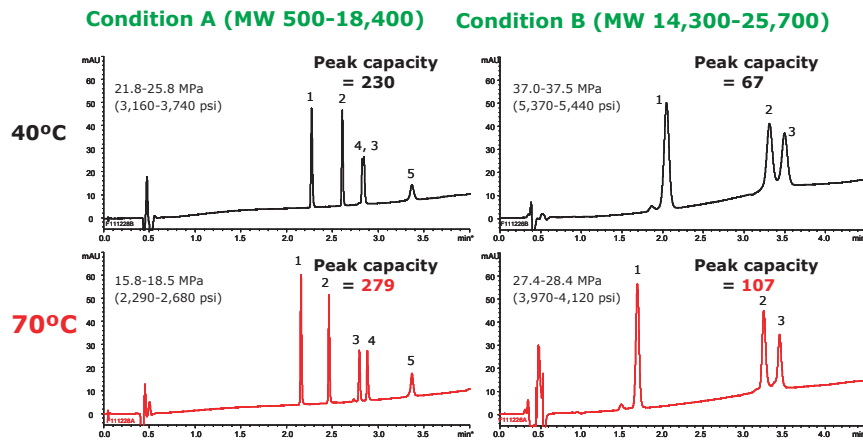


## ペプチド・タンパク質の分離 ～ 高温条件での高分離分析 ～

S120515A

### Triartカラムによる40°Cおよび70°Cにおけるペプチド・タンパク質の分離比較

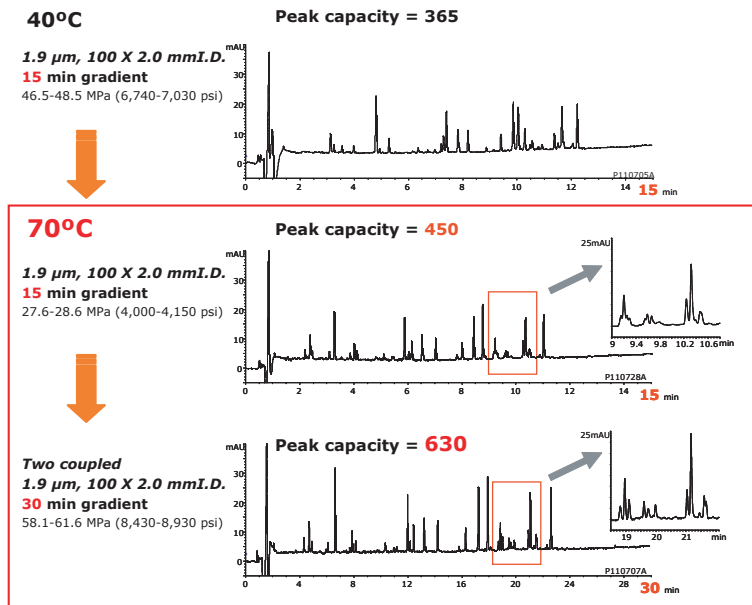


Analytes	MW	Peak width ½ (min)	
		40°C	70°C
<b>Condition A</b>			
1. Oxytocin	1,007	0.017	0.014
2. Leu-Enkephalin	556	0.015	0.015
3. β-Endorphin	3,465	-	0.016
4. Insulin	5,733	-	0.015
5. β-Lactoglobulin A	18,400	0.043	0.030
<b>Condition B</b>			
1. Lysozyme	14,300	0.069	0.044
2. α-Chymotrypsinogen	25,700	0.080	0.049
3. β-Lactoglobulin A	18,400	0.080	0.048

Column : YMC-Triart C18 (1.9 μm, 12 nm), 50 X 2.0 mmI.D.  
 Eluent : A) water/TFA (100/0.1)  
 B) acetonitrile/TFA (100/0.1) - condition A  
 B) acetonitrile/IPA/TFA (50/50/0.1) - condition B  
 Gradient : 10-80%B (0-5 min) - condition A  
 30-60%B (0-5 min) - condition B  
 Flow rate : 0.4 mL/min  
 Detection : UV at 220 nm  
 Injection : 1 μL (50 μg/mL) - condition A  
 1 μL (250 μg/mL) - condition B  
 System : Agilent 1200SL

- 分子量 (MW) が異なるペプチド・タンパク質の分離を0.1%TFAを含む溶離液条件下にて、40°Cと70°Cで比較しています。
- 分子量が大きいペプチド・タンパク質の分離には溶離液へのイソプロパノール (IPA) の添加がピーク形状の改善に有効ですが、分子量が10,000以上の場合、40°Cにおいてはブロードなピークとなっています (condition B 上図)。
- 40°Cと比較して70°Cの高温条件では分離選択性の変化やピーク形状の改善により分離度が向上し、この効果は特に分子量が大きい場合に顕著です。一般的に大きい分子は小さい分子よりも拡散速度が遅いため、ピークがブロードになる傾向があります。高温条件では、溶離液の粘度の低下と物質移動速度の改善によりピーク形状が改善されます。
- ペプチド・タンパク質の分離において、カラム温度の変更は分離度の向上に有効です。

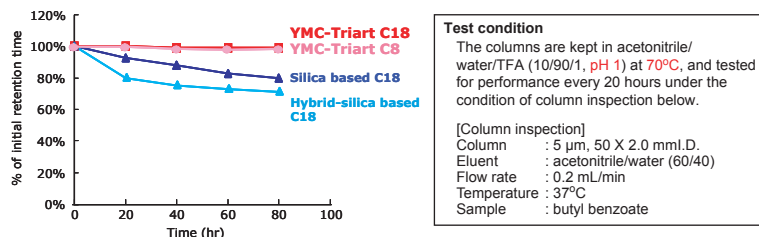
### 高温条件およびUHPLC用1.9 μmカラムの連結による分離度の向上



- ヘモグロビンのトリプシン消化物の分離においてカラム温度を70°Cに上げることで、ピークキャパシティ (分離可能ピーク数) が23%向上しています。
- 粒子径1.9 μm、長さ100 mmのTriart C18カラムを2本連結することで分離は劇的に向上しています。また、高温条件のため、総カラム長200 mmながら多くのUHPLC用システムの耐圧より十分に低圧力で分析可能です。このような手法は、ペプチドマッピングなど高分解能が要求される分離に有効です。

Column : YMC-Triart C18 (1.9 μm, 12 nm)  
 Eluent : A) water/TFA (100/0.1)  
 B) acetonitrile/TFA (100/0.08)  
 5-40%B (0-15 min) for a single column  
 5-40%B (0-30 min) for two coupled columns  
 Flow rate : 0.4 mL/min  
 Detection : UV at 220 nm  
 Injection : 10 μL for a single column  
 20 μL for two coupled columns  
 Sample : Tryptic digest of Bovine Hemoglobin  
 System : Agilent 1290

### pH 1 (1% TFA)、70°Cにおける逆相カラムの耐久性比較



- TFAを含む溶離液を使用した高温条件はペプチド・タンパク質の分離の向上に有効ですが、通常の逆相カラムではカラム寿命が問題となります。
- Triart C18およびC8は新開発の有機シリカハイブリッド基材に緻密な表面修飾を施しているため、左図の1% TFA、70°Cのような厳しい条件でも卓越した耐久性を有しています。このため、通常のカラムには適用しにくい条件での分析も可能です。