

ペプチド・タンパク質の逆相HPLC分析における カラム温度の効果



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)



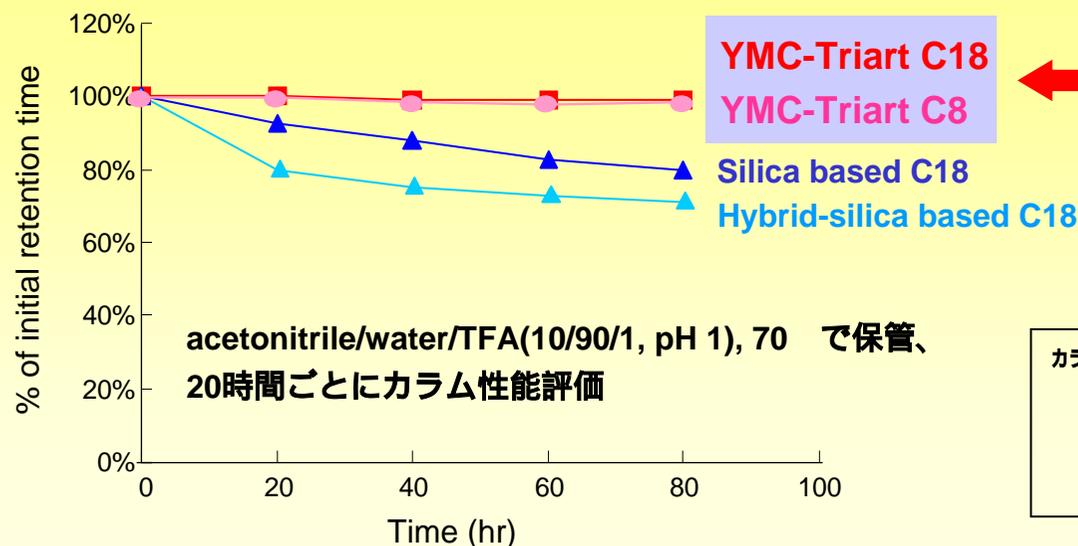
高耐久性カラムTriartにより、最適化ツールとしての温度の活用範囲が拡大

高性能 & 高耐久性を兼ね備えた YMC-Triart C18 / C8

YMC-Triart C18 / C8の主な仕様

基材	有機シリカハイブリッド
官能基	C18, C8 (ポリメリック結合)
粒子径	1.9 μm, 3 μm, 5 μm
細孔径	12 nm
炭素含有量	C18 : 約20% C8 : 約17%
エンドキャッピング	マルチステージエンドキャッピング
使用pHレンジ	1-12
使用温度上限	70 for pH 1-7 50 for pH 7-12

YMC-Triartの優れた耐久性



← **pH 1 (1% TFA), 70 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によるペプチド・タンパク質の 分離スクリーニング

分析対象のペプチドおよびタンパク質

Leu-Enkephalin	MW	556
Oxytocin	MW	1,007
γ -Endorphin	MW	1,859
β -Endorphin	MW	3,465
Amyloid β -protein(1-40)	MW	4,330
Insulin	MW	5,733
Cytochrome C	MW	12,400
Lysozyme	MW	14,300
β -Lactoglobulin A	MW	18,400
α -Chymotrypsinogen A	MW	25,700

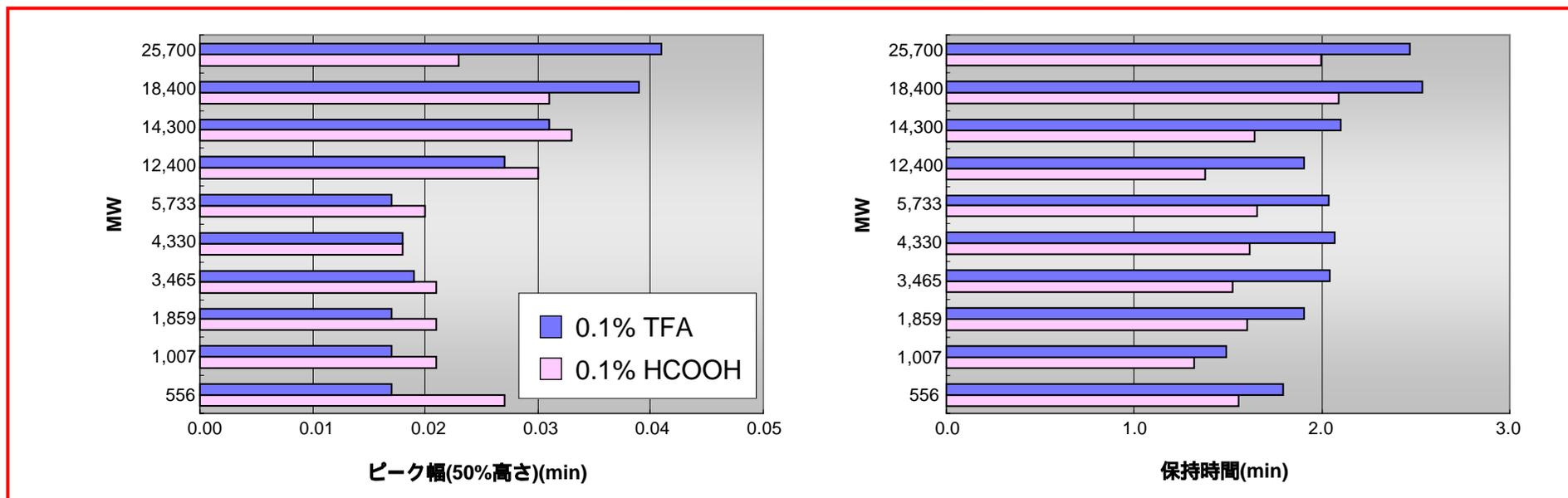
Triart C18によるペプチド・タンパク質の 分離スクリーニング

酸の種類 (HPLC条件)

Column	: YMC-Triart C18 (1.9 μ m, 12 nm), 50 X 2.0 mmI.D.
Eluent	: A) 0.1 % TFA or HCOOH in water B) 0.1 % TFA or HCOOH in acetonitrile 10-95%B (0-5 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Detection	: 220 nm
Temperature	: 40

Triart C18によるペプチド・タンパク質の 分離スクリーニング

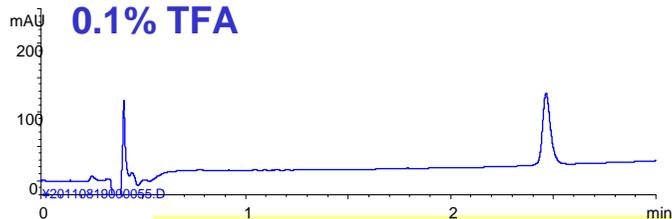
酸の種類 (結果)



酸の種類によるクロマトグラム比較の一例

α-Chymotrypsinogen A (MW 25,700)

0.1% TFA



0.1% HCOOH



酸の種類	ピーク幅 (50%高さ) (min)	保持時間 (min)
TFA	0.041	2.5
HCOOH	0.023	2.0

- ・ 酸の種類によってペプチド・タンパク質のピーク形状や保持が変化する
- ・ TFA条件下ではイオンペア作用が働き、保持が大きくなる傾向がある

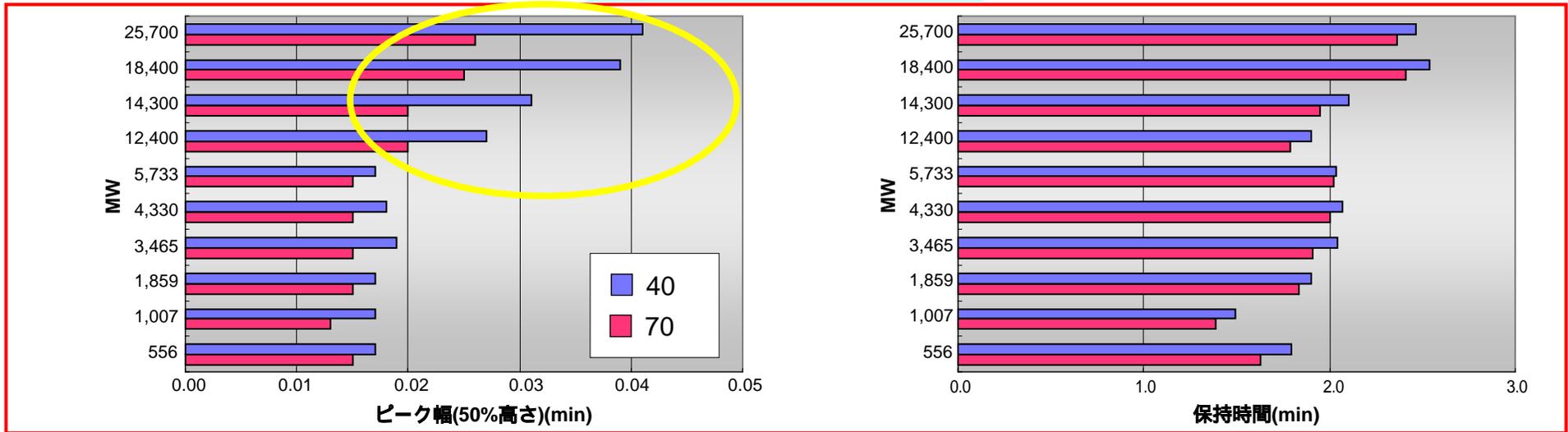
Triart C18によるペプチド・タンパク質の 分離スクリーニング

カラム温度 (HPLC条件)

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) 10-95%B (0-5 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Detection	: 220 nm
Temperature	: 40 or 70

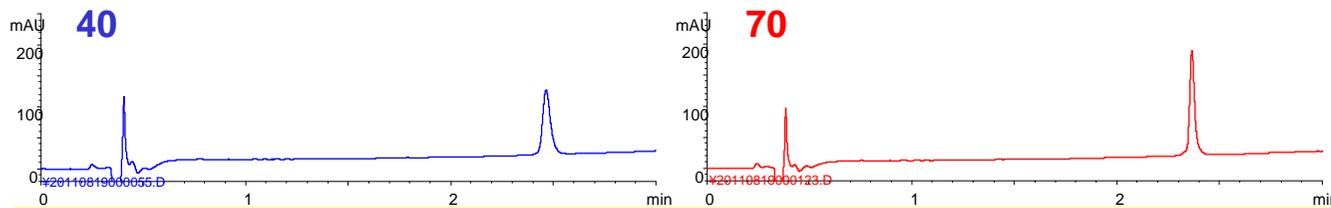
Triart C18によるペプチド・タンパク質の 分離スクリーニング

カラム温度 (結果)



カラム温度によるクロマトグラム比較の一例

α -Chymotrypsinogen A (MW 25,700)



温度	ピーク幅 (50%高さ) (min)	保持時間 (min)
40	0.041	2.5
70	0.026	2.4

- 40 と比較して70 ではピーク幅が狭く良好なピーク形状が得られ、その効果は特に分子量1万以上のタンパク質（黄色囲み部分）において顕著
- 大きい分子は小さい分子より拡散速度が遅く、ピークがブロードになる傾向にあるが高温条件では溶離液の粘度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る

ペプチド・タンパク質分析における カラム温度の効果

分離最適化例

実例 1 . ペプチド・タンパク質混合物 (MW 556-18,400) の分析

実例 2 . タンパク質 (MW 14,300-25,700) の分析

実例 3 . 抗菌ペプチド (1 アミノ酸配列違い) の分析

実例1. ペプチド・タンパク質混合物の分析 (MW 556-18,400)

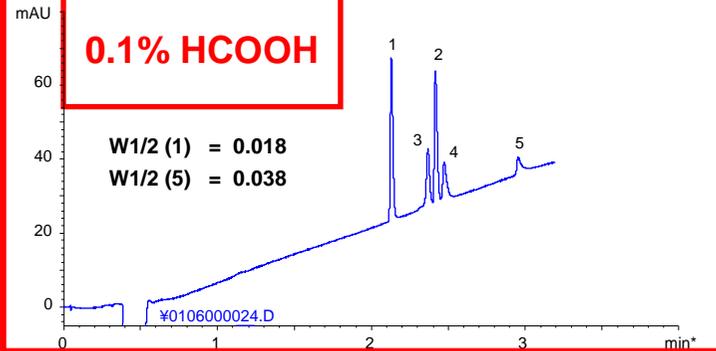
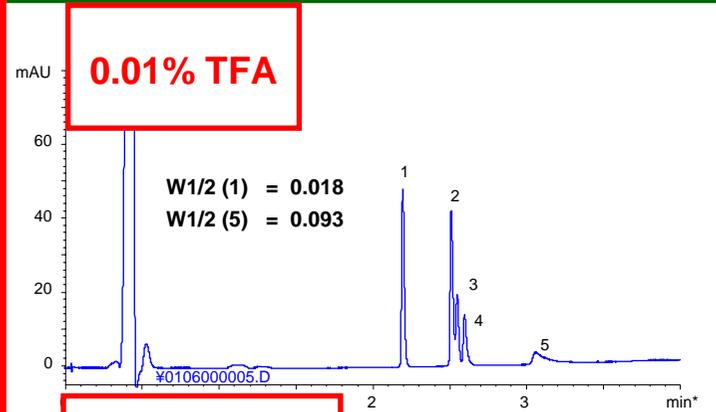
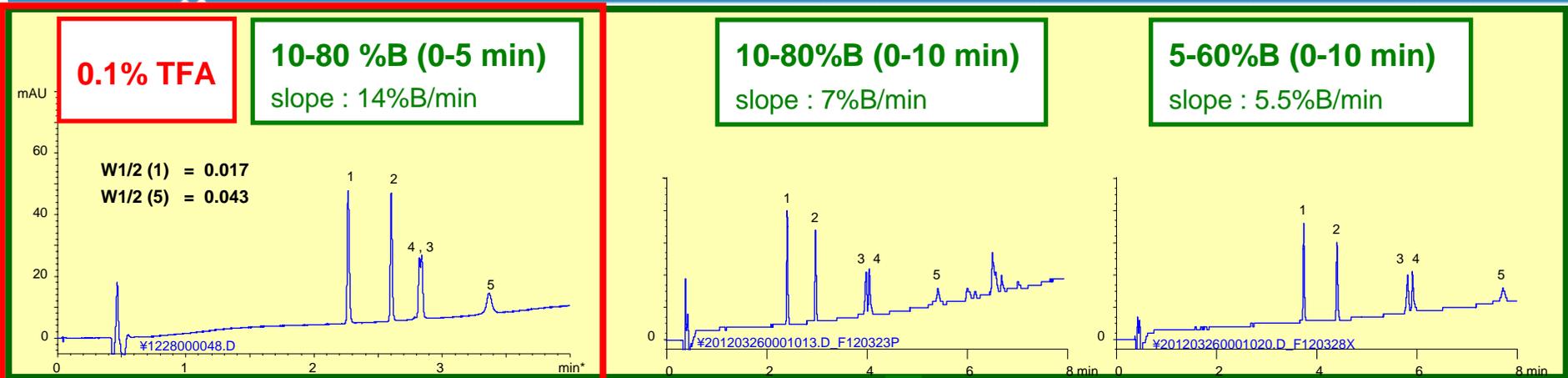
分析対象物

■ Leu-Enkephalin	MW	556
■ Oxytocin	MW	1,007
■ β -Endorphin	MW	3,465
■ Insulin	MW	5,733
■ β -Lactoglobulin A	MW	18,400

基本HPLC条件

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
Flow rate	: 0.4 mL/min
Detection	: 220 nm
Temperature	: 40

実例1. ペプチド・タンパク質混合物の分析 酸の濃度・種類およびグラジエントの検討 (at 40)



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と分離は改善するが、分析時間が長くなる

酸の濃度・種類

濃度や種類によって、塩基性ペプチド(peak 3)の保持は変化するが完全分離は困難

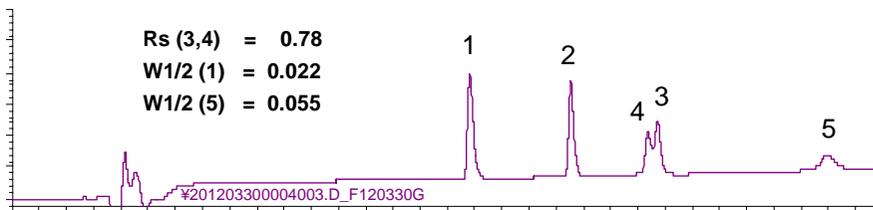
TFAの濃度を下げると分子量の大きいpeak 5の形状が悪化

カラム温度によるアプローチ

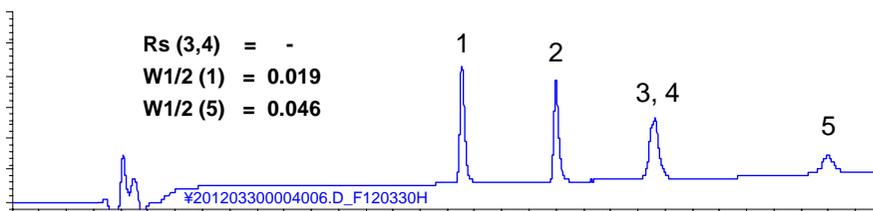
1. Oxytocin
2. Leu-Enkephalin
3. -Endorphin
4. Insulin
5. -Lactoglobulin A

実例1. ペプチド・タンパク質混合物の分析 カラム温度の最適化

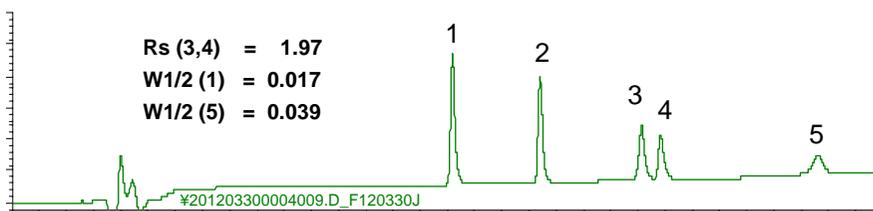
30



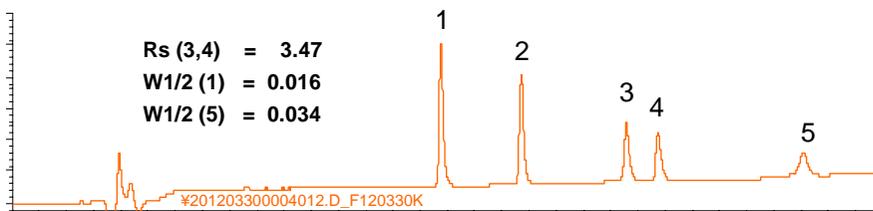
40



50



60

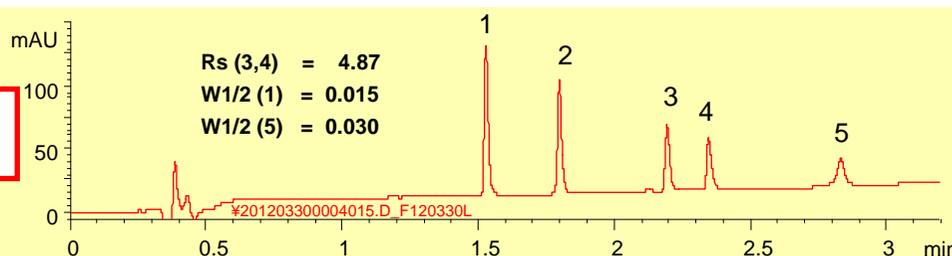


Column : **YMC-Triart C18** (1.9 μ m, 12 nm)
50 X 2.0 mm I.D.
Eluent : A) water/TFA (100/0.1)
B) acetonitrile/TFA (100/0.1)
10-80%B (0-5 min)
Flow rate : 0.4 mL/min
Detection : 220 nm

1. Oxytocin
2. Leu-Enkephalin
3. -Endorphin
4. Insulin
5. -Lactoglobulin A

カラム温度を高めることにより、
peak 3および4の分離が向上
また、全てのピーク形状が改善
(特に分子量が大きい場合に顕著)

70



実例2. タンパク質の分析 (MW 14,300-25,700)

分析対象物

■ Lysozyme	MW	14,300
■ β -Lactoglobulin A	MW	18,400
■ α -Chymotrypsinogen	MW	25,700

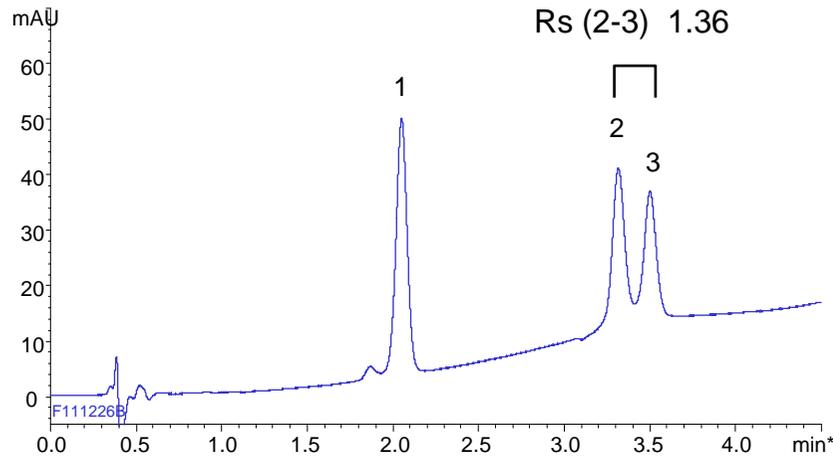
HPLC条件

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/2-propanol**/TFA (50/50/0.1)
 30-60%B (0-5 min)
Flow rate : 0.4 mL/min
Detection : 220 nm

実例2. タンパク質の分析 カラム温度の効果

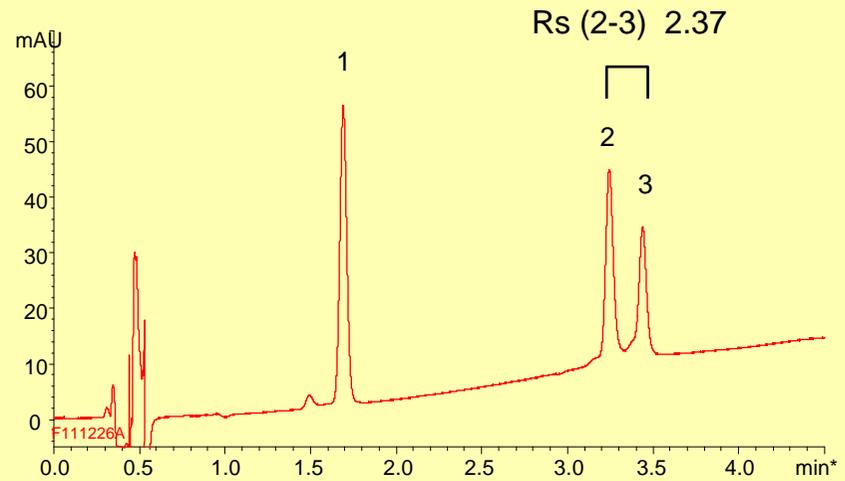
40

Peak capacity = 67



70

Peak capacity = 107



Analytes	MW	ピーク幅(50%高さ) (min)	
		40	70
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

- 1. Lysozyme
- 2. α-Chymotrypsinogen
- 3. β-Lactoglobulin A

70 においてピーク形状の大幅な改善により、peak2および3のベースライン分離を達成

実例3. 抗菌ペプチドの分析 (1 アミノ酸配列違い)

分析対象物

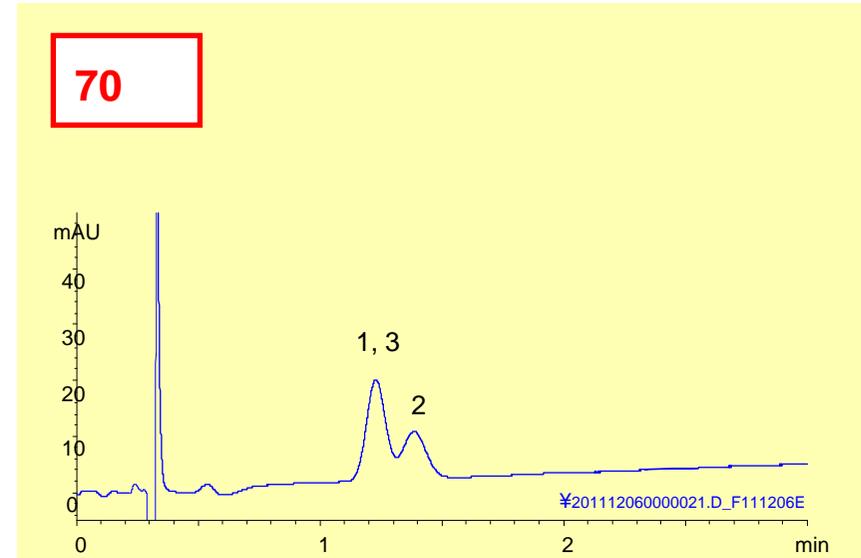
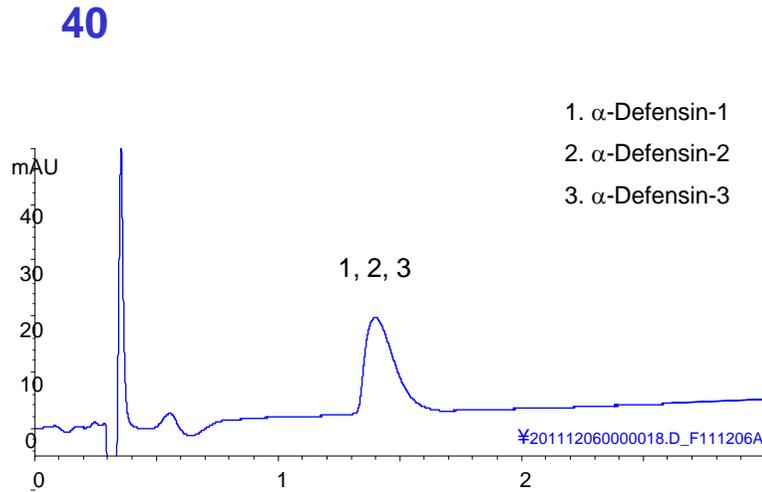
- α -Defensin-1 : **A** CYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC
MW 3,442
- α -Defensin-2 : CYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC
MW 3,371
- α -Defensin-3 : **D** CYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC
MW 3,486

* 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条件

Column : **YMC-Triart C18** (1.9 μ m, 12 nm), 50 X 2.0 mml.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

実例3. 抗菌ペプチドの分析 カラム温度の比較



70 において選択性的変化により、peak1,3とpeak2が分離



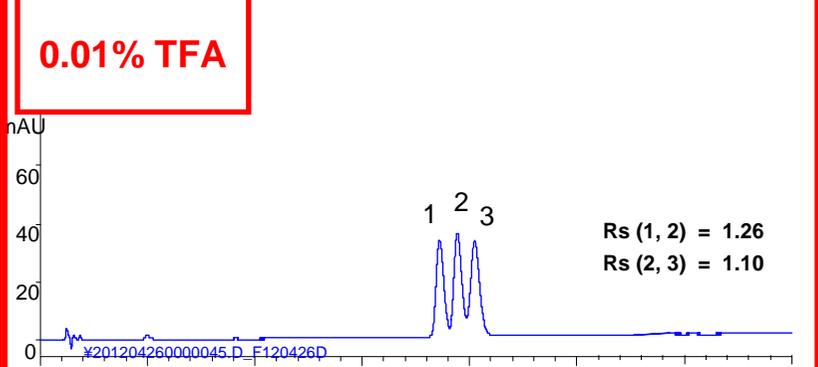
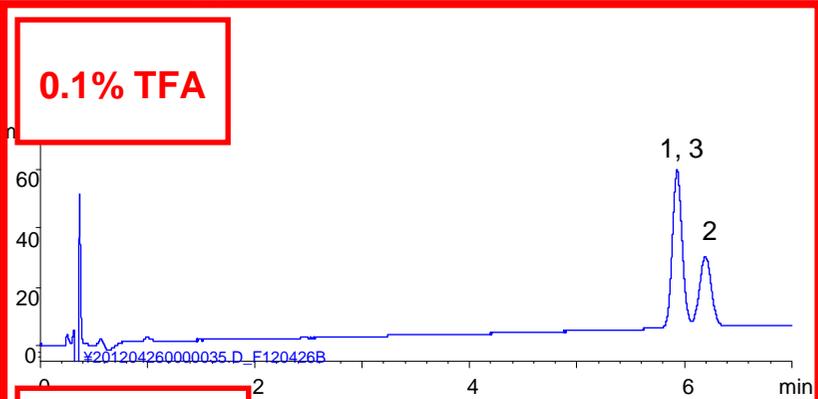
その他の条件を最適化

実例3. 抗菌ペプチドの分析

酸の濃度・種類およびグラジエントの検討 (at 70)

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

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

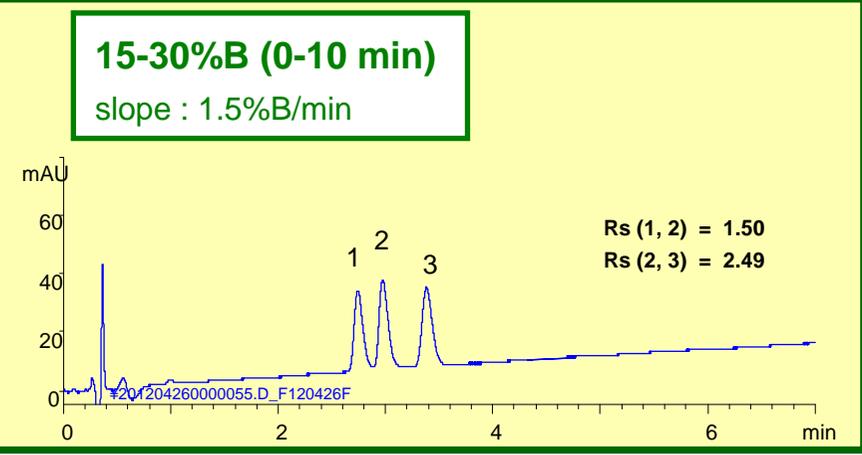
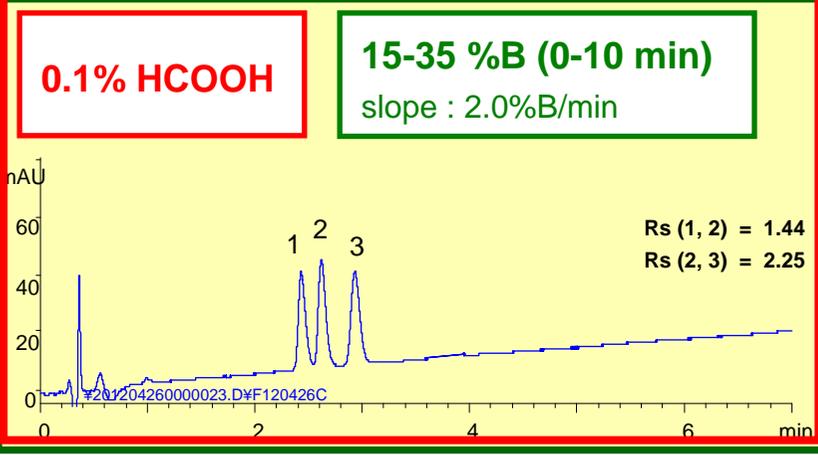


酸の濃度・種類

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

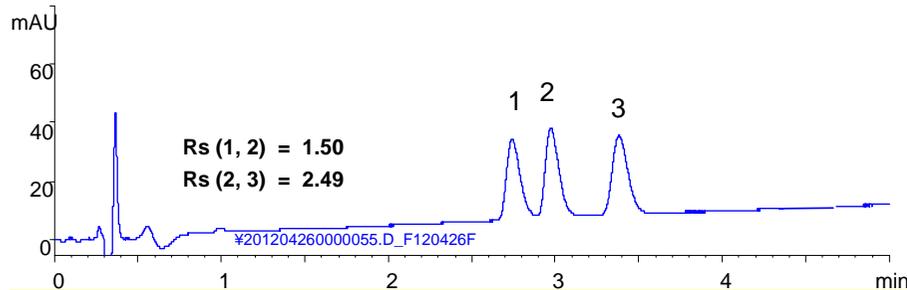


実例3. 抗菌ペプチドの分析

2-propanolの添加

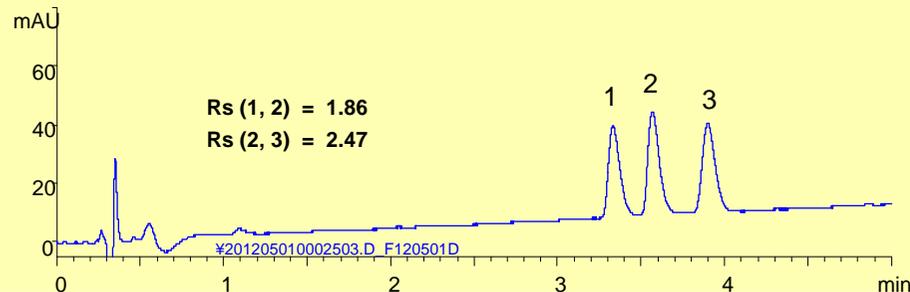
acetonitrile

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 mmI.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

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し、
グラジエント勾配を最適化することで、同等の分析時間でpeak1および2の分離度が向上

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 / C8 (細孔径 12 nm) は、ペプチドのみならず
高温条件と組み合わせることにより、分子量3万までのタンパク質の分析に有効である**