

# SEPARATION REPORT

## 超高性能逆相クロマトグラフィ用充填カラム TSKgel Octadecyl-NPRによるタンパク質 及びペプチドの分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
(1) 溶離液	1
(2) HPLCシステム	1
(3) 洗浄再生	2
3. 基本的性質	3
(1) タンパク質及びペプチドの分離	3
(2) 回収率	4
4. 溶離条件の影響	6
(1) イオンペア試薬の影響	6
(2) ペプチドの分離に対する溶離液のpHの影響	12
(3) 流速の影響	13
(4) グラジエント時間の影響	14
(5) 試料負荷量	15
(6) 標準的溶離条件	18
5. 応用例	19
(1) タンパク質の純度検定	19
(2) プロテアーゼ消化ペプチドの分離	20
6. おわりに	21

## 1. はじめに

近年、液体クロマトグラフィの進歩はめざましく、すべての分離モードにおいて、高速化、高性能化が達成されました。しかし、ほとんどの分離モードには多孔性充填剤が使用されています。多孔性充填剤を用いた高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)の超高性能化は、充填剤の粒子径を小さくすることによって試みられています。これに対して、最近、当社は充填剤の細孔をなくし、しかも従来の充填剤より粒子径を小さくすることによって超高性能化したイオン交換クロマトグラフィ(IEC)用充填剤を開発しました(セパレーションレポートNo.056、057、058参照)。この非多孔性充填剤では、充填剤内部での試料の拡散が起こらないため、試料ピークの広がりを抑えることができます。したがって、非多孔性充填剤は、従来の多孔性充填剤よりも優れた分離能を持ちます。さらに、粒子径 $2.5\mu\text{m}$ という微細粒子のため、分離時間は、わずか10分以内と大幅に短縮され、超高性能IECが実現されました。

本稿では、非多孔性親水性樹脂の表面にオクタデシル基を導入したTSKgel Octadecyl-NPRの基本的性質、溶離条件の影響及びタンパク質、ペプチドの分離への応用例について紹介します。

## 2. カラム使用上の注意

非多孔性逆相クロマトグラフィ用充填カラムTSKgel Octadecyl-NPRは、微量試料でも分離分析できる非常に高性能のカラムです。しかし一方では、このカラムは汚れに対しても非常に敏感です。したがって、このカラムを効果的に使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填カラムよりも一層の注意が必要です。

### (1) 溶離液

カラムは試料中の汚れによる汚染のほか、溶離液に使用した水や試薬中の不純物により汚染されます。したがって、水および有機溶媒はHPLC用グレードを使用して下さい。また、イオンペア試薬等に用いる試薬類はHPLC用グレードまたは特級品を使用して下さい。さらに、溶離液はフィルタ( $0.22\mu\text{m}$ または $0.45\mu\text{m}$ )で濾過したものを使用して下さい。

### (2) HPLCシステム

溶媒グラジエントは、デッドボリュームが少なく高精度で再現性の高い高圧(吐出)グラジエント方式を用いて下さい。また、カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、インジェクションバルブと送液ポンプの間にフィルタアッセイ(品番14594)と $0.45\mu\text{m}$ フィルタ(品番06280)を取り付けて下さい。流速 $1.0\text{ml}/\text{min}$ でシステムの圧力損失が $150\text{kg}/\text{cm}^2$ 以上に上昇した場合は、ラインフィルタが目づまりを起こしていると考えられますので、フィルタを交換して下さい。

### (3) 洗浄再生

TSKgel Octadecyl-NPRは樹脂ベースの逆相クロマトグラフィ用充填剤ですので、優れた化学的安定性を有しています。したがって、アルカリ性溶液による洗浄が可能です。分離性能の低下の原因のひとつとして、試料中の不純物の充填剤への吸着によるカラムの劣化が考えられます。このような場合、カラムをアルカリ性溶液(0.1 N NaOH)で洗浄すると分離性能が回復することがあります。

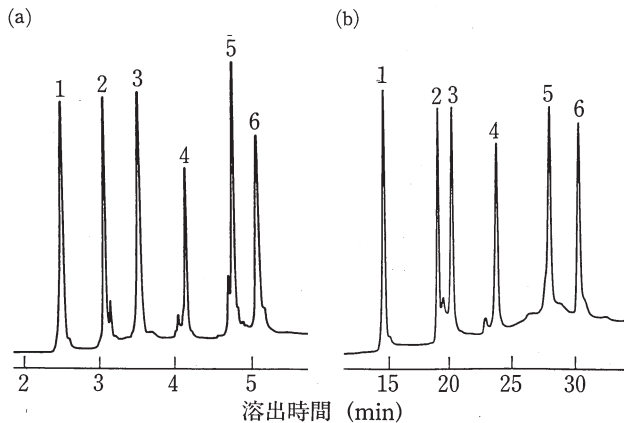


図-1 TSKgel Octadecyl-NPRとTSKgel Octadecyl-4PWの比較(1) — タンパク質混合物の分離

- (a) カラム；TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID  
×3.5cm  
溶離液；A：0.05%TFA+15%アセトニトリル  
B：0.05%TFA+80%アセトニトリル  
A→Bリニアグラジエント(10分)  
流速；1.5ml/min  
温度；25℃  
検出；UV(220nm)
- (b) カラム；TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID  
×15cm  
溶離条件；グラジエント時間及び流速を除き(a)と同じ  
グラジエント時間；60分  
流速；1.0ml/min  
温度；25℃  
検出；UV(220nm)  
試料；1. リボヌクレアーゼ 2. インシュリン 3. チトクロムC 4. リゾチーム 5. α-ラクトアルブミン 6. ミオグロビン  
(a) 各0.5μg (b) 各3μg

また、タンパク質、ペプチドの逆相クロマトグラフィでは、分離を行った後、ブランクグラジエントを行うと未回収の試料のピークがしばしば観察されます。このような場合、分離を行った直後に、グラジエント最終溶離液をカラムに流したまま、0.05~0.2N NaOHとアセトニトリルの混合液(1:1)をサンプルループより数回注入することによって、短時間でカラムを洗浄することができます。詳細については、カラムに添付されている取扱説明書を参照して下さい。

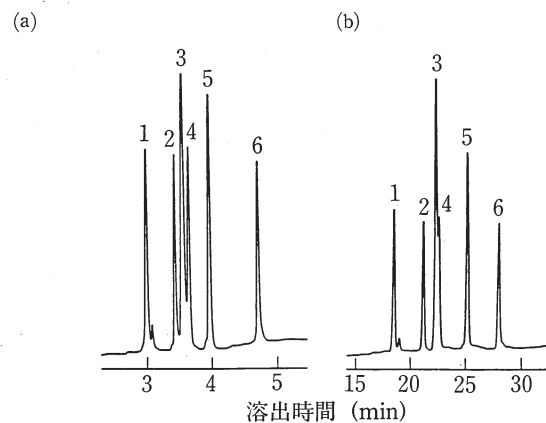


図-2 TSKgel Octadecyl-NPRとTSKgel Octadecyl-4PWの比較(2) — ペプチド混合物の分離

- (a) カラム；TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID  
×3.5cm  
溶離液；A：0.2%TFA  
B：0.2%TFA+80%アセトニトリル  
A→Bリニアグラジエント(10分)  
流速；1.5ml/min  
温度；25℃  
検出；UV(215nm)
- (b) カラム；TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID  
×15cm  
溶離条件；グラジエント時間及び流速を除き(a)と同じ  
グラジエント時間；60分  
流速；1.0ml/min  
温度；25℃  
検出；UV(215nm)  
試料；1. α-エンドルフィン 2. ボンベシン 3. γ-エンドルフィン 4. アンジオテンシンI 5. ソマスタチン 6. カルシトニン  
(a) 各0.5μg (b) 各3μg

### 3. 基本的性質

#### (1) タンパク質及びペプチドの分離

図-1、2に非多孔性充填剤TSKgel Octadecyl-NPRと従来の多孔性充填剤TSKgel Octadecyl-4PWの比較を示します。図-1はタンパク質混合物の分離の比較、図-2はペプチド混合物の分離の比較です。これらの図からわかるように、TSKgel Octadecyl-NPRとTSKgel Octadecyl-4PWのタンパク質、ペプチドに対する選択性

はほぼ同じです。しかし、非多孔性充填剤TSKgel Octadecyl-NPRのほうが、微量の試料(6分の1)を、短時間(6分の1)でしかも高分離能で分離できます。図-3、4に標準的溶離条件でのTSKgel Octadecyl-NPRによるタンパク質混合物及びペプチド混合物の分離例を示します。いずれの場合も6-7分という非常に短時間で高分離能が得られました。

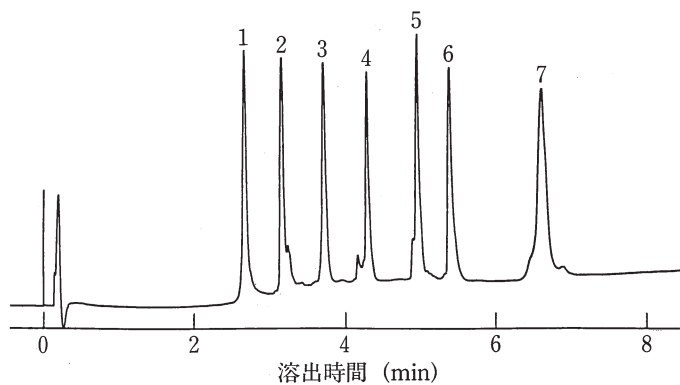


図-3 TSKgel Octadecyl-NPRによる標準タンパク質混合物の分離

溶離液; A: 0.05% TFA + 15% アセトニトリル

B: 0.05% TFA + 80% アセトニトリル

A → B リニアグラジエント (10分)

流速; 1.5 ml/min

温度; 25°C

検出; UV (220nm)

試料; 1. リボヌクレアーゼ 2. インシュリン  
3. チトクロムC 4. リゾチーム  
5. α-ラクトアルブミン 6. ミオグロビン  
7. オボアルブミン

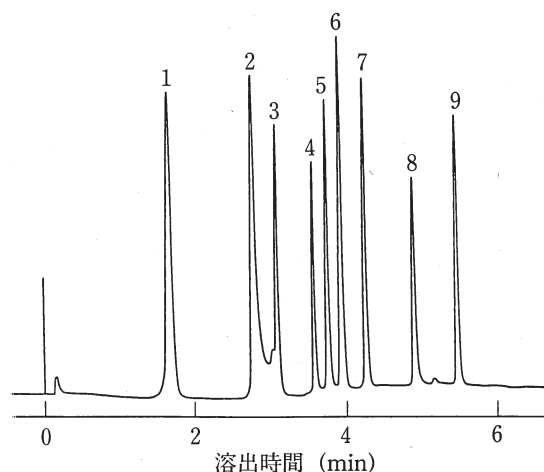


図-4 TSKgel Octadecyl-NPRによる標準ペプチド混合物の分離

溶離液; A: 100mM HClO<sub>4</sub>

B: 100mM HClO<sub>4</sub> + 80% アセトニトリル

A → B リニアグラジエント (10分)

流速; 1.5 ml/min

温度; 25°C

検出; UV (215nm)

試料; 1. ロイシン-エンケファリン 2. ブラジ  
キニン 3. オキシトシン 4. ボンベシ  
ン 5. α-エンドルフィン 6. アンジオ  
テンシン I 7. ソマスタチン 8. カル  
シトニン 9. グルカゴン

## (2) 回収率

表-1、2にタンパク質及びペプチドの回収率を示します。すべて試料負荷量は0.5 $\mu$ gであり、標準的溶離条件での回収率を測定しました。いずれも非常に高い回収率が得られました。

次に、数十ngオーダーのきわめて微量のタンパク質及びペプチドを負荷した場合の回収率を検討しました。表-3、4は試料負荷量50ngのときの回収率を示していますが、いずれも高い回収率が得られました。図-5、6は試料負荷量とピーク面積の関係を示したものです。試

タンパク質	回収率 (%)
リボヌクレアーゼ	94
インシュリン	102
チトクロムC	95
リゾチーム	104
牛血清アルブミン	96
トランスフェリン	101
ミオグロビン	97
オボアルブミン	74

表-1 タンパク質の回収率

溶離液； A：0.05%TFA+20%アセトニトリル  
B：0.05%TFA+80%アセトニトリル  
A→Bリニアグラジエント(8分)

流速；1.5ml/min

温度；25℃

検出；UV(220nm)

試料；各種タンパク質(0.5 $\mu$ g)

回収率；溶出ピークの面積から算出

ペプチド	回収率 (%)
ロイシン-エンケファリン	99
ブラジキニン	89
オキシトシン	92
ボンベシン	95
$\gamma$ -エンドルフィン	102
アンジオテンシンI	103
ソマスタチン	103
グルカゴン	98

表-2 ペプチドの回収率

溶離条件；図-4に同じ

試料；各種ペプチド(0.5 $\mu$ g)

回収率；表-1と同様にして算出

料負荷量12.5ngまで負荷量とピーク面積は比例関係にあり、試料負荷量が非常に微量の場合でも定量的に回収できることがわかります。したがって、TSKgel Octadecyl-NPRは、ごく微量のタンパク質、ペプチドの分離、分析及び分取に適していると考えられます。

タンパク質	回収率 (%)
リボヌクレアーゼ	92
チトクロムC	96
リゾチーム	94
牛血清アルブミン	104
オボアルブミン	89

表-3 微量タンパク質の回収率

溶離液； A：5mM HClO<sub>4</sub>+15%アセトニトリル  
 B：5mM HClO<sub>4</sub>+80%アセトニトリル  
 A→Bリニアグラジエント(10分)

流速；1.5ml/min

温度；25℃

検出；UV(220nm)

試料；各種タンパク質(50ng)

回収率；表-1と同様にして算出

ペプチド	回収率 (%)
ロイシン-エンケファリン	94
アンジオテンシン I	90
オキシトシン	88
γ-エンドルフィン	85

表-4 微量ペプチドの回収率

溶離条件；図-4と同じ

試料；各種ペプチド(50ng)

回収率；表-1と同様にして算出

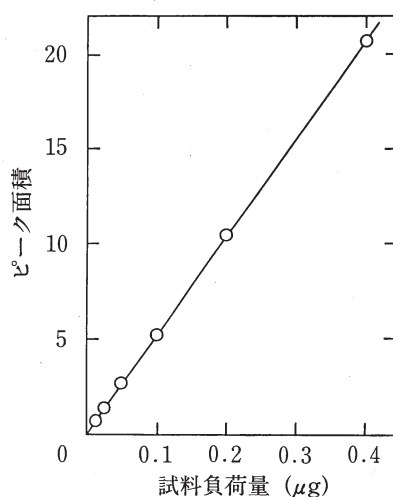


図-5 試料負荷量とピーク面積の関係(1) —— タンパク質の分離

溶離条件；図-3と同じ

試料；ミオグロビン

回収率；96%(試料負荷量0.4μg)

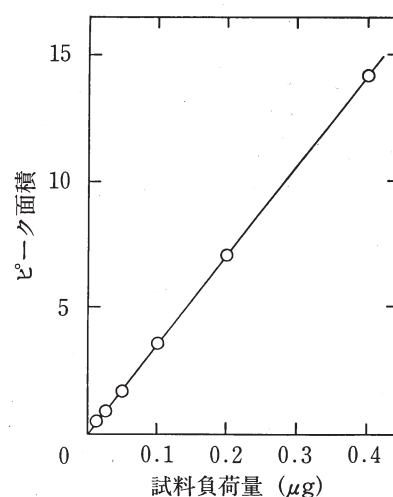


図-6 試料負荷量とピーク面積の関係(2) —— ペプチドの分離

溶離条件；図-4と同じ

試料；ソマトスタチン

回収率；99%(試料負荷量0.4μg)

## 4. 溶離条件の影響

### (1) イオンペア試薬の影響

#### ① タンパク質の分離

一般に、逆相クロマトグラフィでは、イオンペア試薬として、トリフルオロ酢酸(TFA)が最もよく使用されます。図-7にタンパク質の分離に対するTFA濃度の影響を示します。TFA濃度を高くするにしたがい、タンパク質の溶出位置が遅くなります。また、TFA濃度を高くす

るとオボアルブミンのピークが非常に小さくなり、回収率が極端に低下します。一方、TFA濃度を低くするとオボアルブミンの回収率は向上しますが、リゾチームが吸着されず、ボイドボリュームの位置に溶出されました。また、その他のタンパク質のピーク幅がわずかに広くなりました。したがって、回収率、ピーク幅とも良好な結果を得るためには、TFA濃度は0.05%程度が適当と思われます。

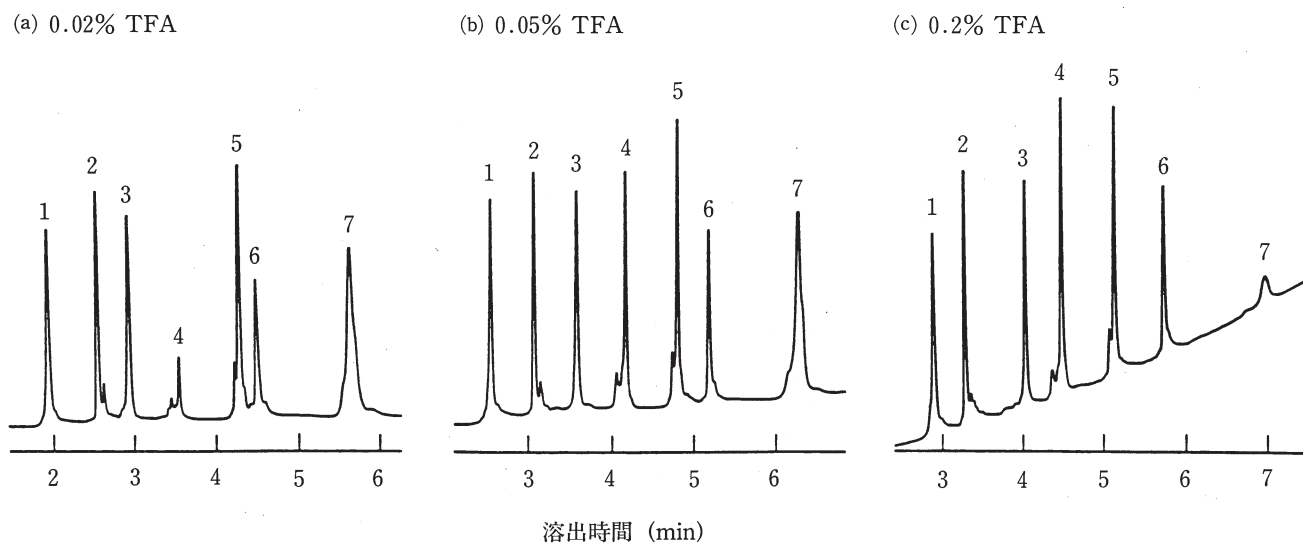


図-7 タンパク質の分離におよぼすTFA濃度の影響

溶離液； A：TFA+15%アセトニトリル

B：TFA+80%アセトニトリル

TFA濃度：(a) 0.02% (b) 0.05%

(c) 0.2%

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25°C

検 出；UV(220nm)

試 料；図-3に同じ

次に、その他のイオンペア試薬として過塩素酸及びリン酸を用いて、それぞれの濃度の影響を調べましたが、TFAと同様に濃度が高くなるにしたがい、タンパク質の溶出位置が遅くなる傾向がみられました。図-8に過塩素酸濃度の影響を示します。過塩素酸濃度が高いほど、

ピークはシャープになりましたが、TFAの場合と同様に、オボアルブミンの回収率が著しく低下し、50mM以上ではピークは検出されません。したがって、過塩素酸を用いる場合は5mM程度の低濃度で使用したほうが良い

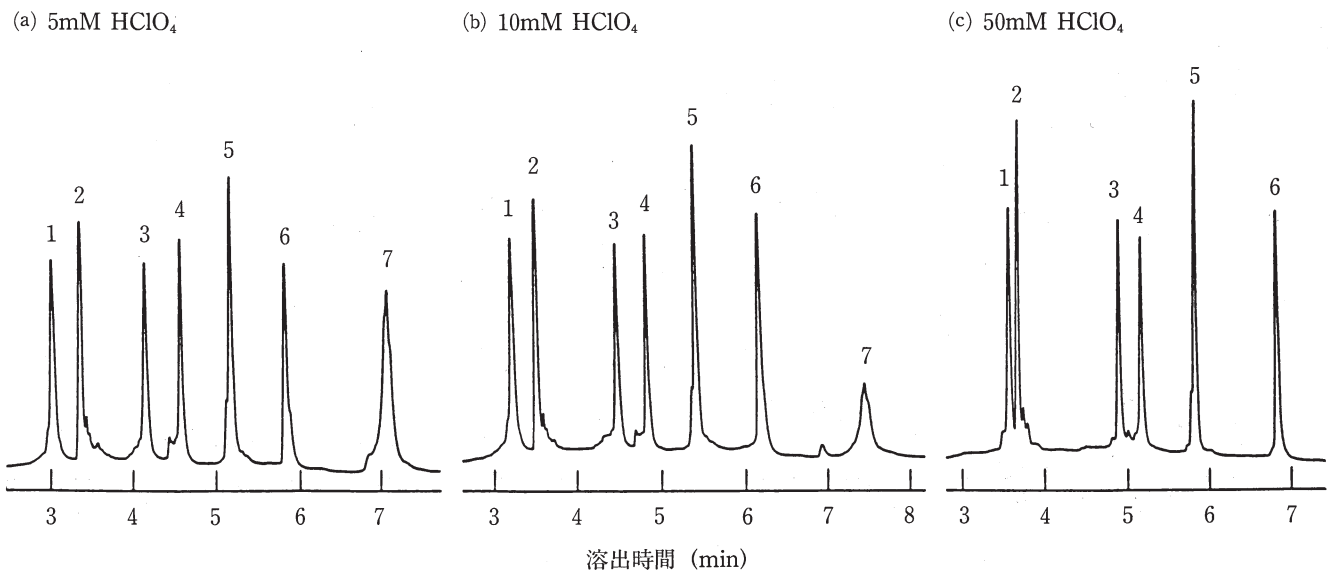


図-8 タンパク質の分離におよぼす過塩素酸濃度の影響

溶離液； A：HClO<sub>4</sub>+15%アセトニトリル  
 B：HClO<sub>4</sub>+80%アセトニトリル  
 HClO<sub>4</sub>濃度：(a) 5mM (b) 10mM  
 (c) 50mM  
 A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min  
 温 度；25℃  
 検 出；UV(220nm)  
 試 料；図-3に同じ



と思われます。図-9にリン酸を用いた場合のクロマトグラムを示します。ここで用いたリン酸濃度の範囲では、リゾチームはカラムに吸着されずボイドボリュームの位置に溶出しました。また、リン酸濃度を下げるとピークがわずかにブロードになりました。以上の検討結果から、TSKgel Octadecyl-NPRによるタンパク質の逆相クロ

マトグラフィについても、TFAが最も一般的なイオンペア試薬と考えられます。しかし、TFAを使用した場合にはグラジエントの進行に伴うベースラインの変動が激しいため、微量の試料を高感度で検出する場合には、ベースラインが安定な過塩素酸を用いたほうが良いと思われます。

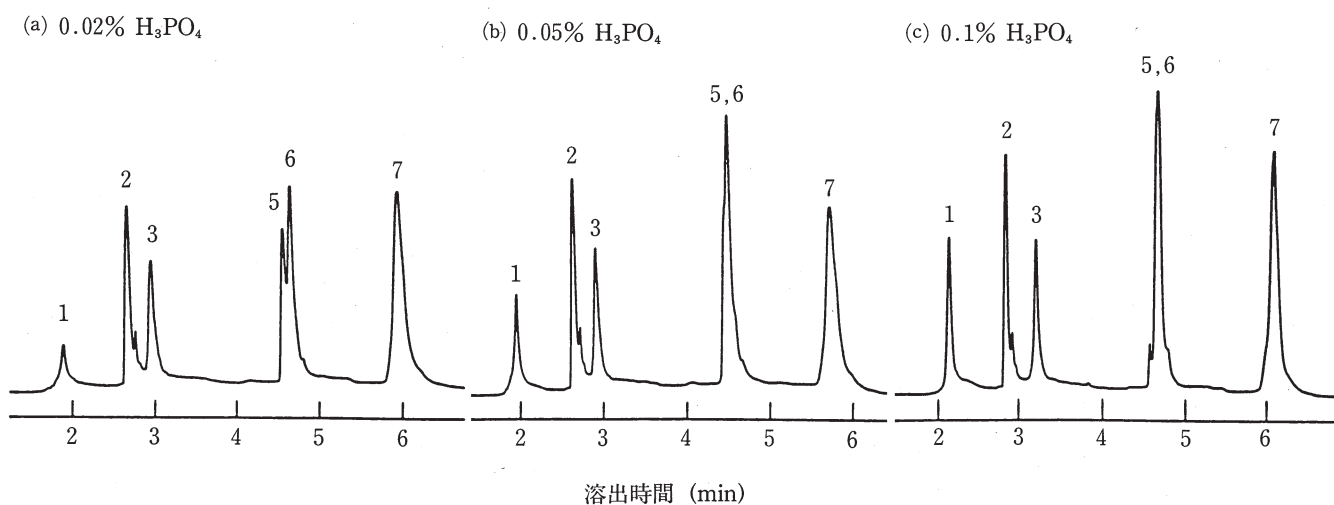


図-9 タンパク質の分離におよぼすリン酸濃度の影響

溶離液； A：H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+15%アセトニトリル

B：H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+80%アセトニトリル

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>濃度：(a) 0.02% (b) 0.05%

(c) 0.1%

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25℃

検 出；UV(220nm)

試 料；図-3に同じ

## ②ペプチドの分離

図-10~12にペプチドの分離に対する種々のイオンペ  
ア試薬の濃度の影響を検討した結果を示します。図-10  
にTFA濃度の影響を示します。TFA濃度が低い場合に

は、タンパク質の分離の場合と同様に、ペプチドのピー  
ク幅はブロードになりますが、溶出位置はタンパク質の  
場合とは逆に遅くなります。したがって、TFAを使用す  
る場合は0.2%程度が良いと思われます。

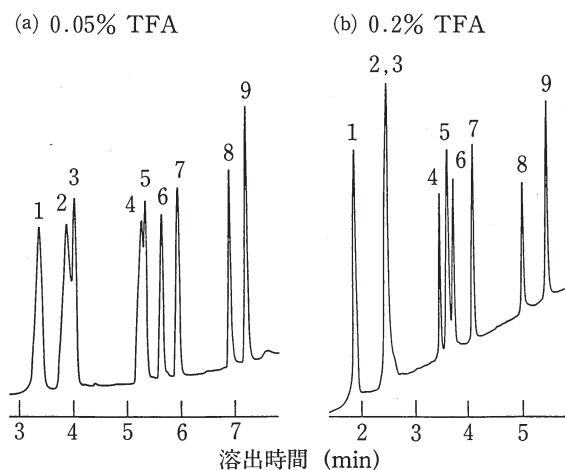


図-10 ペプチドの分離におよぼすTFA濃度の影響

溶離液；A：TFA

B：TFA+80%アセトニトリル

TFA濃度：(a) 0.05% (b) 0.2%

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25°C

検 出；UV(215nm)

試 料；図-4に同じ

図-11に過塩素酸濃度の影響を検討した結果を示します。過塩素酸濃度が5mMと極端に低い場合、ピーク幅が広く分離が悪くなります。50mMの場合には、100mMの場合と比べてピークはわずかにシャープですが、ロイシ

ン-エンケファリンの溶出がわずかに遅れ、その他のペプチドは逆にわずかに早く溶出されます。以上のことから、過塩素酸濃度は50-100mMが適当と思われます。

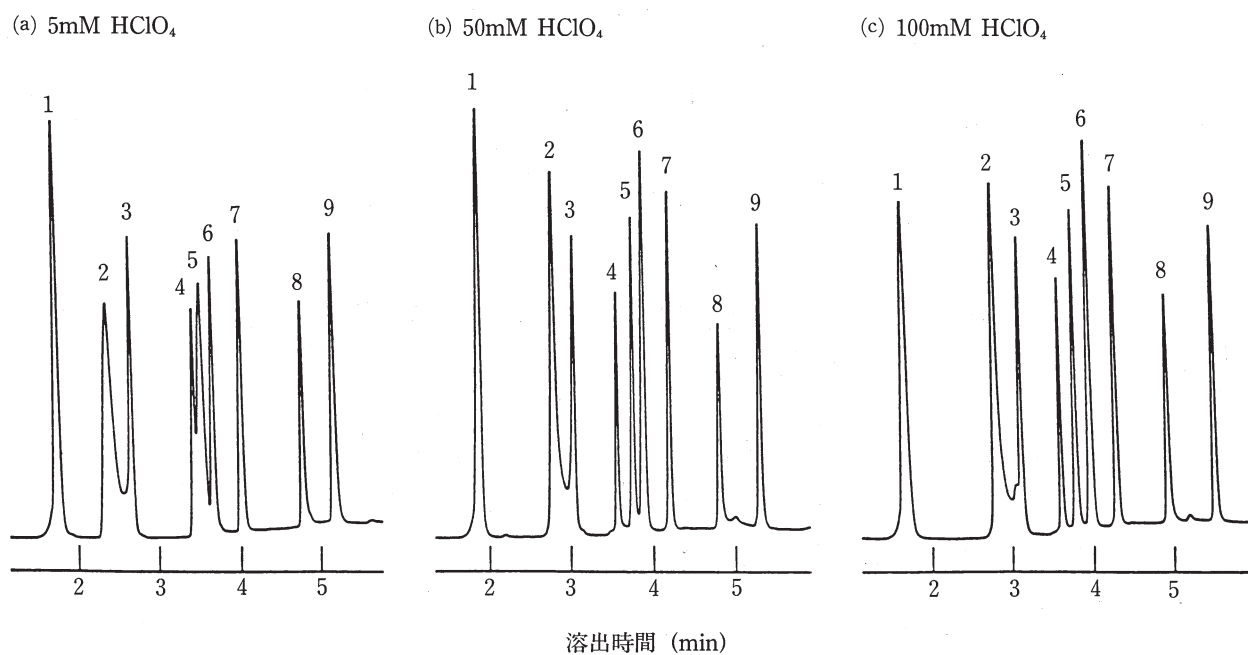


図-11 ペプチドの分離におよぼす過塩素酸濃度の影響

溶離液；A：HClO<sub>4</sub>

B：HClO<sub>4</sub>+80%アセトニトリル

HClO<sub>4</sub>濃度：(a) 5mM (b) 50mM

(c) 100mM

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25℃

検 出；UV(215nm)

試 料；図-4 に同じ

図-12にヘプタフルオロ-n-酪酸(HFBA)を使用した場合のクロマトグラムを示しますが、この場合には、TFAや過塩素酸を使用した場合とは、多少、選択性が異なり、ブラジキニンとオキシトシンの溶出位置が逆転しました。また、HFBA濃度が0.2%と高い場合には、ピークは小さく、溶出は遅くなりました。したがって、HFBAは0.05%が良いと思われま

す。以上のように、TFA、過塩素酸、HFBAをそれぞれ適切な濃度で用いることにより、ペプチドはほぼ同じ程度に分離されます。しかし、グラジエント溶出に伴うベースラインの変動は過塩素酸を用いた場合が最も小さく、微量試料を高感度で検出するには、50-100mM程度の過塩素酸を使用するのが良いと思われま

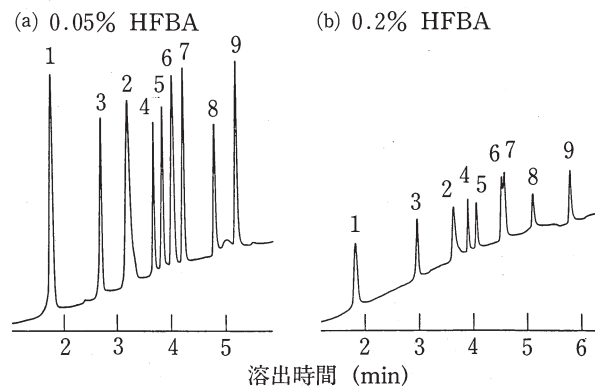


図-12 ペプチドの分離におよぼすHFBA濃度の影響

溶離液； A：HFBA

B：HFBA+80%アセトニトリル

HFBA濃度：(a) 0.05% (b) 0.2%

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25℃

検 出；UV(215nm)

試 料；図-4に同じ

## (2) ペプチドの分離に対する溶離液のpHの影響

TSKgel Octadecyl-NPRは樹脂ベースの充填剤ですので、幅広い範囲のpHで使用できます。したがって、シリカ系充填剤では不可能なアルカリ条件下での分離が可能です。図-13にペプチドの分離に対する溶離液のpHの影響を検討した結果を示します。

pH1.0では $\alpha$ -エンドルフィン、アンジオテンシンIII、ア

ンジオテンシンIIは分離されません。しかし、pHを上昇させるとこれらは分離され、pHによって選択性が異なることがわかります。一方、 $\gamma$ -エンドルフィンはいずれのpHでも溶出位置は変わりません。このように、溶離液のpHを調節することにより、分離が改良されることがあります。図-13に示した例では、pH9.3の溶離液を用いた場合に最も良い分離能が得られました。

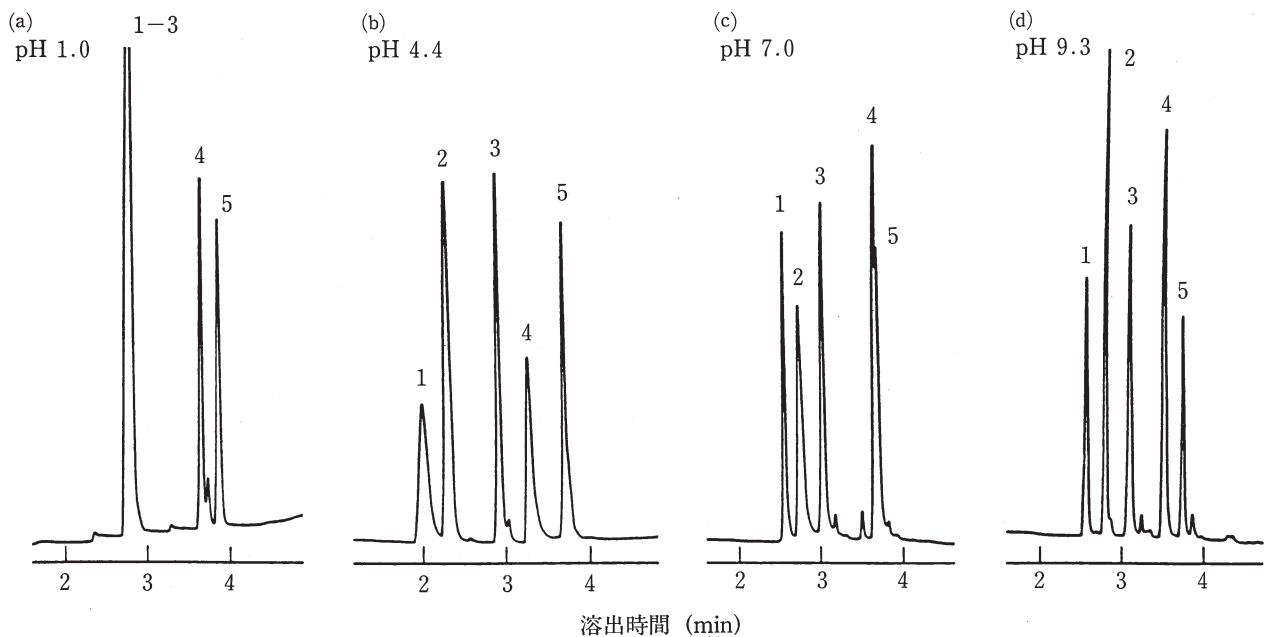


図-13 ペプチドの分離におよぼす溶離液のpHの影響

溶離液；

(a) A : 100mM HClO<sub>4</sub>

B : 100mM HClO<sub>4</sub>+60%アセトニトリル

(b)~(d) A : 10mM リン酸ナトリウム

B : 0.5mM リン酸ナトリウム

+60%アセトニトリル

(a) pH 1.0 (b) pH 4.4 (c) pH 7.0 (d) pH 9.3

A→Bリニアグラジエント(10分)

流 速；1.5ml/min

温 度；25°C

検 出；UV(215nm)

試 料；1.  $\alpha$ -エンドルフィン 2. アンジオテン  
シンIII 3. アンジオテンシンII 4.  $\gamma$ -  
エンドルフィン 5. アンジオテンシンI

### (3) 流速の影響

図-14にタンパク質の分離能に対する流速の影響を示します。0.25-1.0ml/minの範囲では分離能は流速の増加とともに向上していますが、1.0ml/min以上では分離能はほぼ一定になります。また、図-15にペプチドの分離に対する流速の影響を示します。ペプチドの分離能の流速依存性は、 $\gamma$ -エンドルフィンとアンジオテンシン I

の分離を除き、タンパク質の場合と同様に1.0ml/min以上では非常に小さくなっています。一方、 $\gamma$ -エンドルフィンとアンジオテンシン I の分離能は0.75-1.25ml/minのときに最大になっています。以上のことから、タンパク質、ペプチドいずれの場合でも流速は1.0-1.5ml/minが最適であると思われます。

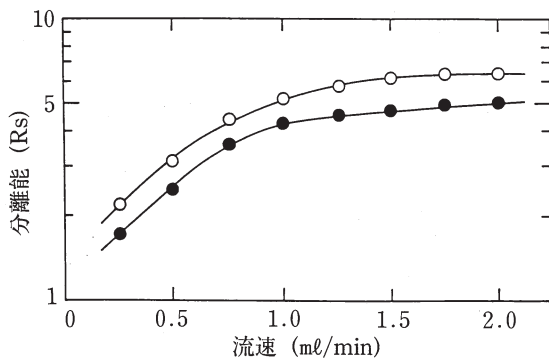


図-14 タンパク質の分離における分離能の流速依存性

溶離条件；図-3に同じ(流速を除く)

流速；0.25-2.0ml/min

試料；○-インシュリンとチトクロムC

●- $\alpha$ -ラクトアルブミンとミオグロビン

分離能；上記のそれぞれの組のタンパク質のピーク幅と溶出容量から算出

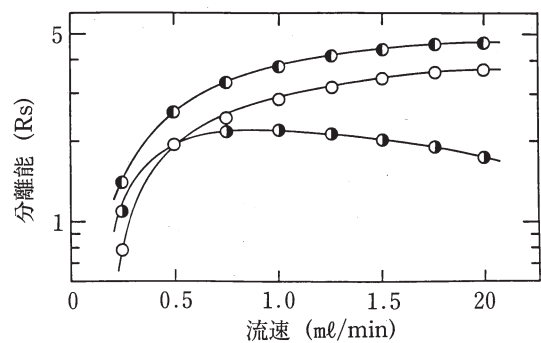


図-15 ペプチドの分離における分離能の流速依存性

溶離条件；図-4に同じ(流速を除く)

流速；0.25-2.0ml/min

試料；○-ボンベシンと $\gamma$ -エンドルフィン

●- $\gamma$ エンドルフィンとアンジオテンシン I

●-アンジオテンシン I とソマトスタチン

分離能；図-14と同様にして算出

#### (4) グラジエント時間の影響

図-16にタンパク質の分離能のグラジエント時間依存性を示します。グラジエント時間が長いほど分離能は向上していますが、10分以上ではグラジエント時間の影響は小さくなっています。また、ペプチドの分離能に対する影響を図-17に示します。 $\gamma$ -エンドルフィンとアンジ

オテンシン I の分離能はグラジエント時間10~20分のときに最大になりますが、その他の分離能は10分以上ではグラジエント時間依存性が小さくなっています。したがって、グラジエント時間はタンパク質、ペプチドいずれの場合でも10~20分程度が良いと考えられます。

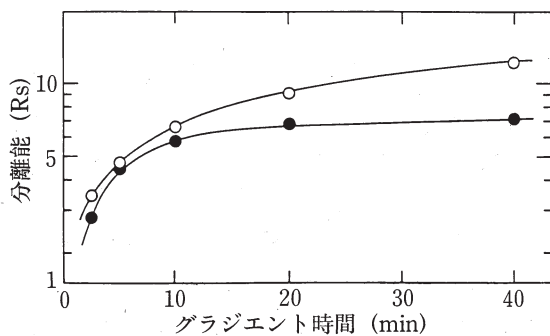


図-16 タンパク質の分離における分離能のグラジエント時間依存性

溶離条件；図-3に同じ(グラジエント時間を除く)  
 グラジエント時間；2.5-40分  
 試料；図-14に同じ  
 分離能；図-14と同様にして算出

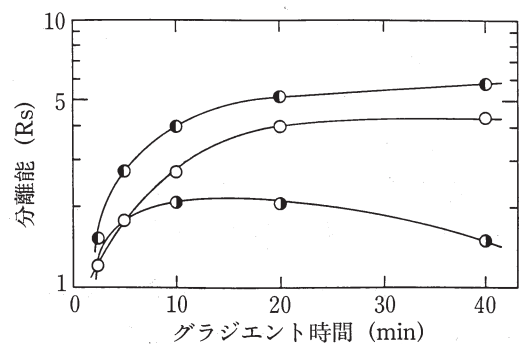


図-17 ペプチドの分離における分離能のグラジエント時間依存性

溶離条件；図-4に同じ(グラジエント時間を除く)  
 グラジエント時間；2.5-40分  
 試料；図-15に同じ  
 分離能；図-14と同様にして算出

(5) 試料負荷量

図-18に精製タンパク質の試料負荷量とピーク幅の関係を示します。試料負荷量が0.5 $\mu$ gまでほぼ一定のピーク幅が得られました。したがって、精製タンパク質の場合、分離能が低下しない最大の試料負荷量は約0.5 $\mu$ gで

あると言えます。図-19、20には不純物を含む粗製タンパク質の試料負荷量の検討結果を示します。図-19は精製ヘキソキナーゼのクロマトグラムですが、試料負荷量が40 $\mu$ gまでクロマトグラムにはほとんど変化はみられ

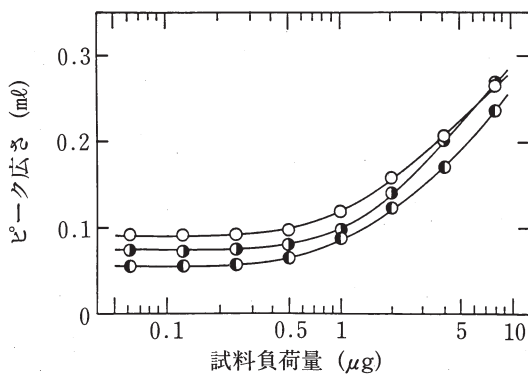


図-18 タンパク質分離における試料負荷量のピーク幅への影響

溶離条件；図-3に同じ

試料；○-チトクロムC

◐-リボヌクレアーゼ

●- $\alpha$ -ラクトアルブミン

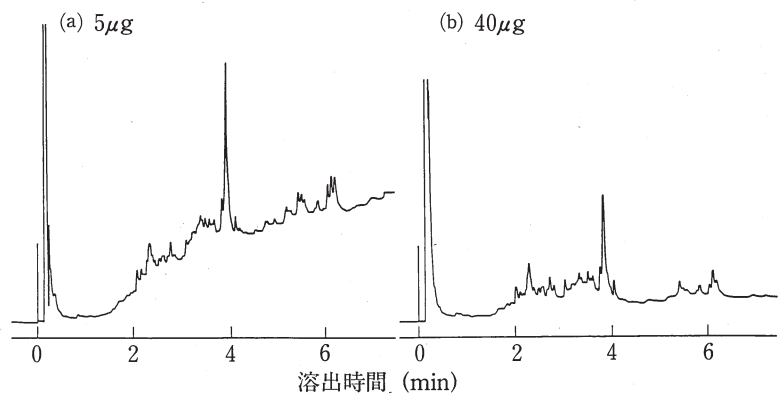


図-19 粗製ヘキソキナーゼの分離

溶離液；A：0.05%TFA+20%アセトニトリル

B：0.05%TFA+80%アセトニトリル

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(220nm)

試料量；粗製ヘキソキナーゼ (a) 5 $\mu$ g (b) 40 $\mu$ g



ませんでした。図-20にYeast enzyme concentrateのクロマトグラムを示しますが、この場合は $20\mu\text{g}$ まではほぼ同じ分離能が得られました。このように、粗製タンパク質の場合、含まれる不純物の割合によって最大試料負荷量は異なりますが、一般に数十 $\mu\text{g}$ であると思われます。

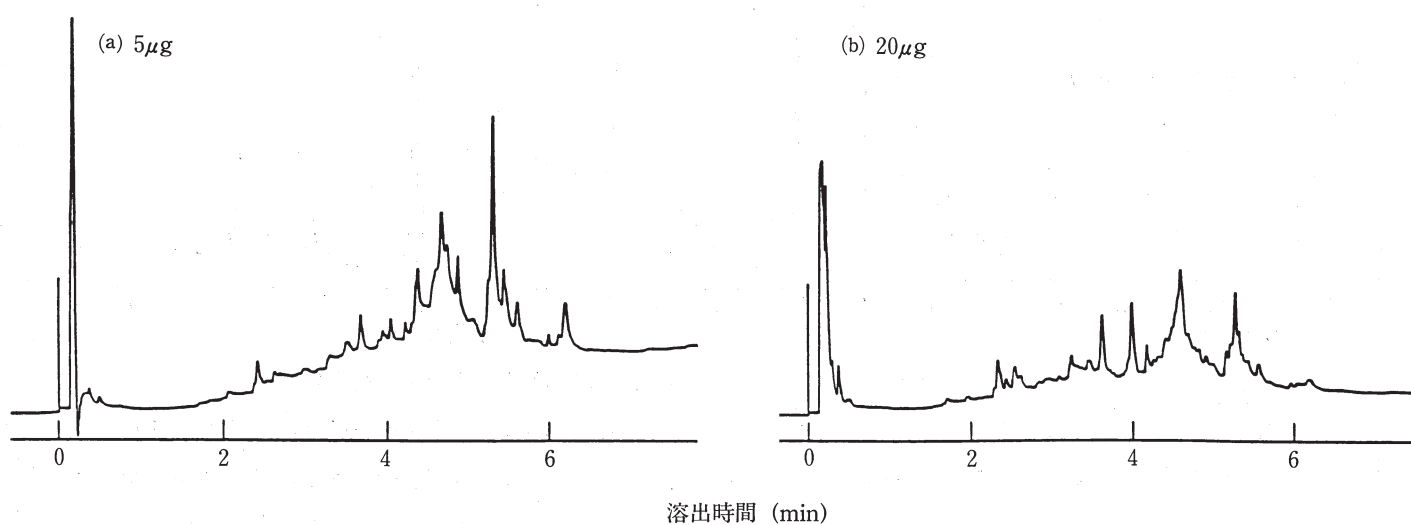


図-20 Yeast enzyme concentrateの分離

溶離条件；図-19に同じ

試料量；Yeast enzyme concentrate

(a)  $5\mu\text{g}$  (b)  $20\mu\text{g}$

図-21にペプチドの分離に対する試料負荷量の影響を示します。ペプチドの場合、試料によってかなり異なりますが、ここで用いた試料では、一定のピーク幅が得られる最大試料負荷量は0.5-4 $\mu$ gでした。

以上のように、TSKgel Octadecyl-NPRの最大試料負荷量は従来の多孔性逆相クロマトグラフィ用充填剤の約

1/200-1/20とかなり少なくなっています。これは充填剤が非多孔性のため、試料との相互作用に必要な充填剤の表面積が小さいことによるものと思われます。しかし、回収率の項で示しましたように、試料負荷量が少ない場合でも試料は定量的に回収できます。これは表面積が小さいことによる利点と思われます。

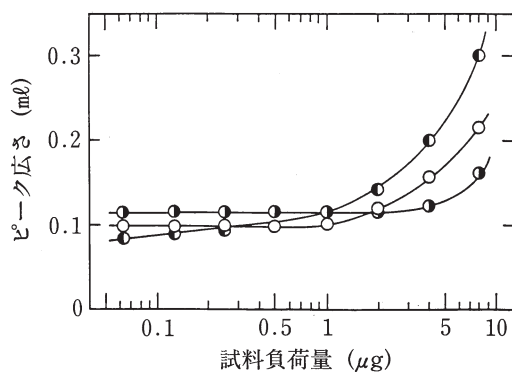


図-21 ペプチド分離における試料負荷量のピーク幅への影響

溶離条件；図-4に同じ

試料；○- $\gamma$ -エンドルフィン

●-グルカゴン

●-オキシトシン

#### (6) 標準的溶離条件

以上の検討結果から、TSKgel Octadecyl-NPRによるタンパク質、ペプチドの分離における標準的な溶離条件をまとめて表-5に示します。イオンペア試薬は一般的にはTFAが良いと思われます。また、TFAは揮発性のため試料から容易に除去できますので、特に分取を目的と

する場合には適しています。一方、過塩素酸は揮発性ではないので分取目的の使用には適さず、分析主体の使用になります。過塩素酸を用いた場合にはベースラインの変動が小さいため、過塩素酸は微量試料の高感度検出に適しています。

表-5 標準的溶離条件

	タンパク質	ペプチド	備考
流速	1.0~1.5ml/min	1.0~1.5ml/min	
アセトニトリル濃度勾配	4~6%/min	6~8%/min	
イオンペア試薬	0.05%TFA または 5mM HClO <sub>4</sub>	0.2%TFA または 100mM HClO <sub>4</sub>	分取に適する 高感度検出に適する
最大試料負荷量*	精製標品 粗製標品	0.5μg 0.5~4μg ——	試料により異なる
溶離液 pH	酸性	酸性	アルカリでも分離可能

\*分離能を低下させない最大の試料負荷量

## 5. 応用例

### (1) タンパク質の純度検定

図-22に市販プロテインAのクロマトグラムを示します。このプロテインAはディスク電気泳動でシングルバンドしか検出されない高純度タンパク質標準品として市販されています。しかし、この図に示すように、メインピークの後に小さなピークが検出されました。

また、図-23は市販トリプシンをTSKgel Octadecyl-NPR及びTSKgel Phenyl-5PW RPで純度検定を行

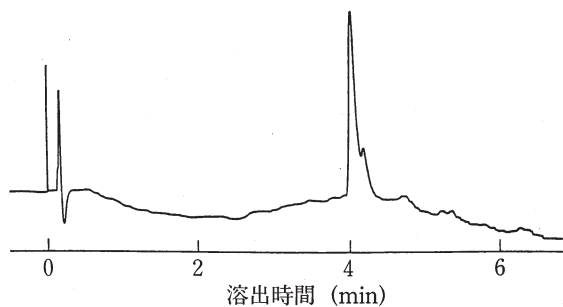


図-22 市販精製プロテインAの分離

溶離液；A：5mM HClO<sub>4</sub>+15%アセトニトリル  
 B：5mM HClO<sub>4</sub>+80%アセトニトリル  
 A→Bリニアグラジエント(10分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(220nm)

試料；*Staphylococcus aureus*産物(0.25μg)

ったときのクロマトグラムを示します。TSKgel Phenyl-5PW RPでは1本のピークしか観察されません。しかし、TSKgel Octadecyl-NPRでは2本のシャープなピークが見られ、この試料が単一標品ではないことがわかります。

以上のように、TSKgel Octadecyl-NPRは微量の試料負荷量で、非常に短時間で高い分離能が得られることから、電気泳動法にかわるタンパク質の純度検定や製品の品質管理に適していると考えられます。

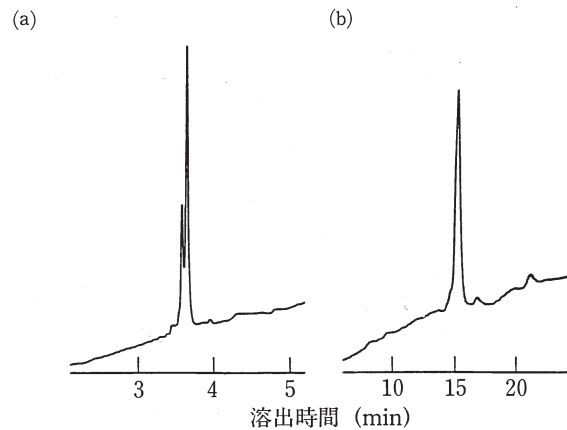


図-23 市販精製トリプシンの分離

(a) カラム；TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID  
 ×3.5cm

溶離液；A：0.05%TFA+20%アセトニトリル

B：0.05%TFA+80%アセトニトリル

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速；1.5ml/min

温度；25°C

検出；UV(220nm)

(b) カラム；TSKgel Phenyl-5PW 4.6mmID  
 ×7.5cm

溶離条件；グラジエント時間及び流速を除き(a)と同じ

グラジエント時間；60分

流速；1.0ml/min

試料；ウシ膵臓トリプシン

(a) 0.5μg (b) 2μg

## (2) プロテアーゼ消化ペプチドの分離

タンパク質の全アミノ酸配列を決定する際、タンパク質を数十残基以下のペプチドに断片化して、それぞれのアミノ酸配列を決めます。プロテアーゼを用いた酵素分解法では、プロテアーゼの種類やタンパク質の構造によって分解の程度が異なります。したがって、タンパク質の断片化を行う際、分解の程度を調べる必要があります。

図-24はチトクロムCのトリプシン消化ペプチドの分離を示します。チトクロムCとトリプシンを混合後、一定時間毎に混合物をTSKgel Octadecyl-NPRによる逆相

クロマトグラフィにより分離し、消化の過程を追跡しました。この図に示すように、短時間でトリプシン消化ペプチドが良好に分離されています。トリプシンは微量のためピークとして検出されていません。以上のように、短時間で高分離能が得られるTSKgel Octadecyl-NPRは、酵素によるタンパク質の断片化の追跡やペプチドマッピングに有用です。さらに、微量の試料でも回収率が高いことから、各ピークをフランクシオンすることにより断片化したペプチドを効率的に分取できます。

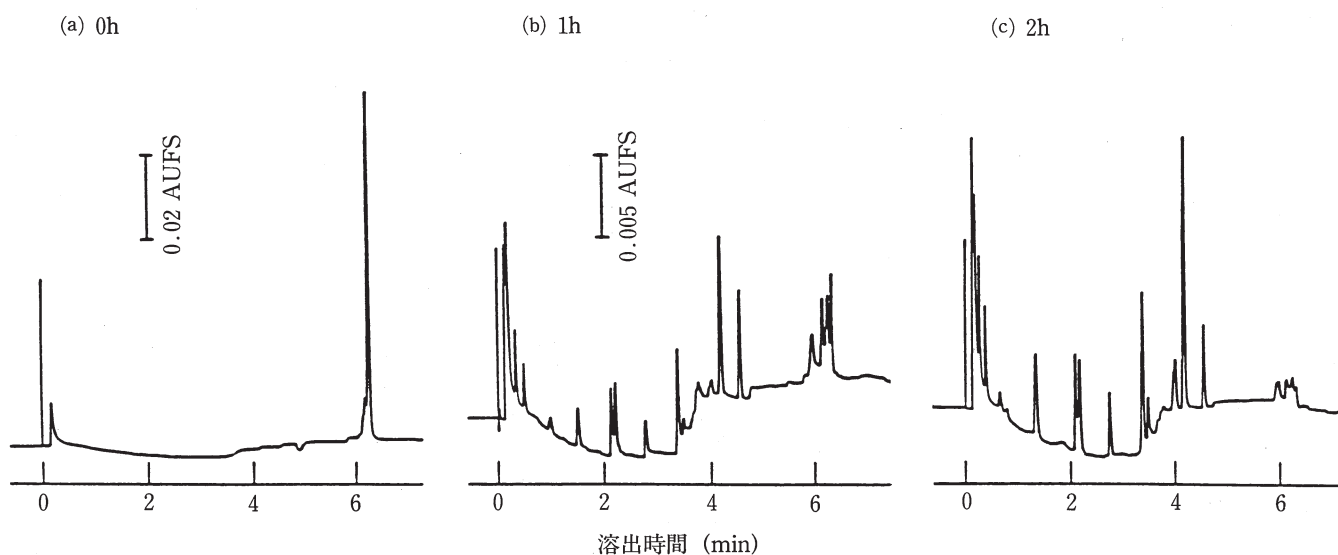


図-24 チトクロムCのトリプシン消化ペプチドの分離

### トリプシン消化条件

100mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、10mM Tris、0.1mM  $\text{CaCl}_2$ を含む溶液(pH 8.3)中で、ウマ心臓チトクロムC (1 mg/ml)とウシ膵臓トリプシン(TPCK処理標品)を重量比50:1(チトクロムC:トリプシン)で混合し、37°Cで2時間インキュベートする。

### トリプシン消化ペプチドの分離

分離条件；図-4に同じ

試料；チトクロムCのトリプシン消化ペプチド

(a) 混合直後 (b) 1時間後

(c) 2時間後

## 6. おわりに

以上紹介しましたように、非多孔性逆相クロマトグラフィ用充填剤TSKgel Octadecyl-NPRは、充填剤に細孔をもたず、しかも粒子径が小さいため、従来の多孔性充填剤よりごく微量の試料を迅速かつ高分離能で分離することができます。一方、TSKgel Octadecyl-NPRは非多孔性のため、試料負荷量はかなり少なくなっていますので、大量精製には向いていません。しかし、微量の試料でも非常に回収率が高いために、アミノ酸配列の決定を目的とする断片化ペプチドの分取など微量試料の精製に適していると考えられます。また、分離時間はわずか10分以内と非常に速く、リアルタイムの結果が要求される生産過程の工程管理や細胞培養液中のタンパク質のチェック、さらには医療診断分野への応用が期待されます。

※“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) 6636-3733	〒104-0028	東京都中央区八重洲2-2-1
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 710-6694	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前3-8-10
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
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 <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>