



FlexFire WP C4

タンパク質、抗体などの高分子化合物の分析に！！

FlexFire WP C4は、タンパク質や抗体などの高分子化合物をターゲットにしたカラムです。あらゆる分析条件に対応できるよう、pH耐久性や温度耐久性を従来よりも大幅にアップグレードされ、これからのバイオ医薬品分析に大きく貢献します。

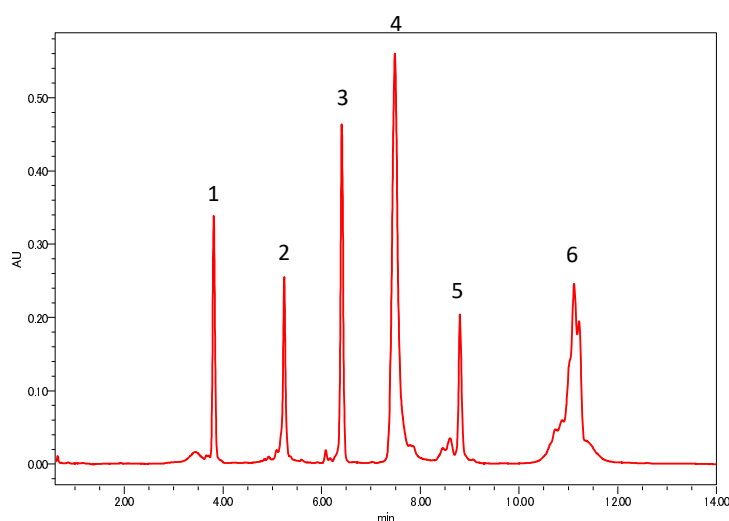
洗練されたシリカゲルを採用したFlexFire WP C4のスペック

	FlexFire WP C4
Particle size	2.6µm, 5µm
Chemistry	Butyl
Surface area	170m ² /g
Pore volume	1.4mL/g
Pore diameter	30nm
Carbon	5.0%
End-cap	あり
pH	pH1-10
Temperature	~80°C
Pressure range	2.6µm: 600bar (=60Mpa=8,702psi)
	5µm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)

FlexFire WP C4は様々な性質をもったタンパク質を疎水性の差異に基づいて溶出し、一次構造の特性解析を主な目的とします。

また、タンパク質の他にインタクトmAbの分析にも適用することができます。インタクトmAbは高温条件を必要としますが、FlexFire WP C4は80°Cの耐久性を確保しているため、シャープなピークを溶出することができます。

■ 標準タンパク質の分析例



Conditions:

Column: FlexFire WP C4, 2.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA

B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

Time	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
12.60	0.3	40	60	6
12.63	0.3	80	20	6

Temperature: 40°C

Detection: UV220nm

Sample:

1. Ribonuclease A (0.15mg/mL) M.W.=13,683
2. Cytochrome C (0.20mg/mL) M.W.=11,702
3. Lysozyme (0.20mg/mL) M.W.=14,314
4. BSA (0.68mg/mL) M.W.=66,296
5. Myoglobin (0.20mg/mL) M.W.=11,199
6. Ovalbumin (1.84mg/mL) M.W.=42,699

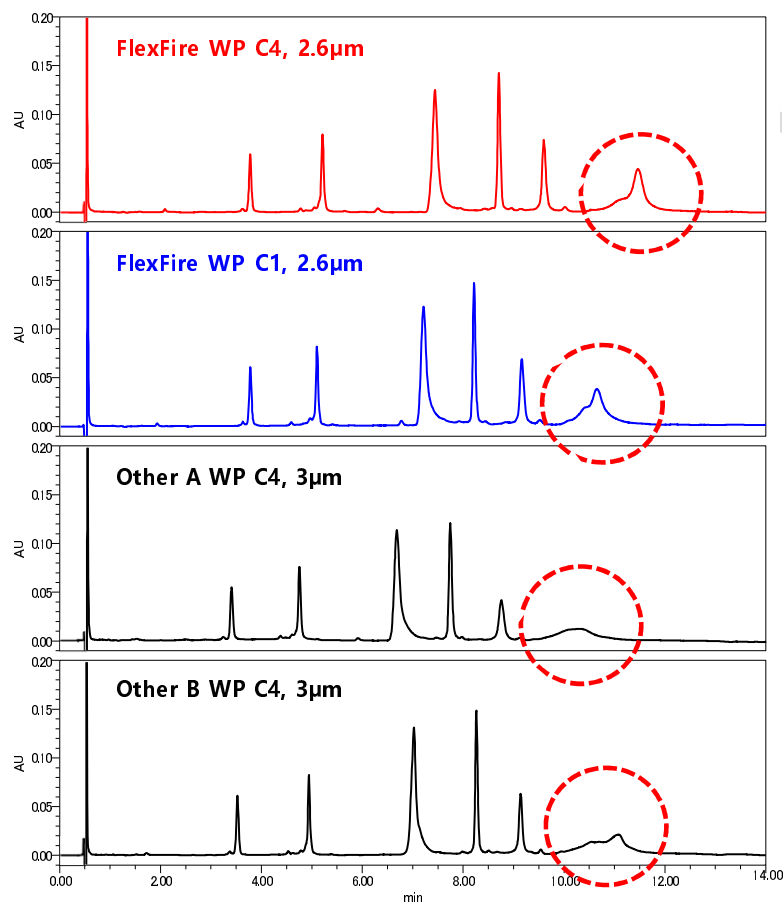
Injection volume: 5.0µL

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class Plus

Mixer: 100µL

※BSA, Ovalbuminは1次溶解液に0.1%HN₄OHを使用しています。

タンパク質の分離比較



Conditions:

Column: FlexFire WP C4, 2.6μm (2.0x50mm)
 FlexFire WP C1, 2.6μm (2.0x50mm)
 Other A WP C4, 3μm (2.0x50mm)
 Other B WP C4, 3μm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
 B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

Time	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
12.60	0.3	40	60	6
12.63	0.3	80	20	6

Temperature:

40°C

Detection:

UV220nm

Sample:

1. Ribonuclease A (0.15mg/mL) M.W.=13,683
2. Cytochrome C (0.20mg/mL) M.W.=11,702
3. Lysozyme (0.20mg/mL) M.W.=14,314
4. BSA (0.68mg/mL) M.W.=66,296
5. Myoglobin (0.20mg/mL) M.W.=11,199
6. Ovalbumin (1.84mg/mL) M.W.=42,699

Injection volume:

5.0μL

System:

Waters ACQUITY UPLC H-Class Plus

Mixer:

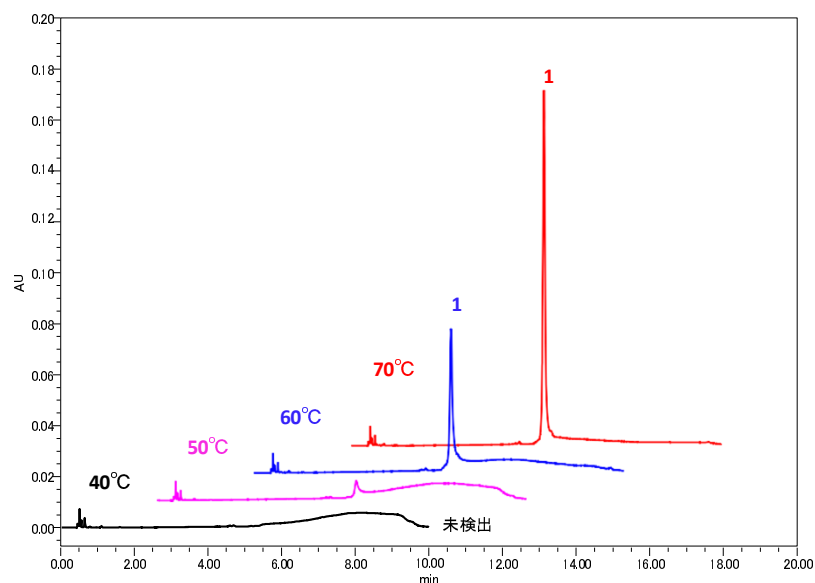
100μL

オボアルブミンに着目して、FlexFire WP C4と他社カラムを比較しました。

FlexFire WP C4, C1において、ピークトップが認識できますが、他社A,Bではブロードになっています。前項でしめしたように、二次的効果の影響を受けているものと考えられます。

※FlexFire WP C1も販売しております。詳しくはお問合せください。

インタクトmAbの分析 - 温度条件によるピーク検出ー



Conditions:

Column: FlexFire WP C4, 2.6μm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
 B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

Time	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
8.40	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6

Temperature:

40°C, 50°C, 60°C, 70°C

Detection:

UV280nm

Sample:

1. Intact Mouse IgG1 (5.0mg/mL)

Injection volume:

1.0μL

System:

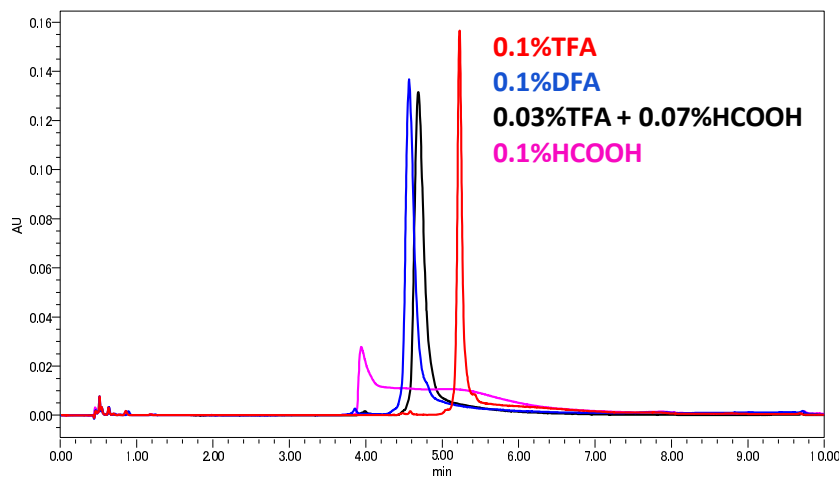
Waters ACQUITY UPLC H-Class

Mixer:

100μL

インタクトmAbの分析において、温度設定は重要なパラメーターとなります。40°Cにおいては未検出でしたが、温度を上げるによりピークが検出されるようになり、70°Cにおいて極めてシャープなピークを得ることができました。

インタクトmAbの分析 - 移動相の違いによるピーク検出ー



Conditions:

column:	FlexFire WP C4, 2.6µm (2.0x50mm)				
Mobile phase:	A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA C) Water + 0.1%DFA D) Acetonitrile + 0.1%DFA E) Water + 0.03%TFA+0.07%HCOOH F) Acetonitrile + 0.03%TFA+0.07%HCOOH G) Water + 0.1%HCOOH H) Acetonitrile + 0.1%HCOOH				
Gradient:	min	Flow	%A	%B	Curve
	0.00	0.3	80	20	6
	8.40	0.3	40	60	6
	8.42	0.3	80	20	6
Temperature:	70°C				
Detection:	UV280nm				
Sample:	Intact Mouse IgG1				
Injection volume:	0.2µL				
System:	Waters ACQUITY UPLC H-Class Plus				
Mixer:	100µL				

LC/MS使用時におけるリスク削減のために、異なる移動相にてインタクトmAbの分析を行いました。ギ酸ではピークの形状を維持するのが困難ですが、わずかなTFAと大部分のギ酸では、0.1%DFAとほぼ変わらない結果を示しました。極めてわずかなイオンペア試薬を用いることでリスクを削減することが可能となり、検出の幅を広げることができます。