

# Bio-inert UHPLC:

## Das Neue 1260 Infinity Bio-inert LC System

**BIO**  
inert



**Katja Kornetzky**  
Produktmanagerin

1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC  
1220 Infinity LC

# Agenda

1. Herausforderungen in der Protein-Chromatographie
2. Der 1260 Infinity Quaternary Bio-inert LC ist ein Interaktionsfreies System
  - Beispieldaten für Metallfreiheit
3. Vereinfachen von Arbeitsabläufen in der Ionenaustauschchromatographie
  - Solvent Master Software (Prototyp) Vorstellung
4. Beispiele einer vollständigen Proteincharakterisierung auf einem System
  - HPLC und UHPLC, alles auf einem LC
5. Zusammenfassung

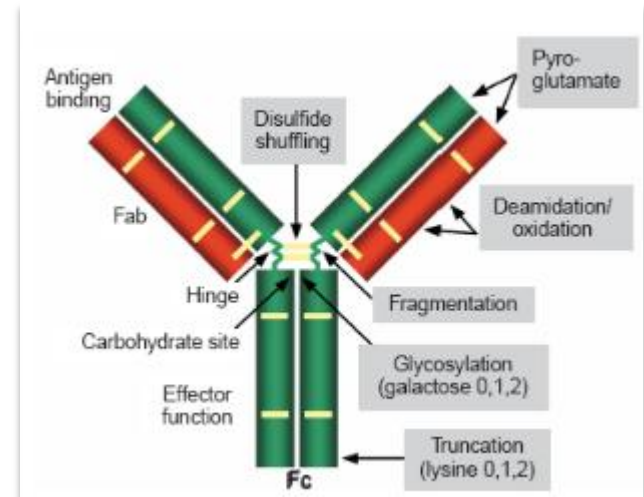
# Protein-Chromatographie:

## Keine On/ Off Kinetik

→ Keine einheitliche Proteinstruktur  
 → Komplexes Verhalten des Proteins auf der Säule führt zu breiteren Peaks

### Proteins sind anfälliger für

- Aggregation/ fallen leicht aus
- Reaktion an Oberflächen (daher extreme Reinigungsprozesse)
- Modifikationen bei Überexpression oder Probenvorbereitung/ Chromatographie



**Masse 150,000 Da**

# Extreme Reinigungsbedingungen in der Protein-Chromatographie

## Cleaning in Place (CiP):

Da Proteine bereitwillig mit ihrer Umwelt reagieren, ist es notwendig das LC System mit aggressiven Substanzen zu ‚reinigen‘:

- **Hohe Salzkonzentration** (2M NaCl, 2M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- **Organische Lösungsmittel** (70% MeOH, EtOH, ACN, 2-propanol)
- **Proteinauflösende Agenzien** (8M Urea, 6M Guanidinium chlorid)
- **Niedriger und hoher pH** (0.5M HCl, 0.5M NaCl) um ausgefallenes Protein zu entfernen

→ Edelstahl (SST) ist oft nicht kompatibel mit diesen Reagenzien

# Dies führt zu Zwei Hauptanforderungen an das Trennsystem

1. Niedrigste Interaktion mit Proteinproben, Metallfreiheit
2. Hohe Robustheit, um extremen Reinigungsprozeduren zu widerstehen

# Gute Gründe für eine Bio-inert HPLC

## Protein Analytik:

- Unspezifische Bindungen
- Niedrige Ausbeute oder Auflösung
- Peak Tailing
- **Korrosions- und pH- Probleme mit Standard HPLC**
- **Geringere Säulenhaltbarkeit und beeinträchtigte Performance**

## Andere Anwendungen:

- metallfreie Chromatographie
- Hohe pH- Anwendungen

# Der Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC

*Der neue Standard in der Bioanalytik*



## 100% Bio-inert

- ✓ Probe berührt keine Metalloberflächen
- ✓ pH Bereich 1-13 (kurzzeitig 14)
- ✓ 2 M Salz, 8 M Harnstoff
- ✓ neue Bio-inert UHPLC-Kapillaren

## UHPLC

600 bar

## Leichte Bedienbarkeit und Robustheit

- ✓ Hohe Korrosionsbeständigkeit
- ✓ Hinterkolbenspülung
- ✓ Quaternäres Mischsystem
- ✓ Agilent Qualität
- ✓ Agilent Garantie und Service Qualität (PMs)
- ✓ Agilent Bio-HPLC Säulen für Charakterisierung von Biotherapeutika

# 1260 Infinity Bio-inert HPLC

**BIO**  
**inert**



Was ist gleich geblieben zum  
1260 Infinity Quaternary LC?

- basierend auf der 1200/1260 Technologie
- Die gleiche Pumpen-, Detektor und Autosampler-Leistung
- bekannte Robustheit

**600 bar (UHPLC)** gibt es nun auch  
für **schnelle Bio-Trennungen**

**Modular flexibel**

# Was ist Neu?

**BIO**  
**inert**



- ✓ Titan-basierende Pumpe
- ✓ Autosampler ist komplett metallfrei
- ✓ Kapillaren und Verbindungen metallfrei
- ✓ Detektor-Flusszelle metallfrei
- ✓ mit Hinterkolbenspülung
- ✓ Niederdruckanwendungen sind möglich

- Weiter pH-Bereich (1-14)
- Hohe Salztoleranz
- Niedrigste Oberflächenaktivität
- **Bio-inert, keine Passivierungsprozeduren notwendig**

# Neues Kapillardesign für Metallfreie UHPLC

- Metallfreie Systeme bestanden bisher aus PEEK
- Die Kapillaren können nur **200 bar Druck widerstehen**
- Daher sind diese Systeme **nur** für SEC und IEX bestimmt
- Es wäre schön, wenn man auf dem modularen Gedanken basierend ein Bio-inert LC System entwickeln könnte

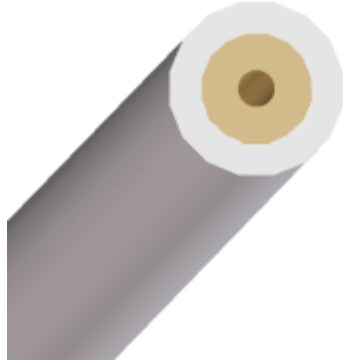


Agilent dachte nach...



# Neues Kapillaren-Design Für Bio-inertheit

BIO  
inert

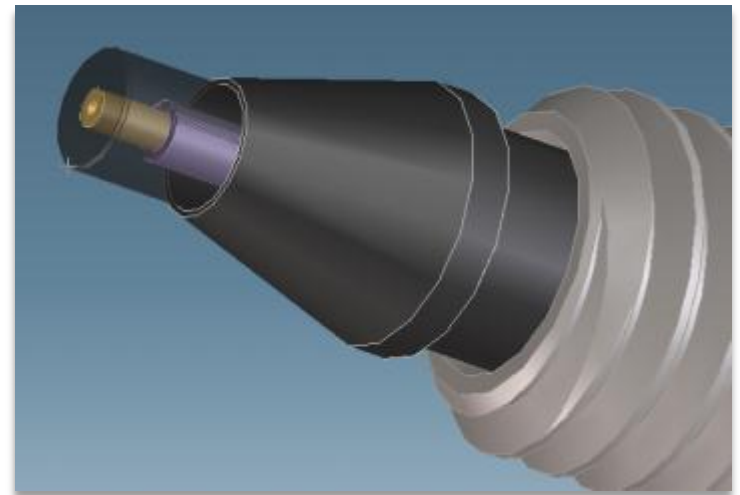


Metallverkleidete PEEK-Kapillare

BIO  
inert

Fitting Design: Hybridtechnik  
-> PEEK-Kappe ist auf SST aufgelasert

Ermöglicht **600 bar**  
und ist metallfrei!

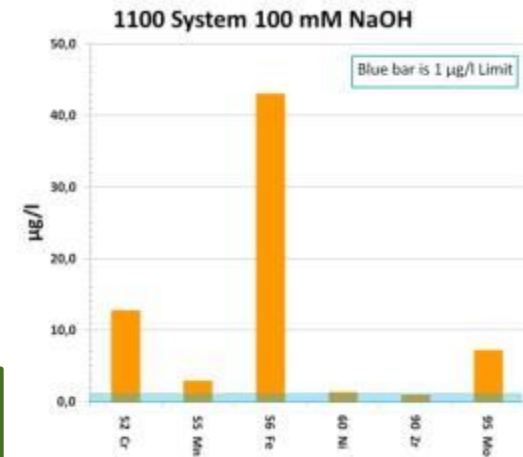
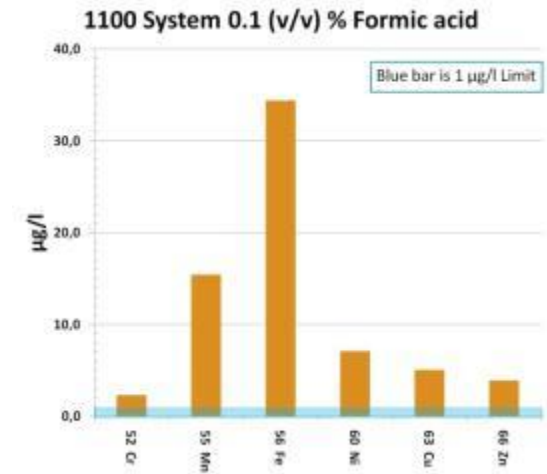


# Niedrigste Metallemissionen.

## Nachweis durch ICP-MS

[ ug/l ]	Formic acid 0.1% (v/v)	Stdev.	25 mM Sodium phosphate	Stdev.	100 mM NaOH	Stdev.
47 Ti [ He ]	1.441	0.285	<0.090		13.481	0.214
51 V [ He ]	<0.031		0.046	0.015	0.005	0.002
52 Cr [ He ]	0.025	0.005	0.066	0.014	<0.031	
55 Mn [ He ]	<0.028		<0.009		<0.021	
56 Fe [ H2 ]	<0.041		<0.057		<0.093	
59 Co [ He ]	0.007	0.0002	<0.003		<0.011	
60 Ni [ He ]	<0.055		0.202	0.014	<0.299	
63 Cu [ He ]	<0.021		<0.013		0.040	
66 Zn [ He ]	<0.058		<0.230		<0.024	
90 Zr [ No Gas ]	0.211	0.004	<0.006		1.243	
93 Nb [ No Gas ]	<0.003		<0.003		0.011	0.002
95 Mo [ No Gas ]	<0.009		<0.007		0.149	0.007
105 Pd [ No Gas ]	<0.017		<0.004		0.004	0.000
107 Ag [ No Gas ]	<0.008		0.046	0.006	0.011	
111 Cd [ No Gas ]	<0.006		<0.008		0.014	0.005
138 Ba [ No Gas ]	0.041		0.031	0.011	<0.235	
195 Pt [ No Gas ]	<0.037		<0.006		<0.020	
197 Au [ No Gas ]	<0.002		<0.006		0.048	0.002
205 Tl [ No Gas ]	<0.001		<0.006		<0.006	
208 Pb [ No Gas ]	0.009	0.001	<0.015		0.063	0.010

Alle Metalle aus dem Bio-inert LC nach Säure/ Base-Behandlung sind deutlich niedriger, sogar oft < 1 µg/ L



# Der 1260 Infinity Bio-inert LC

## Basiskonfiguration



G5611A  
**Bio-inert**  
 Quaternäre Pumpe  
 mit Degasser und  
 ASW



G5667A  
**Bio-inert**  
 Autosampler



G1315 C/D DAD or  
 G1365 C/D MWD mit  
**Bio-inerter Flusszelle**



G1316C  
**TCC mit Bio-inerten**  
**Heizelementen und**  
**Möglichkeit für Ventile**

# Modulare Flexibilität - Weitere Options



**G5664A** Bio-inert  
Analytical Scale  
Fraktionssammler

Für small-scale prep und semi-prep  
Aufreinigung (bis zu 10 mL/min)



**G5628A** Bio-inert  
Manual Injector

Bis zu 5 mL



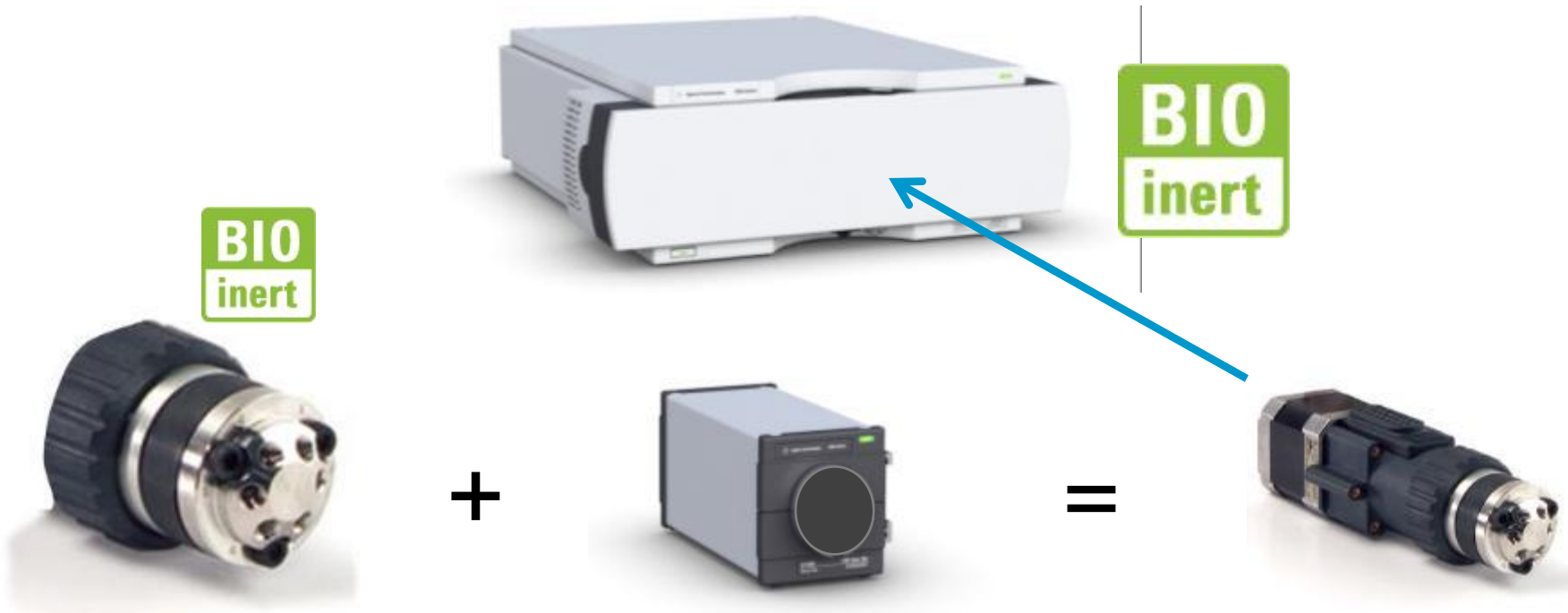
**G1321B #28 FLD**  
Bio-inert flow cell



**G4212A/B # 32 und # 34 DAD**  
Bio-inert flow cell

Max-light  
flow-cell  
10mm und  
60 mm

# Bio-inerte Ventillösungen



## Ventilkopf

- 2 pos / 6port G5631A
- 4-column selector G5639A
- 12/13 solvent selection

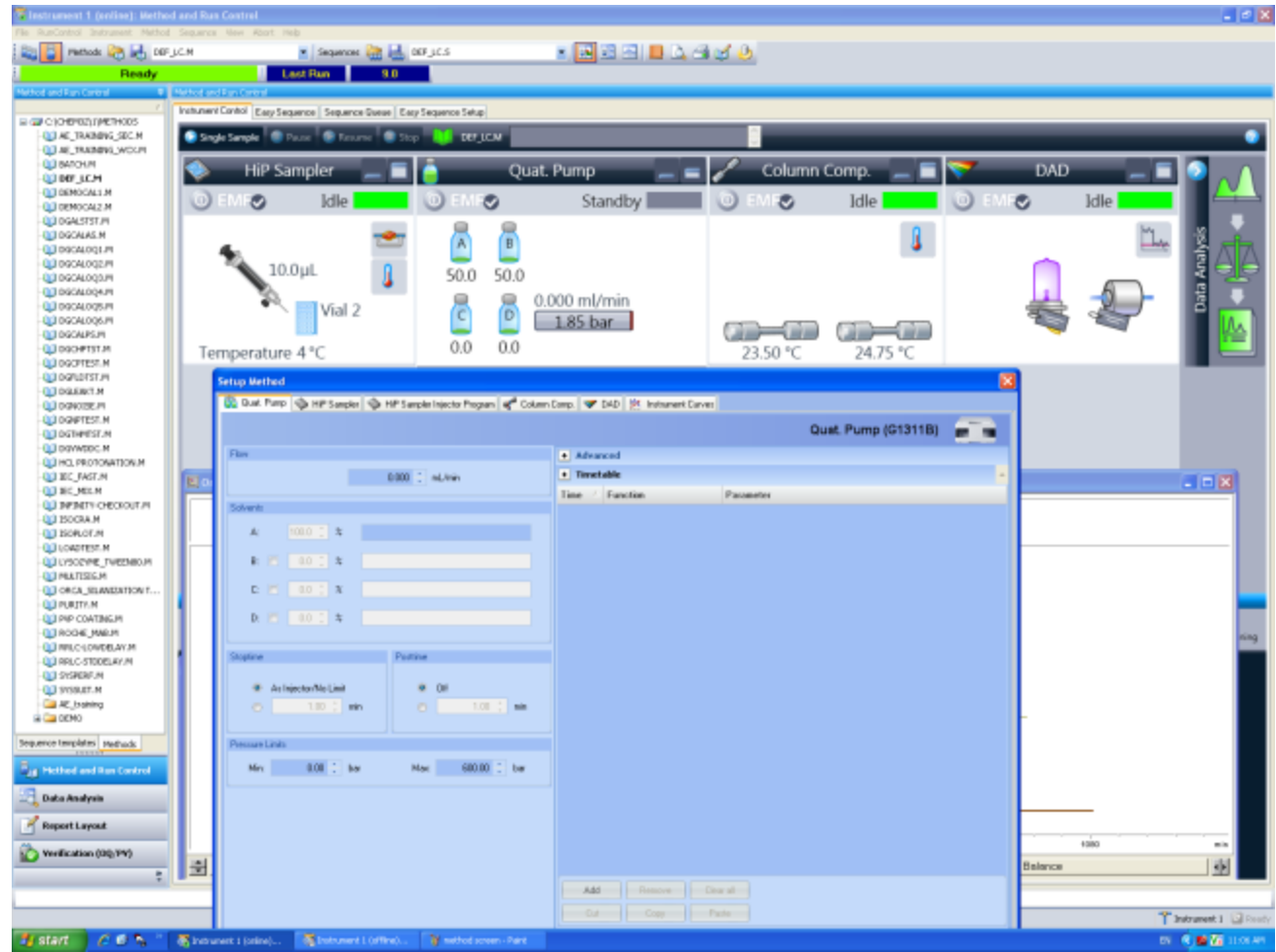
## Ventilantrieb

**Flexibel und schnell austauschbar**

# Bio-inert HPLC Software:

ChemStation (B.04.03 DSP1 or C.01.01), EZChrom oder OpenLAB CDS

RC.net  
basierende  
Treiber wie für  
1260 Infinity  
Quaternary LC  
System



# Solvent Master Software:

## Ionenaustauschchromatographie-,Methodenentwicklung'

1. Herstellung eines Salz- oder pH-Gradienten
2. Mögliche Fehlerquellen bei Ansetzen der Stammlösungen

Einwiegen, mischen, pH einstellen, verdünnen



3. 4 Stammlösungen auf dem LC:

Kanal	Typ
A	Wasser
B	Puffer (Saure Komponente)
C	Puffer (Basische Komponente)
D	Salz



4. Pumpe mischt Lösungen gemäß der Versuchsbedingungen

# Solvent Master Prototype SW

- Die Solvent Master SW ist als Prototyp für Agilent 1260 Infinity Quaternary Bio-inert LC Nutzer erhältlich.
- Auf einer Übersicht kann ein Puffersystem, das dem isoelektrischen Punkt (PI) des zu analysierenden Proteins entspricht ausgewählt werden.
- Eingabe einer Gradiententabelle führt zu Konzentrationsempfehlungen für Stammlösungen und Vorschlag von zusätzlichen Kompensationsschritten für den Gradienten

# Schritt 1: Auswahl des Puffersystems nach pKa

BioLC Gradient Calculator v0.1.2 EDU, Vlastimil Hruska 2011

1. Select Buffer & Gradient Solution

Select Buffer

- Sodium Phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 7.2
- Sodium Phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 7.2**
- Sodium Phosphate (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+NaOH): ... 2.2, 7.2, 12.7 ...
- Sodium Phosphate (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): ... 2.2, 7.2
- TRIS/HCl (TRIS+TRIS.HCl): 8.1
- TRIS/HCl (TRIS+HCl): 8.1
- MES/Na (MES+MES.Na): . 6.1
- MES/Na (MES+NaOH): . 6.1
- Acetic/Na (Acetic+Acetate.Na): ... 4.8
- Acetic/Na (Acetic+NaOH): ... 4.8
- Acetic/NH<sub>4</sub>Ac: ... 4.8 (7.0)
- Acetic/NH<sub>3</sub>: ... 4.8, 9.3
- HEPES/Na (HEPES + HEPES.Na): . 7.5
- HEPES/Na (HEPES + NaOH): . 7.5
- NH<sub>3</sub>/HCl (NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>Cl): 9.3
- NH<sub>3</sub>/HCl (NH<sub>3</sub>+HCl): 9.3
- Bicarbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub>+Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>): 10.3
- Sodium Citrate (Citric + Tri-Sodium Citrate): ... 3.1
- Sodium Citrate (Citric + NaOH): ... 3.1, 4.8, 6.4
- Diammonium Citrate/NH<sub>3</sub>: ... 3.1, 4.8, 6.5
- MES/TRIS (MES + TRIS): . 6.1, 8.1
- ACES/Na (ACES + NaOH): 6.8
- MOPS/Na (MOPS + NaOH): 7.2
- Maleic/Na (Maleic acid + NaOH): ... 1.9, 6.2
- Malonic/Na (Malonic acid + NaOH): ... 2.8, 5.7
- Lactic/Na (Lactic acid + NaOH): ... 3.9
- Formic/Na (Formic acid + NaOH): ... 3.7
- Succinic/Na (Succinic acid + NaOH): ... 4.2, 5.6
- Bicine/Na (Bicine + NaOH): 8.3
- N-methyl-Piperazine/HCl: ... 4.7
- Piperazine/HCl: . 5.7, 9.8
- Histidine/HCl: ... 2, 6.0
- Histidine/NaOH: (7.7) ... 9.3, ...

2. Gradient Time Table

Open Save Sort Clear N=0

Time (min)	Salt (mM)	pH (pH)	Buffer (mM)

3. Composition of Stock Solutions

1. Water (100%)

100%

2. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

25 + 1 %

3. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

25 + 1 %

4. Salt (NaCl type)

5000

4. Create % Time Table

Process

Optimize Gradient

pH Max Error Interval

Export pH

Save XML

pH 0

# Schritt 2: Gradiententabelle für Salz- oder pH-Gradient

BioLC Gradient Calculator v0.1.2 EDU, Vlastimil Hruska 2011

1. Select Buffer & Gradient Solution

Select Buffer: Sodium Phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 7.2

Select Gradient Solution: Salt



Add pKa information to description of buffers  
 Auto-Recalculate (if time-table is changed)

2. Gradient Time Table

Open Save Sort Clear OK=4

Time (min)	Salt (mM)	pH (pH)	Buffer (mM)
0	0	7	20
15.01	1000	7	20
20	0	7	20

3. Composition of Stock Solutions

1. Water (100%) 100%  

2. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (recommended = 29.5 mM)  +  %

3. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (recommended = 33.5 mM)  +  %

4. Salt (NaCl type) (recommended = 3000 mM)

4. Create % Time Table

Optimize Gradient  
 pH Max Error Interval

Gradient Table: Titrating Concentrations

Time (min)	C(Titr) (mM)	pH (pH)	ist (mM)	conduct. (S/m)	BC (mM)	Line 2 (mM)	Line 3 (mM)
0	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2
15	31.1	7	1040	9.19	11.3	8.91	11.1
15.01	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2
20	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2

Total Lines: 4

# Schritt 3: Empfehlung der Stammlösungen

**BioLC Gradient Calculator v0.1.2 EDU, Vlastimil Hruska 2011**

**1. Select Buffer & Gradient Solution**

Select Buffer: Sodium Phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 7.2

Select Gradient Solution: Salt Gradient (NaCl type)



Add pKa information to description of buffers  
 Auto-Recalculate (if time-table is changed)

**2. Gradient Time Table**

Open Save Sort Clear OK=4

Time (min)	Salt (mM)	pH (pH)	Buffer (mM)
0	0	7	20
15	1000	7	20
15.01	0	7	20
20	0	7	20

**3. Composition of Stock Solutions**

1. Water (100%)  

100%

2. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (recommended = 29.5 mM)

29.5 +- 1 %

3. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (recommended = 33.5 mM)

33.5 +- 1 %

4. Salt (NaCl type) (recommended = 3000 mM)

3000

**4. Create % Time Table**

Optimize Gradient  
 pH Max Error Interval

**Gradient Table: Titrating Concentrations**

Time (min)	C(Titr) (mM)	pH (pH)	ist (mM)	conduct. (S/m)	BC (mM)	Line 2 (mM)	Line 3 (mM)
0	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2
15	31.1	7	1040	9.19	11.3	8.91	11.1
15.01	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2
20	30.2	7	40.3	0.248	11.9	9.84	10.2

Total Lines: 4

# „Rezepte“

## 3. Composition of Stock Solutions

1. Water (100%)



2. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (recommended = 29.5 mM)

+·

%

3. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (recommended = 33.5 mM)

+·

%

4. Salt (NaCl type) (recommended = 3000 mM)

### Stock Solution Recipes

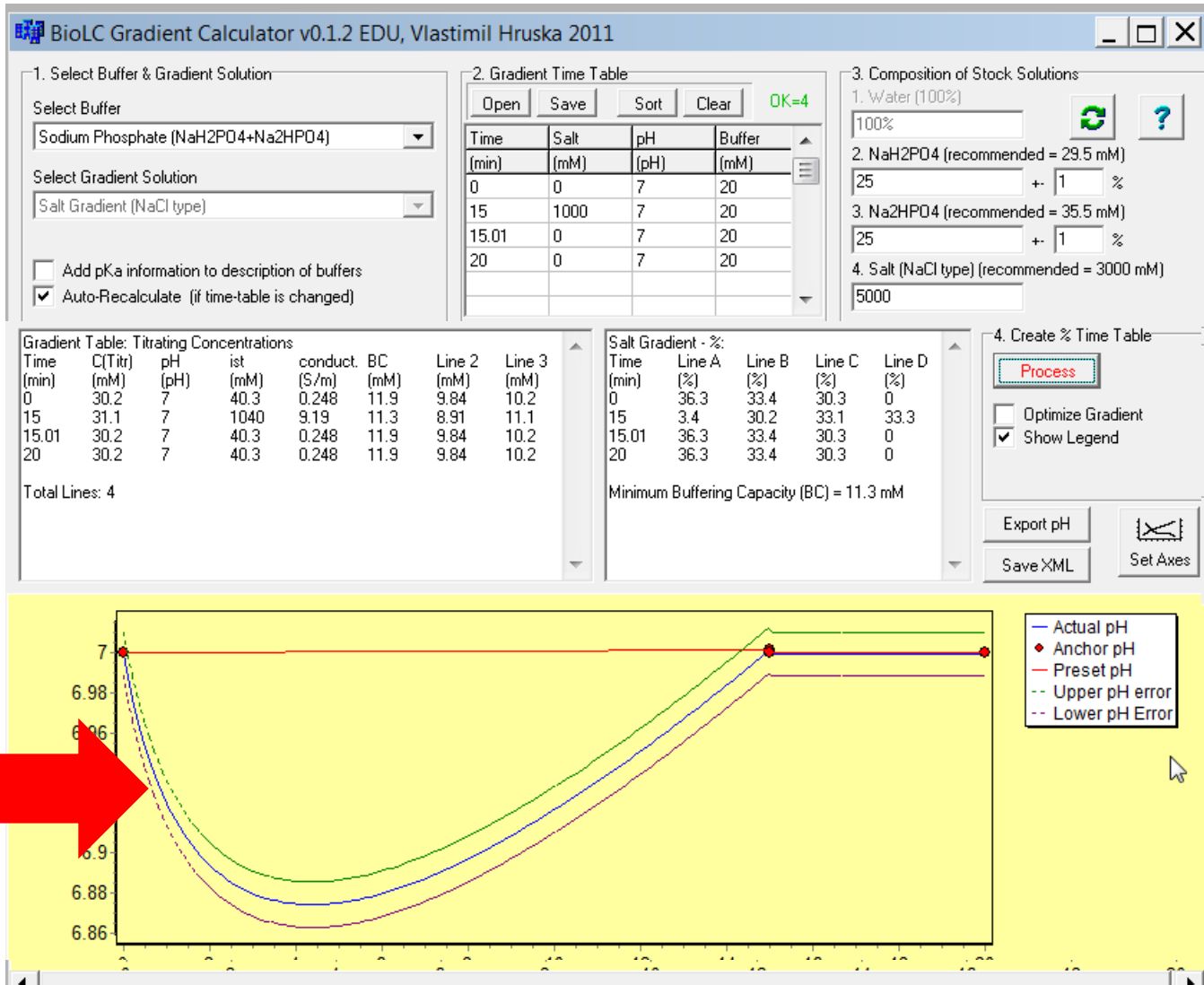
Line2

Weigh 3.5394 g

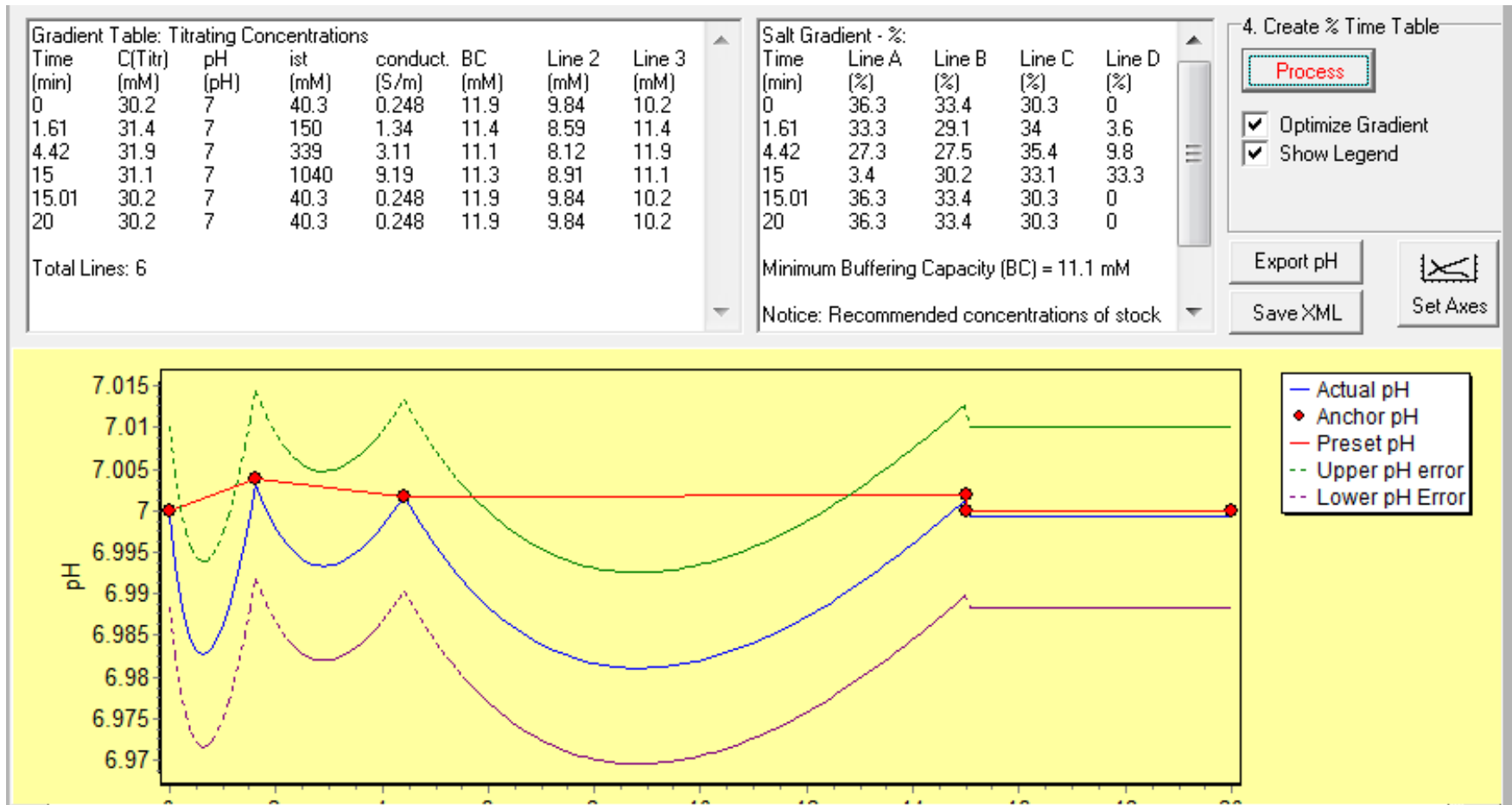
Line3

Weigh 4.7557 g

# Schritt 4a: Der ‚Wahre‘ Gradient wird Gezeigt



# Schritt 4b: Die Gradiententabelle wird Optimiert



# 5. Die Gradiententabelle wird in ChemStation Importiert (Bio-Pumpe, G5611A)

Salt Gradient - %:

Time (min)	Line A (%)	Line B (%)	Line C (%)	Line D (%)
0	36.3	33.4	30.3	0
1.61	33.3	29.1	34	3.6
4.42	27.3	27.5	35.4	9.8
15	3.4	30.2	33.1	33.3
15.01	36.3	33.4	30.3	0
20	36.3	33.4	30.3	0

Minimum Buffering Capacity (BC) = 11.1 mM

The screenshot shows the ChemStation software interface with the following sections:

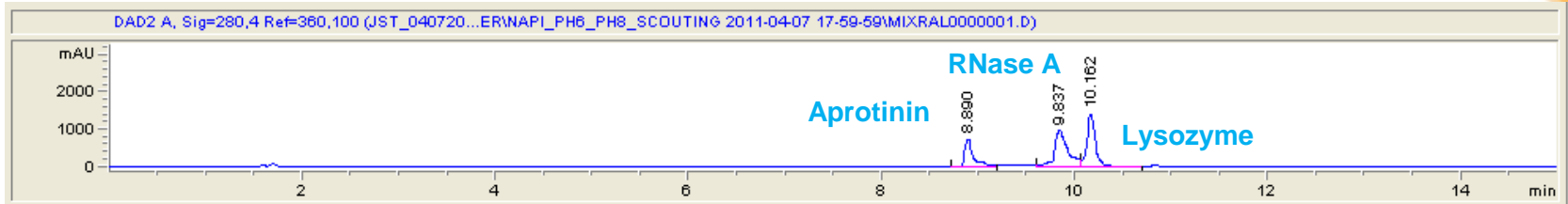
- Flow:** 0.500 mL/min
- Solvents:**
  - A: 20.0 %
  - B:  73.1 %
  - C:  6.9 %
  - D:  0.0 %
- Stoptime:**  As Injector/No Limit, 15.00 min
- Posttime:**  Off, 10.00 min
- Pressure Limits:** Min: 0.00 bar, Max: 200.00 bar
- Advanced Timetable:**

Time	Function	Parameter
0	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 20.0 % B:73.1 % C: 6.9 %D: 0.0 %
1.31	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 18.2 % B:71.1 % C: 8.9 %D: 1.8 %
4.02	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 14.6 % B:70.0 % C: 10.0 %D: 5.4 %
15	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 0.0 % B:71.1 % C: 8.9 %D: 20.0 %
15.01	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 20.0 % B:73.1 % C: 6.9 %D: 0.0 %
20	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 20.0 % B:73.1 % C: 6.9 %D: 0.0 %

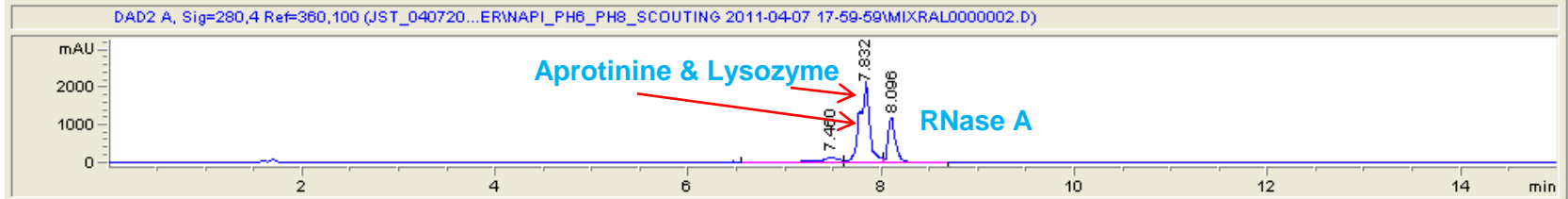
# pH Scouting with Marker Proteins on BioMab NP-10

RNase A (pI 9.45), Aprotinin (pI 10.5), Lysozyme (pI 11.35)

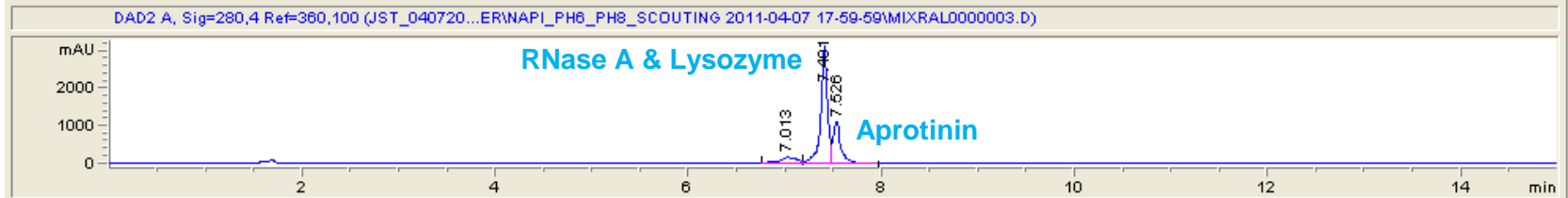
pH 6.0



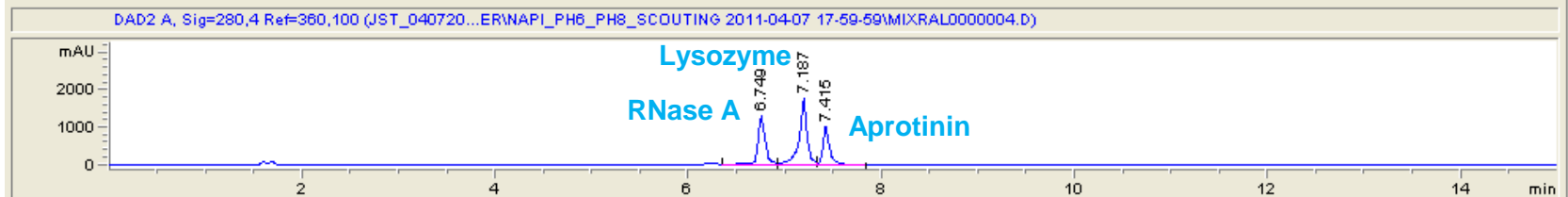
pH 6.5



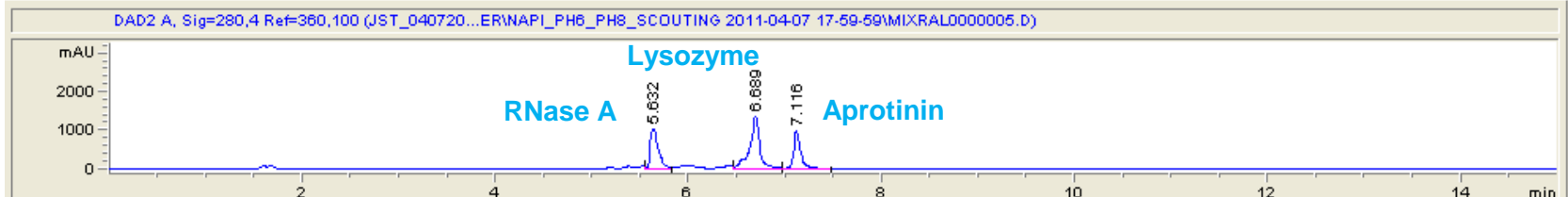
pH 7.0



pH 7.5



pH 8.0



# Zusammenfassung für Solvent Master (Prototyp)

- Empfiehlt Puffer-System und Stammlösungen
- Errechnet optimierte Gradienten-Schritte
- Ermöglicht vereinheitlichte Methoden innerhalb der Firma
- Integration mit ChemStation ermöglicht schnelleres Transferieren der Daten

# HPLC und UHPLC, alles auf einem LC

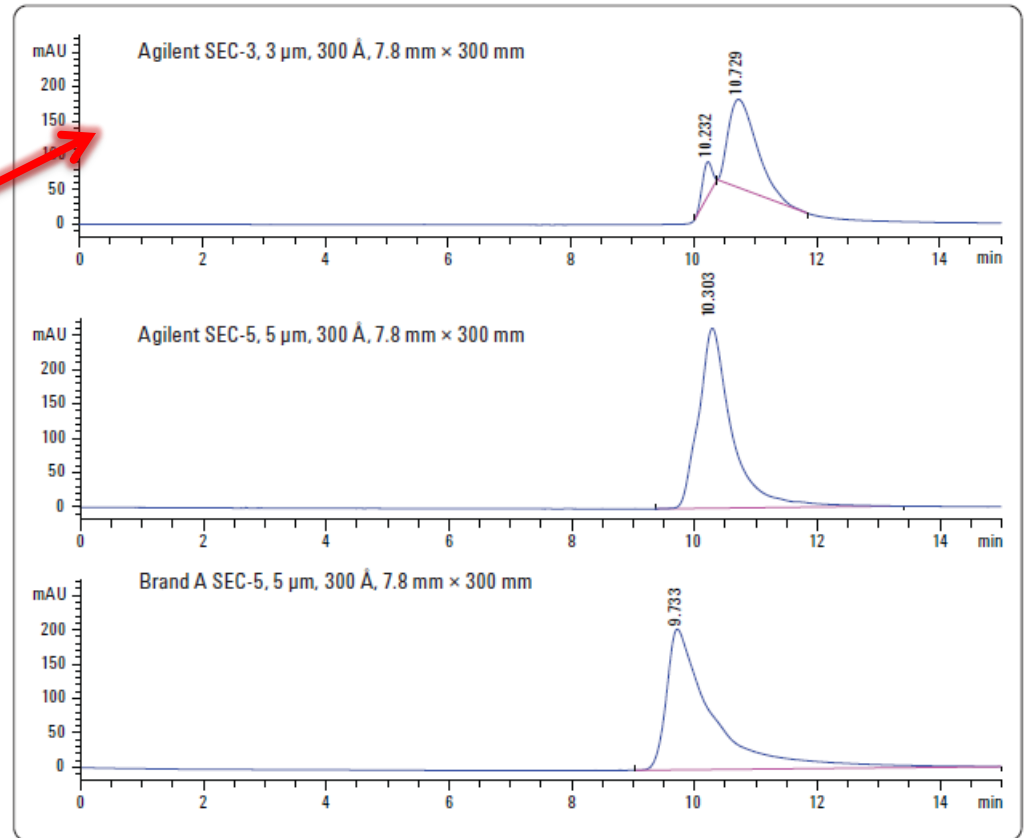
## Und dann auch noch Bio

Anwendung	Analysenzeit	Max Druck	Geeignetes System?
<b>Größenaus-schluss</b>	14	200 bar	?
<b>Ionenaustausch</b>	30	200/ 300 bar	?
<b>Peptide Maps</b>	12	600 bar	?

Physicochemical Characterization of a Therapeutic Protein by Peptide Mapping, SEC und IEX using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC system: [5990-6192EN](#)

# Größenausschlusschromatographie (SEC)

Ein zweiter Peak konnte nur mit der Agilent Bio-SEC 3- $\mu\text{m}$  Säule gezeigt werden.



**Figure 5**  
Size exclusion of a P128 therapeutic protein sample performed on the Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC using different SEC columns.

# Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Die Agilent Bio Mab 5 Säule zeigt beste Peakform und Trennleistung.

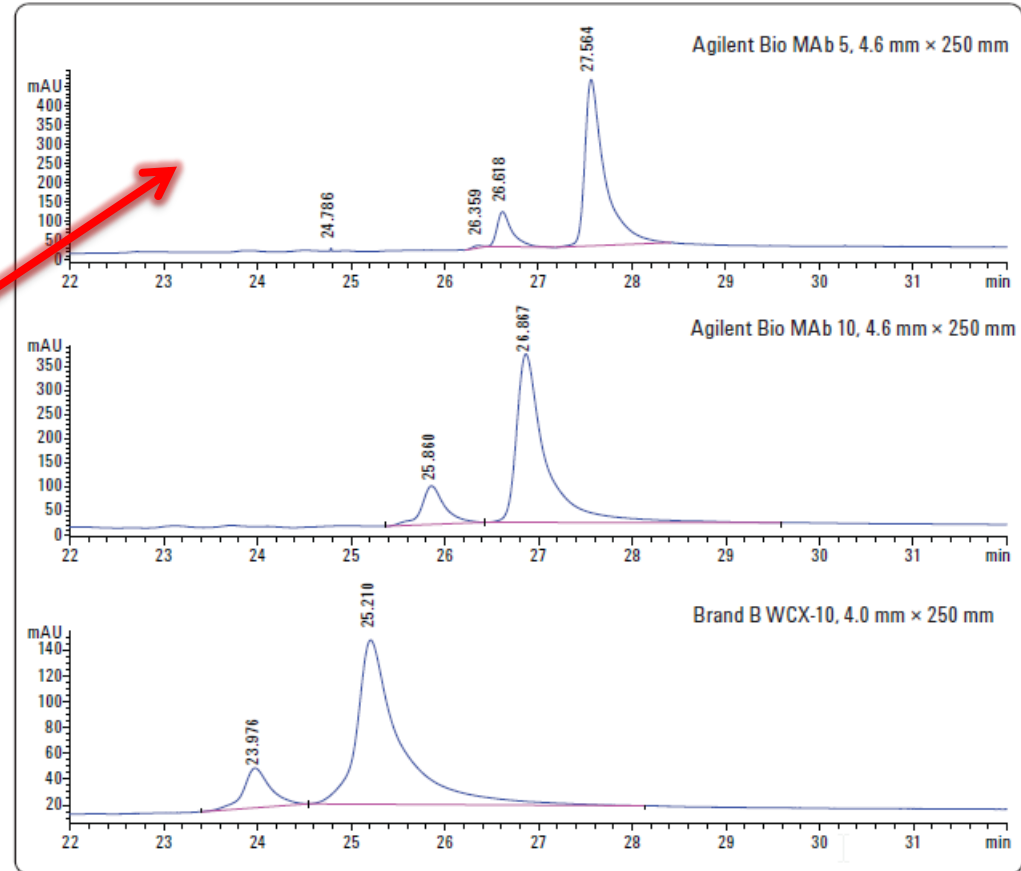
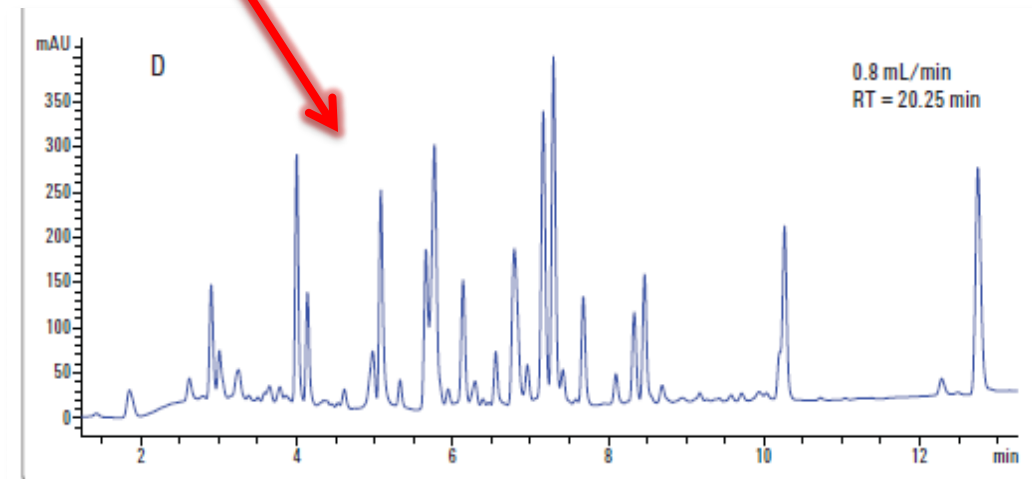
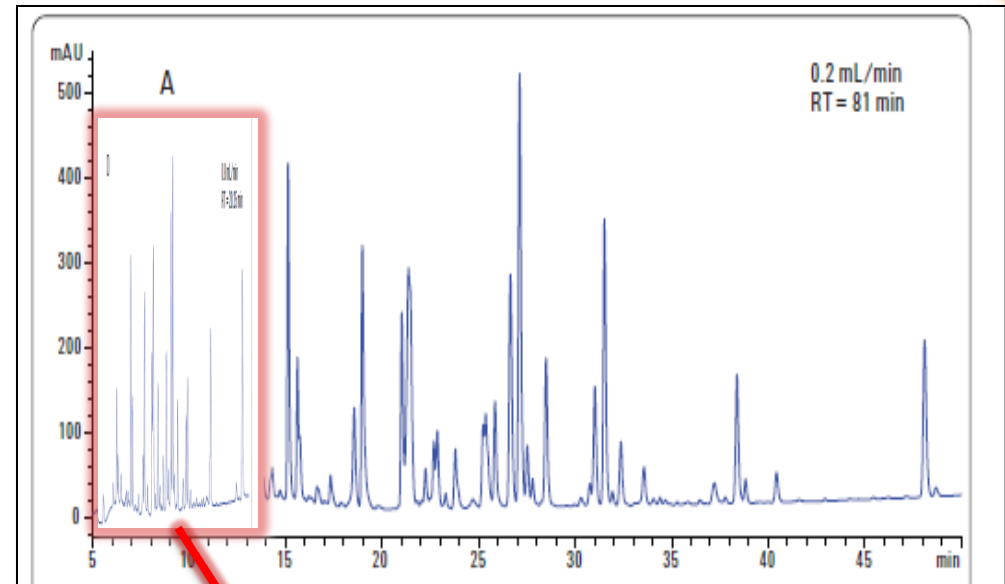


Figure 6

Weak cation-exchange chromatography for P128 therapeutic protein sample on the Agilent 1260 Bio-inert Quaternary LC system using different cation-exchange columns.

# Peptide Map von P128

- In komplexen Proben ist zum Erreichen der optimalen Auflösung eine lange Analysenzeit notwendig
- Eine erhöhte Flußrate kürzt die Analysenzeit und zeigt zudem exzellente Auflösung
- Der 1260 Infinity Bio-inert LC unterstützt die Nutzung von STM-Säulen mit hohen Flussraten



# HPLC und UHPLC, alles auf einem LC

## Und dann auch noch Bio

Anwendung	Analysenzeit	Max Druck	Geeignetes System?
<b>Größenaus-schluss</b>	14	200 bar	ja
<b>Ionenaustausch</b>	30	300 bar	ja
<b>Peptide Maps</b>	12	600 bar	ja

- Ein **flexibles** Instrument für Protein-Charakterisierung
- Bio-inert und korrosionsbeständig
- Hohe Auflösung, hohe Sensitivität und schnelle Trenngeschwindigkeit

## Bio-inert UHPLC:

# Das 1260 Infinity Bio-inert LC System

- Basiert auf dem 1260 Infinity Quaternary LC System, verwendete Materialien sind Bio-inert
- Pumpe aus Titan/ Gold, alle anderen Komponenten enthalten überhaupt kein Metall
- Vertraute Performance wie bisherige Agilent LCs, gleicher Service und Software, wenig Trainingsaufwand
- Dank seiner UHPLC-Fähigkeit sind mehrere Applikationen zur Proteincharakterisierung **auf einem System möglich**
- das System muss nicht umgebaut werden

BIO  
inert



**Vielen Dank**

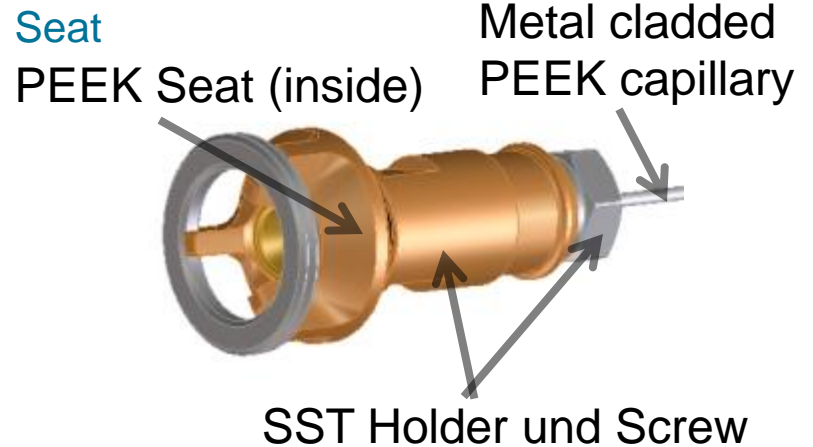
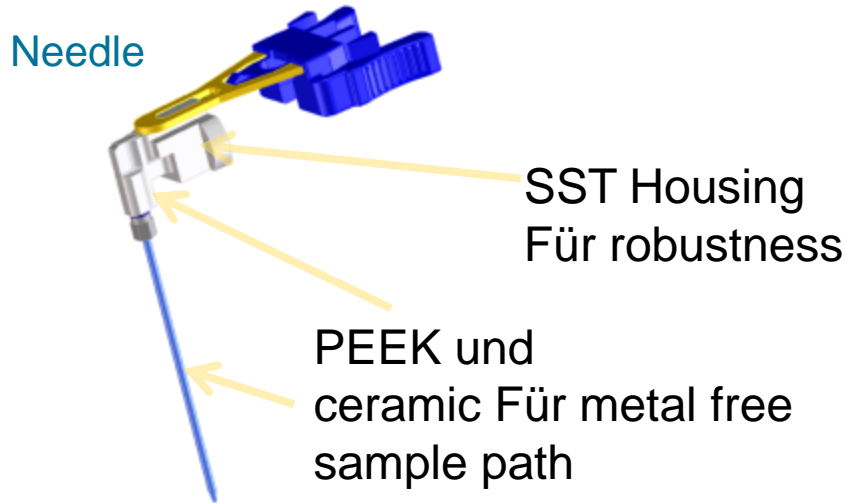
# Appendix

# Autosampler- und Pumpen-Design

## ➤ G5667A HP-Autosampler (Bio)



Titanium (mechanical parts) until sample introduction, PEEK, ceramics, PTFE, FFKM



## ➤ G5611A 600bar Quat. (Bio)



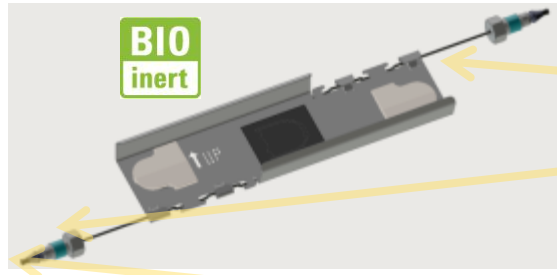
Used materials instead of non inert materials: Titanium (mechanical parts), Platin-Iridium, PTFE, PTFE or FFKM

# TCC und Fraktionssammler design to ensure bio-inertness

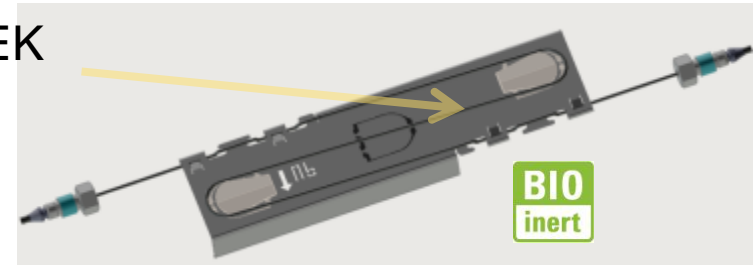
- **G1316C TCC** (thermostatted column compartment)  
# 19 und # 20 (w/o valve drive)



G5613-60050 Solvent Heater (Bio)



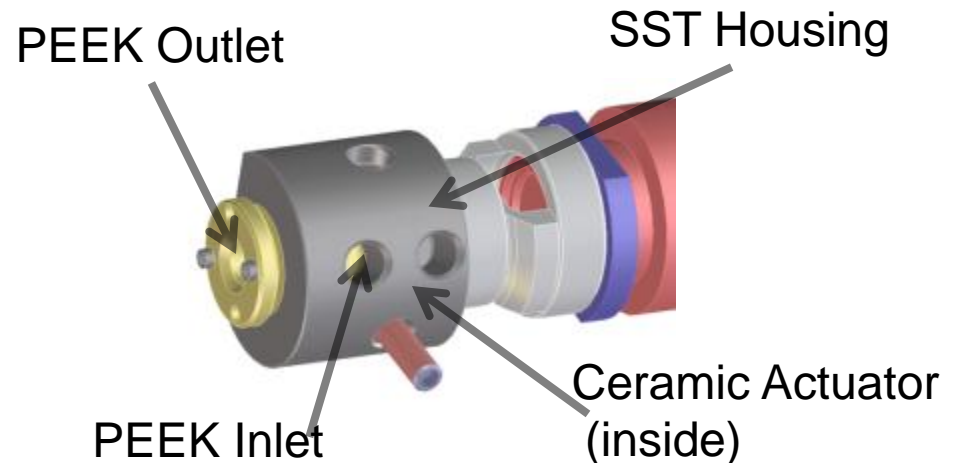
Metal clad PEEK  
Capillaries  
PEEK Ferrules



Inert Sockets (metal free)

- **G5664 A Fraktionssammler (Bio)**

Used materials instead of non inert materials:  
PEEK, ceramics  
und PTFE



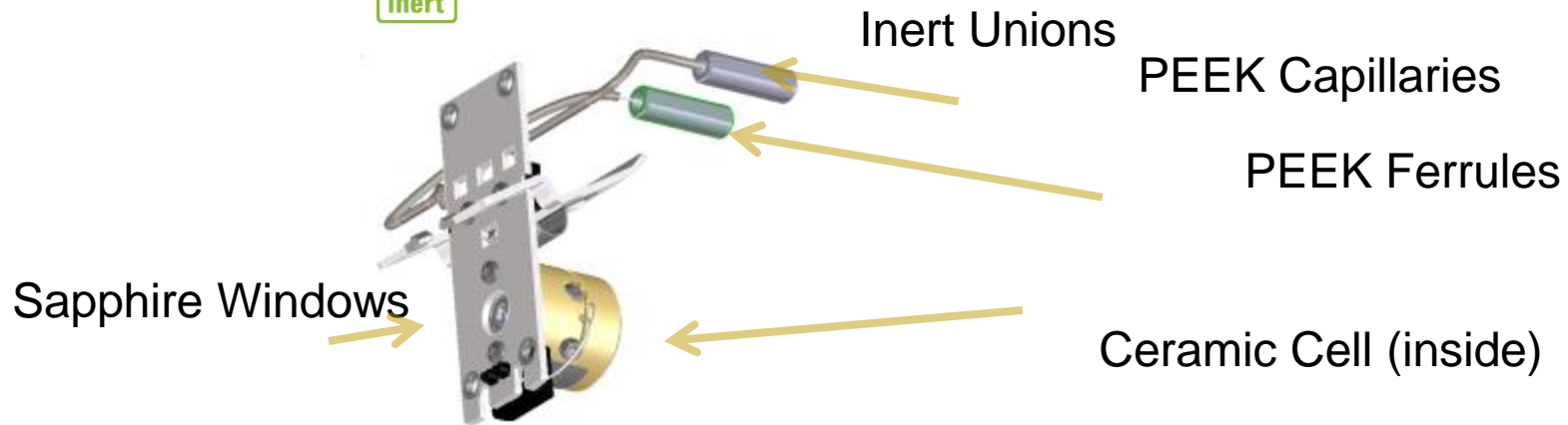
# Flow cell design to ensure bio-inertness

➤ **G1315C/D DAD und G1365C/D MWD**



+ #28 Für complete bio-inertness und pH between 1-13 (shortterm 14)

**BIO  
inert**



# Solvent Master SW: Reality Check

Does predicted buffer gradient match real conditions?

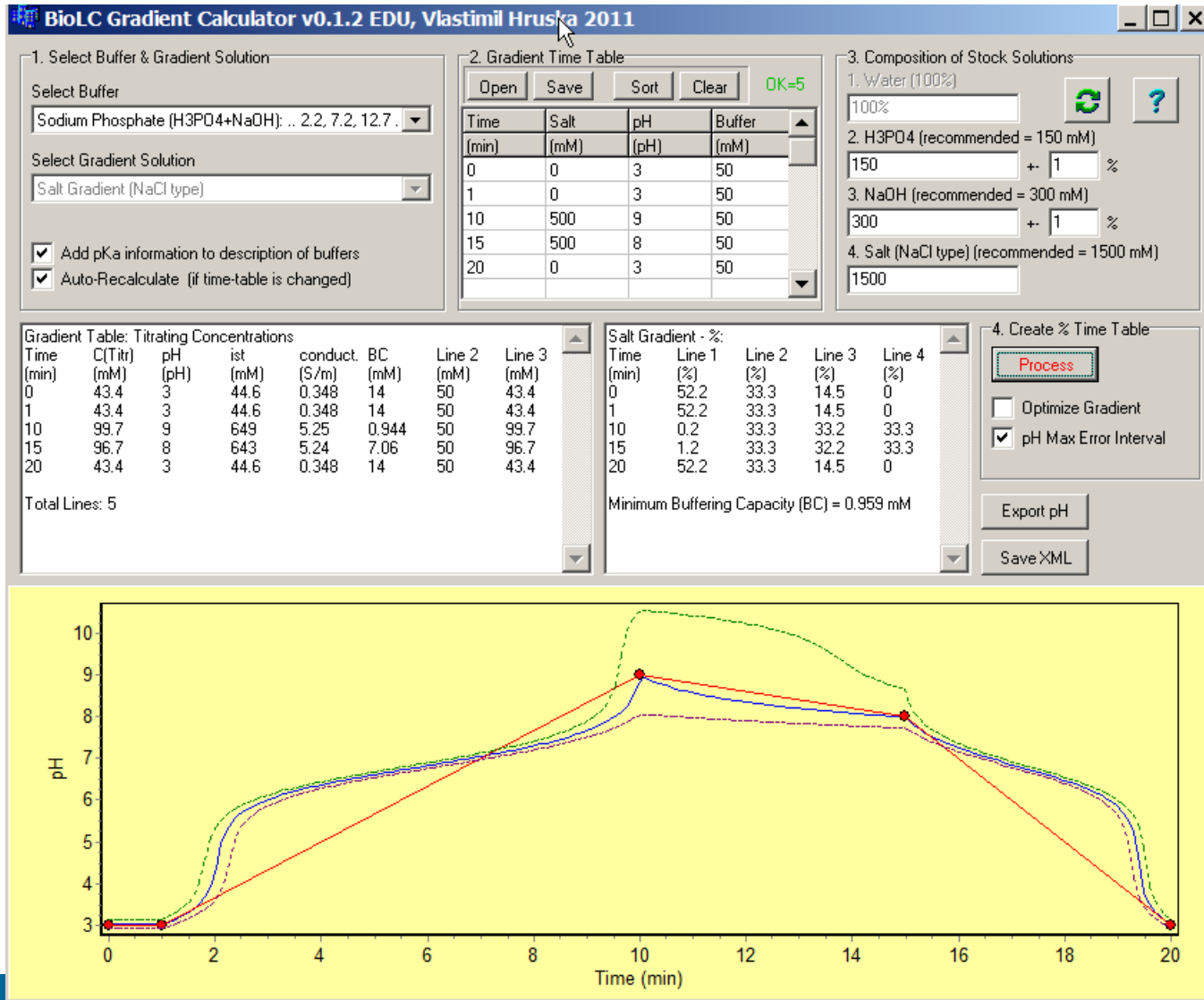
→ Time table (25 lines) of optimized gradient was transferred (manually) to the LC ChemStation method with flow-rate 1 mL/min und experimentally measured with stock solutions 100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

→ Non-buffering region around pH ~ 4.3 und close to pH ~ 9.

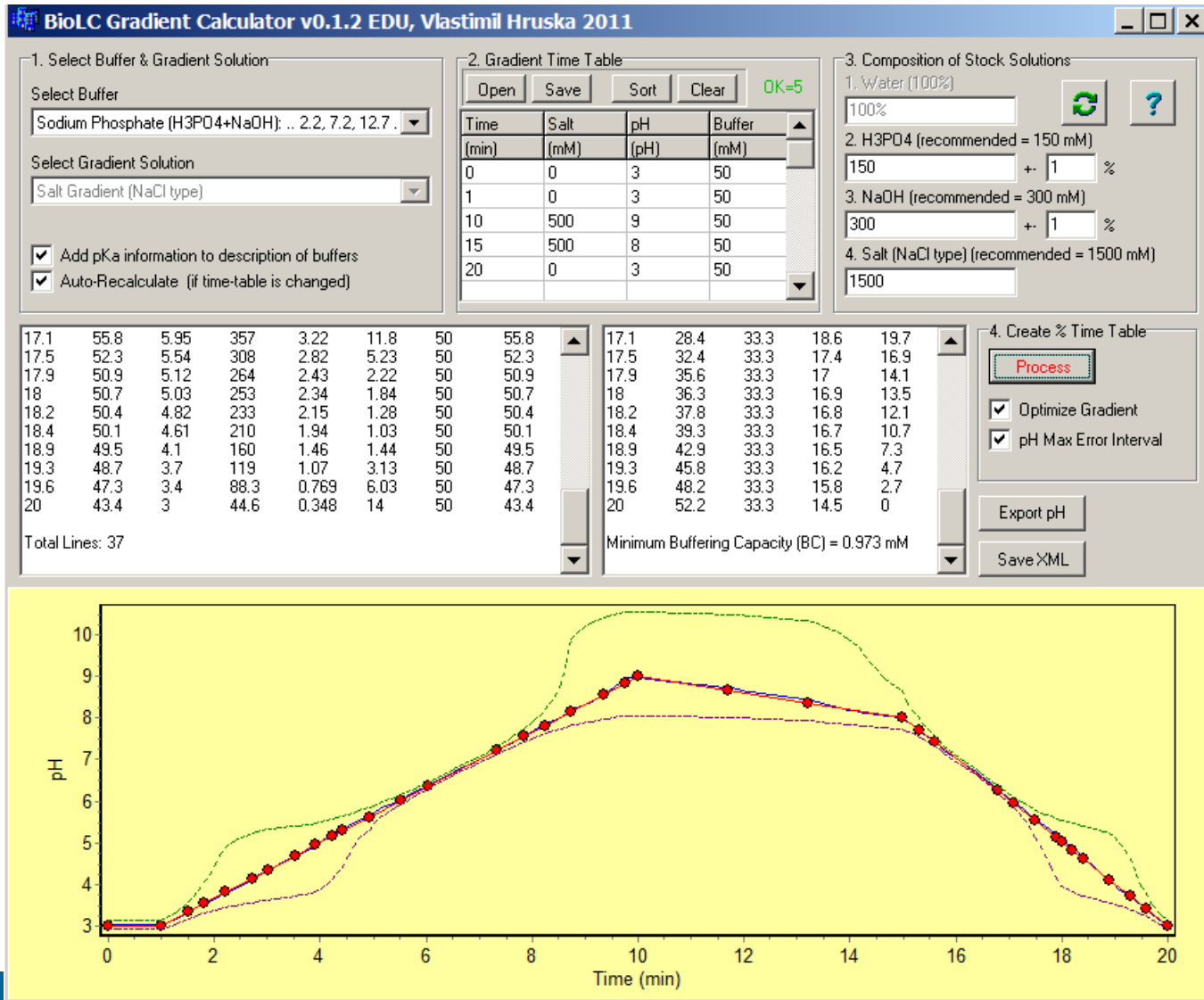
→ Experimental data were shifted by 4.36 min to align with calculated profiles.

# Beispiel einer Gradient-Optimierung

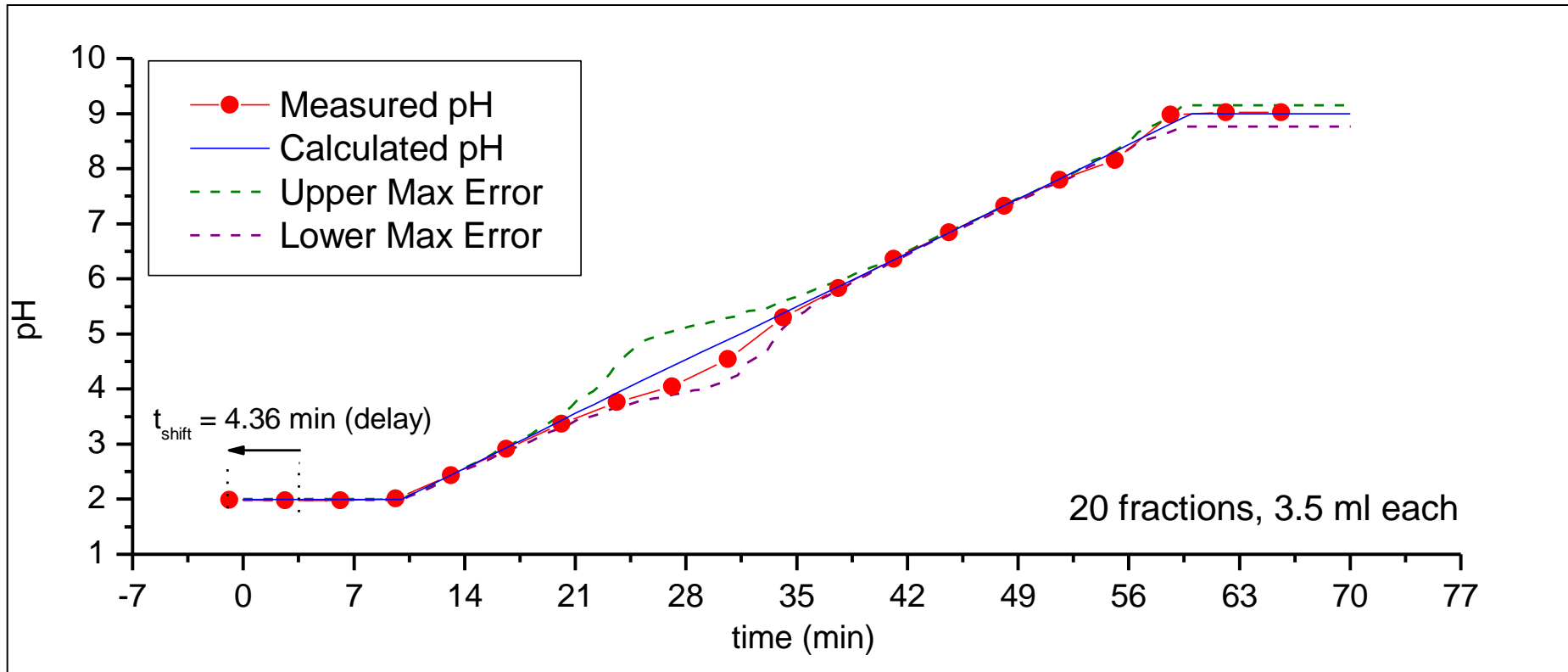
## Vorher



# Beispiel einer Gradient-Optimierung nachher



# pH Gradient 2–9 Experiment (Optimiert)



# pH Gradient 2–9 Experiment (Nicht- Optimiert)

