

ペプチド・タンパク質分離の最適化ノウハウ ~ 高温条件での高分離分析 ~

R150610A

ペプチド・タンパク質における分離に影響するファクター

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

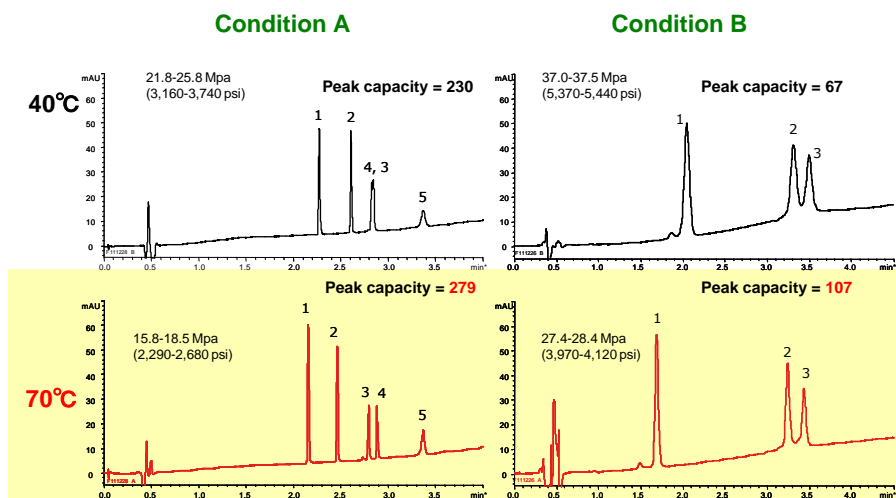
選択性変化やピーク形状の改善に有効だが、カラム耐久性面で制約がある
(TFAを添加した強酸性条件下での加温は、官能基脱離を促進する)
特に分子量が1万以上のタンパク質において、高温分析が非常に効果的

カラム選択の目安

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

◎: excellent ○: good △: moderate

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

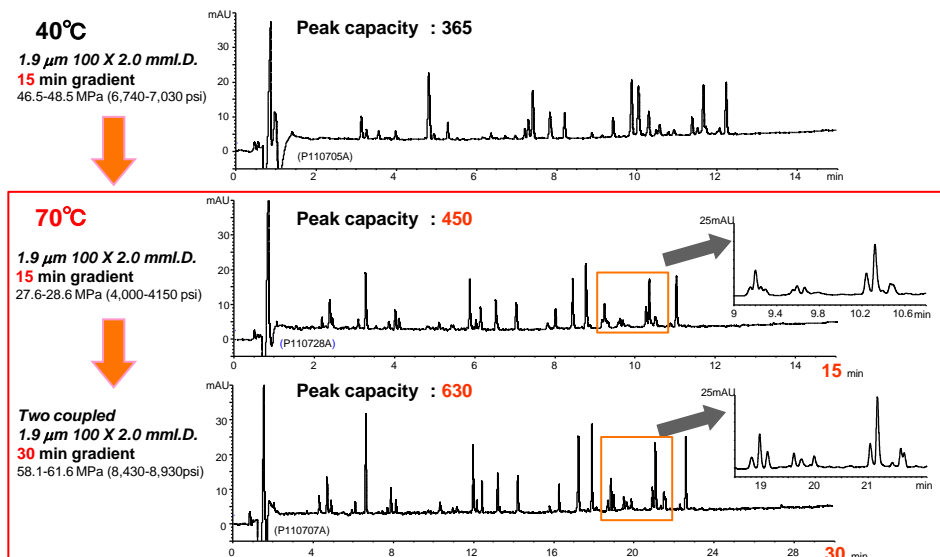


Analytes	MW	Peak width 1/2(min)	
		40°C	70°C
Condition A			
1. Oxytocin	1,007	0.017	0.014
2. Leu-Enkephalin	556	0.015	0.015
3. β-Endorphin	3,465	-	0.016
4. Insulin	5,733	-	0.015
5. β-Lactoglobulin A	18,400	0.043	0.030
Condition B			
1. Lysozyme	14,300	0.069	0.044
2. α-Chymotrypsinogen	25,700	0.080	0.049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

Column : YMC-Triart C18 (1.9 μm, 12 nm), 50 X 2.0 mm I.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

- 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1.9μm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40°Cから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
Sample	: Tryptic digest of Bovine Hemoglobin

抗菌ペプチドの分離最適化例

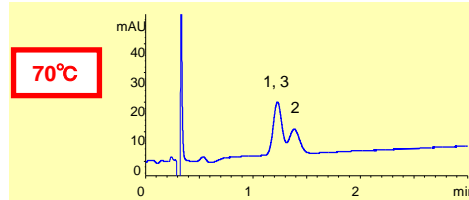
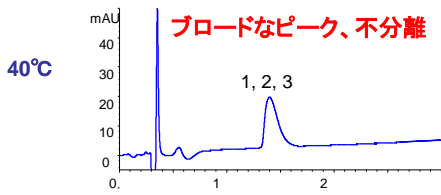
●分析対象物(抗菌ペプチド)

1. α -Defensin-1 : **A** CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
MW 3,442
 2. α -Defensin-2 : **B** CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
MW 3,371
 3. α -Defensin-3 : **D** CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
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

HPLC共通条件

Column : YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm),
50 X 2.0 mmI.D.
Flow rate : 0.4 mL/min
Detection : 220 nm

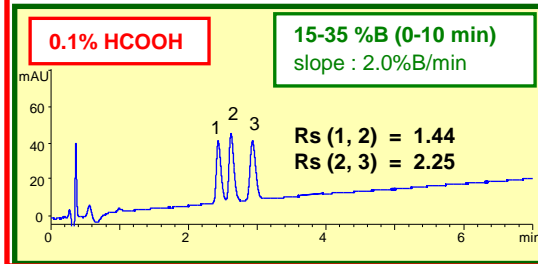
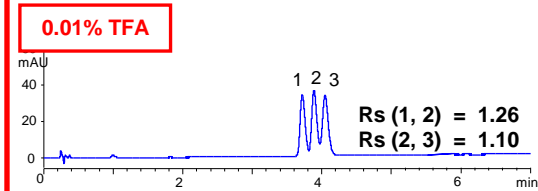
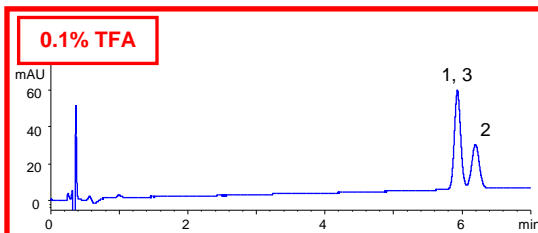
●カラム温度における分離比較



Eluent : A) water/TFA (100/0.1)
B) acetonitrile/TFA (100/0.1)
25-45%B (0-5 min)

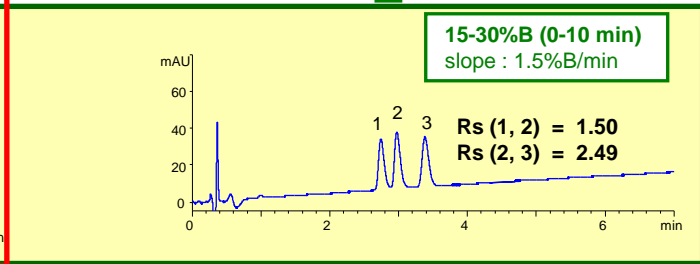
■ 一般的なペプチド分析条件で検討すると分離しませんが、温度を70°Cに上げて分析すると1, 3のピークと2のピークが分離しています。

●酸の濃度・種類およびグラジエントの検討

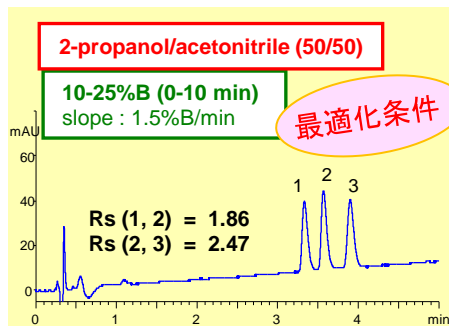
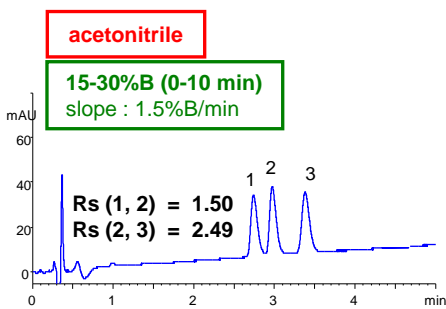


Eluent : A) 酸含有水溶液
B) 酸含有アセトニトリル溶液
(0.1% HCOOHのB液は0.08%)
Temperature : 70°C

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



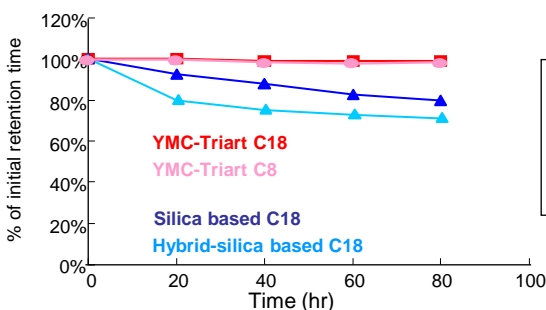
●移動相組成の検討



Eluent : A) 0.1% formic acid in water
B) 0.08% formic acid in organic solvent
Temperature : 70°C

■ 有機溶媒の組成をacetonitrileから2-propanol/acetonitrile混液に変更し、グラジエント条件を最適化することで、同等の分析時間で分離度が向上しています。
■ ペプチド・タンパク質の分析では、移動相に溶出力の高い2-propanolを添加することで分離が改善することがあります。

pH 1 (1% TFA)、70°Cにおける逆相カラムの耐久性比較



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

acetonitrile/water/TFA(10/90/1, pH 1),
70°Cで保管、20時間ごとにカラム性能評価

■ 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。