Uni®HR 疏水クロマトグラフィー媒体

製品紹介

疏水クロマトグラフィー（Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC）とは、生物大分子の親疏水性の違いを利用して分離を行う技術です。この技術では、高塩濃度条件下で生物大分子が疏水クロマトグラフィー媒体の疏水基に吸着し、その後、塩濃度を下げることで、疏水性の弱い順に異なるタンパク質が洗脱され、分離・精製が行われます。疏水クロマトグラフィーは、操作条件が温和で分解能が高いため、生物大分子の分離・精製に広く用いられている方法の一つです。疏水クロマトグラフィー媒体Uni®HRは、単分散高架橋PMMA（ポリメチルメタクリレート）親水改質微粒子を基質とし、先進的な結合技術によりフェニル基およびブチル基の疏水基を基質表面に固定しています。この媒体は、高塩濃度条件下で生物分子を吸着させ、低塩濃度で洗脱することで、高い吸着容量と低い非特異的吸着を特徴としています。特に、イオン交換クロマトグラフィー工程後のさらなる分離・精製に適しています。

製品の優位性

(a) **単分散微球充填材の採用**：ロット間の安定性が向上します。
(b) **特許取得済みの表面結合技術**：より高い動的結合容量を実現します。
(c) **充填材のカラム圧縮係数**：アガロースおよびデキストランゲルに比べてはるかに低いです。
(d) **幅広い充填材の規格**：専門的なカスタマイズサービスを提供し、顧客のニーズに対応します。
(e) **高い機械的強度**：低い逆圧により生産効率が向上し、さまざまなニーズに対応します。

操作手順:

カラム充填

スラリーの濃度は、クロマトグラフィー媒体が沈降した後の体積とスラリー全体の体積の比率を指します。最適なイオン交換クロマトグラフィー媒体のカラム充填効果を得るために、スラリー濃度を50〜70％にすることを推奨します。具体的なカラム充填方法は以下の通りです。

1）まず、充填するカラムの体積Vcを計算します。

$Vc=h\times\pi r^2$*

Vc：カラム体積、h：カラムの高さ、r：カラムの半径。

2）イオン交換クロマトグラフィー媒体を元の容器内で静かに撹拌し、媒体が液体に完全に分散してスラリーを作ります。必要な原液の体積を計量します。

*一般的に、イオン交換クロマトグラフィー媒体は圧力がかかると圧縮され、体積が縮小します。緻密なカラムベッドを得るために、充填材の体積をカラム体積の約1.1倍にすることを推奨します。

3）20％のエタノールを添加し、スラリーの濃度を50％〜70％に調整します。

4）スラリーを全部カラムに注ぎ、圧縮係数1.05〜1.1でカラム充填を行います。まず低流速で定流量の充填を行い、その後高流速で定圧充填を行うことを推奨します。

カラム効率評価

カラムが充填された後、流速50〜200cm/hで移動相を用いて平衡させ、カラム効率のテストを行います。具体的なテストデータは表3を参照してください。

表3.疎水クロマトグラフィーカラムのカラム効率テスト

サンプル	5%(v/v)アセトン水溶液/2MNaCl
サンプル量	0.5-2%カラム体積
移動相	脱イオン水/0.5M NaCl
線形流速	50～200cm/h
検出	5%アセトン：UV@280nm 2M NaCl：導電率計

洗浄

充填されたカラムは、少なくとも5BVの脱イオン水で洗浄する必要があります。

平衡

クロマトグラフィーを行う前に、3〜5倍のカラム体積の移動相でカラムを平衡させます。一般的には、20mM PBS（リン酸緩衝液）と0.5M NaCl溶液（pH7.0）を含む緩衝液を使用します。

サンプルロード

固体サンプルは、平衡液で溶解して調製します。低濃度のサンプル溶液は予め濃縮し、高濃度のサンプル溶液は平衡液で希釈します。カラムの詰まりを防ぐために、サンプルは遠心分離または膜フィルター処理を行います。サンプル量は、媒体の結合容量とサンプル中の目的タンパク質の含有量に基づいて計算し、サンプルロード前に結合容量の緩衝液が平衡液と一致するようにします。

洗脱

サンプルロードが完了したら、平衡緩衝液を使用してベースラインが安定するまで洗浄を続けます。必要に応じて、塩濃度を低下させたり、移動相のpHを変更したりして、クロマトグラフィー媒体に吸着されたサンプルを段階的に洗脱します。

再生

各クロマトグラフィー操作後、カラムを再生するために3〜5カラムボリュームの低イオン強度緩衝液を使用して流速再生を行い、疏水性で強く結合（可逆結合）しているタンパク質を除去します。その後、5カラムボリュームの脱イオン水で洗浄し、最終的に5カラムボリュームの平衡緩衝液でカラムを平衡させます。

インプレース洗浄

カラムの性能を維持するため、再生過程で効果的に除去できなかったタンパク質やその他の不純物が存在する場合、インプレース洗浄（定置洗浄）を行います。インプレース洗浄では、逆洗法を採用することも可能です。具体的な手順は以下の通りです。

1.疏水性結合の沈殿タンパク質やリポタンパク質に対して：0.2〜0.5M NaOHを用いて洗浄し（クロマトグラフィー媒体と1〜2時間接触）、その後5カラムボリューム以上の平衡液と3カラムボリューム以上の脱イオン水で洗浄します。

2.強い疏水性結合のタンパク質、リポタンパク質、および脂質に対して：5カラムボリューム以上の50%エタノールまたは30%イソプロパノールで洗浄し（クロマトグラフィー媒体と0.5〜1時間接触）、その後5カラムボリューム以上の脱イオン水で洗浄します。また、非イオン性界面活性剤を含むアルカリ性または酸性溶液を用いた洗浄も可能です。例えば、0.1〜0.5%のTriton X-100および0.1M酢酸を用いて1〜2時間洗浄し、その後5カラムボリューム以上の50%エタノールで洗浄して洗剤を除去し、最後に5カラムボリューム以上の純水で洗浄します。高濃度の有機溶剤を使用する際には、泡の発生を避けるために有機溶剤の濃度を徐々に増加させる方法を採用することをお勧めします。

保管

未使用のクロマトグラフィー媒体は、4〜25℃の20％エタノール溶液中で密封して保管します。使用済みのクロマトグラフィー媒体は、再生および洗浄した後、20％エタノール中で密封保管します。

表1. 疏水性クロマトグラフィー媒体の特性一覧表

製品シリーズ	Uni®HR シリーズ
基材	ポリメタクリル酸樹脂
基団	フェニル（芳香基）またはブチル（アルキル基）
毎ミリリットル動的吸着容量	10～30 mg/ml（リゾチーム）
粒径（μm）	30/60/80
孔径（Å）	500/1000
純化段階	捕捉、中度純化
主な特長	骨格の親水性が良く、生物相溶性が高く、耐塩性があり、サンプル回収率が高い
典型的な用途	抗体、タンパク質、ペプチド、核酸、抗生物質など生物大分子の捕捉と純化に適している

*注：疏水性は弱～強まで、芳香基～アルキル基の順に強くなります。また、他の基団を持つ疏水性媒体も提供可能です。

表2. 疏水クロマトグラフィー媒体製品技術仕様一覧表

製品名称	配基	粒径（μm）	孔径（Å）	最大耐圧（MPa）	推奨線速度（cm/h）	pH 安定範囲	動的吸着容量（mg/mlgel）
Uni®HR Butyl-30S	Butyl	35	500	1	50-300	2～12	~23
Uni®HR Phenyl-30S	Phenyl	35	500	1	50-300	2～12	~30
Uni®HR Butyl-30L	Butyl	32	1000	1	50-300	2～12	~15
Uni®HR Phenyl-30L	Phenyl	32	1000	1	50-300	2～12	~15
Uni®HR Butyl-60S	Butyl	60	500	0.8	50-300	2～12	~20
Uni®HR Phenyl-60S	Phenyl	60	500	0.8	100-500	2～12	~20
Uni®HR Butyl-80L	Butyl	80	1000	0.5	150-750	2～12	~10
Uni®HR Phenyl-80L	Phenyl	80	1000	0.5	150-750	2～12	~10

注：

1. pH安定範囲は使用時、再生時、およびインプレース洗浄のpH範囲を示しています。
2. 動的吸着容量はリゾチームを用いて測定されています。

トラブルシューティング

疏水性クロマトグラフィー媒体製品を使用する際に問題が発生した場合は、以下の表を参考にして解決するか、ご連絡ください。

トラブル内容	原因分析	推奨対策
カラム圧力の上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	ポンプと収集器の間のバルブが開いていない	出口を開く
	装置のインラインフィルターが詰まっている	不純物を除去して洗浄する、または交換する。使用前にサンプルと緩衝液を0.45μmまたは0.2μmで濾過する。
	ラム前の詰まり	20BVの移動相を使用してカラムを逆流洗浄する
	サンプルがカラム上で沈殿した	定置洗浄を行い、サンプル溶液の濃度を調整する
	サンプルが膨張する、または一部の物質が強く吸着して充填材に残留している	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
	カラムベッドが圧縮された	カラムを再充填する
	カラムの使用時間が長い	カラムまたはカラム充填材を交換する
サンプルの吸着が不十分	サンプル溶液中のイオン強度が高すぎる	サンプル溶液中のイオン強度を低下させる（希釈や脱塩などの手段を使用）
	サンプルのpHが不適切	pHを調整し、結合強度を増加させる
サンプルが洗脱過程で洗脱されない	洗脱液のイオン強度が低すぎる	洗脱液の濃度を増加させる
	洗脱液の洗浄能力が低すぎる	洗浄能力の高い洗脱液に交換する
	洗脱液のpHが不適切	洗脱液のpHを調整する
	カラムに疎水性が強い残留不純物がある場合	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
分離率の低下	洗脱条件が不適切（例：勾配度が急すぎる、流速が高すぎる）	洗脱条件を変更し、より緩やかな勾配洗脱や等度洗脱を採用し、流速を下げる
	カラムが正しく充填されていない	カラムを再充填する
	カラムの上端や下端に大きな混合空間がある	充填材の上表面を増やすか、カラム後部の体積を減らす
	カラムの過負荷	カラムを洗浄し、再び平衡を取り、上サンプル量を減らす
	粒径が大きい	同じタイプでより小さい粒径の充填材に交換する
	選択性の差がある	他のタイプの充填材に交換する
サンプルのロード回数が増えるとサンプルの吸着能力が低下する	サンプル中の不純物が充填材に結合し、正常な結合を妨げている	定置洗浄操作を実行する（再生条件を参照）
使用中にカラムベッドに割れ目が発生する	溶液が十分に脱気されていない	0.5MNaClで均一に混合し、充填を平衡させる
	溶液中に気泡がある	圧力を下げて気泡を除去する
	外部空気がシステムに入り込んでいる	より多くの緩衝液を追加し、システム内の気体を完全に除去する
ベースラインの漂移	カラムが十分に平衡されていない	平衡時間を増加させる
	洗脱液A、Bが同一紫外波長で吸収係数が異なる	異なる波長を使用するか、空白基準を設定する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
不明なノイズピークが現れる	前のサンプルが完全に洗脱されていない	カラムを再生する
	洗脱液が不純である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
	微量の疎水性不純物がカラムに結合し、平衡やサンプルの適用過程で濃縮され、洗脱時にピークとして現れる	カラムを洗浄する

Uni®HR疎水クロマトグラフィー媒体仕様書

品名	包装	品番	品名	包装	品番
Uni®HR Butyl-30S	30 mL	06132-030050-2030	Uni®HR Butyl-60S	30 mL	06132-060050-2030
	100 mL	06132-030050-2100		100 mL	06132-060050-2100
	500 mL	06132-030050-2500		500 mL	06132-060050-2500
	1 L	06132-030050-1001		1 L	06132-060050-1001
	5 L	06132-030050-1005		5 L	06132-060050-1005
	10 L	06132-030050-1010		10 L	06132-060050-1010
	50 L	06132-030050-1050		50 L	06132-060050-1050
	100 L	06132-030050-1100		100 L	06132-060050-1100
Uni®HR Phenyl-30S	30 mL	06131-030050-2030	Uni®HR Phenyl-60S	30 mL	06131-060050-2030
	100 mL	06131-030050-2100		100 mL	06131-060050-2100
	500 mL	06131-030050-2500		500 mL	06131-060050-2500
	1 L	06131-030050-1001		1 L	06131-060050-1001
	5 L	06131-030050-1005		5 L	06131-060050-1005
	10 L	06131-030050-1010		10 L	06131-060050-1010
	50 L	06131-030050-1050		50 L	06131-060050-1050
	100 L	06131-030050-1100		100 L	06131-060050-1100
Uni®HR Butyl-30L	30 mL	06132-030100-2030	Uni®HR Butyl-80L	30 mL	06132-080100-2030
	100 mL	06132-030100-2100		100 mL	06132-080100-2100
	500 mL	06132-030100-2500		500 mL	06132-080100-2500
	1 L	06132-030100-1001		1 L	06132-080100-1001
	5 L	06132-030100-1005		5 L	06132-080100-1005
	10 L	06132-030100-1010		10 L	06132-080100-1010
	50 L	06132-030100-1050		50 L	06132-080100-1050
	100 L	06132-030100-1100		100 L	06132-080100-1100
Uni®HR Phenyl-30L	30 mL	06131-030100-2030	Uni®HR Phenyl-80L	30 mL	06131-080100-2030
	100 mL	06131-030100-2100		100 mL	06131-080100-2100
	500 mL	06131-030100-2500		500 mL	06131-080100-2500
	1 L	06131-030100-1001		1 L	06131-080100-1001
	5 L	06131-030100-1005		5 L	06131-080100-1005
	10 L	06131-030100-1010		10 L	06131-080100-1010
	50 L	06131-030100-1050		50 L	06131-080100-1050
	100 L	06131-030100-1100		100 L	06131-080100-1100

注：Uni®HRは、7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mmのプレパックカラムも提供しています。その他の仕様やカスタマイズのご要望がありましたら、お問い合わせください。

日本販売三島国際貿易株式会社
〒411-0044静岡県三島市徳倉三丁目18-5
TEL（055）988-3590E-mail: jaina@jaina-msm.com