

## カラムの洗浄

シリカ系逆相クロマトグラフィー用カラム	P. 140
ポリマー系たんぱく質分離用カラム	P. 141
サイズ排除クロマトグラフィー用カラム	P. 142

## カラムの洗浄



シリカ系充填剤 (逆相クロマトグラフィー用充填カラム)

**ODS-100V, ODS-100Z, ODS-100S,  
ODS-140HTP 2.3 $\mu$ m, Super-ODS,  
Super-Octyl, Super-Phenyl,  
ODS-80Ts QA, ODS-80Ts, Octyl-80Ts,  
CN-80Ts, ODS-80T<sub>M</sub>, ODS-120H,  
ODS-120T, ODS-120A,  
Protein C4-300, TMS-250,  
OligoDNA RP**

### 吸着の要因

逆相クロマトグラフィー用シリカ系充填剤における吸着現象は、残存シラノール基による塩基性物質のイオンの吸着とシリカゲル表面の金属不純物に対する(金属)配位性物質の吸着が考えられます。  
また、疎水性が非常に強い物質がカラムに蓄積されることがあります。

### 洗浄方法

#### 1. 疎水性物質の除去

有機溶媒濃度を高くした移動相を通液してください。

#### 2. イオン性物質の除去

有機溶媒と酸性水溶液との混合溶媒(アセトニトリル/0.1%りん酸=50/50など)を通液してください。

\*吸着物質の種類によっては回復しない場合があります。

## カラムの洗浄



親水性ビニルポリマーを基材としたたんぱく質分離用カラム

●イオン交換クロマトグラフィー (IEC) 用カラム

**SuperQ-5PW, DEAE-5PW, SP-5PW,  
CM-5PW, DEAE-NPR, SP-NPR  
BioAssist Q, BioAssist S  
Q-STAT, SP-STAT, CM-STAT,  
DNA-STAT**

●疎水クロマトグラフィー (HIC) 用カラム

**Phenyl-5PW, Ether-5PW, Butyl-NPR  
BioAssist Phenyl**

●アフィニティークロマトグラフィー (AFC) 用カラム

**Protein A-5PW, Heparin-5PW,  
Chelate-5PW, Boronate-5PW,  
BioAssist Chelate**

### 吸着の要因 (非特異的吸着)

親水性ビニルポリマーを基材としたたんぱく質分離用カラムには、各種イオン交換基を導入したIECタイプその他、HICタイプやAFCタイプの様々なカラムがあります。

これらのカラムは、化学的に安定で、溶出位置の変化はほとんど認められませんが、試料を繰り返し注入していくと、溶出挙動が変化することがあります。

これは、試料中の極微量の吸着物が充填剤に蓄積されることに起因しています。特に生体試料は成分が複雑なため、しばしばこのような吸着現象が観察されます (非特異的吸着)。

このような場合には、蓄積された吸着物を適切な溶媒で除去することにより、カラム性能を回復させることができます。

### 洗浄方法

1 及び 2 の操作を行ってください。カラム性能を確認し、回復していない場合は、3 及び 4 の操作を行ってください。なお、4 は、カラム内に尿素又は中性界面活性剤が残存する場合がありますので、1～3 で回復しない場合のみ実施してください。

#### 1. イオン性物質の除去

塩濃度を高くした移動相を通液してください。有機溶媒を含む場合には、塩の析出に十分注意してください。

#### 2. 疎水性物質の除去

有機溶媒濃度を高くした移動相を通液してください。その際、塩の析出に十分注意してください。

#### 3. 1 及び 2 で回復しない場合の洗浄方法

インジェクターから、0.1～0.2 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液又は20～40%の酢酸水溶液を数回注入してください。

#### 4. 難溶性たんぱく質の除去

6～8 mol/Lの尿素を添加した移動相又は0.2～0.3%の中性界面活性剤 (Triton、Tween、Brij など) を添加した移動相を通液してください。

\*吸着物質の種類によっては回復しない場合があります。

\*カラムの洗浄は、溶媒置換流速で行ってください。

TritonはUnion Carbide Corporationの登録商標です。TweenはUnichema Chemie BVの登録商標です。BrijはUniqema Americas LLCの登録商標です。

## カラムの洗浄



親水性ビニルポリマーを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用カラム  
**SuperAWシリーズ、 $\alpha$ シリーズ、  
 PW・PW<sub>XL</sub>シリーズ、BioAssist G6PW  
 SuperMultipore PWシリーズ、SuperOligoPW**

### 吸着の要因

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用充填剤として高分子の分子量測定に用いられるカラムには、SuperAWシリーズ、 $\alpha$ シリーズ及びPW・PW<sub>XL</sub>シリーズがあります。これらのカラムの充填剤への吸着は、(A) イオンの相互作用、(B) 疎水の相互作用により起こります。

#### (A) イオンの吸着

ポリマー系SEC充填剤は、ごく僅かですがカルボキシル基を有しているために負に荷電しています。このため、正に荷電したカチオン性試料はイオンの吸着します。

#### (B) 疎水の吸着

ポリマー系SEC用充填剤は、疎水性の高い試料(ベンゼン環等を有する物質)に対して疎水の相互作用による吸着を示します。

### 洗浄方法

洗浄方法は、どのような上記吸着が起こったのかにより異なります。測定試料と照らし合わせて適切な洗浄方法を選択してください。

#### ●ポリマー系SEC用カラム

測定試料を考慮して1及び2の操作から適切な洗浄方法を選択してください。3は、カラム内に尿素が残存する場合がありますので、1及び2で回復しない場合にのみ実施してください。全ての洗浄操作を行うと頻繁な移動相の変更となりカラム性能を低下させることがあります。

##### 1. イオン性物質の除去

塩濃度を高くした移動相を通過してください。有機溶媒を含む場合は、塩の析出に十分注意してください。

##### 2. 疎水性物質の除去

有機溶媒濃度を高くした移動相を通過してください。その際に、塩の析出に十分注意してください。

##### 3. 難溶性たんぱく質の除去

尿素を添加した移動相を通過してください。

\*吸着物質の種類によっては回復しない場合があります。 \*カラムの洗浄は、溶媒置換流速で行ってください。



シリカゲルを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用カラム  
**SW・SW<sub>XL</sub>・SuperSWシリーズ  
 BioAssist SW<sub>XL</sub>シリーズ、UP-SW3000  
 SuperSW mAbシリーズ、UltraSW Aggregate**

### 吸着の要因

シリカ系SEC用充填剤では、ポリマー系充填剤と比較すると弱いものの、膜たんぱく質など難溶性たんぱく質の場合疎水性物質の吸着が生じることがあります。また、残存シラノール基による塩基性物質の吸着も考えられます。

一方、吸着ではありませんが、シリカ系充填剤では、酸性条件下では官能基の脱離が、アルカリ性条件下ではシリカの溶解が起こります。

### 洗浄方法

洗浄方法は、どのような上記吸着が起こったのかにより異なります。測定試料と照らし合わせて適切な洗浄方法を選択してください。

#### ●シリカ系SEC用カラム

測定試料を考慮して1及び2の操作から適切な洗浄方法を選択してください。3は、カラム内に尿素又は中性界面活性剤が残存する場合がありますので、1及び2で回復しない場合にのみ実施してください。全ての洗浄操作を行うと頻繁な移動相の変更となりカラム性能を低下させることがあります。

##### 1. イオン性物質の除去

塩濃度を高くした移動相又は酸性水溶液を通過してください。有機溶媒を含む場合には、塩の析出に十分注意してください。

##### 2. 疎水性物質の除去

有機溶媒濃度を高くした移動相を通過してください。その際、塩の析出に十分注意してください。

##### 3. 難溶性たんぱく質の除去

6~8 mol/L尿素又は0.2~0.3%中性界面活性剤(Triton、Tween、Brijなど)を添加した移動相を通過してください。

\*吸着物質の種類によっては回復しない場合があります。 \*カラムの洗浄は、溶媒置換流速で行ってください。

TritonはUnion Carbide Corporationの登録商標です。TweenはUnichema Chemie BVの登録商標です。BrijはUniqema Americas LLCの登録商標です。