

インタクト10周年記念製品 第二弾！

世界初の高分解能ノンポーラス2 μ mODSカラム …… プレスト FF-C18

ノンポーラスだからできる分析があります

プレスト

Presto FF-C18

数千万Da までの生体・合成高分子物質の逆相分離

ペプチドや蛋白質の圧倒的なピーク数

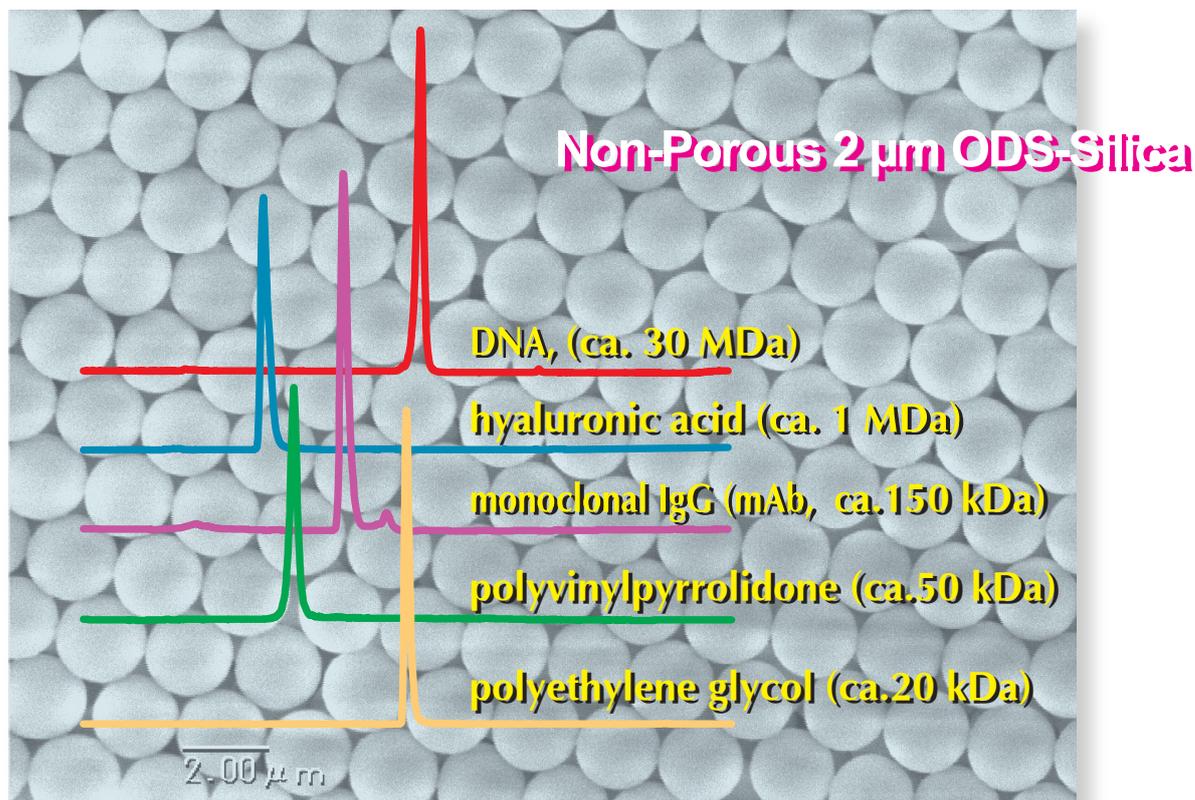
多孔性ODSカラムとは異なる分離特性

粒子径2 μ mによる長さ250mm高理論段カラム

普通のHPLCによる低流量でも高分解能を発揮

高純度非多孔性球状シリカ / 2 μ m 粒子 / ノンポーラス / ODS

高分子分離の世界が変わります。



インタクトは世界で初めての(当社調査)画期的な高分解能ノンポーラス2 μ mODSカラムを開発しました。

多孔性ODSカラムには以下のような問題点があると考えられます。

- 細孔分布に起因する高分子物質のピーク形状の不安定さ
- 細孔(ミクロポア)が原因となる溶質ピークの回収率低下
- 細孔内拡散によるカラム効率の低下

非多孔性ODSはこれらの問題点が発生しにくい構造であり、特に高分子物質の溶出において優れた性能を発揮します。

従来カラムとは全く異なる非多孔性高分解能ODSカラムは、未体験の新しい分離ワールドを拓きます。

♪ ペプチドの逆相分離

ノンポラスODSカラム Presto FF-C18 は、アミド結合を有するペプチドや蛋白質に対して抜群の応答を示します。さらに従来の多孔性逆相カラムの欠点でもある「細孔による溶質ピーク回収率の低下」が軽減されるために、従来カラムに比べて溶出ピーク数が約2倍に向上します。

さらにノンポラス2 μ m, Presto FF-C18 は, Porous sub-2 μ m カラムでも実現されていない, 長さ250mmという高分解能カラムも提供されており, ペプチドや蛋白質の精密分離に貢献します。

● ペプチドマッピング

A: water /TFA = 100 /0.1
B: acetonitrile /TFA = 100 /0.1
50deg.C, 220nm
Tryptic digest of alpha-casein
5 μ L

250 x 4.6 mm

268 peaks

Presto FF-C18 (2 μ m)
1-35%B (0-150min)
0.4mL/min (25MPa)

131 peaks

Porous ODS (3 μ m)
Cadenza CD-C18
5-45%B (0-150min)
1mL/min (14MPa)

0 50 100 150 min

細孔を持たないノンポラスODS, Presto FF-C18は, ペプチド分離に大きな威力を発揮します。

プロテオーム解析では極微量のペプチド分析が重要です。

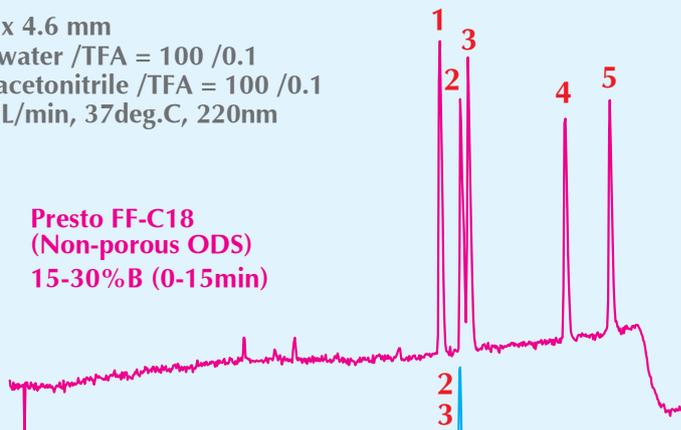
Presto FF-C18は, 従来の多孔性ODSでは限界のあった微量ペプチドまで溶出させることができ, 溶出ピーク数は約2倍まで増加します。

ノンポラスODS Presto FF-C18によって, プロテオミクスの世界が大きく変わります。

● ペプチドの分離特性

50 x 4.6 mm
A: water /TFA = 100 /0.1
B: acetonitrile /TFA = 100 /0.1
1mL/min, 37deg.C, 220nm

Presto FF-C18
(Non-porous ODS)
15-30%B (0-15min)



Cadenza CD-C18
(Porous ODS)
20-30%B (0-15min)

0 5 10 15 min

- 1 Angiotensin IV (Human)
Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
- 2 Angiotensin III (Human)
Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
- 3 Angiotensin II (Human)
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
- 4 [Val⁵]-Angiotensin I (Bovine)
Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Ile
- 5 Angiotensin I (Human)
Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ile

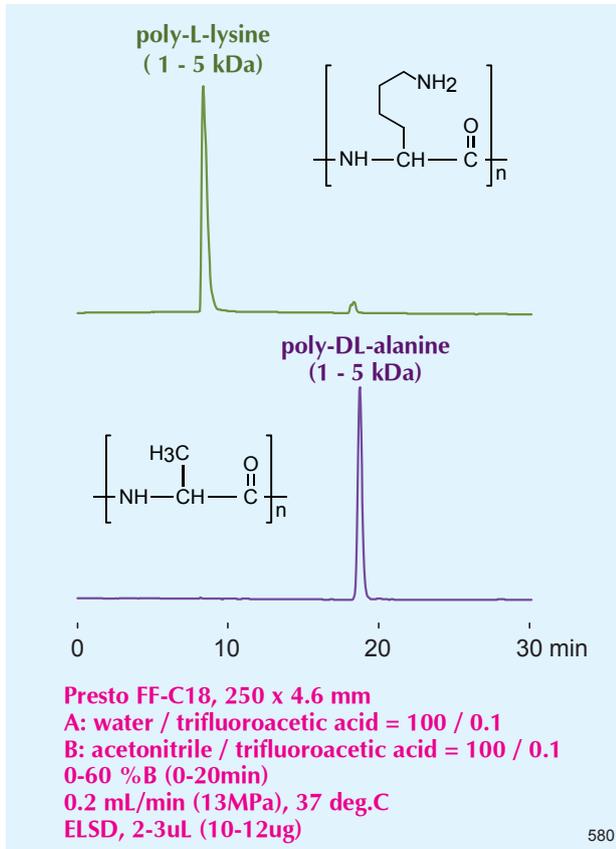
細孔を持たないノンポラスODS, Presto FF-C18は, 比表面積が小さいことから, 多孔性ODSよりも低い有機溶媒濃度に設定すれば同等の保持が得られます。その際, 異なる有機溶媒濃度に起因する分離特性の違いが発揮されます。

アンジオテンシンIIとIIIの分離のように, 多孔性ODSでは困難な分離がFF-C18により改善できます。細孔がないためにピーク形状も極めて良好です。

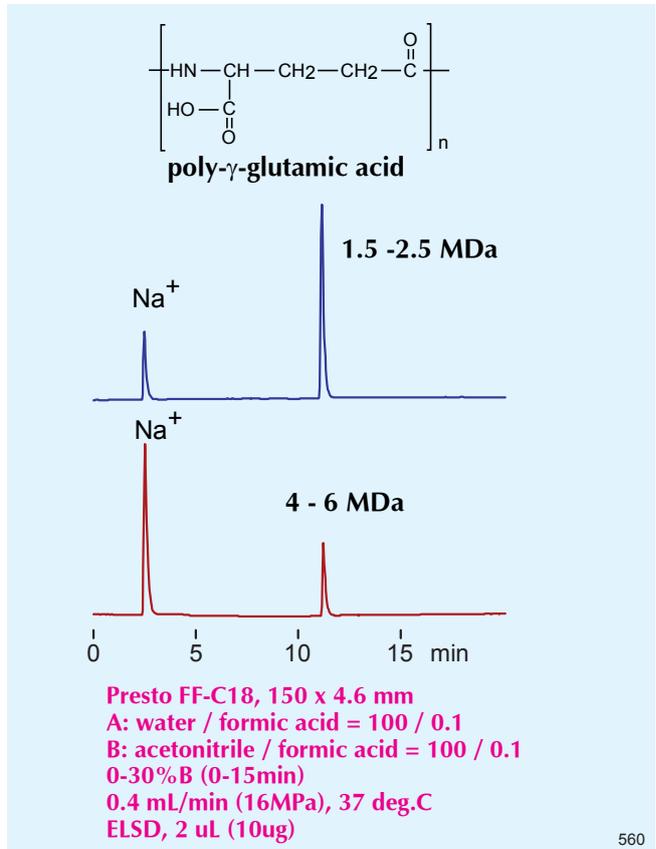
ポリペプチド・蛋白質の逆相分離

Presto FF-C18 はアミノ酸残基の違いを良好に認識します。低分子のペプチドから高分子蛋白質まで幅広い分離が可能です。

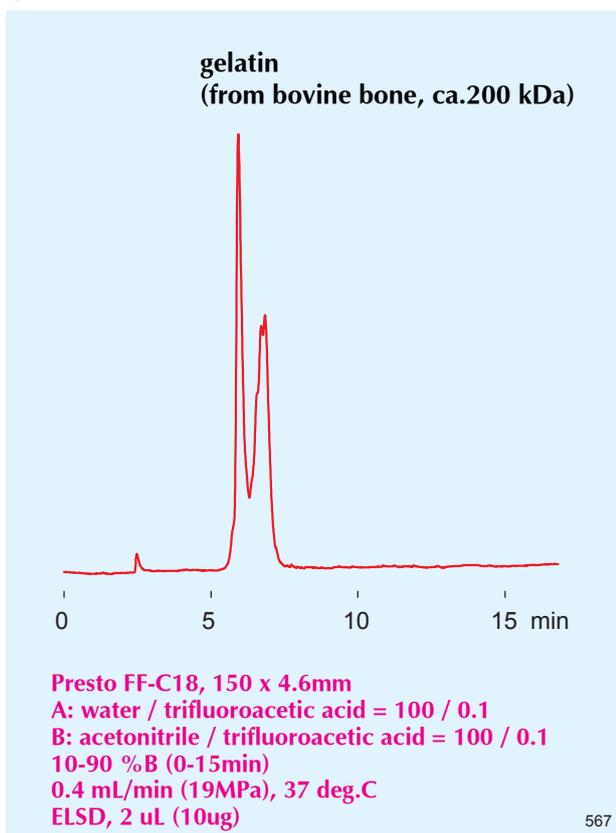
● ポリアミノ酸



● ポリグルタミン酸



● ゼラチン



アミノ酸のホモポリマーであるポリアミノ酸は、構成アミノ酸の疎水性が異なるために、保持挙動に大きな差があらわれます。しかしながら、同種のポリマーの重合度の違いは認識しにくく、それぞれ1本のピークとして溶出されました。

分子量数百万Daのポリグルタミン酸も、重合度の違いを認識することはできずに、1本のシャープなピークとなりました。

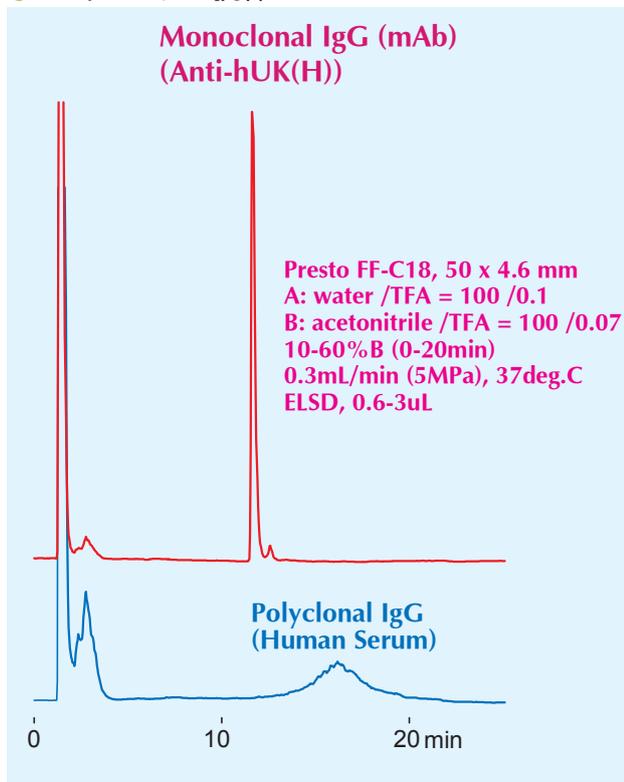
アミノ酸組成が同じで重合度の異なるホモポリマーが分離できない理由は、分子量が十分に大きいポリペプチドの三次構造と固定相との間の接触面積が同じであり、その結果生じる相互作用も同程度となり分子認識が困難になるためと考えられます。

異種のアミノ酸組成からなる一般的蛋白質は、それぞれの疎水性が異なるために、良好な分離を示します。ゼラチンは数種類の分子量が存在するといわれており、FF-C18でもこれらを分離していると考えられます。

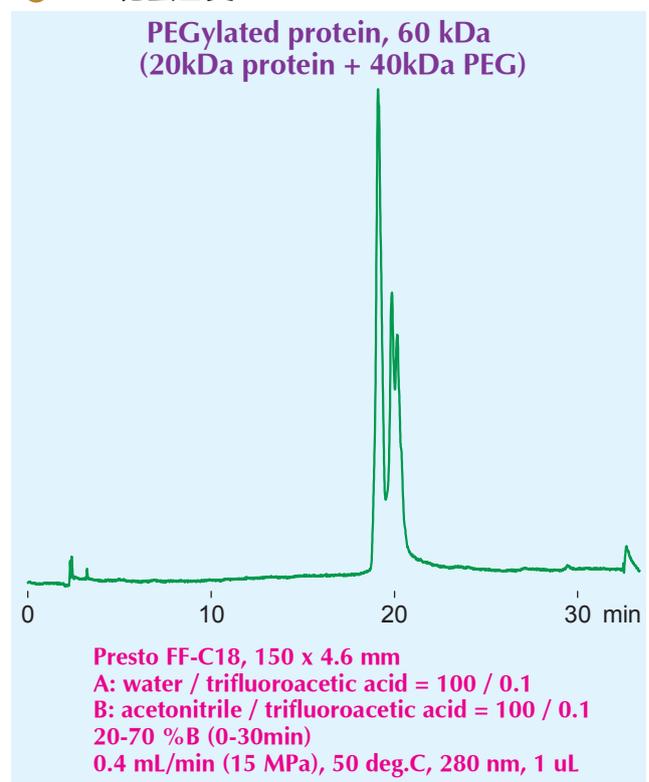
🎵 医薬系蛋白質の逆相分離

Presto FF-C18 は医薬品関連蛋白質の分離に威力を発揮します。従来のイオン交換やSECモードが主流であった分析分野において、ノンポーラスODSの逆相分離が変革をもたらします。

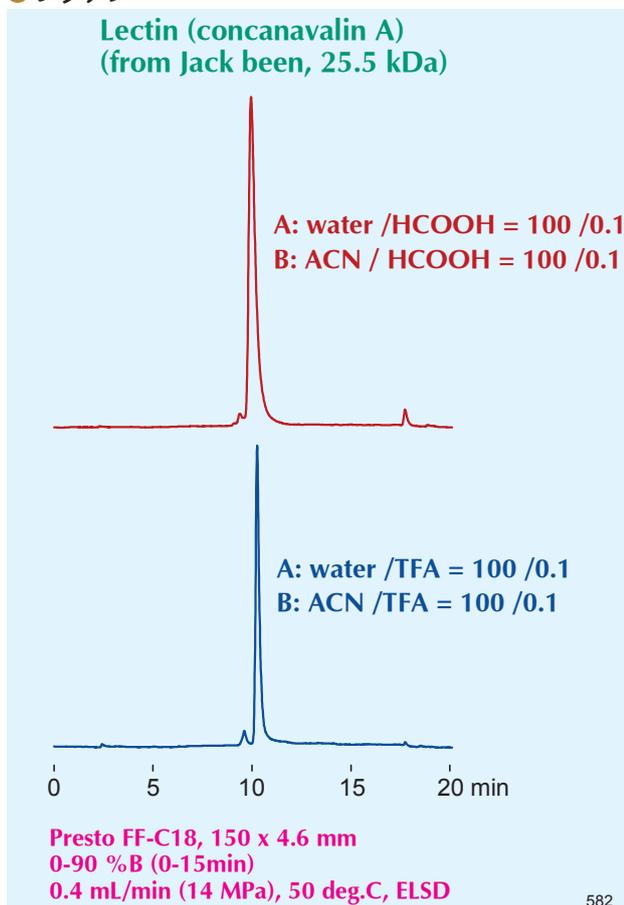
● モノクローナル抗体



● PEG化蛋白質



● レクチン



免疫グロブリン(IgG)は分子量約15万Daで、大きさとその特異な構造から、一般の逆相カラムでは細孔が原因となり良好なピークが得られませんでした。細孔を持たないノンポーラスODSカラム Presto FF-C18は、アミノ酸配列がまったく同じであるモノクローナル抗体と、抗原認識部位のアミノ酸配列が異なるポリクローナル抗体を見事に識別することができます。

PEG(ポリエチレングリコール)を修飾した蛋白質は、安定性を高める効果があります。本実験では、PEGの分子量分布などが原因となり、疎水性の異なるいくつかのピークに分離されました。PEG化の効率チェックやPEG化蛋白質の構造解析、製造管理にはあらゆる分子量を溶出できる可能性のある Presto FF-C18 が有用です。

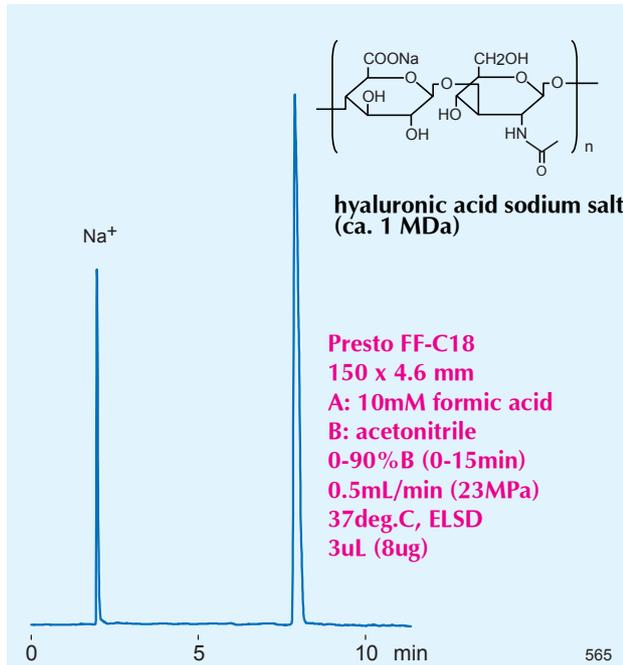
糖鎖を認識するレクチン蛋白質は、創薬・診断薬などで注目されています。コンカナバリンAは単純蛋白質であり、FF-C18によりTFA系でもギ酸系でも溶出させることができます。

Presto FF-C18 は、多孔質逆相カラムとは異なり、溶質の分子量を気にする必要がなく、あらゆる蛋白質の分析に適用できる可能性を秘めています。

多糖類(イオン性)の逆相分離

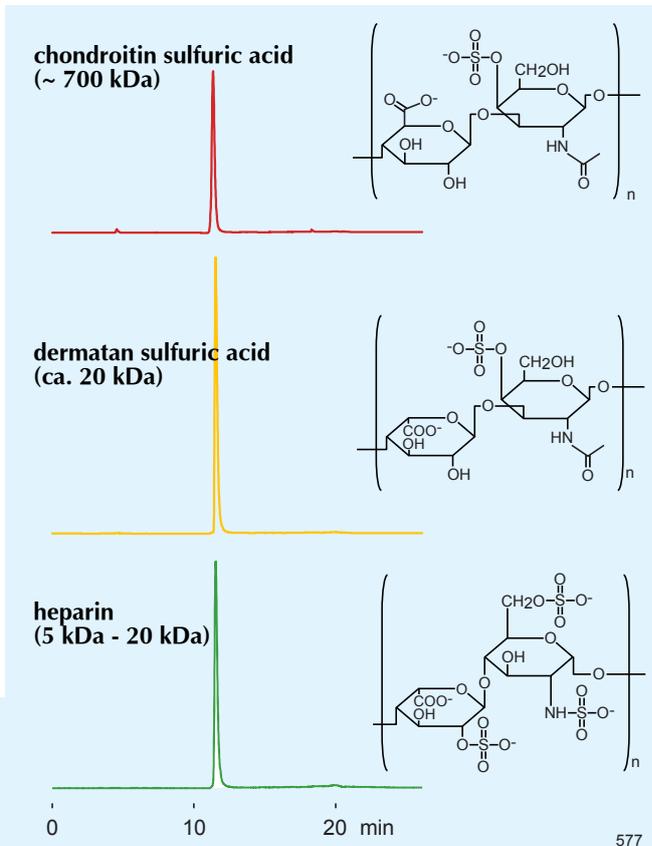
Presto FF-C18 は非多孔性であることから、高分子多糖類の分析が簡単に実現できます。サイズ排除(SEC)モードでは定量性の悪いブロードなピークであっても、本カラムによればよりシャープな形状に改善することができます。

● ヒアルロン酸

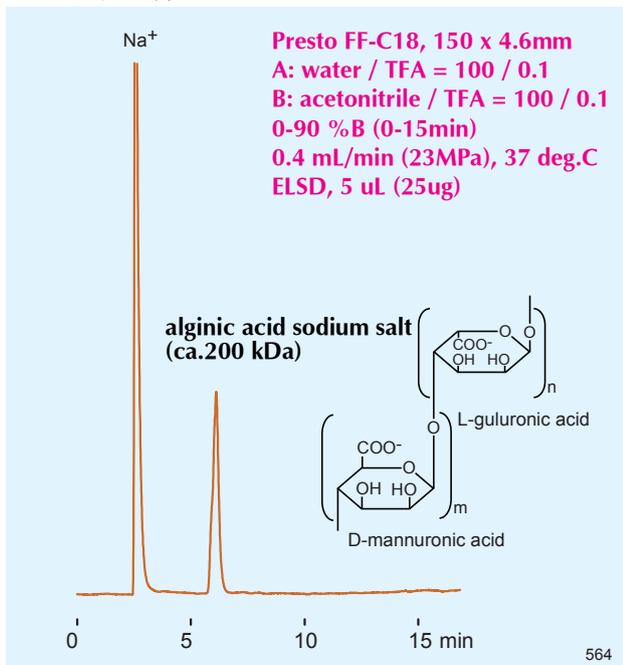


Presto FF-C18, 250 x 4.6 mm
 A: water /triethylamine /acetic acid = 100 /1.1 /0.5
 B: acetonitrile
 0-40%B (0-15min)
 0.35 mL/min (24 MPa), 37 deg.C, ELSD, 2 uL (10 ug)

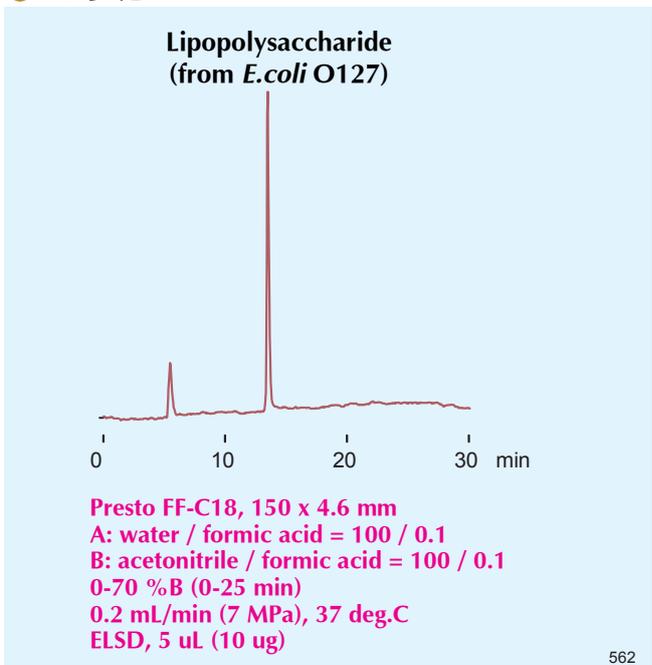
● ムコ多糖 (コンドロイチン硫酸, デルマトン硫酸, ヘパリン)



● アルギン酸



● リポ多糖



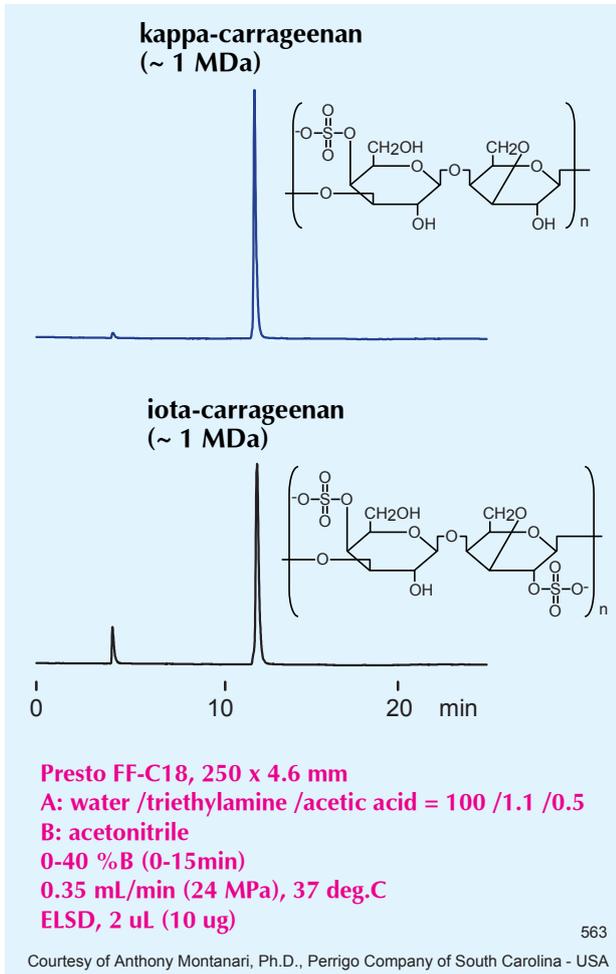
イオン性の多糖類を Presto FF-C18 により逆相分離する場合は、移動相にpH調整剤が必要です。ムコ多糖のうちヒアルロン酸のカルボキシル基は弱酸であるため、pH調整剤としてはギ酸で充分ですが、コンドロイチン硫酸やヘパリンなどには酸性度の高い硫酸基が含まれているために、ギ酸では解離が抑制できずピーク形状が不安定になります。この場合、トリエチルアミンによりイオン対を形成することで良好なピークが得られます。ただし、構造が類似していることから、これらの溶出位置はほとんど同じ結果となりました。

またアルギン酸のように、多糖類の分析においてもトリフルオロ酢酸(TFA)を用いることができます。

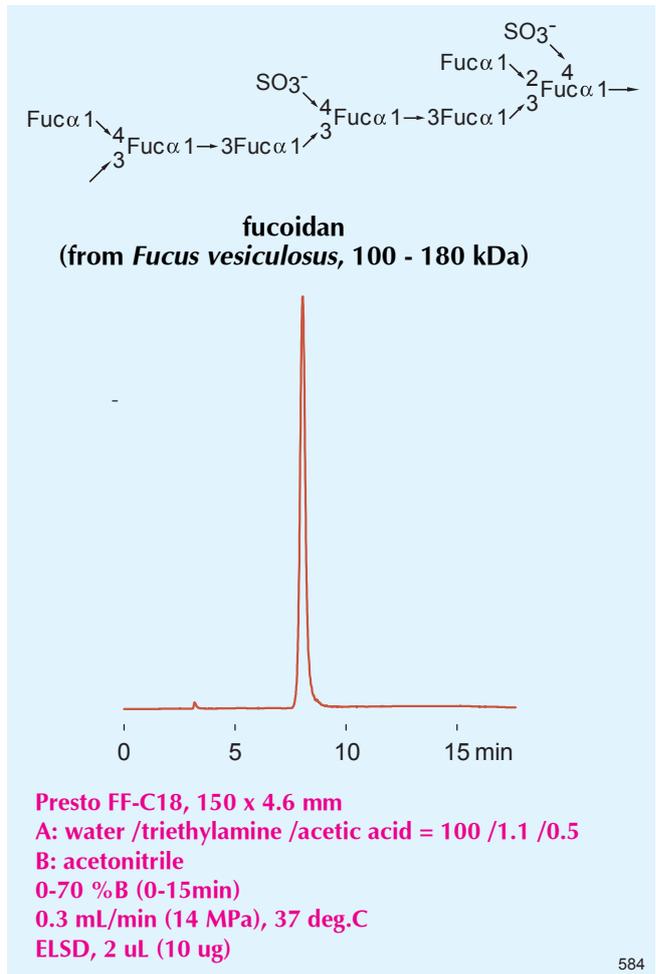
多糖類(イオン性)の逆相分離

Presto FF-C18 を用いれば、イオン性高分子多糖類の分析も簡単にできます。

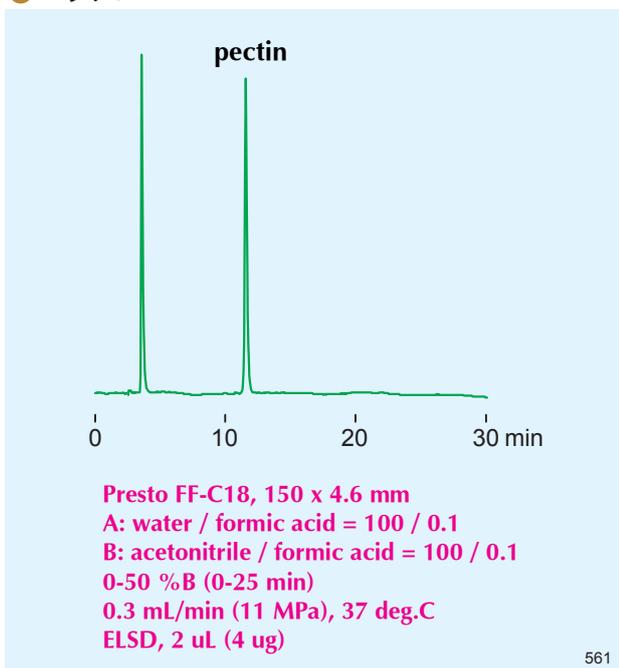
● カラギーナン



● フコイダン



● ペクチン



イオン性の多糖類の分離にはpH調整剤が必須です。特に硫酸基を含む構造(カラギーナン、フコイダン)には、トリエチルアミン酢酸を添加することでシャープなピークが得られます。

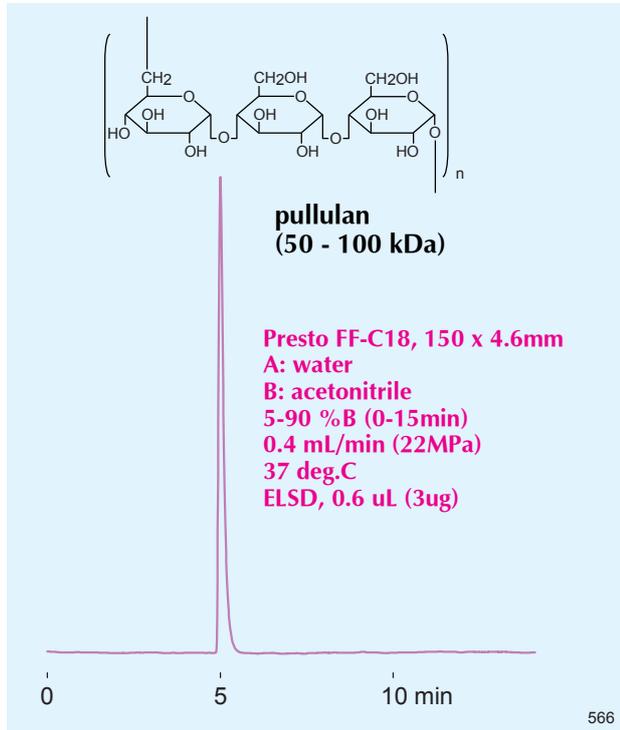
カラギーナンの二種(κ -, ι -)は硫酸基の数が異なりますが、全体の構造が類似しているために、FF-C18 では分離が困難でした。しかし従来カラムでは実現できない鋭い溶出ピークを与えます。

ペクチンは、構成糖であるガラクトツロン酸のカルボキシル基がメチルエステル化されていますが、部分的にエステル化されていない構造があるために、ギ酸によるpH調整が必要です。

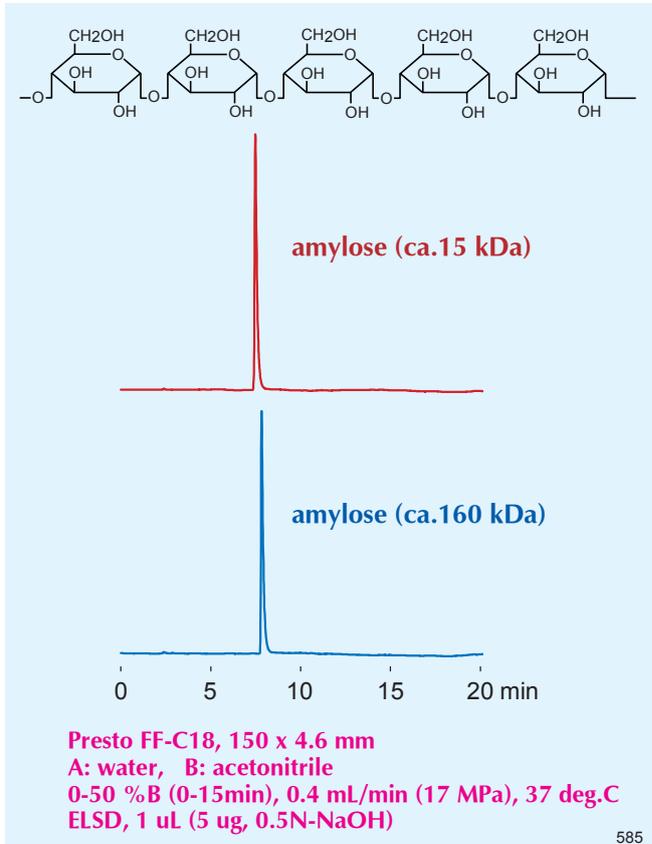
🎵 多糖類(非イオン性)の逆相分離

Presto FF-C18 は多糖類の分析が、サイズ排除(SEC)モードよりもシャープなピーク形状でしかも低コストで可能となります。

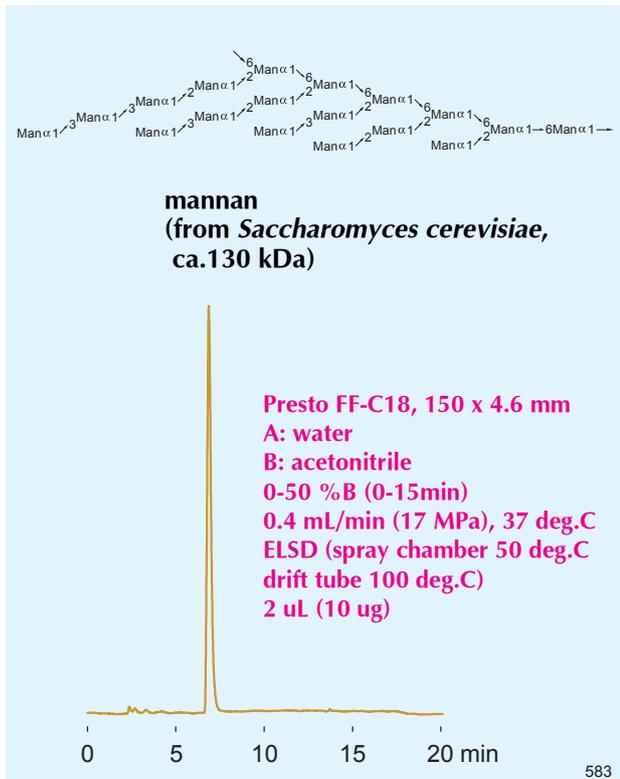
● プルラン



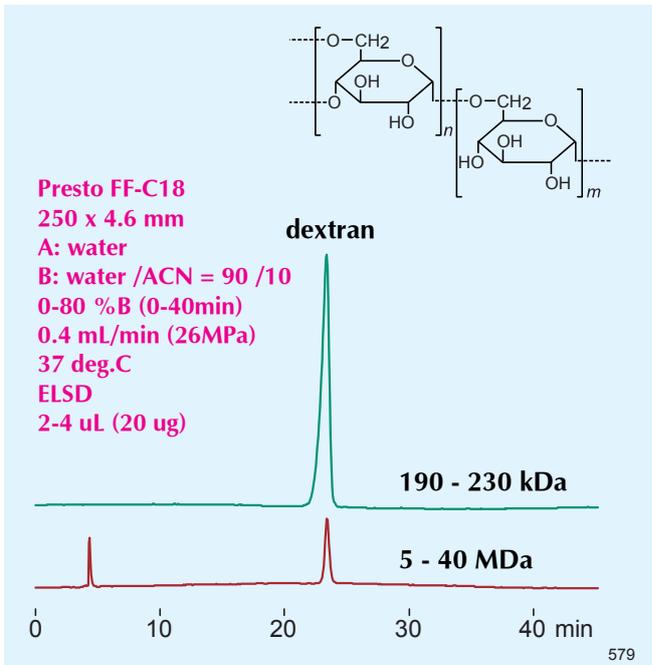
● アミロース



● マンナン



● デキストラン



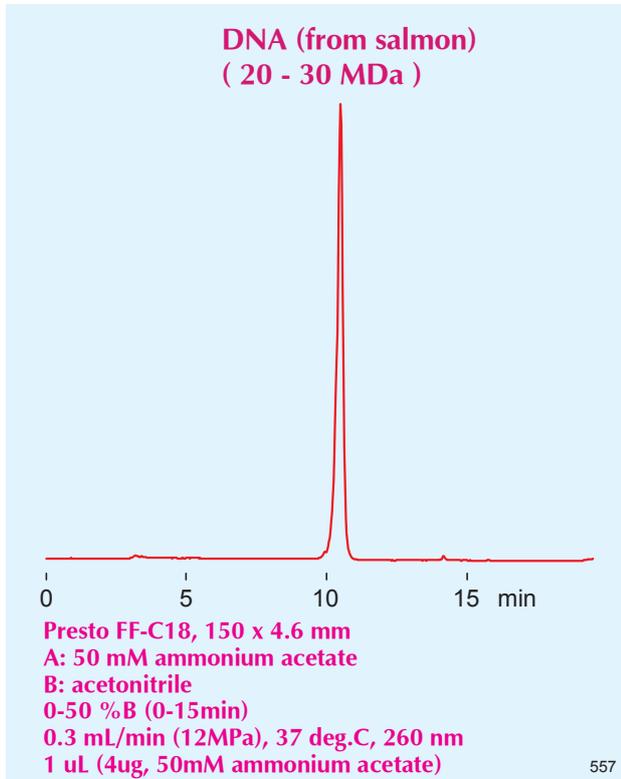
非イオン性の多糖類を Presto FF-C18 により逆相分離する場合は、移動相にpH調整剤は不要です。水とアセトニトリルによるグラジエント溶出が可能です。

多糖類には水酸基が数多く存在するため、溶出に必要なアセトニトリル濃度は構成糖の構造や結合によって異なります。また、同じ構成糖でも重合度が違う分子量数万Da以上の溶質の保持挙動は類似します。(アミロースやデキストラン)。さらに、分子量分布が大きいほどピーク幅も大きくなると考えられます。

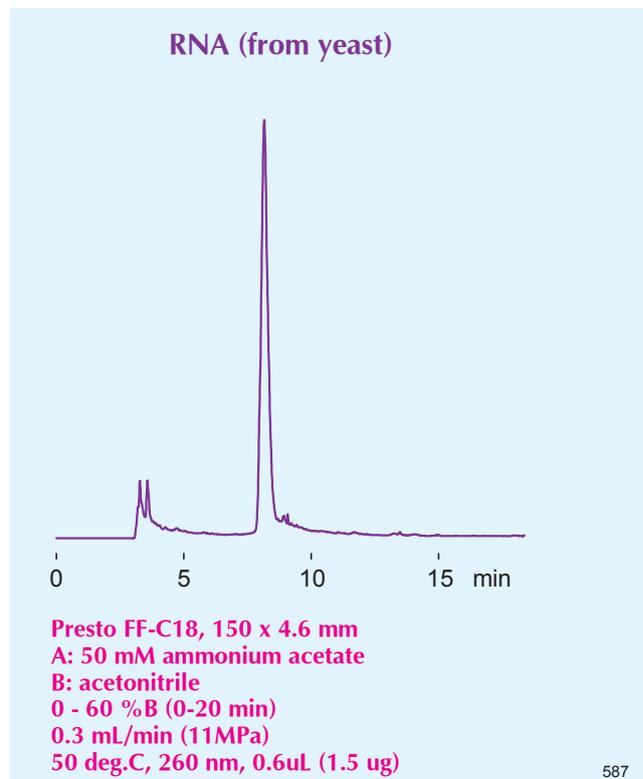
核酸の逆相分離

Presto FF-C18 は高分子核酸へも適用できます。核酸は一般に巨大分子であり、そのものを分析することは従来法では困難でした。細孔のない Presto FF-C18 はこれを可能にします。

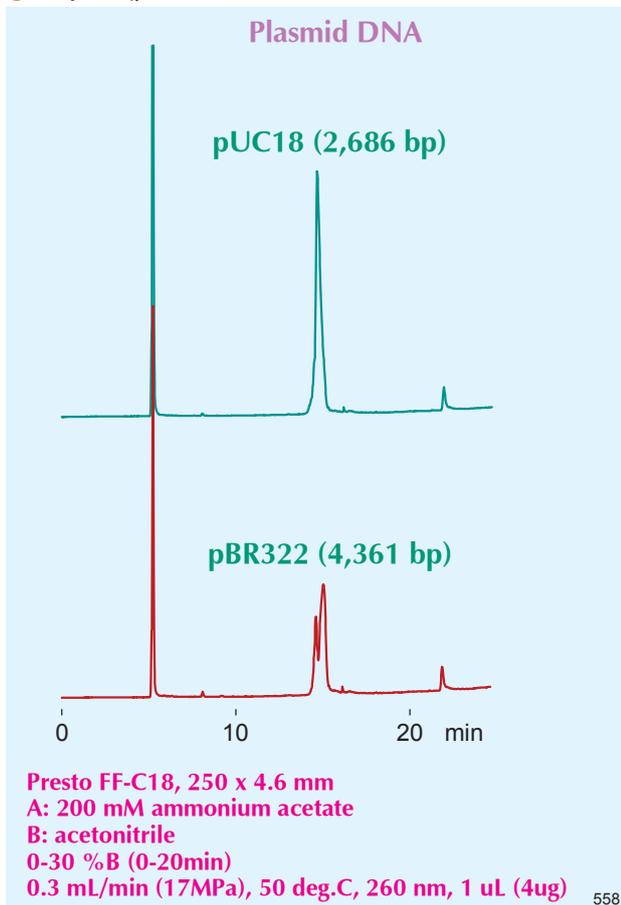
● DNA



● RNA



● プラスミドDNA



二本鎖DNAは逆相分離がたいへん困難な巨大分子です。通常はスクレアーゼで加水分解したフラグメントを分析しますが、Presto FF-C18 はフラグメントを分離することもできますが、DNAそのものの分析も可能です。

DNAやRNAを分離する場合は、カラム温度を50℃に上げて分析することによりシャープなピークが得られます。移動相には中性の酢酸アンモニウム 50mM 程度で溶出させることができます。

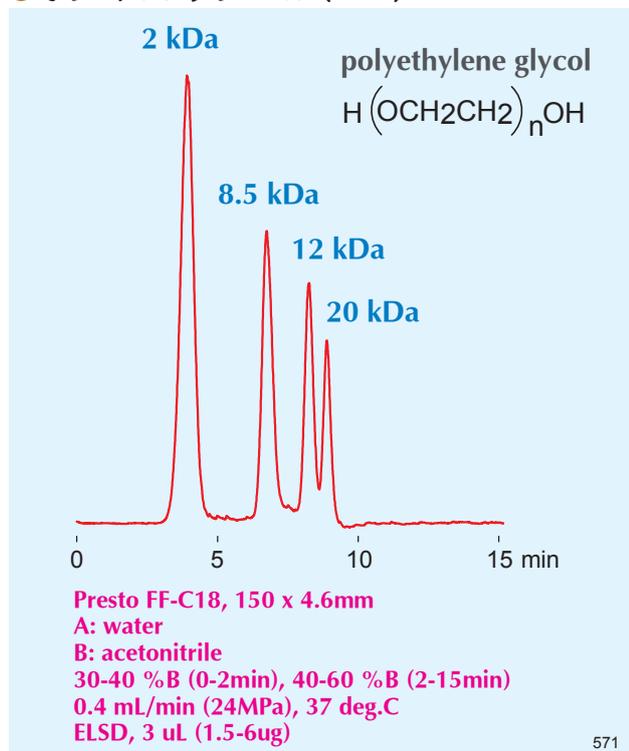
環状DNAであるプラスミドは、一般的にスーパーコイル状のcovalently closed circular構造をとる場合が多く、核DNAとは形態が異なります。本実験では低濃度の酢酸アンモニウムでは溶出することができず、200mM という高濃度が必要でした。

Presto FF-C18 は、多孔質逆相カラムでは困難であった、DNAやRNAを分離することができ、簡便な精製法として将来期待されます。

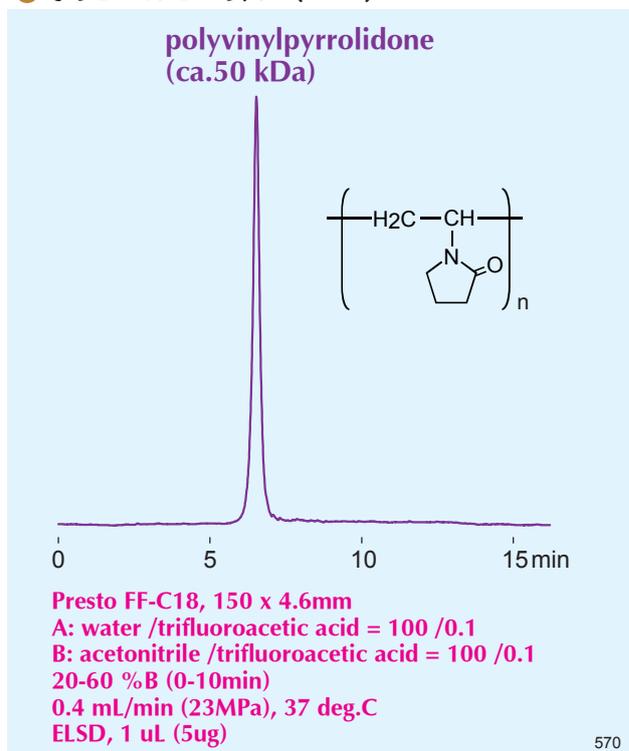
合成高分子(親水性)の逆相分離

Presto FF-C18 は、従来SECモードで分析されていた合成高分子に対しても適用でき、SECカラムよりもはるかにシャープなピーク形状が得られる場合があります。また化合物の分子量分布が狭いほどピーク形状はシャープになります。

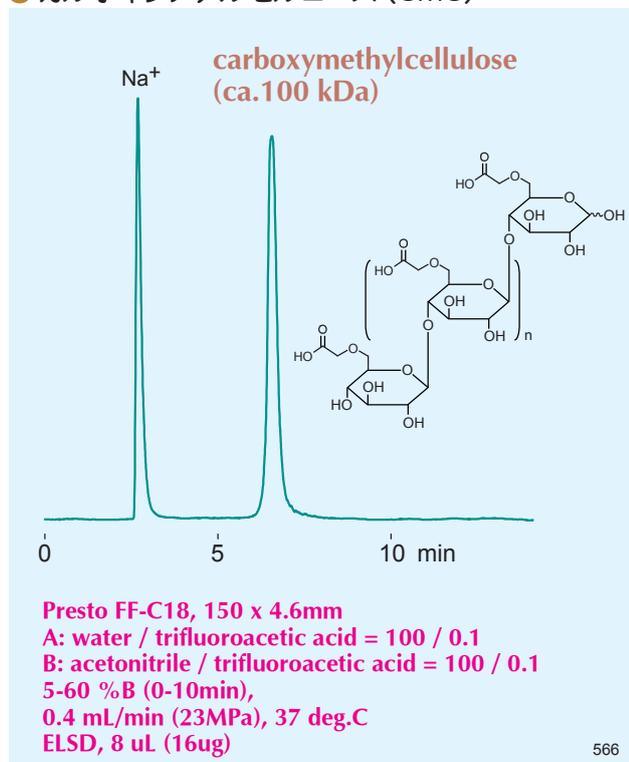
● ポリエチレングリコール (PEG)



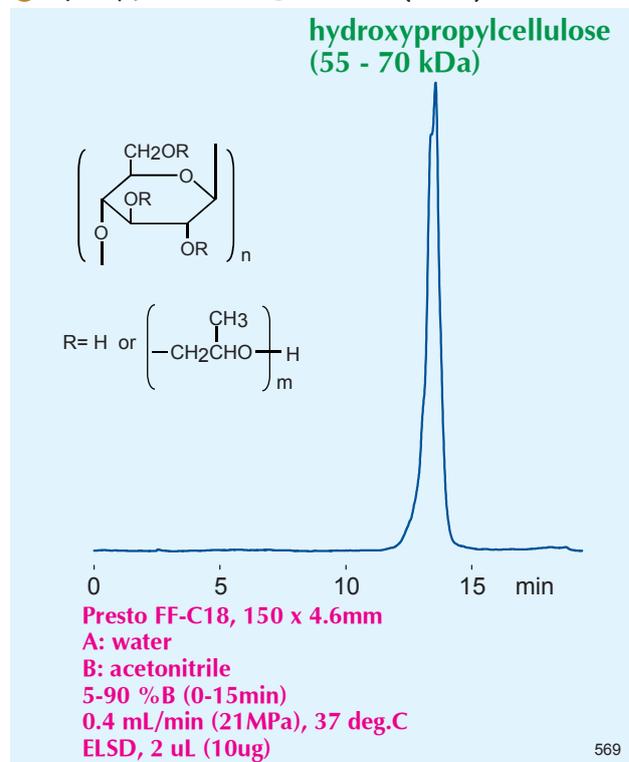
● ポリビニルピロリドン (PVP)



● カルボキシメチルセルロース (CMC)



● ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)



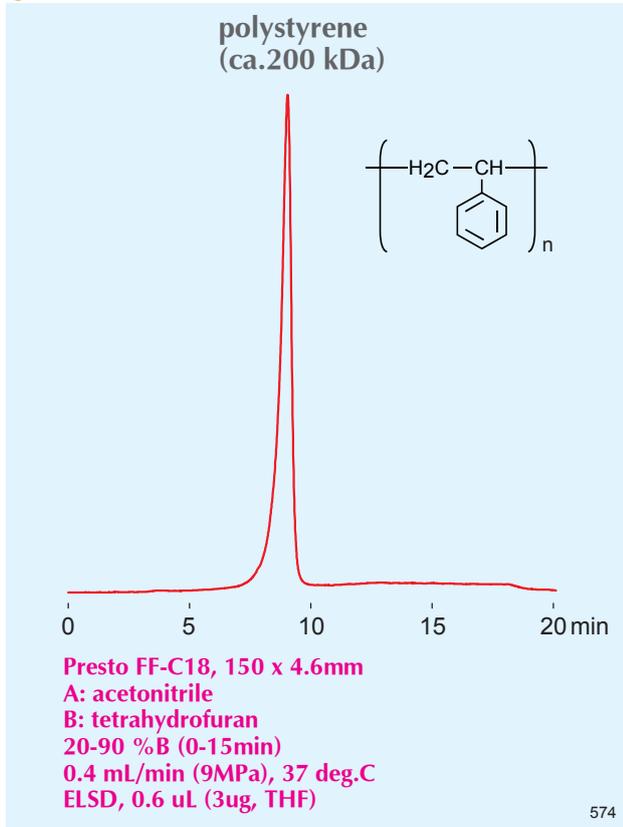
水系SEC(GFC)モードで分析されている親水性高分子化合物は、Presto FF-C18 による逆相分離モードで簡単で安価に分析することが可能となります。

比較的分子量の小さな数万Daまでであれば、同種の分子量の識別ができます(PEG)。CMCのように解離基を有する場合は、移動相にpH調整剤が必要となります。さらに、分析の再現性のためには、グラジエント溶出が必須です。

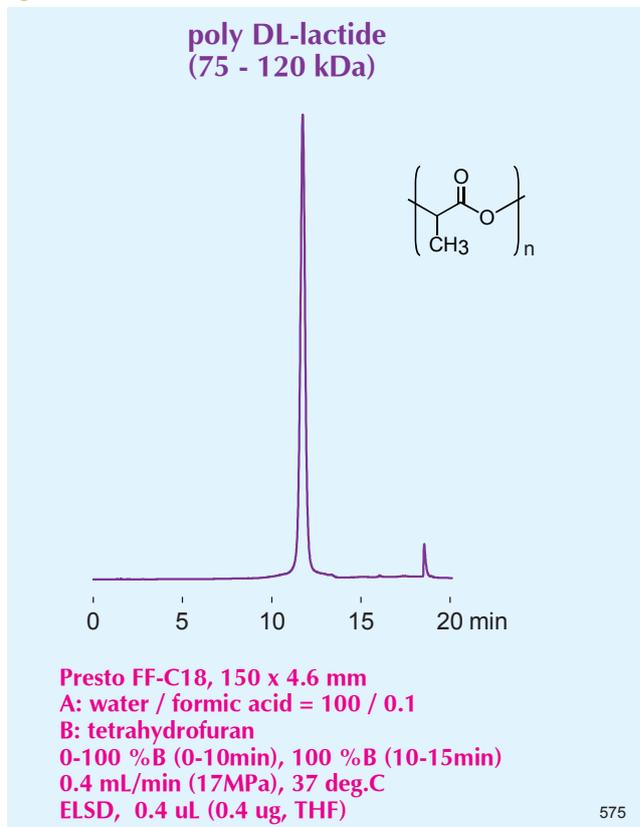
合成高分子(疎水性)の逆相分離

Presto FF-C18 は、低極性の高分子化合物にも適用できます。物質の溶解性と溶出特性を考慮した移動相組成を工夫することにより、従来のGPC分析を逆相分析に置き換えることができる可能性があります。

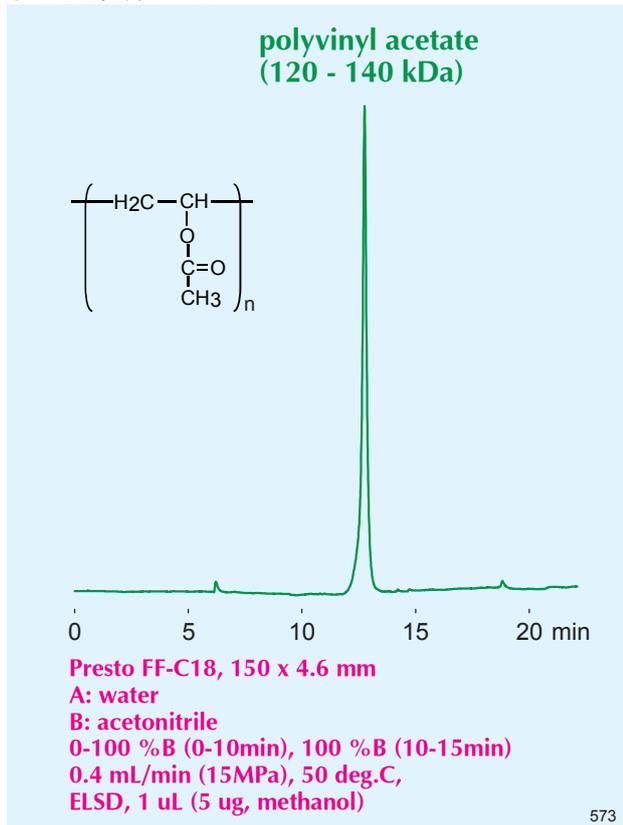
● ポリスチレン



● ポリ乳酸



● ポリ酢酸ビニル



高分子ポリスチレンは極めて疎水性が高いため、多孔性逆相カラムによる分離は困難であり、一般には非水系SEC (GPC) モードで分析されます。Presto FF-C18 を用いた非水系グラジエントで溶出できます。ピーク幅はポリスチレンの分子量分布に依存すると考えられます。

ポリ乳酸は、疎水性と溶解性の関係から、いったん水系で吸着させたあと THF 系のグラジエントで溶出されます。

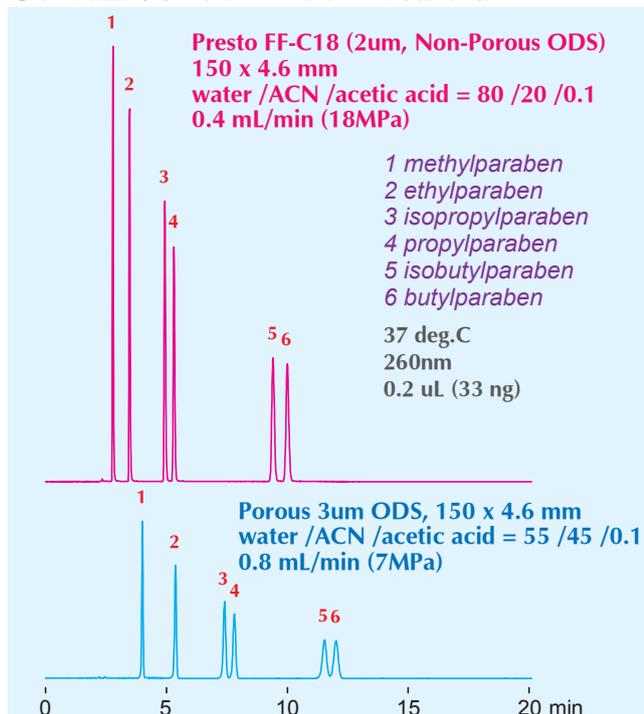
ポリ酢酸ビニルは水には溶解しませんが、逆相分離においては水からアセトニトリルへのグラジエントにより溶出します。

Presto FF-C18 を用いることにより、逆相分離による疎水性高分子分離の新しい可能性が期待されます。

低分子化合物の逆相分離

Presto FF-C18 は非多孔性であり比表面積が小さいため、低分子化合物の分離に必ずしも好適であるとはいえません。しかし、化合物の構造によっては多孔性ODSカラム以上の分離性能が得られる場合があります。

● 低流量・高感度しかも優れた分離性能



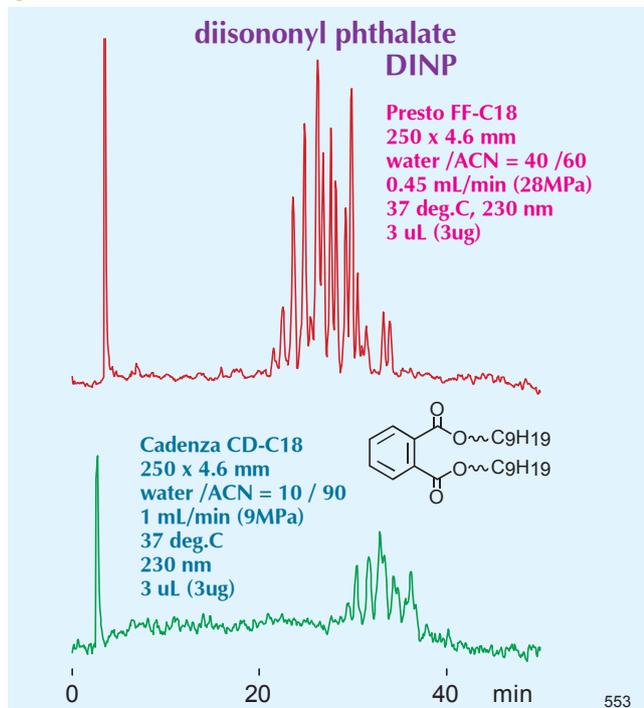
Presto FF-C18 は、移動相組成や流量を最適化すれば、多孔性ODSカラムに比べて格段にシャープなピークが得られることがあります。

多孔性カラムのような細孔内拡散がないために、ベースライン付近のピークのキレが良好になり分離度の向上に有益です。

一般に Presto FF-C18 を使用するときの流量は、同サイズ多孔性ODSカラムの半分程度に下げることが感度や分離の向上が見込まれます。

2µm粒子でありながら低流量で威力を発揮することがノンポーラスODSの特長であり、普通のHPLCでも使用可能な利便性も生まれます。

● アルキル分岐鎖の認識能

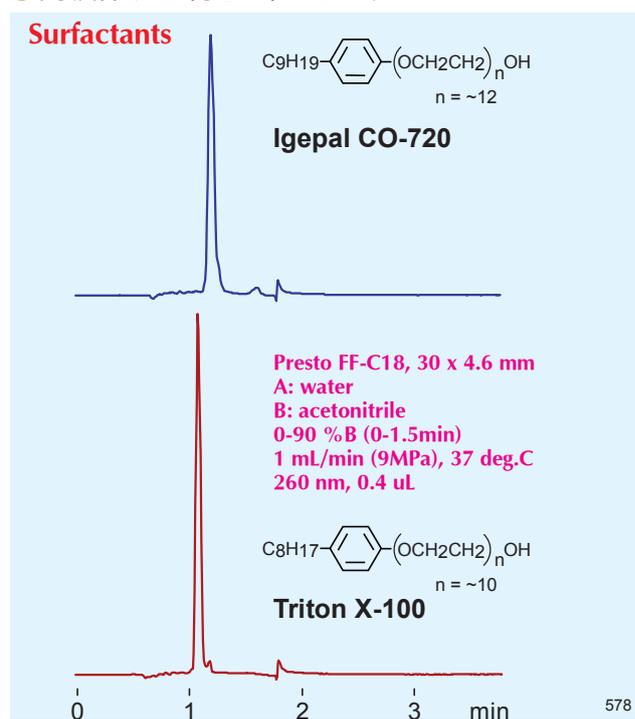


フタル酸ジエステルは分岐鎖による異性体が数多くあり、多孔性ODSカラムでは分離が困難です。

Presto FF-C18 はアルキル鎖による構造異性体の認識が優れていると考えられます。

多孔性ODSよりも低流量で高感度・高分解能分離が実現できる可能性があります。

● 同族体混合物を1本のピークに



Presto FF-C18 は多孔性ODSに比べて分子認識が悪い場合もあります。

イゲパールやトリトンなどは、オキシエチレン鎖長の数が異なる混合物からなっています。多孔性ODSカラムはこのオキシエチレン鎖長の違いを良く分離できますが、Presto FF-C18 ではあまり分離効果がありません。逆に分離度の悪さを利用するなら、短いカラムを用いた高速グラジエント分析により、混合物を1本のピークとして溶出させることができます。

多孔性ODSとは異なる分離特性を有する Presto FF-C18 を併用するなら、今までない成果が期待できます。

♪ Presto FF-C18 使用上の留意点

Presto FF-C18 は、粒子径2 μ m、非多孔性ODSシリカカラムです。比表面積は一般的多孔性ODSカラムよりも極めて小さく、同一移動相条件で分析することは困難です。また粒子径は2 μ mであり、従来の3-5 μ mカラムと同様の流量で使用する場合は、高圧タイプのHPLC (UHPLC) が必要となります。本カラムを有効に使用するためには以下の事項に留意してください。

● 移動相組成

Presto FF-C18 は多孔性ODSに比べて比表面積が極めて小さいために、従来の移動相組成では保持が得られません。多孔性ODSカラムと同様の保持を得るには、移動相有機溶媒比率を 1/2 - 1/3 に設定する必要があります。これは、有機溶媒消費量を削減する上では大きなメリットがあります。

● 流量設定

Presto FF-C18 は粒子径が2 μ mであり、高圧タイプのUHPLCであれば 50MPa（内径 6mm以下）の圧力まで使用できます。非多孔性粒子の特長として高流量でもカラム効率の低下が少ないメリットがあります。一方、細孔内拡散がないために、低流量でもカラム効率の低下が少ない特長もあります。従来の多孔性ODSよりも1/2-1/3程度の低流量に設定することにより、ピーク感度や分離度の向上が期待できます。また低流量にすることにより、従来からのHPLCでも使用することができます。

● 試料溶解溶媒と負荷量

Presto FF-C18 は比表面積が小さいため、注入試料溶媒の影響を受けやすくなります。特に水比率の高い移動相のとき、試料溶媒に有機溶媒を用いると、注入時に一部の溶質がカラム内を移動してピーク形状が悪くなることがあります。試料溶解溶媒はできるだけ水比率の高い溶媒を用いてください。これにより、多孔性ODSカラムと同様の注入容量が可能となります。

● 高極性物質の保持限界

Presto FF-C18 は比表面積が小さいため、一般に高極性物質の保持に難点があります。しかし、本カラムは水100%系移動相も使用できますから、有機溶媒濃度を0.1-1% のように極端に下げることにより、保持の最適化をすることは可能です。

● 溶出モード

Presto FF-C18 は比表面積が小さいため、アイソクラティック分析は多孔性ODSに比べて不利です。可能な限りグラジエント溶出をおすすめします。アイソクラティック分析の場合は、移動相のイオン強度を上げて、溶質のピーク形状や保持の再現性に留意してください。

♪ オーダリングインフォメーション

プレスト Presto FF-C18 粒子:2 μ mシリカ, 細孔径:非多孔性, 固定相:オクタデシル基, エンドキャッピング:あり 2 μ m

長さ (mm)	製品コード / 税抜価格(円)					
	内径 1 mm	内径 2 mm	内径 3 mm	内径 4.6 mm	内径 6 mm	内径 10 mm
10	-	FF020 / 45,000	FF030 / 45,000	FF000 / 45,000	-	-
20	-	FF029 / 45,000	FF039 / 45,000	FF009 / 45,000	-	-
30	FF011 / 45,000	FF021 / 45,000	FF031 / 45,000	FF001 / 45,000	FF061 / 80,000	FF0P1 / 180,000
50	FF012 / 50,000	FF022 / 50,000	FF032 / 50,000	FF002 / 50,000	FF062 / 90,000	FF0P2 / 200,000
75	FF013 / 55,000	FF023 / 55,000	FF033 / 55,000	FF003 / 55,000	FF063 / 100,000	FF0P3 / 220,000
100	FF014 / 60,000	FF024 / 60,000	FF034 / 60,000	FF004 / 60,000	FF064 / 120,000	FF0P4 / 250,000
150	FF015 / 75,000	FF025 / 75,000	FF035 / 75,000	FF005 / 75,000	FF065 / 150,000	FF0P5 / 320,000
250	FF016 / 95,000	FF026 / 95,000	FF036 / 95,000	FF006 / 95,000	FF066 / 180,000	FF0P6 / 400,000

「マイクロ/ナノカラム」についてはお問い合わせください。

取扱店

Imtakt
インタクト株式会社

ホームページにおいでください。
最新情報があります。

www.imtakt.com

〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町 京都リサーチパーク
PHONE:075-315-3006 FAX:075-315-3009 E-mail: info@imtakt.com