

Asahipak の生体成分分析への応用

旭化成工業 (株) GS 開発室 野口康二

1. はじめに

HPLC カラムの特性はゲル素付に依存する部分が多い。従来、HPLC ゲルとしては周知の如くシリカゲル系や hydrophobic polymer 系が主として使われてきた。これに対して Asahipak は hydrophilic polymer を素材としており、hydrophilic / hydrophobic interaction のバランスや pH 耐性等でこの素材特有の性質が発揮される。Asahipak を用いると対象物質の特性に応じ、またキャリアー条件の選択によって下記のような多様なモードで分析できる。

GS シリーズ : 水溶媒系 GPC

有機溶媒系 GPC

吸着クロマトグラフィー

ES シリーズ : イオン交換クロマトグラフィー

Asahipak GS シリーズに充填されているゲルはビニルアルコール単位に基く hydrophilicity と恐らく -C-C- 主鎖に基く hydrophobicity の両特性を持っており、どちらの特性を利用するかによっていろいろなモードでの HPLC 分析が可能である。今回は、主として生体成分分析への応用を紹介したい。

2. 水溶媒系 GPC カラムとしての応用

Asahipak は PEG, 多糖類, 蛋白, 核酸等多様な成分に対し、キャリアー条件を適当に選ぶと、保持時間 ~ log MW のプロットで滑らかな曲線が得られ、GPC (SEC) のモードで分析することができる。

Asahipak のグレードは表 1 に示したが、排除限界の異なる多種のグレードを

表 1 . Asahipak GS シリーズの基本特性

標準サイズ (カラム仕様 7.6mm I D - 500mm L)

タイプ	品名	平均粒子径 (μm)	排除限界分子量 (ブルラン)	理論段数 (TP/カラム)	使用流速(ml/min)		適用pH範囲
					常用	最大	
GPC	GS-310	9 \pm 0.5	40,000	>16,000	1.0	3.5	2 ~ 9
	GS-510	9 \pm 0.5	300,000	>16,000	1.0	2.5	2 ~ 9
	GS-710	9 \pm 0.5	10,000,000	>16,000	1.0	1.3	
DMC	GS-220	9 \pm 0.5	3,000	>16,000	1.0	2.0	2 ~ 9
	GS-320	9 \pm 0.5	40,000	>16,000	1.0	2.5	2 ~ 12
	GS-520	9 \pm 0.5	300,000	>16,000	1.0	1.8	2 ~ 12
	GS-620	9 \pm 0.5	2,000,000	>16,000	1.0	1.3	2 ~ 9

【理論段数の測定条件】 試料: 1%フレングリン水溶液、移動相: 蒸留水、流速: 1ml/min、検出: RI

ハーフサイズ (カラム仕様 7.6mm I D - 250mm L)

タイプ	品名	平均粒子径 (μm)	排除限界分子量 (ブルラン)	理論段数 (TP/カラム)	使用流速(ml/min)		適用pH範囲
					常用	最大	
GPC	GS-310H	9 \pm 0.5	40,000	>8,000	1.0	3.5	2 ~ 9
	GS-510H	9 \pm 0.5	300,000	>8,000	1.0	2.5	2 ~ 9
	GS-710H	9 \pm 0.5	10,000,000	>8,000	1.0	1.3	
DMC	GS-220H	9 \pm 0.5	3,000	>8,000	1.0	2.0	2 ~ 9
	GS-320H	9 \pm 0.5	40,000	>8,000	1.0	2.5	2 ~ 12
	GS-520H	9 \pm 0.5	300,000	>8,000	1.0	1.8	2 ~ 12
	GS-620H	9 \pm 0.5	2,000,000	>8,000	1.0	1.3	2 ~ 9

【理論段数の測定条件】 試料: 1%フレングリン水溶液、移動相: 蒸留水、流速: 1ml/min、検出: RI

揃えており、分子量 50 ~ 100 ダルトンの小さい分子から、1000 万という非常に大きい分子量のポリマーまで 広範囲の分子量の物質の分析、分取に適用可能である。

Asahipak の特徴の一つは排除限界の大きいグレードでも十分な硬さを実現することに成功したため、全グレード 9 μm という微細粒径ゲルで揃えることができた。従って、特に数 10 万以上の高分子の領域で従来にない高分離を実現できる。

一例として DNA 断片の分離例を Fig. 1 に示した。

一方、ビニルアルコールコポリマーゲルの特徴として、シリカゲル中のシラノール基のような強力な吸着サイトを持たないため、多くの対象物質について高い回収率が待られる。従って、分離しにくい成分に適用する場合、リサイクルクロマトを適用することができる。

Myoglobin と Cytochrome C のリサイクルクロマトの例を Fig. 2 に示した。シャープなピークが 10 回以上のリサイクルでベースラインに近く分離し、しかも同一面積を維持していることが回収率の高さを示している。

その他、いくつかの GPC 分析の例をご紹介します。

Fig 1 フラスミット DNA断片の分離例

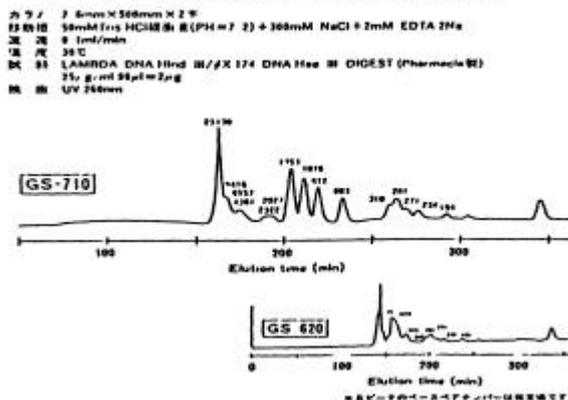
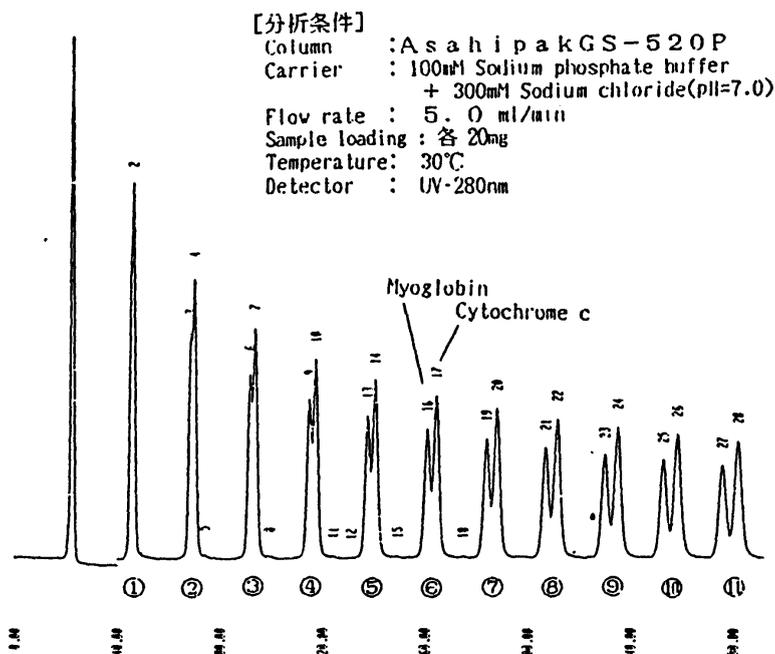


Fig.2 蛋白のリサイクルクロマトの例



○内数字はリサイクルの回数を示します。

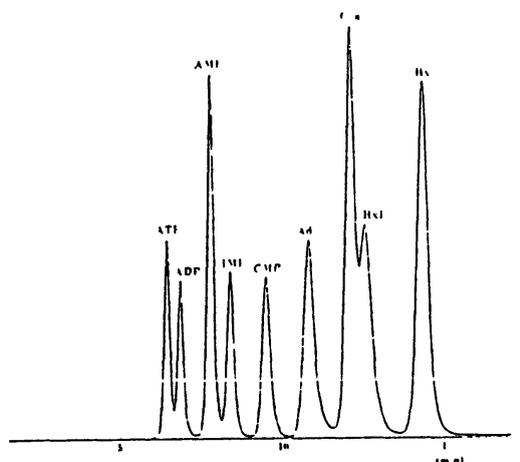
高回収率なのでリサイクルクロマトが可能です。

3. その他の Asahipak に特徴的な 応用

Asahipak は hydrophilic polymer gel という素材に基き、対象成分とキャリアー条件によっては従来のカラムにない特徴的な分離を実現できる。

ポリマー鎖の持つ弱い疎水的な相互作用を利用する“逆相的”な分離が主であるが、いくつかの例を紹介する。

Fig 3 核成分の“isocratic”分離



Chromatogram of ATP and its Metabolites

Column GS 320
Carrier 100mM sodium phosphate (pH 3)
Flow rate 2.0ml/min
 ΔP 95-100kg/cm²
Sample Mixture of Authentic Samples

Fig 3

核酸成分等の“isocratic”分離

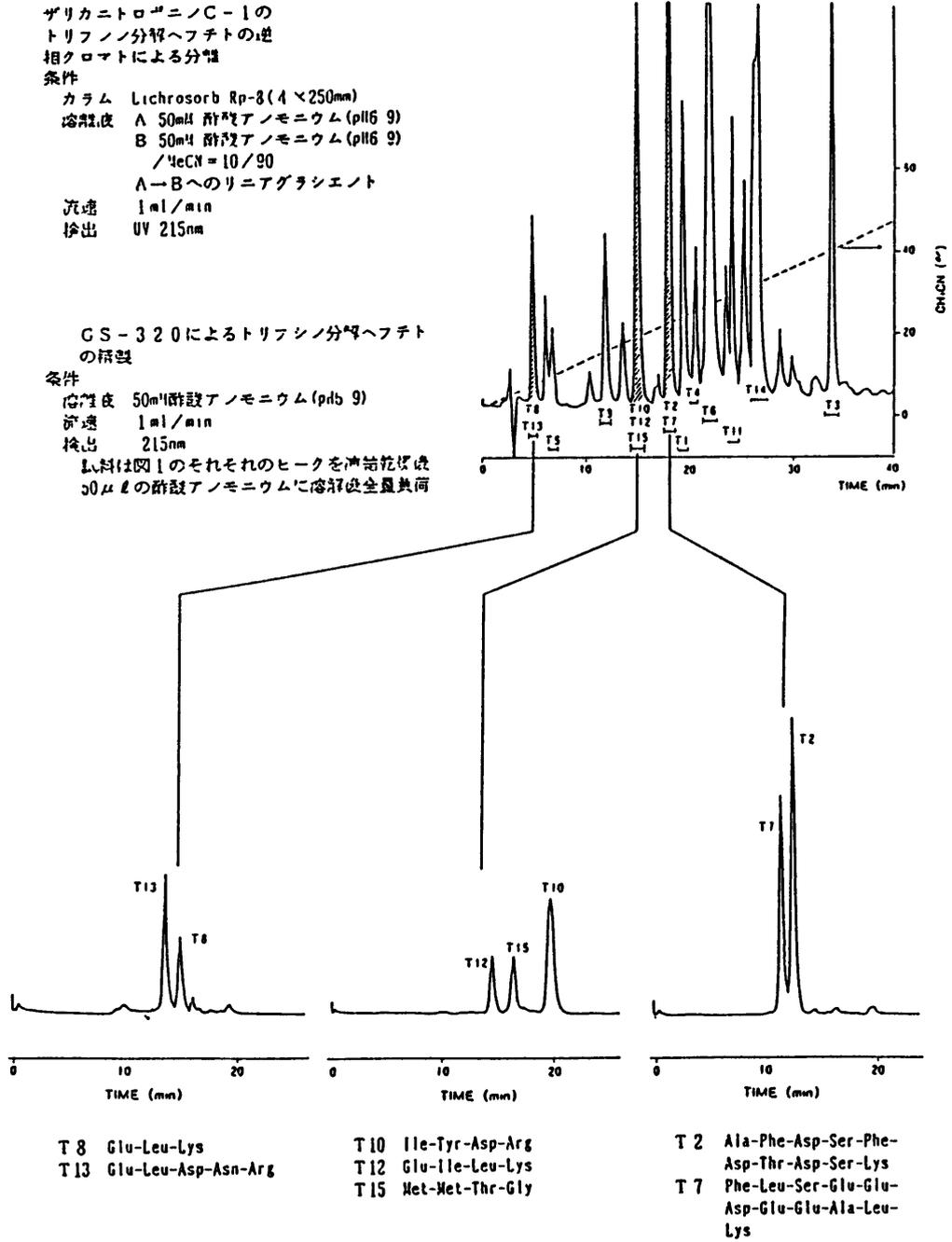
ゲルの持つ弱い疎水的な特性を生かした“逆相的”な分離であり、多く“isocratic”分析が可能なことから実用上の利点が多い。応用範囲は核酸成分に限らずペプチド、ビタミン、アルコール、カルボン酸等、アルキル基、フェニル基、ヘテロ環含有分子等多岐に亘る。

・ ODS で保持が低い成分の“isocratic”分離

ODS は適用範囲が広くシャープな分離のできる良いカラムであるが、極性の強い化合物の場合いわゆるスッポ抜けで、良好な分離が待られないことがある。このような場合、主として Asahipak GS - 320 を用いると良好な分離を isocratic 条件で得ることができる。

このような例として、ペプチドの例を Fig . 4 に示した。

Fig 4 ODSで保持が低い極性成分のisocratic 分離



このデータは東北大 理学部 高木 尚先生より御提供頂いた。

・クルードなサンプルの生打ち

Asahipak 特に GS シリーズは疎水的相互作用が弱くシラノールのような非可逆的吸着サイトもないので多種多様な成分を含む血清，尿，反応液等のクルードなサンプルでも多くの場合直接注入することができる。

一例として血中グルタチオンの分析例を示した。

Fig.5

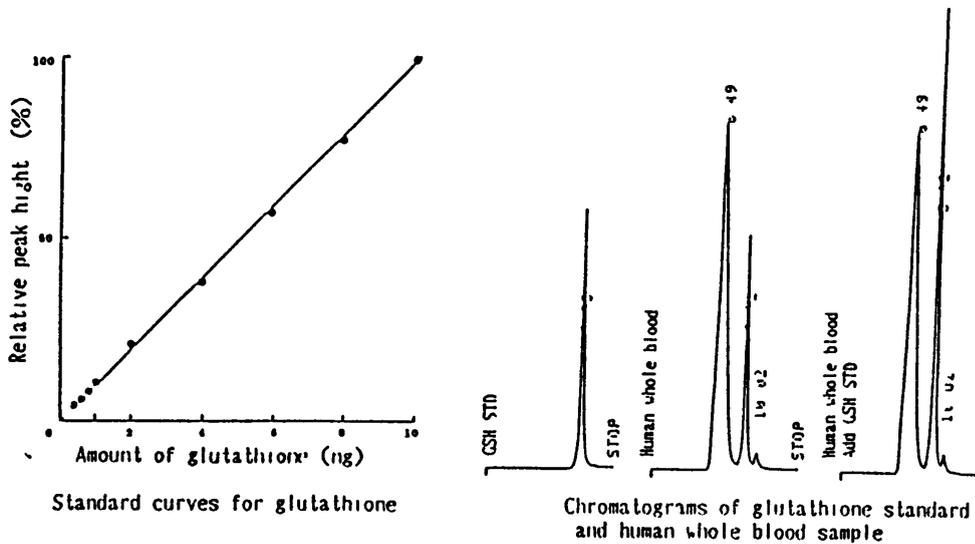
Fig 5 血中グルタチオンの分析

【試料調製】

血液 1~5 μ l を採取後 直ちに 10mM EDTA 2Na 溶液で 10 倍希釈し溶液した試料溶液 5 μ l を直接 HPLC に注入した。

【分析条件】

Column Asahipak GS-320H
Carrier 40mM EDTA 3Na (pH=8.0)
Flow rate 1.0 ml/min
Post column reagent o phthalaldehyde 0.8mg/ml 20% CHCl₃ aq soln
Flow rate 0.35ml/min
Reaction coil 7m \times 0.5mm id, PTFE
Reaction temp 40 $^{\circ}$ C
Detector Spectrofluorometer Ex 350nm Em 420nm



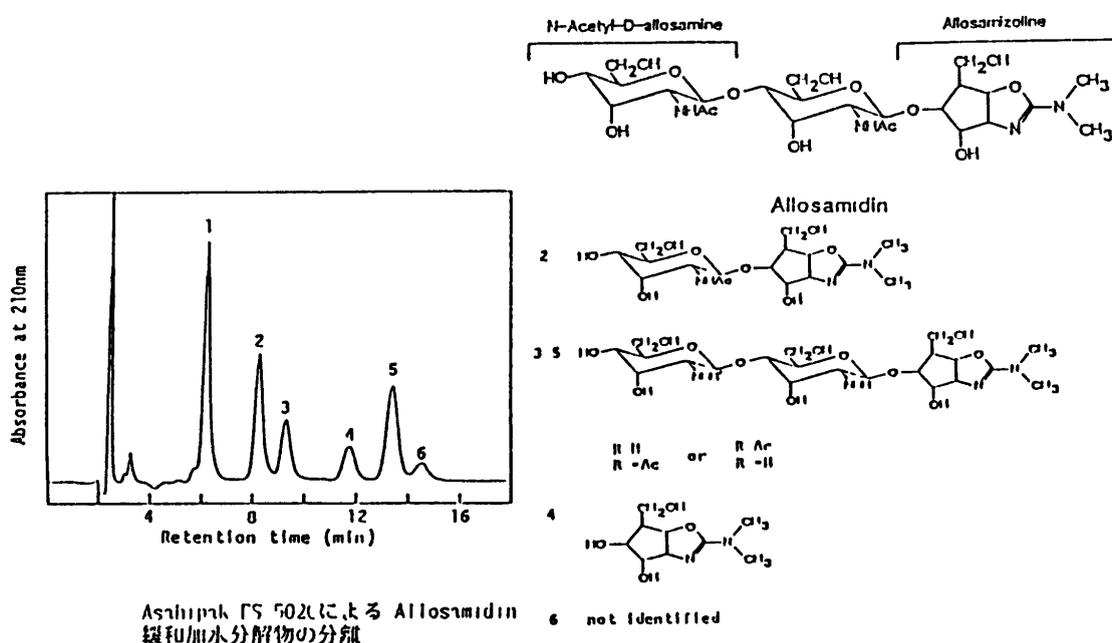
このデータは、北里大学 薬学部 二村 典行先生より御提供頂いた。

アルカリ条件下でのクロマト

Asahipak はシリカ系と異なり、アルカリ条件下でも安定に使用することができる。

一例を Fig. 6 に示したが、このサンプルは放線菌が生産する昆虫のキチナーゼ阻害物質であり、塩基性が強い。シリカベースの担体を用いた逆相クロマトグラフィーでは回収率が低かったが、Asahipak ES - 502C を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでは良好な分離データを得ることができた。

Fig 6 Allosamidin の陽イオン交換分離



Asahipak ES 502Cによる Allosamidin 縦和加水分解物の分離

<分析条件>

Column Asahipak ES-502C (7.6 x 100mm)
 Mobile phase 10mM AcOH₄ - NH₄OH (pH 9.1)
 Flow rate 1.0 ml/min
 Temperature 40°C
 Detector UV-210nm

このデータは東大 農学部 長沢先生より御提供頂いた。

4. おわりに

以上、hydrophilic polymer gel 充填カラム Asahipak のいくつかの応用別を記したが、GPC 分離は hydrophilic polymer gel の Hydrophilicity に基く分離であり、その他の応用例に示した“逆相的”な分離は hydrophilic polymer gel が持つ弱い hydrophobicity を生かした分離である。

高分離能、サンプルの適用範囲の広さ、アルカリ条件下の安定性、有機溶媒使用時の安定性、品質安定性等々を生かして、益々多くの分野でお役に立つことを期待したい。