

Colonnes Agilent BioHPLC

La ressource indispensable pour vos analyses de biomolécules





Qui nous sommes et ce que nous faisons.

Avec vous, au laboratoire, partout dans le monde, à chaque instant.

CrossLab d'Agilent intègre la gestion des services, des consommables et des ressources pour permettre aux laboratoires d'améliorer leur efficacité, d'optimiser leur fonctionnement, d'augmenter la disponibilité des instruments, de développer les compétences des utilisateurs, et plus encore.

Agilent CrossLab est destiné aux instruments Agilent et à certains instruments non Agilent et fournit un service de conseil d'experts techniques pour l'optimisation des procédures de travail, la mise en œuvre d'outils analytiques pour le laboratoire, la mise en conformité, la gestion d'inventaire et la gestion des actifs, ainsi qu'un service de déménagement.

Pour en savoir plus sur Agilent CrossLab et voir des exemples d'excellents résultats obtenus grâce aux conseils d'experts, rendez-vous sur www.agilent.com/crosslab

Lisez les histoires de laboratoire CrossLab et découvrez comment nous pouvons vous aider.



Histoires vraies du laboratoire

Les ingénieurs de maintenance Agilent CrossLab partagent leur expertise lors de chaque interaction avec les utilisateurs, en les aidant à améliorer l'efficacité, optimiser les ressources, augmenter la disponibilité des instruments et développer leurs compétences. Découvrez comment Agilent CrossLab a procuré valeur et expertise à des clients dans le monde entier.

www.agilent.com/chem/crosslabstories

Sommaire

Guide de sélection des biocolonnes	1	AdvanceBio RP-mAb	39
Qu'est-ce qu'une biomolécule ?	2	ZORBAX 300 Å StableBond	44
Qu'est-ce qu'une biocolonne ?	3	ZORBAX 300 Å Extend-C18	53
Organigramme de sélection de colonnes	5	Poroshell 300	57
		AdvanceBio Peptide Mapping	62
		Mélange étalon d'Agilent pour le contrôle-qualité des peptides	66
Séparations de biomolécules	6	PLRP-S	67
Séparation des protéines	6	Cartouche de dessalage Agilent AdvanceBio Desalting-RP	73
Séparations des glycanes	12	AdvanceBio pour oligonucléotides	74
Séparation des peptides	14	Étalons d'oligonucléotides AdvanceBio	76
Colonnes AdvanceBio : des analyses biopharmaceutiques plus fiables et plus rapides	16		
Séparations des oligonucléotides d'ADN et d'ARN	17		
Analyse des acides aminés	19		
Acides aminés	20		
		Analyse des protéines intactes avec la chromatographie par interaction hydrophobe	78
		AdvanceBio HIC	78
Recommandations pour le développement des méthodes	21	Analyse des isoformes	80
Méthodes d'analyse de la structure primaire	21	Purifiez les protéines et les autres molécules chargées	80
Méthodes LC/MS en phase inverse	23	Application de l'IEX à l'analyse des isoformes	80
Méthodes d'analyse des isoformes	24	Colonnes de HPLC Bio MAB	83
Méthodes d'analyses des isoformes avec le logiciel Agilent		Colonnes HPLC Bio IEX	88
Buffer Advisor	26	Colonnes échangeuses d'anions forts PL-SAX	95
Méthodes d'analyse des fragments et agrégats	27	Colonnes échangeuses de cations forts PL-SCX	99
Analyse des glycanes, des peptides hydrophiles et des glycopeptides	29	Colonnes HPLC échangeuses d'ions Bio-Monolith	102
Titration et méthodes d'optimisation des cultures cellulaires	30		
Méthodes avec colonne capillaire de haute sensibilité	31	Analyse des fragments et agrégats	106
		Évaluez avec précision l'agrégation, la fragmentation et les ligations/modifications chimiques des biomolécules	106
		Application de la SEC aux études d'agrégation	106
Instruments Agilent pour l'identification des protéines et le profilage des impuretés	32	Application de la SEC pour la quantification et la détermination des masses moléculaires	107
Système LC bio-inerte 1260 Infinity II	32	Quelle colonne SEC convient à votre application ?	109
LC Agilent 1290 Infinity II avec pompe à haut débit	33	AdvanceBio SEC	110
Système LC 1260 Infinity II avec pompe binaire	34	Étalons AdvanceBio SEC	116
Système LC 1260 Infinity II Prime	35	Bio SEC-3	117
		Bio SEC-5	123
Analyse de la structure primaire	36	ProSEC 300S	127
Déterminez avec précision la séquence d'acides aminés et les modifications post-traductionnelles, et analysez les impuretés des peptides et oligonucléotides	36	Colonnes de filtration sur gel ZORBAX GF-250 et GF-450	128

(Suite)

Sommaire (suite)

Caractérisation de la glycosylation	130	Colonnes microbore (1,0 mm de d.i.)	169
Colonnes AdvanceBio Glycan Mapping	132	LC-2D	172
Étalons de N-glycanes	136	Régénération de la colonne hors ligne	172
Interactions hydrophiles et analyse des glycopeptides	138	LC-2D complète	174
		Colonnes de HPLC préparative pour la purification	176
Titration	140	Colonnes de fractionnement des protéines à haut rendement mRP-C18 Agilent	178
Colonnes de HPLC Agilent Bio-Monolith	140	ZORBAX PrepHT	180
		PLRP-S de la préparation à la production	182
Analyse des acides aminés et des cultures cellulaires	145	Bio MAb et Bio IEX	188
Solutions Agilent pour l'analyse des milieux de culture épuisés	146	PL-SAX et PL-SCX de la préparation à la production	190
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)	147	Purification des peptides	194
Kit et étalons AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés	149	Colonnes VariTide RPC pour peptides synthétiques	194
AdvanceBio MS Spent Media	150	VariPure IPE	195
ZORBAX Eclipse AAA (analyse des acides aminés)	152	Colonnes Load & Lock de HPLC préparative	196
		Bio SEC	198
Déplétion des protéines	155		
Système de fractionnement de protéines et réactifs pour la protéomique d'Agilent	155	Solutions Agilent	200
Système d'immunoaffinités	156		
Kits de démarrage pour système d'immunoaffinités	159	Services Agilent CrossLab	202
Dimensions spéciales	160		
Colonnes capillaires et nanocolonnes	160		
ZORBAX Bio-SCX série II	166		

Conseils et outils

Pour des exemples d'applications couvrant notre gamme de biocolonnes, reportez-vous à notre compendium d'applications sur les attributs qualité critiques sur www.agilent.com/chem/cqa-applications

Guide de sélection des biocolonnes

Les biothérapies ont la capacité d'améliorer considérablement la santé. Le nombre de produits biothérapeutiques à base de protéines et d'anticorps approuvés continue d'augmenter dans le monde, car cette importante classe thérapeutique répond à des besoins médicaux encore non satisfaits. Mais la découverte et le développement de produits biopharmaceutiques sont complexes. Les scientifiques sont confrontés à de nombreux défis et doivent non seulement rester au fait des nouvelles avancées de la recherche, mais aussi se repérer dans un dédale de réglementations gouvernementales en constante évolution. La capacité de prendre les bonnes décisions rapidement est essentielle. À chaque étape, de la recherche médicale à l'AQ/CQ et à la fabrication, Agilent peut faciliter votre prise de décision pour réussir la mise sur le marché de nouveaux produits biothérapeutiques. Et ce n'est pas seulement parce que nous fabriquons des instruments et des consommables fiables qui fournissent des résultats précis et reproductibles. C'est aussi parce que nous comprenons les impératifs de vos procédures biopharmaceutiques et proposons des gammes de produits fonctionnant en parfaite harmonie, comme de véritables moteurs de la recherche, de la découverte et du développement, qui vous permettent d'avancer dans la détermination des agents biopharmaceutiques potentiels.

Puisque les protéines biopharmaceutiques sont très hétérogènes, il est nécessaire d'utiliser un certain nombre de méthodes chromatographiques pour caractériser les principes actifs pharmaceutiques (API) avec précision. Ces méthodes incluent la chromatographie d'exclusion stérique pour la quantification des dimères et des agrégats, ainsi que la chromatographie à échange d'ions pour l'analyse des isoformes.

Pour effectuer une caractérisation complète, il faut analyser la séquence des acides aminés et les éventuelles modifications post-traductionnelles pouvant survenir durant les étapes de purification et de formulation. Afin de permettre une analyse complète, reproductible et de haute qualité pour les principales procédures de caractérisation, Agilent propose une large gamme de colonnes et consommables.

Ce guide détaillé vous aidera à trouver la bonne colonne pour votre procédure de caractérisation. Nous y avons également inclus des conseils et des astuces sur le développement de méthodes, le choix du solvant, la modification de la phase mobile, l'optimisation et de nombreux exemples de séparations pour faciliter la sélection de colonnes et le développement de méthodes.

Agilent offre des solutions complètes pour répondre à vos besoins. Elles incluent le système LC bio-inerte Agilent 1260 Infinity II, qui dispose d'un circuit sans métal, et le LC Agilent 1290 Infinity II, qui est conçu pour apporter une plus grande rapidité, résolution et sensibilité pour les applications UHPLC. La structure des biomolécules peut être complexe, mais leur analyse est simplifiée par l'utilisation de colonnes, systèmes et consommables de HPLC Agilent.

Qu'est-ce qu'une biomolécule ?

Les biomolécules sont des composés synthétisés par les organismes vivants. Leur taille est variable, s'étendant des acides aminés et des lipides de petite taille aux polynucléotides de grande taille, comme l'ADN ou l'ARN.

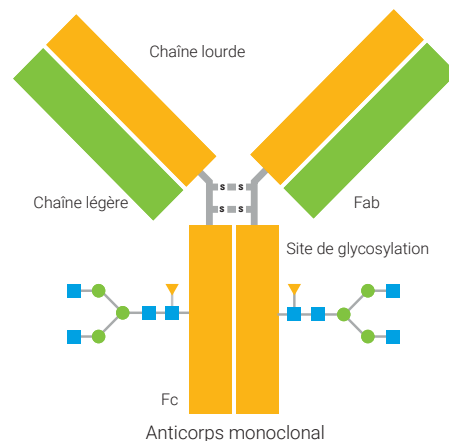
Dans cette section, nous traiterons de la séparation des biomolécules suivantes :

Protéines : séparation en fonction de la taille avec la chromatographie d'exclusion stérique, de la charge avec la chromatographie à échange d'ions et de l'hydrophobicité avec la chromatographie en phase inverse ou la chromatographie par interaction hydrophobe.

Peptides : biocolonnes pour l'analyse et la purification de tous les types de peptides, hydrophobes, hydrophiles, basiques, acides de toutes tailles, dont colonnes HPLC et UHPLC pour la cartographie peptidique.

Oligonucléotides d'ADN/ARN : colonnes de phase inverse et d'échange d'ions avec un choix de taille de pore recouvrant toute la gamme de taille, des petits oligos synthétiques aux grands plasmides.

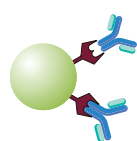
Acides aminés : les colonnes AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés constituent une solution hautement efficace pour l'analyse de 24 acides aminés. Le temps d'analyse est généralement compris entre 14 minutes avec une colonne de 75 mm et 24 minutes avec une colonne de 150 mm.



Qu'est-ce qu'une biocolonne ?

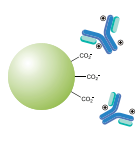
Les colonnes de biochromatographie, ou biocolonnes, sont des colonnes de chromatographie en phase liquide utilisées pour la séparation de composés biologiques tels que les peptides et les protéines, les oligonucléotides et les polynucléotides, ainsi que d'autres biomolécules et complexes. Les biocolonnes sont spécialement conçues pour l'analyse des biomolécules, avec des diamètres de pores plus grands qui permettent la rétention des molécules de grande taille. Le support est conçu pour réduire les interactions non spécifiques avec les composés analysés et assurer un meilleur rendement. Les mécanismes de séparation sont choisis pour soit conserver la fonction biologique afin de ne pas perdre la bioactivité pendant l'analyse, soit dénaturer délibérément les molécules pour la caractérisation de la structure primaire.

Les biocolonnes Agilent représentent des solutions pour toutes les techniques de caractérisation majeures requises pour vos analyses de biomolécules. Ces solutions incluent :



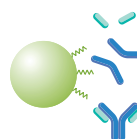
La titration

Utilisez une technologie unique telle que celle des colonnes AdvanceBio Bio-Monolith Protein A pour effectuer les titrations et optimiser les lignées cellulaires.



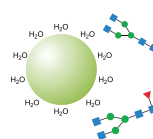
L'analyse des isoformes

Le greffage des colonnes Agilent échangeuses d'ions, telles que les colonnes Bio mAb et Bio IEX, est optimisé pour l'analyse des anticorps monoclonaux et l'analyse précise des isoformes.



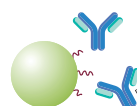
La détermination de la pureté des protéines intactes ou fragmentées en phase inverse

Utilisez des technologies essentielles telles que celles des colonnes AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX RRHD 300 Å et PLRP-S pour garantir la fiabilité des résultats, de la caractérisation de la structure primaire jusqu'à l'analyse des protéines intactes ou de leurs sous-unités.



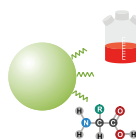
L'analyse des glycanes

Les colonnes de chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) d'Agilent permettent d'analyser les glycanes et les glycopeptides de façon précise et reproductible.



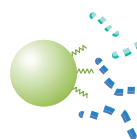
L'analyse des protéines intactes à l'aide des interactions hydrophobes

Les colonnes Agilent AdvanceBio HIC permettent de séparer les variants protéiques dus aux modifications post-traductionnelles (MPT), notamment l'oxydation dans le cas des mAb et les complexes anticorps-médicaments dans le cas des ADC.



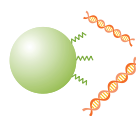
L'analyse des acides aminés et des cultures cellulaires

Analysez les composants essentiels des milieux de culture cellulaire avec les colonnes AdvanceBio AAA en suivant une procédure LC/UV, ou les colonnes Agilent AdvanceBio MS Spent Media en suivant une procédure LC/MS.



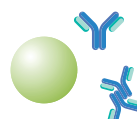
La cartographie peptidique

Détectez et identifiez les modifications post-traductionnelles importantes dans les protéines digérées à l'aide d'AdvanceBio Peptide Mapping.



L'analyse des oligonucléotides

Des solutions d'une grande robustesse et efficacité pour l'analyse des ADN/ARN.



L'analyse des fragments et des agrégats

AdvanceBio SEC mesure les agrégats avec précision (dimères, trimères, tétramères, etc.) et sépare les excipients et les impuretés de faible masse moléculaire des protéines de masse moléculaire plus élevée.

Guide de sélection des biocolonnes

Les colonnes Agilent AdvanceBio sont conçues pour améliorer la précision et la rapidité pour les caractérisations suivantes : anticorps monoclonaux et autres protéines intactes, agrégation des protéines par SEC, isoformes par IEX, masse intacte, structure primaire et modifications post-traductionnelles (MPT) en phase inverse, ainsi que l'analyse par chromatographie d'interaction hydrophile des glycanes clivés.

Ce guide contient plus de détails sur la gamme complète de biocolonnes d'Agilent, ainsi que des informations sur les choix disponibles parmi les produits AdvanceBio qui permettent de caractériser les biothérapies avec précision.



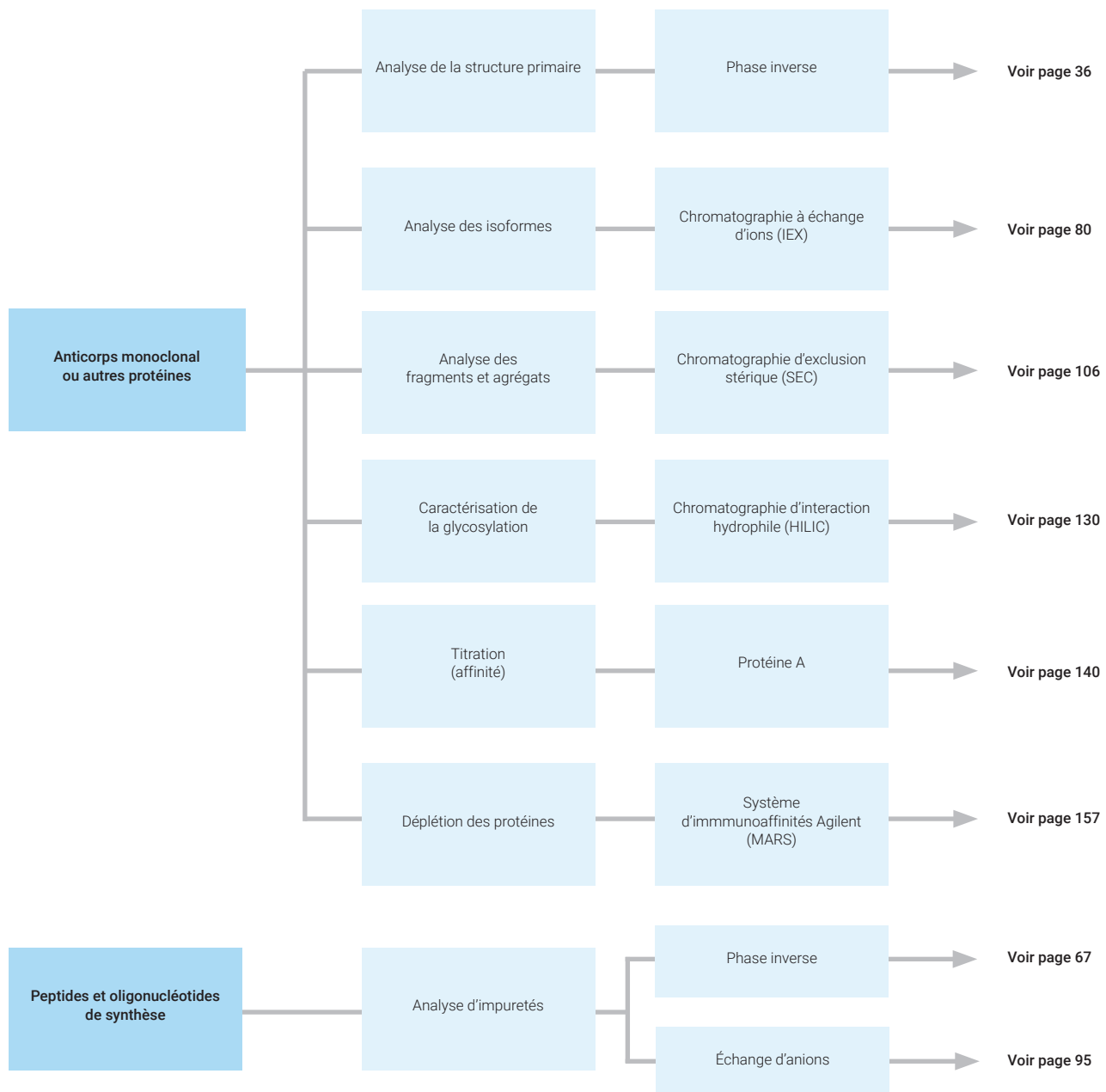
Conseils et outils

Pour en savoir plus sur la gamme de colonnes AdvanceBio et sur les différents outils répondant à vos besoins en termes de caractérisation, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/advancebio

Organigramme de sélection de colonnes

L'organigramme ci-dessous indique les numéros de page où vous trouverez les guides de sélection des différents chapitres. Ces guides vous aideront à choisir la meilleure colonne pour votre application des biomolécules.

Ils contiennent diverses recommandations permettant de sélectionner la meilleure colonne pour une séparation de biomolécules. Le premier point à considérer est la taille de la molécule, car elle détermine la taille de pore de la méthode HPLC utilisée pour la séparation. Ensuite, il faut tenir compte de la solubilité de la molécule. Enfin, il faut prendre en considération le mécanisme de séparation, à savoir taille, hydrophobicité et charge.



Séparations de biomolécules

Séparation des protéines

Les protéines sont des molécules complexes dont la caractérisation nécessite plusieurs techniques. Elles existent sous forme de structures tridimensionnelles qui leur confèrent leur activité biologique.

La séquence d'enchaînement des acides aminés définit la structure primaire des protéines. Les liaisons hydrogène entre les acides aminés de la structure primaire entraînent la formation de la structure secondaire, généralement sous forme d'hélices alpha et de feuillets plissés. La structure tertiaire de la protéine, c'est-à-dire sa conformation tridimensionnelle, se forme par une série d'autres interactions entre différentes régions de la structure secondaire : liaisons hydrogène, ioniques, hydrophobes et ponts disulfures. Si la protéine est constituée de plusieurs chaînes d'acides aminés, les interactions entre ces chaînes permettent la formation de la structure quaternaire.

La figure 1 indique clairement que lors du choix d'une méthode de caractérisation d'une protéine, il faut sélectionner des techniques permettant de caractériser la protéine dans son état natif, sans perturber les structures tertiaire et quaternaire. Il faut également des techniques d'évaluation de la séquence d'acides aminés dans l'état dénaturé, après le dépliage complet de sa structure tridimensionnelle.

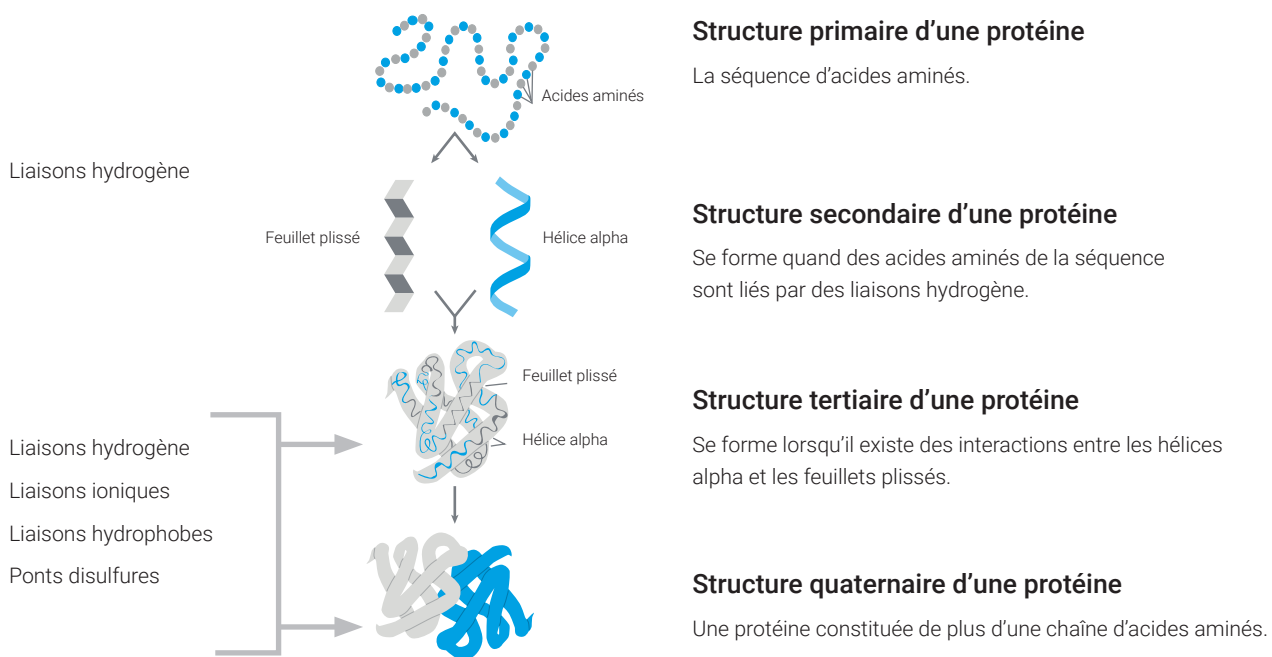


Figure 1. Schéma montrant les différents niveaux de structuration d'une protéine.

L'environnement de la protéine peut influencer, stabiliser ou déstabiliser sa structure. Les facteurs à prendre en compte incluent le pH, la température, la concentration en sels, le contenu en solvant aqueux ou organique et, pour certaines protéines, la présence de petites molécules ou d'ions métalliques stabilisants. La structure des protéines peut également être déstabilisée par l'utilisation d'agents réducteurs sulfhydryles qui coupent les ponts -S-S- ou d'agents chaotropiques, comme l'urée ou le chlorhydrate de guanidine. Étant donné la complexité des protéines et des interactions intramoléculaires qui déterminent leur structure tridimensionnelle, il faut s'attendre à ce qu'elles s'associent entre elles ou avec d'autres entités moléculaires, ou qu'elles se fixent sur les surfaces avec lesquelles elles entrent en contact. Cela peut entraîner la formation de complexes protéiques, l'agrégation des protéines (voire leur précipitation) et leur accumulation sur les surfaces, notamment dans la colonne et le système de HPLC. Par conséquent, il faut toujours tenir compte du traitement et de l'environnement de la protéine.

Guide de sélection des colonnes pour la séparation des protéines

Application	Technique	Colonnes Agilent	Notes
Analyse de la structure primaire	Séparations UHPLC/HPLC en phase inverse	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio Peptide Mapping	Les séparations en phase inverse requièrent (ou entraînent) la dénaturation de la protéine afin d'obtenir des informations détaillées sur la séquence et les modifications d'acides aminés (y compris les modifications post-traductionnelles).
Analyse des isoformes	Séparations par échange d'ions	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	La proportion des différents acides aminés détermine la charge nette de la molécule de protéine. Le pH auquel la charge nette est nulle est appelé point isoélectrique (pI). Quand le pH de la solution est inférieur au pI, la protéine est chargée positivement (acide) et quand le pH de la solution est supérieur au pI, la protéine est chargée négativement (basique). Pour une analyse par échange d'ions, nous conseillons d'utiliser un pH d'éluant qui est supérieur au pI d'au moins une unité de pH. L'analyse des protéines avec des colonnes d'échange d'ions nécessite une phase mobile tamponnée et des gradients salins ou des gradients de pH pour l'élution.
Analyse des fragments et agrégats	Séparations par chromatographie d'exclusion stérique	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	Les agrégats dans les protéines biopharmaceutiques représentent un problème majeur, car ils peuvent induire une réponse immunitaire et affecter la composition de la formulation finale.
Caractérisation de la glycosylation	Chromatographie d'interaction hydrophile	AdvanceBio Glycan Mapping ZORBAX RRHD 300 HILIC	Il est de plus en plus considéré comme important de bien comprendre la glycosylation et la structure des glycanes des protéines et des mAb, en raison de leur effet sur l'immunogénicité et la tolérance des biothérapies. La chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) fournit des informations orthogonales par rapport à celles des colonnes à phase inverse puisqu'elle préserve la portion hydrophile de l'échantillon.
Titration	Séparation par affinité	Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	Pour surveiller le titre et le rendement des anticorps monoclonaux dans les surnageants de cultures cellulaires avant d'utiliser de grandes et coûteuses quantités de protéine A, il est nécessaire de suivre une procédure à petite échelle (analytique) pour déterminer le titre et le meilleur temps de collecte des anticorps monoclonaux.
Déplétion des protéines	Purification par affinité	MARS Human-14 MARS Human-7 MARS Human-6 MARS Human-6 High Capacity MARS Human-2 MARS Human-1 MARS Mouse-3	Éliminez les protéines très abondantes des échantillons biologiques. L'élimination de ces protéines abondantes améliore l'analyse de l'échantillon par LC/MS et électrophorèse en élargissant la gamme dynamique.

Séparation ultrarapide et à haute résolution d'un variant du trastuzumab (IgG1)

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

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans l'eau:IPA (98,2)
B : IPA:ACN:phase mobile A (70:20:10)

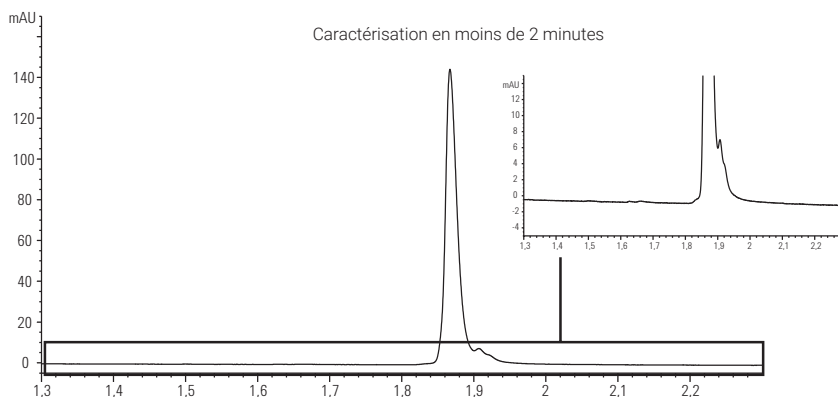
Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage
à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 254 nm

Échantillon : injection de 5 µl de trastuzumab
(anticorps monoclonal humanisé recombinant
de classe IgG1 intact de Creative Biolabs)
(1 mg/mL)



La colonne AdvanceBio RP-mAb C4 fournit en moins de deux minutes un pic fin et une résolution précise.

Meilleure séparation des produits d'oxydation

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

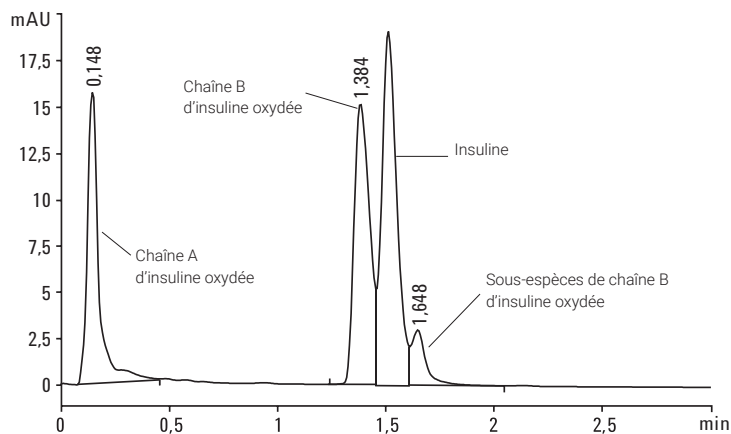
Phase mobile : A : 0,1 % TFA
B : 0,01 % TFA + 80 % ACN

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 33–50 % de B, 0–4 min

Détecteur : LC 1290 Infinity avec détecteur à barrette de diodes
à 280 nm

Échantillon : Insuline, chaîne A et chaîne B de l'insuline, oxydées
(BSA, Sigma-Aldrich, Corp., 1 mg/mL)



Les chaînes d'insuline oxydées sont séparées en moins de deux minutes avec la colonne ZORBAX RRHD 300SB-C18 de 2,1 x 50 mm, 1,8 µm.

Séparation des monomères et dimères de mAb intacts

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

Débit : 1,0 mL/min

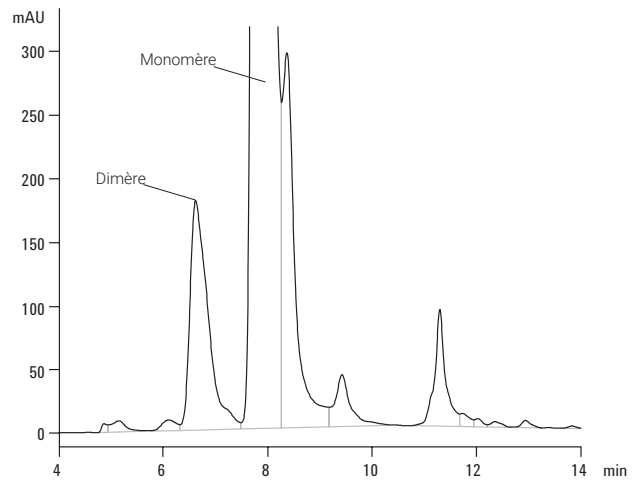
Injection : 5 µL

Température : ambiante

Détecteur : UV, 220 nm

Tampon : tampon phosphate de sodium, 150 mM, pH 7,0

Isocratique : 0–100 % de tampon entre 0–30 min



Conseils et outils

Agilent est consciente de l'incroyable complexité et intensité de votre travail. Nous pouvons donc vous aider. Vous trouverez plus d'informations dans notre publication intitulée « *BioPharma Workflow Solutions: How Agilent Helps Resolve Complex Analytical Challenges* » (publication n° 5991-5235EN). www.agilent.com/search

Séparation des isoformes d'IgG1 humaine avec un gradient salin

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

Détecteur : UV, 225 nm

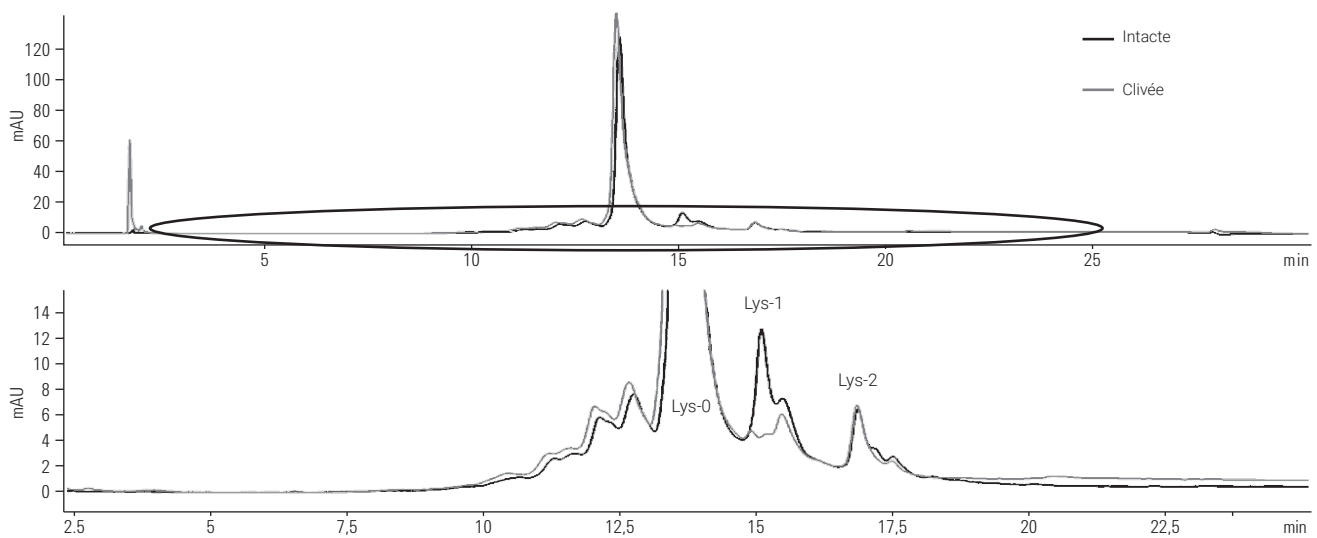
Instrument : LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity ou
LC série 1100

Phase mobile : A : Na₂HPO₄ 10 mM, pH 5,5
B : A + NaCl 0,5 M

Échantillon : 5 µL de 1 mg/mL d'IgG1 intacte ou clivée en C-terminal

Débit : 0,85 mL/min

Gradient : 10–35 % de B de 0 à 25 min



Séparation de l'IgG1 intacte et clivée en C-terminal avec une colonne Agilent Bio MAb 5 µm.

Titration de l'IgG1 du surnageant de cellules CHO

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

Phase mobile : A : phosphate 50 mM, pH 7,4
B : acide citrique 100 mM, pH 2,8

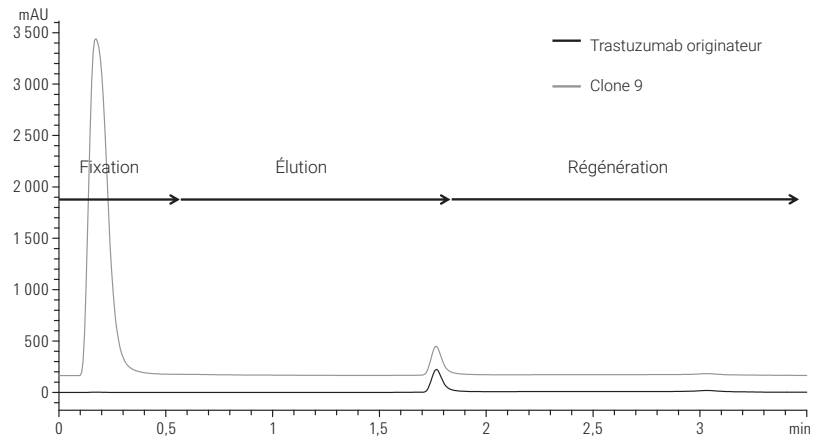
Débit : 1 mL/min

Gradient : **Temps (min) % de B**
0 à 0,5 0 (fixation)
0,6 à 1,7 100 (élution)
1,8 à 3,5 0 (régénération)

Volume d'injection : 50 µL

Détecteur : UV, 280 nm

Collecte de fractions : en fonction du temps



Chromatogramme sur colonne AdvanceBio Bio-Monolith Protein A d'un surnageant de clone de CHO produisant du trastuzumab, le clone 9, et du trastuzumab originateur dilué à 0,2 mg/mL dans un tampon phosphate de sodium à 50 mM et pH 7,4. Notez que le surnageant a été dilué 1:1 dans un tampon phosphate.

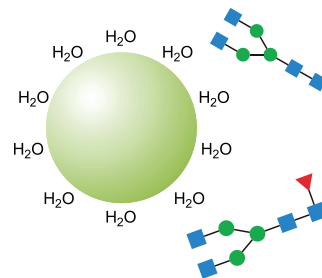
Séparations des glycanes

Profilage de glycanes

La caractérisation des biothérapies nécessite d'analyser les glycanes, car le profil de glycosylation peut affecter la tolérance et l'efficacité du produit final.

La glycoprotéine intacte est traitée avec une enzyme telle que la PNGase F pour rompre les liaisons entre les glycanes et la protéine. Les glycanes sont ensuite marqués avec un colorant fluorescent, car ils ne sont pas autrement détectables par UV ou fluorescence. Le marquage est suivi d'une étape de rinçage pour éliminer l'excès de réactif et de protéine déglycosylée de la solution de l'échantillon. L'échantillon purifié de glycanes libres en solution est ensuite analysé généralement par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) avec détection par fluorescence ou spectrométrie de masse.

Le profil chromatographique est caractéristique des échantillons de la glycoprotéine de départ et peut varier grandement en termes de complexité. Les colonnes AdvanceBio Glycan Mapping sont parfaitement adaptées aux séparations à haute résolution avec un temps d'analyse court.



Conseils et outils

Les consommables Agilent bio-inertes fournissent un circuit sans métal, qui réduit au minimum les interactions avec vos biomolécules. Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

Analyse de glycanes ultrarapide : moins de dix minutes avec des particules de 1,8 µm

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

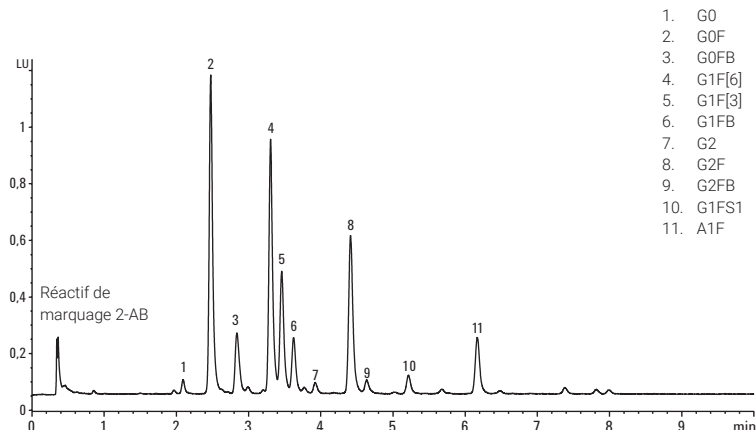
Phase mobile : A : formiate de NH₄ 100 mM, pH 4,5
B : ACN

Volume d'injection : 2 µL dans 70:30 ACN:formiate de NH₄ 100 mM

Détection par fluorescence : excitation = 260 nm;
émission = 430 nm

Instrument : LC Agilent 1290 Infinity avec
détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity

Échantillon : bibliothèque de glycanes d'IgG humaines
à liaison N 2-AB (réf. 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

Cartographie des glycanes rapide et à haute résolution (colonne de 1,8 µm). Cet étalon est utilisé pour tester toutes les colonnes AdvanceBio Glycan Mapping.

Temps	% de A	% de B	Débit (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

Pic	Glycane	Structure
1	G0	
2	G0F	
3	G0FB	
4	G1F	
5	G1F'	
6	G1FB	
7	G1FB Man6	
8	G2	

Pic	Glycane	Structure
9	G2F	
10	G2FB	
11	G1FS1	
12	A1	
13	A1F	
14	A1FB	
15	A2	
16	A2F	
17	A2FB	

- Fucose
- Galactose
- Mannose
- N-acétylglucosamine
- Acide N-acétylneuraminique

Séparation des peptides

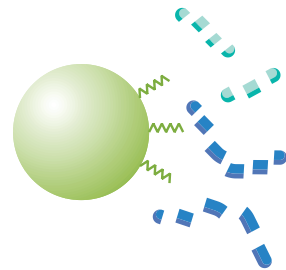
Cartographie peptidique

La cartographie peptidique est nécessaire pour la caractérisation des protéines. Elle est utilisée pour confirmer l'identité de la protéine et identifier et quantifier les modifications post-traductionnelles.

La protéine purifiée est d'abord digérée par une enzyme telle que la trypsine pour générer différents fragments peptidiques. La spécificité du clivage par l'enzyme produit un profilage des peptides qui est caractéristique de cette protéine. L'identification des fragments peptidiques permet de confirmer l'identité de la protéine et les changements dans le profil de la digestion peptidique peuvent servir à identifier les modifications post-traductionnelles, qui ont pu se produire au cours des processus de fabrication ou de purification de la protéine.

La chromatographie en phase inverse UHPLC/HPLC est la meilleure technique pour l'analyse des digestions de peptides avec détection MS ou UV. La LC/MS est utilisée pour l'identification des fragments peptidiques et la détermination de la couverture de séquence, tandis que la LC/UV est surtout utilisée pour la comparaison des cartes peptidiques lors du suivi et du contrôle qualité.

Les digestions de peptides sont des mélanges complexes et, pour une couverture complète, c'est-à-dire une bonne résolution pour chaque peptide individuel, une colonne à haute efficacité et haute résolution est nécessaire. Les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping sont conçues pour fournir des cartes peptidiques à haute résolution pour l'identification de protéines et la détermination des modifications post-traductionnelles. Ces colonnes vous permettent de séparer et d'identifier rapidement les modifications/substitutions d'acides aminés dans une séquence protéique.



Test d'assurance qualité avec le mélange de peptides d'Agilent

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

Débit : 0,5 mL/min

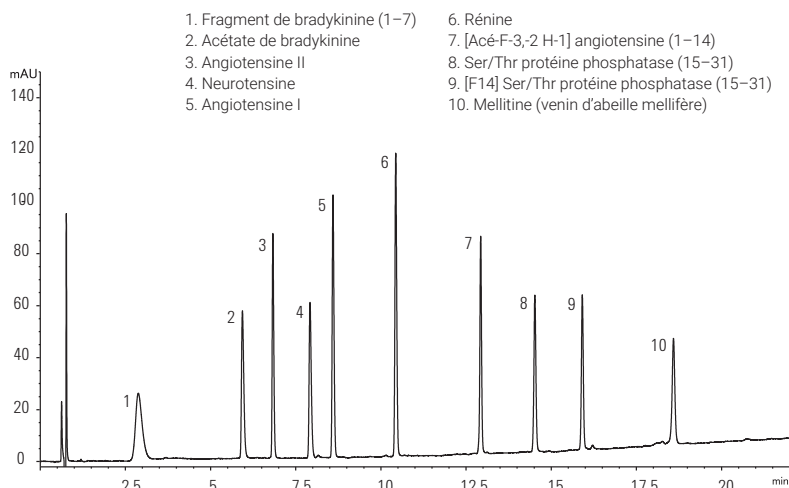
Injection : 3 µL

Gradient : A, eau (0,1 % TFA), B, ACN (0,1 % TFA), 0–25 min,
 15–65 % de B ; 25–26 min, 65–95 % de B

Température : 55 °C

Détecteur : 220 nm

Échantillon : mélange étalon pour cartographie peptidique
 (0,5–1,0 µg/µL par peptide), réf. 5190-0583



Mélange test utilisé pour chaque lot de support AdvanceBio Peptide Mapping. Ce mélange contient 10 peptides hydrophiles, hydrophobes et basiques dont la masse moléculaire est comprise entre 757 et 2 845 Da. Chaque colonne est aussi testée avec une petite molécule pour assurer l'efficacité.

Conseils et outils

Les plaques à puits et tapis de fermeture d'Agilent InfinityLab sont parfaitement adaptés à vos applications de LC/MS à cadence élevée.

Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/well-plates

Colonnes AdvanceBio : des analyses biopharmaceutiques plus fiables et plus rapides

Les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping appartiennent à la gamme en pleine expansion de biocolonnes de pointe d'Agilent. Elles sont conçues pour offrir des performances exceptionnelles et constantes pour la caractérisation et la séparation des peptides, protéines, anticorps, conjugués, nouveaux composés biologiques et produits biopharmaceutiques. La technologie des colonnes AdvanceBio permet d'améliorer la précision et la productivité, accélérant vos analyses et augmentant l'efficacité de votre laboratoire.

Les informations pour commander les solutions de cartographie peptidique Agilent sont indiquées **page 62**.



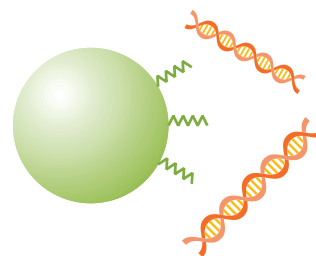
Conseils et outils

Pour plus d'informations sur les biocolonnes Agilent, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/bioHPLC

Séparations des oligonucléotides d'ADN et d'ARN

Utilisés dans de plus en plus d'applications, les oligonucléotides (oligos) connaissent un regain d'intérêt, notamment comme produits biothérapeutiques potentiels. Leur synthèse est réalisée suivant le même procédé que la production des peptides synthétiques mieux établie, avec un support solide de résine activée sur laquelle des nucléotides spécifiques sont ajoutés successivement pour construire la séquence désirée.

Le groupe hydroxyle de l'extrémité 5' de chaque nucléotide ajouté est protégé par un groupe diméthoxytrityle (DMT) et l'oligonucléotide cible conserve ce groupe protecteur après le clivage. L'hydrophobicité du DMT peut être utile lors de la première étape. Pour améliorer la stabilité de l'oligonucléotide, en particulier vis-à-vis de la dégradation enzymatique, il peut être modifié chimiquement, par exemple en remplaçant l'oxygène par du soufre afin d'obtenir des phosphorothioates. Lorsque des biomolécules sont produites par synthèse chimique, l'efficacité du couplage de chaque cycle n'est jamais de 100 %. Après le clivage libérant les oligos du support solide utilisé pour la synthèse, l'échantillon contient des séquences avec délétions, c'est-à-dire des oligos pour lesquels un ou plusieurs résidus sont manquants, et une certaine quantité d'oligos plus grands résultant d'un double couplage ou d'une ramification. Il s'agit d'un mélange complexe et son analyse nécessite des techniques très efficaces.



Il existe trois techniques d'UHPLC/HPLC utilisées en routine pour les séparations d'oligonucléotides :

Trityl-on : cette procédure est relativement simple à mettre en œuvre et permet de séparer l'oligo cible de longueur complète, qui est encore muni d'un groupement DMT, des séquences erronées déprotégées. Les informations analytiques obtenues étant limitées, cette méthode est considérée comme une méthode de purification.

Séparation par échange d'ions des oligos déprotégés (trityl-off) : cette méthode utilise la charge négative du squelette de l'oligo pour faciliter la séparation. La résolution est satisfaisante pour les petits oligos, mais diminue à mesure que la longueur de la chaîne augmente. Des éluants aqueux sont utilisés, mais les oligos étant très chargés, de fortes concentrations en sel sont nécessaires pour leur élution.

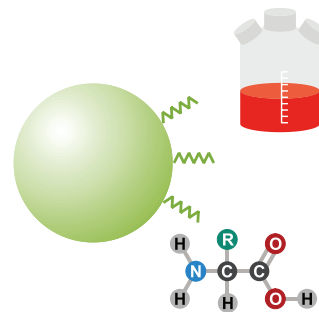
Séparation en phase inverse d'appariement d'ions des oligos trityl-off déprotégés : cette technique, qui utilise des solvants organiques et des agents d'appariement d'ions volatils, est appropriée pour la LC/MS. Ses performances sont optimales avec des particules à haute efficacité. Il est nécessaire d'utiliser des conditions qui dénaturent complètement les oligos et préviennent leur association avec des séquences complémentaires. Cette séparation est donc plus efficace aux températures élevées.

Sélection de colonnes pour les oligonucléotides d'ADN et d'ARN

Application	Technique	Colonnes Agilent	Notes
Oligonucléotides trityl-on/trityl-off	Trityl-on	Support PLRP-S 50 µm	Sépare en fonction des différences d'hydrophobicité. Convient parfaitement pour séparer les oligos protégés des oligos déprotégés et est également utilisée pour les séparations en phase inverse d'appariement d'ions des oligos déprotégés.
Oligonucléotides déprotégés	Séparation en phase inverse d'appariement d'ions des oligos trityl-off déprotégés	Support PLRP-S 3 µm à 50 µm AdvanceBio pour oligonucléotides	
Analyse des fragments et agrégats	Séparation par échange d'ions des oligos trityl-off déprotégés	PL-SAX 1 000 Å	Sépare les oligos déprotégés dans des conditions dénaturantes à pH élevé. Le groupe amine quaternaire sur les particules de polymère permet d'effectuer des séparations par échange d'ions à pH élevé, ce qui améliore la résolution pour les séquences autoccomplémentaires.

Analyse des acides aminés

La colonne AdvanceBio AAA à haute efficacité sépare les acides aminés selon un protocole révisé et amélioré. Pendant la production des protéines, le milieu de culture cellulaire est surveillé pour garantir que les proportions et les niveaux de concentration des nutriments sont appropriés pour l'expression protéique. Les acides aminés sont des nutriments essentiels et ils peuvent être suivis et ajustés durant le procédé de production. La chromatographie en phase inverse est la principale technique utilisée pour l'analyse des acides aminés. Le délai entre deux injections est de 14 minutes (9 minutes de temps d'analyse) sur les colonnes plus courtes de 75 mm et de 24 minutes (18 minutes de temps d'analyse) sur la colonne de 150 mm. Les réactions de dérivatisation avec OPA et FMOC permettent d'obtenir sensibilité (5 à 50 pmol avec des détecteurs à barrette de diodes ou à fluorescence) et fiabilité avec n'importe quel LC Agilent dans une procédure entièrement automatisée.



Analyse des acides aminés avec AdvanceBio

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

Phase mobile : A : Na₂HPO₄ 10 mM et Na₂B₄O₇ 10 mM, pH 8,2
B : acétonitrile:méthanol:eau (45:45:10, v:v:v)

Débit : 1,5 mL/min

Injection : 3 µL

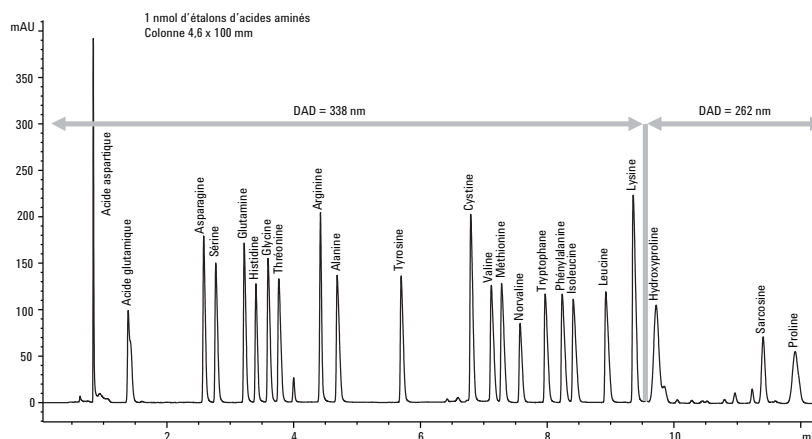
Gradient :

Temps	% de B
0	2
0,35	2
13,4	57
13,5	100
15,7	100
15,8	2
18	arrêt

Température

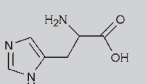
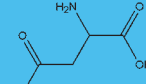
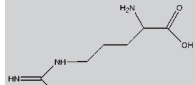
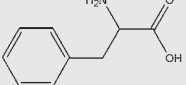
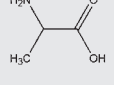
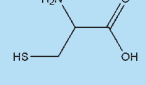
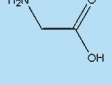
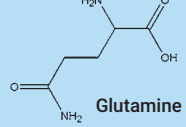
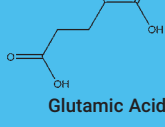
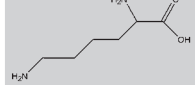
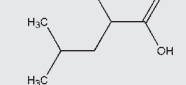
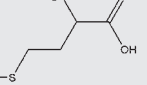
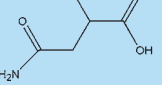
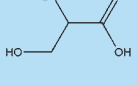
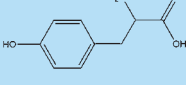
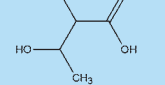
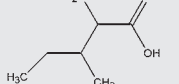
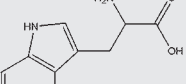
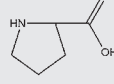
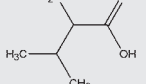
de colonne : 40 °C

Détecteur : UV, 338 et 262 nm



Séparation de 1 nmol d'étalons d'acides aminés à l'aide de la colonne AdvanceBio Amino Acid Analysis

Acides aminés

H 155.16 137.14 C₆H₉N₃O₂  His Histidine	D 133.10 115.09 C₄H₇NO₄  Asp Aspartic Acid					
R 174.20 156.19 C₆H₁₄N₄O₂  Arg Arginine	F 165.19 147.18 C₉H₁₁NO₂  Phe Phenylalanine	A 89.09 71.08 C₃H₇NO₂  Ala Alanine	C 121.16 103.14 C₃H₇NO₂S  Cys Cysteine	G 75.07 57.05 C₂H₇NO₂  Gly Glycine	Q 146.15 128.13 C₅H₁₀N₂O₃  Gln Glutamine	E 147.13 129.11 C₅H₉NO₄  Glu Glutamic Acid
K 146.19 128.17 C₆H₁₄N₂O₂  Lys Lysine	L 131.17 113.16 C₆H₁₃NO₂  Leu Leucine	M 149.21 131.20 C₅H₁₁NO₂S  Met Methionine	N 132.12 114.10 C₄H₈N₂O₃  Asn Asparagine	S 105.09 87.08 C₃H₇NO₃  Ser Serine	Y 181.19 163.17 C₉H₉NO₃  Tyr Tyrosine	T 119.12 101.10 C₄H₉NO₃  Thr Threonine
I 131.18 113.16 C₆H₁₃NO₂  Ile Isoleucine	W 204.23 186.21 C₁₁H₁₂N₂O₂  Trp Tryptophan	P 115.13 97.12 C₅H₉NO₂  Pro Proline	V 117.15 99.13 C₅H₁₁NO₂  Val Valine			

■ Basique

■ Non polaire (hydrophobe)

■ Polaire, non chargé

■ Acide

Code des acides aminés à 1 lettre

Masse moléculaire

Masse moléculaire - H_2O

Formule moléculaire



Code des acides aminés à 3 lettres

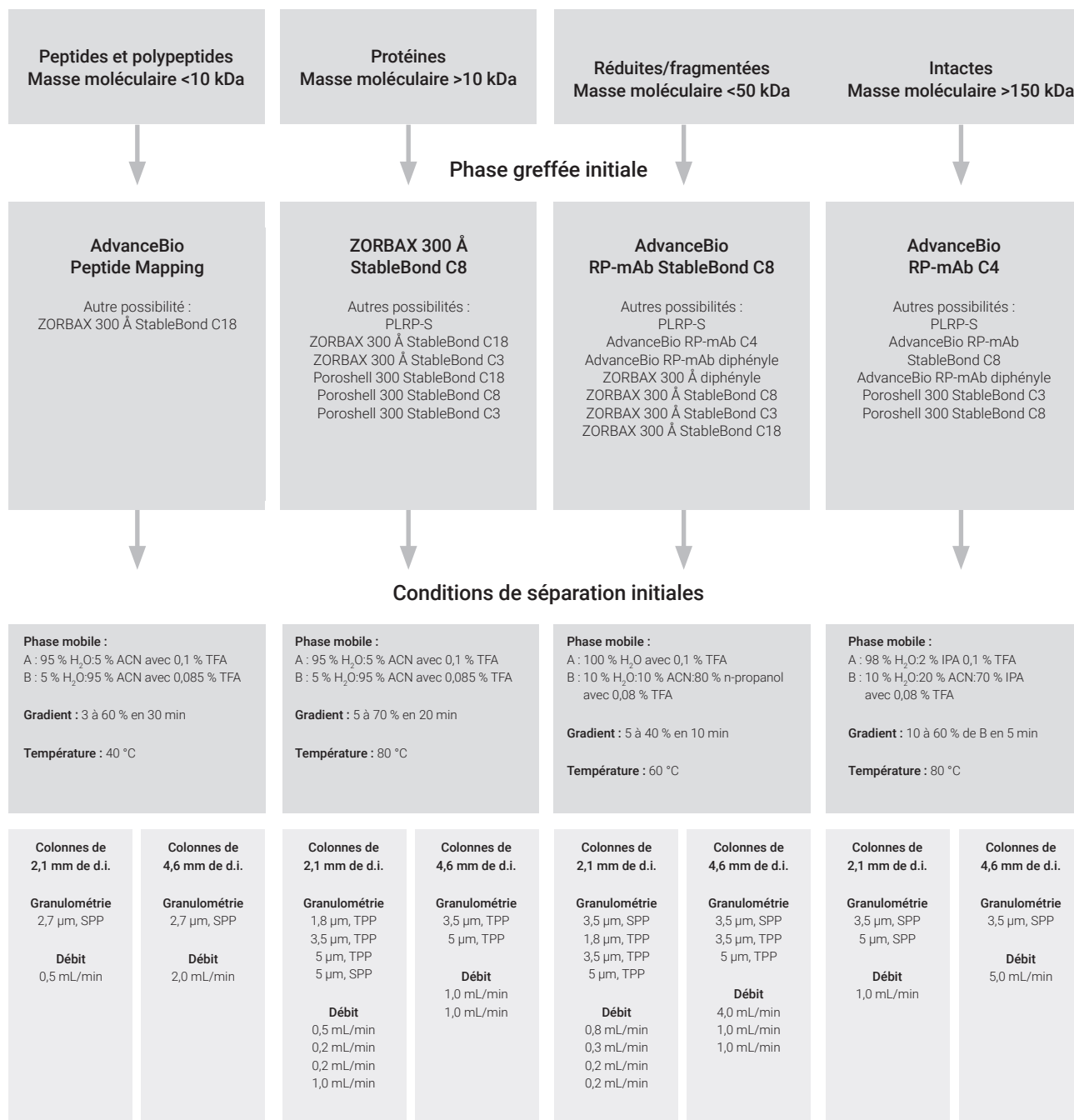
Structure chimique

Nom chimique

Recommandations pour le développement des méthodes

Méthodes d'analyse de la structure primaire

Cette section traitant de la stratégie de sélection de colonne pour l'analyse de la structure primaire fournit des informations essentielles sur le développement de méthodes pour les mAb, protéines et peptides.



SPP = particules partiellement poreuses ; TPP = particules totalement poreuses

Commencez à pH faible avec un simple gradient aqueux/organique

Généralement, un gradient eau:acétonitrile avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) est utilisé pour éluer tous les composants d'intérêt. Un gradient à haute résolution pour une colonne de 300 Å de porosité nécessite 30 à 50 min. Une colonne AdvanceBio RP-mAb permet d'utiliser un temps d'analyse plus court et un débit plus élevé, tout en fournissant une excellente résolution. Pour améliorer la résolution, augmentez la durée du gradient, diminuez la longueur de la colonne ou augmentez le débit.

Le TFA pouvant réduire la sensibilité du détecteur, il est souvent remplacé par un mélange formiate d'ammonium/acide formique pour les méthodes LC/MS.

Optimisez la solubilité de l'échantillon

Il est important de solubiliser complètement l'échantillon pour obtenir la meilleure forme de pic et le meilleur rendement possible au pH choisi. Les solvants neutres ou très acides peuvent être utilisés avec AdvanceBio RP-mAb, ZORBAX 300 Å StableBond, Poroshell 300 StableBond et AdvanceBio Peptide Mapping, tandis que les solvants neutres et les bases diluées peuvent être utilisés avec ZORBAX 300Extend-C18 et Poroshell 300Extend-C18.

Choix du solvant pour solubiliser les protéines et peptides

Eau/tampon phosphate

Acide dilué (TFA, acide acétique ou HCl)

pH neutre, chlorhydrate ou isothiocyanate de guanidine 6–8 M

Acide acétique 5 %/urée 6 M

Acide dilué + solvants aqueux/organiques (ACN, MeOH, THF)

Base diluée (hydroxyde d'ammonium)

DMSO ou 0,1 %–1 % dans le DMSO

Formamide

Plus faible

Plus fort

Augmentez la température

Les séparations des protéines et des peptides sont influencées par la température. Une température de colonne plus élevée peut améliorer considérablement la résolution et le recouvrement des protéines, ainsi que des peptides hydrophobes et ayant tendance à s'agréger.

Colonne AdvanceBio RP-mAb : jusqu'à 90 °C
ZORBAX 300 StableBond, Poroshell 300 StableBond : jusqu'à 80 °C
AdvanceBio Peptide Mapping : jusqu'à 60 °C

Optimisez le pH de la phase mobile

Essayez un pH intermédiaire ou élevé si un pH faible ne convient pas

Si une méthode optimisée avec un pH faible ne fournit pas une qualité de séparation suffisante, alors une phase mobile de pH intermédiaire ou élevé peut être utilisée. À pH élevé, la sélectivité est souvent très différente, parce que les résidus acides deviennent négativement chargés et certains résidus basiques perdent leur charge. La colonne Agilent ZORBAX 300Extend-C18 est un excellent choix pour les séparations à pH élevé.

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

Phase mobile : A : NH₄OH 20 mM dans H₂O
B : NH₄OH 20 mM dans 80 % ACN

Gradient : 5–60 % de B en 30 min

Température : 25–30 °C (<60 °C)

Débit : 1 mL/min

Méthodes LC/MS en phase inverse

La LC/MS des protéines et des peptides est utilisée pour obtenir des informations pour leur caractérisation, afin d'identifier les modifications post-traductionnelles des protéines et de déterminer la masse moléculaire des peptides naturels et synthétiques avec précision. La LC/MS est aussi utilisée afin d'identifier les protéines dans des séparations 2D pour les applications protéomiques. Par conséquent, la LC/MS des protéines et des peptides représente un domaine de séparation essentiel, qui nécessite des recommandations particulières en termes de colonne et de phase mobile. La LC/MS fait souvent appel à des dimensions de colonne plus petites et le TFA n'est habituellement pas utilisé dans la phase mobile, car cet additif entraîne une baisse de sensibilité dans le MS.

Applications de LC/MS analytique

Les colonnes de 2,1 mm de d.i. fournissent généralement une bonne sensibilité quand la taille de l'échantillon n'est pas limitée. Les colonnes Poroshell permettent l'utilisation de d.i. inférieurs à 1 mm.



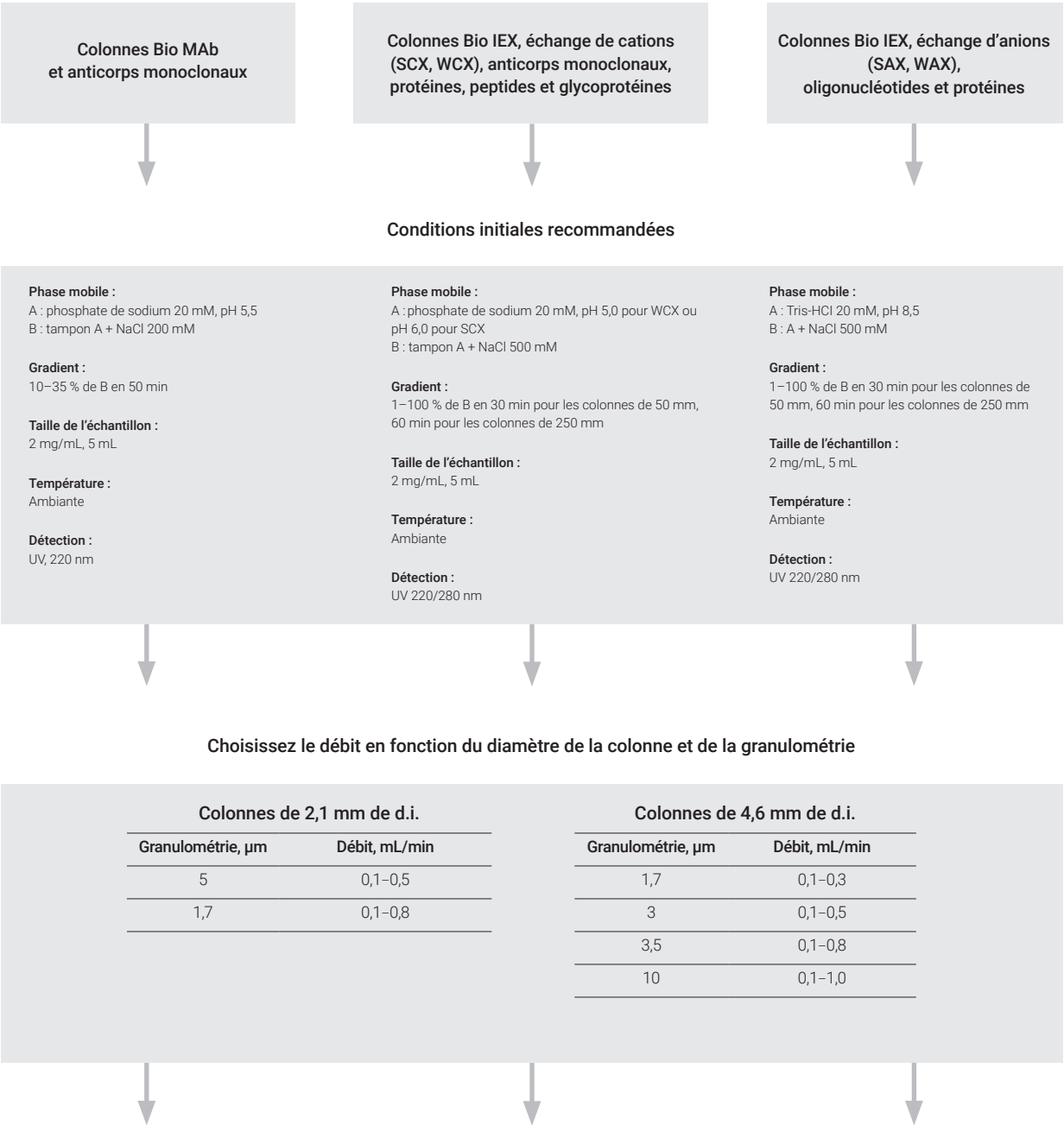
Applications à haute sensibilité/protéomiques

Les colonnes capillaires sont utilisées pour les applications de protéines et de peptides à haute sensibilité. Les colonnes de 0,5 mm de d.i. sont utilisées pour les séparations de digestions de protéines et de peptides, tandis que les colonnes de 0,3 mm de d.i. sont surtout utilisées pour les digestions protéiques. Elles peuvent être analysées à pH élevé avec une phase mobile d'hydroxyde d'ammonium. Les nanocolonnes (0,1 et 0,075 mm de d.i.) sont souvent utilisées dans les LC/MS 2D pour la protéomique et une phase greffée C18 est choisie initialement.



Méthodes d'analyse des isoformes

Cette section traitant de la stratégie de sélection de colonne pour l'analyse des isoformes fournit des informations essentielles sur le développement de méthodes pour les mAb, protéines et peptides.



Optimisez les conditions

Certaines séparations peuvent nécessiter un tampon, une force ionique, un pH ou une température spécifique.

Force ionique

Une certaine force ionique peut être requise pour garantir la fonction des colonnes. Généralement, une concentration minimale en sels de 10 à 20 mM est nécessaire. Cependant, une force ionique supérieure à 20 mM peut prévenir l'adsorption des biomolécules sur la colonne. Le chlorure ou l'acétate de sodium ou de potassium sont des sels fréquemment utilisés. Pour l'élution, la concentration en sels est typiquement de 400 à 500 mM.

Remarque : ne rincez jamais la colonne avec de l'eau seule, car cela provoque une augmentation importante de la contrepression.

Sélection des tampons et du pH

Les tampons jouent un rôle essentiel dans l'optimisation des séparations. Les tampons phosphate sont généralement utilisés pour les anticorps et de nombreuses biomolécules. Les tampons suivants sont également recommandés : MES, TRIS et ACES. Utilisez des tampons avec un pH de 5,0 à 6,5. Le pH peut être ajusté manuellement à $\pm 0,2$ unité près. Pour certaines protéines particulières, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser un pH plus élevé ($>6,5$). Le pH peut être ajusté avec de l'acide phosphorique, de l'acide acétique, HCl et NaOH.

Des gradients de pH peuvent être utilisés pour l'élution.

Additifs

Solvants organiques

L'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol et d'autres solvants équivalents peuvent être utilisés jusqu'à 50 %.

Détergents

Les détergents non ioniques, anioniques et zwitterioniques peuvent être utilisés. Les détergents cationiques ne sont pas recommandés.

Température

Les colonnes Agilent Bio MAb et IEX sont stables jusqu'à 80 °C. Néanmoins, de nombreuses protéines et biomolécules sont thermolabiles. Vérifiez la thermostabilité de votre échantillon avant d'utiliser une température élevée pour votre séparation.

Sélection des tampons et du pH

Pour l'échange d'anions, des tampons acétate et phosphate avec un pH de 8,0 à 9,0 sont recommandés. Le pH peut être ajusté manuellement à $\pm 0,2$ unité près. Pour certaines protéines particulières, il peut s'avérer nécessaire d'utiliser des tampons de pH plus élevé ou moins élevé. Le pH peut être ajusté avec de l'acide phosphorique, de l'acide acétique, HCl et NaOH.

Des gradients de pH peuvent être utilisés pour l'élution.

Additifs

Solvants organiques

L'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol et d'autres solvants équivalents peuvent être utilisés jusqu'à 50 %.

Détergents

Les détergents non ioniques, cationiques et zwitterioniques peuvent être utilisés. Les détergents anioniques ne sont pas recommandés.

Méthodes d'analyses des isoformes avec le logiciel Agilent Buffer Advisor

Agilent Buffer Advisor est un outil logiciel qui permet de développer des méthodes d'échange d'ions plus reproductibles et plus précises. Par exemple, ce logiciel peut générer des méthodes utilisant un mélange quaternaire pour un gradient salin à pH constant ou pour un gradient de pH avec un gradient salin pour le rinçage. Ces méthodes peuvent être importées directement dans le logiciel d'acquisition de LC Agilent.

Conditions initiales recommandées

Gradient salin (voir note d'application : 5991-0656FR)		Gradient de pH (voir note d'application : 5990-9629EN)	
Colonnes :	Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 10 µm Bio WCX, 4,6 x 250 mm, 5 µm	Colonne :	Bio MAb, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Phase mobile :	A : eau B : NaCl 1,6 M C : NaH ₂ PO ₄ 40,0 mM D : Na ₂ HPO ₄ 40,0 mM Le mélange de proportions prédéterminées de C et D donne des solutions tampon de 20 mM dans la plage de pH désirée.	Phase mobile :	A : eau B : NaCl 1,6 M C : NaH ₂ PO ₄ 40,0 mM D : Na ₂ HPO ₄ 40,0 mM Le mélange de proportions prédéterminées de C et D donne des solutions tampon dans la plage de pH et à la force ionique désirées.
Gradient :	0 à 50 % de B, 0 à 20 min (pH constant, par exemple pH 6,0) 50 % de B, 20 à 25 min 0 % de B, 25 à 35 min	Gradient :	pH 6,0 à 8,0, 0 à 20 min NaCl 0 à 800 mM, 20 à 25 min NaCl 800 mM, 25 à 30 min
Température :	ambiante	Température :	ambiante
Volume d'injection :	10 µL	Volume d'injection :	10 µL
Détection :	UV, 220 nm	Détection :	UV, 220 nm
Instrument :	LC bio-inerte 1260 Infinity	Instrument :	LC bio-inerte 1260 Infinity II
Échantillon :	ovalbumine, ribonucléase A, cytochrome c, lysozyme	Échantillon :	anticorps monoclonal IgG
Concentration de l'échant. :	2 mg/mL (dans un tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 6,0)	Concentration de l'échant. :	2 mg/mL (dans un tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 6,0)
Remarque : les approches ci-dessus peuvent aussi être appliquées avec les colonnes WAX et SCX d'Agilent après quelques modifications. Pour accéder au compendium d'applications sur les attributs qualité critiques, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/cqa-applications			

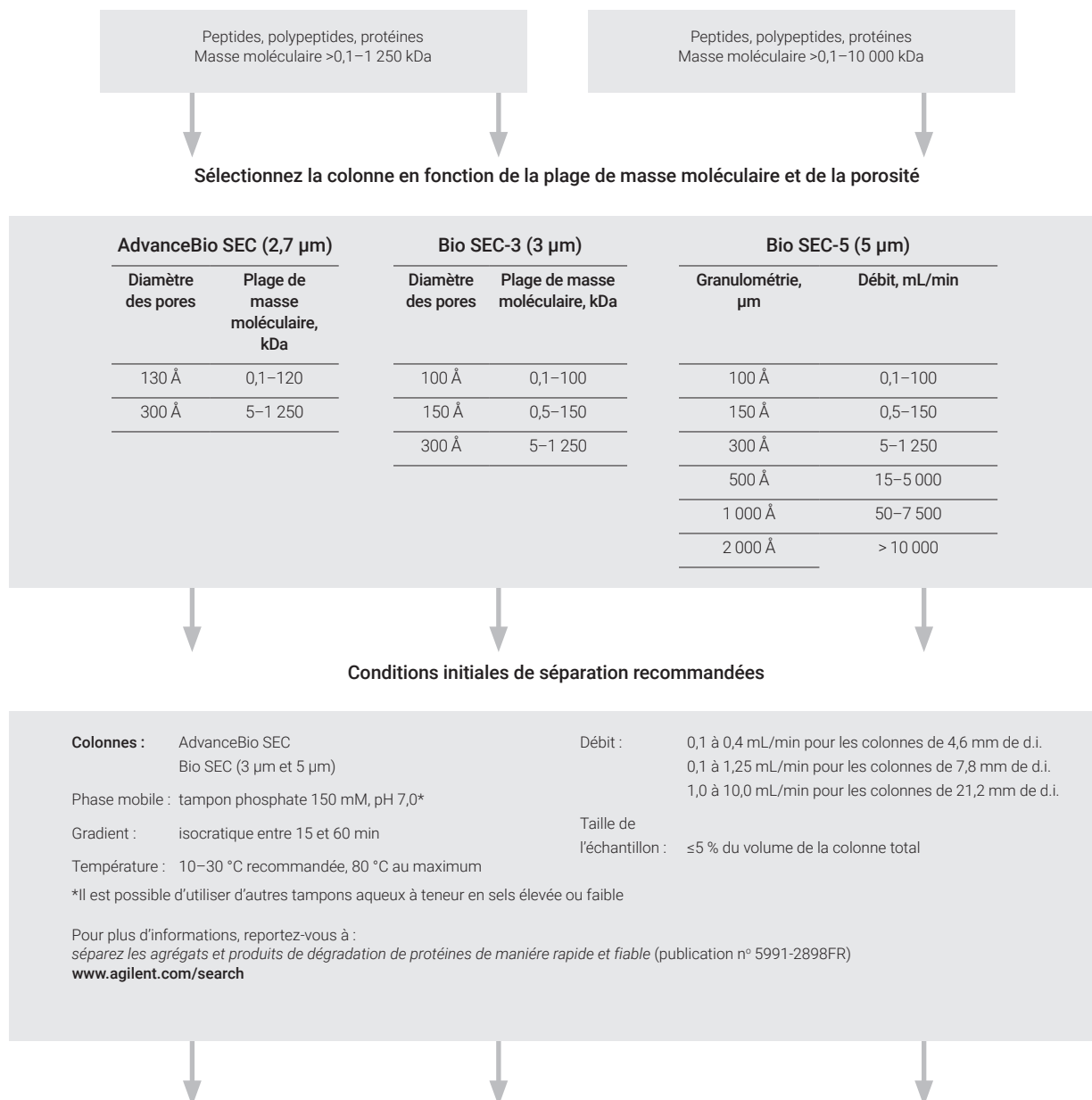
Choisissez le débit en fonction du diamètre de la colonne et de la granulométrie

Colonnes de 2,1 mm de d.i.		Colonnes de 4,6 mm de d.i.	
Granulométrie, µm	Débit, mL/min	Granulométrie, µm	Débit, 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
Remarque : commencez toujours avec le débit faible par défaut recommandé pour les limites d'utilisation de votre colonne.			

Méthodes d'analyse des fragments et agrégats

Cette section traitant de la stratégie de sélection de colonne pour l'analyse de l'agrégation fournit des informations essentielles sur le développement de méthodes pour les mAb, protéines et peptides.

Choisissez les colonnes et les conditions initiales de séparation des biomolécules en fonction de leur taille pour l'analyse de l'agrégation des peptides, polypeptides et protéines



Après le chromatogramme initial, des changements supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires pour améliorer la séparation, maintenir la solubilité des protéines ou diminuer l'interaction de l'échantillon avec le support chromatographique. La force ionique de la phase mobile peut être augmentée ou réduite pour l'optimisation de la séparation. Le pH peut également être ajusté en général à $\pm 0,2$ unité près. Si une optimisation supplémentaire est requise, la limite inférieure ou supérieure de la plage doit être étendue. Un changement de température ou l'ajout d'un solvant organique peuvent aussi être envisagés.

Pour les protocoles qui requièrent l'addition de sel, les tampons suivants sont fréquemment utilisés :

Chlorure de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

Sulfate de sodium 100 à 150 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

Urée 50 à 100 mM dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

Il est possible d'utiliser d'autres sels équivalents (par exemple KCl) et du chlorhydrate de guanidine.

Plage de pH :

2,0 à 8,5

Les solvants organiques qui peuvent être ajoutés incluent les suivants :

Éthanol 5 à 10 % (ou solvants équivalents) dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

DMSO 5 % dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

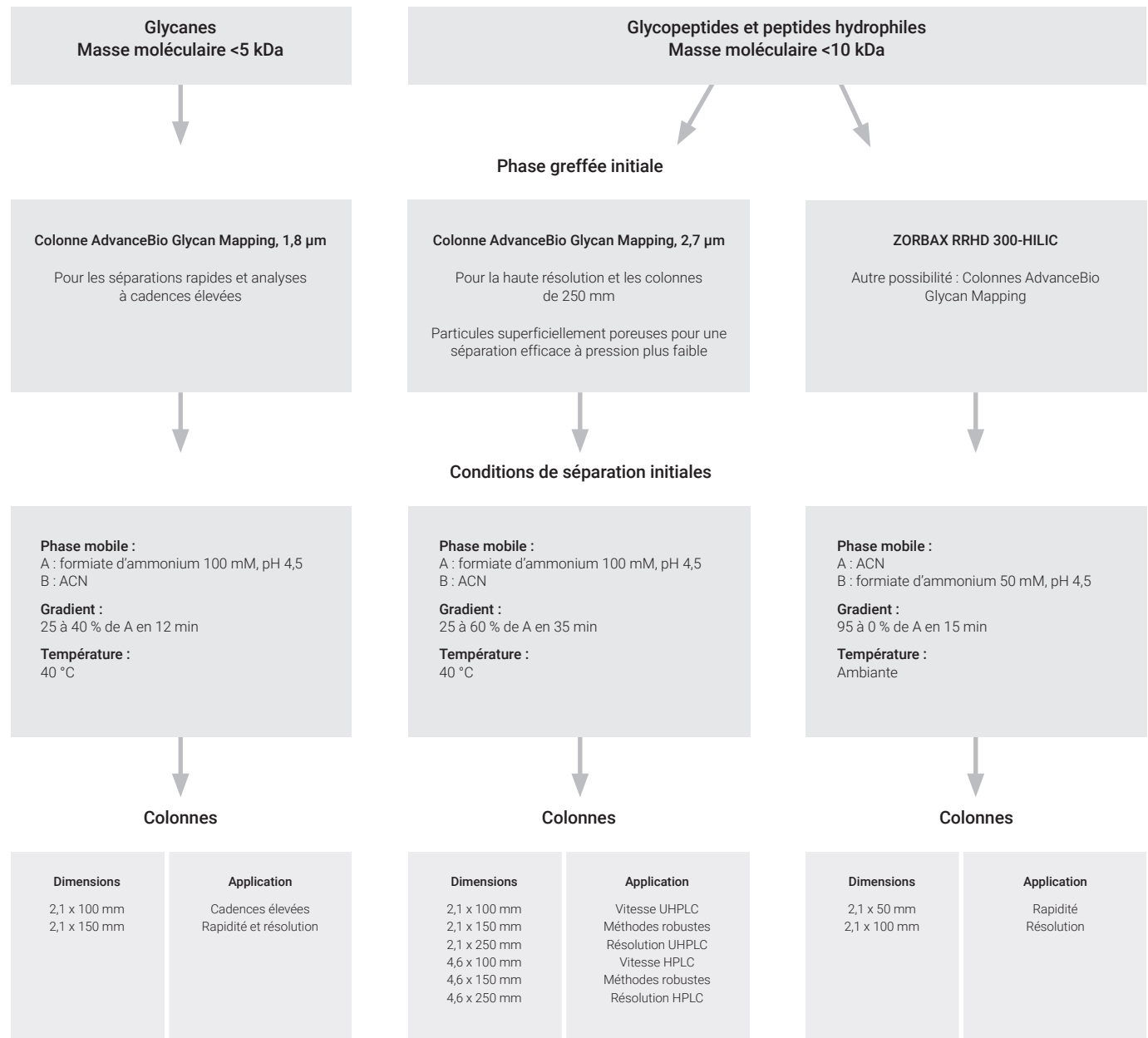
Veillez tout particulièrement à éviter les changements de pression excessifs dus à la haute viscosité de certains mélanges de solvants aqueux/organiques. Réduisez le débit ou augmentez la température pour atténuer les problèmes éventuels.

Température :

Généralement, les séparations SEC sont effectuées entre 20 et 30 °C. La séparation des protéines et des peptides peut requérir des températures plus élevées pour améliorer la résolution et le recouvrement des protéines et des peptides hydrophobes.

La température maximale des colonnes SEC est de 80 °C.

Analyse des glycanes, des peptides hydrophiles et des glycopeptides



Titration et méthodes d'optimisation des cultures cellulaires

Conditions recommandées pour les colonnes Agilent Bio-Monolith Protein A

Colonnes :	Bio-Monolith Protein A (réf. 5069-3639)		
Phase mobile :	A : phosphate 50 mM, pH 7,4 B : acide citrique 100 mM, pH 2,8 ou acide acétique 500 mM, pH 2,6		
Gradient :	Temps (min)	% de A	% de B
	0 à 0,5	100	0 Fixation
	0,6 à 1,7	0	100 Éluion
	1,8 à 3,5	100	0 Stabilisation
Température :	ambiante		
Débit :	1 mL/min		
Volume d'injection :	variable (optimisé à 50 µL pour le surnageant de cultures cellulaires de CHO contenant IgG1)		
Détection :	UV, 280 nm		
Échantillon :	IgG1 (1 à 20 mg/mL) et le surnageant de cultures cellulaires de CHO contient IgG1 (jusqu'à 20 mg/mL de protéines totales)		
Remarque :	il est possible d'ajouter plus de sels aux phases mobiles, comme le chlorure de sodium, jusqu'à la concentration de 150 mM. Les concentrations en sels plus élevées doivent être déterminées expérimentalement.		

Conseils et outils

Agilent a conscience que de nombreux facteurs différents affectent la qualité des séparations des mAb et des protéines. Pour vous permettre d'obtenir les meilleurs résultats possibles, nous avons développé une série de guides pratiques. Pour plus d'informations, voir :

facteurs clés permettant des caractérisations optimales de peptides : Un guide d'instruction sur la cartographie des peptides (publication n° 5991-2348FR)

Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis: A "How to" Guide (publication n° 5991-3775EN)

Guide pratique d'Agilent pour la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse de biomolécules (publication n° 5991-3651FR)

Pour consulter les guides ci-dessus, ainsi que d'autres guides qui vous aideront dans vos caractérisations, rendez-vous sur :

www.agilent.com/chem/getbioguides

Méthodes avec colonne capillaire de haute sensibilité

Caractéristiques de la phase mobile à considérer pour les méthodes en phase inverse

Pour les méthodes LC/MS, dans lesquelles l'éluant passe directement de la colonne au détecteur de masse, les phases mobiles doivent contenir uniquement des sels et des additifs volatils. Afin d'atteindre une sensibilité maximale, il ne doit y avoir ni suppression d'ions ni formation d'ions adduits.

pH faible



Généralement, le TFA n'est pas utilisé pour les séparations des protéines et peptides par LC/MS, car il inhibe l'ionisation et augmente la limite de détection. La première étape consiste habituellement à remplacer le TFA par de l'acide formique entre 0,1 et 1 %. L'autre possibilité est d'utiliser de l'acide acétique jusqu'à 1 % comme modificateur de phase mobile. À pH faible, une phase mobile contenant du TFA peut tout de même permettre d'obtenir la meilleure séparation, mais avec une réduction de la sensibilité. Dans certains cas, le TFA peut être éliminé postcolonne avec un autre acide, comme l'acide propanoïque, à l'aide d'un simple dessalage/échange du contre-ion en ligne.

pH intermédiaire et élevé



Les pH élevés sont moins souvent utilisés pour la caractérisation des protéines, mais la LC/MS peut aussi être réalisée à pH élevé avec NH_4OH 10 à 20 mM comme additif de phase mobile.

Instruments Agilent pour l'identification des protéines et le profilage des impuretés

Système LC bio-inerte 1260 Infinity II

Une véritable bio-inertie pour une plus grande efficacité d'analyse des biomolécules

Le seul UHPLC fournissant un circuit sans métal. Autres avantages :

Bio-inertie complète

- Absence d'inox pour une intégrité d'échantillon maximale
- pH 1 à pH 13 (pH 14 à court terme) pour une plus grande disponibilité de l'instrument
- Compatible avec des concentrations de sel de 2 M et d'urée de 8 M
- Technologie capillaire simple d'utilisation

Capacité UHPLC

- 600 bars

Robustesse et simplicité d'utilisation

- Faible activité de surface, résistance à la corrosion, rinçage actif des joints et mélange de tampon quaternaire

Idéal pour l'identification des protéines

Pour obtenir les meilleurs résultats, utilisez les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping, Bio MAb et AdvanceBio SEC.



Système LC bio-inerte
1260 Infinity II

LC Agilent 1290 Infinity II avec pompe à haut débit

Des performances inégalées pour des résultats d'une fiabilité maximale

Le meilleur de sa catégorie en termes de résolution dans le temps, de dispersion, de sensibilité, d'exactitude et de précision en LC/UV et LC/MS. Associe amortissement actif innovant, mélange microfluidique et technologie de détection avec guide d'onde optofluidique pour obtenir :

- Puissance de gamme UHPLC jusqu'à 1 300 bars et 5 mL/min
- Transposition de méthodes rapide et simple grâce à ISET, la technologie intelligente de simulation de systèmes d'Agilent
- La productivité de l'UHPLC avec les coûts de fonctionnement de l'HPLC

Convient au profilage des impuretés, à la cartographie peptidique et aux gradients ultrarapides

Pour les meilleurs résultats, utilisez-le avec les colonnes ZORBAX RRHD 300 Å 1,8 µm.



LC Agilent 1290 Infinity II avec pompe à haut débit

Profitez de performances et d'une efficacité optimales en utilisant les consommables de LC Agilent.

Les consommables Agilent InfinityLab fonctionnent en parfaite harmonie avec les instruments de la série LC InfinityLab pour fournir d'excellentes performances et efficacité opérationnelle, tout en garantissant la sécurité du laboratoire. Les consommables intelligents suivent l'utilisation pour une plus grande fiabilité de vos analyses.

Rendez-vous sur www.agilent.com/chem/infinitylab ou découvrez le catalogue de consommables LC InfinityLab sur www.agilent.com/chem/catalog

Système LC 1260 Infinity II avec pompe binaire

Repoussez les limites en HPLC analytique avec 600 bars

100 % compatible avec la HPLC et doté de la capacité UHPLC

- Performances de l'UHPLC avec les coûts de fonctionnement de la HPLC
- Compatible avec les applications de LC et LC/MS, avec toute colonne analytique de petit diamètre ou de diamètre ordinaire (2,1 à 4,6 mm de d.i.)
- Précision de gradient supérieure par mélange haute pression

Utilisation pour toute application UHPLC courante



Système LC 1260 Infinity II avec pompe binaire

Système LC 1260 Infinity II Prime

Des analyses quotidiennes d'une fiabilité et d'une précision remarquables

Les meilleures performances UHPLC quaternaire pour un transfert de méthode simplifié et un mélange de tampons automatisé

- Puissance de gamme UHPLC jusqu'à 800 bars et 5 mL/min
- BlendAssist, un outil très convivial pour un mélange précis de tampons et d'additifs
- La productivité de l'UHPLC avec les coûts de fonctionnement de l'HPLC

Utilisation pour le développement de méthodes ou les systèmes en libre-service avec un mélange de tampons précis



LC 1260 Infinity II Prime

Conseils et outils

Pour plus de détails sur ces systèmes avancés, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/BioHPLC

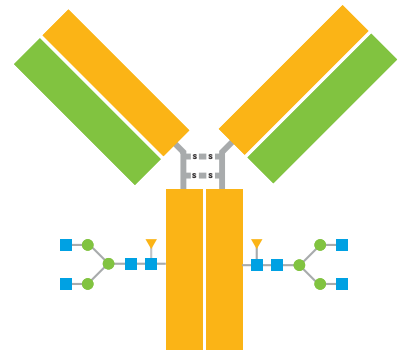
Analyse de la structure primaire

Déterminez avec précision la séquence d'acides aminés et les modifications post-traductionnelles, et analysez les impuretés des peptides et oligonucléotides

Pour la caractérisation complète d'une protéine, telle qu'un anticorps monoclonal, il est nécessaire de déterminer sa séquence d'acides aminés et les modifications post-traductionnelles de cette séquence qui ont pu se produire au cours de la fabrication pendant les étapes de purification et de formulation. Puisque ce type d'analyse nécessite des conditions dénaturantes, la LC en phase inverse est la technique privilégiée.

Agilent propose une vaste gamme de colonnes de BioHPLC à phase inverse à larges pores (300 Å, 450 Å et plus), avec le soutien des experts de l'assistance technique et des chimistes d'application à travers le monde. Cette gamme inclut des particules poreuses de 1,8, 3,5 et 5 µm pour des pressions de 400 à 1 200 bars, trois types de particules superficiellement poreuses pour les séparations par UHPLC à des pressions plus basses, ainsi que des colonnes polymériques pour les analyses dans diverses conditions, notamment avec les phases mobiles contenant de l'acide formique pour la détection par MS.

Pour l'analyse d'impuretés des peptides ou oligonucléotides, Agilent propose des colonnes à base de silice et des colonnes polymériques avec une meilleure tolérance aux pH élevés. Les colonnes polymériques présentent aussi l'avantage de permettre la transposition d'échelle entre analytique et préparative.



- **Les colonnes AdvanceBio RP-mAb** sont les seules colonnes à phase inverse spécialement conçues pour la caractérisation des mAb. La technologie Poroshell avec un diamètre de pores de 450 Å et la sélectivité de la phase greffée permettent la caractérisation à haute résolution des mAb intacts et des fragments de mAb.
- **Les colonnes PLRP-S** comportent des particules polymères macroporeuses qui permettent les séparations par HPLC sur la plage de pH la plus large. Avec trois diamètres de pores larges et huit granulométries, les colonnes PLRP-S représentent une solution optimale pour les séparations à l'échelle préparative ou analytique des peptides, protéines et complexes protéiques.
- **Les colonnes ZORBAX RRHD 300 Å 1,8 µm** offrent des performances d'UHPLC pour les séparations en phase inverse des protéines intactes, des fragments de protéines et des digestions protéiques avec une stabilité à 1 200 bars.
- **Les colonnes ZORBAX 300 Å 3,5 et 5 µm** sont constituées de matériaux totalement poreux pour la HPLC et les séparations préparatives ; une grande partie des phases greffées permet la transposition d'échelle à partir de particules de 1,8 µm.
- **Les colonnes Agilent Poroshell 300** sont les premières colonnes superficiellement poreuses à faible granulométrie à être conçues pour les séparations rapides des polypeptides et protéines.
- **Les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping** garantissent la séparation et l'identification rapides des modifications d'acides aminés dans la structure primaire. Avec leurs particules de 2,7 µm et leur fonctionnalité C18, les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping offrent une excellente rétention, résolution et forme de pic pour les peptides hydrophobes de base.
- **Les colonnes AdvanceBio pour oligonucléotides** comportent des particules partiellement poreuses de 2,7 µm pour l'analyse à haute résolution des oligonucléotides et de leurs impuretés. Grâce à une technologie exclusive, les particules sont modifiées chimiquement afin de les rendre résistantes aux phases mobiles à pH élevé qui sont nécessaires aux séparations d'oligonucléotides.



Sélection de colonnes à phase inverse

Application	Colonnes Agilent	Notes
Anticorps monoclonaux et fragments de mAb	AdvanceBio RP-mAb	Basées sur la technologie Poroshell comprenant des particules superficiellement poreuses qui réduisent les distances de diffusion, permettent l'utilisation de débits plus élevés et de gradients plus accentués et réduisent ainsi le temps d'analyse, même sur les systèmes à 600 bars.
	C4 SB-C8 Diphényle	Le diamètre de pores de 450 Å assure l'accès des molécules de grande taille à la phase greffée, garantissant la meilleure séparation chromatographique possible. Les phases greffées résistantes pour les séparations d'anticorps monoclonaux offrent une gamme de sélectivités qui permettent d'optimiser la résolution.
	PLRP-S 1 000 Å	Le support polymérique macroporeux des colonnes PLRP-S assure d'excellentes séparations des mAb, en particulier avec les phases mobiles contenant de l'acide formique pour la détection par MS.
Protéines intactes, anticorps monoclonaux, fragments de mAb et polypeptides	ZORBAX 300 Å, 1,8 µm	L'optimisation des processus de remplissage offre une stabilité jusqu'à 1 200 bars avec le LC 1290 Infinity II. Les colonnes RHDD 1,8 µm sont disponibles dans des longueurs de 50 et 100 mm pour les séparations rapides ou à haute résolution de vos échantillons les plus complexes.
	RRHD 300SB-C18 RRHD 300SB-C8 RRHD 300SB-C3 RRHD 300-diphényle	La technologie StableBond C18 convient parfaitement aux séparations de protéines et de digestions protéiques complexes.
	ZORBAX 300 Å, 3,5 et 5 µm	Parfaitement adaptées aux systèmes de HPLC. La technologie StableBond C3 et CN est utile avec les composés de plus grande taille et plus hydrophobes.
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300SB-CN	
	PLRP-S	Le support polymérique des colonnes PLRP-S offre une sélectivité alternative à celle des colonnes à base de silice, ainsi qu'une excellente forme de pic avec les phases mobiles contenant de l'acide formique.
	100 Å 300 Å 1 000 Å 4 000 Å	
	Poroshell 300	Les particules Poroshell de 5 µm avec des pores de 300 Å permettent d'effectuer des séparations rapides de protéines intactes par HPLC.
Protéines dans les digestions protéiques	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300Extend-C18	
	AdvanceBio Peptide Mapping	Diamètre de pores de 120 Å idéal pour l'identification des peptides dans une large plage de masses moléculaires. Testé avec un mélange de peptides difficile à séparer afin d'en assurer les performances. La technologie Poroshell, une exclusivité d'Agilent, permet de réduire les temps d'analyse et d'augmenter la résolution de toute la séquence du peptide.
Analyse d'impuretés pour les peptides synthétiques	PLRP-S 100 Å, 300 Å	Permettent la transposition d'échelle entre analytique et préparative. L'excellente stabilité au pH permet l'utilisation des pH extrêmes, y compris pour la désinfection.
Analyse des oligonucléotides	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1 000 Å, 4 000 Å PL-SAX 1 000 Å, 4 000 Å	Plusieurs options de diamètre de pores en fonction de la longueur des oligonucléotides. Stabilité à température élevée. Permettent la transposition d'échelle entre analytique et préparative. Pour plus d'informations sur les colonnes PL-SAX, reportez-vous à la page 95 .
	AdvanceBio pour oligonucléotides	Convient parfaitement aux séparations analytiques à haute résolution.

AB

AB

AB

AB

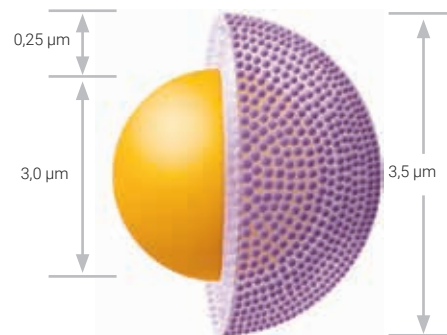
AB

AB

Appartient à la gamme AdvanceBio

AdvanceBio RP-mAb

- **Amélioration de la précision** : les particules superficiellement poreuses (3,5 µm) avec des pores larges (450 Å) augmentent la résolution des séparations de mAb tout en maintenant la compatibilité avec tous les instruments de LC.
- **Rapidité** : des temps d'analyse plus courts que les colonnes remplies de particules totalement poreuses.
- **Souplesse du développement de méthodes** : avec une gamme de greffages comprenant SB-C8, C4 et diphényle.
- **Réduction des coûts** : le fritté d'entrée de 2 µm et le remplissage Poroshell robuste prolongent la durée de vie de la colonne en prévenant les obstructions.



Les seules colonnes à phase inverse qui répondent aux défis posés par la caractérisation des anticorps monoclonaux

L'analyse d'anticorps monoclonaux intacts et réduits est une application essentielle pour la caractérisation des protéines thérapeutiques et la compréhension de leur efficacité et de leur stabilité. Les mauvaises séparations chromatographiques peuvent contraindre l'utilisateur à recommencer les analyses et même compromettre la précision de la caractérisation.

La longueur des temps d'analyse a un impact négatif sur les cadences d'analyses d'un laboratoire et retarde les prises de décisions basées sur les résultats de la caractérisation. Pour éliminer ces problèmes, Agilent a développé une nouvelle colonne à phase inverse afin d'optimiser les performances de l'analyse des mAb intacts et réduits. La colonne AdvanceBio RP-mAb est basée sur la technologie Poroshell, dotée d'un diamètre de pores et d'une phase greffée unique.

Conseils et outils

Pour plus d'informations sur la caractérisation de la structure primaire des anticorps monoclonaux, reportez-vous à la publication suivante :
Better Characterization of Biomolecules using Agilent AdvanceBio Reversed-Phase Columns
 (publication n° 5991-2032EN)

www.agilent.com/search



Les biomolécules de grande taille telles que les anticorps monoclonaux sont généralement séparées lentement pour réduire l'élargissement de pic potentiel de ces composés à diffusion lente. Cependant, la technologie Poroshell des colonnes AdvanceBio RP-mAb comporte des particules superficiellement poreuses qui sont constituées d'une fine couche de silice poreuse, de 0,25 µm d'épaisseur, reposant sur un noyau de silice plein de 3,0 µm. Cette morphologie réduit la distance de diffusion et permet l'utilisation de débits plus élevés et de gradients plus accentués, même sur les systèmes à 600 bars. Le large diamètre des pores (450 Å) de la couche fine assure le plein accès des grosses molécules d'anticorps monoclonaux à la phase greffée, garantissant ainsi la meilleure séparation chromatographique possible. Avec C4, SB-C8 et une phase diphényle unique, nous proposons un grand choix de phases greffées résistantes pour les séparations d'anticorps monoclonaux qui offre une gamme de sélectivités permettant d'optimiser la résolution.

Les colonnes Agilent AdvanceBio RP-mAb fournissent une meilleure résolution et des temps d'analyse plus courts, afin de produire des résultats rapides, fiables et reproductibles lors des analyses d'anticorps monoclonaux pour l'exploration, le développement et les applications d'AQ/CQ en biopharmacie.

Spécifications des colonnes

Phase greffée	Diamètre des pores	Limite de température*	Plage de pH*	Post-silanisée
AdvanceBio RP-mAb C4	450 Å	90 °C	1,0–8,0	Oui
AdvanceBio RP-mAb SB-C8	450 Å	90 °C	1,0–8,0	Non
AdvanceBio RP-mAb diphényle	450 Å	90 °C	1,0–8,0	Oui

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

* Les colonnes sont conçues pour permettre une utilisation optimale à pH faible. À des pH de 6 à 8, la stabilité des colonnes à base de silice est maximale à une température d'utilisation <40 °C avec de faibles concentrations de tampon, de l'ordre de 0,01 à 0,02 M.

Séparation ultrarapide et à haute résolution d'un variant du trastuzumab (IgG1)

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

Température : 80 °C

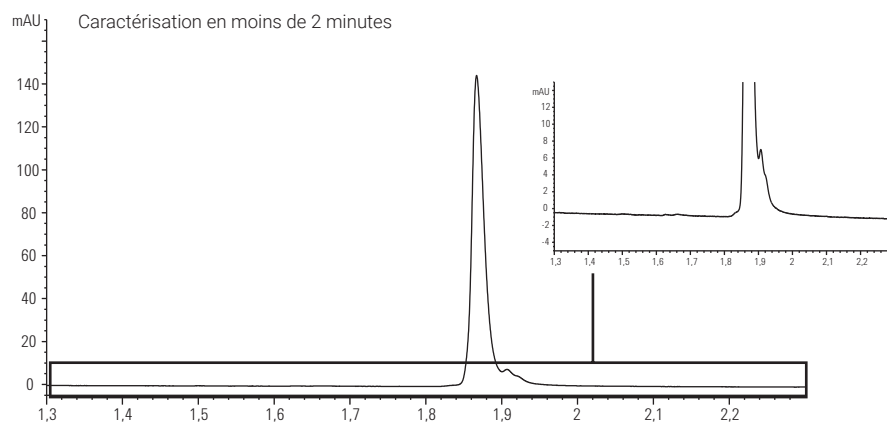
Détecteur : UV, 254 nm

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans l'eau:IPA (98:2)
B : IPA:ACN:phase mobile A (70:20:10)

Échantillon : injection de 5 µl de trastuzumab (anticorps monoclonal
humanisé recombinant de classe IgG1 intact de
Creative Biolabs) (1 mg/mL)

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 % de B,
1 min de stabilisation à 10 % de B



La colonne AdvanceBio RP-mAb C4 fournit en moins de 2 minutes un pic fin et une résolution précise.

Séparation du trastuzumab intact (anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1)

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

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans l'eau:IPA (98:2)
B : IPA:ACN:phase mobile A (70:20:10)

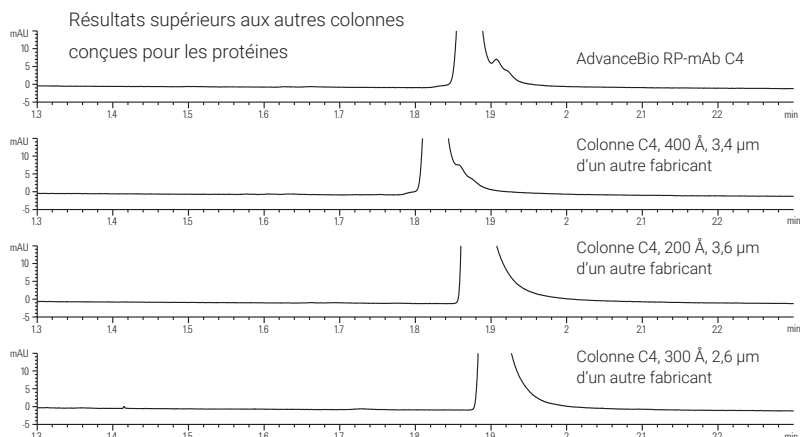
Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 254 nm

Échantillon : injection de 5 µl de trastuzumab (anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1 intact de Creative Biolabs) (1 mg/mL)



Conçue spécifiquement pour la séparation des mAb, la colonne AdvanceBio RP-mAb offre une forme de pic et une résolution supérieures à celles obtenues avec d'autres colonnes de séparation des protéines intactes.

Phase diphényle sélective

Colonne : AdvanceBio RP-mAb diphényle
795775-944
2,1 x 100 mm, 3,5 µm

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans l'eau:IPA (98:2)
B : IPA:ACN:phase mobile A (70:20:10)

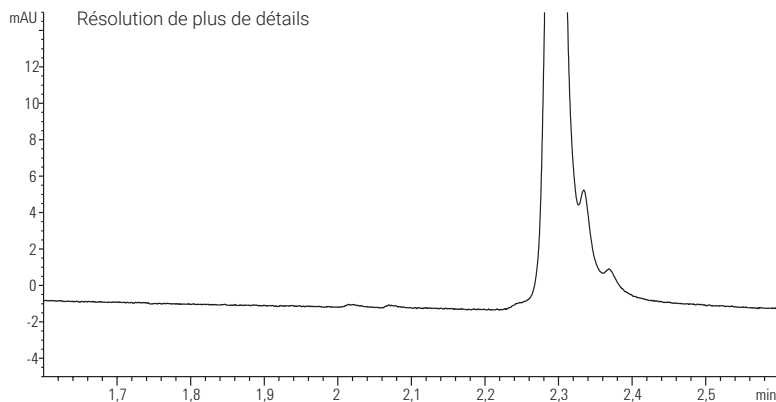
Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 254 nm

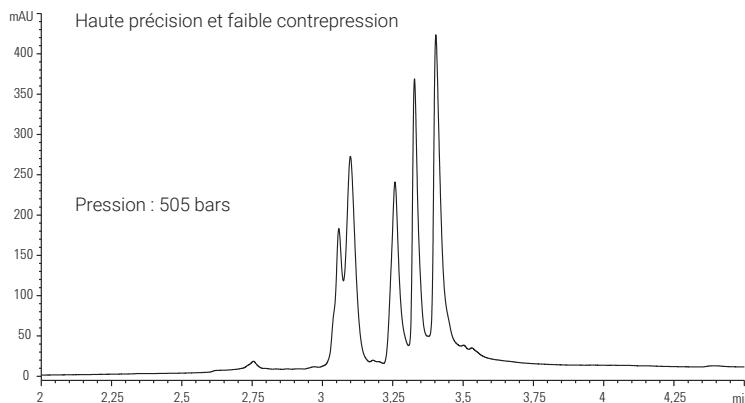
Échantillon : injection de 5 µl de trastuzumab (anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1 intact de Creative Biolabs) (1 mg/mL)



La sélectivité unique de la colonne AdvanceBio RP-mAb diphényle permet de révéler plus de détails.

L'avantage de Poroshell

Colonne :	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 785775-906 2,1 x 100 mm, 3,5 µm
Phase mobile :	A : 0,1 % TFA dans l'eau B: n-propanol:ACN:phase mobile A (80:10:10)
Débit :	0,8 mL/min
Gradient :	5–40 % de B en 5 min, 1 min de rinçage à 95 % de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B
Température :	60 °C
Détecteur :	UV, 220 nm
Échantillon :	injection de 1 µl de Fc/Fab de trastuzumab (anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1 de Creative Biolabs [2 mg/mL] clivé par la papaine)



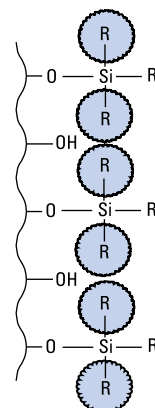
La technologie Poroshell à larges pores de la colonne AdvanceBio RP-mAb permet une analyse rapide, très efficace, à faible pression et à une température inférieure à 80 °C, la température généralement utilisée dans de nombreuses méthodes à phase inverse.

AdvanceBio RP-mAb

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb diphenyle 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

Les colonnes Agilent ZORBAX 300 Å StableBond sont idéales pour séparer les protéines et peptides de façon reproductible, et ce pour deux raisons principales. Tout d'abord, leurs larges pores de 300 Å assurent l'efficacité de la séparation des protéines, des peptides ou des autres grandes molécules, en rendant la phase greffée complètement accessible à ces composés. Ensuite, les colonnes 300StableBond offrent une durabilité inégalée avec les phases mobiles à pH faible, telles que les phases mobiles contenant du TFA typiquement utilisées pour les séparations de protéines et de peptides. Pour les séparations par LC/MS à pH faible, les colonnes 300StableBond peuvent aussi être utilisées avec les modificateurs de phase mobile comme l'acide formique et l'acide acétique. Ces colonnes sont disponibles avec cinq phases greffées différentes (C18, C8, C3, CN et diphenyle [DPI]) pour l'optimisation de la sélectivité et du rendement des protéines et polypeptides. Afin d'améliorer davantage le rendement de l'échantillon et l'efficacité avec les protéines difficiles, les colonnes 300StableBond peuvent être utilisées jusqu'à 80 °C. Les colonnes StableBond 300SB-C18 et 300SB-C8 constituent un excellent choix pour les séparations de protéines et de digestions protéiques complexes. Ces colonnes sont également disponibles en format colonne capillaire (0,3 et 0,5 mm) et nanocolonne (0,075 et 0,10 mm) pour les séparations des digestions protéiques par LC/MS en phase inverse. Les colonnes capillaires et les nanocolonnes sont adaptées aux séparations 1D ou 2D dans les applications protéomiques.



Phase greffée 300StableBond protégée par encombrement stérique

Spécifications des colonnes d'UHPLC

Phase greffée	Diamètre des pores	Limites de température*	Plage de pH*	Post-silanisée
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX RRHD 300-diphényle	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Oui
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX 300SB-C3	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non
ZORBAX 300SB-CN	300 Å	80 °C	1,0–8,0	Non

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

* Les colonnes 300StableBond sont conçues pour permettre une utilisation optimale à pH faible. À des pH de 6 à 8, la stabilité des colonnes à base de silice est maximale à une température d'utilisation <40 °C avec de faibles concentrations de tampon, de l'ordre de 0,01 à 0,02 M. À pH moyen ou élevé, la colonne 300Extend-C18 est recommandée.

Une résolution plus élevée pour les anticorps monoclonaux intacts

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

Phase mobile : A : H₂O:IPA (98:2)+ 0,1 % TFA (v/v)
B : IPA:ACN:H₂O (70:20:10)+ 0,1 % TFA (v/v)

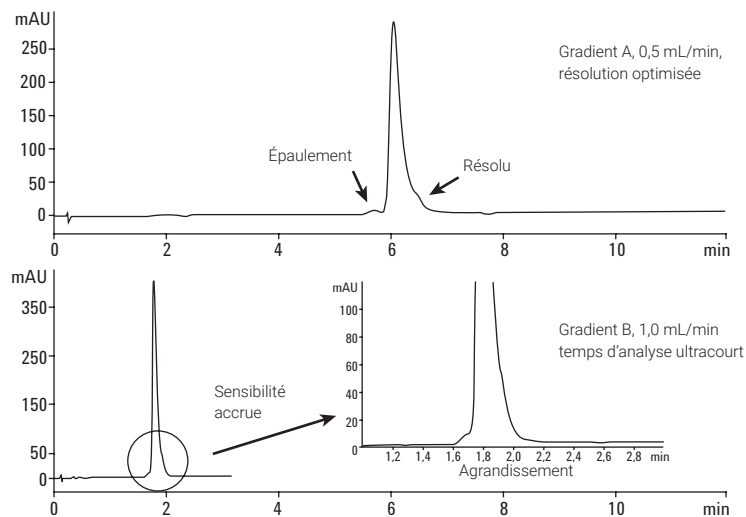
Débit : entre 0,5 mL/min et 1,0 mL/min

Gradient : élution segmentaire et linéaire

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 225 nm

Échantillon : mAB intact



Conseils et outils

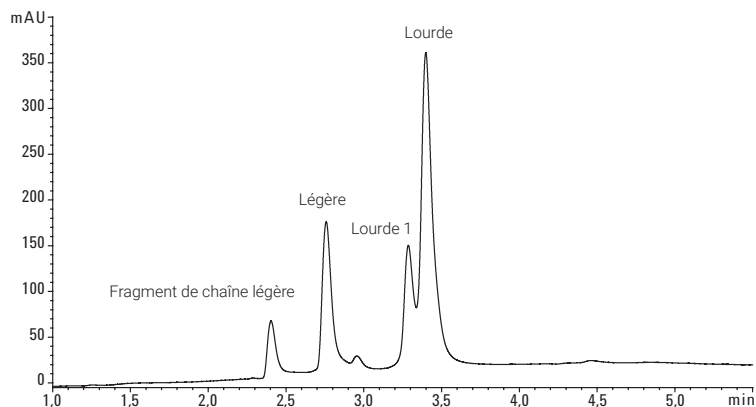
Pour plus d'informations, sur l'amélioration de la caractérisation des biomolécules obtenue avec les colonnes à phase inverse AdvanceBio, reportez-vous au livre blanc traitant de ce sujet (publication n° 5991-2032EN).

www.agilent.com/search



Anticorps monoclonaux réduits et alkylés : séparation des isoformes des chaînes légères et lourdes

Colonne :	ZORBAX RRHD 300SB-C8 858750-906 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Phase mobile :	A : H ₂ O + 0,1 % TFA (v/v) B : n-propanol:ACN:H ₂ O (80:10:10) + 0,1 % TFA (v/v)
Débit :	0,5 mL/min
Injection :	3 µL (d'un échantillon à 2,5 mg/mL)
	% de solvant B Temps (min)
	20 0
	35 3
	40 4
	40 5
	90 5,1
	90 5,5
	25 6
Gradient :	segmentaire
Température :	75 °C
Détecteur :	UV, 225 nm
Instrument :	LC 1290 Infinity avec passeur automatique d'échantillons, pompe binaire, compartiment à colonne thermostaté et détecteur à barrette de diodes (DAD)



Afin de réaliser plusieurs analyses chromatographiques successives, une durée postanalyse de 2 min a été ajoutée pour la stabilisation de la colonne.

Conseils et outils

Les phases mobiles classiques pour la séparation des protéines et des peptides combinent un pH très faible et du TFA (ou d'autres acides) pour solubiliser les protéines. Dans ces conditions, les colonnes StableBond ont une durée de vie très longue. Elles sont disponibles avec un diamètre de pores de 300 Å pour les protéines jusqu'à 100–500 kDa.

Amélioration de la reproductibilité de l'analyse des anticorps monoclonaux

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

Phase mobile : A : H₂O:IPA (98:2) + 0,1 % TFA (v/v)
B : IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0,1 % TFA

Débit : 1,0 mL/min

Température : 80 °C

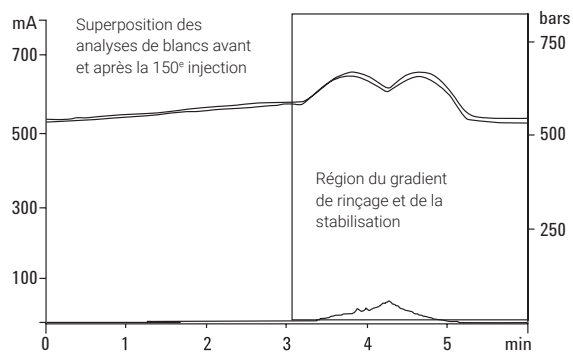
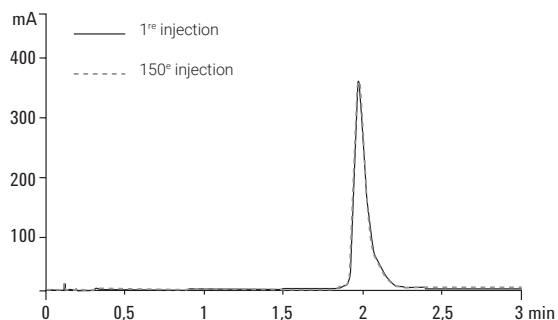
Détecteur : LC 1290 Infinity avec détecteur à barrette de diodes à 225 nm

Échantillon : mAb

Gradient

Granulométrie, µm	Débit, mL/min
0,00	25
3,00	35
4,00	90
5,00	25

Excellente reproductibilité de la colonne et très bon rendement de la protéine avec ZORBAX 300SB-C8.



Des choix de sélectivité uniques pour la caractérisation des mAb

Colonnes : 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-diphényle
858750-944
2,1 x 100 mm, 1,8 µm

Phase mobile : A : H₂O (0,1 % TFA) (v/v)
B : 80 % n-propanol:10 % ACN:10 % H₂O (0,08 % TFA) (v/v)

Volume d'injection : 3 µL (d'un échantillon à 2,5 mg/mL)

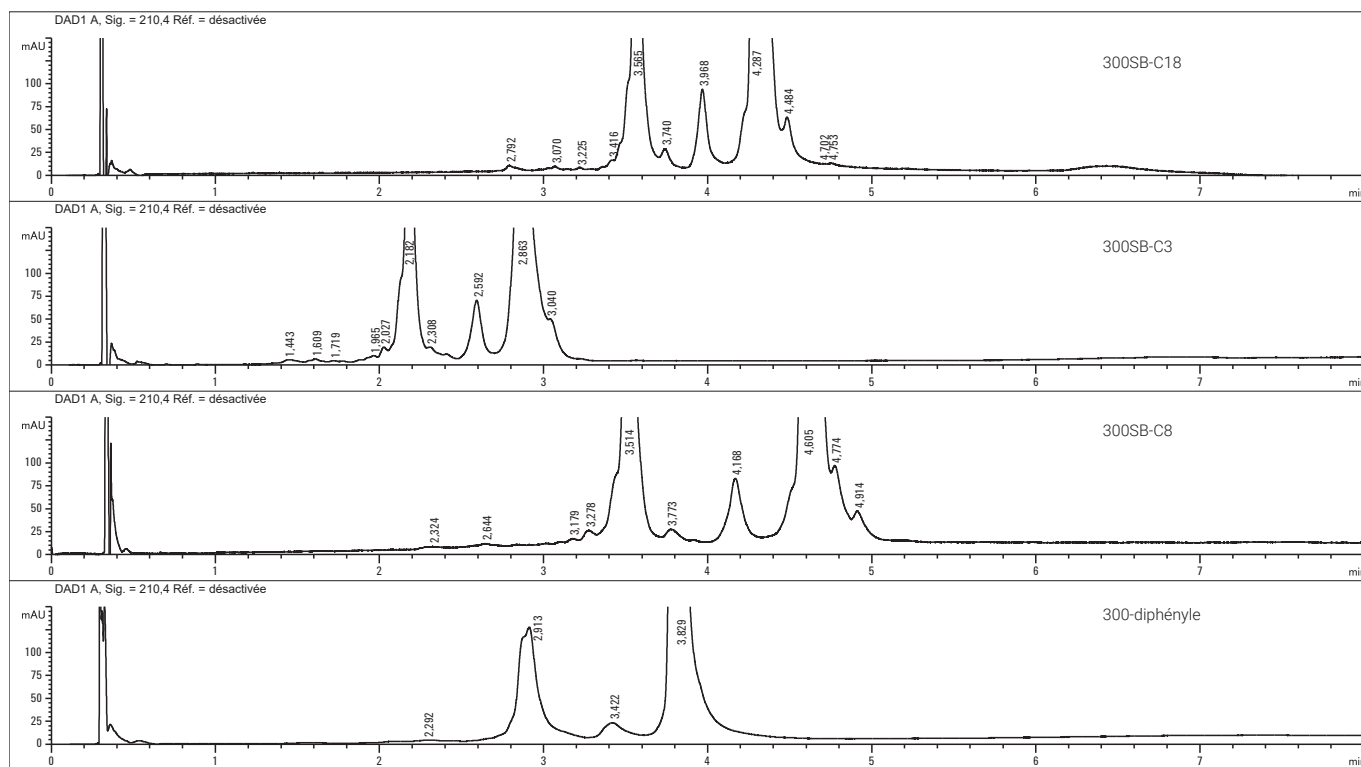
Débit : 1,0 mL/min (3,5 µm*), 1,0 mL/min (1,8 µm)

Gradient : 25–35 % de B, 90 % pour rinçage

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 215 nm

* Élargissement des pics aux débits plus faibles



Peptides/protéines : effet de l'augmentation de la température

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

Phase mobile : A : 5:95 ACN:eau avec 0,10 % TFA (% v/v)
B : 95:5 ACN:eau avec 0,085 % TFA (% v/v)

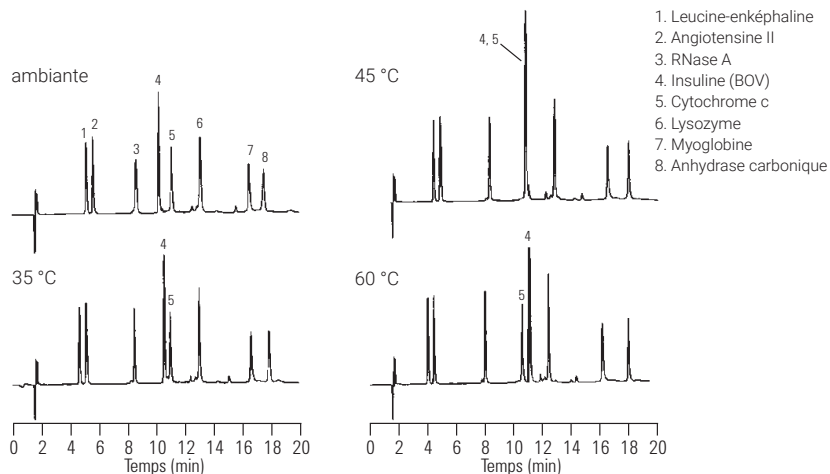
Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 15-53 % en 20 min, durée postanalyse de 12 min

Température : ambiante à 60 °C

Détecteur : UV, 215 nm

Échantillon : Polypeptides



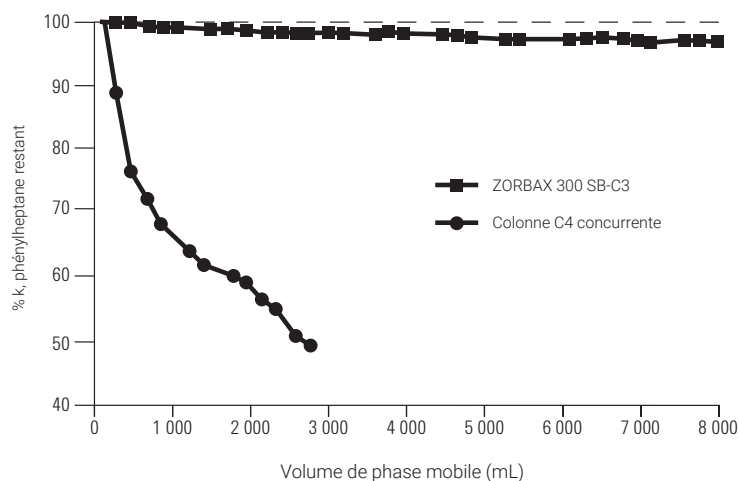
La colonne ZORBAX 300SB-C3 à chaîne courte est stable à pH faible et à haute température

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

Phase mobile : gradient 0-100 % de B en 80 min
A : 0,5 % TFA dans l'eau
B : 0,5 % TFA dans l'acétonitrile
Conditions de test de rétention
isocratiques : 1-phénylheptane, 50 %
de A, 50 % de B

Débit : 1,0 mL/min

Température : 60 °C



Quatre phases greffées 300SB différentes permettent d'optimiser la séparation des polypeptides de grande taille

Colonne A : ZORBAX RRHD 300SB-C18
883995-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Colonne B : ZORBAX 300SB-C8
883995-906
4,6 x 150 mm, 5 µm

Colonne C : ZORBAX 300SB-C3
858750-909
4,6 x 150 mm, 5 µm

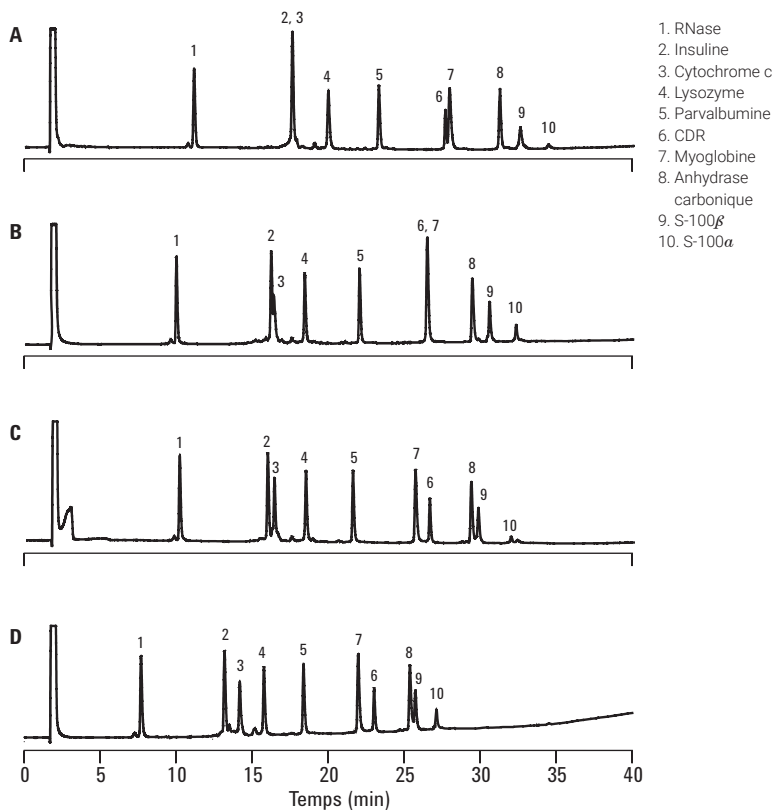
Colonne D : ZORBAX 300SB-CN
858750-905
4,6 x 150 mm, 5 µm

Phase mobile : gradient linéaire, 25–70 % de B en 40 min
A : 0,1 % TFA dans l'eau
B : 0,09 % TFA dans 80 % acétonitrile:20 % eau

Débit : 1,0 mL/min

Température : 60 °C

Échantillon : 3 µg de chaque protéine



LCSB006

La séparation de ce groupe de polypeptides est différente pour toutes les phases greffées 300SB-C18, C8, C3 et CN. C'est un paramètre supplémentaire important pour optimiser rapidement les séparations de protéines. La colonne 300SB-CN offre une sélectivité unique pour les polypeptides plus hydrophiles.

ZORBAX 300 Å StableBond

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-diphényle USP L11
Colonnes de série (aucun matériel spécial n'est requis)							
Semi-préparatives	9,4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
Analytiques	4,6 x 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
Analytiques	4,6 x 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
Analytiques	4,6 x 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
Résolution rapide	4,6 x 150	3,5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
Résolution rapide	4,6 x 100	3,5	861973-902	861973-906			
Résolution rapide	4,6 x 50	3,5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
À économie de solvant (Solvent Saver Plus)	3,0 x 150	3,5	863974-302	863974-306		863974-309	
À économie de solvant (Solvent Saver Plus)	3,0 x 100	3,5		861973-306			
Petit diamètre	2,1 x 250	5	881750-902				
Petit diamètre	2,1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 150	3,5		863750-906			
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 100	3,5	861775-902	861775-906			
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 50	3,5	865750-902	865750-906			
Petit diamètre, haute définition à résolution rapide	2,1 x 150	1,8	863750-902	866750-906		863750-914	863750-944
Petit diamètre, haute définition à résolution rapide	2,1 x 100	1,8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
Petit diamètre, haute définition à résolution rapide	2,1 x 50	1,8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
Microbore	1,0 x 250	5	861630-902				
Microbore, résolution rapide	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906			
Microbore, résolution rapide	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906			
Cartouches de garde pour microbore, 3/pqt	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920			
Cartouches de garde, 2/pqt	9,4 x 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
Cartouches de garde, 4/pqt	4,6 x 12,5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	

(Suite)

AB

AB

Appartient à la gamme AdvanceBio

Conseils et outilsPour exploiter au mieux votre instrument, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/getbioguides

Analyse de la structure primaire

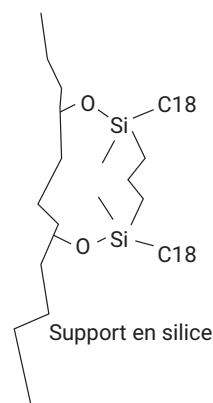
ZORBAX 300 Å StableBond

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-diphényle USP L11
Cartouches de garde, 4/pqt	2,1 x 12,5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	
Kit de montage pour cartouche de garde			840140-901	840140-901	840140-901	840140-901	
Kit de montage pour cartouche de garde			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901	
Cartouche PrepHT (kit de raccords 820400-901 requis)							
Cartouche PrepHT	21,2 x 250	7		897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
Cartouche PrepHT	21,2 x 150	7		897150-102	897150-106		897150-109
Cartouche PrepHT	21,2 x 150	5		895150-902	895150-906		895150-909
Cartouche PrepHT	21,2 x 100	5		895100-902	895100-906		895100-909
Cartouche PrepHT	21,2 x 50	5		895050-902	895050-906		895050-909
Raccords pour cartouche PrepHT, 2/pqt				820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
Cartouche de garde PrepHT	17,0 x 7,5	5		820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Kit de montage pour cartouche de garde				820444-901	820444-901	820444-901	820444-901
Colonnes capillaires à gainage verre							
Capillaire	0,5 x 250	5	5064-8266				
Capillaire	0,5 x 150	5	5064-8264				
Capillaire	0,5 x 35	5	5064-8294				
Capillaire, résolution rapide	0,5 x 150	3,5	5064-8268				
Capillaire, résolution rapide	0,5 x 35	3,5	5065-4459				
Capillaire	0,3 x 250	5	5064-8265				
Capillaire	0,3 x 150	5	5064-8263				
Capillaire	0,3 x 35	5	5064-8295				
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460			
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461			
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 35	3,5	5064-8270	5065-4462			
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463			
Nanocolonnes (PEEK/silice fondue)							
Nanocolonne, résolution rapide	0,1 x 150	3,5	5065-9910				
Nanocolonne, résolution rapide	0,075 x 150	3,5	5065-9911				
Nanocolonne, résolution rapide	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923			
Piège/garde, 5/pqt	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914			
Kit de montage pour piège/garde			5065-9915	5065-9915			

ZORBAX 300 Å Extend-C18

- Séparations fiables des polypeptides et peptides à pH faible ou élevé, avec une plage de pH de 2–11,5
- Possibilité de bénéficier d'une sélectivité différente à pH faible ou à pH élevé
- Haute efficacité et bon rendement des peptides hydrophobes à pH élevé
- Parfaitement adaptée à la LC/MS avec une phase mobile contenant de l'hydroxyde d'ammonium

La colonne ZORBAX 300 Å Extend-C18 est une colonne de HPLC conçue pour les séparations hautement efficaces de peptides dans une plage de pH comprise entre 2 et 11,5. La phase greffée bidentée exclusive offre d'excellentes durées de vie et de reproductibilité à pH faible et élevé. À pH élevé, la rétention et la sélectivité des peptides et polypeptides peuvent varier considérablement en raison des changements de charge des molécules. L'utilisation d'un pH élevé à température ambiante a permis d'obtenir d'excellents rendements des polypeptides hydrophobes. Il est possible également d'améliorer la sensibilité de l'analyse par LC/MS des peptides et polypeptides à pH élevé en utilisant une phase mobile contenant de l'hydroxyde d'ammonium.



Nouveau ligand C18-C18 bidenté pour la phase greffée Extend-C18

Spécifications des colonnes d'UHPLC

Phase greffée	Diamètre des pores	Limites de température*	Plage de pH*	Post-silanisée
ZORBAX 300 Å Extend-C18 60 °C	300 Å	60 °C	2,0-11,5	Double

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

* Les limites de température sont de 60 °C jusqu'à pH 8 et de 40 °C entre les pH 8 et 11,5.

Conseils et outils

La sélection de la bonne colonne n'est qu'un élément de la solution complète. N'oubliez pas les consommables importants tels que notre vaste gamme de lampes de LC. Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/lamps pour plus de détails.



Analyse par LC/MS de l'angiotensine

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

Phase mobile : conditions acides :
A : 0,1 % TFA dans l'eau
B : 0,085 % TFA dans 80 % acétonitrile (ACN)
conditions basiques :
A : NH₄OH 10 mM dans l'eau
B : NH₄OH 10 mM dans 80 % ACN

Débit : 0,2 mL/min

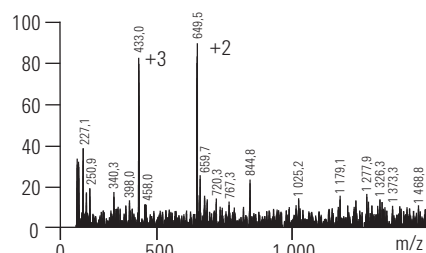
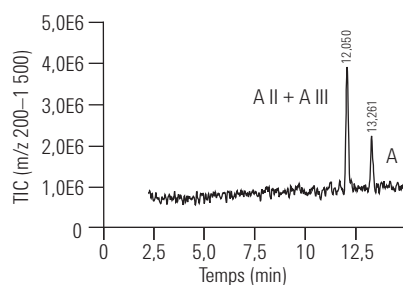
Gradient : 15–50 % de B en 15 min

Température : 35 °C

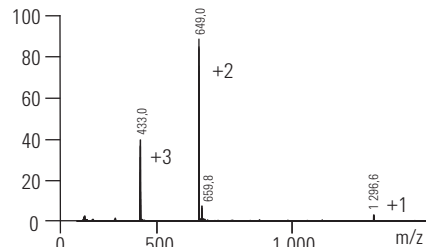
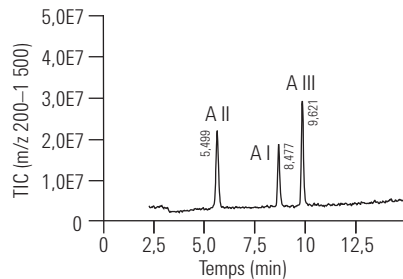
Conditions MS : ionisation electrospray pos. ; Vf 70 V, Vcap 4,5 kV, N₂,
35 psi (2,41 bar), 12 L/min, 325 °C

Échantillon : angiotensine I, II, III, 2,5 µL (50 pmol de chaque)

A
Angiotensine I
Max. : 10 889
pH faible



B
Angiotensine I
Max. : 36 7225
pH élevé



Les peptides, qu'ils soient petits ou grands, présentent des différences de sélectivité à pH faible et élevé. À pH élevé, les trois angiotensines peuvent être séparées grâce à un changement de charge. De plus, la définition spectrale de l'angiotensine I est fortement améliorée à pH élevé avec la phase mobile contenant de l'hydroxyde d'ammonium. La colonne Extend-C18 peut être aussi utilisée pour l'analyse de petits peptides à pH élevé.

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

Longue durée de vie à pH élevé

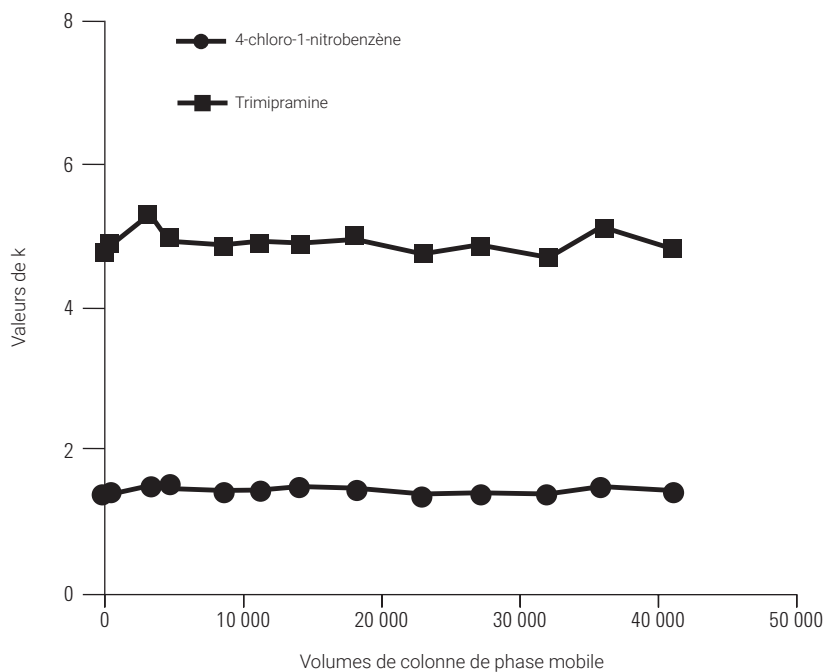
Colonne : **ZORBAX Extend-C18**
773450-902
4,6 x 150 mm, 5 µm

Phase mobile : 20 % NH_4OH 20 mM, pH 10,5
 80 % méthanol

Débit : 1,5 mL/min

Température : phase mobile pure à 24 °C
 tests à 40 °C

10 000 volumes de colonne représentent
 environ un mois de travail.



Utilisez la colonne ZORBAX Extend-C18 pour disposer d'une
 sélectivité différente à pH élevé.

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

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans l'eau
 B : 0,085 % TFA dans 80 % ACN

A : NH_4OH 20 mM dans l'eau
 B : NH_4OH 20 mM dans 80 % ACN

Débit : 0,25 mL/min

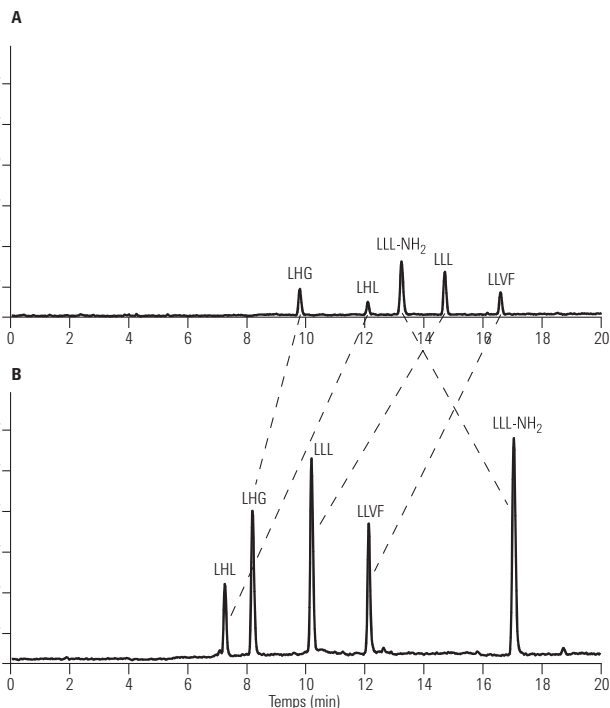
Gradient : 5–60 % de B en 20 min

Température : 25 °C

Conditions MS : ionisation electrospray pos. ; Vf 70 V, Vcap 4,5 kV,
 N_2 , 35 psi (2,41 bar), 12 L/min, 300 °C

Échantillon : 4 µL (50 ng de chaque peptide)

La colonne Extend peut être utilisée pour les séparations de peptides à pH élevé. La sélectivité peut varier considérablement entre les pH faibles ou élevés. Un simple changement du pH permet de développer une méthode complémentaire et il est donc possible de s'assurer que tous les pics sont résolus. Puisque la colonne Extend peut être utilisée à pH élevé ou faible, la méthode de séparation complémentaire peut être évaluée avec une seule colonne. Pour cet échantillon, une meilleure sensibilité du MS est également observée à pH élevé.



ZORBAX 300 Å Extend-C18

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
Analytique	4,6 x 250	5	770995-902
Analytique	4,6 x 150	5	773995-902
Résolution rapide	4,6 x 150	3,5	763973-902
Résolution rapide	4,6 x 100	3,5	761973-902
Résolution rapide	4,6 x 50	3,5	765973-902
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 150	3,5	763750-902
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 100	3,5	761775-902
Petit diamètre, résolution rapide	2,1 x 50	3,5	765750-902
Cartouches de garde, 4/pqt	4,6 x 12,5	5	820950-932
Cartouches de garde, 4/pqt	2,1 x 12,5	5	821125-932
Kit de montage pour cartouche de garde			820999-901
Colonnes capillaires à gainage verre			
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 150	3,5	5065-4464
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 100	3,5	5065-4465
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 75	3,5	5065-4466
Capillaire, résolution rapide	0,3 x 50	3,5	5065-4467

Conseils et outils

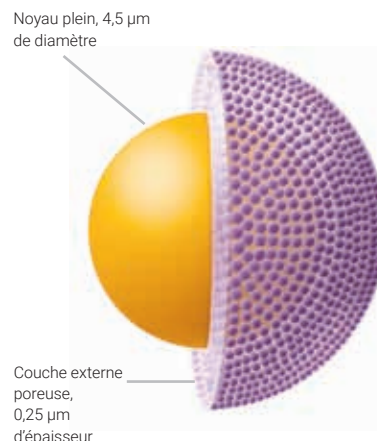
Les filtres et colonnes de garde vous permettent de protéger votre colonne et vos instruments contre les particules qui risquent de provoquer des obstructions entraînant l'augmentation de la pression du système, nuisant à ses performances et interrompant le déroulement de votre journée de travail. Grâce aux nouvelles précolonnes Agilent Fast Guard pour colonnes d'UHPLC et de bio-LC, vous pouvez protéger la colonne afin d'augmenter sa durée de vie et de réduire les interruptions de vos analyses. Pour plus d'informations, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/fastguards

Poroshell 300 AB

- Séparations ultrarapides des biomolécules grâce à des particules superficiellement poreuses
- Haute efficacité et rendement élevé pour les protéines (jusqu'à 1 000 kDa) grâce aux pores de 300 Å
- Durée de vie élevée à pH faible avec la colonne Poroshell 300SB et à pH élevé avec la colonne 300Extend-C18
- Optimisation du rendement et de la sélectivité grâce à quatre phases greffées différentes : 300SB-C18, 300SB-C8, 300SB-C3 et 300Extend-C18

Les colonnes Poroshell 300 sont parfaitement adaptées aux séparations rapides des protéines et des peptides grâce à leurs particules superficiellement poreuses de 5 µm de diamètre, qui permettent d'utiliser des débits élevés tout en garantissant des pics fins et résolus. Les colonnes Poroshell à phases greffées StableBond offrent une excellente stabilité et un choix de sélectivités avec les phases mobiles contenant de l'acide formique et du TFA. La colonne Poroshell 300Extend-C18 permet d'effectuer des séparations entre pH 2 et pH 11. Ces colonnes sont également utilisées pour les séparations analytiques et les séparations par LC/MS des protéines.

Les peptides et les protéines sont généralement séparés lentement pour réduire l'élargissement de pic potentiel de ces composés à diffusion lente. Cependant, la technologie Poroshell comporte des particules superficiellement poreuses constituées d'une fine couche de silice poreuse, de 0,25 µm d'épaisseur, reposant sur un noyau de silice plein, qui réduit la distance de diffusion des protéines et rend possible les séparations par HPLC des peptides et des protéines entre 500 et 1 000 kDa avec les systèmes de HPLC à 400/600 bars, tels que le LC bio-inerte 1260 Infinity II.



Spécifications des colonnes d'UHPLC

Phase greffée	Diamètre des pores	Limites de température*	Plage de pH*	Post-silanisée
Poroshell 300SB-C18, C8, C3	300 Å	90 °C	1,0–8,0	Non
Poroshell 300Extend-C18	300 Å	40 °C au-dessus de pH 8 60 °C au-dessus de pH 8	2,0–11,0	Oui

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

* Les colonnes 300StableBond sont conçues pour permettre une utilisation optimale à pH faible. À des pH de 6 à 8, la stabilité des colonnes à base de silice est maximale à une température d'utilisation <40 °C avec de faibles concentrations de tampon, de l'ordre de 0,01 à 0,02 M. À pH moyen ou élevé, la colonne 300Extend-C18 est recommandée.



Colonnes Agilent Poroshell 300

AB

Appartient à la gamme AdvanceBio

Les colonnes Agilent Poroshell 300 séparent les protéines et les peptides en quelques secondes

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

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans H₂O
B : 0,07 % TFA dans ACN

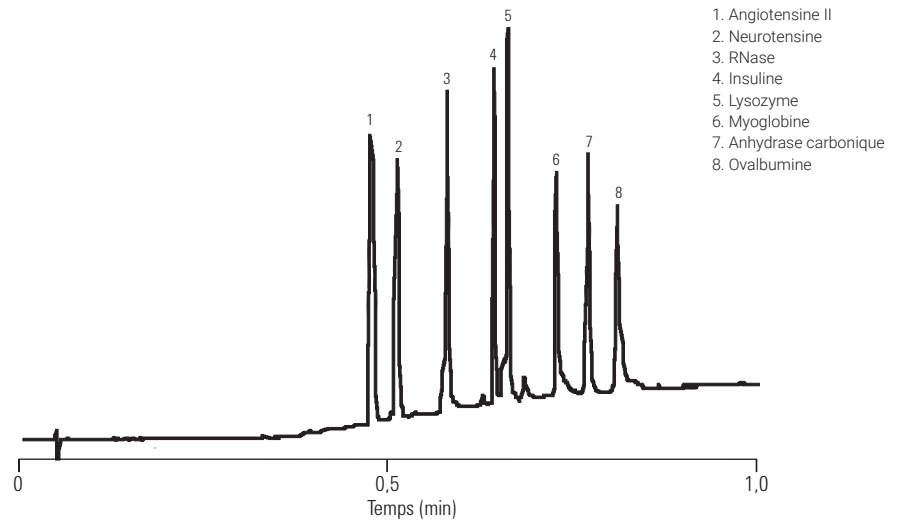
Débit : 0,3 mL/min

Gradient : 5–100 % de B en 1,0 min

Température : 70 °C, 260 bars

Détecteur : UV, 215 nm

Échantillon : protéines et peptides



Cette séparation de huit polypeptides et protéines est effectuée en moins de 60 secondes.
Chaque pic est fin et la séparation efficace.

Conseils et outils

Pour plus d'informations, reportez-vous à la publication suivante :

Characterization of Glycosylation in the Fc Region of Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibody (publication n° **5991-2323EN**)

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

www.agilent.com/search

Analyse rapide et à haute résolution d'une IgG fragmentée

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

Phase mobile : A : eau (5 % AcOH, 1,0 % AF, 0,05 % TFA)
B : 70/20/10 IPA:ACN:eau (5 % AcOH, 1,0 % AF, 0,05 % TFA)

Débit : 1,0 mL/min

Volume d'injection : 2 µL

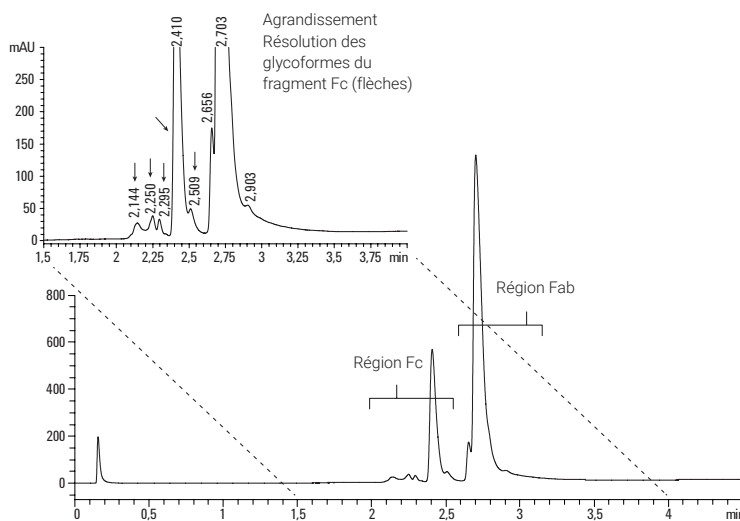
Gradient : segmentaire

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

Température : 80 °C

Détecteur : UV, 280 nm

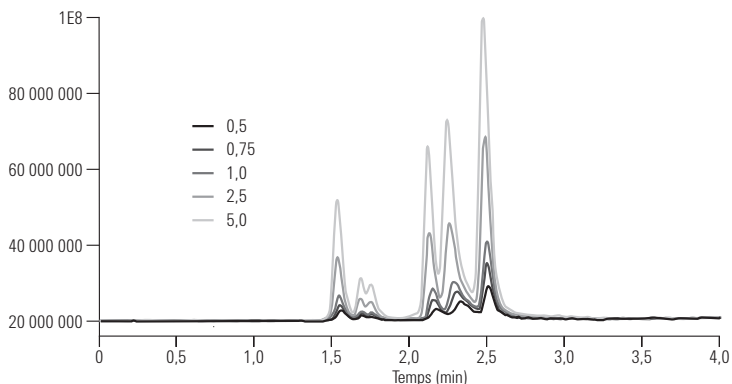
Instrument : série 1200 Infinity avec passeur automatique d'échantillons à haute performance, pompe binaire, compartiment à colonne thermostaté (TCC) et détecteur à barrette de diodes (DAD) couplé à un LC/MS TOF masse exacte série 6224



Séparation en phase inverse d'une IgG1 après digestion par la papaine montrant deux pics principaux des fragments Fc et Fab. L'agrandissement présente les détails des pics partiellement résolus avec différentes isoformes des fragments Fc et Fab (flèches).

Les colonnes microbore Poroshell 300 fournissent une sensibilité maximale pour la LC/MS

Colonne :	Poroshell 300SB-C18 661750-902 1,0 x 75 mm, 5 µm
Phase mobile :	A : eau + 0,1 % acide formique B : ACN + 0,1 % acide formique
Débit :	600 µL/min
Gradient :	20–100 % de B en 5,5 min
Température :	80 °C
Conditions MS :	LC/MS : ionisation electrospray pos. ; Vcap 6 000 V Débit du gaz de séchage : 12 L/min Température du gaz de séchage : 350 °C Nébuliseur : 45 psi Tension du fragmenteur : 140 V Balayage : 600–2 500 Valeur du pas : 0,15 unité de masse atomique Largeur de pic : 0,06 min
Échantillon :	1 µL



Avec leurs petits diamètres de 2,1 mm, 1,0 mm et 0,5 mm, les colonnes Poroshell sont idéales pour votre LC/MS. Quand l'échantillon est en quantité limitée, les colonnes Poroshell de 1,0 mm ou 0,5 mm de d.i. constituent un excellent choix pour les analyses par LC/MS à haute sensibilité. Avec les colonnes Poroshell, vous pouvez effectuer des déterminations sensibles de la masse moléculaire par MS avec des quantités de protéine très faibles, de l'ordre de 0,5 à 5 pmole. Ces colonnes sont également utilisées pour l'identification rapide des protéines intactes par MS, même en présence de stabilisants et d'un milieu de culture tissulaire.

Conseils et outils

Agilent propose un vaste choix de flacons et de récipients à échantillons, notamment en polypropylène et en verre désactivé et silicisé. Pour découvrir notre gamme complète, reportez-vous à la publication n° **5990-9022FR**.

www.agilent.com/chem/vials-productivity



Profils protéiques d'élution

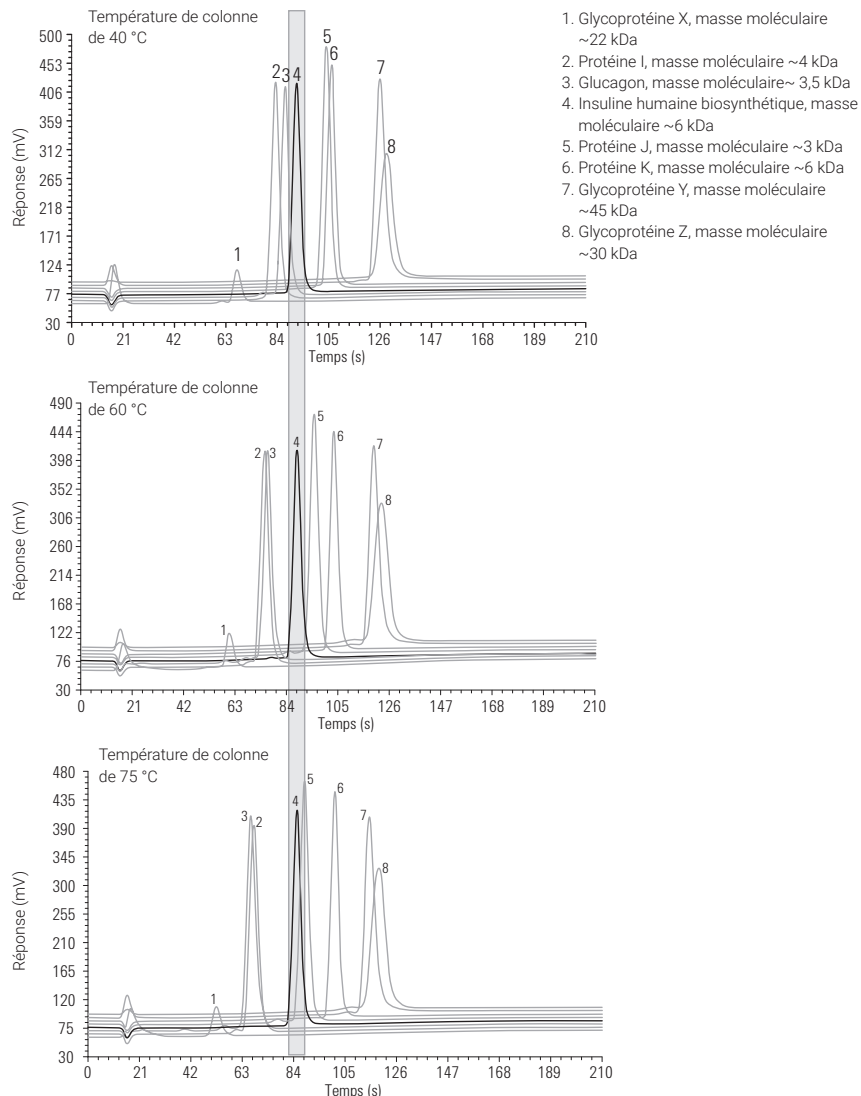
Colonne : Poroshell 300SB-C8
660750-906
2,1 x 75 mm, 5 µm

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans H₂O
B : 0,1 % TFA dans ACN

Débit : 1,0 µL/min

Gradient : 20 à 70 % de B en 3 min

Détecteur : UV, 214 nm



Poroshell 300

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
Petit diamètre	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
Capillaire	0,5 x 75	5		5065-4468		
Cartouches de garde, 4/pqt	2,1 x 12,5	5	821075-920	821075-918	821075-924	
Kit de montage pour cartouche de garde			820999-901	820999-901	820999-901	
Cartouches de garde pour microbore, 3/pqt	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

AdvanceBio Peptide Mapping

- **Meilleure fiabilité analytique** : chaque lot de support AdvanceBio Peptide Mapping est testé avec un mélange de peptides difficile à séparer afin d'assurer la conformité et la reproductibilité, ainsi que de permettre l'identification des peptides principaux sur des cartes peptidiques complexes.
- **Gains de temps** : des résultats obtenus deux à trois fois plus rapidement qu'avec des colonnes de HPLC totalement poreuses.
- **Exploitation plus efficace de chaque instrument** : les colonnes de 4,6, 3,0 et 2,1 mm de d.i. étant stables jusqu'à 600 bars, vous pouvez tirer le meilleur parti de vos instruments d'UHPLC. Elles peuvent aussi fournir d'excellentes performances pour vos anciens instruments à 400 bars.
- **Augmentation de la flexibilité** : améliorez la sensibilité du MS sur tous les HPLC avec des phases mobiles contenant de l'acide formique.



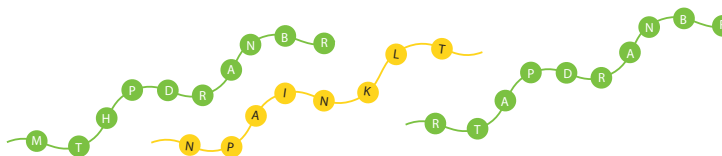
Ces biocolonnes de pointe présentent un diamètre de pores de 120 Å avec des particules superficiellement poreuses de 2,7 µm. Elles sont spécialement testées avec un mélange de peptides difficiles à séparer afin de garantir une cartographie peptidique performante. De plus, les colonnes AdvanceBio Peptide Mapping permettent d'obtenir une résolution et une rapidité remarquables des séparations par UHPLC, ainsi que d'excellents résultats en HPLC conventionnelle.

Spécifications des colonnes

Phase greffée	Diamètre des pores	Limites de température	Plage de pH	Post-silanisée
EC-C18	120 Å	60 °C	2,0–8,0	Double

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

Conseils et outils



Souhaitez-vous savoir comment d'autres scientifiques utilisent la colonne AdvanceBio Peptide Mapping ? Reportez-vous à :

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

Carte peptidique à haute résolution d'une digestion d'érythropoïétine

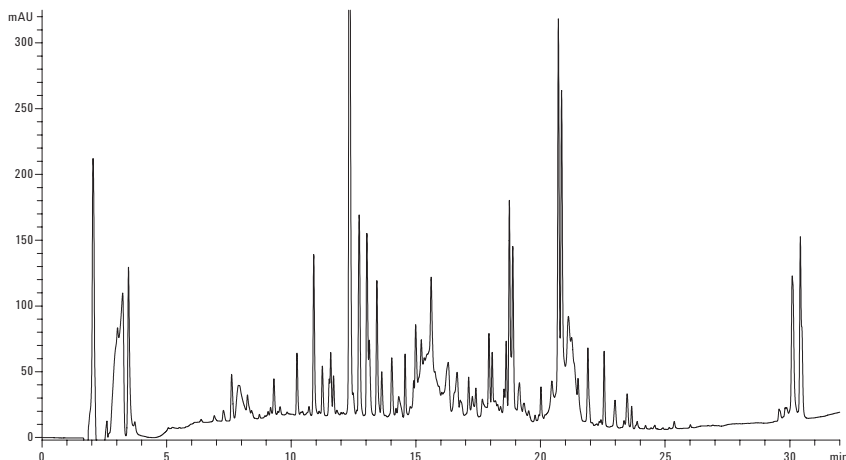
Colonne : **AdvanceBio Peptide Mapping****651750-902****2,1 x 250 mm, 2,7 µm**Phase mobile : A : H₂O + 0,1 % acide formique (v/v)
B : acétonitrile + 0,1 % acide formique (v/v)

Débit : 0,4 mL/min

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

Température : 55 °C

Échantillon : 5 µL (2 µg/µL)



Cartographie peptidique rapide et efficace d'une IgG

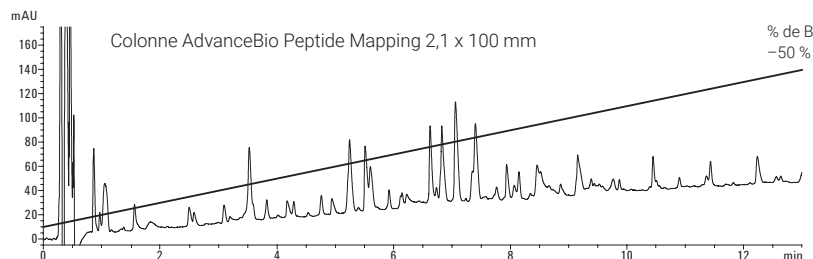
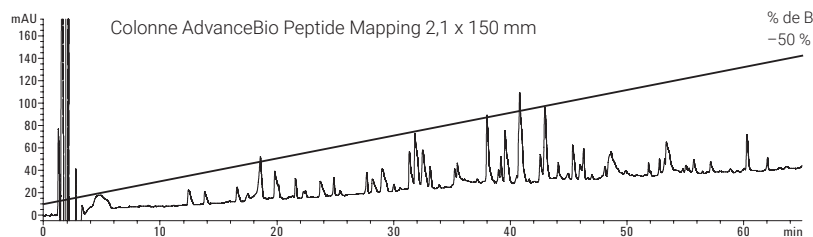
Colonne : **AdvanceBio Peptide Mapping****655750-902****2,1 x 100 mm, 2,7 µm****AdvanceBio Peptide Mapping****653750-902****2,1 x 150 mm, 2,7 µm**Phase mobile : A : H₂O + 0,1 % AF (v/v)
B : 90 % ACN + 0,1 % AF (v/v)

Débit : variable

Volume d'injection : 15 µL

Température : 40 °C

Détecteur : UV 215/220 nm

Instrument : LC 1290 Infinity et
LC/MS Q-TOF
masse exacte 6530

Optimisation de la colonne AdvanceBio Peptide Mapping pour une analyse par cartographie peptidique plus rapide. Gradient : 10–40 % de B ; DAD : 215 nm ; 40 °C. Chromatogramme supérieur : la séparation effectuée en 75 min sur une colonne 2,1 x 150 mm contenait 59 pics de peptides (débit de 0,2 mL/min, 211 bars). Chromatogramme inférieur : la séparation optimisée sur une colonne 2,1 x 100 mm a permis d'obtenir 57 pics de peptides en 14 min (débit de 0,6 mL/min, 433 bars).

Test d'assurance qualité avec le mélange de peptides d'Agilent

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

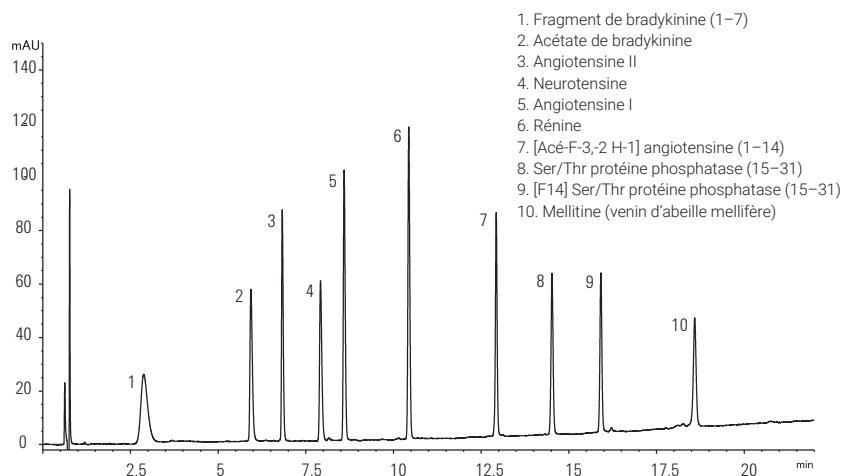
Débit : 3 µL

Gradient : A, H₂O (0,1 % TFA), B, ACN (0,1 % TFA), 0–25 min,
15–65 % de B ; 25–26 min, 65–95 % de B

Température : 55 °C

Détecteur : 220 nm

Échantillon : mélange étalon pour cartographie peptidique
(0,5–1,0 µg/µL par peptide), réf. 5190-0583



Mélange test utilisé pour chaque lot de support AdvanceBio Peptide Mapping. Ce mélange contient 10 peptides hydrophiles, hydrophobes et basiques dont la masse moléculaire est comprise entre 757 et 2 845 Da. Chaque colonne est aussi testée avec une petite molécule pour assurer l'efficacité.



Histoires vraies du laboratoire

La solution Bio

Découvrez comment ce directeur de laboratoire a pu réduire considérablement le temps d'indisponibilité et améliorer la confiance des utilisateurs.

www.agilent.com/chem/story25

Reproductibilité entre lots après 200 injections

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

Débit : 0,5 mL/min

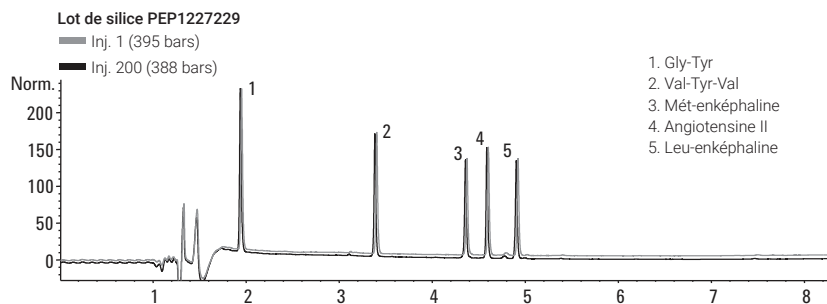
Injection : 1 µL

Gradient : A, H₂O (0,1 % TFA), B, ACN (0,08 % TFA), 0–8 min,
 10–60 % de B ; 8,1–9 min, palier à 95 % de B

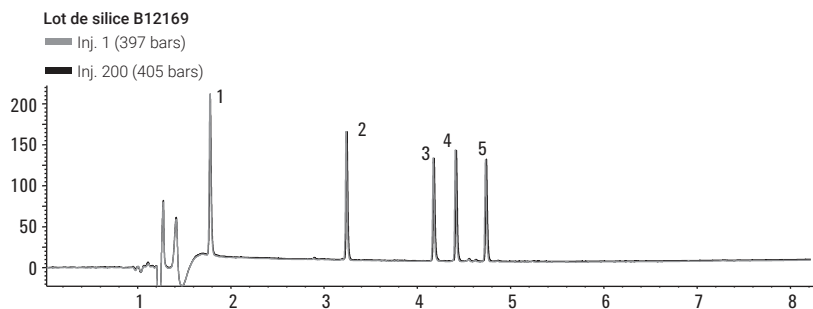
Température : 55 °C

Détecteur : 220 nm

Échantillon : étalons de peptides pour HPLC Sigma



Injection	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
Injection	LP2	LP3	LP4	LP5
1	0,020	0,021	0,020	0,022
200	0,020	0,021	0,019	0,021



Injection	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
Injection	LP2	LP3	LP4	LP5
1	0,019	0,020	0,019	0,020
200	0,019	0,020	0,019	0,020

Reproductibilité supérieure d'un lot à l'autre, analyse après analyse. Une colonne AdvanceBio Peptide Mapping 2,1 x 250 mm a été utilisée pour l'obtention d'une résolution maximale.

AdvanceBio Peptide Mapping

Description	Référence
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, Fast Guard*	850750-911
3,0 x 5 mm, Fast Guard*	853750-911
2,1 x 5 mm, Fast Guard*	851725-911

*Les précolonnes Agilent Fast Guard prolongent la vie des colonnes sans ralentir la séparation ni affecter la résolution.

Mélange étalon d'Agilent pour le contrôle-qualité des peptides

Utilisez le mélange étalon de 10 peptides d'Agilent pour le contrôle-qualité, celui-là même qu'utilise Agilent pour réaliser le CQ de ses colonnes, afin d'évaluer les performances de votre colonne tout au long de sa durée de vie. Il peut être utilisé en HPLC ou en LC/MS. Environ 20 injections par flacon.

Mélange étalon d'Agilent pour le contrôle-qualité des peptides

Description	Référence
Mélange étalon pour le contrôle-qualité des peptides ; 71 µg dans un flacon de 2 mL	5190-0583



Conseils et outils

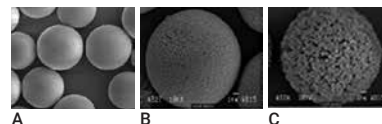
La cartographie peptidique est une technique performante qui constitue le test d'identification le plus largement utilisé pour les protéines, en particulier les protéines recombinantes. Plusieurs aspects doivent être pris en compte, outre la sélection de la colonne, pour obtenir des cartes peptidiques reproductibles et précises, notamment la digestion des protéines, la préparation des échantillons, les tests d'optimisation, etc. Pour les principales techniques utilisées dans les procédures de cartographie peptidique et les éléments à considérer pour optimiser vos séparations de cartographie peptidique, reportez-vous à la publication intitulée *Keys for Enabling Optimum Peptide Characterizations: A Peptide Mapping "How to" Guide* (publication n° **5991-2348EN**).

www.agilent.com/search

PLRP-S

- Contiennent des particules polymères durables et résistantes qui fournissent des résultats reproductibles sur une plus longue durée de vie
- Thermiquement et chimiquement stables
- Conformés à l'USP L21
- Utilisées dans les secteurs suivants : biosciences, chimie, recherche clinique, énergie, environnement, agroalimentaire, science des matériaux et industrie pharmaceutique
- Porosités (100 Å à 4 000 Å) pour les séparations de molécules de toutes tailles, des petites molécules aux grands complexes et aux polynucléotides

Notre gamme de colonnes PLRP-S présente diverses porosités et granulométries, qui ont toutes des caractéristiques chimiques et d'adsorption identiques. Les particules sont intrinsèquement hydrophobes. Par conséquent, les séparations en phase inverse ne nécessitent ni phase greffée, ni ligand alkyle. Il s'agit donc d'un matériau extrêmement reproductible, sans silanols ni ions métalliques lourds. Les colonnes de notre vaste gamme sont adaptées aux microséparations, notamment dans le cadre de la protéomique ascendante et descendante, des séparations analytiques et des purifications préparatives. De plus, les colonnes utilisées à l'échelle des procédés peuvent être remplies de matériau en vrac.



Micrographies à balayage électronique (SEM) de particules de PLRP-S de 10 µm.

La différence de porosité est clairement visible.

A correspond au petit diamètre de pores de 100 Å
B correspond aux pores plus grands d'un diamètre de 300 Å

C correspond aux particules gigaporeuses d'un diamètre de 4 000 Å

Spécifications des colonnes

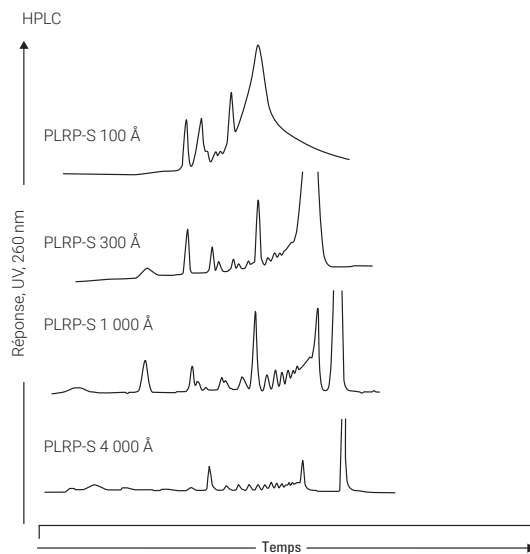
Plage de pH	1–14
Quantité de tampon	Illimitée
Agent modificateur	1–100 %
Limite de température	200 °C
Pression maximale	3 µm : 275 bars/4 000 psi
	5 µm, 8 µm et 10 µm : 207 bars/3 000 psi
	10–15 µm, 15–20 µm et 30 µm : 103 bars/1 500 psi

Applications des colonnes PLRP-S

Diamètre des pores	Application
100 Å	Synthèse/petites molécules
300 Å	Peptides et protéines recombinants
1 000 Å	Grosses protéines
4 000 Å	Séparations rapides/ADN

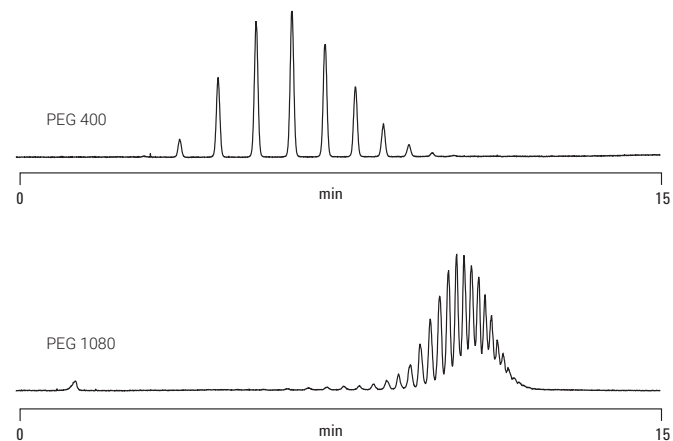
HPLC d'échelle de poids moléculaire d'ADN de 25 pb

Colonne : PLRP-S, 2,1 x 150 mm
Phase mobile : A : TEAA 100 mM
B : TEAA 100 mM dans 50 % eau:50 % ACN
Débit : 200 µL/min
Gradient : 12,5–50 % de B en 150 min



Polyéthylènes glycols

Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1111-3500
4,6 x 150 mm, 5 µm
Phase mobile : A : H₂O
B : ACN
Débit : 1 mL/min
Volume d'injection : 10 µL
Gradient : 10–30 % de B en 12 min, palier à 30 % de B pendant 3 minutes
Détecteur : ELS (néb. = 50 °C, évap. = 70 °C, gaz = 1,6 L/min)
Concentration de l'échant. : 1 mg/mL



Exploitation de la stabilité chimique : concentration en TFA

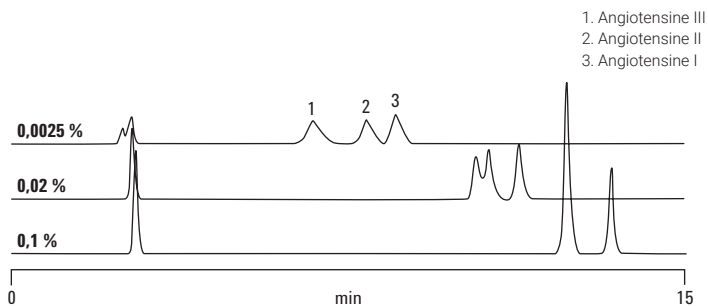
Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Phase mobile : A : TFA (à différents %) dans l'eau
B : TFA (à différents %) dans ACN

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : linéaire, 12–40 % de B en 15 min

Détecteur : ELS (néb. = 75 °C, évap. = 85 °C, gaz = 1,0 L/min)



Exploitation de la stabilité chimique : concentration en NH₄OH

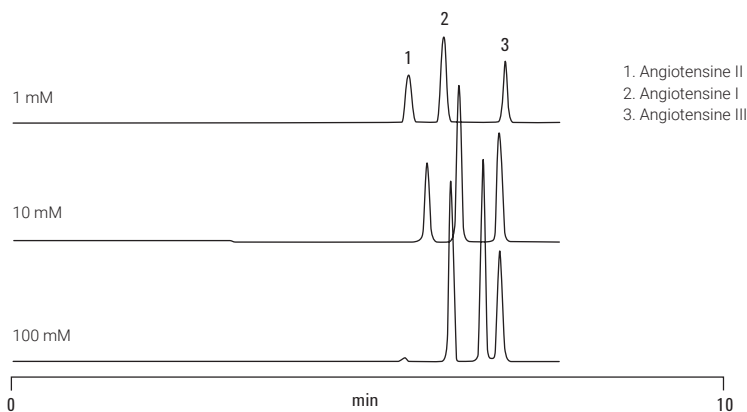
Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Phase mobile : A : NH₄OH (à différentes molarités) dans l'eau
B : NH₄OH (à différentes molarités) dans ACN

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : linéaire, 10–100 % de B en 15 min

Détecteur : ELS (néb. = 80 °C, évap. = 85 °C, gaz = 1,0 L/min)



Mélange test de l'API (Alberta Peptide Institute)

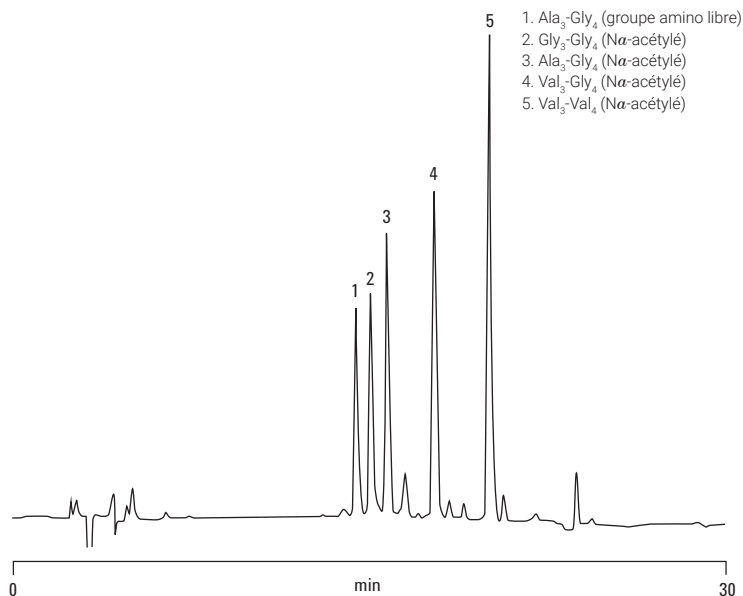
Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4,6 x 250 mm, 5 µm

Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans 99 % eau:1 % ACN
B : 0,1 % TFA dans 70 % eau:30 % ACN

Débit : 1 mL/min

Gradient : 0–100 % de B en 30 min

Détecteur : UV, 220 nm



Protéines du lactosérum dans des échantillons de produits laitiers : lait

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

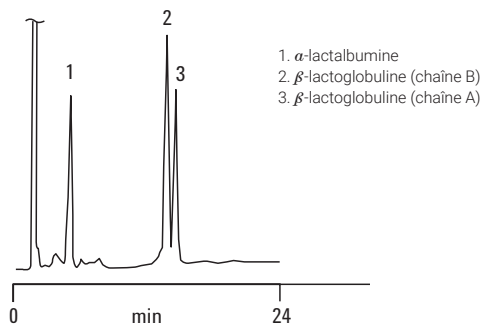
Phase mobile : A : 0,1 % TFA dans 99 % eau: 1 % ACN
B : 0,1 % TFA dans 1 % eau : 99 % ACN

Débit : 1,0 mL/min

Volume d'injection : 10 µL

Gradient : 36–48 % de B, 0–24 min, 48–100 % de B, 24–30 min
100 % de B, 30–35 min, 100–36 % de B, 35–40 min

Détecteur : UV, 220 nm



Température comme outil permettant d'augmenter le transfert de masse et d'améliorer la résolution de la HPLC en phase inverse des oligonucléotides

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

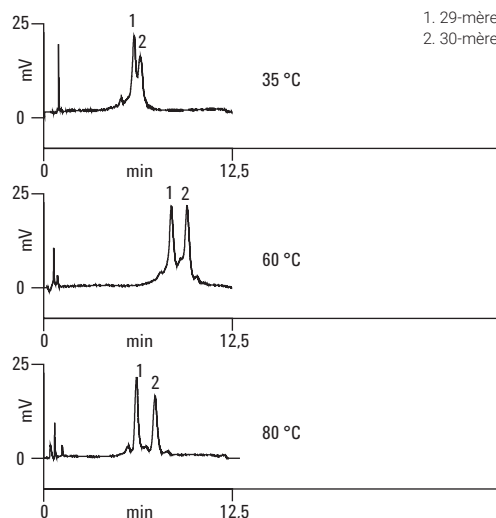
Phase mobile : A : TEAA 100 mM
B : TEAA 100 mM dans 25 % ACN

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 5 % de modification du tampon B sur 5 min

Température : 35 °C, 60 °C ou 80 °C

Détecteur : UV, 254 nm



Protéines fibreuses de grande taille

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

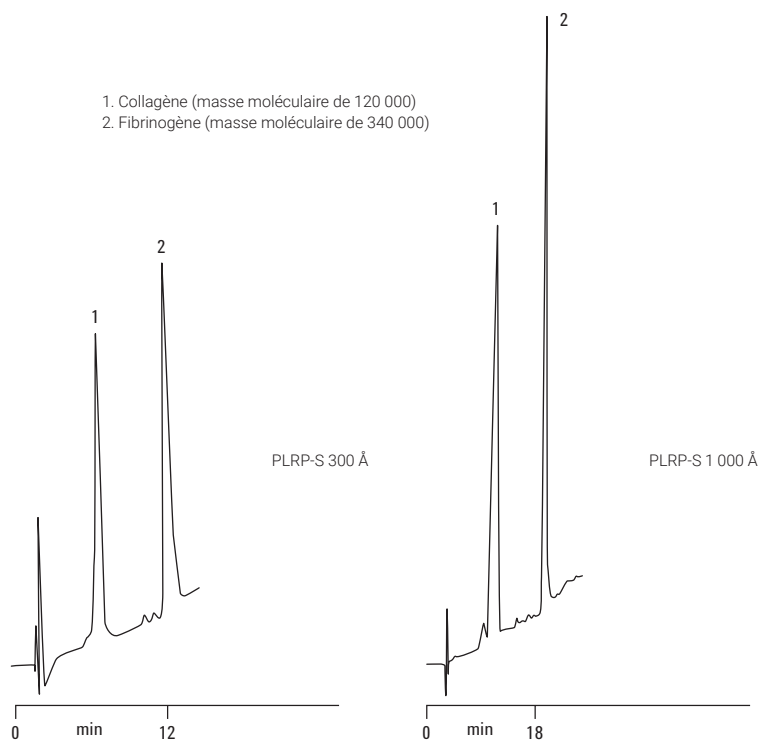
Phase mobile : A : 0,25 % TFA dans l'eau
B : 0,25 % TFA dans 5 % eau:95 % ACN

Débit : 1,0 mL/min

Volume d'injection : 10 µL

Gradient : 20–60 % de B en 15 min

Détecteur : UV, 220 nm



Colonnes PLRP-S pour la HPLC

Taille (mm)	Granulométrie (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
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			
Cartouches de garde PLRP-S pour 3,0 x 5,0 mm, 2/pqt		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
Porte-cartouche de garde pour cartouches 3,0 x 5,0 mm		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

Conseils et outils

Les informations pour commander les colonnes microbore sont indiquées **page 169**.

Vous trouverez les informations pour commander les supports et les colonnes PLRP-S, de l'échelle préparative à l'échelle des procédés, en **page 182**.

Cartouche de dessalage Agilent AdvanceBio Desalting-RP

Dessalage en phase inverse pour l'élimination en ligne des ions salins avant la détection par MS

Les chromatographies par affinité, à échange d'ions et d'exclusion stérique sont des techniques couramment utilisées dans l'analyse de protéines telles que les anticorps monoclonaux. Elles nécessitent toutefois des phases mobiles aqueuses qui contiennent des sels non volatils. Ces phases mobiles posent un problème pour l'utilisation de la détection par MS, car elles entraînent la suppression du signal et peuvent contaminer le détecteur de masse avec une accumulation de sels se traduisant par une augmentation des opérations de maintenance et de l'indisponibilité de l'instrument. Le problème peut être résolu avec les cartouches Agilent AdvanceBio Desalting-RP, qui permettent l'élimination en ligne des ions salins de façon rapide et efficace avant la détection par MS. Ces colonnes de type cartouche peuvent être utilisées seules avec n'importe quel instrument de LC pour dessaler les fractions collectées, ou comme seconde dimension sur un LC 2D 1290 Infinity II, afin d'effectuer le dessalage après la séparation dans la première dimension.



Cartouche de dessalage Agilent
AdvanceBio Desalting-RP, réf. PL1612-1102,
et porte-cartouche, réf. 820999-901

Cartouche de dessalage Agilent AdvanceBio Desalting-RP

Description	Référence
AdvanceBio Desalting-RP, 2,1 mm x 12,5 mm, 2/pqt	PL1612-1102
Porte-cartouche	820999-901

AdvanceBio pour oligonucléotides

La réussite des séparations d'oligonucléotides déprotégés (trityl off) nécessite des colonnes ayant un fort pouvoir de résolution et suffisamment robustes pour supporter des conditions d'analyse difficiles.

Les colonnes Agilent AdvanceBio pour oligonucléotides comportent des particules partiellement poreuses Poroshell de 2,7 µm à haute efficacité. À l'aide d'une technologie Agilent exclusive, nous modifions chimiquement ces particules afin de les rendre extrêmement résistantes aux phases mobiles à pH élevé. Nous effectuons aussi un greffage avec une phase C18 post-silanisée offrant une excellente sélectivité pour les oligonucléotides. De plus, nous testons chaque lot de supports AdvanceBio pour oligonucléotides avec un étalon de résolution pour garantir des performances de qualité constante.

La gamme de produits AdvanceBio a été conçue pour offrir des performances exceptionnelles et constantes pour la caractérisation complète des peptides, protéines, anticorps, conjugués, nouveaux composés biologiques et produits biopharmaceutiques.



Spécifications des colonnes

Phase greffée	Granulométrie	Diamètre des pores	Limite de température	Plage de pH	Post-silanisée	Limite de pression
C18	2,7 µm	100 Å	65 °C	3,0–11,0	Double	600 bars

Colonne : AdvanceBio pour oligonucléotides 2,1 x 50 mm (réf. 659750-702)

Phase mobile : A : HFIP:TEA (400 mM:15 mM) dans l'eau
B : MeOH:phase mobile A (50:50)

Débit : 0,4 mL/min

Gradient : 30–40 % de B en 0,5 min ; 40–70 % de B en 5 min

Échantillon : ADN 25-mère

Température : 65 °C

Détection : UV à 260 nm

Détection : MS

Plage min. : m/z 400

Plage max. : m/z 1 700

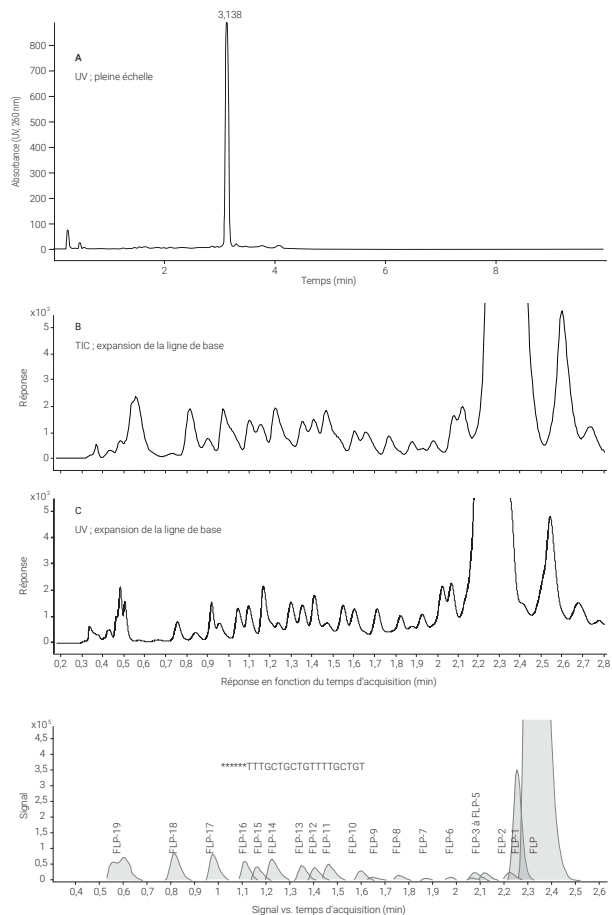
Taux de balayage : 3,00 spectres/s

Polarité ionique : inverse

Vcap : 3 500

Tension de la buse : 1 000 V

Fragmenteur : 200



Données déconvoluées à partir du chromatogramme d'ions totaux
d'un ADN 25-mère obtenu avec une colonne Agilent AdvanceBio pour
oligonucléotides

AdvanceBio pour oligonucléotides

Description	d.i. (mm)	Longueur (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
Conventionnelle	2,1	150	2,7	653750-702
Conventionnelle	2,1	100	2,7	655750-702
Conventionnelle	2,1	50	2,7	659750-702
UG Gard, 600 bars	2,1	5	2,7	821725-921
Conventionnelle	4,6	150	2,7	653950-702
Conventionnelle	4,6	100	2,7	655950-702
Conventionnelle	4,6	50	2,7	659950-702
UG Gard, 600 bars	4,6	5	2,7	820750-921

Étalons d'oligonucléotides AdvanceBio

Afin de garantir les performances de vos séparations, chaque lot de support AdvanceBio pour oligonucléotides est testé avec l'étalon Agilent de résolution pour oligonucléotides. Cet étalon contient des oligonucléotides de synthèse 14-mère, 17-mère, 20-mère et 21-mère et est conçu pour démontrer la résolution de N par rapport à N-1.

Colonne : AdvanceBio pour oligonucléotides
2,1 x 50 mm
(réf. 659750-702)

Phase mobile : A : TEAA 100 mM dans l'eau
B : TEAA 100 mM dans l'acétonitrile

Gradient : 6 à 8 % de B en 12 min

Fin d'analyse : 13 min

Durée

postanalyse : 5 min

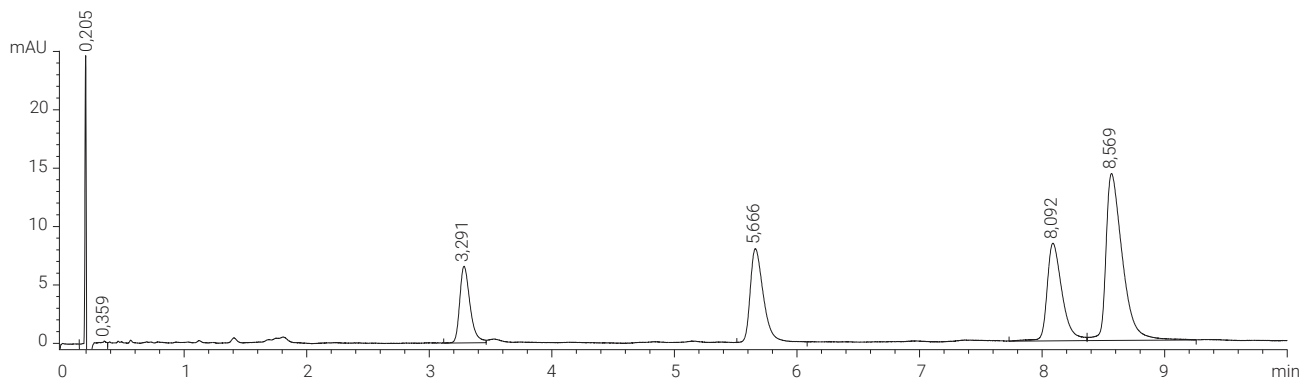
Débit : 0,6 mL/min

Échantillon : Étalon de résolution Agilent pour
oligonucléotides (réf. 5190-9028)

Température : 65 °C

Injection : 0,5 µL

Détection : UV à 260 nm



Agilent propose également une échelle de poids moléculaire pour oligonucléotides contenant des oligo-déoxythymidines de synthèse de 15, 20, 25, 30, 35 et 40 nucléotides, un outil excellent pour démontrer la sélectivité et la reproductibilité de la colonne.

Colonne : AdvanceBio pour oligonucléotides
2,1 x 50 mm
(réf. 659750-702)

Phase mobile : A : TEAA 100 mM dans l'eau

B : TEAA 100 mM dans l'acétonitrile

Gradient : 10 à 14 % de B en 10 min

Fin d'analyse : 11 min

Durée

postanalyse : 5 min

Débit : 0,6 mL/min

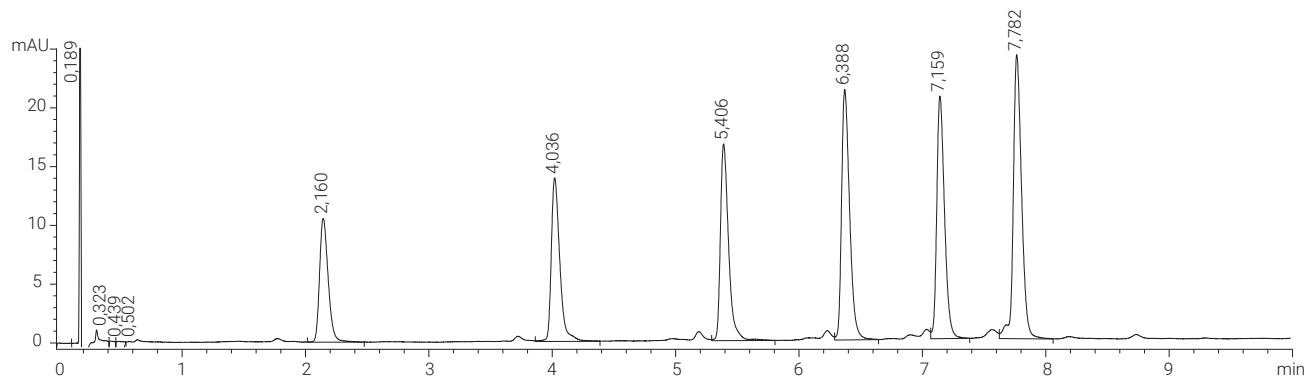
Température

de colonne : 65 °C

Échantillon : échelle de poids moléculaire Agilent pour
oligonucléotides (réf. 5190-9029)

Injection : 10 µL

Détection : UV à 260 nm

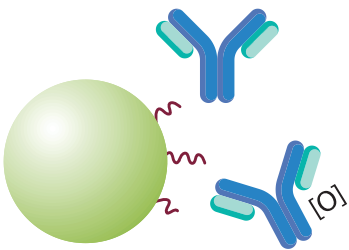


Étalons d'oligonucléotides AdvanceBio

Description	Référence
Étalon de résolution pour oligonucléotides	5190-9028
Échelle de poids moléculaire pour oligonucléotides	5190-9029

Analyse des protéines intactes avec la chromatographie par interaction hydrophobe

AdvanceBio HIC



Les colonnes AdvanceBio HIC permettent les séparations à haute résolution, robustes et reproductibles de protéines natives intactes.

Fabriquées en exploitant les capacités d'une technologie d'interaction exclusive et des particules ZORBAX totalement poreuses, ces colonnes offrent des niveaux inédits d'hydrophobicité et une phase unique polyvalente pour les analyses de molécules particulièrement difficiles, comme les anticorps monoclonaux (mAb), les conjugués anticorps-médicament (ADC) et les autres protéines recombinantes.

Associée au LC bio-inerte 1260 Infinity II, la colonne AdvanceBio HIC fournit des performances irréprochables et des données de qualité constante lors de la caractérisation et de la validation.

- Sélectivité optimisée et parfaitement adaptée à la détermination de l'oxydation des mAb et du nombre moyen de cytotoxiques par anticorps (le DAR) des ADC.
- Phase unique qui réduit la nécessité du criblage sur plusieurs colonnes pour les différents CQA.
- Plus grande solidité améliorant la durée de vie de la colonne pour une meilleure fiabilité de vos données.
- Performances éprouvées, chaque lot de support étant testé avec des mAb du NIST.
- Haute qualité garantie, car chaque colonne est testée individuellement pour assurer l'efficacité du remplissage.
- Productivité supérieure grâce aux colonnes plus courtes qui diminuent le temps d'analyse tout en maintenant de hautes performances de séparation.

Spécifications des colonnes

Diamètre des pores	Granulométrie	Seuil de température	Plage de pH	Limite de pression	Débit*
450 Å	3,5 µm	60 °C (à pH 7)	2,0-8,0 (à 35 °C)	400 bars (pression opérationnelle typique <200 bars)	0,5-1,0 mL/min (4,6 mm de d.i.)

*Dans certains cas, la diminution du débit à 0,3 mL/min et l'augmentation de la durée du gradient peuvent encore améliorer la résolution.

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

Éluant A : sulfate d'ammonium 2 M,
phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

Éluant B : phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

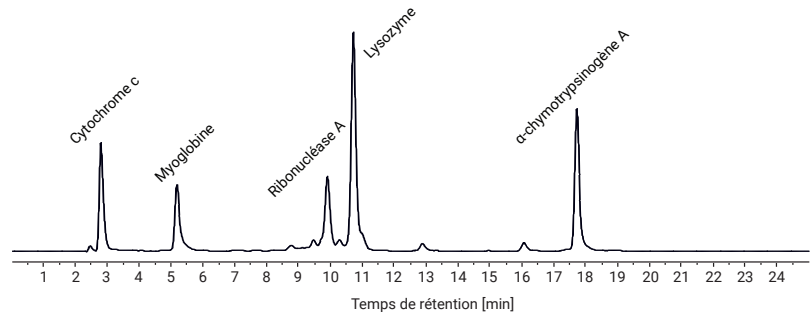
Gradient :	Temps (min)	% de A	% de B
	0	100	0
	20	0	100
	25	0	100
	30	100	0
	40	100	0

Débit : 0,5 mL/min

Température : 30 °C

Volume d'injection : 5 µL

Détection : UV, 220 nm



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

Éluant A : sulfate d'ammonium 2 M,
phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

Éluant B : phosphate de sodium 50 mM, pH 7,0

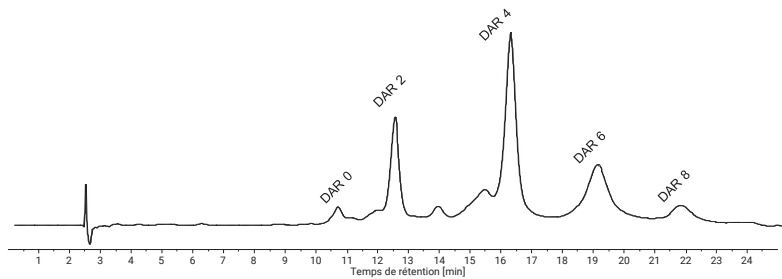
Gradient :	Temps (min)	% de A	% de B	% de C
	0	50	45	5
	20	0	75	25
	25	0	75	25
	30	50	45	5
	40	50	45	5

Débit : 0,5 mL/min

Température : 30 °C

Volume d'injection : 5 µL

Détection : UV, 220 nm



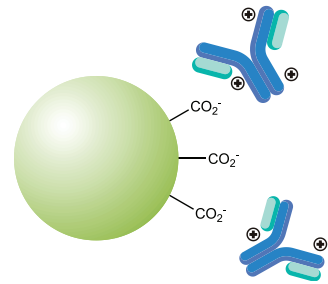
Colonnes Agilent AdvanceBio HIC

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

Analyse des isoformes

Purifiez les protéines et les autres molécules chargées

La chromatographie à échange d'ions (IEX) est une technique très sensible qui permet de séparer les ions et les molécules polaires selon leur charge. Tout comme la SEC, l'IEX peut servir à séparer les protéines à l'état natif.



Application de l'IEX à l'analyse des isoformes

Pendant leur production et purification, les anticorps peuvent connaître des changements d'hétérogénéité de la charge dus aux substitutions d'acides aminés, à la glycosylation, à la phosphorylation et à d'autres modifications post-traductionnelles ou chimiques. Puisque ces changements peuvent affecter leur stabilité et leur activité ou provoquer des effets immunologiques indésirables, l'analyse de l'hétérogénéité de la charge des anticorps monoclonaux (mAb) est essentielle pour la fabrication des produits biopharmaceutiques.

Dans l'analyse des protéines, les variations de la charge à un pH déterminé indiquent un changement de structure primaire qui aboutit à des formes supplémentaires de la protéine. Il s'agit d'isoformes (ou isoformes de charge) qui peuvent être séparées par IEX. L'IEX est aussi utile comme technique préparative.

Puisque ces variations peuvent affecter leur stabilité et leur activité ou provoquer des effets immunologiques indésirables, l'analyse des isoformes est essentielle pour la fabrication des produits biopharmaceutiques.

Principal fournisseur de l'industrie biopharmaceutique, Agilent sait que la qualité et la régularité sont indispensables pour apporter des traitements thérapeutiques sûrs et hautement efficaces. Nos colonnes échangeuses d'ions BioHPLC offrent la vitesse, la résolution et la reproductibilité requises pour fournir de manière rapide et rentable des produits révolutionnaires à ceux qui en ont besoin.

Les pages suivantes décrivent la gamme d'Agilent d'échangeurs d'ions forts et faibles, anioniques et cationiques.

- Les colonnes Bio IEX non poreuses sont conçues pour permettre des séparations à haute résolution, haute efficacité et capacité de rendement élevée.
- Les colonnes Bio MAb sont optimisées pour la séparation des isoformes des anticorps monoclonaux.
- Les colonnes d'IEX poreuses (PL-SAX et PL-SCX) sont chimiquement stables et disponibles dans deux porosités différentes afin que vous puissiez séparer les peptides, oligonucléotides et protéines de très grande taille.
- Les colonnes Bio-Monolith pour IEX sont parfaitement adaptées aux séparations d'anticorps, de virus et d'ADN.
- Le logiciel Buffer Advisor est la solution idéale pour la séparation des protéines automatisée avec des gradients de force ionique.

Conseils et outils

Pour plus d'informations sur le logiciel Agilent Buffer Advisor, reportez-vous à la publication n° **5991-1408EN**

www.agilent.com/search

Sélection des colonnes échangeuses d'ions

Application	Colonnes Agilent	Notes
Anticorps monoclonaux	Bio MAB	La caractérisation complète des anticorps monoclonaux inclut l'identification et le contrôle des isoformes acides et basiques. Les colonnes de HPLC Bio MAB contiennent une résine exclusive conçue spécialement pour les séparations à haute résolution basées sur la charge des anticorps monoclonaux.
Peptides et protéines	Bio IEX	Les colonnes Bio IEX sont remplies de particules échangeuses d'ions polymériques non poreuses. Les colonnes Bio IEX non poreuses sont conçues pour permettre des séparations à haute résolution, capacité de rendement élevée et haute efficacité.
Protéines, peptides et oligonucléotides de synthèse déprotégés	PL-SAX	La fonction d'échange d'anions forts, qui est liée de manière covalente à un polymère chimiquement stable et totalement poreux, étend la plage de pH opérationnel. En outre, la capacité d'échange d'anions est indépendante du pH. Pour les oligonucléotides de synthèse, toutes les séparations réalisées dans des conditions dénaturantes en termes de température, de solvant organique et de pH élevé, sont possibles. Le support de 5 µm fournit des séparations à haute résolution, tandis que le support de 30 µm est utilisé pour la chromatographie en phase liquide à moyenne pression.
	• 1 000 Å • 4 000 Å	
Peptides et protéines globulaires	PL-SAX 1 000 Å	
Biomolécules de très grande taille/haute vitesse	PL-SAX 4 000 Å	
Des petits peptides jusqu'aux protéines de grande taille et aux biomolécules de très grande taille	PL-SCX	La phase PL-SCX est une matrice de PS/DVB macroporeuse dotée d'un revêtement très hydrophile et d'une fonction d'échange de cations forts. Ce procédé est contrôlé afin d'optimiser la densité des groupes d'échange de cations forts pour l'analyse, la séparation et la purification d'une vaste gamme de biomolécules. Le support de 5 µm fournit des séparations à haute résolution, tandis que le support à 30 µm est utilisé pour la chromatographie en phase liquide à pression moyenne.
	• 1 000 Å • 4 000 Å	
Anticorps (IgG, IgM), ADN plasmidiques, virus, phages et autres macrobiomolécules	Bio-Monolith	Phases échangeuses de cations forts, ainsi que phases échangeuses d'anions forts et faibles. Bio-Monolith Les colonnes de HPLC sont compatibles avec la série LC InfinityLab.
	• Bio-Monolith QA • Bio-Monolith DEAE • Bio-Monolith SO ₃	
Virus, ADN, protéines de grande taille	Bio-Monolith QA	
ADN plasmidiques, bactériophages	Bio-Monolith DEAE	
Protéines, anticorps	Bio-Monolith SO ₃	

Colonnes de HPLC Bio MAb

- Remplissage composé de billes non poreuses, rigides et sphériques de polystyrène/divinylbenzène (PS/DVB) fortement réticulé
- Particules greffées avec une couche de polymère hydrophile, éliminant pratiquement les liaisons non spécifiques des protéines d'anticorps
- Utilisation d'un procédé différent pour déposer la phase échangeuse de cations faibles sur les particules leur conférant une densité plus importante que les particules des colonnes Bio WCX
- Spécialement conçues pour la séparation des isoformes des anticorps monoclonaux

La caractérisation complète des anticorps monoclonaux inclut l'identification et le contrôle des isoformes acides et basiques. Les colonnes de HPLC Bio MAb contiennent une résine exclusive conçue spécialement pour les séparations à haute résolution basées sur la charge des anticorps monoclonaux. Ces colonnes sont compatibles avec les tampons aqueux, les mélanges acétonitrile/acétone/méthanol et les mélanges contenant de l'eau. Les tampons couramment utilisés sont les tampons phosphate, TRIS, MES et acétate.

Les colonnes Bio MAb sont disponibles en granulométries de 1,7, 3, 5 et 10 µm, pour une meilleure résolution avec des particules plus petites.

Spécifications des colonnes

Phase greffée	d.i.	Granulométrie	Stabilité au pH	Seuil de température de fonctionnement	Débit
Échange de cations faibles (carboxylate)	2,1 et 4,6 mm	1,7, 3, 5 et 10 µm	2–12	80 °C	0,1–1,0 mL/min

Conseils et outils

Souhaitez-vous augmenter votre cadence d'analyse des isoformes d'anticorps monoclonaux ? Si c'est le cas, reportez-vous à la publication suivante :

Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies
(publication n° **5991-4722EN**)

www.agilent.com/search



Des séparations de mAb par échange d'ions d'une qualité constante

Colonne : Bio MAb, PEEK

5190-2407

4,6 x 250 mm, 5 µm

Détecteur : UV, 225 nm

Phase mobile : A : phosphate de sodium 10 mM, pH 5,5

B : A + chlorure de sodium 0,5 M

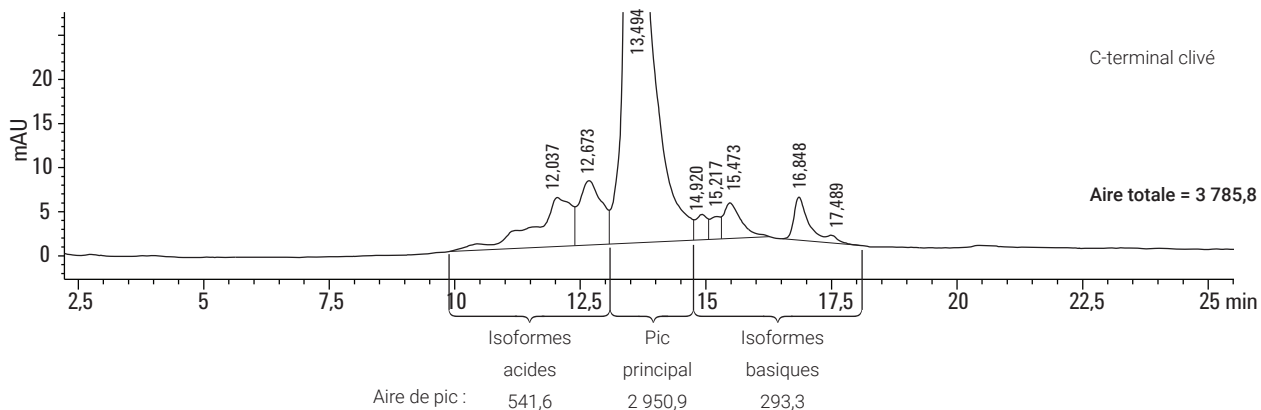
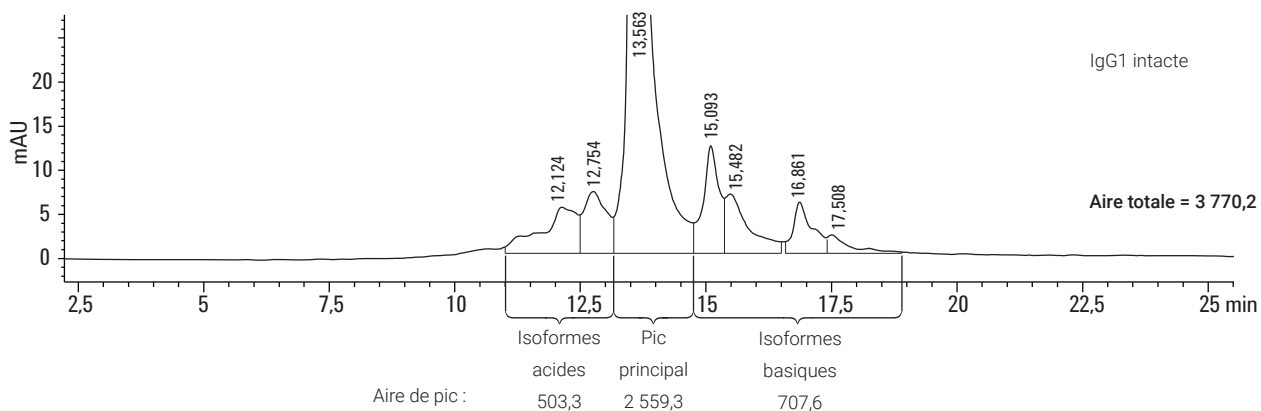
Échantillon : 5 µg à partir d'une solution à 1 mg/mL d'IgG1 intacte ou clivée en C-terminal

Débit : 0,85 mL/min

Instrument : LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity ou

Gradient : 10 à 35 % de B de 0 à 25 min
(sauf indication contraire)

LC série 1100



Calculs pour une IgG1 clivée en C-terminal avec une colonne Bio MAb de 5 µm sur le LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity.

Reproductibilité et précision : les colonnes Bio MAb permettent des quantifications précises avec des méthodes robustes

Colonne : Bio MAb, PEEK
5190-2407
4,6 x 50 mm, 5 µm

Phase mobile : A : tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,0
B : tampon bicarbonate de sodium 10 mM, pH 9,5

Débit : 1,0 mL/min

Volume d'injection : 10 µL (aiguille avec rinçage, orifice de rinçage actif pendant 7 s)

Gradient :

Temps (min)	% de B
0	0
25	100
27	100
30	0

Acquisition de données : 214 et 280 nm

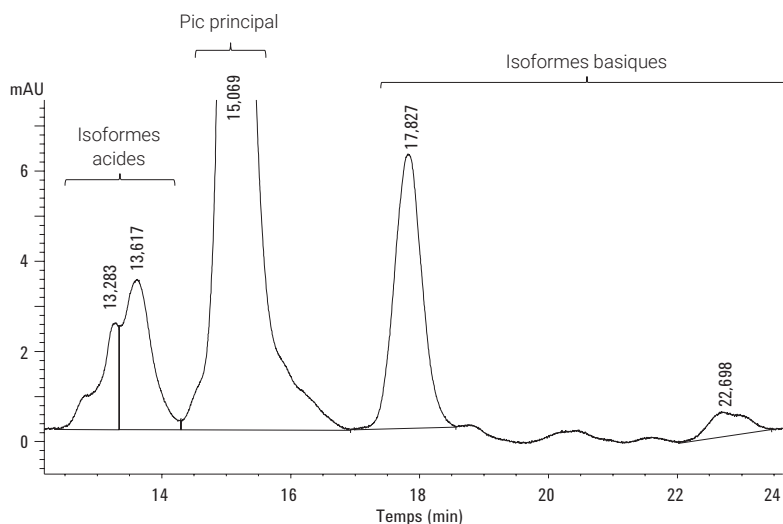
Fréquence d'acquisition : 20 Hz

Cellule : trajet de 60 mm

Température de colonne : 30 °C

Thermostat d'échantillon : 50 °C

Durée postanalyse : 5 min



Séparation des fragments Fab et Fc du trastuzumab par échange de cations faibles

Colonne : Bio MAb, PEEK
5190-2411
2,1 x 250 mm, 5 µm

Phase mobile : A : MES 20 mM, pH 5,6
B : MES 20 mM, pH 5,6 + NaCl 300 mM

Débit : 170 µL/min

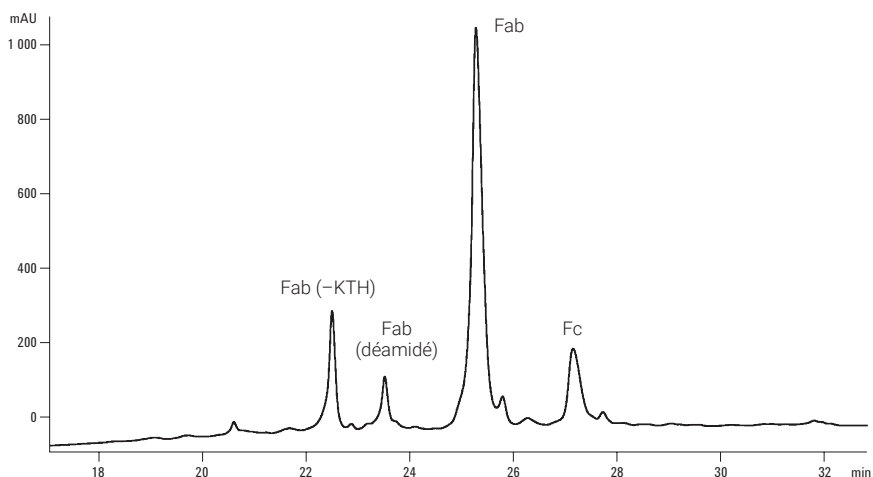
Volume d'injection : 16 µL

Gradient :

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

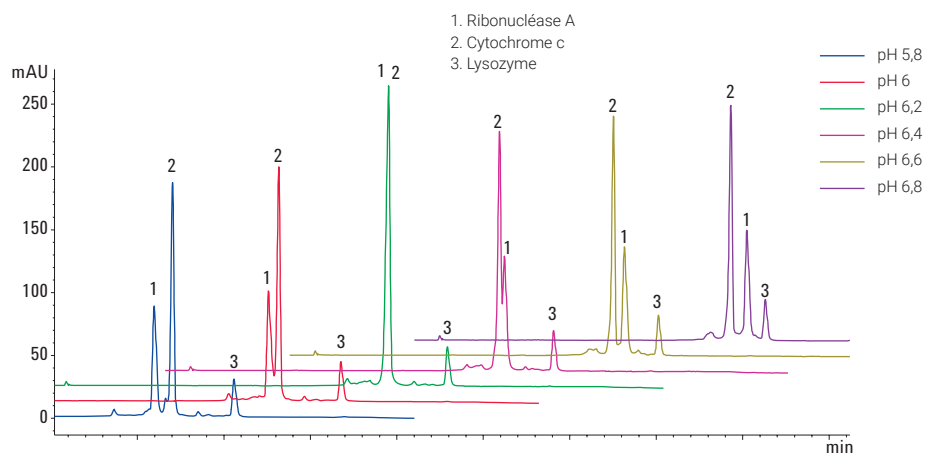
Température : 30 °C

Instrument : série 1100



Développement de méthodes à l'aide du logiciel Agilent Buffer Advisor : détermination du pH optimal

Colonne :	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4,6 x 250 mm, 5 µm		
Instrument :	LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity	Gradient :	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
Tampon :	A : H ₂ O B : NaCl 3 M C : MES (acide 2-[N-morpholino] éthane sulfonique) 60 mM D : MES-Na (sel de sodium de l'acide 2-[N-morpholino] éthane sulfonique)		
35 mM		Volume d'injection :	10 µL
Échantillon :	mélange de trois protéines, dissous dans du PBS (tampon phosphate salin), pH 7,4 Ribonucléase A : 13 700 Da, pI 9,6 Cytochrome c : 12 384 Da, pI 10–10,5 Lysozyme : 14 307 Da, pI 11,35	Thermostat :	4 °C
		Température de colonne :	25 °C
		DAD :	280 nm/4 nm
		Référence :	non utilisée
Débit :	1 mL/min	Largeur de pic :	>0,05 min (temps de réponse de 1,0 s) (5 Hz)



Exploration du pH pour la séparation d'un mélange de trois protéines avec des gradients quaternaires mélangés dynamiquement

Élimination quasi totale des variations des temps de rétention

Colonne : Bio MAb, inox
5190-2413
4,6 x 250 mm, 10 µm

Phase mobile : A : phosphate de sodium 10 mM, pH 6,0
 B : A + chlorure de sodium 1,0 M

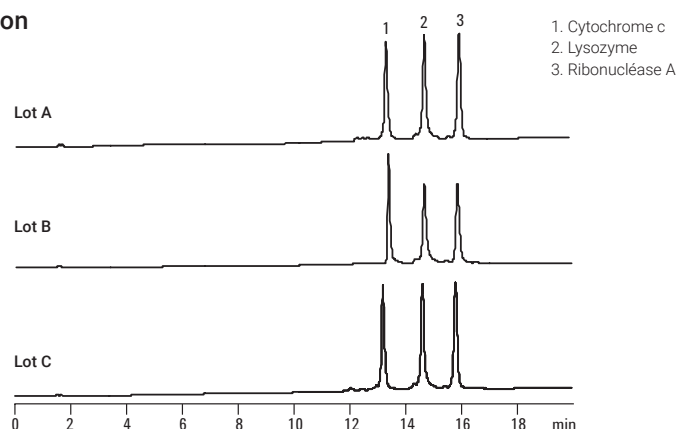
Débit : 1,0 mL/min

Gradient : 0–100 % de B en 42 min

Température : 25 °C

Détecteur : UV, 214 nm

L'association entre le contrôle parfait de la production de la résine, la chimie de surface et le remplissage de la colonne parvient à quasiment éliminer les variations des temps de rétention d'une colonne à l'autre et d'un lot à l'autre.



Colonnes Agilent HPLC Bio MAb

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Bio MAb, PEEK	Limite de pression	Bio MAb, inox	Limite de pression
21,2 x 250	5			5190-6885	275 bars, 4 000 psi
10 x 250	5			5190-6884	275 bars, 4 000 psi
4,6 x 250	10	5190-2415	275 bars, 4 000 psi	5190-2413	275 bars, 4 000 psi
4,6 x 50	10	5190-2416	275 bars, 4 000 psi		
4,6 x 250	5	5190-2407	400 bars, 5 800 psi	5190-2405	400 bars, 5 800 psi
4,6 x 50	5	5190-2408	400 bars, 5 800 psi		
4,6 x 50	3			5190-2403	551 bars, 8 000 psi
4,6 x 50	1,7			5190-2401	600 bars, 8 700 psi
4,0 x 10, colonne de garde	10			5190-2414	275 bars, 4 000 psi
4,0 x 10, colonne de garde	5			5190-2406	413 bars, 6 000 psi
4,0 x 10, colonne de garde	3			5190-2404	551 bars, 8 000 psi
4,0 x 10, colonne de garde	1,7			5190-2402	600 bars, 8 700 psi
2,1 x 250	10	5190-2419	275 bars, 4 000 psi		
2,1 x 50	10	5190-2420	275 bars, 4 000 psi		
2,1 x 250	5	5190-2411	400 bars, 5 800 psi		
2,1 x 50	5	5190-2412	400 bars, 5 800 psi		

Colonnes HPLC Bio IEX

- Les particules non poreuses et rigides de polystyrène/divinylbenzène (PS/DVB) fortement réticulé sont greffées avec une couche de polymère hydrophile, éliminant ainsi les liaisons non spécifiques
- Des groupes fonctionnels échangeurs d'ions uniformes et concentrés sont greffés chimiquement sur la couche hydrophile (plusieurs groupes échangeurs d'ions par site) afin d'augmenter la capacité de la colonne
- Les particules, le revêtement et le greffage résistent aux pressions élevées, augmentant ainsi la résolution et la rapidité des séparations
- Plusieurs groupes échangeurs d'ions sont capturés sur un même site pour une capacité supérieure



Les colonnes HPLC Bio IEX sont remplies avec des particules échangeuses d'ions polymériques non poreuses. Elles sont conçues pour réaliser des séparations à haute résolution des peptides, oligonucléotides et protéines, avec une capacité de rendement élevée et une haute efficacité.

La gamme Bio IEX comprend des phases échangeuses de cations forts (SCX), échangeuses de cations faibles (WCX), échangeuses d'anions forts (SAX) et échangeuses d'anions faibles (WAX). Toutes ces phases sont disponibles avec des particules non poreuses de 1,7, 3, 5 et 10 μm .

Spécifications des colonnes

Phase greffée	d.i.	Granulométrie	Stabilité au pH	Seuil de température de fonctionnement	Débit
SCX (échangeuse de cations forts) $-\text{SO}_3\text{H}$	2,1 et 4,6 mm	1,7, 3, 5 et 10 μm	2–12	80 °C	0,1–1,0 mL/min
WCX (échangeuse de cations faibles) $-\text{COOH}$					
SAX (échangeuse d'anions forts) $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$					
WAX (échangeuse d'anions faibles) $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$					

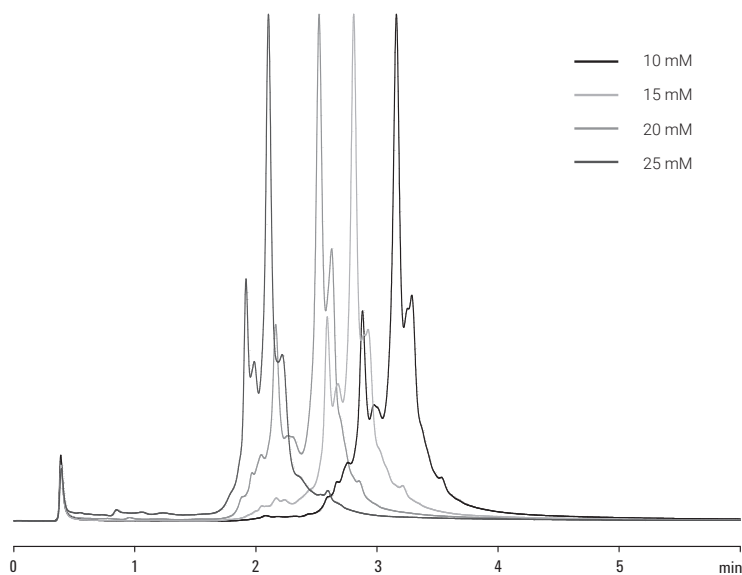
Conseils et outils

Pour plus d'informations sur la façon d'optimiser votre analyse d'isoformes, reportez-vous aux publications suivantes : *Ion-exchange chromatography for biomolecule analysis: a "how-to" guide* (publication n° **5991-3775EN**) et *Colonnes échangeuses d'ions BioHPLC Agilent, Caractériser les isoformes de charges de protéines de manière rapide et fiable* (publication n° **5991-2449FR**)

www.agilent.com/search

Accélération et simplification des procédures d'analyse des isoformes

Colonne :	Bio WCX, inox 5190-2443 4,6 x 50 mm, 3 µm	Gradient :	conditions des chromatogrammes présentés :
	Bio SCX, inox 5190-2423 4,6 x 50 mm, 3 µm		pH 5,0 à 7,0, force ionique de 10 à 25 mM chlorure de sodium (NaCl) 0 à 500 mM, 0 à 15 min chlorure de sodium (NaCl) 500 mM, 15 à 20 min Expériences de détermination des conditions pH 5,0 à 7,0 NaCl 0 à 200 mM, 0 à 250 mM et 0 à 300 mM
Phase mobile :	A : eau	Température :	ambiante
	B : chlorure de sodium 1,5 M		
	C : phosphate monosodique 40 mM	Détecteur :	UV, 220 nm
	D : Phosphate disodique 40 mM	Échantillon :	anticorps monoclonal IgG
	Des solutions tampon dans la plage de pH et la force ionique souhaitées ont été préparées en combinant des proportions prédéfinies de C et D, comme établi par le logiciel Buffer Advisor.	Concentration de l'échant. :	2 mg/mL (dans un tampon phosphate de sodium, 20 mM, pH 6,0)
Débit :	1,0 mL/min	Instrument :	LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity
Volume d'injection :	10 µL		



Automatisation du développement de méthodes pour l'optimisation des séparations d'isoformes. Optimisation de la force ionique à pH 6,5, réalisée à partir d'une série de chromatogrammes d'une séparation d'IgG monoclonale.

Accélérez vos séparations avec des particules plus petites et des colonnes plus courtes, en diminuant votre temps d'analyse de 30 %

Colonne : Bio WCX, inox
5190-2445
4,6 x 250 mm, 5 µm

Bio WCX, inox
5190-2443
4,6 x 50 mm, 3 µm

Phase mobile : A : phosphate de sodium 20 mM, pH 6,5
B : A + chlorure de sodium 1,6 M

Débit : 1,0 mL/min

Volume d'injection : 10 µL

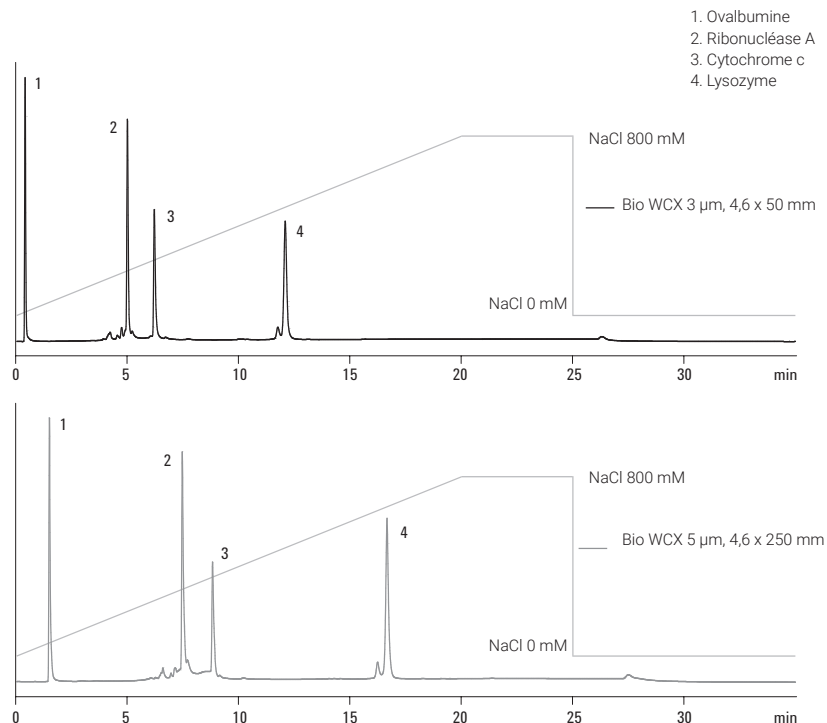
Gradient : 0 à 50 % de B

Température : ambiante

Détecteur : UV, 220 nm

Concentration de l'échant. : 0,5 mg/mL

Instrument : LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity



Comparaison de séparations de protéines effectuées sur une colonne Bio WCX 4,6 x 50 mm, 3 µm et une colonne Bio WCX 4,6 x 250 mm, 5 µm (débit de 1,0 mL/min). Des temps d'analyse plus rapides ont été obtenus avec une granulométrie inférieure et une colonne plus courte ; l'élution de l'échantillon s'est effectuée en 17 min sur la colonne plus longue et en seulement 12 min sur la colonne plus courte.

Les granulométries plus petites augmentent la résolution

Colonne : Bio WCX, inox
5190-2443
4,6 x 50 mm, 3 μ m

Bio WCX, inox
5190-2441
4,6 x 50 mm, 1,7 μ m

Phase mobile : A : phosphate de sodium 20 mM, pH 6,5
B : A + chlorure de sodium 1,6 M

Volume d'injection : 10 μ L

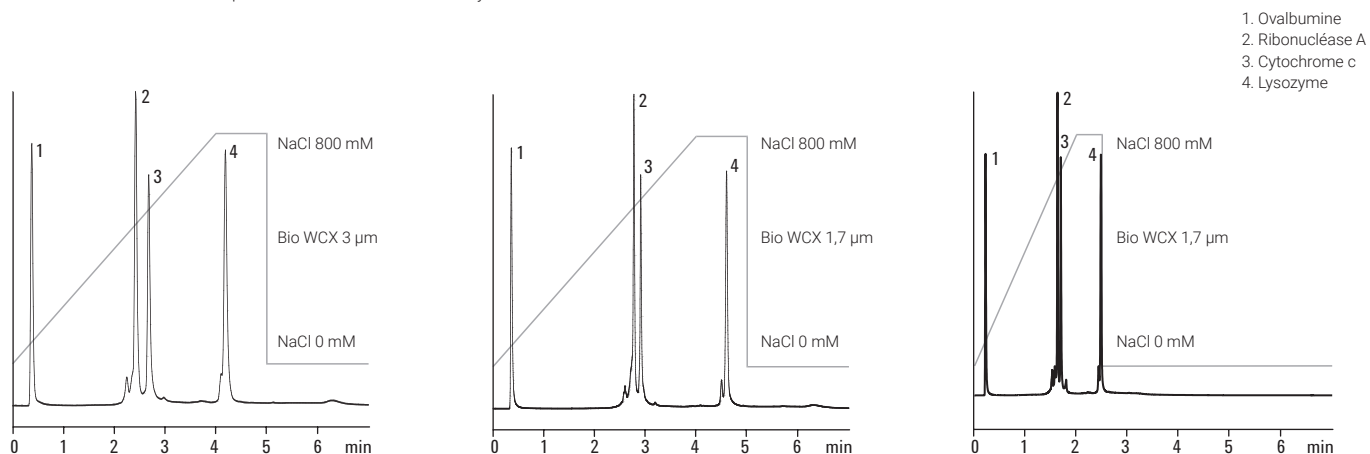
Gradient : 0 à 50 % de B

Température : ambiante

Détecteur : UV, 220 nm

Concentration de l'échant. : 0,5 mg/mL

Instrument : LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity



À gauche et au milieu : comparaison de séparations de protéines effectuées sur une colonne Bio WCX 3 μ m et une colonne Bio WCX 1,7 μ m (débit de 1,0 mL/min).

À droite : l'augmentation du débit à 1,7 mL/min a permis de réduire le temps d'analyse à moins de 3 minutes. (Une colonne Bio WCX a été utilisée.)

Réduisez le temps d'analyse en augmentant le débit, sans sacrifier la forme et la résolution des pics.

Analyse des protéines avec une colonne échangeuse d'anions sur le LC quaternaire bio-inerte 1260 Infinity

Colonne :	Bio WAX, PEEK 5190-2487 4,6 x 250 mm, 5 µm
Tampon :	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, [(CH ₃) ₄ N]Cl 1 M
Gradient 1 M :	5 min–100 % de A 20 min–70 % de B 25 min–100 % de B
Gradient 2 M :	5 min–100 % de A 20 min–35 % de B 25 min–50 % de B 25,01 min–100 % de B
Fin d'analyse :	30 min
Durée postanalyse :	20 min
Température :	25 °C
Débit :	0,5 mL/min
Volume d'injection :	5 µL
DAD :	280 nm
Largeur de pic :	0,025 min (temps de réponse de 0,5 s) (10 Hz)

Pour plus d'informations, reportez-vous
à la note d'application n° 5990-9614EN
(www.agilent.com/search)

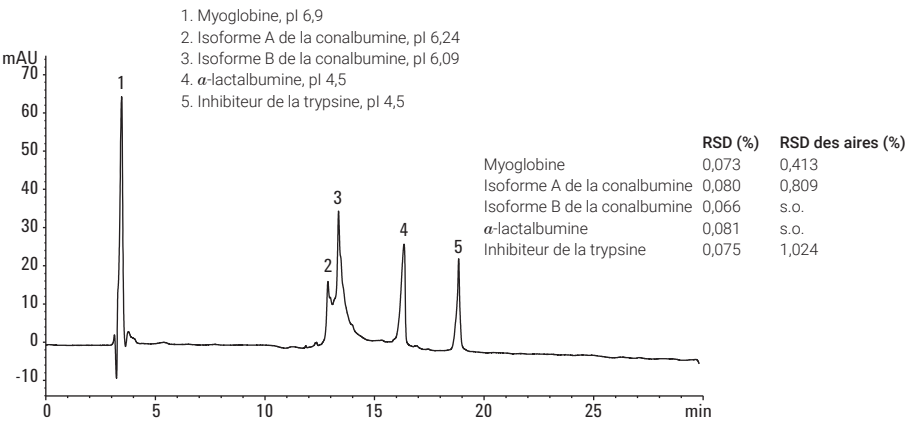


Figure 1. Séparation de protéines par échange d'anions avec un gradient linéaire et une solution d'élution de NaCl 2 M.

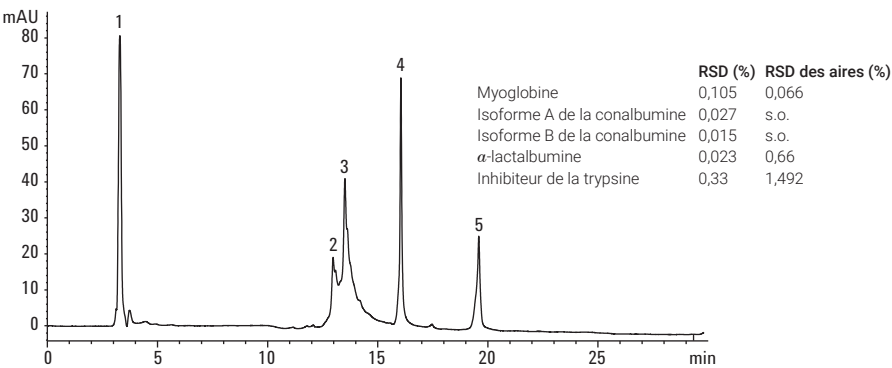


Figure 2. Séparation de protéines par échange d'anions avec un gradient linéaire et une solution d'élution de KCl 1 M.

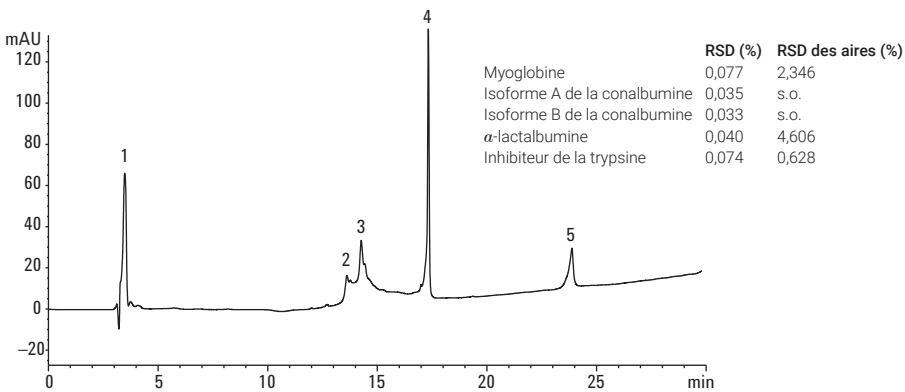


Figure 3. Séparation de protéines par échange d'anions avec un gradient linéaire et une solution d'élution de [(CH₃)₄N]Cl 1 M.

Colonnes de HPLC Bio IEX, PEEK

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Limite de pression	Bio SCX Référence	Bio WCX Référence	Bio SAX Référence	Bio WAX Référence
4,6 x 250	10	275 bars, 4 000 psi	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4,6 x 50	10	275 bars, 4 000 psi	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4,6 x 250	5	400 bars, 5 800 psi	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4,6 x 50	5	400 bars, 5 800 psi	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2,1 x 250	10	275 bars, 4 000 psi	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2,1 x 50	10	275 bars, 4 000 psi	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2,1 x 250	5	400 bars, 5 800 psi	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2,1 x 50	5	400 bars, 5 800 psi	5190-2432	5190-2442	5190-2462	5190-2492

Conseils et outils

Utilisez les filtres pour solvants d'Agilent afin d'éliminer les particules des tampons et des phases mobiles que vous préparez vous-même.

Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

Colonnes de HPLC Bio IEX, inox

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Limite de pression	Bio SCX Référence	Bio WCX Référence	Bio SAX Référence	Bio WAX Référence
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 bars, 4 000 psi	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4,6 x 250	5	413 bars, 6 000 psi	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4,6 x 150	3					5190-6875
4,6 x 50	3	551 bars, 8 000 psi	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4,6 x 50	1,7	600 bars, 8 700 psi	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
4,0 x 10, colonne de garde	10	275 bars, 4 000 psi	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4,0 x 10, colonne de garde	5	413 bars, 6 000 psi	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4,0 x 10, colonne de garde	3	551 bars, 8 000 psi	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4,0 x 10, colonne de garde	1,7	600 bars, 8 700 psi	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

Conseils et outils

Pour plus d'informations, reportez-vous aux publications suivantes :

Optimizing protein separations with Agilent weak cation-exchange columns (publication n° **5990-9628EN**)

Faster separations using Agilent weak cation-exchange columns (publication n° **5990-9931EN**)

pH Gradient elution for improved separation of monoclonal antibody variants (publication n° **5990-9629EN**)

Optimizing protein separations with cation-exchange chromatography using Agilent Buffer Advisor (publication n° **5991-0565EN**)

www.agilent.com/search

Colonnes échangeuses d'anions forts PL-SAX

- La faible granulométrie permet d'obtenir d'excellentes performances chromatographiques
- La vaste gamme de granulométries et les deux diamètres de pores permettent la transposition d'échelle de l'analyse à la purification
- La stabilité exceptionnelle favorise l'allongement de la durée de vie de la colonne

La phase PL-SAX $-N(CH_3)_3^+$ est idéale pour la séparation par HPLC à échange d'anions des protéines, peptides et oligonucléotides de synthèse déprotégés dans des conditions dénaturantes. Le groupe fonctionnel d'échange d'anions forts, lié de manière covalente à un polymère chimiquement stable et totalement poreux, étend la plage de pH opérationnel.

En outre, la capacité d'échange d'anions est indépendante du pH. Pour les oligonucléotides de synthèse, toutes les séparations réalisées dans des conditions dénaturantes en termes de température, de solvant organique et de pH élevé, sont possibles. La phase PL-SAX améliore la séparation des séquences autoccomplémentaires ou riches en guanine, qui peuvent s'associer et former des agrégats ou des structures en forme d'épingle à cheveux. Le matériau d'une granulométrie de 5 μm fournit des séparations à haute efficacité des séquences N et N-1.

La vaste gamme de granulométries et de géométries de colonne permet la transposition d'échelle de l'analyse à la purification. La fonction d'échange d'anions forts assure une stabilité chimique et thermique exceptionnelle du matériau, même avec des éluants contenant de l'hydroxyde de sodium, ce qui donne des colonnes à longue durée de vie.



Spécifications des colonnes

Phase greffée	d.i. (mm)	Granulométrie (μm)	Diamètre des pores	Stabilité au pH	Seuil de température de fonctionnement
Échange d'anions forts	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 et 100	5, 8, 10 et 30	1 000 Å et 4 000 Å	1–14	80 °C

Séparation de protéines par échange d'ions standard

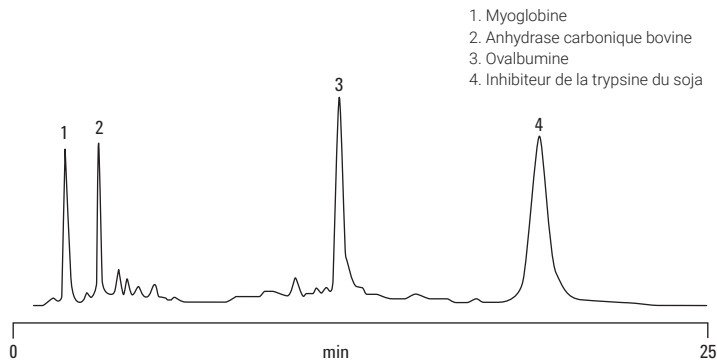
Colonne : PL-S 1 000 Å
PL1551-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Phase mobile : A : TRIS HCL 10 mM, pH 8
B : A + chlorure de sodium 350 mM+ pH 8

Gradient : 0–100 % de B en 20 min

Débit : 1,0 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm



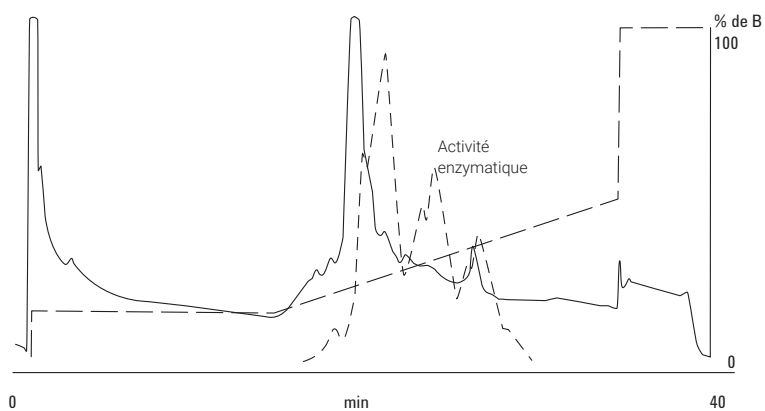
Analyse de la choline kinase

Colonne : PL-SAX 4 000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

Phase mobile : A : TRIS 20 mM, 5 % éthylène glycol, pH 7,5
(Les composés suivants sont nécessaires pour préserver l'activité enzymatique)
Acide éthylène glycol tétra-acétique 1,0 mM
β-mercaptoéthanol 2,0 mM
Fluorure de phénylméthylsulfonyl 0,2 mM
B : A + chlorure de potassium 1 M

Débit : 3,0 mL/min

Détecteur : UV, 280 nm



Séparation présentée avec l'aimable autorisation de
T. Porder, Purdue University, États-Unis

Analyse de protéines représentatives du lactosérum

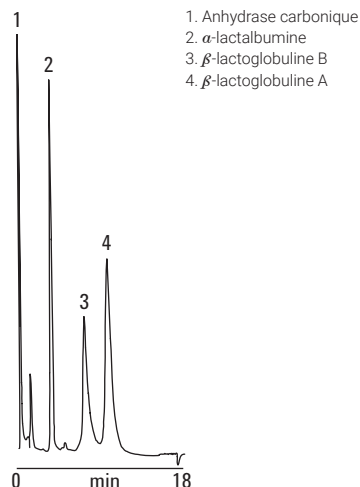
Colonne : PL-S 1 000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

Phase mobile : A : Tris HCl 20 mM, pH 7
B : A + acétate de sodium 500 mM, pH 7

Débit : 1,0 mL/min

Gradient : linéaire, 0–50 % de B en 10 min

Détecteur : UV, 280 nm



**Séparations fiables d'oligonucléotides de synthèse ;
séparation à haute résolution d'un marqueur de taille
d'oligonucléotides poly-T, enrichi avec des oligonucléotides
10-mère, 15-mère, 30-mère et 50-mère (pics principaux)**

Colonne : PL-S 1 000 Å
PL1551-1802
4,6 x 50 mm, 8 µm

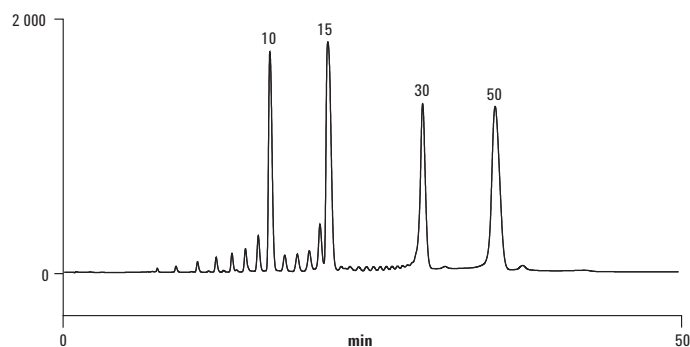
Phase mobile : A : 7:93 (v/v) ACN : TEAA 100 mM, pH 8,5
B : 7:93 (v/v) ACN : TEAA 100 mM, chlorure d'ammonium 1 M, pH 8,5

Gradient : 0–40 % de B en 10 min, suivi de 40–70 % de B en 14 min et 70–100 % de B en 25 min

Débit : 1,0 mL/min

Température : 60 °C

Détecteur : UV, 220 nm



Séparation à haute résolution d'oligonucléotides poly-T. Le gradient utilisé a permis la séparation à la ligne de base des pics N et N-1 jusqu'à l'oligonucléotide 15-mère.

Colonnes échangeuses d'anions forts PL-SAX

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Limite de pression	PL-SAX 1 000 Å	PL-SAX 4 000 Å
100 x 300	10	207 bars, 3 000 psi	PL1851-2102	PL1851-2103
50 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1751-3702	PL1751-3703
50 x 150	10	207 bars, 3 000 psi	PL1751-3102	PL1751-3103
25 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1251-3702	PL1251-3703
25 x 150	10	275 bars, 4 000 psi	PL1251-3102	PL1251-3103
25 x 50	10	207 bars, 3 000 psi	PL1251-1102	PL1251-3103
4,6 x 250	30	207 bars, 3 000 psi	PL1551-5702	PL1551-5703
4,6 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1551-3702	PL1551-3703
4,6 x 250	10	207 bars, 3 000 psi	PL1551-5102	PL1551-5103
4,6 x 150	10	207 bars, 3 000 psi	PL1551-3102	PL1551-3103
4,6 x 150	8	207 bars, 3 000 psi	PL1551-3802	PL1551-3803
4,6 x 50	8	207 bars, 3 000 psi	PL1551-1802	PL1551-1803
4,6 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1551-1502	PL1551-1503
2,1 x 150	8	207 bars, 3 000 psi	PL1951-3802	PL1951-3803
2,1 x 50	8	207 bars, 3 000 psi	PL1951-1802	PL1951-1803
2,1 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1951-1502	PL1951-1503
1,0 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1351-1502	PL1351-1503

Matériau en vrac d'échange d'anions forts PL-SAX

Quantité	Granulométrie (µm)	Limite de pression	PL-SAX 1 000 Å	PL-SAX 4 000 Å
100 g	30	207 bars, 3 000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bars, 3 000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103

Colonnes échangeuses de cations forts PL-SCX

- Conception optimale pour une séparation efficace des biomolécules
- Diamètres de pores permettant l'analyse de solutés de tailles diverses
- Stabilité exceptionnelle qui favorise l'allongement de la durée de vie de la colonne



La phase PL-SCX $-\text{SO}_3$ est une matrice de PS/DVB macroporeuse dotée d'un revêtement très hydrophile et d'une fonction d'échange de cations forts. Ce procédé est contrôlé afin d'optimiser la densité des groupes d'échange de cations forts pour l'analyse, la séparation et la purification d'une vaste gamme de biomolécules allant des petits peptides aux protéines de grande taille. Deux diamètres de pores sont disponibles (1 000 Å et 4 000 Å), afin d'offrir de bonnes caractéristiques de transfert de masse pour diverses tailles de solutés.

Le support de 5 μm fournit des séparations à haute résolution, tandis que le support de 30 μm est utilisé pour la chromatographie en phase liquide à moyenne pression.

Spécifications des colonnes

Phase greffée	d.i. (mm)	Granulométrie (μm)	Diamètre des pores	Stabilité au pH	Seuil de température de fonctionnement
Échange de cations forts	2,1, 4,6, 7,5, 25, 50 et 100	5, 8, 10 et 30	1 000 Å et 4 000 Å	1–14	80 °C

Séparation de protéines standard

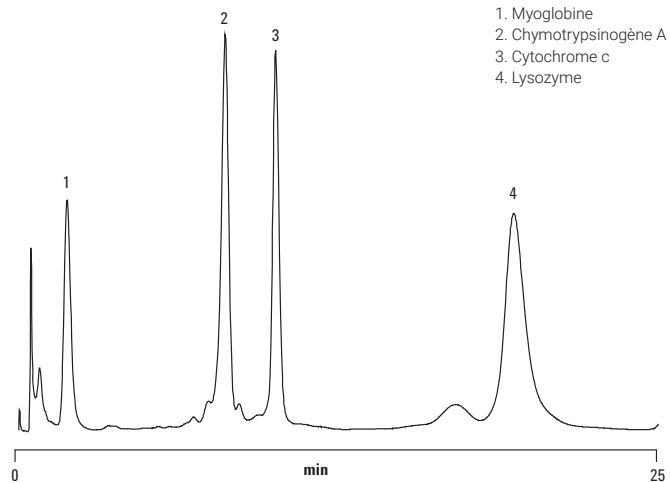
Colonne : PL-SCX 1 000 Å
PL1545-1502
4,6 x 50 mm, 5 µm

Phase mobile : A : phosphate monopotassique 20 mM, pH 6,0
B : A + chlorure de sodium 1 M

Gradient : 0–100 % de B en 20 min

Débit : 1,0 mL/min

Détecteur : UV, 280 nm



Colonnes échangeuses de cations forts PL-SCX

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Limite de pression	PL-SCX 1 000 Å	PL-SCX 4 000 Å
100 x 300	10	207 bars, 3 000 psi	PL1845-2102	PL1845-2103
50 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1745-3703	PL1745-3703
50 x 150	10	207 bars, 3 000 psi	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	207 bars, 3 000 psi	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	207 bars, 3 000 psi	PL1245-1102	PL1245-1103
4,6 x 250	30	207 bars, 3 000 psi	PL1545-5703	PL1545-5703
4,6 x 150	30	207 bars, 3 000 psi	PL1545-3702	PL1545-3703
4,6 x 250	10	207 bars, 3 000 psi	PL1545-5102	PL1545-5103
4,6 x 150	10	207 bars, 3 000 psi	PL1545-3102	PL1545-3103
4,6 x 150	8	207 bars, 3 000 psi	PL1545-3802	PL1545-3803
4,6 x 50	8	207 bars, 3 000 psi	PL1545-1802	PL1545-1803
4,6 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1545-1502	PL1545-1503
2,1 x 150	8	207 bars, 3 000 psi	PL1945-3802	PL1945-3803
2,1 x 50	8	207 bars, 3 000 psi	PL1945-1802	PL1945-1803
2,1 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1945-1502	PL1945-1503
1,0 x 50	5	207 bars, 3 000 psi	PL1345-1502	PL1345-1503

Matériau en vrac d'échange de cations forts PL-SCX

Taille (mm)	Granulométrie (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

Conseils et outils

Les colonnes et matériaux en vrac PL-SAX et PL-SCX sont également disponibles pour l'échelle préparative et les procédés.

Reportez-vous aux **pages 190–195**.

Colonnes HPLC échangeuses d'ions Bio-Monolith

- Colonnes HPLC monolithiques à base de polymère pour les séparations de macromolécules
- Séparations indépendantes du débit ; l'absence de diffusion, de pores et de volume mort favorise un transfert très rapide entre la phase mobile et la phase stationnaire
- Disque monolithique de 5,2 x 4,95 mm (volume de colonne de 100 µL) avec canaux continus, éliminant le transfert de masse par diffusion
- Séparations extrêmement rapides pour accélérer le développement de méthodes et diminuer les coûts; le verrouillage des paramètres de méthode nécessite considérablement moins de temps et de tampon

Les colonnes HPLC échangeuses d'ions Bio-Monolith permettent d'effectuer avec rapidité et à haute résolution les séparations d'anticorps (IgG, IgM), d'ADN plasmidiques, de virus, de phages et des autres macromolécules. Notre gamme inclut des phases échangeuses de cations forts, échangeuses d'anions forts et faibles, ainsi que des phases protéine A. Les colonnes HPLC Bio-Monolith sont compatibles avec la série LC InfinityLab.



Colonne HPLC échangeuses d'ions Bio-Monolith

Guide de sélection des colonnes HPLC Bio-Monolith

Colonne	Description	Principales applications	Référence
Bio-Monolith QA	La phase greffée amine quaternaire (échangeuse d'anions forts) est entièrement chargée sur une plage de pH opérationnel de 2–13 et se lie aux biomolécules chargées négativement.	– Surveillance de procédé et contrôle-qualité pour les adénovirus – Suivi et contrôle-qualité de la purification des IgM – Contrôle de l'élimination des impuretés d'ADN – Contrôle de l'élimination des endotoxines – Pureté de la sérumalbumine humaine	5069-3635
Bio-Monolith DEAE	La phase greffée diéthylaminoéthyle (échangeuse d'anions faibles) offre une meilleure sélectivité pour les biomolécules chargées négativement sur une plage de pH opérationnel de 3–9.	– Surveillance de procédé et contrôle-qualité de la fabrication et de la purification des bactériophages – Surveillance de procédé et contrôle-qualité de la purification des ADN plasmidiques	5069-3636
Bio-Monolith SO ₃	La phase greffée sulfonyle (échangeuse de cations forts) est entièrement chargée sur une plage de pH opérationnel de 2–13 et se lie avec les biomolécules chargées positivement.	– Séparations analytiques rapides et à haute résolution des molécules de grande taille, telles que les protéines et anticorps – Analyse rapide de l'hémoglobine A1c	5069-3637

Spécifications des colonnes

Dimensions	5,2 mm x 4,95 mm
Volume de la colonne	100 µL
Pression maximale	150 bars (15 MPa, 2 200 psi)
Température min./max.	Utilisation : 2 à 40 °C
	Stockage : 2 à 8 °C
pH recommandé	Plage de fonctionnement : 2–13
	Nettoyage in situ : 1–14
Matériaux de fabrication	Tube : inox
	Remplissage : poly(méthacrylate de glycidyle-co-diméthacrylate d'éthylène glycol) monolithique hautement poreux
Couleur de la bague d'identification	Bio-Monolith QA : bleue
	Bio-Monolith DEAE : verte
	Bio-Monolith SO ₃ : rouge
Cycle de vie/date d'expiration	SO ₃ , QA, DEAE : 24–36 mois

Extension de la ligne de base d'une séparation d'étalons de protéines

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

Phase mobile : A : phosphate disodique 10 mM, pH 6,0
B : A + chlorure de sodium 500 mM
ou uniquement phosphate disodique 500 mM, pH 6,0

Débit : 2 mL/min

Gradient : palier de 0,5 min avec phase mobile A suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 45 % de B en 15 min (temps écoulé : 15,5 min), puis 60 % de B à partir de 15,6 min et jusqu'à 20 min. Rinçage de la colonne avec 100 % de B pendant 15 min avant la stabilisation pour l'analyse suivante.

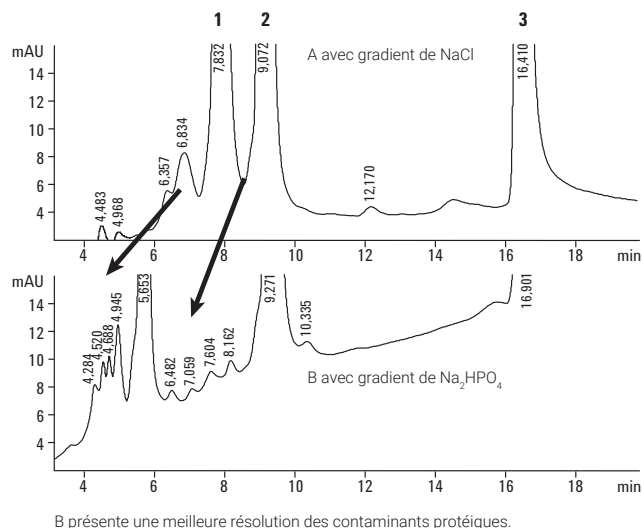
Gradient de pH : A : phosphate disodique 5 mM, tamponné, pH 5,5
et B : phosphate disodique 40 mM (non tamponné, pH 8,9). 2 % de B/min à 1 mL/min pendant 15 min, puis rinçage de la colonne avec 90 % de B pendant 5 min.

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : 1 mg/mL de chacune des molécules suivantes dans la phase mobile A

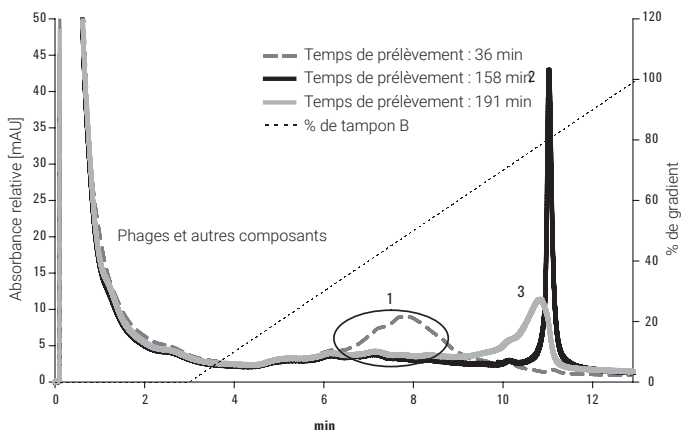
1. RNase de pancréas bovin (pI 9,6)
2. Cytochrome c de cœur bovin (pI 10,37–10,8)
3. Lysozyme d'œuf de poulet (pI 11,35) (0,5 mg)

Instrument : série 1200 Infinity avec détecteur à barrette de diodes



Suivi de la production de phages pendant la fermentation

Colonne :	Bio-Monolith DEAE 5069-3636 5,2 x 4,95 mm
Phase mobile :	A : tampon phosphate de sodium 125 mM, pH 7,0 B : tampon phosphate de sodium 125 mM + chlorure de sodium 1 mM, pH 7,0
Débit :	1 mL/min
Gradient :	100 % de tampon A (2,5 min) 0–100 % de tampon B (10 min) 100 % de tampon A (2 min)
Détecteur :	UV, 280 nm
Instrument :	HPLC à gradient haute pression, série Agilent 1200 Infinity

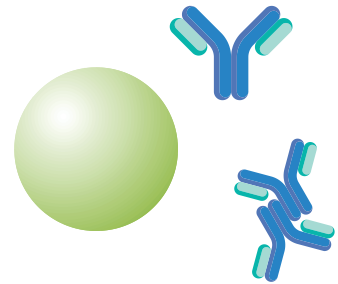


À mesure que la prolifération des phages progresse, la concentration en ADN génomique (ADNg) augmente avec la lyse des cellules hôtes. Lors des dernières phases de la fermentation, l'ADNg commence à se dégrader en fragments. Ces fragments d'ADNg sont difficiles à éliminer avec le milieu de purification et il est donc essentiel d'arrêter le cycle de fermentation avant la dégradation de l'ADNg. Le chromatogramme ci-dessus représente trois échantillons prélevés du bioréacteur à 36, 158 et 191 minutes. Le pic 1 représente les phages, le milieu et les cellules hôtes, le pic 2 l'ADNg intact et le pic 3 l'ADNg fragmenté.



Analyse des fragments et agrégats

Évaluez avec précision l'agrégation, la fragmentation et les ligations/modifications chimiques des biomolécules



La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique de séparation par la taille des protéines, oligonucléotides et autres biopolymères complexes avec des éluants aqueux. Plus précisément, il s'agit d'un outil essentiel pour la quantification des agrégats présents dans les protéines biothérapeutiques. La fabrication de produits biopharmaceutiques, tels que les anticorps monoclonaux, est un processus complexe et l'agrégation des protéines peut survenir pendant les étapes de culture cellulaire, d'isolement, de purification et de formulation. La présence de dimères et d'agrégats de taille supérieure peut affecter tant l'efficacité que la tolérance du produit final ; la quantification de la teneur en agrégats doit être effectuée aussi bien pendant le développement du procédé, afin d'établir les attributs qualité critiques (CQA), que pendant la caractérisation du produit final, afin de faire en sorte que l'étendue de l'agrégation soit minimale et contrôlée à un niveau sûr.

Application de la SEC aux études d'agrégation

La taille, le type et la teneur en agrégats présents dans les protéines biopharmaceutiques peuvent nuire à l'efficacité et à la formulation ou pire, induire une réponse immunitaire. Les agrégats sont formés par l'intermédiaire de divers mécanismes, notamment la formation de ponts disulfures et les interactions non covalentes.

Puisque la taille des agrégats protéiques, y compris celle des dimères, est suffisamment différente de la protéine monomère, il est possible de séparer les différentes formes à l'aide de la SEC. La SEC couplée à un détecteur UV (SEC-UV) ou à un détecteur à diffusion de la lumière (SEC-LS) est une technique courante pour la quantification de l'agrégation des protéines.

Application de la SEC pour la quantification et la détermination des masses moléculaires

Concernant les protéines et les autres molécules de masses moléculaires distinctes, la SEC peut servir à détecter et quantifier les monomères, dimères, agrégats et fragments. Elle permet également de séparer les mélanges d'oligonucléotides.

Pour les biopolymères comportant des chaînes de différentes longueurs, comme les amidons et d'autres polysaccharides, la SEC peut fournir des données sur la distribution des masses moléculaires et les ramifications (en utilisant des détecteurs appropriés).

Fabricant majeur d'instruments et de colonnes SEC depuis plus de 30 ans, Agilent développe continuellement de nouveaux produits permettant des séparations plus rapides avec une meilleure résolution. Cette section décrit la vaste gamme de colonnes SEC d'Agilent pour l'analyse des biopolymères protéiques :

- Les colonnes AdvanceBio SEC existent avec deux granulométries différentes pour les mesures de SEC-UV ou de SEC-LS. Les particules de 2,7 μm sont disponibles avec des pores de 130 Å ou 300 Å de diamètre pour couvrir un large éventail de tailles d'échantillons. Les particules de 1,9 μm ont des pores de 200 Å de diamètre et offrent la résolution la plus élevée. Les deux types de particules ont un revêtement constitué d'un polymère hydrophile réduisant au minimum les interactions secondaires, ce qui les rend adaptées aussi bien aux analyses de routine qu'aux analyses d'échantillons difficiles comme les ADC.
- Les colonnes Bio SEC-3 et Bio SEC-5 sont disponibles avec différents diamètres de pores et conviennent parfaitement aux analyses de protéines avec détection UV ou MS, en particulier pour la détermination de la présence de dimères et d'agrégats dans les produits biologiques thérapeutiques. Notez que les colonnes Bio SEC-3 de 3 μm offrent une meilleure résolution que les colonnes Bio SEC-5 de 5 μm , nos colonnes standard pour ce domaine.
- Les colonnes ProSEC 300S donnent de bons résultats avec les protéines globulaires dans des conditions de salinité élevée.
- Les colonnes ZORBAX GF-250 et GF-450 sont des produits classiques utilisés pour les protocoles devant se conformer à la spécification L35 de la nomenclature de l'USP. Une autre solution consiste à utiliser des colonnes Bio SEC pour des performances améliorées.
- Les colonnes PL Aquagel-OH Agilent peuvent être utilisées pour analyser les biopolymères de masses moléculaires importantes, tels que les PEG, oligo- et polysaccharides, amidons et gommes. Reportez-vous à notre guide des colonnes GPC/SEC aqueuses et polaires (publication n° 5990-7995EN).

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Application	Colonnes Agilent	Notes	Nomenclature de l'USP
Analyse des peptides, protéines et agrégats	AdvanceBio SEC	Solide revêtement en polymère hydrophile minimisant les interactions secondaires ; particules de 2,7 µm avec des pores de 130 Å ou 300 Å de diamètre, ou particules de 1,9 µm avec des pores de 200 Å de diamètre pour une résolution optimale.	L59
	Bio SEC-3	Séparation plus rapide et meilleure résolution avec des particules de 3 µm, avec des pores de 100 Å, 150 Å et 300 Å de diamètre.	L59
Biomolécules et échantillons de grande taille avec composantes de masses moléculaires multiples	Bio SEC-5	Plus d'options de diamètres de pores (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1 000 Å et 2 000 Å) pour couvrir une plus large gamme de composés.	L59
Protéines globulaires, anticorps	ProSEC 300S	Option de colonne unique pour l'analyse des protéines dans des conditions de salinité élevée.	L33
Protéines, protéines globulaires	ZORBAX GF-250/450	Produits classiques utilisés pour les protocoles devant se conformer à la spécification L35 de la nomenclature de l'USP.	L35

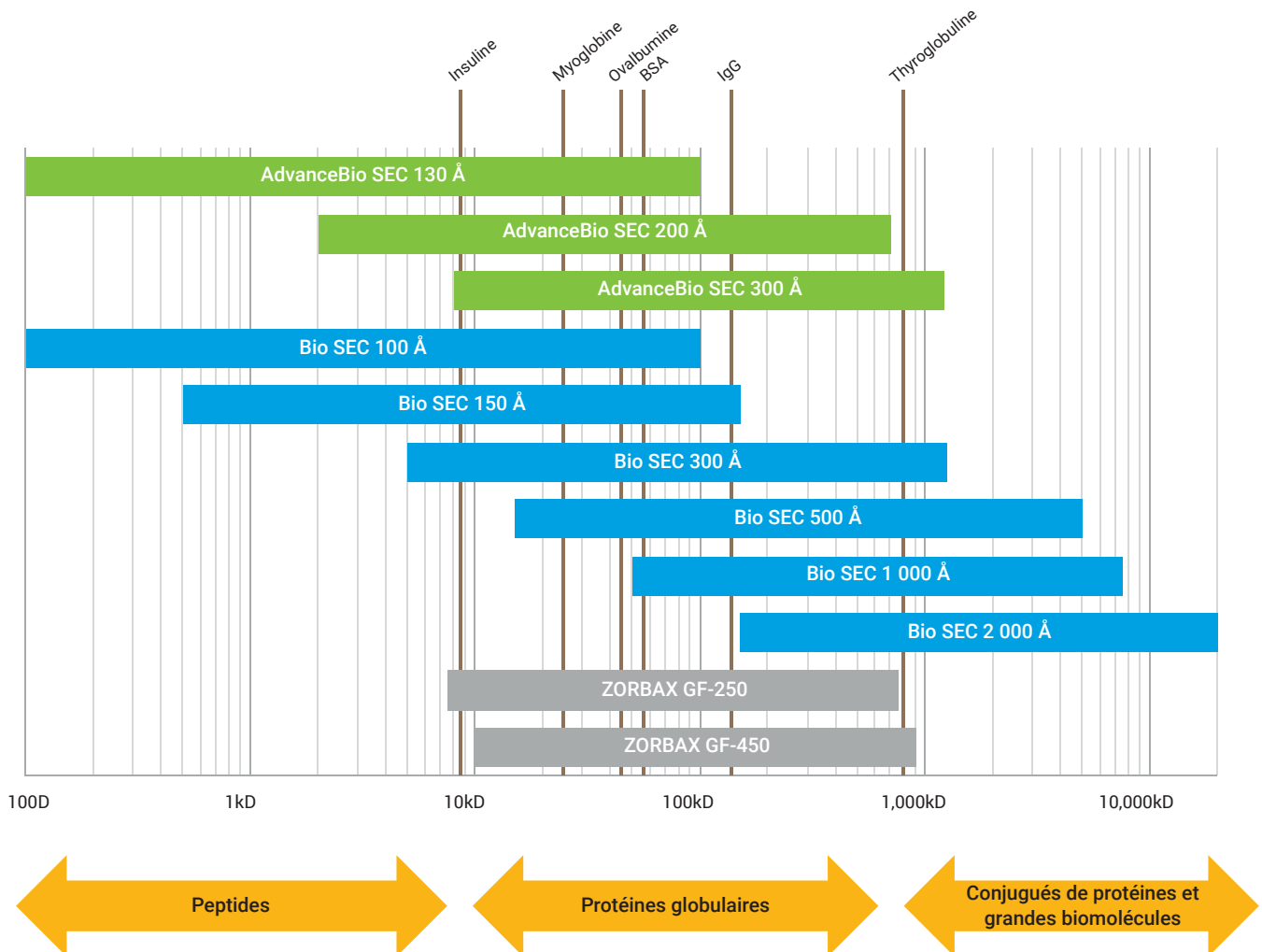
Conseils et outils

Utilisez les filtres pour solvants d'Agilent afin d'éliminer les particules des tampons et des phases mobiles que vous préparez vous-même.

Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/solvent-filters-degassers

Quelle colonne SEC convient à votre application ?

Le large choix de colonnes SEC d'Agilent vous permet d'optimiser vos séparations en fonction de vos composés et paramètres de méthode. Le diagramme ci-dessous présente la gamme de diamètres de pores offrant les meilleurs résultats pour les types de molécules les plus courants. Nous vous recommandons de commencer votre développement de méthodes avec les colonnes AdvanceBio SEC.



AdvanceBio SEC

Les colonnes AdvanceBio SEC permettent une quantification précise et exacte pour l'analyse de l'agrégation des mAb et des protéines. Ces colonnes innovantes de chromatographie d'exclusion stérique ont été conçues et fabriquées par Agilent pour améliorer la productivité du laboratoire en fournissant des méthodes solides et fiables qui éliminent le besoin de refaire des analyses. Elles permettent d'obtenir des résultats cohérents entre colonnes, lots et laboratoires, en garantissant le transfert de méthodes entre les différentes unités ou les différents sites.

- Plus grande vitesse d'analyse pour vous permettre de respecter les délais
- Meilleure résolution pour une quantification plus exacte
- Plus grande sensibilité pour la quantification des agrégats, même à faible concentration
- Meilleure reproductibilité pour éliminer la répétition des analyses
- Étalons conçus spécifiquement pour les colonnes AdvanceBio SEC, vous fournissant les meilleurs étalonnages et vérifications des performances possible

Spécifications des colonnes					
Diamètre des pores	Granulométrie	Plage de masse moléculaire	Plage de pH	Pression max.	Débit
130 Å	2,7 µm	100–120 000	2–8,5	400 bars (pression opérationnelle typique <200 bars)	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 bars (pression opérationnelle typique <200 bars)	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 bars	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

Description	130 Å	300 Å
Colonnes analytiques		
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
Colonnes de garde analytiques		
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

Description	200 Å
Colonnes analytiques	
4,6 x 300 mm, 1,9 µm	PL1580-5201
4,6 x 150 mm, 1,9 µm	PL1580-3201
Colonne de garde	
4,6 x 30 mm, 1,9 µm	PL1580-1201

**Histoires vraies du laboratoire****Reducing complexity drives better lab economics
(La réduction de la complexité permet d'augmenter la rentabilité du laboratoire)**

Découvrez comment l'équipe CrossLab a aidé un grand laboratoire pharmaceutique à gérer plusieurs types d'instruments de différents fournisseurs.

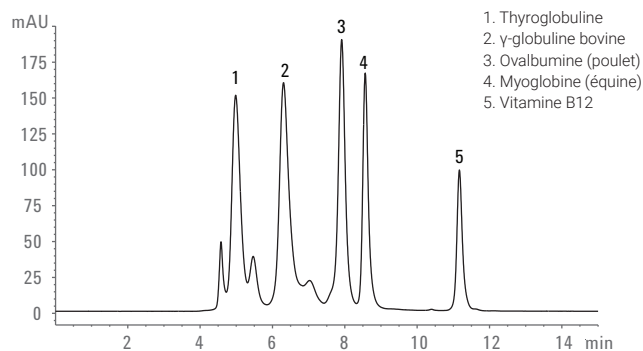
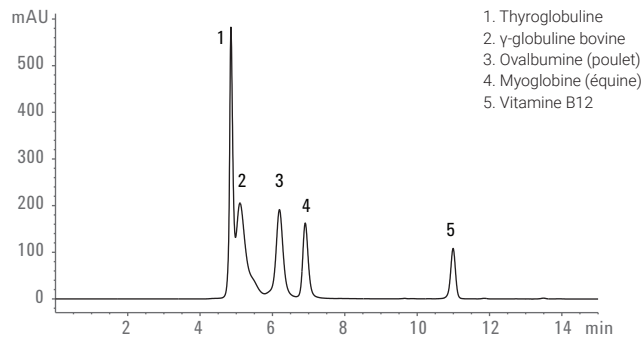
www.agilent.com/chem/story92

Séparations d'un étalon de masse moléculaire pour la SEC

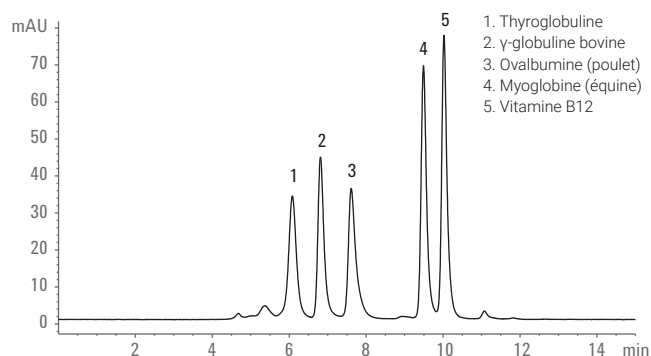
Colonne : **AdvanceBio SEC**
7,8 x 300 mm

Échantillon : étalon pour filtration sur gel BioRad, réf. 1511901

Phase mobile : A : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0



Séparation de l'étalon pour la filtration sur gel BioRad sur colonnes AdvanceBio SEC 300 Å et 130 Å. La colonne 300 Å offre une meilleure résolution.



Chromatogramme de la séparation du mélange de protéines et de peptides avec la colonne AdvanceBio SEC 130 Å montrant la résolution de petits peptides et protéines.

Conditions de démarrage recommandées pour AdvanceBio SEC

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

Débit : 1 mL/min

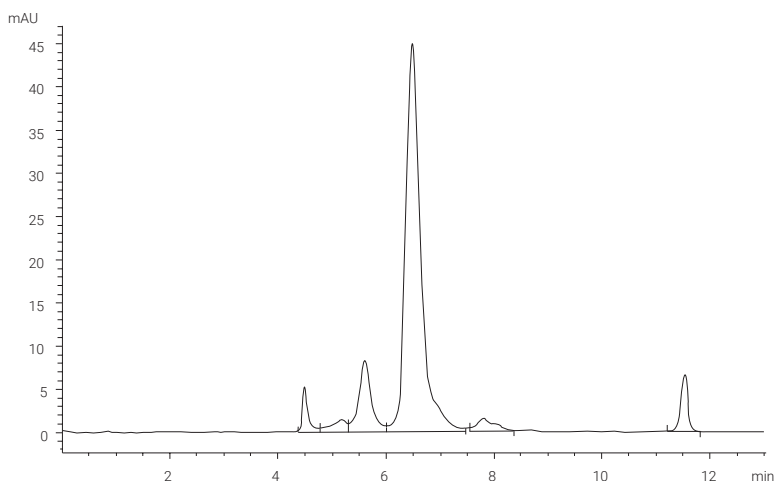
Phase mobile : tampon phosphate 150 mM (pH 7,0)

Longueur d'onde : 220 nm

Température : ambiante

Volume d'injection : 5 µL

Échantillon : IgG



Chromatogramme de la séparation à haute résolution d'un échantillon d'IgG montrant le monomère, les agrégats et les produits de dégradation.

Paramètres opérationnels des colonnes AdvanceBio SEC 2,7 µm

Compatibilité de la phase mobile Tampon phosphate 150 mM, pH 7,0 (conditions de démarrage recommandées)
D'autres tampons aqueux à salinité basse ou élevée peuvent être utilisés.
Les mélanges d'eau et d'acétonitrile peuvent être utilisés.
(Vérifiez la solubilité des composants des tampons et la pression du système.)

Stabilité au pH 2–8,5

Température de fonctionnement 20–30 °C (recommandée)
80 °C (maximale)

Pression opérationnelle typique <200 bars (2 900 psi) (une seule colonne)

Pression maximale 400 bars (5 800 psi)

Débit opérationnel 0,1–2,0 mL/min pour les colonnes de 7,8 mm de d.i. (recommandé)
0,1–0,7 mL/min pour les colonnes de 4,6 mm d.i. (recommandé)
Pour les instruments équipés de deux colonnes en série, il peut être nécessaire d'utiliser des débits plus faibles afin que la pression maximale ne dépasse pas 400 bars (5 800 psi).

Remarque : l'utilisation des valeurs limites des paramètres opérationnels est susceptible de réduire la durée de vie des colonnes.

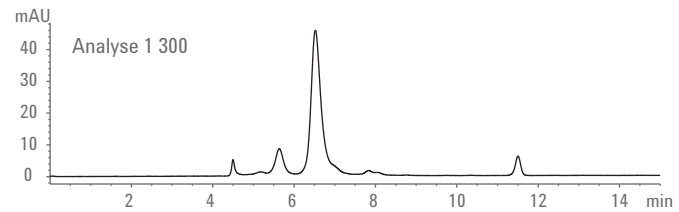
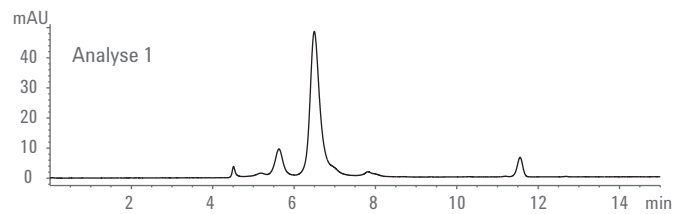
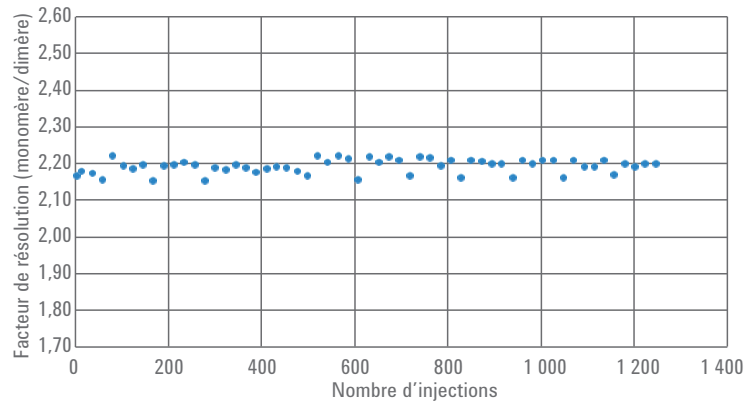
Analyse des fragments et agrégats

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

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Échantillon : IgG

Graphique montrant la résolution obtenue entre le monomère et le dimère d'IgG sur une séquence de 1 300 injections.



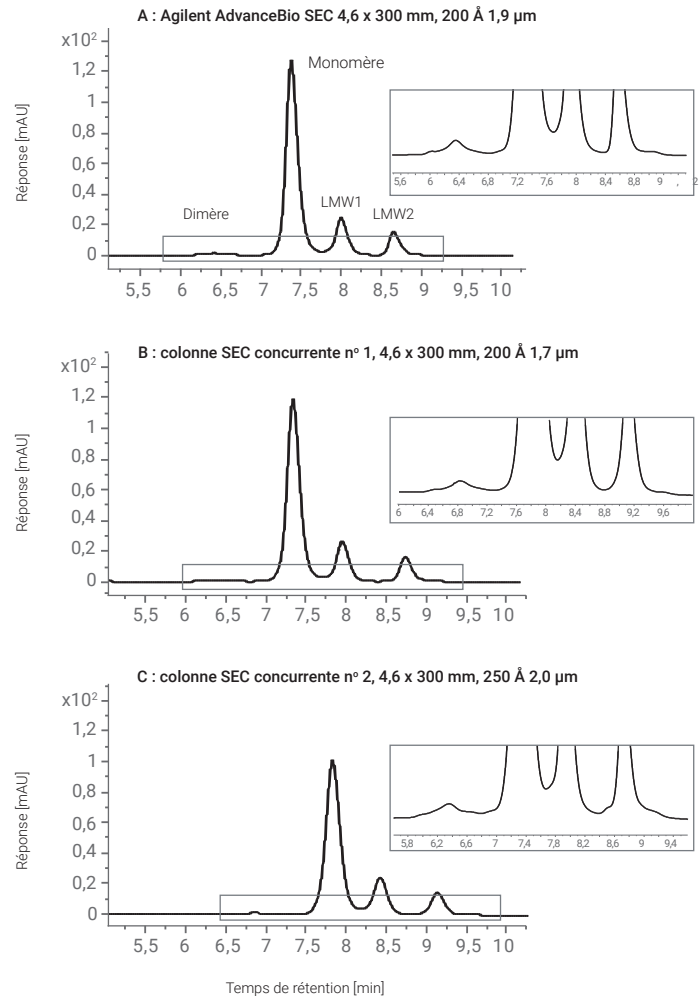
Le profil d'un échantillon d'IgG est resté inchangé, et ce même après 1 300 injections. Les facteurs de résolution et de quantification du monomère et du dimère d'IgG sont également restés dans la même plage de mesure tout au long de la durée de vie de la colonne.

AdvanceBio SEC, 1,9 µm

Instrument : LC bio-inerte 1260 Infinity II
 Logiciel : OpenLab CDS Agilent
 Débit : 0,35 mL/min
 Éluant : phosphate de sodium 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,0
 Température : 25 °C
 Volume d'injection : 1 µL
 Détection : UV, 220 nm

Les particules de silice de 1,9 µm modifiées par la chimie de greffage hydrophile exclusive d'Agilent assurent une haute résolution et efficacité des séparations. De plus, elles réduisent au minimum les interactions secondaires avec les mAb, les ADC et les autres protéines.

Les colonnes AdvanceBio SEC offrent une meilleure résolution et une plus grande efficacité de séparation que les colonnes concurrentes.



Chromatogrammes SEC d'un mélange de SigmaMAb avec des fragments de faible masse moléculaire (LMW1 et LMW2).

	Largeur de pic à mi-hauteur			Résolution		Contrepression (bars)
	Monomère	LMW1	LMW2	Dimère/monomère	Monomère/LMW1	
Agilent Advance Bio SEC 1,9 µm	0,159	0,154	0,148	2,79	2,28	340
Colonne SEC concurrente n° 1	0,172	0,166	0,160	2,46	2,09	354
Colonne SEC concurrente n° 2	0,194	0,182	0,169	2,49	1,83	260

Étalons AdvanceBio SEC

Étalons protéiques pour AdvanceBio SEC 130 Å

Mélange constitué de 5 protéines soigneusement sélectionnées (ovalbumine, myoglobine, aprotinine, neurotensine, angiotensine II) conçu pour l'étalonnage des colonnes d'exclusion stérique Agilent AdvanceBio 130 Å. Cet étalon peut être utilisé régulièrement pour étalonner la colonne et garantir les performances optimales du système dans diverses applications de purification et d'analyse de protéines.

Étalons protéiques pour AdvanceBio SEC 300 Å

Mélange constitué de 5 protéines soigneusement sélectionnées (thyroglobuline, g-globuline, ovalbumine, myoglobine, angiotensine II) conçu pour l'étalonnage des colonnes d'exclusion stérique Agilent AdvanceBio 300 Å. Cet étalon peut être utilisé régulièrement pour étalonner la colonne et garantir les performances optimales du système dans diverses applications de purification et d'analyse de protéines.



Étalons protéiques pour
AdvanceBio SEC, réf. 5190-9416
et réf. 5190-9417

Étalons AdvanceBio SEC

Description	Taille	Référence
130 Å	Flacon de 1,5 mL	5190-9416
300 Å	Flacon de 1,5 mL	5190-9417

Bio SEC-3

Résolution supérieure pour des séparations de peptides et protéines plus rapides

Les colonnes Bio SEC-3 offrent une vitesse et une résolution supérieures à celles des autres colonnes SEC grâce à l'efficacité de leurs petites particules.

- Séparations plus rapides que les colonnes SEC de plus grosses granulométries
- Haute résolution : meilleur rendement des protéines et pics plus fins
- Capacité de chargement et rendement exceptionnels grâce à une couche hydrophile exclusive
- Développement de méthodes souple : compatible avec la plupart des tampons aqueux
- Excellente stabilité à faible ou forte salinité
- Performances fiables et régulières : distribution étroite des tailles de particules ; la couche hydrophile exclusive minimise les interactions secondaires
- Particules robustes compatibles avec plusieurs détecteurs, y compris les détecteurs à dispersion de lumière
- Compatibilité avec la détection par MS

Les colonnes Bio SEC-3 vous permettent de réaliser des séparations SEC plus fiables. Chaque colonne est remplie de particules de silice sphériques de 3 μm à distribution étroite, entourées d'un matériau hydrophile exclusif pour un rendement élevé et des interactions secondaires minimales, ce qui assure la fiabilité des séparations. Cette mince couche polymérique est chimiquement greffée sur une silice pure et mécaniquement stable dans des conditions parfaitement contrôlées, garantissant ainsi la très grande efficacité de ces particules pour la SEC.



Conseils et outils

Les flacons désactivés/silanisés possèdent des surfaces inertes qui n'interagissent pas avec les métaux, les composés biologiques ou les protéines et n'entraînent aucune variation du pH. Évitez les flacons standard en polypropylène avec les composés biologiques ou photosensibles.



Spécifications des colonnes					
Diamètre des pores	Granulométrie	Plage de masse moléculaire	Plage de pH	Pression max.	Débit
100 Å	3 µm	100–100 000	2–8,5	137 bars, 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 bars, 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 bars, 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.)

Courbes d'étalonnage sur Bio SEC-3

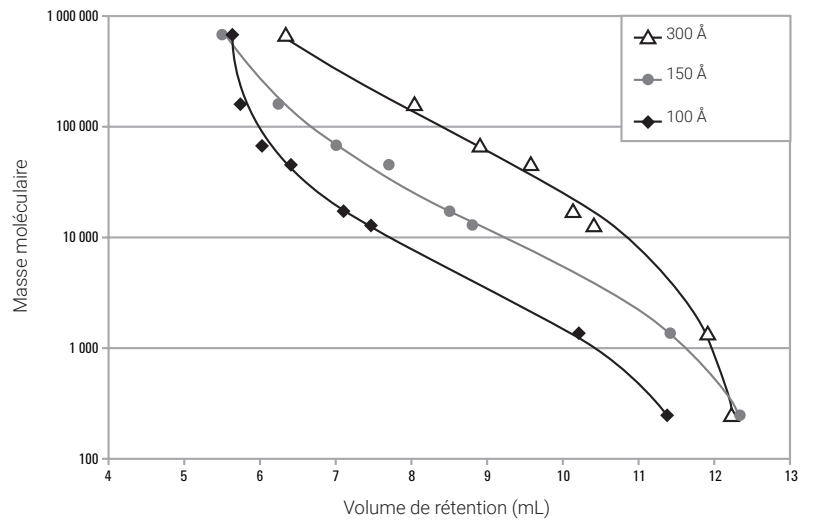
Colonne : Bio SEC-3
7,8 x 300 mm, 3 µm

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Débit : 1,0 mL/min

Détecteur : UV

Protéines	Masse moléculaire	Diamètre des pores		
		300 Å	150 Å	100 Å
Thyroglobuline	670 000	6,34	5,50	5,63
γ-globuline	150 000	8,03	6,24	5,74
BSA	67 000	8,90	7,00	6,03
Ovalbumine	45 000	9,57	7,70	6,41
Myoglobine	17 000	10,12	8,50	7,10
Ribonucléase A	12 700	10,40	8,80	7,46
Vitamine B12	1 350	11,90	11,40	10,20



Choix du diamètre des pores

Le choix du diamètre des pores du support a une influence sur la résolution en SEC. Étant donné que la séparation s'effectue en fonction des différences dans la taille des molécules en solution, l'échantillon doit pouvoir s'infiltrer dans la structure poreuse des particules. Si la taille des pores est trop petite, les échantillons sont exclus des pores et élués avec le volume mort et si elle est trop grande, ils peuvent pénétrer complètement dans les particules et ne sont pratiquement pas séparés.

Choix du diamètre des pores : protéines

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

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

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

Phase mobile : phosphate de sodium 100 mM
+ chlorure de sodium 150 mM, pH 6,8

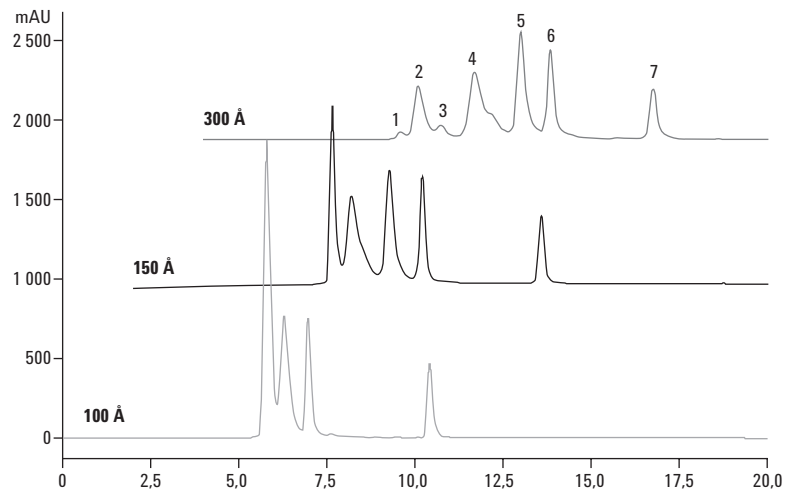
Débit : 0,35 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 %
de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : Mélange étalon pour la filtration sur gel Bio-Rad

- | | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. Agrégats de thyroglobuline | 5. Ovalbumine |
| 2. Thyroglobuline | 6. Myoglobine |
| 3. IgA | 7. Vitamine B12 |
| 4. γ -globuline | |



Choix du diamètre des pores : IgG de souris

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

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

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

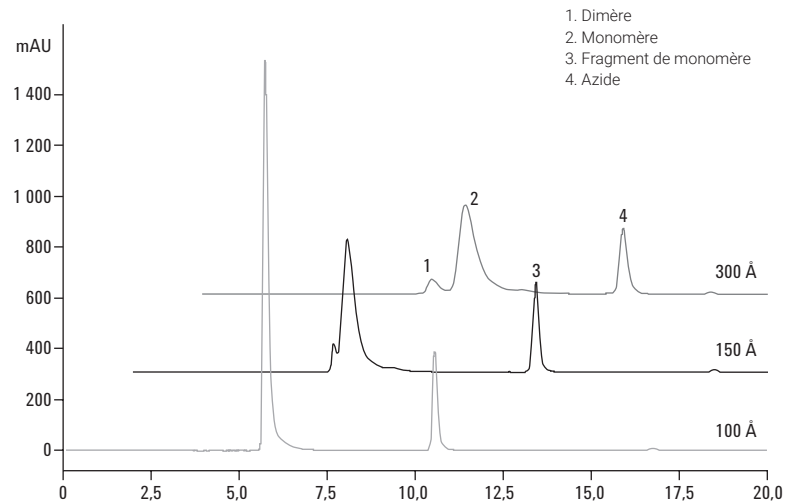
Phase mobile : phosphate de sodium 100 mM
+ chlorure de sodium 150 mM, pH 6,8

Débit : 0,35 mL/min

Gradient : 10–58 % de B en 4 min, 1 min de rinçage à 95 %
de B, 1 min de stabilisation à 10 % de B

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : IgG de souris



Bio SEC-3

Taille (mm)	Granulométrie (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, colonne de garde	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, colonne de garde	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, colonne de garde	3	5190-6846	5190-6847	5190-6848

Conseils et outils

Pour mieux comprendre comment déterminer les masses moléculaires et analyser les agrégats en utilisant la solution multidétecteur Bio-SEC 1260 Infinity II avec les colonnes BioSEC-3, reportez-vous aux publications suivantes :

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

www.agilent.com/search

Bio SEC-5

- Résolution exceptionnelle pour les molécules de grande taille
- Stabilité et efficacité élevées grâce à une couche hydrophile neutre exclusive
- Meilleures résolution et capacité de pics grâce au remplissage spécialement conçu pour augmenter le volume des pores
- Performances robustes : excellentes reproductibilité et durée de vie de la colonne
- Stabilité remarquable, même à pH élevé et à des salinités faibles ou élevées
- Développement de méthodes souple : compatible avec la plupart des tampons aqueux
- Large champ d'application : diamètre de pores allant jusqu'à 2 000 Å pour les vaccins et biomolécules de haute masse moléculaire
- Compatibilité avec la détection par MS

Les colonnes Bio SEC-5 sont idéales pour les grosses biomolécules et les échantillons avec des composants de masses moléculaires différentes. Elles sont remplies de particules de silice de 5 µm entourées d'un matériau neutre et hydrophile exclusif mis au point par Agilent pour obtenir une efficacité et une stabilité maximales. Six diamètres de pores sont proposés pour une résolution optimale sur toute la plage des masses moléculaires.



Spécifications des colonnes

Diamètre des pores	Granulométrie	Plage de masse moléculaire	Plage de pH	Pression max.	Débit
100 Å	5 µm	100–100 000	2–8,5	137 bars, 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 bars, 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 bars, 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 bars, 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 bars, 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 bars, 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.)

Comparaison entre Bio SEC-3 et Bio SEC-5

Analyse d'anticorps monoclonal

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

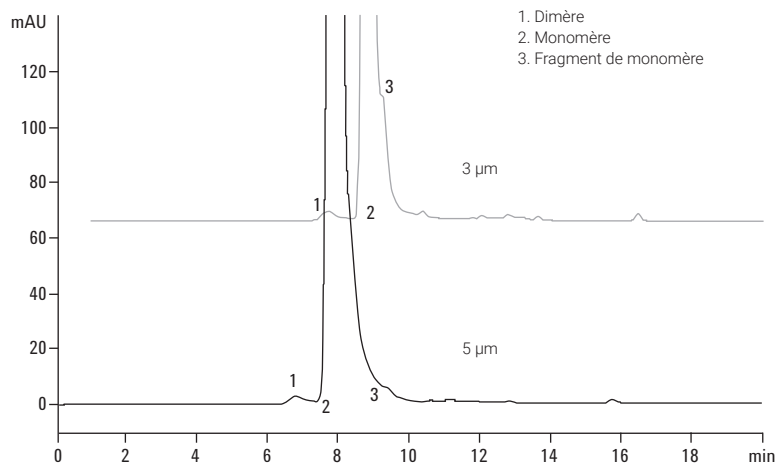
Colonne : Bio SEC-5, 300 Å
5190-2526
7,8 x 300 mm, 5 µm

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Débit : 1 mL/min

Détecteur : UV, 220 nm

Échantillon : anticorps monoclonal humanisé



La colonne de 3 µm donne une meilleure définition du plan de fragmentation.

Conseils et outils

Il faut tenir compte de nombreux facteurs pour développer une analyse d'agrégation des protéines : l'effet de la taille et de la masse moléculaire des solutés, le choix de la colonne et de la phase mobile, et plus encore. Pour un guide traitant de tous ces facteurs, reportez-vous à la publication suivante :

Size exclusion chromatography for biomolecule analysis: A "How to" guide (publication n° 5991-3651EN)

www.agilent.com/search

Courbes d'étalonnage sur Bio SEC-5

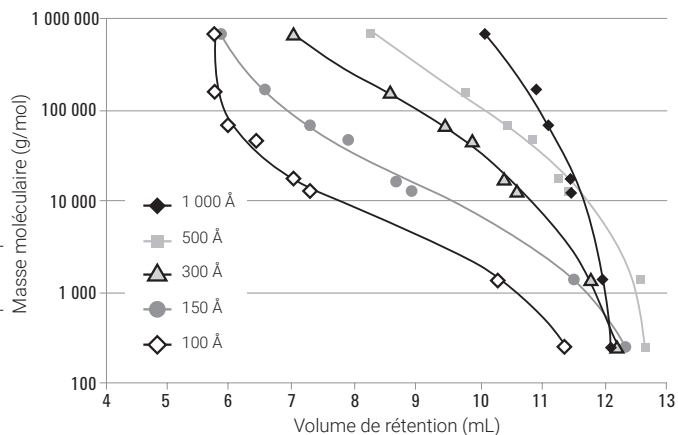
Colonne : **Bio SEC-5**
7,8 x 300 mm, 5 µm

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0

Débit : 1,0 mL/min

Détecteur : UV, 214 nm

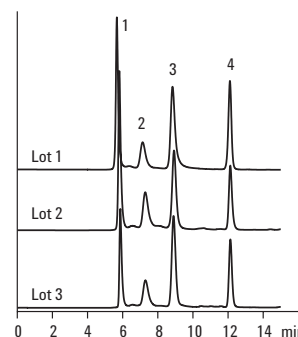
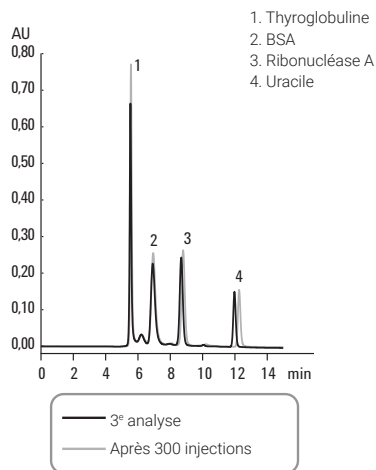
Protéines	Masse moléculaire	Volume de rétention				
		1 000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Thyroglobuline	670 000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-globuline	150 000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
BSA	67 000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Ovalbumine	45 000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Myoglobine	17 000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonucléase A	12 700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamine B12	1 350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Uracile	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41
(marqueur de perméation totale)						



Reproductibilité exceptionnelle d'un lot à l'autre

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

Phase mobile : phosphate de sodium 150 mM, pH 7,0



Le mélange de quatre protéines démontre une excellente reproductibilité des temps de rétention sur 300 injections et sur trois colonnes provenant de différents lots de fabrication.

Bio SEC-5

Taille (mm)	Granulométrie (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, colonne de garde	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, colonne de garde	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, colonne de garde	5	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862

Conseils et outils

Optez pour AdvanceBio SEC 300 Å afin de bénéficier d'une augmentation de la résolution et d'une réduction des interactions secondaires grâce aux dernières avancées de la technologie SEC.

Reportez-vous à la **page 110** pour plus d'informations.

ProSEC 300S

- Performances stables : les particules de silice mécaniquement résistantes n'entraînent pas de ressuyage pendant l'analyse
- Développement de méthodes simplifié : la plage de résolution linéaire étendue élimine la nécessité de choisir entre plusieurs tailles de pores ; une seule colonne suffit pour analyser la plupart des protéines globulaires
- Options vous permettant d'optimiser vos séparations : deux d.i. de colonne pour la SEC multidétecteurs
- Sensibilité accrue avec l'utilisation de détecteurs à dispersion de lumière, pour identifier les dimères, trimères et agrégats



La colonne ProSEC 300S est spécifiquement conçue pour constituer une solution simple colonne d'analyse des protéines globulaires. Le choix et l'optimisation du diamètre des pores permettent d'étendre la plage de résolution linéaire, afin de pouvoir utiliser une colonne unique pour l'analyse de tout l'éventail de protéines globulaires.

Les particules sont extrêmement robustes et ne se fragmentent pas pendant l'utilisation, évitant le ressuyage de débris particulaires. La ligne de base bénéficie ainsi d'une stabilité exceptionnelle qui rend cette colonne parfaitement adaptée à l'utilisation avec des détecteurs à dispersion de lumière.

Les deux dimensions de colonne (7,5 mm et 4,6 mm de d.i.), qui garantissent la compatibilité avec la chromatographie d'exclusion stérique multidétecteurs, offrent la possibilité d'analyser les molécules de faible masse.

Spécifications des colonnes ProSEC 300S

Phase greffée	Dia- mètre des pores	Granulomé- trie	Plage de masse moléculaire des protéines	Plage de pH	Débit	Pression max.
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 bars, 3 700 psi

ProSEC 300S

Dimensions	Granulométrie (µm)	Référence
7,5 x 600	5	PL1147-8501
7,5 x 300	5	PL1147-6501
4,6 x 250	5	PL1547-5501
Colonnes de garde		
7,5 x 50	5	PL1147-1501
4,6 x 50	5	PL1547-1501

Colonnes de filtration sur gel ZORBAX GF-250 et GF-450

- Produits classiques à utiliser pour les protocoles requérant la spécification L35 de la nomenclature de l'USP
- Disponibles avec des dimensions de colonne pour l'échelle semi-préparative et préparative
- Compatibles avec les agents modificateurs et les dénaturants organiques
- Large plage de pH opérationnel (3–8)



Colonnes de filtration sur gel GF-250

Les colonnes d'exclusion stérique (filtration sur gel) ZORBAX GF-250 et GF-450 conviennent parfaitement à la séparation par la taille des protéines et autres biomolécules. Avec les colonnes GF-250 et GF-450, la plage de séparation est de 4 000 à 900 000 pour les protéines globulaires. Les colonnes d'exclusion stérique GF-250/GF-450 comportent une phase greffée diol hydrophile pour une récupération élevée des protéines (généralement >90 %), ainsi qu'une modification du support silice à base de zirconium pour une plage de pH opérationnel de 3 à 8. Les colonnes GF-250/GF-450 sont remplies de microsphères de silice poreuses de taille bien définie avec une distribution étroite du diamètre des pores et de la granulométrie. Il en résulte une colonne d'exclusion stérique efficace, solide et reproductible, utilisable aussi bien pour les séparations analytiques que préparatives avec des débits pouvant atteindre 3 mL/min. Ces colonnes sont compatibles avec les dénaturants et modificateurs organiques (<25 %) de la phase mobile qui permettent de réduire l'agrégation protéique. Les applications courantes incluent les séparations des monomères, dimères et agrégats protéiques, le dessalage et l'estimation de la masse moléculaire des protéines, ainsi que les séparations de protéines modifiées.

Spécifications des colonnes d'UHPLC							
Phase greffée	Diamètre des pores	Granulométrie	Plage de masse moléculaire	Surface spécifique	Plage de pH	Débit	Pression max.
ZORBAX GF-250	150 Å	4 µm	4 000–400 000	140 m ² /g	3,0–8,0	<3,0 mL/min	350 bars
ZORBAX GF-450	300 Å	6 µm	10 000–900 000	50 m ² /g	3,0–8,0	<3,0 mL/min	350 bars

Les spécifications ne représentent que des valeurs types.

Colonnes de filtration sur gel ZORBAX GF-250 (USP L35) et GF-450 (USP L35)

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
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
Colonnes de garde (matériel de montage requis)			
GF-450 Diol, cartouches de garde, 2/pqt	9,4 x 15	6	820675-111
GF-250 Diol, cartouches de garde, 4/pqt	4,6 x 12,5	6	820950-911
GF-450 Diol, cartouches de garde, 2/pqt	9,4 x 15	6	820675-111
Kit de montage pour cartouche de garde prép.			840140-901
Kit de montage pour cartouche de garde			820999-901
Colonnes 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
Raccords pour cartouche PrepHT, 2/pqt			820400-901
Cartouches de garde PrepHT, 2/pqt	17,0 x 7,5	5	820212-911
Kit de montage pour cartouche de garde			820444-901

Conseils et outils

Les guides d'utilisation des colonnes constituent d'excellentes ressources offrant des instructions pour l'utilisation et l'entretien des colonnes ainsi que des suggestions de méthodes de démarrage :

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

Caractérisation de la glycosylation

Les modifications post-traductionnelles de la séquence d'acides aminés, notamment la glycosylation, ont des conséquences fonctionnelles et peuvent affecter l'efficacité et l'immunogénicité d'un produit biopharmaceutique. La structure du glycane contribue également à la demi-vie de la protéine dans le plasma ainsi qu'à l'aptitude des anticorps monoclonaux à déclencher la réponse immunitaire requise pour l'efficacité.

La glycosylation est considérée par les organismes réglementaires comme l'un des attributs qualité critiques ; elle doit donc être caractérisée et quantifiée, en déterminant des plages acceptables, dans le cadre du processus de développement d'une glycoprotéine princeps, d'un biosimilaire ou d'un produit pharmaceutique biosupérieur.

Il existe un certain nombre de méthodes analytiques permettant d'obtenir des informations sur la structure et la forme de la glycosylation des protéines.

- Pour l'identification structurale, notamment l'identification des sites de glycosylation, la détection par spectrométrie de masse est conjuguée à la chromatographie en phase inverse et à la chromatographie par interaction hydrophile (HILIC).
- De plus, les glycanes contenant de l'acide sialique augmentent la charge de la protéine et peuvent être caractérisés par chromatographie à échange d'ions.

Après avoir caractérisé la glycoprotéine et les fragments glycopeptidiques pour déterminer la quantité et la position des sites de glycosylation, il est nécessaire d'identifier et de quantifier individuellement les glycanes. Pour cela, les glycanes doivent être clivés de la protéine puis analysés à l'aide de colonnes HILIC. Comme les glycanes sont dépourvus de chromophore, une dérivation avec un fluorophore permet une détection FLD pour cartographier et quantifier les glycanes.



Sélection des colonnes pour chromatographie par interaction hydrophile

Application	Colonnes Agilent	Notes
Glycanes des glycoprotéines, y compris les anticorps monoclonaux, après clivage	AdvanceBio Glycan Mapping	Phase greffée amide pour une stabilisation rapide et une sélectivité accrue des glycanes.
	1,8 µm	À base de particules totalement poreuses pour les séparations ultrarapides et les applications à cadence élevée. Stabilité jusqu'à 1 200 bars pour utilisation avec le LC 1290 Infinity II.
	2,7 µm	Basée sur la technologie Poroshell pour donner des particules superficiellement poreuses qui réduisent les distances de diffusion, ce qui permet de réaliser des séparations à haute résolution à faible pression et d'utiliser des colonnes plus longues avec une plus grande efficacité de séparation.
Peptides et glycopeptides hydrophiles	ZORBAX RRHD 300 Å, 1,8 µm	Particules de silice de 300 Å pour fournir une séparation orthogonale par rapport aux colonnes à phase inverse ZORBAX RRHD 300 Å, 1,8 µm.
	AdvanceBio Glycan Mapping	La phase greffée amide offre une fonctionnalité HILIC alternative pour les petits peptides et glycopeptides hydrophiles.

AB

AB

AB

Appartient à la gamme AdvanceBio

Profitez de la méthode complète d'Agilent pour les N-glycanes

Agilent constitue une ressource unique pour les instruments et les consommables, depuis l'échantillon jusqu'à l'obtention d'une réponse fiable.

Avec l'intégration des produits et services ProZyme, notre expertise couvre désormais l'ensemble du processus d'analyse des N-glycanes. La gamme d'Agilent inclut la technologie de préparation d'échantillons de N-glycanes Gly-X avec InstantPC, offrant une cadence et une sensibilité analytique exceptionnelles. Des réactifs individuels pour la recherche en glycobiologie, tels que les étalons de glycanes et glycoenzymes, sont également disponibles, ainsi qu'un grand nombre de services de LC analytique.

Pour plus d'informations, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/better-together

Colonnes AdvanceBio Glycan Mapping

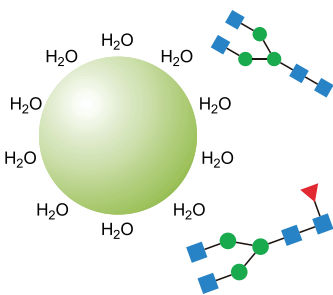
Les colonnes, étalons et produits de préparation d'échantillons AdvanceBio Glycan Mapping permettent d'éliminer de façon sélective les N-glycanes des glycoprotéines, y compris les anticorps monoclonaux.

Analyse rapide : les colonnes de 1,8 µm permettent l'analyse des N-glycanes à cadence élevée lorsque la rapidité est votre principal objectif en raison du nombre d'échantillons ou d'un besoin de données immédiat.

Résolution : séparations à haute résolution grâce à des colonnes de 250 mm remplies de particules de 2,7 µm. Cette résolution supérieure permet de quantifier avec précision les glycanes cibles et les modifications du profil de glycosylation des protéines qui peuvent avoir eu lieu pendant l'expression.

Méthodes complètes : couvrent la préparation d'échantillons, l'analyse chromatographique et l'interprétation des données pour garantir la reproductibilité ainsi que la précision de l'identification et de la quantification.

Commandes simplifiées : une seule référence pour commander les produits nécessaires au processus de préparation d'échantillons (de la solubilisation des protéines à la purification des glycanes marqués 2-AB), ainsi que les kits pour chaque étape garantissant une souplesse maximale.



Spécifications des colonnes						
Phase greffée	d.i. (mm)	Particule	Post-silanisée	Stabilité au pH	Température de fonctionnement	Limite de pression
Amide HILIC	2,1 et 4,6	1,8 µm, totalement poreuses	Non	2–7	40 °C	1 200 bars
Amide HILIC	2,1 et 4,6	2,7 µm, superficiellement poreuses	Non	2–7	40 °C	600 bars

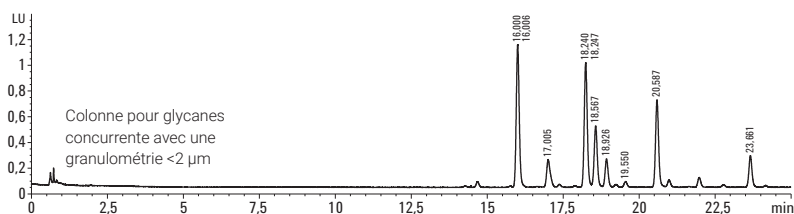
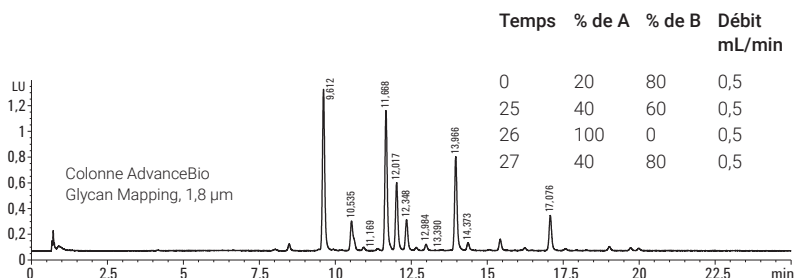
La cartographie du composant N-glycosylé des glycoprotéines, notamment des anticorps monoclonaux, nécessite le clivage enzymatique des N-glycanes, à l'aide de la PNGase F, du squelette d'acides aminés de la protéine. Les N-glycanes ainsi clivés peuvent être analysés avec la chromatographie par interaction hydrophile avec détection MS ou par HPLC/UHPLC avec détection FLD ou MS après dérivatisation avec un fluorophore, le 2-aminobenzamide (2-AB). Les colonnes AdvanceBio Glycan offrent la vitesse d'analyse (1,8 µm) et la résolution (2,7 µm) nécessaires à l'identification et la quantification des glycanes clivés.

Vitesse d'analyse

Les colonnes AdvanceBio Glycan Mapping 1,8 µm sont recommandées pour les analyses à cadence élevée, lorsque des temps d'analyse courts sont nécessaires.

Résultats supérieurs, avec diminution de 40 % du temps d'analyse par rapport aux colonnes concurrentes

Colonne :	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Colonne B :	colonne pour glycanes concurrente avec une granulométrie <2 µm
Phase mobile :	A : formiate de NH ₄ 100 mM, pH 4,5 B : ACN
Volume d'injection :	2 µL dans 70:30 ACN: formiate de NH ₄ 100 mM
Thermostat d'échantillon :	10 °C
FLD :	excitation = 260 ; émission = 430
Débit :	0,35 mL/min
Instrument :	LC 1290 Infinity avec détecteur à fluorescence 1260 Infinity (FLD)
Échantillon :	bibliothèque de glycanes d'IgG humaines à liaison N 2-AB (réf. 5190-6996)



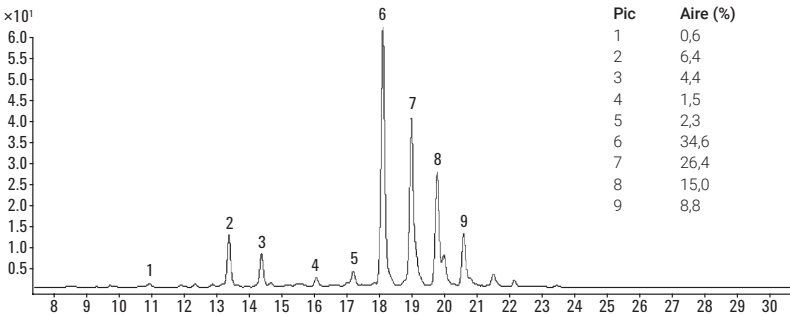
Dans une configuration 2,1 x 150 mm, la colonne AdvanceBio Glycan Mapping offre une meilleure résolution, des pics plus étroits et une capacité de pics plus élevée que la colonne concurrente avec une granulométrie <2 µm.

Résolution

La phase AdvanceBio Glycan Mapping 2,7 µm, dans des longueurs de colonnes supérieures, est recommandée pour les séparations à haute résolution.

Résultats supérieurs, avec diminution de 40 % du temps d’analyse par rapport aux colonnes concurrentes

Colonne :	AdvanceBio Glycan Mapping 859700-913 2,1 x 150 mm, 1,8 µm
Instrument :	LC binaire 1290 Infinity
Tampon :	A : formiate d’ammonium 100 mM dans l’eau, pH 4,5
	B : acétonitrile
Conditions MS :	Température de gaz : 250 °C Température du gaz de gainage : 250 °C Débit du gaz : 8 L/min Débit du gaz de gainage : 8 L/min Nébuliseur : 25 psi Vcap : 3 500 V Buse : 1 000 V Fragmenteur : 200 V Écrêteur : 45 V Vpp Oct 1 RF : 550 Énergies de collision : 15 et 30 V Mode : MS et MS/MS ciblé



Les N-glycanes de la fétuine ont été clivés avec la PNGase F puis analysés par UHPLC-FLD après dérivatisation avec 2-AB. L’attribution des pics par MS montre que les N-glycanes de fétuine clivés sont des glycanes complexes biantennés et triantennés qui contiennent de l’acide N-acétylneuraminique (NeuAc), mais pas de fucose. N-glycanes de fétuine marqués avec 2-AB analysés à l’aide de HILIC-UHPLC et attributions des pics effectuées par MS.

Paramètres de l'instrument

	Gradient pour les anticorps	Gradient pour la fétuine	Gradient pour l'ovalbumine
Débit de démarrage	0,5 mL/min	0,5 mL/min	0,5 mL/min
Gradient	0 min 85 % de B	0 min 75 % de B	0–6 min 85 % de B
	5 min 75 % de B	45 min 50 % de B	10 min 80 % de B
	35 min 64 % de B	47 min 40 % de B, débit de 0,5 mL/min	60 min 70 % de B
	40 min 50 % de B	47,01 min, débit de 0,25 mL/min	65 min 50 % de B, débit de 0,5 mL/min
	42 min, débit de 0,5 mL/min 42,01 min, débit de 0,25 mL/min	49 min 0 % de B	65,01 min, débit de 0,25 mL/min
	43 min 0 % de B	51 min 0 % de B	68 min 0 % de B
	48 min 0 % de B	51,01 min 75 % de B, débit de 0,25 mL/min	73 min 0 % de B
	50 min 85 % de B 50,01 min, débit de 0,25 mL/min	52,00 min, débit de 0,5 mL/min	74 min 85 % de B, débit de 0,25 mL/min
	51 min, débit de 0,5 mL/min		75,00 min, débit de 0,5 mL/min
Fin d'analyse	51 min	52 min	75 min
Durée postanalyse	20 min	20 min	20 min
Volume d'injection	5 µL	1 µL	1 µL
Thermostat du passeur automatique d'échantillons	5 °C		
FLD	excitation = 260 nm ; émission = 430 nm		
Largeur de pic	>0,013 min (temps de réponse de 0,25 s) (37,04 Hz)		

Informations détaillées sur les N-glycanes de fétuine

Pic	Oxford	Structure
1	A2G2S1	
2, 3	A2G2S2	
4	A3GGS2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (traces)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (traces)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (traces)	
8	A3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

- Fucose
- Galactose
- Mannose
- N-acetylglucosamine
- Acide N-acétylneuraminique

Étalons de N-glycanes

Agilent fournit des matériaux de référence, un étalon d'IgG N-glycosylées et une échelle de masses moléculaires des dextrans grâce auxquels vous pouvez optimiser la préparation d'échantillons et les performances du LC. L'étalon et l'échelle de masses moléculaires sont disponibles avec ou sans marquage 2-AB pour être utilisés comme matériaux de référence de préparation d'échantillons.

L'étalon d'IgG N-glycosylées sert de test d'AQ pour chaque lot de support AdvanceBio Glycan Mapping, afin de s'assurer que chaque colonne répond aux conditions de reproductibilité les plus strictes pour ce type d'analyse rigoureuse.

L'échelle de masses moléculaires de dextrans est utilisée pour effectuer l'étalonnage du système en fonction des temps d'élution des unités glucose (UG) dans une série d'homologues de dextrans, ainsi que pour le reporting des données de rétention relative des UG.



Séparation de l'échelle des dextrans marqués 2-AB

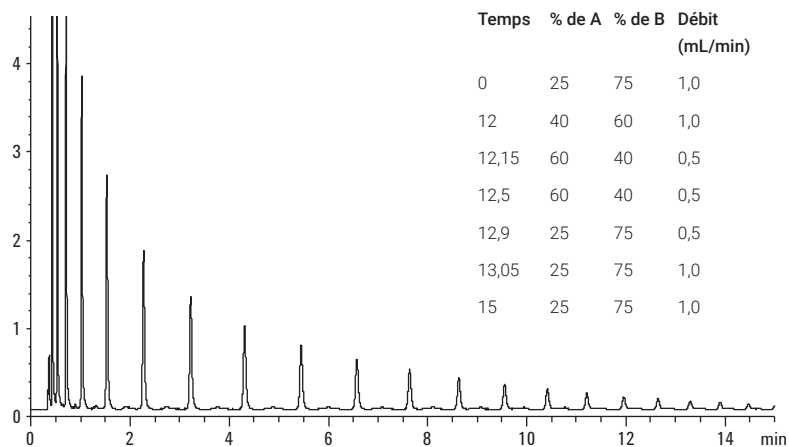
Colonne : AdvanceBio Glycan Mapping
859700-913
2,1 x 150 mm, 1,8 µm

Phase mobile : A : formiate d'ammonium 100 mM, pH 4,5
B : ACN

FLD : excitation = 260 nm ;
émission = 430 nm

Volume d'injection : 2 µL (10 pmol de glycane total/1 µL 75:25 ACN:eau)

Échantillon : Échelle de masses moléculaires de dextrans marqués 2-AB (réf. 5190-6998)



Cette analyse utilise l'échelle de masses moléculaires de dextrans d'Agilent, ainsi qu'une colonne AdvanceBio Glycan Mapping, pour corréler les temps de rétention des glycanes inconnus.

Colonne AdvanceBio Glycan Mapping, 1,8 µm, stable jusqu'à 1 200 bars

Taille (mm)	Référence
2,1 x 150	859700-913
2,1 x 100	858700-913
2,1, 1,8 µm, Fast Guard	821725-905

Colonne AdvanceBio Glycan Mapping, 2,7 µm, particules superficiellement poreuses, stable jusqu'à 1 200 bars

Taille (mm)	Référence
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, Fast Guard	821725-906

Étalons de N-glycanes

Description	Référence
Échelle de masses moléculaires de dextrans, 10 µg, flacon de 0,5 mL	5190-6997
Échelle de masses moléculaires de dextrans marqués 2-AB, 200 pmol	5190-6998
Bibliothèque d'IgG N-glycosylées, 20 µg, 0,5 mL	5190-6995
Bibliothèque d'IgG N-glycosylées marquées 2-AB, 200 pmol	5190-6996

Interactions hydrophiles et analyse des glycopeptides

Les analyses de peptides exigent la forte sélectivité et l'excellente reproductibilité apportées par la chromatographie en phase inverse. Néanmoins, les colonnes à phase inverse présentent une rétention et une sélectivité limitées pour les peptides hydrophiles, notamment les glycopeptides. Avec la colonne ZORBAX RRHD 300-HILIC 1,8 µm, la rétention des molécules hydrophiles et des glycopeptides est meilleure que sur les colonnes à phase inverse, ce qui permet d'éviter la perte d'informations utiles dans les expériences de cartographie peptidique.

Les deux techniques sont orthogonales et délivrent des informations complémentaires pour l'analyse de la structure primaire des protéines.

- Particules ZORBAX 300 Å pour l'analyse de tout un éventail de tailles de peptides
- Les particules de 1,8 µm offrent des performances d'UHPLC avec une stabilité à 1 200 bars
- Apporte une dimension orthogonale par rapport aux colonnes ZORBAX RRHD 300 Å à phase inverse

Spécifications des colonnes

Phase greffée	d.i. (mm)	Granulométrie	Post-silanisée	Stabilité au pH	Température de fonctionnement	Limite de pression
Silice	2,1	1,8, totalement poreuses	Non	1–8	40 °C	1 200 bars

La cartographie peptidique est utilisée pour la caractérisation et le profilage des impuretés des protéines biothérapeutiques. Les techniques d'UHPLC/HPLC en phase inverse sont utilisées en routine, mais certaines informations importantes peuvent faire défaut lorsque la digestion contient des peptides hydrophiles tels que les glycopeptides. La colonne ZORBAX RRHD 300-HILIC retient les glycopeptides hydrophiles et permet, là la spectrométrie de masse, l'identification de ce groupe important de fragments protéiques.

Identification des glycopeptides dans une digestion trypsique de protéines

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

Phase mobile : A : 100 % ACN
B : formiate d'ammonium 50 mM, pH 4,5

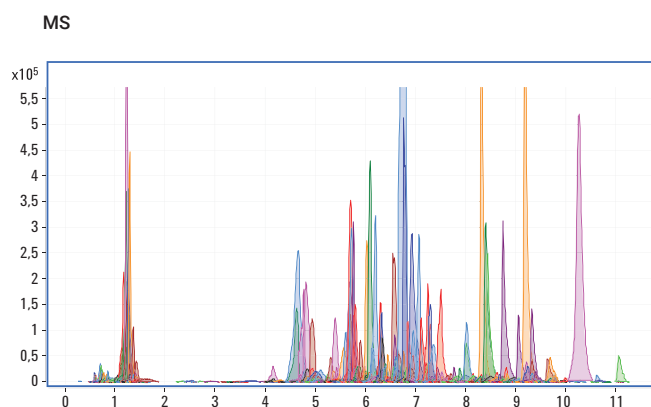
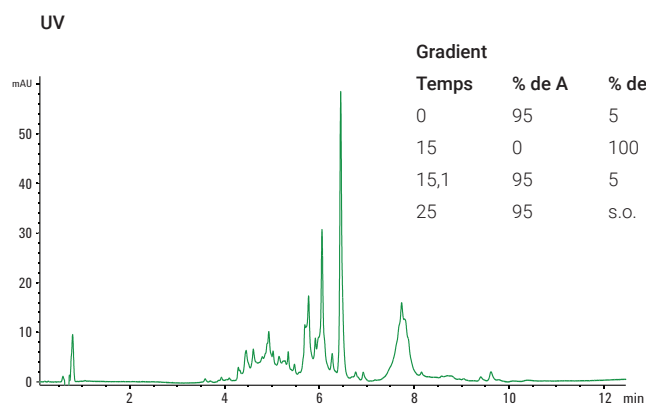
Débit : 0,4 mL/min

Injection : 5 µg

Détecteur : UV, 280 nm

Instrument : LC 1290 Infinity, TOF masse exacte 6224,
source double d'ionisation electrospray en mode ions positifs

Échantillon : glycopeptide d'une protéine EPO hydrolysée (1 mg/mL)



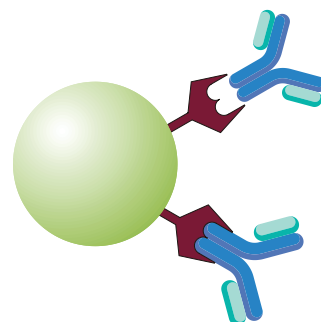
La figure marquée « UV » représente la séparation d'une carte peptidique d'érythropoïétine (EPO) réalisée avec une colonne ZORBAX RRHD 300-HILIC 2,1 x 100 mm et la figure marquée « MS » montre les chromatogrammes des composés extraits de l'EPO correspondante. Sept peptides qui n'avaient pas été identifiés par le couplage entre la colonne phase inverse et la détection MS ont pu l'être avec les données HILIC-MS. La chromatographie par interaction hydrophile fournit des informations orthogonales par rapport à la chromatographie en phase inverse permettant la séparation des glycopeptides hydrophiles contenus dans un hydrolysat enzymatique de protéine.

Colonnes ZORBAX RRHD 300-HILIC 1,8 µm

Taille (mm)	d.i. (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 100	1,8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2,1 x 50	1,8	857750-901

Titration

La chromatographie par affinité est une technique très performante qui tire parti des interactions moléculaires très spécifiques survenant fréquemment entre certaines protéines (par exemple antigène/anticorps). Agilent propose plusieurs produits spécialisés faisant appel à cette technique : les colonnes monolithiques Protein A et Protein G pour l'isolement et la quantification des IgG et une série de systèmes d'immunoaffinités pour l'élimination des protéines très abondantes dans les échantillons biologiques.



Colonnes de HPLC Agilent Bio-Monolith

- Conçues pour la séparation analytique de toutes les IgG (humaines et murines)
- Séparations indépendantes du débit ; pas de diffusion, de pores et de volume mort pour un transfert très rapide entre la phase mobile et la phase stationnaire
- Séparations extrêmement rapides pour accélérer le développement de méthodes et diminuer les coûts
- Le verrouillage des paramètres de méthode nécessite considérablement moins de temps et de tampon

Les colonnes de HPLC Bio-Monolith Protein A et Protein G appartiennent à la famille de colonnes Agilent Bio-Monolith. Les colonnes Bio-Monolith Protein A et Protein G sont compatibles avec les instruments de HPLC et de LC préparative, notamment le LC 1100, le LC 1200 et le LC quaternaire bio-inerte 1260.



Colonne Bio-Monolith
Protein A, 5069-3639

Conseils et outils

Pour plus d'informations sur la tolérance aux sels de la fixation des mAb et sur la compatibilité des tampons acides avec l'élution des mAb sur les colonnes Bio-Monolith Protein A, reportez-vous à la publication n° **5991-2990EN**.

www.agilent.com/search

Spécifications des colonnes

Dimensions	5,2 mm x 4,95 mm
Volume de la colonne	100 µL
Pression maximale	150 bars (15 MPa, 2 200 psi)
Température min./max.	Utilisation : 2–40 °C
	Stockage : 2–8 °C
pH recommandé	Plage de fonctionnement : 2–13
	Nettoyage in situ : 1–14
Matériaux de fabrication	Tube : inox
	Remplissage : poly(méthacrylate de glycidyle-co-diméthacrylate d'éthylène glycol) monolithique hautement poreux
Couleur de la bague d'identification	Bio-Monolith Protein A : blanche
	Bio-Monolith Protein G : orange
Cycle de vie/date d'expiration	12 mois

Colonnes Bio-Monolith Protein A et Protein G

Description	Référence
Colonne Bio-Monolith Protein A, 4,95 x 5,2 mm	5069-3639
Colonne Bio-Monolith Protein G, 4,95 x 5,2 mm	5190-6900

Conseils et outils

Pour plus d'informations, reportez-vous aux publications suivantes :

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (publication n° **5991-5135EN**)

Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures (publication n° **5991-2990EN**)

Cell Clone Selection Using the Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (publication n° **5991-5124EN**)

Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (publication n° **5991-5125EN**)

www.agilent.com/search

Affinité de liaison des colonnes Bio-Monolith Protein A et Protein G pour les différentes sous-classes d'IgG

Anticorps	Protein A	Protein G
humains		
IgG1 humaine	++++	++++
IgG2 humaine	++++	++++
IgG3 humaine	–	++++
IgG4 humaine	++++	++++
IgA humaine	++	–
IgD humaine	++	–
IgE humaine	++	–
IgM humaine	++	–
Souris		
IgG1 de souris	+	++
IgG2a de souris	++++	++++
IgG2b de souris	++++	+++
IgG3 de souris	+	+++
IgM de souris	+/-	–
Fragments d'anticorps		
Fab humain	+	+
F(ab') ₂ humain	+	+
scFv humain	+	+
Fc humain	+	+
κ humain	+	+
λ humain	+	+
++++ = forte affinité +++ = affinité modérée ++ = faible affinité + = très faible affinité – = aucune affinité		



Quantification rapide d'un anticorps monoclonal humanisé

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

Phase mobile : A : phosphate 50 mM, pH 7,4
B : acide citrique 100 mM, pH 2,8

Débit : 1 mL/min

Volume d'injection : variable (optimisé à 50 µL pour le surnageant de cultures cellulaires de CHO contenant IgG1)

Gradient :

Temps (min)	% de A	% de B	
0 à 0,5	100	0	Fixation
0,6 à 1,7	0	100	Élution
1,8 à 3,5	100	0	Stabilisation

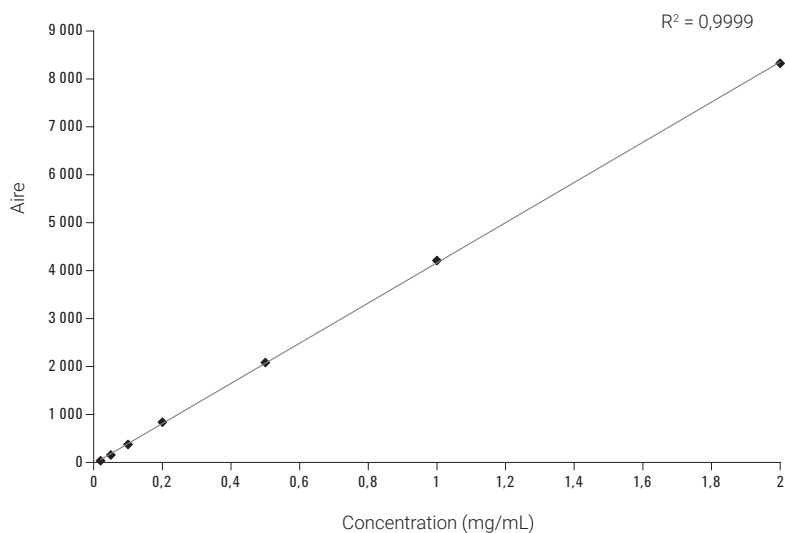
Température : ambiante

Détecteur : UV, 280 nm

Collecte de fractions : en fonction du temps

Échantillon : IgG1 (1–20 mg/mL) et le surnageant de cultures cellulaires de CHO contient IgG1 (jusqu'à 20 mg/mL de protéines totales)

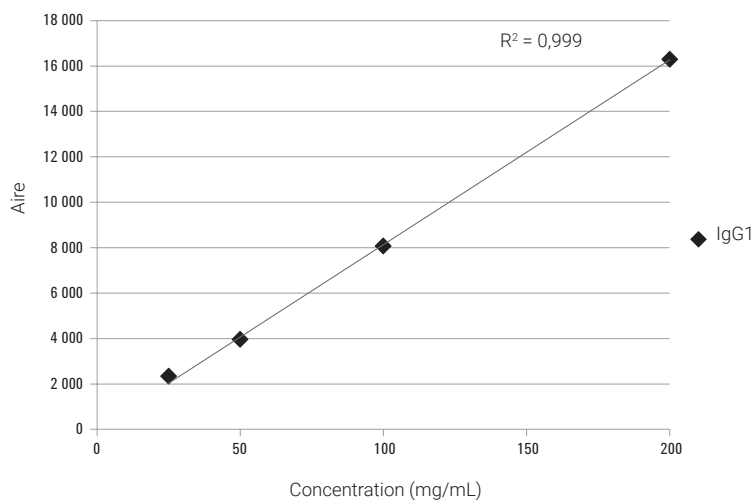
	TR (min)	Aire de pic
1	383	1,666
2	372	1,666
3	365	1,665
4	389	1,667
5	383	1,666
6	378	1,666
7	379	1,668
8	377	1,666
9	376	1,667
10	377	1,667
Moyenne	378	1,667
SD	6,52	0,001
RSD en %	1,73	0,060



Courbes d'étalonnage de l'anticorps monoclonal humanisé modifié trastuzumab (graphique A : 0–2 mg/mL et B : 25–200 mg/mL)



Analyse par SDS-PAGE des fractions de la séparation



Aucun impact des débits élevés sur l'efficacité de la fixation

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

Phase mobile : A : tampon phosphate de sodium, 20 mM, pH 7,4
B : acide citrique, 0,1 M, pH 2,8

Débit : 1,0, 1,5 et 2,0 mL/min

Injection : 4 µL (d'une solution d'IgG1 à 2,5 mg/mL enrichie avec
20 mg/mL de surnageant d'E. coli)

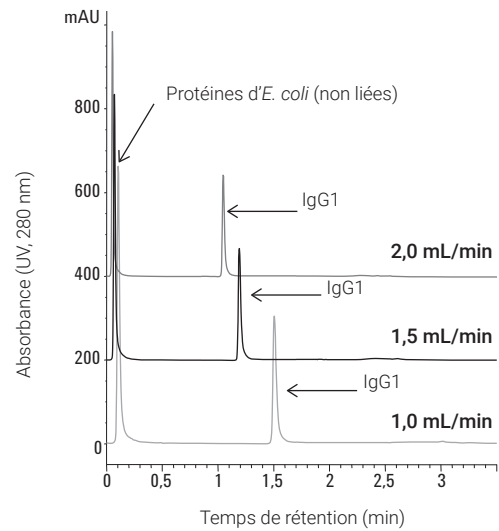
Détecteur : UV, 280 nm

Gradient : 0 % de B pendant 0,5 min, 100 % de B entre 0,6 et 1,7 min,
0 % de B entre 1,8 et 3 min

Température : 25 °C

Échantillon : IgG1 humanisée et lysat d'E. coli

Instrument : LC bio-inerte 1260 Infinity



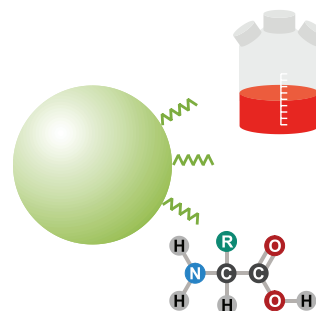
Fixation d'IgG1 sur la colonne Bio-Monolith Protein A évaluée à différents débits. Dans cette étude, une plus grande quantité d'échantillon a été chargée pour observer facilement les changements dans le chromatogramme et l'intégration du signal.

Effet du débit sur les aires de pics relatives d'IgG1 et des protéines non liées

Débit (mL/min)	Aire des protéines non liées (mAu/s)	Aire pour IgG1 (mAu/s)	Aire des protéines non liées(%)	Aire relative pour IgG1 (%)	Pression (bars)
1,0	1 230	738	63	37	32
1,5	840	492	63	37	47
2,0	636	363	64	36	68

Analyse des acides aminés et des cultures cellulaires

Les colonnes AdvanceBio d'Agilent facilitent l'analyse par votre laboratoire de biotechnologie des acides aminés et des autres petits métabolites dans les milieux de culture cellulaire épuisés, avec ou sans dérivation des échantillons. Les colonnes, aussi bien pour les échantillons dérivés que non dérivés, sont testées à l'aide d'acides aminés pour garantir leur qualité et leurs performances. Il vous suffit de choisir la procédure de travail adaptée à vos besoins.



Choisissez le kit d'analyse d'acides aminés Agilent AdvanceBio pour l'analyse standard par LC-UV

- Profitez de la dérivation en ligne automatisée des acides aminés avec séparation par LC en phase inverse et détection UV.
- Utilisez les kits avec tout système de LC Agilent.
- Diminuez votre investissement en termes d'instruments et d'expertise.

Choisissez les colonnes Agilent AdvanceBio MS Spent Media pour des analyses rapides par LC/MS sans dérivation

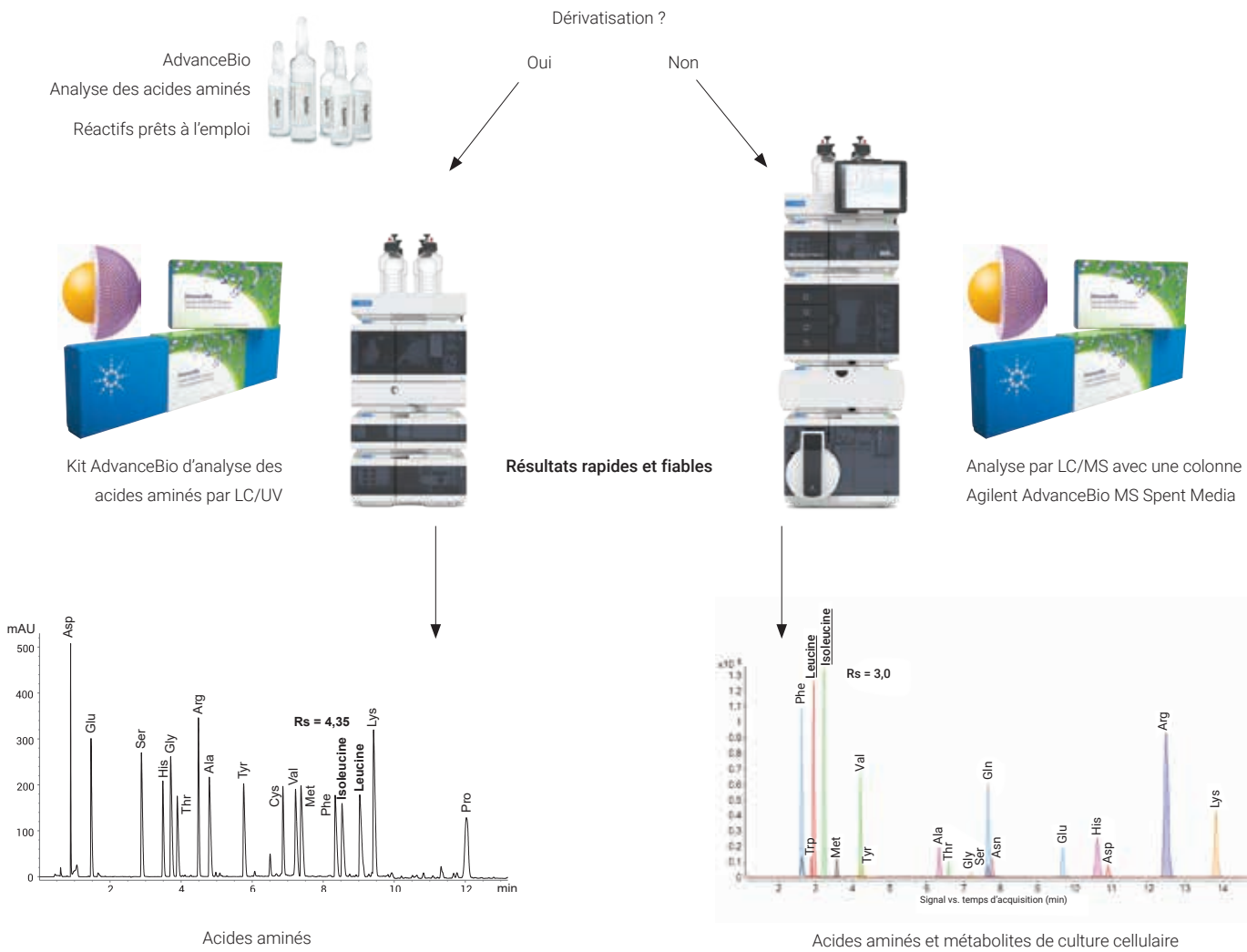
- Analyse d'acides aminés et d'autres métabolites de culture cellulaire avec une seule méthode : séparation par chromatographie liquide HILIC avec détection MS.
- Aucune dérivation de l'échantillon nécessaire.
- Compatible avec tout système de LC/MS.
- Résolution chromatographique à la ligne de base inutile grâce à la détection MS.

Conseils et outils

Les plaques à puits et tapis de fermeture d'Agilent InfinityLab sont parfaitement adaptés à vos applications de LC/MS à cadence élevée.

Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/well-plates

Solutions Agilent pour l'analyse des milieux de culture épuisés



AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA)

Les colonnes AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA) (analyse des acides aminés) d'Agilent assurent des séparations rapides, sensibles et reproductibles des acides aminés présents dans les hydrolysats protéiques et les milieux de culture cellulaire.

La gamme AdvanceBio AAA inclut des réactifs éprouvés pour la dérivation des acides aminés, un kit d'étalons d'acides aminés prêts à l'emploi, des colonnes basées sur la technologie innovante Agilent Poroshell et l'assistance des experts d'Agilent. Associée aux instruments de la série LC Agilent InfinityLab, la technologie AdvanceBio AAA constitue une solution complète pour l'analyse des acides aminés.

Ces colonnes appartiennent à la famille Agilent AdvanceBio de colonnes conçues pour apporter des solutions innovantes pour la caractérisation des biomolécules.

- Fiabilité des résultats : séparations à haute résolution obtenues grâce à la morphologie efficace des particules Poroshell.
- Réduction des coûts : colonnes à durée de vie prolongée faites de silice robuste, modifiée chimiquement et résistante aux pH élevés.
- Augmentation de la flexibilité : colonnes compatibles avec les systèmes de HPLC et d'UHPLC grâce aux particules d'un diamètre de 2,7 µm.
- Contrôle qualité : les colonnes AdvanceBio AAA sont testées par lots avec des étalons d'acides aminés pour garantir leur qualité.
- Commandes facilitées : étalons et réactifs disponibles sous forme de kits.
- Dérivation en ligne automatisée avec les systèmes d'injections d'Agilent.

Spécifications des colonnes

Phase greffée	Granulométrie	Diamètre des pores	Seuil de température	Plage de pH	Post-silanisée	Limite de pression
C18	2,7 µm	100 Å	60 °C	3,0–11,0	Double	600 bars

Conseils et outils

Pour en savoir plus sur la solution complète pour l'analyse des acides aminés d'Agilent, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide

Colonnes AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA) (analyse des acides aminés)

Description	Référence
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 colonnes de garde/paquet)	823750-946
AdvanceBio Amino Acid Analysis 100 Å, 4,6 x 5 mm, 2,7 µm (3 colonnes de garde/paquet)	820750-931

LC/UV

Colonne : Agilent AdvanceBio Amino Acid Analysis
4,6 x 100 mm
réf. 655950-802

Température de colonne : 30 °C

Phase mobile : pH faible, détection MS en mode ions positifs :
A = Na₂HPO₄ 10 mM, Na₂B₄O₇ 10 mM, pH 8,2 ;
B = acétonitrile:méthanol:eau, 45:45:10 (v.v.v)

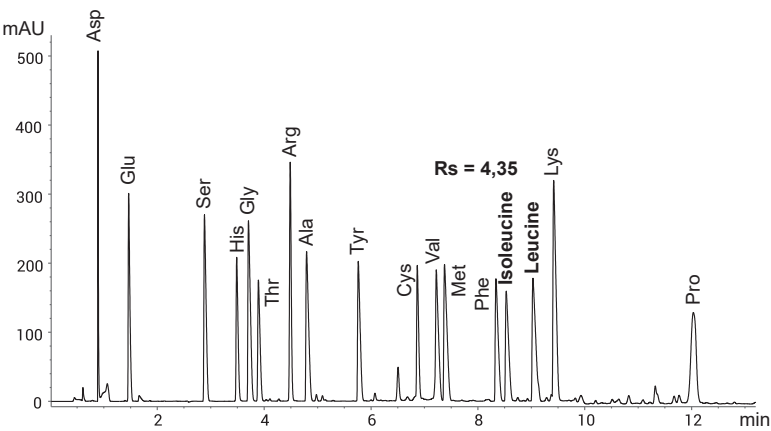
Débit : 1,5 mL/min

Gradient :

Temps (min)	% de B
0	2
0,35	2
13,4	57
13,5	100
15,7	100
15,7	2
18	fin

Échantillon : hydrolysats de protéine

Détection : détecteur à barrette de diodes WR
Agilent 1260 Infinity II



Chromatogramme avec détection UV des acides aminés dans un hydrolysats de protéines.

La résolution entre la leucine et l'isoleucine est de 4,35, ce qui répond pleinement à l'exigence de la Pharmacopée européenne sur une résolution supérieure à 1,5.

[Pharmacopée européenne 9.0 (2.2.56) Analyse d'acides aminés.]

Kit et étalons AdvanceBio pour l'analyse des acides aminés

Tous les réactifs de dérivatisation et les étalons d'acides aminés nécessaires pour la quantification sont inclus dans une même référence. Les composants individuels peuvent être commandés séparément si nécessaire.

Étalons et réactifs AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA) pour l'analyse des acides aminés

Description	Référence
Kit d'étalons et de réactifs	5190-9426
Contenu du kit (chaque produit peut être commandé séparément)	
Tampon, borate, 100 mL	5061-3339
Réactif FMOC, 10 ampoules de 1 mL chacune pour AAA	5061-3337
Réactif OPA, 10 mg/mL, 6 ampoules de 1 mL chacune	5061-3335
Acide dithiodipropionique (DTDPA), 5 g	5062-2479
Étalons d'AA, 1 nmol, 10/pqt	5061-3330
Étalons d'AA, 250 pmol, 10/pqt	5061-3331
Étalons d'AA, 100 pmol, 10/pqt	5061-3332
Étalons d'AA, 25 pmol, 10/pqt	5061-3333
Étalons d'AA, 10 pmol, 10/pqt	5061-3334
Complément d'acides aminés, 1 g de chaque	5062-2478



Tampon, borate,
100 mL, 5061-3339



AA en supplément, 1 g de
chaque, 5062-2478

Chaque étalon d'acides aminés contient les acides aminés suivants :

- Glycine
- L-cystéine
- L-histidine
- L-tyrosine
- L-leucine
- L-méthionine
- L-sérine
- L-alanine
- L-phénylalanine
- Acide L-glutamique
- L-proline
- L-isoleucine
- L-arginine
- L-thréonine
- L-valine
- L-lysine
- Acide L-aspartique



AdvanceBio MS Spent Media

Les colonnes Agilent AdvanceBio MS Spent Media sont des colonnes HILIC qui assurent des séparations rapides, sensibles et reproductibles des acides aminés non dérivatisés et des autres métabolites polaires présents dans les milieux de culture cellulaire des bioprocésseurs en vue de la détection par spectrométrie de masse.

Utilisées avec les instruments de la série LC Agilent InfinityLab et les instruments de MS d'Agilent, les colonnes AdvanceBio MS Spent Media constituent une solution complète pour l'analyse des milieux de culture épuisés.

L'analyse avec les colonnes Agilent AdvanceBio MS Spent Media est une offre qui vient d'être ajoutée à la gamme Agilent AdvanceBio. Elle est conçue pour fournir des solutions innovantes à la production et la caractérisation des biomolécules.

- Méthodes rapides basées sur la MS
- Aucune dérivatisation d'échantillon n'est nécessaire, d'où un gain de temps et une économie de ressources
- Colonnes en inox avec un revêtement interne en PEEK pour un circuit inerte garantissant une excellente forme de pic et un très bon rendement des métabolites ioniques difficiles à analyser
- Résolution chromatographique à la ligne de base de la leucine et de l'isoleucine
- Colonnes testées avec des acides aminés pour garantir leur qualité et leurs performances
- Excellente sensibilité analytique avec les phases mobiles compatibles avec la MS
- Colonnes compatibles avec les systèmes de HPLC et d'UHPLC grâce à des particules Poroshell de 2,7 µm

Spécifications des colonnes					
Phase greffée	Diamètre des pores	Granulométrie	Seuil de température	Plage de pH	Limite de pression
HILIC-Z	100 Å	2,7 µm	80 °C (à pH 7)	3,0-11,0 (à 35 °C)	600 bars

AdvanceBio MS Spent Media

Description	Référence
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

LC/MS

Colonne : AdvanceBio MS
Spent Media
2,1 x 100 mm
réf. 675775-901

Température
de colonne :

30 °C

Phase mobile :

pH faible, détection MS en mode ions positifs :
A = 10 % formiate d'ammonium 200 mM dans l'eau
pH 3, 90 % eau
B = 10 % formiate d'ammonium 200 mM dans l'eau
pH 3, 90 % acétonitrile
Concentration finale en sel de 20 mM.
Nous conseillons de préparer les phases mobiles à
partir de solutions mères concentrées de tampon
pour garantir la robustesse et l'uniformité des phases
mobiles.

Débit :

0,5 mL/min

Gradient :

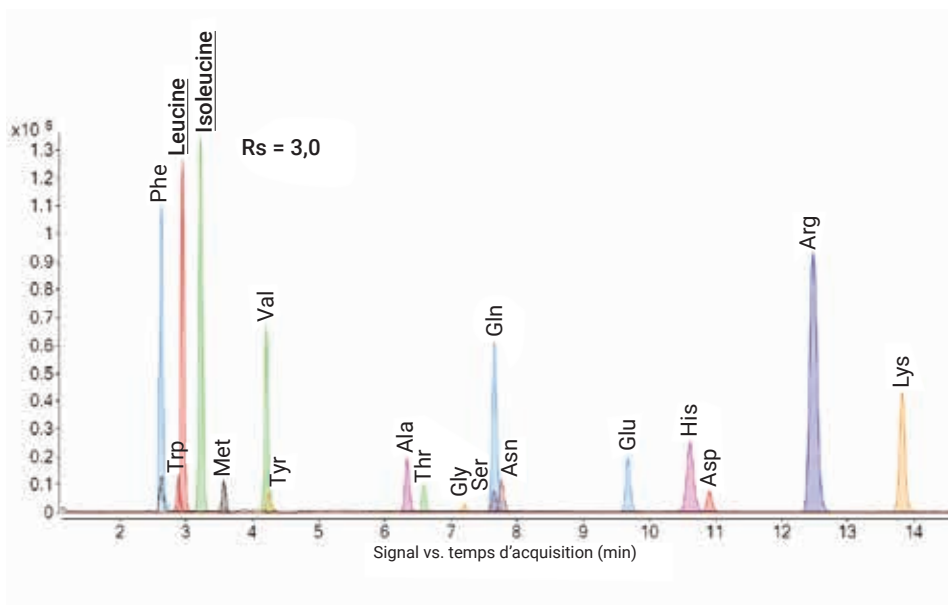
Temps (min)	% de B (pH faible, mode ions positifs)	% de B (pH élevé, mode ions négatifs)
0	1,00	100
15	80	80
15,5	100	100
20	100	100

Échantillon :

Milieu de culture cellulaire, dilué 1/5
avec la phase mobile B

Détection :

LC/MS TOF Agilent 6230

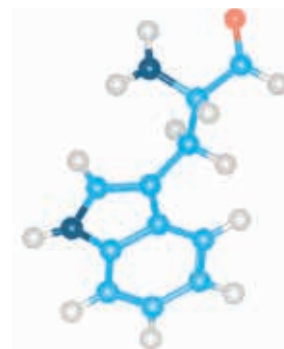
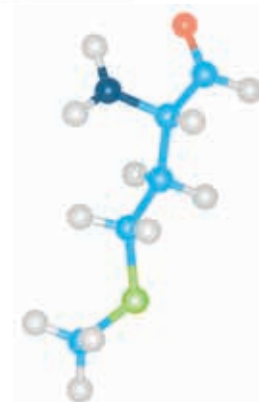
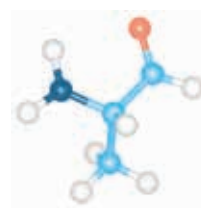


ZORBAX Eclipse AAA (analyse des acides aminés)

- Colonne testée pour l'analyse des acides aminés
- Compatible avec les réactions de dérivation précolonne bien connues avec OPA et FMOC
- Facilement automatisable à l'aide d'un protocole de dérivation en ligne détaillé pour une utilisation avec la série LC InfinityLab

La colonne ZORBAX Eclipse AAA sépare les acides aminés selon un protocole révisé et amélioré. Le délai total entre deux injections est de 14 min (9 min de temps d'analyse) sur les colonnes plus courtes de 75 mm et de 24 min (18 min de temps d'analyse) sur les colonnes de 150 mm de long. Les réactions de dérivation avec OPA et FMOC permettent d'assurer la fiabilité et la sensibilité (5–50 pmol avec des détecteurs à barrette de diodes ou à fluorescence) dans une procédure entièrement automatisée utilisant la série LC InfinityLab.

Pour les analyses d'acides aminés à grande vitesse sur les systèmes d'UHPLC, les colonnes ZORBAX Eclipse Plus C18 1,8 µm donnent d'excellents résultats.



Colonnes ZORBAX Eclipse AAA (analyse des acides aminés)

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
Sensibilité analytique de routine	4,6 x 150	5	993400-902
Sensibilité analytique de routine, haute résolution avec un FLD	4,6 x 150	3,5	963400-902
Sensibilité analytique de routine, cadence élevée	4,6 x 75	3,5	966400-902
Économie de solvant, haute sensibilité et haute résolution	3,0 x 150	5	961400-302
Cartouches de garde, 4/pqt	4,6 x 12,5	5	820950-931
Kit de montage pour cartouche de garde			820999-901

**ZORBAX Eclipse Plus**

Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Eclipse Plus C18 USP L1
Petit diamètre, haute définition à résolution rapide, 1 200 bars	2,1 x 50	1,8	959757-902
Petit diamètre, haute définition à résolution rapide, 600 bars	2,1 x 50	1,8	959741-902

Conseils et outils

Pour plus d'informations, reportez-vous à la publication suivante : *Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids and Analysis by Fast LC using the Agilent 1290 Infinity LC System* (**publication n° 5990-5599EN**)

www.agilent.com/search

Séparation de 24 acides aminés à haute résolution

Colonne : ZORBAX Eclipse AAA
963400-902
4,6 x 150 mm, 3,5 µm

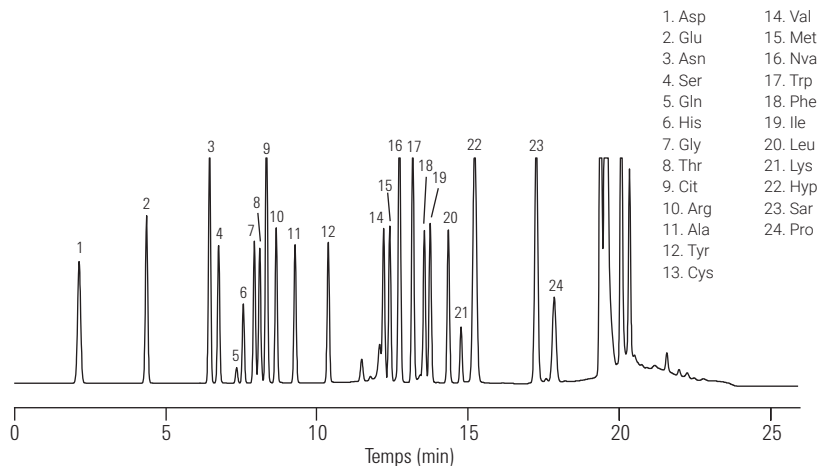
Phase mobile : A : Na₂HPO₄ 40 mM, pH 7,8
B : ACN:MeOH:eau, 45:45:10 (v/v/v)

Débit : 2 mL/min

Température : 40 °C

Détecteur : fluorescence

Échantillon : 24 acides aminés



Cette séparation de 24 acides aminés à haute résolution a été effectuée en 18 minutes. Avec la colonne Eclipse AAA 4,6 x 75 mm à résolution rapide, les acides aminés sont séparés en 9 minutes.

Conseils et outils

Les guides de références rapides contiennent la liste des consommables courants que vous devez garder en réserve pour assurer la meilleure efficacité opérationnelle possible de votre instrument de la série LC InfinityLab. Téléchargez votre exemplaire gratuit sur www.agilent.com/chem/getguides

Déplétion des protéines

Afin de mieux isoler et identifier les protéines dans les échantillons biologiques, tels que le sérum, le plasma et le liquide cébrospinal, le système d'immunoaffinités est conçu pour éliminer chromatographiquement les protéines interférentes très abondantes de ces échantillons. L'élimination de ces protéines abondantes améliore l'analyse de l'échantillon par LC/MS et électrophorèse en élargissant la gamme dynamique.



Système de fractionnement de protéines et réactifs pour la protéomique d'Agilent

- Analyse des échantillons biologiques par LC/MS
- Préparation pour l'analyse par électrophorèse
- Préparation d'échantillons pour la découverte de biomarqueurs
- Instrument et validation des méthodes
- Immunodéplétion rentable
- Dessalage, concentration et fractionnement des échantillons

La colonne de fractionnement à haut rendement mRP-C18 Agilent est conçue pour dessaler, concentrer et fractionner les échantillons en une simple étape, avec un rendement élevé par rapport aux colonnes de HPLC en phase inverse conventionnelles qui sont entièrement compatibles avec l'analyse par LC/MS.

De plus, des réactifs validés sont disponibles pour la préparation d'échantillons dans la découverte de biomarqueurs et d'autres applications protéomiques. Ils incluent notamment un étalon complexe et une trypsine de qualité protéomique. Pour plus de facilité, ces réactifs sont entièrement compatibles avec les méthodes LC/MS d'Agilent et ne nécessitent aucun prétraitement des échantillons supplémentaire.

Nos configurations sur demande permettent de répondre aux besoins en grands volumes ou en dimensions de colonne spéciales.

Système d'immunoaffinités

Le système d'immunoaffinités permet d'identifier et de caractériser les protéines et les biomarqueurs d'intérêt peu abondants présents dans le sérum, le plasma et les autres liquides biologiques.

Le système d'immunoaffinités élimine de façon reproductible et spécifique jusqu'à 14 protéines hautement abondantes présentes dans les liquides biologiques humains et 3 autres dans les liquides biologiques de souris.

Le système d'immunoaffinités est disponible dans diverses dimensions de colonne LC et dans un format cartouche à centrifuger. Associé aux tampons, aux filtres à centrifuger et aux concentrateurs d'Agilent, le système d'immunoaffinités constitue une solution de déplétion intégrée et automatisée compatible avec la plupart des instruments de LC (colonnes) et des centrifugeuses de paillasse (cartouches à centrifuger).

Après la déplétion avec le système d'immunoaffinités, les échantillons sont prêts pour les analyses en aval telles que l'électrophorèse sur gel 2D, la LC/MS et d'autres techniques analytiques.



Système d'immunoaffinités

Conseils et outils

Pour plus d'informations sur la façon dont vous pouvez diminuer le temps de cycle pour la chromatographie par affinité, reportez-vous à la publication suivante :

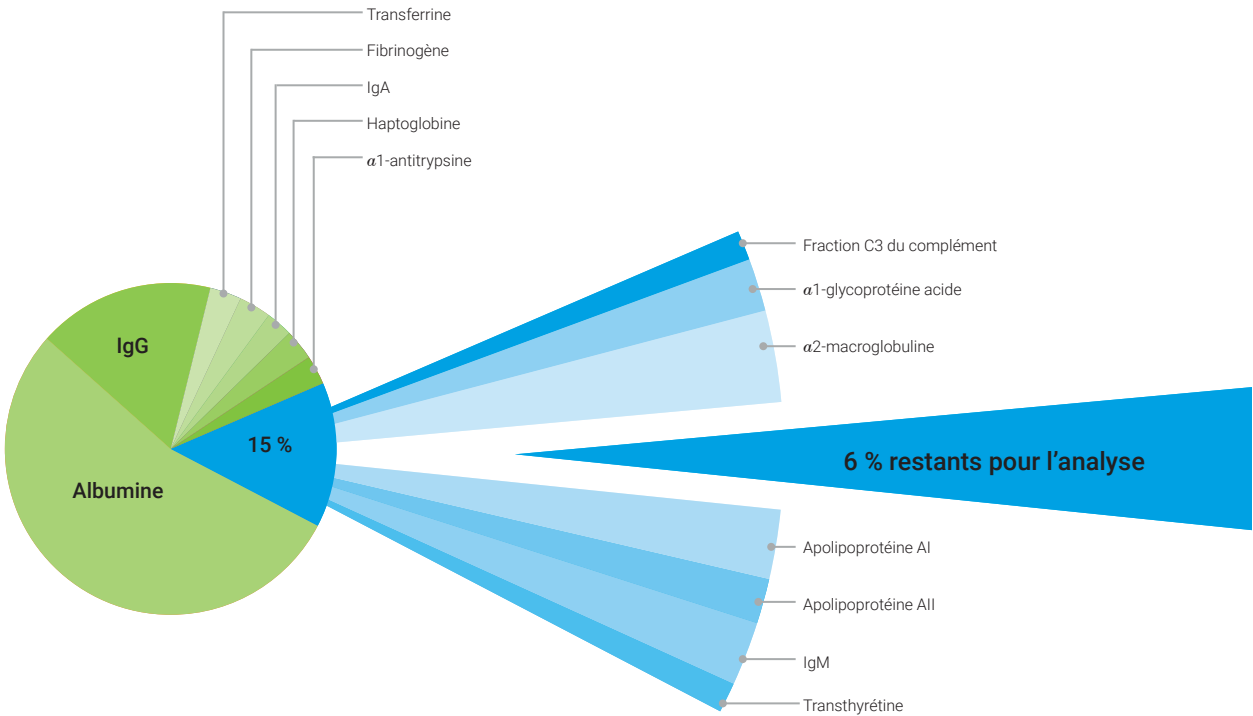
Reducing Cycle Time for Affinity Removal of High-Abundant Proteins in Human Plasma. Alternating Column Regeneration Using an Agilent 1200 Infinity Series Quick-Change Bio-inert 2-position/10-port Valve and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube (publication n° 5991-4721EN)

www.agilent.com/search

Guide de sélection des systèmes d'immunoaffinités

Produit	Protéines éliminées	Protéines totales éliminées	Dimensions	Capacité de charge	Référence
MARS Human-14	Albumine, IgG, antitrypsine, IgA, transferrine, haptoglobine, fibrinogène, alpha-2-macroglobuline, alpha-1-glycoprotéine acide, IgM, apolipoprotéine AI, apolipoprotéine AII, fraction C3 du complément, transthyréine	94 %	Cartouche à centrifuger	8–10 µL	5188-6560
			4,6 x 50 mm	20 µL	5188-6557
			4,6 x 100 mm	40 µL	5188-6558
			10,0 x 100 mm	250 µL	5188-6559
MARS Human-7	Albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobine, antitrypsine, fibrinogène	88–92 %	Cartouche à centrifuger	12–14 µL	5188-6408
			4,6 x 50 mm	30–35 µL	5188-6409
			4,6 x 100 mm	60–70 µL	5188-6410
			10,0 x 100 mm	250–300 µL	5188-6411
MARS Human-6	Albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobine, antitrypsine	85–90 %	Cartouche à centrifuger	7–10 µL	5188-5230
			4,6 x 50 mm	15–20 µL	5185-5984
			4,6 x 100 mm	30–40 µL	5185-5985
MARS Human haute capacité	Albumine, IgG, IgA, transferrine, haptoglobine, antitrypsine	85–90 %	Cartouche à centrifuger	14–16 µL	5188-5341
			4,6 x 50 mm	30–40 µL	5188-5332
			4,6 x 100 mm	60–80 µL	5188-5333
			10,0 x 100 mm	jusqu'à 340 µL	5188-5336
MARS Human-2	Albumine, IgG	69 %	Cartouche à centrifuger	50 µL	5188-8825
			4,6 x 50 mm	100 µL	5188-8826
MARS Human-1	Albumine	50–55 %	Cartouche à centrifuger	65 µL	5188-5334
			4,6 x 50 mm	130 µL	5188-6562
MARS Mouse-3	Albumine, IgG, transferrine	80 %	Cartouche à centrifuger	25–30 µL	5190-2534
			4,6 x 50 mm	37–50 µL	5188-5217
			4,6 x 100 mm	75–100 µL	5188-5218

Protéines hautement abondantes éliminées par les cartouches à centrifuger et colonnes d'immunoaffinités Agilent



Conseils et outils

Pour en savoir plus sur la gamme complète de services Agilent, rendez-vous sur www.agilent.com/chem/services

Kits de démarrage pour système d'immunoaffinités

Les kits de démarrage pour colonnes LC et cartouches à centrifuger incluent tous les consommables nécessaires pour une utilisation avec le système d'immunoaffinités. Les tampons offrent des conditions optimales pour garantir la longévité des colonnes et la reproductibilité des échantillons.

- Les kits contiennent suffisamment de tampon A et de tampon B pour environ 200 déplétions d'échantillons avec les colonnes LC de 4,6 x 50 mm, 100 déplétions d'échantillons avec les colonnes LC de 4,6 x 100 mm et 200 utilisations de cartouches à centrifuger.
- Le tampon A (tampon de chargement) réduit les interactions entre les protéines, permettant le passage à travers la colonne des protéines peu abondantes qui sont souvent liées à des protéines très abondantes, tandis que les protéines très abondantes ciblées se lient aux anticorps correspondants.
- Le tampon B (tampon d'élution) vient ensuite perturber les interactions protéines-anticorps, permettant l'élution des protéines très abondantes.

Kits de démarrage pour système d'immunoaffinités

Description	Référence
Tampon de dilution des échantillons à haute concentration, 50 mL	5188-8283
Le kit de démarrage pour colonnes LC inclut :	5185-5986
Tampon A, pour le chargement, le rinçage et la stabilisation, 1 L	5185-5987
Tampon B, pour l'élution, 1 L	5185-5988
2 x filtres à centrifuger, acétate de cellulose, 0,22 µm, 25/pqt	5185-5990
Concentrateurs centrifuges, seuil de coupure (MWCO) de 5 kDa, 4 mL, 25/pqt	5185-5991
Le kit de réactifs pour cartouches à centrifuger de système d'immunoaffinités inclut :	5188-5254
Tampon A, pour le chargement, le rinçage et la stabilisation, 1 L	5185-5987
Tampon B, pour l'élution, 1 L	5185-5988
2 x filtres à centrifuger, acétate de cellulose, 0,22 µm, 25/pqt	5185-5990
Concentrateurs centrifuges, seuil de coupure (MWCO) de 5 kDa, 4 mL, 25/pqt	5185-5991
Adaptateurs Luer-Lok, 2/pqt	5188-5249
Seringues en plastique, 5 mL, Luer-Lok, 2/pqt	5188-5332
6 x microtubes, 1,5 mL, à visser, 100/pqt	5188-5251
Capsules et bouchons, 6/pqt	5188-5252
Aiguilles en PTFE, Luer-Lok, 10/pqt	5188-5253



Kit de démarrage pour colonnes LC, 5185-5986



Seringue Luer-Lok, 5188-5250



Adaptateurs Luer-Lok, 5188-5249



Aiguilles Luer-Lok, 5188-5253

Dimensions spéciales

Colonnes capillaires et nanocolonnes

- Excellente sensibilité pour les tailles d'échantillons très réduites
- Compatibilité avec toutes les interfaces LC/MS
- Diamètres internes de 0,5, 0,3, 0,1 et 0,075 mm
- Pores de 300 Å de diamètre pour l'analyse des biomolécules
- Parfaitement adaptées aux applications (protéomiques) 1D et 2D

Les colonnes capillaires (0,5 et 0,3 mm de d.i.) et nanocolonnes (0,1 et 0,075 mm de d.i.) ZORBAX sont disponibles dans une grande variété de phases et de dimensions. Ces colonnes conviennent parfaitement aux applications avec des échantillons de taille très limitée, car elles offrent une sensibilité accrue en réduisant la dilution des échantillons sur la colonne.



Nanocolonnes

Conseils et outils

Agilent propose divers séminaires en ligne et formations sur site pour vous permettre d'augmenter vos connaissances de chromatographe. Pour plus d'informations, rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/education

Analyse par LC/MS à haute sensibilité d'une digestion protéique

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

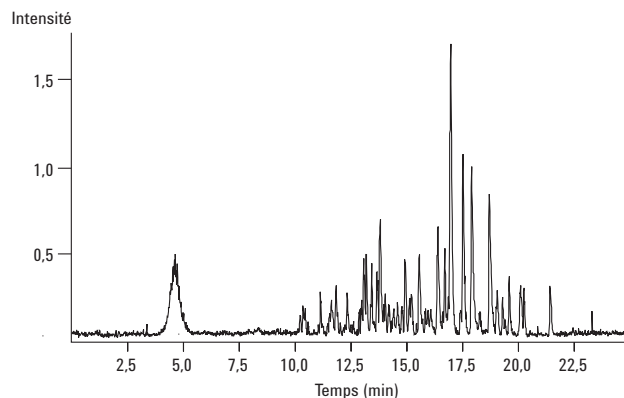
Phase mobile : A : eau + 0,1 % acide formique
B : ACN + 0,1 % acide formique

Débit : 600 nL/min

Gradient : 2 % de B à 52 % de B en 25 min

Détecteur : nano-electrospray MS, ions positifs

Échantillon : digestion de huit protéines, 100 fmol (1 µL)



Une nanocolonne de HPLC ZORBAX de 0,075 mm de d.i. a été utilisée pour l'analyse par LC/MS à haute sensibilité d'un échantillon d'une digestion protéique.

Haute sensibilité avec des colonnes capillaires

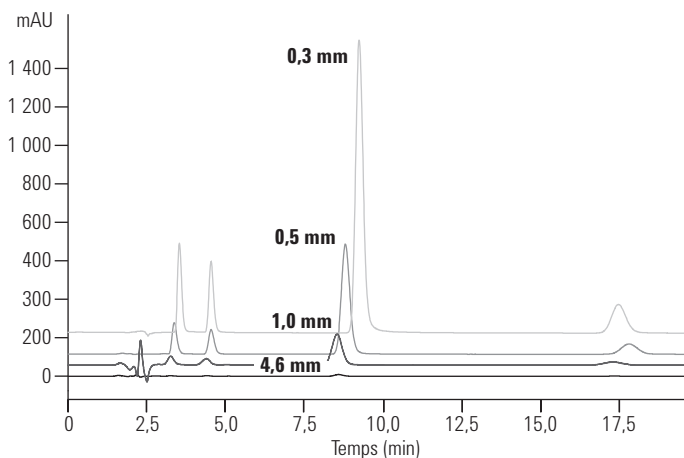
Colonne : ZORBAX SB-C18
5064-8255
0,3 x 150 mm, 5 µm

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

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

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

Échantillon : Biphényle, 200 ng



Les applications avec des tailles d'échantillon limitées nécessitent des colonnes capillaires pour réduire la dilution de l'échantillon sur la colonne et améliorer la sensibilité. La colonne capillaire de 0,3 mm utilisée dans cet exemple offre une sensibilité 100 fois plus élevée que la colonne de 4,6 mm ordinaire. Les colonnes Agilent nanobore (0,1 mm à 0,075 mm de d.i.) peuvent permettre un gain de sensibilité de 2 000 fois pour vos applications avec des tailles d'échantillons extrêmement limitées.

Sérum humain : isolement et identification de protéines peu abondantes à partir d'une bande 1D par LC/MS

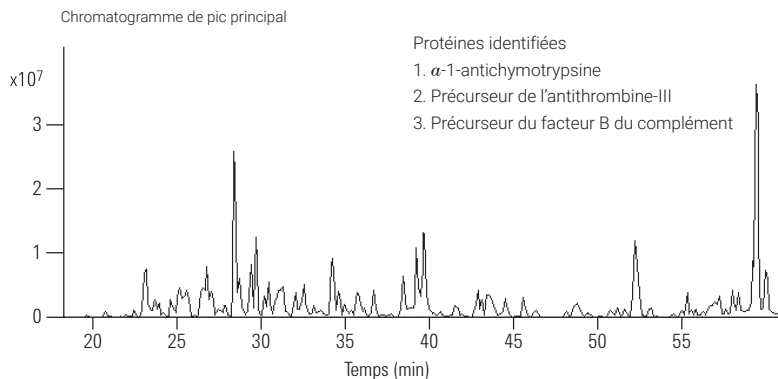
Colonne : ZORBAX 300SB-C18
Piège : 0,3 x 5 mm, 5 µm, 5065-9913
Analytique : 0,3 x 150 mm, 5 µm, 5064-8263

Phase mobile : A : eau + 0,1 % acide formique
B : acétonitrile + 0,1 % acide formique

Débit : 6 µL/min

Gradient : 0 min 3 % de B
5 min 3 % de B (chargement)
50 min 45 % de B
52 min 80 % de B
57 min 80 % de B
60 min 3 % de B

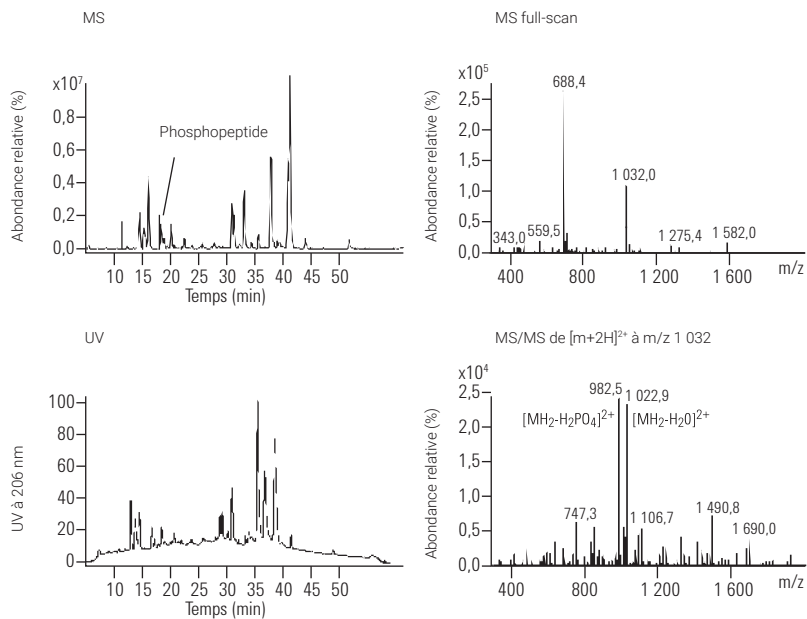
Échantillon : bande d'une digestion de gel 1D



Préparation d'échantillons de sérum humain : les protéines majeures du sérum ont été éliminées à l'aide d'une colonne d'immunoaffinité, 4,6 x 100 mm (réf. 5185-5985)
Puis une digestion de gel 1D a été effectuée.

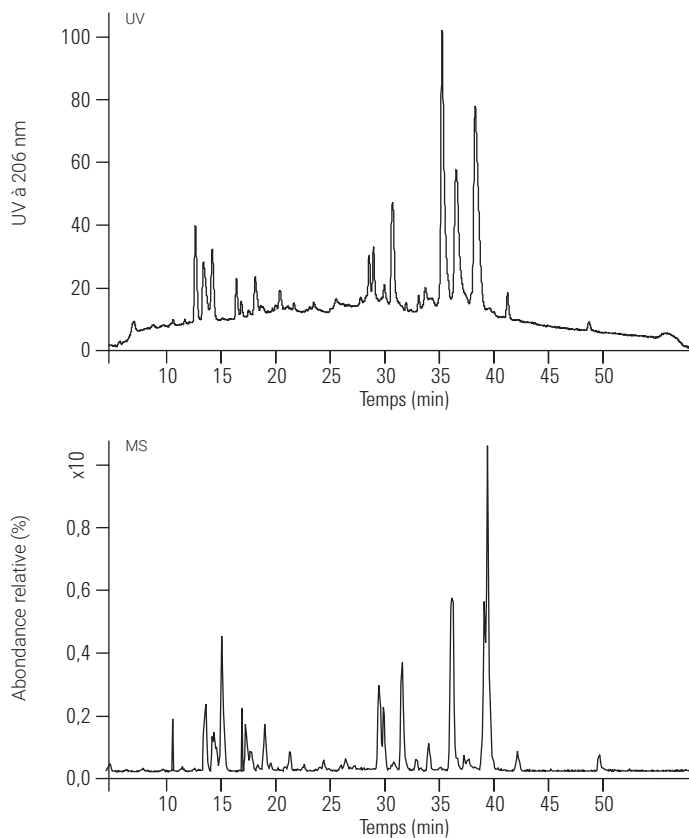
Sites de phosphorylation de peptides ; LC et LC/MS à l'aide de colonnes LC capillaires

Colonne :	ZORBAX 300SB-C18 5064-8268 0,5 x 150 mm, 3,5 µm
Phase mobile :	A : eau + 0,1 % acide formique B : acétonitrile + 0,1 % acide formique
Débit :	5,5 µL/min
Gradient :	5–55 % de B en 50 min, jusqu'à 85 % de B entre 55 et 57 min
Détecteur :	UV, 206 nm
Conditions MS :	LC/MS : ESI ions positifs avec LC/MSD Ion Trap
	Vcap : 4 000 V
	Débit du gaz de séchage : 7 L/min
	Température du gaz de séchage : 250 °C
	Nébuliseur : 15 psi
	Tension de sortie du capillaire : 50 V
	Temps d'accumulation maximal : 300 ms
	Moyennes totales : 3
	Largeur d'isolement : m/z 3
	Amplitude de fragmentation : 1,0 V
Échantillon :	digestion de caséine bêta, 100 nL (4 pmol)



Colonnes capillaires pour analyses par HPLC avec détection UV et MS

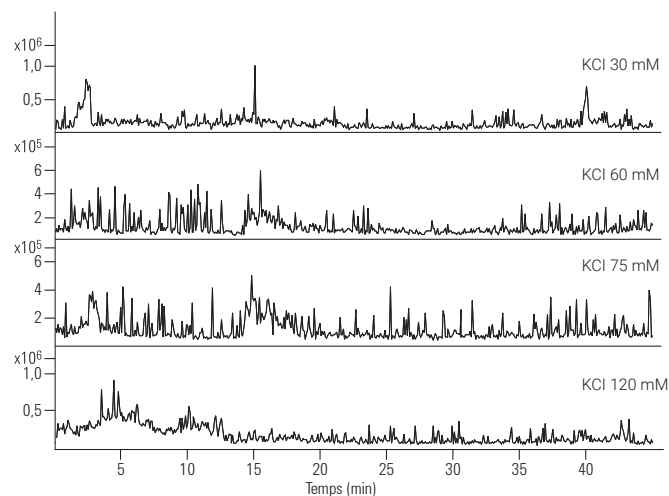
Colonne :	ZORBAX 300SB-C18 5064-8263 0,3 x 150 mm, 5 µm
Phase mobile :	5–55 % de B en 50 min, jusqu'à 85 % de B entre 55 et 57 min
	A : eau + 0,1 % acide formique B : acétonitrile + 0,1 % acide formique
Débit :	5,5 µL/min
Détecteur :	UV, 206 nm
Conditions MS :	LC/MS : ESI ions positifs avec LC/MSD Ion Trap
	Vcap de 4 000 V
	Débit du gaz de séchage : 7 L/min
	Température du gaz de séchage : 250 °C
	Nébuliseur : 15 psi
	Tension de sortie du capillaire : 50 V au max.
	Temps d'accumulation max. : 300 ms
	Moyennes totales : 3
	Largeur d'isolement : m/z 3
	Amplitude de fragmentation : 1,0 V
Échantillon :	digestion de caséine bêta, 100 nL (4 pmol)



Une colonne capillaire ZORBAX 300SB-C18 (0,3 mm de d.i.) a été utilisée pour la séparation de la digestion protéique. La détection a été effectuée par UV et MS electrospray. La détection MS peut être utilisée pour l'identification des fragments peptidiques.

Protéines dans un échantillon complexe analysées par HPLC-2D avec des nanocolonnes de HPLC

Colonne :	ZORBAX 300SB-C18 5065-9913 0,3 x 5 mm, 5 µm
Colonne :	ZORBAX 300SB-C18 5065-9911 0,075 x 150 mm, 3,5 µm
Phase mobile :	pompe quaternaire : acétonitrile 3 % : acide formique 0,1 % pompe à nanodébit : A ; eau, 0,1 % acide formique, B ; ACN, 0,1 % acide formique
Débit :	pompe quaternaire : 30 µL/min pompe à nanodébit : 300 nL/min
Gradient :	pompe quaternaire : isocratique pompe à nanodébit : 6 min = 3 % de B, 120 min = 60 % de B, 125 min = 80 % de B, 130 min = 80 % de B, 131 min = 3 % de B, 140 min = 3 % de B
Conditions MS :	Source : ionisation nano-electrospray ; débit du gaz de séchage : 5 L/min ; température du gaz de séchage : 225 °C « Ion trap » : écrêteur : 1 : 35 V, décalage sortie cap. : 115 V, octopôle 1 : 12 V, octopôle 2 : 3,5 V, entraînement piège : 80 V. CCI : activé, moyennes : 4, temps d'accumulation max. : 150 ms ; cible 60,000, mode ions positifs, mode MS/MS
Échantillon :	digestion tryptique de sérumalbumine bovine Volume : 1 à 8 µL Étapes de salification de l'élution : 8 mL de KCl 10 mM à 100 mM (incrément de 10 mM), 125 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM, 1 M



Digestion tryptique de sérumalbumine bovine (BSA). Les chromatogrammes de pic principal présentent les fractions d'une séparation par HPLC-2D.

Les chromatogrammes individuels représentent l'élution des peptides de la BSA à une concentration en sel donnée, suivie d'un enrichissement et d'une chromatographie en phase inverse.

ZORBAX Bio-SCX série II

Les colonnes ZORBAX Bio-SCX série II sont conçues pour l'optimisation des séparations 2D des peptides et protéines par LC/MS. Leur remplissage est basé sur des particules de silice ZORBAX 3,5 µm ultrapure, greffées avec un polymère biocompatible comportant des groupes acides sulfoniques. Cela confère une forte rétention et une bonne forme de pic à l'étape d'échanges d'ions de l'analyse 2D des peptides et protéines.



Nanocolonnes

Spécifications des colonnes HPLC					
Phase greffée	Diamètre des pores	Surface spécifique	Plage de pH	Groupe fonctionnel	Pression max.
ZORBAX Bio-SCX série II	300 Å	90 m²/g	2,5–8,5	Acide sulfonique	350 bars

Une meilleure rétention des petits peptides

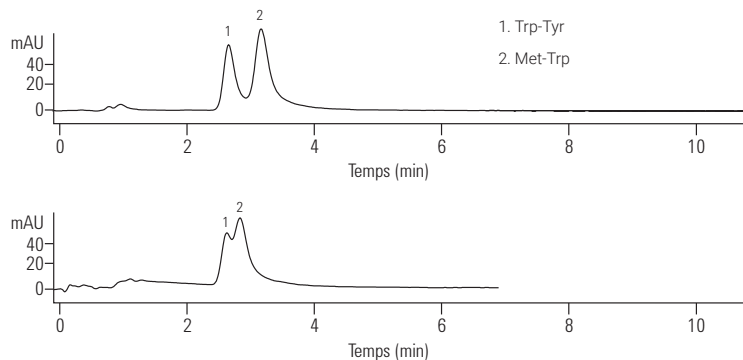
Colonne : **ZORBAX Bio-SCX série II**
5065-9912
0,3 x 35 mm, 3,5 µm

Phase mobile : 95 % NaCl 40 mM: 5 % ACN, 0,3 % acide formique

Débit : 5 µL/min

Détecteur : UV, 230 nm

Échantillon : dipeptides synthétiques



La colonne ZORBAX Bio-SCX série II retient les petits peptides plus fortement que les autres colonnes SCX. Cela se traduit par l'augmentation de la résolution des fragments peptidiques plus hydrophiles et permet une identification plus précise lorsqu'elle est utilisée dans les analyses par HPLC-2D.

Conseils et outils

Les consommables Agilent bio-inertes fournissent un circuit sans métal, qui réduit au minimum les interactions avec vos biomolécules.
 Rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/bio-inert-uhplc

Colonnes capillaires ZORBAX pour HPLC (inox à gainage verre)

Description	Taille (mm)	Granulométrie (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300Extend-C18
Capillaire	0,5 x 250	5	5064-8266		
Capillaire	0,5 x 150	5	5064-8264		
Capillaires, résolution rapide	0,5 x 150	3,5	5064-8268		
Capillaire	0,5 x 35	5	5064-8294		
Capillaires, résolution rapide	0,5 x 35	3,5	5065-4459		
Capillaire	0,3 x 250	5	5064-8265		
Capillaire	0,3 x 150	5	5064-8263		
Capillaire	0,3 x 35	5	5064-8295		
Capillaires, résolution rapide	0,3 x 150	3,5	5064-8267	5065-4460	5065-4464
Capillaires, résolution rapide	0,3 x 100	3,5	5064-8259	5065-4461	5065-4465
Capillaires, résolution rapide	0,3 x 75	3,5	5064-8270	5065-4462	5065-4466
Capillaires, résolution rapide	0,3 x 50	3,5	5064-8300	5065-4463	5065-4467
Tamis de remplacement, 10/pqt			5065-4427	5065-4427	5065-4427

Nanocolonnes ZORBAX pour HPLC (PEEK)

Description	Taille (mm)	Granulométrie (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
Nanocolonne, résolution rapide	0,1 x 150	3,5	5065-9910	
Nanocolonne, résolution rapide	0,075 x 150	3,5	5065-9911	
Nanocolonnes, résolution rapide	0,075 x 50	3,5	5065-9924	5065-9923
Pièges/gardes, 5/pqt	0,3 x 5	5	5065-9913	5065-9914
Kit de montage pour piège/garde			5065-9915	5065-9915



Piège/garde pour ZORBAX 300SB-C18, 5065-9913

Colonnes microbore (1,0 mm de d.i.)

- Haute sensibilité pour les faibles tailles d'échantillons
- Compatibilité avec les interfaces LC/MS
- Large éventail de phases greffées
- Particules de silice et de polymère

Les colonnes microbore (1,0 mm de d.i.) sont un bon choix quand la taille des échantillons est limitée. Comparées aux colonnes de 2,1 mm de d.i., elles peuvent entraîner une augmentation d'un facteur cinq des limites de détection avec la même masse d'échantillon. Cette amélioration de la sensibilité peut jouer un rôle déterminant. Les colonnes microbore nécessitent des débits faibles (généralement ~50 µL/min). Elles sont donc parfaitement adaptées à l'utilisation avec la LC capillaire et les détecteurs qui nécessitent des débits faibles comme certains détecteurs de masse.

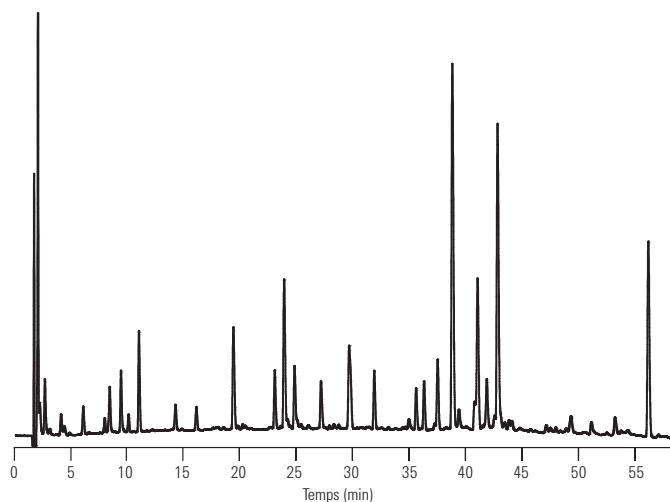
Les performances sont optimales lorsque les colonnes microbore sont utilisées avec les systèmes microbore d'UHPLC/HPLC. Une large gamme de phases greffées est disponible pour des pressions pouvant atteindre 400 bars, notamment les colonnes StableBond, 300SB-C18, 300SB-C8 et Poroshell. Les colonnes à phase inverse (PLRP-S) et d'échange d'ions (PL-SAX et PL-SCX) sont également disponibles pour les applications nécessitant des particules à pores larges très stables. Les colonnes de garde sont désormais disponibles avec une butée de profondeur ajustable pour assurer une connexion parfaite sans volume mort, à chaque fois.



Phase greffée 300StableBond protégée par encombrement stérique

Séparation d'une digestion trypsique

Colonne :	ZORBAX 300SB-C18 863630-902 1,0 x 150 mm, 3,5 µm
Phase mobile :	Gradient : 2–60 % de B en 60 min A : 0,1 % TFA B : 0,075 % TFA :80 % ACN
Débit :	50 µL/min
Température :	50 °C
Détecteur :	UV, 215 nm
Échantillon :	digestion trypsique de rhGH, 2 µL



Cet exemple de séparation d'une digestion trypsique sur une colonne microbore démontre la haute sensibilité et résolution qu'il est possible d'obtenir avec les colonnes de 1,0 mm de d.i.

HPLC microbore pour l'analyse sensible des peptides

Colonne : PLRP-S 100 Å 5 µm
150 mm x divers d.i.

Phase mobile : A : TRIS HCl 0,01 M, pH 8
B : A + NaCl 0,35 M, pH 8

Débit : 1 mL/min

Gradient : linéaire 20 % ACN, 0,1 % TFA à 50 % ACN,
0,1 % TFA sur 15 min

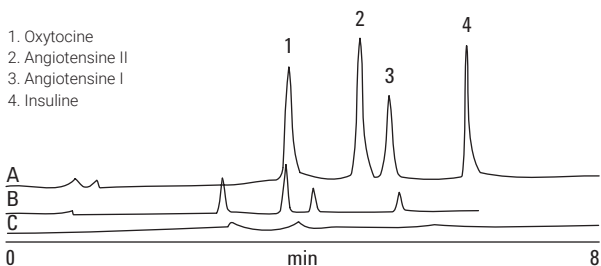
Volume d'injection : 0,5 µL

Concentration de l'échant. : 0,25 mg/mL

Détecteur : UV, 220 nm

Identification des pics

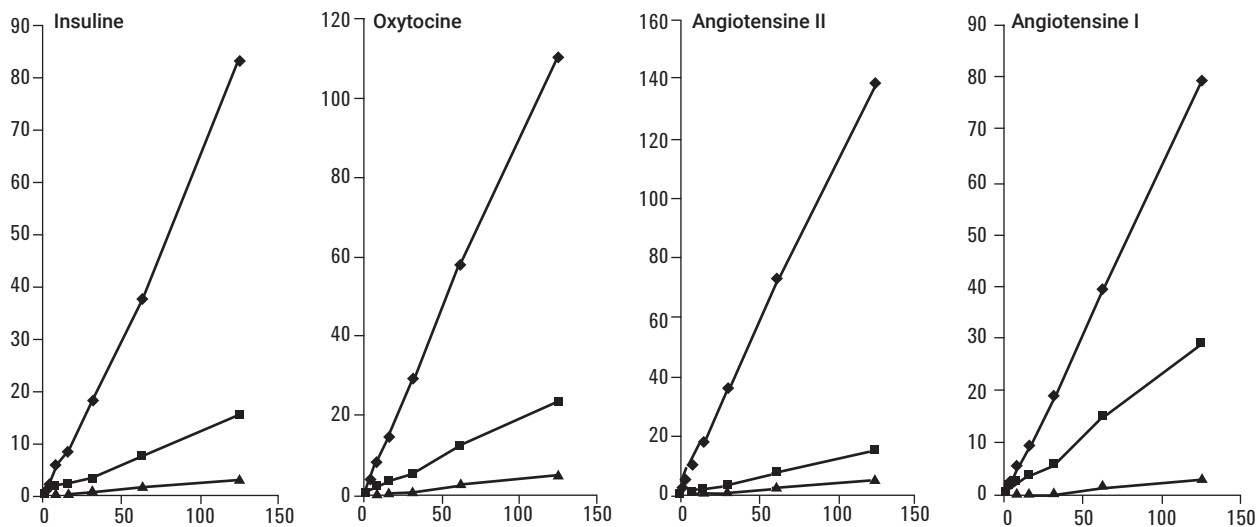
A. 1,0 mm de d.i. (débit de 47 µL/min)
B. 2,1 mm de d.i. (débit de 200 µL/min)
C. 4,6 mm de d.i. (débit de 1 mL/min)



Séparation de peptides sur des colonnes PLRP-S 100 Å 5 µm

Identification des pics

◆ 1,0 mm
■ 2,1 mm
▲ 4,6 mm



Courbes d'étalonnage sur les colonnes PLRP-S. La diminution du diamètre interne de la colonne abaisse la limite de détection et permet de quantifier les échantillons de taille réduite.

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

Description	Taille (mm)	Granulométrie (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
Microbore	1,0 x 250	5	861630-902	
Microbore, résolution rapide	1,0 x 150	3,5	863630-902	863630-906
Microbore, résolution rapide	1,0 x 50	3,5	865630-902	865630-906
Cartouches de garde pour microbore, 3/pqt	1,0 x 17	5	5185-5920	5185-5920

Description	Taille (mm)	Granulométrie (mm)	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
Cartouches de garde pour microbore, 3/pqt	1,0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	

Description	Taille (mm)	Granulométrie (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		

Description	Taille (mm)	Granulométrie (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

- Associe deux techniques de LC orthogonales dans une même analyse
- Fournit une capacité de pics supérieure, même par rapport aux méthodes d'UHPLC
- Permet d'utiliser des méthodes d'exclusion stérique et d'échange d'ions avec un détecteur de masse

L'hétérogénéité et la complexité des biomolécules nécessitent le recours à plusieurs techniques de LC pour identifier et caractériser un produit biopharmaceutique cible. En associant deux techniques orthogonales dans une analyse, par exemple la LC par interaction hydrophile avec la LC en phase inverse, ou la LC d'échange de cations avec la LC en phase inverse, vous pouvez bénéficier de performances de séparation inégalées pour l'identification et l'analyse des attributs qualité critiques.

Les applications de la LC-2D vont du simple dessalage en ligne d'une fraction résultant de la capture d'un anticorps monoclonal par la protéine A à l'utilisation de LC par interaction hydrophile avec des méthodes de cartographie peptidique en phase inverse permettant de caractériser tous les fragments de glycopeptides et de peptides hydrophiles et hydrophobes.

Bénéficiez d'une productivité accrue en utilisant la LC-2D afin de réduire les temps d'analyse et d'optimiser la génération et l'interprétation des données :

- Exploration de méthode et passage d'une application à l'autre
- Régénération de la colonne hors ligne
- Analyse d'impuretés en ligne
- LC-2D par isolement de pic
- LC-2D complète

Régénération de la colonne hors ligne

Pour des analyses solides d'isoformes par LC à échange d'ions, il est nécessaire d'effectuer un nettoyage et une stabilisation rigoureux de la colonne. Le temps d'analyse total étant alors plus long et il faut donc trouver des moyens d'augmenter la cadence d'analyse. L'un d'eux consiste à effectuer la régénération de colonne hors ligne, ce qui écourte le temps de cycle jusqu'à 40 %.

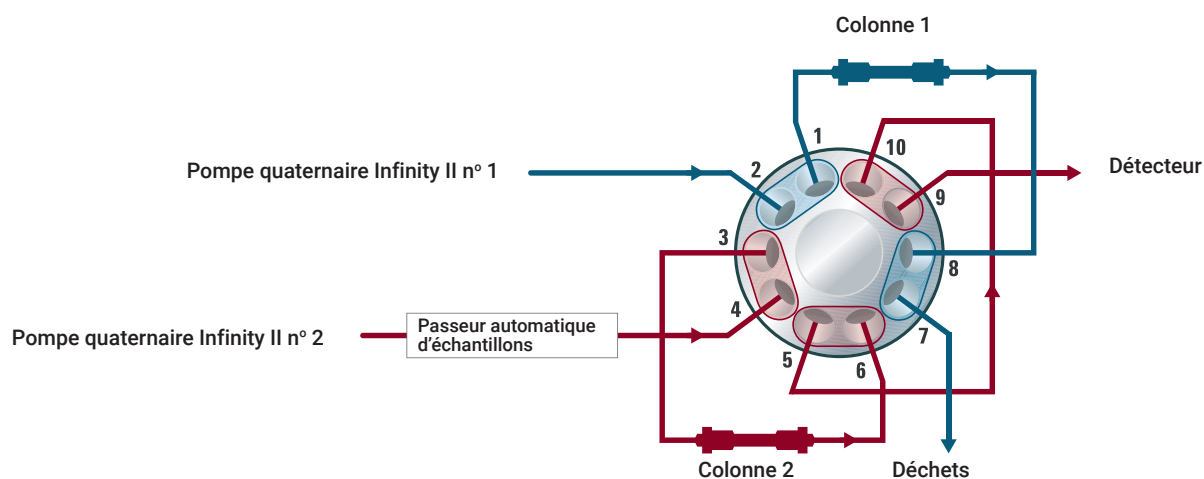


Schéma de la configuration de vanne nécessaire pour la régénération de la colonne hors ligne telle qu'elle peut être utilisée pour effectuer l'analyse des isoformes de mAb avec un LC bio-inerte 1260 Infinity II et deux colonnes Bio MAb en PEEK de 2,1 x 250 mm, 5 µm.

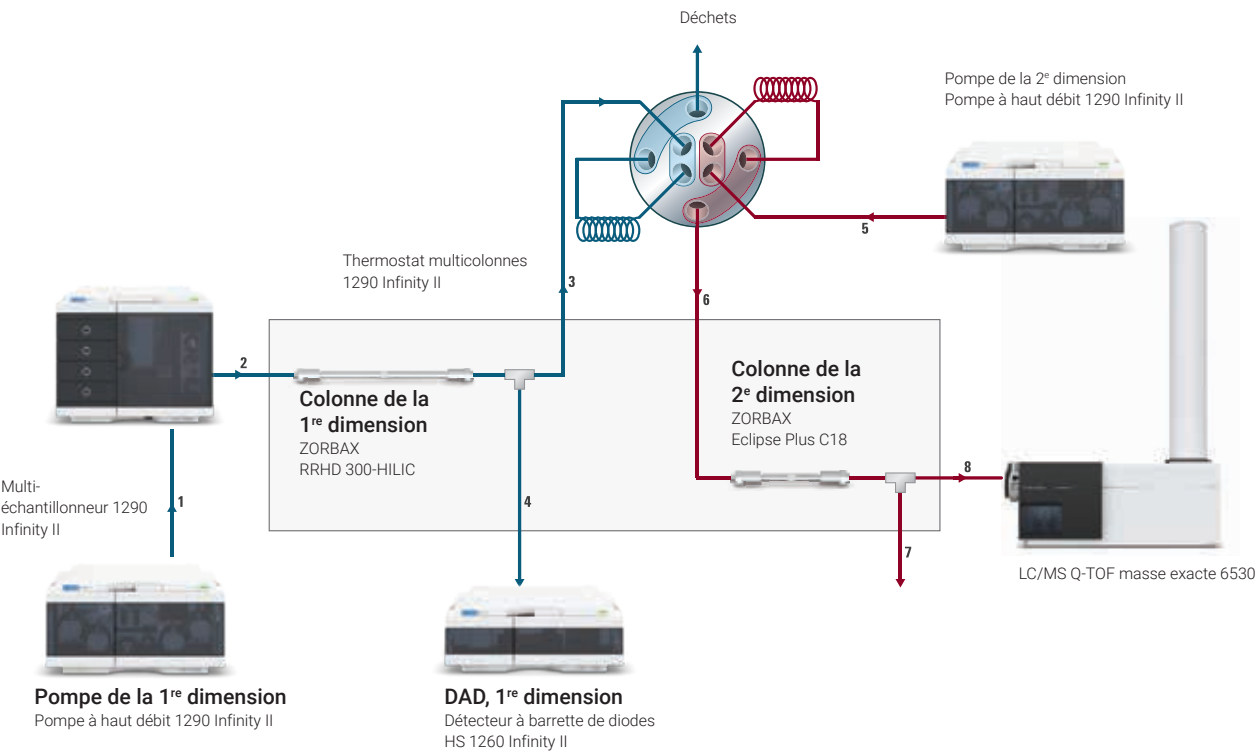
Précision des surfaces et temps de rétention intra- (n = 6) et intercolonne (n = 12)

	RSD (%) des TR intracolonne	RSD (%) des aires intracolonne	RSD (%) des TR intercolonne	RSD (%) des aires intercolonne
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 régénération de la colonne Bio MAb en PEEK a pu être effectuée hors ligne avec une bonne précision intra- et intercolonne des temps de rétention et des aires.

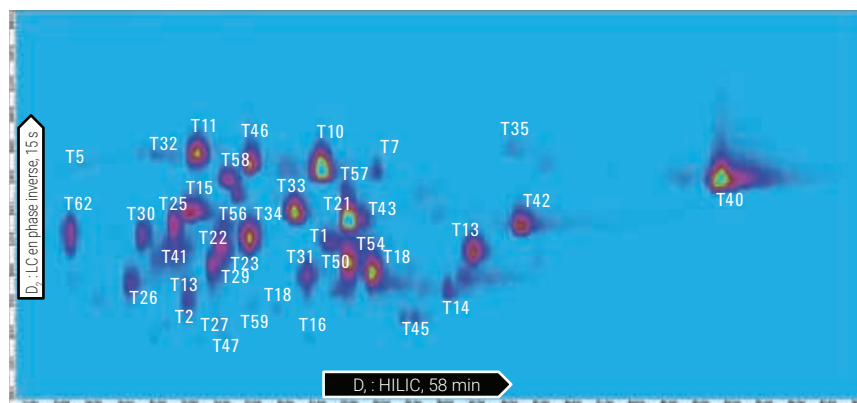
Intracolonne (n = 6) et intercolonne (n = 12).

LC-2D complète



1	Pompe vers passeur automatique d'échantillons (1 ^{re} dimension)	Capillaire d'étalonnage (G1312-67500)
2	Passeur automatique d'échantillons vers colonne de la 1 ^{re} dimension (échangeur de chaleur, 1,6 µL)	Inox, 0,17 mm
3	Raccord en T 1 vers vanne de LC-2D	Inox, 0,12 x 200 mm
4	Raccord en T 1 vers DAD de la 1 ^{re} dimension	Inox, 0,12 x 140 mm
5	Pompe de la 2 ^e dimension vers vanne de LC-2D	Inox, 0,17 mm
6	Vanne de LC-2D vers colonne de la 2 ^e dimension (échangeur de chaleur, 1,6 µL)	Inox, 0,12 x 270 mm
7	Raccord en T 2 vers déchets	Inox, 0,12 x 340 mm
8	Raccord en T 2 vers détecteur (source Agilent Jet Stream ou DAD de la 2 ^e dimension)	Inox, 0,075 x 340 mm (5067-4783)

Configuration d'un LC 2D InfinityLab pour réaliser l'analyse 2D complète et la cartographie peptidique d'une digestion d'anticorps monoclonal avec la LC par interaction hydrophile (HILIC) et la LC en phase inverse couplée à la MS.



Chromatogramme LCxLC de l'analyse d'une digestion tryptique de trastuzumab généré avec les données MS d'ions totaux. Les deux dimensions, HILIC dans la première et phase inverse dans la seconde, ont une bonne orthogonalité pour cette analyse.

Agilent propose une large gamme de phases disponibles dans les tailles de colonne nécessaires. Si vous ne trouvez pas la combinaison de diamètres des pores, granulométrie, phase et taille de colonne dont vous avez besoin, contactez notre équipe dédiée aux colonnes sur mesure qui possède une vaste expertise dans la production de colonnes répondant à des critères de performances spécifiques.

Conseils et outils

Pour en savoir plus sur les principes de base de la LC-2D, consultez notre livre de présentation intitulé : *Principles, Practical Implementation and Applications of Two-Dimensional Liquid Chromatography* (publication n° **5991-2359EN**)

www.agilent.com/chem/2DLC-Primer



Colonnes de HPLC préparative pour la purification

Agilent propose des supports et des colonnes de HPLC polymériques ou à base de silice pour la purification des biomolécules. Notre vaste gamme contient des colonnes de HPLC préparative très efficaces avec une granulométrie fine pour la purification des composés biopharmaceutiques potentiellement actifs dans des quantités de l'ordre du microgramme et du milligramme, ainsi que des matériaux en vrac complètement poreux pour le remplissage des colonnes de développement et de traitement permettant de purifier des grammes ou des kilogrammes d'API.

Certaines colonnes sont spécifiquement conçues pour satisfaire aux besoins des purifications à haute efficacité, tandis que d'autres produits simplifient la transposition d'échelle entre les colonnes analytiques à granulométrie fine et la production d'API. Le tableau suivant présente les options de supports/colonnes de HPLC préparative et la quantité de produit qui peut être purifié.



Colonnes de HPLC préparative polymériques

Cycle de vie des produits biopharmaceutiques		Exploration µg à mg Haute efficacité	Développement g	Production kg à multikg Cadence élevée
Phase inverse	mRP-C18	➔		
	ZORBAX PrepHT 300 Å StableBond	➔	➔	
	VariTide RPC	➔	➔	
	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1 000 Å et 4 000 Å	➔	➔	➔
Échange d'ions	Bio MAb	➔	➔	
	Bio IEX	➔	➔	
	PL-SAX	➔	➔	➔
	PL-SCX	➔	➔	➔
Exclusion stérique	Bio SEC-3 Bio SEC-5	➔	➔	

Colonnes et supports Agilent pour la purification des biomolécules : type de chromatographie, famille de produits et échelle de purification.

Sélection des colonnes de purification

Application	Technique	Notes	Colonnes Agilent
Protéomique	Phase inverse	Colonne à rendement élevé spécialisée pour applications protéomiques. Conçue pour la purification à l'échelle du µg avec un rendement maximal.	mRP-C18
Toutes biomolécules	Phase inverse	Particules à base de silice de 300 Å à haute efficacité.	ZORBAX PrepHT 300SB
Peptides synthétiques	Phase inverse	Matériau polymérique conçu pour la purification des peptides synthétiques. Elle constitue une solution simple colonne pour tout l'éventail des peptides synthétiques, qu'ils soient acides, basiques, hydrophobes ou hydrophiles, et couvre toute la gamme de tailles de peptides produits par synthèse en solution ou sur support solide.	VariTide RPC
Toutes biomolécules	Phase inverse	Famille de phases inverses polymériques d'excellente qualité avec une plage de diamètre de pores et de granulométrie qui permet aussi bien la purification hautement efficace à l'échelle du laboratoire avec des colonnes préparatives à granulométrie fine, que la transposition d'échelle vers la purification de production en grande quantité avec une granulométrie importante à l'échelle du procédé. Utilisez des colonnes PLRP-S quand vous devez effectuer la transposition d'échelle de la purification pour produire des API en constituant la documentation réglementaire. – 3 µm et 5 µm pour une haute efficacité – Particules de 8 µm, 10 µm, 10–15 µm, 15–20 µm, 30 µm et 50 µm pour les purifications à plus grande échelle et à basse pression	PLRP-S
Anticorps monoclonaux	Échange d'ions	Colonne échangeuse de cations faibles non poreuse	Bio MAb
Toutes biomolécules	Échange d'ions	Colonnes échangeuses d'ions non poreuses Groupes fonctionnels SAX, WAX, SCX et WCX offrant plusieurs options pour la purification des molécules acides et basiques Particules de 5 µm non poreuses pour une meilleure efficacité de la HPLC préparative à l'échelle du laboratoire	Bio IEX
Toutes biomolécules	Échange d'ions	Colonne échangeuse d'anions forts totalement poreuse – Granulométrie de 5 µm pour une grande efficacité de séparation – Granulométries de 8 µm, 10 µm et 30 µm pour les purifications à plus grande échelle et à moyenne ou basse pression	PL-SAX
		Colonne échangeuse de cations forts totalement poreuse – Granulométrie de 5 µm pour une grande efficacité de séparation – Granulométries de 8 µm, 10 µm et 30 µm pour les purifications à plus grande échelle et à moyenne ou basse pression	PL-SCX
Toutes biomolécules	Exclusion stérique	Support de SEC à base de silice pour divers diamètres de pores – Granulométries de 3 µm et 5 µm pour une haute efficacité – Diamètres de pores de 100 Å à 2 000 Å couvrant une large plage de tailles de molécules	Bio SEC-3 et Bio SEC-5

Conseils et outils

Pour plus d'informations, reportez-vous à la publication suivante :

Biomolecule Purification (publication n° 5990-8335EN)

www.agilent.com/search

Colonnes de fractionnement des protéines à haut rendement mRP-C18 Agilent

La colonne de fractionnement des protéines à haut rendement mRP-C18 Agilent à phase inverse macroporeuse est conçue pour les séparations à haute résolution et à rendement élevé, ainsi que le fractionnement et le dessalage simultané des échantillons protéiques complexes, comme le sérum après immunodéplétion ou les protéines plasmatiques.

- Un rendement de l'échantillon protéique supérieur à 95–99 % a été observé avec une colonne de LC à système d'immunoaffinités pour des échantillons de sérum après immunodéplétion
- Il est possible de charger jusqu'à 380 µg de masse protéique totale sans diminuer la résolution chromatographique des protéines
- La colonne est remplie de particules C18 macroporeuses de silice ultrapure de 5 µm conçues pour réduire ou éliminer la forte adsorption des protéines
- La pression opérationnelle maximale est de 250 bars (4 000 psi)
- La colonne est compatible avec l'eau et tous les solvants organiques courants



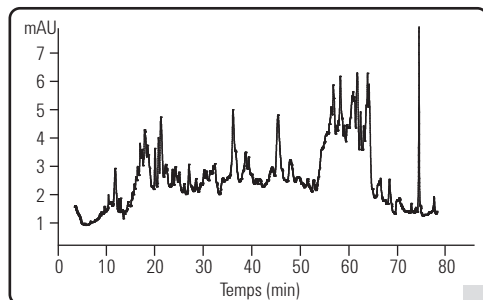
Colonne de fractionnement des protéines à haut rendement mRP-C18 Agilent, 4,6 x 50 mm, 5188-5231

Colonnes de fractionnement des protéines à haut rendement mRP-C18 Agilent

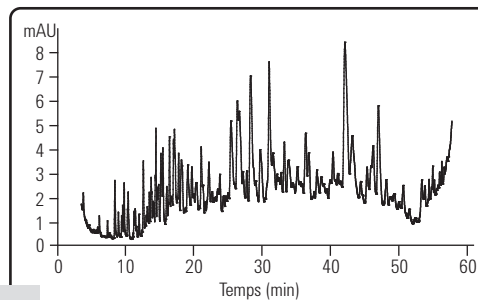
Description	Capacité de charge protéique	Référence
mRP-C18, 0,5 x 100 mm	10 ng–5 µg	5188-6510
mRP-C18, 2,1 x 75 mm	8–85 µg	5188-6511
mRP-C18, 4,6 x 50 mm	40–380 µg	5188-5231

Fractionnement des protéines d'échantillons complexes sur colonne à phase inverse macroporeuse (mRP)

mRP-C18, 4,6 x 50 mm

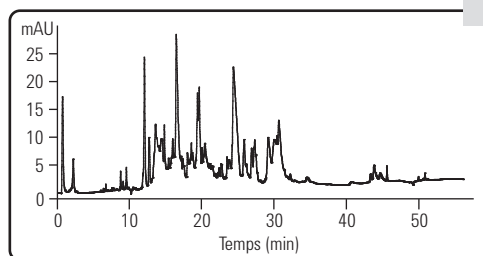


Préparation de membranes de cellules HeLa

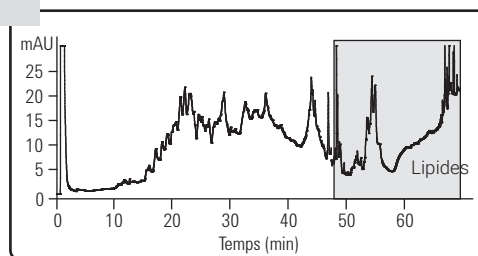


Lysat cellulaire HeLa (352 µg)

Le meilleur rendement



Sérum humain après déplétion des six protéines les plus abondantes



Préparation de radeau lipidique de membranes cérébrales humaines (500 µg)

ZORBAX PrepHT

- Transposition simplifiée de l'échelle analytique à l'échelle préparative avec les phases ZORBAX
- Séparations préparatives rapides, jusqu'à 2 000 mg
- Particules de 5 à 7 µm pour une haute efficacité et un rendement élevé
- Connexions à serrage manuel simples d'installation, jusqu'à 5 000 psi/350 bars
- Pour effectuer vos séparations préparatives avec la même sélectivité que la phase analytique

Les colonnes ZORBAX PrepHT permettent d'obtenir une pureté, un rendement et des cadences élevés. Elles sont disponibles avec diverses phases greffées — StableBond 300 Å, C18, C8, C3 et CN — pour optimiser la résolution et la capacité de charge dans n'importe quelles conditions.

Les colonnes ZORBAX PrepHT possèdent des granulométries de 5 et 7 µm pour une très haute résolution. Cette haute résolution permet une capacité de charge, un rendement et une pureté des composés élevés. Les colonnes de plus grand diamètre et les particules ZORBAX mécaniquement plus résistantes permettent des débits jusqu'à 100 mL/min, augmentant ainsi la cadence.

Les colonnes ZORBAX PrepHT sont conçues pour effectuer rapidement la transposition de l'échelle analytique à l'échelle préparative sans perte de résolution. Pour les séparations complexes réalisées sur de plus grandes colonnes (21,2 mm et longueur de 150 mm, voire plus), Agilent a soigneusement sélectionné la granulométrie de 7 µm afin d'assurer l'équilibre entre haute efficacité et haute capacité de charge.



Cartouches ZORBAX 300 Å
StableBond PrepHT

ZORBAX 300 Å StableBond

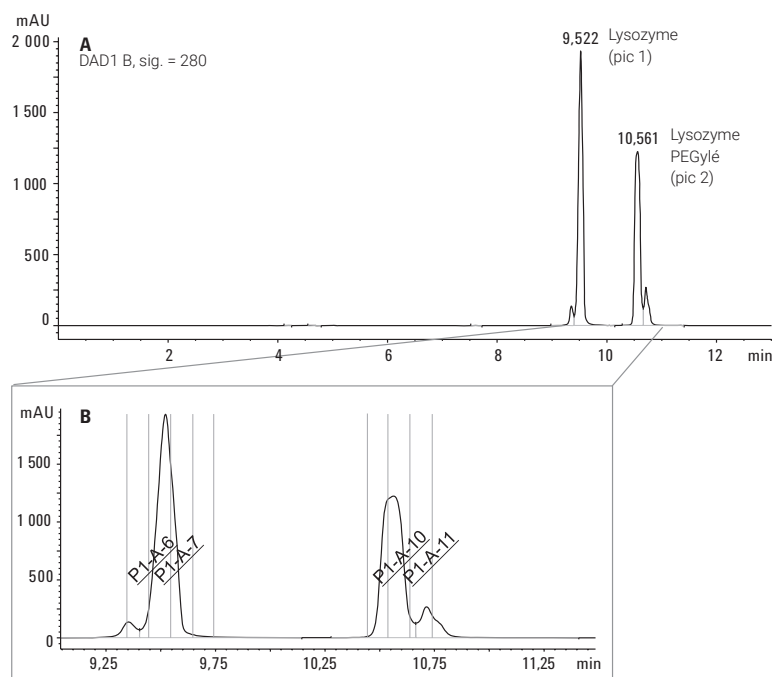
Description	Taille (mm)	Granulométrie (µm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56
Cartouches PrepHT (kit de raccords 820400-901 requis)						
Cartouche PrepHT	21,2 x 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
Cartouche PrepHT	21,2 x 150	7	897150-102	897150-106		897150-109
Cartouche PrepHT	21,2 x 150	5	895150-902	895150-906		895150-909
Cartouche PrepHT	21,2 x 100	5	895100-902	895100-906		895100-909
Cartouche PrepHT	21,2 x 50	5	895050-902	895050-906		895050-909
Raccords pour cartouche PrepHT, 2/pqt			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
Cartouches de garde PrepHT, 2/pqt	17,0 x 7,5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
Kit de montage pour cartouche de garde			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

HPLC semi-préparative en phase inverse d'un mélange réactionnel PEG-lysozyme

Colonne : ZORBAX SB-C18
880975-202
9,4 x 250 mm, 5 µm

A : HPLC semi-préparative en phase inverse d'un mélange réactionnel PEG-lysozyme sur une colonne semi-préparative ZORBAX 300 SB-C18

B : agrandissement montrant la collecte de fractions



PLRP-S de la préparation à la production

- La transposition de l'exploration à la production BPF de quantités de l'ordre de plusieurs kg diminue le temps nécessaire au développement de méthodes.
- La stabilité chimique des étapes de séparation, d'optimisation de désinfection et de régénération augmente la sélectivité et la durée de vie de la colonne.
- Le remplissage de plusieurs colonnes par lot réduit l'indisponibilité du système et les coûts de validation.

Les supports PLRP-S constitués de particules rigides de poly(styrène/divinylbenzène) sont disponibles avec des diamètres de pores pour la purification des petites molécules, des biomolécules synthétiques et des macromolécules. Leur stabilité thermique et chimique les rend parfaitement adaptés aux purifications qui exigent des conditions extrêmes pour la préparation des échantillons, l'élution des composés et la régénération de la colonne.

La capacité et la résolution sont deux paramètres essentiels pour optimiser la cadence d'une purification. Grâce à un large choix de diamètres de pores et à une plage étendue de conditions d'utilisation, les supports PLRP-S offrent plus d'options pour l'optimisation des procédés. Les granulométries vont de 3 μM à 50 μM pour la transposition d'échelle de l'exploration à la production BPF de quantités de l'ordre de plusieurs kg. L'excellente stabilité chimique, jusqu'à NaOH 1 M, permet d'augmenter la durée de vie de la colonne grâce à la désinfection et à la régénération. Les tailles des lots de support PLRP-S peuvent atteindre 600 L, permettant de remplir plusieurs colonnes avec un seul lot.

Fidèles à notre engagement à assurer la qualité et la continuité de l'approvisionnement, nous effectuons toute la fabrication selon un procédé entièrement documenté et réalisons régulièrement des contrôles des installations.



Guide d'applications des supports PLRP-S de la préparation à la production

Application	Diamètre des pores des supports PLRP-S			
	100 Å	300 Å	1 000 Å	4 000 Å
Biomolécules, peptides et oligonucléotides synthétiques	✓	✓		
Biomolécules, peptides et protéines recombinants	✓	✓		
Biomolécules de grande taille, anticorps, fragment d'ADN			✓	✓
Petites molécules, composés instables et sensibilité aux métaux	✓			

Spécifications des colonnes d'UHPLC

Plage de pH	1–14
Quantité de tampon	Illimité
Agent modificateur	1–100 %
Seuil de température	200 °C
Pression maximale	5–8 µm : 3 000 psi (210 bars)
	3 µm : 4 000 psi (300 bars)

Purification d'un oligonucléotide 25-mère trityl-off et quantification analytique de la fraction à l'aide de PLRP-S 100 Å, 4,6 x 50 mm

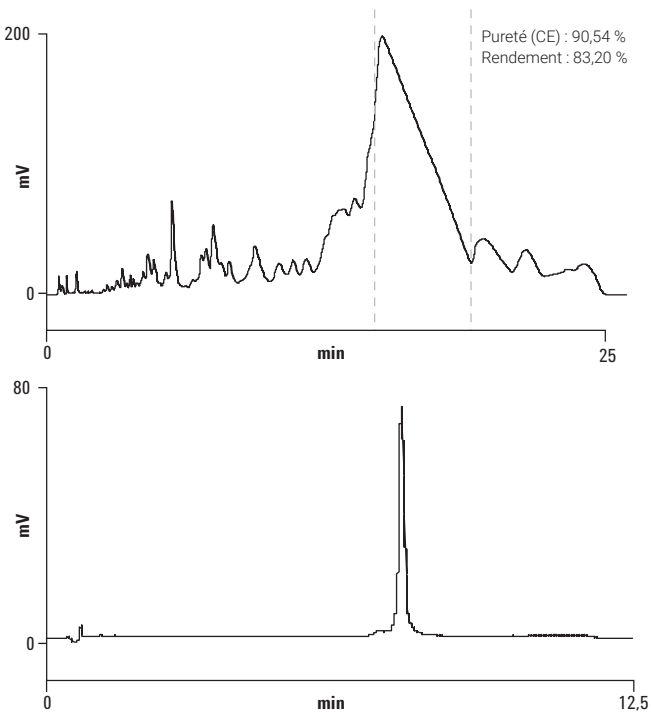
Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4,6 x 50 mm, 3 µm

Phase mobile : A : acétate de tétraméthylammonium 100 mM (TEAA)
B : TEAA 100 mM dans 25:75 acétonitrile:eau

Débit : 1 mL/min

Gradient : 25 % de B 0 min, 35 % de B 2 min,
45 % de B 22,5 min, 45 % de B 23 min,
25 % de B 23,05 min, 25 % de B 26 min

Température : 80 °C



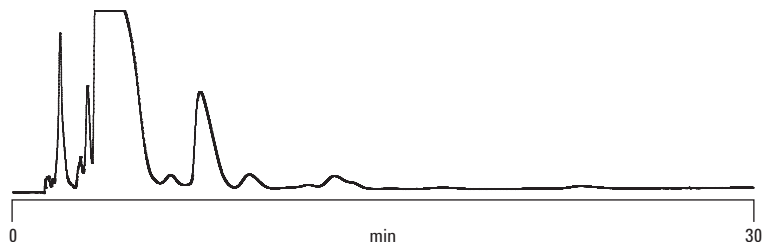
Charge d'une préparation brute de bradykinine

Colonne : PLRP-S 100 Å
PL1512-5100
4,6 x 250 mm, 10 µm

Phase mobile : 0,1 % TFA dans 21 % ACN:79 % eau

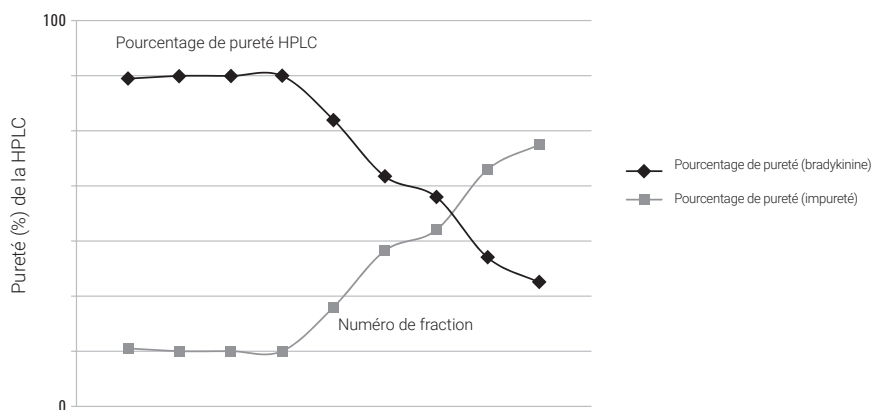
Débit : 1 mL/min (360 cm/h)

Échantillon : 30 µL contenant 1,5 mg de peptide brut



Analyse des fractions : purification de la surcharge de concentration

L'analyse par HPLC des fractions collectées pendant l'élution du pic a démontré que les fractions 1 à 4 contenaient uniquement le peptide d'intérêt et que le niveau d'une impureté critique augmentait avec le nombre de fractions. Grâce à la colonne PLRP-S à haute efficacité, il a été possible d'obtenir un rendement de 97 % avec une pureté de 100 %, à partir du peptide brut qui était pur à 91,7 %. Pour plus d'informations reportez-vous à la note d'application 5990-7736EN.



Dimensions spéciales

PLRP-S pour les échelles préparatives à procédé

Taille (mm)	Granulométrie (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
Colonnes PLRP-S de développement de méthodes					
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		

Support PLRP-S en vrac

Granulométrie (µm)	Qté	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		

Commande de colonnes et de supports en vrac à façon.

Si vous ne voyez pas dans ces tableaux la combinaison de diamètres de pores/granulométrie et de dimensions de colonne ou la quantité de support en vrac que vous recherchez, contactez votre centre Agilent local pour être conseillé sur notre processus de commande à façon.

Conseils et outils

Les guides d'utilisation des colonnes constituent d'excellentes ressources offrant des instructions pour l'utilisation et l'entretien des colonnes ainsi que des suggestions de méthodes de démarrage :

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

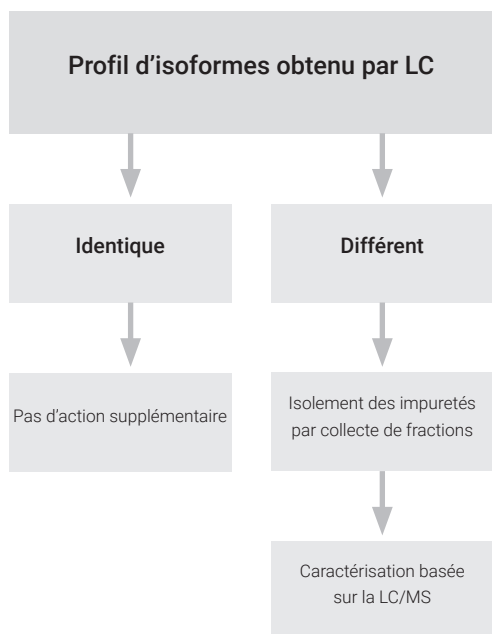
Bio MAb et Bio IEX

De l'échelle analytique à l'échelle préparative à haute efficacité

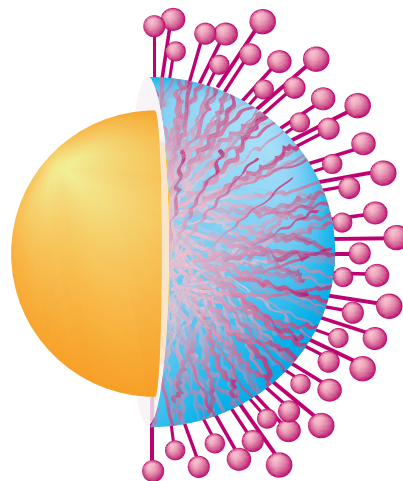
- Particules non poreuses pour éliminer le transfert de masse et offrir la meilleure efficacité possible pour purifier même les impuretés de nature équivalente
- Cinq échangeurs d'ions disponibles : SAX, WAX, SCX, WCX et une phase CX optimisée spécifiquement pour les mAb afin de fournir une résolution maximale pour les charges d'échantillon importantes
- Transposition de l'échelle analytique à l'échelle semi-préparative et préparative avec les mêmes particules de 5 µm

La couche externe hydrophile de ces particules réduit les interactions non spécifiques et fournit un haut rendement.

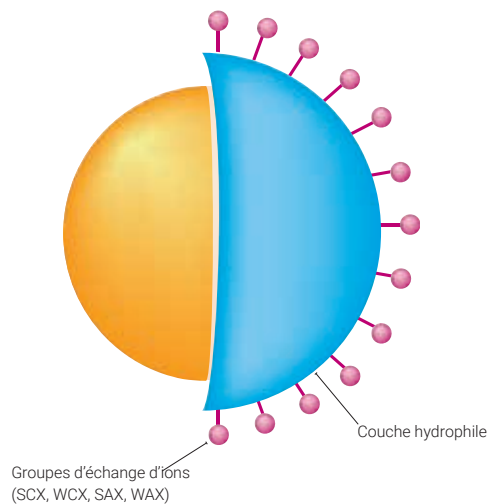
Grâce à l'utilisation de colonnes analytiques, semi-préparatives et préparatives remplies avec les mêmes particules de 5 µm, toute isoforme imprévue observée pendant le développement du procédé du produit biopharmaceutique peut rapidement être purifiée pour une caractérisation et une identification ultérieures.



Particule Bio MAb



Particule Bio IEX



Colonnes de HPLC Bio MAb

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Référence
21,2 x 250	5	5190-6885
10 x 250	5	5190-6884

Colonnes de HPLC Bio IEX, inox

Taille (mm)	Granulométrie (µm)	Bio SCX Référence	Bio WCX Référence	Bio SAX Référence	Bio WAX Référence
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

Conseils et outils

Vous pouvez raccorder votre colonne Agilent BioHPLC avec des raccords rapides InfinityLab Quick Connect et des capillaires bio-inertes sans métal. Pour en savoir plus : www.agilent.com/chem/5991-7469EN

PL-SAX et PL-SCX de la préparation à la production

- Les purifications par échange d'ions sur une plus large plage de pH étendent la gamme d'applications
- Les débits de HPLC et la stabilisation rapide réduisent la durée des cycles de purification
- Les grands diamètres de pores améliorent le transfert de masse et permettent des purifications rapides à haute résolution

Ces supports d'échange d'ions rigides et extrêmement hydrophiles sont conçus pour la purification des biomolécules. Les supports PL-SAX et PL-SCX sont totalement polymériques et présentent une bonne stabilité chimique et thermique pour une multitude de conditions de HPLC. Les groupes d'échange d'ions forts, qui sont liés par liaison covalente à un polymère chimiquement stable, permettent les purifications par échange d'ions sur une plus grande plage de pH. Cette stabilité peut être exploitée pour la désinfection et le nettoyage de la colonne. La stabilité thermique permet également l'utilisation de conditions dénaturantes et d'agents de stabilisation/solubilisation pour la purification des composés cibles, par exemple pour la purification d'oligonucléotides de synthèse avec des séquences autoccomplémentaires.

Les supports à pores larges de 1 000 Å et 4 000 Å sont mécaniquement stables et robustes et peuvent être utilisés avec une plage étendue de vitesses linéaires, avec le chargement rapide des solutions de dilution et des cycles de rinçage. Les débits de HPLC et la stabilisation rapide réduisent la durée des cycles de purification.

Le remplissage avec un équipement de compression axiale dynamique (DAC) est facile à réaliser et permet d'obtenir des colonnes avec d'excellentes reproductibilité et durée de vie. Le diamètre des pores de 1 000 Å permet les purifications à haute capacité et les particules gigaporeuses de 4 000 Å avec transfert de masse optimisé sont conçues pour les biomolécules de grande taille et les purifications rapides à haute résolution.



Spécifications des colonnes d'UHPLC

	PL-SAX	PL-SCX
Matrice	Totalement polymérique	Totalement polymérique
Diamètres des pores	1 000 Å et 4 000 Å	1 000 Å et 4 000 Å
Granulométries	10 µm, 30 µm	10 µm, 30 µm
Forme des billes	Sphère rigide	Sphère rigide
Groupe fonctionnel	Amine quaternaire	Acide sulfonique
Stabilité à la pression	3 000 psi	3 000 psi
Stabilité thermique	80 °C	80 °C
Plage de pH	1–14	1–14
Compatibilité des éluants	Tous tampons d'échange d'anions	Tous tampons d'échange de cations
Densité du remplissage	0,39 g/mL	0,39 g/mL

Purification des oligonucléotides de grande taille

Colonne : PL-SAX 1 000 Å, 8 Å

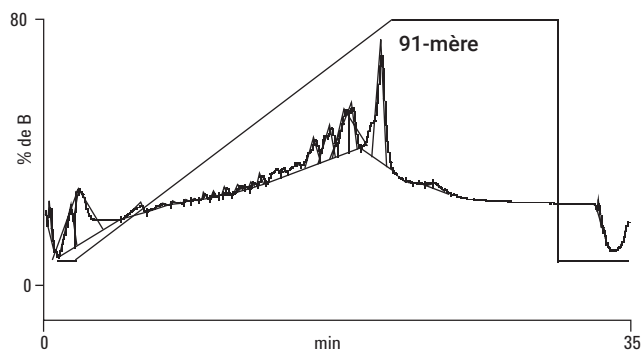
Phase mobile : A : 93 % TEAA 100 mM, pH 7:7 % ACN
 B : 93 % TEAA 100 mM, acétate d'ammonium 3,24 M, pH 7:7 % ACN

Débit : 1,5 mL/min

Gradient : 0–100 % de B en 20 min

Température : 60 °C

Détecteur : UV, 290 nm



Collecte de fractions préparatives d'un filtrat de culture cellulaire contenant des amyloglucosidases

Colonne : PL-SAX 4 000 Å
PL1551-1803
4,6 x 50 mm, 8 µm

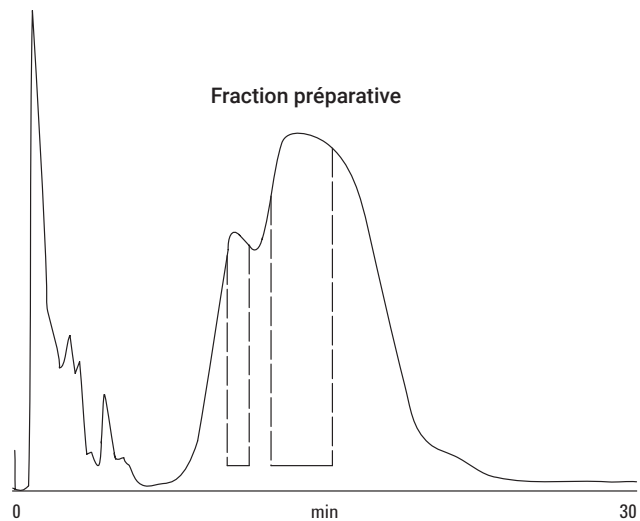
Phase mobile : A : TRIS HCL 10 mM, pH 8
B : A + NaCl 500 mM, pH 8

Débit : 4,0 mL/min

Gradient : linéaire, 0–100 % de B en 2 min

Température : 60 °C

Détecteur : UV, 280 nm



PL-SAX et PL-SCX pour préparation du traitement de colonne LC

Dimensions	Granulométrie (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

Colonnes de développement de méthodes PL-SAX et PL-SCX

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



Colonnes et matériaux en vrac PL-SAX et PL-SCX pour préparation du traitement de colonne LC

Matériaux en vrac PL-SAX et PL-SCX

Granulométrie (µm)	Qté	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

Commande de colonnes et de matériaux en vrac à façon.

Si vous ne voyez pas dans ces tableaux la combinaison de diamètres de pores/granulométrie et de dimensions de colonne ou la quantité de matériau en vrac que vous recherchez, contactez votre centre Agilent local pour être conseillé sur notre processus de commande à façon.

Purification des peptides

La gamme VariTide est une solution rentable pour la production de peptides synthétiques. Ces colonnes vous permettent de gérer le coût et l'efficacité de la purification des peptides synthétiques à grand volume, de l'échelle du gramme au microgramme. VariTide fournit une solution pour les producteurs de peptides qui fabriquent de petites quantités de centaines ou de milliers de peptides dont les délais de fabrication constituent le ressort économique.



Colonnes VariTide RPC

Colonnes VariTide RPC pour peptides synthétiques

- Une seule colonne pour couvrir toute la gamme de peptides synthétiques
- Une granulométrie fine pour une efficacité maximale, même avec des colonnes préparatives de 1 et 2 pouces
- Des matériaux en vrac pour remplir les colonnes préparatives de 1 et 2 pouces pour la purification de quantités de l'ordre du milligramme au gramme

Les colonnes et supports VariTide RPC font partie de la solution VariPep pour les peptides. C'est l'option que nous recommandons pour la séparation et la purification rentables des peptides synthétiques à l'aide de méthodes usuelles.

Colonnes VariTide RPC pour peptides synthétiques

Taille (mm)	Référence
21,2 x 250	PL1E12-5A05
10,0 x 250	PL1012-5A05
4,6 x 250	PL1512-5A05

Matériau en vrac VariTide RPC

Description	Référence
100 g	PL1412-4A05
1 kg	PL1412-6A05

Contrôle de peptides bruts

Colonne : VariTide RPC
PL1512-5A05
4,6 x 250 mm

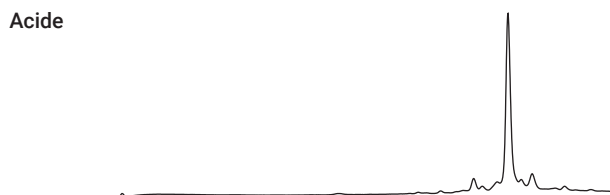
Phase mobile : Acide
A : 0,1 % TFA dans 95 % eau: 5 % ACN
B : 0,1 % TFA dans 50 % eau: 50 % ACN
Basique
A : 5 % ACN, 95 % carbonate d'ammonium 20 mM, pH 9,5
B : 50 % ACN, 50 % carbonate d'ammonium 20 mM, pH 9,5

Débit : 1,0 mL/min (360 cm/h)

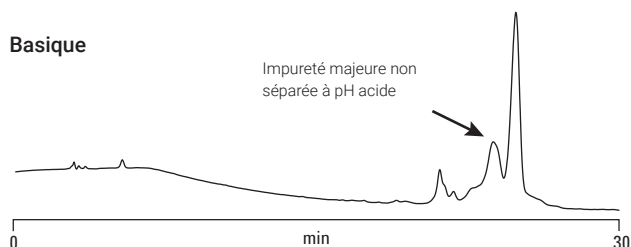
Gradient : 0–100 % de B en 30 min

Détecteur : UV, 220 nm

Acide



Basique



VariPure IPE

- Préremplies pour plus de commodité
- Élimination des agents d'appariement d'ions pour une meilleure reproductibilité
- Hautes performances et rentabilité pour une plus grande efficacité

La résine VariPure IPE est constituée d'un polymère avec des groupes amines quaternaires et de bicarbonate comme contre-ion. Elle est conçue pour l'élimination des réactifs d'appariement d'ions tels que l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide formique ou l'acide acétique. VariPure IPE est un support économique et très performant d'élimination des acides, préconditionné dans un dispositif de type SPE pour plus de commodité. La granulométrie, la capacité et la forme du dispositif sont choisies afin de fournir un temps de rétention suffisant pour l'extraction efficace des paires d'ions sous l'effet de la pesanteur. Pour les peptides sensibles aux acides, l'élimination des agents d'appariement d'ions prévient leur dégradation pendant le traitement post-HPLC et augmente le rendement en produit purifié

VariPure IPE

Chargement	Capacité d'élimination du contre-ion	Qté	Référence
100 mg par tube de 3 mL	~5 mL 0,1 % TFA	50/pqt	PI3540-d603VP
500 mg par tube de 6 mL	~25 mL 0,1 % TFA	50/pqt	PI3540-C603VP
1 g par tube de 20 mL	~50 mL 0,1 % TFA	25/pqt	PI3540-P603VP
25 g			PI3549-3603VP

Colonnes Load & Lock de HPLC préparative

Agilent propose une gamme complète de colonnes Load & Lock et de stations de remplissage mobiles pour les séparations à l'échelle du laboratoire. Conçue pour vous permettre de remplir facilement et rapidement vos propres colonnes préparatives à haute efficacité, cette gamme est la bonne solution pour les applications de développement de composés pharmaceutiques, de peptides et de produits naturels. Nos colonnes Load & Lock disposent d'un système unique de distribution de l'échantillon qui garantit une productivité maximale. Il conduit à l'amélioration des performances de la colonne en diffusant l'échantillon de façon plus efficace sur la surface du support.

- Excellentes performances : obtenez des résultats supérieurs avec un système unique de distribution du flux
- Flexibilité maximale : toutes les colonnes Load & Lock de 1, 2 et 3 pouces sont compatibles avec la même station de remplissage mobile ainsi qu'avec la compression axiale dynamique (DAC) et la compression axiale statique (SAC)
- Plus de commodité : remplissez ou videz votre colonne en quelques minutes
- Mobilité maximale : la colonne et la station de remplissage sont combinées dans un même module que vous pouvez facilement déplacer où vous le souhaitez

Les modèles de remplissage à deux modes simplifient l'utilisation et permettent l'obtention de résultats de qualité constante à l'aide du mode DAC ou SAC.

Les colonnes Agilent Load & Lock conçues pour les séparations à l'échelle du laboratoire associent une excellente stabilité du remplissage avec une distribution du flux améliorée, pour offrir des purifications d'une qualité optimale avec une rapidité, flexibilité et simplicité d'utilisation optimale.

La station de remplissage Load & Lock fonctionne à l'air comprimé, sans alimentation électrique. Elle peut donc être utilisée sans danger avec n'importe quel type de solvant et représente la solution à privilégier pour les environnements dangereux. La pince à ouverture rapide permet de remplir et vider facilement les colonnes en quelques minutes.



Colonnes Load & Lock de HPLC préparative

Description	Gaine d'eau	Taille (mm)	Référence
Colonne Load & Lock	Non	27,0 x 500	PCG93LL500X25
	Oui	27,0 x 500	PCG93LL500X25WJ
	Kit de pièces de rechange		PCG931AAKIT
Station de remplissage mobile (hydraulique pneumatique)			PCG93LLSTAND123

Bio SEC

Purifications proportionnelles à la taille

- Six diamètres de pores différents pour permettre les séparations par la taille de tout l'éventail de produits biopharmaceutiques
- Transposition d'échelle des colonnes analytiques de 3 µm et 5 µm aux colonnes préparatives avec les mêmes particules
- La mince couche de polymère hydrophile réduit les interactions non spécifiques, fournit de bonnes formes de pics et augmente la capacité de charge

Les diamètres et volumes des pores de ces supports de SEC à base de silice sont optimisés pour la réalisation de séparations à haute résolution dans des conditions HPLC de pression et de débit. Les particules de 3 µm avec des diamètres de pores de 100 Å, 150 Å et 300 Å confèrent une haute efficacité aux séparations préparatives du laboratoire, tandis que les particules de 5 µm présentent une large gamme de tailles de pores pour le fractionnement des biomolécules et conjugués de plus grande taille.

Conseils et outils



Les guides d'utilisation des colonnes constituent d'excellentes ressources offrant des instructions pour l'utilisation et l'entretien des colonnes ainsi que des suggestions de méthodes de démarrage :

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

Colonnes HPLC Bio SEC-3 pour des séparations plus rapides des peptides et protéines

Taille (mm)	Granulométrie (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

Colonnes de garde préparatives

21,2 x 50	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856
-----------	---	-----------	-----------	-----------

Colonnes HPLC Bio SEC-5 pour la séparation par la taille des biomolécules

Taille (mm)	Granulométrie (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

Colonnes de garde préparatives

21,2 x 50	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6874	5190-6875
-----------	---	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------



Solutions Agilent

Mettez 40 ans et plus d'innovation continue d'Agilent derrière chacun de vos résultats

Agilent propose une gamme complète de solutions innovantes, allant de l'amélioration de la productivité du laboratoire pour les analyses chimiques aux systèmes de vide et solutions intégrales pour simplifier l'élucidation de la complexité des systèmes vivants. Nous vous aidons à rester au fait des nouvelles applications et des méthodes éprouvées, tandis que nos solutions intégrales produisent des données fiables et complètes vous permettant de prendre des décisions éclairées qui accélèrent l'obtention des résultats.

Les clients qui font confiance à Agilent depuis longtemps connaissent notre engagement. Nous souhaitons aujourd'hui vous montrer comment vous pouvez, vous aussi, tirer parti de notre approche novatrice permanente.



Universités et établissement publics

Déterminés à favoriser les avancées scientifiques de portée internationale, nous nous efforçons d'aider les chercheurs à insuffler une dynamique à leurs travaux qui leur permette d'être reconnus comme des leaders dans leur domaine.



Géochimie, métallurgie et industrie minière

Qu'il s'agisse de mesurer des composés majeurs ou à l'état de traces, de déterminer l'or, l'argent et le platine, d'analyser des solutions de placage ou de réaliser une cartographie géochimique, Agilent fournit les instruments fiables et simples d'utilisation nécessaires à l'analyse des échantillons les plus subtils et les plus difficiles.



Produits biologiques et biosimilaires

Les biothérapies ont la capacité d'améliorer considérablement la santé. Le nombre de produits biothérapeutiques à base de protéines et d'anticorps approuvés continue d'augmenter dans le monde, car cette importante classe thérapeutique répond à des besoins médicaux encore non satisfaits.



Sécurité nationale

Si vous êtes impliqué dans la détection d'agents de guerre chimiques ou biologiques, de produits chimiques industriels toxiques ou dans le contrôle des aliments, de l'air, des sols et de l'eau, Agilent dispose d'une solution rapide, souple et fiable pour répondre à vos besoins.



Métabolisme des cellules

La compréhension du métabolisme des cellules est essentielle à la compréhension de nombreux processus cellulaires. Grâce à Agilent, vous pouvez analyser le métabolisme dans des cellules vivantes en temps réel et générer des données physiologiquement représentatives.



Recherche et tests des matériaux

Agilent vous donne la capacité d'identifier la nature et la source des odeurs indésirables dans les produits finis, de caractériser les irrégularités microcristallines dans les matériaux composites et de quantifier les impuretés à l'état de traces dans les alliages métalliques.



Recherche clinique

Notre gamme complète d'instruments de LC/MS, GC/MS et ICP-MS à la pointe de l'industrie, ainsi que nos solutions d'automatisation et de préparation d'échantillons RapidFire, peuvent vous aider à tirer profit des avancées constantes de l'analyse par MS en recherche clinique.



Secteur de l'énergie et de la chimie

Agilent peut vous fournir des méthodes et solutions sur mesure qui répondent à vos besoins spécifiques afin d'augmenter la productivité et la rentabilité de votre laboratoire, tout en satisfaisant aux strictes exigences réglementaires de l'industrie.



Environnement

Agilent offre une expertise fiable et efficace en matière d'analyse environnementale et de respect de la réglementation, qu'il s'agisse de l'analyse de contaminants dans les eaux usées, de la détermination de la pureté de l'eau potable, de la mesure de la qualité de l'air intérieur, de la réponse aux catastrophes naturelles et d'origine humaine ou de l'identification des nouveaux contaminants.



Agriculture et analyses alimentaires

L'industrie agroalimentaire est confrontée à une demande toujours plus exigeante de solutions analytiques plus sensibles et plus productives. Nos instruments, systèmes et consommables sont utilisés dans toute la chaîne de production agroalimentaire. Agilent développe des systèmes et applications conformes aux dernières exigences réglementaires.



Médecine légale

En matière de tests de poisons, de dépistage ou d'analyse de stupéfiants, ou encore de contrôle de résidus explosifs sur des scènes de crime, Agilent s'impose comme le leader de ce secteur avec des instruments robustes capables d'identifier et de quantifier des milliers de substances.



Génomique

Qu'il s'agisse d'utiliser l'expression génique, le clonage et la PCR quantitative, l'hybridation génomique comparative pour détecter la variation du nombre de copies ou de sélectionner l'exome humain pour séquencer les régions d'intérêt, Agilent offre l'innovation et la fiabilité dont votre recherche a besoin.



Métabolomique

Les solutions métabolomiques d'Agilent sont utilisées pour la recherche médicale, la toxicologie analytique, les analyses environnementales, l'agronomie, le développement des biocarburants et la nutrition. Les résultats métabolomiques sont combinés aux études d'expression génique et/ou protéomiques afin d'élucider les mécanismes biologiques.



Protéomique

La protéomique étudie la structure et les fonctions des protéines, ainsi que leurs interactions au sein d'un système biologique complexe. L'analyse des protéines présentant de nombreuses difficultés, les objectifs de votre recherche en protéomique ne peuvent être réalisés qu'avec des méthodes optimisées et accessibles qui génèrent des résultats rapides, fiables et reproductibles.



Analyse des semi-conducteurs

Les instruments d'Agilent présentent les meilleures performances d'analyse des éléments à l'état de traces pour tout l'éventail d'échantillons dans l'industrie des semi-conducteurs, notamment les plaquettes de silicium par extraction métallique de surface (SME), le silicium photovoltaïque solaire, les produits chimiques de procédé de haute pureté, l'eau ultrapure, les solvants organiques et les photorésists.



Petites molécules pharmaceutiques

L'industrie pharmaceutique est confrontée à des défis constants régis par des pressions commerciales, scientifiques et réglementaires en constante évolution et opposition. De la médecine personnalisée aux CRO, le processus de mise sur le marché des médicaments est devenu radicalement différent de ce qu'il était il y a dix ans.



Spécialités chimiques

La gamme Agilent d'instruments, accessoires, consommables et services d'assistance, ainsi que notre vaste réseau de partenaires divers, peuvent vous permettre de résoudre pratiquement tous les problèmes auxquels vous êtes confrontés dans vos analyses.



Solutions de vide

La compréhension de vos demandes en technologie du vide est essentielle pour vous apporter des solutions fiables qui optimisent votre productivité. Avec Agilent Technologies à vos côtés, vous bénéficiez de notre solide expertise et de nos innovations scientifiques pour développer des solutions adaptées à vos besoins.

Conseils et outils

Pour en savoir plus, rendez-vous sur : www.agilent.com/en/solutions

Services Agilent CrossLab

Optimisez la disponibilité des instruments avec l'assistance intégrale

Faites confiance aux spécialistes des services Agilent CrossLab pour vous faire bénéficier de leur précieuse expertise et maintenir à leur niveau optimal les performances de vos instruments. Adaptables à vos besoins, nos services réputés incluent la remise à niveau technique, le conseil sur les applications, les réparations, la maintenance préventive, la vérification de la conformité et la formation. Demandez-nous comment nous pouvons aider votre laboratoire dès aujourd'hui.

Contrats de services Agilent CrossLab

Réduisez le risque de réparations coûteuses et de temps d'indisponibilité

Les laboratoires font face aujourd'hui à des défis complexes nécessitant l'assistance d'un véritable partenaire de prestation de services. Les services Agilent CrossLab aident votre laboratoire à atteindre une productivité maximale et en assurent le bon fonctionnement, jour après jour. Quelle que soit la configuration de votre laboratoire, nous pouvons offrir le niveau d'assistance correspondant le mieux à vos besoins et à votre budget.

Services de mise en conformité Agilent

Qualification de l'équipement pour répondre aux exigences les plus strictes

Le service de mise en conformité « Enterprise Edition » a été développé pour simplifier les procédures de mise en conformité et de délivrance de qualifications du laboratoire tout entier. Utilisé partout dans les laboratoires réglementés, en particulier par les instances gouvernementales et les organismes de normalisation, Enterprise Edition vous permet :

- d'améliorer l'efficacité de la qualification en harmonisant les protocoles de toutes les plates-formes, afin d'assurer une plus grande efficacité et de réduire les risques de non-conformité réglementaire au minimum ;
- de normaliser toutes vos opérations de conformité grâce à des tests robustes valables pour tous vos instruments ;
- d'ajouter, de supprimer ou de reconfigurer des tests selon vos exigences particulières d'utilisation ;
- de réduire le temps d'évaluation du personnel avec des rapports générés par ordinateur, toujours formatés de la même façon et de nature infalsifiable.



Bénéficiez de la garantie de service Agilent

Si votre instrument nécessite une intervention dans le cadre d'un contrat de services Agilent, nous garantissons la réparation ou nous remplaçons gratuitement votre instrument.

Aucune entreprise n'offre ce niveau d'engagement : Agilent vous assure le fonctionnement continu et optimal de votre laboratoire.

Agilent University

Faites l'acquisition des connaissances nécessaires à la réussite de vos projets

Le maintien d'un niveau élevé de compétence est un véritable défi qui influence directement la disponibilité des instruments, la productivité du laboratoire et l'exactitude analytique. Agilent University offre des solutions de formation complètes pour chaque membre de votre équipe dans le cadre de plans de formation définis, avec des cours de niveau débutant à avancé.

L'engagement de pérennité Agilent : 10 ans de garantie

Contrat de service étendu

L'engagement de pérennité Agilent vous garantit au moins 10 ans d'utilisation de votre instrument avec 7 ans d'assistance garantie. Les services étendus CrossLab assurent aux clients en possession d'instruments anciens un service de qualité pour le diagnostic, les réparations, la maintenance et la formation. Les services étendus CrossLab sont dispensés par des ingénieurs Agilent disposant des derniers outils, des nouvelles procédures et des pièces détachées Agilent d'origine.

Pour plus d'informations, contactez un représentant Agilent ou rendez-vous sur :

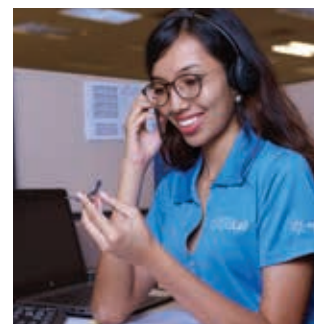
www.agilent.com/chem/extended-services



Une assistance technique à vos côtés

Vous avez une question concernant le matériel, un logiciel, une application, la réparation d'instrument ou la résolution des problèmes ? Les experts techniques d'Agilent sont disponibles pour vous répondre. Avec des années d'expérience en laboratoire, les spécialistes de notre service d'assistance technique peuvent vous faire profiter de leurs connaissances approfondies et de leur expérience.

Pour toute question sur les consommables de ce catalogue, contactez un centre Agilent local ou un distributeur Agilent agréé, ou rendez-vous sur : www.agilent.com/chem/techsupport



Communauté Agilent

Communiquer, collaborer, et partager des perspectives

La communauté Agilent est un outil de choix pour collaborer avec des collègues sur les applications, discuter des produits Agilent et trouver un contenu approfondi en rapport avec votre analyse.

Rendez-vous sur : community.agilent.com

Pour nous contacter :

www.agilent.com/chem/contactus

Pour acheter en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Pour retrouver Agilent sur les réseaux sociaux :

www.agilent.com/chem/social

Pour découvrir notre gamme complète de catalogues :

www.agilent.com/chem/catalog

Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.

Ces renseignements peuvent être modifiés sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Publié aux États-Unis, le 11 juin 2019
5994-0974FR