[TECHNOLOGY BRIEF]

CORTECS UPLC C_8 1.6 µm カラムを用いた低分子量インタクトタンパク質の分離

Jacob N. Fairchild and Erin E. Chambers
Waters Corporation, Milford, MA, USA

目的

CORETECS® UPLC® C_8 1.6 µm カラムのソリッドコアテクノロジーにより得られるシャープなピークによる低分子量インタクトタンパク質の分離効率への影響を実証すること。

背景

UPLC 分離に CORTECS UPLC C_8 1.6 µm カラムを導入することで、全多孔性パーティクルのカラムを用いた場合に比べて著しく高いカラム効率が得られます。最適化したソリッドコアパーティクルの構造により高いカラム効率が得られ、グラジエント分析のピークキャパシティと感度が向上します。CORTECS パーティクルは粒子径 1.6 µm と 2.7 µm をラインアップし、UPLC、UHPLC、HPLC 間でシームレスに分析法移管できます。全ての CORTECS カラムファミリーは厳しい許容範囲で製造、品質試験され、多くのアプリケーションに最適なカラムとなっています。インタクトタンパク質は、許容可能な検出感度を達成するのが難しいため、LC での分析は困難です。MS 検出において、多くのタンパク質が気相に相転移するのが難しいため、選択的なサンプル前処理はもちろんシャープなクロマトグラフィーピークも検出感度を大きく向上させます。リボヌクレアーゼ A（13.7 kDa）、シトクローム C（12 kDa）、リゾチーム（14.3 kDa）はイオン交換で分離されることの多い、3 種類の一般的な低分子量タンパク質です。これらのタンパク質は、逆相クロマトグラフィーを用いて疎水性によっても容易に分離できます。

ソリッドコアパーティクルは、同じサイズの全多孔性パーティクルに比べてクロマトグラフィー効率を大きく向上させます。一般的に C_8 等の短鎖アルキル鎖で分離される低分子量タンパク質の分離においてもソリッドコアパーティクルの利点は明らかです。

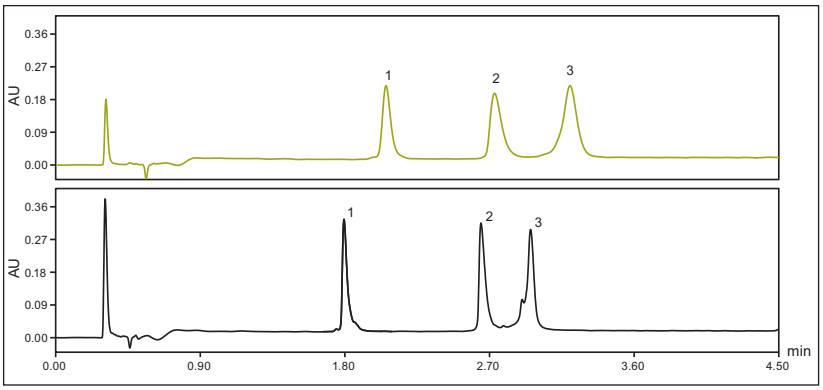

図 1. ACQUITY UPLC® BEH C_8 カラム、130 Å、1.7 µm（上）と CORTECS UPLC C_8 カラム、90 Å、1.6 µm（下）でのリボヌクレアーゼA、シトクローム C、リゾチームの分離

しかしながら、コントロールした表面チャージの無い、C_{18} 官能基は、タンパク質や分子量の大きいペプチドに対し、大きくテーリングしたピーク形状や過度な保持を引き起こすことが多くあります。ペプチド分離は C_{18} 官能基で達成されることも多くはありますが、タンパク質のピーク形状向上は、C_8 のような短鎖のソリッドコアパーティクルで達成できます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ソリューション

CORTECS UPLC C_8 カラム、1.6 µm、2.1 × 50mm（製品番号：186008404）を ACQUITY UPLC BEH C_8 カラム、1.7 µm、2.1 × 50mm（製品番号：186002877）と比較しました。アセトニトリル濃度 10 - 40%（0.1%ギ酸添加）の 4 分間のグラジエントを用いました。用いたサンプル混合物は、IEX Cation Test スタンダード（製品番号：186006870）で、凍結乾燥した等しい質量のリボヌクレアーゼ A、シトクローム C、リゾチームが含まれています。IEX Cation Test スタンダードは 0.1% ギ酸添加 95/5 H_2O/ アセトニトリル 1mL に溶解後、同じ溶媒で 10 倍に希釈して分析に供しました。CORTECS UPLC C_8 カラムを用いることで、ピークキャパシティが著しく向上しました。CORTECS UPLC C_8 カラムで得られたピーク幅（4 σで測定）は、ACQUITY UPLC BEH C_8 カラムに比べて平均で 20% 狭く、ピークキャパシティが 22% 向上し、ピーク高さが 20% 向上しました。図 1 に示すクロマトグラムは、ACQUITY UPLC BEH C_8 カラム、1.7 µm、2.1 × 50mm（製品番号：186002877）と CORTECS UPLC C_8 カラム、1.6µm、2.1 × 50mm（製品番号：186008404）で分離した低分子量タンパク質のピーク高さおよびピーク幅を示しています。CORTECS UPLC カラムは、ソリッドコアパーティクルのコアが存在するため、カラムの相比（固定相 / 移動相体積比）が若干小さく、実際の保持時間は低減します。ピーク幅が狭く、ピーク高さが高いことで、ACQUITY UPLC BEH C_8 カラムでは見えなかったシトクローム C とリゾチームのピークの間にある微量不純物 2 種類が明らかとなります。高性能装置と CORTECS UPLC C_8 カラムにより得られる非常に高いカラム効率の組み合わせにより、低分子量インタクトタンパク質の迅速で高感度な分離が可能となります。

LC 条件	
LCシステム：	Binary Sample Manager（BSM）、Sample Manager（SM-FL）、Active Column Manager（CM-A）を備えたACQUITY UPLC I-Classシステム
検出：	可変UV検出器（220 nm）
カラム：	CORTECS UPLC C_8 カラム、1.6 µm、2.1×50 mm（製品番号：186008404）、ACQUITY UPLC BEH C_8 カラム、1.7 µm、2.1×50 mm（製品番号：186002877）
カラム温度：	45℃
サンプル温度：	15℃
注入量：	1 µL
流速：	0.25 mL/min
移動相A：	0.1 %ギ酸水溶液
移動相B：	0.1 %ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント：	4 分間で10 - 40% B、0.5 分間で75 %まで増加させ、1分間ホールド
バイアル：	TruView™ LCMS品質証明透明ガラス 12×32mm スクリューネックマキシマムリカバリーバイアル、キャップ&プレスリットPTFE/シリコンセプタム付 1.5mL（製品番号：186005662CV）
タンパク質スタンダード：	IEX Cation Test スタンダード（製品番号：186006870）
クロマトグラフィーソフトウェア：Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア	IEX Cation Test Standard（製品番号：186006870）
キーワード：	高分子量ペプチド、低分子量タンパク質、UPLC、CORTECS、リボヌクレアーゼA、リゾチーム、シトクロームC

まとめ

低分子量タンパク質分離において、シャープなピークと検出感度の達成は困難です。ACQUITY UPLC BEH C_8 1.7 µm カラムと比べて、CORTECS UPLC C_8 1.6 µm カラムでは著しく幅の狭いピークが得られます。官能基は全く同じため、ソリッドコアパーティクルのパーティクル基材形態による向上です。ソリッドコアパーティクルによる向上は、ここで示したインタクトタンパク質のような高分子の場合に、より明白です。

参考文献

1. "Increasing Peak Capacity in Reverseed-Phase Peptide Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C_{18} Columns" Mattew A. Lauber, Stephan M. Koza, and Kenneth J. Fountain, Waters Application Note 720004568en.

Waters
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、CORTECS、UPLC、ACQUITY UPLC、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
TruView 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。
©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年10月 720005577JA PDF