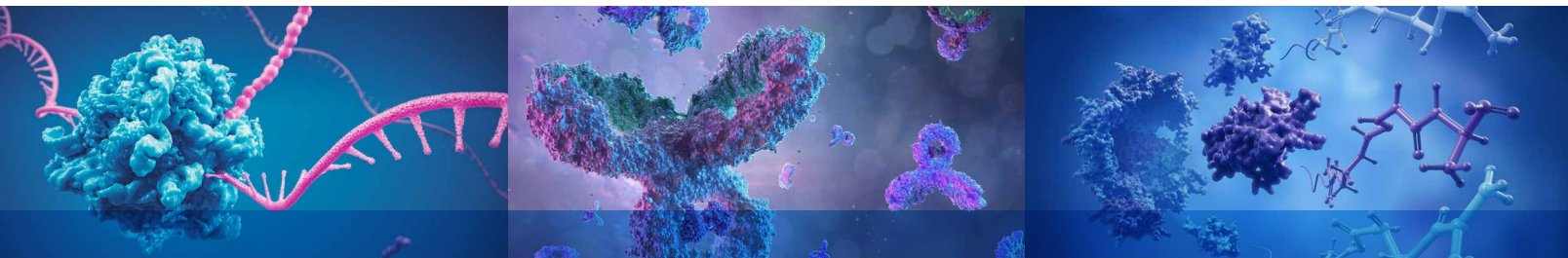


Agilent BioHPLC カラムと消耗品

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も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」が優れた成果を生み出した例については、ホームページをご覧ください。www.agilent.com/crosslab

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

1 バイオカラム選択ガイドライン	5	5 ペプチドのマッピングと分析	60
進化し続ける生物製剤の特性解析という課題	5	アミノ酸配列、翻訳後修飾、および合成関連の不純物を正確に判断	60
生体分子とは	6	AdvanceBio ペプチドマッピング	61
バイオカラムとは	7	CrossLab リアルストーリー	63
カラム選択フローチャート	8	アジレントのペプチド品質管理用標準試料	65
アデノ随伴ウイルス (AAV) 分析	9	AdvanceBio ペプチドプラス	65
		製品の詳細情報	71
2 生体分子の分離	11	6 電荷変異体の分析	72
タンパク質の分離	11	タンパク質およびその他の荷電分子の精製	72
グリカン分離	13	IEX による電荷変異体の分析	72
ペプチド分離	13	Bio MAb HPLC カラム	74
アミノ酸および培地の分析	14	Bio IEX HPLC カラム	79
アミノ酸	14	PL-SAX 強アニオン交換カラム	84
アデノ随伴ウイルス (AAV)	15	PL-SCX 強カチオン交換カラム	87
DNA および RNA オリゴヌクレオチドの分離	16	バイオモリスイオン交換 HPLC カラム	88
		製品の詳細情報	90
3 バイオ医薬品分析のための機器	17	7 凝集およびフラグメントの分析	95
アジレントが提供する包括的なワークフローソリューション	17	生体分子の凝集とフラグメンテーションの正確な測定	95
1260 Infinity II バイオイナート LC システム	17	アプリケーションに適した SEC カラムの選択	95
1260 Infinity II Prime Bio LC システム	17	AdvanceBio SEC	97
1290 Infinity II Bio LC システム	18	CrossLab リアルストーリー	98
1290 Infinity II Bio 2D-LC システム	18	Bio SEC	104
1260 Infinity II Bio-SEC システム	19	PROTEOMA カラム	108
1260 Infinity II マルチ検出器 GPC/SEC システム	19	MAB	109
1290 Infinity II Bio 分析スケール LC 精製システム	20	SEC のタンパク質標準	110
1260 Infinity II Prime Bio 分析スケール LC 精製システム	20	製品の詳細情報	114
Load & Lock 分取用 HPLC カラム	21	8 グリコシル化の特性解析	117
6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム	22	N-グリカンのサンプル前処理	118
6230B 飛行時間型 (TOF) LC/MS	22	AdvanceBio シアル酸のプロファイリングと定量	120
MassHunter BioConfirm ソフトウェア	23	Glycobiology 標準およびライブラリ	121
OpenLab ソフトウェアスイート	24	糖鎖生物学酵素	122
InfinityLab LC 消耗品	25	AdvanceBio Glycan マッピングカラム	123
		親水性ペプチドと糖ペプチドの分析	127
4 クロマトグラフィーを使ったインタクトタンパク質分析	26	製品の詳細情報	129
逆相および疎水性相互作用		9 抗体価測定	134
インタクトまたはサブユニットレベルでのタンパク質の不純物分離に		バイオモリス HPLC カラム	134
必要な選択性と分離能	26	堅牢で確実な抗体価測定	139
逆相	26	製品の詳細情報	141
逆相分離用カラムの選択肢	27	10 細胞培地とアミノ酸の分析	142
疎水性相互作用クロマトグラフィー	27	アジレントの細胞培地分析ソリューション	143
親水性相互作用液体クロマトグラフィー	27	AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)	144
AdvanceBio RP-mAb	29	AdvanceBio アミノ酸分析標準およびキット	145
PLRP-S	33	AdvanceBio MS スペントメディア	146
AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ	37	製品の詳細情報	149
ZORBAX 300 Å StableBond	38		
ZORBAX 300 Å Extend-C18	45		
Poroshell 300	47		
ZORBAX 300 Å HILIC	50		
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	52		
AdvanceBio HIC	52		
製品の詳細情報	55		

(続く)

目次 (続き)

11 タンパク質除去	151	14 メソッド開発のガイドライン	181
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	151	一次構造の分析メソッド	181
マルチプルアフィニティ除去システム	152	逆相 LC/MS メソッド	183
マルチプルアフィニティ除去システムスタータキット	153	電荷変異体の分析メソッド	184
製品の詳細情報	154	Agilent Buffer Advisor ソフトウェアによる電荷変異体の分析メソッド	186
		凝集およびフラグメントの分析メソッド	187
12 オリゴヌクレオチド	156	オリゴヌクレオチド分析	189
はじめに	156	アデノ随伴ウイルス (AAV) 分析	191
DNA および RNA オリゴヌクレオチドのカラムの選択	157	グリカンおよび親水性/糖ペプチド分析	193
イオンペア逆相分離	158	抗体価の測定と細胞培地の最適化メソッド	194
強アニオン交換	164	高感度キャピラリーカラムのメソッド	195
製品の詳細情報	166		
		15 アジレントのソリューション	196
13 ベクターベースの医薬品分析	171		
インタクトベクターから 1 つのアミノ酸の修飾までの特性解析	171	16 アジレントのサービスとサポート	200
カプシドタンパク質の同定確認	172		
アデノ随伴ウイルスの空の AAV カプシド/フル AAV カプシドの分析	175		
ベクターベースの治療薬の凝集体分析	177		
製品の詳細情報	180		

バイオカラム選択ガイドライン

進化し続ける生物製剤の特性解析という課題

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も調査の対象です。アジレントは、主要な特性解析ワークフローで完全かつ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。

生物製剤の特性解析をシンプルにするアジレントのソリューション

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。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 などがあります。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。

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。

1 バイオカラム選択ガイドライン

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、アミノ酸や低分子脂質、さらに 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。ならびに HPLC と UHPLC によるペプチドマッピング用カラム。

アミノ酸

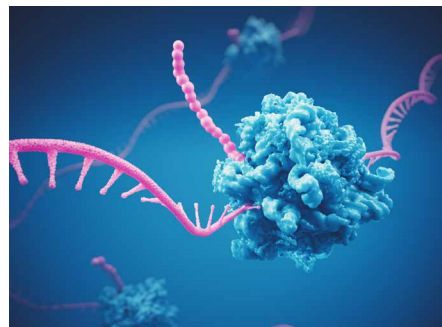
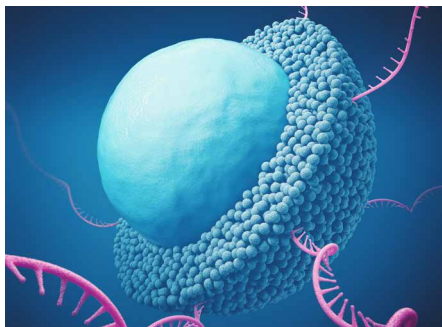
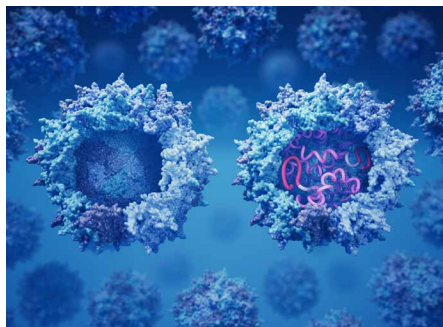
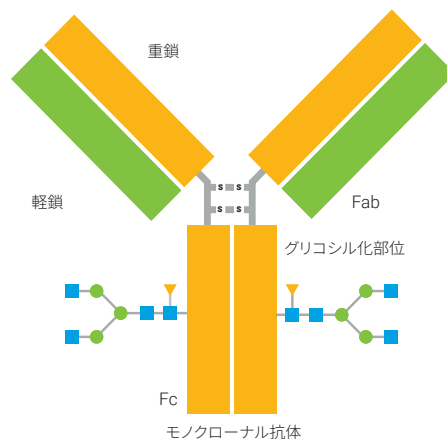
AdvanceBio AAA カラムにより、24 種類のアミノ酸について高効率の分析ソリューションを提供。通常の実験時間は 75 mm カラムで 14 分、150 mm カラムで 24 分です。

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に対応。さらに、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。

アデノ随伴ウイルス (AAV)

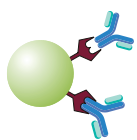
一本鎖 DNA ゲノムをカプセル化する 20 面体のタンパク質の殻からなる、大きな分子複合体。製品全体の品質と安全性を確保するためには、タンパク質カプシドとカプセル化された DNA それぞれに、専用の分析技術が必要。



バイオカラムとは

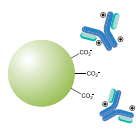
バイオクロマトグラフィーカラム（バイオカラム）は、ペプチドとタンパク質、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチド、およびその他の生体分子と複合体などの生体化合物の分離に使用される液体クロマトグラフィーカラムです。バイオカラムは生体分子の分析に特化した大きいポアサイズで設計されているため、より大きな分子サイズにも対応できます。メディアは成分の非特異的な結合を最小化できるように設計されているため、回収率が向上します。分離メカニズムを選択して、生物学的機能を維持して分析中に生理活性が失われないようにするか、あるいはこれを一次構造特性解析用に意図的に変性させるかします。

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。例えば、次のような手法です。



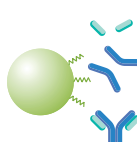
抗体価の測定

Agilent 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。



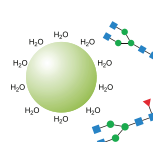
電荷変異体の分析

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。



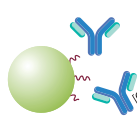
逆相によるインタクトおよびサブユニットの純度

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。



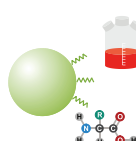
糖鎖分析

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。



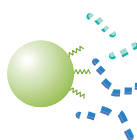
疎水性相互作用によるインタクト分析

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。



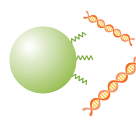
アミノ酸と細胞培地の分析

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。



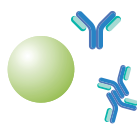
ペプチドマッピング

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。



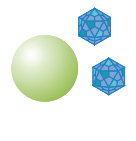
オリゴヌクレオチド分析

DNA/RNA 分析用の堅牢で効率性の高いソリューションです。



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。



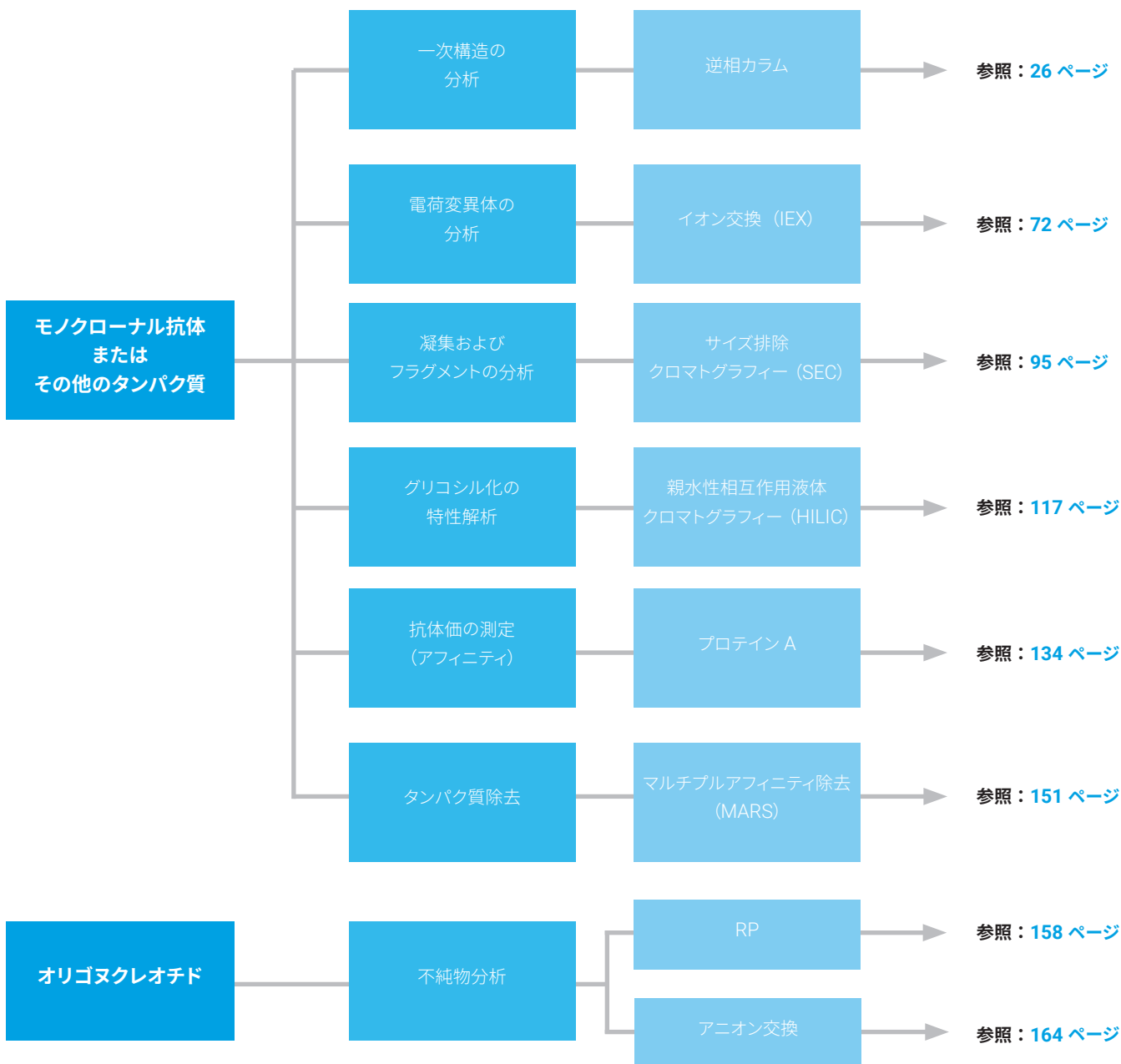
アデノ随伴ウイルス（AAV）

インタクトカプシドタンパク質と翻訳後修飾（PTM）向けに最適化された逆相ソリューション。フルカプシドと空カプシドの強アニオン交換分析、および凝集体とフラグメントの分析のための SEC として使用できます。

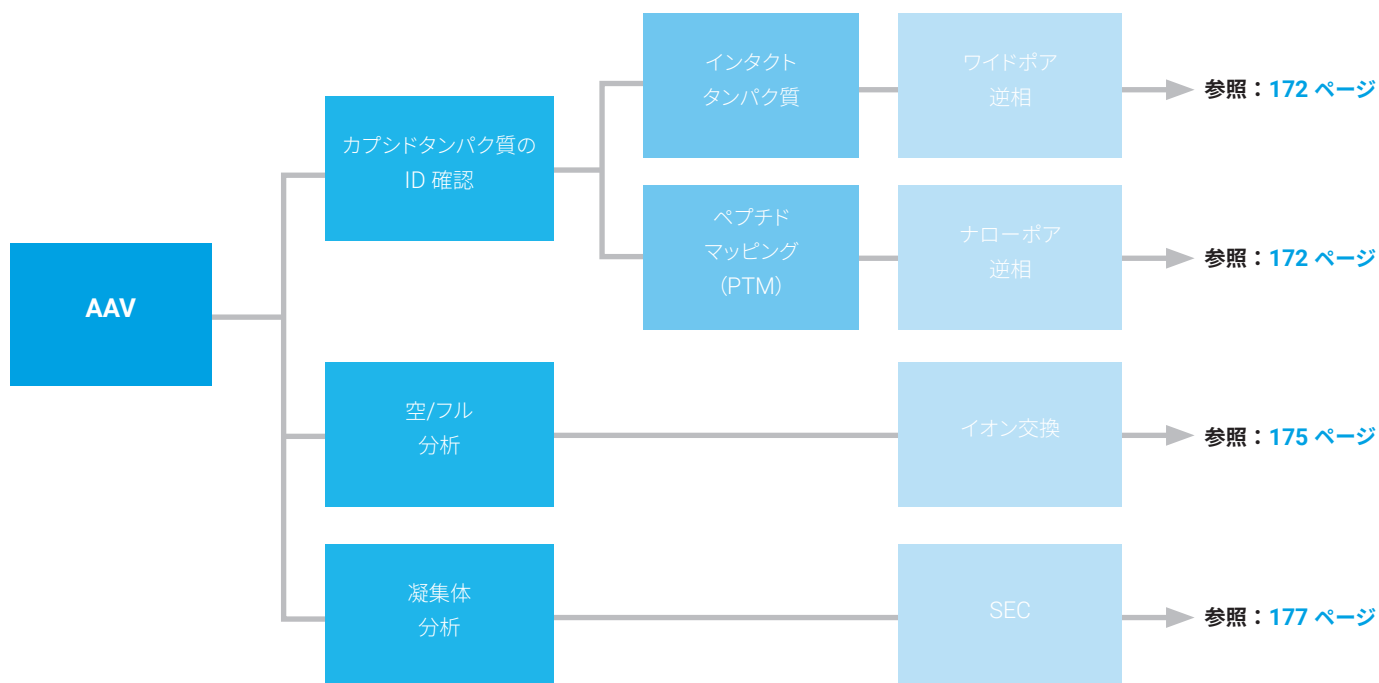
カラム選択フローチャート

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の選択は次の手順で行います。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。



アデノ随伴ウイルス (AAV) 分析



ヒントとツール

アジレントコミュニティは、質問への回答や実践的なアドバイスをアジレントのエキスパートや他のユーザーから受けられる、貴重なオンラインリソースです。生体分子の分離に関するベストプラクティスやトラブルシューティングのヒントを見つけるには、このコミュニティで「AdvanceBio Blog」を検索してください。

1 バイオカラム選択ガイドライン

Agilent AdvanceBio カラム

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。



ヒントとツール

お客様の特性解析のニーズに適した AdvanceBio ファミリーのカラムおよび各種ツールについては、[ホームページ](#)をご覧ください。

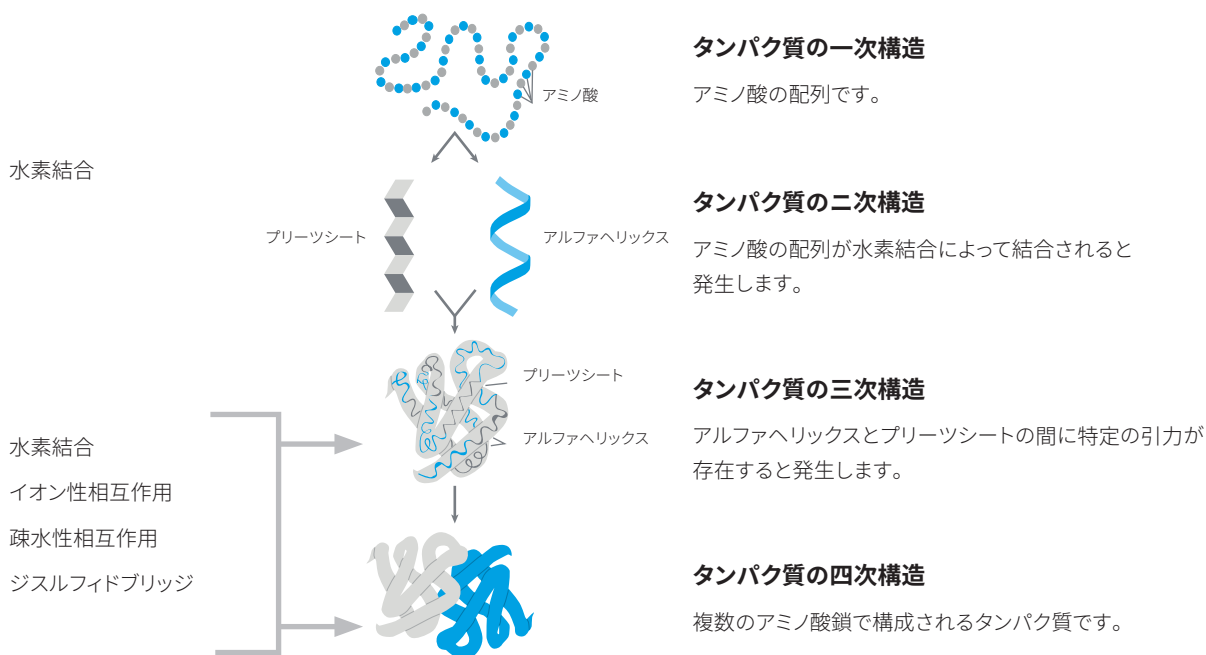
生体分子の分離

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のまま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。



さまざまなレベルのタンパク質構造の概略図

2 生体分子の分離

タンパク質の分離での注意事項

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ヒドリル還元剤や、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	手法	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ります。
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、逆相カラムにオーソゴナルな情報が提供されます。
抗体価測定	アフィニティ分離	バイオモノリスプロテイン A バイオモノリスプロテイン 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。

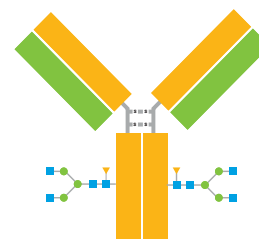
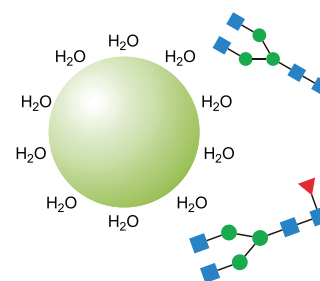
グリカン分離

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コ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。



ペプチド分離

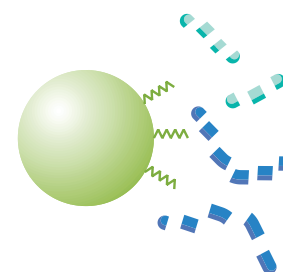
ペプチドマッピング

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。

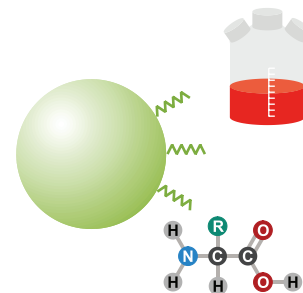
ペプチド分解物は複雑な混合物であり、完全にカバーするには (つまり個々のペプチドを分離するには) 高効率/高分離能カラムが必要です。AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、タンパク質同定および翻訳後修飾の特定に役立つ高分解能のペプチドマップが得られるように設計されています。タンパク質の一次配列に含まれるアミノ酸の置換/修飾をすばやく分離し、同定することができます。



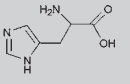
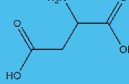
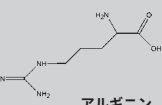
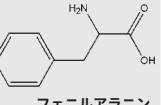
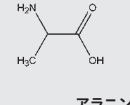
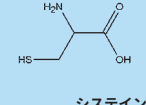
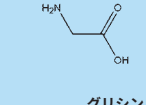
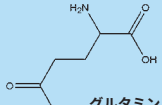
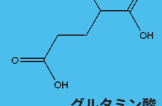
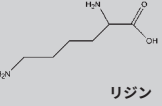
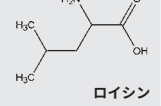
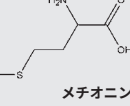
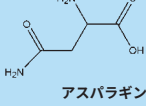
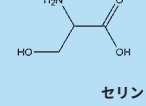
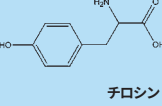
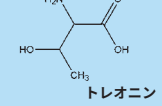
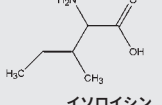
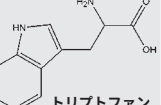
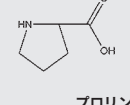
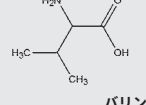
2 生体分子の分離

アミノ酸および培地の分析

生物製剤タンパク質の作製中に細胞培地をモニタリングし、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。アミノ酸はタンパク質の構成要素であり、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。アミノ酸は極性化合物の多様性のある 1 グループです。すべてのアミノ酸がアミンとカルボン酸官能基を持つグループと類似した構造骨格を共有していますが、側鎖の構造は異なり、塩基性、非極性（疎水性）、極性非荷電、酸性などがあります。これらの異なる物理化学的性質がクロマトグラフィーによる分析を困難なものにしていますが、アジレントの AdvanceBio ソリューションはさまざまな方法でこの難問に対処します。AdvanceBio アミノ酸分析カラムと誘導体化試薬キットにより、信頼性と再現性の高い逆相クロマトグラフィーソリューションを得られます。一方、AdvanceBio MS スペントメディアカラムでは、非誘導体化アミノ酸の分析に HILIC 分離と質量分析検出の組み合わせを使用します。



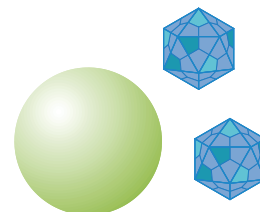
アミノ酸

<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 C₇H₁₀N₂O₃</p> <p>Gln</p>  <p>グルタミン</p>	<p>E 147.13 129.11 C₇H₉NO₄</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 C₅H₉NO₂S</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 C₅H₉NO₂</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

アデノ随伴ウイルス (AAV)

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、新しい治療送達プラットフォームで、遺伝子治療のベクターとして非常に広く用いられ、遺伝性網膜疾患や脊髄性筋萎縮症の治療で大きな成果を上げています。AAV は、約 4.7 kb の線状一本鎖 DNA ゲノムを含む 20 面体のタンパク質の殻で構成されています。インタクト AAV は、オリゴヌクレオチド治療薬を保護して送達する運搬役を務めます。治療送達プラットフォームとしての AAV の開発は継続中なので、AAV の重要な品質特性すべてのモニタリングが不可欠です。製品全体の品質と安全性を確保するためには、タンパク質カプシドとカプセル化された DNA それぞれに、専用の分析技術が必要とされます。



AAV カラムの選択

アプリケーション	手法	アジレントのカラム	注意事項
カプシドタンパク質の ID 確認: インタクトタンパク質	ワイドポア 逆相カラム	ZORBAX RRHD ワイドポアカラム	インタクトカプシドタンパク質の高効率な逆相分離と特性解析のための 1.8 μm 300 Å ZORBAX RRHD StableBond C18 および Diphenyl カラムのオプション。
カプシドタンパク質 ID: ペプチドマッピング (PTM)	ナローポア 逆相	AdvanceBio ペプチドマッピング	最適な効率と分離能のための 2.7 μm Poroshell 粒子。
空/フル カプシド分析	強アニオン交換	Agilent Bio SAX	Agilent Bio SAX 強アニオン交換カラム。AAV カプシドの空とフルの分離に最適。
凝集体分析	サイズ排除クロマトグラフィー	Agilent Bio SEC-5	ポアサイズ 1,000 Å の Agilent Bio SEC-5 は AAV 凝集およびフラグメントの分析と精製に最適。

ヒントとツール

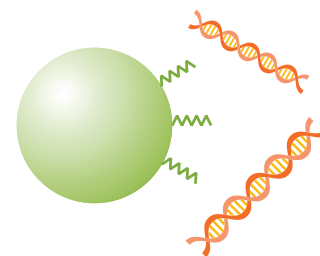
アジレントのバイオイナート消耗品により、メタルフリーのサンプル流路を構成し、生体分子との相互作用を最小限に抑えることができます。

詳細については、ホームページをご覧ください。

2 生体分子の分離

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）が治療薬として有望であることが研究で示され、バイオ医薬品市場では、オリゴへの関心が高まっています。これらのオリゴは、サイズ、配列の複雑性、全体的な修飾の点で幅広い範囲に及んでいます。小さなオリゴヌクレオチドは合成が可能で、サイズは数個のヌクレオチドから 40 または 50 塩基までにおよび、RNA 修飾の DNA は多様です。化学合成プロセスでは、省略、挿入、化学修飾を含む密接に関連した配列を持つさまざまな不純物が生み出されます。gRNA や NGS プライマーおよびプローブなどの大きなオリゴのサイズは 50 から 200 塩基の範囲で、特定の用途に対して多様な修飾やタグを有しています。RNA 治療薬は、数千塩基の長さの配列を持っている場合があり、精製に関して独自の配慮が必要です。このような多様性の結果、液体クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分析および精製は複雑になり、さまざまな手法やカラムケミストリ、粒子支持体が使用されます。



オリゴヌクレオチドの分離には、以下のような UHPLC/HPLC 手法が使用されます。

トリチルオン—この手順では、ジメトキシトリチル（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。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出液を使用しますが、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ます。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	手法	アジレントのカラム	注意事項
トリチルオフオリゴヌクレオチドの特性解析/ 精製	イオンペア逆相分離	AdvanceBio オリゴヌクレオチド	2.7 μm と 4 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析と精製が可能です
		PLRP-S	さまざまな粒子サイズやポアサイズのマクロポラスポリマー粒子で、pH と温度について最高の安定性を示します。
トリチルオフ凝集およびフラグメントの分析	イオン交換分離	Agilent Bio IEX	親水性コーティングされた非多孔質のポリマー性粒子で、質量移動の問題を解消し、卓越した性能を提供します。分析スケールおよびラボスケールの分取機能に対応できるよう、さまざまな粒子サイズが用意されています。
		PL-SAX	強アニオン交換基を持つ全多孔質のポリマー性粒子。バルク充填剤を含め、分析から分取スケールまで利用できます。

バイオ医薬品分析のための機器

アジレントが提供する包括的なワークフローソリューション

LC カラムは多くの精製または分析の特性解析ワークフローで重要な器具ですが、突き詰めれば、1 つのコンポーネントにすぎません。Agilent は、多数の生体分子ワークフローに対し、サンプル前処理、バイアルなどの消耗品、機器、データ分析および管理ツールなど、包括的なソリューションとエキスパートによるサポートを提供します。

1260 Infinity II バイオイナート LC システム

完全な（生体）不活性度を必要とするアプリケーションのためのシステム

1260 Infinity II バイオイナート LC は完全なバイオイナート仕様です。金属との相互作用を排除し、きわめて困難な化合物の分析にも容易に対応できます。溶媒送液システムに耐腐食性のチタンが、またサンプル流路にメタルフリーの材料が採用されており、ルーチンバイオアプリケーションにおいて生体分子の完全性が保たれます。ICP-MS 分析のためのフロントエンドシステムとしても最適です。

- 60 MPa でのメタルフリーのサンプル流路では、信頼性の高い生体サンプル分析結果が得られます。これは、貴重なサンプルはまったく金属面に触れず、表面における不要な作用を最小限に抑えると同時にカラム寿命を延長できることを意味します
- UV および蛍光検出用のイナートフローセル、およびマルチメソッド/マルチ特性分析用のイナート溶媒とカラム選択バルブによって、多様な機器が使用可能になり、最高の適応性を実現します
- 高塩濃度耐性（2 M）と広い pH 範囲（1 ~ 13、短時間での 14）、そしてアクティブシール洗浄機能と 4 種類の溶媒ブレンド機能により、高い柔軟性を実現します
- 新しいバイオイナートキャピラリーと接続デザイン、および InfinityLab クイックコネク/クイックターナカラムフィッティングにより使いやすくなります



1260 Infinity II Prime Bio LC システム

日々の分析で高い柔軟性を実現

生体適合仕様の 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、生体分子の分離に適した汎用 HPLC です。バイオ分析用 HPLC およびエントリーレベルのクォータナリバイオ UHPLC としてご利用いただける、機能性と操作性に優れた分析システムです。

- 生体適合性溶媒とサンプル流路によって生体分子の完全性を確保し、不要な表面相互作用を最小化します
- 高塩濃度耐性と広い pH 範囲により柔軟性と堅牢性が向上し、機器の稼働時間を増大できます
- 最大 80 MPa の高耐圧と最大 5 mL/min の高流量を兼ね備えたパワーレンジ（圧力流量範囲）により、最高の UHPLC 性能を実現します
- シャローマイクロプレート用の引き出しによって最大 6,144 のサンプルを収容でき、優れたサンプルキャパシティを実現できます



1290 Infinity II Bio LC システム

複雑な分析で卓越した性能を発揮

1290 Infinity II Bio LC システムでは、1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプまたはフレキシブルポンプをご利用いただけます。きわめて要求の厳しいアプリケーションを想定して設計されており、非常に緩やかなグラジエントに対応し、優れた性能、精度、信頼性を発揮します。また、生体適合性を備え、システムの堅牢性を維持しながら生体分子の完全性を確保できます。

- あらゆるアプリケーションに対応する柔軟性 - 広いパワーレンジ、温度範囲、拡張可能な自動注入量範囲、グラジエントオプション（2種類および4種類の溶媒混合）によって実現します
- システム全体のディレイボリュームが非常に少ないため、クロマトグラフィー分解能を最大化し、分散を最小限に抑制できます
- 広範な Bio 熱交換器、Bio キャピラリーキット、Bio ループ、分析ヘッドをなど、多様な Bio アクセサリーによって、さまざまなアプリケーションニーズにすべて対応し、機器の汎用性と効率を向上します
- 最大 130 MPa の超高耐圧と最大 5 mL/min の高分析流量を兼ね備えたパワーレンジにより、最高の UHPLC 性能を実現します
- 性能と持続可能性のための選択肢：1260/1290 Infinity II LC システムファミリーは、製品のライフサイクル全体が環境に与える影響を検証する独立監査の結果、My Green Lab の ACT（Accountability = 説明責任、Consistency = 整合性、Transparency = 透明性）ラベルを取得しました



1290 Infinity II Bio 2D-LC システム

生体適合仕様の 2D-LC システムが持つ究極の分離能力

1290 Infinity II Bio 2D-LC システムは 2D-LC システムの非常に優れた分離能力とピークキャパシティ、そして Bio LC システムの生体適合性を兼ね備えています。

- サンプルが、共溶出する化合物について優れた分離能を必要としていたり、従来の (U) HPLC では効率的に分解できなかった化合物を多数含んでいたりする場合でも、2D-LC が最適な選択肢です
- Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションは、専用の 1290 Infinity II ハードウェアと特別なソフトウェア製品をベースに、最高の性能と品質、使いやすさを提供します
- バイオ医薬品も他業界のアプリケーションも、サンプル、溶媒、試薬について、厳しい条件を使用します。生体適合仕様の 2D-LC システムは、このようなアプリケーションに対し、優れた分離性能と堅牢性を提供します。Bio 2D-LC 流路では、セラミック、PEEK、金などの貴重な材料とともに MP35N が使用されます。これらの材料は、生体分子との表面結合や相互作用を低減します。また、溶媒やサンプル、試薬などの広い pH 範囲や高塩濃度のような厳しい条件にも対応します
- 生体適合仕様のバイオイナート LC モジュールとパーツはすべて、1290 Infinity II Bio 2D-LC システムで使用できます



1260 Infinity II Bio-SEC システム

メタルフリーの流路とオプションの高度な検出器を使い、生体ポリマーを確実に分析

1260 Infinity II Bio-SEC システムは、生体ポリマー分析の課題に対処できるように設計されたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) システムです。高度な検出機能を使った、タンパク質のモル質量、純度、凝集の分析には完璧なソリューションです。

- メタルフリーのサンプル流路が生体ポリマーの堅牢な特性解析を可能にします
- 高塩濃度耐性と広い pH 範囲、そしてアクティブシール洗浄機能と 4 種類の移動相ブレンド機能が、高い柔軟性を実現します
- 専用の SEC カラムサーモスタットが大容量と冷却機能をもたらします
- 多角度光散乱 (MALS) 検出器を柔軟に追加できるため、生体ポリマーの凝集体、サイズ、形状の特性解析が可能になります
- WinGPC ソフトウェアによるコンプライアンスソフトウェアのサポートが、専用の SEC ソフトウェアプラットフォームを提供します



1260 Infinity II マルチ検出器 GPC/SEC システム

光散乱検出によりタンパク質と生体分子を正確かつ高い再現性で特性解析

屈折率、光散乱、粘度測定を自由に組み合わせることができます。正確な絶対分子量と分子サイズが得られ、分子量範囲や溶媒に関係なく、幅広いポリマーの分析に使用できます。

- **正確な分子量** - 光散乱検出ではカラムキャリブレーションが不要です。GPC/SEC カラムと組み合わせることで、真のポリマー分子量、サイズ、形状、長鎖分岐の測定が可能です
- **サイズと構造を正確に測定** - 粘度測定により、広い分子量範囲にわたって Rg (サンプルの回転半径) やサンプル構造を測定できます
- **低分子量サンプルの分析** - 粘度計では、シリカおよび圧力トランスデューサ技術の最新の進歩により、百台という低い分子量を測定できます
- **トリプル検出が究極のポリマー分析を実現** - 光散乱検出によって絶対分子量を測定し、光散乱検出器と粘度測定検出器から分子サイズと溶液の挙動を測定できます



1290 Infinity II Bio 分析スケール LC 精製システム

生体分子を保護する高性能で生体適合仕様の 分析 LC 精製システム

1290 Infinity II Bio 分析スケール LC 精製システムは UHPLC、バイナリ、またはクォータリで、バイオ医薬品で使用される生体適合性材料で構成されています。高塩濃度および極端な pH の条件を使って化合物単離を行うための、特に柔軟性と汎用性に優れたソリューションです。

- 生体適合性溶媒とサンプル流路によって生体分子の完全性を確保し、不要な表面相互作用を最小化します
- 高塩濃度耐性と広い pH 範囲により柔軟性と堅牢性が向上し、機器の稼働時間を増大できます
- マイクロタイタープレートに最大 4 x 96 個のフラクションを、または、4 種類の外径の試験管を使用可能なコレクタでガラス製試験管に最大 216 個のフラクションを採取できます
- 統合された自動フラクションディレイセンサ技術により、採取したフラクションの純度と回収率を向上させます
- 需要に基づいてフラクションキャパシティをアップグレードできます。単離された化合物からのみ入手できるオーソゴナル分析情報により、ラボの効率が向上します

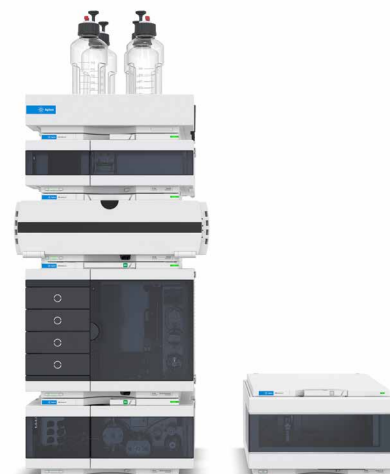


1260 Infinity II Prime Bio 分析スケール LC 精製システム

圧力範囲最大 800 bar、生体適合仕様の 分析用 LC 精製システム

1260 Infinity II Prime Bio 分析スケール LC 精製システムは、生体分子の分離に適した汎用 HPLC です。機能性と利便性に優れており、耐圧最大 80 MPa、最大流量 5 mL/min のバイオ分析用 HPLC およびエントリレベルのクォータナリバイオ UHPLC としてご利用いただけます。

- 生体適合性溶媒とサンプル流路によって生体分子の完全性を確保し、不要な表面相互作用を最小化します
- 最大 80 MPa の高耐圧と最大 5 mL/min の高流量を兼ね備えたパワーレンジ（圧力流量範囲）により、最高の UHPLC 性能を実現します
- VWD、DAD、FLD、または LC/MS 検出用の多様なフローセルによる広範囲高感度光学検出機能があり、適応性に優れています
- 統合された自動フラクションディレイセンサ技術により、採取したフラクションの純度と回収率を向上させます
- 需要に基づいてフラクションキャパシティをアップグレードできます。単離された化合物からのみ入手できるオーソゴナル分析情報により、ラボの効率が向上します



Load & Lock 分取用 HPLC カラム

充填剤の優れた安定性と高度な流量分布で 大容量サンプルのルーチン精製に最適

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します
- 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 カラムに充填可能です
- 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できます
- 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、いつでも簡単に移動可能です

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	内径 x 長さ (mm)	部品番号
Load & Lock カラム	あり	27.0 x 500	PCG93LL500X25WJ
	スベア部品キット		PCG931AAKIT
可動式充填ステーション (空気駆動油圧式)			PCG93LLSTAND123



ヒントとツール

アジレントのセレクションガイド (5991-9153EN) で、InfinityLab LC 分取精製システム、モジュール、カラム、充填剤、物理的仕様、性能特性を比較できます。

www.agilent.com/chem/lc-purification-selection-guide

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム

大規模な生体分子分析に特化した設計

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムは、バイオ医薬品の特性解析で複数のワークフローを処理できるように設計されています。インタクトタンパク質レベルでの詳細情報を取得し、ペプチドマッピングを介して配列を自動的に確認して、自信をもって PTM を理解する必要がある場合、アジレントの UHPLC Q-TOF が役立ちます。

飛行時間型技術を使って、主要プロテオフォームと微量プロテオフォームを正確にプロファイリングし、インタクトタンパク質の質量分析で新たなレベルの精度と感度を実現します。反復 MS/MS 操作モードで、ペプチド分解物を簡単に掘り下げることができます。6545XT AdvanceBio Q-TOF は、バイオ医薬品のために設計された包括的なツールセットにおける分析基盤です。

- 超高真空 ($10E-8$) の TOF により、タンパク質に対して優れたスペクトル分離能を実現します
- SWARM オートチューンにより、ワンクリックで高分子用に最適化できます
- $30k m/z$ までの可変質量範囲により、非常に大型の分子も分析可能です
- ビーム光学の改良により $50k$ の分離能を達成しました
- キャピラリーの取り外し時に大気開放が不要なため、メンテナンスが容易です



6230B 飛行時間型 (TOF) LC/MS

生体分子のための精密質量 TOF LC/MS

Agilent 6230B 飛行時間型 LC/MS (TOF LC/MS) システムは高分解能精密質量システムで、高度な分析能力を提供します。最高 $20,000$ までの質量電荷比のフルスペクトルを同時測定することにより、高速、高感度を実現します。TOF LC/MS のフル質量スペクトルをスキャンすることで、生体分子特性解析に必要な情報がすべて取得できます。6230B TOF LC/MS は、最適化されたインタクトタンパク質の特性解析、ペプチド、グリカン、オリゴヌクレオチド分析に使用される Agilent バイオイナート HPLC システムと互換性があります。高分離能の精密質量により、溶出物や浸出物などの不純物の検出と同定が可能になります。直感的なソフトウェアツールのおかげで、だれでも信頼できる結果を必ず出すことができます。6230B TOF LC/MS MassHunter ソフトウェアスイートはコンプライアンス対応です。

- モノクローナル抗体 (mAb) を高い質量精度と分離能で分析し、グリコフォームや切断を探します
- 最大 $20,000 m/z$ の広い質量範囲により、高分子の生体化合物も分析できます
- 直観的な MassHunter WalkUp ソフトウェアにより、管理タスクとリスクを削減でき、LC/MS の専門知識も不要になります
- キャピラリー電気泳動、SFC、および 2D-LC に対応しており、最高のパフォーマンスを発揮します
- Agilent Jet Stream 技術と低ピコグラムのオンカラム感度により、極めて低濃度で不純物を検出できます



MassHunter BioConfirm ソフトウェア

生体分子の特性解析で大きな一歩を

Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアは、オリゴヌクレオチド分析やインタクトタンパク質分析、ペプチドマッピング、ルーチンのグリカンプロファイリングのワークフローに最適化されており、生体分子のルーチンの特性解析が可能です。この LC/Q-TOF 用のバイオ医薬品ソフトウェアは、モノクローナル抗体やオリゴヌクレオチドといったバイオ医薬品の包括的な質量分析ソリューションの一部です。アジレントのバイオ医薬品ワークフローは、自動化されたサンプル前処理から分離と検出、データ解析とレポート作成まで、非常に高度な分析を提供します。薬物抗体比 (DAR) 計算ツール、柔軟なレポートテンプレート、MassHunter WalkUp との統合により、専門家でなくとも、LC/MS の機能をルーチン分析で使うことができます。

以下を対象とした包括的なワークフロー：

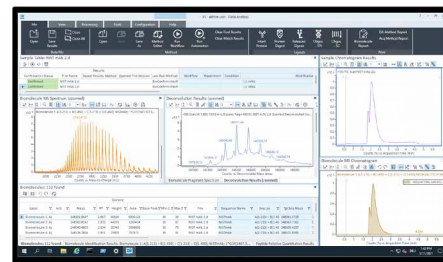
- インタクトタンパク質 (DAR を含む)
- ペプチドマッピング
- 遊離グリガン
- オリゴヌクレオチド

ヒントとツール

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。

カラム消耗品関連カタログ/セレクションガイドをご覧ください。



データインテグリティ規格に対応しており、技術管理機能によって、データの安全な取り込み、処理、報告、格納が可能。FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11、GAMP 5、ISO/IEC 17025、EPA 40 CFR Part 160 のコンプライアンスガイドラインに準拠

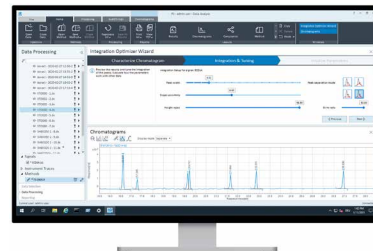
OpenLab ソフトウェアスイート

Agilent OpenLab ソフトウェアは、サンプル管理、データ取り込み、データ分析、データ管理、ラボのワークフロー管理などを搭載した統合製品スイートです。

Agilent
OpenLab

OpenLab CDS – 高分子の分析ワークフローを効率化

OpenLab CDS は、生産性、使いやすさ、およびデータインテグリティをすべて実現するクロマトグラフィーデータシステムです。カスタムカリキュレタや積分最適化のようなソフトウェアツールを使って、オリゴヌクレオチドの純度計算や DAR の測定などのプロセスを自動化し、スプレッドシートにピークデータを手作業で入力する手間を省くことができます。これにより、データを迅速に解釈できるようになり、正確で一貫性の高い結果を得られます。



アプリケーションに特化したツールで、バイオ医薬品ワークフローをサポート

- **MatchCompare for OpenLab**：ユーザー定義の制約に基づいて、未知のサンプルを既知の標準と客観的に比較します
- **2D-LC ソフトウェア**：二次元測定を実施し、多次元データを分析します
- **WalkUp ソフトウェア**：直感的なサンプルサブミットおよびメソッド選択ソフトウェアにより、LC および LC/MS システムの利用をこれまで以上に容易にします

OpenLab ECM XT – 全分析データへのシングルポイントアクセス

OpenLab ECM XT は、一元化されたクラウドとオンプレミスでのデータ保管を目的とした科学データ管理システム (SDMS) ソフトウェアです。MassHunter と OpenLab Server/ECM XT を組み合わせて、安全なストレージにすることにより、ラボは豊富な技術管理機能を生かして、規制当局による監査への対応を強化できます。

- データファイル、メソッド、ワークリスト、レポートテンプレート、結果などの現在使用しているレコードを**オンプレミスまたはクラウドのストレージへ安全に保管**
- 誰が、何を、いつ、どのような理由で行ったかの詳細を含むファイル履歴を明確に示す**監査証跡**
- ユーザーの役割とアクセス可能なデータに基づいて**アクセス権**を割り当て

ネットワークシステムを使ってデータサイロを解体

mRNA 治療薬か、二重特異性モノクローナル抗体かにかかわらず、大きな分子のモビリティをサポートする分析データは重要です。しかし、スタンドアロンのワークステーションを使っていたのでは、機器データのアクセスや管理が難しくなります。ネットワーク構成へ移行することで、ラボの運用が全体的に向上します。



InfinityLab LC 消耗品

生体分子分析に最適

Agilent InfinityLab 消耗品は革新的な消費財です。Agilent LC 機器やカラムで簡単に使用でき、バイオ HPLC 分析で最高の効率とパフォーマンスを発揮するように設計されています。

粒子からカラムを保護

粒子はカラムを詰まらせ、クロマトグラフィーの結果の品質を下げ、ダウンタイムを長引かせる原因となります。このような問題を回避するには、効果的な過手法の採用が不可欠です。特に水ベースの緩衝液を使用するときには、未溶解の塩の結晶や微生物などの残留物を除去するために、LC ろ過アセンブリを使って、移動相をフィルタリングできます。

インラインフィルタを設置して、溶媒やサンプル、摩耗したシステム部品から流路に流れてくるあらゆる粒子を捕捉します。InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタは工具を使わずに交換できるフィルタディスクで、非常に使いやすく、カチッと音がしたら取り付け完了です。

バイオアプリケーションに最適な接続

InfinityLab ファミリーには、お客様のニーズにあったさまざまな材質の HPLC キャピラリーが用意されています。MP35N、PEEK ライナステンレス、およびチタンで作られたキャピラリーは不活性で腐食耐性があり、バイオアプリケーションに特に適しています。InfinityLab クイックコネクティングと併用することで、最大 1300 bar の完璧な手締め接続が可能です。最高の分析性能を実現できます。

ラボの化学薬品から出るガスを削減

ラボでは日常的に、アセトニトリルとメタノールをはじめとする数多くの有機化合物に触れる可能性にさらされています。InfinityLab セーフティキャップは溶媒が空气中に溶出するのを阻止します。革新的な InfinityLab セーフティパーズボトルと併用すると、最高 4 本の溶媒ラインを使った HPLC パージを安全に行えるようになります。

バイアルはサンプル処理の第一歩 - 適切な選択のできる製品ライン

アジレントはバイアルやキャップ、インサートの包括的な商品ラインを取り揃えています。標準的なホウケイ酸ガラス製バイアルだけでなく、表面が不活性化されたガラスバイアルや、ポリプロピレンバイアルなど、ラボの需要にあったソリューションを用意しています。サンプルの量がわずかな場合は 3 ~ 5 μ L のバイアルから、大量にある場合には 1.75 mL のものまで、バイアルの組成のみならず、その性質や使用可能なサンプルの量を反映したさまざまなデザインのバイアルを提供しています。

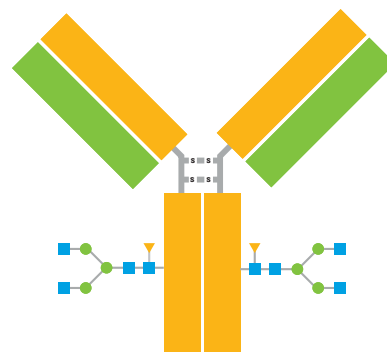
ヒントとツール

バイアルを最終決定する際には、バイアルカタログ (5994-4803JAJP) をダウンロードして、バイアルセレクションツールをご利用ください。



逆相および疎水性相互作用 クロマトグラフィーを使ったインタクト タンパク質分析

インタクトまたはサブユニットレベルでのタンパク質の
不純物分離に必要な選択性と分離能



タンパク質は、通常、インタクトまたはサブユニットレベルで分析され、不純物のモニタリングや、LC/MS を使った正確な分子量測定が行われます。インタクトタンパク質測定に必要なサンプル前処理は、ペプチドレベルの分析と比べ、はるかに少ないことが多く、製品の品質や純度を比較的短時間で評価できます。

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。

さらに、アジレントはインタクトタンパク質またはサブユニット分離への代替的で補完的なアプローチのために、疎水性相互作用 クロマトグラフィー (HIC) カラムと親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムの両方を提供しています。

逆相

- **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。

逆相分離用カラムの選択肢

	ZORBAX RRHD SB 300	AdvanceBio RP-mAb	Poroshell 300	ZORBAX 300SB	PLRP-S
相オプシオン	SB-C3、SB-C8、Diphenyl	C4、SB-C8、Diphenyl	SB-C3、SB-C8	SB-C3、SB-C8、Diphenyl	ポリマー系
ポアサイズ	300 Å	450 Å	300 Å	300 Å	1000 Å
HPLC		●	●	●	●
UHPLC	●				
長所	<ul style="list-style-type: none"> - 最大限の分離能 - 独自の Diphenyl 結合相 	<ul style="list-style-type: none"> - mAb 向けに設計 - 独自の Diphenyl 結合相 	<ul style="list-style-type: none"> - 小さな球状タンパク質 - スループット向上 ZORBAX 300SB メソッドに更新 	<ul style="list-style-type: none"> - 堅牢な製品 - 独自の Diphenyl 結合相 	<ul style="list-style-type: none"> - MS に推奨 - FA と TFA の両方で卓越したピーク形状を示す - PEEK ライナ SS ハードウェア オプション

疎水性相互作用クロマトグラフィー

- **AdvanceBio HIC カラム**は逆相分離に対するネイティブモードの代替製品で、独自の 450 Å ポア、全多孔質 ZORBAX 粒子をベースにしています。インタクト、かつネイティブで折りたたまれたタンパク質は、疎水性が最も低いところから高いところへ向かって溶出します。

親水性相互作用液体クロマトグラフィー

- **ZORBAX RRHD 300 Å HILIC カラム**は全多孔質の 1.8 μm 粒子で構成されています。逆相カラムへの相補的選択性を持ったため、糖ペプチドや糖たんぱく質などの親水性サンプルに対して特に有効です。

4 インタクトタンパク質分析

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	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。
	C4	
	SB-C8 Diphenyl	
	PLRP-S 1000 Å	マクロポラスポリマー 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	充填プロセスの最適化により、1290 Infinity II LC での使用時に最大で 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。 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。
	RRHD 300SB-C18	
	RRHD 300SB-C8	
	RRHD 300SB-C3	
	RRHD 300-Diphenyl	
	ZORBAX 300 Å, 3.5、および 5 µm	
	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	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。
	300SB-C18	
	300SB-C8	
	300SB-C3	
	300Extend-C18	
オリゴヌクレオチド分析	PLRP-S 100 Å, 300 Å, 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できます。 高い温度安定性。
	PL-SAX 1000 Å, 4000 Å	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、 84 ページ を参照してください。
オリゴヌクレオチド	AdvanceBio オリゴヌクレオチド	高分離能分析分離、および分取スケールの分離に最適。 2.7 µm と 4 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

AB

AdvanceBio ファミリーの製品

AB

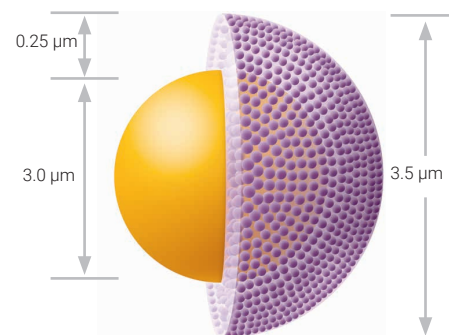
AB

AB

AB

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、再分析や分析精度での妥協につながります。

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。

高速・高分離能 mAb 分離のために特別に設計された堅牢な粒子

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 Diphenyl 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。

4 インタクトタンパク質分析

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 Diphenyl	450 Å	90 °C	1.0 ~ 8.0	あり

仕様の数値は代表値です。

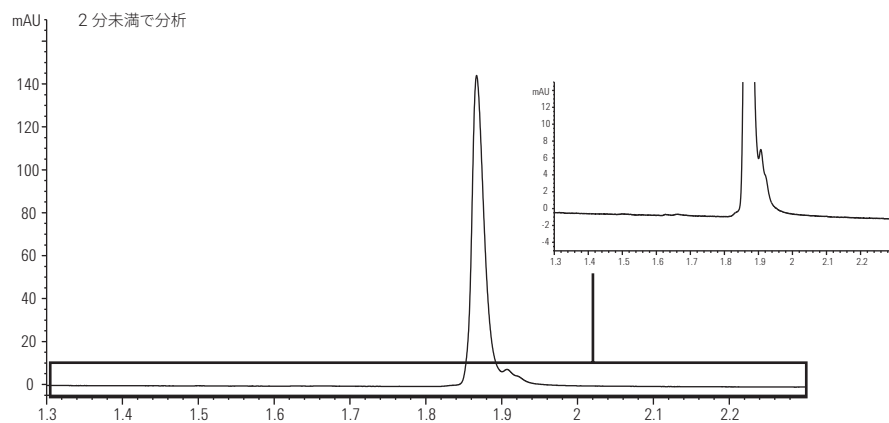
*カラムは低 pH で最適に使用できるように設計されています。シリカを基材とするすべてのカラムを pH 6 ~ 8 の領域で最高の安定性を確保しながら使用するには、温度を 40 °C 未満とし、緩衝液には 0.01 ~ 0.02 M の範囲の低濃度のものを使用します。

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、逆相 LC 1 次構造の特性解析ワークフロー（資料番号 **5991-6321JAJP**）を参照してください。

トラスツズマブ変異体 IgG1 を高速に高分離能で分離

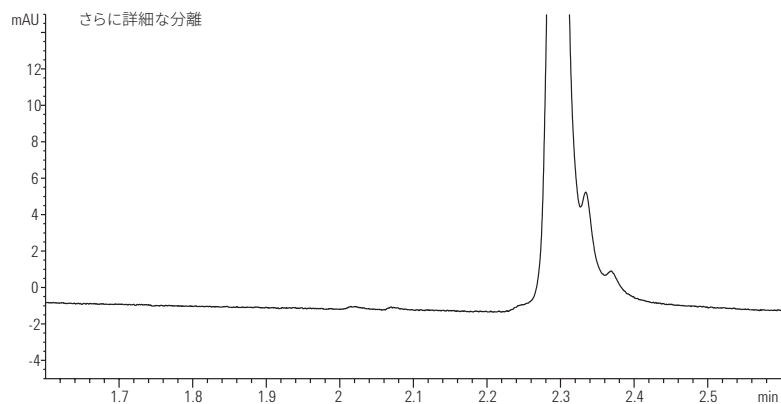
カラム:	AdvanceBio RP-mAb C4 795775-904 2.1 x 100 mm、3.5 μm	温度:	80 °C
移動相:	A: 0.1 % TFA 含有水:IPA (98:2) 溶液 B: IPA:ACN:移動相 A (70:20:10)	検出器:	UV、254 nm
流量:	1.0 mL/min	サンプル:	Creative Biolabs 製のヒト化組み換え トラスツズマブ変異体 IgG1 インタクト (1 mg/mL) を 5 μ L 注入
グラジエント:	4分で 10~58 % B、1分間 95 % B で洗浄、 1分間 10 % B で再平衡		



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。

選択性 Diphenyl 相

カラム:	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 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 μ L 注入



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

4 インタクトタンパク質分析

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 μ m

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

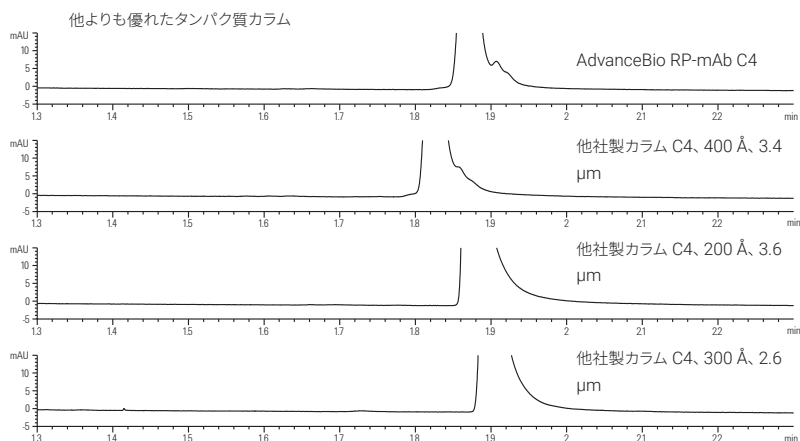
流量: 1.0 mL/min

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 $^{\circ}$ 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 μ L 注入



AdvanceBio RP-mAb は mAb 分離専用設計されており、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。

Poroshell の利点

カラム: AdvanceBio RP-mAb SB-C8
785775-906
2.1 x 100 mm、3.5 μ m

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)

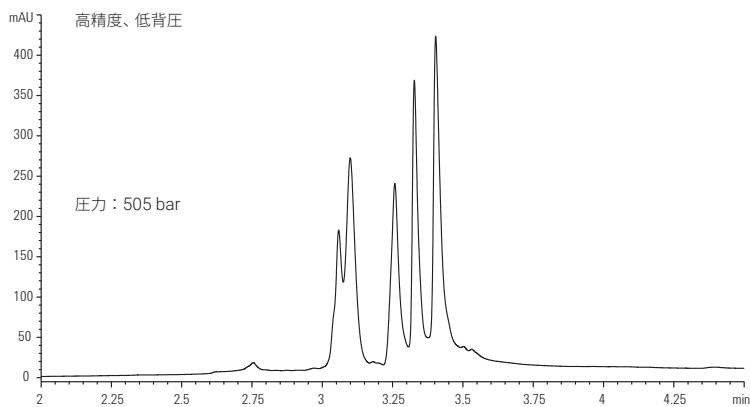
流量: 0.8 mL/min

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 $^{\circ}$ 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ツズマブ
変異体 IgG1 (2 mg/mL) を 1 μ L 注入



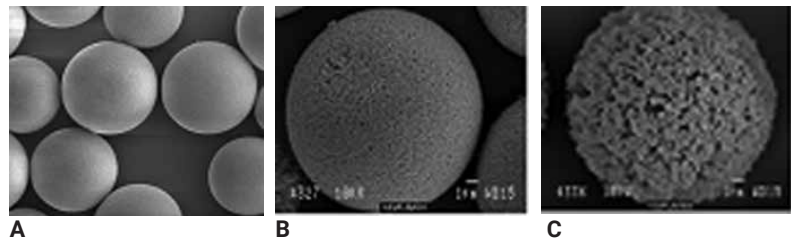
AdvanceBio RP-mAb カラムのワイドポア Poroshell 技術により、一般的な多くの逆相メソッドの温度である 80 $^{\circ}$ C よりも低い温度で、高効率、短い分析時間、低背圧を実現しています。

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します
- 熱的および化学的に安定しています
- USP L21 に準拠
- 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) です

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。

インタクトタンパク質の場合、300 Å を超える大きなポアが一般的ですが、PLRP-S の最初のオプションとしては 1000 Å をお勧めします。小さなポアサイズ 100 Å は通常、ペプチドや、小さな非生体分子の逆相分離に使用されます。また、オリゴヌクレオチドの分離には、すべてのポアサイズが有効です。オリゴヌクレオチドの分離における PLRP-S について、詳しくは **162 ページ** を参照してください。



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 の小さいポアです。
- B は 300 Å の大きいポアです。
- C は 4000 Å の巨大なポアです。

4 インタクトタンパク質分析

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	小さい分子、合成、およびペプチド
300 Å	組み換えペプチド/タンパク質
1000 Å	大きいプロテイン、およびモノクローナル抗体
4000 Å	大きいオリゴヌクレオチド、または高速分離

化学的安定性 — TFA 濃度

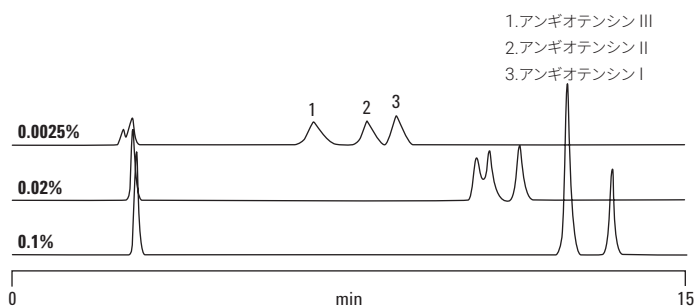
カラム : **PLRP-S 100 Å**
PL1512-5500
4.6 x 250 mm、5 µm

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

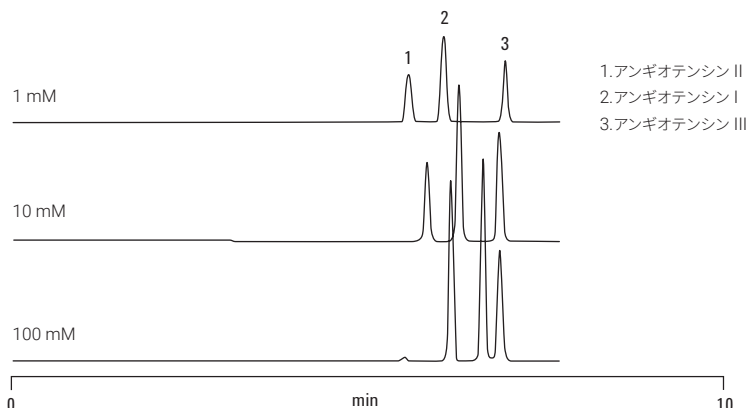
カラム: **PLRP-S 100 Å**
PL1512-5500
4.6 x 250 mm, 5 μm

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

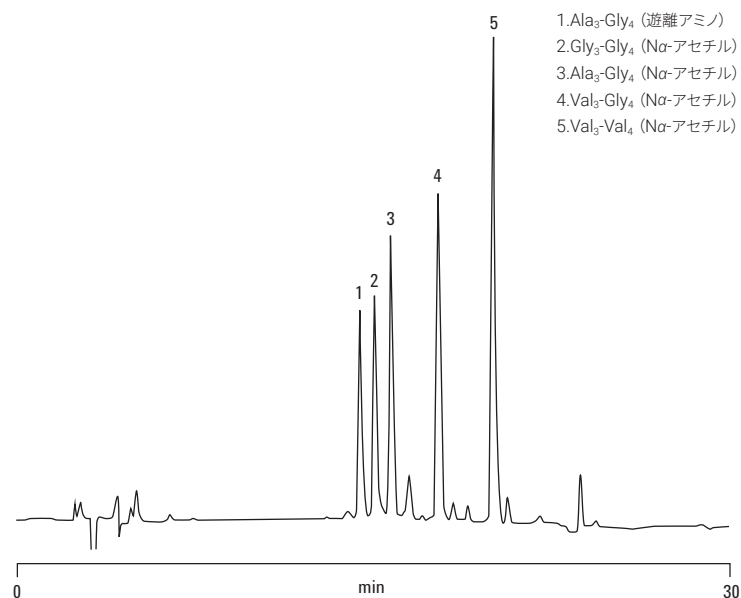
カラム: **PLRP-S 100 Å**
PL1512-5500
4.6 x 250 mm, 5 μm

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



4 インタクトタンパク質分析

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

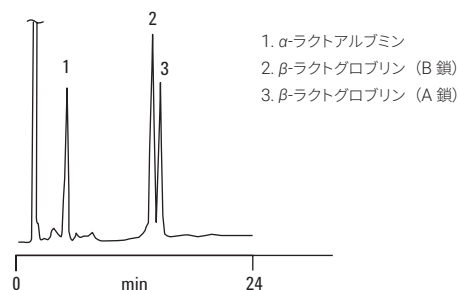
移動相: A: 0.1 % TFA, 99 % 水: 1 % ACN
B: 0.1 % TFA 1 % 水溶液: 99 % ACN

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



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

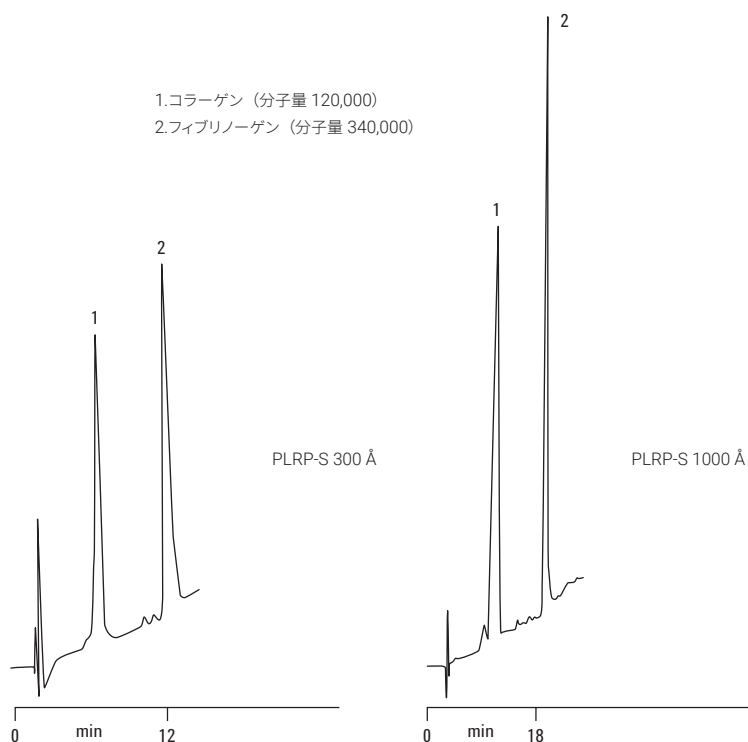
移動相: A: 0.25 % TFA 水溶液
B: 0.25 % TFA, 5 % 水: 95 % ACN

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



AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ

MS 検出前に、オンラインで脱塩操作

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ります。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。



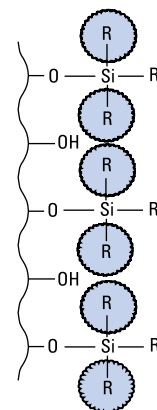
AdvanceBio 脱塩 RP (p/n PL1612-1102) および
カートリッジホルダ (p/n 820999-901)

ヒントとツール

2D-LC/MS での AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジの効果的な使用例については
アプリケーションノート **5991-7066JAJP** を参照してください。

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、Diphenyl (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

カラムの仕様

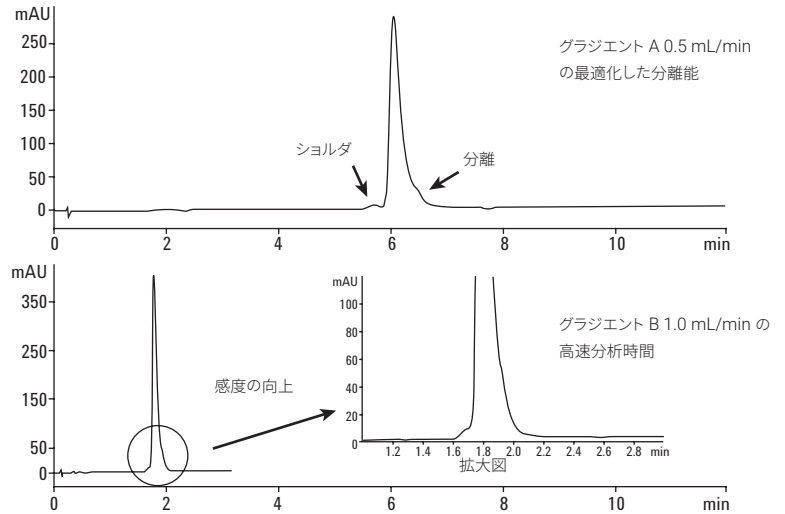
結合相	ポアサイズ	上限温度*	pH 範囲*	エンドキャップ
ZORBAX RRHD 300SB-C18	300 Å	90 °C	1.0 ~ 8.0	なし
ZORBAX RRHD 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0 ~ 8.0	なし
ZORBAX RRHD 300SB-C3	300 Å	80 °C	1.0 ~ 8.0	なし
ZORBAX RRHD 300-Diphenyl	300 Å	80 °C	1.0 ~ 8.0	あり
ZORBAX 300SB-C18	300 Å	80 °C	1.0 ~ 8.0	なし
ZORBAX 300SB-C8	300 Å	80 °C	1.0 ~ 8.0	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、温度を 40 °C 未満とし、緩衝液は 0.01 ~ 0.02 M の範囲の低濃度のものを使用します。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

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の特性解析の向上) (資料番号 **5991-2032EN**) を参照してください。



4 インタクトタンパク質分析

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
866750-906
2.1 x 150 mm, 1.8 μ m

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

注入量: 3 μ L (2.5 mg/mL サンプルから)

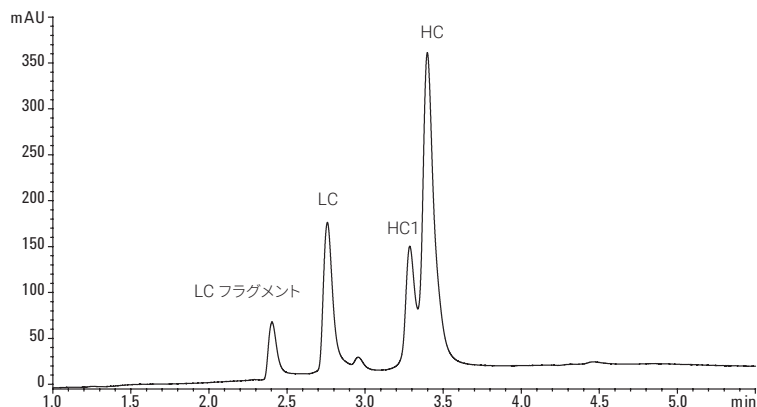
グラジエント:

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

温度: 75 °C

検出器: UV, 225 nm

装置本体: 1290 Infinity LC (オートサンプラ、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

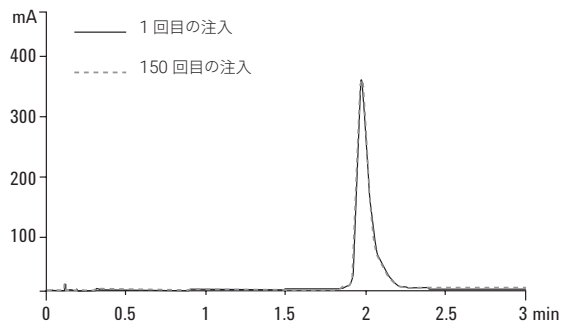
移動相： A : H₂O:IPA (98:2) + 0.1 % TFA (v/v)
 B : IPA:ACN:H₂O (70:20:10) + 0.1 % TFA

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

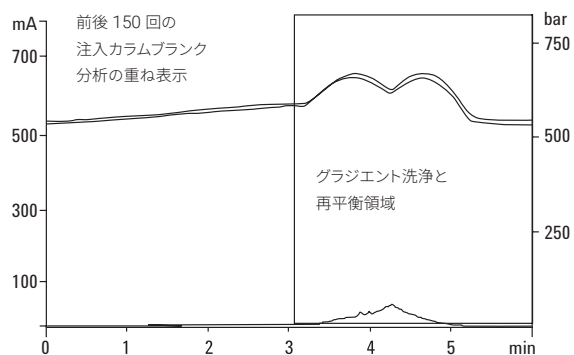
サンプル： mAb



グラジエント

時間 (分)	% B
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



4 インタクトタンパク質分析

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)

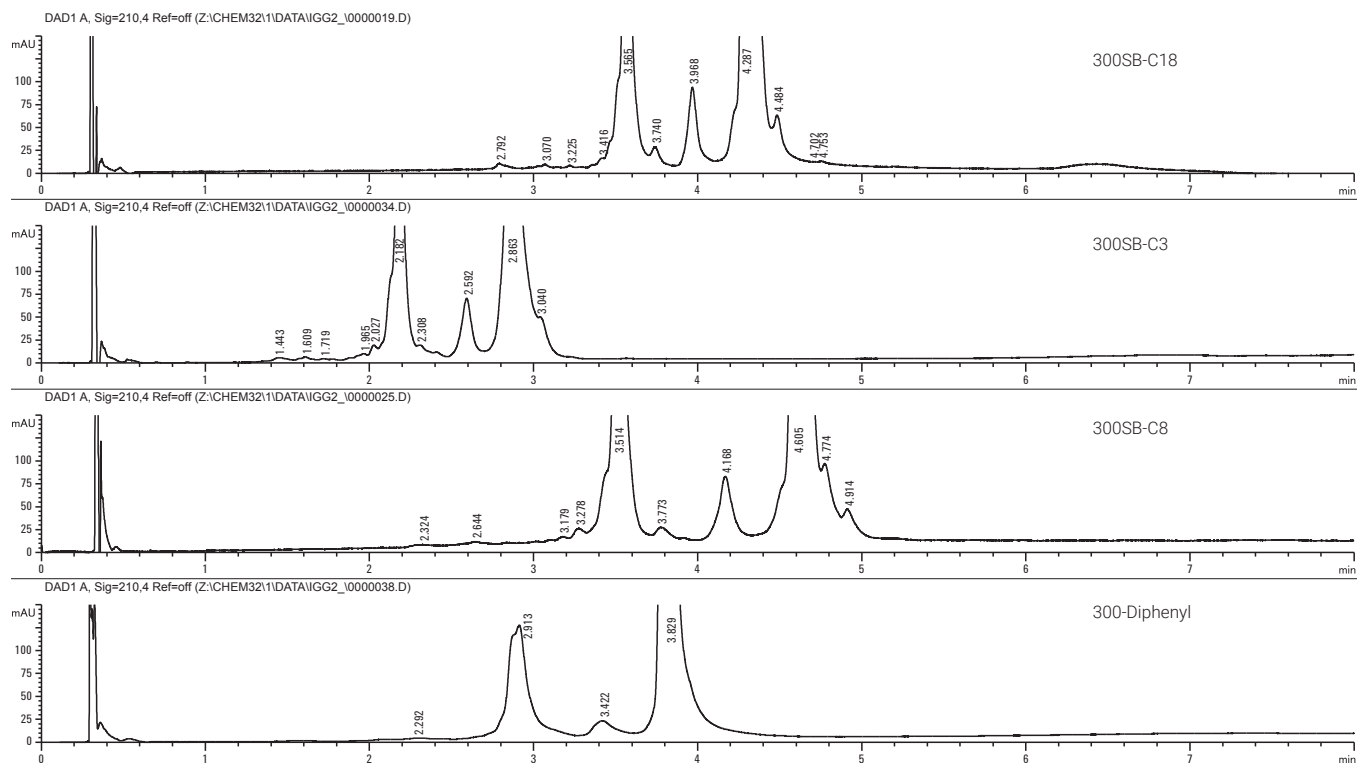
流量: 1.0 mL/min (3.5 μm*), 1.0 mL/min (1.8 μm)

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 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%)

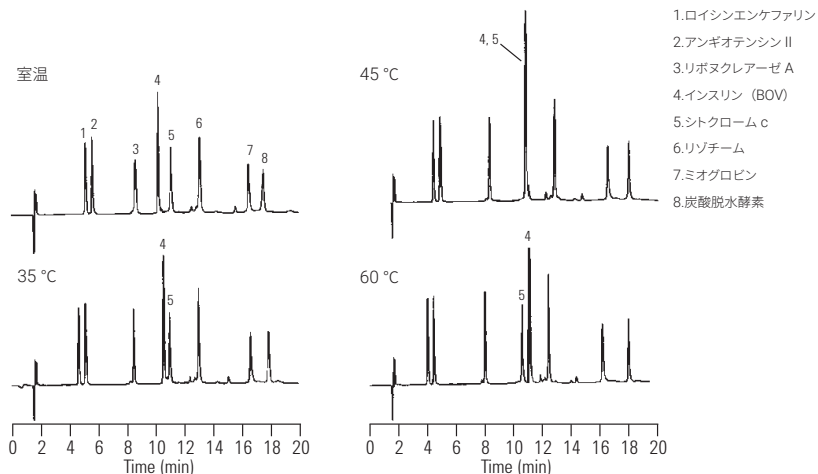
流量： 1.0 mL/min

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℃

検出器： UV, 215 nm

サンプル： ポリペプチド



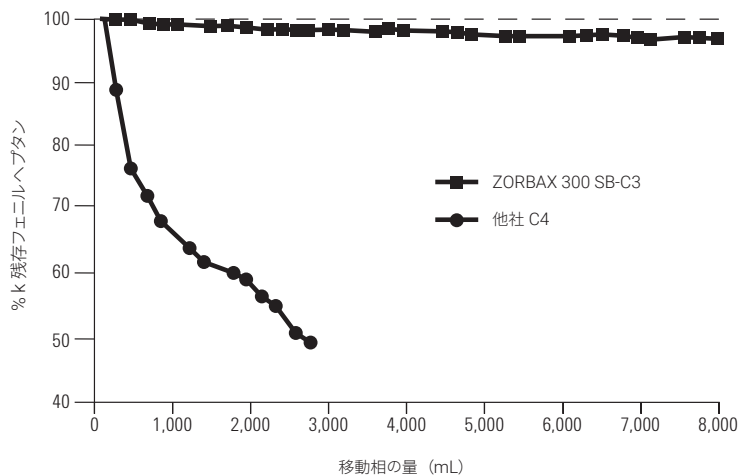
短鎖 ZORBAX 300SB-C3 は低 pH、高温で安定

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℃



4 インタクトタンパク質分析

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 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

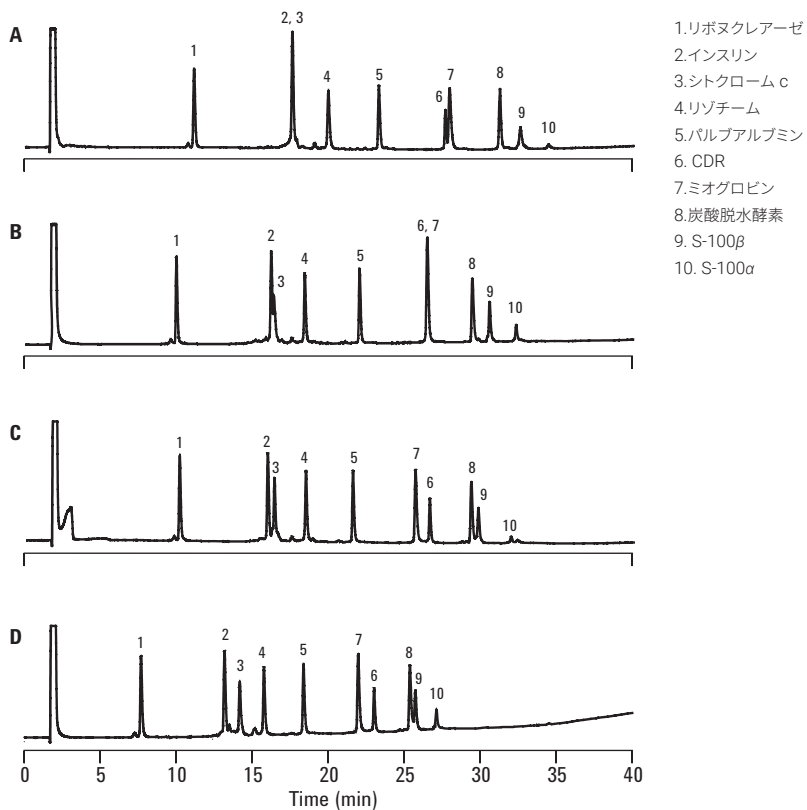
移動相 : 直線性のグラジエント、40 分で 25 ~ 70 % B
A : 0.1 % TFA 水溶液

B : 0.09 % TFA、80 % アセトニトリル:20 % 水
1.0 mL/min

流量 :

温度 : 60 °C

サンプル : 各タンパク質で 3 µg

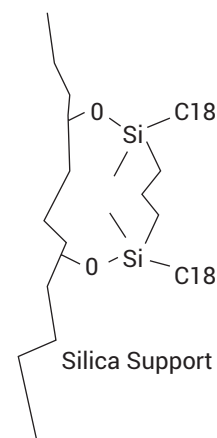


300SB-C18、C8、C3、および CN 結合相ではすべて、このポリペプチド群を異なる方法で分離します。このため、タンパク質分離を迅速に最適化するための重要なパラメータが追加されます。300SB-CN カラムには、親水性ポリペプチドに対する独自の選択性があります。

ZORBAX 300 Å 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 でさまざまな選択性があります
- 高 pH で疎水ペプチドの効率と回収率が高くなります
- 水酸化アンモニウム添加の移動相による LC/MS に最適です

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、疎水性ポリペプチドの高い回収率が得られます。ペプチドとポリペプチドの LC/MS 感度は、水酸化アンモニウムを含むシンプルな移動相を高 pH で使用することで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	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。詳細は[ホームページ](#)をご覧ください。



4 インタクトタンパク質分析

高 pH での長寿命

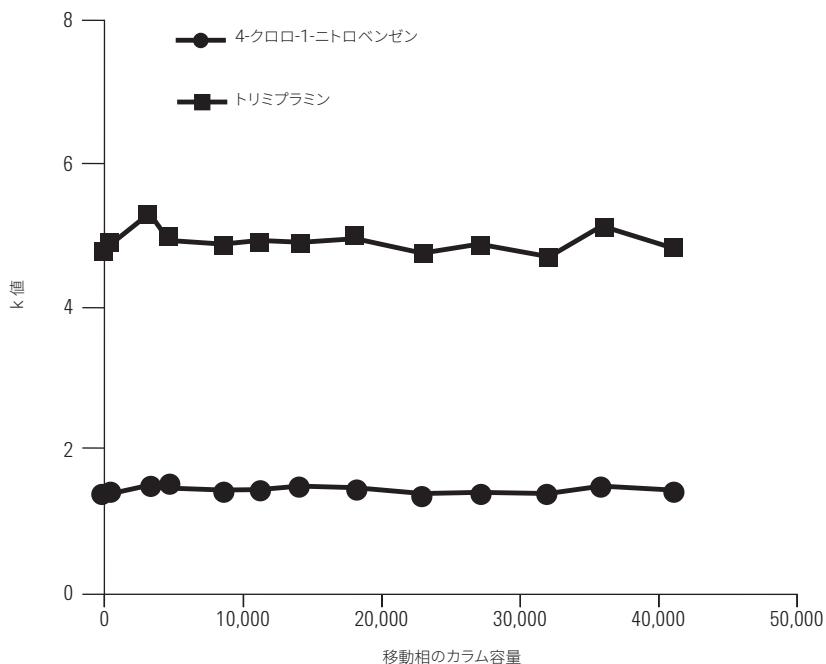
カラム: **ZORBAX Extend-C18**
773450-902
4.6 x 150 mm, 5 µm

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

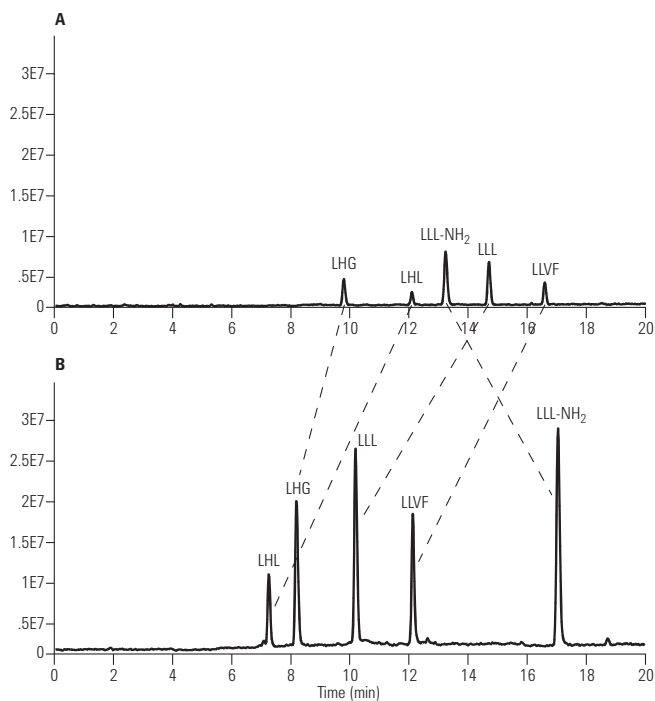
流量: 0.25 mL/min

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。

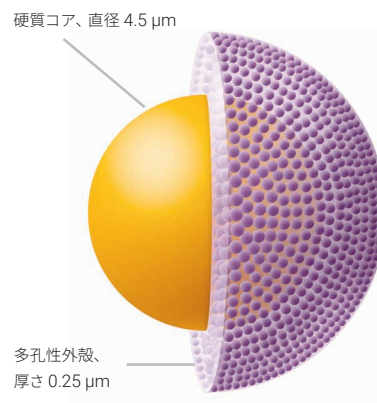


Poroshell 300 AB

- 表面多孔質粒子で生体分子を高速分離します
- 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）します
- 低 pH では Poroshell 300SB を、高 pH では 300Extend-C18 を使用して長寿命を実現します
- 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できます

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。



HPLC 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 未満で 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、温度を 40 °C 未満とし、緩衝液は 0.01 ~ 0.02 M の範囲の低濃度のものを使用します。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

4 インタクトタンパク質分析

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

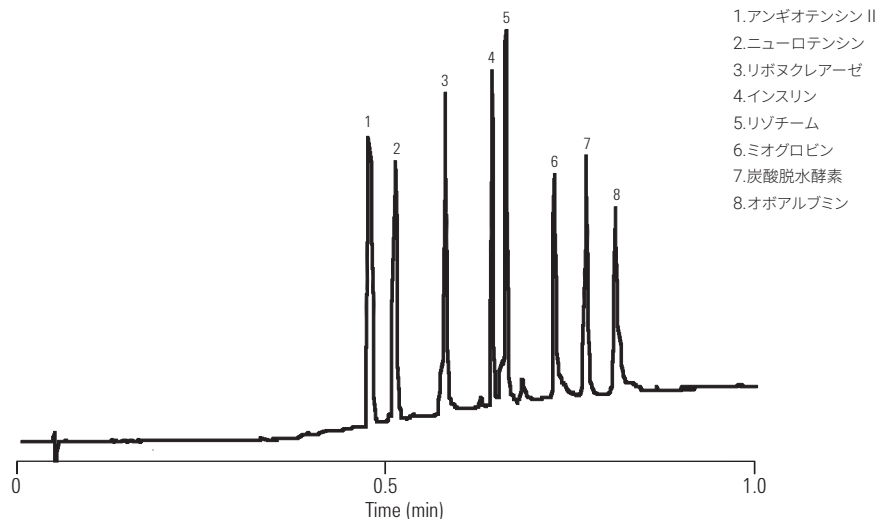
流量： 0.3 mL/min

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

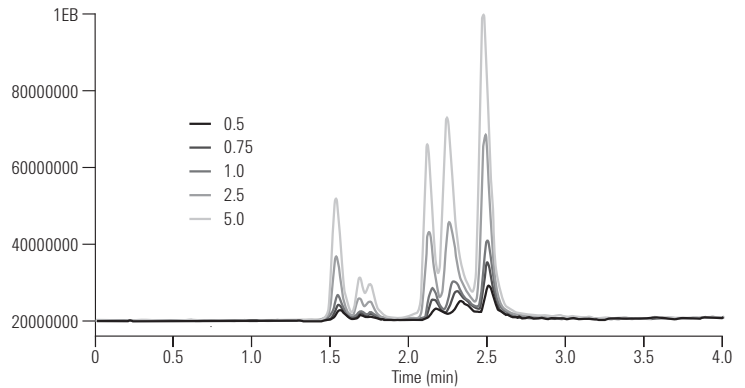
詳細情報：

「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**)

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 % ギ酸 B: ACN + 0.1 % ギ酸
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 **5994-4803JAJP** を参照してください。

カラム消耗品関連カタログ/セレクションガイド



4 インタクトタンパク質分析

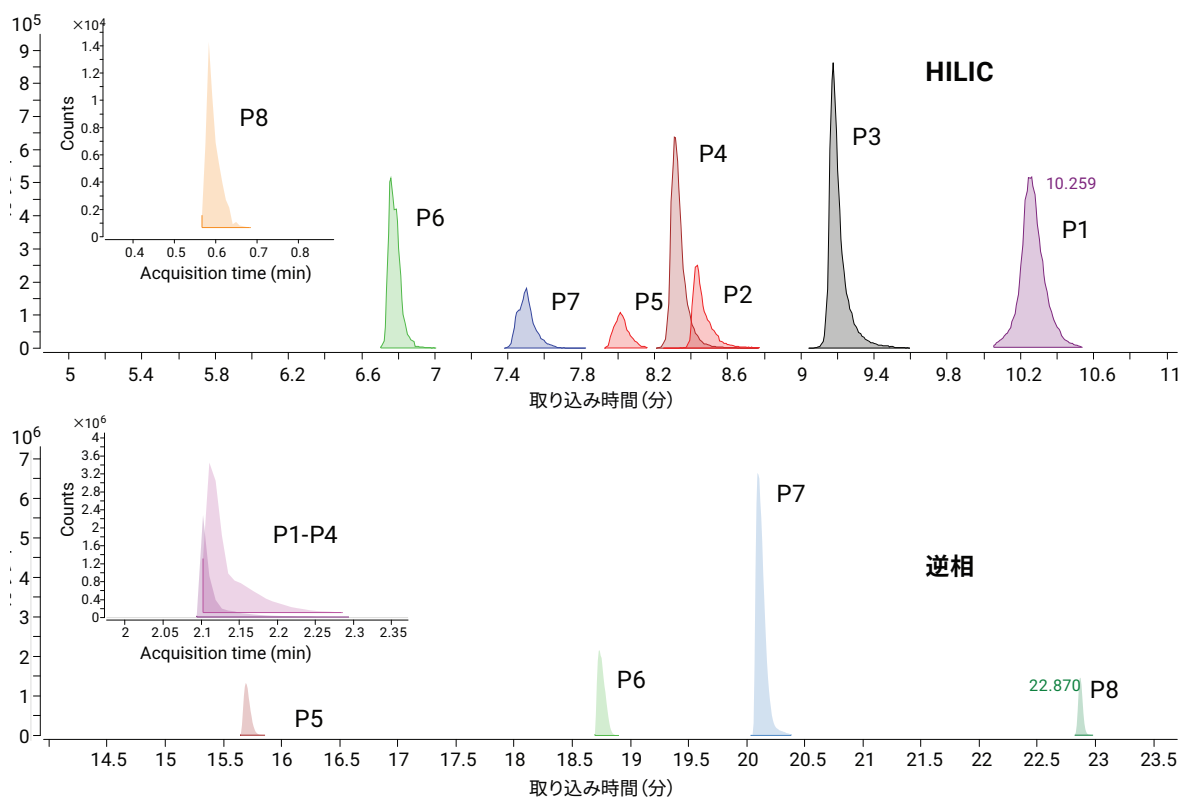
ZORBAX 300 Å HILIC

Agilent ZORBAX 300 Å HILIC カラムは、逆相 ZORBAX RRHD カラムと同じ全多孔性の 1.8 μm 粒子をベースにし、UHPLC による分離の際、低い pH や高圧でも卓越した安定性を示します。HILIC 選択性は、最後ではなく最初に溶出するような最も疎水性の高い物質を使用して、逆相分離を高いレベルで相補します。また、HILIC は親水性の高いペプチドやグリコシル化されたタンパク質のような、逆相ではあまり保持されなかった物質を保持できます。300 Å ポアにより、この HILIC カラムは小さなペプチドと同時に、それよりも大きなインタクトタンパク質にも適合します。

カラムの仕様

結合相	粒子サイズ	ポアサイズ	pH 範囲	最大圧力
HILIC	1.8 μm	300 Å	1~8	1200 bar

ペプチドとタンパク質の分離におけるその他の選択性



両方のカラムに入った 8 つのペプチドのリテンションタイムと分離能を比較

HILIC の条件

カラム： Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション
High Definition 300-HILIC、2.1 x 100 mm、1.8 μm
(部品番号 858750-901)

溶出液： A：95% ACN + 5% の水；
B：50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.0

流量： 0.4 mL/min

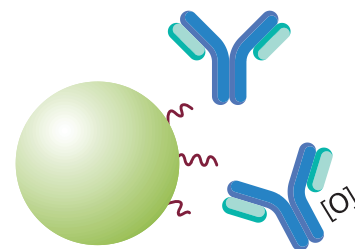
グラジエント： 時間 (分) % B
0 0
15 100
15.1 0
20 0

温度： 55 °C

ペプチド	シーケンス	疎水性	RP リテンション タイム (分)	HILIC リテンション タイム (分)
P1	APPR	1.83	2.103	10.259
P2	GKLLK	3.84	2.118	8.437
P3	ALGAQK	4.57	2.119	9.181
P4	AVSGLR	9.15	2.13	8.316
P5	YLLEAK	19.64	15.698	8.014
P6	VYSNFLRGK	23.14	18.742	6.583
P7	SLTTLLR	24.79	20.109	7.492
P8	VNFYAWKR	27.64	22.87	0.587

ペプチドは両カラムで共通です。

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します
- 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です
- 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します
- 優れた性能：すべての充填剤バッチが NIST mAb 標準でテスト済みです
- 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します
- 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します

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 に下げた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 μm

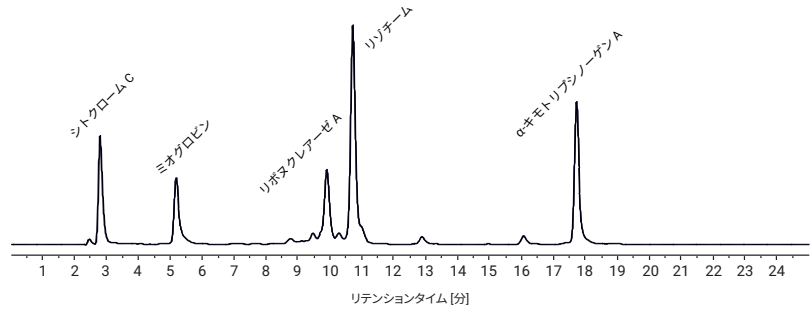
溶出液 A: 2 M 硫酸アンモニウム、
50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

溶出液 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 μL
検出: UV, 220 nm



カラム: AdvanceBio HIC
4.6 x 100 mm, 3.5 μm

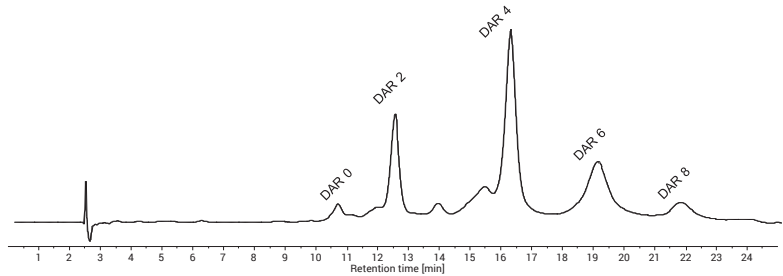
溶出液 A: 2 M 硫酸アンモニウム、
50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

溶出液 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

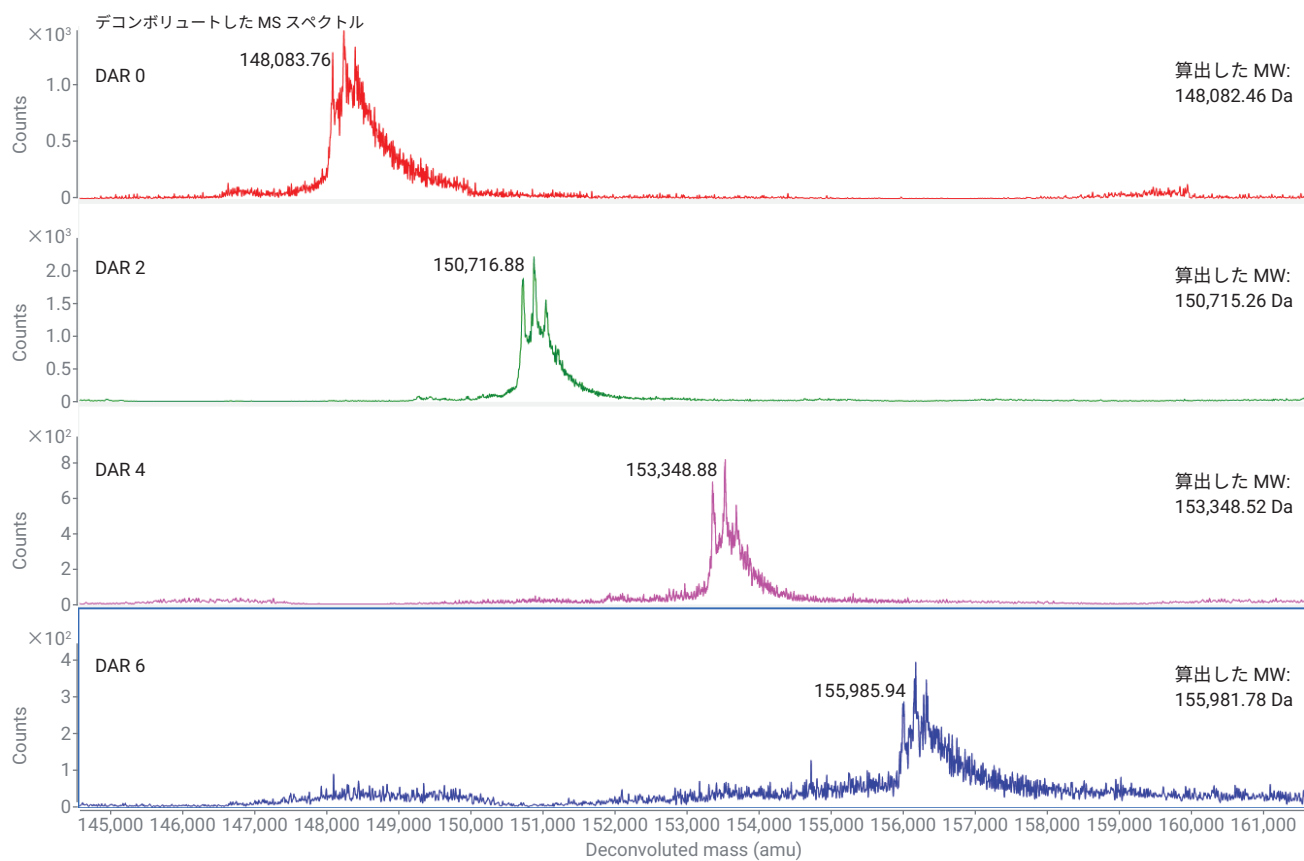
流量: 0.5 mL/min
温度: 30 °C
注入量: 5 μL
検出: UV, 220 nm



4 インタクトタンパク質分析

MS 分析で AdvanceBio HIC DAR 値を正確に確認

LC ネイティブ MS メソッドでは、システイン結合 ADC DAR も測定できます。アジレントでは、ネイティブ LC/MS 条件下でインタクトシステイン結合の DAR を特性解析するための D-LC/MS メソッドを開発しました。ワークフローでは、一次元目で Agilent AdvanceBio HIC カラム、二次元目で脱塩カラムとして Agilent AdvanceBio SEC カラム、および高感度の MS メソッドを使用して、さまざまな DAR を持つすべての ADC のインタクト質量を正確に測定します。



さまざまなプレソキシマブドチン DAR (DAR 0 ~ DAR 6) のネイティブ SEC LC/MS 分析のデコンボリュートした MS スペクトル

製品の詳細情報

AdvanceBio RP-mAb カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	AdvanceBio RP-mAb C4 USP L26	AdvanceBio RP-mAb SB-C8 USP L7	AdvanceBio RP-mAb Diphenyl USP L11
4.6 x 150	3.5	793975-904	783975-906	793975-944
4.6 x 100	3.5	795975-904	785975-906	795975-944
4.6 x 50	3.5	799975-904	789975-906	799975-944
2.1 x 150	3.5	793775-904	783775-906	793775-944
2.1 x 100	3.5	795775-904	785775-906	795775-944
2.1 x 75	3.5	797775-904	787775-906	797775-944
2.1 x 50	3.5	799775-904	789775-906	799775-944

PLRP-S HPLC カラム

寸法 (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	PL1312-1803

(続く)

4 インタクトタンパク質分析

PLRP-S HPLC カラム

寸法 (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
1.0 x 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
1.0 x 10	5			PL1C12-2502	
1.0 x 150	3	PL1312-3300			
1.0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
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

ZORBAX 300 Å StableBond カラム

説明	寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
内径 4.6 mm 分析カラムとガード							
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	
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	
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	
内径 3.0 mm 分析カラムとガード							
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			
内径 2.1 mm 分析カラムとガード							
ナローポア	2.1 x 250	5	881750-902				
ナローポア	2.1 x 150	5	883750-902	883750-906	883750-905	883750-909	
推奨ガード 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 (部品番号 820999-901) が必要です

(続く)

ZORBAX 300 Å StableBond カラム

説明	寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
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 150	1.8	863750-902	866750-906		863750-914	863750-944
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
内径 1.0 mm 分析カラムとガード							
マイクロボア	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 RRHD	1.0 x 50	1.8					965600-944
セミ分取カラムとガード							
セミ分取	9.4 x 250	5	880995-202	880995-206	880995-205	880995-209	
推奨ガードカートリッジ、2個*	9.4 x 15	7	820675-124	820675-124	820675-124	820675-124	
PrepHT カートリッジカラム (フィッティングキット 820400-901 が必要) とガード							
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 ガード、2個*	17.0 x 7.5	5	820212-921	820212-918		820212-924	
キャピラリーガラス管カラム							
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				

*ガードハードウェアキット (部品番号 820999-901) が必要です

(続く)

ヒントとツール

アジレント機器を最大限に活用するには、www.agilent.com/chem/biologic-columns-user-guides をご覧ください。

4 インタクトタンパク質分析

ZORBAX 300 Å StableBond カラム

説明	寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	300SB-C18 USP L1	300SB-C8 USP L7	300SB-CN L10	300SB-C3 USP L56	300-Diphenyl USP L11
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				
トラップ/ガード、5個**	0.3 x 5	5	5065-9913	5065-9914			
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 50	3.5	5064-8300	5065-4463			
ナノカラム (PEEK フェーズドシリカ)							
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			

*ガードハードウェアキット (部品番号 820999-901) が必要です

**ガードハードウェアキット (部品番号 5065-9915) が必要です

ZORBAX 300 Å Extend-C18 カラム

説明	寸法 (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
ナローポア RR	2.1 x 150	3.5	763750-902
ナローポア RR	2.1 x 100	3.5	761775-902
ナローポア 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

Poroshell 300 カラム

説明	寸法 (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 (部品番号 820999-901) が必要です

ZORBAX 300 Å HILIC カラム

説明	部品番号
ZORBAX 300 Å HILIC, 2.1 x 100 mm, 300 Å, 1.8 μm	858750-901
ZORBAX 300 Å HILIC, 2.1 x 50 mm, 300 Å, 1.8 μm	857750-901

Agilent AdvanceBio HIC カラム

説明	部品番号
AdvanceBio HIC, 4.6 x 100 mm, 450 Å, 3.5 μm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 x 100 mm, 3.5 μm, メソッドバリデーションキット	685975-908K
AdvanceBio HIC, 4.6 x 30 mm, 450 Å, 3.5 μm	681975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 x 30 mm, 3.5 μm, メソッドバリデーションキット	681975-908K

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

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。

ペプチドのマッピングと分析

アミノ酸配列、翻訳後修飾、および合成関連の不純物を正確に判断

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（PTM）を調べる必要があります。疎水性に基づいてペプチド内の1つのアミノ酸修飾を分離する能力と、質量確認のためのMS検出との互換性の両面から、一般に好まれる手法は逆相分離です。

アジレントは、グローバルなペプチドマッピング分析、脱アミド化 PTM の詳細観察、UV または MS 検出、高または低 pH 移動相条件など、個々のユーザーの分離ニーズに応えるため、複数のペプチド分析用カラムオプションを用意しています。



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
タンパク質分解物中のペプチド	AdvanceBio ペプチドマッピング	さまざまな分子量域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 宿主細胞タンパク質分析	AdvanceBio ペプチドプラス	AdvanceBio ペプチドマッピングとは異なる選択性を持つ帯電表面 C18 結合相。このカラムは、脱アミド化ペプチド変異体の分離や、ギ酸移動相および高いロード量条件下での分離に優れています。
合成ペプチドの精製または不純物分析	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プでの滅菌処理も可能です。

ヒントとツール

ペプチドの HILIC 分離では、ZORBAX RRHD 300Å HILIC をご検討ください。詳細については、**59 ページ**を参照してください。
PLRP-S について、詳しくは「インタクトタンパク質分析」セクションの「PLRP-S」セクション (**55 ページ**) を参照してください。
部品番号と製品情報については、**71 ページ**の表を参照してください。

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ピングで主要ペプチドを同定できます
- **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。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方法については、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

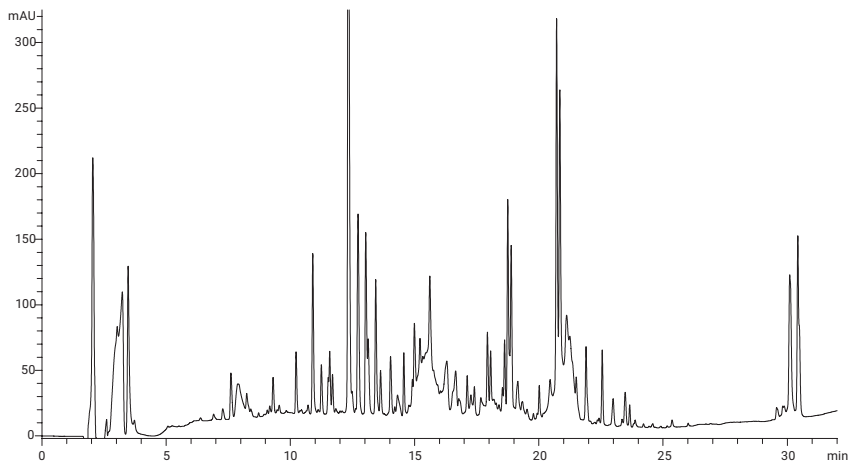
移動相: A: H₂O + 0.1 % ギ酸 (v/v)
 B: アセトニトリル + 0.1 % ギ酸 (v/v)

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)

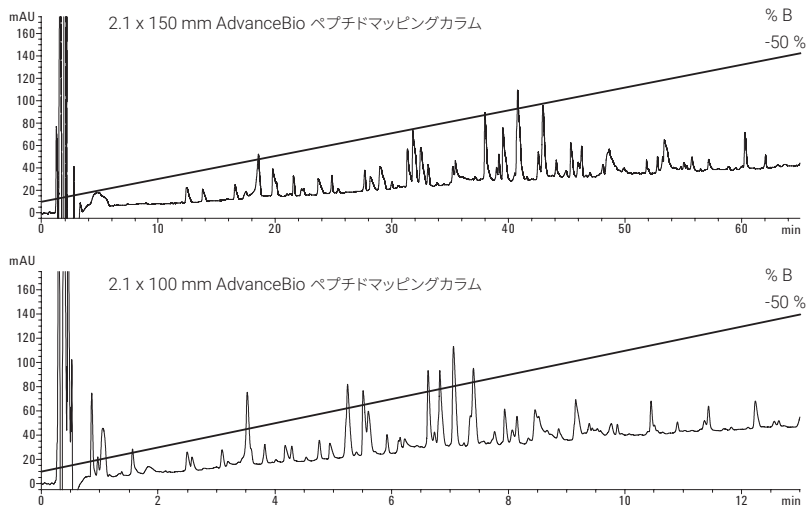
流量: 条件により異なる

注入量: 15 μL

温度: 40 °C

検出器: UV、215/220 nm

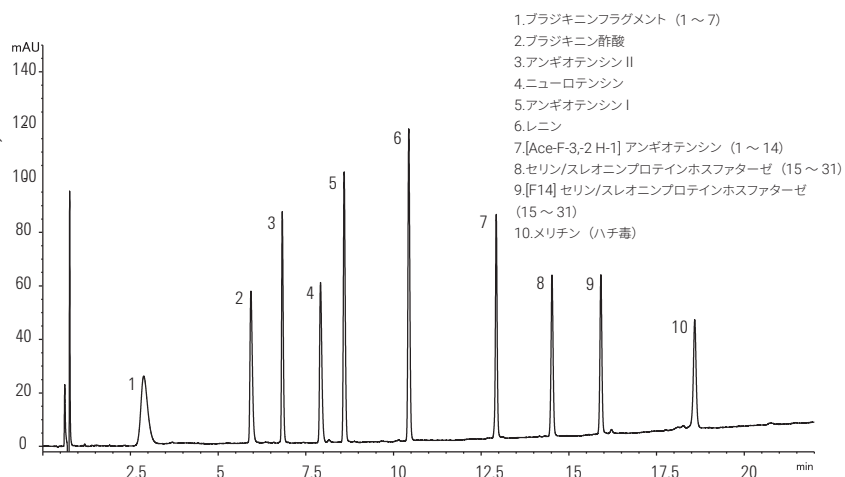
サンプル: 1290 Infinity LC システムと
 6530 Accurate-Mass 四重極
 飛行時間型 LC/MS



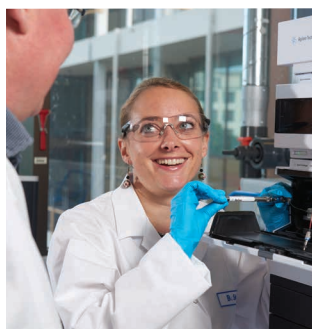
AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの最適化による高速ペプチドマッピング分析の実現。グラジエント 10 ~ 40 % B、DAD : 215 nm、40 °C。上図、2.1 × 150 mm カラムを用いた 75 分の分離により 59 ペプチドピークを生成 (流量 0.2 mL/min、211 bar)。下図、2.1 × 100 mm カラムを用いて最適化した 14 分の分離により 57 ペプチドピークを生成 (流量 0.6 mL/min、433 bar)。

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)
 部品番号 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。混合物は分子量の範囲が 757 ~ 2845 Da の 10 種類の親水性、疎水性、および塩基性ペプチドを含有。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性を保証



CrossLab リアルストーリー

生化学分野での活用例

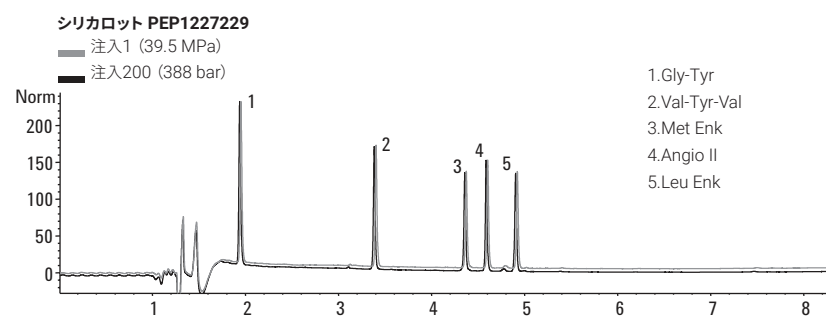
大幅なダウンタイム短縮とユーザーの信頼性向上を実現した、実際のラボの事例をご覧ください。

www.agilent.com/chem/story25

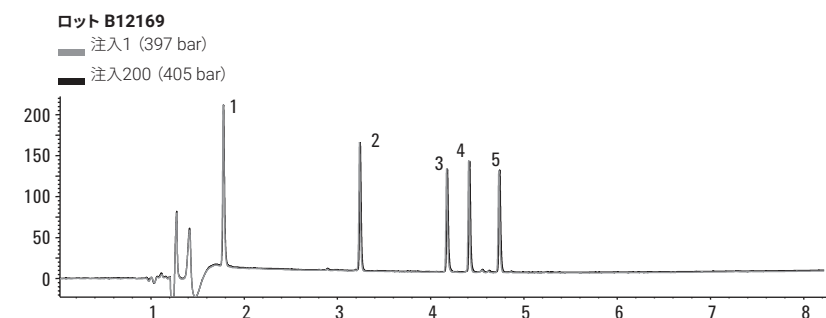
5 ペプチドのマッピングと分析

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
注入量: 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。

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この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じ試料です。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。



AdvanceBio ペプチドプラス

AdvanceBio ペプチドプラスカラムは、ターゲットペプチドと不純物、翻訳後修飾の分離用に最適化された、逆相表面多孔質粒子 HPLC カラムです。ハイブリッドエンドキャップ処理された C18 固定相でポアサイズ 100 Å の 2.7 µm 粒子を修飾することにより、帯電表面を形成しています。帯電表面を持つ C18 カラムを使用すれば、脱アミド化ペプチドとその未修飾変異体の分離度が劇的に向上し、従来の C18 カラムよりも脱アミド化ペプチドと未修飾型ペプチドに対する選択性が大幅に強化されます。

脱アミド化では、アスパラギンがアスパラギン酸またはイソアスパラギン酸に変換されます。脱アミド化ペプチドでは 1 Dalton の質量シフトがよくあるので、このような小さな質量変化を検出するために LC/MS 手法がよく使われます。アスパラギンが対応するカルボン酸性基に変換されても、低 pH では疎水性が大きく変化しないため、脱アミド化ペプチドが未修飾型と共溶出する可能性があります。これが脱アミド化ペプチドの定量と検出を妨げたりする可能性があります。質量分析自体は脱アミド化ペプチドを分離できないため、分離が重要であることに注意してください。

分離能の優れた信頼性の高いペプチドマッピング分離を実現するうえで最も重要な点は、適切なカラムを選択することです。ペプチド分離に適したカラムのポアサイズは 100 Å ~ 120 Å で、一般的に最適な相は C18 です。生物製剤分野を中心に、生物学的分離に表面多孔質カラムが使われることも増えています。これは、表面多孔質カラムでは、タンパク質やペプチドの質量拡散に伴う制約に対応できるためです。表面多孔質カラムでは、拡散経路が短くなるため、小さい粒子のカラムで生じがちなシステム背圧の上昇を引き起こさずに、大きな分子を高線速度で分離することができます。一般に、ペプチドの逆相分離は、低 pH (pH<3) および高温 (>40 °C) で実行されます。

PTM または不純物

脱アミド化変異体の分離 - プラスに帯電した表面を持つ C18 により、脱アミド化変異体の選択性が向上します

データ精度

ピーク形状と MS 感度 - 帯電表面により、ギ酸で良好なピーク形状を実現します

卓越したロード量

低存在量のペプチドを同定 - 帯電表面 C18 相は高いロード量に対する耐性が向上しています

データ品質

優れた見識を持つ科学者のニーズを満たす強力な QC プロセスが可能です

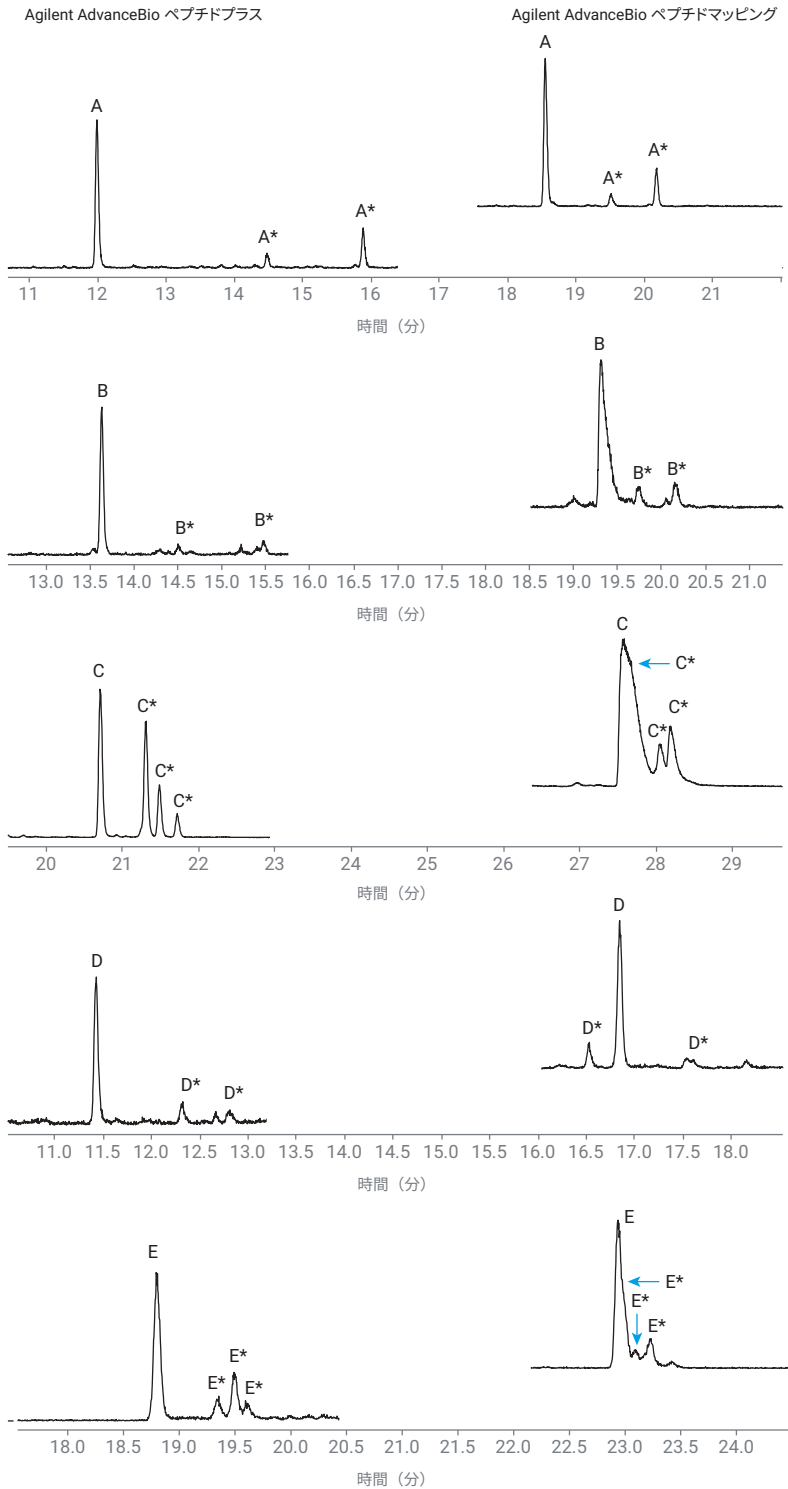
5 ペプチドのマッピングと分析

脱アミド化変異体の選択性向上

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II LC	
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm、(部品番号 695775-949) Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、2.1 × 150 mm、(部品番号 653750-902)	
カラム温度	60 °C	
移動相	A) 0.1 % 酢酸水溶液 B) 0.1 % 酢酸アセトニトリル溶液	
流量	0.4 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	% B
	0	3
	2	3
	40	40
	50.5	100
	53	3
ポストタイム	7 分	

パラメータ	Agilent 6546 Q-TOF
イオン源	Agilent Jet Stream を使用
ガス温度	323 °C
乾燥ガス流量	13 L/min
ネブライザガス	35 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	125 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	m/z 300 ~ 1,700
MS スキャンレート (スペクトル/秒)	5
取り込みモード	ポジティブモード、拡張ダイナミックレンジ (2 GHz) セントロイドデータフォーマット

ペプチド	シーケンス (非脱アミド化型)	[M+2H] ²⁺ の m/z
A	NQVSLTCLVK	581.8103
B	FNWYVDGVEVHNAK	839.4047
C	VVSVLTVLHQDWLNGK	904.5071
D	NTAYLQMNSLR	655.8300
E	GLEWVGYIDPSNGETTYNQK	1136.0323



Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムと Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムの比較。未修飾ペプチド (各ペプチドは、表 1 のアルファベットを表記) とその脱アミド化ペプチド (表 1 のアルファベットに * を示す) を同条件 (0.1% のギ酸による移動相調整) で分離。

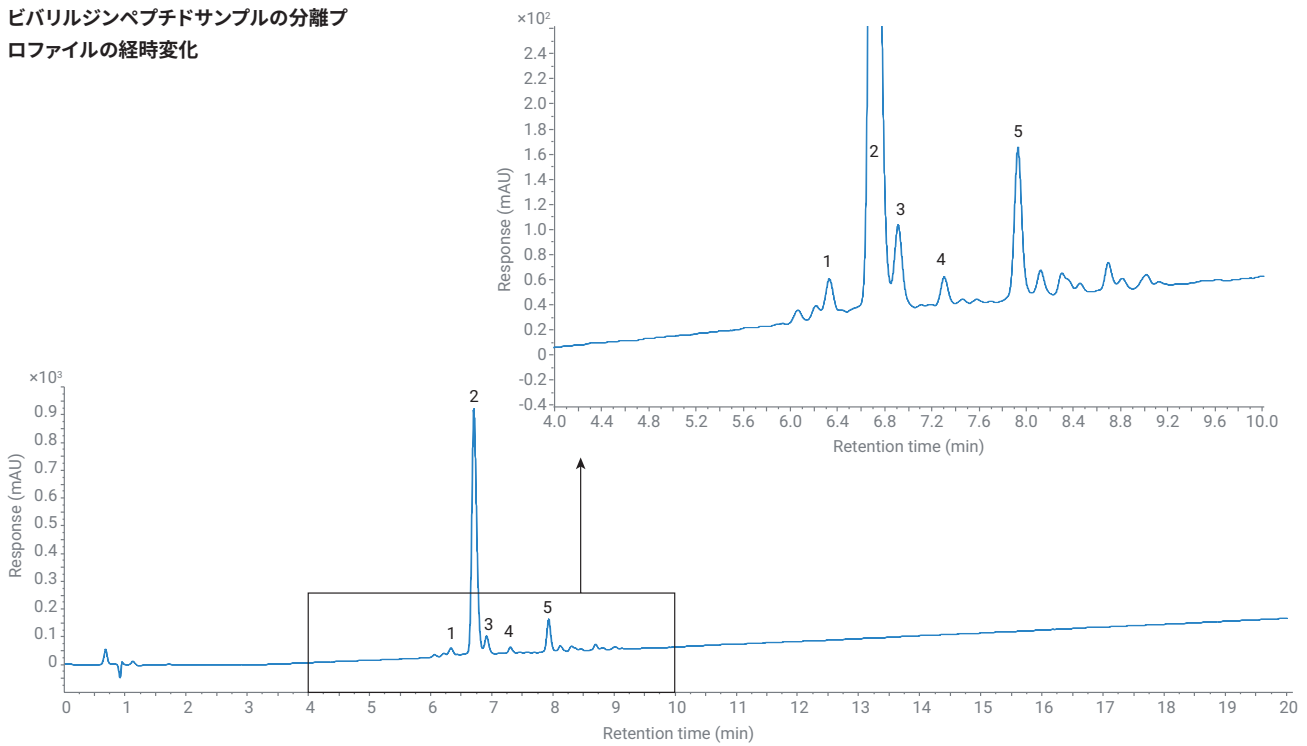
5 ペプチドのマッピングと分析

HPLC 条件

カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm (部品番号 695775-949)
移動相	A) 0.1 % 酢酸水溶液 B) 0.1 % 酢酸アセトニトリル溶液
グラジエント	0分：17 % B 2分：17 % B 22分：37 % B 24分：95 % B 26分：95 % B 26.1分：17 % B
ポストタイム	5分
流量	0.4 mL/min
カラム温度	60 °C
注入量	5 µL (UV)、1 µL (MS)

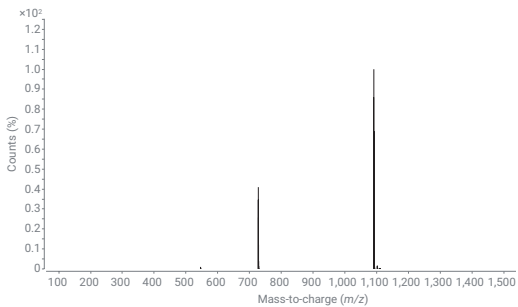
パラメータ	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	350 °C
乾燥ガス流量	10 L/min
ネブライザガス	30 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	125 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	m/z 100 ~ 1,700 (MS)、 m/z 50 ~ 1,700 (MS/MS)
MS スキャンレート	8 スペクトル/秒
MS/MS スキャンレート	3 スペクトル/秒
取り込みモード	ポジティブ、拡張ダイナミックレンジ (2 GHz)
コリジョンエネルギー	3.6 × (m/z) /100 - 4.8

ビバリルジンペプチドサンプルの分離プロファイルの経時変化

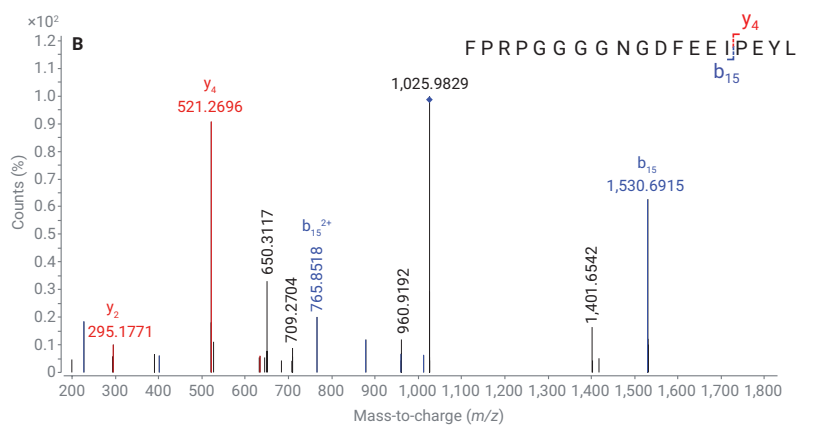


ピーク 1 は 17 位または 18 位でグルタミン酸を失う

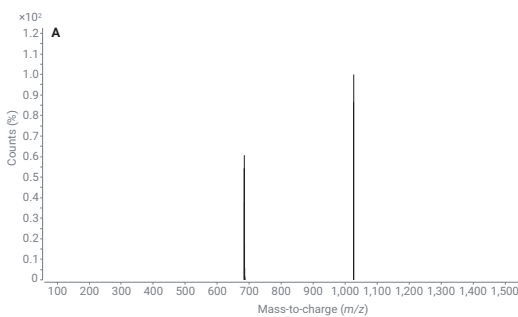
主製品の MS スペクトル (ピーク 2)、
FPRPGGGGNGDFEIEPEYL



不純物の MS/MS スペクトル (ピーク 1)、
不明のグルタミン酸残留物の位置が判明

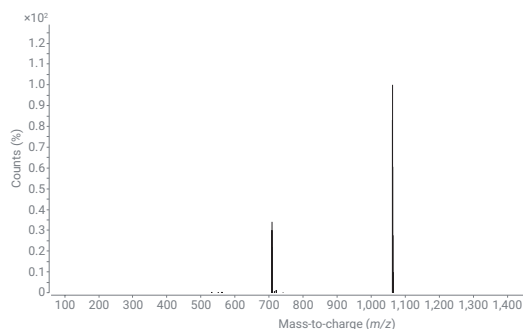


不純物の MS スペクトル (ピーク 1)

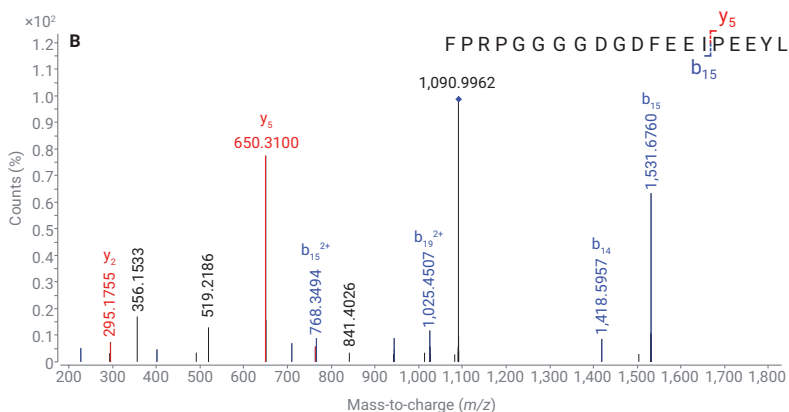


5 ペプチドのマッピングと分析

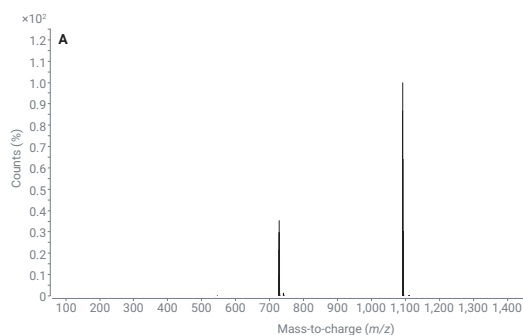
主製品の MS スペクトル (ピーク 2)、 FPRPGGGNGDFEIEPEEYL



不純物の MS/MS スペクトル (ピーク 1)、 Asn 脱アミド化の位置が判明



不純物の MS スペクトル (ピーク 5)



ピーク	質量 (Da)	ピーク ID	ターゲット質量 (Da)	質量誤差 (ppm)
1	2,049.95	Glu 欠失	2,049.94	1.71
2	2,178.99	製品	2,178.99	1.65
5	2,179.97	脱アミド化	2,179.97	2.02

ピーク 5 は脱アミド化を示す - 9 位の Asn は Asp に変換

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 **5991-2348JAJP**) を参照してください。

製品の詳細情報

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
1 x 150 mm, 2.7 µm	863600-911
0.075 x 150 mm, 2.7 µm	5065-9925
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
0.3 x 50 mm, Fast Guard*	5065-9946

*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

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

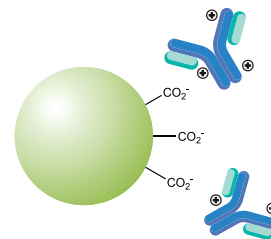
AdvanceBio ペプチドプラス

説明	部品番号
AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 150 mm, 2.7 µm	695775-949
AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 250 mm, 2.7 µm	693775-949
AdvanceBio ペプチドプラス 2.1 x 50 mm, 2.7 µm	699775-949
AdvanceBio ペプチドプラス 3.0 x 150 mm, 2.7 µm	693975-349
AdvanceBio ペプチドプラス 4.6 x 150 mm, 2.7 µm	693975-949
AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 x 150 mm, 2.7 µm、メソッドバリデーションキット	695775-949K
UHPLC ガードカラム、AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 mm, 2.7 µm, 3 パック	821725-954
UHPLC ガードカラム、AdvanceBio ペプチドプラス、3.0 mm, 2.7 µm, 3 パック	823750-952
UHPLC ガードカラム、AdvanceBio ペプチドプラス、4.6 mm, 2.7 µm, 3 パック	820750-940

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。

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、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。

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 • 1000 Å • 4000 Å	化学的安定性の高い全多孔質ポリマーにより、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。
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 1000 Å	PL-SCX は、マクロポ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。
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 • バイオモノリス QA • バイオモノリス DEAE • バイオモノリス SO ₃	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。

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しています
- 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ありません
- 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です
- モノクローナル抗体の電荷アイソフォームの分離のために、特別に設計されました

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
	10 mm	5 μm	2 ~ 12	80 °C	2.3 ~ 4.7 mL/min
	21.2 mm	5 μm	2 ~ 12	80 °C	10.6 ~ 21.2 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**)。



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

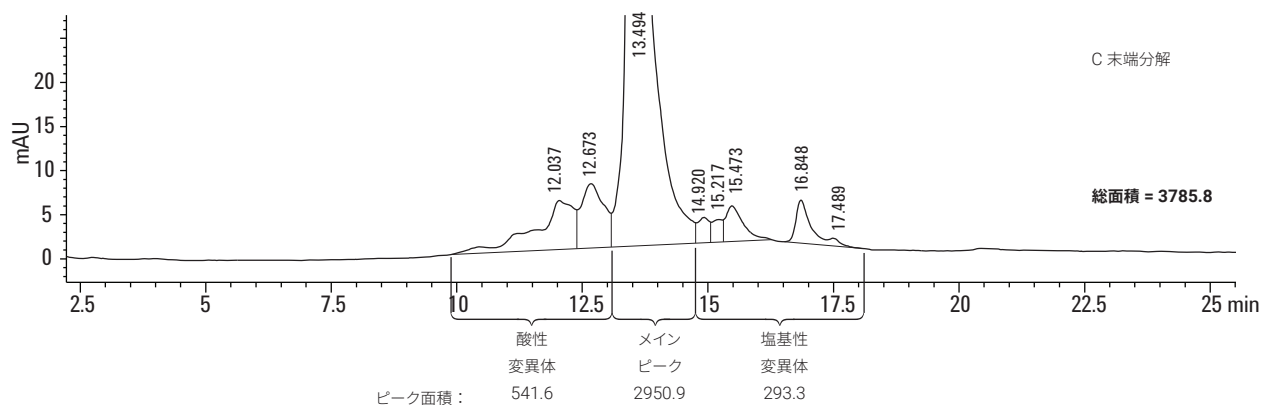
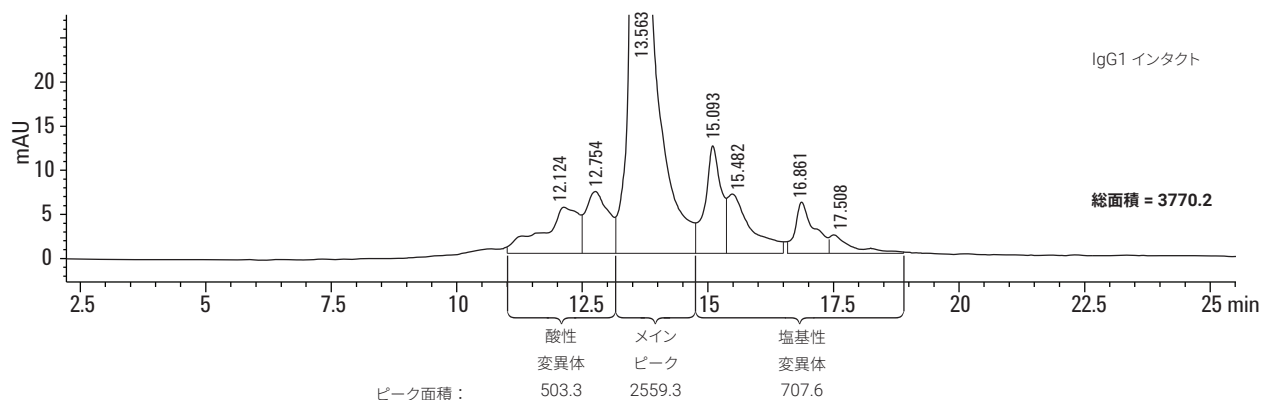
グラジエント:

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

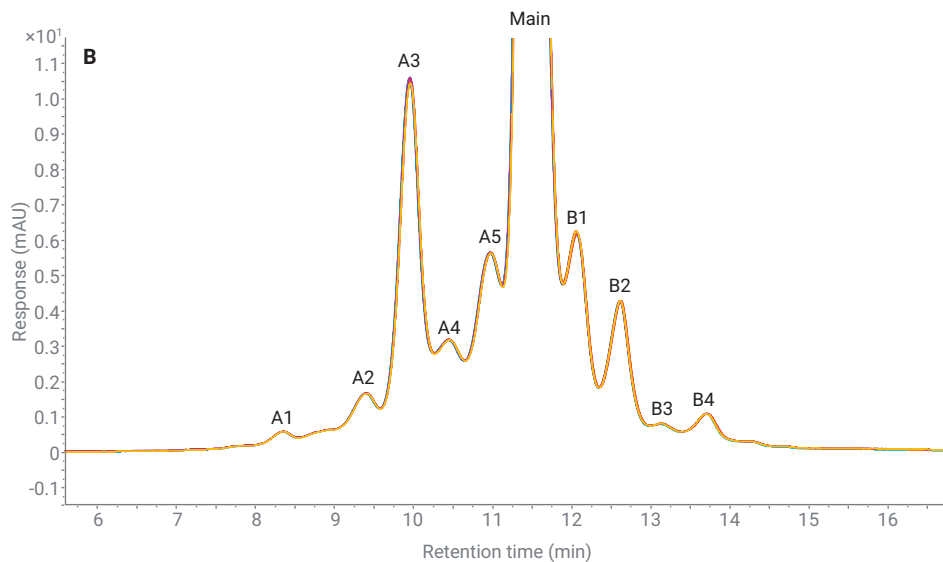
装置本体: 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC または
1100 シリーズ LC



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

6 電荷変異体の分析

トラスツズマブ電荷変異体の分離の再現性



精度 (RSD)	RT (%)	面積 (%)
A1	0.033	1.793
A2	0.016	0.701
A3	0.026	0.403
A4	0.023	0.813
A5	0.032	0.327
メイン	0.033	0.313
B1	0.038	0.329
B2	0.048	0.254
B3	0.046	3.549
B4	0.051	0.812

7回の連続分析において0.66% B/min (3.3 mM/min) のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果

トラスツズマブの 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

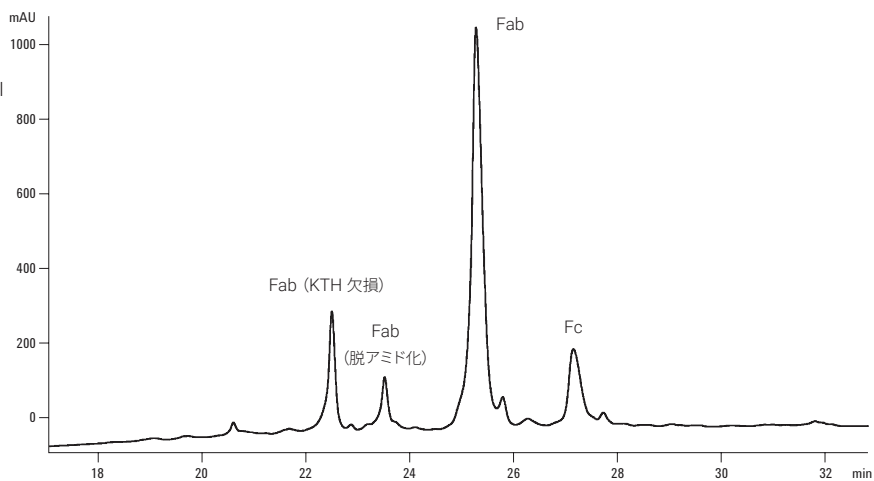
注入量: 16 μL

グラジエント:

時間 (分)	% B
0	0
39.5	80
40	100
50	100
50.5	2
60	2

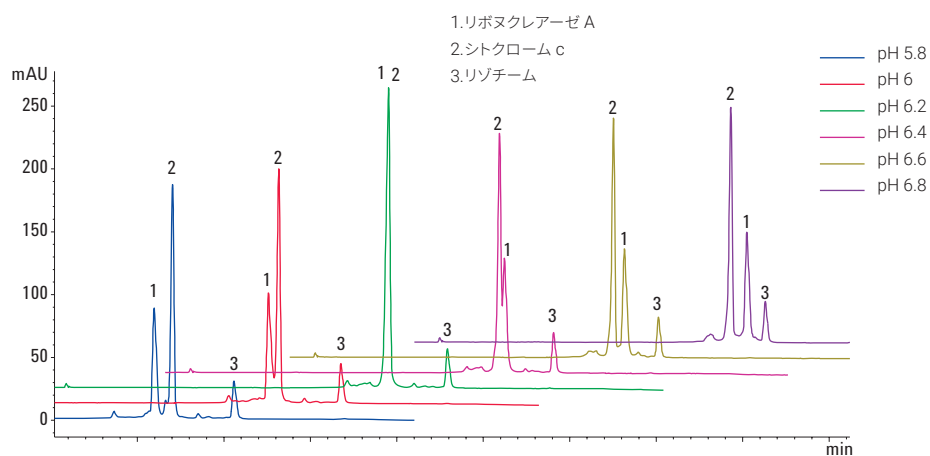
温度: 30 °C

装置本体: 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		
装置本体:	1260 Infinity パ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	注入量:	10 μL
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	サーモスタット:	4 °C
流量:	1 mL/min	温度 TCC:	25 °C
		DAD:	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

6 電荷変異体の分析

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

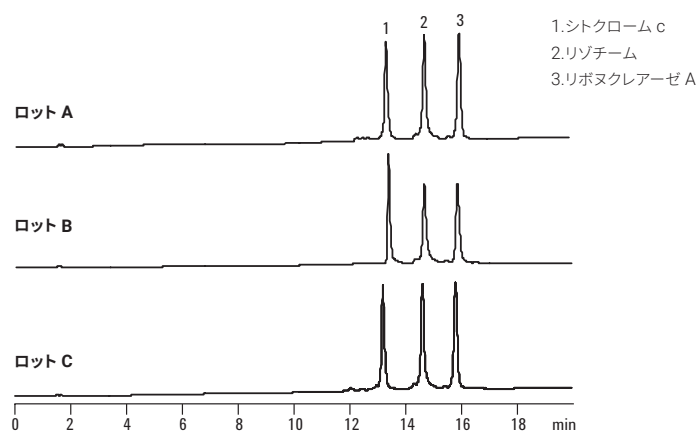
流量: 1.0 mL/min

グラジエント: 0 ~ 100 % B、42 分

温度: 25 °C

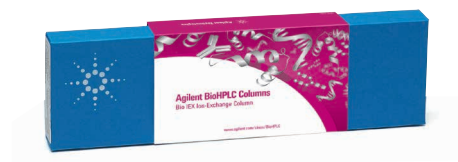
検出器: UV、214 nm

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。



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、非特異的な結合がありません
- 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、カラム容量が増加します
- 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します
- 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、容量が増加します



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 ₃ H					
WCX (弱カチオン交換) -COOH	2.1 および 4.6 mm 10 mm	1.7、3、5、および 10 μm 5 μm	2 ~ 12 2 ~ 12	80 °C 80 °C	0.1 ~ 1.0 mL/min 2.3 ~ 4.7 mL/min
SAX (強アニオン交換) -N(CH ₃) ₃	21.2 mm	5 μm	2 ~ 12	80 °C	10.6 ~ 21.2 mL/min
WAX (弱カチオン交換) -N(C ₂ 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、「分析の手引き」が記載されたアジレントのバイオカラムのアプリケーション総覧の 5 ページめを含め、この総覧の「Charge Variant Analysis (電荷変異体分析) (資料番号 **5994-0034EN**)」を参照してください。

6 電荷変異体の分析

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

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調製。

流量： 1.0 mL/min

注入量： 10 µL

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

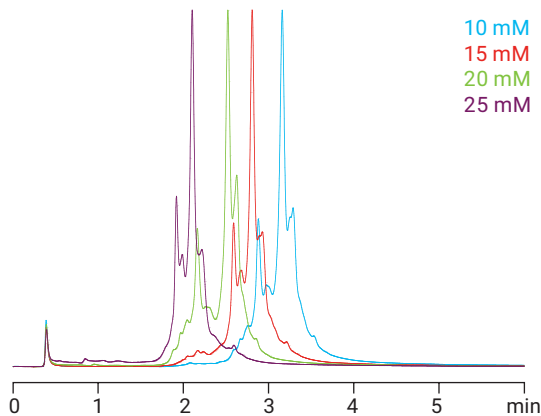
温度： 室温

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)

装置本体： 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC



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

小さい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

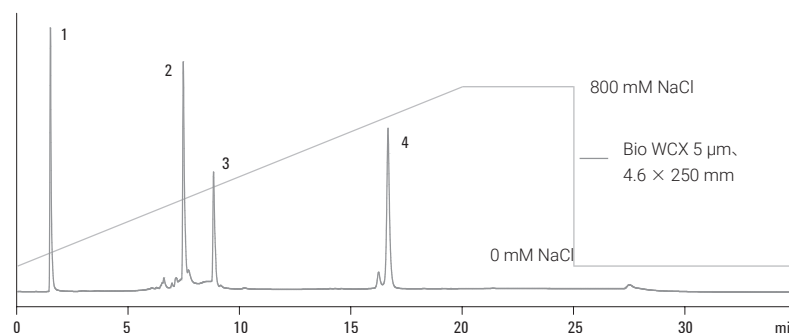
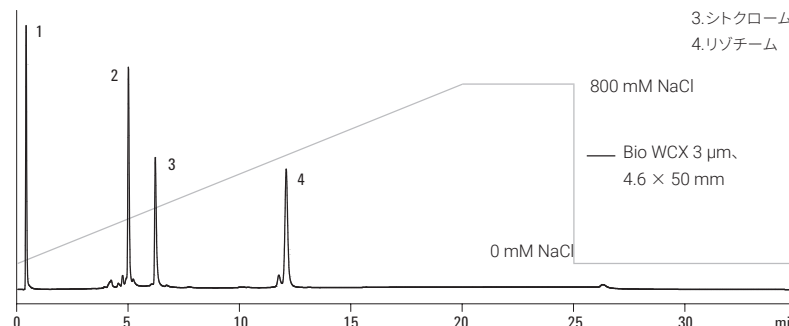
温度： 室温

検出器： UV、220 nm

サンプル濃度： 0.5 mg/mL

装置本体： 1260 Infinity バイオイネートクオータナリ LC

1. オボアルブミン
 2. リボヌクレアーゼ A
 3. シトクローム c
 4. リゾチーム



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。

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**)

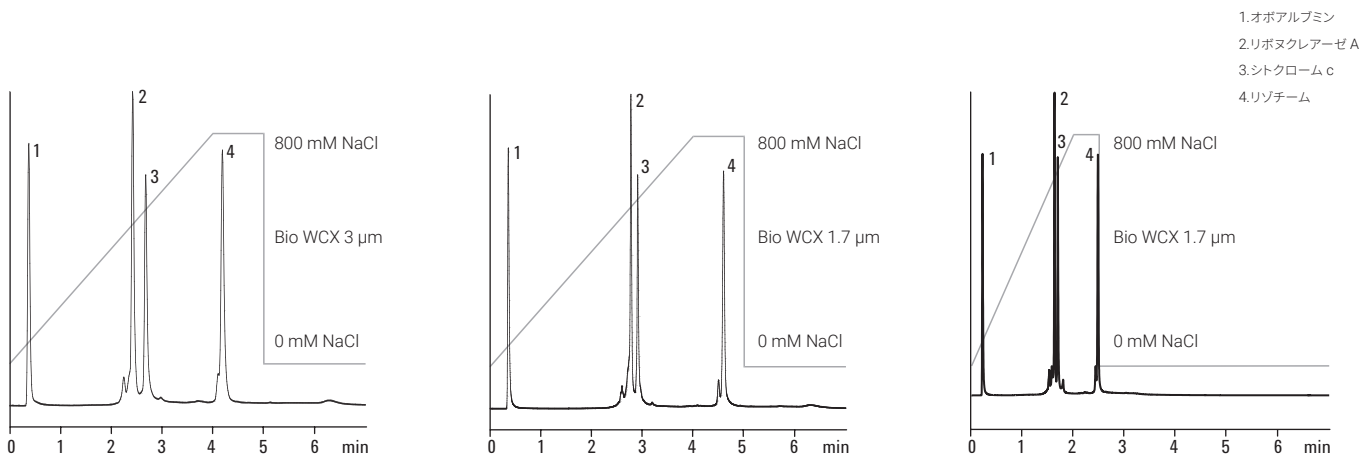
「pH グラジエント溶出によるモノクローナル抗体電荷変異体の分離の向上」(資料番号 **5990-9629JAJP**)

「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**)

6 電荷変異体の分析

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 μm
	Bio WCX、ステンレス 5190-2441 4.6 x 50 mm、1.7 μm
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
装置本体：	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（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、ピーク形状や分離能の低下なし

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：[溶媒フィルター](#)／[脱気装置](#)

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℃
流量: 0.5 mL/min
注入量: 5 μL
DAD: 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 を参照してください。

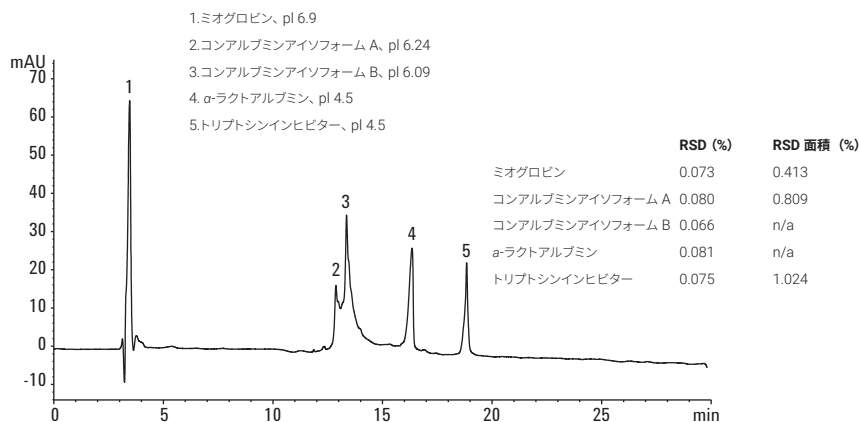


図 1. 2 M NaCl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

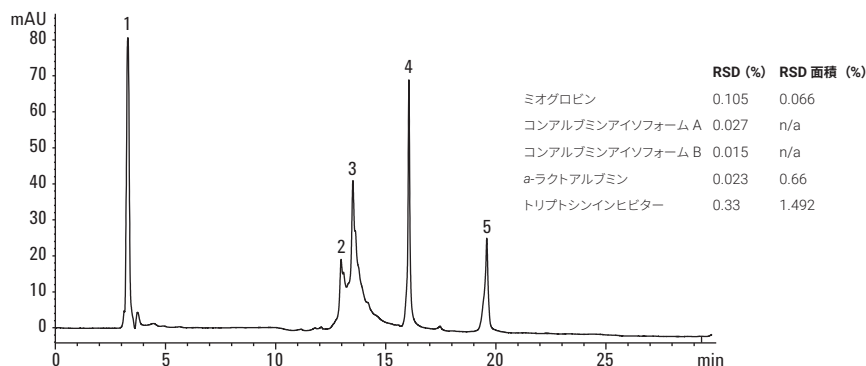


図 2. 1 M KCl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

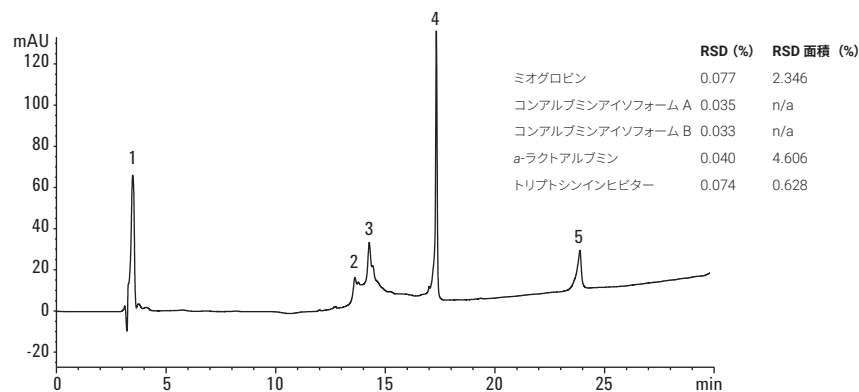


図 3. 1 M [(CH₃)₄N]Cl を溶出塩として使用した、直線グラジエントによる AEX でのタンパク質分離

PL-SAX 強アニオン交換カラム

- 小さい粒子によりクロマトグラフィー性能が優れています
- 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できます
- 優れた安定性により長寿命を実現しました



PL-SAX $-N(CH_3)_3^+$ 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。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 (mm)	粒子サイズ (μm)	ポアサイズ (\AA)	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 \AA および 4000 \AA	1 ~ 14	80 °C

ヒントとツール

オリゴヌクレオチドの分離について、詳しくは本カタログの第 12 章を参照してください。
分取レベルでの PL-SAX については、**5994-4723EN** を参照してください。

標準イオン交換 タンパク質分離

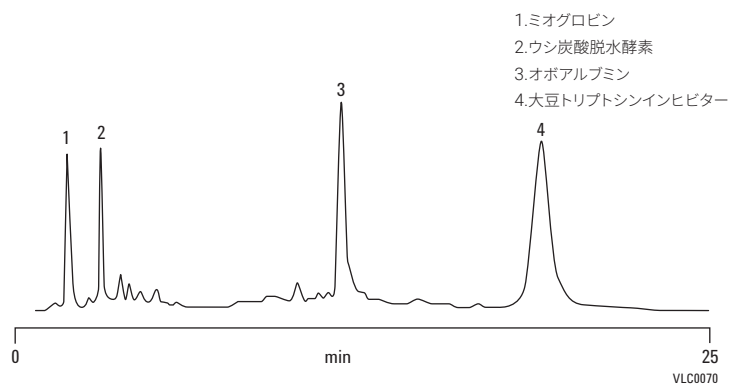
カラム: **PL-SAX 1000 Å
PL1551-1502
4.6 x 50 mm、5 μm**

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: 0 ~ 100 % B、20 分

流量: 1.0 mL/min

検出器: UV、220 nm



オボアルブミンおよび大豆トリプトシンインヒビターの分離

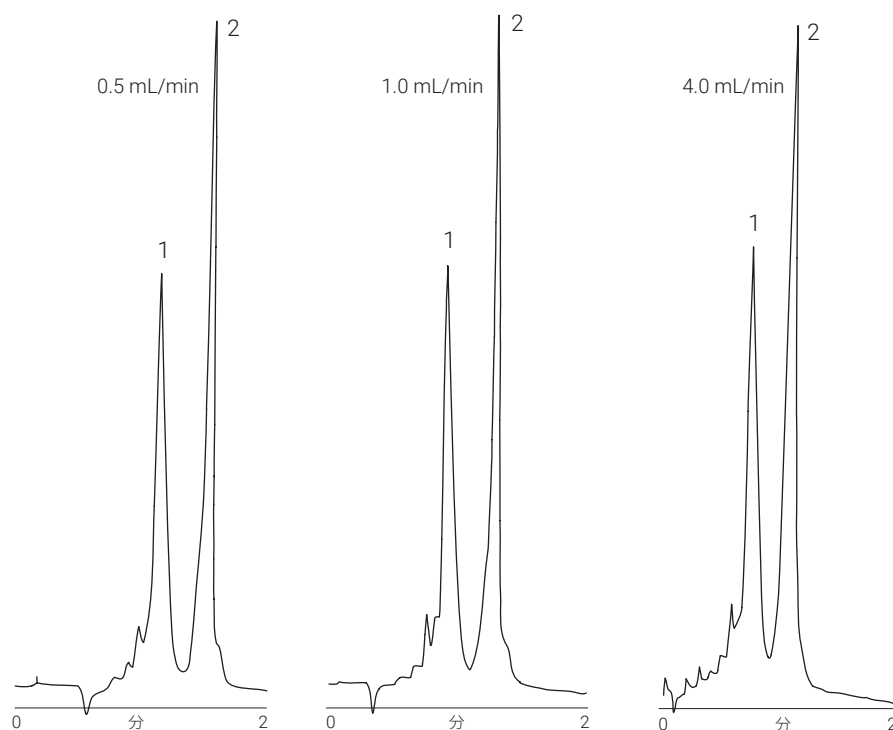
カラム: **PL-SAX 1000Å 8 μm**

緩衝液: 0.01 M トリス、pH 8、溶出塩 NaCl

流量: 1.0 mL/min

1. オボアルブミン
2. 大豆トリプトシンインヒビター

流量 (mL/分)	R _s
0.5	3.79
1.0	4.27
1.5	4.46
2.0	3.68
3.0	3.37
4.0	3.09



6 電荷変異体の分析

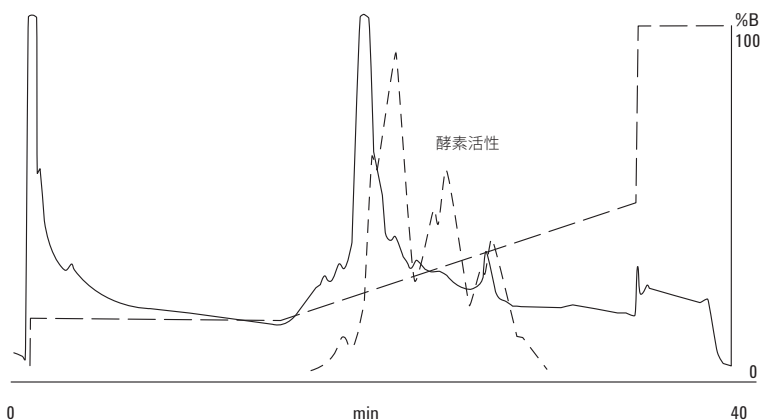
コリンキナーゼの分析

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 % エチレンジグリコール、pH 7.5
(以下は酵素活性を維持するために必要)
1.0 mM エチレンジグリコール四酢酸
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-Porterの分離、パデュー大学 (米国)

代表的な乳清タンパク質の分析

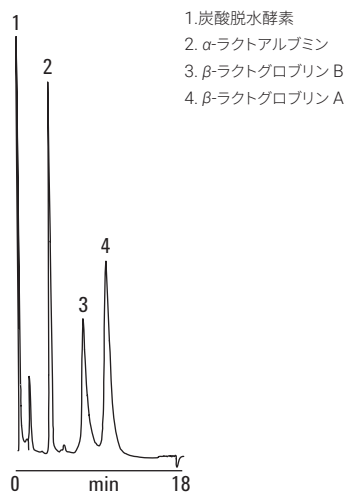
カラム：**PL-SAX 1000 Å**
PL1551-1802
4.6 x 50 mm, 8 μm

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



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です
- さまざまな溶質サイズに適したポアサイズがあります
- 優れた安定性により長寿命を実現しました



PL-SCX-SO₃ 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。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	1 ~ 14	80 °C

標準的なタンパク質の分離

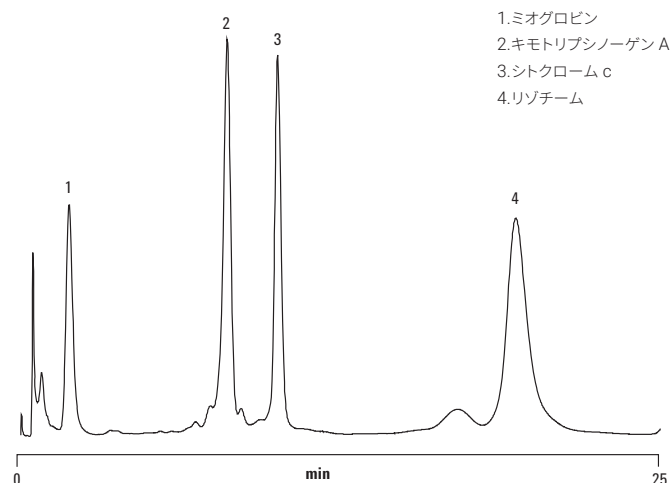
カラム： PL-SCX 1000 Å
PL1545-1502
4.6 x 50 mm、5 μm

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： 0 ~ 100 % B、20 分

流量： 1.0 mL/min

検出器： UV、280 nm



6 電荷変異体の分析

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 カラムです
- 分離が流量に左右されず、また拡散、ポア、ボイドボリュームがないため移動相と固定相の間を高速移動できます
- 連続的なチャンネルを備えたモノリスディスク (5.2 x 4.95 mm、カラム容量 100 µL) により、拡散に起因する物質移動を排除します
- 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できます。メソッドパラメータの固定化で時間と緩衝液の大幅な節約が可能です

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
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
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
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

カラムの仕様

外寸	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

アデノウイルス 5 型粒子の分析

カラム: Agilent Bio-Monolith Column QA,
5.2 mm id × 4.95 mm
(部品番号 5069-3635)

移動相: A/B: 図の凡例を参照

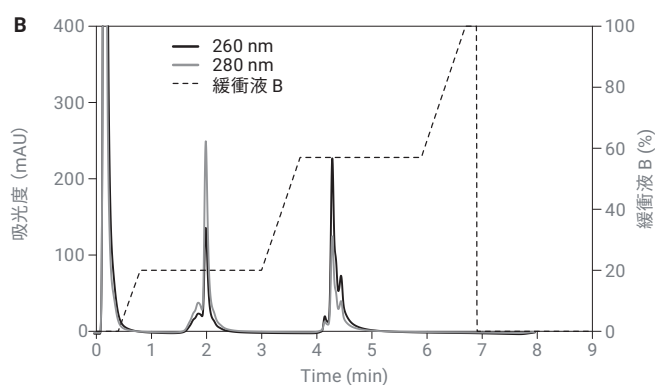
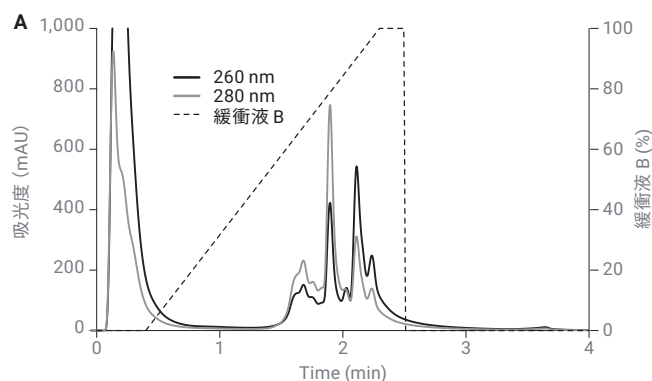
流量: 1 mL/min

グラジエント: 図の凡例を参照

検出器: 260 および 280 nm での UV

装置本体: Agilent 1100 シリーズ HPLC システム
ダイオードアレイ検出器 (DAD) を搭載

Agilent バイオモノリス QA カラムでの Ad5 細胞溶解液の分析。黒の実線は 260 nm での吸光度、灰色の線は 280 nm での吸光度。条件: (A) 緩衝液 A: 20 mM トリス、pH 7.5、緩衝液 B: 20 mM トリス、1.5 M NaCl、pH 7.5。19 カラム容量 (CV) 分、0 ~ 100 % 緩衝液 B へ直線グラジエントし、続けて 2 CV 分、100 % B で保持。(B) 緩衝液 A: 20 mM トリス-HCl 緩衝液 + 0.1 M NaCl、pH 7.5、緩衝液 B: 20 mM トリス-HCl 緩衝液 + 2 M NaCl、pH 7.5。ステップグラジエント: 20 % 緩衝液 B で 22 CV 分保持し、57 % 緩衝液 B で 22 CV 分保持。流量: 1 mL/min サンプル: Ad5 細胞溶解液。注入量: 25 μ L。



発酵中のファージ生成のモニタリング

カラム: バイオモノリス DEAE
5069-3636
5.2 x 4.95 mm

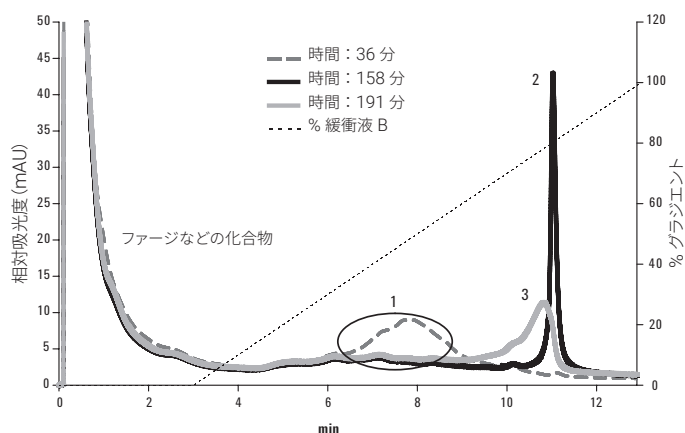
移動相: A: 125 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0
B: 125 mM リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 M 塩化ナトリウム、pH 7.0

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

装置本体: 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。

製品の詳細情報

Bio MAb HPLC カラム

寸法 (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、PEEK

寸法 (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

Bio IEX HPLC カラム、ステンレス

寸法 (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

バイオモノリス HPLC カラム選択ガイド

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



6 電荷変異体の分析

PL-SAX 強アニオン交換カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
100 x 300	30	207 bar, 3000 psi	PL1851-3102	PL1851-3103
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
7.5 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1151-3802	PL1151-3803
7.5 x 150	8	207 bar, 3000 psi	PL1151-1802	PL1151-1803
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

量	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SAX 1000 Å	PL-SAX 4000 Å
10 g	30	207 bar、3000 psi	PL1451-2702	PL1451-2703
10 g	10	207 bar、3000 psi	PL1451-2102	PL1451-2103
100 g	30	207 bar、3000 psi	PL1451-4702	PL1451-4703
100 g	10	207 bar、3000 psi	PL1451-4102	PL1451-4103
1 kg	30	207 bar、3000 psi	PL1451-6702	PL1451-6703
1 kg	10	207 bar、3000 psi	PL1451-6102	PL1451-6102

PL-SCX 強カチオン交換カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	PL-SCX 1000 Å
100 x 300	30	207 bar、3000 psi	PL1845-3102
100 x 300	10	207 bar、3000 psi	PL1845-2102
50 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1745-3703
50 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1745-3102
25 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1245-3702
25 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1245-3102
25 x 50	10	207 bar、3000 psi	PL1245-1102
7.5 x 50	8	207 bar、3000 psi	PL1145-1802
4.6 x 250	30	207 bar、3000 psi	PL1545-5703
4.6 x 150	30	207 bar、3000 psi	PL1545-3702
4.6 x 250	10	207 bar、3000 psi	PL1545-5102
4.6 x 150	10	207 bar、3000 psi	PL1545-3102
4.6 x 150	8	207 bar、3000 psi	PL1545-3802
4.6 x 50	8	207 bar、3000 psi	PL1545-1802
4.6 x 50	5	207 bar、3000 psi	PL1545-1502
2.1 x 150	8	207 bar、3000 psi	PL1945-3802
2.1 x 50	8	207 bar、3000 psi	PL1945-1802
2.1 x 50	5	207 bar、3000 psi	PL1945-1502

6 電荷変異体の分析

PL-SCX 強カチオン交換充填剤バルク

量	粒子サイズ(μm)	圧力上限	PL-SCX 1000 Å
100 g	30	207 bar、3000 psi	PL1455-4702
100 g	10	207 bar、3000 psi	PL1455-4102
1 kg	30	207 bar、3000 psi	PL1455-6702
1 kg	10	207 bar、3000 psi	PL1455-6102

ヒントとツール

アジレントのワークフローのオーダーガイドには、ヒントとコツ、初期条件、特定のアプリケーションのためのカラムやアクセサリーの部品番号が記載されています。

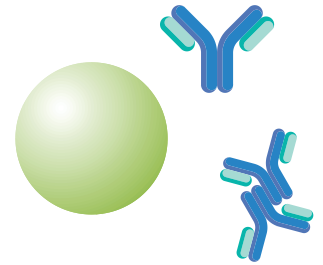
最新のイオン交換ワークフローのオーダーガイドには、PL-SAX カラムを使ったオリゴ精製と、Bio MAb カラムを使った mAb の電荷変異体分析についての資料（資料番号 **5994-4636JAJ** と **5994-6053EN**）が含まれています。

凝集およびフラグメントの分析

生体分子の凝集とフラグメンテーションの正確な測定

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、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。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。

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。凝集体形成は、ジスルフィド結合を介して共有結合されることもありますし、されないこともあります。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。



アプリケーションに適した SEC カラムの選択

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。優れた分離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 では、タンパク質とペプチドの凝集体とフラグメント分析用に 2 種類の粒子サイズが用意されています。ルーチンの SEC-UV または SEC-LS 測定には、2.7 μm 粒子カラムが推奨されます。1.9 μm 粒子は 600 bar までは安定的で、高分離能、高スループットの SEC-UV または SEC-MS 分析で堅牢性が保証されます。どちらの粒子も親水性ポリマーで被膜されているため、二次的作用が最小限に抑えられます
- 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おり、UV または MS 検出器を使用したタンパク質の分析にも適しています。3 μm の Bio SEC-3 カラムでは、5 μm の Bio SEC-5 カラムより高い分解能が得られます
- AAV、ウイルス様粒子、大型のオリゴヌクレオチドなど、高分子構造の SEC 分析のために、Bio SEC-5 カラムでは 500 \AA ~ 2000 \AA のポアサイズを利用できます
- PROTEEMA カラムと MAB カラムはジオール SEC カラムで、USP L20 が必要とされる場合に推奨されます。100 ~ 1000 \AA のポアサイズと、パイオイナートカラムハードウェアをご用意しています

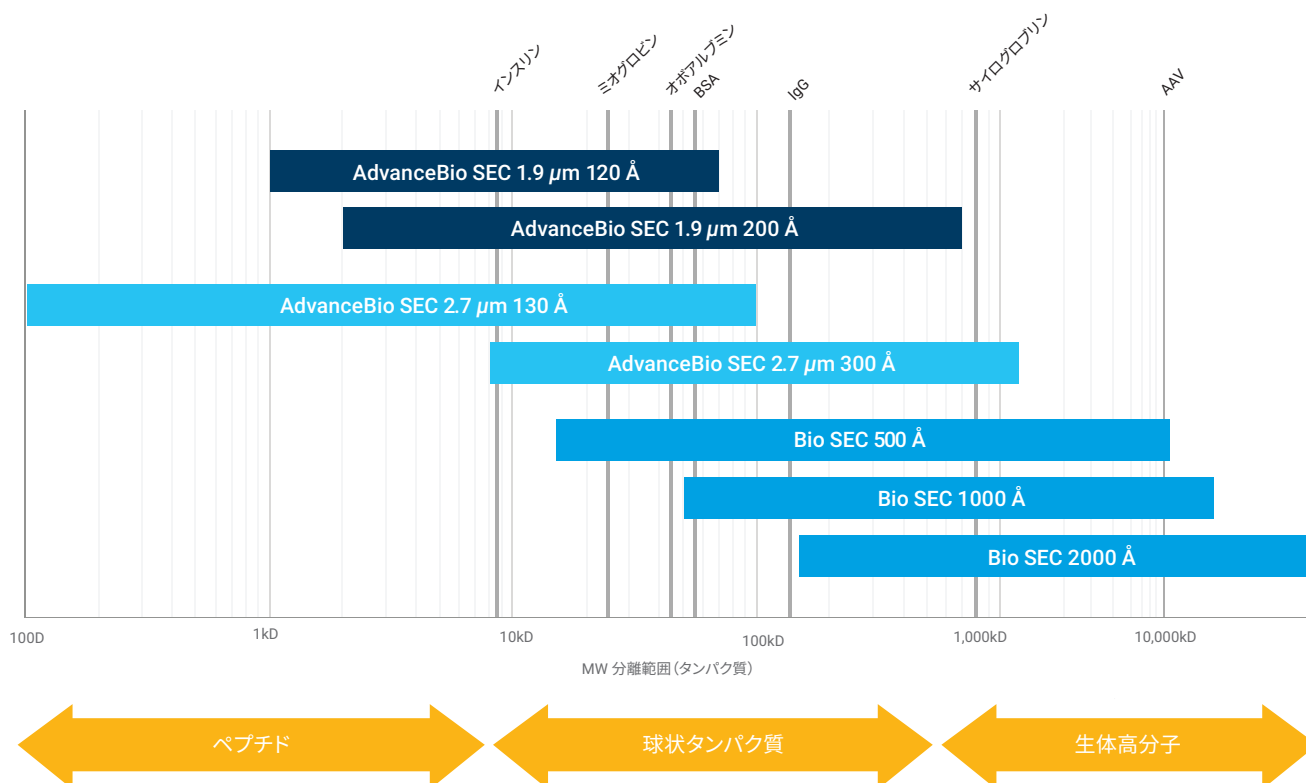
7 凝集およびフラグメントの分析

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 2.7 μm	堅牢な親水性コーティングで二次的作用を最小限に抑えます。ポアサイズは 130 Å と 300 Å の 2 種類があります。	L59
	AdvanceBio SEC 1.9 μm	同様に堅牢な親水性コーティングがされていますが、分離能とスループット向上のため、粒子フォーマットが小さくなっています。1.9 μm 粒子は 620 bar まで堅牢で、ポアサイズは 120 Å と 200 Å の 2 種類です。	L59
	Bio SEC-3	ポアサイズ 100 Å、150 Å、および 300 Å の 3 μm 粒子が分離能と分離スピードを高めます。内径 21.2 mm まで拡張できます。	L59
	PROTEEMA	3 μm 粒子と 100 Å、300 Å、または 1000 Å ポアサイズのジオール SEC 相です。	L20
	MAB	3 μm 粒子のミックスジオール SEC 相	L20
AAV や VLP などの生体高分子、または複数の分子量の成分を持つサンプル	Bio SEC-5	幅広い分析に対応する多くのポアサイズオプション (100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å、2000 Å) があります。内径 21.2 mm まで拡張できます。	L59

ポアサイズの選択肢

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 カラムは、mAb やその他のタンパク質、ペプチドの凝集体およびフラグメント分析において、正確かつ高精度の定量分析を実現するよう最適化されています。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。

AdvanceBio SEC 2.7 μm カラムはルーチンの SEC ニーズに対応した堅牢なカラムで、アジレント独自の親水性コーティングにより、移動相に余分な塩や有機溶媒を加えることなく、サンプルと固定相の間の二次的作用を最小限に抑えます。ADC のような粘性のあるサンプルでも、このカラムは二次的作用を最小限に抑えて、正確な結果を導きます。ポアサイズは 300 \AA と 130 \AA の 2 種類で、タンパク質やペプチドの高感度で再現性に優れた凝集体分析に最適です。

AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムは、SEC 分離を 1 つ上のレベルに引き上げます。小さい粒子と親水結合相が、効率よく、分離能の高い分離を実現します。最高 620 bar の安定性が、高スループットに必要な高速の流量をもたらします。200 \AA のポアサイズは、徹底的な mAb 特性解析に必要な二量体、単量体、フラグメントの同時分離に最適化されたものです。

SEC-MS および極めて困難な SEC アプリケーションの場合は、AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムを内径 2.1 mm の PEEK ライナステンレスハードウェアでご利用いただくこともできます。このバイオイナートでメタルフリーな流路は、金属と反応しやすい、またはネイティブモードの SEC-MS 分析に最適です。

- 分析スピードが向上し、納期を遵守できます
- 分離能が向上し、さらに正確な定量が可能です
- 感度が向上し、低レベルでも凝集の定量が可能です
- 再現性が向上し、再分析のリスクが減らせます
- AdvanceBio SEC カラム用に独自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です
- 粒子サイズは 2.7 と 1.9 μm 。それぞれ、ポアサイズのオプションが 2 種類あります
- PEEK ライナステンレスハードウェアはバイオイナートな流路で使用可能です



7 凝集およびフラグメントの分析

カラムの仕様

粒子サイズ	ポアサイズ	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力	流量
2.7 µm	130 Å	100 ~ 120,000 Da	2 ~ 8.5	40 MPa (推奨使用圧力は 20 MPa 未満)	0.1 ~ 2.0 mL/min (内径 7.8 mm)
2.7 µm	300 Å	5,000 ~ 1,250,000 Da	2 ~ 8.5	40 MPa (推奨使用圧力は 20 MPa 未満)	0.1 ~ 0.7 mL/min (内径 4.6 mm)
1.9 µm	120 Å	1,000 ~ 80,000 Da	2 ~ 8.5	620 bar	0.1 ~ 0.5 mL/min (4.6 x 300 mm)
1.9 µm	200 Å	2,000 ~ 700,000 Da	2 ~ 8.5	620 bar	0.1 ~ 0.7 mL/min (4.6 x 150 mm) 0.05 ~ 0.1 mL/min (内径 2.1 mm)



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

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：[溶媒フィルター／脱気装置のページ](#)

推奨される機器構成、および初期移動相状態とそれに伴うクロマトグラムについては、AdvanceBio SEC 2.7 µm カラムおよび 1.9 µm カラムのクイックスタートガイド（資料番号 **5994-4620EN** および **5994-4621EN**）を参照してください。

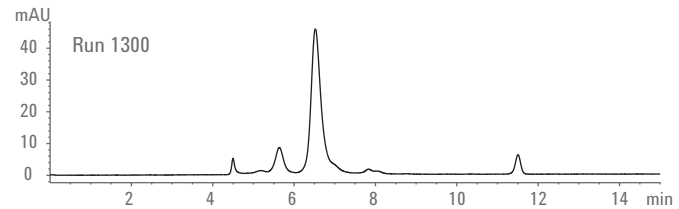
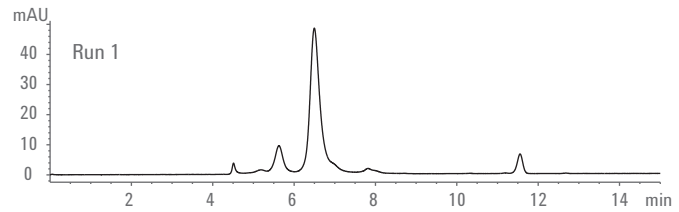
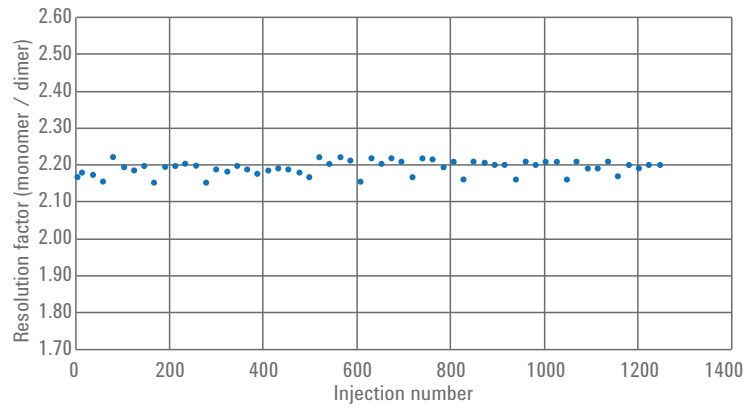
堅牢な AdvanceBio SEC カラムでカラム寿命を延ばす

カラム: AdvanceBio SEC 2.7 μm
300 \AA , 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。

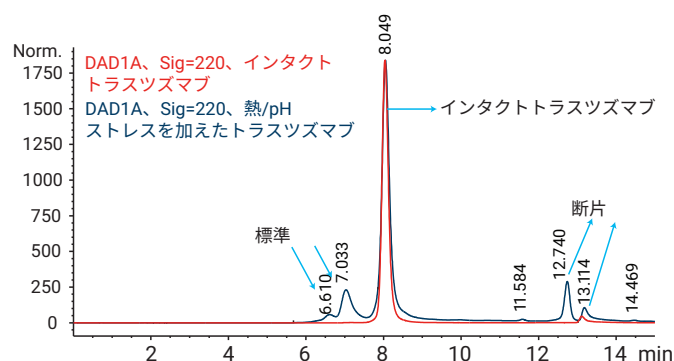
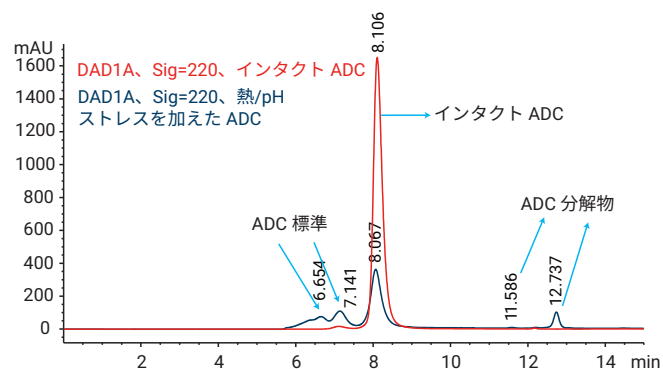


IgG サンプルのプロファイルは、1300 回の注入後も変わりませんでした。IgG の単量体と二量体の分離係数と定量についてもカラム寿命を通して動作範囲に収まっていた。

7 凝集およびフラグメントの分析

抗体に最適な親水性 SEC メディア: 抗体薬の複合体 (ADC) 分析

カラム:	AdvanceBio SEC 2.7 μm 300 Å, 7.8 x 300 mm
装置本体:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	PBS, 150 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4
カラム温度:	室温
注入量:	10 μ L
流量:	0.8 mL/min
検出器:	UV, 220 nm



AdvanceBio SEC 2.7 μ m 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できます。 水とアセトニトリルの混合液を使用できます。 (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
注入量	1 ~ 5 μ L (推奨) カラム容量の最大 1 %
動作温度範囲	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ます。

注意事項: 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。

AdvanceBio SEC 1.9 μm の操作パラメータ

パラメータ	設定値
出荷時の溶媒/長期 ストレージソリューション	pH 6.7 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液、0.02 % NaN_3 有り
使用流量	4.6 \times 150 mm では 0.1 ~ 0.7 mL/min 4.6 \times 300 mm では 0.1 ~ 0.5 mL/min 内径 2.1 mm のカラムでは、0.05 ~ 0.10 mL/min
注入量	1 ~ 5 μL (推奨) カラム容量の最大 1 %
最大圧力	620 bar (9,000 psi)
pH 安定性	2 ~ 8.5
塩濃度	\leq 0.5 M
使用可能な移動相	UV 用 SEC 移動相すべてで使用できます。リン酸緩衝液、pH 7.0 でさまざまな濃度の塩を含む 変性およびネイティブモードのSEC-MS 移動相が使用できます。
動作温度範囲	20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ (推奨)、 80 $^{\circ}\text{C}$ (最高)

注意事項: 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ことがあります。

高分離能、高スループットの mAb 分離

カラム: AdvanceBio SEC 1.9 μm
200 \AA 、4.6 \times 150 mm

装置本体: Agilent 1260 Infinity II LC

移動相: 50 mM リン酸ナトリウム、
200 mM NaCl、pH 7.0

カラム温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

注入量: 1 μL

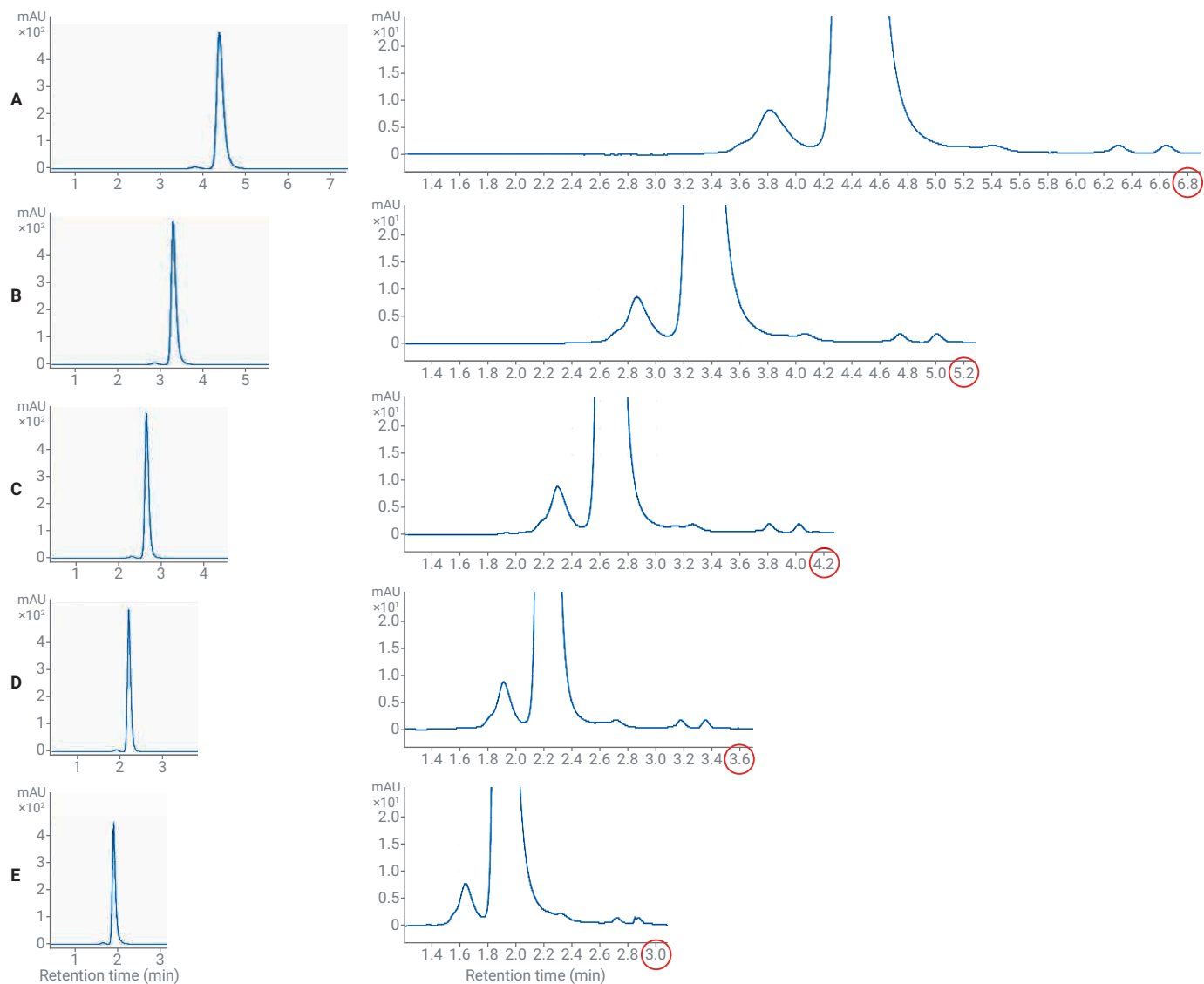
流量: 0.3~0.7 mL/min

検出器: UV、220 nm

分解能、単量体の面積 %、サンプルスループットに流量が与える影響

流量 (mL/min)	分析時間 (分)	背圧 (bar)	分離能 (二量体/単量体)	二量体 面積 %	1 時間当たりの 1 日 (24 時間) サンプル数	あたりの サンプル数
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8 ~ 9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11 ~ 12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16 ~ 17	400
0.7	3.0	380	1.58	2.30	20	480

7 凝集およびフラグメントの分析



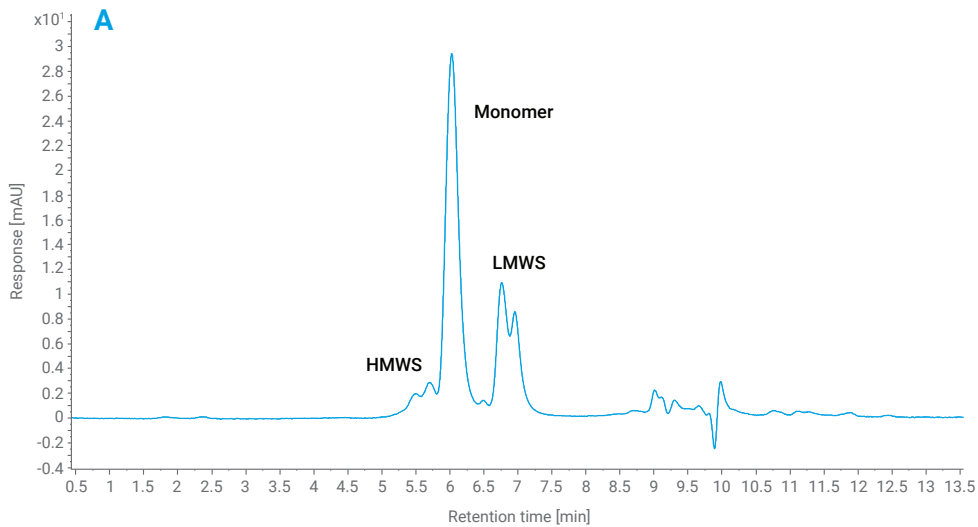
SigmaMABのサイズ排除クロマトグラム。4.6 × 150 mmのSECカラムを用いて50 mMリン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0で分析。流量はそれぞれA) 0.3 mL/min、B) 0.4 mL/min、C) 0.5 mL/min、D) 0.6 mL/min、E) 0.7 mL/min

サイズ排除分離によるヒト成長ホルモンの特性解析

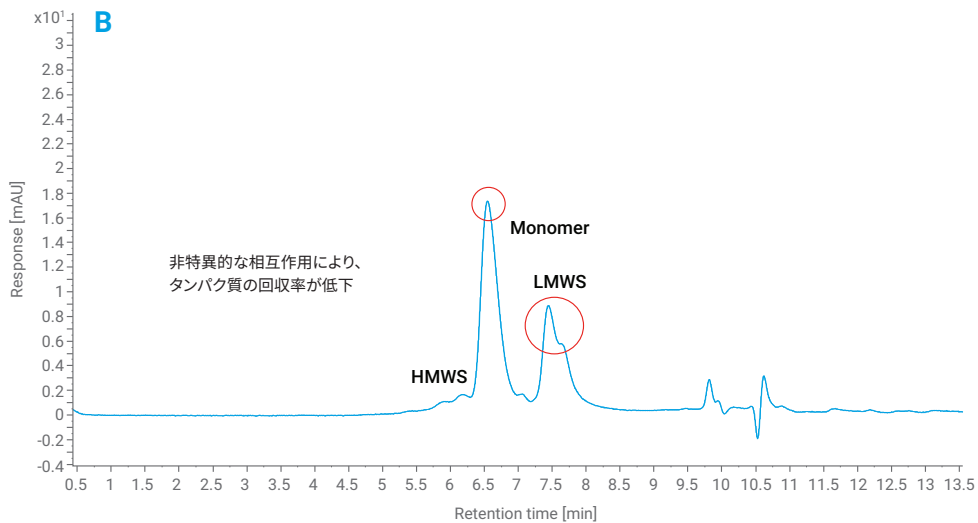
装置本体: Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム
 ソフトウェア: Agilent OpenLab CDS
 流量: 0.35 mL/min
 溶出液: 150 mM リン酸バッファ、pH 7
 サンプル: 濃度 1 mg/mL
 温度: 25 °C
 注入量: 2 μ L
 検出: UV、220 nm

カラム	単量体 RT (分)	総ピーク面積 (n=2 の平均)	単量体 ピークテーリング	単量体 ピーク幅
Agilent AdvanceBio SEC	6.02	691.81	1.22	0.21
他社製 SEC カラム 1.7 μ m	6.54	581.10	1.33	0.28

A: Agilent AdvanceBio SEC、4.6 x 300 mm、120 Å 1.9 μ m



B: 他社製 SEC カラム、4.6 x 300 mm、125 Å 1.7 μ m



7 凝集およびフラグメントの分析

Bio SEC

Agilent Bio SEC は、ポアサイズ 100 Å から 2000 Å、最大内径 21.2 mm の汎用性に優れたポートフォリオで、広い範囲にわたるタンパク質サイズと注入量要件をサポートします。

Agilent Bio SEC カラムは、大型の生体分子に対して、非常に高い分離能を実現し、ポア容積を高めるために特別に設計されたパッキングで、ピークキャパシティと分離能をさらに向上させます。

Bio SEC の特徴

- 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が可能です
- 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します
- 卓越した再現性とカラム寿命を実現する、優れた堅牢性があります
- 高 pH、高塩濃度、低塩濃度といった条件下でも安定性に優れています
- 幅広い水性緩衝液を使用できるため、柔軟なメソッド開発が可能です
- 幅広い適合性があり、100 Å から 2000 Å までの幅広いポアサイズによって、小型のタンパク質やワクチン、高分子量の生体分子に対応します
- 粒子が堅牢で光散乱検出器などのマルチ検出器に対応できます
- MS に対応しています

Bio SEC-3 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。二次的作用が最小限に抑えられるため、回収率が高まり、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。

複数の分子量を持つ生体高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離能が得られます。



カラムの仕様

ポアサイズ	粒子サイズ	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力
100 Å	3 μm	100~100,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
150 Å	3 μm	500~150,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
300 Å	3 μm	5,000~1,250,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
100 Å	5 μm	100~100,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
150 Å	5 μm	500~150,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
300 Å	5 μm	5,000~1,250,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
500 Å	5 μm	15,000~5,000,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
1000 Å	5 μm	50,000~7,500,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi
2000 Å	5 μm	>10,000,000	2~8.5	137 bar, 2000 psi

流量

カラム内径	推奨流量
4.6 mm	0.1~0.4 mL/min
7.8 mm	0.2~1.2 mL/min
21.2 mm	1.0~10.0 mL/min

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、カラムのポ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。

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, 150 Å
5190-2508
4.6 x 300 mm, 3 μm

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

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

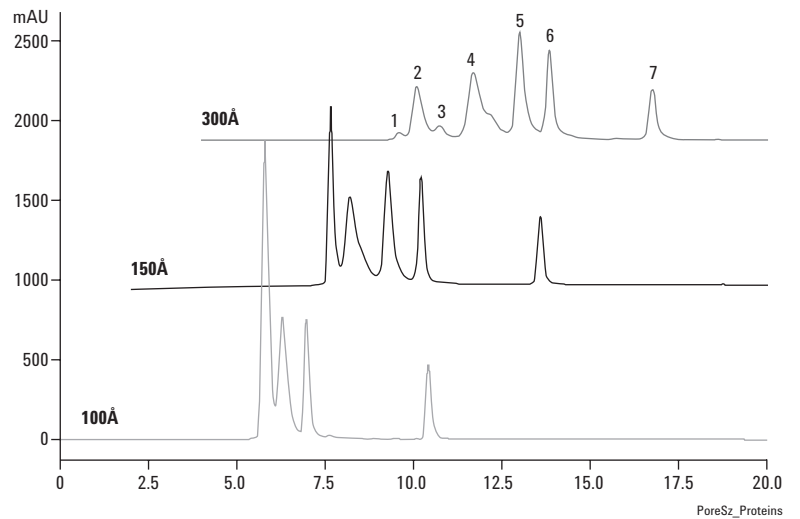
流量: 0.35 mL/min

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. オボアルブミン |
| 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 | |



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。

アジレントの**バイアルとキャップ**でラボの生産性を大幅にアップさせましょう。

7 凝集およびフラグメントの分析

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

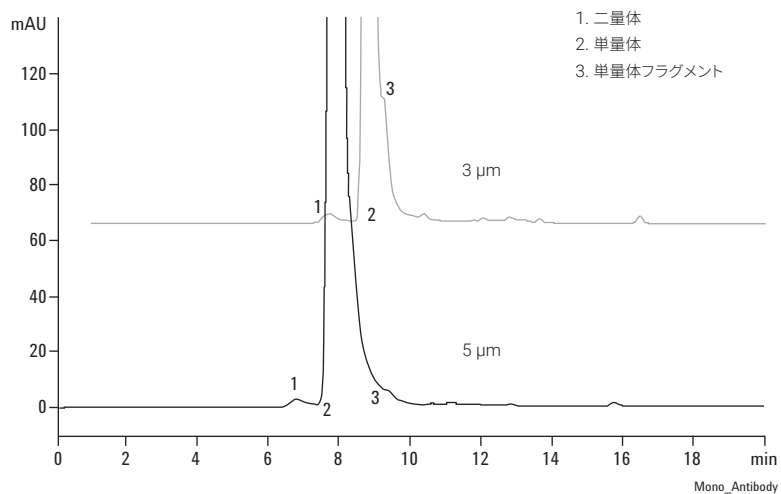
カラム: **Bio SEC-5、300 Å**
5190-2526
7.8 x 300 mm、5 μm

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離能が得られています。

ヒントとツール

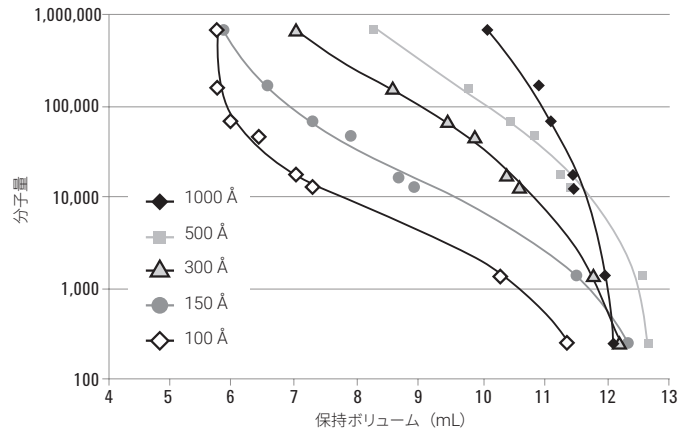
タンパク質の凝集体分析メソッドを開発する際は、溶質のサイズと分子量の影響、カラムの選択、移動相に関する重要な考慮事項など、さまざまな要因を考慮する必要があります。次の資料では、これらすべての要因について解説しています。

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**）

検量線 — Bio SEC-5

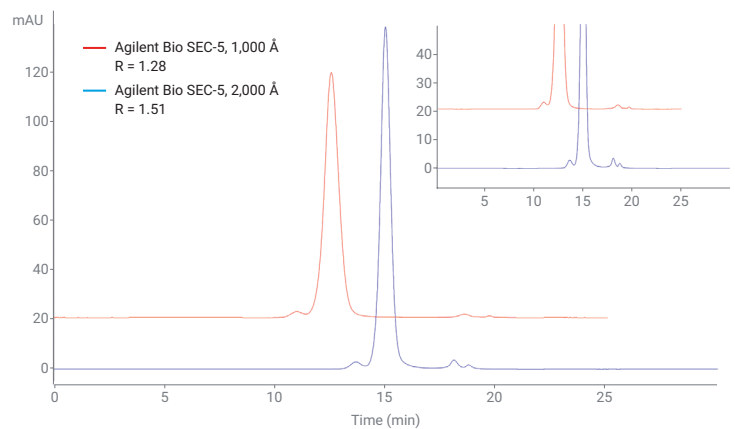
カラム: **Bio SEC-5**
7.8 x 300 mm、5 μm
 移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
 流量: 1.0 mL/min
 検出器: UV、214 nm

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
オボアルブミン	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



ウイルス様粒子の凝集体分析

カラム: **Agilent Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、
 5 μm、2000 Å (部品番号 5190-2541)**
**Agilent Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、
 5 μm、1000 Å (部品番号 5190-2536)**
 移動相: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、
 400 mM 塩化ナトリウム
 流量: 0.6 mL/min
 カラム温度: 室温
 サンプル量: 5 μL
 検出波長: 220 nm
 分析時間: 30 分
 HPLC システム: Agilent 1260 Infinity II LC システム、
 クォーターナリポンプ付き



同じウイルス様粒子をAgilent Bio SEC-5、2,000 Å カラム、および Bio SEC-5、
 1,000 Å カラムを使って分析しました。

7 凝集およびフラグメントの分析

PROTEEMA カラム

PROTEEMA カラムは、分子量 100 ~ 7,500,000 Da の範囲にある天然および合成タンパク質、ペプチド、酵素、ゼラチン/コラーゲンの水溶液の GPC/SEC 分析に適しています。アプリケーションに応じて、2 種類の粒子サイズ (3 および 5 μm)、3 種類のポアサイズ (100、300、1,000 \AA)、ステンレスとバイオイナートの両ハードウェアオプションなどさまざまなカラム構成を利用できます。このジオール SEC 相は USP L20 が必要な分離に適しています。

カラムの仕様

粒子サイズ	ポアサイズ	分子量範囲*	pH 範囲	最大圧力	温度上限	最大流量
3 または 5 μm	100 \AA	100~150,000 Da	2~8	200 bar (3 μm)	70 $^{\circ}\text{C}$	3 mL/min
	300 \AA	1000~1,200,000 Da				
	1000 \AA	1000~7,500,000 Da				

*タンパク質に基づく

検量線-プルラン (緩衝液)

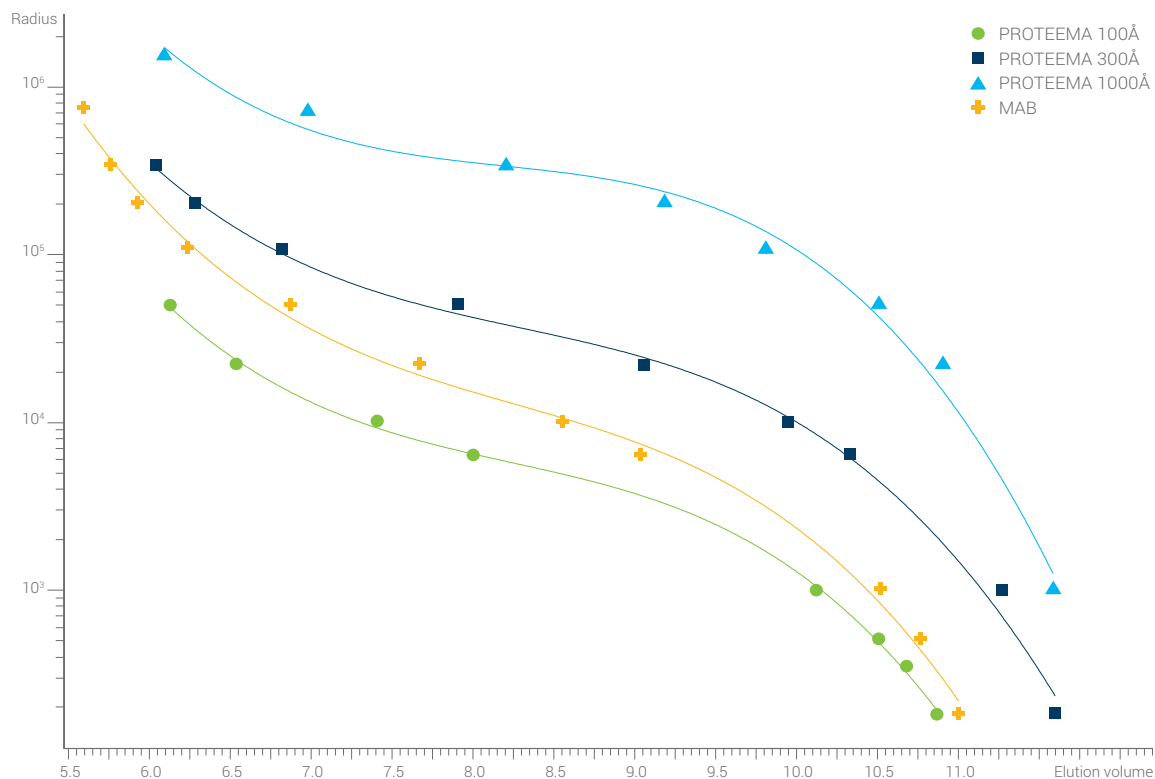
カラム: **PROTEEMA 100 \AA 、300 \AA 、1000 \AA
MAB、各 8 x 300 mm、3 μm**

移動相: リン酸緩衝液 pH 6.6 (34 mmol) + 0.5M NaCl

流量: 1 mL/min

温度: 23 $^{\circ}\text{C}$

検出器: RI



MAB

MAB カラムは、分子量 100 ~ 1,000,000 Da の範囲にあるモノクローナル抗体、IgG、タンパク質の水溶液の GPC/SEC 分析に有効です。このミックスカラムは、モノクローナル抗体凝集体とフラグメントの分離用に設計されていて、光散乱検出で迅速に使えるように最適化および平衡化されています。このようにシリカベースのジオール SEC カラムは、USP L20 に分類されます。MAB カラムの粒子サイズは 3 μm で、タンパク質分析に最適です。

カラムの仕様

粒子サイズ	ポアサイズ	分子量範囲	pH 範囲	最大圧力	温度上限	最大流量
3 μm	混合	100~1,000,000 Da	2~8	150 bar	70 °C	3 mL/min

免疫グロブリン G の凝集体分析

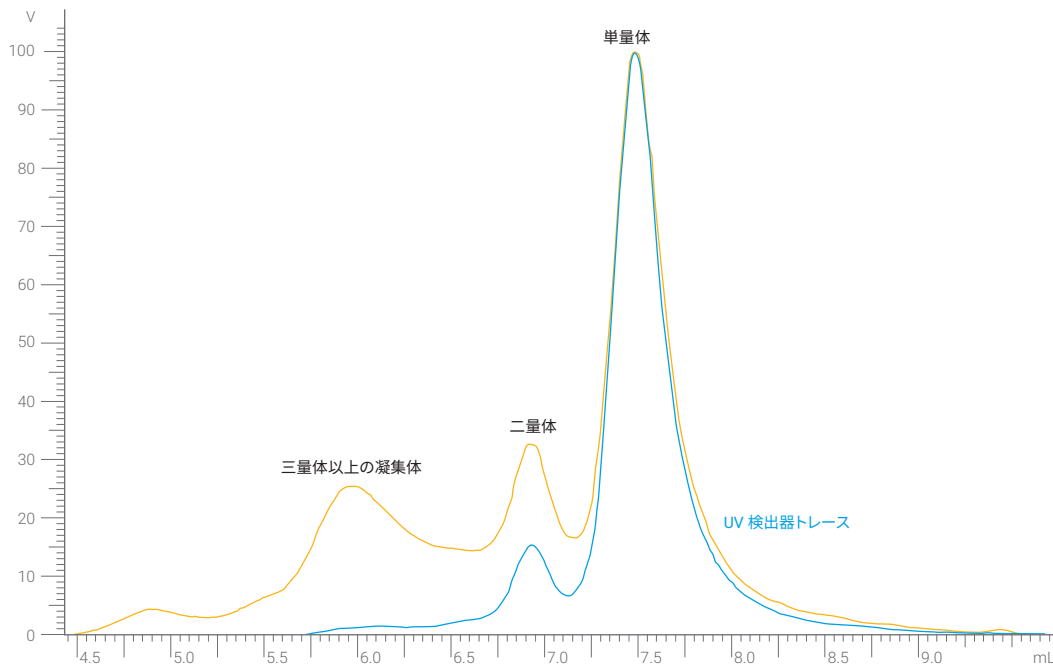
カラム: MAB, 8 x 300 mm, 3 μm

流量: 1 mL/min

サンプル濃度: 2.5 g/L

注入量: 20 μL

検出: UV, 280 nm
MALLS (90°)



低濃度の高次凝集体、MALL (黄色の信号) を使用して検出

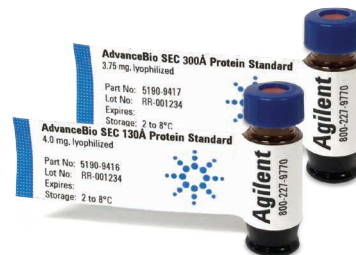
SEC のタンパク質標準

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。この標準を使用して、タンパク質の精製や分析を含むさまざまなアプリケーションで、定期的にかラムのキャリブレーションや最適なシステム性能の確認ができます。

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 または 200 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。この標準を使用して、タンパク質の精製や分析を含むさまざまなアプリケーションで、定期的にかラムのキャリブレーションや最適なシステム性能の確認ができます。



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

ヒントとツール

十分に特性解析された性能標準に基づいて、使用している HPLC システムを定期的にチェックすると、結果の信頼性が高まり、問題の迅速な特定に役立ちます。多くの化学者が AdvanceBio SEC 標準のようなタンパク質混合物を使用していますが、モノクローナル抗体標準が使用される場合もあります。

Agilent-NISTmAb は少量から購入できるため便利です。

メソッドとクロマトグラムのサンプルについては、Agilent NISTmAb アプリケーション総覧（資料番号 **5994-1501EN**）の凝集体分析の章（資料番号 **5994-2069EN**）を参照してください。

SEC によるタンパク質分子量標準品の分離

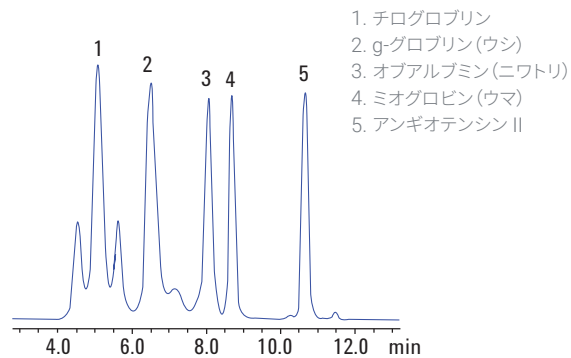
カラム: AdvanceBio SEC 2.7 μm
7.8 x 300 mm

サンプル: AdvanceBio SEC タンパク質標準

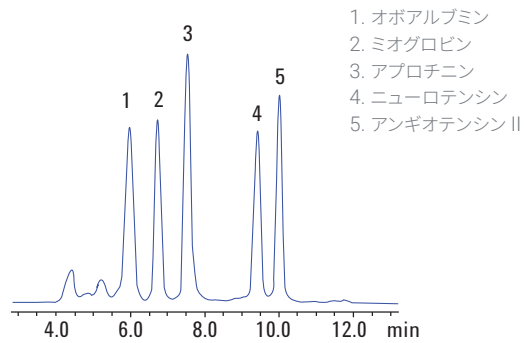
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量: 1.0 mL/min

Agilent AdvanceBio SEC タンパク質標準



AdvanceBio SEC 300Å カラムでの AdvanceBio SEC 300Å タンパク質標準の分離



AdvanceBio SEC 130Å カラムでの AdvanceBio SEC 130Å タンパク質標準の分離

ヒントとツール

カラムユーザーガイドでは、カラムの使用および取り扱い方法、推奨開始メソッドに関する有益な情報をご覧ください。

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

7 凝集およびフラグメントの分析

タンパク質標準キット

キット化されたタンパク質標準により、特定の分析やトラブルシューティングの状況に最適なタンパク質標準を選択することができます。PSS-PROKIT では、分子量範囲 243 ~ 670 kDa の凍結乾燥された標準が 10 種類、ボトル入りで提供されます。PSS-PROKITR1 には、3 ~ 4 種類の凍結乾燥された混合済み標準が入った 3 種類のバイアルが 5 本ずつ含まれます。これらのキットにより、独自の混合物の設計や、個々のタンパク質でのトラブルシューティング、完全に分離された標準をあらかじめ調合した混合物の使用などが柔軟にできるようになります。

PSS-PROKIT の構成

成分名	分子量	流体力学半径 (nm)	DNA 定量
シチジン	243 Da		1 x 0.1 g
ビタミン B12	1.4 kDa		1 x 0.1 g
アプロチニン	6.5 kDa		1 x 0.1 g
シトクローム C	12 kDa	1.5	1 x 0.1 g
ミオグロビン	17.5 kDa	1.8	1 x 0.1 g
B-ラクトグロブリン	35 kDa	2.8	1 x 0.1 g
アルブミン(ニワトリ)	44 kDa	3.5	1 x 0.1 g
アルブミン(ウシ)	67 kDa	4.4	1 x 0.1 g
ガンマグロブリン	158 kDa	5.8	1 x 0.1 g
サイログロブリン	670 kDa	9.1	1 x 0.1 g

ヒントとツール

アプリケーションメソッドオーダーガイドを見れば、カタログを何冊も調べなくても、分析に必要な消耗品を簡単かつ正確に見つけられます。

mAb 二量体やフラグメントの分析、あるいは **SEC-MS** については、オーダーガイドをご覧ください。このガイドには必要なあらゆるツールのほか、選択基準、アプリケーションノート、ベストプラクティスなどの便利な情報も記載されています。

ReadyCal キットの構成

バイアル	成分
緑キャップ	サイログロブリン、アルブミン、シトクローム C、シチジン
赤キャップ	ガンマグロブリン、β-ラクトグロブリン、アプロチニン
白キャップ	アルブミン(ウシ)、ミオグロビン、ビタミン B12

ReadyCal キットタンパク質標準の重ね表示

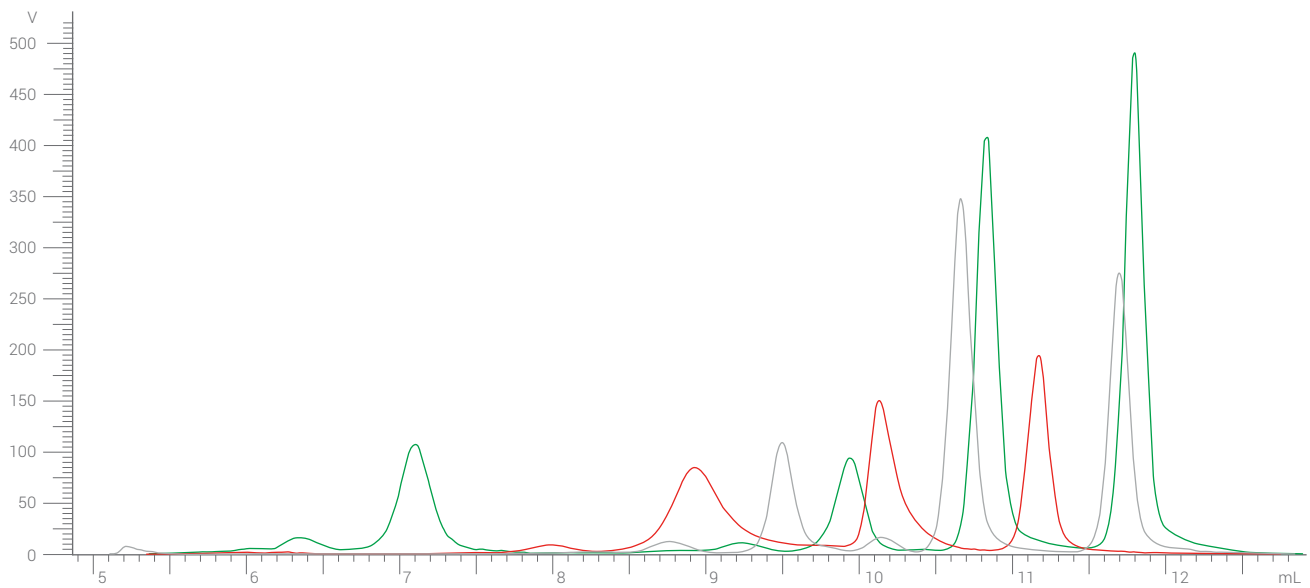
カラム: **PROTEEMA 300 A、
8 x 300 mm, 3 μm**

移動相: リン酸緩衝液 pH 6.6 (34 mmol)、0.5M NaCl

流量: 1 mL/min

温度: 23 °C

検出: UV, 280 nm



製品の詳細情報

AdvanceBio SEC カラム、2.7 μm

寸法(mm)	粒子サイズ(μm)	130 Å	300 Å
4.6 x 300	2.7	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 x 150	2.7	PL1580-3350	PL1580-3301
4.6 x 50、ガード	2.7	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 x 300	2.7	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 x 150	2.7	PL1180-3350	PL1180-3350
7.8 x 50、ガード	2.7	PL1180-1350	PL1180-1301

AdvanceBio SEC カラム、1.9 μm

寸法(mm)	粒子サイズ(μm)	120 Å	200 Å
4.6 x 300	1.9	PL1580-5250	PL1580-5201
4.6 x 150	1.9	PL1580-3250	PL1580-3201
4.6 x 30、ガード	1.9	PL1580-1250	PL1580-1201
2.1 x 150、PEEK ライニング SS	1.9	PL1980-3250PK	PL1980-3250PK
2.1 x 50、PEEK ライニング SS、ガード	1.9	PL1980-1250PK	PL1980-1201PK

Bio SEC-3 カラム

寸法(mm)	粒子サイズ(μm)	Bio SEC-3	Bio SEC-3	Bio SEC-3
		100 Å	150 Å	300 Å
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

Bio SEC-5 カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	Bio SEC-5 100 Å	Bio SEC-5 150 Å	Bio SEC-5 300 Å	Bio SEC-5 500 Å	Bio SEC-5 1000 Å	Bio SEC-5 2000 Å
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

PROTEEMA カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	ポアサイズ (Å)	ステンレス	バイオイナート	PROTEEMA Lux 光散乱対応
4.6 x 30	3	ガードカラム:	PRM050303	PRM050303BI	
4.6 x 250	3	100	PRM0525031E2	PRM0525031E2BI	
4.6 x 250	3	300	PRM0525033E2	PRM0525033E2BI	
4.6 x 250	5	300	PRM0525053E2	PRM0525053E2BI	
8 x 50	5	ガードカラム:	PRA080505	PRA080505BI	PRA080505LS
8 x 300	5	100	PRA0830051E2	PRA0830051E2BI	PRA0830051E2LS
8 x 150	5	300	PRA0815053E2	PRA0815053E2BI	
8 x 300	5	300	PRA0830053E2	PRA0830053E2BI	PRA0830053E2LS
8 x 300	5	1000	PRA0830051E3	PRA0830051E3BI	PRA0830051E3LS

MAB カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	ステンレス	バイオイナート
4.6 x 30、ガード	3	MAM050303	MAM050303BI
4.6 x 250	3	MAM052503MC	MAM052503MCBI
8 x 50、ガード	3	MAA080503	MAA080503BI
8 x 300	3	MAA083003MC	MAA083003MCBI

7 凝集およびフラグメントの分析

AdvanceBio SEC 標準試料

説明	フォーム	部品番号
AdvanceBio SEC 130 Å タンパク質標準	凍結乾燥固体	5190-9416
AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準	凍結乾燥固体	5190-9417

PSS タンパク質標準

説明	フォーム	部品番号
GPC/SEC-キャリブレーションキット、 個別の標準 10 個	凍結乾燥固体	PSS-PROKIT
ReadyCal キットタンパク質、 1 つあたり 3~4 種類のタンパク質を 混合 × 5 個	凍結乾燥固体	PSS-PROKITR1

ZORBAX GF-250 および GF-450 ゲルろ過カラム

説明	寸法 (mm)	粒子サイズ (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

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、分離能を高め、二次的作用を抑えることができます。

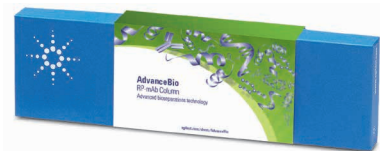
詳細については、[97 ページ](#) を参照してください。

グリコシル化の特性解析

N-結合型グリカンの構造がグリコシル化生物製剤の機能に影響を与える場合があり、多くの場合、グリコシル化は重要な品質特性（CQA）になるため、N-グリカンの特性解析は生物製剤の開発プロセスの重要な部分です。

N-グリカン分析では多くの場合、タグにより遊離グリカンをラベリングして N-グリカンを分離した後、蛍光検出（FLD）や、イオン化を向上させて質量分析（MS）検出、および相対定量します。

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。

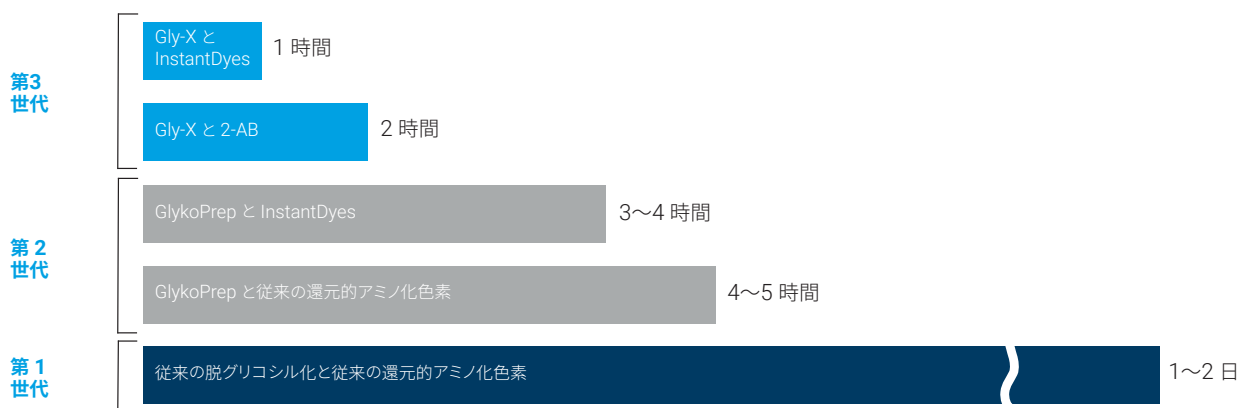


グリコシル化の特性解析メソッド

- 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
- 遊離 N-グリカン分析では、グリカンは蛍光検出できるように蛍光ラベルを使って誘導体化され、HILIC により分離されます
- 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。またアジレントは、蛍光ラベルの付いた遊離シアル酸の調製を、LC/FLD または比色分析で可能にする溶液も提供しています

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特性解析と定量を行えるようにします。

アジレントはカラム、ソフトウェア、機器のほか、N-グリカンおよびシアル酸サンプル前処理キットや、酵素、標準物質、ライブラリなど N-グリカンの同定を支援するツールも幅広く取り揃えています。



N-グリカンのサンプル前処理の進化（右端が時間）

8 グリコシル化の特性解析

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 1.8 µm	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 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、低い背圧での高分離能分離が可能です。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	アミド結合相により、小さい親水性ペプチドおよび糖ペプチドを分析できる、もう一つの HILIC 機能が可能になります。

AB

AB

AB AdvanceBio ファミリーの製品

N-グリカンのサンプル前処理

AdvanceBio Gly-X 技術

Agilent AdvanceBio Gly-X (旧 ProZyme) は、溶液内ワークフローを簡素化する次世代の N-グリカン前処理プラットフォームです。InstantPC 色素や、真空プレートの効率的なクリーンアップステップと組み合わせて、余分な標識色素や変性剤を除去することで、UHPLC や LC/MS 用のサンプルの前処理が 60 分以内に完了します。



ヒントとツール

N-グリカンのサンプル前処理の詳細については、以下を参照してください

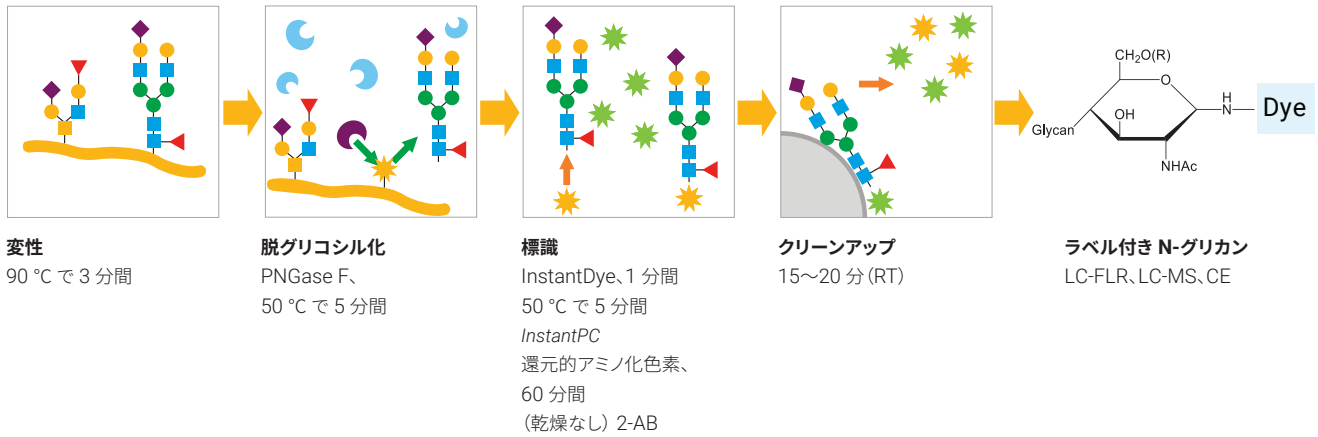
ワークフローとオーダーガイド – AdvanceBio Gly-X InstantPC サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の糖タンパク質の N-グリカン分析 (資料番号 **5994-3926JAJP**)

ワークフローとオーダーガイド – AdvanceBio Gly-X 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の糖タンパク質の N-グリカン分析 (資料番号 **5994-4158JAJP**)

Application note – Gly-X InstantPC vs Waters RapiFluor-MS comparison (アプリケーションノート - Gly-X InstantPC と Waters RapiFluor-MS の比較) (資料番号 **5994-5653EN**)

Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC および 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の N-グリカン分析の効率的なワークフロー (資料番号 **5994-1348JAJP**)

Gly-X N-グリカンのサンプル前処理ワークフロー

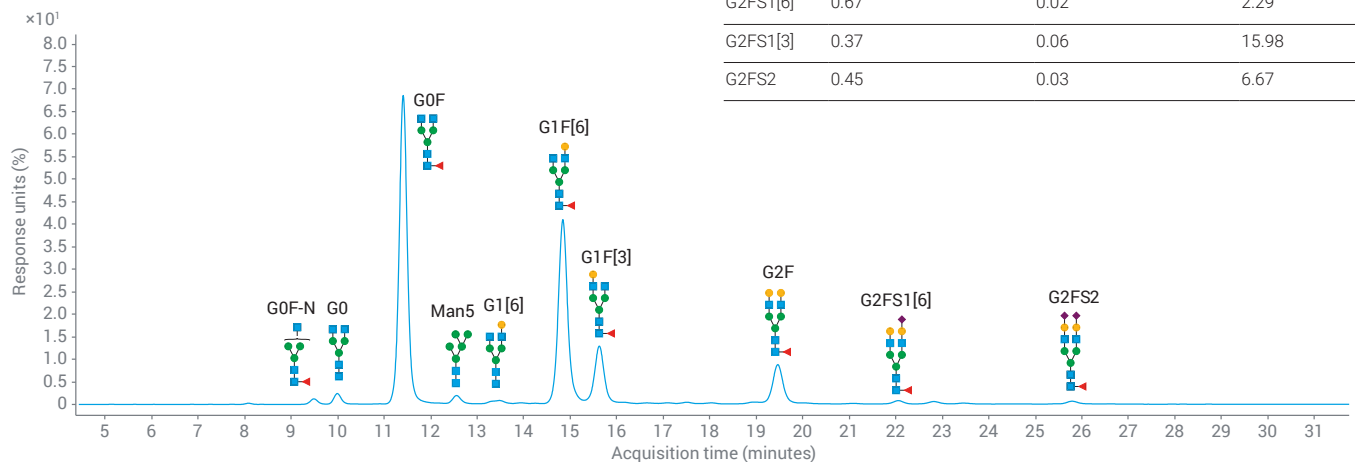


Gly-X N-グリカンのサンプル前処理ワークフローで推奨される初期サンプル量は 1 ~ 40 µg です。これは同様のワークフローの最大サンプル量を上回ります。また、分子によっては、使用するタンパク質を増やすこともできます。サンプルに関する詳しい考慮事項については、個々の Gly-X 製品のマニュアルを参照してください。

リツキシマブ N-グリカン、Gly-X InstantPC

InstantPC でラベル化されたリツキシマブ N-グリカンの相対面積、標準偏差、および CV 値 (n = 4)

	平均相対面積 (%)	標準偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67



GlykoPrep および GlykoPrep-plus N-グリカンのサンプル前処理

2012年にリリースされた ProZyme GlykoPrep 固相カートリッジは、「インスタント」グリカンラベリングを使用した最初のプラットフォームでした。このカートリッジは、N-グリカンのサンプル前処理をスピンおよび自動化 (AssayMAP Bravo) の両形式で合理化し、標準化しました。再現性は LC と CE を使用した 2 つのラボ間研究で実証されました。

GlykoPrep-plus キットにより Agilent AssayMAP Bravo を使った自動化が可能になったため、納入と同時に自動化できるようになり、精度が向上し、無人運転の時間が増えました。GlykoPrep は後継機の Gly-X に取って代わられましたが、アジレントは現在の GlykoPrep のお客様を今後もサポートし続けます。

従来の N-グリカンサンプル前処理のメソッド

これまでの N-グリカンサンプル前処理ワークフローには、PNGase F を使った自然のまたは変性剤による消化、遊離グリカンの精製、蛍光色素分子を使ったラベリング、ラベル付きグリカンの精製などが含まれます。このようなワークフローには 1～2 日かかるため、高スループットのアプリケーションや自動化には適していません。

Gly-X の導入に伴い、アジレントは 2-AB ワークフローからより高速で、スループットが大きなサンプル前処理技術への移行をお手伝いしています。しかし、今後も、豊富なグリカンラベリングとクリーンアップツールで、従来のワークフローをサポートし続けます。

AdvanceBio シアル酸のプロファイリングと定量

シアル酸分析の簡略化 – アジレントはシアル酸分析のニーズに対応するため、シアル酸のプロファイリングと定量のためのオプションを提供しています。

ヒントとツール

Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリングと定量の詳細については、以下をご覧ください。

AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キットと LC/FLD/MS を用いた生物製剤糖タンパク質のシアル酸分析 (資料番号 **5994-4201JAJP**)

生物製剤の糖タンパク質の総シアル酸定量 (資料番号 **5994-4383JAJP**)

Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット – NANA、NGNA の各シアル酸種の高速定量 (資料番号 **5994-2788JAJP**)

Agilent AdvanceBio シアル酸定量キット – サンプル処理の簡素化を実現 (資料番号 **5994-2789JAJP**)

生物製剤中のシアル酸のプロファイリングと定量のワークフローの改良 (資料番号 **5994-2352JAJP**)

Glycobiology 標準およびライブラリ

確かな答えへの到達を助けるグリカン標準 - ラベルなし、または InstantPC、2-AB、InstantAB、APTS、2-AA であらかじめラベル付けされた N-グリカン標準とライブラリをご用意しています。

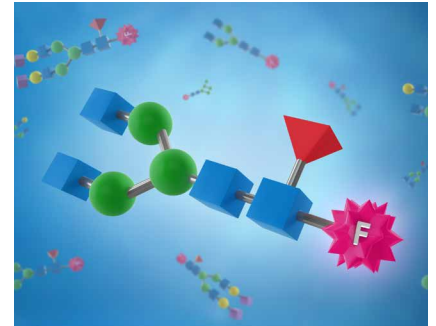
複雑な中性およびシアル化 2 本鎖糖鎖、高マンノース、 α -Gal など生物製剤に見られる多くの一般的なグリカンタイプをカバーしています。また、数種類のグリカンライブラリから糖タンパク質を選択することもできます。例えば以下が挙げられます。

- ヒト IgG
- ウシ RNase B
- ウシフェチュイン
- ヒト α 1-酸性糖タンパク質 (AGP)
- チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で作られた遺伝子組み換え IgG (mAb)
- 3 本鎖糖鎖および 4 本鎖糖鎖シアル化 N-グリカンライブラリ

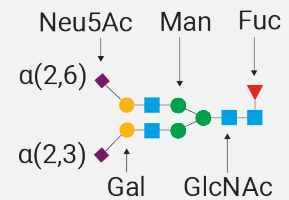
さらに、 $\alpha(2,3)$ - または $\alpha(2,6)$ -結合型シアル酸のどちらかを含む標準も用意しています。

- $\alpha(2,3)$ シアル酸結合は、CHO 細胞で産生された糖タンパク質上で見られます。
 $\alpha(2,3)$ シアル化レベルのグリカンは、 $\alpha(2,6)$ シアル酸結合レベルの異性体 N-グリカンよりも短い HILIC リテンションタイムを示します。
- $\alpha(2,6)$ シアル酸結合は、ヒト静注用免疫グロブリン (IVIg) などの糖タンパク質で見られます。

詳しくは、グリカン標準選択ガイド (5994-2202EN) をご覧ください。

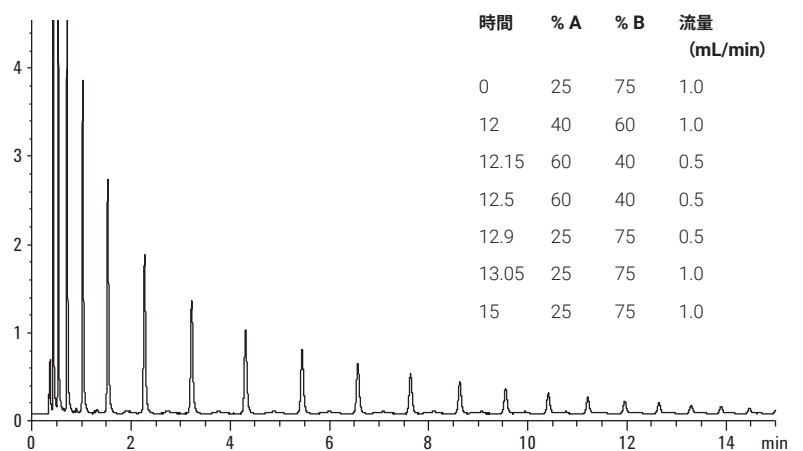


グリカンの構造



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 NH ₄ Fc, pH 4.5 B: ACN
FLD:	励起 = 260 nm 発光 = 430 nm
注入量:	2 μ L (総量 10 pmol のグリカン/1 μ L 75:25 ACN:水)
サンプル:	2-AB (部品番号 GKSB-503) ラベル化デキストランラダー



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た、未知グリカンのリテンションタイムの関連付け

8 グリコシル化の特性解析

糖鎖生物学酵素

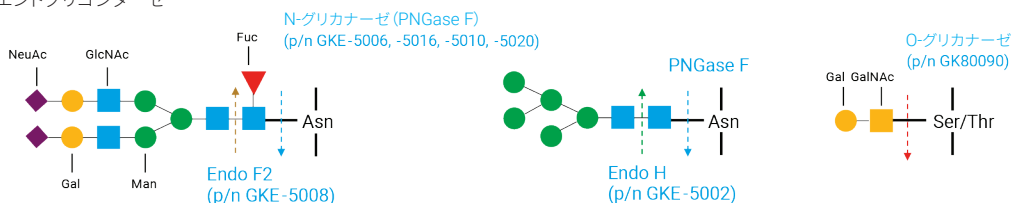
アジレントは遊離グリカンなどの分析ワークフローを支援するために、各種糖酵素の提供を開始しました。酵素のラインナップについては図 8 をご覧ください。その他すべての製品については、アジレントのウェブサイトにお越しください。

- エンドグリコシダーゼはグリカンの構造内で切断させます。N-グリコナーゼ (PNGase F、アスパラギンアミダーゼ) は大部分のインタクト N-グリカンを遊離することから、遊離グリカンの研究や脱 N-グリコシル化タンパク質の生成に広く用いられています
- エキソグリコシダーゼは、露出した、つまり「末端」の単糖残基をグリカンから切断します。一般的に使用されるエキソグリコシダーゼには、脱ガラクトシル化するガラクトシダーゼのほか、遊離グリカン、糖タンパク質、細胞を脱シリアル化するシアリダーゼ (ノイラミニダーゼ) などがあります

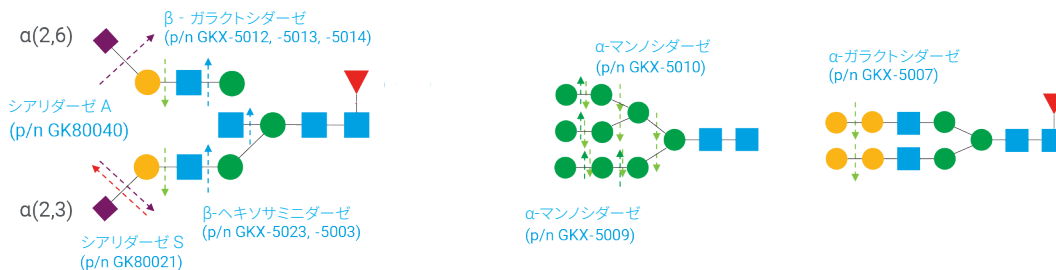
詳しくは、酵素選択ガイド (資料番号 **5994-2202EN**) をご覧ください。

選択したエンドグリコシダーゼ (A) とエキソグリコシダーゼ (B) の特異性

A. エンドグリコシダーゼ



B. エキソグリコシダーゼ



AdvanceBio Glycan マッピングカラム

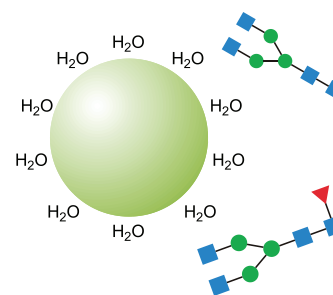
AdvanceBio グリカンマッピングカラムおよび標準の他、モノクローナル抗体などの糖タンパク質から N-グリカンを選択的に除去するためのサンプル前処理製品をご用意しています。

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。

分離能 — 2.7 μm 粒子が充填された 250 mm カラムを使用することで、高分離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	動作温度範囲	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

8 グリコシル化の特性解析

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

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

サンプルサーモスタット: 10 $^{\circ}\text{C}$

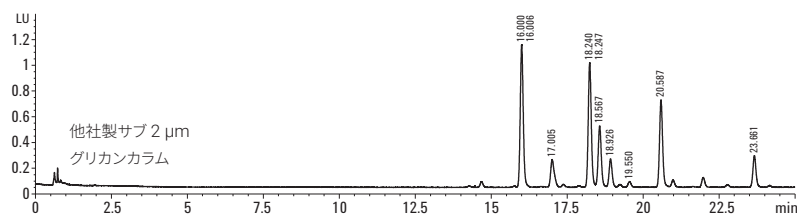
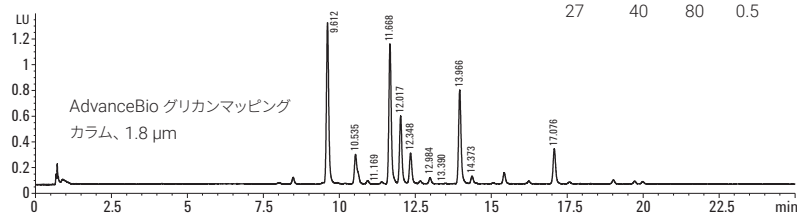
FLD: 励起 = 260 nm
発光 = 430 nm

流量: 0.35 mL/min

装置本体: 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 (部品番号 GKSB-005)

時間	% A	% B	流量 mL/min
0	20	80	0.5
25	40	60	0.5
26	100	0	0.5
27	40	80	0.5



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 カラムよりも分離能が優れており、幅の狭いバンド、高いピークキャパシティが得られた

分離能

高分離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 %

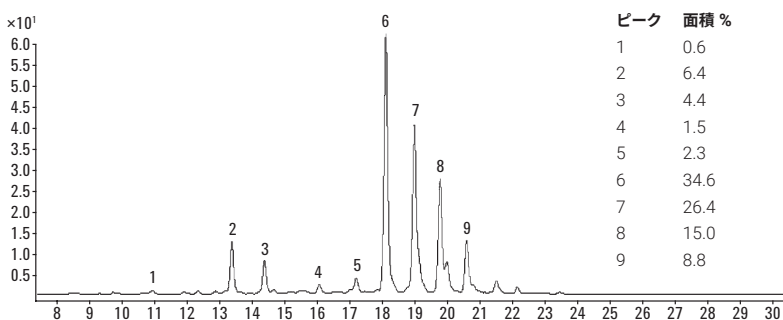
カラム: **AdvanceBio グリカンマッピング
859700-913
2.1 x 150 mm, 1.8 μm**

装置本体: 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
ネプライザ: 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。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った。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た

8 グリコシル化の特性解析

機器条件

フェチュインN-グリカン	
開始流量	0.5 mL/min
グラジエント	0分 75% B 45分 50% B 47分 40% B、 流量 0.5 mL/min 47.01分、 流量 0.25 mL/min 49分 0% B 51分 0% B 51.01分 75% B、 流量 0.25 mL/min 52.00分、 流量 0.5 mL/min
ストップタイム	52分
ポストタイム	20分
注入量	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)

フェチュインN-グリカン構造の詳細情報

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

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。

- ZORBAX 300 Å 粒子により幅広いペプチドサイズの分析が可能です
- 耐圧 1200 bar の 1.8 μm 粒子で UHPLC 性能を実現します
- 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します

カラムの仕様

結合相	内径 (mm)	粒子サイズ	エンドキャップ	pH 安定性	動作温度範囲	圧力上限
シリカ	2.1	1.8、全多孔質	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。

8 グリコシル化の特性解析

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 硝酸アンモニウム、pH 4.5

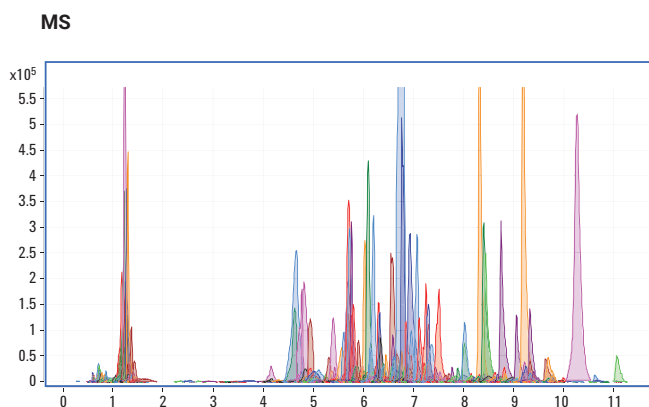
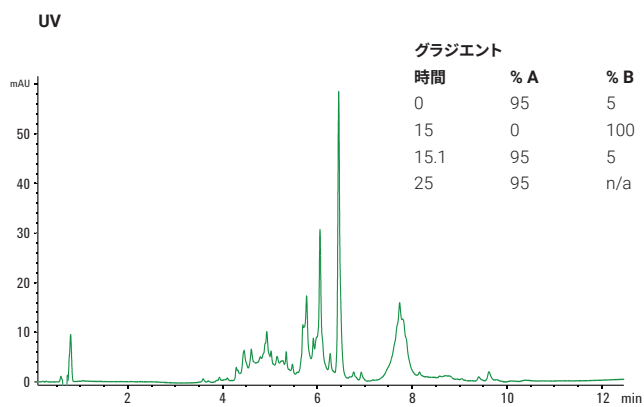
流量: 0.4 mL/min

注入量: 5 μg

検出器: UV, 280 nm

装置本体: 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 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** 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。

製品の詳細情報

AdvanceBio グリカンマッピング、1.8 μm 、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 μm 、Fast Guard	821725-905

AdvanceBio グリカンマッピング、2.7 μm 、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 μm 、Fast Guard	821725-906

GlykoPrep

説明	部品番号
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および InstantPC、24 個	GP24NG-PC
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および 2-AB、24 個	GP24NG-AB
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および InstantPC、96 個	GP96NG-PC
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および 2-AB、96 個	GP96NG-AB
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および InstantPC、96 個、AssayMAP Bravo Automated	GPPNG-PC
GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep および 2-AB、96 個、AssayMAP Bravo Automated	GPPNG-AB
GlykoPrep スタータラボウェアキット	AM200
GlykoPrep マイクロチューブアダプタキット	AM400

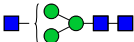
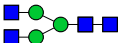
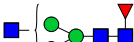


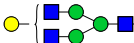


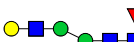

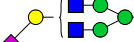
8 グリコシル化の特性解析

Gly-X

AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep および InstantPC、24 個	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep および 2-AB Express、24 個	GX24-2AB
AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep および InstantPC、96 個	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep および 2-AB Express、96 個	GX96-2AB
AdvanceBio Gly-X マニホールドスペーサ	GX100

シアル酸分析

AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット、24 個	GS24-SAP
AdvanceBio 総シアル酸定量キット、48 個	GS48-SAQ
AdvanceBio 総シアル酸定量キット、96 個	GS96-SAQ

グリカン	ProZyme 名	オックスフォード名 ¹	CFG 構造	ラベルなし ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
複雑なタイプの天然型 N-グリカン									
G0-N	NGA2-N	A1			GKPC-401		GKSB-401		GKSP-401
G0	NGA2	A2		GKC-004300	GKPC-301	GKIB-301	GKSB-301	GKSA-301	GKSP-301
G0F-N	NGA2F-N	F(6)A1			GKPC-402		GKSB-402		GKSP-402
G0F	NGA2F	F(6)A2		GKC-004301	GKPC-302	GKIB-302	GKSB-302	GKSA-302	GKSP-302
G0FB	NGA2FB	F(6)A2B		GKC-004311			GKSB-303		
G1	NA2G1	A2G1		GKC-014300	GKPC-317	GKIB-317	GKSB-317		GKSP-317
G1F	NA2G1F	F(6)A2G1		GKC-014301	GKPC-316	GKIB-316	GKSB-316	GKSA-316	GKSP-316
G2	NA2	A2G(4)2		GKC-024300	GKPC-304	GKIB-304	GKSB-304	GKSA-304	GKSP-304
G2F	NA2F	F(6)A2G(4)2		GKC-024301	GKPC-305	GKIB-305	GKSB-305	GKSA-305	GKSP-305
G2FB	NA2FB	F(6)A2BG(4)2		GKC-024311			GKSB-306		
G1S1 α(2,3)		A2G(4)1S(3)1			GKPC-329				

グリカン	ProZyme 名	オックスフォード名 ¹	CFG 構造	ラベルなし ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G1S1 α(2,6)		A2G(4)1S(6)1			GKPC-319				
G1FS1 α(2,3)		FA2G(4)1S(3)1			GKPC-330				
G1FS1 α(2,6)		FA2G(4)1S(6)1			GKPC-320				
G2S1 α(2,3)	A1(α2,3)	A2G(4)2S(3)1			GKPC-321				
G2S1 α(2,6)	A1(α2,6)	A2G(4)2S(6)1		GKC-124300	GKPC-311	GKIB-311	GKSB-311	GKSA-311	GKSP-311
G2FS1 α(2,3)	A1F(α2,3)	F(6)A2G(4)1S(3)2			GKPC-325				
G2FS1 α(2,6)	A1F(α2,6)	F(6)A2G(4)1S(6)2		GKC-124301	GKPC-315	GKIB-315	GKSB-315	GKSA-315	GKSP-315
G2S2 α(2,3)	A2(α2,3)	A2G(4)2S(3)2			GKPC-322				
G2S2 α(2,6)	A2(α2,6)	A2G(4)2S(6)2		GKC-224300	GKPC-312	GKIB-312	GKSB-312	GKSA-312	GKSP-312
G2FS2 α(2,3)	A2F(α2,3)	F(6)A2G(4)2S(3)2			GKPC-323				
G2FS2 α(2,6)	A2F(α2,6)	F(6)A2G(4)2S(6)2		GKC-224301	GKPC-313	GKIB-313	GKSB-313	GKSA-313	GKSP-313
G2F w/2 α-gal	NA2Ga2F	F(6)A2G(4)2Ga(3)2			GKPC-318		GKSB-318		GKSP-318
G1F w/1 α-gal	NA2G 1FGa1	F(6) A2G(4)1Ga(3)1			GKPC-403				
G2F w/1 α-gal	NA2FGa1	F(6)A2G(4)1Ga(3)2			GKPC-404				
A3	NGA3	A3		GKC-005300		GKIB-307	GKSB-307	GKSA-307	
G3	NA3	A3G(4)3		GKC-035300			GKSB-308	GKSA-308	

8 グリコシル化の特性解析

グリカン	ProZyme 名	オックスフォード名 ¹	CFG 構造	ラベルなし ²	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G3S3 α(2,6)	A3(a2,6)	A3G(4)3S(6)3		GKC-335300			GKSB-314		
A4	NGA4	A4		GKC-006300			GKSB-309	GKSA-309	
G4	NA4	A4G(4)4		GKC-046300			GKSB-310		
高マンノース型天然型 N-グリカン									
Man5	MAN-5	M5		GKM-002500	GKPC-103	GKIB-103	GKSB-103	GKSA-103	GKSP-103
Man6	MAN-6	M6		GKM-002600	GKPC-104	GKIB-104	GKSB-104	GKSA-104	GKSP-104
Man7	MAN-7	M7		GKM-002700	GKPC-105	GKIB-105	GKSB-105	GKSA-105	GKSP-105
Man8	MAN-8	M8		GKM-002800	GKPC-106	GKIB-106	GKSB-106	GKSA-106	GKSP-106
Man9	MAN-9	M9		GKM-002900	GKPC-107	GKIB-107	GKSB-107	GKSA-107	GKSP-107
ハイブリッド型天然型 N-グリカン									
ハイブリッド	HYBR	M5A1B					GKSB-111		
天然型 N-グリカンコア									
NF	NF			GKR-001001					
NN	NN			GKR-002000			GKSB-100		
NNF	NNF			GKR-002001					
Man1	MNN	M1		GKR-002100					
Man1F	MNNF	F(6)M1		GKR-002101					
Man3				GKR-002300			GKSB-101		
Man3F				GKR-002301			GKSB-102		

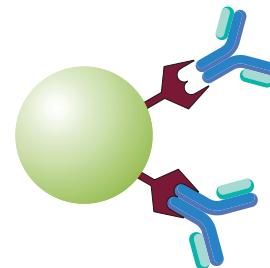
グリカン	ラベルなし	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
N-グリカンライブラリ						
ヒト IgG N-グリカンライブラリ	GKLB-005	GKPC-005	GKIB-005	GKSB-005	GKSA-005	GKSP-005
CHO mAb N-グリカンライブラリ		GKPC-020				
CHO mAb N-グリカンライブラリ+ CHO mAb 糖タンパク質		GKPC-020-P				
ヒト α 1-酸性糖タンパク質 N-グリカンライブラリ	GKLB-001		GKIB-001	GKSB-001	GKSA-001	
ウシフェチュイン N-グリカンライブラリ	GKLB-002		GKIB-002	GKSB-002	GKSA-002	
RNase B N-グリカンライブラリ(高マンノース型)			GKIB-009			
2 本鎖糖鎖および高マンノース分割ライブラリ			GKIB-520	GKSB-520		GKSP-520
シアル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ			GKIB-232	GKSB-232		GKSP-232
α (2,6) シアル化 2 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ				GKSB-262		GKSP-262
α (2,3) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ		GKPC-233	GKIB-233	GKSB-233		GKSP-233
α (2,6) シアル化 3 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ		GKPC-263		GKSB-263		GKSP-263
α (2,3) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ		GKPC-234	GKIB-234	GKSB-234		GKSP-234
α (2,6) シアル化 4 本鎖糖鎖 N-グリカンライブラリ		GKPC-264		GKSB-264		GKSP-264
アライメント標準						
グルコース単位 (GU) ラダー		GKPC-503	GKIB-503	GKSB-503	GKSA-503	GKSP-503
キャピラリー電気泳動 (CE) 用内部泳動標準						GKSP-500

ZORBAX RRHD 300-HILIC 1.8 μ m カラム

サイズ (mm)	内径 (mm)	粒子サイズ (μ m)	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

抗体価測定

アフィニティ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。



バイオモノリス HPLC カラム

- あらゆる IgG（ヒトおよびマウス）の分離用に設計されています
- 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、移動相と固定相間の高速移動が可能です
- 超高速分離により、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を固定化することで分析時間と緩衝液を大幅に削減します

バイオモノリスプロテイン A およびプロテイン G HPLC カラムは、バイオモノリスカラムファミリーの製品です。Protein A および Protein G バイオモノリスカラムは、1100、1200、および 1260 バイオイナートクォータナリ LC などの HPLC および分取 LC システムで使用できます。



バイオモノリスプロテイン A カラム、
5069-3639

ヒントとツール

バイオモノリスプロテイン 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。

カラムの仕様	
外寸	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	バイオモノリス遺伝子組み換えプロテイン A および天然タンパク質 A:白 バイオモノリスプロテイン G:オレンジ
保管期限/使用期限	12 か月

ヒントとツール

詳細情報：

堅牢性と信頼性に優れた遺伝子組み換え Protein A Monolith カラムによる抗体価測定 (資料番号 **5994-3088JAJP**)

Agilent Bio-Monolith rProtein A カラムによる 60 秒での mAb 抗体価測定 (資料番号 **5994-3969JAJP**)

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column (Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムによる mAb タイター分析)
(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 (バイオモノリスプロテイン A カラムと LC/MS を用いた細胞培養の最適化) (資料番号 **5991-5125EN**)

9 抗体価の測定

さまざまな IgG サブクラスに対するバイオモノリスプロテイン A およびプロテイン 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		



遺伝子組み換えプロテイン A と天然タンパク質 A カラム間の架橋実験

カラム: バイオモノリス遺伝子組み換えプロテイン A 5190-6903 4.95 × 5.2 mm
 バイオモノリスタンパク質 A 5069-3639 4.95 × 5.2 mm

移動相: A: リン酸ナトリウム緩衝液、50 mm、pH 7.4
 B: 0.1 M クエン酸、pH 2.6

流量: 1.5 mL/min

注入量: 5~50 µL (ロード量 25 µg)

検出器: UV、280 nm

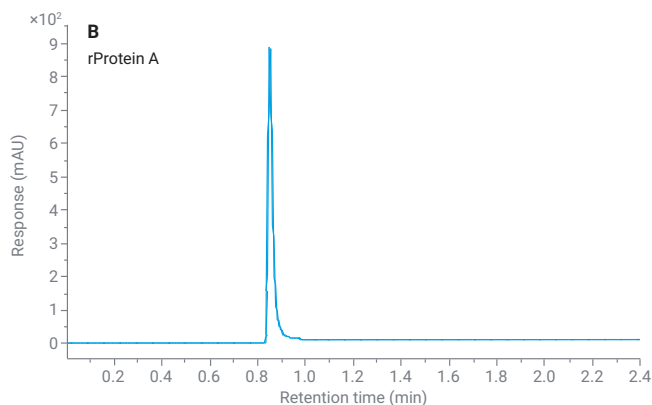
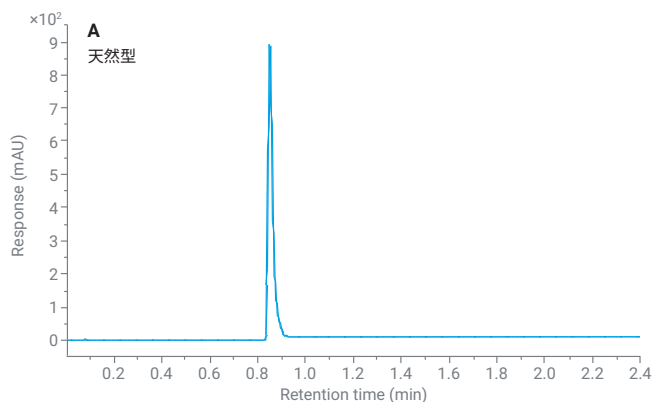
グラジエント: 0% B で 0.5 分保持、100% B で 0.6~2.6 分、0% B で 2.7~4 分

温度: 25 °C

サンプル: チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞培地の上清の遺伝子組み換え IgG

装置本体: 1290 Infinity II Bio LC システム

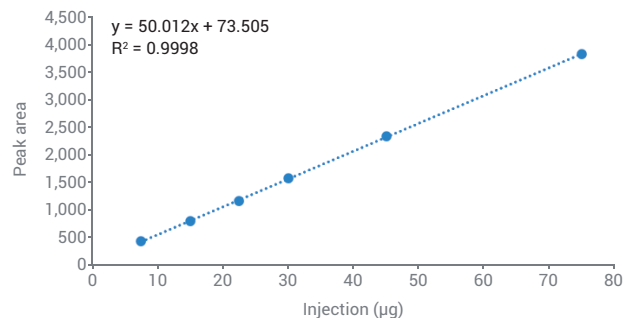
リテンションタイム



	天然型	rProtein A
リテンションタイム (分)	0.850 ± 0.001	0.850 ± 0.001
ピーク高さ	880.9 ± 8.1	881.8 ± 5.3

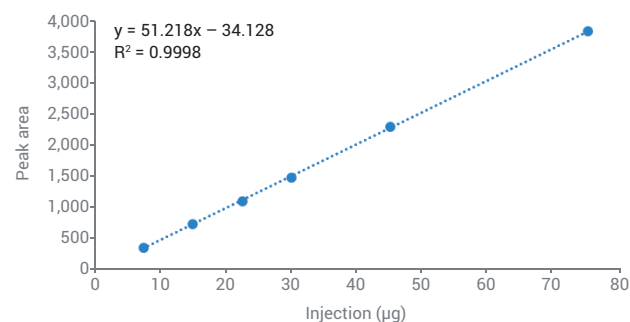
天然タンパク質 A カラムと rProtein A カラムのクロマトグラムおよび mAb ピーク結果の比較

直線性のあるレスポンス



添加サンプル	測定値	% 偏差
25 µg (純粋)	25.25 µg	0.99 %
25 µg (上澄み中)	26.09 µg	4.35 %

rProtein A カラム：直線性のあるレスポンス



添加サンプル	測定値	% 偏差
25 µg (純粋)	24.94 µg	-0.23 %
25 µg (上澄み中)	25.78 µg	3.12 %

天然タンパク質 A カラム：直線性のあるレスポンス

9 抗体価の測定

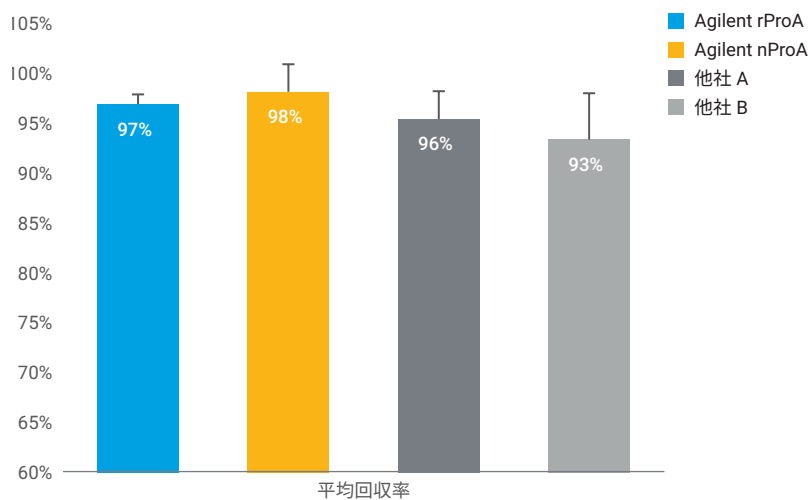
回収率分析

天然タンパク質 A カラムと rProtein A カラムの回収率の比較に加え、他社製 rProtein A カラム 2 個もこの研究で使用しました。他社製カラムの動作流量に合わせて、流量を 2 mL/min に調整しました。追加した mAb サンプルは以下のとおりです。

- Agilent-NISTmAb (部品番号：5191-5744)
- Sigma-Aldrich の Sigma SiLu mAb (SiLu Lite、部品番号：MSQC4)

カラムなし (ユニオンあり) の移動相 B で希釈した、精製済み mAb サンプルを注入して、mAb ピークのベースライン曲線下面積 (AUC) を取得しました。カラムを用いて、溶出した mAb の AUC を取得しました。これと同量の mAb サンプルをベースライン AUC として使用しました。

回収率 % = (溶出した mAb の AUC ÷ ベースライン AUC) × 100



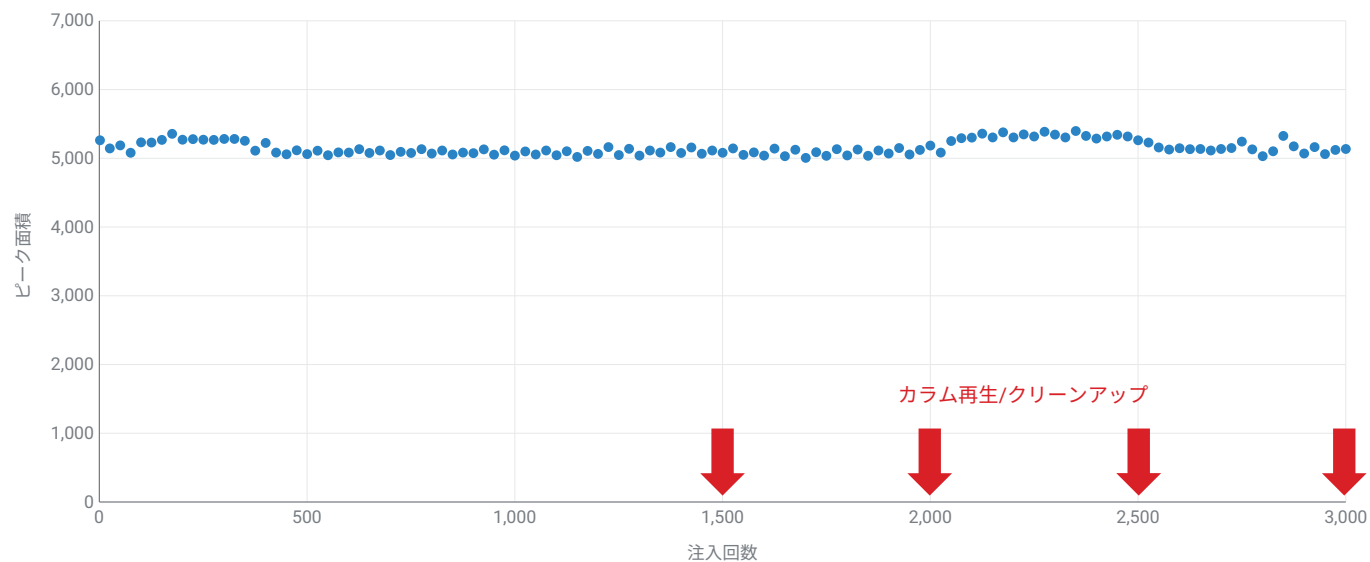
mAb 回収率の比較

rProtein A カラムの平均回収率は天然タンパク質 A カラムよりも 1 % 低くなっていますが、それでも他の 2 つの他社製カラムを上回る回収率を示しています。回収率では nProtein A カラムがややリードしていますが、3 つの mAb サンプルにわたり最も高い回収率を示したのは rProtein A カラムでした。

堅牢で確実な抗体価測定

メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	バイオモノリスプロテイン A、 4.95 × 5.2 mm (部品番号 5190-6903)
結合バッファ (溶出液 A)	50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4
溶出バッファ (溶出液 B)	100 mM クエン酸、pH 2.6
クリーンアップバッファ	100 mM リン酸ナトリウム中に 1 M の NaCl、pH 7.4 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 中に 20 % の イソプロパノール
グラジエントプロフィール	時間 % B 0~0.5 0 (結合) 0.6~1.8 100 (溶出) 1.9~4.0 0 (再コンディショニング)
流量	1 mL/min
カラム温度	24 °C
検出	UV、280 nm
注入量	必要に応じて 1~20 µL



9 抗体価の測定

ヒトモノクローナル抗体の高速定量

カラム: バイオモノリスプロテイン 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

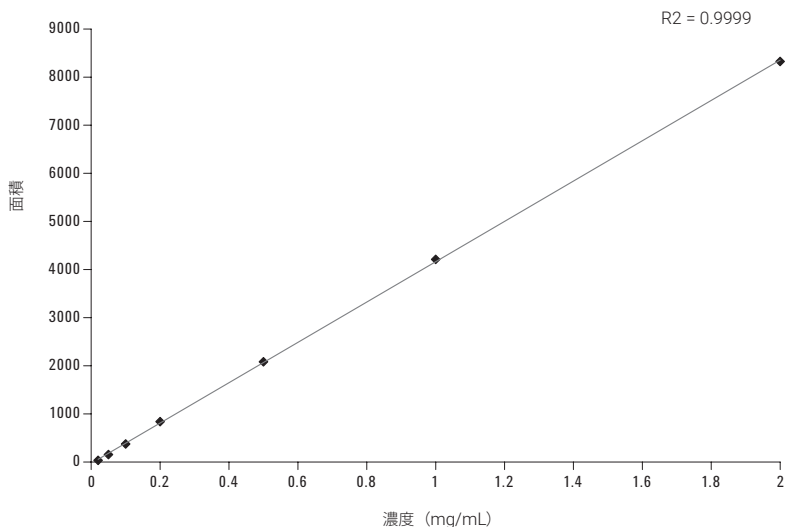
温度: 室温

検出器: UV、280 nm

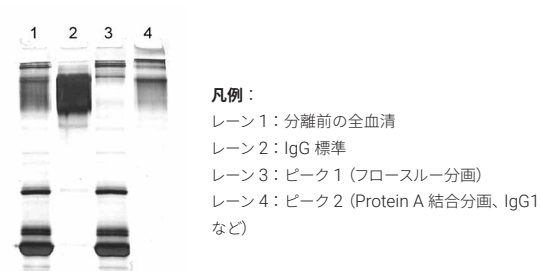
フラクションコレクション: タイムベース

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)

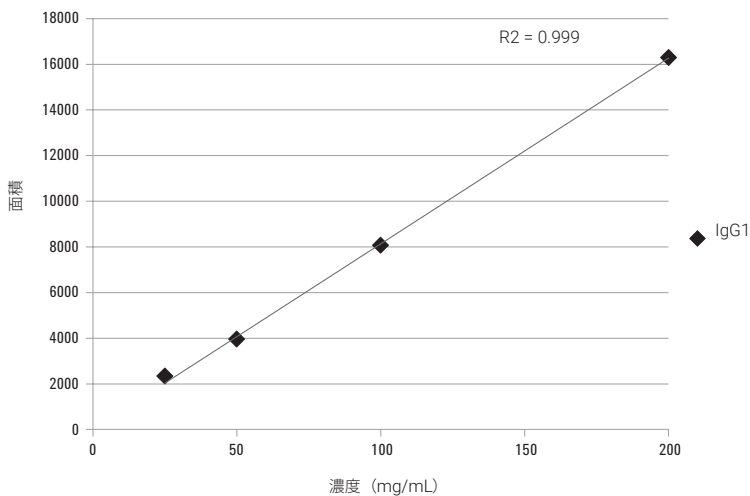
	RT(分)	ピーク面積
1	383	1.666
2	372	1.666
3	365	1.665
4	389	1.667
5	383	1.666
6	378	1.666
7	379	1.668
8	377	1.666
9	376	1.667
10	377	1.667
平均値	378	1.667
S	6.52	0.001
%RSD	1.73	0.060



修飾ヒトトラスツマブの検量線 (パネル A: 0 ~ 2 mg/mL、
パネル B: 25 ~ 200 mg/mL)

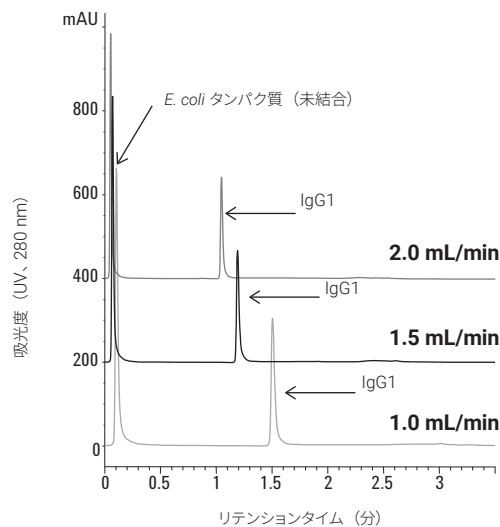


分離により得られた分画の SDS PAGE 分析



高流量でも優れた結合効率を維持

カラム:	バイオモノリスプロテイン 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 μ L (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 $^{\circ}$ C
サンプル:	ヒト化 IgG1 および E. coli 溶解液
装置本体:	1260 Infinity バイオイナート LC



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 (MPa)
1.0	1230	738	63	37	32
1.5	840	492	63	37	47
2.0	636	363	64	36	68

バイオモノリスプロテイン 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。

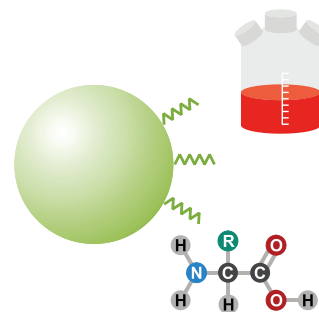
製品の詳細情報

バイオモノリスプロテイン A およびプロテイン G

説明	部品番号
バイオモノリス遺伝子組み換えプロテイン A、4.95 x 5.2 mm	5190-6903
バイオモノリスプロテイン G、4.95 x 5.2 mm	5190-6900
バイオモノリスプロテイン A、4.95 x 5.2 mm	5069-3639

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できます
- Agilent LC システムに使用可能です
- 機器および専門技術への投資を最小化できます

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

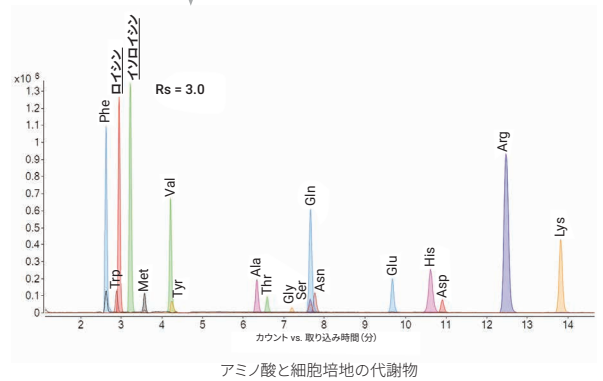
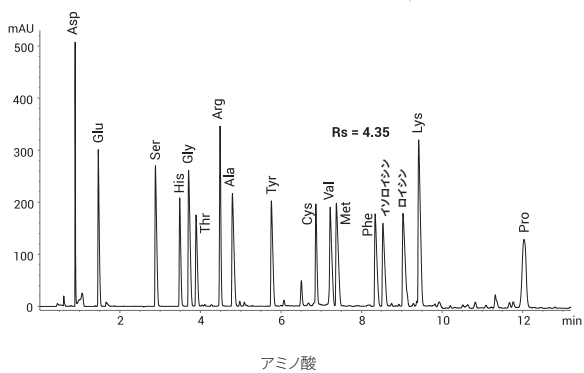
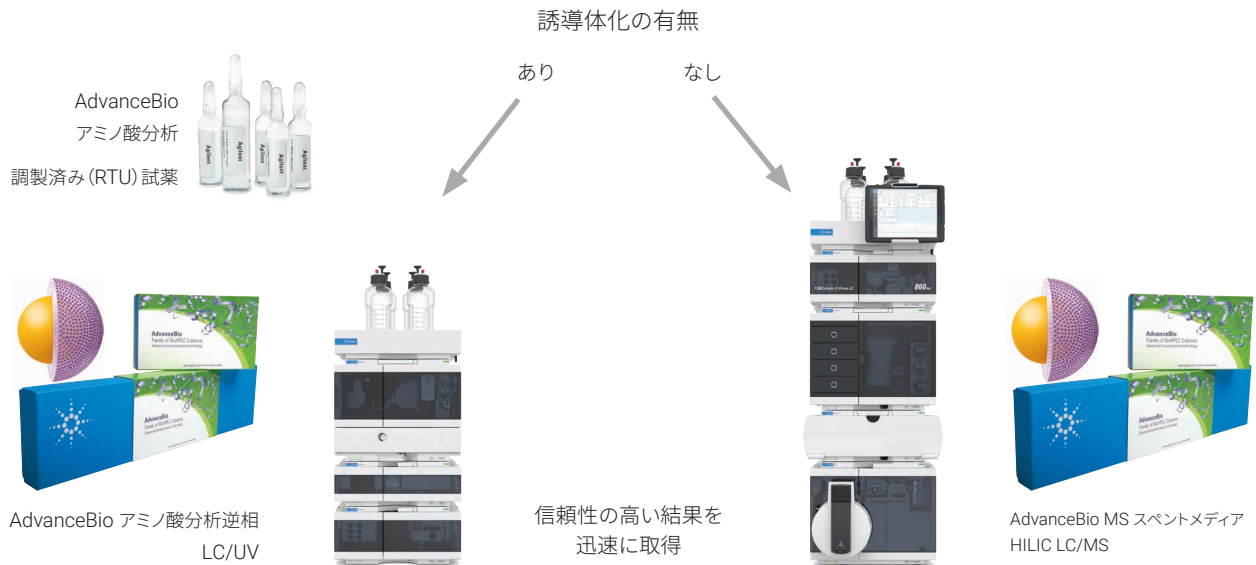
- 単一メソッドによるアミノ酸およびその他の培地の代謝物の分析：MS 検出による HILIC LC 分離です
- サンプルの誘導体化が不要です
- あらゆる LC/MS システムに使用できます
- MS 検出によるベースラインクロマトグラフィー分離が不要です

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。

www.agilent.com/chem/well-plates をご覧ください。

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)

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、アミノ酸誘導体化用の実績のある試薬、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離能分離を実現します
- 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しました
- 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しています
- 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しています
- 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です
- 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しています

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	60 °C	3.0 ~ 11.0	ダブル	600 bar

ヒントとツール

詳しい手順と、アジレントの包括的なソリューションについては、以下をご覧ください。

www.agilent.com/chem/aaa-how-to-guide

LC/UV

カラム: Agilent AdvanceBio
アミノ酸分析
4.6 x 100 mm
部品番号 655950-802

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 mM Na₂HPO₄, 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)

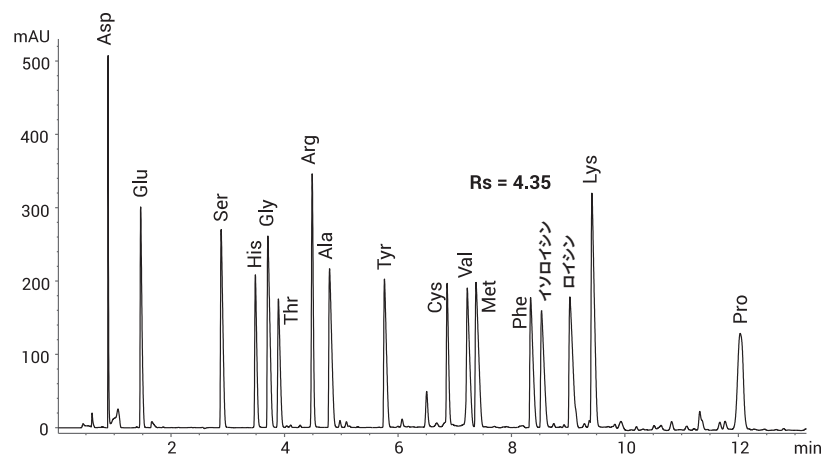
流量: 1.5 mL/min

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離能は 4.35。この数値は欧州薬局方の要件 (1.5 を超える分離能が必要) を完全に充足 [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。

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	粒子サイズ	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 の場合)	600 bar

ヒントとツール

HILIC のベストプラクティスについては、親水性相互作用クロマトグラフィーのメソッド開発およびトラブルシューティング（資料番号 **5991-9271JAJP**）を参照してください。

LC/MS

カラム:

Agilent AdvanceBio
MS スペントメディア
2.1 x 100 mm
部品番号 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:

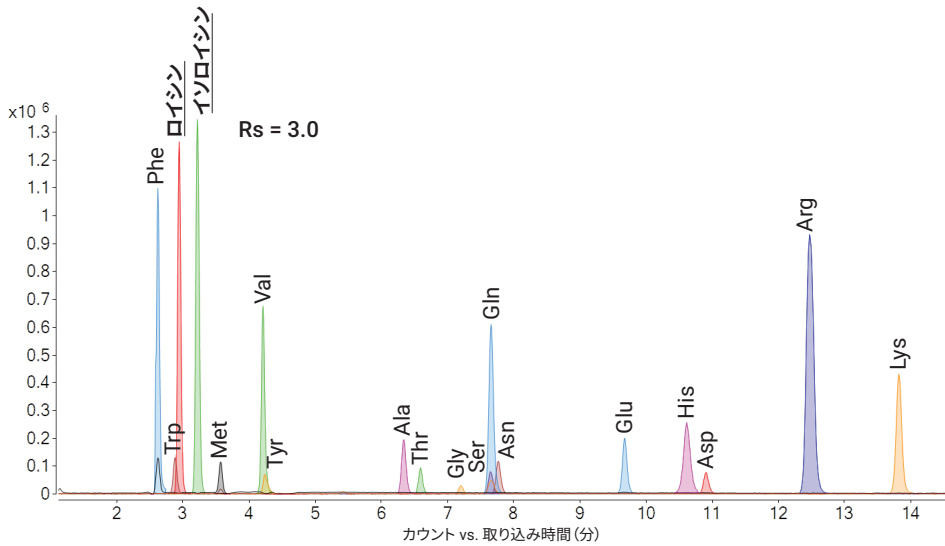
時間 (分)	% B (低 pH、 ポジティブイオンモード)	% B (高 pH、 ネガティブイオンモード)
0	1.00	100
15	80	80
15.5	100	100
20	100	100

サンプル:

細胞培地、移動相 B で
5 倍に希釈

検出:

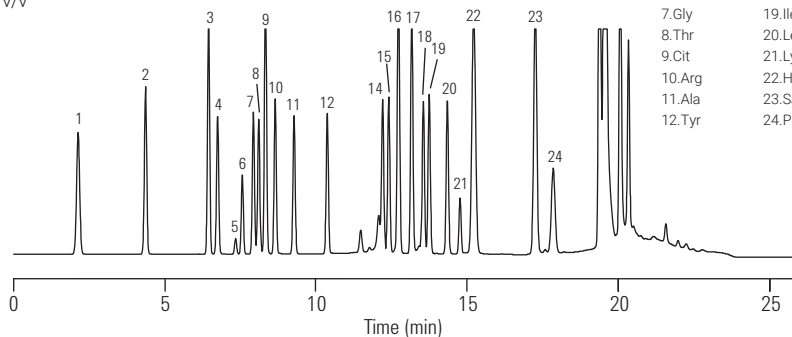
Agilent 6230 飛行時間型 LC/MS



24 種類のアミノ酸を高分離能分離

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
サンプル: 24 種類のアミノ酸

- | | |
|---------|---------|
| 1. Asp | 13. Cys |
| 2. Glu | 14. Val |
| 3. Asn | 15. Met |
| 4. Ser | 16. Nva |
| 5. Gln | 17. Trp |
| 6. His | 18. Phe |
| 7. Gly | 19. Ile |
| 8. Thr | 20. Leu |
| 9. Cit | 21. Lys |
| 10. Arg | 22. Hyp |
| 11. Ala | 23. Sar |
| 12. Tyr | 24. Pro |



ここに示すアミノ酸 24 種の高分離能分離が 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。

ヒントとツール

クイックリファレンスガイドには、Agilent InfinityLab LC シリーズの分析効率を最高レベルに維持するために備えておくべき一般的な消耗品が掲載されています。このガイドは、[カラム消耗品関連カタログ/セクションガイド](#)より無料でダウンロードいただけます。

製品の詳細情報

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

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
ジチオンプロピオン酸 (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



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

ZORBAX カラム

説明	部品番号
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析, 80 Å, 4.6 x 150 mm, 5 μm	993400-902
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析, 80 Å, 4.6 x 150 mm, 3.5 μm	963400-902
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析, 80 Å, 4.6 x 75 mm, 3.5 μm	966400-902
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析, 80 Å, 3.0 x 150 mm, 5 μm	961400-302
ZORBAX Eclipse アミノ酸分析, 80 Å, 4.6 x 12.5 mm, 5 μm (4 個、ガード)	820950-931
ガードハードウェアキット	820999-901
ZORBAX Eclipse Plus RRHD, 95 Å, 2.1 x 50, 1.8 μm, 1200 bar	959757-902
ZORBAX Eclipse Plus RRHT, 95 Å, 2.1 x 50, 1.8 μm, 600 bar	959741-902



緩衝液、ホウ酸、100 mL、
5061-3339



アミノ酸補助キット、各 1 g、
5062-2478

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

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。

ヒントとツール

アジレントのサービスプログラム全体については、[ホームページ](#)をご覧ください。

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。

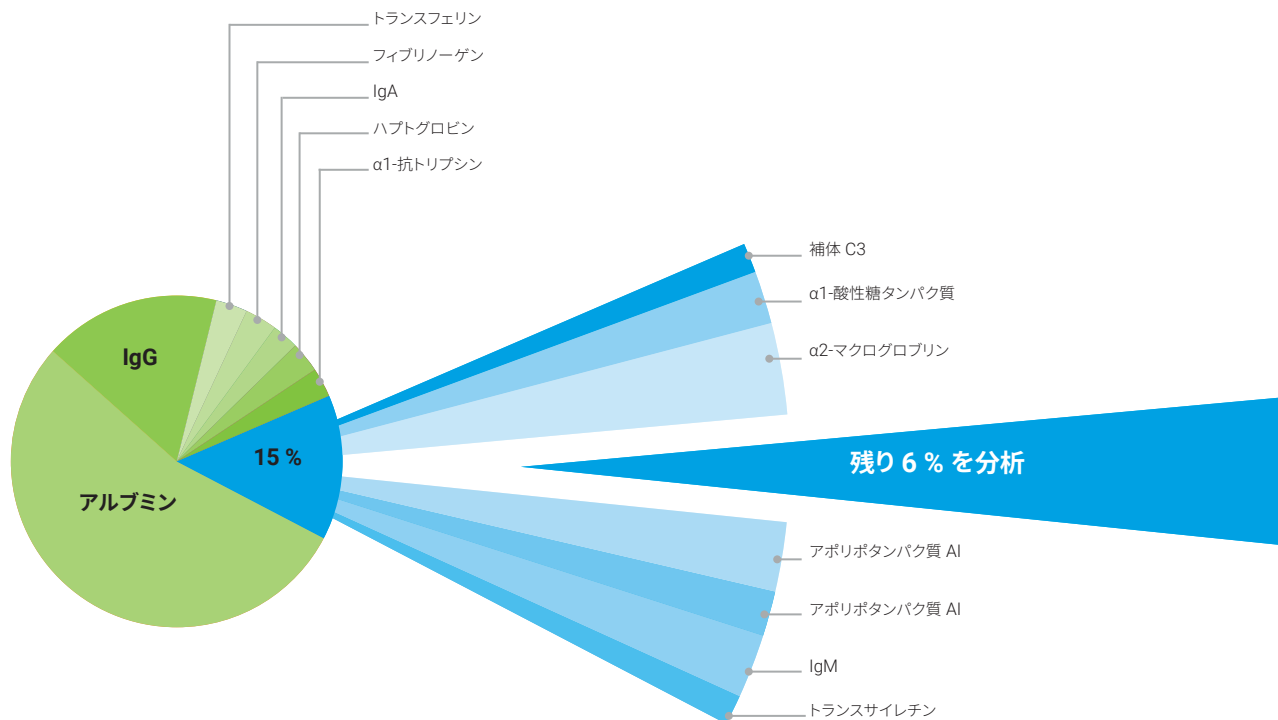
マルチプルアフィニティ除去システムは、多様な LC カラム寸法とスピニングカートリッジフォーマットでご利用いただけます。アジレントの最適化された緩衝液、使いやすいスピニングフィルタ、および濃縮機と組み合わせることで、幅広い LC 機器（カラム）やベンチトップ型遠心分離機（スピニングカートリッジ）に対応した統合型の自動除去ソリューションが実現します。

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

Agilent マルチプルアフィニティ除去カラムおよびスピニング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

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 (ヒト血漿中の多量タンパク質除去にかかるサイクル時間の短縮 - Agilent 1200 Infinity シリーズ Quick-Change パイオイナート 2 ポジション/10 ポートバルブと Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブを用いた交互カラム再生) (資料番号 **5991-4721EN**)。

製品の詳細情報

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	外寸	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、アポリポタンパク質 AI、アポリポタンパク質 AII、補体 C3、トランスサイレチン	94 %	スピカートリッジ	8 ~ 10 µL	5188-6560
			4.6 × 50 mm	20 µL	5188-6557
			4.6 × 100 mm	40 µL	5188-6558
			10.0 × 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 %	スピカートリッジ	12 ~ 14 µL	5188-6408
			4.6 × 50 mm	30 ~ 35 µL	5188-6409
			4.6 × 100 mm	60 ~ 70 µL	5188-6410
			10.0 × 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 %	スピカートリッジ	7 ~ 10 µL	5188-5230
			4.6 × 50 mm	15 ~ 20 µL	5185-5984
			4.6 × 100 mm	30 ~ 40 µL	5185-5985
MARS Human-大容量	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 %	スピカートリッジ	14 ~ 16 µL	5188-5341
			4.6 × 50 mm	30 ~ 40 µL	5188-5332
			4.6 × 100 mm	60 ~ 80 µL	5188-5333
			10.0 × 100 mm	最大 340 µL	5188-5336
MARS Human-2	アルブミン、IgG	69 %	スピカートリッジ	50 µL	5188-8825
			4.6 × 50 mm	100 µL	5188-8826
MARS Human-1	アルブミン	50 ~ 55 %	スピカートリッジ	65 µL	5188-5334
			4.6 × 50 mm	130 µL	5188-6562
MARS Mouse-3	アルブミン、IgG、トランスフェリン	80 %	スピカートリッジ	25 ~ 30 µL	5190-2534
			4.6 × 50 mm	37 ~ 50 µL	5188-5217
			4.6 × 100 mm	75 ~ 100 µL	5188-5218

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

オリゴヌクレオチド

はじめに

近年、オリゴヌクレオチドへの関心が大きく広がりました。これには長さがヌクレオチド 10 ～ 20 個分から数百、数千個分までの、さまざまなサイズの DNA と RNA の両方が含まれます。小型の分子を合成することはできますが、省略や挿入を持つ密接に関係した配列から、故意の、または副反応による意図しない化学修飾を含む配列まで、さまざまな不純物を含む可能性があります。mRNA などの大きな配列は、酵素的に生成された結果、別の不純物を含むことがあります。

このため、液体クロマトグラフィーによるオリゴヌクレオチドの分析と精製には特有の課題があります。リン酸骨格は分子の親水性が高いことを意味します。つまり、逆相クロマトグラフィーは期待されているほど簡単ではないのです。また、相補的配列との強力な水素結合を形成する能力は、おなじみの古典的な二重らせん構造の作成に欠かせませんが、これらの二次構造を解離させるには、高温でクロマトグラフィーを実施する必要があるかもしれないということでもあります。

精製に関する考慮事項

オリゴヌクレオチドはいろいろな目的で使用されますが、精製に必要なアプローチは、要求される純度によって決まる場合があります。一部のケース、例えば、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) プライマーでは、オリゴヌクレオチドのサイズは比較的小さく (約 20 ～ 30 ヌクレオチド)、精製は「トリチルオン」生成と呼ばれる固相抽出法を使って行われます。オリゴヌクレオチドのサイズが大きい別のアプリケーションでは、不純物が生成物と密接に関連しているため、HPLC を使った手法が好まれます。

HILIC カラムオプションについては、AdvanceBio Glycan マッピングカラム、アミドベース HILIC 固定相 (**123 ページ**)、または AdvanceBio MS スペントメディアカラム、両性イオン HILIC 相 (**146 ページ**) をお勧めします。

オリゴヌクレオチド分析および精製で最も一般的なクロマトグラフィー手法は次の 2 つです。

- イオンペア逆相 – 酢酸トリエチルアミン (TEAA) などのカチオン基を、負電荷を持つリン酸骨格とイオンペア化すると、従来の逆相カラムに保持できるほど十分に疎水性の高い錯体が得られます。この錯体は、従来の逆相カラムで簡単に保存できます。有機溶媒を非常に浅いグラジエントで増加させると、オリゴヌクレオチドが非常に良好な分離能で溶出ようになります。
- イオン交換 – 強力なアニオン交換器は、オリゴヌクレオチドの負電荷を持つリン酸骨格と相互に作用します。塩濃度を上げるグラジエントにより、オリゴヌクレオチド種が順次溶出し、十分に分離されることが保証されます。



DNA および RNA オリゴヌクレオチドのカラムの選択

DNA および RNA オリゴヌクレオチドのカラムの選択

手法	アジレントのカラム	注意事項
イオンペア逆相	AdvanceBio オリゴヌクレオチド	効率性の高い 2.7 μm と 4 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析が可能です。
	PLRP-S	さまざまな粒子サイズやポアサイズのマクロポラスポリマー粒子で、pH と温度について最高の安定性を示します。
アニオン交換	Agilent Bio IEX	親水性コーティングされた非多孔質のポリマー性粒子で、質量移動の問題を解消し、卓越した性能を提供します。分析スケールおよびラボスケールの分取機能に対応できるよう、さまざまな粒子サイズが用意されています。
	PL-SAX	強アニオン交換基を持つ全多孔質のポリマー性粒子。バルク充填剤を含め、分析から分取スケールまで利用できます。

最適な手法を選択するときに、考慮すべきことがいくつかあります。その手法が分取スケールの精製に必要かどうかを判断するということは、最大容量を提供しながら、必要な純度を実現できるカラムを選択するだけでなく、必要なサイズまでスケールアップできるカラムまたは固定相を要求するということでもあります。もし、MS 検出の使用を想定しているのであれば、移動相に互換性のある手法を使う必要があるでしょう。

オリゴヌクレオチドのサイズは多種多様なので、すべての分子が拡散できる十分なサイズのポアを持つカラム固定相の選択が不可欠です。ポアのサイズが大きすぎると、表面積が小さくなるため、分離能力の一部が失われます。ポアのサイズが小さすぎると、大きな分子が粒子に浸透できなくなります。ただし、非多孔質粒子を分析目的で使用できる場合は例外です。

ヒントとツール

オリゴヌクレオチドの分離に使用される LC カラムのポートフォリオ（ワークフローとオーダーガイドやトレーニング資料を含む）について、詳しくは、[explore.agilent.com/oligonucleotide-chromatography-solutions-jp](https://www.agilent.com/oligonucleotide-chromatography-solutions-jp) を参照してください。

イオンペア逆相分離

AdvanceBio オリゴヌクレオチド

脱保護された合成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、高効率の 2.7 μm および 4 μm 表面多孔質 Poroshell 粒子が特徴で、2.1 mm ID の分析サイズから 21.2 mm ID の分取カラムまでのサイズが用意されています。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、新規生体物質、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。

このような粒子がもたらす独特なポアサイズ分布と短い拡散距離により、LC-UV (LC-DAD) および LC-MS アプリケーションの両方、または 2D-LC 実験の二次元目としての分離を、高い分離能で、最大約 100 ~ 150 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドで実行できるようになります。

ポアは、ワイドポア PLRP-S 充填剤の使用を必要とする mRNA などの非常に大きなオリゴヌクレオチドの分析ができるほどのサイズではありませんが、AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムを使って、生物製剤 mRNA ベースのワクチンの重要な品質特性である mRNA キャッピングを分析できます。

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
C18	4 μm	100 Å	65 °C	3.0~11.0	ダブル	600 bar

ヒントとツール

オリゴヌクレオチドの分離におけるさまざまなイオンペア試薬の影響について、詳しくはアプリケーションノート **5994-2957JAJP** をご覧ください。

カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド
2.1 x 50 mm
(部品番号 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: 1700 m/z

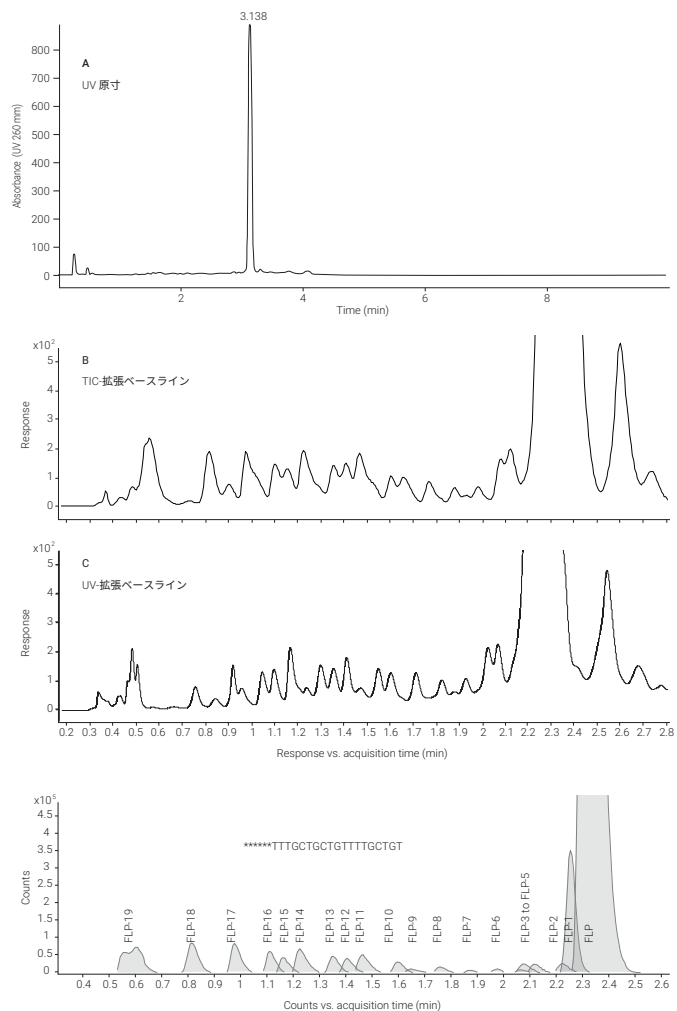
スキャン速度: 3.00 スペクトル/秒

イオン極性: -ve

VCap 3,500

ノズル電圧: 1,000 V

フラグメンタ: 200



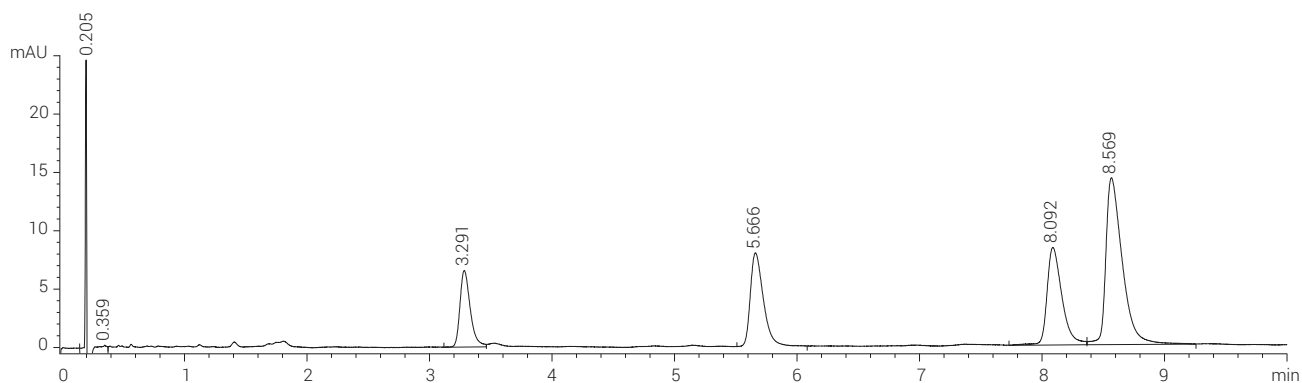
AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラムで分離した 25-mer DNA オリゴヌクレオチドの TIC からの解析データ

12 オリゴヌクレオチド

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 (部品番号 659750-702)	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 (部品番号 5190-9028)
移動相:	A:100 mM TEAA 水溶液 B:100 mM TEAA アセトニトリル溶液	温度:	65 °C
グラジエント:	12 分で 6~8 % B	注入量:	0.5 µL
ストップタイム:	13 分	検出:	UV (260 nm)
分析後:	5 分		
流量:	0.6 mL/min		



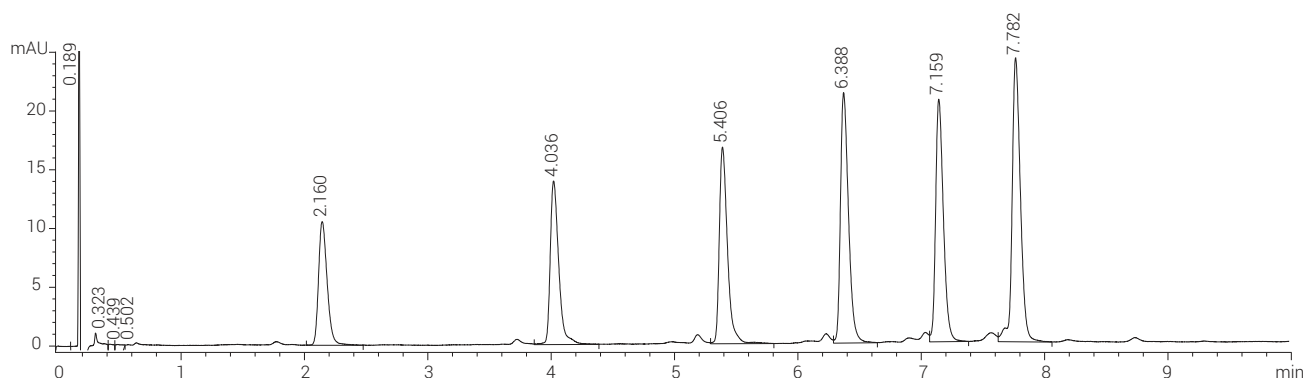
アジレントは、15、20、25、30、35、および 40 mer の合成オリゴデオキシチミジンを含むオリゴヌクレオチドラダー標準試料も用意しています。この標準試料を使用することで、カラムの選択性と再現性を実証できます。

カラム: AdvanceBio オリゴヌクレオチド
2.1 x 50 mm
(部品番号 659750-702)

移動相: A: 100 mM TEAA 水溶液
B: 100 mM TEAA アセトニトリル溶液

グラジエント: 10 分で 10~14 % B
ストップタイム: 11 分
分析後: 5 分
流量: 0.6 mL/min
カラム

温度: 65 °C
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
(部品番号 5190-9029)
注入量: 10 µL
検出: UV (260 nm)



ヒントとツール

サイズ排除クロマトグラフィー – 脱塩や、さまざまなオリゴヌクレオチドクラスの分離に適した SEC は、同等サイズの分子を分離できません。これは非対話型の技術で、グラジエント溶出を必要としないため、操作がとても簡単です。SEC カラムオプションについては AdvanceBio SEC カラム (97 ページ)、また、長いオリゴヌクレオチドに向けた大きなポアサイズについては Agilent Bio SEC-5 カラム (104 ページ) をお勧めします。

HILIC (親水性相互作用液体クロマトグラフィー) – オリゴヌクレオチドなど、極めて親水性の高い分子の分離に理想的な手法です。HILIC は習得が「難しい」手法と考えられています。これは固定相の表面で吸収された水性層で分離が起こるからです。この吸収された層を均等に形成し、維持することが重要であるため、カラムの状態に特別な注意を払う必要があります。

PLRP-S

- プロセススケール分離の除染条件が過酷であっても、長いカラム寿命を実現し、その寿命をとおして再現性の高い結果を提供し続けられる、耐久性の高い堅牢なポリマー性粒子を含有しています
- 熱的および化学的に安定しています
- サイズの小さなオリゴヌクレオチドから大きなポリヌクレオチドまで、ポアサイズ (100 Å ~ 4000 Å) を分離に使用できます
- 分析スケールの創薬段階から数 kg の CGMP 製造まで柔軟に対応できます

PLRP-S カラムと充填剤には幅広いポアサイズと粒径が揃っており、すべてが同一のケミストリの場合と同じ基本的な吸着特性を備えています。本質的に疎水性結合相なので、逆相系での分離には結合相、アルキル結合基は必要ありません。

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。幅広い製品が揃っているため、分析用の分離から分取精製まで、適したポリマー系逆相カラムがあります。さらに、バルク充填剤を充填したプロセススケールカラムもご用意できます。

PLRP-S ポリマー結合層は、オリゴヌクレオチドの精製と分析に欠かせない、高い pH と温度との適合性を備えています。

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。3 μm から 50 μm の粒子サイズにより、μg スケールから数 kg の CGMP 製造スケールまで対応しています。優れた化学的安定性 (最大 1 M NaOH) により、汚染除去と再生が可能で、カラムを長期間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。



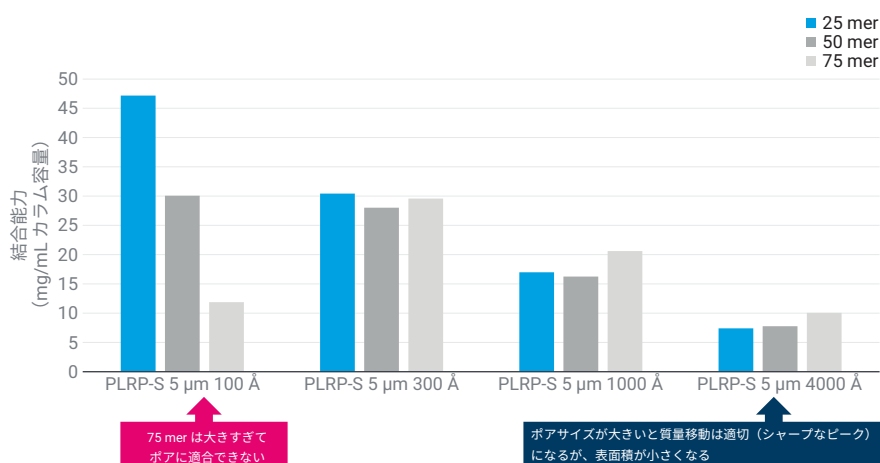
UHPLC カラムの仕様

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、および 10 μm : 207 bar/3000 psi 10 ~ 15 μm、15 ~ 20 μm、および 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, 300 Å	サイズの小さなオリゴヌクレオチドから CRISPR ガイド RNA まで
1000 Å	大きいオリゴヌクレオチド
4000 Å	超大型のオリゴヌクレオチド / mRNA / 高速

適切なポアサイズは、分子のサイズに基づいて選択します。大型の分子は、アクセス性と質量移動を向上させるため、大きめのサイズのポアを必要とします。PLRP-S のような全多孔質の粒子では、ポアサイズが大きいと、内部の表面積が小さくなります。ポアサイズを小さくして、表面積を大きくすると、精製で重要な考慮事項である容量が増える可能性があります。



異なるサイズのオリゴヌクレオチドの結合容量の比較

ヒントとツール

アジレントオリゴヌクレオチド精製ソリューションについて、詳しくは、カタログ **5994-4286JAJP** をご覧ください。

強アニオン交換

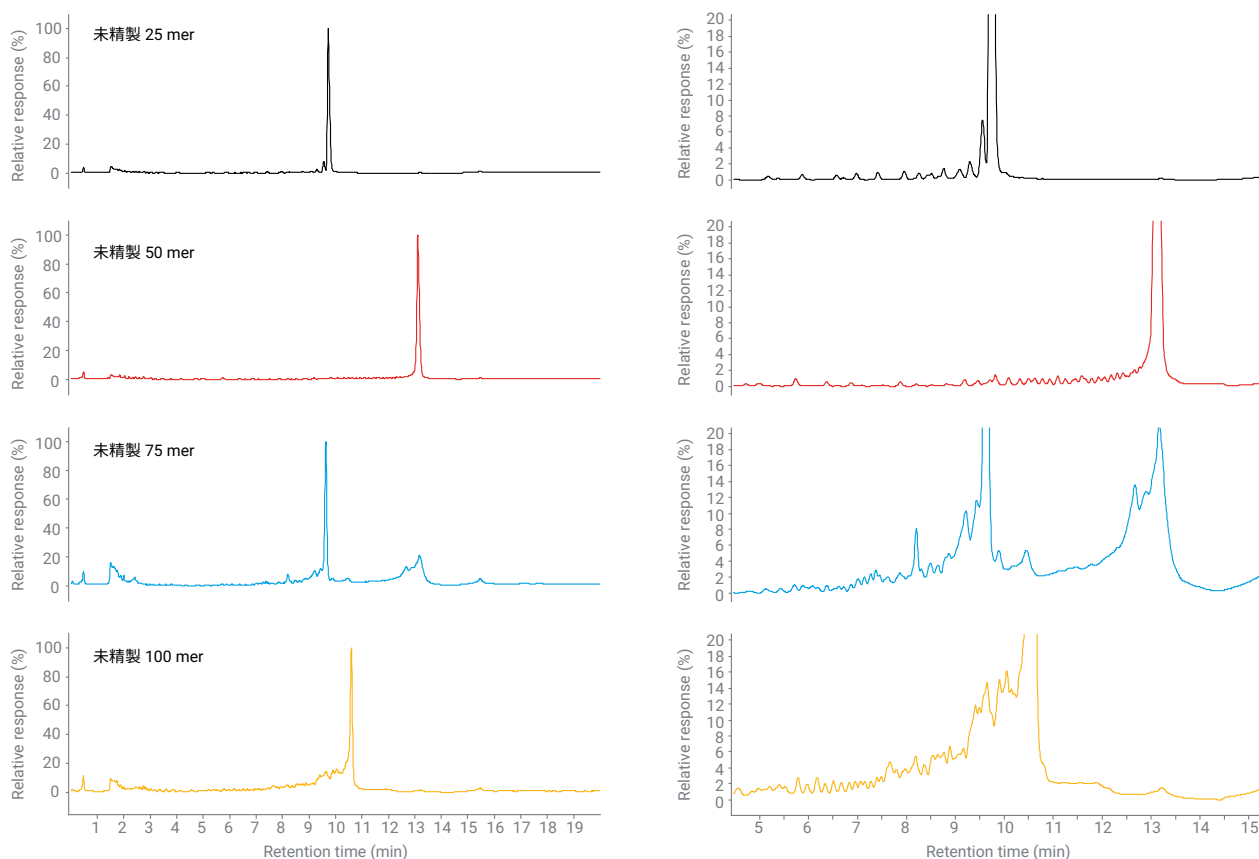
Agilent Bio-IEX

- 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、非特異的な結合がありません
- 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、カラム容量が増加します
- 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します

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 ファミリーにはタンパク質の分析に使用されるカチオン交換が含まれますが、オリゴヌクレオチドの負電荷を持つリン酸骨格には、強アニオン交換 (SAX) が好まれます。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。

ポア構造が存在しないということは、アクセス性と質量移動の問題が解消され、分析での分離の分離能が向上することを意味しますが、全体的な容量は大幅に減少します。



Agilent Bio SAX 5 μm カラムを使用した粗製 25、50、75、100 mer の分析的分離 (左) と領域の拡大図 (右)

PL-SAX

- 小さい全多孔質粒子により優れたクロマトグラフィー性能があります
- 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します
- 優れた安定性により長寿命を実現しました

PL-SAX は、変性条件下での脱保護された合成オリゴヌクレオチドや、その他の酸性ペプチドやタンパク質のアニオン交換体 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。また、5 μm カラムを使用することで、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。

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 (mm)	粒子サイズ (μm)	ポアサイズ (\AA)	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 \AA および 4000 \AA	1 ~ 14	80 $^{\circ}\text{C}$

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-t-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 \AA
PL1551-1802
4.6 x 50 mm, 8 μm

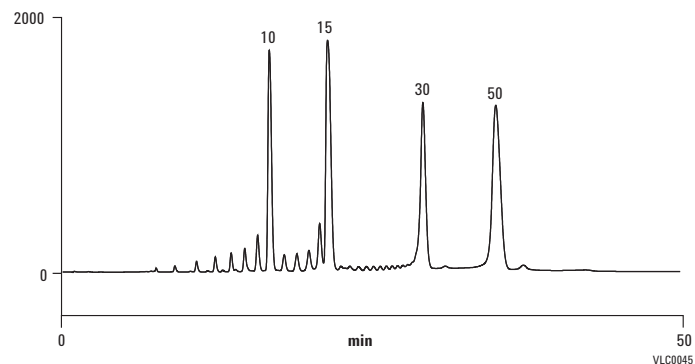
移動相: A: 7:93 v/v アセトニトリル:100 mM TEAA, pH 8.5
B: 7:93 v/v アセトニトリル:100 mM TEAA, 1 M 塩化アンモニウム, pH 8.5

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 $^{\circ}\text{C}$

検出器: UV, 220 nm



ポリ-t-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。

製品の詳細情報

AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	部品番号
2.1 x 150	2.7	653750-702
2.1 x 100	2.7	655750-702
2.1 x 50	2.7	659750-702
2.1 x 5、ガード	2.7	821725-921
4.6 x 150	2.7	653950-702
4.6 x 100	2.7	655950-702
4.6 x 50	2.7	659950-702
4.6 x 5、ガード	2.7	820750-921

AdvanceBio オリゴヌクレオチドカラム

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	部品番号
21.2 x 50	4	671050-702
21.2 x 150	4	671150-702
4.6 x 150	4	693971-702
4.6 x 100	4	695971-702
4.6 x 50	4	699971-702
4.6、ガード	4	820750-941

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標準試料	5190-9028
オリゴヌクレオチドラダー標準試料	5190-9029

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

(続く)

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
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	PL1312-1803
1.0 x 50	5	PL1312-1500	PL1312-1501	PL1312-1502	PL1312-1503
1.0 x 10	5			PL1C12-2502	
1.0 x 150	3	PL1312-3300			
1.0 x 50	3	PL1312-1300	PL1312-1301		
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

分取・プロセス用 PLRP-S

サイズ (mm)	粒子サイズ (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		

(続く)

12 オリゴヌクレオチド

分取・プロセス用 PLRP-S

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	PLRP-S 100 Å	PLRP-S 300 Å	PLRP-S 1000 Å	PLRP-S 4000 Å
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)	ユニット	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 SAX HPLC カラム、PEEK

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	部品番号
4.6 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2475
4.6 x 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2476
4.6 x 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2467
4.6 x 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2468
2.1 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2479
2.1 x 50	10	275 bar, 4000 psi	5190-2480
2.1 x 250	5	400 bar, 5800 psi	5190-2471
2.1 x 50	5	400 bar, 5800 psi	5190-2462

Bio SAX HPLC カラム、ステンレス

サイズ (mm)	粒子サイズ (μm)	圧力上限	部品番号
21.2 x 250	5		5190-6883
10 x 250	5		5190-6882
4.6 x 250	10	275 bar, 4000 psi	5190-2473
4.6 x 250	5	413 bar, 6000 psi	5190-2465
4.6 x 150	3		
4.6 x 50	3	551 bar, 8000 psi	5190-2463
4.6 x 50	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2461
4.0 x 10、ガード	10	275 bar, 4000 psi	5190-2474
4.0 x 10、ガード	5	413 bar, 6000 psi	5190-2466
4.0 x 10、ガード	3	551 bar, 8000 psi	5190-2464
4.0 x 10、ガード	1.7	600 bar, 8700 psi	5190-2462

PL-SAX 強アニオン交換カラム

サイズ (mm)	粒子径 (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)	粒子径 (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

ヒントとツール

カラムユーザーガイドでは、カラムの使用および取り扱い方法、推奨開始メソッドに関する有益な情報をご覧いただけます。

www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides

ベクターベースの医薬品分析

インタクトベクターから1つのアミノ酸の修飾までの特性解析

バイオ医薬品研究における刺激的で前途有望な新しい方法として、多数の治療送達プラットフォームが登場しました。これらは、細胞および遺伝子治療にオリゴヌクレオチドを提供するタンパク質ベースのカプセルから、ワクチン用のタンパク質ベースのウイルス様粒子や、ワクチンに mRNA を提供する脂質ベースのナノ粒子まで多岐にわたります。

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、細胞および遺伝子治療のために研究されている中でも特に一般的なウイルスベクターであり、遺伝性網膜疾患や脊髄性筋萎縮症の治療で大きな成果を上げています。AAV は治療送達プラットフォームとしての使用を目的に開発されており、治療薬のすべての重要品質特性 (CQA) を確実にモニタリングするために欠かせない要素です。

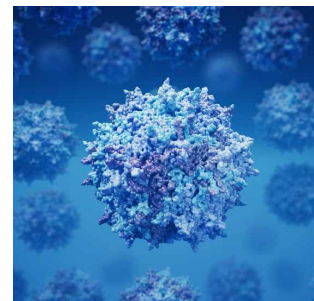
AAV のよく知られた CQA と独自の CQA という両面

AAV には血清型と呼ばれる数種類の形態があります。これらはそれぞれ似たような高次構造をしていますが、アミノ酸配列が異なるため、当然のことながら、標的にする細胞の種類も異なります。この当然の選択性により、これらは目的の生物製剤の開発に有益なベクターとなりますが、同時にプラットフォーム分析メソッドの導入が困難になります。

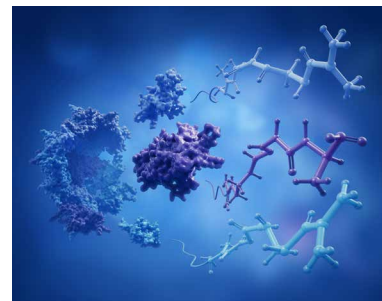
多くの AAV CQA は、LC/MS やペプチドマッピングによるタンパク質配列確認など、他の単一タンパク質の生物製剤でモニタリングされている CQA と似ていることから、よく知られています。一方、充填された（それも正確に充填された）カプシドと空のカプシドの割合など、その他の CQA は独自のものです。このような解析の一部は、AAV の内部にカプセル化されたトランスジェニックの存在により、さらに複雑になります。

ヒントとツール

AAV の CQA 分析に対応したアジレントの LC コラムポートフォリオについて、詳しくは **explore. [agilent.com/advancebio-aav-jp](https://www.agilent.com/advancebio-aav-jp)** を参照してください。



カプシドタンパク質の同定確認



AAV カプシドは、3 種類のタンパク質、VP1、VP2、VP3 を約 1:1:10 の化学量論比で含み、カプシドあたり約 60 コピーのタンパク質で構成されています。これら 3 種類のタンパク質は、すべてが同じ遺伝子からスプライシングされており、高い配列相同性のために、クロマトグラフィーによる分離が困難です。カプシドタンパク質 3 種の比率の評価には、従来、SDS-PAGE ゲル銀染色、または ELISA やイムノブロットングなどの抗体ベースメソッドが用いられてきました。しかし、これらの手法は煩雑でエラーが発生しやすく、AAV のタイプごとに固有の新しい抗体を生成しなければならない場合があります。AAV 血清型間の相同性の高さを考えると、識別に必要な特異性を持つ抗体を生成することは、困難となる可能性があります。液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) は、より優れた速度、特異性、精度により、これらの課題を克服できます。アジレントが提供するワークフローソリューションは、インタクトタンパク質とペプチドマッピングの両方に対応しており、翻訳後修飾 (PTM) の同定と部位決定が可能です。

AAV の逆相分離

AAV カプシドのインタクトタンパク質の分離には、ZORBAX RRHD ワイドポアカラムを推奨します。これらの 1.8 μm 粒子 UHPLC カラムには 4 種類の結合相が用意されています。AAV 血清型の配列の違いが、単一プラットフォームによるメソッドを困難にしていますが、多様な相ケミストリをうまく利用することで、非常によく似たメソッドを使うことができます。現在、血清型に応じて、ZORBAX RRHD 300SB-C18 と 300-Diphenyl が推奨されています。

ペプチドマッピングは、タンパク質配列の決定と PTM の同定に重要なメソッドで、インタクト質量測定だけの場合よりも、粒度が高くなります。これは、開発と特性解析の段階では MS 検出、リリース済み製品の QC では UV または MS 検出を伴うことがよくあります。

AAV カプシドタンパク質の配列および PTM 同定には、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを推奨します。2.7 μm 表面多孔質 C18 固定相が、小さい背圧での高い分離能を可能にし、サイズや疎水性の点でばらつきが大きいペプチドのマッピングに対して全体的に強力なパフォーマンスを発揮します。

ヒントとツール

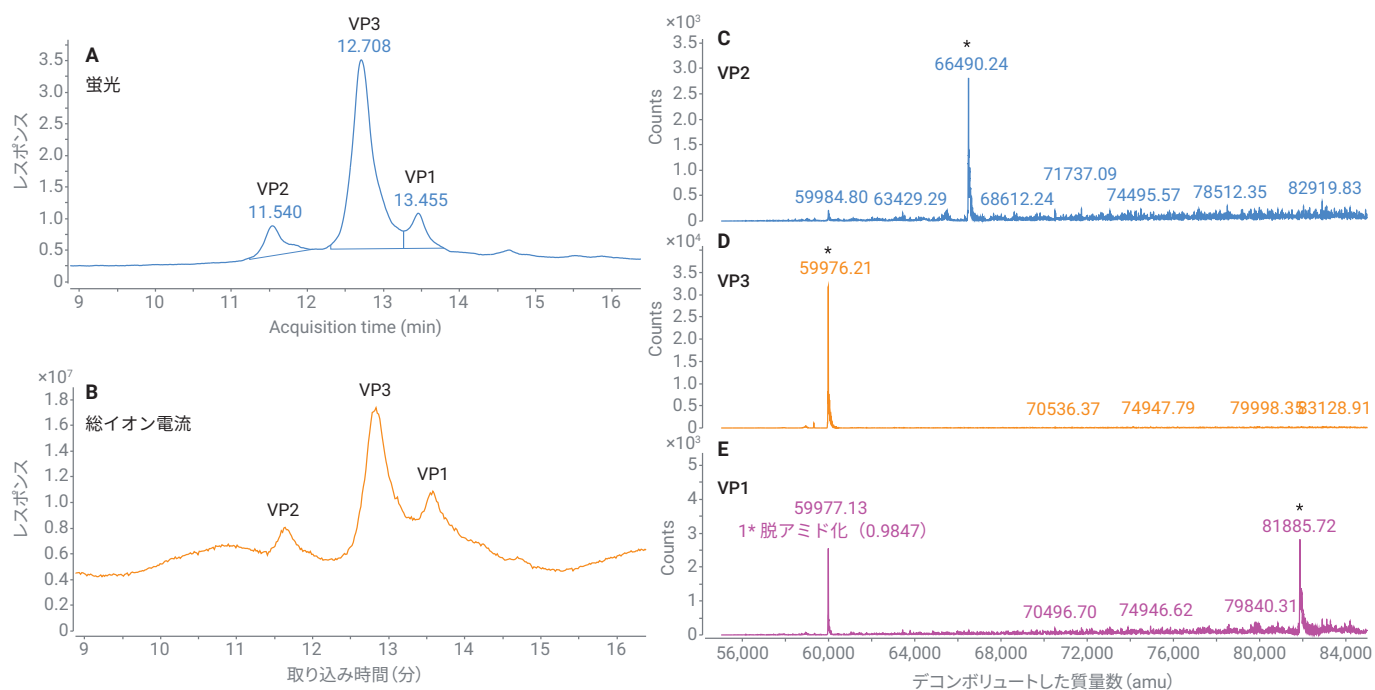
カラムの選択とメソッドの詳細、および追加で推奨する消耗品について、詳しくはオーダーガイド **5994-4829JAJP** を参照してください。

ZORBAX RRHD ワイドポアカラムの仕様

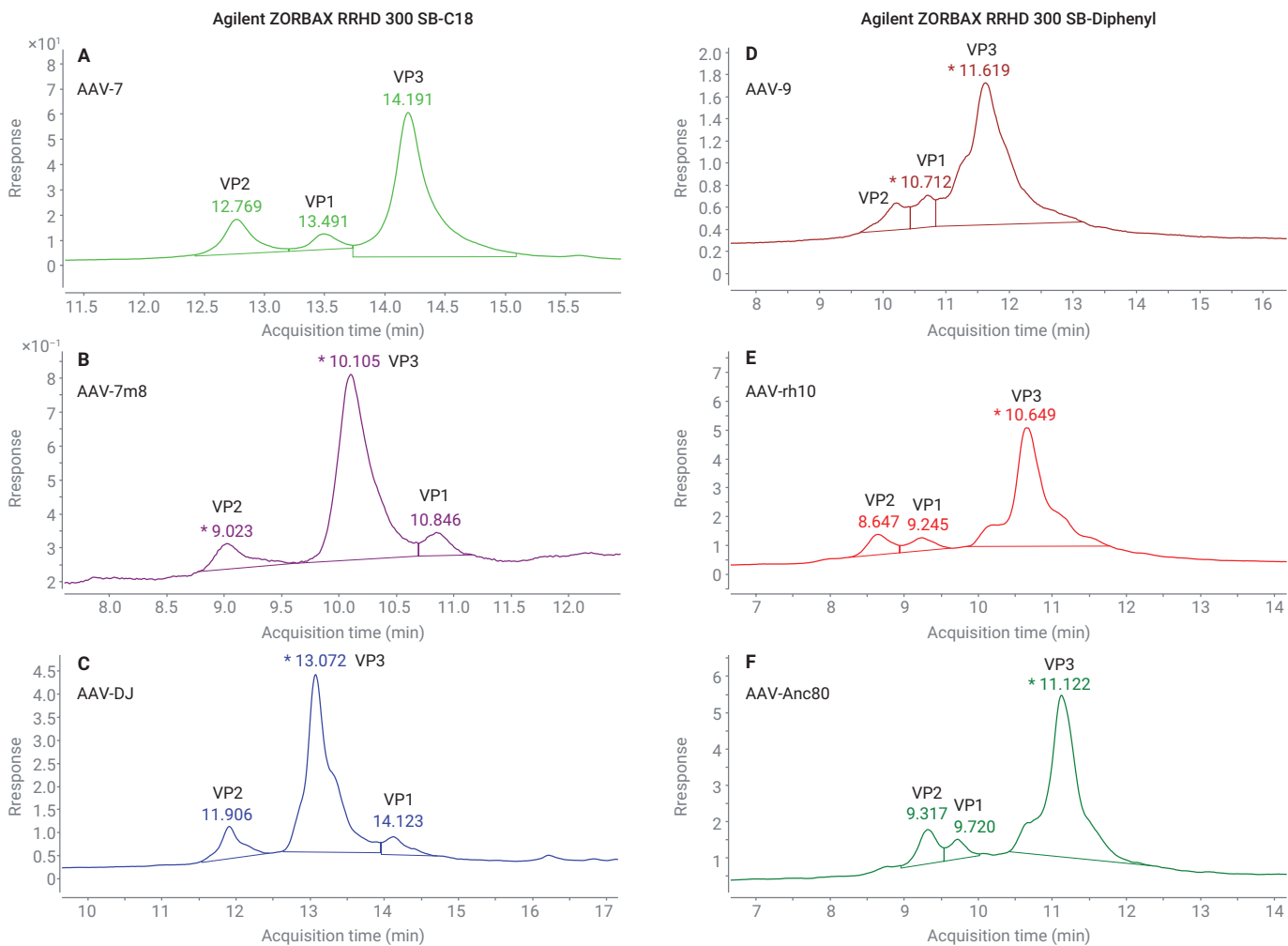
結合相	粒子サイズ	ポアサイズ	温度上限	pH 範囲	エンドキャップ
300SB-C18	1.8 μm	300 \AA	80 $^{\circ}\text{C}$	1.0~8.0	なし
300-Diphenyl	1.8 μm	300 \AA	80 $^{\circ}\text{C}$	1.0~8.0	あり

AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの仕様

結合相	粒子サイズ	ポアサイズ	温度上限	pH 範囲	エンドキャップ
EC-C18	2.7 μm	120 \AA	60 $^{\circ}\text{C}$	2.0~8.0	ダブル



Agilent ZORBAX RRHD 300 \AA SB-C18 カラムで最適化されたメソッドを使用した変性 AAV-2 カプシドタンパク質の LC/MS の結果。(A) 3 つのカプシドタンパク質を示す蛍光クロマトグラム。(B) 総イオン電流。(C~E) 3 つのカプシドタンパク質のデコンボリュートした質量スペクトル。関連する質量ピークはアスタリスクでマークされています。

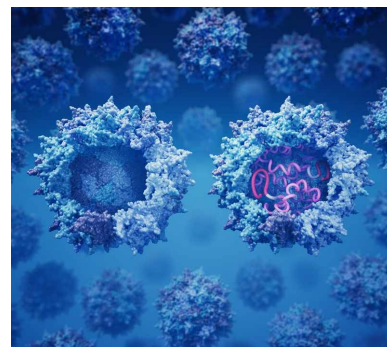


(A ~ C) Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18、および (D ~ F) AgilentSB- ジフェニルカラムにおける 6 種類の異なる血清型の変性 AAV カプシドタンパク質の LC/MS の結果

Agilent 1290 Infinity II LC システム

カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å StableBond C18	Agilent ZORBAX RRHD 300 Å Diphenyl
	2.1 x 100 mm, 1.8 μm	2.1 x 100 mm, 1.8 μm
	部品番号 858750-902	部品番号 858750-944
グラジエント	0 ~ 5 分, 28 % B	0 ~ 5 分, 33 % B
	23 分, 32.5 % B	21 分, 37 % B
	23.5 分, 80 % B	21.5 分, 80 % B
	26 分, 80 % B	23 分, 80 % B
溶媒 A	0.1 % 酢酸、0.1 % TFA 脱イオン水水溶液	
溶媒 B	90 % イソプロパノール、9.8 % 脱イオン水、0.1 % 酢酸、0.1 % TFA	
カラム温度	80 °C	
流量	0.4 mL/min	
サンプル量	1.5 x 10 ¹¹ ウイルスゲノム/注入	

アデノ随伴ウイルスの空の AAV カプシド/フル AAV カプシドの分析



充填されてフル状態のカプシドと空のカプシドの比率およびペイロードの同定の両方から見たペイロード分析は、AAV などカプシドをベースとした生物製剤固有の重要な品質特性です。フルカプシドと空カプシドの区別だけでも困難ですが、このようなサンプルにありがちな濃度の低さを考えると、この測定はさらに難しくなります。空カプシドとフルカプシドの比率の検証には、一般に電子顕微鏡と分析用超遠心分離法が使われますが、これらの方法は困難で、時間とコストがかかり、ユーザーは他の手法を探し続けることになります。空カプシドとフルカプシドをクロマトグラフィーで区別するのは難しいことですが、クロマトグラフィーには処理速度に可能性があり、比較的容易な手法であることから、魅力的なアプローチであり続けています。光散乱検出によるサイズ排除と、蛍光検出によるアニオン交換は 2 つの有望なオプションです。しかし、すべての血清型やペイロードに直接適用できる普遍的なソリューションはないため、理想的な手法については決まっています。

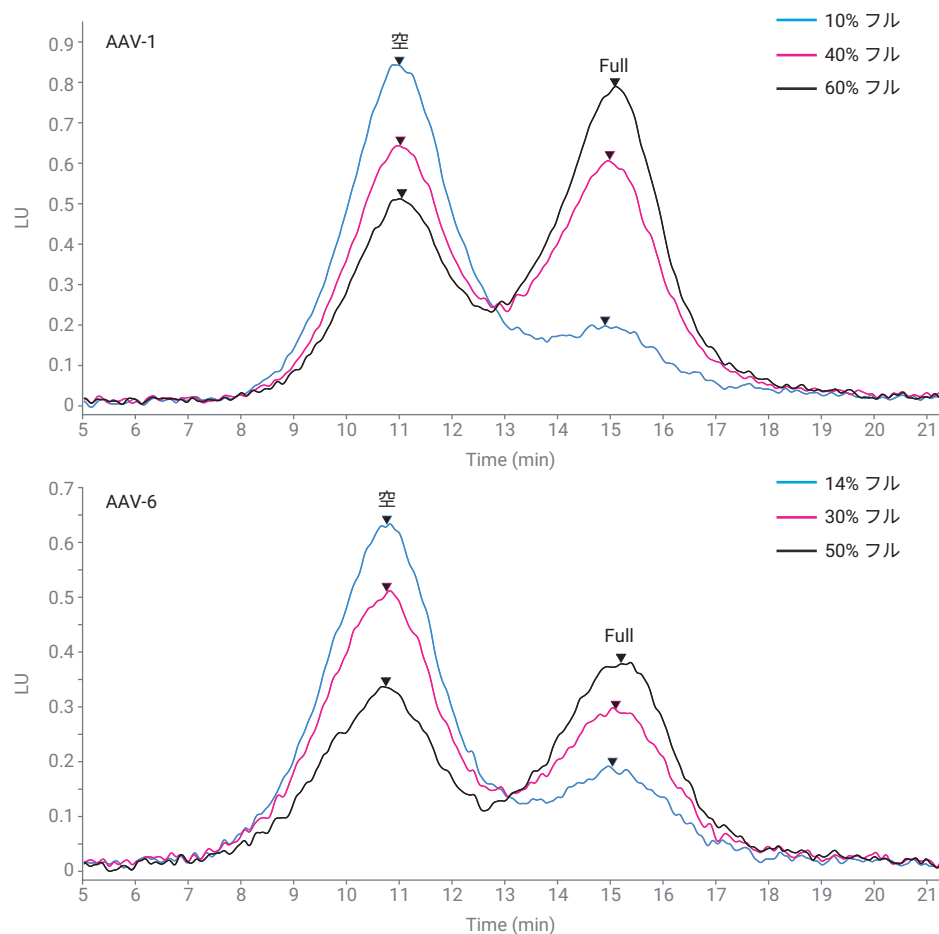
アニオン交換による AAV の分離

血清型が大きく異なれば最適化する必要がありますが、アニオン交換メソッドは卓越した直線性と再現性を示します。Agilent Bio SAX カラムでの分離の再現性は、空とフルの AAV カプシドの定量に推奨できる十分なレベルであることが実証されています。

Agilent Bio SAX カラムの仕様

結合相	粒子 サイズ	温度 上限	pH 範囲	流量
SAX (強アニオン交換) - N(CH ₃) ₃	5 μm	80 °C	2.0 ~ 12.0	0.1 ~ 1.0 mL/min *AAV で最高の結果を得るには 0.1 mL/min を推奨

空とフルの AAV カプシドの混合物の測定



Agilent バイナリハイスピードポンプを使用した、フル/空のカプシド比が異なる AAV-1 および AAV-6 サンプルの分離

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム

カラム	Agilent Bio SAX, 2.1x50 mm, 5 μ m PEEK ハードウェア		
溶媒 A	70 mM Bis-Tris プロパン, pH 9.0 2 mM MgCl ₂		
溶媒 B	70 mM Bis-Tris プロパン + 1M テトラメチル塩化アンモニウム, pH 9.0 2 mM MgCl ₂		
グラジエント	時間	% B	流量
	0 分	15 %	0.1 mL/min
	25 分	27.5 %	0.1 mL/min
	25.1 分	100 %	0.3 mL/min
	28 分	100 %	0.3 mL/min
蛍光 検出	λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm		

ベクターベースの治療薬の凝集体分析

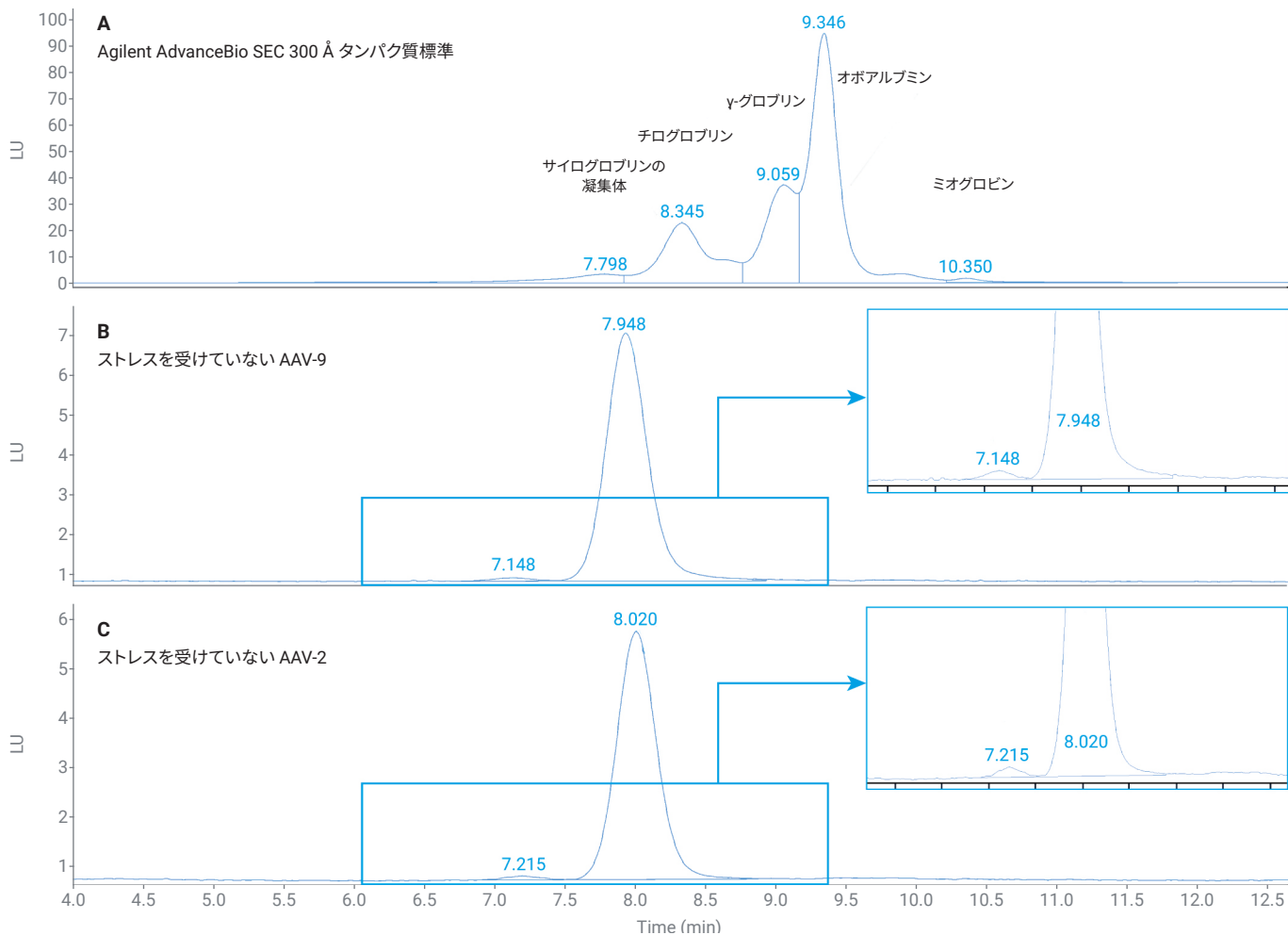
凝集体分析は、他のタンパク質ベースの生物製剤と同様に、AAV の CQA でのモニタリングが非常に一般的です。主な違いは、サンプルの凝集を正確に評価するために必要なポアサイズにあります。AAV カプシドの直径は約 250 Å (25 nm) なので、その凝集体は、通常のポアサイズが 300 Å 以下の一般的なサイズ排除カラムのポアに含めるには大きすぎます。これまでの知見から、SEC のポアサイズは、目的の分子の少なくとも 3 倍は必要であることがわかっているため、この場合に推奨されるポアサイズは 750 Å 以上となります。多くのユーザーが AAV にポアサイズが約 500 Å のカラムを採用していましたが、私たちは、1000 Å ポアを使用することで、モノマーとダイマーの分離度が向上することを発見しました。

アジレントは、500、1000、さらには 2000 Å など、さまざまな高分子生物製剤に適したポアサイズの Bio SEC-5 カラム製品を用意しています。

Agilent Bio SEC-5 カラムの仕様

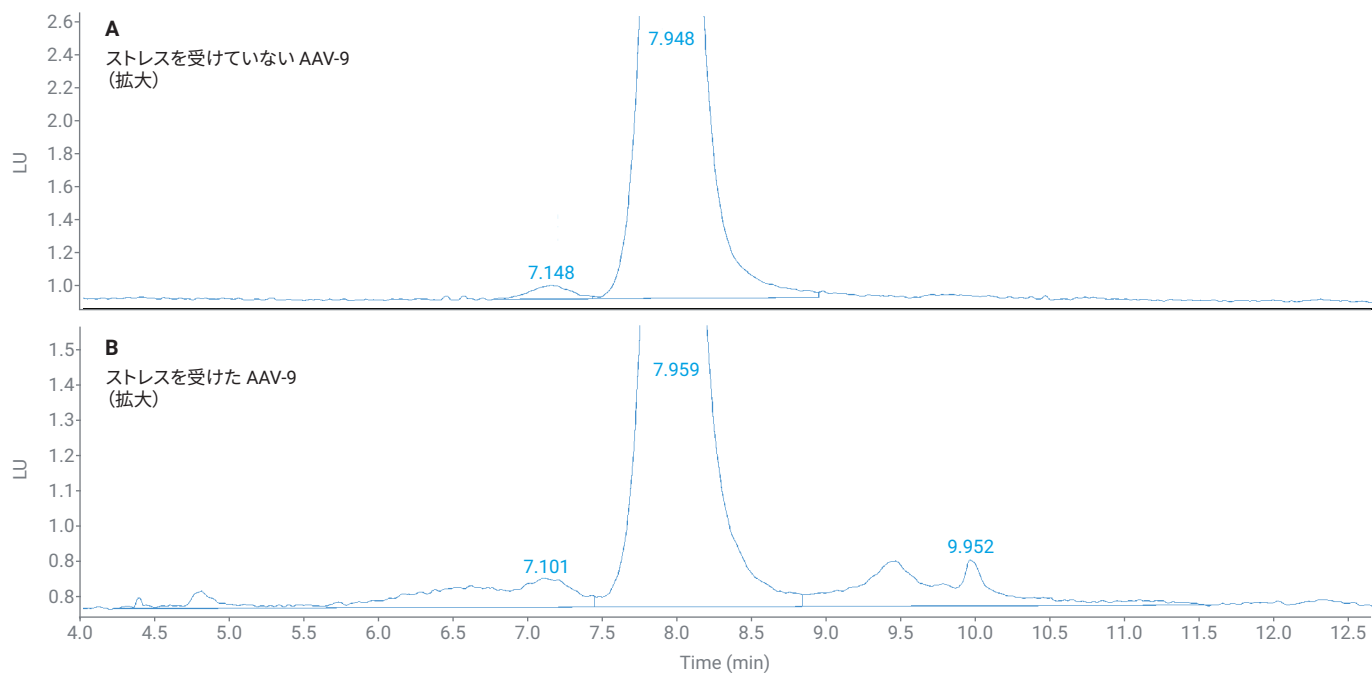
ポア サイズ	粒子 サイズ	分子量範囲	pH 範囲	最大 圧力	流量
500 Å	5 μm	15,000 ~ 5,000,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0 ~ 10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2 ~ 1.2 mL/min (内径 7.8 mm)
					0.1 ~ 0.4 mL/min (内径 4.6 mm)
1000 Å	5 μm	50,000 ~ 7,500,000	2 ~ 8.5	137 bar, 2000 psi	1.0 ~ 10.0 mL/min (内径 21.2 mm)
					0.2 ~ 1.2 mL/min (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

AAV-9 と AAV-2 のサイズ排除クロマトグラム



Agilent AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準とストレスのない AAV-9 および AAV-2 の蛍光クロマトグラム。タンパク質標準にはアンギオテンシン II も含まれていることに注意してください。アンギオテンシン II にはトリプトファン アミノ酸が含まれていないため表示されていません。したがって、選択した励起および発光設定では非蛍光です。

ストレスを受けていない AAV-9 とストレスを受けた AAV-9 の凝集



ストレスを受けていない AAV-9 とストレスを受けた AAV-9 の蛍光クロマトグラム

Agilent 1290 Infinity II LC システム

カラム	Agilent Bio SEC-5 5 μm , 1000 \AA , 4.6 x 300 mm 部品番号 5190-2538
移動相	50 mM リン酸緩衝液 + 400 mM NaCl, pH 7.4
カラム温度	80 $^{\circ}\text{C}$
流量	0.4 mL/min
検出	蛍光、 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$
注入量	20 μL

製品の詳細情報

インタクトタンパク質分析用 ZORBAX RRHD ワイドポアカラム

説明	部品番号
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm, 300 Å	863750-944
Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm, 300 Å	858750-944
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm, 300 Å	863750-902
Agilent ZORBAX RRHD StableBond C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm, 300 Å	868750-902

ペプチドレベル分析用 AdvanceBio ペプチドマッピングカラム

説明	部品番号
AdvanceBio ペプチドマッピング, 2.1 x 150 mm, 2.7 µm	653750-902
AdvanceBio ペプチドマッピング, 2.1 x 250 mm, 2.7 µm	651750-902
AdvanceBio ペプチドマッピングガードカラム, 2.1 x 150 mm, 2.7 µm, 3 個	858750-902

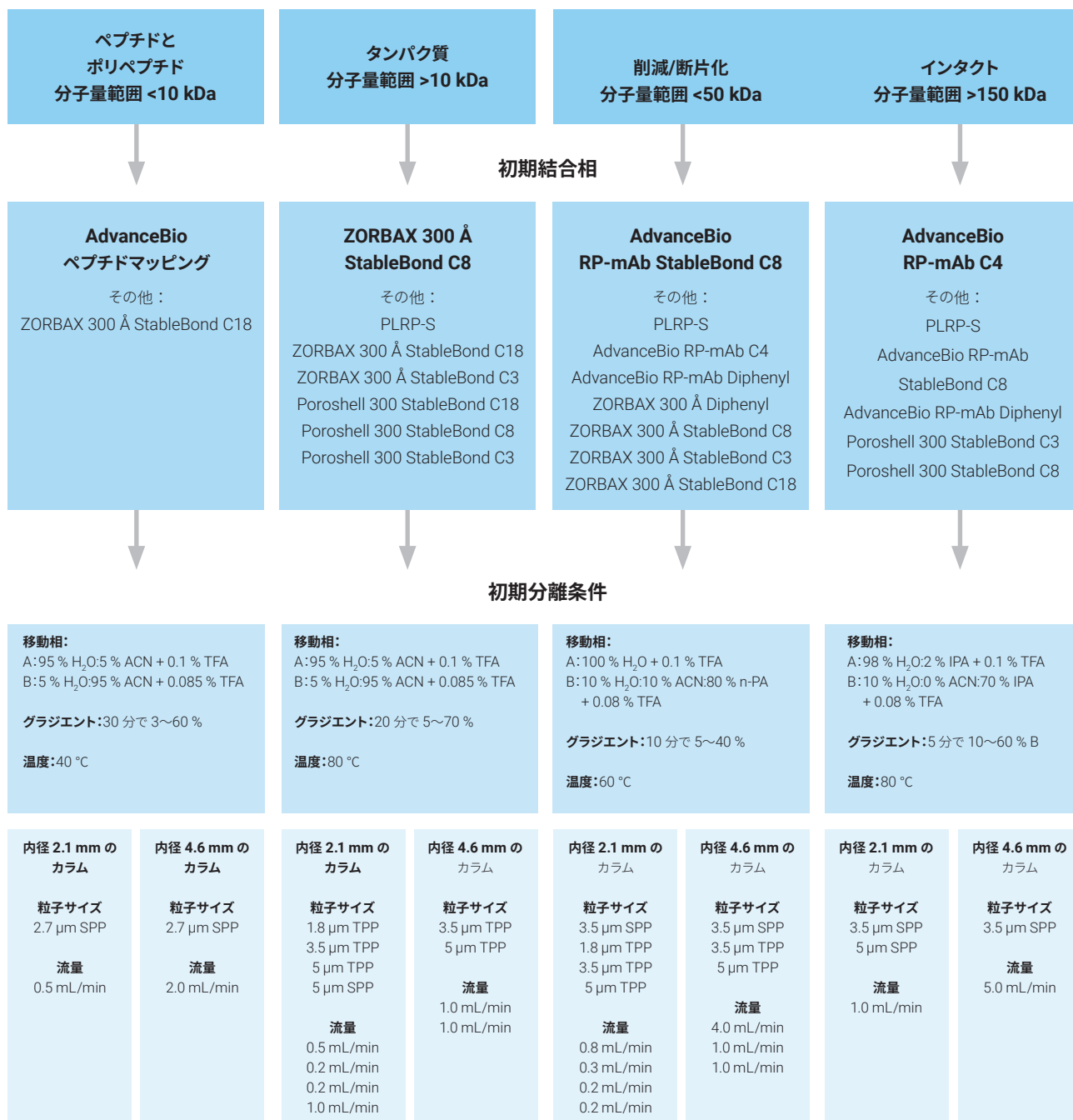
凝集およびサイズ分布解析用 Bio SEC-5 カラム

サイズ (mm)	粒子径 (µm)	Bio SEC-5	Bio SEC-5	Bio SEC-5
		500 Å USP L59	1000 Å USP L59	2000 Å USP L59
21.2 x 300	5	5190-6866	5190-6867	5190-6868
21.2 x 50、ガード	5	5190-6872	5190-6873	5190-6874
7.8 x 300	5	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7.8 x 150	5	5190-2532	5190-2537	5190-2542
7.8 x 50、ガード	5	5190-2535	5190-2540	5190-2545
4.6 x 300	5	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4.6 x 150	5	5190-2534	5190-2539	5190-2544
4.6 x 50、ガード	5	5190-6860	5190-6861	5190-6862

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

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 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。

注意事項： 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 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) が必要な場合もあります。

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もあります。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。

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、カチオン性、および両イオン性洗浄剤を使用できます。アニ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:5991-0656EN 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
装置本体:	1260 Infinity バイオイナート LC	装置本体:	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)

注意事項: 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。詳細情報: www.agilent.com/chem/cqa-applications

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

粒子サイズ, µm	流量 (mL/min)
1.7	0.1 ~ 0.3
3	0.1 ~ 0.5
5	0.1 ~ 0.8
10	0.1 ~ 1.0

内径 4.6 mm のカラム

粒子サイズ, µm	流量 (mL/min)
1.7	0.1 ~ 0.3
3	0.1 ~ 0.5
5	0.1 ~ 0.8
10	0.1 ~ 1.0

注意事項: 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

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質
分子量範囲 >0.1 ~ 1,250 kDa

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質
分子量範囲 >0.1 ~ 10,000 kDa

分子量範囲とポアサイズに基づくカラムの選択

AdvanceBio SEC (2.7 μm)		Bio SEC-3 (3 μm)		Bio SEC-5 (5 μm)	
ポアサイズ	分子量 範囲、kDa	ポアサイズ	分子量 範囲、kDa	ポアサイズ	分子量 範囲、kDa
130 \AA	0.1 ~ 120	100 \AA	0.1 ~ 100	100 \AA	0.1 ~ 100
300 \AA	5 ~ 1,250	150 \AA	0.5 ~ 150	150 \AA	0.5 ~ 150
		300 \AA	5 ~ 1,250	300 \AA	5 ~ 1,250
				500 \AA	15 ~ 5,000
				1000 \AA	50 ~ 7,500
				2000 \AA	>10,000

推奨する初期分離条件

カラム:	AdvanceBio SEC Bio SEC (3 μm および 5 μm)	温度:	推奨 10~30 °C、最大 80 °C
移動相:	リン酸緩衝液 150 mM、pH 7.0*	流量:	0.1~0.4 mL/min (内径 4.6 mm カラムの場合) 0.1~1.25 mL/min (内径 7.8 mm カラムの場合) 1.0~10.0 mL/min (内径 21.2 mm カラムの場合)
グラジエント:	15~60 分間のアイソクラティック	サンプル量:	総カラム容量の 5 % 以下

* 高および低塩濃度のさまざまな水溶性緩衝液を使用可能

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) や塩酸グアニジンも使用できます。

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

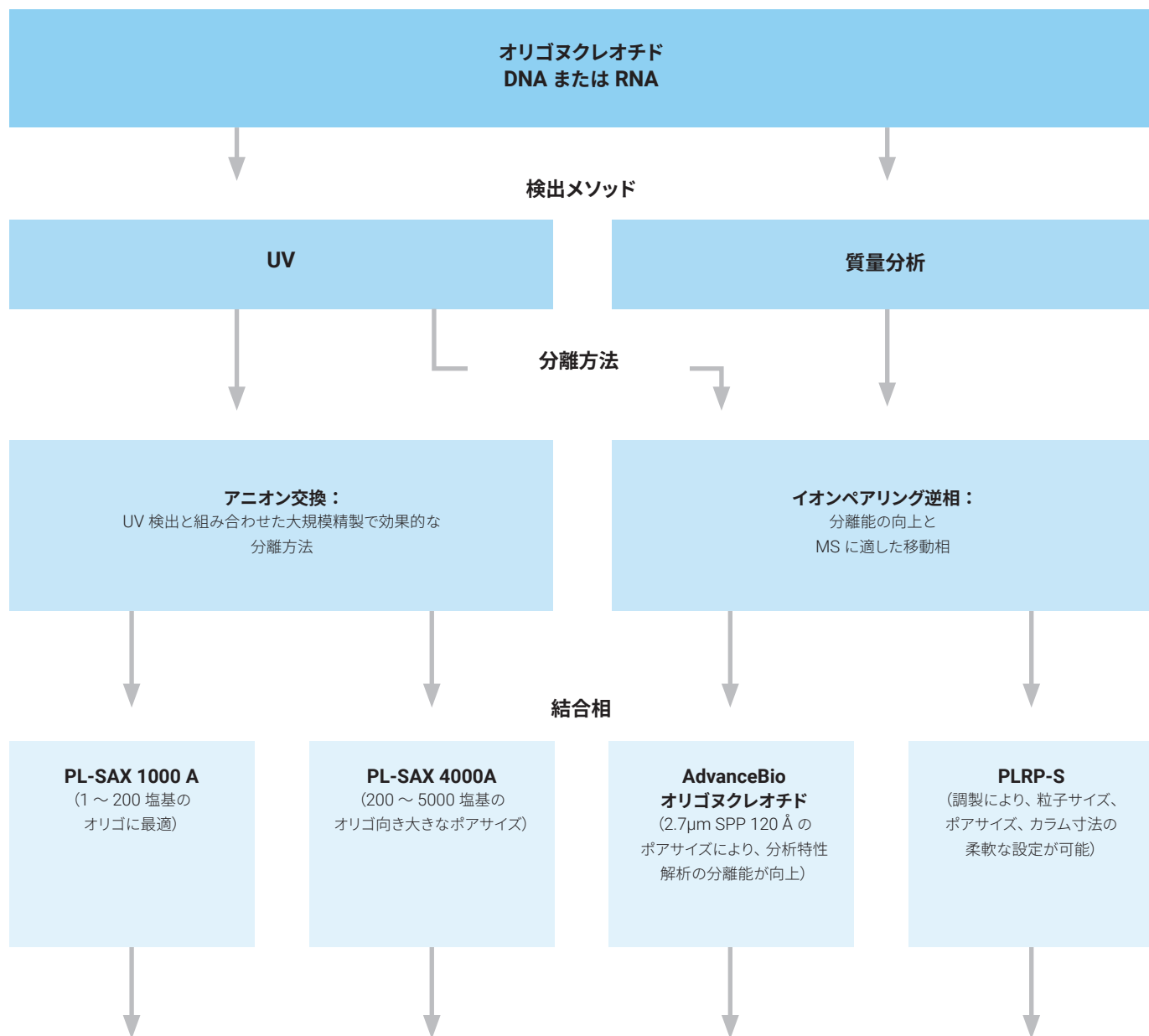
一部の水性/有機溶媒混合物は高粘度であるため、過剰な圧力変化が発生しないように特に注意してください。流量を減らすか温度を上げると、問題が発生する可能性を低減することができます。

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。

オリゴヌクレオチド分析



初期分離条件

移動相：
10mM Tris、pH 8.0 +10 % ACN
原液の作成：1 M トリス、pH 8.0、HCl で調整

MP A
原液緩衝液 10 mL を ACN 100 mL
および水 890 mL と混合

MP B
原液緩衝液 10 mL を ACN 100 mL、
2M NaCl と混合し、1 L になるまで水を加える

グラジエント
10 分で B を 20 % から 40 %

カラム温度
30 °C

カラム
2.7 μm、50 x 2.1 mm
(部品番号 659750-702)

MP A
15 mM TEA と 400 mM
HFIP 水溶液

MP B
メタノール

グラジエント
0 ~ 1 分、10 % B
1 ~ 10 分、10 ~ 40 % B
10 ~ 11 分、40 ~ 95 % B

カラム温度
65 °C

流量
0.5 mL/min

カラム
PLRP-S 5 μm、50 x 2.1 mm、
1000 Å

MP A
15 mM ジブチルアミン + 25 mM
HFIP 脱イオン水溶液

MP B
15 mM ジブチルアミン + 25 mM
HFIP メタノール溶液

グラジエント
0 ~ 1 分、15 % B
1.1 ~ 10.5 分、45 % B
10.6 ~ 11.5 分、90 % B

カラム温度
80 °C

流量
0.4 mL/min

メソッドを最適化するための変数

クロマトグラフィーを最適化するために調整可能な変数：

pH： NaOH を加えて pH を 11 または 12 に上げると、二次的作用を制限し、シャープなピークを得ることができます。pH を上げるとともに、塩濃度を高くすると、溶出されるオリゴが長くなります。

温度： MP とカラムコンパートメントの温度を上げると、MP の粘度が下がり、二次的作用が減少して、ピーク形状が向上します。

有機 MP 溶媒： アセトニトリル移動相調製剤を追加 (10 ~ 15 %) したところ、クロマトグラフィーが向上を示しました。

*pH と温度の上昇が、不要なサンプルの劣化を招くことがあります。変更は、不要な不純物をモニタリングしながら、段階的に行う必要があります。

クロマトグラフィーを最適化するために調整可能な変数：

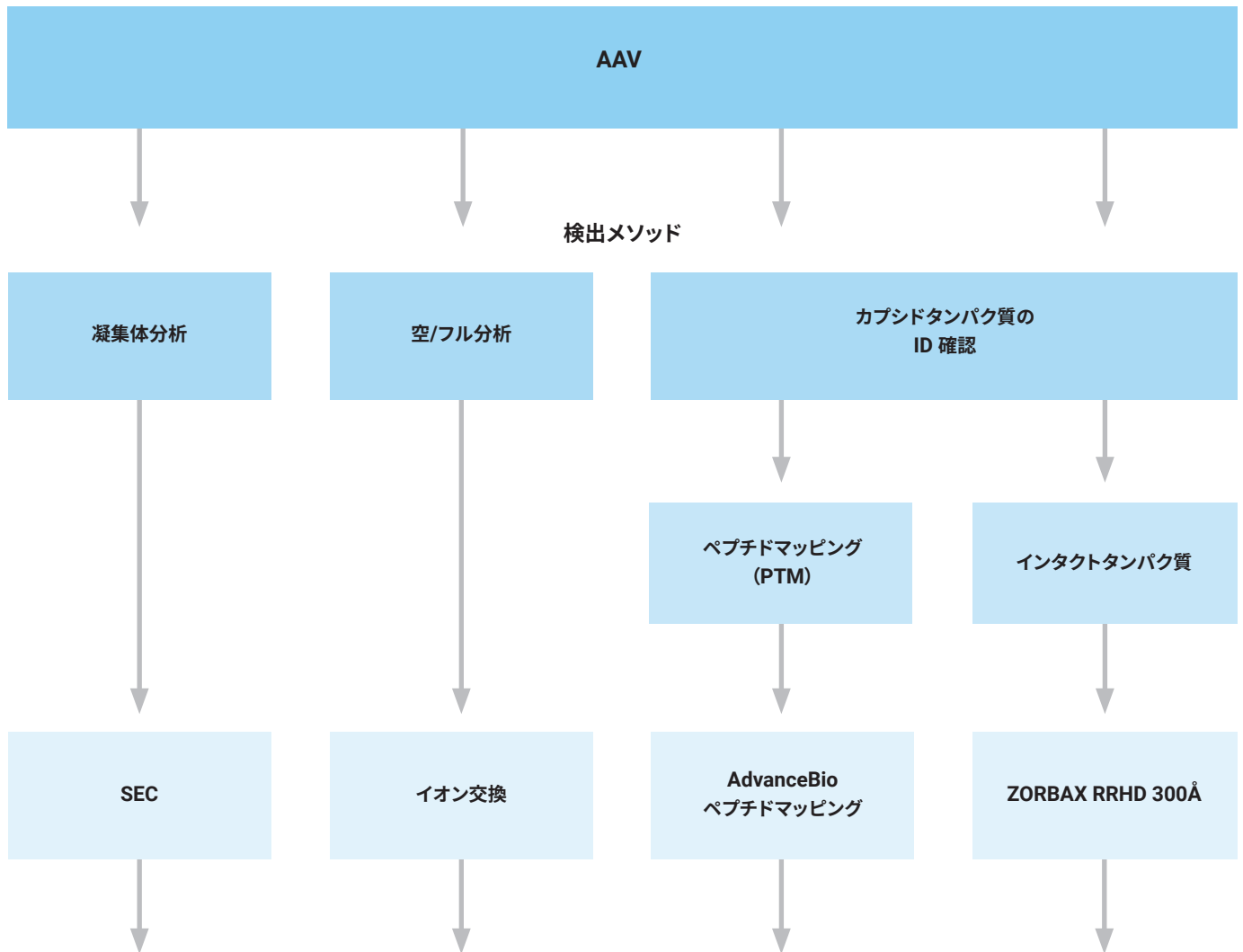
温度： MP とカラムコンパートメントの温度を上げると、MP の粘度が下がり、二次的作用が減少して、ピーク形状が向上します。

イオンペア試薬： IP-RP はイオンペア試薬、通常は異なる疎水性アルキル鎖を持つアミンを使用します。アミンはアニオン性オリゴと相互に作用してペアを形成します。このペアは RP 固定相との疎水性相互作用を通じて保持されます。分離と保持を向上させるには、選択したイオンのペアを調整します。

有機 MP 溶媒： 選択したイオンペア試薬によっては、移動相の有機濃度の変化を利用して、分析対象の保持を最適化 (延長または短縮) できます。

*pH と温度の上昇が、不要なサンプルの劣化を招くことがあります。変更は、不要な不純物をモニタリングしながら、段階的に行う必要があります。

アデノ随伴ウイルス (AAV) 分析



初期分離条件

カラム

Agilent Bio SEC-5、
300 x 4.6 mm 5 μ m、1000 Å

移動相

50 mM リン酸緩衝液、
400 mM NaCl、pH 7.4

カラム温度

80 °C

流量

0.4 mL/min

FLD

λ_{ex} = 280 nm、 λ_{em} = 340 nm

カラム

Agilent Bio SAX、
50 x 2.1 mm 5 μ m

MP A

70 mM Bis-Tris プロパン、pH 9.0
2 mM MgCl₂

MP B

70 mM Bis-Tris プロパン +
1M テトラメチル塩化アンモニウム、
pH 9.0

2 mM MgCl₂

グラジエント

0 分、15 % B

流量：0.1 mL/min

25 分、27.5 % B

流量：0.1 mL/min

25.1 分、100 % B

流量：0.3 mL/min

28 分、100 % B

流量：0.3 mL/min

FLD

λ_{ex} = 280 nm、 λ_{em} = 340 nm

カラム

AdvanceBio ペプチドマッピング、
150 x 2.1 mm 2.7 μ m

MP A

0.1 % ギ酸脱イオン水溶液

MP B

0.1 % FA アセトニトリル溶液

グラジエント

0 ~ 3 分、3 % B

50 分、35 % B

60 分、97 % B

62 分、97 % B

65 分、3 % B

カラム温度

60 °C

流量

0.4 mL/min

カラム

Zorbax RRHD 300A SB C18、
100 x 2.1 mm 1.8 μ m

MP A

0.1 % FA + 0.1 % TFA 脱イオン水
溶液

MP B

90 % IPA + 9.8 % 脱イオン水 +
0.1 % FA + 0.1 % TFA

グラジエント

0 ~ 5 分、28 % B

23 分、32.5 % B

23.5 分、80 % B

26 分、80 % B

カラム温度

80 °C

流量

0.4 mL/min

RP クロマトグラフィーを最適化するために調整可能な変数：**温度**

MP とカラムコンパートメントの温度を上げると、MP の粘度が下がり、二次的作用が減少して、ピーク形状が向上します。

有機 MP 溶媒

逆相分離では、有機溶媒は強力な溶媒です。移動相で有機溶媒の割合を調整すると、溶出強度が影響を受けます。移動相にある有機溶媒の割合が高ければ高いほど、逆相カラムでの疎水性物質の保持期間が短くなります。

カラムケミストリ

固定相の選択性は変数で、これを変更して、ターゲット化合物の分離能を最適化することができます。インタクトカプシドタンパク質の分析のため、Zorbax RRHD 300-Diphenyl には C18 に対して異なる選択性があり、さまざまな血清型に対して、有利に働きます。

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 (部品番号 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	再平衡化
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)			

注意事項: 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。

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**)

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。

40 年以上にわたる技術革新により、分析結果を支援

ルーチン分析をサポートする技術標準のレベルをさらに引き上げるにより、アジレントは次のような技術革新の実現に向けて研究開発に取り組んでいます。

- **最新の GC カラム**により、不活性度およびカラム間の再現性のレベルが向上
- 条件の厳しいアプリケーションでも必要な感度と信頼性を達成する、**種類豊富な LC カラム**
- 信頼性の高い抽出と濃縮を可能にする**最先端のサンプル前処理製品**
- 対象化合物と未知化合物を同定/確認するための**原子分光分析ソリューション**

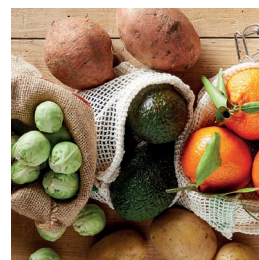
アジレントは長い期間にわたってお客様のサポートに全力で取り組んできました。

今後も絶え間ない技術革新により、お客様がさらにメリットを感じいただけるよう、アジレントは努力していきます。

化学分析ソリューション

食品

食品中の農薬の大容量スクリーニングから、病原体の迅速な同定まで、食品生産、輸出入、規制にかかわるさまざまな分析ニーズに対応します。使いやすいアナライザや最新のスクリーニングライブラリにより、堅牢で信頼性の高いメソッドをすばやく開発することができます。業界をリードするアジレントのガスクロマトグラフィーおよび質量分析システムは、さまざまな食品分析に用いられ、その性能の高さが広く認められています。



環境分析

アジレントは、環境分析および法規制に関する専門知識を 40 年以上にわたって提供してきました。土壌中の重金属のルーチン検査から地下水中の医薬品の検出まで、ppm レベルの化合物を正確に測定可能な幅広い分析機器を通して政府研究機関および民間ラボをサポートしています。



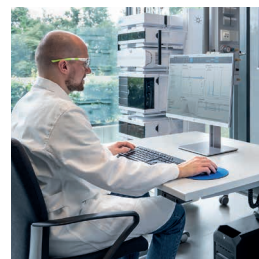
法医学

法医学的調査のための毒物試験、競技者のドーピングのスクリーニング、麻薬のサンプル分析、事件現場での爆発性残留物の調査、そのいずれにおいても装置の精度が生命や人生を左右します。アジレントは、数千種類もの物質を同定、確認、定量できる包括的なワークステーションソリューションのポートフォリオにより、業界をリードしています。



ラボインフォマティクス

データを生成および格納する方法は、ラボの効率に大きく影響しますアジレントは、お客様のワークフローやアーキテクチャに基づく機能豊富なソフトウェア製品を、Agilent OpenLab ソフトウェアで幅広く提供しています。OpenLab は、装置やローカルデータシステムの統一化が可能で、高い拡張性により、投資を有効に活用できます。アジレントは、データの収集、解析、解釈、管理までの各ステップで、高い価値を提供することを約束します。



エネルギーと化学

アジレントは、プロセス産業のニーズに合致した、分離システム、検出装置、スループット、サポートを提供します。システムやアナライザをカスタマイズし、納品後すぐに使える状態でお届けすることも可能です。原油、天然ガス、および精製から特殊化学品または代替燃料の分野に対し、アジレントは業界の厳しい品質要件を満たすと同時に、エネルギーおよび化学ラボの品質、安全性、および収益性を向上する最新の技術とソリューションを提供します。アジレントは、絶えず進化を続け、業界標準となる ASTM コラボレーションをリードしています。



材料科学

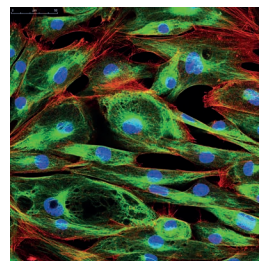
アジレントでは、先進的な物質の研究、製造、および試験に使用される機器のポートフォリオを新たに拡張しました。原子分光分析、分子分光分析、クロマトグラフィーのすべてが、材料科学の継続的な進歩を支えています。



ライフサイエンスソリューション

バイオ医薬品

バイオ医薬品製剤は健康促進のための大きな可能性を秘めており、これまでに経験の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数は増え続けています。疾病の研究から QA/QC および製造まで、アジレントは、開発のすべての段階で治療法を市場に送り出すための研究をお手伝いします。アジレントの製品ファミリーは、生物製剤のワークフローにおいて、研究、発見、および開発の原動力としてシームレスに連動します。アジレントは、逆相、サイズ排除、イオン交換、およびアフィニティクロマトグラフィーなど、さまざまなカラムを取り揃え、生体分子の完全な特性分析をサポートします。また、バイオイナート消耗品は、生体分離に最適化されたフローの構築を可能にします。



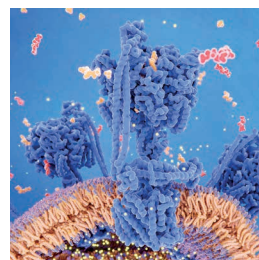
製薬

新薬候補物質の評価、効能の確認、開発および製造時の安全性およびコンプライアンスの保証のための効率的なプロセスが必要とされています。アジレントは、すべてのラボで、また世界規模でコンプライアンスの信頼性と再現性を保証するために、長年にわたり医薬品企業と協力してきました。アジレントの医薬品ソリューションは、自動サンプル前処理、業界をリードする HPLC および UHPLC システム、幅広い高速 LC カラムファミリー、オープンアクセス LC/MS、分光分析、および自動溶出により、製品ライフサイクルのすべての段階で高いスループットを提供します。LC 消耗品やランプなどの幅広い製品ファミリーは、すべての分析の最適化に役立ち、ラボの生産性をさらに向上させます。



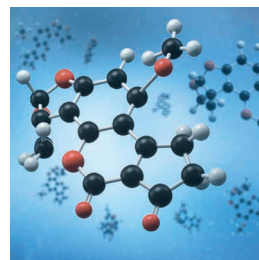
プロテオミクス

多様なタンパク質による生物の健康への影響を解明するには、特殊な分析ツールが必要です。アジレントは、液体クロマトグラフィー / 質量分析計、バイオインフォマティクスシステム、多様なアフィニティタンパク質除去カラム、OFFGEL 電気泳動用消耗品など、タンパク質同定およびバイオマーカー探索のための優れた分析機器を開発しました。精密質量分析計およびマイクロ流体 HPLC-Chip/MS は、世界中のプロテオミクス研究を加速するアジレントの革新技術です。



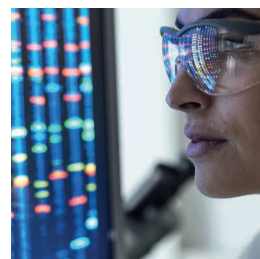
メタボロミクス

メタボロミクスは、ゲノミクスやトランスクリプトミクス、プロテオミクスとは異なる補完的な方法で生体系を理解し、分析サンプルの有効性を立証および確認することができます。代謝物内の分子は絶えず変化するため、速度、精度に優れた強力な解析機能が求められます。アジレントの GC、LC、および MS 製品は、バイオインフォマティクス製品、カスタマイズ可能な LC/MS 用の METLIN 代謝物データベース、業界初の商用 GC/MS リテンションタイムロッキング代謝物ライブラリなどとあわせて、メタボロミクスにおけるニーズに対応します。



ゲノミクス

アジレントは、遺伝子関連疾病の研究で使用されるマイクロアレイ、スキャナ、NGS 試薬における世界的なサプライヤーです。SureSelect および HaloPlex ターゲットエンリッチメントシステムは、次世代シーケンシングを効率化し、この分野に大きく貢献しています。幅広いカタログ CGH および遺伝子発現マイクロアレイに加え、無償のオンラインツール SureDesign で設計したカスタムアレイを作製する先進的なサービスも提供しています。アジレントのマイクロアレイは、感度が良く選択性が高い 60-mer プローブを搭載しています。1 スライドあたり最大 8 つのアレイをプリントできるため、1 サンプルあたりのコストを抑えることができます。



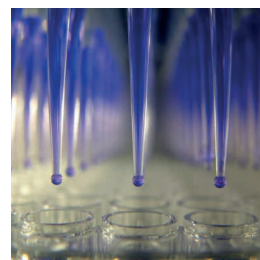
ライフサイエンスインフォマティクス

アジレントは機器の品揃えを充実させるとともに、複雑なゲノム、プロテオミクス、メタボロミクスなどの生物学的データを理解するためのバイオインフォマティクスソフトウェアも幅広く提供しています。SureCall および CytoGenomics ソフトウェアは NGS および aCGH データを分析します。GeneSpring スイートは、複雑なデータセットを比較して複数の視点から生物学上の疑問を解決するために役立つ、マルチオミックス分析および視覚化機能を提供します。GeneSpring スイートには、マイクロアレイに基づく遺伝子発現およびジェノタイプングデータのための GX モジュールとパスウェイ解析およびマルチオミックス分析のための PA モジュールがあります。また、プロテオミクスおよびメタボロミクス分析の質量分析データを解析する MPP ソフトウェアも含まれています。



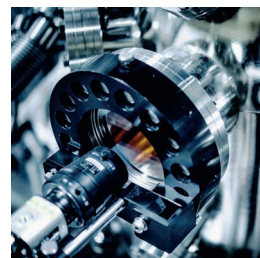
ラボオートメーション

アジレントは、ますます高まりを見せているスループットと自動化に対する要求に応えるために、ラボの自動化への取り組みを大幅に拡大してきました。アジレントのリキッドハンドラとマイクロプレートプロセッサ製品は、大量のライフサイエンスワークフローの効率向上を目指して設計されています。さらに、LC、GC、LC/MS、および GC/MS 用のオートサンプラを継続的にアップグレードして機能性と速度を高めることにより、高度な機器の性能を向上させています。



真空機器

高エネルギー物理学の実験からナノ技術用のシステム開発まで、お客様のニーズに応える真空ソリューションを提案します。アジレントの質量分析機器に加え、他社メーカーの質量分析機器でも使用される真空システムを製造しています。アジレントの真空技術は、ヒッグス粒子の検出に使用された CERN のビッグバンマシンにより実証されています。



サービスとサポート

充実したサポートサービス

アジレントは、お客様のラボのパフォーマンスを最適化するための方法を常に追及しています。だからこそ、お客様の必要とするツールを確実に提供することができます。アジレントにお任せいただければ、幅広いサービスと、ラボの生産性向上に精力的に取り組む経験豊かなアジレント認定サービスプロフェッショナルのグローバルネットワークのサポートにより、投資を最大限に保護することができます。

Agilent CrossLab サービスプラン

ご使用のアジレント機器に最適なサービスを提供

Agilent CrossLab サービスは、お客様のニーズと予算に合わせてお選びいただける包括的なメンテナンスサービスです。アジレントの幅広いサービスプランの中から、お客様に必要なレベルのサービスをお選びいただけます。

- **Agilent CrossLab ゴールド**— 基幹システムに最適なプレミアムサービス
- **Agilent CrossLab シルバー**— 生産性を最大化し、ワークフローの中断を最小化
- **Agilent CrossLab ブロンズ**— タイムリーな修理サービス、予算をコントロール

Agilent CrossLab バーチャルテクニカルサポートにより、最新のビデオコミュニケーションツールを用いてリモートでライブのテクニカルサポートを受けられます。アジレントの Virtual Assist アプリケーションは、安全なビデオ接続を使用して、お客様とアジレント双方のプライバシーを保護します。このアプリケーションはデジタル注釈をサポートしているため、お客様とアジレントのサービスエンジニアが対象をハイライトできます。リモートで問題を解決するために、明確な指示を提供します。これにより、徹底的なトラブルシューティングや故障診断を確実に実施できるようになり、リモートサポートでの解決率の向上とダウンタイムの低減を実現できます。

Agilent CrossLab コンプライアンスサービス

ラボのコンプライアンス確保をサポート

アジレントは、USP <1058> 分析機器適格性評価 (AIQ) に基づく機器およびソフトウェア適格性評価 (IQOQ、OQ、RQ) などの包括的なラボコンプライアンスサービスや、コンピュータシステムのバリデーション、監査/評価、お客様専用の手順書の作成など、幅広いカスタムバリデーションサービスなど、さまざまなサービスを提供しています。お客様のコンプライアンス確保を支援するため、自動コンプライアンスソリューションを使用して、分析機器適格性評価 (AIQ) のプロセス全体をサポートします。自動コンプライアンスエンジン (Automated Compliance Engine: ACE) は、次のようにデータインテグリティと使用目的の要件に対処することのできる、監査に対応した電子形式の適格性評価ソリューションです。

- 複数のプラットフォームにわたってプロトコルを調整することで、監査リスクを必要最小限に抑え、適格性評価の効率を向上させます
- お客様のすべての機器で利用可能で、プロトコルを確実に遵守する堅牢なテスト設計により、コンプライアンス業務全体を標準化します
- SOP に従ってテストを構成し、仕様を選択できます
- 電子形式で適格性評価の計画と報告を行い、確認/承認の時間とコストを削減すると同時に、データインテグリティを確保し、データの保管、検索、取得を容易にします



アジレントサービス ギャランティ

メーカーを問わず、Agilent CrossLab サービスプランの対象機器を修理できなかった場合は、エスカレーションプロセスで、機器の無償交換などにより問題を解消します。*

*利用規約が適用されます。



Agilent CrossLab によりラボの可能性を最大化

[agilent.com/chem/crosslab](https://www.agilent.com/chem/crosslab)



柔軟性の高い支払いプランはこちら：
詳細情報：[agilent.com/chem/financing](https://www.agilent.com/chem/financing)

アジレントの機器トレーニングとメソッドサービス

科学的・経済的に最も望まれる成果を

Agilent CrossLab と提携して、ラボ運用を変革し、実務に生かせる実践的スキルを高めましょう。新しい手法の要点を学習し、高度な方法論で実際に役立つ応用事例をマスターしましょう。

- メソッドの開発から維持まで、ワークフローを強化するメソッドおよびアプリケーションサービスを利用できます
- 新しい技術や既存の技術に結果を移管して最適化するためのトレーニングやメソッドのサポートは、機器にバンドルする形で、または単独でも提供されています
- お客様のニーズやご予算にあった柔軟なトレーニングオプションを提供しています。トレーニングはオンラインまたはクラスルーム形式で、お客様の施設でも受講可能です
- お客様はアジレントのオンライン Cloud Lab ソリューションを使用して、ソフトウェアの使い方を学習できます

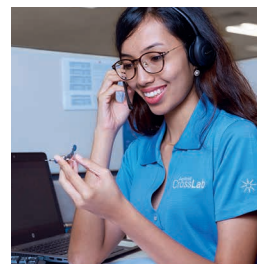


アジレントバリュープロミス - 製品の価値を 10 年間保証

絶えず進化する製品ラインナップに加え、アジレントは充実したサポートサービスを提供しています。アジレントバリュープロミスは、ご購入の日から 10 年間、製品の性能と価値をサポートするというものです。また、代替モデルにアップグレードする際には、製品の残存価値に見合った導入プランをご提供します。アジレントのシステムを支えるバリュープロミスは、最高の投資収益率を実現し、機器を安心してご購入いただけるようにするためのプランです。詳細はホームページをご覧ください。アジレントサービスまたは販売店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エキスパートがお答えします。長年に渡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。本カタログに掲載された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。



お問い合わせ

ホームページをご覧ください。

- エキスパートによるテクニカルサポートをご利用いただけるお近くのアジレントオフィスまたは販売店を見つけることができます
- お急ぎの場合は、電話でご購入および製品についてご相談いただけます。
- メールによるサポートはオンラインフォームからご利用いただけます

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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いません。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。

RA45107.4572916667

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019-2023

Printed in Japan, October 2023

5994-6123JAJP

