

Agilent AdvanceBio SEC カラム

生体分子分析用サイズ排除カラム



概要

Agilent AdvanceBio SEC カラムは、生体分子のサイズ排除クロマトグラフィー用にアジレントが設計して製造したカラムです。革新的な高多孔性シリカ粒子と独自の親水性結合相により、非特異的な相互作用を最小限に抑え、卓越した安定性を実現しています。

AdvanceBio 2.7 μm SEC カラムには、次の 4 つのポアサイズがあります。ペプチドや治療用小型タンパク質には 130 \AA 、モノクローナル抗体 (mAb)、抗体薬複合体 (ADC)、その他のタンパク質には 300 \AA 、アデノ随伴ウイルス (AAV)、その他の大型生物製剤タンパク質とオリゴヌクレオチドには新たな 500 \AA 、ウイルス様粒子 (VLP)、オリゴヌクレオチドなどのその他の大型生物製剤には新たな 1000 \AA のポアサイズが用意されています。

AdvanceBio 1.9 μm UHPLC SEC カラムは、高分解能、ハイスループット分離、サイズ変異体の特性解析に対して最適化されています。このカラムには、次の 2 つのポアサイズがあります。AdvanceBio SEC 1.9 μm 、120 \AA はペプチドや治療用小型タンパク質の分析に最適なカラムであり、AdvanceBio SEC 1.9 μm 、200 \AA は mAb や ADC の特性解析向けに設計されたカラムです。

はじめに

すべての Agilent AdvanceBio SEC カラムには、カラム固有の QC テストクロマトグラムおよびバッチ固有のタンパク質とペプチド分離を含む、カラムパフォーマンスレポートが付属しています。Agilent QC テストシステムは、デッドボリュームを最小化するために標準のシステムから変更されているため、現在お使いのシステムとは異なる可能性があります。この変更により、カラム効率をさらに適切に評価し、より一貫した結果を確実に得ることができます。また、最適化された LC システムを使用して、カラムパフォーマンスレポートのクロマトグラムと同様の結果を生成することができます。

AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムで最良のクロマトグラフィー結果を得るためには、低分散 LC を使用することを推奨します。サンプルインジェクタとカラム間、およびカラムと検出器間のチューブの内径 (id) と長さを最小にすることにより、LC を最適化して分解能を最大にすることができます。内径 2.1 mm カラムでは、低容量のマイクロ UV 検出器フローセルが必要になる場合があります。

カラムを適切に接続することは重要です。アジレントは、特に内径 2.1 mm PEEK ライン付きカラムでは、損傷を防止するために InfinityLab クイックコネクト LC フィッティング (部品番号 5067-5966) またはバイオイナート UHP-FF フィッティング (部品番号 5067-5695) を使用することを推奨しています。

また、カラムと機器性能をモニタリングするために、Agilent AdvanceBio SEC 標準などの標準テスト混合物を定期的に分析することを推奨しています。

すべての Agilent AdvanceBio SEC カラムは、UV 検出器、蛍光検出器、光散乱検出器で使用することを推奨しています。

SEC-MS には、AdvanceBio 1.9 μm 、AdvanceBio 2.7 μm 500 \AA 、または 1000 \AA のポアサイズを推奨しています。

詳細は、アジレントのテクニカルサポートにお問い合わせください。

重要な安全上の注意点

- LC システムでは、すべての接続部で漏れが生じる可能性があります。このため、移動相の潜在的な毒性や可燃性に注意する必要があります。
- カラムのエンドフィッティングは取り外さないでください。

カラムの使用法

取り付け

- 両方のエンドプラグを取り外して、システムの流れの方向がカラムの矢印と一致していることを確認します。流れの方向が逆の状態ではカラムを使用しないでください。
- Agilent InfinityLab クイックコネクト LC フィッティング (部品番号 5067-5966) を使用すると、カラムを LC 機器に簡単な操作で確実に接続できます。内径 2.1 mm PEEK ライン付きカラムには、バイオイナート UHP-FF フィッティング (部品番号 5067-5695) と締めすぎ防止用工具 (部品番号 5043-0915) を推奨します。

カラムのコンディショニング

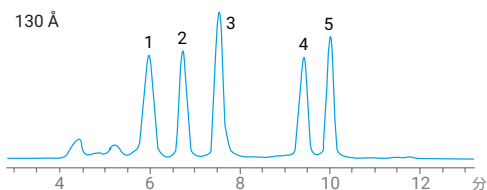
最初に、分離に必要な移動相にカラムをフラッシングする必要があります。0.0 mL/min から目的の動作流量まで、数分間かけてゆっくりと流量を増大させます。可能な場合は、最大流量グラジエントを 0.1 mL/min/min に設定します。カラム容量の 10 倍以上のフラッシングを行うか、ベースラインが安定するまでカラムを平衡化します。

使用手順

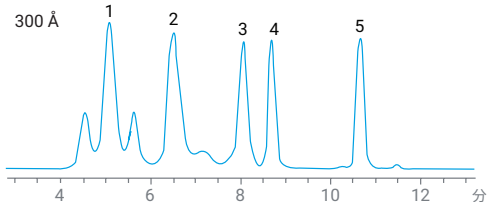
- カラムは、他の塩が添加されているかいないかに関係なく、pH 7.0 の 150 mM リン酸ナトリウムを含む、一般的に使用されている水溶性緩衝液に適合しています。推奨する塩濃度は $\leq 0.5 \text{ M}$ です。有機溶媒の割合は 50 % 未満にすることを推奨します。有機溶媒を使用する場合は、緩衝液成分の溶解性とシステムの圧力に細心の注意を払う必要があります。ネイティブモードの SEC-MS には、酢酸アンモニウムを推奨します。非揮発性の移動相塩が残らないように、MS 検出器に接続する前にカラムを十分にフラッシングします。溶出液を変更する場合は、塩沈殿物の粘度とリスクを考慮してください。状態が把握できない場合は、新しい溶出液を注入する前に、最初に高純度水でカラムをフラッシングします。

2.7 μm

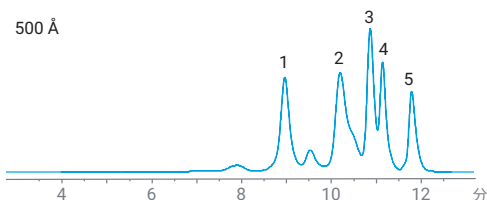
Agilent SEC AdvanceBio 130 Å タンパク質標準		分子量 (Da)
1.	オボアルブミン	45,000
2.	ミオグロビン	17,000
3.	アプロチニン	6,700
4.	ニューロテンシン	1,700
5.	アンギオテンシン II	1,000



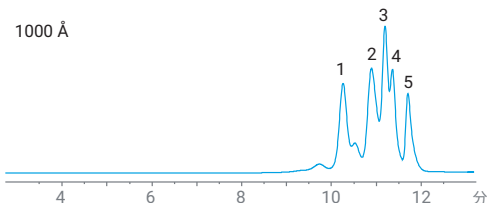
Agilent SEC AdvanceBio 300 Å タンパク質標準		分子量 (Da)
1.	サイログロブリン	670,000
2.	γ-グロブリン	150,000
3.	オボアルブミン	45,000
4.	ミオグロビン	17,000
5.	アンギオテンシン II	1,000



Agilent SEC AdvanceBio 300 Å タンパク質標準		分子量 (Da)
1.	サイログロブリン	670,000
2.	γ-グロブリン	150,000
3.	オボアルブミン	45,000
4.	ミオグロビン	17,000
5.	アンギオテンシン II	1,000

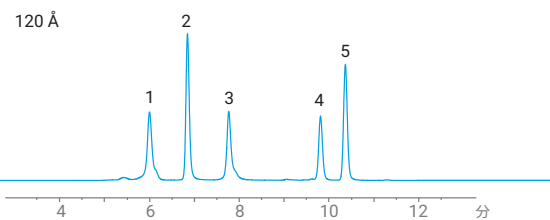


Agilent SEC AdvanceBio 300 Å タンパク質標準		分子量 (Da)
1.	サイログロブリン	670,000
2.	γ-グロブリン	150,000
3.	オボアルブミン	45,000
4.	ミオグロビン	17,000
5.	アンギオテンシン II	1,000

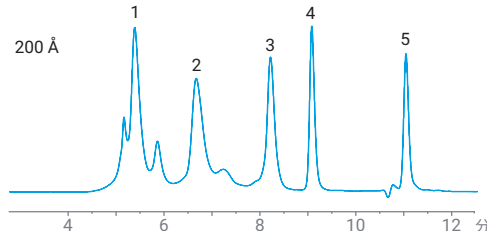


1.9 μm

低分子量 タンパク質混合物		分子量 (Da)
1.	オボアルブミン	44,000
2.	ミオグロビン	17,000
3.	アプロチニン	6,700
4.	ニューロテンシン	1,700
5.	ウリジン	244



Agilent SEC AdvanceBio 200 Å Protein Standard		分子量 (Da)
1.	サイログロブリン	670,000
2.	γ-グロブリン	158,000
3.	オボアルブミン	44,000
4.	ミオグロビン	17,000
5.	アンギオテンシン II	1,000



パラメータ	設定値
カラム	AdvanceBio SEC 130 Å、2.7 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5350) AdvanceBio SEC 300 Å、2.7 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5301) AdvanceBio SEC 500 Å、2.7 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5325) AdvanceBio SEC 1000 Å、2.7 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5302) AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5250) AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm (PL1580-5201)
流量	0.35 mL/min
移動相	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
波長	220 nm
注入量	1 ~ 5 μL

図 1. システム適合性試験に適したタンパク質標準混合物の分離例

- 高純度成分と Milli-Q や Nanopure のような超高純度水を使用して、緩衝液を新たに混合します。緩衝液は、使用前に 0.2 μm または 0.45 μm のフィルタでろ過して、脱気します。ろ過することにより微粒子を除去して、細菌繁殖のリスクを低減します。細菌が繁殖すると、カラムや LC システムに損傷を与えてしまいます。光散乱検出には、3 回ろ過した (0.2 μm) 移動相を推奨します。
- 移動相でサンプルを調製して、完全に溶解していることを確認します。注入前に、サンプルをろ過または遠心分離します。

注：カラムの寿命を最大限に延ばすために、Agilent AdvanceBio SEC ガードカラムを使用することを推奨しています。

測定パラメータ

パラメータ	設定値
使用可能な移動相	高および低塩濃度の水溶性緩衝液を使用できます。 水と有機溶媒の混合物は、 緩衝液成分の溶解性とシステムの圧力に注意 して使用することができます。
pH 安定性	2 ~ 8.5
動作温度範囲	20 ~ 30 °C (推奨)、80 °C (最大)
最大圧力	40 MPa (5,800 psi) (2.7 μm カラムの場合) 62 MPa (9,000 psi) (1.9 μm カラムの場合)
推奨流量	0.1 ~ 2.0 mL/min (内径 7.8 mm カラムの場合) 0.1 ~ 0.7 mL/min (内径 4.6 mm カラムの場合) 0.05 ~ 0.1 mL/min (内径 2.1 mm カラムの場合) カラム 2 本を連結して使用する場合は、最大圧力を超えないように、必要に応じて流量を下げます。
注入量	1 ~ 10 μL (推奨) カラム容量の最大 1 %

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

パラメータ	設定値
流量	1 mL/min
移動相	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
注入量	5 μL
UV 波長	220 nm
温度	室温
サンプル	IgG

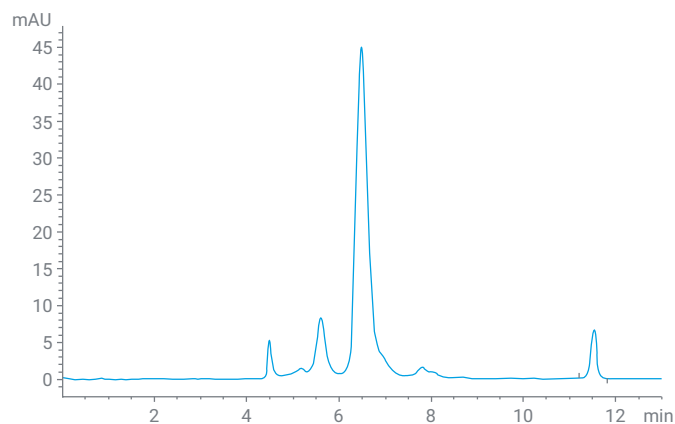


図 2. IgG サンプルの高分解能分離。AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラム (部品番号 PL1180-5301) において、単量体、凝集体、および分解生成物が良好に分離されています。

パラメータ	設定値
流量	0.35 mL/min
移動相	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
UV 波長	280 nm
温度	25 °C
サンプル	ストレスを加えた mAb。pH 9 と 40 °C で一晩インキュベーション済み

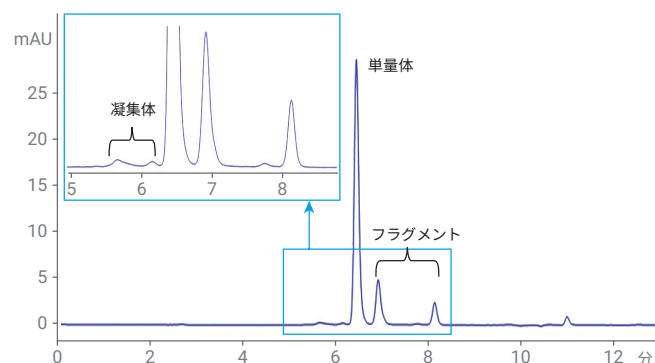


図 3. ストレスを加えた IgG サンプルの分離例。AdvanceBio SEC 200 Å、4.6 × 300 mm、1.9 μm カラム (部品番号 PL1580-5201) において、単量体、凝集体、およびフラグメントが良好に分離されています。

パラメータ	設定値
流量	0.35 mL/min
移動相	50 mM リン酸緩衝液、400 mM NaCl、pH 7.2
注入量	5 μ L
蛍光検出	Ex 280 nm、Em 343 nm
温度	室温
サンプル	AAV9

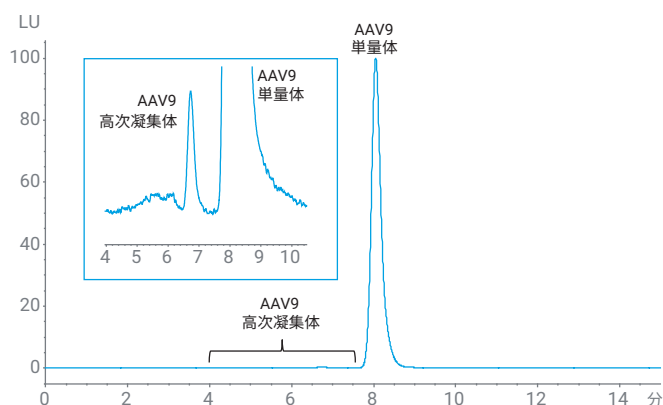


図 4. AAV9 の高分解能分離。Agilent AdvanceBio SEC 500 Å、4.6 × 300 mm、2.7 μ m カラム（部品番号 PL1580-5325）を使用しています。

カラムのメンテナンスとクリーニング

カラムのメンテナンス

時間の経過とともに背圧の上昇と性能の低下が生じる可能性があります。圧力が上昇した場合は、最初にこの上昇がガードカラムに起因するものかどうかを特定し、必要に応じて交換します。圧力の上昇の原因がチューブやフィルタなどのシステムコンポーネントにある場合は、コンポーネントを交換して、再テストを実施します。

カラムのクリーニング手順

以下のいずれかの洗浄液を使用することにより、カラム性能を回復できる可能性があります。

- **強く吸着した汚染物質**：低 pH で高濃度の塩（例えば、0.5 M Na_2SO_4 、pH 3）または 0.5 M 塩酸グアニジン
- **疎水性物質用の有機溶媒**：最大 50 % のメタノール、エタノール、またはイソプロパノール
- **塩基性汚染物質用の酸性試薬**：15 % アセトニトリル中の 0.1 % TFA、ギ酸、または酢酸

カラムは必ず流れの矢印の方向にフラッシングして、2.7 μ m カラムの場合は圧力が 20 MPa未満、1.9 μ m カラムの場合は 40 MPa未満になるように流量を下げます。カラム容量の 20 倍以上の洗浄液でフラッシングする前後に、カラム容量の 5 倍以上の超純水で洗浄します。

3 種類の洗浄用緩衝液すべてを連続して使用することは推奨していません。想定される汚染物質に最適な緩衝液を選択してください。緩衝液塩が沈殿しないように注意して、移動相の粘度差によるカラムへの過剰な圧力を防ぎます。

推奨するカラムの保管方法

短期間の保管（2 週間未満）：カラムを移動相に保管します。

長期間の保管（2 週間以上）：ろ過した 100 mM のリン酸ナトリウム、 $\text{pH} \leq 7$ でカラムを保管します。場合により、0.02 % の NaN_3 水溶液または 20 % のメタノール水溶液を使用します。カラム容量の 10 倍以上でカラムをフラッシングします。20 % メタノールとの間で切り替えるには、高い粘度によるカラムへの過剰な圧力を防ぐために、カラムのフラッシングは低流量で行う必要があります。低流量から開始して、内径 2.1 mm カラムの場合は 0.05 mL/min 以下、内径 4.6 mm カラムの場合は 0.1 mL/min 以下、内径 7.8 mm カラムの場合は 0.2 mL/min 以下でフラッシングすると同時に、2.7 μ m カラムの場合は圧力を 20 MPa未満、1.9 μ m カラムの場合は 40 MPa未満に維持します。

カラムは室温で保管します。

製品情報

説明	部品番号
AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5250
AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3250
AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 4.6 × 30 mm, ガードカラム	PL1580-1250
AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 2.1 × 150 mm, PEEK ライナ付き SS	PL1980-3250PK
AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 µm, 2.1 × 50 mm, PEEK ライナ付き SS	PL1980-1250PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 4.6 × 30 mm, ガードカラム	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 2.1 × 150 mm, PEEK ライナ付き SS	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 µm, 2.1 × 50 mm, PEEK ライナ付き SS	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm	PL1180-5350
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 7.8 × 150 mm	PL1180-3350
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 7.8 × 50 mm, ガードカラム	PL1180-1350
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5350
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3350
AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 4.6 × 50 mm, ガードカラム	PL1580-1350
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 150 mm	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 50 mm, ガードカラム	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 4.6 × 50 mm, ガードカラム	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm	PL1180-5325
AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 µm, 7.8 × 50 mm, ガードカラム	PL1180-1325
AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5325
AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3325
AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 µm, 4.6 × 50 mm, ガードカラム	PL1580-1325
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm	PL1180-5302
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 µm, 7.8 × 50 mm, ガードカラム	PL1180-1302
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 µm, 4.6 × 300 mm	PL1580-5302
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 µm, 4.6 × 150 mm	PL1580-3302
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 µm, 4.6 × 50 mm, ガードカラム	PL1580-1302
AdvanceBio SEC 130 Å タンパク質標準、凍結乾燥済み, 1.5 mL 1 ~ 45 kDa のペプチドとタンパク質	5190-9416
AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準、凍結乾燥済み, 1.5 mL 1 ~ 670 kDa のペプチドとタンパク質	5190-9417

PEG、PEO、多糖類の分子量キャリブレーション用標準については、www.agilent.com を参照してください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE16189012

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021, 2023, 2024

Printed in Japan, May 22, 2024

5971-6580JAJP