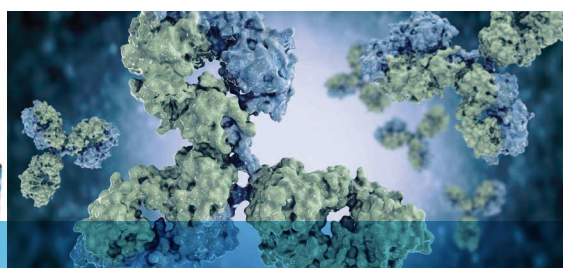


Agilent バイオ HPLC カラム総合カタログ

生体分子分析に最適





Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

アジレントのすべてを お客様のもとに

世界中のあらゆるラボ、あらゆる場面で。

サービス、消耗品、ラボ全体のリソース管理から構成される CrossLab は、ラボの効率の向上、運用の最適化、機器の稼働時間の延長、ユーザースキルの開発などを支援します。

Agilent CrossLab は、アジレント機器だけでなく主要な他メーカーの機器をサポートしています。また、ワークフローの実現、ラボ解析、コンプライアンス、在庫管理、移設サービスを含めた資産管理のためのコンサルティングサポートを提供しています。

Agilent CrossLab の詳細と、見えない価値から優れた成果を生み出す例については、ホームページをご覧ください。

CrossLab ストーリーでは、お客様を支えるアジレントの具体的な活動をご覧ください。



CrossLab リアルストーリー

Agilent CrossLab サービスのエンジニアは、お客様とのあらゆるやり取りの中から見えない価値を引き出そうと努めることで、効率性の改善、リソースの最適化、連続稼働時間の最大化、ユーザースキルの向上をお手伝いします。Agilent CrossLab が世界中のお客様に知見と価値をお届けした事例をご紹介します。

www.agilent.com/chem/crosslabstories

目次

バイオカラム選択ガイドライン	1	AdvanceBio RP-mAb	39
生体分子とは	2	ZORBAX 300 Å StableBond	44
バイオカラムとは	3	ZORBAX 300Å Extend-C18	53
カラム選択フローチャート	5	Poroshell 300	57
		AdvanceBio ペプチドマッピング	62
生体分子の分離	6	CrossLab リアルストーリー	64
タンパク質の分離	6	アジレントのペプチド品質管理用標準試料	66
グリカン分離	12	PLRP-S	67
ペプチド分離	14	AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ	73
高速で一貫性の高いバイオ医薬品分析を実現する		AdvanceBio オリゴヌクレオチド	74
AdvanceBio カラム	16	AdvanceBio オリゴヌクレオチド標準試料	76
DNA および RNA オリゴヌクレオチドの分離	17		
アミノ酸分析	19	疎水性相互作用クロマトグラフィーによる	
アミノ酸	20	インタクト分析	78
		AdvanceBio HIC	78
メソッド開発のガイドライン	21	電荷変異体の分析	80
一次構造の分析メソッド	21	タンパク質およびその他の荷電分子の精製	80
逆相 LC/MS メソッド	23	IEX による電荷変異体の分析	80
電荷変異体の分析メソッド	24	Bio MAb HPLC カラム	83
Agilent Buffer Advisor ソフトウェアによる電荷変異体の		Bio IEX HPLC カラム	88
分析メソッド	26	PL-SAX 強アニオン交換カラム	95
凝集およびフラグメントの分析メソッド	27	PL-SCX 強カチオン交換カラム	99
グリカンおよび親水性/糖ペプチド分析	29	バイオモノリスイオン交換 HPLC カラム	102
抗体価の測定と細胞培地の最適化メソッド	30		
高感度キャピラリーカラムのメソッド	31	凝集およびフラグメントの分析	106
		生体分子の凝集体、フラグメント、	
タンパク質の同定および不純物のプロファイリング用の		化学的ライゲーション/修飾を正確に測定	106
アジレント機器	32	凝集体の調査への SEC の適用	106
1260 Infinity II バイオイナート LC	32	定量および分子量測定への SEC の適用	107
1290 Infinity II LC とハイスピードポンプ	33	アプリケーションに適した SEC カラムの選択チャート	109
1260 Infinity II LC とバイナリポンプ	34	AdvanceBio SEC	110
Agilent 1260 Infinity II Prime LC	35	CrossLab リアルストーリー	111
		AdvanceBio SEC 標準試料	116
一次構造の分析	36	Bio SEC-3	117
アミノ酸配列と翻訳後修飾の正確な測定と、		Bio SEC-5	123
ペプチドおよびオリゴヌクレオチドの不純物の分析	36	ProSEC 300S	127

(続く)

目次（続き）

ZORBAX GF-250 および GF-450 ゲルろ過カラム	128	精製 — 分取 HPLC	176
グリコシル化の特性解析	130	mRP-C18 高回収率タンパク質カラム	178
AdvanceBio グリカンマッピングカラム	132	ZORBAX PrepHT	180
N-グリカン標準	136	分取・プロセス用 PLRP-S	182
親水性ペプチドと糖ペプチドの分析	138	Bio MAb および Bio IEX	188
抗体価の測定	140	分取・プロセス用 PL-SAX および PL-SCX	190
Bio-Monolith HPLC カラム	140	ペプチドの精製	194
細胞培地とアミノ酸の分析	145	合成ペプチド用 VariTide RPC カラム	194
アジレントの細胞培地分析ソリューション	146	VariPure IPE	195
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) カラムと標準液	147	Load & Lock 分取用 HPLC カラム	196
AdvanceBio アミノ酸分析標準およびキット	149	Bio SEC	198
AdvanceBio MS スペントメディア	150	アジレントのソリューション	200
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析 (AAA)	152	Agilent CrossLab サービス	202
タンパク質除去	155		
アジレントのタンパク質分画システムとプロテオミクス用試薬	155		
マルチプルアフィニティ除去システム	156		
マルチプルアフィニティ除去システムスタータキット	159		
特殊寸法のカラム	160		
キャピラリーおよびナノカラム	160		
ZORBAX Bio-SCX シリーズ II	166		
マイクロボア (内径 1.0 mm) カラム	169		
2D-LC	172		
オフラインカラム再生	172		
コンプリヘンシブ 2D-LC	174		

ヒントとツール

バイオカラムポートフォリオ全般のアプリケーションの例については、重要品質特性のアプリケーション総覧（5991-9072JAJP）をご覧ください。

バイオカラム選択ガイドライン

生物製剤は、健康促進のための大きな可能性を秘めています。この重要な薬効分類が、これまでにない医学上のニーズに対応するために、治療用タンパク質および抗体の承認数は世界中で増え続けています。ただし、バイオ医薬品の発見と開発は容易ではありません。科学者は多くの課題に直面しており、知識の進化や技術の向上に関する最新情報を把握するだけでなく、複雑な政府規制の変遷にも対応する必要があります。このため正しい判断を迅速に下すことが重要です。アジレントは、疾病研究から QA/QC、製造までのプロセスのあらゆる段階で、治療法を適切に市場に投入するうえでの正しい選択を支援しています。これは、正確で再現性の高い結果を生み出す信頼性の高い機器と消耗品だけによるものではありません。アジレントはバイオ医薬品のワークフローを理解し、研究、発見、開発のエンジンとしてシームレスに連携して機能する製品ファミリーを提供することで、バイオ医薬品の候補物質の研究に貢献しています。

タンパク質バイオ医薬品が非常に不均一であるという前提に基づき、多くのクロマトグラフィーメソッドによって医薬品有効成分（API）を正確に特性解析する必要があります。メソッドとしては、二量体と凝集体の定量用のサイズ排除クロマトグラフィー、電荷変異体の分析用のイオン交換クロマトグラフィーなどがあります。完全な特性解析の一部として、一次アミノ酸配列と、精製や製剤の段階で発生しうる配列への翻訳後修飾を調べる必要があります。アジレントは、主要な特性解析ワークフローで完全で再現性の高い高品質な分析を実現するため、幅広い種類のカラムと消耗品をご用意しています。

本書は、特性解析ワークフローに適したカラムを見つけることができる包括的なガイドです。またメソッド開発、溶媒選択、移動相修飾、最適化、および多くの分離例についてのアドバイスやヒントも含まれていますので、カラム選択やメソッド開発にお役立てください。

アジレントは、お客様のニーズに適したあらゆるソリューションをご用意しています。このような製品ラインには、サンプルパスに金属を使用しない Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC、UHPLC アプリケーションに最高の速度や分離能、超高感度を提供するように設計された Agilent 1290 Infinity II LC があります。構造が複雑な生体分子でも、Agilent HPLC カラム、システム、消耗品を使用すれば分析が容易です。

生体分子とは

生体分子は、生きた組織で生成される化合物です。生体分子には、アミノ酸および低分子脂質や、DNA や RNA などの高分子ポリヌクレオチドなど、さまざまなサイズがあります。

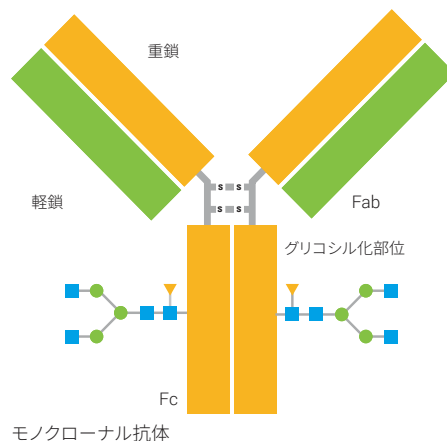
このセクションでは、次の分離について説明します。

タンパク質 - サイズ排除クロマトグラフィーによるサイズ、イオン交換クロマトグラフィーによる電荷、および逆相または疎水性相互作用クロマトグラフィーによる疎水性に基づく分離。

ペプチド - 全範囲のペプチド（全サイズ範囲の疎水性、親水性、塩基性、および酸性ペプチドを含む）の分析および精製用のバイオカラム。および HPLC と UHPLC によるペプチドマッピング用カラム。

DNA/RNA オリゴヌクレオチド - DNA および RNA オリゴ用の逆相およびイオン交換オプション、および粒子ポアサイズにより全サイズ範囲のオリゴヌクレオチド（小さな合成オリゴから大きなプラスミドまで）に対応。

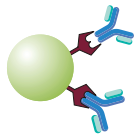
アミノ酸 - AdvanceBio アミノ酸分析カラムにより、24 種類のアミノ酸について高効率の分析ソリューションを提供。通常の分析時間は 75 mm カラムで 14 分、150 mm カラムで 24 分です。



バイオカラムとは

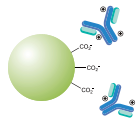
バイオクロマトグラフィーカラム（バイオカラム）は、ペプチドとタンパク質、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド、およびその他の生体分子と複合体などの生体化合物の分離に使用される液体クロマトグラフィーカラムです。バイオカラムは生体分子の分析に特化した大きいポアサイズで設計されているため、より大きな分子サイズにも対応できます。メディアは成分の非特異的な結合を最小化できるように設計されているため、回収率が向上します。分離メカニズムを選択して、生物学的機能を維持して分析中に生理活性が失われないようにするか、あるいはこれを一次構造特性解析用に意図的に変性させるかします。

アジレントのバイオカラムなら、生体分子分析に必要な、あらゆる主要な特性解析手法に対応できます。次のような特長があります。



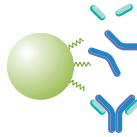
抗体価の測定

AdvanceBio バイオモノリスプロテイン A などの独自技術を使用して、抗体価の測定と細胞株の最適化を実行します。



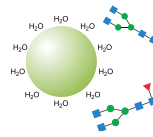
電荷変異体の分析

Agilent イオン交換カラムには、モノクローナル抗体分析用に最適化されたケミストリ（正確なアイソフォーム分析用の Bio MAb および Bio IEX など）が含まれます。



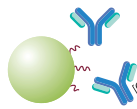
逆相によるインタクトおよびサブユニットの純度

AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX RRHD 300 Å、PLRP-S などの主要技術を使用することで、一次構造特性解析や、インタクトタンパク質または断片化されたタンパク質の分析において、信頼性の高い結果を得ることができます。



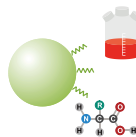
糖鎖分析

Agilent 親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）カラムによって、正確で再現性の高い糖鎖および糖ペプチド分析が可能です。



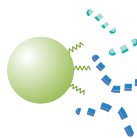
疎水性相互作用によるインタクト分析

Agilent AdvanceBio HIC カラムによって、mAb 中の酸化（翻訳後修飾）や抗体薬物複合体（ADC）で見られる薬物抗体種などのさまざまなタンパク質変異体を分離します。



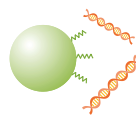
アミノ酸と細胞培地の分析

AdvanceBio AAA による LC/UV ベースのワークフロー、または AdvanceBio MS スペントメディアによる LC/MS ベースのワークフローを用いて、細胞培地の重要な成分を分析します。



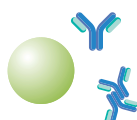
ペプチドマッピング

AdvanceBio ペプチドマッピングを用いて、消化されたタンパク質サンプル中の主要な翻訳後修飾を検出および同定します。



オリゴヌクレオチド分析

DNA/RNA 分析用の堅牢で効率性の高いソリューション。



凝集体とフラグメントの分析

AdvanceBio SEC を用いて、凝集体（二量体、三量体、四量体など）を正確に測定し、分子量の大きいタンパク質から低分子賦形剤や不純物を分離します。

バイオカラム選択ガイドライン

Agilent AdvanceBio カラムは、モノクローナル抗体とその他のインタクトタンパク質、SEC による凝集体、IEX による電荷変異体、逆相によるインタクト質量、一次構造、翻訳後修飾（PTM）の特性解析、および親水性相互作用液体クロマトグラフィーによる切断グリカン分析を、高精度で高速に実行できるように設計されています。

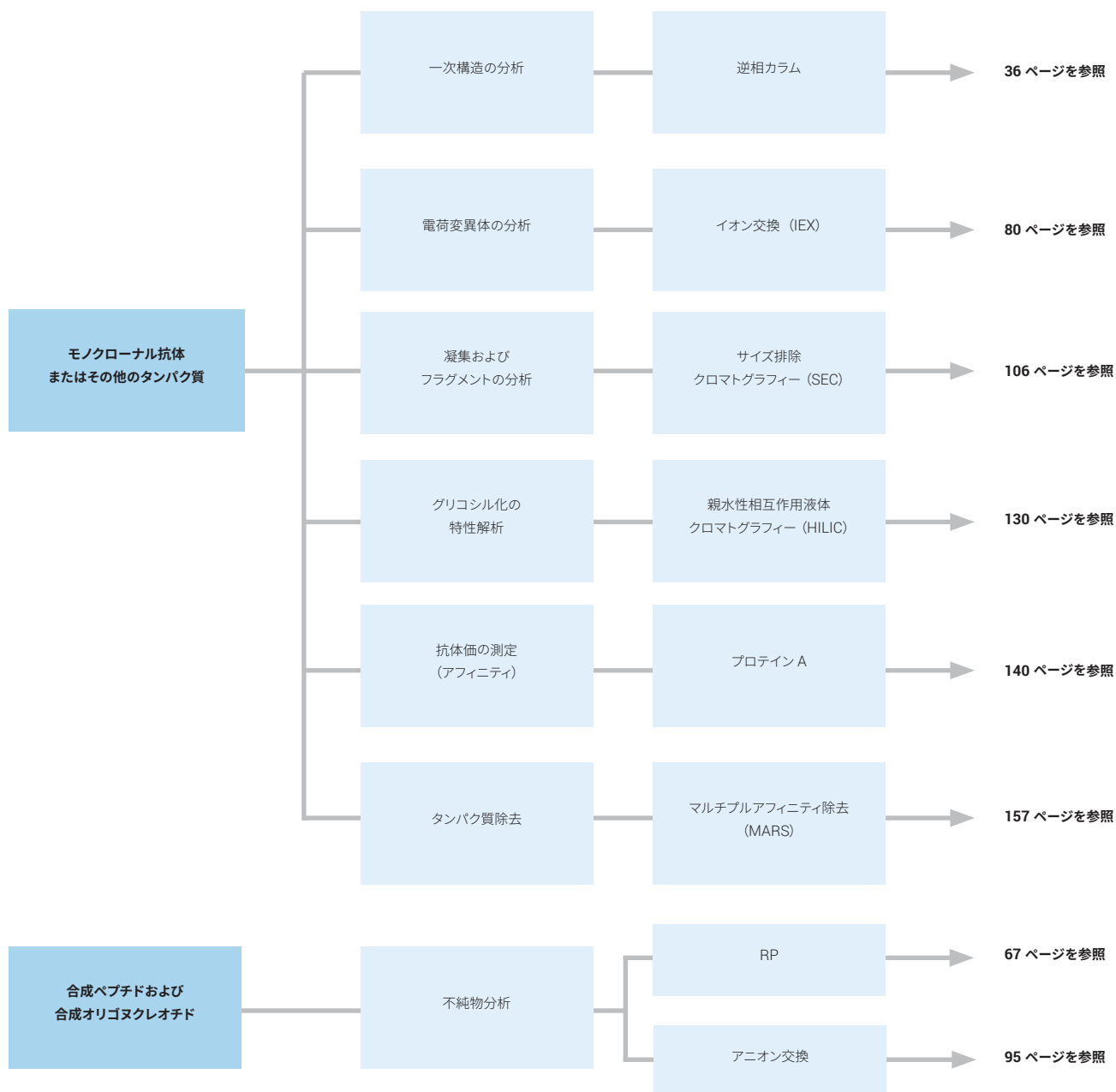
このガイドでは、すべての Agilent バイオカラムポートフォリオの詳細と、生物製剤の正確な特性解析に適した AdvanceBio ファミリー製品の選択について説明します。



カラム選択フローチャート

生体分子アプリケーションに最適なカラムを選択するには、以下のフローチャートに記載されているページをご覧ください。

生体分子の分離に最適なカラムを選択するためには、まずは分子サイズを確認します。分子サイズによって、分離に使用する HPLC メソッドのポアサイズが決まります。次に、分子の溶解性を考慮します。その後で、分離メカニズム、サイズ、疎水性、電荷を確認します。



生体分子の分離

タンパク質の分離

タンパク質は複雑な分子で、完全な特性解析には複数の手法が必要です。タンパク質は三次元構造として存在し、これらの構造によって生物活性がもたらされます。

アミノ酸鎖のシーケンスがタンパク質の一次構造を定義します。続いて一次構造のアミノ酸間の水素結合によって二次構造が生まれます。二次構造は通常、アルファヘリックスとブリーツシート（βシート）の形状です。さらに二次構造の領域間の一連の相互作用、水素結合、イオン性、疎水性、およびジスルフィドブリッジによって、三次タンパク質構造または三次元構造が生まれます。タンパク質がいくつかのアミノ酸鎖で構成される場合、これらの鎖間の相互作用によって四次構造が生まれます。

このため図 1 からわかるとおり、タンパク質の特性解析メソッドを検討する場合は、三次構造や四次構造を破壊せずに未変性状態でタンパク質を特性解析する手法が必要です。また、三次元構造をなくした完全な変性状態で一次アミノ酸配列を評価する手法も必要です。

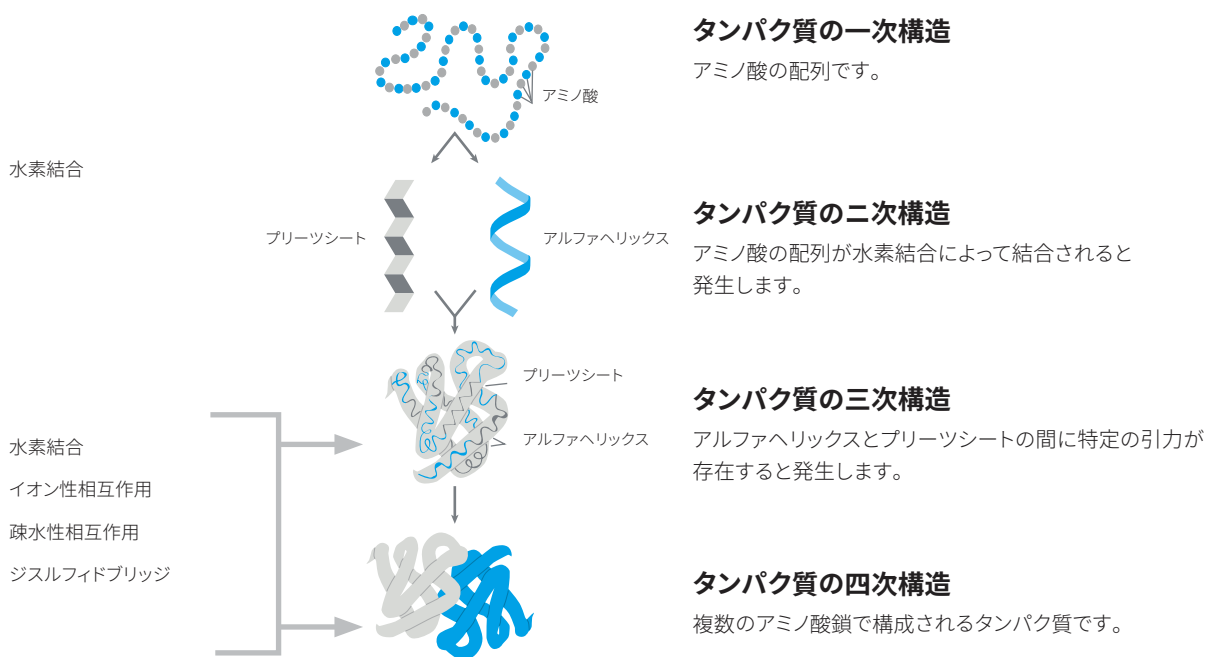


図 1.さまざまなレベルのタンパク質構造の概略図

タンパク質の環境によって、この構造が影響を受けたり、安定化または破壊されたりする場合があります。考慮すべき要素としては、pH、温度、塩濃度、水性溶媒や有機溶媒の含有量、および一部のタンパク質では安定化した低分子や金属イオンの存在などがあります。またタンパク質構造は、-S-S- 結合を破壊するスルフィドリル還元剤や、尿素またはグアニジン HCl などのカオトロピック試薬を使用することで破壊される場合もあります。三次元構造を決定するタンパク質と分子内相互作用は複雑であるため、タンパク質分子とその他の個々の分子およびそれらの接触面との間で分子間結合が発生することも予測できます。この結果、(HPLC カラムおよびシステムの表面を含む) 表面にタンパク質の複合体、凝集体（場合により沈殿物を含む）、堆積物が発生する場合があります。したがって、タンパク質が維持される処理と環境を考慮する必要があります。

タンパク質のカラムセレクションガイド

アプリケーション	技術	アジレントのカラム	注意事項
一次構造の分析	UHPLC/HPLC 逆相分離	AdvanceBio RP-mAb PLRP-S ZORBAX RRHD 300 Å Poroshell 300 Å ZORBAX 300 Å AdvanceBio ペプチドマッピング	逆相分離では、タンパク質の変性によってアミノ酸配列とアミノ酸修飾（翻訳後修飾を含む）に関する詳細情報を取得します。
電荷変異体の分析	イオン交換分離	Agilent Bio IEX Agilent Bio MAb PL-SAX PL-SCX	個々のアミノ酸の比率によって、タンパク質分子の正味電荷が決まります。正味電荷がゼロの pH は等電点 (pI) と呼ばれます。溶媒の pH が pI 未満であるとタンパク質が正電荷（酸性）になり、溶媒の pH が pI を超えるとタンパク質が負電荷（塩基性）になります。イオン交換分析では、溶出液の pH と pI を 1 pH 単位以上離すことを推奨します。イオン交換カラムによるタンパク質分析には、緩衝液入り移動相と、溶出用の塩グラジエントまたは pH グラジエントが必要です。
凝集およびフラグメントの分析	サイズ排除分離	AdvanceBio SEC Bio SEC-3 Bio SEC-5	タンパク質バイオ医薬品の主な懸念事項は凝集体です。凝集体によって免疫原性反応が引き起こされ、最終的な製剤の組成に影響する可能性があるためです。
グリコシル化の特性解析	親水性相互作用液体クロマトグラフィー	AdvanceBio グリカンマッピング ZORBAX RRHD 300 HILIC	免疫原性の影響とバイオ医薬品の安全性のため、タンパク質と mAb のグリコシル化とグリカン構造を理解することの重要性が高まっています。HILIC クロマトグラフィーではサンプルの親水性部分が維持されるため、逆相カラムにオソゴナルな情報が提供されます。
抗体価の測定	アフィニティ分離	Bio-Monolith Protein A Bio-Monolith Protein G	高コストの分取や大量のプロテイン A を使用する際に細胞培養上清のモノクローナル抗体の力価と収率をモニタリングするには、小規模（分析スケール）の手順を使用して、モノクローナル抗体の力価を測定し、モノクローナル抗体を採取する最適な時間を特定する必要があります。
タンパク質除去	アフィニティ精製	MARS Human-14 MARS Human-7 MARS Human-6 MARS Human-6 大容量 MARS Human-2 MARS Human-1 MARS Mouse-3	生体サンプルから高濃度タンパク質を除去します。高濃度タンパク質を除去することで、分析のダイナミックレンジが効果的に広がり、後続の LC/MS 分析や電気泳動分析の感度が向上します。

トラスツマブ変異体 IgG1 を高速に高分離能で分離

カラム: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2.1 x 100 mm, 3.5 µm

移動相: A : 0.1 % TFA 含有水:IPA (98:2) 溶液
B : IPA:ACN:移動相 A (70:20:10)

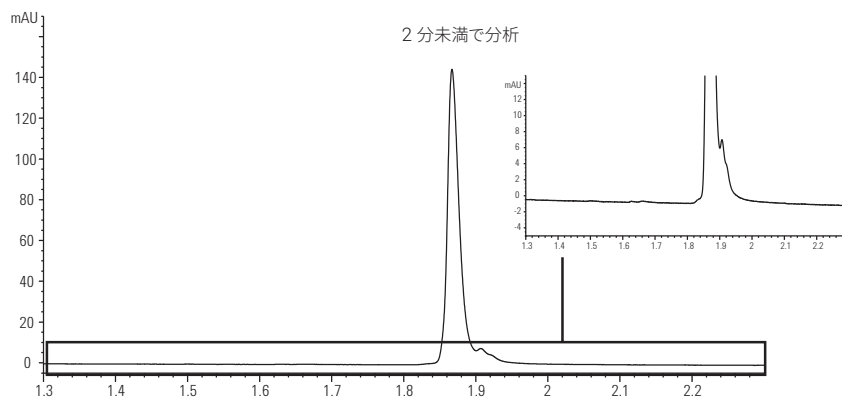
流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
1 分間 10 % B で再平衡

温度: 80 °C

検出器: UV, 254 nm

サンプル: Creative Biolabs 製のヒト化組み換えトラスツマブ
変異体 IgG1 インタクト (1 mg/mL) を 5 µL 注入



AdvanceBio RP-mAb C4 により、2 分未満でシャープなピーク形状で詳細に分離できます。

酸化の高分離能分離

カラム: ZORBAX RRHD 300SB-C18
857750-902
2.1 x 50 mm, 1.8 µm

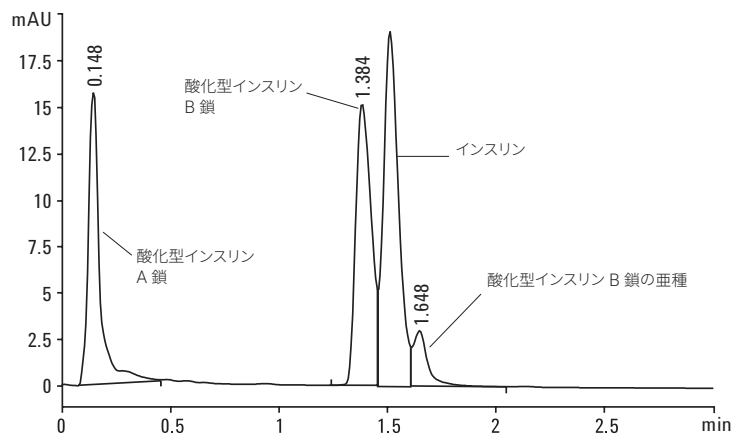
移動相: A : 0.1 % TFA
B : 0.01 % TFA + 80 % ACN

流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 33 ~ 50 % B, 0 ~ 4 分

検出器: 1290 Infinity LC に搭載のダイオードアレイ検出器、280 nm

サンプル: インスリン、インスリン A 鎖および B 鎖、酸化型 (BSA、Sigma-Aldrich, Corp., 1 mg/mL)



ZORBAX RRHD 300SB-C18 2.1 x 50 mm, 1.8 µm カラムを使用すると、インスリンから酸化インスリン鎖を 2 分未満で分離できます。

インタクト MAb 単量体と二量体の分離

カラム: Bio SEC-3, 300 Å
5190-2511
7.8 x 300 mm, 3 µm

流量: 1.0 mL/min

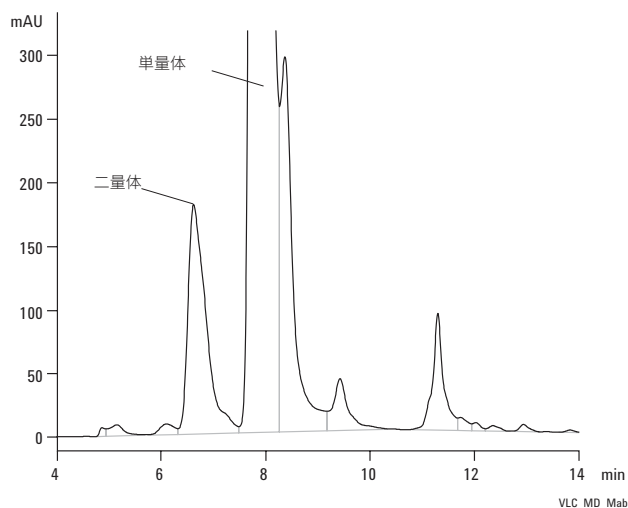
注入: 5 µL

温度: 室温

検出器: UV, 220 nm

緩衝液: リン酸ナトリウム緩衝液 150 mM, pH 7.0

イソクラティック: 0 ~ 100 % 緩衝液 (0 ~ 30 分)



ヒントとツール

アジレントは、複雑で手間のかかる作業の軽減に役立つさまざまなヒントやツールをご提供しています。詳細については、「バイオ医薬品のワークフローソリューション：困難な分析課題へのアジレントの解決法」(資料番号 5991-5235JAJP) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

塩グラジエントによるヒト IgG1 の電荷変異体の分離

カラム: Bio MAb, PEEK

5190-2407

4.6 x 250 mm, 5 μ m

検出器: UV, 225 nm

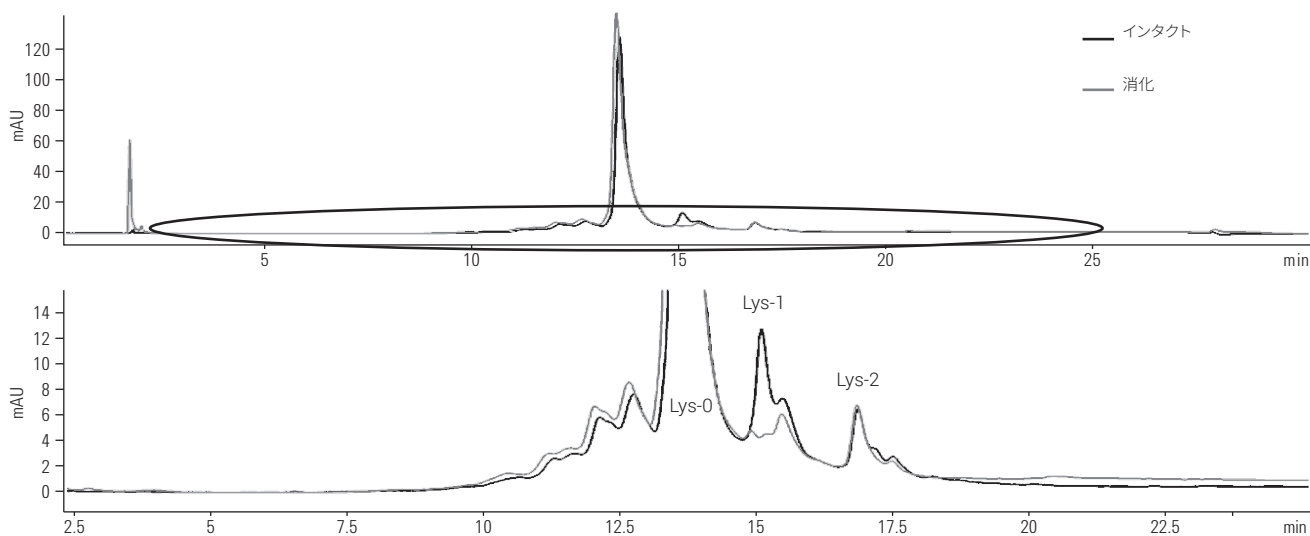
機器: 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC または
1100 シリーズ LC

移動相: A: 10 mM Na₂HPO₄, pH 5.5
B: A + 0.5 M NaCl

サンプル: 1 mg/mL インタクトまたは C-末端分解 IgG1, 5 μ L

流量: 0.85 mL/min

グラジエント: 0 ~ 25 分で 10 ~ 35 % B



Agilent Bio MAb 5 μ m カラムを用いたインタクトおよび C 末端分解 IgG1 の分離

CHO 細胞上清からの IgG1 の抗体価の測定

カラム: Bio-Monolith Protein A

5069-3639

5.2 x 4.95 mm

移動相: A: 50 mM リン酸塩、pH 7.4
B: 100 mM クエン酸、pH 2.8

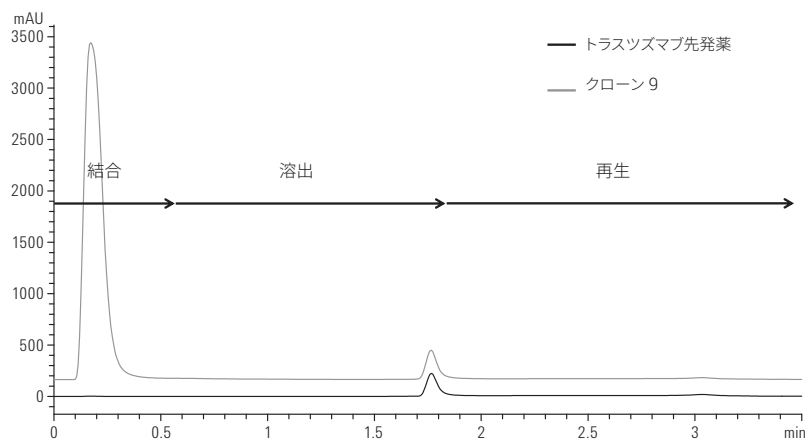
流量: 1 mL/min

グラジエント: 時間 (分) % B
0 ~ 0.5 0 (結合)
0.6 ~ 1.7 100 (溶出)
1.8 ~ 3.5 0 (再生)

注入量: 50 µL

検出器: UV、280 nm

フラクションコレクション: 時間ベース



トラスツマブ産生 CHO クローン、クローン 9 と、50 mM Na-リン酸 pH 7.4 で 0.2 mg/mL に希釈したトラスツマブ先発薬の AdvanceBio バイオモノリスプロテイン A クロマトグラム。上清はリン酸緩衝液で 1:1 に希釈しました。

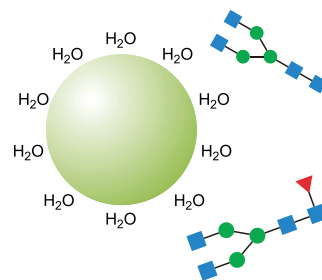
グリカン分離

グリカンプロファイリング

バイオ医薬品の特性解析にはグリカン分析が必要です。グリコシル化パターンが最終製品の安全性と効能に影響する可能性があるためです。

インタクト糖タンパク質は PNGase F などの酵素によって処理され、タンパク質からグリカンが切断されます。次に蛍光色素によってグリカンがラベル化されます。グリカンは本来 UV や蛍光によって目視できないためです。次のラベリング、クリーンアップ手順を実行して、サンプル混合液から過剰な試薬と脱グリコシル化タンパク質を除去します。精製および遊離されたグリカンサンプルの分析方法としては、蛍光または質量分析検出による親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) が最も一般的です。

クロマトグラフィープロファイルは糖タンパク質の開始サンプルごとに特有のものであり、複雑さが大きく異なる可能性があります。AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、短時間での高分離能分離に最適です。



超高速グリカン分析：1.8 μm の粒子で 10 分未満

カラム： Agilent AdvanceBio グリカンマッピング
859700-913

2.1 x 150 mm、1.8 μm

移動相： A：100 mM NH_4 塩酸、pH 4.5
B：ACN

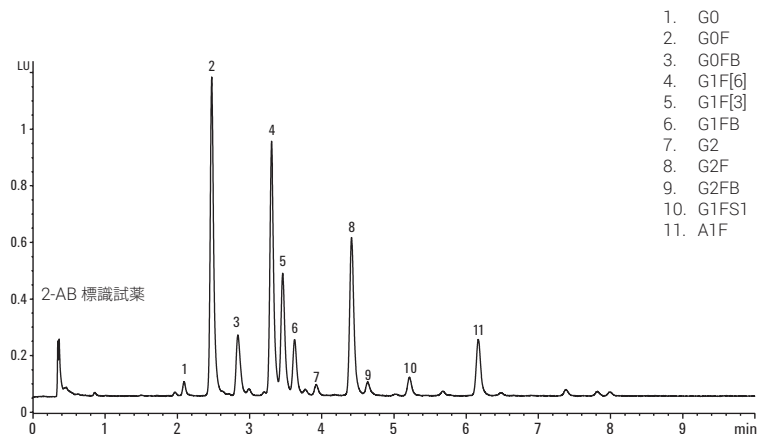
注入量： 70:30 ACN:100 mM NH_4 塩酸中で 2 μL

蛍光 励起 = 260

検出： 蛍光波長 = 430

機器： Agilent 1290 Infinity LC と
Agilent 1260 Infinity FLD

サンプル： 2-AB ラベル化 N-結合型ヒト IgG
グリカンライブラリ (p/n 5190-6996)



高速で高分離能の糖鎖マッピング (1.8 μm カラム)。この標準試料はすべての AdvanceBio Glycan マッピングカラムの試験に使用されています。

時間	%A	%B	流量 (mL/min)
0	25	75	1.0
12	40	60	1.0
12.15	60	40	0.5
12.5	60	40	0.5
12.9	25	75	0.5
13.05	25	75	1.0
15	25	75	1.0

ピーク グリカン 構造

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

ピーク グリカン 構造

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

▲ フコース
● ガラクトース
● マンノース
■ N-アセチルグルコサミン
◆ N-アセチルノイラミン酸

ペプチド分離

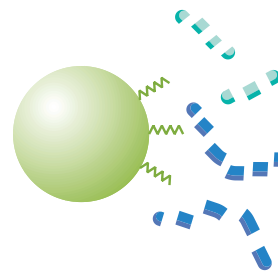
ペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、タンパク質の特性解析に必要です。ペプチドマッピングは、タンパク質の同定と、翻訳後修飾の同定および定量に使用されます。

精製されたタンパク質はまずトリプシンなどの酵素によって消化され、さまざまなペプチドフラグメントが生成されます。酵素切断の特異性によって、タンパク質に特有のペプチドのフィンガープリントができます。ペプチドフラグメントの同定によってタンパク質を同定し、ペプチド分解物のプロファイルの変化を使用して、製造または精製プロセス中に発生した可能性があるタンパク質への翻訳後修飾を同定できます。

逆相 UHPLC/HPLC は、MS または UV 検出によるペプチド分解物の分析に適した技術です。LC/MS は、ペプチドフラグメントの同定と配列カバー率の測定に使用されます。LC/UV は一般的にモニタリング/QC セグメントのペプチドマッピングの比較に使用されます。

ペプチド分解物は複雑な混合物であり、完全にカバーするには（つまり個々のペプチドを分離するには）高効率/高分離能カラムが必要です。AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、タンパク質同定および翻訳後修飾の特定に役立つ高分解能のペプチドマップが得られるように設計されています。タンパク質の一次配列に含まれるアミノ酸の置換/修飾をすばやく分離し、同定することができます。



Agilent ペプチド混合物を使用した品質管理テスト

カラム: AdvanceBio ペプチドマッピング
653750-902
2.1 x 150 mm, 2.7 μ m

流量: 0.5 mL/min

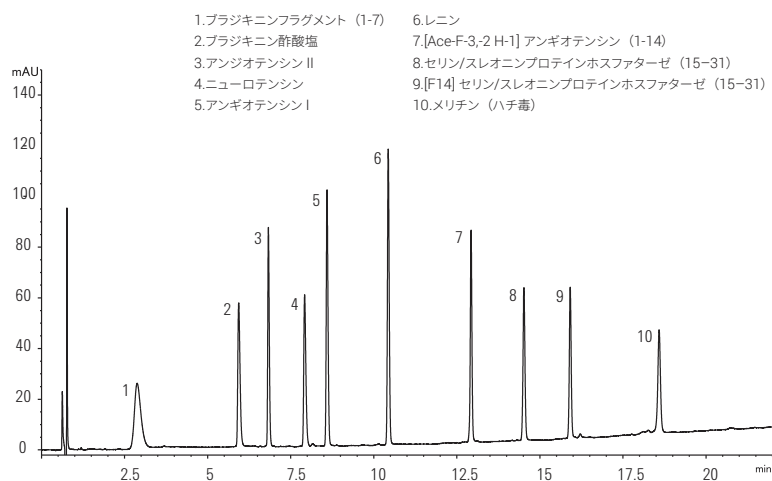
注入: 3 μ L

グラジエント: A、水 (0.1 % TFA)、B、ACN (0.1 % TFA)、0 ~ 25 分、
15 ~ 65 % B、25 ~ 26 分、65 ~ 95 % B

温度: 55 °C

検出器: 220 nm

サンプル: ペプチドマッピング標準混合物
(ペプチドごとに 0.5 ~ 1.0 μ g/ μ L) p/n 5190-0583



AdvanceBio ペプチドマッピング充填剤の全バッチにテスト用混合物を使用しました。この混合物には、分子量の範囲が 757 ~ 2845 Da の 10 種類の親水性、疎水性、および塩基性ペプチドが含まれています。すべてのカラムは低分子プローブを使用したテストにより効率も保証されています。

ヒントとツール

Agilent InfinityLab ウェルプレートおよびシーリングマットは、ハイスループットの LC/MS アプリケーションに最適なサンプル容器です。

詳細情報: www.agilent.com/chem/jp

高速で一貫性の高いバイオ医薬品分析を実現する AdvanceBio カラム

AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、進化を続けるアジレントの最先端のバイオカラムファミリーの一部です。これらのカラムは、ペプチドとタンパク質、抗体、複合物、新規生体物質、およびバイオ医薬品の分離と特性解析のために、一貫性のある卓越した性能を提供できるように設計されています。AdvanceBio カラムの基礎となる技術が精度と生産性を向上させ、分析のスピードアップとラボの生産性向上をサポートします。

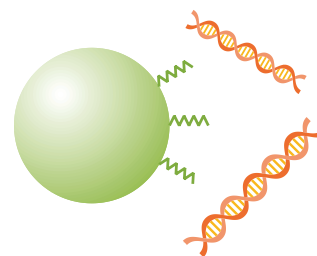
アジレントのペプチドマッピングソリューションの詳細情報については、**62 ページ**をご覧ください。



DNA および RNA オリゴヌクレオチドの分離

オリゴヌクレオチド（オリゴ）は、治療薬の可能性などますます適用範囲が増えているため、改めて注目されるようになってきました。この合成ワークフローは、より確立されている合成ペプチド作製ワークフローに似ています。具体的には、活性化した固定相合成樹脂を特定のヌクレオチドの配列追加で使用して、必要な配列を構築します。

ヌクレオチドの構成要素は 5' ヒドロキシル末端でジメトキシシリチル（DMT）基で保護されます。切断されたターゲットオリゴには、この保護された基が結合したままになります。DMT は疎水性であるため、第 1 段階で便利なハンドルとして使用できます。オリゴヌクレオチドの（特に酵素分解に対する）安定性を向上させるには化学的に修飾する場合があります。このためには例えば酸素と硫黄を交換してホスホロチオエートを作製します。化学合成によって生体分子を作製する場合、各追加サイクルの結合効率が 100 % になることはありません。固定相の合成担体から切断された後のサンプルには欠損配列、残留物が失われたオリゴ、および重複結合や分岐により生み出された一定量の高分子オリゴが含まれます。サンプル混合物は複雑であるため、その分析には高効率な手法が必要です。



オリゴヌクレオチドの分離には、次の 3 つの UHPLC/HPLC 手法が一般的に使用されます。

トリチルオン - DMT 基が結合したままの全長ターゲットオリゴを、脱保護された不完全配列から分離します。この手順は比較的簡単に実行できますが、得られる分析情報が限られるため、精製メソッドとして考えられています。

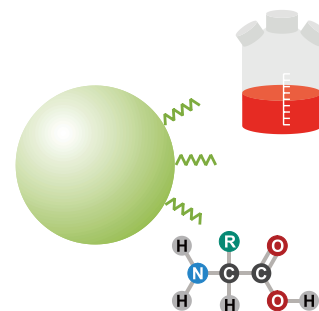
トリチルオフの脱保護オリゴのイオン交換分離 — このメソッドではオリゴの主鎖上の負電荷を利用して分離を促進します。短鎖オリゴは良好に分離しますが、鎖長が長くなるにつれて分離能は低下します。また、この手法では水溶性溶離液を使用しますが、オリゴは高帯電性であり、カラムからの溶出に高濃度の塩が必要です。

トリチルオフの脱保護オリゴのイオンペア逆相分離 - 有機溶媒と揮発性イオンペアリング剤を使用し、LC/MS に適しています。この手法は高効率粒子に最適です。オリゴを完全に変性させ、相補的配列との関連付けを防ぐ条件が必要です。このため高温での分離を推奨します。

DNA および RNA オリゴヌクレオチドのカラムの選択			
アプリケーション	技術	アジレントのカラム	注意事項
トリチルオン/トリチルオフオリゴヌクレオチド	トリチルオン	PLRP-S 50 µm メディア	疎水性の違いによって分離します。トリチルオフオリゴからトリチルオンオリゴを分離するのに最適で、脱保護オリゴのイオンペア逆相分離にも使用されます。
脱保護オリゴヌクレオチド	トリチルオフの脱保護オリゴのイオンペア逆相分離	PLRP-S 3 µm~50 µm AdvanceBio オリゴヌクレオチド	
凝集およびフラグメントの分析	トリチルオフの脱保護オリゴのイオン交換分離	PL-SAX 1000 Å	高 pH の変性条件下で脱保護オリゴを分離します。ポリマー性粒子の 4 級アミン機能により高 pH でイオン交換分離を行えるため、自己相補的配列についてより正確なクロマトグラフィー分析を実施できます。

アミノ酸分析

AdvanceBio AAA 高分離カラムは、更新および改良されたプロトコルに従ってアミノ酸を分離します。タンパク質の作製中に細胞培養をモニタリングし、作製タンパク質の発現に適した栄養素のバランスとレベルが維持されるようにします。アミノ酸は重要な原料成分であるため、作製プロセス中にモニタリングして調整する必要があります。逆相クロマトグラフィーはアミノ酸分析に使用される主要な手法です。注入間でのすべての分析作業を、75 mm の短いカラムでは 14 分（分析時間は 9 分）、150 mm の長いカラムでは 24 分（分析時間は 18 分）で完了できます。Agilent LC による全自動化された 1 つの手順で OPA および FMOC 誘導体化法を使用することで、高い感度（ダイオードアレイ検出器または蛍光検出器で 5 ~ 50 pmol）と信頼性を実現できます。



AdvanceBio AAA

カラム： AdvanceBio AAA
655950-802

4.6 x 100 mm、2.7 μm

移動相： A = 10 mM Na₂HPO₄ および 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2
B = アセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10、v:v:v)

流量： 1.5 mL/min

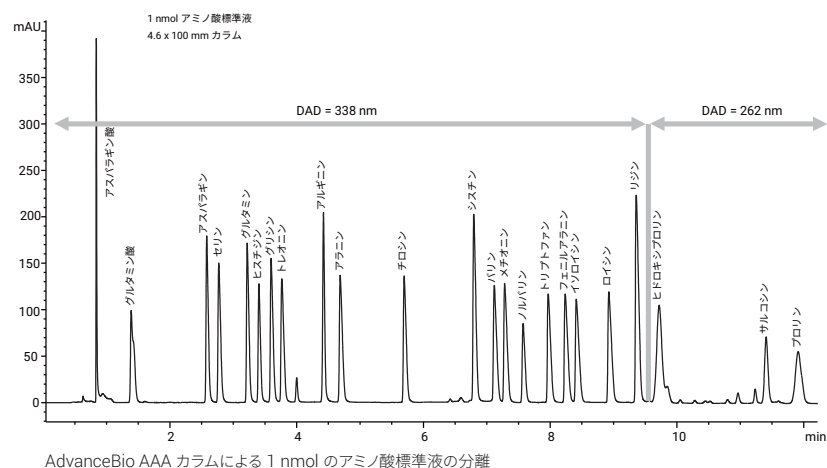
注入： 3 μL

グラジエント：	時間	%B
	0	2
	0.35	2
	13.4	57
	13.5	100
	15.7	100
	15.8	2
	18	停止

カラム

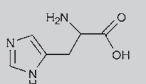
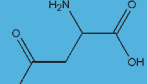
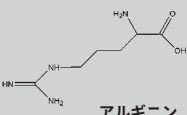
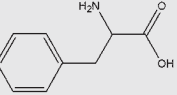
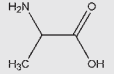
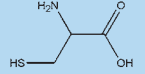
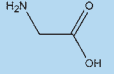
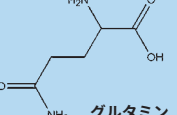
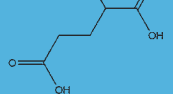
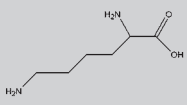
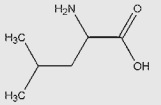
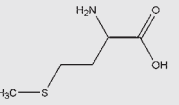
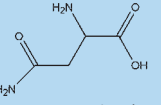
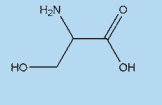
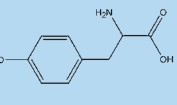
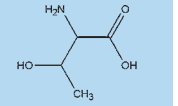
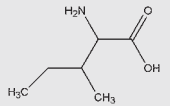
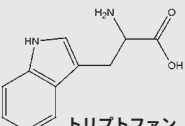
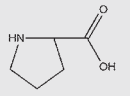
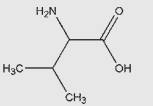
温度： 40 °C

検出器： UV、338 および 262 nm



AdvanceBio AAA カラムによる 1 nmol のアミノ酸標準液の分離

アミノ酸

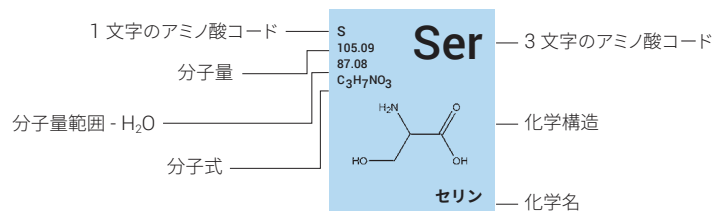
<p>H 155.16 137.14 C₆H₉N₃O₂</p> <p>His</p>  <p>ヒスチジン</p>						<p>D 133.10 115.09 C₄H₇NO₄</p> <p>Asp</p>  <p>アスパラギン酸</p>
<p>R 174.20 156.19 C₆H₁₄N₄O₂</p> <p>Arg</p>  <p>アルギニン</p>	<p>F 165.19 147.18 C₉H₉NO₂</p> <p>Phe</p>  <p>フェニルアラニン</p>	<p>A 89.09 71.08 C₃H₇NO₂</p> <p>Ala</p>  <p>アラニン</p>	<p>C 121.16 103.14 C₃H₇NO₂S</p> <p>Cys</p>  <p>システイン</p>	<p>G 75.07 57.05 C₂H₅NO₂</p> <p>Gly</p>  <p>グリシン</p>	<p>Q 146.15 128.13 C₅H₁₀N₂O₃</p> <p>Gln</p>  <p>グルタミン</p>	<p>E 147.13 129.11 C₅H₉NO₄</p> <p>Glu</p>  <p>グルタミン酸</p>
<p>K 146.19 128.17 C₆H₁₄N₂O₂</p> <p>Lys</p>  <p>リジン</p>	<p>L 131.17 113.16 C₆H₉NO₂</p> <p>Leu</p>  <p>ロイシン</p>	<p>M 149.21 131.20 C₅H₁₁NO₂S</p> <p>Met</p>  <p>メチオニン</p>	<p>N 132.12 114.10 C₄H₈N₂O₃</p> <p>Asn</p>  <p>アスパラギン</p>	<p>S 105.09 87.08 C₃H₇NO₃</p> <p>Ser</p>  <p>セリン</p>	<p>Y 181.19 163.17 C₉H₉NO₃</p> <p>Tyr</p>  <p>チロシン</p>	<p>T 119.12 101.10 C₄H₉NO₃</p> <p>Thr</p>  <p>トレオニン</p>
<p>I 131.18 113.16 C₆H₁₃NO₂</p> <p>Ile</p>  <p>イソロイシン</p>	<p>W 204.23 186.21 C₁₁H₁₂N₂O₂</p> <p>Trp</p>  <p>トリプトファン</p>	<p>P 115.13 97.12 C₅H₉NO₂</p> <p>Pro</p>  <p>プロリン</p>	<p>V 117.15 99.13 C₆H₁₁NO₂</p> <p>Val</p>  <p>バリン</p>			

■ 塩基性

■ 非極性（疎水性）

■ 極性、非荷電

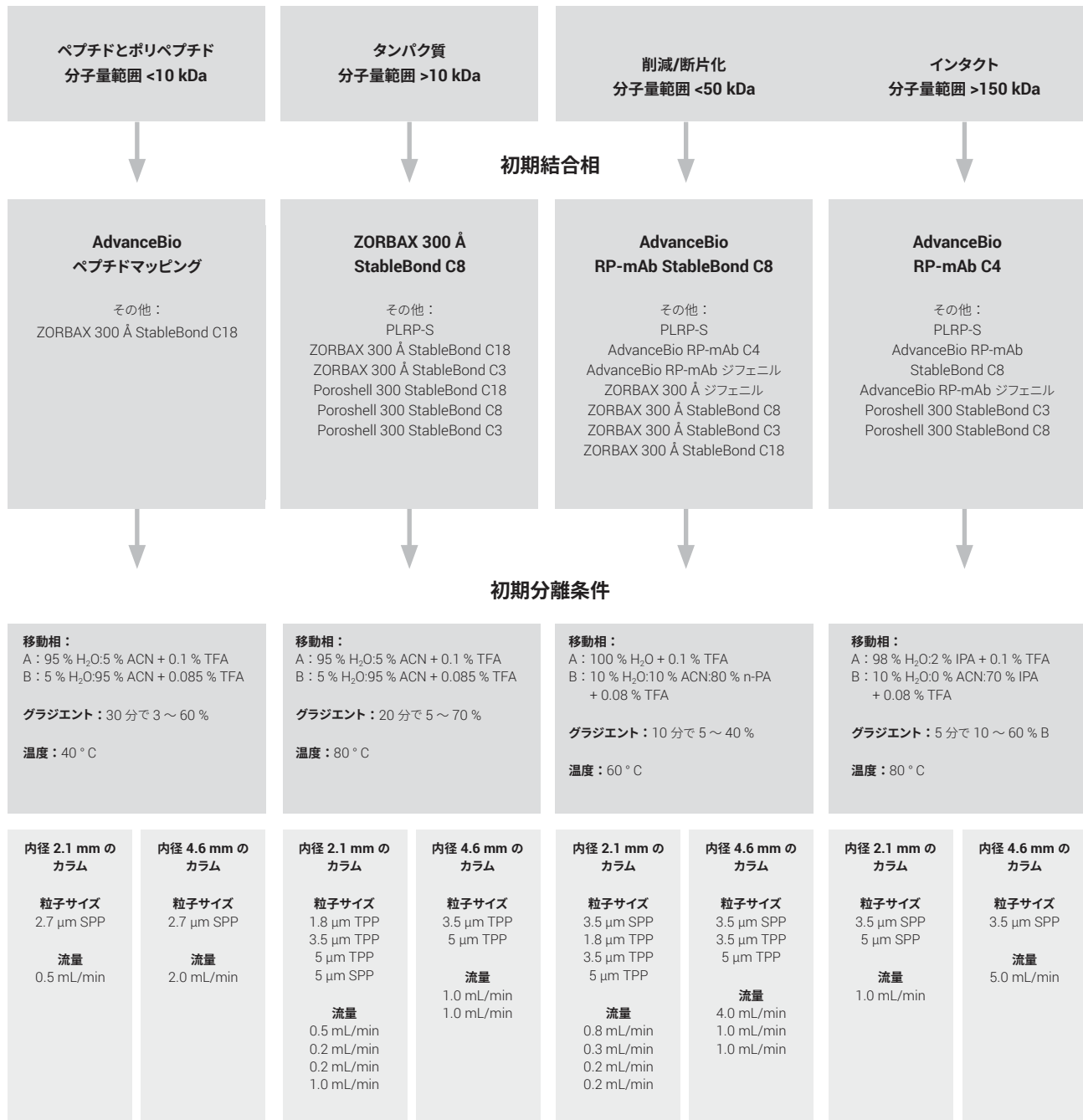
■ 酸性



メソッド開発のガイドライン

一次構造の分析メソッド

このセクションでは、一次構造分析用のカラムの選択方法と、mAb、タンパク質、ペプチドのメソッド開発に関する重要な詳細情報について説明します。



SPP = 表面多孔質粒子、TPP = 全多孔質粒子

低 pH とシンプルな水性/有機グラジエントで開始する

通常は、水:アセトニトリル + 0.1 % のトリフルオロ酢酸 (TFA) グラジエントを使用して、すべての対象成分を溶出させます。300 Å ポアサイズカラムで一般的な高分離能グラジエントを使用した場合は 30 ~ 50 分かかります。AdvanceBio RP-mAb カラムを使用すると、短い分析時間と高い流量で優れた分離能を得ることができます。分離能を上げるには、グラジエント時間を延ばす、カラムを短くする、流量を増やすなどの方法があります。LC/MS メソッドでは、TFA を使用すると検出器の感度が下がる可能性があるため、ギ酸アンモニウムやギ酸に置き換えられる場合があります。

サンプル溶解性を最適化する

あらゆる pH で優れたピーク形状と回収率を得るには、サンプルを完全に可溶性にすることが重要です。AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX 300 Å StableBond、Poroshell 300 StableBond、AdvanceBio ペプチドマッピングでは強酸性溶媒か中性溶媒を使用できます。ZORBAX 300Extend-C18 と Poroshell 300Extend-C18 では中性溶媒か希塩基を使用できます。

タンパク質とペプチドを可溶性にする溶媒の選択

水/リン酸緩衝液

希酸 (TFA、酢酸または HCl)

中性 pH、6 ~ 8 M グアニジジ HCl またはイソチオンアネート

酢酸 5 %/6 M 尿素

希酸 + 水性/有機溶媒 (ACE、MeOH、THF)

希塩基 (水酸化アンモニウム)

DMSO または DMSO を使用して 0.1 % ~ 1 %

ホルムアミド

弱

強

温度を上げる

タンパク質とペプチドの分離は温度の影響を受けます。カラム温度を上げると、タンパク質と疎水性ペプチドおよび凝集ペプチドの分離能と回収率が大幅に向上します。

AdvanceBio RP-mAb : 最大 90 °C
ZORBAX 300 StableBond, Poroshell 300 StableBond : 最大 80 °C
AdvanceBio ペプチドマッピング : 最大 60 °C

移動相の pH を最適化する

低 pH でうまくいかない場合は中 pH や高 pH を試してみる

最適化された低 pH メソッドで最適な分離能を得られない場合は、中 pH や高 pH の移動相を使用できます。高 pH では選択性が大きく変わる場合がよくあります。これは酸性アミノ酸が負電荷になり、一部の塩基性アミノ酸の電荷が失われるためです。ZORBAX 300Extend-C18 は中〜高 pH の分離に最適です。

カラム:	ZORBAX 300Extend-C18 4.6 x 150 mm, 5 µm 773995-902	グラジエント:	30 分で 5 ~ 60 % B
移動相:	A : 20 mM NH ₄ OH 水溶液 B : 20 mM NH ₄ OH、80 % の ACN 溶	温度:	25 ~ 30 °C (<60 °C)
液		流量:	1 mL/min

逆相 LC/MS メソッド

タンパク質とペプチドの LC/MS は、タンパク質の特性解析情報の取得、タンパク質の翻訳後修飾の正確な同定、合成ペプチドや天然ペプチドの分子量の測定に使用されます。またプロテオミクスアプリケーションで、2D 分離でのタンパク質同定にも使用されます。このためタンパク質とペプチドの LC/MS は重要な分離分野であり、カラムと移動相の特殊な推奨事項が必要です。LC/MS には小さいカラムサイズがよく使用され、通常は移動相で TFA は使用されません。この移動相添加剤を MS で使用すると感度が下がるためです。

分析 LC/MS アプリケーション

サンプルサイズの制限がない場合は、内径 2.1 mm のカラムを使用すると良好な感度を得ることができます。Poroshell 300 カラムでは、より小さい内径 1 mm のカラムを使用できます。



高感度/プロテオミクスアプリケーション

キャピラリーカラムは、高感度のタンパク質およびペプチドアプリケーションに使用されます。内径 0.5 mm のカラムは、タンパク質とタンパク質消化物の分離に使用されます。内径 0.3 mm のカラムはタンパク質消化によく使用されます。これらの成分は、水酸化アンモニウム移動相を使って高 pH で分析できます。ナノカラム（内径 0.1 mm および 0.075 mm）は 2D LC/MS システムでプロテオミクス用によく使用され、最初は C18 結合相を選択します。



電荷変異体の分析メソッド

このセクションでは、電荷変異体分析用のカラムの選択方法と、mAb、タンパク質、ペプチドのメソッド開発に関する重要な詳細情報について説明します。



条件を最適化する

一部の分離では特定の緩衝液、イオン強度、pH、温度が必要な場合があります。

イオン強度

カラム機能を維持するには、特定のイオン強度が必要です。通常は、最小で 10 ~ 20 mM の塩濃度が必要です。
ただし強度が 20 mM を超えると、生体分子がカラムに吸着しにくくなります。一般的に使用される塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸塩です。
溶出用の一般的な塩濃度は 400 ~ 500 mM です。

注： 背圧が大幅に上がるため、カラムを水だけで洗浄しないでください。

緩衝液と pH の選択

分離の最適化において、緩衝液は重要な役割を果たします。リン酸緩衝液は通常、抗体と多くの生体分子に使用されます。次の MES、トリス、および ACES 緩衝液も推奨します。
pH 5.0 ~ 6.5. pH の緩衝液の使用は、通常 +/- 0.2 単位で調整できます。
一部の特定のタンパク質では、より高い pH (>pH 6.5) が必要な場合があります。
pH の調整にはリン酸、酢酸、HCl、NaOH を使用できます。

溶出には pH グラジエントも使用できます。

緩衝液と pH の選択

アニオン交換には pH 8.0 ~ 9.0 の酢酸緩衝液とリン酸緩衝液の使用を推奨します。pH は通常、+/- 0.2 単位で調整できます。一部の特定のタンパク質では、より高いまたは低い pH の緩衝液が必要な場合があります。
pH の調整にはリン酸、酢酸、HCl、NaOH を使用できます。

溶出には pH グラジエントも使用できます。

添加剤

有機溶媒

最大 50 % のアセトニトリル、エタノール、メタノール、またはその他の類似の溶媒を使用できます。

洗浄剤

非イオン性、アニオン性、および両イオン性洗浄剤を使用できます。カチオン性洗浄剤は使用しないでください。

温度

Agilent Bio Mab および IEX カラムは 80 °C までは安定しています。ただし、多くのタンパク質と生体分子は易熱性です。
日常的に分離で高温を使用するには、必ずサンプル温度の安定性を確立してください。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアによる電荷変異体の分析メソッド

Agilent Buffer Advisor は、再現性が高く正確なイオン交換メソッドを可能にするソフトウェアツールです。例えばこのソフトウェアでは、一定の pH の塩グラジエント、または pH グラジエントと塩グラジエントに 4 液混合を使用して、クリーンアップ用のメソッドを生成できます。これらのメソッドは、Agilent LC 取り込みソフトウェアに直接インポートできます。

推奨初期条件

塩グラジエント (アプリケーションノート：5994-0656EN を参照)		pH グラジエント (アプリケーションノート：5990-9629JAJP を参照)	
カラム：	Bio WCX, 4.6 x 250 mm, 10 µm Bio WCX, 4.6 x 250 mm, 5 µm	カラム：	Bio MAb, 4.6 x 250 mm, 5 µm
移動相：	A：水 B：1.6 M NaCl C. 40.0 mM NaH ₂ PO ₄ D. 40.0 mM Na ₂ HPO ₄ C と D を事前に決定した割合で混合することで、 最適な pH 範囲の 20 mM 緩衝液が作製されます。	移動相：	A：水 B：1.6 M NaCl C. 40.0 mM NaH ₂ PO ₄ D. 40.0 mM Na ₂ HPO ₄ C と D を事前に決定した割合で混合することで、 最適な pH 範囲の緩衝液溶液が選択した緩衝液強度で 作製されます。
グラジエント：	0 ~ 50 % B, 0 ~ 20 分 (一定の pH、 例えば pH 6.0 など) 50 % B, 20 ~ 25 分 0 % B, 25 ~ 35 分	グラジエント：	pH 6.0 ~ 8.0, 0 ~ 20 分 0 ~ 800 mM NaCl, 20 ~ 25 分 800 mM NaCl, 25 ~ 30 分
温度：	室温	温度：	室温
注入量：	10 µL	注入量：	10 µL
検出：	UV, 220 nm	検出：	UV, 220 nm
機器：	1260 Infinity バイオイナート LC	機器：	1260 Infinity II バイオイナート LC
サンプル：	オプアルブミン、リボヌクレアーゼ A、シトクローム c、 リゾチーム	サンプル：	IgG モノクローナル抗体
サンプル濃度：	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム 緩衝液中、pH 6.0)	サンプル濃度：	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム 緩衝液中、pH 6.0)

注：同様に、上記の方法を Agilent WAX および SCX カラムと修飾に適用できます。
重要品質特性のアプリケーション総覧をダウンロードいただけます。(5991-9072JAJP)

カラム径と粒子サイズに基づいて流量を選択する

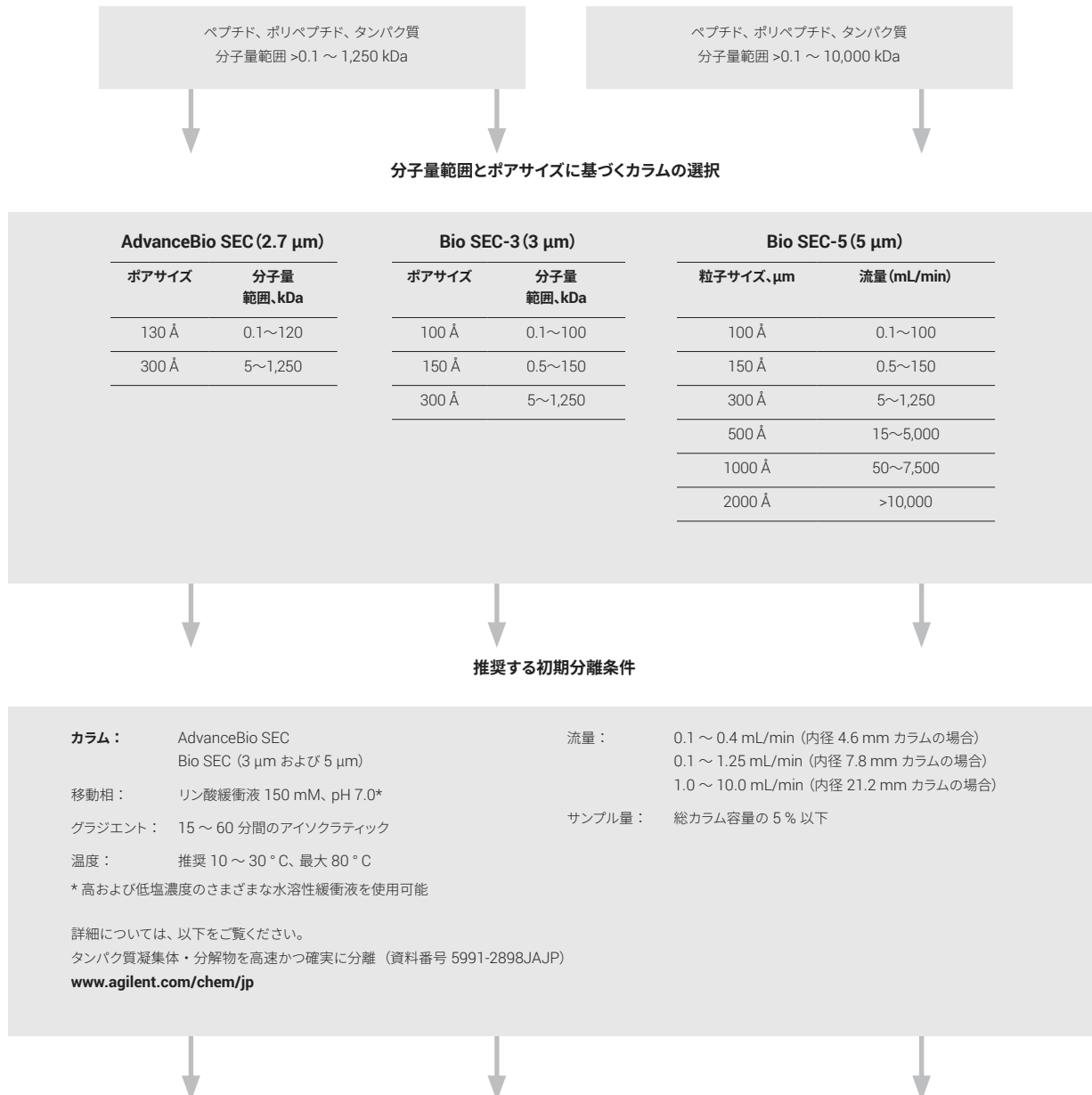
内径 2.1 mm のカラム		内径 4.6 mm のカラム	
粒子サイズ, µm	流量 (mL/min)	粒子サイズ, µm	流量 (mL/min)
1.7	0.1~0.3	1.7	0.1~0.3
3	0.1~0.5	3	0.1~0.5
5	0.1~0.8	5	0.1~0.8
10	0.1~1.0	10	0.1~1.0

注：必ず低流量とカラムのデフォルトの推奨動作限界から開始してください。

凝集およびフラグメントの分析メソッド

このセクションでは、凝集分析用のカラムの選択方法と、mAb、タンパク質、ペプチドのメソッド開発に関する重要な詳細情報について説明します。

生体分子、凝集分析（ペプチド、ポリペプチド、タンパク質）のサイズに基づく分離のための初期カラムおよび初期条件の選択



最初の分離後、分離のさらなる向上、タンパク質溶解度の維持、サンプルとクロマトグラフィー充填剤との相互作用の軽減のために、さらに変更が必要になることがあります。移動相のイオン強度を調整すれば、最適な分離が得られます。pH も通常は ± 0.2 単位で調整可能です。さらに最適化が必要な場合は、範囲を拡張する必要があります。温度の変更や、有機溶媒を追加することも検討します。

その他の塩が必要なプロトコルでは、次の緩衝液が一般的です。

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の塩化ナトリウム

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の硫酸ナトリウム

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 50 ~ 100 mM の尿素

その他の類似した塩 (KCl など) や塩酸 Guanidinium も使用できます。

pH 範囲：

2.0 ~ 8.5

添加可能な有機溶媒：

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 ~ 10 % のエタノール (またはその他の類似した溶媒)

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 % の DMSO

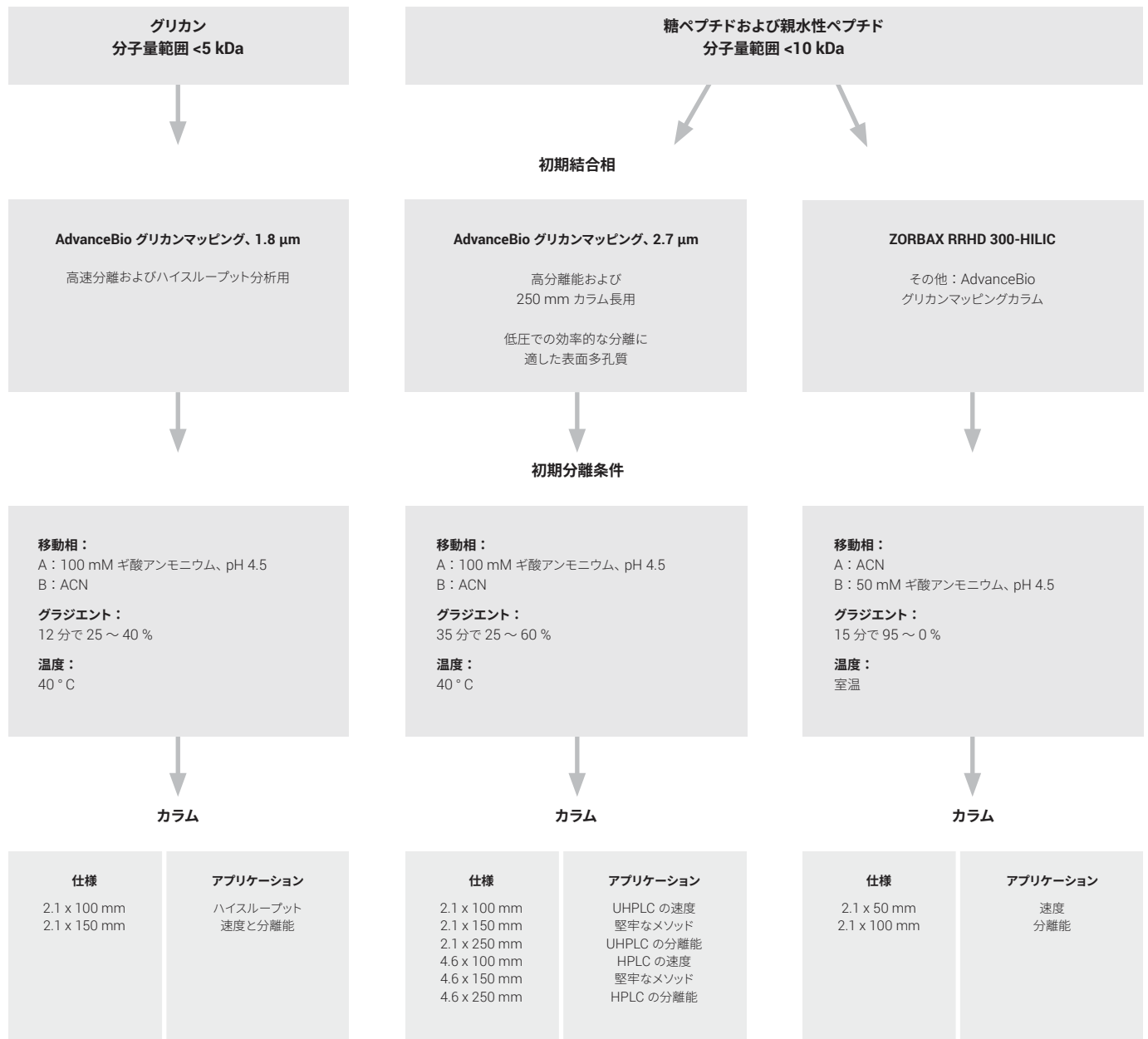
一部の水性/有機溶媒混合物は高粘度であるため、過剰な圧力変化が発生しないように特に注意してください。流量を減らすか温度を上げると、問題が発生する可能性を低減することができます。

温度：

一般に、SEC 分離は 20 ~ 30 °C で行います。タンパク質とペプチドの分離では、タンパク質や疎水性ペプチドの分解能と回収率の両方を上げるために、それよりも高い温度が必要になることがあります。

Bio SEC カラムの最高使用温度は 80 °C です。

グリカンおよび親水性/糖ペプチド分析



抗体価の測定と細胞培地の最適化メソッド

Agilent Bio-Monolith Protein A の推奨条件

カラム：	バイオモノリスプロテイン A (p/n 5069-3639)			
移動相：	A：50 mM リン酸塩、pH 7.4、 B：100 mM クエン酸、pH 2.8 mM、または 500 mM 酢酸、pH 2.6			
グラジエント：	時間 (分)	%A	%B	
	0 ~ 0.5	100	0	結合
	0.6 ~ 1.7	0	100	溶出
	1.8 ~ 3.5	100	0	再平衡
温度：	室温			
流量：	1 mL/min			
注入量：	可変 (50 µL、IgG1 を含む CHO 細胞培地の上清用に最適化)			
検出：	UV、280 nm			
サンプル：	IgG1 (1 ~ 20 mg/mL) および CHO 細胞溶解液には IgG1 が含まれる (最大 20 mg/mL の総タンパク質)			

注：塩化ナトリウムなどのその他の塩は、150 mM まで移動相に追加できます。これより高濃度の塩は、実験で測定する必要があります。

ヒントとツール

アジレントは、mAb とタンパク質の分離の品質にはさまざまな要因が影響することを認識しています。このため、最適な分析結果の取得に役立つ一連の「ハウツー」ガイドをご用意しています。詳細については、次の資料をご覧ください。

Keys for Enabling Optimum Peptide Characterizations: 最適なペプチド分析のために：ペプチドマッピングの基礎 (資料番号 5991-2348JAJP)

Ion-exchange Chromatography for Biomolecule Analysis : A “How to” Guide (イオン交換クロマトグラフィーによる生体分子の分析：「ハウツー」ガイド) (資料番号 5991-3775EN)

生体分子分析のためのサイズ排除クロマトグラフィー：分析の手引き (資料番号 5991-3651JAJP)

以上の詳細や特性解析用のその他のガイドについてはホームページをご覧ください。

高感度キャピラリーカラムのメソッド

逆相メソッドの移動相の考慮事項

カラム溶出液がカラムから MS 検出器へ直接流れる LC/MS メソッドでは、移動相に揮発性塩と添加剤のみが含まれる必要があります。また感度を最大化するには、イオン抑制や付加体の生成がないことが必要です。

低 pH



TFA は通常、タンパク質とペプチドの LC/MS 分離には使用されません。TFA によってイオン化が抑制され、感度が下がるためです。通常は最初に TFA を 0.1 ~ 1 % のギ酸に交換します。代替移動相調整剤として、1 % までの酢酸を使用することもできます。低 pH の場合は、移動相で TFA を使用しても分離能は良好なままですが、感度が低下します。場合によっては、シンプルなポストカラム法でオンライン脱塩/カウンタイオン交換を行い、TFA をプロピオン酸などの代替酸にすることができます。

中 pH と高 pH



高 pH はタンパク質の特性解析ではあまり使用されませんが、10 ~ 20 mM の NH_4OH を移動相添加物として使用すれば、高 pH でも LC/MS を実行できます。

タンパク質の同定および不純物の プロファイリング用のアジレント機器

1260 Infinity II バイオイナート LC

100 % バイオ不活性による効率的な生体分子分析を実現

メタルフリーのサンプル流路を備えた唯一の UHPLC です。この他、次のような特長があります。

100 % バイオ不活性

- ステンレスなし：サンプルの完全性を確保
- pH 1 ～ pH 13 で機器の稼働時間を最大化（短時間なら pH 14 にも対応）
- 2 M の塩や 8 M の尿素を使用可能
- 使いやすいキャピラリー技術

UHPLC 機能

- 600 bar

堅牢で優れた操作性

- 表面不活性、耐腐食性、アクティブシール洗浄、および四液混合

タンパク質同定に最適

AdvanceBio ペプチドマッピング、Bio MAb、および AdvanceBio SEC カラムとともに使用することで、最高の結果を得られます。



1260 Infinity II バイオイナート LC

1290 Infinity II LC とハイスピードポンプ

最高レベルの性能により分析結果に究極の信頼性を提供

LC/UV および LC/MS でクラス最高レベルの時間あたり分離能、分散、感度、精度、確度を備えています。革新的なアクティブダンピング、マイクロ流体の混合、光学流体導波路検出技術を兼ね備えています。

- 最高 1300 bar および 5 mL/min に対応する UHPLC のパワーレンジ
- アジレント独自のインテリジェントシステムエミュレーション技術 (ISET) を使用した非常に高速で容易なメソッド移管
- UHPLC の生産性と HPLC の所有コストの両立

不純物プロファイリング、ペプチドマッピング、超高速グラジエントに最適

ZORBAX RRHD 300 Å、1.8 µm カラムを使用することで、最高の結果を得られます。



1290 Infinity II LC とハイスピードポンプ

Agilent LC 消耗品で最適な性能と効率性を実現

Agilent InfinityLab の消耗品は InfinityLab LC シリーズのシステムとシームレスに連携し、分析性能、運用効率、ラボの安全性を最大限に高めます。消耗品の使用を効率的に追跡することで、分析の信頼性が向上します。

ホームページまたは InfinityLab LC 消耗品カタログ (5991-8031JAJP) を参照してください。

1260 Infinity II LC とバイナリポンプ

600 bar のパワーレンジにより、新たな水準の HPLC 分析を実現

HPLC との 100 % の適合性と UHPLC 機能

- UHPLC の性能と HPLC の所有コストの両立
- LC および LC/MS アプリケーションに対応、あらゆるナローボアおよび標準ボア分析カラム（内径 2.1 ～ 4.6 mm）を使用可能
- 高圧混合による優れたグラジエント精度

あらゆる標準的 UHPLC アプリケーションに対応



1260 Infinity II LC とバイナリポンプ

Agilent 1260 Infinity II Prime LC

分析の信頼性と精度が大幅に向上

優れたクォータナリ UHPLC 性能により、シームレスなメソッド移管と自動的な緩衝液混合が可能です。

- 最高 800 bar および 5 mL/min に対応する UHPLC のパワーレンジ
- 緩衝液および添加剤の正確な混合を簡単に行えるツール、BlendAssist
- UHPLC の生産性と HPLC の所有コストの両立

メソッド開発に、または緩衝液の正確な混合によりワークアップシステムに使用可能



Agilent 1260 Infinity II Prime LC

ヒントとツール

HPLC システムの詳細については、agilent.com/chem/lc:jp をご覧ください。

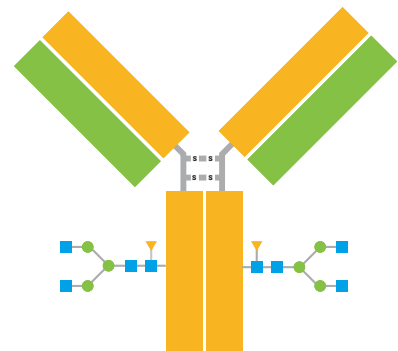
一次構造の分析

アミノ酸配列と翻訳後修飾の正確な測定と、 ペプチドおよびオリゴヌクレオチドの不純物の分析

モノクローナル抗体などのタンパク質を完全に特性解析するには、一次アミノ酸配列と、メーカーの精製や製剤の段階で発生しうる配列への翻訳後修飾を調べる必要があります。このタイプの分析を実行するには変性条件が必要であるため、通常は逆相 LC を使用します。

アジレントは、世界中の技術サポート専門家やアプリケーションケミストにより支持される、包括的なワイドポア（300 Å、450 Å 以上）BioHPLC 逆相カラムを提供しています。製品ファミリーには、400 ～ 1200 bar 用の 1.8、3.5、および 5 μm 多孔質粒子、低圧における UHPLC 分離用の 3 種類の表面多孔質粒子、さまざまな条件下での分析用のポリマーカラム（MS 分析用のギ酸移動相を含む）が含まれます。

アジレントは、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドの不純物の分析用に、高 pH への耐性があるシリカベースカラムとポリマーカラムをご用意しています。ポリマーカラムオプションによって、分析から分取まで分離を拡張できるというメリットもあります。



- **AdvanceBio RP-mAb カラム**は、mAb の特性解析専用に設計された唯一の逆相カラムです。450 Å ポアサイズ Poroshell の技術と適切な結合相の選択性により、インタクト mAb および mAb フラグメントの高速かつ高分離能の特性解析が可能となります。
- **PLRP-S カラム**にはマクロポーラスポリマー粒子が含まれているため、非常に幅広い pH 範囲での HPLC 分離が可能です。3 種類のワイドポアサイズと 8 種類の粒子サイズを備えた PLRP-S カラムは、ペプチド、タンパク質、およびタンパク質複合体の分析分取、分離に最適なソリューションです。
- **ZORBAX RRHD 300 Å 1.8 µm カラム**は 1200 bar での安定性を備え、インタクトタンパク質、タンパク質断片、および分解物の逆相分離に UHPLC の性能を提供します。
- **ZORBAX 300 Å 3.5、および 5 µm カラム**は、HPLC および分取精製用の全多孔質カラムです。多くの結合相は 1.8 µm 粒子から拡張できます。
- **Poroshell 300 カラム**は、ポリペプチドやタンパク質の高速分離を行うための業界初の表面多孔質小粒子カラムです。
- **AdvanceBio ペプチドマッピングカラム**は、一次構造のアミノ酸の修飾をすばやく分離、同定できます。2.7 µm 粒子と C18 の機能により、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは優れた保持能、分離能、およびピーク形状を塩基性疎水ペプチドに提供します。
- **AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム**は、効率性の高い 2.7 µm の表面多孔質粒子を備えており、オリゴヌクレオチドとその不純物の高分離能分離が可能です。粒子は排除技術によって化学的に修飾されるため、オリゴヌクレオチド分離に必要な高 pH 移動相に対する耐性があります。



逆相カラムの選択

アプリケーション	アジレントのカラム	注意事項
モノクローナル抗体および mAb フラグメント	AdvanceBio RP-mAb C4 SB-C8 ジフェニル	表面多孔質粒子を利用する Poroshell 技術に基づきます。この粒子は拡散距離が短く、600 bar システムでも高流量と勾配の大きいグラジエントを使用できるため、分析時間を短縮できます。ポアサイズが 450 Å であるため、大きい分子で結合相にフルにアクセスでき、優れたクロマトグラフィーを得られます。モノクローナル抗体の分離用に設計された堅固な結合相によって、分離能の最適化を可能にする幅広い選択性が提供されています。
	PLRP-S 1000 Å	マクロポーラスポリマー PLRP-S は特にギ酸移動相で mAb 分離能が優れているため、MS 検出に適しています。
インタクトタンパク質、モノクローナル抗体、mAb フラグメント、ポリペプチド	ZORBAX 300 Å, 1.8 µm RRHD 300SB-C18 RRHD 300SB-C8 RRHD 300SB-C3 RRHD 300-Diphenyl	充填プロセスの最適化により、1290 Infinity II LC の使用時に最大で 1200 bar の安定性を実現します。RRHD 1.8 µm カラムには 50 mm と 100 mm の長さが用意されており、非常に複雑なサンプルを高速かつ高分離能で分離できます。StableBond C18 は、複雑なタンパク質、タンパク質分解物の分離に適しています。
	ZORBAX 300 Å, 3.5、および 5 µm	高速液体クロマトグラフィーシステムとの使用に最適です。StableBond C3 および CN は、より大型でより疎水性の高い化合物に最適です。
	300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300SB-CN	
	PLRP-S	ポリマー PLRP-S はシリカベースカラムとは異なる選択性を示します。また、ギ酸移動相でのピーク形状が向上します。
	100 Å 300 Å 1000 Å 4000 Å	
	Poroshell 300 300SB-C18 300SB-C8 300SB-C3 300Extend-C18	5 µm の Poroshell 粒子と 300 Å ポアによって、インタクトタンパク質の高速 HPLC 分離が可能です。
タンパク質分解物中のタンパク質	AdvanceBio ペプチドマッピング	さまざまな分子量のペプチドの同定に最適な 120 Å ポアサイズです。分析が困難なペプチド混合物を使用した試験により性能を保証しています。アジレント独自の Poroshell 技術により、全ペプチド配列を短時間に高分離能で分析できます。
合成ペプチドの不純物分析	PLRP-S 100 Å, 300 Å	分析分離から分取分離まで拡張可能です。pH 安定性に優れているため非常に高い pH でも使用できます。また、耐熱性にも優れておりオートクレーブでの滅菌処理も可能です。
オリゴヌクレオチド分析	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å PL-SAX 1000 Å, 4000 Å	オリゴヌクレオチドの長さに応じて複数のポアサイズを選択可能。高い温度安定性。分析分離から分取分離まで拡張可能です。PL-SAX の詳細については、 95 ページ を参照してください。
	AdvanceBio オリゴヌクレオチド	高分離能分析スケールの分離に最適。

AB

AB

AB

AB

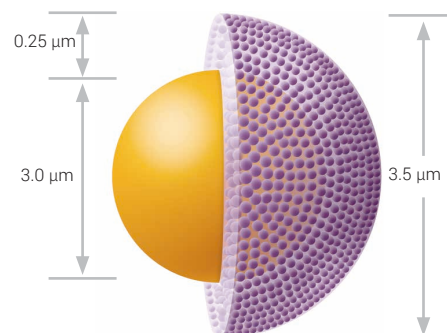
AB

AB

AdvanceBio ファミリーの製品

AdvanceBio RP-mAb

- － **精度の向上**：すべての LC 機器との互換性を維持しつつ、ワイドポア（450 Å）の表面多孔質粒子（3.5 μm）により、mAb の分離能が向上しています。
- － **高速**：同一サイズの全多孔質粒子が充填された他のカラムよりも短時間で分析できます。
- － **柔軟なメソッド開発**：SB-C8、C4、ジフェニルなど、さまざまな化学的性質に対応します。
- － **コストの削減**：堅牢な Poroshell 充填剤と 2 μm 注入口フリットにより、注入口の詰まりを防ぎカラム寿命を延ばすことができます。



モノクローナル抗体の特性分析固有の問題に対応するため開発された逆相カラム

インタクトおよび還元型モノクローナル抗体の分析は、治療用タンパク質を特性分析しその効能と安定性を理解するために、重要な測定です。クロマトグラフィー分離が悪いと、再分析が必要となったり分析精度を妥協することにつながります。

分析時間が長いとラボのスループットに悪影響を与え、特性解析結果に基づく意思決定が遅くなります。アジレントはこれらの問題を解決するために、インタクトおよび還元型 mAb 分析の性能を最適化する逆相カラムを新たに開発しました。AdvanceBio RP-mAb カラムは Poroshell 技術と、ポアサイズと結合相についての独自の技術に基づいています。

ヒントとツール

モノクローナル抗体の一次構造の特性解析の詳細については、「Better Characterization of Biomolecules Using Agilent AdvanceBio Reversed-Phase Columns (Agilent AdvanceBio 逆相カラムによる生体分子分析の向上)」(資料番号 **5991-2032EN**) を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp



一次構造の分析

モノクローナル抗体などの大きい生体分子は、通常、そのような拡散の遅い化合物のピークの幅が広がらないようにするため、低速で分離されます。ただし、AdvanceBio RP-mAb カラムで使用されている Poroshell 技術では、3.0 μm の硬質シリカコアを厚さ 0.25 μm の薄い多孔質シリカ層で覆った表面多孔質粒子を使用しています。このような形態により拡散距離が短くなるため、600 bar システムでも高流量と勾配の大きいグラジエントを使用できます。薄層内のポアの直径が 450 Å と広いため、大きいモノクローナル抗体分子にフルにアクセスでき、優れたクロマトグラフィーを得られます。モノクローナル抗体の分離用に設計された堅固な結合相である C4 相、SB-C8 相、および独自のジフェニル相から選択することができ、分離能の最適化を可能にする幅広い選択性が提供されています。

AdvanceBio RP-mAb カラムは分離能が高く分析時間も短いため、生物製剤の発見、開発、QA/QC アプリケーションのためのモノクローナル抗体の分析時に、正確で再現性のある結果を迅速に得ることができます。

カラムの仕様

結合相	ポアサイズ	温度上限*	pH 範囲*	エンドキャップ
AdvanceBio RP-mAb C4	450 Å	90 °C	1.0~8.0	あり
AdvanceBio RP-mAb SB-C8	450 Å	90 °C	1.0~8.0	なし
AdvanceBio RP-mAb ジフェニル	450 Å	90 °C	1.0~8.0	あり

仕様の数値は代表値です。

* カラムは低 pH で最適に使用できるように設計されています。シリカを基材とするすべてのカラムを pH 6~8 の領域で最高の安定性を確保しながら使用するには、40 °C 未満の使用温度、0.01~0.02 M の範囲の低濃度緩衝液を使用します。

トラスツマブ変異体 IgG1 を高速に高分離能で分離

カラム: **AdvanceBio RP-mAb C4**
795775-904
2.1 x 100 mm、3.5 μ m

温度: 80 °C

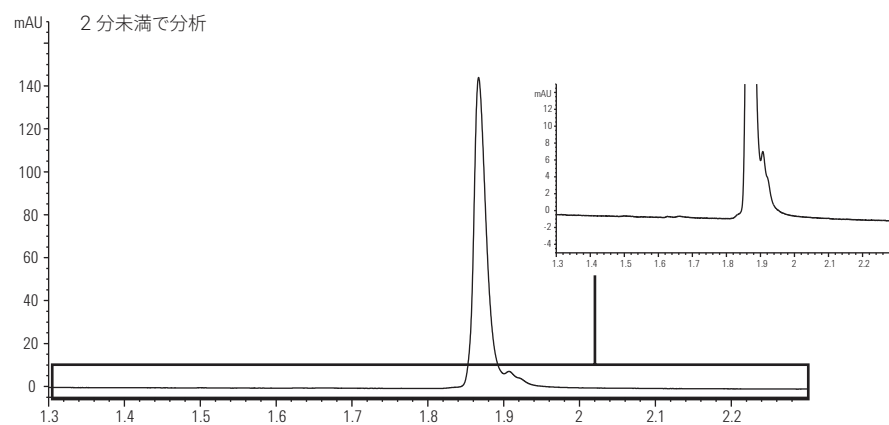
検出器: UV、254 nm

移動相: A: 0.1 % TFA 含有水:IPA (98:2) 溶液
 B: IPA:ACN:移動相 A (70:20:10)

サンプル: Creative Biolabs 製のヒト化組み換えトラスツマブ
 変異体 IgG1 インタクト (1 mg/mL) を 5 μ L 注入

流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
 1 分間 10 % B で再平衡



AdvanceBio RPmAb C4 により、2 分未満でシャープなピーク形状で詳細に分離できます。

インタクトヒト化組み換えトラスツズマブ IgG1 の分離

カラム: AdvanceBio RP-mAb C4
795775-904
2.1 x 100 mm、3.5 µm

移動相: A: 0.1 % TFA 含有水:IPA (98:2)
B: IPA:ACN:移動相 A (70:20:10)

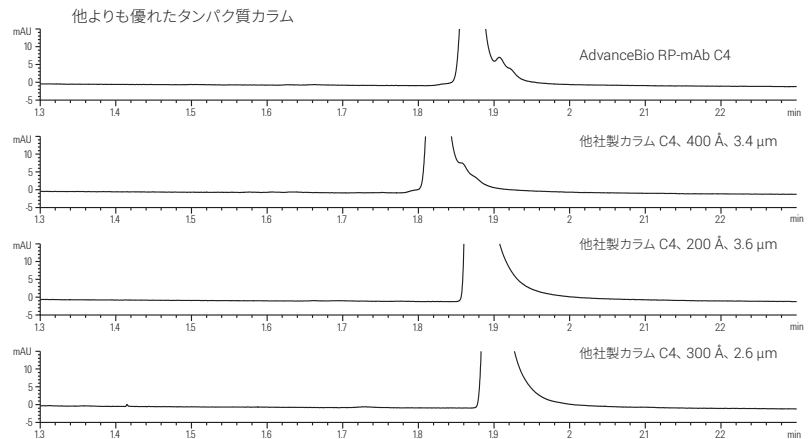
流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
1 分間 10 % B で再平衡

温度: 80 °C

検出器: UV、254 nm

サンプル: Creative Biolabs 製のヒト化組み換え
トラスツズマブ変異体 IgG1 インタクト
(1 mg/mL) を 5 µL 注入



AdvanceBio RP-mAb は mAb 分離用に設計されており、インタクトタンパク質分離で使用される他社製カラムよりも優れたピーク形状と分離能を備えています。

選択性ジフェニル相

カラム: AdvanceBio RP-mAb ジフェニル
795775-944
2.1 x 100 mm、3.5 µm

移動相: A: 0.1 % TFA 水溶液:IPA (98:2)
B: IPA:ACN:移動相 A (70:20:10)

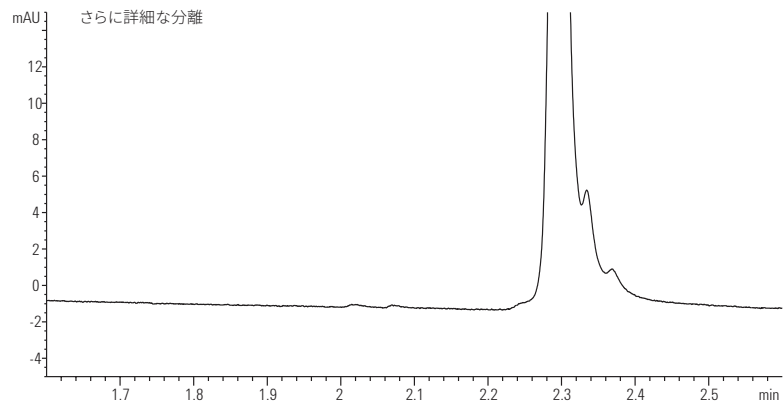
流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
1 分間 10 % B で再平衡

温度: 80 °C

検出器: UV、254 nm

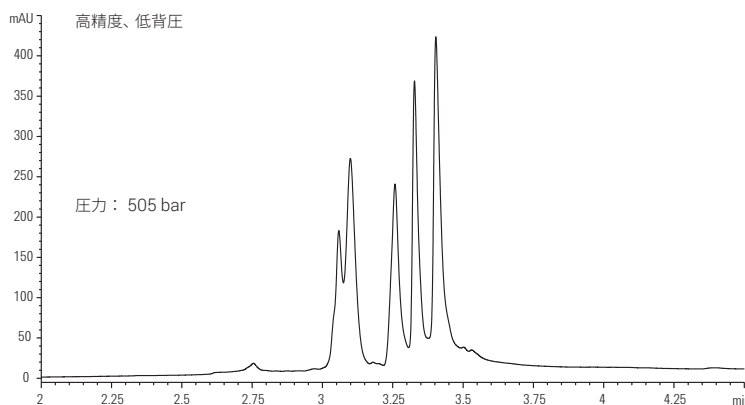
サンプル: Creative Biolabs 製のヒト化組み換え
トラスツズマブ変異体 IgG1 インタクト
(1 mg/mL) を 5 µL 注入



AdvanceBio RP-mAb ジフェニル固有の選択性によってより詳細に分離できます。

Poroshell の利点

カラム：	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 785775-906 2.1 x 100 mm、3.5 µm
移動相：	A：0.1 % TFA 水溶液 B：n-プロパノール:ACN:移動相 A (80:10:10)
流量：	0.8 mL/min
グラジエント：	5 分で 5 ~ 40 % B、1 分間 95 % B で洗浄、 1 分間 10 % B で再平衡
温度：	60 °C
検出器：	UV、220 nm
サンプル：	Creative Biolabs 製の Fc/Fab、パバイン消化ヒト化 組み換えトラスズマブ変異体 IgG1 (2 mg/mL) を 1 µL 注入



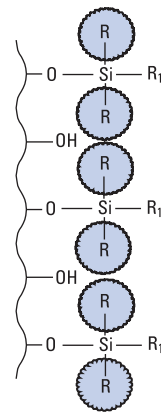
AdvanceBio RP-mAb カラムのワイドポア Poroshell 技術により、一般的な多くの逆相メソッドの温度である 80 °C よりも低い温度で、高効率、短い分析時間、低背圧を実現しています。

AdvanceBio RP-mAb

サイズ (mm)	粒子サイズ (µm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb ジフェニル USP L11
4.6 x 150	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
4.6 x 100	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
4.6 x 50	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 x 150	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 x 100	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 x 75	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
2.1 x 50	3.5	793975-904	783975-906	793975-944

ZORBAX 300 Å StableBond

Agilent ZORBAX 300 Å StableBond カラムは、タンパク質とペプチドを再現性良く分離するために理想的です。その主な理由は次の 2 つです。まず、タンパク質やペプチド、またはその他の高分子を効率的に分離するには、検体が結合相表面に近接する必要があります。そのため、ワイドポア（300 Å）カラムが必要です。また 300StableBond カラムは低 pH（TFA を含む移動相など）での耐久性が非常に優れているため、通常はタンパク質やペプチドの分離に使用されます。低 pH 範囲での LC/MS 分離では、300StableBond カラムにギ酸や酢酸の移動相溶媒を使用することも可能です。これらのカラムには 5 つの異なる結合相（C18、C8、C3、CN、ジフェニル（DP））が用意されており、タンパク質とポリペプチドの選択性と回収率を最適化できます。分析困難なタンパク質のサンプル回収率と効率をさらに高めるため、300StableBond カラムは 80 °C まで使用できます。StableBond 300SB-C18 カラムと 300SB-C8 カラムは、複雑なタンパク質およびタンパク質分解物の分離に最適です。これらのカラムは、タンパク質分解物の逆相 LC/MS 用に、キャピラリーカラム（内径 0.3 mm および 0.5 mm）とナノカラム（内径 0.075 mm および 0.10 mm）も用意されています。キャピラリーカラムとナノカラムは、1D または 2D のプロテオミクス分離に使用できます。



結合相が立体的に保護された
300StableBond

UHPLC カラムの仕様				
結合相	ポアサイズ	上限温度*	pH 範囲*	エンドキャップ
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl	300 Å	80 °C	1.0～8.0	あり
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX 300SB-C3	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし
ZORBAX 300SB-CN	300 Å	80 °C	1.0～8.0	なし

仕様の数値は代表値です。

* 300StableBond カラムは低 pH で最適に使用できるように設計されています。シリカを基材とするすべてのカラムを pH 6 ～ 8 の領域で最高の安定性を確保しながら使用するには、40 °C 未満の使用温度、0.01 ～ 0.02 M の範囲の低濃度緩衝液を使用します。中または高 pH では、300Extend-C18 を推奨します。

インタクトモノクローナル抗体の分離能の向上

カラム: ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2.1 x 50 mm, 1.8 µm

移動相: A: H₂O:IPA (98:2) + 0.1% TFA (v/v)
B: IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1% TFA (v/v)

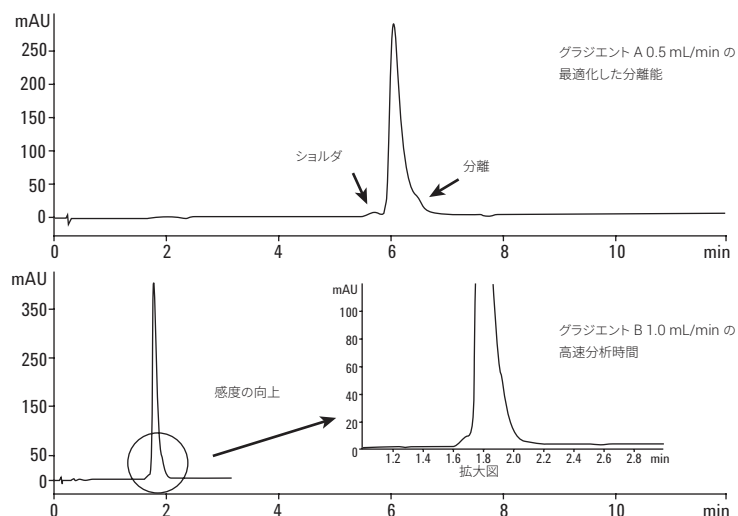
流量: 0.5 mL/min ~ 1.0 mL/min

グラジエント: マルチセグメントの直線溶出

温度: 80 °C

検出器: 1290 Infinity LC (オートサンプラ、バイナリポンプとサーモスタットカラムコンパートメント、およびダイオードアレイ検出器 (DAD) 付)

サンプル: UV、225 nm



ヒントとツール

AdvanceBio 逆相カラムによる生体分子の特性解析の改善については、このトピックに関する白書（資料番号 **5991-2032EN**）を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp



還元およびアルキル化された mAb - 軽鎖および重鎖変異体

カラム: ZORBAX RRHD 300SB-C8
858750-906
2.1 x 150 mm、1.8 μm

移動相: A: H₂O + 0.1% TFA (v/v)
B: n-プロパノール:ACN:H₂O (80:10:10) + 0.1 % TFA (v/v)

流量: 0.5 mL/min

注入: 3 μL (2.5 mg/mL サンプルから)

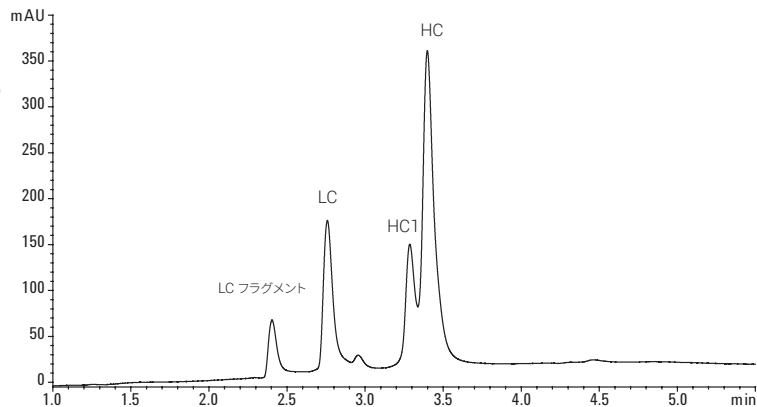
% 溶媒 B	時間 (分)
20	0
35	3
40	4
40	5
90	5.1
90	5.5
25	6

グラジエント: マルチセグメント

温度: 75 °C

検出器: UV、225 nm

機器: 1290 Infinity LC (オートサンブラ、バイナリポンプ、
サーモスタットカラムコンパートメント、および
ダイオードアレイ検出器 (DAD) 付)



連続的なクロマトグラフィー分析のため、2 分間のポストランを追加してカラムを再平衡化しました。

ヒントとツール

タンパク質やペプチド分離用の一般的な移動相では、非常に低い pH と TFA (または他の酸) を組み合わせてタンパク質を可溶性にします。StableBond カラムはこれらの条件下でも極めて長い寿命を誇ります。これらのカラムは、300 Å のポアサイズで最大 100 ~ 500 kDa のタンパク質に使用できます。

モノクローナル抗体の再現性の向上

カラム： ZORBAX RRHD 300SB-C8
857750-906
2.1 x 50 mm、1.8 μm

移動相： A : H₂O:IPA (98:2) + 0.1 % TFA (v/v)
B : IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1 % TFA

流量： 1.0 mL/min

温度： 80 °C

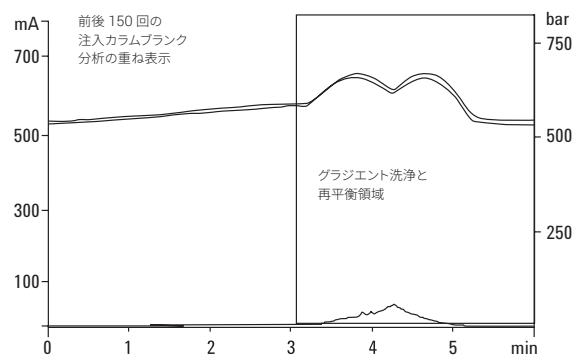
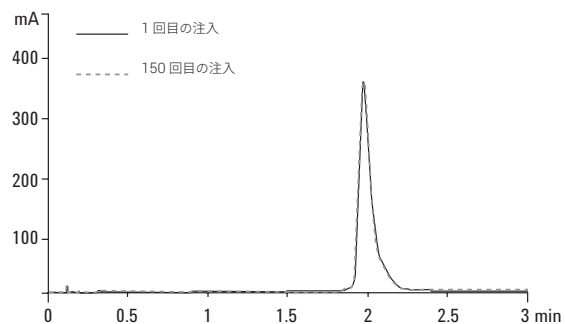
検出器： 1290 Infinity LC に搭載のダイオードアレイ検出器、225 nm

サンプル： mAb

グラジエント

粒子サイズ、μm	流量 (mL/min)
0.00	25
3.00	35
4.00	90
5.00	25

ZORBAX 300SB-C8 により優れたカラム再現性とタンパク質の回収率を実現

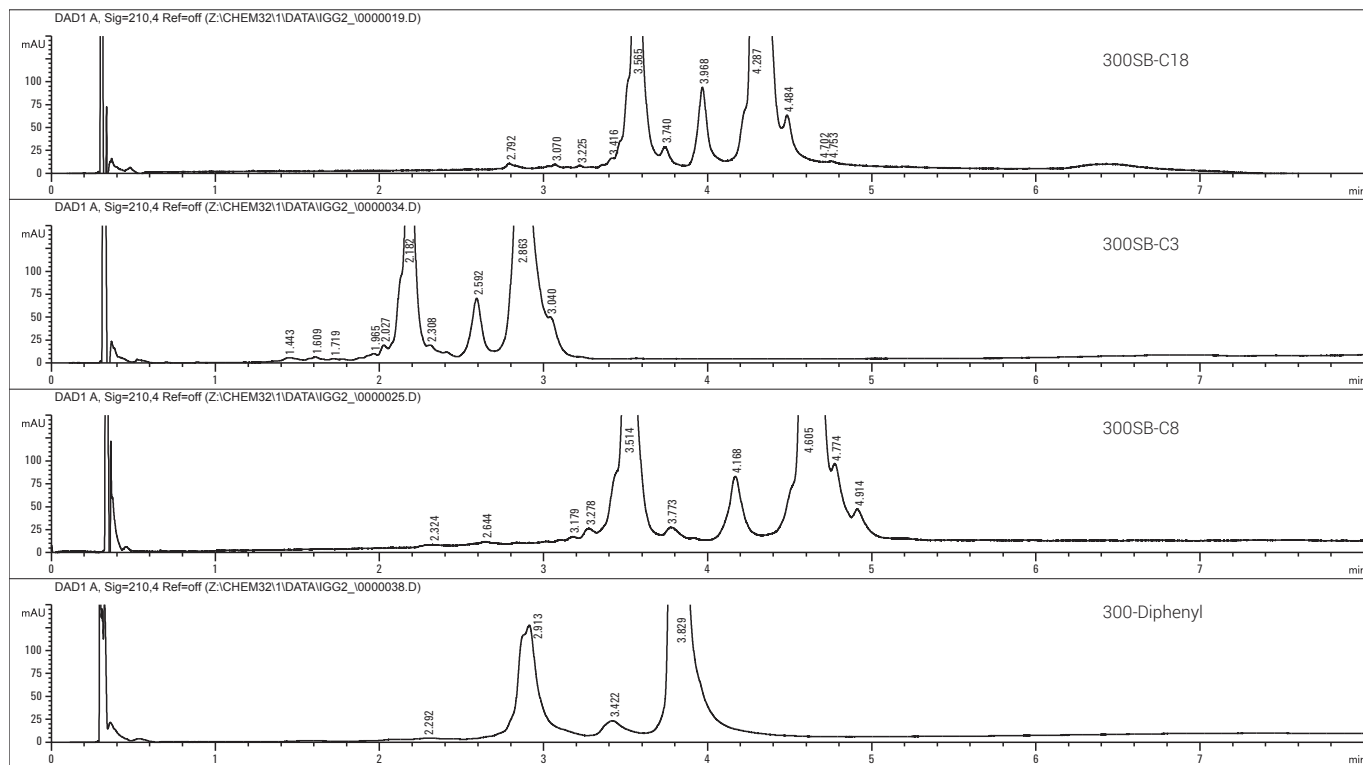


mAb 特性解析に適した独自の選択性

カラム:
ZORBAX RRHD 300SB-C18
858750-902
2.1 x 100 mm、1.8 μm
ZORBAX RRHD 300SB-C3
858750-909
2.1 x 100 mm、1.8 μm
ZORBAX RRHD 300SB-C8
858750-906
2.1 x 100 mm、1.8 μm
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl
858750-944
2.1 x 100 mm、1.8 μm

移動相: A: H₂O (0.1 % TFA) (v/v)
 B: 80 % nPA:10 % ACN:10 % H₂O (0.08 % TFA) (v/v)
注入量: 3 μL (2.5 mg/mL サンプルから)
流量: 1.0 mL/min (3.5 μm*), 1.0 mL/min (1.8 μm)
グラジエント: 25~35 % B, 90 % 洗浄
温度: 80 °C
検出器: UV, 215 nm

* 低流量ではピーク幅が拡大



ペプチド/タンパク質：温度上昇の効果

カラム： ZORBAX RRHD 300SB-C3
883995-909
4.6 x 150 mm、5 µm

移動相： A：5:95 ACN:水と0.10 % TFA (v/v%)
B：95:5 ACN:水と0.085 % TFA (v/v%)

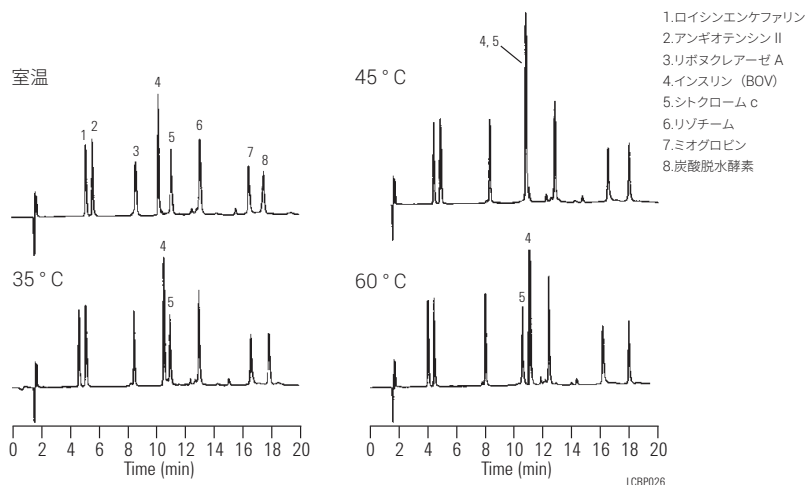
流量： 1.0 mL/min

グラジエント： 20 分間で15 ~ 53 %、ポストタイム 12 分間

温度： 室温 ~ 60 °C

検出器： UV、215 nm

サンプル： ポリペプチド



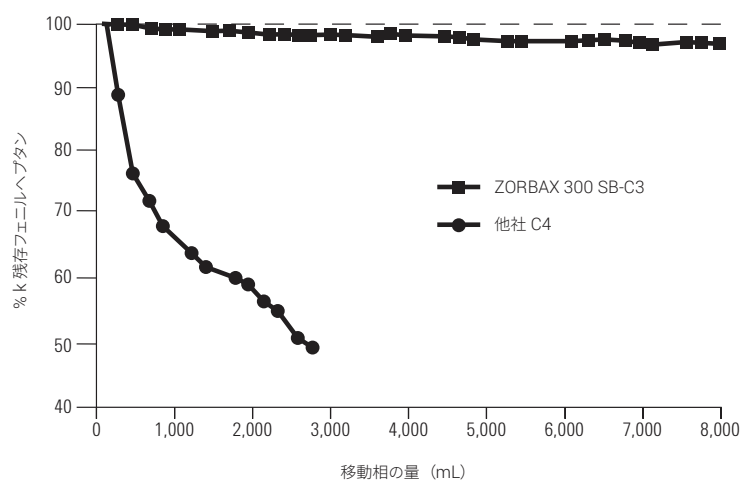
短鎖 ZORBAX 300SB-C3 は低 pH、高温で安定

カラム： ZORBAX 300SB-C3
883995-909
4.6 x 150 mm、5 µm

移動相： 80 分で 0 ~ 100 % B のグラジエント
A：0.5 % TFA 水溶液
B：0.5 % TFA アセトニトリル溶液
イソクラティックリテンションのテスト条件：
1-フェニルヘプタン 50 % A、50 % B

流量： 1.0 mL/min

温度： 60 °C



4 種類の 300SB 結合相で大きいポリペプチドの分離を最適化

カラム A : ZORBAX RRHD 300SB-C18
883995-902

4.6 x 150 mm、5 μm

カラム B : ZORBAX 300SB-C8
883995-906

4.6 x 150 mm、5 μm

カラム C : ZORBAX 300SB-C3
858750-909

4.6 x 150 mm、5 μm

カラム D : ZORBAX 300SB-CN
858750-905

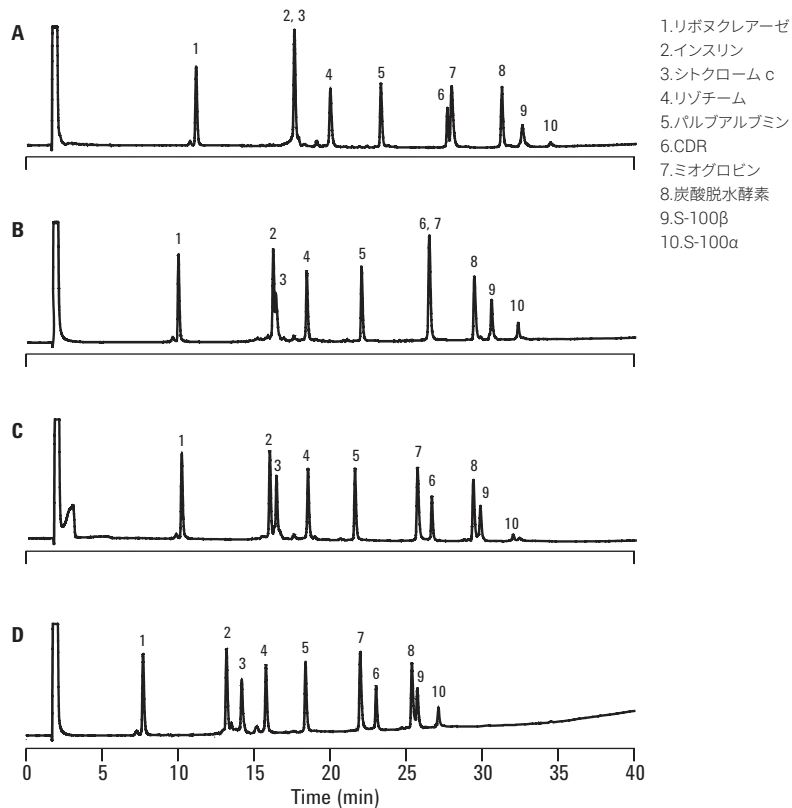
4.6 x 150 mm、5 μm

移動相 : 直線性のグラジエント、40 分で 25 ~ 70 % B
A : 0.1 % TFA 水溶液
B : 0.09 % TFA、80 % アセトニトリル:20 % 水

流量 : 1.0 mL/min

温度 : 60 °C

サンプル : 各タンパク質で 3 μg



LCSB006

300SB-C18、C8、C3、および CN 結合相ではすべて、このポリペプチド群を異なる方法で分離します。このため、タンパク質分離を迅速に最適化するための重要なパラメータが追加されます。300SB-CN カラムには、親水性ポリペプチドに対する独自の選択性があります。

ZORBAX 300 Å StableBond

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
標準カラム (特別なハードウェアは不要)							
セミ分取	9.4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
分析	4.6 x 250	5	880995-902	880995-906	880995-905	880995-909	
分析	4.6 x 150	5	883995-902	883995-906	883995-905	883995-909	
分析	4.6 x 50	5	860950-902	860950-906	860950-905	860950-909	
ラピッドレゾリューション	4.6 x 150	3.5	863973-902	863973-906	863973-905	863973-909	
ラピッドレゾリューション	4.6 x 100	3.5	861973-902	861973-906			
ラピッドレゾリューション	4.6 x 50	3.5	865973-902	865973-906	865973-905	865973-909	
ソルベントセーブプラス	3.0 x 150	3.5	863974-302	863974-306		863974-309	
ソルベントセーブプラス	3.0 x 100	3.5		861973-306			
ナローボア	2.1 x 250	5	881750-902				
ナローボア	2.1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
ナローボア RR	2.1 x 150	3.5		863750-906			
ナローボア RR	2.1 x 100	3.5	861775-902	861775-906			
ナローボア RR	2.1 x 50	3.5	865750-902	865750-906			
ナローボア RRHD	2.1 x 100	1.8	858750-902	858750-906		858750-909	858750-944
ナローボア RRHD	2.1 x 50	1.8	857750-902	857750-906		857750-909	857750-944
MicroBore	1.0 x 250	5	861630-902				
マイクロボア RR	1.0 x 150	3.5	863630-902	863630-906			
マイクロボア RR	1.0 x 50	3.5	865630-902	865630-906			
マイクロボアガード、3 個	1.0 x 17	5	5185-5920	5185-5920			
ガードカートリッジ、2 個	9.4 x 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
ガードカートリッジ、4 個	4.6 x 12.5	5	820950-921	820950-918	820950-923	820950-924	

(続く)

AB

AB

AdvanceBio ファミリーの製品

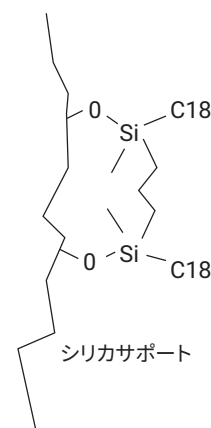
ZORBAX 300 Å StableBond

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
ガードカートリッジ、4 個	2.1 x 12.5	5	821125-918	821125-918	821125-924	821125-924	
ガードハードウェアキット			840140-901	840140-901	840140-901	840140-901	
ガードハードウェアキット			820999-901	820999-901	820999-901	820999-901	
PrepHT カートリッジカラム (エンドフィッティングキット 820400-901 が必要)							
PrepHT カートリッジ	21.2 x 250	7		897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT カートリッジ	21.2 x 150	7		897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT カートリッジ	21.2 x 150	5		895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT カートリッジ	21.2 x 100	5		895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT カートリッジ	21.2 x 50	5		895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT エンド フィッティング、2 個				820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT ガード	17.0 x 7.5	5		820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
ガードカートリッジハードウェア				820444-901	820444-901	820444-901	820444-901
キャピラリーガラス管カラム							
キャピラリー	0.5 x 250	5	5064-8266				
キャピラリー	0.5 x 150	5	5064-8264				
キャピラリー	0.5 x 35	5	5064-8294				
キャピラリー RR	0.5 x 150	3.5	5064-8268				
キャピラリー RR	0.5 x 35	3.5	5065-4459				
キャピラリー	0.3 x 250	5	5064-8265				
キャピラリー	0.3 x 150	5	5064-8263				
キャピラリー	0.3 x 35	5	5064-8295				
キャピラリー RR	0.3 x 150	3.5	5064-8267	5065-4460			
キャピラリー RR	0.3 x 100	3.5	5064-8259	5065-4461			
キャピラリー RR	0.3 x 35	3.5	5064-8270	5065-4462			
キャピラリー RR	0.3 x 50	3.5	5064-8300	5065-4463			
ナノカラム (PEEK フューズドシリカ)							
ナノ RR	0.1 x 150	3.5	5065-9910				
ナノ RR	0.075 x 150	3.5	5065-9911				
ナノ RR	0.075 x 50	3.5	5065-9924	5065-9923			
トラップ/ガード、5 個	0.3 x 5	5	5065-9913	5065-9914			
トラップ/ガードハードウェア キット			5065-9915	5065-9915			

ZORBAX 300Å Extend-C18

- pH 2 ~ 11.5 のポリペプチドとペプチドの堅牢な高 pH および低 pH 分離
- 高 pH および低 pH でのさまざまな選択性
- 高 pH での疎水ペプチドの高い効率と回収率
- 水酸化アンモニウム添加の移動相による LC/MS に最適

ZORBAX 300 Å Extend-C18 は、pH 2 ~ 11.5 のペプチドの高効率分離に適したワイドポア HPLC カラムです。独自の二座型結合相を備えているため、高 pH でも低 pH でも長く使用でき、再現性にも優れています。高 pH ではペプチドやポリペプチドのリテンションと選択性が、分子の電荷の変化によって大きく変わる可能性があります。室温および高 pH では、疎水性ポリペプチドの回収率が非常に高くなります。ペプチドとポリペプチドの LC/MS 選択性は、水酸化アンモニウムを含むシンプルな移動相を高 pH で使用して向上させることもできます。



Extend-C18 結合相の新しい二座型
C18-C18 結合相

UHPLC カラムの仕様

結合相	ポアサイズ	上限温度*	pH 範囲*	エンドキャップ
ZORBAX 300 Å Extend-C18 60 °C	300 Å	60 °C	2.0~11.5	ダブル

仕様の数値は代表値です。

* 温度上限: 60 °C (pH 8 まで)、40 °C (pH 8~11.5)

ヒントとツール

適切なカラムを選択することは、ソリューション全体の一部にすぎません。
アジレントは、LC ランプなどの主要な消耗品も豊富にご用意しています。
詳細情報: www.agilent.com/chem/jp



アンギオテンシンの LC/MS 分析

カラム： ZORBAX Extend-C18
773700-902
2.1 x 150 mm, 5 µm

移動相： 酸性条件：
A：0.1 % TFA 水溶液
B：0.085 % TFA、80 % のアセトニトリル（ACN）溶液
基本条件：
A：10 mM NH₄OH 水溶液
B：10 mM NH₄OH、80 % の ACN 溶液

流量： 0.2 mL/min

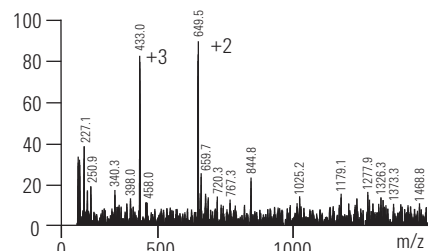
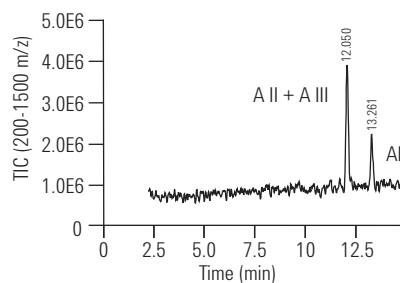
グラジエント： 15 分で 15 ~ 50 % B

温度： 35 °C

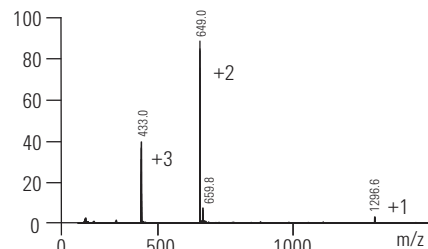
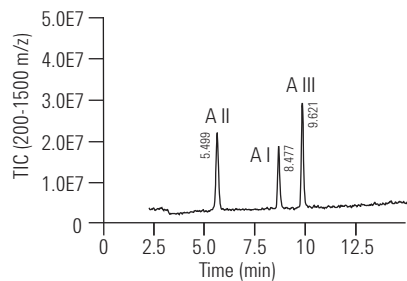
MS 条件： 陽イオン ESI、Vf 70 V、Vcap 4.5 kV、N₂、
35 psi、12 L/min、325 °C

サンプル： アンギオテンシン I、II、III、2.5 µL サンプル
(それぞれ 50 pmol)

A
アンギオテンシン I
最大：10889
低 pH



B
アンギオテンシン I
最大：367225
高 pH



LC30003

ペプチドはそのサイズにかかわらず、pH の高低によって選択性が変わります。高 pH では、電荷の変化によって 3 つのアンギオテンシンをすべて分離できます。また、水酸化アンモニウムを用いた高 pH 移動相を使用すると、アンギオテンシン I のスペクトル分解能が大幅に向上します。Extend-C18 カラムは、高 pH での小さいペプチドの分析にも使用できます。

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

高 pH での長寿命

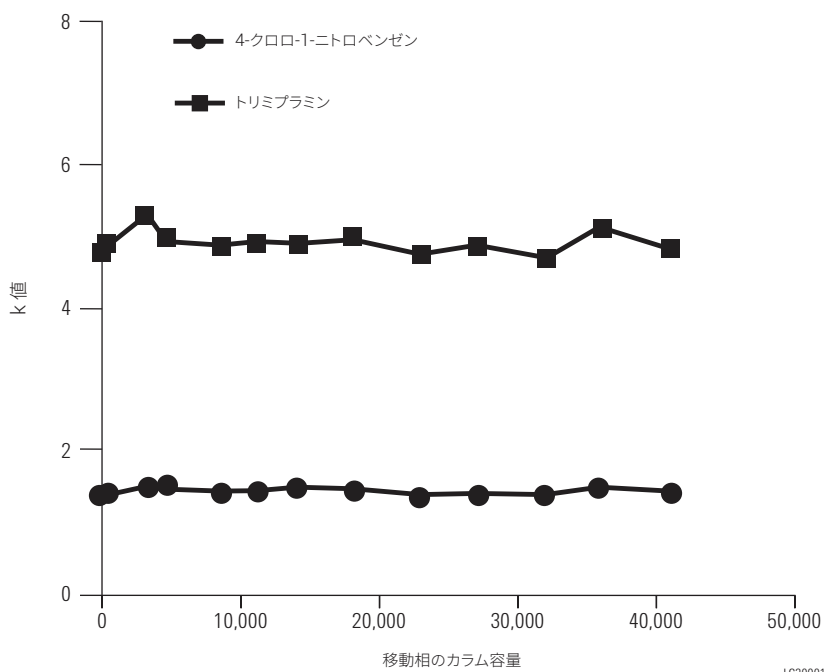
カラム: ZORBAX Extend-C18
773450-902
4.6 x 150 mm, 5 µm

移動相: 20 % 20 mM NH₄OH, pH 10.5
80 % メタノール

流量: 1.5 mL/min

温度: 時効 24 °C
テスト 40 °C

10,000 という各カラム容量は、約 1 か月分です。



ZORBAX Extend-C18 による高 pH での異なる選択性

カラム: ZORBAX Extend-C18
773700-902
2.1 x 150 mm, 5 µm

移動相: A: 0.1% TFA 水溶液
B: 0.085 % TFA, 80 % の ACN 溶液

A: 20 mM NH₄OH 水溶液
B: 20 mM NH₄OH, 80 % の ACN 溶液

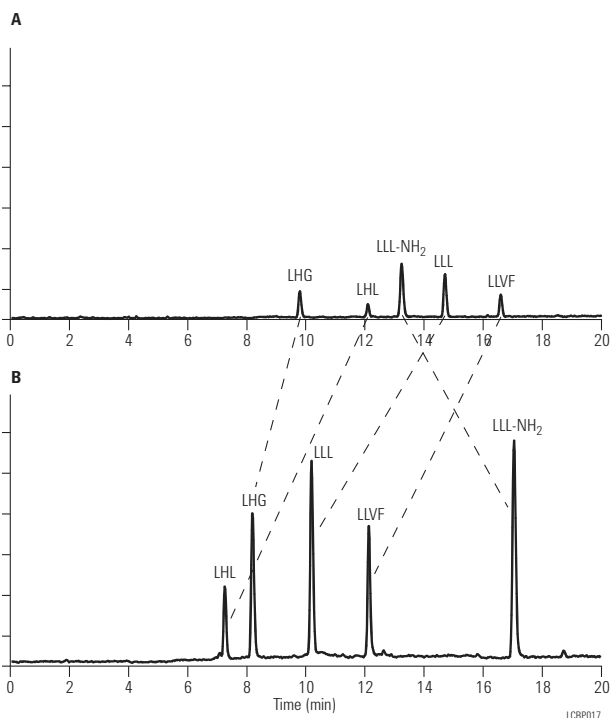
流量: 0.25 mL/min

グラジエント: 20 分で 5 ~ 60 % B

温度: 25 °C

MS 条件: 陽イオン ESI, Vf 70 V, Vcap 4.5 kV,
N₂, 35 psi, 12 L/min, 300 °C
4 µL (ペプチドごとに 50 ng)

Extend カラムはペプチドの高 pH 分離に使用できます。高 pH と低 pH では、選択性が大きく異なります。pH を変えるだけで補完メソッドを開発でき、すべてのピークが分離されているかどうかを特定できます。Extend カラムは高 pH でも低 pH でも使用できるため、相補的分離を 1 つのカラムで調査できます。このサンプルでは、高 pH で MS 選択性も向上します。



ZORBAX 300Å Extend-C18

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	部品番号
分析	4.6 x 250	5	770995-902
分析	4.6 x 150	5	773995-902
ラピッドレゾリューション	4.6 x 150	3.5	763973-902
ラピッドレゾリューション	4.6 x 100	3.5	761973-902
ラピッドレゾリューション	4.6 x 50	3.5	765973-902
ナローボア RR	2.1 x 150	3.5	763750-902
ナローボア RR	2.1 x 100	3.5	761775-902
ナローボア RR	2.1 x 50	3.5	765750-902
ガードカートリッジ、4 個	4.6 x 12.5	5	820950-932
ガードカートリッジ、4 個	2.1 x 12.5	5	821125-932
ガードハードウェアキット			820999-901
キャピラリーガラス管カラム			
キャピラリー RR	0.3 x 150	3.5	5065-4464
キャピラリー RR	0.3 x 100	3.5	5065-4465
キャピラリー RR	0.3 x 75	3.5	5065-4466
キャピラリー RR	0.3 x 50	3.5	5065-4467

ヒントとツール

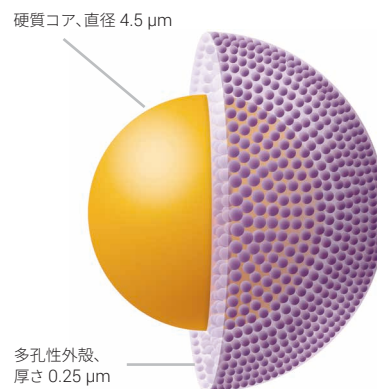
ガードカラムとフィルタを使用すると、詰まりの原因となる微粒子からカラムや機器を保護できます。詰まりがあるとシステム圧力が上がって性能が低下し、日々のワークフローの妨げになります。アジレントの UHPLC カラムおよび Bio LC カラム用の新しい Fast Guard を使用すれば、カラムを保護してカラム寿命を延ばし、ワークフローの中断を最小限に減らすことができます。

Poroshell 300 AB

- 表面多孔質粒子による生体分子の高速分離
- 300 Å ポアにより、タンパク質で高い効率と回収率を実現（最大 1,000 kDa）
- 低 pH では Poroshell 300SB では、高 pH では 300Extend-C18 を使用して長寿命を実現
- 4 種類の結合相（300SB-C18、300SB-C8、300SB-C3、300Extend-C18）により回収率と選択性を最適化

Poroshell 300 カラムは、タンパク質とペプチドの高速分離に最適です。直径 5 μm の表面多孔質粒子により、シャープで効率的なピークを維持しながら高速流量を使用できるためです。Poroshell カラムと StableBond 結合相を組み合わせれば、TFA とギ酸の移動相での安定性と選択性が向上します。Poroshell 300Extend-C18 カラムは pH 2 ～ 11 で使用でき、他にはない分離能が得られます。これらのカラムは、分析用のタンパク質分離と LC/MS 分離にも使用できます。

ペプチドやタンパク質は通常、そのような拡散の遅い化合物のピークの幅が広がらないようにするため、低速で分離されます。ただし、Poroshell カラムは、硬質シリカコアを厚さ 0.25 μm の薄い多孔質シリカ層で覆った表面多孔質粒子を使用しています。このためタンパク質の拡散距離が短くなり、1260 Infinity II バイオイナート LC などの 400/600 bar HPLC システムでは、最大 500 ～ 1,000 kDa のペプチドとタンパク質を高速で HPLC 分離できます。



UHPLC カラムの仕様

結合相	ポアサイズ	上限温度*	pH 範囲*	エンドキャップ
Poroshell 300SB-C18、C8、C3	300 Å	90 °C	1.0～8.0	なし
Poroshell 300Extend-C18	300 Å	pH 8 以上で 40 °C pH 8 以上で 60 °C	2.0～11.0	あり

仕様の数値は代表値です。

* 300StableBond カラムは低 pH で最適に使用できるように設計されています。シリカを基材とするすべてのカラムを pH 6～8 の領域で最高の安定性を確保しながら使用するには、40 °C 未満の使用温度、0.01～0.02 M の範囲の低濃度緩衝液を使用します。中または高 pH では、300Extend-C18 を推奨します。



Poroshell 300 カラム

AB

AdvanceBio ファミリーの製品

Poroshell 300 カラムではタンパク質とペプチドを数秒で分離可能

カラム: Poroshell 300SB-C18
660750-902
2.1 x 75 mm、5 µm

移動相: A: 0.1 % TFA 水溶液
B: 0.07 % TFA ACN 溶液

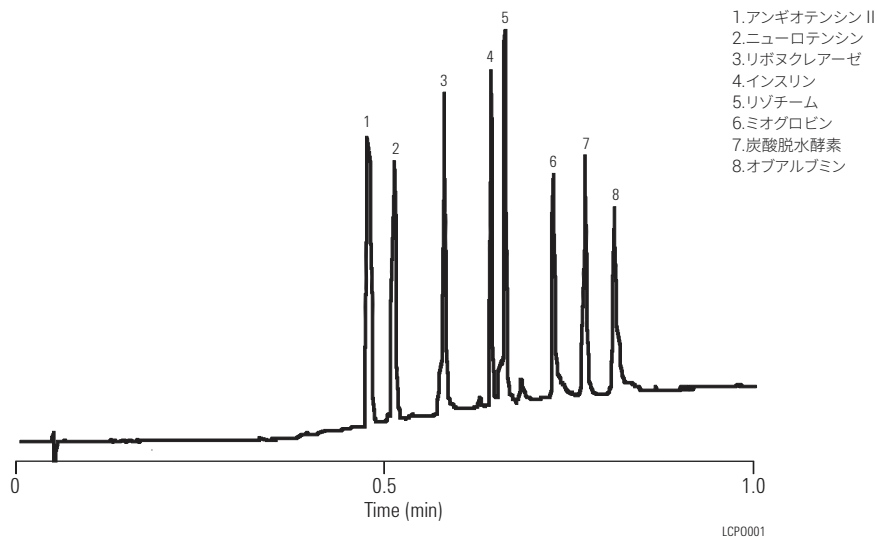
流量: 0.3 mL/min

グラジエント: 1.0 分で 5 ~ 100 % B

温度: 70 °C、260 bar

検出器: UV、215 nm

サンプル: タンパク質およびペプチド



8 種類のポリペプチドとタンパク質を 60 秒未満で分離しました。どのピークもシャープで高効率です。

ヒントとツール

詳細情報:

「Characterization of Glycosylation in the Fc Region of Therapeutic Recombinant Monoclonal Antibody (治療用遺伝子組み換えモノクローナル抗体の Fc 領域のグリコシル化の分析)」(資料番号 **5991-2323EN**)

「Using the High-pH Stability of ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 to Increase Signal-to-Noise in LC/MS (ZORBAX Poroshell 300Extend-C18 の高 pH 安定性による LC/MS での S/N 比の向上)」(資料番号 **5989-0683EN**)

www.agilent.com/chem/jp

断片化された IgG の高速高分離能分析

カラム: Poroshell 300SB-C3
660750-909
2.1 x 75 mm, 5 µm

移動相: A: 水 (5 % AcOH, 1.0 % FA, 0.05 % TFA)
B: 70/20/10 IPA:ACN:水 (5 % AcOH, 1.0 % FA, 0.05 % TFA)

流量: 1.0 mL/min

注入量: 2 µL

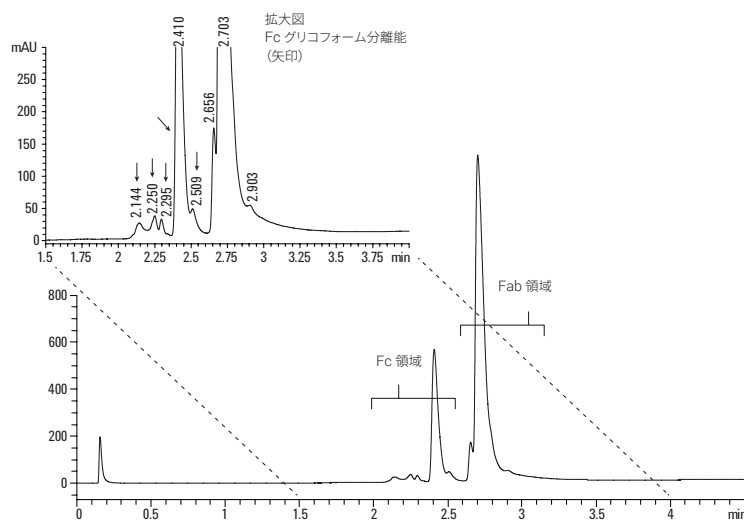
グラジエント: セグメント化

時間 (分)	% B
0	20
4	45
8	45
9	90
10	20

温度: 80 °C

検出器: UV、280 nm

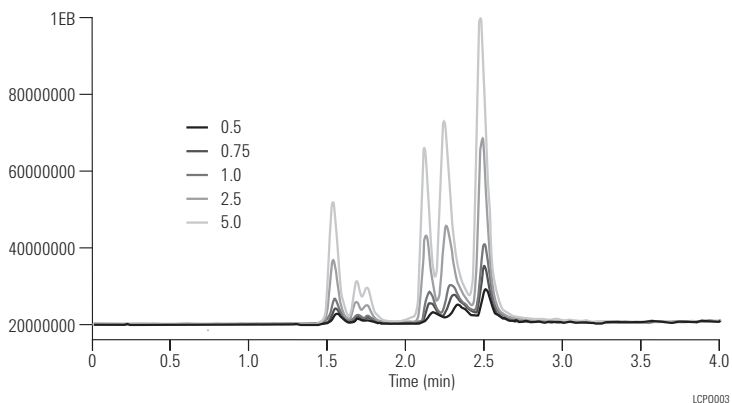
機器: 1200 Infinity シリーズ (高性能オートサンブラ、バイナリポンプ、サーモスタットカラムコンパートメント (TCC)、ダイオードアレイ検出器 (DAD) 付) と 6224 Accurate-Mass TOF LC/MS システムの組み合わせ



Fc および Fab フラグメントの 2 つの主なピークを示すパepsin 消化後の IgG1 の逆相分離。
挿入図は、Fc および Fab フラグメントの変異体を表す、部分的に分離したピークを示しています
(矢印)。

MicroBore Poroshell 300 カラムで実現する高感度 LC/MS

カラム:	Poroshell 300SB-C18 661750-902 1.0 x 75 mm、5 µm	
移動相:	A: 水 + 0.1 % 酢酸 B: ACN + 0.1 % 酢酸	
流量:	600 µL/min	
グラジエント:	5.5 分で 20 ~ 100 % B	
温度:	80 °C	
MS 条件:	LC/MS:	陽イオン ESI、Vcap 6,000 V
	ドライガス流量:	12 L/min
	ドライガス温度:	350 °C
	ネブライザ:	45 psi
	フラグメンタ電圧:	140 V
	スキャン:	600 ~ 2,500
	ステップサイズ:	0.15 amu
	ピーク幅:	0.06 分
サンプル:	1 µL	



Poroshell カラムと 2.1 mm、1.0 mm、および 0.5 mm のナローボア直径の組み合わせは、LC/MS に最適です。サンプル量が限られている場合は、内径 1.0 mm または 0.5 mm の Poroshell カラムを使用すれば LC/MS 分析で高感度を得ることができます。Poroshell カラムでは、0.5 ~ 5 pmole という少量のタンパク質でも、高感度の MS 分子量測定が可能です。また Poroshell カラムは、安定剤や組織培地が存在する場合でも、インタクトタンパク質の高速な MS 同定に使用されてきました。

ヒントとツール

アジレントは、ポリプロピレンや不活性ガラス、シリコンガラスなどのバイアルやサンプル容器を豊富にご用意しています。詳細については、資料番号 **5990-9022JAJ** を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp



タンパク質の溶出パターン

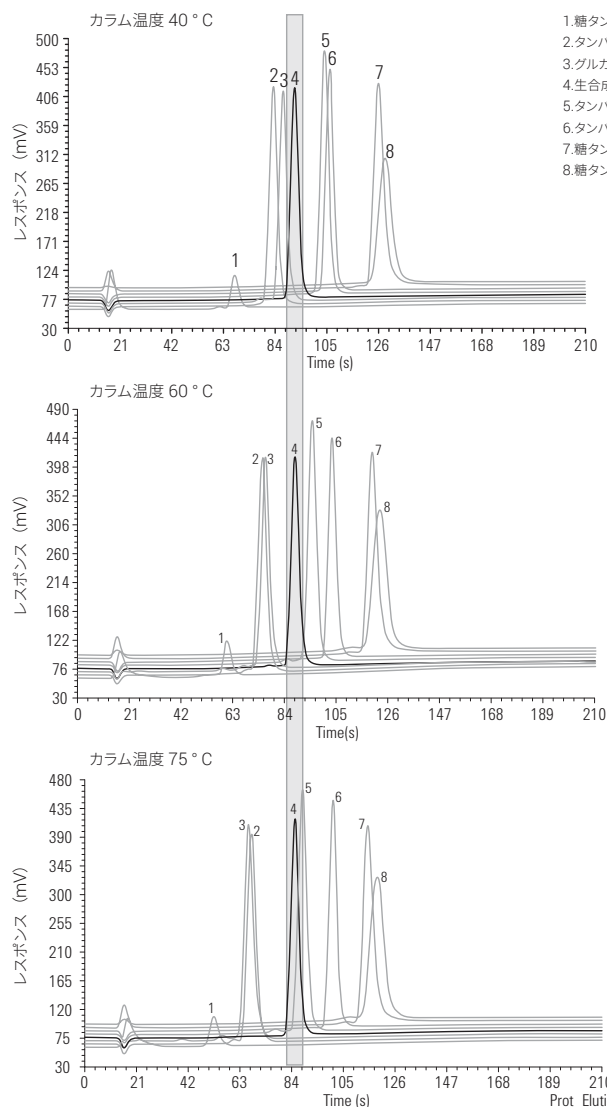
カラム: **Poroshell 300SB-C8**
660750-906
2.1 x 75 mm, 5 µm

移動相: A : 0.1 % TFA 水溶液
 B : 0.1 % TFA ACN 溶液

流量: 1.0 µL/min

グラジエント: 3 分で 20 ~ 70 % B

検出器: UV、214 nm

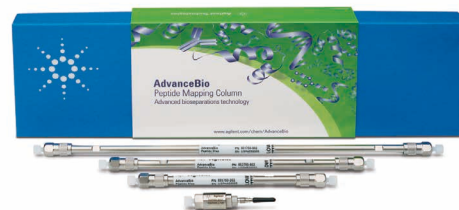


Poroshell 300

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (µm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
ナローポア	2.1 x 75	5	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
マイクロポア	1.0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
キャピラリー	0.5 x 75	5		5065-4468		
ガードカートリッジ、4 個	2.1 x 12.5	5	821075-920	821075-918	821075-924	
ガードハードウェアキット			820999-901	820999-901	820999-901	
マイクロポアガード、3 個	1.0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

AdvanceBio ペプチドマッピング

- **分析信頼性の向上**：AdvanceBio ペプチドマッピングカラム充填剤の各バッチは、厳密なペプチド混合物を使用したテストを実施しているため、適合性と再現性が確保されており、複雑なペプチドマップの主要ペプチドの同定が可能です
- **分析時間の短縮**：全多孔質 HPLC カラムより 2 ～ 3 倍高速です。
- **すべての機器の機能を向上**：内径 4.6、3.0、および 2.1 mm のカラムは 600 bar まで安定しているため、UHPLC 装置を最大限に活用できます。従来の 400 bar の装置でも優れた性能を実現します。
- **柔軟性の向上**：すべての HPLC にギ酸移動相を使用することで MS 感度を上げます。



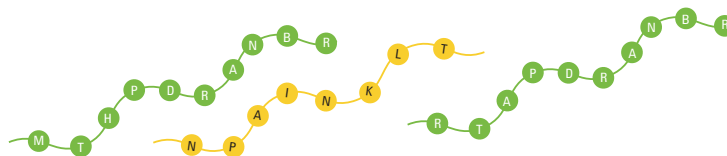
これらの高度なバイオカラムの特徴は、120 Å のポアサイズと 2.7 μm の表面多孔質粒子です。このカラムでは、分析が困難なペプチド混合物を使用して特別にテストを実施し、信頼性の高いペプチドマッピング性能を保証しています。また AdvanceBio ペプチドマッピングカラムと UHPLC を組み合わせると、分離能と速度が大幅に向上します。また従来の HPLC で使用しても優れた結果を得ることができます。

カラムの仕様

結合相	ポアサイズ	上限温度	pH 範囲	エンドキャップ
EC-C18	120 Å	60 °C	2.0～8.0	ダブル

仕様の数値は代表値です。

ヒントとツール



AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの使用法については、次の資料を参照してください。

Amano, M. et al. Detection of Histidine Oxidation in a Monoclonal Immunoglobulin gamma (IgG) 1 Antibody. Analytical Chemistry, 2014, 86 (15) : 7536 -7543

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

エリトロポエチンタンパク質分解物の高分離能ペプチドマップ

カラム: AdvanceBio ペプチドマッピング
651750-902
2.1 x 250 mm、2.7 µm

移動相: A: H₂O + 0.1 % ギ酸 (v/v)
B: アセトニトリル + 0.1 % ギ酸 (v/v)

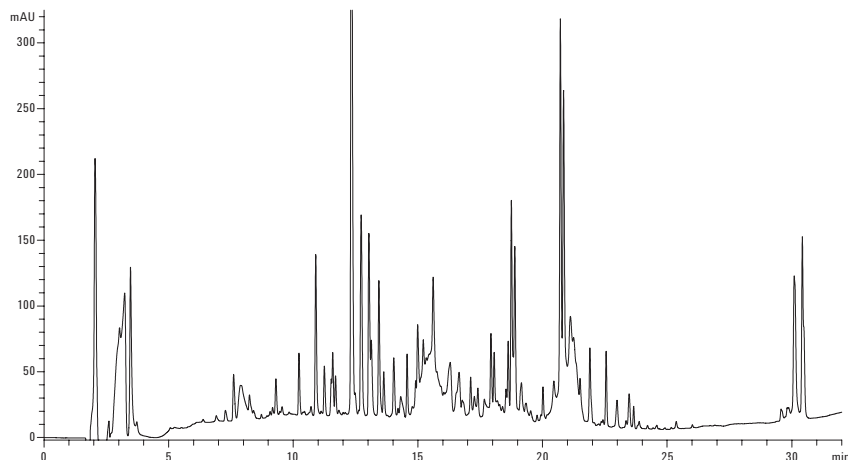
流量: 0.4 mL/min

グラジエント:

時間 (分)	% B
0	3
28	45
33	60
34	95

温度: 55 °C

サンプル: 5 µL (2 µg/µL)



IgG の高速で効率的なペプチドマッピング

カラム: AdvanceBio ペプチドマッピング
655750-902
2.1 x 100 mm、2.7 µm

AdvanceBio ペプチドマッピング
653750-902
2.1 x 150 mm、2.7 µm

移動相: A: H₂O + 0.1 % FA (v/v)
B: 90 % ACN + 0.1 % FA (v/v)

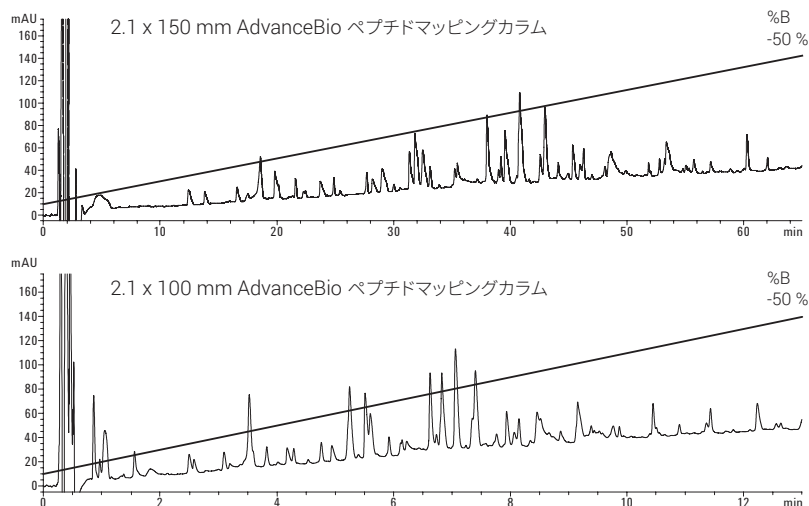
流量: 条件により異なる

注入量: 15 µL

温度: 40 °C

検出器: UV、215/220 nm

サンプル: 1290 Infinity LC システムと 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 LC/MS



AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの最適化による高速ペプチドマッピング分析の実現。グラジエント 10 ~ 40 % B、DAD : 215 nm、40 °C。上図、2.1 × 150 mm カラムを用いた 75 分の分離により 59 ペプチドピークを生成 (流量 0.2 mL/min、211 bar)。下図、2.1 × 100 mm カラムを用いて最適化した 14 分の分離により 57 ペプチドピークを生成 (流量 0.6 mL/min、433 bar)。

Agilent ペプチド混合物を使用した品質管理テスト

カラム: AdvanceBio ペプチドマッピング
653750-902
2.1 x 150 mm, 2.7 µm

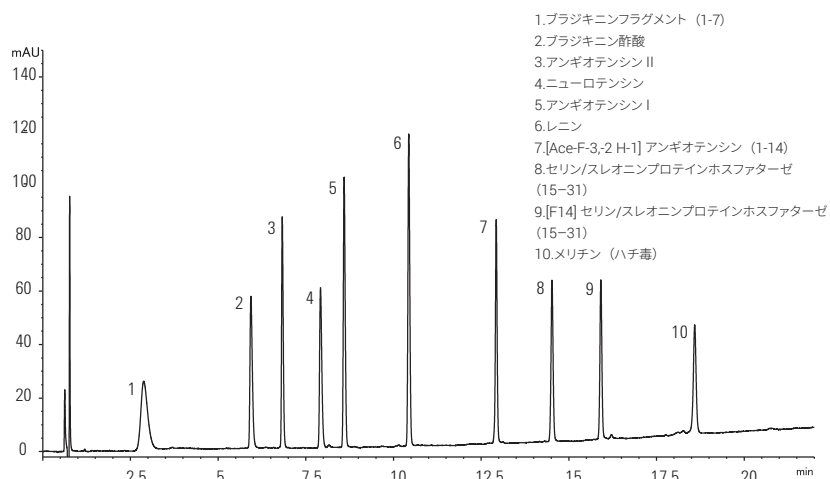
流量: 3 µL

グラジエント: A、H₂O (0.1 % TFA)、B、ACN (0.1 % TFA)、0 ~ 25 分、
15 ~ 65 % B、25 ~ 26 分、65 ~ 95 % B

温度: 55 °C

検出器: 220 nm

サンプル: ペプチドマッピング標準混合物
(ペプチドごとに 0.5 ~ 1.0 µg/µL) p/n 5190-0583



AdvanceBio ペプチドマッピング充填剤の全バッチにテスト用混合物を使用しました。この混合物には、分子量の範囲が 757 ~ 2845 Da の 10 種類の親水性、疎水性、および塩基性ペプチドが含まれています。すべてのカラムは低分子プローブを使用したテストにより効率も保証されています。



CrossLab リアルストーリー

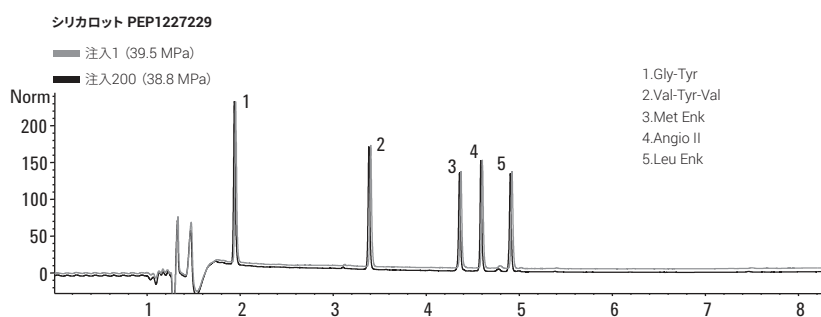
生化学分野での活用例

大幅なダウンタイム短縮とユーザーの信頼性向上を実現した、実際のラボの事例をご覧ください。

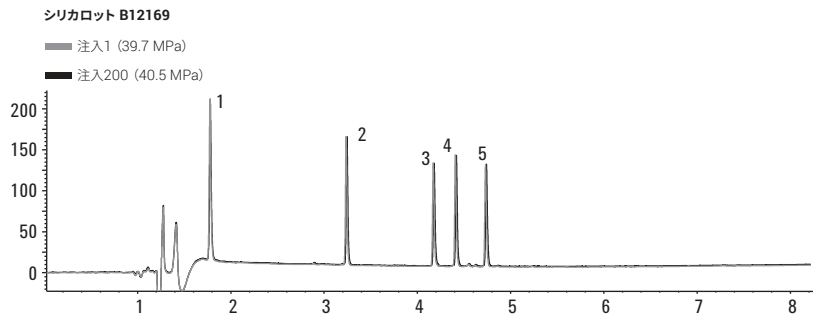
www.agilent.com/chem/story25

200 回の注入後のロット間再現性

カラム: AdvanceBio ペプチドマッピング
651750-902
2.1 x 250 mm、2.7 μm
流量: 0.5 mL/min
注入: 1 μL
グラジエント: A、H₂O (0.1 % TFA)、B、ACN (0.08 % TFA)、0 ~ 8 分、
 10 ~ 60 % B、8.1 ~ 9 分、95 % B で保持
温度: 55 °C
検出器: 220 nm
サンプル: Sigma HPLC ペプチド標準



注入	RT2 (分)	RT3 (分)	RT4 (分)	RT5 (分)
1	3.39	4.36	4.59	4.90
200	3.52	4.48	4.70	5.02
注入	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0.020	0.021	0.020	0.022
200	0.020	0.021	0.019	0.021



注入	RT2 (分)	RT3 (分)	RT4 (分)	RT5 (分)
1	3.36	4.29	4.52	4.85
200	3.24	4.18	4.41	4.74
注入	PW2	PW3	PW4	PW5
1	0.019	0.020	0.019	0.020
200	0.019	0.020	0.019	0.020

ロット間および分析間の優れた再現性。2.1 x 250 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使用することで、最大の分離能を達成しました。

AdvanceBio ペプチドマッピング

説明	部品番号
4.6 x 150 mm, 2.7 µm	653950-902
3.0 x 150 mm, 2.7 µm	653950-302
2.1 x 250 mm, 2.7 µm	651750-902
2.1 x 150 mm, 2.7 µm	653750-902
2.1 x 100 mm, 2.7 µm	655750-902
4.6 x 5 mm, Fast Guard*	850750-911
3.0 x 5 mm, Fast Guard*	853750-911
2.1 x 5 mm, Fast Guard*	851725-911

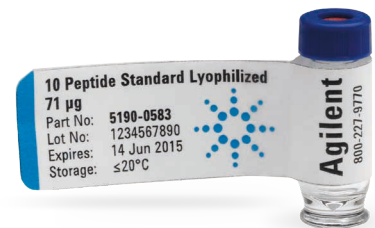
*Fast Guard カラムを使えば、分離スピードや分離能を損なわずに、カラム寿命を長くすることができます。

アジレントのペプチド品質管理用標準試料

10 種のペプチドを含む品質管理用標準試料は、アジレントがカラムの QC に用いているものと同一ものです。この標準試料を使えば、カラム使用期間を通してカラム性能が確認できます。この標準試料は HPLC および LC/MS に使用できます。1 バイアルあたりの注入回数は約 20 回です。

アジレントのペプチド品質管理用標準試料

説明	部品番号
ペプチド品質管理用標準試料、71 µg、2 mL バイアル中	5190-0583



ヒントとツール

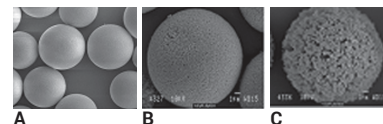
ペプチドマッピングは、組み換えタンパク質をはじめとするタンパク質同定試験に広く用いられている優れた手法です。再現性が高く正確なペプチドマッピングのためには、カラム選択の他にいくつかの点を考慮する必要があります。例えばタンパク質分解、サンプル前処理、メソッド最適化などです。ペプチドマッピング手順で使用される基本的な手法とペプチドマッピング分離を最適化する際の考慮事項については、「最適なペプチド分析のために：ペプチドマッピングの基礎」（資料番号 **5991-2348JAJ**P）を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp

PLRP-S

- － 再現性の高い結果を提供し、長いカラム寿命を実現する、耐久性の高い堅牢なポリマー粒子を含有
- － 熱的および化学的に安定
- － USP L21 に準拠
- － バイオサイエンス、化学、臨床研究、エネルギー、環境、食品や農業、材料科学、医薬品で使用可能
- － 低分子から高分子の複合体やポリヌクレオチドの分離に使用できるポアサイズ (100 Å ~ 4000 Å)

PLRP-S のカラムファミリーには幅広いポアサイズと粒子サイズが揃っており、すべてが同一の結合相と基本的な吸着特性を備えています。粒子は本質的に疎水性です。このため逆相分離に結合相やアルキル結合基は不要です。そのため、残存シラノールや残留重金属は存在せず、分析結果への影響もありません。豊富な製品群から、ボトムアップおよびトップダウンプロテオミクス、分析用分離、前処理精製などのマイクロ分離に適したカラムを選択できます。さらに、バルク充填剤を充填したプロセスカラムもご用意できます。



PLRP-S 10 μm 粒子の走査型電子顕微鏡写真 (SEM)。

ポアサイズの違いが明確にわかります。

A は 100 Å の小さいポア

B は 300 Å の大きいポア

C は 4000 Å のメガポア

カラムの仕様

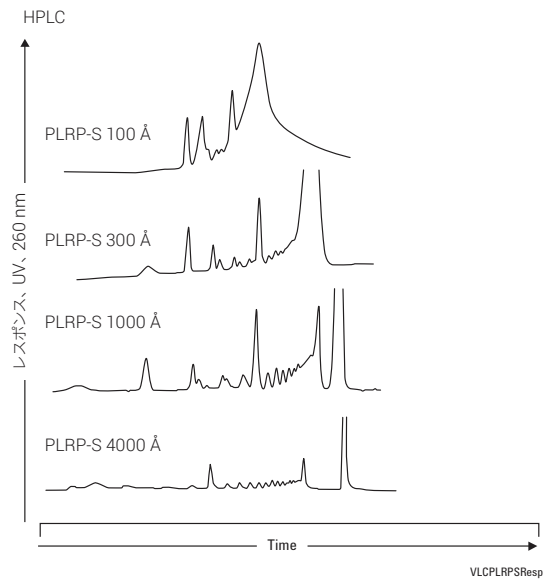
pH 範囲	1~14
緩衝液の種類	制限なし
有機溶媒	1~100 %
温度上限	200 °C
最大圧力:	3 μm: 275 bar/4000 psi
	5 μm, 8 μm, 10 μm: 207 bar/3000 psi
	10~15 μm, 15~20 μm, 30 μm: 103 bar/1500 psi

PLRP-S アプリケーション

ポアサイズ	アプリケーション
100 Å	低分子/合成
300 Å	組み換えペプチド/タンパク質
1000 Å	高分子量タンパク質
4000 Å	DNA/高速

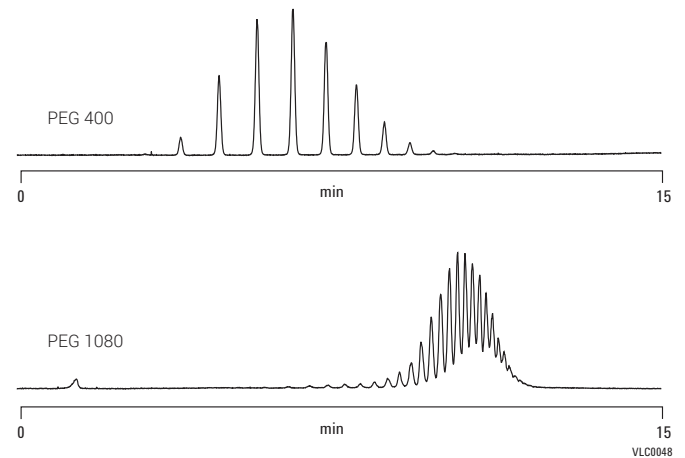
25 bp DNA ラダーの HPLC

カラム： PLRP-S, 2.1 x 150 mm
移動相： A : 100 mM TEAA
 B : 100 mM TEAA, 50 % 水:50 % ACN の溶液
流量： 200 μ L/min
グラジエント： 150 分で 12.5 ~ 50 % B



ポリエチレングリコール

カラム： PLRP-S 100 Å
 PL1111-3500
 4.6 x 150 mm, 5 μ m
移動相： A : H₂O
 B : ACN
流量： 1 μ L/min
注入量： 10 μ L
グラジエント： 12 分で 10 ~ 30 % B, 30 % B で 3 分間保持
検出器： ELS (ネブライザ = 50 °C、蒸発 = 70 °C、ガス = 1.6 SLM)
サンプル濃度： 1 mg/mL



化学的安定性 — TFA 濃度

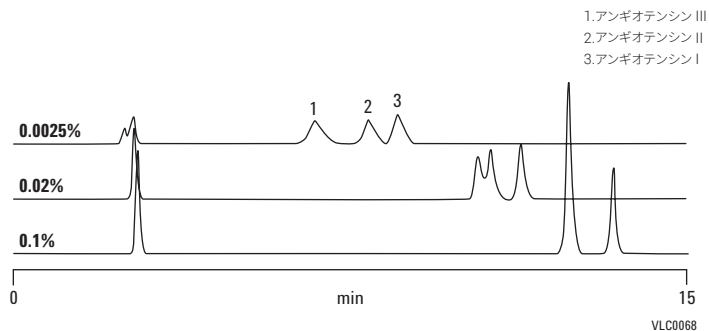
カラム： PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4.6 x 250 mm、5 μm

移動相： A：TFA 水溶液（さまざまな %）
B：TFA（さまざまな %）、ACN 溶液

流量： 1.0 mL/min

グラジエント： 15 分で直線的に 12 ~ 40 % B

検出器： ELS（ネブライザ = 75 °C、蒸発 = 85 °C、ガス = 1.0 SLM）

化学的安定性 - NH₄OH 濃度

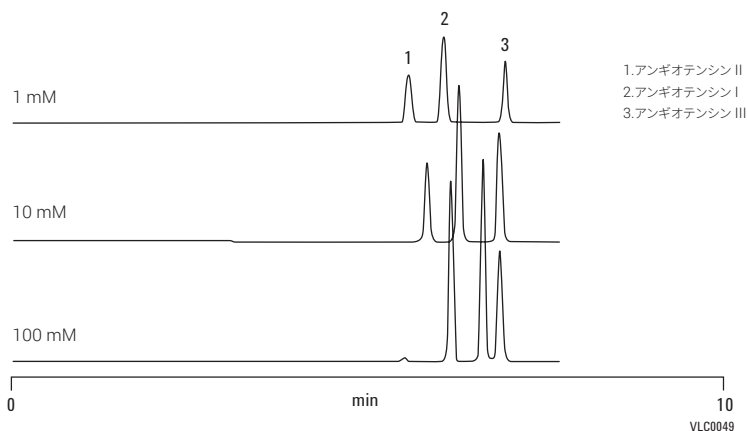
カラム： PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4.6 x 250 mm、5 μm

移動相： A：NH₄OH（さまざまな mM）の水溶液
B：NH₄OH（さまざまな mM）の ACN 溶液

流量： 1.0 mL/min

グラジエント： 15 分で直線的に 10 ~ 100 % B

検出器： ELS（ネブライザ = 80 °C、蒸発 = 85 °C、ガス = 1.0 SLM）



Alberta Peptide Institute のテスト混合物

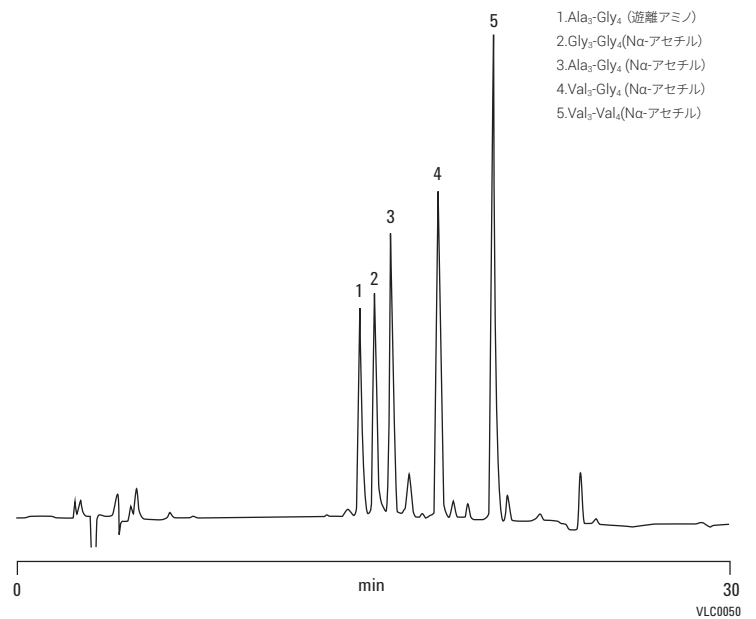
カラム： PLRP-S 100 Å
PL1512-5500
4.6 x 250 mm、5 μm

移動相： A : 0.1 % TFA、99 % 水:1 % ACN
B : 0.1 % TFA、70 % 水:30 % ACN

流量： 1 μL/min

グラジエント： 30 分で 0 ~ 100 % B

検出器： UV、220 nm



乳製品サンプル（牛乳）に含まれるタンパク質

カラム： PLRP-S 300 Å
PL1512-3801
4.6 x 150 mm、8 μm

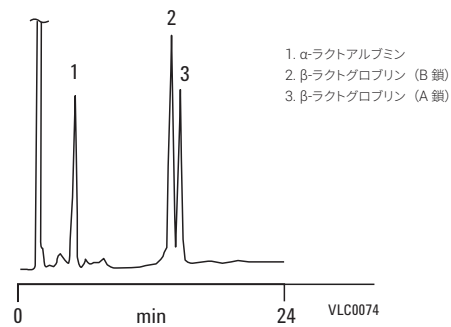
移動相： A : 0.1% TFA、99% 水: 1 % ACN
B : 0.1% TFA、1% 水: 99% ACN

流量： 1.0 mL/min

注入量： 10 μL

グラジエント： 36 ~ 48 % B、0 ~ 24 分、48 ~ 100 % B、24 ~ 30 分
100 % B、30 ~ 35 分、100 ~ 36 % B、35 ~ 40 分

検出器： UV、220 nm



イオンペア逆相 HPLC での、温度によるオリゴヌクレオチドの質量移動と分離能の向上

カラム: **PLRP-S 100 Å**
PL1512-1300
4.6 x 50 mm, 3 μm

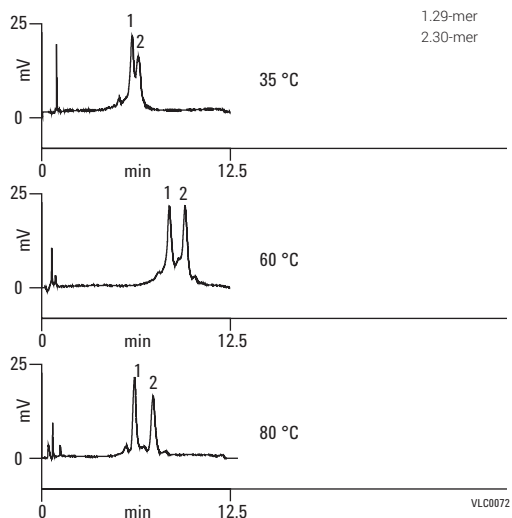
移動相: A: 100 mM TEAA
 B: 100 mM TEAA, 25 % ACN 溶液

流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 5 % 変化 (緩衝液 B で 5 分間)

温度: 35 °C、60 °C、または 80 °C

検出器: UV, 254 nm



分子量の大きい繊維状タンパク質

カラム: **PLRP-S 300 Å**
PL1512-3801
4.6 x 150 mm, 8 μm

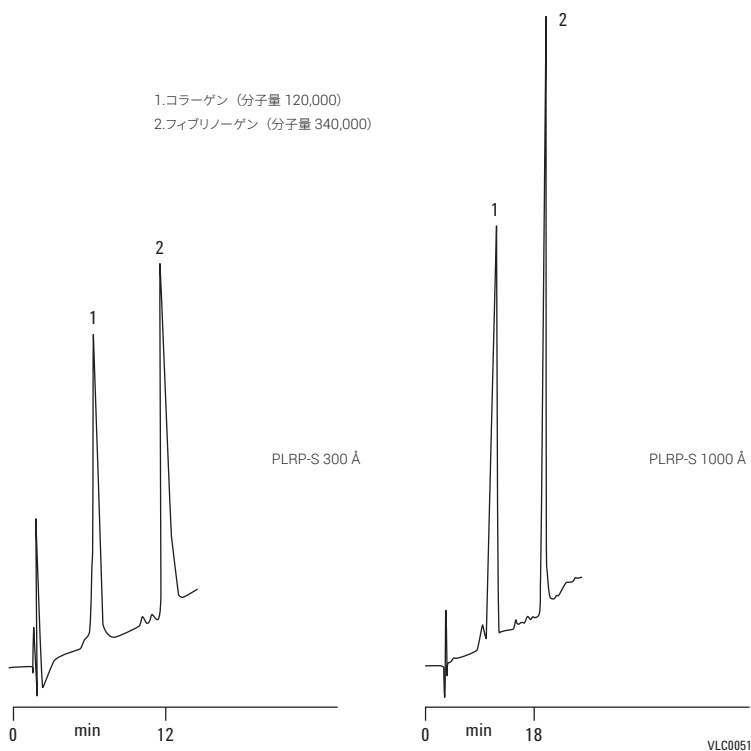
移動相: A: 0.25 % TFA 水溶液
 B: 0.25 % TFA, 5 % 水:95 % ACN

流量: 1.0 mL/min

注入量: 10 μL

グラジエント: 15 分で 20 ~ 60 % B

検出器: UV, 220 nm



PLRP-S HPLC カラム

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
4.6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801	PL1512-5802	
4.6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801	PL1512-3802	PL1512-3803
4.6 x 50	8		PL1512-1801	PL1512-1802	PL1512-1803
4.6 x 250	5	PL1512-5500	PL1512-5501		
4.6 x 150	5	PL1111-3500	PL1512-3501		
4.6 x 50	5	PL1512-1500	PL1512-1501	PL1512-1502	PL1512-1503
4.6 x 150	3	PL1512-3300	PL1512-3301		
4.6 x 50	3	PL1512-1300	PL1512-1301		
2.1 x 250	8		PL1912-5801		
2.1 x 150	8		PL1912-3801	PL1912-3802	PL1912-3803
2.1 x 50	8		PL1912-1801	PL1912-1802	PL1912-1803
2.1 x 250	5	PL1912-5500	PL1912-5501		
2.1 x 150	5	PL1912-3500	PL1912-3501		
2.1 x 50	5	PL1912-1500	PL1912-1501	PL1912-1502	PL1912-1503
2.1 x 150	3	PL1912-3300	PL1912-3301		
2.1 x 50	3	PL1912-1300	PL1912-1301		
1.0 x 50	8			PL1312-1802	
1.0 x 50	5	PL1312-1500		PL1312-1502	
1.0 x 10	5			PL1C12-2502	
1.0 x 150	3	PL1312-3300			
1.0 x 50	3	PL1312-1300			
PLRP-S ガードカートリッジ、 3.0 x 5.0 mm 用、2 個		PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801	PL1612-1801
カートリッジホルダ、 3.0 x 5.0 mm カートリッジ用		PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016	PL1310-0016

ヒントとツール

マイクロボアカラムの詳細情報については、**169 ページ**を参照してください。

PLRP-S 分取からプロセスのカラムおよびメディアの詳細情報については、**182 ページ**を参照してください。

AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ

MS 検出前に塩イオンをオンライン除去する逆相脱塩カートリッジ

モノクローナル抗体などのタンパク質の分析には、アフィニティ、イオン交換（IEX）、およびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）などの手法が広く使用されています。ところが、これらの分析法には、不揮発性塩を含む水性移動相が必要です。この不揮発性塩は、MS 検出を用いる場合に問題を引き起こします。不揮発性塩によってシグナル抑制が生じたり、塩の堆積により MS 検出器が汚染されたりすることで、メンテナンスの負担や機器のダウンタイムの増加につながる可能性があるためです。AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジなら、MS 検出前に高速かつ効率的にオンラインで塩イオンを除去することができます。このカートリッジ型カラムは、採取フラクションを脱塩するために、任意の LC システムと組み合わせて使用することができます。また 1290 Infinity II 2D-LC システムでも使用でき、1 次元側での分離の後に、2 次元側で脱塩を実行します。



AdvanceBio 脱塩 RP (p/n PL1612-1102) および
カートリッジホルダ (p/n 820999-901)

AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ

説明	部品番号
AdvanceBio 脱塩-RP、2.1 x 12.5 mm、2 個	PL1612-1102
カートリッジホルダ	820999-901

AdvanceBio オリゴヌクレオチド

トリチルオフ、脱保護オリゴヌクレオチドを適切に分離するには、高分離能で厳しい条件に耐える堅牢性を備えたカラムが必要です。

Agilent AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムは、高効率、2.7 µm の表面多孔質 Poroshell 粒子が特徴です。アジレント独自のテクノロジーを使用し粒子を化学修飾して、高 pH 移動相に対する耐性を大幅に高めています。また、エンドキャップ処理を施した C18 相でオリゴヌクレオチドの選択性を高めます。さらに、分離能標準を用いて AdvanceBio オリゴヌクレオチドをバッチテストすることで、一貫した性能を実現しています。

AdvanceBio 製品シリーズは、タンパク質、抗体、複合物、新規生物物質、およびバイオ医薬品の完璧な特性分析のために、一貫性のある卓越した性能を提供できるように設計されています。



カラムの仕様

結合相	粒子サイズ	ポアサイズ	上限温度	pH 範囲	エンドキャップ	圧力上限
C18	2.7 µm	100 Å	65 °C	3.0~11.0	ダブル	600 bar

カラム： AdvanceBio オリゴヌクレオチド
2.1 x 50 mm
(p/n 659750-702)

移動相： A : HFIP:TEA (400 mM:15mM) 水溶液
 B : MeOH:移動相 A (50:50)

流量： 0.4 mL/min

グラジエント： 0.5 分で 30 ~ 40 % B、5 分で 40 ~ 70 % B

サンプル： 25 mer DNA

温度： 65 °C

検出： UV (260 nm)

検出： MS

最小範囲： 400 m/z

最大範囲： 1,700 m/z

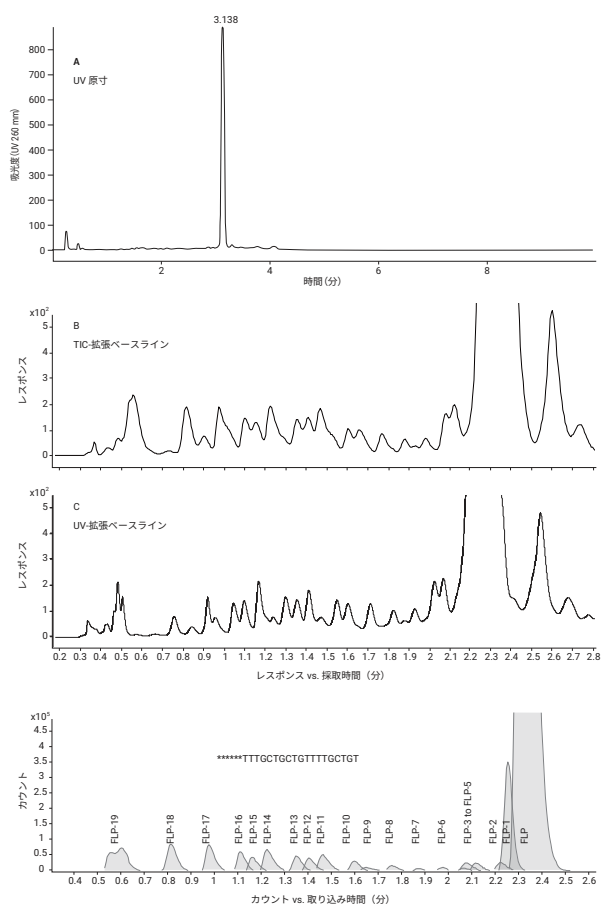
スキャン速度： 3.00 スペクトル/秒

イオン極性： -ve

VCap 3,500

ノズル電圧： 1,000 V

フラグメンタ： 200



AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで分離した 25-mer DNA オリゴヌクレオチドの TIC からの解析データ

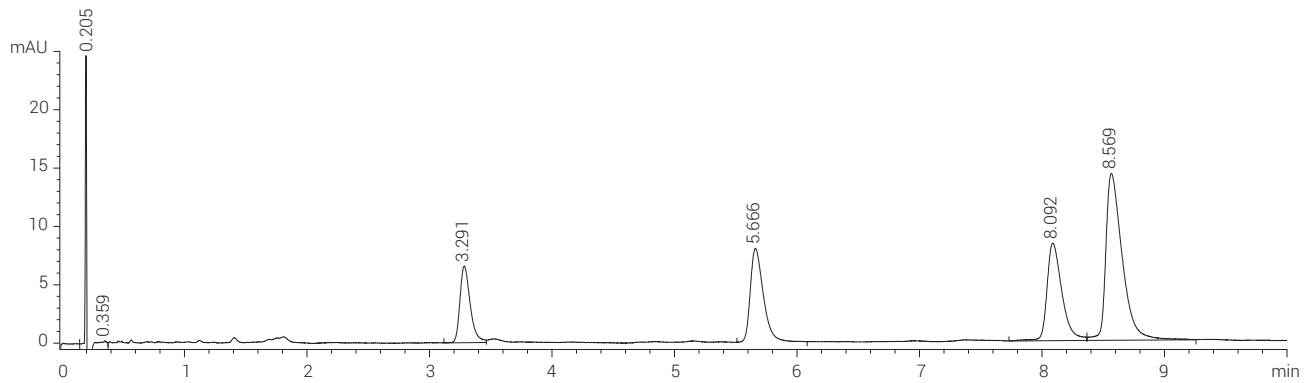
AdvanceBio オリゴヌクレオチド

説明	内径 (mm)	長さ (mm)	粒子サイズ (μm)	部品番号
ナローポア	2.1	150	2.7	653750-702
ナローポア	2.1	100	2.7	655750-702
ナローポア	2.1	50	2.7	659750-702
UG ガード、600 bar	2.1	5	2.7	821725-921
分析	4.6	150	2.7	653950-702
分析	4.6	100	2.7	655950-702
分析	4.6	50	2.7	659950-702
UG ガード、600 bar	4.6	5	2.7	820750-921

AdvanceBio オリゴヌクレオチド標準試料

AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで高い分離能を確保するために、すべてのバッチに対してアジレントのオリゴヌクレオチド分離能標準試料を用いた試験を実施しています。オリゴヌクレオチド分離能試験標準試料には 14、17、20、および 21 mer の合成オリゴヌクレオチドが含まれ、N/N-1 分離能を実証できるよう設計されています。

カラム：	AdvanceBio オリゴヌクレオチド 2.1 x 50 mm (p/n 659750-702)	流量：	0.6 mL/min
移動相：	A：100 mM TEAA 水溶液 B：100 mM TEAA アセトニトリル溶液	サンプル：	アジレントオリゴヌクレオチド分離能標準試料 (p/n 5190-9028)
グラジエント：	12 分で 6 ～ 8 % B	温度：	65 °C
ストップタイム：	13 分	注入：	0.5 µL
ポストラン：	5 分	検出：	UV (260 nm)



アジレントは、15、20、25、30、35、および 40 mer の合成オリゴデオキシチミジンを含むオリゴヌクレオチドラダー標準試料も用意しています。この標準試料を使用することで、カラムの選択性と再現性を実証できます。

カラム： AdvanceBio オリゴヌクレオチド
2.1 x 50 mm
(p/n 659750-702)

流量： 0.6 mL/min

カラム

温度： 65 °C

移動相： A : 100 mM TEAA 水溶液

サンプル： アジレントオリゴヌクレオチドラダー標準試料 (p/n 5190-9029)

B : 100 mM TEAA アセトニトリル溶液

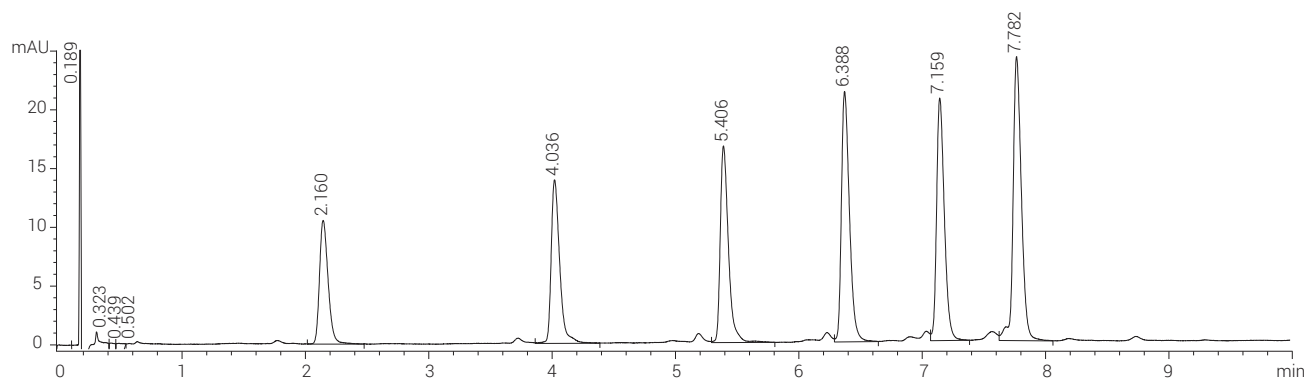
注入： 10 µL

グラジエント： 10 分で 10 ~ 14 % B

検出： UV (260 nm)

ストップタイム： 11 分

ポストラン： 5 分

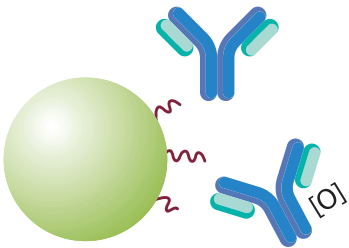


AdvanceBio オリゴヌクレオチド標準試料

説明	部品番号
オリゴヌクレオチド分離能標準試料	5190-9028
オリゴヌクレオチドラダー標準試料	5190-9029

疎水性相互作用クロマトグラフィーによる インタクト分析

AdvanceBio HIC



AdvanceBio HIC カラムでは、インタクトレベルの天然タンパク質を高い分離能、堅牢性、再現性で分離できます。

ZORBAX 全多孔質粒子と独自の結合技術が組み込まれているため、疎水性と多目的の単一結合相を備えており、モノクローナル抗体（mAb）、抗体薬の複合体（ADC）、その他の遺伝子組み換えタンパク質など、非常に分析が困難な分子にも対応しています。

AdvanceBio HIC と 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと組み合わせることで、特性解析やバリデーションにおいて非常に優れた性能を発揮し、データの一貫性を確保します。

- － 最適な選択性：mAb 酸化変異体と ADC の薬物抗体比に対応
- － 単一結合相：CQA ごとの複数のカラムスクリーニングが不要
- － 堅牢性の強化：カラム寿命の向上により、分析結果の信頼性が飛躍的に向上
- － 優れた性能：すべての充填剤バッチが NIST mAb 標準でテスト済み
- － 高品質：すべてのカラムが個別に試験済みで、効率的なパッキングを保証
- － 生産性の向上：短いカラムにより、従来と同じ分離性能で分析の高速化を実現

カラムの仕様					
ポアサイズ	粒子サイズ	温度上限	pH 範囲	圧力上限	流量*
450 Å	3.5 µm	60 °C (pH 7 の場合)	2.0~8.0 (35 °C の場合)	400 bar (推奨使用圧力は 200 bar 未満)	0.5~1.0 mL/min (内径 4.6 mm)

*場合によっては、流量を 0.3 mL/min に下げてグラジエント時間を延長すると、さらに分離能が向上します。

カラム： AdvanceBio HIC
4.6 x 100 mm, 3.5 μ m

溶離液 A： 2 M 硫酸アンモニウム、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

溶離液 B： 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

グラジエント：

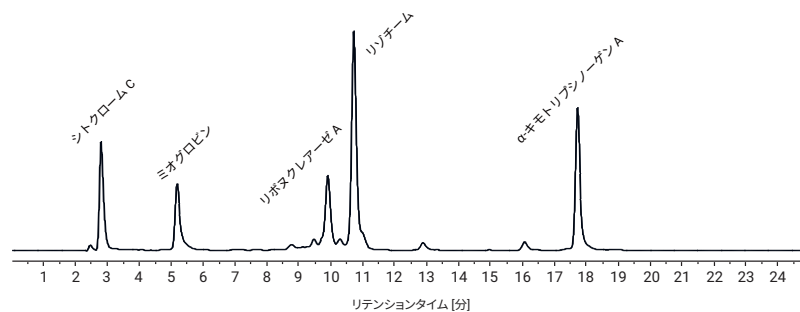
時間 (分)	%A	%B
0	100	0
20	0	100
25	0	100
30	100	0
40	100	0

流量： 0.5 mL/min

温度： 30 °C

注入量： 5 μ L

検出： UV、220 nm



カラム： AdvanceBio HIC
4.6 x 100 mm, 3.5 μ m

溶離液 A： 2 M 硫酸アンモニウム、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

溶離液 B： 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

グラジエント：

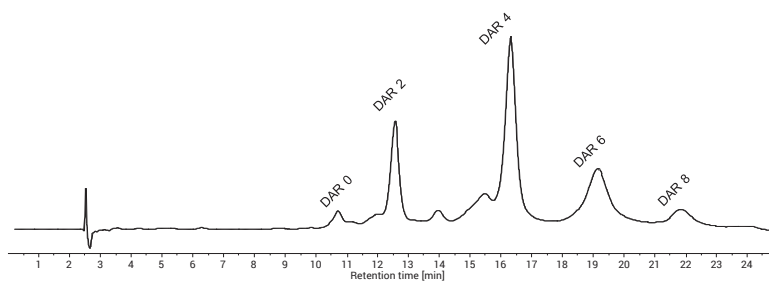
時間 (分)	%A	%B	%C
0	50	45	5
20	0	75	25
25	0	75	25
30	50	45	5
40	50	45	5

流量： 0.5 mL/min

温度： 30 °C

注入量： 5 μ L

検出： UV、220 nm



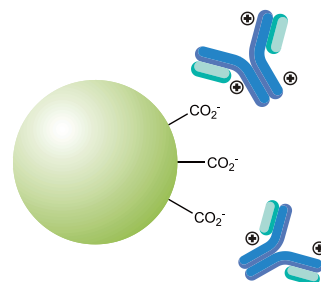
Agilent AdvanceBio HIC カラム

説明	部品番号
AdvanceBio HIC, 4.6 x 100 mm, 450 Å, 3.5 μ m	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 x 30 mm, 450 Å, 3.5 μ m	681975-908

電荷変異体の分析

タンパク質およびその他の荷電分子の精製

イオン交換クロマトグラフィー (IEX) は、イオンと極性分子を電荷に基づいて分離する高感度な手法です。IEX は SEC と同様に、タンパク質を未変性状態のまま分離できます。



IEX による電荷変異体の分析

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。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、モノクローナル抗体 (mAb) の前処理中に電荷均一性を分析することは、バイオ医薬品の製造においてきわめて重要です。

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できます。IEX は前処理法としても有用です。

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、電荷変異体の分析はバイオ医薬品にとってきわめて重要です。

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。

ここからは、アジレントの弱/強イオン交換（アニオンおよびカチオン）製品ファミリーについて説明します。

- 非多孔質 Bio IEX カラムは、高分離能、高効率、高回収率で分離できるように設計されています。
- Bio MAb カラムは、モノクローナル抗体の電荷アイソフォームの分離用に最適化されています。
- Porous IEX カラム（PL-SAX および PL-SCX）は化学的に安定しており、2 種類のポアサイズがあります。このためペプチド、オリゴヌクレオチド、および非常に大きいタンパク質を分離できます。
- 特にバイオモノリス IEX カラムは、抗体、ウイルス、DNA の分離に最適です。
- Buffer Advisor ソフトウェアは、イオン強度グラジエントによる自動的なタンパク質分離に最適なソリューションです。

ヒントとツール

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアの詳細については、資料番号 **5991-1408EN** を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp

電荷変異体の分析

イオン交換カラムの選択		
アプリケーション	アジレントのカラム	注意事項
モノクローナル抗体	Bio MAb	モノクローナル抗体を徹底的に特性解析するためには、酸性および塩基性アイソフォームを同定し、モニタリングする必要があります。Bio MAb HPLC カラムには電荷の違いをもとにモノクローナル抗体を高分離能分離するために設計された独自の樹脂が充填されています。
ペプチドおよびタンパク質	Bio IEX	Bio IEX カラムには、非多孔質のイオン交換ポリマー粒子が充填されています。Bio IEX カラムは、高分離能、高回収率、高効率の分離を実現するように設計されています。
タンパク質、ペプチド、および脱保護合成オリゴヌクレオチド	PL-SAX	化学的安定性の高い全多孔質ポリマーに共有結合した強アニオン交換基により、広い動作 pH 範囲を実現します。アニオン交換容量が pH に左右されることもありません。合成オリゴヌクレオチドの場合は、温度、有機溶媒、高 pH の変性条件を使用した分離にも対応できます。5 µm メディアでは高分離能での分離が可能です。30 µm メディアは中圧での液体クロマトグラフィーに適しています。
	<ul style="list-style-type: none"> • 1000 Å • 4000 Å 	
球状タンパク質およびペプチド	PL-SAX 1000 Å	
非常に大きい生体分子/高速	PL-SAX 4000 Å	
小さなペプチドから大きなタンパク質、および非常に大きい生体分子	PL-SCX	PL-SCX は、マクロポーラス型のポリスチレン/ジビニルベンゼンポリマーに親水性の被膜を施し、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。このプロセスでは、幅広い生体分子の分析、分離、および精製に最適な密度で強カチオン交換基が結合されるようにコントロールされています。5 µm メディアでは高分離能での分離が可能です。30 µm メディアは中圧での液体クロマトグラフィーに適しています。
	<ul style="list-style-type: none"> • 1000 Å • 4000 Å 	
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	バイオモノリス	強カチオン交換相、強および弱アニオン交換相。バイオモノリス HPLC カラムは InfinityLab LC シリーズと互換性があります。
	<ul style="list-style-type: none"> • バイオモノリス QA • バイオモノリス DEAE • バイオモノリス SO₃ 	
ウイルス、DNA、高分子量のタンパク質	バイオモノリス QA	
プラスミド DNS、バクテリオファージ	バイオモノリス DEAE	
タンパク質、抗体	バイオモノリス SO ₃	

Bio MAb HPLC カラム

- 硬い球状の高度に架橋されたポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) 非多孔質ビーズで構成された充填剤を使用
- 粒子に親水性ポリマー層を被膜しているため、抗体タンパク質の非特異的な結合がない
- 弱カチオン交換相と粒子を異なるプロセスを用いて階層化しているため、Bio WCX カラム粒子より高密度
- モノクローナル抗体の電荷アイソフォームの分離に適した特別な設計

モノクローナル抗体を徹底的に特性解析するためには、酸性および塩基性アイソフォームを同定し、モニタリングする必要があります。Bio MAb HPLC カラムには、電荷の違いをもとにモノクローナル抗体を高分離能分離するために設計された独自の樹脂が充填されています。これらのカラムは、水溶液バッファ、アセトニトリル/アセトン/メタノール、および水の混合液と互換性があります。一般的に使用される緩衝液はリン酸、トリス、MES、酢酸です。

Bio MAb カラムには 1.7、3、5、および 10 μm サイズがあり、小さい粒子ほど分離能が高くなります。

カラムの仕様

結合相	内径	粒子サイズ	pH 安定性	使用温度上限	流量
弱カチオン交換 (カルボン酸塩)	2.1 および 4.6 mm	1.7、3、5、 および 10 μm	2 ~ 12	80 °C	0.1 ~ 1.0 mL/min

ヒントとツール

モノクローナル抗体の電荷変異体分析のスループットを上げたい場合は、次の資料を参照してください。

「Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies (モノクローナル抗体の電荷変異体分析のサイクル時間の短縮)」(資料番号 **5991-4722EN**)

www.agilent.com/chem/jp



一貫性のあるイオン交換 mAb 分離

カラム: **Bio MAb、PEEK**
5190-2407
4.6 x 250 mm、5 µm

移動相: A: リン酸ナトリウム 10 mM、pH 5.5
 B: A + 塩化ナトリウム 0.5 M

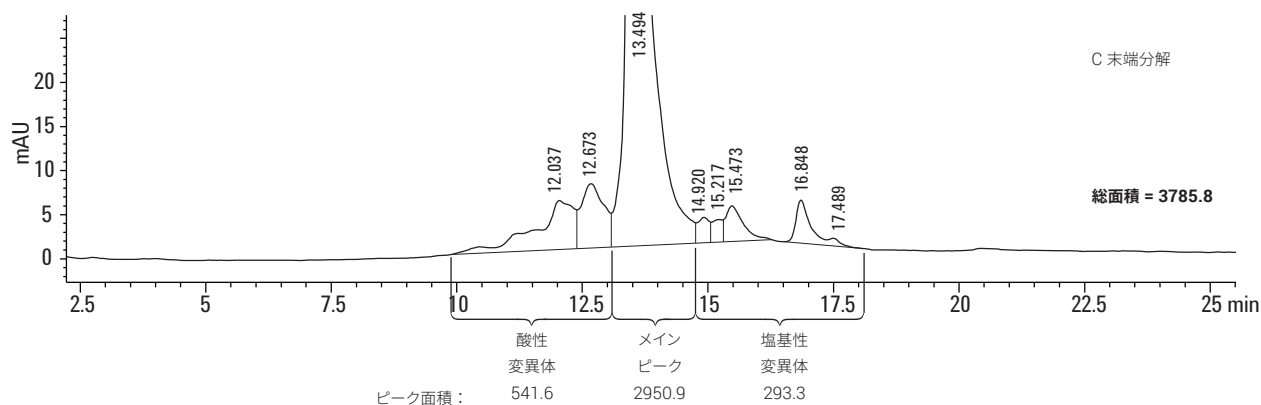
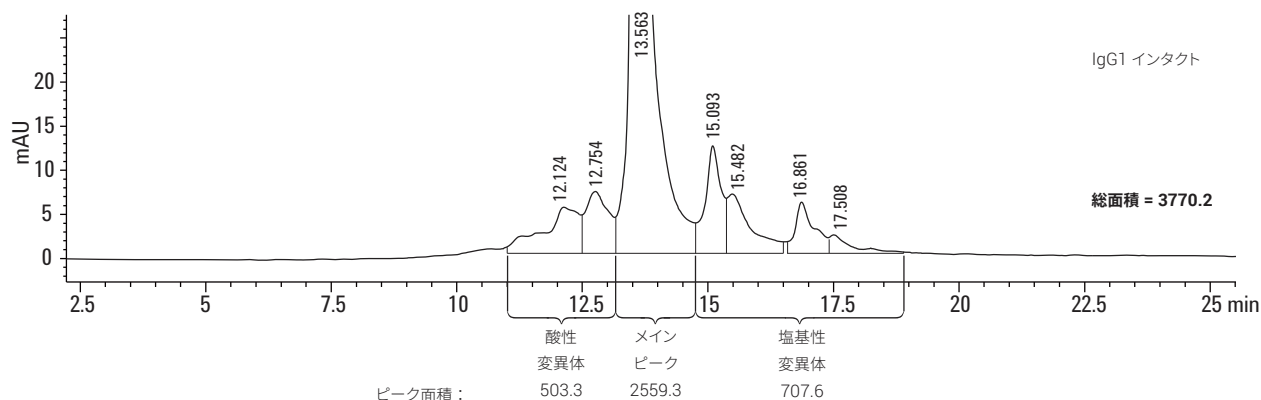
流量: 0.85 mL/min

グラジエント: 10 ~ 35 % B、0 ~ 25 分
 (特に記載のない場合)

検出器: UV、225 nm

サンプル: 1 mg/mL インタクトまたは C-末端分解 IgG1、5 µL

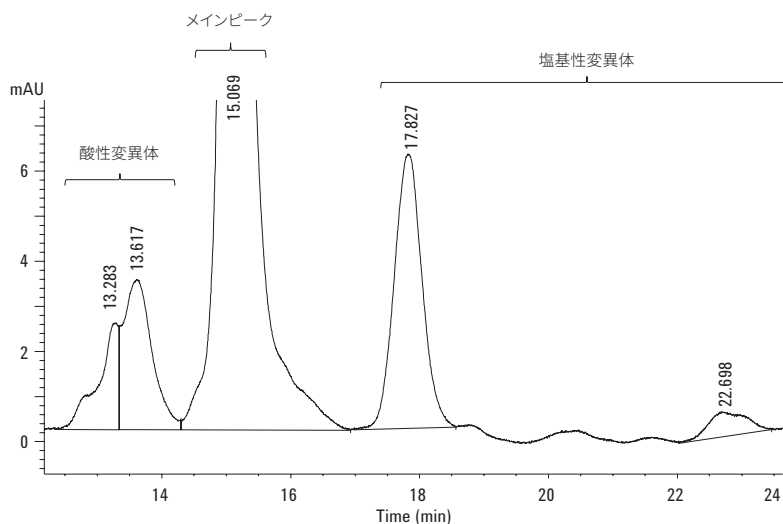
機器: 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC または
 1100 シリーズ LC



Bio MAb 5 µm カラムを装着した 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC による C 末端分解 IgG1 の計算。

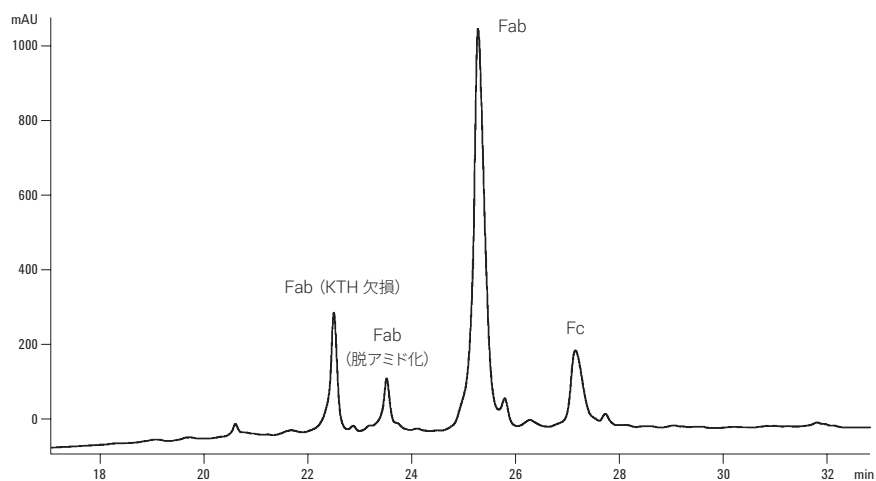
再現性と精度 - 正確な定量と堅牢なメソッドを可能にする Bio MAb カラム

カラム:	Bio MAb、PEEK 5190-2407 4.6 x 50 mm、5 µm										
移動相:	A: 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 B: 10 mM 重炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.5										
流量:	1.0 mL/min										
注入量:	10 µL (ニードル洗浄、フラッシュポートを 7 秒間作動)										
グラジエント:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th><th>% B</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>25</td><td>100</td></tr> <tr><td>27</td><td>100</td></tr> <tr><td>30</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0	0	25	100	27	100	30	0
時間 (分)	% B										
0	0										
25	100										
27	100										
30	0										
データ採取:	214、および 280 nm										
採取レート:	20 Hz										
フローセル:	60 mm パス										
カラム温度:	30 °C										
サンプル温度:	50 °C										
ポストタイム:	5 分										



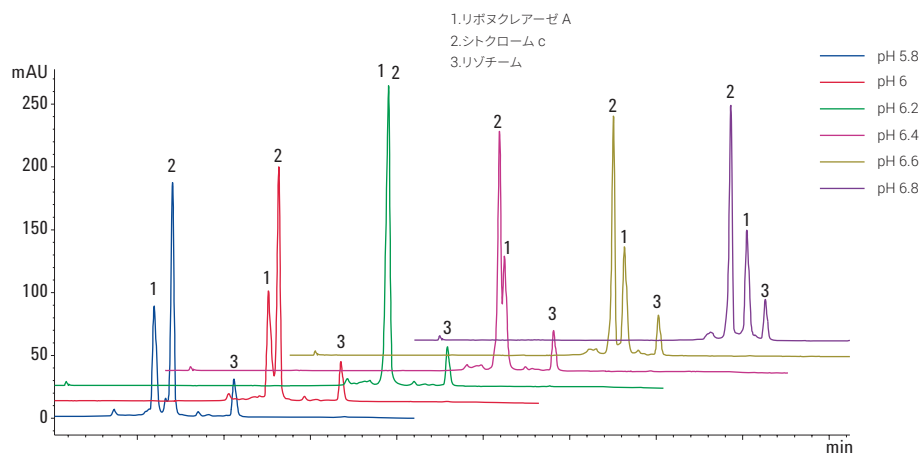
トラスツマブの Fab および Fc フラグメントの WCX 分離

カラム:	Bio MAb、PEEK 5190-2411 2.1 x 250 mm、5 µm														
移動相:	A: 20 mM MES、pH 5.6 B: 20 mM MES、pH 5.6 + 300 mM NaCl														
流量:	170 µL/min														
注入量:	16 µL														
グラジエント:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th><th>% B</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>39.5</td><td>80</td></tr> <tr><td>40</td><td>100</td></tr> <tr><td>50</td><td>100</td></tr> <tr><td>50.5</td><td>2</td></tr> <tr><td>60</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0	0	39.5	80	40	100	50	100	50.5	2	60	2
時間 (分)	% B														
0	0														
39.5	80														
40	100														
50	100														
50.5	2														
60	2														
温度:	30 °C														
機器:	1100 シリーズ														



Buffer Advisor ソフトウェアによるメソッド開発 - 最適な pH の測定

カラム：	Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 x 250 mm, 5 µm		
機器：	1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC	グラジエント：	0 分 - 20 mM NaCl 5 分 - 20 mM NaCl 30 分 - 500 mM NaCl 35 分 - 1,000 mM NaCl 36 分 - 20 mM NaCl
緩衝液：	A : H ₂ O B : NaCl 3 M C : MES (2-N-モルホリノエタンスルホン酸水和物) 60 mM D : MES-Na (2-N-モルホリノエタンスルホン酸ナトリウム塩) 35 mM		
サンプル：	PBS (リン酸緩衝液生理食塩水) に溶解したタンパク質 3 種の混合液、pH 7.4、 リボヌクレアーゼ A : 13,700 Da、pI 9.6 シトクローム c : 12,384 Da、pI 10-10.5 リゾチーム : 14,307 Da、pI 11.35		
流量：	1 mL/min	注入量：	10 µL
		サーモスタット：	4 °C
		温度 TCC：	25 °C
		測定波長：	280 nm/4 nm リファレンス：オフ
		ピーク幅：	0.05 分以上 (1.0 秒のレスポンス時間) (5 Hz)



3 種のタンパク質からなる混合液の分離を目的とした、動的に混合される 4 成分グラジエントを用いた pH スカウティング

リテンションタイムのばらつきを解消

カラム: Bio MAb、ステンレス
5190-2413
4.6 x 250 mm、10 µm

移動相: A: 10 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0
B: A + 1.0 M 塩化ナトリウム

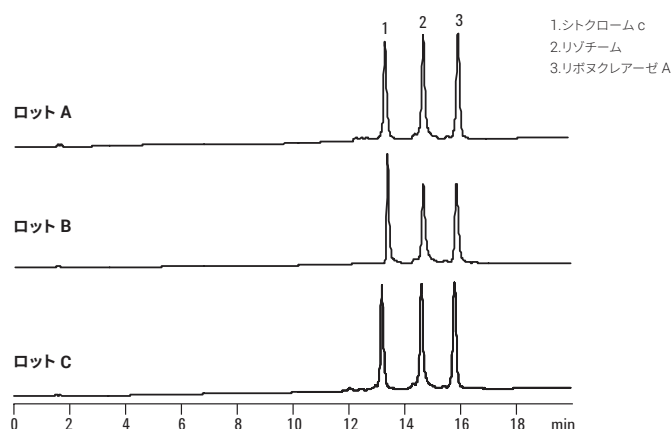
流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 42 分で 0 ~ 100 % B

温度: 25 °C

検出器: UV、214 nm

しっかりと管理された樹脂生産、カラム表面の結合相、カラム充填剤により、カラム間およびロット間でのリテンションタイムのばらつきを解消しています。

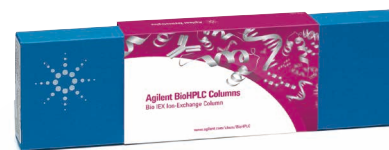


Agilent Bio MAb HPLC カラム

サイズ (mm)	粒子サイズ (µm)	Bio MAb PEEK	圧力上限	Bio MAb ステンレス	圧力上限
21.2 x 250	5			5190-6885	275 bar, 4000 psi
10 x 250	5			5190-6884	275 bar, 4000 psi
4.6 x 250	10	5190-2415	275 bar, 4000 psi	5190-2413	275 bar, 4000 psi
4.6 x 50	10	5190-2416	275 bar, 4000 psi		
4.6 x 250	5	5190-2407	400 bar, 5800 psi	5190-2405	400 bar, 5800 psi
4.6 x 50	5	5190-2408	400 bar, 5800 psi		
4.6 x 50	3			5190-2403	551 bar, 8000 psi
4.6 x 50	1.7			5190-2401	600 bar, 8700 psi
4.0 x 10、ガード	10			5190-2414	275 bar, 4000 psi
4.0 x 10、ガード	5			5190-2406	413 bar, 6000 psi
4.0 x 10、ガード	3			5190-2404	551 bar, 8000 psi
4.0 x 10、ガード	1.7			5190-2402	600 bar, 8700 psi
2.1 x 250	10	5190-2419	275 bar, 4000 psi		
2.1 x 50	10	5190-2420	275 bar, 4000 psi		
2.1 x 250	5	5190-2411	400 bar, 5800 psi		
2.1 x 50	5	5190-2412	400 bar, 5800 psi		

Bio IEX HPLC カラム

- 高度に架橋された硬質の非多孔質ポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) 粒子に親水性ポリマー層を被膜しているため、非特異的な結合がない
- 均一の高密度で充填されたイオン交換基が親水性層 (アンカーあたり複数のイオン交換基) と化学的に結合されているため、カラム容量が増加
- 耐高圧性に優れた粒子、被膜層、および結合相により、分離能および分離スピードが向上
- 複数のイオン交換基が1つのアンカーと結合されるため、容量が増加



Bio IEX HPLC カラムには非多孔質ポリマー性のイオン交換粒子が充填されており、ペプチド、オリゴヌクレオチド、タンパク質を高分離能、高回収率、高効率で分離できるように設計されています。

Bio IEX ファミリーには、強カチオン交換 (SCX)、弱カチオン交換 (WCX)、強アニオン交換 (SAX)、および弱アニオン交換 (WAX) 相が含まれます。すべての相に、1.7、3、5、および 10 μm の非多孔質粒子が用意されています。

カラムの仕様

結合相	内径	粒子サイズ	pH 安定性	使用温度上限	流量
SCX (強カチオン交換) - SO_3H	2.1 および 4.6 mm	1.7、3、5、および 10 μm	2~12	80 °C	0.1~1.0 mL/min
WCX (弱カチオン交換) - COOH					
SAX (強アニオン交換) - $\text{N}(\text{CH}_3)_3$					
WAX (弱カチオン交換) - $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$					

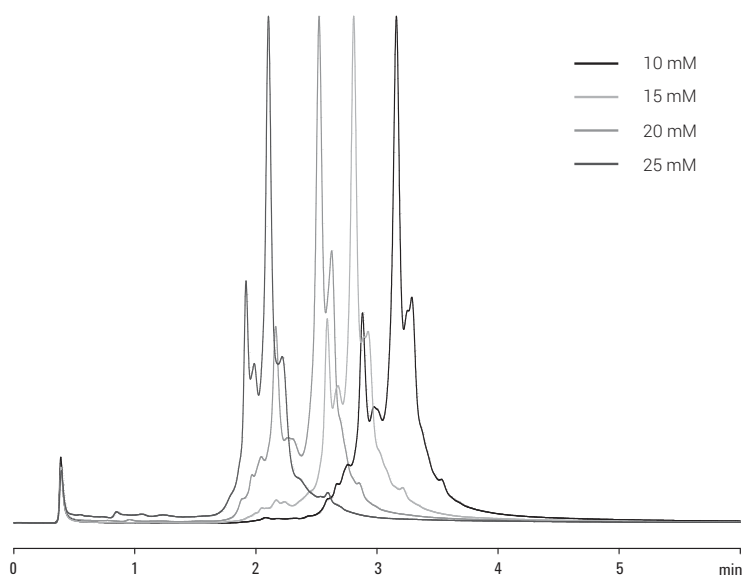
ヒントとツール

電荷変異体の分析の最適化の詳細については、「Ion-exchange chromatography for biomolecule analysis : a “how-to” guide (イオン交換クロマトグラフィーによる生体分子の分析: 「ハウツー」ガイド) (資料番号 **5991-3775EN**)、および「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」(資料番号 **5991-2449JAJP**) を参照してください。

www.agilent.com/chem/jp

高速でシンプルな電荷変異体ワークフロー

カラム：	Bio WCX、ステンレス 5190-2443 4.6 x 50 mm、3 µm Bio SCX、ステンレス 5190-2423 4.6 x 50 mm、3 µm	注入量：	10 µL
移動相：	A：水 B：塩化ナトリウム 1.5 M C：リン酸一ナトリウム 40 mM D：リン酸二ナトリウム 40 mM Buffer Advisor ソフトウェアにより事前に決定した割合で C と D を混合することにより、目的とする pH 範囲とイオン強度の緩衝液を	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、緩衝液強度 10 ～ 25 mM 塩化ナトリウム (NaCl) 0 ～ 500 mM、0 ～ 15 分 塩化ナトリウム (NaCl) 500 mM、15 ～ 20 分 DOE 実験 pH 5.0 ～ 7.0 0 ～ 200 mM、0 ～ 250 mM、および 0 ～ 300 mM の NaCl
調製。		温度：	室温
流量：	1.0 mL/min	検出器：	UV、220 nm
		サンプル：	IgG モノクローナル抗体
		サンプル濃度：	2 mg/mL (リン酸ナトリウム緩衝液 20 mM、pH 6.0)
		機器：	1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC



自動メソッド開発により、最適な電荷変異体分離を実現。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 における緩衝液強度の最適化。

小さな粒子と短いカラムによる分析の高速化 — 分離時間を 30 % 短縮

カラム： Bio WCX、ステンレス
5190-2445
4.6 x 250 mm、5 μ m

Bio WCX、ステンレス
5190-2443
4.6 x 50 mm、3 μ m

移動相： A：リン酸ナトリウム 20 mM、pH 6.5
B：A + 塩化ナトリウム 1.6 M

流量： 1.0 mL/min

注入量： 10 μ L

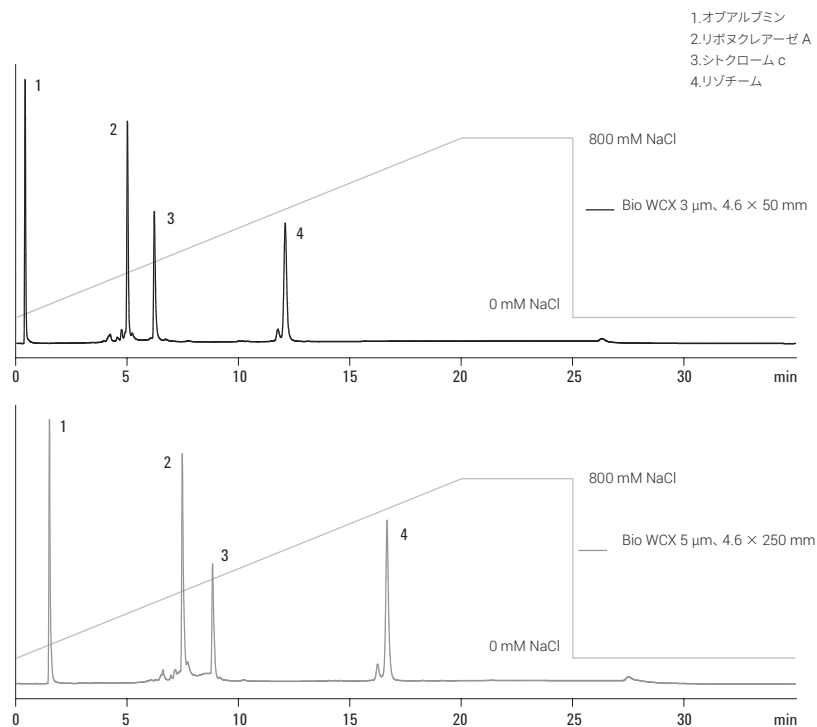
グラジエント： 0 ~ 50 % B

温度： 室温

検出器： UV、220 nm

サンプル濃度： 0.5 mg/mL

機器： 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC



Bio WCX 4.6 x 50 mm、3 μ m カラムと Bio WCX 4.6 x 250 mm、5 μ m 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

カラム： Bio WCX、ステンレス
 5190-2443
 4.6 x 50 mm、3 μ m
 Bio WCX、ステンレス
 5190-2441
 4.6 x 50 mm、1.7 μ m

移動相： A：リン酸ナトリウム 20 mM、pH 6.5
 B：A + 塩化ナトリウム 1.6 M

注入量： 10 μ L

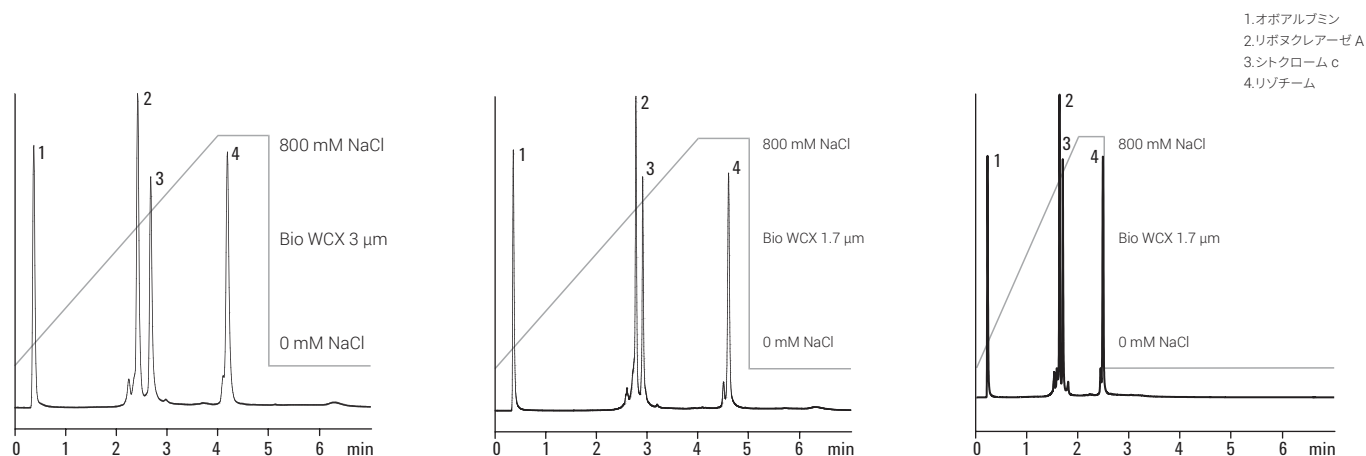
グラジエント： 0 ~ 50 % B

温度： 室温

検出器： UV、220 nm

サンプル濃度： 0.5 mg/mL

機器： 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC



左と中央： Bio WCX 3 μ m カラムと Bio WCX 1.7 μ m 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（Bio WCX カラムを使用）。

流量を上げることで分析時間が短縮されています。ピーク形状や分離能の低下は認められません。

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを用いたアニオン交換カラムによるタンパク質の分析

カラム: Bio WAX, PEEK
5190-2487
4.6 x 250 mm, 5 µm

緩衝液: A: 20 mM トリス, pH 7.6
B: 20 mM トリス, pH 7.6 + 2 M NaCl,
1 M KCl, 1 M CH₃COONa,
1 M [(CH₃)₄N]Cl

グラジエント 1 M: 5 分 – 100 % A
20 分 – 70 % B
25 分 – 100 % B

グラジエント 2 M: 5 分 – 100 % A
20 分 – 35 % B
25 分 – 50 % B
25.01 分 – 100 % B

ストップタイム: 30 分

ポストタイム: 20 分

温度: 25 °C

流量: 0.5 mL/min

注入量: 5 µL

測定波長: 280 nm

ピーク幅: 0.025 分
(0.5 秒のレスポンス時間)
(10 Hz)

詳細については、アプリケーションノート
5990-9614EN (www.agilent.com/chem/jp) を
参照してください。

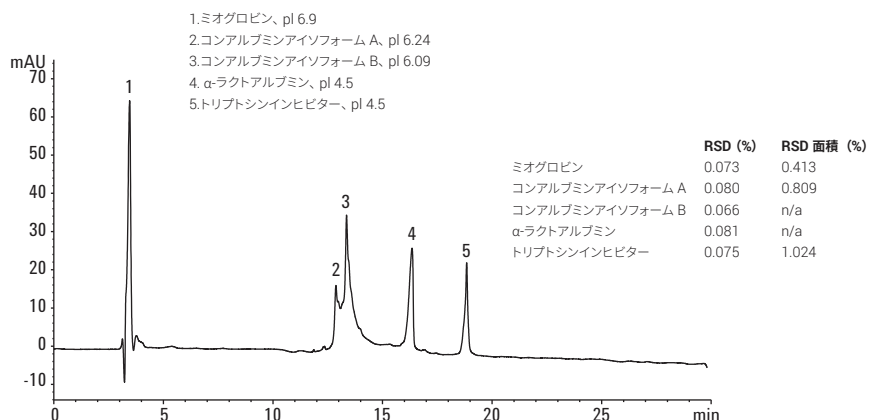


図 1. 2 M NaCl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

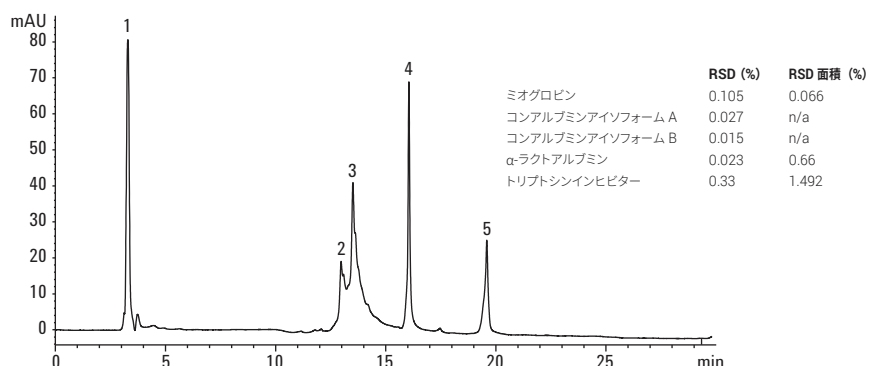


図 2. 1 M KCl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

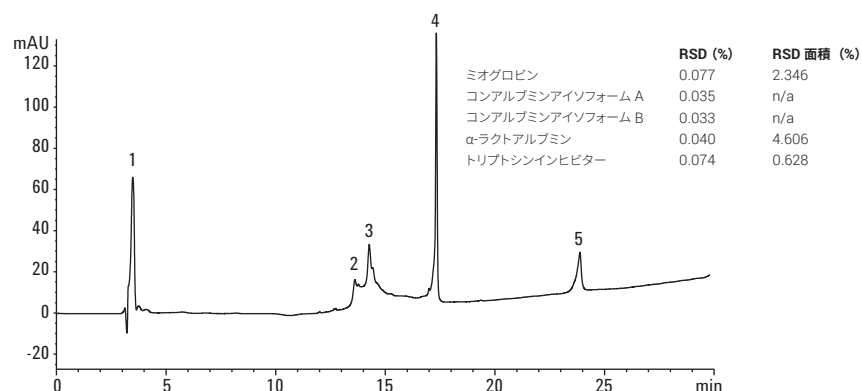


図 3. 1 M [(CH₃)₄N]Cl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

Bio IEX HPLC カラム、PEEK

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	Bio SCX 部品番号	Bio WCX 部品番号	Bio SAX 部品番号	Bio WAX 部品番号
4.6 x 250	10	275 bar、4000 psi	5190-2435	5190-2455	5190-2475	5190-2495
4.6 x 50	10	275 bar、4000 psi	5190-2436	5190-2456	5190-2476	5190-2496
4.6 x 250	5	400 bar、5800 psi	5190-2427	5190-2447	5190-2467	5190-2487
4.6 x 50	5	400 bar、5800 psi	5190-2428	5190-2448	5190-2468	5190-2488
2.1 x 250	10	275 bar、4000 psi	5190-2439	5190-2459	5190-2479	5190-2499
2.1 x 50	10	275 bar、4000 psi	5190-2440	5190-2460	5190-2480	5190-2500
2.1 x 250	5	400 bar、5800 psi	5190-2431	5190-2451	5190-2471	5190-2491
2.1 x 50	5	400 bar、5800 psi	5190-2432	5190-2442	5190-2462	5190-2492

ヒントとツール

緩衝液および移動相は、調製後にアジレントの溶媒フィルタでろ過し、粒子を除去することをおすすめします。

詳細情報：www.agilent.com/chem/jp

Bio IEX HPLC カラム、ステンレス

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	Bio SCX 部品番号	Bio WCX 部品番号	Bio SAX 部品番号	Bio WAX 部品番号
21.2 x 250	5	413 bar、6000 psi	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	413 bar、6000 psi	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6876
4.6 x 250	10	275 bar、4000 psi	5190-2433	5190-2453	5190-2473	5190-2493
4.6 x 250	5	413 bar、6000 psi	5190-2425	5190-2445	5190-2465	5190-2485
4.6 x 150	3	551 bar、8000 psi				5190-6875
4.6 x 50	3	551 bar、8000 psi	5190-2423	5190-2443	5190-2463	5190-2483
4.6 x 50	1.7	600 bar、8700 psi	5190-2421	5190-2441	5190-2461	5190-2481
4.0 x 10、ガード	10	275 bar、4000 psi	5190-2434	5190-2454	5190-2474	5190-2494
4.0 x 10、ガード	5	413 bar、6000 psi	5190-2426	5190-2446	5190-2466	5190-2486
4.0 x 10、ガード	3	551 bar、8000 psi	5190-2424	5190-2444	5190-2464	5190-2484
4.0 x 10、ガード	1.7	600 bar、8700 psi	5190-2422	5190-2442	5190-2462	5190-2482

ヒントとツール

詳細については次の資料をご覧ください。

「アジレントの弱陽イオン交換カラムを使用したタンパク質分離の最適化」(資料番号 **5990-9628JAJP**)

「Faster separations using Agilent weak cation-exchange columns (Agilent 弱カチオン交換カラムを用いた分離の高速化)」(資料番号 **5990-9931EN**)

「pH グラジエント溶出によるモノクローナル抗体電荷変異体の分離の向上」(資料番号 **5990-9629JAJP**)

「Optimizing protein separations with cation-exchange chromatography using Agilent Buffer Advisor (Agilent Buffer Advisor を用いたカチオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質分離の最適化)」(資料番号 **5991-0565EN**)

www.agilent.com/chem/jp

PL-SAX 強アニオン交換カラム

- 小さい粒子による優れたクロマトグラフィー性能
- 幅広い粒子サイズと2種類のポアサイズにより、分析から精製まで柔軟に対応
- 優れた安定性により長寿命を実現



PL-SAX は、変性条件でのタンパク質、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 分離に最適です。化学的安定性の高い全多孔質ポリマーに共有結合した強アニオン交換基により、広い動作 pH 範囲を実現します。アニオン交換容量が pH に左右されることもありません。合成オリゴヌクレオチドの場合は、温度、有機溶媒、高 pH の変性条件を使用した分離にも対応できます。PL-SAX を使用すれば、凝集体やヘアピン構造に関連する自己相補配列や G-rich 配列オリゴヌクレオチドのクロマトグラフィーを改良できます。5 μm カラムを使用すれば、n および n-1 配列を効率的に分離できます。幅広い粒子サイズとカラムサイズが用意されているため、分析にも精製にも使用できます。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を維持できるため、カラムを長期間使用できます。

カラムの仕様

結合相	内径	粒子サイズ (mm)	ポアサイズ (μm)	pH 安定性	使用温度上限
強アニオン交換	2.1、4.6、7.5、25、50、100	5、8、10、30	1000 Å および 4000 Å	1~14	80 °C

電荷変異体の分析

標準イオン交換 タンパク質分離

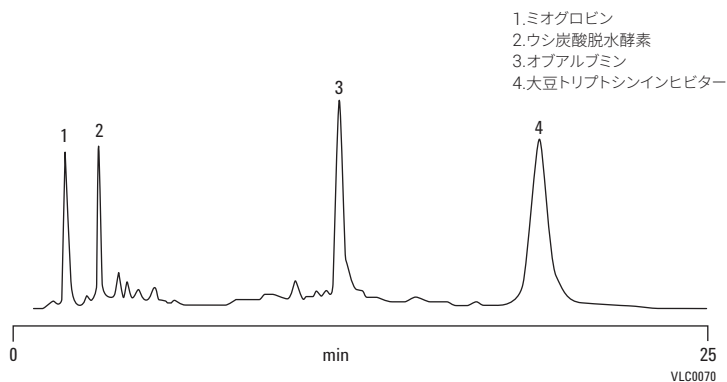
カラム: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1502
4.6 x 50 mm、5 µm

移動相: A: 10 mM tris HCl、pH 8
B: A + 350 mM 塩化ナトリウム、pH 8

グラジエント: 20 分で 0 ~ 100 % B

流量: 1.0 mL/min

検出器: UV、220 nm



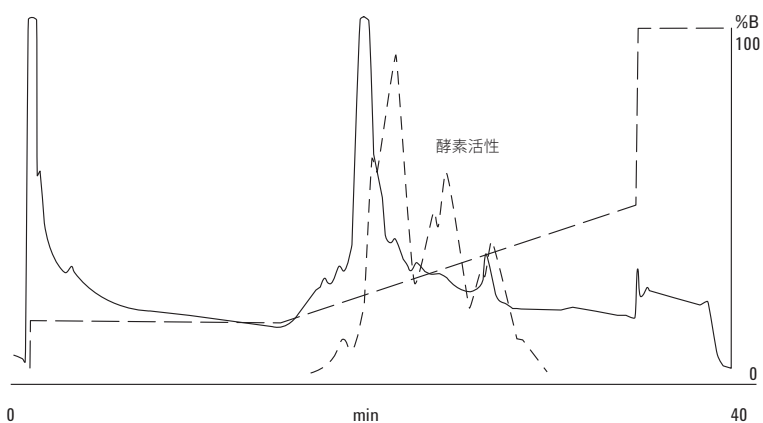
コリンキナーゼの分析

カラム: PL-SAX 4000 Å
PL1551-1803
4.6 x 50 mm、8 µm

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 塩化カリウム

流量: 3.0 mL/min

検出器: UV、280 nm



T-ポーターの分離、バドュー大学 (米国)

代表的な乳清タンパク質の分析

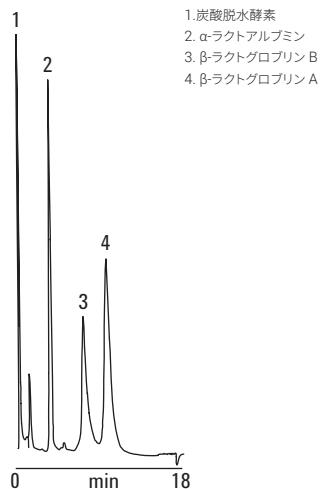
カラム: PL-SAX 1000 Å
PL1551-1802
4.6 x 50 mm, 8 µm

移動相: A: 20 mM トリス HCl, pH 7
B: A + 500 mM 酢酸ナトリウム, pH 7

流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 10 分で直線的に 0 ~ 50 % B

検出器: UV, 280 nm



信頼性の高い合成オリゴヌクレオチドの分離 - 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 1000 Å
PL1551-1802
4.6 x 50 mm, 8 µm

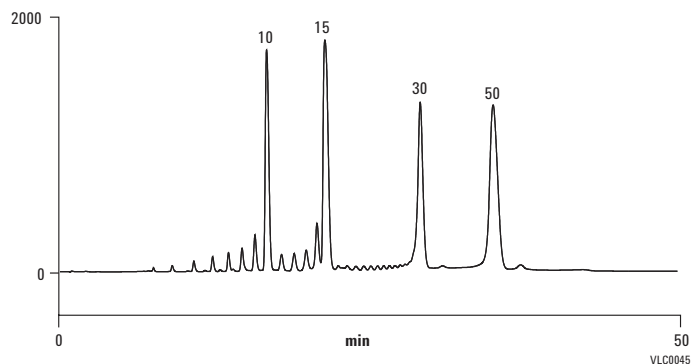
移動相: A: 7:93 v/v アセトニトリル: 100 mM TEAA, pH 8.5
B: 7:93 v/v アセトニトリル: 100 mM TEAA, 1 M 塩化アンモニウム、
pH 8.5

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: 1.0 mL/min

温度: 60 °C

検出器: UV, 220 nm



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
までで 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

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 x 300	10	207 bar, 3000 psi	PL1851-2102	PL1851-2103
50 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1751-3702	PL1751-3703
50 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1751-3102	PL1751-3103
25 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1251-3702	PL1251-3703
25 x 150	10	275 bar, 4000 psi	PL1251-3102	PL1251-3103
25 x 50	10	207 bar, 3000 psi	PL1251-1102	PL1251-3103
4.6 x 250	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-5702	PL1551-5703
4.6 x 150	30	207 bar, 3000 psi	PL1551-3702	PL1551-3703
4.6 x 250	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-5102	PL1551-5103
4.6 x 150	10	207 bar, 3000 psi	PL1551-3102	PL1551-3103
4.6 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-3802	PL1551-3803
4.6 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1551-1802	PL1551-1803
4.6 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1551-1502	PL1551-1503
2.1 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-3802	PL1951-3803
2.1 x 50	8	207 bar, 3000 psi	PL1951-1802	PL1951-1803
2.1 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1951-1502	PL1951-1503
1.0 x 50	5	207 bar, 3000 psi	PL1351-1502	PL1351-1503

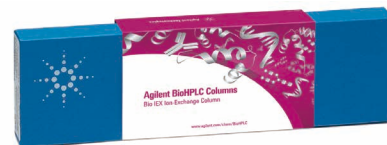
PL-SAX 強アニオン交換充填剤バルク

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 g	30	207 bar, 3000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar, 3000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103

PL-SCX 強カチオン交換カラム

- － 生体分子の効率的な分離に最適な設計
- － さまざまな溶質サイズに適したポアサイズ
- － 優れた安定性により長寿命を実現

PL-SCX は、マクロポーラス型のポリスチレン/ジビニルベンゼンポリマーに親水性の被膜を施し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。このプロセスは、小さいペプチドから大きいタンパク質まで幅広い生体分子の分析、分離、および精製に最適な密度で強カチオン交換基が結合されるようにコントロールされています。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。5 µm メディアでは高分離能での分離が可能です。30 µm メディアは中圧での液体クロマトグラフィーに適しています。



カラムの仕様

結合相	内径(mm)	粒子サイズ(µm)	ポアサイズ	pH 安定性	使用温度上限
強カチオン交換	2.1、4.6、7.5、25、50、100	5、8、10、30	1000 Å および 4000 Å	1～14	80 °C

標準的なタンパク質の分離

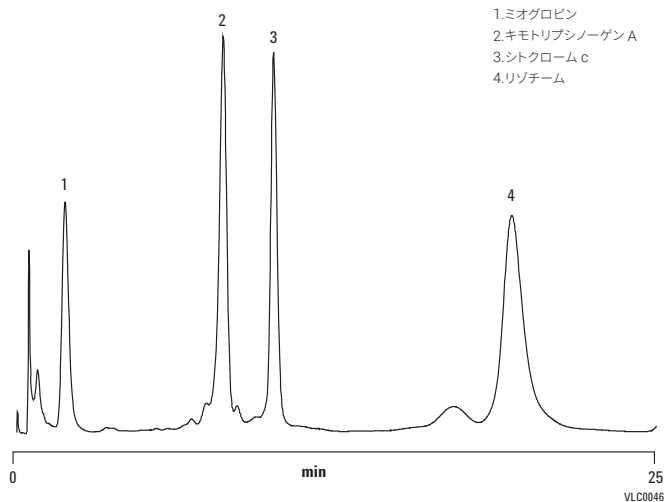
カラム： PL-SCX 1000 Å
PL1545-1502
4.6 x 50 mm、5 µm

移動相： A：20 mM リン酸二水素カリウム、pH 6.0
B：A + 1 M 塩化ナトリウム

グラジエント： 20 分で 0 ～ 100 % B

流量： 1.0 mL/min

検出器： UV、280 nm



PL-SCX 強カチオン交換カラム

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 x 300	10	207 bar、3000 psi	PL1845-2102	PL1845-2103
50 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1745-3703	PL1745-3703
50 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	207 bar、3000 psi	PL1245-1102	PL1245-1103
4.6 x 250	30	207 bar、3000 psi	PL1545-5703	PL1545-5703
4.6 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1545-3702	PL1545-3703
4.6 x 250	10	207 bar、3000 psi	PL1545-5102	PL1545-5103
4.6 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1545-3102	PL1545-3103
4.6 x 150	8	207 bar、3000 psi	PL1545-3802	PL1545-3803
4.6 x 50	8	207 bar、3000 psi	PL1545-1802	PL1545-1803
4.6 x 50	5	207 bar、3000 psi	PL1545-1502	PL1545-1503
2.1 x 150	8	207 bar、3000 psi	PL1945-3802	PL1945-3803
2.1 x 50	8	207 bar、3000 psi	PL1945-1802	PL1945-1803
2.1 x 50	5	207 bar、3000 psi	PL1945-1502	PL1945-1503
1.0 x 50	5	207 bar、3000 psi	PL1345-1502	PL1345-1503

PL-SCX 強カチオン交換充填剤バルク

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
100 g	30	PL1445-4702	PL1445-4703
100 g	10	PL1445-4102	PL1445-4102

ヒントとツール

PL-SAX および PL-SCX カラムと充填剤バルクは、前処理からプロセスまで使用できます。

190 ~ 195 ページを参照してください。

バイオモノリスイオン交換 HPLC カラム

- マクロ生体分子分離のために設計されたポリマーベースのモノリス HPLC カラム
- 流量に左右されない分離。拡散、ポア、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
- 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、カラム容量 100 µL）により、拡散に起因する物質移動を排除
- 超高速分離によりメソッド開発時間を短縮してコストを削減。メソッドパラメータの固定化により時間と緩衝液を大幅に節約

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。この製品ファミリーには、強カチオン交換相、強および弱アニオン交換相、およびプロテイン A 相が用意されています。バイオモノリス HPLC カラムは InfinityLab LC シリーズと互換性があります。



バイオモノリスイオン交換 HPLC カラム

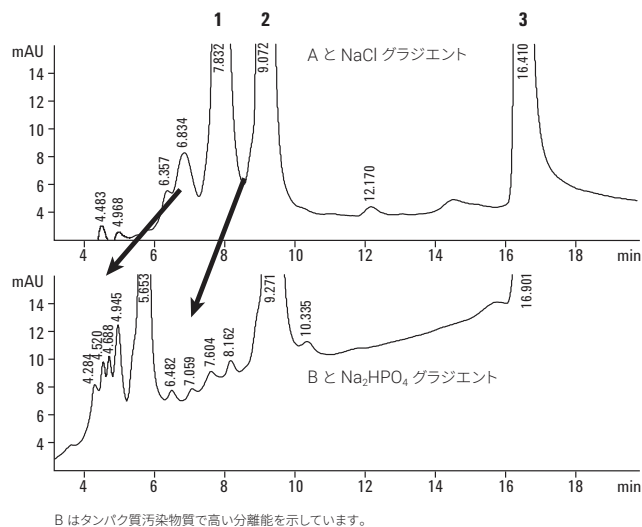
バイオモノリス HPLC カラム選択ガイド

カラム	説明	主要アプリケーション	部品番号
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。	<ul style="list-style-type: none">- 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	5069-3635
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。	<ul style="list-style-type: none">- 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	5069-3636
バイオモノリス SO ₃	スルホン結合相（強カチオン交換）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。	<ul style="list-style-type: none">- 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	5069-3637

カラムの仕様	
仕様	5.2 mm x 4.95 mm
カラム容量	100 µL
最大圧力:	150 bar (15 MPa, 2,200 psi)
最低/最高温度	使用温度: 2~40 °C
	保管: 2~8 °C
推奨 pH	使用範囲: 2~13
	定置洗浄: 1~14
使用材質	ハードウェア: ステンレス製
	充填剤: ポリ(グリシジルメタクリレート-co-エチレンジメタクリレート)多孔質モノリス
カラー識別リング	バイオモノリス QA: 青
	バイオモノリス DEAE: 緑
	バイオモノリス SO ₃ : 赤
保管期限/使用期限	SO ₃ , QA, DEAE: 24~36 か月

タンパク質標準の分離のベースライン拡張

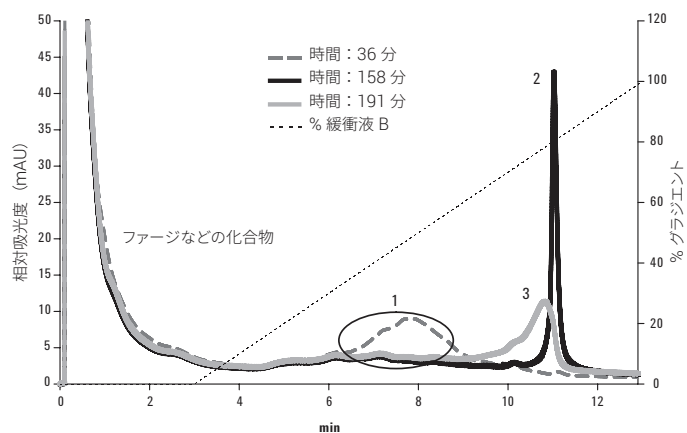
カラム：	バイオモノリス CM15、5.5 x 15 mm
移動相：	A：10 mM リン酸水素二ナトリウム、pH 6.0 B：A + 500 mM 塩化ナトリウムまたは 500 mM リン酸水素二ナトリウム、pH 6.0 のみ
流量：	2 mL/min
グラジエント：	移動相 A で 0.5 分間保持した後、直線グラジエントで 15 分で 45 % B にし（経過時間 15.5 分）、15.6 分で 60 % B にして 20 分まで 継続。カラムを 100 % B で 15 分洗浄してから、次の分析用に再平衡。 pH グラジエント：A：5 mM リン酸水素二ナトリウム、緩衝液、pH 5.5 および B：40 mM リン酸 水素二ナトリウム（緩衝液なし、pH 8.9）。15 分間 1 mL/min で 2 % B/min、その後 90 % B で 5 分間カラムを洗浄。
検出器：	UV、220 nm
サンプル：	移動相 A で各 1 mg/mL 1. ウシ膵臓由来 RNase (pI 9.6) 2. ウシ心臓由来シトクローム (pI 10.37-10.8) 3. 鶏卵由来リゾチーム (pI 11.35) (0.5 mg)
機器：	1200 Infinity II シリーズとダイオードアレイ検出器



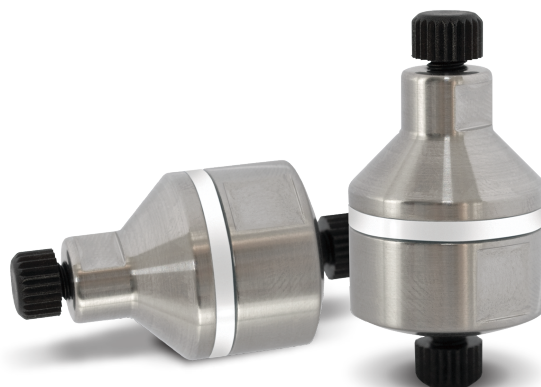
B はタンパク質汚染物質で高い分離能を示しています。

発酵中のファージ生成のモニタリング

カラム： バイオモリス DEAE
 5069-3636
 5.2 x 4.95 mm
移動相： A : 125 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0
 B : 125 mM リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 M 塩化ナトリウム、
 pH 7.0
流量： 1 mL/min
グラジエント： 100 % 緩衝液 A (2.5 分)
 0 ~ 100 % 緩衝液 B (10 分)
 100 % 緩衝液 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



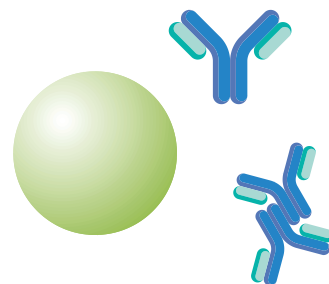
ファージ増殖が進むにつれて、宿主細胞が溶解されるため、ゲノム DNA (gDNA) 濃度は高くなります。発酵の最終段階で、gDNA は断片に分解しはじめます。精製培地ではこれらの gDNA 断片を簡単に除去できないため、gDNA の分解前に発酵サイクルを停止させることが重要です。上記は、36 分、158 分、191 分にバイオリアクターから採取した 3 種類のサンプルのクロマトグラムです。ピーク 1 はファージ、培地、宿主細胞、ピーク 2 はインタクト gDNA、ピーク 3 は断片化された gDNA を表します。



凝集およびフラグメントの分析

生体分子の凝集体、フラグメント、化学的ライゲーシオン/修飾を正確に測定

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）では、水溶性溶離液を使用して、タンパク質やオリゴヌクレオチドなどの複雑な生体高分子をサイズの違いによって分離します。この分析法は、特にタンパク質生物製剤中に存在する凝集体の定量に不可欠です。モノクローナル抗体などのバイオ医薬品の製造は複雑なプロセスであり、培養、単離、精製、および製剤の過程でタンパク質の凝集体が問題になることがあります。二量体やそれ以上の凝集体が存在すると、最終製品の効能や安全性に悪影響がおよぶ可能性があるからです。そのため、プロセス開発段階で、凝集体の含有量を定量し、製品の重要な品質特性（CQA）を確立する必要があります。また、最終製品の特性解析において、凝集が最小化され、安全なレベルに抑えられていることを確認しなければなりません。



凝集体の調査への SEC の適用

バイオ医薬品中に存在する凝集体のサイズ、種類、および含有量は、効能や製剤に悪影響をおよぼし、さらには免疫原性反応を誘発する可能性もあります。凝集体は、ジスルフィド結合や非共有相互作用など、さまざまなメカニズムによって形成されます。

二量体などのタンパク質凝集体のサイズは、単量体タンパク質と大きく異なることから、SEC によってさまざまな形態を分離することが可能です。実際、タンパク質凝集体の定量には、SEC と UV または光散乱検出器が標準的な手法として使用されています。

定量および分子量測定への SEC の適用

タンパク質や分子量の異なるその他の分子に SEC を使用することで、単量体、二量体、凝集体、およびフラグメントを検出し、定量することができます。SEC では、オリゴヌクレオチド混合物の分離も可能です。

また、デンプンやその他の多糖など、鎖長の異なる生体高分子を SEC で分離すれば、分子量分布や分枝に関するデータが得られます（適切な検出器を使用）。

アジレントは 30 年以上にわたり、SEC 用のカラムおよび機器分野をリードしてきました。優れた分解能とスピードを実現するアジレントの SEC 用カラムは、バイオ医薬品の迅速かつ効率的な開発をサポートします。このセクションでは、タンパク質生体高分子分析用の幅広い SEC カラムファミリーを紹介します。

- AdvanceBio SEC は、SEC-UV または SEC-LS 測定用のカラムで、2 種類の粒子サイズが用意されています。2.7 μm 粒子には、ポアサイズが 130 Å および 300 Å のものがあり、多様なサンプルサイズに対応できます。1.9 μm 粒子は、ポアサイズが 200 Å で、最高レベルの分解能が得られます。どちらの粒子も親水性ポリマーで被膜されているため、二次的反応が最小限に抑えられます。また、ADC などの分析困難なサンプルやルーチン分析にも十分に対応できる堅牢性を備えています。
- Bio SEC-3 および Bio SEC-5 カラムは、多様なポアサイズが用意されています。UV または MS 検出器を使用したタンパク質の分析、特にバイオ医薬品中の二量体や凝集体の測定に最適です。3 μm の Bio SEC-3 カラムでは、業界標準である 5 μm の Bio SEC-5 カラムより高い分解能が得られます。
- ProSEC 300S カラムは、高塩濃度条件下での球状タンパク質の分析に適しています。
- ZORBAX GF-250 および GF-450 カラムは、プロトコルで USP L35 カラムの使用が要求される場合に必要な従来製品です。このカラムの代わりに、より高性能な Bio SEC カラムを使用することをおすすめします。
- PL Aquagel-OH カラムでは、PEG やオリゴ、多糖、デンプン、ゴムなど、幅広い分子量の生体高分子を分析できます。水性および極性 GPC/SEC カラムの製品ガイド（資料番号 5990-7995JAJP）をご覧ください。

凝集およびフラグメントの分析

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

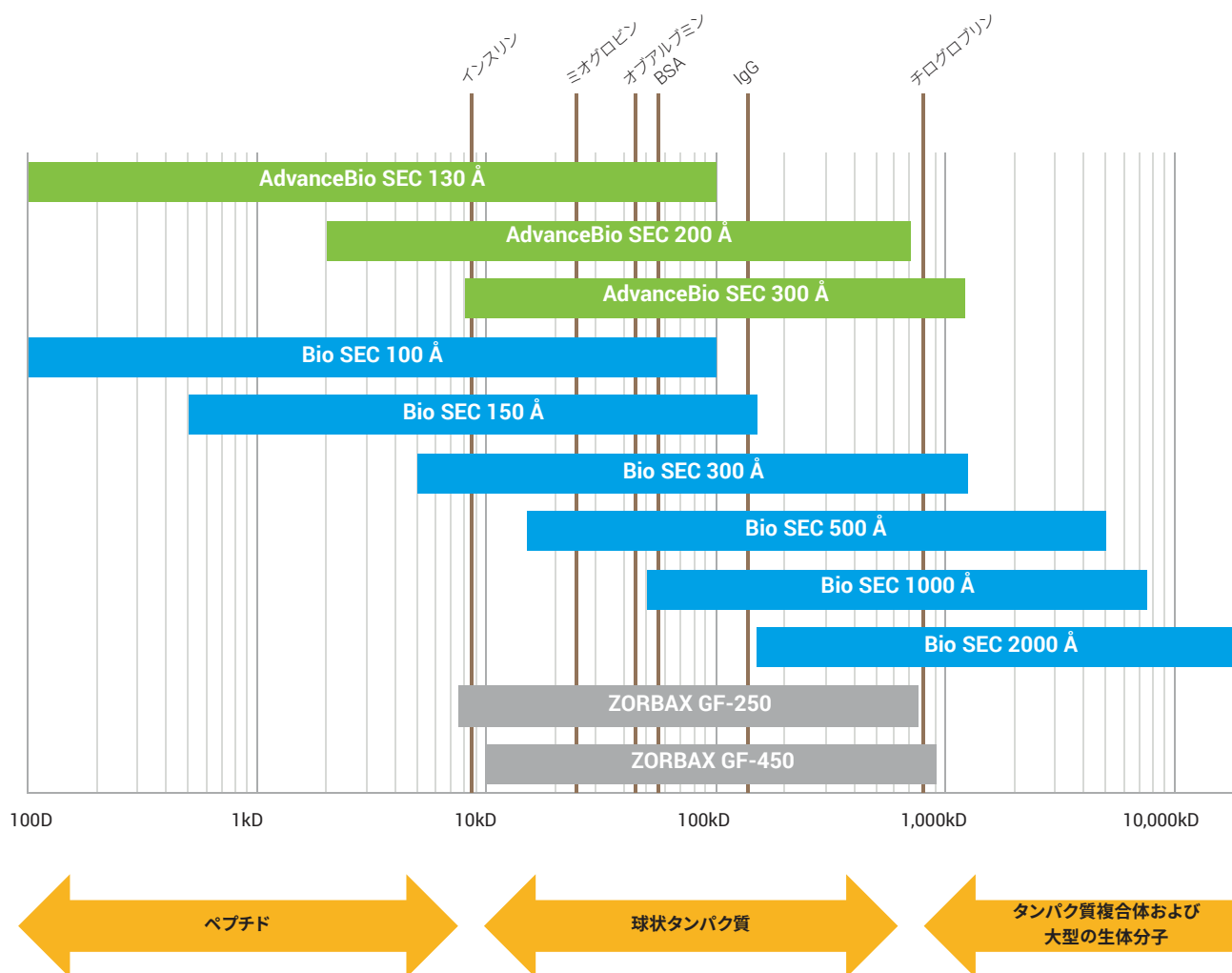
アプリケーション	アジレントのカラム	注意事項	USP
ペプチド、タンパク質、凝集体の分析	AdvanceBio SEC	堅牢な親水性ポリマー被膜が二次的反応を最小限に抑えます。ポアサイズ 130 Å または 300 Å の 2.7 µm 粒子、最高レベルの分解能を実現するポアサイズ 200 Å の 1.9 µm 粒子からお選びいただけます。	L59
	Bio SEC-3	ポアサイズ 100 Å、150 Å、および 300 Å の 3 µm 粒子が分解能と分離スピードを高めます。	L59
いくつかの分子量を持つ成分が含まれる生体高分子およびサンプル	Bio SEC-5	多様なポアサイズ (100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å、2000 Å) により、幅広い成分に対応できます。	L59
球状タンパク質、抗体	ProSEC 300S	高塩濃度条件下でのタンパク質分析のためのシングルカラムオプション。	L33
タンパク質、球状タンパク質	ZORBAX GF-250/450	プロトコルで USP L35 カラムの使用が要求される場合に必要な従来製品です。	L35

ヒントとツール

緩衝液および移動相は、調製後にアジレントの溶媒フィルタでろ過し、粒子を除去することをおすすめします。

アプリケーションに適した SEC カラムの選択チャート

アジレントでは、幅広い SEC カラムを取り揃えています。分析する成分やメソッドパラメータに応じて、分解能を最大限に高める最適なカラムをお選びください。このチャートには、一般的な分子の種類について最善の結果が得られるポアサイズの範囲がまとめられています。メソッド開発の際は、最初に AdvanceBio SEC カラムを使用することをおすすめします。



AdvanceBio SEC

AdvanceBio SEC カラムを使用すると、mAb の凝集とタンパク質の分析において、精密かつ正確な定量が可能となります。アジレントが設計、開発したこの革新的なサイズ排除クロマトグラフィーカラムにより、メソッドの堅牢性と信頼性が高まります。サンプルの再分析が不要になるため、ラボの生産性が向上します。カラム間、バッチ間およびラボ間で一貫した結果を得られるため、異なる部門または事業所においても確実にメソッドを移管できます。

- 分析スピードが向上し、納期の遵守が可能
- 分離能が向上し、さらに正確な定量が可能
- 感度が向上し、低レベルでも凝集の定量が可能
- 再現性が向上し、再分析のリスクが低減
- AdvanceBio SEC カラム用に設計された標準試料により、最適なキャリブレーションと性能評価が可能

カラムの仕様					
ボアサイズ	粒子径	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力	流量
130 Å	2.7 µm	100 ~ 120,000	2 ~ 8.5	400 bar (推奨使用圧力は 200 bar 未満)	0.1 ~ 2.0 mL/min (内径 7.8 mm) 0.1 ~ 0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	2.7 µm	5,000 ~ 1,250,000	2 ~ 8.5	400 bar (推奨使用圧力は 200 bar 未満)	0.1 ~ 2.0 mL/min (内径 7.8 mm) 0.1 ~ 0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
200 Å	1.9 µm	2,000 ~ 700,000	2 ~ 8	620 bar	0.1~0.7 mL/min (4.6 x 150 mm) 0.1~0.5 mL/min (4.6 x 300 mm)



AdvanceBio SEC、2.7 µm

説明	130 Å	300 Å
分析カラム		
4.6 x 300 mm, 2.7 µm	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 x 150 mm, 2.7 µm	PL1580-3350	PL1580-3301
7.8 x 300 mm, 2.7 µm	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 x 150 mm, 2.7 µm	PL1180-3350	PL1180-3350
分析用ガードカラム		
4.6 x 50 mm, 2.7 µm	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 x 50 mm, 2.7 µm	PL1180-1350	PL1180-1301

AdvanceBio SEC、1.9 µm

説明	200 Å
分析カラム	
4.6 x 300 mm, 1.9 µm	PL1580-5201
4.6 x 150 mm, 1.9 µm	PL1580-3201
ガードカラム	
4.6 x 30 mm, 1.9 µm	PL1580-1201

**CrossLab リアルストーリー****効率的な管理により生産性を向上**

CrossLab チームが、メーカーの異なる多様な機器で構成される大規模な医薬品ラボの運営を効率化しました。

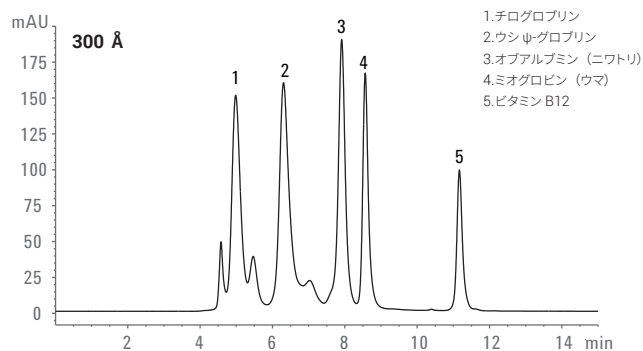
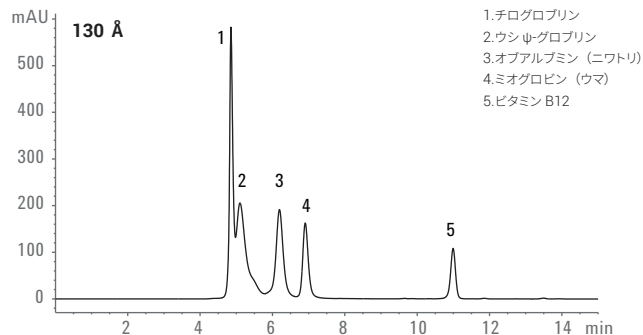
www.agilent.com/chem/story92

SEC によるタンパク質分子量標準品の分離

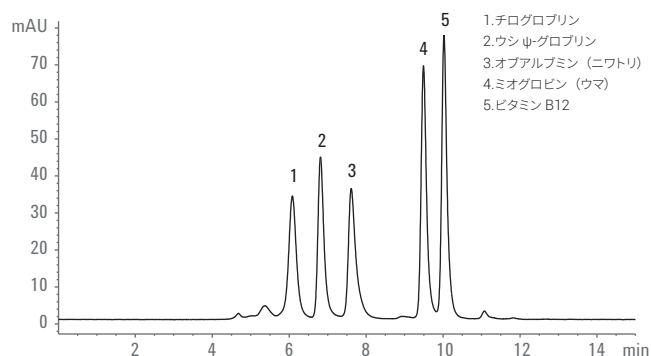
カラム: **AdvanceBio SEC**
7.8 x 300 mm

サンプル: BioRad ゲルろ過標準混合物 #1511901

移動相: A: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0



AdvanceBio SEC 300 Å および 130 Å による BioRad ゲルろ過標準混合物の分離結果。300 Å カラムを使用することで、分解能が高まっています。



AdvanceBio SEC 130 Å によるタンパク質とペプチドの混合物の分離結果。低分子量のペプチドとタンパク質が明確に分離されています。

AdvanceBio SEC の推奨開始条件

カラム: AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm
7.8 x 300 mm
(p/n PL1180-5301)

流量: 1 mL/min

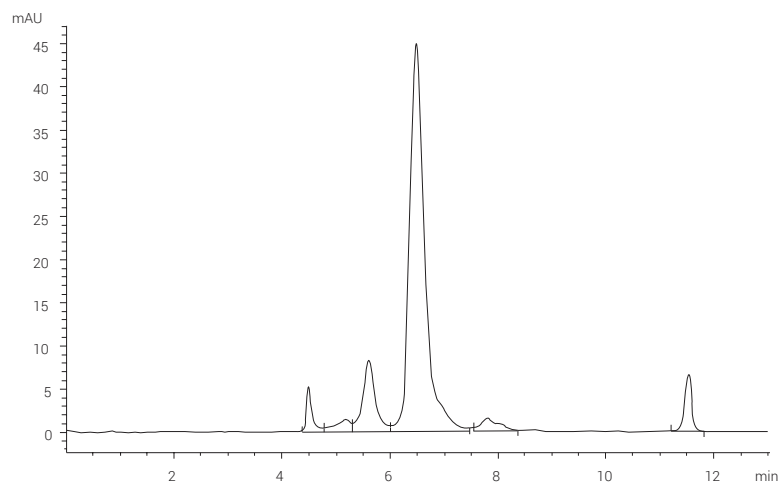
移動相: 150 mM リン酸緩衝液, pH 7.0

波長: 220 nm

温度: 室温

注入量: 5 µL

サンプル: IgG



IgG サンプルの高分解能分離。単量体、凝集体、および分解生成物が良好に分離されています。

AdvanceBio SEC 2.7 µm の操作パラメータ

使用可能な移動相	150 mM リン酸緩衝液, pH 7.0 (推奨開始条件) 高または低塩濃度のさまざまな水性緩衝液を使用可能 水とアセトニトリルの混合液を使用可能 (緩衝液成分の溶解性とシステムの圧力を確認すること)
pH 安定性	2 ~ 8.5
使用温度	20 ~ 30 °C (推奨) 80 °C (最高)
推奨使用圧力	200 bar (2,900 psi) 未満 (シングルカラム)
最大圧力:	400 bar (5,800 psi)
使用流量	内径 7.8 mm カラムの場合は 0.1 ~ 2.0 mL/min (推奨) 内径 4.6 mm カラムの場合は 0.1 ~ 0.7 mL/min (推奨) カラム 2 本を連結して使用する場合は、最大圧力が 400 bar (5,800 psi) を超えないように、必要に応じて流量を下げる

注: 操作パラメータの限度値で使用すると、カラム寿命が短くなる可能性があります。

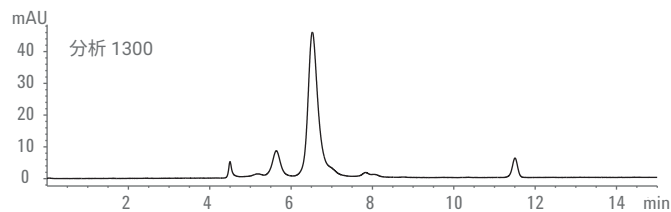
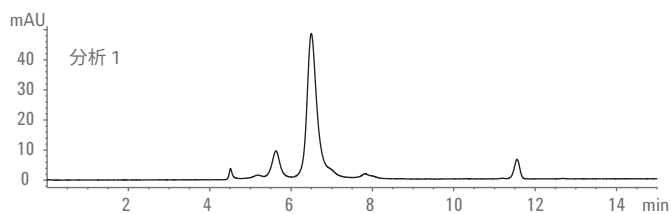
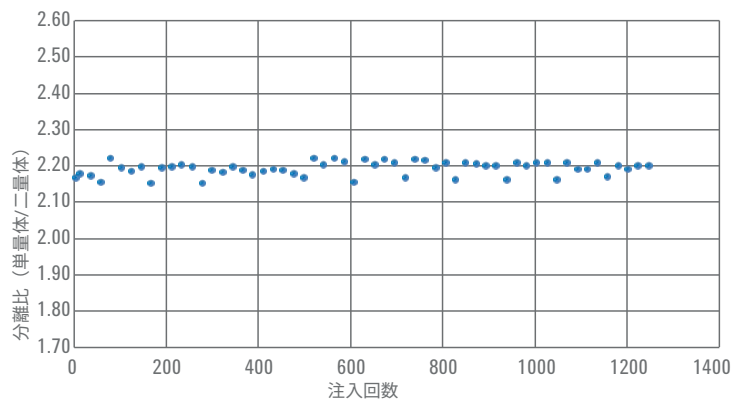
凝集およびフラグメントの分析

カラム: **AdvanceBio SEC**
300 Å, 7.8 x 300 mm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

サンプル: IgG

プロットは 1300 回の注入シーケンスにわたる IgG 単量体と二量体との間の分離能を示しています。



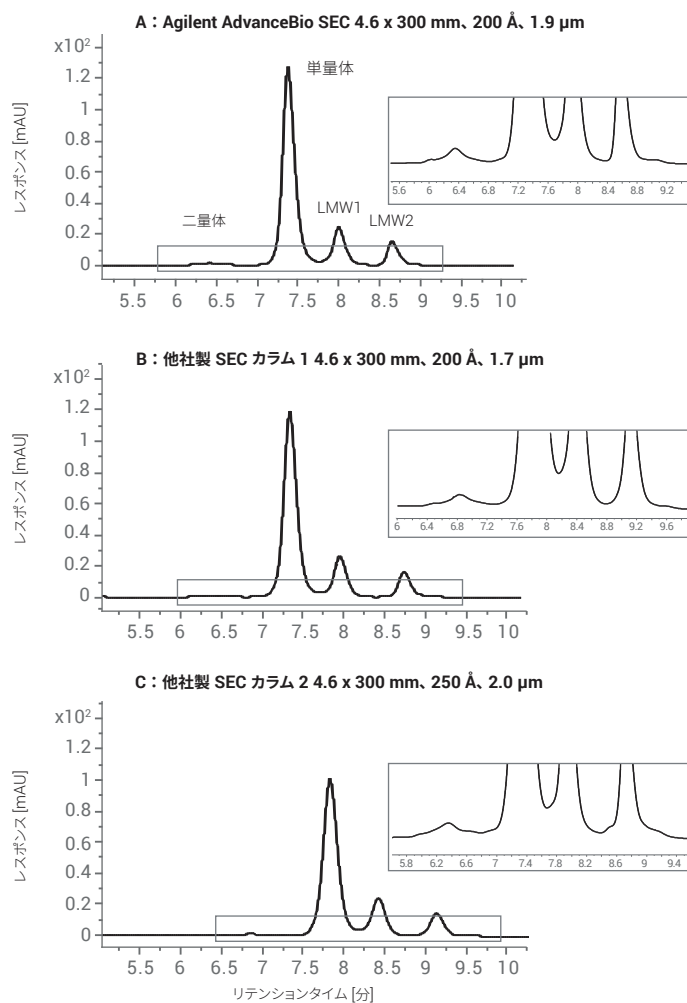
IgG サンプルのプロファイルは、1300 回の注入後も変わりませんでした。IgG の単量体と二量体の分離係数と定量についてもカラム寿命を通して動作範囲に収まっていました。

AdvanceBio SEC, 1.9 μm

機器： 1260 Infinity II パイオイナート LC システム
 ソフトウェア： Agilent OpenLab CDS
 流量： 0.35 mL/min
 移動相： 50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0
 温度： 25 °C
 注入量： 1 μL
 検出： UV、220 nm

アジレント独自の親水性結合相で修飾された 1.9 μm シリカ粒子は、分解能と分離効率に優れています。さらに、この粒子は mAb、ADC、その他のタンパク質との二次的相互作用を最小限に抑えます。

AdvanceBio SEC カラムは、他社製カラムよりも高い分解能と分離効率を示しています。



LMW1 および LMW2 フラグメントと混合した SigmaMAb のサイズ排除クロマトグラム

	ピーク幅 50 %			分離能		背圧 (bar)
	単量体	LMW1	LMW2	二量体/単量体	単量体/LMW1	
Agilent Advance Bio SEC 1.9 μm	0.159	0.154	0.148	2.79	2.28	340
他社製 SEC カラム 1	0.172	0.166	0.160	2.46	2.09	354
他社製 SEC カラム 2	0.194	0.182	0.169	2.49	1.83	260

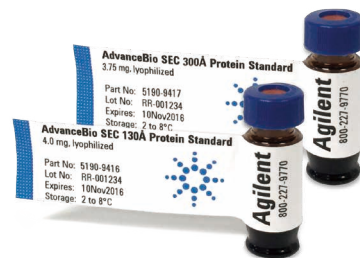
AdvanceBio SEC 標準試料

AdvanceBio SEC 130 Å 用タンパク質標準

厳選された 5 種類のタンパク質・ペプチド（オブアルブミン、ミオグロビン、アプロチニン、ニューロテンシン、アンギオテンシン II）からなるキャリブラントです。Agilent AdvanceBio 130 Å サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。

AdvanceBio SEC 300 Å 用タンパク質標準

厳選された 5 種類のタンパク質・ペプチド（チログロブリン、g-グロブリン、オブアルブミン、ミオグロビン、アンギオテンシン II）からなるキャリブラントです。Agilent AdvanceBio 300 Å サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。



AdvanceBio SEC 用タンパク質標準、
p/n 5190-9416 および p/n 5190-9417

AdvanceBio SEC 標準試料

説明	サイズ	部品番号
130 Å	1.5 mL バイアル	5190-9416
300 Å	1.5 mL バイアル	5190-9417

Bio SEC-3

ペプチドおよびタンパク質の分解能と分離スピードを向上

Bio SEC-3 カラムは、粒径の小さい高効率の粒子を採用し、他の SEC カラムよりも優れた分離スピードと分解能を実現します。

- 粒径の大きい SEC カラムよりも高速に分離
- 高い分解能、よりシャープなピーク、優れたタンパク質回収率
- 独自の親水性基により卓越した保持容量と回収率を実現
- 幅広い水性緩衝液を使用可能なため、柔軟なメソッド開発が可能
- 高および低塩濃度条件下で優れた安定性を発揮
- 狭分散性粒子と独自の親水性層により二次的応答を最小限に抑え、優れた信頼性と一貫性を実現
- 光散乱検出器などのマルチ検出器に対応できる堅牢な粒子
- MS に対応

Bio SEC-3 カラムは、より一貫性の高い SEC 分離を実現します。このカラムには、独自の親水性層で被膜された狭分散性の 3 μm 球状シリカ粒子が充填されています。回収率が高まり、二次的応答が最小限に抑えられるため、一貫性の高い分離結果が得られます。この薄いポリマー層は、厳しく管理された条件下で、高純度で機械的に安定したシリカ粒子に化学的に結合されています。そのため、効率の高い安定したサイズ排除充填剤となっています。



ヒントとツール

不活性化/シラン処理済みバイアルは、金属、生体物質、タンパク質との相互作用が起こらず、サンプルの pH を変化させることもありません。生体物質や光に敏感な化合物には、標準のポリプロピレン製バイアルを使用しないでください。

凝集およびフラグメントの分析



カラムの仕様

ポアサイズ	粒子径	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力	流量
100 Å	3 µm	100-100,000	2 ~ 8.5	137 bar、2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
150 Å	3 µm	500-150,000	2 ~ 8.5	137 bar、2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	3 µm	5,000 ~ 1,250,000	2 ~ 8.5	137 bar、2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)

検量線 — Bio SEC-3

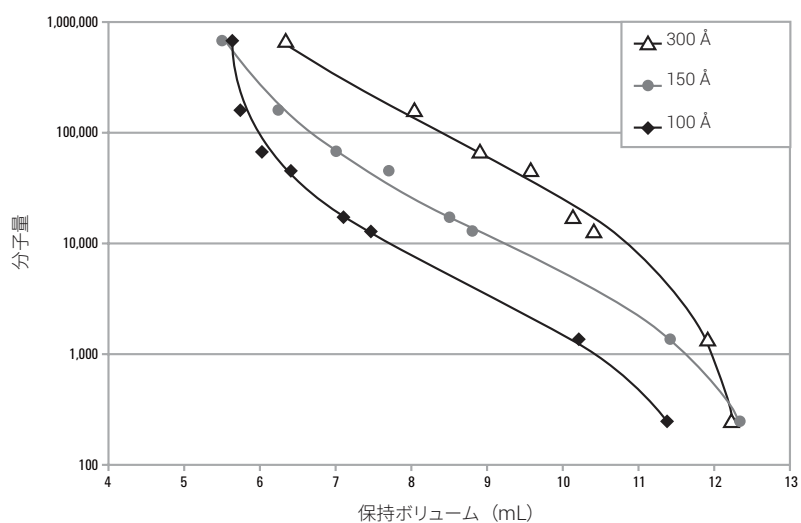
カラム: Bio SEC-3
7.8 x 300 mm, 3 μ m

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0

流量: 1.0 mL/min

検出器: UV

タンパク質	分子量	ポアサイズ		
		300 Å	150 Å	100 Å
チログロブリン	670,000	6.34	5.50	5.63
γ -グロブリン	150,000	8.03	6.24	5.74
BSA	67,000	8.90	7.00	6.03
オプアルブミン	45,000	9.57	7.70	6.41
ミオグロビン	17,000	10.12	8.50	7.10
リボヌクレアーゼ A	12,700	10.40	8.80	7.46
ビタミン B12	1,350	11.90	11.40	10.20



ポアサイズを選択

同じ充填剤でも、どのポアサイズを選択するかによって SEC の分解能は変わってきます。SEC では、溶液中の分子サイズの違いによって分離が行われるため、サンプルが粒子の多孔質構造に浸透できなければなりません。ポアサイズが小さすぎると、サンプルはポアから排除され、カラムのボイドボリュームで溶出します。一方、ポアサイズが大きすぎる場合は、すべての成分が粒子に完全に浸透し、ほとんど分離されません。

ポアサイズを選択：タンパク質

カラム A : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4.6 x 300 mm, 3 μm

カラム B : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2508
4.6 x 300 mm, 3 μm

カラム C : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2513
4.6 x 300 mm, 3 μm

移動相: 100 mM リン酸ナトリウム
+ 150 mM 塩化ナトリウム、pH 6.8

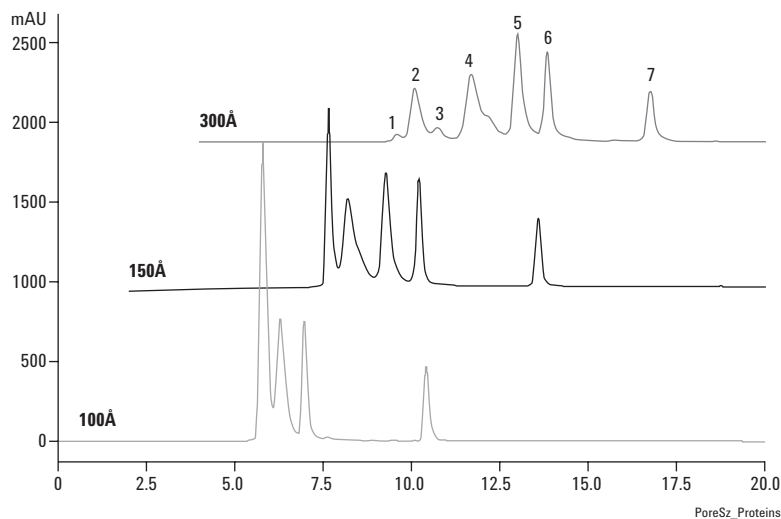
流量: 0.35 mL/min

グラジエント: 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
1 分間 10 % B で再平衡

検出器: UV, 220 nm

サンプル: Bio-Rad ゲルろ過標準混合物

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1. サイログロブリンの凝集体 | 5. オブアルブミン |
| 2. チログロブリン | 6. ミオグロビン |
| 3. IgA | 7. ビタミン B12 |
| 4. γ-グロブリン | |



ポアサイズを選択：マウス IgG

カラム A : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2503
4.6 x 300 mm, 3 μm

カラム B : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2508
4.6 x 300 mm, 3 μm

カラム C : Bio SEC-3, 100 Å
5190-2513
4.6 x 300 mm, 3 μm

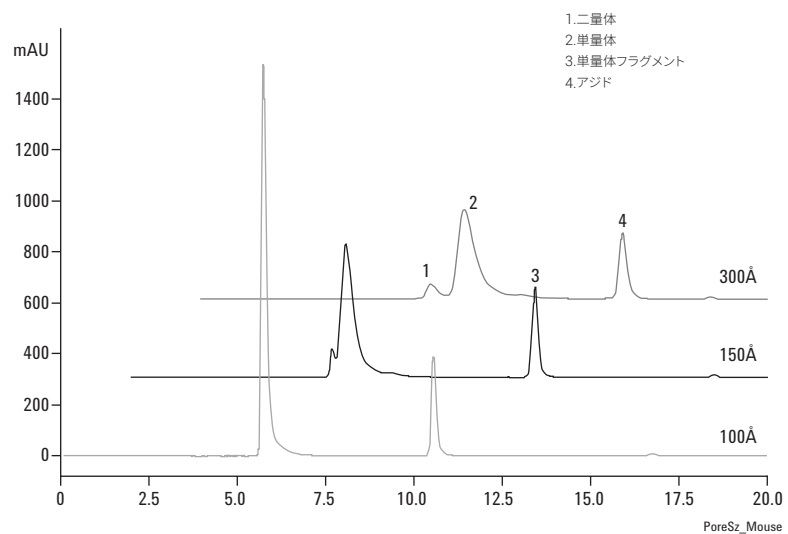
移動相 : 100 mM リン酸ナトリウム
+ 150 mM 塩化ナトリウム、pH 6.8

流量 : 0.35 mL/min

グラジエント : 4 分で 10 ~ 58 % B、1 分間 95 % B で洗浄、
1 分間 10 % B で再平衡

検出器 : UV, 220 nm

サンプル : マウス IgG



Bio SEC-3

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio SEC-3 100 Å USP L59	Bio SEC-3 150 Å USP L59	Bio SEC-3 300 Å USP L59
21.2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
21.2 x 50、ガード	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856
7.8 x 300	3	5190-2501	5190-2506	5190-2511
7.8 x 150	3	5190-2502	5190-2507	5190-2512
7.8 x 50、ガード	3	5190-2505	5190-2510	5190-2515
4.6 x 300	3	5190-2503	5190-2508	5190-2513
4.6 x 150	3	5190-2504	5190-2509	5190-2514
4.6 x 50、ガード	3	5190-6846	5190-6847	5190-6848

ヒントとツール

1260 Infinity マルチ検出器 Bio-SEC ソリューションと BioSEC-3 カラムによる分子量測定と凝集体分析の詳細については、次の技術資料をご覧ください。

Detailed Aggregation Characterization of Monoclonal Antibodies Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection (資料番号 5991-3954EN) および Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection (資料番号 **5991-3955EN**)

www.agilent.com/chem/jp

Bio SEC-5

- 大型の分子に対する優れた分解能
- 独自の中性親水性層により高い安定性と効率を実現
- ポア容積を高めた特殊設計の充填剤によりピークキャパシティと分解能を向上
- 卓越した再現性とカラム寿命を実現する優れた堅牢性
- 高 pH、高塩濃度、低塩濃度といった条件下でも優れた安定性
- 幅広い水性緩衝液を使用可能なため、柔軟なメソッド開発が可能
- 2000 Å までの幅広いポアサイズにより、ワクチンや高分子量の生体分子を含む幅広いアプリケーションに使用可能
- MS に対応



複数の分子量を持つ大型の生体分子やサンプルの分離には、Bio SEC-5 カラムが最適です。このカラムには、分離効率と安定性に優れた、独自の中性親水性層で被膜された 5 μm シリカ粒子が充填されています。6 種類のポアサイズが用意されているため、幅広い分子量範囲にわたって最適な分解能が得られます。

カラムの仕様

ポアサイズ	粒子径	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力	流量
100 Å	5 μm	100-100,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
150 Å	5 μm	500-150,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
300 Å	5 μm	5,000 ~ 1,250,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
500 Å	5 μm	15,000-5,000,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
1000 Å	5 μm	50,000-7,500,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
2000 Å	5 μm	> 10,000,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2~1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm)

Bio SEC-3 と Bio SEC-5 の比較

モノクローナル抗体の分析

カラム: Bio SEC-3、300 Å
5190-2511
7.8 x 300 mm、3 μm

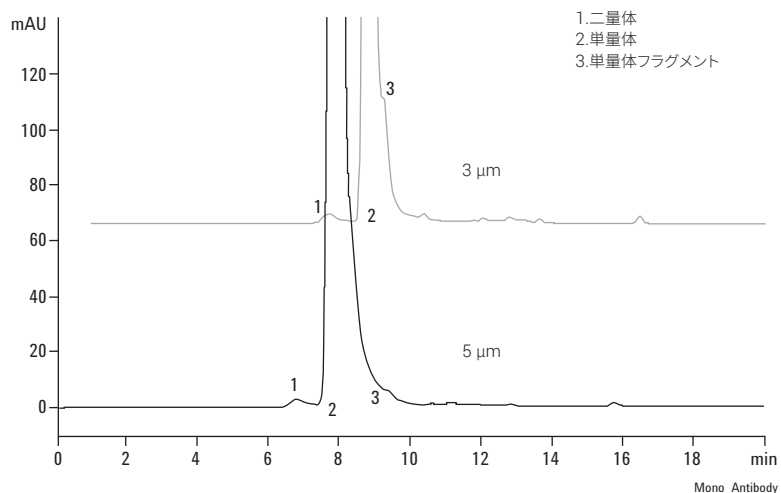
カラム: Bio SEC-5、300 Å
5190-2526
7.8 x 300 mm、5 μm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量: 1 mL/min

検出器: UV、220 nm

サンプル: ヒトモノクローナル抗体



3 μm カラムの方が、フラグメントに対して高い分解能が得られています。

ヒントとツール

タンパク質の凝集体分析メソッドを開発する際は、溶質のサイズと分子量の影響、カラムの選択、移動相に関する重要な考慮事項など、さまざまな要因を考慮する必要があります。次の資料では、これらすべての要因について解説しています。

生体分子分析のためのサイズ排除クロマトグラフィー： 分析の手引き (資料番号 5991-3651JAJP)

www.agilent.com/chem/jp

検量線 — Bio SEC-5

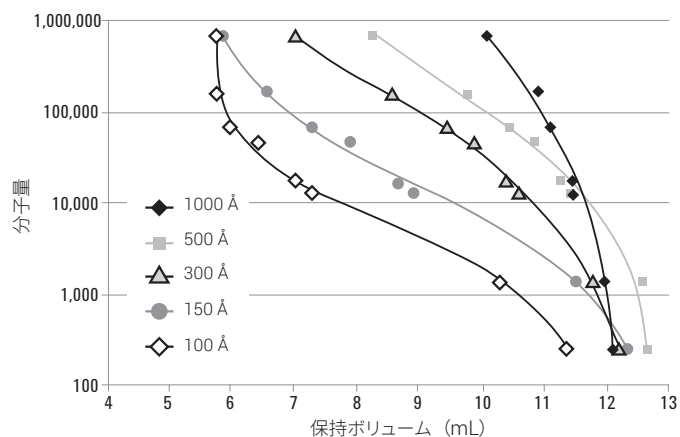
カラム: Bio SEC-5
7.8 x 300 mm, 5 µm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量: 1.0 mL/min

検出器: UV、214 nm

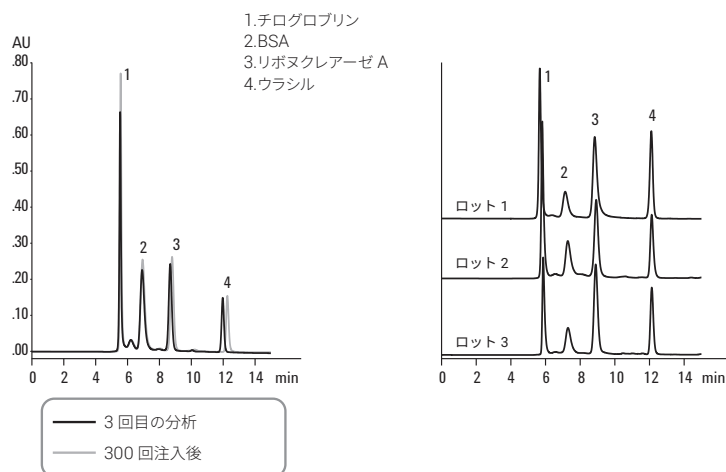
タンパク質	分子量	保持ボリューム				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
チログロブリン	670,000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-グロブリン	150,000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67,000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
オプアルブミン	45,000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
ミオグロビン	17,000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
リボヌクレアーゼ A	12,700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
ビタミン B12	1,350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
ウラシル (浸透 限界マーカー)	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41



卓越したロット間再現性

カラム: Bio SEC-5、150 Å
5190-2521
7.8 x 300 mm, 5 µm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0



タンパク質 4 種の混合物の分析において、300 回の注入にわたり、またそれぞれ製造ロットの異なる 3 本のカラムで、優れたリテンションタイム再現性が得られています。

Bio SEC-5

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio SEC-5 100 Å USP L59	Bio SEC-5 150 Å USP L59	Bio SEC-5 300 Å USP L59	Bio SEC-5 500 Å USP L59	Bio SEC-5 1000 Å USP L59	Bio SEC-5 2000 Å USP L59
21.2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21.2 x 50、ガード	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7.8 x 300	5	5190-2516	5190-2521	5190-2526	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7.8 x 150	5	5190-2517	5190-2522	5190-2527	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7.8 x 50、ガード	5	5190-2520	5190-2525	5190-2530	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4.6 x 300	5	5190-2518	5190-2523	5190-2528	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4.6 x 150	5	5190-2519	5190-2524	5190-2529	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4.6 x 50、ガード	5	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862

ヒントとツール

現在ご使用の SEC カラムを AdvanceBio SEC 300 Å にアップデートすることで、分解能を高め、二次的反応を抑えることができます。

詳細については、**110 ページ**をご覧ください。

ProSEC 300S

- 安定した性能：分析中にブリードが生じない堅牢なシリカ粒子
- 容易なメソッド開発：直線分離範囲が広く、ほとんどの球状タンパク質を分析できるため、ポアサイズを選択が不要
- 最適な分離が得られるカラムオプション：マルチ検出器 SEC に対応した 2 種類のカラム内径
- 高感度：光散乱検出器と組み合わせることで、二量体、三量体、凝集体を分離可能



ProSEC 300S カラムは、球状タンパク質分析用に設計されたシングルカラムソリューションです。ポアサイズを選択と最適化によって直線性の分離範囲が広がったため、幅広い球状タンパク質の分析に使用することができます。

粒子がきわめて堅牢なため、分析中に粒子が崩壊して溶出することがなく、安定したベースラインが得られます。光散乱検出器を使用した SEC に最適なカラムです。

少量のサンプルの分析用に、マルチ検出器によるサイズ排除クロマトグラフィーに対応した 2 種類のカラム寸法（内径 7.5 mm および 4.6 mm）からお選びいただけます。

ProSEC 300S カラムの仕様

結合相	ポアサイズ	粒子径	タンパク質の分子量範囲	pH 範囲	流量	最大圧力
ProSEC 300S	300 Å	5 µm	1,500-800,000	2-7.5	< 1.5 mL/分 (内径 7.5 mm)	250 bar, 3700 psi
					< 0.5 mL/min (内径 4.6 mm)	

ProSEC 300S

仕様	粒子径 (µm)	部品番号
7.5 x 600	5	PL1147-8501
7.5 x 300	5	PL1147-6501
4.6 x 250	5	PL1547-5501
ガードカラム		
7.5 x 50	5	PL1147-1501
4.6 x 50	5	PL1547-1501

ZORBAX GF-250 および GF-450 ゲルろ過カラム

- USP L35 カラムが指定されたプロトコル用の従来製品
- セミ分取および分取に適したカラム寸法
- 有機溶媒および変性剤を使用可能
- 幅広い pH 範囲（3 ～ 8）に対応



GF-250 ゲルろ過カラム

ZORBAX GF-250 および GF-450 サイズ排除（ゲルろ過）カラムは、タンパク質およびその他の生体分子のサイズ分離に最適です。GF-250 および GF-450 カラムを連結して使用すれば、分子量 4,000 ～ 900,000 の球状タンパク質を分離できます。このサイズ排除カラムの親水性ジオール結合相により、高いタンパク質回収率（通常 90 % 超）が得られます。また、独自のジルコニア修飾が施されたシリカにより、pH 3 ～ 8 という広い pH 範囲での使用が可能です。GF-250 および GF-450 カラムには、ポアサイズおよび粒子サイズのばらつきの少ない一貫したサイズの多孔質シリカ微細球が充填されています。効率、堅牢性、再現性に優れたサイズ排除カラムとして、3 mL/min までの流量で、分析スケールおよび分取スケールでのタンパク質の分離に活用いただけます。これらのカラムでは、タンパク質の凝集を抑えるために、移動相で有機溶媒（25 % 未満）および変性剤を使用することもできます。タンパク質の単量体、二量体、および凝集体の分離、脱塩、タンパク質の分子量推定、修飾タンパク質の分離など、幅広いアプリケーションにご使用いただけます。

UHPLC カラムの仕様							
結合相	ポアサイズ	粒子径	分子量範囲	表面積	pH 範囲	流量	最大圧力
ZORBAX GF-250	150 Å	4 μm	4,000-400,000	140 m ² /g	3.0～8.0	< 3.0 mL/min	350 bar
ZORBAX GF-450	300 Å	6 μm	10,000-900,000	50 m ² /g	3.0～8.0	< 3.0 mL/min	350 bar

仕様の数値は代表値です。

ZORBAX GF-250 (USP L35) および GF-450 (USP L35) ゲルろ過カラム

説明	サイズ (mm)	粒子径 (μm)	部品番号
GF-250, 150 Å	9.4 x 250	4	884973-901
GF-250, 150 Å	4.6 x 250	4	884973-701
GF-450, 300 Å	9.4 x 250	6	884973-902
ガードカラム (ハードウェアが必要)			
GF-450 Diol, ガードカートリッジ、2 個	9.4 x 15	6	820675-111
GF-250 Diol, ガードカートリッジ、4 個	4.6 x 12.5	6	820950-911
GF-450 Diol, ガードカートリッジ、2 個	9.4 x 15	6	820675-111
分取ガードハードウェアキット			840140-901
ガードハードウェアキット			820999-901
PrepHT カラム			
PrepHT GF-250, 150 Å	21.2 x 250	6	877974-901
PrepHT GF-450, 300 Å	21.2 x 250	6	877974-910
PrepHT エンドフィッティング、2 個			820400-901
PrepHT ガードカートリッジ、2 個	17.0 x 7.5	5	820212-911
ガードカートリッジハードウェア			820444-901

グリコシル化の特性解析

グリコシル化などの一次アミノ酸配列に対する翻訳後修飾には機能的結果があり、バイオ医薬品の効能と免疫原性に影響を与える可能性があります。またグリカンの構造は、プラズマ中のタンパク質の半減期と、効能に必要な免疫反応を起こさせるモノクローナル抗体の機能に影響します。さらに、グリコシル化は、規制当局に重要な品質特性の1つと見なされています。そのため、糖タンパク質の先発品、バイオシミラー、バイオベター医薬品の開発プロセスの一環としてグリコシル化の特性解析と定量を行い、所定の許容範囲内にあることを確認する必要があります。

タンパク質のグリコシル化の構造と形態に関する情報を取得するために、さまざまな分析メソッドが使用されています。

- グリコシル化部位などの構造の同定には、逆相および親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）と質量分析検出を組み合わせ使用します。
- シアル酸が付加されたグリカンは、より多くの電荷をタンパク質に与えることから、イオン交換クロマトグラフィーでの特性解析が可能です。

糖タンパク質および糖ペプチドのフラグメントの特性解析によりグリコシル化部位の数および位置に関する情報が得られたら、個々のグリカンの同定と定量を行う必要があります。そのために、グリカンをタンパク質から切断し、HILIC カラムで分析します。グリカンには発色団がないため、蛍光標識試薬で誘導体化して、FLD 検出によりグリカンのマッピングと定量を行えるようにします。



親水性相互作用カラムの選択

アプリケーション	アジレントのカラム	注意事項
糖タンパク質（モノクローナル抗体）などから切断されたグリカン	AdvanceBio Glycan マッピング	アミド結合相により、グリカンが迅速に平衡化され選択性が向上
	1.8 μm	全多孔質粒子を採用し、高速分離およびハイスループットアプリケーションに適しています。1290 Infinity II LC で使用する場合、最大 1200 bar での分析が可能です。
	2.7 μm	Poroshell 技術にもとづく表面多孔質粒子を採用しています。拡散距離が短く、低い背圧での高分解能分離が可能です。また、長いカラムを使用することで、分離効率を高めることができます。
親水性ペプチドおよび糖ペプチド	ZORBAX RRHD 300 Å, 1.8 μm	ポアサイズ 300 Å のシリカ粒子により、ZORBAX RRHD 300 Å, 1.8 μm 逆相カラムに対してオーソゴナルな分離を行います。
	AdvanceBio Glycan マッピング	アミド結合相は、小さい親水性ペプチドおよび糖ペプチドを分析可能なもう 1 つの HILIC 官能基です。

AB

AB

AB

AdvanceBio ファミリーの製品

アジレントの包括的な N-グリカン分析ワークフローの利点

グリカン分析のあらゆるステップをサポートする機器および消耗品をすべてアジレントからご購入いただけます。

アジレントのバイオ医薬品向け製品群に ProZyme の製品とサービスが加わりました。これにより、サンプル前処理から始まり、確かな分析結果を得るまでの包括的な N-グリカン分析ワークフローがアジレントで実現します。クラス最高のスループットと分析感度を実現する Gly-X N-グリカンサンプル前処理技術と InstantPC の他、グリカン標準や糖酵素などの糖鎖生物学研究用の個別試薬や、幅広い分析サービスもアジレントからご利用いただけます。

AdvanceBio グリカンマッピングカラム

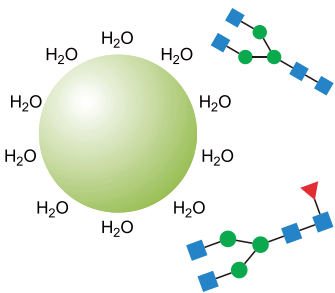
AdvanceBio グリカンマッピングカラムおよび標準の他、モノクローナル抗体などの糖タンパク質から N-グリカンを選択的に除去するためのサンプル前処理製品をご用意しています。

分析スピード — 1.8 μm カラムでは、ハイスループットの N-グリカン分析が可能です。大量のサンプルの分析またはデータの即時性が求められるスピード重視のラボに適しています。

分解能 — 2.7 μm 粒子が充填された 250 mm カラムを使用することで、高分解能分離が実現します。分離能が向上すると、ターゲットグリカンを正確に定量でき、発現中に発生する可能性があるタンパク質のグリコシル化プロファイルを変えることができます。

包括的なメソッド — サンプル前処理からクロマトグラフィー分析、データ解析までをカバーし、再現性と精度に優れた同定および定量を行えます。

シンプルな製品体系 — タンパク質の可溶化から 2-AB ラベル化グリカンの精製まで、サンプル前処理ワークフローに必要なすべての製品を 1 つの部品番号でご注文いただけます。また、サンプル前処理ワークフローの各ステップ用のキットもご用意しています。



カラムの仕様						
結合相	内径 (mm)	粒子	エンドキャップ	pH 安定性	使用温度	圧力上限
アミド HILIC	2.1 および 4.6	1.8 μm、全多孔質	なし	2-7	40 °C	1200 bar
アミド HILIC	2.1 および 4.6	2.7 μm、表面多孔質	なし	2-7	40 °C	600 bar

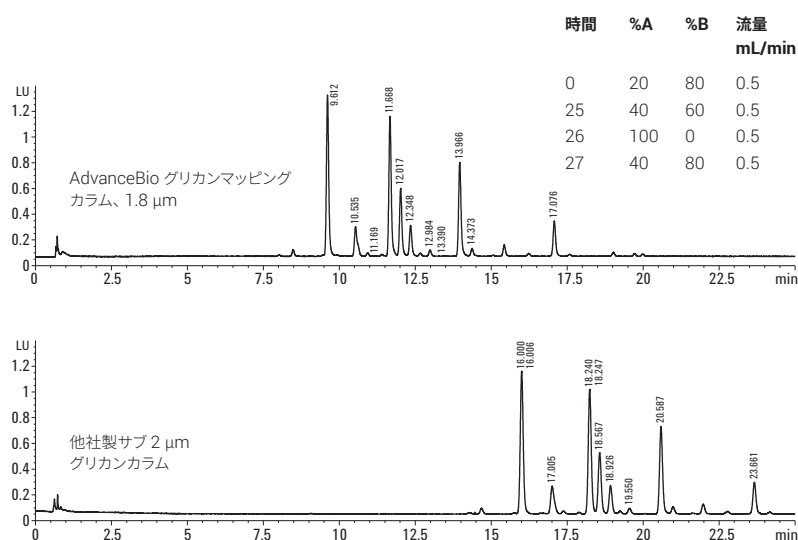
糖タンパク質の N-結合型グリカン成分（モノクローナル抗体など）をマッピングするには、PNGase F を用いて、タンパク質アミノ酸バックボーンから N-型グリカンを酵素によって切断する必要があります。切断した N-グリカンは、親水性相互作用液体クロマトグラフィーと MS 検出器で分析できます。または、蛍光標識試薬である 2-アミノベンズアミド (2-AB) で誘導体化してから、HPLC/UHPLC と FLD または MS 検出器で分析することも可能です。切断グリカンの同定および定量には、AdvanceBio グリカンカラムを使用できます。1.8 μm カラムでは分析スピードを、また 2.7 μm カラム分解能を高めることができます。

分析スピード

分析スピードが要求されるハイスループット分析には、AdvanceBio グリカンマッピング 1.8 μm カラムをおすすめします。

高品質の結果 — 分析時間を他社製品の約 60 % に短縮

カラム：	AdvanceBio グリカンマッピング 859700-913 2.1 x 150 mm、1.8 μm
カラム B：	他社製サブ 2 μm グリカンカラム
移動相：	100 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5 B：ACN
注入量：	2 μL in ACN/100 mMギ酸アンモニウム (7:3) 100 mM NH_4 ギ酸中で 2 μL
サンプル温度：	10 °C
FLD：	励起 = 260 nm 発光 = 430 nm
流量：	0.35 mL/min
機器：	1260 Infinity 蛍光検出器 (FLD) 搭載 1290 Infinity LC
サンプル：	2-AB ラベル化 N-結合型ヒト IgG グリカンライブラリ (p/n 5190-6996)



AdvanceBio グリカンマッピングカラムでは、他社製のサブ 2 μm 、2.1 x 150 mm カラムよりも優れた分解能、幅の狭いバンド、高いピークキャパシティが得られています。

グリコシル化の特性解析

分離能

高分解能分離が求められる分析には、AdvanceBio グリカンマッピング 2.7 μm 充填剤の長いカラムをおすすめします。

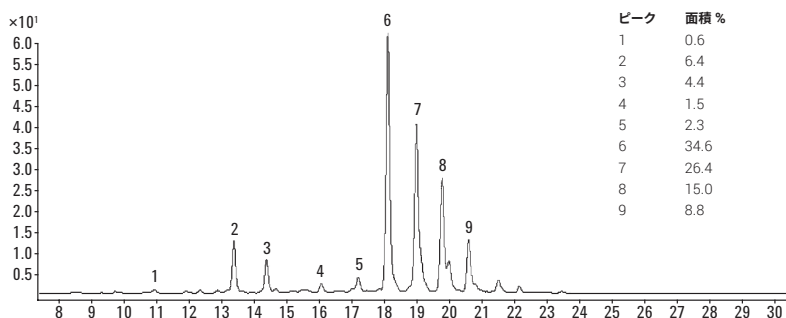
高品質の結果 — 分析時間は他社製品の 約 60 %

カラム： AdvanceBio グリカンマッピング
859700-913
2.1 x 150 mm、1.8 μm

機器： 1290 Infinity バイナリ LC

緩衝液： A：100 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH 4.5
B：アセトニトリル

MS 条件： ガス温度： 250 °C
シースガス
温度： 250 °C
ガス流量： 8 L/min
シースガス流量： 8 L/min
ネブライザ： 25 psi
Vcap： 3,500 V
ノズル： 1,000 V
フラグメンタ： 200 V
スキマ： 45 V
Oct 1 RF Vpp： 550
コリジョンエネルギー： 15 V および 30 V
モード： MS およびターゲット MS/MS



PNGase F によりフェチュインから切断した N-グリカン を 2-AB で誘導体化した後、UHPLC-FLD で分析しました。MS によるピークの割り当てから、フェチュインから切断された N-グリカンが、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を含み、フコースを含まない複雑な 2 本鎖および 3 本鎖グリカンであることがわかりました。フェチュインの 2-AB ラベル化 N-グリカン を HILIC-UHPLC で分析し、MS によりピークを割り当てました。

分析条件

	抗体標準のグラジエント	フェチュインのグラジエント	オボアルブミンのグラジエント
開始流量	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
グラジエント	0 分 85 %B	0 分 75 %B	0 ~ 6 分 85 %B
	5 分 75 %B	45 分 50 %B	10 分 80 %B
	35 分 64 %B	47 分 40 %B、 流量 0.5 mL/min	60 分 70 %B
	40 分 50 %B	47.01 分、 流量 0.25 mL/min	65 分 50 %B、 流量 0.5 mL/min
	42 分、流量 0.5 mL/min 42.01 分、 流量 0.25 mL/min	49 分 0 %B	65.01 分、 流量 0.25 mL/min
	43 分 0 %B	51 分 0 %B	68 分 0 %B
	48 分 0 %B	51.01 分 75 %B、 流量 0.25 mL/min	73 分 0 %B
	50 分 85 %B 50.01 分、 流量 0.25 mL/min	52.00 分、 流量 0.5 mL/min	74 分 85 %B、 流量 0.25 mL/min
	51 分、流量 0.5 mL/min		75.00 分、 流量 0.5 mL/min
ストップタイム	51 min	52 min	75 min
ポストタイム	20 min	20 min	20 min
注入量	5 µL	1 µL	1 µL
サーモスタット オートサンブラ	5 °C		
FLD	励起 = 260 nm 発光 = 430 nm		
ピーク幅	> 0.013 分 (応答時間 0.25 秒) (37.04 Hz)		

オボアルブミンの N-グリカンの詳細情報

ピーク オックスフォード表記 構造

1	A2G2S1	
2, 3	A2G2S2	
4	A3GGS2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (微量)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (微量)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (微量)	
8	A3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

- ▲ フコース
- ガラクトース
- マンノース
- N-アセチルグルコサミン
- ◆ N-アセチルノイラミン酸

N-グリカン標準

アジレントは、サンプル前処理および LC システムの性能を最適化するためにワークフローで必要となる参照物質、IgG N-結合型グリカン標準、およびデキストランラダー標準を提供しています。これら 2 種類の標準には、2-AB でラベル化されたものと 2-AB ラベルなしのもの（サンプル前処理参照物質として使用）があります。

IgG N-結合型グリカン標準は、各カラムがこの分析に要求される厳しい再現性を満たしていることを確認するために、AdvanceBio グリカンマッピング充填剤のバッチごとの QA テストにも使用されています。

デキストランラダー標準は、デキストラン同族列のグルコース単位（GU）の溶出時間にもとづくシステムのキャリブレーションおよび GU の相対リテンションデータのレポートに使用します。



2-AB ラベル化デキストランラダーの分離

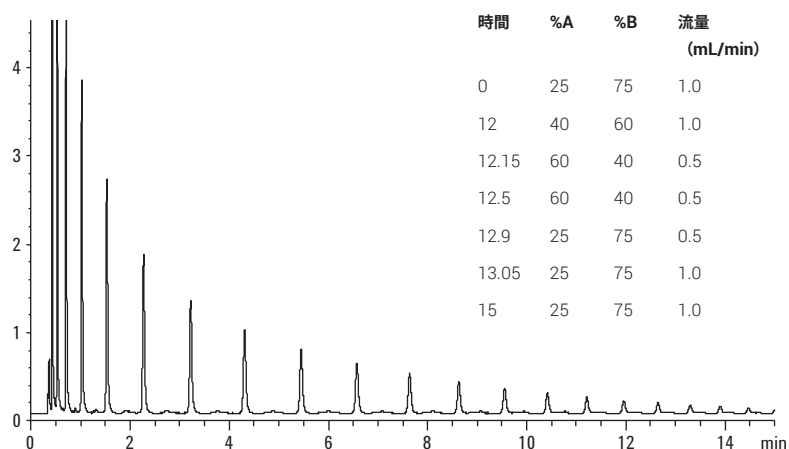
カラム: AdvanceBio グリカンマッピング
859700-913
2.1 x 150 mm, 1.8 μm

移動相: A : 100 mM NH₄Fc, pH 4.5
B : ACN

FLD: 励起 = 260 nm
発光 = 430 nm

注入量: 2 μL (総量 10 pmol のグリカン/1 μL 75:25 ACN:水)

サンプル: 2-AB (p/n 5190-6998)
ラベル化デキストランラダー



この分析では、アジレントのデキストランラダー標準と AdvanceBio グリカンマッピングカラムを使用して、未知グリカンのリテンションタイムの関連付けを行っています。

AdvanceBio グリカンマッピング、1.8 μ m、耐圧 1200 bar

サイズ (mm)	部品番号
2.1 x 150	859700-913
2.1 x 100	858700-913
2.1、1.8 μ m、Fast Guard	821725-905

AdvanceBio グリカンマッピング、2.7 μ m、表面多孔質、耐圧 1200 bar

サイズ (mm)	部品番号
4.6 x 250	680975-913
4.6 x 150	683975-913
4.6 x 100	685975-913
2.1 x 250	651750-913
2.1 x 150	683775-913
2.1 x 100	685775-913
2.1、2.7 μ m、Fast Guard	821725-906

N-グリカン標準

サイズ (mm)	部品番号
デキストランラダー 標準、10 μ g、0.5 mL バイアル	5190-6997
2-AB ラベル化デキストランラダー 標準試料、200 pmol	5190-6998
IgG N-結合型グリカンライブラリ、20 μ g、0.5 mL	5190-6995
2-AB ラベル化 IgG N-結合型 Glycan ライブラリ、200 pmol	5190-6996

親水性ペプチドと糖ペプチドの分析

ペプチドの分析には、逆相クロマトグラフィーと同等の高い選択性と分析間再現性が要求されます。ただし、逆相カラムは、糖ペプチドなどの親水性ペプチドに対する保持力と選択性が限られます。ZORBAX RRHD 300-HILIC、1.8 μm カラムは、逆相カラムよりも親水性ペプチドや糖ペプチドの保持力が高いため、ペプチドマッピング実験で有益な情報を見逃すことなく確実に捉えることができます。

この2つの手法は相互にオーソゴナルであり、タンパク質の一次構造解析に関する相補的な情報が得られます。

- 幅広いペプチドサイズの分析が可能な ZORBAX 300 Å 粒子
- UHPLC 性能を実現する耐圧 1200 bar の 1.8 μm 粒子
- ZORBAX RRHD 300 Å 逆相カラムとの組み合わせにより、UHPLC で相補的な情報を提供

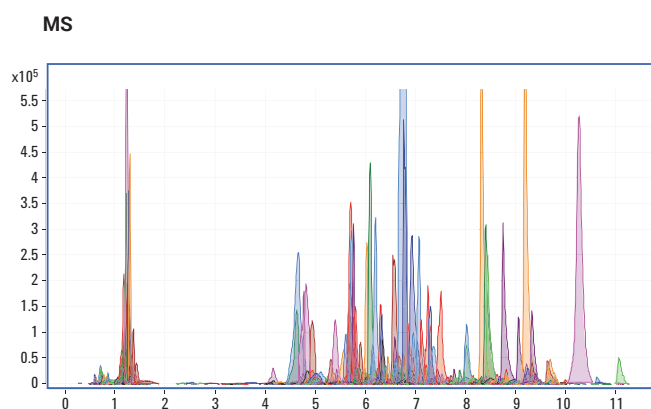
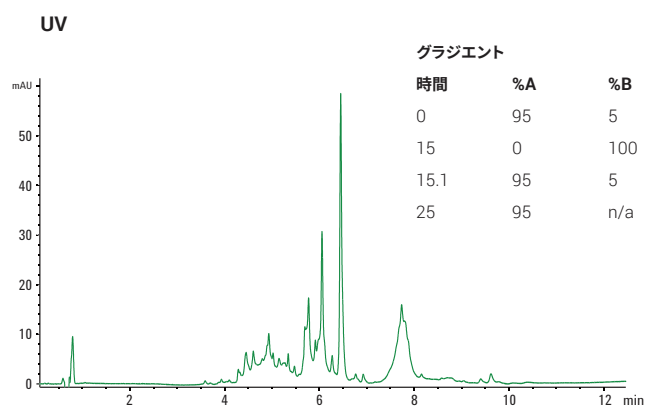
カラムの仕様

結合相	内径 (mm)	粒子径	エンドキャップ	pH 安定性	使用温度	圧力上限
シリカ	2.1	1.8 μm 、全多孔性	なし	1-8	40 °C	1200 bar

タンパク質生物製剤の特性解析および不純物プロファイリングには、ペプチドマッピングが使用されています。そのための手法として逆相 UHPLC/HPLC が一般的ですが、消化物に糖ペプチドなどの親水性ペプチドが含まれていると、有益な情報を見逃す可能性があります。ZORBAX RRHD 300-HILIC カラムは、親水性の糖ペプチドを保持し、質量分析計と組み合わせて使用することで、この重要なタンパク質フラグメント群を同定することができます。

タンパク質トリプシン消化物中の糖ペプチドの同定

カラム: ZORBAX RRHD 300-HILIC
 858750-901
 2.1 x 100 mm、1.8 µm
移動相: A: 100 % ACN
 B: 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5
流量: 0.4 mL/min
注入: 5 µg
検出器: UV、280 nm
機器: 1290 Infinity LC、6224 精密質量飛行時間型、
 デュアル ESI イオン源、ポジティブイオンモード
サンプル: EPO タンパク質消化物から抽出した糖ペプチド (1 mg/mL)



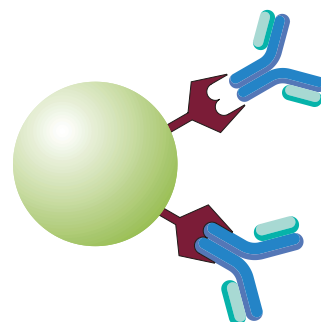
UV の図は、ZORBAX RRHD 300-HILIC 2.1 x 100 mm カラムによるエリトロポエチンタンパク質 (EPO) ペプチドマップの分離結果、MS の図は、一致した EPO の抽出成分のクロマトグラムです。HILIC-MS データにより、RP-MS では同定できなかった 7 種類のペプチドが同定されました。HILIC は RP に対してオーソゴナルな手法であり、RP では捉えることのできないタンパク質酵素消化物中の親水性糖ペプチドを分離することができます。

ZORBAX RRHD 300-HILIC 1.8 µm カラム

サイズ (mm)	内径 (mm)	粒子径 (µm)	部品番号
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 x 100	1.8	858750-901
ZORBAX RRHD 300-HILIC	2.1 x 50	1.8	857750-901

抗体価の測定

アフィニティークロマトグラフィーは、特異性の高い分子相互作用、主に特定のタンパク質同士（抗原/抗体など）の結合を利用して分離する強力な手法です。アジレントは、IgG を単離および定量するための特殊なアフィニティ製品、Protein A および Protein G モノリスカラムや、生体サンプル中の高濃度タンパク質を除去するためのマルチプルアフィニティ除去システムを提供しています。



Bio-Monolith HPLC カラム

- あらゆる IgG（ヒトおよびマウス）の分離用に設計
- 流量に左右されない分離。拡散、ポア、ボイドボリュームがないため、移動相と固定相間的高速移動が可能
- 超高速分離。メソッド開発をスピードアップしてコストを削減できます。
- メソッドパラメータの固定化。分析時間と緩衝液を大幅に削減します。

Bio-Monolith Protein A および Protein G HPLC カラムは、Bio-Monolith カラムファミリーの製品です。Protein A および Protein G Bio-Monolith カラムは、1100、1200、および 1260 バイオイナートクォータナリ LC などの HPLC システムで使用できます。



Bio-Monolith Protein A カラム、
5069-3639

ヒントとツール

Bio-Monolith Protein A カラムの mAb 結合の耐塩性および mAb の溶出に使用可能な酸性緩衝液の詳細については、アプリケーションノート（**5991-2990JAJP**）をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

カラムの仕様

仕様	5.2 mm x 4.95 mm
カラム容量	100 µL
最大圧力:	150 bar (15 MPa, 2,200 psi)
最低/最高温度	使用温度: 2~40 °C
	保管温度: 2~8 °C
推奨 pH	使用範囲: 2-13
	定置洗浄: 1-14
使用材質	ハードウェア: ステンレス
	充填剤: ポリ(グリンジルメタクリレート-co-エチレンジメタクリレート) 多孔質モノリス
カラー識別リング	Bio-Monolith Protein A: 白 Bio-Monolith Protein G: オレンジ
保管期限/使用期限	12 ヶ月

Bio-Monolith Protein A および Protein G

説明	部品番号
バイオモノリスプロテイン A, 4.95 x 5.2 mm	5069-3639
バイオモノリスプロテイン G, 4.95 x 5.2 mm	5190-6900

ヒントとツール

詳細については、次の技術資料をご覧ください。

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (資料番号 **5991-5135EN**)

バイオモノリスプロテイン A による細胞培養のモノクローナル抗体力価のモニタリング (資料番号 **5991-2990JAJP**)

バイオモノリスプロテイン A カラムと LC/MS を用いた細胞クローン選択 (資料番号 **5991-5124JAJP**)

Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (資料番号 **5991-5125EN**)

www.agilent.com/chem/jp

さまざまな IgG サブクラスに対する Bio-Monolith Protein A および Protein G の結合親和性

抗体	プロテイン A	プロテイン G
ヒト		
ヒト IgG1	++++	++++
ヒト IgG2	++++	++++
ヒト IgG3	—	++++
ヒト IgG4	++++	++++
ヒト IgA	++	—
ヒト IgD	++	—
ヒト IgE	++	—
ヒト IgM	++	—
マウス		
マウス IgG1	+	++
マウス IgG2a	++++	++++
マウス IgG2b	++++	+++
マウス IgG3	+	+++
マウス IgM	+/-	—
抗体フラグメント		
ヒト Fab	+	+
人体 F(ab') ₂	+	+
ヒト scFv	+	+
ヒト Fc	+	+
ヒト κ	+	+
ヒト λ	+	+

++++ = 強い親和性
 ++++ = 中位の親和性
 ++++ = 弱い親和性
 + = わずかな親和性
 — = 親和性なし



ヒト化モノクローナル抗体の高速定量

カラム： Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5.2 x 4.95 mm

移動相： A : 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.4
B : 100 mM クエン酸、pH 2.8

流量： 1 mL/min

注入量： 可変 (50 μ L、IgG1 を含む CHO 細胞培地上清に最適化)

グラジエント：

時間 (分)	%A	%B	
0 ~ 0.5	100	0	結合
0.6 ~ 1.7	0	100	溶出
1.8 ~ 3.5	100	0	再平衡化

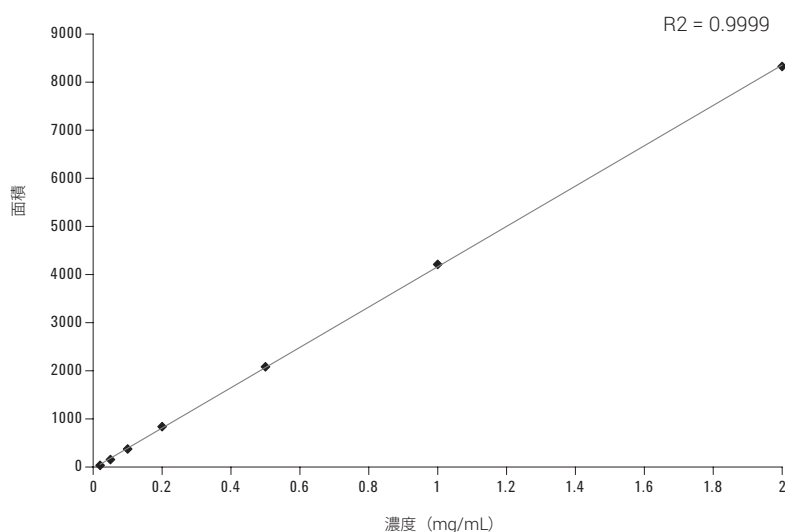
温度： 室温

検出器： UV、280 nm

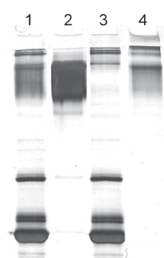
フラクションコレクション： 時間ベース

サンプル： IgG1 (1 ~ 20 mg/mL) および IgG1 を含む
CHO 細胞溶解液 (総タンパク質最大 20 mg/mL)

	RT(分)	ピーク面積
1	383	1.666
2	372	1.666
3	365	1.665
4	389	1.667
5	383	1.666
6	378	1.666
7	379	1.668
8	377	1.666
9	376	1.667
10	377	1.667
平均値	378	1.667
S	6.52	0.001
% RSD	1.73	0.060

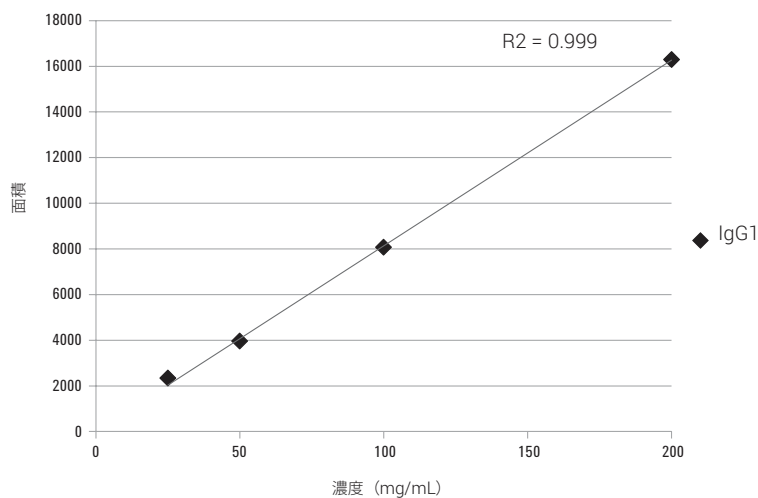


修飾ヒト化トラスツマブの検量線 (上図：0 ~ 2 mg/mL、下図：25 ~ 200 mg/mL)



凡例：
 レーン 1：分離前の全血清
 レーン 2：IgG 標準
 レーン 3：ピーク 1 (フロースルー分画)
 レーン 4：ピーク 2 (Protein A 結合分画、IgG1 など)

分離により得られた分画の SDS PAGE 分析



高流量でも優れた結合効率を維持

カラム： Bio-Monolith Protein A
5069-3639
5.2 x 4.95 mm

移動相： A：20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4
B：0.1 M クエン酸、pH 2.8

流量： 1.0、1.5、および 2.0 mL/分

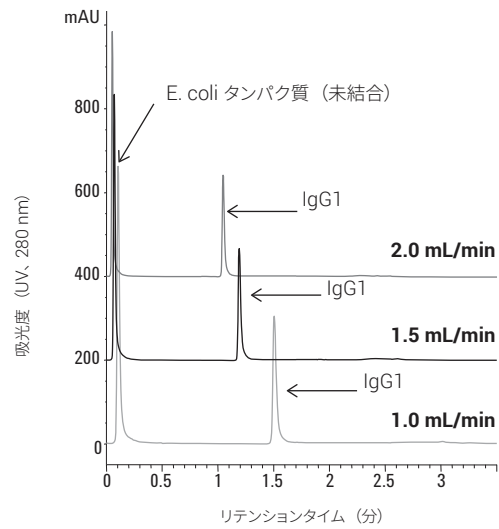
注入量： 4 µL (20 mg/mL の E.coli 上清をスパイクした
2.5 mg/mL の IgG1) 検出器：UV、280 nm

グラジエント： 0 % B で 0.5 分間保持、100 % B で 0.6 ~ 1.7 分、
0 % B で 1.8 ~ 3 分

温度： 25 °C

サンプル： ヒト化 IgG1 および E. coli 溶解液

機器： 1260 Infinity バイオイナート LC

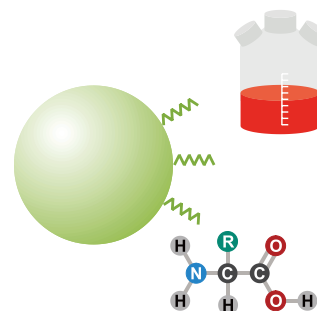


Bio-Monolith Protein A カラムへの IgG1 の結合を複数の流量で評価しました。クロマトグラムの変化と信号の完全性を容易に観察できるよう、この実験ではさらに多くのサンプルをロードしました。

流量と未結合タンパク質および IgG1 のピーク相対面積の関係					
流量 (mL/min)	未結合タンパク質の面積 (mAu/S)	IgG1 の面積 (mAu/S)	未結合タンパク質の 相対面積 (%)	IgG1 の相対 面積 (%)	圧力 (bar)
1.0	1230	738	63	37	32
1.5	840	492	63	37	47
2.0	636	363	64	36	68

細胞培地とアミノ酸の分析

バイオテクノロジーラボは、アジレントの AdvanceBio カラムを使用することで、サンプルの誘導体化に関係なく、細胞培地の培養上清に含まれるアミノ酸や代謝物を簡単に分析できます。どちらのソリューションのカラムもアミノ酸標準品で試験済みであるため、品質と性能が確保されています。ニーズに合ったワークフローをお選びください。



業界標準の LC/UV 分析用の Agilent AdvanceBio アミノ酸分析キットを選択

- 逆相 LC 分離および UV 検出によるアミノ酸のオンライン誘導体化を自動化
- Agilent LC システムに使用可能
- 機器および専門技術への投資を最小化

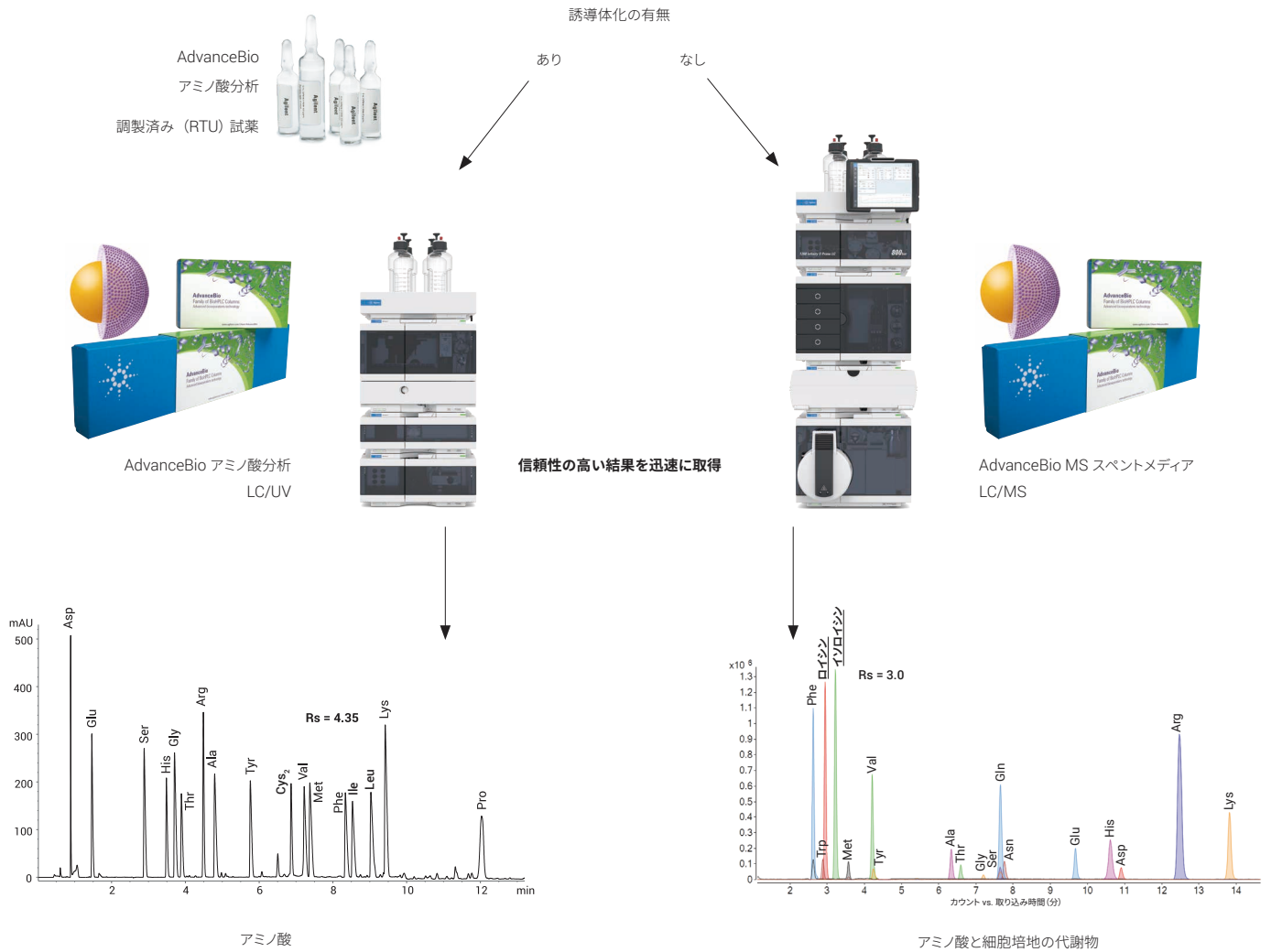
非誘導体化 LC/MS 高速分析用の Agilent AdvanceBio MS スペントメディアカラムを選択

- 単一メソッドによるアミノ酸およびその他の培地の代謝物の分析：MS 検出による HILIC LC 分離です
- サンプルの誘導体化が不要
- LC/MS システムに使用可能
- MS 検出によるベースラインクロマトグラフィー分解能が不要

ヒントとツール

Agilent InfinityLab ウェルプレートおよびシーリングマットは、ハイスループットの LC/MS アプリケーションに最適なサンプル容器です。

アジレントの細胞培地分析ソリューション



AdvanceBio アミノ酸分析（AAA）カラムと標準液

Agilent AdvanceBio アミノ酸分析（AAA）カラムは、タンパク質加水分解物や細胞培地中のアミノ酸を優れた感度と再現性で高速分離できます。

AdvanceBio AAA には、実績あるアミノ酸誘導体化試薬、調製済みアミノ酸標準キット、アジレントの革新的な Poroshell 技術をベースとしたカラム、およびアジレントのエキスパートによるサポートが含まれています。AdvanceBio AAA は、Agilent InfinityLab LC シリーズ機器との併用により、アミノ酸分析の完全なソリューションを提供します。

これらのカラムは、Agilent AdvanceBio ファミリーの製品です。生体分子の特性解析のための革新的なソリューションとして設計されています。

- － 信頼性の高い結果：Poroshell の効率的な粒子形態により高分解能分離を実現
- － コストの削減：高 pH 耐性を持つ堅牢な化学修飾シリカによりカラムを長寿命化
- － 優れた柔軟性：直径 2.7 µm の粒子を採用し、HPLC および UHPLC の両システムに対応
- － 品質管理：アミノ酸標準によるバッチテストにより AdvanceBio AAA カラムの品質を確保
- － シンプルな製品体系：標準および試薬をキットとして入手可能
- － 自動オンラインプレカラム誘導体化：アジレントの一般分析用注入システムを使用

カラムの仕様

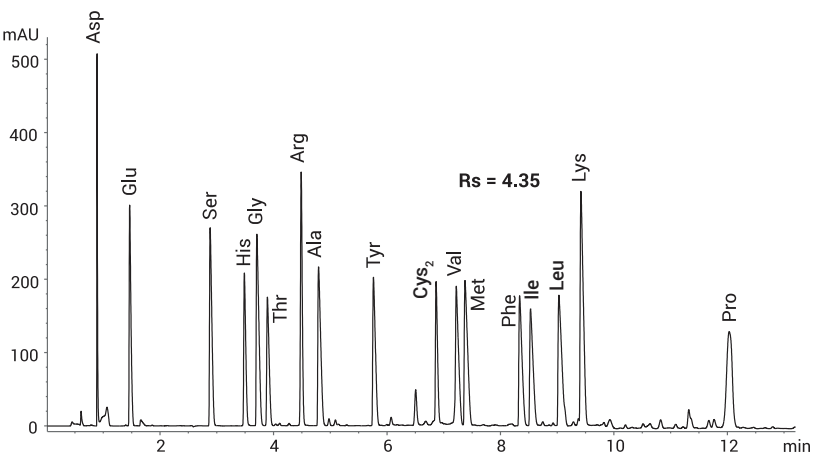
結合相	粒子径	ポアサイズ	上限温度	pH 範囲	エンドキャップ	圧力上限
C18	2.7 µm	100 Å	60 °C	3.0-11.0	ダブル	600 bar

AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) カラム

説明	部品番号
AdvanceBio アミノ酸分析 100 Å、3.0 x 100 mm、2.7 µm	695975-322
AdvanceBio アミノ酸分析 100 Å、4.6 x 100 mm、2.7 µm	655950-802
AdvanceBio アミノ酸分析 100 Å、3.0 x 5 mm、2.7 µm (3 個、ガード)	823750-946
AdvanceBio アミノ酸分析 100 Å、4.6 x 5 mm、2.7 µm (3 個、ガード)	820750-931

LC/UV

カラム：	Agilent AdvanceBio AAA アミノ酸分析 p/n 655950-802	
カラム温度：	30 °C	
移動相：	A = 10 mM Na ₂ HPO ₄ 、10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 、 pH 8.2、B = アセトニトリル:メタノール:水、 45:45:10 (v:v:v)	
流量：	1.5 mL/min	
グラジエント：	時間 (分)	%B
	0	2
	0.35	2
	13.4	57
	13.5	100
	15.7	100
	15.7	2
	18	終了
サンプル：	タンパク質加水分解物	
検出：	Agilent 1260 Infinity II DAD WR	



タンパク質加水分解物によるアミノ酸の紫外線クロマトグラム。ロイシンとイソロイシンの間の分解能は 4.35 です。この数値は、欧州薬局方の要件（1.5 を超える分解能が必要）を完全に満たしています。[European Pharmacopoeia 9.0 (2.2.56) Amino Acid Analysis]

AdvanceBio アミノ酸分析標準およびキット

キットには、定量に必要な誘導体化試薬とアミノ酸標準がすべて含まれています。必要に応じて、各試薬を個別にご注文いただくこともできます。

AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) 標準および試薬

説明	部品番号
標準および試薬キット	5190-9426
キットの内容 (単品での注文も可能)	
緩衝液、ホウ酸、100 mL	5061-3339
FMOC 試薬、10 アンプル、各 1 mL、AAA 用	5061-3337
OPA 試薬、10 mg/mL、6 アンプル、各 1 mL	5061-3335
ジチオジプロピオン酸 (DTDPA)、5g	5062-2479
アミノ酸標準、1 nmol、10 個	5061-3330
アミノ酸標準、250 pmol、10 個	5061-3331
アミノ酸標準、100 pmol、10 個	5061-3332
アミノ酸標準、25 pmol、10 個	5061-3333
アミノ酸標準、10 pmol、10 個	5061-3334
アミノ酸補助キット、各 1 g	5062-2478



緩衝液、ホウ酸、100 mL、
5061-3339



アミノ酸補助キット、各 1 g、
5062-2478

各アミノ酸標準には、次のアミノ酸が含まれています。

- | | | |
|-----------|--------------|-------------|
| – グリシン | – L-セリン | – L-アルギニン |
| – L-シスチン | – L-アラニン | – L-トレオニン |
| – L-ヒスチジン | – L-フェニルアラニン | – L-バリン |
| – L-チロシン | – L-グルタミン酸 | – L-リジン |
| – L-ロイシン | – L-プロリン | – L-アスパラギン酸 |
| – L-メチオニン | – L-イソロイシン | |



AdvanceBio MS スペントメディア

Agilent AdvanceBio MS スペントメディアカラムは、高速かつ優れた感度と再現性でバイオプロセスの細胞培地の非誘導体化アミノ酸やその他の極性代謝物を分離でき、質量分析に最適な HILIC カラムです。

Agilent InfinityLab LC シリーズ機器や Agilent MS 機器との併用により、細胞培地成分分析の包括的なソリューションが実現します。

AdvanceBio MS スペントメディア分析は、Agilent AdvanceBio ファミリーの新製品として、生体分子の生成と特性解析のために設計された革新的なソリューションです。

- 迅速な MS ベースのワークフロー
- サンプルの誘導体化が不要なため、時間とリソースを節約可能
- イナートフローパス用の PEEK ライナ付ステンレスカラムハードウェアにより、分析困難なイオン性代謝物でも卓越したピーク形状と回収率を達成
- ロイシンとイソロイシンの異性体に対するベースラインクロマトグラフィー分離能
- 品質と性能を保証するために、アミノ酸でテストされたカラム
- MS に適した移動相で優れた分析感度を実現
- 2.7 µm の Poroshell 粒子の採用により、HPLC システムと UHPLC システムの両方に対応

カラムの仕様					
結合相	ポアサイズ	粒子径	温度上限	pH 範囲	圧力上限
HILIC-Z	100 Å	2.7 µm	pH 7 で 80 °C	3.0~11.0 (35 °C)	600 bar

AdvanceBio MS スペントメディア

説明	部品番号
AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å, 2.1 x 50 mm, 2.7 µm	679775-901
AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å, 2.1 x 100 mm, 2.7 µm	675775-901
AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å, 2.1 x 150 mm, 2.7 µm	673775-901

LC/MS

カラム：

**Agilent AdvanceBio
MS スペントメディア
2.1 x 100 mm
p/n 675775-901**

カラム温度：

30 °C

移動相：

低 pH、ポジティブイオンモードの MS 検出：
A = 10 % 200 mM ギ酸アンモニウム水溶液
pH 3、90 % 水
B = 10 % 200 mM ギ酸アンモニウム水溶液
pH 3、90 % アセトニトリル
最終的な塩濃度は 20 mM
移動相の堅牢性と一貫性を確保するために、緩衝液の
濃縮原液から移動相を調製することをおすすめします。

流量：

0.5 mL/min

グラジエント：

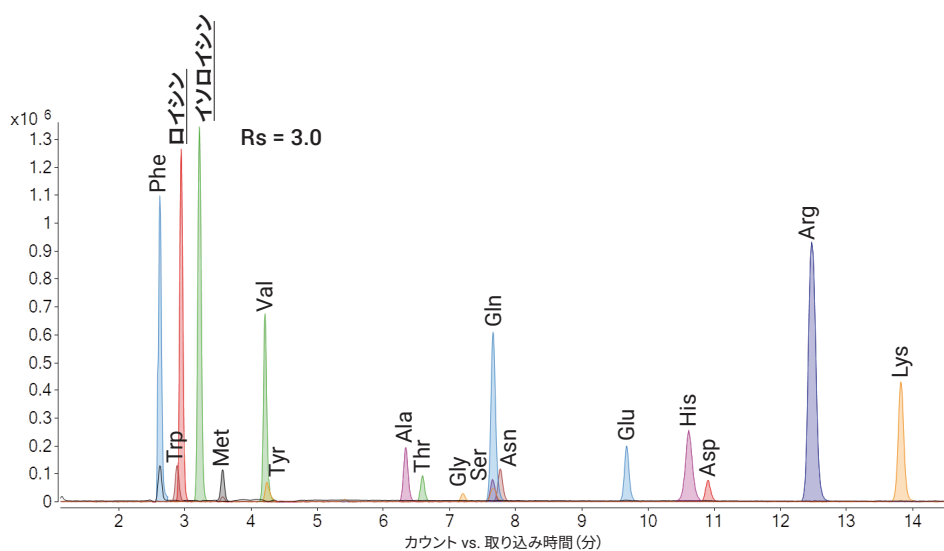
時間 (分)	%B (低 pH、 ポジティブイオンモード)
0	1.00
15	80
15.5	100
20	100

サンプル：

細胞培地、移動相 B で 5 倍に希釈

検出：

Agilent 6230 飛行時間型 LC/MS

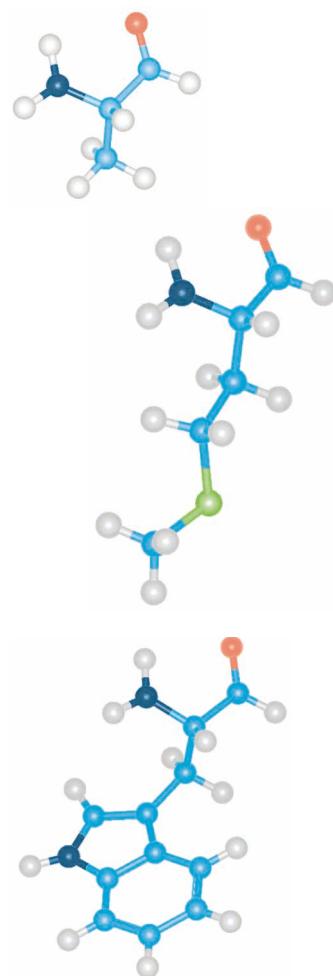


ZORBAX Eclipse アミノ酸分析 (AAA)

- アミノ酸分析用に試験済み
- 一般的な OPA および FMOC プレカラム誘導体化法を使用
- InfinityLab LC シリーズで詳細なオンライン誘導体化プロトコルに従って容易に自動化可能

ZORBAX Eclipse AAA カラムは、更新された改良型プロトコルに従ってアミノ酸を分離します。注入から次の注入までのすべての分析作業を、7.5 cm の短いカラムでは 14 分（分析時間は 9 分）、150 mm の長いカラムでは 24 分（分析時間は 18 分）で完了できます。InfinityLab LC シリーズを使用して OPA や FMOC による誘導体化を全自動化することで、優れた感度（DAD、FLD で 5 ~ 50 pmol）と信頼性を達成できます。

UHPLC システムで高速アミノ酸分析を行う場合は、ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μm カラムを使用することで、高品質の結果が得られます。



ZORBAX Eclipse アミノ酸分析 (AAA) カラム

説明	サイズ (mm)	粒子径 (μm)	部品番号
ルーチン分析	4.6 x 150	5	993400-902
FLD を使用したルーチン分析、高分解能	4.6 x 150	3.5	963400-902
ルーチン分析、ハイスループット	4.6 x 75	3.5	966400-902
ソルベントセーバ、高感度、高分解能	3.0 x 150	5	961400-302
ガードカートリッジ、4 個	4.6 x 12.5	5	820950-931
ガードハードウェアキット			820999-901



ZORBAX Eclipse Plus C18

説明	サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Eclipse Plus C18 USP L1
ナローボア RRHD、1200 bar	2.1 x 50	1.8	959757-902
ナローボア RRHT、600 bar	2.1 x 50	1.8	959741-902

ヒントとツール

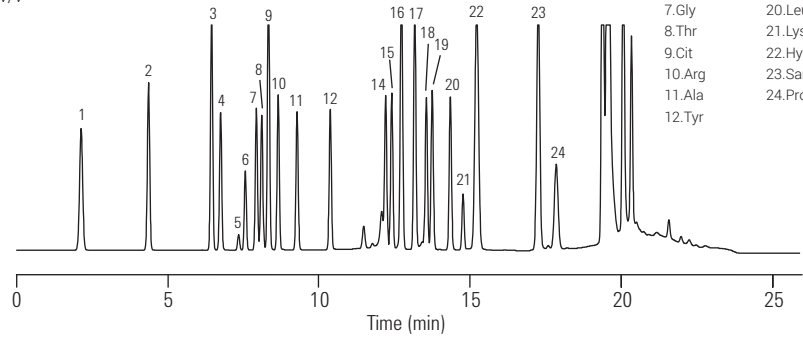
詳細については、「Automatic Precolumn Derivatization of Amino Acids and Analysis by Fast LC using the Agilent 1290 Infinity LC System」(資料番号 5990-5599EN) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

24 種類のアミノ酸を高分解能分離

カラム： ZORBAX Eclipse AAA
963400-902
4.6 x 150 mm、3.5 μm
移動相： A：40 mM Na₂HPO₄, pH 7.8
B：アセトニトリル:メタノール:水、45:45:10、v/v/v
流量： 2 mL/min
温度： 40 °C
検出器： 蛍光分光分析
サンプル： 24 種類のアミノ酸

1. Asp	14. Val
2. Glu	15. Met
3. Asn	16. Nva
4. Ser	17. Trp
5. Gln	18. Phe
6. His	19. Ile
7. Gly	20. Leu
8. Thr	21. Lys
9. Cit	22. Hyp
10. Arg	23. Sar
11. Ala	24. Pro
12. Tyr	



ここに示すアミノ酸 24 種の高分解能分離が 18 分で完了しました。4.6 x 75 mm の Eclipse AAA ラピッドレゾリューションカラムを使用すれば、これらのアミノ酸をわずか 9 分で分離できます。

タンパク質除去

マルチプルアフィニティ除去システムは、クロマトグラフィーによって生体サンプルから高濃度の干渉タンパク質を除去するように設計されています。これにより、血清、血漿、脳脊髄液（CSF）などの生体サンプル中のタンパク質を容易に単離、同定できるようになります。高濃度タンパク質を除去することで、分析のダイナミックレンジが効果的に広がり、後続の LC/MS 分析や電気泳動分析の感度が向上します。



アジレントのタンパク質分画システムと プロテオミクス用試薬

- 生体サンプルの LC/MS 分析
- 電気泳動分析のための前処理
- バイオマーカー探索のためのサンプル前処理
- 機器およびワークフローのバリデーション
- コスト効率の高い免疫枯渇
- サンプルの脱塩、濃縮、分画

Agilent mRP-C18 高回収率タンパク質カラムでは、サンプルの脱塩、濃縮、および分画を簡単な 1 ステップで同時に行うことができ、従来の RP-HPLC カラムよりも格段に高い回収率を実現します。LC/MS 分析に完全に対応しています。

複合標準、プロテオミクスグレードのトリプシンなど、バイオマーカー探索やその他のプロテオミクスアプリケーションのサンプル前処理用のバリデーション済み試薬もご用意しています。これらの試薬は Agilent LC/MS メソッドに完全に対応しており、追加のサンプル前処理は必要ありません。

アジレントのカスタム構成を通して、大量注文やカスタム寸法のカラムのご注文も承ります。

マルチプルアフィニティ除去システム

マルチプルアフィニティ除去システムを使用することで、血清や血漿などの生体サンプル中に存在する有益な微量タンパク質やバイオマーカーを確実に同定および特性解析できるようになります。

マルチプルアフィニティ除去システムは、ヒト生体サンプル中の最大 14 種類の高濃度タンパク質と、マウス生体サンプル中の最大 3 種類の高濃度タンパク質を特異的に高い再現性で除去します。

マルチプルアフィニティ除去システムは、多様な LC カラム寸法とスピニングカートリッジフォーマットでご利用いただけます。アジレントの最適化された緩衝液、使いやすいスピンフィルタ、および濃縮機と組み合わせることで、幅広い LC 機器（カラム）やベンチトップ型遠心分離機（スピニングカートリッジ）に対応した統合型の自動除去ソリューションが実現します。

マルチプルアフィニティ除去システムで処理したサンプルは、2D ゲル電気泳動や LC/MS などの下流分析システムでそのまま分析できます。



マルチプルアフィニティ除去システム

ヒントとツール

アフィニティクロマトグラフィーのサイクル時間を短縮する方法については、次のアプリケーションノートをご覧ください。

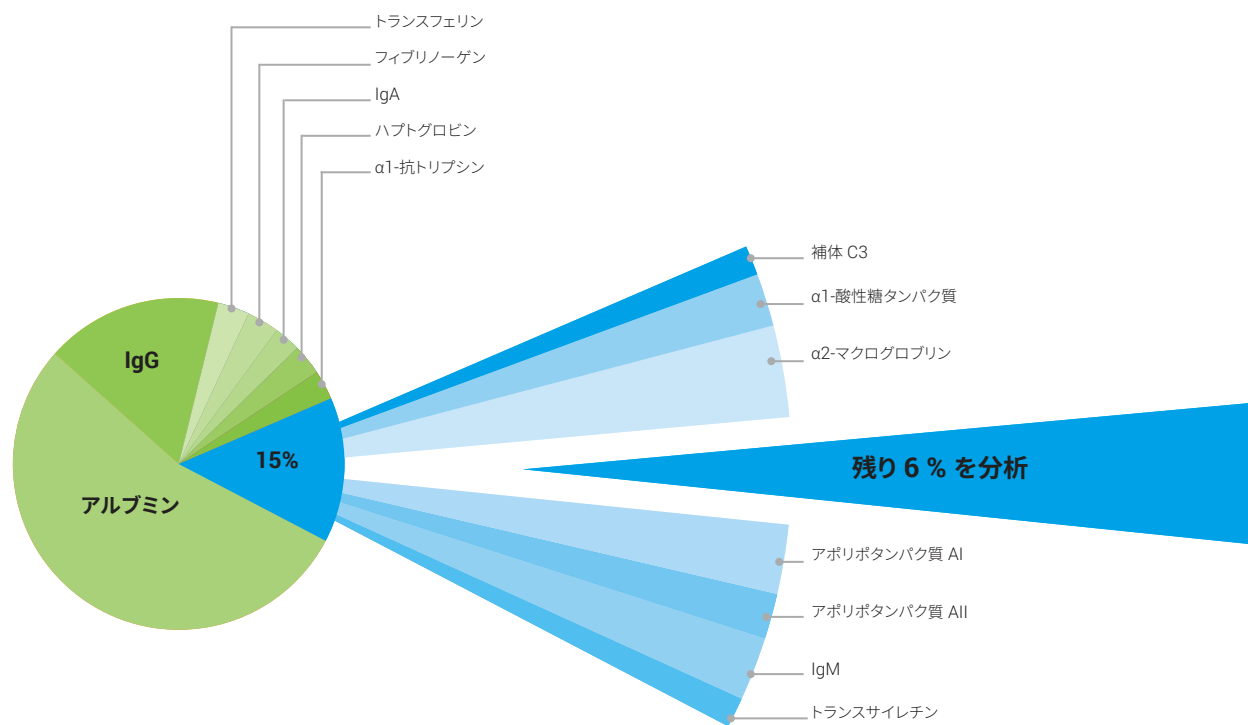
Reducing Cycle Time for Affinity Removal of High-Abundant Proteins in Human Plasma: Alternating Column Regeneration Using an Agilent 1200 Infinity Series Quick-Change Bio-inert 2-position/10-port Valve and an Agilent 1290 Infinity Flexible Cube (資料番号 5991-4721EN)

www.agilent.com/chem/jp

マルチプルアフィニティ除去システム選択ガイド

製品	除去タンパク質	総タンパク質に対する除去率	仕様	保持容量	部品番号
MARS Human-14	アルブミン、IgG、抗トリプシン、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲン、アルファ 2-マクログロブリン、アルファ 1-酸性糖タンパク質、IgM、アポリボタンパク質 AI、アポリボタンパク質 AII、補体 C3、トランスサイレチン	94%	スピニングカートリッジ	8 ~ 10 µL	5188-6560
			4.6 x 50 mm	20 µL	5188-6557
			4.6 x 100 mm	40 µL	5188-6558
			10.0 x 100 mm	250 µL	5188-6559
MARS Human-7	アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、抗トリプシン、フィブリノーゲン	88 ~ 92 %	スピニングカートリッジ	12 ~ 14 µL	5188-6408
			4.6 x 50 mm	30 ~ 35 µL	5188-6409
			4.6 x 100 mm	60 ~ 70 µL	5188-6410
			10.0 x 100 mm	250 ~ 300 µL	5188-6411
MARS Human-6	アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、抗トリプシン	85 ~ 90 %	スピニングカートリッジ	7 ~ 10 µL	5188-5230
			4.6 x 50 mm	15 ~ 20 µL	5185-5984
			4.6 x 100 mm	30 ~ 40 µL	5185-5985
MARS Human-High Capacity	アルブミン、IgG、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、抗トリプシン	85 ~ 90 %	スピニングカートリッジ	14 ~ 16 µL	5188-5341
			4.6 x 50 mm	30 ~ 40 µL	5188-5332
			4.6 x 100 mm	60 ~ 80 µL	5188-5333
			10.0 x 100 mm	最大 340 µL	5188-5336
MARS Human-2	アルブミン、IgG	69%	スピニングカートリッジ	50 µL	5188-8825
			4.6 x 50 mm	100 µL	5188-8826
MARS Human-1	アルブミン	50 ~ 55 %	スピニングカートリッジ	65 µL	5188-5334
			4.6 x 50 mm	130 µL	5188-6562
MARS Mouse-3	アルブミン、IgG、トランスフェリン	80%	スピニングカートリッジ	25 ~ 30 µL	5190-2534
			4.6 x 50 mm	37 ~ 50 µL	5188-5217
			4.6 x 100 mm	75 ~ 100 µL	5188-5218

Agilent マルチプルアフィニティ除去カラムおよびスピンカートリッジで除去される高濃度タンパク質



マルチプルアフィニティ除去システムスタータキット

LC カラムおよびスピニングカートリッジ試薬スタータキットには、マルチプルアフィニティ除去システムに必要なすべての消耗品が含まれています。これらの緩衝液によって条件を最適化することで、カラム寿命が延び、サンプルの再現性が高まります。

- キットには、4.6 x 50 mm LC カラムの場合は約 200 サンプル分、4.6 x 100 mm LC カラムの場合は約 100 サンプル分、スピニングカートリッジを使用する場合は 200 回分の緩衝液 A および緩衝液 B が含まれています。
- 緩衝液 A は、ロード用緩衝液です。タンパク質間の相互作用を最小限に抑えることで、一般に高濃度タンパク質に結合している低濃度タンパク質をカラムから通過させ、ターゲットの高濃度タンパク質を関連する抗体に結合させます。
- 緩衝液 B は溶出用緩衝液です。抗体とタンパク質間の相互作用を妨害し、高濃度タンパク質をカラムから溶出させます。



LC カラム試薬スタータキット、5185-5986

マルチプルアフィニティ除去システムスタータキット

説明	部品番号
高濃度サンプル希釈用緩衝液、50 mL	5188-8283
LC カラム試薬スタータキットの内容:	5185-5986
緩衝液 A、ロード、洗浄、および平衡化用、1 L	5185-5987
緩衝液 B、溶出用、1 L	5185-5988
0.22 μm 酢酸セルロース、25 個、1 L	5185-5990
限外ろ過ユニット、5K MWCO、4 mL、25 個	5185-5991
マルチプルアフィニティ除去スピニングカートリッジ試薬キットの内容:	5188-5254
緩衝液 A、ロード、洗浄、および平衡化用、1 L	5185-5987
緩衝液 B、溶出用、1 L	5185-5988
スピニングフィルタ x 2、0.22 μm 酢酸セルロース、25 個	5185-5990
限外ろ過ユニット、5K MWCO、4 mL、25 個	5185-5991
ルアーロック式アダプタ、2 個	5188-5249
プラスチック製シリンジ、5 mL、ルアーロック式、2 個	5188-5332
マイクロチューブ x 6、1.5 mL、スクリュートップ、100 個	5188-5251
キャップおよびプラグ、6 個	5188-5252
PTFE ニードル、ルアーロック式、10 個	5188-5253



ルアーロック式シリンジ、5188-5250



ルアーロック式アダプタ、5188-5249



ルアーロック式ニードル、5188-5253

特殊寸法のカラム

キャピラリーおよびナノカラム

- 極少量のサンプルで優れた感度を実現
- あらゆる LC/MS インターフェースに適合
- 内径 0.5、0.3、0.1、および 0.075 mm
- 生体分子の分析に適した 300 Å のポアサイズ
- 1D および 2D (プロテオミクス) アプリケーションに最適

ZORBAX キャピラリー (内径 0.5 および 0.3 mm) およびナノカラム (内径 0.1 および 0.075 mm) を幅広い結合相と寸法でご用意しています。オンカラムでのサンプルの希釈を抑えて感度を高めるため、サンプル量が非常に限られたアプリケーションに最適です。



ナノカラム

ヒントとツール

アジレントでは、クロマトグラフィーを効果的に行うために必要な知識を習得できるさまざまな e セミナーおよびオンサイトトレーニングを実施しています。

詳細についてはホームページをご覧ください。

LC/MS によるタンパク質消化物の高感度分析

カラム: ZORBAX 300SB-C18
5065-9911
0.075 x 150 mm、3.5 μ m

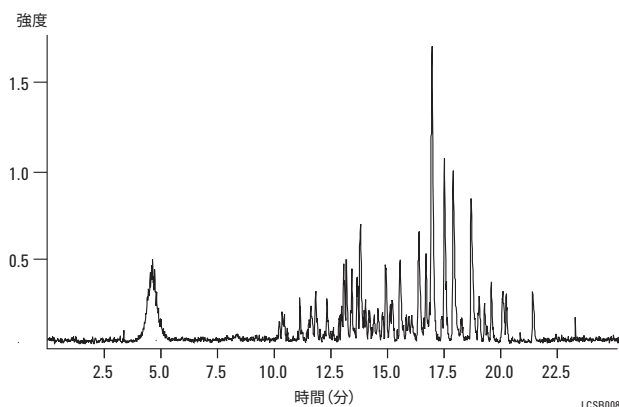
移動相: A: 水 + 0.1 % 酢酸
B: ACN + 0.1 % 酢酸

流量: 600 nL/min

グラジエント: 25 分で B を 2 % から 52 % に増加

検出器: ポジティブイオンナノエレクトロスプレー MS

サンプル: 8 種類のタンパク質の消化物 100 fm (1 μ L)



ZORBAX ナノ HPLC カラム、内径 0.075 mm を使用して、タンパク質消化物サンプルの高感度 LC/MS 分析を行いました。

キャピラリーカラムによる高感度分析

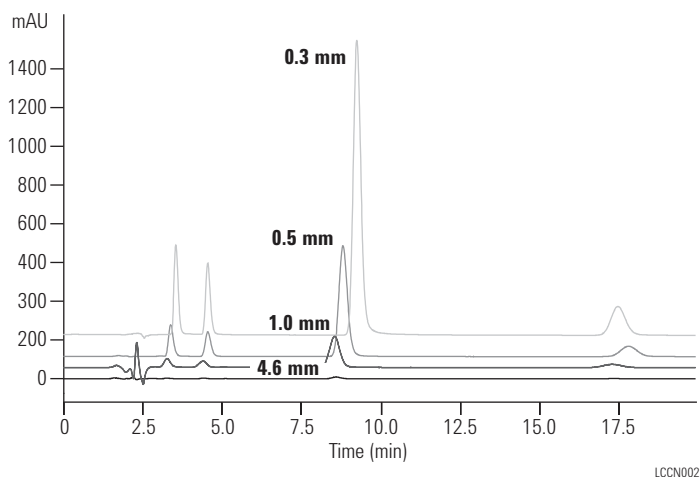
カラム: ZORBAX SB-C18
5064-8255
0.3 x 150 mm、5 μ m

カラム: ZORBAX SB-C18
5064-8256
0.5 x 150 mm、5 μ m

カラム: ZORBAX SB-C18
863600-902
1.0 x 150 mm、3.5 μ m

カラム: ZORBAX SB-C18
883975-902
4.6 x 150 mm、5 μ m

サンプル: ビフェニル 200 ng



サンプル量が限られたアプリケーションには、オンカラムでのサンプルの希釈を最小限に抑え、感度を高めることのできる寸法のキャピラリーカラムが必要です。この例では、0.3 mm キャピラリーを使用することで、標準的な 4.6 mm カラムの 100 倍の感度が得られています。アジレントのナノボア（内径 0.1 ~ 0.075 mm）カラムなら、サンプル量が非常に限られたアプリケーションで最大 2,000 倍の感度を達成できます。

ヒト血清：LC/MS による 1D ゲルバンドからの低濃度タンパク質の単離と同定

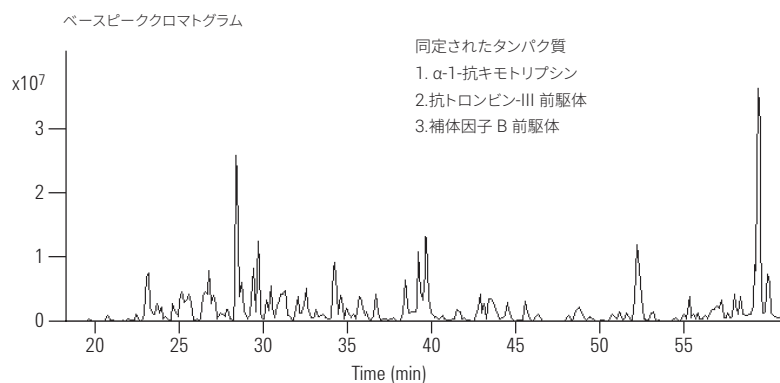
カラム： ZORBAX 300SB-C18
トラップ： 0.3 x 5 mm、5 μ m、5065-9913
分析： 0.3 x 150 mm、5 μ m、5064-8263

移動相： A：水 + 0.1 % ギ酸
 B：アセトニトリル + 0.1% ギ酸

流量： 6 μ L/min

グラジエント： 0 分で 3 %B
 5 分で 3 %B (ロード)
 50 分で 45 %B
 52 分で 80 %B
 57 分で 80 %B
 60 分で 3 %B

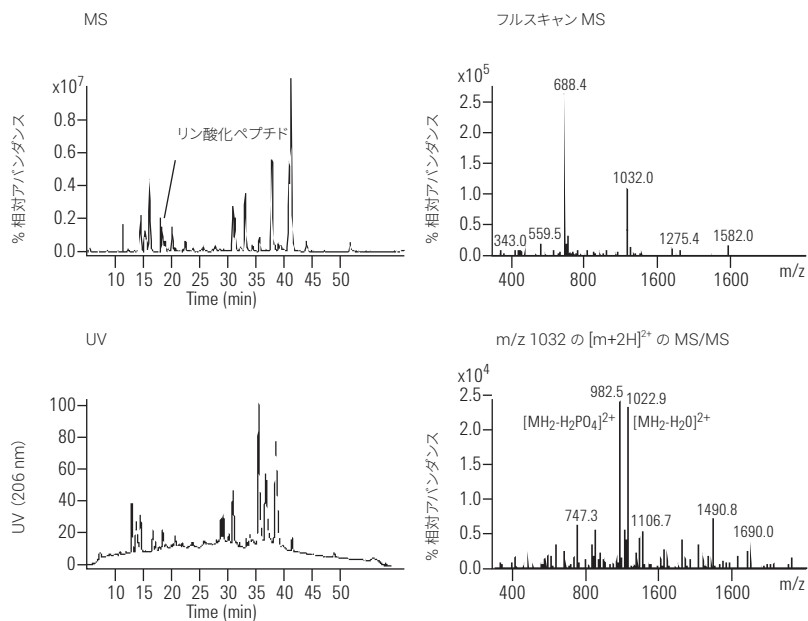
サンプル： 1D ゲルのバンドのゲル内消化物



ヒト血清のサンプル前処理：マルチプルアフィニティ除去カラム 4.6 x 100 mm (p/n 5185-5985) で主要血清タンパク質を除去
 次に、1D ゲルの消化を実施

キャピラリー LC カラムを用いた LC および LC/MS によるペプチドのリン酸化部位の決定

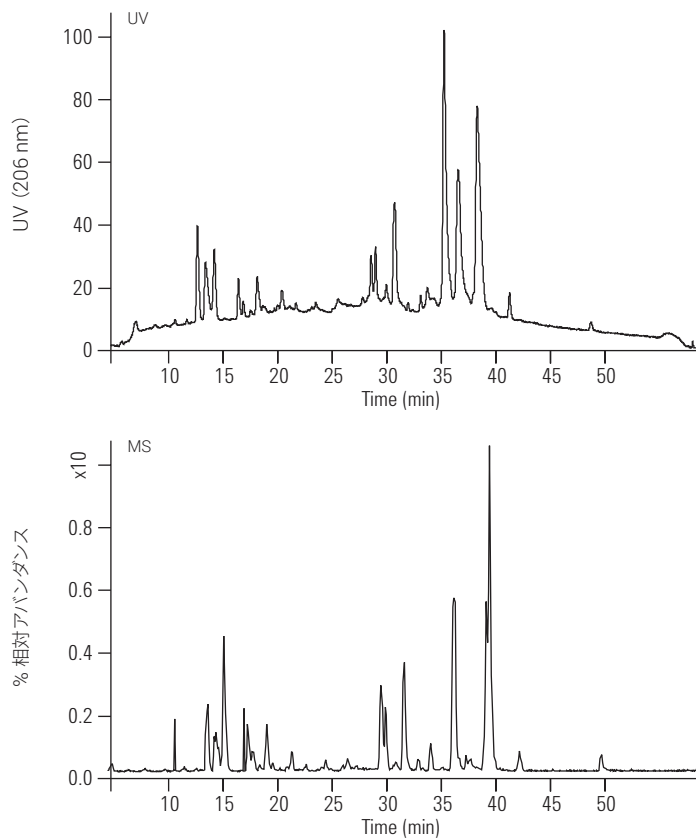
カラム:	ZORBAX 300SB-C18 5064-8268 0.5 x 150 mm、3.5 μm
移動相:	A: 水 + 0.1 % ギ酸 B: アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
流量:	5.5 μL/min
グラジエント:	50 分で B を 5 % から 55 % に増加、 55 ~ 57 分で B を 85 % まで増加
検出器:	UV、206 nm
MS 条件:	LC/MS: ポジティブイオン ESI と LC/MSD トラップ Vcap: 4,000 V ドライガス流量: 7 L/min ドライガス 温度: 250 °C ネブライザ: 15 psi キャピラリー出口電圧: 最大 50 V 累積時間: 300 ms 総平均数: 3 選択幅: 3 m/z フラグメンタ振幅: 1.0 V
サンプル:	ベータカゼイン消化物 100 nL (4 pmol)



LCBP037

UV および MS 検出を使用したキャピラリーカラムによる HPLC 分析

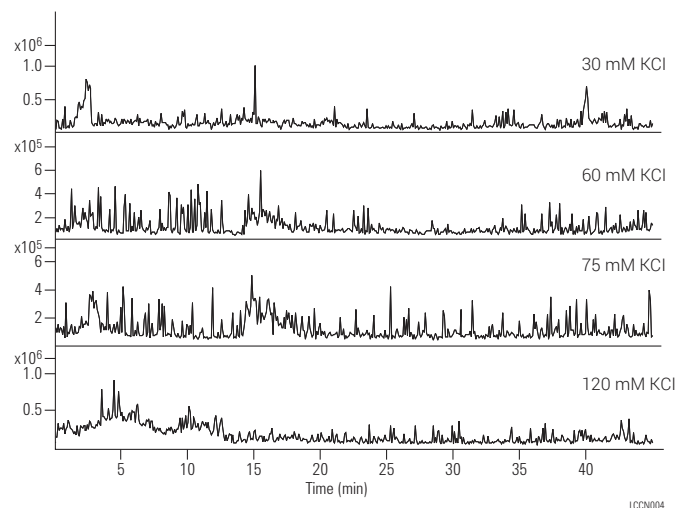
カラム：	ZORBAX 300SB-C18 5064-8263 0.3 x 150 mm、5 µm
移動相：	50 分で B を 5 % から 55 % に増加、55 ~ 57 分で B を 85 % まで増加 A：水 + 0.1 % 酢酸 B：アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
流量：	5.5 µL/min
検出器：	UV、206 nm
MS 条件：	LC/MS： ポジティブイオン ESI および LC/MSD トラップ、 Vcap 4,000 V
ドライガス流量：	7 L/min
ドライガス	
温度：	250 °C
ネブライザ：	15 psi
キャピラリー出口電圧：	50 V
最大累積時間：	300 ms
総平均数：	3
選択幅：	3 m/z
フラグメンタ振幅：	1.0 V
サンプル：	ベータカゼイン消化物 100 nL (4 pmol)



ZORBAX 300SB-C18 キャピラリーカラム (内径 0.3 mm) を使用して、タンパク質消化物を分離し、UV およびエレクトロスプレー MS により検出しました。その結果から、ペプチドフラグメントの同定には MS 検出が有効なことがわかりました。

ナノ HPLC カラムを用いた 2D HPLC による複雑なサンプル中のタンパク質の分析

1D カラム：	ZORBAX 300SB-C18 5065-9913 0.3 x 5 mm、5 μ m
2D カラム：	ZORBAX 300SB-C18 5065-9911 0.075 x 150 mm、3.5 μ m
移動相：	クォータリポンプ：3 % アセトニトリル:0.1 % 酢酸 ナノポンプ：A：水、0.1 % 酢酸、B：ACN、0.1 % 酢酸
流量：	クォータリポンプ：30 μ L/min ナノポンプ：300 nL/min
グラジエント：	クォータリポンプ：イソクラティック ナノポンプ：6 分 = 3 %B、 120 分 = 60 %B、125 分 = 80 %B、130 分 = 80 %B、 131 分 = 3 %B、140 分 = 3 %B
MS 条件：	イオン源：ナノ ESI、ドライガス流量：5 L/min、乾燥 ガス温度：225 °C イオントラップ：スキマ：1：35 V、キャピラリー出口オフセット： 115 V、オクタポール 1：12 V、オクタポール 2：3.5 V、トラップ駆動：80 V、 ICC：オン、平均数： 4、最大累積時間：150 ms、ターゲット 60,000、イオンモード ポジティブ、MS/MS モード
サンプル：	ウシ血清アルブミンのトリプシン消化物 容量：1 ~ 8 μ L 塩による段階的溶出：8 mL の 10 ~ 100 mM KCl (10 mM 刻み)、125 mM、150 mM、200 mM、300 mM、 500 mM、1 M



ウシ血清アルブミン (BSA) のトリプシン消化物。ベースピーククロマトグラムには、2D HPLC 分離により得られた特定の分画が示されています。各クロマトグラムは、各塩濃度で溶出した BSA のペプチドを濃縮し、逆相クロマトグラフィーで分析した結果です。

ZORBAX Bio-SCX シリーズ II

ZORBAX Bio-SCX シリーズ II カラムは、LC/MS によるペプチドおよびタンパク質の 2D 分離用に最適化されています。このカラムの充填剤は、3.5 μm の超高純度 ZORBAX シリカ粒子を基材とし、スルホン酸基で官能化した生体に優しいポリマーが結合されています。これにより、ペプチドおよびタンパク質の 2D 分析のイオン交換段階における保持力が高まり、良好なピーク形状が得られます。

HPLC カラムの仕様					
結合相	ポアサイズ	表面積	pH 範囲	結合官能基	最大圧力
ZORBAX Bio-SCX シリーズ II	300 Å	90 m ² /g	2.5 ~ 8.5	スルホン酸	350 bar



ナノカラム

小さいペプチドに対する保持力を向上

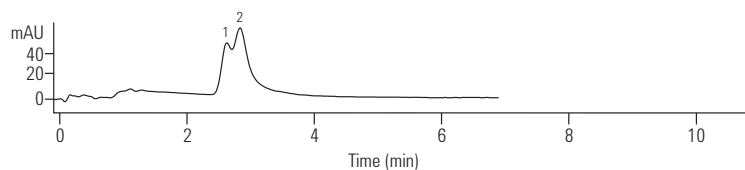
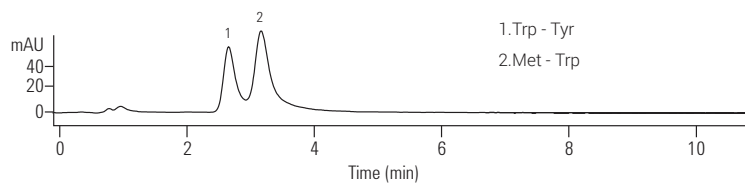
カラム: ZORBAX Bio-SCX シリーズ II
5065-9912
0.3 x 35 mm、3.5 µm

移動相: 95 % 40 mM NaCl、5 % ACN、0.3 % ギ酸

流量: 5 µL/min

検出器: UV、230 nm

サンプル: 合成ジペプチド



LCIE002

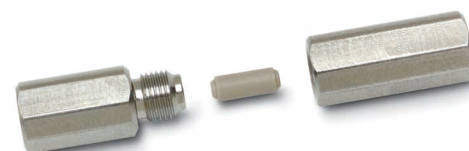
ZORBAX Bio-SCX シリーズ II カラムは、小さいペプチドを他の SCX カラムよりも強力に保持します。これらのカラムを 2D HPLC 分析に使用することで、親水性ペプチドフラグメントの分解能が向上し、より正確な同定を行います。

ZORBAX HPLC キャピラリーカラム (ガラスライニングステンレス)

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (mm)	300SB-C18	300SB-C8	300Extend-C18
キャピラリー	0.5 x 250	5	5064-8266		
キャピラリー	0.5 x 150	5	5064-8264		
キャピラリー RR	0.5 x 150	3.5	5064-8268		
キャピラリー	0.5 x 35	5	5064-8294		
キャピラリー RR	0.5 x 35	3.5	5065-4459		
キャピラリー	0.3 x 250	5	5064-8265		
キャピラリー	0.3 x 150	5	5064-8263		
キャピラリー	0.3 x 35	5	5064-8295		
キャピラリー RR	0.3 x 150	3.5	5064-8267	5065-4460	5065-4464
キャピラリー RR	0.3 x 100	3.5	5064-8259	5065-4461	5065-4465
キャピラリー RR	0.3 x 75	3.5	5064-8270	5065-4462	5065-4466
キャピラリー RR	0.3 x 50	3.5	5064-8300	5065-4463	5065-4467
交換用スクリーン、10 個			5065-4427	5065-4427	5065-4427

ZORBAX ナノ HPLC カラム (PEEK)

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7
ナノ RR	0.1 x 150	3.5	5065-9910	
ナノ RR	0.075 x 150	3.5	5065-9911	
ナノ RR	0.075 x 50	3.5	5065-9924	5065-9923
トラップ/ガード、5 個	0.3 x 5	5	5065-9913	5065-9914
トラップ/ガードハードウェアキット			5065-9915	5065-9915



ZORBAX 300SB-C18 トラップ/ガード、5065-9913

マイクロボア（内径 1.0 mm）カラム

- 少量サンプルでも高感度を実現
- LC/MS インターフェースとの互換性
- 豊富な種類の結合相
- シリカ系およびポリマー系粒子

MicroBore（内径 1.0 mm）カラムは、微量サンプルの分析に最適です。同じサンプル量と比較した場合、内径 2.1 mm カラムの 1/5 の検出下限を達成できます。この感度の向上が非常に重要な場合があります。マイクロボアカラムは、低流量（通常 50 μ L/min 程度）で使用します。そのため、一部の質量分析計など低流量を必要とする検出器や、キャピラリー LC システムを使用する場合に最適です。

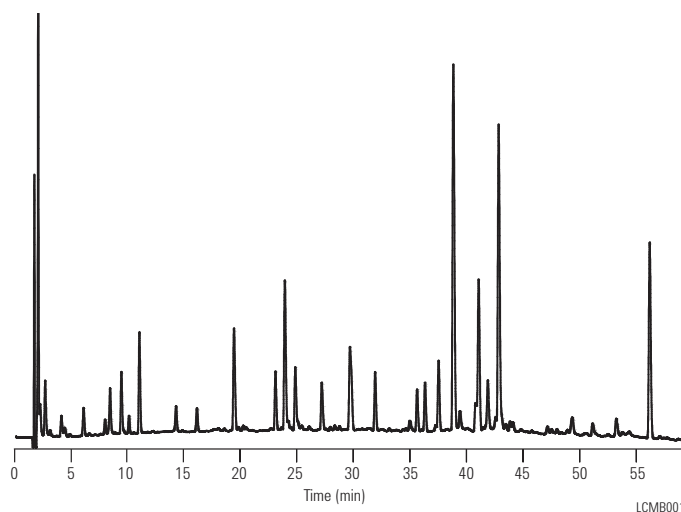
マイクロボアカラムは、UHPLC/HPLC マイクロボアシステムで使用することにより、最適な性能を発揮します。StableBond、300SB-C18、300SB-C8、Poroshell など、幅広い結合相を 400 bar までの圧力で使用できます。安定性の高いワイドボア粒子を必要とするアプリケーション用に、ポリマー系逆相カラム PLRP-S や、イオン交換カラム PL-SAX および PL-SCX もご用意しています。また、チューブ深さを調整可能なストップ付きガードカラムを使用することで、ゼロデッドボリューム接続を確実に行えます。



結合相が立体的に保護された 300StableBond

トリプシン消化物の分離

カラム：	ZORBAX 300SB-C18 863630-902 1.0 x 150 mm、3.5 μm
移動相：	グラジエント：60 分で B を 2 % から 60 % に増加 A：0.1 % TFA B：0.075 % TFA:80 % ACN
流量：	50 μ L/min
温度：	50 °C
検出器：	UV、215 nm
サンプル：	rhGH のトリプシン消化物 2 μ L



この例は、マイクロボアカラムによるトリプシン消化物の分離結果です。内径 1.0 mm のカラムで優れた感度と分解能が得られています。

マイクロボア HPLC による高感度ペプチド分析

カラム: PLRP-S 100 Å 5 μm
150 mm x 多様な内径

移動相: A : 0.01 M tris HCl, pH 8
B : A + 0.35 M NaCl, pH 8

流量: 1 mL/min

グラジエント: 直線、15 分で 20 % ACN, 0.1 % TFA から
50 % ACN, 0.1 % TFA へ

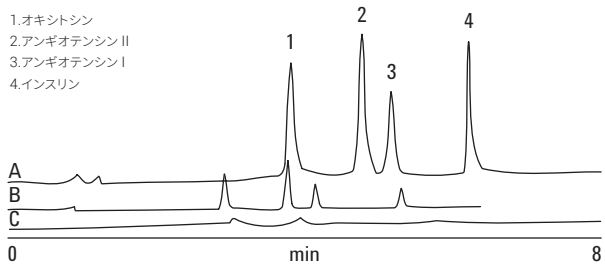
注入量: 0.5 μL

サンプル濃度: 0.25 mg/mL

検出器: UV, 220 nm

ピーク同定

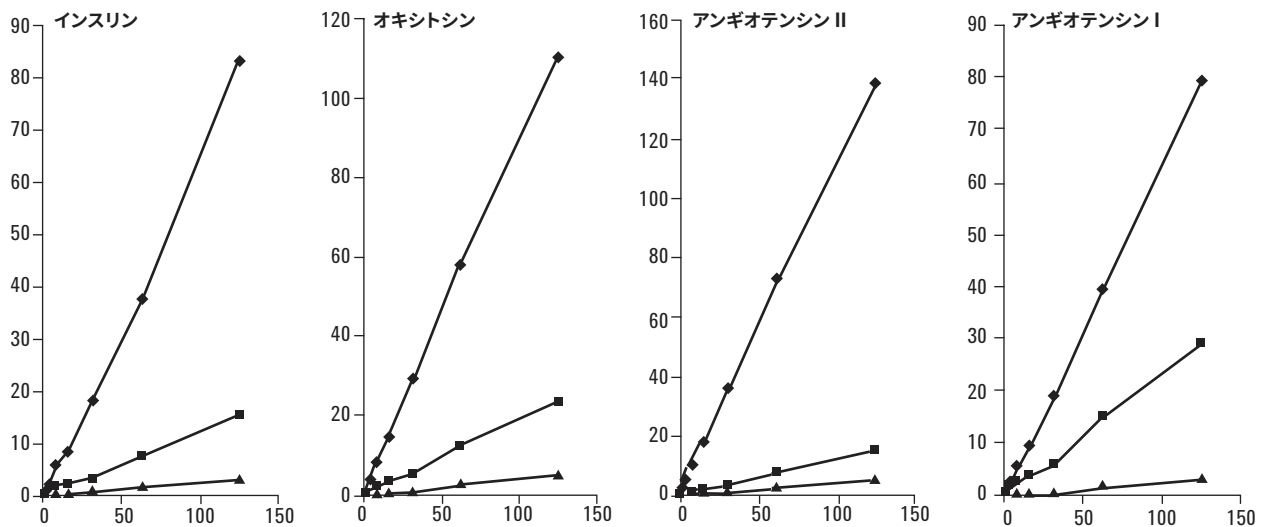
A. 内径 1.0 mm (流量 47 μL/min)
B. 内径 2.1 mm (流量 200 μL/min)
C. 内径 4.6 mm (流量 1 mL/min)



PLRP-S 100 Å 5 μm カラムによるペプチドの分離結果

ピーク同定

◆ 1.0 mm
■ 2.1 mm
▲ 4.6 mm



PLRP-S カラムによる検量線のデータポイントグラフ。カラム内径が小さいほど、検出下限が低くなり、より少量のサンプルを定量できるようになります。

マイクロボア (内径 1.0 mm)

説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (mm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7		
MicroBore	1.0 x 250	5	861630-902			
マイクロボア RR	1.0 x 150	3.5	863630-902	863630-906		
マイクロボア RR	1.0 x 50	3.5	865630-902	865630-906		
マイクロボアガード、3 個	1.0 x 17	5	5185-5920	5185-5920		
説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (mm)	Poroshell 300SB-C18	Poroshell 300SB-C8	Poroshell 300SB-C3	Poroshell 300Extend-C18
MicroBore	1.0 x 75	5	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
マイクロボアガード、3 個	1.0 x 17	5	5185-5968	5185-5968	5185-5968	
説明	サイズ (mm)	粒子径 (μm)	PLRP-S 100 Å USP L21	PLRP-S 300 Å USP L21	PLRP-S 1000 Å USP L21	PLRP-S 4000 Å USP L21
MicroBore	1.0 x 150	3	PL1312-3300			
MicroBore	1.0 x 50	8			PL1312-1802	PL1312-1803
MicroBore	1.0 x 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
MicroBore	1.0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
説明	サイズ (mm)	粒子径 (μm)	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
MicroBore	1.0 x 50	5	PL1351-1502	PL1351-1503	PL1345-1502	PL1345-1503

2D-LC

- 2つのオーソゴナルな LC 手法を 1 つのメソッドに統合
- UHPLC メソッドを凌ぐピークキャパシティ
- サイズ排除メソッドおよびイオン交換メソッドを MS に接続

生体分子は不均一で複雑なため、ターゲットのバイオ医薬品の同定および特性解析には、複数の LC 手法を使用する必要があります。親水性相互作用と逆相、カチオン交換と逆相等、オーソゴナルな 2 つの手法を 1 つのメソッドに統合すれば、卓越した分離能力を達成し、重要な品質特性の同定および分析を行えます。

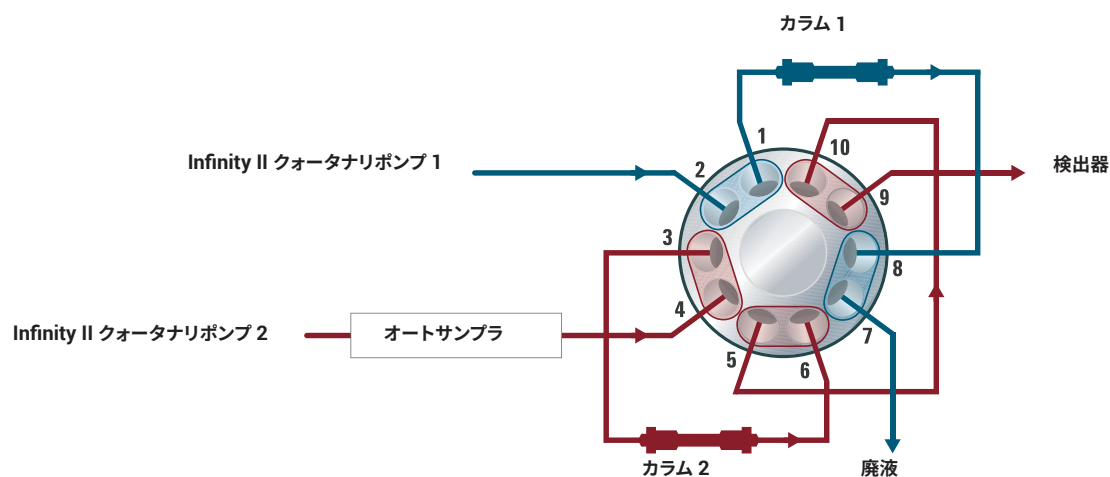
2D-LC は、Protein A でのモノクローナル抗体の分離により得られた分画の単純なオンライン脱塩から、親水性相互作用メソッドと逆相ペプチドマッピングメソッドを組み合わせたあらゆるペプチドフラグメント（親水性、糖、および疎水性ペプチドフラグメント）の特性解析まで、幅広いアプリケーションに応用できます。

2D-LC により分析時間を短縮し、データ生成/解析効率を最大限に高めることで、生産性を向上することができます。

- メソッドスカウティングおよびアプリケーションスイッチング
- オフラインカラム再生
- オンライン不純物分析
- ハートカット 2D-LC
- コンプリヘンシブ 2D-LC

オフラインカラム再生

イオン交換 LC を使用して確実に電荷変異体を分析するためには、徹底的なカラムのクリーンアップと平衡化が必要です。ただし、この作業には一定の時間がかかります。サンプルスループットを高めるためには、この作業時間を短縮することが不可欠です。その方法の 1 つが、オフラインカラム再生です。これにより、サイクル時間を 40 % も短縮できることが確認されています。



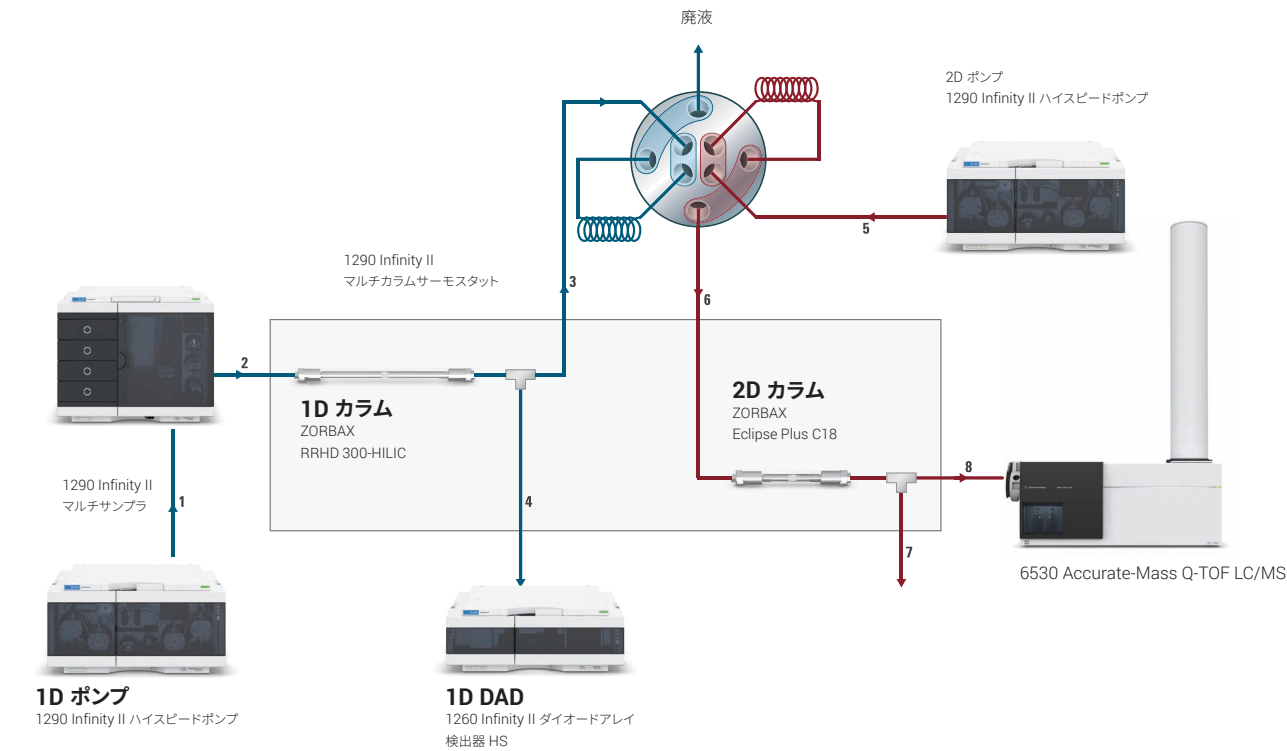
1260 Infinity II バイオイナート LC と 2 本の Bio MAb PEEK、2.1 x 250 mm、5 μ m カラムを使用して mAb の電荷変異体分析を行う場合にオフラインカラム再生に必要なバルブ構成の概略図

リテンションタイムと面積のカラム内 (n = 6) およびカラム間 (n = 12) 精度

	RT のカラム内 %RSD	面積のカラム内 %RSD	RT のカラム間 %RSD	面積のカラム間 %RSD
CV1	0.205	2.50	0.247	3.39
CV2	0.183	1.91	0.218	1.63
CV3	0.247	1.13	0.277	2.56
CV4	0.302	6.73	0.286	6.67
CV5	0.301	1.63	0.255	1.41
CV6	0.252	2.78	0.213	2.93

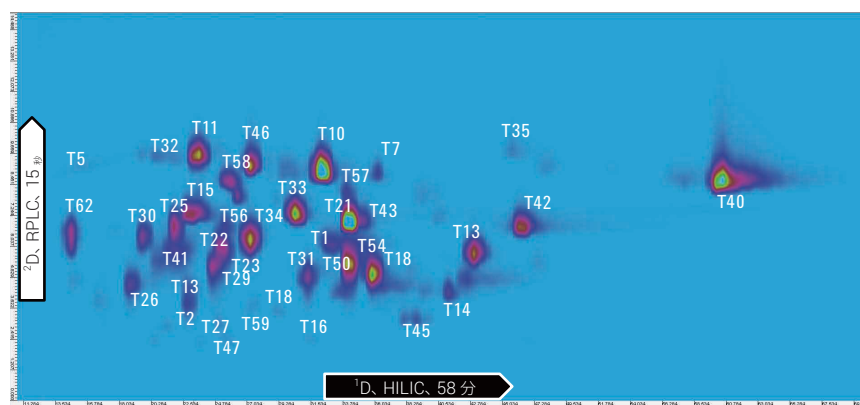
Bio MAb PEEK カラムのオフライン再生において、リテンションタイムと面積の良好なカラム内 (n = 6) およびカラム間 (n = 12) 精度が得られています。

コンプリヘンシブ 2D-LC



1	1D ポンプからオートサンブラ	キャリブレーションキャピラリー (G1312-67500)
2	オートサンブラから 1D カラム (1.6 μ L 熱交換器)	ステンレス、0.17 mm
3	ティ 1 から 2D-LC バルブ	ステンレス、0.12 x 200 mm
4	ティ 1 から 1D DAD	ステンレス、0.12 x 140 mm
5	2D ポンプから 2D-LC バルブ	ステンレス、0.17 mm
6	2D-LC バルブから 2D カラム (1.6 μ L 熱交換器)	ステンレス、0.12 x 270 mm
7	ティ 2 から廃液	ステンレス、0.12 x 340 mm
8	ティ 2 から検出器 (AJS イオン源または 2D DAD)	ステンレス、0.075 x 340 mm (5067-4783)

HILIC と RPLC-MS を使用したモノクローナル抗体消化物のコンプリヘンシブ 2D 分析とペプチドマッピングのための InfinityLab 2D-LC システムの構成



この図は、MS の総イオンカウントデータにもとづくトラスツズマップのトリプシン消化物の分析結果を表す LCxLC 等高線プロットです。この分析では、一次元目の HILIC と二次元目の RP からなる 2D により、良好な直交性が得られています。

アジレントは、幅広い結合相の多様なサイズのカラムを提供しています。ご希望のポアサイズ、粒子サイズ、結合相、およびカラムサイズのカラムが見つからない場合は、特定の性能基準を満たしたカラムの製造に関する豊富な専門知識を持つアジレントのカスタムカラムチームにお問い合わせください。

ヒントとツール

2D-LC の基礎については、2D-LC の入門書「Principles, Practical Implementation and Applications of Two-Dimensional Liquid Chromatography」(資料番号 **5991-2359EN**) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/2DLC-primer



精製 — 分取 HPLC

アジレントでは、生体分子の精製用に設計されたシリカ系およびポリマー系 HPLC カラムと充填剤を幅広く取り揃えています。μg および mg レベルのバイオ医薬品候補物質の精製用に最適化された粒径の小さい高効率の分取カラムの他、g、kg、数 kg レベルの API 精製用の開発およびプロセス用カラムに充填するための全多孔質バルク充填剤をご用意しています。

一部のカラムは、特に精製効率を重視して設計されています。この他、粒径の小さい分析カラムからフルスケールの API 製造へと容易にスケールアップできる製品もあります。表 1 に、分取カラム/充填剤のオプションと、それぞれで精製可能な生成物量を示します。



ポリマー系分取用 HPLC カラム

バイオ医薬品のライフサイクル		発見	開発	製造	
		μ mg		kg	数 kg
		高効率	g	ハイスループット	
逆相カラム	mRP-C18	➡			
	ZORBAX Prep HT		➡		
	300 Å StableBond				
	VariTide RPC		➡		
	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 1000 Å, 4000 Å				➡
イオン交換	Bio MAb		➡		
	Bio IEX		➡		
	PL-SAX			➡	
	PL-SCX			➡	
サイズ排除	Bio SEC-3		➡		
	Bio SEC-5				

アジレントの生体分子精製用カラムと充填剤 — クロマトグラフィーの種類、製品ファミリー、および精製スケール

精製カラムの選択

アプリケーション	技術	注意事項	アジレントのカラム
プロテオミクス	逆相カラム	プロテオミクスアプリケーションのスペシャリスト向け高回収率カラム。μg スケールの精製を最大限の回収率で行えるように設計されています。	mRP-C18
あらゆる生体分子	逆相カラム	高効率のシリカ系 300 Å 粒子。	ZORBAX PrepHT 300SB
合成ペプチド	逆相カラム	合成ペプチドの精製用に設計されたポリマー系充填剤。酸性、塩基性、疎水性、親水性のあらゆる合成ペプチドを精製可能な高効率のシングルカラムソリューションです。液相および固相合成により生成されるペプチドのサイズ範囲に対応しています。	VariTide RPC
あらゆる生体分子	逆相カラム	幅広いポアサイズと粒子サイズで構成される高品質のポリマー系逆相ファミリー。粒径の小さい分取カラムによるラボスケールでの効率的な精製から、より粒径の大きいカラムによるプロセススケールでの高収量の精製へのスケールアップまで対応できます。API を製造するために精製をスケールアップし、規制当局への書類提出が必要な場合は、PLRP-S をご使用ください。 <ul style="list-style-type: none"> 高効率の 3 μm および 5 μm 粒子 より大規模な低圧での精製に適した 8 μm、10 μm、10 ~ 15 μm、15 ~ 20 μm、30 μm、および 50 μm 粒子 	PLRP-S
モノクローナル抗体	イオン交換	非多孔質の弱カチオン交換カラム。	Bio MAb
あらゆる生体分子	イオン交換	非多孔質のイオン交換カラム。 SAX、WAX、SCX、および WCX 官能基により、酸性および塩基性分子の精製オプションを提供。ラボスケールでの分取効率を最大限に高める非多孔質の 5 μm 粒子。	Bio IEX
あらゆる生体分子	イオン交換	全多孔質の強アニオン交換カラム。 <ul style="list-style-type: none"> 高効率分離が可能な 5 μm 粒子 より大規模な低圧での精製に適した 8 μm、10 μm、および 30 μm 粒子 	PL-SAX
		全多孔質の強カチオン交換カラム。 <ul style="list-style-type: none"> 高効率分離が可能な 5 μm 粒子 より大規模な低圧での精製に適した 8 μm、10 μm、および 30 μm 粒子 	PL-SCX
あらゆる生体分子	サイズ排除	幅広いポアサイズのシリカ系 SEC 充填剤。 <ul style="list-style-type: none"> 高効率の 3 μm および 5 μm 粒子 100 ~ 2000 Å のポアサイズにより幅広いサンプル分子サイズに対応 	Bio SEC-3 および 5

ヒントとツール

詳細については、次の技術資料をご覧ください。

Biomolecule Purification (資料番号 **5990-8335EN**)

www.agilent.com/chem/jp

mRP-C18 高回収率タンパク質カラム

mRP（マクロ多孔性逆相）C18 高回収率タンパク質カラムは、免疫枯渇血清または血漿タンパク質などの複雑なタンパク質サンプルを高い回収率で高分解能分離、分画、および同時脱塩するように設計されています。

- マルチプルアフィニティ除去 LC カラムにより免疫枯渇血清で 95 ～ 99 % 以上のタンパク質サンプル回収率を達成
- タンパク質のクロマトグラフィー分解能を低下させることなく合計 380 µg までのタンパク質をロード可能
- タンパク質の強い吸着を低減または排除するように設計されたマクロ多孔性 C18 結合超高純度 5 µm シリカ粒子を充填
- 最大動作圧力 250 bar (4,000 psi)
- 水および一般的な有機溶媒を使用可能



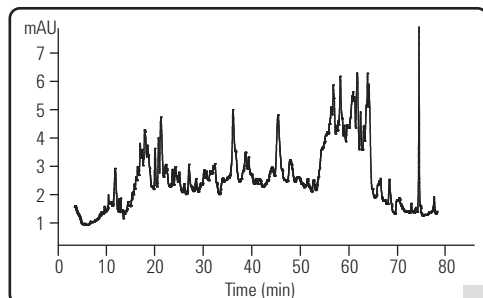
mRP-C18 高回収率タンパク質カラム、
4.6 x 50 mm、5188-5231

mRP-C18 高回収率タンパク質カラム

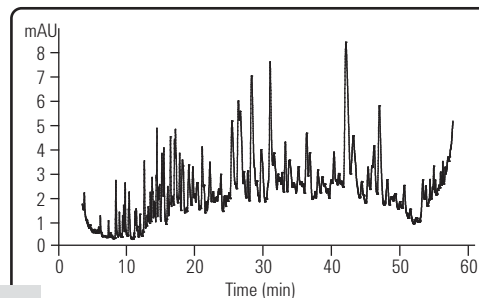
説明	タンパク質ロード量	部品番号
mRP-C18、0.5 x 100 mm	10 ng～5 µg	5188-6510
mRP-C18、2.1 x 75 mm	8～85 µg	5188-6511
mRP-C18、4.6 x 50 mm	40～380 µg	5188-5231

mRP カラムによる複雑なサンプルのタンパク質分画

mRP-C18、4.6 x 50 mm

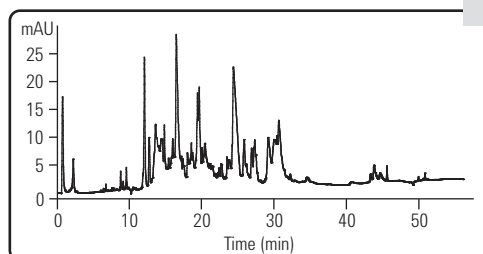


HeLa 細胞膜の分取

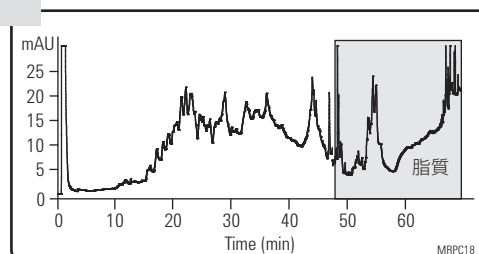


HeLa 細胞溶解液 (352 µg)

きわめて優れた回収率



「Top-6」除去後のヒト血清



ヒト脳膜脂質ラフトの分取 (500 µg)

ZORBAX PrepHT

- ZORBAX 相によって、分析から分取まで簡単にスケールアップ可能
- 2,000 mg までの高速分取分離
- 5 ～ 7 μm の粒子により高い効率と収量を達成
- 取り付けやすいフィンガータイト接続により、5,000 psi/350 bar までの圧力に対応
- 分取精製で分析相の選択性を維持

ZORBAX PrepHT カラムを使用すれば、高純度、高回収率、ハイスルーブットを容易に達成できます。StableBond 300Å、C18、C8、C3、CN など幅広い結合相を取り揃え、あらゆる条件下で最適な分解能とロード量を実現します。

ZORBAX PrepHT カラムには、5 μm および 7 μm 粒子が充填されており、きわめて高い分解能が得られます。この優れた分解能により、高いロード量で高純度の成分を高収量で分取できます。また、大きいカラム内径と高強度の ZORBAX 粒子により、100 mL/min までの流量に対応できるため、スルーブットが高まります。

ZORBAX PrepHT カラムは、分解能を低下させることなく、分析スケールから分取スケールにすばやくスケールアップできるように設計されています。7 μm という粒子サイズは、サイズの大きいカラム（内径 21.2 mm、長さ 150 mm 以上）での複雑な分離において、高い効率と高いロード量をバランスよく達成するためにアジレントが厳選したものです。



ZORBAX 300 Å StableBond
Prep HT カートリッジカラム

ZORBAX 300 Å StableBond

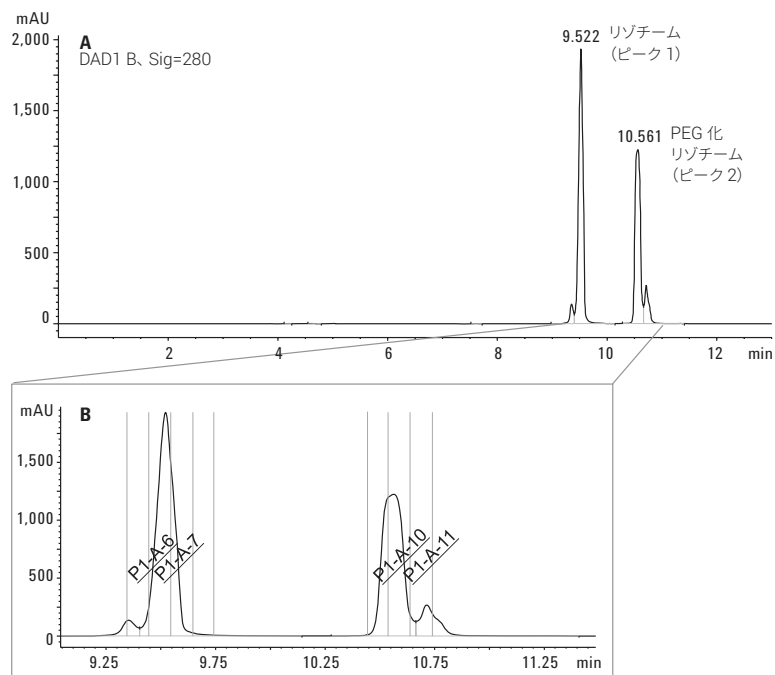
説明	サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN USP L10	300SB-C3 USP L56
PrepHT カートリッジカラム (エンドフィッティングキット 820400-901 が必要)						
PrepHT カートリッジ	21.2 x 250	7	897250-102	897250-106	897250-105	897250-109
PrepHT カートリッジ	21.2 x 150	7	897150-102	897150-106		897150-109
PrepHT カートリッジ	21.2 x 150	5	895150-902	895150-906		895150-909
PrepHT カートリッジ	21.2 x 100	5	895100-902	895100-906		895100-909
PrepHT カートリッジ	21.2 x 50	5	895050-902	895050-906		895050-909
PrepHT エンドフィッティング、2 個			820400-901	820400-901	820400-901	820400-901
PrepHT ガードカートリッジ、2 個	17.0 x 7.5	5	820212-921	820212-918	820212-924	820212-924
ガードカートリッジハードウェア			820444-901	820444-901	820444-901	820444-901

セミ分取 RP-HPLC による PEG リゾチーム反応混合物の分離

カラム: ZORBAX SB-C18
880975-202
9.4 x 250 mm、5 μm

A: ZORBAX セミ分取 300 SB-C18 カラムを使用したセミ分取 RP-HPLC
による PEG リゾチーム反応混合物の分離

B: フラクションコレクションを示す拡大図



分取・プロセス用 PLRP-S

- － 創薬段階から cGMP に準拠した数 kg レベルの製造まで対応できるため、メソッドの再開発が不要
- － 分離の化学的安定性、最適化、クリーニング、再生により、選択性が向上し、カラムの寿命が延長
- － 複数カラムを単一バッチで充填するため、システムのダウンタイムが短縮し、バリデーションコストが低減

堅牢なポリスチレン/ジビニルベンゼン粒子の PLRP-S 充填剤は、幅広いポアサイズを取り揃え、低分子から合成生体分子、巨大分子にいたる幅広い化合物の精製にご利用いただけます。熱安定性と化学的安定性を備えており、サンプル前処理、化合物溶出、カラム再生に極端な条件が必要な精製にも最適です。

精製のスループットを最大化するうえで、容量と分解能が重要なパラメータになります。ポアサイズの見込みが多く、さまざまな使用条件を選択できるため、最適なプロセスを得るための可能性が広がります。また、3 ～ 50 μm の幅広い粒子サイズが用意されており、 $\mu\text{g}/\text{mg}$ レベルの創薬段階から cGMP にもとづく数 kg レベルの製造へのスケールアップも可能です。さらに、化学的安定性に優れ（最大 1 M NaOH）、クリーニングと再生が可能のため、カラムを長期にわたって利用できます。PLRP-S の充填剤のバッチサイズは最大 600 L であり、複数のカラムに単一バッチの充填剤を充填できます。

アジレントでは、高品質の製品を継続的に提供するための取り組みの一環として、すべての製造を完全に文書化されたプロセスに従って行い、製造施設の監査を定期的に行っています。



分取・プロセス用 PLRP-S のアプリケーションガイド

アプリケーション	PLRP-S 充填剤のポアサイズ			
	100 Å	300 Å	1000 Å	4000 Å
合成生体分子、ペプチド、オリゴヌクレオチド	✓	✓		
遺伝子組み換え生体分子、ペプチド、タンパク質	✓	✓		
大型生体分子、抗体、DNA フラグメント			✓	✓
低分子、金属感受性など不安定な成分	✓			

UHPLC カラムの仕様

pH 範囲	1-14
緩衝液の成分	制限なし
有機溶媒濃度	1~100 %
最高温度	200 °C
最大圧力:	5~8 µm: 3,000 psi (210 bar)
	3 µm: 4,000 psi (300 bar)

PLRP-S 100 Å、4.6 x 50 mm による 25 mer のトリチルオフオリゴヌクレオチドの精製と分画の定量

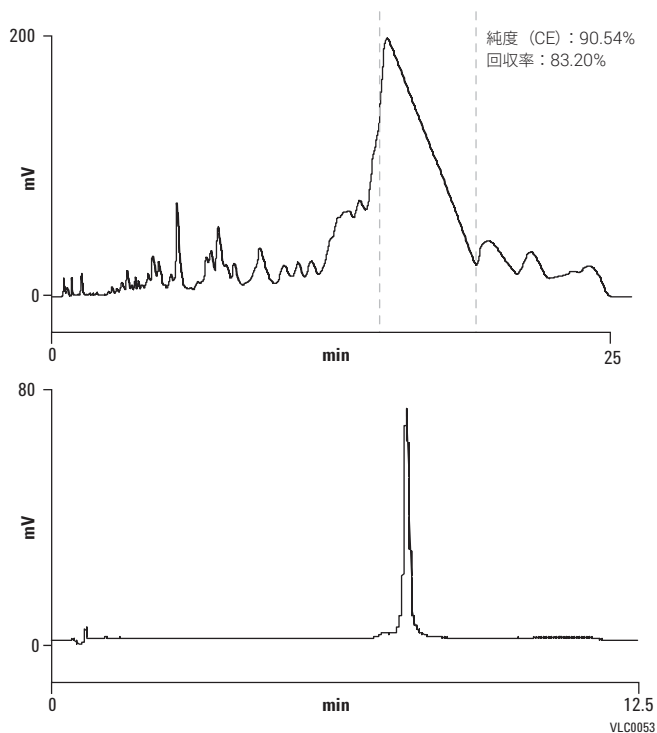
カラム： PLRP-S 100 Å
PL1512-1300
4.6 x 50 mm、3 μm

移動相： A：100 mM 酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA)
B：100 mM TEAA の 25:75 アセトニトリル:水溶液

流量： 1 mL/min

グラジエント： 0 分で 25 %B、2 分で 35 %B、
22.5 分で 45 %B、23 分で 45 %B、
23.05 分で 25 %B、26 分で 25 %B

温度： 80 °C



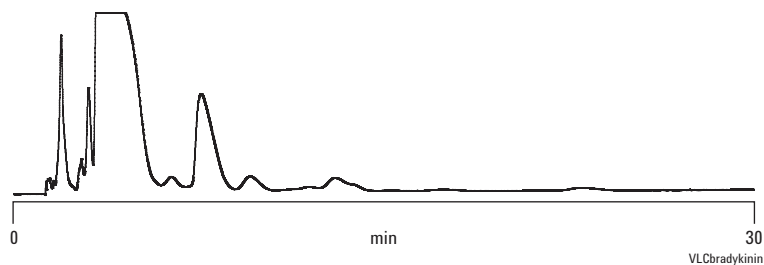
天然ブラジキニンの分取

カラム: PLRP-S 100 Å
PL1512-5100
4.6 x 250 mm、10 μm

移動相: 0.1 % TFA の 21 % ACN:79 % 水溶液

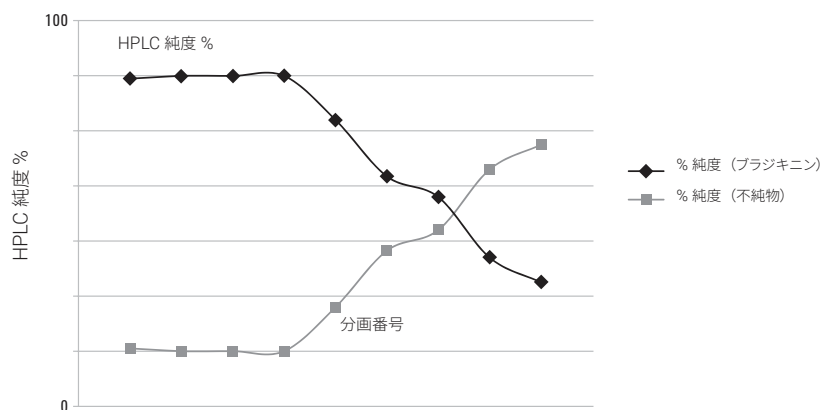
流量: 1 mL/min (360 cm/h)

サンプル: 30 μL (1.5 mg の天然ペプチドを含む)



分画分析 — 濃度過負荷条件下での精製

ピークにわたって収集された分画の HPLC 分析により、分画 1 ～ 4 には目的のペプチドのみが含まれ、分画番号が大きくなるほど重大な不純物の濃度が増加することがわかりました。高効率の PLRP-S カラムを使用することで、純度 91.7 % の天然ペプチドから純度 100 % の目的ペプチドを 97 % の回収率で精製することができました。詳細については、アプリケーションノート 5990-7736EN をご覧ください。



分取・プロセス用 PLRP-S

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
100 x 300	30			PL1812-3102	PL1812-3103
100 x 300	15-20	PL1812-6200	PL1812-6201		
100 x 300	10-15	PL1812-6400	PL1812-6401		
100 x 300	10	PL1812-6100	PL1812-6101		
100 x 300	8	PL1812-6800	PL1812-6801		
50 x 300	8	PL1712-6800	PL1712-6801		
50 x 150	30			PL1712-3702	PL1712-3703
50 x 150	15-20	PL1712-3200	PL1712-3201		
50 x 150	10-15	PL1712-3400	PL1712-3401		
50 x 150	10	PL1712-3100	PL1712-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
50 x 150	8	PL1712-3800	PL1712-3801		
25 x 300	15-20	PL1212-6200	PL1212-6201		
25 x 300	10-15	PL1212-6400	PL1212-6401		
25 x 300	10	PL1212-6100	PL1212-6101		
25 x 300	8	PL1212-6800	PL1212-6801		
25 x 150	30			PL1212-3702	PL1212-3703
25 x 150	10	PL1212-3100	PL1212-3101	PL1712-3102	PL1712-3103
25 x 150	8	PL1212-3800	PL1212-3801		
25 x 50	10			PL1212-1102	PL1212-1103
PLRP-S メソッド開発カラム					
4.6 x 250	30			PL1512-5702	PL1512-5703
4.6 x 250	15-20	PL1512-5200	PL1512-5201		
4.6 x 250	10-15	PL1512-5400	PL1512-5401		
4.6 x 250	10	PL1512-5100	PL1512-5101	PL1512-5102	PL1512-5103
4.6 x 250	8	PL1512-5800	PL1512-5801		
4.6 x 150	30			PL1512-3702	PL1512-3703
4.6 x 150	15-20	PL1512-3200	PL1512-3201		
4.6 x 150	10-15		PL1512-3401		
4.6 x 150	10	PL1512-3100	PL1512-3101	PL1512-3102	PL1512-3103
4.6 x 150	8	PL1512-3800	PL1512-3801		

PLRP-S 充填剤バルク

粒子サイズ (μm)	容量	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
50	1 kg	PL1412-6K00	PL1412-6K01	PL1412-6K02	
	100 g	PL1412-4K00	PL1412-4K01	PL1412-4K02	
30	100 g			PL1412-4702	PL1412-4703
15~20	1 kg	PL1412-6200	PL1412-6201		
	100 g	PL1412-4200	PL1412-4201		
10~15	1 kg	PL1412-6400	PL1412-6401		
	100 g	PL1412-4400	PL1412-4401		
10	1 kg	PL1412-6100	PL1412-6101		
	100 g	PL1412-4100	PL1412-4101	PL1412-4102	PL1412-4103
8	1 kg	PL1412-6800	PL1412-6801		

カスタムカラムとバルク充填剤のご注文

上記の表に、ご希望のポアサイズ/粒子サイズとカラム寸法のカラムまたは必要量のバルク充填剤がない場合は、カスタムオーダープロセスについてお近くのアジレント営業所にお問い合わせください。

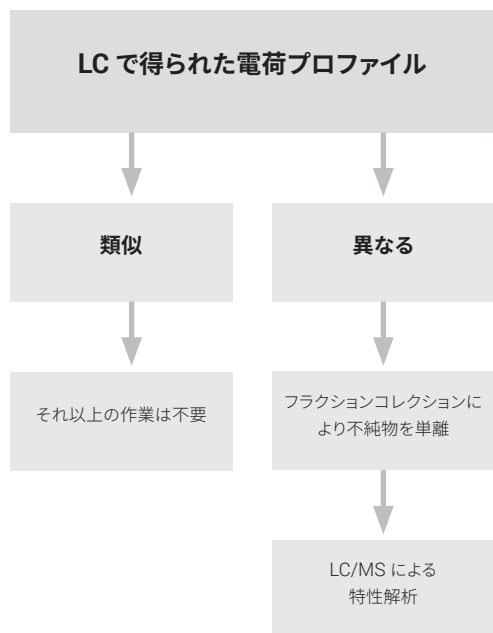
Bio MAb および Bio IEX

分析・高効率分取用カラム

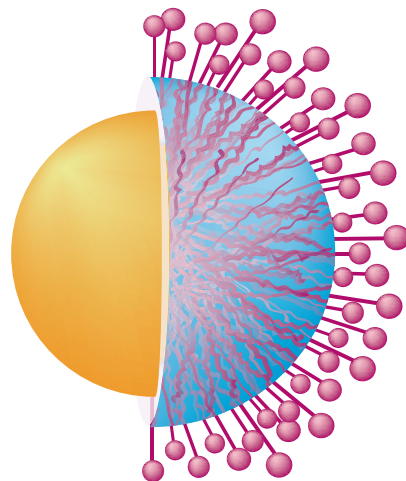
- 物質移動を抑え、関連性の高い不純物も高効率で分離できる非多孔質粒子
- 5種類の官能基：mAb に最適化された SAX、WAX、SCX、WCX、および CX により、サンプルロードが増加しても優れた分解能を発揮
- 同じ 5 μm 粒子で分析スケールからセミ分取、分取スケールにスケールアップ可能

粒子の親水性外層により、非特異的な相互作用が低減され、高いサンプル回収率が得られます。

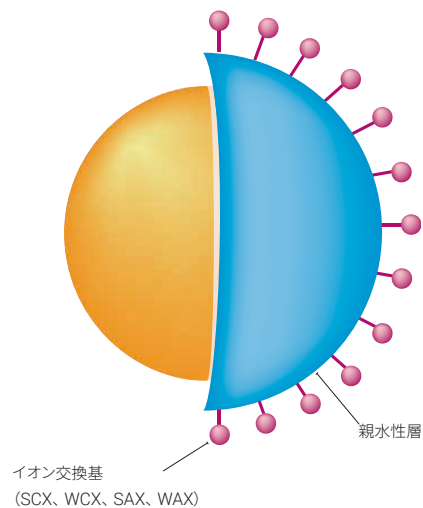
分析、セミ分取、および分取に同じ 5 μm 粒子のカラムを使用できるため、バイオ医薬品のプロセス開発時に予測外の電荷変異体が確認された場合も、すばやく精製して特性解析と同定を行います。



Bio MAb 粒子



Bio IEX 粒子



Bio MAb HPLC カラム

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	部品番号
21.2 x 250	5	5190-6885
10 x 250	5	5190-6884

Bio IEX HPLC カラム、ステンレス

サイズ (mm)	粒子径 (μm)	Bio SCX 部品番号	Bio WCX 部品番号	Bio SAX 部品番号	Bio WAX 部品番号
21.2 x 250	5	5190-6879	5190-6881	5190-6883	5190-6877
10 x 250	5	5190-6878	5190-6880	5190-6882	5190-6878

ヒントとツール

Agilent BioHPLC カラムは、InfinityLab クイックコネクトフィッティングおよびメタルフリーのバイオフィナートキャピラリーで接続できます。
 詳細については、www.agilent.com/chem/5991-7469EN をご覧ください。

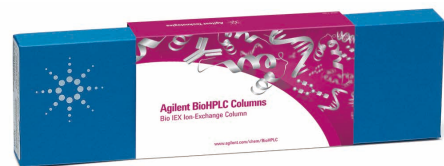
分取・プロセス用 PL-SAX および PL-SCX

- 多様なアプリケーションで幅広い pH 範囲にわたるイオン交換精製が可能
- HPLC の流量と迅速な平衡化により精製サイクル時間を短縮
- 大きいポアサイズが物質移動を高め、高速高分解能の精製を実現

これらの堅牢で高強度のイオン交換充填剤は、非常に高い親水性を備え、生体分子の精製用に設計されています。PL-SAX および PL-SCX の全ポリマー系充填剤は、化学安定性と熱安定性に優れ、多様な HPLC 条件で使用できます。強イオン交換基が化学的安定性の高いポリマーに共有結合しているため、幅広い pH 範囲でイオン交換精製を行えます。この優れた安定性により、カラムのクリーニングやクリーンアップも可能です。また、熱安定性が高いことから、ターゲット成分の精製に変性条件や安定化/可溶化剤を使用することもできるため、自己相補的配列を持つ合成オリゴヌクレオチドの精製にも対応できます。

1000 Å および 4000 Å のワイドポア充填剤はどちらも、機械的安定性と堅牢性に優れています。幅広い直線速度で使用でき、希釈液と洗浄サイクルの高速ロードにも対応できます。HPLC の流量と迅速な平衡化により、精製サイクル時間が短縮されます。

動的軸圧縮 (DAC) カラムハードウェアでは、簡単な充填操作により、再現性と寿命に優れた高効率のカラムを作成できます。1000 Å のポアサイズは、大容量の精製に適しています。また、高い物質移動性を備えた 4000 Å のギガポア粒子は、大型の生体分子や高速、高分解能の精製用です。

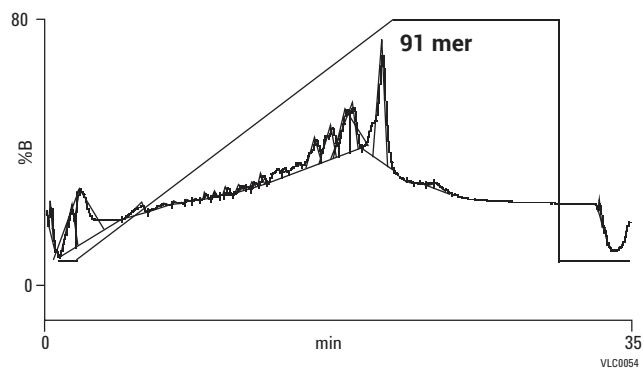


UHPLC カラムの仕様

	PL-SAX	PL-SCX
マトリックス	ポリマー系	ポリマー系
ポアサイズ	1000 Å, 4000 Å	1000 Å, 4000 Å
粒子サイズ	10 µm, 30 µm	10 µm, 30 µm
充填剤の形状	球状	球状
結合官能基	4 級アミン	スルホン酸
最大圧力	3,000 psi	3,000 psi
温度安定性	80 °C	80 °C
pH 範囲	1-14	1-14
使用可能な溶出液	すべての陰イオン交換緩衝液	すべての陽イオン交換緩衝液
充填剤密度	0.39 g/mL	0.39 g/mL

大型のオリゴヌクレオチドの精製

カラム： PL-SAX 1000 Å, 8 µm
移動相： A : 93 % 100 mM TEAA, pH 7.7 % ACN
 B : 93 % 100 mM TEAA, 3.24 M 酢酸
 アンモニウム、pH 7、7 % ACN
流量： 1.5 mL/min
グラジエント： 20 分で B を 0 % から 100 % に増加
温度： 60 °C
検出器： UV、290 nm



アミログルコシダーゼを含む培地ろ過液の分取分画

カラム： PL-SAX 4000 Å
PL1551-1803
4.6 x 50 mm、8 µm

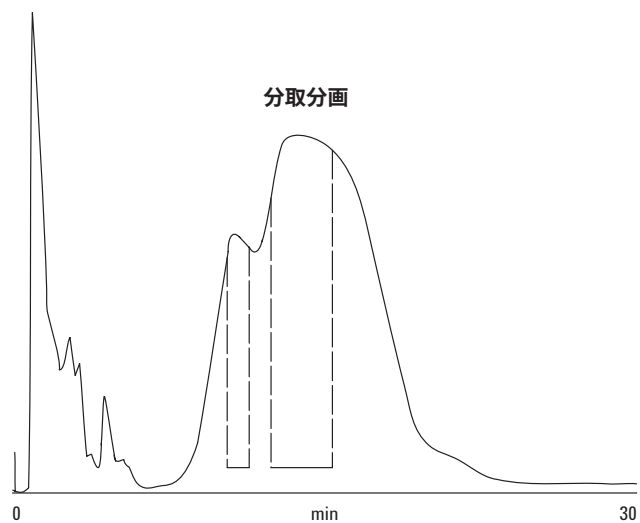
移動相： A：10 mM tris HCL、pH 8
B：A + 500 mM NaCl、pH 8

流量： 4.0 mL/min

グラジエント： 直線、2 分で B を 0 % から 100 % に増加

温度： 60 °C

検出器： UV、280 nm



分取・プロセス用 PL-SAX および PL-SCX

仕様	粒子サイズ (μm)	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
50 x 150	30	PL1751-3702	PL1751-3703	PL1745-3702	PL1745-3703
50 x 150	10	PL1751-3102	PL1751-3103	PL1745-3102	PL1745-3103
25 x 150	30	PL1251-3702	PL1251-3703	PL1245-3702	PL1245-3703
25 x 150	10	PL1251-3102	PL1251-3103	PL1245-3102	PL1245-3103
25 x 50	10	PL1251-1102	PL1251-1103	PL1245-1102	PL1245-1103
7.5 x 150	8	PL1151-3802	PL1151-3803		
7.5 x 50	8	PL1151-1802	PL1151-1803	PL1145-1802	PL1145-1803
PL-SAX および PL-SCX メソッド開発カラム					
4.6 x 250	30	PL1551-5702	PL1551-5703	PL1545-5702	PL1545-5703
4.6 x 250	10	PL1551-5102	PL1551-5103	PL1545-5102	PL1545-5103
4.6 x 150	30	PL1551-3702	PL1551-3703	PL1545-3702	PL1545-3703
4.6 x 150	10	PL1551-3102	PL1551-3103	PL1545-3102	PL1545-3103



分取・プロセス用 PL-SAX および PL-SCX カラムとバルク充填剤

PL-SAX および PL-SCX 充填剤バルク

粒子サイズ (μm)	容量	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å	PL-SCX 1000 Å	PL-SCX 4000 Å
30	100 g	PL1451-4702	PL1451-4703	PL1445-4702	PL1445-4703
10	100 g	PL1451-4102	PL1451-4103	PL1445-4102	PL1445-4103

カスタムカラムとバルク充填剤のご注文

上記の表に、ご希望のポアサイズ/粒子サイズとカラム寸法のカラムまたは必要量のバルク充填剤がない場合は、カスタムオーダープロセスについてお近くのアジレント営業所にお問い合わせください。

ペプチドの精製

VariTide は、コスト効率に優れた合成ペプチド生成ソリューションです。このカラムでは、コストと効率を両立しながら、 μg スケールから g スケールまでの大量の合成ペプチドを精製することができます。VariTide は、多種類におよぶ少量のペプチドを短時間で製造しなければならない場合に最適です。



VariTide RPC カラム

合成ペプチド用 VariTide RPC カラム

- 1 つのカラムで幅広い合成ペプチドに対応
- 1 および 2 インチの分取カラムでも、小さい粒子サイズにより最大限の効率を達成
- 1 および 2 インチの分取カラムにバルク充填剤を充填することで、mg から g レベルの精製が可能

VariTide RPC カラムと充填剤は、VariPep ペプチドソリューションの製品です。一般的なメソッドでコスト効率よく合成ペプチドの分離と生成を行う場合におすすめのオプションです。

合成ペプチド用 VariTide RPC カラム

サイズ (mm)	部品番号
21.2 x 250	PL1E12-5A05
10.0 x 250	PL1012-5A05
4.6 x 250	PL1512-5A05

VariTide RPC バルク充填剤

説明	部品番号
100 g	PL1412-4A05
1 kg	PL1412-6A05

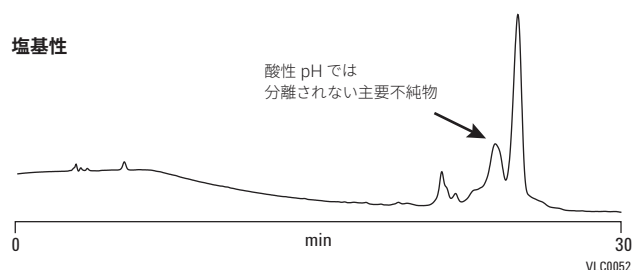
天然ペプチドのスクリーニング

カラム：	VariTide RPC PL1512-5A05 4.6 x 250 mm
移動相：	酸性 A：0.1% TFA 95% 水溶液：5% ACN B：0.1% TFA 50% 水溶液：50% ACN 塩基性 A：5% ACN、95% 20 mM 炭酸アンモニウム、pH 9.5 B：50% ACN、50% 20 mM 炭酸アンモニウム、pH 9.5
流量：	1.0 mL/min (360 cm/h)
グラジエント：	30 分で B を 0% から 100% に増加
検出器：	UV、220 nm

酸性



塩基性



VariPure IPE

- － 充填済みで優れた利便性
- － イオンペア試薬を除去して生産性を向上
- － 高性能・低コストで優れた効率を実現

VariPure IPE は、重炭酸イオンを対イオンとして持つポリマー系の 4 級アミン樹脂です。トリフルオロ酢酸 (TFA)、ギ酸、酢酸などの酸性イオンペア試薬の除去用に設計されています。VariPure IPE では、高性能で経済的な酸除去充填剤を、便利な充填済み SPE カラムとしてご利用いただけます。粒子サイズ、容量、およびカラム形状は、滞留時間を十分に確保し、自然落下によってイオンペア試薬が効果的に抽出されるように考慮されています。酸に不安定なペプチドでは、イオンペア剤を除去することで HPLC 後のワークアップ中のペプチドの酸分解を防ぎ、精製物の収量が向上します。

VariPure IPE

ロード	対イオン除去能力	容量	部品番号
100 mg/3 mL チューブ	0.1 % TFA で約 5 mL	50 個	PI3540-d603VP
500 mg/6 mL チューブ	0.1 % TFA で約 25 mL	50 個	PI3540-C603VP
1 g/20 mL チューブ	0.1 % TFA で約 50 mL	25 個	PI3540-P603VP
25 g			PI3549-3603VP

Load & Lock 分取用 HPLC カラム

アジレントは、ラボスケールの幅広い Load & Lock カラムと可動式充填ステーションを提供しています。お客様が高効率の分取カラムをすばやく簡単に充填できるように設計されており、医薬品成分、ペプチド、および天然物の開発アプリケーションに最適です。Load & Lock カラムは、生産性を最大限に高めるために、独自の流体/サンプル分布システムを備えています。これにより、充填剤の表面全体にサンプルが効率的に拡散し、カラムの性能が高まります。

- 卓越した性能：独自の流量分布システムにより高品質の結果を達成
- 優れた柔軟性：同じ可動式充填ステーションで動的軸圧縮（DAC）または静的軸圧縮（SAC）により 1 インチ、2 インチ、3 インチの Load & Lock カラムに充填可能
- 使いやすさ：カラムの充填または充填剤除去が数分で完了
- 最大限の可動性：カラムと充填ステーションをホイール付きベースにまとめていつでも簡単に移動可能

DAC および SAC のデュアルモード充填フォーマットにより、簡単な操作で高性能のカラムを確実に作成できます。

アジレントのラボスケールの Load & Lock カラムは、充填剤の優れた安定性と高度な流量分布を兼ね備え、最大限のスピード、柔軟性、使いやすさで最高品質の精製を実現します。

Load & Lock 充填ステーションは、圧縮空気のみで動作します。電源が不要なため、危険な環境用に選択したあらゆる種類の溶媒や溶液を安全に使用することができます。クイックリリース式のシングルボルトクランプにより、充填剤の充填および除去作業をわずか数分で簡単に行えます。



Load & Lock 分取用 HPLC カラム

説明	ウォータージャケット	サイズ (mm)	部品番号
Load & Lock カラム	なし	27.0 x 500	PCG93LL500X25
	あり	27.0 x 500	PCG93LL500X25WJ
	スペア部品キット		PCG931AAKIT
可動式充填ステーション (空気駆動油圧式)			PCG93LLSTAND123

Bio SEC

サイズにもとづいて精製

- － 6 種類のポアサイズにより、幅広いバイオ医薬品にわたるサイズ分離が可能
- － 3 μm および 5 μm の分析カラムを同じ粒子でラボ分取スケールにスケールアップ可能
- － 薄い親水性ポリマー層により非特異的な相互作用を抑え、良好なピーク形状と高いサンプル容量を提供

これらのシリカ系 SEC 充填剤は、HPLC の圧力および流量条件下で高分解能分離を実現するようにポアサイズとポア容積が最適化されています。3 μm 粒子には、100 Å、150 Å、300 Å のポアサイズがあり、ラボ分取スケールでの分取効率を最大限に高めます。一方、5 μm 粒子では、より大型の生体分子や複合体の分画に適した幅広いポアサイズを取り揃えています。

Bio SEC-3 HPLC カラム: ペプチドおよびタンパク質の高速分離

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33
21.2 x 300	3	5190-6850	5190-6851	5190-6852
分取用ガードカラム				
21.2 x 50	3	5190-6854	5190-6855	5190-6856

Bio SEC-5 HPLC カラム: 生体分子のサイズ排除分離

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	Bio SEC-5 100 Å USP L33	Bio SEC-5 150 Å USP L33	Bio SEC-5 300 Å USP L33	Bio SEC-5 500 Å USP L33	Bio SEC-5 1000 Å USP L33	Bio SEC-5 2000 Å USP L33
21.2 x 300	5	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
分取用ガードカラム							
21.2 x 50	5	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6874	5190-6875



アジレントのソリューション

40 年以上にわたる絶え間ない技術革新により、あらゆる分析結果を支援

アジレントは、化学分析の生産性の向上から、真空システム、複雑な生体系の解明を促進するワークフローソリューションまで、幅広い分野にわたり革新的なソリューションを提供しています。お客様が新たなアプリケーションや承認済みメソッドをいち早く取り入れることができるよう、また統合型ワークフローソリューションにより得られる正確で包括的なデータをもとに的確な判断を下し、求める結果を迅速に手にすることができるように、お客様を支援しています。

アジレントは長い期間にわたってお客様のサポートに全力で取り組んできました。今後も絶え間ない技術革新により、お客様にさらにメリットを感じていただけるよう、アジレントは努力していきます。



アカデミア

アジレントは、国境や科学的専門分野を越えて達成してきたことを通じ、研究者が研究を推進し、その分野で重要な貢献者となり、成功を収められるよう、支援を続けていきます。



地球化学・鉱業・金属

主要成分または微量成分を測定する場合も、金、銀、および白金元素の測定やめっき液の分析、地球化学マッピングを行う場合も、使いやすく、信頼性の高いアジレントの分析機器があれば、高度に精製されたきわめて分析困難なサンプルにも対応できます。



生物製剤・バイオシミラー

生物製剤は、健康促進のための大きな可能性を秘めています。この重要な薬効分類が、これまでにない医学上のニーズに対応するために、治療用タンパク質および抗体の承認数は世界中で増え続けています。



国土安全保障

化学兵器剤（CWA）、生物兵器剤（BWA）、毒性産業用化学物質（TIC）の検出や、食品、空気、土壌、および水のモニタリングのニーズを満たす、スピード、柔軟性、信頼性を兼ね備えたソリューションが、アジレントにはあります。



細胞代謝

多くの細胞プロセスを理解するためには、細胞代謝を解明することが不可欠です。アジレントのソリューションがあれば、生細胞内の代謝をリアルタイムに解析し、生理学的な関連データを最大限に引き出すことができます。



材料試験と研究

アジレントのソリューションを使用することで、最終製品の不要な臭気の性質と原因を突き止め、複合物中の微結晶の不規則性を特性解析し、金属合金中の微量不純物を定量することができます。



臨床研究

臨床研究において、MS 分析が有効なツールとして活用されるようになっています。その威力を、業界をリードするアジレントの LC/MS、GC/MS、および ICP-MS 機器や、RapidFire および自動サンプル前処理システムを通して、研究に活かすことができます。



エネルギーと化学

アジレントでは、お客様のニーズに応じたカスタムメソッドやカスタムソリューションも提供しています。業界の厳格な規制項目を満たしながら、生産性と収益を最大限に高めることができます。



環境分析

アジレントには、信頼性の高い効率的な環境分析と法規制に関する専門知識があります。その深い知識を廃水中の汚染物質の測定、飲料水の純度測定、室内空気質の測定、自然災害や人災への対処、新規汚染物質の同定にお役立ていただけます。



食品検査と農業

食品産業および農業では、感度と生産性に優れた分析ソリューションがこれまで以上に求められています。アジレントの機器、システム、および消耗品は、食品生産チェーンにわたって活用されています。アジレントは、最新の要件に適合したシステムとアプリケーションを開発しています。



法医学

毒物の検査、薬物のスクリーニング、麻薬の分析、さらに事件現場での爆発性残留物の調査においても、業界をリードするアジレントの堅牢な機器があれば、数千種類の物質を確認、定量することができます。



ゲノミクス

遺伝子発現の使用、クローニングおよび定量 PCR、比較ゲノムハイブリダイゼーションによるコピー数多型の検出、ヒトエクソームの選択による対象領域のシーケンシングのどれを行う場合も、お客様の研究に必要な革新的で信頼性の高いソリューションが、アジレントにはあります。



メタボロミクス

アジレントのメタボロミクスソリューションは、多様な研究、分析中毒学、環境分析、農業、バイオ燃料の開発、および栄養学に活用されています。その結果を遺伝子発現やプロテオミクス研究と組み合わせることで、生物学的機序を包括的に解明することができます。



プロテオミクス

プロテオミクスは、タンパク質の構造および機能と、複雑な生体系におけるその相互作用を研究する分野です。タンパク質分析には多くの課題が伴います。プロテオミクス研究の目標を達成するためには、正確で再現性の高い結果が迅速に得られる包括的で最適化された使いやすいワークフローが必要です。



半導体・電子材料

アジレントの分析機器は、表面金属抽出 (SME) によるシリコンウエハの分析や、太陽電池 PV シリコン、高純度プロセス薬品、超純水、有機溶媒、およびフォトレジストの分析など、半導体産業の幅広いサンプルの微量元素分析において最高レベルの性能を発揮します。



低分子医薬品

医薬品業界では、ビジネス、サイエンス、規制に対する要求が年々高まっており、絶えず難問に直面しています。オーダーメイド医療から CRO まで、医薬品を市場に送り出すまでの今日のプロセスは、10 年前のものとは大きく変わりました。



特殊化学製品

アジレントには、機器、アクセサリ、サポート、および消耗品のポートフォリオに加え、幅広い分野にまたがる大規模なチャネルパートナーのネットワークがあります。これは、お客様が直面する可能性のあるどんな測定上の課題も解決に導くことができるということです。



真空ソリューション

お客様の生産性を高める信頼性の高いソリューションを提供するためには、お客様の真空ニーズを理解することが不可欠です。アジレントは、確かな科学的専門知識と創造力を活かし、お客様が望むカスタムソリューションをお客様とともに開発します。

Agilent CrossLab サービス

稼働時間を最大化する総合サポート

業界最高レベルを誇る Agilent CrossLab サービスのエキスパートにお任せいただくことで、機器の性能を最高の状態でご使用いただくことができます。テクノロジーリフレッシュ、アプリケーションコンサルティング、修理、点検、コンプライアンス検証、トレーニングなど、お客様のニーズに応じたサービスも提供しています。詳細については、アジレントにお問い合わせください。

Agilent CrossLab サービスプラン

機器の修理費用とダウンタイムを最小化するアジレントのサービス契約

現代のラボは複雑な課題に直面しており、真のサービスパートナーによる支援が必要不可欠です。Agilent CrossLab サービスプランは、お客様のラボの生産性を最大化し、日々の作業を円滑に遂行できるようお手伝いします。ラボに導入されている機器に関わらず、お客様のニーズや予算にあわせて最適なサポートをご利用いただけます。



Agilent サービス ギャランティ

アジレントのサービス契約の対象となっている機器に不具合が生じた場合、アジレントはその修理または交換作業を無償で実施します。

お客様のラボの運営効率を最大限に保つために、アジレントは献身的に取り組んでいます。

アジレントコンプライアンスサービス

非常に厳しい要件にも対応できる機器の適格性評価

エンタープライズエディションのコンプライアンスサービスは、ラボ全体の適格性評価コンプライアンス対応を簡素化します。このサービスは、ISO や規制当局などの規制に準拠することが求められているラボで世界的に使用されています。エンタープライズエディションでは以下のことが可能になります。

- 複数のプラットフォームに渡ってプロトコルを自動化することで適格性評価を効率化し、効率を高めると同時に規制関連リスクを最小化
- お客様のすべての機器で利用できる堅牢なテスト設計により、コンプライアンス業務を標準化
- お客様ごとの要件に応じてテストを追加、削除、変更
- コンピュータにより共通フォーマットで生成される改ざん不可のレポートにより、スタッフによる確認時間を短縮

Agilent University

成功のために必要な知識を習得

スキルは、機器の稼働時間やラボの生産性、分析の精度に直接影響をおよぼしますが、高いスキルを維持するのは容易ではありません。Agilent University では、初心者から上級者まで、あらゆるレベルのスタッフが、決められた教育コースを通して必要な知識を包括的に学ぶことができます。



Agilent CrossLab：「見えない価値」を「目に見える成果」へ

Extended Service

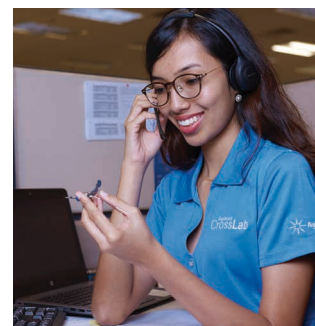
アジレントバリュープロミスでは、最低 10 年間にわたる機器の使用と、製造終了から 7 年間にわたる修理部品の保有を保証します。修理部品の保有期間終了後も、CrossLab 拡張サービスを通して、旧式の機器に対する診断、修理、メンテナンス、教育サービスを引き続き変わらぬ品質でご利用いただけます。CrossLab 拡張サービスは、アジレントのエンジニアが最新のツール、手順、およびアジレント純正部品を使用して実施します。

詳細については、お近くのアジレント販売店またはサポート担当者にお問い合わせください。

お客様第一のテクニカルサポート

ハードウェア、ソフトウェア、アプリケーション、機器の修理、またはトラブルシューティングに関する質問にアジレントの技術者がお答えします。長年にわたるラボ経験を持つアジレントのテクニカルサポート担当者が、深い知識と経験にもとづいてお客様をサポートします。

本カタログ掲載の製品に関するご質問は、担当営業またはアジレントの販売店にお問い合わせください。ホームページでも役立つ情報を提供しています。



アジレントコミュニティ

つながり、手を取り合い、視点を共有

アジレントコミュニティは、他の研究者とのアプリケーションに関する共同作業、アジレント製品についての議論、分析に関する詳細なコンテンツの参照に最適な場所です。詳細情報：community.agilent.com

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
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. 2019
Printed in Japan, June 11, 2019
5994-0974JAJP