

NW Rose HPイオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

イオン交換クロマトグラフィー（Ion Exchange Chromatography, IEC）**は、現代のバイオテクノロジーで最も広く使用されている精製方法の一つであり、1960年代から生体分子の分離に応用され、生体分子の分離・精製において重要な役割を果たしてきました。NW Rose HPシリーズの高分解能イオン交換クロマトグラフィー媒体は、NW Roseシリーズのイオン交換媒体を最適化したもので、高分解能を提供します。この媒体は、微粒子の粒径およびリガンド密度が最適化されており、生体分子の分離精製工程における中度の精製ステップに適しています。

HP（High Performance）シリーズのイオン交換媒体は、以下の3つの部分で構成されています。

1. 架橋されたネット状の基材：この基材は、多孔性、親水性、化学的安定性を特徴としています。
2. 基材に固定された機能基：これは荷電基であり、イオン交換クロマトグラフィー媒体の性質を決定します。
3. 機能基と反対の電荷を持つイオン（平衡イオン）：このイオンは、機能基と可逆的に結合することができます。

NW Rose HPシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体は、粒径を50～60 μmに最適化し、粒子の分散がより均一です。分解能を損なうことなく、操作時の逆圧を低減しています。

NW Rose HPシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体の特徴：

- 高い動的結合容量と優れた流速特性
- 化学的および物理的に安定性が高く、スケールアップが容易で再現性が高く、分解能が優れている
- 簡単なインプレース洗浄と消毒が可能
- 実験室および工業用のクロマトグラフィーカラムの充填に適している

NW Rose CM HPおよびNW Rose DEAE HPは、顧客のニーズに合わせてカスタマイズされたクロマトグラフィー媒体です。NW Rose HPシリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体には、以下の種類があります：

- 強陰イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose Q HP
- 弱陰イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose DEAE HP
- 強陽イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose SP HP
- 弱陽イオン交換クロマトグラフィー媒体：NW Rose CM HP

表1. NW Rose HPシリーズイオン交換クロマトグラフィー媒体技術仕様表

項目	NW Rose Q HP	NW Rose DEAE HP	NW Rose SP HP	NW Rose CM HP
外観	20%保存の均一スラリー			
骨架	高度架橋されたアガロース			
機能基	-N ⁺ (CH ₃) ₃	-(CH ₂) ₂ NH ⁺ (CH ₂) ₅₂	-(CH ₂)SO ₃ ⁻	-O-CH ₂ COO ⁻
粒子サイズ	50 μm			
イオン交換容量	140～200 μmol・mL ⁻¹ Cl ⁻	100～140 μmol・mL ⁻¹ Cl ⁻	140～200 μmol・mL ⁻¹ H ⁺	80～120 μmol・mL ⁻¹ H ⁺
耐圧	0.3 MPa			
推奨流速	150～200 cm/h			
最大流速	400 cm/h (0.1 MPa, XK26/30カラム, 15 cm, 25° C)			
使用pH範囲	2～12		4～13	
化学的安定性	水溶液、1M NaOH、6Mグアニジン、30%異プロパノール、70%エタノール			
pH安定性	2～14（短期間）			
結合容量	各タイプによる、蛋白質ごとに異なる。			

使用前の準備作業

1, 推奨するクロマトグラフィーカラムの種類:

用途に応じてクロマトグラフィーカラムを選択:

生体高分子の精製の場合はカラムの高さは10-20cmのカラムを選択します。

2, NW Rose HPクロマトグラフィー媒体の処理:

クロマトグラフィーカラムの体積に基づいて必要なNW Rose HPの質量を計算します。

カラム体積 = カラムの底面積 x 充填層の高さ

クロマトグラフィー媒体の量 (mLまたはL) = (カラム体積 x クロマトグラフィー媒体の圧縮係数)

NW Rose HPの圧縮係数は1.15です。

スラリーの使用量 (mLまたはL) = クロマトグラフィー媒体の量 / スラリーの濃度

注意:

1) 使用する緩衝液または水は脱気処理が必要です (注射用水の場合は脱気処理は不要です)。

2) 一般的に、包装状態のスラリー濃度は75%前後です。スラリー濃度が不確かである場合、クロマトグラフィー媒体のスラリーをメスシリンダーに注ぎ、一晩静置し (一般12~20時間) で、自然沈降したクロマトグラフィー媒体の体積を計算します。

3) 包装状態のNW Rose HPは20%エタノール中に保存されています。砂芯フィルターを使用し、負圧ろ過でカラムの充填緩衝液に置き換えます (カラムの充填緩衝液は一般的に水または20%エタノール、もしくは平衡緩衝液を使用します)。この手順を3回繰り返します。攪拌時に過度の力を加えないでください。

4) 高圧蒸気滅菌が必要な場合は、121℃、20分間の高圧蒸気滅菌を行ってください。

5) ゲルが膨潤する際には磁気攪拌子を使用しないでください。磁気攪拌子を使用すると、クロマトグラフィー媒体の粒子が破損する可能性があります。

6) スラリーの濃度が50%になるように調製して、よく攪拌してから使用してください。注意: スラリーの温度が高すぎた場合は、カラムが破損する恐れがあります。

カラム充填

クロマトグラフィーカラムの使用手順については、カラムメーカーごとに異なるため、使用手冊を参照してください。

1) カラム充填に使用するバッファー液は、通常、水または平衡バッファー液を使用します。特に、カラムのフィルターメッシュの孔径に注意してください。理想的な範囲は15~20 μmです。

2) カラムの水平を調整します。

3) カラムの底部フィルターを排気し、カラム底部に1cmの充填緩衝液を保持します。

4) カラム充填器を設置します。通常、充填の高さがカラムの2/3を超える場合、充填器を追加で装着する必要があります。

5) よく攪拌したゲルの懸濁液を一度にゆっくりとカラムに注ぎます。この際、気泡が入らないように注意し、注入後に再度ゲル攪拌棒で均一に混ぜます。

6) カラムヘッドを接続し、カラムヘッドとシステムまたは蠕動ポンプの間に圧力計を設置することに注意します (工業用規模のカラムには必要)。カラムヘッドのフィルターの排気を行います。

7) カラムヘッドをカラムに挿入し、カラムヘッドの底部フィルターが液面に接触するようにします。液面とカラムヘッドのフィルターの間の気泡を取り除きます。

8) システムまたは蠕動ポンプを接続し、流速を調整します。圧力を制御し、3barを超えないように注意します。

9) 流速に伴い、クロマトグラフィー媒体の界面が徐々に下降します。クロマトグラフィー媒体の界面が安定するのを待ちます (30分以内に界面がさらに下降しなくなります)。安定したら、界面の位置をマークします。

10) ポンプを停止し、充填器を取り外します (もし使用している場合)。カラムヘッドをクロマトグラフィー媒体の界面まで下げます (マークした位置からさらに0.5 cm下げます)。

11) ポンプを停止する前の流速で、さらに20~30分間、ゲルを圧縮します。クロマトグラフィー媒体の界面が安定した場合、充填が完了です。

カラム評価

表2. カラム効率評価データ

サンプル	1.0% (v/v) アセトン水溶液	2M NaCl溶液
サンプル量	カラム体積の 1.0%	カラム体積の 1～5%
移動相	水	0.4M NaCl溶液
線形流速	30cm/h	30cm/h
検出	UV 280nm	電導検出器

カラム効率の計算

UVまたは電導率の曲線に基づいて、理論塔板高さ（HETP）、理論塔板数（N）、および非対称因子（As）を計算します。式は以下の通りです。

• $HETP = L / N$

• $N = 5.54 \times (VR / Wh)^2$

ここで：

• VR = 保留体積（Retained Volume）

• Wh = 半峰幅

• L = カラムの高さ

• N = 理論塔板数

VRとWhの単位は一致させる必要があります。

• $As = b / a$

ここで：

• a = 10%ピーク高における第1半峰幅

• b = 10%ピーク高における第2半峰幅

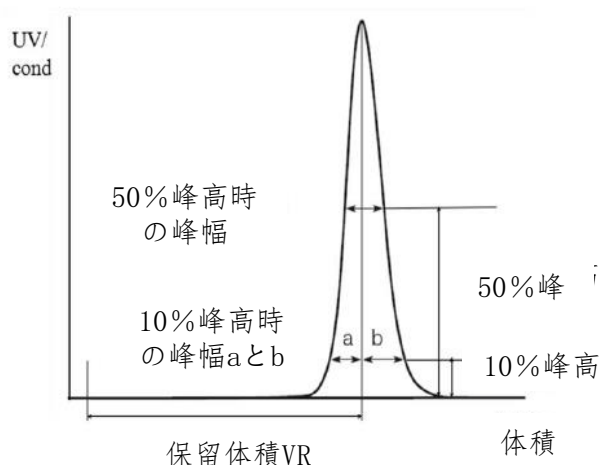


図2. カラム効果評価データの意味

結果評価

上記の公式によって計算されたHETPの値が、膨潤後の媒体の平均粒径の3倍未満であり、かつ非対称因子が0.8～1.8の範囲内であれば、合格と判定されます。理想的でないカラム

効率（柱効）に関しては、原因を分析し、再度カラムを充填する必要があります。異なる用途に応じて、求められるカラム効率は異なります。

a) 精製や分離に高分解能が必要な場合、カラム効率の要件が高くなり、HETPは媒体の平均粒径の2～4倍である必要があります。

b) 成分の分離時には、カラム効率の要件はそれほど高くありません。

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再(CIP)

クロマトグラフィー媒体の洗浄と再生クロマトグラフィー媒体を使用する回数が増えるにつれ、汚染物質がカラム上に蓄積し続けます。定期的なインプレース洗浄は、汚染物質の蓄積を防ぎ、安定した作業状態を維持するために重要です。洗浄の頻度は、媒体の汚染度に応じて決定されます（汚染が深刻な場合は、毎回使用後にインプレース洗浄を行い、結果の再現性の確保することを推奨します）。

異なる種類の不純物や汚染物に対する洗浄条件は以下の通りです。

1. 結合の強いタンパク質を除去する場合：2カラムボリュームの2M NaClで洗浄し、結合の強いタンパク質を除去します。または、1M酢酸ナトリウム（NaAC）、pH3を使用してpHを変えることで、より強く結合しているタンパク質を取り除くことも可能です。
2. 強疎水性タンパク質および沈殿タンパク質の除去：まず2～3カラムボリュームの1M NaOHで洗浄し、直後に5～10カラムボリュームの純水で洗浄します。
3. リポタンパク質および脂質の除去：最初に5～10カラムボリュームの70%エタノールまたは30%イソプロパノールで洗浄し、その後5～10カラムボリュームの純水で洗浄します。

クロマトグラフィー媒体の滅菌

NW Rose HP強陰イオン交換クロマトグラフィー媒体は、1M NaOHで0.5～1時間以上処理することで、滅菌およびエンドトキシンを除去を達成します。

クロマトグラフィー媒体の長期保存

使用後のNW Rose HP強陰イオン交換クロマトグラフィー媒体は、20%エタノール中で密閉して保存します。エタノールの蒸発や微生物の成長を防ぐために、3か月ごとに新しい20%エタノールに交換することを推奨します。

廃棄とリサイクル

NW Rose HPは自然界で分解されにくいため、環境保護のためには焼却処理を行うことを推奨します。

Q&A（質問と回答）

もしNW Rose HP 強陰イオン交換クロマトグラフィー媒体製品を使用中に問題が発生した場合は、以下のQ&Aを参考に解決するか、私たちにご連絡ください。

問題1

クロマトグラフィー媒体を攪拌してスラリー化すると、白い細かい泡が浮かぶことがありますか？

この現象は、長期間使用した後や、媒体を攪拌する際に磁気攪拌器を使用したり、媒体の移送時に蠕動ポンプを使用した際に、媒体の微粒子が破壊されたために発生します。また、長期間使用していない場合、媒体が過度に沈降し、攪拌を始める際に激しく攪拌しすぎたことが原因です。

問題2

イオン交換後、タンパク質の純度が低い？

イオン交換の分離能（解像度）はいくつかの要因によって決まります：

- クロマトグラフィー媒体のカラム効率が高いほど、解像度も高くなります。（カラム効率の測定を参照）
- クロマトグラフィー媒体の粒径が小さいほど、解像度が高く、粒径が大きいと解像度が低くなります。
- 洗脱方法として、線形洗脱は解像度が高いです。
- サンプル中のターゲットと不純物の電荷の違いに基づいて、試験中に最大の差異があるpH環境を見つけ、適切なクロマトグラフィー媒体を選択します。

問題3

イオン交換後、タンパク質の収率が低い場合はどうすればよいですか？

流出液中のサンプル濃度（または活性）を確認し、サンプルがクロマトグラフィー媒体に吸着されているか、部分的にしか吸着されていないかを確認します。（サンプルが過剰な場合も、収率が低い原因です）

再生液中でサンプルを確認し、サンプルが非常に強く吸着しているかどうかを確認します。（バッファや媒体の種類を変更することも可能です）

CIP中にサンプルが残っているかどうかを確認し、サンプルがカラム中で沈殿している場合は、クロマトグラフィー条件を変更します。

問題4

サンプルが吸着しない？

以下の原因が考えられます。

- サンプルが過剰である可能性があります。流出液中のサンプル濃度や活性を確認します。
- サンプルの環境が非常電、またはサンプルの電荷がクロマトグラフィー媒体の電荷と同じ可能性があります。

問題5

サンプルを繰り返しロードできますか？繰り返しロードは何回まで可能ですか？

精製目的が達成され、クロマトグラフィー媒体が汚染されていないかを確認します。通常、サンプルが澄んでいて、粒子や沈殿がなく、分離後のサンプルも澄んでいる場合、このようなサンプルは10～15回まで繰り返しロードすることが可能です。

問題6：イオン交換精製後、どのように脱塩すればよいですか？

ゲルろ過技術を使用して脱塩することができます。例：NW DEX G-25C。または、洗脱時にpHを変える方法で脱塩を行うことも可能です。

問題7：クロマトグラフィー媒体の変色や凝集について

この現象は、クロマトグラフィー媒体を長期間使用した際に発生します。サンプル中の色素、脂質、核酸などによって媒体が汚染された場合です。異なるCIP方法を試して解決を試みてください。一般的なサンプルの場合、NW Rose Plusシリーズのクロマトグラフィー媒体は300～600回使用できますが、複雑なサンプルの場合は100～200回の使用が推奨されます。

問題8：クロマトグラフィー媒体の寿命をどのように判断しますか？

実験室での使用の場合、一般的にはクロマトグラフィー媒体のカラム圧、流速、色などを基に寿命を簡単に判断します。工業生産では、プロセス検証の方法に従って厳密に寿命を確認する必要があります。

NW Rose HPイオン交換クロマトグラフィー媒体製品仕様書

NW Rose Q HP	25 mL	60022-101400-2025
	100 mL	60022-101400-2100
	500 mL	60022-101400-2500
	1 L	60022-101400-1001
	5 L	60022-101400-1005
	10 L	60022-101400-1010
NW Rose SP HP	25 mL	60022-108700-2025
	100 mL	60022-108700-2100
	500 mL	60022-108700-2500
	1 L	60022-108700-1001
	5 L	60022-108700-1005
	10 L	60022-108700-1010
NW Rose DEAE HP	25 mL	60022-101401-2025
	100 mL	60022-101401-2100
	500 mL	60022-101401-2500
	1 L	60022-101401-1001
	5 L	60022-101401-1005
	10 L	60022-101401-1010
NW Rose CM HP	25 mL	60022-101402-2025
	100 mL	60022-101402-2100
	500 mL	60022-101402-2500
	1 L	60022-101402-1001
	5 L	60022-101402-1005
	10 L	60022-101402-1010

お問合せ 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) 988-3590 E-mail: jaina@jaina-msm.com