

SEPARATION REPORT

TSK-GEL SW タイプによるたん白質の測定

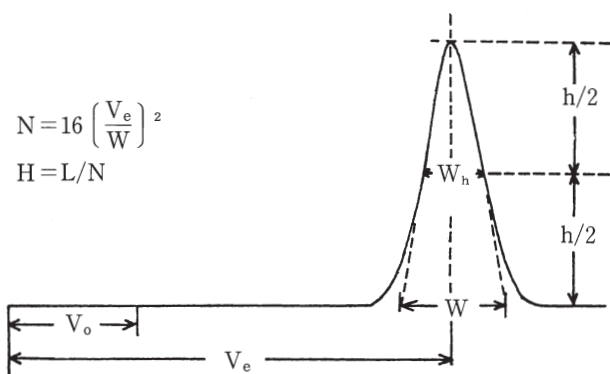
—— 目 次 ——

	ページ
1. ゲル透過クロマトグラフィの高速化	1
2. TSK-GEL SW タイプの校正曲線の考え方と適正使用範囲	3
3. 分離能を支配する因子	7
4. 溶離液組成の選択と分子量の推定	12
5. 試料負荷量	19
6. 使用上の注意点	21

1. ゲル濾過クロマトグラフィの高速化

たん白質などの水溶性物質の分子サイズ分離に利用されるゲル濾過クロマトグラフィにおいては、デキストラン、アガロース、アクリルアミドなどを架橋した網目構造のゲルが、多くの分野で幅広く使用されてきた。これらの充てん剤は吸着性などにおいて優れた性質を有し、生化学物質など水溶性物質の分子サイズ分離に応用されているが、その機械的強度(耐圧性)、粒径などの理由により、高速化は難しい。最近、ほとんどの分離モードの液体クロマトグラフィが高速化されているが、TSK-GEL SWタイプ、及びPWタイプはこの水溶液系でのゲル濾過クロマトグラフィの領域を高速化したもので、たん白質、酵素などの分離、水溶性高分子の分子量分布測定、水溶性の低分子の分離などの水溶性物質の高速、高性能測定が可能となった¹⁾²⁾³⁾。ゲル濾過クロマトグラフィにおいては、分配クロマトグラフィのような他の分離モードの液体クロマトグラフィと異なり、溶離液組成により重要な分離因子である保持力、選択性を調節することは困難であり、使用する充てん剤の性質によって試料成分の溶出容量はほぼ決定されてしまうため、他の分離モードのクロマトグラフィに比較するとピークの鋭さがより重要な分離因子となる。液体クロマトグラフィにおいてはピークの広がりを表すパラメータとして、蒸留の理論によって定義される理論段数がよく使用される。ここで、図1のクロマトグラムに示されるように、

図1 Number of Theoretical Plates & Height equivalent to a Theoretical Plate



$$N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

$$H = L/N$$

V_e ; 試料成分の溶出容量
 W ; ピークの広がり

とすると、この理論段数; N は

$$N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2 \dots\dots\dots 1)$$

で与えられる。

また、理論段数をピークの半値巾 W_h で表現すると、

$$N = 5.545 \left(\frac{V_e}{W_h} \right)^2 \dots\dots\dots 2)$$

となり、ピークの広がり; W が変曲点における接線の引き方により個人誤差の要因になりがちであることから、半値巾法による理論段数の算出法もよく利用される。理論段数はカラムの長さ按比例し、複数本のカラムを接続して使用する場合、単純に各々のカラムの段数を加算すれば全体のカラム系の理論段数が算出でき、分離能はその総理論段数の平方根に比例する。さらに、この理論段数でカラム長さ; L を除した値、理論段相当高さ(HETP); H もピークの鋭さを表すパラメータとしてよく使用される

$$H = L/N \dots\dots\dots 3)$$

L ; カラム長さ

このHETPは単位長さ当りのカラムの性能を示しており、かつ統計的には分散に相当し種々のピーク広がり要因に対して加成性があるため、ピークの広がりを各要因毎に考察する上においては、HETPで考えると便利である。従って、カラム縦軸方向への拡散に起因する広がりを h_d 、固定相内でのピークの広がりを h_s 、移動相での広がりを h_m とすると

$$H = h_d + h_s + h_m \dots\dots\dots 4)$$

と表現することができる。この3つの広がり要因はさらに次のように表わすことができる。各項は

第1項; $h_d = 2 \gamma \cdot \frac{D_M}{v} \dots\dots\dots 5)$

第2項; $h_s = q \cdot \frac{d_p^2 \cdot v}{D_m} \dots\dots\dots 6)$

第3項; $h_m = \frac{1}{2 \lambda d_p} + \frac{D_M}{\omega \cdot d_p^2 \cdot v} \dots\dots\dots 7)$

3.1うず拡散 3.2横軸方向への拡散による広がり

D_M ; 移動相中の溶質の拡散係数
 D_m ; 充てん剤細孔内での拡散係数
 v ; 移動相中の線速度
 d_p ; 充てん剤の粒径
 $\lambda, \omega, \gamma, q$; 定数

液体クロマトグラフィにおいては、気体の場合に比較し拡散が極めて遅いため、通常の測定条件下では第1項は無視できる場合が多い。第2項、第3項はいずれも充てん剤粒径の関数で粒径が小さい程広がりはないが、特に第2項と第3.2項は粒径の自乗と測定線速の積になっており、小さな粒径の充てん剤では測定線速を増大させても良好な分離能が得られる。例えば、充てん剤粒径を50 μm から10 μm に変更した場合、第2項及び第3.2項は25倍向上するため、測定流速を10倍(測定時間を1/10)にしてもこの両項は2.5倍向上しており、流速が上昇することによる第1項の減少、粒径が小さくなることによる第3.1項の向上とも合せ、高速でかつ高性能の液体クロマトグラフィを達成できることが予想される。図2はこれらの現象をゲル透過クロマトグラフィにおいて実際のクロマトグラムにて示している。中速ゲル透過クロマトグラフィ用充てん剤として愛用されているTSK-GELトヨパールを用い、移動相線速を一定にして、いくつかのたん白質を測定したクロマトグラムであるが、75 μm 程度の粒径を持つ充てん剤であるトヨパールCoarseグレード、45 μm のFineグレード、30 μm のSuper Fineグレードの分離能の差、ピークの広がりの差は明瞭に理解できる。さらに、高速ゲル透過クロマトグラフィ用充てん剤であるTSKgel G3000SWカラム(粒径10 μm)を使用した場合、図2d)のように線速度を大きくし約 $\frac{1}{4}$ の測定時間に短縮しても、トヨパールSuper Fineグレード(30 μm)よりもさらに良好な分離を示すクロマトグラムを得ることができる。このように、液体クロマトグラフィにおいてはより小粒径の充てん剤を使用することにより、より高速にそして高性能のクロマトグラフィを達成することができるが、一般に充てん剤粒径を小さくすると、細孔径/粒径比が大きくなり機械的強度は弱くなってゆく傾向がある。特に水溶液系での測定は移動相の粘度も高く、単に軟らかい充てん剤の粒径を小さくしただけでは、高速測定により充てん剤が変形したり、破壊される可能性が強く、高速化にあたっては単に粒径だけでなく機械的強度の強い硬質ゲルの開発が重要なポイントとなる。さらに硬質化にあたっては目的に合致した較正曲線と十分に大きな細孔容積を持つことに留意しておかなければならない。以上のように、ゲル透過クロマトグラフィの高速化にあたっては種々の要素を考慮する必要があるが、

TSK-GEL SWタイプはこれらのことに充分留意し開発された高速ゲル透過クロマトグラフィ用充てん剤である。

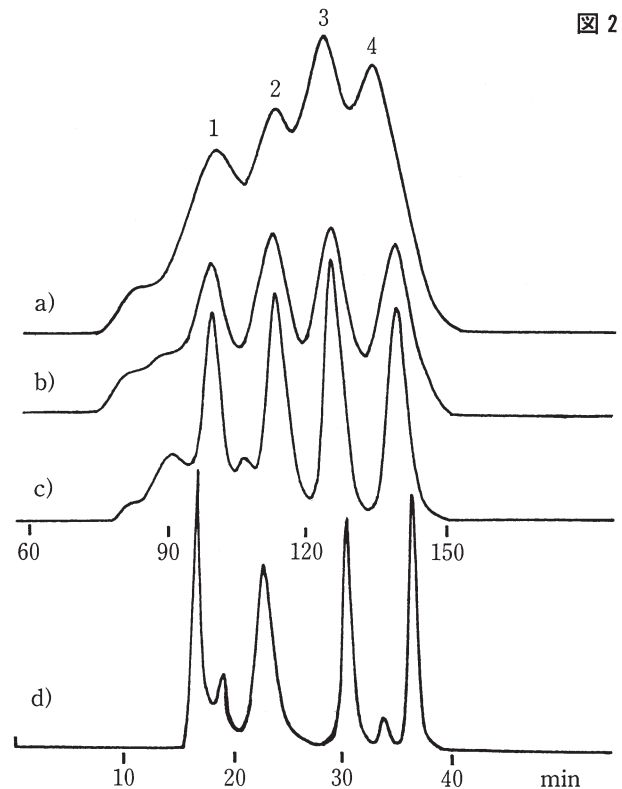


図 2

図 2 充てん剤粒径のたん白質分離に及ぼす影響

- カラム a) TOYOPEARL HW-55 Coarse Grade
(26mm ID×700mm)
- b) TOYOPEARL HW-55 Fine Grade
(26mm ID×700mm)
- c) TOYOPEARL HW-55 Super Fine Grade
(26mm ID×700mm)
- d) TSKgel G3000SW
(7.53mm ID×600mm)

- 試料 1. Thyroglobulin
2. γ -Globulin
3. β -Lactoglobulin
4. Cytochrome C

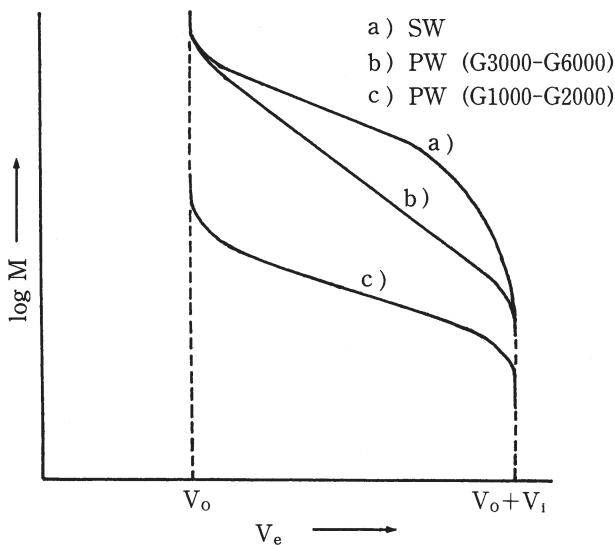
2. TSK-GEL SWタイプの較正曲線の考え方と適正使用範囲

無機溶媒系でのゲル浸透クロマトグラフィでは、オリゴ糖など比較的 low molecular weight のパターン分析、分離分析と高分子の分子量分布測定との2つの目的に大別されるが、水溶液系でのゲル浸透クロマトグラフィにおいては、たん白質の分離を主目的とする高分子物質の分離に適した充填剤が必要である。そのために水溶液系の高速ゲル浸透クロマトグラフィにおいては、

- (1) 高分子側で較正曲線の傾きが極めて小さく、かつ低分子側でも塩類などとの分離上ある程度程度の分離帯をもつ充填剤
- (2) 直線性がよくかつ数千から千万以上の幅広い分子量範囲をカバーできるような細孔径分布を持つ数種の充填剤系列
- (3) オリゴ糖など低分子の分離などを目的とした低分子側で傾きの小さな較正曲線をもつ充填剤

が要求される。図3はこの3つの目的の較正曲線を典型的に示したものであるが、b)は(2)の目的のために設計されている細孔径の大きなPWタイプ (G3000PW~G6000PW)、c)は(3)の目的に使用される低分子用PWタイプ (G1000PW~G2000PW)、a)が本技術資料の主題である(1)の目的に使用されるSWタイプの較正曲線に相当している⁵⁾。

図3 Typical Calibration Curve of Aqueous GPC



このように、SWタイプの較正曲線は平均細孔径の異なる各グレード共、その分離帯の範囲内では分子サイズの大きい領域では勾配は小さくなっており、たん白質、酵素など比較的分子サイズの大きい物質の分離に適する

ように設計されている。従って、分子量分布の測定のように較正曲線の直線性が要求されるような場合や、オリゴ糖の分離など低分子の分離を目的とする場合にはSWタイプは適していない。さらに、一般的にはPWタイプは水溶性合成高分子、オリゴ糖、SWタイプはたん白質を主対象物質としているため、PWタイプは親水性ポラスポリマ型、SWタイプは表面に第一級水酸基をもつ親水層化学結合型充填剤が使用されている。図4はTSK-GEL SWタイプ3グレードの較正曲線をたん白質で示したものであるが、最も細孔径の大きなG4000SWで10万以上、G3000SWで2万~20万、最も細孔径の小さなG2000SWで1万~数万の範囲で較正曲線の勾配は最も小さく、それぞれのカラムの性能をより有効に利用できる。

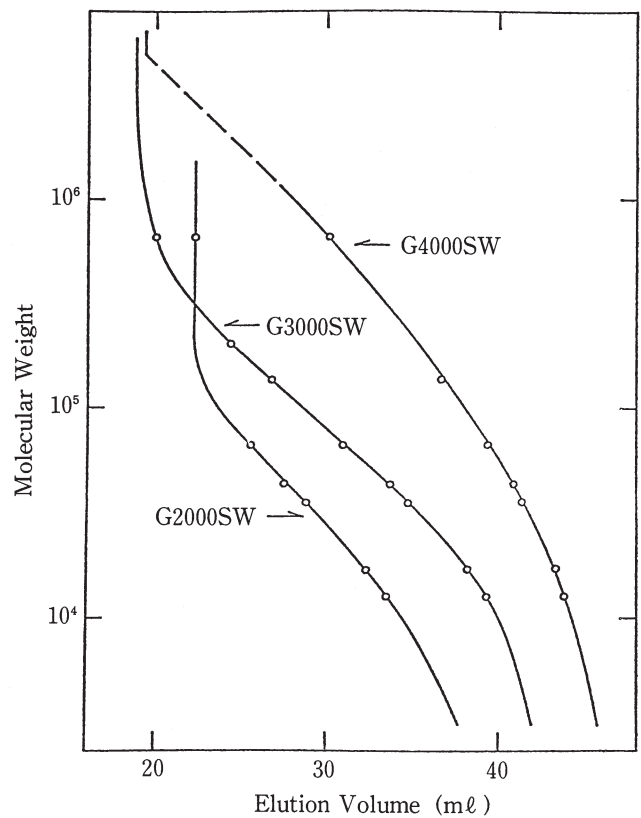


図4

Calibration curves of G2000SW, G3000SW and G4000SW for protein.

Size of each column system: 7.5 mm I.D. x 120 cm

ゲル濾過クロマトグラフィでは溶液中の分子サイズで分離するため、同じ分子量でも溶液中での分子サイズが異なる物質では溶出容量も異なってくる。図 5 a)、b)、c) はデキストラン、ポリエチレングリコール、たん白質を試料成分とした各グレードのSWタイプでの較正曲線を示しているが、3種の試料系では全く異なる較正曲線が得られている。規則的な3次元構造をもち、球形構造などをとることが多いたん白質では、分子量の割に溶液内での分子サイズは小さく、側鎖構造を有していないポリエチレンオキシドと比較すると、同じ溶出容量で10倍近くの分子量の差が認められ、主鎖の中に環状構造をもつデキストランでは中間の値が得られる。

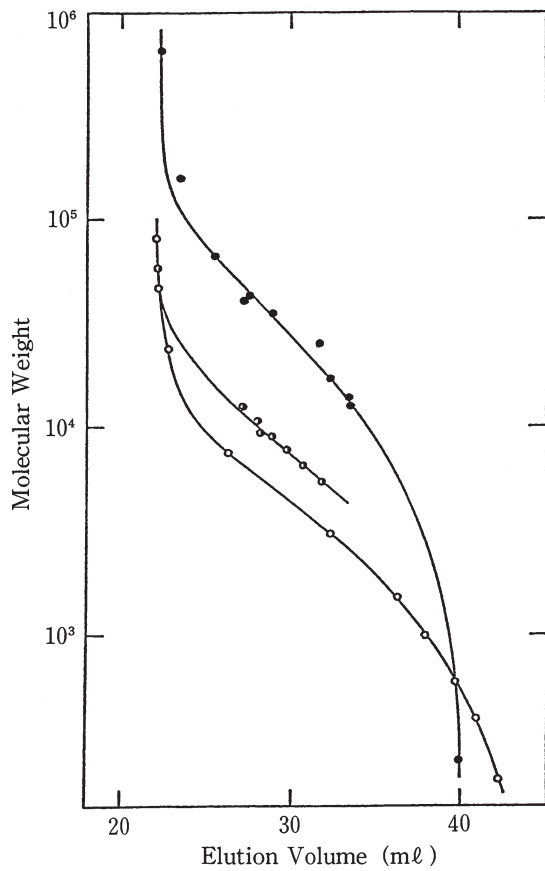


図 5 a)
Calibration curves of G2000SW
(7.5 mm I.D. x 120 cm) for
(○) polyethylene glycol, (◐) dextran and (●) protein.

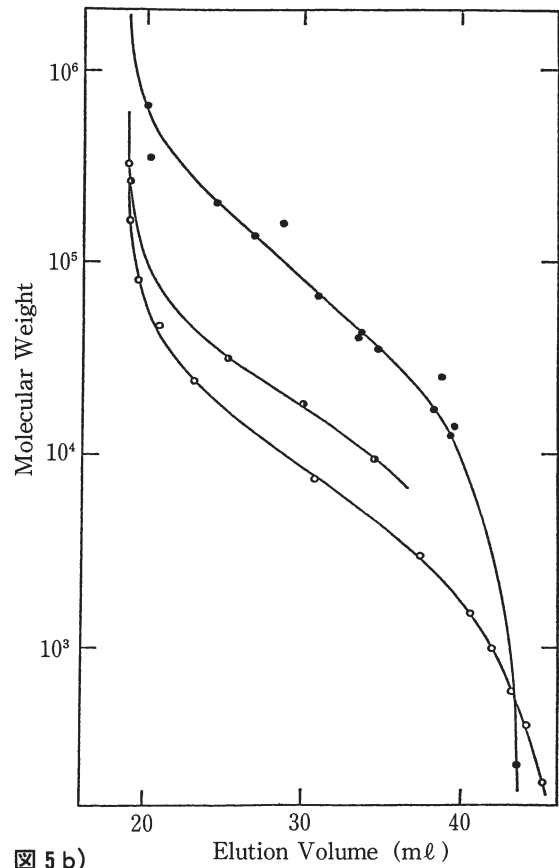


図 5 b)
Calibration curves of G3000SW
(7.5 mm I.D. x 120 cm) for
(○) polyethylene glycol, (◐) dextran and (●) protein.

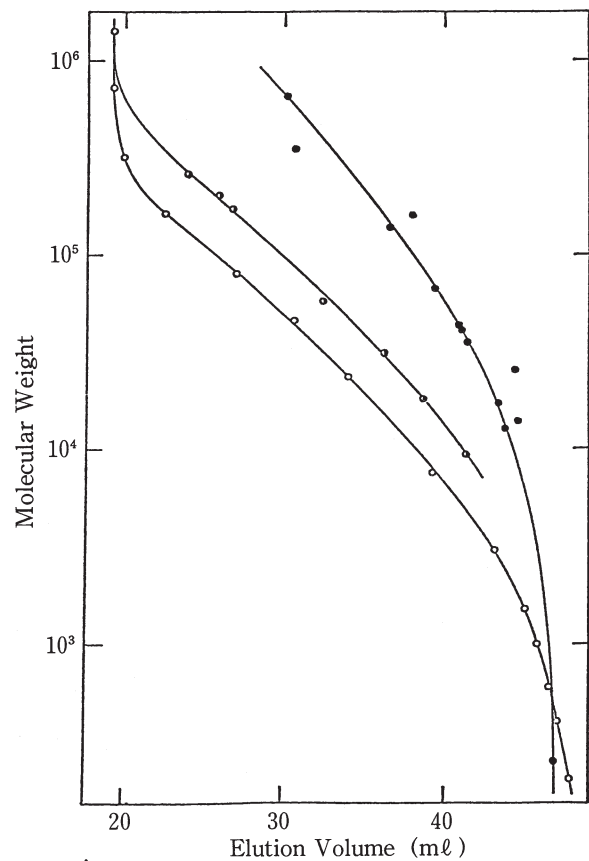


図 5 c)
Calibration curves of G4000SW
(7.5 mm I.D. x 120 cm) for
(○) polyethylene glycol, (◐) dextran and (●) protein.

このように、ゲル透過クロマトグラフィでは物質の種類により較正曲線が異なるため、同じ分子量でも使用するカラムのグレード（細孔径分布）は異なってくる。表1にポリエチレンオキシド、デキストラン、たん白質を試料とする場合のSWタイプ各グレードの既略の使用範囲を示しているが、同じグレードのカラムでもポリエチレンオキシドに比較するとデキストランで約2倍、たん白質では約10倍の分子量の試料に適していることが理解できる⁶⁾。

次に、SWタイプの主対象物質であるたん白質の分離例で細孔径の異なる3つのグレードの適正使用範囲とその程度について考えてみよう。図6は0.1Mリン酸緩衝液(pH 7) + 0.3M NaCl溶離液を使用した場合のチロglobリン、牛血清アルブミン、 β -ラクトglobリン、ミオglobリン、チトクロムC、グリシルグリシルグリシルグリシンを試料成分とするSWタイプの各グレードでのクロマトグラムを示している⁷⁾。分子量2万以下のミオglobリン (equine skeletal muscle 分子量; 16,900) とチトクロムC (分子量; 12,400) の分離では、分離能、 R_s はG2000SWの場合1.01、G3000SWでは0.89の値が得られ、より細孔径の小さなG2000SWを使用した方が高い分離が得られるが、分子量16,900のミオglobリンと分子量35,000の β -ラクトglobリンの分離では、G2000SWで $R_s=2.30$ 、G3000SWで $R_s=2.55$ となりG3000SWの方が良好な分離を示すようになる。さらに、分子量35,000の β -ラクトglobリンと分子量67,000の牛血清アルブミンの分離の場合は、G2000SWで $R_s=1.78$ 、G3000SWで $R_s=2.74$ となり、完全にG3000SWの使用領域となる。分子量66万のチロglobリンの場合、G3000SWではほとんどV。

に排除されているが、G4000SWを使用すると十分に細孔内に浸透していることが図6から理解できる。図7は各グレードでの人血清のクロマトグラムを示しているが、アルブミン付近ではG3000SWが適している。このように、2~20万付近ではG3000SWが最も適しており、たん白質の多くはG3000SWが汎用性が高く、最もこのグレードが多用されている。

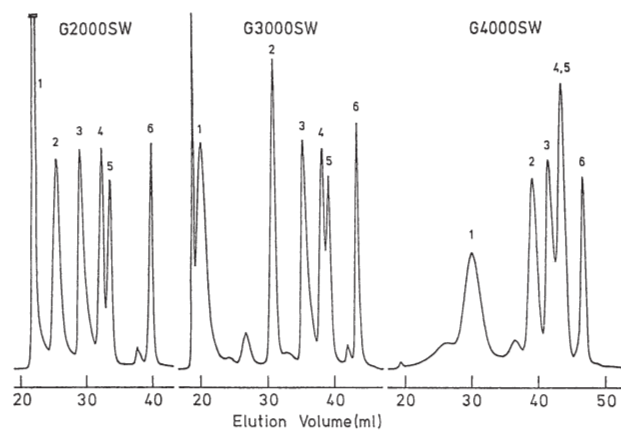


図6
Comparison of elution curves of a mixture of (1) thyroglobin (0.03%), (2) bovine serum albumin (0.02%), (3) β -lactoglobulin (0.02%), (4) myoglobin (0.01%), (5) cytochrome-C (0.01%) and (6) glycyl-glycyl-glycyl-glycine (0.03%) measured on G2000SW, G3000SW and G4000SW.

Size of each column system: 7.5 mm I.D. x 120 cm
Solvent: 0.1 M phosphate buffer containing 0.3 M NaCl (pH = 7)
Temperature: 25°C
Detector: UV monitor at 220 nm
Flow rate: 1 ml/min

表1 SEPARATION RANGE OF TSK-GEL SW TYPE

	Separation Range		
	G2000SW	G3000SW	G4000SW
Polyethylene Glycol	500—15,000	1,000—35,000	2,000—250,000
Dextran	1,000—30,000	2,000—70,000	4,000—500,000
Protein	5,000—100,000	10,000—500,000	20,000—7,000,000

図 7

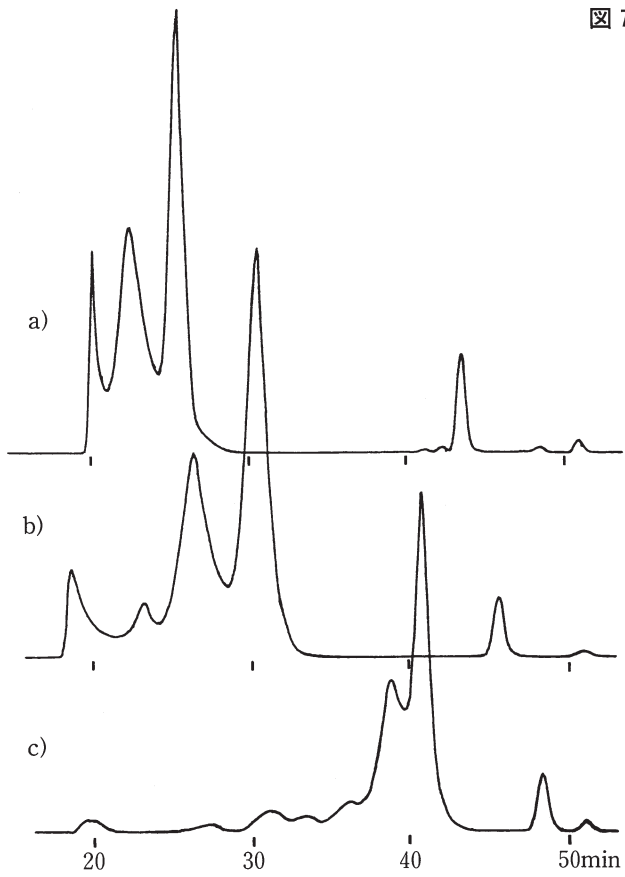


図 7 SWタイプ各グレードによる
人血清のクロマトグラム

カラム ; a) TSKgel G2000SW (7.5×600mm)

b) TSKgel G3000SW (7.5×600mm)

c) TSKgel G4000SW (7.5×600mm)

溶離液 ; 0.2Mリン酸緩衝液 (pH6.9)

(0.2M KH_2PO_4 + 0.2M K_2HPO_4)

流 速 ; 0.5ml /min

検 出 ; UV280nm

3. 分離能を支配する因子

ゲル濾過クロマトグラフィでは、充てん剤細孔内に浸透できない大きな分子は早く溶出し、十分に浸透できる小さな分子は遅く溶出する。カラムの全容積を V_t 、充てん剤間空隙すなわち充てん剤内細孔に浸透できない分子でも利用できる空隙を V_o 、ゲル細孔の容量すなわち分離帯を V_i 、充てん剤の固体部分の容量を V_s とすると、

$$V_t = V_o + V_i + V_s \dots\dots\dots 7)$$

ここで、試料成分の溶出容量を V_e とすると

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i \dots\dots\dots 8)$$

と表現される。 K_d は分布係数と呼ばれ、全く細孔内に浸透できない分子は $K_d = 0$ すなわち V_o に溶出し、すべてのゲル細孔内に浸透できる分子は $K_d = 1$ ($V_o + V_i$) に溶出する。

ここで、全カラム容積に対する充てん剤間空隙容量の割合を E_o 、充てん剤内細孔容積の割合を E_i 、充てん剤の固体部分の割合を E_s とすると、

$$E_o = V_o / V_t \dots\dots\dots 9)$$

$$E_i = V_i / V_t \dots\dots\dots 10)$$

$$E_s = V_s / V_t \dots\dots\dots 11)$$

と表わされる。充てん剤間容積； E_o は全く分離に寄与しないため、本質的には E_o の値は小さい程良いが、 E_o を小さくするため球形ゲルが変形する程強く充てんすると前述の理論段数； N が減少し分離が悪くなることが多い。ちなみに、変形しない場合の球形ゲルの理論的最密充てんにおける E_o は25.94%であり、この値が最適 E_o の1つの目安となろう。

また、 E_o の値が大きいと分離だけでなく、流速、脈流などに対する機械的強度も弱くなり、カラム寿命が短くなることも考えられる。一方、分離帯である V_i は8)式からも理解できるように大きい方が同じ K_d 値の差を持つ試料成分間の溶出容量； V_e の差も大きくなり、より高い分離能が得られる。しかし、余り大きくなると充てん剤の固体部分 E_s が小さくなり充てん剤の物理的強度が小さくなる欠点を持つようになる。一般には細孔径の大きさによってもこの値は異なり、平均細孔径が大きくなる程 E_i は大きくなる傾向があるようである。 E_i と E_s の比は充てん方法などによらず充てん剤そのものの構造によって決まるが、充てん剤内での空隙比率

$$E_{P1} = V_i / V_s + V_i \dots\dots\dots 12)$$

を考えると、分離上は大きい方が良く、逆に同じ構造の充てん剤では E_{P1} は小さい方が機械的強度は大きい。また、平均細孔径が大きい充てん剤になるに従って、 E_{P1} が大きい値でも大きな機械的強度が得られるようである。

これらの値は代表的な水溶液系ゲル濾過クロマトグラフィ用充てんカラムでの測定値が報告されている⁷⁾。表2は7種類の市販充てん剤について、これらの値が示されているが、充てん度合を示す E_o はG3000SWで最も最密充てんに近い値が得られ、G2000SWは7種の充てん剤中中間の値が得られている⁷⁾。前述のように、物理的強度を考慮しても平均細孔径の大きな充てん剤では分離帯 E_i 及び充てん剤中の細孔比率 E_{P1} を大きくとることが可能であるが、比較的細孔径の大きなG3000SWでは7種の市販品中、 E_i 、 E_{P1} とも2番目の大きさを示し、細孔径の小さな2000SWでは中間の値を示している。

表2 市販充てんカラムの分離帯及び空隙率⁷⁾

	E_o %	E_i %	E_s %	E_{P1} %
TSKgel G3000SW	35.3	47.7	16.9	73.8
TSKgel G2000SW	38.9	37.0	24.1	60.5
Waters I-125	37.5	34.5	28.1	55.1
Waters μ -Bondagel	45.3	33.5	21.2	61.2
Shodex OH Pak B-804	38.4	32.6	29.0	52.9
LiChrosorb Diol	47.3	30.0	22.7	56.9
Syn Chropak GPC 100	39.4	48.2	12.5	79.4

ゲル濾過クロマトグラフィにおいては、校正曲線の直線部分では、分子量 (M) と溶出容量; V_e の間には

$$\log M = b - CV_e \dots\dots\dots 13)$$

の関係が成立する。

従って、2つの試料成分間の溶出容量の差; ΔV_e は

$$\Delta V_e = V_{e1} - V_{e2} = \log M_1/M_2/C \dots\dots\dots 14)$$

となり、校正曲線の勾配; C の値が小さい程高い分離能が得られる。

液体クロマトグラフィでは分離能; R_s は

$$R_s = \frac{V_{e2} - V_{e1}}{W_1 + W_2/2} \dots\dots\dots 15)$$

と表現させる。

これに1)式と14)式を代入すると

$$R_s = \frac{\log M_1/M_2}{C} \cdot \frac{N}{4V_e} \dots\dots\dots 16)$$

が得られる。

ほぼ完全分離といえる $R_s = 1$ が得られる時の2つの試料成分の分子量の比を R_M とすると、 $R_s = 1$ 、 $M_1/M_2 = R_M$ を16)式に代入し、

$$\log R_M = \frac{4C \cdot V_e}{N} \dots\dots\dots 17)$$

が得られる。

さらに、この時の比分離能; R_{sp} は

$$R_{sp} = \frac{R_s}{\log M_1/M_2} = \frac{1}{\log R_M} \dots\dots\dots 18)$$

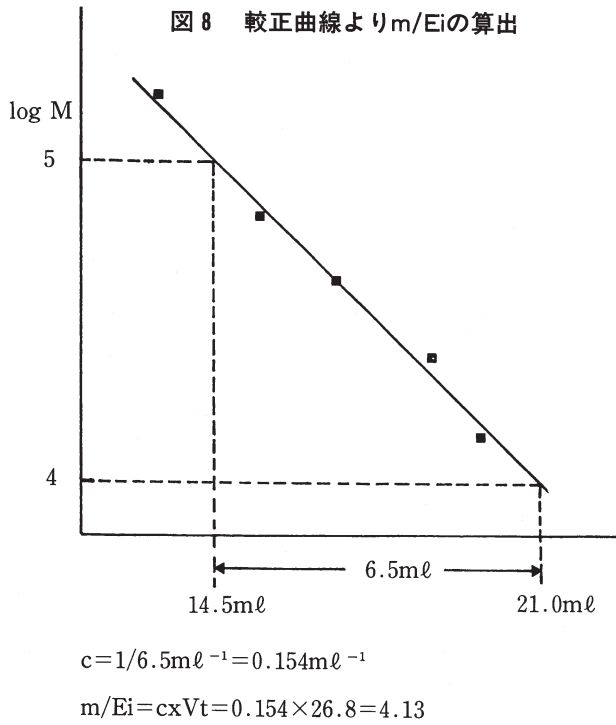
と表わすことができる。

これらの値、校正曲線の勾配; C 、分離能 $R_s = 1$ を得ることができ分子量比; R_M 、その時の比分離能; R_s 、についてもいくつかの代表的ゲル濾過クロマトグラフィ用充填剤について報告されており⁷⁾、表3はその値を示している。13)式を分布係数で表現した場合、 $\log M = a - mK_d$ となり、 $C = m/V_i$ の関係が得られるが、同じカラム容積当りで比較するため規格化した値を使用すると $C = m/E_i$ となり、 C として文献値 m/E_i を記載)

表3の数値からわかるように、TSKgel G2000SW、G3000SWは双方共校正曲線の傾き; C は比較例の中では中間の値を示しているが、分離能 $R_s = 1$ を得ることができ分子量比; R_M は卵アルブミンの溶出位置でG3000SWで $R_M = 2.00$ と最高の値を示し、G2000SWで2.46と2番目の値が得られている。従って、比分離能もそれぞれ3.32、2.57と最高の値を示している。このことは17)式から明らかなように校正曲線の勾配; C が中間的な値を示しているにもかかわらず、理論段数; N が極めて高いことを示している。ここで、表3における校正曲線の勾配; C は分子量66,000の卵アルブミンと低分子のグリシルチロシンで直線的に決定されているが、実際のSWタイプの校正曲線は図3に示されているように、高分子側で校正曲線の勾配は小さく、低分子側になる程大きくなっている。従って、実際の実験値は表3の値と比較すると、たん白質などのように比較的分子サイズの大きな分子を対象とする場合、勾配; C あるいは m/E_i はさらに小さな値となるため、文献値より高い分離能が得られることが考えられる。図8は多く使用されている溶離液、0.2Mリン酸緩衝液 ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, pH6.9)で、 γ -グロブリン、牛血清アルブミン、 β -ラクトグロブリン、 α -キモトリプシノーゲン、チトクロムCを試料として作成した校正曲線を示しているが、このようなたん白質領域の較

表3 市販充填剤の理論段数と R_M 値⁷⁾

カラム	理論段数 (卵アルブミン)	理論段数 (グリシルチロシン)	m/E_i	R_M	R_{sp}
TSKgel G3000SW	2488	9216	5.83	2.00	3.32
TSKgel G2000SW	886	6770	5.62	2.46	2.57
SynChropak GPC 300	848	4200	4.63	3.03	2.08
Waters I-125	1070	4947	8.06	3.09	2.04
SynChropak GPC 100	620	2079	4.71	3.21	1.65
LiChrosord Diol	418	1764	9.27	11.06	0.48



正曲線から得られる勾配； m/E_i の値は4.1程度であり、グリシルチロシンと卵アルブミンより得られた文献値（表3；5.83）に比較するとさらに良好な値が得られている。表4は図8における各たん白質の溶出容量、理論段数及び17)式より算出した分離能；1を得ることができる分子量比 R_M の値を示している。後述のように、溶出容量、理論段数は溶離液に使用する緩衝液のpH、種類、塩濃度によって異なり、各々のたん白質間の分離にはこれらの要因を考慮する必要があるが、1本のG3000SWカラムで、0.5ml/minの流速で測定した場合、較正曲線の直線部分からはずれていないたん白質では、概略的には2つの試料の分子量が1.35~1.65倍異なると分離が可能であることが理解できる。

次に、1)式において V_e が大きくなることから推測できるように、一般には表3、表4の例のように分子サ

イズが小さい程高い理論段数が得られる。さらに、 V_e を考慮しない絶対的なピークの拡がりでも、拡散速度の大きな低分子になる程、一般的にはピークの拡がり、 W の値は小さくなり、表4のように分子量の小さなたん白質程良好な R_M の値が得られる。図9は種々のたん白質の分子量に対する理論段数、ピークの拡がりをプロットしたものであるが、理論段数だけでなくピークの拡がりも分子量が小さい程小さくなる。この例では、G3000SWの主分離帯よりも、高分子側と低分子側の両サイドでピークの拡がりの分子量依存性は大きいようである。

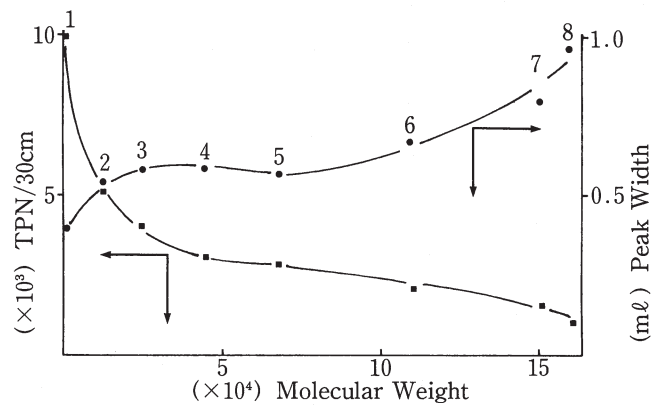


図 9 理論段数、ピーク拡がりの分子量依存性

カラム TSKgel G3000SW

溶離液 25mM GTA緩衝液²⁹⁾+0.2M NaCl

流速 1.0ml/min

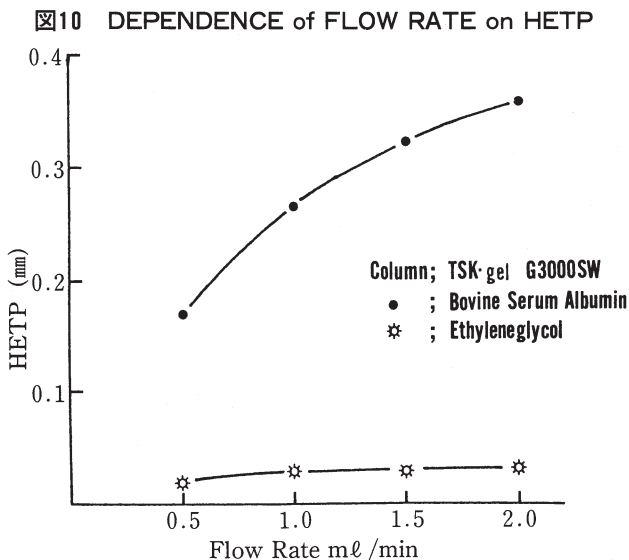
- 試料
1. アスコルビン酸
 2. チトクロム C_2
 3. α -キモトリプシノーゲンA
 4. 卵アルブミン
 5. 牛血清アルブミン
 6. 乳酸脱水素酸素
 7. アルドラーゼ
 8. γ -グロブリン

表 4 G3000SWカラムでのたん白質の分離能

Sample	V_e (mℓ)	N	R_M
γ -Globulin	13.3	1300	1.694
Albumin	15.3	4050	1.416
β -Lactoglobulin	17.4	4800	1.416
α -Chymotripsinogenes	18.9	7800	1.355
Cytochrome C	19.2	9300	1.333

ピークの拡がりは、4)、5)、6)式からも推定できるように測定流速によって変化し、4)式が無視できるような一般的な流速範囲内では流速が小さい程、高い理論段数が得られ、一般的にはその流速依存性の大きさは拡散速度の小さい高分子程大きいようである。図10は分子量62のエチレングリコールと66,000の牛血清アルブミンを試料成分とした場合のHETPを、測定流速に対してプロットしたものである。分子量の大きな牛血清アルブミンは分子量の小さなエチレングリコールに比較してピークの拡がり；HETPが大きいが、同時にその流速依存性も大である。従って、たん白質の測定にあたっては、通常の流速範囲内では測定時間が許す限り、低い流速で測定した方が高い分離能が得られるであろう。図11はG3000SWカラム1本で前記のたん白質の理論段数を流速1.0ml/min、その2倍の測定時間となる0.5ml/min、3倍の測定時間である0.33ml/minで測定した結果であるが、いずれのたん白質も測定流速が小さくなると理論段数は上昇する。しかし、各たん白質の溶出挙動は微妙に異なり、例えばβ-ラクトグロブリンと牛血清アルブミンの理論段数は0.5ml/minと0.33ml/minでは逆転している。全体的には1.0ml/minの流速での測定結果と比較すると、その2倍の測定時間となる0.5ml/minでの理論段数は、1.5倍程度向上していることがわかる。

一方、理論段数はカラムの長さに比例するため、カラムを多数本接続すれば分離能は向上するが、流速を変更する際と同様分析時間も長くなる。すなわち、2本のカラム(120cm)では1本(60cm)の場合の理論段数の2倍の値は得られ、分離能は16)式より2倍向上する。1本



のカラムで1.0ml/minで測定する場合を基準として考えると、1本のカラムで測定流速を0.5ml/minにしても、1.0ml/minで2本のカラムを接続しても分析時間は同じ2倍となるが、この時の理論段数の向上は、前者の方法では図11のように約1.5倍、後者の方法では2倍向上することになる。図12は流速を1/2にした場合とカラムを2本にした場合のたん白質の分離例を示しているが、分析時間は同じであるがカラム接続法の方が分離が良好であることを示している。従って、単位時間での分離能を考慮すると、カラム、溶媒使用量の面では高価な系となるが、経済的に許せば後者、すなわちカラム本数を増加し分離能を向上させる方が、流速を減少し分離能を向上させる方法より有利であることが理解できる。

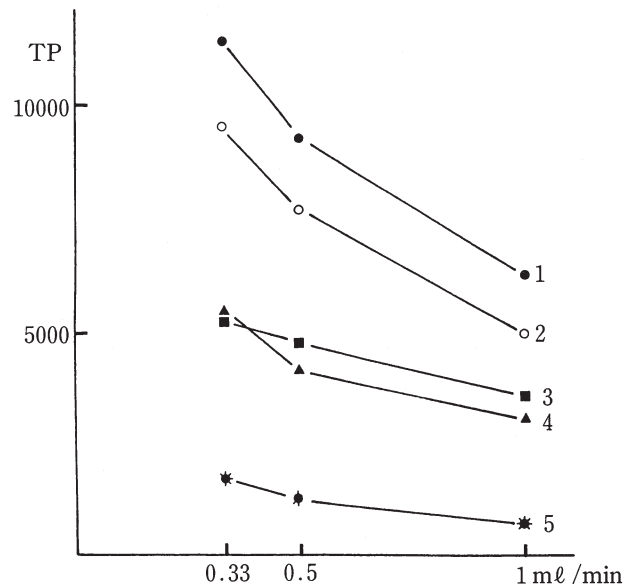
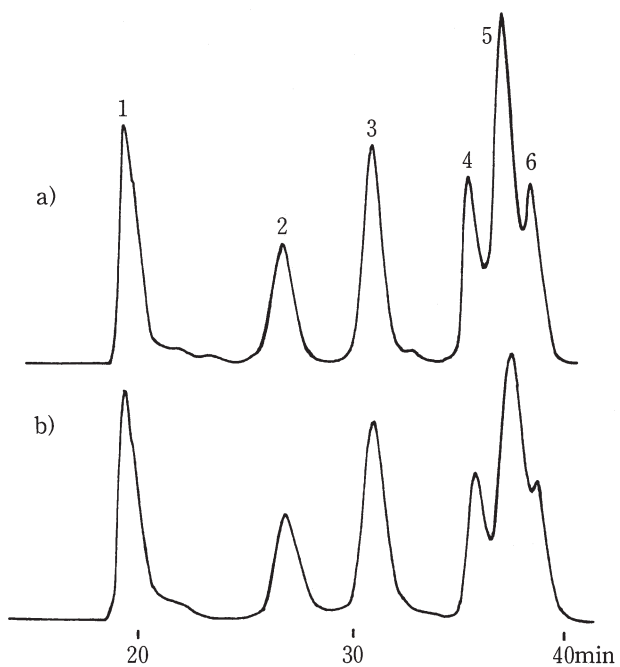


図11 たん白質の流速と理論段数

- 試料1. Cytochrom C (MW=13,000)
 2. α-Chymotripsinogen A (MW=24,000)
 3. β-Lactoglobulin (MW=41,000)
 4. Albumin (Bovine) (MW=66,500)
 5. γ-Globulin (MW=160,000)

カラム TSKgel G3000SW

溶離液 0.2MKH₂PO₄ + 0.2MK₂HPO₄ (pH6.9)



注) GTA緩衝液

G ; 3,3-ジメチルグルタリクアシッド

T ; トリスヒドロキシメチルアミノメタン

A ; 2-アミノ 2-メチル1,3.プロパンジオール

図12 同分析時間でのクロマトグラム

a) G3000TW×2 (1200mm) 1.0ml/min

b) G3000SW×1 (600mm) 0.5ml/min

溶離液 ; 0.2MKH₂PO₄+0.2MK₂HPO₄ (pH6.9)

試料 ; 1. Thyroglobulin

2. γ -Globulin

3. Albumin

4. β -Latoglobulin

5. α -Chymotripsinogen A

6. Cytochrome C

4. 溶離液組成の選択と分子量の推定

一般に、ゲル滲過クロマトグラフィにおける充てん剤と試料成分間の二次的相互作用については、イオンの相互作用や疎水的、あるいは水素結合的な相互作用などが考えられる。シリカゲルを基材とするSWタイプの充てん剤は残留シラノール基によるわずかなアニオン性を有しており、アニオン性試料に対するイオン排除効果とカチオン性試料に対するイオン交換的な吸着効果がイオンの相互作用として考えられる。充てん剤表面のアニオン性はたん白質などの大きな分子が浸透できないような小さな細孔あるいは親水層程より多く存在すると考えられ、試料成分の分子サイズが小さい程、かつ試料の分子サイズが小さい場合は充てん剤の細孔径が小さい程、イオンの相互作用は大きいようである。低分子に対するイオン排除効果については種々の市販高速ゲル滲過剤について報告されており²⁾、試料成分としてクエン酸を用いた場合、低いイオン強度の溶離液ではG3000SWに比較し前述のように細孔径の小さなG2000SWの方がこのような低分子ではその効果は大きい⁷⁾。しかし、一般にこのイオン排除効果は通常使用される0.1M以上の塩濃度の溶離液では、特にたん白質などの比較的大きな分子を対象とする場合、あまり考慮する必要はないと考えら

れる。

低分子に対するイオン交換的相互作用、疎水的な吸着効果についても、同様に種々の市販高速ゲル滲過剤について報告されている。表5は溶離液のイオン強度を変化させた場合の塩基性アミノ酸、アルギニンの種々の市販充てん剤での分布係数； k_d の値が示されており⁷⁾、カチオン性の強いアルギニンを試料とした場合、溶離液のイオン強度を上昇させないとイオン交換的な相互作用により、本来のゲル滲過分離領域 ($k_d \leq 1$) には溶出しない。このイオン交換的効果も排除効果同様、低い塩濃度の溶離液では低分子試料では有効表面積の大きなG2000SWの方がG3000SWより大きいことが表5より理解できる。同様に、表6は中性の分子であるフェニルエタノールを試料とした場合の塩濃度効果を示しているが⁷⁾、このように疎水的な試料ではアルギニンの際とは逆に溶離液の塩濃度が高くなる程逆相分配的な疎水的吸着は大きくなり、 k_d 値は増加しすべての溶離条件、カラムに対し1以上の k_d 値が得られている。この効果も低分子に対しより有効表面積の大きなG2000SWの方がG3000SWより大きい。以上、低分子で典型的な二次的相互作用について考えてきたが、たん白質のように比較的大きな分子

表5 種々の充てん剤におけるアルギニンの k_d 値の溶離液イオン強度依存性⁷⁾

カラム	溶離液イオン強度	0.026	0.12	0.24	0.60	1.20	2.40
TSKgel G3000SW		1.30	1.05	1.02	1.00	—	0.98
SynChropak GPC100		1.35	1.06	1.01	—	—	0.98
LiChrosorb Diol		1.53	1.15	1.05	0.99	—	1.07
TSKgel G2000SW		1.57	1.06	1.02	0.99	—	0.98
Waters I-125		1.70	1.23	1.16	1.08	—	1.05
Waters μ -Bondagel		1.75	1.11	1.06	1.02	—	1.00
Shodex OH pak B-804		2.06	1.16	1.07	1.02	1.02	—

表6 種々の充てん剤におけるフェニルエタノールの k_d 値の溶離液イオン強度依存性⁷⁾

カラム	溶離液イオン強度	0.026	0.12	0.24	0.60	1.20	2.40
SynChropak GPC100		1.44	1.49	1.53	1.63	1.81	2.33
TSKgel G3000SW		1.47	1.50	1.53	1.61	1.81	2.35
Waters I-125		1.83	1.88	1.88	2.03	2.29	3.03
TSKgel G2000SW		1.93	2.02	2.10	2.30	2.71	4.01
LiChrosorb Diol		2.49	2.56	2.64	2.93	3.52	5.31
Waters μ -Bondagel		5.32	5.19	5.37	5.97	7.44	11.47
Shodex OH pak B-804		6.36	6.65	6.96	8.47	10.96	—

サイズを持つ分子では、有効表面積が少ないためこれらの効果は低分子程大きくないと考えられるが、種々の相互作用が複合的に働き、かつたん白質の性質によりその程度が異なるため、目的とする試料系によりこれらの効果を次分考慮し溶離液組成を設定する必要がある。

前述の報告において、低分子だけでなく塩基的な性質も強く疎水的吸着も比較的強いたん白質であるリゾチームを例に溶離液のイオン強度に対する種々の市販ゲル濾過剤についてkdの値が示されている。図13はそのイオン強度に対する各充てん剤のkdの値を示しているが、溶離液のイオン強度が小さい場合、イオン交換的な効果のため吸着され、逆にイオン強度が強い場合、疎水的な吸着のため遅く溶出し、いずれの場合もkd値が1以上になる。したがって、適正なクロマトグラムを得るためには適切なイオン強度が存在することが理解できる。また較正曲線まで考慮すると、低分子を試料とする時とは異なり、小さな細孔を利用できないたん白質では同じ化学構造をもつ充てん剤であるG2000SWとG3000SWは同じ程度の二次的相互作用を有していることがわかる。さらに、リゾチームを試料としリン酸緩衝液で測定した場合、LiChrosorb Diolと共にTSK-GEL G2000SWとG3000SWで良好な結果が得られている。

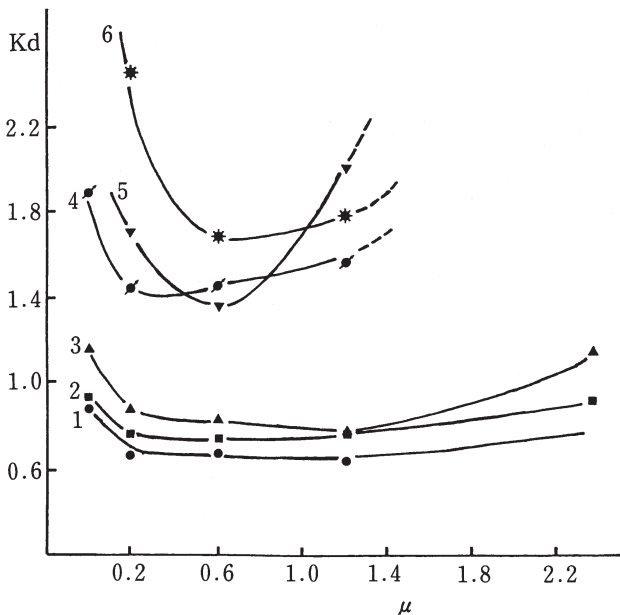


図13 リゾチームのKd値のイオン強度依存性⁷⁾

1. TSKgel G3000SW
2. TSKgel G2000SW
3. LiChrosorb Diol
4. Waters I-125
5. Shodex OHpak B-804
6. SynChropak GPC100

このような二次的相互作用はkd値に影響を及ぼすだけでなく、ピークの鋭さすなわち理論段数にも大きな影響を及ぼす。図14は α -キモトリプシノーゲンを試料とした場合の溶離液塩濃度と溶出容量、理論段数の関係を示しているが、リゾチームの場合と同様、低イオン強度、高イオン強度の溶離液では吸着傾向にあり中間の0.1~1.0M/l程度の塩濃度の範囲でほぼ同じ溶出容量が得られる。しかし、この範囲内でもピークの鋭さすなわち理論段数は大きく変化し、 α -キモトリプシノーゲンでは0.2~0.3M/l付近で最高の理論段数が得られる。このように、溶離条件の設定にあたっては溶出容量だけでなくピークの鋭さも考慮する必要がある。

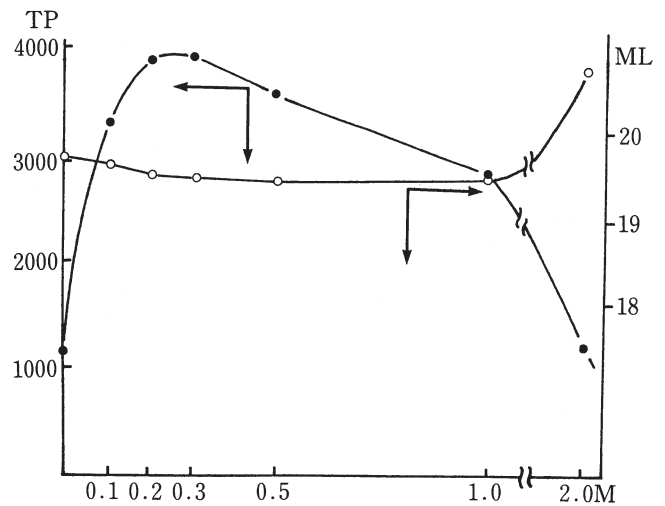


図14 溶離液塩濃度と溶出容量及び理論段数

カラム TSKgel G3000SW
 溶離液 50mM GTA緩衝液+NaCl
 試料 α -キモトリプシノーゲン

図15、図16、図17はチトクロムC、 α -キモトリプシノーゲン、リゾチームの各溶離液塩濃度でのピーク形状、溶出容量を示しているが、いずれの場合も低い塩濃度、高い塩濃度では異常ピークあるいはブロードなピークとなる。またその適切な塩濃度はチトクロムCで0.1~0.2M/l、 α -キモトリプシノーゲンで0.2~0.3M/l、リゾチームで0.3~0.4M/lとたん白質によって最適な塩濃度が異なっているようである。図18は上記3つのたん白質の各塩濃度での紫外吸収法による回収率測定結果を示しているが、最高の回収率が得られる塩濃度は、ピーク形状、理論段数が良好である溶離液塩濃度とほぼ一致している。これらのことから、最高の理論段数的に最高の条件を設定すれば、回収率、kd値も良好な値が得られることが考えられる。

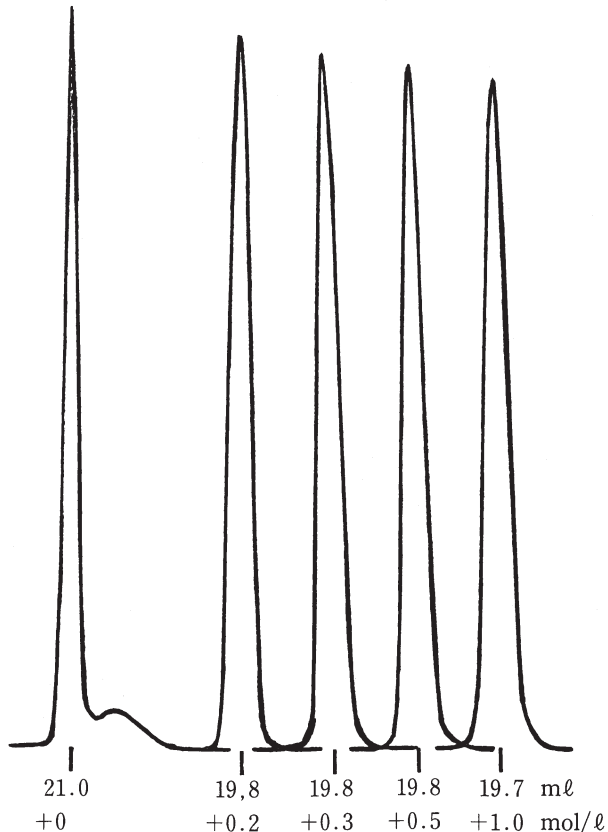
以上のように、塩濃度によってkd値が異なってくるため較正曲線も変化する。図19は0.25M GTA緩衝液 (pH 7.0)に硫酸ナトリウムを添加した場合の較正曲線の変化を示しているが、通常使用される0.1~0.3M程度の添加範囲でも各たん白質の溶出挙動はわずかに異なっており、

図15

EFFECT OF SALT CONC. ON PEAK SHAPE

SAMPLE CYTOCHROME-C

ELUENT 0.05M PHOSPHATE BUFFER (pH6.9) + NaCl



さらに1M程度添加すると疎水的な吸着効果が顕著に表われ、kd値は極めて大きくなる。このように硫酸ナトリウムは塩化ナトリウムに比較し、吸着効果は大きいが、一方ハロゲンイオンはポンプ、配管、カラムなどステンレス鋼で構成されるHPLCシステムには不向きであり、場合によっては溶出した鉄イオンが充てん剤に吸着し、酸性試料までイオン交換的に吸着される程充てん剤が変性することがある。表7は種々の溶離液での代表的たん白質の回収率を示しているが、平均的にはリン酸緩衝液で良好な結果が得られている。リン酸緩衝液は中性付近

図16 EFFECT OF SALT CONC. ON PEAK SHAPE

SAMPLE LYSOZYME

ELUENT 0.05M

PHOSPHATE

BUFFER

pH6.9+NaCl

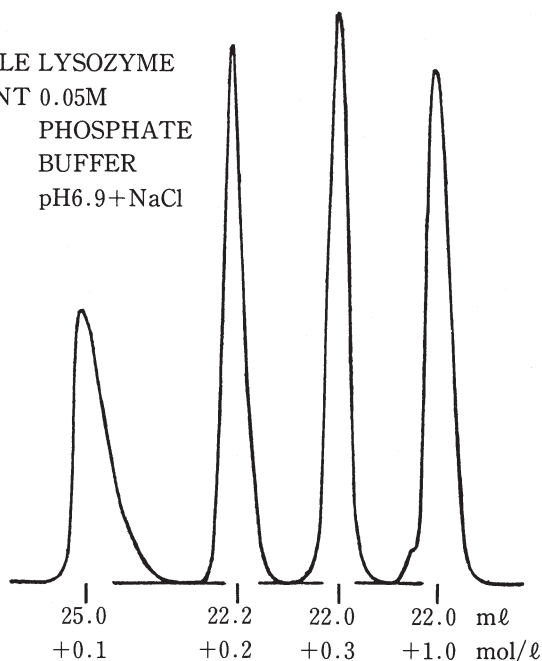
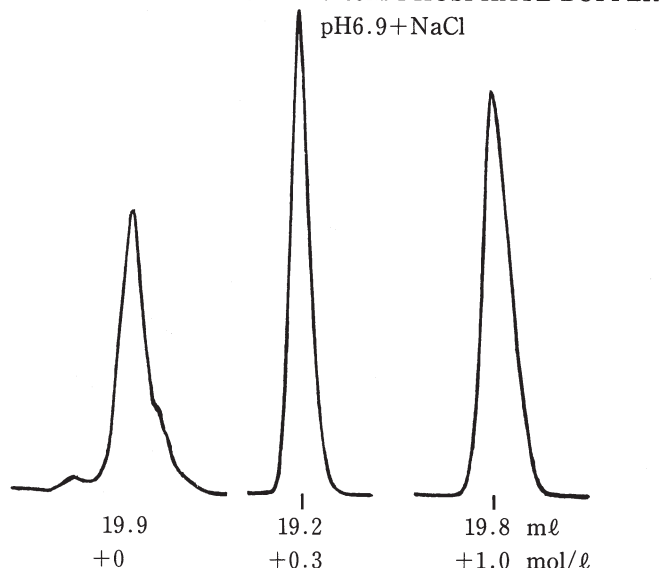


図17 EFFECT OF SALT CONC. ON PEAK SHAPE

SAMPLE α -CHYMOTRYPSINOGEN

ELUENT 0.05M PHOSPHATE BUFFER

pH6.9+NaCl



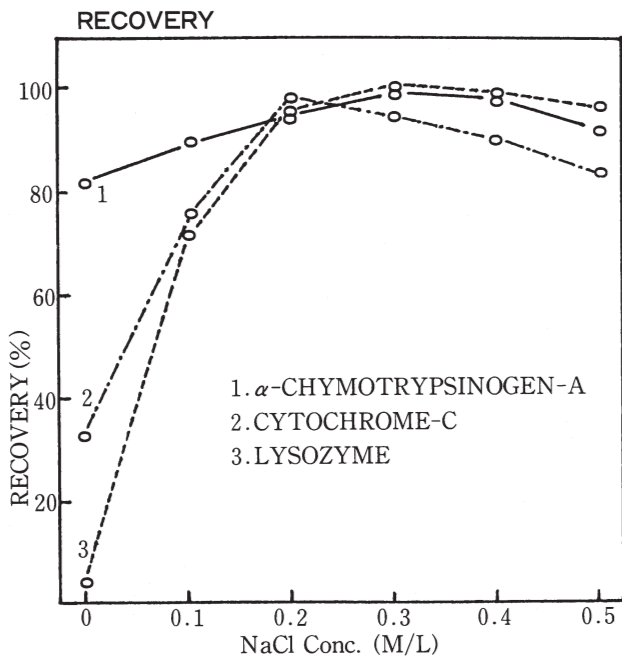
で微粒子が発生し易いのが欠点であるが、丁寧に作り直せば、検出的にも紫外吸収が少なく、幅広いpH範囲で(pH2~3.5、5.5~8)の緩衝効果も考え合せると、良好な溶離液系であると思われる。以下リン酸緩衝液での溶出挙動について考えてみよう。

図20はリン酸緩衝液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH6.9)を溶離液とした場合での塩濃度による較正曲線の変化を示しているが、たん白質の種類によって溶出挙動が異なっている。ADHでは塩濃度が増加する程溶出容量は大きくなるが、チトクロムCでは逆に溶出は速くなっている。このようにたん白質によって溶出挙動が異なるので、分離したい物質により最適分離条件は異なってくるが、分

子量を推定する手段として考えると、0.2M/l程度の塩濃度でより多くのたん白質で直線的較正曲線が得られるようである。

同じアルカリ金属—リン酸系の緩衝液でもカチオンとしてナトリウムを使った場合とカリウムの場合では溶出挙動が異なる。図21は0.25M/lの塩濃度でのカリウム系のリン酸緩衝液とナトリウム系での較正曲線を示しているが、カリウム系の緩衝液の方が較正曲線の勾配はより小さい傾向を示している。また、Sørensen BufferのようにKとNaが混在しているリン酸緩衝液では中間の溶離挙動を示す。さらに、溶離液のpHによっても溶出挙動は異なる。図22は塩基性たん白質の α -キモトリプシノーゲ

図18 EFFECT OF SALT CONCENTRATION ON RECOVERY



COLUMN TSK-gel G3000SW
 ELUENT 0.05M PHOSPHATE BUFFER (pH6.9) + NaCl
 LOAD 60 μ g

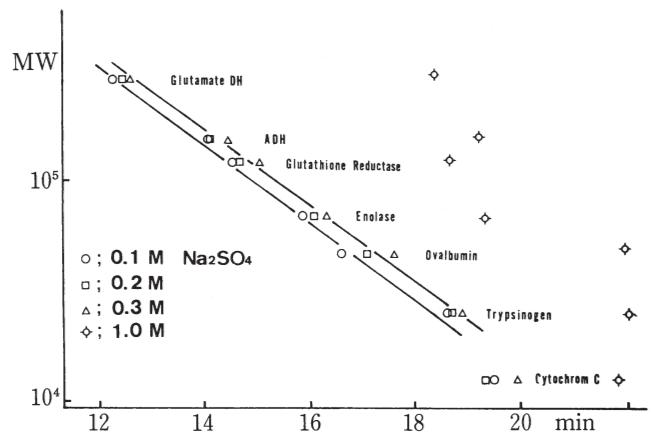


図19 溶出容量の塩濃度効果 [I]

カラム TSKgel G3000SW
 (7.53mm i.d.×600mm)
 溶離液 25mM GTA緩衝液 (pH7.0) + Na_2SO_4
 流速 1.02ml/min

表7 代表的緩衝液によるたん白質の回収率実験例 (UV法による)

試料	溶離液 0.2MKH ₂ PO ₄ +0.2M K ₂ HPO ₄ (pH6.9)	0.2MNaH ₂ PO ₄ +0.2M Na ₂ HPO ₄ (pH6.9)	0.05Mリン酸緩衝液 (pH6.9) +0.2M NaCl	0.05Mトリス—塩酸 緩衝液(pH7.8) +0.2M NaCl
リゾチーム	96%	91%	94%	75%
チトクロムC	101%	98%	98%	92%
α -キモトリプシノーゲン	98%	95%	92%	90%
γ -グロブリン	98%	95%	88%	88%
チログロブリン	94%	94%	87%	85%
卵アルブミン	92%	96%	68%	66%

ンを例に溶出容量と理論段数のpH依存性を示している。(後述のように、SWタイプのカラムはpH8以上では劣化するが、ここでは傾向を示すために測定されている。なおpH4,5ではリン酸緩衝液の緩衝効果はほとんどない。)等電点9.5の α -キモトリプシノーゲンでは塩基性側の溶離液で溶出が遅れるようになるとともに理論段数も低下する。一般には等電点よりある程度離れたpHで測定した方が、良好な結果が得られることが多いようである。表8は0.05M GTA緩衝液(pH7)に種々の塩を添加した溶離液での各たん白質間の分離能を示しているが、分離したいたん白質の種類によって使用する塩の種類を選択する必要があることを示している。

以上のように、塩濃度、塩の種類、pHなどによって較正曲線は変化するが、ある一定の標準的条件下(塩濃度0.2~0.3M/l、pH7付近)においては多くのたん白質に関して分子量の対数と溶出容量は直線関係が得られる。

TSKgel G3000SWを使用し較正曲線を作成、多くのたん白質について分子量を測定した結果、文献値に対し-6%の平均誤差で測定が可能であることが報告されている⁹⁾。表9はその文献値、G3000SWによる測定値、充来から多く使用されている軟質ゲル汚過剤での測定結果、図23はG3000SWでの測定結果をプロットしたものであるが、充分分子量の推定手段として使用できることが理解できる。図24はこの測定条件下でのクロマトグラムを示している。

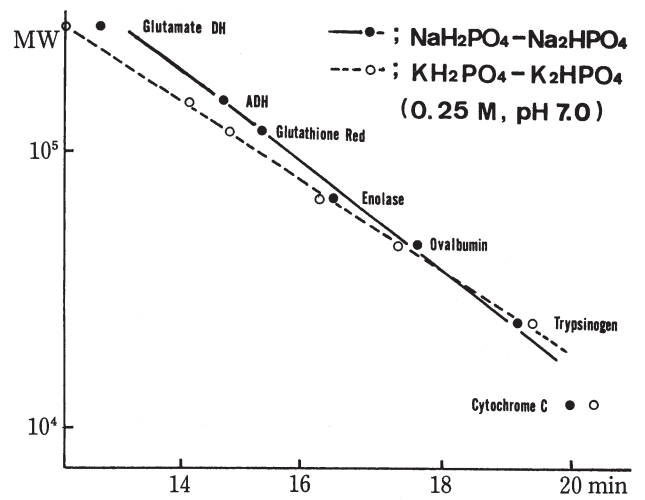


図21 緩衝液を構成する陽イオンの影響
カラム TSKgel G3000SW

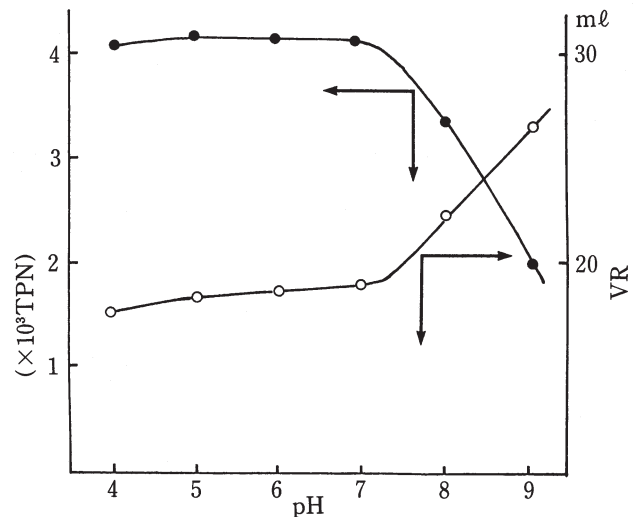


図22 溶出容量のpH依存性

カラム TSKgel G3000SW×1
溶離液 25mM GTA緩衝液+200mMNaCl
試料 α -キモトリプシノーゲン
流速 1.02ml/min

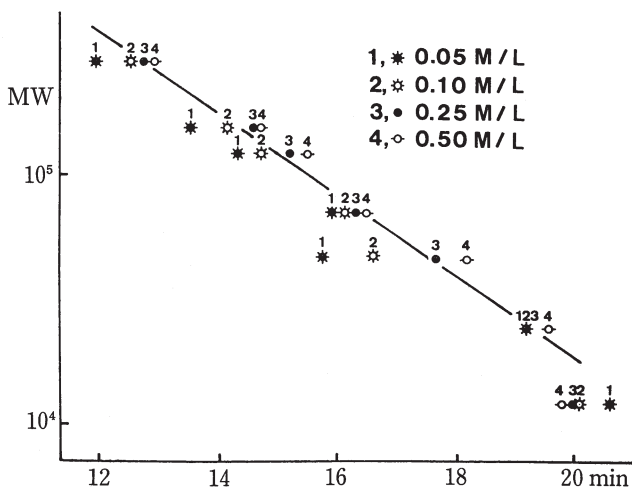


図20 溶出容量の塩濃度効果〔II〕

試料 図19と同様

溶離液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH6.9)

流量 1.0ml/min

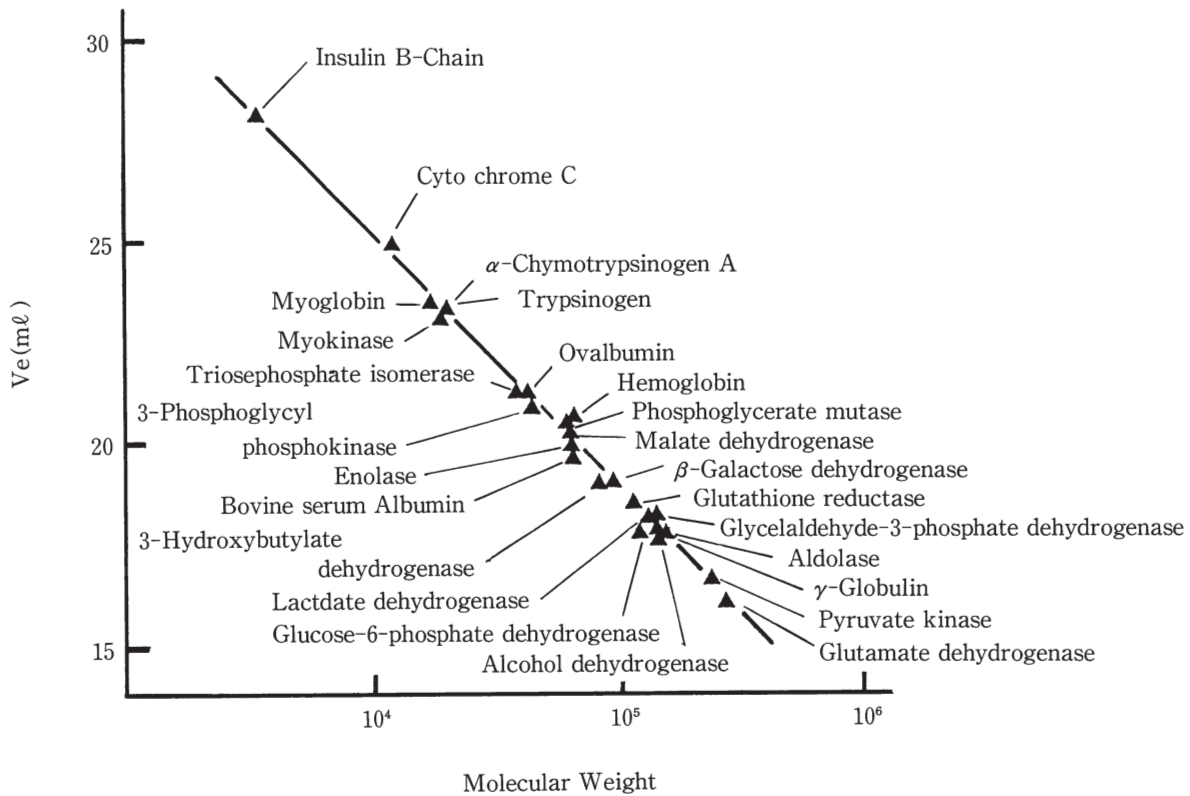


図23 たん白質による較正曲線の一例⁹⁾

カラム TSKgel G3000SW

溶離液 50mMリン酸緩衝液+0.2MNaCl(pH7.5)

流速 1.02ml/min

表 8 添加塩の種類と分離能

溶離液；0.05M GTA緩衝液+添加塩

$$\text{resolution} = 2(V_2 - V_1) / (W_2 + W_1)$$

Sample	添加塩	0.2M(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2MNa ₂ SO ₄	0.2M(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2MMgCl ₂	0.2MNaCl
Glutamate DH		1.35	1.14	1.54	1.26	1.54
ADH		0.42	0.46	0.24	0.45	0.63
Glutathione red		0.94	1.08	0.89	0.92	1.21
Enolase		1.07	0.82	1.26	0.81	0.36
Ovalbumin		1.27	1.29	1.36	1.90	2.22
Trypsinogen		0.97	0.54	0.20	0.76	0.91
Cytochrome C						

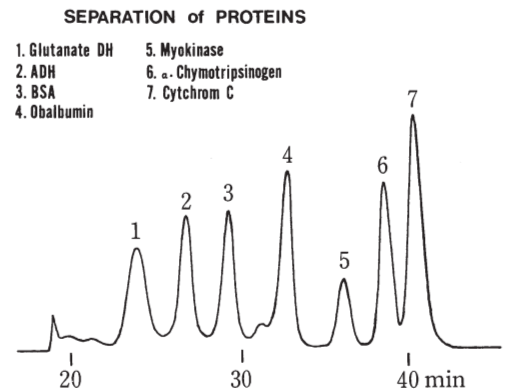


図24 たん白質の分離

カラム；TSKgel G3000SW

溶離液；50mMリン酸緩衝液

+0.2MNaCl (pH7.5)

表 9

TSK-gel G3000SWと Sephadex G-200カラムによる分子量測定⁹⁾

タンパク質 (DH ; dehydrogenase)	起源	pI	分子量		
			文献値	G3000SW (Δ MW)	*Sephadex G-200 (Δ MW) ¹²⁾
Glutamate DH	Yeast		280,000	268,000 (-12,000)	
Pyruvate kinase	Rabbit muscle	7.8	237,000	201,000 (-36,000)	
γ -Globulin(Cohn fr. II)	Human	6.3	160,000	155,000 (-5,000)	210,000 (50,000)
Alcohol DH	Yeast	5.4	150,000	155,000 (5,000)	150,000 (0)
Aldolase	Rabbit muscle	8.2	150,000	132,000 (-18,000)	145,000 (-5,000)
Glyceraldehyde-3-phosphate DH	Rabbit muscle	8.3	146,000	105,000 (-41,000)	130,000 (-16,000)
Lactate DH	Lactobacillus	4	132,000	135,000 (3,000)	140,000 (8,000)
Glucose-6-phosphate DH	Yeast	6	128,000	140,000 (12,000)	
Glutathione reductase	Yeast		118,000	114,000 (-4,000)	
β -Galactose DH	P. fluorescens	6.5	101,000	95,000 (-6,000)	
3-Hydroxybutylate DH	R. spheroides		85,000	94,000 (9,000)	
Malate DH	Pig seart	6.1	67,000	54,000 (-13,000)	63,000 (-4,000)
Hemoglobin	Beef blood	7	67,000	34,000 (-33,000)	
Enolase	Yeast	5.4	67,000	69,000 (2,000)	
Bovine serum albumin	Bovine	4.7	67,000	94,000 (27,000)	70,000 (3,000)
Phosphoglycerate mutase	Rabbit muscle	6.8	64,000	59,000 (-5,000)	
3-Phosphoglycerate phosphokinase	Yeast	7.2	47,000	50,000 (3,000)	
Ovalbumin	Hen egg	4.6	45,000	54,000 (9,000)	42,000 (-3,000)
Triosephosphate isomerase	Rabbit muscle	5.8	43,000	52,000 (9,000)	
α -Chymotrypsinogen A	Bovine pancreas	9	24,000	18,000 (-6,000)	24,000 (0)
Trypsinogen	Bovine pancreas	9.3	24,000	21,000 (-3,000)	
Myokinase	Pig heart	4.3	21,000	30,000 (9,000)	
Myoglobin	Whale muscle	8.1	18,000	19,000 (1,000)	19,000 (1,000)
Lysozyme	Egg white	11	14,000	1,000 (-13,000)	
Cytochrome C	Horse heart	9.0	13,000	12,000 (-1,000)	13,000 (0)
Insulin B-chain	Bovine		4,000	4,000 (0)	
Ovomucoid			28,000		55,000 (27,000)
Fetuin	Calf serum		47,000		120,000 (73,000)
Fumarase	Pig heart		205,000		160,000 (-45,000)
Ferritin	Horse spleen		750,000		500,000 (-250,000)

*Sephadex G-200カラム(2.0×50cm)、展開液0.05M Tris+0.1M KCl(pH7.5)

5. 試料負荷量

他の分離モードの高速液体クロマトグラフィの場合と同様、試料注入量が大きくなり過ぎると理論段数の低下あるいはピークの歪みなどのオーバーロード現象を起す。このオーバーロード現象は一般には溶離液粘度を低下させる、試料の溶解度を上昇させるなどの手法である程度改善することが可能であるが、たん白質の高速水溶液系ゲル透過クロマトグラフィでは有機溶媒の添加、測定温度を上昇するなどの方法は試料の性質上制限を受けることが多く、これらの手法は使用できないことが多い。図25はG3000SW (7.5mmφ×600mmの分析用標準カラム)での牛血清アルブミンの注入濃度に対するHETPの変化が示されているが⁹⁾、注入液量100μℓの場合、10mg/ml付近すなわち注入量1mg付近から急速にHETPが上昇することが理解できる。しかし、たん白質の場合、前述のように分子量の割には溶液中での分子サイズは小さく、同じ分子量で比較すると合成高分子よりも試料負荷量は大きいのが一般的である。図26は内径21.5mmφの分取用G3000SWカラムにおけるポリエチレングリコール(分子量7,500)と牛血清アルブミン(分子量66,500)の注入量とHETPの関係を示しているが、ポリエチレングリコールでは20mgの注入量付近からHETPが大きくなり始めるのに対し、牛血清アルブミンでは分子量は大きいにもかかわらず、100mg程度まで正常なHETPが得られている。ここで、試料負荷量はカラムの断面積に比例するため、分析用カラム(7.5mmφ)と分取用カラム(21.5mmφ)では同じ条件であれば8~9倍負荷量が異なることが予想されるが、管径が大きくなると充填剤粒径を大きくしても良好な理論段数が得られ、粒径効果による負荷量増加により分取用カラムは管径比から考えられるより更に10倍大きい負荷量が得られている⁴⁾。また、一般には測定流速が小さい方が高い分離能が得られるが、試料注入量が大きくなると、逆に測定流速が大きい方が小さなHETPが得られ高分離能となっているのも特徴的である。同じ注入量でも注入濃度、注入液量によって分離能は異なる。図27は分析用G3000SWカラムを使用し、たん白質5mg及び0.5mg注入する際のHETPと注入液量の関係を示しているが⁹⁾、大量(5mg)注入する場合は注入濃度を低く注入液量を増加した方が良好な結果が得られるのに対し、少量(0.5mg)注入する際はオーバーロード現象を考慮する必要がなく注入液量が少ない方が高い分離

能が得られている。一般に注入たん白質濃度は1mg/ml~20mg/mlの間が³⁾適当であることが述べられている。

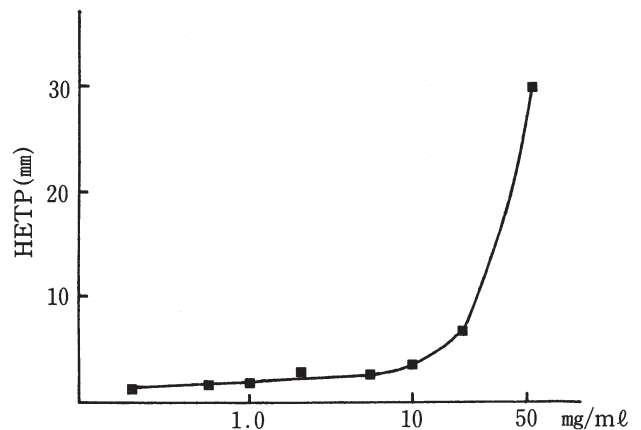


図25 注入量とHETP⁹⁾

カラム ; TSKgel G3000SW

溶離液 ; 0.1Mリン酸緩衝液

+0.2M NaCl (pH7.0)

試料 ; 牛血清アルブミン

流速 ; 1 ml/min

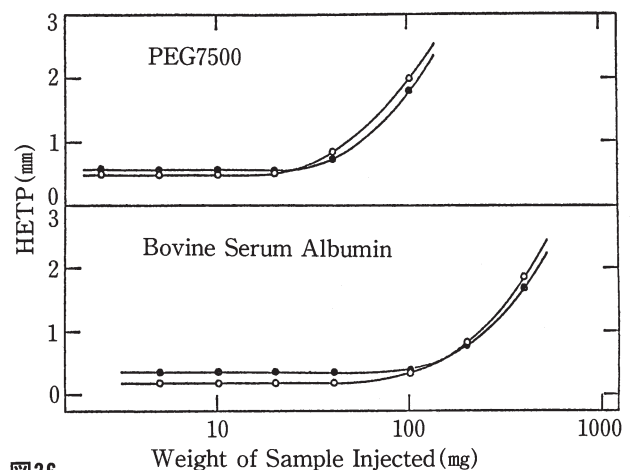


図26

Flow rate dependence of maximum sample loading on G3000SWG.

Column size: 2.15 cm I.D. x 120 cm Injection volume: 4 ml

Sample: bovine serum albumin, polyethylene glycol of molecular weight 7,500

Solvent: 0.1 M phosphate buffer containing 0.3 M NaCl (pH = 7)

Flow rate: (○) 4 ml/min, (●) 16 ml/min

Temperature: 25°C Detector: RI

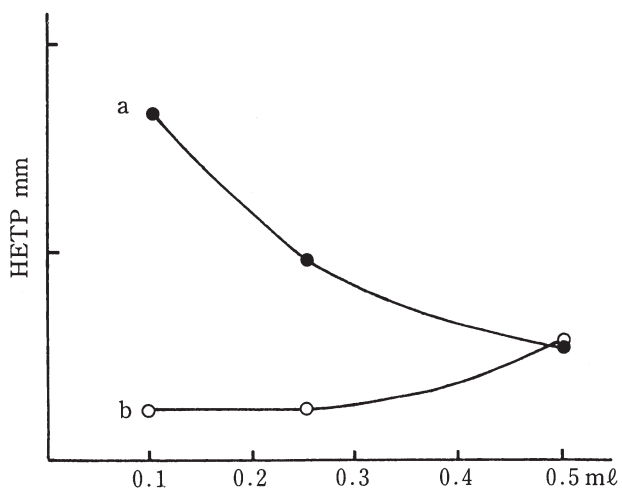


図27 注入液量と注入濃度のHETPへの影響⁸⁾

カラム TSKgel G3000SW

溶離液 0.1Mリン酸緩衝液

+0.2M NaCl (pH7.0)

流速 1 ml/min

a) 注入量 5mg

b) 注入量 0.5mg

6. 使用上の注意点

溶離液の選択、オーバーロード現象、低温測定などによる理論段数の低下はその条件下での劣化現象であり、適切な条件に戻せば通常分離能が得られるのが普通である。しかし、使用条件、保存条件によっては、化学的性質などが劣化することがあり注意を要する。カラムの劣化原因としては次の4項目が代表的である。

- 1) カラム入口側空隙の発生いわゆるトップオフ現象
- 2) 乾燥、凍結による充てん状態の変化
- 3) 充てん剤表面の変性、劣化
- 4) 吸着物質による充てん剤性質、理論段数の変化

カラム取扱説明書に記してある最高流速以上の過流速状態で使用していると、1)の入口側空隙が生じ、理論段数が低下したりピークの歪みを生じる。実際には、このような状態で使用することは考え難く、むしろ装置の溶媒を変更するために高流速で装置内を置換したままカラムを接続したり、注入バルブをゆるやかにまわしたためにおこる圧力の急変などの不注意でおこることの方が多い。また脈流の大きな送液システムでは低目に流速を設定する方が好ましく、特にクイックリターン方式のポンプ脈流はアキュムレータで充分に消す必要がある。これらの現象はSWタイプ3グレード中、特に細孔空隙容量の大きなG4000SWで注意が必要である。さらに、ストップドフロー方式の注入方法はSWタイプのカラムには使用できない。

2)の乾燥、凍結は注意しておけば問題ないが、長く使用しない時はカラム入口、出口を充分にめくらピンで締めおき、0°C以下になる可能性がある時は有機溶媒をある程度添加して保存するなどの注意が必要である。

SWタイプは前述のようにシリカゲルを基材とするために、塩基性の溶離液を使用していると3)の劣化現象を起す。溶離液の塩基性だけでなく、注入サンプルにより塩基性となることも考えられるためできるだけ溶離液は緩衝効果が強くかつ少しでも酸性側であることが望ましい。これらのことを考え、一般にはpH6.5~7.2(リン酸緩衝液など)の緩衝液がよく使用されている。かつ、試料によるpH変化はカラム入口側で顕著であり、4)の目的だけでなく、3)の現象を防ぐためにもプレカラムを使用した方が分析カラムの保護のためには望ましい。

4)の吸着現象によるカラムの劣化は、充てん剤に吸着した物質がカラムの性質を変性させることにより起るが、これらの吸着現象は主として疎水的吸着、イオンの吸着

によることが多いと考えられる。疎水的な吸着は有機溶媒の添加、測定温度の上昇などによってある程度は改善されるが、たん白質が試料である場合これらの措置を取れないことも多く、疎水性、芳香性の強い不純物を含む場合、抽出などの前処理により取り除くか、プレカラムを用いて、プレカラムに吸着させ分析カラムを保護する必要がある。また、塩基性の強い不純物を含む場合、溶離液塩濃度を増加する、pHを2~3にしてシラノールの解離を抑えるなどの手法が考えられるが、疎水性吸着同様これらの方法は測定対象物質にとって好ましくないことも多く、陽イオン交換樹脂などによる前処理が使えなければ、プレカラムで使用分析カラムを保護するのが実用的である。これらの他に、コロイド状物質など非溶解成分の吸着による劣化も考えられ、SWタイプの使用にあたってはプレカラムを使用した方が安全であろう。これらの劣化は試料からだけではなく、溶離液よりも生じ、前述のようにハロゲン系の溶離液ではステンレス鋼を基調とする液体クロマトグラフで鉄、イオンが溶出し易く、鉄イオンがSWタイプカラムに吸着しアニオン系試料まで吸着することがある。従って、溶離液にハロゲンイオンはできるだけ使用しないことが望ましく、やむを得ず使用する時は使用終了後直ちに純水などに置換しておく必要がある。さらに、ドデシル硫酸ナトリウム、グアニジンなどのたん白質変性剤を使用するクロマトグラフィに使用したカラムは、これらの変性剤が充てん剤表面に吸着されていることが多く、一般のゲル透過クロマトグラフィに使用すると異常値を示すことが多い。従って、特殊なクロマトグラフィに使用するカラムと一般の溶離液で使用するカラムは専用カラムとして区別しておく方が安全であろう。

最後に、これらの吸着現象により劣化したカラムの再生方法について経験的に述べる。疎水性あるいは芳香性物質が吸着した場合、メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジオキサンなどの有機溶媒を添加した溶媒で洗浄する、塩基性物質の吸着では硫酸カリウムなどの高塩度で洗浄する、pH2~3の緩衝液を流す。吸着性たん白質の吸着の場合、たん白質分解酵素など分解する物質で洗浄するなどの方法が考えられるが、60cmの分析カラムでは時間が必要なため現実的でない。しかし、プレカラムでは分析カラムの1/3程度でありかつ圧力もかからないためベリスタポンプな

どで前述の溶媒を1～2日流すことにより回復することがあり、このような時には2本のプレカラムを準備して交互に洗浄、分析に使用することが可能である。

文 献

- 1) K. Fukano, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto
J. Chromatogr. 166(1978)47
- 2) T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura, Y. Kato J.
Polymer Sci. 16(1978)1789
- 3) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto J.
Chromatogr. 193(1980)311
- 4) 海野益郎
化学工業 33(1982)351
- 5) 高松 享
化学工業 32(1981)1057
- 6) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto J.
Chromatogr. 190(1980)297
- 7) E. Pfannkoch, K. C. Lu, F. E. Regnier J.
Chromatogr. Sci. 18(1980)430
- 8) 星 猛、堀尾武一、監修、大澤一爽・田中善喜 編集
巨大粒子のゲルパーミエーションクロマトグラフィ
生体粒子の粒径分離 (喜多見書房)
- 9) 堀尾武一・山下仁平 編集
蛋白質・酵素の基礎実験法 (南江堂)

※“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) 6636-3733	〒104-0028	東京都中央区八重洲2-2-1
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) 710-6694	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前3-8-10
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/>