

テクニカルレポート No.30

UHPLCによるペプチド・タンパク質、モノクローナル抗体の分析

1. はじめに

弊社では、2020年2月に新製品「FlexFire WP C4」を発売しました。FlexFire WP C4は現在、大変注目を集めているバイオ医薬品分析に向けた300 Åのシリカゲル基材を採用しています。このワイドポアは低分子化合物から数十万単位の高分子化合物をターゲットとし一次構造の特性解析へと繋がっていきます。

本レポートではカタログには記載できなかった最新のデータや他のWPシリーズのデータを収載しています。是非、ご活用ください。

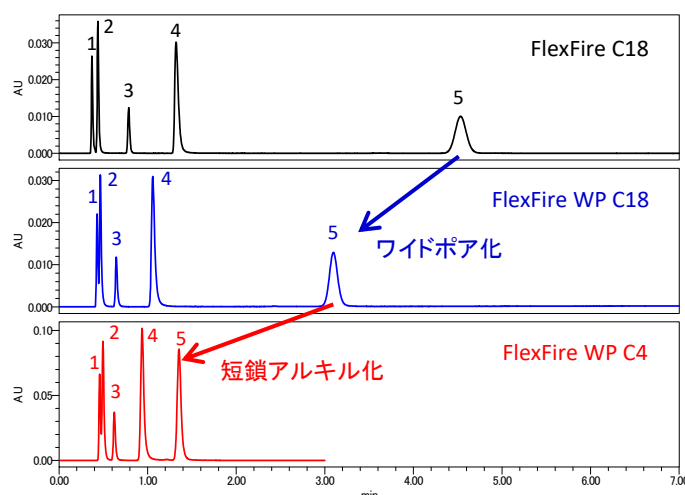
2. 細孔径の違いによる保持と分離

細孔径120 Åと300 Åでは物性が大きく異なります。細孔が大きい=表面積が小さいことから、ワイドポアほど、アルキル鎖が短いほど保持は短くなります。

■ Specification of comparison target column

	FlexFire C18	FlexFire WP C18	FlexFire WP C4
Particle size	2.6μm	2.6μm	2.6μm
Chemistry	Octadecyl	Octadecyl	Butyl
Surface area	340m ² /g	170m ² /g	170m ² /g
Pore volume	1.0mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g
Pore diameter	11nm	30nm	30nm
Carbon	22%	15%	5%

※FlexFire WP C18は2020年3月発売予定です。



Conditions;

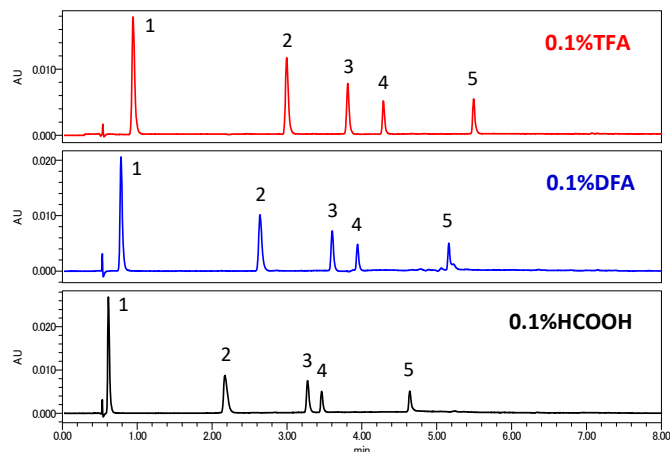
Column:	FlexFire C18, 2.6μm (2.0x50mm) FlexFire WP C18, 2.6μm (2.0x50mm) FlexFire WP C4, 2.6μm (2.0x50mm)
Mobile phase	Acetonitrile/10mM HCOONH ₄ =40/60
Flow rate:	0.3mL/min
Temperature:	40°C
Sample:	1.Uracil 2.Caffeine 3.Phenol 4.Amitriptyline 5.Naphthalene
injection volume:	0.1μL
System:	Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

■ Develosil QCサンプルによる保持比較

表面積および炭素含有量によって得られる保持が変化。極端に保持が強すぎる場合、同系列でのアルキル鎖違いよりもワイドポア化されたカラムに加え、短鎖アルキル化のカラムへ移行する方が時間短縮の実感があります。

2. ペプチドの分析

低分子ペプチドの分析には細孔径が120 Åクラスのカラムを使用することが多いですが、バイオ医薬品分析が注目される昨今、低分子から高分子まで幅広く分析されるカラムが求められています。



Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6μm (2.0x50mm)

Mobile phase:

A) Water + 0.1%TFA

B) Acetonitrile + 0.1%TFA

A) Water + 0.1%DFA

B) Acetonitrile + 0.1%DFA

A) Water + 0.1%HCOOH

B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
4.76	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6
8.50	0.3	100	0	6

Temperature:

40°C

Detection:

UV260nm

Sample:

1. Gly-Tyr (0.20mg/mL)
2. Val-Tyr-Val (0.21mg/mL)
3. Methionine Enkephalin (0.18mg/mL)
4. Angiotensin II (0.17mg/mL)
5. Insulin (0.20mg/mL)

Injection volume:

0.2μL

Sysytem:

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100μL

■ 異なる移動相でのペプチドの分析

低分子ペプチドの分析においては、TFA移動相でなくても分析が可能となります。LC/MSのネガティブモードでの測定やイオン源の汚染が懸念される場合には、0.1%ギ酸移動相で分析することでリスクを最大限に抑えることができます。

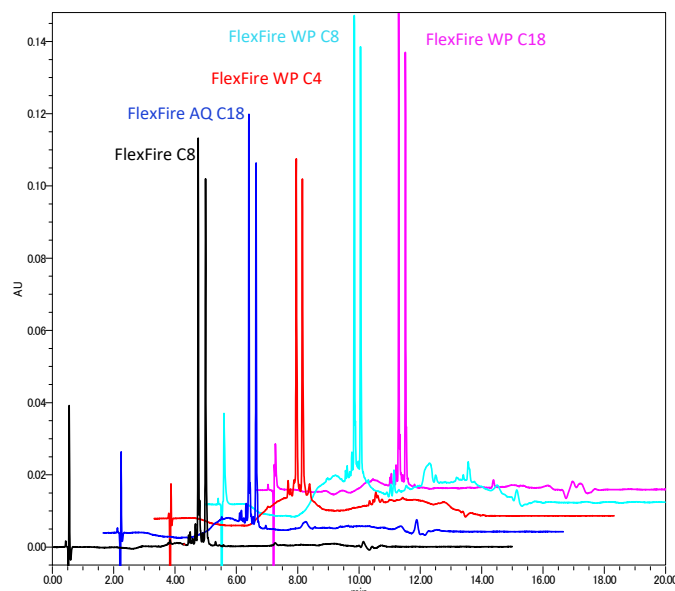
★テクニック★

FlexFire WPシリーズでは分子量が2,000程度から0.1%ギ酸移動相では制御できない化合物が出現しました。メソッドを構築する際には0.1%ギ酸をファーストチョイスとして、保持や形状によりDFAやTFAでのメソッド構築をおすすめします。また、大きすぎる分子量では酵素消化によって得られるペプチドマッピングで断片化できれば0.1%ギ酸移動相が使用できます。

3. 環状ペプチドの分析

ペプチドにはジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチドやポリペプチドなど複数の種類が存在します。中でも環状ペプチドは、代謝安定性や膜透過性など優れた物性を示すことが知られています。

分析においては鎖状のペプチドと同様に取り扱うことができます。



Conditions:

Column:

Develosil FlexFire WP C18, 2.6μm (2.0x50mm)

Develosil FlexFire WP C8, 2.6μm (2.0x50mm)

Develosil FlexFire WP C4, 2.6μm (2.0x50mm)

Develosil FlexFire AQ C18, 2.6μm (2.0x50mm)

Develosil FlexFire C8, 2.6μm (2.0x50mm)

Mobile phase:

A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
4.76	0.3	60	40	6
8.42	0.3	20	80	6
8.50	0.3	100	0	6

Temperature:

40°C

Sample:

Colistin (0.51mg/mL)

Injection volume:

0.5μL

System:

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100μL

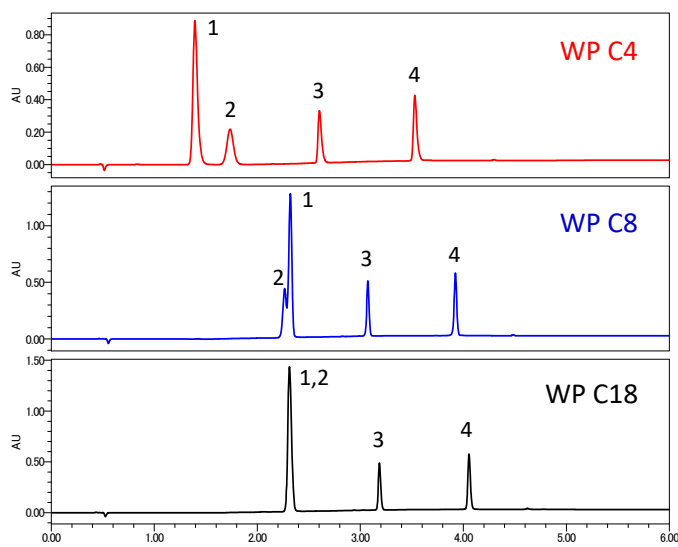
※FlexFire WP C8は2020年3月発売予定です。

■ コリスチンの分析例

コリスチンは7つのアミノ酸から構成される環状ペプチドです。使用したコリスチンはコリスチンAとコリスチンBの混合物で、一か所のアミノ酸が異なるだけの構造が非常に近く分子量はともに約1.4KDaの化合物です。

細孔径120 Åのカラムでも分離は可能ですが、構造の広がった化合物の分析にはワイドポアカラムも選択肢の一つです。





Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Develosil FlexFire WP C8, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Develosil FlexFire WP C18, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
4.76	0.3	60	40	6
8.42	0.3	20	80	6
8.50	0.3	100	0	6

Temperature:

40°C

Sample:

Cyclo (-RGDSP)
 Cyclo (-GRGESF)
 Cyclo (-RGDFK)
 Cyclo (-RGDFC)

Injection volume:

0.5 μ L

System:

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100 μ L

■ アルキル鎖の長さで変わる保持と分離

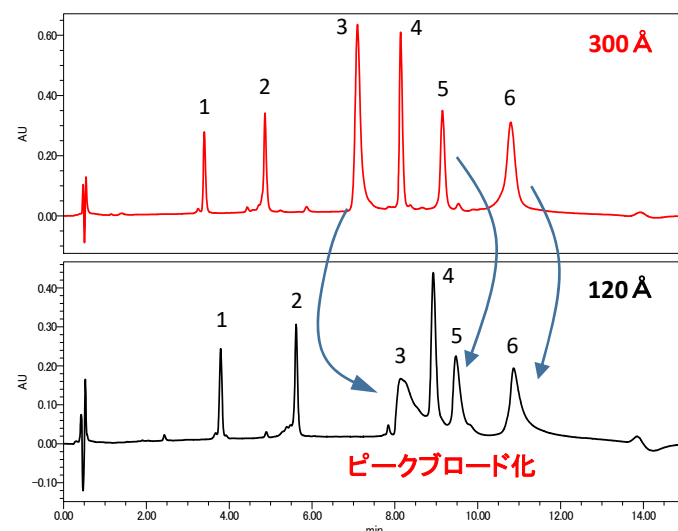
環状ペプチドを異なるアルキル鎖で分離と保持の比較をしました。「アルキル鎖が短い=保持が弱い」は上記の結果から成立しますが、「C1やC4は保持が弱い=分離しない」ということにはなりません。

上記クロマトでは、最も分離に長けているのはアルキル鎖の一番短いWP C4です。



3. タンパク質の分析

前項までのペプチドと異なり、タンパク質になると分子量が一気に大きくなります。細孔に入りきらない分子はピークのブロード化、ピーク潰れを引き起こします。細孔径120 Åカラムでは得られなシャープなピークは300 Åカラムで得ることができます。



Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Develosil FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
12.60	0.3	40	60	6
12.63	0.3	80	20	6

Temperature:

40°C

Detection:

UV210nm

Sample:

1. Ribonuclease A (13KDa)
 2. Cytochrome C (11KDa)
 3. BSA (67KDa)
 4. Myoglobin (14KDa)
 5. Enolase (46KDa)
 6. Phosphorylase B (97KDa)

Injection volume:

10 μ L

System:

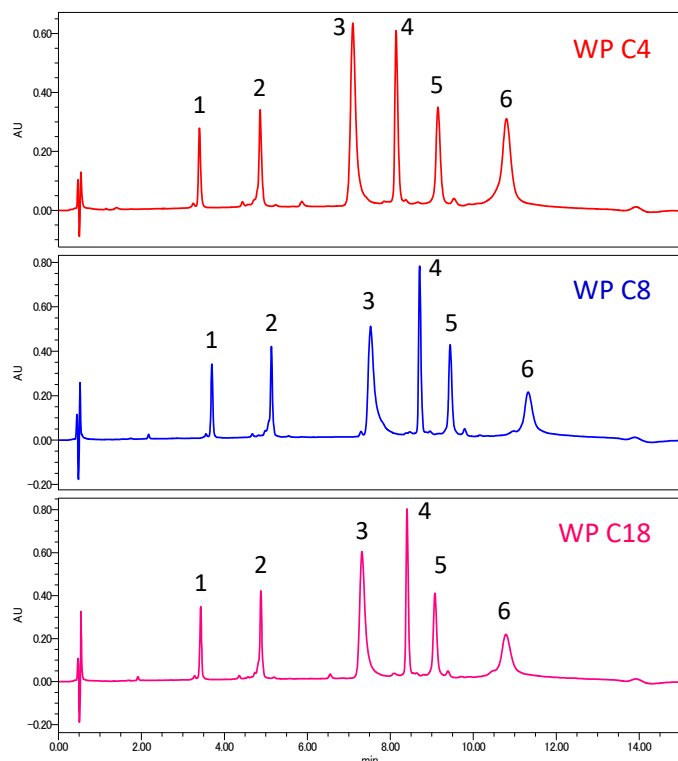
Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100 μ L

■ 細孔径の違いによるタンパク質のピーク形状

300 Åカラムではタンパク質は良好なピーク形状を示しますが、120 Åカラムでは大きい分子量(BSA、Enolase、Phosphorylase)においてピークがブロード化しました。これは分子構造が大きいため細孔に入りきらずにピークが広がっているものと思われます。



Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Develosil FlexFire WP C8, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Develosil FlexFire WP C18, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
12.60	0.3	40	60	6
12.63	0.3	80	20	6

Temperature: 40°C
 Detection: UV210nm
 Sample: Ribonuclease A (13KDa)
 Cytochrome C (11KDa)
 BSA (67KDa)
 Myoglobin (14KDa)
 Enolase (46KDa)
 Phosphorylase (97KDa)

Injection volume: 10 μ L
 System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
 Mixer: 100 μ L

■ アルキル鎖の違いによるタンパク質の保持

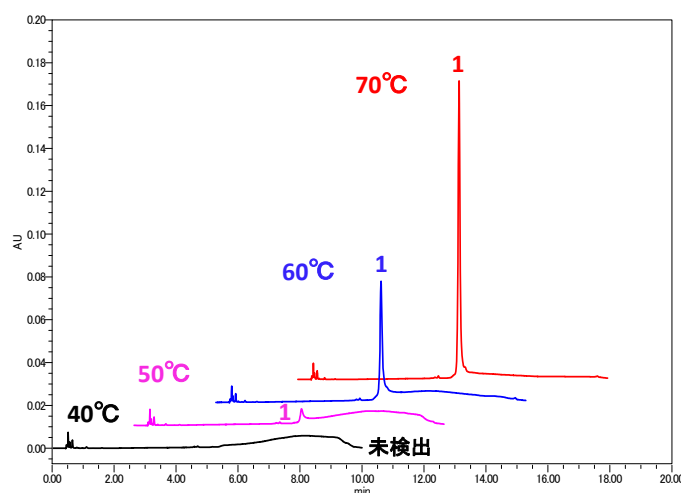
タンパク質などの高分子化合物の保持はアルキル鎖の長さに依存せず、保持に影響をほぼ与えません。低分子化合物とは違い、構造が大きい高分子はアルキル鎖が長いとフルで相互作用を発揮できないためと考えられます。したがって、C4のように短いアルキル鎖の方が効率、回収率が高く、バックグラウンドが低くなる傾向にあります。

4. モノクローナル抗体の分析

モノクローナル抗体は抗体医薬品として大変注目されています。生物由来のタンパク質同定だけではなく、がんや感染症など有効な治療法がない疾患の治療が期待されています。

HPLCやUHPLCでもこのモノクローナル抗体の分析が可能で、製品の安定化や品質管理などに広く使用されています。また、カラムの種類に応じて分析条件も様々です。

ここではFlexFire WPシリーズがモノクローナル抗体分析において何ができるかを紹介します。



Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
 Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
 B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

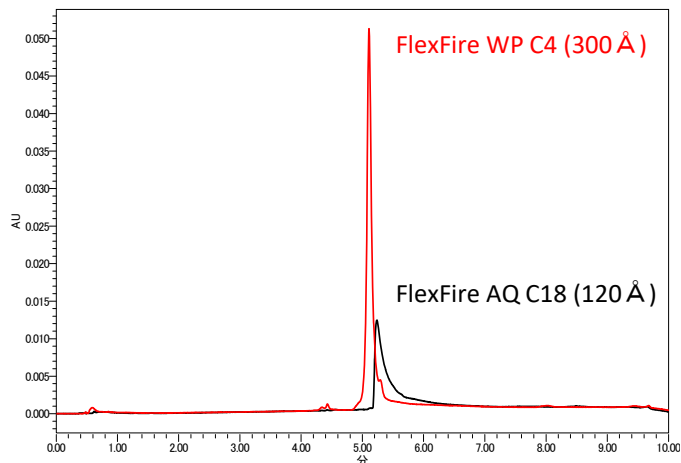
Time	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
8.40	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6

Temperature: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C
 Detection: UV280nm
 Sample: 1. Intact Mouse IgG1 (5.0mg/mL)
 Injection volume: 1.0 μ L
 System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
 Mixer: 100 μ L

■ 温度条件によるモノクローナル抗体の検出

モノクローナル抗体分析にてメソッドを構築する場合には、温度条件が重要となります。分析例が示すように、タンパク質の分析条件(40°C)では検出することができませんが、70°Cにおいて良好なピークを得ることができます。FlexFire WPシリーズはこれらの分析に備えて、温度耐久性を80°Cまで使用できるように開発されています。





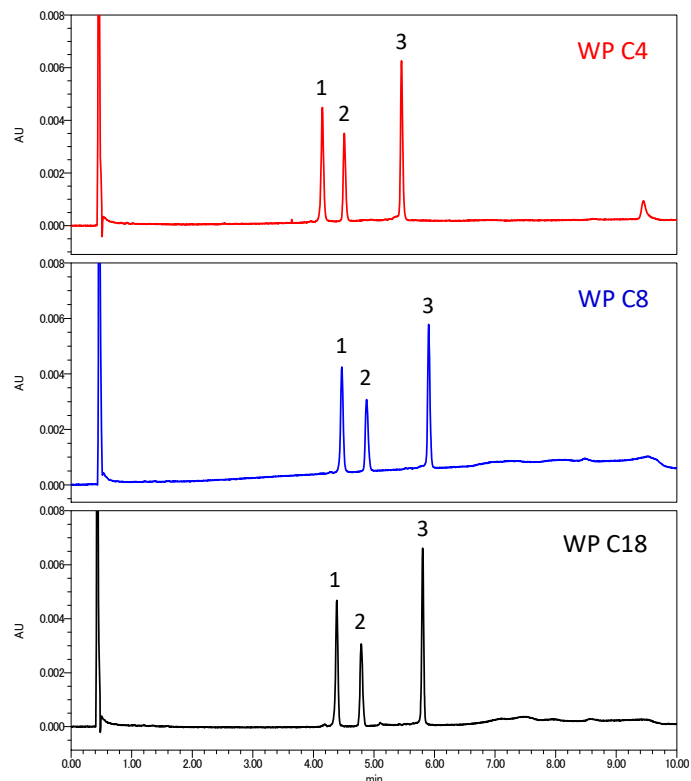
Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
Develosil FlexFire AQ C18, 2.6 μ m (2.0x50mm)
Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

Time	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
8.40	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6

Temperature: 70°C
Detection: UV280nm
Sample: 1. Intact Mouse IgG1 (5.0mg/mL)
Injection volume: 1.0 μ L
System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
Mixer: 100 μ L



Conditions:

Column: Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x50mm)
Develosil FlexFire WP C8, 2.6 μ m (2.0x50mm)
Develosil FlexFire WP C18, 2.6 μ m (2.0x50mm)
Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA
B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
4.76	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6
8.50	0.3	100	0	6

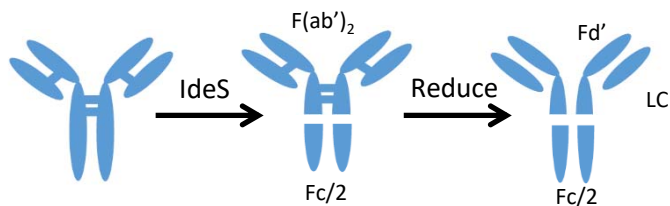
Temperature: 70°C
Detection: UV260nm
Sample: mAb subunit
1. Fc/2
2. LC
3. Fd'
Injection volume: 1.0 μ L (0.25 μ g)
System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS
Mixer: 100 μ L

■ 120 Å カラムとの比較

このデータで用いたIntact Mous IgG 1の分子量は約150KDaです。タンパク質の分析において、約50KDaのタンパク質からピークのブロード化が起きていたことから120 Å カラムではモノクローナル抗体はピークがブロード化します。

4-2. モノクローナル抗体の断片化

モノクローナル抗体は酵素によって断片化（低分子化）することができます。IdeS消化によって得られたF(ab')₂、Fc/2を還元することによって3つのフラグメントを得ています。



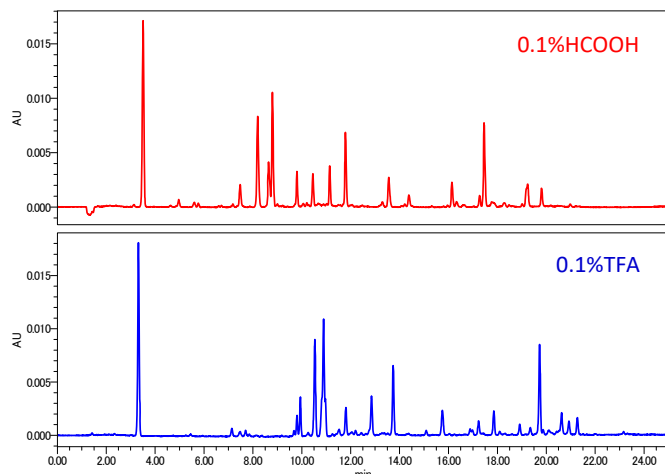
■ 温度条件によるモノクローナル抗体の検出

アルキル鎖による保持の違いはほぼありません。しかし、バックグラウンドはFlexFire WP C4が最も低い傾向にあることが分かります。

5. インタクトタンパク質・mAbのペプチドマッピング

モノクローナル抗体のIdeS消化/還元により得られたフラグメントは25kDa前後へ低分子化されます。インタクトタンパク質やmAbをトリプシンなどの酵素で消化を行うことで、さらに低分子化をすることができます。

■ BSA



Conditions:

Column:

Mobile phase:

Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x150mm)

A) Water + 0.1% HCOOH B) Acetonitrile + 0.1% HCOOH

A) Water + 0.1% TFA B) Acetonitrile + 0.1% TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
30.0	0.3	50	50	6
30.1	0.3	100	0	6

Temperature:

40°C

Detection:

UV280nm

Sample:

Tryptic digest of BSA

Injection volume:

10 μ L

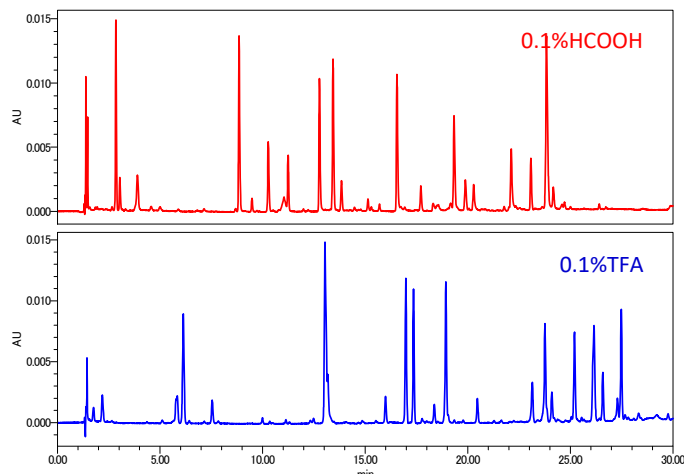
system:

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100 μ L

■ mAb



Conditions:

Column:

Mobile phase:

Develosil FlexFire WP C4, 2.6 μ m (2.0x150mm)

A) Water + 0.1% HCOOH B) Acetonitrile + 0.1% HCOOH

A) Water + 0.1% TFA B) Acetonitrile + 0.1% TFA

Gradient:

min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	100	0	
30.0	0.3	50	50	6
30.1	0.3	100	0	6

Temperature:

70°C

Detection:

UV280nm

Sample:

Tryptic digest of mAb

Injection volume:

10 μ L

system:

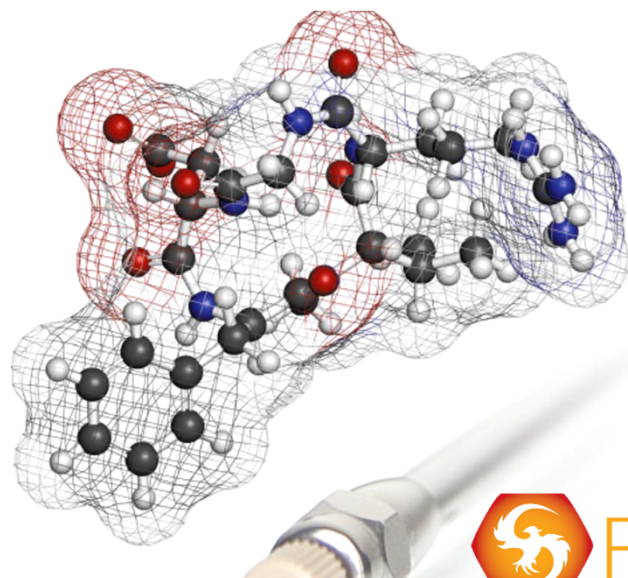
Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer:

100 μ L

■ ペプチドマッピングにおける移動相の選択

消化されペプチドレベルまで断片化されたBSAやmAbは通常のペプチド分析と同様に扱うことができ、比較的容易に検出することが可能です。数百、数千のペプチドであれば移動相にも0.1%ギ酸を選択することができます。



6. おわりに

ターゲットが大きな分子量を持っているもしくは構造が広がっている場合には、ワイドポアカラムの使用がおすすめです。また、酵素等による断片化、低分子化されてもカラムを変える必要はなく、ワイドポアカラムのまま低分子化されたターゲットを分析することが可能となります。これらの化合物以外にもAMP, ADP, ATPなどの核酸の分析においてもシャープなピークを得ることができます。

温度・pH耐久性など現在求められている点をアップデートした「FlexFire WPシリーズ」を是非、お試しください。



FlexFire WPシリーズスペックおよび価格表

	FlexFire WP C18	FlexFire WP C8	FlexFire WP C4	FlexFire WP C1
Particle size	5μm, 2.6μm			
Chemistry	Octadecyl	Octyl	Butyl	Trimethyl
Surface area	170m ² /g	170m ² /g	170m ² /g	170m ² /g
Pore volume	1.4mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g
Pore diameter	30nm	30nm	30nm	30nm
Carbon	15%	7%	5%	3%
pH range	pH1-10			
Temp. range	5-80℃			
Max Pressure	5μm: 300Bar (=30Mpa=4,351psi) 2.6μm: 600Bar (=60MPa=8,702psi)			

FlexFire WP C18

内径 (mm)	長さ (mm)	粒子径 (μm)	ステンレスカラム		メタルフリーカラム	
			価格(円)	商品コード	価格(円)	商品コード
2.0	35	2.6μm	70,000	308-L20035W	93,000	308-L20035MFW
	50		70,000	308-L20050W	93,000	308-L20050MFW
	75		72,000	308-L20075W	95,000	308-L20075MFW
	100		75,000	308-L20100W	98,000	308-L20100MFW
	150		80,000	308-L20150W	103,000	308-L20150MFW
	250		85,000	308-L20250W	108,000	308-L20250MFW
	35	5μm	65,000	308-520035W	88,000	308-520035MFW
	50		65,000	308-520050W	88,000	308-520050MFW
	75		67,000	308-520075W	90,000	308-520075MFW
	100		72,000	308-520100W	95,000	308-520100MFW
	150		75,000	308-520150W	98,000	308-520150MFW
	250		80,000	308-520250W	103,000	308-520250MFW

FlexFire WP C8

内径 (mm)	長さ (mm)	粒子径 (μm)	ステンレスカラム		メタルフリーカラム	
			価格(円)	商品コード	価格(円)	商品コード
2.0	35	2.6μm	70,000	309-L20035W	93,000	309-L20035MFW
	50		70,000	309-L20050W	93,000	309-L20050MFW
	75		72,000	309-L20075W	95,000	309-L20075MFW
	100		75,000	309-L20100W	98,000	309-L20100MFW
	150		80,000	309-L20150W	103,000	309-L20150MFW
	250		85,000	309-L20250W	108,000	309-L20250MFW
	35	5μm	65,000	309-520035W	88,000	309-520035MFW
	50		65,000	309-520050W	88,000	309-520050MFW
	75		67,000	309-520075W	90,000	309-520075MFW
	100		72,000	309-520100W	95,000	309-520100MFW
	150		75,000	309-520150W	98,000	309-520150MFW
	250		80,000	309-520250W	103,000	309-520250MFW



FlexFire WP C4

内径 (mm)	長さ (mm)	粒子径 (μm)	ステンレスカラム		メタルフリーカラム	
			価格(円)	商品コード	価格(円)	商品コード
2.0	35	2.6 μm	70,000	310-L20035W	93,000	310-L20035MFW
	50		70,000	310-L20050W	93,000	310-L20050MFW
	75		72,000	310-L20075W	95,000	310-L20075MFW
	100		75,000	310-L20100W	98,000	310-L20100MFW
	150		80,000	310-L20150W	103,000	310-L20150MFW
	250		85,000	310-L20250W	108,000	310-L20250MFW
	35	5 μm	65,000	310-520035W	88,000	310-520035MFW
	50		65,000	310-520050W	88,000	310-520050MFW
	75		67,000	310-520075W	90,000	310-520075MFW
	100		72,000	310-520100W	95,000	310-520100MFW
	150		75,000	310-520150W	98,000	310-520150MFW
	250		80,000	310-520250W	103,000	310-520250MFW

FlexFire WP C1

内径 (mm)	長さ (mm)	粒子径 (μm)	ステンレスカラム		メタルフリーカラム	
			価格(円)	商品コード	価格(円)	商品コード
2.0	35	2.6 μm	70,000	311-L20035W	93,000	311-L20035MFW
	50		70,000	311-L20050W	93,000	311-L20050MFW
	75		72,000	311-L20075W	95,000	311-L20075MFW
	100		75,000	311-L20100W	98,000	311-L20100MFW
	150		80,000	311-L20150W	103,000	311-L20150MFW
	250		85,000	311-L20250W	108,000	311-L20250MFW
	35	5 μm	65,000	311-520035W	88,000	311-520035MFW
	50		65,000	311-520050W	88,000	311-520050MFW
	75		67,000	311-520075W	90,000	311-520075MFW
	100		72,000	311-520100W	95,000	311-520100MFW
	150		75,000	311-520150W	98,000	311-520150MFW
	250		80,000	311-520250W	103,000	311-520250MFW

※価格は2020年3月現在の価格であり予告なしに変更される場合があります。あらかじめご了承ください。

※表示価格には消費税は含まれておりません。

※製品の外観および仕様は予告なしに変更される場合があります。あらかじめご了承ください。

■ お問い合わせ/Contact us



野村化学株式会社
〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
Tel: 0561-48-1853 Fax: 0561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Nomura Chemical Co., Ltd.
15, Hinode-cho, Seto, 489-0004, Japan
Tel: +81-561-48-1853 Fax: +81-561-48-1434
e-mail: info@develosil.net



Develosil USA
10060 Carroll Canyon Rd. Ste. 100 San Diego, CA 92131
Phone: 858-800-2433
Web: <https://develosil.us/>

