



ペプチド分離の最適化ノウハウ

分離困難なペプチドの
分離最適化事例

株式会社ワイエムシイ

ペプチド・タンパク質の分離最適化における 主要ファクター

カラム

官能基・細孔径の組み合わせ

- ⇒ ターゲットのペプチド・タンパク質の分子量や疎水性に合わせて選択
- 一般的に分子量が大きいほど、疎水性が低く、細孔径の大きいカラムが適する

移動相

0.1% TFA/acetonitrileのグラジエント溶出がファーストチョイス

- ⇒ イオン性に差がある混合物の場合、TFAの濃度や酸の種類、pH値の変更も有効
- ⇒ acetonitrileのグラジエント条件の最適化
- 分子量の大きいタンパク質では溶出力の高い2-propanolの添加も効果的

温度

選択性変化やピーク形状の改善に有効だが、カラム耐久性面で制約がある
(TFAを添加した強酸性条件下での加温は、官能基脱離を促進する)



高耐久性カラムTriartにより、最適化ツールとしての温度の活用範囲が拡大

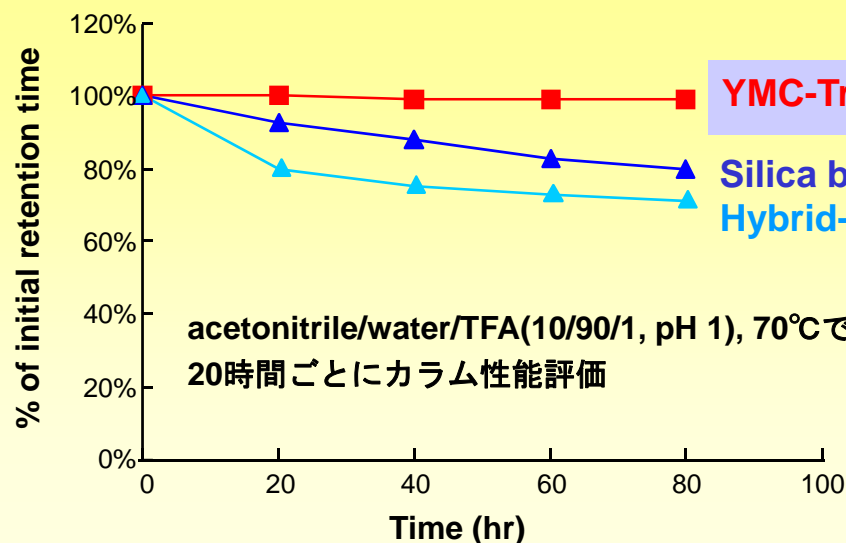
高性能 & 高耐久性を兼ね備えた YMC-Triart C18



YMC-Triart C18 の主な仕様

基材	有機シリカハイブリッド
官能基	C18 (トリファンクショナル結合)
粒子径	1.9 μm, 3 μm, 5 μm
細孔径	12 nm
炭素含有量	約20%
エンドキャッピング	あり
使用pHレンジ	1-12
使用温度上限	70°C for pH 1-7 50°C for pH 7-12

YMC-Triartの優れた耐久性



pH 1 (1% TFA), 70°Cのような
厳しい条件でも卓越した耐久性

カラム性能試験	Column	: 5 μm, 50 X 2.0 mm I.D.
	Eluent	: acetonitrile/water (60/40)
	Flow rate	: 0.2 mL/min
	Temperature	: 37°C
	Sample	: butyl benzoate

Triart C18による抗菌ペプチドの分離最適化例 (1)

1 アミノ酸配列違い

分析対象物

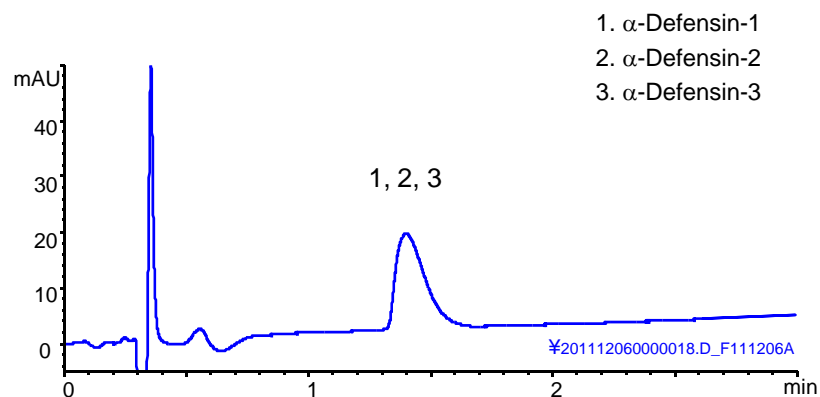
- α -Defensin-1 : **A** CYCRIPACIAGERRYGTTCIYQGRLWAFCC
MW 3,442
- α -Defensin-2 : CYCRIPACIAGERRYGTTCIYQGRLWAFCC
MW 3,371
- α -Defensin-3 : **D** CYCRIPACIAGERRYGTTCIYQGRLWAFCC
MW 3,486

* Total 30残基のうち
N末端のアミノ酸のみ異なる or 少ない

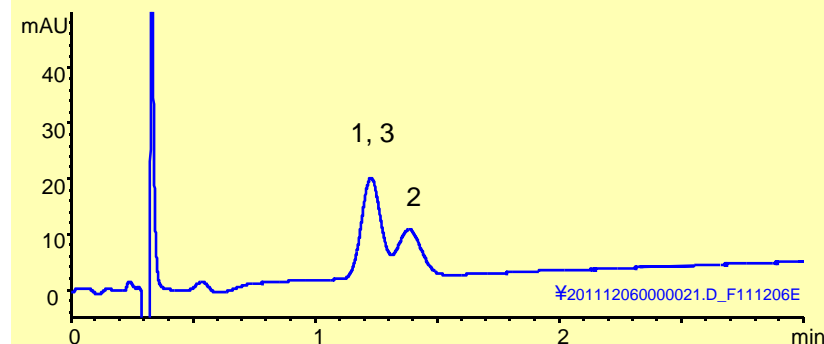
Triart C18による抗菌ペプチドの分離最適化例 (2)

カラム温度の比較

40°C



70°C



Column	: YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm), : 50 X 2.0 mmI.D.
Eluent	: A) water/TFA (100/0.1) : B) acetonitrile/TFA (100/0.1) : 25-45%B (0-5 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Detection	: 220 nm

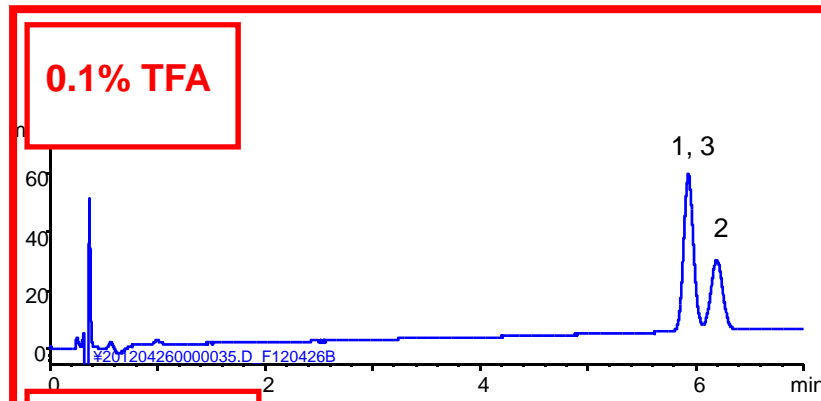
70°Cにおいて選択性の変化により、
peak1,3とpeak2が分離



その他の条件を最適化

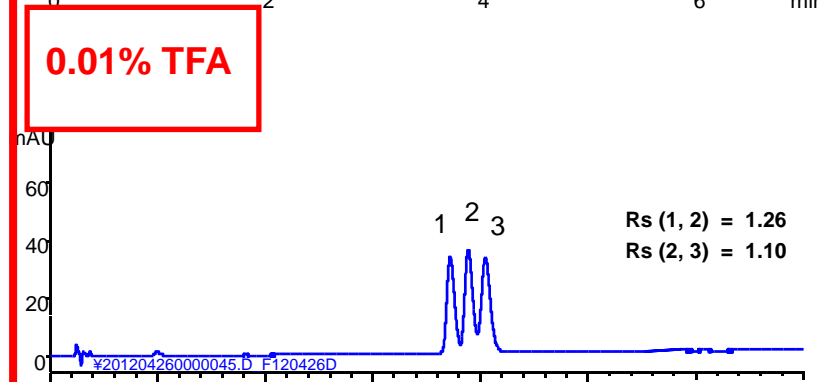
Triart C18による抗菌ペプチドの分離最適化例 (3)

酸の濃度・種類およびグラジエントの検討 (at 70°C)



Column : YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm), 50 X 2.0 mmI.D.
 Eluent : A) 酸含有水溶液
 B) 酸含有アセトニトリル溶液
 (0.1 % HCOOHのB液は0.08%)
 Flow rate : 0.4 mL/min
 Detection : 220 nm
 Temperature : 70°C

1. α -Defensin-1
2. α -Defensin-2
3. α -Defensin-3

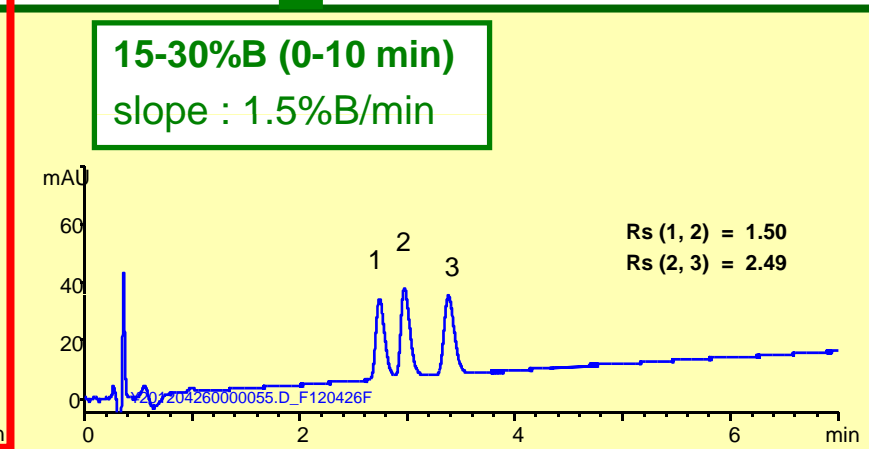
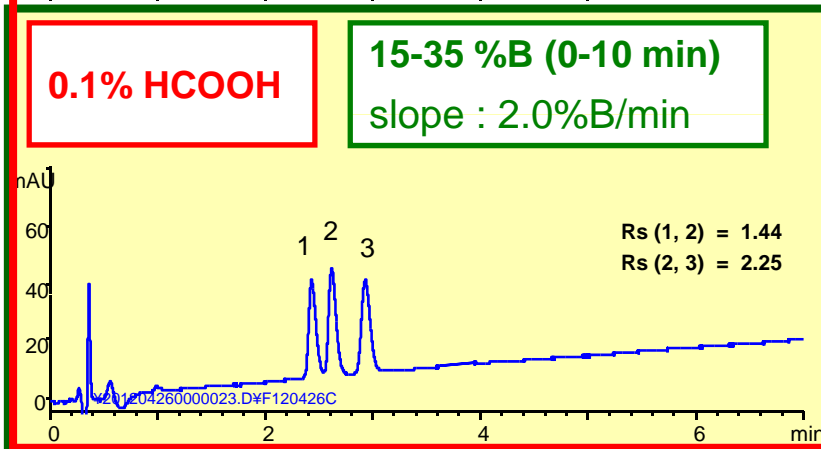


酸の濃度・種類

TFA濃度の変更、さらにギ酸への変更により
分離選択性が大きく改善

アセトニトリルのグラジエント勾配

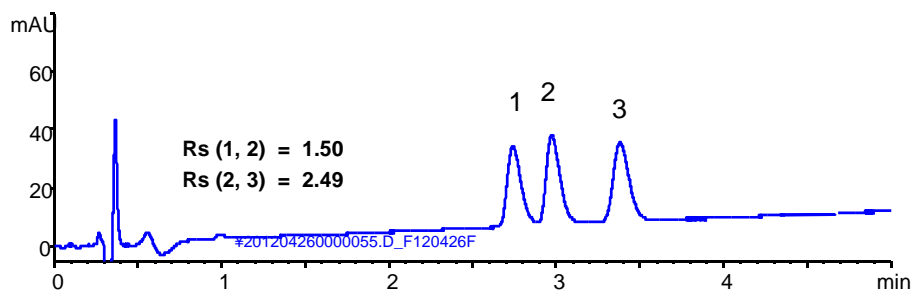
勾配を緩やかにすることで分離度が向上



Triart C18による抗菌ペプチドの分離最適化例 (4) 2-propanolの添加

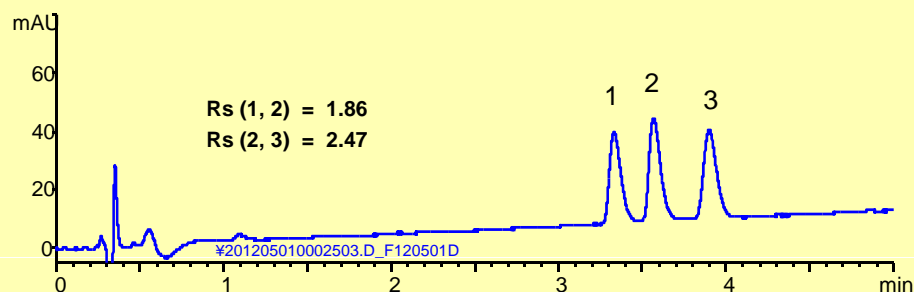
acetonitrile

15-30%B (0-10 min)
slope : 1.5%B/min



2-propanol/acetonitrile (50/50)

10-25%B (0-10 min)
slope : 1.5%B/min



1. α -Defensin-1
2. α -Defensin-2
3. α -Defensin-3

Column	: YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm) 50 X 2.0 mm I.D.
Eluent	: A) 0.1% formic acid in water B) 0.08% formic acid in organic solvent
Flow rate	: 0.4 mL/min
Detection	: 220 nm
Temperature	: 70°C

有機溶媒をアセトニトリルから2-プロパノール/アセトニトリル混液に変更
& グラジエント勾配を最適化

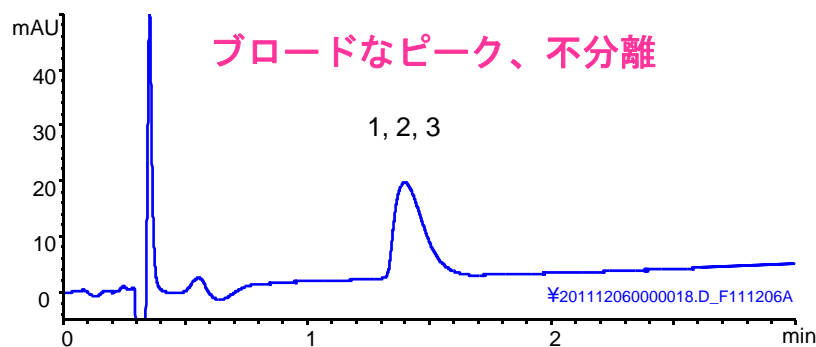


同等の分析時間でpeak1および2の分離度が向上

Triart C18による抗菌ペプチドの分離最適化例 (5) まとめ

YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm), 50 X 2.0 mmI.D.

ファーストチョイスの条件



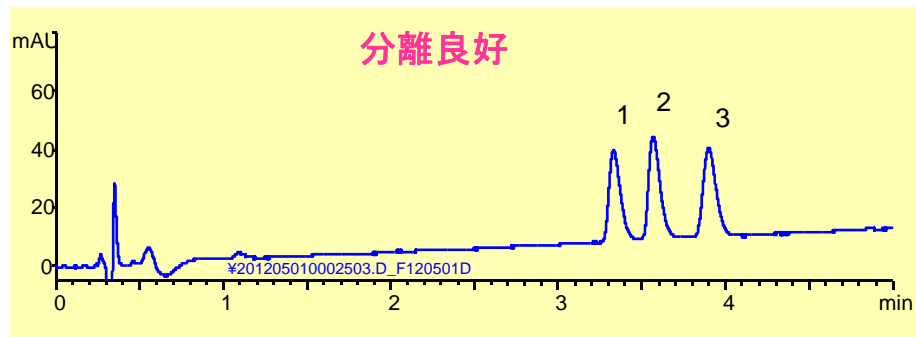
1. α -Defensin-1
2. α -Defensin-2
3. α -Defensin-3

Eluent	: A) water/TFA (100/0.1) B) acetonitrile/TFA (100/0.1) 25-45%B (0-5 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Temperature	: 40°C
Detection	: 220 nm

分離条件最適化

- ・ カラム温度の変更
- ・ 移動相の酸、有機溶媒の変更
- ・ グラジエント勾配の変更

最適化条件



Eluent	: A) water/formic acid (100/0.1) B) 2-propanol/acetonitrile/formic acid (50/50/0.08) 10-25%B (0-10 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Temperature	: 70°C
Detection	: 220 nm

ペプチド・タンパク質の逆相HPLC分析における 分離最適化のポイント



- **酸の濃度および種類**

酸の濃度および種類による選択性変化を利用して分離を改善
特に、目的のペプチド・タンパク質のイオン性に差がある場合に有効

- **有機溶媒の濃度および種類**

分子量や疎水性の大きいタンパク質では、より溶出力の高い有機溶媒の使用が
保持やピーク形状の改善に効果的

- **カラム温度**

カラム温度の変更は選択性変化と共に、ピーク形状の変化をもたらすため
分離の大幅な改善が期待できる
特に、分子量が1万以上のタンパク質において、高温分析が非常に効果的

**高耐久性カラムYMC-Triart C18 は、高温条件でも耐久性に優れ、
ペプチド・タンパク質の分離にも有効**