

# SEPARATION REPORT

## 高性能イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel STAT シリーズについて

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラムの基本的性質	1
2-1. 充てん剤の特性	1
2-2. カラム圧	2
2-3. 標準タンパク質の分離	2
2-4. 核酸の分離	4
2-5. 試料負荷量	5
3. アニオン交換カラムの応用例	6
4. カチオン交換カラムの応用例	10
5. おわりに	14

## 1. はじめに

イオン交換クロマトグラフィーは、タンパク質、核酸などの生体高分子試料を簡便に分離、定量できる分析手法としてバイオ医薬品、生化学、食品などの分野で利用されています。イオン交換クロマトグラフィーには、第4級アンモニウム基や第3級アンモニウム基を導入した充てん剤を用いるアニオン交換クロマトグラフィー、スルホン酸やカルボン酸などを導入した充てん剤を用いるカチオン交換クロマトグラフィーがあり、目的タンパク質の等電点、化学的性質、立体的特性や夾雑成分との分離選択性に応じて最適な充てん剤を選択することが可能です。核酸は一般的にアニオン交換クロマトグラフィーで分離されます。イオン交換クロマトグラフィーに用いられる当社カラムとしては、多孔性充てん剤を用い、実験室レベルでの分離精製を目的に開発されたTSKgel 5PW系イオン交換カラムや、粒子径 $2.5\mu\text{m}$ の非多孔性充てん剤を使用し高速・高分離・微量分析用に開発されたTSKgel NPRシリーズなどがあります。TSKgel 5PW系イオン交換カラムは、より粒子径の大きな高速分取用充てん剤TSKgel PWシリーズや工業スケール用充てん剤トヨパールシリーズと同じ化学組成であるため、実験室レベルでのTSKgel 5PW系イオン交換カラムを用いた分離条件を容易にスケールアップすることが可能です。TSKgel NPRシリーズは粒子径 $2.5\mu\text{m}$ の非多孔性充てん剤を使用したカラムであるため分離能に優れハイスループット、高分離の分析が可能です。また、低濃度のタンパク質、ペプチドの回収率に優れます。

最近上市されたTSKgel STATシリーズは非多孔性充てん剤を使用したカラムであり、TSKgel NPRシリーズと同等以上の分離能、保持力を低カラム圧で実現したカラムです。ここではTSKgel STATシリーズの基本特性、応用例を紹介します。

## 2. カラムの基本的性質

### 2-1 充てん剤の特性

TSKgel STATシリーズは、粒子径 $10, 7$ 及び $5\mu\text{m}$ の非多孔性の親水性ポリマー粒子を基材とし、第4級アンモニウム基を導入した、TSKgel Q-STAT及びTSKgel DNA-STATカラム、粒子径 $10$ 及び $7\mu\text{m}$ の親水性ポリマー粒子にスルホプロピル基を導入したTSKgel SP-STATカラム、カルボキシメチル基を導入したTSKgel CM-STATカラムからなります。表-1にそれぞれのカラムの仕様、特性を示します。TSKgel STATシリーズには1~2分以内のハイスループット分析用にデザインされた $3.0\text{ mm ID}\times 3.5\text{ cm}$ カラム（粒子径 $10\mu\text{m}$ ：ハイスループットカラム）と、高分離用にデザインされた $4.6\text{ mm ID}\times 10\text{ cm}$ カラム（粒子径 $7\mu\text{m}$ ：高分離能カラム）がそれぞれ用意されています。また、基材の機械的強度が高く、溶媒変化に対する充てん剤の膨潤収縮が小さいため、有機溶剤を添加した溶離液を用いることも可能です。溶離液に有機溶媒を添加することで疎水性が強い試料の吸着を抑制し溶出を早めることが可能です。また、実試料測定においてカラムに吸着した汚染物質を有機溶媒を含む溶離液で洗浄・除去することが可能です。

表1 TSKgel STATシリーズの充てん剤の特性

品名	TSKgel Q-STAT		TSKgel DNA-STAT	TSKgel SP-STAT		TSKgel CM-STAT	
	0021960	0021961	0021962	0021963	0021964	0021965	0021966
カラムサイズ* (mm I.D.×cm)	3.0×3.5	4.6×10	4.6×10	3.0×3.5	4.6×10	3.0×3.5	4.6×10
基材	非多孔性親水性ポリマー						
粒子径 (μm)	10	7	5	10	7	10	7
官能基	第4級アンモニウム基			スルホプロピル基		カルボキシメチル基	
イオン交換容量 (μeq/g-drygel)	約250			約20		約100	
対イオン	塩化物イオン			ナトリウムイオン			
出荷溶媒	20% エタノール水溶液						

\*：カラム部材：ステンレス（フィルターPEEK）

## 2-2 カラム圧

図-1に各充てん剤が充てんされた高分離能カラムを用い、カラム温度を変化させたときのカラム圧を示します。いずれのカラムも標準的な使用流速である1.0 mL/minにおいて、低温域でもカラム圧が10 MPa程度です。したがって、耐圧の低いHPLCでも十分使用可能であることがわかります。

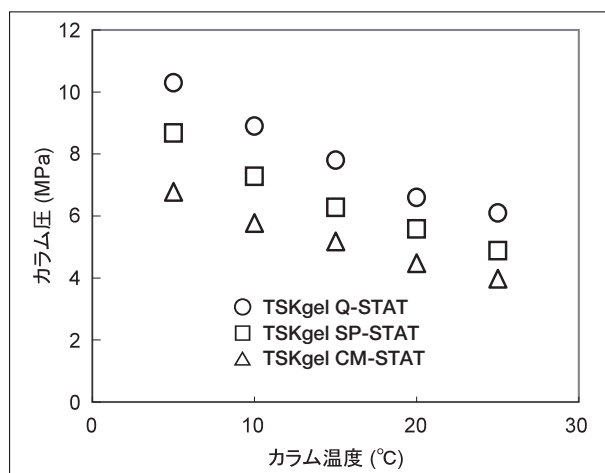


図-1 カラム温度とカラム圧の関係

カラム：TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：10 mmol/L 酢酸ナトリウム 緩衝液 (pH 5.0)  
 (TSKgel SP-STAT, TSKgel CM-STAT)  
 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 (TSKgel Q-STAT)  
 流 速：1.0 mL/min

## 2-3 標準タンパク質の分離

図-2及び図-3に、高分離能カラムとTSKgel NPRシリーズ (粒子径2.5 μm) でタンパク質の分離を比較した結果を示します。TSKgel STATシリーズは、充てん剤表面処理技術の改良により、従来のTSKgel NPRシリーズより保持力が強く、粒子径が大きいかかわらずピークがシャープであり高分離能を有しています。また、TSKgel SP-STATとTSKgel CM-STATではイオン交換基の違いにより分離選択性が異なることがわかります。

また粒子径10 μmの充てん剤が充てんされたハイス

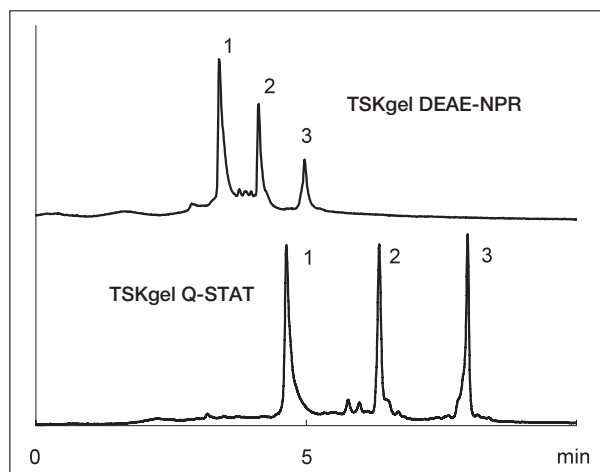


図-2 標準タンパク質のアニオン交換カラムによる分離の比較

カラム：TSKgel DEAE-NPR (4.6 mm I.D.×3.5 cm) (上段)  
 TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm) (下段)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 10分  
 流 速：1.0 mL/min  
 検 出：UV (280 nm)  
 温 度：25 °C  
 注入量：各 0.6 μg 注入  
 試 料：1. Conalbumin 2. Ovalbumin 3. Trypsin Inhibitor

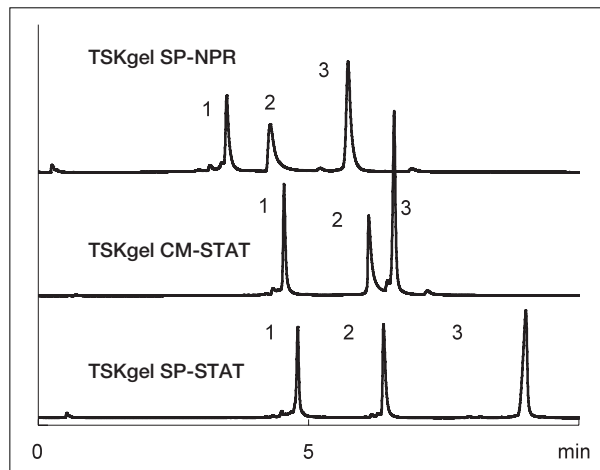


図-3 標準タンパク質のカチオン交換カラムによる分離の比較

カラム：TSKgel SP-NPR (4.6 mm I.D.×3.5 cm) (上段)  
 TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm) (中段)  
 TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm) (下段)  
 溶離液：A；10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.2)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.2)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 10分  
 流 速：1.0 mL/min  
 検 出：UV (280 nm)  
 温 度：25 °C  
 注入量：各 10 μg 注入  
 試 料：1. α-Chymotrypsinogen A  
 2. Cytochrome C 3. Lysozyme

ループットカラムを用い、高速分析を実施した例を図-4、5及び6に示します。図-4は、TSKgel Q-STATハイスループットカラムとモノリス型アニオン交換カラムの分離を比較したデータです。TSKgel Q-STATハイスループットカラムは、モノリスカラムより良好なピーク形状で3種類の標準タンパク質が1分以内に分離できることを示しています。図-5は、TSKgel SP-STATハイスループットカラムとモノリス型カチオン交換カラムの分離を比較したデータです。TSKgel SP-STATハイスループットカラムは、モノリスカラムより良好なピーク形状で3種類の標準タンパク質が1分以内に分離できることを示しています。

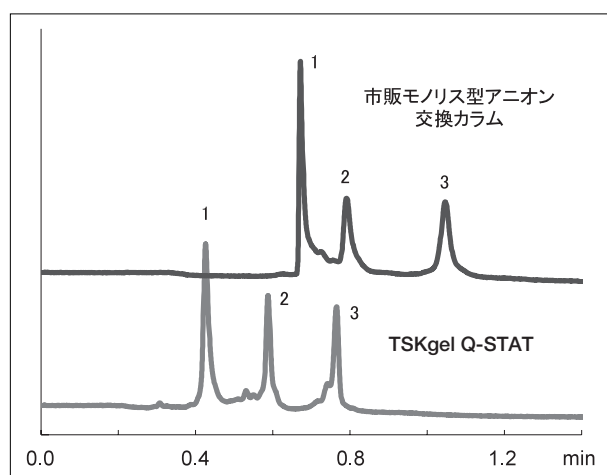


図-4 標準タンパク質のアニオン交換カラムによるハイスループット分析

カラム：市販モノリス型アニオン交換カラム (5 mm I.D.×5 cm) (上段)  
 TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm) (下段)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 1分  
 流速：2.0 mL/min (モノリスカラム)  
 1.0 mL/min (TSKgel Q-STAT)  
 検出：UV (280 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：各 3 μg 注入  
 試料：1. Conalbumin  
 2. Ovalbumin  
 3. Trypsin Inhibitor  
 \* マイクロミキサー使用

図-5は、TSKgel SP-STATハイスループットカラムとモノリス型カチオン交換カラムの分離を比較したデータです。TSKgel SP-STATハイスループットカラムは、モノリスカラムより良好なピーク形状で3種類の標準タンパク質が1分以内に分離できることを示しています。

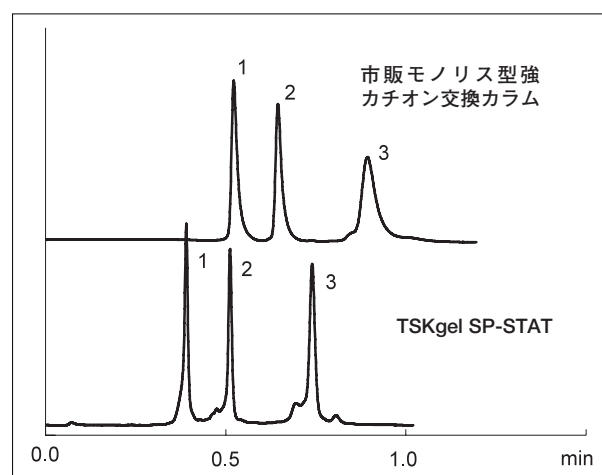


図-5 標準タンパク質のカチオン交換カラムによるハイスループット分析

カラム：市販モノリス型カチオン交換カラム (5.0 mm I.D.×5 cm) (上段)  
 TSKgel SP-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm) (下段)  
 溶媒：A；20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
 B；1.0mol/L NaCl in 20mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) (TSKgel SP-STAT)  
 1.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) (モノリスカラム)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 1分  
 流速：4.73 mL/min (モノリスカラム)  
 2.0 mL/min (TSKgel SP-STAT)  
 検出：UV (280nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：5 μL  
 試料：1. α-Chymotrypsinogen A 1 g/L  
 2. Cytochrome C 1 g/L  
 3. Lysozyme 1 g/L  
 \* マイクロミキサー使用

## 2-4 核酸の分離

図-6にTSKgel Q-STATハイスループットカラムを用いて6種類のヌクレオチドを1分以内に分離したクロマトグラムを示します。

図-7はヌクレオチドであるシチジン二リン酸 (CDP) とシチジン三リン酸 (CTP) を種々のグラジエント時間で分離し、これらのヌクレオチド間の分離能をCTPの溶出時間に対してプロットした図です。高分離能カラムでもグラジエント時間を短くすれば分離時間が短くなりますが、CTPの溶出時間が非常に短くなるようなグラジエント時間 (例えば、この場合には2.5分以下) にした場合にはハイスループットカラムを用いる方が分離が優れていることがわかります。

図-8には高分離能カラムをもちい、15種類のヌクレオチド類を一斉分離した例を示します。このように、TSKgel STATシリーズでは要求される分析時間や分離性能に応じてもちいるカラムを選択することが可能です。

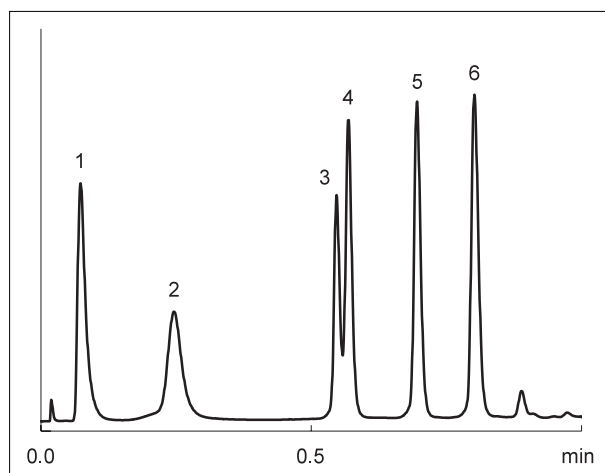


図-6 ヌクレオチドのアニオン交換カラムによるハイスループット分析

カラム：TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)

リニアグラジエント；B 0% → 100%, 1分

流速：2.0 mL/min  
 検出：UV (260 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：5 μL

試料	1. Cytidine	0.05 g/L
	2. 3',5'-CyclicCMP	0.1 g/L
	3. 2d-CMP	0.1 g/L
	4. CMP	0.15 g/L
	5. CDP	0.2 g/L
	6. CTP	0.25 g/L

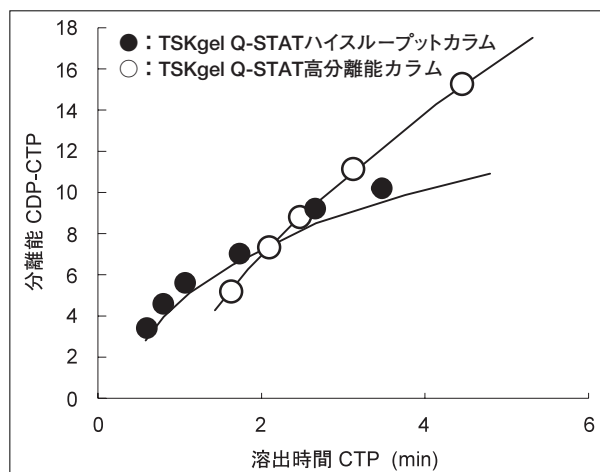


図-7 ハイスループットカラムと高分離能カラムの分析時間による使い分け

カラム：TSKgel Q-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm)  
 TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)

グラジエント時間を変更

流速：2.0 mL/min (3.0 mm I.D. カラム)  
 1.5 mL/min (4.6 mm I.D. カラム)

検出：UV (260 nm)

温度：25 °C

試料：CTP, CDP

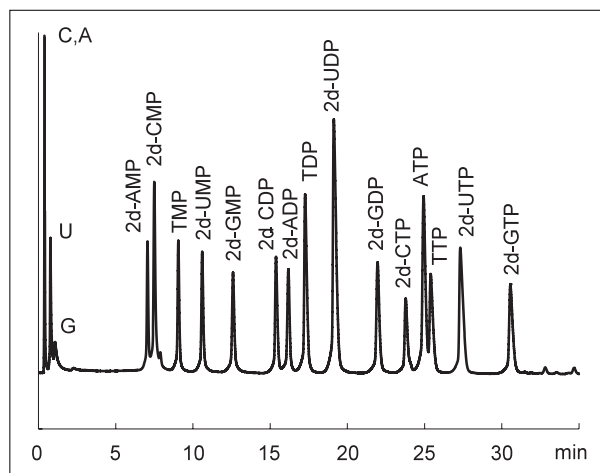


図-8 ヌクレオチドのアニオン交換カラムによる分析

カラム：TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)

リニアグラジエント；B 0% → 50%, 60分

流速：1.5 mL/min  
 検出：UV (260 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：5 μL

試料	核酸塩基	各 0.05 g/L
	1リン酸型	各 0.1 g/L
	2リン酸型	各 0.15 g/L
	3リン酸型	各 0.2 g/L

## 2-5 試料負荷量

TSKgel STATシリーズは、多孔性充てん剤より表面積の小さい非多孔性充てん剤を用いているために、多孔性充てん剤を使用したカラムと比較して試料負荷量が低

い領域で、分離性能への影響が大きくなります。図-9及び図-10に試料負荷量と分離能の関係を示します。アニオン交換及びカチオン交換共に試料負荷量は約10 $\mu$ g以下とすることが適切です。

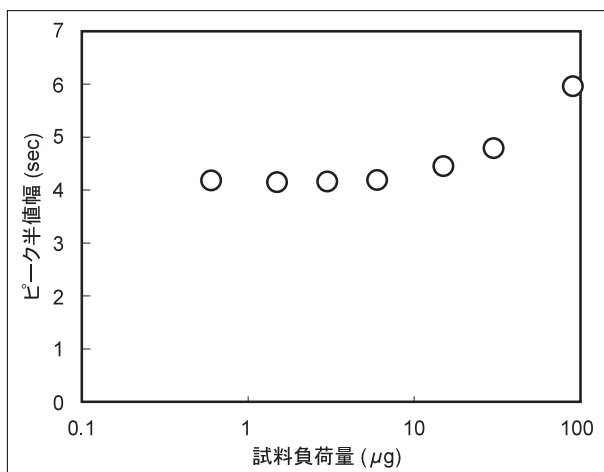


図-9 試料負荷量とピーク半値幅の関係

カラム：TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
          B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 10 分  
流 速：1.0 mL/min  
検 出：UV (280 nm)  
温 度：25 °C  
試 料：Ovalbumin

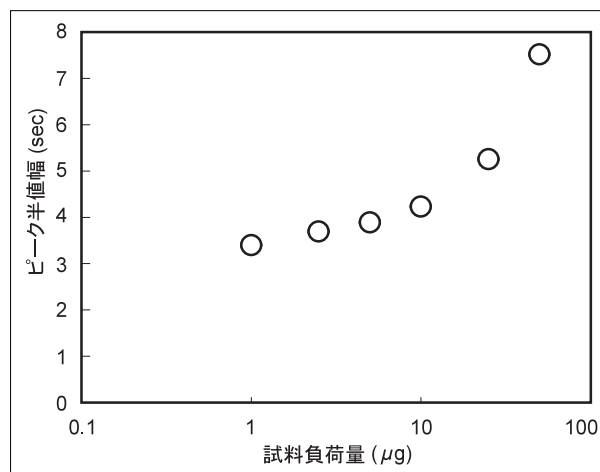


図-10 試料負荷量とピーク半値幅の関係

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
溶離液：A；20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
          B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 10 分  
流 速：1.0 mL/min  
検 出：UV (280 nm)  
温 度：25 °C  
試 料：Cytochrome C

### 3. アニオン交換カラムの応用例

応用例として図-11に市販粗精製リパーゼの分離例を示します。TSKgel DEAE-NPRと比較し、TSKgel Q-STATカラムでは保持力が強く、かつピークがシャープで分離能に優れていることが分かります。図-12には市

販BSA消化物標品の分離例を示します。TSKgel Q-STATで分離されたピークの数、TSKgel DEAE-NPR、及び市販WAXカラムより多く、かつ素通り成分が少ない（図の楕円内）ことが分ります。

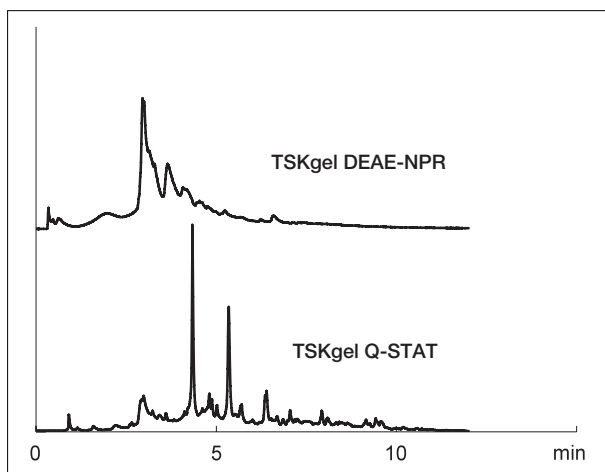


図-11 粗精製lipaseの分離

カラム：TSKgel DEAE-NPR(4.6 mm I.D.×3.5 cm) (上段)  
TSKgel Q-STAT(4.6 mm I.D.×10 cm) (下段)  
溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 10 分  
流 速：1.0 mL/min  
検 出：UV (280 nm)  
温 度：25 °C  
注入量：10 μL  
試 料：粗精製lipase

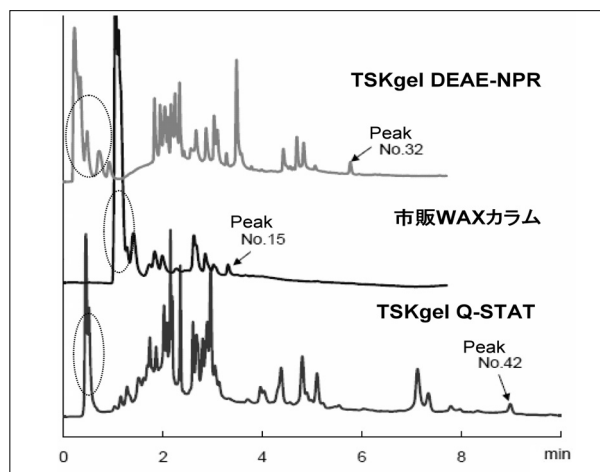


図-12 市販BSA消化物の分離

カラム：TSKgel DEAE-NPR(4.6 mm I.D.×3.5 cm) (上段)  
市販WAXカラム (4.0 mm I.D.×2.5 cm) (中段)  
TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm) (下段)  
溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 10 分  
流 速：1.5 mL/min  
検 出：UV (220 nm)  
温 度：25 °C  
注入量：10 μL  
試 料：BSA digest STD (Waters co) 10 μL

図-13にモノクローナル抗体 (MAb) を含むマウス腹水の分離例を示します。上段はTSKgel Q-STATでマウス腹水を分離したクロマトグラムですが、抗体とアルブミン成分が良く分離されていることがわかります。下段は、マウス腹水から精製されたMAbをTSKgel Q-STATで分離したクロマトグラムですが、複数のピークが認め

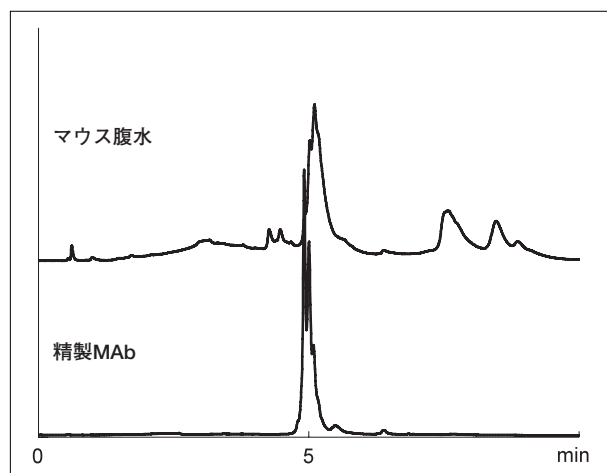


図-13 モノクローナル抗体を含有したマウス腹水と精製モノクローナル抗体の分析

カラム：TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
           B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
           リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 10 分  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV (280 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：10 μL  
 試料：上段 MAb含有マウス腹水1/10希釈液  
       下段 精製マウスMAb  
       試料を溶離液Aで10倍希釈, 10 μL注入

られます。図-13の精製MAbを緩いグラジエント勾配で分離した例を図-14に示します。精製された抗体にも、イオン交換的な相互作用が異なる電荷異性体があることが知られていますが、グラジエント勾配を緩くすることにより、電荷異性体を分離することが可能です。

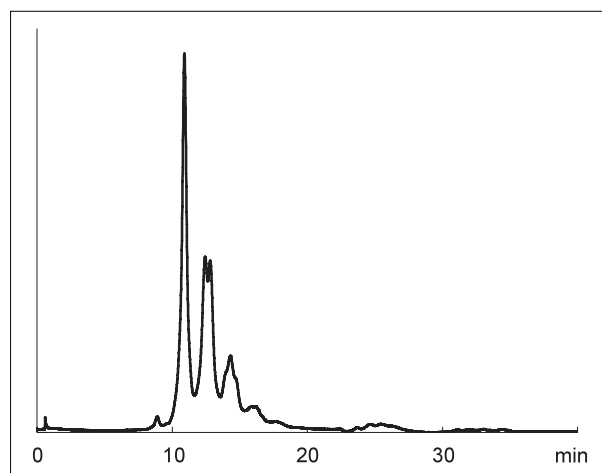


図-14 精製モノクローナル抗体の電荷異性体の分離

カラム：TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：A；0.05 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
           B；0.15 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)  
           リニアグラジエント；B 25 % → 100 %, 30 分  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV (280 nm)  
 温度：25 °C  
 試料：精製マウスMAb



核酸の分離例として1 kb DNA ladderの分離例を図-15及び図-16に示します。試料は75 bpから12,216 bpまでの23種の異なる長さのDNAフラグメントを含んでいます。TSKgel DNA-NPRでは20番目の9,126 bp以上の

フラグメントがこの分析条件では十分分離されていませんが、TSKgel DNA-STATカラムでは分離能1.5以上で分離されており、含まれる全てのフラグメントが分離可能です。

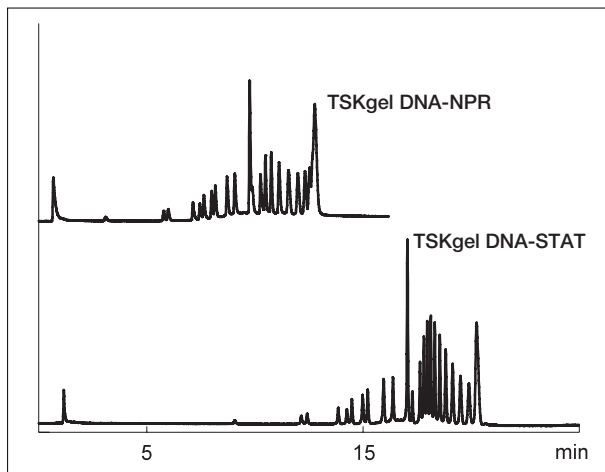


図-15 1 kb DNA ladderの分離

カラム：TSKgel DNA-NPR(4.6 mm I.D.×7.5 cm) (上段)  
 TSKgel DNA-STAT(4.6 mm I.D.×10 cm) (下段)  
 溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0)  
 B；2 mol/L NaCl in 20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0)  
 リニアグラジエント；B 37.5 % → 50 %, 20 分 (TSKgel DNA-STAT)  
 B 25 % → 37.5 %, 20 分 (TSKgel DNA-NPR)

流速：0.75 mL/min  
 検出：UV (260 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：2 μL  
 試料：1 kb DNA Ladder

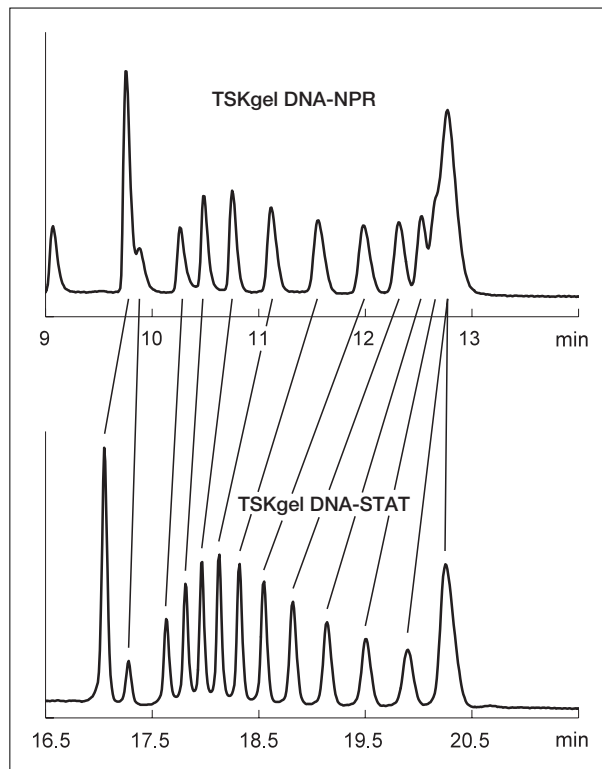
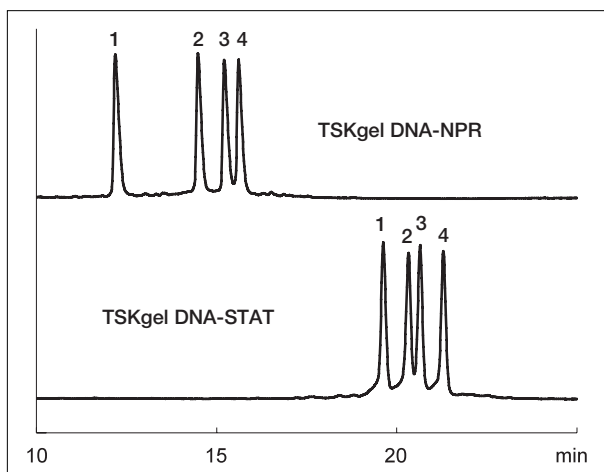


図-16 図-15の拡大図

一方、**図-17**に示すように同じ長さで配列が異なる短鎖フラグメント（26 merプライマー）の分離ではTSKgel DNA-NPRの選択性が優れており、試料によりTSKgel NPRシリーズとTSKgel STATシリーズの使い分けが必要です。



**図-17** プライマーの分離

カラム：TSKgel DNA-NPR (4.6 mm ID.×7.5 cm) (上段)  
TSKgel DNA-STAT(4.6 mm ID.×10 cm) (下段)

溶離液：A；20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)

B；0.75 mol/L NaCl in 20mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)

リニアグラジエント；B 50 % → 75 %, 25 分

流速：0.8 mL/min

検出：UV (260 nm)

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料濃度：各 10 μmol/L

試料：26 merプライマー

1. 5'-TAATTAAGGACTCCGTTCTTCTATAT-3'-NH<sub>2</sub>
2. 5'-TCTTTACTTTAGTCACAAAGCGATAA-3'-NH<sub>2</sub>
3. 5'-GACTCCGTTCTTCTATATTTTCGAGG-3'-NH<sub>2</sub>
4. 5'-GGACGTGCTGGGTGTCTTCTCCGTCG-3'-NH<sub>2</sub>

#### 4. カチオン交換カラムの応用例

カチオン交換カラムによるMAbの電荷異性体分離例を図-18に示します。電荷のわずかな違いにより異性体を分離することが可能です。本試料についてはTSKgel

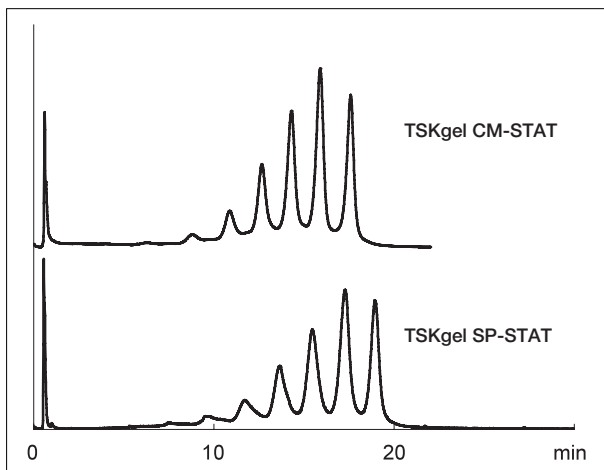


図-18 精製MAbの電荷異性体分離,  
塩濃度グラジエント

カラム：TSKgel CM-STAT (4.6 mm ID.×10 cm) (上段)  
TSKgel SP-STAT (4.6 mm ID.×10 cm) (下段)  
溶離液：A；20 mmol/L MES 緩衝液 (pH 6.0)  
B；0.1 mol/L NaCl in 20 mmol/L MES 緩衝液  
(pH 6.0)  
リニアグラジエント；B 25 % → 55 %, 30 分  
(TSKgel SP-STAT)  
B 20 % → 50 %, 30 分  
(TSKgel CM-STAT)

流 速：1.0 mL/min  
検 出：UV (280 nm)  
温 度：25 °C  
注入量：10 μL  
試料濃度：1 g/L  
試 料：精製MAb

CM-STATの方がピークがシャープで優れた分離を示しています。また図-19に示すようにTSKgel CM-STATカラムを用いて、pHグラジエントにより電荷異性体の分離を行うことが可能です。

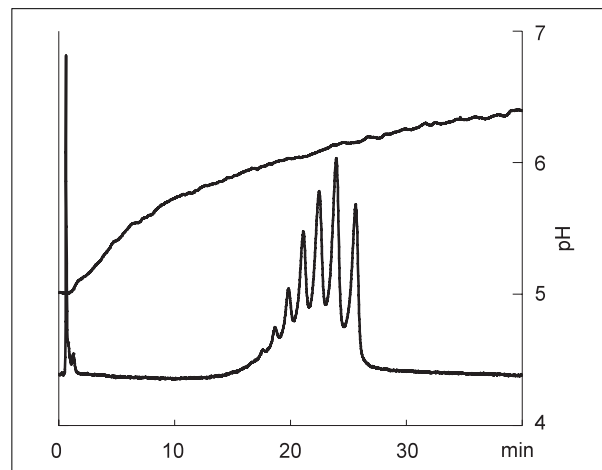


図-19 精製MAbの電荷異性体分離,  
pHグラジエント (クロマトフォーカシング)

カラム：TSKgel CM-STAT (4.6 mm ID.×10 cm)  
溶離液：A；50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
B；30 mmol/L 酢酸ナトリウム (pH 調整無し)  
A液で平衡化し、試料注入後、B液100%にステップ  
流 速：1.0 mL/min  
検 出：UV (280 nm)  
温 度：25 °C  
注入量：10 μL  
試料濃度：1 g/L  
試 料：精製MAb

タンパク質のポリエチレングリコールによる修飾(PEG化)は、医薬用タンパク質の生体内での半減期の延長などを目的として検討がなされています。図-20、21に、TSKgel SP-STATのハイスループットカラムを用いてリゾチームのPEG化反応を追跡した例を示します。図-20は反応開始後一定時間毎に反応液を測定したクロマトグラムの重ね書きです。さらにこれらのクロマトグラムの各ピーク面積の割合を反応時間に対してプロ

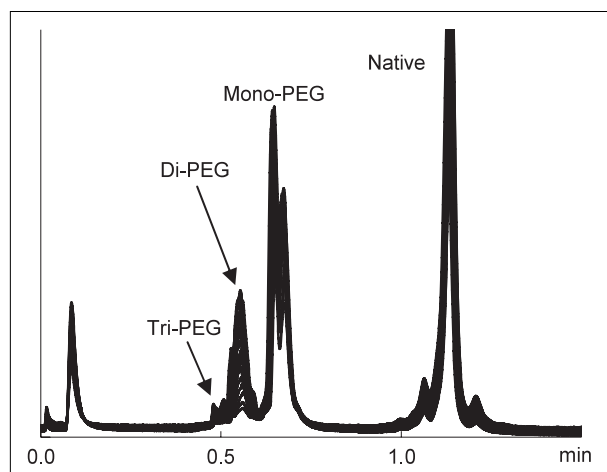


図-20 リゾチームのPEG化反応追跡クロマトグラム

カラム：TSKgel SP-STAT (3.0 mm I.D.×3.5 cm)  
 溶 媒：A；20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 1.5分  
 流 速：2.0 mL/min  
 検 出：UV (280 nm)  
 温 度：25℃  
 試 料：5 g/Lリゾチームをリン酸緩衝液中に溶解し、3倍モル当量のPEG化試薬 (ME-200CS日本油脂製) を添加。4分ごとにサンプリングし測定

ットしたものを図-21に示します。ハイスループットカラムでは測定時間が短いため、PEG化反応のような早い反応速度の追跡も十分可能であることが分かります。

さらにTSKgel SP-STATの高分離能カラムを用いることで、図-22に示すような精密な分離を行うことが可能です。モノ,ジ,トリPEG化タンパク質の異性体が複数分離されていることが分かります。

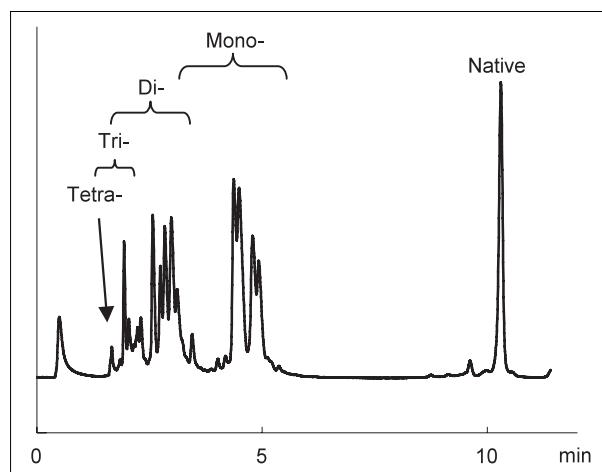


図-22 リゾチームのPEG化反応物のクロマトグラム

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
 B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)  
 リニアグラジエント；B 0% → 100%, 10分  
 流 速：1.4 mL/min  
 検 出：UV (280 nm)  
 温 度：25℃  
 注入量：5μL  
 試 料：図-20 反応最終回分

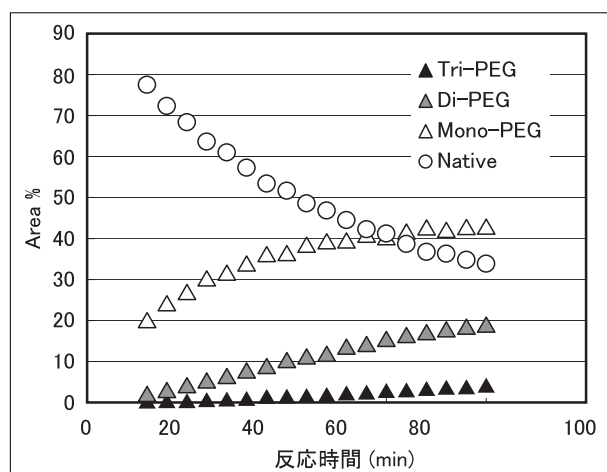
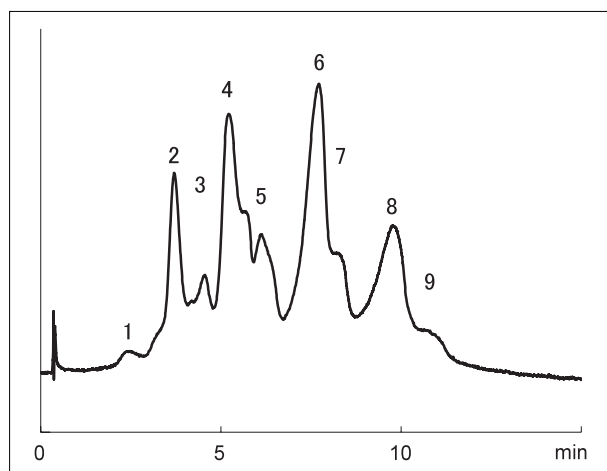


図-21 リゾチームのPEG化反応追跡クロマトグラムからの各溶出ピーク面積割合追跡図

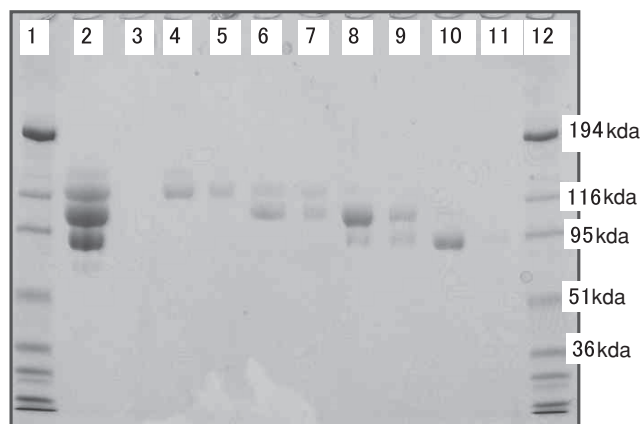
また、市販のPEG化タンパク質医薬品を分析した例を  
**図-23**に示します。さらに各ピークを分取し、SDS-  
 PAGEで分析した結果を**図-24**に示します。SDS-PAGE



**図-23 市販PEG化タンパク質医薬品の分析**

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm ID.×10 cm)  
 溶離液：A；20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.2)  
 B；0.2 mol/L NaCl in 20 mmol/L 酢酸ナトリウ  
 ム緩衝液 (pH 4.2)  
 リニアグラジエント；B 0 % → 100 %, 20 分  
 流 速：1.5 mL/min  
 検 出：UV (280 nm)  
 温 度：25 °C  
 試 料 市販PEG化タンパク質医薬品

の結果から、未分離成分のピークが含まれていることが  
 分かりますが、医薬品の品質管理に使用可能であること  
 が示唆されます。



**図-24 市販PEG化タンパク質医薬品の溶出分画の  
 SDS-PAGE**

\*非還元下でのSDS-PAGE

Lane 1, 12 マーカー  
 2 市販PEG化タンパク質医薬品  
 3-11 図-22に示す各ピークフラクション

図-25に各種抗体医薬品をTSKgel CM-STATの高分離能カラムで分離したクロマトグラムを示します。どの抗体医薬品についてもバリエントが短時間で良好に分離されており、TSKgel CM-STATが抗体医薬品の開発、品質管理に適したカラムであることが分かります。

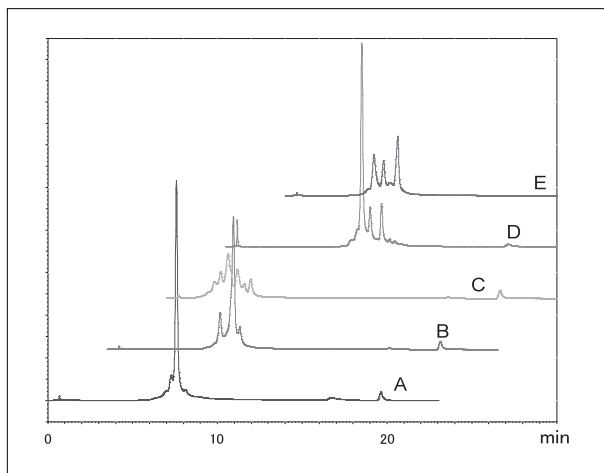


図-25 抗体医薬品のバリエント分離

カラム：TSKgel CM-STAT (4.6 mm ID.×10 cm)

溶離液：A；20 mmol/L MES 緩衝液 (pH 6.0)

B；0.5 mol/L NaCl in 20 mmol/L MES 緩衝液 (pH 6.0)

グラジエント：B 10 %→30 %， 15分

流 速：1.0 mL/min

検 出：UV (280 nm)

温 度：25℃

注入量：20 μL

試料濃度：0.5 g/L

試 料：A：ヒト化抗体、IgG<sub>1</sub>

B：ヒト化抗体、IgG<sub>1</sub>

C：キメラ抗体、IgG<sub>1</sub>

D：キメラ抗体、IgG<sub>1</sub>

E：キメラ抗体、IgG<sub>1</sub>

\*相模中央化学研究所 柿谷 均博士のご厚意によります。

## 5. おわりに

これまで、タンパク質、核酸などのイオン交換クロマトグラフィーでは、非多孔性充てん剤であるTSKgel NPRシリーズにより高分離性能が達成されてきました。しかしカラム圧が高いことや低分子量成分のピーク形状が悪い場合があります。TSKgel STATシリーズでは、基材特性および表面修飾法の改良により低分子量物質のピーク形状の改善、および、粒子径の最適化により、低カラム圧での高分離能を達成しました。さらには、高分離能カラムとハイスループットカラムのラインアップにより、イオン交換クロマトグラフィーの適応範囲が広がることを期待されます。

※ 本紙に記載している以下の名称は東ソー株式会社の商標です。  
TSKgel、TSKgel STAT



## 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 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0003 名古屋市中区錦1-17-13  
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 [hlc@tosoh.co.jp](mailto:hlc@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/>

東ソーHLCデータベース <http://www2.tosoh.co.jp/hlc/hlcdb.nsf/StartJ?OpenForm>

3011SB—品番0994050A