

## 高性能生体高分子分離用 逆相クロマトグラフィーカラム TSKgel® Protein C<sub>4</sub>-300 について

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 特長	1
3. 基本的性質	4
3-1 物性一覧	4
3-2 標準測定条件	4
3-3 タンパク質の分離挙動	5
3-4 ペプチドの分離挙動	6
3-5 グラジエント時間の影響	7
3-6 流速の影響	8
3-7 測定条件による選択性の変化	10
3-8 イオンペア試薬の影響	12
3-9 温度の影響	13
3-10 試料負荷量の影響	15
3-11 定量性	15
3-12 他の TSKgel RPC カラムとの比較	17
3-13 市販のタンパク質分析用 RPC カラムとの比較	19
4. 分離例	20
4-1 ハイスループット分析	20
4-2 ペプチドマッピング	21
4-3 PEG 化タンパク質	22
4-4 モノクローナル抗体 (IgG)	23
5. おわりに	24

## 1. はじめに

近年、タンパク質やペプチドなどの生体分子を利用したバイオ医薬品の開発が盛んに行われており、これらの特性を明らかにするための分析技術に対するニーズも高まっています。液体クロマトグラフィーを利用したタンパク質やペプチドの分離法としては、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、イオン交換クロマトグラフィー (IEC)、疎水クロマトグラフィー (HIC) などとともに、逆相クロマトグラフィー (RPC) も多く用いられています。

本レポートでは、タンパク質の高速・高分離分析を目的として開発されたRPCカラムTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300について、基本的性質、測定条件が分離に及ぼす影響、他のRPCカラムとの比較、および分離例をご紹介します。

## 2. 特長

### 1) タンパク質の分離に適した30 nmの細孔径

分離に適した細孔径の大きさは、測定対象によって異なります。測定したい分子の大きさに比べて細孔径が小さい場合、分子が細孔内に拡散することができないため、十分な分離能が得られません。逆に細孔径が大きすぎる場合も、充てん剤の比表面積が小さくなり、すなわち分離に寄与する固定相の体積が小さくなってしまうため、分離が悪くなります。よって、良好な分離能を得るためには、分子の大きさに応じて適切な細孔径を選択する必要があります。

細孔径が異なるシリカゲルにブチル基を導入した試作充てん剤を用いて、細孔径がタンパク質の分離に及ぼす影響を評価した結果を図1に示します。細孔径30 nmの充てん剤では、分子量12,000~66,000のタンパク質がいずれも良好なピーク形状で溶出しましたが、細孔径が小さくなるにつれてピーク幅は増大し、分子量66,000のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) で特にピークの歪みが顕著に現れました。この結果から、30 nmの細孔径はタンパク質の分離に適した大きさであることが分かります。

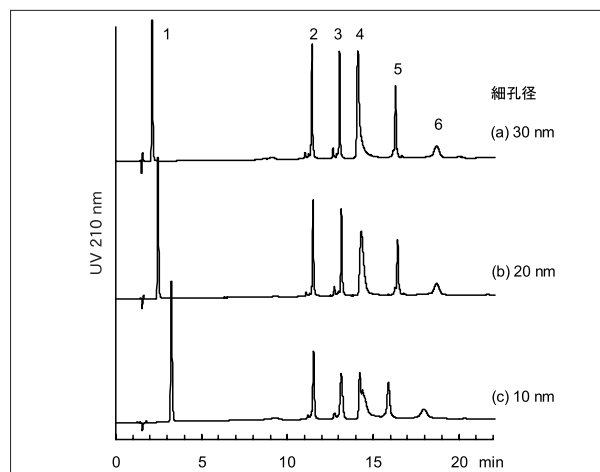


図1 細孔径がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：試作RPCカラム (4.6 mm ID.×10 cm)

粒子径：3  $\mu\text{m}$

細孔径：(a) 30 nm, (b) 20 nm, (c) 10 nm

官能基：ブチル基

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (30 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 210 nm

温度：40  $^{\circ}\text{C}$

注入量：10  $\mu\text{L}$

試料：1. フェニルアラニン (MW 165)  
2. チトクロム c (ウマ) (MW 12,400)  
3. リゾチーム (MW 14,300)  
4. ウシ血清アルブミン (MW 66,000)  
5.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)  
6. オブアルブミン (MW 44,300)  
(各2  $\mu\text{g}$ )

### 2) タンパク質の分離に適したC<sub>4</sub>固定相

RPCでは、オクタデシル基 (C<sub>18</sub>) を固定相としたODSカラムが広く用いられていますが、疎水性が強い試料を測定する場合には、試料との相互作用が弱いオクチル基 (C<sub>8</sub>)、ブチル基 (C<sub>4</sub>) などアルキル鎖が短い固定相を用いたほうが良好な分離が得られることがあります。

細孔径30 nmのシリカゲルにC<sub>18</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>4</sub>を導入した試作充てん剤を用いて、固定相のアルキル鎖長がタンパク質の分離に及ぼす影響を評価した結果を図2に示します。C<sub>4</sub>を導入した充てん剤では、いずれのタンパク質も良好なピーク形状で溶出しましたが、C<sub>8</sub>やC<sub>18</sub>を導入した充てん剤ではピーク面積の減少やピーク幅の増大が観察されました。この結果から、C<sub>4</sub>はタンパク質

の吸着性が低く、高い回収率でタンパク質を測定するのに適した固定相であることが分かります。

シリカゲルへのブチル基導入量がタンパク質の分離に及ぼす影響を評価した結果を図3に示します。ブチル基を導入しエンドキャップを実施した後の炭素含有量が3.8%以上の試作充てん剤(c)および(d)では、BSA(ピーク3)のテーリングが大きくなり、ピーク面積が低

下しました。また、炭素含有量が2.3%の試作充てん剤(a)では、BSAのピーク形状は良好でしたが、酸性溶離液中において十分な耐久性が得られませんでした。これらの検討結果に基づき、TSKgel Protein C4-300は炭素含有量が3%となるようにブチル基導入量を調節し、良好な分離能・回収率と高いカラム耐久性を両立させています。

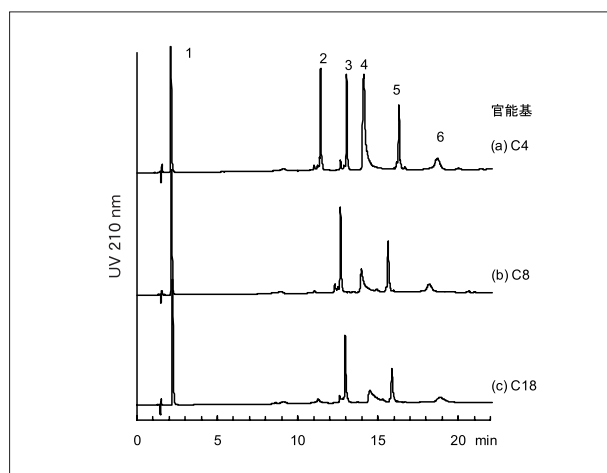


図2 固定相のアルキル鎖長がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：試作RPCカラム (4.6 mm I.D.×10 cm)

粒子径：3 μm

細孔径：30 nm

官能基：(a) C4, (b) C8, (c) C18

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (30 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 210 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. フェニルアラニン (MW 165)

2. チトクロム c (ウマ) (MW 12,400)

3. リゾチーム (MW 14,300)

4. ウシ血清アルブミン (MW 66,000)

5. α-キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)

6. オブアルブミン (MW 44,300)

(各2 μg)

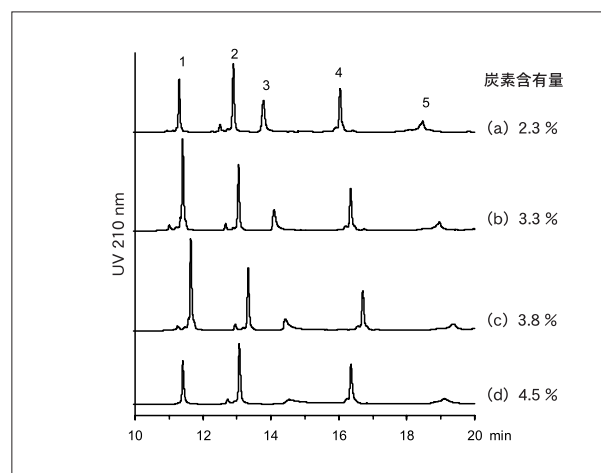


図3 ブチル基の導入量がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：試作RPCカラム (4.6 mm I.D.×10 cm)

粒子径：3 μm

細孔径：30 nm

官能基：C4

炭素含有量：

(a) 2.3%, (b) 3.3%, (c) 3.8%, (d) 4.5%

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (30 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 210 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. チトクロム c (ウマ) (MW 12,400)

2. リゾチーム (MW 14,300)

3. ウシ血清アルブミン (MW 66,000)

4. α-キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)

5. オブアルブミン (MW 44,300)

(各2 μg)

### 3) TFAを含む酸性溶離液中での高い耐久性

TSKgel Protein C4-300は、加水分解されにくいポリメリック様式でブチル基を導入し、なおかつ残存シラノールに対して高効率エンドキャップを施すことによって、高い耐久性を実現しています。

RPCによるタンパク質分析で通常用いられる、トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む酸性溶離液中でのカラムの耐久性を評価しました。通常より高濃度 (0.2 %) の TFA を含む溶離液を TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D.×15 cm) に流速1.0 mL/minで1,000時間通液し、ナ

フタレンの保持時間、およびフェノールの理論段数を追跡した結果を図4および図5に示します。ナフタレンの保持時間は通液とともに少しずつ低下しますが、1,000時間通液した後においても通液前の90%以上の保持時間を維持していました。また、フェノールの理論段数は通液前後において変化が見られませんでした。このようにTSKgel Protein C4-300は固定相の化学的安定性、充てん層の物理的安定性ともに良好であり、長時間の使用においても再現性の高い測定が可能です。

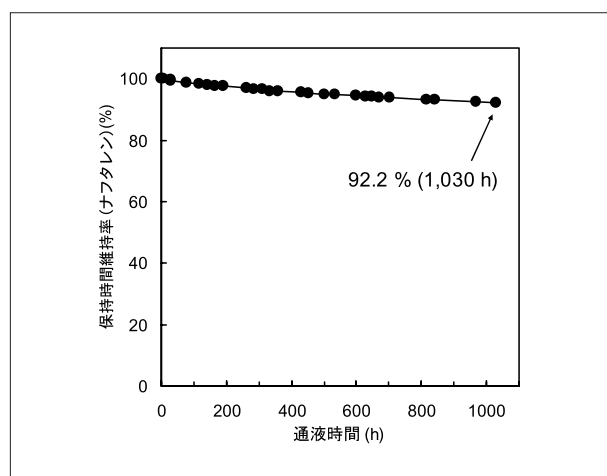


図4 酸性条件下におけるナフタレンの保持時間の変化

カラム：TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
溶離液：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=70/30/0.2 (v/v/v)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 254 nm  
温度：40 °C  
注入量：10 μL  
試料：ナフタレン

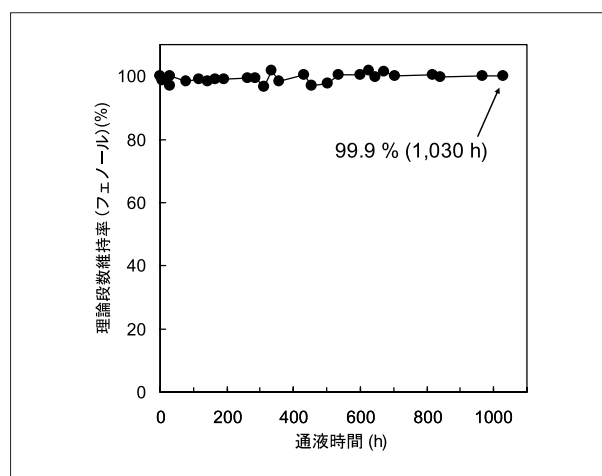


図5 酸性条件下におけるフェノールの理論段数の変化

カラム：TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
溶離液：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=70/30/0.2 (v/v/v)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 254 nm  
温度：40 °C  
注入量：10 μL  
試料：フェノール

### 3. 基本的性質

#### 3-1 物性一覧

TSKgel Protein C4-300の仕様を表1および表2に示します。4.6 mm I.D.カラムは一般分析に、2.0 mm I.D.カラムは微量分析およびLC/MS ( /MS) に適しています。4.6 mm I.D.カラム、2.0 mm I.D.カラムともに、吸着性が強い夾雑物から分析カラムを保護するためのカートリッジ式ガードカラムTSKgel guardgel Protein C4が使用可能です (別途カートリッジホルダが必要です)。

表1 TSKgel Protein C4-300 充てん剤の仕様

基材	シリカゲル
平均粒子径	3 μm
細孔径	30 nm (シリカゲル)
比表面積	100 m <sup>2</sup> /g (シリカゲル)
表面官能基	ブチル基 (ポリメリック)
エンドキャップ	トリメチルシリル基
炭素含有量	3 %

表2 TSKgel Protein C4-300 カラムの仕様

品名	品番	カラムサイズ (mm I.D. x cm)	
TSKgel Protein C4-300	0022827	4.6 x 5	
	0022828	4.6 x 10	
	0022829	4.6 x 15	
	0022830	2.0 x 5	
	0022831	2.0 x 10	
	0022832	2.0 x 15	
TSKgel guardgel Protein C4	0022833	3.2 x 1.5 (3本入り)	※1
	0022834	2.0 x 1 (3本入り)	※2

カラム材質: ステンレス 出荷溶媒: アセトニトリル

※1 別途カートリッジホルダ(品番:0019018)が必要

※2 別途カートリッジホルダ(品番:0019308)が必要

#### 3-2 標準測定条件

TSKgel Protein C4-300を用いてタンパク質やペプチドを測定する際の標準測定条件を表3に示します。分析メソッド構築の際には、標準測定条件にて試料の溶出パターンを確認した後、3-3~3-11に記載された内容を参考にして測定条件を検討されることをおすすめします。

表3 標準測定条件

溶離液	A: H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/TFA = 90/10/0.05 (v/v/v) B: H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN/TFA = 20/80/0.05 (v/v/v) A→B リニアグラジエント
グラジエント時間	45 min (15 cm カラム) 30 min (10 cm カラム) 15 min (5 cm カラム)
再平衡化時間	15 min (15 cm カラム) 10 min (10 cm カラム) 5 min (5 cm カラム)
流速	1.0 mL/min (4.6 mm I.D.) 0.2 mL/min (2.0 mm I.D.)
温度	40 °C
試料負荷量	0.1 ~ 1.0 μg 程度になるように調製

### 3-3 タンパク質の分離挙動

標準タンパク質を測定したクロマトグラムを図6に示します。概ね分子量が大きな試料ほど保持が強くなる傾向が見られていますが、たとえばラクトフェリンは分子量が約90,000と大きいにもかかわらず、分子量が小さい $\alpha$ -キモトリプシノーゲン Aやカルボニックアンヒドラーゼよりも早く溶出しています。アミノ酸組成、翻訳後修飾、高次構造などが要因となって、ラクトフェリンは他のタンパク質とくらべてC4固定相に対する疎水的相

相互作用が弱いものと推測されます。

一般的に逆相クロマトグラフィー (RPC) は、機構が異なる他の分離モード (サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、イオン交換クロマトグラフィー (IEC)、疎水クロマトグラフィー (HIC) など) と比べて、タンパク質の分離において分離能が高いという特徴を有しています。反面、RPCの溶離液として用いられる有機溶媒やイオンペア試薬はタンパク質を強く変性させるため、タンパク質を分取して構造や機能を解析する目的には適しません。

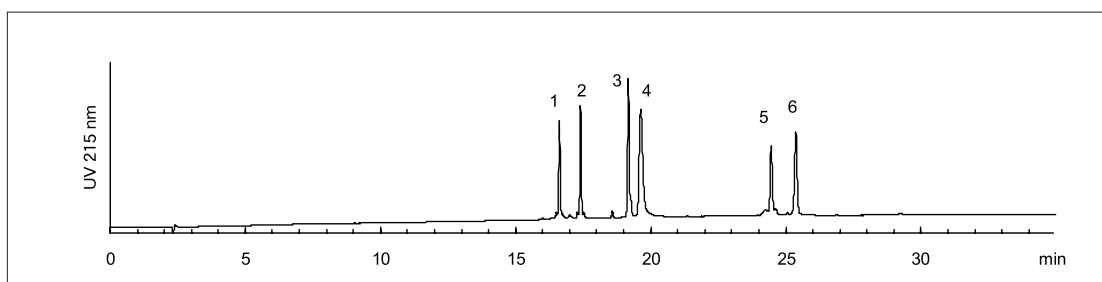


図6 標準タンパク質試料のクロマトグラム

カラム：TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm ID.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10  $\mu$ L

試料：1. チトクロム c (ウマ) (MW 12,400)

2. チトクロム c (ウシ) (MW 12,300)

3. リゾチーム (MW 14,300)

4. ラクトフェリン (ヒト) (MW 90,000)

5.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)

6. カルボニックアンヒドラーゼ (MW 29,000)

(各1  $\mu$ g)

### 3-4 ペプチドの分離挙動

標準ペプチドを測定したクロマトグラムを図7に示します。タンパク質の場合と同様に、分子量が大きくても保持が弱いペプチド、あるいは分子量が小さくても保持が強いペプチドが存在し、アミノ酸組成によって疎水的相互作用に違いが生じていることが示唆されました。

RPCによるペプチドの分離に関しては、アミノ酸配列から疎水性を計算しODSカラムによる分離挙動を予測する試みが古くから行われています。39種類のペプチド試料について、Sasagawaらにより報告された疎水性保

持係数<sup>1)</sup>を用いて算出したペプチドの疎水性と、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×5 cm) で測定した保持時間との関係を図8に示します。予測されるペプチドの疎水性とTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300での保持時間の間には相関が認められ、疎水性が高いペプチドほど強く保持されることが確認できました。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300とODSカラムでは二次的な保持機構(残存シラノール基との相互作用など)が異なると考えられるため、アミノ酸の保持係数および近似式をTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300に最適化することによって、さらに確度の高い分離挙動の予測が可能になるものと考えられます。

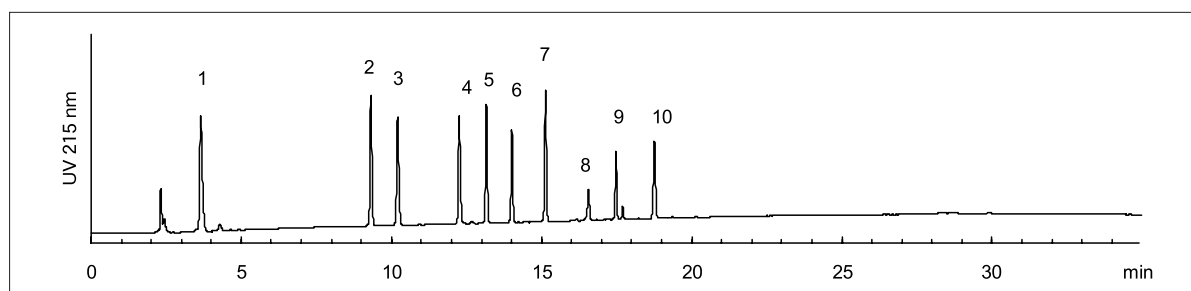


図7 標準ペプチド試料のクロマトグラム

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 215 nm  
 温度：40 °C  
 注入量：10 μL

試料：1. δ-睡眠誘発ペプチド (MW 849)  
 2. メチオニン-エンケファリン (MW 574)  
 3. ブラジキニン (MW 1,060)  
 4. エレドイシン関連ペプチド (MW 707)  
 5. アンジオテンシン I (MW 1,297)  
 6. サブスタンス P (MW 1,348)  
 7. ソマトスタチン (MW 1,638)  
 8. β-エンドルフィン (MW 3,465)  
 9. インスリン (MW 5,808)  
 10. ガストリン I (MW 2,098)  
 (各0.25 μg)

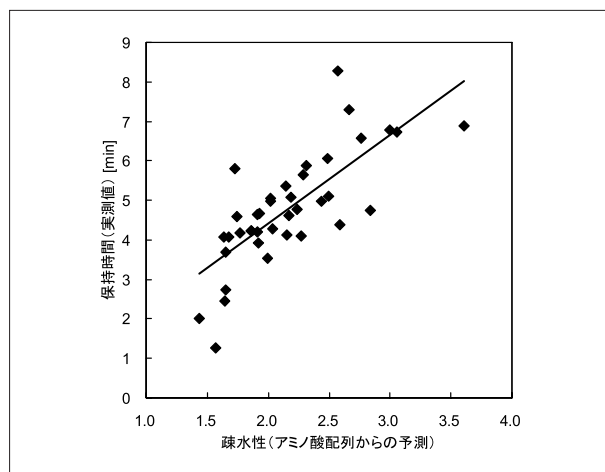


図8 アミノ酸配列から予測されるペプチドの疎水性と保持時間の関係

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×5 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 0% B→75% B リニアグラジエント (11.25 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 215 nm  
 温度：40 °C  
 注入量：10 μL

### 3-5 グラジエント時間の影響

流速一定の条件でグラジエント時間を変化させた場合の分離度への影響を図9に示します。グラジエント時間が長くなるほど、保持時間が近接したタンパク質（チトクロム c (ウシ) とチトクロム c (ウマ)、および  $\alpha$ -キモトリプシノーゲンAとカルボニックアンヒドラーゼ)間の分離度は向上しましたが、分離を改善する効果はだんだん小さくなりました。長さの異なるカラム (4.6 mm I.D.×15 cm、4.6 mm I.D.×5 cm) でグラジエント時間の影響を比較すると、長いグラジエント時間で測定を行う場合には4.6 mm I.D.×15 cmカラムを使用したほ

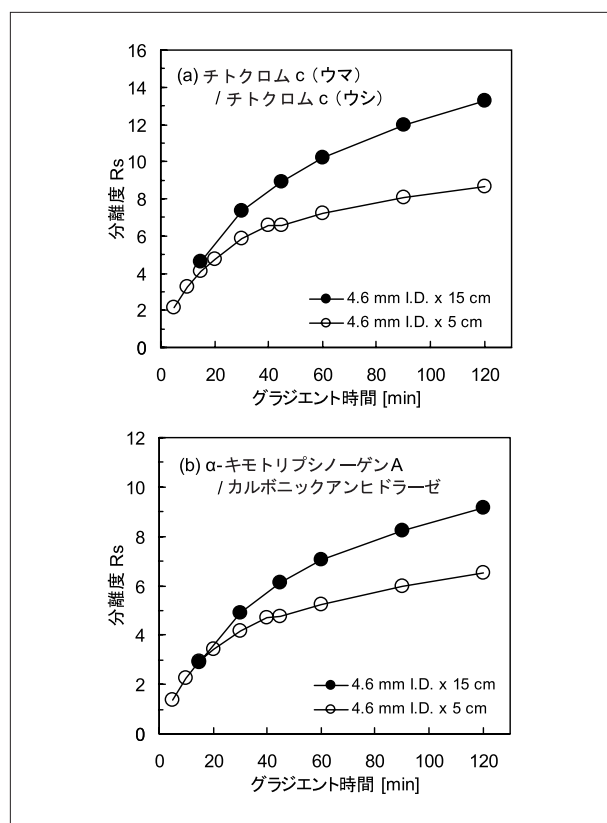


図9 グラジエント時間がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm),  
TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×5 cm)  
溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
A→B リニアグラジエント (5~120 min)

流速：1.0 mL/min  
検出：UV 215 nm  
温度：40 °C  
注入量：10  $\mu$ L

試料：(a) チトクロム c (ウマ), チトクロム c (ウシ)  
(b)  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A, カルボニック  
アンヒドラーゼ  
(各1  $\mu$ g)

うが高い分離度が得られましたが、グラジエント時間が短い場合には、カラムの長さによる分離度の違いは小さくなりました。この結果から、高分離能を目的とする場合には長いカラムを用いてグラジエント時間を長くし、ハイスループット分析を目的とする場合には短いカラムを用いてグラジエント時間を短くする使い方が好ましいといえます。

ペプチド試料を用いて算出したピークキャパシティ ( $P_c$ ; 分離度Rs=1で分離することができる最大のピーク数<sup>2)</sup>) についても、タンパク質と同様の結果が得られました (図10)。

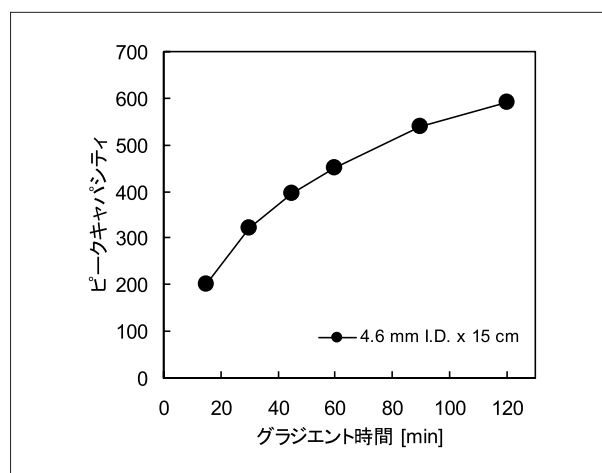


図10 グラジエント時間がペプチドの分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
A→B リニアグラジエント (15~120 min)

流速：1.0 mL/min  
検出：UV 215 nm  
温度：40 °C  
注入量：10  $\mu$ L

試料： $\delta$ -睡眠誘導ペプチド,  
メチオニン-エンケファリン, プラジキニン,  
エレドイシン関連ペプチド, アンジオテンシン I,  
サブスタンス P, ソマトスタチン,  
 $\beta$ -エンドルフィン,  
インスリン, ガストリン I (各0.25  $\mu$ g)

ピークキャパシティ ( $P_c$ ) の算出式

$$P_c = 1 + \frac{t_G}{1.7 \cdot w_{0.5}}$$

$t_G$ ：グラジエント時間

$w_{0.5}$ ：測定した10種類のペプチド試料のピーク半値幅の平均



### 3-6 流速の影響

グラジエント時間一定の条件で流速を変化させた場合の分離度への影響を図11に示します。保持時間が近接

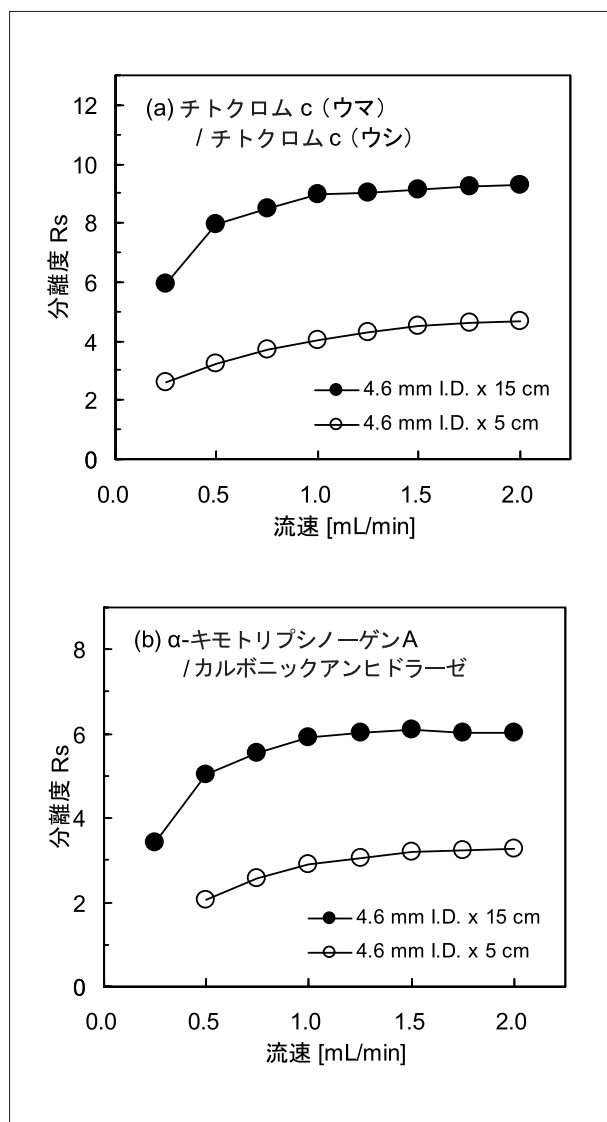


図11 流速がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm),  
TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×5 cm)  
溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
A→B リニアグラジエント  
45 min (4.6 mm I.D.×15 cm), 15 min (4.6 mm I.D.×5 cm)

流速：0.25~2.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40℃

注入量：10  $\mu$ L

試料：(a) チトクロム c (ウマ), チトクロム c (ウシ)  
(b)  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A, カルボニック  
アンヒドラーゼ  
(各1  $\mu$ g)

したタンパク質 (チトクロム c (ウシ) とチトクロム c (ウマ)、および  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A とカルボニックアンヒドラーゼ) 間の分離度は、流速が大きいほど向上しましたが、1.0 mL/min以上 (線速度6 cm/min以上) では流速の影響が小さくなりほぼ一定の分離度を示しました。また、ペプチド試料を用いて算出したピークキャパシティについても、タンパク質と同様の結果が得られました (図12)。この結果から、流速は4.6 mm I.D. カラムの場合1.0 mL/min程度、2.0 mm I.D.カラムの場合0.2 mL/min程度が適当であると考えられます。

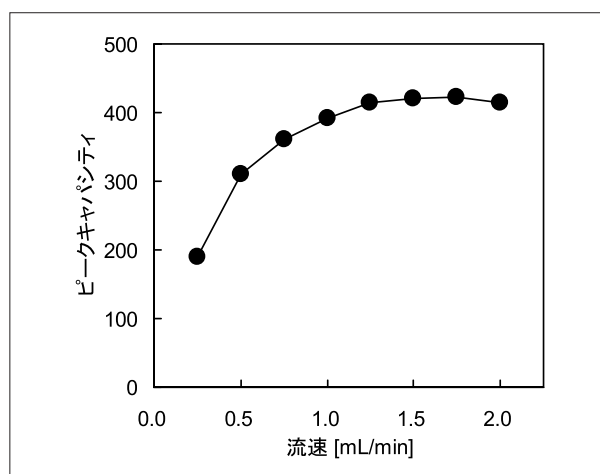


図12 流速がペプチドの分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：0.25~2.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40℃

注入量：10  $\mu$ L

試料： $\delta$ -睡眠誘導ペプチド,

メチオニン-エンケファリン, ブラジキニン,

エレドイシン関連ペプチド, アンジオテンシン I,

サブスタンス P, ソマトスタチン,  $\beta$ -エンドルフィン,

インスリン, ガストリン I

(各0.25  $\mu$ g)

ピークキャパシティの算出式は図10と同じ

低い流速でグラジエント測定を行う場合には、使用するシステムによっては、カラム外の流路（インジェクター、配管、検出器）における拡散や、不十分なグラジエント精度などに起因して分離性能および再現性が低下するおそれがあります。この場合、測定中のカラム圧力が最大使用圧力を超えない範囲で流速を大きくすることにより分離が改善される場合があります。

### 3-7 測定条件による選択性の変化

一般的に、アイソクラティック条件による逆相クロマトグラフィーでは、溶離液の有機溶媒濃度  $\phi$  と試料の保持力  $\log k'$  ( $k'$ : 保持係数) はほぼ直線関係にあり、その傾き  $S$  (アイソクラティックパラメーター) の値は試料によって異なることが知られています。このため、 $S$  値が異なる試料をアイソクラティック条件で測定する場合、溶離液の有機溶媒濃度を変えることによって分離係数  $\alpha = k'_2/k'_1$  が変化します。同様にグラジエント測定においても、有機溶媒濃度のグラジエント勾配に影響を与える因子 (グラジエント時間、流速、カラムの長さ) を変化させることによって分離の選択性が変わり、ピークの溶出パターンが変化します。グラジエント時間 (a)、および流速 (b) を変えて標準ペプチドの測定を行ったときのクロマトグラムの変化を図13に示します。

便宜上ブラジキニン (ピーク2)、ソマトスタチン (ピーク6)、ガストリン I (ピーク9) の溶出位置が一致するように横軸のスケールを調整しましたが、グラジエ

ント時間、および流速を変えた何れの場合も選択性が異なるピークが見られました。ここではインスリン (ピーク8) の変化に着目し矢印を記しました。

選択性を維持したまま測定条件を変更したい場合には、 $t_G F/V_0 \Delta\phi$  ( $t_G$ : グラジエント時間、 $F$ : 流速、 $V_0$ : カラム空隙容量、 $\Delta\phi$ : グラジエントの始点から終点にかけての有機溶媒濃度の変化量) の値が一定となるように測定条件を設定する必要があります。具体例を図14に示します。図13と同様にソマトスタチン (ピーク2)、ガストリン I (ピーク5) の溶出位置が一致するように横軸のスケールを調整しました。 $t_G F/V_0 \Delta\phi$  の値が一定 ((a)、(b) とも上段と下段のクロマトグラム) の場合は他のピークを選択性も変化していないことがわかります。ここではインスリン (ピーク4) の変化に着目し矢印を記しました。詳しくは成書をご参照ください (L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland, (邦訳) 高橋 昭、荒木 峻、「高速液体クロマトグラフィーの実際」、p.154、東京化学同人 (1992))。

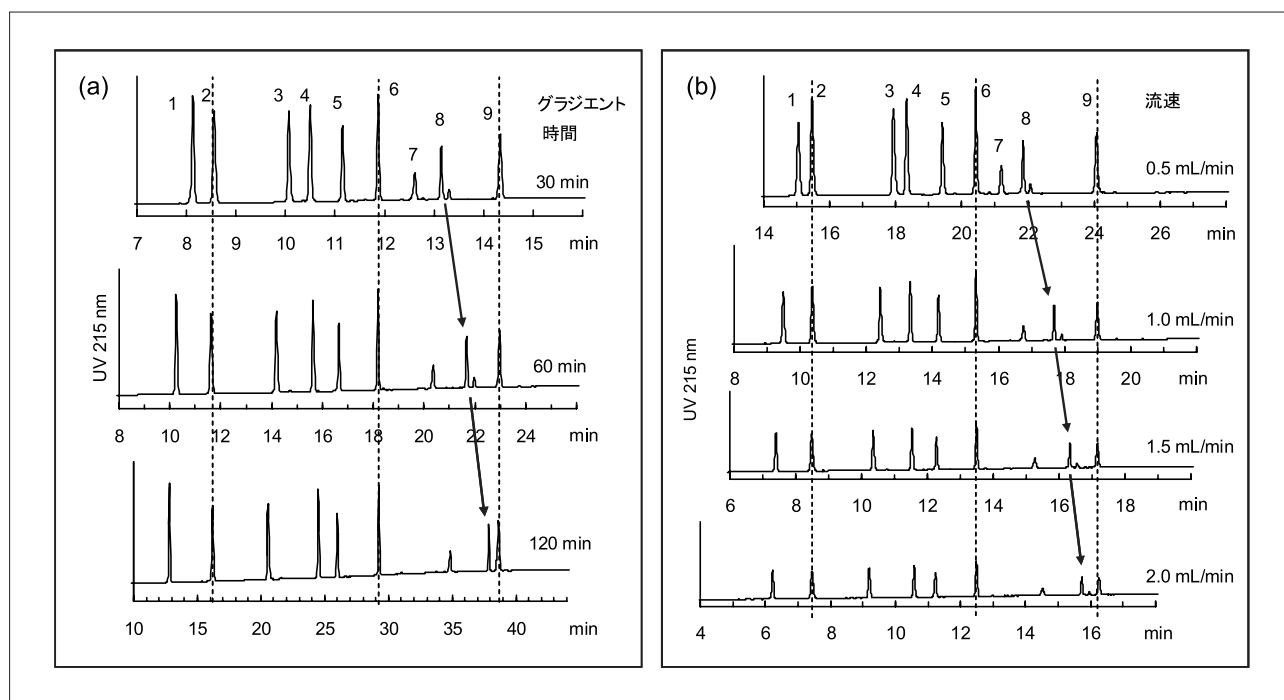


図13 測定条件による標準ペプチド試料の分離選択性の変化

カラム: TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm ID.×15 cm)  
 溶離液: A: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B: H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント, (a) 30~120 min,  
 (b) 45 min  
 流速: (a) 1.0 mL/min, (b) 0.5~2.0 mL/min  
 検出: UV 215 nm  
 温度: 40 °C  
 注入量: 10  $\mu$ L

試料: 1. メチオニン-エンケファリン  
 2. ブラジキニン  
 3. エレドイシン関連ペプチド  
 4. アンジオテンシン I  
 5. サブスタンス P  
 6. ソマトスタチン  
 7.  $\beta$ -エンドルフィン  
 8. インスリン  
 9. ガストリン I  
 (各 0.25  $\mu$ g)

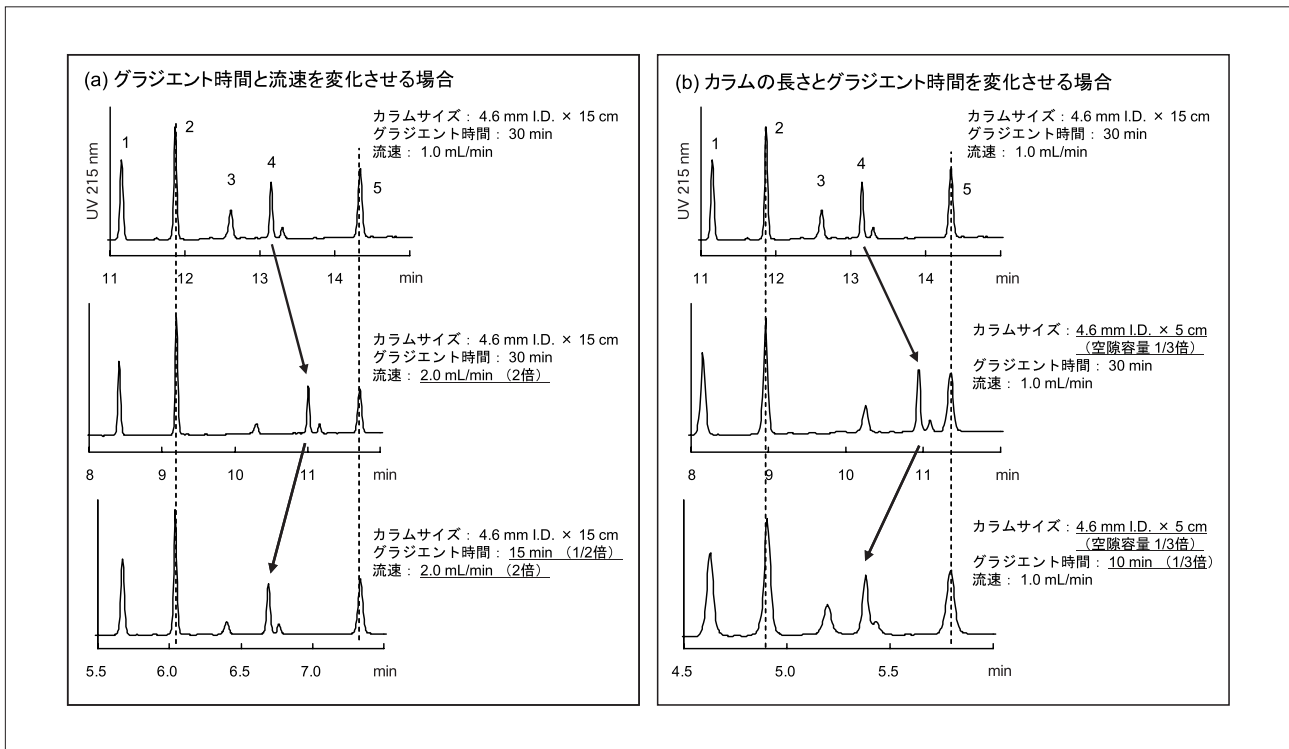


図14 分離選択性の合理的な制御

カラム：TSKgel Protein C4-300

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. サブスタンス P

2. ソマトスタチン

3. β-エンドルフィン

4. インスリン

5. ガストリン I

(各0.25 μg)

※カラムサイズ、グラジエント時間、流速は図中に記載

### 3-8 イオンペア試薬の影響

RPCでタンパク質を分離する場合には、イオンペア試薬としてトリフルオロ酢酸 (TFA) を添加した溶離液を用いるのが一般的です。

溶離液中のTFA濃度が分離に及ぼす影響を図15および図16に示します。TFA濃度が0.02~0.1 %の範囲ではタンパク質、ペプチドともに良好な分離が得られました。ペプチド試料ではTFA濃度の違いによる選択性的変化が観察されました。TFA濃度が0.01 %以下になると、

一部のタンパク質でピークの顕著なリーディング・テールリングが観察されました。ペプチドではピークのリーディング・テールリングは観察されませんでした。ピーク幅が若干大きくなりピークキャパシティ ( $P_c$ ) が低下しました。また、0.1 %よりも高いTFA濃度を用いることは、LC/MSにおける感度低下やカラム劣化の原因となるため好ましくありません。これらの結果から、タンパク質、ペプチドの測定におけるTFA濃度は0.02~0.1 %程度が適当であると考えられます。

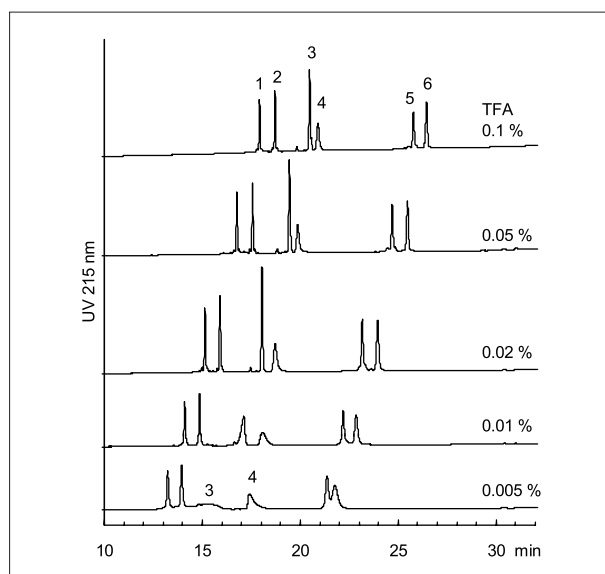


図15 TFA濃度がタンパク質の分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.005~0.1 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.005~0.1 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. チトクロム c (ウマ)  
 2. チトクロム c (ウシ)  
 3. リゾチーム  
 4. ラクトフェリン (ヒト)  
 5. α-キモトリプシノーゲン A  
 6. カルボニックアンヒドラーゼ  
 (各1 μg)

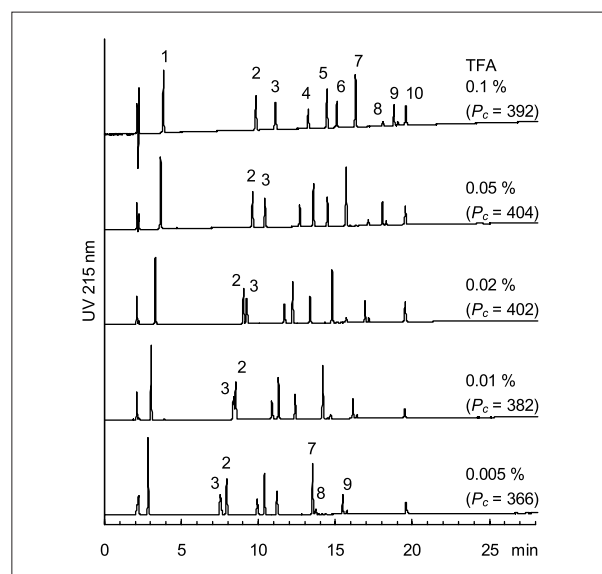


図16 TFA濃度がペプチドの分離に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.005~0.1 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.005~0.1 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. δ-睡眠誘導ペプチド  
 2. メチオニン-エンケファリン  
 3. ブラジキニン  
 4. エレドイシン関連ペプチド  
 5. アンジオテンシン I  
 6. サブスタンス P  
 7. ソマトスタチン  
 8. β-エンドルフィン  
 9. インスリン  
 10. ガストリン I  
 (各0.25 μg)

ピークキャパシティ ( $P_c$ ) の算出式は図10と同じ

TFAの代わりに過塩素酸やリン酸をイオンペア試薬として使用することも可能です。測定例を図17に示します。過塩素酸やリン酸は短波長における吸光度が低いいため、UV検出器を使用する測定においてはベースライン変動やゴーストピークの低減が期待できます。反面、これらの試薬は不揮発性であるため、LC/MSや蒸発光散乱検出器 (ELSD) などによる検出には適しません。

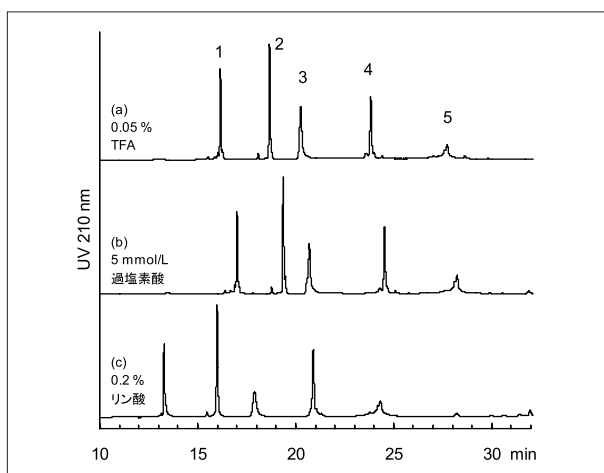


図17 イオンペア試薬として過塩素酸およびリン酸を用いた場合のタンパク質試料のクロマトグラム

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm)  
 溶離液：(a) A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 (b) A：5 mmol/L HClO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=90/10 (v/v/v)  
 B：5 mmol/L HClO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN=20/80 (v/v/v)  
 (c) A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=90/10/0.2 (v/v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>=20/80/0.2 (v/v/v/v)  
 (a) ~ (c) のいずれも、A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 210 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. チトクロム c (ウマ)

2. リゾチーム

3. ウシ血清アルブミン

4. α-キモトリプシノーゲン A

5. オブアルブミン

(各2 μg)

### 3-9 温度の影響

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm) を用いた測定における、カラム温度が分離に及ぼす影響を図18および図19に示します。27~50 °Cの範囲においては、カラム温度が高いほどタンパク質のピークはシャープになり、チトクロムcやα-キモトリプシノーゲン Aの主ピークに近接して溶出する不純物ピークの分離も改善されました。これは、温度が高いほど試料の拡散係数が大きくなり、細孔への出入りが速やかに行われるためであると考えられます。この結果から、タンパク質を測定する際のカラム温度は一般に40~50 °C付近が適切であると考えられます。ただし、高温下における長時間の使用はカラム劣化の原因となりますので注意が必要です。

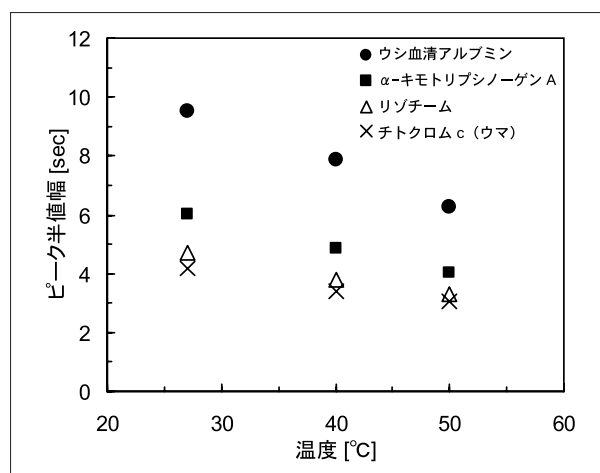


図18 カラム温度がタンパク質のピーク半値幅に及ぼす影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：27, 40, 50 °C

注入量：10 μL

試料：チトクロム c (ウマ), リゾチーム, ウシ血清ア

ルブミン, α-キモトリプシノーゲン A

(各2 μg)

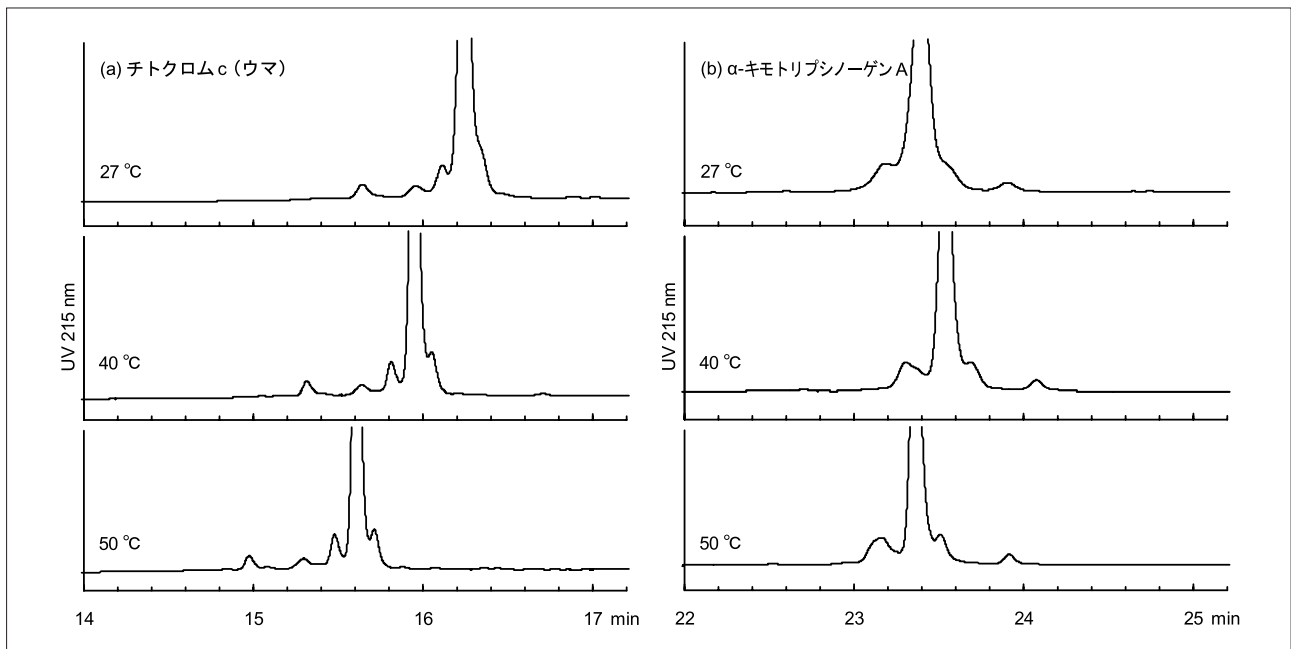


図19 カラム温度による不純物ピークの違い

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流 速：1.0 mL/min

検 出：UV 215 nm

温 度：27, 40, 50 °C

注入量：10 μL

試 料：チトクロム c(ウマ), α-キモトリブシノーゲン A  
(各 2 μg)

### 3-10 試料負荷量の影響

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm) を用いた測定における、試料負荷量とピーク幅の関係を図20に示します。タンパク質試料の場合、負荷量が3 μg程度まではピーク幅はほぼ一定ですが、3 μgより大きくなると過負荷によるピーク幅の増大が観察されました。また、ペプチド試料ではタンパク質の場合よりも少ない負荷量でピーク幅が増大し、疎水性が小さく保持が弱い試料ほど過負荷の影響が表れやすい傾向が見られました。

### 3-11 定量性

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm) を用いた測定における、試料負荷量とピーク面積の関係を図21に示します。ペプチド、および分子量が比較的小さ

いタンパク質試料については、検量線は10~1000 ngの範囲で原点を通る直線となり、定量性は良好でした。一方、分子量が大きいBSAやラクトフェリンでは、検量線は原点の下側を通り、30 ng以下の負荷量では定量することができませんでした。BSAやラクトフェリンのように固定相への吸着が見られる試料の微量分析を行う方法としては、(1) 溶離条件 (カラム温度、イオンペア試薬の濃度、種類など) を変更して吸着の抑制を図る、(2) 使用するカラムを内径および長さが小さいものに変更する、(3) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300よりも細孔径が大きいRPCカラム (TSKgel Phenyl-5PW RPなど)、あるいは充てん剤表面積が小さい非多孔性RPCカラム (TSKgel Octadecyl-NPRなど) を使用する、などが考えられます。

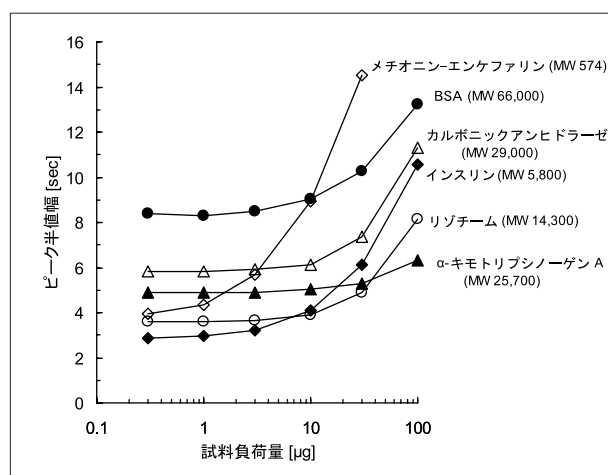


図20 試料負荷量のピーク幅への影響

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 245 nm

温度：40℃

注入量：100 μL

試料：メチオニン-エンケファリン (MW 574)

インスリン (MW 5,800)

リゾチーム (MW 14,300)

α-キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)

カルボニックアンヒドラーゼ (MW 29,000)

ウシ血清アルブミン (MW 66,000)

(各0.3~100 μg)



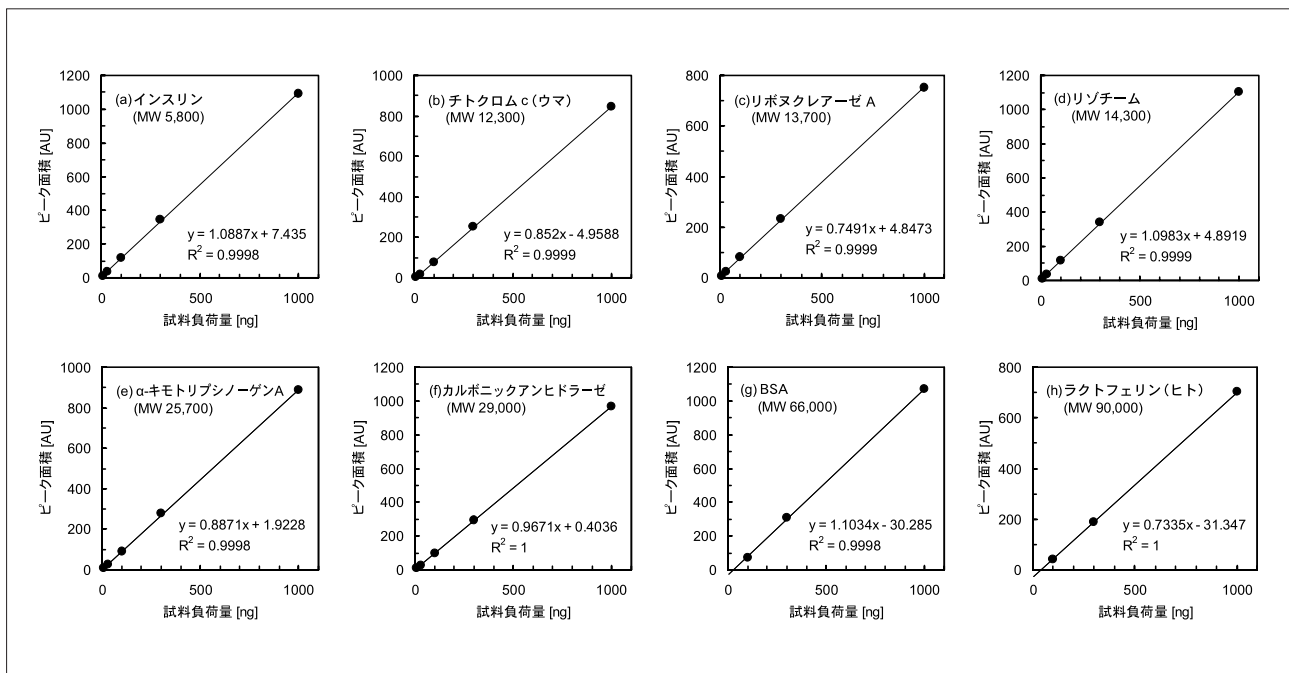


図21 試料負荷量とピーク面積の関係

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：100  $\mu$ L

試料：(a) インスリン (MW 5,800)

(b) チトクロム c (ウマ) (MW 12,300)

(c) リボヌクレアーゼ A (MW 13,700)

(d) リゾチーム (MW 14,300)

(e)  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A (MW 25,700)

(f) カルボニックアンヒドラーゼ (MW 29,000)

(g) ウシ血清アルブミン (BSA) (MW 66,000)

(h) ラクトフェリン (ヒト) (MW 90,000)

(各10~1000 ng)

### 3-12 他のTSKgel RPC カラムとの比較

官能基、粒子径、細孔径、および基材が異なる6種類のTSKgel RPC カラム (表4) を用いて、標準タンパク質および標準ペプチドの分離の比較を行いました。

標準タンパク質6種を同一条件で測定したクロマトグラムを図22に示します。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300を用いた場合に最も良好な分離が得られました。また、カラムによって一部のタンパク質 (特にラクトフェリン) のピーク面積に大きな違いが見られましたが、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300ではピーク面積の減少は観察されず、他のTSKgel RPC カラムとくらべて高い回収率が得られることが分かりました。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300とTSKgel ODS-100V 3 $\mu$ mはどちらも粒子径3 $\mu$ mのシリカゲルを基材としたRPCカラムですが、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300のほうがピークがシャープに溶出しており、官能基および細孔径の違いがタンパク質の分離に大きく寄与していることが分かります。

表4 比較した TSKgel RPC カラム

カラム	カラムサイズ (mm I.D. × cm)	粒子径 ( $\mu$ m)	細孔径 (nm)	基材
TSKgel Protein C <sub>4</sub> -300	4.6 × 15	3	30	シリカ
TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m	4.6 × 15	3	10	シリカ
TSKgel ODS-120T	4.6 × 15	5	12	シリカ
TSKgel Octadecyl-4PW	4.6 × 15	7	50	ポリマー
TSKgel Octadecyl-NPR	4.6 × 3.5	2.5	非多孔性	ポリマー
TSKgel Phenyl-5PW RP	4.6 × 7.5	10	100	ポリマー

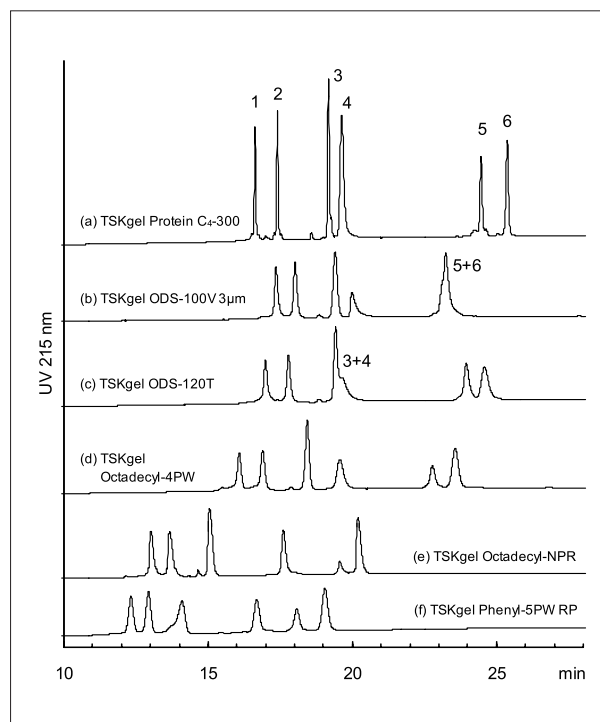


図22 他の TSKgel RPC カラムとの比較 (標準タンパク質試料)

カラム : (a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (b) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (c) TSKgel ODS-120T (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (d) TSKgel Octadecyl-4PW (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (e) TSKgel Octadecyl-NPR (4.6 mm I.D.×3.5 cm)  
 (f) TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6 mm I.D.×7.5 cm)

溶離液 : A : H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)

B : H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)

A→B リニアグラジエント (45 min)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV 215 nm

温度 : 40 °C

注入量 : 10  $\mu$ L

試料 : 1. チトクロム c (ウマ)

2. チトクロム c (ウシ)

3. リゾチーム

4. ラクトフェリン (ヒト)

5.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A

6. カルボニックアンヒドラーゼ  
(各1  $\mu$ g)

標準ペプチド10種を同一条件で測定したクロマトグラムを図23に示します。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300およびTSKgel ODS-100V 3 $\mu$ mを用いた場合に最もシャープなピークが得られ、逆にポリマー系カラム3種類を用いた場合にはピークがブロードになりました。また、一部のペプチドの溶出順序の逆転が見られ、カラムによってペプチドの分離選択性に違いがあることが分かりました。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300とTSKgel ODS-100V 3 $\mu$ mのクロマトグラムを比較すると、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300では $\delta$ -睡眠誘導ペプチド（ピーク1）の保持が弱いことから、分子量が小さく疎水性が低いオリゴペプチドを測定する際にはTSKgel ODS-100V 3 $\mu$ mのほうが良好な分離が得られやすいと考えられます。一方、TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ mではガストリン I（ピーク10）のピーク面積が小さいことから、分子量が大きく疎水性が高いペプチドを測定する際にはTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300のほうが高い回収率が得られやすいと考えられます。

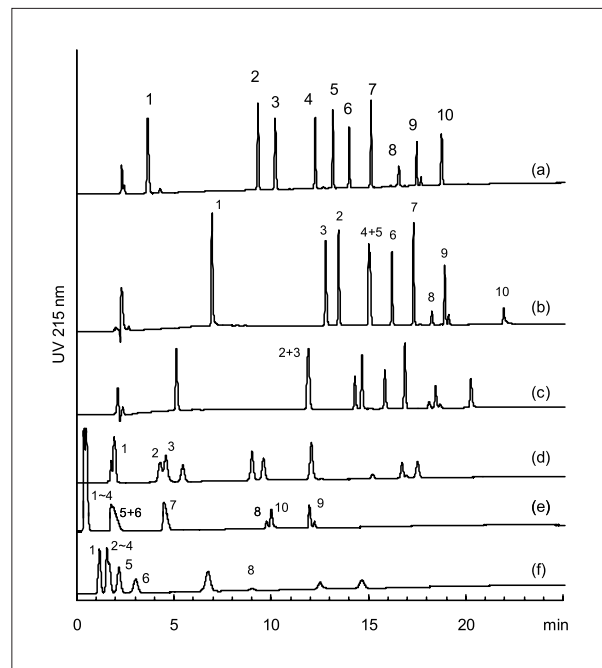


図23 他の TSKgel RPC カラムとの比較（標準ペプチド試料）

カラム：(a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (b) TSKgel ODS-100V 3 $\mu$ m (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (c) TSKgel ODS-120T (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (d) TSKgel Octadecyl-4PW (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 (e) TSKgel Octadecyl-NPR (4.6 mm I.D.×3.5 cm)  
 (f) TSKgel Phenyl-5PW RP (4.6 mm I.D.×7.5 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10  $\mu$ L

試料：1.  $\delta$ -睡眠誘導ペプチド  
 2. メチオニン-エンケファリン  
 3. プラジキニン  
 4. エレドイシン関連ペプチド  
 5. アンジオテンシン I  
 6. サブスタンス P  
 7. ソマトスタチン  
 8.  $\beta$ -エンドルフィン  
 9. インスリン  
 10. ガストリン I  
 (各 0.25  $\mu$ g)

### 3-13 市販のタンパク質分析用RPCカラムとの比較

標準タンパク質の分離についてTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300と市販のタンパク質分析用RPCカラム6種類を比較した結果を図24に示します。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300で

は市販カラムよりも高い分離能が得られました。また図25に示すように、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300で得られたピーク面積は他のカラムと同程度であり、回収率も良好でした。

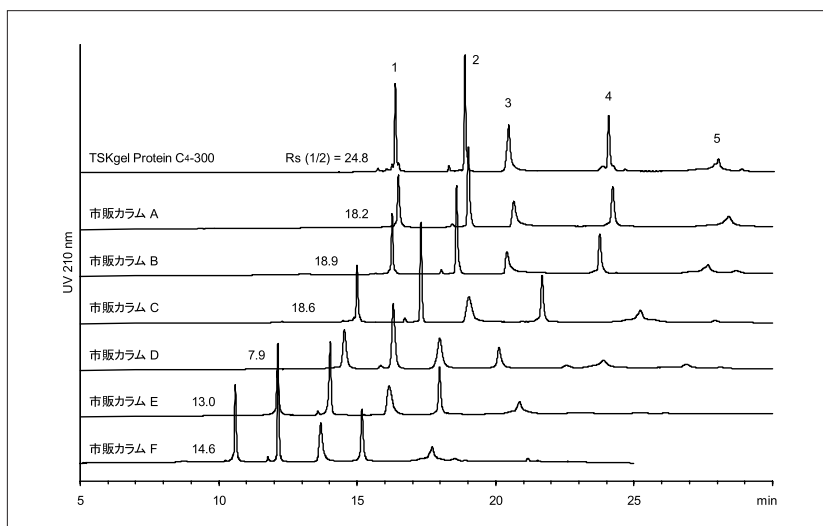


図24 市販のタンパク質分析用RPCカラムとの比較

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (3 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPC (C<sub>4</sub>) カラム A (5 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPC (C<sub>4</sub>) カラム B (5 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPC (C<sub>4</sub>) カラム C (3.5 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPC (C<sub>4</sub>) カラム D (5 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPCカラム E (3 μm, 4.6 mm I.D.×15 cm)  
 市販RPC (C<sub>4</sub>) カラム F (3 μm, 4.6 mm I.D.×10 cm)

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min, カラムFのみ30 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 210 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. チトクロム c (ウマ)

2. リゾチーム

3. ウシ血清アルブミン

4. α-キモトリプシノーゲン A

5. オブアルブミン

(各2 μg)

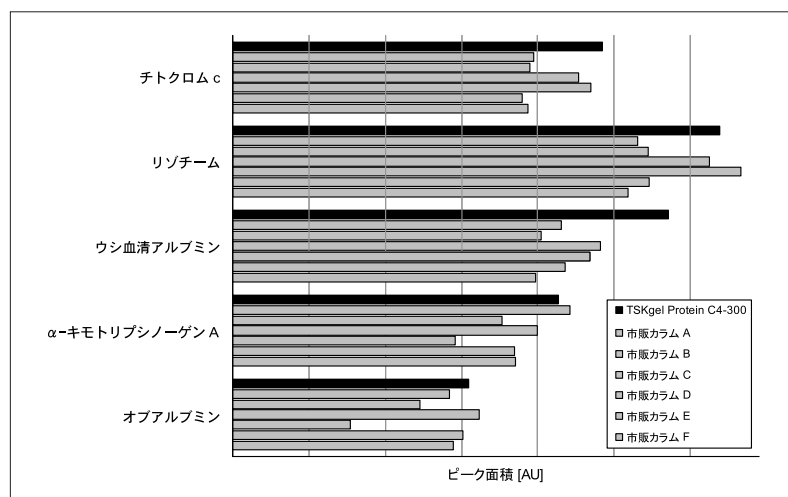


図25 標準タンパク質のピーク面積比較

## 4. 分離例

### 4-1 ハイスループット分析

測定時間の短縮が要求されるハイスループット分析においては、短いカラム（5 cm）を用い、最大使用圧力を超えない範囲で流速をなるべく大きく設定して、必要な分離が達成できるようにグラジエント条件を調整する方法が有効です。

TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300（2.0 mm I.D.×5 cm）を用いて標準タンパク質6種を2 min以内に分離したクロマトグラムを図26に示します。市販のワイドポアRPCカラム（充填剤：5 μm表面多孔性（コアシェル）粒子、カラムサイズ：2.1 mm I.D.×7.5 cm）と比較すると、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300ではテーリングが小さくシャープなピークが得られ、ハイスループット分析においても分離能に優れていることがわかります。

なお、ハイスループット分析においてはピーク幅が非常に小さくなるため、最良の結果を得るためには、カラム外における拡散の低減、検出器のレスポンス、データ取り込み間隔などにも十分留意する必要があります。

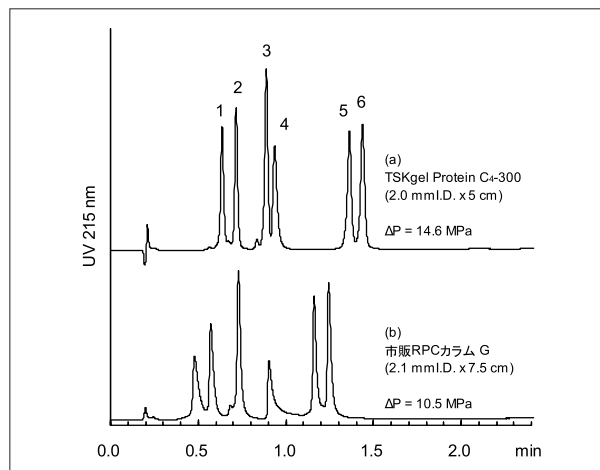


図26 標準タンパク質のハイスループット分析

カラム：(a) TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300（3 μm, 2.0 mm I.D.×5 cm）

(b) 市販RPCカラム G（5 μmコアシェル粒子, 2.1 mm I.D.×7.5 cm）

溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05（v/v/v）

B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05（v/v/v）

25% B→75% B リニアグラジエント（2 min）

流速：0.8 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：40 °C

注入量：10 μL

試料：1. チトクロム c（ウマ）

2. チトクロム c（ウシ）

3. リゾチーム

4. ラクトフェリン（ヒト）

5. α-キモトリプシノーゲン A

6. カルボニックアンヒドラーゼ

（各1 μg）

## 4-2 ペプチドマッピング

タンパク質をトリプシン消化などの方法によって分解し、得られたペプチド断片をRPCによって分離してアミノ酸配列を解析する手法は「ペプチドマッピング」と呼ばれています。ペプチドマッピングには、数十～数百種類ものペプチド断片が分離できる高い分離性能が必要とされるため、長いカラム（15 cm）を用いた、緩やかなグラジエント勾配での測定が有効です。

TSKgel Protein C4-300（4.6 mm I.D.×15 cm）を用いてBSAのトリプシン消化物を分離したクロマトグラム

を図27に示します。消化時間が異なる2サンプルのクロマトグラムを重ね合わせることにより、消化が進行するにつれて各ピークの高さが変化している様子が分かります。

グラジエント時間によるピークキャパシティの変化を図28に示します。複雑なペプチド混合物を分析する場合、グラジエント時間を長くすることによってより多くのピークを分離することができるようになります。

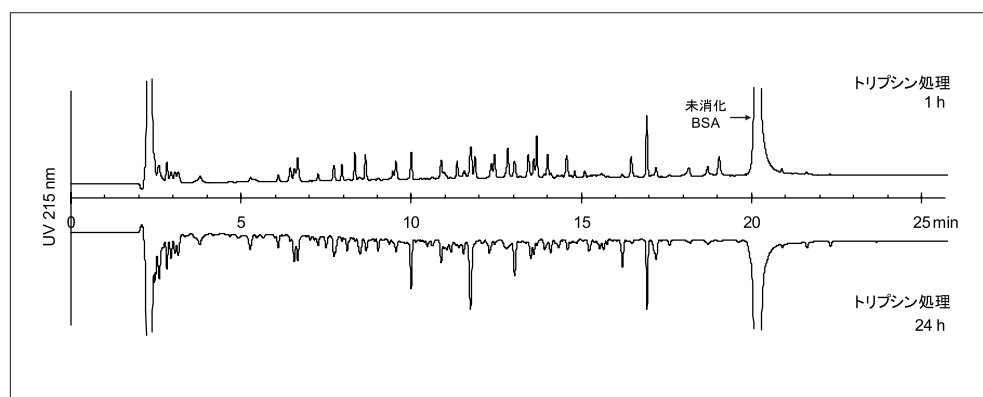


図27 BSA のトリプシン消化物の分離

カラム：TSKgel Protein C4-300（4.6 mm I.D.×15 cm）  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05（v/v/v）  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05（v/v/v）  
 A→B リニアグラジエント（45 min）

流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 215 nm  
 温度：40 °C  
 注入量：10 μL

試料：BSAのトリプシン消化物  
 （処理時間：A. 1 h, B. 24 h）  
 （各 20 μg）

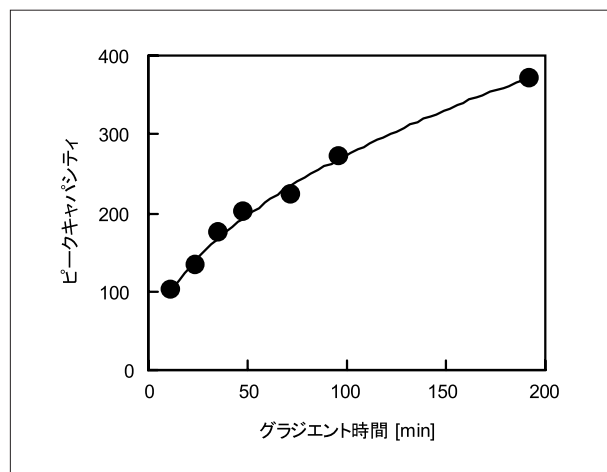


図28 グラジエント時間によるピークキャパシティの変化

ピークキャパシティ ( $P_c$ ) の算出式

$$P_c = 1 + \frac{t_R - t_0}{1.7 \cdot w_{0.5}}$$

$t_R$ ：未消化BSAの溶出時間

$t_0$ ：デッドタイム

（溶離液がカラムを通過する時間）

$w_{0.5}$ ：ピーク高さが上位5本までのペプチド断片ピークの半値幅の平均

### 4-3 PEG化タンパク質

ポリエチレングリコール (PEG) をタンパク質に結合させることによって、タンパク質の免疫原性の低下、酵素による加水分解の抑制などの効果が得られることが知られています。毒性の軽減や薬物動態の改善を目的としたタンパク質のPEG化は、いくつかのバイオ医薬品において既に実用化されています。

平均分子量5,000および30,000のPEGを結合させたりゾチームをSECによって分子サイズごとに分離し (図

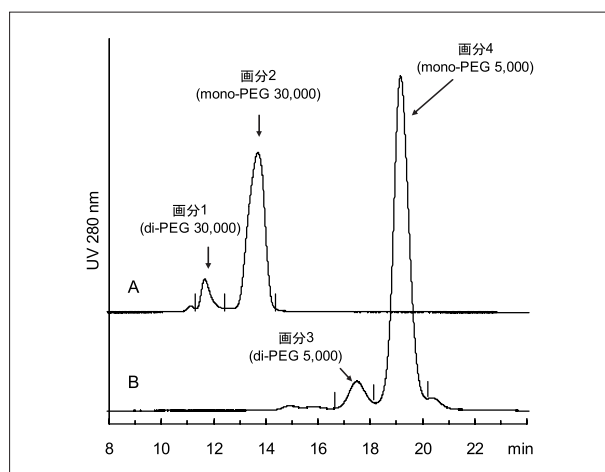


図29 SEC (TSKgel SuperSW3000) によるPEG化リゾチームの分離

カラム：TSKgel SuperSW3000 (4.6 mm I.D.×30 cm×2本)  
 溶離液：0.2 mol/Lリン酸緩衝液 + 0.05% NaN<sub>3</sub> (pH 6.7)  
 流速：0.35 mL/min  
 検出：UV 280 nm  
 温度：25 °C  
 注入量：50 μL  
 試料：A. PEG化リゾチーム (PEG分子量：5,000) (5 g/L)  
 B. PEG化リゾチーム (PEG分子量：30,000) (5 g/L)

29)、得られた画分をTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300で分析しました (図30)。PEG化リゾチームは未修飾リゾチームよりも強くカラムに保持され、PEGの分子量や、リゾチーム1分子に結合したPEGの数によって保持時間が異なることが分かりました。未修飾リゾチームと比較してPEG化リゾチームではピーク幅が広がっていますが、これはリゾチームに結合したPEGが分子量分布を持っているためであると推測されます。

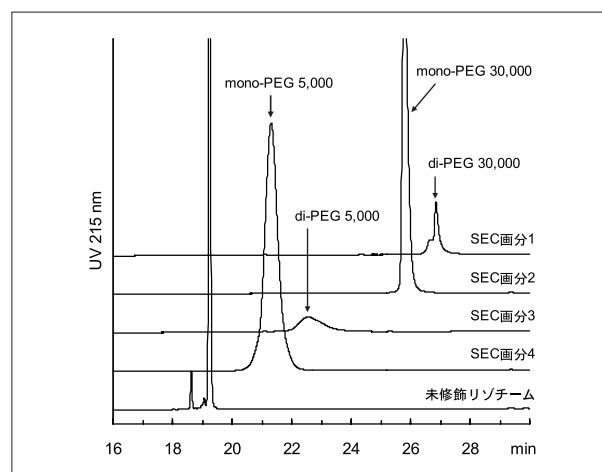


図30 RPC (TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300) によるPEG化リゾチームの分離

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm I.D.×15 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 215 nm  
 温度：40 °C  
 注入量：100 μL  
 試料：未修飾リゾチーム (0.1 g/L), SEC画分1~4

#### 4-4 モノクローナル抗体 (IgG)

抗体医薬品として実用化されているモノクローナル抗体 (IgG) は、製造工程や保存中においてアミノ酸配列、糖鎖構造、ジスルフィド結合などの不均一化が生じる場合があることが知られています。不均一化によって生じた分子種は医薬品の有効性・安全性に影響を与えるおそれがあるため、不均一性の確認試験はバイオ医薬品の開発および品質管理において極めて重要となっています。ここでは、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300による不均一化IgGの分析例を示します。

IgGをジチオスレイトールで還元処理することによって得られたH鎖、L鎖をTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300で分析したクロマトグラムを図31に示します。1本のL鎖ピークと2本のH鎖ピークが観察されました。このIgGはH鎖を構成するアミノ酸配列に何らかの変化が生じている、もしくはH鎖上に結合している糖鎖の構造が異なっているものと推測されます。

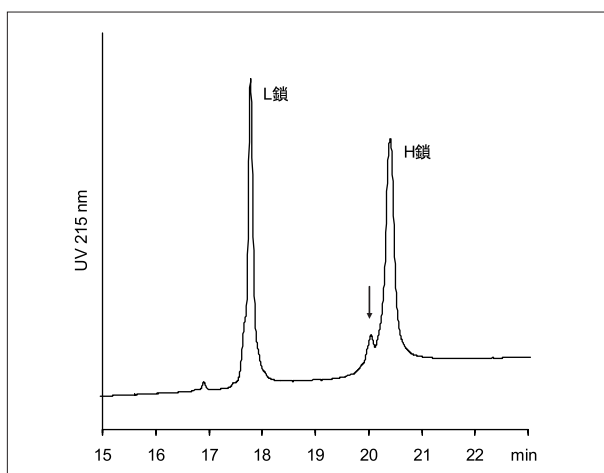


図31 ジチオスレイトールで還元処理した IgG の分離

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm)  
溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
A→B リニアグラジエント (45 min)

流速：1.0 mL/min  
検出：UV 215 nm  
温度：50 °C  
注入量：100 μL  
試料：還元型モノクローナルIgG (マウス)

上記とは由来が異なるIgGについて、パパイン消化によってFab断片とFc断片に分解した後、SECによって分子量50,000相当および分子量100,000相当の画分を分離し (図32)、得られた画分をTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300で分析しました (図33)。分子量50,000画分中にはFab断片とFc断片が含まれていると推定されますが、TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300を用いたRPCでは5本のピークに分離されました。このIgGはアミノ酸配列もしくは糖鎖構造が不均一であるものと推測されます。

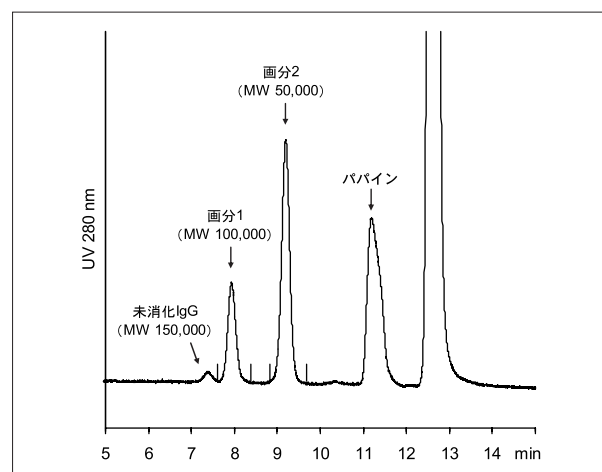


図32 SEC (TSKgel SuperSW3000) によるIgG のパパイン消化物の分離

カラム：TSKgel SuperSW3000 (4.6 mm ID.×30 cm)  
溶離液：0.2 mol/Lリン酸緩衝液 + 0.05% NaN<sub>3</sub> (pH 6.7)  
流速：0.35 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25 °C  
注入量：100 μL  
試料：モノクローナルIgG (マウス) のパパイン消化物



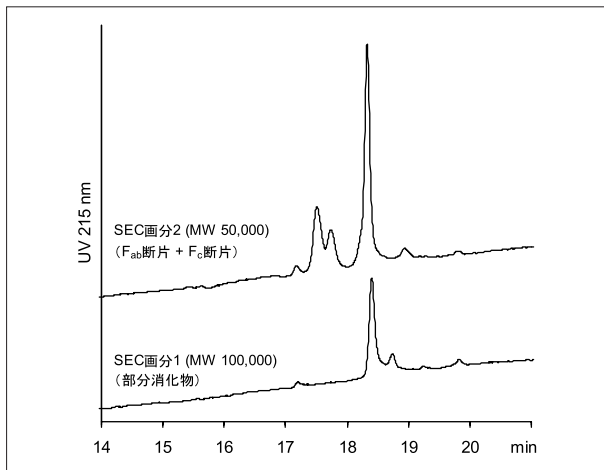


図33 RPC (TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300) によるIgG のパ  
 イン消化物の分離

カラム：TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300 (4.6 mm ID.×15 cm)  
 溶離液：A：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)  
 B：H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)  
 A→B リニアグラジエント (45 min)

流 速：1.0 mL/min

検 出：UV 215 nm

温 度：50 °C

注入量：100 μL

試 料：SEC画分1, 2

## 5. おわりに

以上、タンパク質の高速・高分離分析に適した分離特性を有するRPCカラムTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300についてご紹介いたしました。粒子径3 μm、細孔径30 nmの多孔性シリカゲルの表面にブチル基を導入したTSKgel Protein C<sub>4</sub>-300によって、従来のRPCカラムでは測定が困難であった高分子量・高疎水性のタンパク質を、良好なピーク形状と回収率で分離することが可能となります。今後さらなる市場の拡大が予想されるバイオ医薬品の開発や品質管理において、純度・不均一性の確認試験は不可欠なものです。TSKgel Protein C<sub>4</sub>-300はそのための有力な分析手段を提供します。

## (参考文献)

- 1) Sasagawa, T. *et al.*, *J. Chromatogr.*, 240, 329-340 (1982)
- 2) Neue, U., D., *J. Chromatogr. A*, 1184, 107-130 (2008)

※“TSKgel”は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2  
大阪支店 バイオエッセンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
名古屋支店 バイオエッセンス ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7  
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2  
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1  
山口営業所 ☎(0834) 63-9888 〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1  
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>

東ソーHLCデータベース <http://www2.tosoh.co.jp/hlc/hlcdb.nsf/StartJ?OpenForm>