

HPLCにおけるサイズ排除クロマトグラフィーの超高分離: 3.5 μm エチレン架橋型ハイブリッド (BEH) パーティクルを用いた低分子量タンパク質およびペプチドの分析

Susan Serpa, Hua Yang, Edouard S. P. Bouvier, and Stephan Koza Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- バリデートした分析法に対して高い信頼性が得られる BEH ベースのパーティクルを充塡し、卓越したカラム耐久性と信頼性の高いカラム再現性の得られる SEC カラム
- 粒子径の大きい(5 µm) 従来の HPLC 用 SEC カラムと比べて低分子量タンパク質とペプ チドの分離が向上
- ポアサイズ 125 Å によりペプチドから低分子 量タンパク質の範囲で効率的な分離を提供

ウォーターズのソリューション

XBridge® Protein BEH SEC 125 Å、3.5 µm カラム

Alliance® HPLC システム

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システムおよび ACQUITY UPLC システム

BEH125 SEC Protein Standard Mix

キーワード

サイズ排除クロマトグラフィー、SEC、HPLC、 UPLC、タンパク質、SE-HPLC、SE-UPLC、 ゲルろ過クロマトグラフィー

はじめに

ウォーターズは以前から、低分子量タンパク質およびペプチドの分析に適した ポアサイズ 125 Å で粒子径 2 um 以下のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラムをご提供していました ¹。この UPLC® テクノロジーサイズ排除クロマト グラフィー (SE-UPLC)は、従来のシリカベースパーティクルに比べて機械的 に強く、化学的にも安定な粒子径 1.7 μm のエチレン架橋型ハイブリッド(BEH) パーティクルを採用しています。ただし、内径 4.6 mm の SE-UPLC カラムは、 HPLC システムが UPLC システムに比べて顕著にカラム外拡散が大きく耐圧が低 いため、HPLCシステムでの使用には適していません。そのため、ウォーター ズは、従来からの HPLC システムでの使用に向けて、ポアサイズ 125 Åで粒子 径 3.5 µm の BEH SEC カラムを開発しました。このカラムにより HPLC システ ムでも BEH パーティクルテクノロジーのメリットを得られるようになりました。 本アプリケーションノートでは、UPLC 分析法移管、カラム間再現性、カラム 耐久性の観点から、低分子量タンパク質およびペプチドのためにデザインされ た本カラムの性能の特徴について紹介します。さらに、従来の SE-HPLC パーティ クル (5 μm) に比べた粒子径 3.5 μm 充塡剤の性能のメリットを、非変性および 変性条件両方の分離について紹介します。

実験方法

分析条件

(特に記載の無い限り同じ)

LC条件

LC システム: Alliance HPLC、ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

もしくは ACQUITY UPLC

検出器: Alliance HPLC TUV 検出器

ACQUITY UPLC TUV 検出器 (5 mm チタンセル)

波長: 280 または 214 nm

カラム: XBridge Protein BEH SEC、125Å、3.5 μm、

7.8×150 mm (製品番号: 176003596) および ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、 125 Å、1.7 μm、4.6×300 mm (製品番号: 186006506)

比較カラム: Silica-DIOL SEC、125Å、5 μm、7.8×300 m

カラム温度: 室温

サンプル温度:10℃

注入量: 10 μL (特に記載の無い限り)

流速: 0.84 mL/min (特に記載の無い限り)

移動相: 25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム

pH7.2 (Auto•Blend Plus Technology で調整)

移動相 A: 100 mM NaH₂PO₄、14.5 %

移動相 B: 100 mM Na₂HPO₄、15.0 %

移動相 C: 1.0 M NaCl、65 %

移動相 D: 水 もしくは 30% (v/v) アセトニトリル

グラジエント:アイソクラティック

スタンダード: BEH125 SEC Protein Standard Mix

(製品番号:186006842)

サンプルバイアル: 不活性ガラス 12×32 mm スクリューネック

トータルリカバリーバイアル、

キャップ&プレスリットPTFE/シリコンセプタム、

lmL (製品番号: 18600385DV)

クロマトグラフィーソフトウェア: Waters Empower® Pro (v2 & v3)

サンプル詳細

全てのサンプルは、特に記載のない限り移動相に溶解しました。 タンパク質およびペプチドはそれぞれ単品のスタンダードもしくは 混合物として入手しました(Waters® & Sigma-Aldrich)。サンプル 濃度は特に記載のない限り 1.0 mg/mL (公称値)です。

結果および考察

ペプチドおよびタンパク質分析に向けたサイズ排除 UPLC(SE-UPLC)カラムの製造に BEH パーティクルテクノロジーを採用することで得られる顕著なサンプルスループットおよび性能のメリットは以前に報告しました ^{2,3}。しかしながら、HPLC システムで使用した場合には、システムでのピーク拡散により、これらのメリットを十分に得られません。HPLC システムにおける低分子量タンパク質およびペプチドの SEC 分離に BEH パーティクルテクノロジーの化学的および構造的なメリットを活用するために、ポアサイズ 125 Åで粒子径 3.5 μm の BEH パーティクルを充塡した内径 7.8 mm のカラムを発売しました。このカラムに適した SE-HPLC 分離の分子量範囲は、タンパク質からペプチドまで、分子量として1 KDa から約80 KDa です。評価の一環として、大きい粒子径 (5 μm)の HPLC 用充塡剤との比較、カラム間再現性の重要な性能特性、カラム耐久性 (寿命) の観点からこの充塡剤の分離効率の利点について示します。

3.5 µm BEHパーティクルを用いた SE-HPLC分離の向上

性能を示すために、低分子量タンパク質(myoqlobin、 MW 17 KDa) と一連のペプチドについてシリカベース 125 Å、5 μm、7.8×300 mm カラムと BEH SEC、125 Å、 3.5 µm、7.8×300 mm カラムで、同じ Alliance HPLC システムと水系もしくは有機溶媒系移動相条件を用 いて分析を行いました(図1および図2)。両比較 は、同じ流速および注入量で行いました。従来の粒 子径 5 µm に比べて、粒子径 3.5 µm 充塡剤では、感 度が向上し、幅の狭いピークが得られました。BEH SEC カラムは機械的耐性が向上するため、従来の SE-HPLC カラムよりも高流速かつ高い圧力で使用で きます。この性能を活用した例を図2(一番下)に示 しています。この分析では、BEH SEC、125 Å、3.5 um、7.8 × 300 mm カラムを 2 本つないで(トータ ルカラム長:600 mm) 流速を 2 倍にすることで、分 析時間は維持しながら顕著な分離向上が見られまし た。ペプチドの SEC 分離に BEH パーティクルを採用 するもう 1 つの利点として、ubiquitin や aprotinin な どいくつかのペプチドで見られる二次相互作用が従 来のシリカベース SEC と比べて大きく低減できます (図2)。上記2つのペプチドの電荷を考えると、こ の二次相互作用はおそらくシラノール活性によるも のと考えられます。aprotinin は塩基性の強いタンパク 質(pl=10.5)で、ubiquitin は "ubiquination" と称される タンパク質 -ubiquitin 相互作用に関わる複数のリシン 残基により非常に塩基性の強い表面電荷を示します。

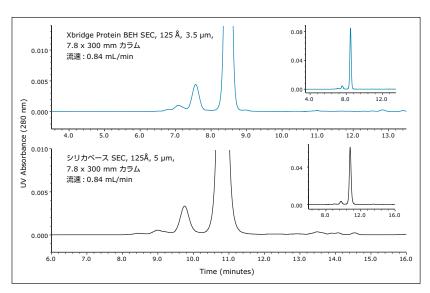


図 1. XBridge Protein BEH SEC、3.5 μm カラム (上) と従来のシリカベース SEC、5 μm カラム (下) による myoglobin(17 KDa)の分離比較。実験条件に記載の通りカラムは水系移動相で使用。

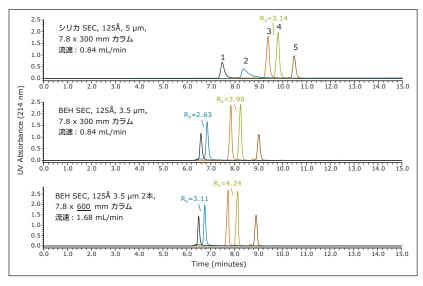


図 2. XBridge Protein BEH SEC、3.5 µm カラム(中)、従来のシリカベース SEC、5 µm カラム(上) および XBridge Protein BEH SEC、3.5 µm カラムを2 本連結して流速を2 倍にして分析時間は 同じ(下)での数種のペプチド分離比較。移動相は0.1% TFA 含有30% アセトニトリル溶液。 ピーク1: Ubiquitin (8565 Da)、2: Aprotinin (6511 Da)、3: Angiotensin I (1296 Da)、 4: Btsfykinin (1060 Da)、5: DLWQK (689 Da)

卓越したカラム耐久性と 信頼性の高いカラム間再現性

分析法開発の主要な懸念事項は、バッチ間・カラム間再現性と、充塡カラムの耐久性です。図3には、3本のBEH SEC、125Å、3.5 μm、7.8×300 mm カラムによるタンパク質スタンダード Mix のクロマトグラムを示しています。これらのクロマトグラムは、異なる3種類の充塡剤バッチから製造したSECカラム間での再現性を示しています。流速0.42 mL/min でポアサイズ125Åカラムの保持時間の標準偏差は0.06分から0.27分の範囲で、全ての標識ピークについての平均標準偏差は0.17分でした。uracil (浸透限界のマーカー)の保持時間に対するこの平均保持時間再現性は0.99% RSDでした。

BEH SEC、125 Å、3.5 μm、7.8 × 300 mm カラムの 耐久性は、トータル 600 回以上の注入に渡るタン パク質スタンダード分析の結果の評価により実証 しました。シリカベース SEC カラムの耐久性は弱 塩基性の pH でも悪化するため、移動相はリン酸緩 衝液 (pH7.2) に設定しました。図 4 には、BEH SEC、 125 Å、3.5 μm カラムと従来の 100% シリカベー ス SEC、5 μm カラムについて、myoglobin スタン ダートを用いた耐久性評価の最初と最後のクロマ トグラムを示しました。各カラムについて、重要 な myoglobin のモノマーとダイマーのピークの分離 度を測定しました。BEH SEC、125 Å、3.5 μm カラム では顕著な分離度の低下は見られず優れた耐久性 を示しました。これらのデータは、XBridge Protein BEH125 SEC、3.5 µm カラムが、信頼性の高い分析 法を開発し、品質管理環境下においてルーチンで 分析を実施するのに必要な再現性と耐久性を提供 できることを実証しています。

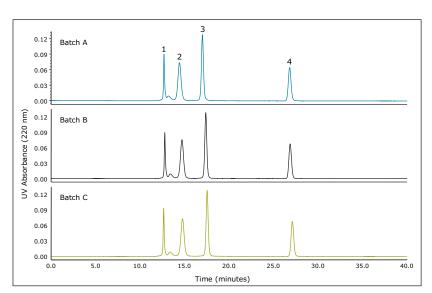


図3. 異なる3種類の充塡剤バッチから製造したXBridge Protein BEH125 SEC、3.5 μm カラムによるBEH125 SEC Protein Standard Mix(製品番号:186006842)の分離比較。移動相は100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) で、流速は0.42 mL/min。

ピーク 1: Thyroglobulin、2: Ovalubmin、3: Ribonuclease、4: Uracil

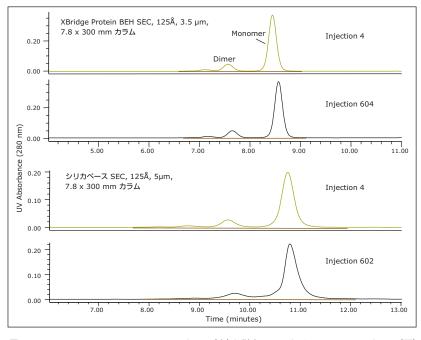


図 4. XBridge Protein BEH125 SEC、3.5 µm カラム(上)と従来のシリカベース SEC、5 µm カラム(下)を用いた myoglobin (17 KDa)分離によるカラム寿命(注入 600 回以上)比較。カラムは文章中に記載した水系移動相条件で使用。

ポアサイズ 125 Å SEC HPLC および UPLC 分析法移管性

ポアサイズ 200 Å および 450 Åの SEC カラムにお ける、UPLC と HPLC 間でのシームレスな分析法移管 性については、以前に報告しました³。SEC 分析法 の UPLC と HPLC 間での移管性は、パーティクルの ポアサイズおよびケミストリーに最も影響されます。 例えば、BEH とシリカベースの SEC カラムによるペ プチド分離を比較すると(図2)、同じ条件下で2つ のパーティクルでは ubiquitin および aprotinin につ いて二次相互作用の程度が同じではないことは明ら かです。ここでは XBridge Protein BEH125 SEC、3.5 μm カラムと ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、125 Å、 1.7 µm カラムとの分析法移管性を示すための検討 を実施しました。一般的なクロマトグラフィーのス ケーリングの原理に基づいて、粒子径に対するカラ ム長さの比(L/dp)を維持するために HPLC カラムで は長さを UPLC カラムの 2 倍にする必要があり、還 元線速度は UPLC カラムの半分にする必要があります。 この分析法移管の結果を図5に示しました。時間軸 を標準化して得られたクロマトグラムを比較してい ますが、4.6 mm 内径カラムを用いた 1.7 μm の UPLC 分離に比べて 7.8 mm 内径カラムを用いた 3.5 µm の HPLC 分離では分析時間が 4 倍かかり、移動相消費 量が約6倍になっている点にご留意下さい。一方、1.7 μm、内径 4.6 mm の SEC 分離を 5 μm、内径 7.8 mm の HPLC カラムに適切にスケーリングするには、3倍 のカラム長さが必要で、分析時間は約9倍になります。

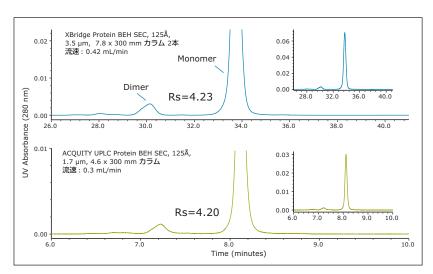


図 5. XBridge Protein BEH125 SEC、 $3.5 \, \mu m$ カラム $2 \, \Delta (\, h - g \, h)$ を移(上)および ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、 $1.25 \, \mathring{A}$, $1.7 \, \mu m$ 、 $300 \, mm$ カラム $(\, h)$ における myoblobin(17 KDa)の分離比較。ダイマーとモノマーの分離度を記載。

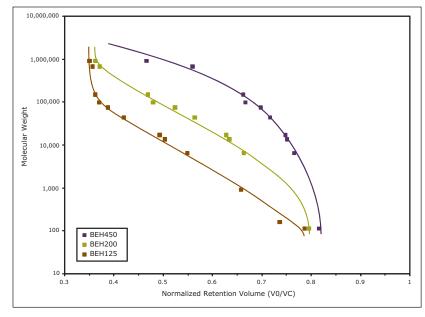


図 6. 125 Å、200 Å、450 Å Protein BEH SEC 3.5 μm カラムについての様々なタンパク質、ペプチド、ウラシルによる較正曲線。

幅広い分子量のタンパク質分離に向けた3種類のポアサイズ: 125Å、200Å、450Å

タンパク質およびペプチドの分離について、ポアサイズ 125 Å、200 Å、450 Å間で比較しました。タンパク質の分子量較正曲線は図 6 に示しました。ポアサイズ 125 Åの分子量直線範囲は大体 <1 KDa から 80 KDa、ポアサイズ 200 Åでは 10 KDa から 450 KDa、ポアサイズ 450 Åでは、50 KDa から 1.3 MDa 以上までと推定されます。

結論

ポアサイズ 125 Åの粒子径 3.5 μ m HPLC 用 BEH SEC カラム導入により、従来の 5 μ m シリカベース SEC カラムと比べて SE-HPLC の分離を向上しました。この 特徴と BEH テクノロジーの化学的耐性との組み合わせにより、卓越したカラム 寿命が得られます。ウォーターズの Protein Separation カラムファミリーの一環 として、厳しい公差で製造され、関連するスタンダードを用いて品質試験を実施しています。HPLC の分離は、1.7 μ m の BEH テクノロジーパーティクルを採用 した内径の小さい (4.6 mm) カラムを用いた SE-UPLC 分離にシームレスに移管でき、UPLC システムとの組み合わせにより高い分離とスループットが実現します。

Waters XBridge Protein BEH SEC、125 Å、3.5 µm カラムは以下を提供します。

- 従来の 5 µm SE-HPLC パーティクルを充塡したカラムに比べて分離が向上
- 従来のシリカベース SE-HPLC パーティクルを充塡したカラムに比べて二次相 互作用が低減
- 充塡剤の各バッチはタンパク質スタンダードで QC 試験を実施し、品質試験 成績書を添付
- 卓越したバッチ間、カラム間再現性
- BEH パーティクルは従来のシリカベースパーティクルに比べて塩基性移動相 条件での卓越したカラム耐久性を実現
- Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、125 Å、1.7 µm カラムを用いて HPLC ⇔ UPLC 間でシームレスな分析法移管が可能

参考文献

- Paula Hong, Stephan Koza, and Kenneth J. Fountain, Advances in Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Small Proteins and Peptides: Evaluation of Calibration Curves for Molecular Weight Estimation. Waters Corporation, <u>Application Note</u> 720004412EN, 2012.
- Stephan Koza, Susan Serpa, Hua Yang, Edouard Bouvier, and Kenneth J. Fountain, Advanced HPLC Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Macromolecular Proteins Using 3.5 μm Ethylene Bridged Hybrid (BEH) Particles. Waters Corporation, <u>Application Note</u> 720005202EN, 2015.
- Stephan Koza and Kenneth J. Fountain. Successful Transfer of Size Exclusion Separations between HPLC and UPLC. Waters Corporation, <u>Application Note</u> 720005214EN, 2014.



THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118 大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734ショールーム 東京 大阪 サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Allience、XBridge、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。 Auto•Blend Plus および BEH Technology は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。