

カチオン交換クロマトグラフィーワークフロー

AGILENT BIO IEX HPLC カラム

AGILENT BIO MAB HPLC カラム



本書では、生体分子の特性分析に最適な LC システムとその構成の推奨事項について説明します。また、入門用の一般的なメソッドと、このメソッドを特定の分離目標に合わせて最適化する方法についても説明しています。

Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システム

ガイドライン

- 塩基性タンパク質: SCX または WCX
- 移動相の pH を選択する場合は、タンパク質の等電点 (pI) を考慮します。pH が pI より小さいと、タンパク質は正電荷を持ちます。
- 開始時の緩衝液の pH は、pI から 0.5~1 pH 単位である必要があります (カチオン交換の場合は pI 未満である必要があります)。
- pI が不明の場合、カチオン交換では pH 6 で開始します。
- 操作範囲が最も広い SCX カラムで開始します。WCX を使用すると、選択できる範囲が変わります。
- カチオン交換用の緩衝液 (pH 4~7) には、ギ酸塩、酢酸塩、MES、リン酸塩、HEPS 等が使用可能です。

移動相

移動相には、必要な動作 pH (通常は 20 mM) を維持するための緩衝液が含まれる必要があります。溶出塩は通常 400 ~ 500 mM です。

Agilent Buffer Advisor は、4 種類の原液をさまざまな割合で組み合わせて必要なグラジエントプロファイルを作成するのに使用します。

サンプル注入量

分解能を最大にするには、1 ~ 10 μ L を注入します。サンプルは、移動相で溶解します。

流量

4.6 mm の ID カラムの通常の流量は、0.5~1.0 mL/min です。

カラム温度

上限は 80 $^{\circ}$ C です。カラム寿命を考慮した、一般的な使用条件は 10 ~ 50 $^{\circ}$ C です。

検出

UV、G1315D、10 mm バイオイナート標準フローセル

**BIO
inert**



カラムの選択

説明	Bio IEX HPLC カラム、PEEK		Bio MAb HPLC カラム、PEEK
	Bio SCX 部品番号	Bio WCX 部品番号	部品番号
4.6 x 250 mm, 10 μ m	5190-2435	5190-2455	5190-2415
4.6 x 50 mm, 10 μ m	5190-2436	5190-2456	5190-2416
4.6 x 250 mm, 5 μ m	5190-2427	5190-2447	5190-2407
4.6 x 50 mm, 5 μ m	5190-2428	5190-2448	5190-2408
2.1 x 250 mm, 10 μ m	5190-2439	5190-2459	5190-2419
2.1 x 50 mm, 10 μ m	5190-2440	5190-2460	5190-2420
2.1 x 250 mm, 5 μ m	5190-2431	5190-2451	5190-2411
2.1 x 50 mm, 5 μ m	5190-2432	5190-2452	5190-2412

結合相	
SCX (強カチオン交換) - SO ₃ H	
WCX (弱カチオン交換) - COOH	
サンプル	カラム
モノクローナル抗体	Bio MAb
ペプチドおよびタンパク質	Bio SCX および WCX
球状タンパク質およびペプチド	PL-SCX 1000Å
超高分子量生体分子/高速	PL-SCX 4000Å
タンパク質、抗体	バイオモノリス S03

注: Bio IEX および Bio MAb ステンレス HPLC カラムの部品番号の場合は、「Agilent バイオ HPLC カラム セレクションガイド」(5990-9384JAJP) を参照してください。



Agilent Technologies

推奨初期条件

モノクローナル抗体		モノクローナル抗体、タンパク質およびペプチド	
	塩グラジエント	pH グラジエント	塩グラジエント
カラム	Bio WCX, 4.6 x 250 mm, 10 μm Bio WCX, 4.6 x 250 mm, 5 μm	Bio MAb, 4.6 x 250 mm, 5 μm	Bio SCX, 4.6 x 50 mm, 3 μm WCX, 4.6 x 50 mm, 3 μm Bio MAb, 4.6 x 50 mm, 3 μm
移動相	A: 水 B: 1.6 M NaCl C: 40.0 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40.0 mM Na ₂ HPO ₄ CとDを所定の割合で組み合わせると、必要なpH範囲の20mMの緩衝液が調製されます。	A: 水 B: 1.6 M NaCl C: 40.0 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40.0 mM Na ₂ HPO ₄ CとDを所定の割合で組み合わせると、必要なpH範囲の緩衝液が、選択した緩衝液の強度で調製されます。	A: 20 mM リン酸ナトリウム、WCXの場合 pH 5.0 または SCXの場合 pH 6.0 B: 緩衝液 A + 1 mM NaCl
グラジエント	0 ~ 50 % B, 0 ~ 20 分 (一定のpH, 例えば pH 6.0) 50 % B, 20 ~ 25 分 0 % B, 25 ~ 35 分	pH 6.0 ~ 8.0, 0 ~ 20 分 0 ~ 800 mM NaCl, 20 ~ 25 分 800 mM NaCl, 25 ~ 30 分	1 ~ 100 % B 30 分 (50 mm カラムの場合)、 60 分 (250 mm カラムの場合)
流量	1 mL/min	1 mL/min	0.5 mL/min
温度	室温	室温	室温
注入量	10 μL	10 μL	10 μL
サンプル	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中、pH 6.0)	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中、pH 6.0)	
検出	UV, 220 nm	UV, 220 nm	UV, 220 nm
	<p>Agilent Bio WCX, 4.6 x 250 mm, 10 μm カラムを使用した、pH 7.0 でタンパク質標準液の分離。 オボアルブミン (pI 4.5) リボヌクレアーゼ (pI 9.4) シトクローム C (pI 9.8) リゾチーム (pI 11)</p>	<p>6.5 ~ 7.5 の pH グラジエント (0 ~ 20 分)、50 mM、Agilent Bio MAb, 4.6 x 50 mm, 5 μm を使用した IgG モノクローナル抗体の分析。</p>	<p>カチオン交換クロマトグラフィーを使用した Agilent 3 μm イオン交換カラムでのタンパク質標準液の分離。 リボヌクレアーゼ (pI 9.4) シトクローム C (pI 9.8) リゾチーム (pI 11)</p>

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan, August 1, 2015

5991-6104JAJP



Agilent Technologies