

大きな分子の分離に適したHPLCカラムは？ (シリカ粒子の細孔径とモノリス型カラムについて)

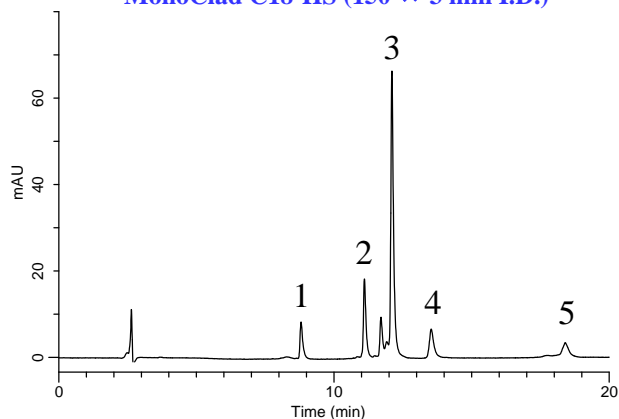
シリカ粒子を充填したHPLCカラムは、今やなくてはならない存在となっています。しかし、その多くは低分子の分離を目的として設計されており、近年ニーズが高まっているペプチドや糖鎖の分離においては、必ずしも高い性能を示しません。

そこで、今回はタンパク質や糖鎖をいくつかのカラムで分析し、比較を行いました。タンパク質は分子量が大きいいため、細孔径の小さい粒子充填カラムではピーク形状が崩れる傾向がみられました。一方MonoCladでは、モノリス型の構造のため高分子であってもピーク形状が崩れにくく、細孔径の大きな粒子充填カラムよりもさらに優れた分離性能を示しました。
(R. Hirano)

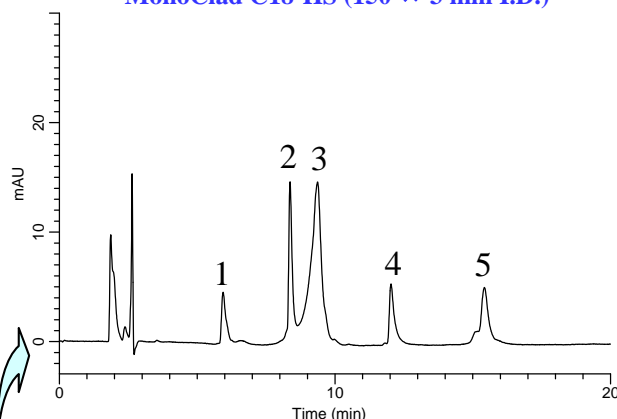
TFA系溶離液でのタンパク質の分離

ギ酸系溶離液でのタンパク質の分離

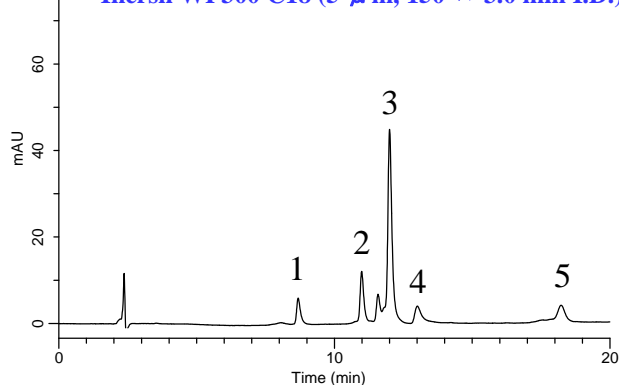
MonoClad C18-HS (150 × 3 mm I.D.)



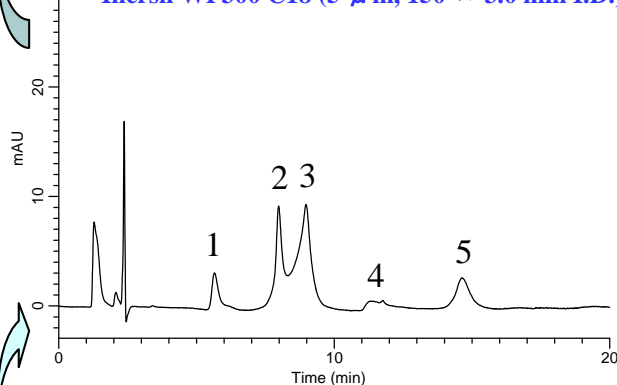
MonoClad C18-HS (150 × 3 mm I.D.)



Inersil WP300 C18 (5 μm, 150 × 3.0 mm I.D.)



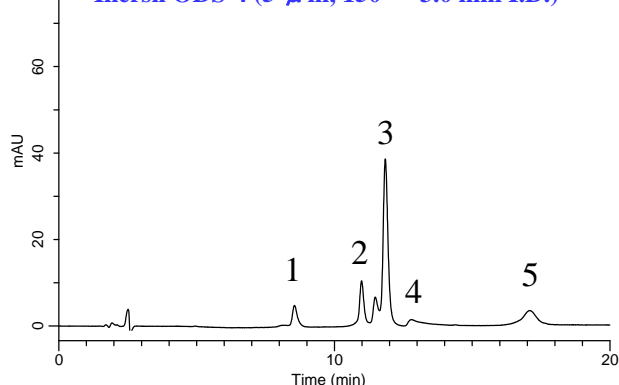
Inersil WP300 C18 (5 μm, 150 × 3.0 mm I.D.)



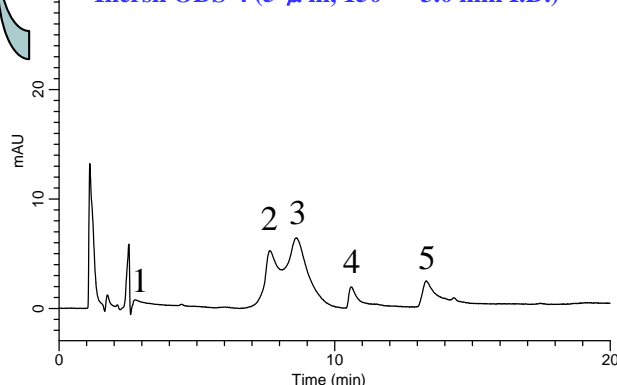
母体が粒子から
網の目(モノリス)
状の構造になる
とさらに分離能
UP!!

細孔径が100 Å
から300 Åにな
ると分離能UP!

Inersil ODS-4 (5 μm, 150 × 3.0 mm I.D.)



Inersil ODS-4 (5 μm, 150 × 3.0 mm I.D.)



Conditions

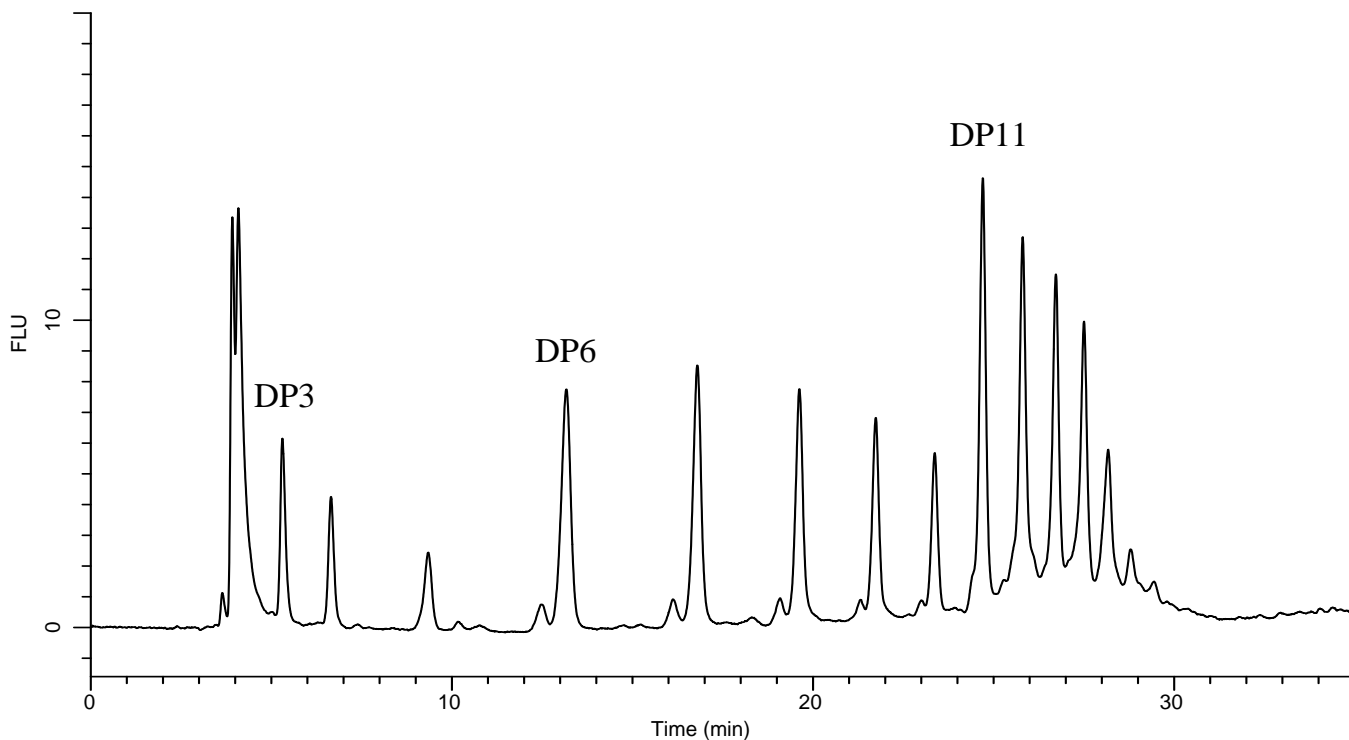
Column : 各クロマトグラム中に記載
Eluent : TFA系での条件 ギ酸系での条件
 A) 0.1% TFA in CH₃CN A) 0.1% HCOOH in CH₃CN
 B) 0.1% TFA in H₂O B) 0.1% HCOOH in H₂O
 A/B = 20/80 – 20 min – 70/30, v/v
Flow Rate : 0.4 mL/min
Col. Temp. : 40 °C
Detection : UV 280 nm (GL-7452A PDA Detector)
Injection Vol. : 10 μL

Analyte : 1. Ribonuclease B M.W. 13,700
 2. Cytochrome c M.W. 13,000
 3. Lysozyme M.W. 14,000
 4. BSA M.W. 66,000
 5. Ovalbumin M.W. 45,000

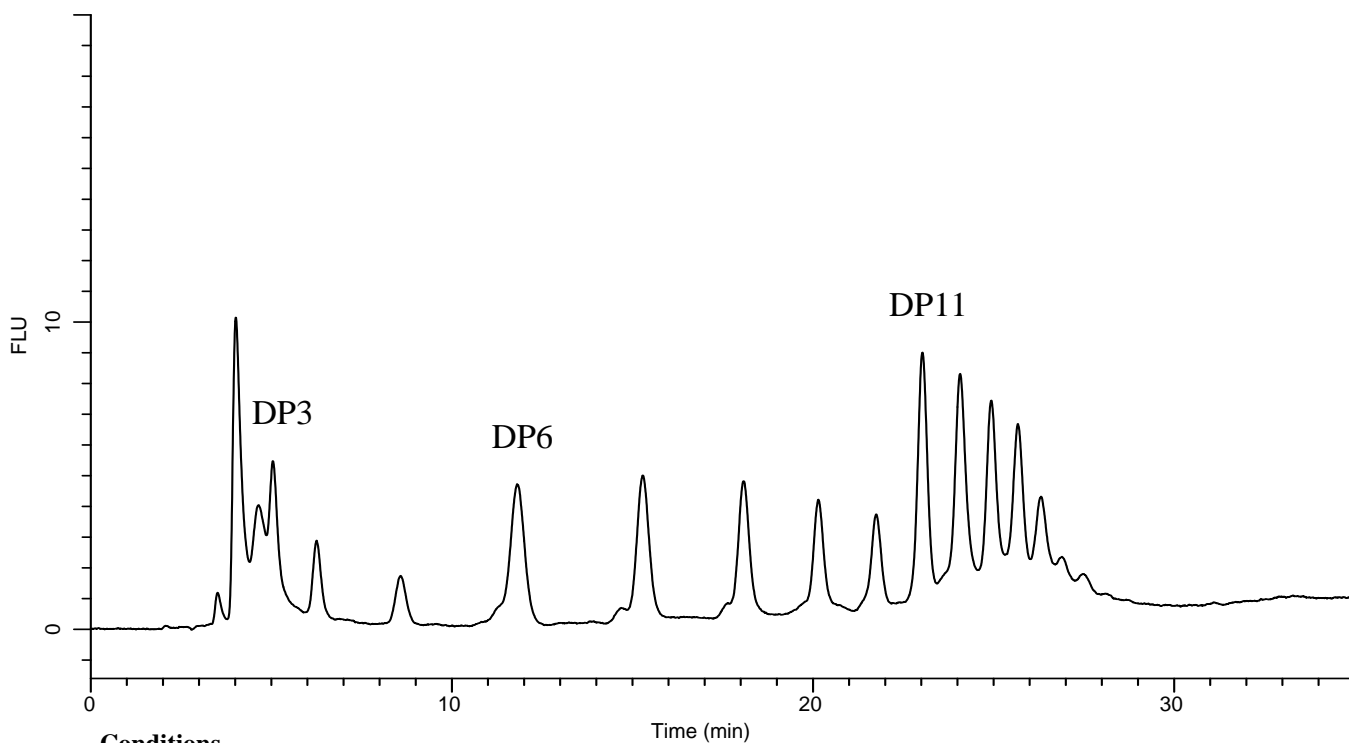
ピリジルアミノ化糖の分離

ここではピリジルアミノ化糖をHPLCで分析した例を用いて、粒子充填カラムとモノリスカラムの分離の比較をご紹介します。タンパク質と同様に、MonoCladでは空隙率が高いモノリス構造のため、高分子量のサンプルでもピーク形状が崩れにくく、高分離を実現することができます。

MonoClad C18-HS (150 × 3 mm I.D.)



Inersil WP300 C18 (5 μm, 150 × 3.0 mm I.D.)



Conditions

System	: GL-7400 HPLC system
Eluent	: A) CH ₃ CN / H ₂ O / TFA = 20 / 80 / 0.02 B) H ₂ O/TFA = 100 / 0.02 A/B = 5 / 95 – 5min – 5 / 95 – 20min – 15 / 85 – 5min – 20 / 80, v/v
Col. Temp.	: 30 °C
Detection	: FL Ex 310 nm Em 380 nm
Injection Vol.	: 5 μL
Sample	: PA-Glucose oligomer (DP = 3 - 15)

充填剤の細孔径について

LCカラムを選択する上で重要なパラメータとして、充填剤の細孔径があります。サンプルの大きさ(分子量)によって、充填剤の細孔径を変更することで、よりシャープなピークを溶出させることができます。具体的には高分子量のサンプルには充填剤の細孔径が大きいカラム、低分子量のサンプルには充填剤の細孔径が小さいカラムで分析します。

今回分析しましたタンパク質は高分子量のため、充填剤の細孔径が大きいカラムの方がピークがシャープになり、空隙率の高いモノリスカラムでは、さらにピークをシャープに溶出することができます。

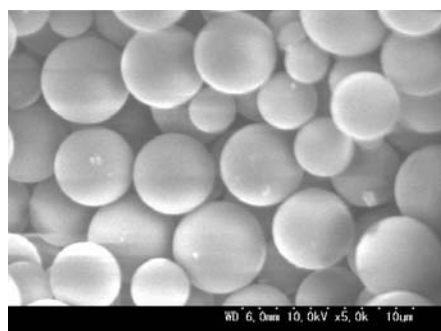
今回使用しましたカラムの諸性能を以下に記載しました。

カラム名	化学結合基	エンドキャップ	炭素量	細孔径	表面積
MonoClad C18-HS	オクタデシル基	あり	14 %	180 Å *	200 m ² /g
Inertsil WP300 C18	オクタデシル基	あり	9 %	300 Å	150 m ² /g
Inertsil ODS-4	オクタデシル基	あり	11 %	100 Å	450 m ² /g

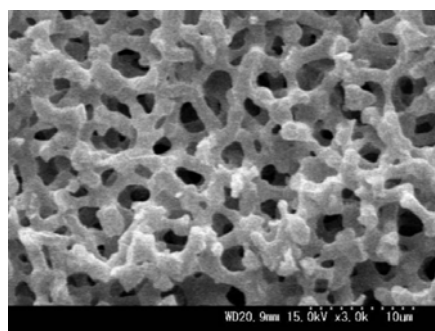
* MonoClad C18-HSはシリカモノリスを母体としているため、充填粒子の細孔径に相当するメソポアの径を記載しました。

粒子充填型カラムとシリカモノリス型カラムの比較

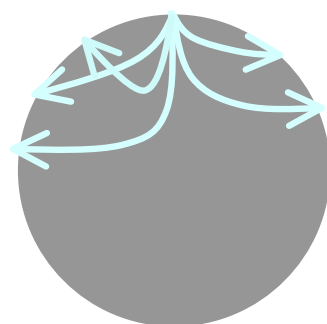
シリカ粒子の拡大図



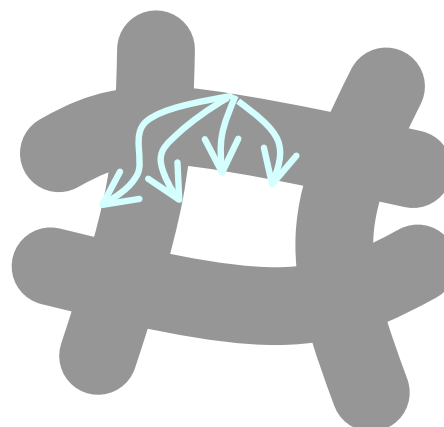
シリカモノリスの拡大図



粒子中を通過するサンプルのイメージ



モノリス骨格中を通過するサンプルのイメージ



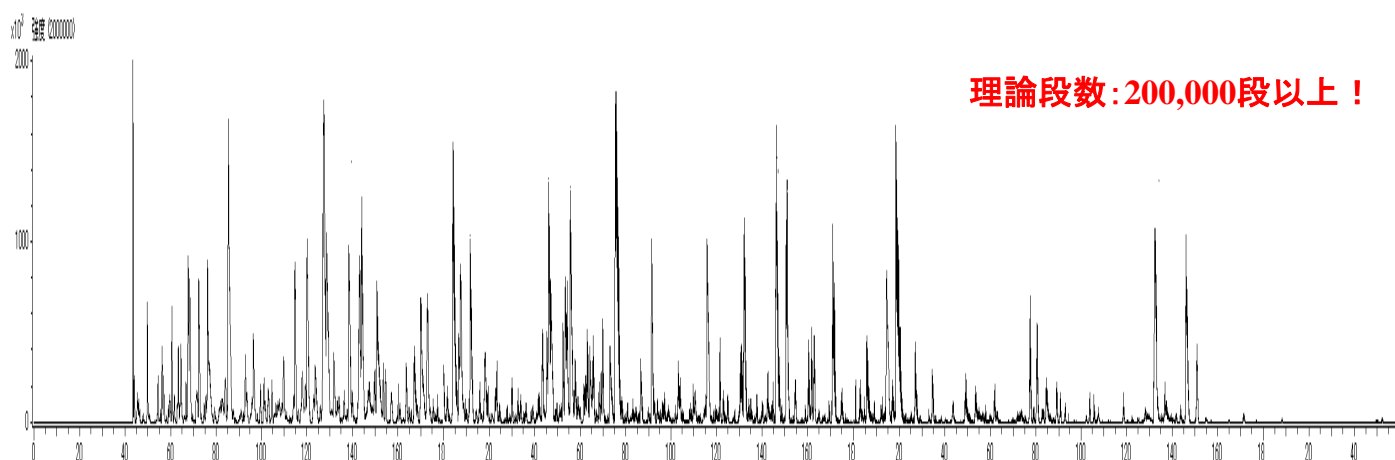
多孔質粒子を充填したカラム(Inertsil ODS-4, Inertsil WP300 C18 など)では、多孔質層に留まる時間が長いこと、低分子を強く保持させることができます。しかし、固定相での分子移動が遅い高分子では逆に試料バンドが広がる原因となり、ピーク形状が悪化してしまいます。Inertsil WP300 C18 などのように細孔径が大きくなると、分子の移動性が改善するため、ピーク形状が良くなる場合があります。

さらに、シリカモノリス型カラム(MonoClad C18-HS)ではシリカが網目状の構造となっていますので、構成するシリカ骨格が細く、多孔質の層も薄くなっています。そのため、移動速度が遅い高分子であっても試料バンドが拡散しにくく、その結果として粒子充填型よりも良好なピーク形状が得られると考えられています。*

* H. Minakuchi et al., J. Chromatogr. A, 828, 83-90, (1998).

タンパク質の酵素消化物の分析例

MonoCap High Resolution 2000 という、カラム長さが2メートルのキャピラリーカラムを使用した分析例です。シリカモノリスカラムは大きな分子の分離に優れているだけでなく、粒子充填型より圧力が低いという特長もあります。その利点を最大限に活用することで、理論段数20万段を実現することができました。



MonoCladは、汎用HPLCで使用可能なシリカモノリス型カラムです。外観は通常の粒子充填型カラムと全く同じであり、普通のカラムと同じようにお使いいただけます。

製品名	Cat.No.
MonoClad C18-HS 3 × 50 mm	5020-10801
MonoClad C18-HS 3 × 100 mm	5020-10802
MonoClad C18-HS 3 × 150 mm	5020-10803
MonoClad C18-HS 3 × 250 mm	5020-10804

MonoCap High Resolution 2000は、内径0.1 mm、長さが2 mのキャピラリーモノリスカラムです。プロテオーム解析などにおいて抜群の性能を誇ります。なお、さらに短いカラムやスイッチング用のトラップカラムもご用意しております。

製品名	Cat.No.
MonoCap High Resolution 2000	5020-10015

Based on monolithic technology, Merck KGaA(Darmstadt, Germany), Nakanishi, Soga and Minakuchi

ジーエルサイエンスでは、分析ノウハウときめこまやかなフォローもお付けしたシステム提案を行っております。お近くの営業所やカスタマーサポートセンターまでお気軽にお問い合わせください。



ジーエルサイエンス株式会社

〒163-1130 東京都新宿区西新宿6丁目22番1号 新宿スクエアタワー30F
TEL.03(5323)6611 FAX.03(5323)6622

東京営業部	TEL.03(5323)6611	FAX.03(5323)6622
大阪支店	TEL.06(6357)5060	FAX.06(6357)4580
横浜支店	TEL.045(985)7900	FAX.045(985)7901
北関東営業所	TEL.024(534)2191	FAX.024(536)1518
千葉営業所	TEL.029(858)3700	FAX.029(858)3780
北関東営業所	TEL.043(248)2441	FAX.043(248)2485
名古屋営業所	TEL.048(667)1611	FAX.048(667)1656
広島営業所	TEL.052(931)1761	FAX.052(931)1814
九州営業所	TEL.082(233)1101	FAX.082(233)1110
九州営業所	TEL.092(291)5200	FAX.092(291)2552

カスタマーサポートセンター TEL.04(2934)1100 FAX.04(2934)3361

ホームページはこちらから...

<http://www.gls.co.jp/hplc.html>