

テクニカルレポート No.32

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 II

1. 高分子化合物用カラム

タンパク質やモノクローナル抗体(以下、mAb)は数万~数十万の分子量を持つ化合物です。 これらを分析するには300 Å 程度の細孔径を持つカラムが必要となります。

FlexFire WPシリーズには300Åで4種類、モノクローナル抗体専用カラム(1000Å)として1種類の計5種類をラインナップしており、目的に合わせた選択が可能です。

本レポートでは、前回よりもさらに高分子化合物をターゲットにワイドポアカラムの有用性をご紹介します。

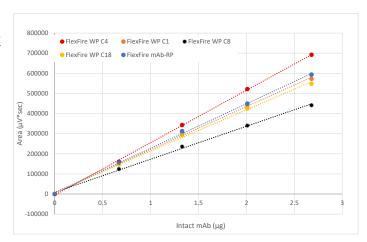
2. FlexFire WPシリーズ スペックシート

	FlexFire mAb-RP	FlexFire WP C4	FlexFire WP C18	FlexFire WP C8	FlexFire WP C1
Particle size	2.6µm, 5µm				
Chemistry	Butyl	Butyl	Octadecyl	Octyl	Trimethyl
Surface area	24m²/g	170m²/g	170m²/g	170m²/g	170m²/g
Pore volume	1.4mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g	1.4mL/g
Pore diametter	100nm	30nm	30nm	30nm	30nm
Carbon	1.3%	5%	15%	7%	3%
End-cap	0	0	0	0	0
рН	pH1-10	pH1-10	pH1-10	pH1-10	pH1-10
Temperature	~80℃	~80℃	~80℃	~80℃	~80℃
Pressure range	2.6µm: 600bar (=60Mpa=8,702psi)				
riessure range	5μm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)	5µm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)	5μm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)	5µm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)	5µm: 300bar (=30Mpa=4,351psi)

3. mAbの回収率

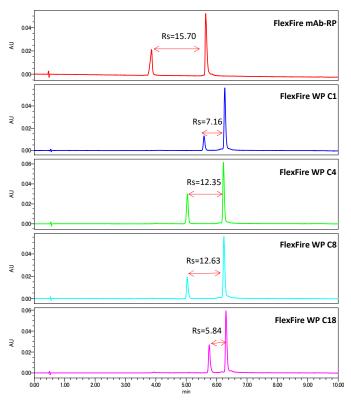
各カラムにおけるmAb(150KDa)の回収率を求めました。C4以下のアルキル鎖を持つカラムにおいて良好な直線性と高い回収率を得ることができます。

Column	R^2	Recovery (%)
FlexFire WP C1	0.99886	104
FlexFire WP C4	0.99961	103
FlexFire WP C8	0.99795	89.8
FlexFire WP C18	0.99823	98.1
FlexFire mAb-RP	0.99886	101





4. ミオグロビンと不純物の分離度比較



Conditions;

Column: FlexFire WP Series, 2.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water+0.1%TFA B) Acetonitrile+0.1%TFA

Gradient:

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

Temperature: 40℃
Detection: UV280nm
Sample: Myoglobin
Injection volume: 0.2µL

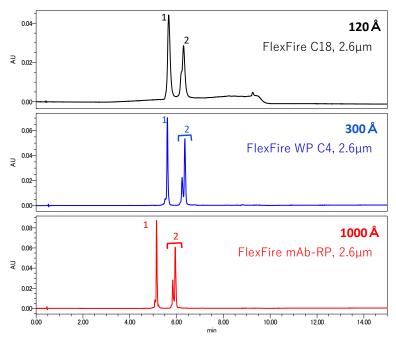
System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer: 100µL

ミオグロビンと不純物の分離

いずれのカラムを用いてもミオグロビンと不純物の分離は良好です。FlexFire mAb-RP、WP C8、WP C4において高い分離度を得られるため、複数成分の分離への効果が期待できます。

5. タンパク質の分析



ラクトアルブミンの分析

細孔径120Åのカラムに比べて、300Åおよび1000Åのカラムではピーク分離と感度向上に優れます。

特に1000Åではより鮮明なピーク分離を達成しています。

Conditions;

Gradient:

Column: FlexFire C18, 2.6um (2.0x50mm)

FlexFire WP C4, 2.6um (2.0x50mm)

%В

Curve

FlexFire mAb-RP, 2.6um (2.0x50mm)

mL/min

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

0.00 0.3 80 20 8.40 0.3 40 60 8.42 0.3 80 20

min

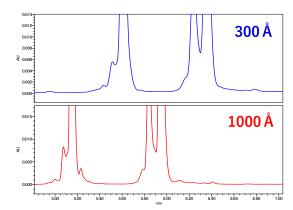
Temperature: 40℃ Detection: UV280nm

Sample: 1. α -Lactalbumin (0.34mg/mL) 2. β -Lactoglobulin (1.00mg/mL)

Injection volume: 2.0uL

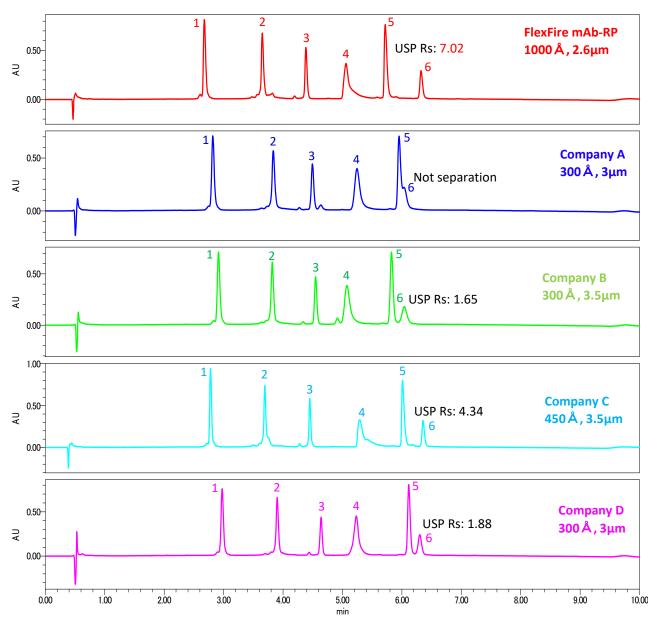
System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer: 100uL





6.多成分タンパク質の分離比較



Conditions:

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm) Column:

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient: mL/min %A %B min 0.00 0.3 80 20

Curve 8.40 0.3 40 60 6 8.42 0.3 80 20 6

Temperature: 40℃ Detection: UV210nm

Sample: 1. Ribonuclease A (13.7KDa)

> 2.Cytochrome C (12.4KDa) 3.Lysozyme (14.3KDa) 4.BSA (66.3KDa) 5.Myoglobin (11.2KDa)

6.Catalase (220KDa)

Injection volume: 2.0µL

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

Mixer: 100µL

ミオグロビン-カタラーゼ間の分離比較

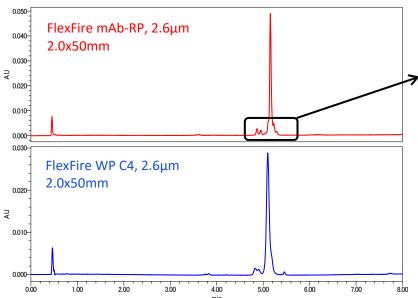
10KDa-60KDaでの分離は細孔径300Åのカ ラムでも十分に分離は可能ですが、200KDa の高分子化合物においては細孔径が大きいカ ラムの方が優位に分離を達成していることが 分かります。

FlexFire mAb-RPを用いることで高分子間 の分離だけではなく、タンパク質に含まれ る不純物の検出にも期待できます。

※このデータで使用したカラムのケミストリーは全てC4です。



7. モノクローナル抗体の分析



Conditions;

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm) Column:

FlexFire WP C4, 2.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

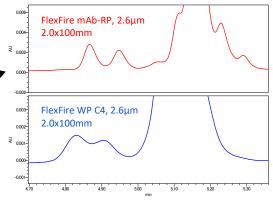
Gradient:

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

Temperature: 40℃ UV280nm Detection: Sample: **NISTmAb** Injection volume: 1.0µL

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS System:

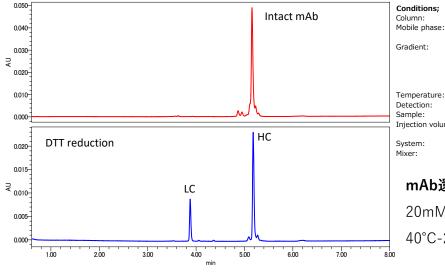
Mixer: 100µL



モノクローナル抗体の分析例

テクニカルレポートNo.30では細孔 径300Åのアプリケーションが中心 でしたが、本レポートでは1000Åの カラムを用いています。1000 Å のカ ラムはより鮮明なピークを見出すこ とができ、新たな知見を得ることが できます。

テクニカルレポートNo.30に300Åカラム を用いた分析例があります。



Conditions; Column

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm) A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

mL/min 0.3 %В min Curve 8 40 0.3 40 60 6

Temperature: 40℃

Detection: UV280nm Sample: NISTmAb, Reduced NISTmAb

8.42

Injection volume:

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

100µL

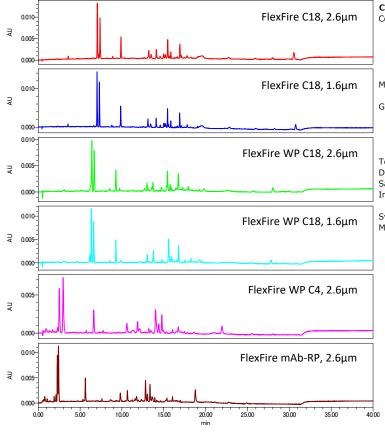
mAb還元体の分析

20mM DTTをNISTmAbと1:1で混合し、 40°C-2hrで反応させました。

> テクニカルレポートNo.30に300 Åカラム を用いた分析例があります。



8. ペプチドマッピング



Conditions;

Column:

FlexFire C18, 2.6µm (2.0x50mm) FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm)

FlexFire WP C18, 2.6µm (2.0x50mm) FlexFire WP C18, 1.6µm (2.0x50mm)

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm)

A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA Mobile phase:

Gradient: mL/min %В Curve min %A 0.00 0.3 8.40 0.3 40 60

Temperature: 40℃ Detection: UV280nm Sample: BSA Digest Injection volume: 1.0µL

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS System:

100µL Mixer:

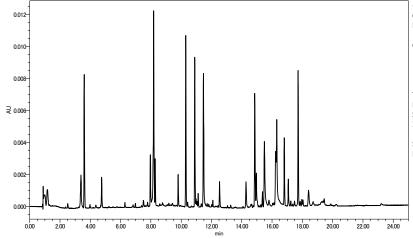
タンパク質の消化には、

「Thermo Scientific™ SMART Digest™ キット」 を使用しました。

インタクト分析を含める場合には、分子量に適したカラ ムの選定が必要になりますが、消化により低分子化され たペプチドのみであれば、120Åのような標準的なカラ ムの選択ができます。

※Thermo Scientific™ SMART Digest™ キットはサーモフィッシャー サイエンティフィック株式会社の登録商品です。

8-1. mAbのトリプシン消化物



Conditions;

Column: Mobile phase:

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm) A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient:

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

80℃ Temperature: UV280nm Detection: Sample: NISTmAb Digest

Injection volume: 1.0uL

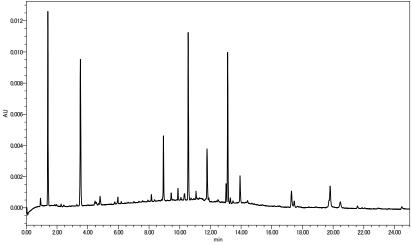
System: Mixer: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

100µL

mAbは分子量が約150KDaの化合物です。「7.モノクローナル抗体」の分析においてインタクトmAb1000 Åの有用性が 分かっています。ペプチドマッピングにおいてもカラムを変えることなく、インタクト分析から消化物分析までをカラ ム1本で完結させることができます。



8-2. ヘモグロビンのトリプシン消化物



Conditions; Column:

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

20

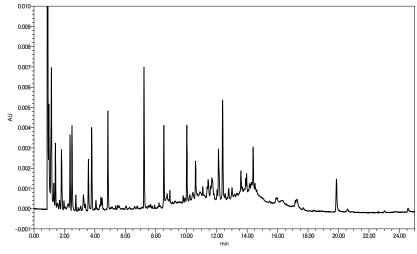
Gradient: min mL/min %A %В Curve 20 60 0.00 80 6 8.40 0.3 40

Temperature: 40℃ Detection: UV280nm Sample: Injection volume: Hemoglobin Digest 1.0µL

8.42

System: Mixer: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

8-3. ADHのトリプシン消化物



Conditions;

Column: Mobile phase:

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm) A) Water + 0.1%TFA B) Acetonitrile + 0.1%TFA

80

20

Gradient: mL/min 0.3 min %A %B Curve 0.00 80 20 8.40 0.3 40 60 6 0.3

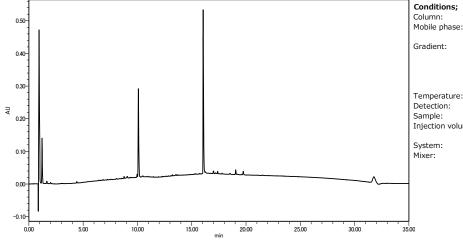
Temperature: Detection: 40℃ UV280nm Sample: ADH Digest Injection volume: 1.0µL

System: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS

8.42

Mixer: 100µL

8-4. Insulinのトリプシン消化物



Conditions;

FlexFire mAb-RP, 2.6µm (2.0x50mm)

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

Gradient:

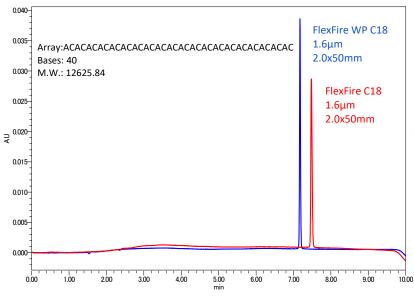
min	mL/min	%A	%B	Curve
0.00	0.3	80	20	
8.40	0.3	40	60	6
8.42	0.3	80	20	6

Temperature: 40℃ Detection: UV280nm Insulin Digest Sample: Injection volume:

System: Mixer: Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS



9. 合成RNAの分析



Conditions:

FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm) Column:

FlexFire WP C18, 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase: A) 100mM HFIP + 10mM TEA B) Methanol

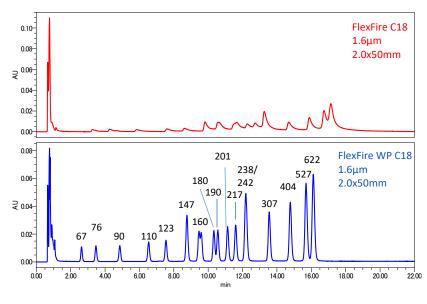
Gradient: mL/min %В min %A Curve 0.00 0.3 95 8.60 0.3 80 20 6 8.61 0.3 95 6

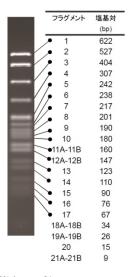
50℃ Temperature: Sample: RNA Injection volume: 0.2µL

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS System:

Mixer: 100µL

10. pBR322消化物の分析





3% Agarose 21 EtBr 染色

Conditions:

FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm) Column:

FlexFire WP C18, 1.6µm (2.0x50mm)

A) 0.1M TEAA, pH7.0 B) 0.1M TEAA, pH7.0/ACN=80/20 Mobile phase:

mL/min %A %B Gradient: Curve min 0.00 0.2 42.5 57.5 20.0 02 15.5 84.5 6 20.1 57.5

Temperature: 50°C

pBr322 MspI Digest Sample:

Injection volume: 10µL

Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS System:

Mixer: 100µL データ提供:株式会社ニッポンジーン様

高分子化合物の分析において、FlexFire C18(120 Å)では 達成できない分析は300Åの"FlexFire WP C18"を用いる ことによって、分析が可能となります。





ホームページにてアプリケーションを随時、更新しています。



粒子径5μm, 内径4.6mmのスタンダードカラム発売中!! 汎用HPLCにもFlexFireを使用することができます。

FlexFireは野村化学の登録商標です。

FlexFire WP C18は2021年3月現在、発売前の商品になります。仕様や価格等はお問合せください。 本レポート中に掲載している会社名および製品名は、該当する会社の商標、登録商標になります。 本カタログ中におけるデータ等を無断で複製および転写することを禁止しています。

■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/

