

Agilent praktischer Leitfaden für

GRÖSSENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE ANALYSE VON BIOMOLEKÜLEN

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

EINE ANLEITUNG ZUR ERFOLGREICHEN SEC

Die chromatographische Trennung von Biomolekülen anhand ihrer Größe in Lösung wird als Größenausschlusschromatographie (SEC) bezeichnet. Im Gegensatz zu anderen Chromatographiemodi kommen hierbei keinerlei Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase der Säule zum Tragen. Dies bietet die ideale Grundlage für die Analyse intakter Proteine und zur Abtrennung von Verunreinigungen wie Aggregaten, Hilfsstoffen, Zelltrümmern und anderen Kontaminationen, die durch Abbau entstehen. Die SEC findet daher breite Anwendung bei der Charakterisierung biotherapeutischer Moleküle sowohl in der Entwicklung als auch der Herstellung.

In diesem Leitfaden werden die SEC-Trennung, die Effekte der Größe und des Molekulargewichts gelöster Stoffe, die Säulenauswahl, wichtige Überlegungen zur mobilen Phase, allgemeine Regeln bei der Anwendung der SEC und vieles mehr diskutiert.



EINFACHE UND UNKOMPLIZIERTE TRENNUNG

Bei der SEC werden Moleküle proportional zu ihrer Größe in Lösung vom größten bis zum kleinsten aufgetrennt. Sehr große Moleküle werden aus dem gepackten Säulenbett ausgeschlossen und eluieren als Erstes im Totvolumen. Kleinere Moleküle können, abhängig von ihrer Größe, in unterschiedlichem Ausmaß in die Poren hinein diffundieren (Abbildung 1), wobei die kleinsten Moleküle am weitesten eindringen und als Letzte eluieren.

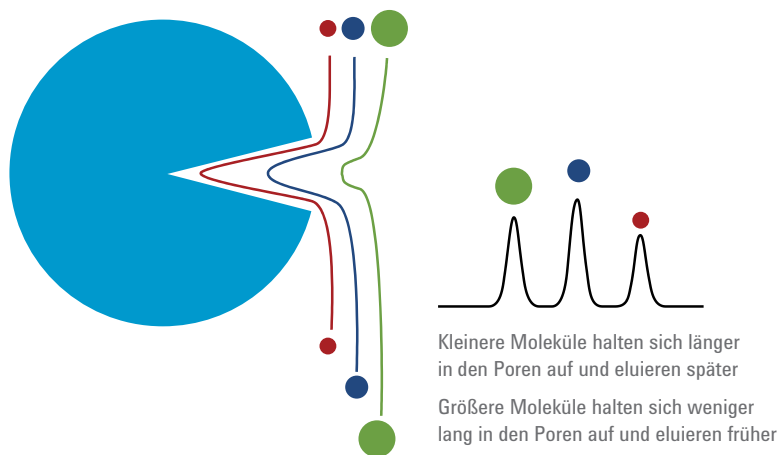


Abbildung 1: Moleküle dringen, abhängig von ihrer Größe, in verschiedenem Ausmaß in die Poren der stationären Phase ein.

Weitere Informationen zu Agilent Biosäulen für die SEC erhalten Sie unter www.agilent.com/chem/bioHPLC

Die Größenausschlusschromatographie eignet sich für die Trennung und Quantifizierung von Proteinmischungen und ist daher eine wertvolle Technik für die Qualitätskontrolle bei der Herstellung rekombinanter Proteine. Dies schließt die Quantifizierung von Aggregaten (Dimere, Trimere, Tetramere usw.) oder die Trennung von Hilfsstoffen und Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht von Proteinen mit höherem Molekulargewicht ein (Abbildung 2).

Der Einblick in die Aggregationsprozesse bei therapeutischen Proteinen und deren Kontrolle ist von großer Bedeutung, da Aggregation die Wirksamkeit und Haltbarkeit beeinflusst und sogar zu verstärkter Immunogenität führen kann. Richtlinien wie die Leitlinie ICH (Q6B) legen fest, dass Aggregate vom gewünschten Produkt abgetrennt und quantifiziert werden müssen.

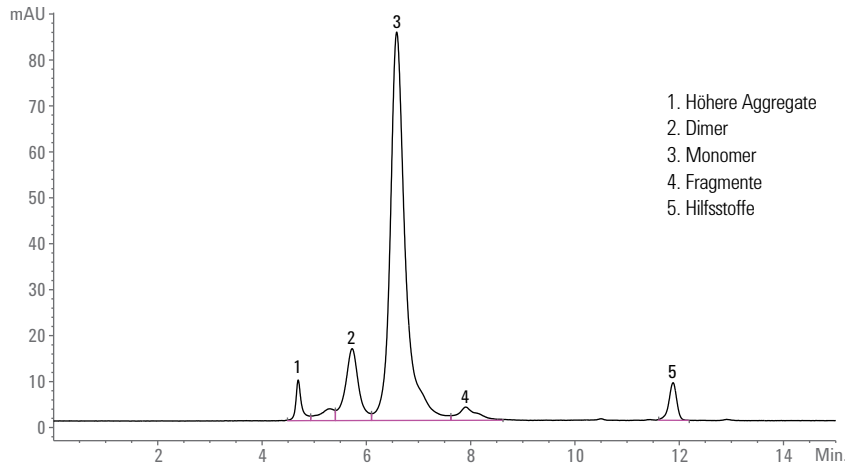


Abbildung 2: Trennung von IgG-Aggregaten und Hilfsstoffen.

Trennung intakter IgG-Monomere und -Dimere

Säule:	Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å, 7,8 × 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1180-5301)
Gerät:	Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System
Flussrate:	1,0 ml/min
Temperatur:	Umgebungstemperatur
Detektor:	UV, 220 nm
Injektion:	5 µl
Probe:	Polyklonale IgG
Mobile Phase:	150 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

Die Elutionsreihenfolge richtet sich in der Regel nach dem Molekulargewicht. Die Moleküle mit dem höchsten Molekulargewicht eluieren zuerst. Ganz genau betrachtet beruht der Mechanismus der SEC jedoch auf der Größe in Lösung. Die meisten Proteinmoleküle sind kompakt, einige allerdings haben eine zylindrische Form und eluieren daher in Lösung aufgrund ihres größeren hydrodynamischen Radius früher als erwartet (Abbildung 3). Darüber hinaus können verschiedene mobile Phasen über Größenveränderungen in der Lösung die Elutionsreihenfolge beeinflussen (hydrodynamischer Radius oder Gyrationradius).

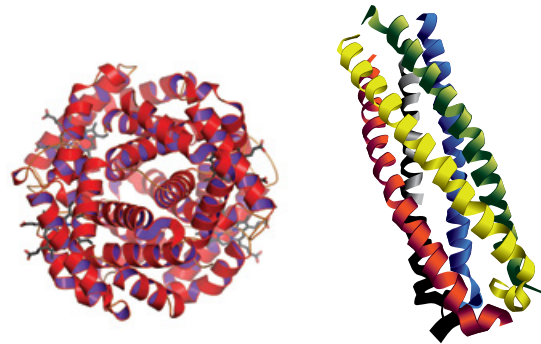


Abbildung 3: Vergleich eines kompakten globulären Proteins mit einem zylindrischen Protein.

Leitfaden für die SEC-UV/DAD-Methodenentwicklung

Anfängliche Säulenauswahl und Bedingungen für die größenabhängige Trennung von Biomolekülen, die Aggregationsanalyse sowie für Peptide, Polypeptide und Proteine

Peptide, Polypeptide, Proteine, mAb
MW > 0,1-1250 kDa

Peptide, Polypeptide, Proteine, mAb
MW > 0,1-10.000 kDa

Auswahl der Säule nach Molekulargewichtsbereich und Porengröße

AdvanceBio SEC (2,7 µm)

Porengröße	Molekulargewichtsbereich (kDa)
130 Å	0,1-100
300 Å	5-1250

Agilent Bio SEC-5 (5 µm)

Porengröße	Molekulargewichtsbereich (kDa)
100 Å	0,1-100
150 Å	0,5-150
300 Å	5-1250
500 Å	15-5000
1000 Å	50-7500
2000 Å	>10.000

Empfohlene Ausgangsbedingungen für die Trennung

Säule: AdvanceBio SEC oder Agilent Bio SEC-5

Mobile Phase: 150 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0*

Gradient: Isokratisch im Bereich 10-30 min

Temperatur: Empfohlen: 10-30 °C, Maximum: 80 °C

Flussrate: 0,1-0,4 ml/min für Säulen mit 4,6 mm ID
0,1-1,25 ml/min für Säulen mit 7,8 mm ID

Probengröße: ≤ 5% des gesamten Säulenvolumens

*Andere wässrige Puffer mit hohem oder niedrigem Salzgehalt können ebenfalls verwendet werden

Weitere Informationen finden Sie in der Application Note: *Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins* (Definition der optimalen Parameter für eine effiziente Größentrennung von Proteinen; Publikation Nr. 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

Nach dem ersten Chromatogramm sind möglicherweise Änderungen erforderlich, um die Trennung zu verbessern, die Löslichkeit der Proteine aufrechtzuerhalten oder Wechselwirkungen der Probe mit dem Chromatographiemedium zu verringern. Die Ionenstärke der mobilen Phase kann nach oben oder nach unten korrigiert werden, um eine optimale Trennung zu erhalten. Auch der pH-Wert kann in der Regel um ± 0,2 Einheiten angepasst werden. Sind weitere Optimierungsschritte erforderlich, sollte der Bereich nach unten oder nach oben erweitert werden. Eine Änderung der Temperatur oder der Zusatz eines organischen Lösemittels ist ebenfalls möglich.

Typische Puffer für Protokolle, die höhere Salzkonzentrationen erfordern:

100-150 mM Natriumchlorid in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
100-150 mM Natriumsulfat in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
50-100 mM Harnstoff in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0. Andere ähnliche Salze (z. B. KCl) und Guanidiniumhydrochlorid können ebenfalls verwendet werden.

pH-Bereich: 2,0-8,5

Folgende organische Lösemittel können zugesetzt werden:

5-10 % Ethanol (oder ähnliche Lösemittel wie Methanol oder Acetonitril) in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0; 5 % DMSO in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0. Beachten Sie, dass eine Verringerung der Flussrate nötig sein kann, um bei Verwendung

von mobilen Phasen mit höherer Viskosität unterhalb des maximalen Betriebsdrucks zu bleiben.

Temperatur:

In der Regel erfolgen SEC-Trennungen bei 10-30 °C. Die Trennung von Proteinen und Peptiden kann höhere Temperaturen erfordern, um die Auflösung und die Wiederfindung von Proteinen und hydrophoben Peptiden zu verbessern. Die SEC kann in einem Kühlraum durchgeführt werden, um bei temperaturempfindlichen Proteinen die maximale biologische Aktivität zu erhalten.

Die maximale Betriebstemperatur von Agilent Bio SEC-Säulen beträgt 80 °C. Beachten Sie, dass höhere Temperaturen Proteine denaturieren können.

ÜBERLEGUNGEN ZU GERÄTEN FÜR DIE SEC

Aufgrund des Trennmechanismus der SEC ist das Elutionsvolumen oder die Retentionszeit von entscheidender Bedeutung für die Analyse. Daher sind Hochleistungsgeräte erforderlich, um Präzision und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Isokratische Pumpen oder Gradientenpumpen, die im isokratischen Modus betrieben werden, sind geeignet, daher können Brechungsindex-(RI-)Detektoren sowie die herkömmlichen UV- oder Diodenarray-Detektoren verwendet werden. Um eine stabile Basislinie zu gewährleisten, speziell bei Einsatz eines Brechungsindexdetektors, sind eine Online-Entgasung der mobilen Phase und die Verwendung eines thermostatisierten Säulenofens unbedingt zu empfehlen. Das Arbeiten bei höherer Temperatur erhöht den Diffusionskoeffizienten und führt zu besserer Auflösung, besserer Reproduzierbarkeit und zu geringerer Belastung der Säule. Daher ist ein thermostatisierter Säulenofen wesentlich für ein Hochleistungssystem.

Robuster und zuverlässiger Betrieb auch unter schwierigen Lösemittelbedingungen

Puffer mit hoher Salzkonzentration, wie 2 M NaCl oder 8 M Harnstoff, und extreme pH-Werte im Bereich von bis zu 1 oder 13 werden bei der Analyse von Biomolekülen häufig verwendet, was eine erhebliche Belastung für LC-Geräte darstellt. Dank seiner besonderen Konstruktion ist das Agilent 1260 Infinity bioinerte Quaternäre LC-Gerät diesen rauen Lösemittelbedingungen problemlos gewachsen. Das korrosionsbeständige Titan im Pumpensystem und die metallfreien Materialien im Probenflussweg ergeben ein äußerst robustes Instrument, das nicht nur Ihre Proben schützt, sondern eine langlebige und wertbeständige Investition darstellt. Der Detektor ist ebenfalls für die Trennung von Biomolekülen konzipiert und beeinträchtigt die Proteinanalyse, die Peakform und die Wiederfindung nicht.

Schützen Sie Ihre Proteine bei der Analyse

Da Hitze Proteine denaturieren kann, ist es wichtig, die Probe innerhalb des gesamten LC-Flussweges bei konstanter Temperatur zu halten. Der Agilent bioinerte automatische Probengeber mit inerte Probenschleife und Keramiknadel kann mit einem zusätzlichen Thermostaten gekühlt werden. Bioinerte Wärmetauscher für den thermostatisierten Säulenofen halten die Temperatur konstant. Agilent bietet eine Reihe von bioinerten Flusszellen, die eine zuverlässige Analyse von Proteinen unter verschiedensten Bedingungen ermöglichen. Weitere Informationen zu Flusszellenoptionen erhalten Sie unter www.agilent.com/chem/bioflowcells.



Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System



Bioinerte Flusszelle mit RFID-Tag, 10 mm, 13 µl (Best.-Nr. G5615-60022)

Software-Lösungen bieten neue Erkenntnisse

Für die Arbeit mit der Größenausschlusschromatographie stehen Ihnen mehrere Software-Optionen zur Verfügung:

- **HPLC-Software:** Die Agilent OpenLAB CDS ChemStation-Software unterstützt Sie bei der Akquisition, Überprüfung und Organisation von Chromatographiedaten und bei der quantitativen Analyse
- **GPC/SEC-Software:** Verfügbar als Teil des Agilent GPC/SEC-Systems, bietet mehr Informationen auf der Basis des Molekulargewichts
- **Buffer-Advisor-Software:** Macht bei der Methodenentwicklung die mühsamen und fehleranfälligen Schritte des Ansetzens und der Mischung des Puffers überflüssig und erleichtert und beschleunigt die Ermittlung des richtigen pH-Werts durch Erstellung von Salz- und pH-Gradienten



Umfassende Charakterisierung von Molekülen

Die SEC kann eingesetzt werden, um das durchschnittliche Molekulargewicht polymerer Analyten, einschließlich natürlich vorkommender Moleküle (Polysaccharide, Stärke usw.) und synthetischer Polymere (Polyethylenglykol oder Polyethylenoxid) zu bestimmen (Abbildung 4).

Für Proteine oder komplexere Proben, einschließlich Impfstoffe, ist häufig eine anspruchsvollere Form der Datenanalyse mit spezieller Software nötig. In Kombination mit geeigneten Detektoren können wertvolle Daten zur Konformation der Probe erhalten werden. Weitere Informationen über die Auswahl an Detektoren finden Sie auf Seite 17.

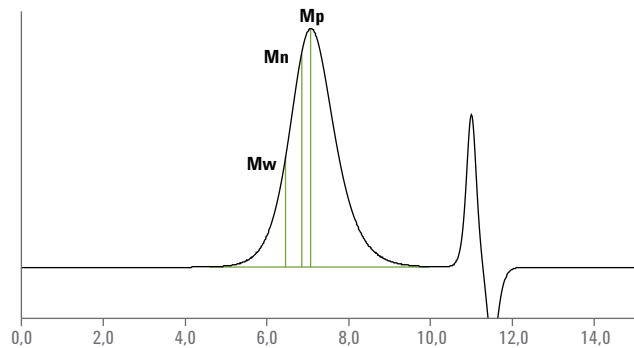
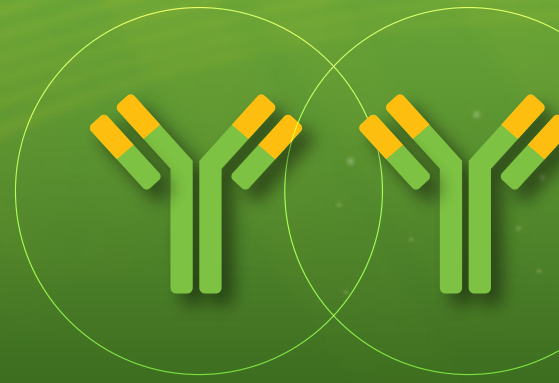


Abbildung 4: SEC-Trennung eines Polysaccharids, mit Mw, Mn und Mp.

KOMPONENTEN DER SEC-CHARAKTERISIERUNG



Probenvorbereitung

Die Proben werden für die Größenausschlusschromatographie auf ähnliche Weise vorbereitet wie für die Proteinanalyse mithilfe von HPLC-Methoden. Der wichtigste Aspekt der Probenvorbereitung ist, dass die Probe im Lösemittel löslich sein muss. Im Idealfall sollte sie in der mobilen Phase selbst gelöst werden. Aufgrund der größeren Säulenabmessungen und der geringen Lineargeschwindigkeit – eine Folge der verglichen mit anderen HPLC-Formen langsamen Flussrate (siehe „Säulengröße“ weiter unten) –, müssen die Probenkonzentration und das Injektionsvolumen eventuell höher sein als üblich. Zum Schutz der Säule vor möglicher Beschädigung empfehlen wir, die Proben vor der Analyse zu filtrieren oder zu zentrifugieren, um Partikel zu entfernen. Eine Filtration ist jedoch kein geeigneter Schritt bei geringer Löslichkeit einer Probe. In diesem Fall muss eventuell ein anderes Lösemittel gefunden werden.

Für eine effektive Probenvorbereitung ist es darüber hinaus erforderlich, dass die zum Lösen der Probe eingesetzten Methoden die Eigenschaften der Probe selbst nicht verändern. Einige Proteine können unter Stressbedingungen aggregieren (Dimere und Multimere mit höherem Molekulargewicht bilden) oder dissoziieren (Untereinheiten mit niedrigerem Molekulargewicht bilden). Dazu gehören häufiges Einfrieren und Auftauen, extreme Temperaturen, Beschallung oder sogar Konzentration. Weitere Informationen finden Sie im Leitfaden für die Methodenentwicklung auf Seite 5.

Captiva-Filter mit geringer Proteinbindung

Unabhängig davon, welche Art der Probenvorbereitung Sie durchführen, empfiehlt es sich, die Probe mit einem Filter mit geringer Proteinbindung zu filtrieren.

Agilent PES-Filter weisen eine konsistent niedrige Proteinbindung auf und sind daher für die Filtration proteinhaltiger Proben ideal geeignet. Für die meisten LC-Analysen sind PES-Filtermembranen besser geeignet als PVDF-Membranen. Agilent PES hat eine mit PVDF-Filtern vergleichbare Kompatibilität für übliche LC-Lösungsmittel und ist diesen hinsichtlich der Proteinbindung und -aufreinigung überlegen. Weitere Informationen finden Sie unter www.agilent.com/chem/filtration



Captiva PES-Filter

Durchmesser (mm)	Porengröße (µm)	Zertifizierung	Gehäuse	Bestellnummer
4	0,45	LC	Polypropylen	5190-5095
4	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5094
15	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5096
15	0,45	LC	Polypropylen	5190-5097
25	0,2	LC/MS	Polypropylen	5190-5098
25	0,45	LC	Polypropylen	5190-5099

Säulenauswahl

Säulengröße

SEC-Säulen sind normalerweise viel größer als Säulen, die für andere chromatographische Techniken verwendet werden. Außerdem werden sie mit vergleichsweise niedrigen Flussraten und langsamen Lineargeschwindigkeiten betrieben. Die Standard-Säulenabmessungen für die SEC sind 7,8 x 300 mm (betrieben bei 1,0 ml/min), bei einer Umkehrphasensäule dagegen 2,1 oder 4,6 x 150 mm (betrieben bei 2- bis 3-fach höheren Lineargeschwindigkeiten). Dies ist kein Effekt der Säulengröße, sondern eine Folge des SEC-Mechanismus.

Bei der SEC gibt es keine Erhöhung der Probenkonzentration aufgrund von Adsorption oder Interaktion mit der stationären Phase, wie dies in der Regel bei anderen Chromatographietechniken beobachtet wird. Daher werden die mittels SEC analysierten Proben in wesentlich größeren Volumina (5-20 µl) injiziert, oft auch in hohen Konzentrationen (1-4 mg/ml). Die Analysendauer beträgt in der Regel 10-12 Minuten pro Säule (bei einer herkömmlichen Säule mit 7,8 x 300 mm, die bei 1,0 ml/min betrieben wird) und die Peaks sind meist breit, sodass keine hohen Datenerfassungsraten erforderlich sind. Zu Vergleichszwecken oder zur Quantifizierung von Proteinaggregaten wird HPLC-Software verwendet. Um Informationen zur Molekulargewichtsverteilung bei polydispersen Polymeren zu erhalten, wird dagegen spezielle SEC-Software eingesetzt.

Es ist von großer Wichtigkeit, dass Sie sich durch regelmäßige Kalibrierung einen Einblick in die Eigenschaften Ihrer ausgewählten Säule verschaffen. Durch Einbeziehen eines Moleküls, das so groß ist, dass es in keine der Poren eindringen kann, sollte es möglich sein, die Ausschlussgrenze der Säule zu bestimmen. Ähnlich lässt sich anhand einer niedermolekularen Verbindung, die so klein ist, dass sie in alle Poren eindringen kann, die Gesamtpermeationsgrenze der Säule ermitteln. Anschließend sollten Sie sicherstellen, dass die Trennung, die Sie durchführen möchten, innerhalb dieser beiden Grenzen erfolgt. Enthält das Chromatogramm Ihrer Probe ausgeschlossenes Material oder Material, das an der Gesamtpermeationsgrenze eluiert, ist dies ein Anzeichen dafür, dass Sie für Ihre Analyse eine andere Porengröße benötigen.



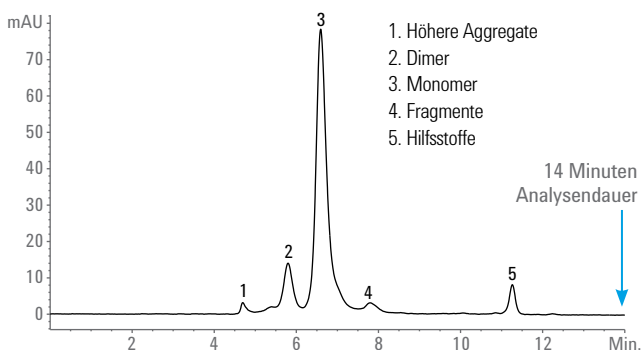
Höhere analytische Geschwindigkeit mit kürzeren Säulen

In der Regel müssen Säulen mit einer Länge von 300 mm verwendet werden, um eine ausreichende Auflösung zu erreichen. Um die Geschwindigkeit der Trennung zu erhöhen, können Sie jedoch die Verwendung einer kürzeren Säule in Betracht ziehen. Die Trennung kann mit einer 150 mm langen Säule in der Hälfte der Zeit durchgeführt werden. Dadurch wird jedoch die Auflösung beeinträchtigt. Kürzere Säulen können häufig auch mit höherer Flussrate betrieben werden, ohne dass die Gefahr besteht, die Rückdruckgrenze zu erreichen. Ist ein hoher Probendurchsatz erforderlich, kann auf diese Weise die Analysendauer weiter verkürzt werden. Siehe Abbildung 5.

Säule: AdvanceBio SEC, 7,8 x 300 mm

Flussrate: 1,0 ml/min

Probe: Polyklonale IgG



Säule: AdvanceBio SEC, 7,8 x 150 mm

Flussrate: 2,0 ml/min

Probe: Polyklonale IgG

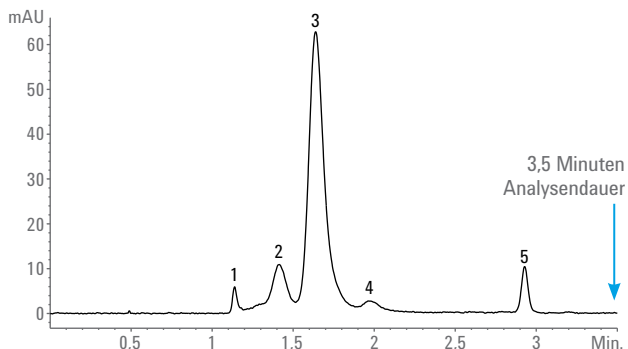


Abbildung 5: Vergleich zwischen Analysen mit einer 300-mm- bzw. einer 150-mm-Säule zur Demonstration der Zeitersparnis.

Auswahl des Säulenmediums

Nachdem Sie die Löslichkeit der Probe ermittelt und die mobile Phase – Wasser, Puffer oder organisches Lösemittel – für Ihre Trennung festgelegt haben, wählen Sie eine Größenausschlusssäule, die für den jeweiligen Molekülyp und seine Größe geeignet ist. Mit einem Sorbens auf Polymerbasis gepackte Säulen werden häufig für polymere Moleküle mit breiter Molekulargewichtsverteilung wie Heparin, Stärke oder Cellulose verwendet. Proteine und Moleküle mit diskreten Molekulargewichten lassen sich am besten mit stationären Phasen auf Silicabasis analysieren (Tabelle 1).

Denken Sie daran, dass Proteine aus Aminosäuren bestehen, deren Seitenketten unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweisen: säurehaltige, basische, hydrophobe und neutrale/hydrophile. Um Wechselwirkungen mit Silica-Säulen zu verhindern, sind in der mobilen Phase Puffer erforderlich.

Agilent empfiehlt für seine Säulen einen geeigneten Molekulargewichtsbereich. Im Idealfall sollte sich die ausgewählte Säule in der Mitte des Einsatzbereichs befinden.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Applikation	Agilent Säulen	Hinweise
Proteine		
SEC-UV/DAD- oder LS-Analyse von mAb, Proteinen und Peptiden	Agilent AdvanceBio SEC	Die neueste innovative Technik bietet eine Auflösung, die Wiederholungsanalysen von Proben überflüssig macht und durch höhere Geschwindigkeit die Analysendauer verkürzt, was die Laborproduktivität deutlich verbessert.
SEC-MS-Analyse von mAb, Proteinen und Peptiden	Agilent Bio SEC-3	Bietet stabile Basislinien bei der MS-Detektion
Große Biomoleküle und Proben mit mehreren Komponenten mit unterschiedlichen Molekulargewichten	Agilent Bio SEC-5	Weitere Porengrößenoptionen (100 Å, 150 Å, 300 Å, 500 Å, 1000 Å und 2000 Å) für ein breiteres Spektrum von Analyten
Globuläre Proteine, Antikörper	ProSEC 300S	Einzelsäulenoption für die Proteinanalyse bei hohem Salzgehalt
Proteine, globuläre Proteine	ZORBAX GF-250/450	Ältere Produkte, die verwendet werden sollten, wenn Protokolle die Verwendung von Geräten mit der USP-Kennzeichnung L35 vorsehen
Wasserlösliche Analyten		
Polymere und Oligomere mit niedrigem MW, Oligosaccharide, PEGs, Lignosulfonate	2 oder 3 PL Aquagel-OH ✓ PL Aquagel-OH 8 µm ✓ PL Aquagel-OH 20 5 µm ✓ PL Aquagel-OH MIXED-M 8 µm	Die Serie analytischer Säulen PL Aquagel-OH ist für einen pH-Bereich von 2 bis 10 geeignet, zudem kompatibel mit organischen Lösemitteln (bis zu 50 % Methanol), mechanisch stabil bis 140 bar (2030 psi) und für niedrige Säulendrucke geeignet
Polydisperse Biopolymere, Polysaccharide, Cellulosederivate	2 oder 3 PL Aquagel-OH ✓ PL Aquagel-OH MIXED-H 8 µm ✓ PL Aquagel-OH 60/50/40 8 µm	
Polymere mit sehr hohem MW, Hyaluronsäure, Stärke, Gummi	PL Aquagel-OH 60/50/40 15 µm in Serien	

Tabelle 1: Säulenauswahl nach Applikation und Probengröße.



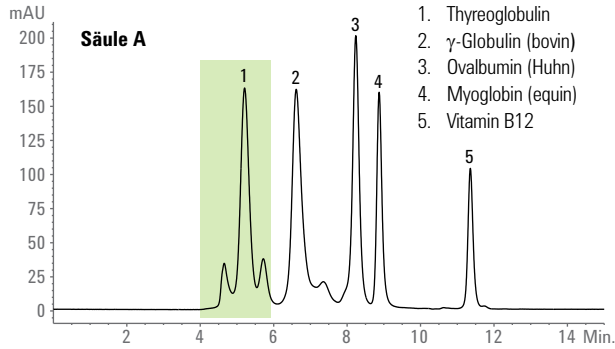
Agilent Bio SEC-Säulen für die Trennung von Biomolekülen, einschließlich Proteinaggregate, und Agilent GPC-Säulen für die Analyse natürlicher Polymere, einschließlich Molekulargewichtsbestimmung von Polysacchariden.

Porengröße

Proteine sind im Vergleich zu anderen Biopolymeren vergleichsweise klein und kompakt, sodass eine Porengröße von 300 Å ein guter Ausgangspunkt für die Säulenauswahl ist. In Abbildung 6 wird die Auflösung eines Referenzstandardgemisches aus fünf Proteinen bzw. einer Probe polyklonaler IgG auf Säulen mit unterschiedlicher

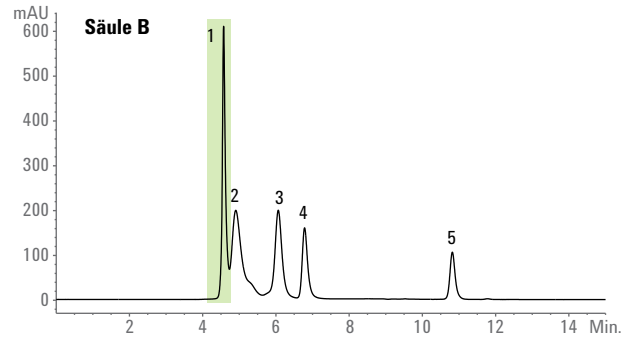
Porengröße verglichen. Der Effekt der Porengröße auf die Auflösung ist klar ersichtlich. Mit 300-Å-Poren werden das größte Protein Thyreoglobulin und das IgG-Dimer aufgelöst, mit abnehmender Porengröße werden die größten Proteine jedoch ausgeschlossen und es findet keine Trennung mehr statt.

BioRad Standardgemisch für die Gelfiltration



Säule A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1580-5301)

Säule B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1580-5350)



Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System

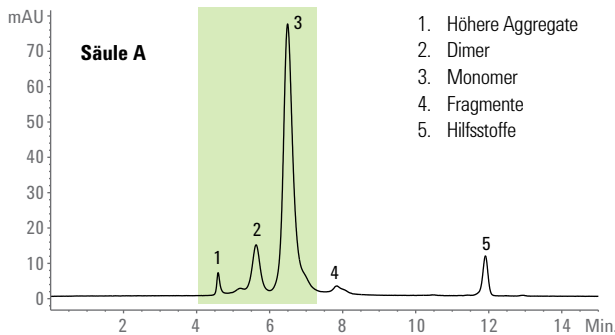
Mobile Phase: 150 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0

Flussrate: 0,35 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

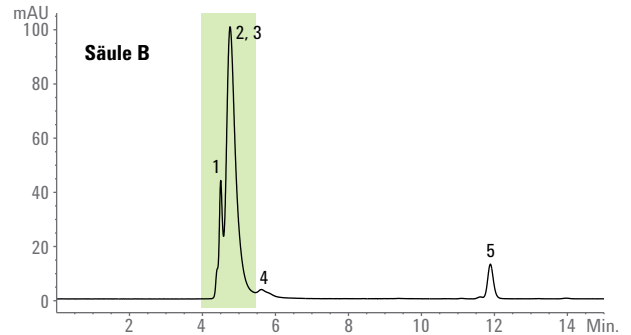
Probe: BioRad Standardgemisch für die Gelfiltration

Trennung polyklonaler IgG



Säule A: AdvanceBio SEC 300 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1580-5301)

Säule B: AdvanceBio SEC 130 Å
4,6 x 300 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. PL1580-5350)



Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System

Mobile Phase: 150 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0

Flussrate: 0,35 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

Probe: Polyklonale IgG

Abbildung 6: Vergleich des Einflusses der Porengröße auf die Auflösung von BioRad-Standards für die Gelfiltration und eines polyklonalen IgG. Der grün unterlegte Bereich verdeutlicht den Unterschied hinsichtlich der Auflösung zwischen den beiden Porengrößen. Für die Analyse größerer Proteine ist eine größere Porengröße erforderlich.

Beurteilung des SEC-Permeationsbereichs

Bei der Analyse von Proteinen muss man sich klar machen, dass der SEC-Mechanismus eine Auftrennung gelöster Stoffe nach ihrer Größe und nicht nach ihrem Molekulargewicht bewirkt. Dies ist offensichtlich, wenn man die Kalibrierkurve der Proteine/Peptide mit den Kurven für Pullulan/Polysaccharide und PEG/PEO vergleicht, die in Abbildung 7 gezeigt sind. Die Kalibriersubstanzen Pullulan/Polysaccharide und PEG/PEO ergaben recht ähnliche Kalibrierungskurven, die Protein-/Peptidkurve ist jedoch verschoben und hat eine andere Form.

Proteine bestehen aus komplexen Polypeptidketten, die dreidimensionale Strukturen ausbilden. Diese Strukturen werden von der Umwelt beeinflusst, der sie ausgesetzt sind, wie zum Beispiel dem pH-Wert und der Ionenstärke. Die Ketten falten sich in die am besten geeignete Form, daher können ihre Struktur und ihre Größe variieren.

Um zu zeigen, dass die Elutionszeit von der Größe statt vom Molekulargewicht abhängt, betrachte man die Retentionszeiten von Kalibriersubstanzen mit einem Molekulargewicht von etwa 50.000, die sich stark unterscheiden (Abbildung 8). PEG eluiert bereits nach 7 Minuten, das Polysaccharid nach 7,5 Minuten, das Protein jedoch nach etwa 9,5 Minuten.

Dies zeigt deutlich, dass der SEC-Trennmechanismus auf der tatsächlichen Größe basiert und nicht auf dem Molekulargewicht. Daher muss bei der Verwendung von Kalibrierungskurven unbedingt angegeben werden, mit welchen Kalibriersubstanzen sie erstellt wurde. Beispielsweise kann angegeben werden, dass die interessierende Probe ein Molekulargewicht von 50.000 hat, das dem von Pullulan/Polysaccharid äquivalent ist. Auf Seite 16 finden Sie Informationen zu erweiterten Detektoren, mit denen sich dieser Effekt vermeiden lässt.

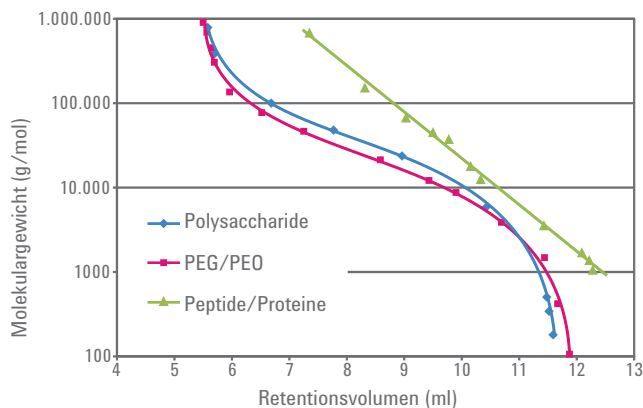


Abbildung 7: Vergleich von Kalibrierkurven, erstellt für drei Arten von Kalibriersubstanzen

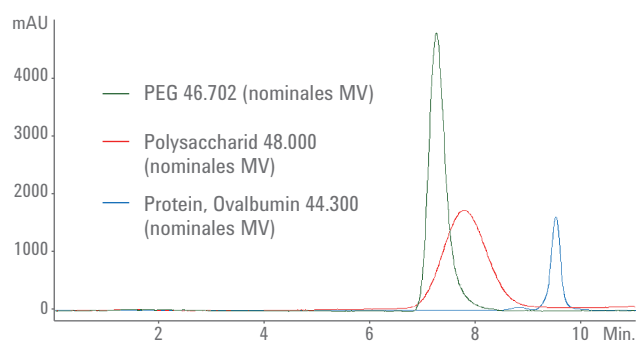


Abbildung 8: Überlagerung der Chromatogramme für Kalibriersubstanzen mit verschiedenem Molekulargewicht.

130 Å AdvanceBio SEC-Kalibrierungsstandard

(Best.-Nr. 5190-9416 130 Å AdvanceBio SEC-Kalibrierungsstandard, 2 ml Probenflasche)

Eine Proteinmischung aus 5 sorgfältig ausgewählten Proteinen (Ovalbumin, Myoglobin, Aprotinin, Neurotensin, Angiotensin II) für die Kalibrierung der 130 Å AdvanceBio SEC-Säulen von Agilent. Dieser Standard kann zur regelmäßigen Kalibrierung der Säule eingesetzt werden, um optimale Systemleistung bei verschiedensten Applikationen sicherzustellen, wie beispielsweise Aufreinigung und Analyse von Proteinen.

300 Å AdvanceBio SEC-Kalibrierungsstandard

(Best.-Nr. 5190-9417 300 Å AdvanceBio SEC-Kalibrierungsstandard, 2 ml Probenflasche)

Eine Proteinmischung aus 5 sorgfältig ausgewählten Proteinen (Thyroglobulin, γ -Globulin, Ovalbumin, Myoglobin, Angiotensin II) für die Kalibrierung der 300 Å AdvanceBio SEC-Säulen von Agilent. Dieser Standard kann zur regelmäßigen Kalibrierung der Säule eingesetzt werden, um optimale Systemleistung bei verschiedensten Applikationen sicherzustellen, wie beispielsweise Aufreinigung und Analyse von Proteinen.



Partikelgröße

Die Partikelgröße ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt, der bei der Säulenauswahl zu beachten ist. Kleinere Partikelgrößen ergeben eine effizientere Trennung, es besteht jedoch die Gefahr, dass Proteine abgebaut werden (Scheren/Verformen). Abbildung 9 zeigt einen Vergleich zwischen der 3- μm -Säule Bio SEC-3 und der 5- μm -Säule Bio SEC-5 von Agilent. Werden die Proben und die Lösemittel

nicht sorgfältig vorbereitet, besteht ein höheres Risiko für einen stärkeren Rückdruck und eine Verstopfung der Säule. Daher ist es empfehlenswert, unlösliches Material und Ablagerungen durch Filtration zu entfernen. Die Verwendung einer Vorsäule oder eines Inline-Filters kann die Lebensdauer der Säule verlängern.

Vergleich zwischen einer Agilent Bio SEC-3- und einer Agilent Bio SEC-5-Säule

Analyse eines monoklonalen Antikörpers

Säule: Bio SEC-3, 300 Å,
7,8 × 300 mm, 3 μm
(Best.-Nr. 5190-2511)

Säule: Bio SEC-5, 300 Å,
7,8 × 300 mm, 5 μm
(Best.-Nr. 5190-2526)

Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes
Quaternäres LC-System

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7

Flussrate: 1 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

Probe: Humanisierter monoklonaler
Antikörper

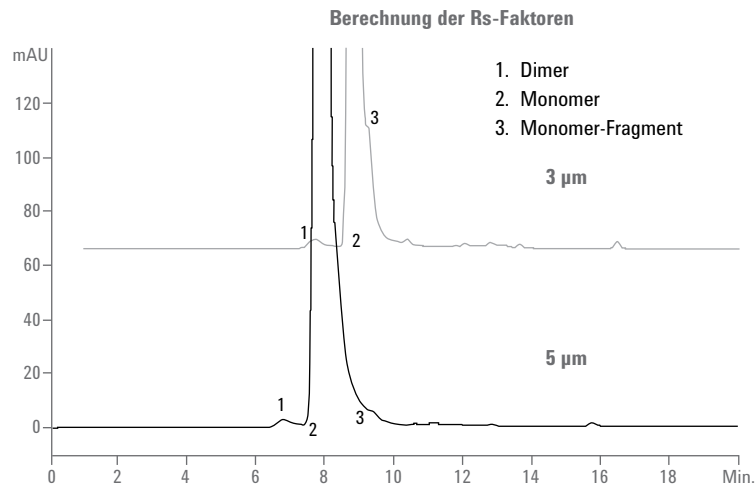


Abbildung 9: Vergleich zwischen einer Agilent Bio SEC-3- und einer Agilent Bio SEC-5-Säule. Die 3- μm -Säule ergibt eine bessere Trennung.

Säulendurchmesser

Im Zusammenhang mit der Probenmenge kann auch der Säulendurchmesser von Bedeutung sein. Wenn nur eine begrenzte Menge von Material zur Verfügung steht, ist eine Säule mit 4,6 mm ID (Flussrate 0,35 ml/min) sinnvoll. Bei Verwendung von Säulen mit kleinerem ID ist es jedoch wichtig, das Systemvolumen zu minimieren, um übermäßige Dispersion und Verlust an Auflösung zu vermeiden.

Die SEC wird bei Verwendung wässriger Eluenten als nicht-denaturierende Technik betrachtet. Daher ist sie äußerst nützlich für die Fraktionierung komplexer Proben oder die Isolierung einer Probenkomponente für die weitere Analyse. Säulen mit größerem Durchmesser, zum Beispiel 21,2 mm, wie sie auch im Rahmen der Produktlinien SEC-3 und SEC-5 von Agilent angeboten werden, ermöglichen die Durchführung präparativer Trennungen im Labor unter Verwendung analytischer HPLC-Systeme.



Agilent AdvanceBio SEC-Säulen mit 7,8 x 300 mm und 4,6 x 300 mm

Methodenparameter

Flussrate

Bei einigen Applikationen ist die Analysegeschwindigkeit entscheidend. Zu Verkürzung der Analysendauer kann entweder eine kürzere Säule – mit 150 statt der üblichen 300 mm Länge – verwendet, die Flussrate erhöht oder beide Maßnahmen kombiniert werden. Dies kann jedoch einen nachteiligen Einfluss auf die Auflösung haben, denn die SEC beruht auf der Diffusion in Poren, wodurch unterschiedliche Schichtdicken und Weglängen durch die Säule entstehen. Dennoch ist es möglich, mit einer 150-mm-Säule bei einer Flussrate von 2 ml/min eine ausreichende Auflösung für die Quantifizierung von IgG-Dimeren und -Monomeren in weniger als 4 Minuten zu erreichen (Abbildung 10).

Säule: AdvanceBio SEC 300Å,
7,8 x 150 mm, 2,7 µm
(Best.-Nr. PL1180-3301)

Mobile Phase: 150 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0

Flussrate: 0,5, 1,0, 1,5 ml/min (52, 102, 152 bar)

Detektor: UV, 220 nm

Injektion: 5 µl

Probe: IgG (2 mg/ml)

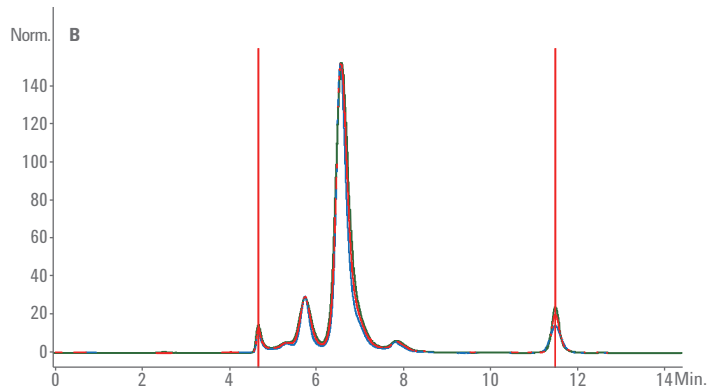
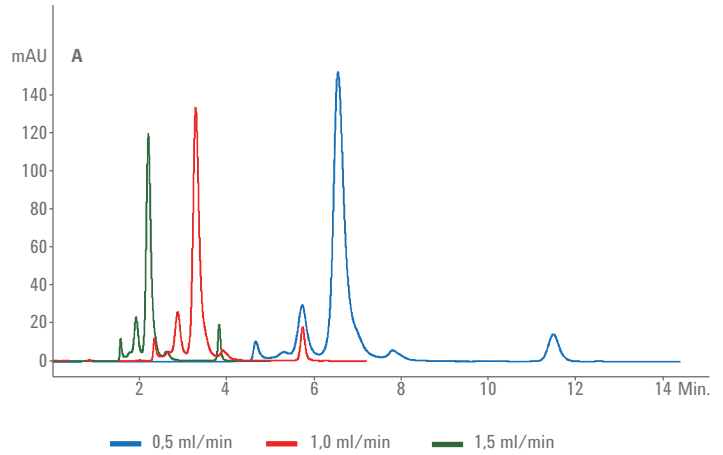


Abbildung 10: Die Erhöhung der Flussrate verkürzt die Analysendauer von 12 auf 4 Minuten (A). Nach Normalisierung der Retentionszeiten und Überlagerung (B) wird deutlich, dass die Retentionszeiten konsistent sind und die Auflösung nur geringfügig beeinträchtigt wird.

Fehlersuche bei SEC-Methoden

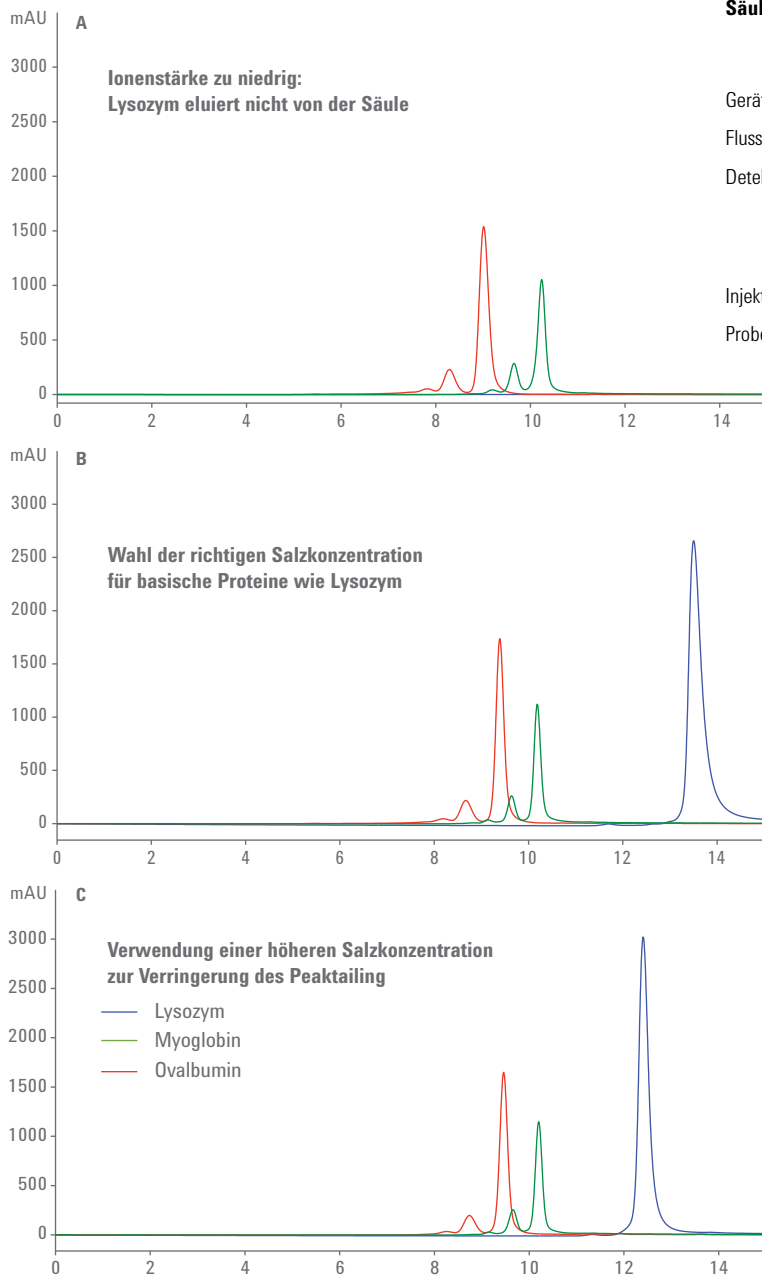
Problem	Quelle	Lösung
Geringere Wiederfindung als erwartet oder Peakverbreiterung	Hydrophobe Substanzen	Setzen Sie der mobilen Phase eine kleine Menge (10-20 %) an organischem Modifier (Acetonitril oder Methanol) zu
Peaks, die nicht an der dem Molekulargewicht entsprechenden Stelle erscheinen oder Peaktailing	Ionische Wechselwirkungen oder basische Proteine	Erhöhen Sie die Ionenstärke, d. h. die Salzkonzentration, in Schritten von 50-100 mM; fügen Sie Phosphatpuffer hinzu
Mangelhafte Peakform	Nicht-spezifische Adsorption	Erhöhen Sie die Salzkonzentration oder versuchen Sie es mit einem Agilent 1260 Infinity bioinerten Quaternären LC-System
Mangelhafte Retention bzw. Auflösung der Analyten	Zu geringe Porengröße für die Molekülgröße	Überprüfen Sie die Porengröße; weitere Informationen siehe Seite 11

Auswahl der mobilen Phase

Sekundäre Wechselwirkungen können Probleme verursachen

Zur Vermeidung unerwünschter sekundärer Wechselwirkungen kann es erforderlich sein, eine Methodenoptimierung durchzuführen. Solche Wechselwirkungen können dazu führen, dass ein Analyt später als erwartet eluiert, was den Eindruck eines niedrigeren Molekulargewichts erweckt. Leichte Änderungen an den Eigenschaften der mobilen Phase – zum Beispiel am pH-Wert,

an der Ionenstärke oder durch den Zusatz von organischen Modifiern – können dazu beitragen, solche Probleme zu beseitigen (Abbildung 11). Darüber hinaus kann es erforderlich sein, die Porengröße anzupassen, Säulen in Serie zu schalten, die Flussrate bei der Analyse zu verringern oder die Temperatur zu erniedrigen, um die gewünschte Trennung zu erhalten.



Säule: Agilent Bio SEC-3 300 Å
4,6 mm x 300 mm, 3 µm
(Best.-Nr. 5190-2513)

Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System

Flussrate: 0,35 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

A: Mobile Phase 20 mM Phosphatpuffer, pH 7 + 50 mM NaCl

B: Mobile Phase 20 mM Phosphatpuffer, pH 7 + 100 mM NaCl

C: Mobile Phase 20 mM Phosphatpuffer, pH 7 + 400 mM NaCl

Injektion: 5 µl

Probe: Protein (1 mg/ml in 20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7)

50 mM NaCl in 20 mM Puffer



400 mM NaCl in 20 mM Puffer

Abbildung 11: Effekt einer zu hohen oder zu niedrigen Ionenstärke auf die gewünschte Trennung.

Kalibrierung

Haben Sie die Säule ausgewählt, muss eine Kalibrierung mithilfe von Standards mit bekannten Molekulargewicht durchgeführt werden. Diese Kalibrierung muss jedes Mal, wenn die Säule gewechselt oder die mobile Phase modifiziert wird, wiederholt werden. Die Kalibrierungskurve wird durch Auftragen der Retentionszeit gegen das Molekulargewicht erstellt (Abbildung 12).

Es ist besonders wichtig, Standards auszuwählen, die für das interessierende Molekül geeignet sind. Verwenden Sie Protein-Molekulargewichtsstandards für eine Proteintrennung. Für eine Trennung von Polysacchariden sollten Pullulan-Molekulargewichtsstandards eingesetzt werden.

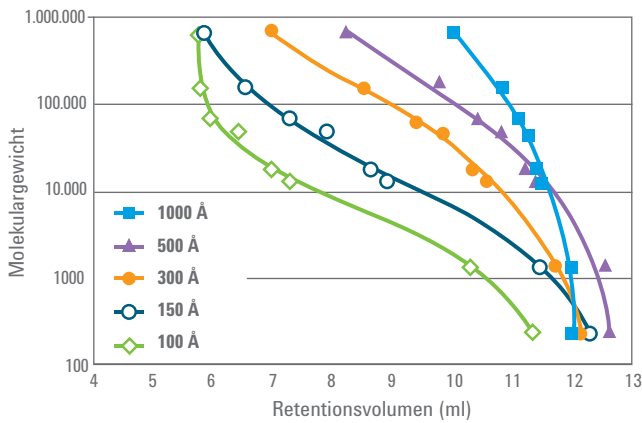
Säule: Agilent Bio SEC-5,
7,8 × 300 mm, 5 µm
(Best.-Nr. 5190-2521)

Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Flussrate: 1,0 ml/min

Detektor: UV



Proteine	MW	Retentionsvolumen				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
Thyreoglobulin	670.000	10,07	8,23	7,03	5,82	5,77
γ-Globulin	158.000	10,88	9,80	8,57	6,55	5,79
BSA	67.000	11,13	10,44	9,44	7,29	6,00
Ovalbumin	45.000	11,28	10,83	9,89	7,90	6,40
Myoglobin	17.000	11,44	11,28	10,42	8,66	7,05
Ribonuklease A	12.700	11,52	11,41	10,58	8,93	7,32
Vitamin B12	1.350	12,00	12,59	11,78	11,49	10,30
Uracil	112	12,08	12,68	12,21	12,13	11,41

Abbildung 12: Kalibrierungskurven, erhalten durch Auftragen der Retentionszeit gegen das Molekulargewicht.

Im Idealfall sollten die Standards in der mobilen Phase gelöst werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Probe sich vollständig löst. Erscheint die Lösung trüb, müssen weitere Maßnahmen ergriffen werden. Um unlösliches Material vor der Injektion zu entfernen, sollte die Probe zentrifugiert oder filtriert werden.

Unter Umständen ist es jedoch erforderlich, nach einer mobilen Phase mit alternativen Eigenschaften zu suchen, in der sich die Probe besser löst, da physikalische Prozesse wie Zentrifugation und Filtration die Molekulargewichtszusammensetzung ändern können.



Moderne Detektionsverfahren

Weitere Überlegungen zur SEC betreffen die Auswahl des Detektors. Für Proteintrennungen werden häufig UV- oder Diodenarray- (DAD)-Detektoren verwendet.

Das beste Ergebnis, d. h. die höchste Empfindlichkeit für Peptide und Proteine, wird normalerweise bei 220 nm erreicht. Manche Pufferlösungen oder organische Modifier zeigen bei niedrigen Wellenlängen jedoch eine zu hohe Hintergrundextinktion, sodass eine Wellenlänge von 254 nm oder 280 nm erforderlich sein kann. Ein Nachteil der UV-Detektion besteht darin, dass manche Moleküle kein entsprechendes Chromophor haben. Da jedoch die Analyten isokratisch eluiert werden, ist der Einsatz eines Brechungsindexdetektors möglich.

Durch die Nutzung moderner Lichtstreuendetektoren lässt sich die Leistung bei der SEC deutlich verbessern. Durch Messung der statischen Lichtstreuung lassen sich Molmassen unabhängig von der Säulenkalibrierung und von unerwünschten Wechselwirkungen exakt bestimmen. Zur Untersuchung der Molekülgröße kann sie durch die Messung der dynamischen Lichtstreuung ergänzt werden. Lichtstreuendetektoren sind für große Moleküle empfindlicher, sodass sich Aggregate mit viel geringeren Probenmengen nachweisen lassen (Abbildung 13). Dabei ist es wichtig, einen Detektor mit geringem Totvolumen zu verwenden, sodass diese zusätzlichen Informationen nicht durch eine geringere chromatographische Leistung erkauft werden müssen.

Säule: Agilent AdvanceBio 300 Å,
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes
Quaternäres LC-System mit
Agilent 1260 Infinity Multi-Detektor
GPC/SEC

Mobile Phase: 150 mM Natriumphosphat, pH 7,0

Flussrate: 0,8 ml/min

Temperatur: 30 °C

Detektor: UV, 280 nm + RI + LS 90°

Injektion: 5 µl

Probe: Abgebauter monoklonaler Antikörper

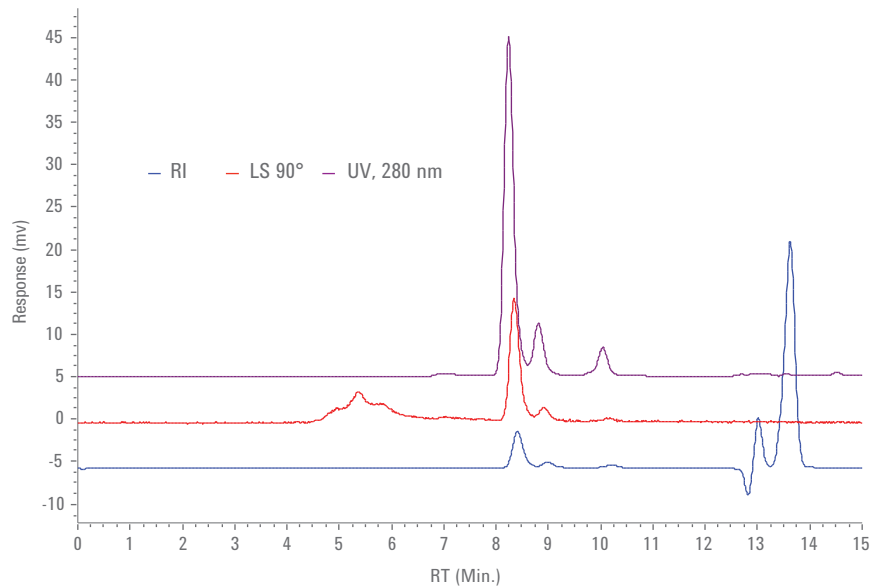


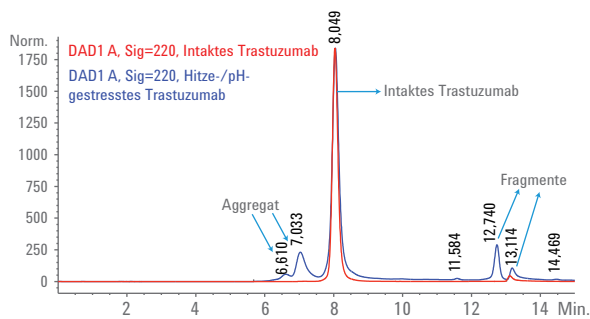
Abbildung 13: Ergebnisse für den Einsatz unterschiedlicher Detektoren bei der Proteintrennung

Konjugierte Proteine

Therapeutische Proteine unterliegen der Aggregation und Degradation während sämtlicher Phasen der Entwicklung, wie beispielsweise Expression, Neufaltung, nachgelagerte Prozessierung, Formulierung, Sterilisation und Lagerung. Zwar liegen Aggregate und Abbauprodukte nur in äußerst niedrigen Konzentrationen vor, sie können jedoch die Qualität von Biologika stark beeinflussen und unter anderem zu Aktivitätsverlust, verringerter Löslichkeit und erhöhter Immunogenität führen. Die Größenausschlusschromatographie ist die Standardmethode zur Untersuchung der Proteinaggregation. SEC-Untersuchungen sind darüber hinaus Voraussetzung für die Einreichung von Zulassungsanträgen bei den Regulierungsbehörden und deren Genehmigung.

Zur Verbesserung des Transports zum Wirkort, Verlängerung der Halbwertszeit und Erhöhung der Wirksamkeit können Proteine,

einschließlich monoklonaler Antikörper, konjugiert werden. Wasserlösliche Polymere wie Polyethylenglykol werden mit einem Protein konjugiert, um die pharmakologische Aktivität zu erhöhen, ihre Halbwertszeit im Blut zu verlängern und ihre Immunogenität zu verringern. Kürzlich stieg das Interesse an Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten, ADC, bei denen zytotoxische Wirkstoffe mit monoklonalen Antikörpern konjugiert werden, um einen gezielten Wirkstofftransport zu erreichen und damit die Wirksamkeit zu steigern. Nach der Konjugation sind erneute Aggregationsstudien erforderlich, und durch die veränderten Probeneigenschaften kann es schwieriger werden, eine SEC-Trennung zu erreichen. Für die Analyse sowohl des Antikörpers als auch des ADC unter Verwendung einer wässrigen mobilen Phase sind Säulen wie die Agilent AdvanceBio mit besonders geringer unspezifischer Bindung erforderlich. Siehe Abbildung 14.

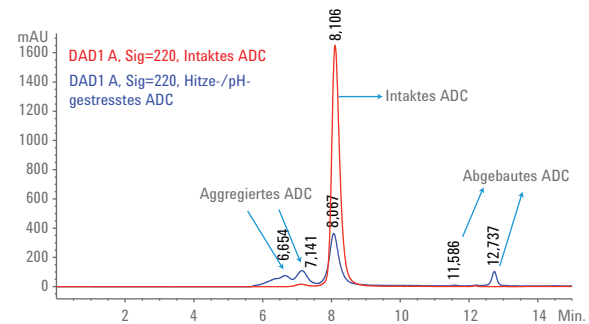


Säule: AdvanceBio SEC 300 Å
7,8 x 300 mm, 2,7 µm

Gerät: Agilent 1260 Infinity bioinertes Quaternäres LC-System

Mobile Phase: PBS, 50 mM Natriumphosphat mit 150 mM Natriumchlorid, pH 7,4

TCC-Temperatur Umgebungstemperatur



Injektionsvolumen: 10 µl

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektor: UV, 220 nm

Abbildung 14: Dieselbe wässrige mobile Phase wurde für den mAb und das stärker hydrophobe ADC verwendet.

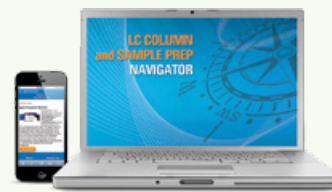
Ihr Weg zu erfolgreichen Resultaten

www.agilent.com/chem/navigator

Angesichts der Vielzahl erhältlicher Biosäulen und Säulen für niedermolekulare Verbindungen hat Agilent den NAVIGATOR für LC-Säulen und die Probenvorbereitung eingeführt. Dieser erleichtert Ihnen die Auswahl der richtigen Säule für Ihre Applikation.

Der NAVIGATOR bietet vier einfache Suchoptionen:

- Nach Bestellnummer, mit Verweisen auf LC-Säulen und Produkte für die Probenvorbereitung, damit Sie das bestmögliche Agilent Ersatzprodukt finden



- Nach Verbindung, mithilfe der Dropdown-Liste
- Nach USP-Methode
- Nach Säule, mit Empfehlungen basierend auf der Methode

Probenvorbereitung

- Im Idealfall sollten Proben in der mobilen Phase gelöst werden
- Ist eine Probe trüb, müssen die Eigenschaften der mobilen Phase geändert werden
- Zum Klären der Probe kann auch eine Filtration oder Zentrifugation durchgeführt werden, durch diese Schritte kann sich jedoch die Molekulargewichtszusammensetzung der Probe verändern
- Gelegentlich wird eine Probe zum Lösen leicht erwärmt, gevortext oder beschallt, dies sollte jedoch mit Vorsicht geschehen, da sich ansonsten die Molekulargewichtszusammensetzung der Probe verändern kann
- Es ist auch darauf zu achten, dass sich die Probe bei der Lagerung nicht verändert
- Proben sollten frisch hergestellt und so bald wie möglich analysiert werden
- In Pufferlösungen können Bakterien rasch wachsen
- Proben mit hoher Konzentration können sich mit der Zeit verändern, wobei es zur Aggregation oder sogar zur Präzipitation kommen kann



Säulenauswahl

- Um die Probenintegrität sicherzustellen, wird die SEC langsam und auf langen Säulen durchgeführt.
- Die Länge der Säule beträgt in der Regel 250 oder 300 mm
- Die übliche Flussrate beträgt 1,0 ml/min bei einer Säule mit 7,5 oder 7,8 mm ID und 0,35 ml/min bei einer Säule mit 4,6 mm ID
- Säulen werden häufig in Serie geschaltet, um bei Biopolymer-Applikationen die Auflösung zu verbessern
- Zur Verbesserung der Auflösung bei Proteinapplikationen werden kleinere Partikelgrößen verwendet
- Werden Trennungen auf 150-mm-Säulen mit kleinerer Partikelgröße durchgeführt, lässt sich die Analysendauer verkürzen

Auswahl des Säulenmediums

- Zwischen den Analyten und dem Säulenmedium sollten keine nicht-spezifischen Wechselwirkungen auftreten
- Für die Analyse von Peptiden und Proteinen werden Silica-basierte Sorbenzien verwendet
- Polymer-basierte Sorbenzien eignen sich für die Analyse von Biopolymeren



Säulenparameter

- **Porengröße** – Abhängig vom Molekulargewichtsbereich der Probe; muss so gewählt werden, dass der Ausschluss von Probenkomponenten vermieden und das Volumen im erforderlichen Trennbereich maximiert wird
- **Partikelgröße** – Kleinere Partikel ergeben eine bessere Auflösung (aber einen höheren Rückdruck)
- **Säulenlänge** – Kompromiss zwischen Auflösung und Analysendauer erforderlich
- **Säuleninnendurchmesser** – Kleinere Säulen für niedrigeren Lösemittelverbrauch und geringeres Injektionsvolumen

Mobile Phase

- Die mobile Phase sollte Puffer und Salz enthalten, um ionische Wechselwirkungen zu unterbinden, wobei zu viel davon auch hydrophobe Wechselwirkungen verursachen kann
- Um Abbau, Aggregation usw. zu vermeiden, darf der Analyt nicht verändert werden
- Stellen Sie die mobile Phase frisch her und verwenden Sie sie rasch, da sich in verdünnten Puffern, die bei Raumtemperatur gelagert werden, Bakterien rasch vermehren
- Werden Puffer nicht gekühlt, beträgt ihre Haltbarkeit weniger als 7 Tage
- Filtrieren Sie die mobile Phase vor der Verwendung, um Partikel im Wasser (weniger wahrscheinlich) oder in salzhaltigen Pufferlösungen (wahrscheinlicher) zu entfernen
- Phosphatpuffer mit hohem pH-Wert (insbesondere bei erhöhter Temperatur) können die Lebensdauer einer Silica-Säule beträchtlich verkürzen

Weitere Informationen zu Agilent Biosäulen für die SEC erhalten Sie unter www.agilent.com/chem/bioHPLC

Ihr Partner für hochwertige Resultate

Für Ihre wachsenden Herausforderungen benötigen Sie bessere Lösungen. Mit unseren Lösungen können biopharmazeutische Wissenschaftler die Erforschung von Krankheiten vorantreiben, die Wirkstoffforschung beschleunigen und eine größere Zuverlässigkeit in der Entwicklung und Herstellung erreichen.

Erfahren Sie mehr über Lösungen von Agilent für die Biopharma-Branche:

www.agilent.com/chem/togetherbiopharma

Weitere Informationen

www.agilent.com/chem/BioHPLC

Hier finden Sie ein Agilent

Kundeninformationszentrum in Ihrem Land

www.agilent.com/chem/contact

Deutschland

0800-603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien/Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

Ausschließlich zu Forschungszwecken.
Änderungen vorbehalten. Agilent Technologies
ist nicht haftbar für in diesem Dokument enthaltene
Fehler oder für unmittelbare oder mittelbare
Schäden in Verbindung mit der Bereitstellung,
der Leistungsfähigkeit oder dem Gebrauch
dieses Materials.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Gedruckt in den USA, 1. November 2015
5991-3651DEE



Agilent Technologies