



TOSOH

# TOYOPEARL® 総合カタログ

※以下の名称は日本における東ソー株式会社の登録商標です。

“バイオアシスト/BIOASSIST”、“Enviropak/エンバイロパック”、  
“Enviropak/エンビロパック”、“Lipopropak/リポプロパック”、  
“トヨパール/TOYOPEARL”、“トヨパールバック/TOYOPEARLPAK”、  
“マイシヨリディスク”、“PStQuick”、“TSKgel SuperOligo”、“SuperOligo”、“NPR”

※以下の名称は日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。

“TSKgel”、“BioAssist”、“Lipopropak”、“TSKgel STAT”、  
“TSKgel SuperMultipore”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”、  
“TOYOPEARL MegaCap”、“ToyoScreen”、“TOYOPAK”

※“HLC”は日本、中国における東ソー株式会社の登録商標です。

※外観、仕様は予告なく変更することがあります。

※掲載写真と説明文、構成ユニットは異なる場合があります。

※製品の多くは毒性・安全性について検査されていません。

特に警告・注意がなくても、無害・無毒であると保証されている訳ではありません。

※当社製品を使用して得られた分離精製物または精製溶液を、製品及び中間体として  
使用する場合は、十分にその安全性の確認を行ってご使用ください。

※記載されたデータは当社が取得した参考データで、保証するデータではありません。

お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認もしくはデータの取得を  
お願い致します。



TOSOH

## 東ソー株式会社

バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部

☎(03)5427-5180 FAX(03)5427-5220 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2

大阪支店 バイオサイエンスG

☎(06)6209-1948 FAX(06)6209-1965 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9

名古屋支店 バイオサイエンスG

☎(052)211-5730 FAX(052)222-8623 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7

福岡支店

☎(092)781-0481 FAX(092)751-7015 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2

仙台支店

☎(022)266-2341 FAX(022)267-5745 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1

山口営業所

☎(0834)63-9888 FAX(0834)63-6627 〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1

カスタマーサポートセンター

☎(0467)76-5384 FAX(0467)79-2550 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ

<http://www.separations.asia.tosohbioscience.com>

HPLC Applications Database

<http://hplcapplications.tosohbioscience.com/applications-database>

お問い合わせ E-mail

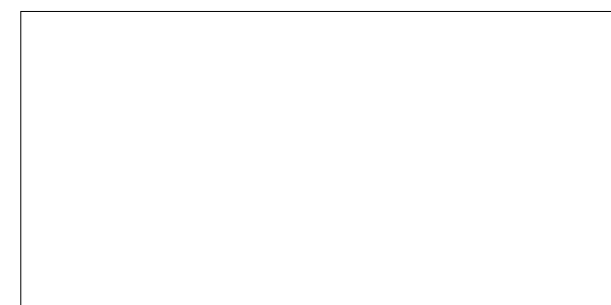
●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp  
●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp  
●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp

## ■海外でのお求めについて

TSKgel, TOYOPEARLは、海外でもご購入できます。

海外でのお問い合わせは下記までお願いいたします。

- Tosoh Bioscience LLC  
Address : 3604 Horizon Drive Suite 100, King of Prussia, PA 19406, USA  
Telephone : +1 800 366 4875 Fax : +1 610 272 3028
- Tosoh Bioscience GmbH  
Address : Im Leuschnerpark 4, 64347 Griesheim, Germany  
Telephone : +49 6155 7043700 Fax : +49 6155 8357900
- Tosoh Bioscience Shanghai Co., Ltd.  
Address : Room 1001, Innov Tower, Block A, 1801 Hong Mei Road,  
Xu Hui District, Shanghai 200233, China  
Telephone : +86 21 3461 0856 Fax : +86 21 3461 0858
- Tosoh Asia Pte., Ltd.  
Address : 63 Market Street #10-03 Singapore 048942  
Telephone : +65 6226 5106 Fax : +65 6226 5215



5701GX-[品番0994040]D



TOYOPEARL® Bulk Resin  
TSKgel® Bulk Resin

Product Guide

## 目次

はじめに	3
製品概要	4
サイズ排除クロマトグラフィー	5
製品の特長	6
製品一覧	10
イオン交換クロマトグラフィー	11
製品の特長	12
製品一覧	21
疎水クロマトグラフィー	25
製品の特長	26
製品一覧	32
ミックスモードクロマトグラフィー	35
製品の特長	36
製品一覧	38
アフィニティークロマトグラフィー	39
製品の特長	40
製品一覧	48
TOYOPEARLの用法・充填法	50

## TOYOPEARL充填剤

TOYOPEARLはラボスケールから生産スケールまでのクロマトグラフィーに適した親水性ポリマー充填剤です。機械的強度の高いポリマー骨格を持つため、市販されている多くの充填剤よりも優れた圧損/流速特性を示します。高い線速度で溶液を流せることから、プロセスの生産性向上とサイクル時間の短縮に大きく寄与します。

TOYOPEARLはpH 2～12の範囲で安定であり、更に洗浄の場合ではpH 1～13の範囲まで使用することができます。平均粒子径として35 μm(一部30 μm)、65 μm(一部75 μm)及び100 μmのタイプを用意しておりますので初期精製、中間精製、高分離能分離工程などの目的に合わせてお使いいただけます。また、細孔径の異なる製品が用意されており、サイズ排除、イオン交換、疎水、アフィニティークロマトグラフィーなどの各種分離モードに対応可能です。細孔径と表面積を最適化することにより目的成分の分子サイズによらず高い動的吸着量が得られます。

TSKgel充填剤と同じ化学組成で作られており、TSKgelを使用して開発したメソッドをシームレスにスケールアップすることができます。

## TSKgel 5PW充填剤

TSKgelカラムで使用されている粒子径20 μm及び30 μmの充填剤が用意されており、生産スケールのイオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーにご利用いただけます。これらの製品は機械的強度と吸着性に優れ、高い分離性能と理論段数が必要とされる分取用やプロセス用の充填剤としてご利用いただけます。

TSKgelカラムのさらに詳しい情報をご希望のお客様は当社の「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご請求ください。

## スクリーニング・プロセス開発用カラム

ToyoScreen<sup>®</sup>、MiniChrom<sup>®</sup>、RoboColumn<sup>®</sup>

ToyoScreenは、各種TOYOPEARLを充填した簡易型のスクリーニング用カラムです。1 mL、5 mLのカートリッジカラムが用意されており、精製プロセス開発のための充填剤スクリーニングや分離条件の初期検討が、汎用LCシステム等に接続して容易に行えます。

MiniChromは、カラムサイズ8 mm I.D. × 10 cm(容量5 mL)で、ToyoScreenカラムでのスクリーニング後、分離条件の最適化や小スケールでの分取精製用に設計されたカラムです。

RoboColumnは、Tecan社Freedom EVO<sup>®</sup>のような全自動分注システムとの組み合わせで使用するミニカラムでハイスループットでの充填剤スクリーニングや条件検討が可能です。

※ MiniChrom、RoboColumnはAtoll GmbHの登録商標です。  
Freedom EVOはTecan Group Ltd.の登録商標です。

## 安全性データと保証

すべてのバルク充填剤の安全性データシート(SDS)が常にアップデートされています。

## TOYOPEARLのGMP、バリデーション支援データ、法規制関連資料

医薬品などの製造にTOYOPEARLをご使用いただくため、TOYOPEARLの各種基礎データの充実を図り、GMPやバリデーション支援を行っています。

## 法規制関連

- 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)に関する届出
- 少量新規化学物質に関する届出

## GMP、バリデーション支援・試験データ

- バイオバーデン対応(医薬品等の製造原料の微生物汚染に関する品質保証)
- 製品の長期放置安定性試験
- 製品溶液中の全有機炭素(TOC)定量試験
- 製品中の残留モノマー確認試験
- 有機溶媒洗浄における溶出物の定量試験
- 製品の安全性試験(毒性試験、変異原性試験等)
- アルカリ溶液中での長期放置安定性試験
- アルカリ溶液中での溶出物の同定試験
- アルカリ溶液を用いたCIPにおける耐久性試験
- TOYOPEARL CIPマニュアル

※ 上記試験データの内容等の詳細につきましては、当社営業までお問い合わせください。

※ 上記試験データは、そのグレード、数値を保証するものではありません。

※ TOYOPEARLのバリデーションを含めたインハウスセミナーも行ってまいります。詳細は、当社営業までお問い合わせください。

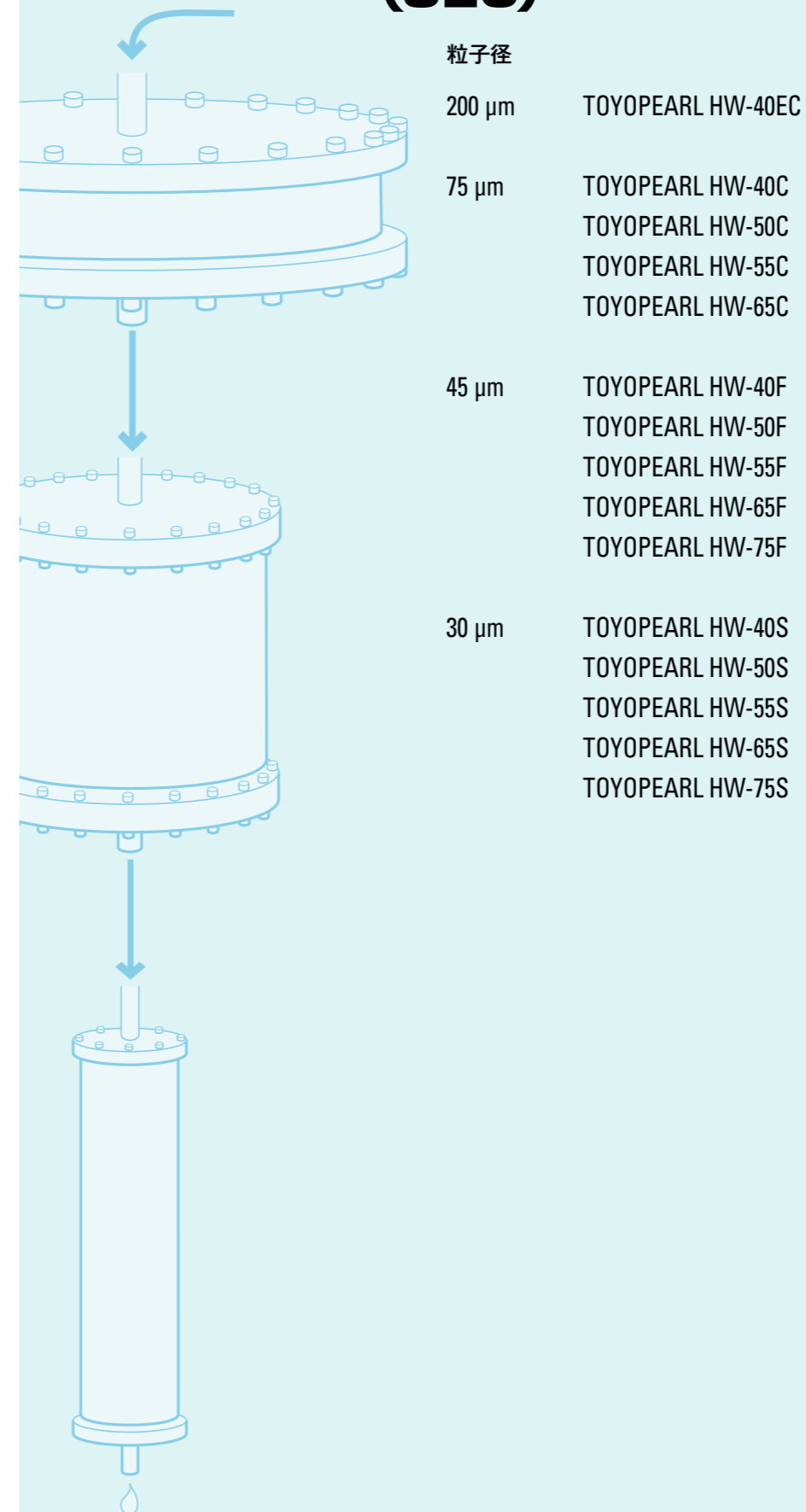


# 製品概要

充填剤	サイズ排除クロマトグラフィー用	TOYOPEARL HWタイプ
	イオン交換クロマトグラフィー用	陰イオン交換体
		TOYOPEARL GigaCap Q-650
		TOYOPEARL GigaCap DEAE-650
		TOYOPEARL SuperQ-650
		TOYOPEARL DEAE-650
		TOYOPEARL Q-600 AR
		TOYOPEARL QAE-550
		TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750
		陽イオン交換体
		TOYOPEARL GigaCap S-650
		TOYOPEARL GigaCap CM-650
		TOYOPEARL SP-650
		TOYOPEARL CM-650
		TOYOPEARL SP-550
		TOYOPEARL MegaCap II SP-550
		TOYOPEARL Sulfate-650
	疎水クロマトグラフィー用	650シリーズ
		TOYOPEARL Hexyl-650
		TOYOPEARL Butyl-650
		TOYOPEARL Phenyl-650
		TOYOPEARL Ether-650
		600シリーズ
		TOYOPEARL Phenyl-600
		TOYOPEARL Butyl-600
		TOYOPEARL PPG-600
		550シリーズ (高吸着タイプ)
		TOYOPEARL SuperButyl-550
	ミックスモードクロマトグラフィー用	650シリーズ
		TOYOPEARL MX-Trp-650M
	アフィニティークロマトグラフィー用	群特異的AFC用
		TOYOPEARL AF-650タイプ
		活性化型AFC用
		TOYOPEARL AF-650タイプ
充填カラム	プロセス開発用カラム	ToyoScreenシリーズ
		MiniChromシリーズ
		RoboColumnシリーズ
	セミ分取用、工業用	特別注文にてお受けします*

\*詳細やTOYOPEARLの大口径充填カラムについては、当社営業までお問い合わせください。

## サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)





# サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

## プロセス精製におけるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の役割

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、水溶液中の分子の大きさにより、充填剤内での浸透性が異なることで分離されます。充填剤カラムの中の充填剤の最大細孔径よりも大きなサイズを持つ分子は充填剤粒子の細孔内部へ入り込むことができません、充填剤粒子の間を素通りして最初に溶出します。より小さな分子は充填剤粒子内の細孔に入り込むため溶出が遅くなります。従って分子量の大きい順に溶出します。

SECは、目的とするたんぱく質を凝集体や大幅に分子量の異なる不純物から分離するための最終精製ステップとしても使用されます。また、精製後のたんぱく質の脱塩処理にも利用されます。

TOYOPEARL HWタイプには種々の粒子径、細孔を有する充填剤があります (表1参照)。これらのSEC用TOYOPEARL HWシリーズにイオン交換基や疎水基、アフィニティーリガンドなどを導入して化学的に修飾した充填剤も用意しています。

## 充填剤の化学構造

TOYOPEARLサイズ排除クロマトグラフィー充填剤は水酸基が導入されたポリマー充填剤です (図1)。表面の水酸基がたんぱく質のSEC分離に有効に機能します。TOYOPEARLは、官能基を導入したタイプを含めて、クロマトグラフィー用充填剤の中でも非特異的吸着の低い製品です。例えば血液成分の分離では充填剤と試料との相互作用が目的物質の回収率低下の原因となることから、この非特異的吸着が低いことが特に重要です。

また、半硬質ゲルであるため、アガロース系のような軟質充填剤と比較して優れた圧損/通液特性を有しています。

## 細孔径

SEC用のTOYOPEARL HWタイプには5段階の分画範囲に対応するグレード、細孔径が用意されています。どのタイプが最適であるかは試料中に含まれる成分の分子量に依存します。たんぱく質、デキストラン、PEGポリマーを対象としたときの選択条件をまとめて表1、表2に示します。

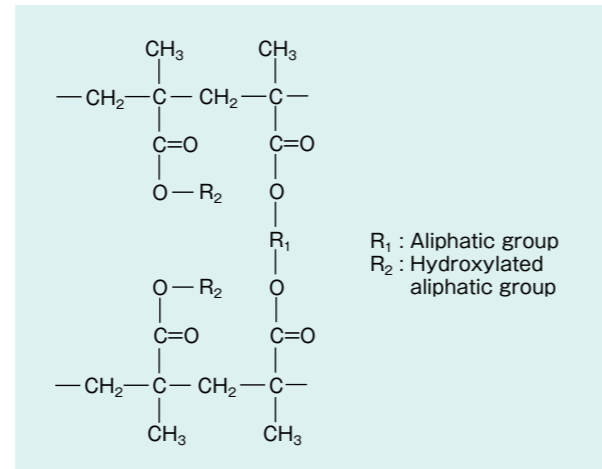


図1 TOYOPEARL SEC充填剤の化学構造 (ヒドロキシアクリル)

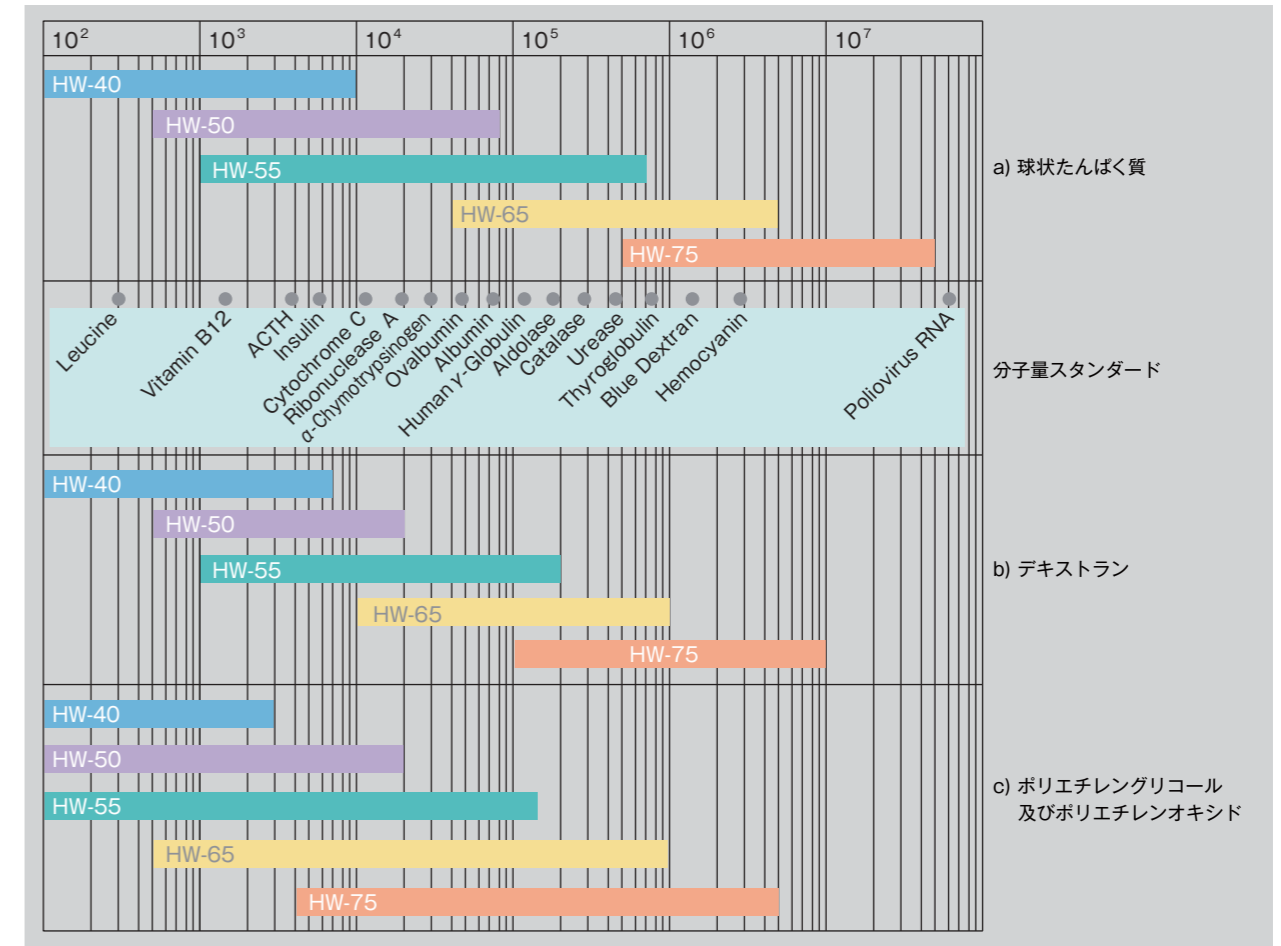
## TOYOPEARL HW タイプの特徴及び利点

● 微細粒子径グレード	⇒	・ 高分離能、シャープなピーク
● 親水性多孔質ポリマー構造	⇒	・ 非特異的吸着の低減
● 狭い粒子径分布	⇒	・ 高分離能、より効果的な分離 流通特性 (流速 / 圧力の関係) の向上
● 優れた機械的強度	⇒	・ 工業用大型カラムでの優れた通液特性 (<0.3 MPa)
● 優れた化学的安定性 (pH 2 - 14)	⇒	・ 溶液の塩濃度が変化しても、カラムベッド容量の変化が少ない ・ 定置洗浄 (CIP) における酸、アルカリ、有機溶媒での洗浄が可能 ・ 昇温 (4 - 60 °C) や、121 °Cでのオートクレーブに対応
● TSKgel HPLC 充填剤と同じ特性	⇒	・ TSKgel HPLC カラムからスケールアップが可能

表1 TOYOPEARL HWタイプの特徴と分子量分画範囲

TOYOPEARL	粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	試料の分子量 (Da)		
			ポリエチレングリコール 及びポリエチレンオキシド	デキストラン	球状たんぱく質 (ワクチンなどを含む)
HW-40S	20 - 40	5	100 - 3,000	100 - 7,000	100 - 10,000
HW-40F	30 - 60				
HW-40C	50 - 100				
HW-50S	20 - 40	12.5	100 - 18,000	500 - 20,000	500 - 80,000
HW-50F	30 - 60				
HW-55S	20 - 40	50	100 - 150,000	1,000 - 200,000	1,000 - 700,000
HW-55F	30 - 60				
HW-65S	20 - 40	100	500 - 1,000,000	10,000 - 1,000,000	40,000 - 5,000,000
HW-65F	30 - 60				
HW-75S	20 - 40	>100	4,000 - 5,000,000	100,000 - 10,000,000	500,000 - 50,000,000
HW-75F	30 - 60				

表2 TOYOPEARL HWタイプの適用分子量範囲



# サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

TOYOPEARL HWタイプで分画可能な範囲はペプチドからたんぱく質まで、分子量として100~50,000,000の範囲です。図2にTOYOPEARL HWタイプの球状たんぱく質に対する較正曲線を示します。

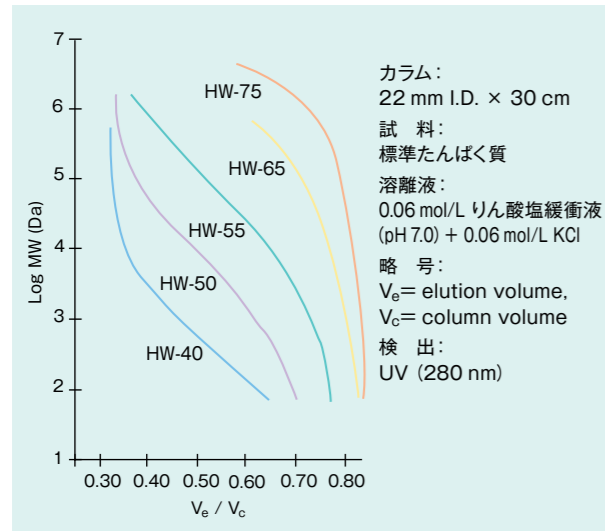


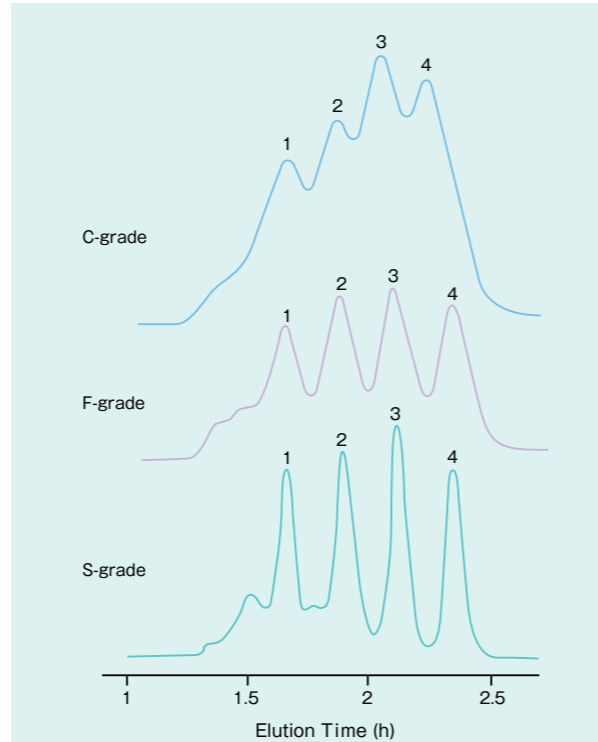
図2 TOYOPEARL HWタイプの球状たんぱく質に対する較正曲線

## 粒子径

分離能は粒子径が小さくなるほど向上します(図3)。TOYOPEARL HWタイプには3種類の粒子径を有するグレードが用意されています:

- Sグレード: 20~40 μm (Superfine)
- Fグレード: 30~60 μm (Fine)
- Cグレード: 50~100 μm (Coarse)

高い分離能を必要とする場合は、より粒子径の小さなSまたはFグレードが使用されます。



カラム: TOYOPEARL HW-55, 26 mm I.D. × 70 cm  
 溶離液: 33.3 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 7.0) + 0.2 mol/L NaCl  
 流速: 106 mL/h(20 cm/h)  
 温度: 25℃  
 検出: UV(280 nm)  
 試料: 1. チログロブリン(0.3%)  
 2. γ-グロブリン(0.3%)  
 3. β-ラクトグロブリン(0.3%)  
 4. チトクロム C(0.1%)  
 注入量: 1 mL

図3 TOYOPEARL HW-55の異なる粒子径における分離能の比較

## 溶離液の影響

溶離液の組成もSECの分離に影響します。図4にTOYOPEARL HW-55F充填カラムを使用し、塩濃度を変えた場合のたんぱく質の較正曲線を示します。塩濃度はたんぱく質の流体力学的半径を変化させる能力を持つため、イオン強度の大小によって実効分子サイズが増大または減少し、溶出容量が変化します。

SEC測定において目的物質は充填剤と相互作用をしないというのが理想ですが、実際には分析種と充填剤との二次的相互作用を最小にするような塩濃度を選択しなければなりません。

## TOYOPEARL SEC充填剤の水系溶離液中での特性

- 優れた機械的強度
- ゲルベッド容積がほとんど変化しない
- 化学的安定性
- シャープなクロマトピーク
- 温度安定性
- 微生物耐性

TOYOPEARLは有機合成により作られた材料であり、微生物の作用による劣化に耐性があります。

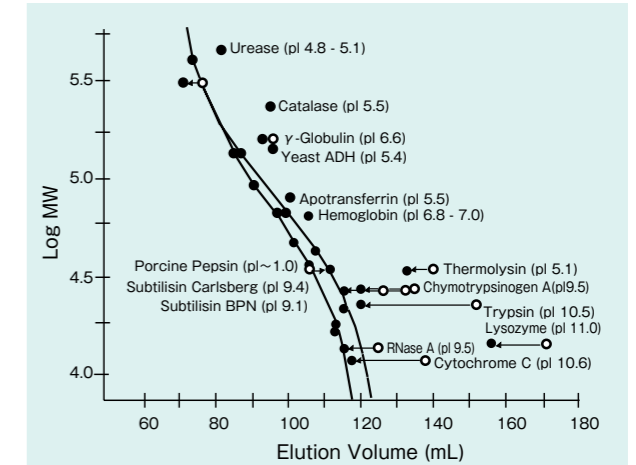
## TOYOPEARL SEC充填剤の有機溶媒系溶離液中での特性

有機溶媒や有機溶媒と水との混合溶液でも使用することができます。ただし、溶媒によっては、表3及び4に示すとおり、溶媒中の水分含量に応じてゲルベッドが収縮または膨潤を起こすことがあります。オリゴ糖やポリエチレングリコールのSEC分離用としてDMSOの使用も可能です。また、DMFも使用できますので、DMFを溶媒としてポリスチレンのような疎水性物質をSECで分離することもできます。

## その他の応用:

TOYOPEARL HWタイプはサイズ排除クロマトグラフィーや脱塩用途で用いられますが、それ以外にも次のような用途でも使用されています:

- ・生体試料からTriton X-100等の界面活性剤を疎水的吸着性を除去する
- ・選択する溶媒系によっては逆相用充填剤としてカテキンなど低分子化合物の分離も可能



カラム: TOYOPEARL HW-55F, 22 mm I.D. × 50 cm  
 溶離液: 25 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 + 0.5 mol/L NaCl (pH 7.5) (●)  
 25 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 7.5) (○)  
 流速: 1.0 mL/min (16 cm/h)  
 温度: 5-10℃  
 検出: UV (280 nm, 420 nm for heme proteins, 200 nm for proteins without aromatic amino acid)

図4 NaClの添加の有無におけるたんぱく質のSEC溶出容量の比較

表3 TOYOPEARL充填剤の各種溶媒における膨潤収縮

TOYOPEARL	HW-40	HW-50	HW-55	HW-65	HW-75
H <sub>2</sub> O	100	100	100	100	100
0.2 mol/L KCl	100	100	100	100	100
CH <sub>3</sub> OH	100	100	100	100	105
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	100	100	100	100	110
DMF	110	110	105	105	120
Acetone	80	80	85	90	110
Toluene	65	70	70	75	90

表4 TOYOPEARL HW-40の各種溶媒における水に対しての膨潤収縮

TOYOPEARL	DMSO	Ethyl Acetate	Benzene	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH (1/1)
HW-40	140	80	70	105	120

# サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

## 製品一覧表

### TOYOPEARL SEC充填剤

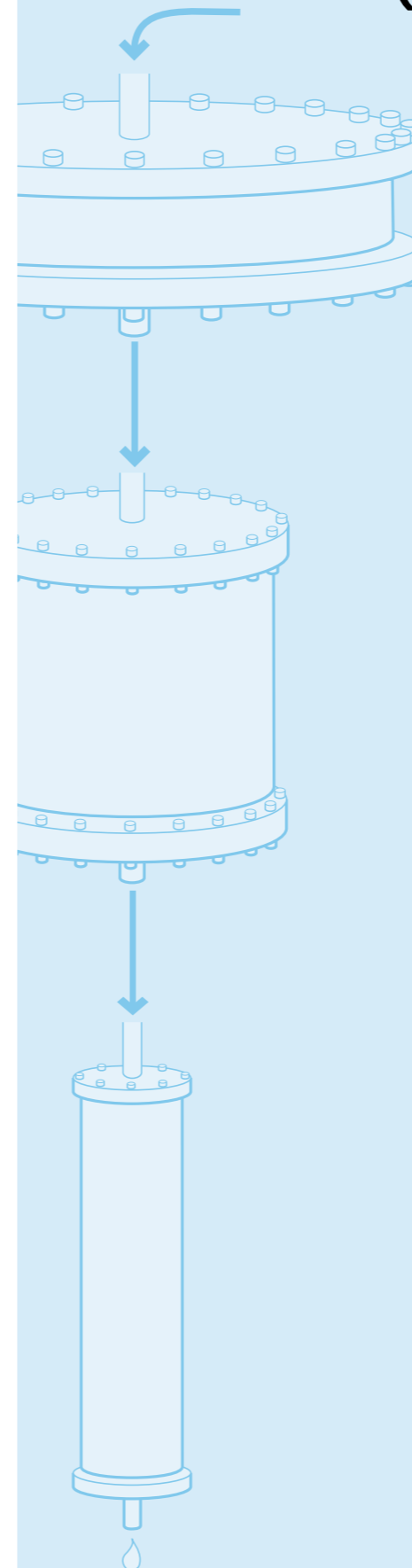
品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	排除限界 (デキストラン) (Da)
0007447	TOYOPEARL HW-40S	500	20 - 40	7 × 10 <sup>3</sup>
0014681		1,000		
0007967		5,000		
0007448	TOYOPEARL HW-40F	500	30 - 60	7 × 10 <sup>3</sup>
0014682		1,000		
0007968		5,000		
0007449	TOYOPEARL HW-40C	500	50 - 100	7 × 10 <sup>3</sup>
0014683		1,000		
0007969		5,000		
0007452	TOYOPEARL HW-50S	500	20 - 40	4.5 × 10 <sup>4</sup>
0014684		1,000		
0008059		5,000		
0007453	TOYOPEARL HW-50F	500	30 - 60	4.5 × 10 <sup>4</sup>
0014685		1,000		
0008060		5,000		
0007456	TOYOPEARL HW-55S	500	20 - 40	3.8 × 10 <sup>5</sup>
0014686		1,000		
0008062		5,000		
0007457	TOYOPEARL HW-55F	500	30 - 60	3.8 × 10 <sup>5</sup>
0014687		1,000		
0008063		5,000		
0007464	TOYOPEARL HW-65S	500	20 - 40	2.5 × 10 <sup>6</sup>
0014688		1,000		
0008068		5,000		
0007465	TOYOPEARL HW-65F	500	30 - 60	2.5 × 10 <sup>6</sup>
0014689		1,000		
0008069		5,000		
0007468	TOYOPEARL HW-75S	500	20 - 40	2 × 10 <sup>7</sup>
0008071		5,000		
0007469	TOYOPEARL HW-75F	500	30 - 60	2 × 10 <sup>7</sup>
0014691		1,000		
0008072		5,000		

\* 価格につきましては、「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご覧ください。  
 \* TOYOPEARL HW-40にはECグレード (100-300 μm) もあります。  
 \* 容量1,000 mL、5,000 mLの製品の価格につきましては、当社営業までお問い合わせください。

### RoboColumn

品番	品名	容量 (μL)	粒子径 (μm)
0045071	TOYOPEARL HW-40F	200 × 8	30 - 60
0045072	TOYOPEARL HW-40F	600 × 8	30 - 60

# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)



粒子径	陰イオン交換体	陽イオン交換体
200 μm		TOYOPEARL MegaCap II SP-550EC
100 μm	TOYOPEARL SuperQ-650C TOYOPEARL QAE-550C TOYOPEARL Q-600C AR TOYOPEARL DEAE-650C	TOYOPEARL SP-650C TOYOPEARL SP-550C TOYOPEARL CM-650C
75 μm	TOYOPEARL GigaCap Q-650M TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	TOYOPEARL GigaCap S-650M TOYOPEARL GigaCap CM-650M
65 μm	TOYOPEARL SuperQ-650M TOYOPEARL DEAE-650M	TOYOPEARL SP-650M TOYOPEARL CM-650M
45 μm	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	TOYOPEARL Sulfate-650F
35 μm	TOYOPEARL GigaCap Q-650S TOYOPEARL SuperQ-650S TOYOPEARL DEAE-650S	TOYOPEARL GigaCap S-650S TOYOPEARL SP-650S TOYOPEARL CM-650S
30 μm	TSKgel SuperQ-5PW (30) TSKgel DEAE-5PW (30)	TSKgel SP-5PW (30) TSKgel SP-3PW (30)
20 μm	TSKgel SuperQ-5PW (20) TSKgel DEAE-5PW (20)	TSKgel SP-5PW (20)



# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

## イオン交換クロマトグラフィー用TOYOPEARL充填剤

イオン交換クロマトグラフィー (IEC) は医薬用たんぱく質の精製などで広く使用されている分離モードです。多くの製薬メーカーがクロマトグラフィーによる成分の吸着や濃縮ステップとしてIECを選択する理由は、他の分離モードと比較して大きな動的吸着量を持つことによります (表1)。

### 充填剤のイオン交換基

TOYOPEARL及びTSKgelのIEC充填剤は6種類の異なるイオン交換基を持つタイプが用意されています (表2参照)。

- 陰イオン交換体3種類: Q (QAE)、DEAE、NH<sub>2</sub>
- 陽イオン交換体3種類: SP (S)、Sulfate、CM

これらのイオン交換基のpKa値をまとめて図1に示します。また特長と用途をまとめて表2に示します。

### 充填剤の細孔径

基材となる充填剤の細孔径を幅広い範囲で用意しており、イオン交換体としては次の4種類があります: 100 nm以上、100 nm、75 nm、50 nm (表4)。

表1 各種分離モードにおける吸着量の比較

分離モード	標準たんぱく質の吸着量 (g/L)	製造プロセスでの吸着量 (g/L)
イオン交換体	100 - 200	50 - 100
疎水充填剤	40 - 60	10 - 30
アフィニティー充填剤	40 - 100	20 - 60
逆相充填剤	60 - 100	30 - 50

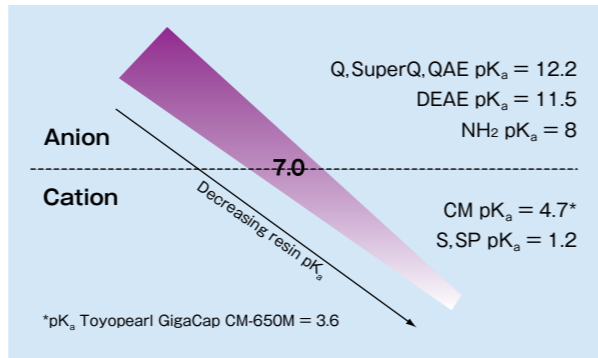


図1 イオン交換基とpKa値

表2 イオン交換基と特長、用途

イオン交換基	特長、用途
DEAEタイプ	塩濃度が低い試料に適する。吸着が強すぎる試料や、巨大分子量試料に適する。
NH <sub>2</sub> タイプ	塩濃度が高くて吸着しやすい。抗体の凝集体、巨大分子量試料の吸着に適する。
Q (QAE)タイプ	吸着・保持力が強く、凝集体やDNA、エンドトキシンなどの吸着除去に、フロースルーモードでも利用。塩濃度が高くて吸着しやすい。
SP (S)タイプ	DNAや培養液中の色素やpH指示薬などが吸着されにくい。初期精製に効果的に利用。
Sulfateタイプ	塩濃度が高くて吸着しやすい。ヘパリンアフィニティーゲルに似た挙動を示す。
CMタイプ	SP (S)タイプと異なる分離選択性を示す。

表3 イオン交換体の特長

陰イオン交換体	基材	細孔径 (nm)	粒子径 (μm)	交換容量 (eq/L)	吸着量 DBC* (BSA) (g/L)
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	HW-65	100	50 - 100	0.10 - 0.20	≥162
TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	HW-65	100	50 - 100	0.15 - 0.25	≥156
TOYOPEARL SuperQ-650M	HW-65	100	40 - 90	0.20 - 0.30	105 - 155
TOYOPEARL DEAE-650M	HW-65	100	40 - 90	0.08 - 0.12	25 - 35
TOYOPEARL Q-600C AR	HW-60	75	50 - 150	0.14 - 0.23	≥120
TOYOPEARL QAE-550C	HW-55	50	50 - 150	0.28 - 0.38	60 - 80
TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	HW-75	≥100	30 - 60	0.07 - 0.13	≥70 (ヒト免疫グロブリン)
陽イオン交換体	基材	細孔径 (nm)	粒子径 (μm)	交換容量 (eq/L)	吸着量 DBC* (ヒト免疫グロブリン) (g/L)
TOYOPEARL GigaCap S-650M	HW-65	100	50 - 100	0.10 - 0.20	136 - 176
TOYOPEARL GigaCap CM-650M	HW-65	100	50 - 100	0.17 - 0.28	≥110
TOYOPEARL SP-650C	HW-65	100	50 - 150	0.12 - 0.18	35 - 55 (リゾチーム)
TOYOPEARL CM-650C	HW-65	100	50 - 150	0.05 - 0.11	25 - 45 (リゾチーム)
TOYOPEARL SP-550C	HW-55	50	50 - 150	0.14 - 0.18	80 - 120 (リゾチーム)
TOYOPEARL Sulfate-650F	HW-65	100	30 - 60	≥0.53	≥114

※動的吸着量

表4 TOYOPEARL及びTSKgelイオン交換体の細孔径

基材	TOYOPEARL HW-65 or TSKgel G5000PW	TOYOPEARL HW-60	TOYOPEARL HW-55
細孔径	100 nm	75 nm	50 nm
	TOYOPEARL GigaCap S-650 TOYOPEARL GigaCap CM-650 TOYOPEARL GigaCap Q-650 TOYOPEARL GigaCap DEAE-650 TOYOPEARL SuperQ-650 TOYOPEARL DEAE-650 TOYOPEARL SP-650 TOYOPEARL CM-650 TOYOPEARL Sulfate-650F TSKgel SP-5PW TSKgel SuperQ-5PW TSKgel SP-5PW TSKgel DEAE-5PW	TOYOPEARL Q-600C AR	TOYOPEARL SP-550 TOYOPEARL MegaCap II SP-550 TOYOPEARL QAE-550            (TSKgel SP-3PW)
	※TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F (基材: HW-75、細孔径: >100 nm)		

### 細孔径の選択

#### 吸脱着クロマトグラフィー用

- 目的物質に適した、適切な細孔径の充填剤を選択します。
- 初期精製には、大きな粒子径の充填剤を、中間精製や最終精製には、より小さな粒子径の充填剤を選択します。

#### フロースルークロマトグラフィー用

- 目的物質の大きさが、不純物成分よりも大きい場合は、目的物質を排除するような細孔径の充填剤を選択することにより、効率の良い精製が可能になります (この手法は kinetic exclusionとして知られており、吸着条件で目的物質が排除され、わずか1%の充填剤表面しか利用されず、吸着、回収率のロスが最小限である場合に使用されます)。

#### 高分子量不純物の除去法

- 目的物質が、細孔内部に入り込め、かつ不純物は、排除される細孔径の充填剤を選択します。

### スクリーニング用カラム ToyoScreen

TOYOPEARLイオン交換体の全てのグレードで、充填剤量1 mLと5 mLカラムが用意されています。ToyoScreenは、スクリーニング (初期検討) における目的物質の吸着保持と回収率の検討に適したカラム製品です。複数のカラムを直列接続することで、更に分離を検討することも可能です。

### 複数の粒子径でスケールアップまたはダウンが容易

TOYOPEARL HW-65とTSKgel G5000PWシリーズの製品は共通の化学的性質と選択性を持っていますので、イオン交換体のスケールアップまたはスケールダウンが容易です。粒子径を小さくすると分離能は向上しますが、試料成分の溶出順序自体は変化しません。



# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

## オリゴヌクレオチドの精製

オリゴヌクレオチドとペプチドの精製においては、より粒子径の小さな充填剤を用いて、高分離能で分離することが非常に有効です。

表5に異なる粒子径を持つSuperQタイプの陰イオン交換体の長短を示します。相対的な吸着量と分離能を、5種類の粒子径の異なる充填剤について、“+”記号表示で示します。+記号が多いほうが、相対的に優れていることを示します。製造プロセスが開発され、さらに高い分離能が要求される場合は、適宜、粒子径の小さい充填剤を選択することになります。

同様に、分離能ではなく、高速処理が要求される場合は、大きな粒子径の充填剤を選択することも可能です。

表5に示すようにTOYOPEARL GigaCap Q-650Mは、選択性はSuperQタイプの充填剤とは少し異なりますが、非常に高い吸着量を示します。

TSKgel SuperQ-5PWは、他社製品と比べて高い吸着量を示し、試料負荷量が多い条件下でも高い分離能が維持されます。

図2にTSKgel SuperQ-5PW (20)と他社製品のオリゴヌクレオチド分離の試料負荷量依存性比較データを示します。オリゴヌクレオチドの試料負荷量が、0.2 g/L充填剤の場合は、粒子径の小さい他社製品のほうが高い分離能を示しますが、試料負荷量が4 g/L充填剤になると、他社充填剤では、分離能が著しく低下しています。TSKgel SuperQ-5PW (20)は、オリゴヌクレオチドの試料負荷量が多い場合でも、優れた分離能を示します。

表5 各IEC充填剤の特性

オリゴヌクレオチド精製用IEC充填剤 (Q-タイプ)				
	平均粒子径 (μm)	吸着量	分離能	イオン交換基導入法
TSKgel SuperQ-5PW (20)	20	++	+++++	タイプA
TSKgel SuperQ-5PW (30)	30	++	++++	タイプA
TOYOPEARL SuperQ-650S	35	++++	+++	タイプA
TOYOPEARL SuperQ-650M	65	++++	++	タイプA
TOYOPEARL SuperQ-650C	100	++++	+	タイプA
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	75	+++++	++	タイプB
TOYOPEARL GigaCap Q-650S	35	+++++	+++	タイプB

ペプチド精製用IEC充填剤 (S、SP-タイプ)				
	平均粒子径 (μm)	吸着量	分離能	イオン交換基導入法
TSKgel SP-5PW (20)	20	++	+++++	伝統法
TSKgel SP-5PW (30)	30	++	++++	伝統法
TSKgel SP-3PW (30)	30	+++	++++	伝統法
TOYOPEARL SP-650S	35	++++	+++	伝統法
TOYOPEARL SP-650M	65	++++	++	伝統法
TOYOPEARL SP-650C	100	++++	+	伝統法
TOYOPEARL GigaCap S-650M	75	+++++	++	タイプB
TOYOPEARL GigaCap S-650S	35	+++++	+++	タイプB

## ペプチドの精製

陽イオン交換クロマトグラフィーは、ペプチド精製に広く使用されています。表5に陽イオン交換基としてSPタイプを導入したTOYOPEARLとTSKgel PWタイプの充填剤を示します。必要な吸着量と分離能に基づいて適切なSPタイプの充填剤を選択します。

## イオン交換基の導入法

表5に示すように、三世代のイオン交換基の導入法があります。“伝統”法または、第一世代のイオン交換基の導入法は、基材表面へ直接イオン交換基をスパーサーとともに導入するものです。第一世代のTOYOPEARL及びTSKgel PWタイプのイオン交換体には以下の充填剤があります。

- TOYOPEARL SP-650
- TOYOPEARL SP-550
- TSKgel SP-5PW
- TOYOPEARL CM-650
- TOYOPEARL Q-550C
- TOYOPEARL DEAE-650
- TSKgel DEAE-5PW
- TOYOPEARL MegaCap II SP-550EC

第二世代のイオン交換基導入法(表5、タイプA)は、基材表面でイオン交換基とスパーサーをネットワーク化し、吸着表面を増加させたばく質吸着量を増やすものです。以下の2種類の充填剤が該当します。

- TOYOPEARL SuperQ-650
- TSKgel SuperQ-5PW

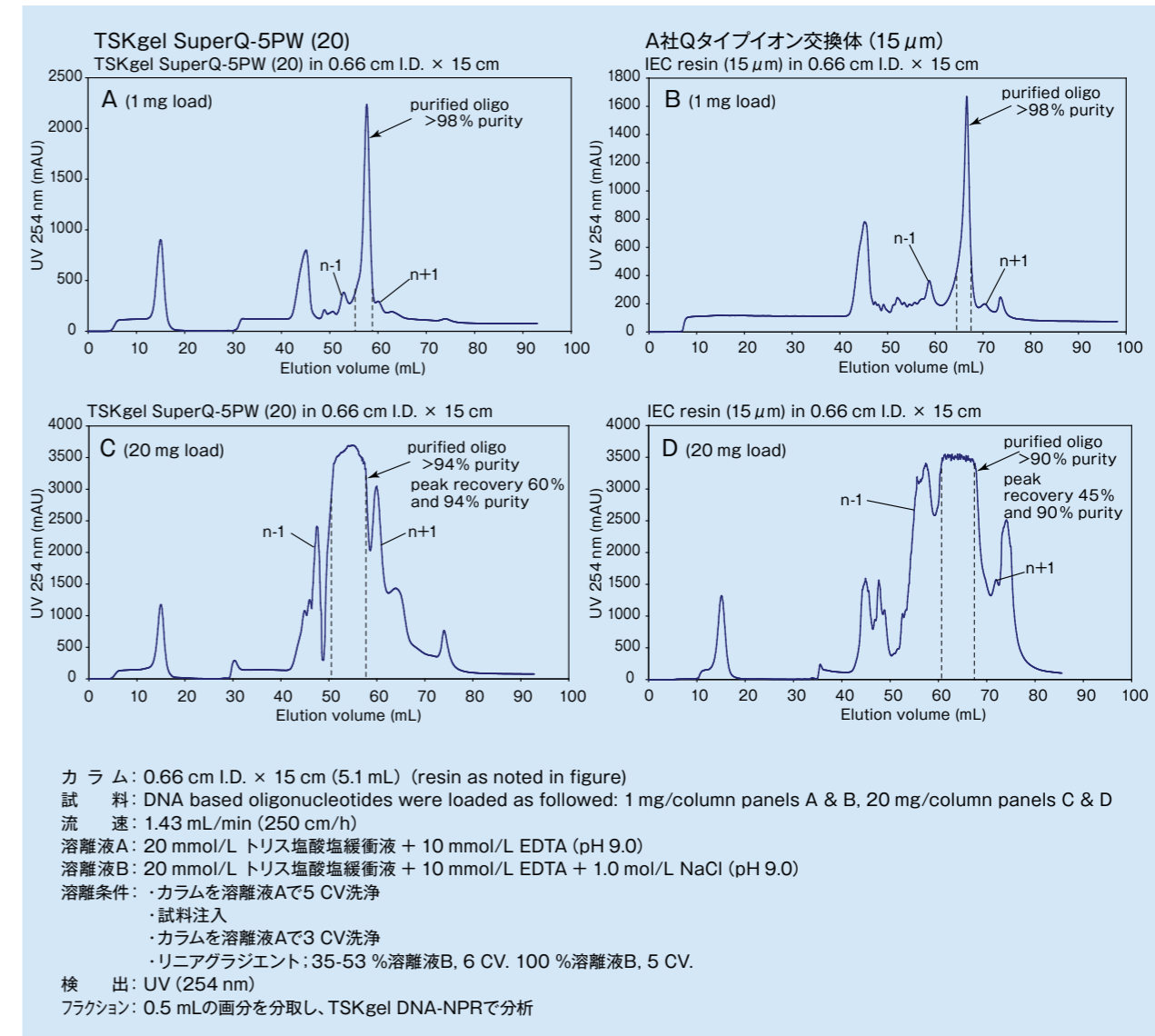


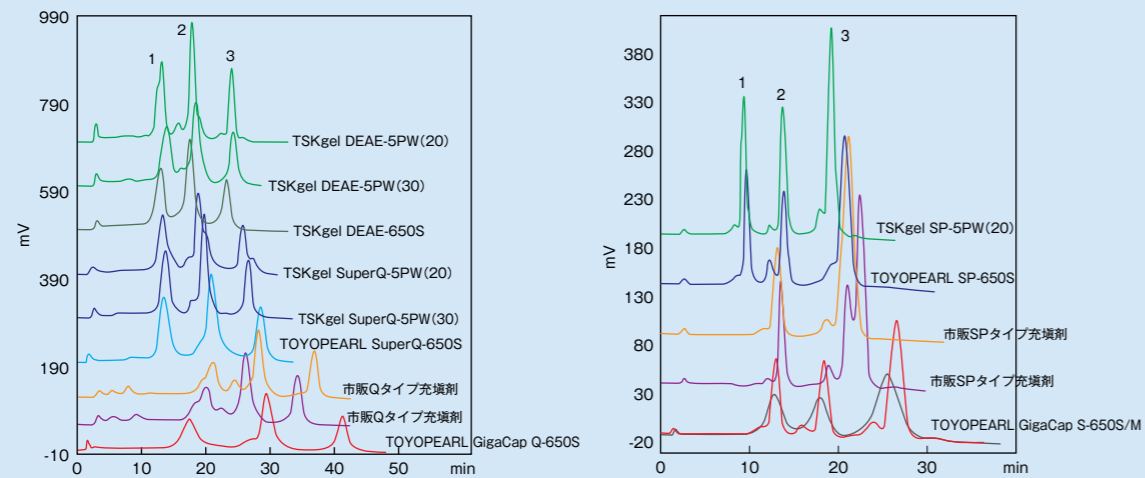
図2 TSKgel SuperQ-5PW (20)を用いたオリゴヌクレオチドの分離(高試料負荷量でも高分離能を維持)

第三世代のイオン交換基導入法(表5、タイプB)は、イオン交換基の吸着場(部位)を向上させたものです。このタイプは、大きな細孔径の内部で、たんぱく質が吸着できる空間にイオン交換基を立体的に化学結合させたものです。この構造により、吸着量が著しく増加し、かつ細孔内部での物質移動も向上しました。物質移動を向上させることで、目的物質の溶出容量を減少することができます(図8)。全てのTOYOPEARL GigaCapシリーズはこのタイプBのイオン交換基導入法に相当します。

- TOYOPEARL GigaCap S-650
- TOYOPEARL GigaCap CM-650
- TOYOPEARL Sulfate-650F
- TOYOPEARL GigaCap Q-650
- TOYOPEARL GigaCap DEAE-650
- TOYOPEARL Q-600C AR
- TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F



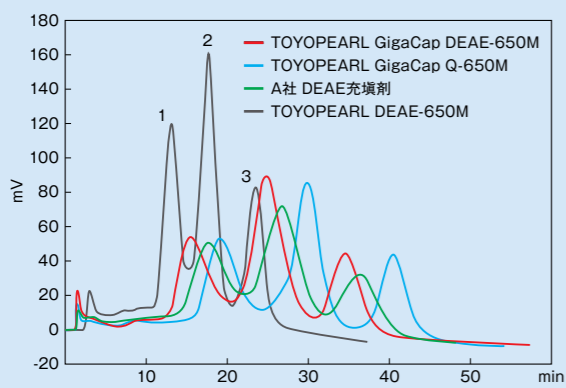
# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)



カラム: 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 溶離液 A: 50 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.5)  
 溶離液 B: 50 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 + 1.0 mol/L NaCl (pH 8.5)  
 グラジエント: 溶離液 A → B 120 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出: UV (280 nm)  
 試料: 1. トランスフェリン (2.9 g/L)  
 2. オブアルブミン (6.5 g/L)  
 3. トリプシンインヒビター (10.0 g/L)  
 注入量: 100 μL

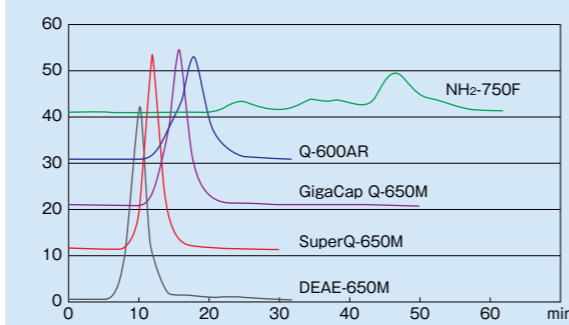
カラム: 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 溶離液 A: 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)  
 溶離液 B: 20 mmol/L リン酸塩緩衝液 + 1.0 mol/L NaCl (pH 7.0)  
 グラジエント: 溶離液 A → B 60 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出: UV (280 nm)  
 試料: 1. リボヌクレアーゼ A (9.8 g/L)  
 2. チトクロム C (3.6 g/L)  
 3. リゾチーム (6.4 g/L)  
 注入量: 20 μL

図3 微粒子イオン交換体の分離選択性の比較



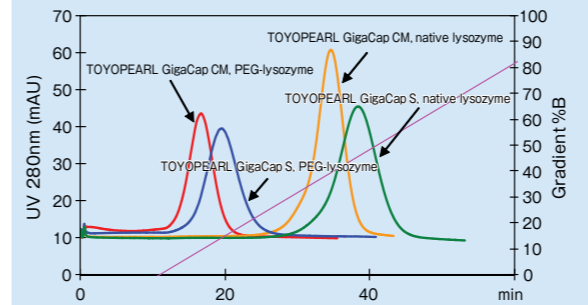
カラム: 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 溶離液 A: 50 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.5)  
 溶離液 B: 50 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 + 1.0 mol/L NaCl (pH 8.5)  
 グラジエント: A → B 120 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出: UV (280 nm)  
 注入量: 25 μL  
 試料: トランスフェリン (2.9 g/L)  
 オブアルブミン (6.5 g/L)  
 トリプシンインヒビター (10.0 g/L)

図4 分離選択性の比較



カラム: 5 mm I.D. × 5 cm  
 溶離液 A: 20 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.0)  
 溶離液 B: 溶離液 A + 2.0 mol/L NaCl (pH 8.0)  
 グラジエント: 溶離液 A → B 120 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出: UV (280 nm)  
 試料: BSA 1 mg

図5 各種イオン交換体におけるBSAの分離挙動



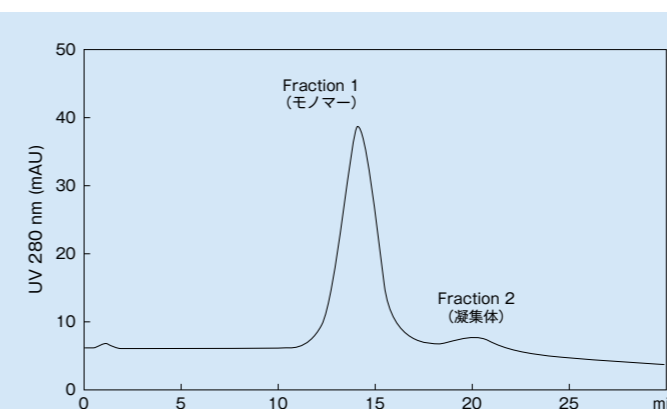
カラム: 6 mm I.D. × 4 cm  
 溶離液 A: 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)  
 溶離液 B: 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0), 0.5 mol/L NaCl  
 グラジエント:  
 TOYOPEARL GigaCap S-650M TOYOPEARL GigaCap CM-650M  
 10minute 100% 溶離液 A 10minute 100% 溶離液 A  
 60minutes 0%B-100%B 60minutes 0%B to 50%B  
 流速: 1 mL/min  
 試料: ネイティブリゾチーム 5 g/L,  
 mono-PEG化リゾチーム 5 g/L

図6 ネイティブたんぱく質とPEG化たんぱく質の分離選択性比較

表6 たんぱく質の大きさとの動的吸着量 (DBC) の関係

充填剤	細孔径 (nm)	吸着量 (g/L)		
		BSA 66 kDa	human IgG 160 kDa	Thyroglobulin 660 kDa
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	100	173	104	71
TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	100	170	103	—
TOYOPEARL SuperQ-650M	100	145	13	3
TOYOPEARL Q-600C AR	75	108	90	26
TOYOPEARL QAE-550C	50	29	32	6
TOYOPEARL DEAE-650M	100	25	31	3

カラム: 6 mm I.D. × 4 cm  
 試料濃度: 1 g/L  
 吸着溶離液:  
 BSA 0.05 mol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.5)  
 Human IgG 0.05 mol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.7) + 0.015 mol/L NaCl  
 Thyroglobulin 0.05 mol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.7) + 0.15 mol/L NaCl  
 溶出溶離液: 吸着溶離液 + 1.0 mol/L NaCl  
 流速: 1.0 mL/min (212 cm/h)  
 検出: UV (280 nm)



カラム: 5 mm I.D. × 5 cm  
 溶離液 A: 20 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.0)  
 溶離液 B: 溶離液 A + 1 mol/L NaCl  
 グラジエント: 溶離液 A → B 60 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min  
 検出: UV (280 nm)  
 試料: Mab (IgG<sub>1</sub>, 0.5 mg)

Fraction 2の凝集体はほとんどが2量体。

図7 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750Fによるモノクローナル抗体 (IgG<sub>1</sub>) の凝集体の分離

# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

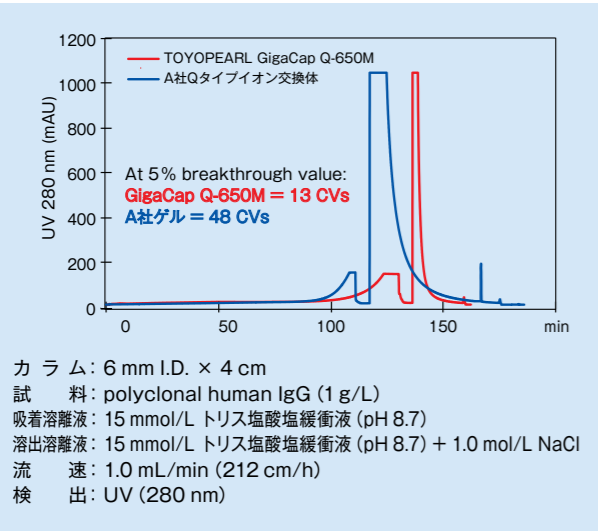


図8 TOYOPEARL GigaCap Q-650Mと他社イオン交換体との吸着物(抗体)の溶出容量比較

表7 TOYOPEARL GigaCapシリーズのアルカリ耐久性

充填剤	保存溶液	試料	吸着量測定法	開始時吸着量	1週間後	2週間後	3週間後
TOYOPEARL GigaCap S-650M	1.0 mol/L NaOH	hIgG	Dynamic	143 (g/L)	144	140	135
TOYOPEARL GigaCap CM-650M	0.5 mol/L NaOH	hIgG	Dynamic	99 (g/L)	88	90	91
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	0.5 mol/L NaOH	BSA	Static	166 (g/L)	NA	153*	136

\*12日

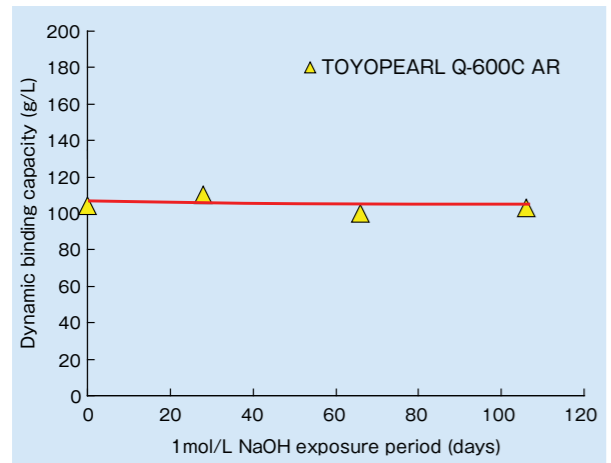


図9 TOYOPEARL Q-600C ARのアルカリ耐久性と動的吸着量

図8にTOYOPEARL GigaCap Q-650Mと他社同等品のブレイクスルーカーブの比較図を示します。図は、10%のブレイクスルーまでの吸着と、溶出のクロマトグラムを示しています。TOYOPEARL GigaCap充填剤では、他社品に比べ、溶出画分の容量が著しく少なく、高濃度での回収が可能となります。

## アルカリ耐久性

高吸着量タイプの充填剤は、目的物質だけでなく不純物や異性体も、より多く吸着します。場合によっては、0.5 mol/Lや、1.0 mol/L NaOH等のアルカリ溶液による充填剤の洗浄・再生が必要となります。したがって、充填剤には、高いアルカリ耐久性が要求されます。

## TOYOPEARL Q-600C AR

TOYOPEARL Q-600C ARは、高いアルカリ安定性を示します。またTOYOPEARL GigaCap Q-650Mよりは、やや小さい細孔径を持ち、BSAの吸着量は100 g/Lです。図9に示すように、1 mol/L NaOH溶液で100日間保存しても、動的吸着量は変化しません。

## TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750Fは、TOYOPEARL HW-75に第1級アミノ基を導入した陰イオン交換体で、以下のようなユニークな特性を示します。

## 塩耐性(salt tolerant)

試料溶液や吸着溶液の塩濃度が高い状態でも吸着分離が可能な塩耐性を示します。例えば、0.15 mol/L NaClを含んだ試料に対してpHに関わらず、高い吸着量が維持されます(表8)。塩濃度が高い試料溶液でも、希釈、脱塩といった操作を行うことなく、そのまま負荷することが可能です。

表8 動的吸着量の比較

吸着溶液	BSAの動的吸着量 (g/L)	
	TOYOPEARL Q-600C AR	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F*
20mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.0)	90	65
20mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.0) + 0.15 mol/L NaCl	27	46
20mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 7.5) + 0.15 mol/L NaCl	16	42
20mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 6.0) + 0.15 mol/L NaCl	11	38

\*滞留時間：1分  
\*吸着溶液のNaCl濃度が0.15 mol/L以下の場合、BSAの吸着量が減ることがあります。

## 強い保持力

通常の陰イオン交換体に比較して、選択性が異なり、極めて強い保持力を示します(図10)。従来の陰イオン交換体では保持、分離できなかった試料を効率良く精製できます。

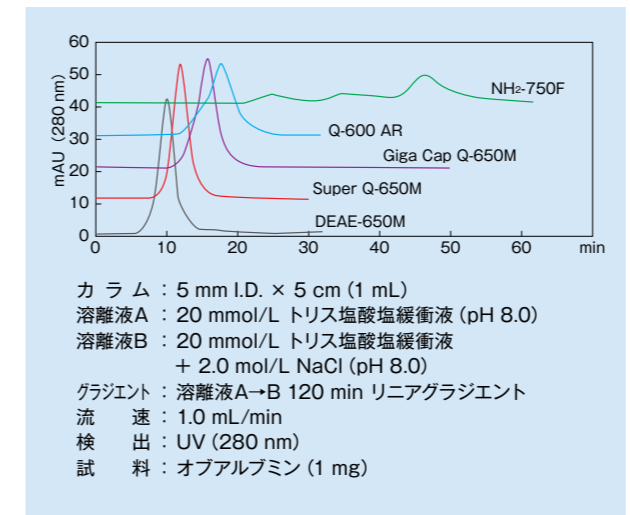


図10 たんぱく質の溶出挙動

## 優れた凝集体分離

抗体等たんぱく質の凝集体分離に優れます(図11)。バイオ医薬品の精製工程において凝集体の除去は重要です。例えば抗体医薬品精製であれば、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750FをプロテインAの後ステップに使用することで、凝集体を効率的に除去することが可能です。

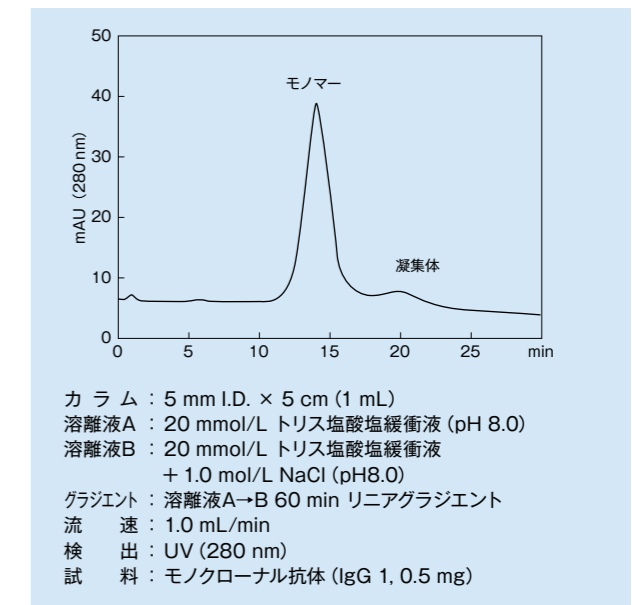


図11 モノクローナル抗体の凝集体の分離

# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

## TOYOPEARL Sulfate-650F

TOYOPEARL Sulfate-650Fは、硫酸エステル基を持つ高吸着量型の陽イオン交換体です。抗体凝集体の分離能に優れ、プロテインAの後ステップとしても有効です(図12)。さらにヘパリンAF充填剤に似た挙動を示し、血液凝固因子等への適用が可能です。図13はアンチトロンビンIII保持挙動の比較を示したものです。測定を行った条件では、通常の陽イオン交換体では全く保持されないのに対し、TOYOPEARL Sulfate-650Fでは保持することが確認されています。

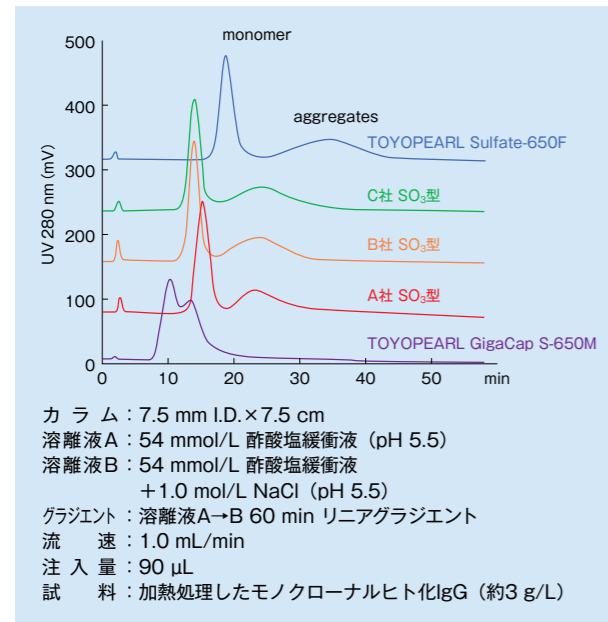


図12 抗体凝集体分離

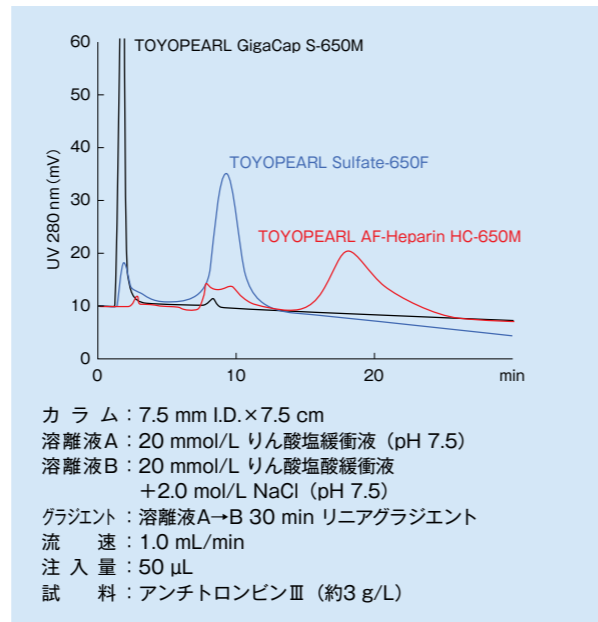


図13 アンチトロンビンIII保持特性

## 製品一覧表

### 陰イオン交換体

#### TOYOPEARL IEC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	イオン交換容量 (eq/L)	たんぱく質吸着量 (BSA, g/L)
0022882	TOYOPEARL GigaCap Q-650S	250	20 - 50	0.14 - 0.24	≥ 170
0022883		1,000			
0022884		5,000			
0021855	TOYOPEARL GigaCap Q-650M	250	50 - 100	0.10 - 0.20	≥ 162
0021856		1,000			
0021857		5,000			
0022866	TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	250	50 - 100	0.15 - 0.25	≥ 156
0022867		1,000			
0022868		5,000			
0017223	TOYOPEARL SuperQ-650S	250	20 - 50	0.20 - 0.30	105 - 155
0017224		1,000			
0017225		5,000			
0017227	TOYOPEARL SuperQ-650M	250	40 - 90	0.20 - 0.30	105 - 155
0017228		1,000			
0017229		5,000			
0017231	TOYOPEARL SuperQ-650C	250	50 - 150	0.20 - 0.30	105 - 155
0017232		1,000			
0017233		5,000			
0007472	TOYOPEARL DEAE-650S	250	20 - 50	0.08 - 0.12	25 - 35
0014692		1,000			
0007973		5,000			
0007473	TOYOPEARL DEAE-650M	250	40 - 90	0.08 - 0.12	25 - 35
0014693		1,000			
0007974		5,000			
0007988	TOYOPEARL DEAE-650C	250	50 - 150	0.05 - 0.11	25 - 35
0014694		1,000			
0007989		5,000			
0021986	TOYOPEARL Q-600C AR	250	50 - 150	0.14 - 0.23	≥ 120
0021987		1,000			
0021988		5,000			
0014026	TOYOPEARL QAE-550C	250	50 - 150	0.28 - 0.38	60 - 80
0014704		1,000			
0014027		5,000			
0023439	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	250	30 - 60	0.07-0.13	≥ 70 (ヒト免疫グロブリンG)
0023440		1,000			
0023441		5,000			

### 陰イオン交換体

#### TSKgel IEC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	イオン交換容量 (eq/L)	たんぱく質吸着量 (BSA, g/L)
0043383	TSKgel SuperQ-5PW (20)	25	15 - 25	0.12 - 0.18	52 - 88
0018535		250			
0018546		1,000			
0018547		5,000			
0043283	TSKgel SuperQ-5PW (30)	25	20 - 40	0.12 - 0.18	52 - 88
0018536		250			
0018548		1,000			
0018549		5,000			
0043381	TSKgel DEAE-5PW (20)	25	15 - 25	0.05 - 0.11	25 - 45
0014710		250			
0014711		1,000			
0018436		5,000			
0043281	TSKgel DEAE-5PW (30)	25	20 - 40	0.05 - 0.11	20 - 40
0014712		250			
0014713		1,000			
0018370		5,000			



# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

## 製品一覧表

### 陽イオン交換体

#### TOYOPEARL IEC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	イオン交換容量 (eq/L)	たんぱく質吸着量 (リゾチーム, g/L)
0022876	TOYOPEARL GigaCap S-650S	250	20 - 50	0.15 - 0.25	≥ 150 (ヒト免疫グロブリン)
0022877		1,000			
0022878		5,000			
0021834	TOYOPEARL GigaCap S-650M	250	50 - 100	0.10 - 0.20	136 - 176 (ヒト免疫グロブリン)
0021835		1,000			
0021836		5,000			
0021947	TOYOPEARL GigaCap CM-650M	250	50 - 100	0.17 - 0.28	≥ 110 (ヒト免疫グロブリン)
0021948		1,000			
0021949		5,000			
0008437	TOYOPEARL SP-650S	250	20 - 50	0.13 - 0.17	40 - 60
0014698		1,000			
0008438		5,000			
0007997	TOYOPEARL SP-650M	250	40 - 90	0.13 - 0.17	40 - 60
0014699		1,000			
0007998		5,000			
0007994	TOYOPEARL SP-650C	250	50 - 150	0.12 - 0.18	35 - 55
0014700		1,000			
0007995		5,000			
0007474	TOYOPEARL CM-650S	250	20 - 50	0.08 - 0.12	30 - 50
0014695		1,000			
0007971		5,000			
0007475	TOYOPEARL CM-650M	250	40 - 90	0.08 - 0.12	30 - 50
0014696		1,000			
0007972		5,000			
0007991	TOYOPEARL CM-650C	250	50 - 150	0.05 - 0.11	24 - 45
0014697		1,000			
0007992		5,000			
0014028	TOYOPEARL SP-550C	250	50 - 150	0.14 - 0.18	80 - 120
0014705		1,000			
0014029		5,000			
0021805	TOYOPEARL MegaCap II SP-550EC	250	100 - 300	0.10 - 0.20	100 - 155 (インスリン)
0021806		1,000			
0021807		5,000			
0023468	TOYOPEARL Sulfate-650F	250	30 - 60	≥ 0.53	≥ 114 (ヒト免疫グロブリン)
0023469		1,000			
0023470		5,000			

### 陽イオン交換体

#### TSKgel IEC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	イオン交換容量 (eq/L)	たんぱく質吸着量 (リゾチーム, g/L)
0043382	TSKgel SP-5PW (20)	25	15 - 25	0.06 - 0.12	20 - 40
0014714		250			
0014715		1,000			
0018435		5,000			
0043282	TSKgel SP-5PW (30)	25	20 - 40	0.06 - 0.12	20 - 40
0014716		250			
0014717		1,000			
0018384		5,000			
0021976	TSKgel SP-3PW (30)	25	20 - 40	0.07 - 0.22	≥ 65 (インスリン)
0021977		250			
0021978		1,000			
0021979		5,000			

\* 価格につきましては、「TSKgel / TOYOPEARL 総合カタログ」をご覧ください。

\* 容量が1,000 mL、5,000 mLの製品の価格につきましては、当社営業までお問い合わせください。

## 製品一覧表

### ToyoScreen IECカラム (プロセス開発用、スクリーニング用)

品番	品名	内容
0021859	ToyoScreen GigaCap Q-650M	GigaCap Q-650M 1 mLタイプ6本
0021860		GigaCap Q-650M 5 mLタイプ6本
0022872	ToyoScreen GigaCap DEAE-650M	GigaCap DEAE-650M 1 mLタイプ6本
0022873		GigaCap DEAE-650M 5 mLタイプ6本
0021362	ToyoScreen SuperQ-650M	SuperQ-650M 1 mLタイプ6本
0021363		SuperQ-650M 5 mLタイプ6本
0021360	ToyoScreen DEAE-650M	DEAE-650M 1 mLタイプ6本
0021361		DEAE-650M 5 mLタイプ6本
0021992	ToyoScreen Q-600C AR	Q-600C AR 1 mLタイプ6本
0021993		Q-600C AR 5 mLタイプ6本
0021364	ToyoScreen QAE-550C	QAE-550C 1 mLタイプ6本
0021365		QAE-550C 5 mLタイプ6本
0023443	ToyoScreen NH <sub>2</sub> -750F	NH <sub>2</sub> -750F 1 mLタイプ6本
0023444		NH <sub>2</sub> -750F 5 mLタイプ6本
0021868	ToyoScreen GigaCap S-650M	GigaCap S-650M 1 mLタイプ6本
0021869		GigaCap S-650M 5 mLタイプ6本
0021951	ToyoScreen GigaCap CM-650M	GigaCap CM-650M 1 mLタイプ6本
0021952		GigaCap CM-650M 5 mLタイプ6本
0021368	ToyoScreen SP-650M	SP-650M 1 mLタイプ6本
0021369		SP-650M 5 mLタイプ6本
0021366	ToyoScreen CM-650M	CM-650M 1 mLタイプ6本
0021367		CM-650M 5 mLタイプ6本
0021370	ToyoScreen SP-550C	SP-550C 1 mLタイプ6本
0021371		SP-550C 5 mLタイプ6本
0021870	ToyoScreen MegaCap II SP-550EC	MegaCap II SP-550EC 1 mLタイプ6本
0021871		MegaCap II SP-550EC 5 mLタイプ6本
0023472	ToyoScreen Sulfate-650F	Sulfate-650F 1 mLタイプ6本
0023473		Sulfate-650F 5 mLタイプ6本
0021396	ToyoScreen IEC	GigaCap Q-650M、GigaCap S-650M、GigaCap CM-650M、SuperQ-650M、Q-600C AR、SP-550C 1 mLタイプ各1本
0021397		GigaCap Q-650M、GigaCap S-650M、GigaCap CM-650M、SuperQ-650M、Q-600C AR、SP-550C 5 mLタイプ各1本
0021392	ToyoScreen A-IEC	GigaCap Q-650M、DEAE-650M、SuperQ-650M、Q-600C AR、QAE-550C 1 mLタイプ各1本
0021393		GigaCap Q-650M、DEAE-650M、SuperQ-650M、Q-600C AR、QAE-550C 5 mLタイプ各1本
0021394	ToyoScreen C-IEC	GigaCap S-650M、GigaCap CM-650M、CM-650M、SP-650M、SP-550C 1 mLタイプ各1本
0021395		GigaCap S-650M、GigaCap CM-650M、CM-650M、SP-650M、SP-550C 5 mLタイプ各1本

\* ToyoScreenをご使用の際には、品番0021400 ToyoScreen Holderが必要になります。

### ToyoScreenカラムホルダ、コネクタ

品番	品名	内容
0021400	ToyoScreen Holder	1 mL、5 mLカラム共通
0020028	T-Fユニオン	FPLC® 用コネクタ

\* 「FPLC」はGEヘルスケア・ジャパン社の登録商標です。

# イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

## 製品一覧表

### MiniChrom

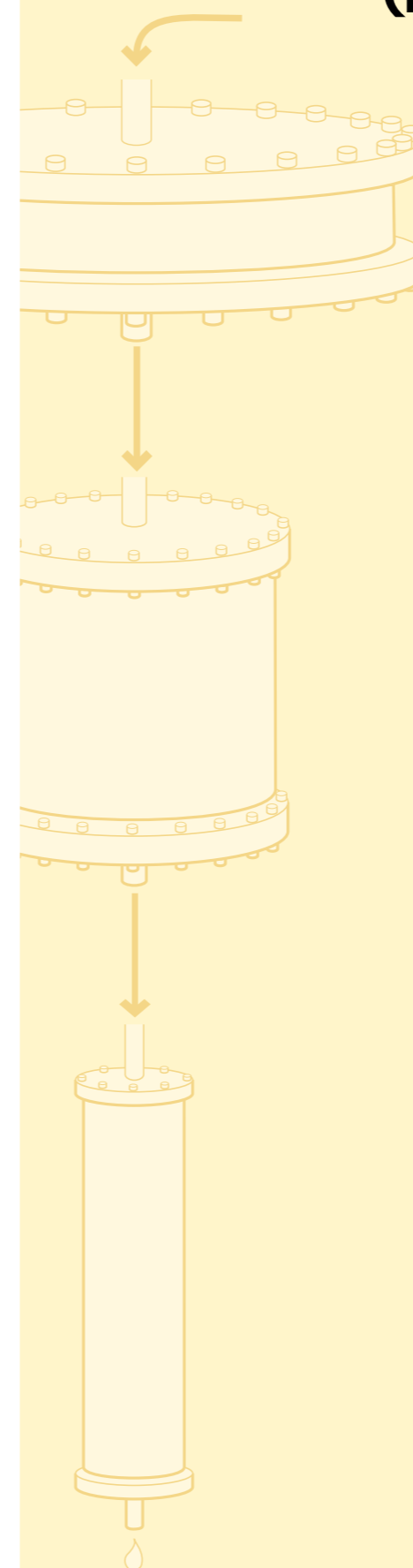
品番	品名	カラム容量 (mL)	粒子径 (μm)
0045101	TOYOPEARL GigaCap S-650M	5	50 - 100
0045102	TOYOPEARL GigaCap S-650S	5	20 - 50
0045103	TOYOPEARL GigaCap CM-650M	5	50 - 100
0045104	TOYOPEARL GigaCap Q-650M	5	50 - 100
0045105	TOYOPEARL GigaCap Q-650S	5	20 - 50
0045106	TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	5	50 - 100
0045107	TSKgel SuperQ-5PW (20)	5	15 - 25
0045108	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	5	30 - 60
0045117	TOYOPEARL Sulfate-650F	5	30 - 60

### RoboColumn

品番	品名	容量 (μL)	粒子径 (μm)
0045001	TOYOPEARL GigaCap S-650M	200 × 8	50 - 100
0045002	TOYOPEARL GigaCap S-650M	600 × 8	50 - 100
0045003	TOYOPEARL GigaCap Q-650M	200 × 8	50 - 100
0045004	TOYOPEARL GigaCap Q-650M	600 × 8	50 - 100
0045005	TOYOPEARL GigaCap CM-650M	200 × 8	50 - 100
0045006	TOYOPEARL GigaCap CM-650M	600 × 8	50 - 100
0045007	TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	200 × 8	50 - 100
0045008	TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	600 × 8	50 - 100
0045011	TOYOPEARL Q-600C AR	200 × 8	50 - 150
0045012	TOYOPEARL Q-600C AR	600 × 8	50 - 150
0045021	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	200 × 8	30 - 60
0045022	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	600 × 8	30 - 60
0045027	TOYOPEARL Sulfate-650F	200 × 8	30 - 60
0045028	TOYOPEARL Sulfate-650F	600 × 8	30 - 60

\* MiniChrom、RoboColumnの他グレード製品につきましては、当社営業までお問い合わせください。

## 疎水クロマトグラフィー (HIC)



粒子径

100 μm

65 μm

35 μm

30 μm

20 μm

HIC充填剤 (疎水ゲル)

TOYOPEARL SuperButyl-550C  
TOYOPEARL Hexyl-650C  
TOYOPEARL Butyl-650C  
TOYOPEARL Phenyl-650C

TOYOPEARL Butyl-600M  
TOYOPEARL Phenyl-600M  
TOYOPEARL PPG-600M

TOYOPEARL Butyl-650M  
TOYOPEARL Phenyl-650M  
TOYOPEARL Ether-650M

TOYOPEARL Butyl-650S  
TOYOPEARL Phenyl-650S  
TOYOPEARL Ether-650S

TSKgel Phenyl-5PW (30)  
TSKgel Ether-5PW (30)

TSKgel Phenyl-5PW (20)  
TSKgel Ether-5PW (20)



# 疎水クロマトグラフィー (HIC)

## 疎水クロマトグラフィー用TOYOPEARL充填剤

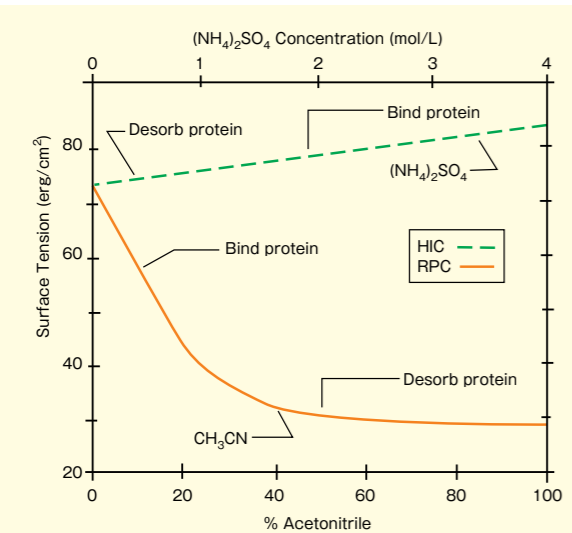
疎水クロマトグラフィー (HIC) は生体分子を分離精製するための有効な分離モードです。このモードはたんぱく質表面に存在する疎水性領域と、弱い疎水性を持つ充填剤固定相との相互作用を利用します。HICはイオン交換とサイズ排除クロマトグラフィーを補完する優れた方法で、特にたんぱく質の異性体が存在する場合や粗試料中の不純物が、類似の等電点や類似の分子量を持つ場合などの分離に効果を発揮します。アフィニティーリガンドと類似の結合サイトを持つたんぱく質を、アフィニティークロマトグラフィーにより分離した後にHICを用いて疎水性の違いで分離するといった方法も考えられます。

## HICはどのように作用するか？

疎水性表面を持つたんぱく質やその他の分子は、HIC充填剤の疎水性領域に吸着されます。

HICにおけるたんぱく質の充填剤への結合は塩濃度の高い水溶液中で起こります。塩析効果により疎水性リガンドへのたんぱく質が結合します。したがって、HICでは塩濃度を下げることによってたんぱく質の溶出が起こります。目的とするバイオ医薬品は低塩濃度または塩を含まない緩衝液で溶出することになります。

逆相クロマトグラフィー (RPC) とHICの溶出法を比較すると、HIC分離の吸着エネルギーの方がRPC分離のそれよりも低い値を示します。この2つの分離モードの相対的な結合エネルギーを比較するものとして、分離における吸着条件と溶出条件の表面張力を測定する手段があります。HICとRPCの溶出における表面張力を比較した例を図1に示します。HICは(表面張力の変化が小さく)温和な溶離条件で分離を行うため、ほとんどの場合、試料の生理活性も保持されます。



C. Horvath et al., Separation Processes in Biotechnology, (J. Asenjo, Ed.) 9, 447 (1990) Marcel Dekker

図1 HICとRPCに用いられる水溶性溶離液の表面張力

## 異なる5種類の疎水性リガンドが示す選択性

HIC充填剤にはそれぞれが程度の異なる疎水性と選択性を示す5種類のリガンドがあります。TOYOPEARL HIC充填剤では次の順に疎水性が高くなります: Ether < PPG (ポリプロピレングリコール) < Phenyl < Butyl < Hexyl (図2参照)。

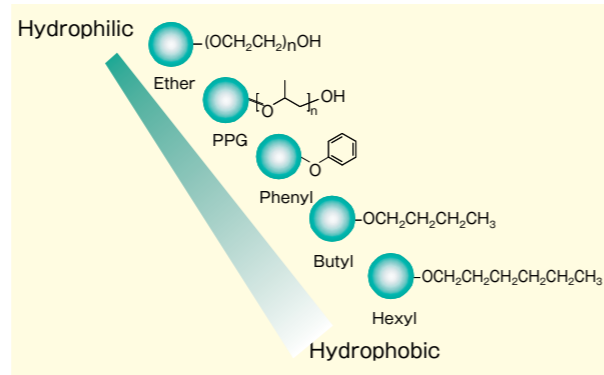


図2 HICリガンドの構造

## たんぱく質の回収率

目的とするバイオ医薬品の疎水性と充填剤の疎水性とを適合させることが、高い精製効率を得るために非常に重要です。たんぱく質に対して疎水性が強すぎる充填剤を使用するとたんぱく質が不可逆的に充填剤に結合したり、酵素活性を失う原因になります。TOYOPEARL HIC充填剤の標準的な質量回収率と生理活性回収率を表1と表2に示します。

HIC工程を最適化するためには、高い動的吸着量と適切な分離選択性、良好な質量回収率と生理活性回収率のバランスをうまくとることが重要です。

TOYOPEARL Hexyl-650及びButyl-650/550は強い吸着力を持つことから、親水性の高いたんぱく質の分離に使用されます。この2種類の充填剤は、塩濃度の低い条件での分離にも使用することができます。

TOYOPEARL PPG-600、Butyl-600、Phenyl-600は特に抗体の分離に適し、高い吸着量を示します。また中程度の疎水性を示すたんぱく質分離用充填剤です。

TOYOPEARL Ether-650充填剤は、非常に疎水性の高い抗体や膜たんぱく質のような目的物質を精製するために使用されます。

## スクリーニング用カラムToyoScreen

TOYOPEARL HICの全てのグレードで、充填剤量1 mLと5 mLのカラムが用意されています。目的物質の吸着・選択性と回収に適した充填剤をスクリーニングするために簡便にご使用いただけるカラムです。複数のカラムを直列接続することにより更に複雑な分離を行うことも可能です。

ToyoScreenを使用して標準たんぱく質のTOYOPEARL HIC充填剤に対する吸着特性と選択性を調べた結果を図3に示します。

## 塩の種類が及ぼす影響

HIC分離の選択性は、リガンドの疎水性に加え、溶離液に用いる塩の種類によっても影響を受けます。異なるたんぱく質の分離能に及ぼす塩の影響を図4に示します。

## 二塩混合溶液での動的吸着量

疎水クロマトグラフィーにおける吸着溶液において用いられる塩を1種類から2種類の異なる性質の塩を混合することにより、疎水ゲルの動的吸着量を改善することが可能です(表3)。疎水クロマトグラフィーの塩として一般的に用いられている硫酸アンモニウム(硫酸)のほかにも塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、グリシンなどを混合することにより、疎水ゲルの動的吸着量を20%ないし50%改善できる場合があります\*)。

\*) A. M. Senczuk et al., *Hydrophobic Interaction Chromatography in Dual Salt System Increases Protein Binding Capacity*, Biotechnology and Bioengineering, 103(2009)930

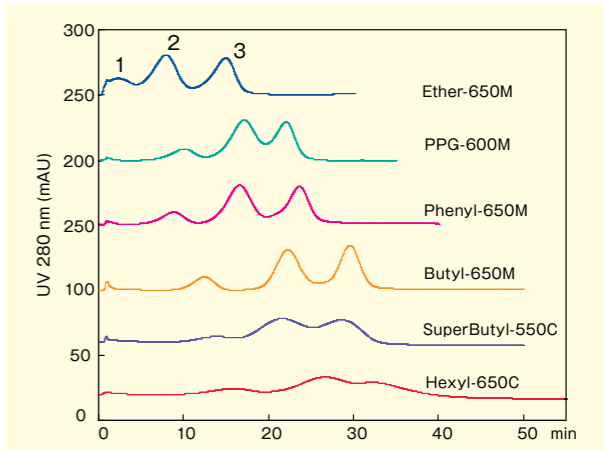
表1 たんぱく質の回収率(%)

	TOYOPEARL HIC 充填剤		
	Ether -650M	Phenyl -650M	Butyl -650M
Bovine serum albumin	84	62	76*
$\alpha$ -Chymotrypsinogen A	96	88*	90
Cytochrome c	—	81*	87*
IgG	91	—	—
$\alpha$ -Lactalbumin	90	—	—
Lysozyme	94	92	85
Ovalbumin	83	88	73
Ribonuclease A	—	72*	82*

Procedure: A 200 mL sample containing 200 mg of protein was loaded onto a 7.5 mm I.D. x 7.5 cm column and eluted with a 60 minute gradient of 1.8 mol/L (\*1.5 mol/L) to 0.0 mol/L ammonium sulfate in 0.1 mol/L sodium phosphate (pH 7.0). The mass recovery was determined spectrophotometrically at UV 280 nm and 25 °C.

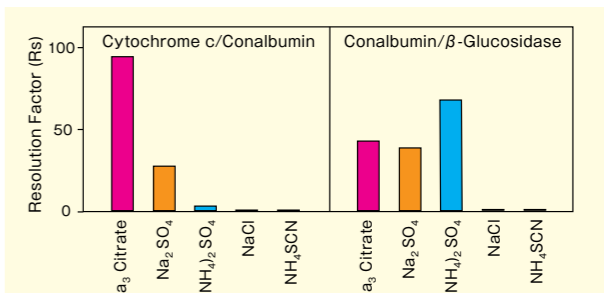
表2 たんぱく質の酵素活性回収率

TOYOPEARL HIC 充填剤	たんぱく質	活性回収率 (%)
Phenyl-650	Phytochrome	79
Butyl-650	Halophilic protease	85
Butyl-650	Poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase	88
Butyl-650	Aculeacin-A acylase	82
Butyl-650	Opine dehydrogenase	81



カラム: ToyoScreen (1 mL)  
 溶離液A: 0.1 mol/L リン酸緩衝液 + 1.8 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.0)  
 溶離液B: 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント: 溶離液A → B 30 min リニアグラジエント  
 流速: 1 mL/min 検出: UV (280 nm)  
 試料: 1.リボヌクレアーゼA、2.リゾチーム、3. $\alpha$ -キモトリプシノーゲンA、1 g/L  
 注入量: 50  $\mu$ L

図3 TOYOPEARL HIC充填剤のスクリーニング (標準たんぱく質の分離)



カラム: TOYOPEARL Butyl-650 4.1 mm I.D. x 4 cm  
 溶離液A: 20 mmol/L リン酸緩衝液 + 1 mmol/Lの上記各塩 (pH 7.0)  
 溶離液B: 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント: 溶離液A → B 20 min リニアグラジエント  
 流速: 1 mL/min 検出: UV (280 nm)

J. Fausnaugh, L. Kennedy and F. Regnier, J. Chromatography 317, 141 (1984)

図4 分離能における塩の種類の影響

表3 二塩混合溶液でのモノクローナル抗体の動的吸着量の比較

吸着溶液	動的吸着量 (IgG <sub>1</sub> , g/L)			
	Ether-650M	PPG-600M	Phenyl-600M	Butyl-600M
1 mol/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (135 mS/cm)	0.9	23.1	20.9	10.2
1.3 mol/L NaCl + 0.4 mol/L クエン酸ナトリウム (118 mS/cm)	0	22.9	16.7	11.1
1.2 mol/L Glycine + 0.6 mmol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (65 mS/cm)	0	18.9	19.8	16
1.7 mol/L NaCl + 0.7 mol/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (185 mS/cm)	0	29.2	25.1	15.3
1.4 mol/L Glycine + 0.8 mol/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (100 mS/cm)	0	26.2	19.1	16.6



# 疎水クロマトグラフィー (HIC)

図5に示すホフマイスター系列は、各種アニオンとカチオンを疎水的吸着を促進する能力の順に並べたものです。系列の左側に属するイオンはリオトロピック性 (lyotropic) と呼ばれ、系列の右側のイオンはカオトロピック性 (chaotropic) と呼ばれます。リオトロピックの塩は、塩濃度が高くなると疎水性相互作用を高める性質があるため、たんぱく質を沈殿、塩析させ、カオトロピックの塩は、塩濃度が高くなるとたんぱく質の変性を促進させます。図4及び表3に示すように塩の種類により充填剤の吸脱着の性質が変化します。

For anions	
$SO_4^{2-} > HPO_4^{2-} > CH_3COO^- > halide > NO_3^- > ClO_4^- > SCN^-$	
For cations	
$(CH_3)_4N^+ > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$	
硫酸アンモニウム及び硫酸ナトリウムがHICに最もよく使用される塩です。	

図5 ホフマイスター系列

## 粒子径の最適化

TOYOPEARL HIC充填剤は、次に示す各種粒子径が用意されています：

100 μm	TOYOPEARL C	キャプチャー (初期精製)
65 μm	TOYOPEARL M	中間精製
35 μm	TOYOPEARL S	中間精製/最終精製
30, 20 μm	TSKgel 5PW	高分離能/最終精製

工業スケールでHICを応用するために使用できる各種リガンドと粒子径をまとめて図7に示します。この図では、各粒子サイズの充填剤が、クロマトグラフィーの一連の製造工程 (キャプチャー、中間精製、最終精製) のどの工程で用いられているのかも示しています。

細孔径 (nm)	5	12.5	40-50	75	100	>100	>170
TOYOPEARL HW:	40	50	55	60	65	75	(80)
TSKgel PW:	G2000 G4000		G5000 G6000				
	← 表面積の増加						

図6 HIC充填剤に使用される基材の特徴比較

精製工程	粒子径	充填剤
初期精製	100 μm	TOYOPEARL SuperButyl-550C
		TOYOPEARL Hexyl-650C
		TOYOPEARL Butyl-650C
		TOYOPEARL Phenyl-650C
中間精製	65 μm	TOYOPEARL Butyl-600M
		TOYOPEARL Phenyl-600M
		TOYOPEARL PPG-600M
	35 μm	TOYOPEARL Butyl-650M
		TOYOPEARL Phenyl-650M
		TOYOPEARL Ether-650M
最終精製	30 μm	TOYOPEARL Butyl-650S
		TOYOPEARL Phenyl-650S
	20 μm	TOYOPEARL Ether-650S
		10 μm
TSKgel Ether-5PW (30)		
QC	10 μm	TSKgel Phenyl-5PW
分選選択性の同じ HPLC カラム		TSKgel Ether-5PW

図7 各種精製プロセスにおける疎水クロマトグラフィー用充填剤

## 機械的強度

TOYOPEARLとTSKgel 5PWのHIC充填剤は、高い流速で使用できます。TOYOPEARL Phenyl-650の各粒子径が示す圧損/流速の関係を図8に示します。粒子径の大きなCグレードでは、圧力が低く、より高流速で使用可能なことがわかります。

## 化学的安定性

これらの製品はいずれも広い範囲のpHとイオン強度に耐える化学構造を有しています。

## 細孔径の最適化

多孔質充填剤の絶対表面積は平均細孔径が小さくなるほど大きくなります。一方、細孔径が小さすぎると、大きなたんぱく質は細孔内に浸透しにくくなり、有効な表面積は減少します。このため、たんぱく質のサイズに応じて、有効な表面積が最大となる最適細孔径が存在することになります。吸着可能な表面積が増加すると、目的のバイオ医薬品の動的吸着量 (DBC) も大きくなります。上記の観点から、より大きな動的吸着量を持つことを目的とした3種の細孔径のHIC充填剤が開発されました。

## 高い動的吸着量を持つTOYOPEARL

モノクローナル抗体への応用には細孔径約75 nmの充填剤が適しています。製品としてはTOYOPEARL PPG-600M、Butyl-600MとPhenyl-600Mの3タイプが用意されています。これらの製品の動的吸着量 (DBC) をTOYOPEARL Phenyl-650と比較したデータを図9に示します。図10に、HIC充填剤600シリーズの分離選択性の比較を示します。

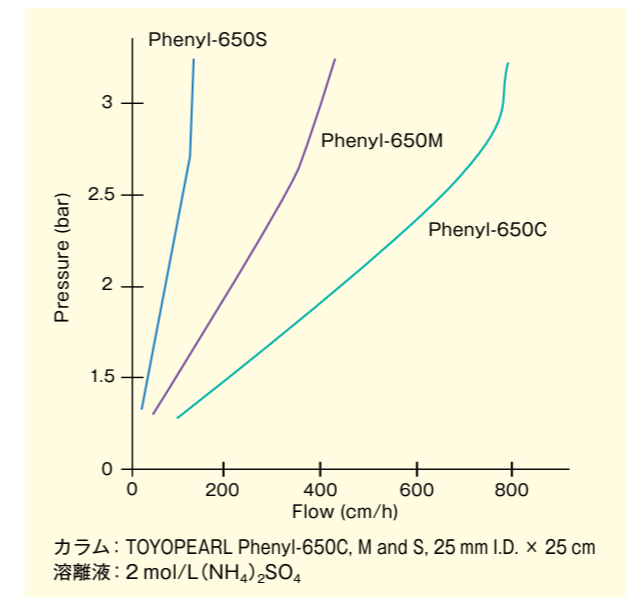


図8 TOYOPEARL Phenyl-650の流速と圧力損失の関係

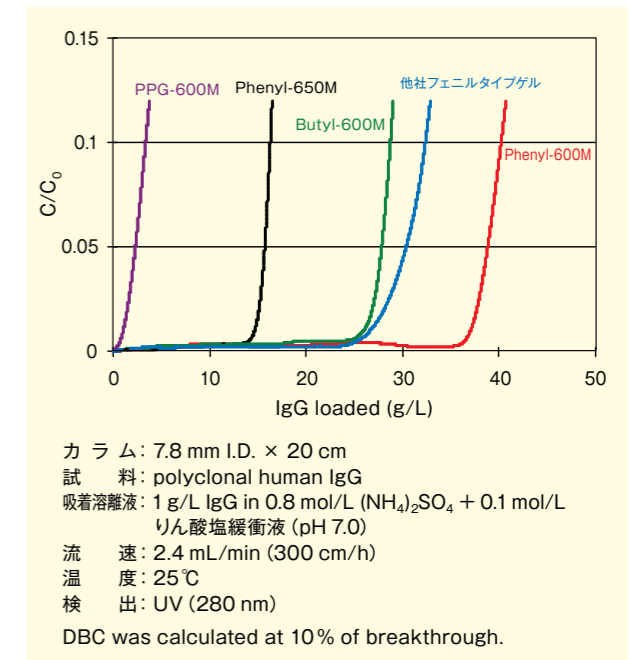


図9 各種HIC充填剤におけるポリクローナル抗体のブレイクスルーカーブ

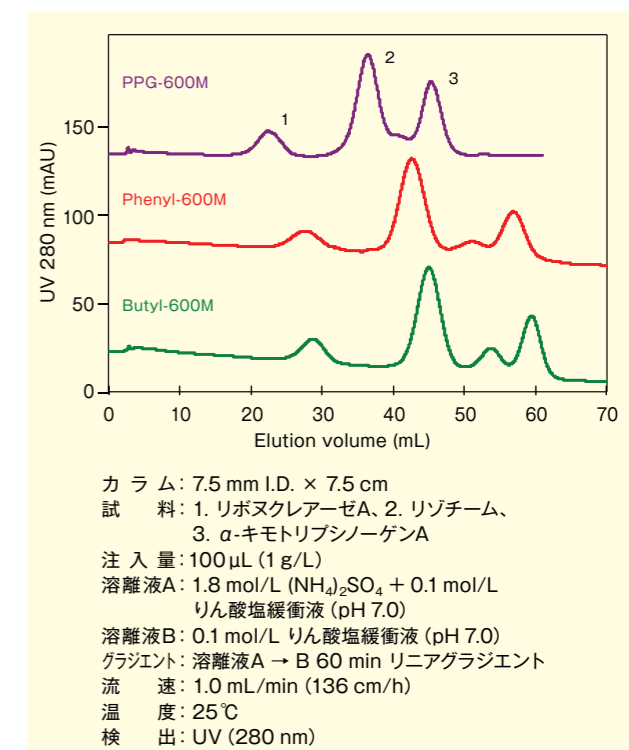
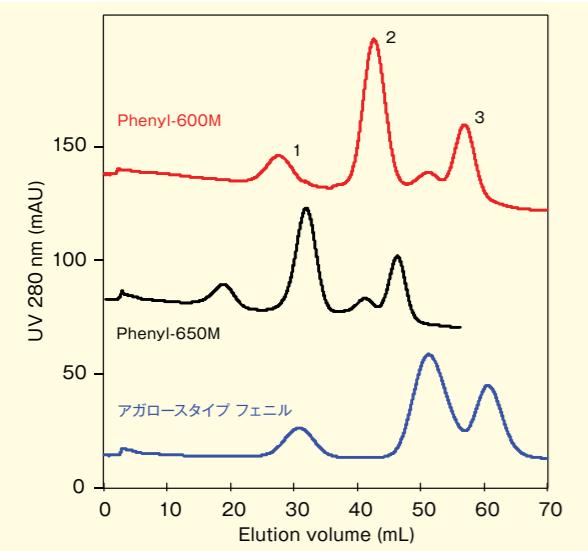


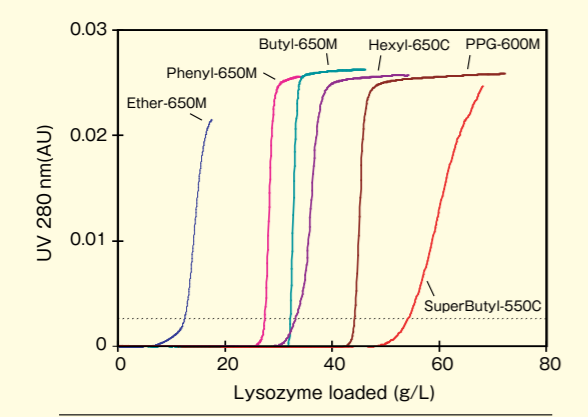
図10 TOYOPEARL HIC充填剤600シリーズの分離選択性比較

# 疎水クロマトグラフィー (HIC)



カラム: 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 試料: 1. リボヌクレアーゼA、2. リゾチーム、  
 3. α-キモトリプシノーゲンA  
 注入量: 100 μL (1 g/L)  
 溶離液A: 1.8 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.1 mol/L  
 リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)  
 溶離液B: 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント: 溶離液A → B 60 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min (136 cm/h)  
 温度: 25℃  
 検出: UV (280 nm)

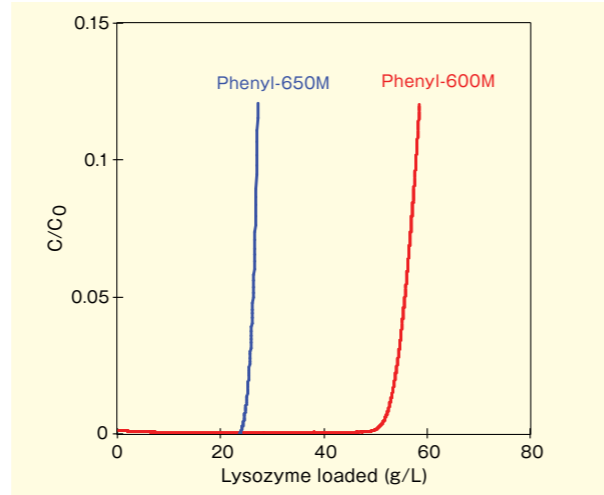
図11 フェニルタイプのHIC充填剤の分離選択性比較



Filler	Binding capacity (g/L) (10% Breakthrough)
Ether-650M	12.5
Phenyl-650M	27.5
Butyl-650M	32.2
Hexyl-650C	33.2
PPG-600M	44.2
SuperButyl-550C	54.3

カラム: 7.8 mm I.D. × 20 cm  
 試料: 1 g/L リゾチームを含む 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液  
 + 1.8 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.0)  
 流速: 0.8 mL/min (100 cm/h)  
 検出: UV (280 nm)

図12 各種HIC充填剤を用いたリゾチーム分離のブレイクスルーカーブと動的吸着量



Filler	Binding capacity (g/L) (10% Breakthrough)
Phenyl-600M	58
Phenyl-650M	27

カラム: 7.8 mm I.D. × 20 cm  
 試料: 1 g/L リゾチームを含む 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液  
 (pH 7.0) + 1.8 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 流速: 2.4 mL/min (300 cm/h)  
 検出: UV (280 nm)

図13 TOYOPEARL Phenyl-600Mのブレイクスルーカーブ(リゾチーム)

図11にフェニル基を持つ充填剤TOYOPEARL Phenyl-600M、Phenyl-650M及びアガロース系充填剤の分離比較を示します。

図12にTOYOPEARL SuperButyl-550Cとその他HIC充填剤のDBCの比較を示します。リゾチーム(分子量12,000 Da)のような低分子たんぱく質には、TOYOPEARL SuperButyl-550C(細孔径50 nmのTOYOPEARL HW-55から誘導体化)が適しています。

TOYOPEARL Phenyl-600Mは、分子量の小さいたんぱく質リゾチームに対しても、高いDBCを示します(図13)。

600と550シリーズのHIC充填剤はあるたんぱく質に対し高い動的吸着量を示し、細孔径とリガンドの違いにより製造プロセスの経済性(Process economics)に劇的な変化をもたらします。

## モノクローナル抗体

HICはモノクローナル抗体(mAb)の精製に有用です。図14は51種類の異なるマウスIgGをTSKgel Phenyl-5PWで測定(溶離時間を疎水性の指標として代用)したものです。mAbは非常に多様な疎水性を示すことがわかります。何種類かのIgGは他のIgGよりも2~3倍も溶出が遅く、より強い疎水性を持つことがわかります。

疎水性の強いmAb(マウスの抗ニトリ14kDaレクチン抗体など)に対しては、より疎水性の弱い(親水性が強い)TOYOPEARL Ether-650Mが適しています。腹水からのmAbの精製(図15)ではTSKgel Ether-5PW(10 μm)を使用し、スケールアップでは同じ選択性を持つTOYOPEARL Ether-650M(粒子径65 μm)を使用することができます。

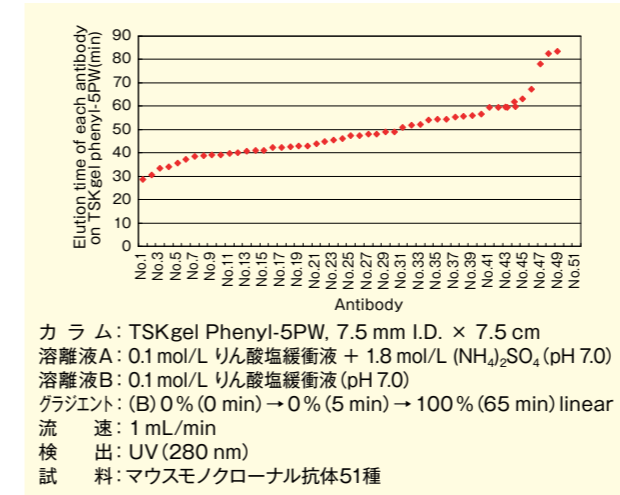


図14 HIC分離におけるマウスモノクローナル抗体の多様性(溶出時間)

## たんぱく凝集体の除去

大きな細孔径を持つTOYOPEARL Butyl-650とPhenyl-650はたんぱく凝集体の分離、除去に非常に有効です。Kargerら\*)は、分子量20万を超えるたんぱく質と凝集体を対象とした研究においてHICが凝集体除去に有効であることを明らかにしました。

## 糖たんぱく質

糖たんぱく質は糖を基材とする充填剤ではしばしば不可逆的結合を起こしますが、TOYOPEARL HIC充填剤を使用すれば精製が可能です。TOYOPEARL Butyl-650S充填剤を使用して巨大糖たんぱく質を精製した例を図16に示します。

## DNAプラスミドの精製とエンドトキシン除去

Cambrex, Baltimore, MDは、プラスミドDNAの精製にTOYOPEARL Hexyl-650C充填剤を使用しました(US patent 6,953,686)。Hexyl-650Cはエンドトキシン除去用としてもHIC充填剤の中で最も高い効果を持つことが示されており、その吸着除去量は2百万 EU/mL充填剤です。RNAと混入たんぱく質も効果的に除去されました。またTOYOPEARL Hexyl-650Cは、スーパーコイル状及び開環環状型(open circular forms)のプラスミドDNAの分離でも有効でした。

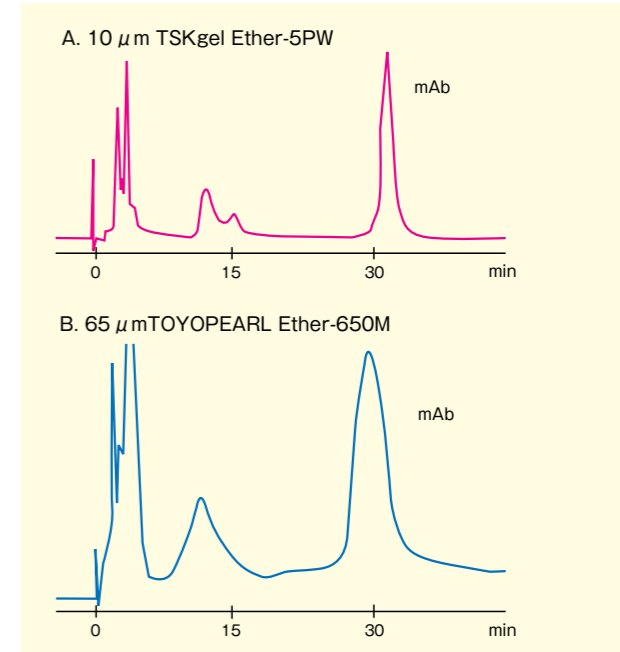
## ミスフォールドたんぱく質の除去

ミスフォールドたんぱく質は一般に、本来のたんぱく質よりも高い疎水性を示しますので、ミスフォールドたんぱく質除去にはTOYOPEARL Butyl-650M充填剤が利用されます。多くの場合、ミスフォールドたんぱく質を吸着し、目的物質がカラムを通過するような溶離条件(フロースルー)でのクロマトグラフィーを用います。詳細な応用例については、弊社のウェブサイトを参照ください。

[www.separations.asia.tosohbioscience.com](http://www.separations.asia.tosohbioscience.com)

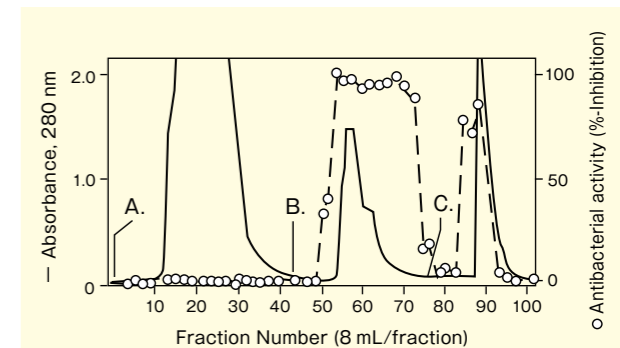
[www.separations.us.tosohbioscience.com](http://www.separations.us.tosohbioscience.com)

\*) Grinberg, N. Blanco, R. Yarmush, D. Karger, B. L. *Protein Aggregation in High Performance Liquid Chromatography: Hydrophobic Interaction Chromatography of β-Lactoglobulin*, Anal. Chem. 1989, 61, 514-520



カラム: A. TSKgel Ether-5PW, 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 B. TOYOPEARL Ether-650M, 7.5 mm I.D. × 7.5 cm  
 試料: マウス腹水  
 A. 1.5 mg in 100 μL; B. 0.76 mg in 50 μL  
 溶離液A: 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 + 1.5 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.0)  
 溶離液B: 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント: 溶離液A → B 60 min リニアグラジエント  
 流速: 1.0 mL/min (136 cm/h)  
 検出: UV (280 nm)

図15 マウス腹水からのモノクローナル抗体の分離 (TOYOPEARLとTSKgelの比較)



カラム: TOYOPEARL Butyl-650S, 22 mm I.D. × 26 cm  
 試料: アメフラシ由来粗たんぱく質  
 溶離液: 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7.0)  
 A. 40%飽和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 B. 20%飽和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 C. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 不含  
 グラジエント: ステップ (図内に表示)  
 検出: UV (280 nm)

図16 TOYOPEARL Butyl-650Sを用いた高分子糖たんぱく質の分離

## 疎水クロマトグラフィー (HIC)

### 製品一覧表

#### TOYOPEARL HIC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	たんぱく質吸着量(参考値) (リゾチーム, g/L)
0016172	TOYOPEARL Ether-650S	100	20 - 50	10 - 30
0016174		1,000		
0016176		5,000		
0016173	TOYOPEARL Ether-650M	100	40 - 90	10 - 30
0016175		1,000		
0016177		5,000		
0021302	TOYOPEARL PPG-600M	100	40 - 90	20 - 35 (γ-globulin)
0021303		1,000		
0021304		5,000		
0021888	TOYOPEARL Phenyl-600M	100	40 - 90	45 - 65
0021889		1,000		
0021890		5,000		
0014477	TOYOPEARL Phenyl-650S	100	20 - 50	30 - 50
0014784		1,000		
0014935		5,000		
0014478	TOYOPEARL Phenyl-650M	100	40 - 90	30 - 50
0014783		1,000		
0014943		5,000		
0014479	TOYOPEARL Phenyl-650C	100	50 - 150	30 - 50
0014785		1,000		
0014944		5,000		
0007476	TOYOPEARL Butyl-650S	100	20 - 50	30 - 50
0014701		1,000		
0007975		5,000		
0007477	TOYOPEARL Butyl-650M	100	40 - 90	30 - 50
0014702		1,000		
0007976		5,000		
0007478	TOYOPEARL Butyl-650C	100	50 - 150	30 - 50
0014703		1,000		
0007977		5,000		
0021449	TOYOPEARL Butyl-600M	100	40 - 90	40 - 60 (γ-globulin)
0021450		1,000		
0021451		5,000		
0019956	TOYOPEARL SuperButyl-550C	100	50 - 150	52 - 70
0019957		1,000		
0019958		5,000		
0019026	TOYOPEARL Hexyl-650C	100	50 - 150	30 - 50
0019027		1,000		
0019028		5,000		

### 製品一覧表

#### TSKgel HIC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	たんぱく質吸着量 (リゾチーム, g/L)
0043276	TSKgel Ether-5PW (20)	25	15 - 25	10 - 30
0016052		250		
0016053		1,000		
0018437		5,000		
0043176	TSKgel Ether-5PW (30)	25	20 - 40	10 - 30
0016050		250		
0016051		1,000		
0018439		5,000		
0043277	TSKgel Phenyl-5PW (20)	25	15 - 25	15 - 35
0014718		250		
0014719		1,000		
0018438		5,000		
0043177	TSKgel Phenyl-5PW (30)	25	20 - 40	10 - 30
0014720		250		
0014721		1,000		
0017210		5,000		

\* 価格につきましては、「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご覧ください。

\* 容量が1,000 mL、5,000 mLの製品の価格につきましては、当社営業までお問い合わせください。



## 疎水クロマトグラフィー (HIC)

### 製品一覧表

#### ToyoScreen HICカラム (プロセス開発、スクリーニング用)

品番	品名	内容
0021372	ToyoScreen Ether-650M	Ether-650M 1 mLタイプ6本
0021373		Ether-650M 5 mLタイプ6本
0021380	ToyoScreen PPG-600M	PPG-600M 1 mLタイプ6本
0021381		PPG-600M 5 mLタイプ6本
0021374	ToyoScreen Phenyl-650M	Phenyl-650M 1 mLタイプ6本
0021375		Phenyl-650M 5 mLタイプ6本
0021892	ToyoScreen Phenyl-600M	Phenyl-600M 1 mLタイプ6本
0021893		Phenyl-600M 5 mLタイプ6本
0021376	ToyoScreen Butyl-650M	Butyl-650M 1 mLタイプ6本
0021377		Butyl-650M 5 mLタイプ6本
0021494	ToyoScreen Butyl-600M	Butyl-600M 1 mLタイプ6本
0021495		Butyl-600M 5 mLタイプ6本
0021382	ToyoScreen SuperButyl-550C	SuperButyl-550C 1 mLタイプ6本
0021383		SuperButyl-550C 5 mLタイプ6本
0021378	ToyoScreen Hexyl-650C	Hexyl-650C 1 mLタイプ6本
0021379		Hexyl-650C 5 mLタイプ6本
0021398	ToyoScreen HIC	Phenyl-600M、PPG-600M、Phenyl-650M、Hexyl-650C、Butyl-600M、Butyl-650M 1 mLタイプ各1本
0021399		Phenyl-600M、PPG-600M、Phenyl-650M、Hexyl-650C、Butyl-600M、Butyl-650M 5 mLタイプ各1本

\* ToyoScreenをご使用の際には、品番0021400 ToyoScreen Holderが必要になります。

#### ToyoScreenカラムホルダ、コネクタ

品番	品名	内容
0021400	ToyoScreen Holder	1 mL、5 mLカラム共通
0020028	T-Fユニオン	FPLC® 用コネクタ

#### MiniChrom

品番	品名	カラム容量 (mL)	粒子径 (μm)
0045121	TOYOPEARL Phenyl-650M	5	40 - 90
0045122	TOYOPEARL Phenyl-650S	5	20 - 50
0045123	TOYOPEARL Phenyl-600M	5	40 - 90
0045124	TOYOPEARL PPG-600M	5	40 - 90
0045125	TOYOPEARL Butyl-650M	5	40 - 90
0045126	TOYOPEARL Butyl-650S	5	20 - 50
0045127	TOYOPEARL Butyl-600M	5	40 - 90

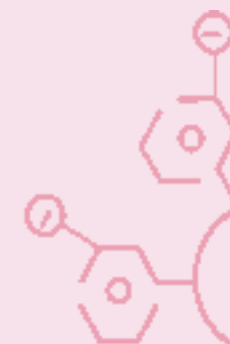
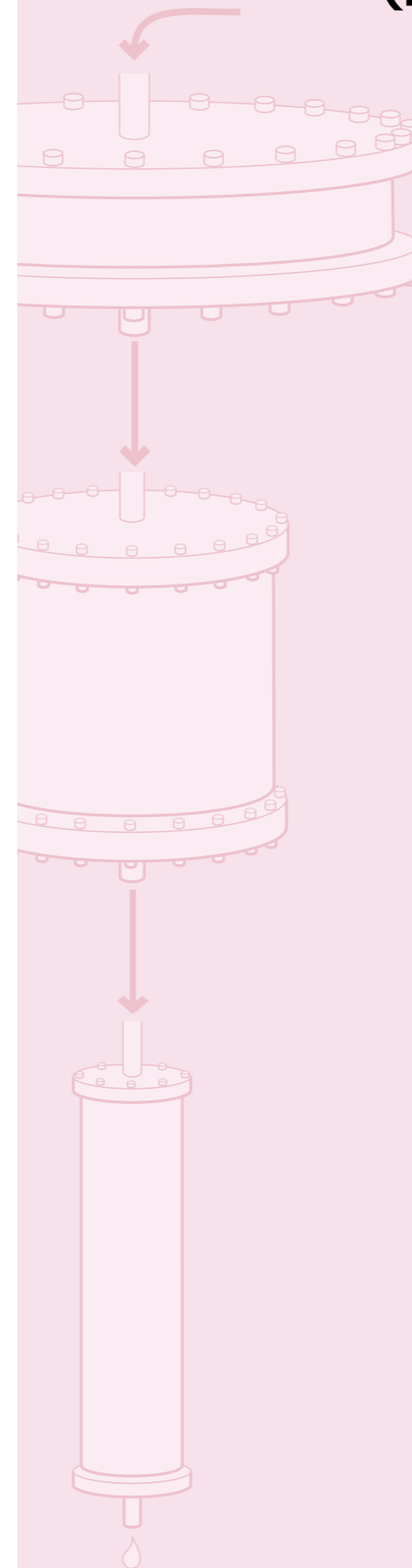
#### RoboColumn

品番	品名	容量 (μL)	粒子径 (μm)
0045031	TOYOPEARL Phenyl-600M	200 × 8	40 - 90
0045032	TOYOPEARL Phenyl-600M	600 × 8	40 - 90
0045033	TOYOPEARL Butyl-600M	200 × 8	40 - 90
0045034	TOYOPEARL Butyl-600M	600 × 8	40 - 90
0045035	TOYOPEARL PPG-600M	200 × 8	40 - 90
0045036	TOYOPEARL PPG-600M	600 × 8	40 - 90
0045037	TOYOPEARL Phenyl-650M	200 × 8	40 - 90
0045038	TOYOPEARL Phenyl-650M	600 × 8	40 - 90

\* MiniChrom、RoboColumnの他グレード製品につきましては、当社営業までお問い合わせください。

## ミックスモードクロマトグラフィー (MXC)

粒子径 65 μm  
MXC充填剤 (ミックスモード充填剤)  
TOYOPEARL MX-Trp-650M



# ミックスモードクロマトグラフィー (MXC)

## ミックスモードクロマトグラフィー用TOYOPEARL充填剤

ミックスモードクロマトグラフィー (MXC)は、異なる複数の相互作用 (イオン交換、疎水結合、アフィニティー結合など) を持つ官能基を導入した充填剤を用いる分離モードです。したがって、目的物質の分離において、複合的な相互作用と分離選択性により、一段階で不純物を除去し、高純度精製が可能となります。また、イオン交換クロマトグラフィーに較べて、試料や溶離液中の塩濃度が高い場合でも、試料が吸着しやすい (塩耐性クロマトグラフィー)、初期精製や、中間精製において有利になります。

一方、複雑な相互作用のため、分離条件の最適化が必要となります。実験計画 (DoE) などにより、溶離液の塩濃度、pHなどの検討が、MXCの利用におけるポイントとなります。

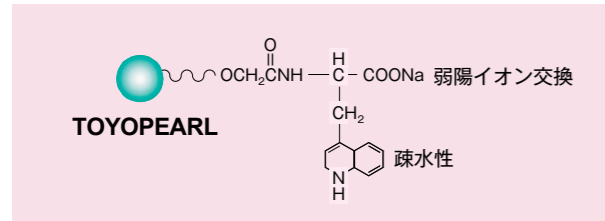


図1 TOYOPEARL MX-Trp-650Mの構造

## TOYOPEARL MX-Trp-650M

TOYOPEARL MX-Trp-650Mには、アミノ酸であるトリプトファンが固定化されています (図1)。トリプトファン分子には、インドール環による疎水性相互作用と、カルボキシ基による陽イオン交換作用があります。

また、抗体の吸着量が高く、試料中や、試料溶液中の塩濃度が高い場合でも、分析種を十分吸着できる能力 (塩耐性) を有しています。表1に、市販ミックスモード充填剤との抗体の吸着量の比較を示します。

イオン交換基と疎水基の両方が、吸着に寄与するため、吸着条件、溶出条件、洗浄条件の検討が重要です。一般的な分離条件を表2に示します。

表2 TOYOPEARL MX-Trp-650Mにおける一般的な分離条件

- イオン交換基と疎水基の両方が、試料の吸着に寄与するため、吸着条件、溶出条件、洗浄条件の検討が重要です。
- 陽イオン交換体に近い分離条件になります。
- 吸着溶離液のpH及び塩濃度で、吸着量が大きく変動します。

吸着条件	緩衝液: pH 4.0 - 5.5 塩濃度: 0.1 mol/L NaCl以下が望ましい 試料に塩(0.15 mol/L以下)が含まれていても吸着にはあまり問題はありません。 *不純物が多い場合には、吸着条件で洗浄の後、塩濃度が0.1 mol/L以下の緩衝液(pH 5.0 - 7.0)で洗浄することも効果的です。
溶出条件	緩衝液: pH 7.0 - 8.0前後 塩濃度: 0.15 mol/L NaCl以上
洗浄条件	塩濃度: 0.5 - 1.0 mol/L NaCl アルカリ溶液: 0.1 - 0.5 mol/L NaOH

表1 抗体の吸着量の比較

	粒子径 (μm)	イオン交換容量 (μL)	吸着溶離液 (pH 4.7) 中のNaCl濃度			
			0.10 mol/L (12 mS/cm)		0.15 mol/L (17 mS/cm)	
			動的吸着量 (IgG)	回収率	動的吸着量 (IgG)	回収率
TOYOPEARL MX-Trp-650M	50 - 100	0.12	95 g/L	97 %	48 g/L	96 %
市販ミックスモード充填剤	平均 75	0.07	14 g/L	86 %	11 g/L	85 %

吸着溶離液: 0.05 mol/L 酢酸塩緩衝液 (pH 4.7) + 0.1 mol/L or 0.15 mol/L NaCl  
流速: 212 cm/h  
DBC: 10 % プレークスルーカーブ

## MXC及びIECにおける塩存在下での動的吸着量の比較

MXCでは、一般のイオン交換体と比べ、試料中に塩が含まれていても、高い吸着量を維持することができます。図2は、0.15 mol/L NaClを含む試料中のIgG吸着量を各pHで比較したものです。高い吸着量を得るため、通常のイオン交換体ではpHを下げる必要がありますが、MXCでは中性に近いpHでも高い吸着量が維持されています。

## MXCでの動的吸着量と塩濃度及びpHの影響

MXCにおける動的吸着量は、吸着溶離液における塩濃度とpHの影響が大きく、pHが低い場合、より高い塩濃度でも、高い吸着量が得られます (図3)。

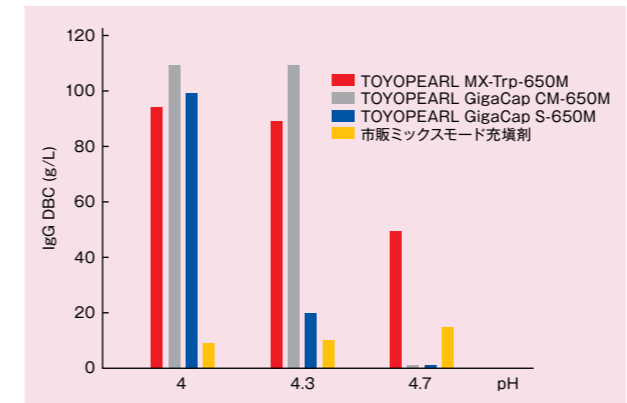
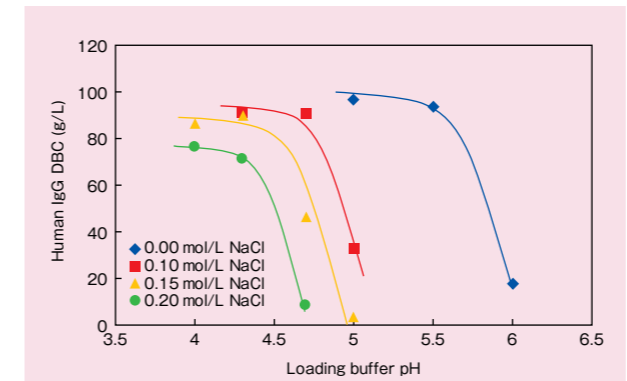


図2 ミックスモード充填剤及び陽イオン交換体におけるIgGの動的吸着量の比較 (0.15 mol/L NaCl 存在下、各種pH)



カラム: 6 mm I.D. × 4 cm  
吸着溶離液: 0.05 mol/L 酢酸塩緩衝液 (pH 4.0 - 6.0) + 0 - 0.2 mol/L NaCl  
溶出溶離液: 0.1 mol/L トリス塩緩衝液 (pH 8.5) + 0.3 mol/L NaCl  
流速: 1.0 mL/min (212 cm/h)  
検出: UV (280 nm)  
試料: ヒトポリクローナルIgG (1 g/L)  
動的吸着量は、プレークスルーカーブ (10%高さ) より算出した。

図3 動的吸着量における吸着緩衝液のpH及び塩濃度の影響

## 抗体の分離精製

細胞培養液には、イオン強度として0.1-0.15 mol/LのNaClに相当する塩が含まれており、この条件で吸着分離できるMXCは、モノクローナル抗体の分離精製に適用可能です (図4)。

また、2種類の塩を組み合わせた溶離液において、塩とpHの両方のグラジエントを用いることによって、良好な抗体フラグメントの分離が行えます (図5)。

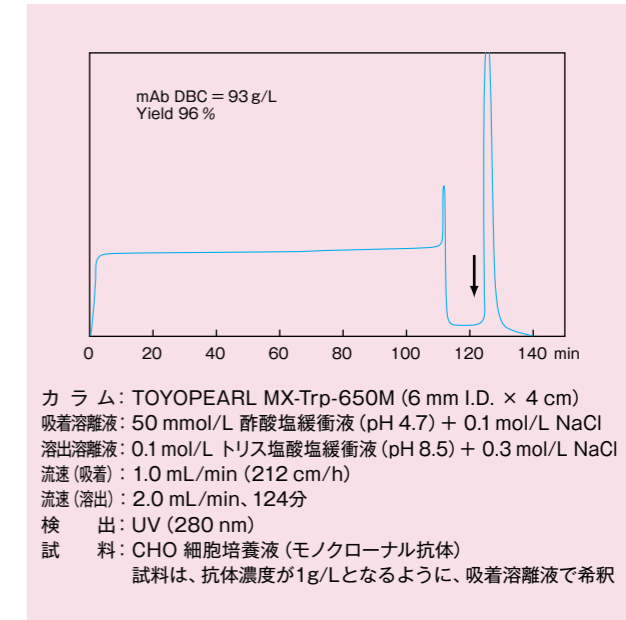


図4 細胞培養液からのモノクローナル抗体の精製

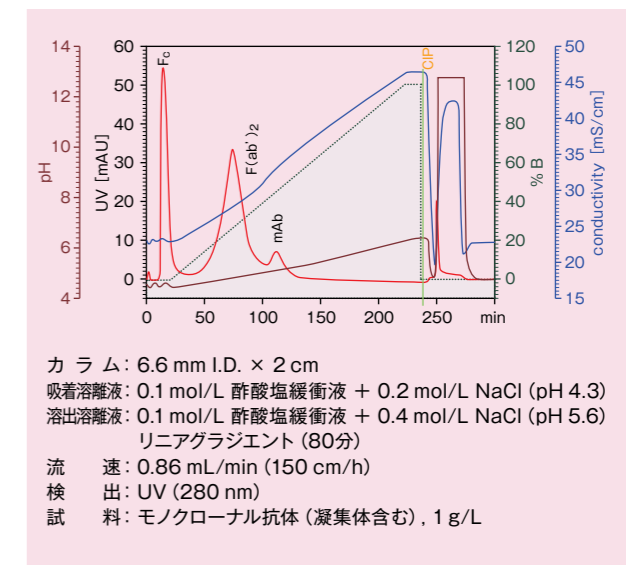


図5 TOYOPEARL MX-Trp-650Mによる抗体フラグメントの分離

## ミックスモードクロマトグラフィー (MXC)

### 製品一覧表

#### TOYOPEARL MXC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	たんぱく質吸着量 (γ-globulin, g/L)
0022817	TOYOPEARL MX-Trp-650M	25	50 - 100	≥75
0022818		100		
0022819		1,000		
0022820		5,000		

\* 価格につきましては、「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご覧ください。

\* 容量が1,000 mL、5,000 mLの製品の価格につきましては、当社営業までお問い合わせください。

\* 使用時に、酸化剤の使用や、強い直射日光、UV光への暴露は避けてください。

\* 遮光保存してください。

#### ToyoScreen カラム (プロセス開発、スクリーニング用)

品番	品名	規格	内容
0022824	ToyoScreen MX-Trp-650M	1 mL × 6 本	MX-Trp-650M 1 mL タイプ6 本
0022825	ToyoScreen MX-Trp-650M	5 mL × 6 本	MX-Trp-650M 5 mL タイプ6 本

\* ToyoScreenをご使用の際は、品番0021400 ToyoScreen Holderが必要になります。

#### ToyoScreenカラムホルダ、コネクタ

品番	品名	内容
0021400	ToyoScreen Holder	1 mL, 5 mLカラム共通
0020028	T-Fユニオン	FPLC®用コネクタ

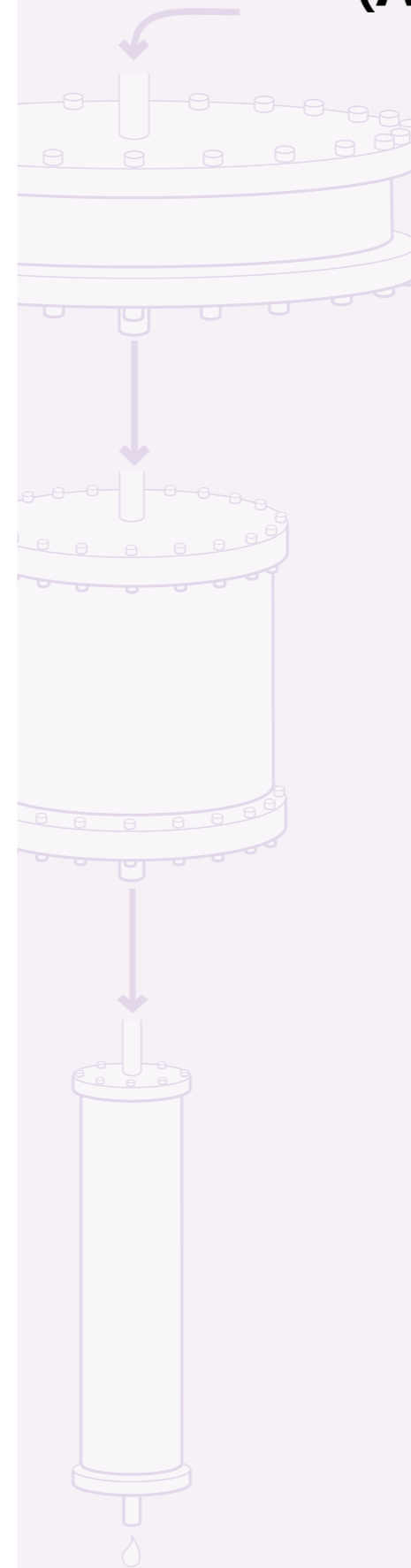
#### MiniChrom

品番	品名	カラム容量 (mL)	粒子径 (μm)
0045151	TOYOPEARL MX-Trp-650M	5	50 - 100

#### RoboColumn

品番	品名	容量 (μL)	粒子径 (μm)
0045051	TOYOPEARL MX-Trp-650M	200 × 8	50 - 100
0045052		600 × 8	50 - 100

## アフィニティークロマトグラフィー (AFC)



粒子径  
45 μm

抗体特異的AFC充填剤  
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F  
TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F  
TOYOPEARL AF-rProtein L-650F

群特異的AFC充填剤  
65 μm  
TOYOPEARL AF-Chelate-650M  
TOYOPEARL AF-Red-650ML  
TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M

活性化型AFC充填剤  
65 μm  
TOYOPEARL AF-Tresyl-650M  
TOYOPEARL AF-Epoxy-650M

活性化型AFC充填剤 (添加剤必要)  
65 μm  
TOYOPEARL AF-Formyl-650M  
TOYOPEARL AF-Amino-650M  
TOYOPEARL AF-Carboxy-650M





# アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

## プロテインAアフィニティークロマトグラフィー

モノクローナル抗体はバイオ医薬品や診断検査試薬として需要が高く、大量精製、高純度精製が必須となっています。そのためダウンストリームでのクロマトグラフィーによる精製が、ますます重要になっています。

表1に各種クロマトグラフィー分離モードの特長を、図1に、抗体精製のクロマトグラフィープロセス例を示します。現在では、プロテインA充填剤は、抗体の精製純度が非常に高く、初期精製に最もよく使用されています。

初期工程にプロテインA充填剤を用いるプロセスでは、以降のプロセスで、不純物(ホストセルたんぱく質、核酸、抗体凝集体、プロテインAリガンドなど)を除去していく方法です。陰イオン交換体(陰イオン交換膜クロマトグラフィーも含む)は、フロースルーモードで、不純物の除去分離を行います。

## 耐アルカリ・高吸着型及び高速型プロテインA充填剤

初期工程では、大量の培養上清を迅速に精製することが要求されるため、高吸着量で、高速処理が可能なプロテインA充填剤が適しています。TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650Fは、高濃度の抗体試料液に対しても非常に高い吸着量を示します。また、短い滞留時間でも高い吸着量が維持されます。TOYOPEARL AF-rProtein A-650Fは、機械的強度に優れており、カラム高さを20 cmないし30 cmにすることで、高流速条件(線速を500 cm/hないし1,000 cm/h)でも、比較的高い吸着量を維持でき、抗体精製における生産効率を向上させることが可能です。

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F及びAF-rProtein A-650Fは、アルカリ耐久性のあるプロテインAを親水性ビニルポリマー基材に多点で結合しており、一般的に吸着が弱かったマウスIgG<sub>1</sub>や、IgM、Fabなどに対しても強い親和性を示します。またアルカリ洗浄による繰り返しCIPでも、吸着量の減少が抑えられています。

表 1 各種クロマトグラフィー分離モードの特長

	抗体吸着量	抗体精製純度	充填剤の洗浄	充填剤のコスト
プロテインA充填剤	++	+++	++	+
陽イオン交換体	+++	++	+++	+++
疎水充填剤	++	++	+++	++
ミックスモード充填剤	++	++	++	++

+++ : 特に優れている  
++ : 優れている  
+ : 改善が望まれる

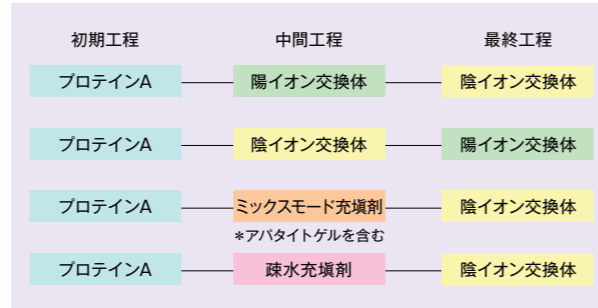
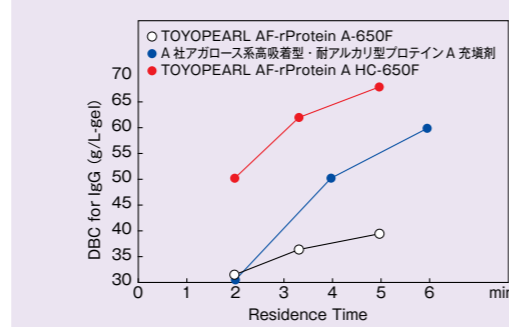


図 1 プロテインA充填剤を用いる抗体精製プロセス例

## 高吸着型プロテインA充填剤



カラム: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F  
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F  
A社アガロース系高吸着型・耐アルカリ型プロテインA充填剤  
カラムサイズ: 5 mm I.D. × 5 cm  
溶離液: 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0)  
試料: ヒトポリクローナル IgG (1 g/L)

滞留時間3分以上で60 g/L以上の高い動的吸着量が得られます。

図 2 滞留時間と動的吸着量の関係

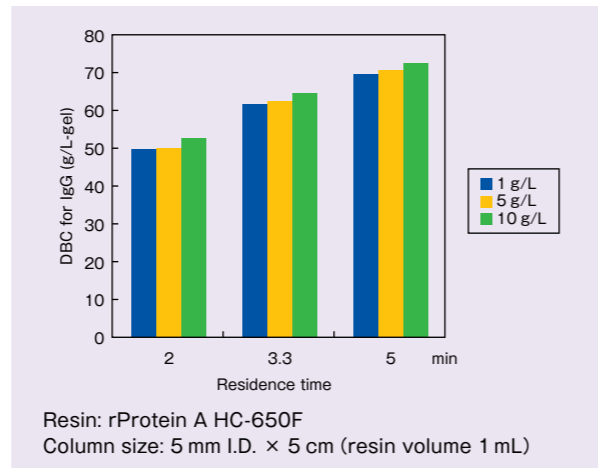


図 3 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650FにおけるIgG濃度と動的吸着量

## プロテインA充填剤の通液特性

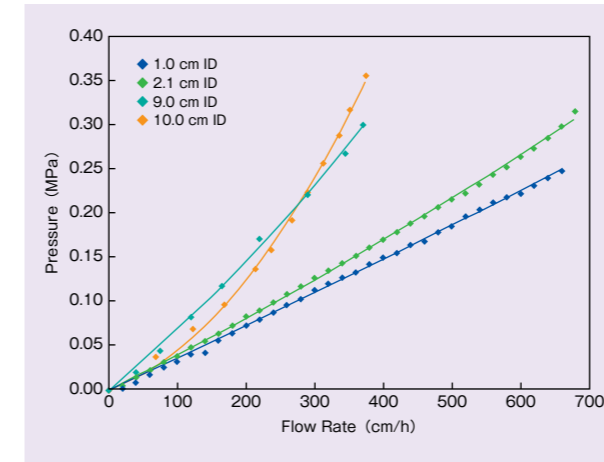
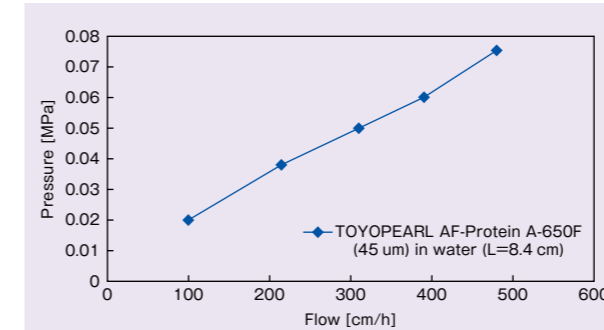
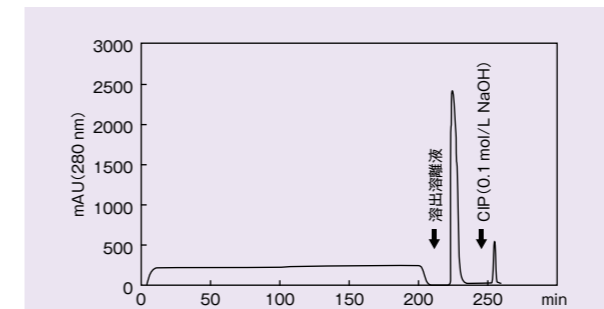


図 4 高吸着型TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650Fの通液特性



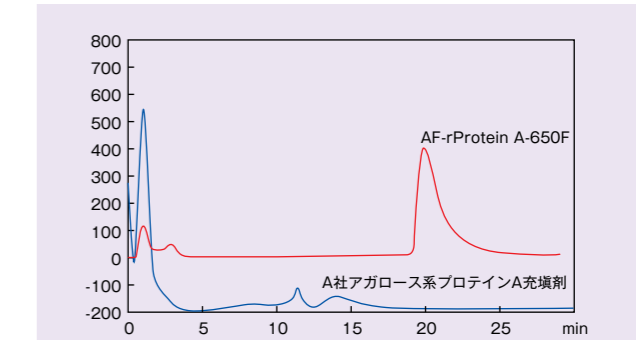
カラムサイズ: 40 cm I.D. × 8.4 cm (10.6 L)  
カラム圧力は、線速500 cm/hでも、0.1 MPa以下

図 5 高速型TOYOPEARL AF-rProtein A-650Fの通液特性



カラム: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D. × 5 cm)  
吸着溶離液: 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0)  
溶出溶離液: 0.1 mol/L クエン酸塩緩衝液 (pH 3.0)  
流速: 0.2 mL/min  
検出: UV (280 nm)  
試料: 細胞培養液 40 mL (ヒトIgG1: 1 g/L)  
\*精製画分は、TSK gel G3000SW<sub>XL</sub>による純度チェックにより、純度95%と確認されました。

図 6 モノクローナル抗体(IgG1)の精製例



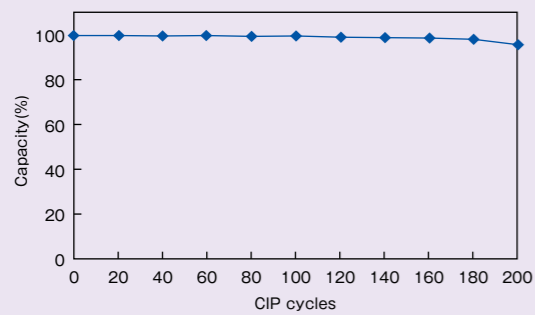
カラム: 5.0 mm I.D. × 5 cm for TP AF-rProtein A-650F  
A社アガロース系プロテインA充填剤 1 mL  
流速: 1.0 mL/min  
溶離液A: 20 mmol/L トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.5)  
溶離液B: 25 mmol/L クエン酸塩緩衝液 (pH 2.8)  
0 to 100% B 30分リニアグラジエント  
試料: mouse IgM in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5) ca. 8 g/L 100 μL  
検出: UV (280 nm)

図 7 IgMの分離例

# アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

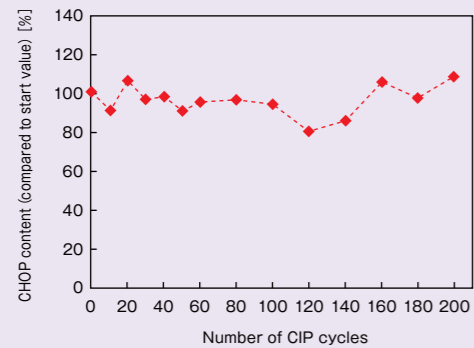
## プロテインA充填剤のアルカリ耐久性

耐アルカリ型プロテインA充填剤は、0.1 mol/L NaOHによるCIPでは、200サイクルまで、吸着量の減少は10%程度です(図8)。また、その際のプロテインA充填剤の精製能力として、CIP200サイクル後も、ホストたんぱく質の除去効率は、低下しません(図9)。



カラム: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5.0 mm I.D. × 5 cm)  
CIPサイクル: 10 CV 吸着溶離液, 5 CV 溶出溶離液, 7 CV 吸着溶離液 3 CV 0.1 N NaOH (接触時間: 15分), 5 CV 吸着溶離液  
DBCは20CIP毎に10%ブレイクスルーにより測定

図8 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650Fのアルカリ耐久性(CIP)



CIPは0.2 mol/L NaOH (接触時間15分) で実施した。200CIPサイクルでもゲルは安定

図9 CIPにおけるホストたんぱく質の除去効率

## プロテインA充填剤からのリガンド漏出量

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650Fは、プロテインAリガンドが基材に化学的に多点結合されているため、リガンドが充填剤から漏出する量が非常に少なくなっています(図10)。

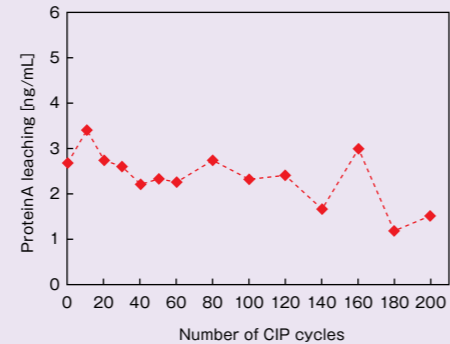
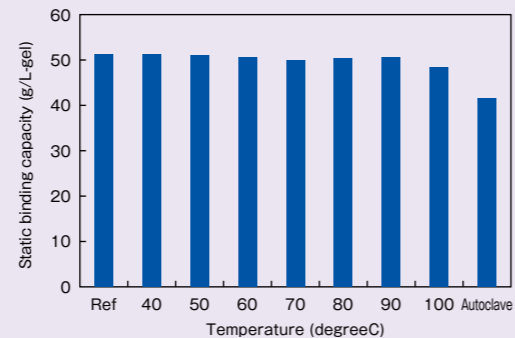


図10 CIPにおけるプロテインAリガンドの漏出量

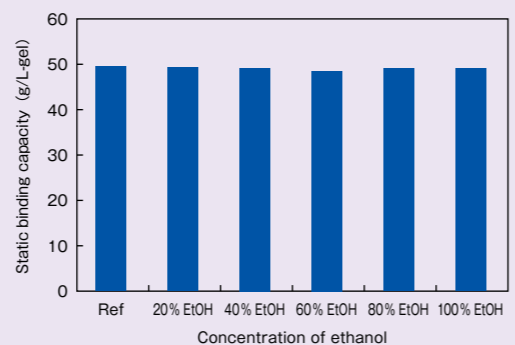
## プロテインA充填剤の温度安定性、溶媒安定性

プロテインA充填剤のリガンドは、遺伝子組み換えによるプロテインAで、化学的、物理的に安定な構造を持ち、高温や、高濃度の有機溶媒、変性剤などの処理においても、吸着量の変化が少なくなっています(図11、図12)。



加温時間: 30分  
溶媒: イオン交換水  
オートクレーブ: 120度、1.2気圧、15分

図11 温度安定性



接触時間: 16時間

図12 エタノール溶媒安定性

## プロテインLアフィニティークロマトグラフィー

Fab, scFv, Diabodyといったフラグメント抗体は、一般的に製造コストが安いメリットがあり、また組織への浸透性等、優れた特性を有することから次世代の抗体医薬品として開発が進められています。

通常の抗体(フルボディ) 精製のアフィニティー精製には、抗体のFc領域に親和性を有するプロテインA充填剤が広く使用されていますが、フラグメント抗体はFc領域を有さないため、適用できません。

これまでに数種類のフラグメント抗体医薬品が承認されていますが、精製にはイオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーといった従来型の分離モードが使用されています。

TOYOPEARL AF-rProtein L-650Fは、κ 軽鎖に親和性のある遺伝子組み換えプロテインLを固定化したフラグメント抗体精製用アフィニティークロマトグラフィー用充填剤です。新規に開発した遺伝子組み換えプロテインLは、既存市販品に比較して、吸着量、耐アルカリ性が大幅に向上しています。また他のTOYOPEARLグレードと同様に機械的強度にも優れ、大型プロセスでも実用的に使用可能です。

## プロテインL充填剤の吸着量

TOYOPEARL AF-rProtein L-650Fは、新規リガンドの使用に加えて基材の特性を最適に設計することにより、他社品(アガローススペース)に比較して、高いFab動的吸着量を示します(表2)。

## プロテインL充填剤の耐アルカリ性

TOYOPEARL AF-rProtein L-650Fは、既存他社品(アガローススペース)に比較して、優れた耐アルカリ性を示します。

例として、0.1 mol/L NaOH水溶液に浸漬した場合、初期から90%以上の吸着量が維持できる時間は2倍以上長くなっています(図13)。

## プロテインL充填剤の親和性

プロテインL充填剤ではIgAやIgMにも親和性があります。プロテインA充填剤で吸着しない抗体の精製における補完的な役割も果たします。

表2 Fab動的吸着量の比較

	Fab動的吸着量 (g/L)	
	滞留時間 3.4分	滞留時間 4.0分
TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	33	50
他社品	19	26

カラムサイズ: 4.6 mm I.D. × 5 cm  
吸着液: 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)  
試料: 2 g/L Fab (ポリクローナルヒト免疫グロブリンG由来)  
吸着量は10%ブレイクスルーより算出

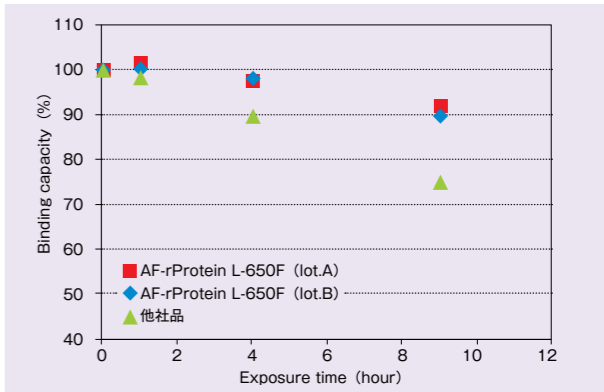
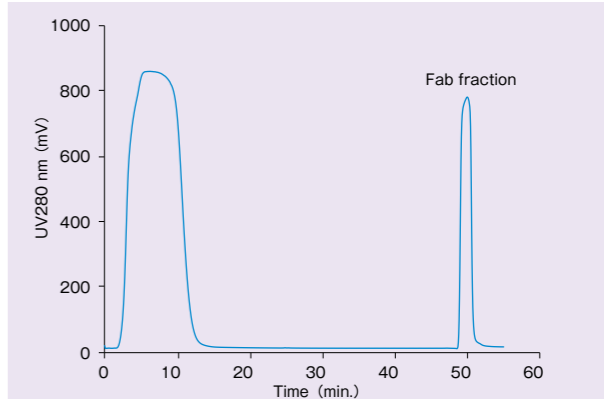


図13 耐アルカリ性

表3 種、抗体クラスによる親和性の確認

種	クラス	親和性
ヒト	IgG1	+
	IgG2	+
	IgG3	+
	IgG4	+
マウス	IgG1	+
	IgG2a	+
	IgG2b	+
	IgA	+
	IgM	+
	λ 軽鎖	-
ラット	IgG1	+
	IgG2a	+
	IgG2b	+
	IgG2c	+
	IgA	+
	IgM	+
	λ 軽鎖	-

※個別の抗体により親和性が異なることがあります。



カラムサイズ: 5 mm I.D. × 5 cm  
吸着液: 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)  
溶出液: 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5)  
流速: 0.25 mL/min  
検出: UV (280 nm)  
注入量: 1.2 mL  
試料: ヒトモノクローナル抗体のパパイン消化物

図14 ヒトモノクローナル抗体パパン消化物からのFab精製

# アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

## アフィニティークロマトグラフィー用TOYOPEARL充填剤

TOYOPEARLアフィニティークロマトグラフィー (AFC) 充填剤には活性化型充填剤や、群特異的リガンドを導入した充填剤が用意されています。活性化型充填剤はたんぱく質その他のリガンドを直接結合させることが可能です。固定化反応についてはカルボジイミドカップリングまたは還元アミノ化処理を施して共有結合を形成させるタイプもあります。

TOYOPEARLの活性化型充填剤の構造を図16に、TOYOPEARLの群特異的リガンドを図17に示します。

### リガンド固定化のための活性化型充填剤の選択

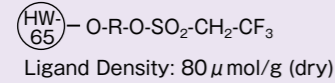
たんぱく質のカップリング用としてTOYOPEARL AF-Tresyl-650MまたはTOYOPEARL AF-Formyl-650Mを推奨しますが、分子量の小さいリガンドのカップリング用としてはTOYOPEARL AF-Epoxy-650Mが適しています。TOYOPEARL AF-Amino-650M及びTOYOPEARL AF-Carboxy-650Mはどちらの目的にも使用できます。

### TOYOPEARLアフィニティークロマトグラフィーの固相合成への応用

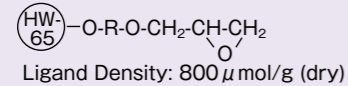
各種の有機溶媒及び過酷なpH値に対して優れた安定性を示すTOYOPEARL AFC充填剤は、ペプチドやオリゴヌクレオチドのコンビナトリアルケミストリーや固相合成用としても使用することができます。

### 活性化型TOYOPEARL

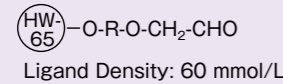
TOYOPEARL AF-Tresyl-650M



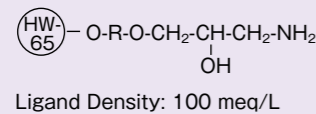
TOYOPEARL AF-Epoxy-650M



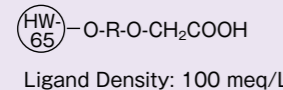
TOYOPEARL AF-Formyl-650M



TOYOPEARL AF-Amino-650M



TOYOPEARL AF-Carboxy-650M



R = hydrophilic polymer

図16 活性化型AFC充填剤の構造

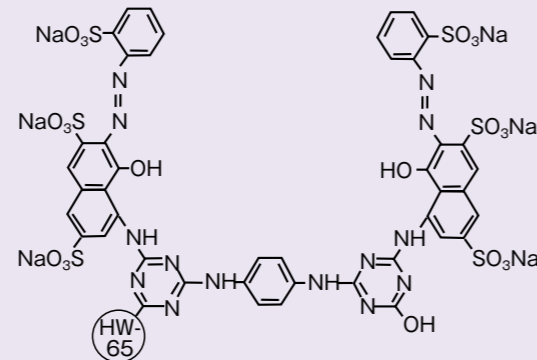
## TOYOPEARLアフィニティークロマトグラフィーの共通の特性

- 膨潤収縮が少なく、優れた圧損/流通特性を備えた親水性充填剤
- 巨大たんぱく質にも対応できる大きい細孔径(100 nm)
- ラボと生産スケール両方のAFC分離に適したMグレード(40 ~ 90  $\mu\text{m}$ )

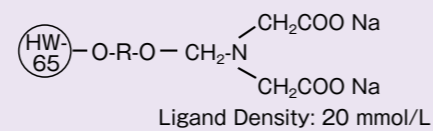
表3 タイプ別AFC充填剤

活性化型		群特異的
AF-Tresyl	AF-Amino	AF-Red
AF-Epoxy	AF-Carboxy	AF-Chelate
	AF-Formyl	AF-Heparin HC

### TOYOPEARL AF-Red-650ML



### TOYOPEARL AF-Chelate-650M



### TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M

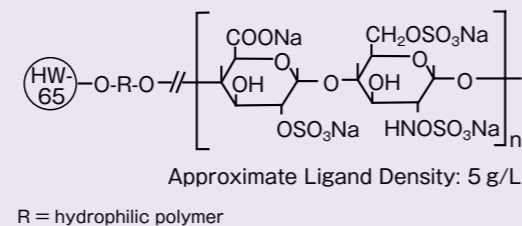


図17 群特異的AFC充填剤の構造

## 活性化型充填剤 - リガンドを直接固定化

TOYOPEARL AF-Tresyl-650Mはアミノ基及びチオール基に対して強い反応性を示す活性化型充填剤です。

この充填剤は乾燥状態で提供され、たんぱく質その他のリガンドを含む緩衝液で反応します。固定化反応は中性から弱アルカリ性(pH7~8)の溶液で行います(図18)。

このような条件下では不安定なたんぱく質でも固定化させることができます。この固定化反応によって非常に安定性の高い二級アミンまたはチオエーテル結合が作られます。トレスシル(tresyl-)基密度は最適化(膨潤ウェット状態で約20 mmol/L)しており、多点結合によるたんぱく質リガンドの不活化を防ぎながら、固定化が可能です。代表的データを表4にまとめてあります。

粒子径10  $\mu\text{m}$ のTSKgel Tresyl-5PWにつきましては、「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご覧ください。

TOYOPEARL AF-Epoxy-650Mは高密度のエポキシ基(約800  $\mu\text{mol/g}$ )を持つ活性化型充填剤であり、乾燥状態で提供されます。低分子量リガンドを高密度で固定化する場合に特に効果を発揮します(図19)。たとえば、膨潤状態の充填剤にグルタチオンとグリシンは100 mmol/Lを超える密度で固定化されます。

## 活性化型充填剤 - リガンド固定化に添加剤を利用

TOYOPEARL AF-Formyl-650Mを使用すれば、温和な条件下で第一級アミンを有するリガンドを固定化することができます。

リガンドは充填剤のホルミル基(アルデヒド基)と安定な二級アミン結合により充填剤に結合します(図20)。代表的な固定化例を表4に示します。

多種多様な工業用酵素がアルデヒド基を含む担体を用いて固定化されています。TOYOPEARL AF-Formyl-650Mは、機械的強度に優れた多孔性充填剤に、そのまま使用可能なアルデヒド基を持つ担体です。

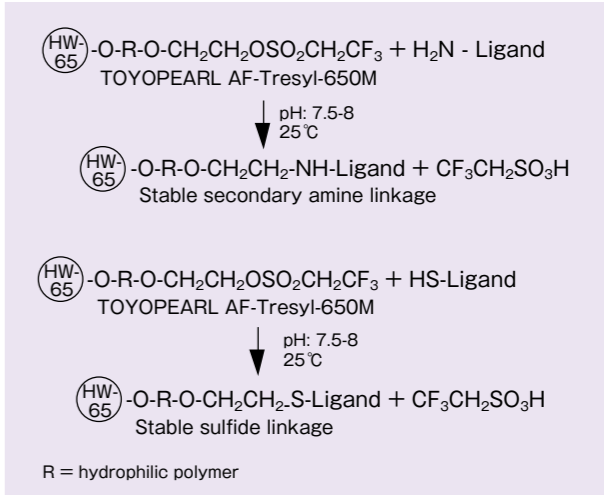


図18 活性化型AFC充填剤を用いた固定化方法

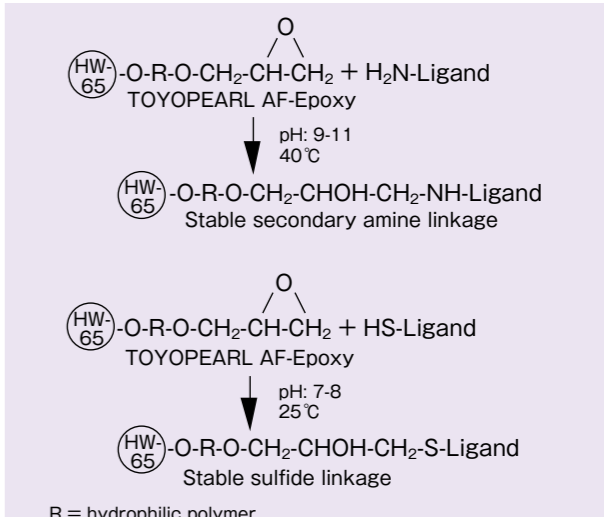


図19 活性化型AFC充填剤を用いた固定化方法

表4 活性化型AFC充填剤を用いたたんぱく質の固定化

TOYOPEARL 充填剤	AF-Tresyl-650M	AF-Formyl-650M	AF-Amino-650M	AF-Carboxy-650M
たんぱく質固定化量 (g/L)				
Soybean trypsin inhibitor	16	3.5	5.8	15
Protein A	1.9	—	—	—
Concanavalin A	13	—	—	—
$\alpha$ 1-Antitrypsin	12.3	—	—	—
$\alpha$ -Chymotrypsin	12.5	—	—	—
Myoglobin	12.4	—	—	—
Ovalbumin	—	2.5	6.7	0.8
Bovine serum albumin	12.4	14	19.2	3.3
Human IgG	10.0	15	6.7	11.7
Cytochrome C	—	5.8	3.3	7.5
Lysozyme	60	20	5.8	17.5
Coupling agent	not required	NaCNBH <sub>3</sub>	NaCNBH <sub>3</sub> or Carbodiimide	Carbodiimide
Optimal pH	7.0 - 9.0	6.9 - 9.0	4.5 - 6.0	4.5 - 6.0



# アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

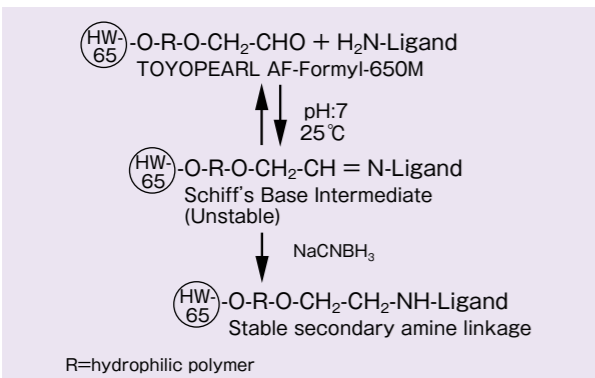


図20 活性化型AFC充填剤を用いた固定化方法

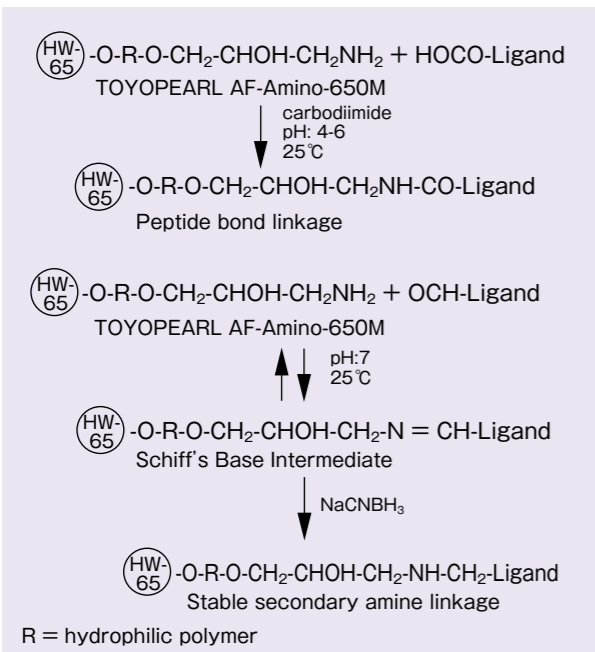


図21 活性化型AFC充填剤を用いた固定化方法

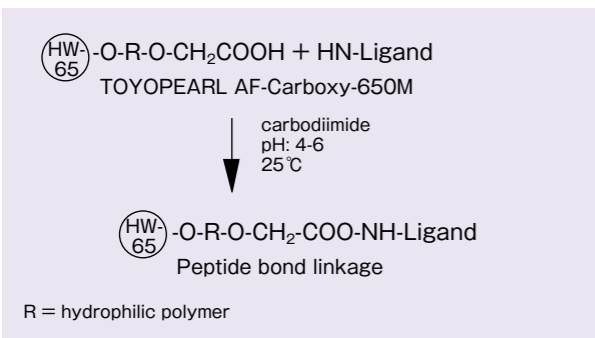


図22 活性化型AFC充填剤を用いた固定化方法

TOYOPEARL AF-Amino-650Mはカルボン酸(ペプチド結合)またはアルデヒド基(還元アミノ化)を介してリガンドを固定化します(図21)。カルボキシ基を持つリガンドを、カルボジイミドをカップリング剤として使用し、リガンドと担体間にアミド結合を生成し固定化することが可能です。

アルデヒド基を持つリガンドとしては、還元糖を有する炭水化物や糖たんぱく質か、あるいは温和な過ヨウ素酸化反応で糖鎖のジオール基をアルデヒド基に開裂した化合物が利用可能です。

TOYOPEARL AF-Amino-650Mは官能基の導入密度が至適化(100 mmol/L)されていますので、たんぱく質や低分子量リガンドの固定化に適しています。たとえば、ラクトースは還元アミノ化反応を用いて30 mmol/L充填剤で固定化することができます。各種たんぱく質の固定化例を表4に示します。

またTOYOPEARL AF-Carboxy-650Mは、温和な方法でたんぱく質のアミノ基または低分子量リガンドの固定化に使用できます。カルボジイミドをカップリング剤とする固定化反応で、リガンドと担体間にアミド結合を生成します(図22)。代表的な固定化例を表4に示します。

## 群特異性リガンドを導入したTOYOPEARL

### TOYOPEARL AF-Chelate -650M

この充填剤はリガンド密度約35 mmol/Lのイミノジ酢酸(IDA)を導入したものです(図17)。応用例としては、金属イオン(Ca<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>など)を安定な三座キレート配位により担体に結合させます。得られた金属イオン配位充填剤は、His-Tagたんぱく質などアミノ酸配列にヒスチジンや遊離システインを含むたんぱく質やペプチドを選択的に結合、保持します。金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)は組み換え型ヒト成長因子や組織プラスミノーゲン活性化因子、グリコホリン、細胞そのものなどの精製に使用されています。

### TOYOPEARL AF-Red-650ML

TOYOPEARL AF-Red-650MLにはReactive Red 120 (Procion Red HE-3B)が導入されています(図17)。この充填剤はヌクレオチド依存性酵素、リボたんぱく質、プラスミノーゲン、ペプチド、ホルモン、サイトキシンなどの精製に有効です。

### TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M

ヘパリンは抗血液凝固作用を持つ高度に硫酸化された直鎖グルコサミノグリカンです。このポリアニオン特性により、ヘパリンは血漿成分やリボたんぱく質、リパーゼ、コラゲナーゼ、DNAポリメラーゼなど幅広い生体分子と相互作用します。

TOYOPEARL AF-Heparin-HC-650Mは高い吸着量と優れた化学的安定性を持つアフィニティ充填剤です(図17)。

### スクリーニング用カラムToyoScreen

充填剤量として1 mLと5 mLのタイプがあり、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F、TOYOPEARL AF-rProtein A-650F、TOYOPEARL AF-rProtein L-650F、TOYOPEARL AF-Chelate 650M、TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M及びTOYOPEARL AF-Red-650MLが用意されています。

ToyoScreenはプロセス開発の初期段階で目的物質の吸着と回収率に適した充填剤をスクリーニングする目的で簡便にご使用いただける製品です。

# アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

## 製品一覧表

### TOYOPEARL AFC充填剤

品番	品名	容量 (mL)	粒子径 (μm)	リガンド濃度	たんぱく質吸着量 (参考値)
<b>抗体的AFC充填剤</b>					
0022803	TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	10	30 - 60	—	≥45 g/L (免疫グロブリンG)
0022804		25			
0022805		100			
0022806		1,000			
0022807		5,000			
0023425	TOYOPEARL AF-rProtein A HC -650F	10	30 - 60	—	≥68 g/L (免疫グロブリンG)
0023426		25			
0023427		100			
0023428		1,000			
0023429		5,000			
0023486	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	10	30 - 60	—	≥64 g/L (免疫グロブリンG)
0023487		25			
0023488		100			
0023489		1,000			
0023490		5,000			

### 群特異的AFC充填剤

0014475	TOYOPEARL AF-Chelate-650M	25	40 - 90	2.5 - 45 meq/L	—
0019800		100			
0014476		250			
0014907		1,000			
0008651	TOYOPEARL AF-Red-650ML	25	40 - 90	—	2.5 - 4.5 g/L (HSA)
0019801		100			
0008706		500			
0020030	TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M	10	40 - 90	—	≥5 g/L (AT III)
0020031		100			
0020032		1,000			
0020033		5,000			

### 活性型AFC充填剤

0014471	TOYOPEARL AF-Tresyl-650M	5 g*	40 - 90	—	≥60 g/L (STI)
0014472		100 g*			
0014906		1,000 g*			
0008000	TOYOPEARL AF-Epoxy-650M	10 g*	40 - 90	600 - 1,000 μeq/L	—
0008038		100 g*			
0018315		1,000 g*			
0008004	TOYOPEARL AF-Formyl-650M	25	40 - 90	40 - 70 meq/L	—
0008040		100			
0017396		1,000			
0017397		5,000			
0008002	TOYOPEARL AF-Amino-650M	25	40 - 90	70 - 130 meq/L	—
0008039		100			
0018074		1,000			
0018316		5,000			
0008006	TOYOPEARL AF-Carboxy-650M	25	40 - 90	80 - 120 meq/L	—
0008041		100			
0018827		1,000			
0018828		5,000			

\* プロテインA、プロテインLリガンド漏出率キット (ELISAキット) につきましては、当社営業までお問い合わせください。

\* ドライゲル1gは水溶液中で約3.5 mLに膨潤します。

\* 価格につきましては、「TSKgel / TOYOPEARL総合カタログ」をご覧ください。

\* 容量が1,000 mL、5,000 mLの製品の価格につきましては、当社営業までお問い合わせください。

## 製品一覧表

### ToyoScreen AFCカラム (プロセス開発、スクリーニング用)

品番	品名	内容
0022809	ToyoScreen AF-rProtein A-650F	AF-rProtein A-650F 1 mLタイプ5本
0022810		AF-rProtein A-650F 5 mLタイプ1本
0022811		AF-rProtein A-650F 5 mLタイプ5本
0023430	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F	AF-rProtein A HC-650F 1 mLタイプ5本
0023431		AF-rProtein A HC-650F 5 mLタイプ1本
0023432		AF-rProtein A HC-650F 5 mLタイプ5本
0023494	ToyoScreen AF-rProtein L-650F	AF-rProtein L-650F 1 mLタイプ5本
0023495		AF-rProtein L-650F 5 mLタイプ1本
0023496		AF-rProtein L-650F 5 mLタイプ5本
0021384	ToyoScreen AF-Chelate-650M	AF-Chelate-650M 1 mLタイプ6本
0021385		AF-Chelate-650M 5 mLタイプ6本
0021388	ToyoScreen AF-Red-650M	AF-Red-650M 1 mLタイプ6本
0021389		AF-Red-650M 5 mLタイプ6本
0021390	ToyoScreen AF-Heparin HC-650M	AF-Heparin HC-650M 1 mLタイプ6本
0021391		AF-Heparin HC-650M 5 mLタイプ6本

\* ToyoScreenをご使用の際には、品番0021400 ToyoScreen Holderが必要になります。

### ToyoScreen カラムホルダ、コネクタ

品番	品名	規格
0021400	ToyoScreen Holder	1 mL、5 mLカラム共通
0020028	T-Fユニオン	FPLC® 用コネクタ

\* 「FPLC」はGEヘルスケア・ジャパン社の登録商標です。

### MiniChrom

品番	品名	カラム容量 (mL)	粒子径 (μm)
0045161	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	5	30 - 60
0045162	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	5	30 - 60

### RoboColumn

品番	品名	容量 (μL)	粒子径 (μm)
0045061	TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	200 × 8	30 - 60
0045062		600 × 8	30 - 60
0045063	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	200 × 8	30 - 60
0045064		600 × 8	30 - 60
0045065	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	200 × 8	30 - 60
0045066		600 × 8	30 - 60

無加圧でも、ポンプまたは落差圧で圧力をかけた加圧状態でも充填できます。  
 但し、粒子径が小さいので、無加圧充填では大きなカラムでは流速が非常に遅くなります。  
 このような場合には、溶出液槽の位置をたとえば1 m程度高くし落差をつけるか、またはポンプ使用により加圧します。  
 詳細は「TOYOPEARL、TSKgel PW充填及び使用法ガイド」を参照ください。

## スラリーの調整

### 1. 微粒子の除去

微粒子の混在はフィルタの目づまりの原因となり流速の低下につながります。次の要領で微粒子を除去します。

#### ●除去方法の一例

—TOYOPEARL DEAE-650S 250 mLの場合—

- ① 懸濁液250 mLを2 Lのビーカーに取り出し水を約750 mL入れて合計1 Lとする。
- ② 次に2～3分よく攪拌する。
- ③ 1.5時間静置後上澄の浮遊微粒子含有部約500～600 mLを捨てる。
- ④ 以上の操作を3～4回繰り返す。

最も粒子径の小さいSuper Fineの例であり、粒子径の大きいMediumでは、静置時間を短くします。

### 2. 必要充填剤量

充填法により異なります。加圧しないで充填する方法は、カラム体積よりいくらか多めに取ります。

加圧して充填する場合には、カラム体積のおおよそ20 %増程度が必要となります。

### 3. 洗浄

ほとんどのTOYOPEARLは20 %エタノール水溶液に懸濁して出荷されますので、使用に先だってグラスフィルター上で、充填剤の3倍量以上  
 の水で洗浄する必要があります。

### 4. 濃度の調製

- ① デカンテーションで微粒子を除去した充填剤を、充填剤容積の3倍量の充填溶媒で2～3回洗浄します。
- ② 洗浄後、カラム容積の1.2倍量の充填剤をメスシリンダーで計量します。
- ③ スラリー濃度が30～50 %になるように充填溶媒を加えてスラリー化します。充填には、分離に使用する溶液のうち最も塩濃度の高い溶液  
 (例えばIECの場合、0.5 mol/L NaCl溶液等) を用います。

## カラムへの充填

### 充填法

以下にTOYOPEARL HWタイプの充填を行うに当たっての注意点を示します。

- ① TOYOPEARLの充填は、緩和な加圧条件(50～数100 kPa)でおこなうのが最適です。この観点からペリスタリックポンプ(HPLC用ポンプも使用可能)を使用する充填法が好ましいものといえます。HPLC用充填剤の場合のように高圧下での充填は、お勧めできません。
- ② 簡便法である自然落差充填法においては、できるだけ水圧を大きく取っていただく方が性能の良いカラムが得られます。また充填溶媒を加温し粘性を下げるなどして、充填流速を大きくすることも良い効果をもたらします。
- ③ 懸濁液中に浮遊微粒子が存在すると、フィルターが目づまりし、圧力上昇、流速低下が起きます。デカンテーションにより浮遊物を取り除いてください。

### 各種充填法の比較

項目	ペリスタリックポンプによる充填法		自然落差による充填法	
	1.定流速法	2.半定圧法	3.リザーバ 使用法	4.簡易法 (加温)
特 充填流速	○速い	◎速い (1よりも速い)	×遅い	×遅い (3よりも速い)
微 使用流速	○大きいところまで可能	◎大きいところまで可能	×使用流速が制限される	×使用流速が制限される
微 充填における再現性	○良い	◎非常に良い	○良い	○良い
必要 な器具	×必要	×必要	×必要	○不要
	×必要	×必要	×必要	○不要
	△使用する方が良い	×必要	○不要	○不要

\* HPLC用ポンプも使用可能 (○長所、×短所)

### 定流速充填法における充填流速

#### 各種HW充填剤の充填流速

品名	カラムサイズ mm I.D. × cm	流速 mL/min	線速度 cm/h
HW-40F	10 × 60	1.0 ~ 1.4	70 ~ 110
	16 × 60	2.4 ~ 3.0	70 ~ 90
	22 × 60	4.0 ~ 5.0	60 ~ 80
	44 × 60	10.0 ~ 14.0	40 ~ 60
HW-55F HW-50F	16 × 60	2.0 ~ 3.0	60 ~ 85
	32 × 60	6.0 ~ 9.0	45 ~ 65
	44 × 60	1.0 ~ 6.0	45 ~ 65
	22 × 30	6.0 ~ 8.0	95 ~ 130
	22 × 45	4.0 ~ 6.0	65 ~ 90
HW-65F HW-75F	22 × 60	3.0 ~ 5.0	50 ~ 70
	22 × 90	2.4 ~ 3.0	35 ~ 55
HW-65F HW-75F	22 × 60	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150
	22 × 60	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150

\* 使用流速は充填流速の半分以下に設定してください。

#### 各種充填剤の充填流速及び使用流速

品名	カラムサイズ (mm I.D. × cm)	グレード	充填流速	充填線速度	使用線速度
			mL/min	cm/h	cm/h
HW-40	22 × 60	S	2.0 ~ 2.5	30 ~ 40	10 ~ 25
		F	4.0 ~ 5.0	60 ~ 80	25 ~ 50
		C	8.0 ~ 10.0	120 ~ 160	50 ~ 100
HW-50, HW-55	22 × 60	S	1.5 ~ 2.0	25 ~ 35	10 ~ 20
		F	3.0 ~ 5.0	50 ~ 70	25 ~ 35
		C	6.0 ~ 8.0	90 ~ 130	35 ~ 70
HW-65, HW-75	22 × 60	S	1.5 ~ 5.0	20 ~ 75	10 ~ 15
		F	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150	15 ~ 30
		C	5.0 ~ 20.0	30 ~ 300	30 ~ 65
IEC	22 × 20	S	<35	<550	45 ~ 65
		M, C	<65	<1000	80 ~ 240
HIC	22 × 20	S	<35	<550	45 ~ 65
		M, C	<65	<1000	80 ~ 240
AF-650タイプ	22 × 10	M	<65	<1000	30 ~ 130