

Columnas BioHPLC Agilent

Su recurso esencial para el análisis de biomoléculas





Así somos y así trabajamos

En todo el laboratorio, en todo el mundo, con usted en todo momento.

Agilent CrossLab es una herramienta que integra servicios, consumibles y gestión de los recursos del laboratorio para, entre otras cosas, mejorar la eficiencia, optimizar las operaciones, aumentar el tiempo de actividad de los instrumentos y desarrollar las capacidades de los usuarios.

Agilent CrossLab es compatible con los instrumentos de Agilent y ciertos instrumentos de otras marcas. Ofrece soporte de consultoría para los procesos de definición de flujos de trabajo, análisis de laboratorio, conformidad, gestión de inventarios y gestión de activos, incluidos servicios de reubicación.

Para obtener más información acerca de Agilent CrossLab y conocer ejemplos de casos en los que se han conseguido grandes resultados, visite www.agilent.com/crosslab.

Conozca las historias de laboratorios de CrossLab y descubra cómo podemos ayudarle.



Historias reales de laboratorios

Los ingenieros de soporte de Agilent CrossLab se esfuerzan por mantener informados a los usuarios cada vez que interactúan con ellos, ayudando a estos a mejorar su eficiencia, optimizar sus recursos, aumentar el tiempo de actividad de los instrumentos y desarrollar habilidades. Conozca de qué modo Agilent CrossLab proporciona información esencial y valor añadido a clientes de todo el mundo:

www.agilent.com/chem/crosslabstories

Índice

Directrices para la selección de biocolumnas	1	AdvanceBio RP-mAb	39
¿Qué es una biomolécula?	2	ZORBAX 300 Å StableBond	44
¿Qué es una biocolumna?	3	ZORBAX 300 Å Extend-C18	53
Diagrama de flujo de selección de columnas	5	Poroshell 300	57
Separaciones de biomoléculas	6	AdvanceBio Peptide Mapping	62
Separaciones de proteínas	6	Patrón de control de calidad de péptidos de Agilent	66
Separaciones de glicanos	12	Columnas PLRP-S	67
Separaciones de péptidos	14	AdvanceBio Desalting-RP	73
Columnas AdvanceBio: análisis biofarmacéuticos más rápidos y uniformes	16	AdvanceBio Oligonucleotide	74
Separaciones de oligonucleótidos de ADN y ARN	17	Patrones AdvanceBio Oligonucleotide	76
Análisis de aminoácidos	19	Análisis de proteínas intactas por cromatografía de interacción hidrofóbica	78
Aminoácidos	20	AdvanceBio HIC	78
Directrices para el desarrollo de métodos	21	Análisis de variantes cargadas	80
Métodos de análisis de la estructura primaria	21	Purificación de proteínas y otras moléculas cargadas	80
Métodos de LC/MS de fase reversa	23	Aplicación de la IEX al análisis de variantes cargadas	80
Métodos de análisis de variantes cargadas	24	Columnas Bio MAb para HPLC	83
Métodos de análisis de variantes cargadas con el software Agilent Buffer Advisor	26	Columnas Bio IEX para HPLC	88
Métodos de análisis de agregados y fragmentos	27	Columnas PL-SAX de intercambio aniónico fuerte	95
Análisis de glicanos, péptidos hidrófilos y glicopéptidos	29	Columnas PL-SCX de intercambio catiónico fuerte	99
Métodos de titulación y optimización de cultivos celulares	30	Columnas Bio-Monolith de intercambio iónico para HPLC	102
Métodos con columnas capilares de alta sensibilidad	31	Análisis de agregados y fragmentos	106
Instrumentos Agilent para la identificación de proteínas y la determinación de perfiles de impurezas	32	Determinación precisa de agregados, fragmentos y modificaciones/uniones químicas de biomoléculas	106
Sistema LC bioinerte 1260 Infinity II	32	Aplicación de la SEC a los estudios de agregación	106
Sistema LC 1290 Infinity II con bomba de alta velocidad	33	Aplicación de la SEC a la cuantificación y determinación del peso molecular	107
Sistema LC 1260 Infinity II con bomba binaria	34	¿Cuál es la columna SEC idónea para su aplicación?	109
Sistema LC 1260 Infinity II Prime	35	AdvanceBio SEC	110
Análisis de la estructura primaria	36	Patrones AdvanceBio SEC	116
Determine secuencias de aminoácidos y modificaciones postranslacionales de forma precisa y analice impurezas de péptidos y oligonucleótidos	36	Bio SEC-3	117
		Bio SEC-5	123
		ProSEC 300S	127
		Columnas de filtración con gel ZORBAX GF-250 y GF-450	128

(Continúa)

Índice (continuación)

Caracterización de la glicosilación	130	Columnas MicroBore (1,0 mm de d.i.)	169
Columnas AdvanceBio Glycan Mapping	132	LC-2D	172
Patrones de N-glicanos	136	Regeneración de la columna fuera de línea	172
Análisis de péptidos y glicopéptidos hidrófilos	138	LC-2D integral	174
		Purificación mediante HPLC preparativa	176
Titulación	140	Columnas mRP-C18 de alta recuperación de proteínas	178
Columnas Bio-Monolith para HPLC	140	ZORBAX PrepHT	180
		Columnas PLRP-S preparativas y de proceso	182
Análisis de cultivos celulares y aminoácidos	145	Bio MAb y Bio IEX	188
Soluciones Agilent para el análisis de medios de cultivo agotados	146	Columnas PL-SAX y PL-SCX preparativas y de proceso	190
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)	147	Purificación de péptidos	194
Patrones y kits AdvanceBio Amino Acid Analysis	149	Columnas VariTide RPC para péptidos sintéticos	194
AdvanceBio MS Spent Media	150	VariPure IPE	195
ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis (AAA)	152	Columnas Load & Lock para HPLC preparativa	196
		Bio SEC	198
Eliminación de proteínas	155	Soluciones Agilent	200
Sistema de fraccionamiento de proteínas y reactivos para proteómica de Agilent	155	Servicios Agilent CrossLab	202
Sistema de eliminación por afinidad múltiple	156		
Kits básicos para el sistema de eliminación por afinidad múltiple	159		
Dimensiones especiales	160		
Columnas capilares y nanocolumnas	160		
ZORBAX Bio-SCX serie II	166		

Recomendaciones y herramientas

Para conocer ejemplos de aplicaciones de la gama de biocolumnas, descargue el Compendio de aplicaciones sobre atributos de calidad críticos en: www.agilent.com/chem/cqa-applications

Directrices para la selección de biocolumnas

Los productos bioterapéuticos ofrecen enormes posibilidades para mejorar la salud de las personas. El número de productos terapéuticos aprobados con proteínas y anticuerpos no cesa de aumentar en todo el mundo, ya que esta importante clase de fármacos da respuesta a necesidades médicas irresolubles hasta ahora. Sin embargo, la exploración y el desarrollo de productos biofarmacéuticos resultan complejos. Los científicos se enfrentan a numerosos desafíos y, además de tener que estar al día acerca de los avances de los conocimientos y la tecnología, también deben desenvolverse en un auténtico laberinto de voluble normativa gubernamental. Tomar decisiones correctas y rápidas es fundamental. En cada etapa del proceso, desde la investigación de enfermedades hasta el control y la garantía de calidad y la fabricación, Agilent puede ayudarle a tomar las decisiones correctas para llevar con éxito al mercado los productos terapéuticos. Y no solo porque fabriquemos instrumentos y consumibles fiables que permiten obtener resultados precisos y reproducibles. Comprendemos el flujo de trabajo biofarmacéutico y ponemos a su disposición familias de productos que pueden combinarse perfectamente (y actuar como motores de la investigación, la exploración y el desarrollo) para conseguir que los productos biofarmacéuticos experimentales avancen.

Dado que los productos biofarmacéuticos con proteínas son muy heterogéneos, requieren usar distintos métodos cromatográficos para caracterizar con precisión el ingrediente farmacéutico activo. Entre dichos métodos se incluyen la cromatografía de exclusión por tamaño, para la cuantificación de dímeros y agregados, y la cromatografía de intercambio iónico, para el análisis de variantes cargadas. Como parte del proceso de caracterización completa, habrá que examinar la secuencia primaria de aminoácidos y todas las modificaciones postranslacionales de la secuencia que puedan producirse durante las etapas de purificación o formulación. Para conseguir un análisis completo, reproducible y de alta calidad en los flujos de trabajo clave de caracterización, Agilent pone a su disposición una amplia variedad de columnas y consumibles.

Esta detallada guía le ayudará a encontrar la columna adecuada para su flujo de trabajo de caracterización. También incluye consejos y recomendaciones sobre desarrollo de métodos, selección de disolventes, modificación de fases móviles y optimización, además de numerosos ejemplos de separaciones, todo ello para ayudarle con la selección de columnas y el desarrollo de métodos.

Agilent dispone de soluciones completas para dar respuesta a sus necesidades. Entre ellas se incluyen el sistema LC bioinerte Agilent 1260 Infinity II, con una ruta de paso de muestras exenta de metal, y el sistema LC Agilent 1290 Infinity II, diseñado para ofrecer una velocidad y una resolución máximas y una sensibilidad excepcional para aplicaciones UHPLC. Aunque las biomoléculas tengan una estructura compleja, su análisis ahora resulta más sencillo gracias a las columnas, los consumibles y los sistemas HPLC de Agilent.

¿Qué es una biomolécula?

Las biomoléculas son compuestos producidos por organismos vivos. Presentan un amplio rango de tamaños, desde aminoácidos y pequeños lípidos hasta grandes polinucleótidos, como el ADN o el ARN.

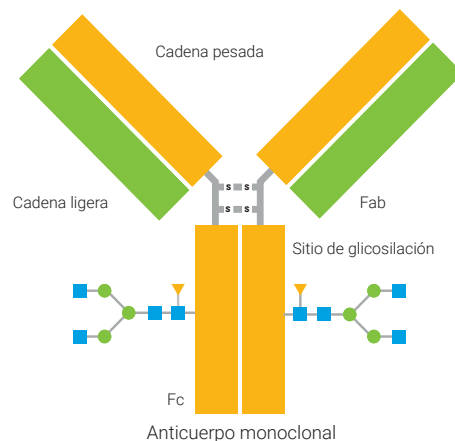
En esta sección, abordaremos la separación de los siguientes compuestos:

Proteínas: separación por tamaño, mediante cromatografía de exclusión por tamaño; por carga, mediante cromatografía de intercambio iónico; y por hidrofobicidad, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica o de fase reversa.

Péptidos: biocolumnas para el análisis y la purificación de todo tipo de péptidos, incluidos péptidos hidrofóbicos, hidrófilos, básicos y ácidos de todo el rango posible de tamaños. Asimismo, también hay columnas para el mapeo de péptidos por HPLC y UHPLC.

Oligonucleótidos de ADN/ARN: opciones de fase reversa e intercambio iónico para oligonucleótidos de ADN y ARN, con tamaños de poro de partícula que abarcan el rango completo de tamaños de estos compuestos, desde pequeños oligonucleótidos sintéticos hasta grandes plásmidos.

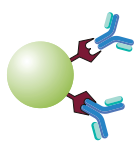
Aminoácidos: las columnas AdvanceBio Amino Acid Analysis son una solución de alta eficiencia para el análisis de 24 aminoácidos. Los tiempos de análisis típicos oscilan entre 14 minutos (para columnas de 75 mm) y 24 minutos (para columnas de 150 mm).



¿Qué es una biocolumna?

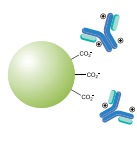
Las columnas de biocromatografía (o biocolumnas) son columnas de cromatografía de líquidos utilizadas para la separación de compuestos biológicos (como péptidos y proteínas, oligonucleótidos y polinucleótidos) y otras biomoléculas y complejos. Las biocolumnas están específicamente diseñadas para el análisis de biomoléculas y presentan tamaños de poro grandes, adaptados a las moléculas de mayor tamaño. Los medios están diseñados para minimizar la unión inespecífica de los analitos y mejorar la recuperación. Los mecanismos de separación se seleccionan para mantener la función biológica y evitar la pérdida de bioactividad durante el análisis, o bien para provocar una desnaturalización deliberada con el fin de caracterizar la estructura primaria.

La oferta de biocolumnas de Agilent proporciona soluciones para todas las principales técnicas de caracterización necesarias para el análisis de biomoléculas. Entre estas se incluyen los siguientes:



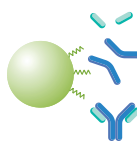
Titulación

Use tecnología exclusiva, como la que incorpora la columna AdvanceBio Bio-Monolith Protein A, para llevar a cabo tareas de titulación y optimización de estirpes celulares.



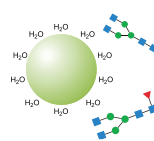
Análisis de variantes cargadas

Las columnas de intercambio iónico de Agilent incluyen fases químicas optimizadas para el análisis de anticuerpos monoclonales; por ejemplo, las columnas Bio MAb y Bio IEX permiten un análisis preciso de isoformas.



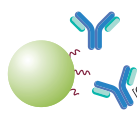
Pureza de proteínas intactas y subunidades mediante técnicas de fase reversa

Use avanzadas tecnologías, como las de las columnas AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX RRHD 300 Å y PLRP-S, para obtener resultados fiables de caracterización de la estructura primaria mediante el análisis de proteínas intactas o fragmentadas.



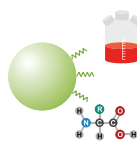
Análisis de glicanos

Las columnas de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) de Agilent posibilitan un análisis preciso y reproducible de glicanos y glicopéptidos.



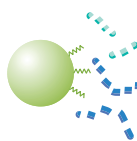
Análisis de proteínas intactas mediante técnicas de interacción hidrofóbica

Las columnas HIC Agilent AdvanceBio permiten resolver distintas variantes de proteínas (PTM), como las generadas por oxidación de anticuerpos monoclonales y las especies anticuerpo-fármaco en conjugados anticuerpo-fármaco (ADC).



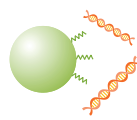
Análisis de aminoácidos y cultivos celulares

Analice componentes críticos de los medios de cultivo celular mediante un flujo de trabajo de LC/UV con columnas AdvanceBio AAA o un flujo de trabajo de LC/MS con columnas MS AdvanceBio Spent Media.



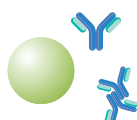
Mapeo de péptidos

Detecte e identifique modificaciones postranslacionales clave en muestras de proteínas digeridas con las columnas AdvanceBio Peptide Mapping.



Análisis de oligonucleótidos

Soluciones robustas y de alta eficiencia para el análisis de ADN/ARN.



Análisis de agregados y fragmentos

Las columnas AdvanceBio SEC permiten medir de forma precisa agregados (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.) y separar los excipientes e impurezas de bajo peso molecular de las proteínas, cuyo peso molecular es mayor.

Directrices para la selección de biocolumnas

Las columnas Agilent AdvanceBio están diseñadas para mejorar la precisión y la velocidad de caracterización de: los anticuerpos monoclonales y otras proteínas intactas; la agregación, mediante SEC; las variantes cargadas, mediante IEX; la masa, la estructura primaria y las modificaciones postranslacionales (PTM) de las proteínas intactas, mediante técnicas de fase reversa; y el análisis de glicanos escindidos, mediante cromatografía de interacción hidrofílica.

Esta guía le ofrece detalles adicionales sobre la gama completa de biocolumnas de Agilent, así como información acerca de las distintas opciones disponibles en la familia AdvanceBio para caracterizar los productos bioterapéuticos de forma precisa.



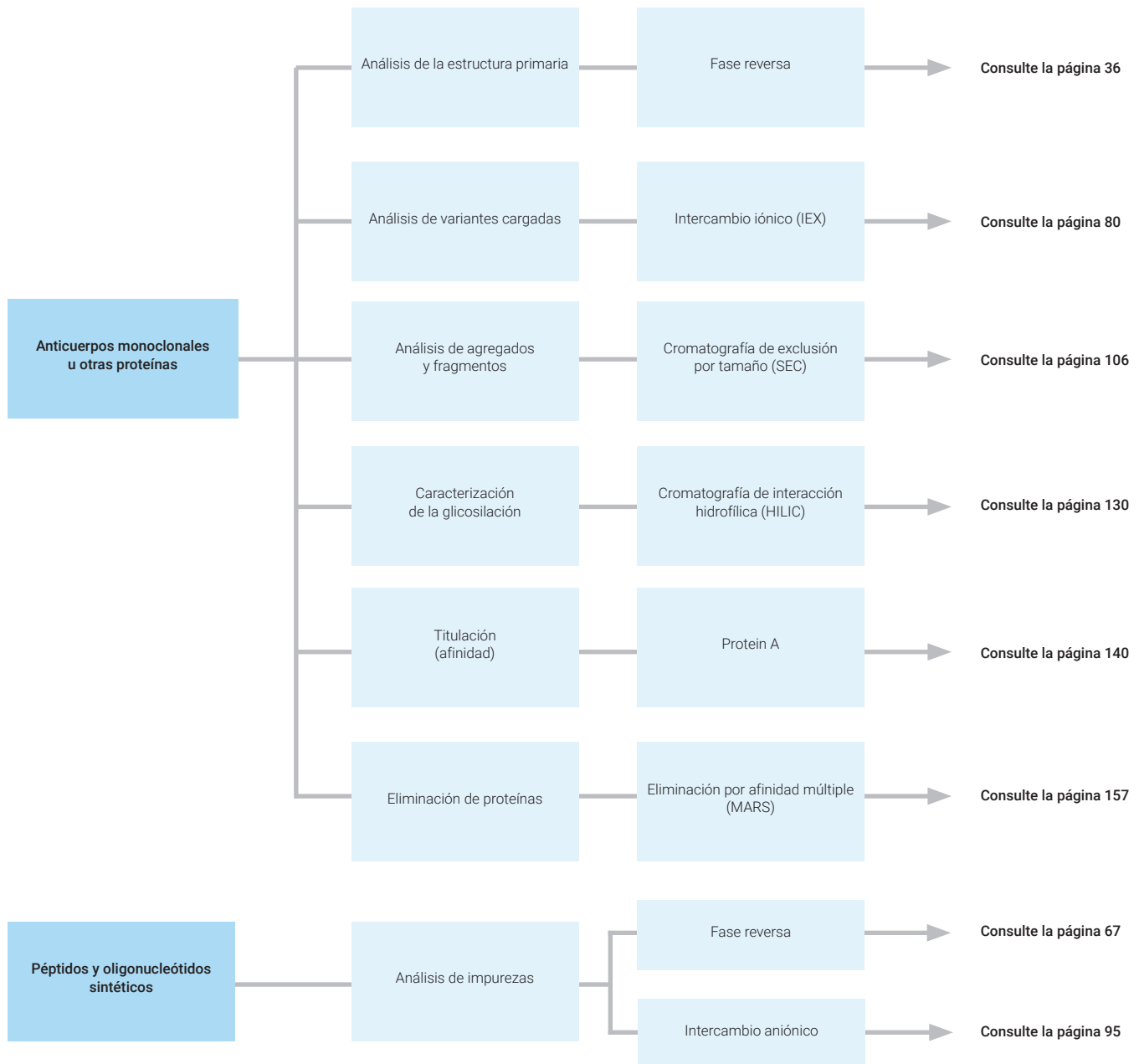
Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre la familia de columnas AdvanceBio y las distintas herramientas disponibles para dar respuesta a sus necesidades de caracterización, visite: www.agilent.com/chem/advancebio

Diagrama de flujo de selección de columnas

En el diagrama de flujo siguiente se indican las páginas en las que puede encontrar las guías de selección en cada uno de los capítulos para ayudarle a seleccionar la columna idónea para su aplicación biomolecular.

Puede consultar diversas directrices que le ayudarán a seleccionar la columna óptima para una determinada separación biomolecular. El punto de partida es el tamaño de la molécula en cuestión, que determinará el tamaño de poro del método HPLC utilizado para la separación. En segundo lugar, hay que considerar la solubilidad de la molécula. Y, en tercer lugar, el mecanismo de separación, el tamaño, la hidrofobicidad y la carga.



Separaciones de biomoléculas

Separaciones de proteínas

Las proteínas son moléculas complejas que requieren el uso de múltiples técnicas para conseguir una caracterización completa. Forman estructuras tridimensionales que les confieren su actividad biológica.

La secuencia de las cadenas de aminoácidos define la estructura primaria de una proteína. Asimismo, los enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos de la estructura primaria conforman la estructura secundaria, normalmente en forma de hélices alfa y láminas plegadas. Una serie de interacciones adicionales (como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas y puentes disulfuro) entre ciertas regiones de la estructura secundaria dan lugar a una estructura terciaria (o conformación tridimensional) de las proteínas. Si una proteína está compuesta por un determinado número de cadenas de aminoácidos, la interacción entre estas cadenas genera una estructura cuaternaria.

A la hora de determinar los métodos para la caracterización de proteínas, tal como puede apreciarse en la Figura 1, es evidente que habrá que recurrir a técnicas que permitan caracterizar la proteína intacta, sin alterar las estructuras terciaria y cuaternaria. También habrá que usar técnicas para analizar la secuencia primaria de aminoácidos en estado completamente desnaturalizado; es decir, sin que exista la estructura tridimensional.

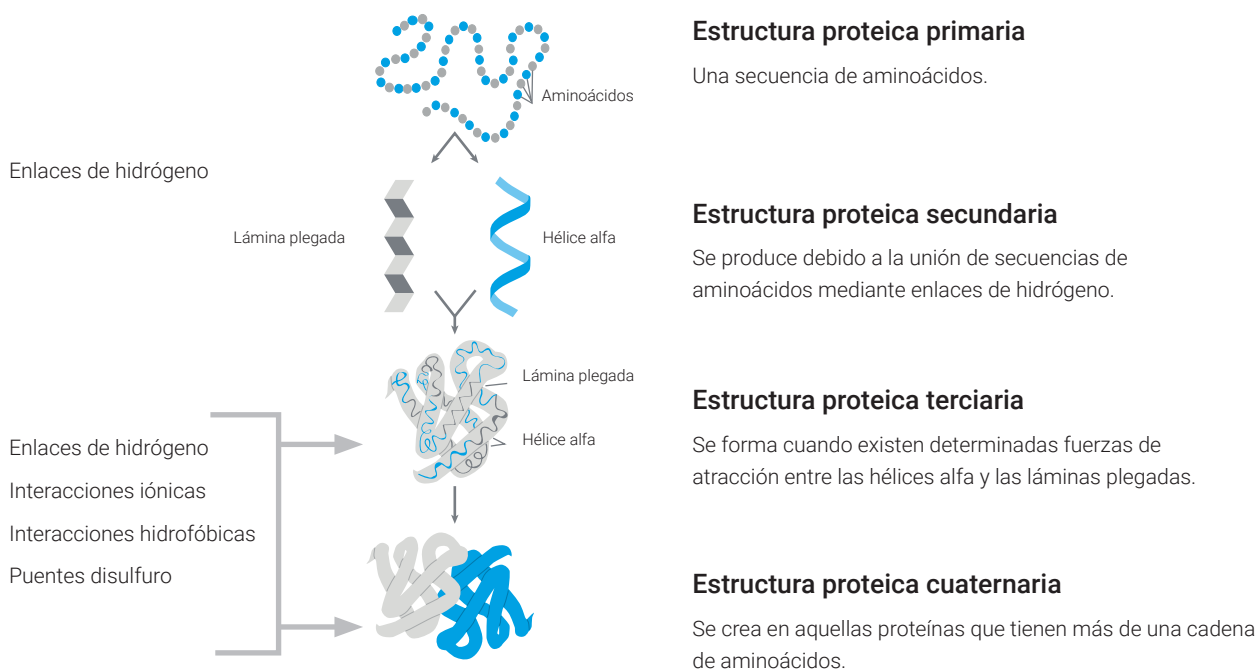


Figura 1. Esquema que muestra los diferentes niveles de la estructura proteica.

El entorno de la proteína puede influir en su estructura, estabilizarla o alterarla. Entre los factores que deben tomarse en consideración se incluyen los siguientes: pH, temperatura, concentraciones salinas, contenido de disolventes acuosos u orgánicos y, para algunas proteínas, presencia de moléculas pequeñas estabilizadoras o iones metálicos. La estructura proteica también puede verse alterada por el uso de agentes reductores con grupos sulfhidrido, que pueden romper los enlaces -S-S-, o caótopos, como la urea o el hidrocloreuro de guanidina. Debido a la complejidad de las proteínas y de las interacciones intramoleculares que determinan su estructura tridimensional, también es previsible que existan asociaciones intermoleculares entre moléculas proteicas y de otro tipo, así como con las superficies con las que entren en contacto. Esto puede dar lugar a complejos de proteínas y fenómenos de agregación (y posible precipitación) y deposición en superficies, incluidas las del sistema y la columna HPLC. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta la manipulación y el ambiente en el que se vaya a conservar la proteína.

Guía de selección de columnas para proteínas

Aplicación	Técnica	Columnas Agilent	Notas
Análisis de la estructura primaria	Separaciones UHPLC/HPLC de fase reversa	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio Peptide Mapping	Las separaciones de fase reversa conllevan (es decir, provocan) la desnaturalización de la proteína para obtener información detallada sobre la secuencia de aminoácidos y las modificaciones de estos (incluidas las modificaciones postranslacionales).
Análisis de variantes cargadas	Separaciones por intercambio iónico	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	La proporción de aminoácidos individuales determina la carga neta de la molécula de proteína. El valor de pH en el que la carga neta es nula recibe el nombre de punto isoelectrónico (pI). Si el pH de la solución es inferior al pI, la proteína tendrá carga positiva (proteína ácida); si es superior al pI, tendrá carga negativa (proteína básica). Para el análisis por intercambio iónico, se recomienda que exista, como mínimo, una unidad de pH de diferencia entre el pH del eluyente y el pI. El análisis de proteínas con columnas de intercambio iónico exige usar fases móviles tamponadas y gradientes salinos o de pH para la elución.
Análisis de agregados y fragmentos	Separaciones de exclusión por tamaño	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	Los agregados en los productos biofarmacéuticos con proteínas son una gran fuente de problemas, ya que pueden provocar una respuesta inmunogénica e influir en la composición de la formulación final.
Caracterización de la glicosilación	Cromatografía de interacción hidrofílica	AdvanceBio Glycan Mapping ZORBAX RRHD 300 HILIC	Cada vez resulta más importante comprender la glicosilación y las estructuras de glicanos de las proteínas y los anticuerpos monoclonales debido a sus efectos sobre la inmunogenicidad y la seguridad de los productos bioterapéuticos. La cromatografía HILIC proporciona información ortogonal respecto a la obtenida con columnas de fase reversa, ya que retiene la fracción hidrófila de la muestra.
Titulación	Separación por afinidad	Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	Para monitorizar las concentraciones de un anticuerpo monoclonal y el rendimiento de los sobrenadantes de los cultivos celulares antes de iniciar costosas preparaciones y usar grandes cantidades de proteína A, debe llevarse a cabo un pequeño procedimiento (de escala analítica) para determinar la concentración de anticuerpo monoclonal y el tiempo óptimo de cosecha de los productos con anticuerpos monoclonales.
Eliminación de proteínas	Purificación por afinidad	MARS Human-14 MARS Human-7 MARS Human-6 MARS Human-6 de alta capacidad MARS Human-2 MARS Human-1 MARS Mouse-3	Permite eliminar proteínas de elevada abundancia de las muestras biológicas. La eliminación de estas proteínas abundantes mejora el posterior análisis por LC/MS y electroforético de la muestra gracias a la ampliación eficaz del rango dinámico.

Separación de alta velocidad y alta resolución de IgG1 (variante de trastuzumab)

Columna: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2,1 x 100 mm, 3,5 µm

Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en agua e isopropanol (98:2)
B: isopropanol, acetonitrilo y fase móvil A (70:20:10)

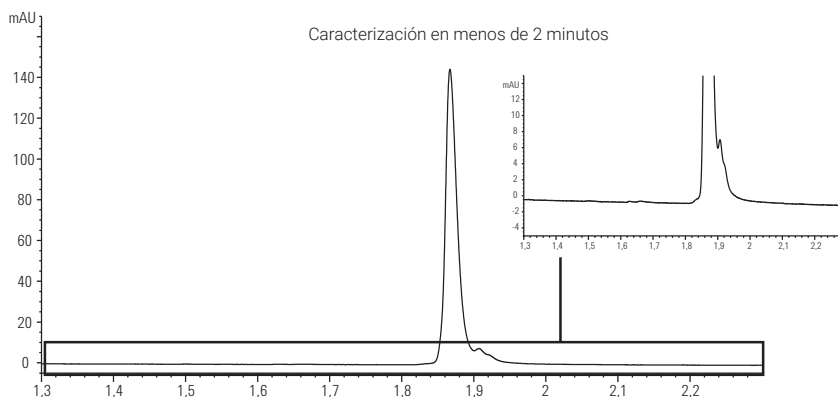
Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: 10-58 % B durante 4 min; lavado durante 1 min con 95 % B; estabilización durante 1 min con 10 % B

Temperatura: 80 °C

Detector: UV (254 nm)

Muestra: Inyección de 5 µl de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado (variante de trastuzumab) e intacto de Creative Biolabs (1 mg/ml)



La columna AdvanceBio RP-mAb C4 consigue un pico estrecho y una resolución con un elevado nivel de detalle en menos de dos minutos.

Mayor resolución para la oxidación

Columna: ZORBAX RRHD 300SB-C18
857750-902
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

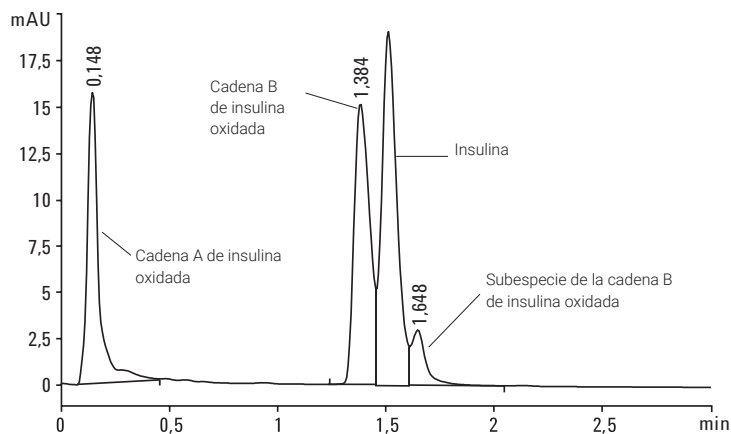
Fase móvil: A: TFA al 0,1 %
B: TFA al 0,01 % + ACN al 80 %

Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: 33-50 % B, 0-4 min

Detector: Sistema LC 1290 Infinity con detector de diodo array (280 nm)

Muestra: Insulina, cadenas A y B de insulina oxidadas (BSA, Sigma-Aldrich Corp., 1 mg/ml)



La columna ZORBAX RRHD 300SB-C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm) resuelve las cadenas de insulina oxidadas en menos de dos minutos.

Separación de monómeros y dímeros de un anticuerpo monoclonal inalterado

Columna: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2511
7,8 x 300 mm, 3 µm

Flujo: 1,0 ml/min

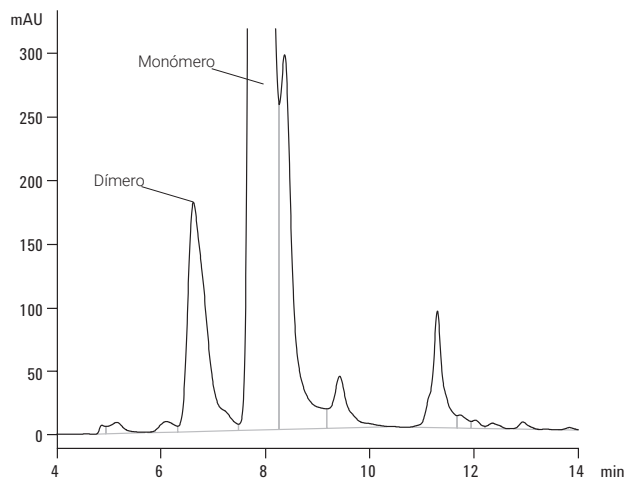
Inyección: 5 µl

Temperatura: Ambiente

Detector: UV (220 nm)

Tampón: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0

Gradiente isocrático: 0-100 % de tampón, 0-30 min



Recomendaciones y herramientas

En Agilent, somos conscientes del trabajo extraordinariamente complejo y laborioso que tiene que llevar a cabo y podemos ayudarle. Puede encontrar más información en el documento *BioPharma Workflow Solutions: How Agilent Helps Resolve Complex Analytical Challenges* (n.º de publicación 5991-5235EN). www.agilent.com/search

Separación de variantes cargadas de IgG1 humana con un gradiente salino

Columna: Bio MAb, PEEK
5190-2407
4,6 x 250 mm, 5 µm

Detector: UV (225 nm)

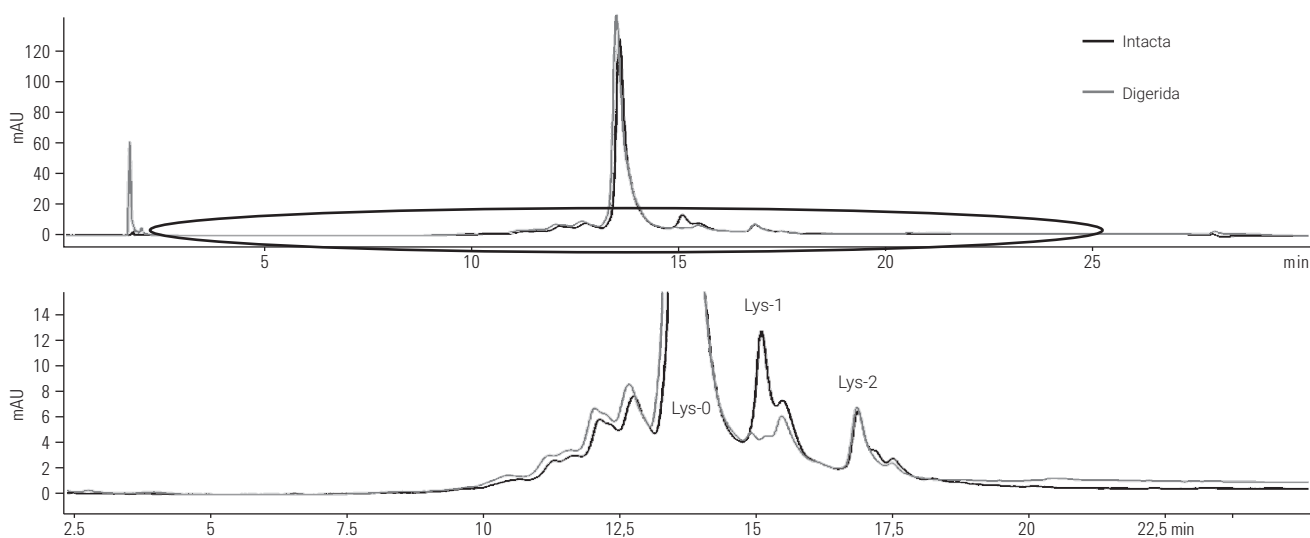
Instrumento: Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity
o sistema LC serie 1100

Fase móvil: A: Na₂HPO₄ 10 mM, pH = 5,5
B: A + NaCl 0,5 M

Muestra: 5 µl de 1 mg/ml de IgG1 intacta o digerida en el extremo carboxílico

Flujo: 0,85 ml/min

Gradiente: 10-35 % B, 0-25 min



Separación de IgG1 intacta y digerida en el extremo carboxílico con una columna Agilent Bio MAb de 5 µm.

Titulación de IgG1 a partir de sobrenadante de cultivo de células de ovario de hámster chino

Columna: Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Fase móvil: A: fosfato 50 mM, pH = 7,4
B: ácido cítrico 100 mM, pH = 2,8

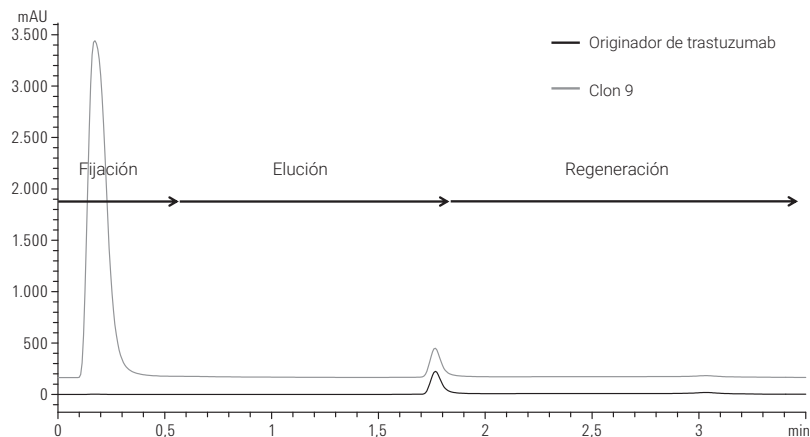
Flujo: 1 ml/min

Gradiente: **Tiempo (min) % B**
0-0,5 0 (fijación)
0,6-1,7 100 (elución)
1,8-3,5 0 (regeneración)

Volumen de inyección: 50 µl

Detector: UV (280 nm)

Colección de fracciones: Basada en el tiempo



Cromatograma obtenido con una columna AdvanceBio Bio-Monolith Protein A de un clon de células de ovario de hámster chino (clon 9) productor de trastuzumab y un originador de trastuzumab diluido en tampón (fosfato sódico 50 mM, pH = 7,4) hasta una concentración de 0,2 mg/ml. El sobrenadante se diluyó en tampón fosfato en la proporción 1:1.

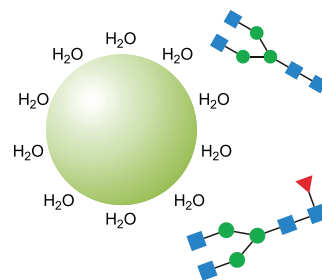
Separaciones de glicanos

Mapas de distribución de glicanos

El análisis de glicanos es necesario para la caracterización de productos bioterapéuticos, ya que el patrón de glicosilación puede afectar a la seguridad y la eficacia del producto final.

La glicoproteína intacta se trata con una enzima, como PNGasa F, para escindir los glicanos de la proteína. Seguidamente, los glicanos se marcan con un tinte fluorescente, ya que no son visibles de forma natural en presencia de luz UV o fluorescencia. Tras el marcaje, se lleva a cabo una etapa de purificación para eliminar el exceso de reactivo y proteína desglicosilada de la mezcla de muestra. Después, la muestra purificada y con glicanos libres se suele analizar por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), usando técnicas de fluorescencia o espectrometría de masas para la detección.

El mapa de distribución cromatográfico es característico de las muestras de glicoproteínas de partida, y su complejidad puede variar enormemente. Las columnas AdvanceBio Glycan Mapping son idóneas para conseguir una separación de alta resolución en poco tiempo.



Recomendaciones y herramientas

Los consumibles bioinertes de Agilent permiten disponer de una ruta de paso de muestras exenta de metal, lo que minimiza las interacciones con las biomoléculas.

Visite: www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

Análisis ultrarrápido de glicanos en menos de diez minutos con partículas de 1,8 µm

Columna: Agilent AdvanceBio Glycan Mapping
859700-913
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

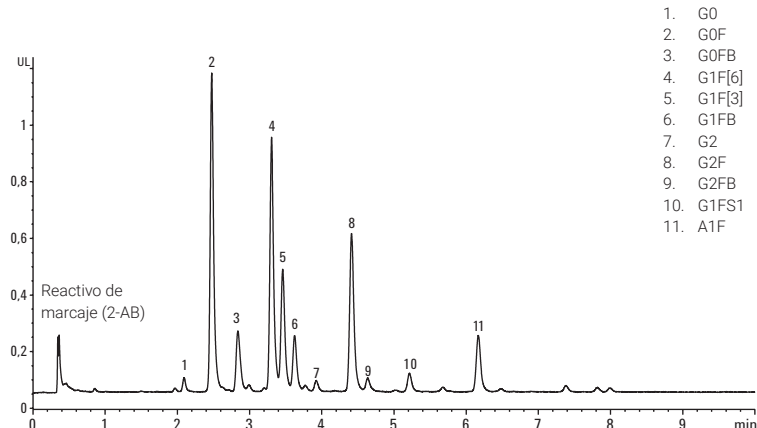
Fase móvil: A: formiato de NH₄ 100 mM, pH = 4,5
B: ACN

Volumen de inyección: 2 µl en ACN y formiato de NH₄ 100 mM (70:30)

Detección por fluorescencia: Excitación = 260 nm
Emisión = 430 nm

Instrumento: Sistema LC Agilent 1290 Infinity con detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity

Muestra: Biblioteca de N-glicanos IgG humanos marcados con 2-AB (ref. 5190-6996)



1. G0
2. G0F
3. G0FB
4. G1F[6]
5. G1F[3]
6. G1FB
7. G2
8. G2F
9. G2FB
10. G1FS1
11. A1F

Mapeo de glicanos rápido y de alta resolución (columna de 1,8 µm).

Este patrón se utiliza para probar todas las columnas AdvanceBio Glycan Mapping.

Tiempo	% A	% B	Flujo (ml/min)
0	25	75	1,0
12	40	60	1,0
12,15	60	40	0,5
12,5	60	40	0,5
12,9	25	75	0,5
13,05	25	75	1,0
15	25	75	1,0

Pico	Glicano	Estructura	Pico	Glicano	Estructura
1	G0		9	G2F	
2	G0F		10	G2FB	
3	G0FB		11	G1FS1	
4	G1F		12	A1	
5	G1F'		13	A1F	
6	G1FB		14	A1FB	
7	G1FB Man6		15	A2	
8	G2		16	A2F	
			17	A2FB	

- Fucosa
- Galactosa
- Manosa
- N-acetilglucosamina
- Ácido N-acetilneuramínico

Separaciones de péptidos

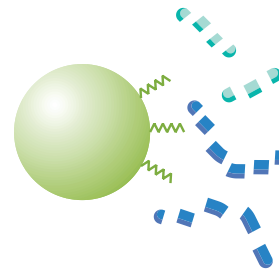
Mapeo de péptidos

El mapeo de péptidos resulta necesario para la caracterización de proteínas. Se utiliza para confirmar la identidad de una proteína e identificar y cuantificar las modificaciones postranslacionales.

En primer lugar, la proteína purificada se digiere con una enzima (por ejemplo, tripsina), lo que da lugar a diversos fragmentos de péptidos. La especificidad de la división enzimática genera una "huella dactilar" de péptidos que es específica de la proteína en cuestión. La identificación de los fragmentos de péptidos confirma la identidad de la proteína; asimismo, los cambios en el perfil de la digestión de péptidos pueden utilizarse para identificar modificaciones postranslacionales en la proteína que puedan haberse producido durante los procesos de fabricación o purificación.

La UHPLC/HPLC de fase reversa con detección por MS o UV es la técnica de referencia para el análisis de digestiones de péptidos. La LC/MS se utiliza para identificar los fragmentos de péptidos y determinar la cobertura de la secuencia, mientras que la LC/UV se usa con mayor frecuencia para comparar mapas de péptidos en operaciones de monitorización o control de calidad.

Las digestiones de péptidos son mezclas complejas; por lo tanto, para conseguir una cobertura completa (es decir, una resolución adecuada de los péptidos individuales), se requiere una columna que ofrezca alta eficiencia y resolución. Las columnas AdvanceBio Peptide Mapping están diseñadas para proporcionar mapas de péptidos de alta resolución para la identificación de proteínas y la determinación de modificaciones postranslacionales. Estas columnas permiten resolver e identificar rápidamente sustituciones o modificaciones de aminoácidos en la secuencia primaria de una proteína.



Prueba de garantía de calidad con una mezcla de péptidos de Agilent

Columna: AdvanceBio Peptide Mapping
653750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm

Flujo: 0,5 ml/min

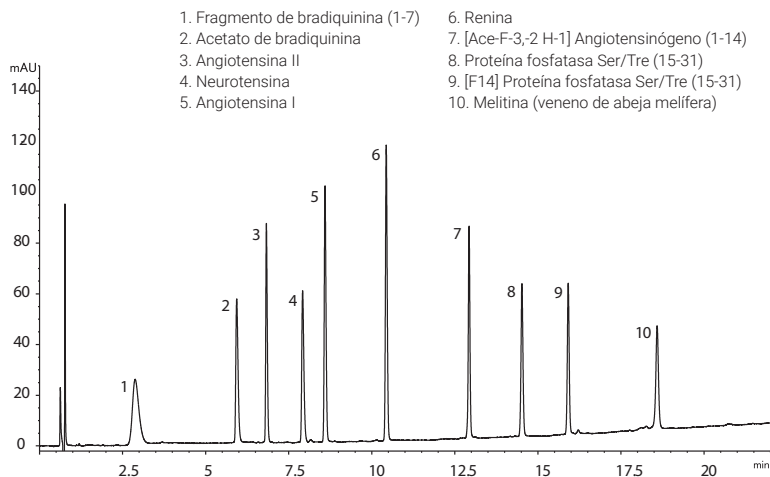
Inyección: 3 µl

Gradiente: A: agua (TFA al 0,1 %), B: ACN (TFA al 0,1 %), 0-25 min, 15-65 % B; 25-26 min, 65-95 % B

Temperatura: 55 °C

Detector: 220 nm

Muestra: Mezcla de patrones de mapeo de péptidos, 0,5-1,0 µg/µl de cada péptido (ref. 5190-0583)



Mezcla de test utilizada para todos los lotes de medio de mapeo de péptidos AdvanceBio. La mezcla contiene 10 péptidos hidrófilos, hidrofóbicos y básicos, con un peso molecular que va desde los 757 Da a los 2.845 Da. Todas las columnas también se han probado con una sonda de moléculas pequeñas para garantizar su eficiencia.

Recomendaciones y herramientas

Las placas de pocillos y las almohadillas de sellado Agilent InfinityLab le permiten disponer de contenedores de muestras idóneos para sus aplicaciones LC/MS de alta productividad.

Visite: www.agilent.com/chem/well-plates

Columnas AdvanceBio: análisis biofarmacéuticos más rápidos y uniformes

Las columnas AdvanceBio Peptide Mapping forman parte de la familia de biocolumnas de última generación de Agilent, que no cesa de crecer. Están diseñadas para ofrecer un rendimiento excepcional y uniforme en la separación y la caracterización de péptidos y proteínas, anticuerpos, conjugados, nuevas entidades biológicas y productos biofarmacéuticos. Los fundamentos científicos en los que se basan las columnas AdvanceBio contribuyen a mejorar la precisión y la productividad, lo que le permitirá acortar los tiempos de análisis e incrementar la eficiencia en su laboratorio.

Para obtener información sobre cómo hacer pedidos de las soluciones de mapeo de péptidos de Agilent, vaya a la **página 62**.



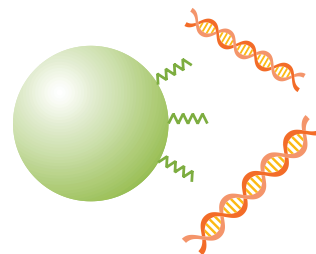
Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre las biocolumnas de Agilent, visite: www.agilent.com/chem/bioHPLC

Separaciones de oligonucleótidos de ADN y ARN

Existe un interés renovado por los oligonucleótidos, ya que cada vez se usan en más aplicaciones (incluidos posibles productos terapéuticos). El flujo de trabajo de síntesis es similar al empleado para el proceso de síntesis de péptidos, que está más consolidado; es decir, se usa una resina activada de síntesis en fase sólida a la que se le añaden de forma secuencial los nucleótidos específicos para obtener la secuencia deseada.

Los nucleótidos utilizados como “bloques de construcción” se protegen en el extremo 5' hidroxílico con un grupo dimetoxitritilo (DMT), de tal forma que el oligonucleótido diana escindido aún tendrá unido este grupo protegido. Dado que el grupo DMT es hidrofóbico, es un recurso útil que puede utilizarse para la primera etapa. Para incrementar la estabilidad del oligonucleótido (en particular, la resistencia a la degradación enzimática), este puede modificarse químicamente; por ejemplo, mediante la sustitución del oxígeno por azufre para producir fosforotioatos. Cuando se emplea la síntesis química para producir biomoléculas, la eficiencia de acoplamiento de cada ciclo adicional nunca alcanza el 100 %. La muestra, tras la escisión del soporte de síntesis en fase sólida, incluirá secuencias de eliminación, oligonucleótidos en los que falten uno o varios residuos y una determinada cantidad de oligonucleótidos más grandes, formados por acoplamiento doble o ramificación. La mezcla de muestra es compleja y exige usar técnicas de alta eficiencia para analizarla.



Hay tres técnicas UHPLC/HPLC que suelen utilizarse de forma rutinaria para la separación de oligonucleótidos:

Oligonucleótidos con tritilo: este procedimiento es relativamente sencillo de llevar a cabo y permite separar el oligonucleótido diana en toda su longitud (con el grupo DMT unido) de las secuencias fallidas desprotegidas. La información analítica obtenida es limitada, y se suele considerar como un método de purificación.

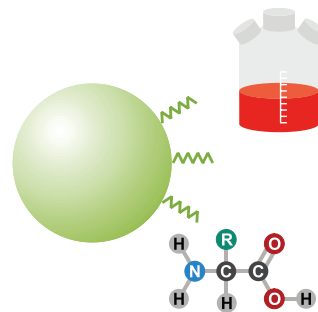
Separaciones por intercambio iónico de oligonucleótidos desprotegidos sin tritilo: este método aprovecha la carga negativa de la cadena principal del oligonucleótido para facilitar la separación. La resolución es buena para los oligonucleótidos cortos, pero disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena. Se utilizan eluyentes acuosos; sin embargo, los oligonucleótidos tienen cargas grandes y se requieren elevadas concentraciones salinas para lograr la elución de la columna.

Separación en fase reversa mediante emparejamiento iónico de oligonucleótidos desprotegidos sin tritilo: en esta técnica, adecuada para LC/MS, se utilizan disolventes orgánicos y agentes volátiles de emparejamiento iónico. Ofrece unos resultados óptimos con partículas de alta eficiencia. Para ello, es necesario que existan unas condiciones tales que desnaturalicen por completo los oligonucleótidos y eviten la unión con secuencias complementarias. Por este motivo, la separación ofrece un rendimiento óptimo a altas temperaturas.

Selección de columnas para oligonucleótidos de ADN y ARN			
Aplicación	Técnica	Columnas Agilent	Notas
Oligonucleótidos con/sin tritilo	Con tritilo	PLRP-S de 50 µm	La separación se produce por diferencia de hidrofobicidad. Esto resulta idóneo para la separación de oligonucleótidos con tritilo y sin tritilo; también se utiliza para la separación en fase reversa mediante emparejamiento iónico de oligonucleótidos desprotegidos.
Oligonucleótidos desprotegidos	Separación en fase reversa mediante emparejamiento iónico de oligonucleótidos desprotegidos sin tritilo	PLRP-S de 3-50 µm AdvanceBio Oligonucleotide	
Análisis de agregados y fragmentos	Separaciones por intercambio iónico de oligonucleótidos desprotegidos sin tritilo	PL-SAX 1.000 Å	Separa oligonucleótidos desprotegidos en condiciones de pH alto desnaturalizante. La funcionalidad de la amina cuaternaria en las partículas poliméricas permite las separaciones por intercambio iónico a pH alto, mejorando la cromatografía en las secuencias autocomplementarias.

Análisis de aminoácidos

La columna de alta eficiencia AdvanceBio AAA separa aminoácidos conforme a un protocolo actualizado y mejorado. Durante la producción de proteínas, el medio de cultivo celular se monitoriza para garantizar que se mantengan un equilibrio de nutrientes y unos niveles adecuados de concentración para la expresión del producto proteico. Los aminoácidos son componentes críticos de la materia prima, por lo que deben monitorizarse y ajustarse durante el proceso de producción. La cromatografía de fase reversa es la principal técnica utilizada para el análisis de aminoácidos. El análisis completo entre inyecciones puede llevarse a cabo en 14 minutos (con un tiempo de análisis de 9 minutos), en columnas cortas de 75 mm, o 24 minutos (con un tiempo de análisis de 18 minutos), en columnas de 150 mm. La sensibilidad (entre 5 y 50 pmol con detectores de diodo array o de fluorescencia) y la fiabilidad necesarias se consiguen mediante el uso de fases químicas de derivatización OPA y FMOC en un único procedimiento completamente automatizado, utilizando cualquier sistema LC de Agilent.



Análisis con una columna AdvanceBio Amino Acid Analysis

Columna: AdvanceBio Amino Acid Analysis
655950-802
4,6 x 100 mm, 2,7 µm

Fase móvil: A: Na₂HPO₄ 10 mM y Na₂B₄O₇ 10 mM, pH = 8,2
B: acetonitrilo, metanol y agua (45:45:10, v/v/v)

Flujo: 1,5 ml/min

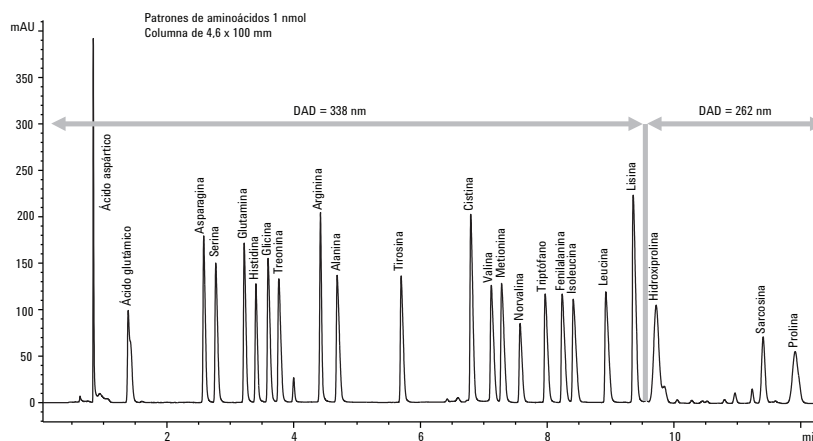
Inyección: 3 µl

Gradiente:

Tiempo	% B
0	2
0,35	2
13,4	57
13,5	100
15,7	100
15,8	2
18	Parada

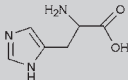
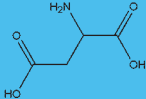
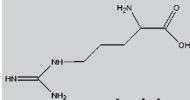
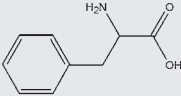
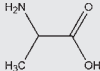
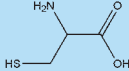
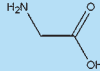
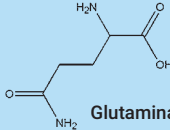
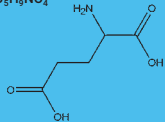
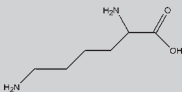
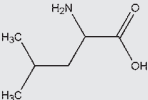
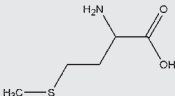
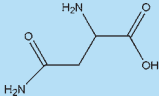
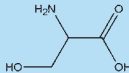
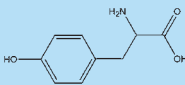
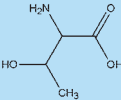
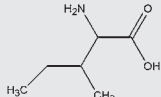
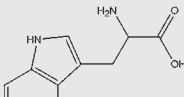
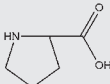
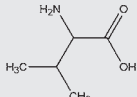
Temperatura de la columna: 40 °C

Detector: UV (338 y 262 nm)



Separación de patrones de aminoácidos con una concentración de 1 nmol con la columna AdvanceBio Amino Acid Analysis.

Aminoácidos

H 155,16 137,14 $C_6H_7N_3O_2$  Histidina	D 133,10 115,09 $C_4H_7NO_4$  Ácido aspártico					
R 174,20 156,19 $C_6H_{14}N_4O_2$  Arginina	F 165,19 147,18 $C_9H_{11}NO_2$  Fenilalanina	A 89,09 71,08 $C_3H_7NO_2$  Alanina	C 121,16 103,14 $C_3H_7NO_2S$  Cisteína	G 75,07 57,05 $C_2H_7NO_2$  Glicina	Q 146,15 128,13 $C_5H_{10}N_2O_3$  Glutamina	E 147,13 129,11 $C_5H_9NO_4$  Ácido glutámico
K 146,19 128,17 $C_6H_{14}N_2O_2$  Lisina	L 131,17 113,16 $C_6H_{13}NO_2$  Leucina	M 149,21 131,20 $C_5H_{11}NO_2S$  Metionina	N 132,12 114,10 $C_4H_8N_2O_3$  Asparagina	S 105,09 87,08 $C_3H_7NO_3$  Serina	Y 181,19 163,17 $C_9H_9NO_3$  Tirosina	T 119,12 101,10 $C_4H_9NO_3$  Treonina
I 131,18 113,16 $C_6H_{13}NO_2$  Ile	W 204,23 186,21 $C_{11}H_{12}N_2O_2$  Trp	P 115,13 97,12 $C_5H_9NO_2$  Pro	V 117,15 99,13 $C_5H_{11}NO_2$  Val			

- Básico
- No polar (hidrofóbico)
- Polar (sin carga)
- Ácido

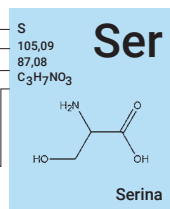
Código de una letra

del aminoácido

Peso molecular

Peso mol. sin H_2O

Fórmula molecular



Código de tres letras del aminoácido

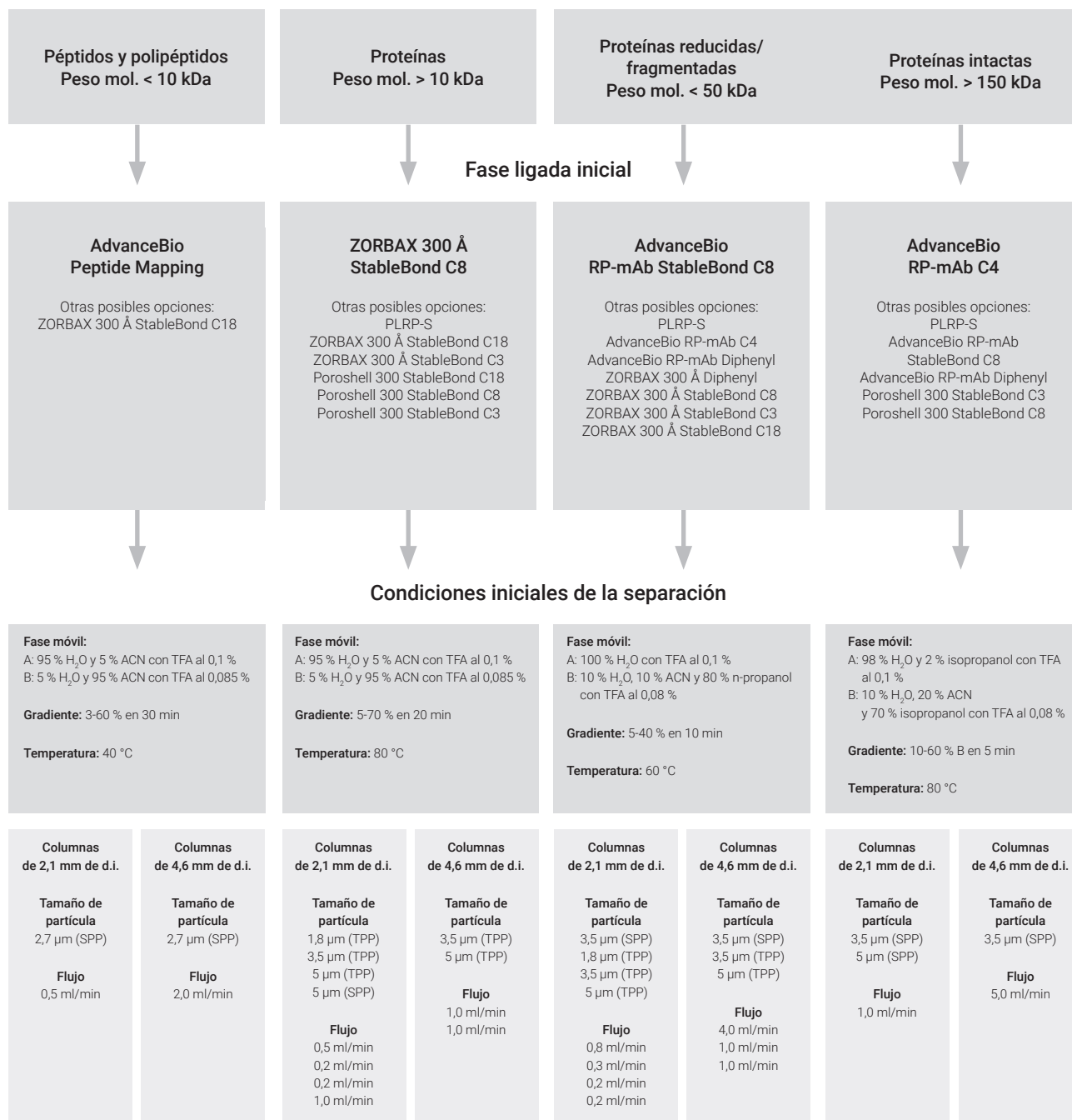
Estructura química

Nombre químico

Directrices para el desarrollo de métodos

Métodos de análisis de la estructura primaria

En esta sección sobre la estrategia de selección de columnas para el análisis de la estructura primaria se proporciona información esencial para el desarrollo de métodos para anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos.



SPP = partículas superficialmente porosas; TPP = partículas completamente porosas

Inicio con pH bajo y un gradiente acuoso/orgánico sencillo

Por lo general, se utiliza un gradiente de mezcla de agua y acetonitrilo con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % para eluir todos los compuestos de interés. Para realizar un análisis con un gradiente típico de alta resolución en una columna con un tamaño de poro de 300 Å se requieren entre 30 y 50 min. Una columna AdvanceBio RP-mAb permite acortar el tiempo de análisis y usar un flujo mayor, manteniendo una resolución excepcional. Para mejorar la resolución, se puede incrementar el tiempo de gradiente, reducir la longitud de la columna o aumentar el flujo. Para los métodos de LC/MS, el uso de TFA puede reducir la sensibilidad del detector; por ello, a menudo se sustituye por formiato de amonio/ácido fórmico.

Optimización de la solubilidad de la muestra

Para optimizar la forma de pico y la recuperación, sea cual sea el valor de pH, es importante solubilizar por completo la muestra. Los disolventes muy ácidos o neutros se pueden usar con las columnas AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX 300 Å StableBond, Poroshell 300 StableBond y AdvanceBio Peptide Mapping, mientras que los disolventes neutros y las bases diluidas se pueden utilizar con las columnas ZORBAX 300Extend-C18 y Poroshell 300Extend-C18.

Opciones de disolventes para solubilizar proteínas y péptidos

Agua/tampón fosfato

Ácido diluido (TFA, ácido acético o HCl)

Solución con pH neutro, hidrócloruro de guanidina 6-8 M o isotiocianato

Ácido acético al 5 %/urea 6 M

Ácido diluido + disolventes acuosos/orgánicos (acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, etc.)

Base diluida (hidróxido de amonio)

DMSO o 0,1-1 % en DMSO

Formamida

Más débil

Más fuerte

Aumento de la temperatura

La temperatura influye en las separaciones de proteínas y péptidos, de tal modo que un incremento de la temperatura de la columna puede mejorar drásticamente la resolución y la recuperación de proteínas, péptidos hidrofóbicos y agregaciones de péptidos.

AdvanceBio RP-mAb: hasta 90 °C
ZORBAX 300 StableBond/Poroshell 300 StableBond: hasta 80 °C
AdvanceBio Peptide Mapping: hasta 60 °C

Optimización del pH de la fase móvil

Si un pH bajo no funciona, pruebe a usar valores medios y altos de pH

Si un método optimizado con un valor bajo de pH no consigue una buena separación, puede intentar usar una fase móvil con un valor de pH medio o alto. Con un pH alto, la selectividad suele variar mucho, ya que los aminoácidos ácidos adquieren una carga negativa y algunos aminoácidos básicos pueden perder su carga. La columna ZORBAX 300Extend-C18 es una excelente opción para las separaciones con valores de pH medios o altos.

Columna: ZORBAX 300Extend-C18
4,6 x 150 mm, 5 µm
Ref. 773995-902

Fase móvil: A: NH₄OH 20 mM en H₂O
B: NH₄OH 20 mM en ACN al 80 %

Gradiente: 5-60% B en 30 min

Temperatura: 25-30 °C (< 60 °C)

Flujo: 1 ml/min

Métodos de LC/MS de fase reversa

El análisis por LC/MS de proteínas y péptidos se utiliza para obtener información para la caracterización de proteínas, para identificar de forma precisa las modificaciones postranslacionales de las proteínas y para determinar el peso molecular de los péptidos sintéticos y naturales. La LC/MS también se emplea para identificar proteínas en separaciones 2D para aplicaciones de proteómica. Por consiguiente, la LC/MS de proteínas y péptidos es una técnica crítica de separación que requiere usar determinadas columnas y fases móviles especiales recomendadas. Para la LC/MS a menudo se usan columnas de tamaños pequeños; asimismo, no se suele utilizar TFA en la fase móvil debido a la menor sensibilidad del instrumento MS con este aditivo de la fase móvil.

Aplicaciones LC/MS analíticas

Las columnas de 2,1 mm de d.i. ofrecen una buena sensibilidad si no existen limitaciones que afecten al tamaño de la muestra. En el caso de las columnas Poroshell, pueden utilizarse columnas más pequeñas, de 1 mm de d.i.



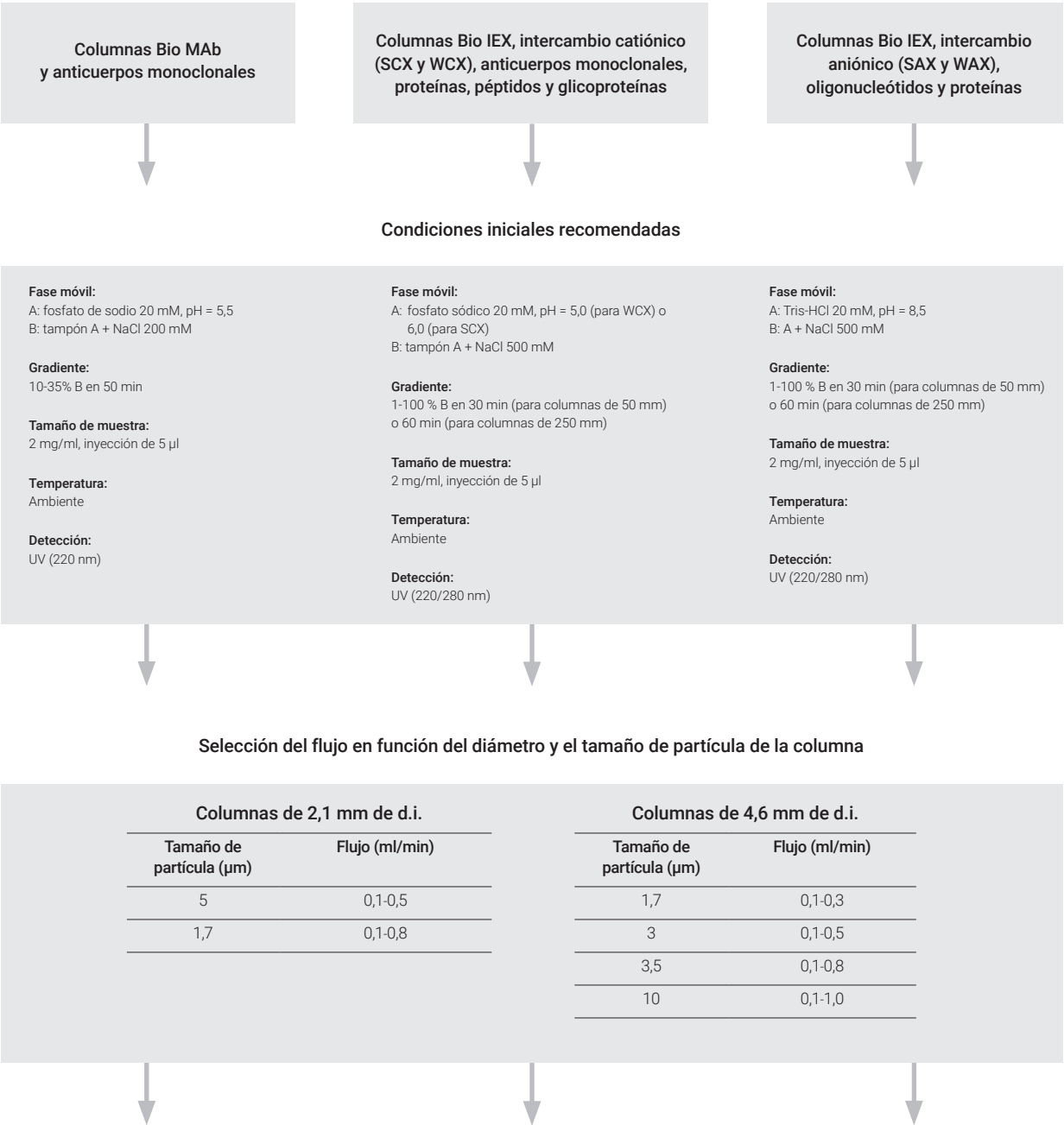
Aplicaciones de proteómica/alta sensibilidad

Para las aplicaciones de proteínas y péptidos de alta sensibilidad se emplean columnas capilares. Las columnas de 0,5 mm de d.i. se utilizan para separaciones de proteínas y digestiones de proteínas, mientras que las columnas de 0,3 mm de d.i. se suelen utilizar sobre todo para digestiones de proteínas. Pueden analizarse con un valor de pH alto y una fase móvil de hidróxido de amonio. Las nanocolumnas (de 0,1 y 0,075 mm de d.i.) a menudo se usan en sistemas LC/MS 2D para aplicaciones de proteómica; la opción inicial es emplear una fase ligada C18.



Métodos de análisis de variantes cargadas

En esta sección sobre la estrategia de selección de columnas para el análisis de variantes cargadas se proporciona información esencial para el desarrollo de métodos para anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos.



Optimización de las condiciones

Algunas separaciones pueden requerir usar un tampón, una fuerza iónica, un pH o una temperatura específicos.

Fuerza iónica

Se necesita una cierta fuerza iónica para que las columnas puedan funcionar correctamente. Por lo general, se requiere una concentración salina mínima de entre 10 y 20 mM.

No obstante, si la fuerza iónica es superior a 20 mM, eso puede impedir la adsorción de las biomoléculas en la columna. Las sales empleadas de forma común son cloruros y acetatos de sodio y potasio. Para la elución, la concentración salina típica es de entre 400 y 500 mM.

Nota: Nunca debe utilizarse agua sola para lavar las columnas, ya que eso provocará un aumento significativo de la retropresión.

Selección de los tampones y el pH

Los tampones desempeñan un papel crucial en la optimización de las separaciones. Los tampones fosfato se suelen usar habitualmente para anticuerpos y muchas otras biomoléculas. También se recomiendan los siguientes tampones: MES, tris y ACES. Use tampones con un pH entre 5,0 y 6,5. Por lo general, el pH se puede ajustar en tramos de $\pm 0,2$ unidades. Para algunas proteínas específicas, puede ser necesario usar tampones con un pH más alto ($> 6,5$). Para ajustar el pH se pueden emplear ácido fosfórico, ácido acético, HCl y NaOH.

También pueden utilizarse gradientes de pH para la elución.

Aditivos

Disolventes orgánicos

Pueden utilizarse acetonitrilo, etanol, metanol y otros disolventes similares con una concentración de hasta el 50 %.

Detergentes

Pueden emplearse detergentes no iónicos, aniónicos y zwitteriónicos. No se recomienda usar detergentes catiónicos.

Temperatura

Las columnas Agilent Bio MAB e IEX son estables hasta 80 °C. No obstante, hay muchas proteínas y biomoléculas que son termolábiles. Asegúrese de determinar la estabilidad térmica de la muestra antes de usar altas temperaturas de forma rutinaria para la separación.

Selección de los tampones y el pH

Para las columnas de intercambio aniónico, se recomienda usar tampones acetato y fosfato con un pH entre 8,0 y 9,0. Por lo general, el pH se puede ajustar en tramos de $\pm 0,2$ unidades. Para algunas proteínas específicas, puede ser necesario usar tampones con un pH más bajo. Para ajustar el pH se pueden emplear ácido fosfórico, ácido acético, HCl y NaOH.

También pueden utilizarse gradientes de pH para la elución.

Aditivos

Disolventes orgánicos

Pueden utilizarse acetonitrilo, etanol, metanol y otros disolventes similares con una concentración de hasta el 50 %.

Detergentes

Pueden emplearse detergentes no iónicos, catiónicos y zwitteriónicos. No se recomienda usar detergentes aniónicos.

Métodos de análisis de variantes cargadas con el software Agilent Buffer Advisor

Agilent Buffer Advisor es una herramienta de software que posibilita que los métodos de intercambio iónico sean más reproducibles y precisos. Por ejemplo, el software puede generar métodos usando una mezcla cuaternaria para un gradiente salino con pH constante o para un gradiente de pH con un gradiente salino para la purificación. Estos métodos pueden importarse directamente en el software de adquisición para LC de Agilent.

Condiciones iniciales recomendadas

Gradiente salino (consulte la nota de aplicación 5991-0656ES)		Gradiente de pH (consulte la nota de aplicación 5990-9629EN)	
Columnas:	Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 10 µm Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 5 µm	Columna:	Bio MAb, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Fase móvil:	A: agua B: NaCl 1,6 M C: NaH ₂ PO ₄ 40,0 mM D: Na ₂ HPO ₄ 40,0 mM La combinación de C y D en proporciones predeterminadas permite obtener disoluciones tampón de 20 mM dentro del rango de pH deseado.	Fase móvil:	A: agua B: NaCl 1,6 M C: NaH ₂ PO ₄ 40,0 mM D: Na ₂ HPO ₄ 40,0 mM La combinación de C y D en proporciones predeterminadas permite obtener disoluciones tampón dentro del rango de pH deseado y con la concentración necesaria.
Gradiente:	De 0 a 50 % B, de 0 a 20 min (pH constante; por ejemplo, pH = 6,0) 50 % B, de 20 a 25 min 0 % B, de 25 a 35 min	Gradiente:	pH de 6,0 a 8,0, de 0 a 20 min NaCl de 0 a 800 mM, de 20 a 25 min NaCl 800 mM, de 25 a 30 min
Temperatura:	Ambiente	Temperatura:	Ambiente
Volumen de inyección:	10 µl	Volumen de inyección:	10 µl
Detección:	UV (220 nm)	Detección:	UV (220 nm)
Instrumento:	Sistema LC bioinerte 1260 Infinity	Instrumento:	Sistema LC bioinerte 1260 Infinity II
Muestra:	Ovoalbúmina, ribonucleasa A, citocromo c y lisozima	Muestra:	Anticuerpo monoclonal IgG
Conc. muestra:	2 mg/ml (en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH = 6,0)	Conc. muestra:	2 mg/ml (en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH = 6,0)

Nota: Los planteamientos anteriores pueden aplicarse de forma similar a las columnas WAX y SCX de Agilent con las modificaciones oportunas. Para acceder al Compendio de aplicaciones sobre atributos de calidad críticos, visite: www.agilent.com/chem/cqa-applications

Selección del flujo en función del diámetro y el tamaño de partícula de la columna

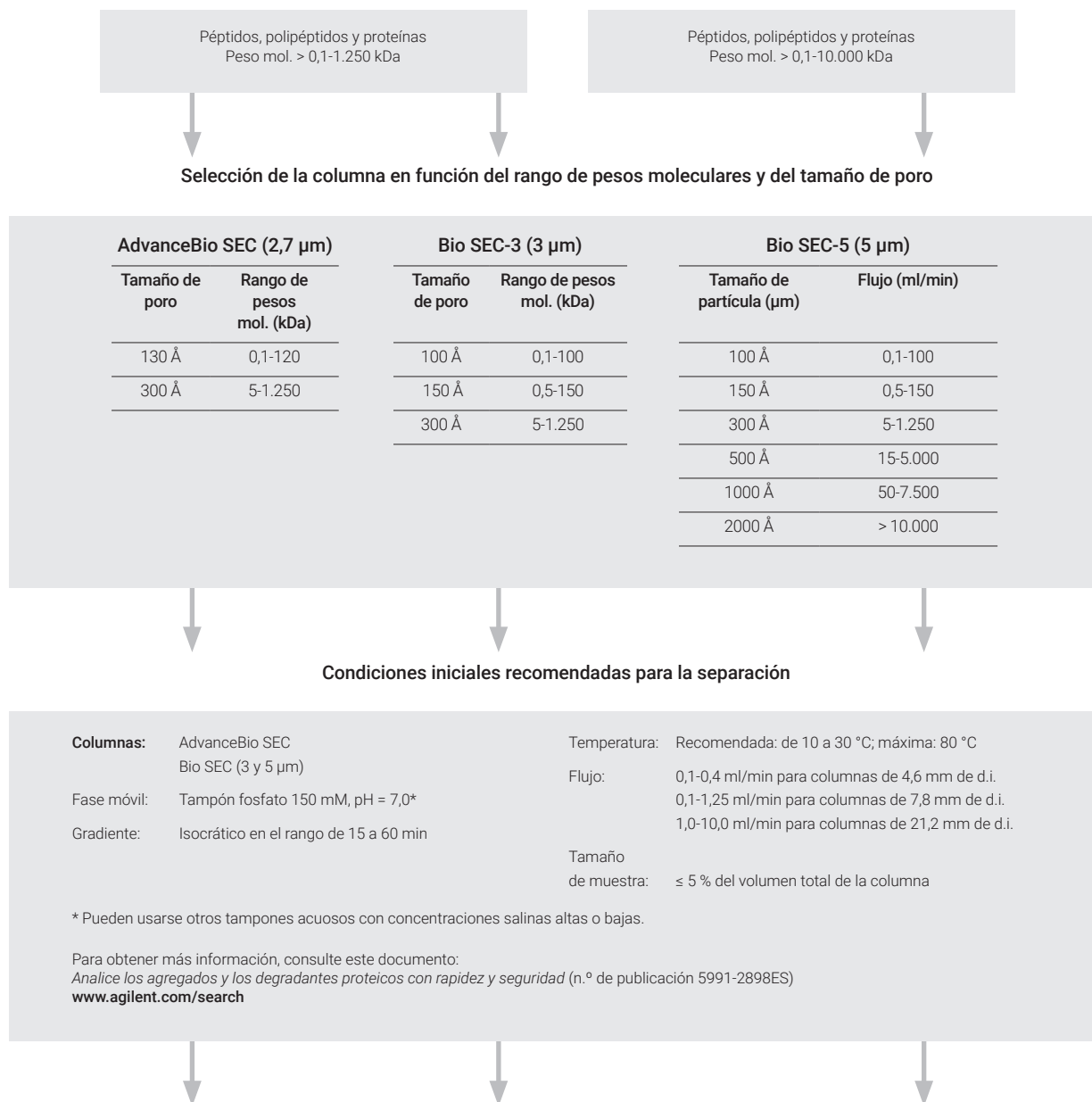
Columnas de 2,1 mm de d.i.		Columnas de 4,6 mm de d.i.	
Tamaño de partícula (µm)	Flujo (ml/min)	Tamaño de partícula (µm)	Flujo (ml/min)
1,7	0,1-0,3	1,7	0,1-0,3
3	0,1-0,5	3	0,1-0,5
5	0,1-0,8	5	0,1-0,8
10	0,1-1,0	10	0,1-1,0

Nota: Comience siempre con un flujo bajo y use por defecto el límite recomendado de funcionamiento de la columna.

Métodos de análisis de agregados y fragmentos

En esta sección sobre la estrategia de selección de columnas para el análisis de agregados se proporciona información esencial para el desarrollo de métodos para anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos.

Selección de las columnas y las condiciones iniciales para la separación por tamaño de biomoléculas y el análisis de agregación (péptidos, polipéptidos y proteínas)



Después del cromatograma inicial, podrían ser necesarios cambios adicionales para mejorar la separación, mantener la solubilidad de las proteínas o reducir la interacción de la muestra con los medios cromatográficos. La fuerza iónica de la fase móvil puede aumentarse o reducirse para optimizar la separación. También puede ajustarse el pH, por lo general, en tramos de $\pm 0,2$ unidades. Si fuera necesaria una mayor optimización, podría ampliarse el rango de aumento o disminución. También pueden utilizarse un cambio de temperatura o la adición de un disolvente orgánico.



Para aquellos protocolos que requieran una concentración salina adicional, suelen utilizarse los siguientes tampones:

Cloruro sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0.

Sulfato sódico 100-150 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0.

Urea 50-100 mM en fosfato sódico 50 mM, pH = 7,0.

También pueden utilizarse otras sales similares (por ejemplo, KCl) y clorhidrato de guanidina.

Rango de pH:

2,0-8,5

Posibles disolventes orgánicos que se pueden añadir:

Etanol al 5-10 % (u otros disolventes similares) en fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0.

DMSO al 5 % en fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0.

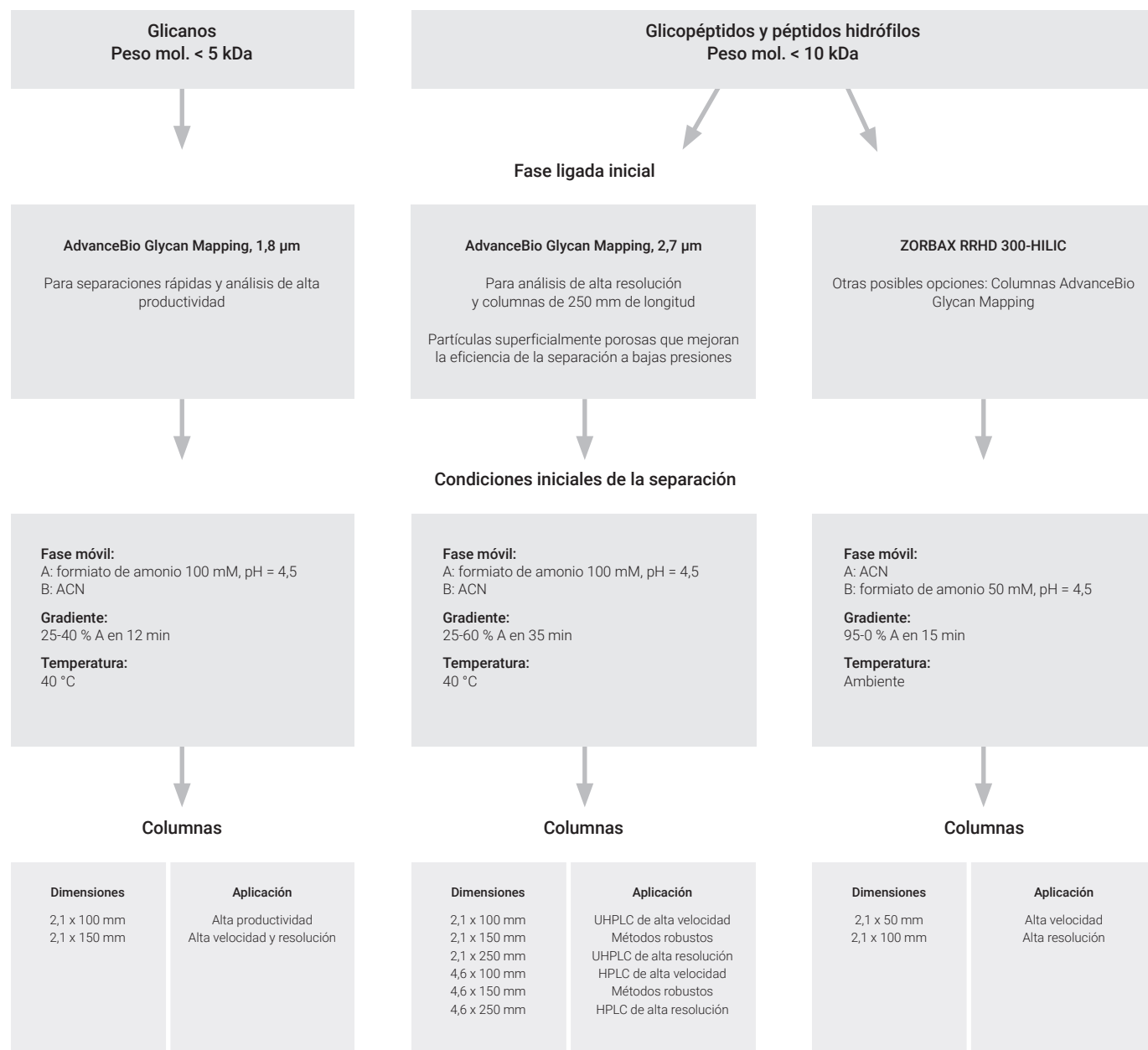
Deben extremarse las precauciones para evitar grandes cambios de presión causados por la alta viscosidad de algunas mezclas de disolventes acuosos/orgánicos. Use un flujo bajo o aumente la temperatura para mitigar posibles problemas.

Temperatura:

Normalmente, las separaciones SEC se realizan a entre 20 y 30 °C. La separación de proteínas y péptidos podría requerir una temperatura superior con el fin de mejorar la resolución y la recuperación de proteínas y péptidos hidrofóbicos.

La temperatura máxima de las columnas Bio SEC es de 80 °C.

Análisis de glicanos, péptidos hidrófilos y glicopéptidos



Métodos de titulación y optimización de cultivos celulares

Condiciones recomendadas para las columnas Agilent Bio-Monolith Protein A

Columnas:	Bio-Monolith Protein A (ref. 5069-3639)			
Fase móvil:	A: fosfato 50 mM, pH = 7,4 B: ácido cítrico 100 mM, pH = 2,8 o ácido acético 500 mM, pH = 2,6			
Gradiente:	Tiempo (min)	% A	% B	
	0-0,5	100	0	Fijación
	0,6-1,7	0	100	Elución
	1,8-3,5	100	0	Estabilización
Temperatura:	Ambiente			
Flujo:	1 ml/min			
Volumen de inyección:	Variable (50 µl; optimizado para sobrenadante de cultivos de células de ovario de hámster chino que contenga IgG1)			
Detección:	UV (280 nm)			
Muestra:	IgG1 (1-20 mg/ml) y sobrenadante de cultivo de células de ovario de hámster chino que contenga IgG1 (hasta 20 mg/ml de proteína total)			

Nota: Pueden agregarse sales adicionales (por ejemplo, cloruro sódico) a las fases móviles hasta alcanzar una concentración máxima de 150 mM. Las concentraciones salinas superiores deben determinarse experimentalmente.

Recomendaciones y herramientas

En Agilent, somos conscientes de que existen numerosos factores distintos que afectan a la calidad de las separaciones de anticuerpos monoclonales y proteínas. Para permitirle obtener unos resultados óptimos, hemos elaborado una serie de guías prácticas. Para obtener más información, consulte los siguientes documentos:

Claves para conseguir caracterizaciones de péptidos óptimas: una guía práctica de mapa de péptidos (n.º de publicación 5991-2348ES).

Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis: A "How to" Guide (n.º de publicación 5991-3775EN).

Guía práctica de Agilent sobre Cromatografía de exclusión por tamaño para el análisis de biomoléculas (n.º de publicación 5991-3651ES).

Para acceder a más información sobre los temas anteriores y a otras guías que le ayudarán a llevar a cabo la caracterización, visite: www.agilent.com/chem/getbioguides

Métodos con columnas capilares de alta sensibilidad

Consideraciones relacionadas con la fase móvil para métodos de fase reversa

Para los métodos LC/MS en los que el eluyente de la columna pase directamente de la columna al detector selectivo de masas (MS), las fases móviles solo deben contener sales volátiles y aditivos. Asimismo, para lograr una sensibilidad máxima, no deben existir supresión iónica ni formación de aductos.

pH bajo



No se suele utilizar TFA para las separaciones de proteínas y péptidos por LC/MS, ya que suprime la ionización e incrementa el límite de detección. Por lo general, el primer paso es sustituir el TFA por ácido fórmico al 0,1-1 %. También puede utilizarse ácido acético con una concentración de hasta el 1 % como modificador de fase móvil alternativo. Con valores bajos de pH, puede conseguirse una separación óptima aunque se use una fase móvil con TFA; no obstante, la sensibilidad disminuirá. En algunos casos, el TFA puede desplazarse después de la columna con otro ácido (por ejemplo, ácido propiónico) mediante el uso de un sistema en línea de desalinización/contraresta de intercambio iónico.

pH medio o alto



Los valores de pH altos se utilizan menos para la caracterización de proteínas; sin embargo, la LC/MS también se puede llevar a cabo con un pH alto, usando NH_4OH 10-20 mM como aditivo de fase móvil.

Instrumentos Agilent para la identificación de proteínas y la determinación de perfiles de impurezas

Sistema LC bioinerte 1260 Infinity II

Análisis eficiente de biomoléculas gracias a su auténtica condición bioinerte

Es el único sistema UHPLC que proporciona una ruta de paso de muestras exenta de metal. Otras de sus ventajas son las siguientes:

100 % de condición bioinerte

- Sin acero inoxidable, lo que garantiza una integridad excepcional de las muestras
- Valores de pH entre 1 y 13 (o 14 durante un período breve de tiempo), con el fin de maximizar el funcionamiento continuado del instrumento
- Admite concentraciones 2 M de sales y 8 M de urea
- Tecnología capilar fácil de usar

Capacidad de análisis por UHPLC

- 600 bar

Robustez y facilidad de uso

- Actividad superficial baja, resistencia a la corrosión, lavado activo de sellos y mezcla de tampón cuaternaria

Ideal para identificación de proteínas

Para obtener unos resultados óptimos, use columnas AdvanceBio Peptide Mapping, Bio MAb y AdvanceBio SEC.



Sistema LC bioinerte 1260
Infinity II

Sistema LC 1290 Infinity II con bomba de alta velocidad

Rendimiento sin igual para conseguir la máxima confianza en sus resultados

Ofrece los mejores valores de resolución por tiempo, dispersión, sensibilidad y precisión de su categoría para el análisis por LC/UV y LC/MS. Combina una innovadora amortiguación activa, mezcla microfluidica y tecnología de detección de guía de ondas optofluídica para conseguir:

- un rango de potencia propio de un sistema UHPLC con hasta 1.300 bar y 5 ml/min;
- la transferencia de métodos más rápida y sencilla que existe mediante ISET, la exclusiva tecnología inteligente de emulación de sistemas de Agilent;
- la productividad de un sistema UHPLC con los costes de mantenimiento de un sistema HPLC.

Uso adecuado para determinación de perfiles de impurezas, mapeo de péptidos o gradientes ultrarrápidos

Para obtener los mejores resultados posibles, utilice una columna ZORBAX RRHD 300 Å de 1,8 µm.



Sistema LC 1290 Infinity II con bomba de alta velocidad

Consiga un rendimiento y una eficiencia óptimos con los consumibles Agilent para LC

Los consumibles Agilent InfinityLab funcionan a la perfección con los instrumentos LC serie InfinityLab y proporcionan un rendimiento, una eficiencia operativa y un nivel de seguridad en el laboratorio inigualables. Además, las funciones inteligentes de seguimiento del uso de consumibles le aportarán aún mayor confianza en sus análisis.

Visite www.agilent.com/chem/infinitylab o consulte el catálogo de consumibles InfinityLab para LC en www.agilent.com/chem/catalog.

Sistema LC 1260 Infinity II con bomba binaria

Superando los límites de la HPLC analítica con una presión de 600 bar

Sistema 100 % compatible con la HPLC que también ofrece capacidad de análisis por UHPLC.

- Rendimiento de un sistema UHPLC con los costes de mantenimiento de un sistema HPLC.
- Admite aplicaciones de LC y LC/MS con cualquier columna analítica de diámetro estrecho y estándar (de 2,1 a 4,6 mm de d.i.).
- Precisión de gradiente extraordinaria mediante mezcla de alta presión.

Apto para cualquier aplicación estándar de UHPLC



Sistema LC 1260 Infinity II
con bomba binaria

Sistema LC 1260 Infinity II Prime

Disfrute de la máxima confianza y precisión en sus análisis cotidianos

Rendimiento máximo de UHPLC cuaternaria, lo que facilita una transferencia de métodos sin problemas y una mezcla de tampones automatizada.

- Rango de potencia propio de un sistema UHPLC con hasta 800 bar y 5 ml/min.
- Incorpora BlendAssist, la herramienta más sencilla para conseguir una mezcla precisa de tampón y aditivo.
- La productividad de un sistema UHPLC con los costes de mantenimiento de un sistema HPLC.

Uso adecuado para desarrollo de métodos o sistemas automatizados con una mezcla de tampones precisa



Sistema LC 1260 Infinity II
Prime

Recomendaciones y herramientas

Para conocer con detalle estos sistemas avanzados, visite www.agilent.com/chem/BioHPLC.

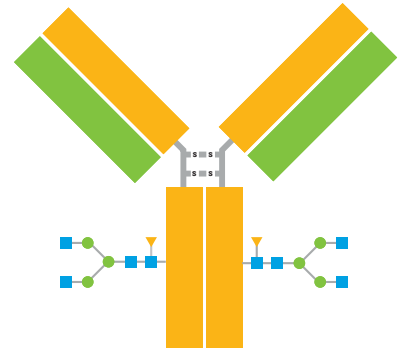
Análisis de la estructura primaria

Determine secuencias de aminoácidos y modificaciones postranslacionales de forma precisa y analice impurezas de péptidos y oligonucleótidos

Para conseguir una caracterización completa de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal), es necesario examinar la secuencia primaria de aminoácidos y todas las modificaciones postranslacionales de la secuencia que puedan haberse producido durante las etapas de purificación o formulación del proceso de fabricación. Para llevar a cabo este tipo de análisis se requieren condiciones de desnaturalización; por ello, la técnica elegida suele ser la LC de fase reversa.

Agilent ofrece la gama más completa de columnas BioHPLC de fase reversa y poro ancho con tamaños de 300 Å, 450 Å y más grandes, respaldada por un experto equipo de soporte técnico y químicos de aplicaciones de todo el mundo. La gama incluye partículas porosas de 1,8, 3,5 y 5 µm para presiones de 400 a 1.200 bar, tres tipos diferentes de partículas superficialmente porosas para separaciones UHPLC a presiones bajas y columnas poliméricas para análisis bajo una amplia variedad de condiciones, incluido el uso de fases móviles con ácido fórmico para análisis por MS.

Para el análisis de impurezas de péptidos u oligonucleótidos, Agilent pone a su disposición opciones de columnas poliméricas y de sílice con tolerancia a valores de pH altos. Las columnas poliméricas ofrecen la ventaja adicional de que son escalables para efectuar separaciones analíticas o preparativas.



- Las **columnas AdvanceBio RP-mAb** son las únicas columnas de fase reversa diseñadas específicamente para la caracterización de anticuerpos monoclonales. La tecnología Poroshell con un tamaño de poro de 450 Å y la fase ligada con una selectividad idónea permiten conseguir una caracterización rápida y de alta resolución de anticuerpos monoclonales inalterados y fragmentos de anticuerpos monoclonales.
- Las **columnas PLRP-S** incluyen partículas de polímero macroporosas que ofrecen separaciones por HPLC en el rango más amplio posible de pH. Con ocho tamaños de partícula y tres tamaños de ancho de poro, las columnas PLRP-S proporcionan soluciones óptimas para separaciones analíticas preparativas de péptidos, proteínas y complejos de proteínas.
- Las **columnas ZORBAX RRHD 300 Å de 1,8 µm** ofrecen un rendimiento propio de la UHPLC para separaciones de fase reversa de proteínas intactas, fragmentos de proteínas y digestiones con estabilidad hasta 1.200 bar.
- Las **columnas Agilent ZORBAX 300 Å de 3,5 y 5 µm** están fabricadas con materiales completamente porosos para separaciones preparativas y HPLC; muchas de las fases ligadas son escalables a partir del tamaño de partícula de 1,8 µm.
- Las **columnas Poroshell 300** son las primeras columnas de partículas pequeñas superficialmente porosas del sector para separaciones rápidas de polipéptidos y proteínas.
- Las **columnas AdvanceBio Peptide Mapping** permiten resolver e identificar rápidamente modificaciones de aminoácidos en la estructura primaria. Con sus partículas de 2,7 µm y la funcionalidad C18, las columnas AdvanceBio Peptide Mapping proporcionan niveles excelentes de retención, resolución y forma de pico para péptidos hidrofóbicos básicos.
- Las **columnas AdvanceBio Oligonucleotide** cuentan con partículas superficialmente porosas de 2,7 µm y alta eficiencia que posibilitan un análisis de alta resolución de oligonucleótidos y sus impurezas. Mediante el uso de una exclusiva tecnología, las partículas se modifican químicamente para lograr que resistan las condiciones de pH alto de la fase móvil que resultan necesarias para las separaciones de oligonucleótidos.



Selección de columnas de fase reversa

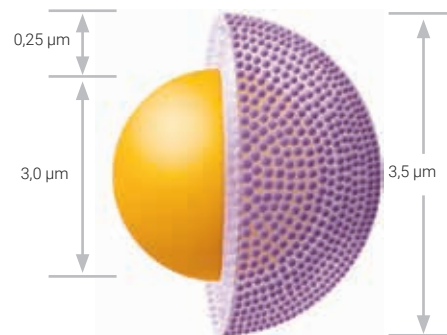
Aplicación	Columnas Agilent	Notas
Anticuerpos monoclonales y fragmentos de estos	AdvanceBio RP-mAb	Están basadas en la tecnología Poroshell, que incorpora partículas superficialmente porosas que reducen las distancias de difusión y permiten usar flujos más altos y gradientes más pronunciados, lo que acorta los tiempos de análisis (incluso en los sistemas de 600 bar).
	C4 SB-C8 Diphenyl	El tamaño de poro de 450 Å ofrece un acceso óptimo a la fase ligada para las moléculas grandes, lo que garantiza unas condiciones idóneas para la cromatografía. Las robustas fases ligadas, diseñadas para la separación de anticuerpos monoclonales, proporcionan un rango de selectividades que permite optimizar la resolución.
	PLRP-S 1000 Å	Las columnas poliméricas macroporosas PLRP-S posibilitan una separación excelente de anticuerpos monoclonales, sobre todo con fases móviles con ácido fórmico para la detección por MS.
Proteínas intactas, anticuerpos monoclonales (y fragmentos de estos) y polipéptidos	ZORBAX 300 Å de 1,8 µm	Los procesos de empaquetado optimizados garantizan la estabilidad hasta 1.200 bar para su uso con el sistema LC 1290 Infinity II. Las columnas de alta definición y resolución rápida (RRHD) de 1,8 µm están disponibles en longitudes de 50 y 100 mm que consiguen separaciones rápidas o de alta resolución de las muestras más complejas.
	RRHD 300SB-C18 RRHD 300SB-C8 RRHD 300SB-C3 RRHD 300-Diphenyl	Las columnas StableBond C18 son idóneas para la separación de proteínas complejas y digestiones de proteínas.
	ZORBAX 300 Å de 3,5 y 5 µm	Idóneas para su uso con sistemas HPLC. Las columnas StableBond C3 y CN resultan útiles para la separación de compuestos de gran tamaño y carácter marcadamente hidrofóbico.
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300SB-CN	
	PLRP-S	Las columnas poliméricas PLRP-S ofrecen una selectividad alternativa a la de las columnas de sílice, así como una excelente forma de pico para fases móviles con ácido fórmico.
	100 Å 300 Å 1000 Å 4000 Å	
	Poroshell 300	Las partículas Poroshell de 5 µm con poros de 300 Å posibilitan separaciones rápidas de proteínas intactas por HPLC.
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300Extend-C18	
Proteínas en digestiones de proteínas	AdvanceBio Peptide Mapping	Tamaño de poro de 120 Å, idóneo para identificar péptidos de un amplio rango de pesos moleculares. Probadas con una mezcla compleja de péptidos para garantizar el rendimiento. La exclusiva tecnología Agilent Poroshell acorta los tiempos de análisis y mejora la resolución de la secuencia completa de péptidos.
Análisis de impurezas de péptidos sintéticos	PLRP-S 100 Å y 300 Å	Columnas escalables para separaciones analíticas y preparativas. Excelente estabilidad de pH que posibilita su uso en aplicaciones con valores de pH extremos, incluidas las de desinfección.
Análisis de oligonucleótidos	PLRP-S 100, 300, 1.000 y 4.000 Å PL-SAX 1.000 y 4.000 Å	Múltiples opciones de tamaño de poro en función de la longitud de los oligonucleótidos. Estabilidad a altas temperaturas. Columnas escalables para separaciones analíticas y preparativas. Para obtener más información sobre las columnas PL-SAX, consulte la página 95 .
	AdvanceBio Oligonucleotide	Columnas idóneas para separaciones de escala analítica y alta resolución.

AB

Parte de la gama AdvanceBio

AdvanceBio RP-mAb

- **Mayor precisión:** las partículas superficialmente porosas (3,5 μm) con poros anchos (450 Å) aumentan la resolución para los anticuerpos monoclonales y mantienen la compatibilidad con todos los instrumentos LC.
- **Velocidad:** tiempos de análisis más cortos en comparación con las columnas empaquetadas con partículas completamente porosas.
- **Desarrollo flexible de métodos:** variedad de fases químicas (SB-C8, C4 y difenilo).
- **Menores costes:** el robusto lecho empaquetado Poroshell y la frita de entrada de 2 μm alargan la vida útil de la columna, ya que contribuyen a evitar las obstrucciones a la entrada.



Columnas de fase reversa desarrolladas para dar respuesta a los desafíos específicos de la caracterización de anticuerpos monoclonales

El análisis de anticuerpos monoclonales inalterados y reducidos permite obtener medidas fundamentales para caracterizar proteínas terapéuticas y comprender su eficacia y estabilidad. Las separaciones cromatográficas deficientes pueden obligar a reprocesar muestras e incluso afectar sensiblemente a la precisión de la caracterización.

Los tiempos de análisis largos producen un impacto negativo sobre la productividad del laboratorio y retrasan la toma de decisiones basadas en los resultados de la caracterización. Con el fin de resolver estos problemas, Agilent ha desarrollado una nueva columna de fase reversa para optimizar el rendimiento del análisis de anticuerpos monoclonales inalterados y reducidos. La columna AdvanceBio RP-mAb está basada en la tecnología Poroshell y presenta un exclusivo diseño en lo referente al tamaño de poro y las fases ligadas.

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre la caracterización de la estructura primaria de los anticuerpos monoclonales, consulte el siguiente documento:
Better Characterization of Biomolecules using Agilent AdvanceBio Reversed-Phase Columns
 (n.º de publicación 5991-2032EN).

www.agilent.com/search



Análisis de la estructura primaria

Las biomoléculas de gran tamaño, como los anticuerpos monoclonales, se suelen separar lentamente para reducir la posibilidad de que se produzca ensanchamiento de los picos de estos analitos de baja difusión. Sin embargo, la tecnología Poroshell de las columnas AdvanceBio RP-mAb hace que estas cuenten con partículas superficialmente porosas con una fina capa de sílice porosa (de 0,25 µm de grosor) sobre un núcleo sólido de sílice de 3,0 µm. Estas características morfológicas reducen la distancia de difusión y permiten usar flujos más elevados y gradientes más pronunciados (incluso en sistemas de 600 bar). El amplio diámetro de los poros (450 Å) de la capa fina permite un acceso completo a la fase ligada de las grandes moléculas de anticuerpos monoclonales, garantizando la mejor cromatografía posible. La selección de fases ligadas robustas y diseñadas para separaciones de anticuerpos monoclonales (C4, SB-C8 y una exclusiva fase con difenilo) proporciona un amplio rango de selectividades, lo que permite optimizar la resolución.

Las columnas AdvanceBio RP-mAb ofrecen una resolución mayor y unos tiempos de análisis más cortos que permiten obtener resultados rápidos, precisos y reproducibles a la hora de analizar anticuerpos monoclonales en aplicaciones biofarmacéuticas de exploración, desarrollo y control y garantía de calidad (QA/QC).

Especificaciones de las columnas

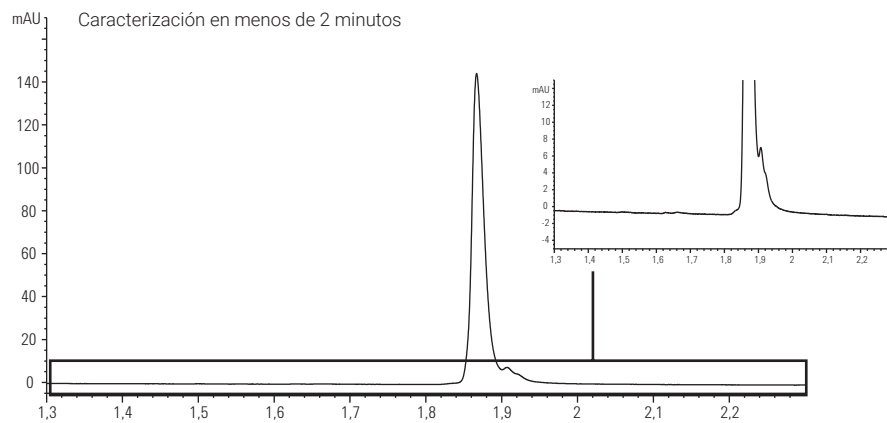
Fase ligada	Tamaño de poro	Límites de temperatura*	Rango de pH*	Desactivación
AdvanceBio RP-mAb C4	450 Å	90 °C	1,0-8,0	Sí
AdvanceBio RP-mAb SB-C8	450 Å	90 °C	1,0-8,0	No
AdvanceBio RP-mAb Diphenyl	450 Å	90 °C	1,0-8,0	Sí

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

* Las columnas están diseñadas para su uso óptimo a pH bajo. En un rango de pH de 6-8, se consigue una estabilidad máxima para todas las columnas de sílice trabajando a temperaturas < 40 °C y usando concentraciones de tampón bajas (en un rango de 0,01-0,02 M).

Separación de alta velocidad y alta resolución de IgG1 (variante de trastuzumab)

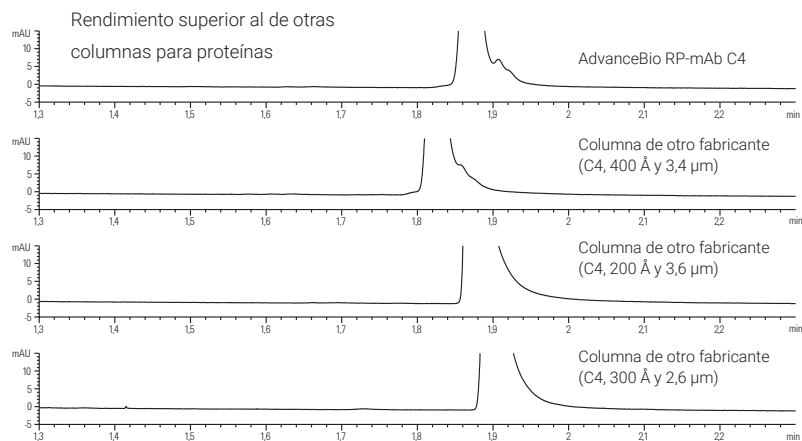
Columna:	AdvanceBio RP-mAb C4 795775-904 2,1 x 100 mm, 3,5 µm	Temperatura:	80 °C
		Detector:	UV (254 nm)
Fase móvil:	A: TFA al 0,1 % en agua e isopropanol (98:2) B: isopropanol, acetonitrilo y fase móvil A (70:20:10)	Muestra:	Inyección de 5 µl de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado (variante de trastuzumab) e intacto de Creative Biolabs (1 mg/ml)
Flujo:	1,0 ml/min		
Gradiente:	10-58 % B durante 4 min; lavado durante 1 min con 95 % B; estabilización durante 1 min con 10 % B		



La columna AdvanceBio RP-mAb C4 consigue un pico estrecho y una resolución con un elevado nivel de detalle en menos de 2 minutos.

Separación de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado inalterado (variante de trastuzumab)

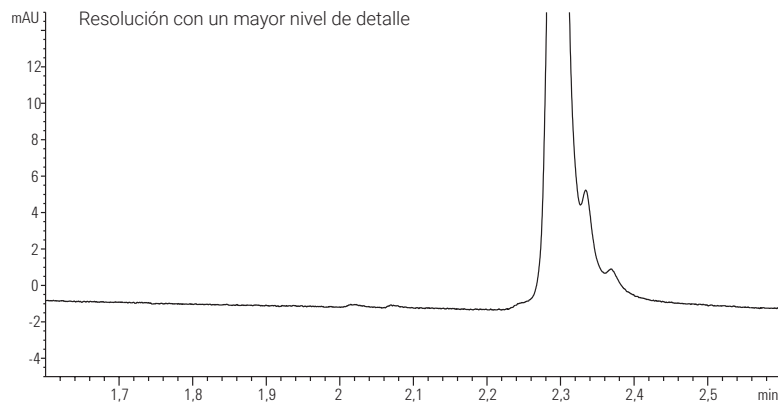
Columna:	AdvanceBio RP-mAb C4 795775-904 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	A: TFA al 0,1 % en agua e isopropanol (98:2) B: isopropanol, acetonitrilo y fase móvil A (70:20:10)
Flujo:	1,0 ml/min
Gradiente:	10-58 % B durante 4 min; lavado durante 1 min con 95 % B; estabilización durante 1 min con 10 % B
Temperatura:	80 °C
Detector:	UV (254 nm)
Muestra:	Inyección de 5 µl de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado (variante de trastuzumab) e intacto de Creative Biolabs (1 mg/ml)



La columna AdvanceBio RP-mAb, diseñada específicamente para la separación de anticuerpos monoclonales, ofrece una forma de pico y una resolución mejores que las de otras columnas utilizadas para la separación de proteínas intactas.

Fase selectiva con difenilo

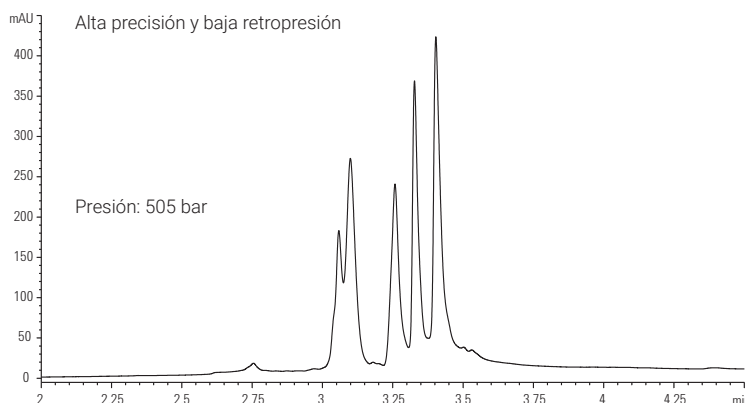
Columna:	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 795775-944 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	A: TFA al 0,1 % en agua e isopropanol (98:2) B: isopropanol, acetonitrilo y fase móvil A (70:20:10)
Flujo:	1,0 ml/min
Gradiente:	10-58 % B durante 4 min; lavado durante 1 min con 95 % B; estabilización durante 1 min con 10 % B
Temperatura:	80 °C
Detector:	UV (254 nm)
Muestra:	Inyección de 5 µl de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado (variante de trastuzumab) e intacto de Creative Biolabs (1 mg/ml)



La exclusiva selectividad de la columna AdvanceBio RP-mAb Diphenyl permite realizar análisis con un nivel de detalle aún mayor.

Ventajas de la tecnología Poroshell

Columna:	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 785775-906 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	A: TFA al 0,1 % en agua B: n-propanol, acetonitrilo y fase móvil A (80:10:10)
Flujo:	0,8 ml/min
Gradiente:	5-40 % B durante 5 min; lavado durante 1 min con 95 % B; estabilización durante 1 min con 10 % B
Temperatura:	60 °C
Detector:	UV (220 nm)
Muestra:	Inyección de 1 µl de un anticuerpo IgG1 recombinante humanizado (versión de trastuzumab) digerido en papaína (regiones Fc y Fab) de Creative Biolabs (2 mg/ml)



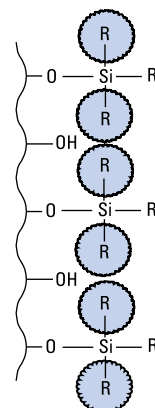
La tecnología Poroshell de poro ancho de la columna AdvanceBio RP-mAb ofrece una eficiencia elevada, un tiempo de análisis corto y una presión baja a temperaturas inferiores a 80 °C (las habituales en muchos métodos de fase reversa).

AdvanceBio RP-mAb

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl USP L11
4,6 x 150	3,5	793975-904	783975-906	793975-944
4,6 x 100	3,5	795975-904	785975-906	795975-944
4,6 x 50	3,5	799975-904	799975-906	799975-944
2,1 x 150	3,5	793775-904	783775-906	793775-944
2,1 x 100	3,5	795775-904	785775-906	795775-944
2,1 x 75	3,5	797775-904	787775-906	797775-944
2,1 x 50	3,5	799775-904	789775-906	799775-944

ZORBAX 300 Å StableBond

Las columnas Agilent ZORBAX 300 Å StableBond son una opción ideal para conseguir separaciones reproducibles de proteínas y péptidos por dos motivos: en primer lugar, es necesario usar columnas de poro ancho (300 Å) para lograr una separación eficaz de proteínas y péptidos, o bien de otras moléculas grandes, ya que permiten que estos analitos entren por completo en la fase ligada; y, en segundo lugar, las columnas 300StableBond ofrecen una durabilidad inigualable a pH bajo, como el de las fases móviles con ácido trifluoroacético (TFA) que se suelen usar para las separaciones de proteínas y péptidos. Para separaciones por LC/MS con pH bajo, las columnas 300StableBond también pueden usarse con modificadores de fase móvil como ácido fórmico y ácido acético. Estas columnas están disponibles con cinco fases ligadas distintas (C18, C8, C3, CN y difenilo (DP)) que aportan selectividad y permiten optimizar la recuperación de proteínas y polipéptidos. Para incrementar aún más la recuperación de las muestras y mejorar la eficiencia para las proteínas complejas, las columnas 300StableBond permiten usar temperaturas de hasta 80 °C. Las columnas StableBond 300SB-C18 y 300SB-C8 son una opción perfecta para las separaciones de proteínas y digestiones de proteínas complejas. Estas columnas también están disponibles en formatos capilares (0,3 y 0,5 mm de d.i.) y de nanocolumna (0,075 y 0,10 mm de d.i.) para llevar a cabo separaciones de digestiones de proteínas por LC/MS de fase reversa. Las columnas capilares y las nanocolumnas pueden emplearse para separaciones proteómicas 1D o 2D.



Fase ligada 300StableBond protegida estéricamente

Especificaciones de las columnas UHPLC

Fase ligada	Tamaño de poro	Límites de temp.*	Rango de pH*	Desactivación
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl	300 Å	80 °C	1,0-8,0	Sí
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No
ZORBAX 300SB-CN	300 Å	80 °C	1,0-8,0	No

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

* Las columnas 300StableBond están diseñadas para su uso óptimo a pH bajo. En un rango de pH de 6-8, se consigue una estabilidad máxima para todas las columnas de sílice trabajando a temperaturas < 40 °C y usando concentraciones de tampón bajas (en un rango de 0,01-0,02 M). Para valores de pH medios o altos, se recomienda usar la columna 300Extend-C18.

Mayor resolución de anticuerpos monoclonales inalterados

Columna: ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

Fase móvil: A: H₂O e isopropanol (98:2) + TFA al 0,1 % (v/v)
B: isopropanol, acetonitrilo y H₂O (70:20:10) + TFA al 0,1 %

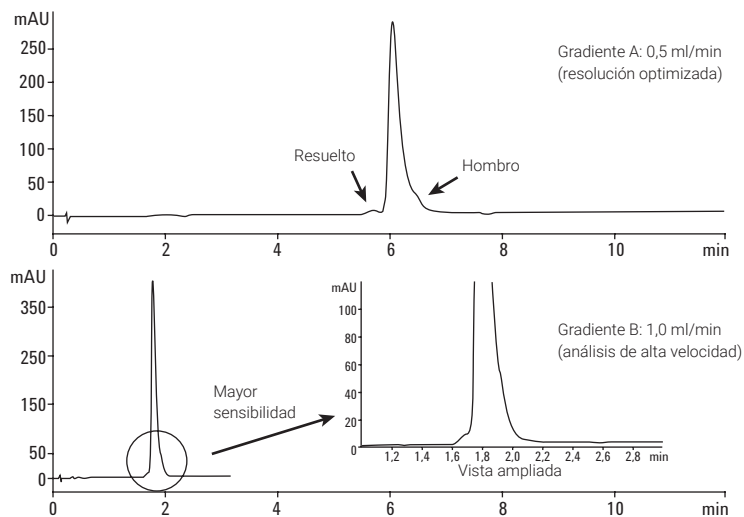
Flujo: Entre 0,5 y 1,0 ml/min

Gradiente: Multisegmentado, con elución lineal

Temperatura: 80 °C

Detector: UV (225 nm)

Muestra: Anticuerpos monoclonales inalterados



Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre cómo mejorar la caracterización de las biomoléculas con las columnas de fase reversa AdvanceBio, consulte el libro blanco sobre este tema (n.º de publicación **5991-2032EN**).

www.agilent.com/search



Separación de anticuerpos monoclonales reducidos y alquilados: separación de variantes de cadena ligera y cadena pesada

Columna: ZORBAX RRHD 300SB-C8
858750-906
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

Fase móvil: A: H₂O + TFA al 0,1 % (v/v)
B: n-propanol, acetonitrilo y H₂O (80:10:10) + TFA al 0,1 % (v/v)

Flujo: 0,5 ml/min

Inyección: 3 µl (de una muestra de 2,5 mg/ml)

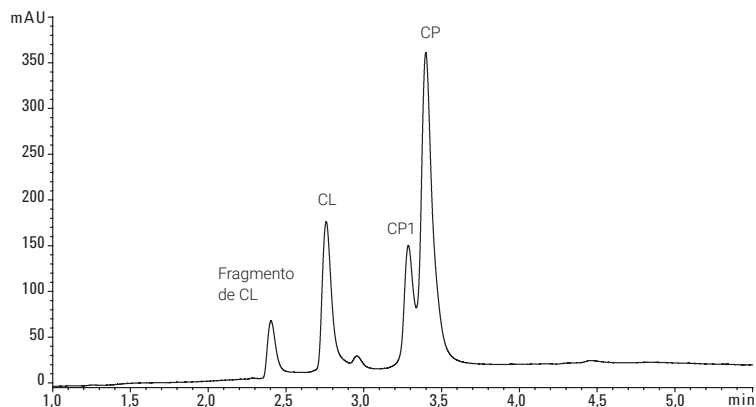
% disolv. B	Tiempo (min)
20	0
35	3
40	4
40	5
90	5,1
90	5,5
25	6

Gradiente: Multisegmentado

Temperatura: 75 °C

Detector: UV (225 nm)

Instrumento: Sistema LC 1290 Infinity con muestreador automático, bomba binaria, compartimento termostatzado de columna y detector de diodo array (DAD)



Para los análisis cromatográficos consecutivos, se añadió un tiempo posterior al análisis de 2 min para estabilizar la columna.

Recomendaciones y herramientas

Las fases móviles típicas para separaciones de proteínas y péptidos combinan un pH muy bajo con el uso de TFA (u otros ácidos) para solubilizar las proteínas. Las columnas StableBond tienen una vida útil muy larga en estas condiciones. Están disponibles con un tamaño de poro de 300 Å para proteínas de hasta 100-500 kDa.

Mejora de la reproducibilidad del análisis de anticuerpos monoclonales

Columna: ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2,1 x 50 mm, 1,8 µm

Fase móvil: A: H₂O e isopropanol (98:2) + TFA al 0,1 % (v/v)
B: isopropanol, acetonitrilo y H₂O (70:20:10) y TFA al 0,1 %

Flujo: 1,0 ml/min

Temperatura: 80 °C

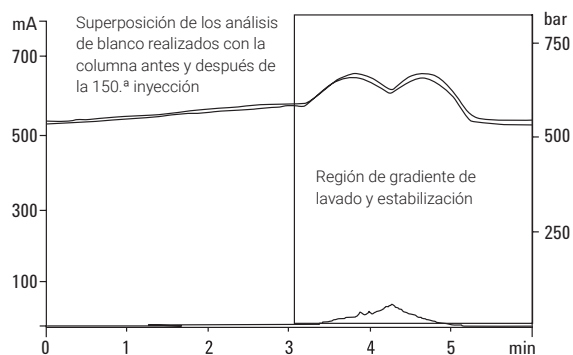
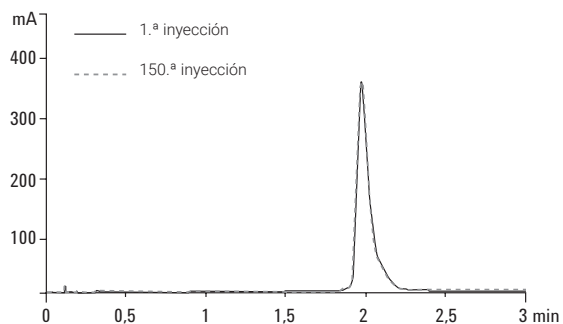
Detector: Sistema LC 1290 Infinity con detector de diodo array (225 nm)

Muestra: Anticuerpos monoclonales

Gradiente

Tamaño de partícula (µm)	Flujo (ml/min)
0,00	25
3,00	35
4,00	90
5,00	25

La columna ZORBAX 300SB-C8 permite obtener una reproducibilidad y una recuperación de proteínas excelentes.



Exclusivas opciones de selectividad para la caracterización de anticuerpos monoclonales

Columnas: ZORBAX RRHD 300SB-C18
858750-902
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300SB-C3
858750-909
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300SB-C8
858750-906
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

ZORBAX RRHD 300-Diphenyl
858750-944
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

Fase móvil: A: H₂O (TFA al 0,1 %) (v/v)
B: n-propanol, acetonitrilo y H₂O (80:10:10) (TFA al 0.08 %) (v/v)

Volumen de inyección: 3 µl (de una muestra de 2,5 mg/ml)

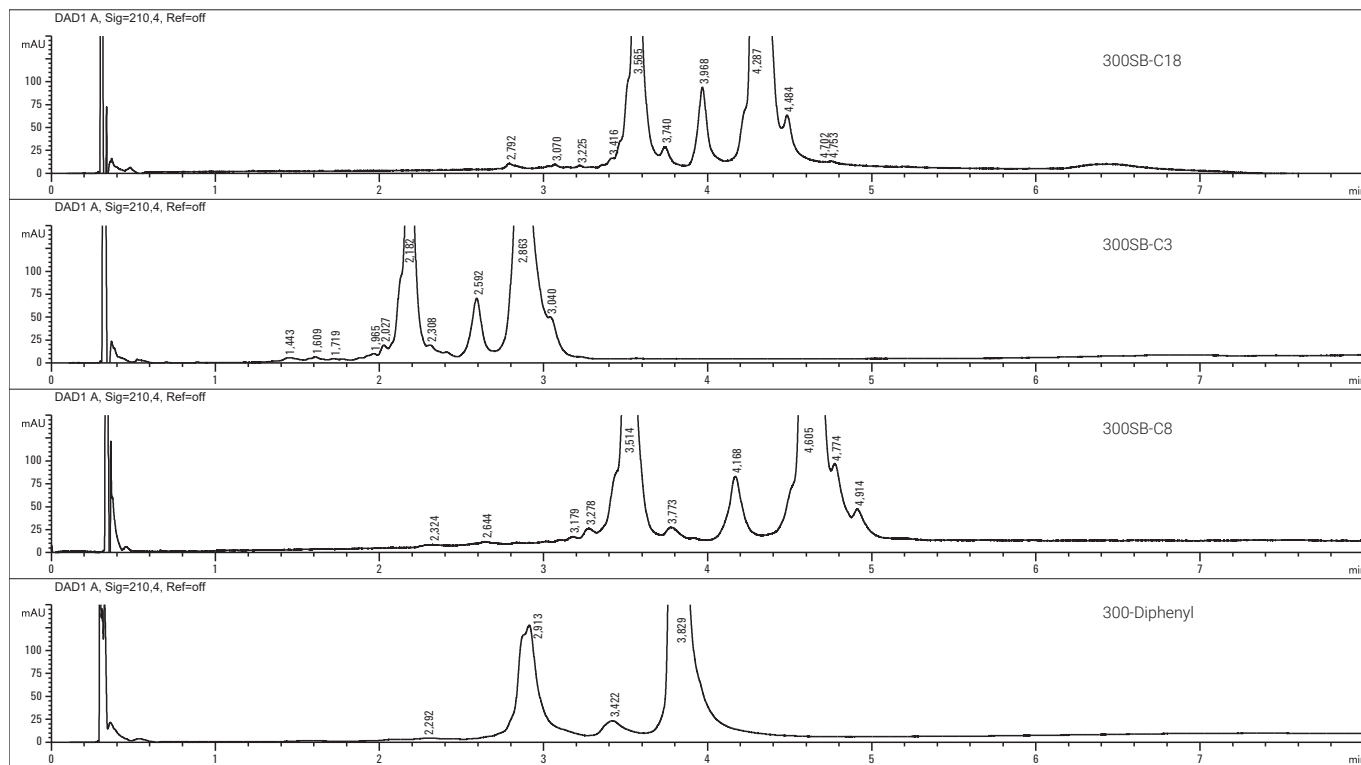
Flujo: 1,0 ml/min (3,5 µm*); 1,0 ml/min (1,8 µm)

Gradiente: 25-35 % B, solución de lavado al 90 %

Temperatura: 80 °C

Detector: UV (215 nm)

* Picos anchos con flujos bajos



Péptidos y proteínas: efecto de las altas temperaturas

Columna: ZORBAX RRHD 300SB-C3
883995-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: A: acetonitrilo y agua con TFA al 0,10 % (v/v) (95:5)
B: acetonitrilo y agua con TFA al 0,085 % (v/v) (95:5)

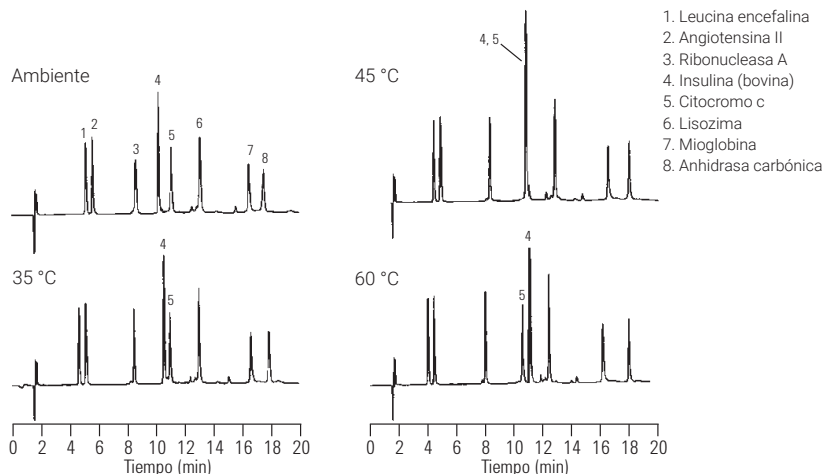
Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: 15-53 % en 20 min; tiempo posterior al análisis de 12 min

Temperatura: Ambiente (60 °C)

Detector: UV (215 nm)

Muestra: Polipéptidos



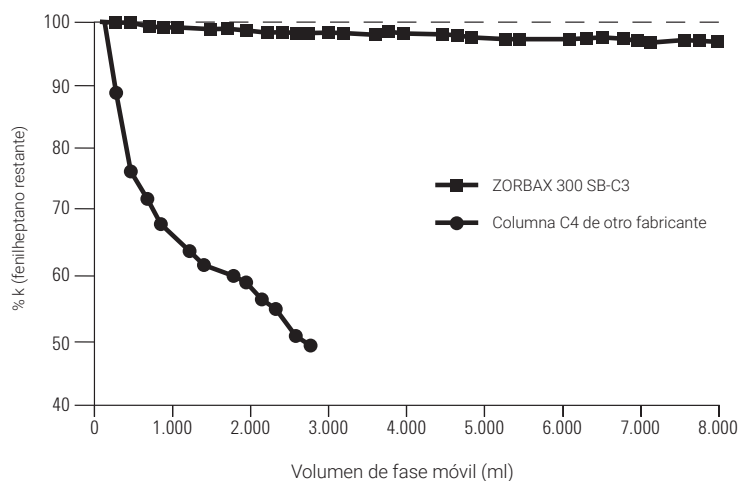
Columna ZORBAX 300SB-C3 de cadena corta: estabilidad a pH bajo y altas temperaturas

Columna: ZORBAX 300SB-C3
883995-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: Gradiente: 0-100 % B en 80 min
A: TFA al 0,5 % en agua
B: TFA al 0,5 % en acetonitrilo
Condiciones de la prueba de retención isocrática:
1-fenilheptano (50 % A y 50 % B)

Flujo: 1,0 ml/min

Temperatura: 60 °C



Optimización de la separación de polipéptidos de gran tamaño mediante cuatro fases ligadas 300SB diferentes

Columna A: ZORBAX RRHD 300SB-C18

883995-902

4,6 x 150 mm, 5 µm

Columna B: ZORBAX 300SB-C8

883995-906

4,6 x 150 mm, 5 µm

Columna C: ZORBAX 300SB-C3

858750-909

4,6 x 150 mm, 5 µm

Columna D: ZORBAX 300SB-CN

858750-905

4,6 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: Gradiente lineal: 25-70 % B en 40 min

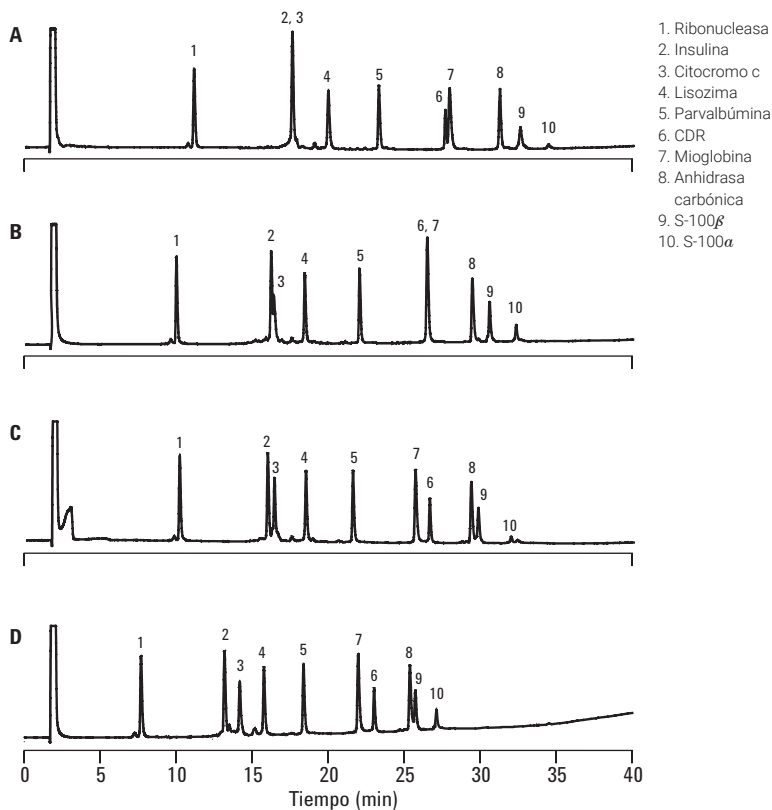
A: TFA al 0,1% en agua

B: TFA al 0,09 % en acetonitrilo y agua (80:20)

Flujo: 1,0 ml/min

Temperatura: 60 °C

Muestra: 3 µg de cada proteína



LCSB006

Cada una de las fases ligadas (300SB-C18, C8, C3 y CN) proporciona una separación distinta de este grupo de polipéptidos. Esto aporta un parámetro importante para poder optimizar con rapidez las separaciones de proteínas. La columna 300SB-CN ofrece una selectividad exclusiva para los polipéptidos con carácter marcadamente hidrófilo.

ZORBAX 300 Å StableBond

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
Columnas estándar (no requieren hardware especial)							
Semipreparativa	9,4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
Analítica	4,6 x 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
Analítica	4,6 x 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
Analítica	4,6 x 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
Resolución rápida	4,6 x 150	3,5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
Resolución rápida	4,6 x 100	3,5	861973-902	861973-906			
Resolución rápida	4,6 x 50	3,5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
Solvent Saver Plus	3,0 x 150	3,5	863974-302	863974-306		863974-309	
Solvent Saver Plus	3,0 x 100	3,5		861973-306			
Diámetro estrecho	2,1 x 250	5	881750-902				
Diámetro estrecho	2,1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 150	3,5		863750-906			
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 100	3,5	861775-902	861775-906			
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 50	3,5	865750-902	865750-906			
Diámetro estrecho (RRHD)	2,1 x 150	1,8	863750-902	866750-906		863750-914	863750-944
Diámetro estrecho (RRHD)	2,1 x 100	1,8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
Diámetro estrecho (RRHD)	2,1 x 50	1,8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
MicroBore	1,0 x 250	5	861630-902				
MicroBore (RR)	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906			
MicroBore (RR)	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906			
Precolumna MicroBore, 3/paq.	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920			
Cartucho precolumna, 2/paq.	9,4 x 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
Cartucho precolumna, 4/paq.	4,6 x 12,5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	

(Continúa)

AB

Parte de la gama AdvanceBio

AB

Recomendaciones y herramientas

Para sacar el máximo partido a sus instrumentos Agilent, visite www.agilent.com/chem/getbioguides.

Análisis de la estructura primaria

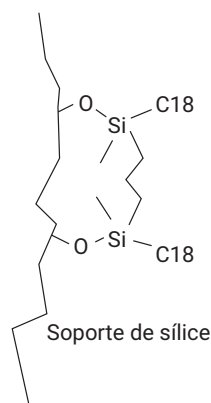
ZORBAX 300 Å StableBond

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
Cartucho precolumna, 4/paq.	2,1 x 12,5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	
Kit de hardware para precolumnas			840140-901	840140-901	840140-901	840140-901	
Kit de hardware para precolumnas			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901	
Columnas de cartucho PrepHT (requieren el kit de terminales de conexión; ref. 820400-901)							
Cartucho PrepHT	21,2 x 250	7		897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
Cartucho PrepHT	21,2 x 150	7		897150-102	897150-106		897150-109
Cartucho PrepHT	21,2 x 150	5		895150-902	895150-906		895150-909
Cartucho PrepHT	21,2 x 100	5		895100-902	895100-906		895100-909
Cartucho PrepHT	21,2 x 50	5		895050-902	895050-906		895050-909
Terminales de conexión PrepHT, 2/paq.				820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
Precolumna PrepHT	17,0 x 7,5	5		820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Hardware para cartuchos precolumna				820444-901	820444-901	820444-901	820444-901
Columnas capilares forradas de vidrio							
Capilar	0,5 x 250	5	5064-8266				
Capilar	0,5 x 150	5	5064-8264				
Capilar	0,5 x 35	5	5064-8294				
Capilar (RR)	0,5 x 150	3,5	5064-8268				
Capilar (RR)	0,5 x 35	3,5	5065-4459				
Capilar	0,3 x 250	5	5064-8265				
Capilar	0,3 x 150	5	5064-8263				
Capilar	0,3 x 35	5	5064-8295				
Capilar (RR)	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460			
Capilar (RR)	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461			
Capilar (RR)	0,3 x 35	3,5	5064-8270	5065-4462			
Capilar (RR)	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463			
Nanocolumnas (sílice fundida y PEEK)							
Nanocolumna (RR)	0,1 x 150	3,5	5065-9910				
Nanocolumna (RR)	0,075 x 150	3,5	5065-9911				
Nanocolumna (RR)	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923			
Trampa/precolumna, 5/paq.	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914			
Kit de hardware para trampas/precolumnas			5065-9915	5065-9915			

ZORBAX 300 Å Extend-C18

- Separaciones robustas de péptidos y polipéptidos con valores de pH altos y bajos (entre 2 y 11,5).
- Posibilidad de obtener selectividades diferentes con valores de pH altos y bajos.
- Alta eficiencia y buena recuperación de péptidos hidrofóbicos a pH alto.
- Opción idónea para LC/MS con fases móviles modificadas con hidróxido de amonio.

La columna ZORBAX 300 Å Extend-C18 es una columna HPLC de poro ancho que consigue separaciones de péptidos de alta eficiencia con valores de pH comprendidos entre 2 y 11,5. La exclusiva fase ligada bidentada hace que la columna ofrezca una vida útil y una reproducibilidad excelentes con valores de pH altos y bajos. A pH alto, la retención y la selectividad de los péptidos y polipéptidos puede variar sensiblemente debido a los cambios en la carga de las moléculas. Se han obtenido excelentes recuperaciones de polipéptidos hidrofóbicos a temperatura ambiente y pH alto. La sensibilidad del análisis de péptidos y polipéptidos por LC/MS también puede aumentar con valores de pH altos, usando simplemente una fase móvil con hidróxido de amonio.



Innovador enlace C18-C18
bidentado
de la fase ligada Extend-C18

Especificaciones de las columnas UHPLC

Fase ligada	Tamaño de poro	Límites de temp.*	Rango de pH*	Desactivación
ZORBAX 300 Å Extend-C18 60 °C	300 Å	60 °C	2,0-11,5	Doble

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

* Límites de temperatura: hasta 60 °C para valores de pH de hasta 8; 40 °C para un rango de pH de 8-11,5.

Recomendaciones y herramientas

La selección de una columna adecuada es tan solo una parte de la solución completa. También hay que elegir los consumibles principales, como alguna de las lámparas para LC de nuestra amplia gama. Visite www.agilent.com/chem/lamps para obtener más información.



Análisis de angiotensinas por LC/MS

Columna: ZORBAX Extend-C18
773700-902
2,1 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: Condiciones ácidas:
A: TFA al 0,1% en agua
B: TFA al 0,085 % en acetonitrilo (ACN) al 80 %
Condiciones básicas:
A: NH₄OH 10 mM en agua
B: NH₄OH 10 mM en ACN al 80 %

Flujo: 0,2 ml/min

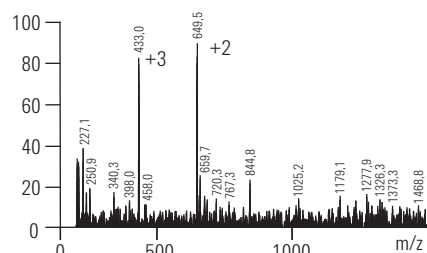
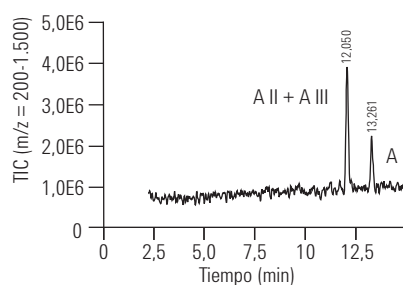
Gradiente: 15-50 % B en 15 min

Temperatura: 35 °C

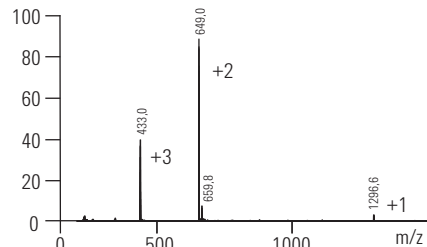
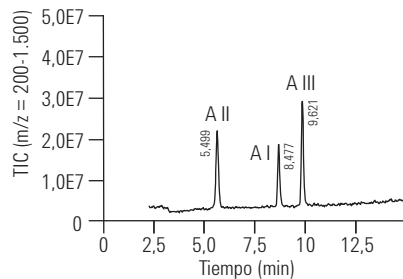
Condiciones del sistema MS: ESI ion posit.; Vf: 70 V; Vcap: 4,5 kV; N₂, 35 psi, 12 l/min, 325 °C

Muestra: Muestra de 2,5 µl de angiotensinas I, II y III (50 pmol de cada una de ellas)

A
Angiotensina I
Máx.: 10889
pH bajo



B
Angiotensina I
Máx.: 367225
pH alto



Los péptidos, ya sean pequeños o grandes, presentan cambios de selectividad en función de si el pH es alto o bajo. A pH alto, debido a los cambios en la carga, se pueden resolver las tres angiotensinas. Además, la claridad espectral de la angiotensina I mejora drásticamente a pH alto con la fase móvil con hidróxido de amonio. La columna Extend-C18 también puede utilizarse para el análisis de péptidos pequeños con valores de pH altos.

Referencia: B. E. Boyes. *Separation and Analysis of Peptides at High pH Using RP-HPLC/ESI-MS*, 4.º WCBP, San Francisco, CA, enero de 2000.

Vida útil extensa con valores de pH altos

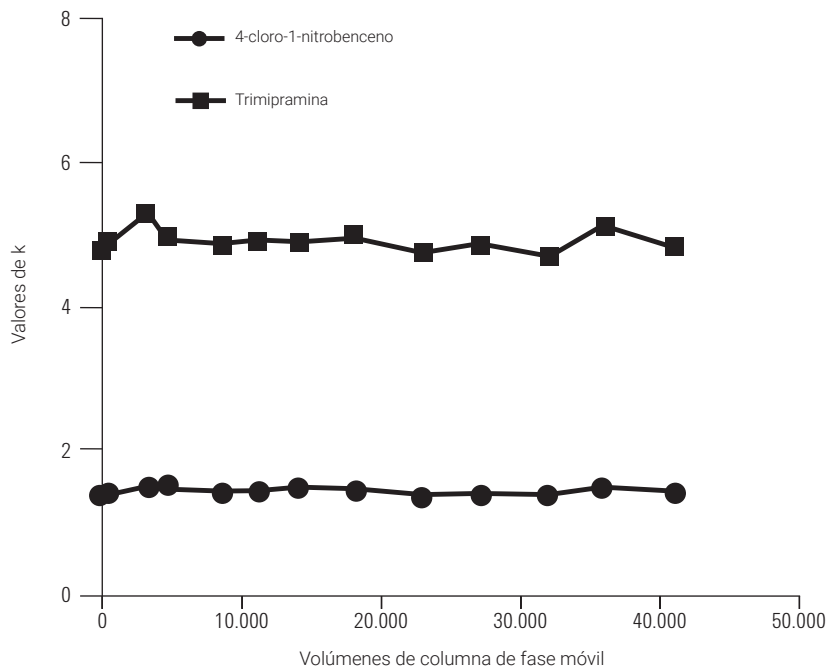
Columna: ZORBAX Extend-C18
773450-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: NH₄OH 20 mM, pH = 10,5
y metanol (20:80)

Flujo: 1,5 ml/min

Temperatura: Envejecimiento: 24 °C
Prueba: 40 °C

Cada 10.000 volúmenes de columna equivalen a aproximadamente un mes de trabajo.



Uso de la columna ZORBAX Extend-C18 para conseguir una selectividad alternativa a pH alto

Columna: ZORBAX Extend-C18
773700-902
2,1 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: A: TFA al 0,1% en agua
B: TFA al 0,085 % en acetonitrilo al 80 %

A: NH₄OH 20 mM en agua
B: NH₄OH 20 mM en ACN al 80 %

Flujo: 0,25 ml/min

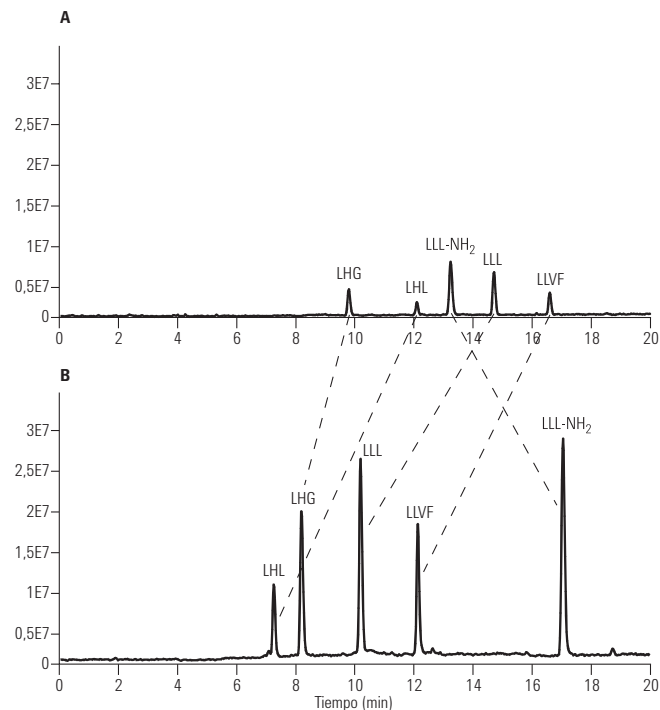
Gradiente: 5-60 % B en 20 min

Temperatura: 25 °C

Condiciones del sistema MS: ESI ion posit.; Vf: 70 V; Vcap: 4,5 kV; N₂,
35 psi, 12 l/min, 300 °C

Muestra: 4 µl (50 ng de cada péptido)

La columna Extend se puede usar para llevar a cabo separaciones de péptidos con valores de pH altos. La selectividad puede variar enormemente a pH altos y bajos. El simple cambio del pH permite desarrollar un método complementario y determinar si todos los picos se han resuelto. La columna Extend se puede usar con valores de pH altos y bajos, lo que posibilita investigar separaciones complementarias con una sola columna. La sensibilidad del sistema MS también mejora para esta muestra a pH alto.



ZORBAX 300 Å Extend-C18

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
Analítica	4,6 x 250	5	770995-902
Analítica	4,6 x 150	5	773995-902
Resolución rápida	4,6 x 150	3,5	763973-902
Resolución rápida	4,6 x 100	3,5	761973-902
Resolución rápida	4,6 x 50	3,5	765973-902
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 150	3,5	763750-902
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 100	3,5	761775-902
Diámetro estrecho (RR)	2,1 x 50	3,5	765750-902
Cartucho precolumna, 4/paq.	4,6 x 12,5	5	820950-932
Cartucho precolumna, 4/paq.	2,1 x 12,5	5	821125-932
Kit de hardware para precolumnas			820999-901
Columnas capilares forradas de vidrio			
Capilar (RR)	0,3 x 150	3,5	5065-4464
Capilar (RR)	0,3 x 100	3,5	5065-4465
Capilar (RR)	0,3 x 75	3,5	5065-4466
Capilar (RR)	0,3 x 50	3,5	5065-4467

Recomendaciones y herramientas

Las precolumnas y los filtros ayudan a proteger las columnas y los instrumentos frente a las partículas, que pueden provocar obstrucciones y hacer que la presión del sistema aumente y el rendimiento disminuya, llegando a interrumpir su flujo de trabajo cotidiano. Las nuevas precolumnas rápidas de Agilent para columnas UHPLC y Bio LC contribuyen a proteger estas columnas y alargar su vida útil, minimizando las interrupciones de su flujo de trabajo. Para obtener más información, visite:

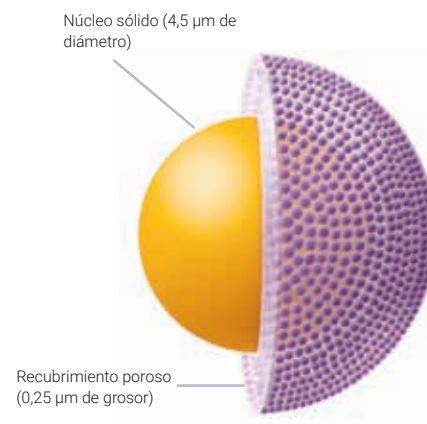
www.agilent.com/chem/fastguards

Poroshell 300 AB

- Separación rápida de biomoléculas gracias a las partículas superficialmente porosas.
- Los poros de 300 Å consiguen una eficiencia y una recuperación elevadas para el análisis de proteínas (de hasta 1.000 kDa).
- Alargue la vida útil a pH bajo con las columnas Poroshell 300SB y a pH alto con las columnas 300Extend-C18.
- Optimice la recuperación y la selectividad gracias a las cuatro fases ligadas diferentes: 300SB-C18, 300SB-C8, 300SB-C3 y 300Extend-C18.

Las columnas Poroshell 300 son idóneas para conseguir separaciones rápidas de proteínas y péptidos, ya que las partículas superficialmente porosas de 5 µm de diámetro permiten usar flujos elevados y mantener picos estrechos y eficientes. Las columnas Poroshell con fases ligadas StableBond ofrecen una estabilidad y una selectividad excelentes para fases móviles con ácido trifluoroacético (TFA) y ácido fórmico. La columna Poroshell 300Extend-C18 puede utilizarse para lograr separaciones específicas con valores de pH entre 2 y 11. Estas columnas también pueden emplearse para separaciones analíticas de proteínas y separaciones por LC/MS.

Los péptidos y las proteínas se suelen separar lentamente para reducir la posibilidad de que se produzca ensanchamiento de los picos de estos analitos de baja difusión. Sin embargo, las columnas Poroshell cuentan con partículas superficialmente porosas con una fina capa de sílice porosa (de 0,25 µm de grosor) sobre un núcleo sólido de sílice. Esto reduce la distancia de difusión para las proteínas y posibilita conseguir separaciones rápidas por HPLC de péptidos y proteínas de hasta 500-1.000 kDa con sistemas HPLC de 400/600 bar, incluido el sistema LC bioinerte 1260 Infinity II.



Especificaciones de las columnas UHPLC

Fase ligada	Tamaño de poro	Límites de temp.*	Rango de pH*	Desactivación
Poroshell 300SB-C18, C8 y C3	300 Å	90 °C	1,0-8,0	No
Poroshell 300Extend-C18	300 Å	40 °C (pH > 8) 60 °C (pH > 8)	2,0-11,0	Sí

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

* Las columnas 300StableBond están diseñadas para su uso óptimo a pH bajo. En un rango de pH de 6-8, se consigue una estabilidad máxima para todas las columnas de sílice trabajando a temperaturas < 40 °C y usando concentraciones de tampón bajas (en un rango de 0,01-0,02 M). Para valores de pH medios o altos, se recomienda usar la columna 300Extend-C18.



Columnas Poroshell 300

AB

Parte de la gama AdvanceBio

Separación de proteínas y péptidos en segundos con columnas Poroshell 300

Columna: Poroshell 300SB-C18
660750-902
2,1 x 75 mm, 5 µm

Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en H₂O
B: TFA al 0,07 % en ACN

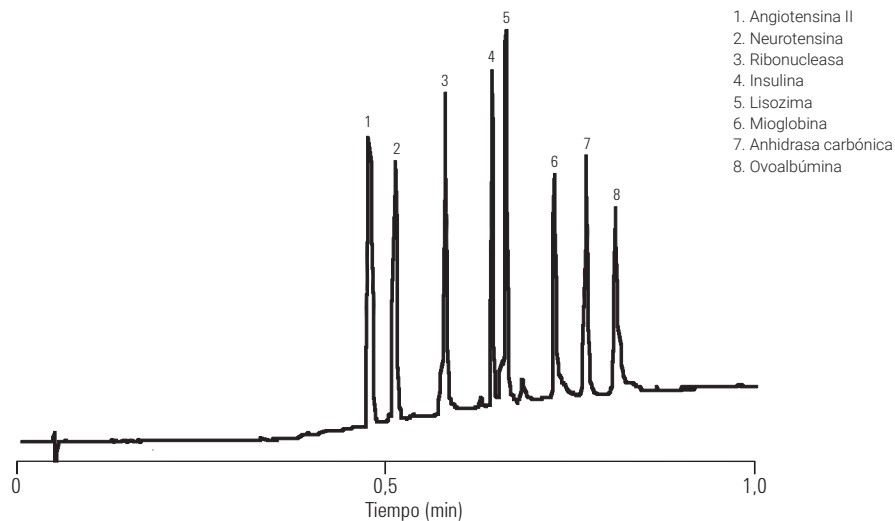
Flujo: 0,3 ml/min

Gradiente: 5-100 % B en 1,0 min

Temperatura: 70 °C, 260 bar

Detector: UV (215 nm)

Muestra: Proteínas y péptidos



Esta separación de ocho polipéptidos y proteínas se llevó a cabo en menos de 60 segundos.
Cada uno de los picos es estrecho y eficiente.

Recomendaciones y herramientas

Puede encontrar más información en:

Characterization of Glycosylation in the Fc Region of Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibody (n.º de publicación **5991-2323EN**).

Using the High-pH Stability of ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 to Increase Signal-to-Noise in LC/MS (n.º de publicación **5989-0683EN**)

www.agilent.com/search

Análisis rápido y de alta resolución de IgG fragmentada

Columna: Poroshell 300SB-C3
660750-909
2,1 x 75 mm, 5 µm

Fase móvil: A: agua (ácido acético al 5 %, ácido fórmico al 1,0 % y TFA al 0,05 %)

B: isopropanol, acetonitrilo y agua (ácido acético al 5 %, ácido fórmico al 1,0 % y TFA al 0,05 %) (70:20:10)

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 2 µl

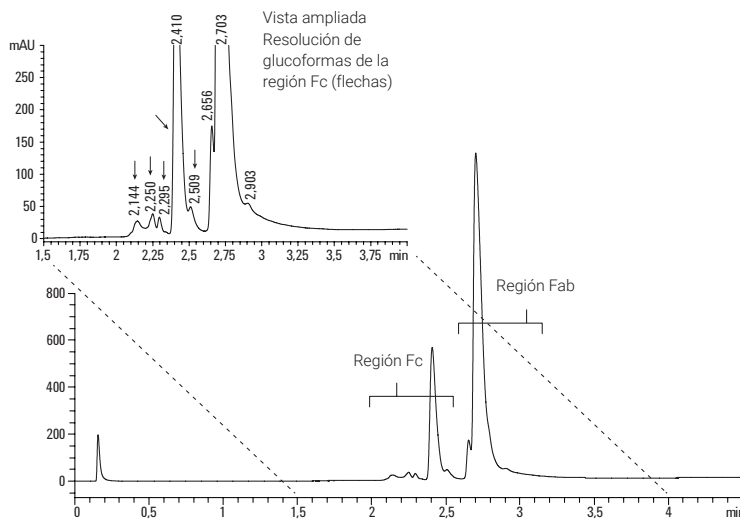
Gradiente: Segmentado

Tiempo (min)	% B
0	20
4	45
8	45
9	90
10	20

Temperatura: 80 °C

Detector: UV (280 nm)

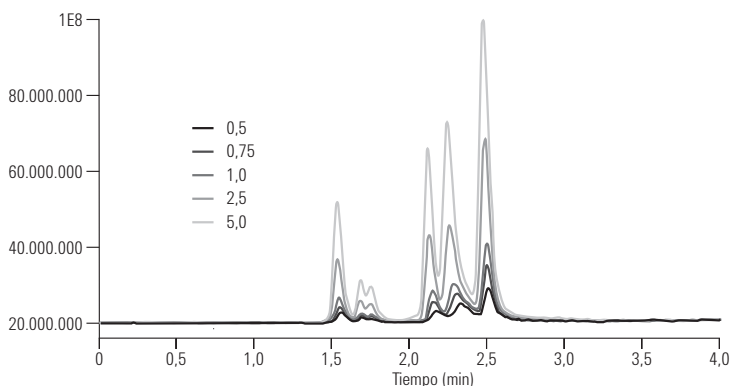
Instrumento: Sistema de la serie 1200 Infinity con muestreador automático de alto rendimiento, bomba binaria, compartimento termostatzado de columna (TCC) y detector de diodo array (DAD), acoplado con un sistema LC/MS TOF de masa exacta 6224



Separación de fase reversa de IgG1 tras una digestión con papaína en la que se observan dos picos principales, asociados a los fragmentos de las regiones Fc y Fab. La vista ampliada detalla los picos parcialmente resueltos, correspondientes a variantes de los fragmentos de las regiones Fc y Fab (flechas).

Análisis por LC/MS con una sensibilidad máxima gracias a las columnas Poroshell 300 MicroBore

Columna:	Poroshell 300SB-C18 661750-902 1,0 x 75 mm, 5 µm	
Fase móvil:	A: agua + ácido fórmico al 0,1 % B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %	
Flujo:	600 µl/min	
Gradiente:	20-100 % B en 5,5 min	
Temperatura:	80 °C	
Condiciones del sistema MS:	LC/MS:	ESI ion posit.; Vcap: 6.000 V
	Flujo de gas de secado:	12 l/min
	Temperatura del gas de secado:	350 °C
	Nebulizador:	45 psi
	Tensión del fragmentador:	140 V
	Barrido:	600-2.500
	Tamaño de paso:	0,15 uma
	Anchura de pico:	0,06 min
Muestra:	1 µl	



Las columnas Poroshell, con diámetros estrechos de 0,5, 1,0 y 2,1 mm, son idóneas para la LC/MS. Si se dispone de una cantidad de muestra muy limitada, las columnas Poroshell de 0,5 o 1,0 mm de d.i. son una opción excelente para conseguir un análisis de alta sensibilidad por LC/MS. Las columnas Poroshell permiten llevar a cabo determinaciones de pesos moleculares de alta sensibilidad por MS con solo entre 0,5 y 5 pmol de proteína. Estas columnas también se han utilizado para lograr una identificación rápida de proteínas intactas por MS, incluso en presencia de estabilizadores o medios de cultivo de tejidos.

Recomendaciones y herramientas

Agilent ofrece una amplia selección de viales y soluciones de contención de muestras en materiales como polipropileno y vidrio siliconado y desactivado. Para conocer la gama completa de productos, consulte la publicación **5990-9022ES**.

www.agilent.com/chem/vials-productivity



Patrones de elución de proteínas

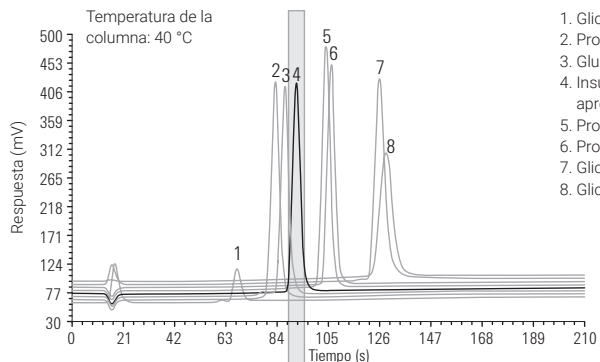
Columna: Poroshell 300SB-C8
660750-906
2,1 x 75 mm, 5 µm

Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en H₂O
B: TFA al 0,1% en ACN

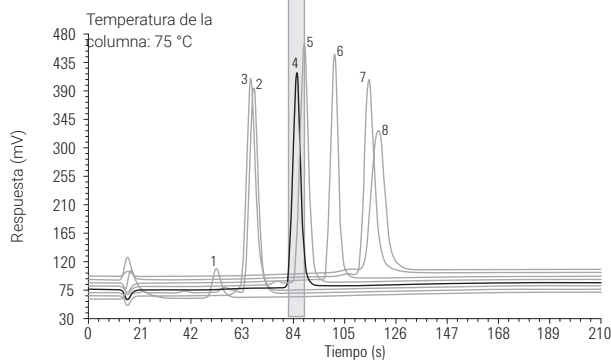
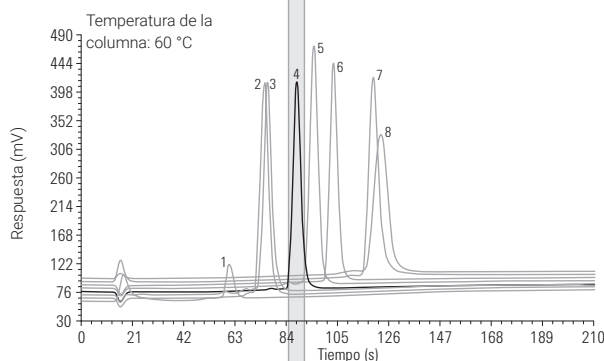
Flujo: 1,0 µl/min

Gradiente: 20-70 % B en 3 min

Detector: UV (214 nm)



1. Glicoproteína X (peso mol.: aprox. 22 kDa)
2. Proteína I (peso mol.: aprox. 4 kDa)
3. Glucagón (peso mol.: aprox. 3,5 kDa)
4. Insulina humana biosintética (peso mol.: aprox. 6 kDa)
5. Proteína J (peso mol.: aprox. 3 kDa)
6. Proteína K (peso mol.: aprox. 6 kDa)
7. Glicoproteína Y (peso mol.: aprox. 45 kDa)
8. Glicoproteína Z (peso mol.: aprox. 30 kDa)



Poroshell 300

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
Diámetro estrecho	2,1 x 75	5	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
MicroBore	1,0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
Capilar	0,5 x 75	5		5065-4468		
Cartucho precolumna, 4/paq.	2,1 x 12,5	5	821075-920	821075-918	821075-924	
Kit de hardware para precolumnas			820999-901	820999-901	820999-901	
Precolumna MicroBore, 3/paq.	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

AdvanceBio Peptide Mapping

- **Mayor fiabilidad analítica:** cada lote de medio AdvanceBio Peptide Mapping se somete a rigurosos ensayos con una mezcla de péptidos para garantizar su idoneidad y la reproducibilidad de los análisis, así como para permitir la identificación de los péptidos principales en mapas complejos de péptidos.
- **Ahorro de tiempo:** análisis entre dos y tres veces más rápidos que con columnas HPLC con partículas completamente porosas.
- **Mayor rendimiento de todos los instrumentos:** las columnas de 2,1, 3,0 y 4,6 mm de d.i. son estables hasta 600 bar, lo que le permitirá sacar el máximo partido a todos sus instrumentos UHPLC. También pueden ofrecer un excelente rendimiento en sus instrumentos antiguos de la serie 400.
- **Mayor flexibilidad:** mejore la sensibilidad del análisis por MS con fases móviles con ácido fórmico en cualquier sistema HPLC.



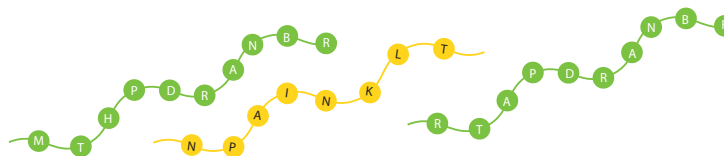
Estas avanzadas biocolumnas cuentan con partículas superficialmente porosas de 2,7 μm con un tamaño de poro de 120 Å. Se someten a rigurosos ensayos con una mezcla compleja de péptidos para garantizar un rendimiento fiable en las aplicaciones de mapeo de péptidos. Además, las columnas AdvanceBio Peptide Mapping ofrecen una resolución y una velocidad excepcionales para el análisis por UHPLC, además de unos excelentes resultados para la HPLC convencional.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Tamaño de poro	Límites de temp.	Rango de pH	
EC-C18	120 Å	60 °C	2,0-8,0	Doble

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

Recomendaciones y herramientas



¿Quiere conocer cómo usan los científicos las columnas AdvanceBio Peptide Mapping? Consulte las siguientes publicaciones:

Amano, M. *et al.* Detection of Histidine Oxidation in a Monoclonal Immunoglobulin gamma (IgG) 1 Antibody. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (15): 7536-7543.

Leah G. Luna y Katherine Coady. Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 2014, 5: 3.

Mapa de péptidos de alta resolución de una digestión de eritropoyetina

Columna: AdvanceBio Peptide Mapping

651750-902

2,1 x 250 mm, 2,7 µm

Fase móvil: A: H₂O + ácido fórmico al 0,1 % (v/v)

B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 % (v/v)

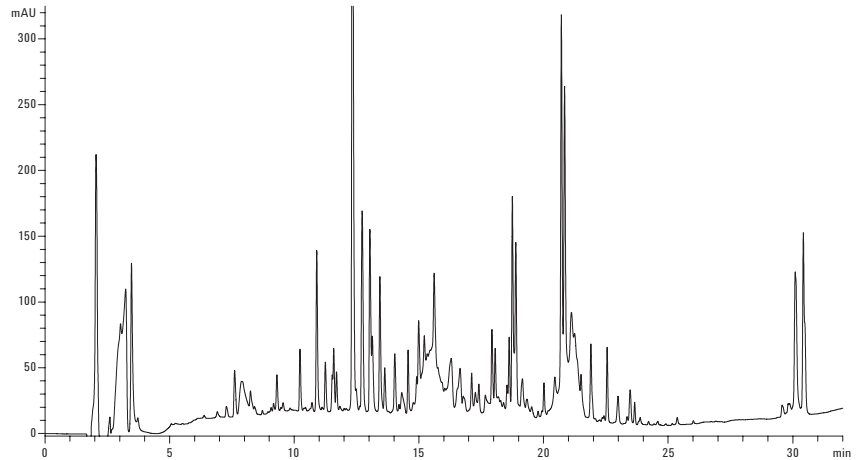
Flujo: 0,4 ml/min

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	3
28	45
33	60
34	95

Temperatura: 55 °C

Muestra: 5 µl (2 µg/µl)



Mapeo rápido y eficiente de péptidos de IgG

Columna: AdvanceBio Peptide Mapping

655750-902

2,1 x 100 mm, 2,7 µm

AdvanceBio Peptide Mapping

653750-902

2,1 x 150 mm, 2,7 µm

Fase móvil: A: H₂O + ácido fórmico al 0,1 % (v/v)

B: ACN al 90 % + ácido fórmico al 0,1 % (v/v)

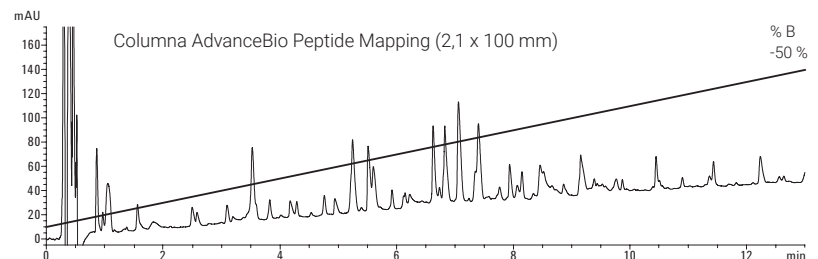
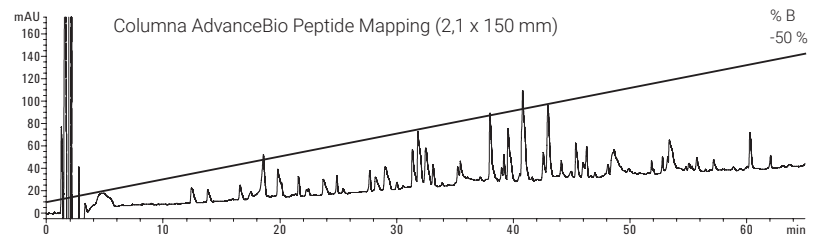
Flujo: Variable

Volumen de inyección: 15 µl

Temperatura: 40 °C

Detector: UV (215/220 nm)

Instrumento: Sistema LC 1290 Infinity y sistema LC/MS TOF de masa exacta 6530



Optimización de una columna AdvanceBio Peptide Mapping para conseguir un mapeo de péptidos más rápido. Gradiente: 10-40 % B. Detector de diodo array (DAD): 215 nm a 40 °C. La gráfica superior muestra una separación durante 75 min en una columna de 2,1 x 150 mm, en la que se generaron 59 picos de péptidos (flujo: 0,2 ml/min; 211 bar). La gráfica inferior muestra una separación optimizada de 14 min de duración en una columna de 2,1 x 100 mm, en la que se generaron 57 picos de péptidos (flujo: 0,6 ml/min; 433 bar).

Prueba de garantía de calidad con una mezcla de péptidos de Agilent

Columna: AdvanceBio Peptide Mapping
653750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm

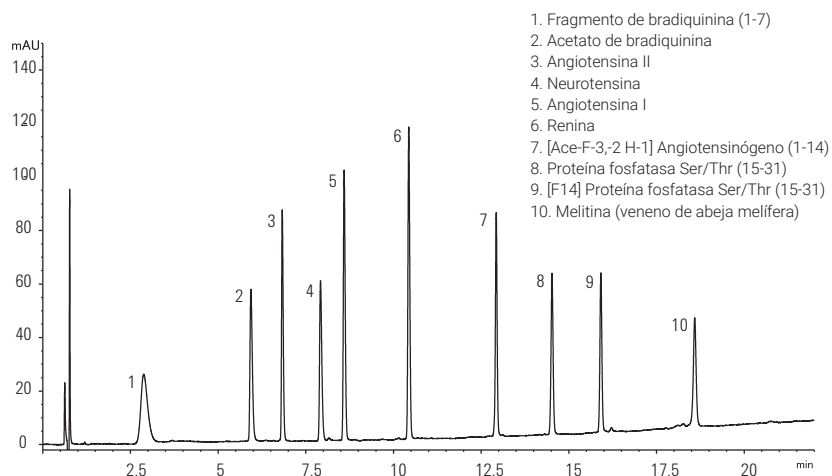
Flujo: 3 µl

Gradiente: A: H₂O (TFA al 0,1 %). B: ACN (TFA al 0,1 %). 0-25 min, 15-65 % B; 25-26 min, 65-95 % B

Temperatura: 55 °C

Detector: 220 nm

Muestra: Mezcla de patrones de mapeo de péptidos, 0,5-1,0 µg/µl de cada péptido (ref. 5190-0583)



Mezcla de test utilizada para todos los lotes de medio de mapeo de péptidos AdvanceBio. La mezcla contiene 10 péptidos hidrófilos, hidrofóbicos y básicos, con un peso molecular que va desde los 757 Da a los 2.845 Da. Todas las columnas también se han probado con una sonda de moléculas pequeñas para garantizar su eficiencia.



Historias reales de laboratorios

Resolución de un problema relacionado con las biocolumnas

Descubra cómo un director de laboratorio consiguió reducir drásticamente el tiempo de inactividad y mejorar la confianza de los usuarios.

www.agilent.com/chem/story25

Reproducibilidad entre lotes después de 200 inyecciones

Columna: AdvanceBio Peptide Mapping
651750-902
2,1 x 250 mm, 2,7 µm

Flujo: 0,5 ml/min

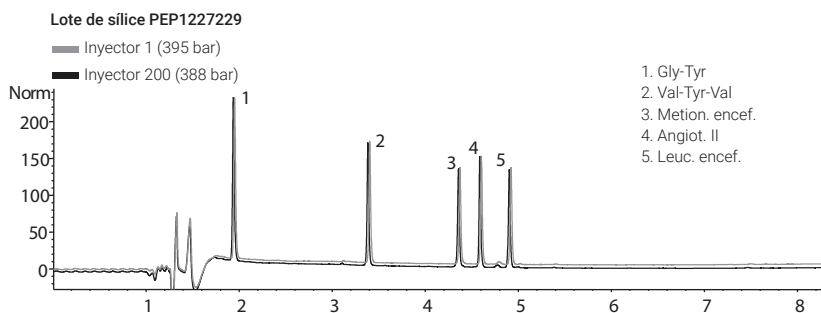
Inyección: 1 µl

Gradiente: A: H₂O (TFA al 0,1 %). B: ACN (TFA al 0,08 %). 0-8 min, 10-60 % B; 8,1-9 min, mantener 95 % B

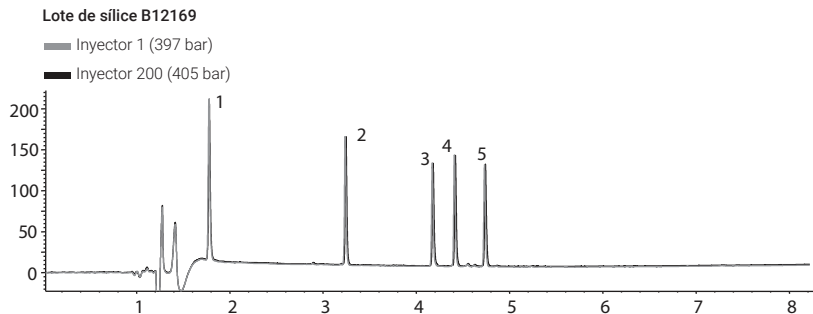
Temperatura: 55 °C

Detector: 220 nm

Muestra: Patrones de péptidos para HPLC de Sigma



Inyección	TR2 (min)	TR3 (min)	TR4 (min)	TR5 (min)
1	3,39	4,36	4,59	4,90
200	3,52	4,48	4,70	5,02
Inyección	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0,020	0,021	0,020	0,022
200	0,020	0,021	0,019	0,021



Inyección	TR2 (min)	TR3 (min)	TR4 (min)	TR5 (min)
1	3,36	4,29	4,52	4,85
200	3,24	4,18	4,41	4,74
Inyección	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0,019	0,020	0,019	0,020
200	0,019	0,020	0,019	0,020

Reproducibilidad excelente entre lotes y entre análisis. Se utilizó una columna AdvanceBio Peptide Mapping de 2,1 x 250 mm para obtener la máxima resolución.

AdvanceBio Peptide Mapping

Descripción	Referencia
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	653950-902
3,0 x 150 mm, 2,7 µm	653950-302
2,1 x 250 mm, 2,7 µm	651750-902
2,1 x 150 mm, 2,7 µm	653750-902
2,1 x 100 mm, 2,7 µm	655750-902
4,6 x 5 mm, precolumna rápida*	850750-911
3,0 x 5 mm, precolumna rápida*	853750-911
2,1 x 5 mm, precolumna rápida*	851725-911

* Las precolumnas rápidas prolongan la vida útil de las columnas sin retardar la separación ni afectar a la resolución.

Patrón de control de calidad de péptidos de Agilent

Utilice este patrón de control de calidad de Agilent con diez péptidos (el mismo patrón que Agilent usa para el control de calidad de sus columnas) para evaluar el rendimiento de su columna a lo largo de su vida útil. Puede utilizarse en sistemas HPLC o LC/MS. Aproximadamente 20 inyecciones por vial.

Patrón de control de calidad de péptidos de Agilent

Descripción	Referencia
Patrón de control de calidad de péptidos, 71 µg en un vial de 2 ml	5190-0583



Recomendaciones y herramientas

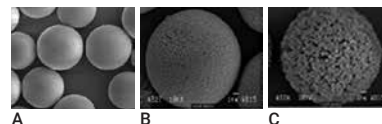
El mapeo de péptidos es una técnica de gran poder de resolución y la prueba de identificación más utilizada para las proteínas (en particular para aquellas de origen recombinante). Además de la selección de columnas, se deben tener en cuenta diversos aspectos para conseguir mapas de péptidos reproducibles y precisos, como la digestión de las proteínas, la preparación de muestras, la optimización de los métodos, etc. Para conocer las técnicas fundamentales que se utilizan en los procedimientos de mapeo de péptidos y las consideraciones oportunas para optimizar las separaciones de mapeo de péptidos, consulte el documento *Claves para conseguir caracterizaciones de péptidos óptimas: una guía práctica de mapa de péptidos* (n.º de publicación **5991-2348ES**).

www.agilent.com/search

Columnas PLRP-S

- Partículas de polímero duraderas y flexibles que ofrecen resultados reproducibles y una extensa vida útil.
- Estabilidad térmica y química.
- Conformidad con los requisitos de la categoría L21 de la USP.
- Uso en diversos sectores: biociencia, química, investigación clínica, energía, medio ambiente, alimentación y agricultura, ciencia de materiales e industria farmacéutica.
- Tamaños de poro (de 100 a 4.000 Å) que permiten realizar separaciones de todo tipo, desde moléculas pequeñas hasta complejos y polinucleótidos de gran tamaño.

La familia de columnas PLRP-S incluye distintos tamaños de poro y de partícula, todos ellos con fases químicas y características fundamentales de adsorción idénticas. Las partículas tienen un carácter hidrofóbico intrínseco, lo que hace que no se requieran fases ligadas o ligandos alquílicos para las separaciones de fase reversa. Esto consigue un material altamente reproducible que no contiene silanoles ni iones de metales pesados. Las columnas de esta amplia gama de productos son adecuadas para microseparaciones (incluidas las de proteómica de abajo arriba y de arriba abajo), separaciones analíticas y purificaciones preparativas. Además, las columnas de proceso se pueden empaquetar con medio a granel.



Imágenes de partículas de 10 µm de columnas PLRP-S obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

La diferencia de tamaño de los poros puede apreciarse con claridad.

A: poro pequeño (100 Å).

B: poro grande (300 Å).

C: macroporo (4.000 Å).

Especificaciones de las columnas

Rango de pH	1-14
Contenido de tampón	Ilimitado
Modificador orgánico	1-100 %
Límites de temperatura	200 °C
Presión máxima	3 µm: 275 bar (4.000 psi)
	5, 8 y 10 µm: 207 bar (3000 psi)
	10-15, 15-20 y 30 µm: 103 bar (1500 psi)

Aplicaciones de las columnas PLRP-S

Tamaño de poro	Aplicación
100 Å	Moléculas pequeñas y síntesis
300 Å	Péptidos y proteínas recombinantes
1000 Å	Proteínas grandes
4000 Å	ADN y separaciones de alta velocidad

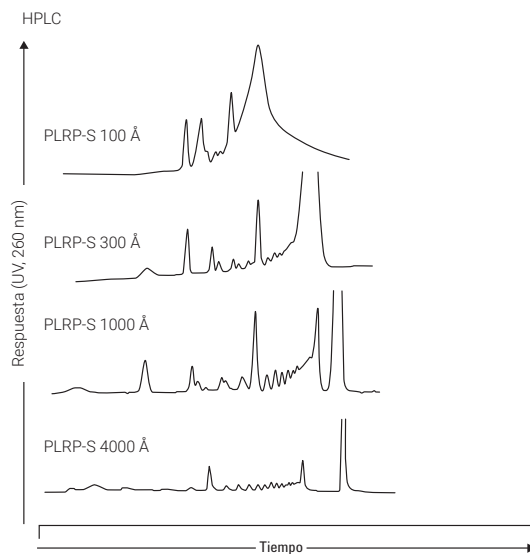
Análisis por HPLC de una escalera de ADN de 25 pb

Columna: PLRP-S, 2,1 x 150 mm

Fase móvil: A: TEAA 100 mM
B: TEAA 100 mM en agua y ACN (50:50)

Flujo: 200 µl/min

Gradiente: 12,5-50% B en 150 min



Polietilenglicoles

Columna: PLRP-S 100 Å
PL1111-3500
4,6 x 150 mm, 5 µm

Fase móvil: A: H₂O
B: ACN

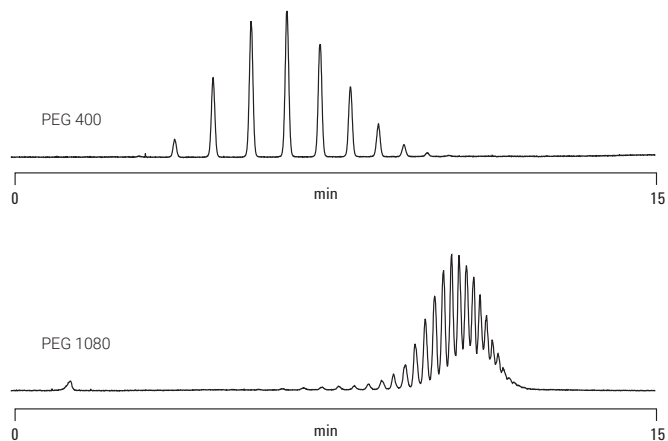
Flujo: 1 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Gradiente: 10-30 % B en 12 min; 30 % B mantenido durante 3 min

Detector: ELS (neb. = 50 °C; evap. = 70 °C; gas = 1,6 SLM)

Conc. muestra: 1 mg/ml



Explotación de la estabilidad química: concentración de ácido trifluoroacético (TFA)

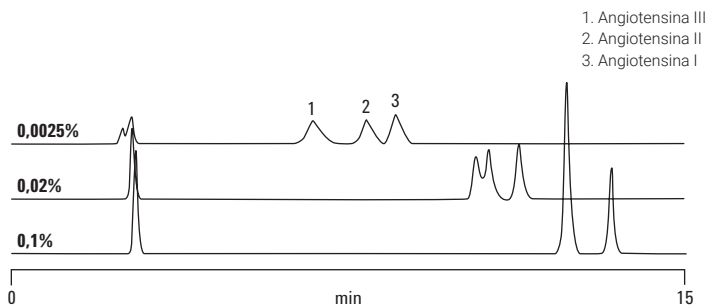
Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Fase móvil: A: TFA (distintos %) en agua
B: TFA (distintos %) en acetonitrilo

Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: Lineal, 12-40 % B en 15 min

Detector: ELS (neb. = 75 °C; evap. = 85 °C; gas = 1,0 SLM)



Explotación de la estabilidad química: concentración de NH₄OH

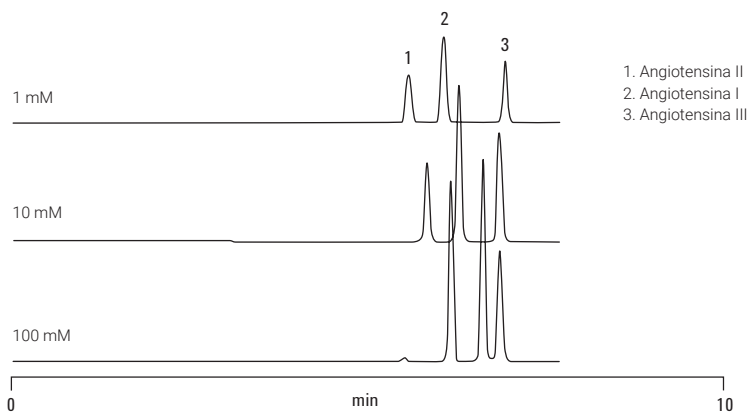
Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Fase móvil: A: NH₄OH (distintos valores en mM) en agua
B: NH₄OH (distintos valores en mM) en acetonitrilo

Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: Lineal, 10-100 % B en 15 min

Detector: ELS (neb. = 80 °C; evap. = 85 °C; gas = 1,0 SLM)



Mezcla de test del Alberta Peptide Institute

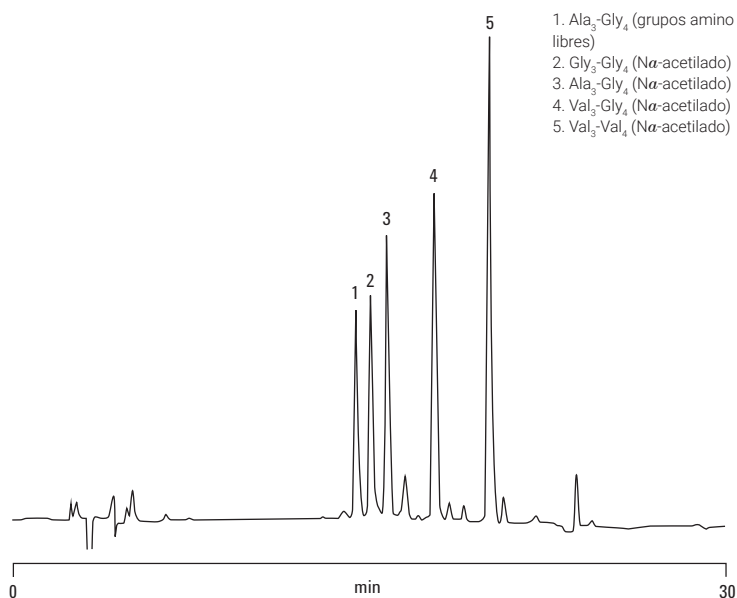
Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en agua y acetonitrilo (99:1)
B: TFA al 0,1 % en agua y acetonitrilo (70:30)

Flujo: 1 ml/min

Gradiente: 0-100 % B en 30 min

Detector: UV (220 nm)



Proteínas de suero en muestras de productos lácteos (leche)

Columna: PLRP-S 300 Å
PL1512-3801
4,6 x 150 mm, 8 µm

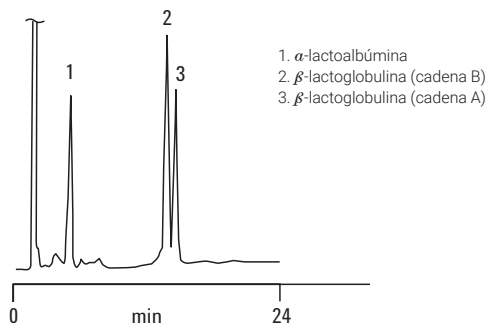
Fase móvil: A: TFA al 0,1 % en agua y acetonitrilo (99:1)
B: TFA al 0,1 % en agua y acetonitrilo (1:99)

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Gradiente: 36-48 % B, 0-24 min; 48-100 % B, 24-30 min;
100 % B, 30-35 min; 100-36 % B, 35-40 min

Detector: UV (220 nm)



Uso de la temperatura como herramienta para mejorar la transferencia de masa y la resolución de los oligonucleótidos en la HPLC en fase reversa mediante par iónico

Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4,6 x 50 mm, 3 µm

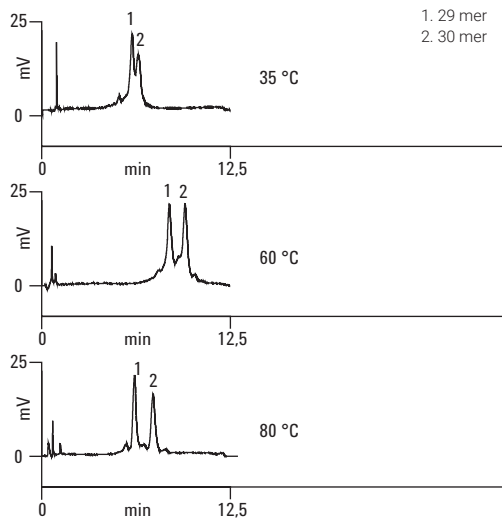
Fase móvil: A: TEAA 100 mM
B: TEAA 100 mM en acetonitrilo al 25 %

Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: Cambio del 5 % en el tampón B durante 5 min

Temperatura: 35, 60 u 80 °C

Detector: UV (254 nm)



Proteínas fibrosas grandes

Columna: PLRP-S 300 Å
PL1512-3801
4,6 x 150 mm, 8 µm

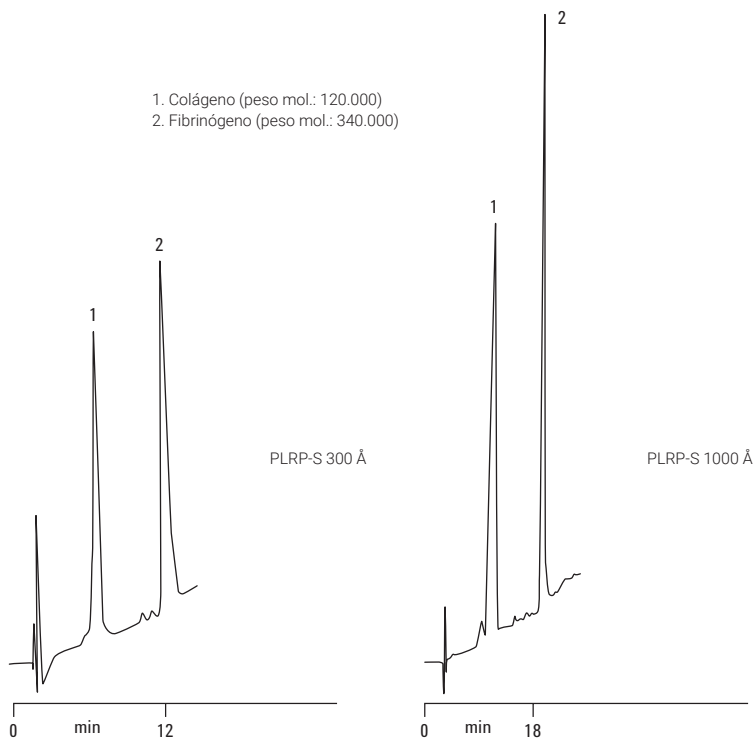
Fase móvil: A: TFA al 0,25% en agua
B: TFA al 0,25 % en agua y acetonitrilo (5:95)

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Gradiente: 20-60% B en 15 min

Detector: UV (220 nm)



Columnas PLRP-S para HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
4,6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801	PL1512-5802	
4,6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801	PL1512-3802	PL1512-3803
4,6 x 50	8		PL1512-1801	PL1512-1802	PL1512-1803
4,6 x 250	5	PL1512-5500	PL1512-5501		
4,6 x 150	5	PL1111-3500	PL1512-3501		
4,6 x 50	5	PL1512-1500	PL1512-1501	PL1512-1502	PL1512-1503
4,6 x 150	3	PL1512-3300	PL1512-3301		
4,6 x 50	3	PL1512-1300	PL1512-1301		
2,1 x 250	8		PL1912-5801		
2,1 x 150	8		PL1912-3801	PL1912-3802	PL1912-3803
2,1 x 50	8		PL1912-1801	PL1912-1802	PL1912-1803
2,1 x 250	5	PL1912-5500	PL1912-5501		
2,1 x 150	5	PL1912-3500	PL1912-3501		
2,1 x 50	5	PL1912-1500	PL1912-1501	PL1912-1502	PL1912-1503
2,1 x 150	3	PL1912-3300	PL1912-3301		
2,1 x 50	3	PL1912-1300	PL1912-1301		
1,0 x 50	8			PL1312-1802	
1,0 x 50	5	PL1312-1500		PL1312-1502	
1,0 x 10	5			PL1C12-2502	
1,0 x 150	3	PL1312-3300			
1,0 x 50	3	PL1312-1300			
Cartuchos precolumna PLRP-S para cartuchos de 3,0 x 5,0 mm, 2/paq.		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
Soporte para cartucho precolumna para cartuchos de 3,0 x 5,0 mm		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

Recomendaciones y herramientas

Para obtener información para pedidos de columnas MicroBore, vaya a la **página 169**.

Para obtener información para pedidos de medios y columnas preparativas y de proceso PLRP-S, vaya a la **página 182**.

AdvanceBio Desalting-RP

Desalinización en fase reversa para la eliminación en línea de iones salinos antes de la detección por MS

Las técnicas de cromatografía por afinidad, de intercambio iónico y de exclusión por tamaño se suelen usar para el análisis de proteínas como los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, estas técnicas requieren utilizar fases móviles acuosas que contienen sales no volátiles.

Dichas sales no volátiles constituyen un problema si se usa un detector MS, ya que pueden provocar supresión de la señal y contaminar el detector por deposición salina, incrementando las necesidades de mantenimiento y los tiempos de inactividad del instrumento. Los cartuchos AdvanceBio Desalting-RP resuelven este problema y posibilitan una eliminación en línea rápida y eficiente de los iones salinos antes de que lleguen al detector MS. Estas columnas de cartucho se pueden utilizar por sí solas en cualquier sistema LC para desalinizar las fracciones recogidas, o bien en un sistema LC-2D 1290 Infinity II como una segunda dimensión de desalinización después de la primera dimensión de separación.



Columna AdvanceBio Desalting-RP
(ref. PL1612-1102) y soporte para cartucho
(ref. 820999-901)

AdvanceBio Desalting-RP

Descripción	Referencia
AdvanceBio Desalting-RP, 2,1 x 12,5 mm, 2/paq.	PL1612-1102
Soporte para cartucho	820999-901

AdvanceBio Oligonucleotide

Para poder separar con éxito oligonucleótidos desprotegidos sin tritilo es necesario utilizar columnas con alto poder de resolución y lo suficientemente robustas como para soportar condiciones exigentes.

Las columnas Agilent AdvanceBio Oligonucleotide cuentan con partículas Poroshell superficialmente porosas de 2,7 µm y alta eficiencia. Mediante el uso de tecnología exclusiva de Agilent, las partículas se modifican químicamente para conferirles una excepcional resistencia a las fases móviles con pH alto. También se ligan con una fase C18 desactivada que ofrece una excelente selectividad para los oligonucleótidos. Además, cada lote de medio AdvanceBio Oligonucleotide se somete a ensayos con un patrón de resolución para garantizar un rendimiento uniforme.

Los productos de la familia AdvanceBio están diseñados para ofrecer un rendimiento excepcional y uniforme para la caracterización completa de proteínas, anticuerpos, conjugados, nuevas entidades biológicas y productos biofarmacéuticos.



Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Tamaño de partícula	Tamaño de poro	Límite de temp.	Rango de pH	Desactivación	Límite de presión
C18	2,7 µm	100 Å	65 °C	3,0-11,0	Doble	600 bar

Columna: AdvanceBio Oligonucleotide
2,1 x 50 mm
(ref. 659750-702)

Fase móvil: A: HFIP 400 mM y TEA 15 mM en agua
B: Metanol y fase móvil A (50:50)

Flujo: 0,4 ml/min

Gradiente: 30-40 % B en 0,5 min; 40-70 % B en 5 min

Muestra: ADN de 25 mer

Temperatura: 65 °C

Detección: UV a 260 nm

Detección: MS

Valor mín. del rango: m/z = 400

Valor máx. del rango: m/z = 1.700

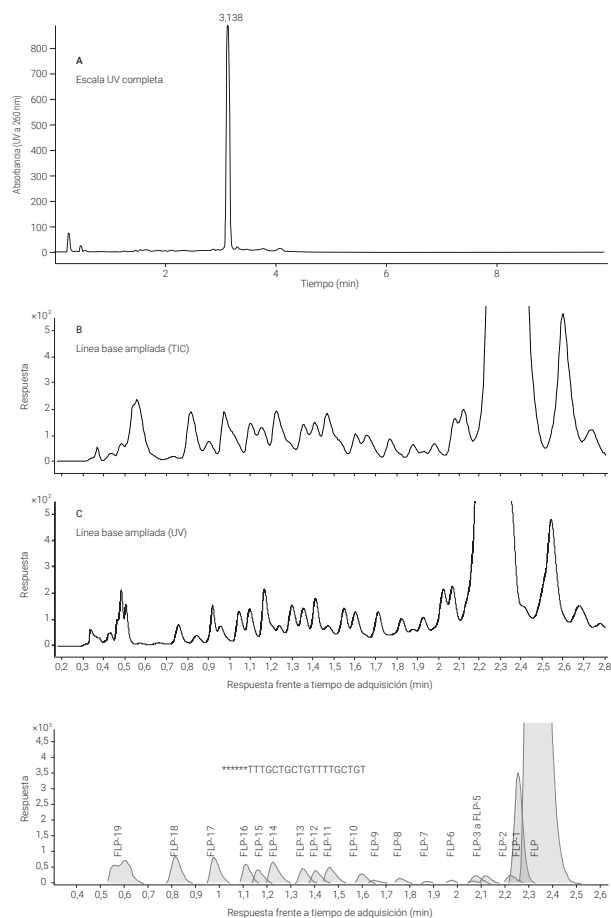
Velocidad de barrido: 3,00 espectros/segundo

Polaridad de iones: -ve

Vcap: 3.500

Tensión de la boquilla: 1.000 V

Fragmentador: 200



Datos deconvolucionados de un análisis por TIC de oligonucleótidos de ADN de 25 mer separados con una columna AdvanceBio Oligonucleotide.

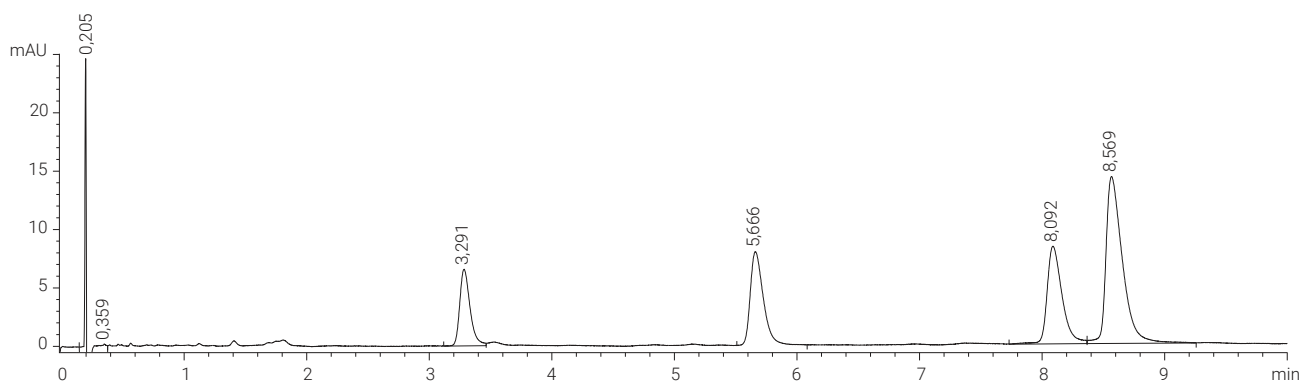
AdvanceBio Oligonucleotide

Descripción	Diám. int. (mm)	Longitud (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
Convencional	2,1	150	2,7	653750-702
Convencional	2,1	100	2,7	655750-702
Convencional	2,1	50	2,7	659750-702
Precolumna UG (600 bar)	2,1	5	2,7	821725-921
Convencional	4,6	150	2,7	653950-702
Convencional	4,6	100	2,7	655950-702
Convencional	4,6	50	2,7	659950-702
Precolumna UG (600 bar)	4,6	5	2,7	820750-921

Patrones AdvanceBio Oligonucleotide

Para asegurar el rendimiento de sus separaciones, cada lote de medio AdvanceBio Oligonucleotide se comprueba con el patrón de resolución de oligonucleótidos de Agilent. El patrón de resolución de oligonucleótidos contiene oligonucleótidos sintéticos de 14, 17, 20 y 21 mer, y está diseñado para demostrar una resolución N/N-1.

Columna:	AdvanceBio Oligonucleotide 2,1 x 50 mm (ref. 659750-702)	Flujo:	0,6 ml/min
		Muestra:	Patrón de resolución de oligonucleótidos de Agilent (ref. 5190-9028)
Fase móvil:	A: TEAA 100 mM en agua B: TEAA 100 mM en acetonitrilo	Temperatura:	65 °C
Gradiente:	6-8 % B en 12 min	Inyección:	0,5 µl
Tiempo de parada:	13 min	Detección:	UV a 260 nm
Tiempo posterior al análisis:	5 min		



Además, Agilent ofrece un patrón escalera de oligonucleótidos con oligodeoxitimidinas sintéticas de 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mer, una herramienta excelente para verificar la selectividad y reproducibilidad de las columnas.

Columna: AdvanceBio Oligonucleotide
2,1 x 50 mm
(ref. 659750-702)

Flujo: 0,6 ml/min

Temperatura
de la columna: 65 °C

Fase móvil: A: TEAA 100 mM en agua
B: TEAA 100 mM en acetonitrilo

Muestra: Patrón escalera de oligonucleótidos de Agilent
(ref. 5190-9029)

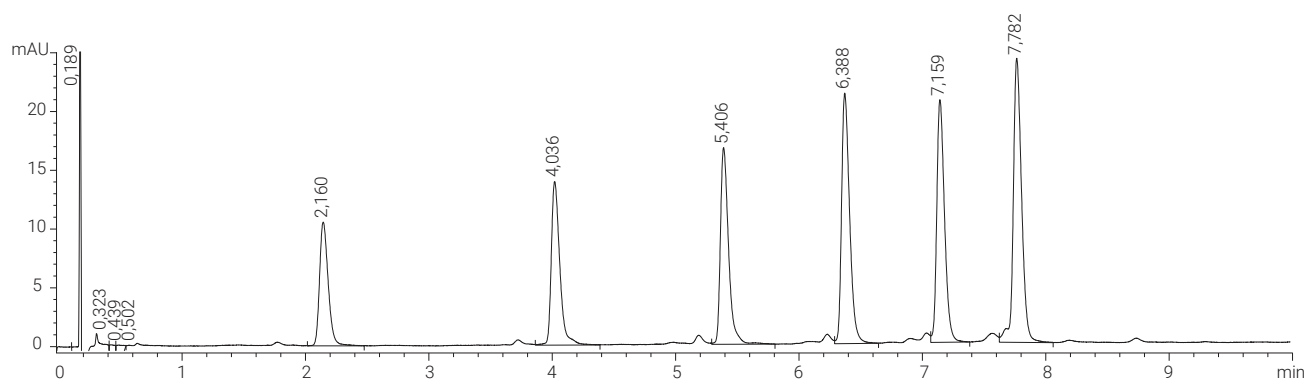
Gradiente: 10-14 % B en 10 min

Inyección: 10 µl

Tiempo de parada: 11 min

Detección: UV a 260 nm

Tiempo posterior
al análisis: 5 min

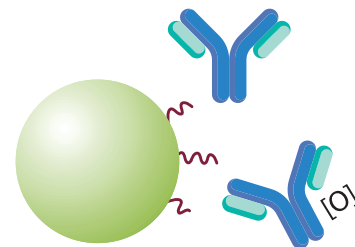


Patrones AdvanceBio Oligonucleotide

Descripción	Referencia
Patrón de resolución de oligonucleótidos	5190-9028
Patrón escalera de oligonucleótidos	5190-9029

Análisis de proteínas intactas por cromatografía de interacción hidrofóbica

AdvanceBio HIC



Las columnas AdvanceBio HIC permiten realizar separaciones robustas, reproducibles y de alta resolución de proteínas nativas e intactas.

Estas columnas, fabricadas aprovechando las capacidades de las partículas ZORBAX completamente porosas y la tecnología patentada de enlace, ofrecen nuevos niveles de hidrofobicidad y una fase química única y versátil que permite analizar moléculas especialmente complejas, como anticuerpos monoclonales (mAb), conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) y otras proteínas recombinantes.

Las columnas AdvanceBio HIC, combinadas con el sistema LC bioinerte 1260 Infinity II, ofrecen un rendimiento y una uniformidad de los datos excelentes durante la caracterización y la validación.

- Selectividad optimizada: son idóneas para determinar la oxidación de anticuerpos monoclonales y las relaciones fármaco-anticuerpo de los ADC.
- Fase química única: evita tener que llevar a cabo un cribado con varias columnas para diferentes atributos de calidad críticos.
- Mayor robustez: vida útil más extensa de la columna y confianza extraordinaria en los datos.
- Rendimiento comprobado: cada lote de medio se somete a pruebas con un patrón de anticuerpos monoclonales del NIST.
- Excelente calidad: cada columna se somete a pruebas para garantizar que el empaquetado sea eficiente.
- Mayor productividad: las columnas cortas reducen el tiempo de análisis y mantienen el rendimiento de separación.

Especificaciones de las columnas

Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Límite de temperatura	Rango de pH	Límite de presión	Flujo*
450 Å	3,5 µm	60 °C (a pH = 7)	2,0-8,0 (a 35 °C)	400 bar (presión operativa típica < 200 bar)	0,5-1,0 ml/min (4,6 mm de d.i.)

* En algunos casos, reducir el flujo a 0,3 ml/min y alargar el tiempo de gradiente puede aumentar aún más la resolución.

Columna: AdvanceBio HIC
4,6 x 100 mm, 3,5 µm

Eluyente A: Sulfato de amonio 2 M y fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0

Eluyente B: Fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0

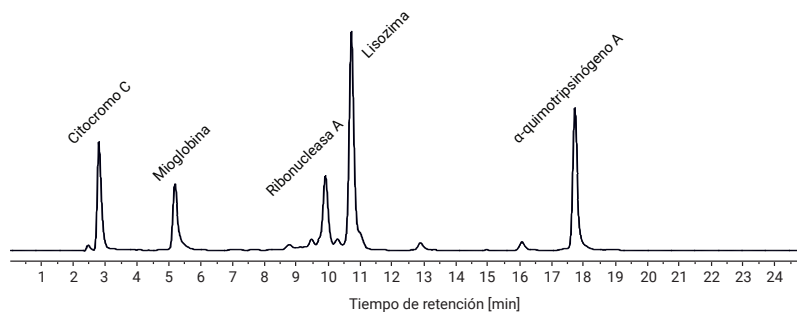
Gradiente:	Tiempo (min)	% A	% B
	0	100	0
	20	0	100
	25	0	100
	30	100	0
	40	100	0

Flujo: 0,5 ml/min

Temperatura: 30 °C

Volumen de inyección: 5 µl

Detección: UV (220 nm)



Columna: AdvanceBio HIC
4,6 x 100 mm, 3,5 µm

Eluyente A: Sulfato de amonio 2 M y fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0

Eluyente B: Fosfato de sodio 50 mM, pH = 7,0

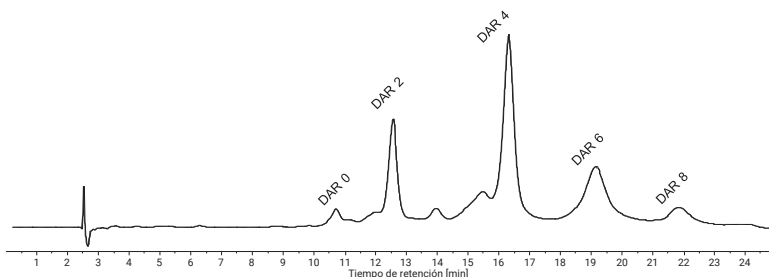
Gradiente:	Tiempo (min)	% A	% B	% C
	0	50	45	5
	20	0	75	25
	25	0	75	25
	30	50	45	5
	40	50	45	5

Flujo: 0,5 ml/min

Temperatura: 30 °C

Volumen de inyección: 5 µl

Detección: UV (220 nm)



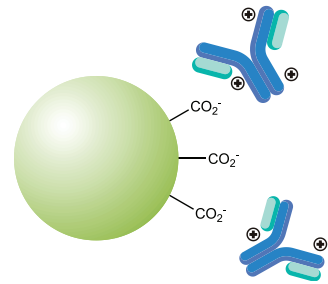
Columnas HIC Agilent AdvanceBio

Descripción	Referencia
HIC AdvanceBio, 4,6 x 100 mm, 450 Å, 3,5 µm	685975-908
HIC AdvanceBio, 4,6 x 30 mm, 450 Å, 3,5 µm	681975-908

Análisis de variantes cargadas

Purificación de proteínas y otras moléculas cargadas

La cromatografía de intercambio iónico (IEX) es una técnica de alta sensibilidad que permite separar iones y moléculas polares en función de su carga. Al igual que la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), la IEX se puede usar para separar proteínas en su estado nativo.



Aplicación de la IEX al análisis de variantes cargadas

Durante la producción y la purificación, los anticuerpos pueden sufrir cambios de heterogeneidad de la carga, provocados por sustituciones de aminoácidos, glicosilación, fosforilación y otras modificaciones químicas o postranslacionales. El análisis de la heterogeneidad de la carga en las preparaciones de anticuerpos monoclonales (mAb) es fundamental para la fabricación de biofármacos, ya que estos cambios pueden afectar a la estabilidad y la actividad, o provocar reacciones inmunológicamente adversas.

En el análisis de proteínas, las variaciones de carga a un pH específico indican un cambio en la estructura molecular primaria, que genera formas adicionales de la proteína en cuestión. Estas formas reciben el nombre de isoformas (o variantes cargadas) y pueden resolverse mediante cromatografía IEX. La IEX también resulta útil como técnica preparativa.

El análisis de las variantes cargadas es esencial para los biofármacos, ya que estos cambios pueden afectar a su estabilidad y actividad, o provocar reacciones inmunológicamente adversas.

Como proveedor líder de la industria biofarmacéutica, Agilent entiende que la calidad y la uniformidad son fundamentales para poder ofrecer productos terapéuticos seguros y muy eficaces. Las columnas Agilent BioHPLC de intercambio iónico ofrecen la rapidez, la resolución y la reproducibilidad que busca para hacer llegar productos que pueden cambiar vidas a las personas que los necesitan, de forma rápida y asequible.

En las páginas siguientes se describe la familia de columnas de intercambio iónico (aniónico y catiónico) débil y fuerte de Agilent.

- Las columnas Bio IEX no porosas están diseñadas para conseguir separaciones de alta resolución, eficiencia y recuperación.
- Las columnas Bio MAb están optimizadas para separar isoformas cargadas de anticuerpos monoclonales.
- Las columnas IEX porosas (PL-SAX y PL-SCX) son químicamente estables y están disponibles con dos tamaños de poro, lo que posibilita separar péptidos, oligonucleótidos y proteínas de gran tamaño.
- Las columnas Bio-Monolith IEX son idóneas para la separación de anticuerpos, virus y ADN.
- El software Buffer Advisor es una solución perfecta para automatizar la separación de proteínas mediante gradientes de fuerza iónica.

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre el software Agilent Buffer Advisor, consulte la publicación **5991-1408EN**.

www.agilent.com/search

Selección de columnas de intercambio iónico

Aplicación	Columnas Agilent	Notas
Anticuerpos monoclonales	Bio MAb	Caracterización exhaustiva de anticuerpos monoclonales, incluidas la identificación y la monitorización de isoformas ácidas y básicas. Las columnas Bio MAb para HPLC cuentan con una exclusiva resina, diseñada específicamente para separar variantes cargadas de anticuerpos monoclonales con una alta resolución.
Péptidos y proteínas	Bio IEX	Las columnas Bio IEX tienen un empaquetado de partículas poliméricas y no porosas de intercambio iónico. Están diseñadas para conseguir separaciones de alta resolución, recuperación y eficiencia.
Proteínas, péptidos y oligonucleótidos sintéticos desprotegidos	PL-SAX	La capacidad de intercambio aniónico fuerte gracias al enlace covalente con un polímero químicamente estable y completamente poroso amplía el rango de pH operativo. Además, la capacidad de intercambio aniónico no depende del pH. Para los oligonucleótidos sintéticos, existe la posibilidad de llevar a cabo separaciones en condiciones de desnaturalización por temperatura, disolvente orgánico y pH alto. El medio de 5 µm consigue separaciones de alta resolución, mientras que el medio de 30 µm se utiliza para la cromatografía de líquidos a presiones intermedias.
	• 1000 Å • 4000 Å	
Proteínas globulares y péptidos	PL-SAX 1.000 Å	
Biomoléculas muy grandes/análisis de alta velocidad	PL-SAX 4000 Å	
Desde péptidos pequeños hasta proteínas grandes y biomoléculas muy grandes	PL-SCX	Las columnas PL-SCX tienen una matriz macroporosa de PS/DVB con un revestimiento marcadamente hidrofílico y cuentan con capacidad de intercambio catiónico fuerte. El proceso se controla para conseguir una densidad óptima de grupos de intercambio catiónico fuerte para el análisis, la separación y la purificación de una amplia variedad de biomoléculas. El medio de 5 µm consigue separaciones de mayor resolución, mientras que el medio de 30 µm se utiliza para la cromatografía de líquidos a presiones intermedias.
	• 1000 Å • 4000 Å	
Anticuerpos (IgG e IgM), plásmidos de ADN, virus, fagos y otras macrobiomoléculas	Bio-Monolith	Fases de intercambio catiónico fuerte e intercambio aniónico fuerte y débil. Bio-Monolith columnas HPLC son compatibles con los instrumentos LC serie InfinityLab.
	• Bio-Monolith QA • Bio-Monolith DEAE • Bio-Monolith SO ₃	
Virus, ADN y proteínas grandes	Bio-Monolith QA	
Plásmidos de ADN y bacteriófagos	Bio-Monolith DEAE	
Proteínas y anticuerpos	Bio-Monolith SO ₃	

Columnas Bio MAb para HPLC

- Soporte empaquetado compuesto por microesferas rígidas no porosas de un copolímero de poliestireno y divinilbenceno (PS/DVB) muy reticulado.
- Partículas revestidas con una capa polimérica hidrófila, lo que elimina casi por completo la unión inespecífica de proteínas de anticuerpos.
- Uso de un proceso diferente para revestir la fase de intercambio catiónico débil, que hace que tenga mayor densidad que las partículas de las columnas Bio WCX.
- Diseño específico para la separación de isoformas cargadas de anticuerpos monoclonales.

La caracterización exhaustiva de los anticuerpos monoclonales exige la identificación y la monitorización de las isoformas ácidas y básicas. Las columnas Bio MAb para HPLC cuentan con una exclusiva resina, diseñada específicamente para conseguir separaciones de alta resolución de variantes cargadas de anticuerpos monoclonales. Estas columnas son compatibles con el uso de disoluciones acuosas como tampones, acetonitrilo/acetona/metanol y mezclas acuosas. Los tampones más utilizados son fosfato, tris, MES y acetato.

Las columnas Bio MAb están disponibles en tamaños de 1,7, 3, 5 y 10 µm; las partículas de menor tamaño ofrecen mayor resolución.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Diám. int.	Tamaño de partícula	Estabilidad de pH	Límite de temperatura operativa	Flujo
Intercambio catiónico débil (carboxilato)	2,1 y 4,6 mm	1,7, 3, 5 y 10 µm	2-12	80 °C	0,1-1 ml/min

Recomendaciones y herramientas

¿Quiere mejorar la productividad del análisis de variantes cargadas de anticuerpos monoclonales? En ese caso, consulte el siguiente documento:

Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies
(n.º de publicación **5991-4722EN**)

www.agilent.com/search



Separación uniforme de anticuerpos monoclonales por intercambio iónico

Columna: Bio Mab, PEEK

5190-2407

4,6 x 250 mm, 5 µm

Detector: UV (225 nm)

Fase móvil: A: fosfato de sodio 10 mM, pH = 5,5

B: A + cloruro sódico 0,5 M

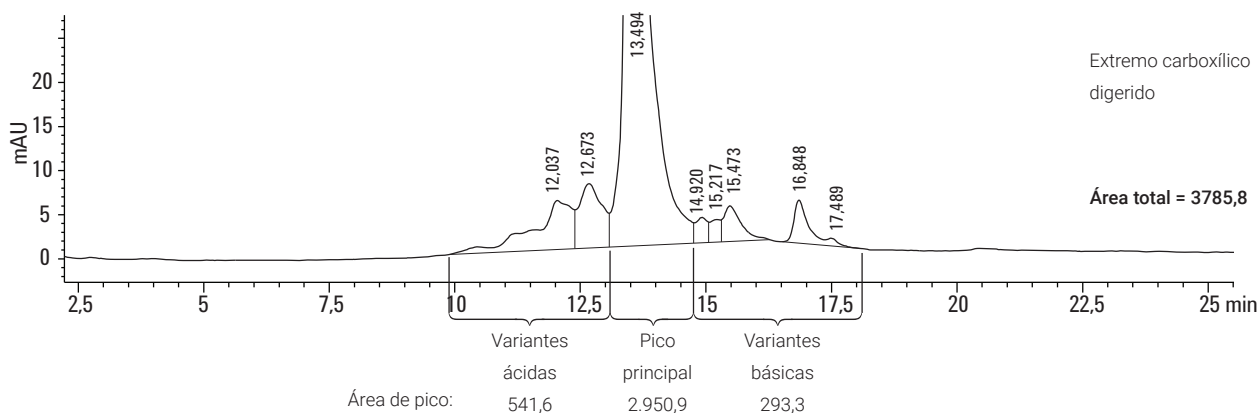
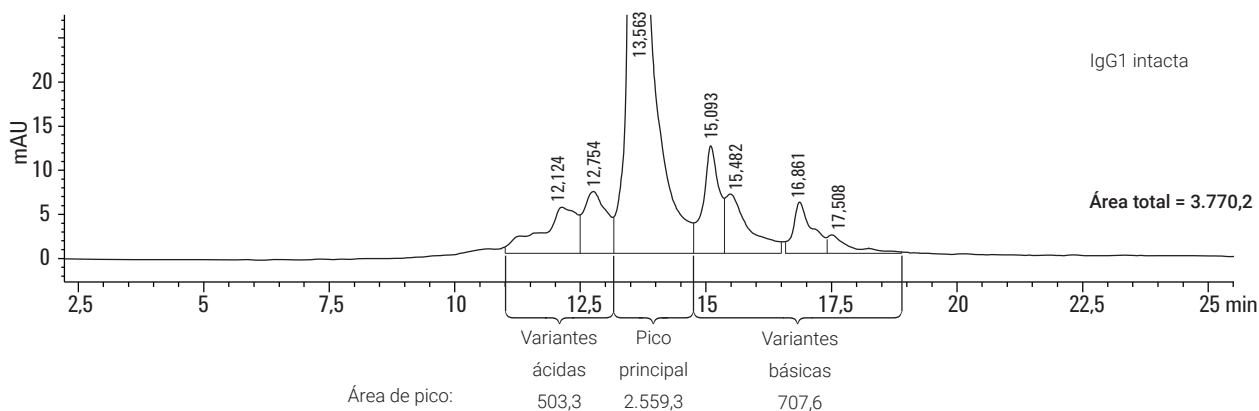
Muestra: 5 µg de 1 mg/ml de IgG1 intacta o digerida en el extremo carboxílico

Flujo: 0,85 ml/min

Instrumento: Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity o

Gradiente: 10-35 % B de 0 a 25 minutos
(salvo que se especifique lo contrario)

sistema LC serie 1100



Cálculo de IgG1 digerida en el extremo carboxílico utilizando una columna Bio Mab de 5 µm y el sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity.

Reproducibilidad y precisión: las columnas Bio MAb proporcionan métodos robustos para una cuantificación precisa

Columna: Bio MAb, PEEK

5190-2407

4,6 x 50 mm, 5 µm

Fase móvil: A: tampón fosfato sódico 10 mM, pH = 6,0
B: tampón bicarbonato sódico 10 mM, pH = 9,5

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl (aguja con lavado, puerto de lavado activo durante 7 s)

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	0
25	100
27	100
30	0

Adquisición de datos: 214 y 280 nm

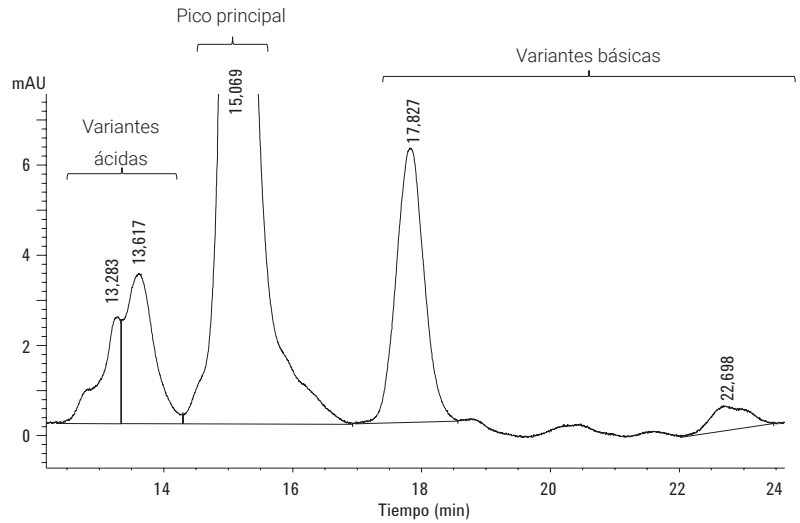
Velocidad de adquisición: 20 Hz

Celda de flujo: Paso de 60 mm

Temperatura de la columna: 30 °C

Termostato de muestra: 50 °C

Tiempo posterior: 5 min



Separación de fragmentos de las regiones Fab y Fc del trastuzumab por WCX

Columna: Bio MAb, PEEK

5190-2411

2,1 x 250 mm, 5 µm

Fase móvil: A: MES 20 mM, pH = 5,6
B: MES 20 mM, pH = 5,6 + NaCl 300 M

Flujo: 170 µl/min

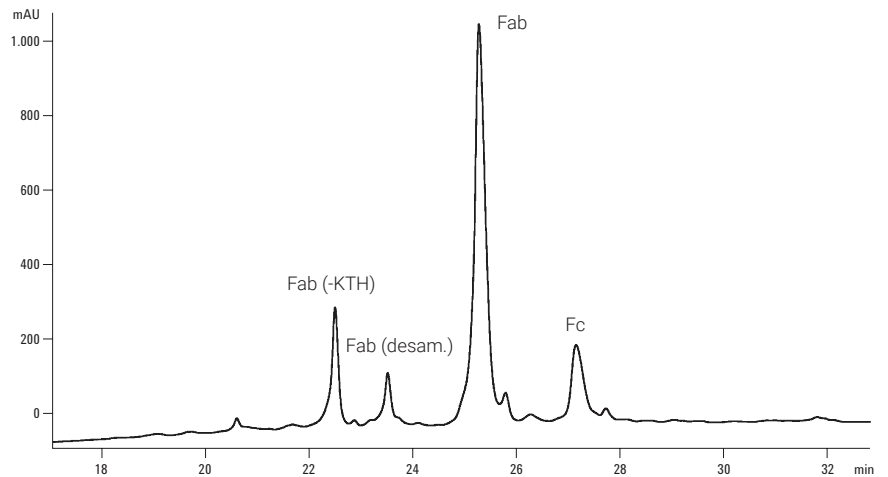
Volumen de inyección: 16 µl

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0	0
39,5	80
40	100
50	100
50,5	2
60	2

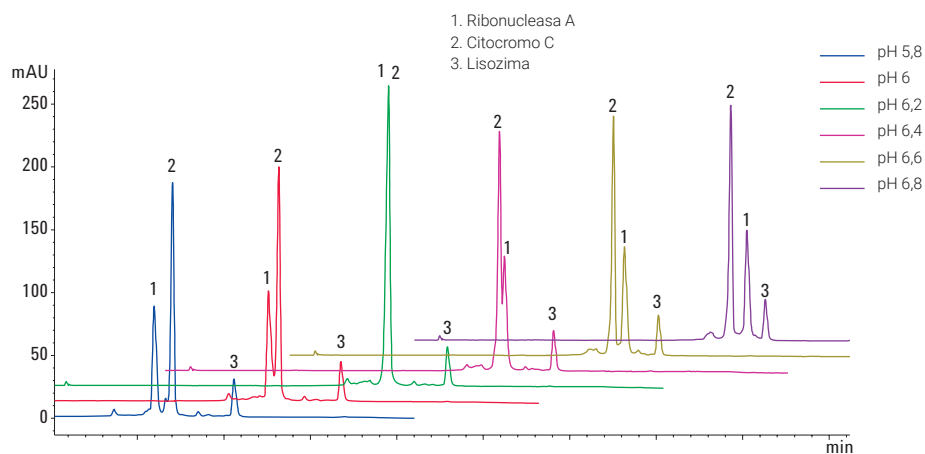
Temperatura: 30 °C

Instrumento: Serie 1100



Desarrollo de métodos con el software Buffer Advisor: determinación del pH óptimo

Columna:	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4,6 x 250 mm, 5 µm		
Instrumento:	Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity	Gradiente:	0 min: NaCl 20 mM 5 min: NaCl 20 mM 30 min: NaCl 500 mM 35 min: NaCl 1.000 mM 36 min: NaCl 20 mM
Tampón:	A: H ₂ O B: NaCl 3 M C: ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico monohidrato (MES) 60 mM D: 2-N-morfolinoetanosulfonato de sodio (MES-Na) 35 mM	Volumen de inyección:	10 µl
Muestra:	Mezcla de tres proteínas disueltas en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH = 7,4 Ribonucleasa A: 13.700 Da, pI = 9,6 Citocromo C: 12.384 Da, pI = 10-10,5 Lisozima: 14.307 Da, pI = 11,35	Termostato:	4 °C
Flujo:	1 ml/min	Temperatura del TCC:	25 °C
		DAD:	280 nm/4 nm Referencia: Desactivada
		Anchura de pico:	> 0,05 min (tiempo de respuesta: 1,0 s) (5 Hz)



Control del pH para la separación de una mezcla de tres proteínas usando gradientes cuaternarios con mezcla dinámica.

Eliminación casi completa de las variaciones de los tiempos de retención

Columna: Bio MAb, acero inoxidable
5190-2413
4,6 x 250 mm, 10 µm

Fase móvil: A: fosfato de sodio 10 mM, pH = 6,0
B: A + cloruro sódico 1,0 M

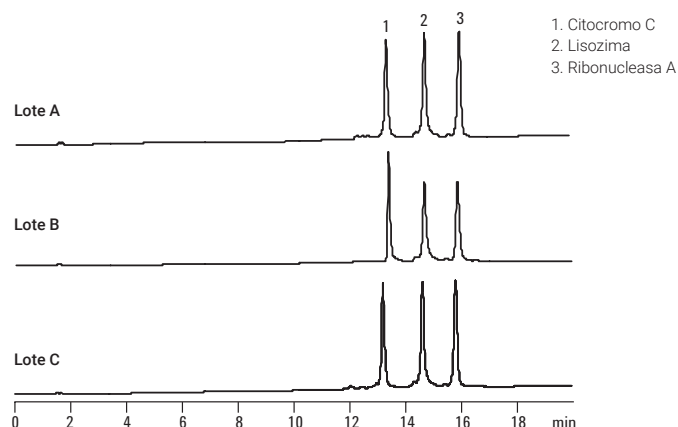
Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: 0-100 % B en 42 min

Temperatura: 25 °C

Detector: UV (214 nm)

La combinación de un perfecto control del proceso de producción de la resina y la química superficial y el empaquetado de la columna elimina casi por completo las variaciones de los tiempos de retención entre columnas y entre lotes.



Columnas Agilent Bio MAb para HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio MAb, PEEK	Límite de presión	Bio MAb, acero inoxidable	Límite de presión
21,2 x 250	5			5190-6885	275 bar (4.000 psi)
10 x 250	5			5190-6884	275 bar (4.000 psi)
4,6 x 250	10	5190-2415	275 bar (4.000 psi)	5190-2413	275 bar (4.000 psi)
4,6 x 50	10	5190-2416	275 bar (4.000 psi)		
4,6 x 250	5	5190-2407	400 bar (5.800 psi)	5190-2405	400 bar (5.800 psi)
4,6 x 50	5	5190-2408	400 bar (5.800 psi)		
4,6 x 50	3			5190-2403	551 bar (8.000 psi)
4,6 x 50	1,7			5190-2401	600 bar (8.700 psi)
Precolumna, 4,0 x 10	10			5190-2414	275 bar (4.000 psi)
Precolumna, 4,0 x 10	5			5190-2406	413 bar (6.000 psi)
Precolumna, 4,0 x 10	3			5190-2404	551 bar (8.000 psi)
Precolumna, 4,0 x 10	1,7			5190-2402	600 bar (8.700 psi)
2,1 x 250	10	5190-2419	275 bar (4.000 psi)		
2,1 x 50	10	5190-2420	275 bar (4.000 psi)		
2,1 x 250	5	5190-2411	400 bar (5.800 psi)		
2,1 x 50	5	5190-2412	400 bar (5.800 psi)		

Columnas Bio IEX para HPLC

- Partículas rígidas y no porosas de un copolímero de poliestireno y divinilbenceno (PS/DVB) muy reticulado, revestidas con una capa polimérica hidrófila que elimina la unión inespecífica.
- Los grupos funcionales de intercambio iónico, empaquetados de manera uniforme y densa, están ligados químicamente al revestimiento hidrofílico (varios grupos de intercambio iónico por anclaje) para aumentar la capacidad de la columna.
- Las partículas, el revestimiento y las uniones resisten las altas presiones y ofrecen una resolución mayor y separaciones más rápidas.
- En cada anclaje hay varios grupos de intercambio iónico, lo que incrementa la capacidad.



Las columnas Bio IEX para HPLC cuentan con un empaquetado de partículas poliméricas y no porosas de intercambio iónico, y están diseñadas para realizar separaciones de péptidos, oligonucleótidos y proteínas con una alta resolución, recuperación y eficiencia.

La familia Bio IEX incluye fases de intercambio catiónico fuerte (SCX), intercambio catiónico débil (WCX), intercambio aniónico fuerte (SAX) e intercambio aniónico débil (WAX). Todas las fases están disponibles con partículas no porosas de 1,7, 3, 5 y 10 μm .

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Diám. int.	Tamaño de partícula	Estabilidad de pH	Límite de temperatura operativa	Flujo
Intercambio catiónico fuerte (SCX), $-\text{SO}_3\text{H}$	2,1 y 4,6 mm	1,7, 3, 5 y 10 μm	2-12	80 °C	0,1-1 ml/min
Intercambio catiónico débil (WCX), $-\text{COOH}$					
Intercambio aniónico fuerte (SAX), $-\text{N}+(\text{CH}_3)_3$					
Intercambio aniónico débil (WAX), $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$					

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre cómo optimizar el análisis de variantes cargadas, consulte los siguientes documentos: *Ion-exchange chromatography for biomolecule analysis: a "how-to" guide* (n.º de publicación **5991-3775EN**); y *Columnas BioHPLC Agilent de intercambio iónico: caracterice variantes cargadas de proteínas con rapidez y confianza* (n.º de publicación **5991-2449ES**).

www.agilent.com/search

Flujo de trabajo más rápido y sencillo para el análisis de variantes cargadas

Columna: Bio WCX, acero inoxidable
5190-2443

4,6 x 50 mm, 3 µm

Bio SCX, acero inoxidable

5190-2423

4,6 x 50 mm, 3 µm

Fase móvil:

A: agua

B: cloruro sódico 1,5 M

C: fosfato monosódico 40 mM

D: fosfato disódico 40 mM

Combinando proporciones predeterminadas de C y D, según lo determinado por el software Buffer Advisor, se crearon disoluciones tampón con el rango de pH y la fuerza deseados.

Flujo:

1,0 ml/min

Volumen de inyección: 10 µl

Gradiente:

Condiciones para los cromatogramas mostrados:

pH = 5,0-7,0; fuerza del tampón: 10-25 mM

Cloruro sódico (NaCl) 0-500 mM, 0-15 min

Cloruro sódico (NaCl) 500 mM, 15-20 min

Experimentos DOE

pH = 5,0-7,0

NaCl 0-200 mM, 0-250 mM y 0-300 mM

Temperatura:

Ambiente

Detector:

UV (220 nm)

Muestra:

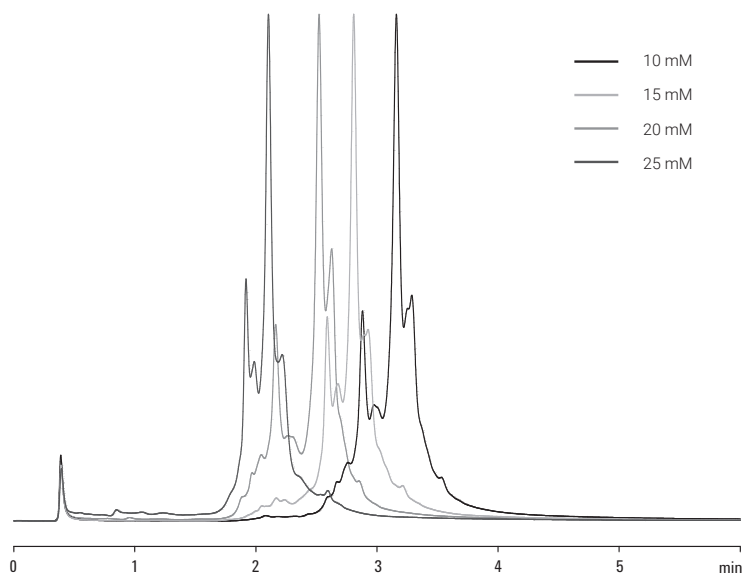
Anticuerpo monoclonal IgG

Conc. muestra:

2 mg/ml (en tampón fosfato sódico 20 mM, pH = 6,0)

Instrumento:

Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity



Desarrollo automatizado de métodos para optimizar las separaciones de variantes cargadas.

Optimización de la fuerza del tampón a un pH de 6,5 a partir de los cromatogramas de

cribado de una separación de IgG monoclonal.

Reducción del tiempo de análisis con partículas más pequeñas y longitudes de columna más cortas: procesos de separación un 30 % más rápidos

Columna: Bio WCX, acero inoxidable
5190-2445
4,6 x 250 mm, 5 μ m
Bio WCX, acero inoxidable
5190-2443
4,6 x 50 mm, 3 μ m

Fase móvil: A: fosfato de sodio 20 mM, pH = 6,5
B: A + cloruro sódico 1,6 M

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de inyección: 10 μ l

Gradiente: 0-50 % B

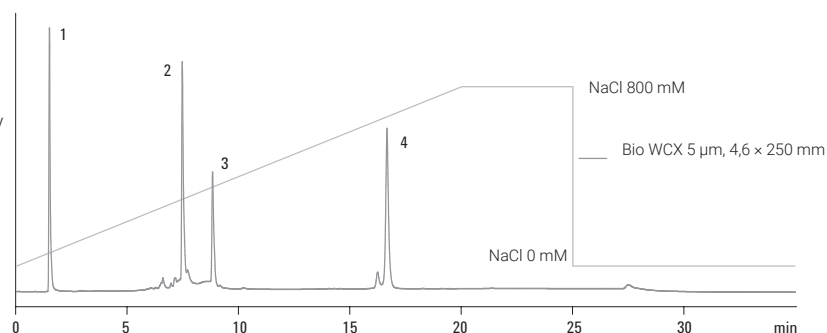
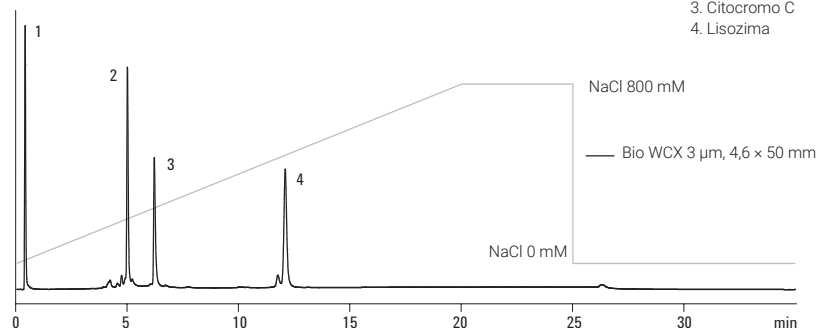
Temperatura: Ambiente

Detector: UV (220 nm)

Conc. muestra: 0,5 mg/ml

Instrumento: Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity

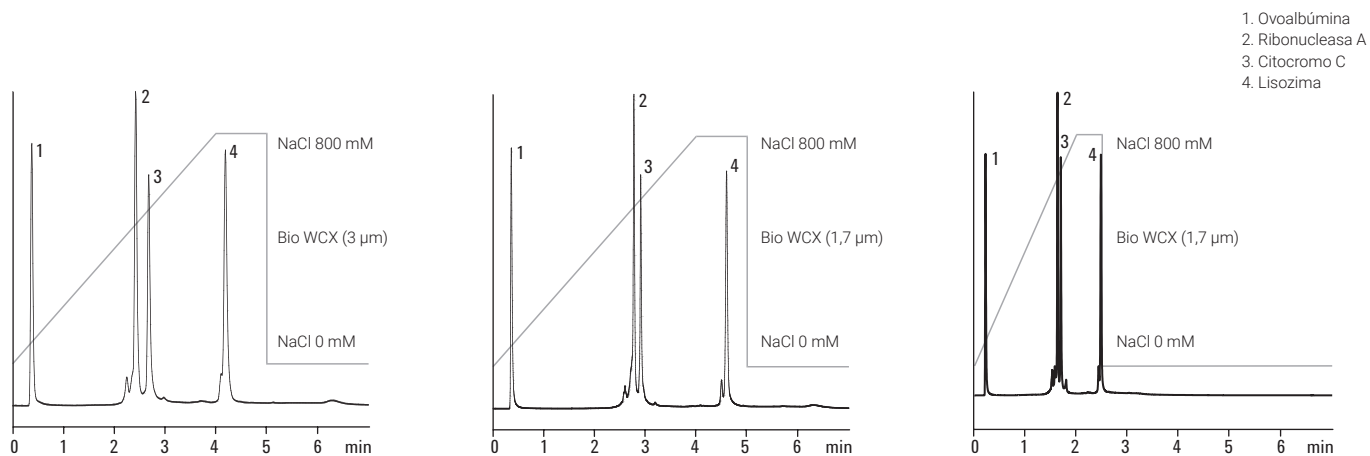
1. Ovalbúmina
2. Ribonucleasa A
3. Citocromo C
4. Lisozima



Comparación de la separación de proteínas con una columna Bio WCX de 4,6 x 50 mm y 3 μ m y una columna Bio WCX de 4,6 x 250 mm y 5 μ m (flujo: 1,0 ml/min). Se consiguieron tiempos de análisis menores con un tamaño de partícula más pequeño y una longitud de columna más corta. Las muestras se eluyeron en 17 minutos de la columna más larga y en tan solo 12 minutos de la columna más corta.

Aumento de la resolución mediante la reducción del tamaño de partícula

Columna: Bio WCX, acero inoxidable
 5190-2443
 4,6 x 50 mm, 3 μ m
 Bio WCX, acero inoxidable
 5190-2441
 4,6 x 50 mm, 1,7 μ m
Fase móvil: A: fosfato de sodio 20 mM, pH = 6,5
 B: A + cloruro sódico 1,6 M
Volumen de inyección: 10 μ l
Gradiente: 0-50 % B
Temperatura: Ambiente
Detector: UV (220 nm)
Conc. muestra: 0,5 mg/ml
Instrumento: Sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity



Izquierda y centro: Comparación de la separación de proteínas con una columna Bio WCX de 3 μ m y una columna Bio WCX de 1,7 μ m (flujo: 1,0 ml/min).

Derecha: Mediante el aumento del flujo a 1,7 ml/min, se redujo el tiempo de separación a menos de 3 minutos (se utilizó una columna Agilent Bio WCX).

Reduzca el tiempo de análisis mediante el aumento del flujo, sin sacrificar la resolución ni la forma de pico.

Análisis de proteínas con columnas de intercambio aniónico en el sistema LC bioinerte cuaternario 1260 Infinity

Columna:	Bio WAX, PEEK 5190-2487 4,6 x 250 mm, 5 µm
Tampón:	A: tris 20 mM (pH = 7,6) B: tris 20 mM (pH = 7,6) + NaCl 2 M, KCl 1 M, CH ₃ COONa 1 M y [(CH ₃) ₄ N]Cl 1 M
Gradiente 1 M:	5 min: 100 % A 20 min: 70 % B 25 min: 100 % B
Gradiente 2 M:	5 min: 100 % A 20 min: 35 % B 25 min: 50 % B 25,01 min: 100 % B
Tiempo de parada:	30 min
Tiempo posterior:	20 min
Temperatura:	25 °C
Flujo:	0,5 ml/min
Volumen de inyección:	5 µl
DAD:	280 nm
Anchura de pico:	0,025 min (tiempo de respuesta: 0,5 s) (10 Hz)

Para obtener más información, consulte la
 nota de aplicación 5990-9614EN
 (www.agilent.com/search).

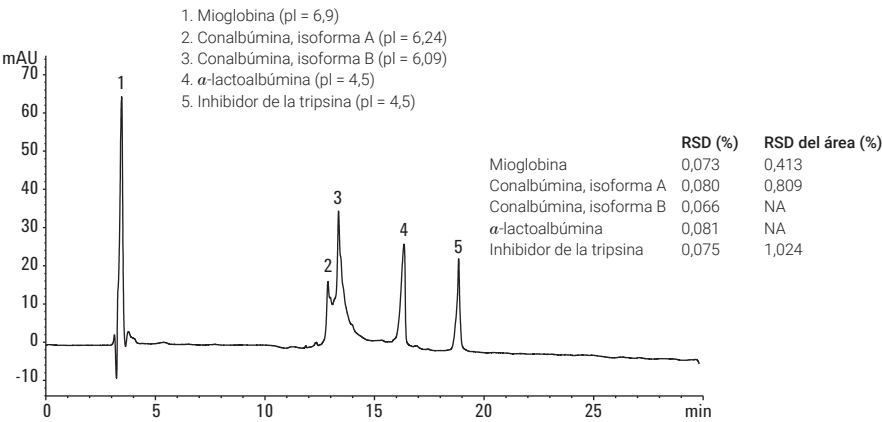


Figura 1. Separación de proteínas mediante intercambio aniónico con un gradiente lineal y NaCl 2 M como sal de elución.

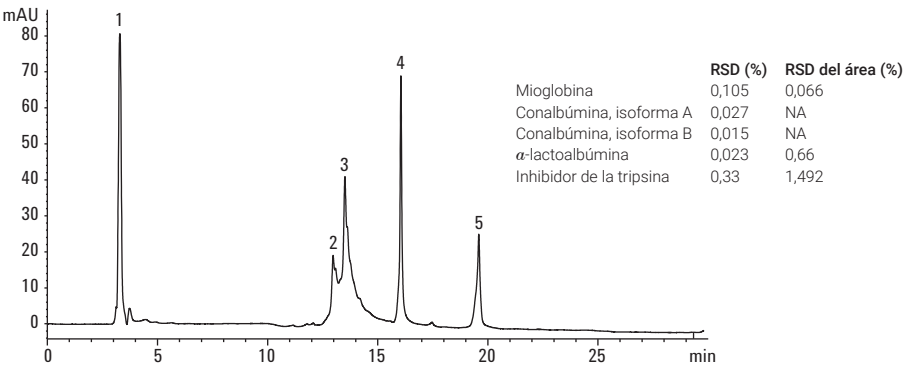


Figura 2. Separación de proteínas mediante intercambio aniónico con un gradiente lineal y KCl 1 M como sal de elución.

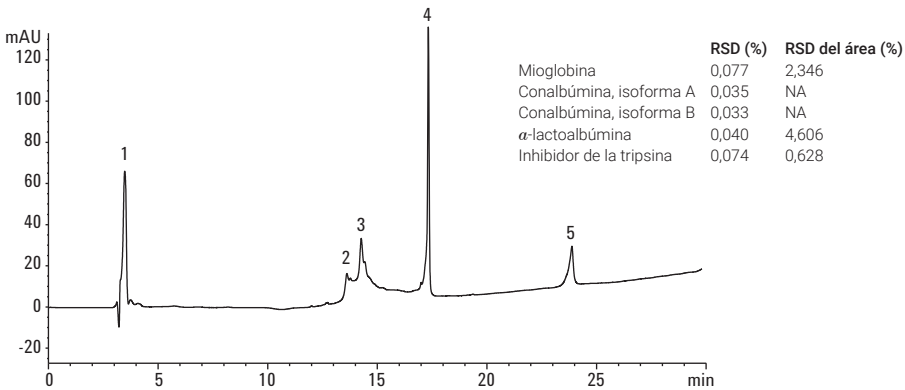


Figura 3. Separación de proteínas mediante intercambio aniónico con un gradiente lineal y [(CH₃)₄N] Cl 1 M como sal de elución.

Columnas Bio IEX para HPLC (PEEK)

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Límite de presión	Bio SCX Referencia	Bio WCX Referencia	Bio SAX Referencia	Bio WAX Referencia
4,6 x 250	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4,6 x 50	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4,6 x 250	5	400 bar (5.800 psi)	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4,6 x 50	5	400 bar (5.800 psi)	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2,1 x 250	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2,1 x 50	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2,1 x 250	5	400 bar (5.800 psi)	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2,1 x 50	5	400 bar (5.800 psi)	5190-2432	5190-2442	5190-2462	5190-2492

Recomendaciones y herramientas

Utilice filtros de disolvente de Agilent para eliminar las partículas de los tampones y las fases móviles de elaboración propia.

Visite: www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

Columnas Bio IEX para HPLC (acero inoxidable)

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Límite de presión	Bio SCX Referencia	Bio WCX Referencia	Bio SAX Referencia	Bio WAX Referencia
21,2 x 250	5		5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5		5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4,6 x 250	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4,6 x 250	5	413 bar (6.000 psi)	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4,6 x 150	3					5190-6875
4,6 x 50	3	551 bar (8.000 psi)	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4,6 x 50	1,7	600 bar (8.700 psi)	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
Precolumna, 4,0 x 10	10	275 bar (4.000 psi)	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
Precolumna, 4,0 x 10	5	413 bar (6.000 psi)	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
Precolumna, 4,0 x 10	3	551 bar (8.000 psi)	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
Precolumna, 4,0 x 10	1,7	600 bar (8.700 psi)	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

Para obtener más información, consulte los siguientes documentos:

Optimizing protein separations with Agilent weak cation-exchange columns (n.º de publicación **5990-9628EN**).

Faster separations using Agilent weak cation-exchange columns (n.º de publicación **5990-9931EN**).

pH Gradient elution for improved separation of monoclonal antibody variants (n.º de publicación **5990-9629EN**).

Optimizing protein separations with cation-exchange chromatography using Agilent Buffer Advisor (n.º de publicación **5991-0565EN**).

www.agilent.com/search

Columnas PL-SAX de intercambio aniónico fuerte

- Partículas pequeñas que ofrecen un rendimiento cromatográfico excelente.
- Amplio rango de tamaños de partícula y dos tamaños de poro para conseguir un análisis flexible y llevar a cabo un escalamiento hacia arriba de la purificación.
- Estabilidad excepcional que se traduce en una larga vida útil de la columna.

La columna PL-SAX $-N(CH_3)_3^+$ es ideal para las separaciones por HPLC mediante intercambio aniónico de proteínas, péptidos y oligonucleótidos sintéticos desprotegidos en condiciones de desnaturalización. La capacidad de intercambio aniónico fuerte gracias al enlace covalente con un polímero completamente poroso y químicamente estable amplía el rango de pH operativo. Además, la capacidad de intercambio aniónico no depende del pH. Para los oligonucleótidos sintéticos, existe la posibilidad de llevar a cabo separaciones en condiciones de desnaturalización por temperatura, disolvente orgánico y pH alto. La columna PL-SAX mejora la cromatografía de las secuencias autocomplementarias o ricas en guanina que pueden asociarse para formar agregados o estructuras en forma de horquilla. Las partículas de 5 μm consiguen separaciones de alta eficiencia de las secuencias "n" y "n-1". Además, el amplio rango de tamaños de partícula y geometrías de columna posibilita el escalado del análisis hasta aplicaciones de purificación. La capacidad de intercambio aniónico fuerte hace que el material ofrezca una excepcional estabilidad química y térmica, incluso con eluyentes con hidróxido sódico, lo que alarga la vida útil de la columna.



Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Diám. int. (mm)	Tamaño de partícula (μm)	Tamaño de poro	Estabilidad de pH	Límite de temperatura operativa
Intercambio aniónico fuerte	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 y 100	5, 8, 10 y 30	1.000 y 4.000 Å	1-14	80 °C

Separación estándar de proteínas mediante intercambio iónico

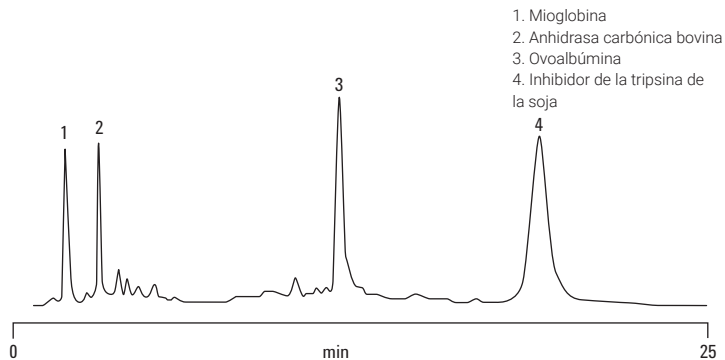
Columna: PL-SAX 1.000 Å
PL1551-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Fase móvil: A: tris-HCl 10 mM, pH = 8
B: A + cloruro sódico 350 mM, pH = 8

Gradiente: 0-100 % B en 20 min

Flujo: 1,0 ml/min

Detector: UV (220 nm)



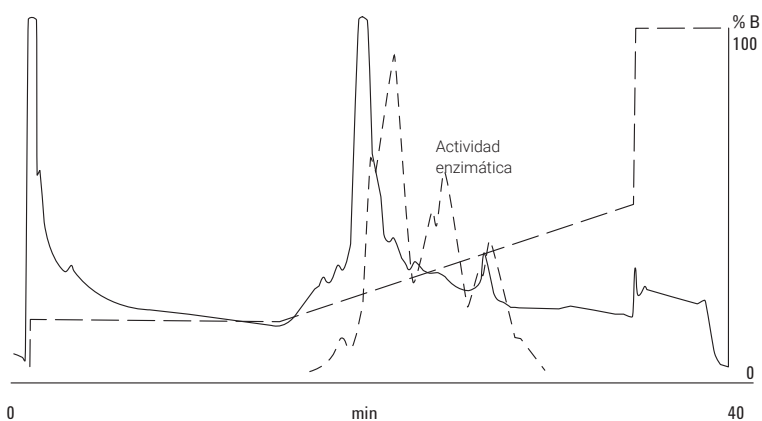
Análisis de colina quinasa

Columna: PL-SAX 4000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

Fase móvil: A: tris 20 mM en etilenglicol al 5 %, pH = 7,5
(Los compuestos siguientes son necesarios para mantener la actividad enzimática)
EGTA 1,0 mM
β-mercaptoetanol 2,0 mM
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,2 mM
B: A + cloruro potásico 1 M

Flujo: 3 ml/min

Detector: UV (280 nm)



Separación cortesía de T. Porter, Universidad Purdue (EE. UU.).

Análisis de proteínas representativas de lactosuero

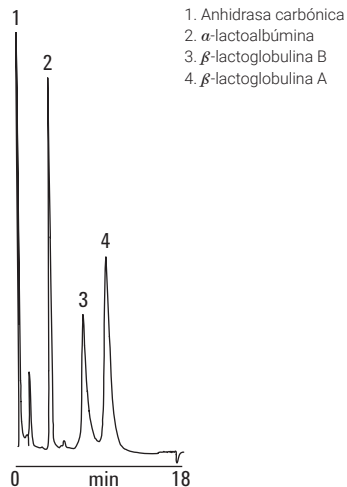
Columna: PL-SAX 1.000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

Fase móvil: A: tris-HCl 20 mM, pH = 7
B: A + acetato sódico 500 mM, pH = 7

Flujo: 1,0 ml/min

Gradiente: Lineal, 0-50% B en 10 min

Detector: UV (280 nm)



Separación fiable de oligonucleótidos sintéticos: separación de alta resolución de un poli-t-oligonucleótido de tamaño estándar marcado con 10, 15, 30 y 50 mer (picos principales)

Columna: PL-SAX 1.000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

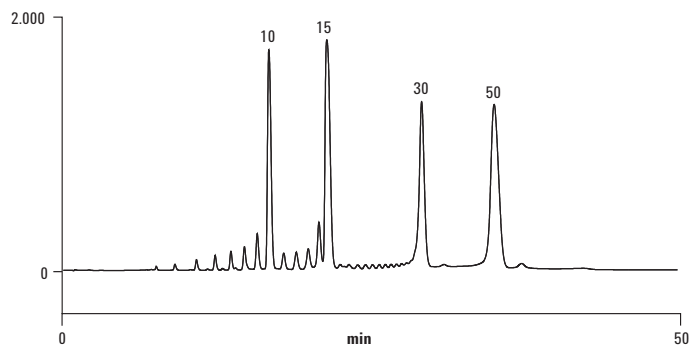
Fase móvil: A: ACN y TEAA 100 mM (7:93), pH = 8,5
B: ACN y TEAA 100 mM (7:93) con cloruro de amonio 1 M, pH = 8,5

Gradiente: 0-40 % B en 10 min; 40-70 % B en 14 min; y 70-100 % B en 25 min

Flujo: 1,0 ml/min

Temperatura: 60 °C

Detector: UV (220 nm)



Separación de alta resolución de un poli-t-oligonucleótido. Gracias al gradiente utilizado, la separación en línea de base de las secuencias "n-1" y "n" se obtuvo fácilmente hasta 15 mer.

Columnas PL-SAX de intercambio aniónico fuerte

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Límite de presión	PL-SAX 1.000 Å	PL-SAX 4.000 Å
100 x 300	10	207 bar (3.000 psi)	PL1851-2102	PL1851-2103
50 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1751-3702	PL1751-3703
50 x 150	10	207 bar (3.000 psi)	PL1751-3102	PL1751-3103
25 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1251-3702	PL1251-3703
25 x 150	10	275 bar (4.000 psi)	PL1251-3102	PL1251-3103
25 x 50	10	207 bar (3.000 psi)	PL1251-1102	PL1251-3103
4,6 x 250	30	207 bar (3.000 psi)	PL1551-5702	PL1551-5703
4,6 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1551-3702	PL1551-3703
4,6 x 250	10	207 bar (3.000 psi)	PL1551-5102	PL1551-5103
4,6 x 150	10	207 bar (3.000 psi)	PL1551-3102	PL1551-3103
4,6 x 150	8	207 bar (3.000 psi)	PL1551-3802	PL1551-3803
4,6 x 50	8	207 bar (3.000 psi)	PL1551-1802	PL1551-1803
4,6 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1551-1502	PL1551-1503
2,1 x 150	8	207 bar (3.000 psi)	PL1951-3802	PL1951-3803
2,1 x 50	8	207 bar (3.000 psi)	PL1951-1802	PL1951-1803
2,1 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1951-1502	PL1951-1503
1,0 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1351-1502	PL1351-1503

Medio a granel PL-SAX para intercambio aniónico fuerte

Tamaño de paquete	Tamaño de partícula (µm)	Límite de presión	PL-SAX 1.000 Å	PL-SAX 4.000 Å
100 g	30	207 bar (3.000 psi)	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar (3.000 psi)	PL1451-4102	PL1451-4103

Columnas PL-SCX de intercambio catiónico fuerte

- Diseño óptimo para conseguir una separación eficaz de biomoléculas.
- Tamaños de poro que permiten usar solutos de distintos tamaños.
- Estabilidad excepcional que se traduce en una larga vida útil de la columna.



La columna PL-SCX $-\text{SO}_3^-$ tiene una matriz macroporosa de PS/DVB con un revestimiento marcadamente hidrofílico y ofrece capacidad de intercambio catiónico fuerte. El proceso de fabricación se controla para lograr una densidad óptima de las fracciones de intercambio catiónico fuerte para analizar, separar y purificar una amplia variedad de biomoléculas, desde péptidos pequeños a proteínas grandes. Existen dos tamaños de poro (1.000 Å y 4.000 Å) que ofrecen buenas características de transferencia de masa para distintos solutos de diversos tamaños. El medio de 5 μm consigue separaciones con una resolución mayor, mientras que el medio de 30 μm se utiliza para la cromatografía de líquidos a presiones intermedias.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Diám. int. (mm)	Tamaño de partícula (μm)	Tamaño de poro	Estabilidad de pH	Límite de temperatura operativa
Intercambio catiónico fuerte	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 y 100	5, 8, 10 y 30	1.000 y 4.000 Å	1-14	80 °C

Separación estándar de proteínas

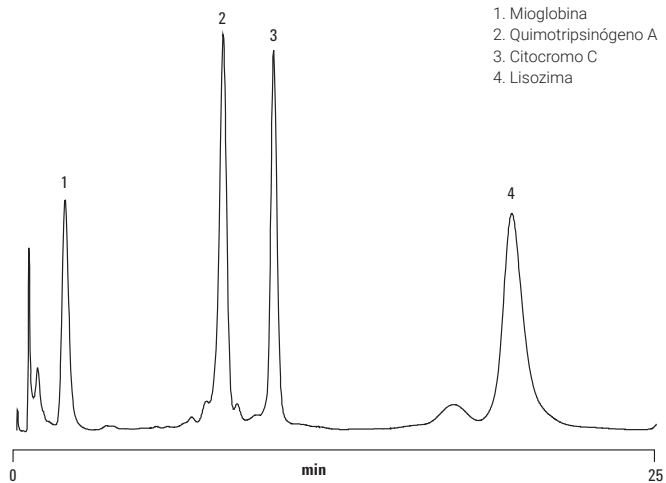
Columna: PL-SCX 1.000 Å
PL1545-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Fase móvil: A: dihidrogenofosfato de potasio 20 mM, pH = 6,0
B: A + 1 M cloruro sódico

Gradiente: 0-100 % B en 20 min

Flujo: 1,0 ml/min

Detector: UV (280 nm)



Columnas PL-SCX de intercambio catiónico fuerte

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Límite de presión	PL-SCX 1.000 Å	PL-SCX 4.000 Å
100 x 300	10	207 bar (3.000 psi)	PL1845-2102	PL1845-2103
50 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1745-3703	PL1745-3703
50 x 150	10	207 bar (3.000 psi)	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	207 bar (3.000 psi)	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	207 bar (3.000 psi)	PL1245-1102	PL1245-1103
4,6 x 250	30	207 bar (3.000 psi)	PL1545-5703	PL1545-5703
4,6 x 150	30	207 bar (3.000 psi)	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 250	10	207 bar (3.000 psi)	PL1545-5102	PL1545-5103
4,6 x 150	10	207 bar (3.000 psi)	PL1545-3102	PL1545-3103
4,6 x 150	8	207 bar (3.000 psi)	PL1545-3802	PL1545-3803
4,6 x 50	8	207 bar (3.000 psi)	PL1545-1802	PL1545-1803
4,6 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1545-1502	PL1545-1503
2,1 x 150	8	207 bar (3.000 psi)	PL1945-3802	PL1945-3803
2,1 x 50	8	207 bar (3.000 psi)	PL1945-1802	PL1945-1803
2,1 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1945-1502	PL1945-1503
1,0 x 50	5	207 bar (3.000 psi)	PL1345-1502	PL1345-1503

Medio a granel PL-SCX para intercambio catiónico fuerte

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PL-SCX 1.000 Å	PL-SCX 4.000 Å
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102

Recomendaciones y herramientas

También están disponibles columnas y medios a granel PL-SAX y PL-SCX para operaciones de preparación para el procesamiento.

Consulte las **páginas 190–195**.

Columnas Bio-Monolith de intercambio iónico para HPLC

- Columnas monolíticas con base de polímero para HPLC, diseñadas para separaciones de macrobiomoléculas.
- Separaciones independientes del flujo: sin difusión, sin poros y sin volumen muerto, lo que hace que el transporte entre las fases móvil y estacionaria sea muy rápido.
- Disco monolítico de 5,2 x 4,95 mm (volumen de columna de 100 µl) con canales continuos, lo que elimina la transferencia de masa por difusión.
- Separaciones extremadamente rápidas que acortan el tiempo de desarrollo de métodos y reducen los costes; además, el bloqueo de los parámetros de los métodos requiere mucho menos tiempo y consumo de tampón.

Las columnas Bio-Monolith de intercambio iónico para HPLC consiguen separaciones rápidas y de alta resolución de anticuerpos (IgG e IgM), plásmidos de ADN, virus, fagos y otras macrobiomoléculas. Esta familia incluye productos con fases de intercambio catiónico fuerte, de intercambio aniónico fuerte y débil, y con proteína A. Las columnas Bio-Monolith para HPLC son compatibles con los sistemas LC serie InfinityLab.



Columna Bio-Monolith de intercambio iónico para HPLC

Guía de selección de columnas Agilent Bio-Monolith para HPLC

Columna	Descripción	Aplicaciones clave	Referencia
Bio-Monolith QA	La fase ligada con aminas cuaternarias (intercambio aniónico fuerte) se carga completamente en un rango operativo de pH de 2 a 13, fijando biomoléculas con carga negativa.	– Monitorización y control de calidad de procesos de producción de adenovirus. – Monitorización y control de calidad de procesos de purificación de IgM. – Monitorización de la eliminación de impurezas del ADN. – Monitorización de la eliminación de endotoxinas. – Pureza de seroalbúmina humana (HSA).	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	La fase ligada con grupos dietilaminoetilo (intercambio aniónico débil) ofrece una mayor selectividad para biomoléculas con carga negativa en un rango operativo de pH de 3 a 9.	– Monitorización y control de calidad de procesos de fabricación y purificación de bacteriófagos. – Monitorización y control de calidad de procesos de purificación de plásmidos de ADN.	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	La fase ligada con grupos sulfonilo (intercambio catiónico fuerte) se carga completamente en un rango operativo de pH de 2 a 13, fijando biomoléculas con carga positiva.	– Separaciones analíticas rápidas y de alta resolución de grandes moléculas, como proteínas y anticuerpos. – Análisis rápido de hemoglobina A1c.	5069-3637

Especificaciones de las columnas

Dimensiones	5,2 mm x 4,95 mm
Volumen de la columna	100 µl
Presión máxima	150 bar (15 MPa/2.200 psi)
Temperatura mín./máx.	Funcionamiento: 2-40 °C
	Almacenamiento: 2-8 °C
pH recomendado	Rango de funcionamiento: 2-13
	Limpieza <i>in situ</i> : 1-14
Materiales de fabricación	Estructura: acero inoxidable
	Empaquetado: monolito altamente poroso de un copolímero de metacrilato de glicidilo y dimetacrilato de etileno
Anillo de color identificativo	Bio-Monolith QA: azul
	Bio-Monolith DEAE: verde
	Bio-Monolith SO ₃ : rojo
Vida útil/período de caducidad	SO ₃ , QA y DEAE: 24-36 meses

Ampliación de la línea base de una separación de patrones de proteínas

Columna: Bio-Monolith CM15, 5,5 x 15 mm

Fase móvil: A: hidrogenofosfato sódico 10 mM, pH = 6,0
B: A + cloruro sódico 500 mM, o solo hidrogenofosfato sódico 500 mM, pH = 6,0

Flujo: 2 ml/min

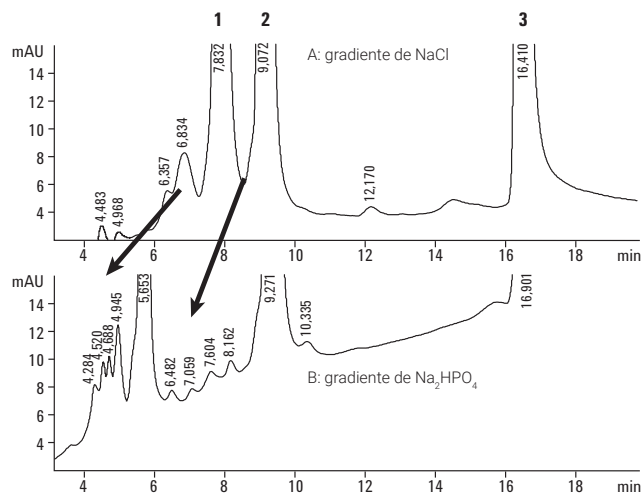
Gradiente: 0,5 min con fase móvil A; gradiente lineal hasta 45 % B en 15 min (tiempo total transcurrido: 15,5 min); y 60 % B a los 15,6 min y hasta los 20 min. Lavado de la columna con 100 % B durante 15 min antes de la estabilización para el siguiente análisis.

Gradiente de pH: A: hidrogenofosfato sódico 5 mM, con tampón, pH = 5,5. B: hidrogenofosfato sódico 40 mM, sin tampón, pH = 8,9. 2 % B/min con un flujo de 1 ml/min durante 15 min; después, lavado de la columna con 90 % B durante 5 min.

Detector: UV (220 nm)

Muestra: 1 mg/ml de cada proteína en fase móvil A
1. Ribonucleasa de páncreas bovino (pI = 9,6)
2. Citocromo c de corazón bovino (pI = 10,37-10,8)
3. Lisozima de huevo de gallina (pI = 11,35) (0,5 mg)

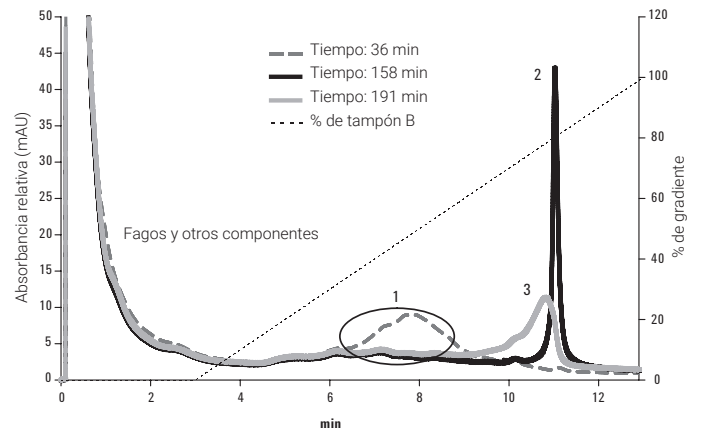
Instrumento: Sistema de la serie 1200 Infinity con detector de diodo array



En la gráfica B se aprecia una mejor resolución de los contaminantes de las proteínas.

Monitorización de la producción de fagos durante la fermentación

Columna:	Bio-Monolith DEAE 5069-3636 5,2 x 4,95 mm
Fase móvil:	A: tampón fosfato sódico 125 mM, pH = 7,0 B: tampón fosfato sódico 125 mM + cloruro sódico 1 M, pH = 7,0
Flujo:	1 ml/min
Gradiente:	100 % de tampón A (2,5 min) 0-100 % de tampón B (10 min) 100 % de tampón A (2 min)
Detector:	UV (280 nm)
Instrumento:	Sistema HPLC Agilent serie 1200 Infinity con gradiente a alta presión



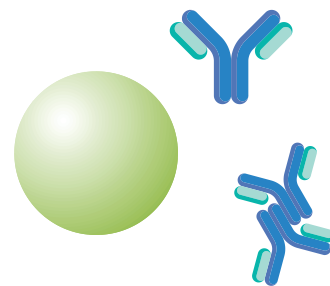
A medida que avanza la proliferación de los fagos, la concentración de ADN genómico (ADNg) aumenta debido a la lisis de las células anfitrionas. En las últimas fases de fermentación, el ADNg empieza a degradarse en fragmentos. Estos fragmentos de ADNg no pueden eliminarse fácilmente con medios de purificación. Por lo tanto, es esencial detener el ciclo de fermentación antes de la degradación del ADNg. El cromatograma anterior representa tres muestras tomadas del biorreactor después de 36, 158 y 191 minutos. El pico 1 representa los fagos, el medio y las células anfitrionas; el pico 2, el ADNg intacto; y el pico 3, el ADNg fragmentado.



Análisis de agregados y fragmentos

Determinación precisa de agregados, fragmentos y modificaciones/uniones químicas de biomoléculas

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica que permite separar proteínas, oligonucleótidos y otros biopolímeros complejos en función de su tamaño, utilizando para ello eluyentes acuosos. En particular, es una herramienta esencial para la cuantificación de los agregados presentes en los productos bioterapéuticos con proteínas. La fabricación de un producto biofarmacéutico, como un anticuerpo monoclonal, es un proceso complejo. La agregación de proteínas es un problema que puede surgir durante las etapas de cultivo celular, aislamiento, purificación y formulación. La presencia de dímeros y agregados de orden superior puede afectar a la eficacia y seguridad del producto final. Es necesario llevar a cabo una cuantificación del contenido de agregados durante el desarrollo del proceso, para establecer los atributos de calidad críticos (CQA) del producto, y durante la caracterización del producto final, para garantizar que la agregación se haya minimizado y controlado para mantenerla en niveles seguros.



Aplicación de la SEC a los estudios de agregación

El tamaño, tipo y contenido de los agregados presentes en los productos biofarmacéuticos con proteínas pueden afectar a la eficacia y a la formulación o, incluso peor, inducir una respuesta inmunogénica. La formación de agregados se produce a través de diversos mecanismos, como la formación de enlaces disulfuro y las interacciones no covalentes.

Existe una diferencia sensible de tamaño entre los agregados, incluidos los dímeros, y el monómero de una proteína, lo que permite separar las distintas formas por SEC. De hecho, la SEC con UV o dispersión de luz es una técnica de referencia para cuantificar la agregación de proteínas.

Aplicación de la SEC a la cuantificación y determinación del peso molecular

Para las proteínas y otras moléculas de bajo peso molecular, puede recurrirse a la SEC para detectar y cuantificar monómeros, dímeros, agregados y fragmentos. La SEC también permite separar mezclas de oligonucleótidos.

Para los biopolímeros con cadenas de longitud variable, como almidones y otros polisacáridos, la SEC (en combinación con detectores adecuados) puede proporcionar datos sobre la distribución de pesos moleculares y las ramificaciones.

Como fabricante líder de instrumentos y columnas SEC desde hace más de 30 años, Agilent desarrolla continuamente nuevos productos para SEC que ofrecen una resolución aún más elevada y acortan la duración de las separaciones. En esta sección se destaca la amplia familia de columnas SEC de Agilent para análisis de biopolímeros de proteínas:

- Las columnas AdvanceBio SEC están disponibles con dos tamaños de partícula para medidas por SEC-UV o SEC-LS. Las partículas de 2,7 μm presentan tamaños de poro de 130 o 300 Å, lo que permite abarcar un amplio rango de tamaños de muestra. Las partículas de 1,9 μm tienen un tamaño de poro de 200 Å y ofrecen la máxima resolución. Ambos tipos de partículas cuentan con un revestimiento polimérico hidrófilo, lo que minimiza las interacciones secundarias. Todo ello las convierte en columnas robustas para muestras complejas (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco), así como para análisis de rutina.
- Las columnas Bio SEC-3 y Bio SEC-5 están disponibles con diversos tamaños de poro y son idóneas para el análisis de proteínas con detección UV o MS (en especial, para determinar la presencia de dímeros y agregados en muestras de productos bioterapéuticos). Debe tenerse en cuenta que las columnas Bio SEC-3 de 3 μm proporcionan una resolución mayor que las columnas Bio SEC-5 de 5 μm , que son la referencia dentro del sector.
- Las columnas ProSEC 300S ofrecen buenos resultados para proteínas globulares en condiciones de alto contenido de sal.
- Las columnas ZORBAX GF-250 y GF-450 son modelos antiguos que deben utilizarse si los protocolos aún precisan el uso de productos de la categoría L35 de la USP. Como alternativa, se recomienda usar columnas Bio SEC, que ofrecen un mayor rendimiento.
- Las columnas PL aquagel-OH pueden utilizarse para analizar biopolímeros de un amplio rango de peso molecular, como PEG, oligo y polisacáridos, almidones y gomas. Consulte la guía de producto de las columnas GPC/SEC para disoluciones acuosas y polares (n.º de publicación 5990-7995ES).

Análisis de agregados y fragmentos

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Aplicación	Columnas Agilent	Notas	Categoría de la USP
Análisis de péptidos, proteínas y agregados	AdvanceBio SEC	Revestimiento polimérico hidrófilo robusto que minimiza las interacciones secundarias; partículas de 2,7 µm (con un tamaño de poro de 130 o 300 Å) o de 1,9 µm (con un tamaño de poro de 200 Å) para obtener la máxima resolución.	L59
	Bio SEC-3	Mayor resolución y separación más rápida gracias a las partículas de 3 µm con tamaños de poro de 100, 150 y 300 Å.	L59
Biomoléculas grandes y muestras con componentes de distintos pesos moleculares	Bio SEC-5	Más opciones de tamaño de poro (100, 150, 300, 500, 1.000 y 2.000 Å) para abarcar un rango más amplio de analitos.	L59
Proteínas globulares y anticuerpos	ProSEC 300S	Opción de columna sencilla para el análisis de proteínas en condiciones de alto contenido de sal.	L33
Proteínas y proteínas globulares	ZORBAX GF-250/450	Modelos antiguos que deben utilizarse si los protocolos aún precisan el uso de productos de la categoría L35 de la USP.	L35

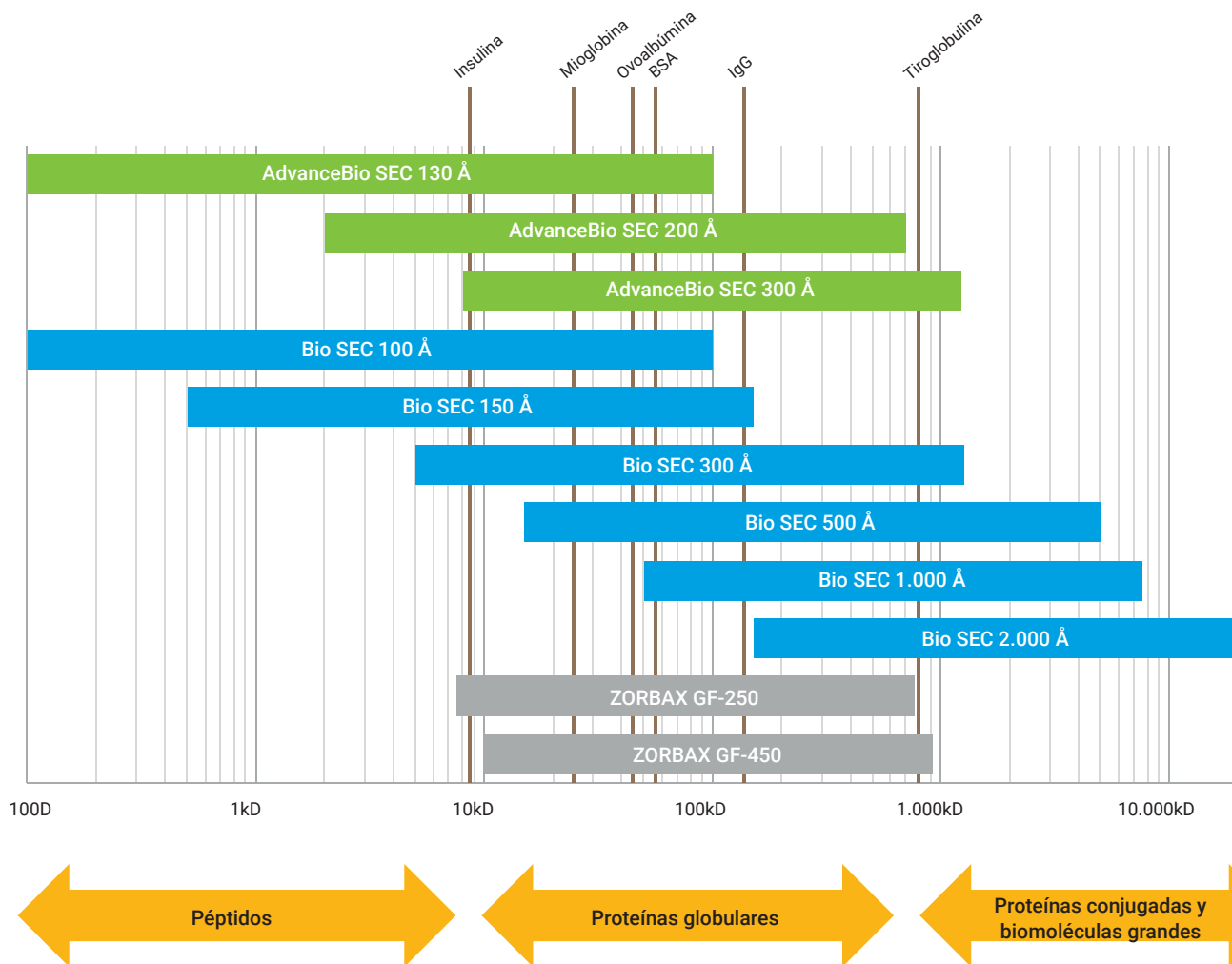
Recomendaciones y herramientas

Utilice filtros de disolvente de Agilent para eliminar las partículas de los tampones y las fases móviles de elaboración propia.

Visite: www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

¿Cuál es la columna SEC idónea para su aplicación?

Agilent ofrece una amplia selección de columnas SEC que le proporciona todo lo que necesita para obtener separaciones perfectas en función de sus analitos y de los parámetros de sus métodos. Este gráfico resume los rangos de tamaño de poro que proporcionan los mejores resultados posibles para distintos tipos comunes de moléculas. Le recomendamos que inicie el desarrollo de métodos con columnas AdvanceBio SEC.



AdvanceBio SEC

Las columnas AdvanceBio SEC consiguen una cuantificación precisa y exacta para el análisis de agregados de anticuerpos monoclonales y proteínas. Agilent diseñó estas innovadoras columnas de cromatografía de exclusión por tamaño para mejorar la productividad del laboratorio mediante el desarrollo de métodos robustos y fiables que eviten tener que repetir análisis de muestras. La obtención de resultados uniformes entre columnas, lotes y laboratorios garantiza que los métodos puedan transferirse entre departamentos e instalaciones y elimina la incertidumbre.

- Incremento de la velocidad de análisis, para ayudarle a cumplir plazos críticos.
- Mayor resolución, lo que permite obtener una cuantificación más precisa.
- Mejora de la sensibilidad de la cuantificación de agregados, incluso con bajos niveles de concentración.
- Mejora de la reproducibilidad, lo que elimina el reprocesamiento.
- Patrones diseñados específicamente para las columnas AdvanceBio SEC, lo que consigue una calibración y una verificación del rendimiento óptimas.

Especificaciones de las columnas					
Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Rango de peso mol.	Rango de pH	Presión máx.	Flujo
130 Å	2,7 µm	100-120.000	2-8,5	400 bar (presión operativa típica < 200 bar)	0,1-2,0 ml/min (7,8 mm de d.i.) 0,1-0,7 ml/min (4,6 mm de d.i.)
300 Å	2,7 µm	5.000-1.250.000	2-8,5	400 bar (presión operativa típica < 200 bar)	0,1-2,0 ml/min (7,8 mm de d.i.) 0,1-0,7 ml/min (4,6 mm de d.i.)
200 Å	1,9 µm	2.000-700.000	2-8	620 bar	0,1-0,7 ml/min (4,6 x 150 mm) 0,1-0,5 ml/min (4,6 x 300 mm)



AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Descripción	130 Å	300 Å
Columnas analíticas		
4,6 x 300 mm, 2,7 µm	PL1580-5350	PL1580-5301
4,6 x 150 mm, 2,7 µm	PL1580-3350	PL1580-3301
7,8 x 300 mm, 2,7 µm	PL1180-5350	PL1180-5301
7,8 x 150 mm, 2,7 µm	PL1180-3350	PL1180-3350
Precolumnas analíticas		
4,6 x 50 mm, 2,7 µm	PL1580-1350	PL1580-1301
7,8 x 50 mm, 2,7 µm	PL1180-1350	PL1180-1301

AdvanceBio SEC (1,9 µm)

Descripción	200 Å
Columnas analíticas	
4,6 x 300 mm, 1,9 µm	PL1580-5201
4,6 x 150 mm, 1,9 µm	PL1580-3201
Precolumna	
4,6 x 30 mm, 1,9 µm	PL1580-1201



Historias reales de laboratorios

Mejora de los resultados económicos del laboratorio mediante la reducción de la complejidad

Descubra cómo el equipo de Agilent CrossLab ayudó a un gran laboratorio farmacéutico a gestionar distintos tipos de instrumentos de diferentes fabricantes.

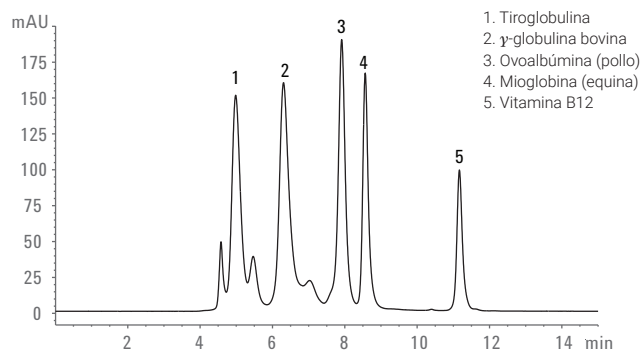
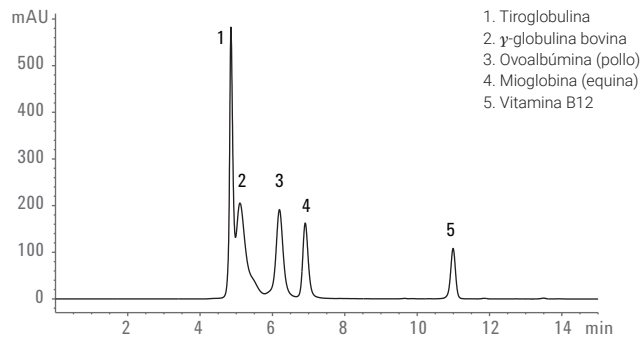
www.agilent.com/chem/story92

Separaciones de patrones de peso molecular mediante SEC

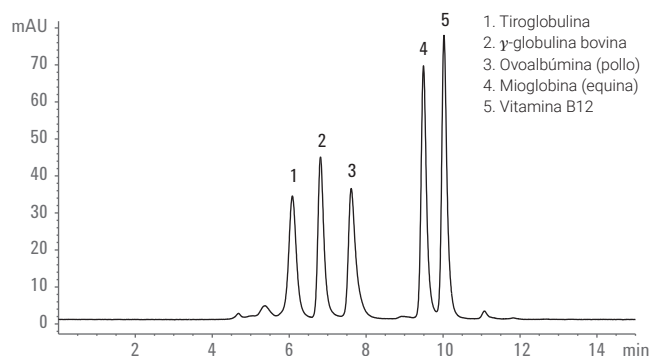
Columna: AdvanceBio SEC
7,8 x 300 mm

Muestra: Patrón de filtración con gel BioRad (ref. 1511901)

Fase móvil: A: fosfato de sodio 150 mM, pH =7,0



Separación de la mezcla de filtración con gel BioRad con columnas AdvanceBio SEC 130 Å y 300 Å. La columna de 300 Å ofrece mayor resolución.



Separación de una mezcla de proteínas y péptidos con una columna AdvanceBio SEC 130 Å, en la que puede apreciarse la resolución de las proteínas y los péptidos pequeños.

Condiciones iniciales recomendadas para las columnas AdvanceBio SEC

Columna: AdvanceBio SEC 300 Å, 2,7 µm
7,8 x 300 mm
(ref. PL1180-5301)

Flujo: 1 ml/min

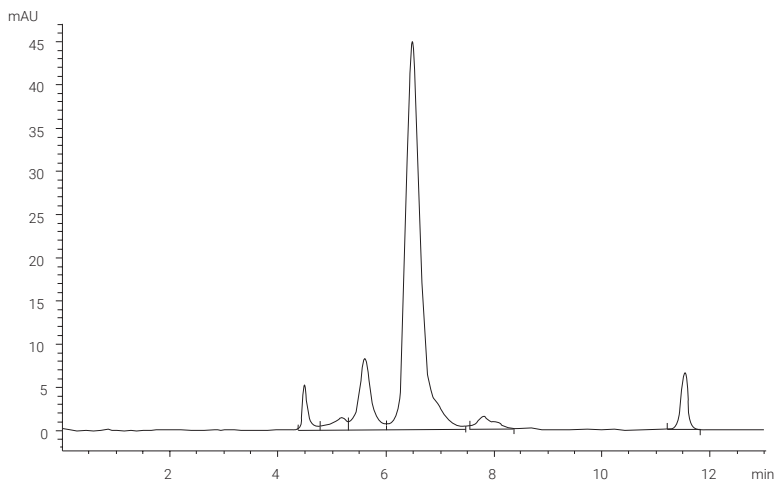
Fase móvil: Tampón fosfato 150 mM, pH = 7,0

Longitud de onda: 220 nm

Temperatura: Ambiente

Volumen de inyección: 5 µl

Muestra: IgG



Separación de alta resolución de una muestra de IgG, en la que pueden apreciarse el monómero, los agregados y los productos de degradación.

Parámetros de operación de la columna AdvanceBio SEC de 2,7 µm

Fases móviles compatibles	Tampón fosfato 150 mM, pH = 7,0 (condiciones iniciales recomendadas) Pueden utilizarse otros tampones acuosos con concentraciones salinas altas o bajas Pueden utilizarse mezclas de agua y acetonitrilo (Compruebe la solubilidad de los componentes del tampón y la presión del sistema)
Estabilidad de pH	2 a 8,5
Temperatura operativa	20-30 °C (recomendada) 80 °C (máxima)
Presión operativa típica	< 200 bar (2.900 psi) (columna sencilla)
Presión máxima	400 bar (5.800 psi)
Flujo de trabajo	0,1-2,0 ml/min para columnas de 7,8 mm de d.i. (recomendado) 0,1-0,7 ml/min para columnas de 4,6 mm de d.i. (recomendado) Para dos columnas en serie, puede ser necesario reducir el flujo para garantizar que la presión máxima no sea superior a 400 bar (5.800 psi)

Nota: Si trabaja con valores extremos del rango de parámetros de operación, es probable que eso acorte la vida útil de la columna.

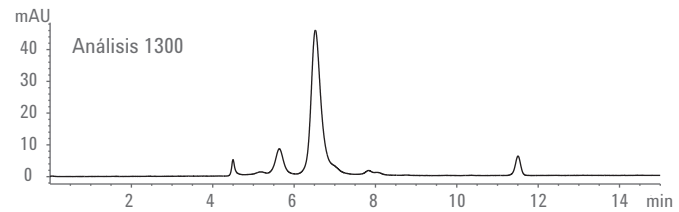
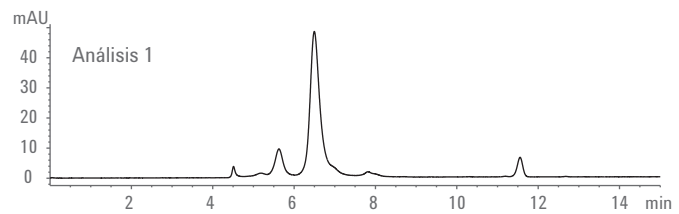
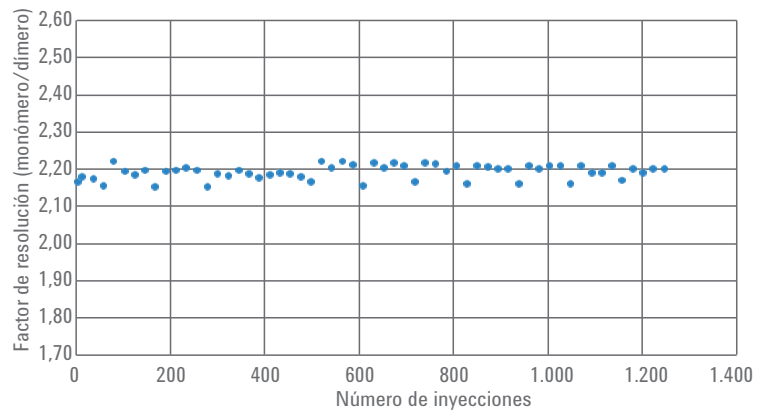
Análisis de agregados y fragmentos

Columna: AdvanceBio SEC
300 Å, 7,8 x 300 mm

Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0

Muestra: IgG

Gráfico que muestra la resolución del monómero y el dímero de IgG tras una secuencia de 1.300 inyecciones.



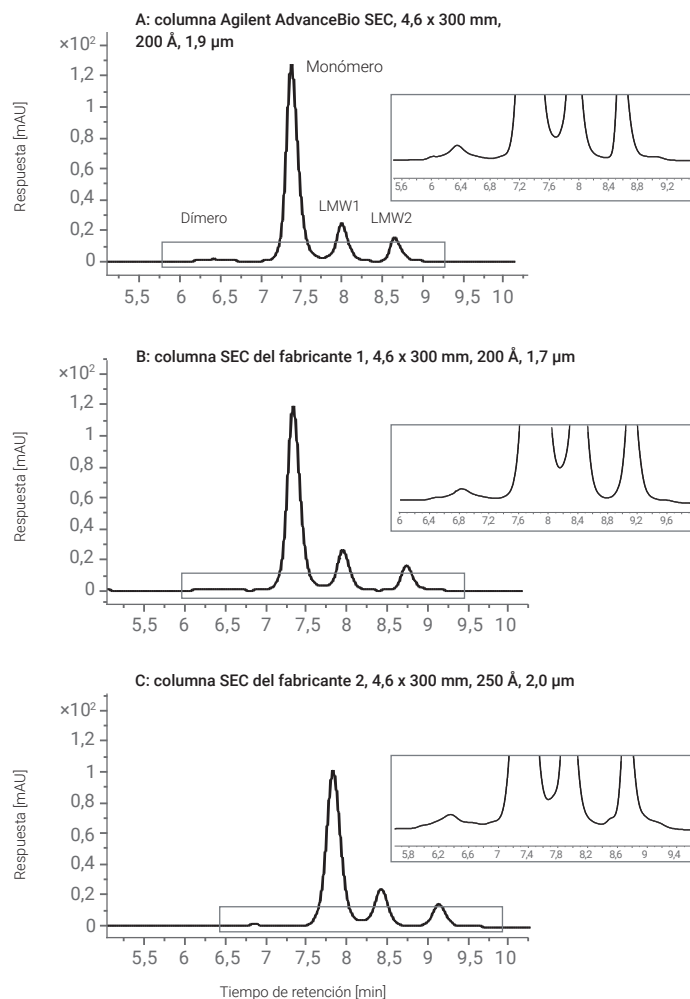
El perfil de una muestra de IgG no cambió, ni siquiera después de 1.300 inyecciones. Los factores de resolución y la cuantificación del monómero y el dímero de IgG también se mantuvieron dentro del rango de trabajo durante toda la vida útil de la columna.

AdvanceBio SEC (1,9 µm)

Instrumento:	Sistema LC bioinerte 1260 Infinity II
Software:	Agilent OpenLab CDS
Flujo:	0,35 ml/min
Eluyente:	Fosfato de sodio 50 mM y NaCl 200 mM, pH = 7,0
Temperatura:	25 °C
Volumen de inyección:	1 µl
Detección:	UV (220 nm)

Las partículas de sílice de 1,9 µm, modificadas mediante un enlace de la fase estacionaria hidrófilo y exclusivo de Agilent, garantizan una alta resolución y eficiencia de la separación. Además, minimizan las interacciones secundarias con anticuerpos monoclonales, conjugados anticuerpo-fármaco y otras proteínas.

Las columnas AdvanceBio SEC demuestran una mejor resolución y eficiencia de la separación en comparación con las columnas de la competencia.



Cromatogramas de exclusión por tamaño del patrón SigmaMAb mezclado con fragmentos LMW1 y LMW2.

	Anchura de pico al 50 %			Resolución		Retropresión (bar)
	Monómero	LMW1	LMW2	Dímero/monómero	Monómero/LMW1	
Agilent AdvanceBio SEC (1,9 µm)	0,159	0,154	0,148	2,79	2,28	340
Columna SEC del fabricante 1	0,172	0,166	0,160	2,46	2,09	354
Columna SEC del fabricante 2	0,194	0,182	0,169	2,49	1,83	260

Patrones AdvanceBio SEC

Patrones de proteínas para columnas AdvanceBio SEC 130 Å

Mezcla de proteínas que consta de cinco proteínas cuidadosamente seleccionadas (ovoalbúmina, mioglobina, aprotinina, neurotensina y angiotensina II), diseñada para calibrar las columnas de exclusión por tamaño AdvanceBio 130 Å de Agilent. Este patrón se puede usar periódicamente para calibrar la columna y asegurar un rendimiento ideal del sistema en diversas aplicaciones que implican la purificación y el análisis de proteínas.

Patrones de proteínas para columnas AdvanceBio SEC 300 Å

Mezcla de proteínas que consta de cinco proteínas cuidadosamente seleccionadas (tioglobulina, γ -globulina, ovoalbúmina, mioglobina y angiotensina II), diseñada para calibrar las columnas de exclusión por tamaño AdvanceBio 300 Å de Agilent. Este patrón se puede usar periódicamente para calibrar la columna y asegurar un rendimiento ideal del sistema en diversas aplicaciones que implican la purificación y el análisis de proteínas.

Patrones AdvanceBio SEC

Descripción	Tamaño	Referencia
130 Å	Vial de 1,5 ml	5190-9416
300 Å	Vial de 1,5 ml	5190-9417



Patrones de proteínas AdvanceBio SEC (refs. 5190-9416 y 5190-9417)

Bio SEC-3

Mayor resolución para conseguir separaciones de péptidos y proteínas más rápidas

Las columnas Bio SEC-3 ofrecen ventajas de velocidad y resolución si las comparamos con otras columnas SEC, gracias a sus partículas pequeñas y eficientes.

- Separaciones más rápidas que con las columnas SEC de partículas grandes.
- Alta resolución: forma de pico más definida y mayor recuperación de proteínas.
- Características excelentes de capacidad de carga y recuperación gracias a la capa hidrófila patentada.
- Desarrollo flexible de métodos: compatibilidad con la mayoría de los tampones acuosos.
- Estabilidad excelente en condiciones de alto y bajo contenido de sal.
- Rendimiento fiable y uniforme: partículas con un bajo nivel de dispersión; además, la capa hidrófila patentada reduce al mínimo las interacciones secundarias.
- Partículas robustas y compatibles con multidetectores como el detector de dispersión de luz.
- Compatibilidad con sistemas MS.

Las columnas Bio SEC-3 le ayudan a conseguir separaciones SEC más uniformes. Todas las columnas están empaquetadas con partículas esféricas de sílice de 3 μm con un bajo nivel de dispersión, recubiertas con una capa hidrófila patentada que consigue una alta recuperación y minimiza las interacciones secundarias, lo que hace que las separaciones sean más uniformes. Esta fina capa polimérica se liga químicamente a sílice pura y mecánicamente estable en condiciones controladas, lo que garantiza obtener partículas eficientes y estables para el análisis de exclusión por tamaño.



Recomendaciones y herramientas

Los viales desactivados/silanizados tienen superficies inertes que no interactúan con los metales, las sustancias biológicas o las proteínas ni provocan cambios en el pH. No use viales de polipropileno estándar para compuestos biológicos o fotosensibles.



Especificaciones de las columnas					
Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Rango de peso mol.	Rango de pH	Presión máx.	Flujo
100 Å	3 µm	100-100.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
150 Å	3 µm	500-150.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
300 Å	3 µm	5.000-1.250.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)

Curvas de calibración: columnas Bio SEC-3

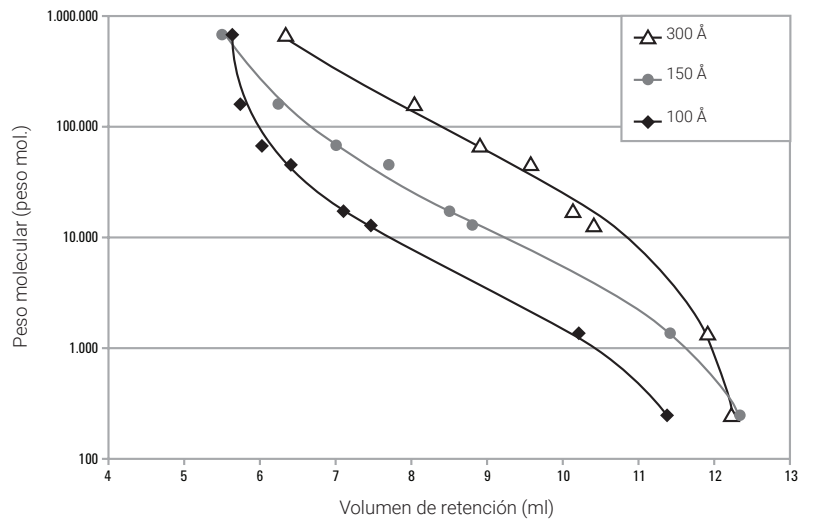
Columna: Bio SEC-3
7,8 x 300 mm, 3 µm

Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0

Flujo: 1,0 ml/min

Detector: UV

Proteínas	Peso mol.	Tamaño de poro		
		300 Å	150 Å	100 Å
Tiroglobulina	670.000	6,34	5,50	5,63
γ-globulina	150.000	8,03	6,24	5,74
BSA	67.000	8,90	7,00	6,03
Ovoalbúmina	45.000	9,57	7,70	6,41
Mioglobina	17.000	10,12	8,50	7,10
Ribonucleasa A	12.700	10,40	8,80	7,46
Vitamina B12	1.350	11,90	11,40	10,20



Elección del tamaño de poro

La elección del tamaño de poro del medio influirá en la resolución de la SEC. Dado que la separación se basa en la diferencia de tamaño de las moléculas de la solución, la muestra debe ser capaz de permear la estructura porosa de las partículas. Si el tamaño de poro es demasiado pequeño, la muestra no entrará en los poros y eluirá en el volumen de exclusión de la columna; si es demasiado grande, todos los componentes de la muestra podrán permear las partículas por completo y apenas se producirá separación.

Elección del tamaño de poro: proteínas

Columna A: Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4,6 x 300 mm, 3 µm

Columna B: Bio SEC-3, 150 Å
5190-2508
4,6 x 300 mm, 3 µm

Columna C: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2513
4,6 x 300 mm, 3 µm

Fase móvil: Fosfato de sodio 100 mM
+ cloruro sódico 150 mM, pH = 6,8

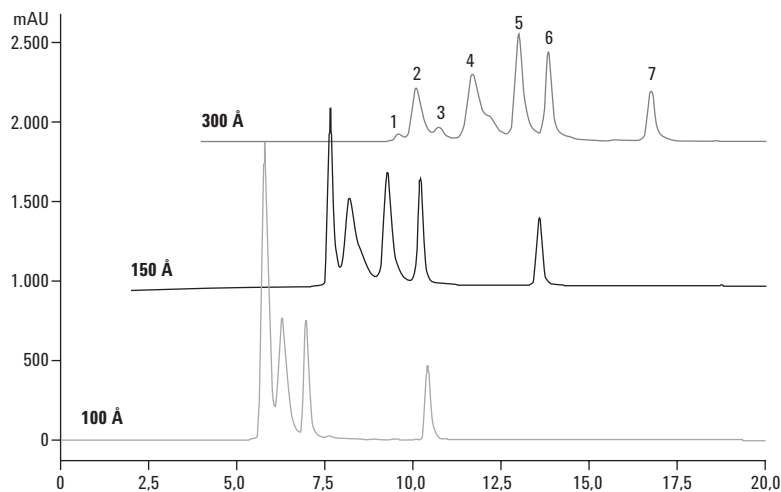
Flujo: 0,35 ml/min

Gradiente: 10-58 % B durante 4 min; lavado durante 1 min
con 95 % B; reequilibrado durante 1 min con 10 % B

Detector: UV (220 nm)

Muestra: Mezcla de patrones de filtración con gel BioRad

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. Agregados de tiroglobulina | 5. Ovoalbúmina |
| 2. Tiroglobulina | 6. Mioglobina |
| 3. IgA | 7. Vitamina B12 |
| 4. γ-globulina | |



Elección del tamaño de poro: IgG de ratón

Columna A: Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4,6 x 300 mm, 3 µm

Columna B: Bio SEC-3, 150 Å
5190-2508
4,6 x 300 mm, 3 µm

Columna C: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2513
4,6 x 300 mm, 3 µm

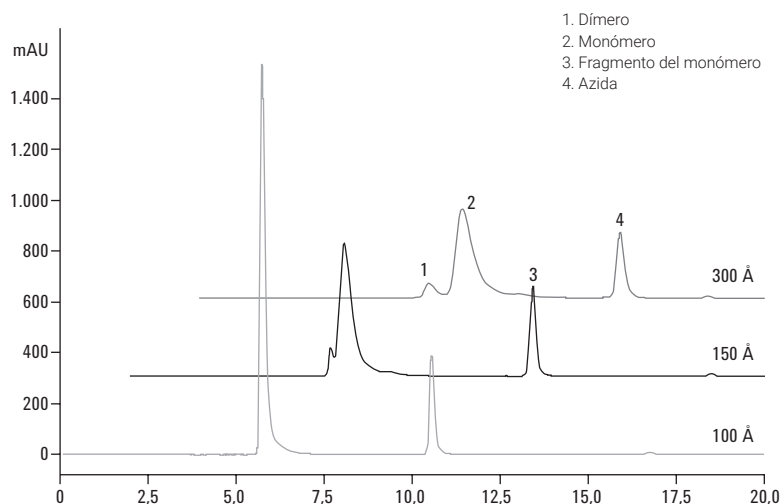
Fase móvil: Fosfato de sodio 100 mM
+ cloruro sódico 150 mM, pH = 6,8

Flujo: 0,35 ml/min

Gradiente: 10-58% B durante 4 min; lavado durante 1 min
con 95 % B; reequilibrado durante 1 min con 10 % B

Detector: UV (220 nm)

Muestra: IgG de ratón



Análisis de agregados y fragmentos

Bio SEC-3

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SEC-3 100 Å USP L59	Bio SEC-3 150 Å USP L59	Bio SEC-3 300 Å USP L59
21,2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
21,2 x 50 (precolumna)	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856
7,8 x 300	3	5190-2501	5190-2506	5190-2511
7,8 x 150	3	5190-2502	5190-2507	5190-2512
7,8 x 50 (precolumna)	3	5190-2505	5190-2510	5190-2515
4,6 x 300	3	5190-2503	5190-2508	5190-2513
4,6 x 150	3	5190-2504	5190-2509	5190-2514
4,6 x 50 (precolumna)	3	5190-6846	5190-6847	5190-6848

Recomendaciones y herramientas

Para conocer mejor la determinación de pesos moleculares y el análisis de agregados usando la solución compuesta por el sistema multidetector 1260 Infinity Bio-SEC y las columnas Bio SEC-3, consulte los siguientes documentos:

Detailed Aggregation Characterization of Monoclonal Antibodies Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection (n.º de publicación 5991-3954EN); y *Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection* (n.º de publicación 5991-3955EN).

www.agilent.com/search

Bio SEC-5

- Resolución excepcional para moléculas grandes.
- Altos niveles de estabilidad y eficiencia gracias a la capa hidrófila neutra y patentada.
- Mejora de la resolución y la capacidad de picos gracias al diseño especial del empaquetado, que aumenta el volumen de poros.
- Rendimiento robusto: reproducibilidad extraordinaria y larga vida útil de la columna.
- Estabilidad excelente, incluso con pH alto y concentraciones salinas altas o bajas.
- Desarrollo flexible de métodos: compatibilidad con la mayoría de los tampones acuosos.
- Amplia aplicabilidad: tamaños de poro de hasta 2.000 Å para vacunas y biomoléculas de alto peso molecular.
- Compatibilidad con sistemas MS.

Las columnas Bio SEC-5 son la elección perfecta para biomoléculas grandes y muestras con componentes de distintos pesos moleculares. Están empaquetadas con partículas de sílice de 5 µm recubiertas con una capa hidrófila, neutra y patentada, que ofrecen niveles inigualables de eficiencia y estabilidad; además, cuentan con seis tamaños de poro distintos para proporcionar una resolución óptima en todo el rango de pesos moleculares.



Especificaciones de las columnas

Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Rango de peso mol.	Rango de pH	Presión máx.	Flujo
100 Å	5 µm	100-100.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
150 Å	5 µm	500-150.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
300 Å	5 µm	5.000-1.250.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
500 Å	5 µm	15.000-5.000.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
1.000 Å	5 µm	50.000-7.500.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)
2.000 Å	5 µm	> 10.000.000	2-8,5	137 bar (2.000 psi)	1,0-10,0 ml/min (21,2 mm de d.i.)
					0,2-1,2 ml/min (7,8 mm de d.i.)
					0,1-0,4 ml/min (4,6 mm de d.i.)

Comparación de las columnas Bio SEC-3 y Bio SEC-5

Análisis de anticuerpos monoclonales

Columna: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2511
7,8 x 300 mm, 3 µm

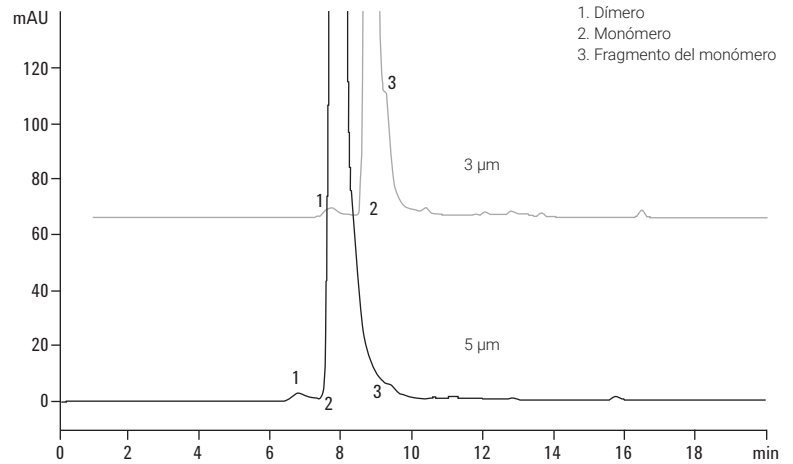
Columna: Bio SEC-5, 300 Å
5190-2526
7,8 x 300 mm, 5 µm

Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0

Flujo: 1 ml/min

Detector: UV (220 nm)

Muestra: Anticuerpo monoclonal humanizado



La columna de 3 µm ofrece una mayor definición del plano de fragmentación.

Recomendaciones y herramientas

Hay muchos factores que deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar un análisis de agregados para las proteínas: el efecto del tamaño y el peso molecular del soluto, las opciones existentes para la selección de columnas, consideraciones importantes sobre la fase móvil, etc. Puede encontrar más información sobre todos estos aspectos en el siguiente documento:

Guía práctica de Agilent sobre cromatografía de exclusión por tamaño para el análisis de biomoléculas (n.º de publicación 5991-3651ES)

www.agilent.com/search

Curvas de calibración: columnas Bio SEC-5

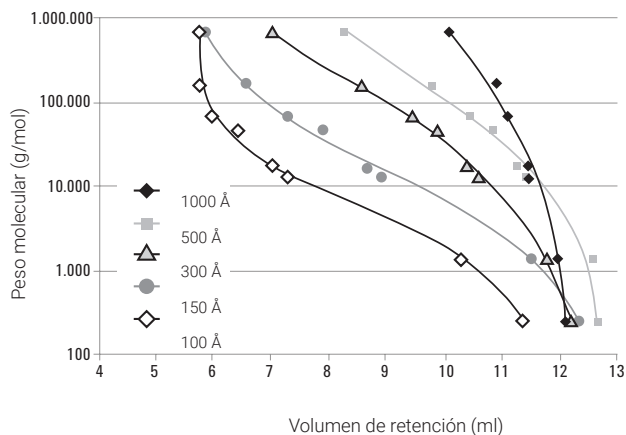
Columna: Bio SEC-5
7,8 x 300 mm, 5 µm

Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0

Flujo: 1,0 ml/min

Detector: UV (214 nm)

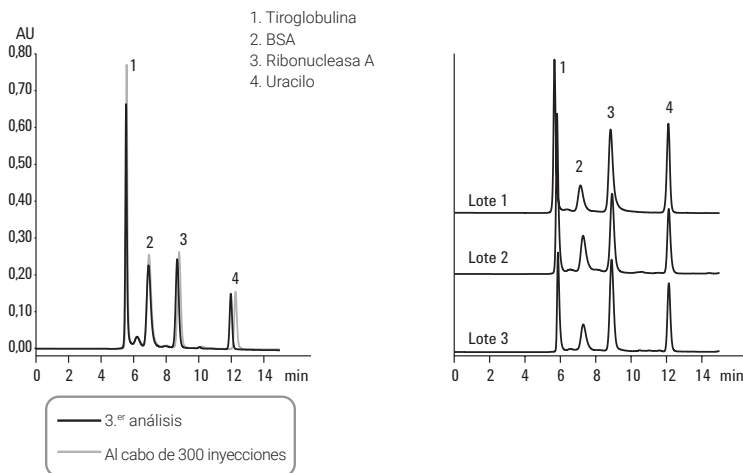
Proteínas	Peso mol.	Volumen de retención				
		1.000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Tiroglobulina	670.000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-globulina	150.000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
BSA	67.000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Ovoalbúmina	45.000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Mioglobina	17.000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonucleasa A	12.700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamina B12	1.350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Uracilo (marcador de permeación total)	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41



Excepcional reproducibilidad entre lotes

Columna: Bio SEC-5, 150 Å
5190-2521
7,8 x 300 mm, 5 µm

Fase móvil: Fosfato de sodio 150 mM, pH = 7,0



Para esta mezcla de cuatro proteínas, se observa una excelente reproducibilidad del tiempo de retención al cabo de 300 inyecciones y para tres columnas de diferentes lotes de fabricación.

Análisis de agregados y fragmentos

Bio SEC-5

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L59	Bio SEC-5 150 Å USP L59	Bio SEC-5 300 Å USP L59	Bio SEC-5 500 Å USP L59	Bio SEC-5 1.000 Å USP L59	Bio SEC-5 2.000 Å USP L59
21,2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21,2 x 50 (precolumna)	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7,8 x 300	5	5190-2516	5190-2521	5190-2526	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7,8 x 150	5	5190-2517	5190-2522	5190-2527	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7,8 x 50 (precolumna)	5	5190-2520	5190-2525	5190-2530	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4,6 x 300	5	5190-2518	5190-2523	5190-2528	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4,6 x 150	5	5190-2519	5190-2524	5190-2529	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4,6 x 50 (precolumna)	5	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862

Recomendaciones y herramientas

Actualice su tecnología SEC y pásese a las columnas AdvanceBio SEC 300 Å para obtener una mayor resolución y reducir las interacciones secundarias.

Consulte la **página 110** para obtener más información.

ProSEC 300S

- Rendimiento estable: partículas de sílice mecánicamente robustas que no producen sangrado durante su uso.
- Desarrollo sencillo de métodos: el rango ampliado de resolución lineal elimina la necesidad de seleccionar el tamaño de poro (una única columna permite analizar la mayoría de las proteínas globulares).
- Opciones para ayudarlo a perfeccionar la separación: dos diámetros internos de columna adaptados a las necesidades de los sistemas SEC multidetector.
- Aumento de la sensibilidad cuando se utiliza con detectores de dispersión de luz para identificar dímeros, trímeros y agregados.



La columna ProSEC 300S se ha diseñado específicamente como una solución de una sola columna para el análisis de proteínas globulares. La optimización y selección del tamaño de poro proporciona un rango ampliado de resolución lineal y permite utilizarla como columna única para el análisis de todo tipo de proteínas globulares.

Las partículas son extremadamente robustas y no se fragmentan durante su uso, lo que evita que se formen lixiviados con partículas. Esto proporciona una línea base excepcionalmente estable, lo que convierte a esta columna en la opción ideal para su uso con detectores de dispersión de luz.

Las columnas tienen dos tamaños distintos (4,6 y 7,5 mm de d.i.), adaptados a la cromatografía de exclusión por tamaño con sistemas multidetector, y son una opción para el análisis de compuestos con masas pequeñas.

Especificaciones de las columnas ProSEC 300S

Fase ligada	Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Rango de pesos mol. de las proteínas	Rango de pH	Flujo	Presión máx.
ProSEC 300S	300 Å	5 µm	1.500-800.000	2-7,5	< 1,5 ml/min (7,5 mm de d.i.) < 0,5 ml/min (4,6 mm de d.i.)	250 bar (3.700 psi)

ProSEC 300S

Dimensiones	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
7,5 x 600	5	PL1147-8501
7,5 x 300	5	PL1147-6501
4,6 x 250	5	PL1547-5501
Precolumnas		
7,5 x 50	5	PL1147-1501
4,6 x 50	5	PL1547-1501

Columnas de filtración con gel ZORBAX GF-250 y GF-450

- Modelos antiguos que deben utilizarse si los protocolos exigen usar productos de la categoría L35 de la USP.
- Dimensiones de columnas semipreparativas y preparativas.
- Compatibilidad con desnaturalizantes y modificadores orgánicos.
- Aptas para un amplio rango de pH (3-8).



Columnas de filtración con gel GF-250

Las columnas ZORBAX GF-250 y GF-450 de exclusión por tamaño (filtración con gel) son idóneas para separaciones por tamaño de proteínas y otras biomoléculas. El rango de separación por peso molecular es de 4.000 a 900.000 para proteínas globulares cuando se utilizan columnas GF-250 y GF-450 en serie. Las columnas de exclusión por tamaño GF-250 y GF-450 tienen una fase ligada hidrófila con grupos funcionales diol que consigue una alta recuperación de proteínas (típicamente, > 90 %); además, incluyen una exclusiva modificación de la sílice con óxido de circonio para obtener un rango operativo de pH entre 3 y 8. Las columnas GF-250 y GF-450 están empaquetadas con microesferas de sílice porosa de tamaño preciso y presentan una distribución estrecha de tamaños de poro y tamaños de partícula. El resultado es una columna de exclusión por tamaño eficaz, robusta y reproducible que puede emplearse para separaciones analíticas y preparativas de proteínas con flujos de hasta 3 ml/min. Estas columnas son compatibles con la presencia de desnaturalizantes y modificadores orgánicos (< 25 %) en la fase móvil para reducir la agregación de proteínas. Algunas de las aplicaciones habituales son las siguientes: separación de monómeros, dímeros y agregados de proteínas; desalinización; estimación del peso molecular de las proteínas; y separación de proteínas modificadas.

Especificaciones de las columnas UHPLC

Fase ligada	Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Rango de peso mol.	Área superficial	Rango de pH	Flujo	Presión máx.
ZORBAX GF-250	150 Å	4 µm	4.000-400.000	140 m ² /g	3,0-8,0	< 3,0 ml/min	350 bar
ZORBAX GF-450	300 Å	6 µm	10.000-900.000	50 m ² /g	3,0-8,0	< 3,0 ml/min	350 bar

Las especificaciones solo representan los valores típicos.

Columnas de filtración con gel ZORBAX GF-250 (USP L35) y GF-450 (USP L35)

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
GF-250, 150 Å	9,4 x 250	4	884973-901
GF-250, 150 Å	4,6 x 250	4	884973-701
GF-450, 300 Å	9,4 x 250	6	884973-902
Precolumnas (requieren hardware)			
Cartucho precolumna GF-450 Diol, 2/paq.	9,4 x 15	6	820675-111
Cartucho precolumna GF-250 Diol, 4/paq.	4,6 x 12,5	6	820950-911
Cartucho precolumna GF-450 Diol, 2/paq.	9,4 x 15	6	820675-111
Kit de hardware para precolumnas preparativas			840140-901
Kit de hardware para precolumnas			820999-901
Columnas PrepHT			
PrepHT GF-250, 150 Å	21,2 x 250	6	877974-901
PrepHT GF-450, 300 Å	21,2 x 250	6	877974-910
Terminales de conexión PrepHT, 2/paq.			820400-901
Cartucho precolumna PrepHT, 2/paq.	17,0 x 7,5	5	820212-911
Hardware para cartuchos precolumna			820444-901

Recomendaciones y herramientas

Las guías del usuario de las columnas son excelentes recursos que incluyen instrucciones acerca del uso y el cuidado de las columnas, además de los métodos iniciales recomendados:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

Caracterización de la glicosilación

Las modificaciones postranslacionales de la secuencia primaria de aminoácidos, incluida la glicosilación, tienen consecuencias funcionales y pueden afectar a la eficacia y la inmunogenicidad de un producto biofarmacéutico. La estructura del glicano también contribuye a la vida media de la proteína en el plasma y a la capacidad del anticuerpo monoclonal de activar la respuesta inmunogénica necesaria para que el producto resulte eficaz. Las autoridades reguladoras consideran que la glicosilación es uno de los atributos de calidad críticos; por lo tanto, debe caracterizarse y cuantificarse, determinando los rangos aceptables, como parte del proceso de desarrollo de un producto farmacéutico innovador, biosimilar o biomejorado con glicoproteínas.

Se utilizan diversos métodos analíticos para obtener información sobre la estructura y la forma de glicosilación de las proteínas.

- Para la identificación estructural, incluida la identificación de los centros de glicosilación, se emplea la detección por espectrometría de masas con cromatografía de fase reversa y de interacción hidrofílica (HILIC).
- Los glicanos con ácido siálico también incrementarán la carga de la proteína y pueden caracterizarse mediante cromatografía de intercambio iónico.

Una vez caracterizados las glicoproteínas y los fragmentos de glicopéptidos para obtener información sobre el número de centros de glicosilación y la posición de estos, será necesario identificar y cuantificar los glicanos individuales. Para ello, habrá que escindir los glicanos de la proteína y analizarlos con columnas HILIC. Dado que los glicanos no tienen cromóforos, debe llevarse a cabo una derivatización con un fluoróforo para permitir la detección FLD y mapear y cuantificar los glicanos.



Selección de columnas para cromatografía de interacción hidrofílica

Aplicación	Columnas Agilent	Notas
Glicanos escindidos de una glicoproteína, incluidos los anticuerpos monoclonales	AdvanceBio Glycan Mapping	Fase ligada de amida para conseguir un equilibrio rápido y mejorar la selectividad para los glicanos.
	1,8 µm	Basadas en la tecnología de partículas completamente porosas para obtener separaciones de alta velocidad y aplicaciones de alta productividad. Estabilidad hasta 1.200 bar para su uso con el sistema LC 1290 Infinity II.
	2,7 µm	Basadas en la tecnología Poroshell para obtener partículas superficialmente porosas con menores distancias de difusión. Esto permite lograr separaciones de alta resolución a menor presión y usar columnas más largas para aumentar la eficiencia de la separación.
Péptidos y glicopéptidos hidrófilos	ZORBAX RRHD 300 Å de 1,8 µm	Partículas de sílice con un tamaño de poro de 300 Å que ofrecen una separación ortogonal respecto a las columnas de fase reversa ZORBAX RRHD 300 Å de 1,8 µm.
	AdvanceBio Glycan Mapping	La fase ligada de amida proporciona una capacidad HILIC alternativa para pequeños péptidos y glicopéptidos hidrófilos.

AB

AB

AB

Parte de la gama AdvanceBio

Ventajas de un flujo de trabajo completo de Agilent para N-glicanos

La oferta de instrumentos y consumibles de Agilent puede dar respuesta a todas sus necesidades: desde la preparación de muestras hasta la obtención de resultados fiables.

Gracias a la incorporación de los productos y servicios de ProZyme, ahora nuestra experiencia abarca el flujo de trabajo completo de análisis de N-glicanos. Además, la gama de Agilent incluye ahora la tecnología de preparación de muestras de N-glicanos Gly-X con InstantPC, que ofrece la mayor productividad y sensibilidad analítica de su categoría. También hay disponibles reactivos individuales para la investigación de la glicobiología, como patrones de glicanos y glicoenzimas, además de un amplio abanico de servicios analíticos.

Para obtener más información, visite: www.agilent.com/chem/better-together

Columnas AdvanceBio Glycan Mapping

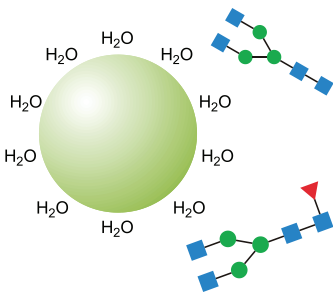
Columnas, patrones y productos de preparación de muestras AdvanceBio Glycan Mapping para la eliminación selectiva de los N-glicanos de una glicoproteína, incluidos los anticuerpos monoclonales.

Velocidad de análisis: las columnas de 1,8 µm ofrecen un análisis de N-glicanos de alta productividad para aquellos casos en los que la velocidad sea el factor determinante, ya sea debido al número de muestras o a la necesidad de disponer inmediatamente de datos.

Resolución: pueden conseguirse separaciones de alta resolución utilizando partículas de 2,7 µm empaquetadas en una columna de 250 mm. Esta mayor resolución permite una cuantificación precisa de los glicanos de interés y de los cambios en el perfil de glicosilación de las proteínas que puedan haberse producido durante la expresión.

Métodos integrales: para la preparación de muestras, el análisis cromatográfico y la interpretación de los datos, con el fin de garantizar la reproducibilidad y la precisión de la identificación y la cuantificación.

Realización de pedidos con sencillez: una única referencia para pedir todo lo necesario para el flujo de trabajo completo de preparación de muestras, desde la solubilización de proteínas hasta la purificación de glicanos marcados con 2-AB, además de kits para cada parte del flujo de trabajo de preparación de muestras, lo que aporta versatilidad.



Especificaciones de las columnas						
Fase ligada	Diám. int. (mm)	Partículas	Desactivación	Estabilidad de pH	Temperatura operativa	Límite de presión
Amida HILIC	2,1 y 4,6	1,8 µm, completamente porosas	No	2-7	40 °C	1.200 bar
Amida HILIC	2,1 y 4,6	2,7 µm, superficialmente porosas	No	2-7	40 °C	600 bar

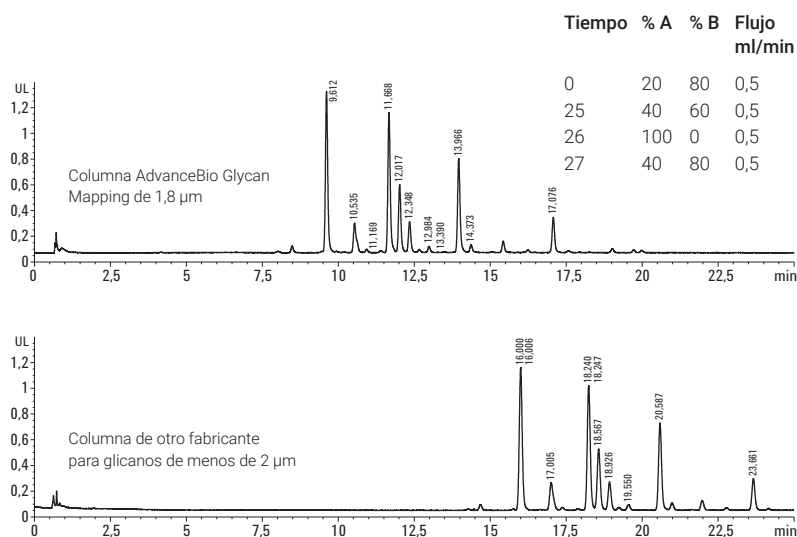
El mapeo de un N-glicano de una glicoproteína, incluidos los anticuerpos monoclonales, requiere la escisión enzimática (con PNGasa F) de los N-glicanos de la cadena principal de aminoácidos de la proteína. Los N-glicanos escindidos pueden analizarse por cromatografía de interacción hidrofílica con detección MS o, tras una derivatización con un fluoróforo (2-aminobenzamida (2-AB)), por HPLC/UHPLC con detección FLD o MS. Las columnas AdvanceBio Glycan Mapping proporcionan velocidad de análisis (1,8 µm) y alta resolución (2,7 µm) para la identificación y cuantificación de los glicanos escindidos.

Velocidad de análisis

Las columnas AdvanceBio Glycan Mapping de 1,8 µm se recomiendan para análisis de alta productividad en los que se requieran tiempos cortos de análisis.

Resultados excelentes en un 40 % menos de tiempo que los productos de la competencia

Columna:	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Columna B:	Columna de otro fabricante para glicanos de menos de 2 µm
Fase móvil:	A: formiato de NH ₄ 100 mM, pH = 4,5 B: ACN
Volumen de inyección:	2 µl en ACN y formiato de NH ₄ 100 mM (70:30)
Termostato de muestra:	10 °C
FLD:	Excitación = 260 Emisión = 430
Flujo:	0,35 ml/min
Instrumento:	Sistema LC 1290 Infinity con detector de fluorescencia (FLD) 1260 Infinity
Muestra:	Biblioteca de N-glicanos IgG humanos marcados con 2-AB (ref. 5190-6996)



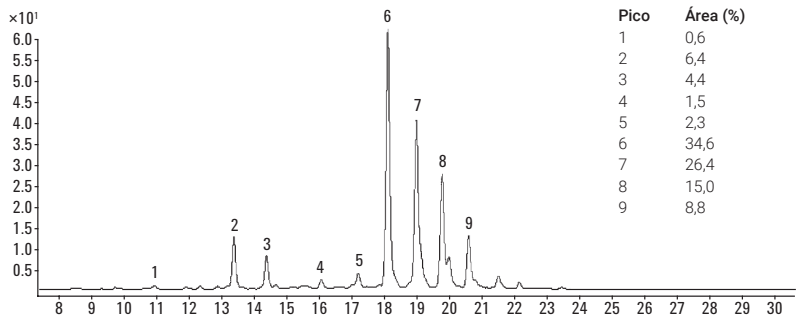
La columna AdvanceBio Glycan Mapping ofrece una mejor resolución, bandas más estrechas y una mayor capacidad de picos que la columna de menos de 2 µm del otro fabricante en una configuración de 2,1 x 150 mm.

Resolución

Para obtener separaciones de alta resolución, se recomienda usar la columna AdvanceBio Glycan Mapping con medio de 2,7 µm y longitudes de columna mayores.

Resultados excelentes en un 40 % menos de tiempo que los productos de la competencia

Columna:	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Instrumento:	Sistema LC binario 1290 Infinity
Tampón:	A: formiato de amonio 100 mM en agua, pH = 4,5 B: acetonitrilo
Condiciones del sistema MS:	Temperatura del gas: 250 °C Temperatura del gas de focalización: 250 °C Flujo de gas: 8 l/min Flujo de gas de focalización: 8 l/min Nebulizador: 25 psi Vcap: 3.500 V Boquilla: 1.000 V Fragmentador: 200 V Skimmer: 45 V Oct. 1 RF Vpp: 550 Energías de colisión: 15 y 30 V Modo: MS y MS/MS específico



Los N-glicanos, escindidos de la fetuina usando PNGasa F, se analizaron por UHPLC-FLD tras una derivatización con 2-AB. La asignación de picos mediante MS muestra que los N-glicanos escindidos de la fetuina son glicanos biantenarios y triantenarios complejos que contienen ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), pero no fucosa. Los N-glicanos de la fetuina marcados con 2-AB se analizaron por HILIC-UHPLC y las asignaciones de pico se determinaron mediante MS.

Condiciones del instrumento

	Gradiente de patrón de anticuerpos	Gradiente de fetuina	Gradiente de ovoalbúmina
Flujo inicial	0,5 ml/min	0,5 ml/min	0,5 ml/min
Gradiente	0 min, 85 % B	0 min, 75% B	0-6 min, 85 % B
	5 min, 75% B	45 min, 50% B	10 min, 80% B
	35 min, 64% B	47 min, 40 % B, flujo de 0,5 ml/min	60 min, 70% B
	40 min, 50% B	47,01 min, flujo de 0,25 ml/min	65 min, 50% B, flujo de 0,5 ml/min
	42 min, flujo de 0,5 ml/min	49 min, 0% B	65,01 min, flujo de 0,25 ml/min
	42,01 min, flujo de 0,25 ml/min		
	43 min, 0 % B	51 min, 0% B	68 min, 0% B
	48 min, 0% B	51,01 min, 75 % B, flujo de 0,25 ml/min	73 min, 0% B
	50 min, 85 % B	52,00 min, flujo de 0,5 ml/min	74 min, 85 % B, flujo de 0,25 ml/min
	50,01 min, flujo de 0,25 ml/min		
	51 min, flujo de 0,5 ml/min		75,00 min, flujo de 0,5 ml/min
Tiempo de parada	51 min	52 min	75 min
Tiempo posterior	20 min	20 min	20 min
Volumen de inyección	5 µl	1 µl	1 µl
Muestreador automático termostatzado	5 °C		
FLD	Excitación = 260 nm Emisión = 430 nm		
Anchura de pico	> 0,013 min (tiempo de resp.: 0,25 s) (37,04 Hz)		

Información detallada de los N-glicanos de fetuina

Pico	Oxford	Estructura
1	A2G2S1	
2 y 3	A2G2S2	
4	A3GGS2	
5	A3G3S3 y A3G3S2 (trazas)	
6	A3G3S3 y A3G3S2 (trazas)	
7	A3G3S3 y A3G3S4 (trazas)	
8	A3G3S4 y A3G3S3	
9	A3G3S4	

- Fucosa
- Galactosa
- Manosa
- N-acetilglucosamina
- Ácido N-acetilneuramínico

Patrones de N-glicanos

Agilent proporciona los materiales de referencia (el patrón de N-glicanos IgG y el patrón de escalera de dextrano) necesarios como parte del flujo de trabajo para garantizar un rendimiento óptimo del proceso de preparación de muestras y del sistema LC. Los dos patrones están disponibles marcados con 2-AB y sin marcar, para su uso como materiales de referencia para la preparación de muestras.

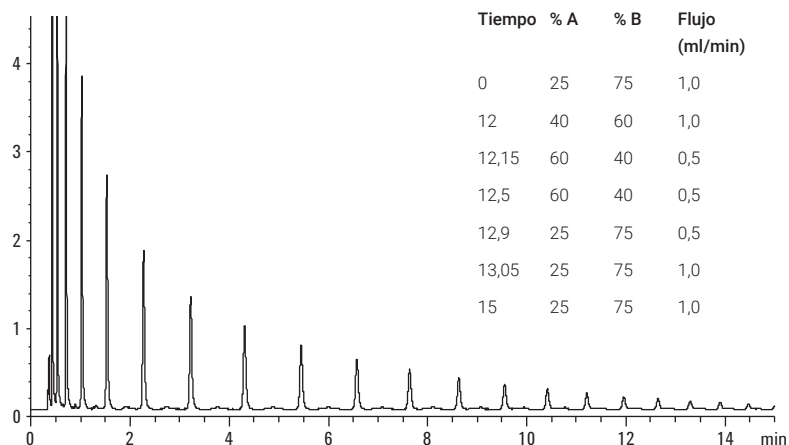
El patrón de N-glicanos IgG se usa como prueba de garantía de calidad para todos los lotes de medio AdvanceBio Glycan Mapping, con el fin de garantizar que cada columna cumpla los requisitos de reproducibilidad más estrictos para este exigente análisis.

El patrón de escalera de dextrano se emplea para calibrar el sistema tomando como referencia los tiempos de elución de las unidades de glucosa de la serie homóloga del dextrano y para elaborar el informe de los datos de retención asociados a las unidades de glucosa.



Separación de una escalera de dextrano marcada con 2-AB

Columna:	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 μm
Fase móvil:	A: NH ₄ F 100 mM, pH = 4,5 B: ACN
FLD:	Excitación = 260 nm Emisión = 430 nm
Volumen de inyección:	2 μl; 10 pmol de glicano total en 1 μl de ACN y agua (75:25)
Muestra:	Escalera de dextrano marcada con 2-AB (ref. 5190-6998)



En este análisis se usan el patrón de escalera de dextrano de Agilent y una columna AdvanceBio Glycan Mapping para correlacionar los tiempos de retención de glicanos desconocidos.

Columnas AdvanceBio Glycan Mapping de 1,8 µm (estables hasta 1.200 bar)

Tamaño (mm)	Referencia
2,1 x 150	859700-913
2,1 x 100	858700-913
2,1/1,8 µm (precolumna rápida)	821725-905

Columnas AdvanceBio Glycan Mapping de 2,7 µm (partículas superficialmente porosas; estables hasta 1.200 bar)

Tamaño (mm)	Referencia
4,6 x 250	680975-913
4,6 x 150	683975-913
4,6 x 100	685975-913
2,1 x 250	651750-913
2,1 x 150	683775-913
2,1 x 100	685775-913
2,1/2,7 µm (precolumna rápida)	821725-906

Patrones de N-glicanos

Descripción	Referencia
Patrón de escalera de dextrano, 10 µg, vial de 0,5 ml	5190-6997
Patrón de escalera de dextrano marcado con 2-AB, 200 pmol	5190-6998
Biblioteca de N-glicanos IgG, 20 µg, 0,5 ml	5190-6995
Biblioteca de N-glicanos IgG marcados con 2-AB, 200 pmol	5190-6996

Análisis de péptidos y glicopéptidos hidrófilos

El análisis de péptidos requiere una alta selectividad y reproducibilidad entre análisis, algo que proporciona la cromatografía de fase reversa. Sin embargo, las columnas de fase reversa ofrecen una retención y una selectividad limitadas para los péptidos hidrófilos, incluidos los glicopéptidos. Las columnas ZORBAX RRHD 300-HILIC de 1,8 µm mejoran la retención de los péptidos y glicopéptidos hidrófilos en comparación con las columnas de fase reversa, lo que evita la pérdida de información valiosa durante la realización de experimentos de mapeo de péptidos.

Las dos técnicas son ortogonales y proporcionan información complementaria para el análisis de la estructura primaria de una proteína.

- Una única partícula ZORBAX con un tamaño de poro de 300 Å para el análisis de péptidos de todos los tamaños.
- La partícula de 1,8 µm ofrece un rendimiento propio de la UHPLC y estabilidad a 1.200 bar.
- Aporta ortogonalidad a la UHPLC cuando se usa con columnas de fase reversa ZORBAX RRHD 300 Å.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Diám. int. (mm)	Tamaño de partícula	Desactivación	Estabilidad de pH	Temperatura operativa	Límite de presión
Sílice	2,1	1,8, completamente porosas	No	1-8	40 °C	1.200 bar

El mapeo de péptidos se usa para la caracterización y la determinación de perfiles de impurezas de productos bioterapéuticos con proteínas. La UHPLC/HPLC de fase reversa es la técnica que se emplea de forma rutinaria; sin embargo, cuando la digestión contiene péptidos hidrófilos (por ejemplo, glicopéptidos), podría perderse información valiosa. La columna ZORBAX RRHD 300-HILIC retiene los glicopéptidos hidrófilos y, si se acopla a la espectrometría de masas, posibilita la identificación de este importante grupo de fragmentos de proteínas.

Identificación de glicopéptidos en una digestión tripsínica de proteínas

Columna: ZORBAX RRHD 300-HILIC
858750-901
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

Fase móvil: A: acetonitrilo (100 %)
B: formiato de amonio 50 mM, pH = 4,5

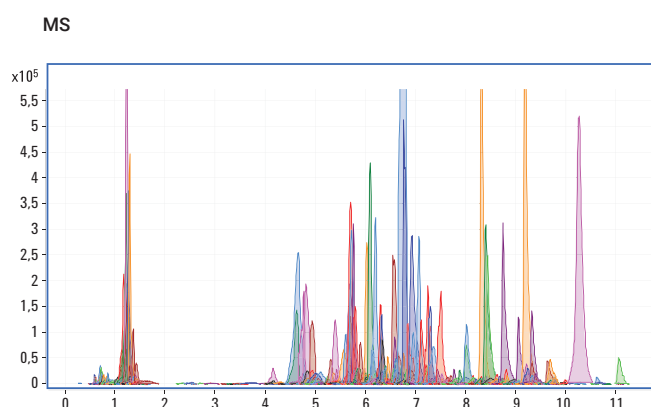
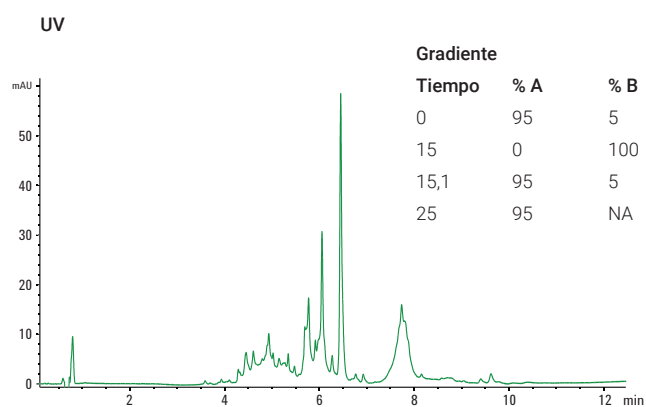
Flujo: 0,4 ml/min

Inyección: 5 µg

Detector: UV (280 nm)

Instrumento: Sistema LC 1290 Infinity, sistema 6224 TOF de masa exacta y fuente ESI dual en modo de ionización positiva

Muestra: Glicopéptido de proteína de EPO digerida (1 mg/ml)



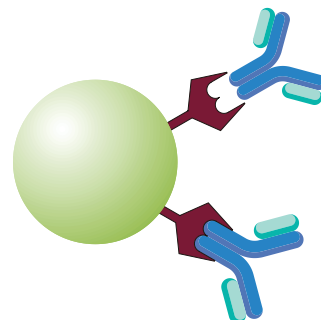
La figura UV muestra la separación de un mapa de péptidos de eritropoyetina (EPO) utilizando la columna ZORBAX RRHD 300-HILIC de 2,1 x 100 mm, mientras que la figura MS muestra los cromatogramas de los compuestos extraídos de la EPO correspondiente. A partir de los datos obtenidos por HILIC-MS se identificaron siete péptidos que no se habrían podido identificar mediante RP-MS. La HILIC es una técnica ortogonal a la RP y ofrece mayor resolución para los glicopéptidos hidrófilos en digestiones enzimáticas de proteínas.

Columnas ZORBAX RRHD 300-HILIC de 1,8 µm

Tamaño (mm)	Diám. int. (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 100	1,8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 50	1,8	857750-901

Titulación

La cromatografía de afinidad es una técnica de gran poder de resolución que aprovecha las interacciones moleculares altamente específicas que se suelen producir entre proteínas específicas (por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo). Agilent ofrece diversos productos específicos para análisis de afinidad, como las columnas monolíticas Protein A y Protein G (que permiten aislar y cuantificar IgG), y una serie de sistemas de eliminación por afinidad múltiple para eliminar proteínas muy abundantes en muestras biológicas.



Columnas Bio-Monolith para HPLC

- Diseñadas para la separación analítica de todas las IgG (humanas y de ratón).
- Separaciones independientes del flujo: sin difusión, sin poros y sin volumen muerto, lo que hace que el transporte entre las fases móvil y estacionaria sea muy rápido.
- Separaciones extremadamente rápidas que acortan el tiempo de desarrollo de métodos y reducen los costes.
- Bloqueo de los parámetros de los métodos en mucho menos tiempo y con un consumo de tampón sensiblemente menor.

Las columnas Bio-Monolith Protein A y Protein G para HPLC forman parte de la familia de columnas Bio-Monolith. Las columnas Bio-Monolith Protein A y Protein G son compatibles con los instrumentos LC preparativos y HPLC, incluidos los sistemas LC bioinertes cuaternarios 1100, 1200 y 1260.



Columna Bio-Monolith Protein A (5069-3639)

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre la tolerancia a las sales para la unión de anticuerpos monoclonales y la compatibilidad con los tampones ácidos para la elución de anticuerpos monoclonales en las columnas Bio-Monolith Protein A, consulte la publicación **5991-2990EN**.

www.agilent.com/search

Especificaciones de las columnas

Dimensiones	5,2 mm x 4,95 mm
Volumen de la columna	100 µl
Presión máxima	150 bar (15 MPa/2.200 psi)
Temperatura mín./máx.	Funcionamiento: 2-40 °C
	Almacenamiento: 2-8 °C
pH recomendado	Rango de funcionamiento: 2-13
	Limpieza <i>in situ</i> : 1-14
Materiales de fabricación	Estructura: acero inoxidable
	Empaquetado: monolito altamente poroso de un copolímero de metacrilato de glicidilo y dimetacrilato de etileno
Anillo de color identificativo	Bio-Monolith Protein A: blanco Bio-Monolith Protein G: naranja
Vida útil/período de caducidad	12 meses

Columnas Bio-Monolith Protein A y Protein G

Descripción	Referencia
Bio-Monolith Protein A, 4,95 x 5,2 mm	5069-3639
Bio-Monolith Protein G, 4,95 x 5,2 mm	5190-6900

Recomendaciones y herramientas

Puede encontrar más información en:

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (n.º de publicación **5991-5135EN**)

Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures (n.º de publicación **5991-2990EN**)

Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (n.º de publicación **5991-5124EN**)

Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (n.º de publicación **5991-5125EN**)

www.agilent.com/search

Afinidad de unión de las columnas Bio-Monolith Protein A y G por diferentes subclases de IgG

Anticuerpo	Protein A	Protein G
Humano		
IgG1 humana	++++	++++
IgG2 humana	++++	++++
IgG3 humana	–	++++
IgG4 humana	++++	++++
IgA humana	++	–
IgD humana	++	–
IgE humana	++	–
IgM humana	++	–
Ratón		
IgG1 de ratón	+	++
IgG2a de ratón	++++	++++
IgG2b de ratón	++++	+++
IgG3 de ratón	+	+++
IgM de ratón	+/-	–
Fragmentos de anticuerpos		
Fab humano	+	+
F(ab')2 humano	+	+
scFv humano	+	+
Fc humano	+	+
κ humano	+	+
λ humano	+	+
++++ = Afinidad fuerte +++ = Afinidad moderada ++ = Afinidad débil + = Afinidad leve – = Afinidad nula		



Cuantificación rápida de un anticuerpo monoclonal humanizado

Columna: Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Fase móvil: A: fosfato 50 mM, pH = 7,4
B: ácido cítrico 100 mM, pH = 2,8

Flujo: 1 ml/min

Volumen de inyección: Variable (50 µl; optimizado para sobrenadante de cultivos de células de ovario de hámster chino que contenga IgG1)

Gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B	
0-0,5	100	0	Fijación
0,6-1,7	0	100	Elución
1,8-3,5	100	0	Estabilización

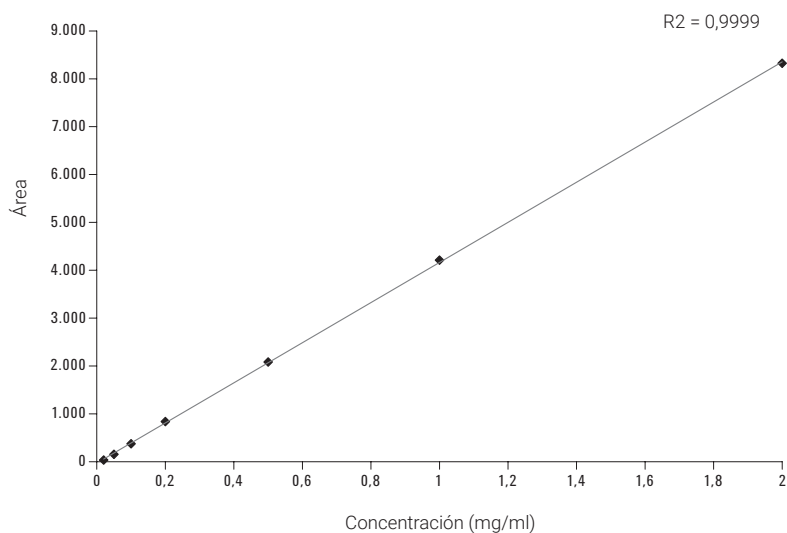
Temperatura: Ambiente

Detector: UV (280 nm)

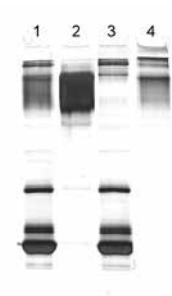
Colección de fracciones: Basada en el tiempo

Muestra: IgG1 (1-20 mg/ml) y sobrenadante de cultivo de células de ovario de hámster chino que contenga IgG1 (hasta 20 mg/ml de proteína total)

	TR (min)	Área de pico
1	383	1,666
2	372	1,666
3	365	1,665
4	389	1,667
5	383	1,666
6	378	1,666
7	379	1,668
8	377	1,666
9	376	1,667
10	377	1,667
Media	378	1,667
S	6,52	0,001
DER (%)	1,73	0,060



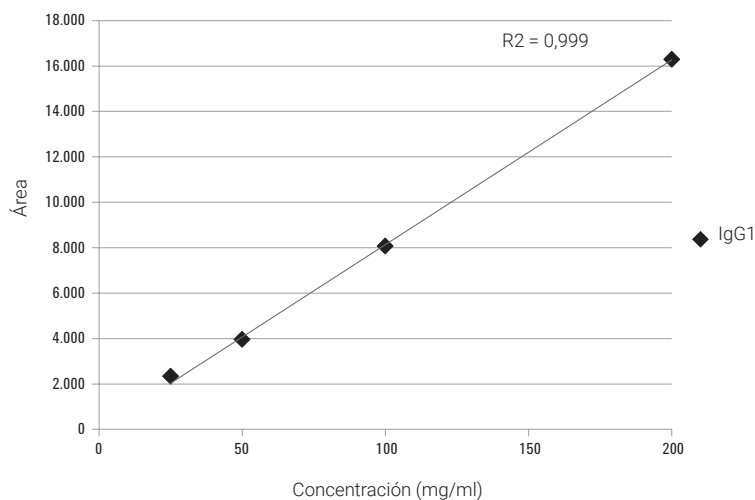
Curvas de calibración para trastuzumab humanizado modificado (panel A: 0-2 mg/ml; panel B: 25-200 mg/ml).



Leyenda:

Franja 1: suero completo antes de la separación
Franja 2: patrón de IgG
Franja 3: pico 1 (fracción de flujo continuo)
Franja 4: pico 2 (fracción ligada a Protein A; por ejemplo, IgG1)

Análisis por SDS-PAGE de fracciones de la separación.



Ausencia de efectos del flujo alto sobre la eficiencia de unión

Columna: Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5,2 x 4,95 mm

Fase móvil: A: tampón fosfato sódico, 20 mM, pH = 7,4
B: ácido cítrico 0,1 M, pH = 2,8

Flujo: 1,0, 1,5 y 2,0 ml/min

Inyección: 4 µl (concentración de IgG1 de 2,5 mg/ml; enriquecida con sobrenadante con una concentración de 20 mg/ml de *E. coli*)

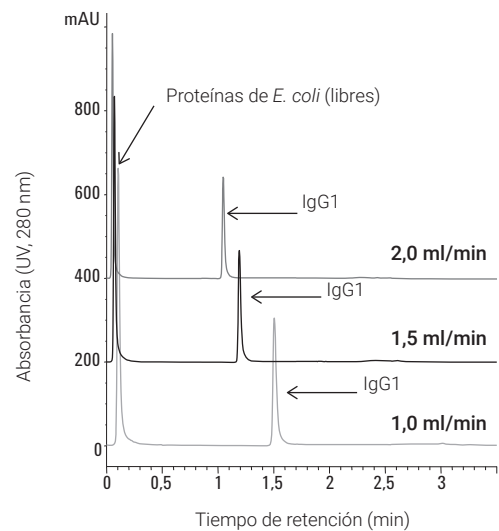
Detector: UV (280 nm)

Gradiente: 0 % B, 0,5 min; 100 % B, 0,6-1,7 min;
0 % B, 1,8-3 min

Temperatura: 25 °C

Muestra: IgG1 humanizada y lisado de *E. coli*

Instrumento: Sistema LC bioinerte 1260 Infinity

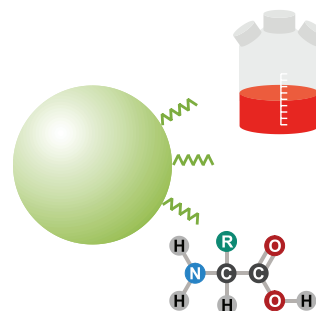


Unión de IgG1 con la columna Bio-Monolith Protein A, evaluada con distintos flujos. En este estudio se cargó más muestra para observar con facilidad los cambios en el cromatograma y en la integración de la señal.

Flujo frente a área relativa de pico para proteínas libres e IgG1					
Flujo (ml/min)	Área prot. libres (mAU/s)	Área IgG1 (mAU/s)	Área relativa prot. libres (%)	Área relativa IgG1 (%)	Presión (bar)
1,0	1230	738	63	37	32
1,5	840	492	63	37	47
2,0	636	363	64	36	68

Análisis de cultivos celulares y aminoácidos

Las columnas AdvanceBio de Agilent facilitan a los laboratorios de biotecnología el análisis de aminoácidos y otros metabolitos pequeños en medios de cultivo celular agotados, con o sin derivatización de la muestra. Las columnas para ambas soluciones se someten a ensayos con aminoácidos para garantizar la calidad y el rendimiento. Solo tendrá que elegir el flujo de trabajo que mejor se adapte a sus necesidades.



Elija el kit Agilent AdvanceBio Amino Acid Analysis para conseguir el mejor análisis LC/UV del sector

- Consiga una derivatización automatizada y on-line de aminoácidos con separación por LC de fase reversa y detección UV.
- Se puede utilizar con cualquier sistema LC de Agilent.
- Minimice la inversión en instrumentos y experiencia.

Elija las columnas Agilent AdvanceBio MS Spent Media para lograr un análisis LC/MS rápido y sin derivatización

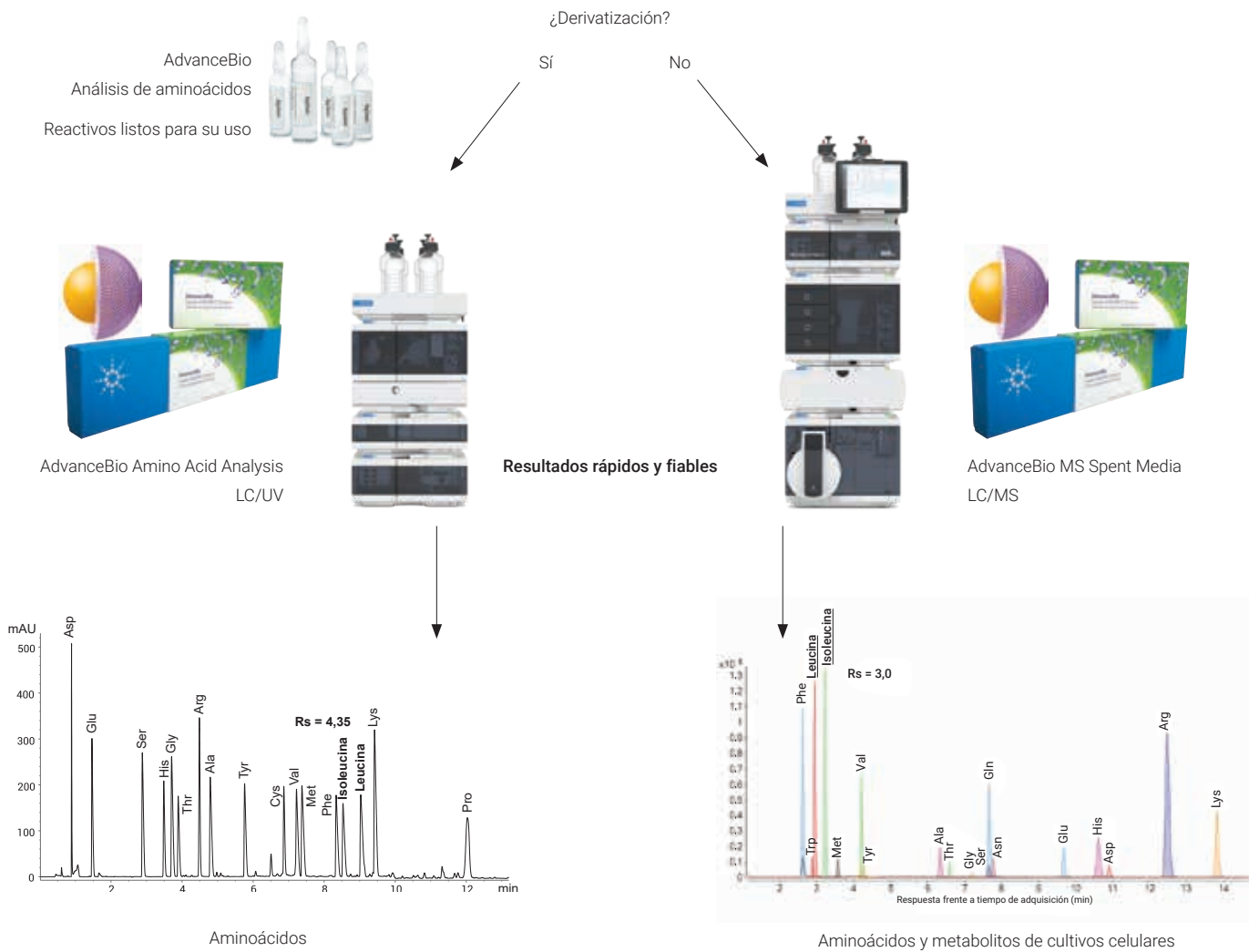
- Analice aminoácidos y otros metabolitos de cultivos celulares con un único método: separación por cromatografía de líquidos HILIC con detección MS.
- Evite tener que derivatizar la muestra.
- Se puede utilizar con cualquier sistema LC/MS.
- No se requiere resolución cromatográfica de la línea base gracias a la detección MS.

Recomendaciones y herramientas

Las placas de pocillos y las almohadillas de sellado Agilent InfinityLab le permiten disponer de contenedores de muestras idóneos para sus aplicaciones LC/MS de alta productividad.

Visite: www.agilent.com/chem/well-plates

Soluciones Agilent para el análisis de medios de cultivo agotados



AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)

Las columnas AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA) de Agilent posibilitan separaciones rápidas, sensibles y reproducibles de aminoácidos en hidrolizados de proteínas y medios de cultivo celular.

La gama AdvanceBio AAA incluye reactivos de eficacia probada para la derivatización de aminoácidos, un kit de patrones de aminoácidos listo para usar y columnas basadas en la innovadora tecnología Poroshell de Agilent, junto con el soporte experto de Agilent. En conjunto, los productos de la gama AdvanceBio AAA y los instrumentos LC Agilent serie InfinityLab ofrecen una solución integral para el análisis de aminoácidos.

Estas columnas forman parte de la familia AdvanceBio de Agilent, diseñada para aportar soluciones innovadoras para la caracterización de biomoléculas.

- Resultados fiables: separaciones de alta resolución debido a la eficiente morfología de las partículas Poroshell.
- Reducción de costes: larga vida útil de la columna gracias a la sílice modificada químicamente, robusta y resistente a valores de pH altos.
- Mayor flexibilidad: compatibilidad con los sistemas HPLC y UHPLC gracias a las partículas de 2,7 µm de diámetro.
- Control de calidad: las columnas AdvanceBio AAA se someten a pruebas por lotes con patrones de aminoácidos para garantizar su calidad.
- Realización sencilla de pedidos: los patrones y reactivos están disponibles en forma de kits.
- Derivatización on-line automatizada: con sistemas de inyección analíticos de Agilent.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Tamaño de partícula	Tamaño de poro	Límite de temp.	Rango de pH	Desactivación	Límite de presión
C18	2,7 µm	100 Å	60 °C	3,0-11,0	Doble	600 bar

Recomendaciones y herramientas

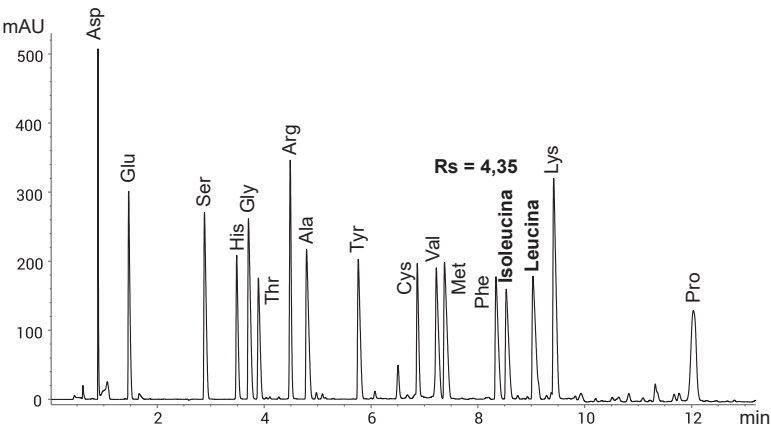
Para obtener más información sobre la solución integral de Agilent para el análisis de aminoácidos, visite: www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide

Columnas AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)

Descripción	Referencia
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 3,0 x 100 mm, 2,7 µm	695975-322
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm	655950-802
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 3,0 x 5 mm, 2,7 µm (3 precolumnas/paq.)	823750-946
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 4,6 x 5 mm, 2,7 µm (3 precolumnas/paq.)	820750-931

Análisis por LC/UV

Columna:	Agilent AdvanceBio Amino Acid Analysis 4,6 x 100 mm Ref. 655950-802	
Temperatura de la columna:	30 °C	
Fase móvil:	pH bajo, detección MS en modo de ionización positiva: A = Na ₂ HPO ₄ 10 mM y Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM, pH = 8,2 B = acetonitrilo, metanol y agua (45:45:10, v:v:v)	
Flujo:	1,5 ml/min	
Gradiente:	Tiempo (min)	% B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
	15,7	2
	18	Fin
Muestra:	Hidrolizado de proteínas	
Detección:	Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity II WR	



Cromatograma ultravioleta de aminoácidos procedentes de un hidrolizado de proteínas. La resolución entre la leucina y la isoleucina es de 4,35, un valor que cumple sobradamente el requisito de la Farmacopea Europea (EP), que exige que la resolución sea superior a 1,5 [EP 9.0, sección 2.2.56, "Análisis de aminoácidos"].

Patrones y kits AdvanceBio Amino Acid Analysis

Todos los reactivos de derivatización y patrones de aminoácidos necesarios para la cuantificación se incluyen en una única referencia. Pueden pedirse componentes individuales según sea necesario.

Patrones y reactivos AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)

Descripción	Referencia
Kit de patrones y reactivos	5190-9426
Contenido del kit (cada producto puede pedirse por separado)	
Tampón de borato, 100 ml	5061-3339
Reactivo FMOC, 10 ampollas de 1 ml, para análisis de aminoácidos	5061-3337
Reactivo OPA, 10 mg/ml, 6 ampollas de 1 ml	5061-3335
Ácido ditiodipropiónico (DTDPA), 5 g	5062-2479
Patrón de aminoácidos, 1 nmol, 10/paq.	5061-3330
Patrón de aminoácidos, 250 pmol, 10/paq.	5061-3331
Patrón de aminoácidos, 100 pmol, 10/paq.	5061-3332
Patrón de aminoácidos, 25 pmol, 10/paq.	5061-3333
Patrón de aminoácidos, 10 pmol, 10/paq.	5061-3334
Complemento de aminoácidos, 1 g de cada aminoácido	5062-2478



Tampón de borato, 100 ml
(5061-3339)

Cada patrón de aminoácidos contiene los siguientes aminoácidos:

- Glicina
- L-serina
- L-arginina
- L-cisteína
- L-alanina
- L-treonina
- L-histidina
- L-fenilalanina
- L-valina
- L-tirosina
- Ácido L-glutámico
- L-lisina
- L-leucina
- L-prolina
- Ácido L-aspártico
- L-metionina
- L-isoleucina



Complemento de aminoácidos, 1 g
de cada aminoácido (5062-2478)



AdvanceBio MS Spent Media

Las columnas Agilent AdvanceBio MS Spent Media son columnas HILIC que consiguen separaciones rápidas, sensibles y reproducibles de aminoácidos sin derivatizar y otros metabolitos polares presentes en medios de cultivo celular de bioprocesadores para su posterior detección por espectrometría de masas.

Junto con los instrumentos LC serie InfinityLab y los instrumentos MS de Agilent, las columnas AdvanceBio MS Spent Media ofrecen una solución completa para el análisis de medios agotados.

Las columnas AdvanceBio MS Spent Media son una nueva incorporación a la familia Agilent AdvanceBio, y se han diseñado como soluciones innovadoras para la producción y caracterización de biomoléculas.

- Flujo de trabajo rápido y basado en MS.
- No es necesario derivatizar las muestras, lo que ahorra tiempo y recursos.
- Estructura de la columna de acero inoxidable forrado de PEEK, que proporciona una ruta de flujo inerte para conseguir una forma de pico excelente y la recuperación de metabolitos iónicos complejos.
- Resolución cromatográfica de línea base de isómeros como la leucina y la isoleucina.
- Las columnas se someten a ensayos con aminoácidos para garantizar la calidad y el rendimiento.
- Excelente sensibilidad analítica con fases móviles idóneas para la MS.
- Compatibilidad con los sistemas HPLC y UHPLC gracias a las partículas Poroshell de 2,7 µm.

Especificaciones de las columnas

Fase ligada	Tamaño de poro	Tamaño de partícula	Límite de temperatura	Rango de pH	Límite de presión
HILIC-Z	100 Å	2,7 µm	80 °C (a pH = 7)	3,0-11,0 (a 35 °C)	600 bar

AdvanceBio MS Spent Media

Descripción	Referencia
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 100 mm, 2,7 µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	673775-901

Análisis por LC/MS

Columna: Agilent AdvanceBio
MS Spent Media
2,1 x 100 mm
Ref. 675775-901

Temperatura
de la columna:

30 °C

Fase móvil:
positiva:

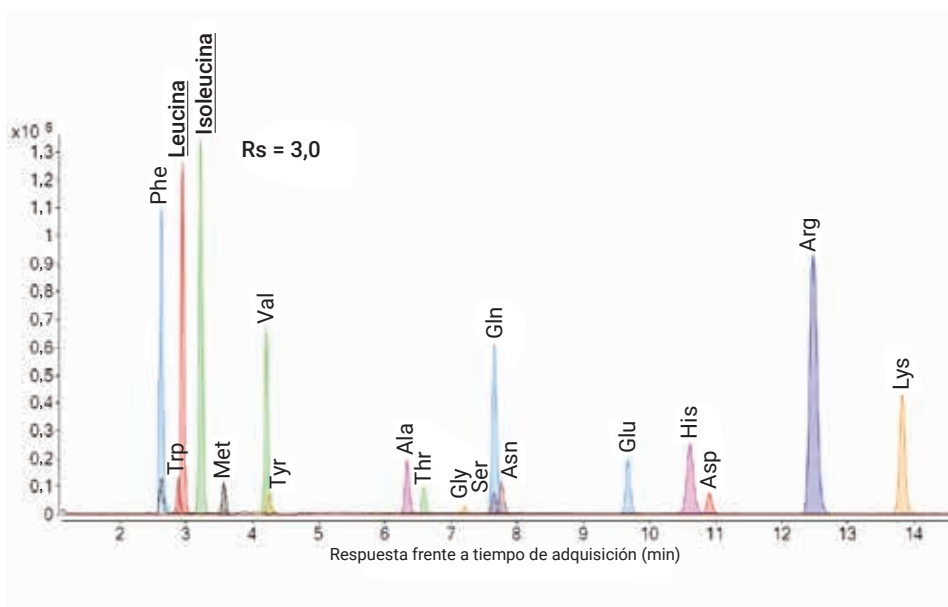
pH bajo, detección MS en modo de ionización
A = formiato de amonio 200 mM en agua
(pH = 3) y agua (10:90)
B = formiato de amonio 200 mM en agua
(pH = 3) y acetonitrilo (10:90)
Concentración salina final: 20 mM.
Recomendamos preparar las fases móviles a partir
de soluciones madre de tampón concentradas para
asegurar unas fases móviles robustas y uniformes.

Flujo: 0,5 ml/min

Gradiente:	Tiempo (min)	% B (pH bajo, modo ioniz. posit.)	% B (pH alto, modo ioniz. negat.)
	0	1,00	100
	15	80	80
	15,5	100	100
	20	100	100

Muestra: Medio de cultivo celular diluido
cinco veces con fase móvil B

Detección: Sistema LC/MS TOF Agilent 6230

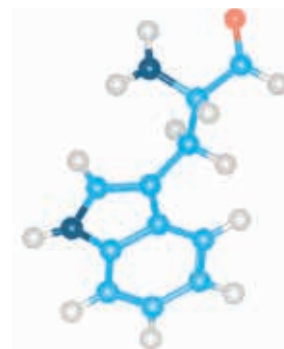
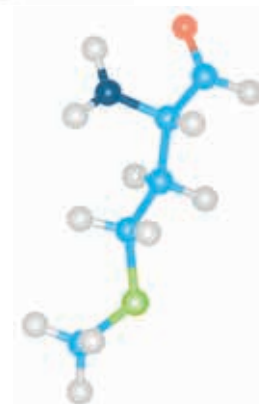
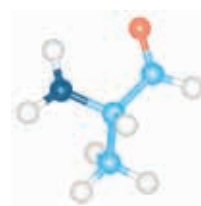


ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis (AAA)

- Eficacia probada para el análisis de aminoácidos.
- Uso de compuestos químicos (OPA y FMOC) sobradamente conocidos para la derivatización precolumna.
- Automatización sencilla mediante un protocolo detallado de derivatización en línea, disponible para su uso con los sistemas LC serie InfinityLab.

La columna ZORBAX Eclipse AAA separa aminoácidos conforme a un protocolo actualizado y mejorado. El análisis completo entre inyecciones puede llevarse a cabo en 14 minutos (con un tiempo de análisis de 9 minutos), en columnas cortas de 75 mm de longitud, o 24 minutos (con un tiempo de análisis de 18 minutos), en columnas de 150 mm de longitud. La sensibilidad (entre 5 y 50 pmol con detectores de diodo array o de fluorescencia) y la fiabilidad necesarias se consiguen mediante el uso de fases químicas de derivatización OPA y FMOC en un único procedimiento completamente automatizado, utilizando cualquier sistema LC serie InfinityLab.

Para el análisis de aminoácidos de alta velocidad con sistemas UHPLC, las columnas ZORBAX Eclipse Plus C18 de 1,8 μm ofrecen excelentes resultados.



Columnas ZORBAX Eclipse Amino Acid Analysis (AAA)

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
Sensibilidad analítica rutinaria	4,6 x 150	5	993400-902
Sensibilidad analítica rutinaria; alta resolución con un detector FLD	4,6 x 150	3,5	963400-902
Sensibilidad analítica rutinaria; alta productividad	4,6 x 75	3,5	966400-902
Alta sensibilidad (Solvent Saver); alta resolución	3,0 x 150	5	961400-302
Cartuchos precolumna, 4/paq.	4,6 x 12,5	5	820950-931
Kit de hardware para precolumnas			820999-901

**ZORBAX Eclipse Plus**

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Eclipse Plus C18 USP L1
Diámetro estrecho (RRHD), 1.200 bar	2,1 x 50	1,8	959757-902
Diámetro estrecho (RRHT), 600 bar	2,1 x 50	1,8	959741-902

Recomendaciones y herramientas

Puede encontrar más información en: *Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids and Analysis by Fast LC using the Agilent 1290 Infinity LC System* (n.º de publicación **5990-5599ES**).

www.agilent.com/search

Análisis de alta resolución de 24 aminoácidos

Columna: ZORBAX Eclipse AAA
963400-902

4,6 x 150 mm, 3,5 µm

Fase móvil: A: Na₂HPO₄ 40 mM, pH = 7,8
B: acetonitrilo, metanol y agua (45:45:10, v.v.v)

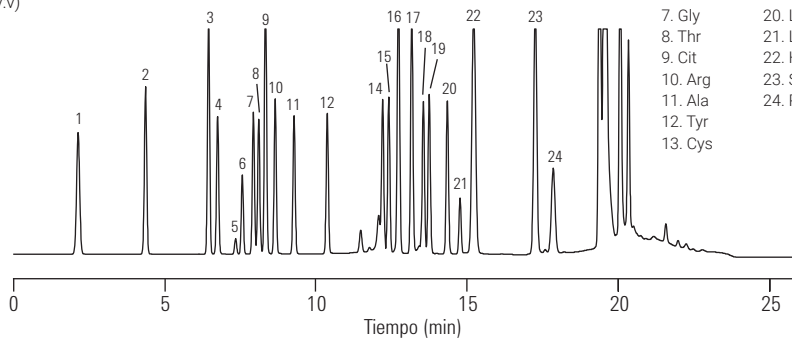
Flujo: 2 ml/min

Temperatura: 40 °C

Detector: Fluorescencia

Muestra: 24 aminoácidos

1. Asp	14. Val
2. Glu	15. Met
3. Asn	16. Nva
4. Ser	17. Trp
5. Gln	18. Phe
6. His	19. Ile
7. Gly	20. Leu
8. Thr	21. Lys
9. Cit	22. Hyp
10. Arg	23. Sar
11. Ala	24. Pro
12. Tyr	
13. Cys	



Esta separación de alta resolución de 24 aminoácidos se consiguió en 18 minutos. Con la columna Eclipse AAA de 4,6 x 75 mm y resolución rápida, estos aminoácidos se resuelven en 9 minutos.

Recomendaciones y herramientas

Las guías de referencia rápida indican los consumibles comunes que debe tener a mano para mantener su instrumento LC serie InfinityLab de Agilent funcionando con una eficiencia máxima. Puede descargar una copia gratuita en www.agilent.com/chem/getguides.

Eliminación de proteínas

Con el fin de aislar e identificar más fácilmente proteínas en muestras biológicas, como suero, plasma y líquido cefalorraquídeo, el sistema de eliminación por afinidad múltiple está diseñado para eliminar cromatográficamente proteínas muy abundantes que actúen como interferencias en muestras biológicas. La eliminación de estas proteínas abundantes mejora el posterior análisis por LC/MS y electroforético de la muestra gracias a la ampliación eficaz del rango dinámico.



Sistema de fraccionamiento de proteínas y reactivos para proteómica de Agilent

- Análisis LC/MS de muestras biológicas.
- Preparación para el análisis electroforético.
- Preparación de muestras para el descubrimiento de biomarcadores.
- Validación de instrumentos y flujos de trabajo.
- Inmunodepleción económica.
- Desalinización, concentración y fraccionamiento de muestras.

Para aplicaciones de fraccionamiento y desalinización de muestras, la columna Agilent mRP-C18 de alta recuperación de proteínas está diseñada para desalinizar, concentrar y fraccionar muestras simultáneamente en un único y sencillo paso, logrando una recuperación extremadamente alta de las muestras en comparación con las columnas RP-HPLC convencionales que son totalmente compatibles con el análisis LC/MS.

Además, también hay disponibles reactivos validados para la preparación de muestras en aplicaciones de descubrimiento de biomarcadores y otras aplicaciones de proteómica, entre los cuales se incluyen un patrón complejo y tripsina de calidad proteómica. Para su comodidad, estos reactivos son completamente compatibles con los métodos LC/MS de Agilent y no requieren ningún tipo de pretratamiento adicional de las muestras.

Además, nuestras configuraciones a medida también permiten dar respuesta a las necesidades de gran volumen y dimensiones personalizadas de las columnas.

Sistema de eliminación por afinidad múltiple

El sistema de eliminación por afinidad múltiple permite la identificación y caracterización de proteínas y biomarcadores valiosos y con bajas concentraciones que están presentes en el suero, el plasma y otros fluidos biológicos.

El sistema de eliminación por afinidad múltiple elimina de forma reproducible y específica hasta catorce proteínas muy abundantes presentes en los fluidos biológicos humanos, así como otras tres presentes en fluidos biológicos de ratón.

El sistema de eliminación por afinidad múltiple está disponible con diversas dimensiones de columna LC y en formato de cartucho rotativo. Mediante su combinación con tampones optimizados de Agilent, cómodos filtros rotativos y concentradores, el sistema de eliminación por afinidad múltiple se convierte en una solución automatizada e integral de agotamiento de proteínas, compatible con la mayoría de los instrumentos LC (columnas) y centrífugas de sobremesa (cartuchos rotativos).

Las muestras procesadas con el sistema de eliminación por afinidad múltiple quedan listas para someterlas a análisis posteriores; por ejemplo, por electroforesis en gel 2D, LC/MS u otras técnicas analíticas.



Sistema de eliminación por afinidad múltiple

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre cómo reducir la duración del ciclo de la cromatografía de afinidad, consulte el siguiente documento:

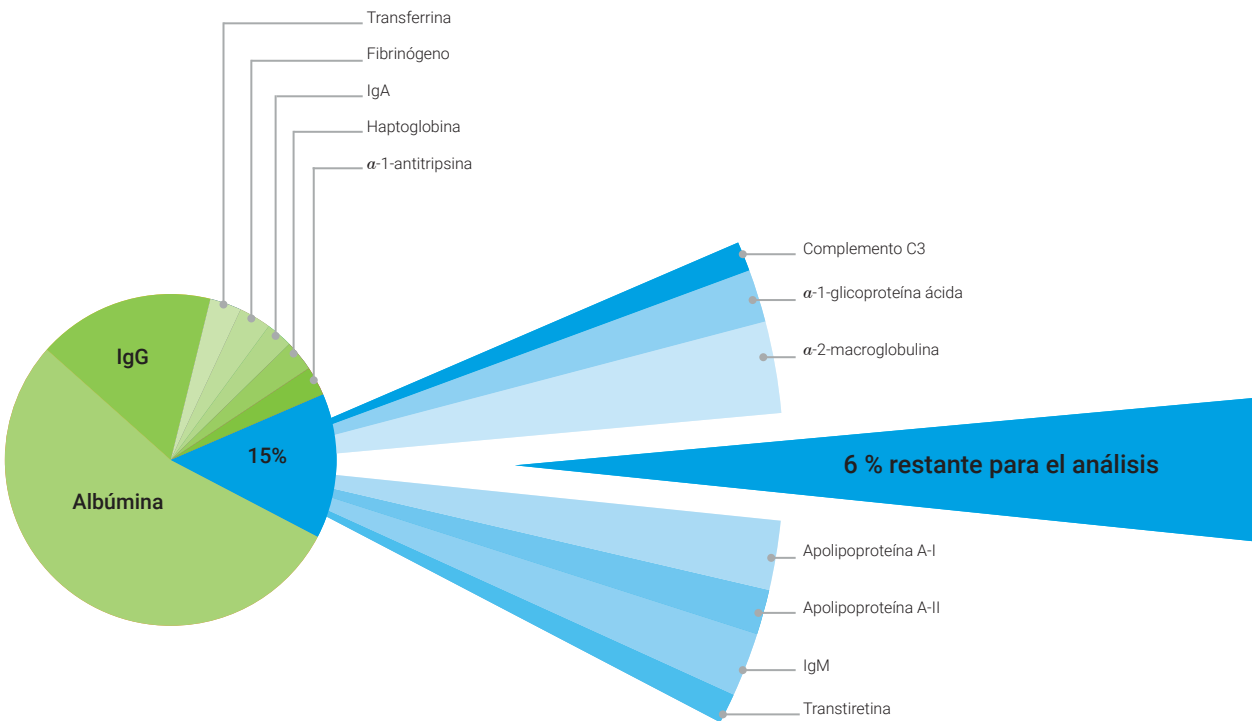
Reducing Cycle Time for Affinity Removal of High-Abundant Proteins in Human Plasma. Alternating Column Regeneration Using an Agilent 1200 Infinity Series Quick-Change Bio-inert 2-position/10-port Valve and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube (n.º de publicación 5991-4721EN)

www.agilent.com/search

Guía de selección para el sistema de eliminación por afinidad múltiple

Producto	Proteínas eliminadas	Cant. total de proteínas eliminadas	Dimensiones	Capacidad de carga	Referencia
MARS Human-14	Albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinógeno, α -2-macroglobulina, α -1-glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II, complemento C3 y transtiretina	94 %	Cartucho rotativo	8-10 μ l	5188-6560
			4,6 x 50 mm	20 μ l	5188-6557
			4,6 x 100 mm	40 μ l	5188-6558
			10,0 x 100 mm	250 μ l	5188-6559
MARS Human-7	Albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina, antitripsina y fibrinógeno	88-92 %	Cartucho rotativo	12-14 μ l	5188-6408
			4,6 x 50 mm	30-35 μ l	5188-6409
			4,6 x 100 mm	60-70 μ l	5188-6410
			10,0 x 100 mm	250-300 μ l	5188-6411
MARS Human-6	Albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina y antitripsina	85-90%	Cartucho rotativo	7-10 μ l	5188-5230
			4,6 x 50 mm	15-20 μ l	5185-5984
			4,6 x 100 mm	30-40 μ l	5185-5985
MARS Human-High Capacity	Albúmina, IgG, IgA, transferrina, haptoglobina y antitripsina	85-90%	Cartucho rotativo	14-16 μ l	5188-5341
			4,6 x 50 mm	30-40 μ l	5188-5332
			4,6 x 100 mm	60-80 μ l	5188-5333
			10,0 x 100 mm	Hasta 340 μ l	5188-5336
MARS Human-2	Albúmina e IgG	69%	Cartucho rotativo	50 μ l	5188-8825
			4,6 x 50 mm	100 μ l	5188-8826
MARS Human-1	Albúmina	50-55%	Cartucho rotativo	65 μ l	5188-5334
			4,6 x 50 mm	130 μ l	5188-6562
MARS Mouse-3	Albúmina, IgG y transferrina	80%	Cartucho rotativo	25-30 μ l	5190-2534
			4,6 x 50 mm	37-50 μ l	5188-5217
			4,6 x 100 mm	75-100 μ l	5188-5218

Proteínas muy abundantes eliminadas por las columnas y los cartuchos rotativos de eliminación por afinidad múltiple de Agilent



Recomendaciones y herramientas

Puede obtener más información sobre el catálogo completo de servicios de Agilent en www.agilent.com/chem/services.

Kits básicos para el sistema de eliminación por afinidad múltiple

Los kits básicos de reactivos para columnas LC y cartuchos rotativos incluyen todos los consumibles necesarios para el sistema de eliminación por afinidad múltiple. Los tampones proporcionan las condiciones óptimas para alargar la vida útil de la columna y mejorar la reproducibilidad de las muestras.

- Los kits incluyen suficiente tampón A y tampón B para agotar unas 200 muestras con columnas LC de 4,6 x 50 mm, agotar unas 100 muestras con columnas LC de 4,6 x 100 mm o usar 200 veces cartuchos rotativos.
- El tampón A (tampón de carga) minimiza las interacciones proteína-proteína, permitiendo que las proteínas poco abundantes (que a menudo están unidas a proteínas muy abundantes) atraviesen la columna y las proteínas abundantes de interés se unan a sus anticuerpos asociados.
- El tampón B (tampón de elución) interrumpe la interacción anticuerpo-proteína y hace que las proteínas muy abundantes se eluyan de la columna.



Kit básico de reactivos para columnas LC (5185-5986)

Kits básicos para el sistema de eliminación por afinidad múltiple

Descripción	Referencia
Tampón de dilución de muestras de alta concentración, 50 ml	5188-8283
El kit básico de reactivos para columnas LC incluye lo siguiente:	5185-5986
Tampón A de carga, lavado y equilibrado, 1 l	5185-5987
Tampón B de elución, 1 l	5185-5988
Filtros rotativos, acetato de celulosa, 0,22 µm, 25/paq.	5185-5990
Concentradores centrífugos, 5K MWCO, 4 ml, 25/paq.	5185-5991
El kit de reactivos para cartuchos rotativos de eliminación por afinidad múltiple incluye lo siguiente:	5188-5254
Tampón A de carga, lavado y equilibrado, 1 l	5185-5987
Tampón B de elución, 1 l	5185-5988
2 filtros rotativos, acetato de celulosa, 0,22 µm, 25/paq.	5185-5990
Concentradores centrífugos, 5K MWCO, 4 ml, 25/paq.	5185-5991
Adaptadores Luer-Lok, 2/paq.	5188-5249
Jeringa de plástico, 5 ml, Luer-Lok, 2/paq.	5188-5332
Juego de 6 microtubos, 1,5 ml, tapón de rosca, 100/paq.	5188-5251
Tapas y tapones, 6/paq.	5188-5252
Agujas de PTFE, Luer-Lok, 10/paq.	5188-5253



Jeringa Luer-Lok (5188-5250)



Adaptadores Luer-Lok (5188-5249)



Agujas Luer-Lok (5188-5253)

Dimensiones especiales

Columnas capilares y nanocolumnas

- Sensibilidad máxima para los tamaños de muestra más pequeños.
- Compatibles con todas las interfases LC/MS.
- Diámetros internos de 0,075, 0,1, 0,3 y 0,5 mm.
- Tamaño de poro de 300 Å para el análisis de biomoléculas.
- Idóneas para aplicaciones 1D y 2D (proteómica).

Las columnas capilares (0,3 y 0,5 mm de d.i.) y nanocolumnas (0,075 y 0,1 mm de d.i.) ZORBAX están disponibles con una amplia variedad de fases y dimensiones. Estas columnas son perfectas para aplicaciones en las que existan cantidades de muestra muy limitadas, ya que mejoran la sensibilidad mediante la reducción de la dilución de las muestras en la columna.



Nanocolumnas

Recomendaciones y herramientas

Agilent ofrece diversos seminarios electrónicos y cursos de formación en las instalaciones del cliente para ayudarle a mejorar la eficiencia de la cromatografía.

Para obtener más información, visite: www.agilent.com/chem/education.

Análisis de alta sensibilidad de digestiones de proteínas por LC/MS

Columna: ZORBAX 300SB-C18
5065-9911
0,075 x 150 mm, 3,5 µm

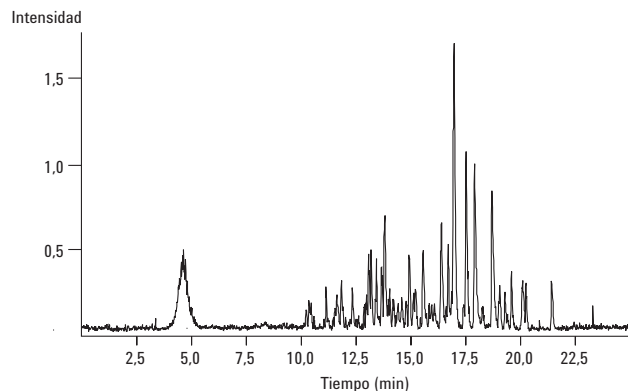
Fase móvil: A: agua + ácido fórmico al 0,1 %
B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %

Flujo: 600 nL/min

Gradiente: 2-52 % B en 25 min

Detector: Nanosistema MS de electrospray con ionización positiva

Muestra: Digestión de ocho proteínas 100 fmol (1 µL)



Una nanocolumna ZORBAX de 0,075 mm de d.i. para HPLC se utilizó para llevar a cabo un análisis de alta sensibilidad de una muestra de digestión de proteínas por LC/MS.

Alta sensibilidad gracias a las columnas capilares

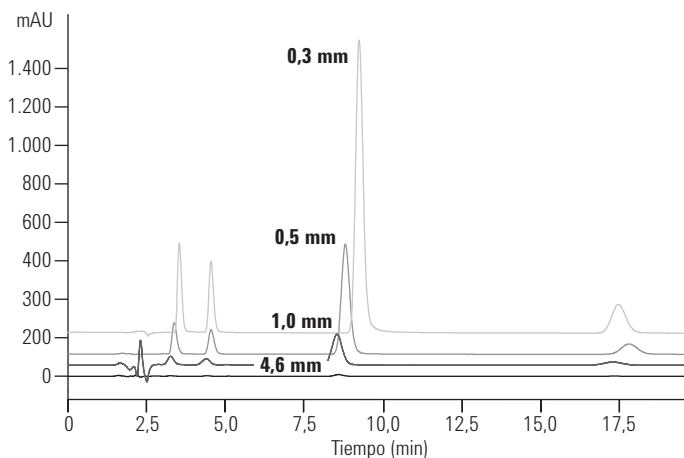
Columna: ZORBAX SB-C18
5064-8255
0,3 x 150 mm, 5 µm

Columna: ZORBAX SB-C18
5064-8256
0,5 x 150 mm, 5 µm

Columna: ZORBAX SB-C18
863600-902
1,0 x 150 mm, 3,5 µm

Columna: ZORBAX SB-C18
883975-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Muestra: 200 ng de bifenilo



Las aplicaciones en las que la cantidad de muestra es limitada requieren usar columnas capilares para minimizar la dilución de la muestra en la columna y mejorar la sensibilidad. La columna capilar de 0,3 mm de este ejemplo ofrece una sensibilidad cien veces mayor que la columna estándar de 4,6 mm. Las nanocolumnas Agilent (de 0,075 y 0,1 mm de d.i.) pueden incrementar la sensibilidad hasta dos mil veces en aquellas aplicaciones en las que existan mayores limitaciones en relación con la cantidad de muestra.

Suero humano: aislamiento e identificación de proteínas poco abundantes a partir de una banda de gel 1D por LC/MS

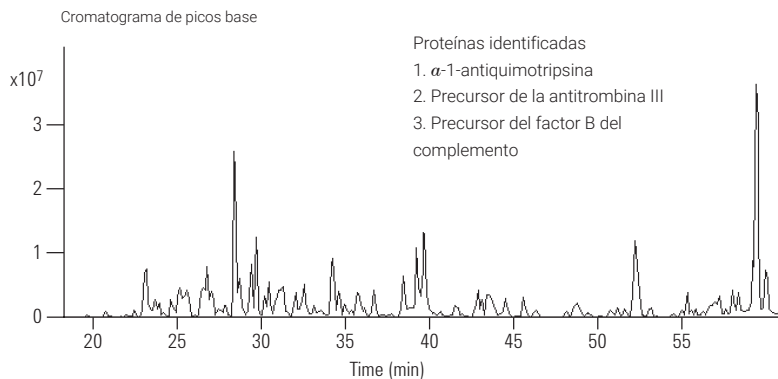
Columna: ZORBAX 300SB-C18
Trampa: 0,3 x 5 mm, 5 µm, 5065-9913
Análítica: 0,3 x 150 mm, 5 µm, 5064-8263

Fase móvil: A: agua + ácido fórmico al 0,1 %
B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %

Flujo: 6 µl/min

Gradiente: 0 min, 3 % B
5 min, 3 % B (carga)
50 min, 45 % B
52 min, 80 % B
57 min, 80 % B
60 min, 3 % B

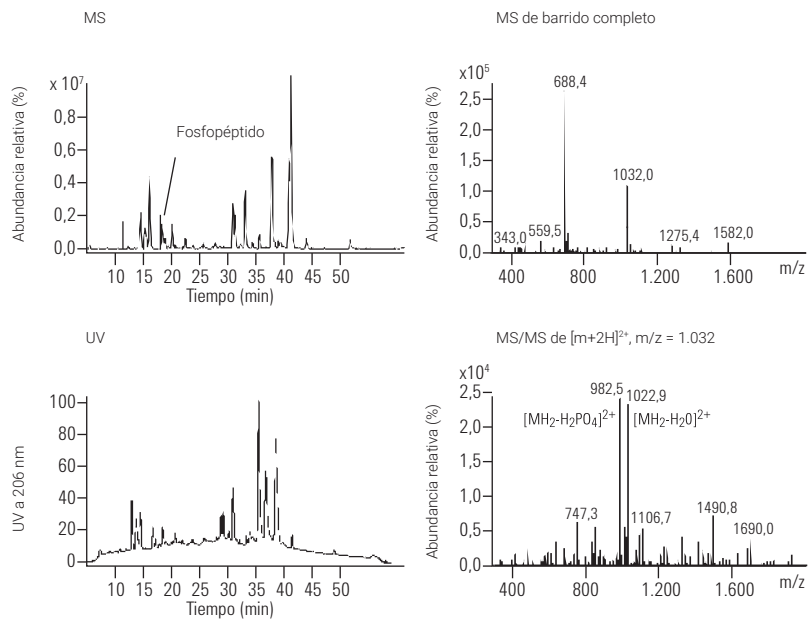
Muestra: Banda 1D a partir de una digestión en gel



Preparación de muestras de suero humano: las proteínas más abundantes del suero se eliminaron usando una columna de eliminación por afinidad múltiple de 4,6 x 100 mm (ref. 5185-5985). Después, se llevó a cabo una digestión de gel 1D.

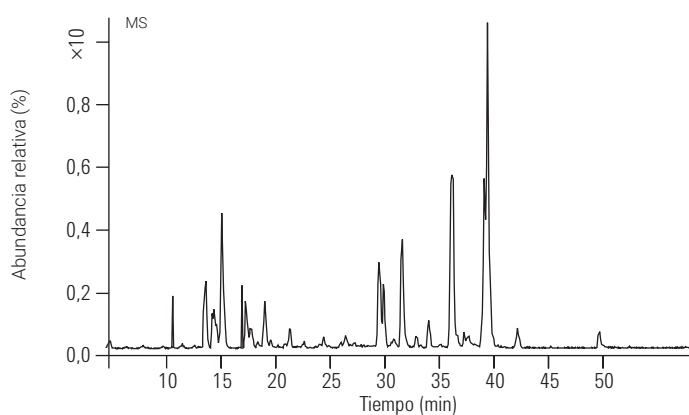
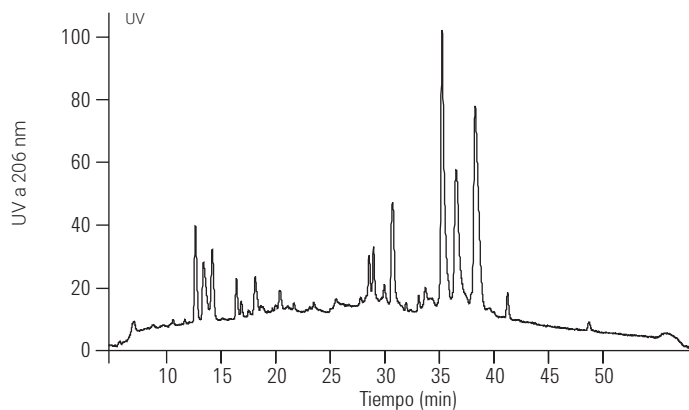
Determinación de centros de fosforilación de péptidos por LC y LC/MS utilizando columnas LC capilares

Columna:	ZORBAX 300SB-C18 5064-8268 0,5 x 150 mm, 3,5 µm	
Fase móvil:	A: agua + ácido fórmico al 0,1 % B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %	
Flujo:	5,5 µl/min	
Gradiente:	5-55 % B, 50 min; hasta 85 % B, 55-57 min	
Detector:	UV (206 nm)	
Condiciones del sistema MS:	LC/MS:	ESI ion. posit. con trampa LC/MSD
	Vcap:	4.000 V
	Flujo de gas de secado:	7 l/min
	Temperatura del gas de secado:	250 °C
	Nebulizador:	15 psi
	Tensión de salida del capilar:	50 V
	Tiempo máx. de acum.:	300 ms
	N.º total de promedios:	3
	Anchura de aislamiento:	m/z = 3
	Amplitud frag.:	1,0 V
Muestra:	100 ml de digestión de β-caseína (4 pmol)	



Columnas capilares para análisis por HPLC con detección UV y MS

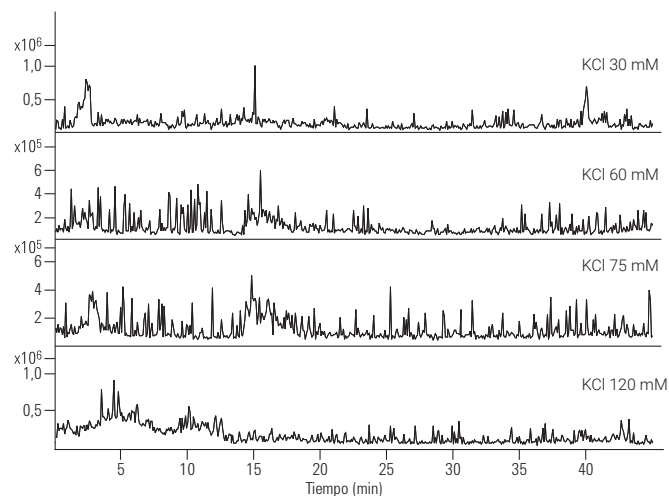
Columna:	ZORBAX 300SB-C18 5064-8263 0,3 x 150 mm, 5 µm
Fase móvil:	5-55 % B, 50 min; hasta 85 % B, 55-57 min A: agua + ácido fórmico al 0,1 % B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 %
Flujo:	5,5 µl/min
Detector:	UV (206 nm)
Condiciones del sistema MS:	LC/MS: ESI ion. posit. con trampa LC/MSD Vcap: 4.000 V Flujo de gas de secado: 7 l/min Temperatura del gas de secado: 250 °C Nebulizador: 15 psi Tensión de salida del capilar: 50 V Tiempo máx. de acum.: 300 ms N.º total de promedios: 3 Anchura de aislamiento: m/z = 3 Amplitud frag.: 1,0 V
Muestra:	100 ml de digestión de β-caseína (4 pmol)



La separación de la digestión de proteínas se realizó con una columna capilar ZORBAX 300SB-C18 (0,3 mm de d.i.). La detección se llevó a cabo por UV y MS de electrospray. La detección MS puede emplearse para la identificación de fragmentos de péptidos.

Análisis de proteínas en una mezcla compleja por HPLC 2D con nanocolumnas para HPLC

Columna:	ZORBAX 300SB-C18 5065-9913 0,3 x 5 mm, 5 µm
Columna:	ZORBAX 300SB-C18 5065-9911 0,075 x 150 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	Bomba cuaternaria: acetonitrilo al 3 % y ácido fórmico al 0,1 % Nanobomba: A: agua y ácido fórmico al 0,1 %; B: acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1 %
Flujo:	Bomba cuaternaria: 30 µl/min Nanobomba: 300 nl/min
Gradiente:	Bomba cuaternaria: isocrático Nanobomba: 6 min = 3 % B; 120 min = 60 % B; 125 min = 80 % B; 130 min = 80 % B; 131 min = 3 % B; 140 min = 3 % B
Condiciones del sistema MS:	Fuente: nano-ESI; flujo de gas de secado: 5 l/min; temp. del gas de secado: 225 °C Trampa de iones: skim. 1: 35 V; compens. salida cap.: 115 V; octopolo 1: 12 V; octopolo 2: 3,5 V; acc. trampa: 80 V; ICC: activ.; n.º de promedios: 4; tiempo máx. de acum.: 150 ms; objetivo: 60.000; modo de ion. posit.; modo MS/MS
Muestra:	Digestión tripsínica de seroalbúmina bovina Volumen: 1-8 µl Elución con gradiente salino: 8 ml de KCl de 10 a 100 mM (incrementos de 10 mM), 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM y 1 M



Digestión tripsínica de seroalbúmina bovina. Los cromatogramas de picos base muestran una selección de fracciones de una separación por HPLC 2D. Los cromatogramas individuales representan péptidos de seroalbúmina bovina eluyendo con una determinada concentración salina; después, se enriquecieron y sometieron a una cromatografía de fase reversa.

ZORBAX Bio-SCX serie II

Las columnas ZORBAX Bio-SCX serie II están diseñadas para optimizar las separaciones 2D de péptidos y proteínas por LC/MS. Cuentan con un empaquetado de partículas ZORBAX de sílice ultrapura de 3,5 µm, ligadas con un polímero apto para productos biológicos con grupos funcionales ácido sulfónico. Esto consigue una fuerte retención y una buena forma de pico en la etapa de intercambio iónico del análisis 2D de péptidos y proteínas.

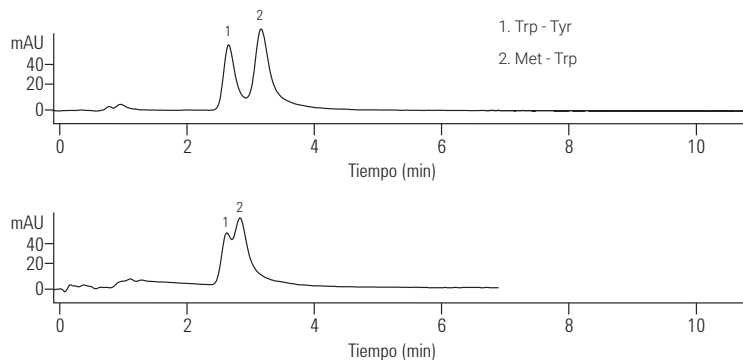


Nanocolumnas

Especificaciones de las columnas HPLC					
Fase ligada	Tamaño de poro	Área superficial	Rango de pH	Grupo funcional	Presión máx.
ZORBAX Bio-SCX serie II	300 Å	90 m²/g	2,5-8,5	Ácido sulfónico	350 bar

Mayor retención de péptidos pequeños

Columna:	ZORBAX Bio-SCX serie II 5065-9912 0,3 x 35 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	NaCl 40 mM y acetonitrilo (95:5) con ácido fórmico al 0,3 %
Flujo:	5 µl/min
Detector:	UV (230 nm)
Muestra:	Dipéptidos sintéticos



La columna ZORBAX Bio-SCX serie II consigue una retención más fuerte de los péptidos pequeños que otras columnas SCX. Esto incrementa la resolución de los fragmentos de péptidos marcadamente hidrófilos y consigue una identificación más precisa cuando estas columnas se usan para el análisis por HPLC 2D.

Recomendaciones y herramientas

Los consumibles bioinertes de Agilent permiten disponer de una ruta de paso de muestras exenta de metal, lo que minimiza las interacciones con las biomoléculas.

Visite: www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

Columnas capilares ZORBAX para HPLC (acero inoxidable forrado de vidrio)

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18	300SB-C8	300Extend-C18
Capilar	0,5 x 250	5	5064-8266		
Capilar	0,5 x 150	5	5064-8264		
Capilar (RR)	0,5 x 150	3,5	5064-8268		
Capilar	0,5 x 35	5	5064-8294		
Capilar (RR)	0,5 x 35	3,5	5065-4459		
Capilar	0,3 x 250	5	5064-8265		
Capilar	0,3 x 150	5	5064-8263		
Capilar	0,3 x 35	5	5064-8295		
Capilar (RR)	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460	5065-4464
Capilar (RR)	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461	5065-4465
Capilar (RR)	0,3 x 75	3,5	5064-8270	5065-4462	5065-4466
Capilar (RR)	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463	5065-4467
Pantallas de repuesto, 10/paq.			5065-4427	5065-4427	5065-4427

Nanocolumnas ZORBAX para HPLC (PEEK)

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
Nanocolumna (RR)	0,1 x 150	3,5	5065-9910	
Nanocolumna (RR)	0,075 x 150	3,5	5065-9911	
Nanocolumna (RR)	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923
Trampa/precolumna, 5/paq.	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914
Kit de hardware para trampas/precolumnas			5065-9915	5065-9915



Trampa/precolumna ZORBAX 300SB-C18 (5065-9913)

Columnas MicroBore (1,0 mm de d.i.)

- Alta sensibilidad para tamaños de muestra pequeños.
- Compatibles con las interfases LC/MS.
- Amplia variedad de fases ligadas.
- Partículas poliméricas y de sílice.

Las columnas MicroBore (1,0 mm de d.i.) son una buena opción cuando la cantidad de muestra disponible es escasa. Pueden ofrecer límites de detección cinco veces mejores en comparación con las columnas de 2,1 mm de d.i. usando la misma cantidad de muestra. Este aumento de la sensibilidad puede resultar crucial. En las columnas MicroBore se utilizan flujos bajos (por lo general, de aproximadamente 50 µl/min). Por ello, estas columnas resultan idóneas para usarlas con detectores que requieran flujos bajos, como algunos espectrómetros de masas, y con sistemas LC capilares.

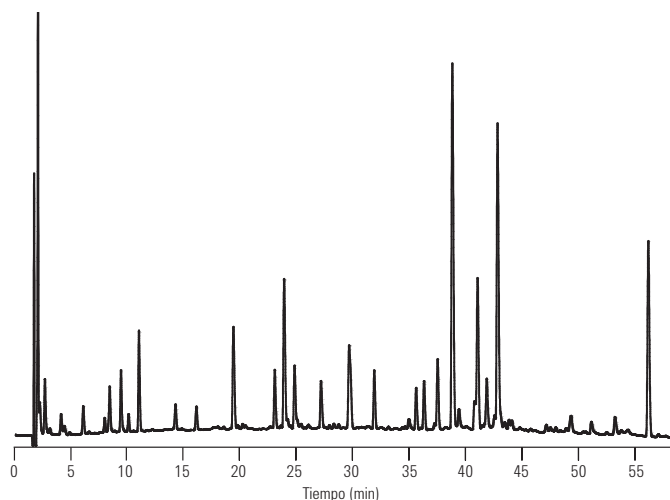
Las columnas MicroBore ofrecen un rendimiento óptimo cuando se combinan con sistemas UHPLC/HPLC MicroBore. Existen columnas con una amplia variedad de fases ligadas para presiones de hasta 400 bar, incluidas las siguientes: StableBond, 300SB-C18, 300SB-C8 y Poroshell. También hay disponibles columnas de fase reversa poliméricas (PLRP-S) e intercambio iónico (PL-SAX y PL-SCX) para aplicaciones que requieran partículas con poros anchos y excepcionalmente estables. Además, ahora también existen precolumnas con un tope ajustable de regulación de la profundidad del tubo que permite conseguir siempre conexiones sin volumen muerto.



Fase ligada 300StableBond protegida estéricamente

Separación de una digestión tripsínica

Columna:	ZORBAX 300SB-C18 863630-902 1,0 x 150 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	Gradiente: 2-60 % B en 60 min A: TFA al 0,1 % B: TFA al 0,075 % y acetonitrilo al 80 %
Flujo:	50 µl/min
Temperatura:	50 °C
Detector:	UV (215 nm)
Muestra:	Digestión tripsínica de rhGH (2 µl)



Este ejemplo de separación de una digestión tripsínica en una columna MicroBore demuestra la alta sensibilidad y resolución que permiten obtener las columnas de 1,0 mm de d.i.

Análisis de alta sensibilidad de péptidos con una columna MicroBore para HPLC

Columna: PLRP-S 100 Å, 5 µm
150 mm x distintos d.i.

Fase móvil: A: tris-HCl 0,01 M, pH = 8
B: A + NaCl 0,35 M, pH = 8

Flujo: 1 ml/min

Gradiente: Lineal; 20-50 % ACN con TFA al 0,1 %
en 15 min

Volumen de inyección: 0,5 µl

Conc. muestra: 0,25 mg/ml

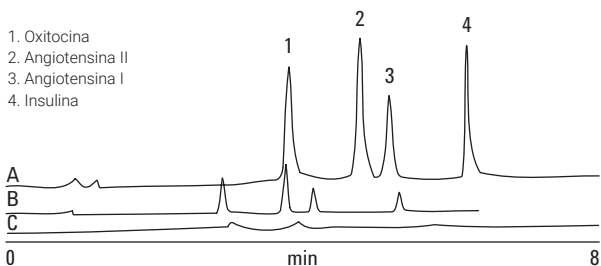
Detector: UV (220 nm)

Identificación de picos

A. 1,0 mm de d.i. (flujo: 47 µl/min)

B. 2,1 mm de d.i. (flujo: 200 µl/min)

C. 4,6 mm de d.i. (flujo: 1 µl/min)



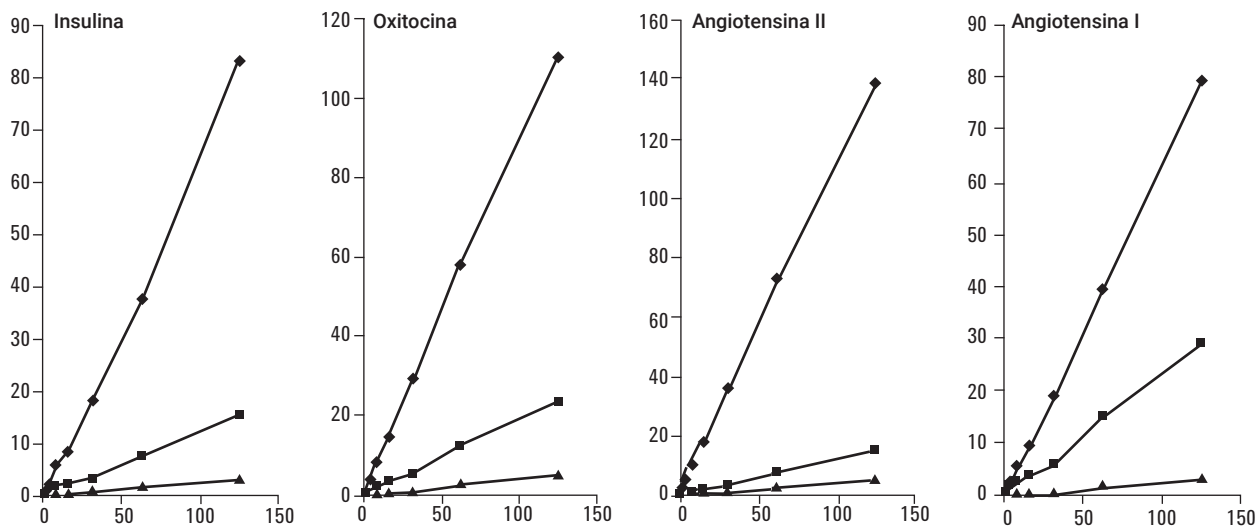
Separación de péptidos en columnas PLRP-S 100 Å de 5 µm.

Identificación de picos

◆ 1,0 mm

■ 2,1 mm

▲ 4,6 mm



Gráficos de puntos de datos de curvas estándar obtenidos para columnas PLRP-S. El pequeño diámetro interno de las columnas reduce el límite de detección y posibilita la cuantificación de cantidades más bajas de muestra.

MicroBore (1,0 mm de d.i.)

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
MicroBore	1,0 x 250	5	861630-902	
MicroBore (RR)	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906
MicroBore (RR)	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906
Precolumna MicroBore, 3/paq.	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
MicroBore	1,0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
Precolumna MicroBore, 3/paq.	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1.000 Å USP L21	PLRP-S 4.000 Å USP L21
MicroBore	1,0 x 150	3	PL1312-3300			
MicroBore	1,0 x 50	8			PL1312-1802	PL1312-1803
MicroBore	1,0 x 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
MicroBore	1,0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		

Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PL-SAX 1.000 Å	PL-SAX 4.000 Å	PL-SCX 1.000 Å	PL-SCX 4.000 Å
MicroBore	1,0 x 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503	PL1345-1502	PL1345-1503

LC-2D

- Combinación de dos técnicas de LC ortogonales en un único análisis.
- Mejora de la capacidad de picos en comparación incluso con los métodos de UHPLC.
- Interfase entre los métodos de exclusión por tamaño e intercambio iónico y la MS.

La heterogeneidad y complejidad de las biomoléculas requiere usar múltiples técnicas de LC para identificar y caracterizar un producto biofarmacéutico de interés. Mediante la combinación de dos técnicas ortogonales en un único análisis (por ejemplo, técnicas de interacción hidrofílica y fase reversa o de intercambio catiónico y fase reversa), puede conseguir un poder de separación insuperable que posibilite la identificación y el análisis de atributos de calidad críticos.

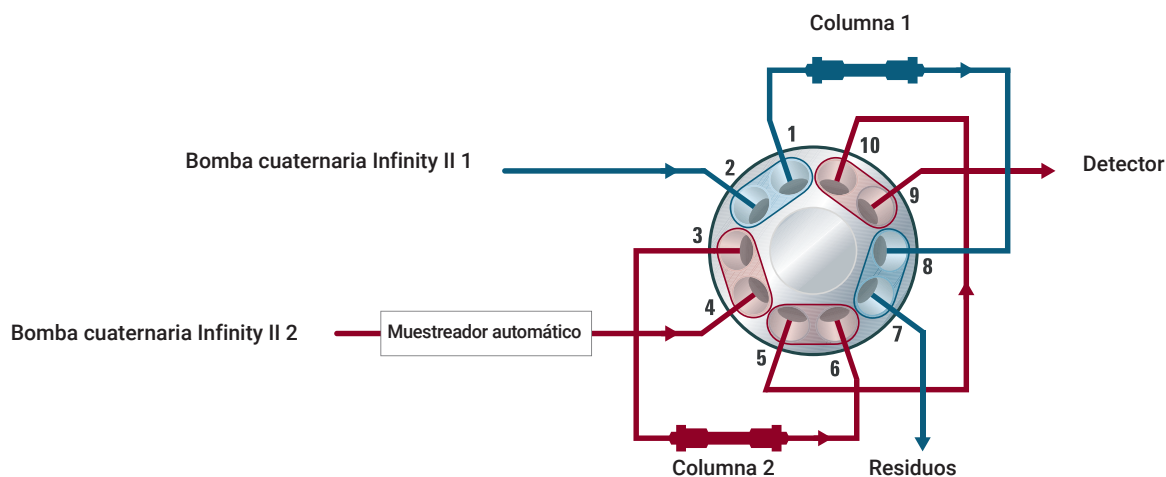
Entre las aplicaciones de la LC-2D se incluyen desde la simple desalinización en línea de una fracción obtenida a partir de la captura en Protein A de un anticuerpo monoclonal hasta el uso como interfase entre los métodos de mapeo de péptidos de interacción hidrofílica y de fase reversa para caracterizar el espectro completo de fragmentos de péptidos (hidrófilos, hidrofóbicos y glicopéptidos).

Mejore la productividad gracias a la LC-2D, que le permitirá acortar los tiempos de análisis y optimizar la generación e interpretación de datos:

- Control de los métodos y cambio de aplicación
- Regeneración de la columna fuera de línea
- Análisis de impurezas en línea
- LC-2D con corte de fracciones
- LC-2D integral

Regeneración de la columna fuera de línea

Para conseguir un análisis robusto de variantes cargadas por LC de intercambio iónico, se requieren una limpieza y un equilibrado robustos de la columna. Esto incrementa el tiempo total de análisis, lo que exige buscar formas de reducir dicho tiempo para incrementar la productividad en términos del número de muestras analizadas. Una manera de conseguirlo es recurrir a la regeneración de la columna fuera de línea, y que se ha comprobado que puede reducir la duración del ciclo de análisis en hasta un 40 %.



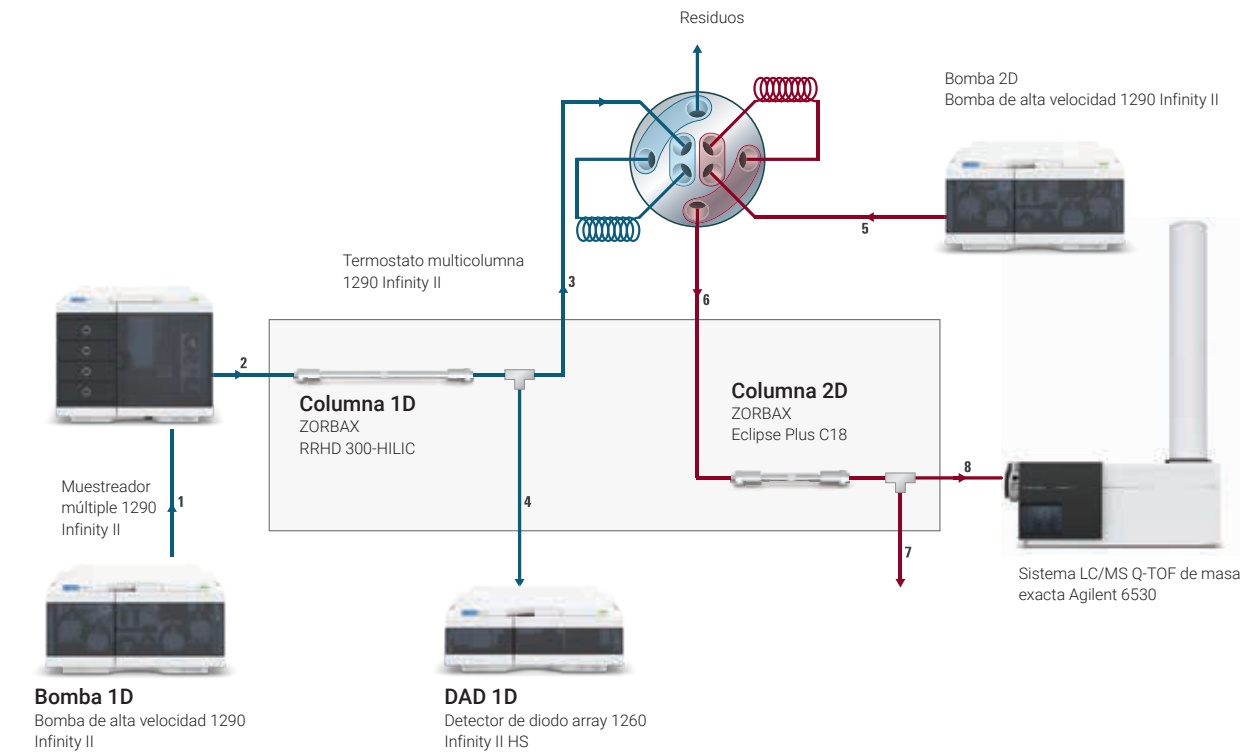
Esquema que muestra la configuración de la válvula requerida para la regeneración de la columna fuera de línea, tal como se haría en el análisis de variantes cargadas de anticuerpos monoclonales con un sistema LC bioinerte 1260 Infinity II y dos columnas Bio MAb de PEEK de 2,1 x 250 mm y 5 µm.

Precisión del tiempo de retención y el área para una misma columna (n = 6) y entre columnas (n = 12)

	DER (%) del TR para una misma columna	DER (%) del área para una misma columna	DER (%) del TR entre columnas	DER (%) del área entre columnas
CV1	0,205	2,50	0,247	3,39
CV2	0,183	1,91	0,218	1,63
CV3	0,247	1,13	0,277	2,56
CV4	0,302	6,73	0,286	6,67
CV5	0,301	1,63	0,255	1,41
CV6	0,252	2,78	0,213	2,93

La regeneración fuera de línea de la columna Bio MAb de PEEK permite obtener una buena precisión para el tiempo de retención y el área, tanto entre columnas (n = 12) como para una misma columna (n = 6).

LC-2D integral



1	De la bomba 1D al muestreador automático	Capilar de calibración (G1312-67500)
2	Del muestreador automático a la columna 1D (intercambiador de calor de 1,6 µl)	Acero inoxidable, 0,17 mm
3	De la unión en "T" 1 a la válvula de LC-2D	Acero inoxidable, 0,12 x 200 mm
4	De la unión en "T" 1 al DAD 1D	Acero inoxidable, 0,12 x 140 mm
5	De la bomba 2D a la válvula de LC-2D	Acero inoxidable, 0,17 mm
6	De la válvula de LC-2D a la columna 2D (intercambiador de calor de 1,6 µl)	Acero inoxidable, 0,12 x 270 mm
7	De la unión en "T" 2 al contenedor de residuos	Acero inoxidable, 0,12 x 340 mm
8	De la unión en "T" 2 al detector (fuente AJ5 o DAD 2D)	Acero inoxidable, 0,075 x 340 mm (5067-4783)

Configuración del sistema LC-2D InfinityLab para el análisis 2D completo de digestiones de anticuerpos monoclonales y el mapeo de péptidos por HILIC y RPLC-MS.

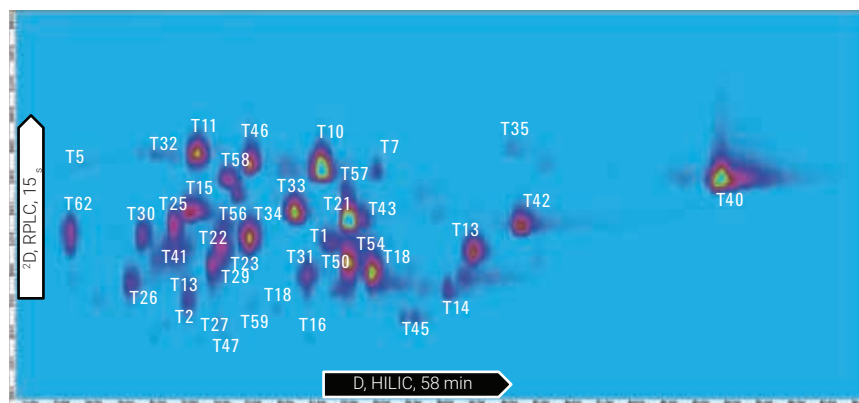


Gráfico de contornos LC x LC para el análisis de una digestión tripsínica de trastuzumab, generado a partir de datos de recuento de iones total de MS. Las dos dimensiones (HILIC como primera dimensión y fase reversa como segunda dimensión) ofrecieron una buena ortogonalidad para este análisis.

Agilent dispone de una amplia variedad de fases para los tamaños de columna requeridos. Si no puede encontrar la combinación de tamaño de poro, tamaño de partícula, fase y tamaño de columna que necesita, póngase en contacto con nuestro equipo de diseño de columnas a medida, que posee una amplia experiencia en la producción de columnas para dar respuesta a criterios específicos de rendimiento.

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información sobre los fundamentos de la LC-2D, consulte el siguiente manual técnico: *Principles, Practical Implementation and Applications of Two-Dimensional Liquid Chromatography* (n.º de publicación **5991-2359EN**).

www.agilent.com/chem/2DLC-Primer



Purificación mediante HPLC preparativa

Agilent cuenta con una completa gama de medios y columnas poliméricos y de sílice para HPLC, diseñados para la purificación de biomoléculas: desde columnas preparativas de partículas pequeñas y alta eficiencia, optimizadas para la purificación de cantidades de candidatos a biofármacos del orden de los microgramos o los miligramos, hasta medios a granel completamente porosos, para empaquetar columnas de desarrollo y de proceso con el fin de purificar cantidades del orden de gramos o de algunos o muchos kilogramos de ingrediente farmacéutico activo.

Algunas columnas están diseñadas específicamente para satisfacer las necesidades de purificación de alta eficiencia, mientras que otros productos permiten realizar un escalado y pasar de columnas analíticas de partículas pequeñas a otras para procesos de producción industriales de ingredientes farmacéuticos activos. En la tabla siguiente se muestran las distintas opciones de medios y columnas de preparación, así como la cantidad de producto que permiten purificar.



Columnas poliméricas preparativas para HPLC

Ciclo de vida de los productos biofarmacéuticos		Exploración		Desarrollo	Producción	
		μ	mg		kg	Muchos kg
		alta eficiencia		g	alta productividad	
Fase reversa	mRP-C18	→				
	ZORBAX PrepHT 300 Å StableBond	→		→		
	VariTide RPC	→		→		
	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1.000 y 4.000 Å	→			→	
Intercambio iónico	Bio MAb	→		→		
	Bio IEX	→		→		
	PL-SAX	→			→	
	PL-SCX	→			→	
Exclusión por tamaño	Bio SEC-3	→		→		
	Bio SEC-5	→		→		

Columnas y medios Agilent para la purificación de biomoléculas: tipo de cromatografía, familia de productos y escala de purificación.

Selección de columnas de purificación

Aplicación	Técnica	Notas	Columnas Agilent
Proteómica	Fase reversa	Columna especial de alta recuperación para aplicaciones de proteómica. Está diseñada para la purificación a escala de microgramos con una recuperación máxima.	mRP-C18
Todas las biomoléculas	Fase reversa	Partículas de sílice de alta eficiencia con un tamaño de poro de 300 Å.	ZORBAX PrepHT 300SB
Péptidos sintéticos	Fase reversa	Material polimérico diseñado para la purificación de péptidos sintéticos. Se trata de una solución de alta eficiencia con una única columna para todo tipo de péptidos sintéticos (ácidos, básicos, hidrofóbicos e hidrófilos) que abarca todo el rango de tamaños de los péptidos producidos mediante síntesis en fase sólida y en solución.	VariTide RPC
Todas las biomoléculas	Fase reversa	Familia de columnas poliméricas de fase reversa y excelente calidad, con diversos tamaños de poro y de partícula, que permiten conseguir una purificación de alta eficiencia a escala de laboratorio con columnas preparativas de partículas pequeñas, así como llevar a cabo un escalado para conseguir procesos industriales de purificación de alto rendimiento con partículas más grandes. Utilice columnas PLRP-S cuando deba llevar a cabo un escalado para producir ingredientes farmacéuticos activos y necesite disponer de documentación conforme a la normativa vigente. - Partículas de 3 y 5 µm para conseguir una alta eficiencia. - Partículas de 8, 10, 10-15, 15-20, 30 y 50 µm para procesos de purificación de mayor escala a baja presión.	PLRP-S
Anticuerpos monoclonales	Intercambio iónico	Medio no poroso de intercambio catiónico débil.	Bio MAb
Todas las biomoléculas	Intercambio iónico	Medios no porosos de intercambio iónico. Capacidades de SAX, WAX, SCX y WCX que ofrecen opciones para la purificación de moléculas ácidas y básicas. Partículas no porosas de 5 µm para maximizar la eficiencia del laboratorio a escala preparativa.	Bio IEX
Todas las biomoléculas	Intercambio iónico	Medio completamente poroso de intercambio aniónico fuerte. - Partículas de 5 µm para conseguir separaciones de alta eficiencia. - Partículas de 8, 10 y 30 µm para procesos de purificación de mayor escala a baja presión.	PL-SAX
		Medio completamente poroso de intercambio catiónico fuerte. - Partículas de 5 µm para conseguir separaciones de alta eficiencia. - Partículas de 8, 10 y 30 µm para procesos de purificación de mayor escala a baja presión.	PL-SCX
Todas las biomoléculas	Exclusión por tamaño	Materiales de sílice para SEC con diversos tamaños de poro. - Partículas de 3 y 5 µm de tamaño para conseguir una alta eficiencia. - Tamaños de poro de 100 a 2.000 Å que abarcan un amplio rango de tamaños de molécula para las muestras.	Bio SEC-3 y 5

Recomendaciones y herramientas

Puede encontrar más información en:

Biomolecule Purification (n.º de publicación **5990-8335EN**)

www.agilent.com/search

Columnas mRP-C18 de alta recuperación de proteínas

La columna de alta recuperación de proteínas C18 de fase reversa macroporosa (mRP) está diseñada para conseguir una separación, un fraccionamiento y una desalinización simultánea de alta recuperación y alta resolución de muestras complejas de proteínas, como suero con inmunodepleción o proteínas de plasma.

- Obtención de una recuperación superior al 95-99 % para muestras de proteínas con suero con inmunodepleción mediante el uso de un sistema de eliminación por afinidad múltiple y una columna LC.
- Posibilidad de cargar hasta 380 µg de masa total de proteínas sin que eso reduzca la resolución cromatográfica de las proteínas.
- Columna empaquetada con partículas macroporosas de sílice ultrapura de 5 µm y una fase ligada C18 para reducir o eliminar la adsorción fuerte de proteínas.
- Presión operativa máxima de 250 bar (4.000 psi).
- Compatibilidad con agua y con todos los disolventes orgánicos comunes.



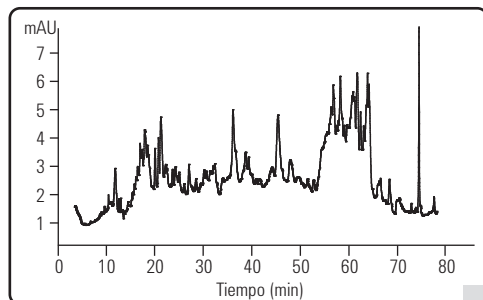
Columna mRP-C18 de alta recuperación de proteínas, 4,6 x 50 mm, 5188-5231

Columnas mRP-C18 de alta recuperación de proteínas

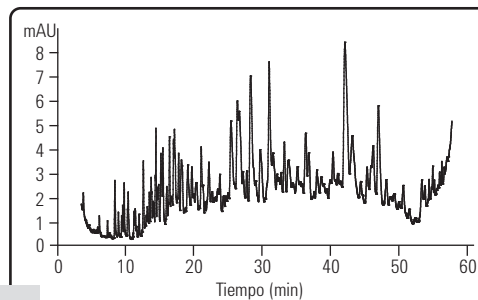
Descripción	Capacidad de carga de proteínas	Referencia
mRP-C18, 0,5 x 100 mm	10 ng-5 µg	5188-6510
mRP-C18, 2,1 x 75 mm	8-85 µg	5188-6511
mRP-C18, 4,6 x 50 mm	40-380 µg	5188-5231

Fraccionamiento de proteínas de muestras complejas en la columna mRP

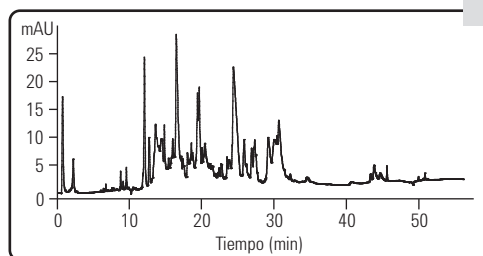
mRP-C18, 4,6 x 50 mm



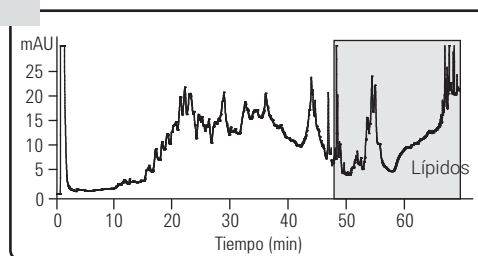
Preparación de membrana de células HeLa



Lisado de células HeLa (352 µg)



Suero humano con depleción de las seis proteínas más abundantes



Preparación de balsas lipídicas de membrana de células de cerebro humano (500 µg)

Recuperación máxima

ZORBAX PrepHT

- Facilidad de escalado para pasar de la escala analítica a la preparativa gracias a las fases ZORBAX.
- Separaciones preparativas rápidas para muestras de hasta 2.000 mg.
- Partículas de 5 a 7 µm que consiguen una alta eficiencia y un elevado rendimiento.
- Conexiones de ajuste manual que resultan fáciles de instalar y garantizan el sellado hasta 350 bar (5.000 psi).
- Utilización para mantener la selectividad de la fase analítica en las separaciones preparativas.

Las columnas ZORBAX PrepHT permiten conseguir fácilmente una alta pureza, recuperación y productividad. Están disponibles con diversas fases ligadas (StableBond 300 Å, C18, C8, C3 y CN) para optimizar la resolución y la capacidad de carga en todo tipo de condiciones.

Las columnas ZORBAX PrepHT están empaquetadas con partículas de 5 y 7 µm de tamaño que ofrecen una excepcional resolución. Esta alta resolución se traduce en elevados valores de capacidad de carga, rendimiento y pureza de los compuestos. El uso de columnas de diámetro grande y de partículas ZORBAX de gran resistencia mecánica posibilita utilizar flujos de hasta 100 ml/min, lo que incrementa la productividad.

Las columnas ZORBAX PrepHT están diseñadas para poder realizar un escalado rápido y pasar de la escala analítica a la preparativa sin perder resolución. Para separaciones complejas en columnas grandes (21,2 mm de d.i. y longitud igual o superior a 150 mm), Agilent ha seleccionado cuidadosamente partículas de 7 µm que permiten alcanzar un equilibrio entre alta eficiencia y alta capacidad de carga.



Columnas de cartucho ZORBAX 300 Å StableBond PrepHT

ZORBAX 300 Å StableBond

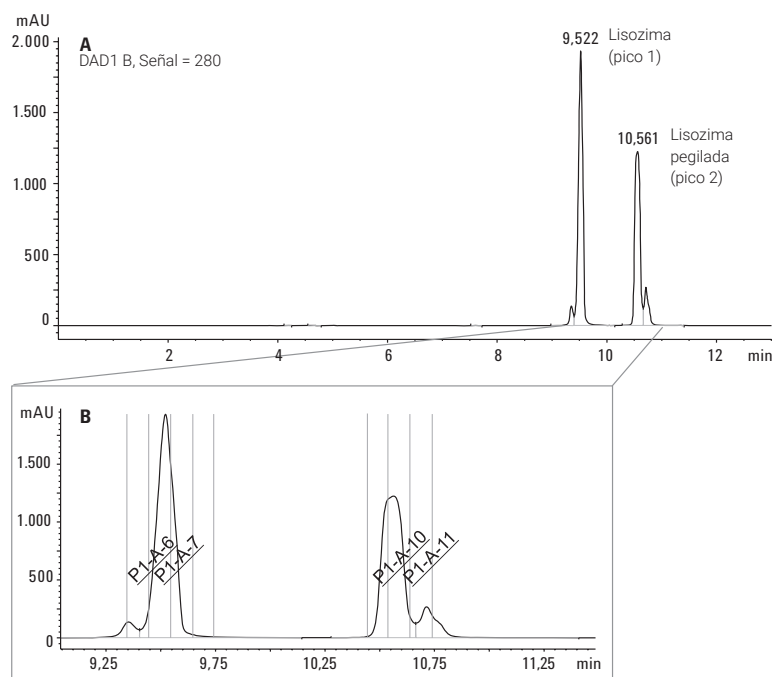
Descripción	Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56
Columnas de cartucho PrepHT (requieren el kit de terminales de conexión; ref. 820400-901)						
Cartucho PrepHT	21,2 x 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
Cartucho PrepHT	21,2 x 150	7	897150-102	897150-106		897150-109
Cartucho PrepHT	21,2 x 150	5	895150-902	895150-906		895150-909
Cartucho PrepHT	21,2 x 100	5	895100-902	895100-906		895100-909
Cartucho PrepHT	21,2 x 50	5	895050-902	895050-906		895050-909
Terminales de conexión PrepHT, 2/paq.			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
Cartucho precolumna PrepHT, 2/paq.	17,0 x 7,5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Hardware para cartuchos precolumna			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

RP-HPLC semipreparativa de una mezcla de reacción de lisozima pegilada

Columna: ZORBAX SB-C18
880975-202
9,4 x 250 mm, 5 µm

A: RP-HPLC semipreparativa de una mezcla de reacción de lisozima pegilada en una columna semipreparativa ZORBAX 300 SB-C18

B: Detalle que muestra la colección de fracciones



Columnas PLRP-S preparativas y de proceso

- Reducción del tiempo de desarrollo de métodos gracias a la etapa de exploración para la producción de muchos kilogramos de producto conforme a las buenas prácticas de fabricación vigentes (cGMP).
- Aumento de la selectividad y la vida útil de la columna gracias a la estabilidad química para aplicaciones de separación, optimización, higienización y regeneración.
- Empaquetado de muchas columnas con un único lote de medio, lo que reduce el tiempo de inactividad del sistema y los costes de validación.

Las partículas rígidas y no porosas de copolímero de poliestireno y divinilbenceno del medio PLRP-S están disponibles con diversos tamaños de poro para la purificación de moléculas pequeñas, biomoléculas sintéticas y macromoléculas. Su estabilidad térmica y química hace que resulten ideales para purificaciones que requieran condiciones extremas para la preparación de muestras, la elución de compuestos y la regeneración de columnas.

La capacidad y la resolución son dos parámetros fundamentales para maximizar la productividad de una purificación. Gracias a la amplia variedad de tamaños de poro y al rango ampliado de condiciones operativas, las columnas PLRP-S ofrecen más opciones para conseguir un proceso óptimo. Los tamaños de partícula abarcan desde 3 hasta 50 μm , lo que posibilita el escalado desde la etapa de exploración, con cantidades del orden de los microgramos o miligramos, hasta la producción de muchos kilogramos de producto conforme a las cGMP. La excelente estabilidad química, que permite usar concentraciones de NaOH de hasta 1 M, hace posible la higienización y la regeneración, lo que prolonga la vida útil de la columna. Hay disponibles lotes de medio PLRP-S de hasta 600 l, lo que posibilita el empaquetado de muchas columnas con un único lote.

Como parte de nuestro compromiso con la calidad y la continuidad del suministro, la fabricación se lleva a cabo de manera íntegra conforme a un proceso completamente documentado; además, también se realizan auditorías de las instalaciones de forma rutinaria.



Guía de aplicaciones de las columnas PLRP-S preparativas y de proceso

Aplicación	Tamaño de poro del medio PLRP-S			
	100 Å	300 Å	1.000 Å	4.000 Å
Biomoléculas, péptidos y oligonucleótidos sintéticos	✓	✓		
Biomoléculas, péptidos y proteínas recombinantes	✓	✓		
Biomoléculas grandes, anticuerpos y fragmentos de ADN			✓	✓
Moléculas pequeñas y compuestos inestables (incluidos aquellos sensibles a los metales)	✓			

Especificaciones de las columnas UHPLC

Rango de pH	1-14
Contenido de tampón	Ilimitado
Modificador orgánico	1-100 %
Límites de temperatura	200 °C
Presión máxima	5-8 µm: 3.000 psi (210 bar)
	3 µm: 4.000 psi (300 bar)

Purificación de un oligonucleótido sin tritilo de 25 mer y cuantificación analítica de la fracción con una columna PLRP-S 100 Å de 4,6 x 50 mm

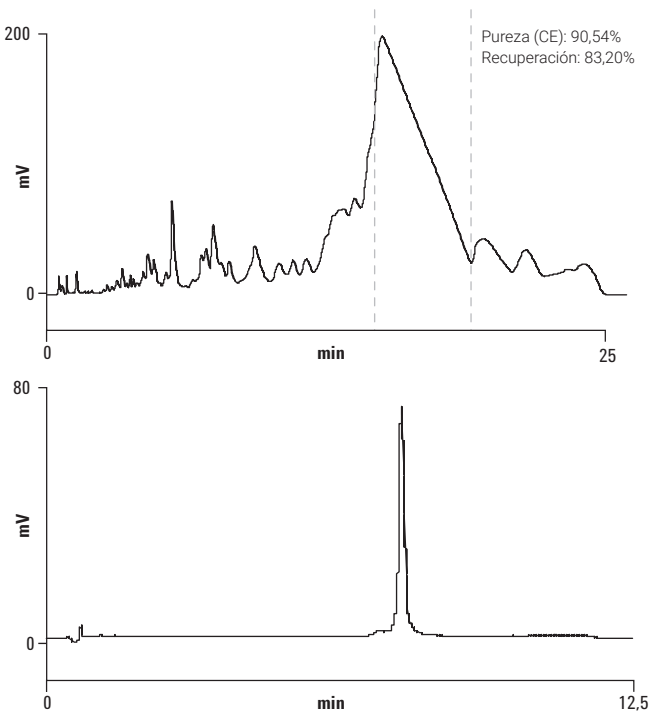
Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4,6 x 50 mm, 3 µm

Fase móvil: A: acetato de trietilamonio (TEAA) 100 mM
B: TEAA 100 mM en acetonitrilo y agua (25:75)

Flujo: 1 ml/min

Gradiente: 25 % B, 0 min; 35 % B, 2 min;
45 % B, 22,5 min; 45 % B, 23 min;
25 % B, 23,05 min; 25 % B, 26 min

Temperatura: 80 °C



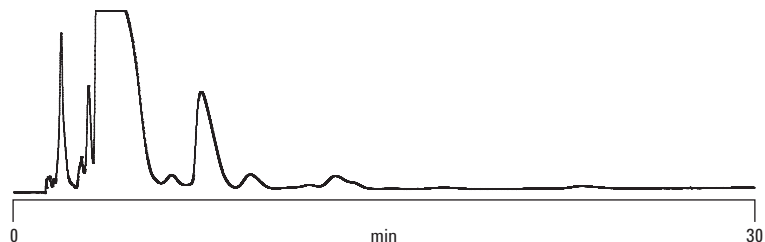
Carga preparativa de bradiquinina bruta

Columna: PLRP-S 100 Å
PL1512-5100
4,6 x 250 mm, 10 µm

Fase móvil: TFA al 0,1 % en acetonitrilo y agua (21:79)

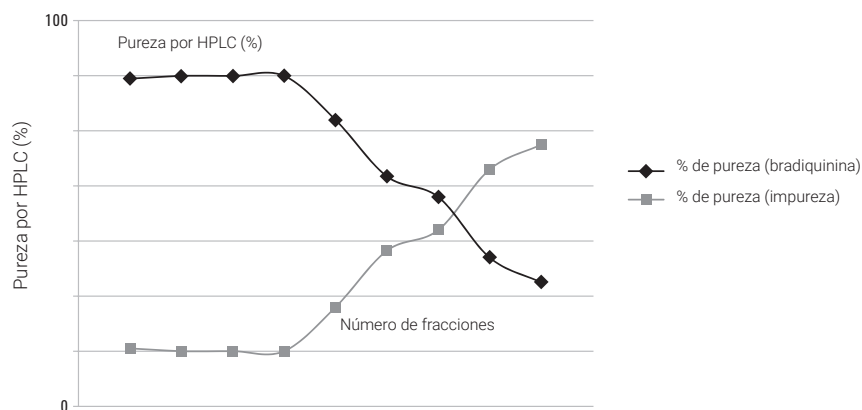
Flujo: 1 ml/min (360 cm/h)

Muestra: 30 µl, con 1,5 mg de péptido bruto



Análisis de fracciones: purificación de una sobrecarga de concentración

El análisis por HPLC de las fracciones recogidas a lo largo del pico mostró que las fracciones 1-4 contenían únicamente el péptido de interés y que el nivel de concentración de la impureza crítica se incrementó a medida que aumentó el número de fracciones. Gracias a la columna PLRP-S de alta eficiencia, fue posible obtener una recuperación del 97 % con un 100 % de pureza a partir del péptido crudo, cuya pureza era del 91,7 %. Para obtener más información, consulte la nota de aplicación 5990-7736EN.



Columnas PLRP-S preparativas y de proceso

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1.000 Å	PLRP-S 4.000 Å
100 x 300	30			PL1812-3102	PL1812-3103
100 x 300	15-20	PL1812-6200	PL1812-6201		
100 x 300	10-15	PL1812-6400	PL1812-6401		
100 x 300	10	PL1812-6100	PL1812-6101		
100 x 300	8	PL1812-6800	PL1812-6801		
50 x 300	8	PL1712-6800	PL1712-6801		
50 x 150	30			PL1712-3702	PL1712-3703
50 x 150	15-20	PL1712-3200	PL1712-3201		
50 x 150	10-15	PL1712-3400	PL1712-3401		
50 x 150	10	PL1712-3100	PL1712-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
50 x 150	8	PL1712-3800	PL1712-3801		
25 x 300	15-20	PL1212-6200	PL1212-6201		
25 x 300	10-15	PL1212-6400	PL1212-6401		
25 x 300	10	PL1212-6100	PL1212-6101		
25 x 300	8	PL1212-6800	PL1212-6801		
25 x 150	30			PL1212-3702	PL1212-3703
25 x 150	10	PL1212-3100	PL1212-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
25 x 150	8	PL1212-3800	PL1212-3801		
25 x 50	10			PL1212-1102	PL1212-1103

Columnas PLRP-S de desarrollo de métodos

4,6 x 250	30			PL1512-5702	PL1512-5703
4,6 x 250	15-20	PL1512-5200	PL1512-5201		
4,6 x 250	10-15	PL1512-5400	PL1512-5401		
4,6 x 250	10	PL1512-5100	PL1512-5101	PL1512-5102	PL1512-5103
4,6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801		
4,6 x 150	30			PL1512-3702	PL1512-3703
4,6 x 150	15-20	PL1512-3200	PL1512-3201		
4,6 x 150	10-15		PL1512-3401		
4,6 x 150	10	PL1512-3100	PL1512-3101	PL1512-3102	PL1512-3103
4,6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801		

Medio a granel PLRP-S

Tamaño de partícula (µm)	Cant.	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1.000 Å	PLRP-S 4.000 Å
50	1 kg	PL1412-6K00	PL1412-6K01	PL1412-6K02	
	100 g	PL1412-4K00	PL1412-4K01	PL1412-4K02	
30	100 g			PL1412-4702	PL1412-4703
15-20	1 kg	PL1412-6200	PL1412-6201		
	100 g	PL1412-4200	PL1412-4201		
10-15	1 kg	PL1412-6400	PL1412-6401		
	100 g	PL1412-4400	PL1412-4401		
10	1 kg	PL1412-6100	PL1412-6101		
	100 g	PL1412-4100	PL1412-4101	PL1412-4102	PL1412-4103
8	1 kg	PL1412-6800	PL1412-6801		

Pedidos personalizados de columnas y medios a granel:

Si no encuentra en estas tablas la combinación de tamaño de poro y tamaño de partícula, las dimensiones de la columna o la cantidad de medio a granel que necesita, póngase en contacto con la oficina de ventas local para solicitar asistencia con el proceso de realización de pedidos personalizados.

Recomendaciones y herramientas

Las guías del usuario de las columnas son excelentes recursos que incluyen instrucciones acerca del uso y el cuidado de las columnas, además de los métodos iniciales recomendados:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

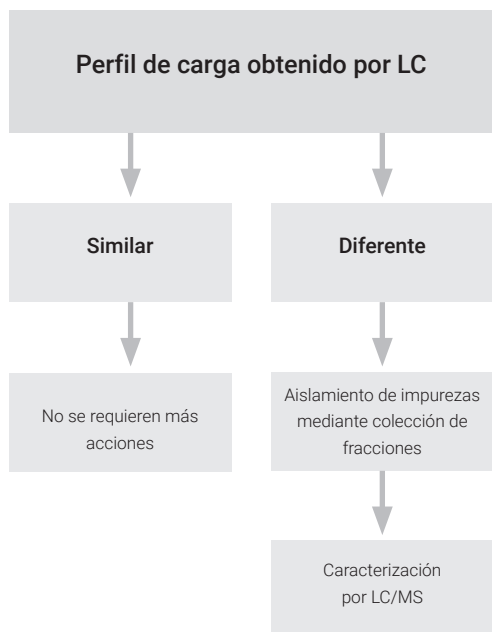
Bio MAb y Bio IEX

De la escala analítica a la escala preparativa de alta eficiencia

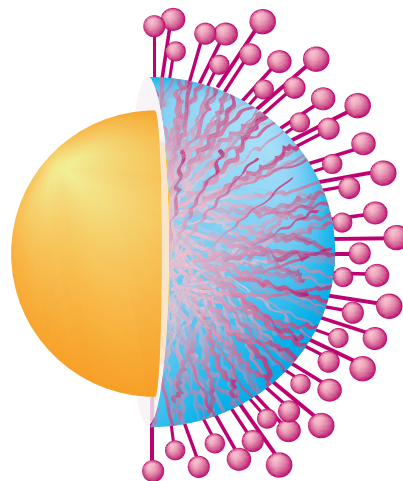
- Partículas no porosas que eliminan la transferencia de masa y ofrecen la máxima eficiencia posible, con el fin de purificar incluso impurezas muy similares.
- Cinco capacidades: SAX, WAX, SCX, WCX y una fase CX optimizada específicamente para anticuerpos monoclonales, que ofrece una resolución máxima y permite procesar una mayor carga de muestra.
- Escalado desde la escala analítica a la semipreparativa o preparativa con las mismas partículas de 5 μm .

La capa hidrófila exterior de estas partículas reduce la interacción no específica y consigue una alta recuperación de las muestras.

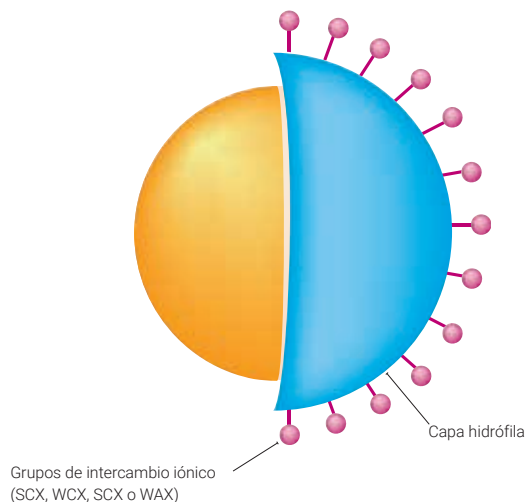
Gracias a que las columnas analíticas, semipreparativas y preparativas están empaquetadas con las mismas partículas de 5 μm , cualquier variante cargada imprevista que se detecte durante el desarrollo del proceso de fabricación de un producto biofarmacéutico se puede purificar y someter a una caracterización e identificación adicionales con rapidez.



Partícula Bio MAb



Partícula Bio IEX



Columnas Bio MAb para HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Referencia
21,2 x 250	5	5190-6885
10 x 250	5	5190-6884

Columnas Bio IEX para HPLC (acero inoxidable)

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SCX Ref.	Bio WCX Ref.	Bio SAX Ref.	Bio WAX Ref.
21,2 x 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6878

Recomendaciones y herramientas

Para conectar su columna Agilent BioHPLC, puede usar conectores de conexión rápida InfinityLab y capilares exentos de metales.

Para obtener más información, visite: www.agilent.com/chem/5991-7469EN

Columnas PL-SAX y PL-SCX preparativas y de proceso

- Purificaciones por intercambio iónico para un conjunto más amplio de aplicaciones y con un rango de pH más amplio.
- Flujos de HPLC y equilibrado rápido, lo que reduce la duración del ciclo de purificación.
- Tamaño de poro grande que mejora la transferencia de masa y consigue purificaciones rápidas y de alta resolución.

Estos materiales rígidos y resistentes de intercambio iónico son marcadamente hidrófilos y están diseñados para la purificación de biomoléculas. Los materiales PL-SAX y PL-SCX son completamente poliméricos y ofrecen estabilidad química y térmica en un amplio rango de condiciones de HPLC. La gran capacidad de intercambio iónico, gracias al enlace covalente con un polímero químicamente estable, facilita las purificaciones por intercambio iónico en un rango de pH más amplio. Esta estabilidad puede aprovecharse para la higienización y la limpieza de la columna. La estabilidad térmica también posibilita usar condiciones de desnaturalización y agentes de solubilización/estabilización para la purificación de los compuestos diana; por ejemplo, para la purificación de oligonucleótidos sintéticos con secuencias autocomplementarias.

Los materiales con tamaños de poro grandes (1.000 y 4.000 Å) son mecánicamente estables y robustos; además, permiten usar un amplio rango de velocidad lineal, cargar soluciones diluidas con rapidez y acortar la duración de los ciclos de lavado. Los flujos de HPLC y el equilibrado rápido acortan la duración del ciclo de purificación.

El empaquetado de columnas con un equipo de compresión axial dinámica (DAC) resulta sencillo y permite disponer de columnas de alta eficiencia con una reproducibilidad y una vida útil excelentes. El tamaño de poro de 1.000 Å está diseñado para purificaciones de alta capacidad, mientras que las partículas con macroporos de 4.000 Å y transferencia de masa mejorada están indicadas para purificaciones de alta velocidad y resolución de biomoléculas grandes.



Especificaciones de las columnas UHPLC

	PL-SAX	PL-SCX
Matriz	Completamente polimérica	Completamente polimérica
Tamaños de poro	1.000 y 4.000 Å	1.000 y 4.000 Å
Tamaños de partícula	10 y 30 µm	10 y 30 µm
Forma de las micropartículas	Esférica y rígida	Esférica y rígida
Grupo funcional	Amina cuaternaria	Ácido sulfónico
Estabilidad frente a la presión	3.000 psi	3.000 psi
Estabilidad frente a la temperatura	80 °C	80 °C
Rango de pH	1-14	1-14
Eluyentes compatibles	Todos los tampones de intercambio aniónico	Todos los tampones de intercambio catiónico
Densidad del lecho empaquetado	0,39 g/ml	0,39 g/ml

Purificación de un oligonucleótido de gran tamaño

Columna: PL-SAX 1.000 Å, 8 µm

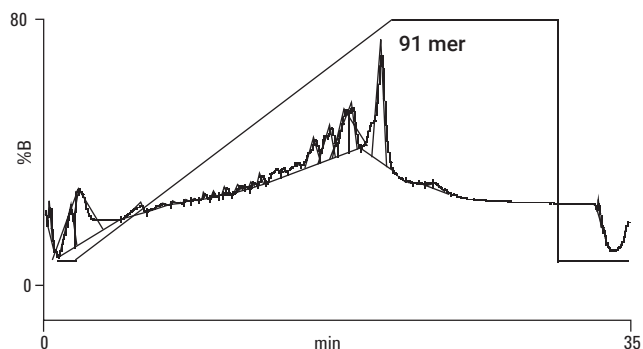
Fase móvil: A: TEAA 100 mM y ACN (93:7), pH = 7
B: TEAA 100 mM con acetato de amonio 3,24 M (pH = 7) y ACN (93:7)

Flujo: 1,5 ml/min

Gradiente: 0-100 % B en 20 min

Temperatura: 60 °C

Detector: UV (290 nm)



Fraccionamiento preparativo de filtrado de un cultivo con amiloglucosidasas

Columna: PL-SAX 4.000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

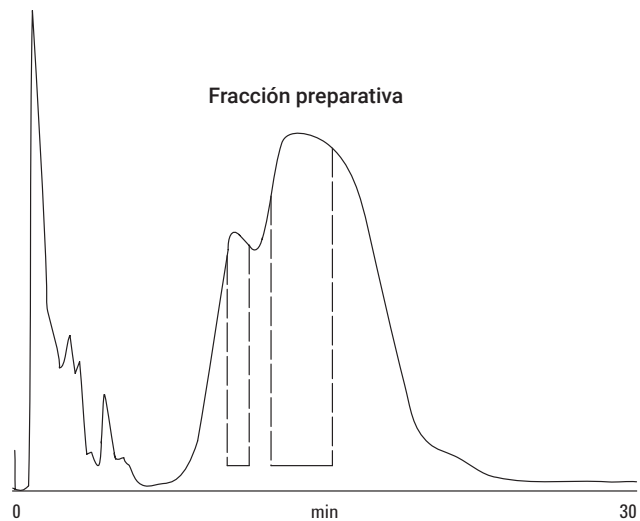
Fase móvil: A: tris-HCl 10 mM, pH = 8
B: A + NaCl 500 mM, pH = 8

Flujo: 4,0 ml/min

Gradiente: Lineal, 0-100 % B en 2 min

Temperatura: 60 °C

Detector: UV (280 nm)



Columnas PL-SAX y PL-SCX preparativas y de proceso

Dimensiones	Tamaño de partícula (µm)	PL-SAX 1.000 Å	PL-SAX 4.000 Å	PL-SCX 1.000 Å	PL-SCX 4.000 Å
50 x 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703	PL1745-3702	PL1745-3703
50 x 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103	PL1245-1102	PL1245-1103
7,5 x 150	8	PL1151-3802	PL1151-3803		
7,5 x 50	8	PL1151-1802	PL1151-1803	PL1145-1802	PL1145-1803

Columnas PL-SAX y PL-SCX de desarrollo de métodos

4,6 x 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703	PL1545-5702	PL1545-5703
4,6 x 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103	PL1545-5102	PL1545-5103
4,6 x 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103	PL1545-3102	PL1545-3103



Columnas y medio a granel PL-SAX y PL-SCX preparativos y de proceso

Medio a granel PL-SAX y PL-SCX

Tamaño de partícula (µm)	Cant.	PL-SAX 1.000 Å	PL-SAX 4.000 Å	PL-SCX 1.000 Å	PL-SCX 4.000 Å
30	100 g	PL1451-4702	PL1451-4703	PL1445-4702	PL1445-4703
10	100 g	PL1451-4102	PL1451-4103	PL1445-4102	PL1445-4103

Pedidos personalizados de columnas y medios a granel:

Si no encuentra en estas tablas la combinación de tamaño de poro y tamaño de partícula, las dimensiones de la columna o la cantidad de medio a granel que necesita, póngase en contacto con la oficina de ventas local para solicitar asistencia con el proceso de realización de pedidos personalizados.

Purificación de péptidos

La columna VariTide es una solución económica para la producción de péptidos sintéticos. Esta columna le permite gestionar el coste y la eficiencia de los procesos de purificación de péptidos sintéticos de alto volumen en una escala desde los microgramos hasta los gramos. VariTide es una solución idónea para aquellos fabricantes de péptidos que produzcan pequeñas cantidades de cientos o miles de péptidos, lo que hace que el tiempo de fabricación sea el factor económico principal.



Columnas VariTide RPC

Columnas VariTide RPC para péptidos sintéticos

- Una única columna para todo tipo de péptidos sintéticos.
- Tamaño de partícula pequeño que ofrece una eficiencia máxima, incluso para columnas preparativas de 1 y 2 pulgadas.
- Medio a granel para empaquetar columnas preparativas de 1 y 2 pulgadas para la purificación de cantidades que van desde los miligramos hasta los gramos.

Las columnas y los medios VariTide RPC forman parte de la solución VariPep para péptidos. Es la opción recomendada para conseguir una separación y una purificación económicas de péptidos sintéticos mediante métodos genéricos.

Columnas VariTide RPC para péptidos sintéticos

Tamaño (mm)	Referencia
21,2 x 250	PL1E12-5A05
10,0 x 250	PL1012-5A05
4,6 x 250	PL1512-5A05

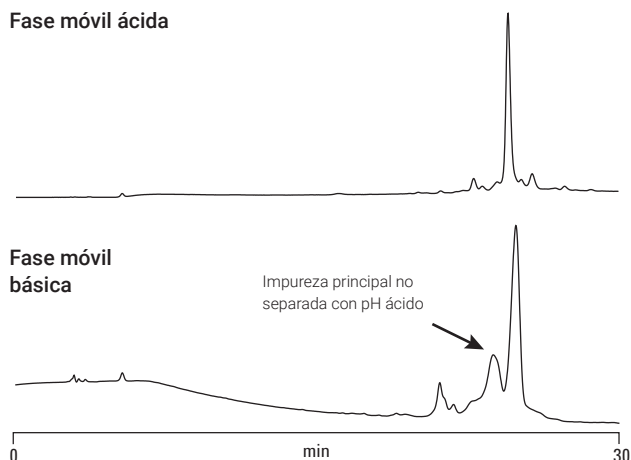
Medio a granel VariTide RPC

Descripción	Referencia
100 g	PL1412-4A05
1 kg	PL1412-6A05

Cribado de péptidos brutos

Columna:	VariTide RPC PL1512-5A05 4,6 x 250 mm
Fase móvil:	Ácida: A: TFA al 0,1 % en agua y acetonitrilo (95:5) B: TFA al 0,1 % en agua y ACN (50:50) Básica A: ACN y carbonato de amonio 20 mM (5:95), pH = 9,5 B: ACN y carbonato de amonio 20 mM (50:50), pH = 9,5
Flujo:	1,0 ml/min (360 cm ³ /h)
Gradiente:	0-100 % B en 30 min
Detector:	UV (220 nm)

Fase móvil ácida



VariPure IPE

- Preempaquetada para mayor comodidad.
- Eliminación de los agentes de emparejamiento iónico, lo que mejora la productividad.
- Solución económica y de alto rendimiento, lo que se traduce en una eficiencia excelente.

La resina VariPure IPE, con aminas cuaternarias y soporte polimérico, incluye un contraión bicarbonato y está diseñada para eliminar reactivos ácidos de emparejamiento iónico, como ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico o ácido acético. VariPure IPE es un material de eliminación de ácidos económico y de alto rendimiento, suministrado en cómodos dispositivos preempaquetados, similares a los de extracción en fase sólida (SPE). La combinación de tamaño de partícula, capacidad y geometría del dispositivo está pensada para conseguir un tiempo de residencia adecuado y una extracción eficaz por emparejamiento iónico en condiciones de flujo por gravedad. Para péptidos inestables en presencia de ácidos, la eliminación del agente de emparejamiento iónico evita la degradación ácida del péptido durante las operaciones posteriores a la HPLC e incrementa el rendimiento del producto purificado.

VariPure IPE

Carga	Capacidad de eliminación de contraiones	Cant.	Referencia
100 mg por cada tubo de 3 ml	Aprox. 5 ml de TFA al 0,1 %	50/paq.	PI3540-d603VP
500 mg por cada tubo de 6 ml	Aprox. 25 ml de TFA al 0,1 %	50/paq.	PI3540-C603VP
1 g por cada tubo de 20 ml	Aprox. 50 ml de TFA al 0,1 %	25/paq.	PI3540-P603VP
25 g			PI3549-3603VP

Columnas Load & Lock para HPLC preparativa

Agilent ofrece una gama completa de columnas Load & Lock de escala de laboratorio y una estación móvil de empaquetado. Esta solución, diseñada para permitirle empaquetar de forma rápida y sencilla sus propias columnas preparativas de alta eficiencia, es idónea para aplicaciones de desarrollo de principios activos de medicamentos, péptidos y productos naturales. Nuestras columnas Load & Lock cuentan con un exclusivo sistema de distribución de fluido y muestra para maximizar la productividad. Esto mejora el rendimiento de las columnas gracias a la difusión más eficiente de la muestra por toda la superficie del lecho.

- Rendimiento excepcional: el exclusivo sistema de distribución del flujo consigue unos resultados excelentes.
- Flexibilidad máxima: todas las columnas Load & Lock de 1, 2 y 3 pulgadas aportan la comodidad de poder usar la misma estación móvil de empaquetado y se pueden usar en modo de compresión axial dinámica (DAC) o estática (SAC).
- Mayor comodidad: empaque o desempaque sus columnas en cuestión de minutos.
- Movilidad máxima: la columna y la estación de empaquetado se colocan en una única estructura que puede transportarse con facilidad hasta el lugar donde se necesite.

Los formatos de empaquetado de modo dual garantizan un funcionamiento sencillo y la obtención de resultados uniformes y de un alto rendimiento, sin importar si usa el modo DAC o SAC.

Las columnas Agilent Load & Lock de escala de laboratorio combinan una excelente estabilidad del lecho empaquetado y una distribución mejorada del flujo, y posibilitan obtener una purificación de excepcional calidad con una velocidad, una flexibilidad y una facilidad de uso óptimas.

La estación de empaquetado Load & Lock solo requiere aire comprimido (no requiere suministro eléctrico), lo que hace que su uso resulte seguro con cualquier tipo de disolvente; además, esto la convierte en una solución inmejorable para entornos peligrosos. La abrazadera de liberación rápida con un solo perno permite llevar a cabo el empaquetado y el desempaquetado con facilidad y rapidez, en cuestión de minutos.



Columnas Load & Lock para HPLC preparativa

Descripción	Camisa de agua	Tamaño (mm)	Referencia
Columna Load & Lock	No	27,0 x 500	PCG93LL500X25
	Sí	27,0 x 500	PCG93LL500X25WJ
	Kits de piezas de repuesto		PCG931AAKIT
Estación móvil de empaquetado (sistema hidroneumático)			PCG93LLSTAND123

Bio SEC

Purificación en función del tamaño

- Seis tamaños de poro que permiten separar productos biofarmacéuticos en función de su tamaño.
- Escalado de columnas analíticas con partículas de 3 y 5 μm a columnas preparativas de laboratorio con esas mismas partículas.
- Capa fina de polímero hidrófilo que minimiza las interacciones no específicas, consigue formas de pico adecuadas e incrementa la capacidad de muestra.

Estos materiales de sílice para SEC cuentan con tamaños y volúmenes de poro optimizados para lograr separaciones de alta resolución en condiciones de presión y flujo propias de la HPLC. Las partículas de 3 μm con tamaños de poro de 100, 150 y 300 Å ofrecen una eficiencia óptima para aplicaciones preparativas de laboratorio, mientras que las partículas de 5 μm proporcionan una amplia variedad de tamaños de poro para el fraccionamiento de biomoléculas y conjugados de mayor tamaño.

Recomendaciones y herramientas



Las guías del usuario de las columnas son excelentes recursos que incluyen instrucciones acerca del uso y el cuidado de las columnas, además de los métodos iniciales recomendados:

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

Columnas Bio SEC-3 para separaciones más rápidas de proteínas y péptidos por HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33
21,2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
Precolumnas preparativas				
21,2 x 50	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856

Columnas Bio SEC-5 para separaciones de biomoléculas en función del tamaño por HPLC

Tamaño (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33	Bio SEC-5 500 Å USP L33	Bio SEC-5 1.000 Å USP L33	Bio SEC-5 2.000 Å USP L33
21,2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
Precolumnas preparativas							
21,2 x 50	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6874	5190-6875



Soluciones Agilent

Ponga a disposición de sus resultados más de 40 años de continua innovación

Agilent ofrece una completa gama de soluciones innovadoras, que abarcan desde la mejora de la productividad del laboratorio para el análisis químico hasta sistemas de vacío o soluciones de flujo de trabajo desarrolladas para facilitar la comprensión de las complejidades asociadas a los sistemas de los seres vivos. Le ayudamos a mantenerse al día acerca de las nuevas aplicaciones y métodos aprobados; además, nuestras soluciones integrales de flujos de trabajo permiten obtener datos precisos y completos para que pueda tomar decisiones empresariales informadas y agilizar la obtención de resultados.

Los clientes que llevan usando los productos y servicios de Agilent desde hace tiempo conocen de primera mano nuestro compromiso. Ahora, queremos demostrarle cómo puede aprovechar nuestro planteamiento de continua innovación a su favor.



Instituciones académicas

Gracias a nuestro compromiso con los logros académicos, que traspasa las fronteras y las disciplinas científicas, nos esforzamos por ayudar a los investigadores a dar un impulso a su labor y a que obtengan mayor reconocimiento como contribuyentes destacados en sus respectivos campos.



Geoquímica, minería y metales

No importa si tiene que determinar analitos principales o a nivel de trazas (o incluso oro, plata y platino), analizar soluciones de chapado o llevar a cabo un mapeo geoquímico: Agilent le ofrece los instrumentos analíticos fiables y fáciles de usar que necesita para analizar las muestras más complejas y refinadas.



Productos biológicos y biosimilares

Los productos bioterapéuticos ofrecen enormes posibilidades para mejorar la salud de las personas. El número de productos terapéuticos aprobados con proteínas y anticuerpos no cesa de aumentar en todo el mundo, ya que esta importante clase de fármacos da respuesta a necesidades médicas irresolubles hasta ahora.



Seguridad nacional

Si tiene que detectar agentes de guerra química, agentes de guerra biológica o productos químicos industriales tóxicos, o bien monitorizar alimentos, aire, suelos o agua, Agilent dispone de una solución rápida, flexible y fiable para dar respuesta a sus necesidades.



Metabolismo celular

Comprender el metabolismo celular resulta esencial para entender numerosos procesos celulares. Agilent le ayuda a analizar el metabolismo de células vivas en tiempo real y obtener datos con una relevancia fisiológica excepcional.



Investigación y análisis de materiales

Agilent le proporciona los medios para identificar la naturaleza y la fuente de olores indeseados en productos terminados, caracterizar irregularidades microcristalinas en materiales compuestos y cuantificar impurezas a nivel de trazas en aleaciones metálicas.



Investigación clínica

Agilent, gracias a su completa gama de instrumentos LC/MS, GC/MS e ICP-MS, auténticos líderes del sector, y a los productos RapidFire y de automatización de la preparación de muestras, puede ayudarle a aprovechar todas las ventajas del análisis MS, un campo en plena expansión, en aplicaciones de investigación clínica.



Energía y productos químicos

Agilent cuenta con métodos y soluciones personalizados para dar respuesta a sus necesidades específicas y lograr que su laboratorio ofrezca una productividad y una rentabilidad máximas, cumpliendo al mismo tiempo los exigentes requisitos reglamentarios del sector.



Análisis medioambiental

Agilent pone a su disposición la fiabilidad y la eficiencia de su experiencia con la normativa y el análisis medioambiental, sin importar si tiene que analizar contaminantes en aguas residuales o la pureza de agua potable, medir la calidad del aire de interiores, dar respuesta a desastres de origen natural o antropogénico, o identificar nuevos contaminantes.



Agricultura y análisis alimentario

La industria alimentaria y la agricultura afrontan exigencias cada vez mayores de encontrar soluciones analíticas más sensibles y productivas. Nuestros instrumentos, sistemas y consumibles se emplean a lo largo de la cadena de producción de alimentos. Agilent desarrolla sistemas y aplicaciones que cumplen hasta los últimos requisitos.



Ciencias forenses

No importa si tiene que analizar venenos, realizar un cribado de fármacos, llevar a cabo pruebas de detección de drogas recreativas o buscar residuos de explosivos en la escena de un crimen: Agilent Technologies lidera el sector con instrumentos robustos que aportan la capacidad de confirmar y cuantificar miles de sustancias.



Genómica

Da igual si usa técnicas de expresión génica, clonación y PCR cuantitativa, hibridación genómica comparativa para detectar variaciones del número de copias o selección del exoma humano para secuenciar regiones de interés: Agilent puede aportarle la innovación y la fiabilidad que su investigación requiere.



Metabolómica

Las soluciones de metabolómica de Agilent se utilizan en campos como la investigación de enfermedades, la toxicología analítica, el análisis medioambiental, la agricultura, el desarrollo de biocombustibles y la nutrición. Los resultados metabolómicos se combinan con estudios de expresión génica y/o proteómica para obtener una comprensión profunda de la biología.



Proteómica

La proteómica estudia la estructura y la función de las proteínas, además de sus interacciones dentro de sistemas biológicos complejos. El análisis de proteínas conlleva numerosos desafíos; por ello, para alcanzar sus objetivos de investigación proteómica debe disponer de flujos de trabajo completos, optimizados y accesibles que le permitan obtener resultados rápidos, precisos y reproducibles.



Análisis de semiconductores

Los instrumentos analíticos de Agilent ofrecen un rendimiento insuperable para el análisis de elementos a nivel de trazas en todo tipo de muestras de la industria de los semiconductores, incluidas obleas de silicio por extracción de metales superficiales (SME), silicio de paneles fotovoltaicos, productos químicos de proceso de alta pureza, agua ultrapura, disolventes orgánicos y fotorresistencias.



Fármacos de molécula pequeña

La industria farmacéutica se enfrenta a constantes desafíos, ya que la actividad comercial, la ciencia y la presión normativa evolucionan y chocan. Desde medicamentos personalizados a organismos de investigación por contrato (CRO), el proceso para lanzar un fármaco al mercado en la actualidad es sensiblemente diferente del que se seguía hace diez años.



Productos químicos especializados

La gama de instrumentos, accesorios, soporte y consumibles de Agilent (junto con una amplia y variada red de socios comerciales de canales de ventas) puede ayudarle a resolver casi cualquier problema al que se pueda enfrentar.



Soluciones de vacío

Comprender sus necesidades de vacío resulta crucial para poder ofrecerle soluciones fiables que mejoren la productividad. Con Agilent Technologies a su lado, contará con nuestros sólidos conocimientos científicos y nuestra creatividad a la hora de desarrollar soluciones adaptadas a sus necesidades.

Recomendaciones y herramientas

Para obtener más información, visite: www.agilent.com/en/solutions

Servicios Agilent CrossLab

Maximice el funcionamiento continuado gracias al soporte integral

Confíe en los expertos en servicios de Agilent CrossLab, que le aportarán sus valiosos conocimientos y mantendrán sus instrumentos funcionando a pleno rendimiento. Nuestros servicios son la auténtica referencia del sector y podemos adaptarlos a sus necesidades; entre ellos se incluyen los siguientes: actualización tecnológica, consultoría de aplicaciones, reparación, mantenimiento preventivo, verificación de conformidad y formación. Consúltenos y estudiaremos cómo podemos dar soporte a su laboratorio desde hoy mismo.

Planes de servicios Agilent CrossLab

Protéjase frente a costosas reparaciones y al tiempo de inactividad

Hoy en día, los laboratorios se enfrentan a complejos desafíos que exigen disponer del soporte de un socio fiable. Los planes de servicios Agilent CrossLab le permitirán mejorar la productividad de su laboratorio y garantizar que funcione sin problemas día tras día. Sea cual sea la configuración de su laboratorio, podemos ofrecerle el nivel de soporte que mejor se adapte a sus necesidades y a su presupuesto.

Servicios de conformidad Agilent

Cualificación de equipos que cumple los requisitos más exigentes

El programa Enterprise Edition Compliance se ha desarrollado para agilizar la conformidad en las cualificaciones a lo largo y ancho de su laboratorio. El programa Enterprise Edition se utiliza a nivel internacional en laboratorios regulados, incluidos los de organizaciones de normalización y organismos de regulación, y le permite:

- Aumentar la eficiencia de la cualificación armonizando los protocolos entre plataformas para garantizar una mayor eficiencia y minimizar los riesgos en entorno regulado.
- Estandarizar los protocolos de conformidad gracias a robustos diseños de pruebas compatibles con todos sus instrumentos.
- Añadir, eliminar o reconfigurar pruebas en función de sus necesidades específicas como usuario.
- Reducir el tiempo dedicado por el personal a la revisión mediante el uso de informes generados por ordenador con un formato uniforme y a prueba de manipulaciones.



Disfrute del servicio garantizado Agilent

Si su instrumento requiere algún servicio que esté cubierto por un contrato de servicios de Agilent, garantizamos la reparación del mismo o lo sustituiremos sin ningún tipo de coste.

Ninguna otra empresa alcanza este grado de compromiso para mantener su laboratorio funcionando con la máxima eficiencia.

Agilent University

Obtenga todos los conocimientos que su equipo y usted necesitan para tener éxito

Mantener unos elevados niveles de conocimientos resulta un reto y genera un impacto directo sobre el funcionamiento continuado de los instrumentos, la productividad del laboratorio y la precisión analítica. Agilent University ofrece oportunidades de formación integrales (desde cursos para principiantes hasta clases avanzadas) para todos los miembros de su equipo mediante rutas de aprendizaje predefinidas.

La promesa de valor Agilent: 10 años de garantía

Servicios extendidos

La promesa de valor Agilent garantiza al menos 10 años de ciclo de vida instrumental y 7 años de soporte. Los servicios extendidos Agilent CrossLab proporcionan a los clientes con instrumentos antiguos una calidad uniforme en los servicios de diagnóstico, reparación, mantenimiento y formación. Los servicios extendidos Agilent CrossLab son prestados por técnicos de Agilent que utilizan las herramientas y los procedimientos más recientes y piezas originales de Agilent.

Para obtener información más detallada, póngase en contacto con su representante local de servicios y soporte de Agilent o visite www.agilent.com/chem/extended-services.

Soporte técnico a su disposición

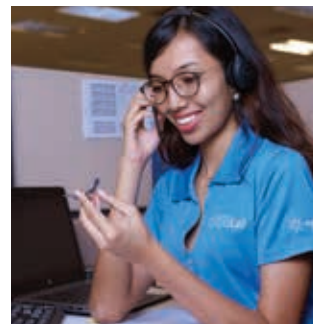
¿Tiene alguna consulta sobre hardware, software, aplicaciones, reparación de instrumentos o resolución de problemas? Los expertos técnicos de Agilent están siempre disponibles para resolver sus dudas. Nuestros especialistas en soporte técnico poseen años de experiencia en el laboratorio y le aportarán su profundo conocimiento y su experiencia.

Si tiene cualquier consulta acerca de los consumibles incluidos en este catálogo, póngase en contacto con su oficina de ventas o distribuidor autorizado local de Agilent, o visite www.agilent.com/chem/techsupport.

Comunidad Agilent

Conéctese, colabore y comparta conocimientos

La Comunidad Agilent es el lugar idóneo para colaborar con colegas en temas relacionados con aplicaciones, hablar sobre los productos Agilent y encontrar materiales detallados que le resulten útiles para sus análisis. Visite: community.agilent.com.



Contacte con nosotros:

www.agilent.com/chem/contactus

Tienda on-line:

www.agilent.com/chem/store

Agilent en las redes sociales:

www.agilent.com/chem/social

Consulte todos nuestros catálogos:

www.agilent.com/chem/catalog

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso
en procedimientos diagnósticos.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

Agilent Technologies, Inc. 2019
Publicado en EE. UU., 11 de junio de 2019
5994-0974ES