



SEPARATION REPORT

TSK-GELを用いたセミマイクロカラムの高感度分析への応用

——目 次——

	ページ
1. はじめに	2
2. 特徴	2
3. 基本的性質	3
3-1. セミマイクロカラムと汎用カラムの感度の比較	3
3-2. 流速依存性	5
3-3. グラジエント勾配の影響	6
3-4. 試料負荷量	6
3-5. 試料注入容量	6
3-6. 回収率	8
4. 応用例	8
5. おわりに	11

1. はじめに

セミマイクロカラムは、汎用カラムに比較して高感度に検出できるため試料注入量を少なくでき、極微量試料の高感度分析に適しています。また、グラジエント溶出法を利用する場合には、セミマイクロカラムは試料をより高濃度に濃縮できるため、希薄試料の高感度分析および濃縮・精製にも適しています。これまで、微量試料の高感度分析は、主に逆相クロマトグラフィー(RPC)における低分子化合物の分析が必要とされてきました。しかし、近年、生体試料の分離・精製においても試料の希少化により、微量試料の分析に適したセミマイクロカラムが必要とされ、RPCの他にイオン交換クロマトグラフィー(IEC)、疎水クロマトグラフィー(HIC)のセミマイクロカラムが要望されています。

下記に示す当社の生体試料分離用カラムは、いずれも優れた化学的安定性と分離性能から幅広く利用されています。

- ・ イオン交換クロマトグラフィー(IEC)
TSKgel DEAE-5PW, TSKgel SP-5PW,
TSKgel DEAE-2SW
- ・ 疎水クロマトグラフィー(HIC)
TSKgel Phenyl-5PW, TSKgel Ether-5PW
- ・ 逆相クロマトグラフィー (RPC)

TSKgel ODS-80Ts, TSKgel ODS-80TsQA,
TSKgel ODS-120T, TSKgel Phenyl-5PW RP,
TSKgel Octadecyl-4PW, TSKgel Octadecyl-2PW

今回、これらのカラムの高感度分析への応用を目的に、カラムをダウンサイズ化した生体試料分離用セミマイクロカラムを開発しました。

本報では、これらの基本的性質と応用例について報告します。

2. 特徴

表-1にセミマイクロカラムの仕様一覧を示します。

生体試料分離用セミマイクロカラムは、これまで生体試料の分離・精製に利用されているカラムをダウンサイズ化したカラムです。

以下の特徴があります。

- ① 汎用カラム(7.5mmID.)と比較して、約14倍の高感度検出ができます。
RPCについては、汎用カラムの内径が4.6mmであるため、約5倍の高感度検出が可能です。
- ② 汎用カラムと同じ充填剤を使用しているため、同条件で使用でき、分離パターンは同一です。
- ③ 微量成分を高濃度・高回収率で分離することが可能です。

表-1 生体試料分離用セミマイクロカラムの仕様

分離モード	品名	基材	カラムサイズ	品番
IEC	TSKgel DEAE-5PW	ポリマー	2.0mmID.×7.5cm	18757
	TSKgel SP-5PW	ポリマー	2.0mmID.×7.5cm	18758
	TSKgel DEAE-2SW	シリカ	2.0mmID.×25cm	18761
HIC	TSKgel Phenyl-5PW	ポリマー	2.0mmID.×7.5cm	18759
	TSKgel Ether-5PW	ポリマー	2.0mmID.×7.5cm	18760
RPC	TSKgel ODS-80Ts	シリカ	2.0mmID.×15cm	18150
			2.0mmID.×25cm	18151
	TSKgel ODS-80TsQA	シリカ	2.0mmID.×15cm	18768
			2.0mmID.×25cm	18769
	TSKgel ODS-120T	シリカ	2.0mmID.×15cm	18152
			2.0mmID.×25cm	18153
	TSKgel Phenyl-5PW RP	ポリマー	2.0mmID.×7.5cm	18756
	TSKgel Octadecyl-4PW	ポリマー	2.0mmID.×15cm	18755
	TSKgel Octadecyl-2PW	ポリマー	2.0mmID.×15cm	18754

3. 基本的性質

3-1. セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較

試料負荷量が同じ場合、ピークの高さはカラムの断面積に反比例して高くなります。図-1, 図-2に TSKgel DEAE-5PW, TSKgel SP-5PW における汎用カラムとセミマイクロカラムの感度の比較を示します。今回比較したセミマイクロカラムの断面積は汎用カラムに比べて1/14になっており、各タンパク質を10倍以上で高

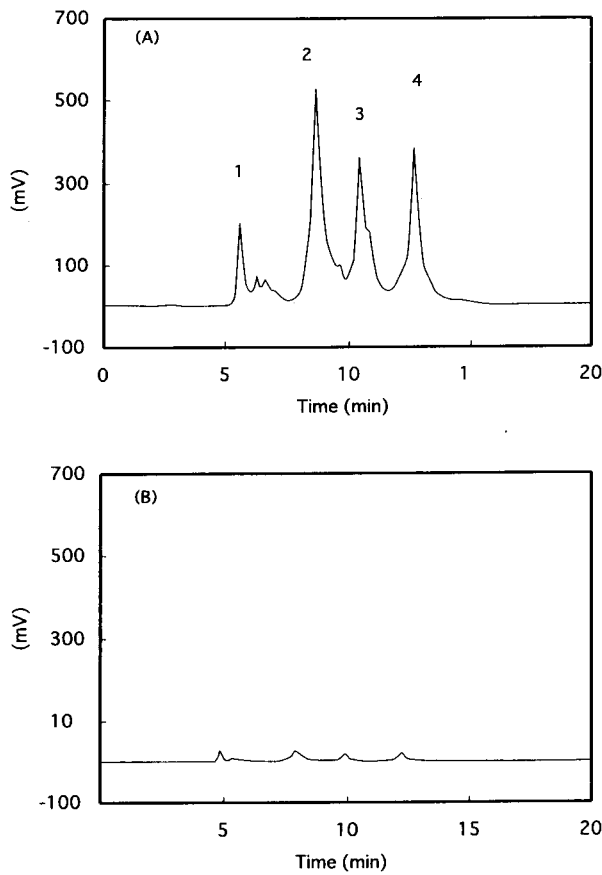


図-1 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較 (TSKgel DEAE-5PW)

カラム ; (A) TSKgel DEAE-5PW (2.0mmID.×7.5cm)
 (B) TSKgel DEAE-5PW (7.5mmID.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; (A) 0.10ml/min
 (B) 1.00ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (10 μl)
 1.カルボニックアンヒドラーゼ (2.4g/l)
 2.トランスフェリン (4g/l)
 3.オボアルブミン (5g/l)
 4.大豆トリプシンインヒビター (5g/l)

感度検出することができます。

図-3に TSKgel Phenyl-5PW RP における汎用カラムとセミマイクロカラムの感度の比較を示します。TSKgel Phenyl-5PW RP ではカラムの断面積が1/5であるため、汎用カラムに比べて約5倍の高感度検出が可能です。

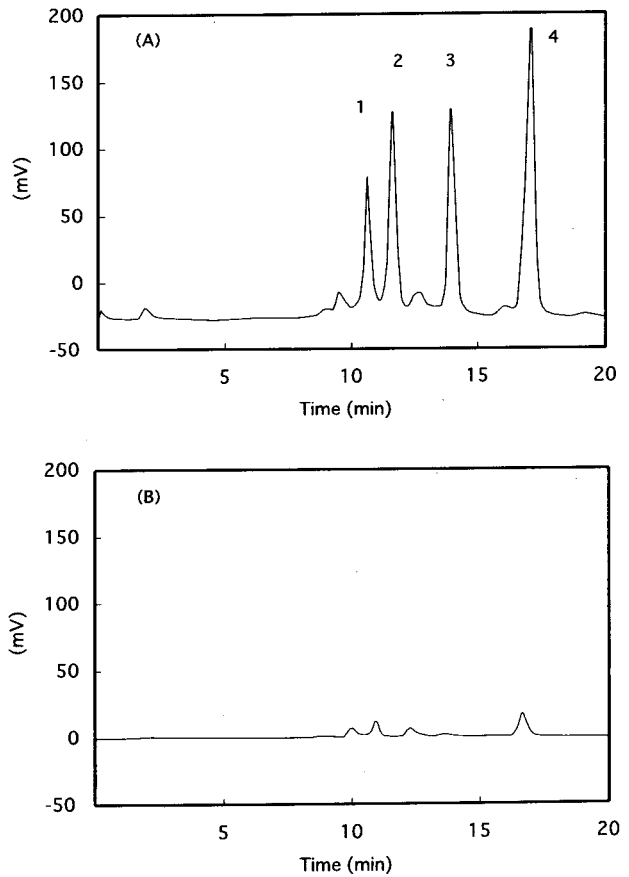


図-2 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較 (TSKgel SP-5PW)

カラム ; (A) TSKgel SP-5PW (2.0mmID.×7.5cm)
 (B) TSKgel SP-5PW (7.5mmID.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; (A) 0.10ml/min
 (B) 1.00ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (10 μl)
 1.リボヌクレアーゼ A (2g/l)
 2.α-キモトリプシンノーゲン A (1g/l)
 3.シトクロム C (5g/l)
 4.リゾチーム (1g/l)

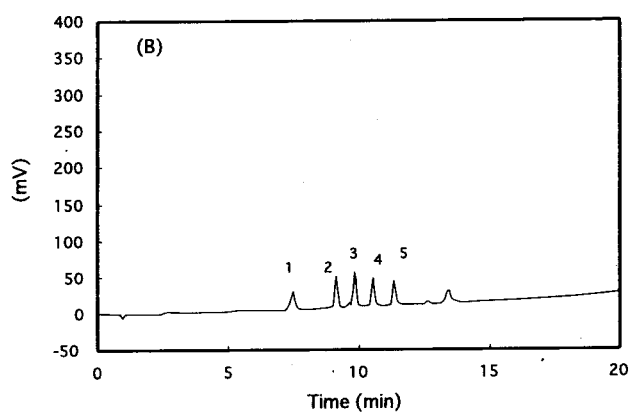
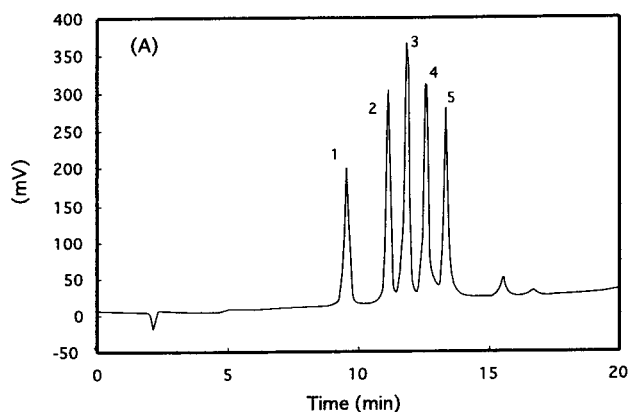


図-3 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較
(TSKgel Phenyl-5PW RP)

カラム ; (A) TSKgel Phenyl-5PW RP (2.0mmLD.×7.5cm)

(B) TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6mmLD.×7.5cm)

溶離液 ; A : 5%アセトニトリル水溶液+0.1%

B : 80% アセトニトリル水溶液+0.1% TFA

A→B リニアグラジエント (20分)

流速 ; (A) 0.10ml/min

(B) 1.00ml/min

温度 ; 25℃

検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用

試料 ; 標準タンパク質 (10μl)

1.リボヌクレアーゼ A (0.2g/l)

2.シトクロム C (0.2g/l)

3.リゾチーム (0.2g/l)

4.α-ラクトグロブリン (0.2g/l)

5.ミオグロビン (0.2g/l)

3-2. 流速依存性

一般にグラジエントモードを利用したHPLCでは流速とグラジエント勾配によって分離およびピーク高さが変化します。その傾向は次のようになります。

1) 流速が速いと

- ・分離が良くなる
- ・ピークが低くなる

2) グラジエント勾配が緩やかだと

- ・分離が良くなる
- ・ピークが低くなる

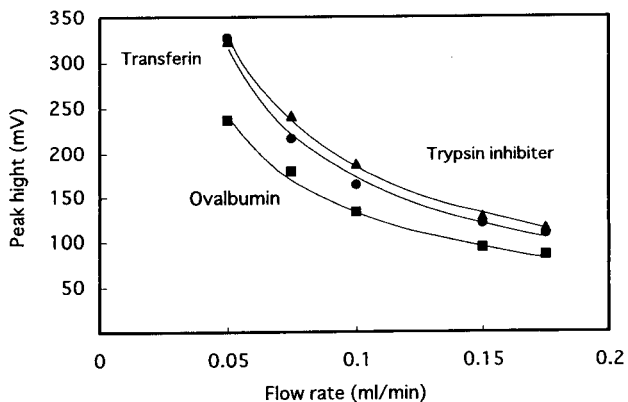
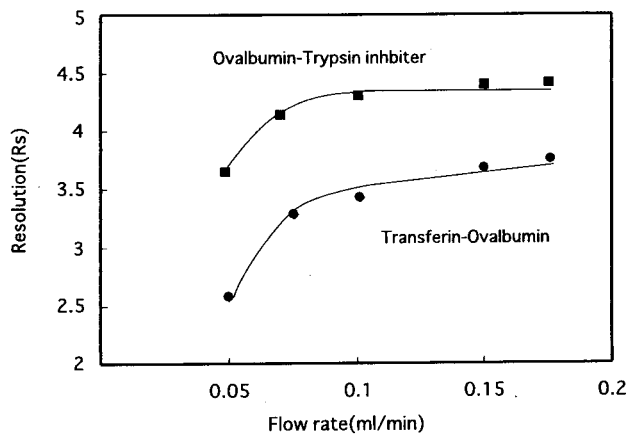


図-4 TSKgel DEAE-5PW (セミマイクロ) カラムの流速依存性

カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl緩衝液 (pH8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→Bリニアグラジエント (20分)
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm) マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (10μl)
 ・トランスフェリン (4g/l)
 ・オボアルブミン (5g/l)
 ・大豆トリプシンインヒビター (5g/l)

図-4および図-5にTSKgel DEAE-5PWおよびTSKgel SP-5PWにおいて流速を変化させた場合の分離能とピーク高さの影響を示します。

流速が速くなるにしたがって、分離能は高くなり、流速0.10ml/min以上でほぼ一定になることがわかります。一方、ピーク高さは流速が遅くなるに従い、徐々に高くなる傾向にあります。

このことから、セミマイクロカラムでは流速0.10ml/min付近が、分離能とピーク高さを両立させる最適な流速と考えられます。

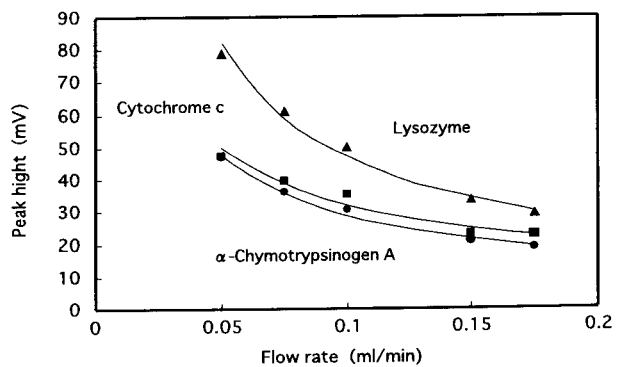
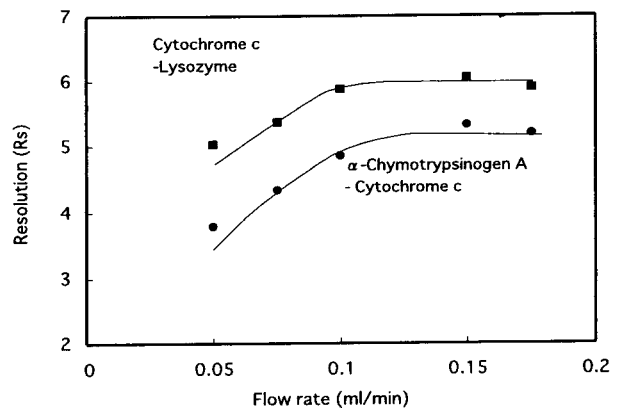


図-5 TSKgel SP-5PW (セミマイクロ) カラムの流速依存性

カラム ; TSKgel SP-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 50mmol/l リン緩衝液 (pH7.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm) マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (10μl)
 ・α-キモトリプシノーゲン A (1g/l)
 ・シトクロム C (1g/l)
 ・リゾチーム (1g/l)

3-3. グラジエント勾配の影響

図-6にTSKgel DEAE-5PWにおいてグラジエント勾配を変化させた場合のクロマトグラムを示します。

20分のグラジエントを60分にすることによって、分離は大幅に良くなりますが、ピーク高さは約1/2となります。

3-4. 試料負荷量

図-7および図-8にTSKgel DEAE-5PWおよびTSKgel SP-5PWの試料負荷量を示します。試料負荷量100 μ gまでは、分離能はほぼ一定の値を保ちますが、200 μ g以上では徐々に分離能は低下することがわかります。

図-9に微量負荷量でのTrypsin inhibitorの検量線を示します。汎用カラムでは250 μ g以下で直線からはずれることがわかります。一方、セミマイクロカラムでは、100 μ g以下でも良好な検量線が得られています。

このことから、試料負荷量が200 μ g以上では汎用カラムの使用が適しており、200 μ g以下となるような微量分析では、セミマイクロカラムの使用が適していることがわかります。

3-5. 試料注入容量

アイソクラティック条件では試料注入中にも試料がカラム内を移動するため、流速の遅いセミマイクロカラムでは試料注入容量を少なくし、カラム内のバンドの広がりを抑える必要が有ります。アイソクラティック条件での、セミマイクロカラムへの注入量は10 μ l以下が望ましいことがすでに示されています(セパレーションレポート No91)。

しかし、グラジエント条件を利用する場合、注入された試料をカラム前面で濃縮させることにより、試料注入容量の影響は除くことができます。

図-10にグラジエント条件を利用することで試料注入容量の影響を除いた例を示します。注入された試料はカラム前面で濃縮されるため、試料注入容量を1000 μ lとした場合でも分離能は影響を受けないことがわかります。このような条件下では、セミマイクロカラムは汎用カラムに比べて、希薄試料をより高濃度に濃縮することができ、希薄試料の高感度分析および濃縮・精製を効率よく行うことができます。

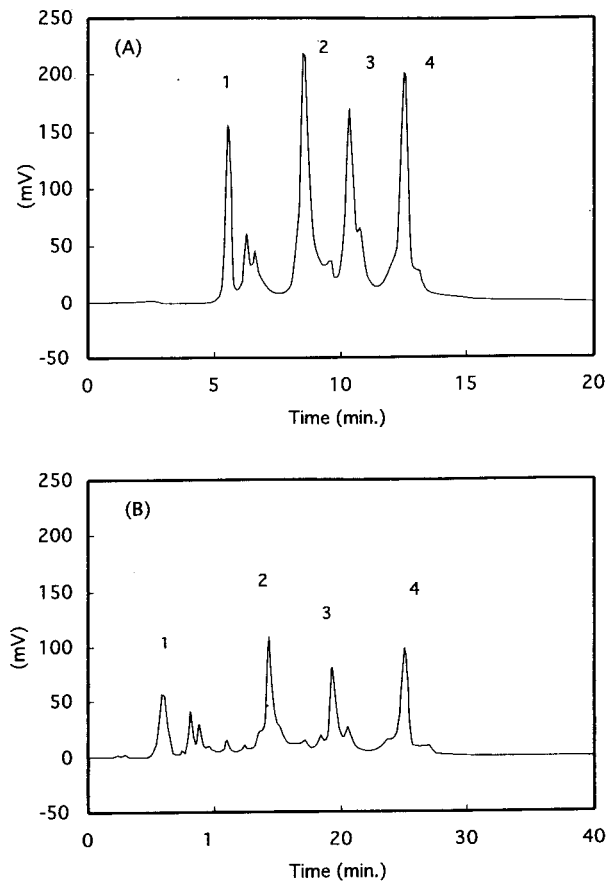


図-6 分離に及ぼすグラジエント勾配の影響 (TSKgel DEAE-5PW)

- カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmID.×7.5cm)
分離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
(A) : A→B リニアグラジエント (20分)
(B) : A→B リニアグラジエント (60分)
- 流速 ; 0.10ml/min
温度 ; 25℃
検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
試料 ; 標準タンパク質 (10 μ l)
 1.カルボニックアンヒドラーゼ (2.4g/l)
 2.トランスフェリン (4g/l)
 3.オボアルブミン (5g/l)
 4.大豆トリプシンインヒビター (5g/l)

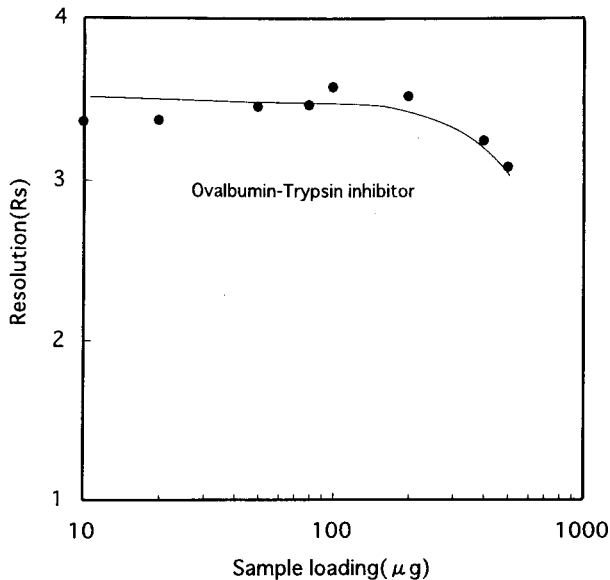


図-7 TSKgel DEAE-5PWにおける分離能と試料負荷量の関係

カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; 0.10ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (50 μl)
 ・オボアルブミン
 ・大豆トリプシンインヒビター

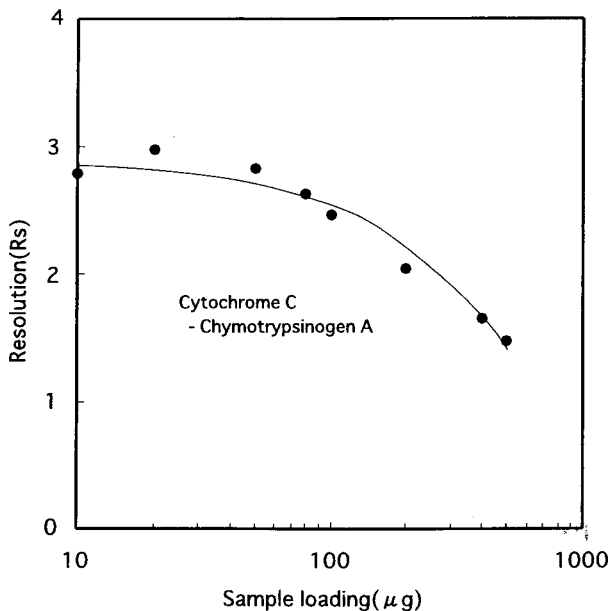


図-8 TSKgel SP-5PWにおける分離能と試料負荷量の関係

カラム ; TSKgel SP-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l リン酸緩衝液 (pH 7.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; 0.10ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質(50 μl)
 ・α-キモトリプシノーゲン A
 ・シトクロム C

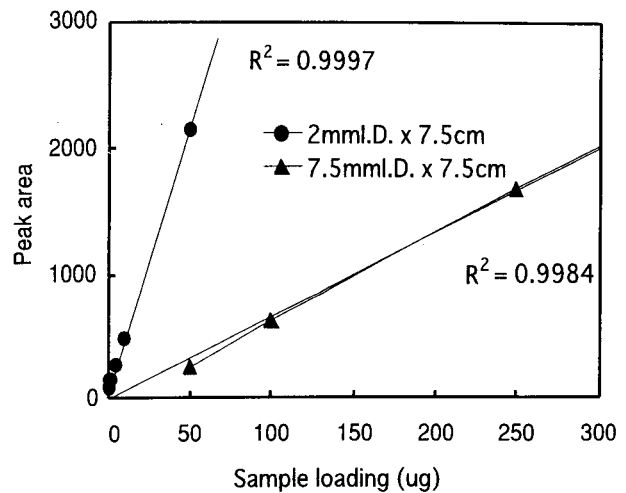


図-9 微量試料負荷量でのセミマイクロカラムと汎用カラムの検量線の比較

カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 TSKgel DEAE-5PW (7.5mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; 0.10ml/min (2.0mmI.D.×7.5cm)
 1.00ml/min (7.5mmI.D.×7.5cm)
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm) マイクロセル使用
 試料 ; 大豆トリプシンインヒビター (10 μl)

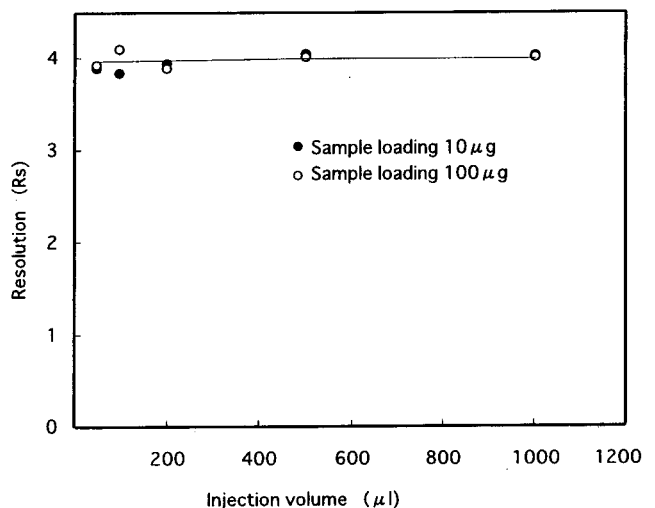


図-10 TSKgel DEAE-5PWにおける分離能と試料注入容量の関係

カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; 0.10ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質
 ・オボアルブミン
 ・大豆トリプシンインヒビター

3-6. 回収率

表-2にTSKgel DEAE-5PWのタンパク質回収率を示します。

汎用カラムの回収率は、試料負荷量 $20\mu\text{g}$ 程度までは高い回収率が得られました。しかし、試料負荷量が $5\mu\text{g}$ の場合、ほとんどのタンパク質について回収率は大きく低下します。

一方、セミマイクロカラムでは $2\mu\text{g}$ の試料負荷量でも高い回収率が得られました。

表-2 セミマイクロカラムと汎用カラムのタンパク質回収率の比較

試料負荷量	セミマイクロカラム (2.0mmLD.×7.5cm)		汎用カラム (7.5mmLD.×7.5cm)	
	20 μg	2 μg	20 μg	5 μg
ウシ血清アルブミン	88%	82%	87%	75%
オプアルブミン	96%	93%	94%	81%
ミオグロビン	98%	93%	94%	79%
大豆トリプシンインヒビター	89%	72%	84%	62%

カラム ; TSKgel DEAE-5PW (2.0mmLD.×7.5cm)
 TSKgel DEAE-5PW (7.5mmLD.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 20mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5)
 B : A+0.5mol/l NaCl
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; 0.10ml/min (2.0mmLD.×7.5cm)
 1.00ml/min (7.5mmLD.×7.5cm)
 注入量 : 20 μl

4. その他のカラムおよび応用例

図-11~14にその他の生体試料分離用カラムについての、汎用カラムとセミマイクロカラムの相対的な感度の比較を示します。また、図-15にTSKgel ODS-80Tsセミマイクロカラムを使用したトリプシン消化物の分析例を示します。

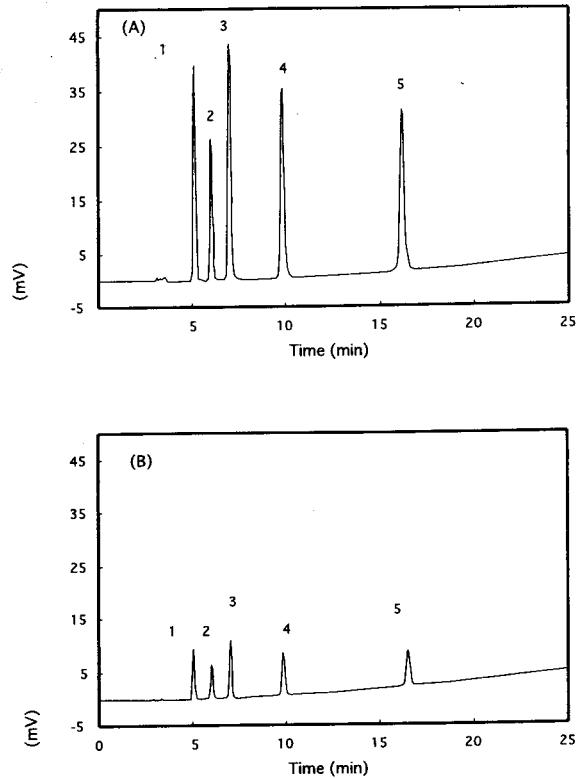


図-11 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較 (TSKgel DEAE-2SW)

カラム ; (A) TSKgel DEAE-2SW (2.0mmLD.×25cm)
 (B) TSKgel DEAE-2SW (4.6mmLD.×25cm)
 溶離液 ; A : 10mmol/lリン酸緩衝液 (pH3.0) /
 アセトニトリル=80/20
 B : 50mmol/lリン酸緩衝液 (pH3.0) /
 アセトニトリル=80/20
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; (A) 0.10ml/min
 (B) 1.00ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (260nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 試料 (2 μl)
 1.AMP (45g/l)
 2.IMP (90g/l)
 3.GMP (90g/l)
 4.ADP (90g/l)
 5.ATP (90g/l)

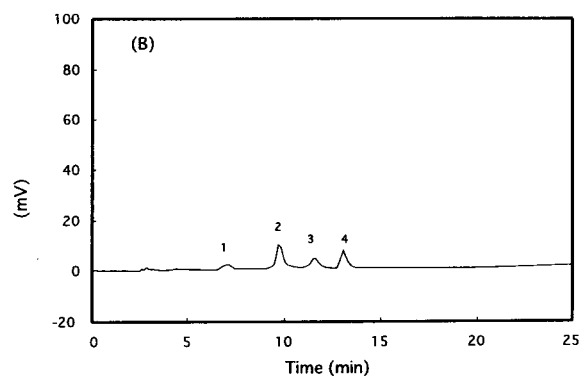
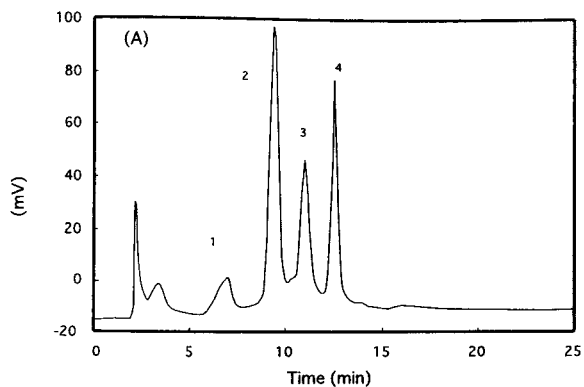


図-12 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較 (TSKgel Ether-5PW)

カラム ; (A) TSKgel Ether-5PW (2.0mmI.D.×7.5cm)
 (B) TSKgel Ether-5PW (7.5mmI.D.×7.5cm)
 溶離液 ; A : 0.1mol/lリン酸緩衝液+1.8mol/l 硫酸アンモニウム (pH7.0)
 B : 0.1mol/lリン酸緩衝液 (pH7.0)
 A→B リニアグラジエント (20分)
 流速 ; (A) 0.10ml/min
 (B) 1.00ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (280nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 標準タンパク質 (10μl)
 1.リボヌクレアーゼ A (0.5g/l)
 2.リゾチーム (0.5g/l)
 3.α-キモトリプシン (0.5g/l)
 4.α-キモトリプシノ-ゲン (0.5g/l)

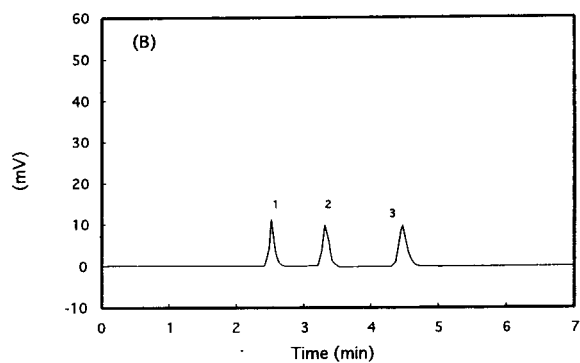
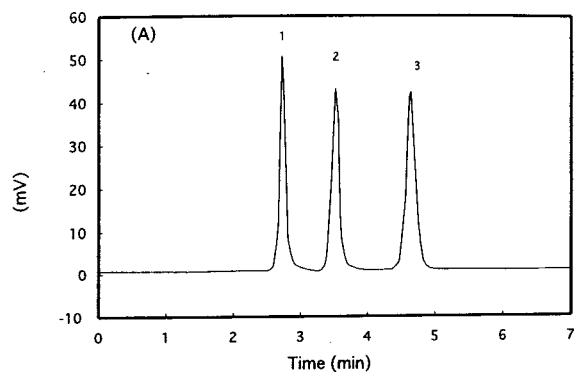


図-13 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較 (TSKgel Octadecyl-2PW)

カラム ; (A) TSKgel Octadecyl-2PW (2.0mmI.D.×15cm)
 (B) TSKgel Octadecyl-2PW (4.6mmI.D.×15cm)
 溶離液 ; 20mmol/l リン酸緩衝液 (pH7.0) / アセトニトリル=50/50
 流速 ; (A) 0.19ml/min
 (B) 1.00ml/min
 温度 ; 25℃
 検出 ; UV (254nm)、マイクロセル使用
 試料 ; 試料 (1μl)
 1.アニリン (13.8mg/l)
 2.N-メチルアニリン (30mg/l)
 3.N,N-ジメチルアニリン (30mg/l)

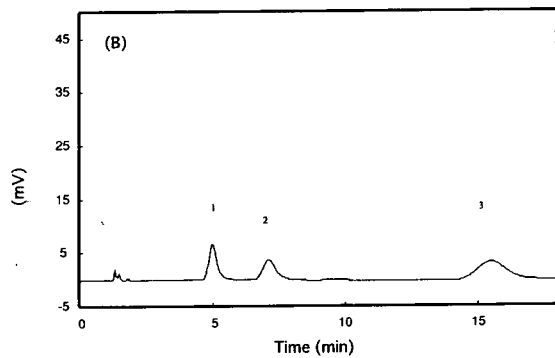
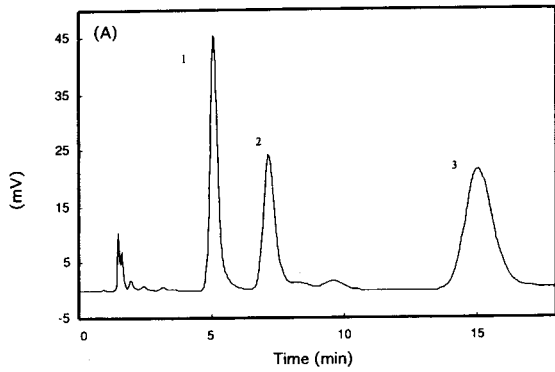


図-14 セミマイクロカラムと汎用カラムの感度比較
(TSKgel Octadecyl-4PW)

カラム ; (A) TSKgel Octadecyl-4PW (2.0mmI.D.×15cm)
 (B) TSKgel Octadecyl-4PW (4.6mmI.D.×15cm)

溶離液 ; 50mmol/l リン酸緩衝液(pH7.0)/
 アセトニトリル=90/10

流速 ; (A) 0.19ml/min
 (B) 1.00ml/min

温度 ; 25℃

検出 ; UV (215nm)、マイクロセル使用

試料 ; 試料 (1.4μl)

- 1.メチオニン-エンケファリン (30mg/l)
- 2.ルイシン-エンケファリン (30mg/l)
- 3.オキトシン (30mg/l)

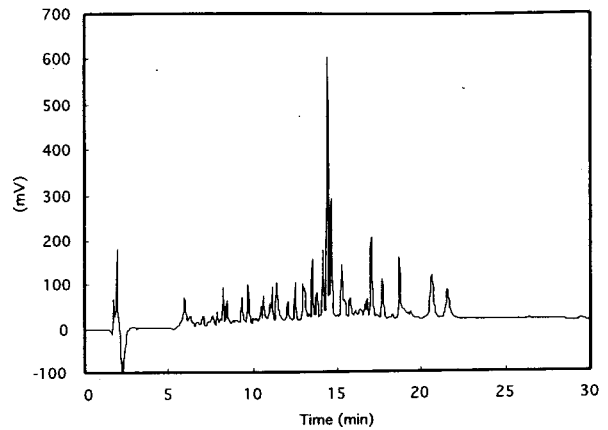


図-15 β-ラクトグロブリンのトリプシン消化物の分析

カラム ; TSKgel ODS-80Ts (2.0mmI.D.×15cm)

溶離液 ; A : 0.1% TFA水溶液
 B : アセトニトリル+0.1% TFA
 A (100%) → A (30%) リニアグラジエント
 (30分)

流速 ; 0.20ml/min

温度 ; 25℃

検出 ; UV (215nm)、マイクロセル使用

試料 ; β-ラクトグロブリンのトリプシン
 消化物(10μl)

5. 終わりに

生体試料分離用セミマイクロカラムは、カラムのダウンサイズにより高感度検出を可能にしたカラムです。試料負荷量が同じ場合、従来の汎用カラムに比べて約14倍（RPCでは約5倍）の高感度検出が可能のため、微量試料の分析に適しています。

また、カラムがセミマイクロ化されたことで、微量分析時に高い回収率が期待でき、微量成分を高濃度で分離・回収することが可能です。

グラジエント条件では、試料をカラム前面に濃縮することで、希薄試料の高感度分析および精製を効率よく行うことが可能です。

充填剤に従来のものと同じものを使用していますので、これまでと同条件で、同じ分離パターンを得ることができます。

なお、TSK-GEL セミマイクロカラムシリーズの性能をより良く引き出すために、出来る限りデッドボリウムを小さくしたシステムでの分離を行って下さい。カラム外でのピークの広がり分離性能を低下させる大きな原因となります。表-3にTSK-GEL セミマイクロカラムシリーズ使用上の注意点をまとめます。

表-3 TSK-GELセミマイクロカラムシリーズ使用上の注意点

* 配管、検出器等でのピークの広がりを抑える。
* サンプルがオーバーロードしないようにする。
* 流速が遅いので、ポンプの流速に注意する。
配管：
0.1mm I.D.配管を使用。配管の総合計の長さは100cm以下が望ましい。
接続パイプセット・Lタイプ（品番018186：0.1mm I.D.×40cm、2組入り）が使用可能；接続面（両末端）はファインカット仕上げ
0.1mm I.D.配管が必要な部分
a) インジェクションバルブ/カラム入口間、あるいはオートサンプラ/カラム入口間
b) カラム出口/検出器入口間（検出器入口側配管）
ポンプ：
セミマイクロ対応ポンプDP-8020の使用が望ましい。
流速は0.1ml/min。
インジェクタ及びオートサンプラ：
当社オートサンプラAS-8021もしくは低拡散型インジェクタ（レオダイン8125）が望ましい。
ミキサ：
グラジエントを利用する場合は、スタティックミキサーC（品番08409）を使用する。
検出器：
UV検出器は、マイクロフローセルを使用して下さい。（ローデッドボリウムタイプのセルでの使用も可能です。ただし理論段数はマイクロセル使用時の約90%となります）
UV-8020：マイクロフローセル（品番17545）
