

疎水クロマトグラフィー分離に影響する要因

U181127A

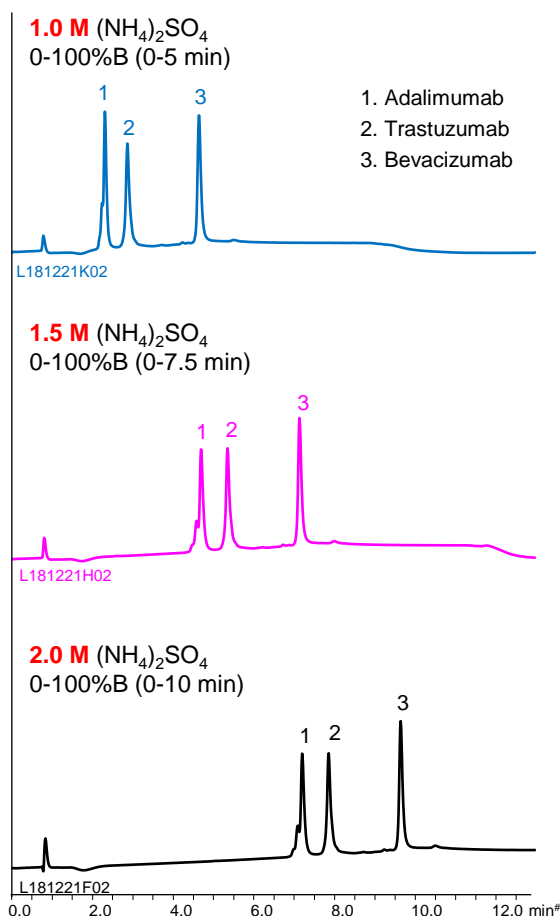
疎水クロマトグラフィー(HIC)は、抗体などのタンパク質と充填剤(担体)との疎水性相互作用に基づいて分離するモードです。高塩濃度の移動相条件下でタンパク質を担体に吸着させ、塩濃度を下げることで溶出させます。温和な条件で分離するため、タンパク質などを変性させることなく活性を維持したまま分析できます。

本データシートでは、HIC分離に影響する要因をご紹介します。

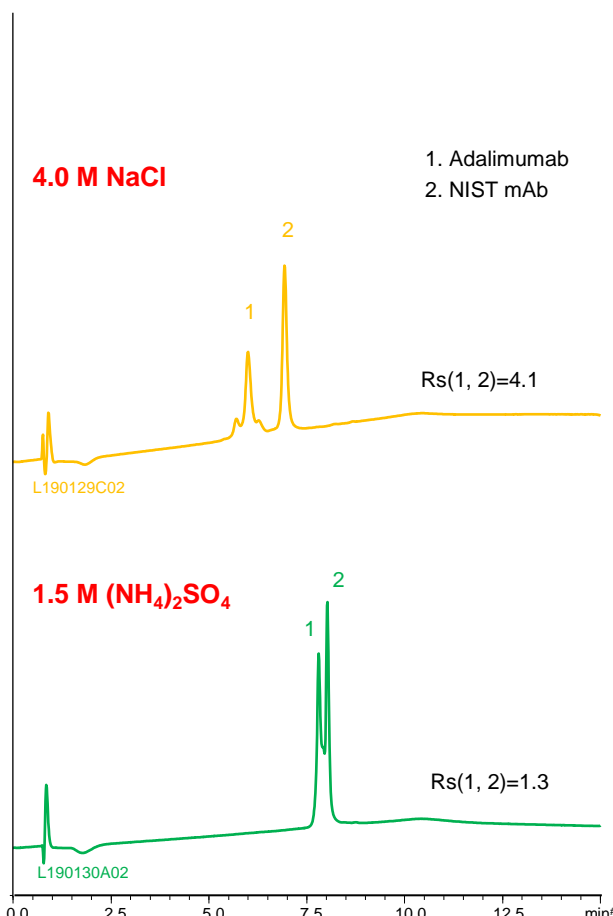
グラジエント開始塩濃度や塩の種類の影響

《グラジエント開始塩濃度の違い》

《塩の種類の違い》



Column : BioPro HIC BF 4 μm, 100 X 4.6 mmI.D.
Eluent : A) 塩を含む 100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)
B) 100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)
0.2 M/min (塩のグラジエント勾配は同一)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 280 nm
Injection : 5 μL (0.5 mg/mL)



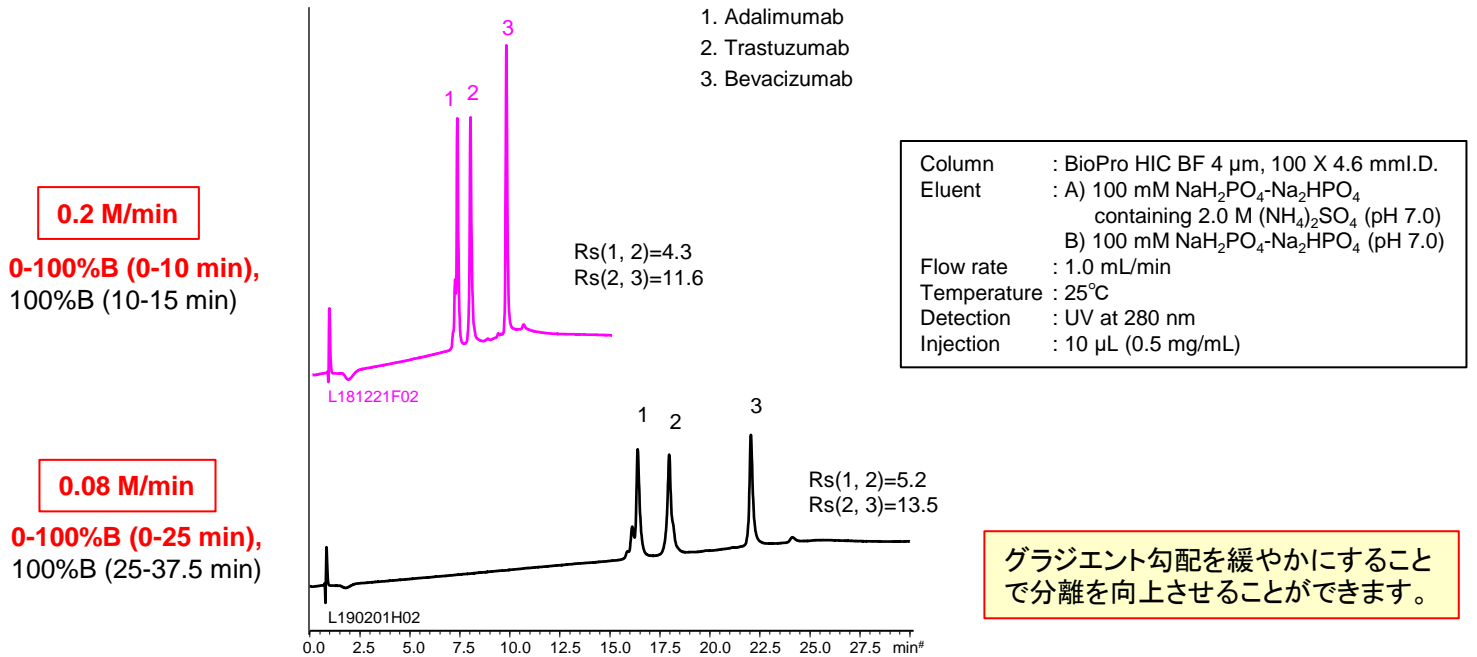
Column : BioPro HIC BF 4 μm, 100 X 4.6 mmI.D.
Eluent : A) 塩を含む 100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)
B) 100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)
0-100%B (0-10 min), 100%B (10-15 min)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 280 nm
Injection : 10 μL (0.25 mg/mL)

HICの移動相には、塩析力が強い(NH₄)₂SO₄を含む緩衝液が一般的によく用いられます。グラジエント開始時の(NH₄)₂SO₄塩の濃度が高いほど、タンパク質の保持が強くなります。タンパク質の疎水性が低く、保持が十分ではない場合は、グラジエント開始塩濃度を上げることが有効です。

その他の塩としてはNaClやCH₃COONH₄なども使用されます。上図のように、タンパク質の種類によっては塩の違いで分離選択性が大きく変わるため、分離が困難な場合には塩の変更も有効です。ただし、これらの緩衝液で(NH₄)₂SO₄と同程度の保持を得るには高濃度にする必要があるため、塩が析出したりLCシステムに影響を与えたりする可能性があり、注意が必要です。

ワイエムシの疎水クロマトグラフィー用カラム BioPro HIC BFは、担体の疎水性を高く設計しているため、他の市販カラムでは保持できないような疎水性の低いタンパク質を、低塩濃度あるいは塩析効果の低い塩の条件でも分析することができます。

グラジエント勾配の影響



分析温度の影響

