



# HPLCのノウハウ一挙公開 (RPC、IC、GPC、バイオ分離)

東ソー株式会社  
バイオサイエンス事業部



# 内容

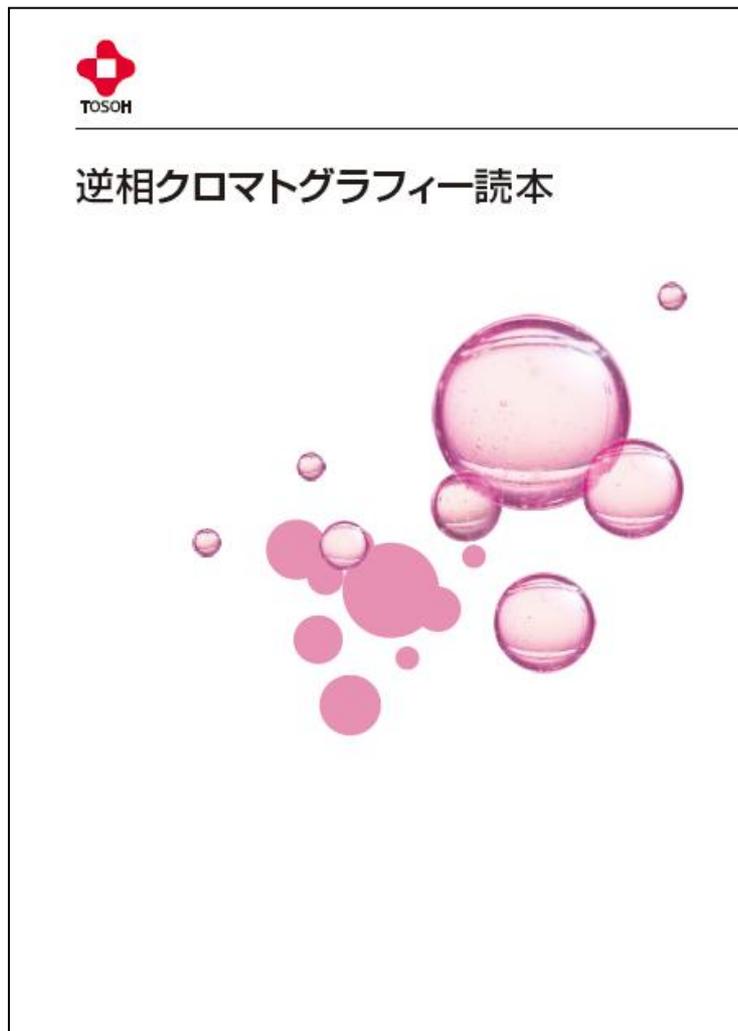
- はじめに
- HPLCのノウハウ
  - ✓ 逆相クロマトグラフィー
  - ✓ イオンクロマトグラフィー
  - ✓ サイズ排除クロマトグラフィー
  - ✓ バイオセパレーション
- まとめ



# はじめに

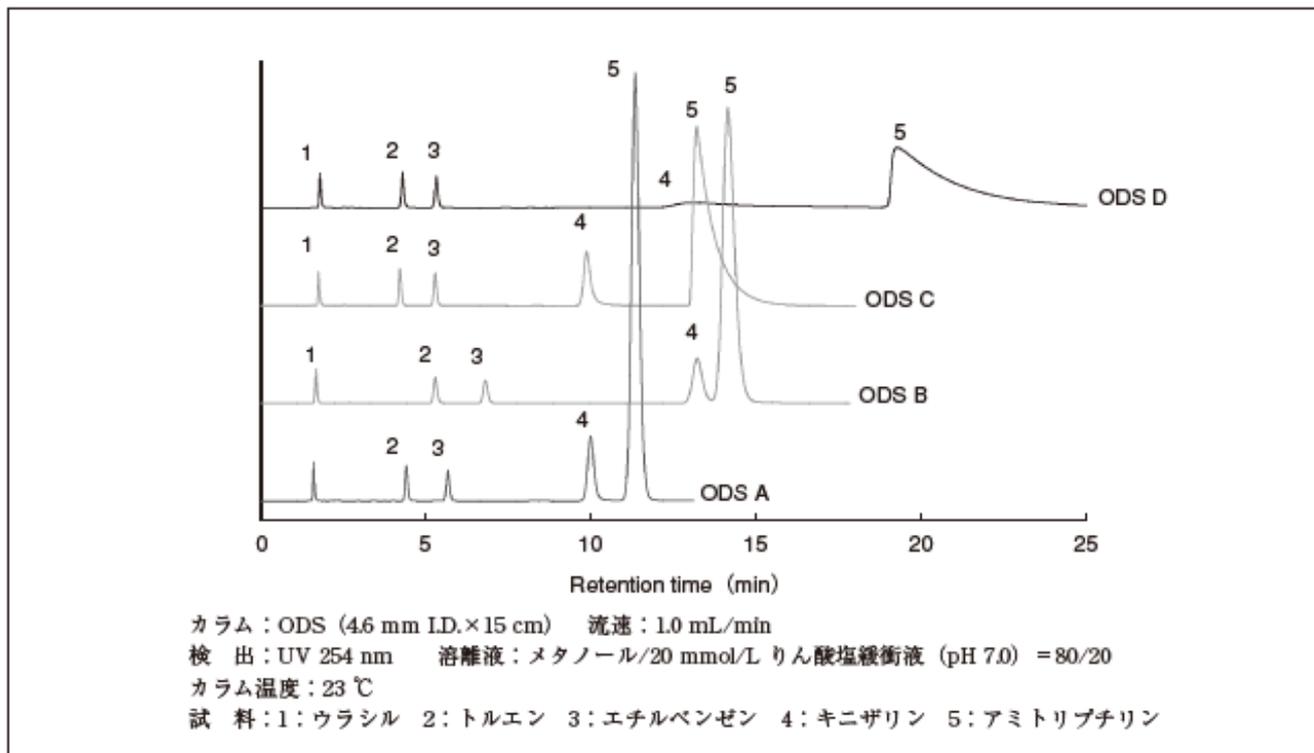
- 以下の読本類を発行
  - ✓ 逆相クロマトグラフィー読本
  - ✓ イオンクロマトグラフィー読本
  - ✓ サイズ排除クロマトグラフィー読本
  - ✓ バイオセパレーション読本
  
- 対象分野ごとにクロマトグラフィーの基本原理、特性、応用例などをまとめました。

# 逆相クロマトグラフィー読本



- 原理と特徴
- カラムの種類と選択
  - ✓ ODSカラム
  - ✓ HILIC
- 溶離液の調製
- 分析条件の設定
- 試料の前処理
- 定量法

# ODSカラムの特性比較 (SRM870)



- SRM870: ODSカラムの特性を把握する方法。
- 5種類の化合物を測定し、保持、ピーク形状よりカラムの特性を比較可能。

# 分析条件の最適化

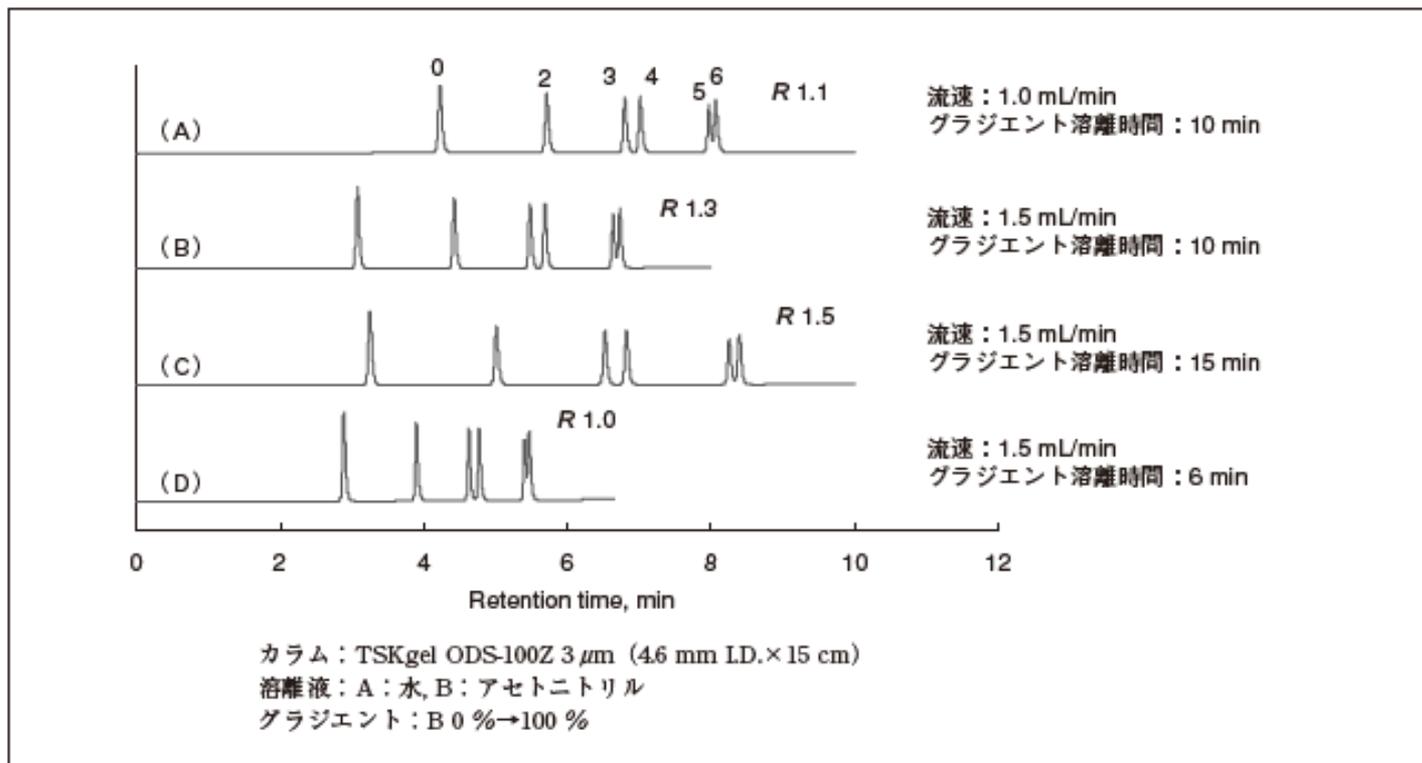
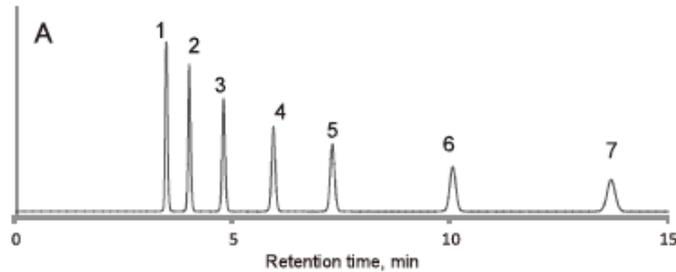


図 5 - 3 流速及びグラジエント溶離時間の影響

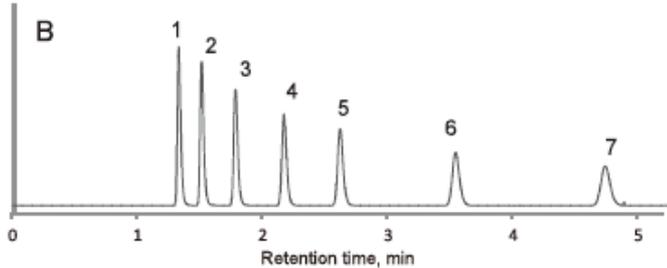
- 同一カラムで分析条件（流速、グラジエント時間）を変更することにより、分離を向上することが可能です。



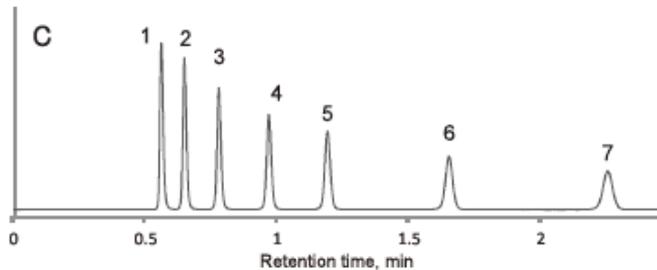
# メソッドの移行



粒子径: 5.0  $\mu\text{m}$   
カラム: 4.6 mmI.D. x 250 mm  
流速: 1.00 mL/min



粒子径: 3.0  $\mu\text{m}$   
カラム: 4.6 mmI.D. x 150 mm  
流速: 1.67 mL/min



粒子径: 1.9  $\mu\text{m}$   
カラム: 3.0 mmI.D. x 100 mm  
流速: 1.12 mL/min

- 粒子径の異なるカラム間でのメソッドの移行
- $L/dp$  (粒子径当たりのカラム長さ) を同等にすることにより同様の分離が可能。

$$L/dp = 250,000 / 5 = 50,000 \text{ (例 A)}$$

$$L/dp = 150,000 / 3 = 50,000 \text{ (例 B)}$$

$$L/dp = 100,000 / 1.9 = 52,631 \text{ (例 C)}$$

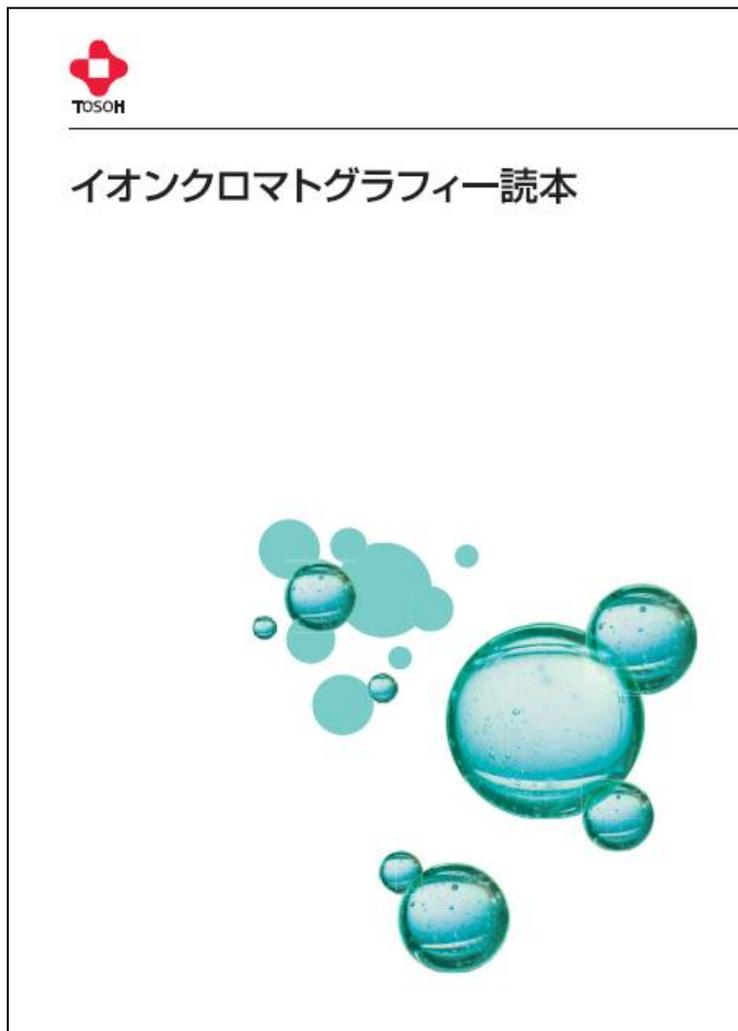
$$\text{流速} = 1.0 \times (4.6)^2 / (4.6)^2 \times 5.0/3.0$$

$$= 1.67 \text{ mL/min (例 B)}$$

$$\text{流速} = 1.0 \times (3.0)^2 / (4.6)^2 \times 5.0/1.9$$

$$= 1.12 \text{ mL/min (例 C)}$$

# イオンクロマトグラフィー読本



- 分離の原理
- 測定の原理
  - ✓ サプレッサー法
  - ✓ 検出器
- 測定方法
  - ✓ カラムの選択
  - ✓ 溶離液の選択
  - ✓ 前処理
  - ✓ 定量方法
- 応用例
- トラブルシューティング

# サプレッサー法とノンサプレッサー法

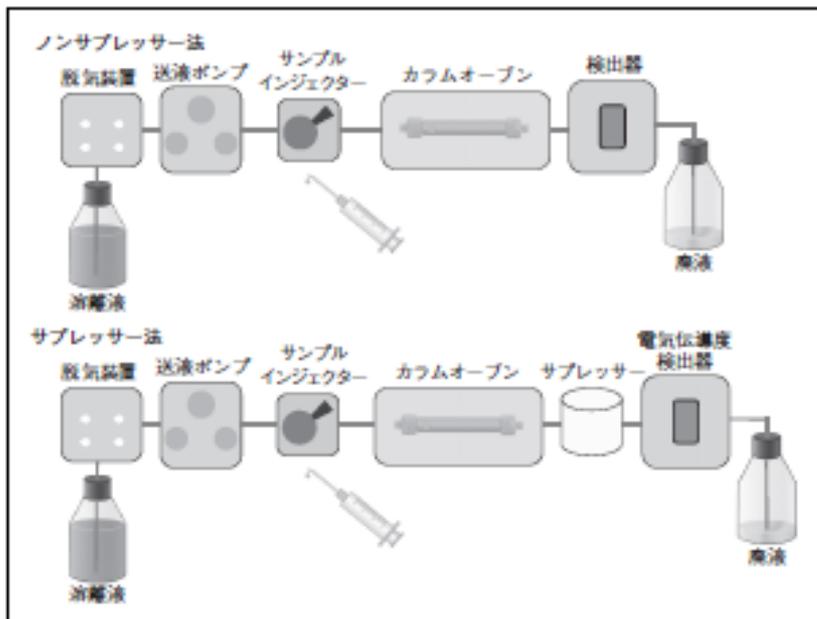


図-6 ICの検量構成

表-5 ノンサプレッサー法とサプレッサー法の違い

方式	利点	欠点
ノンサプレッサー法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・システム構成がシンプルのため汎用HPLCからの応用も可能</li> <li>・ランニングコストが安価</li> <li>・試料の測定濃度範囲が広い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・伝導率の低い溶離液しか使えないため測定条件の選択肢が少ない</li> <li>・サプレッサー法と比較して感度が低い (特に陰イオン測定)</li> </ul>
サプレッサー法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・電気伝導度検出を用いた高感度検出が可能 (陰イオン測定)</li> <li>・広い濃度範囲で溶離液を選択できるため、適用試料が広範囲</li> <li>・ウォーターディップが小さくなるため保持の弱い成分の定量が容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・サプレッサーを用意する必要がある</li> <li>・ランニングコストが高い</li> <li>・検量線が直線近似できない場合がある</li> </ul>

# 前処理(希釈、ろ過、固相抽出)

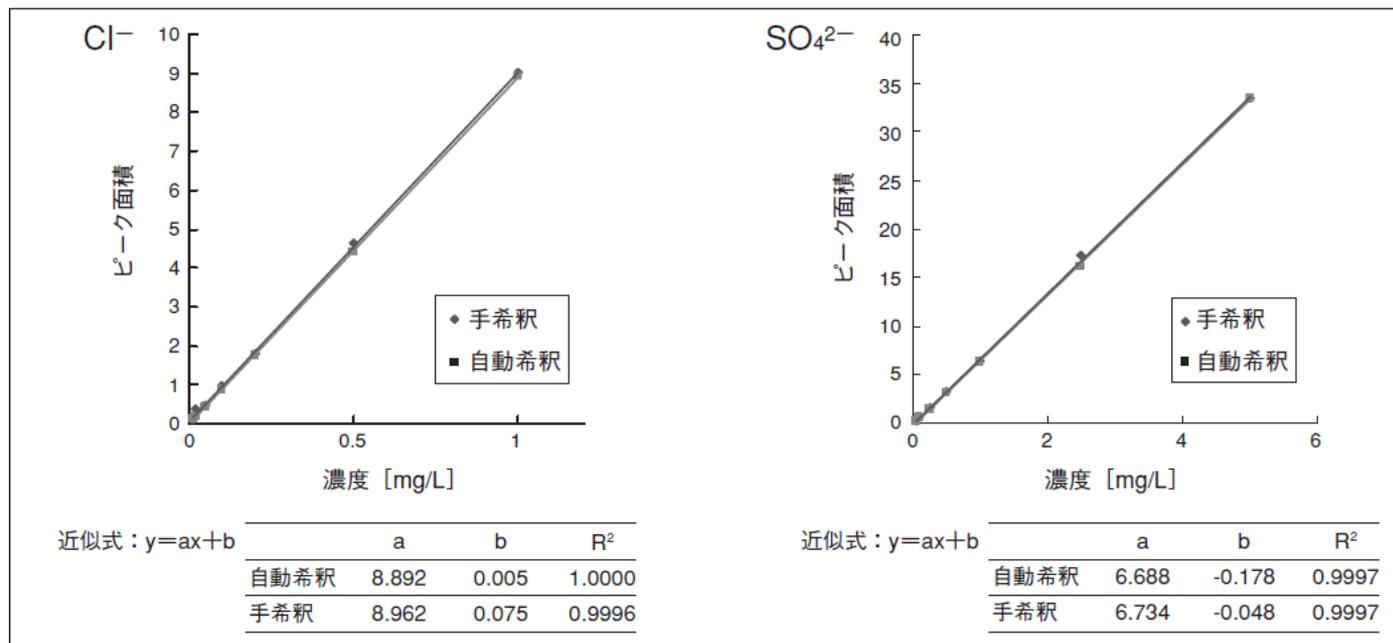


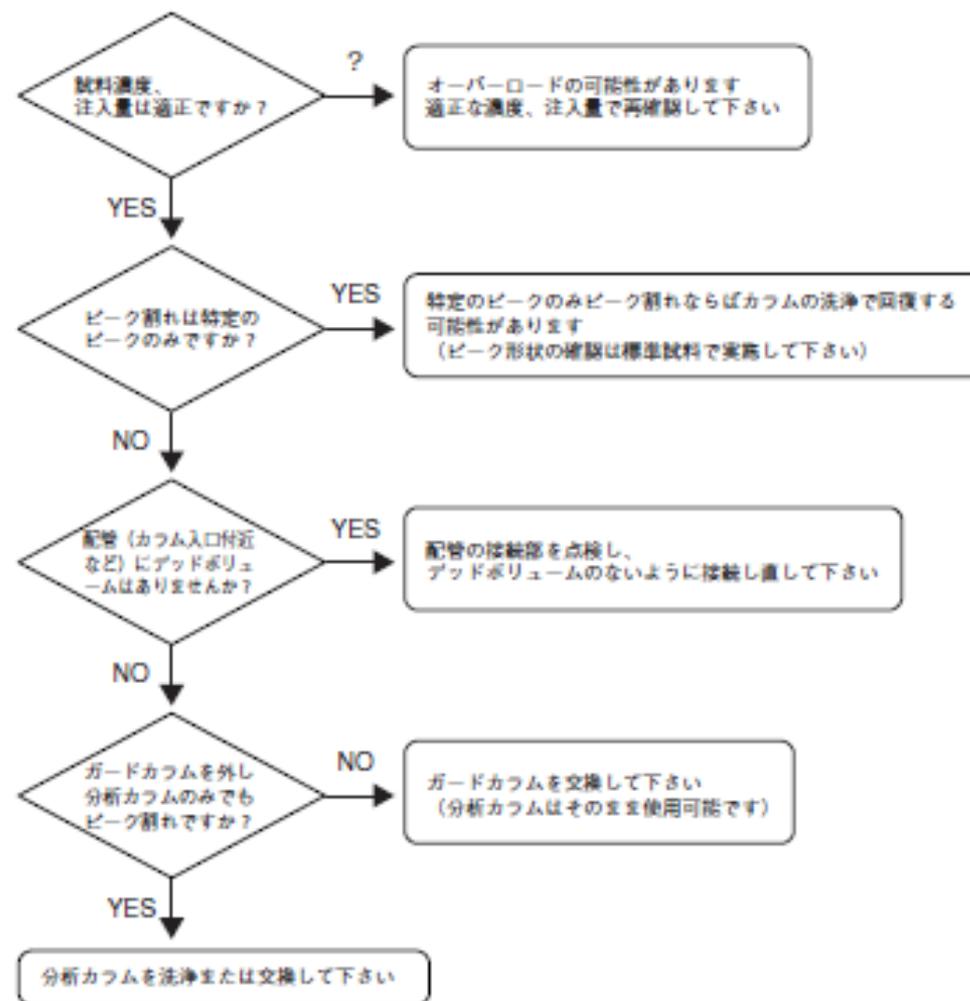
図-18 手希釈と自動希釈で作成した検量線の比較

**ポイント** 試料の特性に注意しましょう！

試料の特性が把握できていない場合、いきなり測定するのはカラムや装置にダメージを与える原因になります（試料の pH や含有有機溶媒など）。このような場合には、まず純水で 100 倍またはそれ以上の希釈を行い、前処理が必要か検討します。高希釈倍率では微量の目的成分が検出できない場合があるので、前処理が不要であれば希釈倍率を下げても最適化します。

# トラブルシューティング

●ピークが割れたり、ピーク形状が歪になる



# サイズ排除クロマトグラフィー読本



- 分離の原理
- 測定の手順
- カラムの選択
  - ・ 充填剤の種類と選択
  - ・ グレード(細孔径)
- 溶離液の選択
  - ✓ 溶離液の種類
  - ✓ 二次的相互作用
- 試料濃度
- 応用例

# カラムの選択

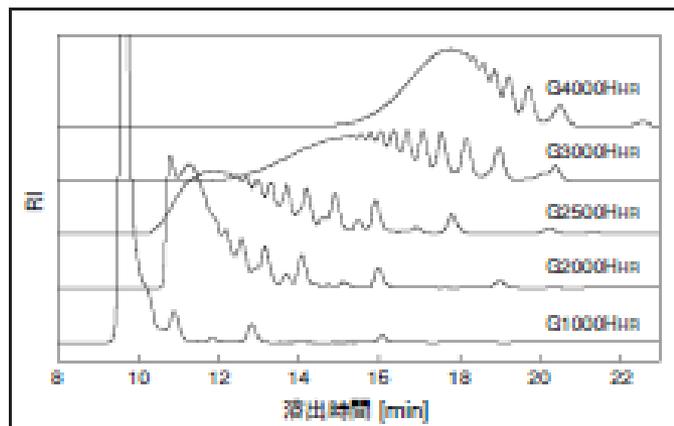


図18 TSKgel H<sub>8</sub> カラムでのエポキシ樹脂の測定

カラム：TSKgel H<sub>8</sub> シリーズ (7.8 mmID × 30 cm × 2)  
 溶媒液：THF  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：RI  
 温度：40℃  
 試料：エポキシ樹脂

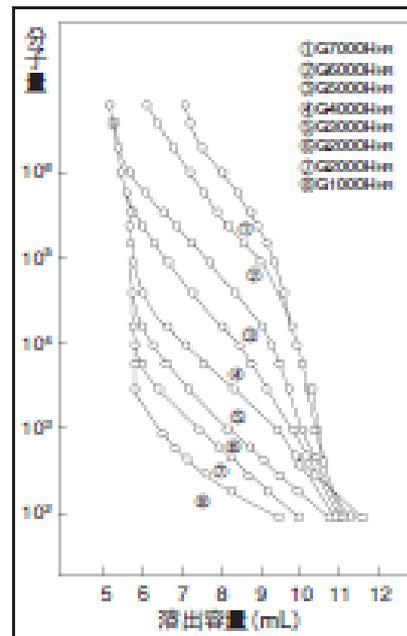


図19 TSKgel H<sub>8</sub> シリーズの校正曲線

カラム：TSKgel H<sub>8</sub> シリーズ (7.8 mmID × 30 cm)  
 溶媒液：THF  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV (254 nm)  
 温度：25℃  
 試料：標準ポリスチレン

- 正確な分子量測定には適切なカラムグレード（細孔径）の選択が重要です。

# 溶離液の選択

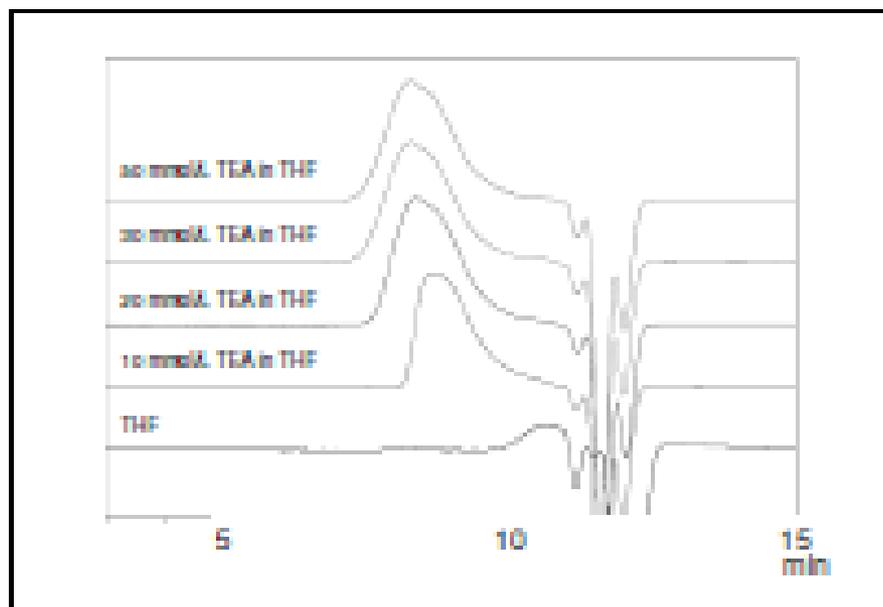


図25 溶離液へのTEA添加 (塩基性ポリマー測定例)

表

有機溶媒系 GPC	対処法		
酸性高分子	溶離液に酸を添加	リン酸、クエン酸など	5 ~ 100 mmol/L
塩基性高分子	溶離液にアミン添加	TEA、TMA など	5 ~ 100 mmol/L
水系 GPC	対処法		
酸性高分子	溶離液の緩衝液濃度を上げる		
塩基性高分子	硫酸ナトリウムと酢酸の混合溶離液を用いる 溶離液として酢酸緩衝液を用いる TSKgel PWxl-CP シリーズを用いる		

注) 溶離液に酸やアミンを添加して使用したカラムは、専用カラムとしてお使い下さい。

# 試料濃度

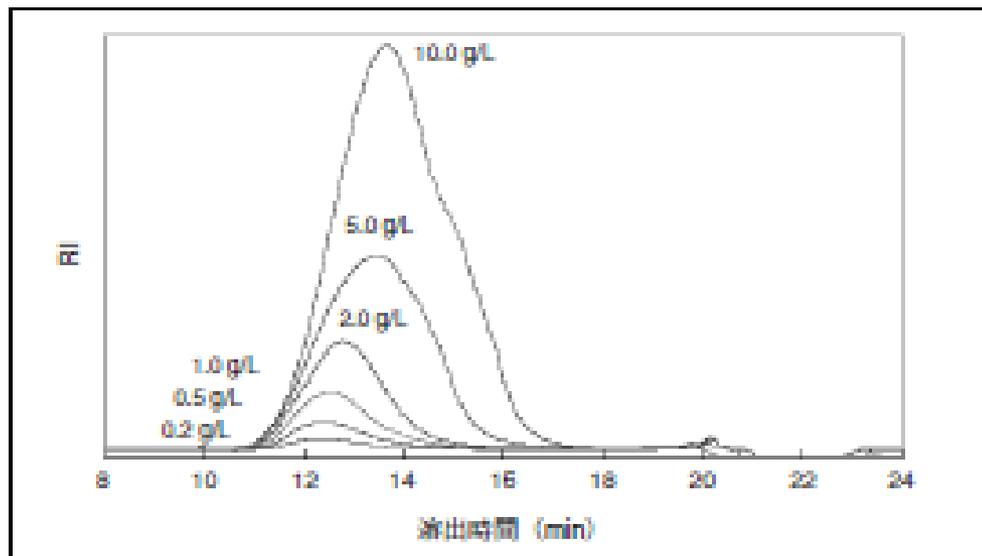


図28 試料濃度変化が及ぼすクロマトグラムへの影響

カラム：TSKgel GMHh. (7.8 mmID × 30 cm × 2)  
 流 速：1.0 mL/min  
 検 出：RI  
 温 度：40℃  
 注入量：100 μL  
 試 料：ポリイソブチレン

- 高分子は溶液中の濃度により見かけ上の分子サイズが変わります。
- 出来るだけ低濃度での測定が重要です。

# バイオセパレーション読本 **NEW**



- 高分子（たんぱく質、ペプチド、核酸など）を対象とした読本
- 各分離モードの特徴
- カラムの種類と選択方法
- 溶離条件の設定方法
- 応用例

# PEG化たんぱく質のSECによる分離

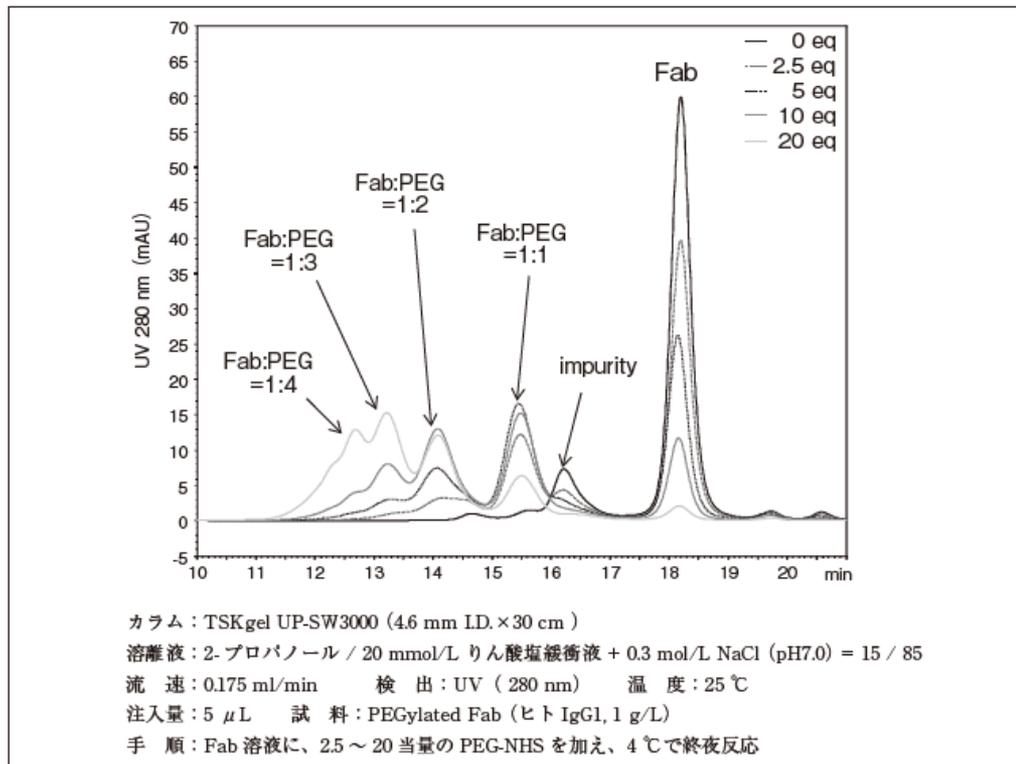


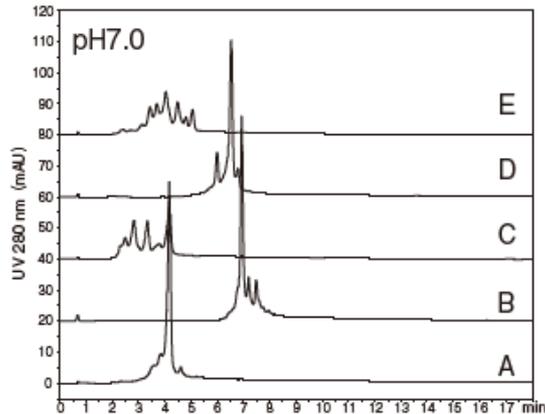
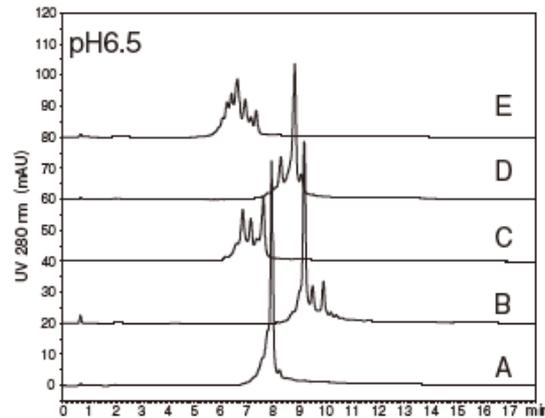
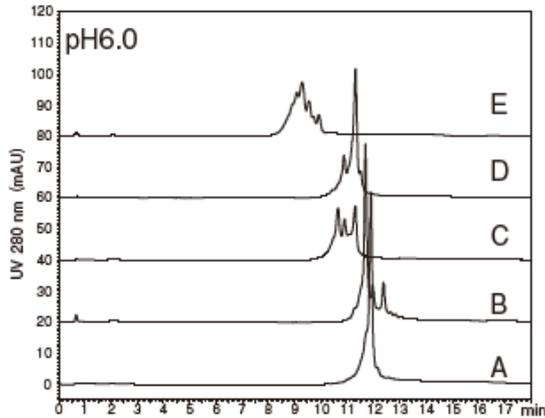
図 5-27 PEG 化たんぱく質の分離例

- PEG化FabのSEC分離
- Fab1分子当たりに結合したPEGの数により分離が可能



TOSOH

# 溶離液のpHが分離に与える影響 (IEC)



カラム：TSKgel CM-STAT (4.6 mm I.D.×10 cm)

溶離液：A：20 mmol/L MES + 20 mmol/L HEPES

緩衝液 (pH6.0, 6.5, 7.0)

B：20 mmol/L MES + 20 mmol/L HEPES

緩衝液 + 0.5 mol/L NaCl

(pH6.0, 6.5, 7.0)

グラジエント：リニアグラジエント

B 0%→30% (30 min)

流速：1.0 mL/min

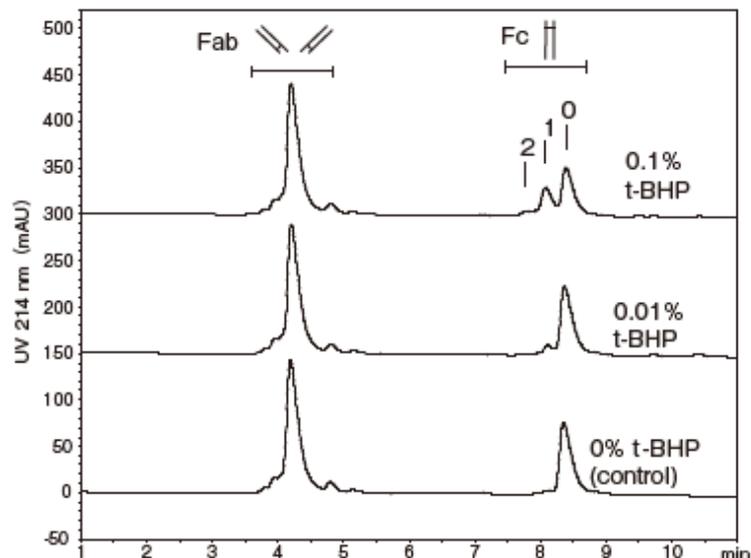
検出：UV (280 nm)

温度：25℃

試料：抗体医薬品, 0.5 g/L

- 抗体の荷電異性体を弱陽イオン交換クロマトグラフィーで分離
- 溶離液のpHにより、保持、分離選択性が変化する。

# Met酸化異性体の分離(HIC)



- 抗体Fc領域のメチオニン残基酸化異性体の分離
- 疎水クロマトグラフィーで、酸化メチオニン残基の数により分離が可能

カラム：TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液：A：20 mmol/L リン酸塩緩衝液 + 2 mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH7.0)

B：20 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)

グラジエント：リニアグラジエント B 25% → 60% (20 min)

流速：1.0 mL/min 検出：UV (214 nm) 温度：35℃ 注入量：2  $\mu\text{L}$

試料：ヒトモノクローナル抗体のメチオニン酸化異性体 (パパイン消化後), 2 g/L

# まとめ

- 測定対象の性質、分離モードの特徴を理解する。
- カラム、LCシステム(検出器)の特性を把握する。
- 溶離条件を選択・最適化する。
  - ✓ 溶離液の種類、pH、グラジエント条件、注入量
  
- 東ソーブース(6A-602)に各読本をご用意してお待ちしております。
- 是非実際にご覧になって下さい。