



TOSOH

充てんおよび使用法ガイド

TOYOPEARL[®]、TSKgel[®] PW

充てんおよび使用法ガイド

— 目 次 —

I. カラム充てん	1
1. 充てんの準備	1
a) 充てんのための一般的注意事項	1
b) 微粒子の除去	1
c) 緩衝液での平衡化	2
d) スラリーの調製	2
2. 充てん操作手順	4
a) 定流速法/半定圧法	4
b) その他の充てん方法	6
3. 平衡化、および性能評価	8
II. カラムの使用法	9
1. クロマトグラフィー	
a) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	9
b) イオン交換クロマトグラフィー (IEC)	9
c) 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)	9
d) アフィニティークロマトグラフィー (AFC)	10
2. 洗 浄	11
3. 保 管	12
4. 滅菌/発熱物質除去/保存剤除去	12

東ソー株式会社

はじめに

TOYOPEARL/TSKgel PW シリーズは、分取クロマトグラフィー用に開発された大孔径ポリマー充てん剤で、タンパク質やペプチド、核酸、その他の生体成分の分離・精製用としてラボスケールおよび分取スケールでご使用頂けます。これら充てん剤は、親水性メタクリレート基材としており、優れた圧力・通液特性と pH 安定性を備えています。

I. カラム充てん



充てん作業に必要な主な器具

1. 充てんの準備

a) 充てんのための一般注意事項

TOYOPEARL の充てんに適した圧力は 0.05 ~ 0.3 MPa (7 ~ 45 psi)、TSKgel PW シリーズの充てんに適した圧力は 0.3 ~ 1 MPa (45 ~ 140 psi) です。TOYOPEARL / TSKgel PW シリーズは単純な重力沈降（静水圧）によって充てんすることも可能ですが、カラム性能が十分に発揮できないため一般的ではありません。

ここでは、TOYOPEARL/TSKgel PW シリーズの充てん法について説明します。これら充てん剤の充てんには次のような器具を準備下さい。

準備する器具（写真参照）：ポンプ（HPLC用またはペリスタポンプ）、圧力ゲージ、水準器、カラム（ガラス/アクリル/PEEK/ステンレス製）、および充てん用リザーバー（省略可）。

注) TOYOPEARL は、0.5 MPa 以上の圧力では充てんしないで下さい。同様に、TSKgel PW シリーズは、2 MPa 以上の圧力では充てんしないで下さい。

b) 微粒子の除去

製品中に含まれる微粒子は、カラムエンドのフィルター（スクリーン）や焼結フィルターで目詰まりし、カラム圧増大の原因になります。充てんする前に微粒子を取り除くためのデカンテーション処理を行う必要があります。

1. 静置した容器内に沈降している充てん剤を十分振とう、または棒やパドルで攪拌、懸濁して下さい。充てん剤がスラリー状態になったら、スラリー溶液の必要量（スラリー容量のうちの約 70% が充てん剤自体の容量です）を十分大きい容を持つ別の容器に移します（使用する充てん剤量の少なくとも 5 倍以上の容量を持つ容器を使用して下さい）。充てん剤容積の 4 倍の容量の蒸留水または緩衝液を加えて十分に攪拌します。

例：5 L の製品を購入された場合、スラリー溶液全体の容量は 7 ~ 8 L になります（スラリー濃度 65 ~ 70%）。

スラリー全量を使用する場合には、25 L 以上の容器を準備して下さい。

注) 攪拌の際に、マグネチックスターラ（攪拌子）は使用しないで下さい。充てん剤と攪拌子のすり潰しにより微粒子を発生させる恐れがあります。

2. 充てん剤が容器内で沈降するのを待ちます。沈降に要する時間は容器の直径やスラリー溶媒、充てん剤の粒子径によって異なります。蒸留水中に懸濁した場合の代表的な平均沈降時間を表 . 1 に示します。

表 . 1 充てん剤の沈降時間（蒸留水）

TOYOPEARL

Exter coarse (EC) グレード：200 μm	5 ~ 10 分
Coarse (C) グレード：100 μm	15 ~ 30 分
Medium (M) グレード：65 μm	30 ~ 45 分
Fine (F) グレード：45 μm	45 ~ 60 分
Superfine (S) グレード：35 μm	60 ~ 90 分

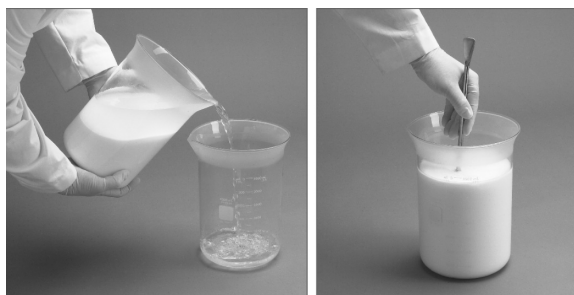
TSKgel PW シリーズ

30 μm	90 ~ 120 分
20 μm	120 分以上

3. 充てん剤が沈降したら、容器を傾けて上澄みを慎重に流し出して下さい。

4. 充てん剤容積の約3倍容量の蒸留水または充てん用緩衝液を充てん剤の入った容器に加え、容器の上から棒やパドルなどを使用してゆっくりと攪拌します。

注) 攪拌の際に、マグネチックスターラ（攪拌子）は使用しないで下さい。充てん剤と攪拌子のすり潰しにより微粒子を発生させる恐れがあります。



3. 容器を傾けて上澄みを流し出す 4. 再度懸濁

5. ステップ3からステップ4までの操作をさらに3回以上（上澄み液の濁りが見られなくなるまで）繰り返して下さい。

c) 緩衝液での平衡化

充てんに用いる溶液は、イオン強度の大きな緩衝液を使用することをお奨めします。蒸留水を使用して充てんすることも可能ですが、塩を含む緩衝液で充てんしたカラムと比較して理論段数が低くなり、非対称性係数が大きくなります。

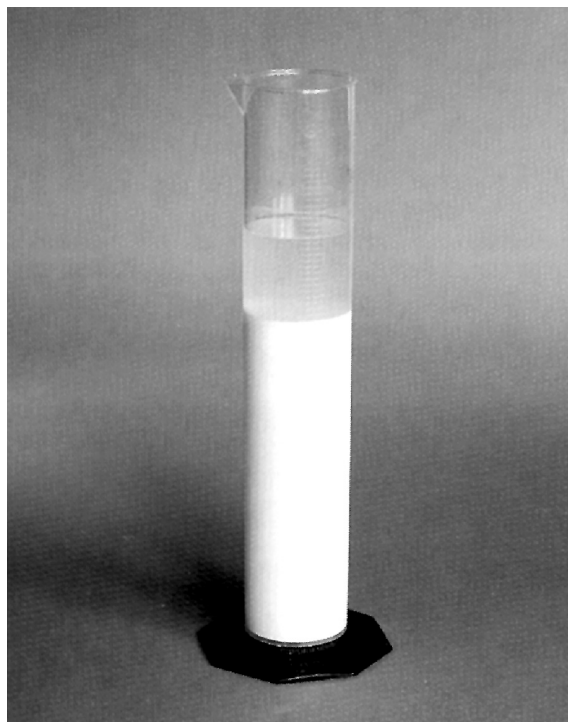
さらに、蒸留水を使用して充てんした疎水クロマトグラフィ用充てんカラムでは、イオン強度の高い緩衝液と蒸留水を繰り返し使用した場合、カラム内側の壁面に沿ってチャネリングが発生し易くなります。

充てんに使用する緩衝液は、用途により異なりますが、一般的には、分離で使用される最もイオン強度の高い溶離液（洗浄や滅菌目的で使用される溶離液も含む）を選択します。一般的に使用される充てん用緩衝液を表. 3（次ページ）に示します。

d)-1 スラリーの調製（通常の場合）

充てん剤から微粒子を除去した後、スラリー濃度を調節します。スラリー濃度は、沈降後の充てん剤体積とスラリー全容積から求められますが、さらに以下の項目を考慮して濃度を調節します。

1. 容器内でスラリーを再度懸濁し、均一になったスラリーをメスシリンダーへ移します。



2. スラリーを一晩放置（12時間以上）して沈降させます。

3. 沈降後の充てん剤体積を測定し、TOYOPEARLの場合は、スラリー濃度が30～50%となるように充てん用緩衝液を追加または除いて下さい。

TSGel PWの場合、充てんに使用できるスラリー濃度は25～70%ですが最適スラリー濃度は40～50%です。

4. 充てんするカラムサイズに対して沈降後の充てん剤量として表. 2に示す充てん剤量を使用して下さい。

表.2 充てんに必要な充てん剤量

TOYOPEARL HW-40、HW-50、HW-55、HW-65、HW-75F	カラム容積の約1.1倍を準備して下さい
TOYOPEARL イオン交換体、疎水ゲルおよびアフィニティーゲル（ただしTOYOPEARL QAE-550C、SP-550C、MegaCap II SP-550ECを除く）	カラム容積の約1.2倍を準備して下さい
TSKgel DEAE-5PW、SuperQ-5PW、SP-5PW、SP-3PW、Ether-5PW、Phenyl-5PW	
TOYOPEARL QAE-550C、SP-550C、およびMegaCap II SP-550EC	カラム容積の約1.25倍を準備して下さい

d)-2 スラリーの調製（ラボスケールなど少量の場合）

1. 充てん剤を容器内で再度懸濁させ、均一に懸濁したスラリーをブフナー漏斗または類似の容器へ移します。
2. スラリーが湿ったケーキ状になるまで吸引ろ過します（余分なスラリーろ液を完全に取り除きます）。
3. 表.2を参照しながら、適切な量の充てん剤ウェットケーキを秤量します（1 gのウェットケーキがゲル1 mLにほぼ相当します）。
4. 秤量したウェットケーキ（ゲル）をビーカーへ移し、十分な量の充てん用緩衝液を加えてスラリー濃度が30～50%となるように調整します。

表.3 代表的な充てん用緩衝液

SEC	
TOYOPEARL HW-40F、HW-50F、HW-55F、HW-65F、HW-75F	0.05 mol/L リン酸緩衝液またはトリス緩衝液中に0.1 mol/L Na ₂ SO ₄ 、NaNO ₃ またはNaClを溶解
IEC	
TOYOPEARL イオン交換体	0.05 mol/L リン酸緩衝液、トリス緩衝液または酢酸緩衝液中に1 mol/L NaClを溶解
TSKgel DEAE-5PW、SuperQ-5PW、SP-5PW、SP-3PW	
HIC	
TOYOPEARL 疎水ゲル	0.05 mol/L リン酸緩衝液中に2 mol/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 、Na ₂ SO ₄ またはNaClを溶解
TSKgel Ether-5PW、Phenyl-5PW	
AFC	
TOYOPEARL AF-Tresyl-650M、AF-Epoxy-650M	0.1 mol/L NaHCO ₃ またはリン酸緩衝液中に0.5 mol/L NaClを溶解
TOYOPEARL AF-Formyl-650M、AF-Amino-650M、AF-Carboxy-650M	0.1 mol/L リン酸緩衝液または炭酸緩衝液中に1 mol/L NaClを溶解
TOYOPEARL AF-Chelate-650M、AF-Blue HC-650M、AF-Red-650ML	0.02 mol/L リン酸緩衝液またはトリス緩衝液中に0.5 mol/L NaClまたは0.2 mol/L グリシンを溶解

微粒子除去の最後のステップで、分離に使用する、あるいは充てん用の緩衝液を使用することで手順が簡略化できます。

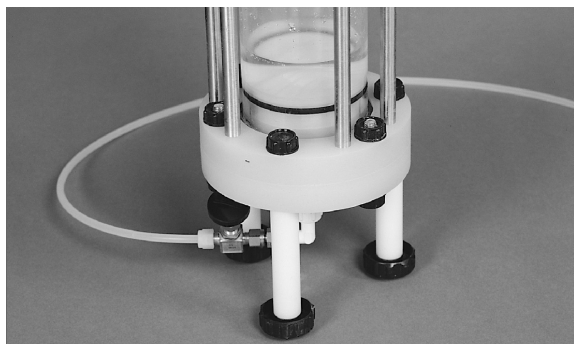
2. 充てん操作手順

以下の充てん法の説明は、送液しながら行う充てん法を述べたものです。他の装置での充てん、もしくは5 L以上の充てんを行う場合は、カラム、装置の取扱説明書を確認して下さい。

a) 定流速／半定圧充てん法

1. リザーバーをカラムの上部に装着します。リザーバーのサイズは、カラムとリザーバーを合わせた全容量がスラリー液量以上である必要があります。

2. カラムの底部のフィルター（スクリーン）を緩衝液で濡らしておきます。気泡を取り除くため、緩衝液を数秒間流し出して下さい。カラム出口を栓で止め、カラム底部には深さ1～2 cm程度の緩衝液を残しておきます。



3. スラリーが均一になるように再度懸濁します。



4. スラリーを慎重に、ゆっくりとカラム内部に流し込みます。スラリー内に気泡が巻き込まれないように注意して下さい。



5. スラリーを全てカラムへ注いだ後、洗浄瓶を使用してリザーバー内壁を洗浄して下さい。

6. 直ちにフローアダプタをスラリー上部へ装着します。このとき、フローアダプタと緩衝液（スラリー）との間に空気を閉じ込めないように注意して下さい。



7. カラム出口を開き、ポンプを起動します。充てん用緩衝液をカラムにゆっくりと流し始めます。一例を表.4、5に示します。

8 a. (定流速法)

最終流速に達するまで、何段階かに分けて流速を増加させます。徐々に流速を上昇させることにより、ゲルベッドに急激な水圧が加わるのを防止し、不均一な充てん状態になるのを防ぎます。

流速の変化は、カラムのサイズと最終目標とする流速によって決まります。参考までに、一例を表.6に示します。

8 b. (半定圧法)

目標とする圧力値まで、充てん圧力をゆっくりと一定の割合で増加させます。徐々に圧力を増加させることにより、ゲルベッドに急激な水圧が加わるのを防止し、不均一な充てん状態になるのを防ぎます。目標圧に達したら、マニュアル（または自動）で流量を減らしていくことにより圧力を維持し、ゲルベッドにかかる圧力を一定に保ちます。TOYOPEARLの一般的な最適充てん圧は0.3 MPa（44 psi）です。

表 . 4 TOYOPEARL の充てん時および操作時に使用する流速

充てん剤タイプ	カラムサイズ I.D.×L (cm)	グレード 粒子径	充てん時の流速 (cm/h)	操作時の流速			
				(cm/h)	(mL/min)		
SEC	HW40	S (30 μm)	30 - 40	10 - 25	0.6 - 1.6		
		F (45 μm)	60 - 80	25 - 50	1.6 - 3.2		
		C (75 μm)	120 - 160	50 - 100	3.2 - 6.4		
	HW-50	S (30 μm)	25 - 35	10 - 20	0.6 - 1.3		
		F (45 μm)	50 - 70	25 - 35	1.6 - 2.2		
HW-55	S (30 μm)	25 - 35	10 - 20	0.6 - 1.3			
	F (45 μm)	50 - 70	25 - 35	1.6 - 2.2			
HW-65	2.2 × 60	S (30 μm)	20 - 75	10 - 15	0.6 - 1.0		
		F (45 μm)	40 - 150	15 - 30	1.0 - 1.9		
HW-75	2.2 × 60	F (45 μm)	40 - 150	15 - 30	1.0 - 1.9		
IEC*	DEAE-650、SuperQ-650 CM-650、SP-650 GigaCap S-650、Q-650、CM-650	S (35 μm)	400 - 600	45 - 65	3.0 - 4.0		
		M (65 μm)	800 - 1,000	80 - 130	5.0 - 8.0		
		C (100 μm)	800 - 1,200	80 - 600	5.0 - 40.0		
	SP-550、QAE-550	2.2 × 20	C (100 μm)	700 - 1,000	80 - 240	5.0 - 15.0	
	MegaCap II SP-550		EC(100-300 μm)	800 - 1,200	80 - 500	5.0 - 30.0	
HIC*	Ether-650、Butyl-650	PPG-600、Butyl-600	2.2 × 20	S (35 μm)	400 - 600	45 - 65	3.0 - 4.0
	Phenyl-650	Phenyl-600		M (65 μm)	800 - 1,000	80 - 130	5.0 - 8.0
	Hexyl-650	Super Butyl-550		C (100 μm)	800 - 1,200	80 - 500	5.0 - 30.0
AFC*	AF-Amino-650	AF-Tresyl-650	2.2 × 10	M (65 μm)	800 - 1,000	30 - 130	2.0 - 8.0
	AF-Carboxy-650	AF-Blue HC-650					
	AF-Formyl-650	AF-Red-650					
	AF-Epoxy-650	AF-Chelate-650					
		AF-Heparin-650					

高性能なカラムを得るには、より大きな流速かつ高い圧力をかけて充てんする必要があります。TOYOPEARL を従来のソフトゲルと同じ重力沈降（静水圧）法で充てんした場合、十分な性能が出ない場合があります。

*充てん剤のタイプによってはすべての粒子サイズ（グレード）が用意されていません。

表 . 5 TSKgel PW の充てん時および操作時に使用する流速

充てん剤タイプ	カラムサイズ I.D.×L (cm)	グレード 粒子径	充てん時の流速 (cm/h)	操作時の流速	
				(cm/h)	(mL/min)
IEC/HIC TSKgel PW シリーズ	5.5 × 20	20 μm	100 - 400	50 - 300	19.8 - 119
	10.8 × 20	20 μm	100 - 400	50 - 300	76.3 - 458
	15.8 × 30	30 μm	100 - 500	50 - 400	163 - 1,307
	21 × 30	30 μm	100 - 500	50 - 400	289 - 2,309
	30 × 20-30*	20 - 30 μm	(N/A)	50 - 400	589 - 4,712

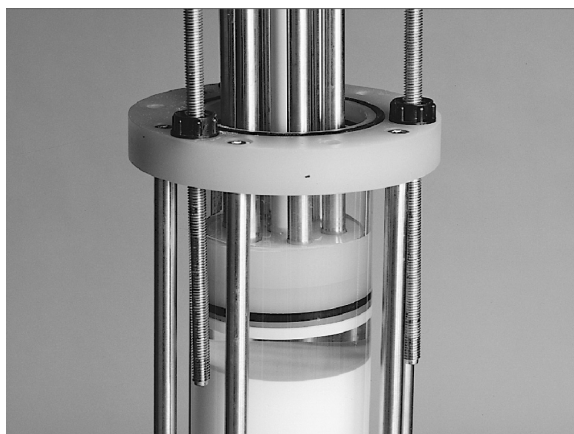
*ピストン圧 (=0.3 MPa) でのダイナミックアキシャルコンプレッション (DAC;Dynamic Axial Compression) による

* 操作時は、充てん時の流速よりも必ず低い流速をご使用下さい。

表 . 6 流速変化量の例

カラムサイズ (I.D.×L)	充てん剤 タイプ	目標流速 (mL/min)	流速増分 (mL/min)	ホールド 時間 (min)
2.2 cm × 60 cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9 cm × 30 cm	QAE-550C	300	50	2
25 cm × 30 cm	DEAE-650M	2,000	400	3

9. 充てん層が完全に形成されたら、ポンプを停止させてカラム出口の栓を閉じます。
10. ここまでの操作でゲルベッドがカラムの下側部分に形成されます。ピペットまたはポンプを使用してリザーバー上部の上澄み液を吸い出します。上部に据えていたリザーバーとのジョイント（カップリングリング）を取り外します。
11. フローアダプタをカラム内に慎重に下ろし、充てん層上端から2-3 cmの距離まで挿入します。その際、カラム内へ空気が入らないように注意して下さい。



12. フローアダプタを所定の位置に固定した後、カラム出口の栓を開きます。ステップ8a（定流速法）または8b（半定圧法）の手順に従ってポンプを起動します。



13. ステップ12の操作により充てん層はさらに圧縮されます。圧縮が完了して圧力が安定したことを確認して、ポンプを停止し、カラム出口の栓を閉じて下さい。
14. フローアダプタのシールを慎重に緩め、充てん剤上端面に触れるまでアダプタの位置を下げます。フローアダプタを移動させるときに充てん層の界面を乱さない注意が必要です（フローアダプタは充てん層に直接接触する状態にして下さい）。



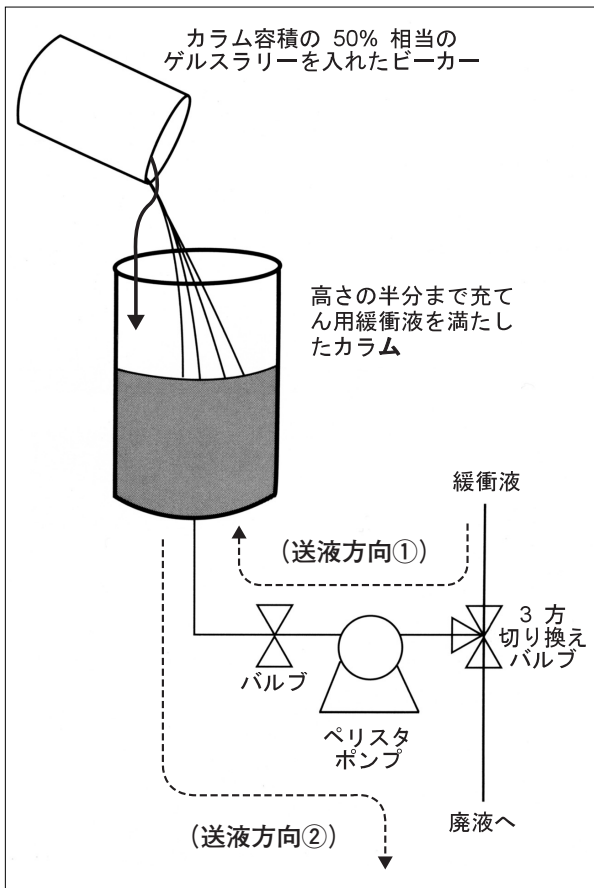
15. ステップ12から14の操作を繰り返すことで、充てん層がさらに圧縮されます。フローアダプタと充てん層との隙間がなくなるまで（ < 0.5 cm）、これらの操作を繰り返します。通常、充てん層が十分に圧縮するまでに、2～3回の繰り返し操作が必要です。
16. これでカラムへの充てん操作は完了です。次に、充てんしたカラムの性能評価を行います（p.8参照）。

b) その他の充てん方法（重力補助充てん法）

カラムの構造上充てんにリザーバーを使用できない場合があります。以下に示す方法は、充てん用リザーバーを使用せずに充てんする方法です。

1. スラリー濃度が50%となるように調製し、容器内で、ゆっくりと充てん剤を再懸濁させます。
注）攪拌の際に、マグネチックスターラ（攪拌子）は使用しないで下さい。充てん剤と攪拌子のすり潰しにより微粒子を発生させる恐れがあります。

図.1 カラム充てん模式図



2. 図.1に示されるように、ペリスタポンプをカラム下端の出口側に接続します。

3. 充てん開始の前に、カラムが水平に設置されていることを確認して下さい。

4. ポンプで、充てん用緩衝液をカラム内へ流し込む方向で送液し、カラムの約50%の高さまで緩衝液を流し込みます（送液方向①）。ポンプを停止します。

5. ポンプを設定流速で、カラムから外へ流し出す方向で運転しながら（送液方向②）、均一に懸濁した充てん剤スラリーをカラムに流し込みます。

注) 気泡の形成を防止するため、スラリーはカラムの壁を伝わらせて流し込んで下さい。

6. 充てん層がほぼ完全に形成され、充てん層の上に約2~3 cmの深さの緩衝液が残る状態でポンプを停止させ、カラム出口バルブを閉じます。

7. 充てん用緩衝液を満たした洗浄瓶を使用して、ゆっくりカラム内壁のゲルを洗い落とします。

8. フローアダプタをカラム内へ慎重に下ろし、充てん緩衝液表面に触れる位置まで挿入します。

9. アダプタを所定の位置にしっかりと固定し、ポンプをカラム送液のために、カラム入り口側に接続します。配管内の気泡を完全に取り除いて下さい。

10. 流速を下げてポンプを起動し、カラムの底部のバルブを開きます。

11. 目的とする流速まで、一定の割合で流速を増加させます。徐々に流速を上昇させることにより、ゲルベッドに急激な水圧が加わるのを防止し、不均一な充てん状態になるのを防ぎます。充てんの最初の段階から、流量を段階的に（最小単位）増加させていく方法でも充てんできます。流量の増分および継続時間は充てんするカラムのサイズによって決まります。参考までに、一例を表.7に示します。

表.7 流速変化量の例

カラムサイズ (I.D.×L)	充てん剤 タイプ	目標流量 (mL/min)	流量増分 (mL/min)	ホールド 時間 (min)
2.2 cm×60 cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9 cm×30 cm	QAE-550C	300	50	2
25 cm×30 cm	DEAE-650M	2,000	400	3

12. 充てん層が完全に形成されたら、ポンプを停止してカラム底部のバルブを閉じます。

13. フローアダプタのシールを緩め、フローアダプタを力が加わらないように静かに充てん層界面の上に置きます。このとき、充てん剤がカラムシールの脇を通り抜けないように注意して下さい。

14. ステップ10から13までの操作を繰り返すことで、充てん層がさらに圧縮されます。フローアダプタと充てん層との隙間がなくなるまで (<0.5 cm) これらの操作を繰り返します。

通常、充てん層が圧縮するまでに、2~3回の繰り返し操作が必要です。

15. これでカラムへの充てん操作は完了です。次に、充てんしたカラムの性能評価を行います (p.8参照)。

3. 平衡化、およびカラム性能評価

TOYOPEARL：カラム容積の5～10倍のイオン強度の低い緩衝液を通液してカラムを平衡化します。充てん性能評価のために、カラムに保持されない低分子量サンプル（アセトン、ビタミンB12、塩化ナトリウムなどをカラム容積の0.25～1%程度）を注入してカラムの理論段数とピークの非対称係数の評価を行います（図. 2、表. 8 参照）。

前述の方法で充てんされたカラムに線速50～250 cm/hr（充てん剤の粒子径に依存）で溶離液を送液し性能評価を行うと、カラムは少なくとも表. 9に示す理論段数、非対称係数は0.8～1.4が得られます。

TSKgel PWシリーズ：粒子径20 μm、30 μmの高速分取用充てん剤のTSKgel PWシリーズは、TOYOPEARLと類似の化学的特性を有していますが、TSKgel PWの方が架橋度が高いため、TOYOPEARLよりも高い耐圧性があります。

表. 10から分かるとおり、DACカラムに3 MPaまたはこれを超える圧力で充てんした場合、TSKgel PWシリーズの方が、より高いカラム段数が得られます。TSKgel PWシリーズは3から10 MPa程度の圧力で使用するのが一般的ですが、カラムやハードウェアが高圧かつ安全に操作できるのであれば、15～20 MPaの高圧で使用することも可能です。

図. 2 理論段数と非対称係数の計算方法

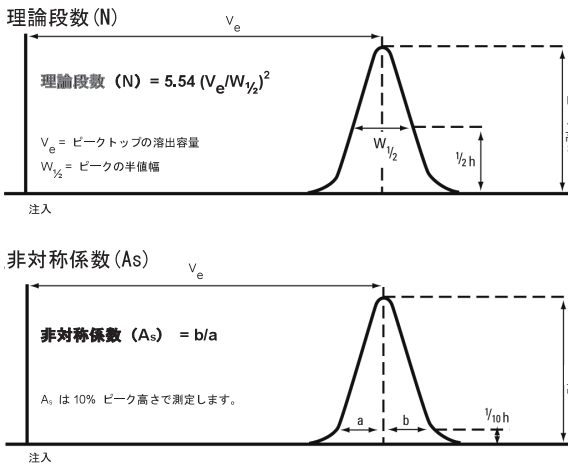


表. 8 性能評価の際のトラブルシューティング

As < 0.8	As > 1.4
カラムが過充てん。充てん圧が高すぎる。カラム充てん層にクラックが発生している。	カラムが「密」に充てんされていない。カラム上端/下端のスクリーン/フリットの目詰まり。カラム上端部に空隙が発生している。カラムハードウェアのポイドにエアかみが発生。サンプル注入法に問題。
低理論段数	高理論段数
カラム以外でのポイド容量が大きすぎる（インジェクター、検出器までの配管が長すぎるなど） サンプルオーバーロード。 カラムの充てん不良。	試料が充てん剤との相互作用によってカラムに保持されている。

表. 9 TOYOPEARL カラムの理論段数(試料:アセトン)

モード	カラム I.D.(cm)	Sグレード (段数/m)	Fグレード (段数/m)	Mグレード (段数/m)	Cグレード (段数/m)
SEC	2.2	5,000	3,500	-	3,000
	5.5	5,000	3,300	-	-
	10.8	5,000	2,500	-	-
	21	4,000	2,200	-	1,500
	31	-	2,000	-	1,200
	40	-	1,800	-	1,000
IEC	2.2	6,000	-	4,000	2,000
	5.5	6,000	-	4,000	-
	10.8	6,000	-	4,000	-
	21	4,000	-	2,600	2,000
	31	-	-	2,000	1,000
	40	-	-	1,500	750
HIC	2.2	6,000	-	4,000	2,000
	5.5	6,000	-	4,000	-
	10.8	6,000	-	4,000	-
	21	4,000	-	2,600	2,000
	31	-	-	2,000	1,000
	40	-	-	1,500	750
AFC	2.2	-	-	4,000	-
	5.5	-	-	4,000	-
	10.8	-	-	4,000	-
	21	-	-	2,600	-
	31	-	-	2,000	-
	40	-	-	1,500	-

実際の充てんカラムの理論段数および非対称係数が、表の数値と比較して大きく異なる場合は、充てん操作をやり直してみて下さい。

内径40 cm以上のカラムの場合は、段数/mの値が内径に反比例して減少します。

表. 10 TSKgel PW シリーズカラムの理論段数（試料：アセトン）

モード	充てん方法	充てん用緩衝液	カラム I.D. (cm)	20 μm グレード (段数/m)	30 μm グレード (段数/m)
IEC	従来法 ^{*1}	水	5.5	1,500	-
	従来法 ^{*1}	水	10.8	1,500	-
	従来法 ^{*1}	水	15.8	-	1,200
	従来法 ^{*1}	水	21	-	1,000
	DAC ^{*2}	高塩濃度 ^{*3}	20-30	10,000	7,000
HIC	従来法 ^{*1}	水	5.5	1,500	-
	従来法 ^{*1}	水	10.8	1,500	-
	従来法 ^{*1}	水	15.8	-	1,200
	従来法 ^{*1}	水	21	-	1,000
	DAC ^{*2}	高塩濃度 ^{*3}	20-30	10,000	7,000

*1 従来法；スラリー充てん法

*2 DAC；Dynamic Axial Compression、ピストン圧(=3 MPa)

*3 高塩濃度；=0.5 mol/L NaCl

II. カラムの使用法

1. クロマトグラフィー分離

a) サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

カラム容積の5～10倍程度の適量の緩衝液(表. 3参照)を流し、カラムを平衡化します。TOYOPEARL HWカラムを使用するSECでは、適度なイオン強度の緩衝液・塩溶液を使用します。通常、サンプル注入量はカラム容積の1～3%程度とします。溶出時間が予想されるよりも長い、あるいは短い場合は移動相の変更が必要となることがあります。

移動相の変更に関しては表. 11を参照下さい。

表. 11 SECでの溶出挙動

現象	原因/解決方法
溶出時間が予想よりも短い	サンプルが部分的、または完全にカラムから排除されている可能性がある/サンプルの分子量を確認して、必要ならばより高い排除限界を持つ充てん剤に変更する。 アニオン性化合物はイオン性反発によって排除される可能性がある/移動相のイオン強度を高くする。
溶出時間が予想よりも長い	カチオン性化合物はイオン性吸着で溶出が遅くなる可能性がある/移動相のイオン強度を高くする。 疎水性化合物は疎水吸着によって溶出が遅れる可能性がある/移動相のイオン強度を下げる、または、10～20%程度の有機溶媒(メタノール、エタノール、アセトニトリルなど)を添加する。

b) イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

カラム容積の5から10倍程度の適量の開始緩衝液を流し、カラムを平衡化させます(表. 12参照)。試料を溶出させるには溶離液の塩濃度を高くするか、またはpHを変化させます。

表. 12 イオン交換クロマトグラフィーで使用される緩衝液の例

充てん剤タイプ	緩衝液	緩衝能のあるpH範囲
陽イオン交換体	酢酸	4.8 - 5.2
	クエン酸	4.2 - 5.2
	MES	5.5 - 6.7
	リン酸	6.7 - 7.6
	HEPES	7.6 - 8.2
陰イオン交換体	L-ヒスチジン	5.5 - 6.0
	イミダゾール	6.6 - 7.1
	トリエタノールアミン	7.3 - 7.7
	トリス	7.5 - 8.0
	ジエタノールアミン	8.4 - 8.8

目的のタンパク質がカラムに吸着されない場合は、適当な酸またはアルカリ溶液を使用してイオン交換体を活性化(対イオンの置換)する必要があります。このような処理を行ってもイオン交換体が目的のタンパク質を吸着しないようであれば、開始緩衝液のpHを変化させてタンパク質とイオン交換体間の静電相互作用を強くするか、または開始緩衝液の塩濃度を下げてみて下さい(試料をカラムに導入する前に、必ず1回はブランク分析を行うことにより開始緩衝液でカラムを平衡状態にして下さい)。

c) 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)

適当な中性塩(表. 13参照)を選択し、その中性塩を高濃度(一般に1 mol/Lから3 mol/L程度)で含む緩衝液でカラムを平衡化します。塩のイオン強度を高めることによりタンパク質-充てん剤間の疎水性相互作用が促進され、より効果的に吸着が起こります(試料をカラムに導入する前に、必ず1回はブランク分析を行うことにより開始緩衝液でカラムを平衡状態にして下さい)。

吸着したタンパク質を溶出させるため溶離液中の塩濃度を低下させます。疎水性の低いタンパク質がより早く(より塩濃度の高い状態で)溶出し、より疎水性の高いタンパク質がそれよりも遅れて溶出します。この方法で目的のタンパク質を溶出できない場合、少量の有機溶媒添加(数%程度)や非イオン性界面活性剤の添加、溶離液pHの変更、または温度を下げるなどの方法を行います。使用可能な有機溶媒、界面活性剤、カオトロピック試薬については表. 14を参照して下さい。

表. 13 HICで使用される中性塩

塩 (強度の高い順)*	注記
クエン酸ナトリウム	高いUV吸収を示す。微生物が繁殖しやすい。
硫酸アンモニウム	pH 8以上で不安定。UV干渉を受けにくい。微生物の繁殖を阻害する。HIC用として最も一般的に使用される塩。
硫酸ナトリウム	溶解度が低い(25℃にて1.5 mol/L)。
塩化ナトリウム	ハロゲン塩はステンレス鋼を腐食させる。安価。
塩化カリウム	ハロゲン塩はステンレス鋼を腐食させる。

*リオトロピック塩(lyotropic salts)のHofmeister系列に従う。

表. 14 HICで使用される溶離液への添加剤

有機溶媒	界面活性剤	カオトロピック試薬
エタノール	Triton X-100	グアニジン塩酸塩
メタノール	オクチルグリコシド	塩化テトラアセチルアンモニウム
イソプロパノール	Tween 20	尿素
n-ブタノール	SDS	チオシアン酸カリウム
アセトニトリル	CHAPS	
エチレングリコール	Emulgen 911	
	CTAB	
	Lubrol PX	

ピークの溶出に再現性がない場合は、まずカラムの平衡化時間を長くして下さい(カラム容積の3から10倍程度の開始緩衝液をカラムに通液)。

目的のタンパク質がカラムに吸着されない場合は、開始緩衝液の塩濃度をさらに高くするか、または緩衝液のpHが該当するタンパク質の等電点に、より近い値となるように調節して下さい。

d) アフィニティークロマトグラフィー (AFC)

アフィニティークロマトグラフィー用 TOYOPEARL には、群特異性を示す充てん剤 (AF-Chelate-650M、AF-Red-650ML、AF-Blue HC-650M) と、使用目的に合わせてリガンドが固定化できる活性化型充てん剤があります。

活性化型 TOYOPEARL (Formyl、Carboxy、Amino、Epoxy、Tresylタイプ) へのリガンド結合方法については、取扱説明書または TSK-GEL/TOYOPEARL 総合カタログまたは、トヨパール総合カタログを参照して下さい。

平 衡 化

TOYOPEARL AF-Red-650ML、AF-Blue HC-650M、AF-Chelate-650M はリン酸緩衝液やトリス緩衝液などの適切な開始緩衝液 (ほとんど、あるいは全く塩は含まない) をカラム容量の3~5倍通液しカラムを平衡化させます。

色素を固定化した充てん剤 (TOYOPEARL AF-Red-650ML、AF-Blue HC-650M) は保存中に色素が漏出することがあります。漏出した色素を除去するため、カラムは使用前に必ず洗浄して下さい。新しい充てん剤が充てんされたカラムの場合は、1 mol/L 塩化ナトリウム溶液または1 mol/L 塩化カリウム溶液で洗浄します。カラム使用後の洗浄には2 mol/L 塩化カリウム溶液または4 mol/L 尿素溶液などを使用します。

カラムの平衡化には0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5) などの適切な開始緩衝液を使用して下さい。

試料注入と溶出

試料注入後、カラム容積の3~5倍程度の開始緩衝液を通液して未吸着不純物を洗い流して下さい。アフィニティークロマトグラフィー (AFC) では、一般に非特異的または特異的溶出の2種類の溶出法が使用されます。

非特異的溶出法では、溶離液中の塩濃度を高くして目的成分を溶出させます。大部分のタンパク質は3 mol/L 塩化ナトリウムまたは2 mol/L 塩化カリウムを含む溶液で溶出します。目的のタンパク質がこれら溶離液で溶出しない場合は、溶出力の強い溶離液を用います (表 . 15 を参照下さい)。

表 . 15 AFC用充てん剤における溶出力の強い溶離液

- 1) : 3 mol/L NaCl または 2 mol/L KCl
- 2) : 1% Triton X-100、1 mol/L NaSCN、75% エチレングリコール、4 mol/L 尿素または 0.1 mol/L NaOH、4.2 mol/L 硫酸アンモニウム (飽和)

特異的溶出法は、酵素の溶出に用いられる方法であり、基質や補酵素を含む溶離液を使用して溶出させます。溶出のために添加する基質や補酵素の量は通常0.01 mol/L 以下で十分です。

2. 洗 浄

TOYOPEARL/TSKgel PW シリーズはカラムに充てんされたままでも、あるいはカラムから抜き出したスラリー（充てん剤）としても洗浄が可能です。洗浄方法と処理に要する時間は汚れの程度に依存します。充てんカラムを洗浄する場合は、一般にカラム容積の少なくとも3倍の洗浄溶液を通液します。

SEC 充てん剤

ほとんどの場合、蒸留水を通液するだけで十分な洗浄効果が得られます。しかし、より強固に吸着している物質を洗い流すには、以下の手順を実施して下さい。

イオン性吸着物質

まず、0.5～1 mol/L 程度の塩溶液を洗浄溶液として使用します。より強固に吸着している物質に対しては、0.1～0.5 mol/L の水酸化ナトリウム、または0.1～0.5 mol/L の塩酸または硫酸溶液を使用します。酸はタンパク質を凝集させることがあるので、タンパク質を洗浄除去するときはまずアルカリ性溶液の使用を試みて下さい。

注) TOYOPEARL の洗浄に硝酸を使用しないで下さい。

硝酸は充てん剤と激しく反応を起こすことがあります。

疎水性吸着物質

疎水性物質の吸着には、10～20% 程度のアルコール（エタノール、メタノール、イソプロパノールなど）を含む溶離液を洗浄溶液として使用します。アルコールの代わりにアセトニトリルやアセトンなどの有機溶媒を使用することも可能です。ただし、有機溶媒はタンパク質を凝集させることがあるので注意が必要です。

注) 塩基、酸、有機溶媒を使用した場合は、必ず最後に蒸留水で洗浄して下さい。

IEC 充てん剤

まず、0.5～1 mol/L 程度の塩化ナトリウム溶液で洗浄後、開始緩衝液でカラム・充てん剤を平衡化して下さい。汚れがさらに進んでいる場合は、0.1～0.5 mol/L 水酸化ナトリウムで洗浄後に0.1～0.5 mol/L 程度の塩化ナトリウムで洗浄し、最後に開始緩衝液を使用してカラム・充てん剤を平衡化します。

極度に汚染された DEAE および QAE タイプの IEC 充てん剤の場合は、0.1～0.5 mol/L 水酸化ナトリウム、蒸留水、0.1～0.5 mol/L 塩酸、次に0.1～0.5 mol/L 塩化ナトリウムの順で洗浄し、最後に開始緩衝液でカラム・充てん剤を平衡化します。

HIC 充てん剤

ほとんどの場合、蒸留水を通液するだけで十分な洗浄効果が得られます。しかし、より強固に吸着している物質を洗い流すには、以下の手順を実施して下さい。

イオン性吸着物質

まず、0.5～1 mol/L 程度の塩溶液を洗浄溶液として使用します。より強固に吸着している物質に対しては、0.1～0.5 mol/L の水酸化ナトリウムまたは適当な酸（塩酸または硫酸）を洗浄液として使用します。酸はタンパク質を凝集させることがあるので、タンパク質を洗浄除去するときはまずアルカリ性溶液の使用を試みて下さい。

注) TOYOPEARL/TSKgel PW シリーズの洗浄に硝酸を使用しないで下さい。硝酸は充てん剤と激しく反応を起こすことがあります。

疎水性吸着物質

疎水性物質の吸着には、10～20% 程度のアルコール（エタノール、メタノール、イソプロパノールなど）を含む溶離液を洗浄溶液として使用します。アルコールの代わりにアセトニトリルやアセトンなどの有機溶媒を使用することも可能です。ただし、有機溶媒はタンパク質を凝集させることがあるので注意が必要です。特殊な洗浄方法として、非イオン性界面活性剤を用いることもあります。

注) 塩基、酸、有機溶媒を使用した場合は、必ず最後に蒸留水で洗浄して下さい。

AFC 充てん剤

強い洗浄を行う前に、高濃度の中性塩溶液、カオトロピック塩、または界面活性剤（表 14 参照）を溶離液としてカラムに通液して下さい。充てん剤に吸着しているタンパク質は、カラム容積の2倍程度の0.5 mol/L 水酸化ナトリウムを流し、それに続いて蒸留水で洗浄することにより除去できます。

注) TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M に水酸化ナトリウムを使用する場合は、汚れが極端に進んでいる場合のみとして下さい。

3. 保 管

SEC、IEC、HIC 充てん剤

カラムおよび使用後の充てん剤は、静菌剤（たとえば20%エタノール）を含む蒸留水中で、室温（4～25℃の温度）で保管して下さい。

AFC 充てん剤

カラムおよび使用後の充てん剤は、静菌剤（たとえば20%アルコール）を含む1 mol/L塩化ナトリウムまたは塩化カリウムの中性溶液中で、4～10℃の温度で保管して下さい。

TOYOPEARL AF-Formyl-650Mの場合、カラムおよび使用後の充てん剤は1%グルタルアルデヒドを含む1 mol/L塩化ナトリウムまたは塩化カリウムの中性溶液中で、4～10℃の温度で保管して下さい。

色素を固定化した充てん剤（TOYOPEARL AF-Red-650M、AF-Blue HC-650M）は保管中に色素を漏出することがあるので注意が必要です。漏出された色素を除去するため、色素アフィニティー充てん剤は使用前に必ず洗浄して下さい。

4. 滅菌／発熱物質除去／保存剤除去

滅 菌

TOYOPEARL/TSKgel PWシリーズは、121℃で20分間のオートクレーブによる滅菌処理が可能です。また、充てんカラムは、200 mg/Lの次亜塩素酸ナトリウムを12時間、封入、放置しても充てんカラムの分離性能に影響を与えません。

発熱物質除去

TOYOPEARL/TSKgel PWシリーズはpH2からpH12の範囲での使用を推奨していますが、短時間（<12 hr）であれば発熱物質除去のためにより高いpH（0.5 mol/L NaOH）条件で封入、放置することも可能です。4時間の0.5 mol/L NaOH処理後にカラム容積の3倍のエンドトキシンを含まない平衡化緩衝液で洗浄することによって、エンドトキシン濃度が1/10,000以下に減少します。

保存剤除去

TOYOPEARLおよび/TSKgel PWシリーズは20%エタノールを含む溶液にスラリー状態で出荷されます（何種類かのアフィニティー製品は除く）。この資料で説明した充てん剤のスラリー調製を実施することによりスラリー中のエタノール濃度が減少します。

カラムフィルター（スクリーン）

カラムフィルター（スクリーン）の目詰まりは、しばしば圧力に関係した問題を引き起こします。

目詰まりが起こったときはフィルターを取り外し、メーカーの推奨方法に従って洗浄して下さい。それでも問題が解決しない場合にはフィルターを交換して下さい。

注) 多孔性テフロン／ポリスチレン／ステンレスのフィルターよりもネットタイプのフィルターの使用をお奨めします。



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 〒746-8501 山口県周南市開成町4560
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

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.tosoh.co.jp/science/>

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

3006SB-[品番0994042](#)A