

Agilent イオン交換 BioHPLC カラム

高速かつ確実な タンパク質アイソフォーム分析を実現

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

タンパク質アイソフォーム分析カラムの 選択肢が増えました。

イオン交換 (IEX) は、タンパク質やバイオ医薬品の分離に用いられる重要なテクニックです。SEC と同様、IEX もネイティブ状態のタンパク質の分離に使用できます。また、そうしたタンパク質の精製および分離のための分取テクニックとしても有効です。

抗体の生成および精製時には、アミノ酸置換、グリコシル化、リン酸化、その他の翻訳後修飾や化学修飾により、抗体の電荷均一性に変化が生じることがあります。

タンパク質の分析では、特定の pH における電荷の変動は、分子の一次構造が変化したことを示しています。こうした構造の変化により、分析対象のタンパク質に別の形態が生じます。これらはアイソフォーム (または電荷変異体) と呼ばれ、IEX クロマトグラフィーにより分離することができます。

このような変化は安定性と活性に影響を与えることがあるほか、免疫上マイナスの反応を引き起こすこともあるため、アイソフォームの分析はバイオ医薬品にとってきわめて重要です。

アジレントは、イオン交換 BioHPLC カラムファミリーにより、生体分子の分離と分析を支援しています。

目標が新たなバイオ医薬品の分析でもターゲットタンパク質の分離でも、アジレントなら、タンパク質のアイソフォームの分離や分析に伴う難問を解決することができます。

アジレントのイオン交換 BioHPLC カラムは、以下の利点が得られるように設計およびテストされています。

- ・優れた効率と再現性
- ・高速かつ高分離能の分離
- ・堅牢性の高いメソッド
- ・さまざまなボアサイズを取り揃えることにより、あらゆるサイズのタンパク質およびアイソフォームを効率的に分離
- ・複雑なサンプルでもカラムの汚染を最小限に抑制

安全で効果の高い医薬品を提供するためには、品質と一貫性が欠かせません。バイオ医薬品業界を支えるメーカーとして、アジレントは、最高の分離能とスピード、再現性を提供するカラムを通じて、医薬品の迅速かつ効率的な開発をサポートします。

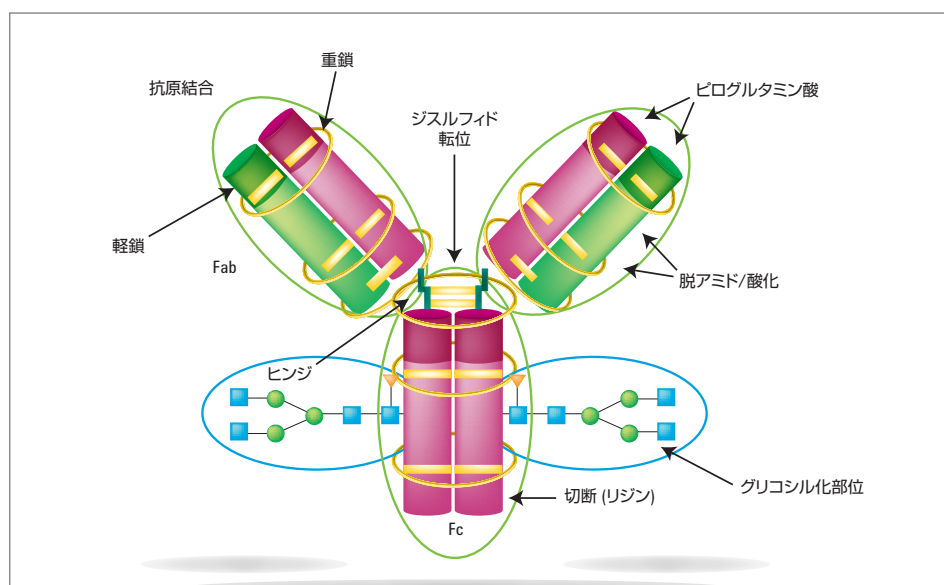


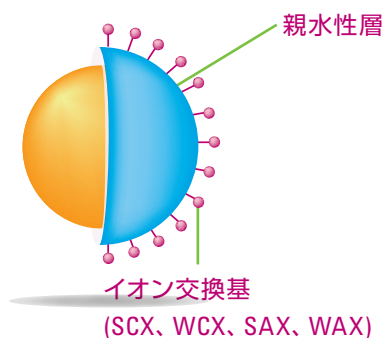
図 1. モノクローナル抗体のアイソフォームは、さまざまなレベルのアミノ酸のグリコシル化、脱アミド、酸化や、重鎖のリジン切断により生じます。

目次：最先端の生体分子アプリケーションに対応する、イオン交換 BioHPLC カラム

タンパク質とペプチド – Agilent Bio IEX カラム	4
モノクローナル抗体 – Agilent Bio MAb カラム	8
マクロ生体分子分離 – Agilent バイオモノリスカラム	12
合成オリゴヌクレオチド – Agilent PL-SAX カラム	14
さまざまな生体分子および溶質 – Agilent PL-SCX カラム	16
製品情報	18
生体分子アプリケーション用の LC 機器およびソフトウェア	22

タンパク質、ペプチドなどの電荷ベースの 高分離能分離に対応

Bio IEX 粒子



非多孔質ポリマー性のイオン交換粒子を充填した Agilent Bio IEX HPLC カラムは、ペプチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質の高回収率で高効率な分離を実現します。

- **正確な分析結果**：高架橋の硬質非多孔質ポリスチレンジビニルベンゼン粒子が親水性のポリマー層に接しているため、非特異的な結合が生じません。
- **優れたスピードと分離能**：小さい粒子、被膜、交換基には高压に対する優れた耐性があります。
- **カラムキャパシティの向上**：親水性層にイオン交換基が結合し、均一で細密に充填され、キャパシティが向上しています。
- **堅牢なメソッド**：Agilent Buffer Advisor ソフトウェアおよび 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC と併用すると、堅牢なメソッドが実現します。
- **完璧な分離を実現する選択肢**：4 種類のイオン交換 (WCX、WAX、SCX、SAX) により、あらゆるタンパク質の分離に対応できます。

小さい粒子と短いカラムにより、分析の高速化を実現 –
分離スピードが 30 % 向上

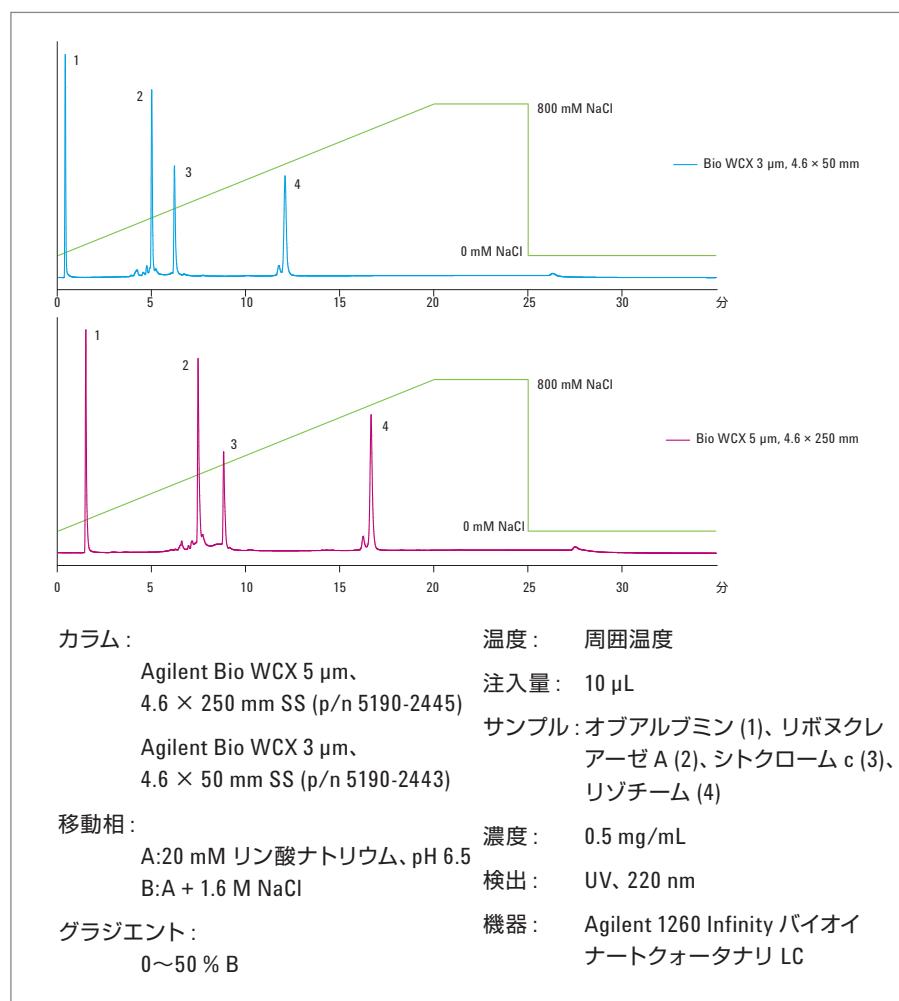
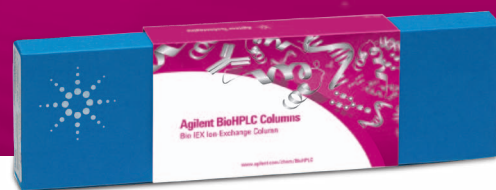
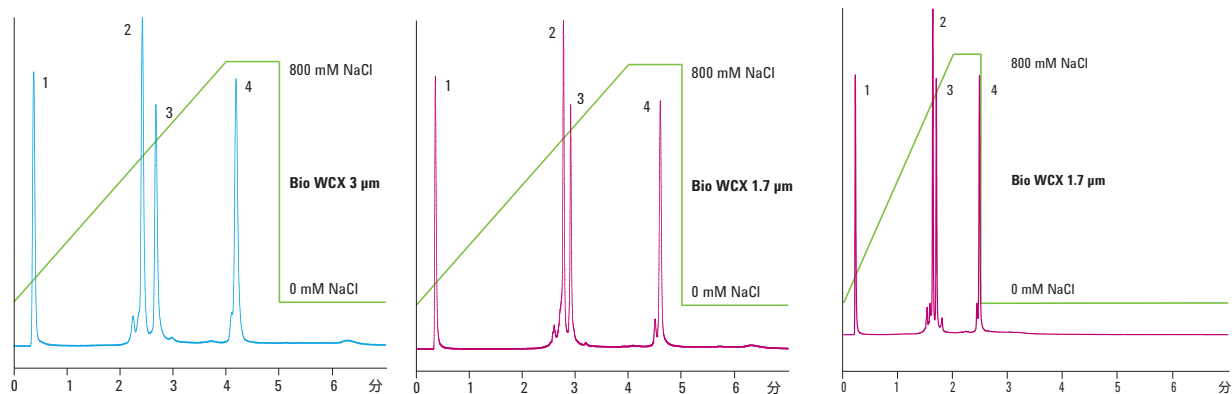


図 2. Agilent Bio WCX 4.6 x 50 mm、3 μm カラムと Agilent Bio WCX 4.6 x 250 mm、5 μm カラムにおけるタンパク質分離 (流量 1.0 mL/min)。小さい粒子サイズと短いカラムにより、分析時間が短縮されています。サンプル溶出時間は、長いカラムでは 17 分ですが、短いカラムでは 12 分です。



小さい粒子サイズにより分離能が向上



左と中央：Agilent Bio WCX 3 μm カラムと Agilent Bio WCX 1.7 μm カラムにおけるタンパク質分離 (流量 1.0 mL/min)。

右：流量を 1.7 mL/min に上げたところ、分離時間が**3 分未満**に短縮されました (Agilent Bio WCX カラムを使用)。

カラム：

Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 $\times$ 50 mm SS (p/n 5190-2443)

Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 $\times$ 50 mm SS (p/n 5190-2441)

移動相：

A: 20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.5

B: A + 1.6 M NaCl

グラジエント：

0~50 % B

温度： 周囲温度

注入量： 10 μL

サンプル： オブアルブミン (1)、リボヌクレアーゼ A (2)、
シトクローム c (3)、リゾチーム (4)

濃度： 0.5 mg/mL

検出： UV, 220 nm

機器： Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC

図 3. 流量を上げた場合の分析時間の短縮。ピーク形状と分離能に悪影響は出ていません。

Buffer Advisor ソフトウェアにより IEX ワークフローを短縮および単純化

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで計算した 4 成分グラジエントの自動調製により、実験計画にもとづく堅牢なメソッドが実現します。Buffer Advisor ソフトウェアを使えば、バッファ調製時間が大幅に短縮します。特に、あらかじめ混合された 2 成分グラジエントの手動調製に比べると、その効果は大きくなります。また、バッファ調製の精度が向上することで、メソッドの堅牢性が高まり、他のラボへの移管が容易になります。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、バリデーション済みでユーザーによる選択が可能な幅広いバッファシステムを備えています。これにより、アニオンおよびカチオン交換クロマトグラフィーに対応し、状況にもっとも適した移動相の調製を可能にします。ソフトウェアを用いて pH を最適化すれば、手動で調製するバッファ溶液と比べて、グラジエントの精度と正確性が高まります。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアでは、4 成分グラジエントの調合を再計算し、酸および塩基のバッファ成分の濃度を確認することで、一貫して最適な pH が保たれます。

20 の実験の初期スクリーニングでは、通常なら 40 種類の溶液が必要となるところ、わずか 4 つの移動相原液だけで完了することができました。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、自動的にバッファを混合し、最適な pH とバッファ強度を作り出します。その後、グラジエントのタイムテーブルをクォータリポンプでプログラミングすることができます。

15 時間の無人分析で 20 の実験すべてが完了し、最適な結果が得られました。この実験に要した溶媒は 1 L 未満でした。0~500 mM NaCl のグラジエントで、流量は 1.0 mL/min でした。

自動メソッド開発により、最適なアイソフォーム分離を実現

カラム:	Agilent Bio WCX 3 μ m, 4.6 x 50 mm SS (p/n 5190-2443) Agilent Bio SCX 3 μ m, 4.6 x 50 mm SS (p/n 5190-2423)
移動相:	A: 水 B: 1.5 M NaCl C: 40 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40 mM Na ₂ HPO ₄ Buffer Advisor ソフトウェアがあらかじめ決定した割合で C と D を混合することで、最適な pH 範囲および強度のバッファ溶液が作成されます。
グラジエント:	提示したクロマトグラムの条件: pH 5.0~7.0、10~25 mM バッファ強度 0~500 mM NaCl、0~15 分 500 mM NaCl、15~20 分 DOE 実験 pH 5.0~7.0 0~200 mM、0~250 mM、0~300 mM
流量:	1.0 mL/min
温度:	周囲温度
注入量:	5 μ L
サンプル:	IgG モノクローナル抗体
濃度:	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウムバッファ中、pH 6.0)
検出:	UV、220 nm
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC

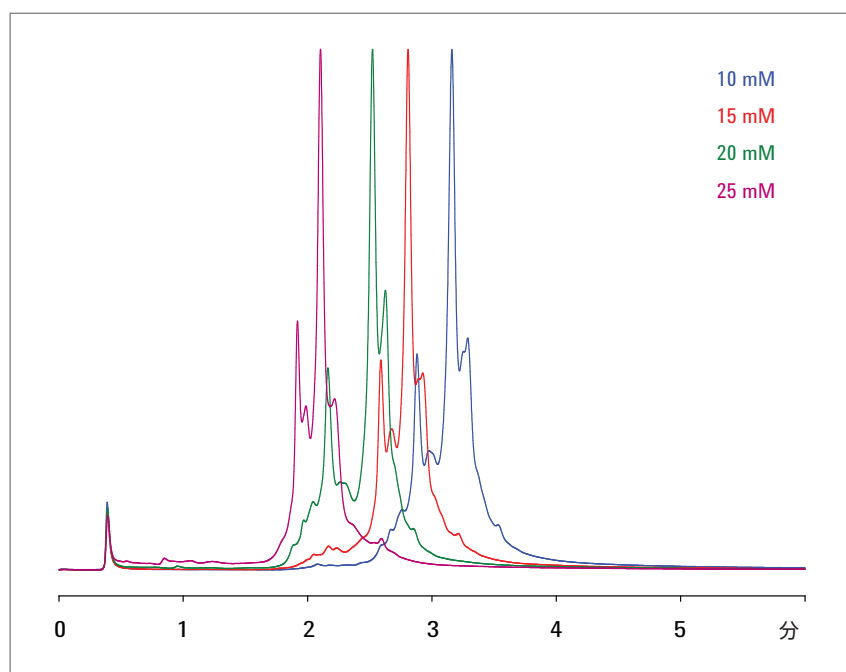


図 4. モノクローナル IgG 分離のクロマトグラムのスクリーニングによる pH 6.5 におけるバッファ強度の最適化。



図 4 は、1 つの pH 値 (6.5) で得られた 20 セットの実験のクロマトグラムを示しています。分離には Bio SCX 3 μ m カラムを使用しました。実験全体の結果を視覚化するために、主成分ピークと初期に溶出する主要汚染物質の分離係数を計算しました。Bio SCX カラムおよび Bio WCX カラムについて得られた結果を、それぞれ図 5a および 5b に示しています。強力カチオン交換カラムでは、強力カチオン交換により広い pH 範囲で一貫した電荷が得られるため、メソッドの堅牢性が高くなります。

当然のことながら、弱カチオン交換カラムでは、pH 5.0 のピークを分離することができませんでした。これは、この条件下では弱カチオン交換カラムが荷電せず、イオン交換モードで機能しなかったためです。pH を高くすると、分離能が向上しました。

Buffer Advisor ソフトウェアのもう 1 つの利点は、原液を異なる割合で混合し、直線的な pH グラジエントを作り出せることです。これにより、分離能を同様に保ったまま、選択性を変化させることができます (たとえば、図 4 とは異なる選択性)。こうした機能は、分離に役立つことがあります。

堅牢なメソッド開発における DOE 実験

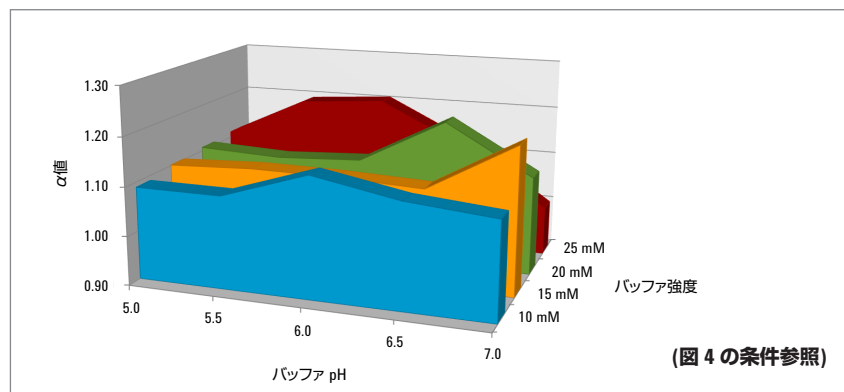


図 5a. Bio SCX 3 μ m、4.6 x 50 mm カラムの α 値プロット。

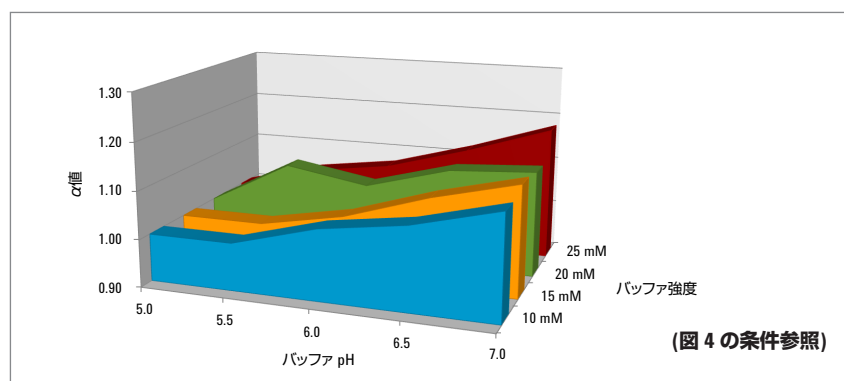


図 5b. Bio WCX 3 μ m、4.6 x 50 mm カラムの α 値プロット。

バッファ調製の時間と費用を節約



手動でのバッファ調製



自動オンラインダイナミックバッファ調製

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、バッファ調製の自動化を支援します。わずか 4 つの原液を動的に調製するので、多数のバッファ溶液を作成および調製する必要がなくなります。

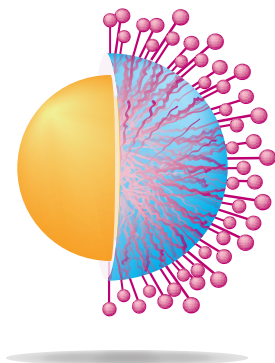
パフォーマンスの向上: 4 つの原液を用いて、88 種類以上の分析に対応し、分析時間を短縮することができます。

時間の節約: クォータナリ混合により、pH の異なる多数のバッファを容易に混合し、バッファ調製の手間を軽減します。

コストの削減: サンプル分析前に pH スカウティングの条件を評価できるので、サンプルの無駄が減り、分析時間が短縮されます。

高回収率のモノクローナル抗体分離を実現する設計

Bio MAb 粒子



Agilent Bio MAb HPLC カラム : 徹底した高性能

- 粒子、被膜、および交換基は高圧に対する耐性があり、より高い分解能で高速な分離が可能です。
- 親水性被膜により、ほとんどの非特異性結合が排除されます。
- 親水性層に弱カチオン交換基が結合し、均一で細密に充填されています。

Bio MAb を用いた重鎖の C-末端切断の分析

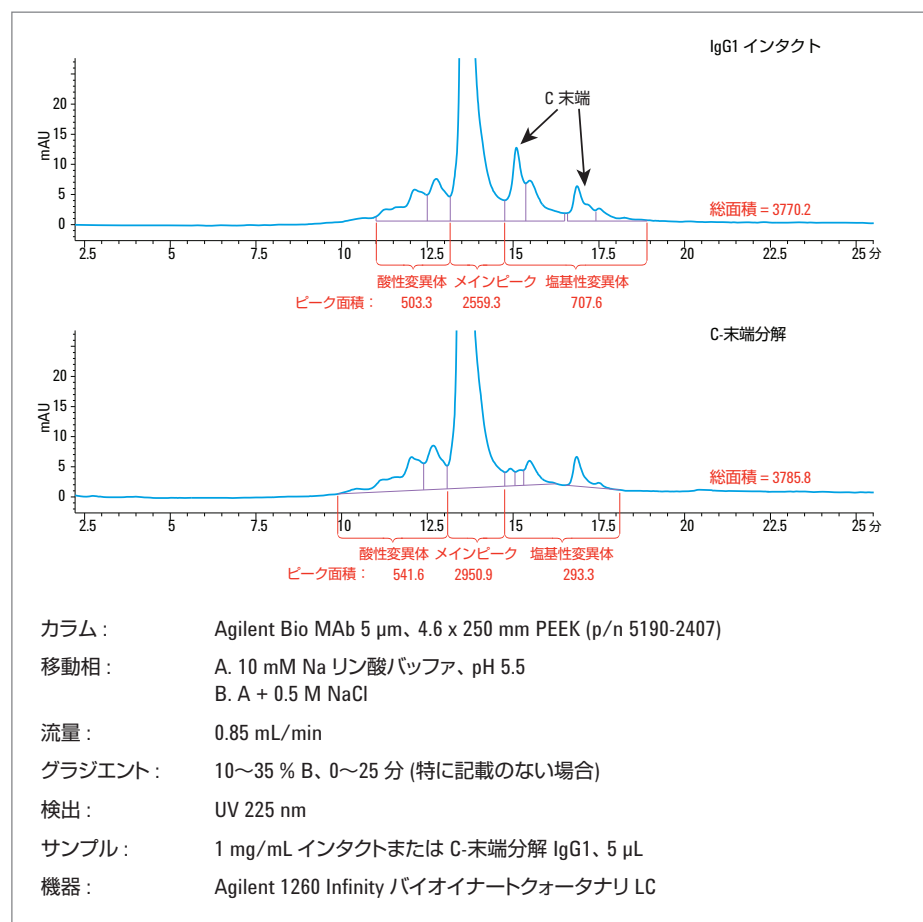


図 6. Agilent Bio MAb 5 μ m カラムと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を用いたソース A の C-末端分解 IgG1 の計算。このカラムで優れた分離能が得られ、良好なピーク同定と正確な定量が可能でした。



抗体の効率的な分離には、スピードと精度の両方が求められます。Agilent Bio MAb カラムは、高分離能の抗体分離に最適な独自の利点を備えています。

- **優れた精度**：高架橋の球状硬質非多孔質ポリスチレンジビニルベンゼン粒子が親水性のポリマー層に接しているため、非特異的な結合が生じません。
- **優れた MAb 分析**：最適化されたプロセスで作成された密度の高い外層により、粒子に対する弱カチオン交換相の層が形成されています。
- **メソッドの堅牢性**：定評のある性能により、正確で一貫性の高い結果を実現します。
- **完璧な分離を実現する選択肢**：幅広い粒子サイズにより、抗体分離で最高の分離能を実現します。

pH グラジエント - アイソフォーム分析の強力な代替テクニック

アイソフォーム分析における従来のイオン交換メソッドに変わるテクニックとして、新たに注目を集めているのが、pH グラジエントを用いるテクニックです。

従来のイオン交換メソッドでは、溶媒のイオン強度を高めることで、IEX カラムからタンパク質や変異体を溶出および分離させます。塩が増加すると、タンパク質と IEX カラムの相互作用が妨害され、分離がおこなわれます。

pH グラジエントアプローチは、カチオン交換クロマトグラフィーで使用できます。pH が高くなると、タンパク質が中性（またはマイナス電荷）になり、カラムから溶出します。このアプローチは、高分離能が得られるほか、最新の HPLC を用いたメソッドに容易に対応できることから、広く利用されるようになっていきます。

下の表では、この 2 つのメソッドを比較しています。

塩ベースの IEX	
利点	• 確立されたメソッド • 標準的な HPLC 機器を使用 • フラクシオンの直接採取に対応
欠点	• サンプルマトリックスの極端な塩および pH への耐性が低い • メソッド開発に、しばしば時間がかかる

pH ベースの IEX	
利点	• 多数の製品オプション • サンプルの塩濃度および pH 変化への耐性が高い • 一般的な HPLC 機器および専門知識を使用 • インプロセスサンプルの分析に対応 • Buffer Advisor ソフトウェアなどのツールにより、簡単かつ迅速な実行が可能
欠点	• 比較的新しい手法で、なじみが無い



6.5~7.5 の pH グラジエント (0~20 分)、50 mM、Agilent Bio MAb 5 μ m、4.6 x 50 mm を用いた IgG モノクローナル抗体の分析。

再現性と精度

独自の樹脂を備えた Agilent Bio MAb カラムは、モノクローナル抗体の荷電ベースの分離に最適です。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、pH グラジエントの設定を支援します。

表 1 および 2 は、IgG1 の 6 回繰り返し注入により得られた平均リテンションタイムと面積 RSD を示しています。RSD 値の低さからもわかるように、Bio MAb カラムは、優れた再現性と精度を備えたメソッドを実現するための鍵となります。

実際のメソッドに対して $\pm 10\%$ の範囲での注入量の変動により、面積 RSD が大きく偏向しています。しかし、この偏向は、イオン交換カラムへのロードに起因するものと見られます。実験条件において故意に変動させた場合には、クロマトグラフィーパターンに大きな変化は見られませんでした。このことは、メソッドの堅牢性を示しています。

正確な定量と堅牢なメソッドを可能にする Bio MAb カラム

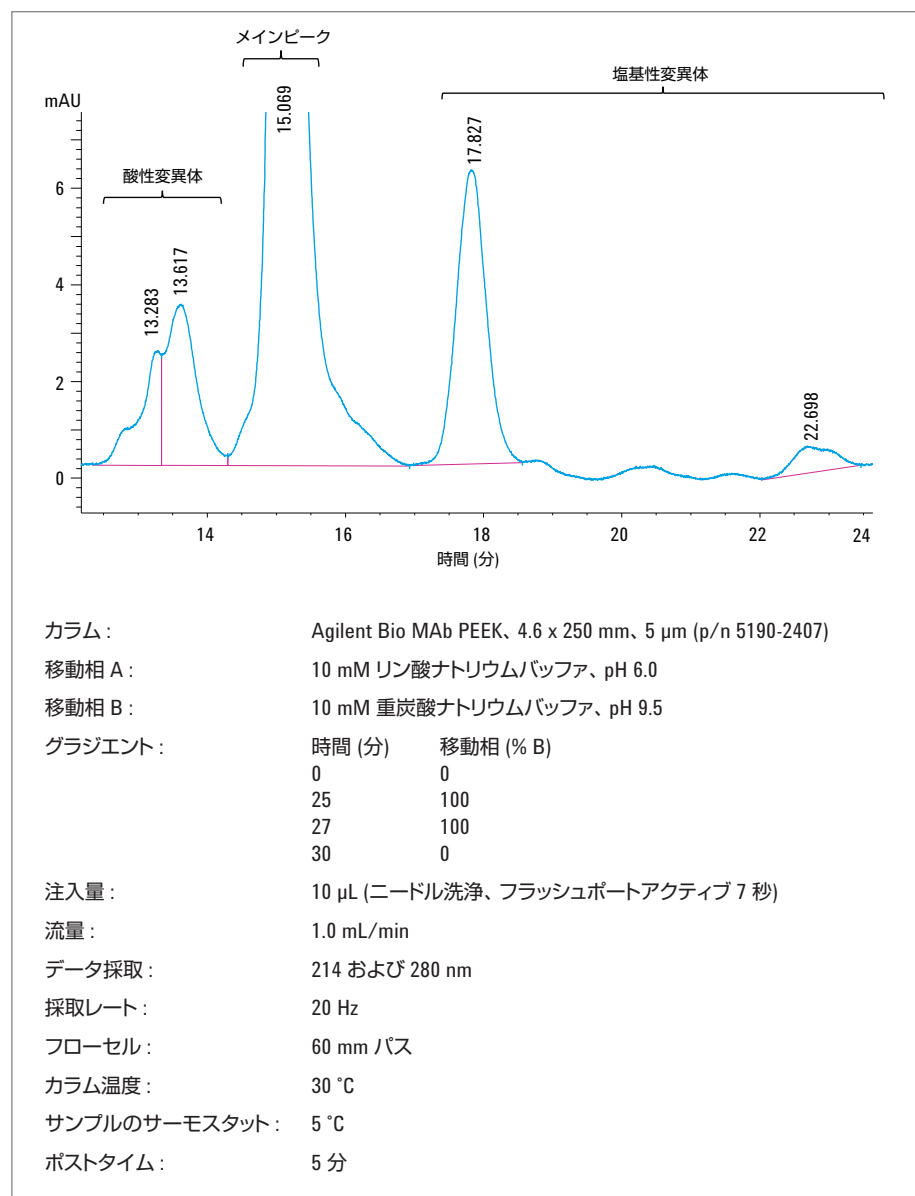


図 7. Agilent Bio MAb PEEK、4.6 x 250 mm、5 μ m カラムを用いた IgG1 分離における pH グラジエントベースのカチオン交換クロマトグラム。

信頼性の高い堅牢なパフォーマンス

現代のラボでは、メソッドが若干変動する場合でも一貫した分離を実現できるカラムが求められます。アジレントのカラムは、必要とされる堅牢なパフォーマンスが確実に得られるようにテストされています。

表 1. 面積 % によるアイソフォーム定量、n=6

	RT (分) A	面積 %
酸性変異体	13.28	9.87
	13.61	
メインピーク	15.058	76.92
塩基性変異体	17.82	13.21
	22.69	

表 2. メインピークのリテンションタイムと面積 RSD (%), n=6

	リテンションタイム	ピーク面積
平均 (分)	15.058	1172
RSD	0.1061	1.60

表 3. メソッド堅牢性の評価 – 各種の主要パラメータ

パラメータ	変動	RT 偏向 (限度値: ± 3.0 %)	面積偏向 (限度値: ± 5.0 %)
		メインピーク	
注入量の変動 (10 µL ± 10 %)	– 1 µL	– 0.19	10.49
	+ 1 µL	0	– 9.89
カラム温度の変動 (30 °C ± 5 %)	– 5 %	– 1.19	2.73
	+ 5 %	0.66	2.13
バッファ pH の変動 (6.0 ± 0.2)	– 0.2	0.199	– 0.68
	+ 0.2	0.99	– 0.08
流量の変動 (1.0 ± 2 %)	– 2 %	0.66	2.73
	+ 2 %	0	– 1.10

このメソッドの堅牢性を評価するために、最適化されたメソッドの 4 つの主要パラメータ (注入量、カラム温度、バッファ pH、流量) を変化させました。RSD の偏向は、すべて予想範囲内でした。

マクロ生体分子分離に対応するポリマーベースのモノリスカラム

Agilent バイオモノリスイオン交換 HPLC カラムは、抗体 (IgG、IgM)、プラスミド DNA、ウイルス、ファージ、その他のマクロ生体分子の高速高分解能の分離を実現します。

- **精度の向上**：複雑なサンプルでも汚染を最小限に抑制します。連続的なチャンネルを備えたモノリスディスク (5.2 x 4.95 mm, 100 µL) により、拡散に起因する物質移動を排除します。
- **高速分離**：拡散、ボア、およびボイドボリュームがないため、移動相と固定相の間の高速移動が可能です。
- **効率的なメソッド開発**：超高速分離により、メソッド開発の時間とコストを削減します。メソッドパラメータを固定することで分析時間とバッファを削減します。
- **完璧な分離を実現する選択肢**：強力カチオン交換相、強および弱アニオン交換相が用意されています。バイオモノリス HPLC カラムは、Agilent 1200 Infinity シリーズを含む HPLC および分取 LC システムに適合します。

Agilent バイオモノリス HPLC カラム選択ガイド

カラム	説明	主要アプリケーション
バイオモノリス QA	第 4 級アミン結合相 (強アニオン交換) は使用 pH 範囲 2~13 で完全に荷電し、負電荷により生体分子と結合します。	• アデノウイルスのプロセスモニタリングと品質管理 • IgM 精製のモニタリングと品質管理 • DNA 不純物除去のモニタリング • エンドトキシン除去のモニタリング • HSA 純度分析
バイオモノリス DEAE	ジエチルアミノエチル結合相 (弱アニオン交換) は、使用 pH 範囲 3~9 で負電荷を帯びるため、生体分子の選択性が向上します。	• バクテリオファージ精製のプロセスモニタリングと品質管理 • プラスミド DNA 精製のプロセスモニタリングと品質管理
バイオモノリス SO ₃	スルホニル結合相 (強力カチオン交換) は使用 pH 範囲 2~13 で完全に荷電し、正電荷により生体分子と結合します。	• タンパク質や抗体などの大型生体分子の高速高分離 • ヘモグロビン A1c の高速分析

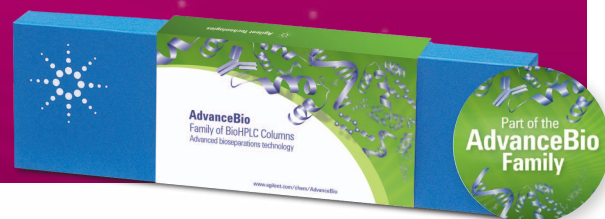


図 8 は、バイオモノリス DEAE カラムを用いた、ファージ精製のモニタリングの例です。この例では、36、158、191 分にバイオリアクターからサンプルを採取しました。ピーク 1 はファージ、培地、宿主細胞、ピーク 2 はインタクト gDNA、ピーク 3 は断片化された gDNA を表します。ファージ増殖のあいだは、宿主細胞が溶解されるため、ゲノム DNA (gDNA) 濃度が高くなります。発酵の最終段階で、gDNA は断片に分解しはじめます。精製培地ではこれらの gDNA 断片を簡単に除去できません。そのため、ゲノム DNA の分解前に発酵サイクルを停止させることが重要です。

この複雑なサンプルに含まれる細胞残屑は、HPLC カラムのつまりの原因となり、迅速な発酵モニタリングを妨げることがあります。オープンポア構造のバイオモノリス DEAE カラムなら、つまりを軽減し、効率的なリアルタイムプロセスモニタリングをおこなうことができます。

バイオモノリス DEAE カラムにより、効率的なプロセスモニタリングを実現し、生成物の収率を最大化

バイオモノリス DEAE カラムを使用したファージ精製のモニタリング

カラム: バイオモノリス DEAE, 5.2 x 4.95 mm (p/n 5069-3636)

移動相: A:125 mM リン酸バッファ, pH 7.0
B:125 mM リン酸バッファ + 1 M NaCl, pH 7.0

流量: 1 mL/min

グラジエント: 100 % バッファ A (2.5 分)
0~100 % バッファ B (10 分)
100 % バッファ A (2 分)

検出器: UV, 280 nm

機器: 高圧グラジエント HPLC システム、Agilent 1200 Infinity シリーズ

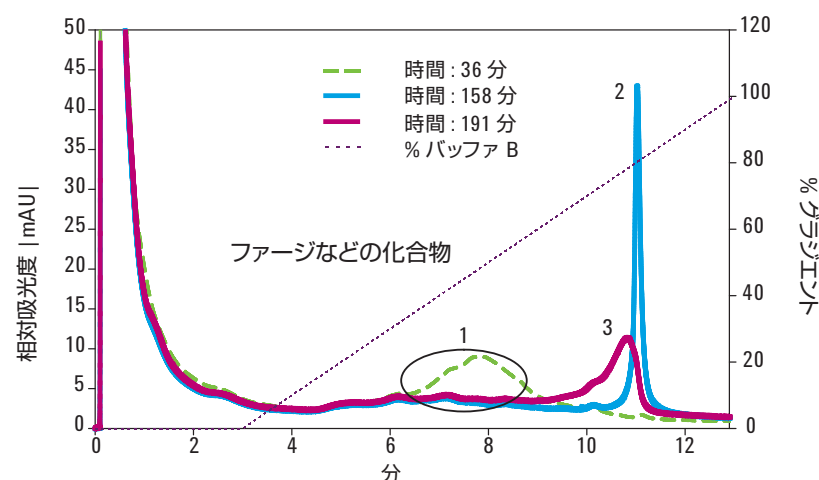


図 8. ファージ増殖が進むにつれて、宿主細胞が溶解されるため、ゲノム DNA (gDNA) 濃度は高くなります。発酵の最終段階で、gDNA は断片に分解しはじめます。精製培地ではこれらの gDNA 断片を簡単に除去できないため、ゲノム DNA の分解前に発酵サイクルを停止させることが重要です。上記は、36 分、158 分、191 分にバイオリアクターから採取した 3 種類のサンプルのクロマトグラムです。ピーク 1 はファージ、培地、宿主細胞、ピーク 2 はインタクト gDNA、ピーク 3 は断片化された gDNA を表します。

信頼性の高い合成オリゴヌクレオチド分離

Agilent PL-SAX カラムは、タンパク質やペプチド、脱保護合成オリゴヌクレオチドのアニオン交換 HPLC 分離に理想的なカラムです。変性条件の温度では、オリゴヌクレオチド分離には有機溶媒と高 pH が用いられます。

- ・**長いカラム寿命：強アニオン交換基**により、水酸化ナトリウム溶媒の使用時にも優れた化学的および温度的安定性が保たれます。
- ・**優れたクロマトグラフィー性能**：小さいサイズの粒子により実現します。
- ・**エンドツーエンドの分析オプション**：分析用の 5 μm 、精製用の 10 および 30 μm が用意されています。
- ・**フレキシブルなメソッド開発**：幅広い pH での IEX に対応します。化学的に安定した全多孔質ポリマーに共有結合する強アニオン交換基が、広い動作 pH 範囲を実現します。
- ・**精製に最適**：タンパク質の生物学的活性を保ちます。

オリゴヌクレオチドの高分離能分離

10 mer、15 mer、30 mer、50 mer (メインピーク) をスパイクしたポリ- ϵ -オリゴヌクレオチドサイズ標準の高分離能分離

カラム： PL-SAX 1000Å、4.6 x 50 mm、8 μm (p/n PL1551-1802)
移動相： A:7:93 v/v アセトニトリル:0.1 M TEAA、pH 8.5
B:7:93 v/v アセトニトリル:0.1M TEAA、1 M 塩化アンモニウム、pH 8.5
グラジエント：10 分で 0~40 % B、14 分で 40~70 % B、25 分で 70~100 % B
流量： 1.5 mL/min
温度： 60 °C
検出器： UV、220 nm

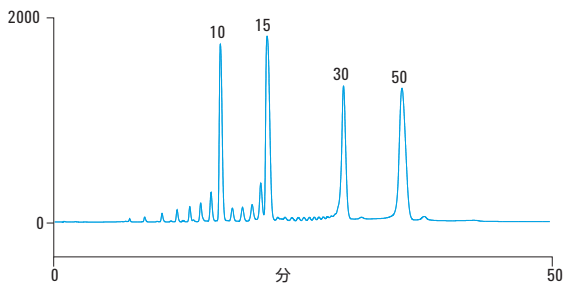


図 9. ポリ- ϵ -オリゴヌクレオチドの高分離能分離。ここで用いたグラジエントにより、15 mer までは n と n-1 を容易にベースラインで分離することができました。



PL-SAX 強アニオン交換カラムを使えば、オリゴヌクレオチドの高分離能分離が実現します。n と n-1 の分離が可能です。図 9 は、10 mer、15 mer、30 mer、50 mer (メインピーク) をスパイクしたポリ-T-オリゴヌクレオチドサイズ標準の分離を示しています。溶媒にアセトニトリルを添加し、分離に悪影響を与える二次構造の生成を抑制しました。

図 11 では、*Aspergillus niger* 細胞培地の過剰物から酵素のアミログルコシダーゼが分離されています。この酵素は、分子量が 99 kD および 112 kD (それぞれピーク 1 および 2) の 2 つの形態を有しています。いずれもアミノ酸組成は同じですが、糖質含有量が異なります。PL-SAX 4000Å 4.6 x 50 mm、8 µm カラムを使えば、2 分未満でイソ酵素 3.6 mg またはトータル酵素 20 mg を精製することができます。

生物学的活性のあるタンパク質を精製

PL-SAX 4000Å を使用したコリンキナーゼの分析

カラム: PL-SAX、4.6 x 50 mm、8 µm (p/n PL1551-1803)
 移動相: A:20 mM トリス 5 % エチレングリコール、pH 7.5
 (以下は酵素活性を維持するために必要)
 1.0 mM エチレングリコール四酢酸
 2.0 mM β-メルカプトエタノール
 0.2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル
 B:A + 1 M KCl
 流量: 3.0 mL/min
 検出器: UV、280 nm

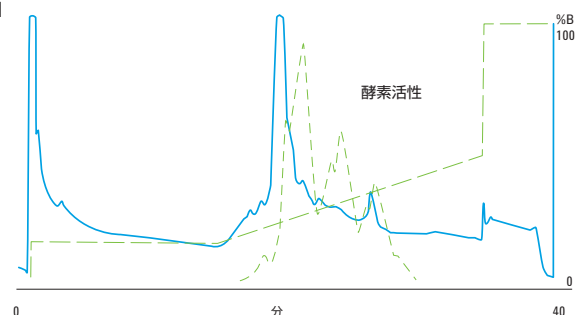


図 10. このコリンキナーゼの分析では、酵素活性が維持され、分離終了時にも活性タンパク質が存在していました。

サンプルローディングを最大化

カラム: PL-SAX 4000Å、4.6 x 50 mm、8 µm グラジエント: 2 分で直線的に 0~100 % B (p/n PL1551-1803)
 流量: 4.0 mL/min
 溶媒 A: 0.01M トリス HCl、pH 8
 検出器: UV、280 nm
 溶媒 B: A + 0.5M NaCl、pH 8

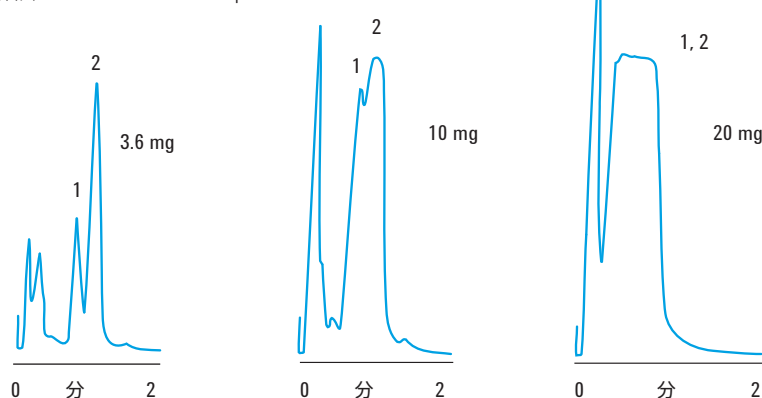


図 11. 異なる酵素濃度におけるアミログルコシダーゼの高速精製。
 Agilent PL-SAX 4000Å 8 µm カラムを使えば、2 分未満でイソ酵素 3.6 mg またはトータル酵素 20 mg を精製することができます。

Agilent PL-SCX カラム

多様な生体分子の分離および精製に対応

PL-SCX は、マクロポーラス型のスチレンジビニルベンゼンポリマーに親水性コーティングと強カチオン交換基を化学結合させた、ポリマー系の陽イオン交換 HPLC カラムです。小さなペプチドから大きなタンパク質まで、幅広い生体分子を効率よく分離精製するために、製造プロセスにおいて強カチオン交換基の官能基密度を適切にコントロールしています。

- **高分離能** : 5 μm メディアにより信頼性の高い高分離能分離を実現します。10 および 30 μm メディアは、中程度の圧力を用いた LC に最適です。
- **分離の最適化に適した選択肢** : 目的の化合物に応じて、1000 Å と 4000 Å の 2 つのポアサイズを選択できます。
- **優れた安定性** により長寿命が実現しています。

幅広い溶媒と精製手順に対応する優れた化学的安定性

カラム : PL-SCX 1000Å、4.6 x 50 mm、8 μm (p/n PL1545-1802)

溶媒 A : 0.02 M KH_2PO_4 、pH 6

溶媒 B : A + 0.5 M NaCl、pH 6

グラジエント : 20 分で直線的に 0~100 % B

検出 : UV、280 nm

洗浄溶液 (約 40 カラム分)	R ₂ 係数 (ピーク 2 および 3)	タンパク質キャパシティ (mg リゾチーム/mL CV)
初回分析	1.5	33
0.2 M HCl	1.7	31
0.2 M NaOH	2.0	33
最終分析		
6 M 尿素	1.6	33
1% TFA	1.6	33
10 % 酢酸	1.7	28
100 % メタノール	1.6	31
0.5 M HCl	1.5	31
2 M NaOH	2.0	33

表 4. 強酸、アルカリ、有機溶媒での洗浄前後における Agilent PL-SCX カラムのタンパク質分離の比較。

Captiva 低タンパク質結合フィルタ

アジレントの PES フィルタは、タンパク質に関連するろ過で優れた一貫性のある低いタンパク質結合特性を実現します。

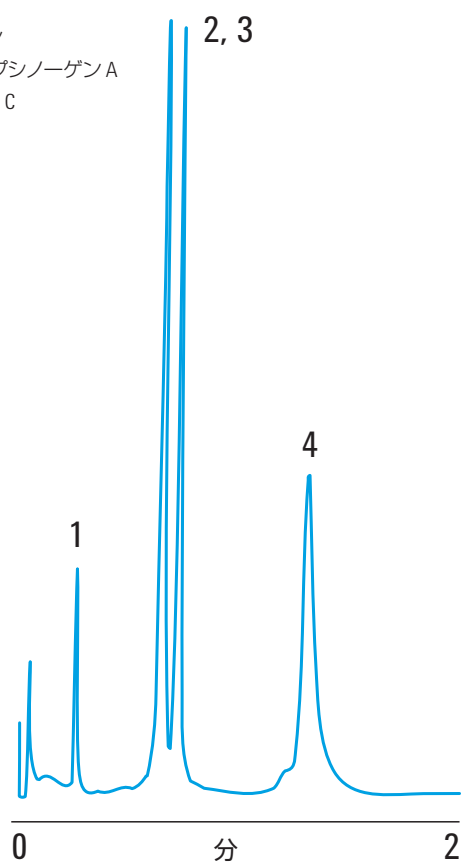
詳しくは agilent.com/chem/jp をご覧ください。



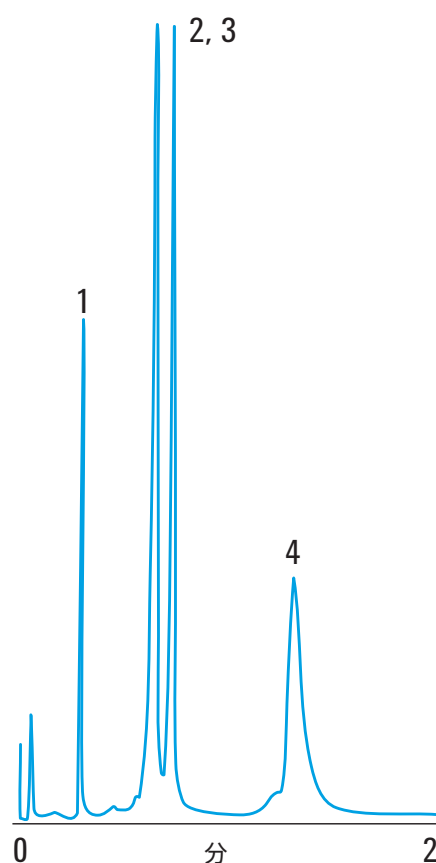


ピーク番号

1. ミオグロビン
2. α -キモトリプシノーゲン A
3. シトクローム C
4. リゾチーム



Agilent PL-SCX カラムを用いた初回のタンパク質分離のクロマトグラム。



40 カラム分の強溶媒を用いて洗浄したあとの、同じカラム、同じタンパク質溶液の最終分析のクロマトグラム。

16 ページの条件を参照。

図 12. 上の例からもわかるように、PL-SCX 充填剤は、高圧、強酸、強アルカリにさらされた場合でも、優れた安定性を保ちます。

製品情報

さまざまなタンパク質およびペプチドの分析に対応する Agilent Bio IEX カラム

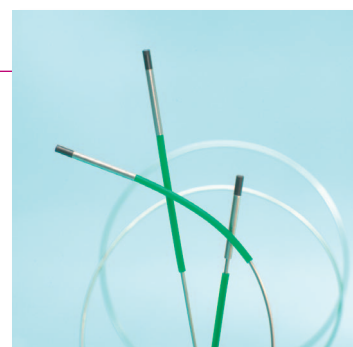
Agilent Bio IEX HPLC カラム、PEEK ハードウェア

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio SCX	Bio WCX	Bio SAX	Bio WAX
4.6 x 250	10	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4.6 x 50、ガード	10	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4.6 x 250	5	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4.6 x 50、ガード	5	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2.1 x 250	10	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2.1 x 50、ガード	10	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2.1 x 250	5	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2.1 x 50、ガード	5	5190-2432	5190-2452	5190-2472	5190-2492

Agilent Bio IEX HPLC カラム、ステンレスハードウェア

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio SCX	Bio WCX	Bio SAX	Bio WAX
21.2 x 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4.6 x 250	10	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4.6 x 150	3				5190-6875
4.6 x 250	5	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4.6 x 50	3	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4.6 x 50	1.7	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
4.0 x 10、ガード	10	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4.0 x 10、ガード	5	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4.0 x 10、ガード	3	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4.0 x 10、ガード	1.7	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

高圧でのバイオ不活性および堅牢性を備えたステンレスコーティング PEEK キャピラリーなど、高性能バイオ分離に対応する部品や補用品をお探しの場合は、agilent.com/chem/jp をご覧ください。



モノクローナル抗体用の Agilent Bio MAb カラム

Agilent Bio MAb HPLC カラム

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio MAb PEEK	Bio MAb ステンレス
21.2 x 250	5		5190-6885
10 x 250	5		5190-6884
4.6 x 250	10	5190-2415	5190-2413
4.6 x 50、ガード	10	5190-2416	
4.6 x 250	5	5190-2407	5190-2405
4.6 x 50、ガード	5	5190-2408	
4.6 x 50	3		5190-2403
4.6 x 50	1.7		5190-2401
4.0 x 10、ガード	10		5190-2414
4.0 x 10、ガード	5		5190-2406
4.0 x 10、ガード	3		5190-2404
4.0 x 10、ガード	1.7		5190-2402
2.1 x 250	10	5190-2419	
2.1 x 50、ガード	10	5190-2420	
2.1 x 250	5	5190-2411	
2.1 x 50、ガード	5	5190-2412	

マクロ生体分子分離用の Agilent バイオモノリスカラム

Agilent バイオモノリス HPLC カラム

カラム	部品番号
バイオモノリス QA	5069-3635
バイオモノリス DEAE	5069-3636
バイオモノリス SO ₃	5069-3637



製品情報

合成オリゴヌクレオチド用の Agilent PL-SAX カラム

PL-SAX 強アニオン交換カラム

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
1.0 x 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503
2.1 x 50	5	PL1951-1502	PL1951-1503
4.6 x 50	5	PL1551-1502	PL1551-1503
2.1 x 50	8	PL1951-1802	PL1951-1803
2.1 x 150	8	PL1951-3802	PL1951-3803
4.6 x 50	8	PL1551-1802	PL1551-1803
4.6 x 150	8	PL1551-3802	PL1551-3803
4.6 x 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103
4.6 x 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103
25 x 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103
25 x 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103
50 x 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103
100 x 300	10	PL1851-2102	PL1851-2103
4.6 x 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703
4.6 x 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703
25 x 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703
50 x 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703
100 x 300	30	PL1851-3102	PL1851-3103

PL-SAX 強アニオン交換充填剤バルク

サイズ	粒子径 (μm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
100 g	10	PL1451-4102	PL1451-4103
1 kg	10	PL1451-6102	PL1451-6103
100 g	30	PL1451-4702	PL1451-4703
1 kg	30	PL1451-6702	PL1451-6703

幅広い生体分子および溶質用の Agilent PL-SCX カラム

PL-SCX 強カチオン交換カラム

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
1.0 x 50	5	PL1345-1502	PL1345-1503
2.1 x 50	5	PL1945-1502	PL1945-1503
4.6 x 50	5	PL1545-1502	PL1545-1503
2.1 x 50	8	PL1945-1802	PL1945-1803
2.1 x 150	8	PL1945-3802	PL1945-3803
4.6 x 50	8	PL1545-1802	PL1545-1803
4.6 x 150	8	PL1545-3802	PL1545-3803
4.6 x 250	10	PL1545-3102	PL1545-3103
4.6 x 150	10	PL1545-5102	PL1541-5103
25 x 50	10	PL1245-1103	PL1245-1103
25 x 150	10	PL1245-3103	PL1245-3103
50 x 150	10	PL1745-3103	PL1745-3103
100 x 300	10	PL1845-2103	PL1845-2103
4.6 x 250	30	PL1545-3702	PL1545-3703
4.6 x 150	30	PL1545-5703	PL1545-5703
25 x 150	30	PL1245-3702	PL1245-3703
50 x 150	30	PL1745-3703	PL1745-3703
100 x 300	30	PL1845-3102	PL1845-3103

PL-SCX 強カチオン交換充填剤バルク

サイズ	粒子径 (μm)	PL-SAX 1000Å	PL-SAX 4000Å
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102
1 kg	10	PL1445-6102	PL1445-6103
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
1 kg	30	PL1445-6702	PL1445-6703

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC : 限りなく優れた生体分子分析を実現

サンプル流路における金属フリーを実現した Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、新たな水準の性能と信頼性を実現します。

この堅牢なシステムは、タンパク質やバイオ医薬品の分析に一般的に用いられる、扱いの困難な溶媒条件に対応することができます。また、非特異的結合に伴う問題も軽減します。Agilent イオン交換 BioHPLC カラムと組み合わせれば、最高の分離を実現することができます。

100 % バイオイナートサンプルフローパス

オートサンプルからカラムコンパートメント、検出器に至るまでのあらゆるキャピラリーとフィッティングから完全に金属を排除しています。そのため、生体分子が接触するのはセラミックか PEEK だけです。これにより、金属表面とタンパク質やペプチドの二次的な反応を防ぎ、ピークテーリング、低回収率、カラム寿命の短縮といった問題を回避します。

真の UHPLC 性能

最高 60 MPa のパワーレンジと、小さい粒子を用いた最新のカラムテクニックで求められる高圧への耐性を備えています。そのため、1.7 μm までの粒子サイズのあらゆる SEC および IEX カラムに完璧に適合します。

毎日の分析で堅牢性と安全な動作を約束するキャピラリーおよびフィッティング技術

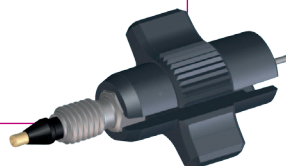
1260 Infinity バイオイナート LC では、金属フリーのバイオ不活性と高圧耐性という独自の組み合わせを備えたキャピラリーおよびフィッティング技術が使われています。以下の 3 種類のキャピラリーが導入されています。

- 送液ライン用の腐食体制の高いチタンキャピラリー
- オートサンプルおよびカラムコンパートメントの金属クラッド PEEK キャピラリー
- 分離カラム下流の低圧部品の NPEEK キャピラリー

金属クラッド PEEK キャピラリーでは、独自の接続システムが採用されています。これにより、あらゆる接続で完全なバイオ不活性が実現します。

機械的に連結された PEEK チップは、水平移動や回転による圧力への耐性が高いため、フィッティングを締める際のキャピラリーのトルクが排除されます。

詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



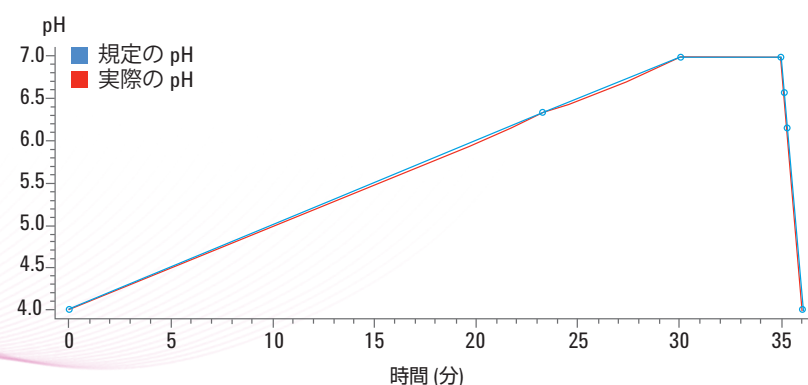
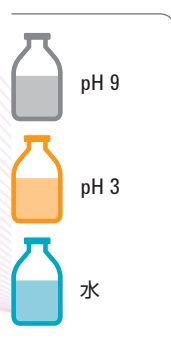
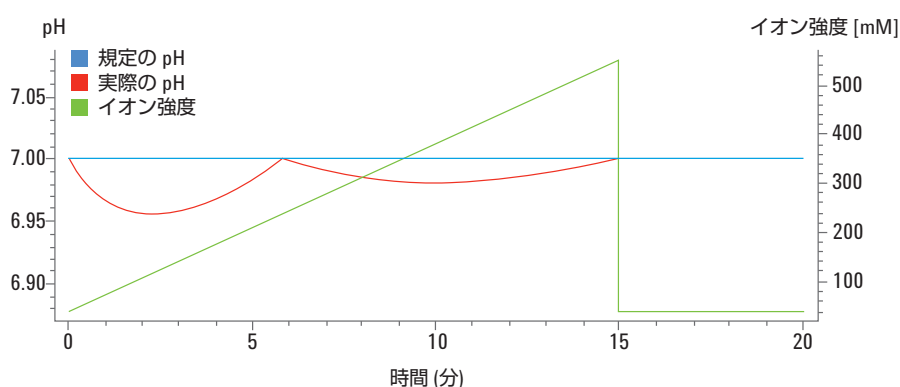
Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC の詳細については、[agilent.com/chem/lc:jp](http://www.agilent.com/chem/lc:jp) をご覧ください。

バイオ分析のワークフローを簡単に

簡単なバッファ調製と pH スカウティング

1260 Infinity バイオイナートクォータナリポンプのミキシング原理を活用した Buffer Advisor ソフトウェアは、わずか 4 つの原液から溶媒を動的に調製します。これにより、バイオ分析のワークフローを簡略化し、バッファ調製に要する時間を大幅に短縮することが可能です。

まず、理論的モデリングにより、任意のタンパク質分離に最適な塩または pH 条件を特定します。最適化されたグラジエント条件は、XML-フォーマットファイルに保存されます。ファイルは Agilent OpenLAB CDS にインポートすることも可能です。このファイルにより、1260 Infinity バイオイナートクォータナリ 4 チャンネルミキシングポンプのタイムテーブル内で溶媒混合が設定されます。ユーザーが調製する必要があるのは、酸性バッファ、塩基性バッファ、水、塩という 4 つの原液だけです。塩グラジエントの作成では、チャンネル D の塩溶媒の量を徐々に増やしながら、チャンネル A および B の酸性および塩基性バッファ成分、チャンネル C の希釈用の水と混合します。



原液から塩グラジエントまたは pH グラジエントを簡単に作成することができます。

幅広い選択肢と最高のコントロールを実現する バイオカラムファミリー

Agilent イオン交換 BioHPLC カラムは、生物関連のクロマトグラフィー分析で優れた分離能と性能が得られるように設計およびテストされています。そのため、アイソフォームの分離に最適です。

幅広い選択肢を用意しています。

- Agilent Bio IEX カラム、タンパク質およびペプチド用
- Agilent Bio MAb カラム、モノクローナル抗体用
- Agilent バイオモノリスカラム、分取 LC システム用
- Agilent PL-SAX カラム、合成オリゴヌクレオチド用
- Agilent PL-SCX カラム、生体分子および溶質用

サンプル精製から分析にまで対応する Agilent イオン交換 BioHPLC カラムは、ワークフローに簡単に統合し、再現性の高い高品質の分析や簡単なメソッドスケールアップを実現することができます。

アジレントは、サイズ排除カラム、逆相カラム、HILIC カラム、アフィニティカラムといったあらゆる BioHPLC カラムのニーズにお応えします。



詳細情報

ホームページ

agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

高速で一貫性の高いバイオ医薬品分析を実現する Agilent AdvanceBio カラム

Agilent AdvanceBio HPLC カラムは、ペプチドやタンパク質の分離およびキャラクタライゼーションにおいて一貫した高品質の性能が得られるように設計されています。この最先端のカラムファミリーでは、精度と生産性を高め、分析を妨げる干渉を排除するための技術が用いられています。

究極の信頼性を得るために、徹底的な試験を実施し、優れた結果を確実に得られます。

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
©Agilent Technologies, Inc. 2013
Printed in Japan, November 30, 2013
5991-2449JAJP



Agilent Technologies