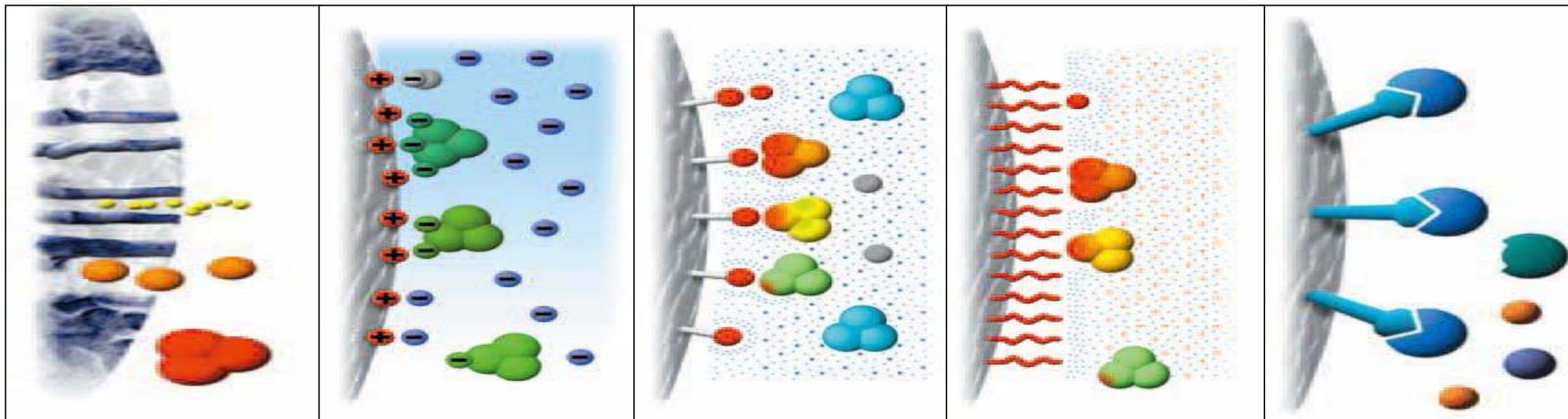


Применение аналитической хроматографии в молекулярном анализе

Suzhou Sepax Technology CO., LTD.





SEC

IEX

HIC

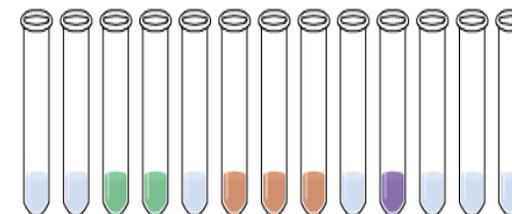
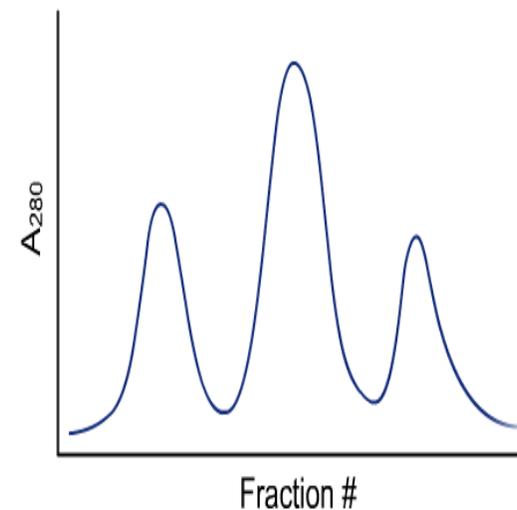
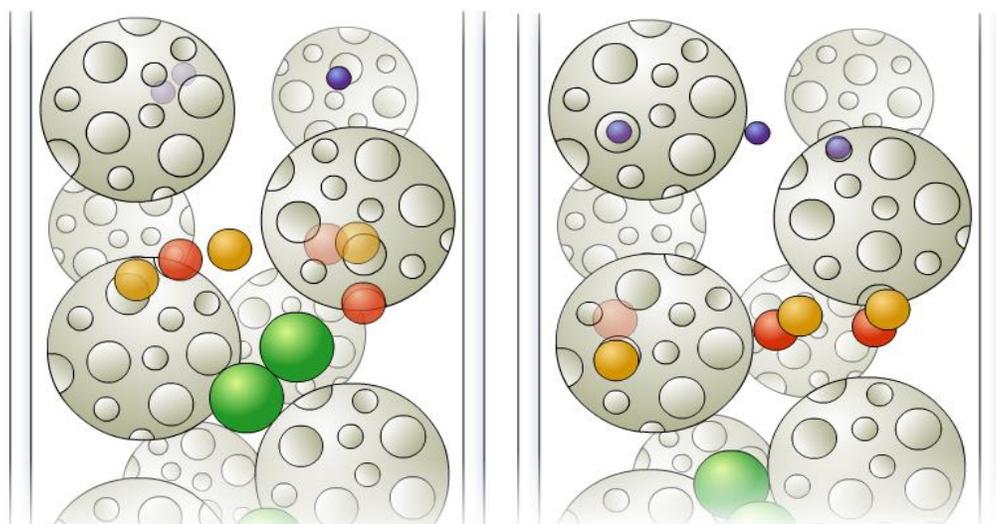
Reverse Phase

Affinity



Механизм разделения SEC

Разделение основано на соотношении между молекулярной массой отделяемого компонента и размером пор матрицы неподвижной фазы. Подвижная фаза не влияет на разделение молекул на сорбенте. Неспецифическую адсорбцию целевого белка можно эффективно уменьшить, добавив в буфер хлорид натрия.





Характеристики разделения SEC



- Возможность проведения быстрого анализа повышает эффективность обнаружения
- Селективное извлечение биомакромолекул
- Подвижная фаза проста и экологически безопасна. Позволяет работать с водорастворимыми солевыми растворами
- Вводимый объем образца на колонку должен составлять $< 10\%$ от объема слоя колонки, предпочтительно в пределах 5%
- Следует избегать присутствия твердых веществ в образцах, вводимых на колонку
- Для гель-фильтрации вязкость образцов должна быть максимально снижена
- При гель-фильтрации разделяемые вещества должны иметь соотношение молекулярных масс > 2



Выбор колонки Sepax SEC

Более гидрофобный
Способствует гидрофобному взаимодействию

Более гидрофильный
Минимизирует вторичное взаимодействие

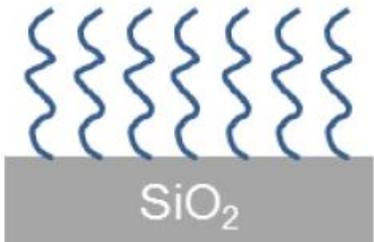


BioMix 04



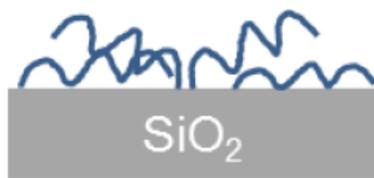
Разные формы BsAbs
(Биспецифические
моноклональные антитела)

**Unix
Zenix
SRT
SRT-10** 02



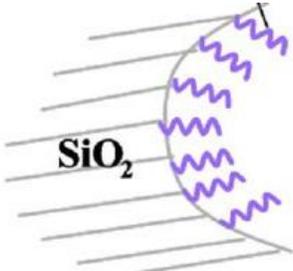
Обычный монослой
Моноклональные
антитела (mAbs)
и белки

**Unix-C
Zenix-C
SRT-C
SRT-10C** 03



Прижатый к матрице слой
Высоко гидрофобный /
липкий образец

Nanofilm 01



Nanofilm SEC Phase

Некоторые
мембранные белки с
детергентом

Разделение веществ с близкой MW, но с различной гидрофобностью

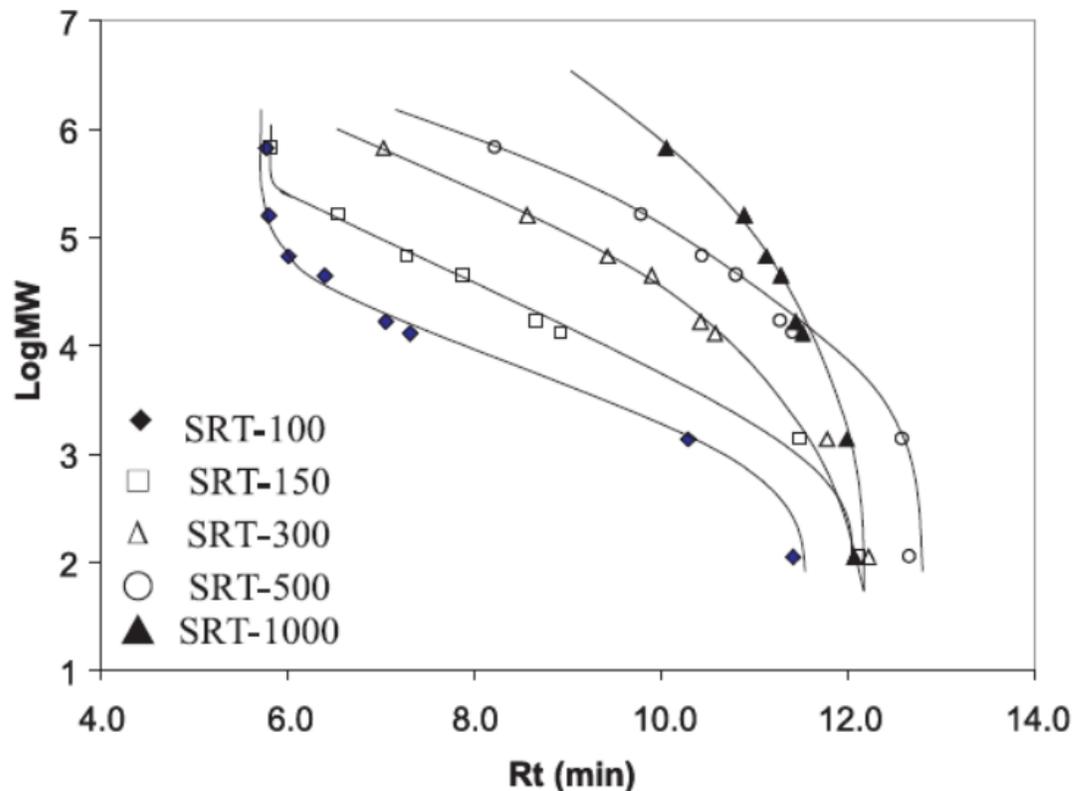
Разделение основано на разнице в размерах и MW; Агрегаты, белковая смесь....



Стандартная кривая SRT SEC



Выбирайте хроматографическую колонку с подходящим линейным диапазоном молекулярных масс. MW образца который Вам необходимо выделить должен находится в пределах линейного диапазона колонки.



Колонки: SRT, 4,6x300 мм, 5 мкм
Подвижная фаза: 0,15 М фосфатный буфер, рН 7,0.
Скорость потока: 0,35 мл/мин.
Детектор: УФ 214 нм
Объем инъекции: 3 мкл
Образец:

1. Тиреоглобулин, 670 кДа.
2. γ -глобулин, 158 кДа.
3. БСА, 66 кД.
4. Овальбумин, 44 кД.
5. Миоглобин, 17,6 кДа.
6. Рибонуклеаза А, 13,7 кД.
7. В12, 1,35 кД.



Серах SEC (водорастворимые образцы)



Тип	Размер частиц (мкм)	Размер пор (Å)	Диапазон разделения белков	Водорастворимые полимеры Диапазон разделения
SRT SEC-100	5	100	100-100 000	500-10 000
SRT SEC-150	5	150	500-150 000	500-25 000
SRT SEC-300	5	300	5 000-1 250 000	1 000-100 000
SRT SEC-500	5	500	15 000-5 000 000	2 500-500 000
SRT SEC-1000	5	1000	50 000-7 500 000	5 000-1 500 000
SRT SEC-2000	5	2000	>10 000 000	50 000-} 2 500 000
Zenix SEC-80	3	80	< 10 000	500-5 000
Zenix SEC-100	3	100	100-100 000	500-10 000
Zenix SEC-150	3	150	500-15 000	500-25 000
Zenix SEC-300	3	300	5 000-1 250 000	1000-100 000



Стандартное разделение белков на Zenix

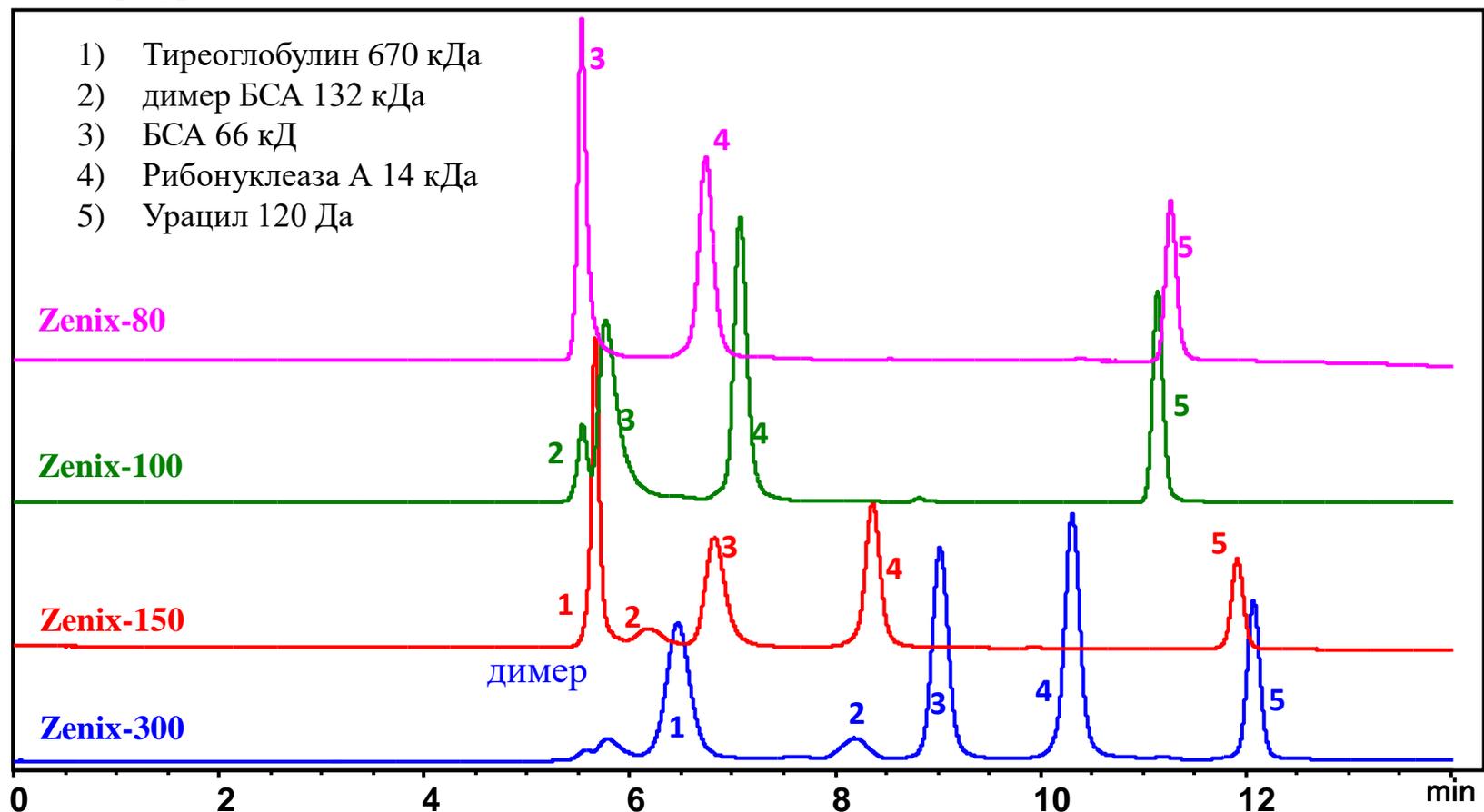


Колонка: Zenix-SEC (3 мкм, 80, 100, 150, 300 Å, 7,8 x 300 мм каждая)

Подвижная фаза: 150 мМ фосфатный буфер, рН 7,0.

Скорость потока: 1,0 мл/мин, Детектор: УФ 214 нм

Температура колонки: 25 °С, Объем инъекции: 5 мкл





Стандартное разделение белков на SRT SEC



赛分科技

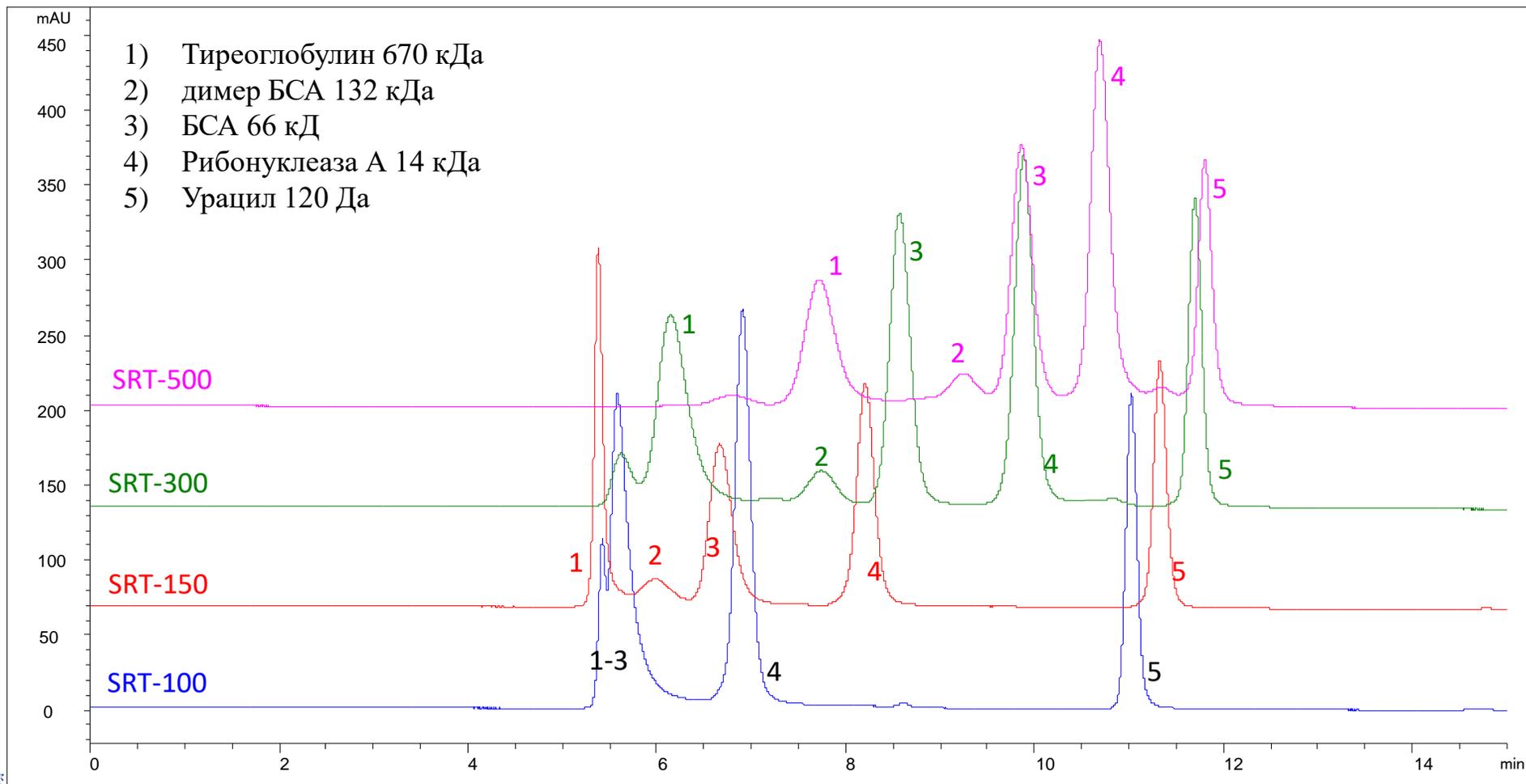
Колонка: SRT-SEC (5 мкм, 100, 150, 300, 500 Å, 7,8 x 300 мм каждая)

Подвижная фаза: 150 мМ фосфатный буфер, рН 7,0.

Скорость потока: 1,0 мл/мин; Детектор: УФ 214 нм;

Температура колонки: 25 °С

Объем инъекции: 5 мкл





Стандартное разделение белков на SRT-C



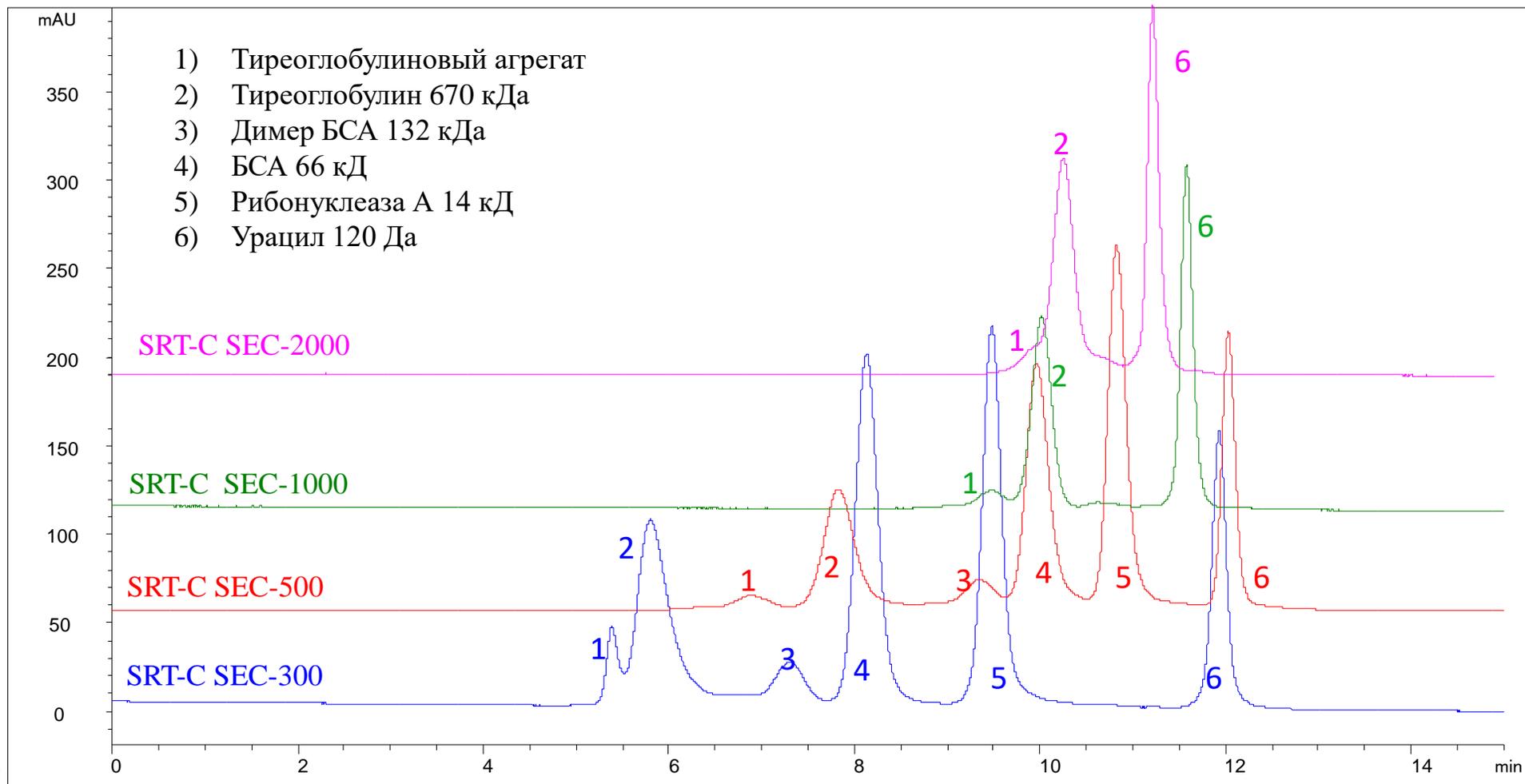
Колонка: SRT-C-SEC (5 мкм, 300, 500, 1000, 2000 Å, 7,8 x 300 мм каждая)

Подвижная фаза: 150 мМ фосфатный буфер, рН 7,0.

Скорость потока: 1,0 мл/мин; Детектор: УФ 214 нм;

Температура колонки: 25 °С

Объем инъекции: 5 мкл

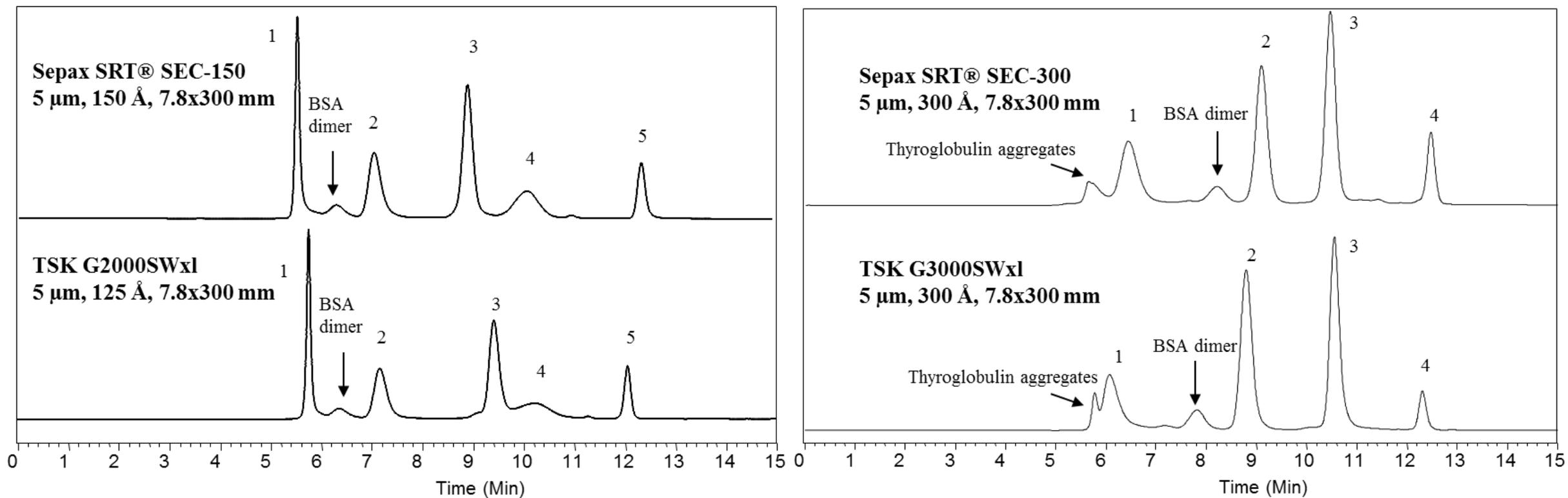




Сравнение колонок SEC

Сравнение хроматограмм Sepax SRT и Tosoh TSK SWxl на смеси белков

1) Тиреоглобулин, 2) Мономер БСА, 3) Рибонуклеаза А, 4) Поли-DL-аланин, 5) Урацил





1. Белки

SRT/-C, Zenix/-C, Unix/-C, Nanofilm

2. Вирусный вектор

SRT 500, 1000, 2000

3. Антитела

SRT/Zenix/Unix 300

4. Нуклеиновые кислоты

SRT/-C, Zenix/-C

5. Гепарин/
Полипептид

SRT/Zenix 100, 150, 300

6. Цефалоспорины

Mono GPC 50~100 (Liposoluble)

7. Полимеры

SRT/Zenix (water)
Mono GPC (Liposoluble)

8. Липиды

Mono GPC 50, 100, 150, 300

Выбор основан на двух факторах:

1. Растворимость
2. Молекулярный вес



Разработка метода SEC



Рекомендуемая подвижная фаза: система с добавлением фосфата, ацетата, ацетонитрила.

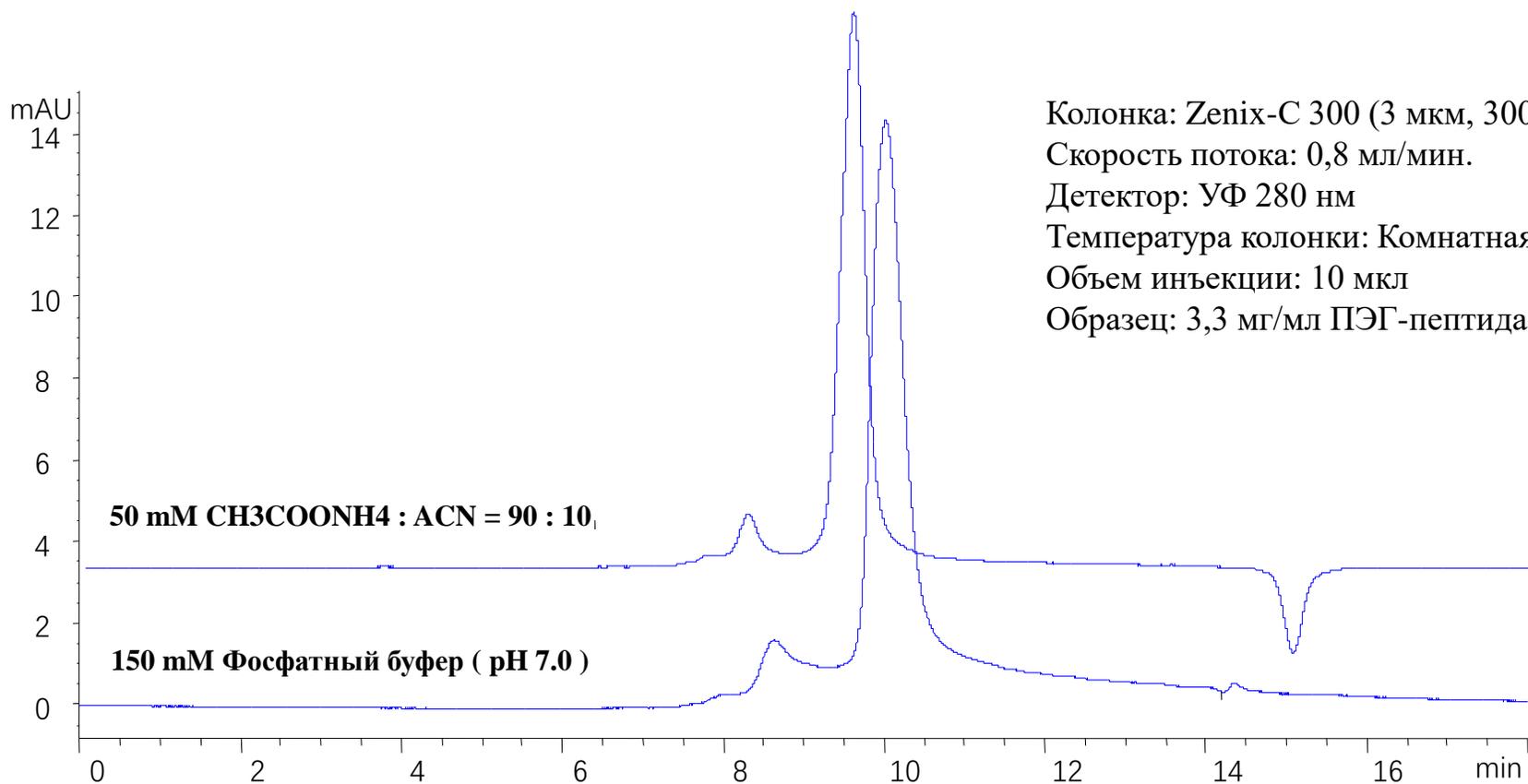
Длины волн УФ-детектирования: 214 нм, 280 нм, 260 нм.

Рекомендуемые условия испытаний для легко адсорбируемых образцов:

- Подвижная фаза с высоким содержанием соли: NaCl, Na₂SO₄, NaClO₄.
- Добавление модификаторов: ацетонитрила, изопропанола, гидрохлорид гуанидина.
- Выберите колонки Zenix-C: чтобы минимизировать адсорбцию между белком и сорбентом.



SEC-анализ



Колонка: Zenix-C 300 (3 мкм, 300 Å, 7,8 x 300 мм)

Скорость потока: 0,8 мл/мин.

Детектор: УФ 280 нм

Температура колонки: Комнатная температура

Объем инъекции: 10 мкл

Образец: 3,3 мг/мл ПЭГ-пептида в воде.

* Добавление соответствующей пропорции органических растворителей в подвижную фазу может уменьшить вторичное взаимодействие между ПЭГ-модифицированными белками и сорбентом, что улучшит форму пика.



Влияние подвижной фазы на разделение слитых белков

Колонка: Zenix-C SEC-300 (3 мкм, 300 Å, 7,8 x 300 мм)

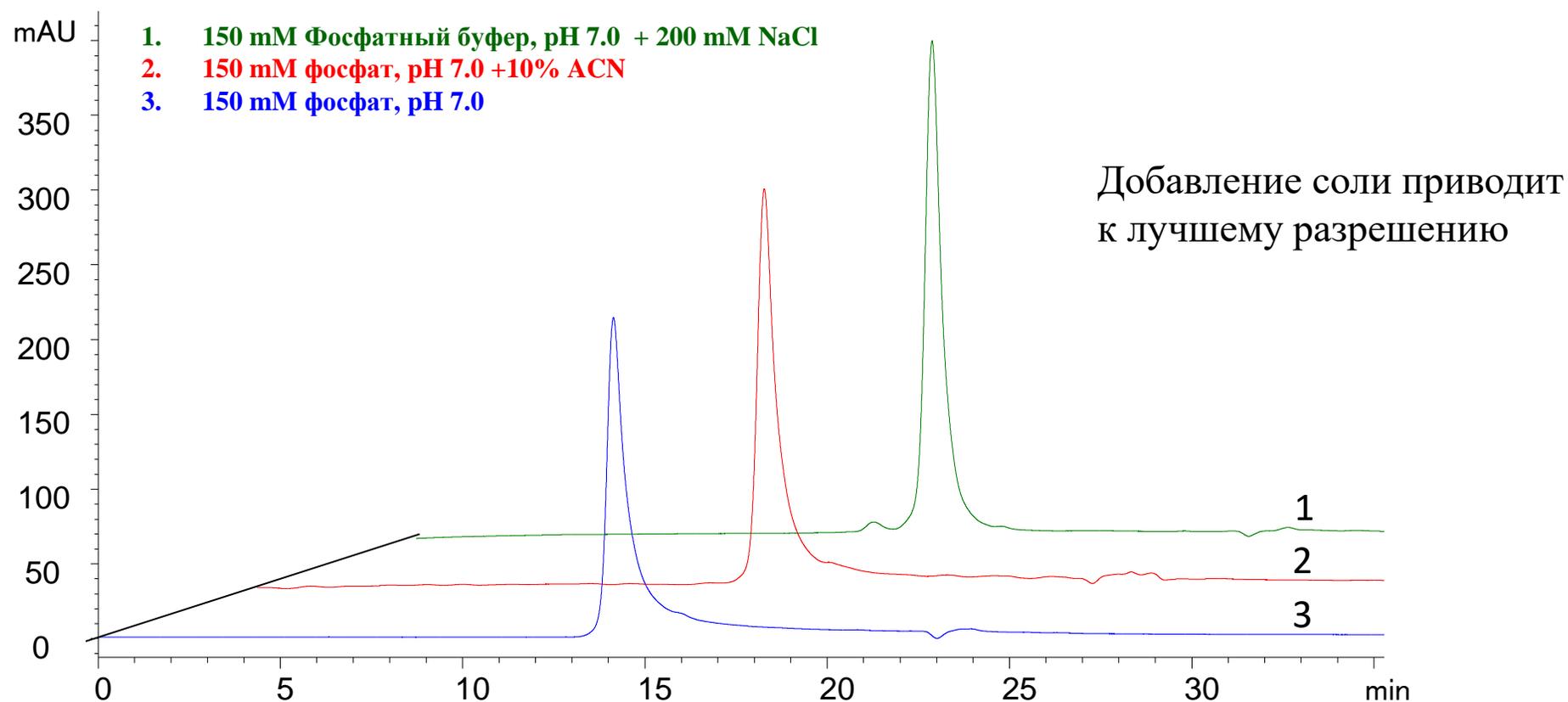
Подвижная фаза: как показание

Скорость потока: 0,5 мл/мин; Детектор: УФ 214 нм;

Температура колонки: 25 °С;

Объем инъекции: 10 мкл;

Образцы: слитый белок 1 мг/мл, молекулярная масса 170 кДа, pI 6,8-7,0.





Разделение слитых белков

Колонка: Zenix SEC-300, Zenix-C SEC-300 (3 мкм, 300 Å, 7,8 x 300 мм)

Подвижная фаза: 150 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) + 200 мМ NaCl;

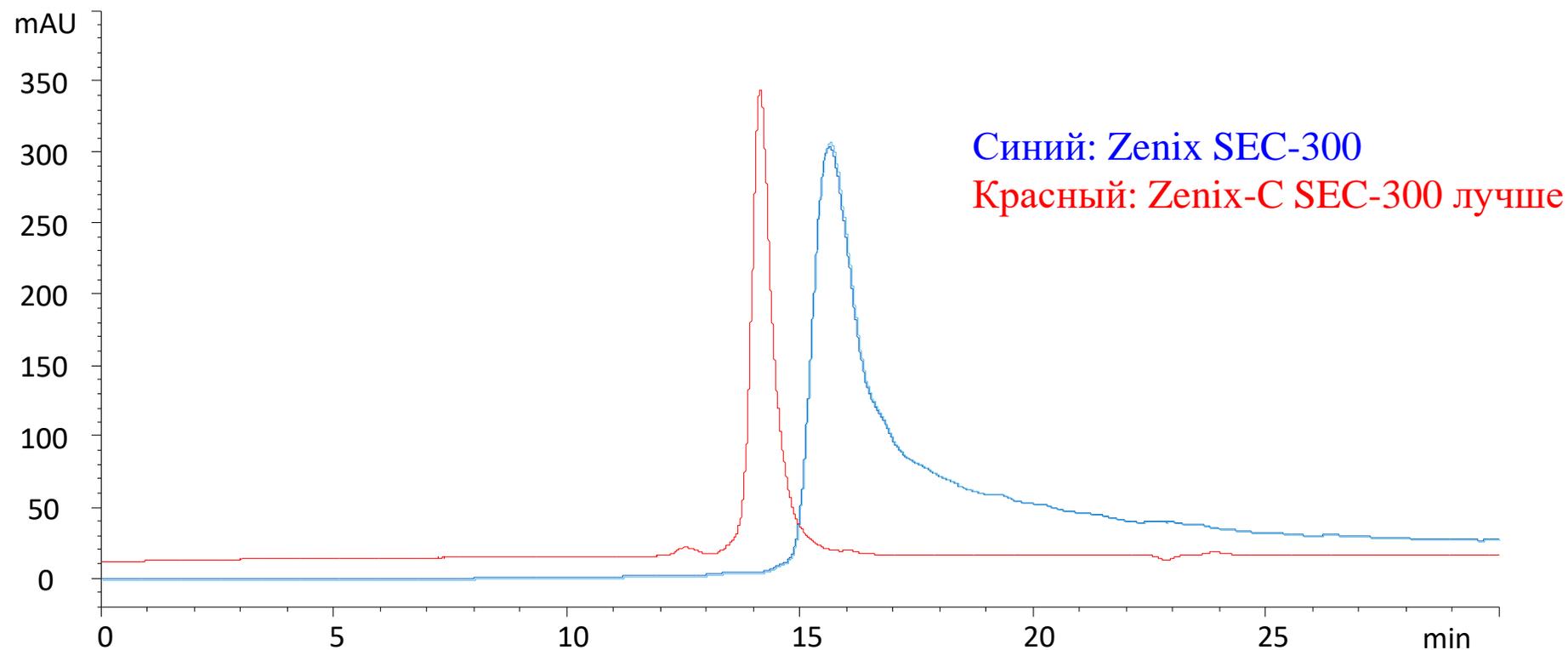
Скорость потока: 0,5 мл/мин;

Детектор: УФ 214 нм;

Температура колонки: 25 °С;

Объем инъекции: 10 мкл;

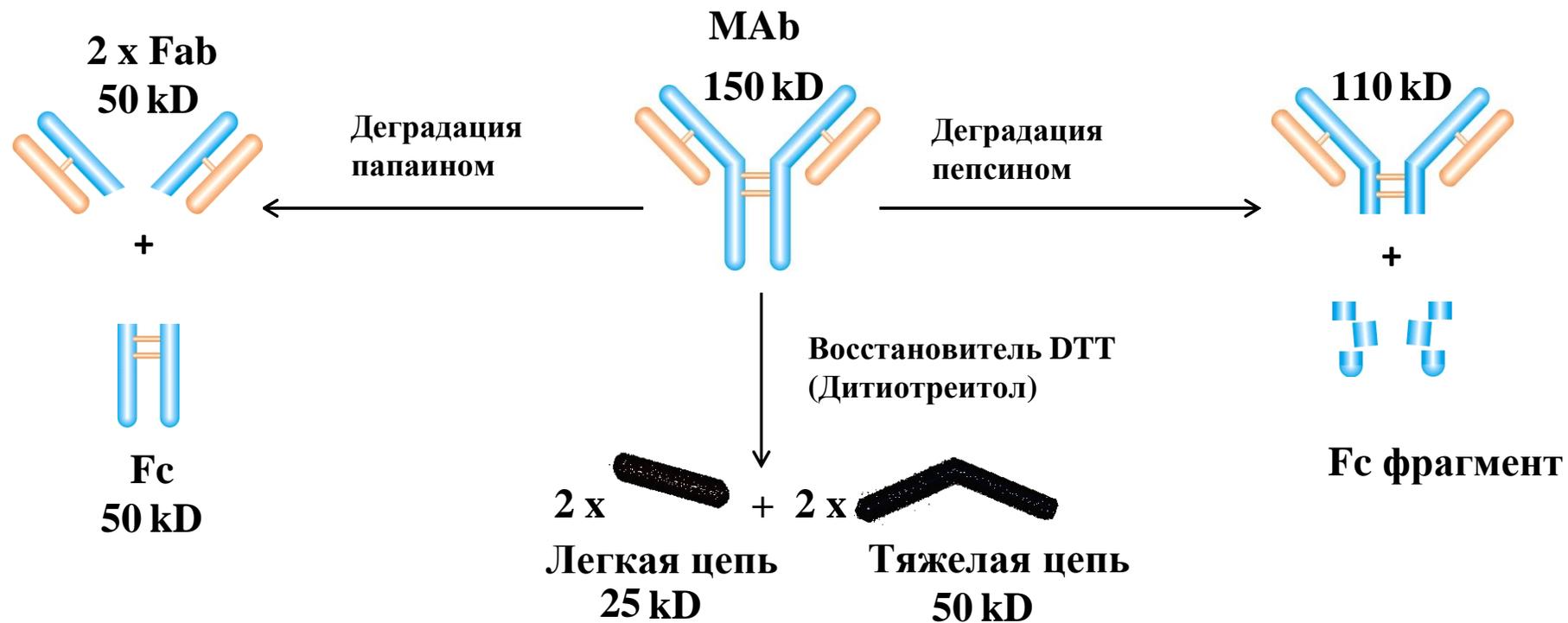
Образцы: слитый белок 1 мг/мл, молекулярная масса 170 кДа, pI 6,8-7,0.





Анализ фрагментов антител

Zenix-300 (3 мм, 300 Å) — SEC-MS



Продукты деградации МАb



Анализ герцептина и фрагментов на Zenix-C

0.1% TFA, 0.1% муравьиной кислоты и 20% ACN

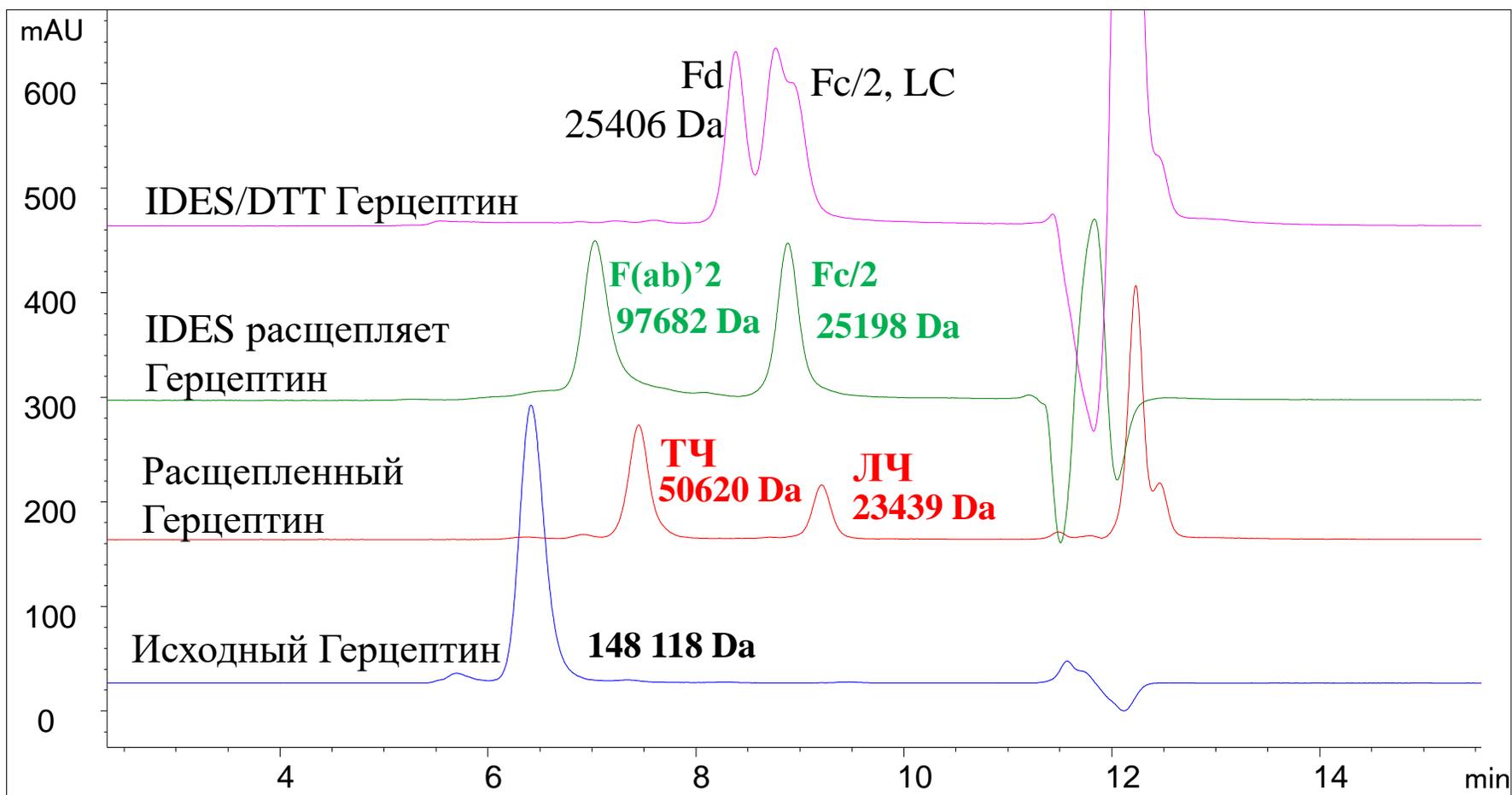
Колонка: Zenix-C SEC-300 (3 мкм, 300 Å, 4,6 x 300 мм)

Подвижная фаза: 0.1% TFA, 0.1% муравьиной кислоты и 20% ACN.

Скорость потока: 0,35 мл/мин.

Детектор: УФ, 280 нм.

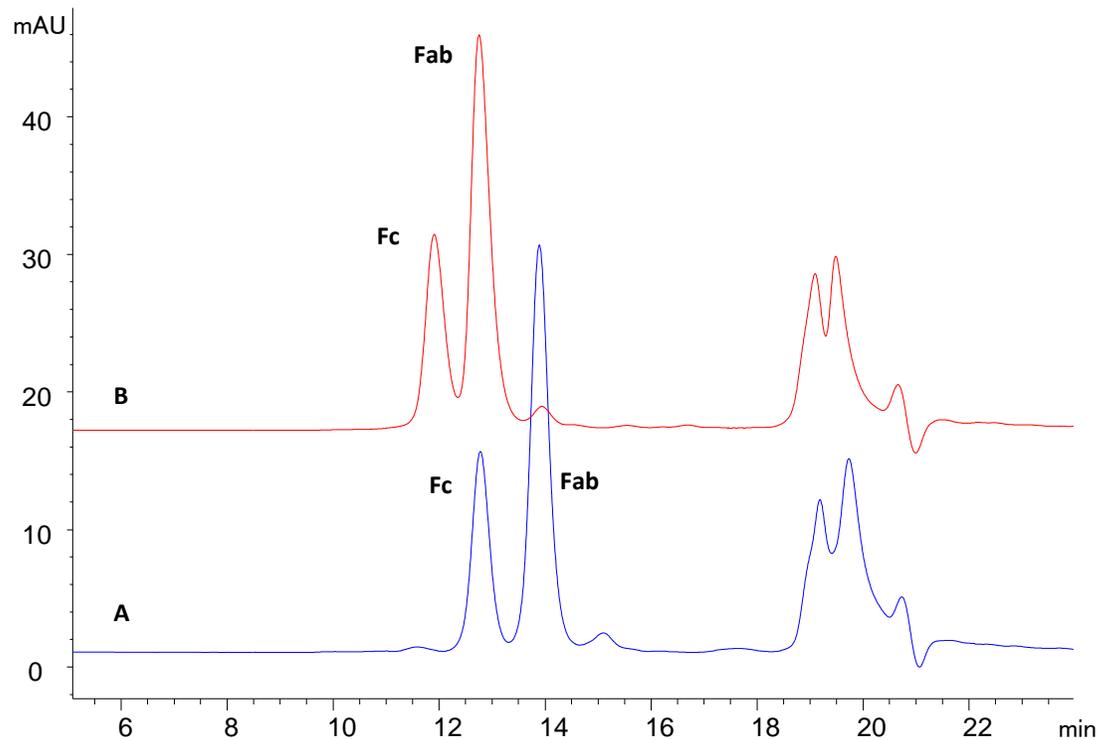
Температура колонки: 25 °С. Объем инъекции: 2 мкг на каждый образец





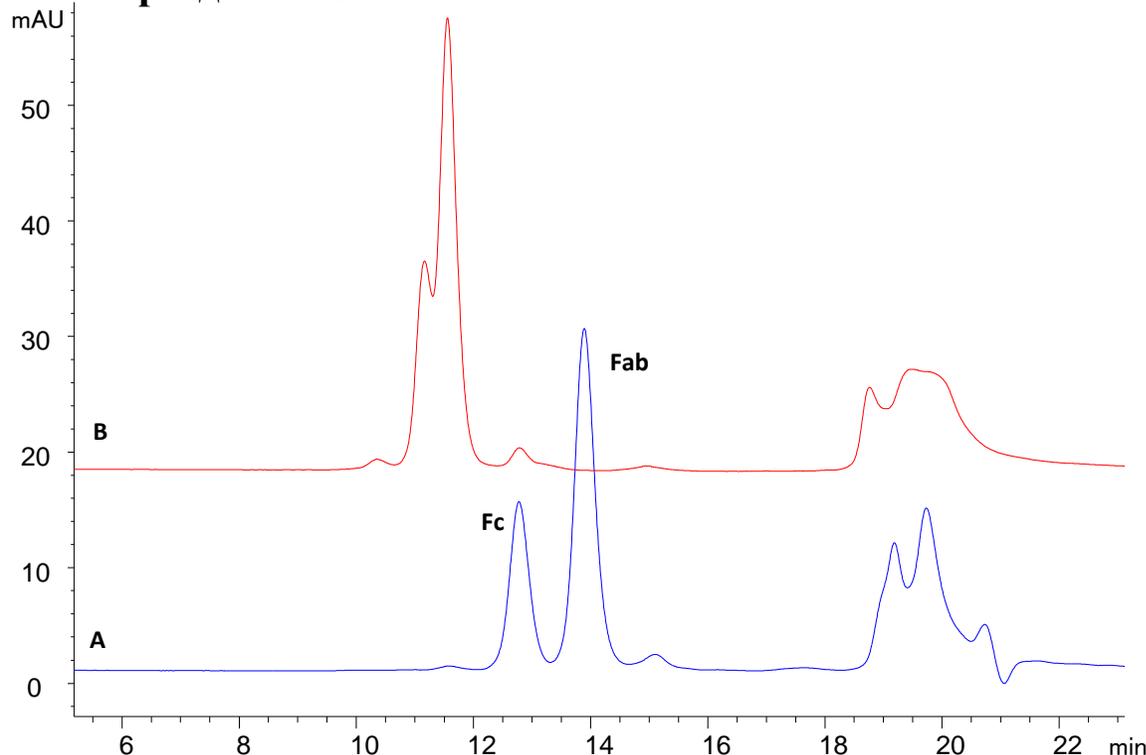
Фрагмент mAb — Fab/Fc

Влияние добавления TFA на разделение в условиях подвижной фазы



- A. 0.02% TFA, 1% муравьиная кислота, 20% ACN**
- B. 1% муравьиная кислота, 20% ACN**

Влияние концентрации ацетонитрила на разделение Fab/Fc



- A. 0.02% TFA, 1% муравьиная кислота, 20% ACN**
- B. 0.02% TFA, 1% муравьиная кислота, 50% ACN**



Анализ конъюгата антитело-лекарственное средство на Zenix-C



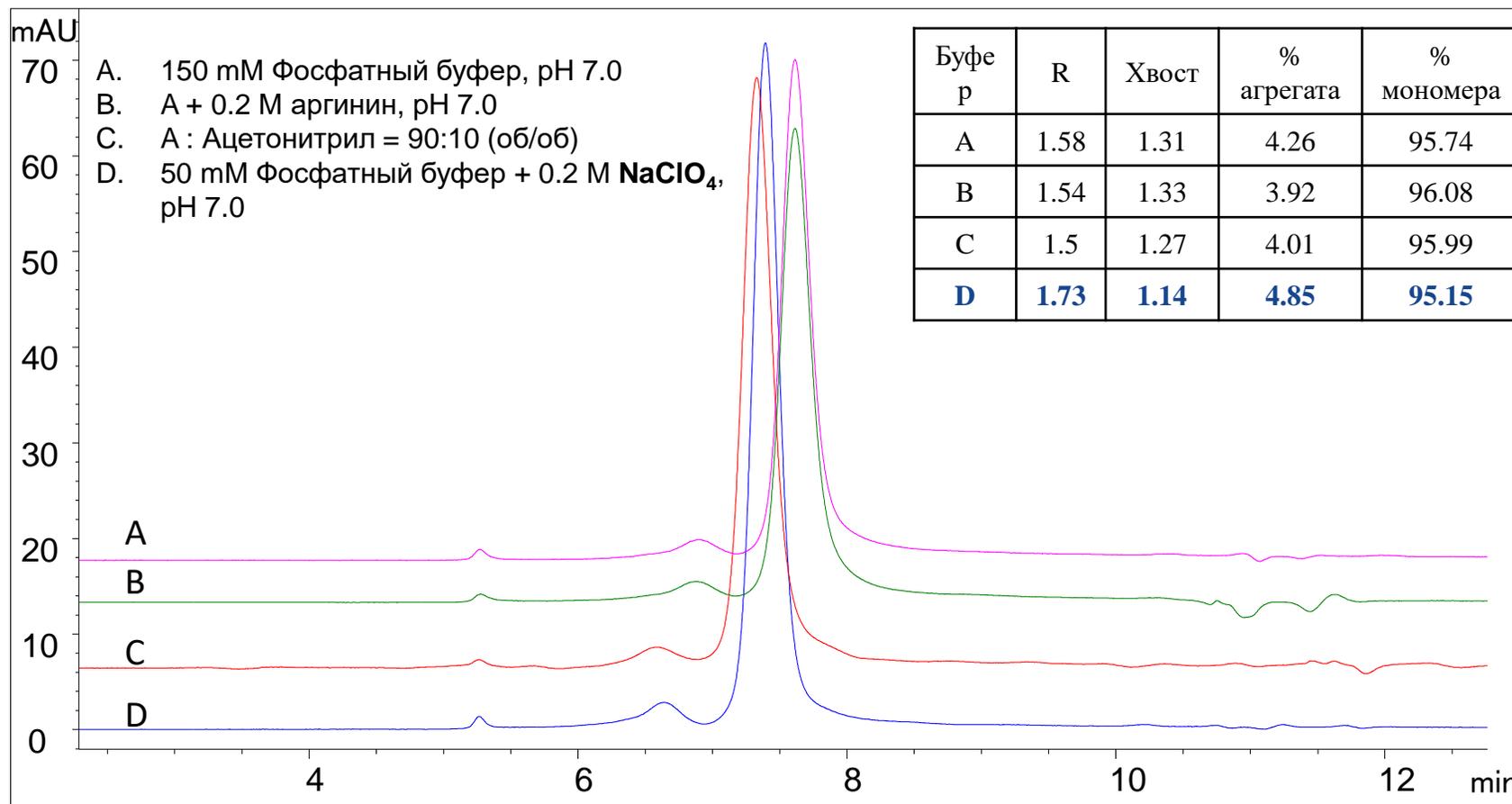
赛分科技

Колонка: Zenix-C SEC-300 (3 мкм, 300 Å, 7,8 x 300 мм)

Подвижная фаза: Как указано ниже

Скорость потока: 1 мл/мин; Детектор: УФ 280 нм; Температура колонки: 25 °С

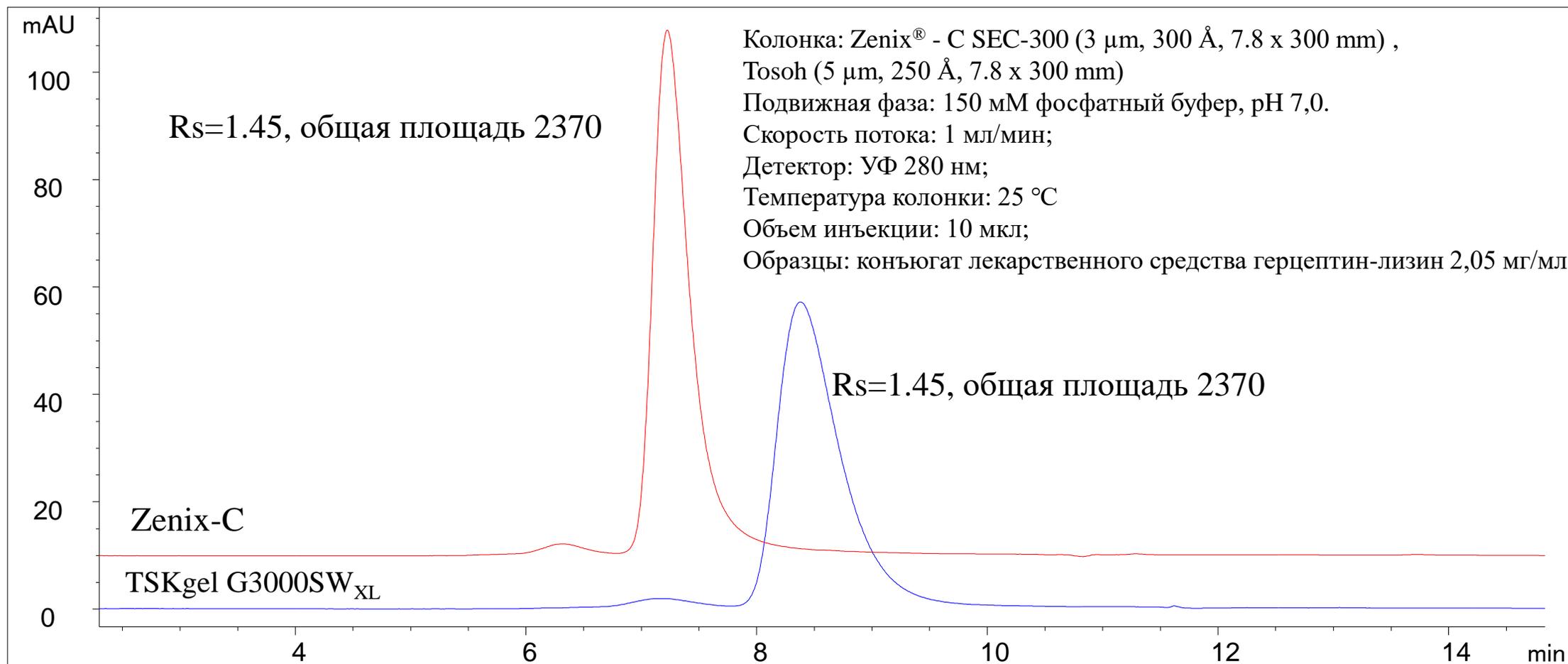
Объем инъекции: 20 мкл; Образцы: 1,68 мг/мл ADC.



При использовании 10% ацетонитрила и 200 мМ NaClO₄ улучшаются общее извлечение белка, разрешение и коэффициент хвоста пика мономера.



Zenix-C SEC-300 vs TSKgel G3000SWXL



TSKgel и Tosoh Bioscience являются зарегистрированными торговыми марками Tosoh Corporation.
Данный сравнительный анализ не может быть репрезентативным для всех приложений.



биспецифических антител (BsAb)

analytical
chemistry

Subscriber access provided by Uppsala universitetsbibliotek

Article

Characterization of bispecific antibody production in cell cultures by unique mixed mode size exclusion chromatography

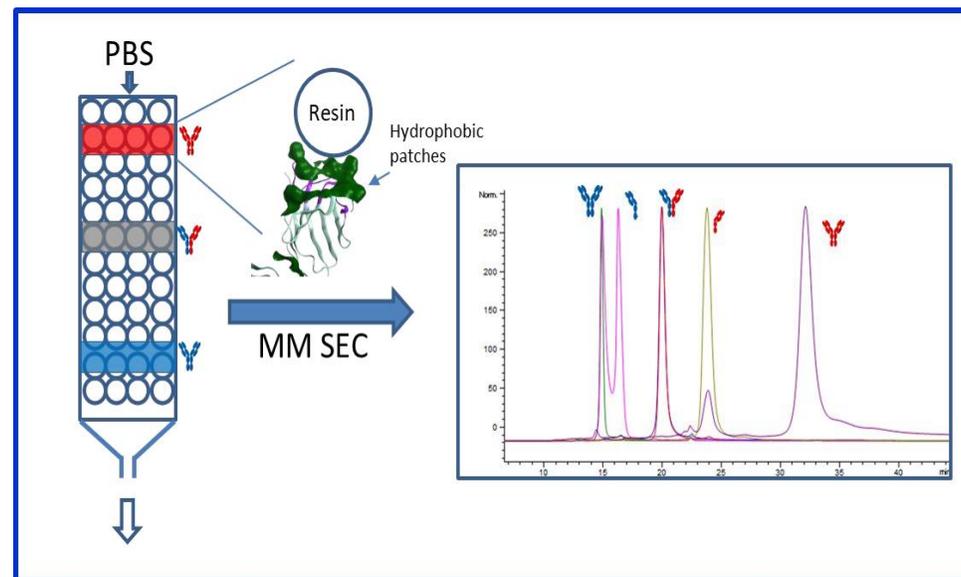
Haitao Jiang, Wei Xu, Ren Liu, Balrına Gupta, Bruce Kilgore, Zhimei Du, and Xiaoyu Yang

Anal. Chem., Just Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01641 • Publication Date (Web): 04 Jun 2020

Downloaded from pubs.acs.org on June 5, 2020

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.



Эксклюзионная хроматография смешанного режима в сочетании с многоугловым светорассеянием (MM SEC-MALS).

MM SEC-хроматографию в нативных условиях проводили на Sepax BioMix™ SEC-300, 3 мкм, 7,8x300 мм (номер по каталогу: 214300-7830) при 25 °C.



Анализ BsAb--BioMix

Колонка: BioMix SEC-300(3 μ m,300 Å 7.8×300mm, SN:0A30907)

Колонка: Zenix-C SEC-300(3 μ m,300 Å 7.8×300mm, SN:2F38830)

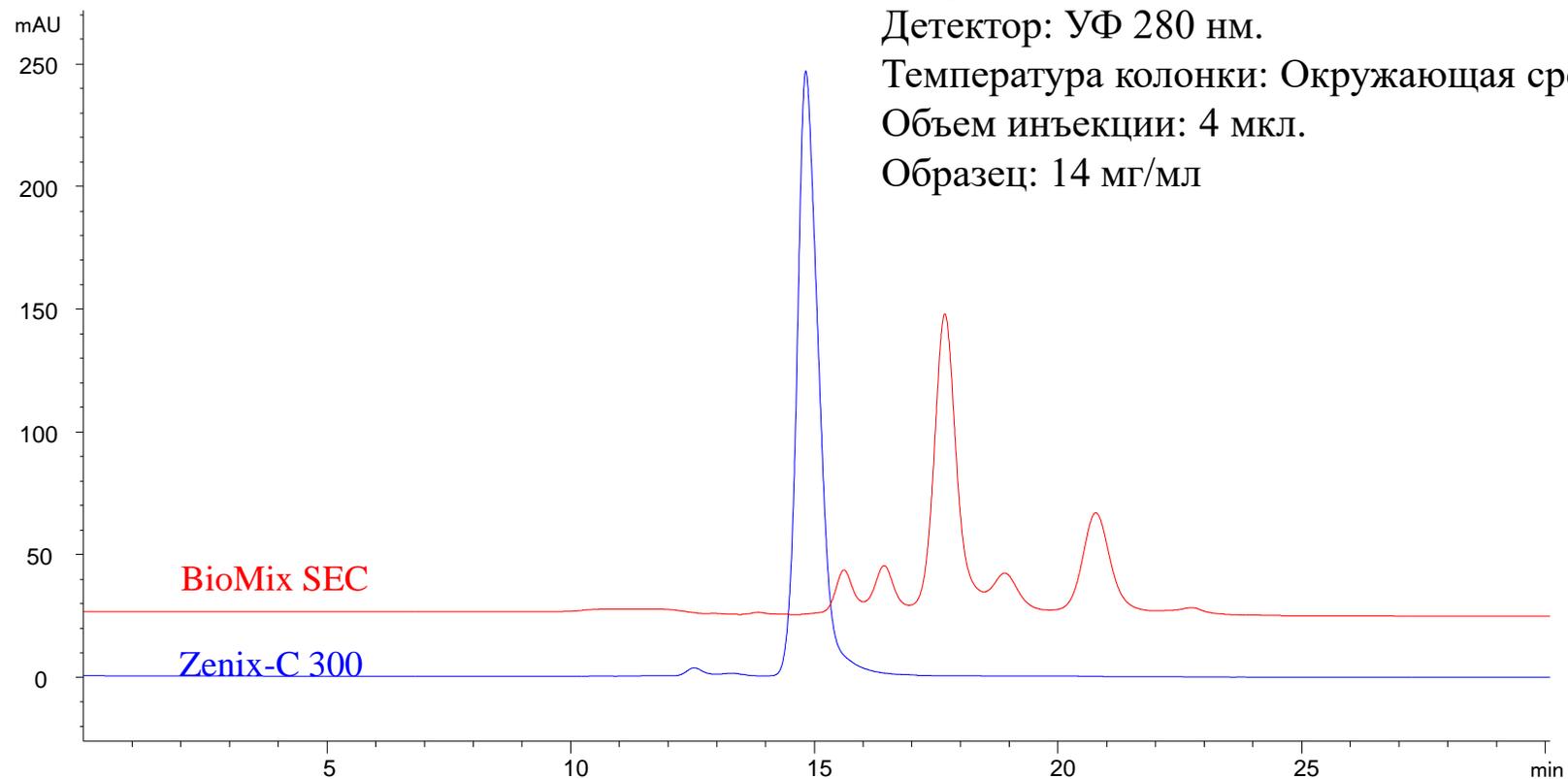
Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Детектор: УФ 280 нм.

Температура колонки: Окружающая среда.

Объем инъекции: 4 мкл.

Образец: 14 мг/мл

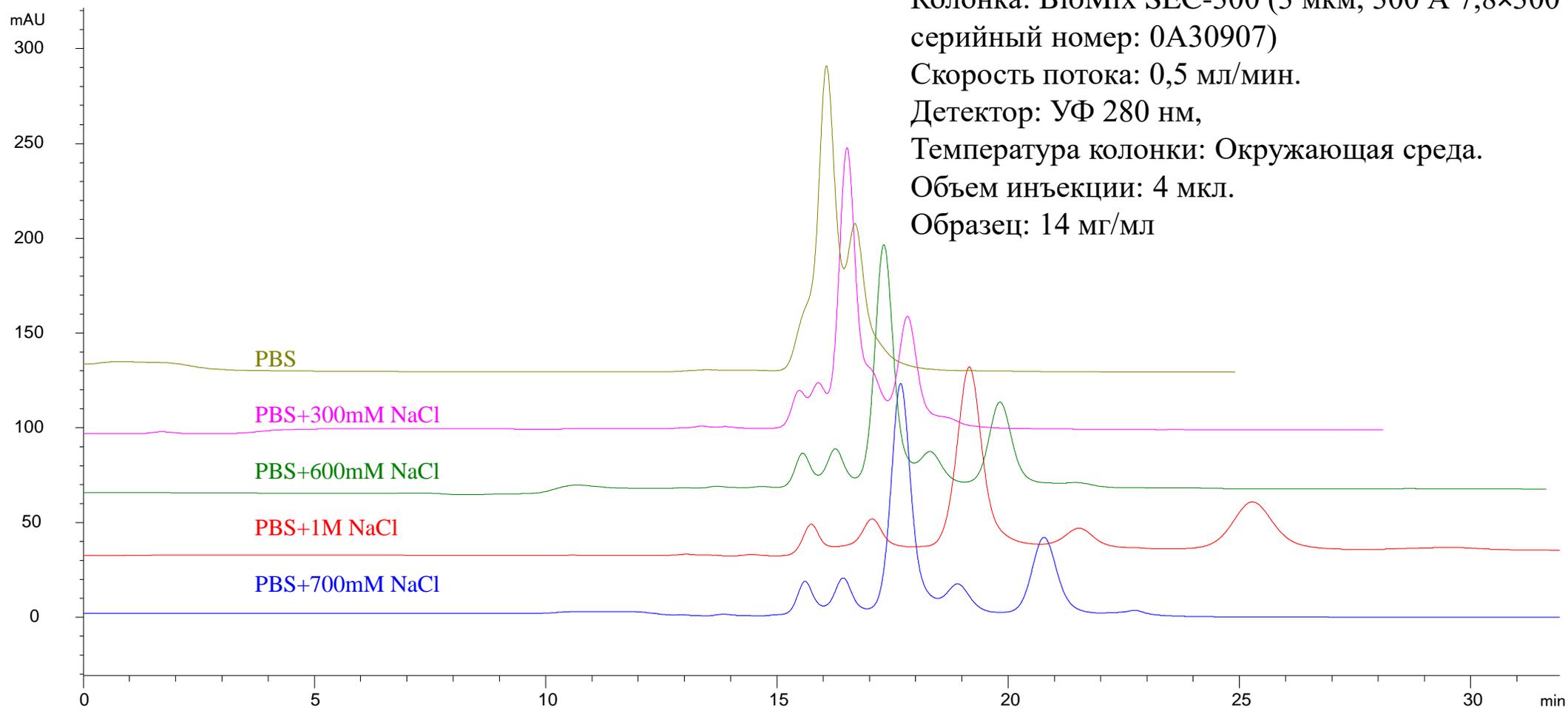




Влияние различной концентрации соли при анализе BsAb



Колонка: BioMix SEC-300 (3 мкм, 300 Å 7,8×300 мм,
серийный номер: 0A30907)
Скорость потока: 0,5 мл/мин.
Детектор: УФ 280 нм,
Температура колонки: Окружающая среда.
Объем инъекции: 4 мкл.
Образец: 14 мг/мл





Разделение олигонуклеотидов

Разный размер пор Zenix SEC-150 vs Zenix SEC-300

Колонка: Zenix™ SEC-300, Zenix™ SEC-150, 7,8 x 300 мм.

Подвижная фаза: 150 мМ фосфатный буфер, pH 7;

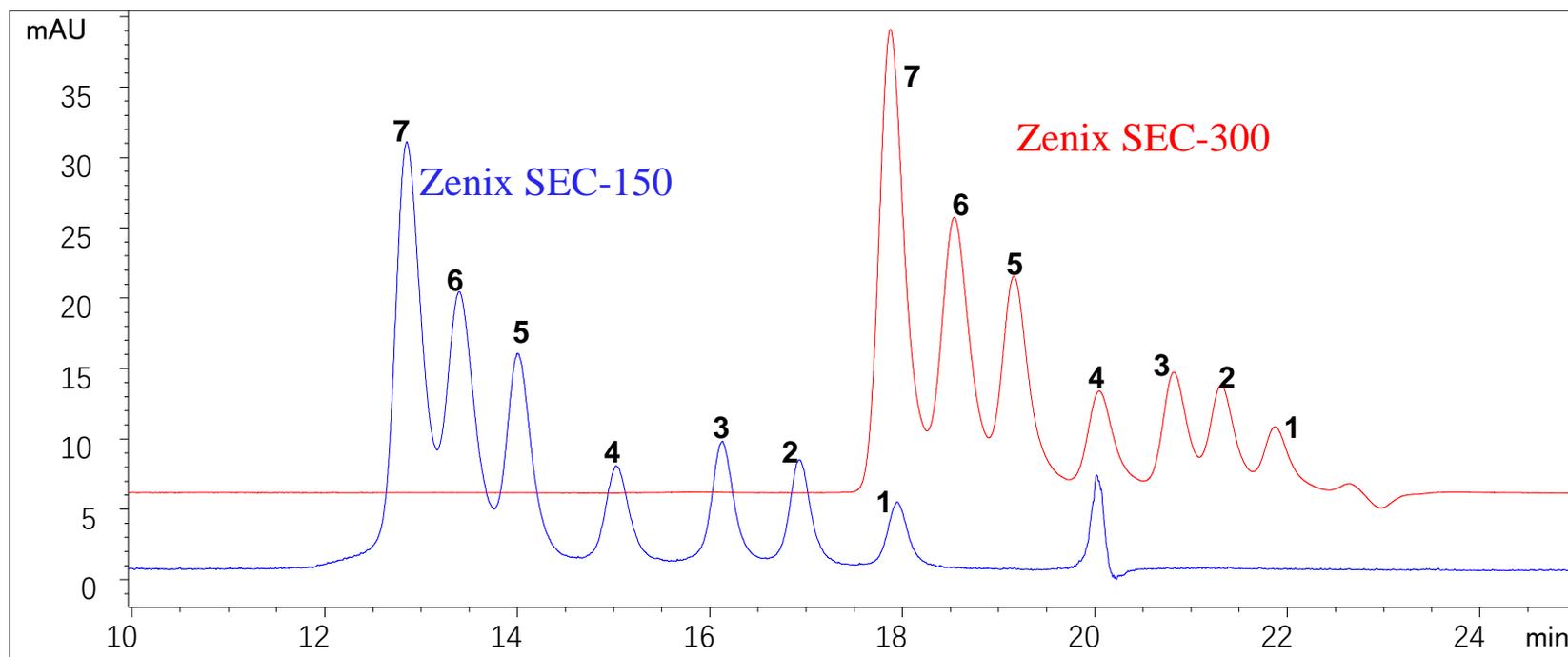
Скорость потока: 0,5 мл/мин;

Детектор: УФ 260 нм, температура колонки: 25 °С;

Объем инъекции: 30 мкл; Давление: 41 бар;

Образцы: 1) dA10, 2) dA15, 3) dA20, 5) dA40, 6) dA50, 7) dA60, каждый по 0,1 мкМ в воде

4) 5'-АТАТСТАСАСGGГТАССCGТАССААТГСТГСТТСС-3' (35 nt)

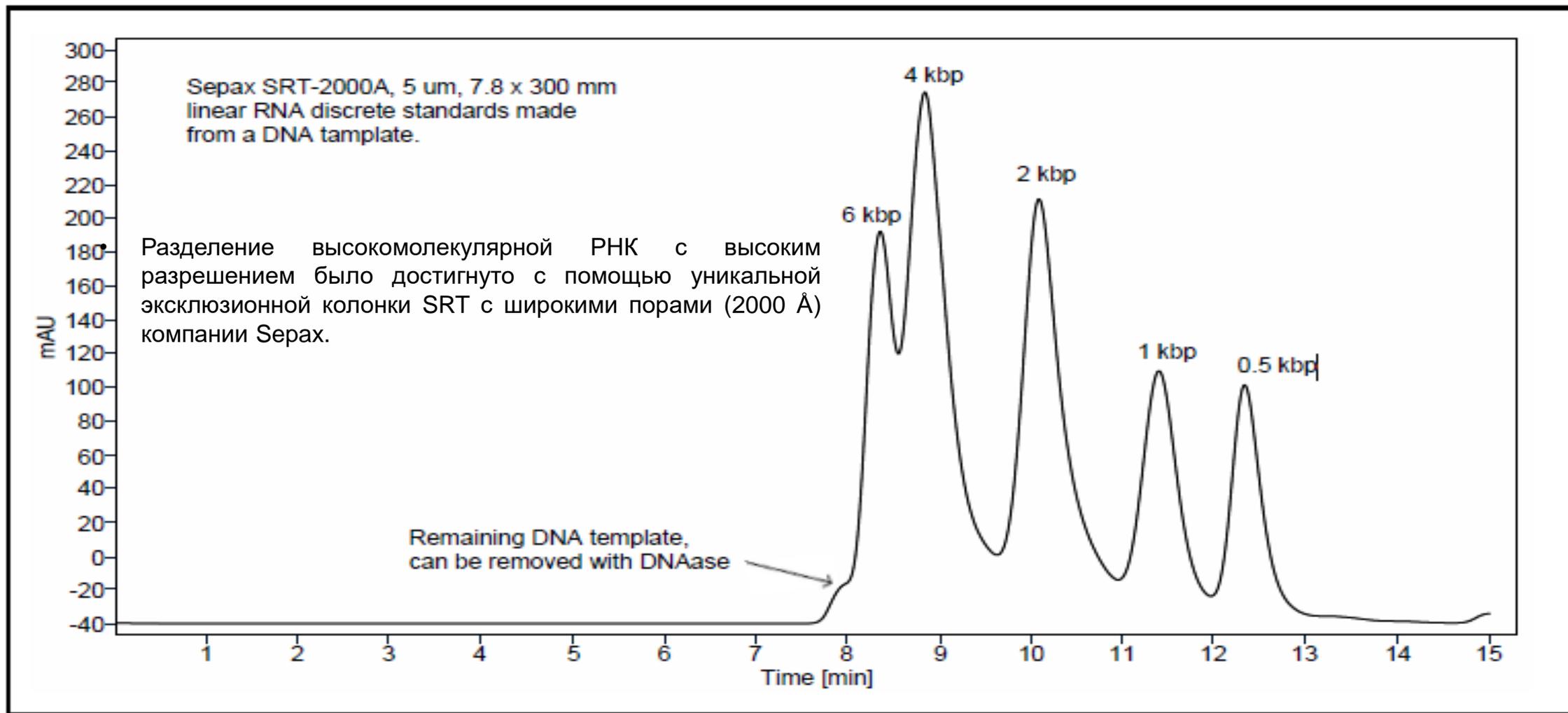


300 Å обеспечивает лучшее разрешение для более длинных олигонуклеотидов (>30 нт), 150 Å разделяет poly dAs с базовым разрешением для более коротких олигонуклеотидов (<35 нт).



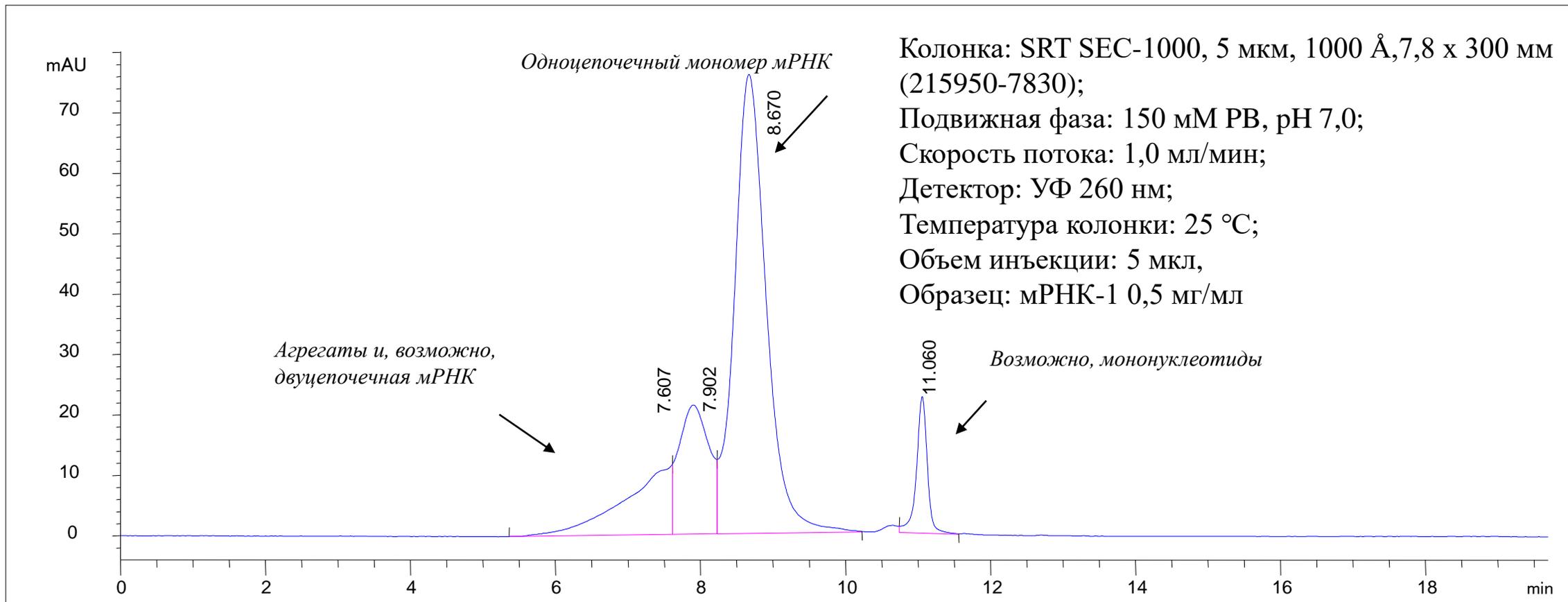
РНК — SEC с широкими порами

Разделение РНК на SEC с широкими порами





Анализ mRNA-1 на SRT SEC-1000



Колонка: SRT SEC-1000, 5 мкм, 1000 Å, 7,8 x 300 мм (215950-7830);

Подвижная фаза: 150 mM РВ, pH 7,0;

Скорость потока: 1,0 мл/мин;

Детектор: УФ 260 нм;

Температура колонки: 25 °С;

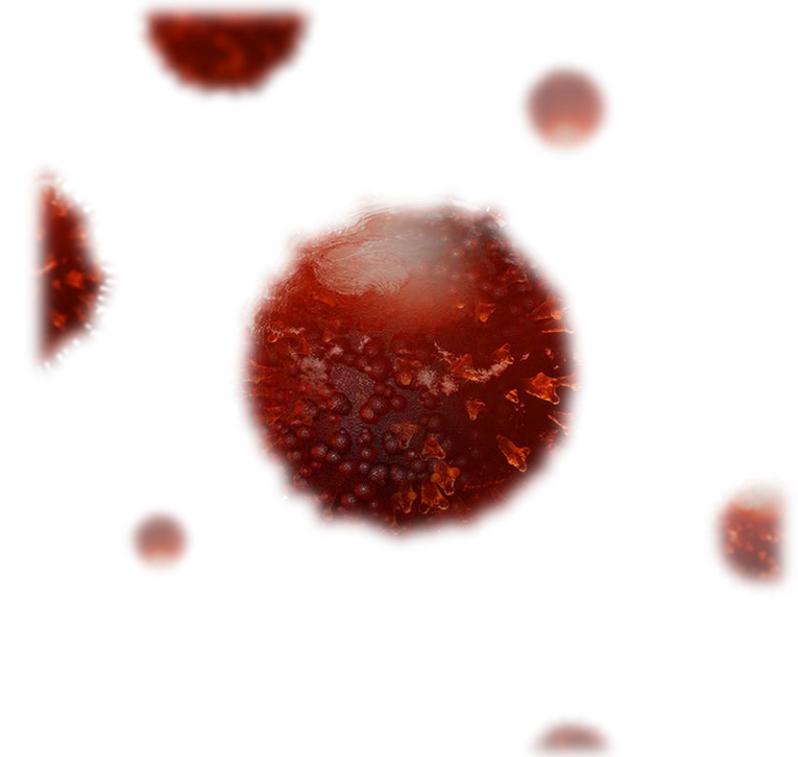
Объем инъекции: 5 мкл,

Образец: мРНК-1 0,5 мг/мл

RT [min]	Height	Area	Area%	Plates	Tailing	Resolution
7.607	11	517.2	13.952	832	0.50	
7.902	21	623.2	16.812		-1.74	
8.670	76	2329.6	62.847	2055	1.23	
11.060	23	236.9	6.390	31503	0.78	4.71



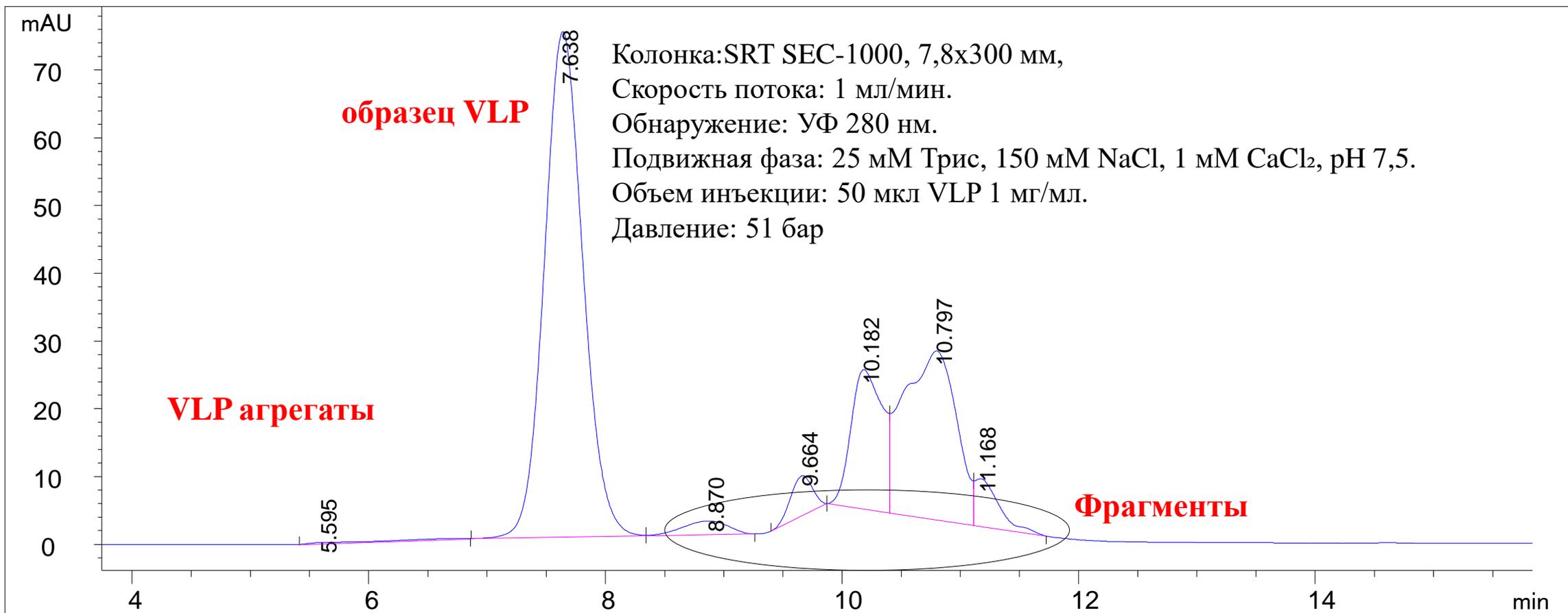
- Вирусоподобные частицы (VLP)
- Аденоассоциированные вирусы (AAV)
- ПЭГилированные белки (большой ПЭГ > 30 кДа)
- IgM
- Вирусы
- мРНК



Область разработки вакцин и генной терапии



Вирус как частица



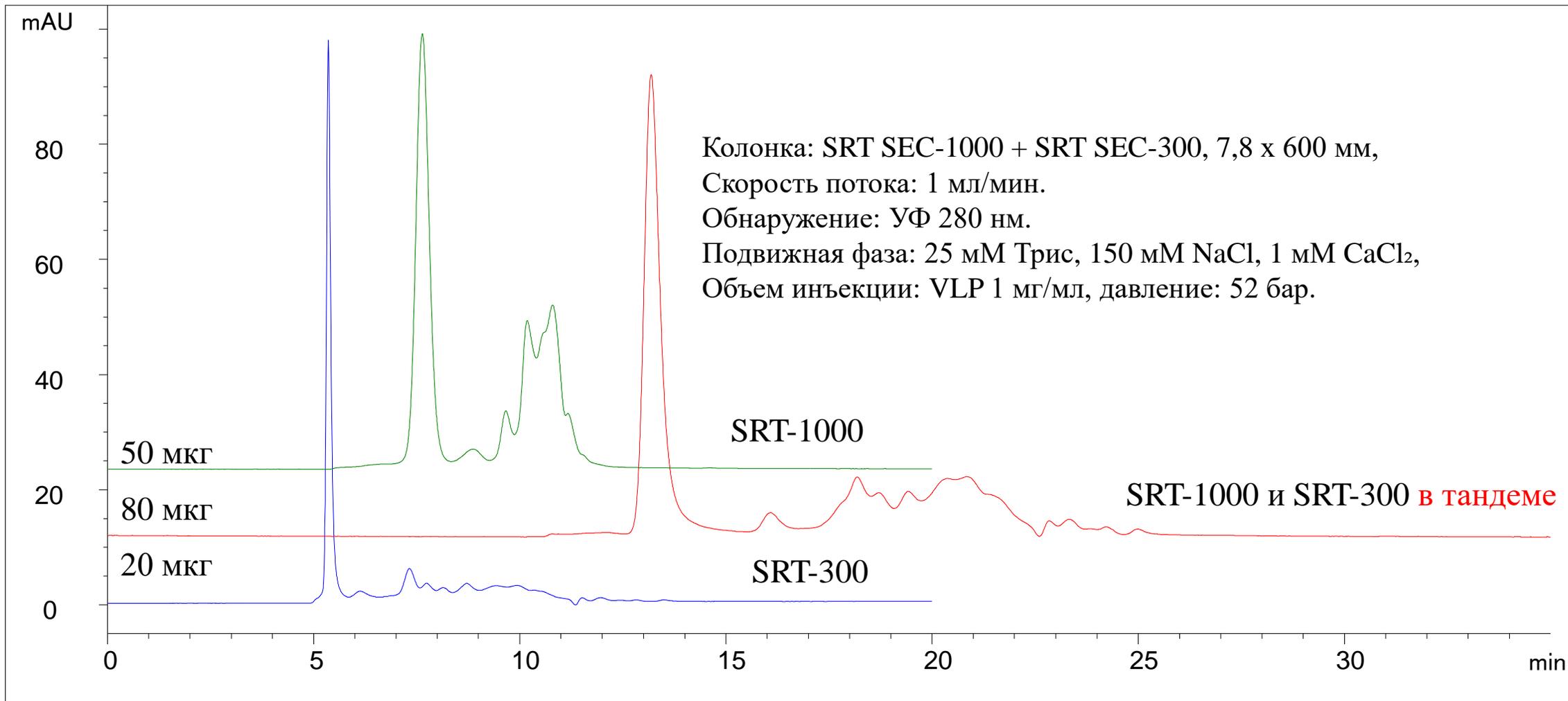
#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	5.595	13.8	2.3E-1	0.9976	0.445	0.145
2	7.638	1692.7	74.6	0.3488	54.702	0.893
3	8.87	54.6	2	0.4019	1.763	1.303
4	9.664	76.3	5.9	0.2052	2.466	1.203
5	10.182	388.1	20.6	0.2757	12.542	0.684
6	10.797	768.3	24.9	0.4397	24.828	1.57
7	11.168	100.7	7	0.2151	3.254	0.279



Разделение VLP на SRT SEC-1000 & SEC-300



赛分科技





Обнаружение AAV с двойной длиной волны



赛分科技

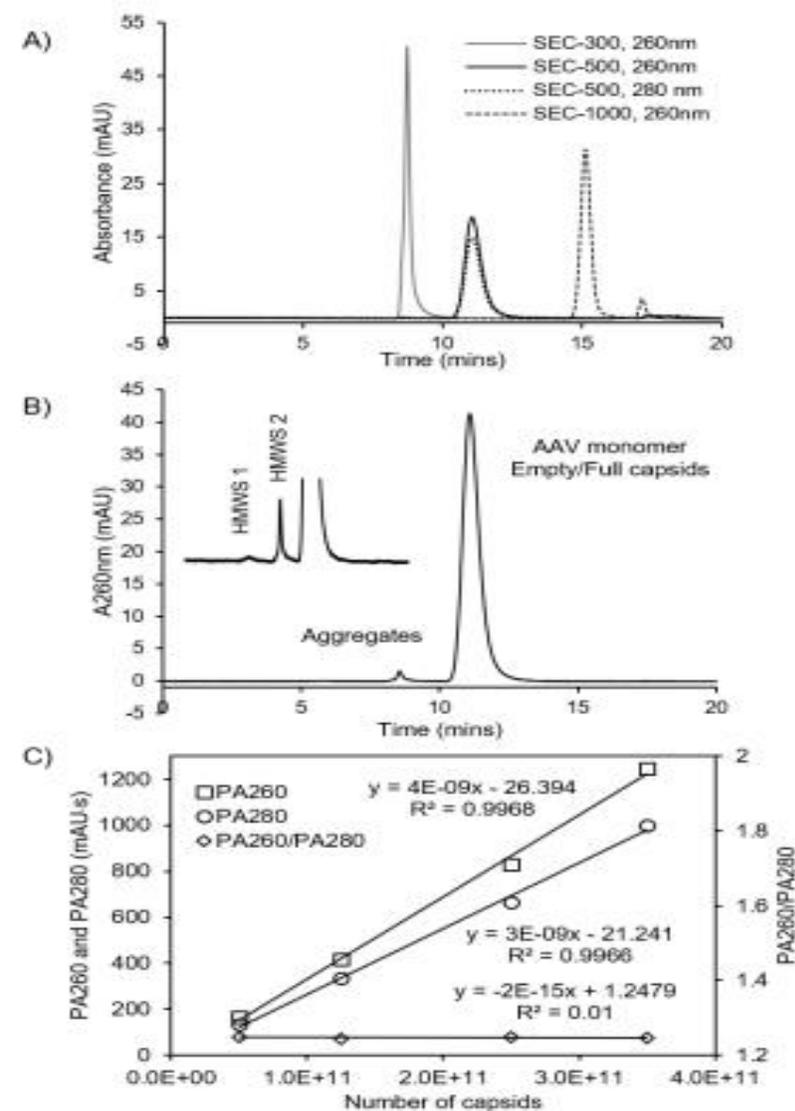
Size Exclusion Chromatography with Dual Wavelength Detection as a Sensitive and Accurate Method for Determining the Empty and Full Capsids of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors

He Meng^{*1}, Michelle Sorrentino¹, Denise Woodcock², Catherine O’Riordan², Vijender Dhawan¹, Marc Verhagen¹, and Claire Davies¹

Колонка	SRT SEC (300, 500, 1000A), 7.8 x 50 мм & 7.8 x 300 мм
Размер частиц	5 мкм
Образец	Аденоассоциированные вирус AAV5
Мобильная фаза	DPBS (фосфатный буферный солевой раствор Дульбекко)
Flow rate	0.75 мл/мин
Injection Vol	25 мкл
Концентрация	5.0×10^{12} копий/мл
Длина волны	230, 260, 280 нм

Соотношение ~1,8 чистой ДНК
Соотношение ~2,0 чистой РНК

Мономерные тяжелые капсиды ~ 1,34
Легкие капсиды имели соотношение ~ 0,6



- A) Хроматограммы SEC – выбор размера пор**
- B) Мономер и агрегат оценены при длине волны 260/280 нм.**
- C) Кривые A260 и 280 нм + соотношение площади пика к титру**



Полный анализ AAV8 на AAV SEC-5 (4630)



Колонка: AAV SEC-5 (5 мкм, 4,6x300 мм)

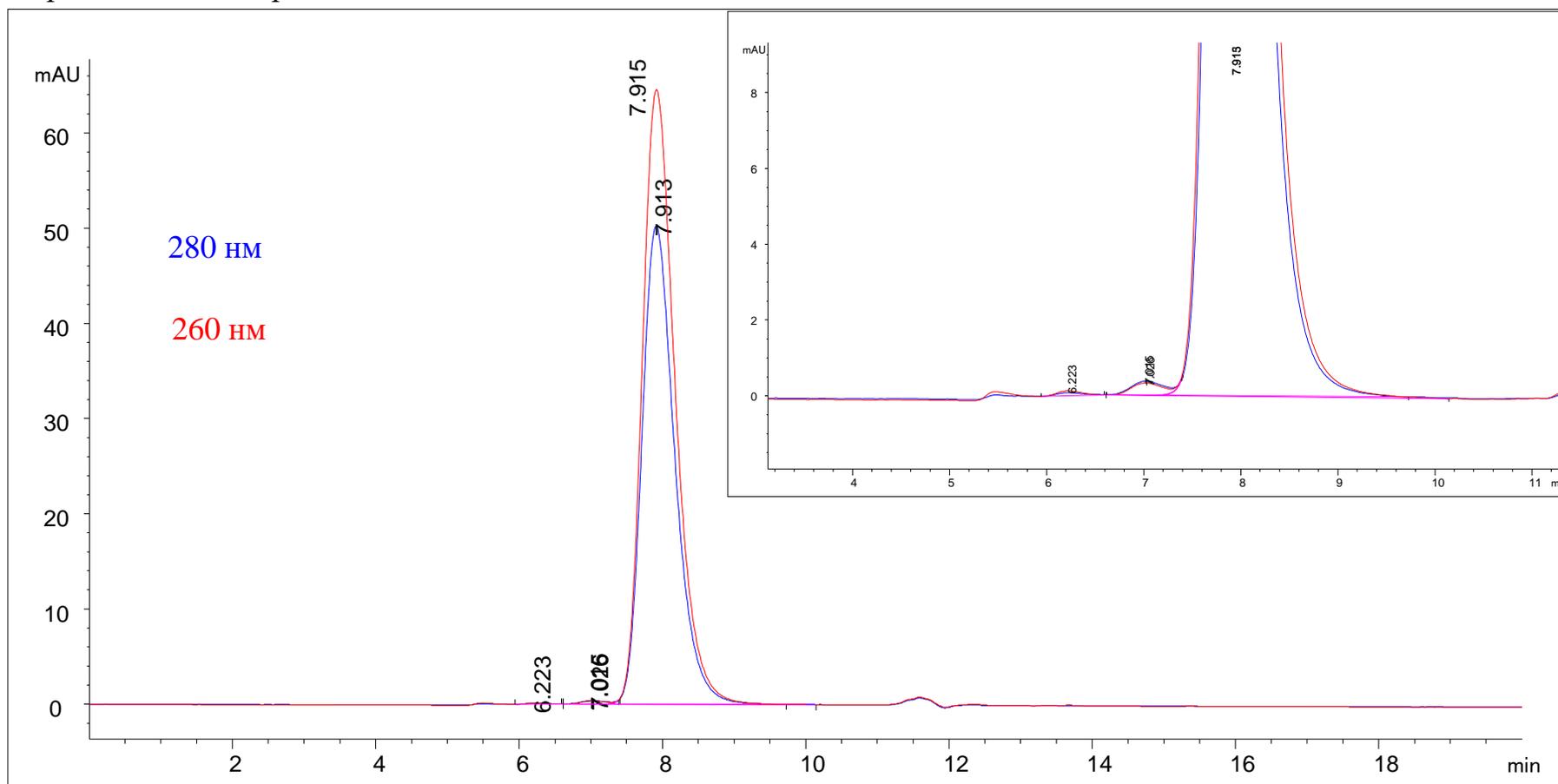
Подвижная фаза: А: 1,8Х DPBS + 10% этанола.

Скорость потока: 0,35 мл/мин; Температура колонки: 25 °С.

Давление в колонке: 48 бар; Объем инъекции: 20 мкл;

Детектор: FLD Возбуждение 280 нм, Эмиссия 330 нм; УФ 260 нм, 280 нм

Образец: полная версия AAV8.

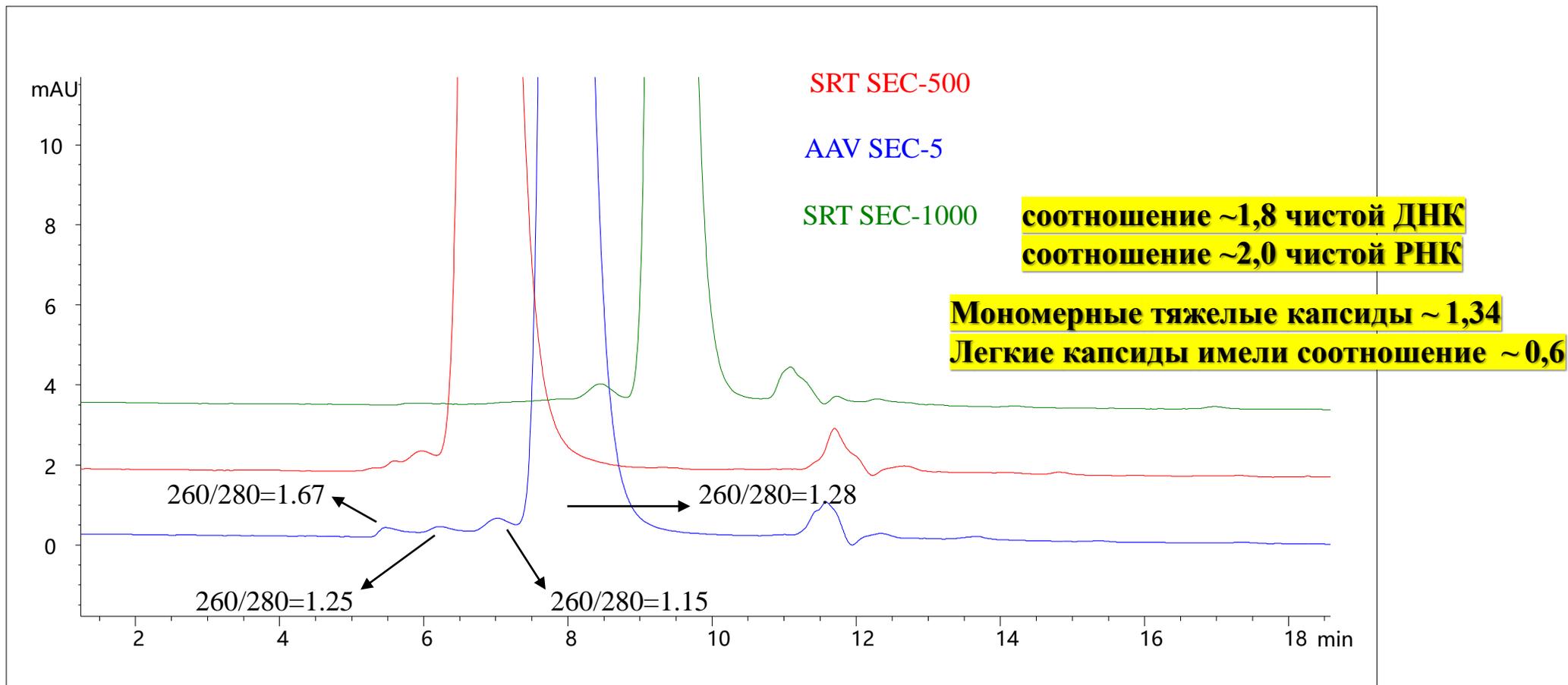




Наложение хроматограмм образца AAV8 ($\lambda = 260$ нм)

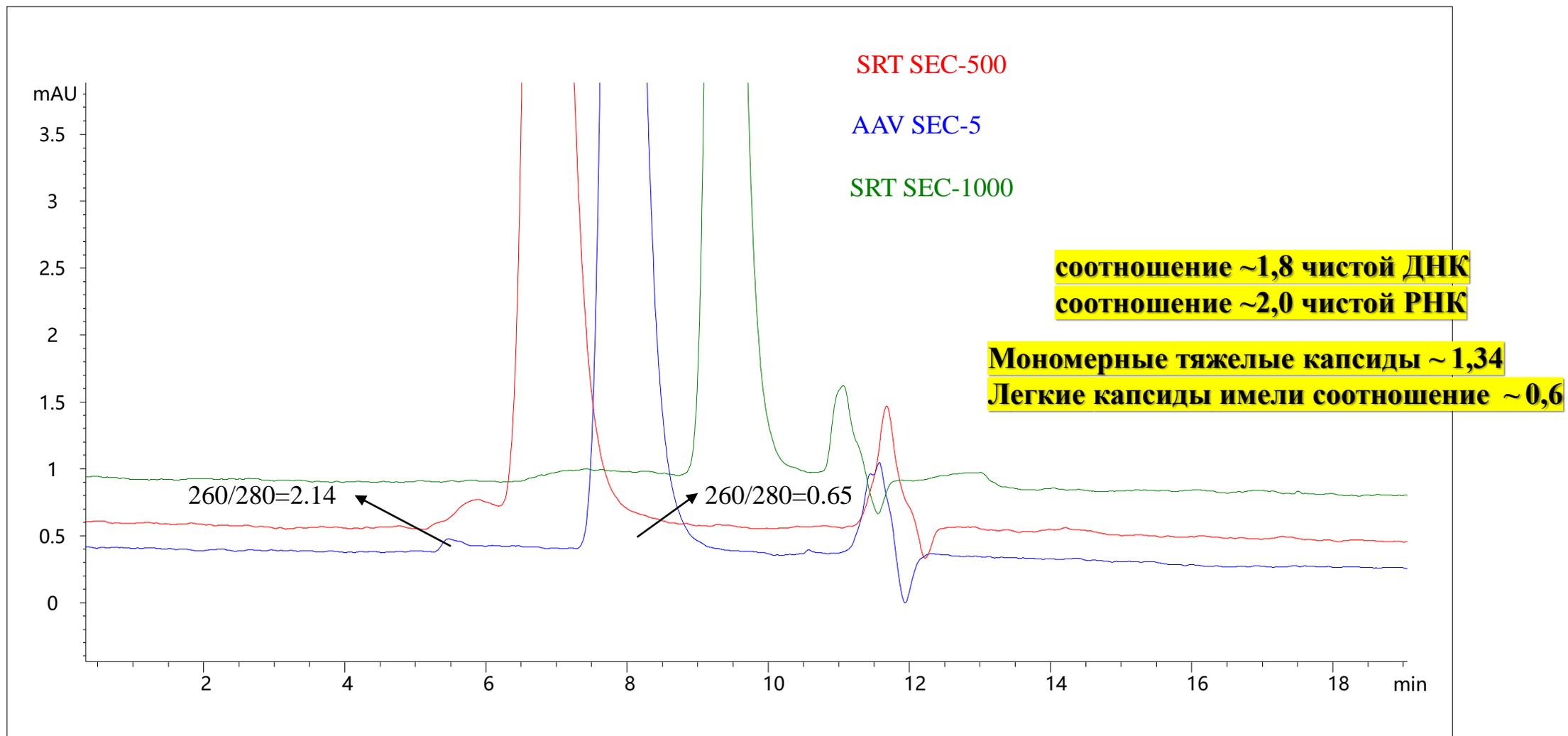


赛分科技





Наложение хроматограмм образца AAV8 ($\lambda = 280$ нм)





Гепарин натрия



Молекулярно-массовое распределение гепарина натрия

(Версия фармакопеи СР 2020)

Колонки: SRT SEC-500 (5 μm , 500 \AA , 7.8 x 50 mm)

SRT SEC-500 (5 μm , 500 \AA , 7.8 x 300 mm)

SRT SEC-300 (5 μm , 300 \AA , 7.8 x 300 mm)

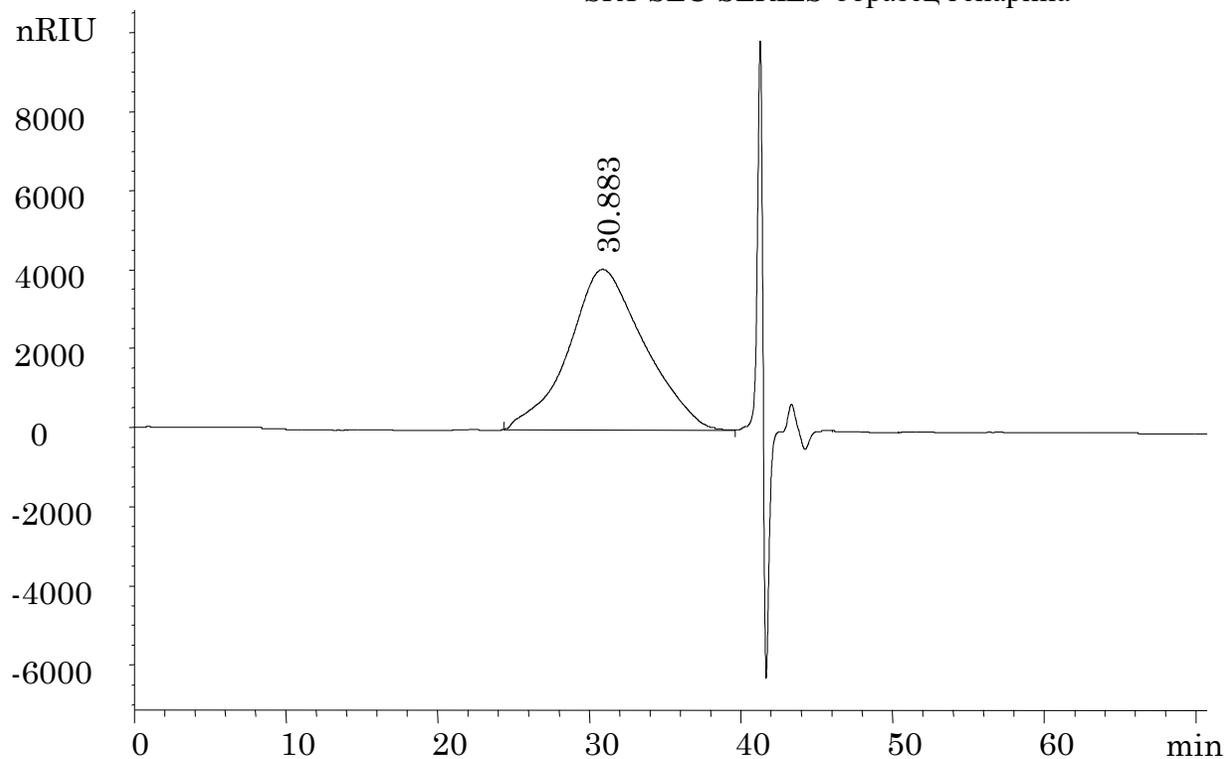
Подвижная фаза: 0,1 М ацетат аммония.

Скорость потока: 0,6 мл/мин.

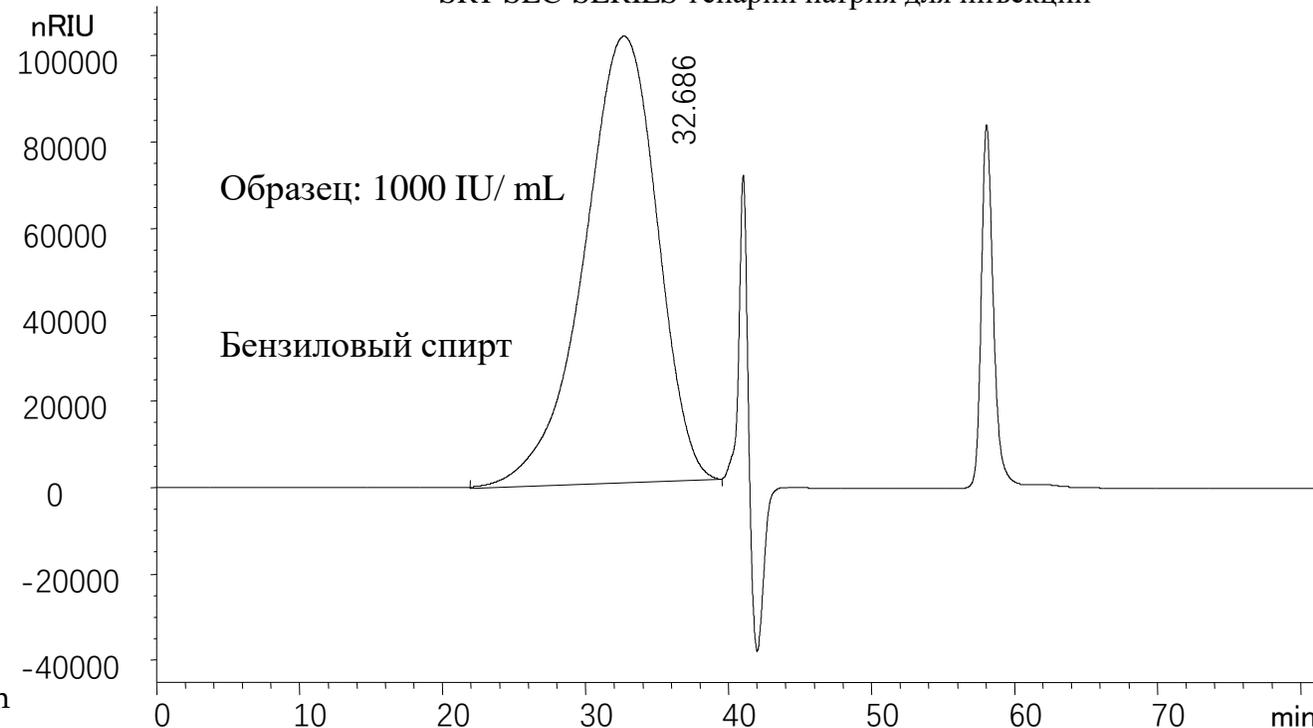
Детектор: RI (30 °C), температура колонки: 30 °C,

Объем инъекции: 25 мкл. Образец: 5 мг/мл в подвижной фазе.

SRT-SEC-SERIES-образец гепарина



SRT-SEC-SERIES-гепарин натрия для инъекций



Он полностью соответствует требованиям теста молекулярной массы и молекулярно-массового распределения по пункту гепарин натрия [инспекция] в СР 2020.



Анализ полисахаридов тремелла (Tremella) на Zenix SEC-80

Колонка: Zenix SEC-80 (3 мкм, 80 Å, 7,8 x 300 мм).

Подвижная фаза: 0,7% Na₂SO₄; Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Детектор: RI (35 °C); Температура колонки: 35 °C;

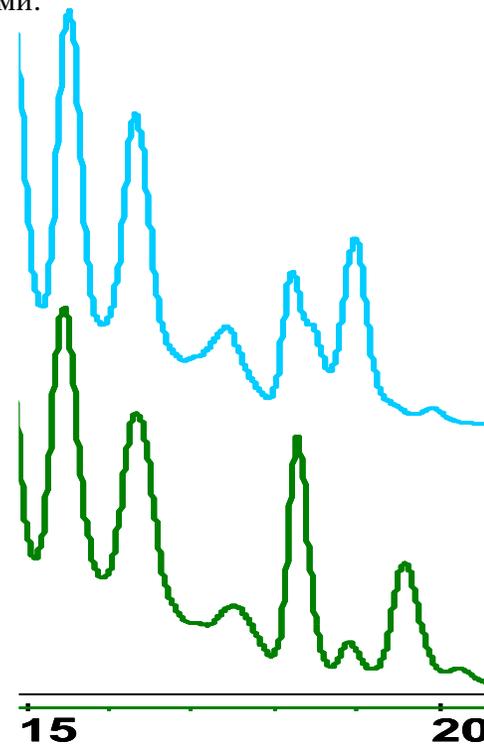
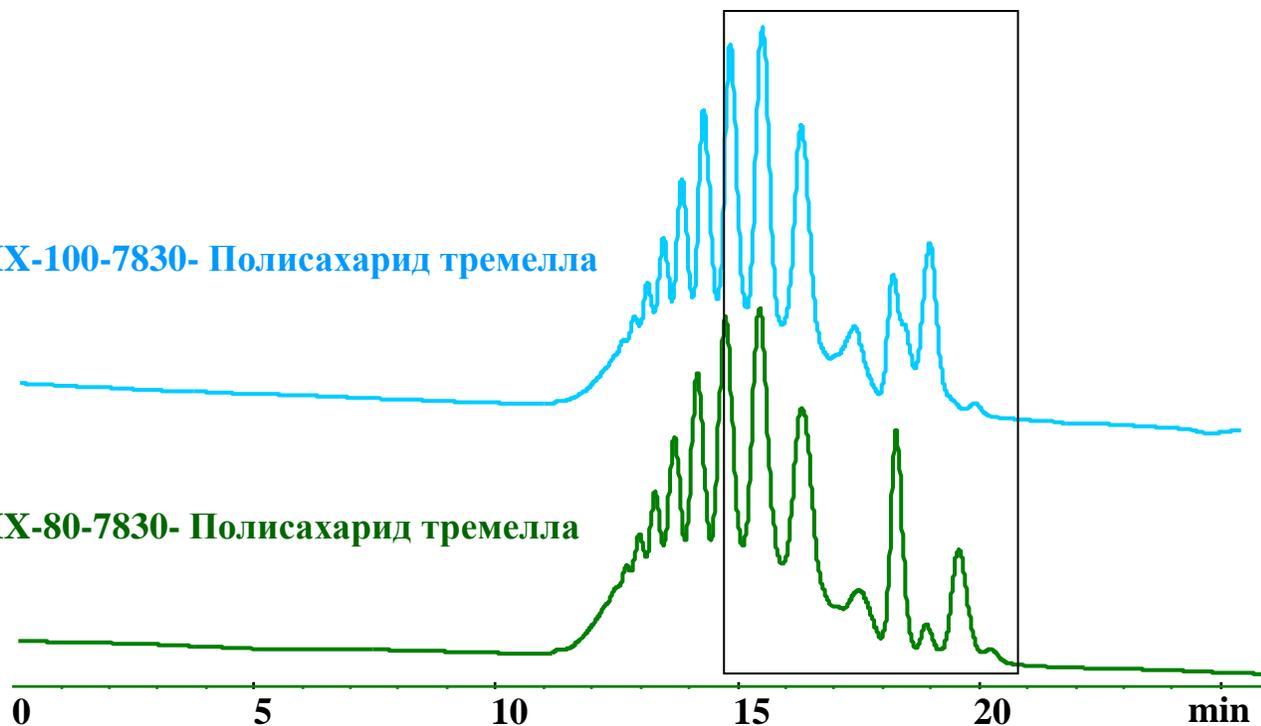
Объем инъекции: 10 мкл;

Образец: 5,0 мг/мл полисахарида Tremella в подвижной фазе.

Полисахариды тремелла состоят из 5 мономерных остатков – α-маннозы, β-глюкуроновой кислоты, β-ксилозы, фукозы и β-маннозы. Основу главной цепи молекулы составляют остатки α-1,3-маннозы, а боковые ветви представлены остатками других сахаров, кроме того, боковые ветви могут образовывать комплексы с аминокислотами и нуклеиновыми кислотами.

ZENIX-100-7830- Полисахарид тремелла

ZENIX-80-7830- Полисахарид тремелла



SEC колонки с меньшим размером пор лучше подходят для разделения молекул меньшего размера.



Хранение: При ежедневном использовании колонки Sepax SEC рекомендуется ее хранить в 150 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,0); Или в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,02% (мас./об.) азида натрия (NaN_3), при этом не рекомендуется хранить его в чистой воде.

Техническое обслуживание: после ежедневного использования колонки промывайте ее раствором 100 мкл 6М гуанидина HCl.

Мы не рекомендуем использовать растворители с высокой вязкостью, такие как этанол и IPA (изопропиловый спирт). В начале и в конце работы с колонкой необходимо медленно увеличивать и уменьшать скорость потока подвижной фазы, чтобы не было существенного изменения давления.

Очистка: после многократного использования некоторые образцы могут адсорбироваться на входной ситовой пластине или сорбенте. При подобном загрязнении в определенной степени возникает повышенное давления в колонке, сопровождающееся расширением диаграммы пиков. Очищайте колонку по мере необходимости.

Общий процесс заключается в отсоединении детектора от системы, обратном подключении колонки и ее промывки 10-15-кратным объемом колонки с помощью очищающего раствора при скорости потока ниже 50 % от максимальной рекомендуемой для работы.

Рекомендуемые чистящие средства:

0,5 М раствор сульфата натрия (рН 3,0): подходит для очистки после щелочной адсорбции белков;

10% - 20% органические растворители (этанол, изопропанол, ацетонитрил): очистка после адсорбции гидрофобных белков;

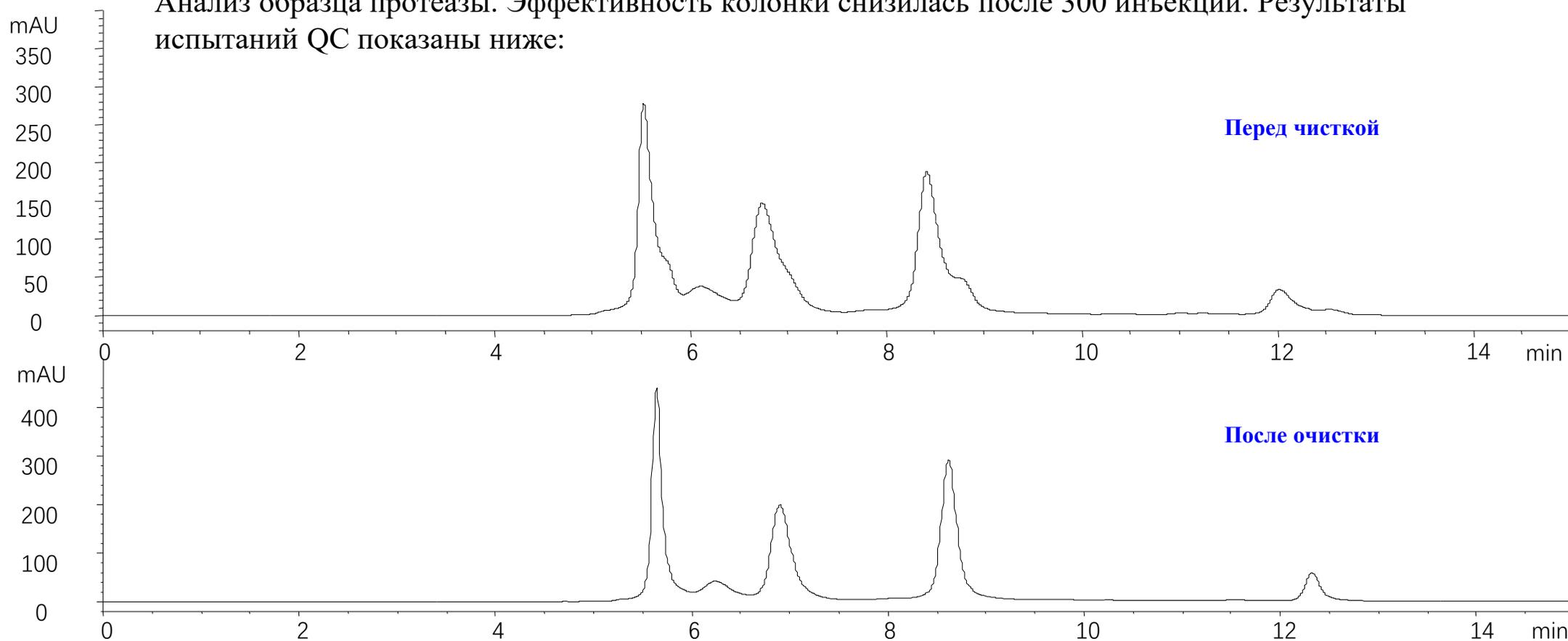
4~6 М мочевины (рН 7,0): подходит для очистки легко агрегируемых образцов белка;

*убедитесь, что значение рН очищающего растворителя находится в пределах допустимого диапазона рН хроматографической колонки.



До и после чистки мочевиной 6M

Анализ образца протеазы. Эффективность колонки снизилась после 300 инъекций. Результаты испытаний QC показаны ниже:



Процедура:

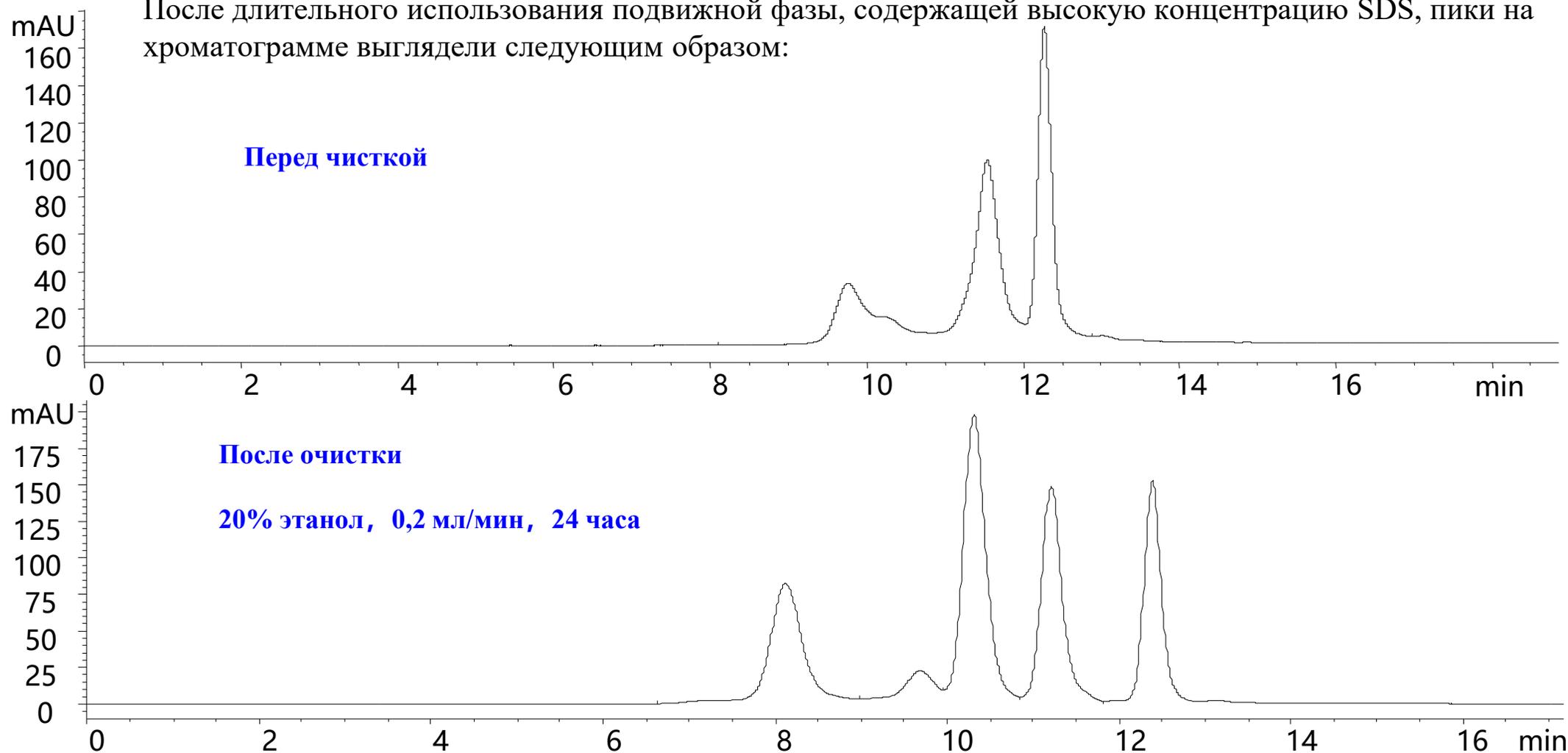




До и после очистки SRT SEC-500 20%

ЭТАНОЛОМ

После длительного использования подвижной фазы, содержащей высокую концентрацию SDS, пики на хроматограмме выглядели следующим образом:

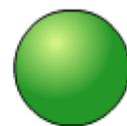




Механизм разделения ионообменной хроматографии (ИЭХ)

Разделение достигается за счет конкуренции между ионами образца и ионами подвижной фазы за взаимодействие с ионами противоположными зарядами на сорбенте-ионообменнике.

Here's our sample mix of proteins.



60 kDa

low pI (6)
(-)



20 kDa

low pI (7)
(-)



20 kDa

high pI (8)
(+)

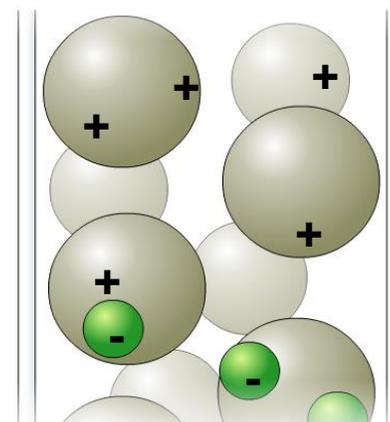
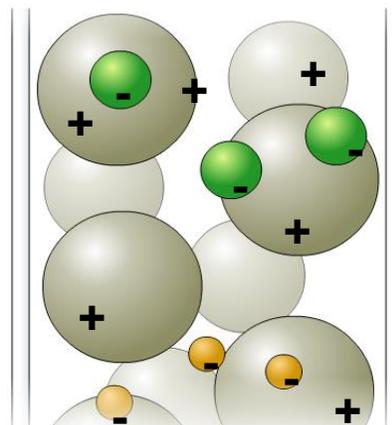
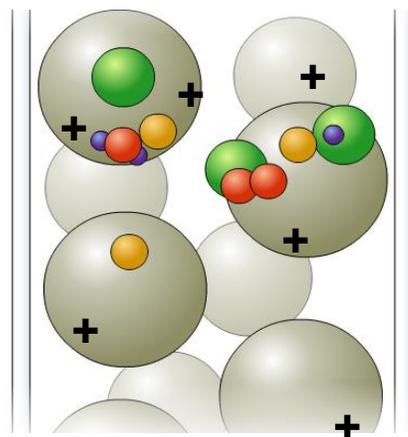


5 kDa

high pI (8)
(+)

Если pH подвижной фазы = 7,2

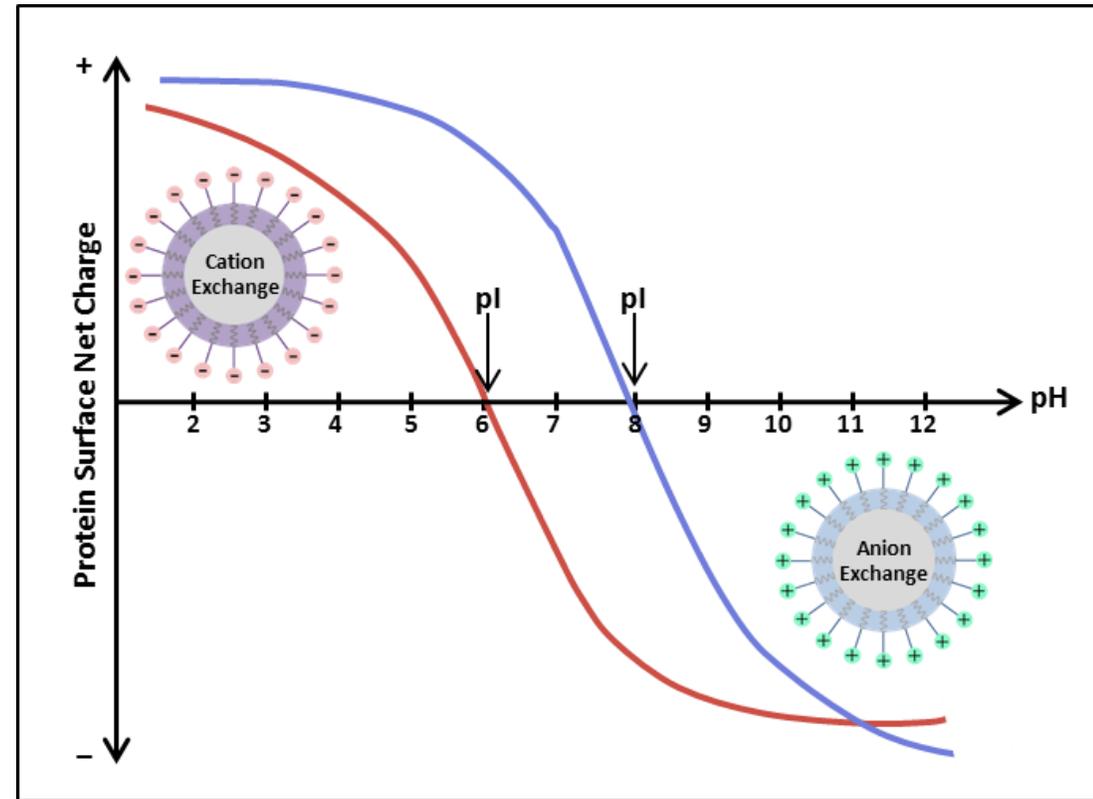
Заряд белков:





Характеристики ИЕХ

- Использование градиентного элюирования системы буферных солей в качестве подвижной фазы.
- Величина удерживания и степень разделения компонентов в основном регулируются путем контроля значения рН и ионной силы подвижной фазы.
- На катионообменных колонках задерживаются белки, которые имеют рI, превышающим рН подвижной фазы, тогда как белки с рI, меньшим или равным рН подвижной фазы, вымываются как пики растворителя. Последовательность пиков элюирующихся белков начинается с пика белка с самым низким значением рI; Обратное верно для анионообменных колонок.





Решение для IEX от Sepax

Sepax IEX

Proteomix

Antibodix

WAX

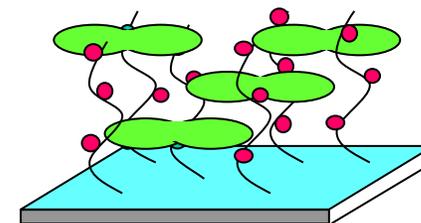
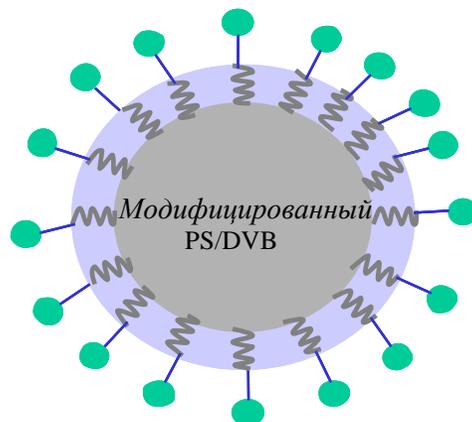
SAX

WCX

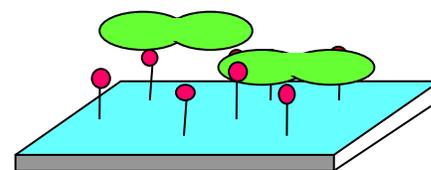
SCX

Запатентованные технологии модификации гидрофильной поверхности матрицы и пришивки с ней лигандов.

Данные технологии предотвращают адсорбцию белка и повышают обменную емкость сорбента.



Модификация с несколькими слоями лиганда



Монослойная модификация



Выбор колонки Sepax IEX

Тип	Матрица	Размер частиц (мкм)	Диапазон pH	Образцы
Proteomix SCX	полистирол / дивинилбензол	1.7 ,3 ,5 ,10	2-12	pI > 7 белок, полипептид
Proteomix WCX				pI < 7 белок, полипептид ДНК, РНК, олигонуклеотиды, сахараиды
Proteomix SAX				
Proteomix WAX				Специальная колонка для анализа биспецифических антител (BsAb)
Proteomix CV-1				Специальная колонка для анализа моноклональных антител (mAb)
Antibodix™				

•Функциональная группа:

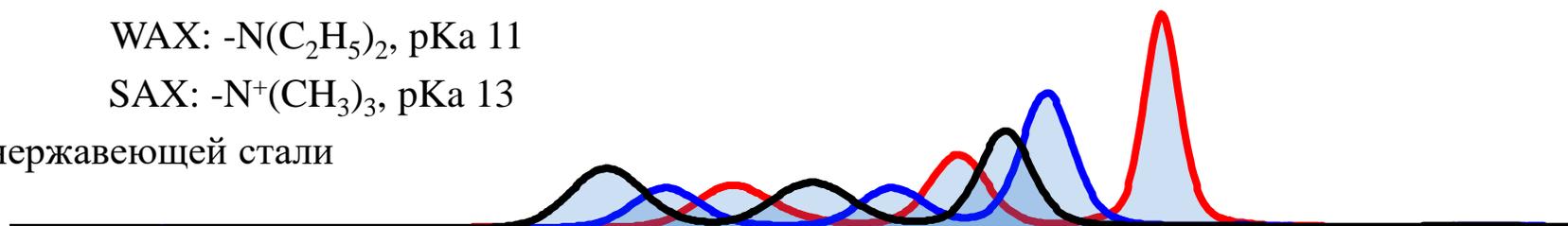
WCX: -COOH, pKa 4.75

SCX: -SO₃H, pKa < 1.0

WAX: -N(C₂H₅)₂, pKa 11

SAX: -N⁺(CH₃)₃, pKa 13

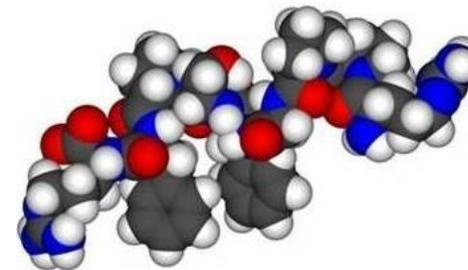
•Колонка: PEEK, Материал из нержавеющей стали





Применение колонок ИЕХ

- ① Исследование заряда белков и антител
- ② Исследование структуры образцов белка до и после гликозилирования
- ③ Анализ фрагментов олигонуклеотидов
- ④ Анализ олигосахаридов с разной полимеризацией



Требования для анализа с помощью ИЕХ:

Необходима разница в заряде или между pI целевого аналита и другими компонентами или примесями, которые могут существовать в образце.

Компоненты образца имеют хорошую взаимную растворимость в выбранной системе подвижной фазы.

Выбор колонки для анализа ИЕХ:

Выберите подходящий тип колонки, исходя из pI целевого образца (SCX/WCX/SAX/WAX).

Выберите подходящую матрицу и размер пор в соответствии с требованиями к разрешению хроматограммы и четкости пиков.



Выбор колонки ИЕХ

1. Белки

Proteomix WCX/SCX/WAX/SAX

2. Антитела

Antibodix WCX / Proteomix WCX、SCX

3. Полипептиды

Proteomix WCX/SCX/WAX/SAX

4. Нуклеиновые кислоты

Proteomix SAX

5. Водорастворимые полимеры

Proteomix SCX/WCX(base) WAX/SAX(acid)

Выбор на основе двух факторов:

1. Кислотность и щелочность образца
2. Изоэлектрическая точка белка (pI)



Выбор буферного раствора:

- Чем меньше ионная сила при достаточной буферной емкости в выбранном диапазоне рН, тем лучше. Концентрация исходного буферного раствора должна быть как можно более низкой, например 10 мМ.
- Используйте анионные буферы при использовании колонки СЕХ и катионы при использовании колонки АЕХ, чтобы избежать нежелательных процессов ионного обмена.
- Определите, какую буферную систему использовать, исходя из различных условий рН подвижной фазы. Например, когда рН подвижной фазы составляет 3-5, используют буферный раствор формиата аммония; При рН подвижной фазы 4-6 используют буферный раствор ацетата натрия или ацетата калия; Если подвижная фаза имеет рН 6-8, используют буферный раствор фосфата натрия или фосфата калия. Кроме того, диапазон рН буфера Трис-соляной кислоты составляет 7-9, а диапазон рН буфера Трис-фосфорной кислоты составляет 6-9.

Выбор метода элюирования :

- Изменяйте рН буферного раствора, чтобы изменить адсорбцию белка на его десорбцию. Например, при анионном обмене уменьшите рН подвижной фазы, чтобы положительно зарядить отрицательно заряженный белок, адсорбированный на колонке. Таким образом вы добьетесь его десорбции.
- Элюирование адсорбированных молекул с сорбента при увеличении ионной силы буфера.
- Одновременное изменения рН буфера и ионной силы.



pH	Вещество (соль)	Противоион	pKa (25 °C)
1.4–2.4	Maleic acid	Na ⁺	1.92
2.6–3.6	Methyl malonic acid	Na ⁺ или Li ⁺	3.07
2.6–3.6	Citric acid	Na ⁺	3.13
3.3–4.3	Lactic acid	Na ⁺	3.86
3.3–4.3	Formic acid	Na ⁺ или Li ⁺	3.75
3.7–4.7	Succinic acid	Na ⁺	4.21
5.1–6.1	Succinic acid	Na ⁺	5.64
4.3–5.3	Acetic acid	Na ⁺ или Li ⁺	4.75
5.2–6.2	Methyl malonic acid	Na ⁺ или Li ⁺	5.76
5.6–6.6	MES	Na ⁺ или Li ⁺	6.27
6.5–7.9	MOPS	Na ⁺ или Li ⁺	7.20
5.5–7.7	Phosphate	Na ⁺	7.20
7.0–8.0	HEPES	Na ⁺ или Li ⁺	7.56
7.8–8.8	BICINE	Na ⁺	8.33

Ссылка: Справочник по химии и физике, 93-е издание, CRC, 2012–2013 гг.

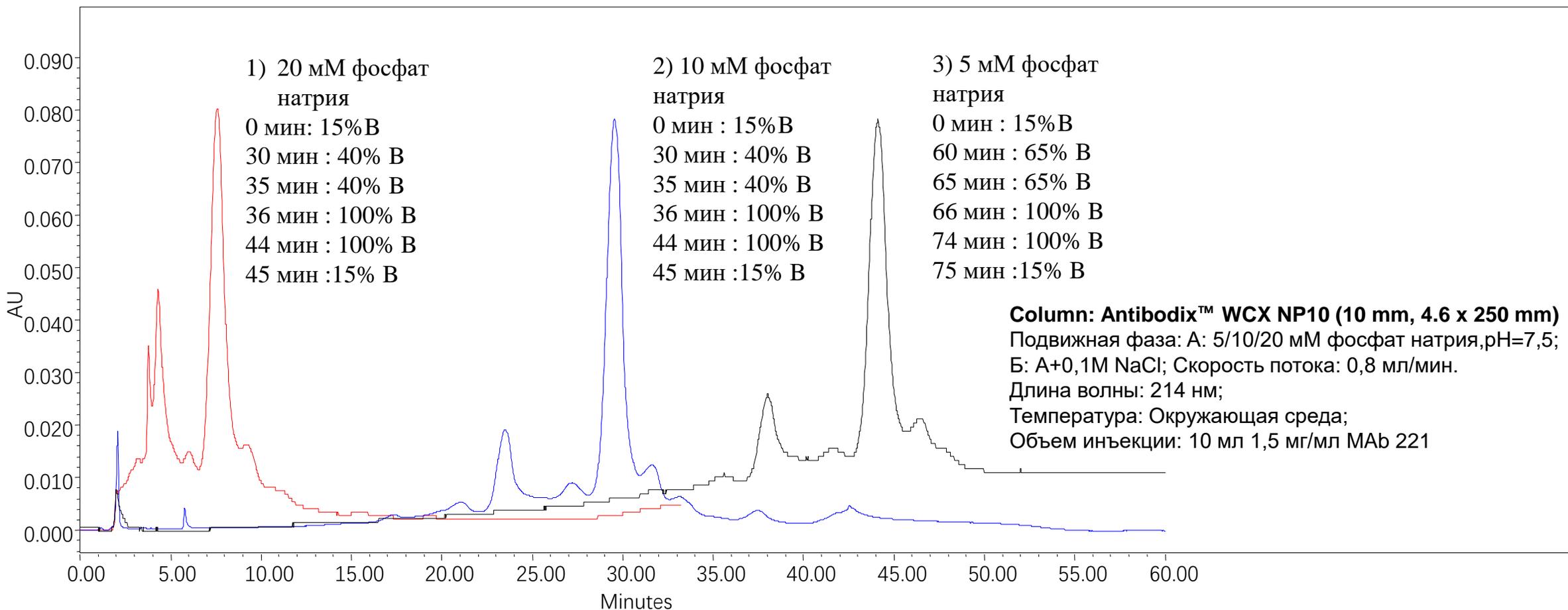


Буферы для анионной хроматографии (АЕХ)

pH	Вещество	Конц. (мМ)	Противоион	pKa (25°C)
4.5-5.3	N-Methylpiperazine*	20	Cl ⁻	4.75
4.8-6.0	Piperazine*	20	Cl ⁻ или HCOO ⁻	5.68
5.5-6.0	L-Histidine*	20	Cl ⁻	6.15
5.8-7.0	bis-Tris*	20	Cl ⁻	6.48
6.4-7.3	bis-Tris propane*	20	Cl ⁻	6.80
6.5-7.9	MOPS*	20	Cl ⁻	7.28
7.3-8.2	Triethanolamine*	20	Cl ⁻ или CH ₃ COO ⁻	7.76
7.5-8.8	Tris*	20	Cl ⁻	8.06
8.0-8.5	N-Methyldiethanolamine*	20		8.54
8.0-8.5	N-Methyldiethanolamine*	50	Cl ⁻ или CH ₃ COO ⁻	8.54
8.4-9.4	Diethanolamine*	20 при pH 8.4 50 при pH 8.8	Cl ⁻	8.88
8.5-9.0	1,3-Diaminopropane*	20	Cl ⁻	8.64
9.0-10.0	Ethanolamine*	20	Cl ⁻	9.50
9.5-9.8	Piperazine*	20	Cl ⁻	9.73
9.7-10.0	CAPS*	20	Cl ⁻	10.40
9.8-10.3	1,3-Diaminopropane*	20	Cl ⁻	10.47
10.6-11.6	Piperidine*	20	Cl ⁻	11.12

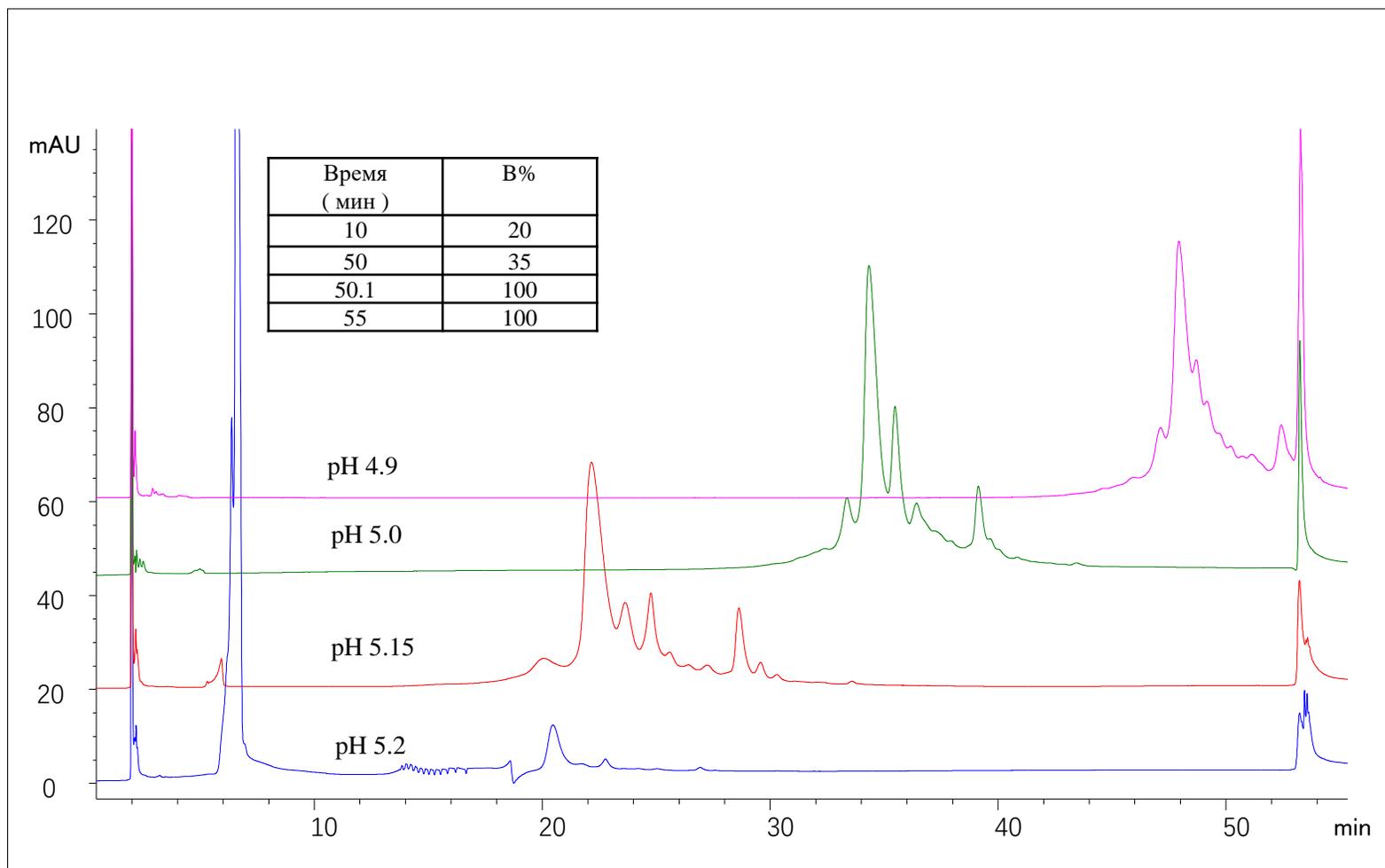


Одинаковый pH, разные концентрации буфера А





Разделение МАв – зависимость от pH



Column: Antibodix WCX NP5
(5 μ m, 4.6 x 250 mm)

Подвижная фаза: А: 20 mM NaAc, pH 5,15, Б: А + 1 M LiCl.

Скорость потока: 0,8 мл/мин;

Детектор: УФ 280 нм;

Температура колонки: 30 °C;

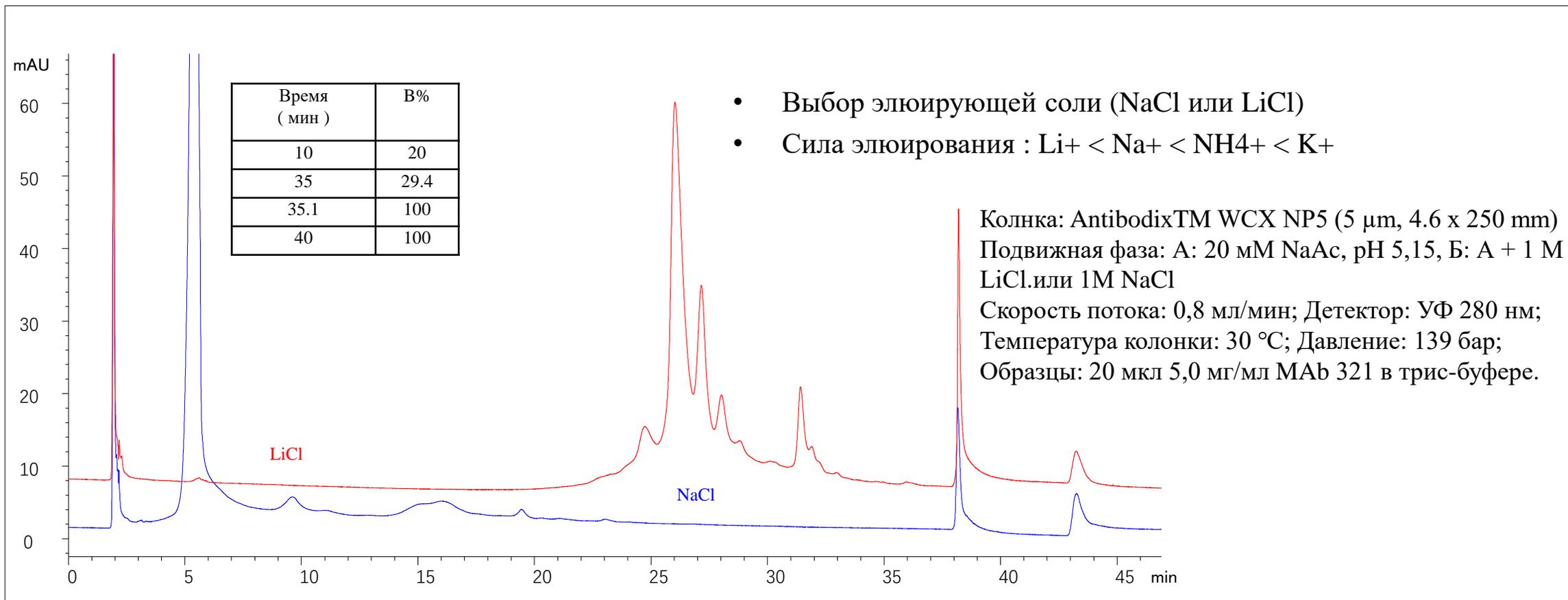
Давление: 139 бар;

Образцы: 20 мкл 5,0 мг/мл МАв 321 в трис-буфере.

Обеспечьте стабильность тестов при анализе ИЕХ: подготовка подвижной фазы, источник реагента, валидация



LiCl vs. NaCl на колонки Antibodix WCX



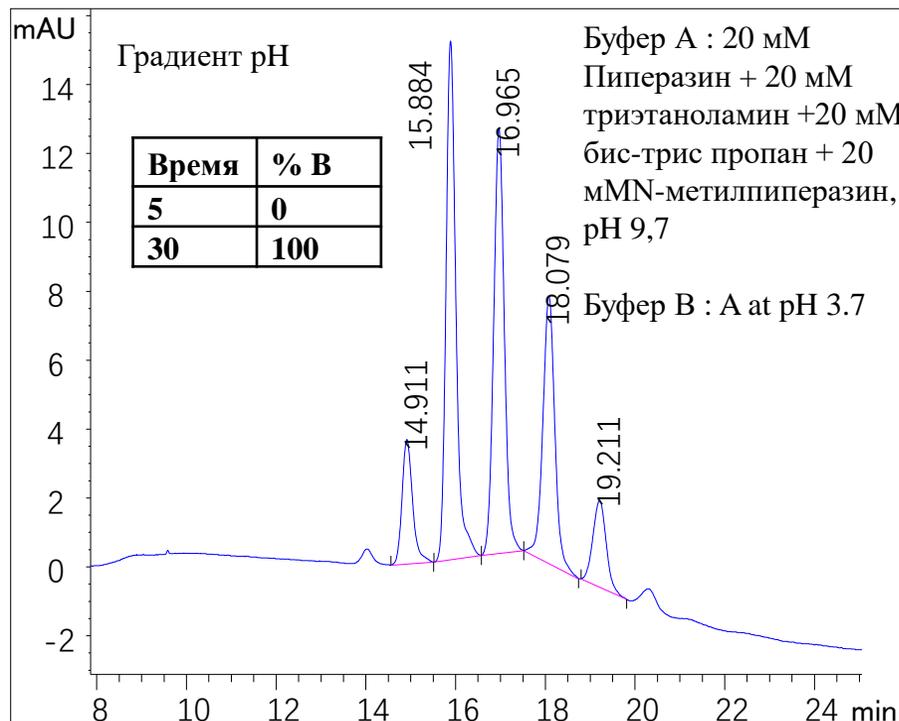
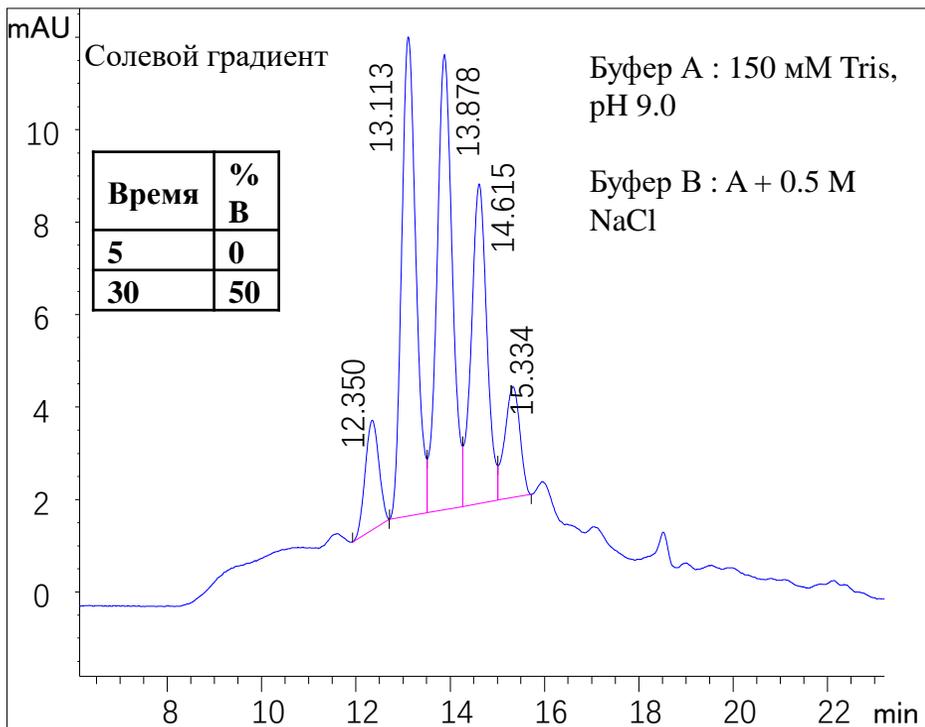


Гликопротеин — различные методы элюирования



赛分科技

Сравнение эффекта разделения при изменении градиента соли и градиента pH



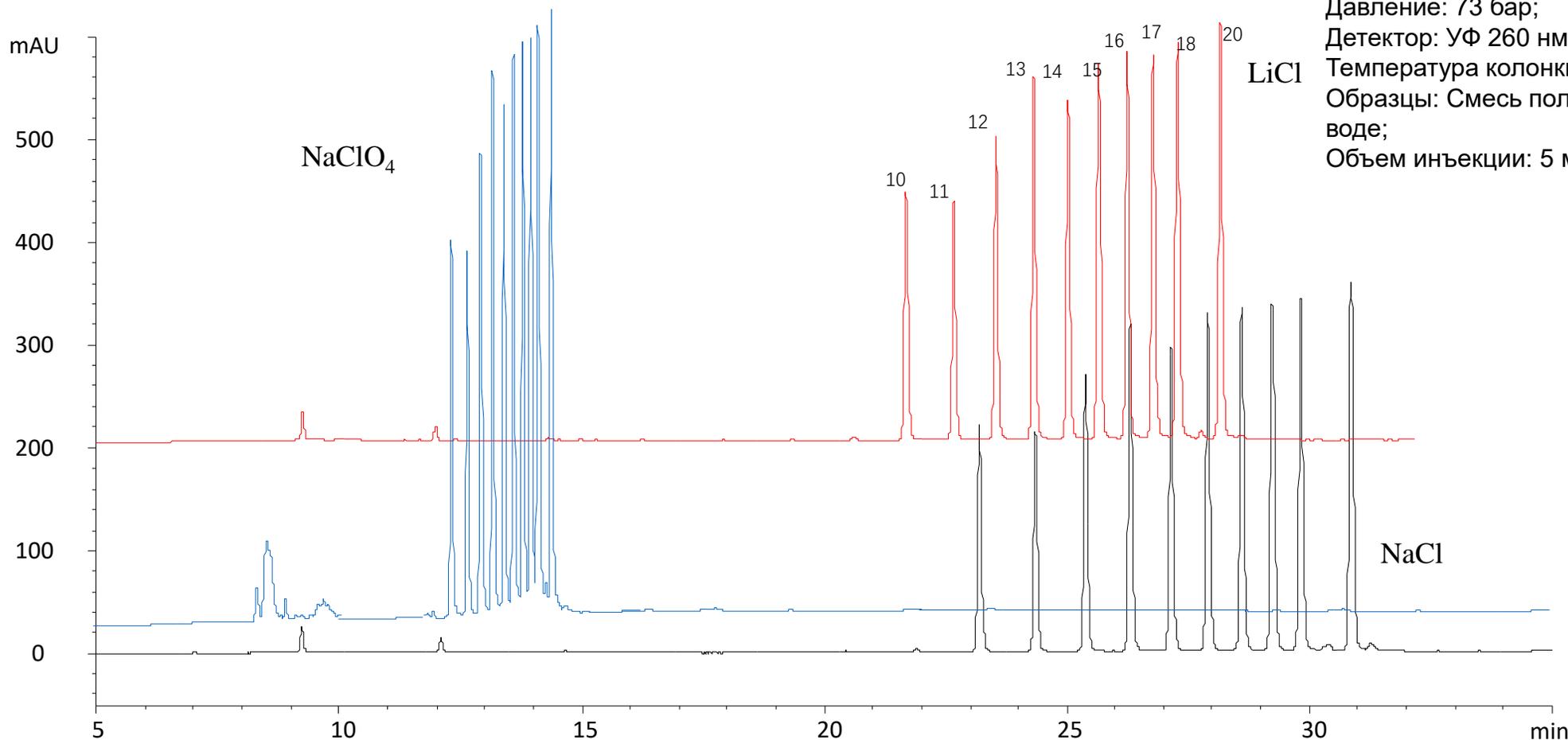
RT [min]	Height	Area	Plates	Tailing	Resolution
12.35	2	48	7914	1.16	
13.11	10	218	8927	1.17	1.37
13.88	10	223	8881	-1.35	1.33
14.62	7	158	9750	-1.45	1.25
15.33	2	54	9688	1.09	1.18

RT [min]	Height	Area	Plates	Tailing	Resolution
14.91	4	60	20620	1.41	
15.88	15	231	26689	1.38	2.41
16.97	12	203	24419	1.07	2.62
18.08	8	144	23470	0.79	2.45
19.21	3	52	20394	0.84	2.24



Влияние буферных солей на разделение олигонуклеотидов

Колонка: Proteomix® NP5 SAX (5 μ m, 4.6 x 250 mm)
Подвижная фаза: А: 20 мМ Трис, рН 8,0,
Б: А + 0,5 М NaCl/NaClO₄/LiCl.
Скорость потока: 0,5 мл/мин;
Градиент: 0→100% В за 30 минут;
Давление: 73 бар;
Детектор: УФ 260 нм;
Температура колонки: 25 °С;
Образцы: Смесь поли dA10-18, dA20, по 10 мкМ в воде;
Объем инъекции: 5 мкл





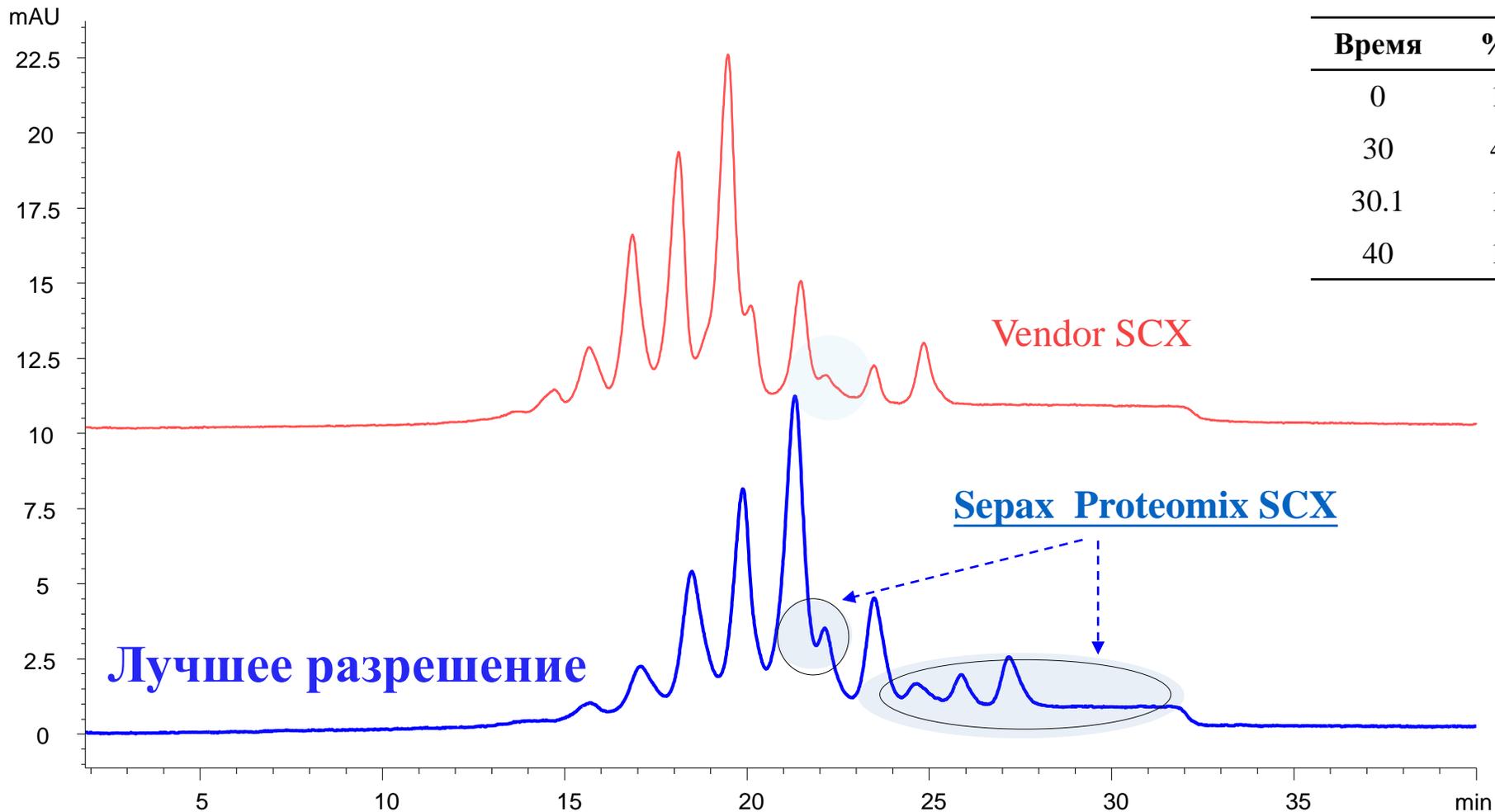
Erbitux-Proteomix SCX vs Vendor SCX



Колонки: Proteomix SCX-NP5 PEEK, 5 μ m, 4.6 x 250 mm; Other Vendor SCX PEEK, 5 μ m, 4.0 x 250 mm;

Подвижная фаза: рН-буфер А СХ-1; В: рН-буфер В СХ-1; Скорость потока: 480 см/ч,

Детектор: УФ 280 нм, Температура колонки: 30 °С; Образец: [Erbitux](#) (2 мг/мл), Объем инъекции: 10 мкл





NIST Mab-Proteomix SCX vs MAbPac SCX



赛分科技

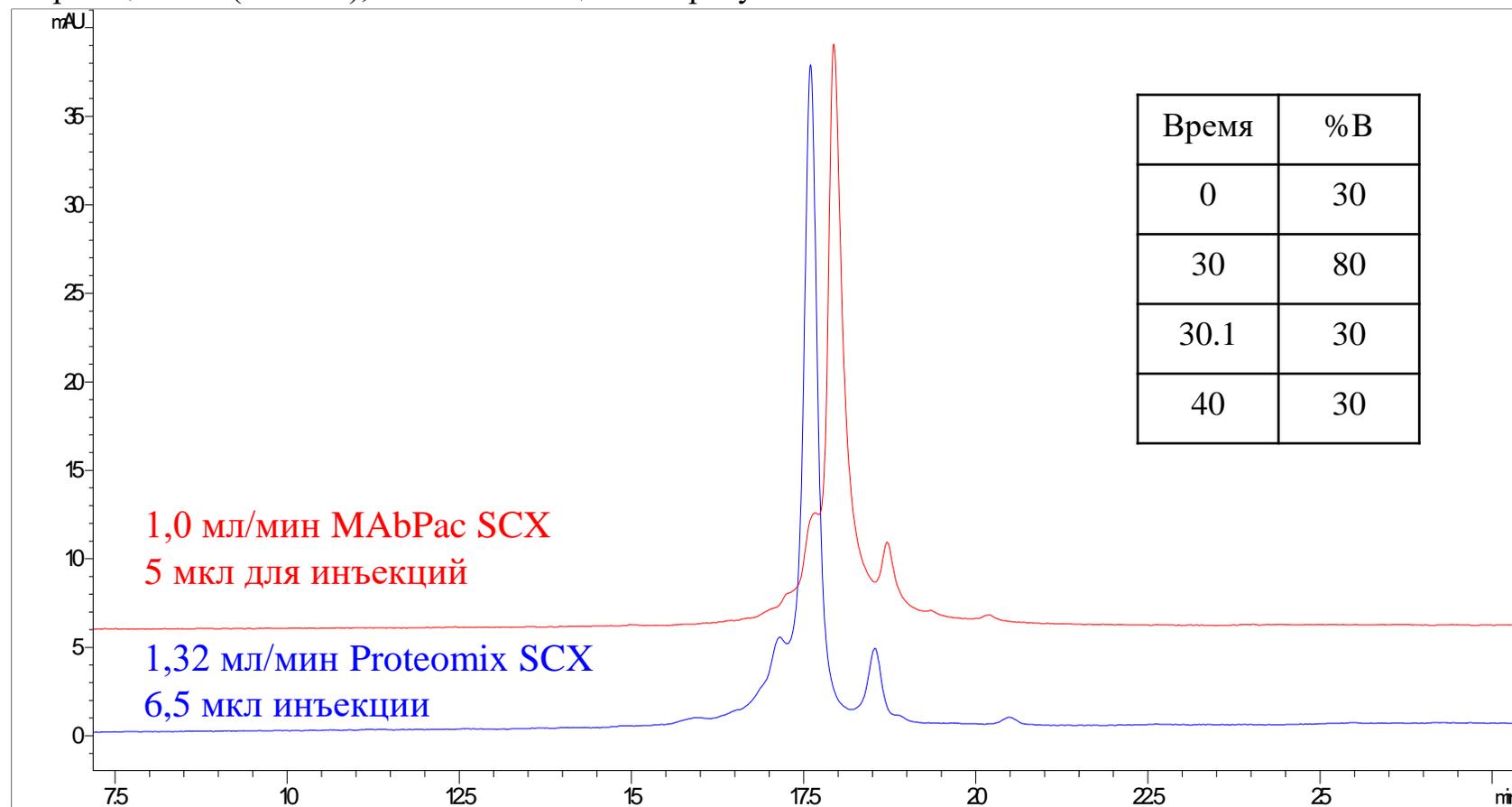
Колонки: см. на рисунке ниже.

Подвижная фаза А: рН-буфер А CX1 (Thermo Scientific) В: рН-буфер В CX1 (Thermo Scientific)

Расход: см. на рисунке ниже.; Детектор: УФ 280 нм;

Температура колонки: 30 °С;

Образец: NIST (2 мг/мл); Объем инъекции: см. рисунок ниже.





NIST Mab анализ на SCX



赛分科技

NIST Mab -Proteomix SCX vs. MAbPac SCX –Солевой градиент

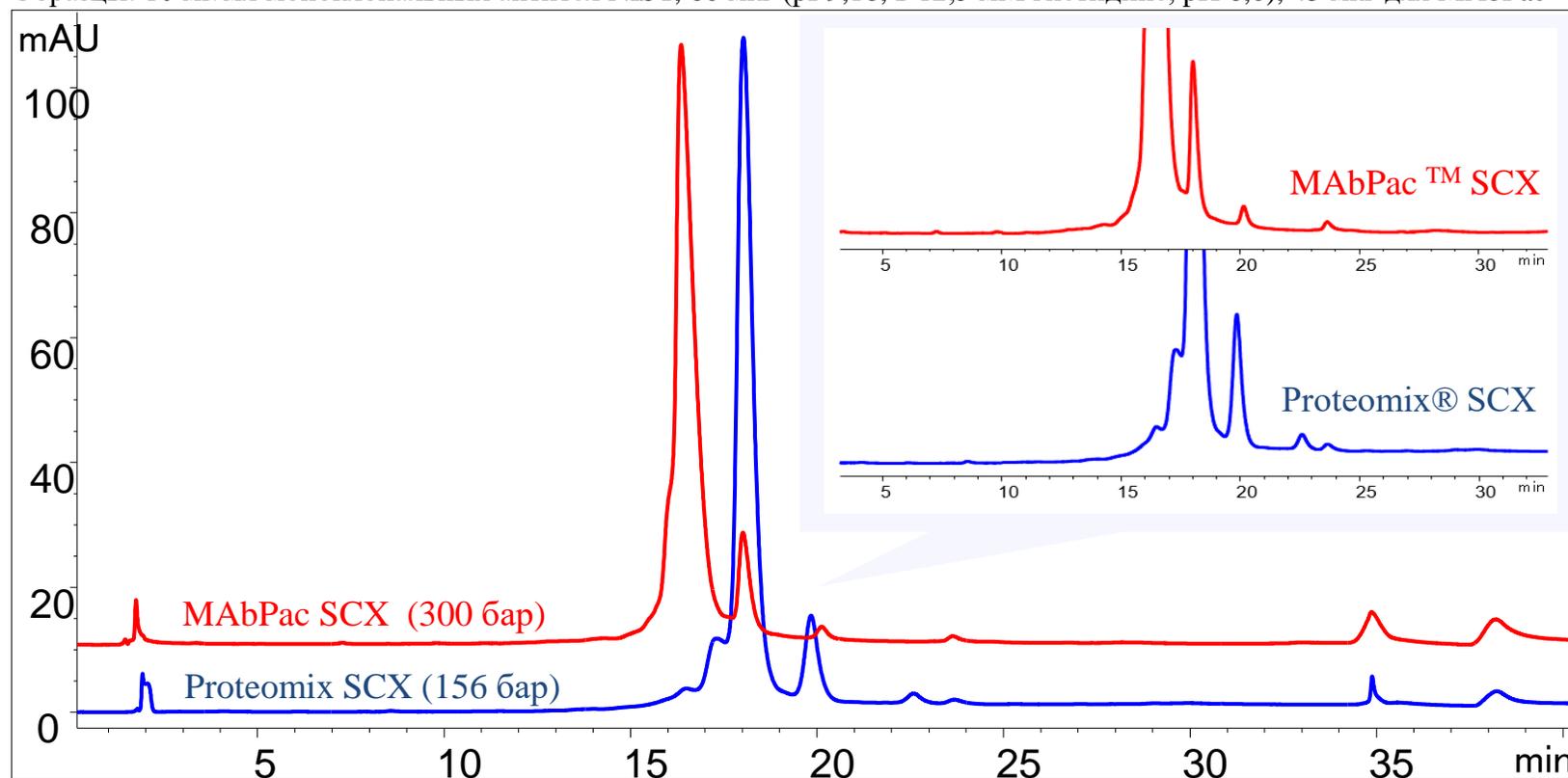
Колонки: Proteomix SCX-NP5 PEEK(5 μ m, 4.6 x 250 mm) , MAbPa SCX

Подвижная фаза: А: 10 мМ фосфат, рН 7,0, Б: А+ 0,5 М NaCl;

Скорость потока: 0,75 мл/мин для MAbPac™ SCX, 1 мл/мин для Proteomix®, Детектор: УФ 280 нм,

Температура колонки: 25 °С,

Образцы: 10 мг/мл моноклональных антител NIST, 60 мкг (рI 9,18, в 12,5 мМ гистидине, рН 6,0), 45 мкг для MAbPac™ SCX.



Время (мин)	В%
2	10
32	23
32.5	100
38	100
38.5	10
60	10

Proteomix® SCX превосходит MAbPac™ SCX во всем диапазоне рН



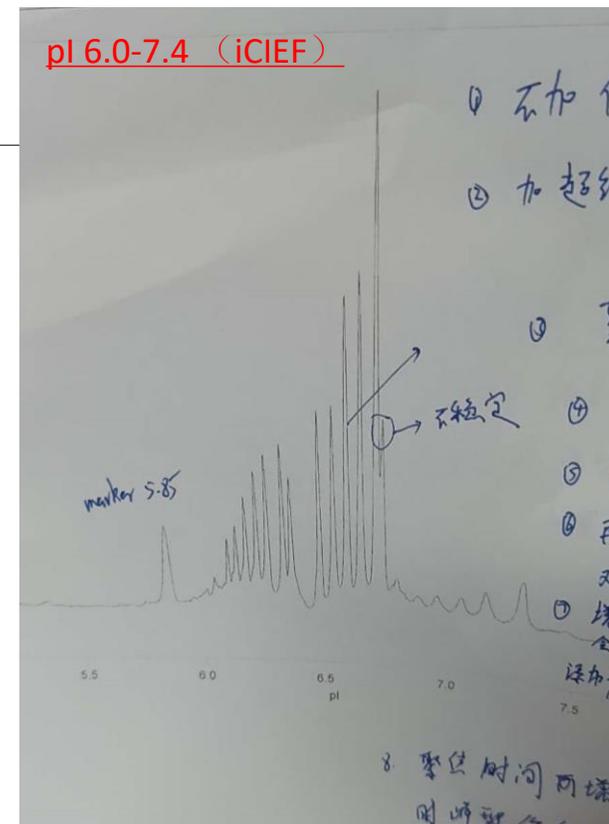
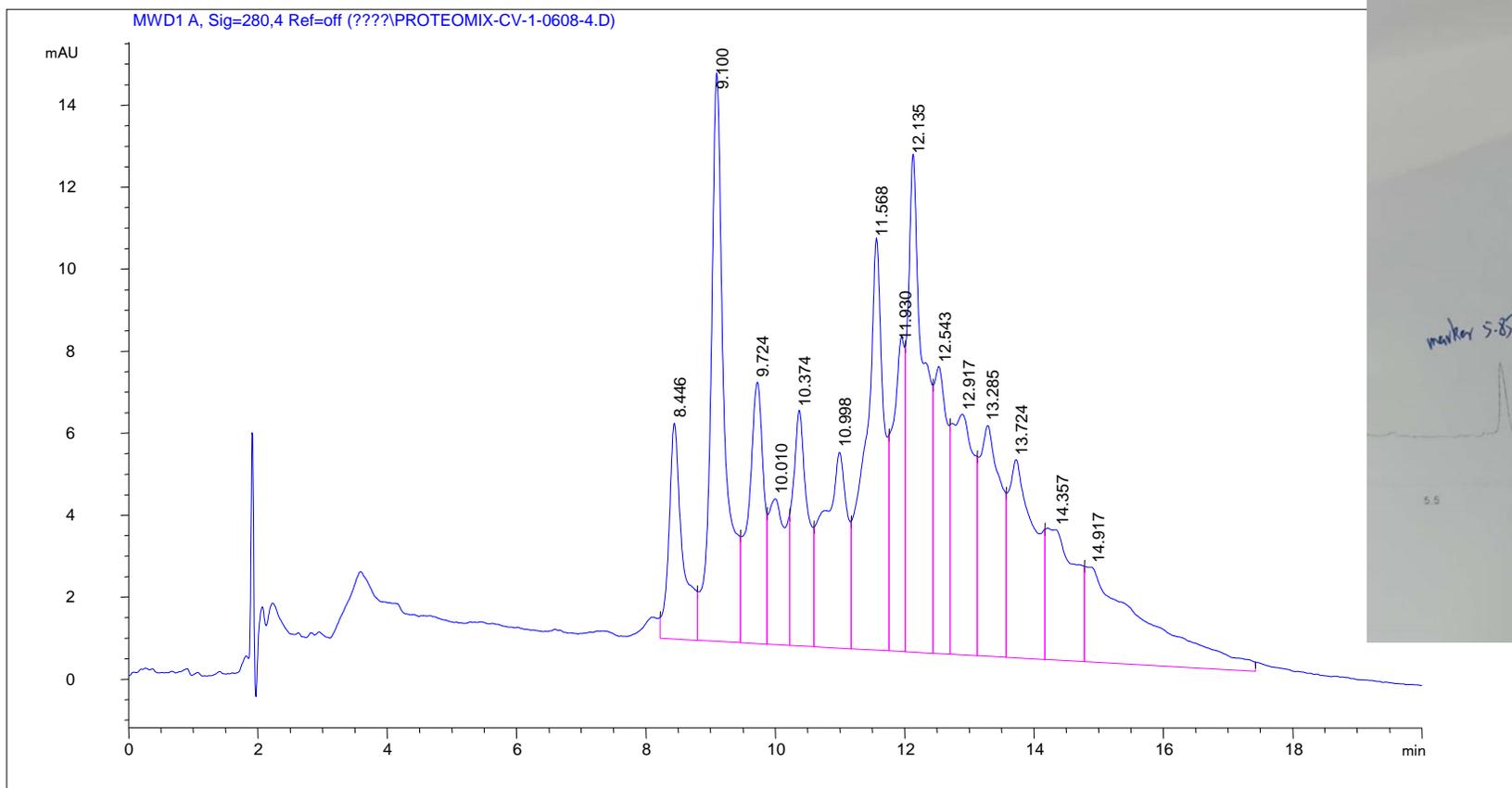
Анализ VsAb — Proteomix CV-1

Колонка: Proteomix CV-1 (5 мкм, 4,6×250 мм)

Мобильная фаза: Скорость потока: 0,8 мл/мин. Детектор: УФ, 280 нм.

Колонка: 30 °С. Объем инъекции: 15 мкл. Образец: белок 2 мг/мл.

Давление в колонке: 186 бар.





Анализ BsAb - Proteomix SCX

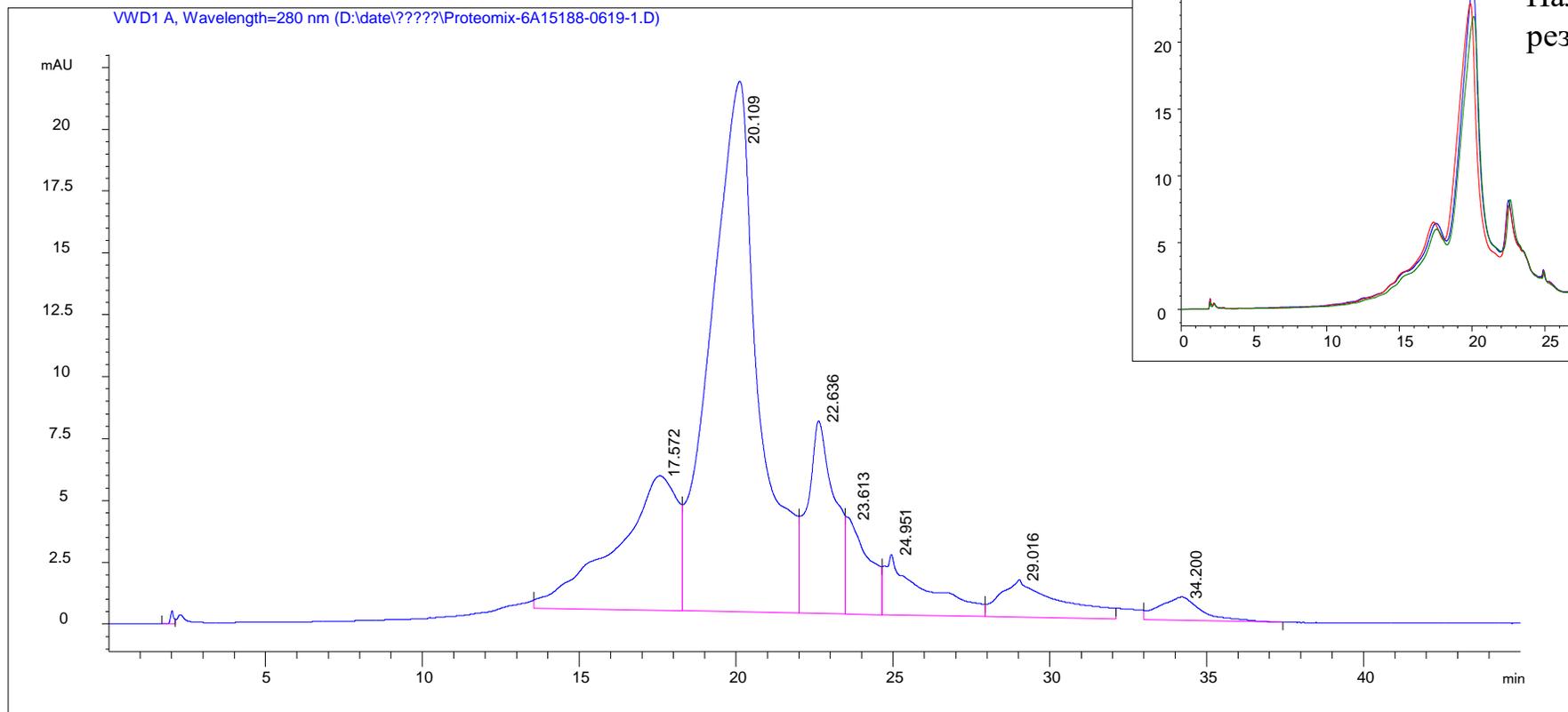


Колонка: Proteomix SCX-NP5 (5 мкм, 4,6×250 мм).

Скорость потока: 0,8 мл/мин.

Детектор: УФ, 280 нм. Температура колонки: 30 °С. Объем инъекции: 10 мкл.

Образец: 4,8 мг/мл. Давление в колонке: 131 бар.





Хранение колонок IEX :

При ежедневном использовании хроматографическую колонку Sepax IEX можно хранить в подвижной фазе А указанной в инструкции на колонку. Если он не используется в течение длительного времени, рекомендуется добавить 0,1% NaN₃ в фазу А для хранения, чтобы предотвратить рост бактерий.

Очистка колонки IEX :

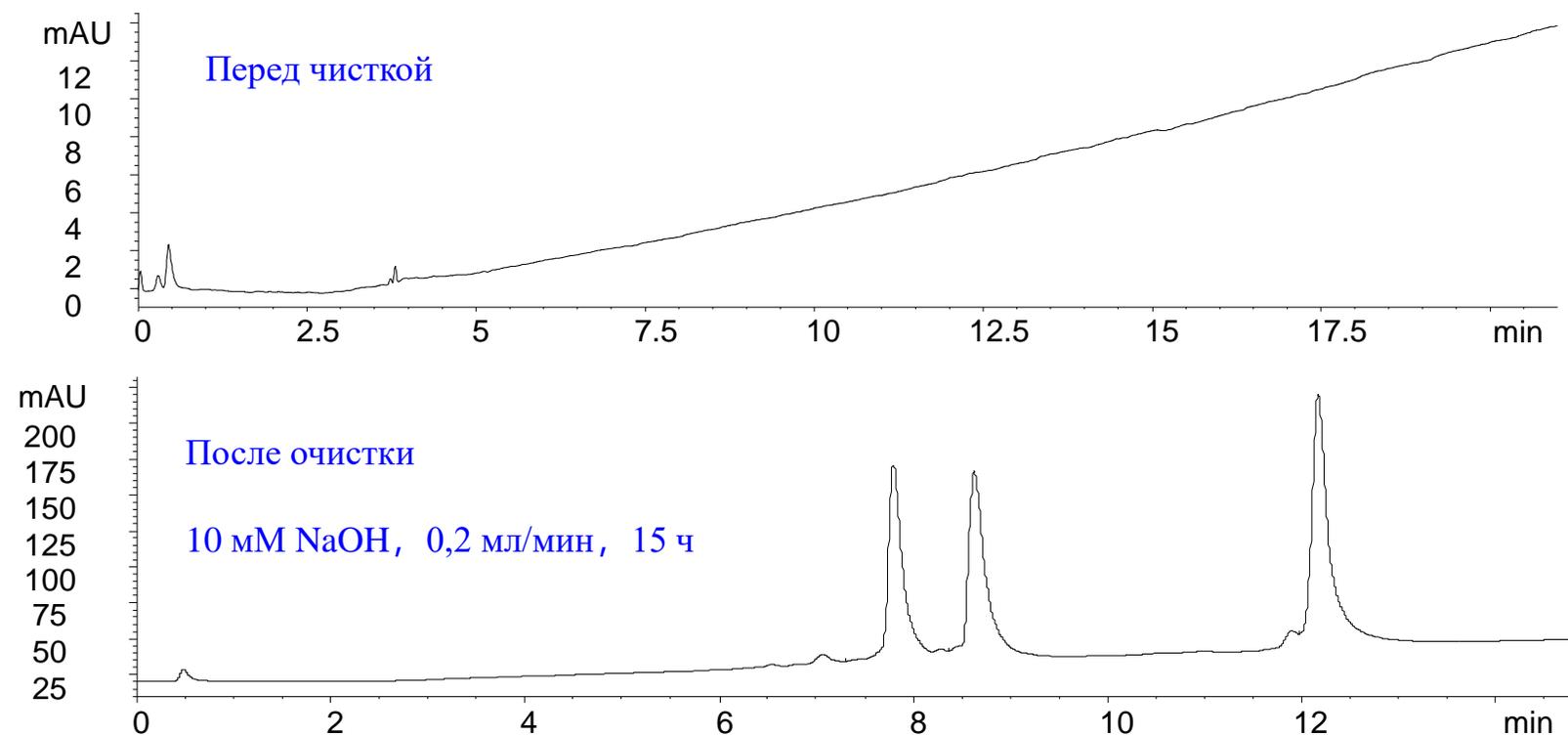
После многократного использования некоторые образцы могут адсорбироваться на входном фильтре или сорбенте. Промывайте колонку по мере необходимости. Общий процесс заключается в отсоединении детектора и обратном подключении колонки к системе. Промывайте колонку ее 10-15-кратным объемом с чистящим раствором при скорости потока ниже 50 % от максимальной рекомендуемой рабочей скорости потока.

Рекомендуемый чистящий раствор :

- Колонка Proteomix CEX : раствор NaOH с концентрацией менее 10 мМ, 7 М гидрохлорида гуанидина, 10 мМ ЭДТА · 2 Na или 50 мМ фосфатный буферный раствор 1,0 М NaCl (pH 10);
- Колонка Proteomix AEX : 75% раствор ацетонитрила, содержащий 150 мМ нитрата калия (pH 2), 0,1% ТФУ, 1 М HCl, 10 мМ ЭДТА · 2 Na или 6 М мочевины.



До и после очистки Proteomix SCX 10 mM NaOH

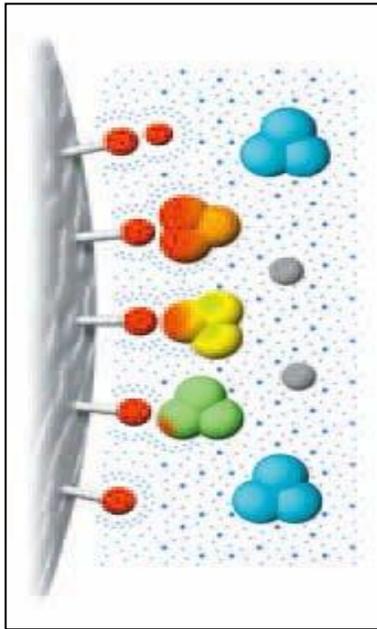


Колонка ИЕХ использовалась для анализа образцов меда. После длительного использования колонки на хроматограмме более не выявлялось никаких пиков. Использовали раствор 10 mM NaOH для очистки колонки. Колонка была регенерирована.

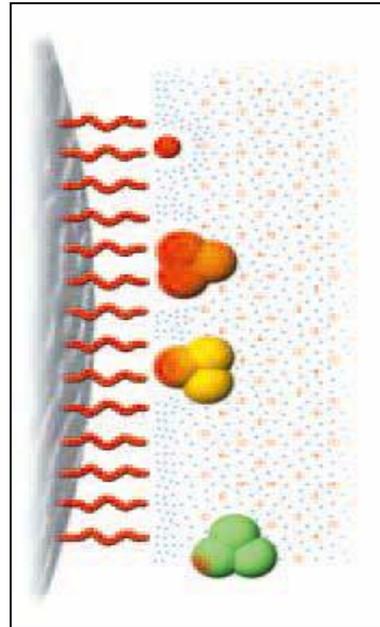


Общее для методов НИС и RP:

Основаны на различиях в гидрофобности каждого компонента и силе взаимодействия между гидрофобными группами в матрице неподвижной фазы.



**Гидрофобная
хроматография (НИС)**



**Обращённо-фазовая
хроматография (RP)**

Разница:

По сравнению с НИС неподвижная фаза RP обладает более сильной гидрофобностью.

Следовательно, при элюировании с RP колонки необходимо использовать органические растворители, такие как метанол, ацетонитрил. При

работе с НИС-колонкой можно элюировать с использованием более мягкой солевой фазы.

Мягкая элюирующая среда может поддержать

стабильность биологических макромолекул.



Proteomix® HIC

Proteomix® HIC Ethyl

Proteomix® HIC Propyl

Proteomix® HIC Butyl

Proteomix® HIC Phenyl

Применение:

- ✓ Анализ и очистка белков и полипептидов (в том числе синтетических полипептидов)
- ✓ Анализ соотношения лекарство-антитело (DAR) для лекарств, связанных с антителами (не денатурированные условия)

Требование к образцу:

- ✓ Целевой аналит и другие компоненты или примеси в образце должны отличаться по гидрофобности
- ✓ Компоненты образца имеют хорошую растворимость в выбранной системе подвижной фазы.

Выбор колонки:

- ✓ Если образец нестабилен в системе органических растворителей, предпочтительным является режим HIC.



Герцептин-цистеин ADC DAR анализ

Колонка: Proteomix HIC Butyl-NP5 (5 мкм, 4,6 x 35 мм)

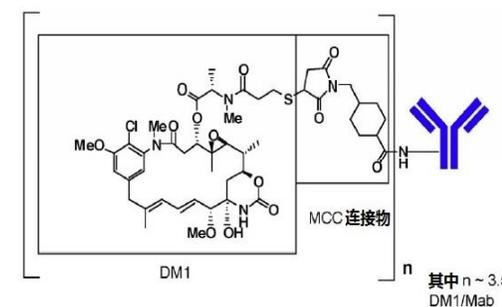
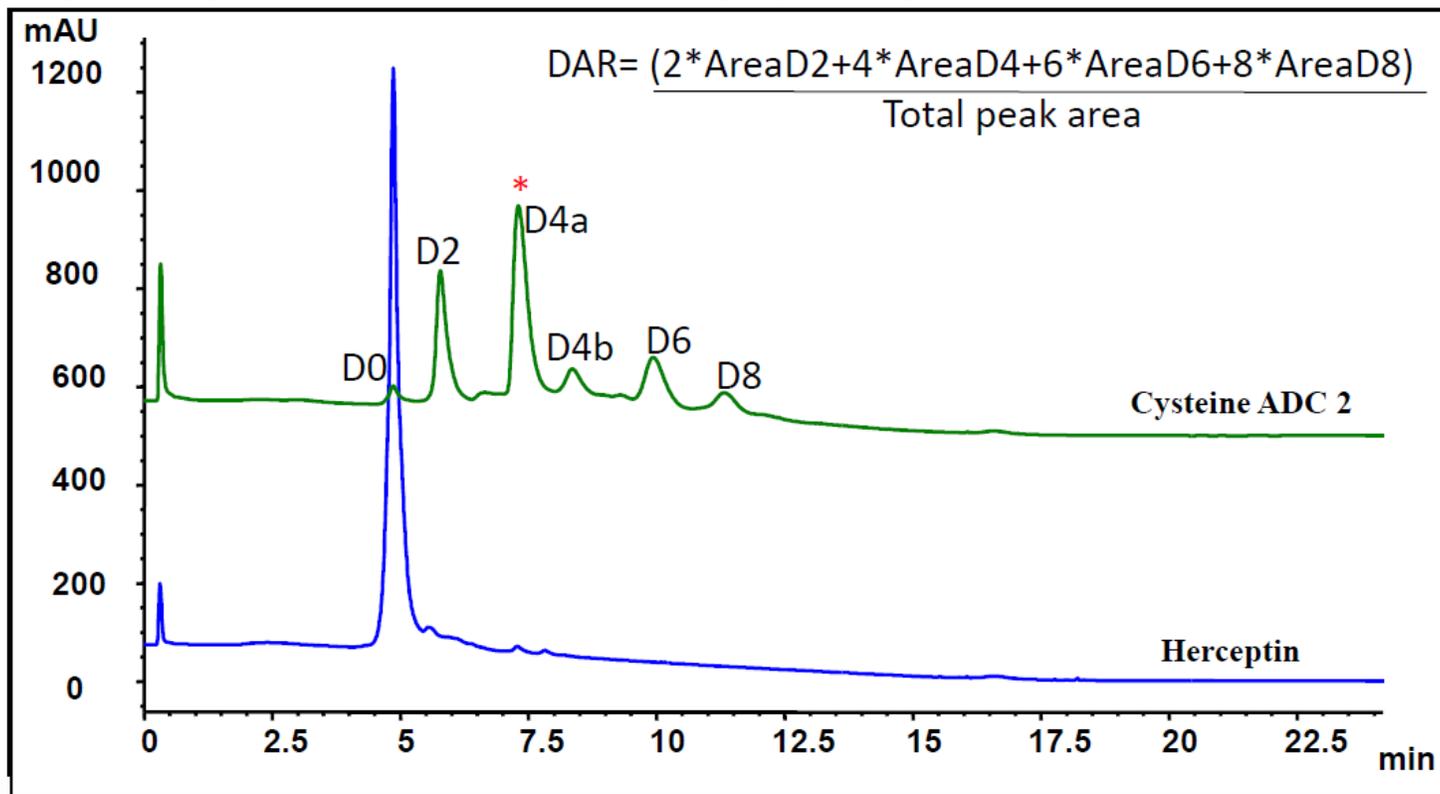
Подвижная фаза: А: 2 М сульфат аммония в 0,025 М фосфате натрия, рН 7,0,

В: 0,025 М фосфат натрия, рН 7,0,

С: 100% IPA.

Скорость потока: 0,8 мл/мин. Детектор: УФ, 214 нм. Температура колонки: 25 °С.

Образец: Герцептин ADC, 1 мг/мл в 25 мМ фосфате натрия. Для инъекций: 10 мкл.



Использование колонки Proteomix HIC Butyl позволяет разделить образцы конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) с различными значениями DAR и использовать их для расчета нагрузки лекарственным средством.



Разделение ADC герцетин-цистеина

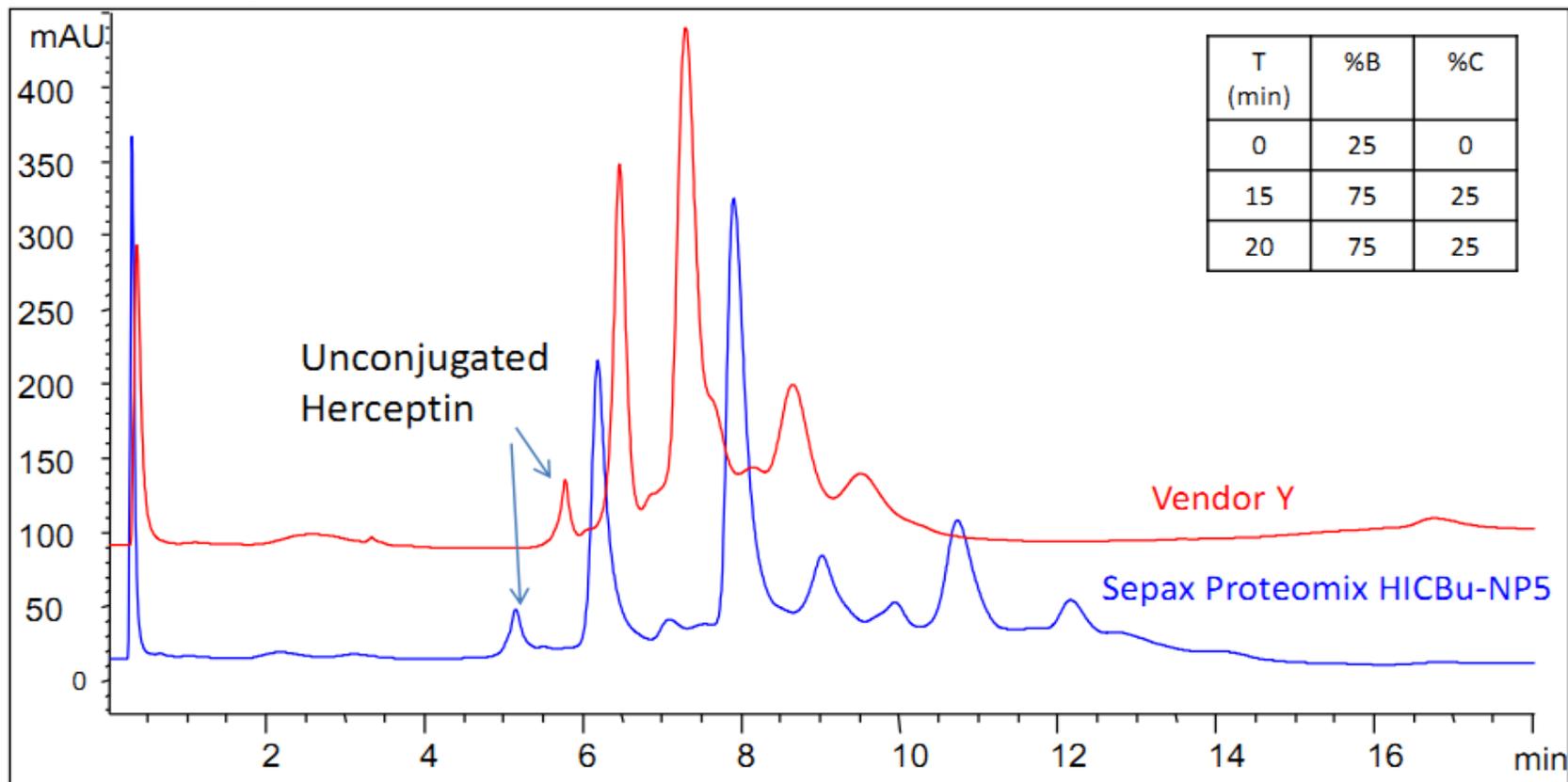
Колонки: Proteomix HIC Butyl-NP5 (5 μ m, 4.6 x 35 mm) VS Vendor Y butyl

Подвижная фаза: А: 2 М сульфат аммония в 0,025 М фосфата натрия, рН 7,0,

В: 0,025 М фосфат натрия, рН 7,0,

С: 100% IPA;

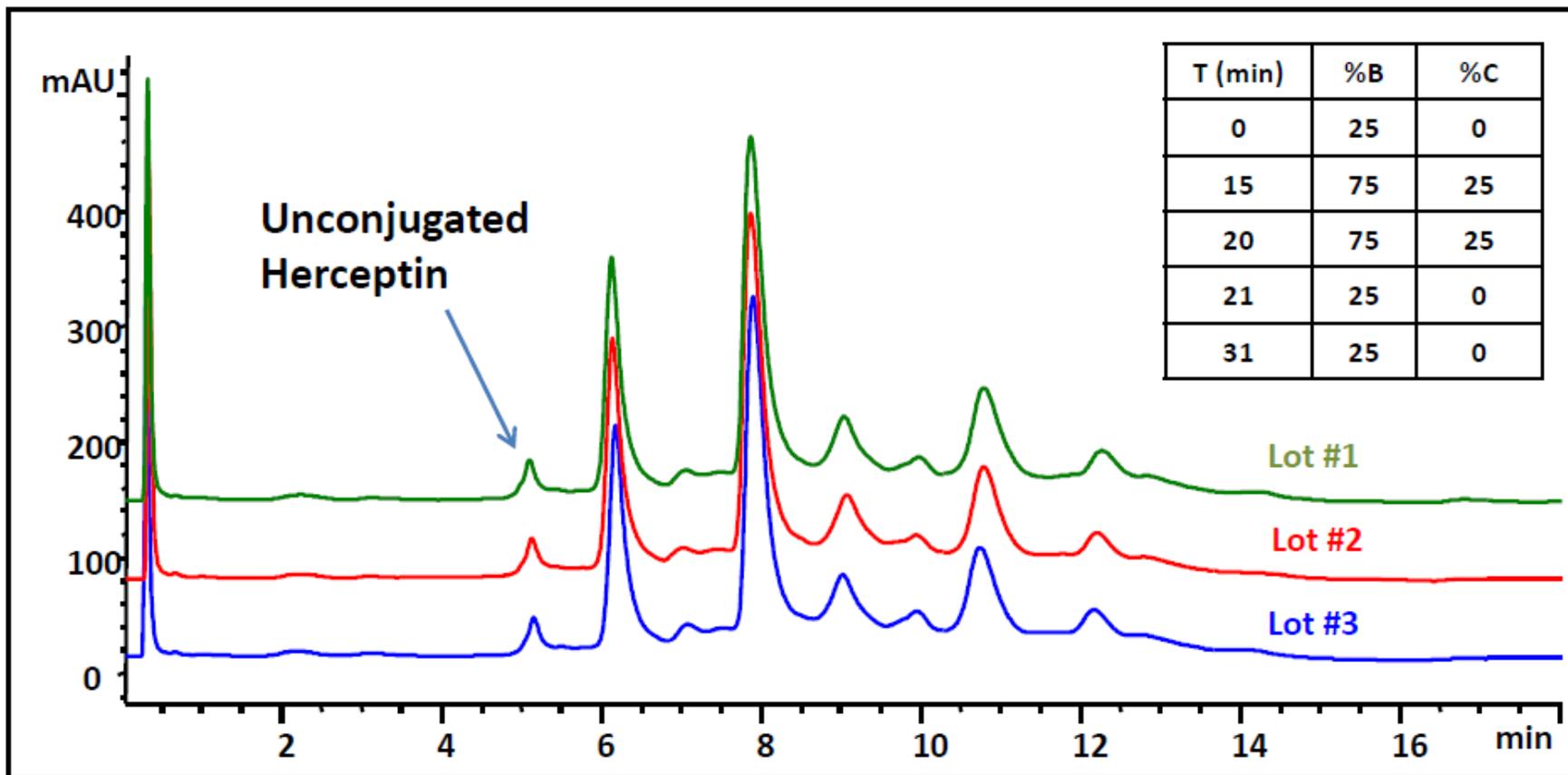
Скорость потока: 0,8 мл/мин. Детектор: УФ, 214 нм. Температура колонки: 25 °С. Образец: ADC, 1 мг/мл в 1М сульфате аммония. Инъекция: 10 мкл.



Сравнение колонок Sepax Proteomix HIC Butyl VS Vendor Y Butyl



Sepax Proteomix HIC Butyl-NP5 для разделения ADC герцептина и цистеина



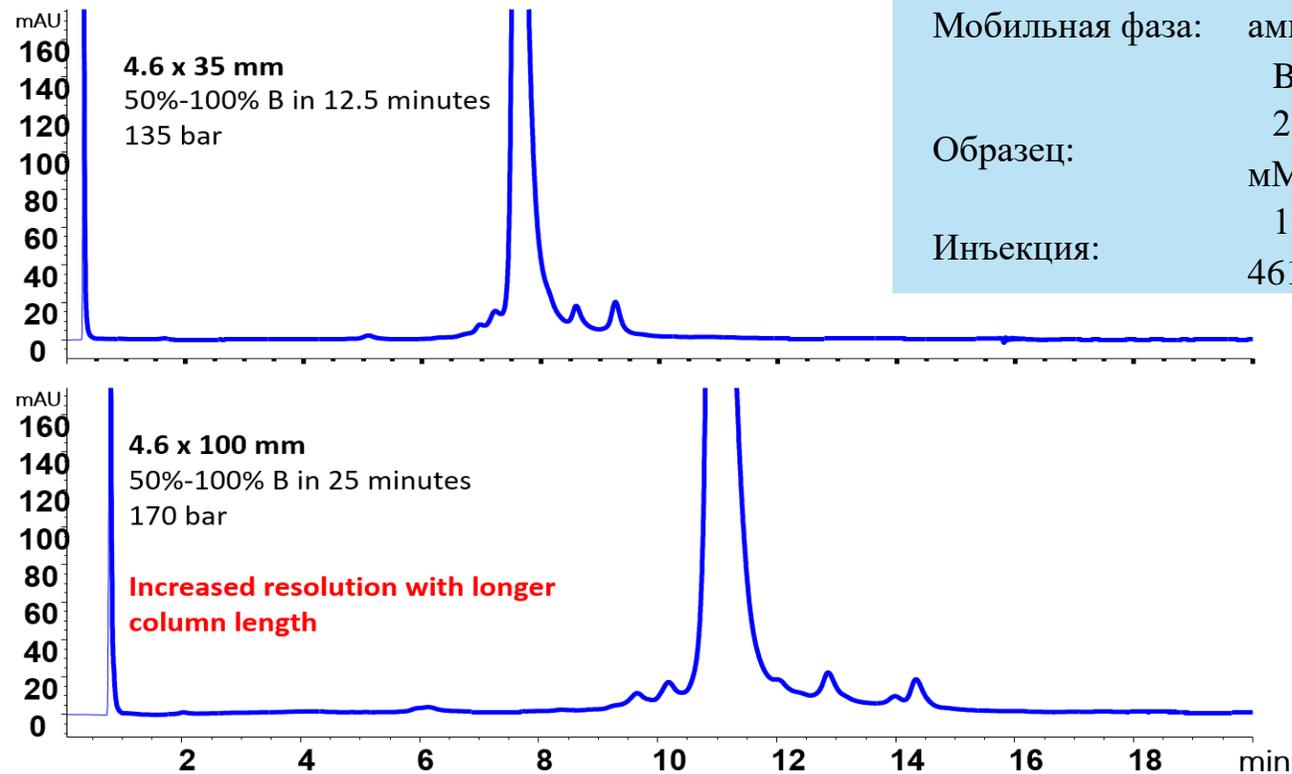
Проверена воспроизводимость трех колонок Proteomix HIC Butyl с сорбентами из разных партий.



Анализ ритуксимаба на Proteomix HIC Butyl



Колонка: Proteomix® HIC Butyl NP5 (4.6 x 35 mm), (4.6 x 100 mm),
Скорость потока: 0.8 мл/мин
Детектор: UV 214 нм
Система: UHPLC
Температура: 25 °C
А: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, 2 М сульфат
Мобильная фаза: аммония, рН 7,0.
В: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,0;
Образец: 2,5 мг/мл ритуксимаба в 500 мМ сульфата аммония, 25 мМ фосфатном буфере
Инъекция: 10 мкг моноклональных антител для 4603, 20 мкг для 4610





Proteomix® RP Полимерная матрица

Proteomix® RP-300 (размер пор: 300 Å)

Proteomix® RP-500 (размер пор: 500 Å)

Proteomix® RP-1000 (размер пор: 1000 Å)

Силикагельная матрица

Bio-C18, C8, C4 (размер пор: 200Å/300 Å)

HP-C18 (работает при 100% водной фазы)

BR-C18 (работает при pH1.5~10.5)

....

Матрица Proteomix RP основана на сильно сшитых полистирол/дивинилбензольных (ПС/ДВБ) микросферах. Гидрофобные взаимодействия достигаются за счет взаимодействия с фенильными и поверхностно-модифицированными алкильными группами.

Преимущества полимерной матрицы:

По сравнению с силикагелем полимерная матрица более пригодна для разделения биологических молекул и имеет широкий диапазон pH (1-14)

Высокая термостойкость: до 80 °C

Селективность и эффективное разделение белковых молекул и их родственных белковых фрагментов, таких как mAb и ADC

Применение RP:

Анализ значения DAR для ADC (полимерная матрица, подвижная фаза органической фазы)

Анализ пептидной карты, анализ содержания низкомолекулярных лекарств и т. д. (силикагель)



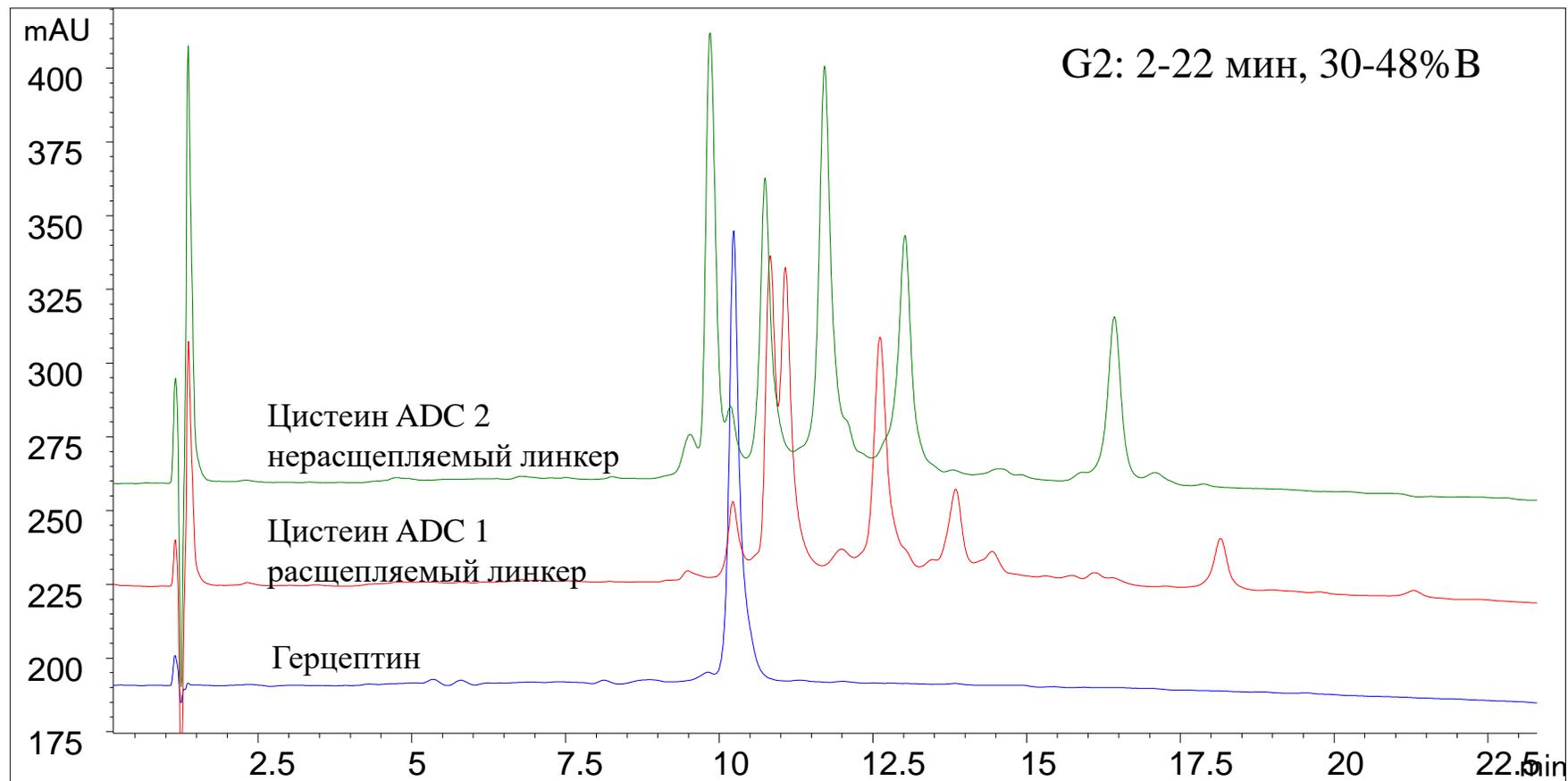
Разделение герцептина и его конъюгатов ADC

Колонка: **Proteomix RP-1000 (5 μ m, 1000 \AA , 4.6 x 100 mm)**

Подвижная фаза: А: 0,1% ТФК в воде; В: 0,1% ТФА в 100% АСN;

Скорость потока: 1,0 мл/мин; Детектор: УФ 210 нм; Температура колонки: 80 °С.

Объем инъекции: 10 мкл. Образец: Герцептин и ADC 1 мг/мл, разведенные в 0,1% ТФА.





Герцептин Цистеин ADC Разделение-MS

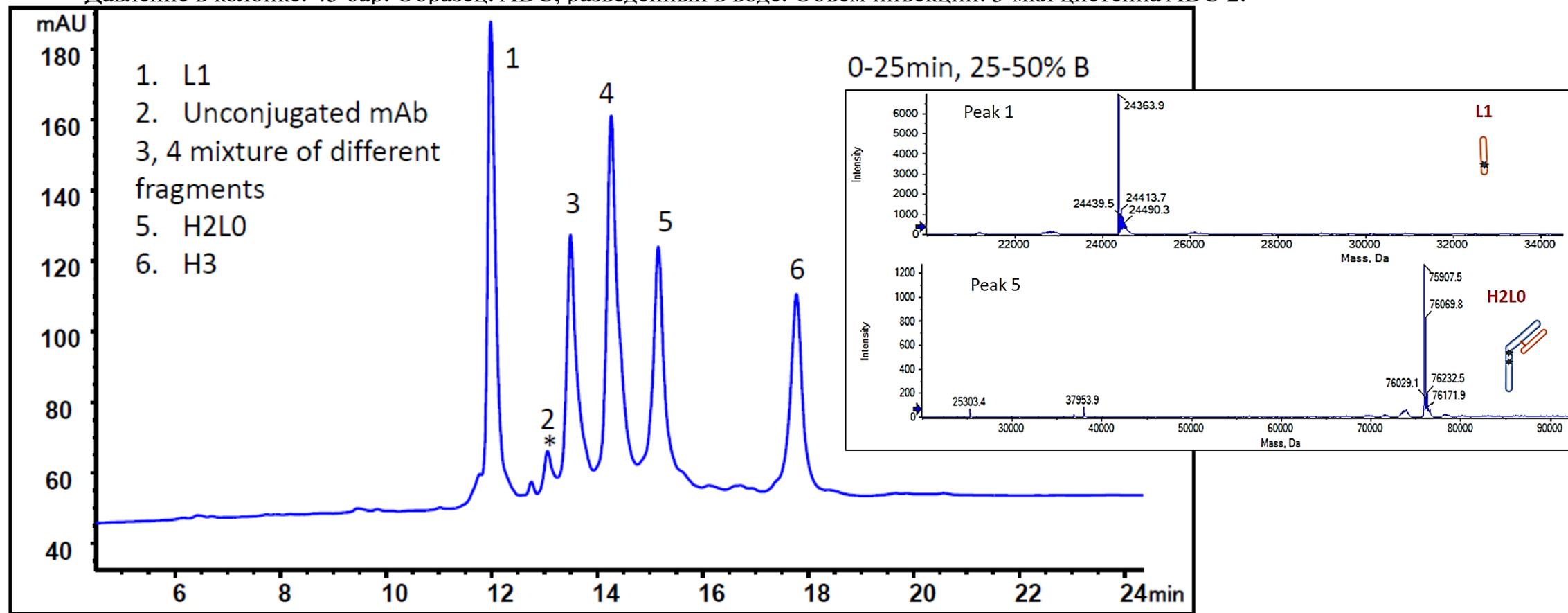
Колонка: Proteomix RP-1000 (5 μ m, 1000 \AA , 2.1 x 50 mm)

Подвижная фаза: А: 0,1% TFA в воде

В: 0,1% TFA в 100% ACN

Скорость потока: 0,4 мл/мин. Детектор: УФ 210 нм-МС. Температура колонки: 80 °С;

Давление в колонке: 45 бар. Образец: ADC, разведенный в воде. Объем инъекции: 3 мкл цистеина ADC 2.





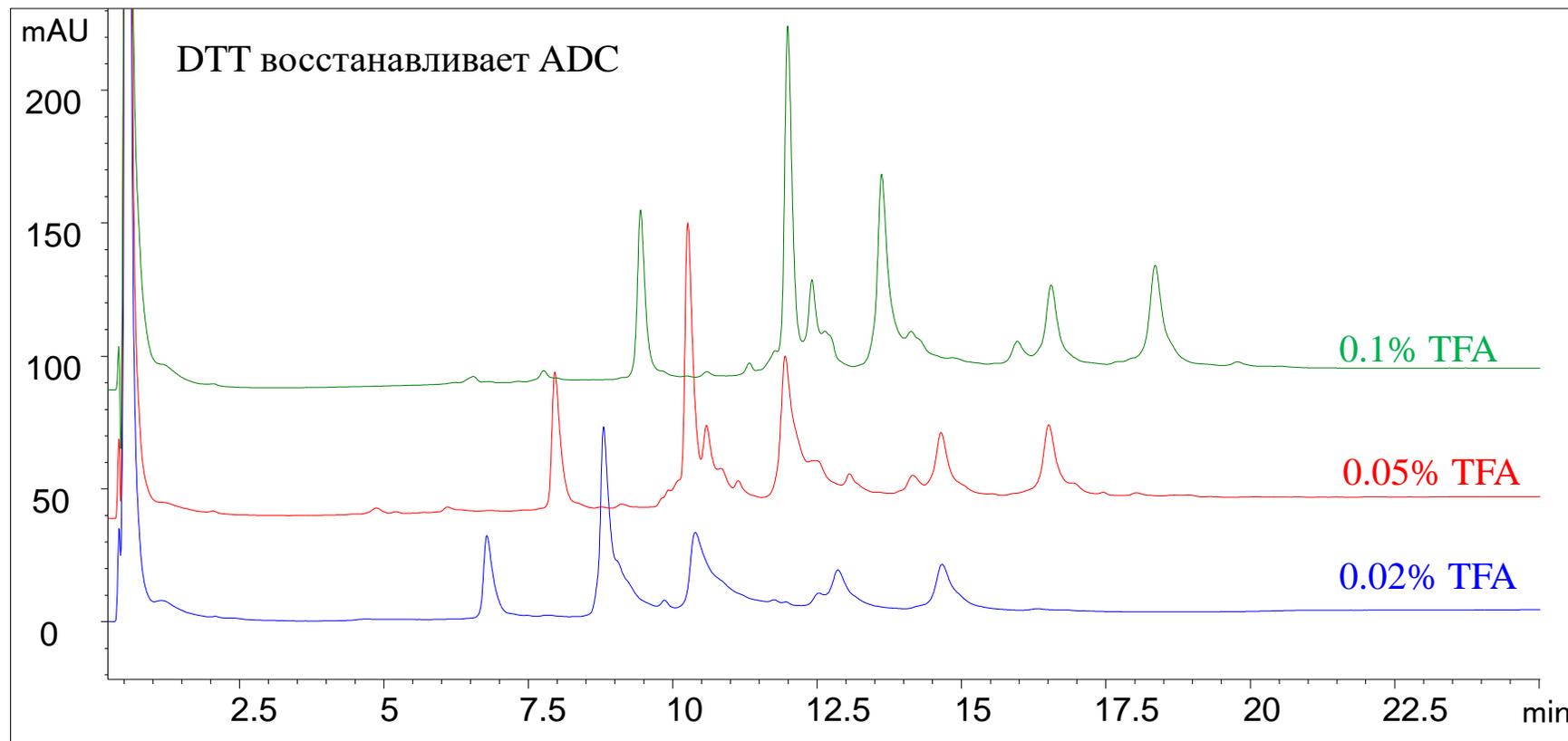
Влияние TFA на разделение фрагментов ADC

Колонка: Proteomix RP-1000 (5 μm , 1000 \AA , 2.1 x 50 mm)

Подвижная фаза: А: X % TFA в воде; В: X% TFA в 100% ACN;

Скорость потока: 0,4 мл/мин; Детектор: УФ 214 нм; Температура колонки: 80 °С; Давление в колонке: 45 бар;

Инъекции: 3 мкл для анализов DTT со сниженным содержанием герцептина и цистеина ADC 0,1 и 0,05% TFA, 2 мкл для 0,02% TFA.



В условиях обращенной фазы более высокое содержание TFA позволяет лучше разделять образцы ADC, что значительно повышает эффективность и разрешение колонки.



Влияние температуры колонки на разделение ADC



赛分科技

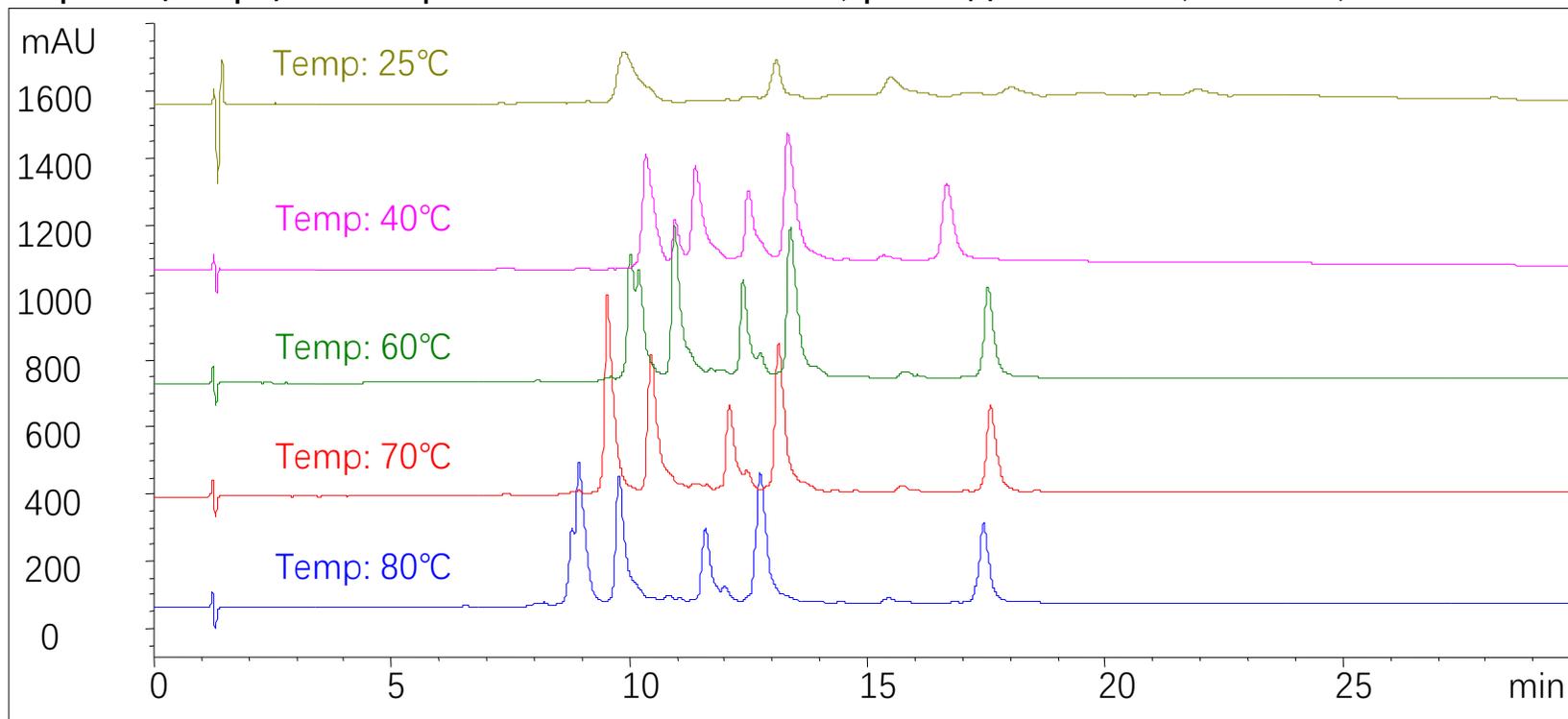
Колонка: Proteomix® RP-1000 (5 μm , 1000 \AA , 4.6 x 100 mm);

Подвижная фаза: А: 0,1% ТФК в воде;

В: 0,1% TFA в 100% ACN;

Скорость потока: 1,0 мл/мин. Детектор: УФ, 210 нм. Температура колонки: 25–80 °С;

Образец: Герцептин Цистеин ADC 2 1 мг/мл, разведенный в 0,1% TFA; Объем инъекции: 20 мл.



Время (мин)	В%
0	32
2	32
22	48

Повышение температуры способствует изменениям конформации белка.

Данные конформационные эффекты увеличивают четкость пиков.



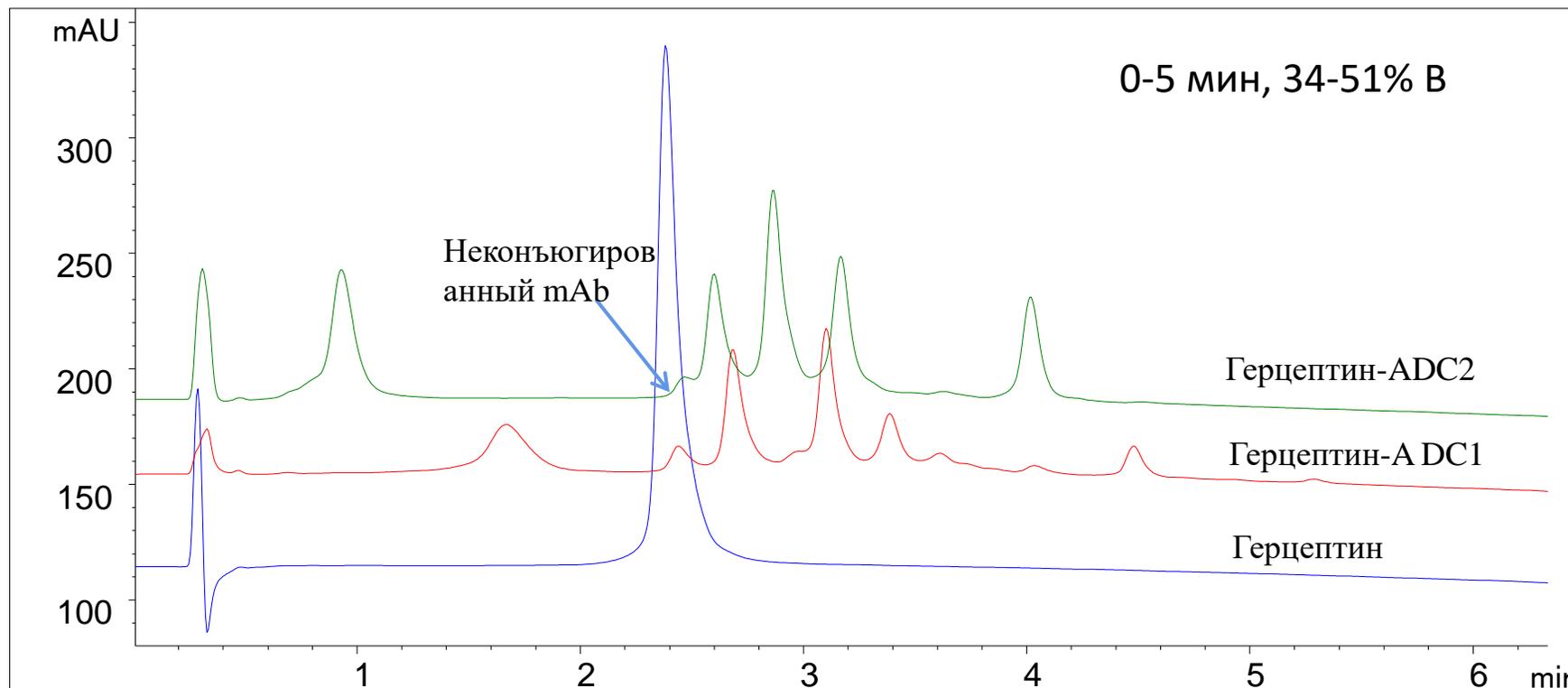
Герцептин и его ADC-быстрый анализ

Колонка: **Proteomix RP-1000 (5 μ m, 1000 \AA , 2.1 x 50 mm)**

Подвижная фаза: А: 0,1% TFA в воде; В: 0,1% TFA в 100% ACN;

Скорость потока: 0,6 мл/мин; Детектор: УФ 210 нм; Температура колонки: 80 °С; Давление в колонке: 70 бар;

Образец: Герцептин, АЦП 1 и АЦП 2; Объем инъекции: 0,5 мкл для Герцептина, 1 мкл для ADC 1 и ADC 2.



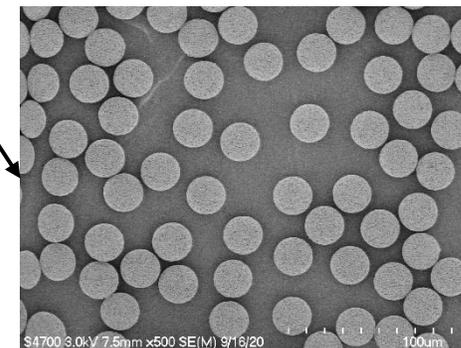
Proteomix RP-1000 быстрый анализ ADC образца



Аффинная колонка- ProAqa Excel

ProAqa Excel техническая спецификация

ProAqa Excel	Технические особенности
Матрица	PS/DVB(20 мкм, 1000-2000 Å)
Лиганд	Рекомбинационный Protein A
Размер (внутренний диаметр × длина)	2.1 мм × 30 мм
Материал колонки	PEEK или нержавеющая сталь
Максимальное давление	200 бар
Диапазон pH	1.2-13.0
Максимальная скорость потока	5 мл/мин
Рекомендуемый расход	1-3 мл/мин
CIP	0.1 М NaOH
Связывающий буфер pH	6.6-7.5
Срок службы	>2000 инъекция
Стандартная инъекция	10 мкл
Концентрация обнаружения IgG	0.029-40 мг/мл*
Предел обнаружения	0.29 мкг



ProAqa Excel СЭМ-изображение,
20 мкм,
D90/D10<1.3

(*UV 280 нм: 0.029 -7.500 мг/мл, UV 300 нм: 0.117-40.000 мг/мл)



Колонка ProAqa Excel

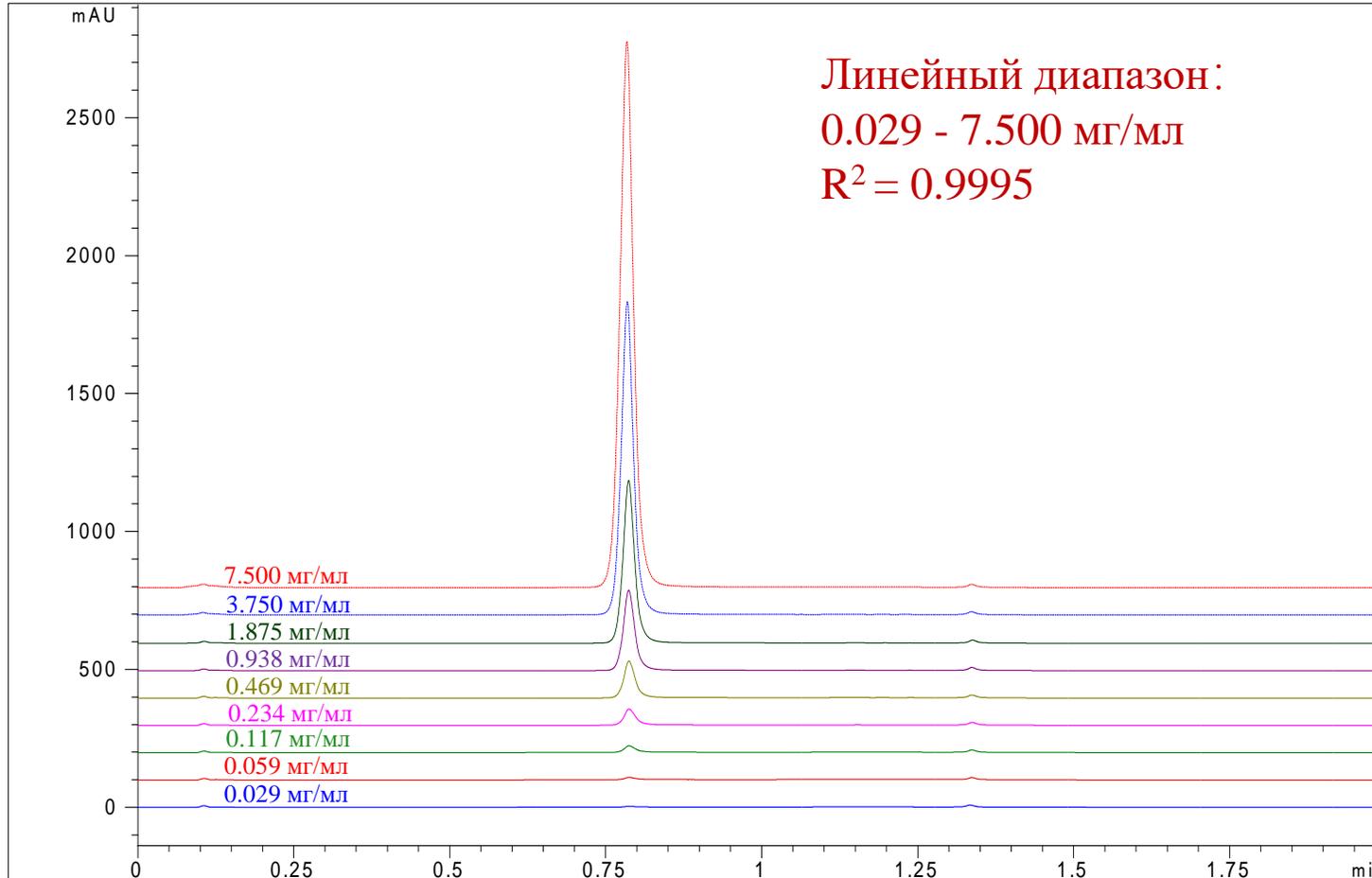
Эта колонка специально разработана для быстрого и точного количественного определения антител во время скрининга клеточных линий или оптимизации биопроцессов и контроля качества. Сорбент состоит из матрицы из однородного PS/DVB со средним размером частиц 20 мкм и размером пор 1000-2000 Å и пришитым рекомбинантным белком А - лигандом, который может связываться с Fc-содержащими иммуноглобулинами, отличными от IgG3, и подходит для определения содержания Fc-иммуноглобулина в супернатанте культуры клеток CHO на разных уровнях.

Быстрое определение количества антител

- Скорость потока до 3 мл/мин
- Общее время цикла (включая балансировку) может составлять менее 0,5 мин.
- Диапазон линейного ответа до 40 мг/мл:
 - UV 280 нм: 0.029 - 7.50 мг/мл, LOD 0.294 мкг
 - UV 300 нм: 0.117 - 40.0 мг/мл
- Срок службы: > 2000 инъекций
- Превосходная воспроизводимость между партиями
- Совместимость с системами HPLC, UPLC и FPLC.



Линейный диапазон и предел обнаружения колонки ProAqa Excel — UPLC



Время (мин)	%В
0	0
0.1	0
0.11	100
0.60	100
0.61	0
2.00	0



ProAqa Excel

Колонка: ProAqa Excel 2.1 × 30 mm

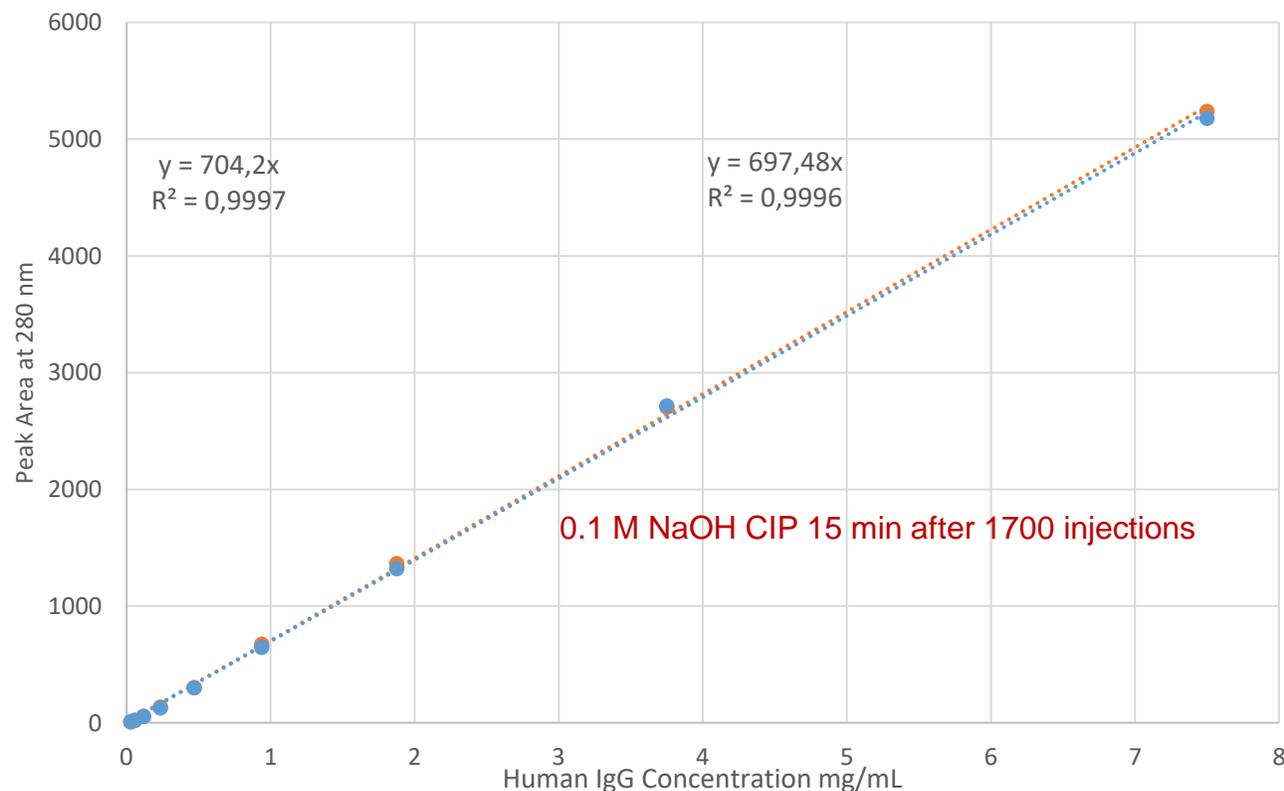
Анализатор: Agilent 1260; Температура: 25 °C;

Подвижная фаза: А: 50 mM фосфат натрия, 150 mM NaCl, pH 7,0; Б: 100 mM глицин, pH 2,5;

Скорость потока: 1 мл/мин; Длина волны обнаружения: 280 нм;

Образец: раствор hIgG; Инъекция: 10 мкл

ProAqa Excel durability and linear range studies



Инъекция #	Концентрация (мг/мл)
1	0.029
2	0.059
3	0.117
4	0.234
5	0.469
6	0.938
7	1.875
8	3.750
9	7.500

RT(мин)	%В
0	0
0.10	0
0.11	100
0.60	100
0.61	0
2.00	0

Как показано на рисунке, калибровочная кривая hIgG не имеет существенных изменений.

Колонка по-прежнему сохраняет превосходную линейность.



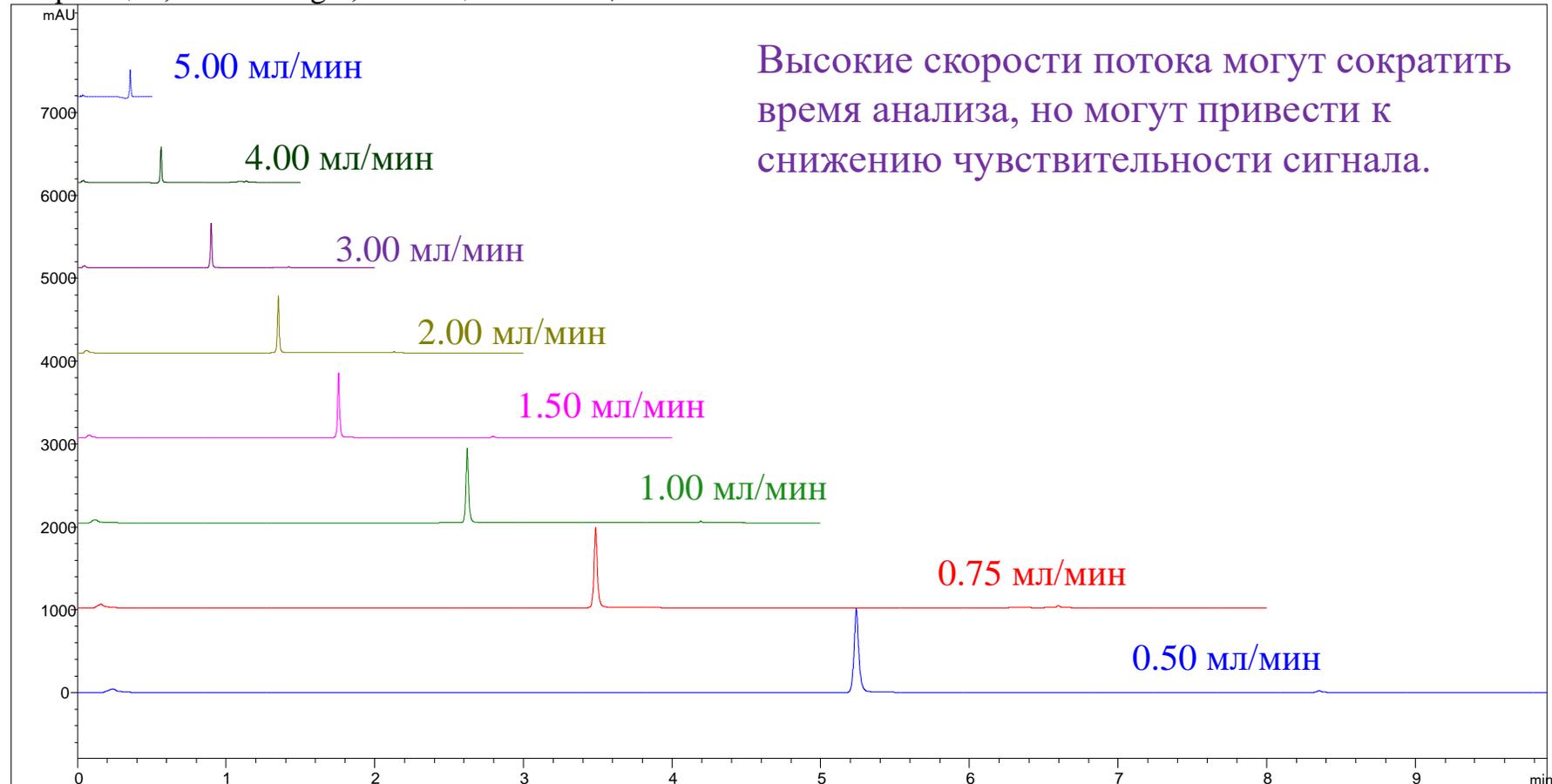
Исследование скорости потока ProAqa Excel

Колонка: ProAqa Excel 2.1×30 mm SS; Анализатор: Agilent 1260; Температура: 23 °C;

Подвижная фаза: А: 50 mM фосфат натрия, 150 mM NaCl, pH 7,0, В: 100 mM глицин, pH 2,5;

Скорость потока: как показано ниже на графике; Длина волны обнаружения: 280 нм;

Образец: 2,0 мг/мл hIgG; инъекция: 10 мкл;



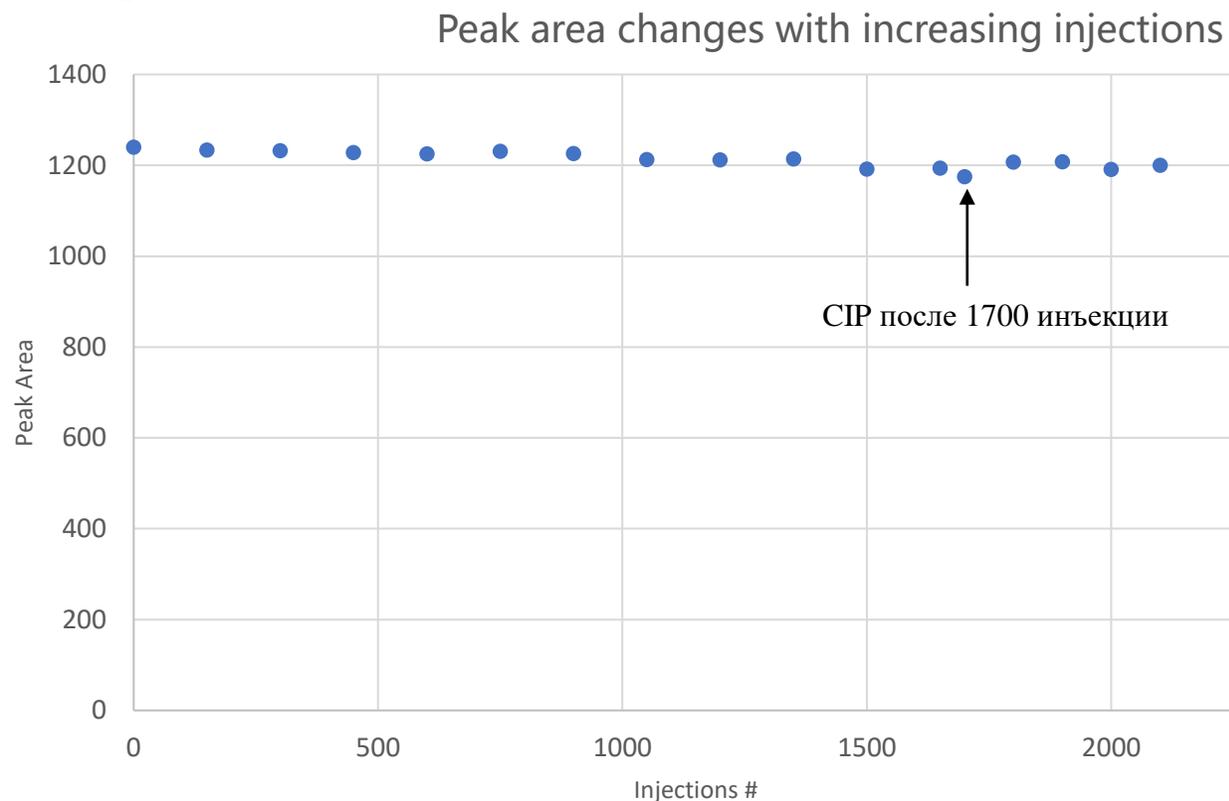


ProAqa Excel

Тест ProAqa Excel на срок службы

Column: ProAqa Excel 2.1 × 30 mm; Анализатор: Agilent 1260; Температура: 25 °C;
 Подвижная фаза: А: 50 mM фосфат натрия, 150 mM NaCl, pH 7,0; Б: 100 mM глицин, pH 2,5;
 Скорость потока: 1 мл/мин; Длина волны обнаружения: 280 нм;
 Образец: раствор hIgG; Инъекция: 10 мкл

Инъекция #	Площадь пика	Изменение %
0	1240	100.0
150	1234	99.5
300	1232	99.4
450	1228	99.0
600	1225	98.8
750	1231	99.3
900	1226	98.9
1050	1213	97.8
1200	1212	97.7
1350	1214	97.9
1500	1192	96.1
1650	1194	96.3
1700	1175	94.8
1800	1207	97.3
1900	1208	97.4
2000	1191	96.0
2100	1200	96.8



RT(мин)	%B
0	0
0.10	0
0.11	100
0.60	100
0.61	0
2.00	0

Колонка очень стойкая – не происходит существенных изменений времени удерживания, площади пика и его симметрии после 2100 инъекций (при использовании 0,1 М NaOH CIP через 15 минут после 1700 инъекций)

Добро пожаловать в Серах



Спасибо за просмотр!

Дополнительная информация о Sepax:
tarasova@sysbiosyn.ru

