



SEPARATION REPORT

TSK-GEL PWタイプによる水溶性オリゴマのGFC測定 —PW_{XL}シリーズを用いて—

— 目 次 —

	ページ
1. はじめに	1
2. 特徴	1
2-1 カラム性能	1
2-2 校正曲線	2
3. 代表的な測定例	2
3-1 オリゴ糖	2
3-2 オリゴヌクレオチド	3
3-3 ペプチド	4
3-4 ポリエチレングリコール (PEG)	5
4. PW _{XL} シリーズと従来のPWシリーズの比較	6
4-1 従来のPWシリーズ60cmカラムとの比較	6
4-2 従来のPWシリーズ30cmカラムとの比較	7
5. TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW _{XL} の比較	7
6. 分離能を向上させるための方法	8
6-1 カラム長さ	8
6-2 流速	8
6-3 温度	9
7. 低分子物質の溶出挙動	10
7-1 アミノ酸	10
7-2 核酸関連物質	10
7-3 アルコール類	11
8. 疎水性相互作用の抑制方法	12

1. はじめに

高性能ゲル透過クロマトグラフィ用でお使い頂いているTSK-GEL PWシリーズを更に高性能化したPW_{XL}シリーズを販売しています。

表-1に示すようにPW_{XL}シリーズには6種類の一般用のPW_{XL}シリーズに加えてオリゴマ分離用のTSKgel G-Oligo-PWと核酸分離用のTSKgel G-DNA-PWの専用カラムがあります。PW_{XL}シリーズの概要についてはすでにセパレーションレポートNo.37に記載してあります。

従って、ここではTSKgel G-Oligo-PW、TSKgel G2500PW_{XL}およびTSKgel G3000PW_{XL}のようなポアサイズの小さいグレードでの水溶性オリゴマの分離について述べることにし、基礎的な性質、代表的な応用例、従

来のPWシリーズとの比較、TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}との比較、分離能の改良方法、低分子物質の溶出挙動、疎水性相互作用の抑制方法などについて詳述します。

2. 特 徴

2-1 カラム性能

PW_{XL}シリーズと従来のPWシリーズのカラム性能を表-2に示します。PW_{XL}シリーズでは小さな粒子径を用いているため保証理論段数は従来のPWシリーズに比べて約2.8倍以上あります。PW_{XL}シリーズのカラムサイズはすべて7.8mmID×30cmを使用しています。

表-1 PW_{XL}シリーズの特徴

カラム	粒 径 μm	保証理論段数×1 (TP/Column)	排除限界分子量×2			カラム寸法 mmID.cm
			ポリエチレ ンオキシド	デキストラ ン	タンパク質	
TSKgel G2500PW _{XL}	6	14,000	5×10 ³			7.8×30
TSKgel G3000PW _{XL}	6	14,000	8×10 ⁴	2×10 ⁵	8×10 ⁵	
TSKgel G4000PW _{XL}	10	10,000	4×10 ⁵	1×10 ⁶	(>4×10 ⁶)	
TSKgel G5000PW _{XL}	10	10,000	1×10 ⁶	(>2.5×10 ⁶)	(>1×10 ⁷)	
TSKgel G6000PW _{XL}	13	7,000	(2×10 ⁷)	(> 5×10 ⁷)	(>2×10 ⁸)	
TSKgel GMPW _{XL}	13	7,000	(2×10 ⁷)	(> 5×10 ⁷)	(>2×10 ⁸)	
TSKgel G-Oligo-PW	6	14,000	5×11 ³			7.8×30
TSKgel G-DNA-PW	10	10,000	2×10 ⁷			

(注) ×1 理論段数測定の溶離条件

溶離液；蒸留水

流 速；1.0ml/min

試 料；1%エチレングリコール20μl

×2 ()内数値は予想値

表-2 PW_{XL}シリーズとPWシリーズの比較

カラム	PW _{XL} シリーズ		PWシリーズ					
	7.8mmID×30cm		7.5mmID×30cm		7.5mmID×60cm		21.5mmID×60cm	
	粒径(μm)	TP/column	粒径(μm)	TP/column	粒径(μm)	TP/column	粒径(μm)	TP/column
TSKgel G2500PW	6	14,000	10	5,000	10	10,000	17	5,000
TSKgel G3000PW	6	14,000	10	5,000	10	10,000	17	5,000
TSKgel G-Oligo-PW	6	14,000	—	—	—	—	—	—

2-2 校正曲線

図-1にTSKgel G-Oligo-PW、TSKgel G2500PW_{XL}およびTSKgel G3000PW_{XL}のPEGでの校正曲線を示します。他の標準物質で測定した校正曲線は後で示します。

3. 代表的な測定例

3-1 オリゴ糖

図-2、3にTSKgel G-Oligo-PW 2本でのデキストランT-40加水分解物とβ-シクロデキストリン加水分解物のクロマトグラムをそれぞれ示します。

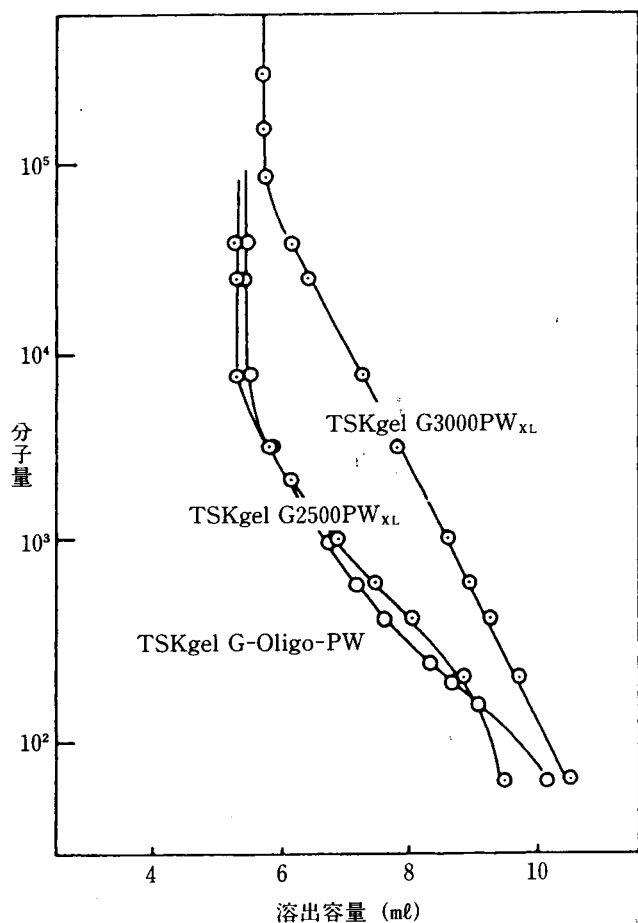


図-1 ポリエチレングリコールによる校正曲線

カラム寸法; 7.8mmID×30cm

試料; 標準ポリエチレングリコール

溶離液; 蒸留水

流速; 1.0ml/min

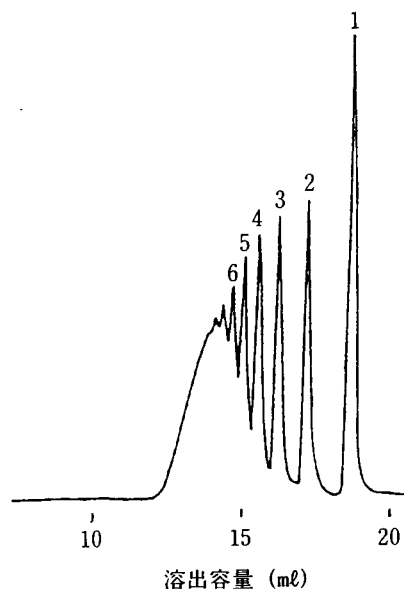


図-2 オリゴ糖の分離(1)

カラム; TSKgel G-Oligo-PW

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; デキストランT-40加水分解物

溶離液; 蒸留水

流速; 1.0ml/min

温度; 60°C

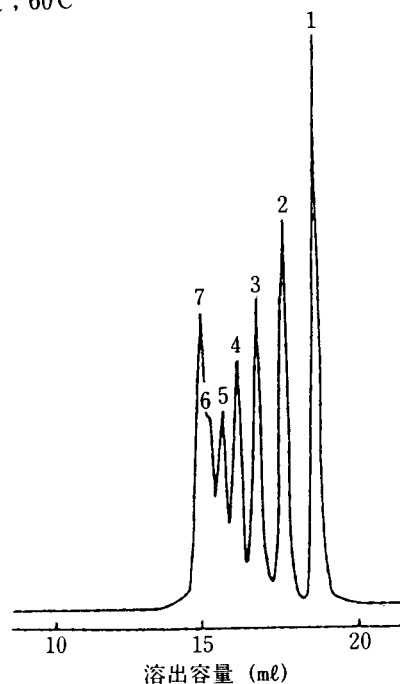


図-3 オリゴ糖の分離(2)

カラム; TSKgel G-Oligo-PW

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; β-シクロデキストリン加水分解物

溶離液; 蒸留水

流速; 1.0ml/min

温度; 60°C

図-4にそのクロマトグラムから得られたオリゴ糖の較正曲線を示しました。

図-5にTSKgel G-Oligo-PW 2本でのキトオリゴ糖の溶出パターンを示します。

3-2 オリゴヌクレオチド

図-6にTSKgel G2500PW_{XL} 2本でのオリゴヌクレオチドの分離を示しました。またそのクロマトグラムか

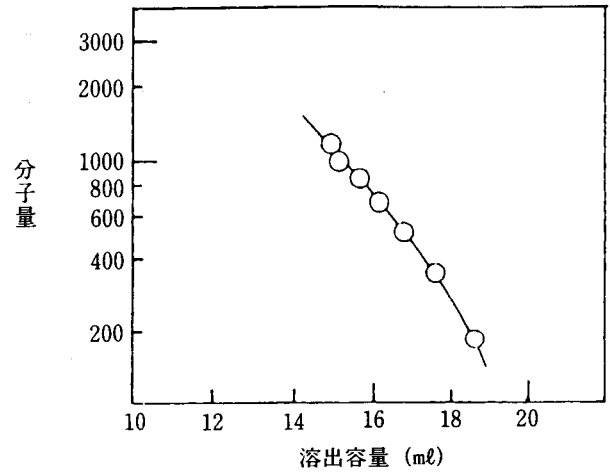


図-4 β -シクロデキストリン加水分解物による較正曲線

カラム; TSKgel G-Oligo-PW

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; β -シクロデキストリン加水分解物

溶離液; 蒸留水

流速; 1.0ml/min

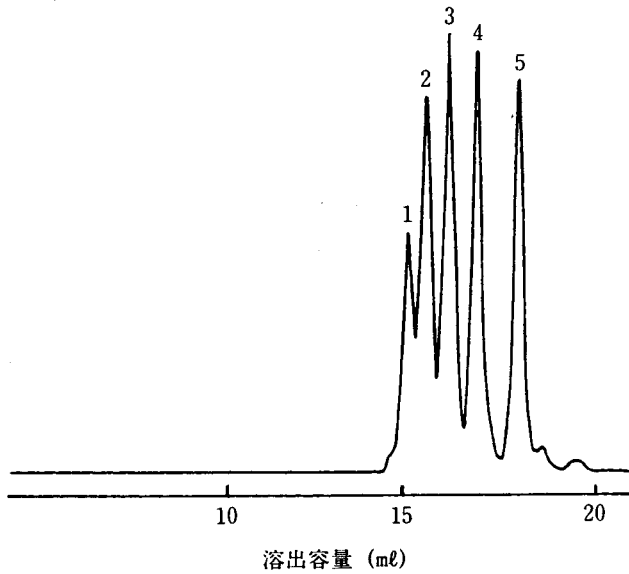


図-5 キトオリゴ糖の分離

カラム; TSKgel G-Oligo-PW

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; キトオリゴ糖

1. キトヘキサオース
2. キトペンタオース
3. キトテトラオース
4. キトトリオース
5. キトビオース

溶離液; 蒸留水

流速; 1.0ml/min

温度; 60°C

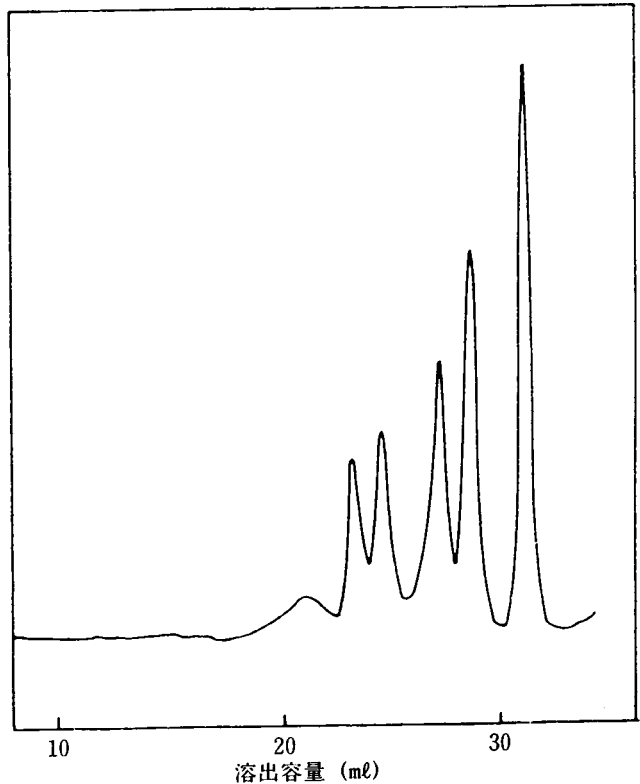


図-6 オリゴヌクレオチドの分離

カラム; TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; アデニンオリゴマ_p(dA)_n

溶離液; 0.02M りん酸緩衝液(pH6.8)+0.2M NaCl

流速; 1.0ml/min

検出器; UV260nm

ら得られた較正曲線を図-7に示しています。従来、高性能GFCによるオリゴヌクレオチドの分離については他に例がなく本例は先駆的な応用例です。

3-3 ペプチド

図-8にTSKgel G3000PW_{XL}を2本使用した生理活性ペプチドの分離例を示し、図-9にそのクロマトグラムから得られた較正曲線を示しました。溶離液としては0.1%のトリフルオロ酢酸を含む45%アセトニトリル水溶液が用いられています。セパレーションレポートNo.37で詳述したように一般にペプチドのGFCは従来極めて困難とされており、本例はたいへん貴重な例と言えます。

溶離液に不揮発性の塩類が含まれておらず、試料の回収が容易な点にも特徴があります。またPW_{XL}シリーズは代表的な水溶性有機溶媒の50%溶液の使用が可能ですので本例はその特徴を活用した例とすることができます。

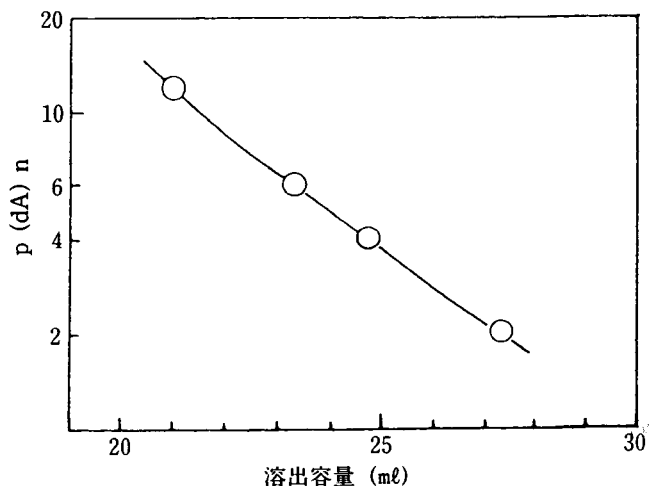


図-7 オリゴヌクレオチドによる較正曲線

カラム; TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; アデニンオリゴマ p(dA)n

溶離液; 0.02Mりん酸緩衝液(pH6.8)+0.2M NaCl

流速; 1.0ml/min

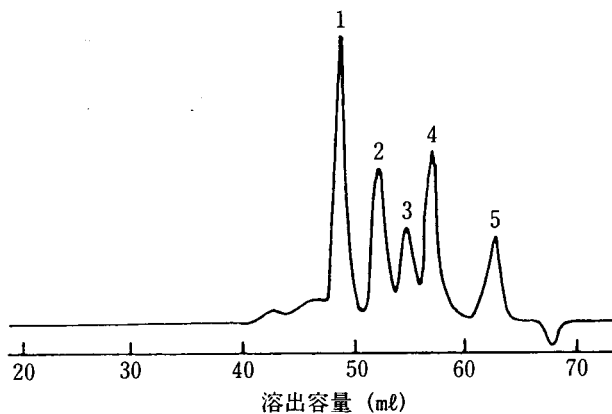


図-8 ペプチドの分離

カラム; TSKgel G3000PW_{XL}

カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2

試料; ペプチド

1. アプロチニン
2. インスリンB鎖
3. α-MSH
4. ブラジキニンポテンシエータC
5. グルタチオン

溶離液; 0.1% TFA/45%アセトニトリル

流速; 0.3ml/min

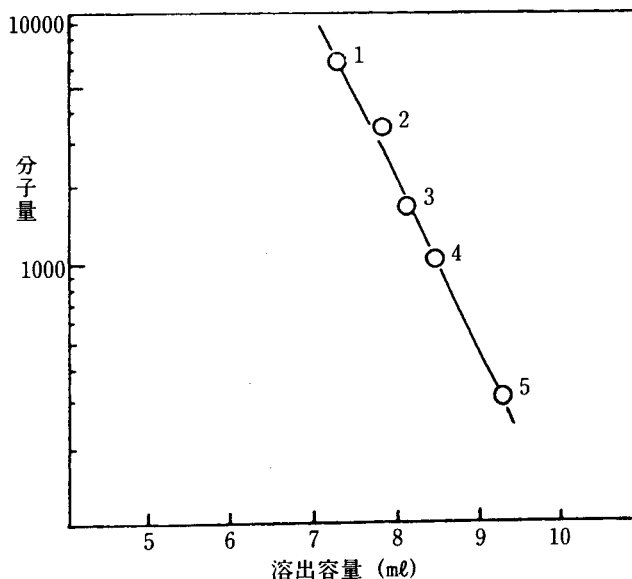


図-9 ペプチドによる較正曲線

カラム; TSKgel G300PW_{XL}

カラム寸法; 7.8mmID×30cm

試料; 1. アプロチニン(6500)

2. インスリンB鎖(3400)

3. α-MSH(1665)

4. ブラジキニンポテンシエータC(1052)

5. グルタチオン(307)

溶離液; 0.1% TFA/45%アセトニトリル

流速; 1.0ml/min

3-4 ポリエチレングリコール (PEG)

図-10、11および12にTSKgel G-Oligo-PW、TSKgel G2500PW_{XL}およびTSKgel G3000PW_{XL}のPEGの溶出曲線をそれぞれ示します。

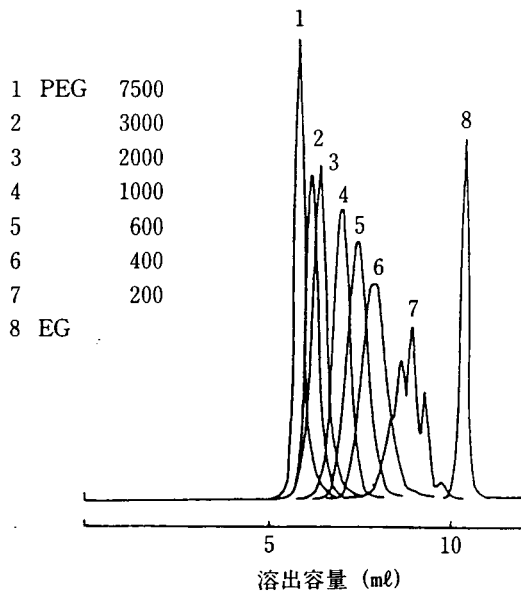


図-10 ポリエチレングリコールの分離(1)

カラム；TSKgel G-Oligo-PW
 カラム寸法；7.8mmID×30cm
 試料；ポリエチレングリコール(PEG)
 溶離液；蒸留水
 流速；1.0ml/min

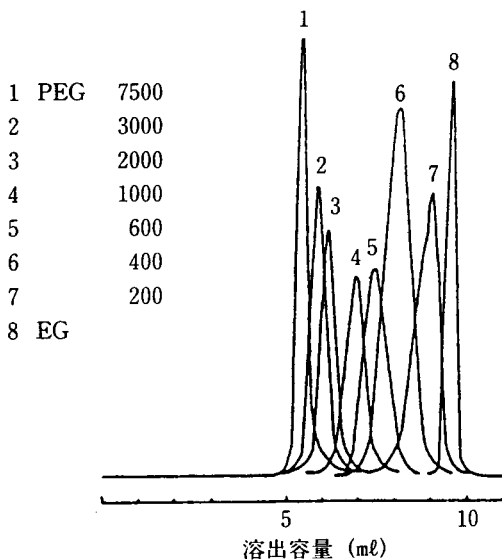


図-11 ポリエチレングリコールの分離(2)

カラム；TSKgel G2500PW_{XL}
 カラム寸法；7.8mmID×30cm
 試料；ポリエチレングリコール(PEG)
 溶離液；蒸留水
 流速；1.0ml/min

図-13にTSKgel G-Oligo-PW 2本でのPEG200、300、400の溶出パターンを示しました。

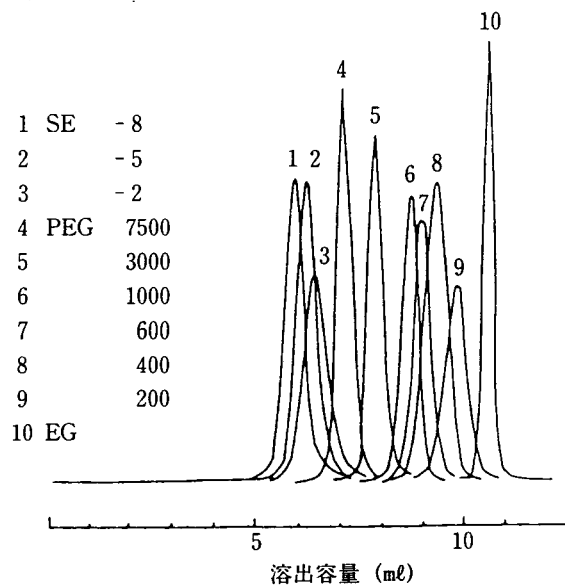


図-12 ポリエチレングリコールの分離(3)

カラム；TSKgel G3000PW_{XL}
 カラム寸法；7.8mmID×30cm
 試料；ポリエチレングリコール
 溶離液；蒸留水
 流速；1.0ml/min

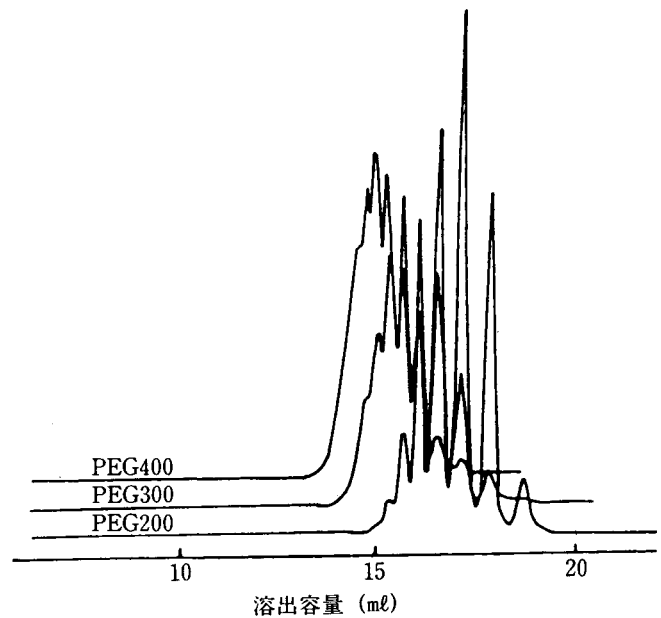


図-13 ポリエチレングリコールの分離(4)

カラム；TSKgel G-Oligo-PW
 カラム寸法；7.8mmID×30cm×2
 試料；ポリエチレングリコール
 溶離液；蒸留水
 流速；1.0ml/min
 温度；25°C

4. PW_{XL}シリーズと従来のPWシリーズの比較

4-1 従来のPWシリーズ60cmカラムとの比較

使用するカラムの本数が同じならば、PW_{XL}シリーズでは分析時間が従来のPWシリーズと比べて約半分に短縮され分離能は同等もしくはそれ以上です。図-14にTSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2000PWカラム2本系でのオリゴ糖の分離の比較を示しました。図-15に同じくキトオリゴ糖の分離の比較を示します。図-16にカラム2本系でPEG200の分離におけるTSKgel G2500PW_{XL}とTSKgel G2500PWとの比較を示しました。図-17はカラム2本系でポリグリセリンの分離におけるTSKgel G3000PW_{XL}とTSKgel G3000PWとの比較を示した図です。

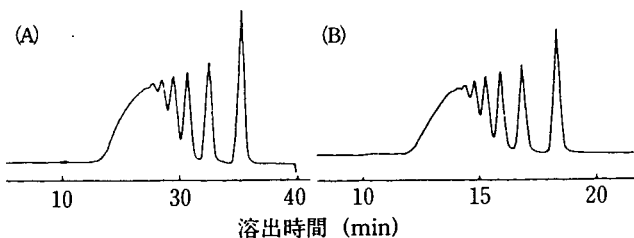


図-14 TSKgel G2000PWとTSKgel G-Oligo-PWとの比較(1)

カラム；(A) TSKgel G2000PW
7.5mmID×60cm×2
(B) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm×2

試料；デキストランT-40加水分解物
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

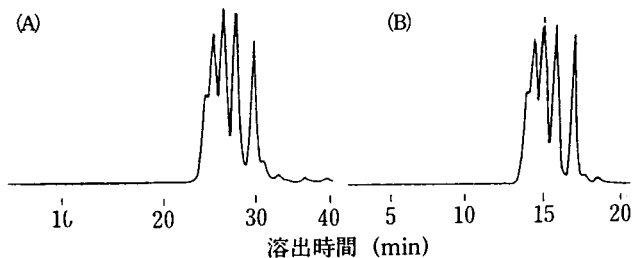


図-15 TSKgel G2000PWとTSKgel G-Oligo-PWとの比較(2)

カラム；(A) TSKgel G2000PW
7.5mmID×60cm×2
(B) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm×2

試料；キトオリゴ糖
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

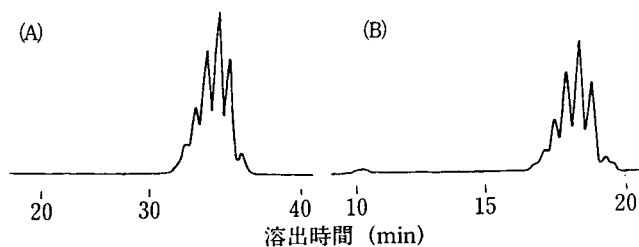


図-16 TSKgel G2500PWとTSKgel G2500PW_{XL}との比較

カラム；(A) TSKgel G2500PW
7.5mmID×60cm×2
(B) TSKgel G2500PW_{XL}
7.8mmID×30cm×2

試料；PEG200
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

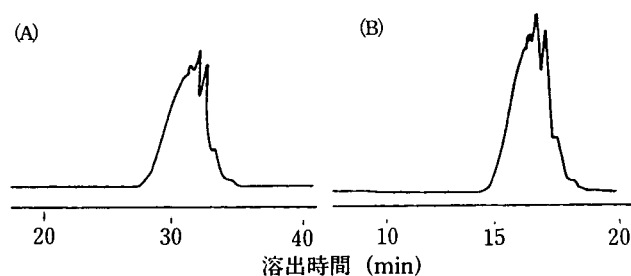


図-17 TSKgel G3000PWとTSKgel G3000PW_{XL}との比較

カラム；(A) TSKgel G3000PW
7.5mmID×60cm×2
(B) TSKgel G3000PW_{XL}
7.8mmID×30cm×2

試料；ポリグリセロール500
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

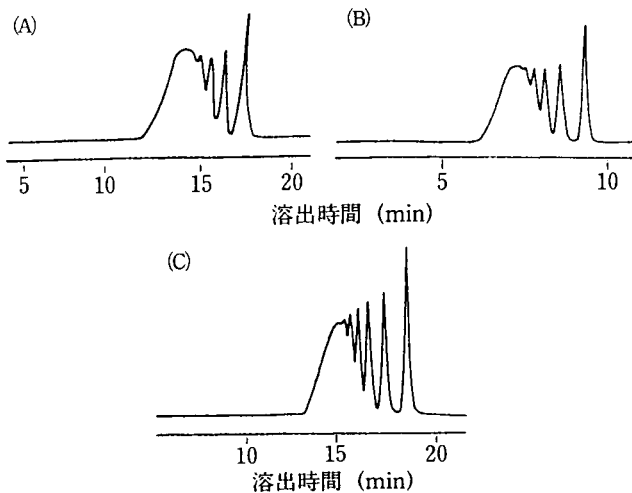


図-18 TSKgel G2000PWとTSKgel G-Oligo-PWとの比較(3)

- カラム；(A) TSKgel G2000PW
7.5mmID×30cm×2
(B) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm
(C) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm×2

試料；デキストランT-40加水分解物
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

4-2 従来のPWシリーズ30cmカラムとの比較

図-18にオリゴ糖の分離におけるTSKgel G2000PW 30cmカラム2本とTSKgel G-Oligo-PW 1本および2本との比較を示しました。

5. TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}の比較

TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}の検量線に大きな差はありませんが通常、非イオン性オリゴマの分離においてはTSKgel G-Oligo-PWの方がTSKgel G2500PW_{XL}よりも良い分離を与えます。図-19、20にオリゴ糖とPEG200の分離における両者の比較を示しました。しかしながら図-6や図-8に示したようにオリゴヌクレオチドやペプチドのようなアニオン性物質の分離に対してはTSKgel G2500PW_{XL}を使用することをおすすめします。

図-21に示すようにTSKgel G-Oligo-PWの充填剤はアニオン性物質と強いイオンの相互作用を引き起こすようなカチオン基を有しています。大きいポアサイズのカラム (TSKgel G6000PW_{XL}~G3000PW_{XL}) と小さなポアサイズのカラムを組合せて使う必要がある時には溶離条件の選択において生じる混乱をさけるために類似した化学的性質をもつTSKgel G2500PW_{XL}を使用するのが無難です。

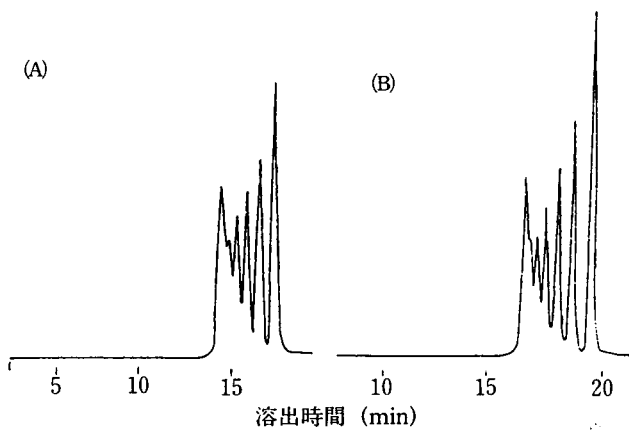


図-19 TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}との比較(1)

- カラム；(A) TSKgel G2500PW_{XL}
7.8mmID×30cm×2
(B) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm×2

試料；β-シクロデキストリン加水分解物
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

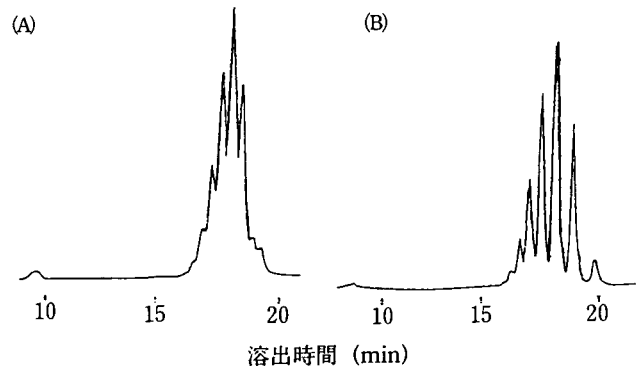


図-20 TSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}との比較(2)

- カラム；(A) TSKgel G2500PW_{XL}
7.8mmID×30cm×2
(B) TSKgel G-Oligo-PW
7.8mmID×30cm×2

試料；ポリエチレングリコール200
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

6. 分離能を向上させるための方法

6-1 カラム長さ

よく知られているようにカラム性能はカラム長さに比例します。図-22にTSKgel G-Oligo-PWにおけるカラム長さと理論段数の関係を示します。図-23にTSKgel G-Oligo-PWでのPEG300の分離におけるカラム長さの影響を示しました。

6-2 流速

図-24にTSKgel G-Oligo-PW 2本でのPEG200の分離における流速の影響を示しました。図からわかるように分離能の流速依存性は比較的小さいが、それは充填剤の粒子径が小さいことと試料の分子量が小さいことに起因しています。

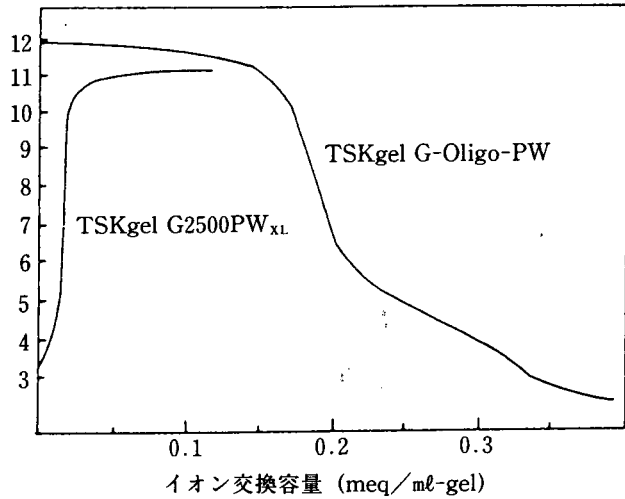


図-21 滴定曲線

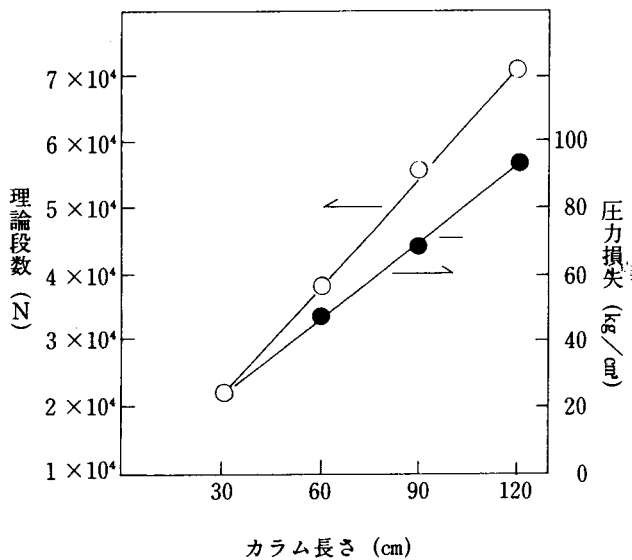


図-22 カラム長さと理論段数、圧力損失の関係

カラム；TSKgel G-Oligo-PW
流速；1.0ml/min

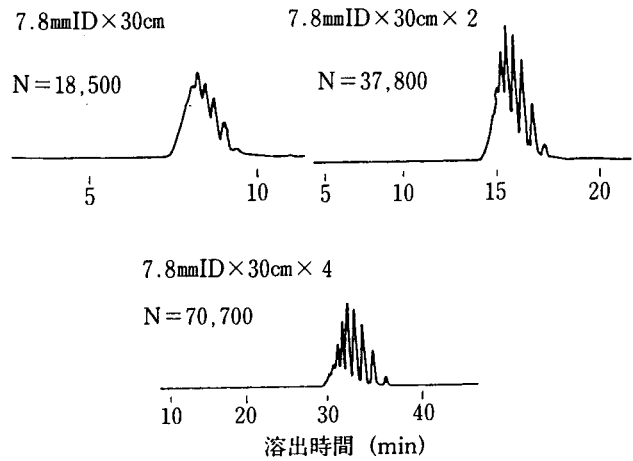


図-23 カラム長さの影響

カラム；TSKgel G-Oligo-PW
試料；ポリエチレングリコール300
溶離液；蒸留水
流速；1.0ml/min

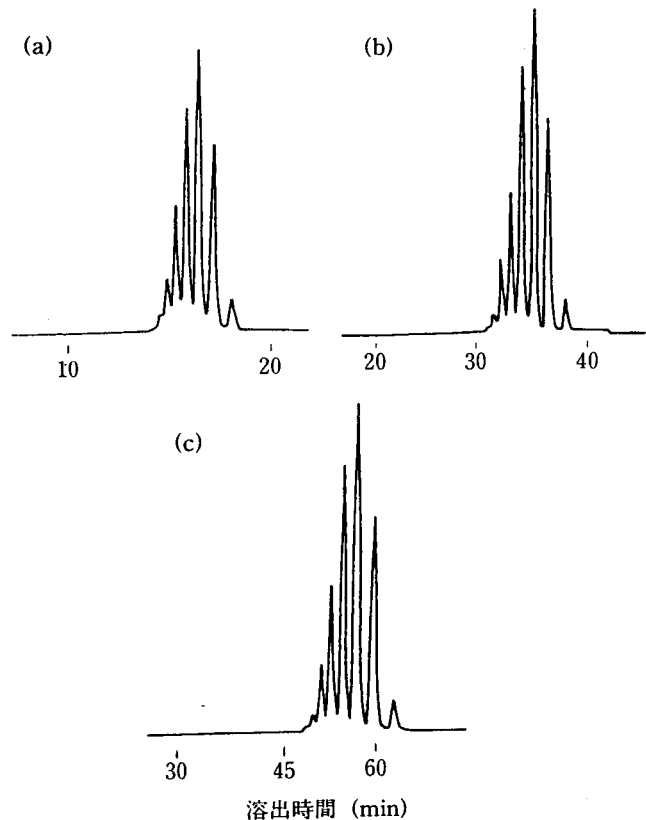


図-24 流速の影響

カラム；TSKgel G-Oligo-PW
カラム寸法；7.8mmID x 30cm x 2
試料；ポリエチレングリコール200
溶離液；蒸留水
流速；(a) 1.0 ml/min
(b) 0.51 ml/min
(c) 0.29 ml/min

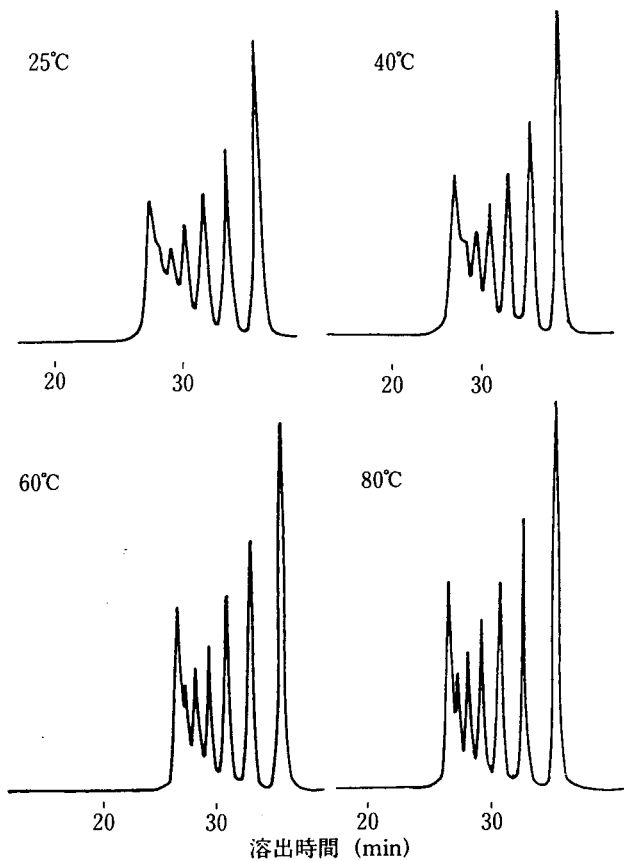


図-25 温度の影響(1)

カラム; TSKgel G-Oligo-PW
 カラム寸法; 7.8mmID×30cm×4
 試料; β -シクロデキストリン加水分解物
 溶離液; 蒸留水
 流速; 1.0ml/min

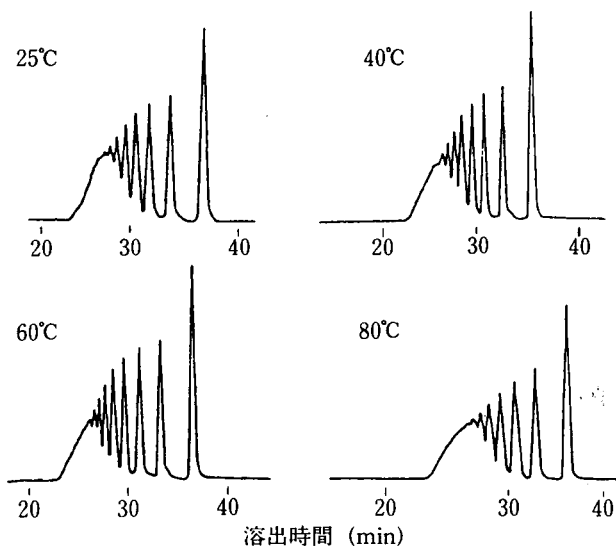


図-26 温度の影響(2)

カラム; TSKgel G-Oligo-PW
 カラム寸法; 7.8mmID×30cm×4
 試料; デキストランT-40加水分解物
 溶離液; 蒸留水
 流速; 1.0ml/min

6-3 温度

TSKgel G-Oligo-PWのカラム2本と4本で図-25、26および27にオリゴ糖とポリグリセリン、PEG200、300の分離におよぼす温度の影響をそれぞれ示しました。図からも明らかなように温度を上げることにより溶媒の粘度は低下し、試料の拡散速度が大きくなるために分離能は向上します。

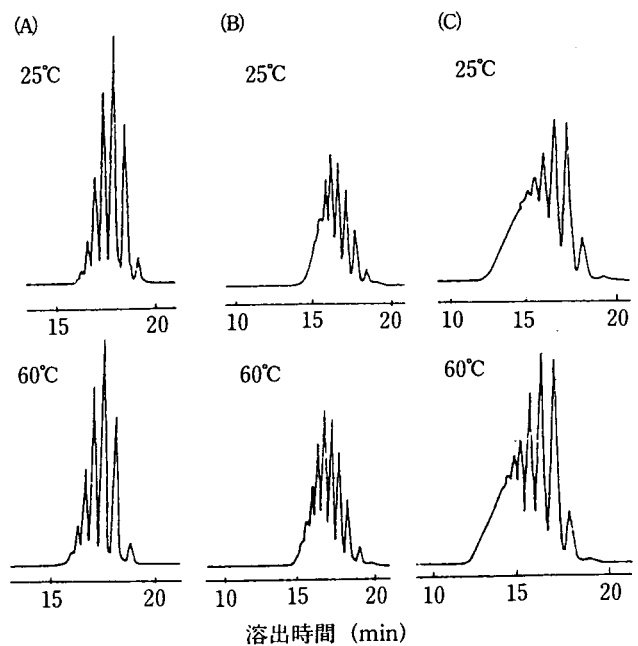


図-27 温度の影響(3)

カラム; TSKgel G-Oligo-PW
 カラム寸法; 7.8mmID×30cm×2
 試料; (A) ポリエチレングリコール200
 (B) ポリエチレングリコール300
 (C) ポリグリセロール500
 溶離液; 蒸留水
 流速; 1.0ml/min

7. 低分子物質の溶出挙動

7-1 アミノ酸

表-3に種々の溶離条件でのTSKgel G-Oligo-PWとTSKgel G2500PW_{XL}における代表的なアミノ酸の溶出容量を示しました。他のアミノ酸の大部分はグリシンと同様の挙動を示します。結果を次のように要約することができます。

1) フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンなどのような芳香族アミノ酸は疎水性相互作用により溶出が遅れます。

2) グルタミン酸などの酸性アミノ酸はTSKgel G2500PW_{XL}では早く溶出しTSKgel G-Oligo-PWでは遅れて溶出します。

3) TSKgel G2500PW_{XL}においてすべてのアミノ酸はpHの影響を受けませんが、TSKgel G-Oligo-PWではかなりpHの影響を受けます。TSKgel G-Oligo-PWにおいてほとんどのアミノ酸は高いpH領域で溶出が遅れます。このアミノ酸の溶出挙動の違いはすでに述べたような充填剤のイオンの性質にもとづくものと思われます。

7-2 核酸関連物質

図-28にTSKgel G2500PW_{XL}におけるヌクレオシドの溶出容量の塩濃度依存性を示しました。疎水性相互作用にもとづくと思われるアデノシンの著しい溶出の遅れがみられます。この図にはアデニンもその強い相互作用を示すために加えてあります。塩濃度が上がると疎水性

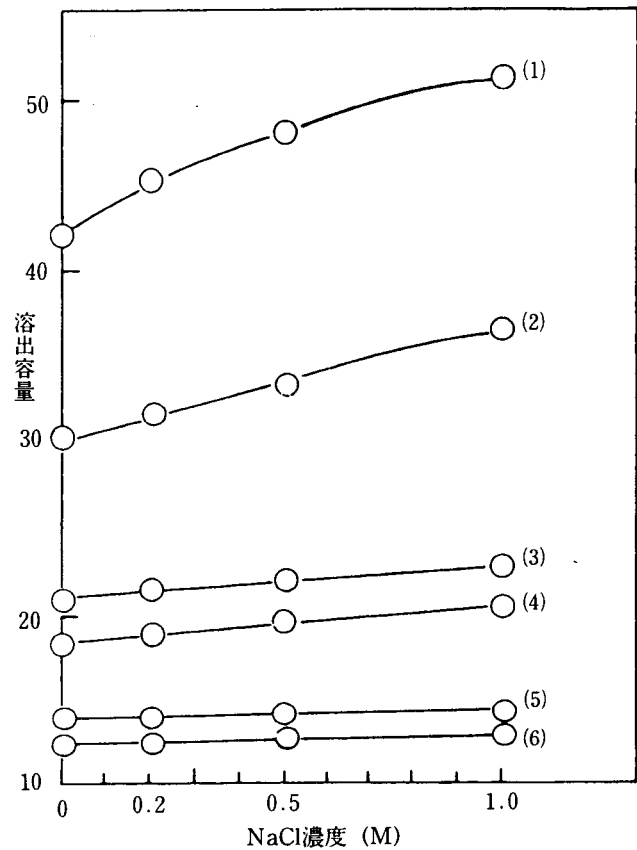


図-28 塩濃度依存性(1)

カラム; TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法; 7.8mmID×30cm

試料; (1)アデニン

(2)アデノシン

(3)グアノシン

(4)チミジン

(5)ウリジン

(6)シチジン

溶離液; 0.02Mりん酸緩衝液(pH6.8)

流速; 1.0ml/min

表-3 アミノ酸の溶出容量

アミノ酸	TSKgel G2500PW _{XL}					TSKgel G-Oligo-PW				
	水	pH			備考	水	pH			備考
		5.5	6.8	8.5			5.5	6.8	8.5	
グリシン	8.11	7.91	7.91	8.03	正常溶出 pH非依存	9.94	9.26	9.26	9.99	正常溶出 pH依存
グルタミン酸	4.96	5.95	5.81	5.44	排除される pH非依存	12.24	11.73	12.92	22.47	遅れる pH依存
チロシン	12.35	12.54	12.50	11.97	遅れる pH非依存	25.92	14.78	15.24	32.07	遅れる pH依存
フェニルアラニン	12.54	12.77	12.70	12.18	遅れる pH非依存	22.37	12.82	13.21	26.63	遅れる pH依存
トリプトファン	27.66	27.50	27.86	26.75	遅れる pH非依存	53.43	27.86	29.01	58.86	遅れる pH依存

相互作用も強まる傾向にあります。図-29にTSKgel G 2500PW_{XL}とTSKgel G-Oligo-PWにおけるAMPの溶出容量の塩濃度依存性を示しました。TSKgel G-Oligo-PWでの低い塩濃度における溶出の遅れは強いイオンの相互作用によるものです。

7-3 アルコール類

表-4にTSKgel G2500PW_{XL}とTSKgel G3000PW_{XL}における種々のアルコール類の溶出容量を示しました。アルキル基が長くなるほど溶出容量は大きくなります。 β -フェネチルアルコールの著しい溶出の遅れはその芳香族性によるものと思われます。

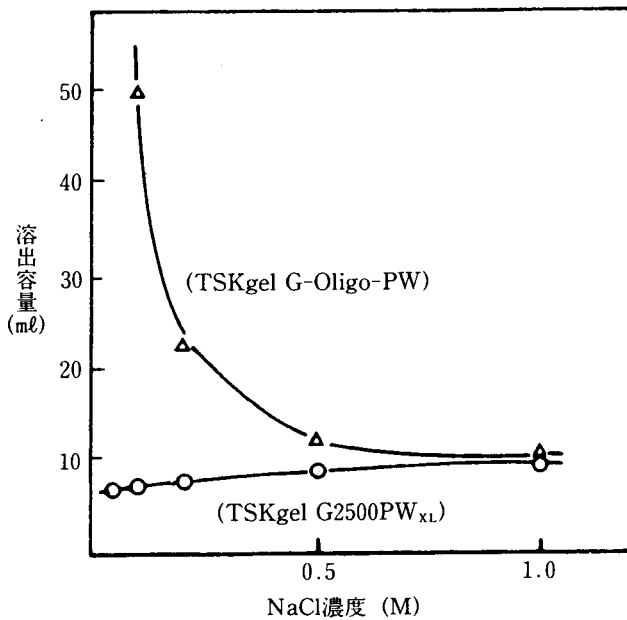


図-29 塩濃度依存性(2)

カラム寸法；7.8mmID×30cm

試料；アデノシン-1りん酸

溶離液；0.02Mりん酸緩衝液(pH6.8)

+0.05M~1.0M NaCl

表-4 脂肪族アルコールの溶出容量

アルコール	TSKgel G2500PW _{XL}	TSKgel G3000PW _{XL}
エチルアルコール	10.96	11.97
イソプロピルアルコール	13.70	14.18
n-ブチルアルコール	18.24	19.11
β -フェネチルアルコール	61.71	65.10

カラム寸法；7.8mmID×30cm

溶離液；蒸留水

流速；1.0ml/min

8. 疎水性相互作用の抑制方法

通常疎水性相互作用は溶離液に有機溶媒を加えることにより弱めることができます。高い温度での測定も疎水性相互作用を弱める効果があります。図-30にTSKgel G2500PW_{XL}でのトリプトファン、アデノシン、アデニンおよびβ-フェネチルアルコールの溶出容量のアセトニトリル濃度依存性を示します。すべての試料は50%アセトニトリル濃度において正常に溶出します。図-31にアセトニトリル濃度の違いによるβ-フェネチルアルコールの溶出容量の温度依存性を示しました。温度の上昇により疎水性相互作用を弱めることができます。

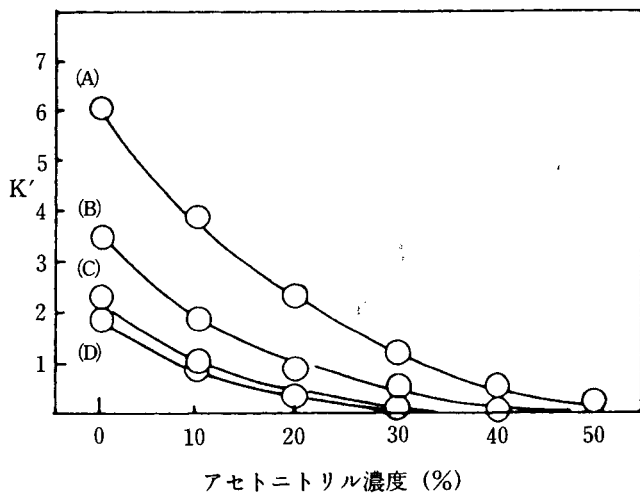


図-30 アセトニトリル濃度依存性

カラム；TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法；7.8mmID×30cm

試料；(A)β-フェネチルアルコール

(B)アデニン

(C)アデノシン

(D)トリプトファン

流速；1.0ml/min

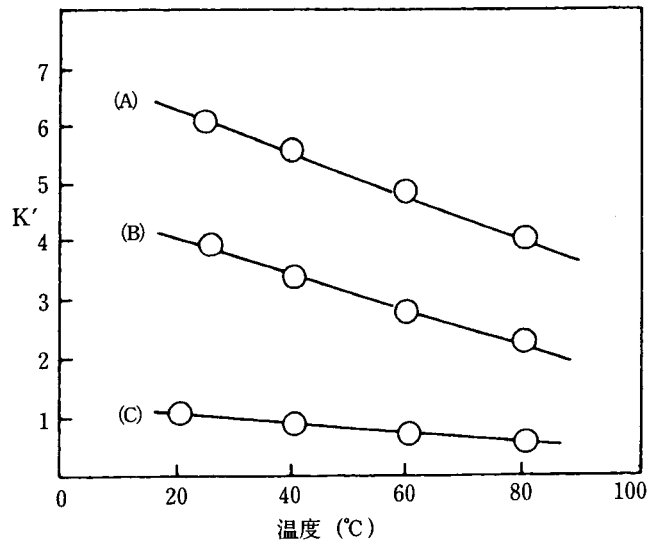


図-31 温度依存性

カラム；TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法；7.8mmID×30cm

試料；β-フェネチルアルコール

溶離液；(A)水

(B)10%アセトニトリル

(C)30%アセトニトリル

流速；1.0ml/min