

効率的なバイオセパレーションのためのHPLC



カラム選択とメソッド最適化法のご紹介



2008.9.4 12:40~13:30

2008分析展 新技術説明会

株式会社 ワイエムシィ

生体分子分析のための分離モード・カラム選択の目安

タンパク質
ペプチド

逆相

分子量5,000以下

ProシリーズODS、YMC-Pack ODSシリーズ

分子量5,000~100,000

Wide-Pore Columns、YMCbasic、PROTEIN-RP

イオン交換

YMC-BioProシリーズ

サイズ排除

YMC-Pack Diol

順相

YMC-Pack Diol-NP

アフィニティ

疎水クロマト

核酸

逆相

核酸塩基
ヌクレオシド
ヌクレオチド

Hydrosphere C18、YMC-Pack ODS-AQ

オリゴヌクレオチド

Hydrosphere C18、YMC-Pack ODS-AQ、
Wide-Pore Columns

イオン交換

YMC-BioProシリーズ

サイズ排除

YMC-Pack Diol

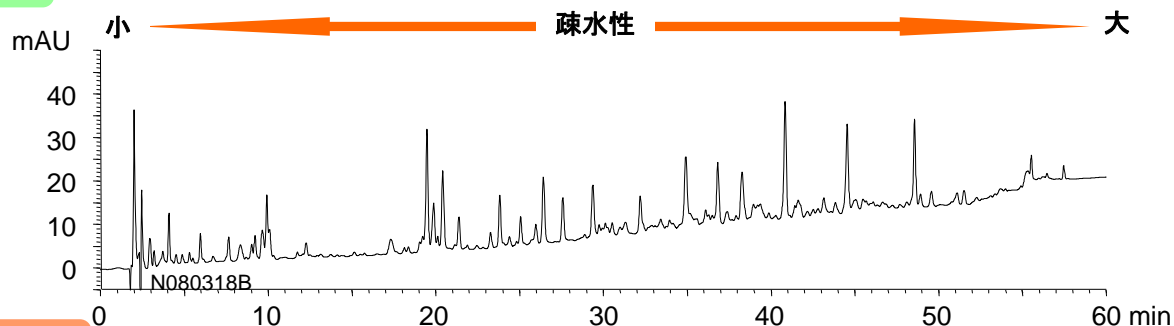
順相

YMC-Pack Diol-NP、YMC-Pack Polyamine II

分離モードによる溶出パターンの違い BSAのトリプシン消化物（ペプチドマッピング）

逆相

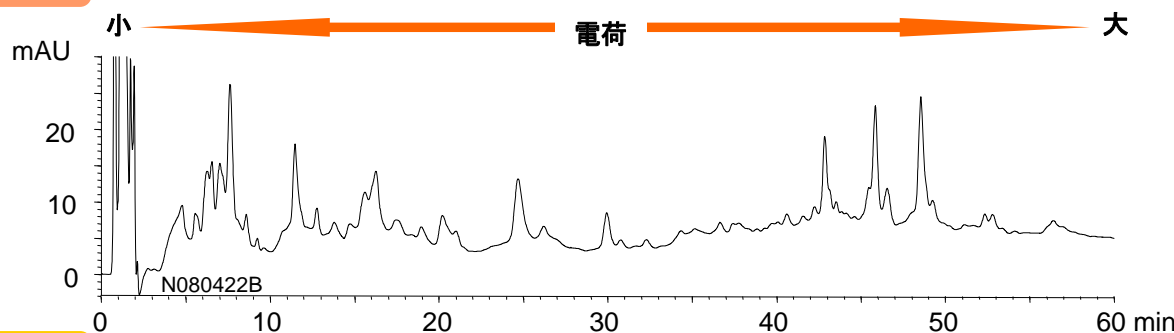
試料が疎水性固定相と極性移動相に分配する作用を利用して、試料を疎水性の違いによって分離



Column	: YMCbasic 5 μm, 150 X 2.0 mmI.D.
Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / TFA (100/0.1) 5-35%B (0-50 min), 35-45%B (50-55 min), 45%B (55-60 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Temperature	: 37°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 1 μL

イオン交換

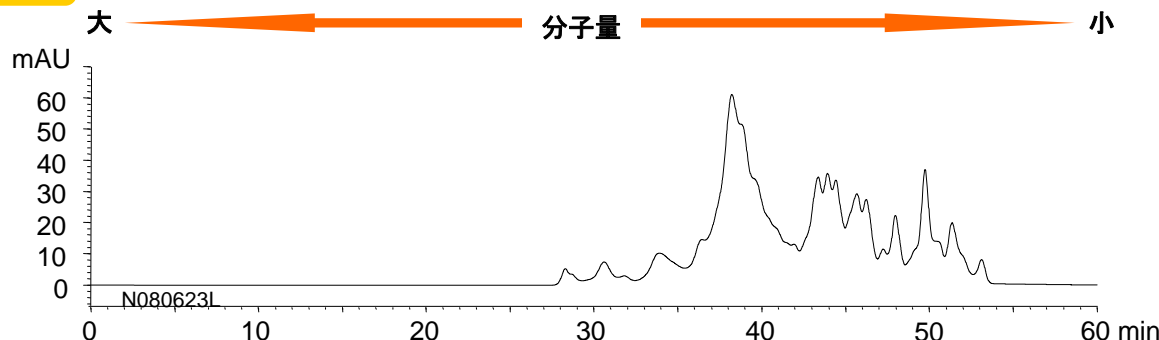
試料の電荷と固定相の解離基とのイオン結合を利用して、試料を電荷の違いによって分離



Column	: YMC-BioPro QA 5 μm, 50 X 4.6 mmI.D.
Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 0.5 M NaCl 0-15%B (0-30 min), 15-60%B (30-60 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 20 μL

サイズ排除

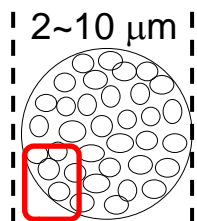
充填剤の細孔によるふるいの効果を利用して、試料を分子サイズの違いによって分離



Column	: YMC-Pack Diol-120 + Diol-60 5 μm, 500 X 8.0 mmI.D. X 2
Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl / acetonitrile (70/30)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μL

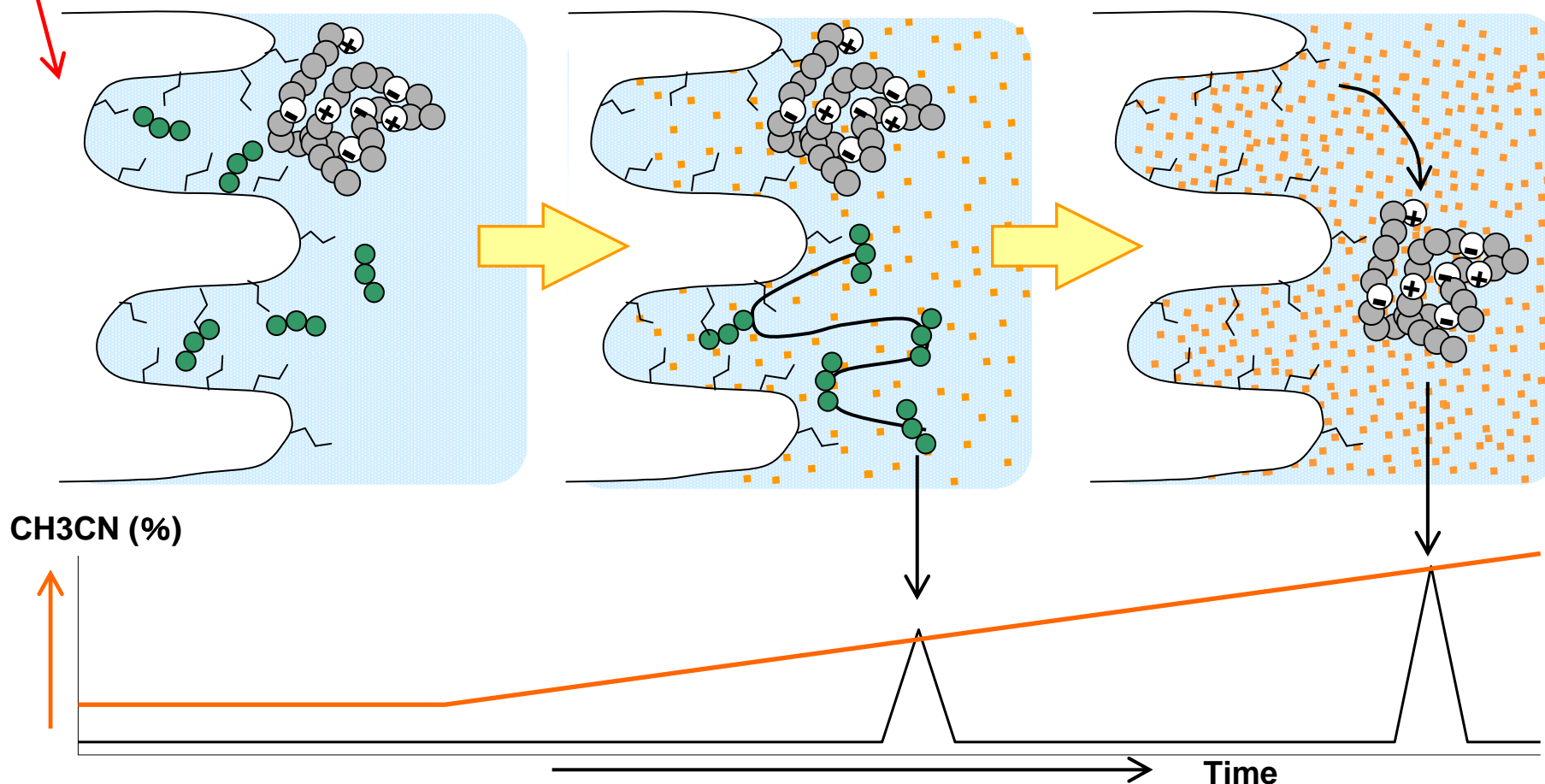
- 逆相クロマトグラフィー
- イオン交換クロマトグラフィー
- サイズ排除クロマトグラフィー

逆相クロマトグラフィーの分離メカニズム Reversed Phase Chromatography (RPC)



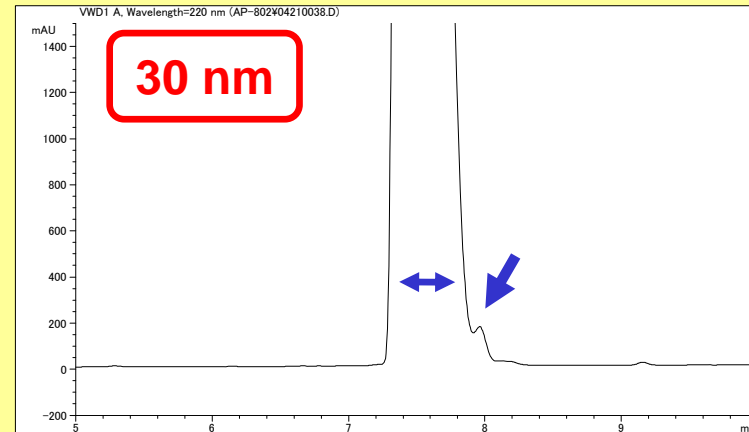
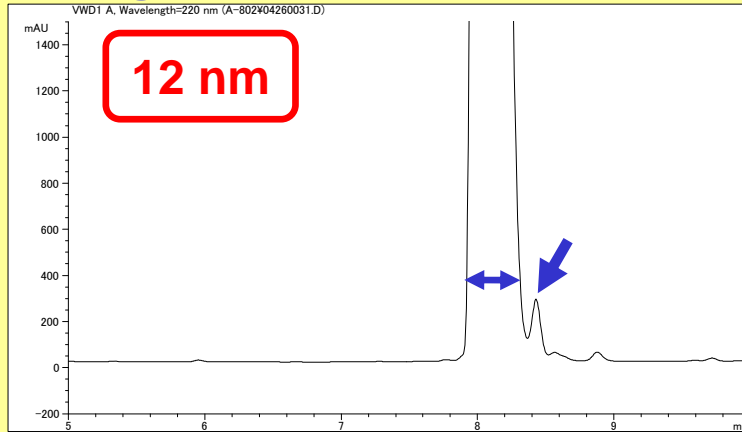
一般的な分離条件

- **固定相** 疎水性官能基 (C18, C8, C4 etc.) を結合させた多孔性シリカゲル
- **移動相** 酸水溶液や緩衝液と有機溶媒の混液 (0.1% TFA / CH_3CN etc.)
- **溶出** 移動相の有機溶媒濃度を高めて、疎水性の小さい試料から溶出

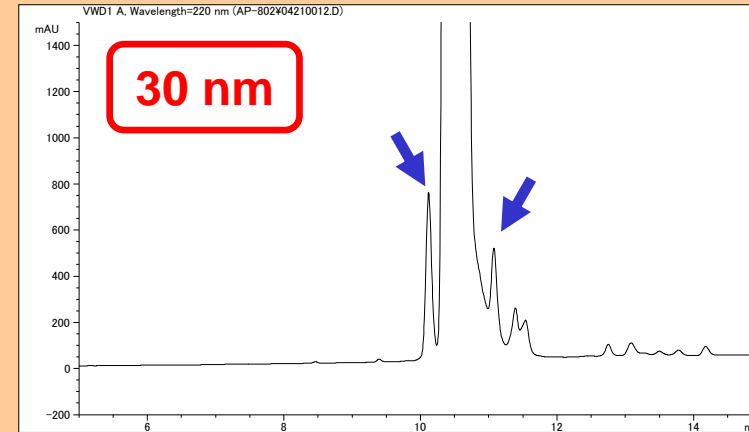
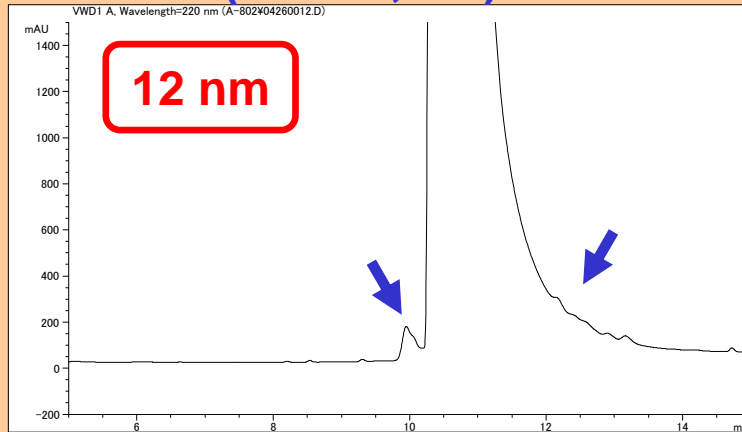


充填剤の細孔径による影響

Angiotensin II (MW 1,046)



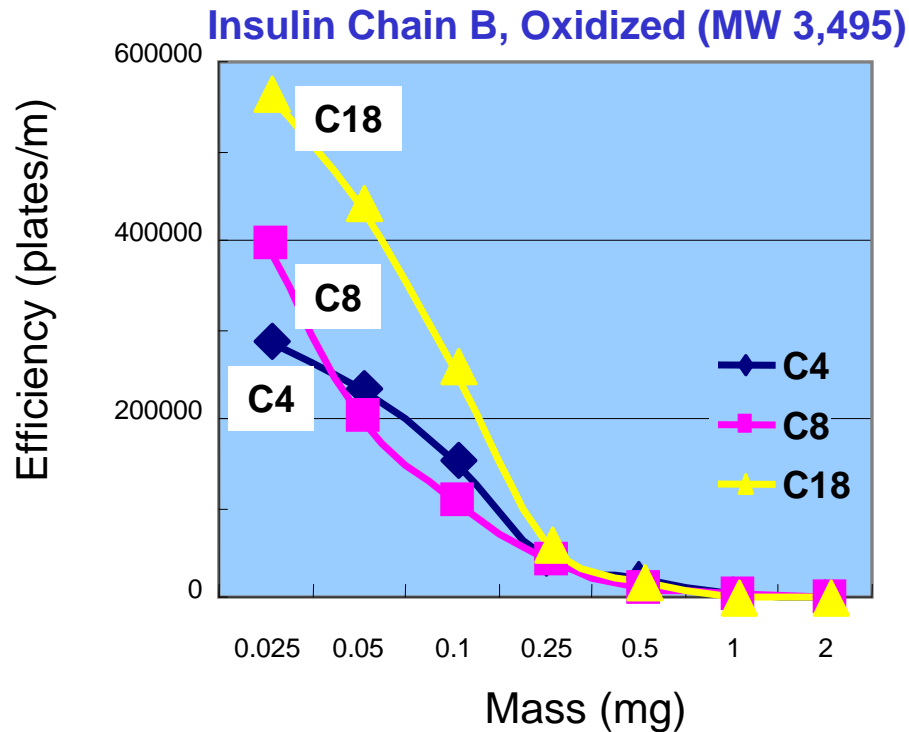
BSA (MW 66,000)



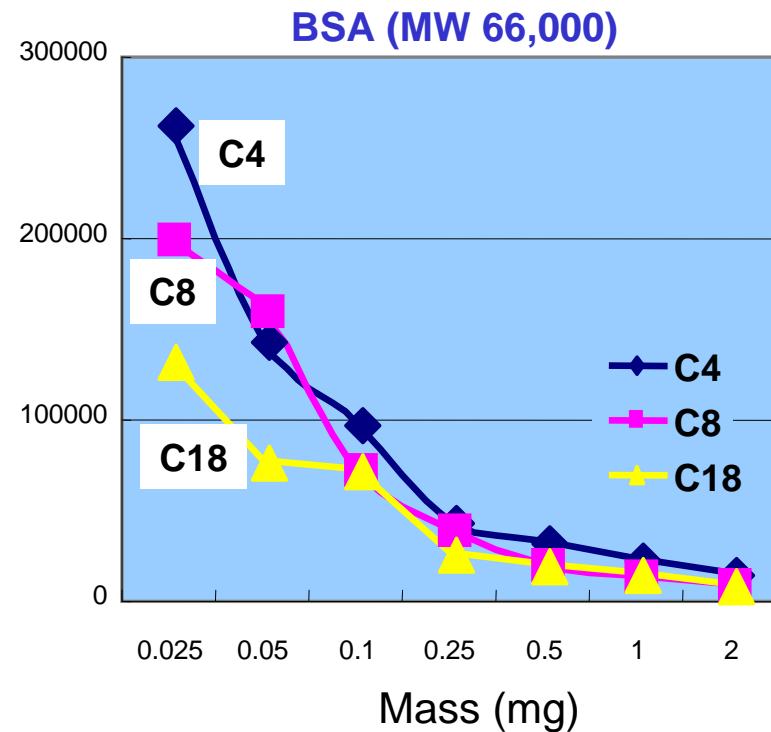
試料の分子サイズに対して充填剤細孔径が小さすぎても、大きすぎてもピークの広がりが生じる
→ 分子サイズに適した細孔径の選択が重要

充填剤の疎水性による影響

12 nm



30 nm



小さなタンパク質・ペプチドでは疎水性の大きい官能基が、
分子量数万程度のタンパク質では疎水性の小さい官能基が
高いカラム効率を示す

逆相カラム選択の目安

試料の 分子量	官能基	C18	C8	C4
	細孔径			
 5,000 20,000 100,000	12 nm	◎	○	△
	20 nm	○	◎	○
	30 nm	△	○	◎

◎: excellent ○: good △: moderate

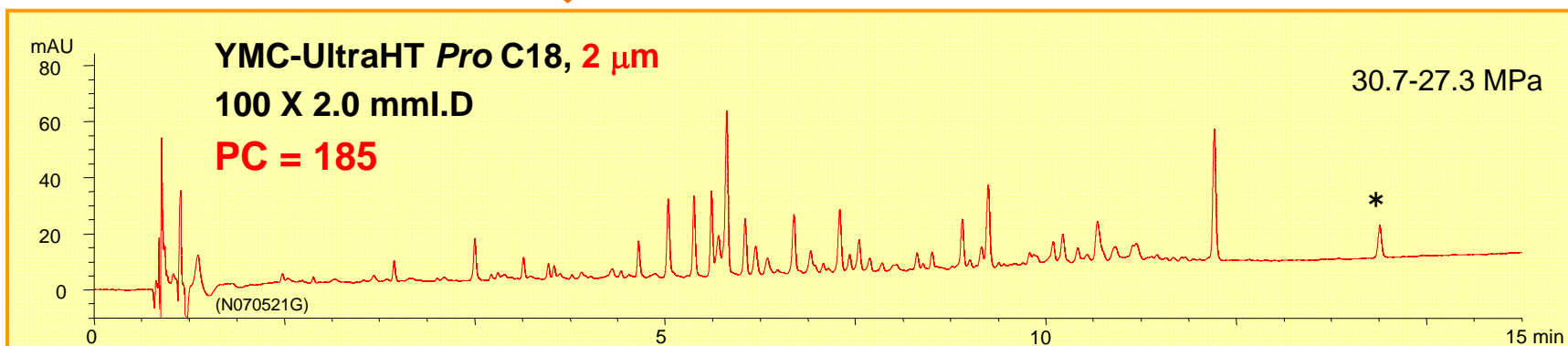
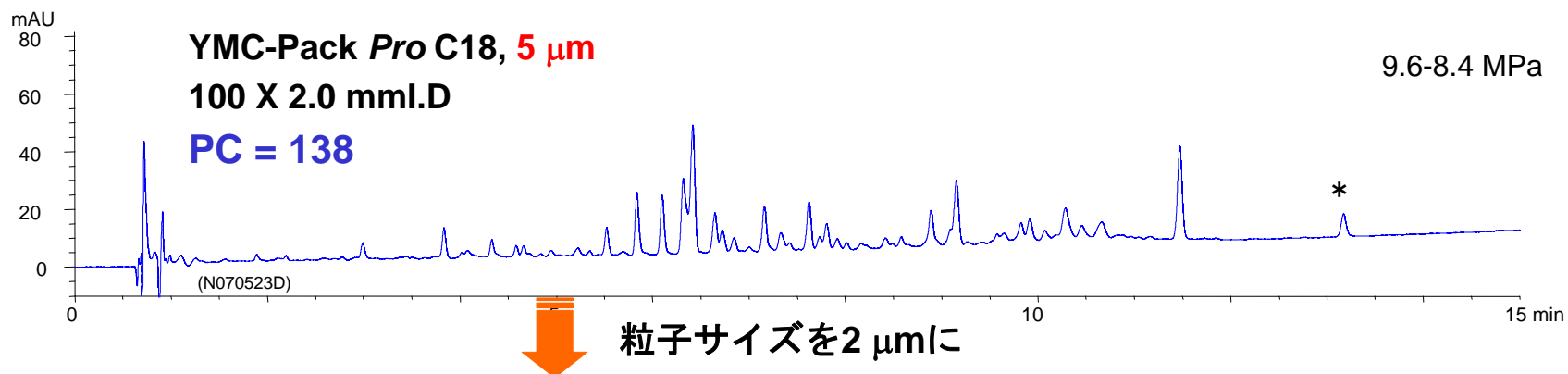
YMC逆相カラムラインナップ

カラムの種類		細孔径 (nm)		
Pro シリーズ (高エンドキャッピング)	Pro C18 (標準型ODS)	12		
	Hydrosphere C18 (低カーボン型ODS)	12		
	Pro C18 RS (高カーボン型ODS)	8		
	C8	12		
	C4	12		
YMC-Pack シリーズ	ODS-A (標準型ODS)	12	20	30
	ODS-AQ (低カーボン型ODS)	12	20	
	C8	12	20	30
	C4	12	20	30
	Ph	12		30
	CN	12		30
	YMCbasic		20	
タンパク質・ペプチド分離専用	PROTEIN-RP		20	
ポリマー系	Polymer C18	—		

ペプチドの分析

高分離分析に有効な2 μm YMC-UltraHTカラム

β -Lactoglobulin Bのトリプシン消化物 (ペプチドマッピング)



* undigested β -Lactoglobulin B

PC (peak capacity) = $1 + (\text{gradient time} / \text{peak width}^*)$ *peak width = $2W_{0.5h}$ average

Eluent	: A) water / TFA (100/0.1)	Detection	: UV at 220 nm
	B) acetonitrile / TFA (100/0.1)	Injection	: 1 μL
	5-50%B (0-15 min)	Sample	: Tryptic digest of β -Lactoglobulin B
Flow rate	: 0.4 mL/min		(5 mg/mL; 37°C, 24 h)
Temperature	: 37°C		

低分子ペプチドにはC18, 12 nmが最適
高分離能の2 μm カラムの使用により、
検出ピーク数・感度が向上

ペプチド～タンパク質 (MW 4,330～17,000) の分析 (1) カラムの選択と初期条件の設定

Model case : peptides & small proteins

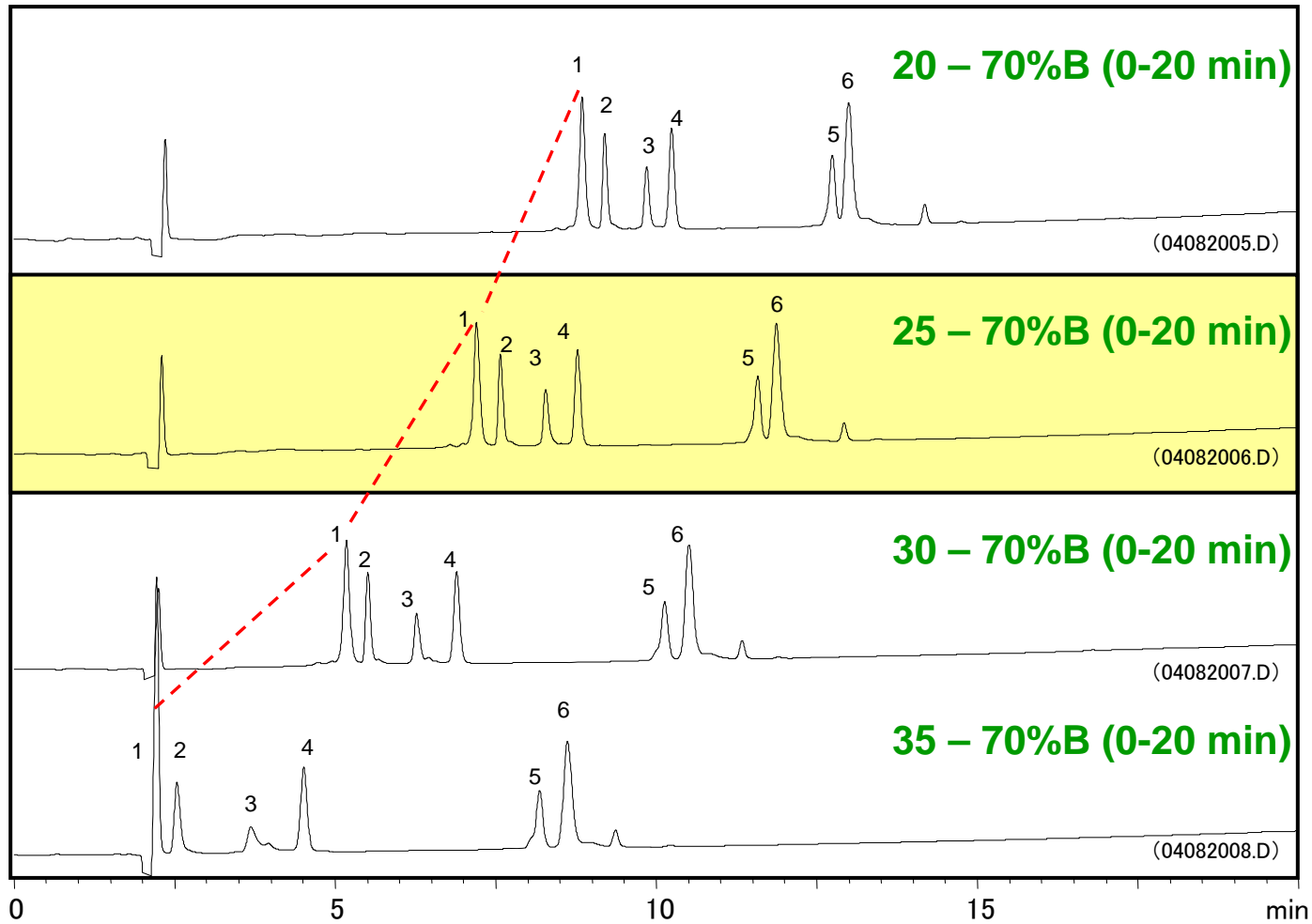
■ Amyloid β -protein (1-40)	MW 4,330
■ Insulin, from Bovine pancreas	MW 5,733
■ Cytochrome c, from Horse heart	MW 12,400
■ α -Lactalbumin, from Human milk	MW 14,100
■ Lysozyme, from Egg white	MW 14,300
■ Myoglobin, from Horse skeletal muscle	MW 17,000

1. 分子量に応じた細孔径 & 官能基の組み合わせを選択 → **C8, 20 nm**
2. 目的（分析 or 分取）、カラム効率、分析時間等を考慮して
粒子径・カラムサイズを選択 → 5 μ m
150 X 4.6 mm I.D.
3. 移動相・流速・検出条件等の設定 → 一般的な条件からスタート

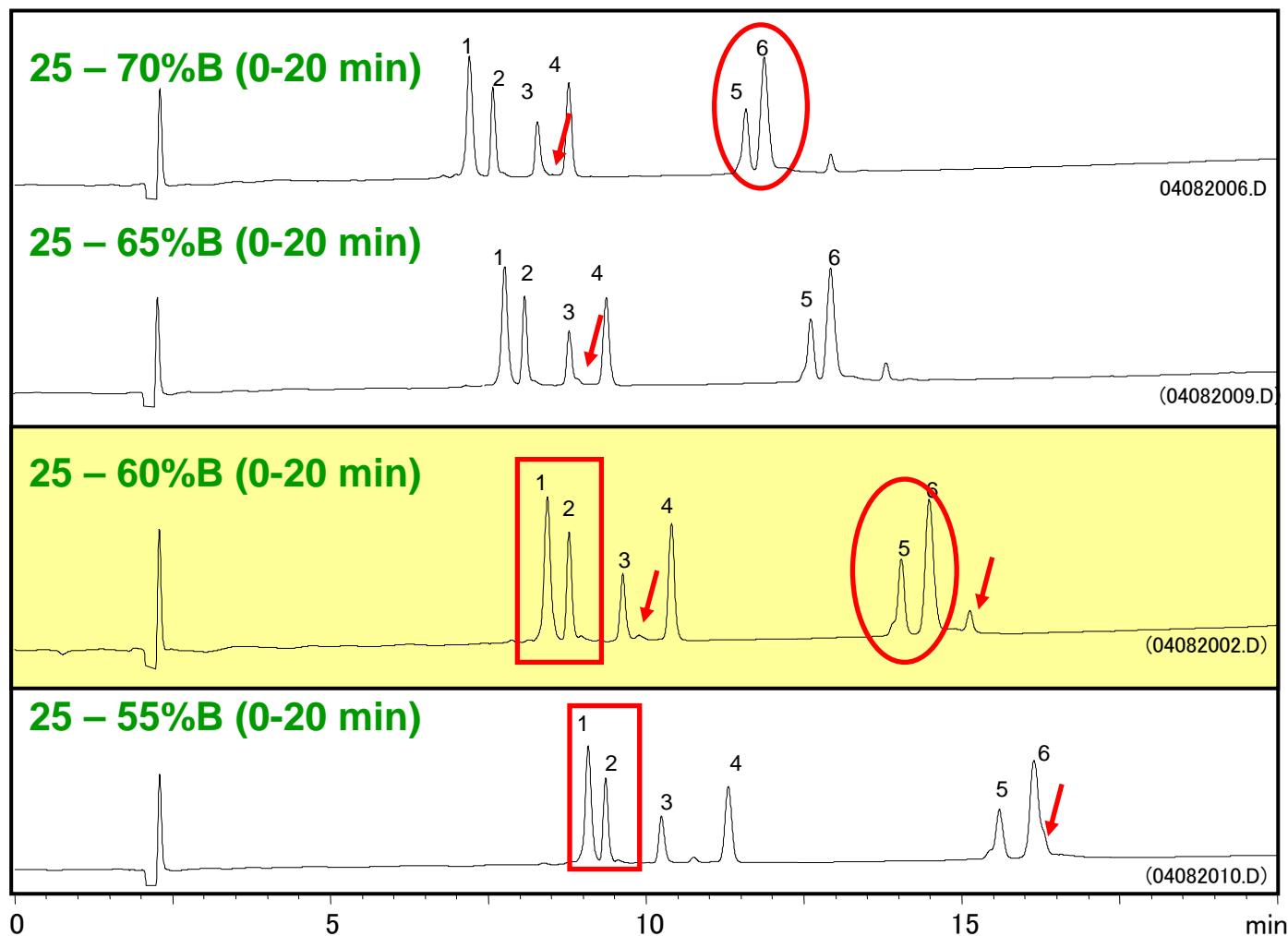


Column	: YMC-Pack C8 (5 μm, 20 nm) 150 X 4.6 mm I.D.
Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / TFA (100/0.1)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 37 °C
Detection	: UV at 220 nm

ペプチド～タンパク質 (MW 4,330～17,000) の分析 (2) 初期アセトニトリル濃度の決定



ペプチド～タンパク質 (MW 4,330～17,000) の分析 (3) 最終アセトニトリル濃度・勾配の決定

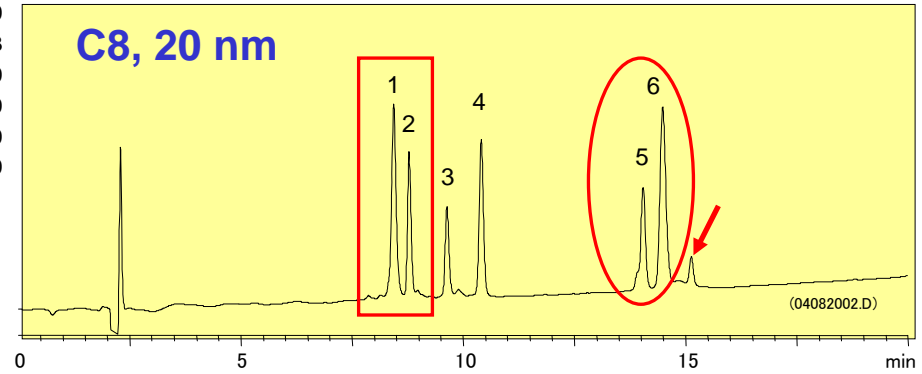


ペプチド～タンパク質 (MW 4,330～17,000) の分析 (4)

最適化条件における細孔径・官能基の比較

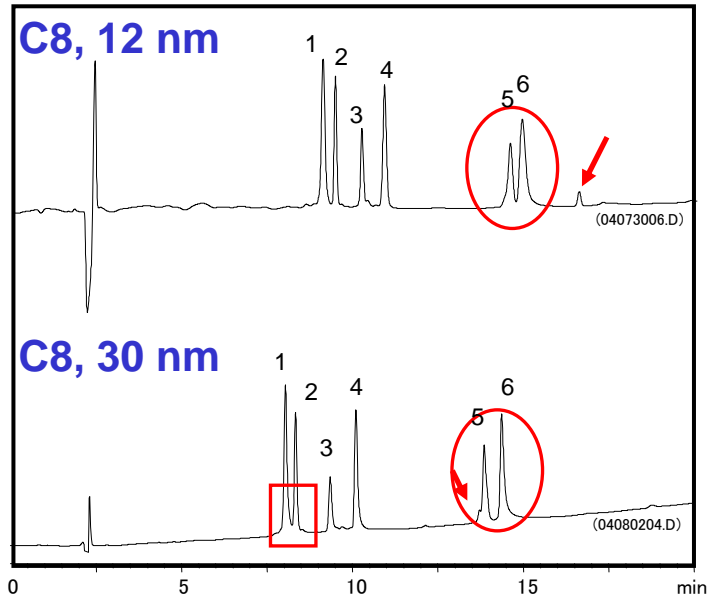
最適化条件

- | | |
|----------------------|-----------|
| 1. Cytochrome c | MW 12,400 |
| 2. Insulin | MW 5,733 |
| 3. Amyloid β-protein | MW 4,330 |
| 4. Lysozyme | MW 14,300 |
| 5. α-Lactalbumin | MW 14,100 |
| 6. Myoglobin | MW 17,000 |

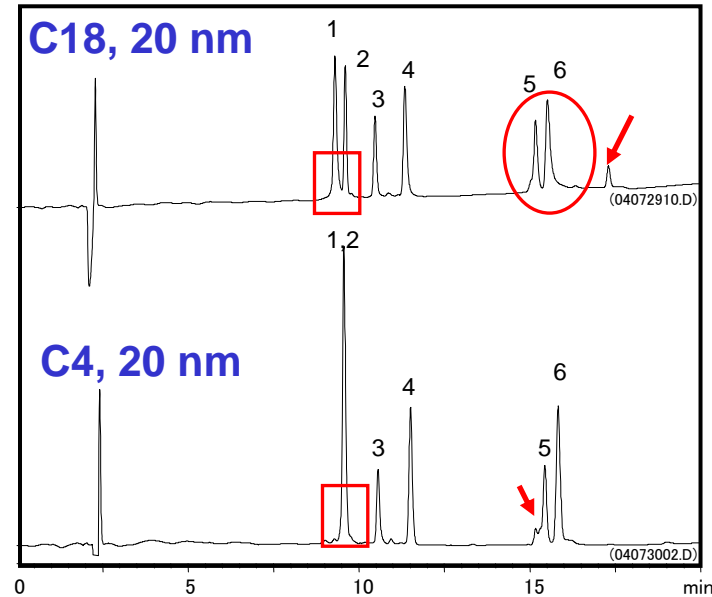


Column	: 5 μm, 150 X 4.6 mmI.D.
Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / TFA (100/0.1) 25-60%B (0-20 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 37°C
Detection	: UV at 220 nm

細孔径の比較



官能基の比較



タンパク質 (MW 66,000~96,000) の分析 (1)

カラムの選択と初期条件の設定

Model case : Proteins (MW 66,000-96,000)

- | | | |
|---------------|----|--------|
| 1. BSA | MW | 66,000 |
| 2. Conalbumin | MW | 77,000 |
| 3. Lipoxidase | MW | 96,000 |



Column	:	C4 (5 μm, 30 nm) 150 X 4.6 mm I.D.
Flow rate	:	1.0 mL/min
Temperature	:	37 °C
Detection	:	UV at 220 nm

タンパク質 (MW 66,000~96,000) の分析 (2) 異なる有機溶媒添加による効果

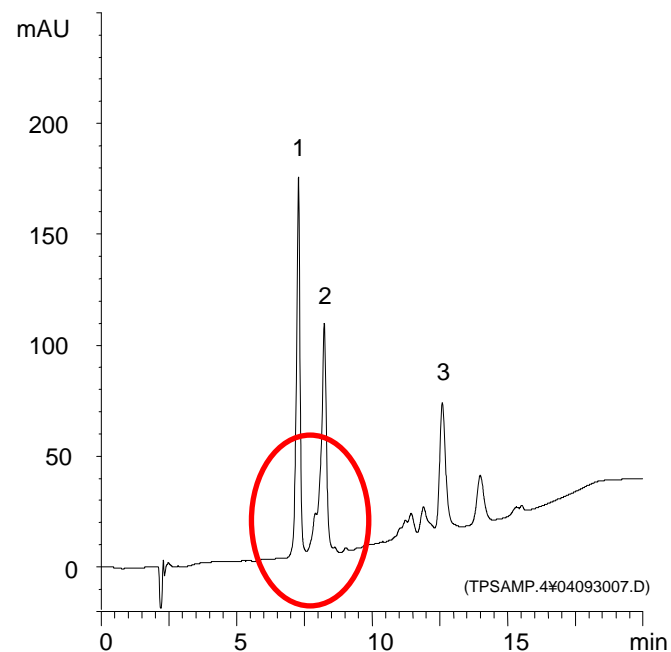
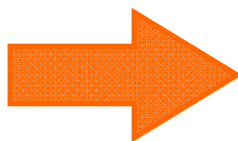
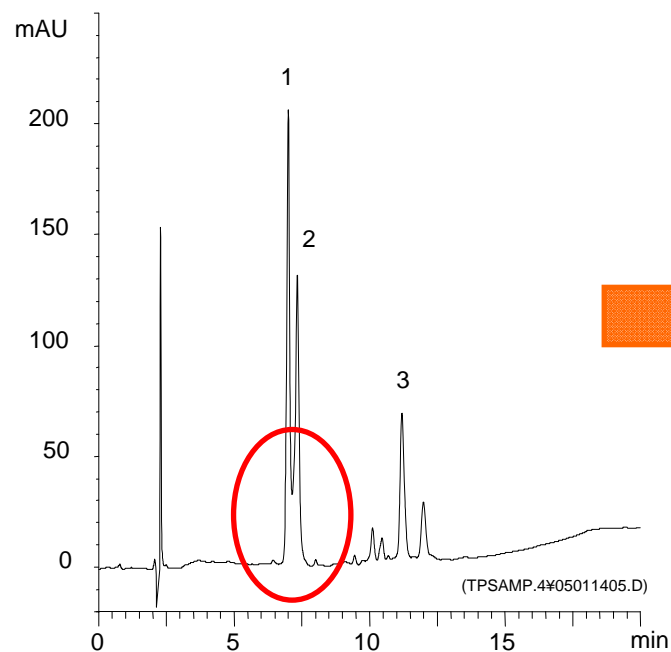
2-Propanolの添加による分離向上

A) water / TFA (100/0.1)

B) acetonitrile / TFA (100/0.1)

A) water / TFA (100/0.1)

B) acetonitrile / 2-propanol / TFA (50/50/0.1)



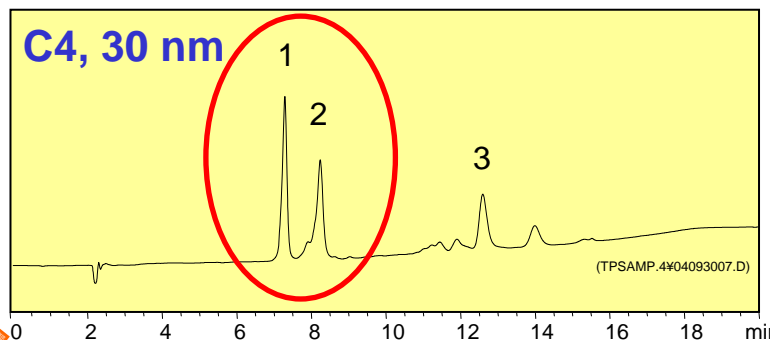
30-75%B (0-15 min), 75%B (15-20 min)

タンパク質 (MW 66,000~96,000) の分析 (3)

最適化条件における細孔径・官能基の比較

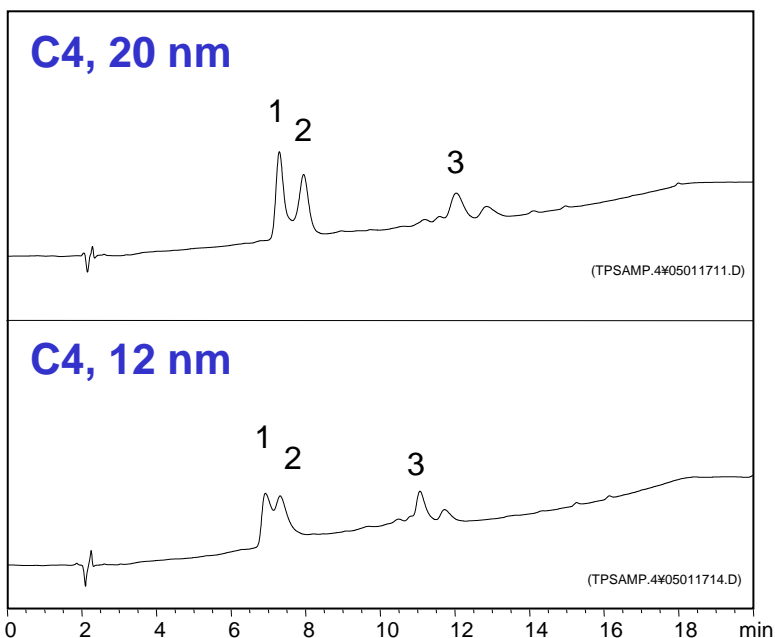
最適化条件

- 1. BSA MW 66,000
- 2. Conalbumin MW 77,000
- 3. Lipoxidase MW 96,000

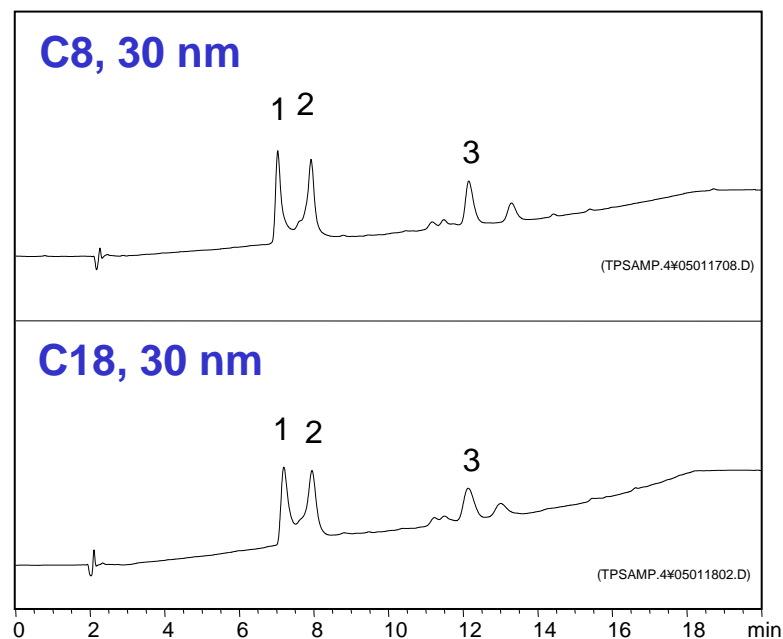


Column	: 5 μm, 150 X 4.6 mm I.D.
Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / 2-propanol / TFA (50/50/0.1) 30-75%B (0-15 min), 75%B (15-20 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 37°C
Detection	: UV at 220 nm

細孔径の比較



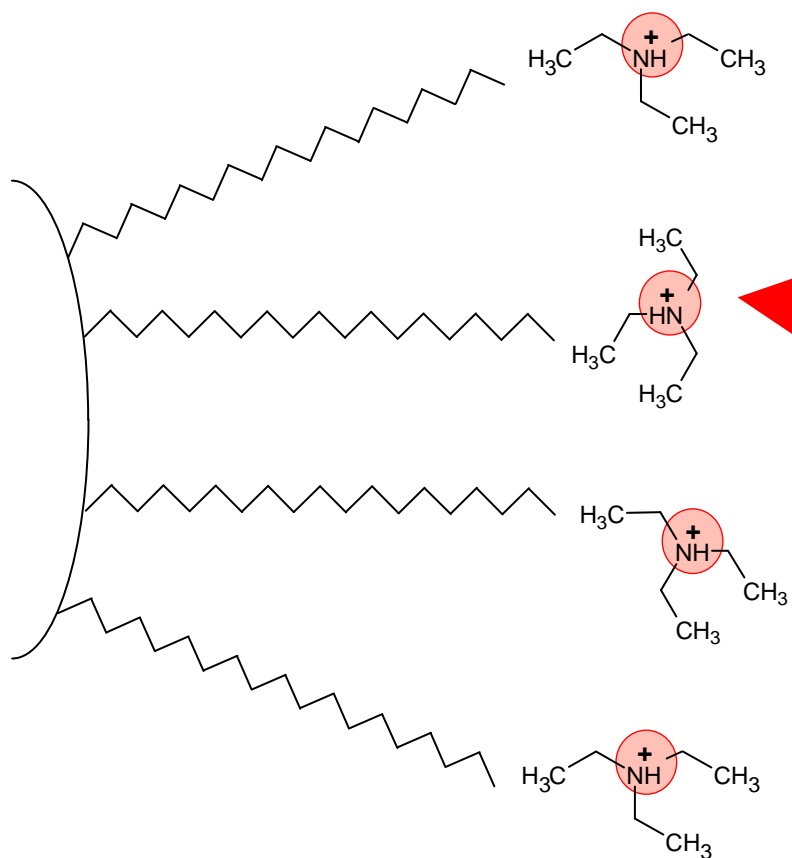
官能基の比較



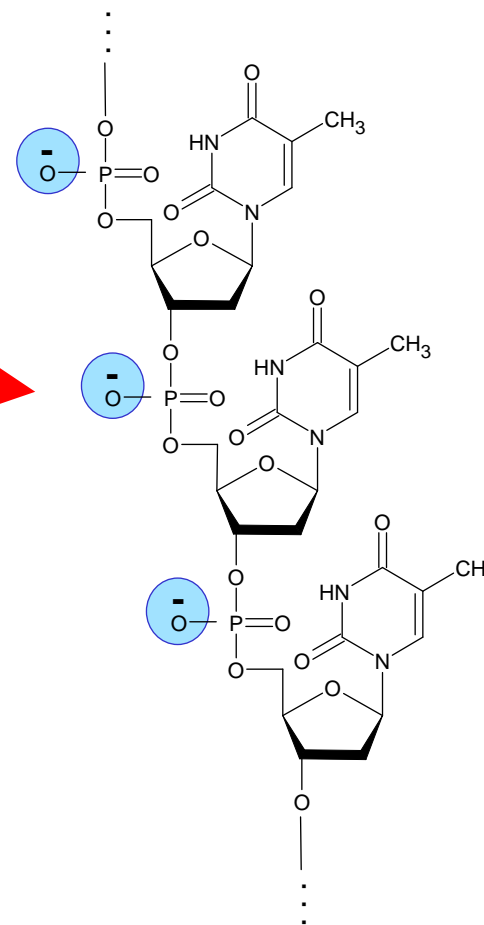
オリゴヌクレオチドの逆相分離 イオンペア試薬の使用

イオンペア試薬を用いた場合の分離のイメージ

充填剤表面

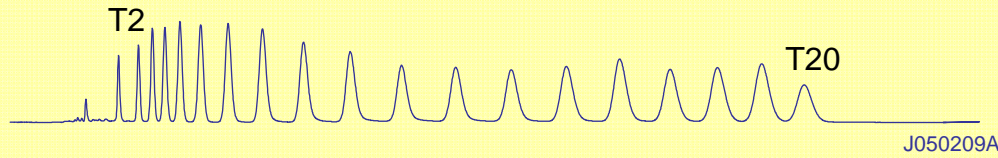


オリゴヌクレオチド



親水性化合物用カラムHydrosphere C18を用いた オリゴヌクレオチド分析

Hydrosphere C18, 10 mM TEAA



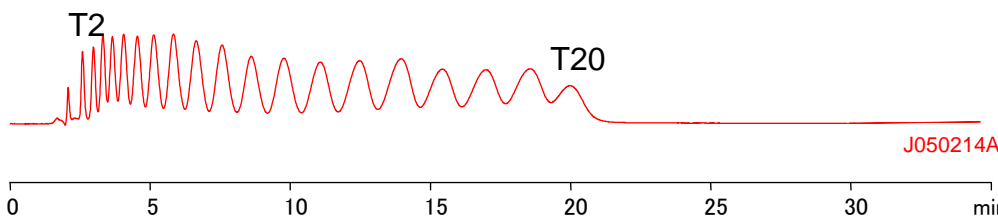
YMC-Pack Pro C18, 10 mM TEAA



Brand I1, 10 mM TEAA



Brand I1, 100 mM TEAA



Oligodeoxythymidylic acid [d(T)₂₋₂₀]

Column	: 5 μm, 150 X 4.6 mm I.D.
Eluent	: A) 10 mM or 100 mM TEAA* (pH 6.0) B) 10 mM or 100 mM TEAA* (pH 6.0) / acetonitrile (80/20) 55-61%B (0-30 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 35°C
Detection	: UV at 269 nm
Injection	: 5 μL (5 nmol/mL)
	* triethylamine-acetic acid

親水性化合物の分離に最適な
Hydrosphere C18では
イオンペア試薬が低濃度な移動相
条件下においても優れた分離を示す

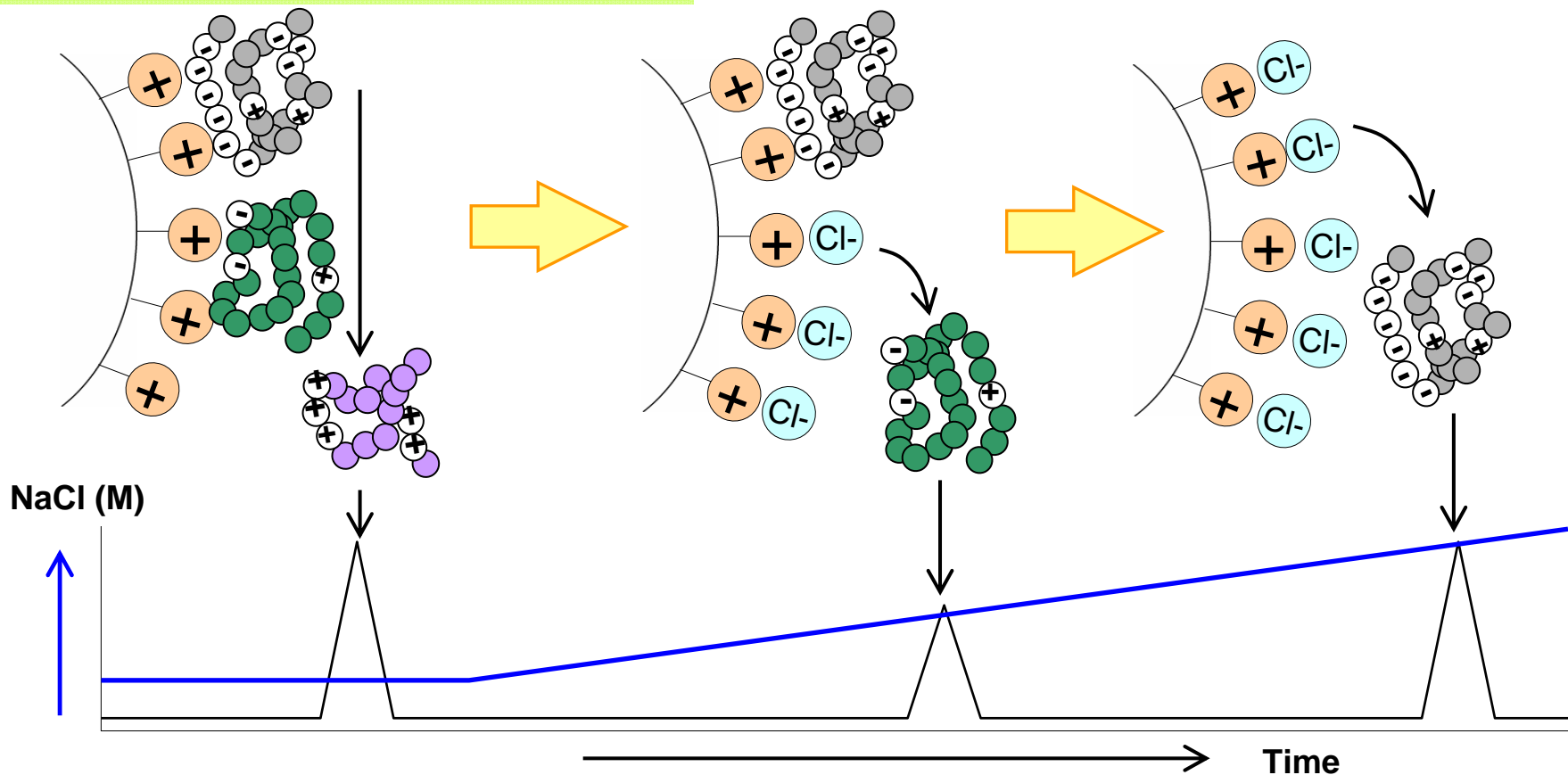
- 逆相クロマトグラフィー
- イオン交換クロマトグラフィー
- サイズ排除クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーの分離メカニズム Ion Exchange Chromatography (IEC)

一般的な分離条件

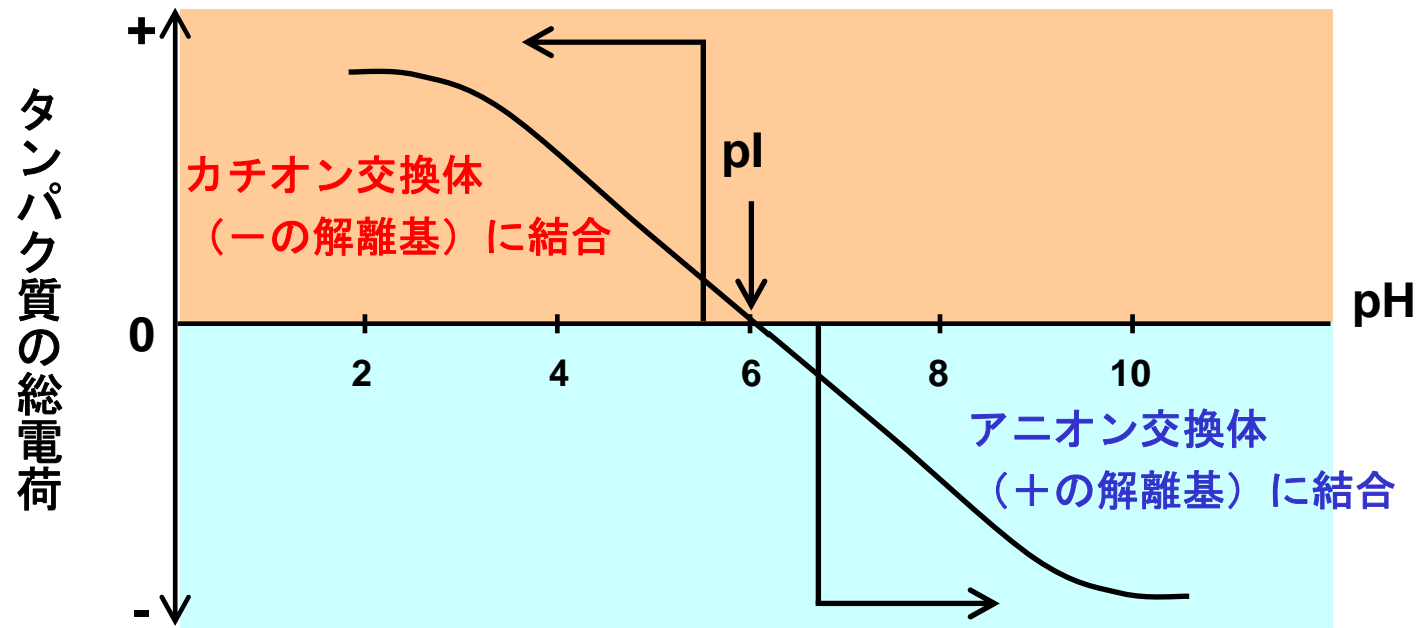
- 固定相 +の解離基（アニオン交換体） / -の解離基（カチオン交換体）を結合させた親水性高分子
- 移動相 10~50 mM緩衝液を初期移動相としてカウンターイオン（NaClが一般的）を添加
- 溶出 移動相中のカウンターイオン（NaCl濃度）を高めて、総電荷の小さい試料から溶出

アニオン交換クロマトグラフィーの場合



試料の電荷に応じた分析条件の設定

等電点 (pI) . . . タンパク質の正と負の電荷がつりあう (総電荷がゼロになる) 点の pH



- カチオン交換体 . . . 試料のpIから0.5~1.0以上低いpH (通常pH 5~7) の緩衝液を選択
- アニオン交換体 . . . 試料のpIから0.5~1.0以上高いpH (通常pH 7~9) の緩衝液を選択

タンパク質 : pIや安定性を考慮して緩衝液のpH, 種類, およびイオン交換体を選択する
DNAおよびオリゴヌクレオチド : アニオン交換体を選択する

イオン交換クロマトグラフィー用カラム

新製品 YMC-BioProシリーズ

特長

- タンパク質の非特異的吸着が極めて小さい新開発の親水性ポリマー基材
- 強アニオン交換体（**QA**）と強カチオン交換体（**SP**）
- 動的吸着量・回収率が高く少量分取にも有効な**ポーラスタイプ**
- 超高速・高分離分析用にデザインされた**ノンポーラスタイプ**

仕様

	YMC-BioPro QA	YMC-BioPro SP	YMC-BioPro QA-F	YMC-BioPro SP-F
基材	親水性ポリマー			
粒子径 (μm)	5			
細孔径 (nm)	100		Non-porous	
官能基	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
イオン交換容量 (meq/mL-resin)	0.075~0.100	0.070~0.095	0.075~0.110	0.230~0.290
動的吸着容量 (mg/mL-resin)	110~150 (BSA)	70~100 (human IgG)	12~20 (BSA)	10~18 (human IgG)
使用温度範囲 (°C)	4~60			
使用pH範囲	2~12			

YMC-BioProポラスカラムの特長 (1)

高い動的吸着容量および回収率

「DBC (Dynamic binding capacity) : 動的吸着容量」とは、試料（タンパク質）が流れている状態で、試料がどれだけ充填剤に吸着されるか（充填剤の結合容量）を表す指標。DBCが高いほど高流速でより多くの試料を添加できる。

	DBC for BSA (mg/mL-resin, 10% breakthrough)	Eluted amount (mg/mL-resin)	Recovery* (%)
YMC-BioPro QA	126	120	95
A社 (porous Q type)	73	58	79
B社 (porous Q type)	100	35	35

*Recovery : (Eluted amount / DBC) X 100

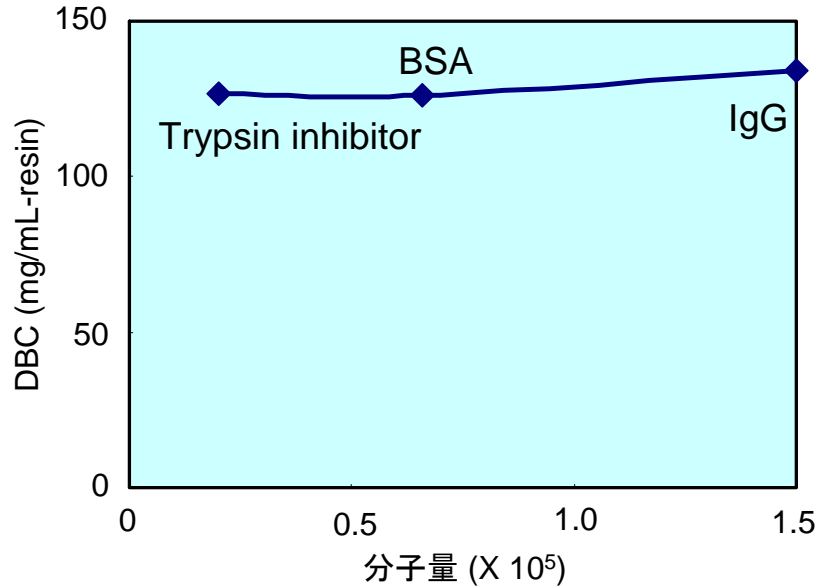
Column	: YMC-BioPro QA	50 X 4.6 mmI.D.
	A社 (porous Q type)	50 X 4.6 mmI.D.
	B社 (porous Q type)	50 X 5.0 mmI.D.
Linear velocity	: 3.0 cm/min	
Sample	: 1 mg/mL BSA in equilibration buffer	
Equilibration buffer	: 20 mM Tris-HCl (pH 8.6)	
Elution buffer	: 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 1.0 M NaCl	
Detection	: UV at 280 nm	

YMC-BioProポラスカラムは他社ポラスカラムと比べ高い動的吸着容量および回収率を示す

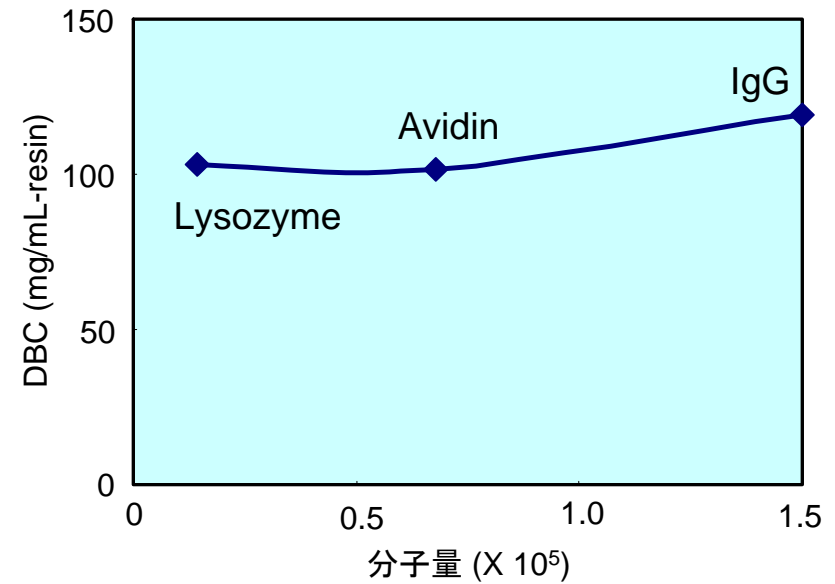
YMC-BioProポラスカラムの特長 (2)

分子量の異なるタンパク質のDBC比較

YMC-BioPro QA



YMC-BioPro SP



Protein	MW	DBC (mg/mL-resin)	Eluted amount (mg/mL-resin)	Recovery (%)
IgG	150,000	134	120	90
BSA	66,000	126	120	95
Trypsin inhibitor	20,100	127	120	95

Protein	MW	DBC (mg/mL-resin)	Eluted amount (mg/mL-resin)	Recovery (%)
IgG	150,000	119	117	98
Avidin	68,000	101	93	92
Lysozyme	14,300	103	110	107

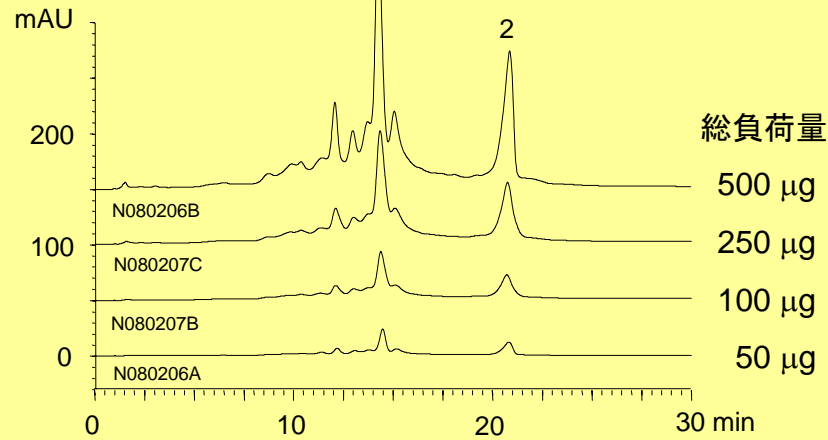
タンパク質の分子量によらず、高い動的吸着容量および回収率を示す

YMC-BioProポラスカラムの特長 (3)

負荷量による分離と回収量の変化

YMC-BioPro QA

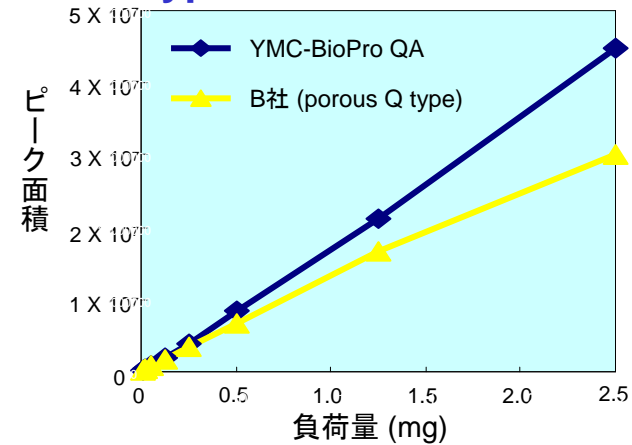
5 μm, 50 X 4.6 mmI.D.



1. Ovalbumin
2. Trypsin inhibitor

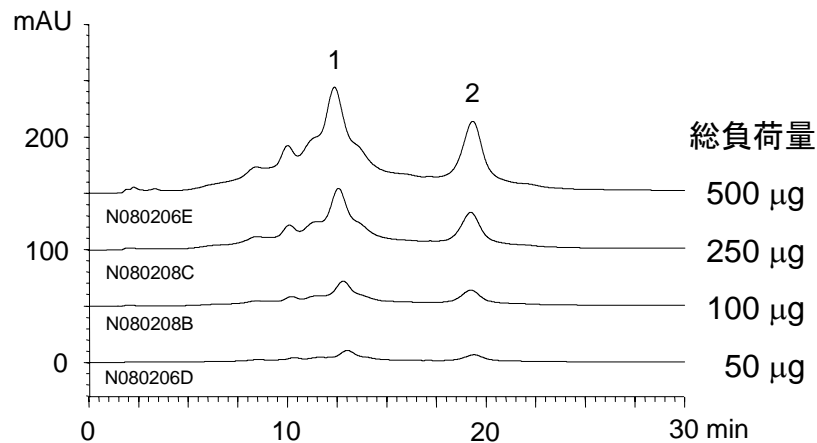
Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl 10-80%B (0-30 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 100 μL

Trypsin inhibitorの回収量



B社 (porous Q type)

10 μm, 50 X 5.0 mmI.D.



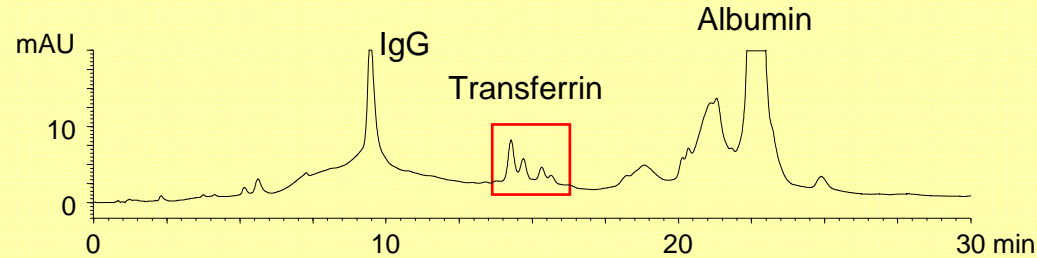
ポラスカラムYMC-BioPro QAでは
高負荷でもピークがシャープで
マイナー成分との分離が良好
回収量も高く、少量精製にも有効

YMC-BioProポラスカラムの特長 (4)

夾雑成分の多い試料にも有効

YMC-BioPro QA

5 μ m, 50 X 4.6 mml.D.



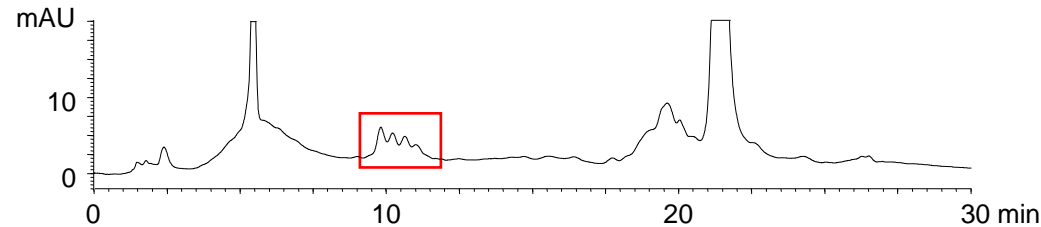
ヒト血清中のタンパク質の分離

血清中主要タンパクのpI

Albumin (MW 66,000)	4.7-5.2
Transferrin (MW 75,000)	5.2
IgG (MW 150,000-)	5.8-7.3

A社 (porous Q type)

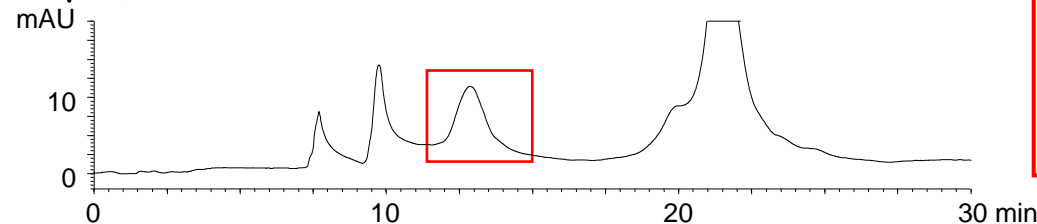
10 μ m, 50 X 4.6 mml.D.



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 0.5 M NaCl 0-30%B (0-15 min), 30-100%B (15-30 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 20 μ L
Sample	: Human serum (100 μ L/mL)

B社 (porous Q type)

10 μ m, 50 X 5.0 mml.D.



**YMC-BioProポラスカラムは
DBCが高く、優れた分離能を有するため
夾雑物を多く含む試料にも有効**

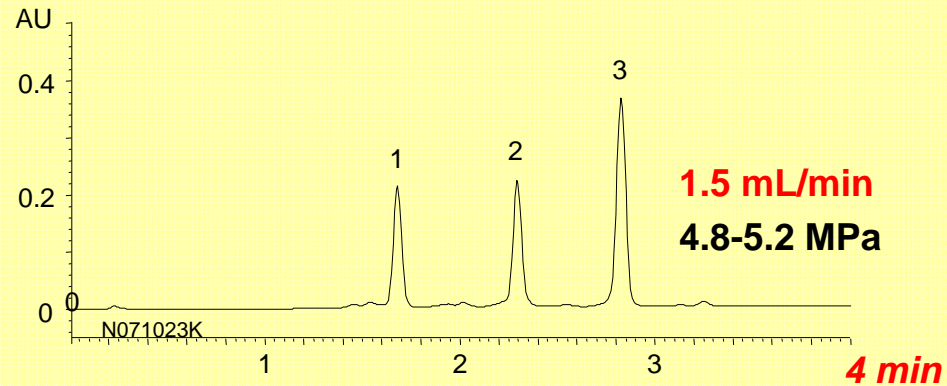
YMC-BioPro ノンポーラスカラムの特長 (1)

30 mm長カラムを用いた超高速分析

ノンポーラスタイプ

YMC-BioPro SP-F

5 μ m, 30 X 4.6 mmI.D.



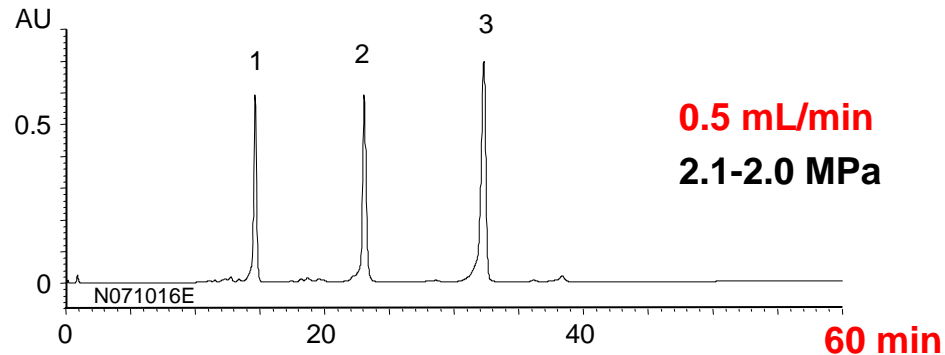
1. Ribonuclease A
2. Cytochrome c
3. Lysozyme

Eluent	: A) 20 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.8) B) 20 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 6.8) containing 0.5 M NaCl 0-100%B (0-4 min) for YMC-BioPro SP-F 0-100%B (0-60 min) for YMC-BioPro SP
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 20 μ L

ポーラスタイプ

YMC-BioPro SP

5 μ m, 50 X 4.6 mmI.D.



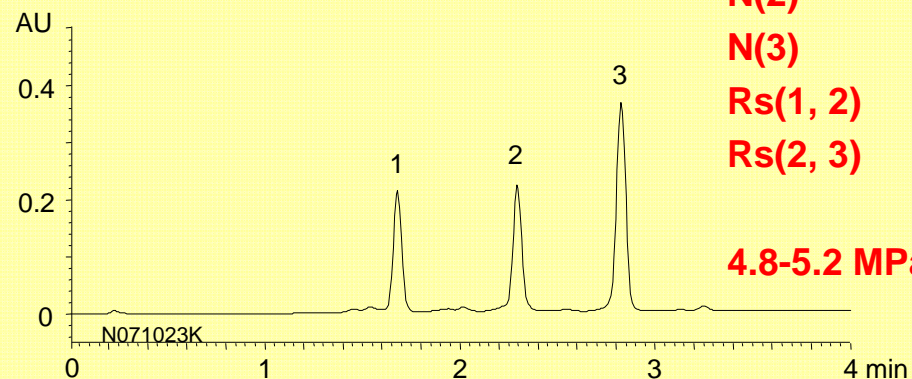
YMC-BioPro ノンポーラスカラムは
機械的強度に優れているため、
流速をあげた高速分析に適する

YMC-BioPro ノンポーラスカラムの特長 (2)

高い理論段数と優れたピーク対称性

YMC-BioPro SP-F

5 μm, 30 X 4.6 mml.D.



N(1) 7100
N(2) 12100
N(3) 17600
Rs(1, 2) 7.60
Rs(2, 3) 6.38

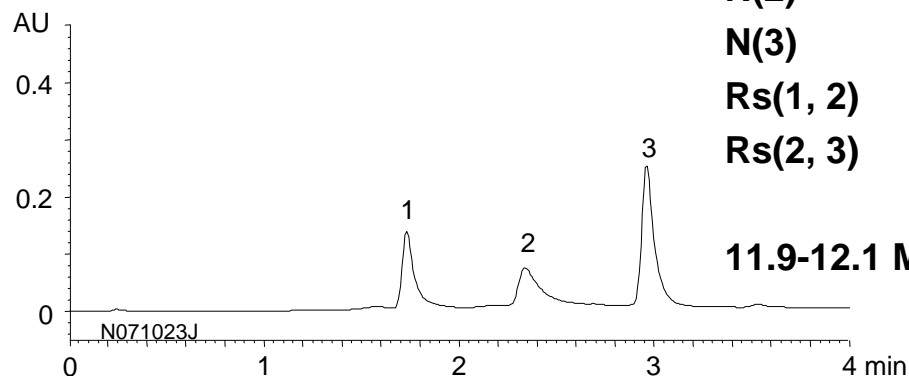
4.8-5.2 MPa

1. Ribonuclease A
2. Cytochrome c
3. Lysozyme

Eluent	: A) 20 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 6.8) B) 20 mM KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 6.8) containing 0.5 M NaCl
	0-100%B (0-4 min) for YMC-BioPro SP-F 0-100%B (0-4.67 min) for A社 (non-porous S type)
Flow rate	: 1.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 20 μL (0.1 mg/mL)

A社 (non-porous S type)

2.5 μm, 35 X 4.6 mml.D.



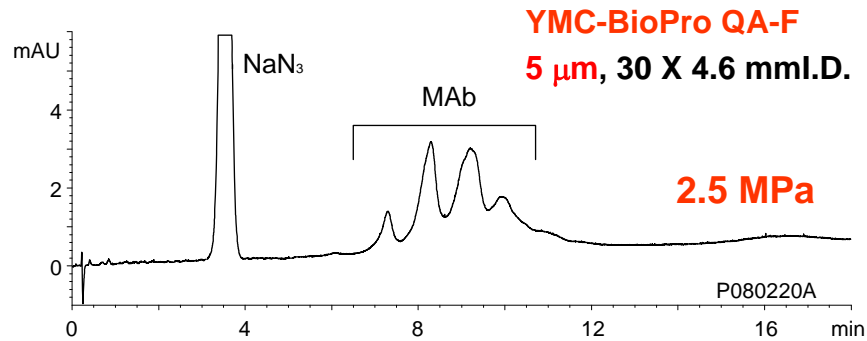
N(1) 4400
N(2) 2600
N(3) 11400
Rs(1, 2) 4.50
Rs(2, 3) 4.50

11.9-12.1 MPa

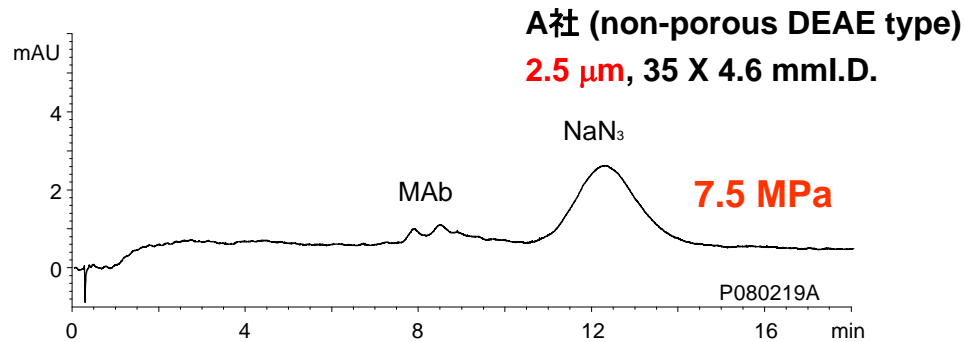
**YMC-BioPro ノンポーラスカラムは
高い理論段数とテイリングのない
良好なピーク形状を示す**

YMC-BioPro ノンポーラスカラムの特長 (3)

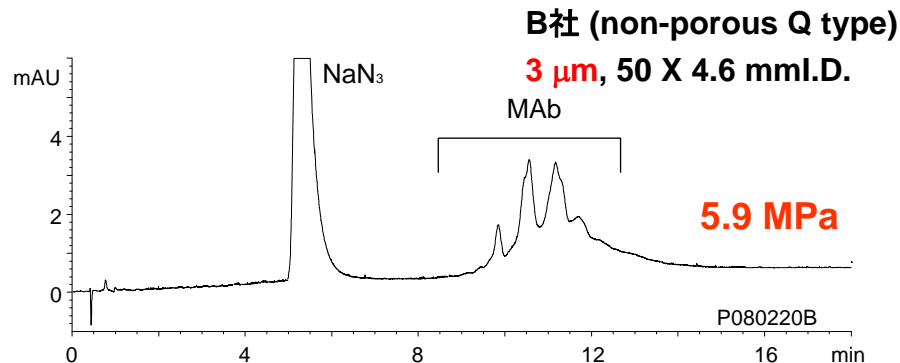
モノクローナル抗体の優れた分離



MAb : Mouse monoclonal IgG1
(Anti-human IgG4)



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl 10-25%B (0-18 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μL (0.1 mg/mL)
Sample	: Monoclonal mouse IgG1 (Purified by DEAE chromatography, containing NaN ₃)



**YMC BioPro QA-Fでは圧力が低く
かつ高分離分析が可能**

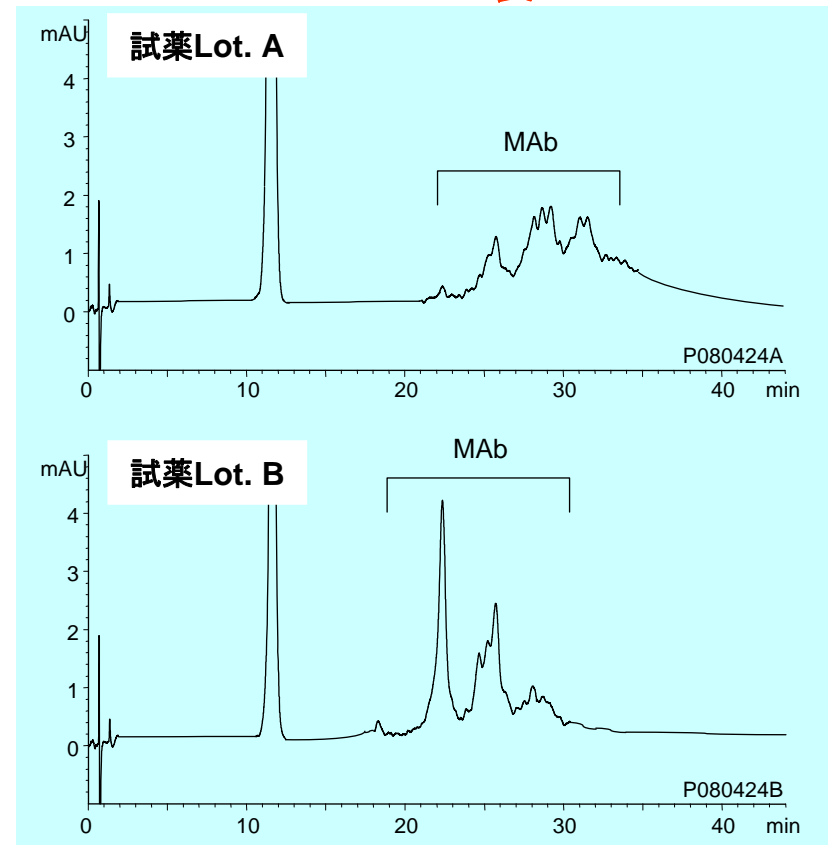
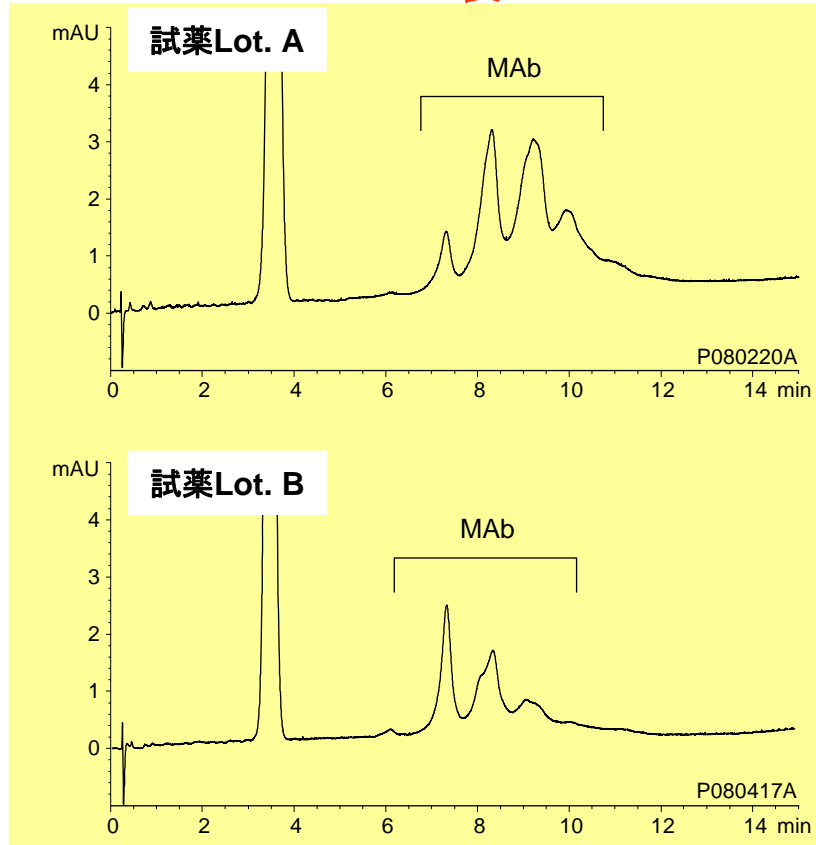
YMC-BioPro ノンポーラスカラムの特長 (4)

100 mm長カラムによる分離能の向上

YMC-BioPro QA-F

30 mm長

100 mm長



Column : YMC-BioPro QA-F 30 X 4.6 mm.I.D.
 YMC-BioPro QA-F 100 X 4.6 mm.I.D.
 Eluent : A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1)
 B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl
 10-25%B (0-18 min) for 30 mm length column
 10-25%B (0-60 min) for 100 mm length column
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Temperature : 25°C
 Detection : UV at 220 nm
 Injection : 10 μL for 30 mm length column
 14 μL for 100 mm length column
 Sample : Monoclonal mouse IgG1 (0.1 mg/mL)
 (Purified by DEAE chromatography, containing NaNa)

**100 mm長カラムによって試薬ロット差もさらに詳細に識別可能
 ⇒ 抗体医薬の品質管理にも有効**

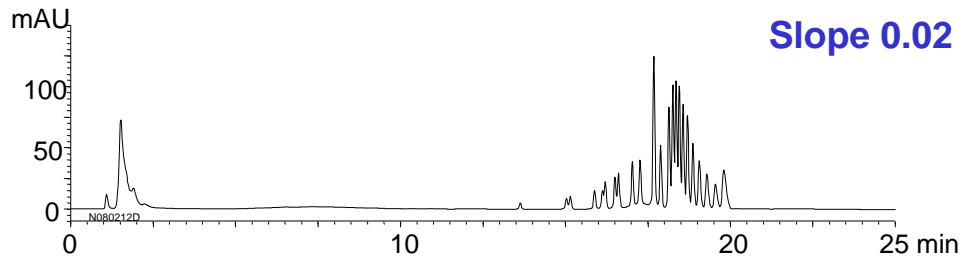
MAb : Mouse monoclonal IgG1 (Anti-human IgG4)

DNAフラグメントの分離最適化

NaClグラジエント条件の設定

YMC-BioPro QA-F
5 μ m, 100 X 4.6 mmI.D.

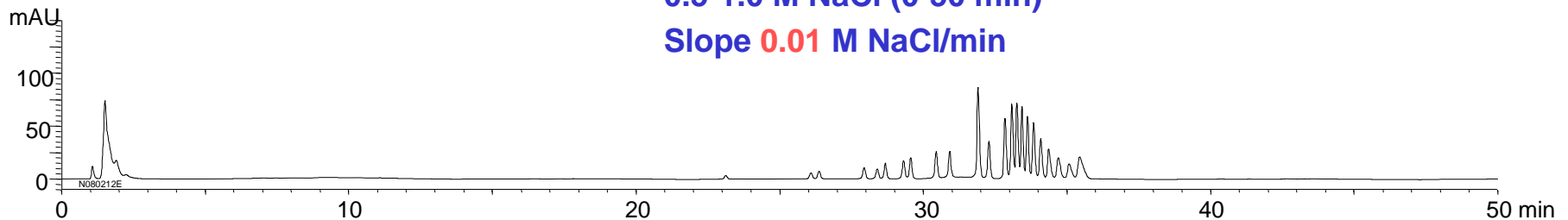
Step 1)
0.5-1.0 M NaCl (0-25 min)
Slope 0.02 M NaCl/min



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 1.0 M NaCl
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 260 nm
Injection	: 20 μ L (0.25 mg/mL)
Sample	: 1 kb DNA ladder (75-12,216 bp)

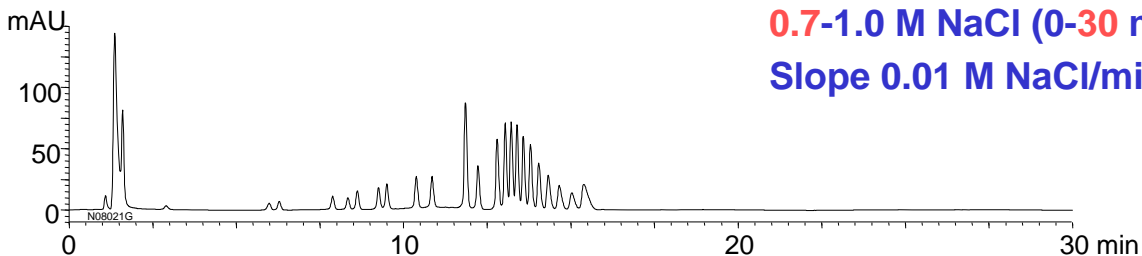
↓
グラジエント時間 X 2
グラジエント勾配 X 1/2

Step 2)
0.5-1.0 M NaCl (0-50 min)
Slope 0.01 M NaCl/min



↓
グラジエント勾配をそのままに
初期のNaCl濃度を0.2 M増加

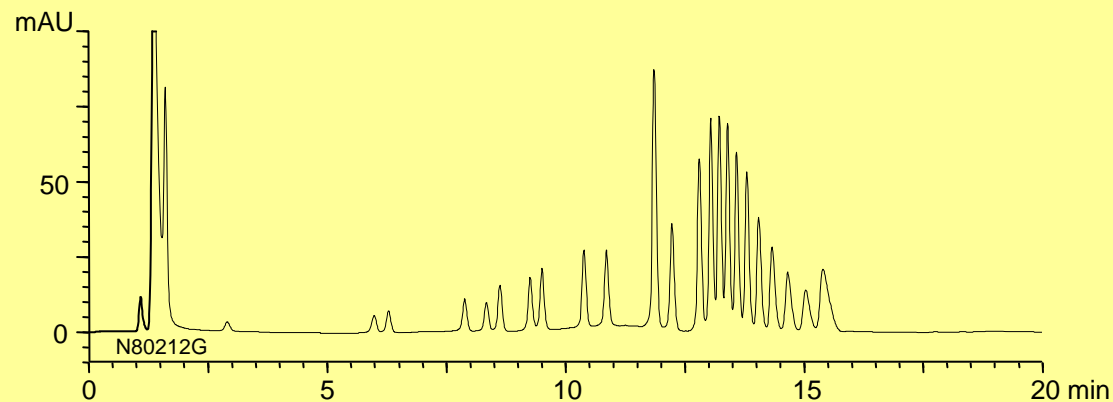
Step 3)
0.7-1.0 M NaCl (0-30 min)
Slope 0.01 M NaCl/min



グラジエント条件の最適化により
短時間で高分離分析が可能

YMC-BioPro QA-F

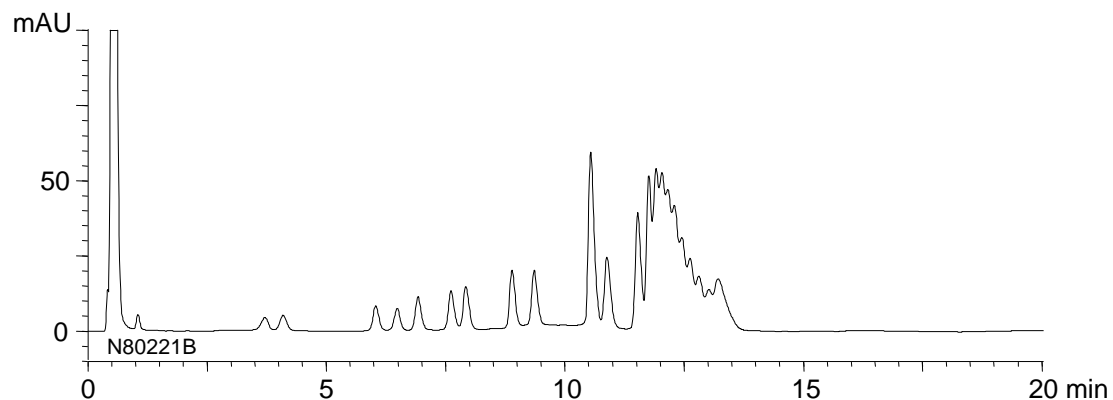
100 X 4.6 mmI.D.



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.7 M NaCl B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 1.0 M NaCl 0-100%B (0-30 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 260 nm
Injection	: 20 μ L (0.25 mg/mL)
Sample	: 1 kb DNA ladder (75-12,216 bp)

YMC-BioPro QA-F

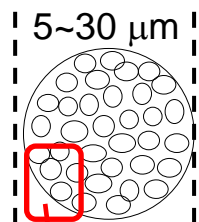
30 X 4.6 mmI.D.



**YMC-BioPro QA-F 100 mm長
カラムは核酸の高分離分析に有効**

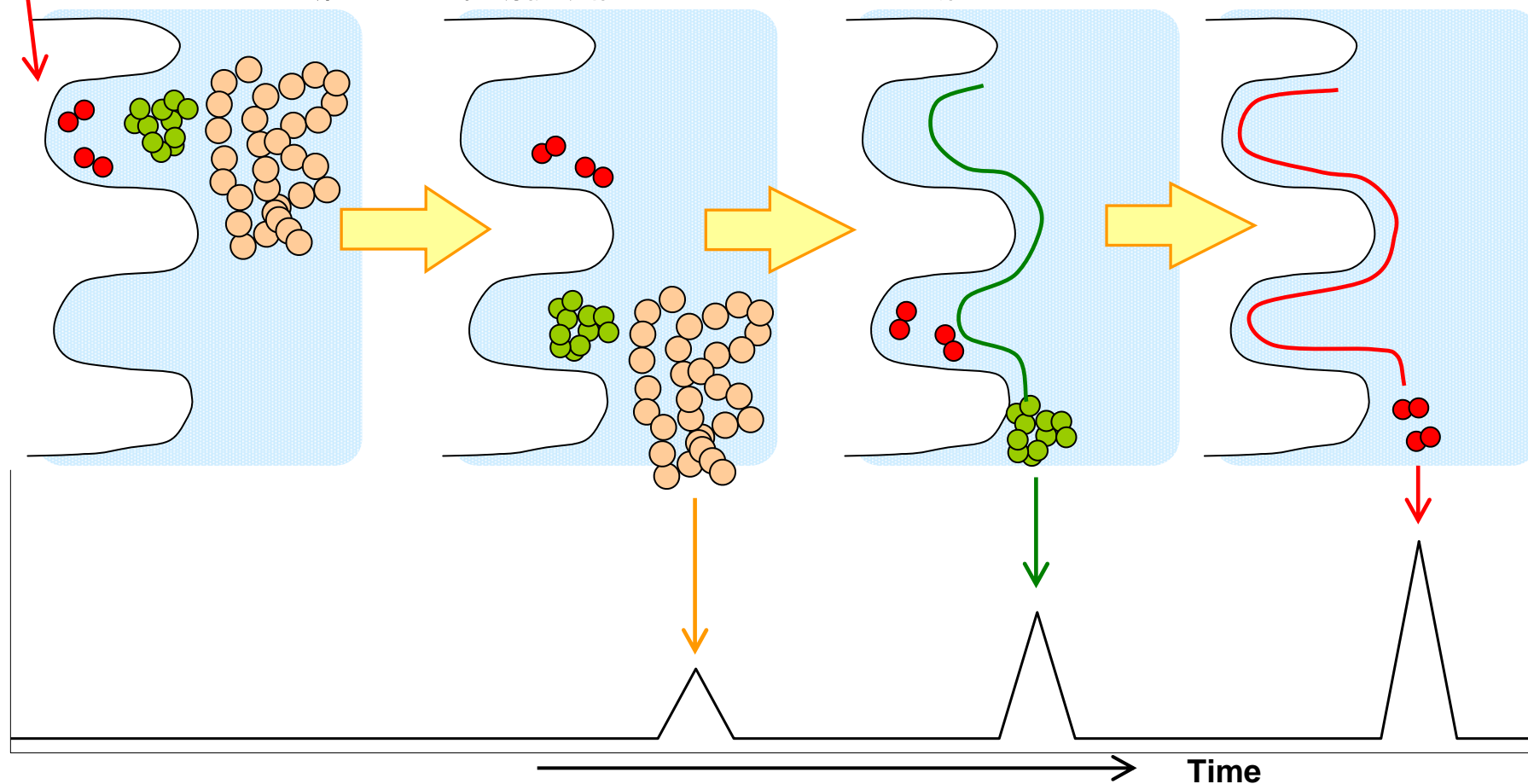
- 逆相クロマトグラフィー
- イオン交換クロマトグラフィー
- サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーの分離メカニズム Size Exclusion Chromatography (SEC)



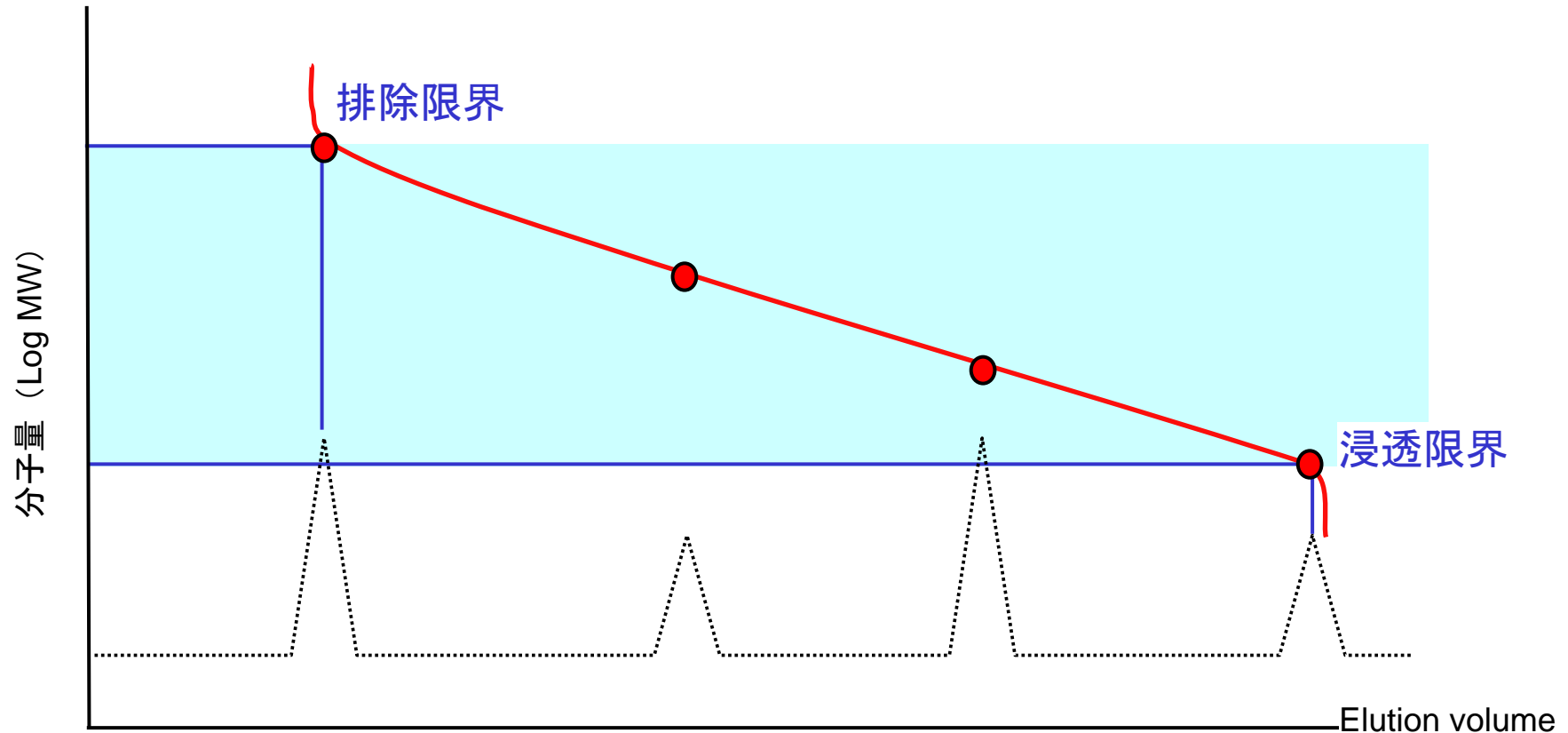
一般的な分離条件

- **固定相** 網目構造の細孔（ポア）を有するシリカゲル（化学修飾型も）やポリマー
- **移動相** 試料の溶解性や安定性が高いpHの緩衝液（リン酸buffer, pH 7付近が一般的）
充填剤との相互作用低減のため塩や水溶性有機溶媒の添加も有効
- **溶出** 初期移動相のアイソクラティック溶出



較正曲線 (Calibration curve) とは

- 細孔以上の大きさの分子は、細孔に入ることができずゲル粒子の隙間を通過（排除限界）
- 細孔内に完全に浸透しきってしまう小さい分子は、ほぼ同じ位置に溶出（浸透限界）



SECでは排除限界と浸透限界の間が分離に有効な領域であり、目的試料の分子量がこの領域に入るカラムを選択することが必要

サイズ排除クロマトグラフィー用カラム YMC-Pack Diol

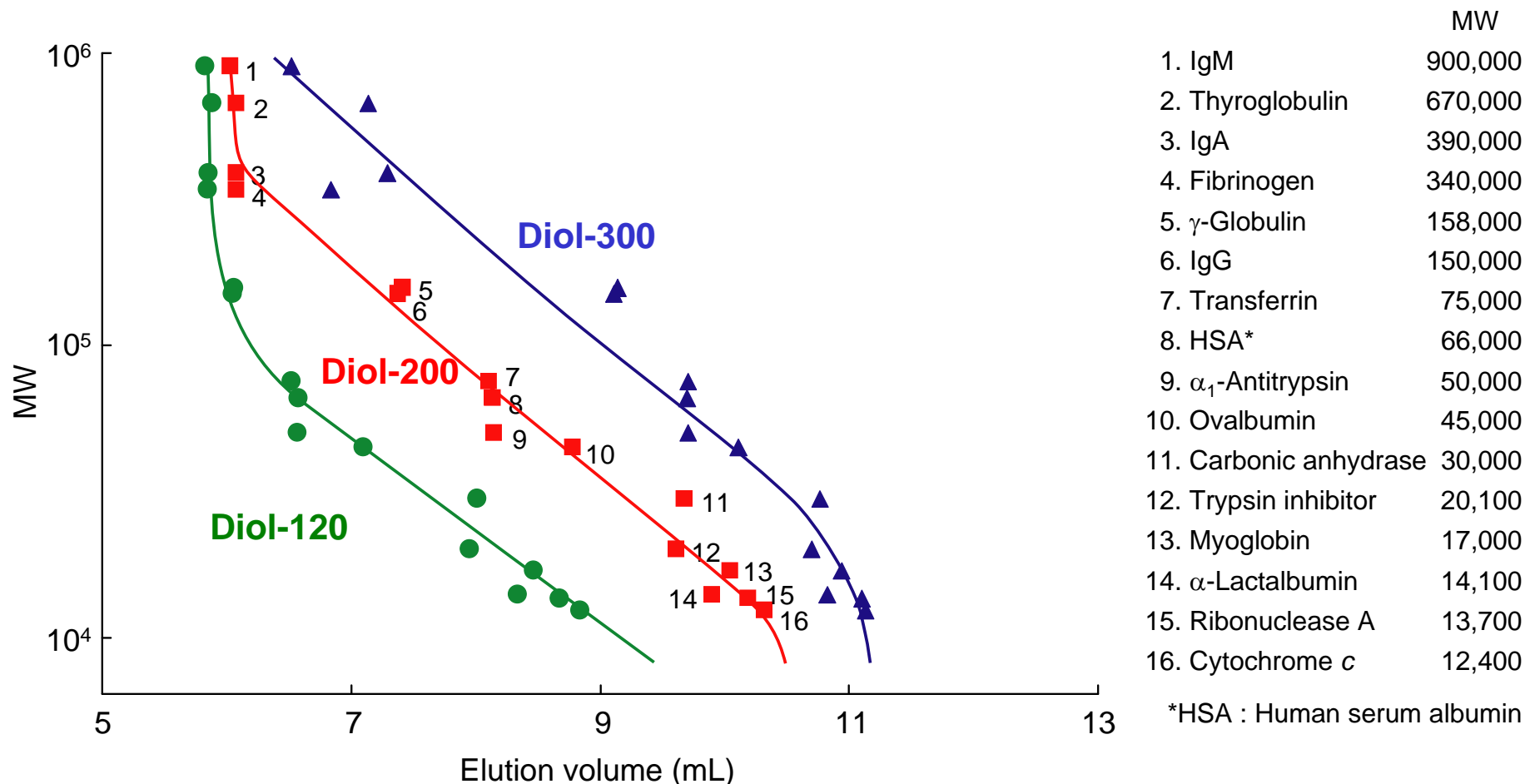
特長

- 耐圧性の高いシリカゲル基材を使用
- 安価なサイズ排除カラム
- 適用分子量範囲の異なる4種類の細孔径をラインナップ
- タンパク質、ペプチド、核酸、糖類の分離や分子量測定に有効

仕様

	Diol-60	Diol-120	Diol-200	Diol-300
基材	多孔性シリカゲル			
官能基	ジヒドロキシプロピル (Diol)			
粒子径 (μm)	5			
細孔径 (nm)	6	12	20	30
使用pH範囲 (°C)	5~7.5			
適用分子量範囲	1万以下	5,000~10万	1万~数十万	数万~100万

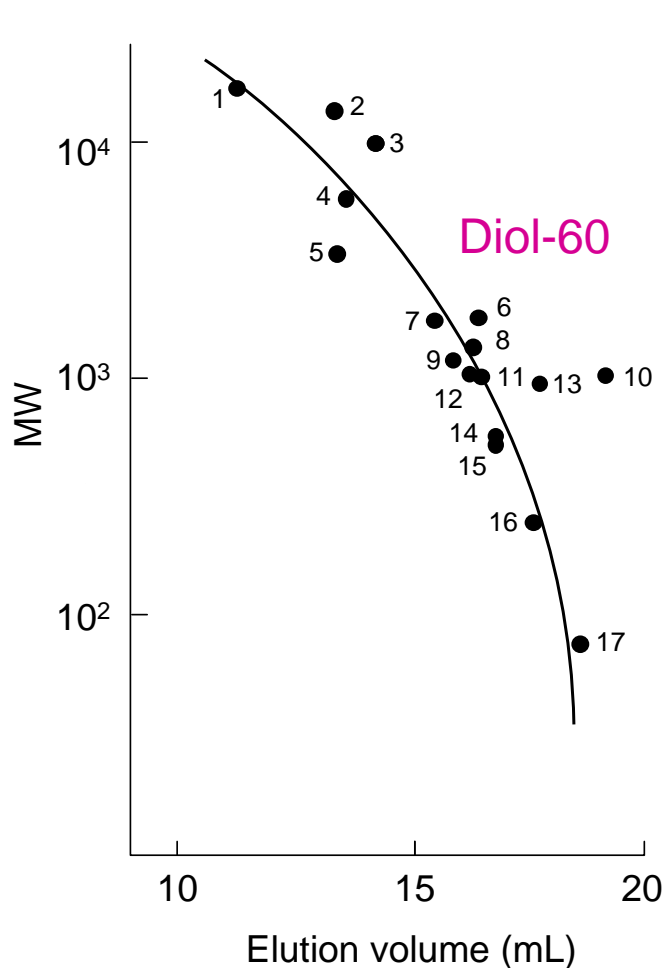
タンパク質 (MW 1万~90万) の校正曲線



Column : YMC-Pack Diol 300 X 8.0 mmI.D.
 Eluent : 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl
 Flow rate : 0.5 mL/min
 Temperature : 25°C
 Detection : UV at 280 nm

Diol-300 - MW 数万~100万程度の分離に
Diol-200 - MW 1万~数十万程度の分離に
Diol-120 - MW 5,000~10万程度 of 分離に

ペプチド～低分子タンパク質の校正曲線



	MW
1. Myoglobin	17,000
2. Ribonuclease A	13,700
3. Cytochrome c	12,400
4. Insulin (bovine)	5,700
5. Insulin chain B	3,496
6. α -Mating factor	1,684
7. Neurotensin	1,672
8. Angiotensin I	1,296
9. CCK-Octapeptide	1,143
10. Bradykinin	1,060
11. Angiotensin II	1,040
12. Oxytocin	1,007
13. Angiotensin III	931
14. Met-Enkephalin	573
15. Leu-Enkephalin	555
16. Tetraglycine	246
17. Glycine	75

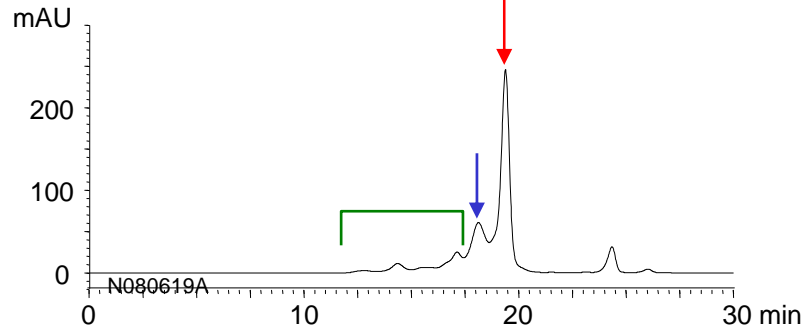
Column : YMC-Pack Diol-60 500 X 8.0 mm I.D.
 Eluent : 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl / acetonitrile (70/30)
 Flow rate : 0.7 mL/min
 Temperature : ambient
 Detection : UV at 215 nm

Diol-60 — MW 1万以下の分離に

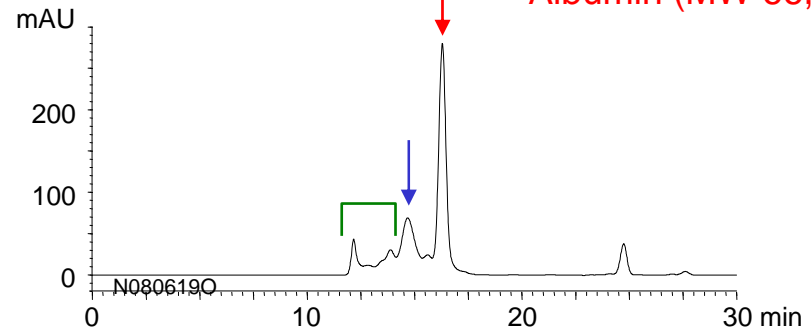
カラム連結による効果 (1)

ヒト血清中のタンパク質

YMC-Pack Diol-300
5 μm, 300 X 8.0 mml.D.



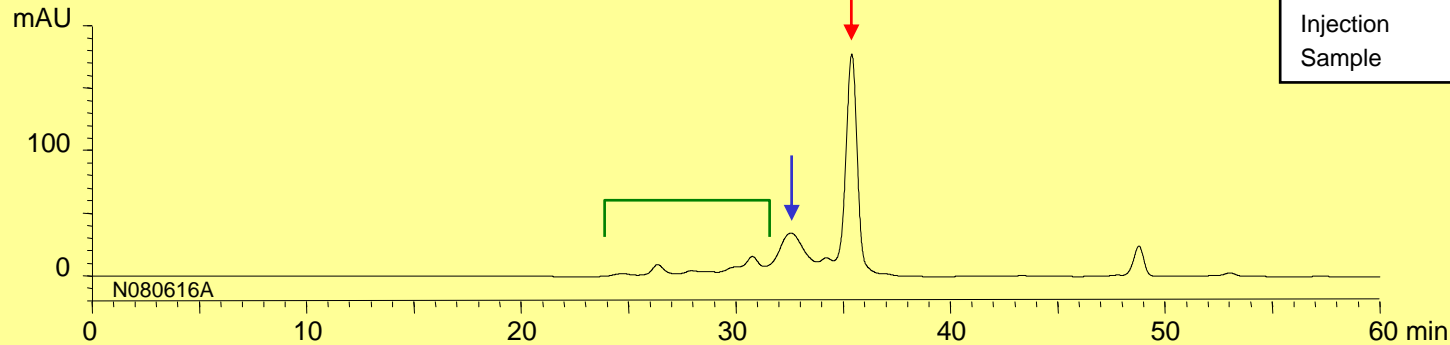
YMC-Pack Diol-200
5 μm, 300 X 8.0 mml.D.



↓ : IgG (MW 150,000)
↓ : Transferrin (MW 75,000)
Albumin (MW 66,000)

↓ Diol-300とDiol-200を連結 ↓

YMC-Pack Diol-300 + Diol-200 5 μm, 300 X 8.0 mml.D. X 2



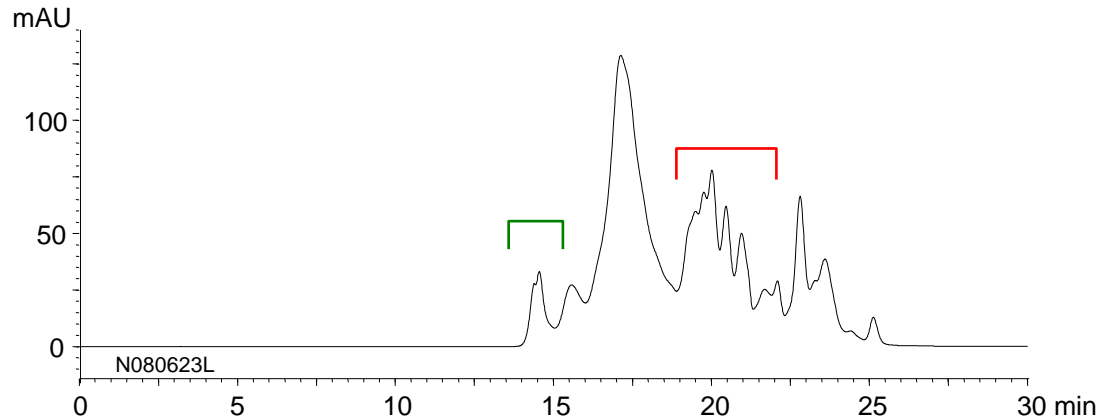
Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 20 μL
Sample	: Human serum (100 μL/mL)

連結によりIgGより高分子部分およびIgGとTransferrin・Albuminの分離のいずれも改善

カラム連結による効果 (2)

BSAのトリプシン消化物 (ペプチドマッピング)

YMC-Pack Diol-60 5 μ m, 500 X 8.0 mmI.D.

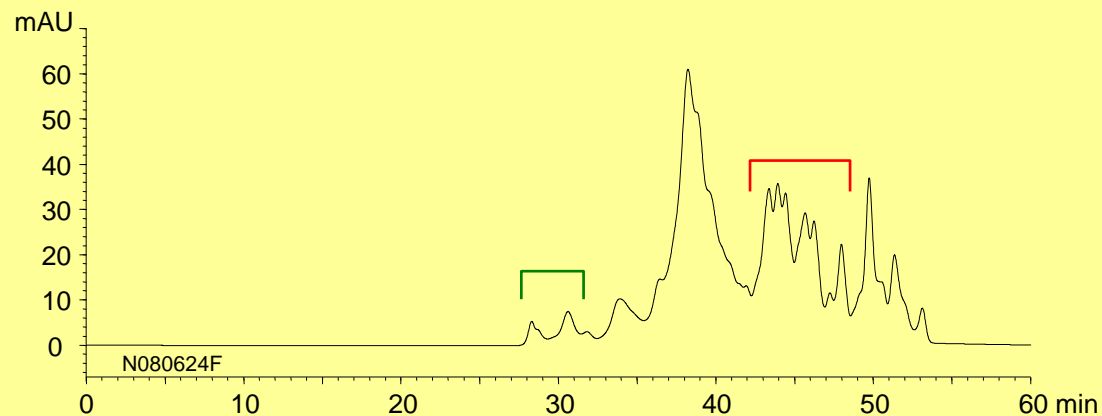


Eluent	: 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl / acetonitrile (70/30)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μ L
Sample	: Tryptic digest of BSA



Diol-120とDiol-60を連結

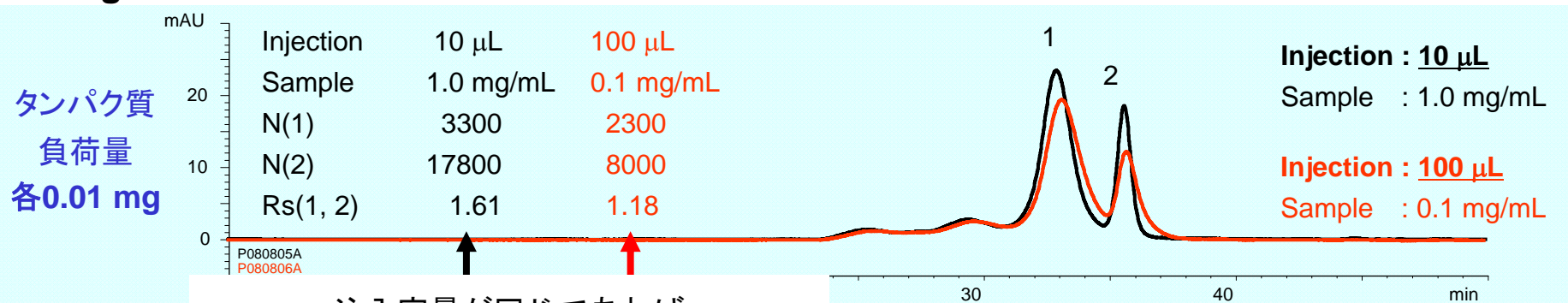
YMC-Pack Diol-120 + Diol-60 5 μ m, 500 X 8.0 mmI.D. X 2



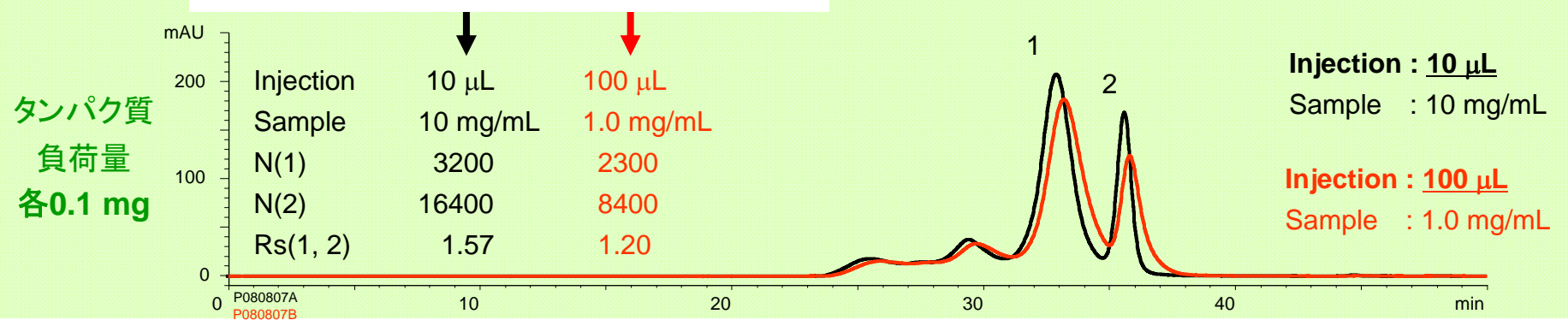
目的物の分子量分布が大きいときは
細孔径の異なる2種類のカラムを
つないで使用することが有効

注入容量 (Injection volume) による影響 (1)

ヒトIgG、ヒトアルブミン等量混合サンプル



注入容量が同じであれば
サンプル負荷量が異なっても同等の分離能



Column : YMC-Pack Diol-300+ Diol-200
300 X 4.6 mmI.D. X 2

Eluent : 0.1 M KH_2PO_4 - K_2HPO_4 (pH 7.0)
containing 0.2 M NaCl

Flow rate : 0.17 mL/min

Temperature : ambient (25°C)

Detection : UV at 280 nm

1. IgG (MW 150,000)
2. Albumin (MW 66,000)

SECでは注入容量による影響大 (サンプル負荷量と同じでも、注入容量が10倍多いとピークはブロードになる)
サンプル負荷量による影響小

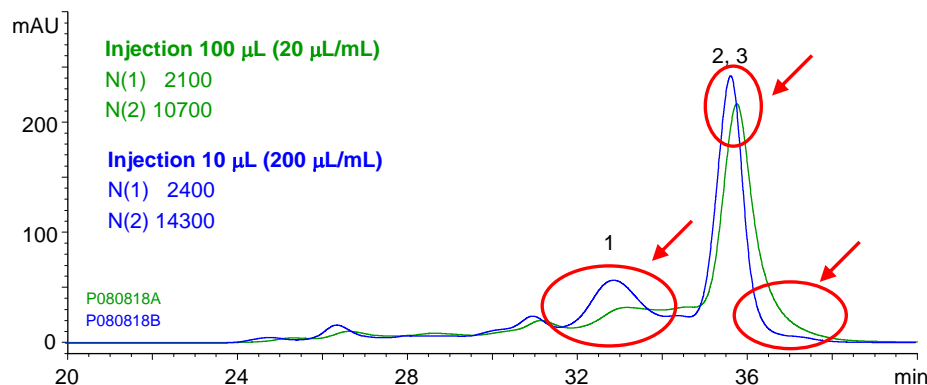
注入容量 (Injection volume) による影響 (2)

サイズ排除とイオン交換の比較

ヒト血清

サイズ排除

YMC-Pack Diol-300 + Diol-200 5 μm, 300 X 4.6 mm I.D. X 2



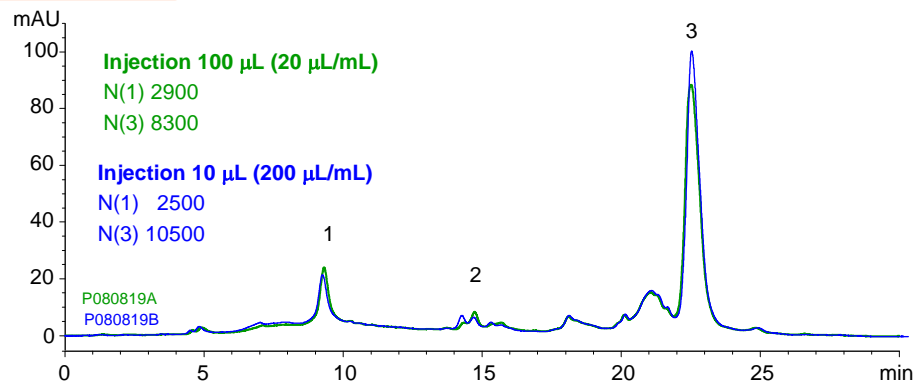
1. IgG (MW 150,000)
2. Transferrin (MW 75,000)
3. Albumin (MW 66,000)

Eluent : 0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl
Flow rate : 0.17 mL/min
Temperature : ambient (25°C)
Detection : UV at 280 nm

サンプル負荷量が同じでも、注入容量が異なると分離は大きく異なる

イオン交換

YMC-BioPro QA 5 μm, 50 X 4.6 mm I.D.



Eluent : A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6)
B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 0.5 M NaCl
0-30%B (0-15 min), 30-100%B (15-30 min)
Flow rate : 0.5 mL/min
Temperature : 25°C
Detection : UV at 280 nm

サンプル負荷量が同じなら、注入容量が異なっても分離はほとんど変わらない

各分離モードの特徴および分離最適化のポイント

		逆相 Proシリーズ, Wide-Poreカラム etc.	イオン交換 YMC-BioProシリーズ	サイズ排除 YMC-Pack Diol
分離の原理		疎水性	電荷	分子サイズ
適用分子量		約10万まで	数百万まで	約100万まで
分離への主要なファクター	試料	疎水性 分子サイズ イオン性 サンプル溶液の種類 (初期移動相が適)	表面電荷の状態 サンプル溶液の種類 (初期移動相が適)	分子サイズ サンプル容量
	固定相	細孔径と官能基の組み合わせ 粒子径	イオン交換基の種類 ポーラス or ノンポーラス	細孔径の大きさ カラム長
	移動相	緩衝液・酸の種類, pH, 濃度 有機溶媒の種類 グラジエント勾配	緩衝液のpH、種類 カウンターイオンの種類 グラジエント勾配	緩衝液、塩の濃度 有機溶媒の添加
分離能		+++	+++	++
スピード		+++	++ ~ +++	+
試料負荷量		++	+++	++
試料安定性		+ ~ ++	+++	+++

タンパク質・核酸類のアプリケーション 分離モードによる比較

タンパク質

- ヒト血清中のタンパク質
- モノクローナル抗体 (IgG) およびそのフラグメント

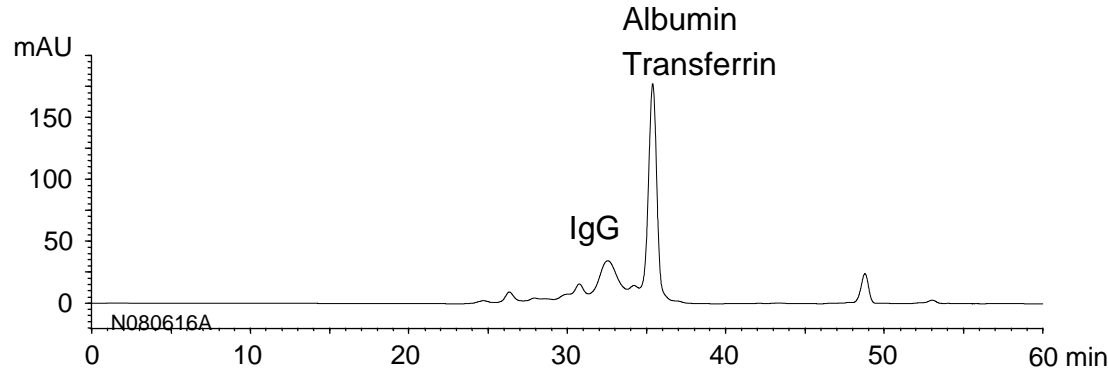
核酸類

- 核酸塩基・ヌクレオチド
- オリゴヌクレオチド
- プラスミドおよびその制限酵素分解物

ヒト血清中のタンパク質 サイズ排除とイオン交換の比較

サイズ排除

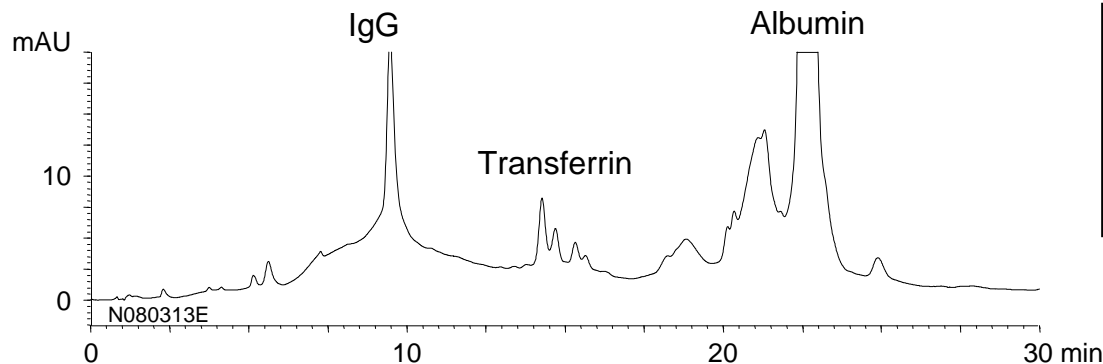
YMC-Pack Diol-300 + Diol-200 5 μ m, 300 X 8.0 mmI.D. X 2



Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 20 μ L (100 μ L/mL)

イオン交換

YMC-BioPro QA 5 μ m, 50 X 4.6 mmI.D.



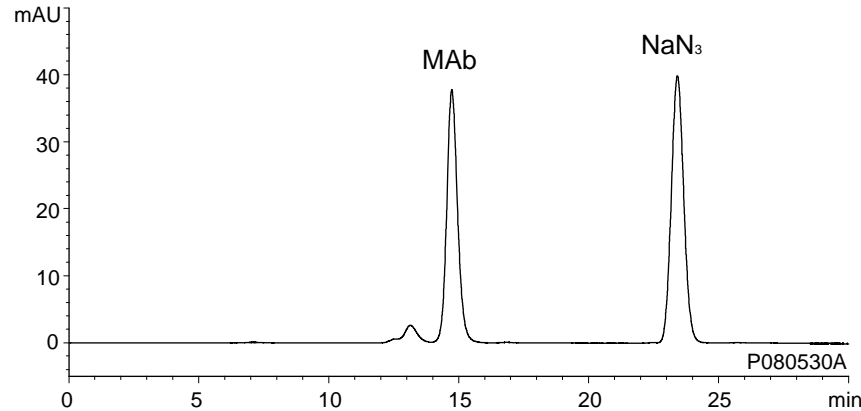
Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) containing 0.5 M NaCl 0-30%B (0-15 min), 30-100%B (15-30 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 280 nm
Injection	: 20 μ L (100 μ L/mL)

サイズ排除では分子量の近いTransferrinとAlbuminの分離不可
イオン交換では電荷の異なるTransferrinとAlbuminの分離可能

モノクローナル抗体 (MAb) サイズ排除とイオン交換の比較

サイズ排除

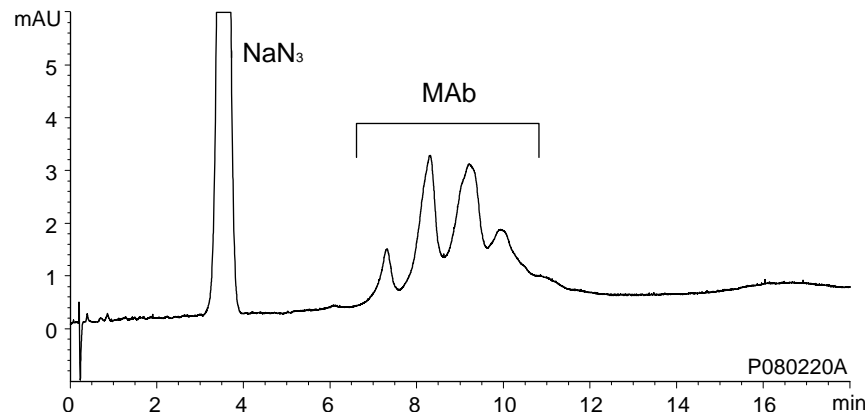
YMC-Pack Diol-200 5 μ m, 300 X 4.6 mmI.D.



Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
Flow rate	: 0.17 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μ L
Sample	: a commercially available mouse monoclonal IgG1 (0.05 mg/mL) (purified by DEAE chromatography, containing NaN ₃)

イオン交換

YMC-BioPro QA-F 5 μ m, 30 X 4.6 mmI.D.



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 0.5 M NaCl 10-25%B (0-18 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 25°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 10 μ L
Sample	: a commercially available mouse monoclonal IgG1 (0.1 mg/mL) (purified by DEAE chromatography, containing NaN ₃)

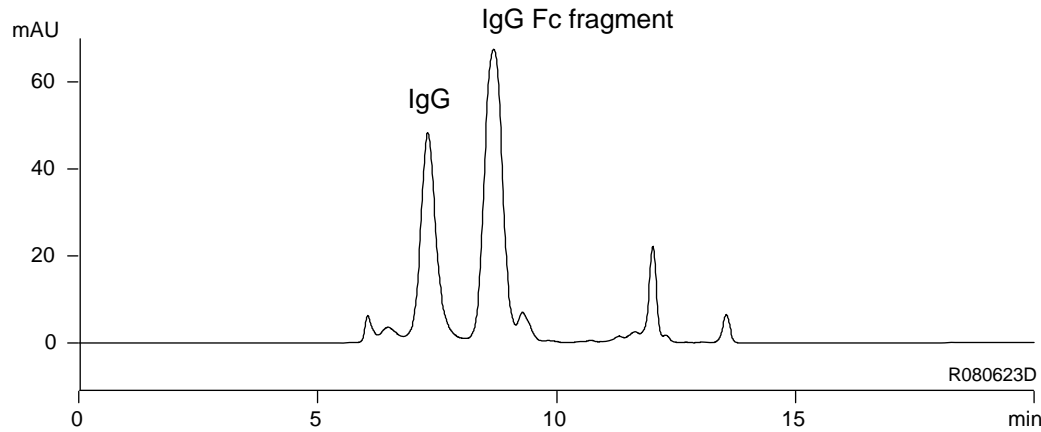
※MAb = Mouse monoclonal IgG1 (Anti-human IgG4)

DEAE精製後のMAb (IgG) は、
サイズ排除ではほぼ単一のピーク
イオン交換ではアイソフォームに由来すると考えられる複数のピークに分離

IgGおよびそのフラグメント サイズ排除と逆相の比較

サイズ排除

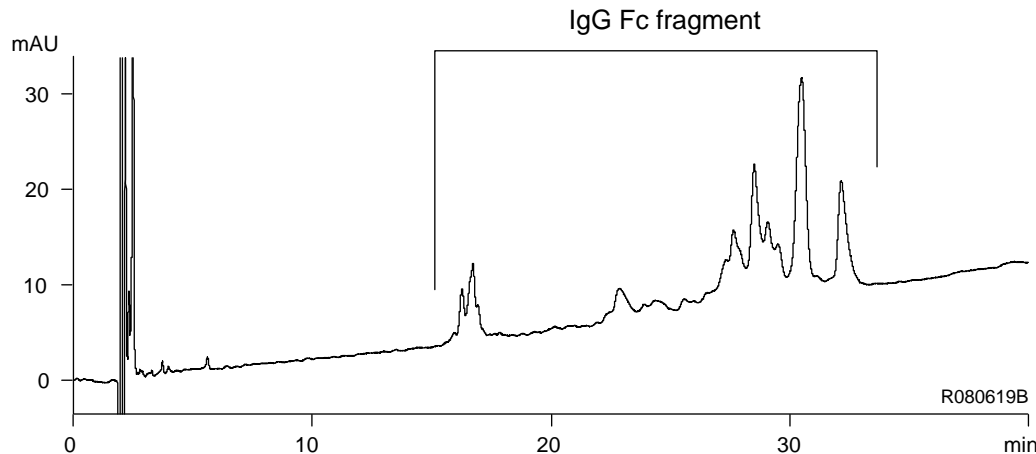
YMC-Pack Diol-200 5 μ m, 300 X 8.0 mmI.D.



Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 6.9) containing 0.2 M NaCl
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: ambient (27°C)
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μ L (0.5 mg/mL)

逆相

YMC-Pack C4 (30 nm) 5 μ m, 150 X 4.6 mmI.D.

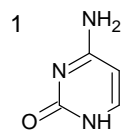
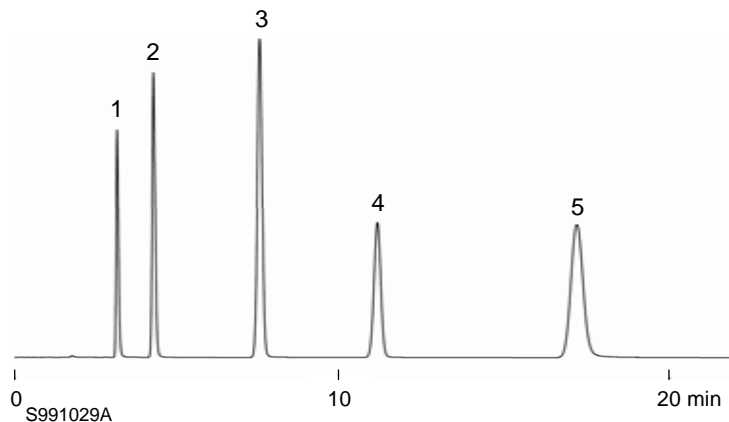


Eluent	: A) water / TFA (100/0.1) B) acetonitrile / TFA (100/0.1) 25-45%B (0-40 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Temperature	: 37°C
Detection	: UV at 220 nm
Injection	: 5 μ L (1.0 mg/mL)

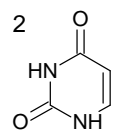
**IgGとそのフラグメントのように
分子量に差があるサンプルでは
サイズ排除が有効
逆相ではIgGフラグメントの高分離
分析が可能**

核酸塩基・ヌクレオチド 逆相モードによる分離

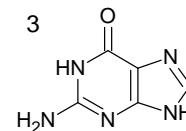
核酸塩基



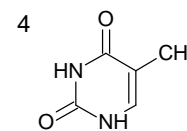
Cytosine



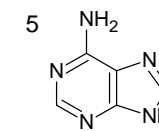
Uracil



Guanine



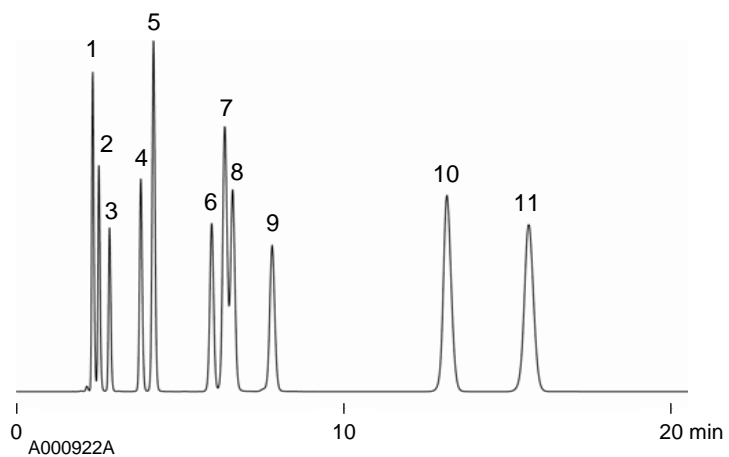
Thymine



Adenine

Column : **Hydrosphere C18** 5 μm, 150 X 4.6 mm I.D.
Eluent : 20 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 6.9)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 37°C
Detection : UV at 254 nm, 0.064 AUFS
Injection : 8 μL (0.01-0.02 mg/mL)

ヌクレオチド

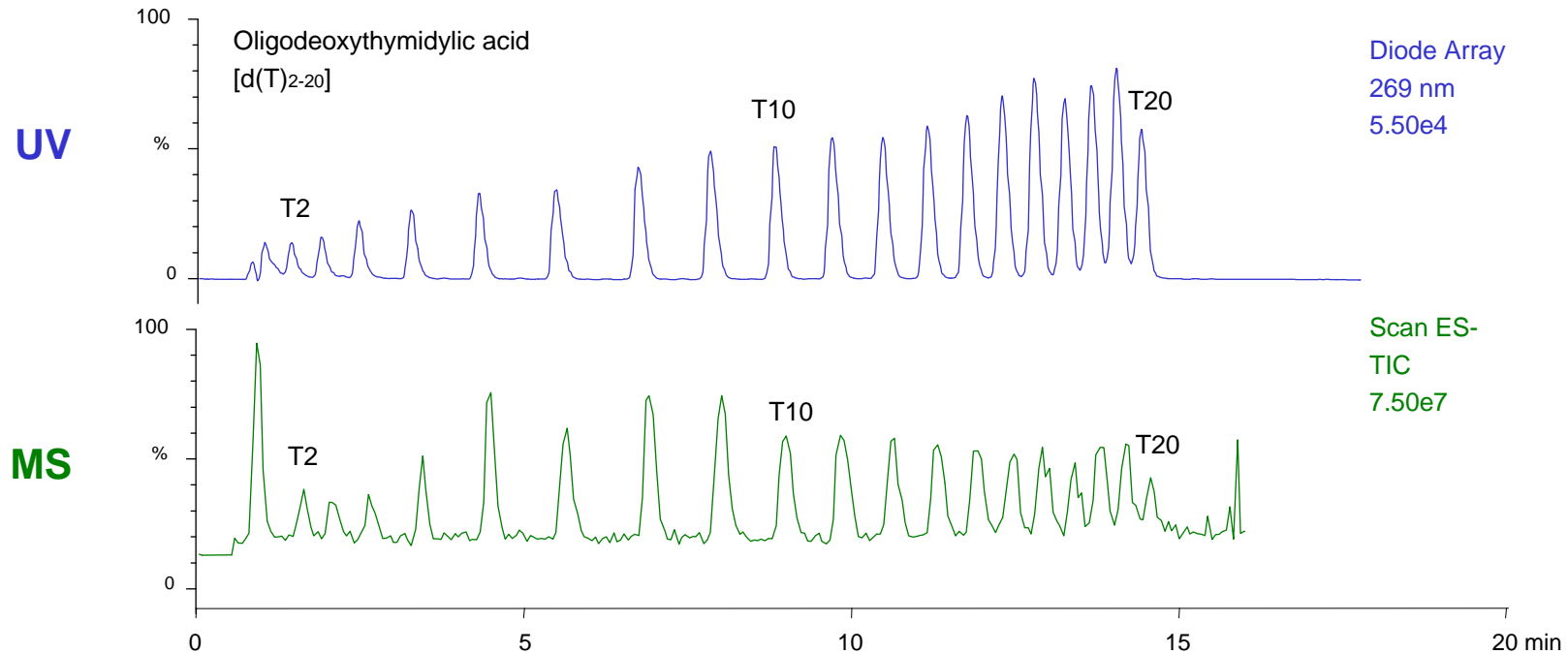


1. 5'-UTP
2. 5'-UDP
3. 5'-CMP
4. 5'-UMP
5. 5'-dCMP
6. 5'-GMP
7. 5'-ATP
8. 5'-IMP
9. 5'-ADP
10. 5'-TMP
11. 5'-AMP

Column : **Hydrosphere C18** 5 μm, 150 X 4.6 mm I.D.
Eluent : 100 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 5.5)
Flow rate : 1.0 mL/min
Temperature : 30°C
Detection : UV at 260 nm, 0.256 AUFS
Injection : 10 μL (0.05-0.15 mg/mL)

核酸塩基やヌクレオチド分析には
水100%の移動相条件下でも安定して
使用可能なHydrosphere C18が有効

オリゴヌクレオチド d(T)₂₋₂₀ 逆相カラムによるLC/MSへの適応



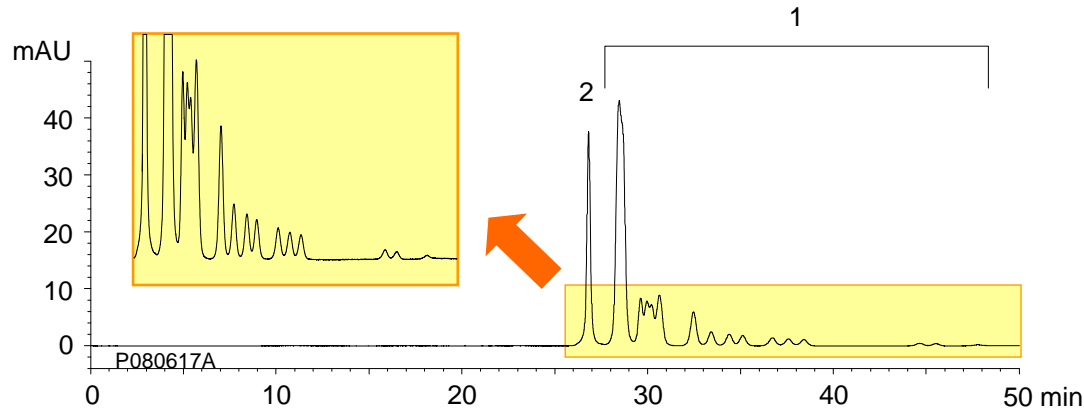
Column : Hydrosphere C18 3 μm, 50 X 2.0 mmI.D.
 Eluent : A) 5 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0)
 B) 5 mM di-n-butylamine-acetic acid (pH 6.0) / methanol (20/80)
 42-70%B (0-20 min)
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Temperature : 35°C
 Detection : UV at 269 nm
 ESI negative-mode
 Injection : 5 μL (5 nmol/mL)

揮発性イオンペア試薬を用いる逆相分析
はLC/MSにも適用可能
Hydrosphere C18と低濃度のジブチルア
ミンbufferの組み合わせは高感度LC/MS
分析に最適

プラスミドpBR322とその制限酵素Hae III分解物 サイズ排除とイオン交換の比較

サイズ排除

YMC-Pack Diol-300 + Diol-200 5 μm, 500 X 8.0 mmI.D. X 2

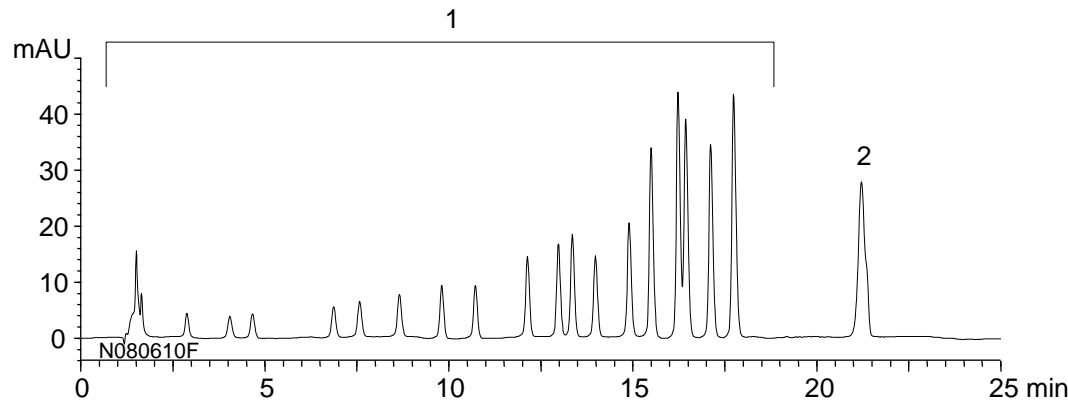


1. Plasmid pBR322 *Hae* III digest (8-587 bp)
2. Plasmid pBR322 (4,361 bp)

Eluent	: 0.1 M KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl
Flow rate	: 0.7 mL/min
Temperature	: ambient (25°C)
Detection	: UV at 260 nm
Injection	: 10 μL
Sample	: Plasmid pBR322 <i>Hae</i> III digest (0.13 mg/mL) Plasmid pBR322 (0.03 mg/mL)

イオン交換

YMC-BioPro QA-F 5 μm, 100 X 4.6 mmI.D.



Eluent	: A) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) B) 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) containing 1.0 M NaCl 70-85%B (0-20 min), 85%B (20-25 min)
Flow rate	: 0.5 mL/min
Temperature	: 35°C
Detection	: UV at 260 nm
Injection	: 10 μL
Sample	: Plasmid pBR322 <i>Hae</i> III digest (0.13 mg/mL) Plasmid pBR322 (0.03 mg/mL)

分子量による分離はサイズ排除で
高い分離能が必要な場合はイオン交換が有効

まとめ

効率的なバイオセパレーションのために

■ 逆相

分子量に応じて最適な細孔径・官能基を用いることで良好な分離が可能
特に低分子化合物で優れた分離能

■ イオン交換

わずかな表面電荷の差（アミノ酸1残基のような）により分離が可能（逆相では分離できない試料にも有効）

移動相のpHとイオン交換基の組み合わせなどにより、分離最適化のファクターが豊富

■ サイズ排除

分子量の差が大きい化合物同士の分離に有効

目的物の分子量範囲に応じて最適な細孔径のカラムを選択

分離改善のためには、サンプル注入容量の少量化、また、カラム連結が有効

- 逆相・イオン交換・サイズ排除等の各モードのカラムを組み合わせることで、効率的かつ網羅的な解析が可能