

サイズ排除クロマトグラフィー UV/DAD ワークフロー AGILENT ADVANCEBIO SEC カラム



本書は、生体分子の特性解析に必要な最適な LC システムとその構成に関する、アジレントのアプリケーションケミストからの推奨事項を記載しています。また、メソッド開発のスタート地点となる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も示します。

Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システム

ガイドライン

- タンパク質の凝集体は、pH、イオン強度、温度などさまざまな環境要因の影響を受けます。凝集体の濃度を定量するために、サンプルに影響を与えない移動相を使用します。一般には、150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 で開始します。
- ルーチン SEC では 300 mm カラムを使用します。
- サンプルスループットを高めるには、150 mm カラムを使用して流量を上げます。
- 分離能を上げるには、2つのカラムを連結して使用します。
- SEC は非相互作用の LC 技術のため、効率的な分離を実現するには少ない注入量で行われなければなりません。サンプルサイズは、総カラムボリュームの 5% 以下にしてください。
- SEC/DAD、SEC/UV、SEC/LS アプリケーションには AdvanceBio 2.7 μm SEC カラムを推奨します。SEC/MS メソッドの場合は、アジレントでは Bio SEC-3 カラムを推奨します。
- カラムの寿命を最大にするために、アジレントではガードカラムの使用、1つのカラムを使用する場合は 200 bar 以下、2つのカラムを連結して使用する場合は 400 bar 以下の使用圧力を推奨します。

移動相

水溶液または水性/有機緩衝液を用いてアイソクラティック溶出をします。使用前に 0.2 μm フィルタでろ過します。

ポンプ (G5611A)

内径 7.8 mm の場合は 0.1 ~ 2.0 mL/min
内径 4.6 mm の場合は 0.1 ~ 0.7 mL/min

サンプル注入 (G5667A)

1 ~ 5 mg/mL のタンパク質を含むサンプルの場合、5 ~ 10 μL を注入。

カラムコンパートメント (G1316C)

生物学的に活性なタンパク質に SEC を使用する場合、一般的に 20 ~ 30 °C の温度で使用します。

検出器 (G1315D)

DAD、バイオイナート標準フローセル 10 mm 付き

**BIO
inert**



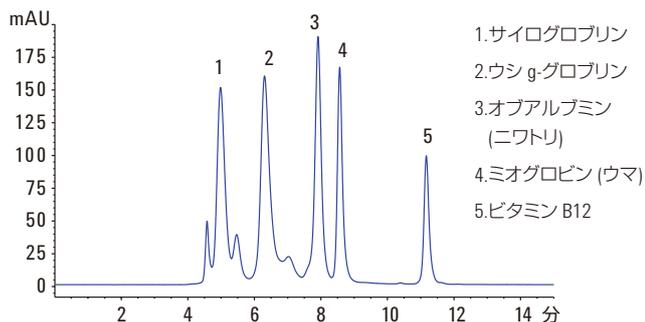
概要	130 Å	300 Å
分析カラム		
4.6 x 300 mm, 2.7 μm	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 x 150 mm, 2.7 μm	PL1580-3350	PL1580-3301
7.8 x 300 mm, 2.7 μm	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 x 150 mm, 2.7 μm	PL1180-3350	PL1180-3301
分析用ガードカラム		
4.6 x 50 mm, 2.7 μm	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 x 50 mm, 2.7 μm	PL1180-1350	PL1180-1301



Agilent Technologies

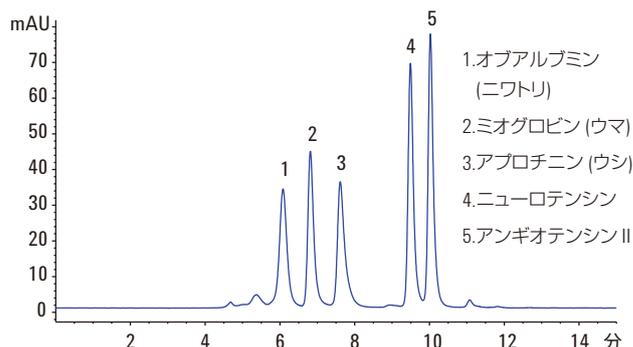
AdvanceBio SEC カラムの選択

AdvanceBio SEC 300 Å、タンパク質の分離範囲は 5 ~ 1,200 KD



カラム: AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 300 mm
BioRad ゲルろ過標準混合物 #1511901
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0

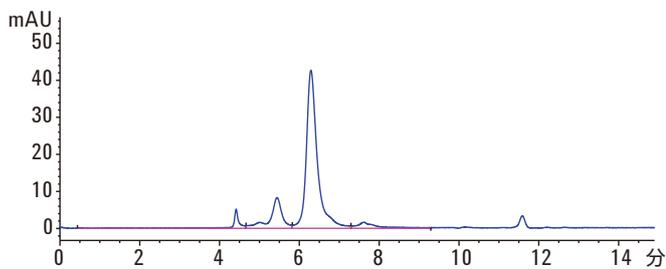
AdvanceBio SEC 130 Å、タンパク質の分離範囲は 0.1~100 KD



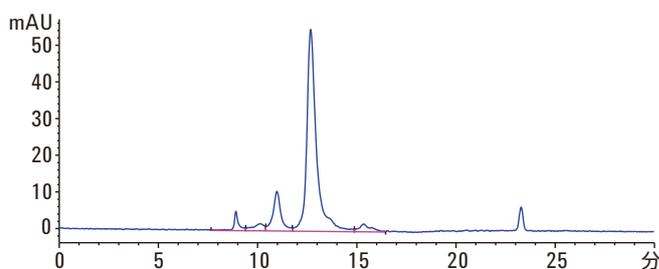
カラム: AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 x 300 mm
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0

分離能の向上

2つのカラムを連結して使用すると分離能を向上できます。



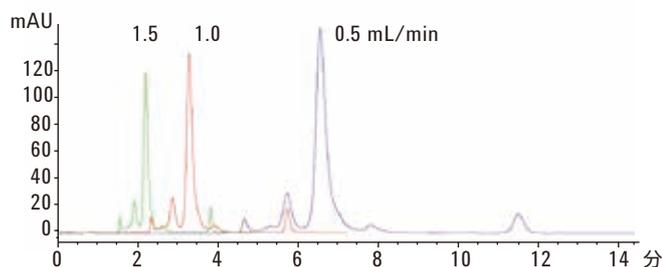
カラム: 1 x AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 300 mm
分析時間: 15分
Rs (単量体/二量体) = 2.06
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0
サンプル: IgG



カラム: 2 x AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 300 mm
分析時間: 30分
Rs (単量体/二量体) = 2.59
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0
サンプル: IgG

分析時間の短縮

150 mm の短いカラムを使用し、流量を高速にして時間を短縮できます。



カラム: 1 x AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 150 mm
移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0
サンプル: IgG

流量	Rs (単量体/二量体)	分析時間
0.5 mL/min	1.94	15分
1.0 mL/min	1.63	8分
1.5 mL/min	1.46	4分

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, November 1, 2015
5991-6424JAJP



Agilent Technologies