

TOYOPEARL®

ゲルろ過剤トヨパール

充てん法マニュアル



東ソー株式会社

TOSOH

ご使用前に



- 本製品を使用する前に、必ずこの取扱説明書をよく読んで理解してください。
 - この取扱説明書は、いつも手元においてご使用ください。
 - 製品本来の使用法および取扱説明書で指定した使用法を守ってください。
 - 本書の安全に関する指示に対しては、指示内容を理解の上、必ず従ってください。
- 以上の指示を必ず厳守してください。
指示に従わないと、けがや事故の恐れがあります。

【取扱説明書について】

- 取扱説明書の内容は、製品の性能・機能の向上により将来予告なしに変更することがあります。
- 取扱説明書の全部または一部を無断で転載、複製することは禁止しています。
- 取扱説明書を紛失したときは、弊社営業担当者までお問い合わせください。
- 取扱説明書の内容に関しては万全を期していますが、万一不審な点や誤り、記載漏れに気づいたときは、お手数ですが巻末の連絡先までご連絡ください。

安全上のご注意

- ご使用前に、この「安全上のご注意」をよくお読みのうえ、正しくお使いください。
- この項目は、いずれも安全に関する内容ですので、必ず守ってください。
- 「警告」「注意」の意味は次のようになっています。

 警告	取扱いを誤った場合、使用者が死亡または重傷を負う可能性が想定されるもの。
 注意	取扱いを誤った場合、使用者が傷害を負う可能性が想定されるものまたは物的損害の発生が想定されるもの。

ご使用时

警告

- **火気厳禁**
 - 引火性のある溶媒を使用する場合、火気の使用は厳禁です。火災、爆発の原因になります。

注意

- **換気に注意を**
 - 引火性、毒性のある溶媒を使用する場合、十分換気をしないと火災、爆発、中毒の原因になります。
- **液漏れに注意を**
 - 溶媒等の液漏れは、感電、中毒、薬傷、火災、腐食などの原因になります。液漏れの場合は、適切な保護具を着用し、液を取り除いてください。

注意

● 保護具の着用を

- 有機溶媒や酸などの溶離液を取扱う場合は、保護メガネ、手袋などの保護具をご使用ください。薬傷を負う恐れがあります。

● 容器の取扱いに注意を

- 保存温度および取扱いが不適切であると、容器が破裂、破損する可能性があります。取扱いには十分注意してください。

● 適切な使用方法を

- 本パルクゲルは分離、精製等に用いるもので、それ以外の目的には使用しないでください。

● 圧力に注意を

- 本パルクゲルのカラムへの充てん時、または充てん後のカラム使用時に、送液ポンプ等により圧力を過度に加えると十分な性能が得られないことやカラムの破裂、ゲルの飛散等の可能性があります。本取扱説明書に記載された規定圧力以上にならないよう注意してください。
- 適切な保護具を着用し、十分注意して作業をおこなってください。

● 分離精製物の取扱いに注意を

- 得られた分離精製物または精製溶液を製品あるいは中間体として使用する場合は、十分にその安全性の確認をおこなってご使用ください。

● 処分には適切な処理を

- 廃棄する場合は、産業廃棄物として適切な処置をおこなってください。
- 不要になった容器は、溶媒が残らないように処置・洗浄し、材質別に適切に処分してください。

トヨパールをお買い求めいただき、ありがとうございます。

このマニュアルをご覧いただき、より優れたカラムを作成し、ご利用くださいますようお願い申し上げます。

なお、この内容は、充てんに関する「トヨパールニュース」No.3,No.4,No.5,No.6, No.20,No.40,No.41をまとめたものです。

したがって、これらのNo.のトヨパールニュースは廃刊としました。

目 次

1. はじめに	1
1-1 注意点	1
1-2 カラム	2
2. 微粒子の除去とゲルスラリーの調製	3
2-1 微粒子の除去	3
2-2 ゲルスラリーの調製	4
3. ペリスタリックポンプを用いる充てん法	5
3-1 定流速充てん法	5
3-2 半定圧充てん法	7
4. 自然落差による充てん法	10
4-1 リザーバーを用いる充てん法	10
4-2 簡易充てん法	12
5. 洗浄, 再生	13
6. 保 存	14

1. はじめに

トヨパールは、粒子径あるいは機械的強度などの基礎物性が、デキストランゲルのような軟質ゲルと、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用充てん剤との中間の性質を有する充てん剤です。

このことは、トヨパールをカラムに充てんする場合にもあてはまり、自然落差充てん法からポンプによる加圧充てん法まで幅広く充てんすることができます。

本マニュアルでは、充てんに注意を要するゲルろ過剤トヨパールHWタイプについて説明します。

表1に主な充てん法の特徴と必要な用具を示しました。お客様の事情により最も好ましい方法を選んでお試しく下さい。

1-1 注意点

以下にトヨパールHWの充てんをおこなうに当たっての注意点を示します。

- a トヨパールの充てんは、緩やかな加圧（50～数100 kPa）下でおこなうのが適切です。この観点からペリスタリックポンプを使用する充てん法をお勧めします。HPLC用充てん剤の場合のように高压下での充てんは、お勧めできません。
- s 簡便法である自然落差充てん法の水圧では、トヨパールは、つぶれません。む

表1 各種充てん法の比較

項 目		ペリスタリックポンプによる充てん法		自然落差による充てん法	
		1. 定流速法	2. 半定圧法	3. リザーバー使用法	4. 簡易法（加温）
特 徴	充てん流速	○速い	◎速い （1よりも速い）	×遅い	×遅い （3よりも速い）
	使用流速	○大きいところまで可能	○大きいところまで可能	×使用流速が制限される	×使用流速が制限される
	充てんにおける再現性	○良い	◎非常に良い	○良い	○良い
必要 な 器 具	ポンプ	×必要	×必要	×必要	○不要
	リザーバー	×必要	×必要	×必要	○不要
	圧力計	△使用する方が良い	×必要	○不要	○不要

〔○長所、×短所〕

しろ、水圧が大きい方が性能の良いカラムが得られます。また充てん溶媒を加熱し粘性を下げるなどして、充てん流速を大きくすることも良い効果をもたらします。

- d ゲル懸たく液中に浮遊微粒子が存在すると、フィルターが目づまりし、圧力上昇、流速低下が起こります。デカンテーションにより浮遊物を捨ててください。(2-1微粒子の除去 参考)

1-2 カラム

- a 耐圧性300 kPa程度のカラムが適切ですが、普通のガラスカラムでも十分使えます。
- s カラムがあまり細すぎると、分離に乱れが生じます。内径1.5 cm以上のカラムをご使用ください。

2. 微粒子の除去とゲルスラリーの調製

2-1 微粒子の除去

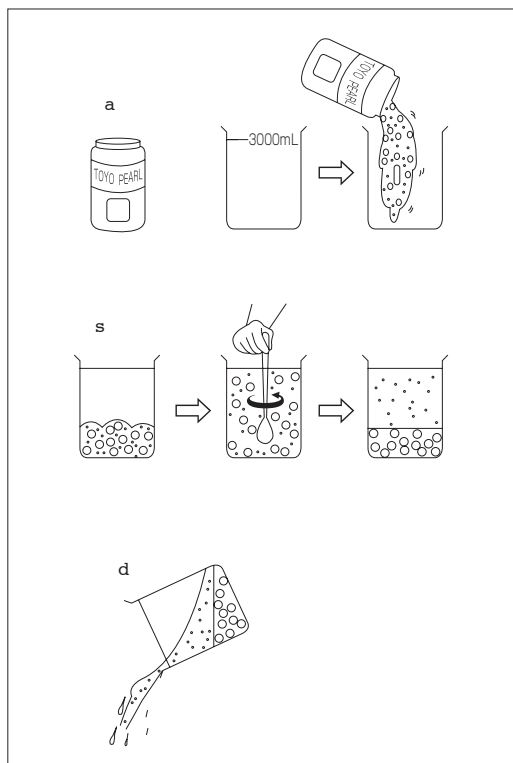
a ゲル 500 mL を 3 L のビーカーに移します。

s 蒸留水を加えて全体を 2 L にし、攪拌して、静置します。

注 静置時間はグレード（粒子径のちがい）によって異なりますが、HW-55 の場合、Coarse グレードで 15～30 分、Fine グレードで 30～45 分、Super Fine で 60～90 分程度が必要です。

d 上澄み液（微粒子含む）を捨てます。

f s～d までの操作を 3 回程度くりかえします。



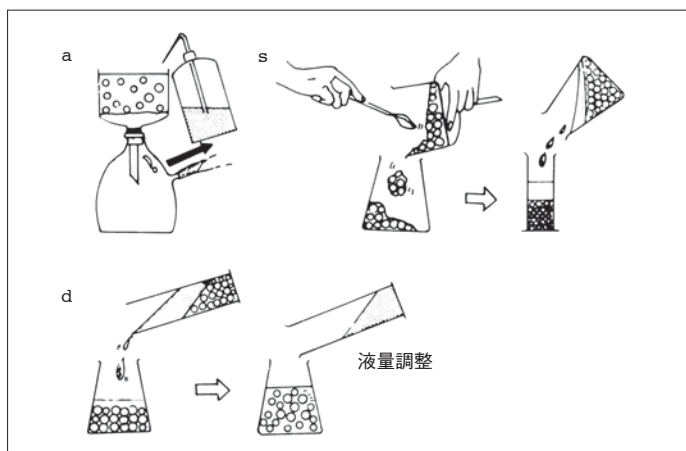
微粒子の除去

2-2 ゲルスラリーの調製

- a デカンテーションで微粒子を除去したゲルを、ゲル容積の3倍量の充てん溶媒で2回ほど洗浄します。
- s 洗浄後、カラム容積の1.2倍量のゲルをメスシリンダーで計量します。標準的なカラムサイズと必要なゲル量の目安を下記に示します。

カラムサイズ 内径 (cm) × 長さ (cm)	ゲル量 mL
1.5 × 80	170
2.2 × 80	360
4.4 × 30	550
4.4 × 60	1100

- d スラリー濃度が30～50 %になるように充てん溶媒を加えてスラリー化します。



ゲルスラリー溶液の調製

3. ペリスタリックポンプを用いる充てん法

グレード、タイプ毎に条件が異なります。

3-1 定流速充てん法

長所：充てん流速が早い。

：使用流速が大きいところまで可能である。

短所：ペリスタリックポンプが必要である。

：リザーバーが必要である。

—充てんまで—

a 図のように用具をセットします。出口に栓をします。

注 ・リザーバーはカラムによって代用可能です。

・充てんしようとするカラムと同一内径でより長いものが適当です。

s 図のように、ペリスタリックポンプ（以下ポンプと略します）のネジをいっばいに閉めます。

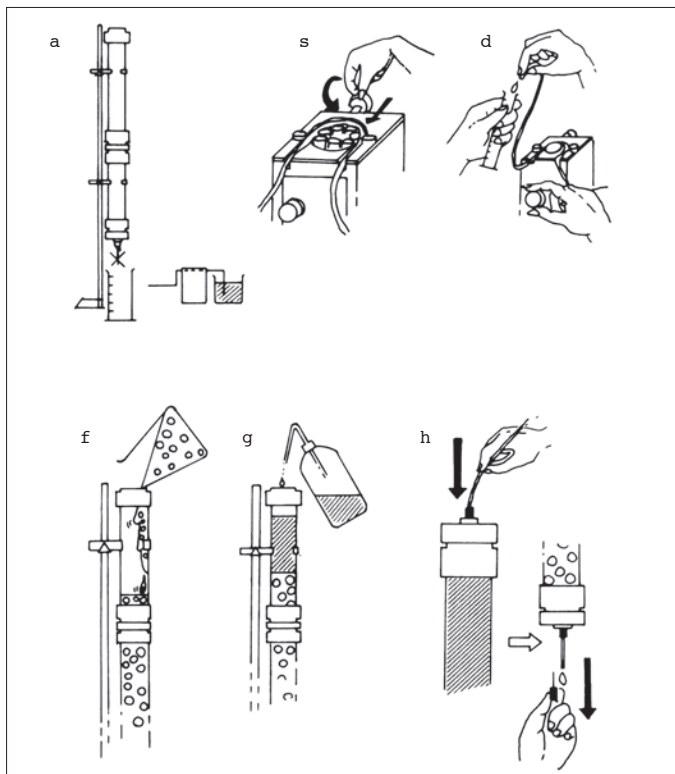
d ポンプのスイッチを入れ、CONTROLのつまみで適正な流量に調整します。

Fineグレードの好ましい流速範囲を下記の表に示します。Super FineグレードではFineグレードの約半分、CoarseグレードではFineグレードの約2倍が目安となります。

表2 各種ゲルの充てん流速

グレード	カラムサイズ 内径(cm)×長さ(cm)	流 速	
		絶対流速 mL/min	線 速 cm/h
HW-40F	1.0×60	1.0～ 1.4	70～110
	1.6×60	2.4～ 3.0	70～ 90
	2.2×60	4.0～ 5.0	60～ 80
	4.4×60	10.0～14.0	40～ 60
HW-55F	1.6×60	2.0～ 3.0	60～ 85
HW-50F	3.2×60	6.0～ 9.0	45～ 65
HW-60F	4.4×60	1.0～ 6.0	45～ 65
	2.2×30	6.0～ 8.0	95～130
	2.2×45	4.0～ 6.0	65～ 90
	2.2×60	3.0～ 5.0	50～ 70
	2.2×90	2.4～ 3.0	35～ 55
HW-65F	2.2×60	2.5～10.0	40～150
HW-75F	2.2×60	2.5～10.0	40～150

- f ゲルスラリーを十分攪拌した後、注意深く一度にリザーバーに注入します。
- g 充てん溶媒でリザーバーを満した後、フタをします。
- h ポンプからの管をリザーバーに接続して、ポンプのスイッチを入れ、速やかに出口を開きます。途中で流速が落ちてそのまま流しつづけます。
- j 一度に充てんできない場合は、上澄み液を除きゲルスラリーを追加し充てんします。少なくともベッド体積の3倍以上の溶出液を流し、ゲルベッドを平衡化してください。



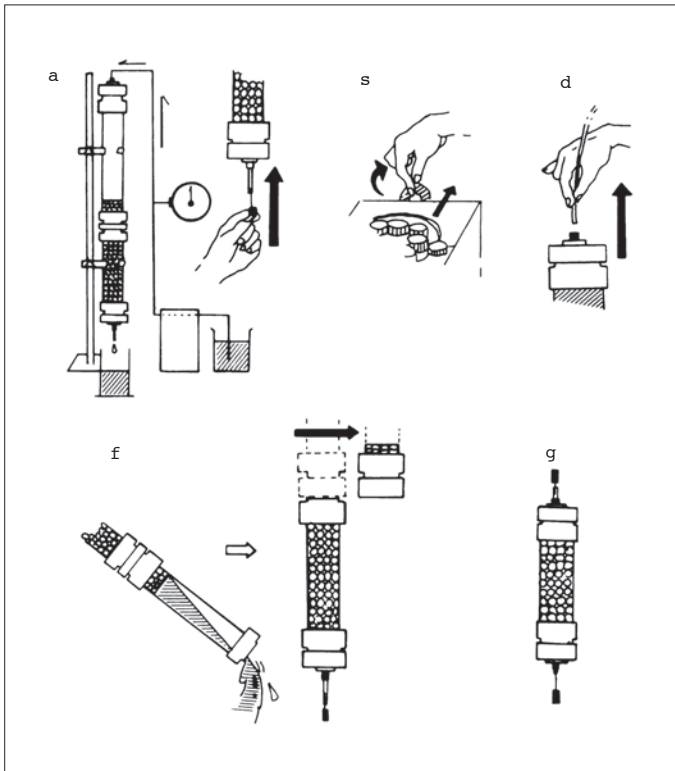
定流速充てん法（充てんまで）

—充てん終了後—

- a 出口に栓をします。
- s ポンプのスイッチを切り、図のようにネジをいっぱいゆるめます。
- d ポンプからの管をリザーバーからはずします。
- f リザーバーに残っている充てん溶媒を捨て、カラムからリザーバーをはずします。

このときリザーバーに残っているゲルがこぼれ落ちないように注意してください。

g フタをしめ、栓をします。



定流速充てん法（充てん終了後）

3-2 半定圧充てん法

長所：定流速充てん法より充てん流速が速い。

：使用流速が大きいところまで可能である。

：充てんの再現性が非常に良い。

：適正流速範囲が広く、ゲルの種類による依存性が小さい。

短所：ペリスタリックポンプが必要である。

：圧力計が必要である。

：リザーバーが必要である。

— 充てんまで —

a 図のように用具をセットします。出口には栓をします。

注 ・リザーバーはカラムによって代用可能です。充てんしようとするカラムと同一内径で、より長いものが適当です。

s 図のようにペリスタリックポンプ（以下ポンプと略します）のネジをいっぱい閉めCONTROLのつまみをMAXに合わせます。

d 図のように栓をした後、ポンプのスイッチを入れます。

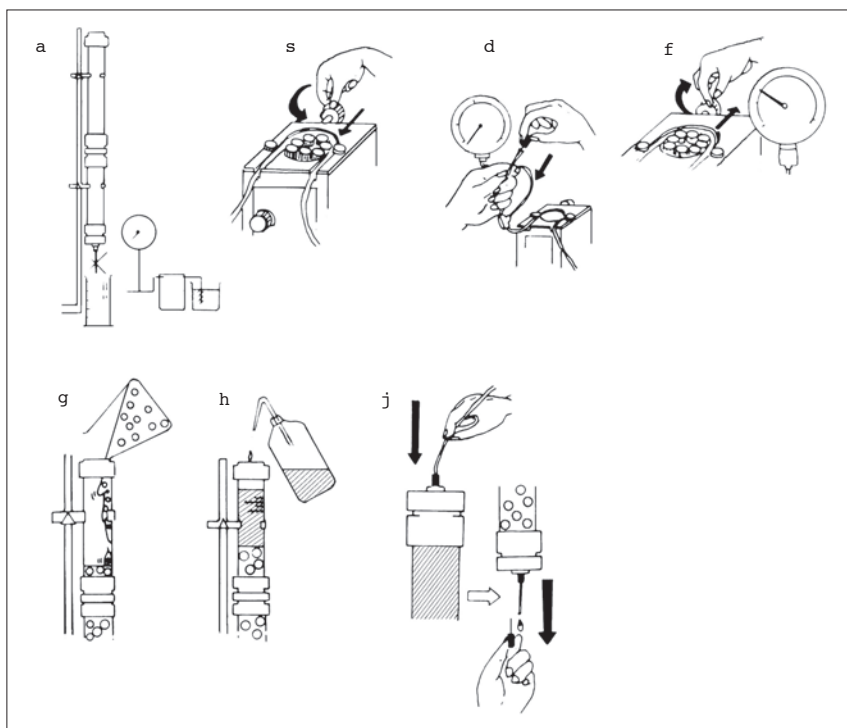
f 図のようにポンプのネジを徐々にゆるめ、圧力150～200 kPaに調整しておきます。

g ゲルスラリーを十分攪拌した後、注意深く一度にリザーバーに注入します。

h 充てん溶媒でリザーバーを満たし、フタをします。

j ポンプからの管をリザーバーに接続してポンプのスイッチを入れ、すみやかに出口を開きます。

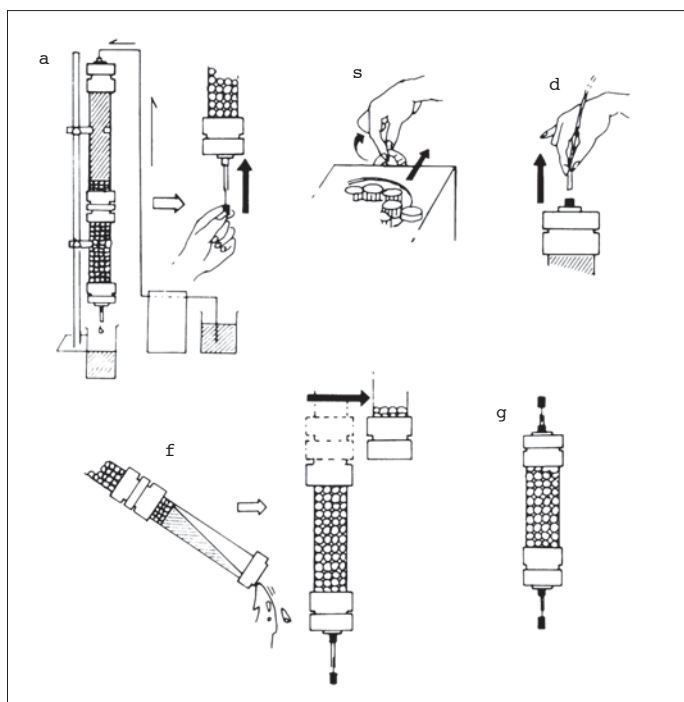
少なくともベッド体積の3倍以上の溶出液を流し、ゲルベッドを平衡化してください。



半定圧充てん法（充てんまで）

— 充てん終了後 —

- a 出口に栓をします。
- s ポンプのスイッチを切り、図のようにネジをいっぱいにゆるめ、圧力を抜いてください。
- d ポンプからの管をリザーバーからはずします。
- f リザーバーに残っている充てん溶媒を捨て、カラムからリザーバーをはずします。このときリザーバーに残っているゲルがこぼれ落ちないように注意してください。
- g フタをしめ栓をします。



半定圧充てん法（充てん終了後）

4. 自然落差による充てん法

4-1 リザーバーを用いる充てん法

長所：ポンプが不要である。

：圧力計が不要である。

短所：充てん流速が遅い。

：使用流速が制限される。

—充てんまで—

a 図のように用具をセットします。出口と溶媒タンクに栓をします。

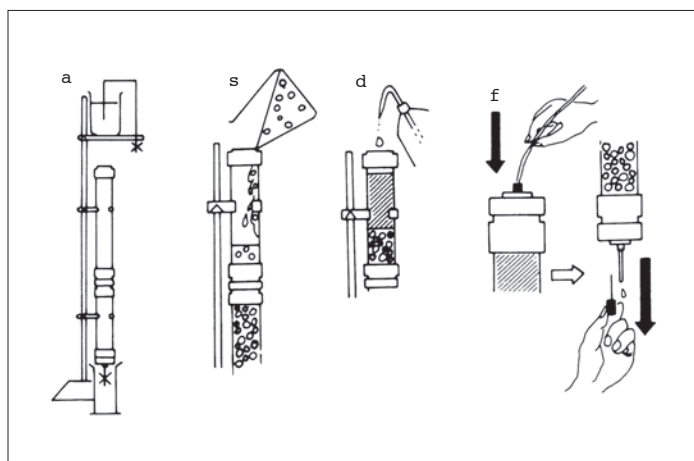
☒ ・溶媒タンクの位置は、高いほど性能の良いカラムが得られます。

・リザーバーはカラムによって代用可能です。充てんしようとするカラムと同一内径で、より長いものが適当です。

s ゲルスラリーを十分攪拌した後、注意深く一度にリザーバーに注入します。

d 充てん溶媒でリザーバーを満たした後、フタをします。

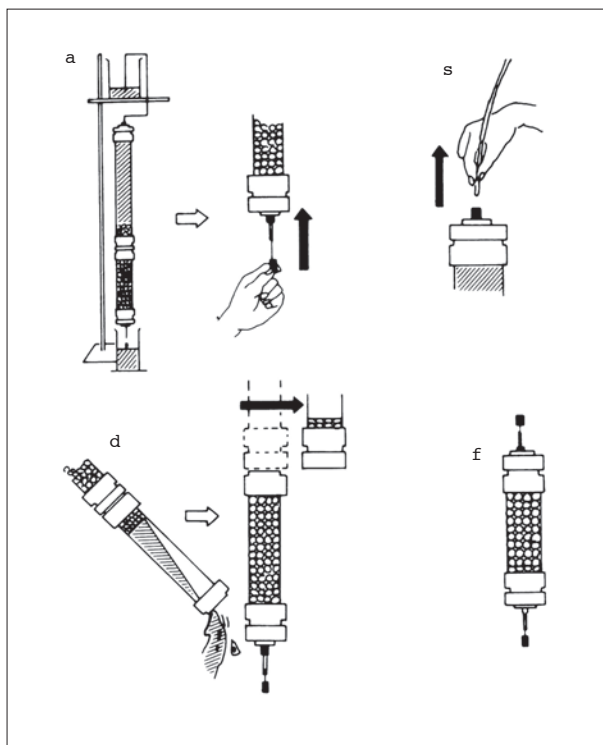
f 溶媒タンクからの管をリザーバーに接続して、速やかに出口を開きます。少なくともベッド体積の3倍以上の溶出液を流し、ゲルベッドを平衡化してください。



リザーバーを用いる充てん法（充てんまで）

— 充てん終了後 —

- a 出口に栓をします。
- s 溶媒タンクからの管をはずします。
- d リザーバーに残っている充てん溶媒を捨て、カラムからリザーバーをはずします。このとき、リザーバーに残っているゲルがこぼれ落ちないように注意してください。
- f フタをしめ、栓をします。



リザーバーを用いる充てん法 (充てん終了後)

4-2 簡易充てん法

長所：ポンプが不要である。

：圧力計が不要である。

：リザーバーが不要である。

短所：充てん流速が遅い。

：使用流速が制限される。

—充てんまで—

a 図のように用具をセットします。出口に栓をします。

注 ●ロートの位置は、高いほど性能の良いカラムが得られます。

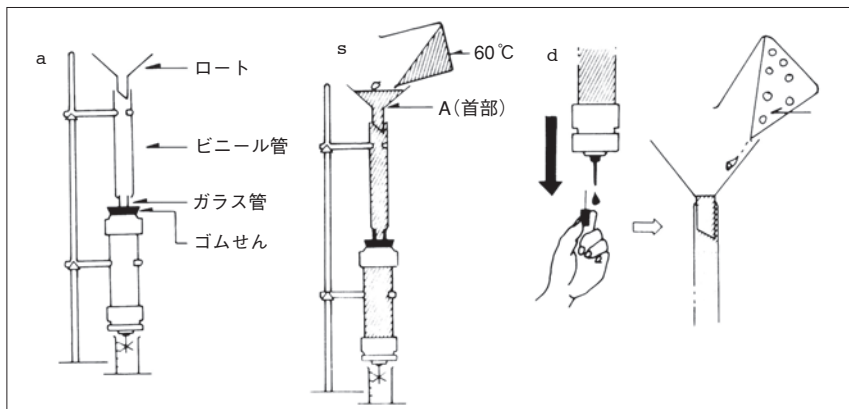
●ガラス管は、内径：1.5 cm以上、長さ：ゴム栓の長さ+2 cm～3 cmが適当です。

s 60℃に加熱した溶媒をロートより注ぎ、Aの位置より、やや高く張りこみます。

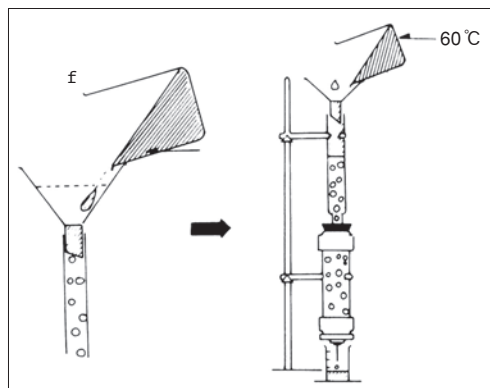
d 出口の栓を開き、溶媒がAの位置になった時点で60℃に加熱し、十分に攪拌したゲルスラリー液をロートに注ぎこみます。

f 所定のゲルスラリー液の供給終了後、Aの位置までゲルスラリー液が下降したら、充てん溶媒をロートに注ぎ始めます。充てん終了まで、常に溶媒がAの位置以上にあるようにしてください。そして、少なくとも最初のカラム内に張り込んだ液量も含めて、ベッド体積の約4倍の溶出液を流し、ゲルベッドを平衡化してください。

注：充てん途中でゲルがガラス管およびビニール管に詰まり、流速が低下することがあります。この場合には、ガラス管やビニール管に詰まったゲルを抜き出し、さらに通液をつづけてください。



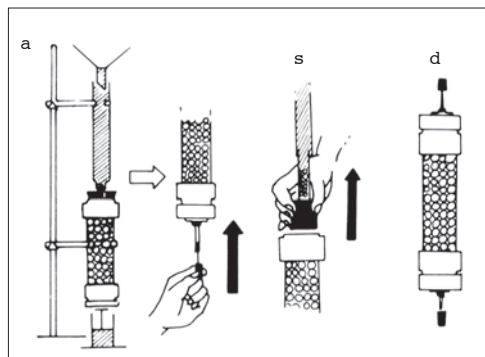
簡易充てん法（充てんまで）



簡易充てん法（充てんまで）〔前ページ図のつづき〕

—充てん終了後—

- a 出口に栓をします。
- s カラムからゴム栓をはずします。このときガラス管に残っているゲルが、こぼれ落ちないように注意してください。
- d フタをしめ、栓をします。



5. 洗浄, 再生

使用済みのゲルは、再生してくり返し使用することができます。ゲルに吸着して溶出しにくい物質が残った場合、以下の方法を試みてください。再生は、ゲルの汚れの程度により異なるのでおおよその目安を示します。洗浄・再生法は、バッチ法とカラム法の2つの方法が考えられます。

5-1 バッチ法

必要液量は、ゲル体積の3～5倍でピーカー中で軽く攪拌、放置をくり返した後、デカンテーションにより、上澄み液を捨てます。この操作を2～3回くり返します。

- (a) a. 0.1～0.5 mol/L NaOH→水洗→溶離液で平衡化
b. 0.1～0.5 mol/L HCl→水洗→0.1～0.5 mol/L NaOH→水洗→溶離液で平衡化
- (b) アルコール，アセトン等の有機溶媒→水洗→溶離液で平衡化

5-2 カラム法

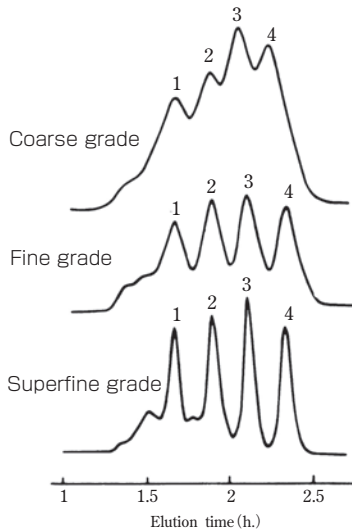
トヨパールは、強度に優れ、いろいろの条件によって容積変化をおこし難いので、カラム中で容易に再生できます。洗浄液はバッチ法と同じです。

- カラム法の利点
 1. 充てんする手間が最初の一回ですむ。
 2. 再現性がよい。
 3. ポンプを使えば早い。
 4. 洗浄効果が高い（バッチ法と比べると少ない液量でよく洗浄できる。）

6. 保 存

ゲルは20%エタノール水溶液中で、室温（4℃～35℃）で保存してください。

粒径が小さくなるほど分離能が上がります。
分析の場合には、Superfine をおすすめします。



粒子径の違いによる分離能の比較

ゲル： TOYOPEARL HW-55
 ゲルベット： 2.6cm×70cm
 溶出液： 1/30mol/Lりん酸緩衝液 (pH7.0, 0.2mol/L NaCl)
 流速： 106mL/h (20mL/(h・f))
 温度： 25℃
 試料： 1mL
 1 チログロブリン (0.3%) M.W670×10⁶
 2 γ-グロブリン (0.3%) M.W160×10⁶
 3 β-ラクトグロブリン (0.3%) M.W 37×10⁶
 4 チトクローム-C (0.1%) M.W 12×10⁶
 検出： UV280nm



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G	☎(06)6344-3857	〒530-0004	大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店	バイオサイエンスG	☎(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