

逆相 LC 1 次構造の特性解析ワークフロー

Agilent LC AdvanceBio RP-mAb カラム



本書は、生体分子の特性解析に必要な最適な LC システムとその構成に関する、アジレントのアプリケーションケミストからの推奨事項を記載しています。また、メソッド開発のスタート地点となる一般的なメソッドと、このメソッドを特定の分離目標に合わせて最適化する方法も示します。

Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システム

ガイドライン

結合相: 一般的には、C4 および SB-C8 を使用します。または、ジフェニルカラムを使用します。

グラジエント: IPA:ACN:0.1 % TFA または 0.1 % FA 水溶液により、対象化合物をすべて溶出しています。

サンプルの可溶性: 開始時の移動相と混合します。

温度: カラム温度を高くすると、タンパク質の分離能と回収率が大幅に向上します。

分離能/選択性: IPA:ACN 混合物により、分離能が向上します。その他の有機溶媒の置換物は、異なる選択性で使用できます。IPA を使用すると、圧力が増加します。これは、カラム温度と流量により調整できます。

LC/MS

脱塩したサンプルを注入します。

流量 0.5 ~ 1.0 mL/min では、小内径カラム (例えば、2.1 mm) が最適です。

FA は、適切な MS 信号を供給します。溶離液中の TFA の使用量を減少させて MS 信号を拡大させるか、または AcOH を使用します。

移動相で IPA に ACN を添加すると、TIC のピークがシャープになります。

移動相

溶離液 A: 0.1 % TFA

溶離液 B: IPA、ACN、および 0.09 % TFA 水溶液

ポンプ (G5611A)

内径 2.1 mm カラムの通常の流量は、1.0 mL/min です。

サンプル注入量 (G5667A)

1~5 mg/mL の mAb を含むサンプルの場合、1~5 μ L を注入します。サンプルは、水または溶離液 A 中で溶解可能です。

カラムコンパートメント (G1316C)

良好な分離が得られる一般的な温度は 60 ~ 90 °C です。

検出器 (G1315D)

UV (210、280 nm)、10 mm バイオイナート標準フローセルです。

BIO
inert



カラムの選択

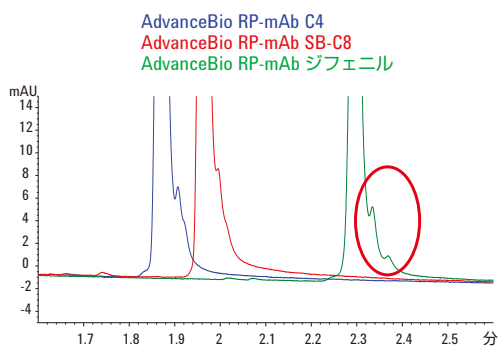
カラム	C4	SB-C8	Diphenyl
2.1 x 50 mm, 3.5 μ m	799775-904	789775-906	799775-944
2.1 x 75 mm, 3.5 μ m	797775-904	787775-906	797775-944
2.1 x 100 mm, 3.5 μ m	795775-904	785775-906	795775-944
2.1 x 150 mm, 3.5 μ m	793775-904	783775-906	793775-944
4.6 x 50 mm, 3.5 μ m	799975-904	789975-906	799975-944
4.6 x 100 mm, 3.5 μ m	795975-904	785975-906	795975-944
4.6 x 150 mm, 3.5 μ m	793975-904	783975-906	793975-944



Agilent Technologies

インタクト mAb 分析

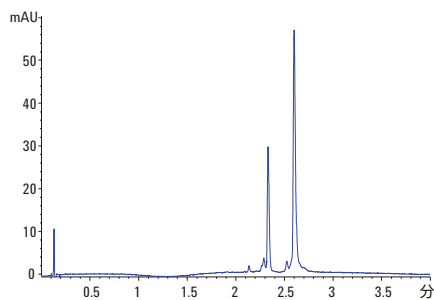
高速かつ高分離能の分離



カラム: 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m
 溶離液 A: 0.1 % TFA 水溶液 :IPA (98:2)
 溶離液 B: IPA:ACN: 溶離液 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
 注入量: 5 μ L (1 mg/mL)
 サンプル: ハーセプチン IgG1 バリエーション
 温度: 80 °C
 検出器: UV、254 nm

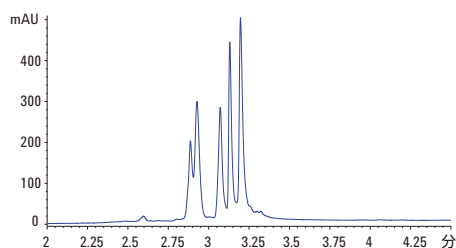
mAb フラグメントの分析

化学的分解 – 重鎖/軽鎖



カラム: AdvanceBio RP-mAb Diphenyl,
 2.1 x 50 mm, 3.5 μ m
 溶離液 A: 0.1 % TFA 水溶液
 溶離液 B: IPA:ACN:水 (70:20:10)
 + 0.09 % TFA
 流量: 1 mL/min
 グラジエント: 0 分 15 % B、0.5 分 25 % B、
 1.5 分 35 % B、1.51 分 35 % B、
 3 分 60 % B、4 分 60 % B
 注入量: 1 μ L (1 mg/mL) (TCEP 還元剤)
 サンプル: リツキシマブ先発品
 温度: 80 °C
 検出器: UV、220 nm

酸素による分解 – Fab/Fc 領域

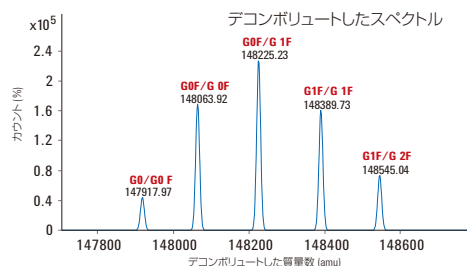
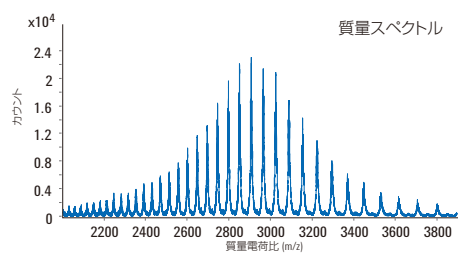
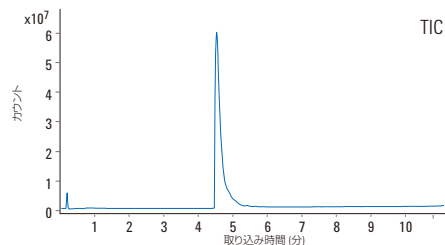


カラム: AdvanceBio RP-mAb C4,
 2.1 x 100 mm, 3.5 μ m
 溶離液 A: 0.1 % TFA 水溶液
 溶離液 B: n-プロパノール:ACN: 溶離液 A
 (80:10:10)
 流量: 0.8 mL/min
 グラジエント: 5 分で 5 ~ 40 % B、
 1 分間 95 % B で洗浄、
 1 分間 10 % B で再平衡
 注入量: 1 μ L (2 mg/mL)
 サンプル: ハーセプチン IgG1 バリエーション –
 パパイン消化
 温度: 60 °C
 検出器: UV、220 nm

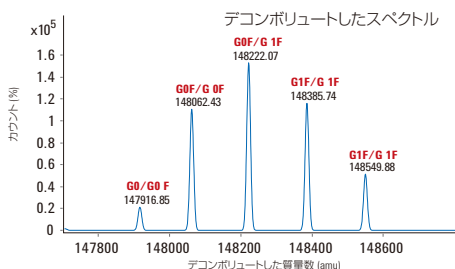
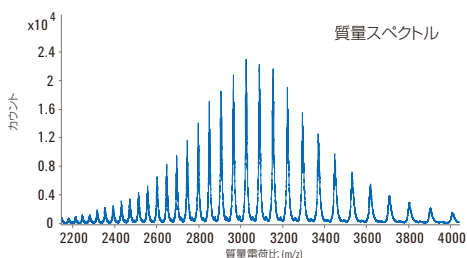
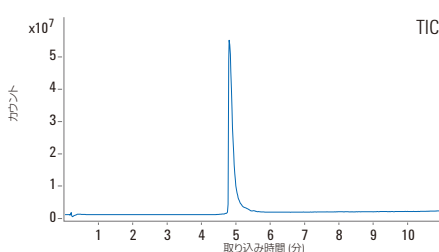
インタクト mAb の LC/MS 分析

ギ酸移動相を使用した、優れたピーク形状と MS データが得られる、高速クロマトグラフィー

AdvanceBio RP-mAb C4,
 2.1 x 50 mm, 3.5 μ m



AdvanceBio RP-mAb ジフェニル,
 2.1 x 50 mm, 3.5 μ m



溶離液 A: 0.1 % FA 水溶液
 溶離液 B: IPA:ACN:水 (80:10:9.9) + 0.1 % FA
 グラジエント: 0 分 20 % B、4 分 20 % B、
 5 分 40 % B、10 分 70 % B、
 11 分 90 % B、11.1 分 20 % B
 流量: 0.6 mL/min
 温度: 80 °C
 注入量: 1 μ L (1 μ g/ μ L)
 サンプル: 先発品ハーセプチン
 検出器: Agilent 6530 Accurate Mass
 Q-TOF LC/MS

本資料に記載の情報は、
 予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2015
 Printed in Japan, October 6, 2015
 5991-6321JAJP



Agilent Technologies