

# SEPARATION REPORT

## 高性能順相クロマトグラフィー (NPC) / 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラム TSKgel<sup>®</sup> Amide-80 2 $\mu$ m について

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 特長	1
3. 基本的性質	1
3 - 1. 物性一覧	1
3 - 2. 流速の影響	3
3 - 3. 有機溶媒 (アセトニトリル) 濃度の影響	4
3 - 4. 緩衝液塩濃度の影響	5
3 - 5. 緩衝液 pH の影響	6
3 - 6. 温度の影響	7
3 - 7. 試料負荷量の影響	8
3 - 8. 試料溶液注入量の影響	8
3 - 9. 試料溶液の組成 (アセトニトリル濃度) の影響	9
3 - 10. カラム耐久性	10
4. 分離例	11
4 - 1. 既存製品 TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m との比較	11
4 - 2. 市販のカルバモイル型 HILIC カラムとの比較	11
4 - 3. 固定相が異なる HILIC カラムとの比較	12
4 - 4. 抗体由来糖鎖の分離	14
5. おわりに	14

## 1. はじめに

TSKgel Amide-80は、シリカゲル表面にカルバモイル基(アミド基)を化学結合した順相クロマトグラフィー(NPC) / 親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムです。糖類(単糖、二糖、オリゴ糖)をはじめ、ペプチド、核酸、天然物、薬物およびその代謝物など、ODSカラムに保持されにくい親水性化合物の分析に適したカラムとして、発売以来現在に至るまで高い評価をいただいております。一方、近年では高耐圧と低デッドボリュームを特長とする超高速液体クロマトグラフ(UHPLC)の普及が進み、カラムに対しても装置の性能に見合った高性能化のご要望が挙がっておりました。

本レポートでは、粒子径を2 $\mu\text{m}$ に縮小することによって従来のTSKgel Amide-80よりも分離性能を向上させたTSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$ をご紹介します。

## 2. 特長

TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$ は、粒子径2 $\mu\text{m}$ のシリカゲルを基材とし表面にカルバモイル基を導入した充填剤を充填したカラムです。既存製品TSKgel Amide-80 3 $\mu\text{m}$ にくらべて理論段数が向上し、より高速・高分離での分析が可能となりました。粒子径の違いによる分離選択性への影響はなく、既存製品と同様に糖類(単糖、二糖、オリゴ糖)、ペプチド、核酸、天然物、薬物およびその代謝物などの親水性化合物の分析に適しています。

## 3. 基本的性質

### 3-1. 物性一覧

TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$ の仕様を表1、表2に示します。

微量分析やLC/MS(/MS)を行う場合には高感度が得られる2.0 mm I.D.カラム、セミマイクロ対応ではない

表1 TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$ の仕様一覧

品名	TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$
基材	シリカゲル
粒子径(平均)	2 $\mu\text{m}$
細孔径	10 nm (ベースシリカ)
比表面積	450 m <sup>2</sup> /g
官能基	カルバモイル基(エンドキャップなし)
カラム材質	ステンレス
出荷溶媒	水/アセトニトリル=15/85
使用条件	
pH	2.0 ~ 7.5
温度	10 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$

表2 カラムサイズごとの理論段数および最大使用圧力(TSKgel Amide-80 3 $\mu\text{m}$ との比較)

品番	カラムサイズ	TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$		TSKgel Amide-80 3 $\mu\text{m}$	
		理論段数	最大圧力損失	理論段数	最大圧力損失
分析カラム					
0023454	2.0 mm I.D. × 5 cm	≥ 5800	40 MPa	≥ 3500	20 MPa
0023455	2.0 mm I.D. × 10 cm	≥ 14000	60 MPa	—	—
0023456	2.0 mm I.D. × 15 cm	≥ 21500	80 MPa	≥ 13000	20 MPa
0023457	3.0 mm I.D. × 5 cm	≥ 8300	40 MPa	≥ 5500	20 MPa
0023458	3.0 mm I.D. × 10 cm	≥ 16500	60 MPa	≥ 11000	20 MPa
0023459	3.0 mm I.D. × 15 cm	≥ 24000	80 MPa	≥ 16000	20 MPa
ガードカラム					
0023460	2.0 mm I.D. × 1 cm (直結式)	—	—	—	—

汎用 LC システム（インジェクター、配管、検出器など）で分析を行う場合はカラム外拡散の影響を受けにくい 3.0 mm I.D. カラムが適しています。

試料中の夾雑物から分析カラムを保護するためのガードカラム TSKgel guardcolumn Amide-80 2 $\mu$ m（サイズ：

2.0 mm I.D.  $\times$  1 cm）は、配管を使用せずに分析カラムに直接接続できる構造（**図 1**）となっているため、分離性能（理論段数：N）低下の原因となるデッドボリウムを最小に抑えることができます（**図 2**）。

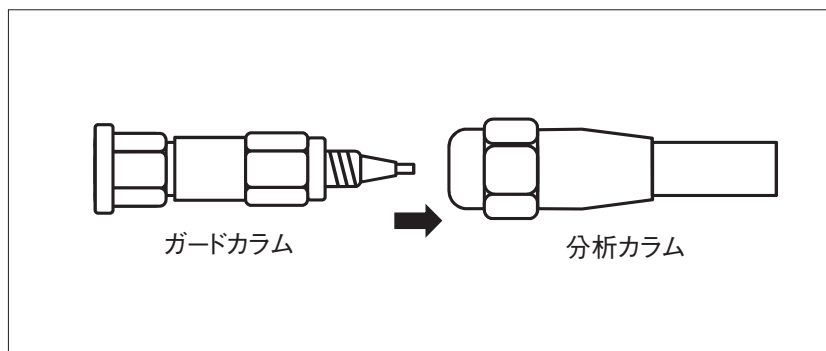


図 1 ガードカラム TSKgel guardcolumn Amide-80 2 $\mu$ m の構造

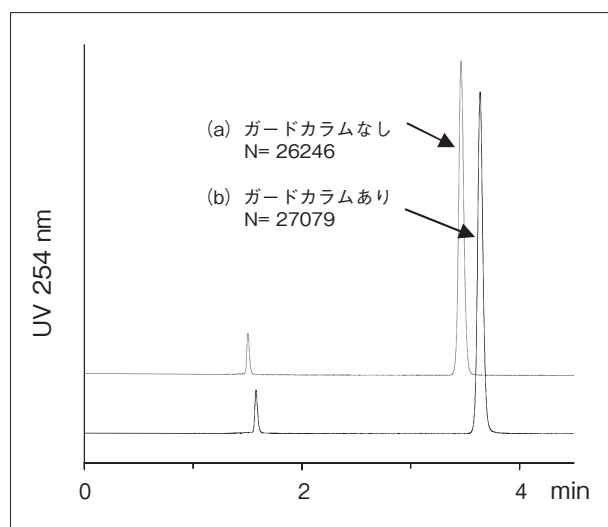


図 2 ガードカラム有無のクロマトグラムと理論段数 (N)

カラム：(a) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
(b) TSKgel guardcolumn Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D.  $\times$  1 cm) +  
TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液：水 / アセトニトリル = 15/85 (v/v)

流 量：0.43 mL/min

検 出：UV 254 nm

温 度：40  $^{\circ}$ C

注入量：2  $\mu$ L

試 料：ウラシル (35 mg/L)

### 3-2. 流速の影響

溶離液の流速（線速度）と理論段相当高さ（HETP）との関係を図3に示します。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ mでは線速度 1.3 mm/sec 付近で HETP が最小（4.8  $\mu$ m）となり、これより高流速域では HETP はほとんど変化が見られませんでした。一方、粒子径 3  $\mu$ m の既存製品 TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m では、線速度 0.76 mm/sec 付近で HETP が最小（7.5  $\mu$ m）となり、これより高流速域では HETP が上昇する傾向が見られました。この結果が示すように、粒子径が小さい TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m では、溶離液の線速度が 1.0 mm/sec（流量に換算すると、2.0 mm I.D. カラムでは約 0.20 mL/min、3.0 mm I.D. カラムでは約 0.43 mL/min）以上となるような高流速条件において高い理論段数が得られ、高速分析に適しています。

溶離液（アセトニトリル濃度 90 %）の流量とカラム圧力損失の関係を図4に示します。理論上、カラム圧

力損失はカラムの長さ、溶離液の粘度、溶離液の線速度それぞれに比例し、充填剤粒子径の 2 乗に反比例します。逆相クロマトグラフィーで一般的に用いられる溶離液は、条件により有機溶媒濃度が低く粘度が比較的高いことがあり、粒子径 2  $\mu$ m 以下の高性能カラムではカラム圧力損失が高くなり、従来型の HPLC 用送液ポンプ（最大吐出圧力 35 ~ 40 MPa 程度）では分析が困難となる場合があります。しかし TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m のような HILIC カラムでは通常、有機溶媒の比率が高く粘度が低い溶離液を用いるため、粒子径が小さいカラムでも圧力損失が低く抑えられ、従来型送液ポンプでも分析が可能です。また UHPLC に対応した高压ポンプを用いる場合には、カラムの最大圧力損失（15 cm カラムでは 80 MPa、10 cm カラムでは 60 MPa、5 cm カラムでは 40 MPa）を超えない範囲で、より高流速での分析（目安として 2.0 mm I.D. カラムでは 0.50 mL/min 程度、3.0 mm I.D. カラムでは 1.0 mL/min 程度）が可能です。

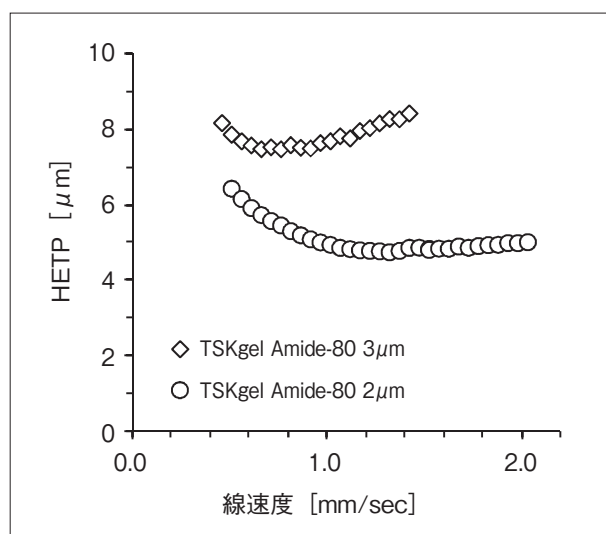


図3 流速と HETP の関係

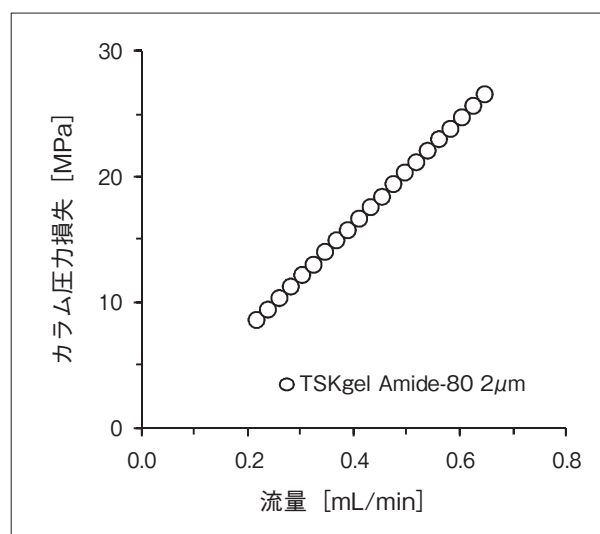


図4 流量とカラム圧力損失の関係

カラム：(a) TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

(b) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)

流量：0.19 ~ 0.86 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：40  $^{\circ}$ C

注入量：2  $\mu$ L

試料：ウリジン (0.1 g/L)

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)

流量：0.20 ~ 0.65 mL/min

温度：40  $^{\circ}$ C

### 3-3. 有機溶媒（アセトニトリル）濃度の影響

アイソクラティック分析において、溶離液中のアセトニトリル濃度が保持係数（キャパシティブァクター  $k$ ）に及ぼす影響を図5に示します。アセトニトリル濃度が高いほど、親水性試料の保持は強くなりました。また、図6に示すように、アセトニトリル濃度が高いほど溶離液の粘度が下がるためカラム圧力損失が小さくなりました。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ mを用いてアイソクラティック分析を行う場合、溶離液のアセトニトリル濃度は70～90%程度が適しています。HILICに用いる有機溶媒としては粘度が低くUV吸収が小さいアセトニトリルが最も適していますが、アセトン、エタノール、THFなどの水と混和できる有機溶媒も使用可能です。

グラジエント分析を行う場合の標準的な溶離条件は、アセトニトリル濃度を90%から50%まで変化させるリニアグラジエントです。より短い分析時間で良好な分離度を得たい場合には、上記条件でグラジエント分析を行ってピークの溶出位置を確認した後、グラジエント開始・終了時のアセトニトリル濃度とグラジエント時間を調整してください。グラジエント分析で再現性の良いク

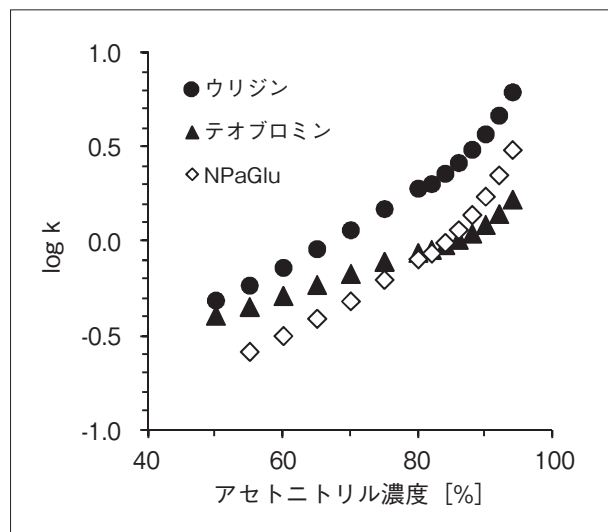


図5 溶離液のアセトニトリル濃度と保持係数の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D. × 15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 50/50 ~ 6/94 (v/v)  
流量：0.20 mL/min  
検出：UV 254 nm  
温度：40℃  
注入量：2  $\mu$ L  
試料：トルエン, ウリジン, テオブロミン,  
4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド (NPaGlu)

ロマトグラムを得るためには、試料注入前にグラジエント開始時の溶離液でカラムが十分に平衡化されていることが重要です。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ mを完全に平衡化するためには、一般的なODSカラムよりも多くの通液量（カラム容積の20倍程度）が必要となりますのでご注意ください。

以下に、溶離液の有機溶媒濃度に関する主な注意点を記載します。

- ・グラジエント分析を行う場合、アセトニトリル濃度が最も低くなるグラジエント終点付近でカラムの圧力損失が最大となります。グラジエント中に最大圧力損失を超えることがないように適切な送液流量を設定してください。
- ・溶離液のアセトニトリル濃度が50～90%の範囲でカラムを使用することをおすすめします。アセトニトリル濃度が90%よりも高い場合、ピーク形状の悪化や回収率の低下が生じる場合があります。また、アセトニトリル濃度が50%よりも低くなるとカラム圧力損失が急激に上昇するため、カラムを破損するおそれがあります。

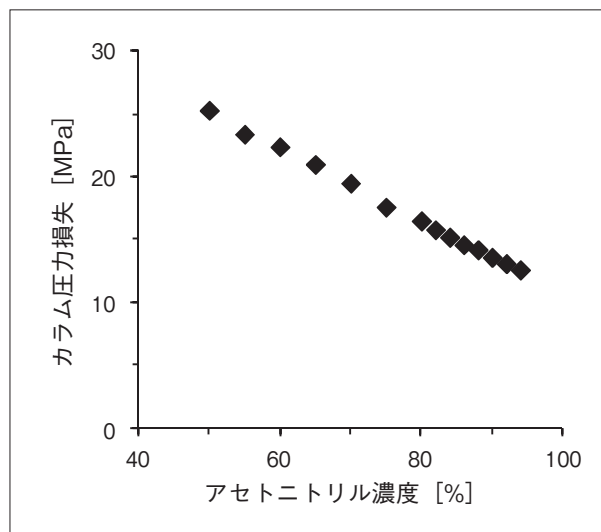


図6 溶離液のアセトニトリル濃度とカラム圧力損失の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D. × 15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 50/50 ~ 6/94 (v/v)  
流量：0.20 mL/min  
温度：40℃

### 3-4. 緩衝液塩濃度の影響

溶離液中の緩衝液（酢酸アンモニウム、pH 4.7）塩濃度が酸性、中性、塩基性試料の保持に及ぼす影響を図7に示します。中性試料（ウリジン）の保持は塩濃度の影響をほとんど受けないのに対して、酸性試料（p-トルエンスルホン酸ナトリウム、SPTS）は塩濃度が高いほど保持が強くなり、逆に塩基性試料（トリメチルフェニルアンモニウムクロリド、TMPAC）は塩濃度が高いほど保持が弱くなりました。この結果は、充填剤の基材であるシリカゲル表面のシラノール基がイオン交換基としてはたらく、酸性試料とシラノール基の間のイオン排除、および塩基性試料とシラノール基の間のイオン交換が保持に寄与していることを示唆しています。

イオン性試料を TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m で測定する場合、再現性の良いクロマトグラムを得るためには、アセトニトリルと 10 ~ 50 mmol/L 程度の緩衝液の混合溶媒を溶離液として用いることが望ましいと考えられます。緩衝剤の種類は、アセトニトリルと混合した時に析出しにくい酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムなどの有機酸系の塩が適しています。

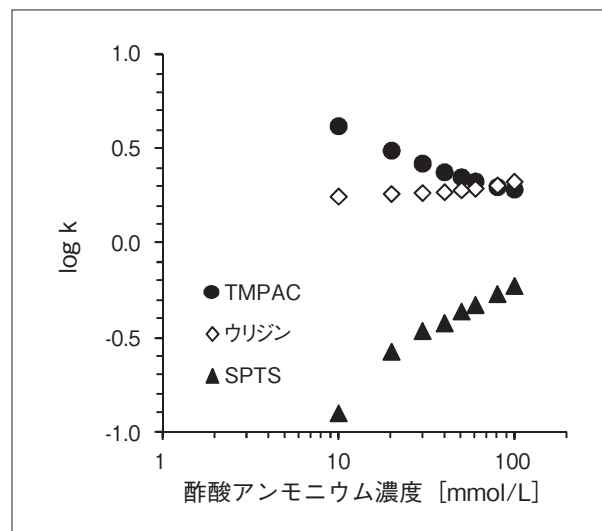


図7 溶離液の緩衝液塩濃度と保持係数の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
溶離液：10 ~ 100 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 20/80 (v/v)

流量：0.20 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：40  $^{\circ}$ C

注入量：2  $\mu$ L

試料：トルエン，ウリジン，

p-トルエンスルホン酸ナトリウム (SPTS)，

トリメチルフェニルアンモニウムクロリド (TMPAC)

### 3-5. 緩衝液 pH の影響

溶離液中の緩衝液（50 mmol/L 酢酸アンモニウム）の pH が酸性、塩基性試料の保持に及ぼす影響を図 8 に示します。酸性試料（SPTS）は pH が高いほど保持が弱くなり、逆に塩基性試料（ベンジルトリメチルアンモニウム、BTMA）は pH が高いほど保持が強くなりました。今回検討した pH の範囲（3.7～5.7）では SPTS および BTMA の解離状態は変化しないため、保持係数の

変化は充填剤表面のシラノール基の解離状態に起因し、pH が高いほどシラノール基の解離度が高いことを示しているものと考えられます。

一般的にイオン性試料の保持は、試料、充填剤双方の解離状態に依存して変化します。溶離液の pH を調整して分離選択性を最適化することは、再現性の良い分析を行う上で有効な手段であるといえます。

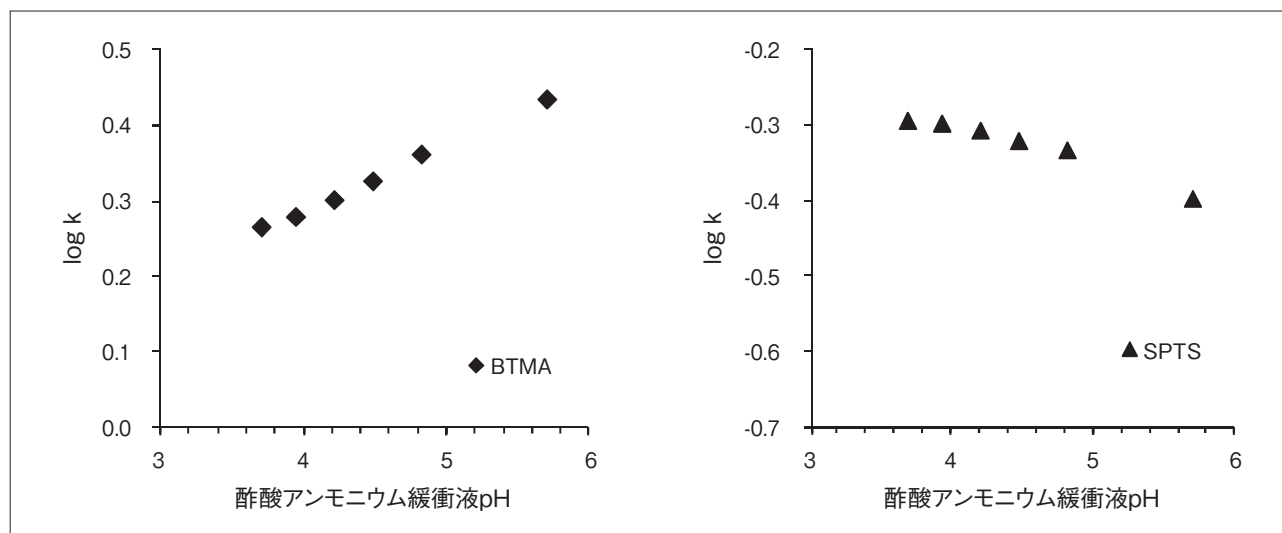


図 8 溶離液の緩衝液 pH と保持係数の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液：50 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 3.7～5.7) / アセトニトリル = 20/80 (v/v)

流量：0.20 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：40  $^{\circ}$ C

注入量：2  $\mu$ L

試料：トルエン,

p-トルエンスルホン酸ナトリウム (SPTS),

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド (BTMA)

### 3-6. 温度の影響

カラム温度が分離に及ぼす影響を図9に示します。30～50℃の範囲において、温度が高いほど親水性試料の保持は弱くなりました。また、図10に示すように、温度が高いほど溶離液の粘度が下がるためカラム圧力損失が小さくなりました。この結果から、ハイスループット

分析のように高流速条件で測定を行う場合はカラム温度を40～50℃付近まで上げることが好ましいと考えられます。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ mは通常の測定条件において最高50℃まで物理的・化学的に安定ですが、高塩濃度、高pHなどの条件では高温で使用するとカラムが早く劣化するおそれがありますので注意が必要です。

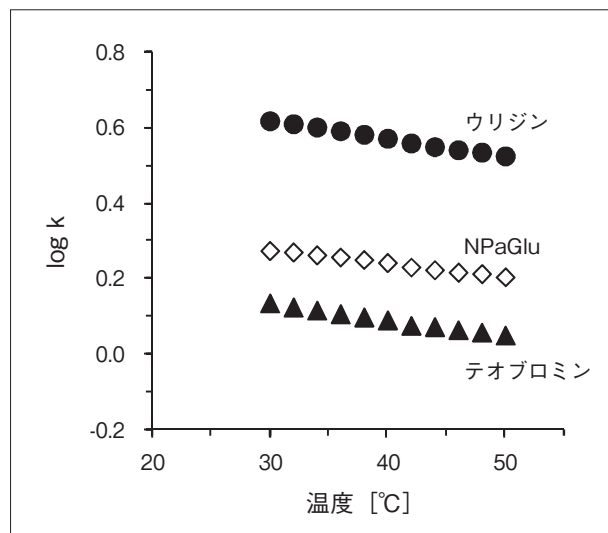


図9 温度と保持係数の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D. × 15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)  
流量：0.20 mL/min  
検出：UV 254 nm  
温度：30～50℃  
注入量：2  $\mu$ L  
試料：トルエン, ウリジン, テオプロミン,  
4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド  
(NPaGlu)

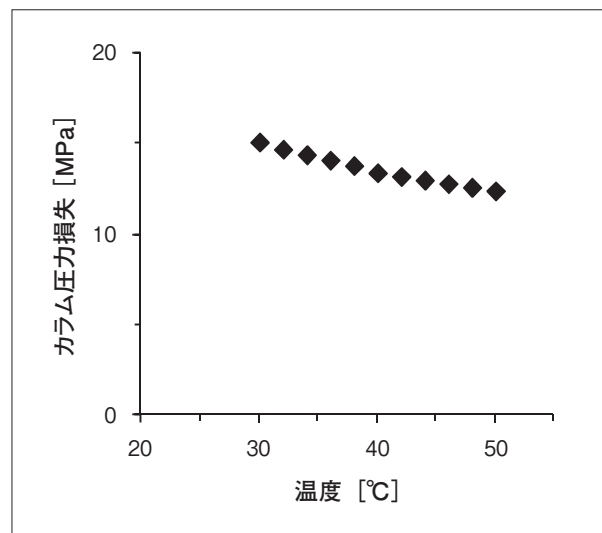


図10 温度とカラム圧力損失の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D. × 15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)  
流量：0.20 mL/min  
温度：30～50℃



### 3-7. 試料負荷量の影響

試料負荷量と理論段数の関係を図 11 に示します。試料がウリジンの場合、負荷量が 2  $\mu\text{g}$  程度までは理論段数はほぼ一定ですが、4  $\mu\text{g}$  以上になると過負荷による理論段数の低下が観察されました。

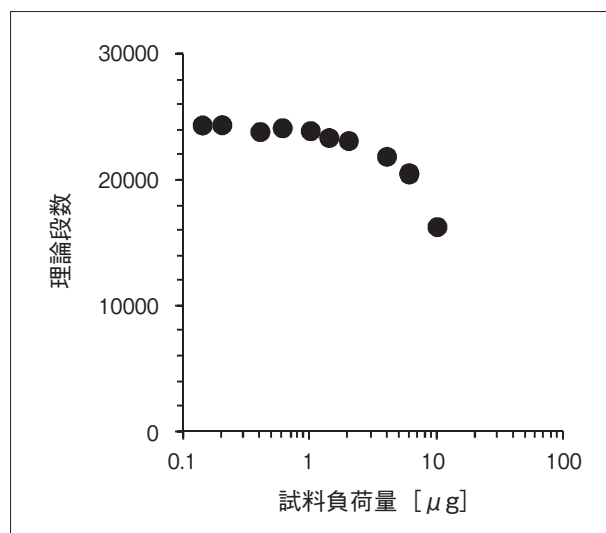


図 11 試料負荷量と理論段数の関係

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$  (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 15/85 (v/v)  
流量：0.20 mL/min  
検出：UV 290 nm  
温度：40  $^{\circ}\text{C}$   
注入量：2  $\mu\text{L}$   
試料：ウリジン (0.07 ~ 5.0 g/L)

### 3-8. 試料溶液注入量の影響

TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$  (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm, 3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm) を用いた測定における、試料溶液注入量 (負荷量が一定になるように試料濃度を調整) と理論段数の関係を図 12 に示します。2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm カラムの場合、注入量が 2  $\mu\text{L}$  程度までは理論段数はほぼ一定ですが、3  $\mu\text{L}$  以上では理論段数の顕著な低下が観察されました。また、3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm カラムの場合、注入量 5  $\mu\text{L}$  程度まで理論段数がほぼ一定で、10  $\mu\text{L}$  では理論段数が低下しました。

一般的に、カラム容積に対して試料溶液注入量の割合が大きくなると理論段数の低下が見られますが、特に内径が小さい 2.0 mm I.D. カラムを用いてアイソクラティック分析を行う場合には注入量の影響が顕著に表れますのでご注意ください。

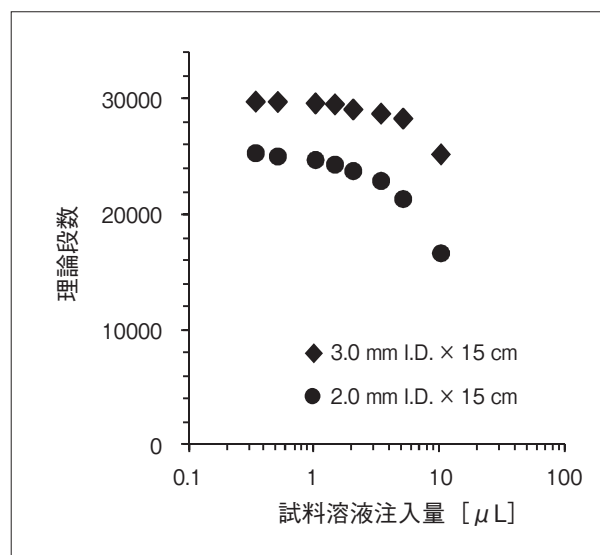


図 12 試料溶液注入量と理論段数の関係

カラム：(a) TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$  (3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
(b) TSKgel Amide-80 2 $\mu\text{m}$  (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 15/85 (v/v)  
流量：A) 0.43 mL/min, B) 0.20 mL/min  
検出：UV 260 nm  
温度：40  $^{\circ}\text{C}$   
注入量：0.33 ~ 10  $\mu\text{L}$   
試料：ウリジン (試料負荷量：0.1  $\mu\text{g}$ )

### 3-9. 試料溶液の組成（アセトニトリル濃度）の影響

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm、2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm) を用いたアイソクラティック分析における、試料溶液のアセトニトリル濃度と HETP の関係を図 13 に示します。2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm カラムの場合、溶離液よりも低いアセトニトリル濃度（85 % 未満）になるように調製した試料では HETP の上昇が見られました。2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm カラムでは、2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm カラムとくらべて HETP の変化が抑えられましたが、カラム容積に対する試料溶液注入量の割合が小さいためと考えられます。

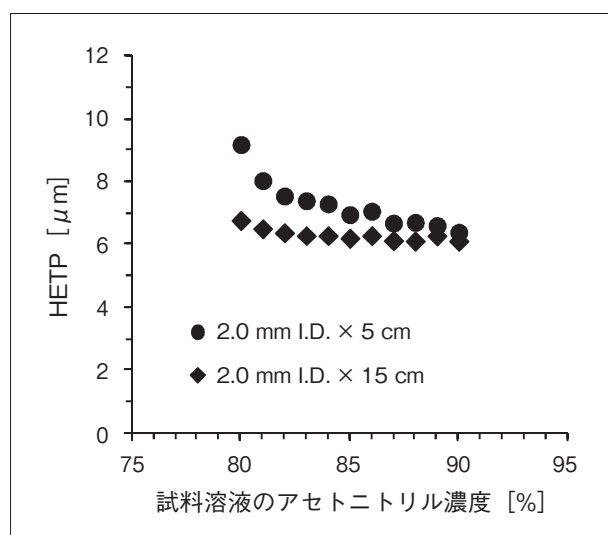


図 13 試料溶液のアセトニトリル濃度と HETP の関係 (アイソクラティック分析時)

カラム：(a) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm)  
 (b) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)  
 溶離液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) / アセトニトリル = 15/85 (v/v)  
 流量：0.20 mL/min  
 検出：UV 254 nm  
 温度：40  $^{\circ}$ C  
 注入量：2  $\mu$ L  
 試料：ウリジン (0.1 g/L)

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm) を用いたグラジエント分析についても同様に、試料溶液中のアセトニトリル濃度と HETP の関係を評価しました。図 14 に示すように、試料溶液中のアセトニトリル濃度が低いほど HETP が上昇しました。

試料溶液の水分量が多い場合、溶離液よりも試料溶液のほうが溶出力が強いために、ピークが広がって理論段数が低下します。カラムに注入する試料溶液は、可能な限り溶離液に近いアセトニトリル濃度（グラジエント分析の場合は、グラジエント開始時のアセトニトリル濃度）になるように調製してください。

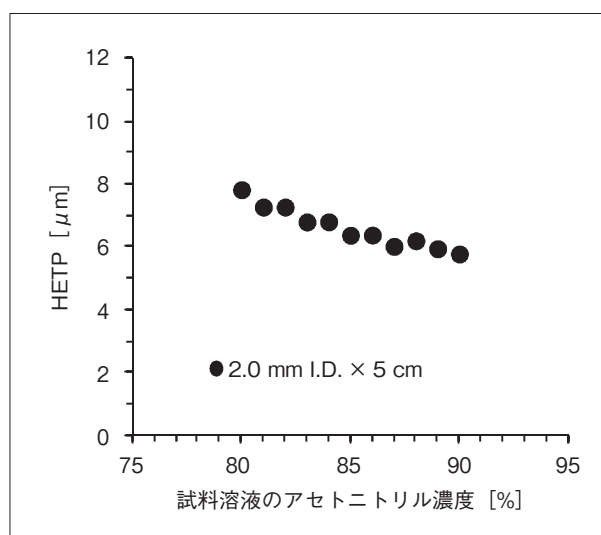


図 14 試料溶液のアセトニトリル濃度と HETP の関係 (グラジエント分析時)

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  5 cm)  
 溶離液 A：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) / アセトニトリル = 15/85 (v/v)  
 B：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) / アセトニトリル = 50/50 (v/v)  
 グラジエント：A  $\rightarrow$  B リニアグラジエント (5 min)  
 流量：0.20 mL/min  
 検出：UV 254 nm  
 温度：40  $^{\circ}$ C  
 注入量：2  $\mu$ L  
 試料：ウリジン (0.1 g/L)

### 3-10. カラム耐久性

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m(2.0 mm I.D.×15 cm、3.0 mm I.D. × 15 cm) について、高流速でグラジエントを繰り返す条件におけるカラム耐久性試験を行いました。この試験では、2.0 mm I.D. × 15 cm カラムは 0.5 mL/min、3.0 mm I.D. × 15 cm は 1.0 mL/min に流量を設定し、10 min でアセトニトリル濃度を 85 % から 50 % まで変化させるリニアグラジエントを 500 回繰り返し、グラジエント 10 回ごとに理論段数を測定してカラム性能を確認しました。

図 15 に示すように、3.0 mm I.D. × 15 cm カラムでは、グラジエントを 500 回実施した後もカラム性能に変化は見られませんでした。2.0 mm I.D. × 15 cm カラムではグラジエントを 400 回実施した後に理論段数が低下しましたが、ガードカラムを交換した後は理論段数が回復しており、分析カラムは劣化していないことが確認されました。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m は従来のカラムとくらべて充填剤の粒子径が小さいため、溶解液に含まれる不溶性物質や試料中の夾雑物がカラムの入口に蓄積しやすく、分離性能の低下を引き起こす場合があります。分析カラムの入口にガードカラムを取り付け、適宜交換することにより、分析カラムの劣化を防いで長期間安定した測定を行うことができます。

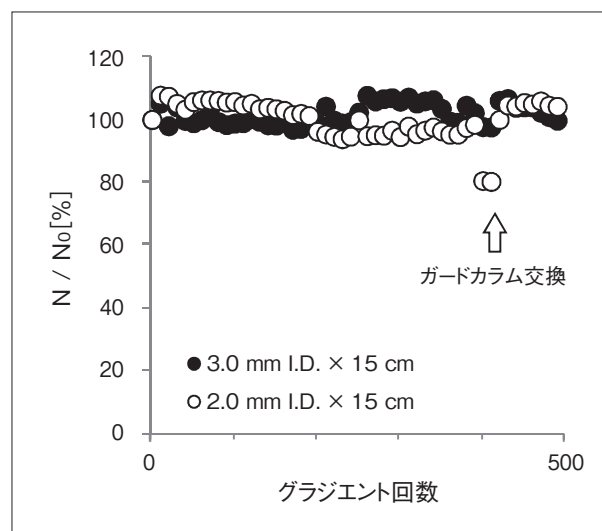


図 15 カラム耐久性試験における理論段数の変化  
(初期理論段数  $N_0$  に対する維持率として表示)

- カラム : (a) TSKgel guardcolumn Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D. × 1 cm) +  
TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D. × 15 cm)  
(b) TSKgel guardcolumn Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D. × 1 cm) +  
TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D. × 15 cm)

#### 耐久性試験条件

溶解液 A : 水 / アセトニトリル = 15/85 (v/v)

B : 20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル  
= 50/50 (v/v)

グラジエント : B : 0 % (0 min) → 100 % (10 min) →  
0 % (10 - 15 min)

流量 : (a) 1.0 mL/min, (b) 0.50 mL/min

温度 : 40 °C

#### 理論段数測定条件

溶解液 : 水 / アセトニトリル = 15/85 (v/v)

流量 : (a) 0.43 mL/min, (b) 0.20 mL/min

検出 : UV 254 nm

温度 : 40 °C

注入量 : 2  $\mu$ L

試料 : ウラシル (35 mg/L)

## 4. 分離例

### 4-1. 既存製品 TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m との比較

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m と既存製品 TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m について、同一条件で分析した親水性試料のクロマトグラムをカラム間で比較しました。図 16 に示すように、粒子径を 3  $\mu$ m から 2  $\mu$ m に小さくすることによって、理論段数が約 1.6 倍、分離度は約 1.3 倍に向上しました。カラムの圧力損失は約 2.9 倍になりましたが、HILIC で一般的に使用される溶離液はアセトニトリル濃度が高く粘度が低いため、従来型の HPLC 用送液ポンプが使用できる圧力 (13.7 MPa) に抑えられています。

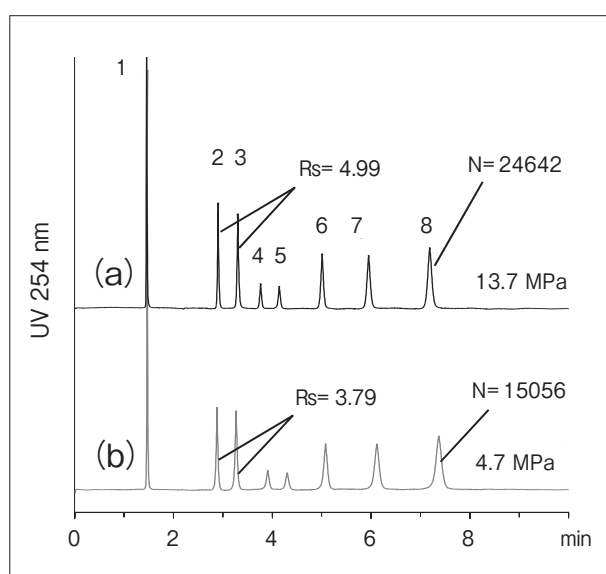


図 16 標準試料のクロマトグラム  
(TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m との比較)

カラム : (a) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

(b) TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m  
(3.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液 : 20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)

流量 : 0.43 mL/min

検出 : UV 254 nm

温度 : 40  $^{\circ}$ C

注入量 : 2  $\mu$ L

試料 : 1. トルエン

2. テオフィリン

3. テオプロミン

4. 4-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコピラノシド

5. 4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド

6. 2'-デオキシウリジン

7. 5-メチルウリジン

8. ウリジン

### 4-2. 市販のカルバモイル型 HILIC カラムとの比較

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m と他社より市販されている 4 種類のカルバモイル基結合型 HILIC カラムについて、同一条件で分析した親水性試料のクロマトグラムをカラム間で比較しました。図 17 に示すように、5 種類のカルバモイル型 HILIC カラムのうち TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m が最も強い保持を示しました。また、得られたクロマトグラムからピークキャパシティ (PC; 分離度  $R_s=1$  で分離することができる最大のピーク数 [1]) を算出した結果、TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m が最も大きな値を示しました。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m はピーク数が多い複雑な試料の分析に有利であるといえます。

(参考文献 [1] : Neue, U., D., J. Chromatogr. A, 1184, 107-130 (2008))

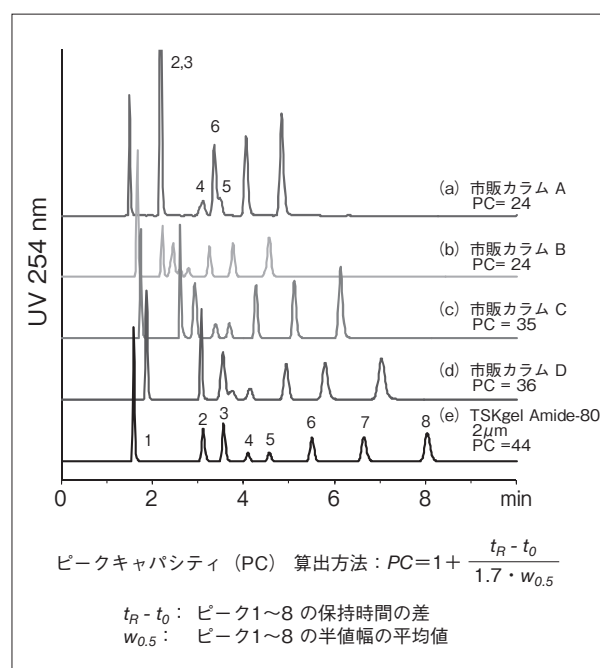


図 17 標準試料のクロマトグラム  
(市販のカルバモイル型 HILIC カラムとの比較)

カラム : (a)~(d) 市販カルバモイル型 HILIC カラム  
(2.1 mm I.D.  $\times$  15 cm)

(e) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m  
(2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液 : 20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)

流量 : 0.20 mL/min

検出 : UV 254 nm

温度 : 30  $^{\circ}$ C

注入量 : 1  $\mu$ L

試料 : 1. トルエン

2. テオフィリン

3. テオプロミン

4. 4-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコピラノシド

5. 4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド

6. 2'-デオキシウリジン

7. 5-メチルウリジン

8. ウリジン

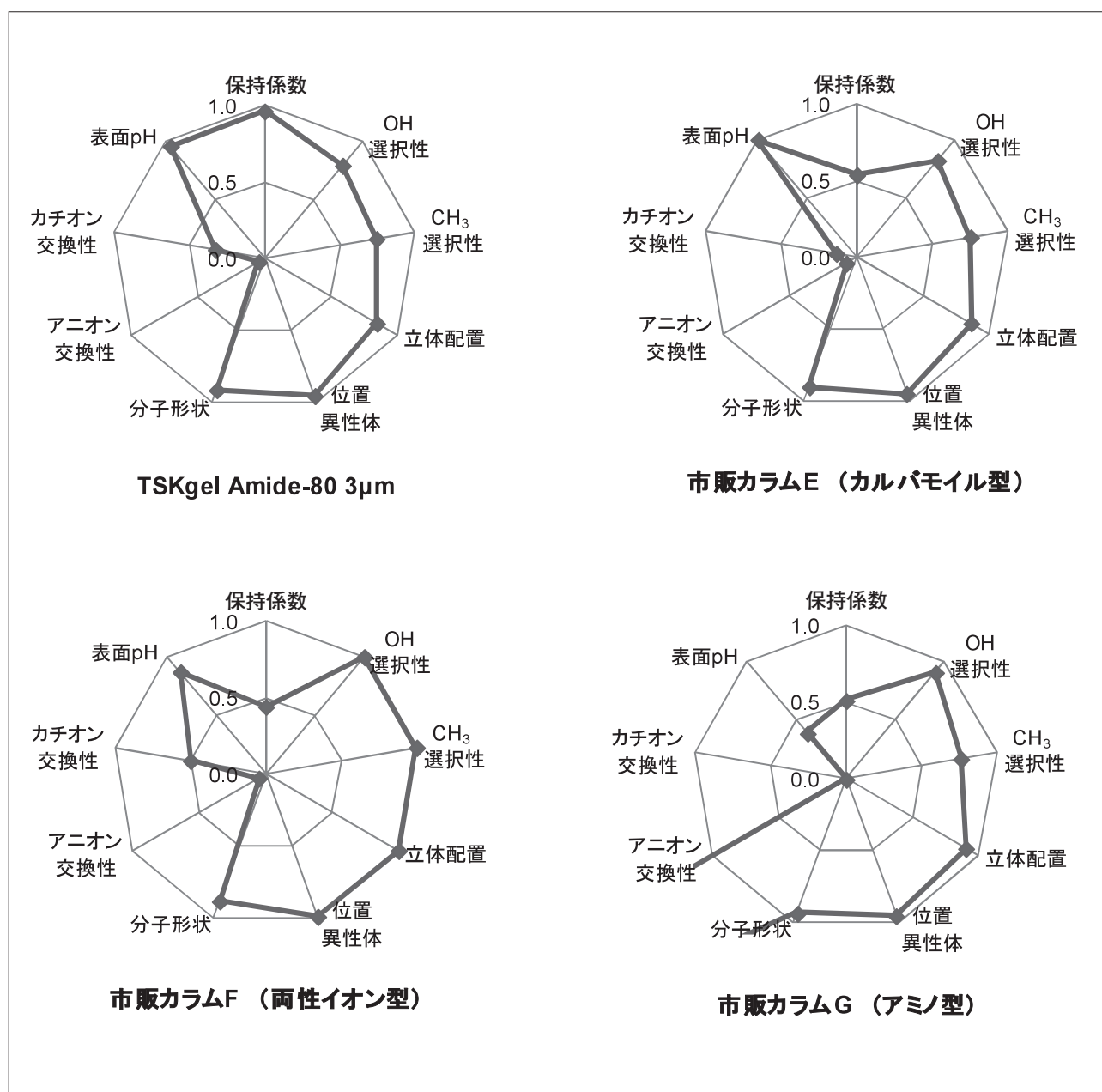
### 4-3. 固定相が異なる HILIC カラムとの比較

HILIC モードによる分析は TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m のようなカルバモイル基結合型充填剤だけではなく、未修飾シリカゲル、あるいは両性イオン基（スルホペタイン基、ホスホリルコリン基）、アミノプロピル基、ジオール基などの親水性官能基で修飾された充填剤によっても行うことができます。HILIC の分離パターンはカラムの種類によって異なることが知られており、分離特性を評価するためのいくつかの方法が考案されています。Kawachi らは、保持係数と 8 つの分離選択性指標を用いた HILIC カラムの評価方法を報告しています [2]。図 18 は TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m および固定相が異なる 5 種類の HILIC カラムについて Kawachi らが評価、報告した結果に基づいて作図したレーダーチャートです。

チャートの形状によってカラムの分離特性を視覚的に把握することができ、たとえば TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m については、他のカラムとくらべて保持が最も強い、分子構造に基づく選択性が中程度である、イオン交換性が比較的小さい、といった特徴を有していることが分かります。

Kawachi らの方法にしたがって TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m の分離特性を評価した結果を図 19 に示します。チャートの形状は TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m と非常に良く一致し、粒子径の違いによらず同等の保持係数、分離選択性を有していることが確かめられました。

(参考文献 [2] : Kawachi, Y., et al. J. Chromatogr. A, 1218, 5903-5919 (2011))



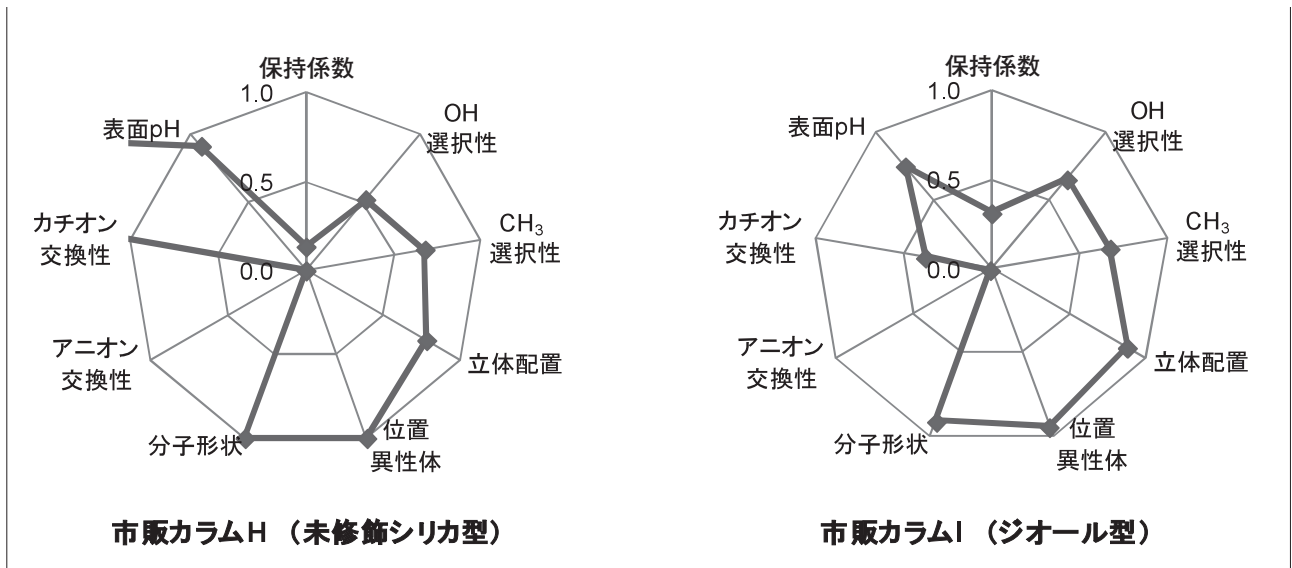


図 18 6 種類の HILIC カラムの分離特性 (Kawachi, Y., et al., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 5903 の数値データに基づいて作図)

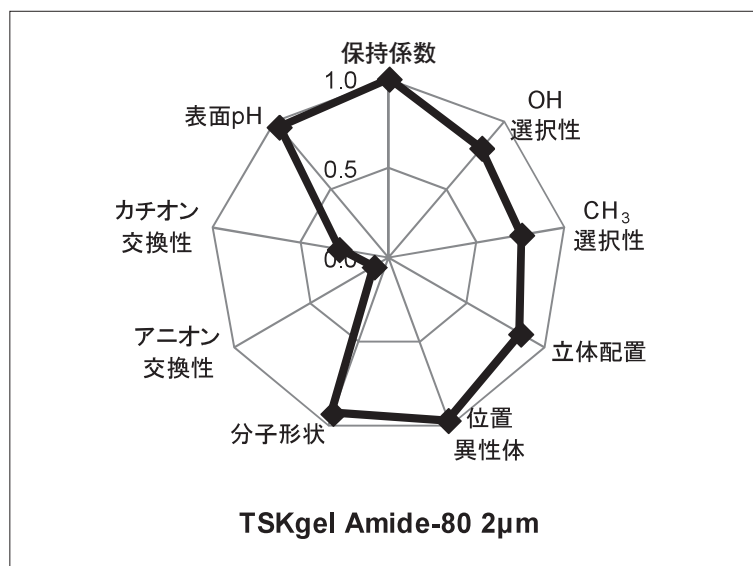


図 19 TSKgel Amide-80 2µm の分離特性

カラム：TSKgel Amide-80 2µm (4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶液液：20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 4.7) /  
アセトニトリル = 10/90 (v/v)

流 量：1.0 mL/min

検 出：UV 254 nm

温 度：30 °C

注入量：5 µL

試 料：トルエン (Tol), ウリジン (U),  
2'-デオキシウリジン (2dU),  
5-メチルウリジン (5MU),  
ピダラビン (V), アデノシン (A),  
2'-デオキシグアノシン (2dG),  
3'-デオキシグアノシン (3dG),  
4-ニトロフェニル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド (a),  
4-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコピラノシド (b),  
p-トルエンスルホン酸ナトリウム (SPTS),  
N,N,N'-トリメチルフェニルアンモニウムクロリド (TMPAC),  
テオフィリン (Tp), テオブロミン (Tb)

レーダーチャートにプロットされた数値は、下記の計算式によって求められた  $k'$  (U) および 8 つの分離係数  $a$  それぞれについて文献に記載された方法にしたがって規格化した数値である。

$$\text{保持係数: } k(U) = \frac{(t_U - t_{Tol})}{t_{Tol}}$$

$$\text{OH 選択性: } a(U/2dU) = \frac{k(U)}{k(2dU)}$$

$$\text{CH}_3 \text{ 選択性: } a(U/5MU) = \frac{k(U)}{k(5MU)}$$

$$\text{立体配置選択性: } a(V/A) = \frac{k(V)}{k(A)}$$

$$\text{位置異性体選択性: } a(2dG/3dG) = \frac{k(2dG)}{k(3dG)}$$

$$\text{分子形状選択性: } a(a/b) = \frac{k(a)}{k(b)}$$

$$\text{アニオン交換性: } a(\text{SPTS}/U) = \frac{k(\text{SPTS})}{k(U)}$$

$$\text{カチオン交換性: } a(\text{TMPAC}/U) = \frac{k(\text{TMPAC})}{k(U)}$$

$$\text{表面 pH: } a(Tp/Tb) = \frac{k(Tp)}{k(Tb)}$$

#### 4-4. 抗体由来糖鎖の分離

抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品は、その分子構造が複雑であるために、目的物質以外のさまざまな分子種を含んだ混合物として得られる場合があり、構造の不均一性について十分な解析が求められています。不均一性の一例として、抗体 (IgG) の H 鎖に共通して結合する N-結合型糖鎖の構造が医薬品の有効性や安全性に影響することがよく知られており、各糖鎖の構造と結合比率の分析が必須となっています。糖鎖構造の解析は、誘導体化した糖鎖を HPLC で分離し、蛍光、もしくは質量分析 (LC-MS (MS)) で検出する方法が広く用いられています。ここでは、TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m を用いた糖鎖分析の例を二つご紹介します。

図 20 は、ピリジルアミノ (PA) 化した糖鎖を TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm) で分離し蛍光検出した例です。測定試料は、マウスモノクローナル IgG から酵素 (Peptide-N-Glycosidase F; PNGase F) を用いて N-結合型糖鎖を切り出し、市販のピリジルアミノ化試薬キット (タカラバイオ社 Pyridylation Manual Kit) を用いて PA 化することにより調製しました。G1F 糖鎖の構造異性体と推定される 2 本の近接したピーク間の分離度 R は 1.77 であり、既存製品 TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm) を用いて同条件で分離した場合の R 1.26 と比べて高い分離能が得られました。

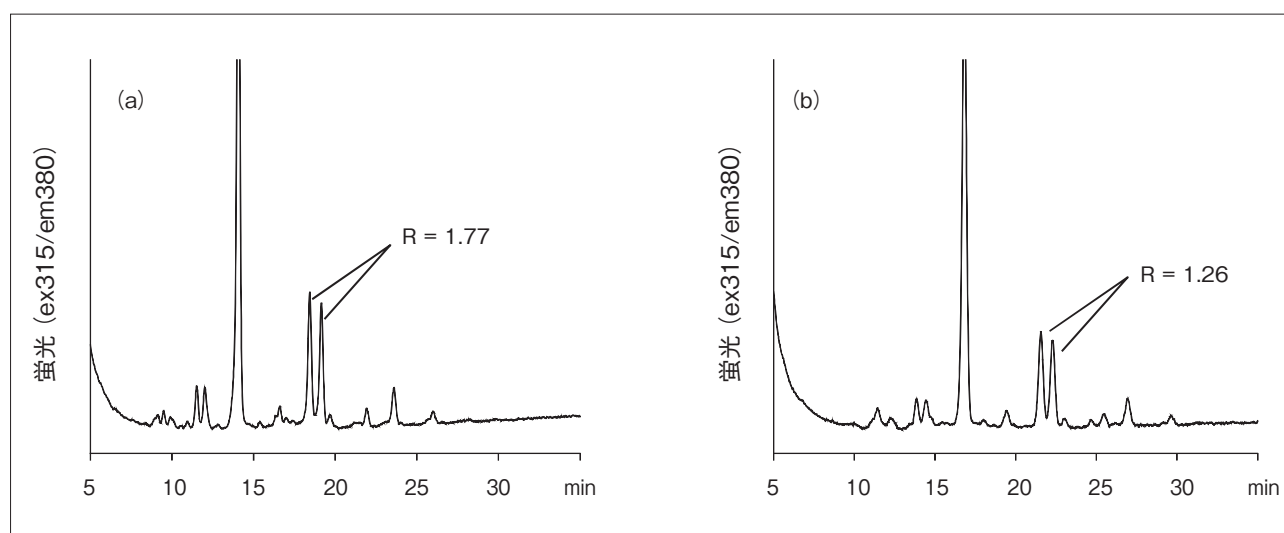


図 20 ピリジルアミノ化した抗体由来糖鎖のクロマトグラム

カラム : (a) TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

(b) TSKgel Amide-80 3 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液 A : 200 mmol/L 酢酸 + トリエチルアミン (pH 7.3)

B : アセトニトリル

グラジエント : 75 % B (0-5 min)  $\rightarrow$  50 % B (80 min)

流量 : 0.50 mL/min

検出 : 蛍光 (励起波長 315 nm, 蛍光波長 380 nm)

温度 : 40  $^{\circ}$ C

注入量 : 50  $\mu$ L

試料 : ピリジルアミノ化糖鎖 (マウスモノクローナル IgG 由来 N-結合型糖鎖)

図 21 は、2-アミノベンズアミド (2-AB) 化した糖鎖を TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm) で分離し、蛍光と質量分析 (MS) で検出した例です。測定試料は、市販のヒト IgG 由来 N-結合型糖鎖 (Ludger 社 IgG N glycan library) を、糖鎖精製ラベル化キット (住友ベークライト社 BlotGlyco<sup>®</sup>) を用いて 2-AB 化するこ

とにより調製しました。検出に MS を用いることによって、得られた m/z 情報から各ピークの構造を推定することができます。TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m による糖鎖の親水性の大きさに基づいた高分離と、MS (/MS) による構造解析の組み合わせにより、高度な糖鎖プロファイリングが可能となります。

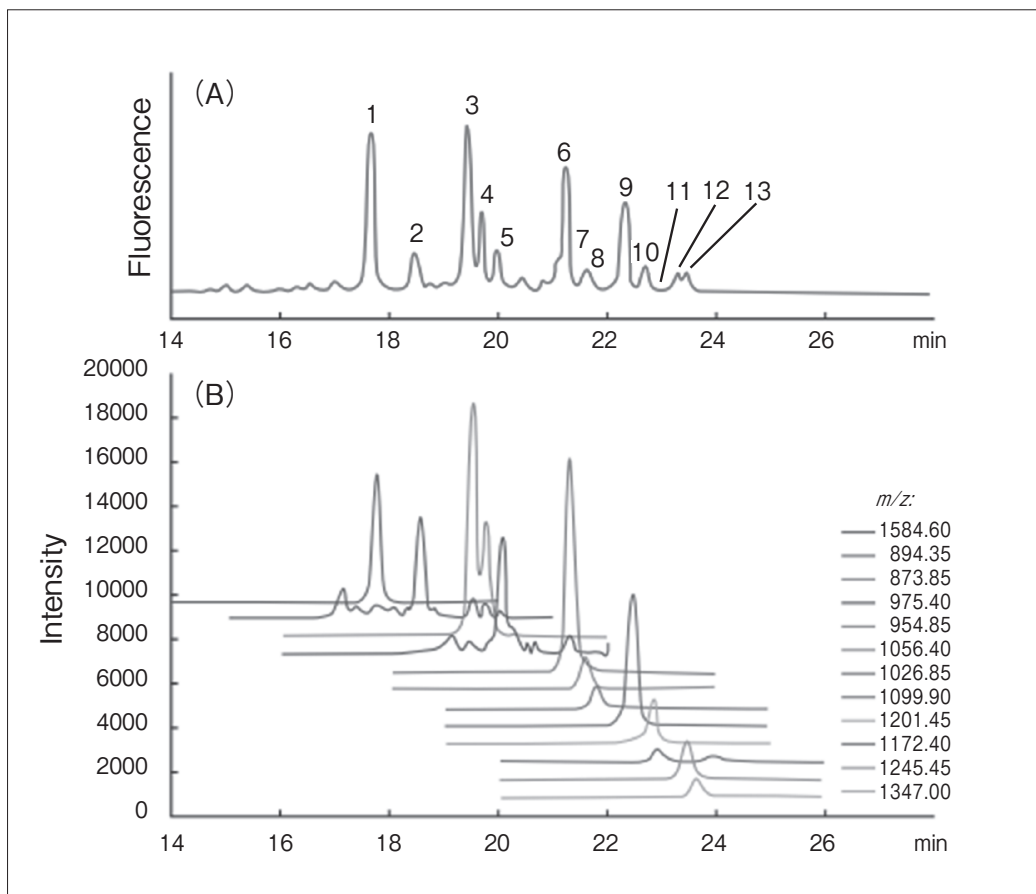


図 21 2-AB 化した抗体由来糖鎖の LC-MS 分析

カラム：TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m (2.0 mm I.D.  $\times$  15 cm)

溶離液 A：50 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.5)

B：アセトニトリル

グラジエント：75% B (0 - 5 min), 75 - 50% B (5 - 30 min)

流速：0.3 mL/min

温度：40  $^{\circ}$ C

試料：2-AB 化 N 型糖鎖 (ヒト IgG) (Ludger, cat. # CLIBN-IGG-01)

~ 80  $\mu$ g (80 % アセトニトリルで希釈)

検出：(A) 蛍光 ex. 330 nm, em. 420 nm

(B) MS, ESI positive, SIM (Shimadzu LCMS-8030)



## 5. おわりに

本製品 TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m は、充填剤の粒子径を微小化することによって従来の TSKgel Amide-80 をさらに高性能化したカラムです。有機溶媒比率が高い溶離液を用いる HILIC ではカラム圧力損失が低いため、耐圧が低い従来型 HPLC システムでも本カラムは使用可能です。また、近年普及が進む高耐圧の UHPLC システムに本カラムを接続した場合には、高流速による高速分析が可能となります。いずれのシステムを用いる場合で

も、本カラムの分離性能が十分に発揮されるためには、カラム外拡散が最小になるようにシステム（インジェクター、配管、検出器など）のデッドボリュームにご留意ください。

TSKgel Amide-80 2 $\mu$ m をお使いいただくことにより、糖類、ペプチド、核酸、天然物、薬物などの親水性化合物をより高速・高分離に分析できるようになり、医薬品、食品、化学品などの開発や品質管理の効率化が期待されます。

※ “TSKgel” は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオインテグ	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオインテグ	☎ (052) 211-5730	〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
山口営業所	☎ (0834) 63-9888	〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせ e-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>