

SEPARATION REPORT

TSKgel PW_{XL} シリーズについて

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 特徴	1
3. 基本的性質	4
3-1 理論段数の流速依存性	4
3-2 イオンの性質	4
3-3 疎水性	5
3-4 熱安定性	6
3-5 溶媒適合性	7
4. カラムの選択	9
4-1 PW タイプと SW タイプの選択	9
4-2 PW タイプの中での最適カラム選択	12
5. TSKgel PW タイプの全シリーズ	13
6. 使用上の注意点	14
6-1 システムとの関係 (十分な性能が出ない時の一因)	14
6-2 カラムの劣化対策	14
7. おわりに	14

1. はじめに

過去約10年の間に、高速ゲル透過クロマトグラフィ (high performance gel filtration chromatography、以下HPGFCと略記します。) は急速に進歩し、幾つかの優れた総説 (1 - 7) も発表されています。1978年より販売されている TSKgel PWタイプはHPGFCの分野において先駆的な製品の一つであり、その基本的な性質 (8 - 13) や応用について多くの文献が発表されてきています。代表的な応用例としては、多糖類 (8、11、13 - 19)、核酸 (20、21)、巨大タンパク質 (14、22 - 31)、小ペプチド (32、33) などの生体高分子をはじめとして水溶性合成高分子 (8、13、14、34 - 37)、およびオリゴマー (2、13、38 - 44) などに関するものがあります。

1984年秋より、TSKgel PWタイプの高性能化および応用範囲の拡大を目的としてPW_{XL}シリーズを発売しております。PW_{XL}シリーズは表1に示すような8種類のグレードからなり、うち6グレードは一般用のPW_{XL}シリーズ、あとの2つはオリゴマーおよび巨大DNAフラグメント分離用の専用カラムです。PW_{XL}シリーズの主な特徴と改良点を従来のPWシリーズとの比較において以下に示しました。

1) 高性能

PW_{XL}シリーズの単位長さ当りの理論段数は、相当する従来のPWシリーズと比べて保証値で2.8倍以上、実用的には、およそ2倍である。従ってPW_{XL}シリーズの分離能は、従来のPWシリーズ30cmカラムと比べて約1.4倍向上し、60cmカラムとの比較では同等ですが、測定時間が約半分に短縮されます。

2) TSKgel GMPW_{XL}

従来から好評の有機溶媒GPC用カラムTSKgel GMH_{XL}に相当するこのグレードは、広い分子量範囲にわたって、検量線にすぐれた直線性があり、分布の広い水溶性合成高分子の測定では、一種の万能カラムです。

3) TSKgel G2500PW_{XL}

PWシリーズの問題点の一つとして、小さなポアサイズのグレード (TSKgel G2000PW) と大きなポアサイズのグレード (TSKgel G3000PW~TSKgel G6000PW) との間に化学的性質の違いがあります。というのは、前者はかなりの量のイオン基 (カチオンとアニオン) を有するのに対して、後者はごく少

量のアニオン基のみを有します。そのために TSKgel G2000PWを他のグレードと組み合わせて使う場合混乱を生じることが多くありました。このことを改良するために、TSKgel G2500PWを新たに加えました。TSKgel G2500PWは大きいポアサイズのグレードと化学的性質がほぼ同じであり、それらと組み合わせて使うことができます。TSKgel G2500PWの検量線はTSKgel G2000PWのほとんど同じです。しかし低分子領域では、TSKgel G2000PWの方がTSKgel G2500PWに勝っています。

4) TSKgel G-Oligo-PW

TSKgel G2500PW_{XL}に比べて更に非イオン性オリゴマーおよびカチオン性オリゴマーの分離能を向上させるために、TSKgel G-Oligo-PWを新たに加えました。TSKgel G-Oligo-PWの充填剤はTSKgel G2000PWの充填剤と同じようにカチオン性を示します。従って、TSKgel G-Oligo-PWでアニオン性試料を測定する場合にはイオンの相互作用についての十分な配慮が必要です。

5) TSKgel G-DNA-PW

TSKgel G-DNA-PWは、巨大分子のポリヌクレオチド (例えば、500~5000塩基対のDNAフラグメントのような) を分離するための専用カラムです。TSKgel G-DNA-PWは、小さな粒子径 (10 μ m) と4000Åという大きなポアサイズをもっているために、巨大DNAフラグメントを塩基対が2倍違えばほぼ完全に2時間以内で分離することができます。

なお、このレポートではPW_{XL}シリーズの特徴および基本的性質について述べます。またHPGFC用TSKカラムの選択法についても総括します。

2. 特徴

表1にPW_{XL}シリーズの排除限界分子量および理論段数を示しました。

表2にポリエチレンオキッドおよびポリエチレングリコールに対する分画範囲を示します。

PW_{XL}シリーズのカラムサイズはすべて7.8mmID×30cmです。PWシリーズに比べてより小さな粒子を使用しているため、保証理論段数は表3に示したように従来の

表1 TSKgel PW_{XL}シリーズ

カラム	粒径 μm	保証理論段数*1 (TP/m)	排除限界分子量*2			カラム寸法 mmID×cm
			PEO	Dextran	Protein	
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	5×10 ³			7.8×30
TSKgel G-DNA-PW	10	10,000	2×10 ⁷			

注 *1 理論段数測定条件

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 予 想 値

表2 分子量分画範囲

『ポリエチレンオキシド (PEO) 及ポリエチレングリコール (PEG)』

カラム	分子量分画範囲
TSKgel G2500PW _{XL}	～ 3,000
TSKgel G3000PW _{XL}	～ 40,000
TSKgel G4000PW _{XL}	2,000～ 300,000
TSKgel G5000PW _{XL}	4,000～ 800,000
TSKgel G6000PW _{XL}	40,000～8,000,000
TSKgel GMPW _{XL}	1,000～8,000,000
TSKgel G-Oligo-PW	～ 3,000
TSKgel G-DNA-PW	40,000～8,000,000

表3 PWシリーズとPW_{XL}シリーズとの保証理論段数の比較

	PWシリーズ		PW _{XL} シリーズ
	7.5mmID×60cm	7.5mmID×30cm	7.8mmID×30cm
TSKgel G2500PW	10,000 _{TP/カラム}	5,000 _{TP/カラム}	14,000 _{TP/カラム}
TSKgel G3000PW	10,000	5,000	14,000
TSKgel G4000PW	6,000	3,000	10,000
TSKgel G5000PW	6,000	3,000	10,000
TSKgel G6000PW	6,000	3,000	7,000
TSKgel GMPW	6,000	3,000	7,000

TSKgel PWシリーズの理論段数と比べて2.8倍以上あります。図1～3に上述の標準試料により測定したTSKgel PW_{XL}シリーズの較正曲線を示します。

図4にPEGで測定したTSKgel G-Oligo PWカラム(実線)とTSKgel G2500PW×Lカラム(点線)の較正曲線を示しました。

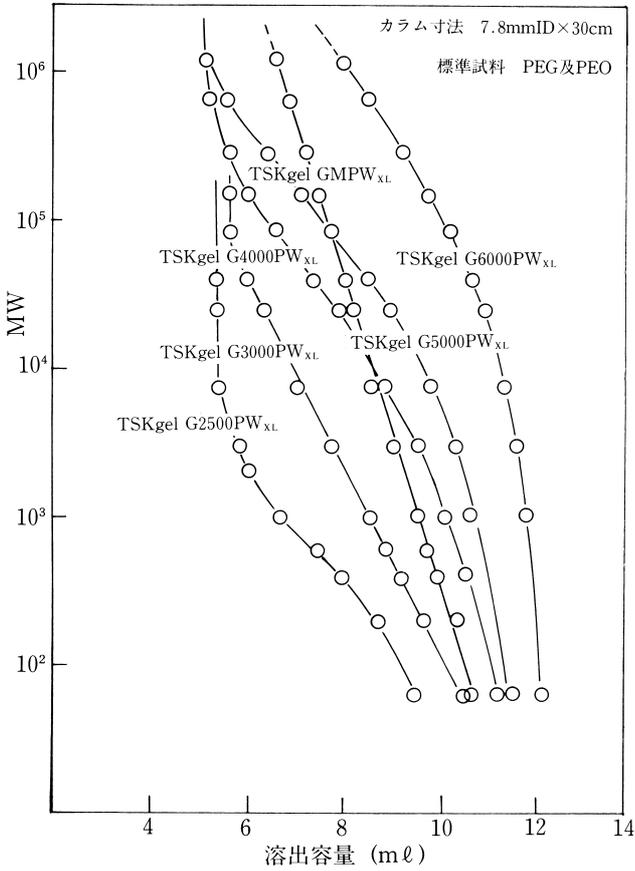


図1. PEG及PEOを用いた較正曲線

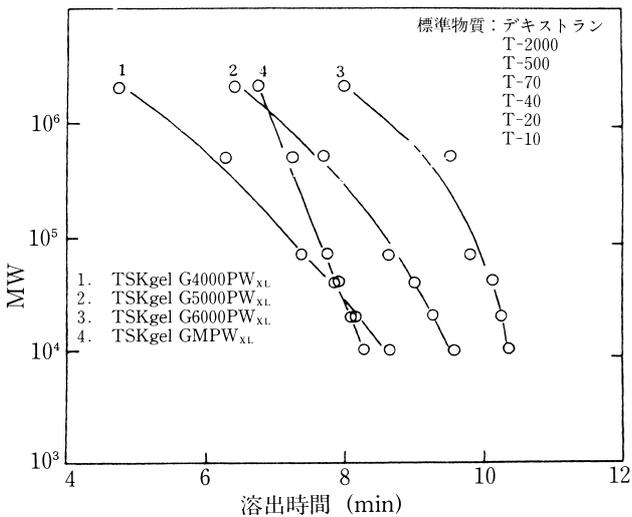


図2. デキストランを用いた較正曲線

カラム寸法: 7.8mmID×30cm

溶離液: 0.2Mリン酸緩衝液 (pH6.8)

流速: 1.0ml/min

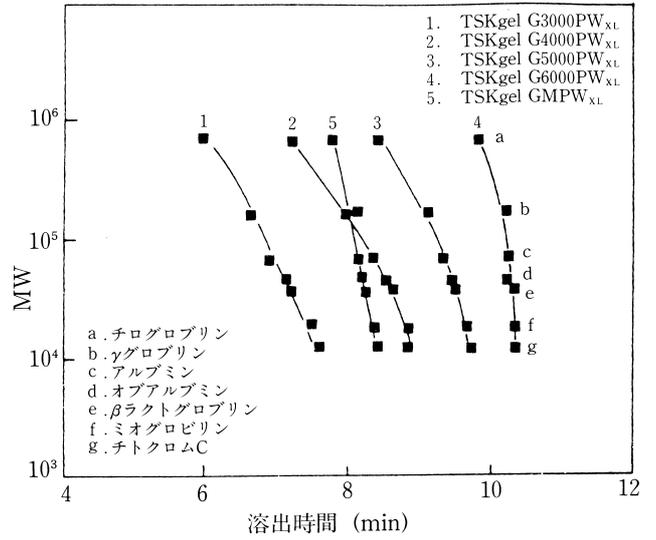


図3. タンパク質を用いた較正曲線

カラム寸法: 7.8mmID×30cm

溶離液: 0.2Mリン酸緩衝液

流速: 1.0ml/min

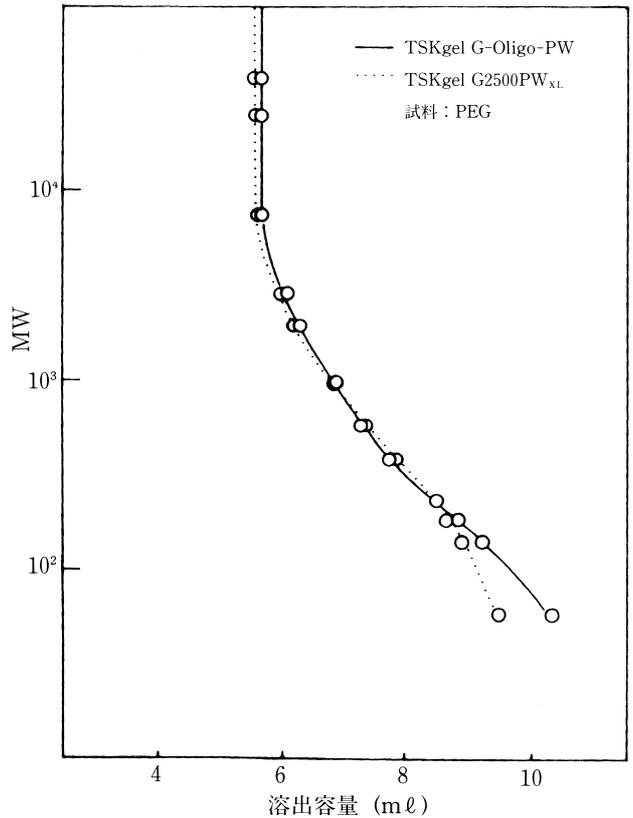


図4. 較正曲線の比較

3. 基本的性質

3-1 理論段数の流速依存性

流速の理論段数への影響は、充填剤の粒子径、試料の分子の大きさ、溶離液の粘度などに依存します。代表的な例として図5にエチレングリコール(代表的な低分子)のTSKgel G2500PW_{XL} (PW_{XL}シリーズの中で最小粒子径6 μ mを使用)での理論段数の流速への依存性とTSKgel G6000PW_{XL} (PW_{XL}シリーズの中で最大粒子径13 μ m使用)でのポリエチレンオキシド(代表的な巨大分子)の理論段数の流速への依存性を示します。前者の理論段数は、ほとんど一定であるのに比べ後者の理論段数は流速が増大するとかなり減少します。従ってポアサイズの大きなグレードで高分子の試料を測定する場合には、低い流速で使用することが好ましいといえます。

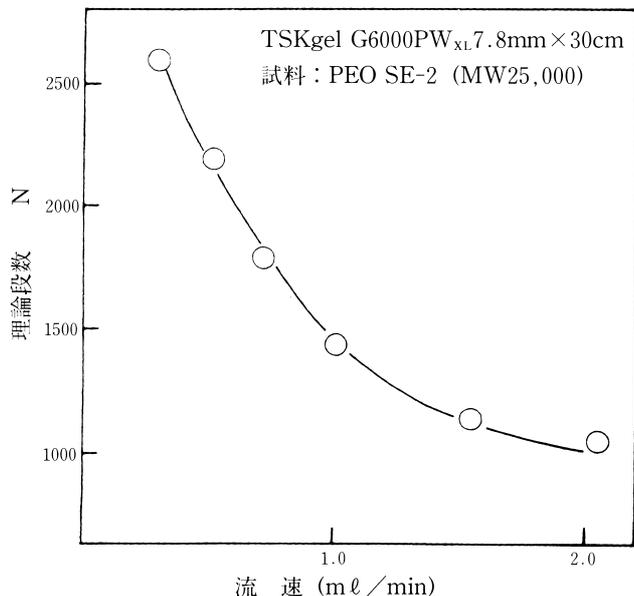
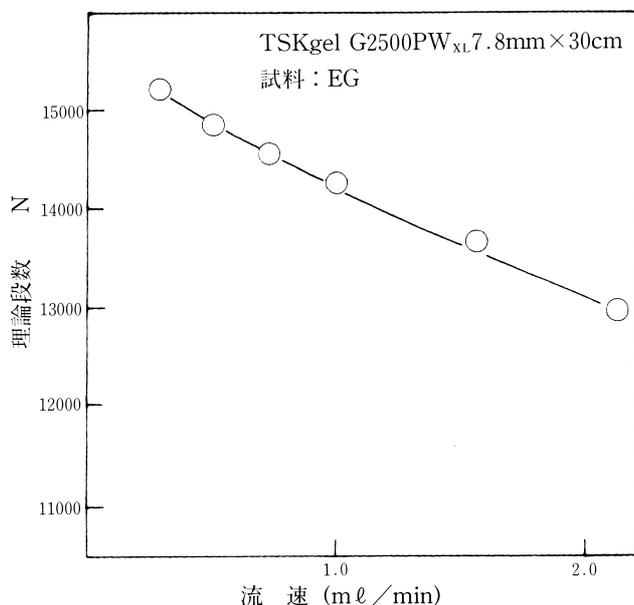


図5. 理論段数の流速への依存性

3-2 イオンの性質

図6に0.1N NaOH溶液でのPW_{XL}シリーズゲルの滴定曲線を示します。そのすべてのグレードにおいてごく少量の弱アニオン基を有することがわかります。溶離液のイオン強度が低い場合、アニオン性の試料は、イオン排除により理論的に予想されるよりも早く溶出します。一方、カチオン性の試料は、イオンの吸着により、遅れて溶出します。このようなイオンの相互作用を除去するために通常は0.1M以上のイオン強度をもつ溶離液を使用します。

図7にTSKgel G2000PWとTSKgel G2500PWの滴定曲線の違いを示します。後者は、イオンの性質をより改良したものです。

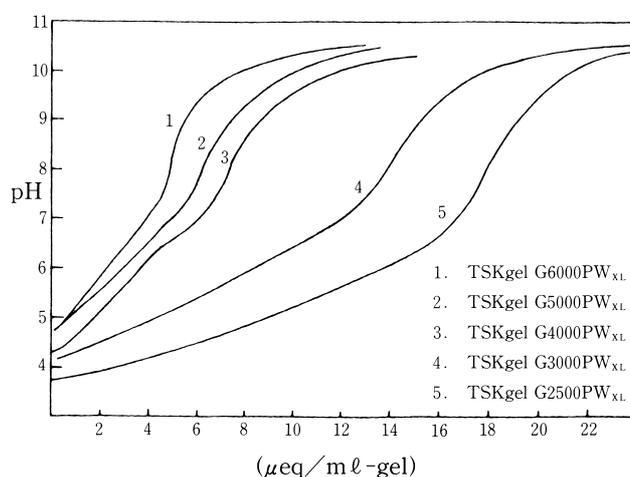


図6. 滴定曲線

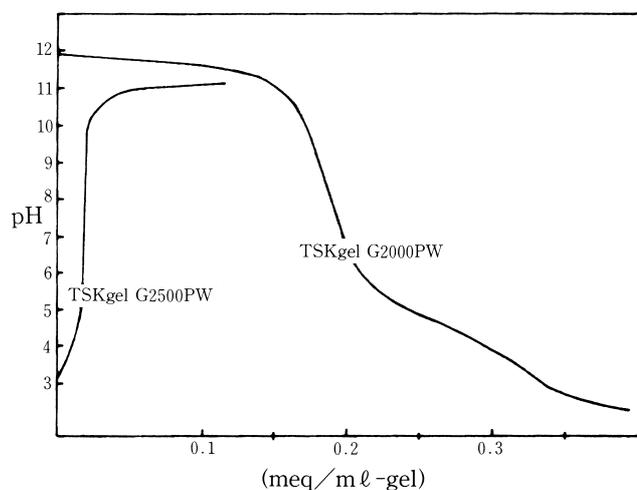


図7. 滴定曲線の比較

図8にTSKgel G2500PW_{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もTSKgel G2000PWと同様のイオン性を有するためAMPのようなアニオン性の試料に対して強い吸着性を示します。

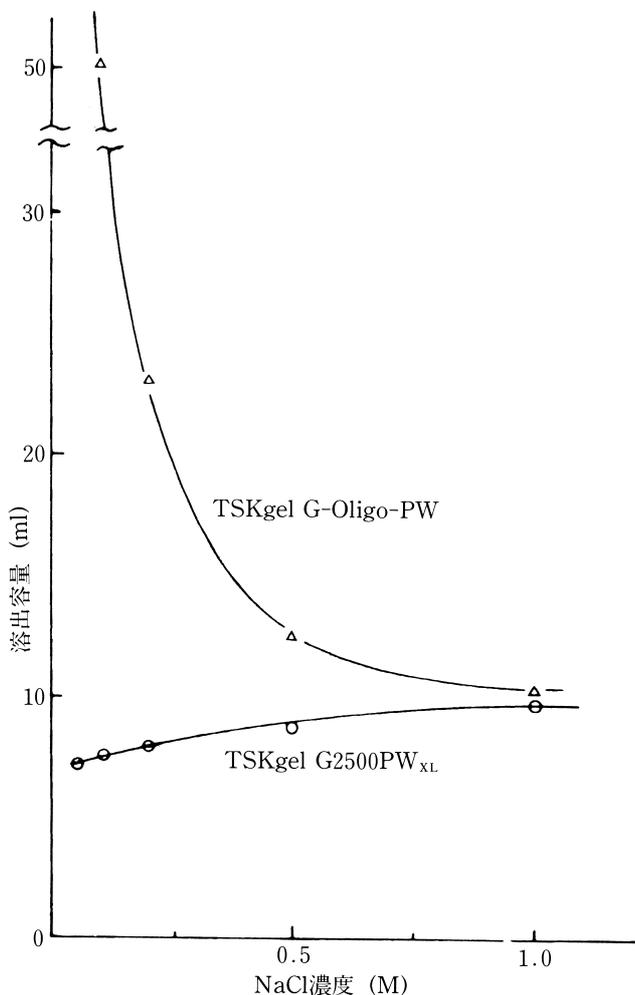


図8. 塩濃度依存性の比較

試料：AMP

カラム寸法：7.8mmID×30cm

溶離液：0.02Mりん酸緩衝液 (pH6.8)

+0.05M~1.0M NaCl

3-3 疎水性

TSKgel PWタイプゲルは、デキストランゲルのような多糖ゲルに比べるとより高い疎水性を示します。

表4にTSKgel G2500PW_{XL}におけるアルコール類のk'を示しました。アルキル基が長くなるほど遅れは大きくなります。疎水的相互作用は溶離液の塩濃度が高くなると強くなる傾向にあります。一方、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。アルコールの溶出容量の塩濃度への依存性を図9に示します。

図10にβ-フェネチルアルコール、アデニン、アデノシンおよびトリプトファンの溶出容量のアセトニトリル濃度への依存性を示します。この実験に用いた試料はいずれもPWタイプゲルと強い疎水的相互作用を示す代表的な水溶性低分子物質です。図10から明らかなようにアセトニトリル濃度50%においてはほぼ正常な溶出位置に溶出します。

図11に示すようにβ-フェネチルアルコールの疎水的相互作用は温度の上昇とともに低下します。

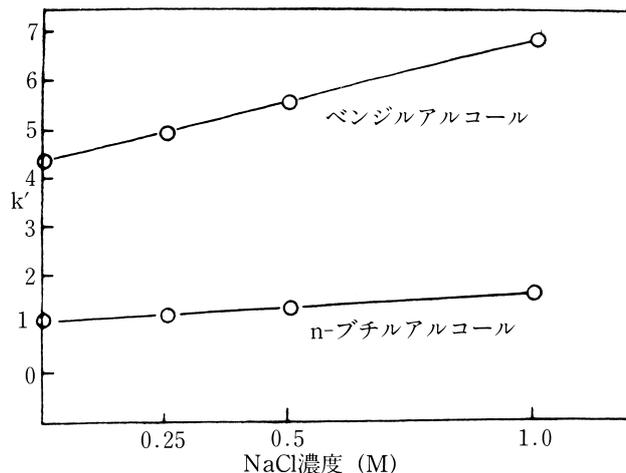


図9. k'の塩濃度依存性

カラム：TSKgel G2500PW_{XL}

カラム寸法：7.8mmID×30cm

表4. アルコール類のk'

	エチルアルコール	イソプロピルアルコール	n-ブチルアルコール	β-フェネチルアルコール
TSKgel G2500PW _{XL}	0.16	0.45	0.93	5.53
TSKgel G3000PW _{XL}	0.14	0.35	0.82	5.20
TSKgel G4000PW _{XL}	0.09	0.22	0.49	2.84
TSKgel G5000PW _{XL}	0.07	0.19	0.44	2.84
TSKgel G6000PW _{XL}	0.05	0.15	0.37	2.55

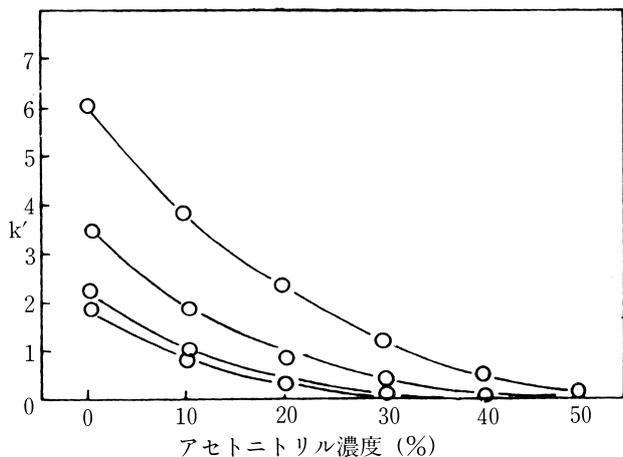


図10. k' の有機溶媒依存性

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) L-トリプトファン

流速: 1.0ml/min

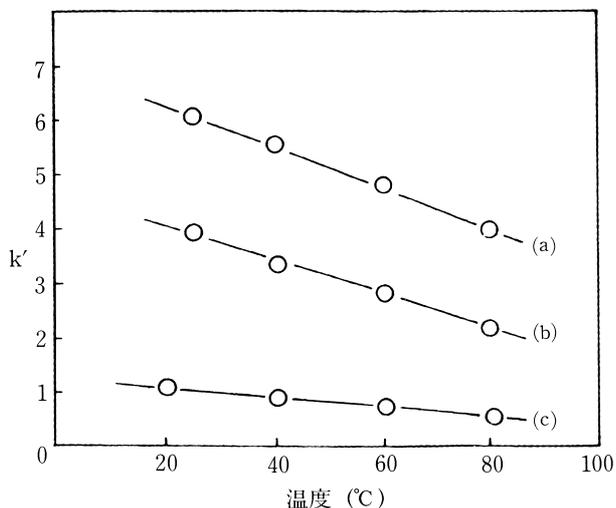


図11. k' の温度依存性

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) H₂O

(b) 10%CH₃CN

(c) 30%CH₃CN

流速: 1.0ml/min

3-4 熱安定性

すべてのPWタイプゲルは中性水溶液中で熱に安定で120°Cにおいてオートクレーブにより加熱することができます。カラムは通常、中性水溶液で80°C以下で使用することができます。高いpHおよび低いpH溶液では高い温度で使うことはできません。

図12に60°CにおけるTSKgel G-Oligo-PW、TSKgel G 2500PW_{XL}、TSKgel GMPW_{XL}カラムのランニングテストの実験結果を示します。3ヶ月の連続運転中、理論段数および圧力損失はほとんど一定でした。

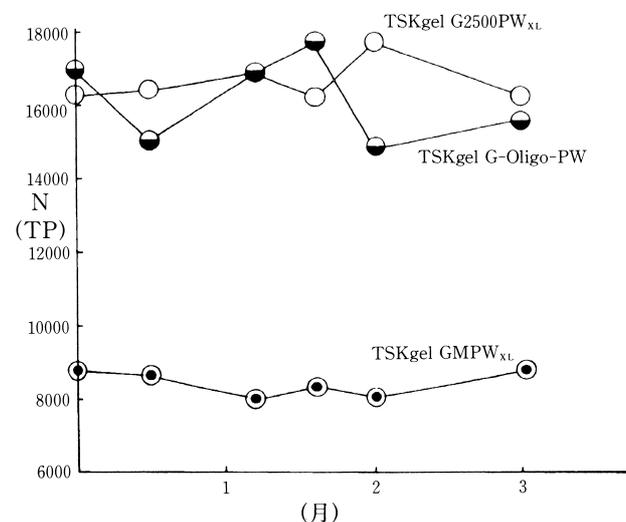


図12. 熱安定性

測定条件

流速: 1.0ml/min

温度: 25°C

試料: 1%エチレングリコール20 μ l

ランニング条件

流速: 1.2ml/min

温度: 60°C

3-5 溶媒適合性

1) 有機溶媒

有機溶媒はしばしば試料と充填剤の間の疎水的相互作用をおさえるために使われます。

表5に代表的な例を示しました。PW_{XL}シリーズ (TSKgel G-DNA-PWは除く) を含めたすべてのPWタイプゲルはメタノール、エタノール、イソプロ

パノール、アセトニトリル、ギ酸、酢酸、DMF、DMSO、アセトンなどのような有機溶媒の少なくとも20%水溶液で使用することができます。

また、表6に示したようにいくつかの代表的な溶媒に対してより高い濃度での適用性について検討しました。

表5. 有機溶媒使用例

No.	試料	カラム	溶離液	文献
1	ペプチド	TSKgel G3000PW	36~45%CH ₃ CN (含0.1% TFA)	32,33
2	ポリビニルピロリドン	TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PW	20%CH ₃ CN (含0.1M酢酸ナトリウム)	14
3	ポリスチレンスルホン酸	TSKgel G6000PW+TSKgel G3000PW	10%CH ₃ CN+0.2Mりん酸緩衝液	14
4	ポリジメチルアミノエチル メタクリル酸	TSKgel G6000PW+TSKgel G3000PW	0.5M酢酸+0.5M酢酸ナトリウム	14
5	ポリエチレンイミン	TSKgel G6000PW+TSKgel G3000PW	〃	14
6	キトサン	TSKgel G6000PW+TSKgel G3000PW	〃	14
7	グリコールキトサン	TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PW	0.5M酢酸+0.3M硫酸ナトリウム	14
8	ポリ(4-ビニルベンジル トリメチル塩化アンモニウム)	TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PW	1~5%酢酸+0.1M硫酸ナトリウム	35
9	リン酸セルロースとN-ビニル- 2-ピロリドンの反応生成物	TSKgel G4000PW+TSKgel G3000PW	10%CH ₃ CN+0.3%酢酸 +0.1%トリエチルアミン	15

表6. 有機溶媒の適用性

	H ₂ O/MeOH 50/50	H ₂ O/CH ₃ CN 50/50	H ₂ O/HCOOH 50/50	H ₂ O/DMSO 50/50
TSKgel G2500PW _{XL}	1) 15,200 2) 15,100 3) 14,800	1) 14,700 2) 15,200 3) 15,000	1) 15,600 2) 15,300 3) 14,200	1) 16,600 2) 18,000 3) 17,400
TSKgel G3000PW _{XL}	1) 17,200 2) 16,500 3) 16,200	1) 16,000 2) 16,500 3) 15,700	1) 18,300 2) 19,100 3) 18,600	1) 18,000 2) 18,500 3) 18,700
TSKgel G5000PW _{XL}	1) 12,400 2) 11,000 3) 11,800	1) 13,000 2) 12,500 3) 12,300	1) 12,400 2) 12,000 3) 11,800	1) 13,700 2) 13,700 3) 13,900
TSKgel G6000PW _{XL}	1) 7,800 2) 7,300 3) 8,200	1) 8,800 2) 8,100 3) 8,400	1) 8,000 2) 7,800 3) 7,800	1) 8,800 2) 8,800 3) 8,200
TSKgel G-Oligo-PW	1) 16,200 2) 17,100 3) 16,900	1) 17,200 2) 17,400 3) 16,900	1) 16,400 2) 16,000 3) 16,100	1) 14,800 2) 15,200 3) 14,200

- 1) テスト前の理論段数 (TP/カラム)
- 2) 溶媒交換後の理論段数
- 3) 再度溶媒交換後の理論段数

理論段数の測定は、1)、2)、3) のいずれも、1%エチレングリコール水溶液20μl

溶媒交換はグラジエント装置を用いて図13に示すように連続的に溶媒組成を変化させて流速0.5ml/minでゆっくりと行いました。

溶媒交換時における圧力変化の例を図14に示しました。少なくとも表6に示しましたPW_{XL}カラムおよび、TSKgel G-Oligo-PWカラムは溶媒交換を注意深く行うことによりメタノール、アセトニトリル、

ギ酸、DMSOの50%水溶液で使用することができます。

2) pH

PW_{XL}カラムは室温でpH 2 - 12の範囲で使用することができます。高温におけるアルカリ性あるいは酸性水溶液での使用は、カラムが劣化する恐れがありますのでおすすめできません。

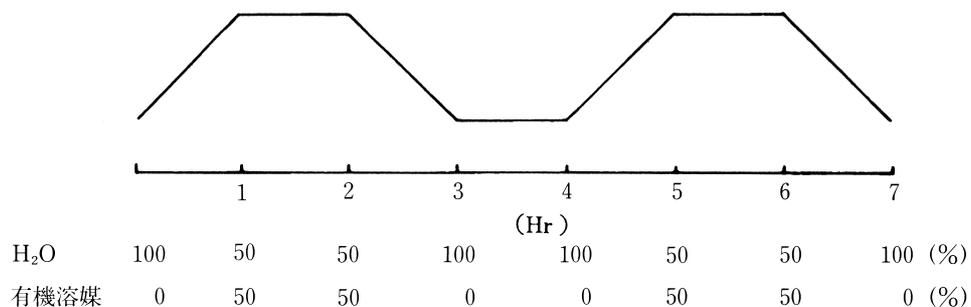


図13. 表6における溶媒交換時のグラジエントカーブ

条件：60分リアグラジエント

流速 0.5ml/min

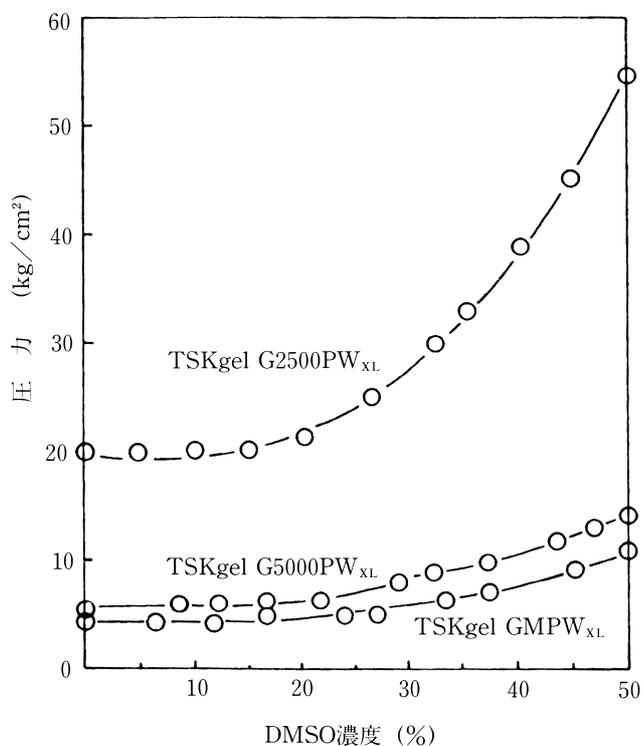


図14. 溶媒交換時の圧力変化

溶離液：50%DMSO

カラム寸法：7.8mmID×30cm

流速：0.5ml/min

4. カラムの選択

高性能GFCカラムを効率よく使うためには、使用目的に最も適するカラムの選択が必要です。高性能GFC用

TSKgel は、全部で18種類(3種類のSWタイプ、7種類の通常のPWシリーズと8種類のPW_{XL}シリーズ)ありますので、おのこの目的のために最適のカラムを選択することは容易ではありません。

表7に、カラムを選択するための大まかな考え方を代表的な例によって示しました。カラムの選択にあたっては種々の要因、たとえば、分離能、分子量分画範囲、較正曲線の直線性、吸着性、回収率、溶媒交換性、カラムの寿命、試料負荷量、システムのデッドボリュームなどを考慮する必要があります。

表7. カラムの選択

試料		カラム選択		選択のポイント
		第1選択	第2選択	
炭水化物	多糖類	TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} +G3000PW _{XL}	大孔径 較正曲線の直線性
	オリゴ糖	TSKgel G-Oligo-PW	TSKgel G2500PW _{XL} TSKgel G2000PW	分離能
核酸	DNA フラグメント	高分子	TSKgel G-DNA-PW TSKgel G5000PW _{XL}	大孔径 分離能
		中低分子	TSKgel G4000SW TSKgel G3000SW	適当な孔径 分離能
	RNA	TSKgel G4000SW TSKgel G3000SW		
	オリゴヌクレオチド	TSKgel G2500PW _{XL}		小孔径 イオン相互作用
タンパク質	普通タンパク質	TSKgel G3000SW TSKgel G4000SW TSKgel G2000SW	TSKgel G3000PW _{XL} TSKgel G4000PW _{XL}	分離能
	高分子 タンパク質	LDL	TSKgel G6000PW _{XL} TSKgel G5000PW _{XL}	大孔径 分離能
		ゼラチン	TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} +G3000PW _{XL}
ペプチド	高分子	TSKgel G3000SW TSKgel G2000SW	TSKgel G3000PW _{XL}	
	低分子	TSKgel G2500PW _{XL}	TSKgel G2000SW	較正曲線の直線性 分離能
ウイルス		TSKgel G6000PW _{XL} TSKgel G5000PW _{XL}		大孔径 分離能
合成高分子		TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} +G3000PW _{XL}	大孔径 較正曲線の直線性 低吸着性
合成 オリゴマ	非イオン性	TSKgel G-Oligo-PW	TSKgel G2500PW _{XL}	小孔径 分離能
	カチオン性			
	アニオン性	TSKgel G2500PW _{XL}	イオンの相互作用	

4-1 PWタイプとSWタイプの選択

通常、タンパク質や核酸のような単一分散である生体物質の分離に対しては、高分子領域において検量線の傾きが小さいSWタイプの方が、分離能が優れています。一方較正曲線に直線性があり、大きい排除限界分子量をもつPWタイプは、多量類及び水溶性合成高分子などのような多分散試料の分離に適しています。

1) 多糖類

中性の多糖類は、SWタイプに対してもPWタイプに対しても素直な溶出挙動を示す代表的な物質です。

多糖類は通常広い分子量分布をもっていますので、PWタイプがこれらの測定に対して使用されます。

Alsopら (16) は、PWタイプ (TSKgel G5000PW

+TSKgel G3000PW)が臨床用デキストランのキャラクタリゼーションにおいて、非常に有効であることを報告しています。すぐれた再現性や精度とともに、カラムの2年以上にもわたる長期耐久性についても確かめられています。加藤ら(19)はPWタイプ(TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PW)を用いて、プルランのキャラクタリゼーションを行いました。

高木ら(19)はPWタイプ(TSKgel G6000PW+TSKgel G4000PW+TSKgel G3000PW)と低角度光散乱光度計を用いて、ユリのアミラーゼのキャラクタリゼーションを行い、従来の方法に比べて、試料と時間を大幅に削減できることを報告しています。

加藤ら(18)は、錠剤コーティング用のヒドロキシプロピルセルロースおよびヒドロキシプロピルメチルセルロースの分子量および分子量分布測定にPWカラムを用いたGFC/LS法を適用し、良好な結果を報告しています。その他、コンドロイチン硫酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、マンナン、でんぷんおよびカルボキシメチルセルロースのようないくつかの多糖類の溶出パターンは、文献(14)に報告されています。

2) 核酸

低分子の核酸は、加藤ら(21)によって示されているように、SWタイプによって分離できますが、大きい分子量の核酸(2重鎖DNAフラグメントで分子量約250,000以上)は、TSKgel G-DNA-PW、TSKgel G6000PW_{XL}およびTSKgel G5000PW_{XL}のような大きいポアサイズのPWタイプによって分離することができます。通常、核酸は単一分散の分子として存在していますので、PW_{XL}シリーズのもつ高分離能が従来のカラムと比較してより効果的となります。表8に2重鎖DNAフラグメントの分離における最適カラムを示します。

図15に流速の理論段数への依存性、図16に塩濃度と溶出容量の関係を示します。

表8. 2重鎖DNAフラグメント分離用最適カラム

塩基対数 (bp)	最適カラム
2重鎖DNAフラグメント	
<80	TSKgel G2000SW または TSKgel G3000SW
80~160	TSKgel G3000SW
160~500	TSKgel G4000SW
500~2000	TSKgel G5000PW
2000~7000	TSKgel G-DNA-PW

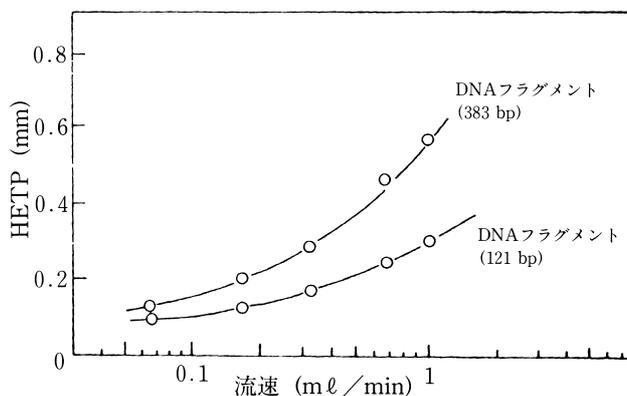


図15. 流速依存性

カラム: TSKgel G5000PW

カラム寸法: 7.5mmID×120cm (60cm×2)

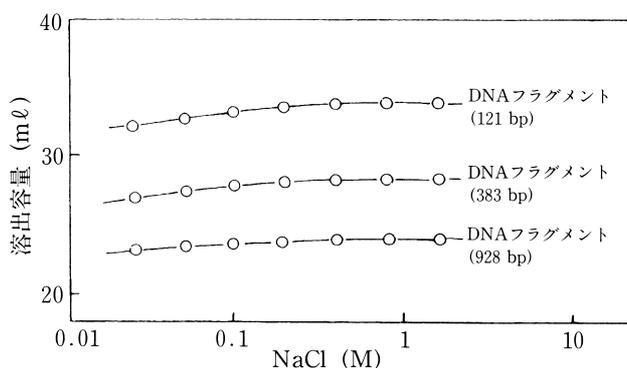


図16. 塩濃度と溶出容量との関係

カラム: TSKgel G5000PW

カラム寸法: 7.5mmID×120cm (60cm×2)

溶離液: 0.01M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5)

+0.025~1.6M NaCl+1mM EDTA

流速: 1.0ml/min

3) タンパク質およびペプチド

一般的なタンパク質の分離においてPWタイプよりSWタイプの方がすぐれていることは、加藤(11)、Alfredson(12)および渡辺ら(46)により述べられている通りです。GFCカラムの分離能は、主に細孔の大きさ、細孔分布および細孔容積などで決定される検量線の傾きと主に粒子径により決定される理論段数に依存しています。PW_{XL}シリーズは、SWタイプと同じような粒子径(又は、TSKgel G4000SWと比較してかなり小さい粒子径)を使用しているけれども、小さい細孔容積と広い細孔分布のためにタンパク質の分離にはSWタイプに比べてよくありません。しかしながら、次に述べる場合には、SWカラムよりもPWカラムを選択してください。

a) 溶離液としてpHの高い水溶液を使用しなければならぬ場合にはSWタイプは使用できませんのでPWタイプを使用します。また分取GFCにおいてはアルカリ水溶液による定期的なカラムの先浄再生などの必要性もあるため、分離が満足されればPWタイプの方がカラム耐久性の面から好ましいと思われ

ます。b) リポタンパク質 (LDL、VLDL)、ゼラチン、海虫クロロクルオリンなどの巨大タンパク質の測定においては、TSKgel G4000SWでも排除されるためポアサイズのより大きなPWタイプ (TSKgel G5000PW_{XL}、TSKgel G6000PW_{XL}など) を用います。

原ら (22 - 29) は、PWタイプとSWタイプを用いて血漿中のリポタンパク質の分析方法を詳細に研究し、超遠心法に代る極めて有力な方法であることを示しました。

図17に示すようにポアサイズの大きいPWタイプとSWタイプの各種の組合せについて検討し、分析の目的に応じて最適カラムを使いわけを推奨しています。たとえば、分子量最大のカイロミクロンに関する情報が必要な場合には、TSKgel G6000PWが好ましく、リポタンパク質全体の分離パターンを求めるには、TSKgel G5000PWとTSKgel G3000SWの連結系が優れ、またHDLに関する詳しい情報が必要な場合には、TSKgel G3000SWの2本連結系が最適であると述べています。原らはまたリポタンパク質中に含まれるコレステロール、リン脂質およびトリグリセリドなどの脂質を反応型高性能GFCによって分析する方法を確立しました。TSKgel G5000PW_{XL}やTSKgel G6000PW_{XL}を使用することによりこの方法は一層有効な方法になるものと期待されます。

Carrollら (30) はLDLの分析および分取の研究において、その簡便性、安定性および経済性により1本のTSKgel G5000PWカラム (7.5mm×60cm) を使用しています。

分取用のTSKgel G5000PWを使うことにより、Himmelら (31) は、海虫*Potamilla leptochaeta*から単離された色素タンパク質クロロクルオリンが、GFC用の高分子量タンパク質マーカー (2.9×10^6) として優れていることを示しました。参考文献 (14) にはTSKgel G6000PWとTSKgel G4000PWの2本

のカラム系を用いてゼラチンの溶出パターンにおけるpHの効果について報告しています。

c) 低分子量ペプチド

低分子量のペプチドは、GFCで分離するには最もむずかしい物質の一つです。イオン性および疎水性の両方の性質による複雑で強い吸着性は通常PWタイプとSWタイプのいずれにおいてもみられます。吉田ら (47) は、「種々の複雑な溶離液を使用してSWタイプについてこの問題を検討しましたが、試料の分子量の対数と溶出容量とのよい直線関係は得られませんでした。Swergoldら (33) は、TSKgel G3000PWで低分子量ペプチドの分離をするための非常に単純な溶離液を開発しました。0.1%トリフルオロ酢酸を含む36~45%アセトニトリル水溶液からなる溶離液系により、分子量数100から数10万までのオリゴおよびポリペプチドがGFCの原理により溶出されます。この方法は、溶離液の揮発性にも特徴があります。図18 (クロマトグラム) と図19 (検量線) に示すようにTSKgel G3000PW_{XL}カラムによりこの方法が使えることが確認されました。

4) 水溶性合成高分子

水溶性合成高分子の分離においては、PWタイプの方がSWタイプと比較してより広い分子量分画範囲およびより直線性に優れた検量線を有するうえに、吸着性についても顕著に優れていることが多いため通常はPWタイプが用いられます。Alfredsonら (12) は、ポリビニルピロリドン、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸などのような直鎖状高分子に対して、SWタイプはしばしば高い吸着性を示すことを報告しています。これは試料とSWタイプゲルの表面における残存シラノール基との相互作用のためと考えられます。これらの鎖状の合成高分子とタンパク質とが吸着性について異なった溶出挙動を示すのは、分子のフレキシビリティに起因するものと推定されます。すなわちフレキシブルな鎖状高分子は、化学結合した有機層に十分深く浸透することができ、シラノール基と接触するのに対して、分子形態の固まっているタンパク質では十分浸透できないため相互作用が小さいものと考えられます。

Caroleら (34) は、TSKgel G5000PWとTSKgel G3000PWからなる2本のカラムシステムを使用してポリビニルアルコールの特性を調べました。

Higoら (35) は、TSKgel G5000PWとTSKgel G3000PWからなる2本のカラムシステムを使用してカチオン性高分子電解質、Poly (4-Vinyl benzyl trimethylammonium chloride) の特性を調べました。彼らは溶出パターンに対する有機溶媒の添加効果などを調べ溶離液に少量の酢酸を含む0.1M Na₂SO₄を用いたときに正常な検量線が得られることを見出しました。

Dubinら (36) は、ポリエチレンイミン、Polydimethyldiallylammonium chlorideおよびPolymethacryloxyethyltrimethylammonium methosulfateなどのようなカチオン性ポリマの測定に対してTSKgel G5000PWとTSKgel G3000PWが有効であることを報告しています。

分子量数千以下のオリゴマに対しては、分離能においてポアサイズの小さいPWタイプ (TSKgel G-Oligo-PW、TSKgel G2500PW_{XL}、TSKgel G2000PWなど。) がTSKgel G2000SWに比べて著しく優れていますのでおすすめできます。加藤ら (9) は、ポリエチレングリコールを中心にTSKgel G2000PWおよびTSKgel G3000PWの分離能を調べました。近藤ら (38)、長谷ら (39)、深溝ら (40-43)、およびJanssensら (44) は、糖の研究におけるオリゴ糖の分析にTSKgel G2000PWを使用しています。

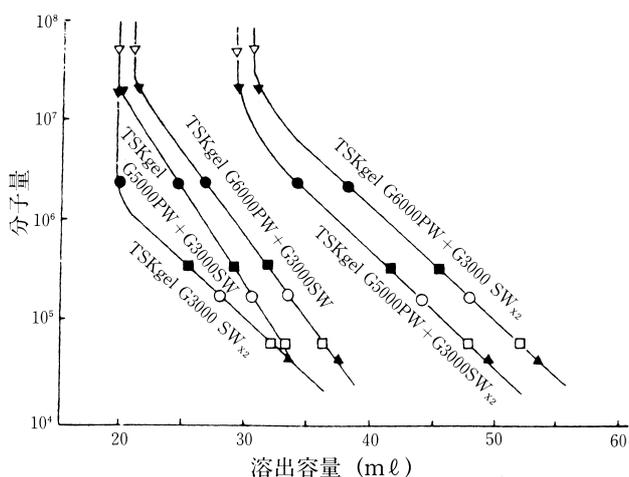


図17. リポタンパク質

試料：▽、カイロミクロン；▼、VLDL；●、LDL；
■、HDL₂；○、HDL₃；□、アルブミン；
▲、オブアルブミン

カラム寸法：7.5mmID×60cm

溶離液：0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH7.4)

流速：1.0ml/min

4-2 PWタイプの中での最適カラムの選択

1) PW_{XL}シリーズが良いかPWシリーズが良いか？

分析用としては、使用されるHPLCシステムのデッドボリュームが、十分に小さい限り、PW_{XL}シリーズを使用することが適します。システムのデッドボリュームが大きい場合にはPW_{XL}シリーズの高性能が十分に発揮されませんので、注意しなければいけません。分取が目的の場合には、多量の試料を注入するとき、PWシリーズの方がオーバーローディング現象をおこしにくく、試料負荷量が大きいため適します。

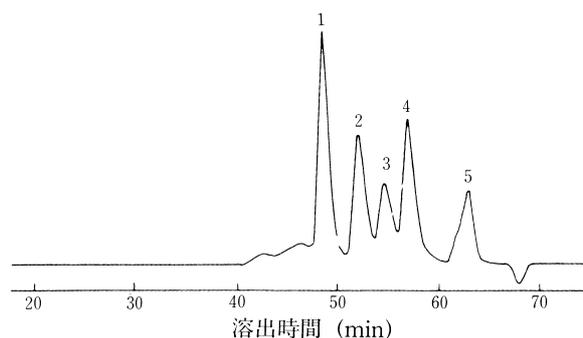


図18. ペプチドの分離

カラム：TSKgel G3000PW_{XL}

カラム寸法：7.8mmID×30cm

溶離液：45%CH₃CN (含0.1%TFA)

流速：0.3ml/min

試料：1. アプロチニン (MW6500)

2. インスリンB鎖 (MW3400)

3. α-MSH (MW1665)

4. ブラジキニンポテンシエータC (MW1052)

5. グルタチオン (MW307)

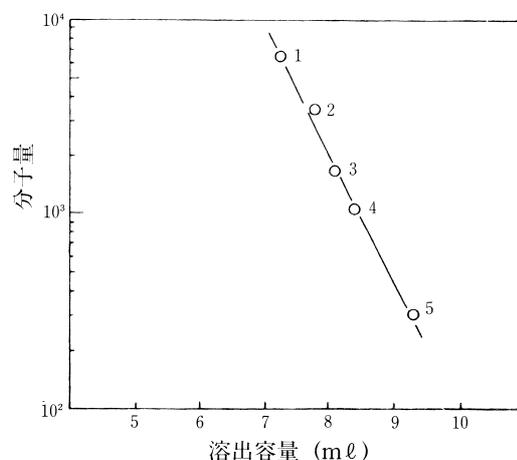


図19. 校正曲線

溶離条件：図18に同じ (流速を除く)

流速1.0ml/min

2) 高分子の測定における最適カラムの選択

分子量分布の広い水溶性高分子の測定においては、従来広い分子量範囲における検量線の直線性を得るためにポアサイズの異なる複数のカラム系（たとえばTSKgel G6000PW+TSKgel G4000PW、TSKgel G6000PW+TSKgel G3000PW、TSKgel G5000PW+TSKgel G3000PWなど）が利用されてきました。今後は、試料の分子量および分子量分布が不明の場合にはまずTSKgel GMPW_{XL}またはTSKgel GMPWで測定してみても見当をつけたうえで最適カラムを選択するのが、一般的な方法といえます。その意味でTSKgel GMPW_{XL}またはTSKgel GMPWは分子量分布の広い水溶性高分子の測定において必須のカラムと言っても過言ではありません。最適カラムの選択においてはなるべくカラムの有効分画範囲を広く利用し、かつ高分子側が排除されないようにすることが必要です。

3) オリゴマの測定における最適カラムの選択

オリゴマの測定においては、TSKgel G-Oligo-PWまたはTSKgel G2500PW_{XL}が最適です。非イオン性オリゴマおよびカチオン性オリゴマについてはTSKgel G-Oligo-PWの方が分離能が良くおすすめできます。一方、アニオン性オリゴマや両性オリゴマの場合には、イオンの相互作用に対する考慮からTSKgel G2500PW_{XL}を選択するのが適当と思われます。

5. TSKgel PWタイプの全シリーズ

表9に TSKgel PWタイプの全製品全体系を示しました。主に①分析用PW_{XL}シリーズ、②分析用PWシリーズ、③分取用PWシリーズおよび④ガードカラムなどのアクセサリで構成されています。すでに述べましたように、PWシリーズにおいても以下の点で従来と変わって

表9. TSKgel PWタイプ

	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	TP/カラム	粒径	TP/カラム	粒径	TP/カラム	粒径	TP/カラム
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 G4000PW	10	10,000	17	3,000	17	6,000	22	3,000
TSKgel G5000PW	10	10,000	17	3,000	17	6,000	22	3,000
TSKgel G6000PW	13	7,000	17	3,000	17	6,000	25	2,500
TSKgel GMPW	13	7,000	17	3,000	17	6,000	—	—
TSKgel G-Oligo-PW	6	14,000	—	—	—	—	—	—
TSKgel GDNA-PW	10	10,000	—	—	—	—	—	—

	対象カラム	カラム寸法
TSKguard column PW _{XL}	TSKgel G2500 PW _{XL} ~GWPW _{XL}	6.0mmID×40mm
TSKguard column G-Oligo-PW	TSKgel G-Oligo-PW	6.0mmID×40mm
TSKguard column PW	TSKgel G2500PW~GMPW	7.5mmID×75mm
TSKguard column PW	TSKgel G2500PW~G6000PW	21.5mmID×75mm

表10. PW_{XL}シリーズの使用範囲

カラム	流 速		最大圧力損失 Kg/cm ²	温 度	
	適正範囲	最大		適正範囲	最大
	ml/min	ml/min		℃	℃
TSKgel G2500PW _{XL}	0.5—0.8	1.0	50	10—60	80
TSKgel G3000PW _{XL}	0.5—0.8	1.0	50	10—60	80
TSKgel G4000PW _{XL}	0.3—0.6	1.0	20	10—60	80
TSKgel G5000PW _{XL}	0.3—0.6	1.0	20	10—60	80
TSKgel G6000PW _{XL}	0.3—0.6	1.0	15	10—60	80
TSKgel GMPW _{XL}	0.3—0.6	1.0	15	10—60	80
TSKgel G-Oligo-PW	0.5—0.8	1.0	50	10—60	80
TSKgel G-DNA-PW	0.2—0.5	0.6	20	10—40	50

ることに注意する必要があります。

- (1) TSKgel G2500PWの追加発売
- (2) TSKgel GMPWの追加発売

6. 使用上の注意点

表10にPW_{XL}シリーズの使用できる範囲を一覧表にしてあります。

6-1 システムとの関係（十分な性能が出ない時の一因）

PW_{XL}シリーズの高性能は旧式のデッドボリュームの大きいHPLCシステムでは、十分に発揮されないことがありますので、注意する必要があります。旧式のGPCシステムに使用されている示差屈折計などは特に注意する必要があります。

6-2 カラムの劣化対策

カラムの主な劣化原因と対策については、カラムの取扱説明書や参考文献(46)に詳細に記述されています。カラムが高性能化されるほど劣化防止に十分な注意が必要になりますが、主な注意点を列挙すれば下記の通りになります。

- (1) きれいな溶媒および試料を使用する。(フィルタおよびゲルベッド先端の詰まりによる圧力上昇および性能低下の防止)
- (2) システムの腐食を防止する。(サビによるフィルタおよびゲルベッド先端の詰まりによる圧力上昇および性能低下の防止)
- (3) ガードカラムを必ず使用し、異常が認められた時には直ちに交換する。(分析カラムへの汚染の防止)
- (4) 流速をなるべく低く設定する。(トップオフ現象による性能低下の防止)
- (5) 溶媒交換はゆっくりとかつ段階的に行う。(トップオフ現象などによる性能低下の防止)

7. おわりに

以上、TSKgel PW_{XL}シリーズについて概説しました。また参考文献を列挙しましたので併せてご参照ください。

参考文献

1. E. Pfannkoch, K.C. Lu, E. Regnier and H.G. Barth: J. Chromatogr. Sci., **18**, 430 (1980)
2. Ronald E. Majors: J. Chromatogr. Sci., **18**, 488 (1980)
3. Haward G. Barth: J. Chromatogr. Sci., **18**, 409 (1980)
4. T. Takagi: Gel Permeation Chromatography of Macromolecules, **107** (1981)
5. Paul L. Dubin: Separation and Purification Methods, **10**(2), 287 (1981)
6. R.E. Majors, H.G. Barth and C.H. Lochmüller: Anal. Chem., **56**, 300R (1984)
7. B.G. Belenkii and L.Z. Vilenchik: J. Chromatogr. Library, **25**, 327 (1983)
8. T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura and Y. Kato: J. Poly. Sci. Poly. Phys. Ed., **16**, 1789 (1978)
9. Y. Kato, H. Sasaki, M. Aiura and T. Hashimoto: J. Chromatogr., **153**, 546 (1978)
10. T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura and Y. Kato: J. Chromatogr., **160**, 301 (1978)
11. Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki and T. Hashimoto: J. Chromatogr., **193**, 311 (1980)
12. T.V. Alfredson, C.T. Wher, L. Tallman and F.E. Klink: J. Liquid Chromatogr., **5**, 489-524 (1982)
13. TOSOH, TSK-GEL PW Type, Technical Data
14. TOSOH, Separation Report No.035
15. N. Inagaki and K. Katsura: J. Poly. Sci. Poly. Chem. Ed., **18**, 441 (1980)
16. R.M. Alsop and G.J. Vlachogiannis: J. Chromatogr., **246**, 227 (1982)
17. T. Kato, T. Okamoto and T. Tokuya: Biopolymers, **21**, 1623 (1981)
18. T. Kato, T. Tokuya and A. Takahashi: Kobunshi Ronbunshu, **39**, 293-298 (1982)
19. T. Takagi and S. Hizukuri: J. Biochem., **95**, 1459 (1984)
20. M.E. Himmel, Peter J. Perna and Michael W. Mcdnell: J. Chromatogr., **240**, 155 (1982)
21. Y. Kato, M. Sasaki and T. Hashimoto: J. Chromatogr., **266**, 341 (1983)
22. I. Hara, M. Okazaki and Y. Ohno: J. Biochem., **87**, 1863 (1980)
23. M. Okazaki, Y. Ohno and I. Hara: J. Chromatogr., **221**, 257 (1980)
24. Y. Ohno, M. Okazaki and I. Hara: J. Biochem., **88**, 1215 (1980)
25. I. Hara, K. Shiraishi and M. Okazaki: J. Chromatogr., **239**, 549 (1982)
26. M. Okazaki, N. Hagiwara and I. Hara: J. Biochem., **91**, 1381 (1982)
27. M. Okazaki, I. Hara and A. Tanaka: The New England J. Medicine, **304**, 1608 (1981)
28. TOSOH, Separation Report No 019
29. TOSOH, Separation Report No.027
30. R.M. Carroll and L.L. Rudel: J. Lipid Research, **24**, 200 (1983)
31. Michael E. Himmel and Phil G. Squire: J. Chromatogr., **210**, 443 (1981)
32. G.D. Swergold, O.M. Rosen and C.S. Rubin: J. Biol. Chem., **257**(8), 4207 (1982)
33. G.D. Swergold and C.S. Rubin: Anal. Biochem., **131**, 295 (1983)
34. Carole M.L. Atkinson, Roy Dietz and Michael A. Francis: Polymer, **21**, 891 (1980)
35. Y. Higo, Y. Kato, M. Itoh, N. Kozuka, I. Noda and M. Nagasawa: Polymer Journal, **14**(10), 809 (1982)
36. I.J. Levy and P.L. Dubin: Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., **21**, 59 (1982)
37. P.L. Dubin and I.J. Levy: J. Chromatogr., **235**, 377 (1982)
38. H. Kondo, H. Nakatani, R. Matsuno and K. Hiromi: J. Biochem., **87**, 1053 (1980)
39. S. Hase, T. Ikenaka and Y. Matsushima: J. Biochem., **90**, 407 (1981)
40. T. Fukamizo and K. Hayashi: J. Biochem., **91**, 619 (1982)
41. S. Kuhara, E. Ezaki, T. Fukamizo K. Hayashi: J. Biochem., **92**, 121 (1982)
42. T. Fukamizo, T. Torikata, S. Kuhara and K. Hayashi: J. Biochem., **92**, 709 (1982)
43. T. Fukamizo, S. Kuhara and K. Hayashi: J. Biochem., **92**, 717 (1982)
44. K. Oh, J. Janssens, K. Grohmann and M.E. Himmel: Biotechnology Letters, **4**(7), 405 (1982)
45. Y. Kato, Y. Yamazaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushima and K. Matsubara: in preparation
46. H. Watanabe, M. Umino and T. Sasagawa: TOSOH Kenkyuhokoku, **28**, 1-20 (1984)
47. Y. Shiyoya, H. Yoshida and T. Nakajima: J. Chromatogr., **240**, 341-348 (1982)
48. TOSOH, Separation Report No.039



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 ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
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 〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1
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 <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>