

高性能 SEC カラム TSKgel[®] UP-SW2000 について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel UP-SW2000 の基本特性	1
2 - 1. 充填剤、カラムの仕様	1
2 - 2. カラムの分離特性	2
2 - 3. 測定流速の影響	6
2 - 4. 試料注入量の影響	8
2 - 5. カラム外体積（配管）の影響	9
2 - 6. カラムの耐久性	11
2 - 7. 充填剤のロット間差	12
2 - 8. 市販 UHPLC 用 SEC カラムとの比較	12
3. 応用例	14
3 - 1. バイオ医薬品の分離	14
3 - 2. オリゴヌクレオチドの分離	15
4. おわりに	15

1. はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は試料の分子サイズによる分離であり、古くからたんぱく質の分離・精製に使われてきました。

当社の既存カラム TSKgel G2000SW_{XL}（粒子径 5 μm）及び TSKgel SuperSW2000（粒子径 4 μm）は分子量が 5,000 ～ 100,000 の範囲のたんぱく質やペプチドの分離分析に適していますが、高速の高分離測定が可能な SEC カラムが求められています。

今回、UHPLC 及び HPLC で使用可能な粒子径 2 μm の高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW2000 を商品化いたしました。

本稿では、TSKgel UP-SW2000 の基本特性と分離例を紹介いたします。

2. TSKgel UP-SW2000 の基本特性

2-1. 充填剤、カラムの仕様

表 1 に TSKgel UP-SW2000 の充填剤、カラム仕様及び同じ用途で用いられる既存カラムとの比較を示します。

TSKgel UP-SW2000 は、細孔径 12.5 nm のシリカゲル表面にジオール基を導入した粒子径 2 μm の充填剤を充填したカラムです。既存カラムに比べ高い分離性能を示し、低分子量のたんぱく質やペプチドの分離分析に適しています。

カラムサイズは 4.6 mm I.D. × 30 cm の高分離分析用と 4.6 mm I.D. × 15 cm の高速分析用があります。

表 1 カラム、充填剤仕様

品名	本カラム		既存カラム	
	TSKgel UP-SW2000		TSKgel SuperSW2000	TSKgel G2000SW _{XL}
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 30 cm	4.6 mm I.D. × 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm
基材	シリカゲル		シリカゲル	シリカゲル
官能基	ジオール		ジオール	ジオール
粒子径	2 μm		4 μm	5 μm
排除限界分子量	500 kDa		500 kDa	500 kDa
分子量測定範囲	5 ～ 100 kDa		5 ～ 100 kDa	5 ～ 100 kDa

2-2. カラムの分離特性

2-2-1. たんぱく質の分離

TSKgel UP-SW2000、TSKgel SuperSW2000（粒子径 4 μm ）及び TSKgel G2000SW_{XL}（粒子径 5 μm ）を用いて標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を

図 1 に、標準たんぱく質による較正曲線の比較を図 2 に示します。

TSKgel UP-SW2000 は既存カラムと同様の分離選択性を有していることがわかります。また、較正曲線は既存カラムと同等の傾きを有していることがわかります。

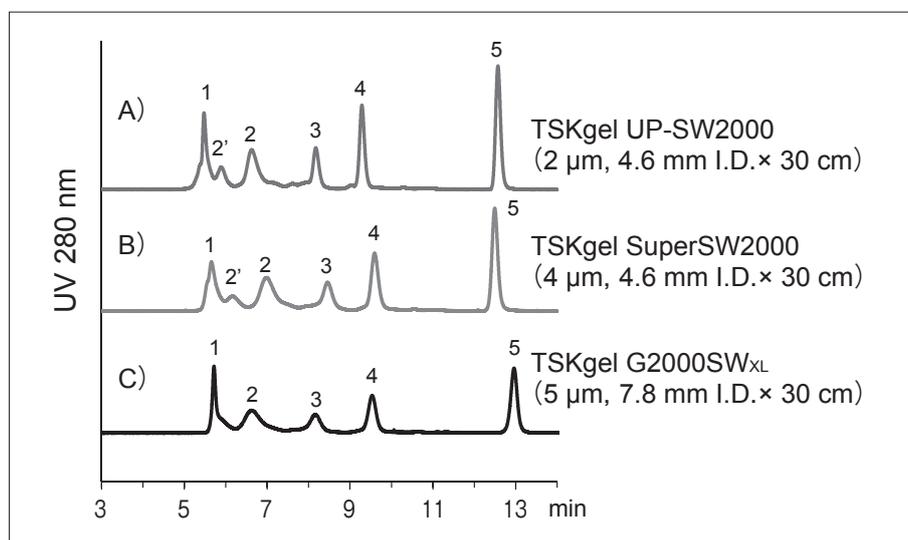


図 1 標準たんぱく質のクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

B) TSKgel SuperSW2000 (4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

C) TSKgel G2000SW_{XL} (5 μm , 7.8 mm I.D. \times 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A), B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

検出：UV 280 nm、マイクロセル 温度：25 $^{\circ}\text{C}$ 注入量：10 μL

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da (0.5 g/L) 2. γ -グロブリン, 155,000 Da (1.0 g/L) (2' γ -グロブリン二量体)
3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L) 4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

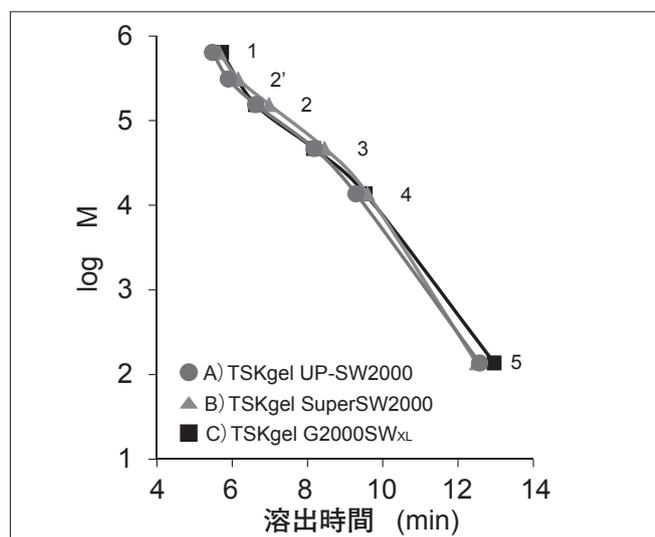


図 2 標準たんぱく質の較正曲線

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

B) TSKgel SuperSW2000 (4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

C) TSKgel G2000SW_{XL} (5 μm , 7.8 mm I.D. \times 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A), B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

検出：UV 280 nm、マイクロセル

温度：25 $^{\circ}\text{C}$ 注入量：10 μL

試料：1. チログロブリン, 640,000 Da (0.5 g/L)
2. γ -グロブリン, 155,000 Da (1.0 g/L) (2' γ -グロブリン二量体)
3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)
4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)
5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

表2 カラム性能の比較 (標準たんぱく質の分離能(R))

カラム	粒子径	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)	R (ピーク 3/4)	R (ピーク 4/5)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	3.3	4.0	4.5	14.5
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	2.0	2.7	3.7	11.2
C) TSKgel G2000SW _{XL}	5 μm	1.9	2.4	3.2	10.4

表2に図1の各ピークの実験分離能を示します。粒子径が小さいTSKgel UP-SW2000が全てのピーク間について最も高い分離能を示しました。

表3に各カラムの保証理論段数を示します。

粒子径の小さいTSKgel UP-SW2000は既存カラムに比べて保証理論段数が高いことがわかります。

表3 カラム性能の比較 (理論段数)

カラム	粒子径	理論段数	
		リボヌクレアーゼ A (ピーク 4)	p-アミノ安息香酸 (ピーク 5)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	28,767	53,818
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	13,308	35,929
C) TSKgel G2000SW _{XL}	5 μm	10,115	29,371

異なるカラムサイズのTSKgel UP-SW2000を用いて、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムを図3に示します。長さ15 cmのカラム (クロマトグラム A) は、

30 cmのカラム (クロマトグラム B) に比べ約半分の時間で同様な分離能のクロマトグラムが得られており、高速分析が可能であることがわかります。

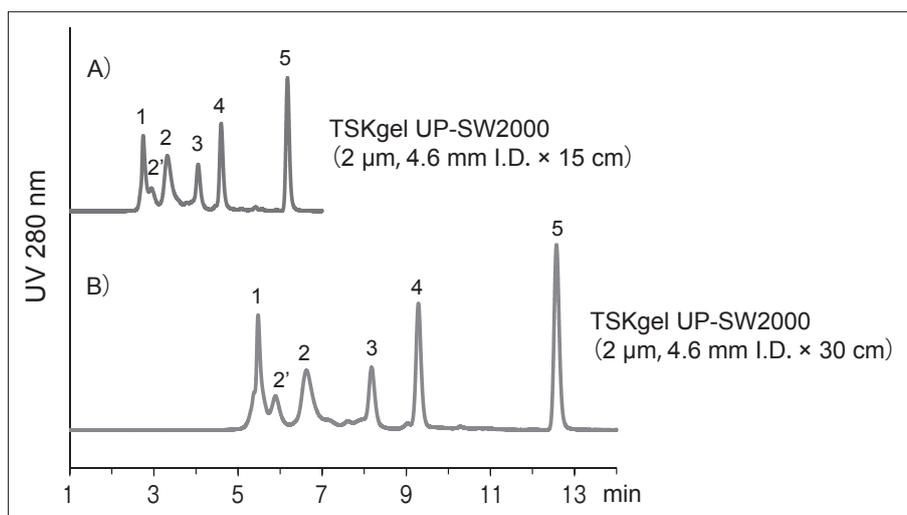


図3 標準たんぱく質のクロマトグラム (カラムサイズの比較)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm , 4.6 mm I.D. × 15 cm)

B) TSKgel UP-SW2000 (2 μm , 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min 検出：UV 280 nm、マイクロセル 温度：25 $^{\circ}\text{C}$ 注入量：A) 5 μL , B) 10 μL

試料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L) 2. γ -球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L) (2' γ -球蛋白二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L) 4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

表4 カラム性能の比較 (理論段数)

カラム	カラムサイズ	理論段数	
		リボヌクレアーゼ A (ピーク 4)	p-アミノ安息香酸 (ピーク 5)
A) TSKgel UP-SW2000	4.6 mm I.D. × 30 cm	28,767	53,818
B) TSKgel UP-SW2000	4.6 mm I.D. × 15 cm	17,535	29,545

TSKgel UP-SW2000、TSKgel UP-SW3000 を用いて標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図4、標準たんぱく質による校正曲線の比較を図5に示し

ます。TSKgel UP-SW2000 は TSKgel UP-SW3000 に比べ、より低い分子量領域（約5万以下）で校正曲線の傾きが緩やかであることがわかります。

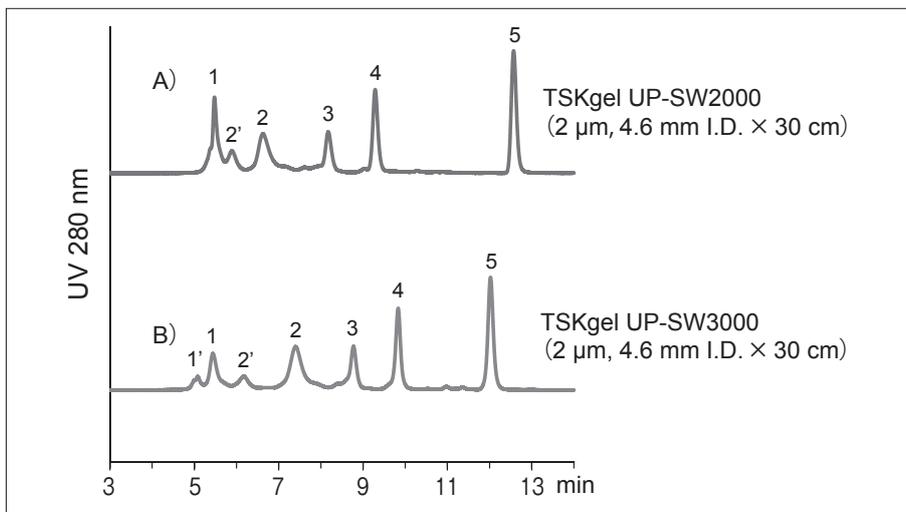


図4 標準たんぱく質のクロマトグラム

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A), B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min 検出：UV 280 nm、マイクロセル

温度：25 °C 注入量：10 μL

試料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L) (1' チロ球蛋白二量体)

2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L) (2' γ-球蛋白二量体) 3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L) 5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

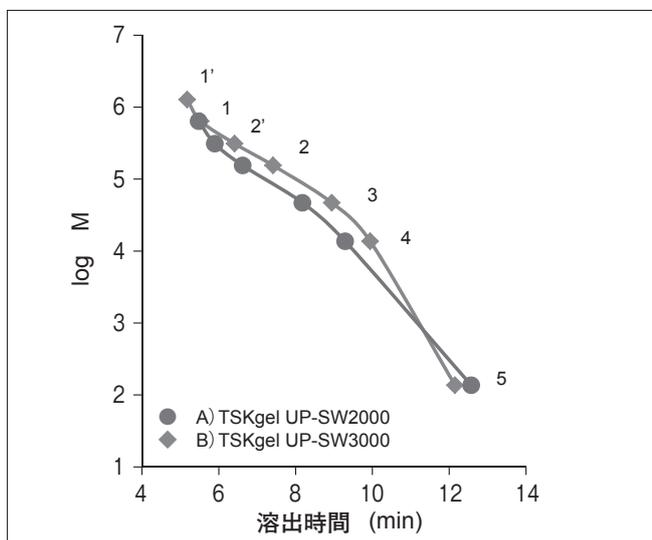


図5 標準たんぱく質の校正曲線

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000

(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) TSKgel UP-SW3000

(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：A), B) 0.35 mL/min, C) 1.0 mL/min

検出：UV 280 nm、マイクロセル

温度：25 °C 注入量：10 μL

試料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)

(1' チロ球蛋白二量体)

2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L)

(2' γ-球蛋白二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

表5 カラム、充填剤仕様

	TSKgel UP-SW2000	TSKgel UP-SW3000
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm	4.6 mm I.D. × 30 cm, 15 cm
基材	シリカゲル	シリカゲル
官能基	ジオール	ジオール
粒子径	2 μm	2 μm
排除限界分子量*	500 kDa	800 kDa
分子量分画範囲*	5 ~ 100 kDa	10 ~ 500 kDa
カラム用途	低分子量たんぱく質、ペプチドの分離分析	抗体(二量体/単量体/フラグメント)の分離分析

* 標準たんぱく質

2-2-2. ペプチドの分離

TSKgel UP-SW2000（粒子径 2 μm ）及び TSKgel SuperSW2000（粒子径 4 μm ）を用いて、溶離液を 40 %アセトニトリル水溶液 + 0.05 %トリフルオロ酢酸としてペプチド混合物を変性条件下で測定したクロマトグラム

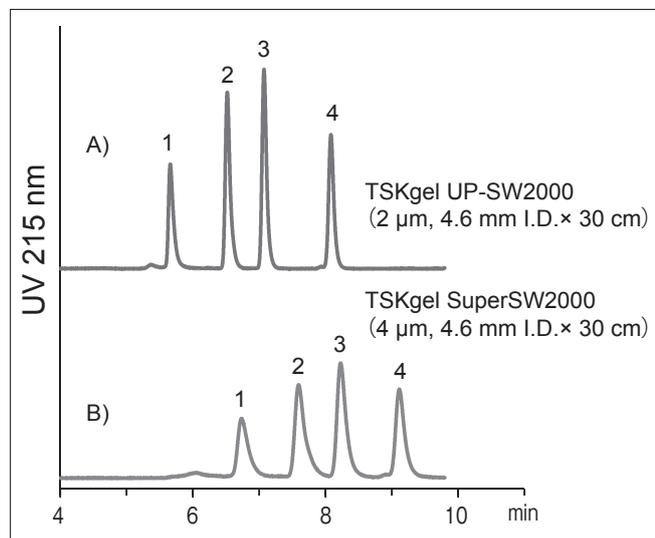


図6 ペプチド混合物のクロマトグラム (1)

ラムの比較を図6、7に、各溶出ピークの見離能 (R) の比較を表6、7に示します。

TSKgel SuperSW2000 に比べ、粒子径の小さな TSKgel UP-SW2000 は何れのペプチドもピーク幅が狭く、見離能が高いことがわかります。

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：40 %アセトニトリル + 0.05 %トリフルオロ酢酸
流速：0.35 mL/min

検出：UV 215 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}\text{C}$

注入量：10 μL

試料濃度：各 0.05 g/L

試料：1. アプロチニン, 6,512 Da
2. ビッグガストリン, 3,849 Da
3. ボンベシン, 1,620 Da
4. オキシトシン, 1,007 Da

表6 カラム性能の比較 (見離能 (R))

カラム	粒子径	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)	R (ピーク 3/4)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	6.6	4.4	7.6
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	3.1	2.5	3.7

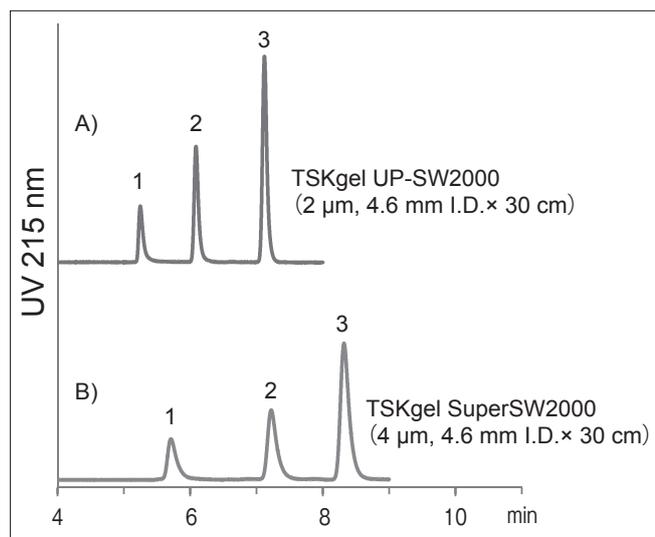


図7 ペプチド混合物のクロマトグラム (2)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. × 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：40 %アセトニトリル + 0.05 %トリフルオロ酢酸
流速：0.35 mL/min

検出：UV 215 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}\text{C}$

注入量：10 μL

試料濃度：各 0.05 g/L

試料：1. ミオグロブリン, 17,800 Da
2. グルカゴン, 3,483 Da
3. LH - RH, 1,182 Da

表7 カラム性能の比較 (見離能 (R))

カラム	粒子径	R (ピーク 1/2)	R (ピーク 2/3)
A) TSKgel UP-SW2000	2 μm	7.3	8.8
B) TSKgel SuperSW2000	4 μm	6.2	4.6

2-3. 測定流速の影響

2-3-1. 理論段数との関係

分子量の異なる2種類のたんぱく質(オブアルブミン: Mw 47,000、リボヌクレアーゼA: Mw 13,700) 及び p-アミノ安息香酸 (Mw 137) における、測定流速と理論

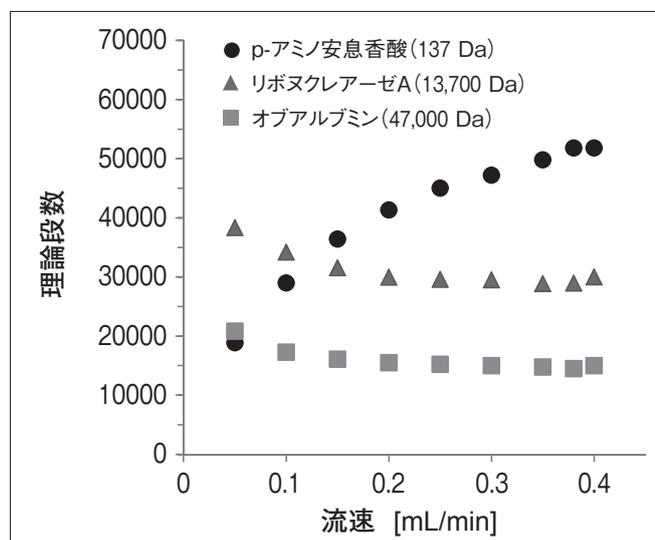


図8 測定流速と理論段数の関係

段数の関係を図8に示します。低分子のp-アミノ安息香酸では測定流速が高くなるほど理論段数が高くなっています。一方、分子量の大きいたんぱく質では、測定流速が低くなるほど理論段数が高くなる傾向を示しております。

〈測定条件〉

カラム: TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
溶離液: 100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム
流速: 0.05 ~ 0.40 mL/min
検出: UV 280 nm, マイクロセル
温度: 25 $^{\circ}\text{C}$
注入量: 10 μL
試料: オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)
リボヌクレアーゼA, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-3-2. 理論段高さ (HETP) との関係

TSKgel UP-SW2000 (粒子径 2 μm) と TSKgel Super SW2000 (粒子径 4 μm) の測定流速と理論段高さ (HETP) の関係を図9に示します。

充填剤の粒子径が小さい TSKgel UP-SW2000 では、測定試料の分子量に依らず、測定流速の HETP への影響が小さく、測定流速を高くした場合のカラム効率の低

下を抑えることができます。

一方、TSKgel SuperSW2000 では、測定流速により HETP が大きく変化しています。特にたんぱく質では顕著で流速が高くなるに従い HETP が大きくなり、カラム効率が低下していることがわかります。従って、TSKgel UP-SW2000 は特にたんぱく質の高速分析に適用可能であることが示唆されます。

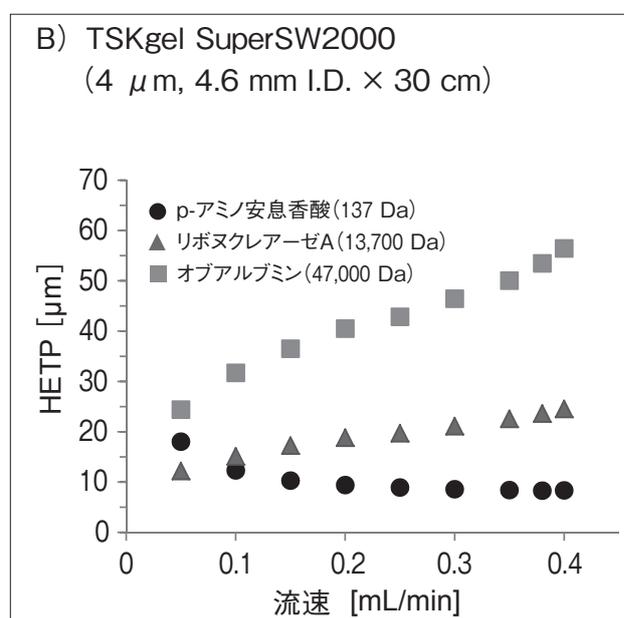
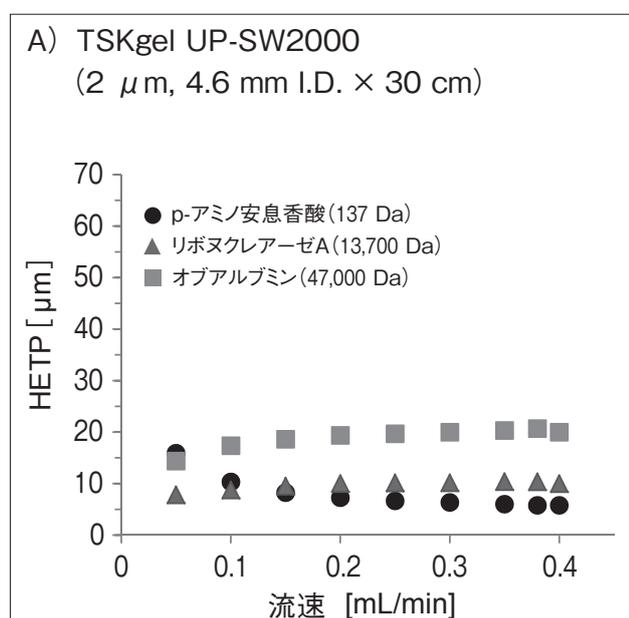


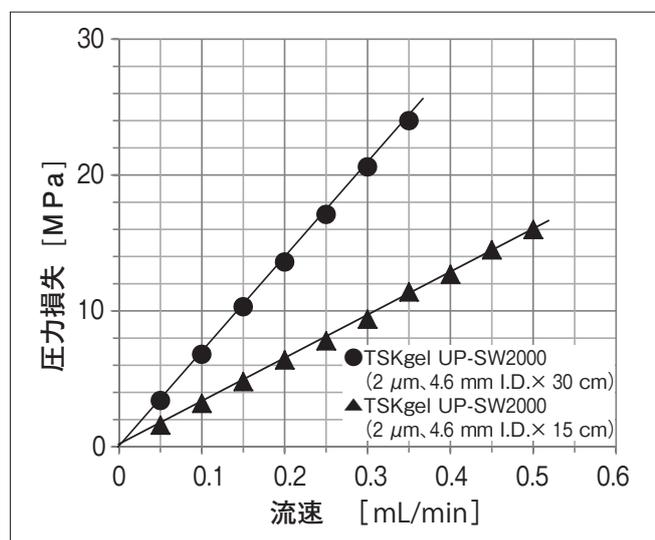
図9 測定流速と理論段高さ (HETP) との関係

2-3-3. カラム圧力との関係

測定流速とカラム圧力の関係を図 10 に示します。

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm について、測定流速 0.05 ~ 0.35 mL/min の範囲で流速と圧力の関係は直線関係を示します。又、カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 15

cm については測定流速 0.05 ~ 0.50 mL/min の範囲で流速と圧力の関係は直線関係を示しており、図 11 に示すように測定流速を 0.50 mL/min として標準たんぱく質を測定した場合、5 min の分析時間で良好な分離を得ることが可能となります。



〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

カラムサイズ：4.6 mm I.D. × 15 cm, 30 cm

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)

+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：0.05 ~ 0.50 mL/min

図 10 測定流速とカラム圧力の関係

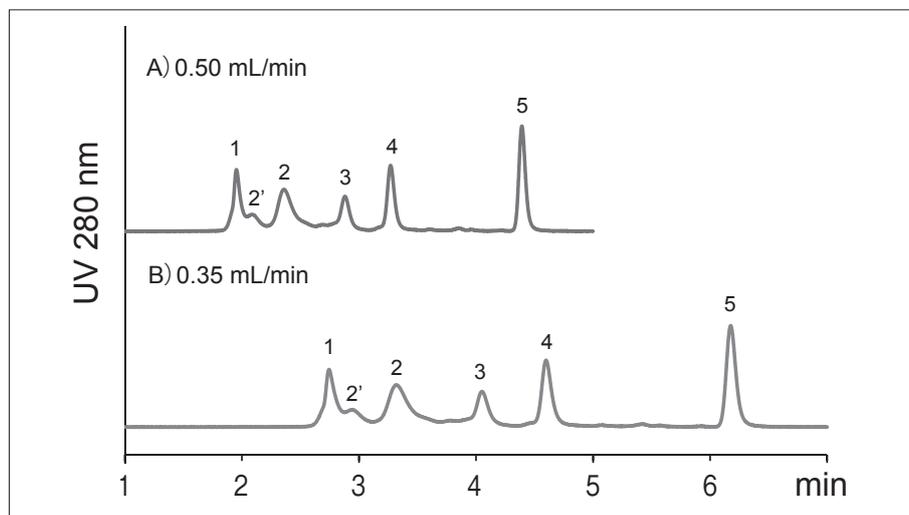


図 11 標準たんぱく質のクロマトグラム (測定流速の影響)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：A) 0.50 mL/min、B) 0.35 mL/min

検 出：UV 280 nm, マイクロセル

温 度：25 °C

注入量：5 μL

試 料：1. チログロブリン, 640,000 Da (0.5 g/L)

2. γ - グロブリン, 155,000 Da (2' γ - グロブリン二量体) (1.0 g/L)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p- アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-4. 試料注入量の影響

オブアルブミン、リボヌクレアーゼ A 及び p-アミノ安息香酸を用いて試料負荷量（試料注入量）と理論段数の関係を検討しました。一定の試料濃度で注入量を 1～30 μL の範囲で変更して測定した場合の理論段数を図 12、図 13 に示します。図 12 は 4.6 mm I.D. \times 30 cm カラム、図 13 は 4.6 mm I.D. \times 15 cm カラムの結果で

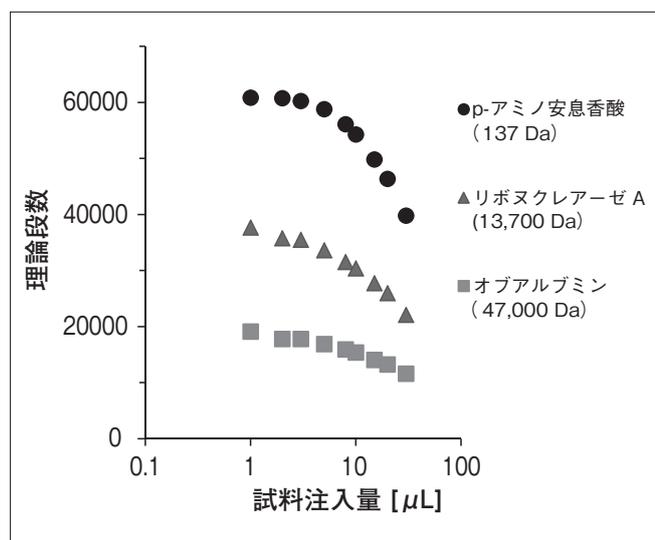


図 12 試料注入量と理論段数の関係(4.6 mm I.D. \times 30 cm)

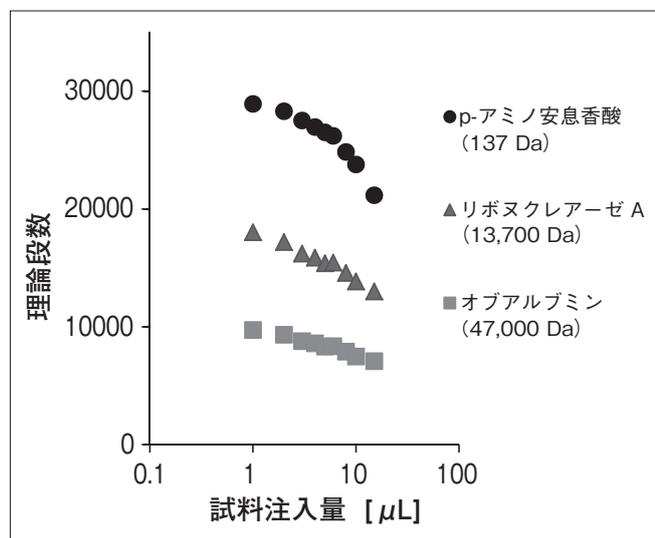


図 13 試料注入量と理論段数の関係(4.6 mm I.D. \times 15 cm)

す。

試料注入量の増加とともに理論段数が低下する傾向を示しました。4.6 mm I.D. \times 30 cm については、試料注入量が 10 μL を超えると理論段数の低下率が大きくなっており、注入量 10 μL 以下での使用をお勧めします。

又、4.6 mm I.D. \times 15 cm については、試料注入量 5 μL 以下での使用をお勧めします。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}\text{C}$

注入量：1～30 μL

試料：オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)
リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}\text{C}$

注入量：1～15 μL

試料：オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)
リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-5. カラム外体積（配管）の影響

TSKgel UP-SW2000 は粒子径が小さい為、配管等のカラム外での試料の拡がりにより、カラム本来の性能が得られない場合があります。十分なカラム性能を得るために検出器のセルはマイクロセルなど容量の小さなセルを用いる必要があります。また、カラム前後の配管は出来るだけ容量を小さくする必要があります。

インジェクションバルブーカラム入口間及びカラム出口ー検出器（UV セル）間の配管径、配管長さとして試料成分の理論段数との関係を確認する為、配管径を内径 0.10 mm、0.13 mm、0.20 mm とし、配管長さを 5 cm から 30 cm まで長さを変えて、たんぱく質、低分子化合物の理論段数を測定しました。

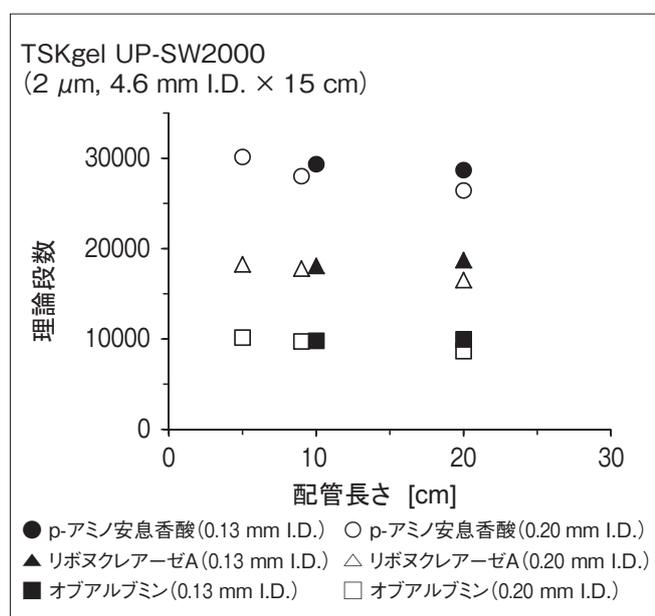


図 14 カラム入口配管と理論段数の関係

2-5-1. インジェクションバルブーカラム入口間の配管の影響

4.6 mm I.D. × 15 cm カラムについて、インジェクションバルブーカラム入口間の配管径、配管長さとして理論段数の関係を図 14 に示します。

配管径を 0.20 mm とした場合（図 14 の○、△、□）、配管が長くなるにしたがい徐々に理論段数の低下が認められ、配管長さ 20 cm（配管容量：約 6.28 μL）での理論段数の低下率（対配管長さ 5 cm）は 10 % を超えました。

インジェクションバルブーカラム入口間の配管径は 0.13 mm 以下、配管長さは 20 cm 以下で使用することをお勧めします。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

（2 μm, 4.6 mm I.D. × 15 cm）

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.7）
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)
リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)
p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

※ カラム出口配管：0.10 mm I.D. × 20 cm

2-5-2. カラム出口ー検出器 (UV セル) 間の配管の影響

4.6 mm I.D. × 15 cm カラムについて、カラム出口ー検出器 (UV セル) 間の配管径、配管長さとの理論段数の関係を図 15 に示します。又、配管容量と理論段数の関係を図 16 に示します。

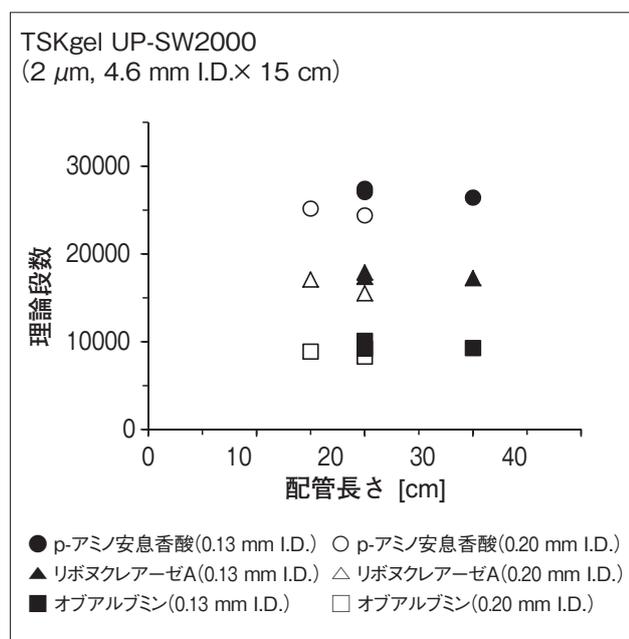


図 15 カラム出口配管と理論段数の関係

2-5-1 と同様に、配管径を 0.20 mm とした場合 (図 15 の○、△、□)、配管長さが 20 cm では理論段数の低下が認められました。

カラム出口ー検出器 (UV セル) 間の配管径は 0.13 mm 以下、配管長さは 30 cm 以下で使用することをお勧めします。

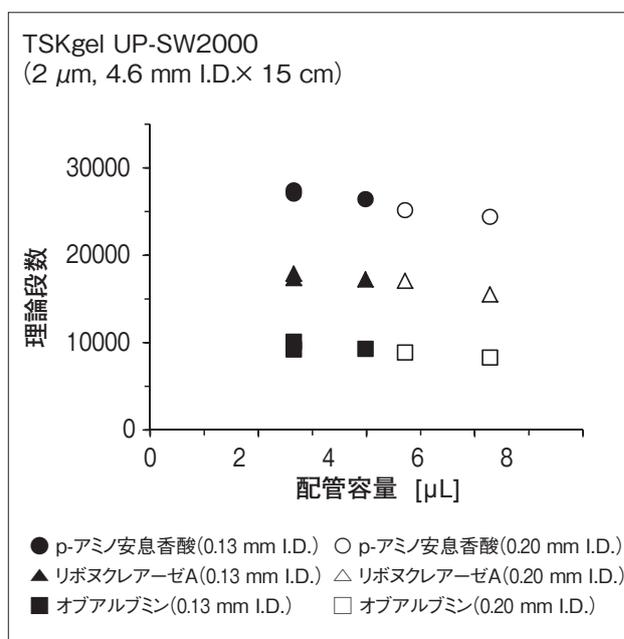


図 16 カラム出口配管容量と理論段数の関係

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

※ カラム入口配管：0.10 mm I.D. × 20 cm

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm については、配管長さの影響が小さくなりますので、カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 15 cm での推奨条件で使用可能です。

又、同じ粒子径である当社の既存カラム TSKgel UP-SW3000 (カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm、4.6 mm

I.D. × 15 cm) についても装置の配管径を 0.13 mm 以下、インジェクションバルブーカラム入口間の配管長さを 20 cm 以下、カラム出口ー検出器 (UV セル) 間の配管長さを 30 cm 以下として推奨しております。

2-6. カラムの耐久性

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm 及び 4.6 mm I.D. × 15 cm について p-アミノ安息香酸を連続注入した場合の試料注入回数と理論段数の関係を図 17 に示します。

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm については、流速を 0.35 mL/min とし て試料を 100 回連続注入後に溶離液の送液を 6 時間以上停止する操作を 5 回繰返 し、理論段数

の変化を確認しました。500 回注入後の理論段数の変化は小さく、図 18 に示す標準たんぱく質のクロマトグラムの変化も無いことから、十分なカラム耐久性を有することがわかりました。

又、カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 15 cm については、流速を 0.50 mL/min とし て同様の操作を行い、十分なカラム耐久性を確認しました。

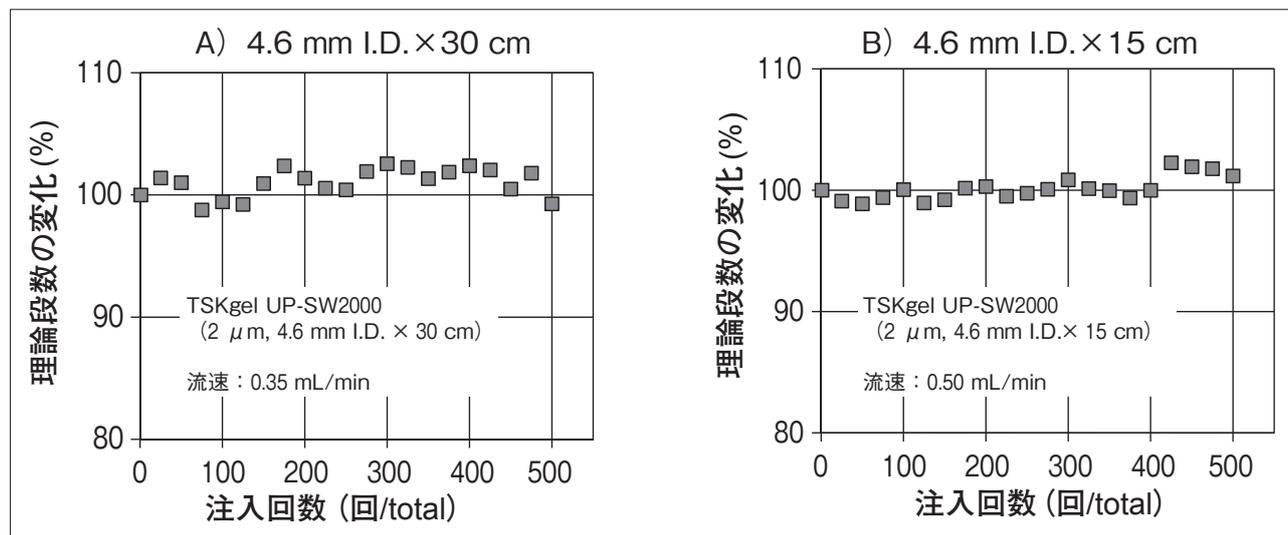


図 17 試料注入回数と理論段数の関係

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000 (2 μm, A) 4.6 mm I.D. × 30 cm、B) 4.6 mm I.D. × 15 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム + 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：A) 0.35 mL/min、B) 0.50 mL/min

検 出：UV 280 nm, マイクロセル

温 度：25 °C

注入量：A) 10 μL, B) 5 μL

注入間隔：A) 15 分間隔 (100 回注入後、溶離液の送液を 6 時間以上停止)

：B) 5 分間隔 (100 回注入後、溶離液の送液を 6 時間以上停止)

試 料：p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

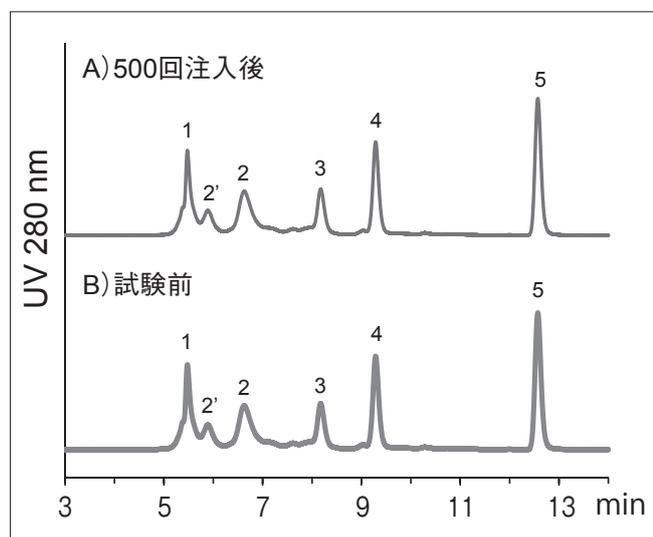


図 18 標準たんぱく質のクロマトグラム (耐久性試験前後)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

(2 μm, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流 速：0.35 mL/min

検 出：UV 280 nm, マイクロセル

温 度：25 °C

注入量：10 μL

試 料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)

2. γ-球蛋白, 155,000 Da (1.0 g/L)
(2' γ-球蛋白二量体)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレア-ゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-7. 充填剤のロット間差

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 30 cm について、異なるロットの充填剤を充填したカラムの標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図 19 に示します。

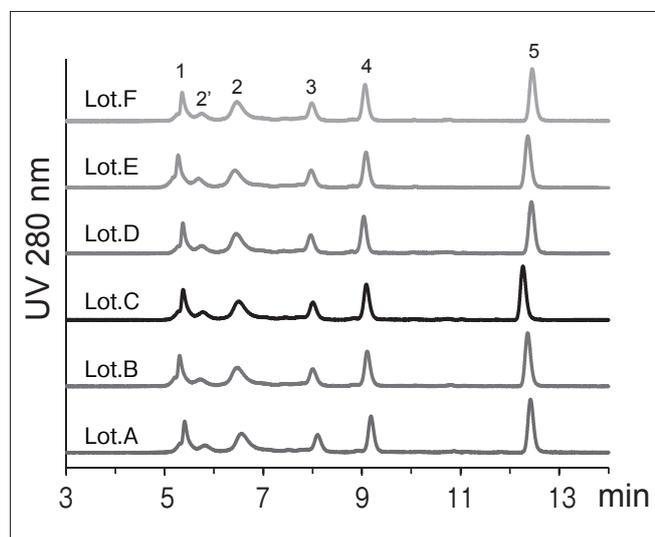


図 19 標準たんぱく質のクロマトグラム (充填剤ロット間差)

ピーク形状、溶出位置の差が小さいことから、ロット間差が小さく製造安定性が高い充填剤であることが分かります。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

(2 μ m, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}$ C

注入量：10 μ L

試料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)

2. γ -球蛋白, 155,000 Da

(2' γ -球蛋白二量体) (1.0 g/L)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-8. 市販 UHPLC 用 SEC カラムとの比較

2-8-1. たんぱく質の分離

TSKgel UP-SW2000 (粒子径 2 μ m) と市販 UHPLC

用 SEC カラム (粒子径 1.7 μ m) において、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図 20 に示します。

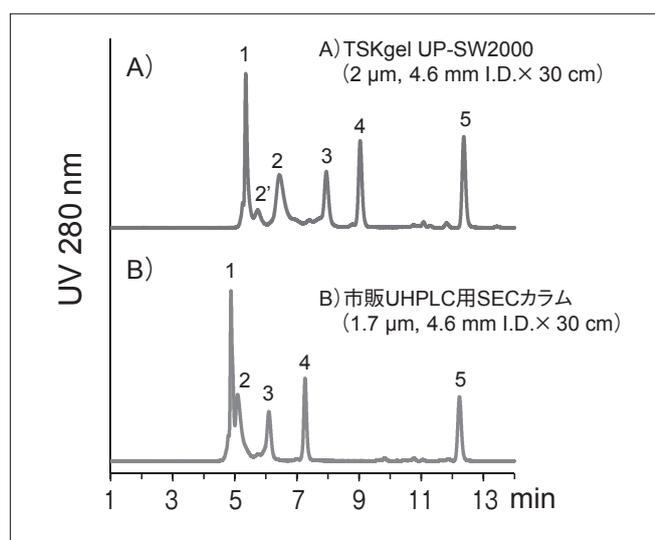


図 20 標準たんぱく質のクロマトグラム (製品比較)

〈測定条件〉

カラム：A) TSKgel UP-SW2000

(2 μ m, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

B) 市販 UHPLC 用 SEC カラム

(1.7 μ m, 4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7)
+ 100 mmol/L 硫酸ナトリウム
+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.35 mL/min

検出：UV 280 nm, マイクロセル

温度：25 $^{\circ}$ C

注入量：10 μ L

試料：1. チロ球蛋白, 640,000 Da (0.5 g/L)

2. γ -球蛋白, 155,000 Da

(2' γ -球蛋白二量体) (1.0 g/L)

3. オブアルブミン, 47,000 Da (1.0 g/L)

4. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da (1.0 g/L)

5. p-アミノ安息香酸, 137 Da (0.01 g/L)

2-8-2. ペプチドの分離

TSKgel UP-SW2000 (粒子径 2 μm)、TSKgel Super SW2000 (粒子径 4 μm) 及び市販UHPLC用SECカラム (粒子径 1.7 μm) において、溶離液を 40 % アセト

ニトリル水溶液 + 0.10 % トリフルオロ酢酸としてペプチド試料を測定した較正曲線の比較を図 21 に、ペプチド混合物を測定したクロマトグラムの比較を図 22 に示します。

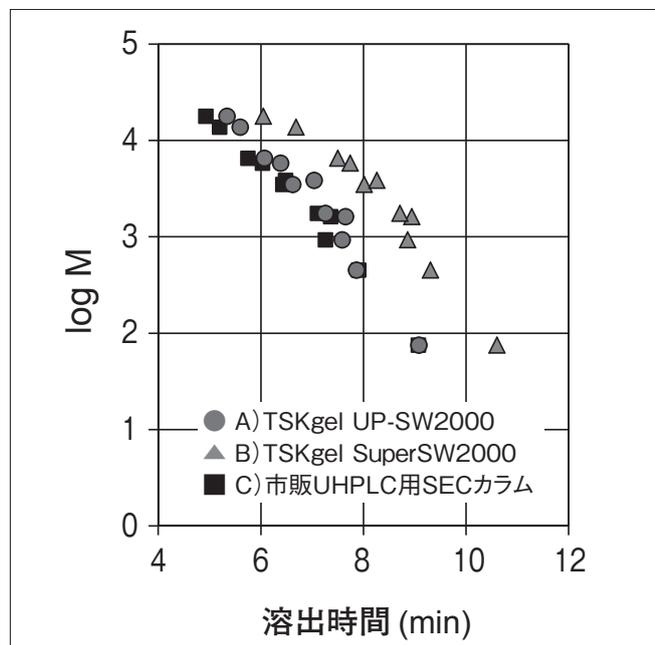


図 21 ペプチド試料の較正曲線

〈測定条件〉

- カラム：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
C) 市販UHPLC用SECカラム
(1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
- 溶離液：40 % アセトニトリル
+ 0.10 % トリフルオロ酢酸
- 流速：0.35 mL/min
検出：UV 215 nm, マイクロセル
温度：25 $^{\circ}\text{C}$
注入量：10 μL
試料濃度：0.05 g/L
- 試料：1. ミオグロブリン, 17,800 Da
2. リボヌクレアーゼ A, 13,700 Da
3. アプロチニン, 6,512 Da
4. インスリン, 5,808 Da
5. グルカゴン, 3,483 Da
6. ビッグガストリン, 3,849 Da
7. α -エンドルフィン, 1,746 Da
8. ボンベシン, 1,620 Da
9. アンジオテンシン III, 931 Da
10. Gly-Gly-Tyr-Ag, 451 Da
11. グリシン, 75 Da

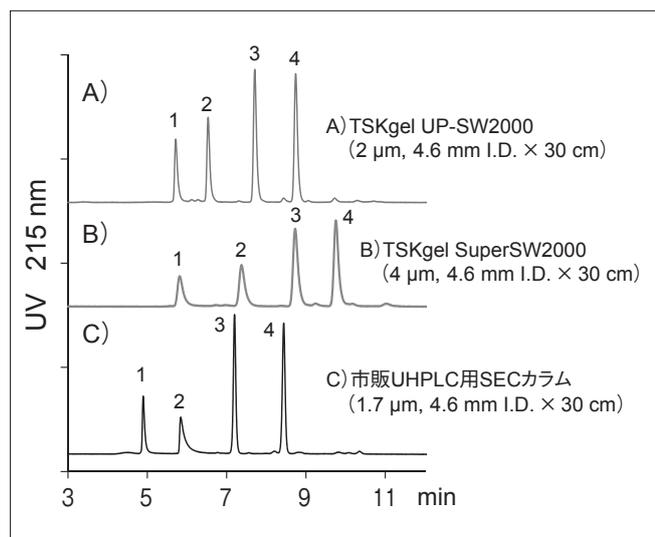


図 22 ペプチド混合物のクロマトグラム

〈測定条件〉

- カラム：A) TSKgel UP-SW2000
(2 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
B) TSKgel SuperSW2000
(4 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
C) 市販UHPLC用SECカラム
(1.7 μm , 4.6 mm I.D. \times 30 cm)
- 溶離液：40 % アセトニトリル
+ 0.10 % トリフルオロ酢酸
- 流速：0.35 mL/min
検出：UV 215 nm, マイクロセル
温度：25 $^{\circ}\text{C}$
注入量：10 μL
試料濃度：0.05 g/L
- 試料：1. ミオグロブリン, 17,800 Da
2. インスリン, 5,808 Da
3. LH-RH, 1,182 Da
4. TRH, 362 Da

3. 応用例

3-1. バイオ医薬品の分離

図 23 及び 24 にバイオ医薬品を TSKgel UP-SW2000 で測定したクロマトグラムを示します。何れも第 17 改正日本薬局方に準拠した条件で測定しました。尚、局方に記載されたカラムとは内径が異なるため、線速度を合わせて流速を変更しています。

エポエチンアルファは分子量約 28,000 の糖たんぱく

質を本質とするバイオ医薬品です。TSKgel UP-SW2000 で測定することによりエポエチンアルファと多量体が十分に分離されました (図 23)。

ヒトインスリンは分子量約 5,800 のペプチドで遺伝子組換え品が医薬品として使用されます。疎水性の高いペプチドのため 20 % アセトニトリルを含む溶離液で測定されます。TSKgel UP-SW2000 で測定することによりヒトインスリンと高分子量体が良好に分離されました (図 24)。

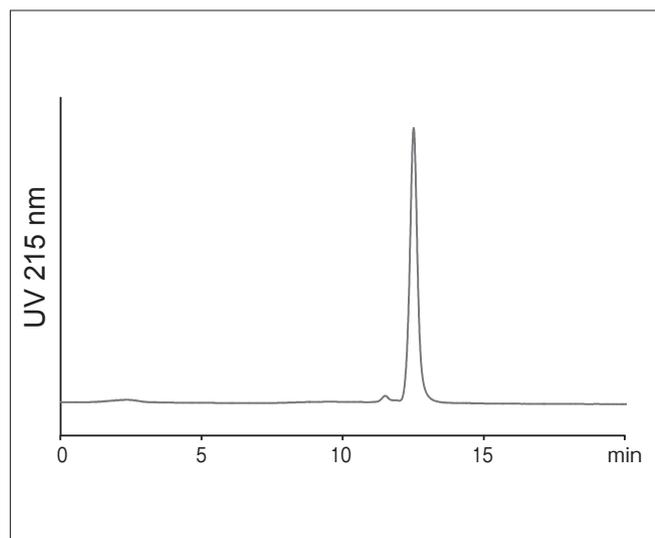


図 23 エポエチンアルファの分離

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
溶離液：0.25 mmol/L リン酸水素二ナトリウム
+ 1.7 mmol/L リン酸二水素ナトリウム
+ 0.15 mol/L 塩化ナトリウム
流 速：0.3 mL/min
検 出：UV 215 nm
注入量：10 μ L
試 料：エポエチンアルファ製剤

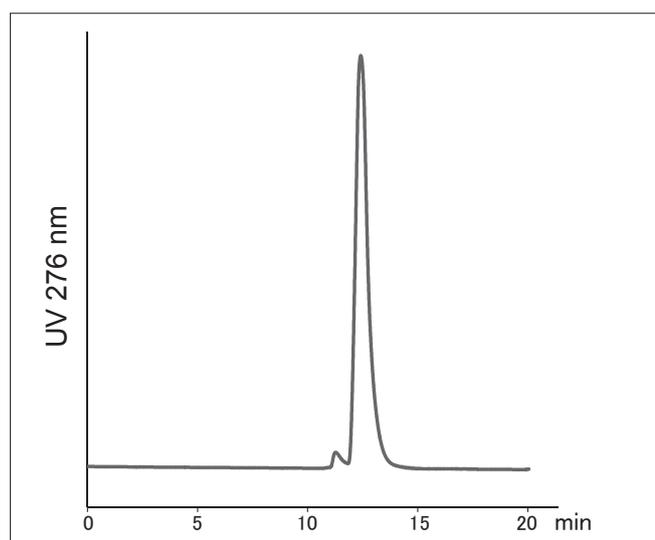


図 24 遺伝子組換えヒトインスリンの分離

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000
(4.6 mm I.D. × 30 cm)
溶離液：0.1 % L-アルギニン / アセトニトリル / 酢酸 =
13 / 4 / 3
流 速：0.2 mL/min
検 出：UV 276 nm
注入量：10 μ L
試 料：遺伝子組換えヒトインスリン

3-2. オリゴヌクレオチドの分離

近年合成オリゴヌクレオチドを用いた核酸医薬品が盛んに開発されており、承認・市販された製品が増加しています。オリゴヌクレオチドを合成する際、鎖長の異なる成分が生成されるため分離分析が必要となり、一般にイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーで分析されます。一方、サイズ排除クロマトグラ

フィーを用いることにより、より簡便に分離分析することが可能です。核酸医薬品に用いられるオリゴヌクレオチドは通常修飾型ですが、ここでは未修飾の鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを TSKgel UP-SW2000 で分離した例を示します (図 25)。各試料とも主ピークと鎖長の異なる成分が分離されています。又、約 100 量体までの分離が可能です。

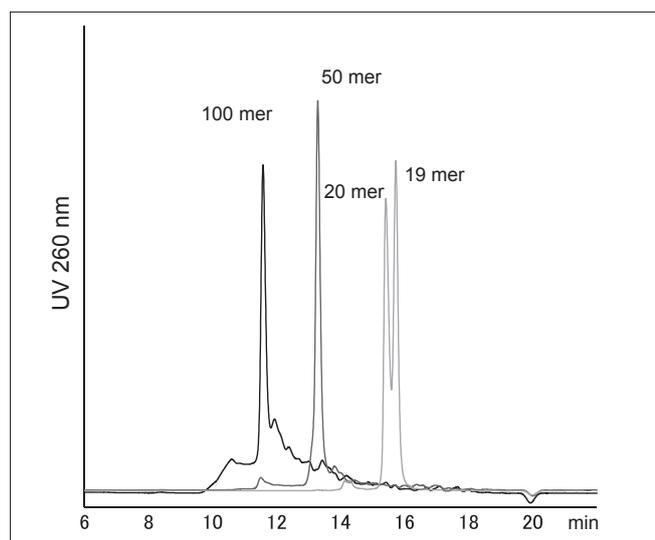


図 25 粗合成オリゴヌクレオチドの分離

〈測定条件〉

カラム：TSKgel UP-SW2000

(4.6 mm I.D. × 30 cm)

溶離液：50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 6.7)

+ 0.3 mol/L 塩化ナトリウム

+ 0.05 % アジ化ナトリウム

流速：0.2 mL/min

検出：UV 260 nm

温度：25 °C

注入量：2 μ L

試料：粗合成オリゴヌクレオチド

(100mer、50mer、20mer と 19mer の混合物)

4. おわりに

以上、粒子径 2 μ m の高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW2000 について概説しました。UHPLC 或いはシステムのデッドボリュームを低減した HPLC システムを用いることにより、汎用の SEC カラムに比べより高分離、高速の分離が可能です。既存品 TSKgel UP-

SW3000 より分子量分画帯が低いいため、低分子量たんぱく質、ペプチド、オリゴヌクレオチドの分離に適しています。

TSKgel UP-SW2000 は既存のバイオ医薬品のみならず、今後市場の拡大が期待されている中分子医薬品の研究開発、品質管理に利用可能と考えられます。

※“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 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (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
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

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