

역상 LC 기본 구조 특성화 워크플로

AGILENT LC ADVANCEBIO RP-mAb 컬럼



본 문서에서 애질런트 응용 화학자들은 생체분자 특성 규명에 필요한 최적의 LC 시스템과 그 구성에 대한 권장사항을 공유합니다. 또한 여러분들이 시작하는 일반적인 방법에 대한 지침을 제공하고 더 나아가, 이 방법은 사용자의 특정한 분리 목표를 달성하는 방법을 최적화할 수 있습니다. 자세한 내용은 www.agilent.com/chem/advancebio를 참조하시기 바랍니다.

Agilent 1260 Infinity Bio-Inert LC 시스템

지침

결합상: 일반적으로 C4 및 SB-C8이 사용되며 Diphenyl 컬럼을 사용할 수도 있습니다.

이동상 변화도: IPA:ACN:0.1% TFA 또는 0.1% FA를 포함한 물로 모든 표적 성분을 용출시킵니다.

시료 용해도: 초기 이동상과 혼합합니다.

온도: 높은 컬럼 온도는 단백질의 분리능과 회수율을 크게 개선할 수 있습니다.

분리능/선택성: IPA:ACN의 혼합물은 우수한 분리능을 제공하며 다양한 선택성을 위해 기타 유기 용매를 사용할 수도 있습니다. IPA를 사용하면 압력이 증가하며 이는 컬럼 온도와 유속을 통해 조절할 수 있습니다.

LC/MS

단백질 시료를 주입하기에 앞서 탈염해야 합니다.

내경이 작은 컬럼(예: 2.1mm)이 가장 많이 사용되며, 이때 최적의 유속은 0.5 ~ 1.0mL/분입니다.

FA는 보다 나은 MS 시그널을 제공하며, MS 시그널 강도를 높이려면 용리액에 TFA를 적게 사용하거나 AcOH를 사용합니다.

ACN와 IPA로 조성된 이동상은 보다 선명한 TIC 피크를 제공합니다.

이동상

용리액 A: 0.1% TFA

용리액 B: IPA, ACN, 0.09%의 TFA를 포함한 물

펌프(G5611A)

2.1mm id 컬럼의 일반적인 유속은 1.0mL/분입니다.

시료 주입기(G5667A)

mAb 농도가 1 ~ 5mg/mL인 시료의 경우 1 ~ 5µL 주입. 시료는 물이나 용리액 A에 용해될 수 있습니다.

컬럼 장치(G1316C)

성공적인 분리를 위한 일반적인 온도는 60 ~ 90°C입니다.

검출기(G1315D)

UV(210, 280nm), 10mm 생체 비활성 표준 흐름 셀 포함

**BIO
inert**



컬럼 선택

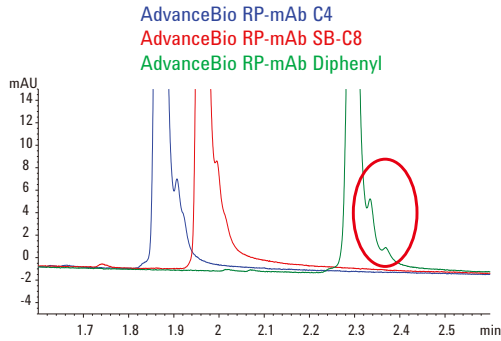
컬럼	C4	SB-C8	Diphenyl
2.1 x 50mm, 3.5µm	799775-904	789775-906	799775-944
2.1 x 75mm, 3.5µm	797775-904	787775-906	797775-944
2.1 x 100mm, 3.5µm	795775-904	785775-906	795775-944
2.1 x 150mm, 3.5µm	793775-904	783775-906	793775-944
4.6 x 50mm, 3.5µm	799975-904	789975-906	799975-944
4.6 x 100mm, 3.5µm	795975-904	785975-906	795975-944
4.6 x 150mm, 3.5µm	793975-904	783975-906	793975-944



Agilent Technologies

Intact mAb 분석

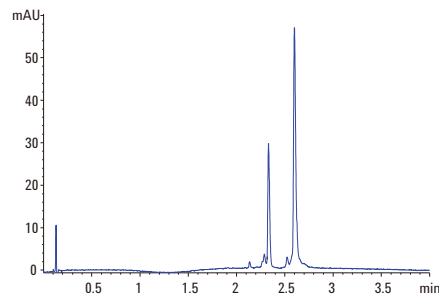
신속한 고분리능 분리



컬럼: 2.1 x 100mm, 3.5µm
 용리액 A: 0.1% TFA가 함유된 물:IPA(98:2)
 용리액 B: IPA:ACN:용리액 A(70:20:10)
 유속: 1.0mL/분
 이동상 변화도: 4분, 10-58% B; 95% B로 1분간 세척;
 10% B로 1분간 재평형
 주입: 5µL(1mg/mL)
 시료: Herceptin IgG1 변종
 온도: 80°C
 검출: UV, 254nm

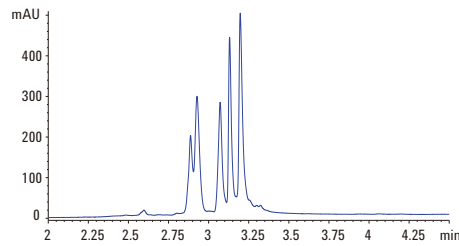
mAb 조각 분석

화학적 분해 -
 H 사슬(heavy chain)/L 사슬(light chain)



컬럼: AdvanceBio RP-mAb Diphenyl,
 2.1 x 50mm, 3.5µm
 용리액 A: 0.1% TFA가 함유된 물
 용리액 B: IPA:ACN:물(70:20:10)
 + 0.09% TFA
 유속: 1mL/분
 이동상 변화도: 0분, 15% B; 0.5분, 25% B;
 1.5분, 35% B; 1.51분, 35% B;
 3분, 60% B; 4분, 60% B
 주입: 1µL(1mg/mL)(TECP 검출 시
 감소됨)
 시료: Rituximab innovator
 온도: 80°C
 검출: UV, 220nm

효소 분해 - Fab/Fc 영역

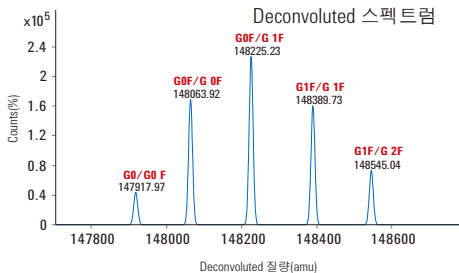
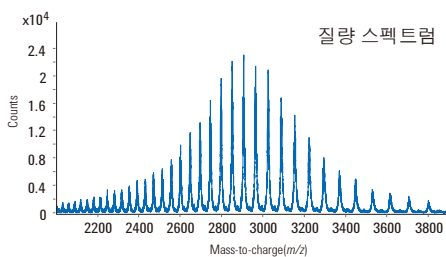
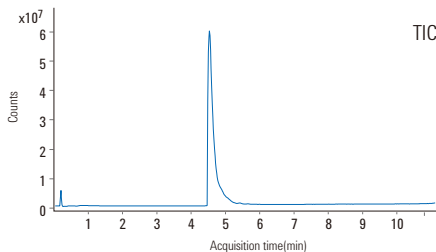


컬럼: AdvanceBio RP-mAb C4,
 2.1 x 100mm, 3.5µm
 용리액 A: 0.1% TFA가 함유된 물
 용리액 B: n-Propanol:ACN:용리액
 A(80:10:10)
 유속: 0.8mL/분
 이동상 변화도: 5분, 5-40% B; 95% B로 1분간
 세척;
 10% B로 1분간 재평형
 주입: 1µL(2mg/mL)
 시료: Herceptin IgG1 변종 - 파파인
 효소로 분해
 온도: 60°C
 검출: UV, 220nm

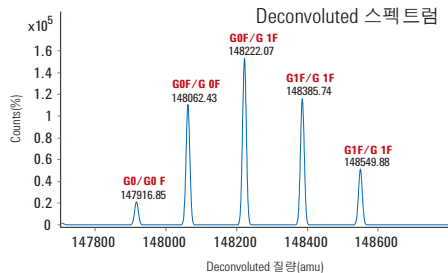
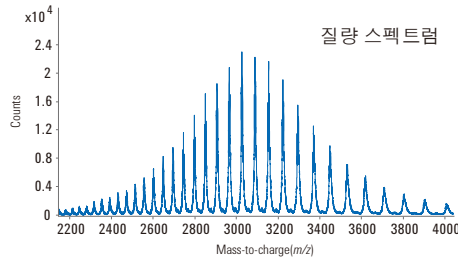
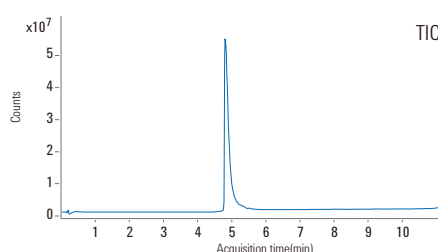
Intact mAbs의 LC/MS 분석

우수한 피크 모양과 MS 데이터를 가진 신속한 크로마토그래피(이동상: 포름산)

AdvanceBio RP-mAb C4,
 2.1 x 50mm, 3.5µm



AdvanceBio RP-mAb Diphenyl,
 2.1 x 50mm, 3.5µm



용리액 A: 0.1% FA가 함유된 물
 용리액 B: IPA:ACN:물(80:10:9.9) + 0.1% FA
 이동상 변화도: 0분, 20% B; 4분, 20% B;
 5분, 40% B; 10분, 70% B;
 11분, 90% B; 11.1분, 20% B
 유속: 0.6mL/분
 온도: 80°C
 주입: 1µL(1µg/µL)
 시료: Innovator Herceptin
 검출: Agilent 6530 Accurate-Mass
 Q-TOF LC/MS

이 정보는 사전 공지 없이
 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
 2015년 10월 6일 한국에서 인쇄
 발행물 번호 5991-6321KO

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우)06187
 한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
 고객센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies