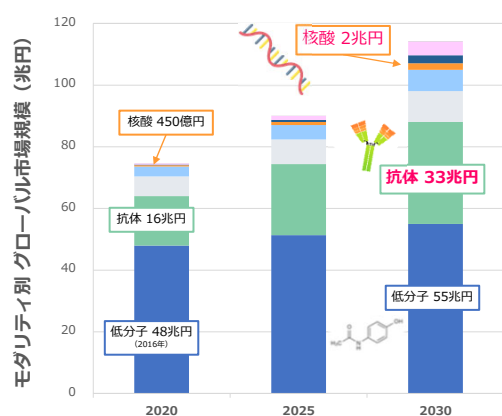


これで解決！タンパク質、ペプチドのLC分析 におけるカラム・バイアルの選び方

株式会社島津製作所 分析計測事業部

医薬品市場の現状と推移予測

- 核酸医薬：現在の市場規模 小、成長率 大（CAGR 16.7%）。研究開発分野で分析の機会が多い。
- ペプチド/抗体医薬等：現在、一定規模の市場あり（CAGR 1.4%（低分子）、7.5%（抗体））。研究開発の他、製造～品質管理でも分析の機会が多い。



モダリティ	現在の市場規模	成長性
抗体	大	中
タンパク質	中	小
ペプチド	中	中
核酸	小	大
低分子	大	小

10兆円以上：大
 1～10兆円：中
 1兆円未満：小

CAGR 10%以上：大
 CAGR 5～10%：中
 CAGR 1～5%：小

市場の変化は「機器分析の需要」に影響する

令和元年度補正予算調査事業 医薬品・再生医療・細胞治療・遺伝子治療関連の産業化に向けた課題及び課題解決に必要な技術に関する調査報告書
https://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouyoushiyoushi/01theses_ayukakaren-sangyouka.html

バイオ医薬品のLC、LC/MS分析

- LCによるバイオ医薬品分析はサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)やイオン交換クロマトグラフィー(IEX)、逆相クロマトグラフィー(RP)など、多様。

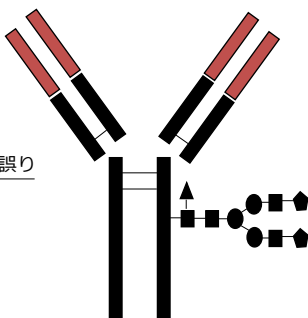
LC(SEC *1) 凝集体形成

LC(SEC) 分解物(断片化)

SDS-PAGE ジスルフィド結合の誤り

LC(HIC *2) Met残基の酸化

LC(IEX *3) 重鎖C末端
Lys残基の欠失



N末端Glu、Gln残基の酸化 (Glu, Gln → pGlu) LC(IEX)
LC/MS

Asn残基の脱アミド(Asn → Asp) LC(IEX)
Asn残基の異性化(Asp → isoAsp) LC/MS

LC(RP *4)
アミノ酸配列 LC/MS

糖鎖構造の違い LC/MS(HILIC *5)

人為的修飾 (PEG化、アイソトープ修飾等) LC(SEC, HIC)
LC/MS

- * 1 SEC: サイズ排除クロマトグラフィー * 2 HIC: 疎水クロマトグラフィー
* 3 IEX: イオン交換クロマトグラフィー * 4 RP: 逆相クロマトグラフィー

3

タンパク質、ペプチド分析における カラムやバイアルについて



- ・ 上手く分離ができない。
 - ・ カラムを変えてみたいが種類が多く区別がつかない。
- etc...

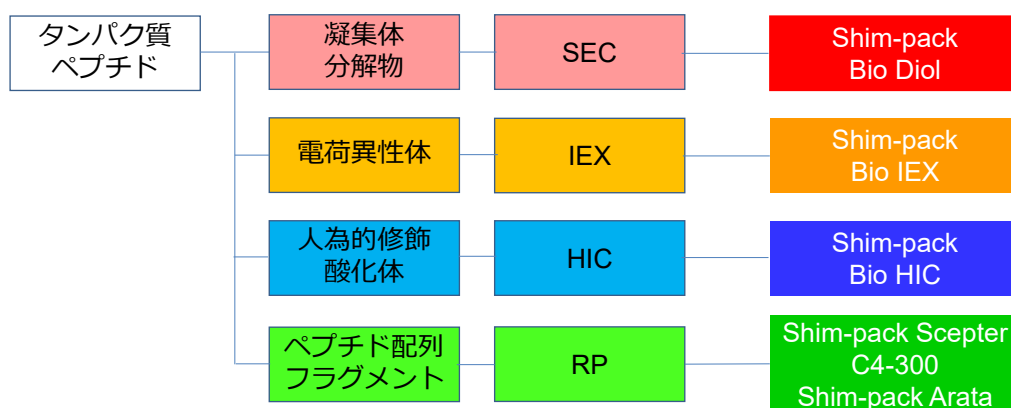
4

本日紹介する消耗品

- ① Shim-pack™ Bio シリーズ
- ② Shim-pack Scepter™ C4-300, Shim-pack Arata™
- ③ TORAST™-H Bio シリーズ

5

分析用途に対応するShim-pack シリーズ



6

SHIMADZU

サイズ排除クロマトグラフィーカラムの紹介

Shim-pack Bio Diol

特長

- バイオ医薬品の凝集体やフラグメントの分離に有効
- 微粒子充填剤により高速・高分離分析が可能

Shim-pack Bio Diol	Diol-60	Diol-120	Diol-200	Diol-300
基材	シリカゲル			
官能基	ジヒドロキシプロピル (Diol)			
粒子径	3, 5 μm		2, 3, 5 μm	
ポアサイズ	6 nm	12 nm	20 nm	30 nm
使用pH範囲	5.0-7.5			
対象分子量範囲	1万以下	1,000 – 10万	5,000 – 30万	2万 – 100万
使用サンプル例	低分子/ペプチド	ペプチド/核酸	核酸/タンパク質	タンパク質

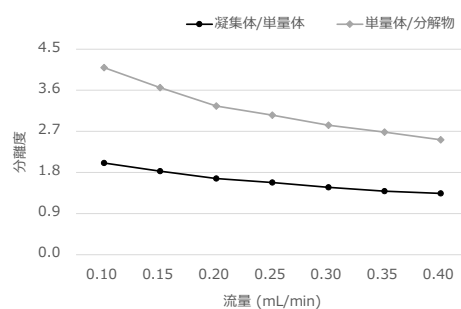
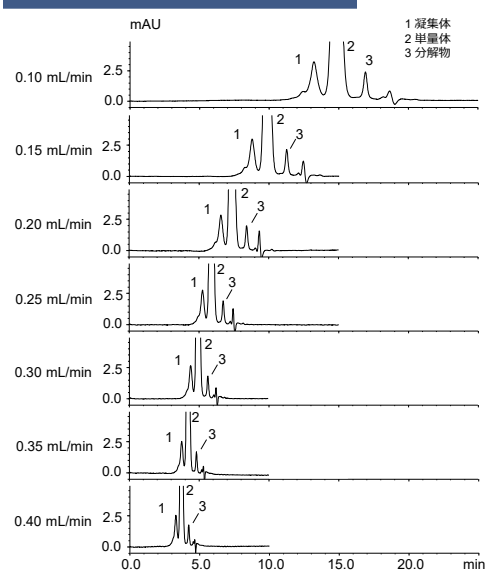
7

SHIMADZU

サイズ排除クロマトグラフィーカラムの紹介

Shim-pack Bio Diol

抗体の凝集体の分析例



Tips

- 移動相の塩濃度やpH
-> 二次相互作用や試料の変性を抑制
- 流量
-> 低流量にするほど分離が向上
- カラムの長さ
-> 長くするほど分離が向上
- ガードカラム
-> 微粒子充填剤カラムにはガードカラム推奨

8

イオン交換クロマトグラフィーカラムの紹介

Shim-pack Bio IEX

特長

- 非特異的吸着が非常に小さいポリマー充填剤を使用
- 高速・高分離に最適なノンポーラスタイプ / 精製に最適なポーラスタイプ

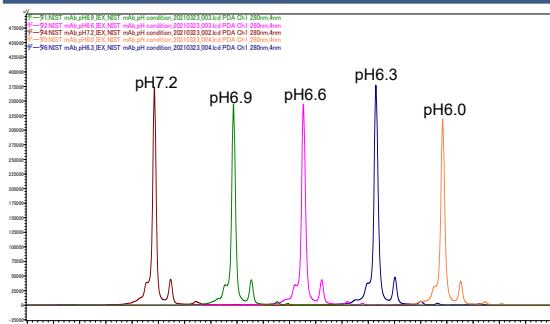
Shim-pack Bio IEX	Q-NP	Q	SP-NP	SP
基材	親水性ノンポーラス ポリマー	親水性ポーラス ポリマー	親水性ノンポーラス ポリマー	親水性ポーラス ポリマー
官能基	-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃		-(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	
粒子径	5 μm		3, 5 μm	
使用pH範囲	2-12			

9

イオン交換クロマトグラフィーカラムの紹介

Shim-pack Bio IEX

塩グラジエントによるチャージバリエーション分析例



Column : Shim-pack Bio IEX SP-NP(4.6 mm I.D. × 100 mm, 5 μm)

Mobile Phase : A: 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液
B: 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 + 500mM NaCl

Flow Rate : 0.6 mL/min

Detection : UV at 280 nm

Column Temp. : 25 °C

Inj. Volume : 5 μL

Sample : NIST mAb standard

Vial : TORAST-H™ Bio Vial

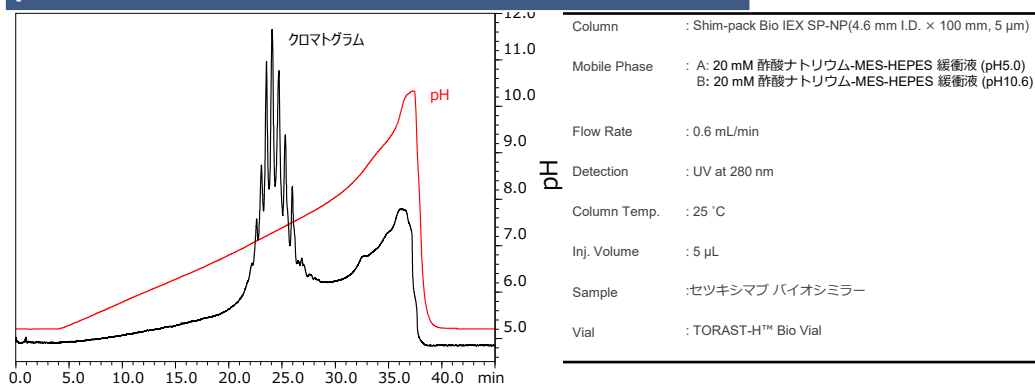
Tips

- 移動相の塩濃度やpH
->バリエーションの分離に影響
- 流量
->低流量にするほど回収率向上
- カラムの長さ
->長くするほど分離が向上

10

イオン交換クロマトグラフィーカラムの紹介 Shim-pack Bio IEX

pHグラジエントによるチャージバリエーション分析例



Tips

- 移動相の濃度やpH
->濃度は低濃度、pHは抗体のpIに合わせて設定
- 流量
->低流量にするほど回収率向上
- カラムの長さ
->カラムの長さは分離にほぼ影響しない

11

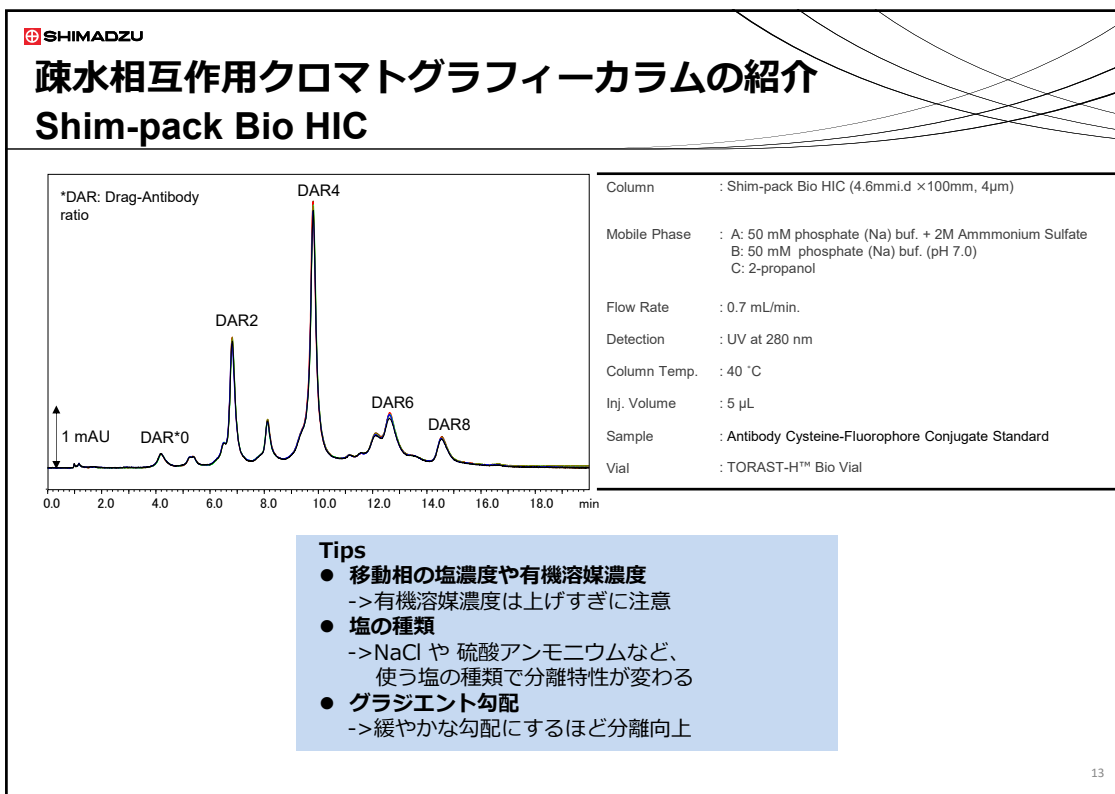
疎水相互作用クロマトグラフィーカラムの紹介 Shim-pack Bio HIC

特長

- 抗体薬物複合体やたんぱく質の酸化異性体などの分析に有効
- 低背圧により高流量での迅速分析が可能

Shim-pack Bio HIC	
基材	親水性ノンポラスポリマー
官能基	ブチル基
粒子径	4 μm
使用pH範囲	2-12

12



Tips

- 移動相の塩濃度や有機溶媒濃度
->有機溶媒濃度は上げすぎに注意
- 塩の種類
->NaCl や 硫酸アンモニウムなど、
使う塩の種類で分離特性が変わる
- グラジエント勾配
->緩やかな勾配にするほど分離向上

SHIMADZU

Shim-pack Bio シリーズ まとめ

1. 抗体医薬品を代表するバイオ医薬品の分析は多岐にわたる。
2. 各分析目的に合わせ、Shim-pack Bio シリーズを
ラインアップ。

14

本日紹介する消耗品

- ① Shim-pack™ Bio シリーズ
- ② Shim-pack Scepter™ C4-300, Shim-pack Arata™
- ③ TORAST™-H Bio シリーズ

15

Shim-pack Scepter C4-300 の紹介

特長

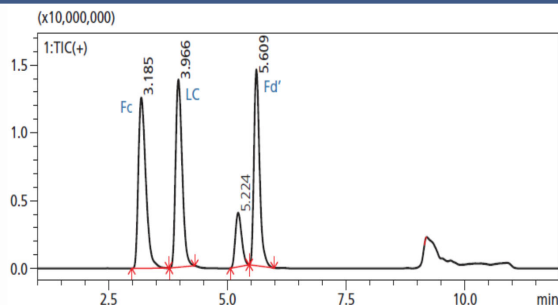
- 幅広い条件下での卓越した耐久性と性能
- 充填剤に含まれる金属イオンの影響を抑制
- 30 nm ポアサイズにより、抗体フラグメントなどの分析に最適

Shim-pack Scepter	逆相						HILIC
	C18	HD-C18	C8	C4	Phenyl	PFPP	Diol-HILIC
官能基タイプ	C18	C18 (高官能基密度)	C8	C4	Phenylbutyl	Pentafluorophenylpropyl	Dihydroxypropyl
基材	有機シリカハイブリッド						
粒子径	1.9, 3, 5 μm						
ポアサイズ	12 nm	8 nm	12 nm	30 nm	12 nm		
エンドキャッピング	独自						なし
水100%移動相	使用 可	使用 不可	使用 不可	使用 可	使用 可	使用 可	-
USP分類	L1	L1	L7	L26	L11	L43	L20

16

Shim-pack Scepter C4-300 の紹介

抗体消化物のフラグメント分析例



Column	: Shim-pack Scepter C4 (2.1 mm I.D. × 50 mm, 3 μm)
Mobile Phase	: A: 0.1% HCOOH in H ₂ O B: 0.1% HCOOH in CH ₃ CN
Gradient	: B conc. 1% (1min) → 25% (1.1min) → 40% (8min) → 95% (8.1-10min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min.
Detection	: LCMS TM -8060
Column Temp.	: 50 °C
Inj. Volume	: 1 μL
Sample	: IdeZ digested + DTT treated Adalimumab 0.2 mg/mL

Tips

- 初期移動相
->サンプルがカラムに保持するよう設定
- グラジエント勾配
->緩やかな勾配に設定するのが良い

17

Shim-pack Arata の紹介 特長

特長

- 希薄有機酸移動相における塩基性化合物の卓越したピーク形状
- 希薄酸移動相における迅速なカラムの平衡化
- ペプチドに対する良好な分離性能

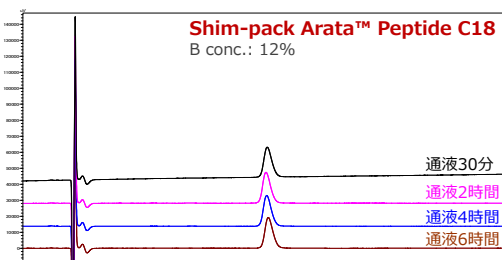


18

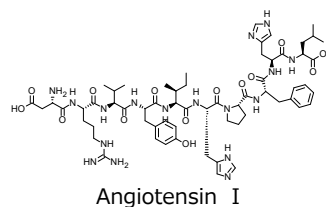
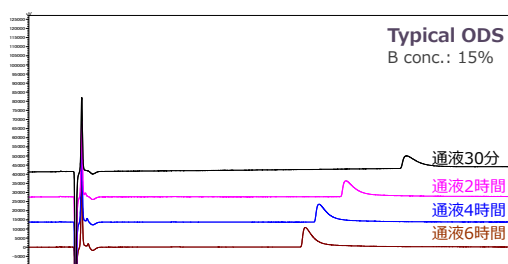
SHIMADZU

Shim-pack Arata の紹介 優れたピーク形状と迅速なカラム平衡化

ペプチド試料の分析におけるカラムの平衡化比較



Column	: Shim-pack Arata Peptide C18 (3.0 mm I.D. × 75 mm, 2.2 μm) Typical ODS (3.0 mm I.D. × 75 mm, sub2 μm)
Mobile Phase	: A: 0.1% HCOOH in H ₂ O B: 0.1% HCOOH in CH ₃ CN
Flow Rate	: 0.4 mL/min.
Detection	: UV at 254 nm
Column Temp.	: 40 °C
Inj. Volume	: 1 μL
Sample	: Angiotensin I
Vial	: TORAST-H™ Bio Vial

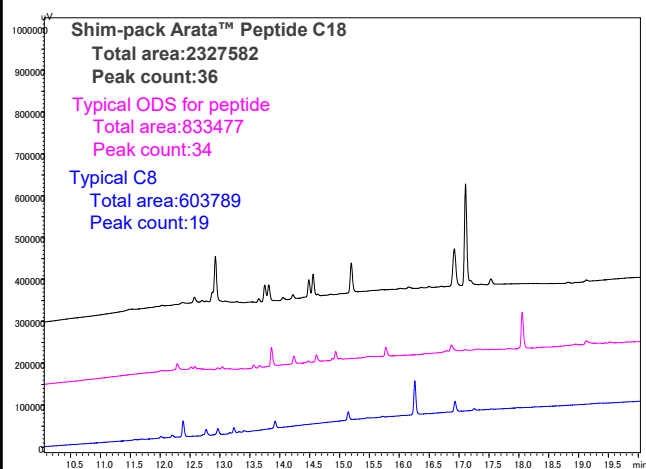


19

SHIMADZU

Shim-pack Arata の紹介 優れたペプチドの回収率

トリプシン消化ペプチド試料の分析例



Column	: Shim-pack Arata Peptide C18 (2.0 mm I.D. × 150 mm)
	Typical ODS for peptide (2.1 mm I.D. × 150 mm)
	Typical C8 (2.0 mm I.D. × 150 mm)
Mobile Phase	: A: 0.1% HCOOH in H ₂ O B: 0.1% HCOOH in CH ₃ CN
	2%B (0-5 min.), 2-45%B (5-20 min.), 100%B (20.01-25 min.), 100-2%B (25.01 min.), 2%B (25.01-30 min.)
Flow Rate	: 0.2 mL/min.
Detection	: UV at 214 nm
Column Temp.	: 40 °C
Inj. Volume	: 5 μL
Sample	: Myoglobin tryptic digest
Vial	: TORAST-H Bio Vial

20

Shim-pack Scepter C4-300, Shim-pack Arata まとめ

1. 抗体のサブユニット分析など、分子量の大きなタンパク質の分析には、細孔径が大きく疎水性相互作用が程よく弱い Shim-pack Scepter C4-300がおすすめ。
2. 塩基性化合物の吸着を抑制するために開発されたShim-pack Arataは、迅速なカラム平衡化とペプチドの高い回収率によりペプチド分析のメソッド開発効率を向上する。

21

本で紹介する消耗品

- ① Shim-pack™ Bio シリーズ
- ② Shim-pack Scepter™ C4-300, Shim-pack Arata™
- ③ TORAST™-H Bio シリーズ

22

SHIMADZU

低吸着樹脂製容器・器具 特長

特長

- ペプチドが極めて低吸着なPP製消耗品。
- 疎水性吸着を抑制することで、酸性、塩基性、疎水性ペプチドのすべての感度向上。

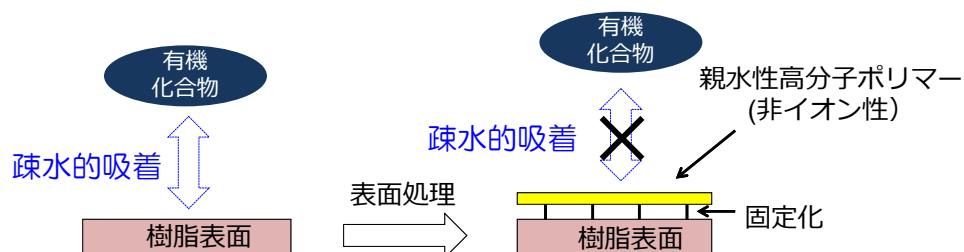


23

SHIMADZU

低吸着樹脂製容器・器具 樹脂材質への吸着メカニズムと開発コンセプト

- 疎水性の樹脂表面と有機化合物の疎水的部分との疎水的吸着が主な吸着メカニズム。
-> 試料との接触部を親水化することで低吸着化。



試料との接触部を親水化することで低吸着化した。

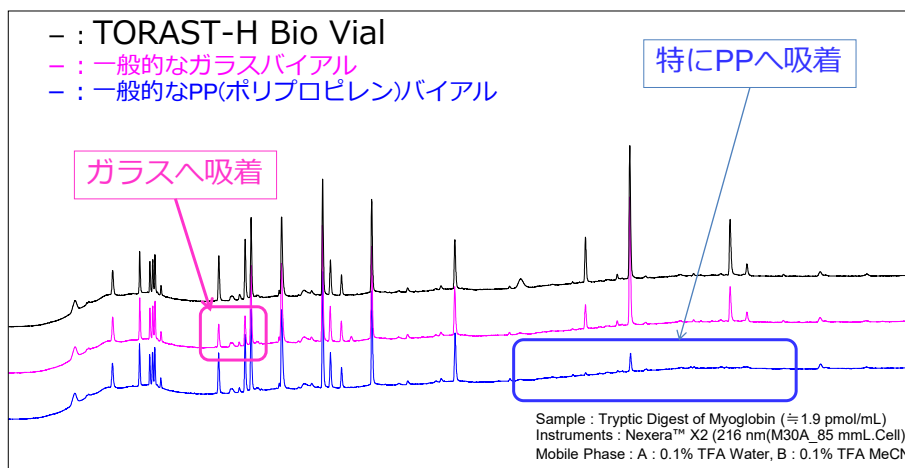
24

SHIMADZU

低吸着樹脂製容器・器具 (TORAST-H Bio Vial)

ミオグロビン(≒1.9 pmol/mL)のトリプシン消化物の吸着試験

- ミオグロビン消化ペプチドでバイアルを評価。
-> 他のバイアルと比べ7-8min, および13min 以降で特異性を確認。



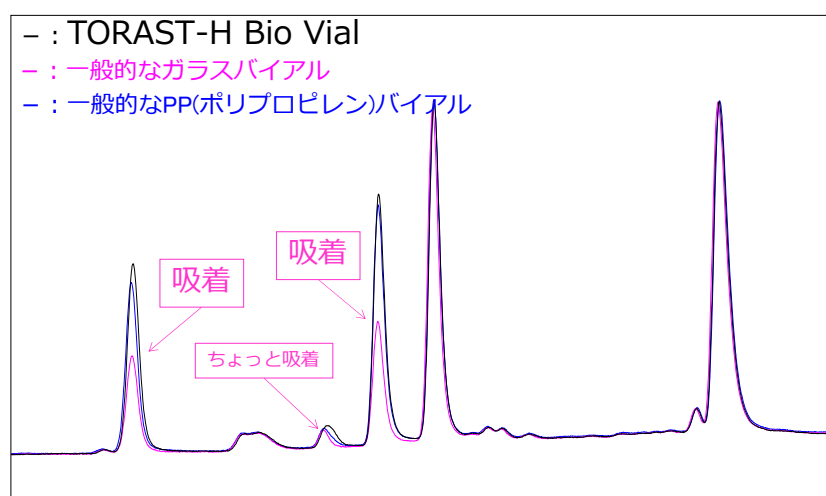
25

SHIMADZU

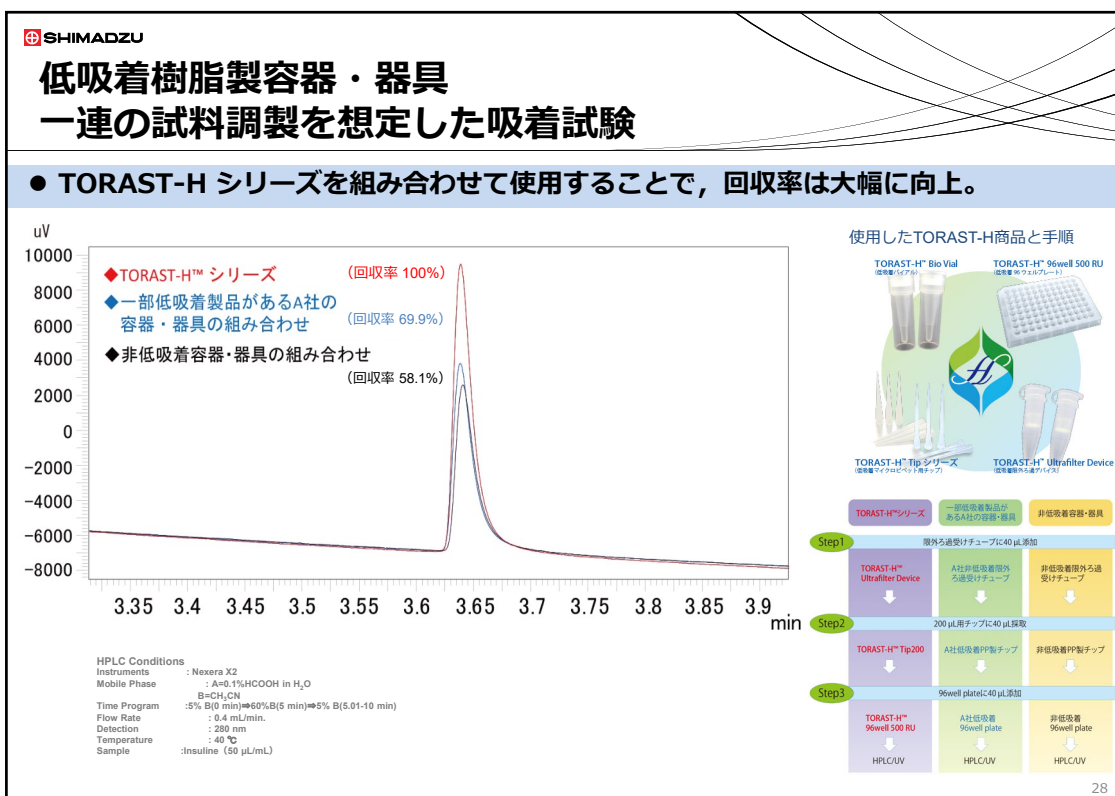
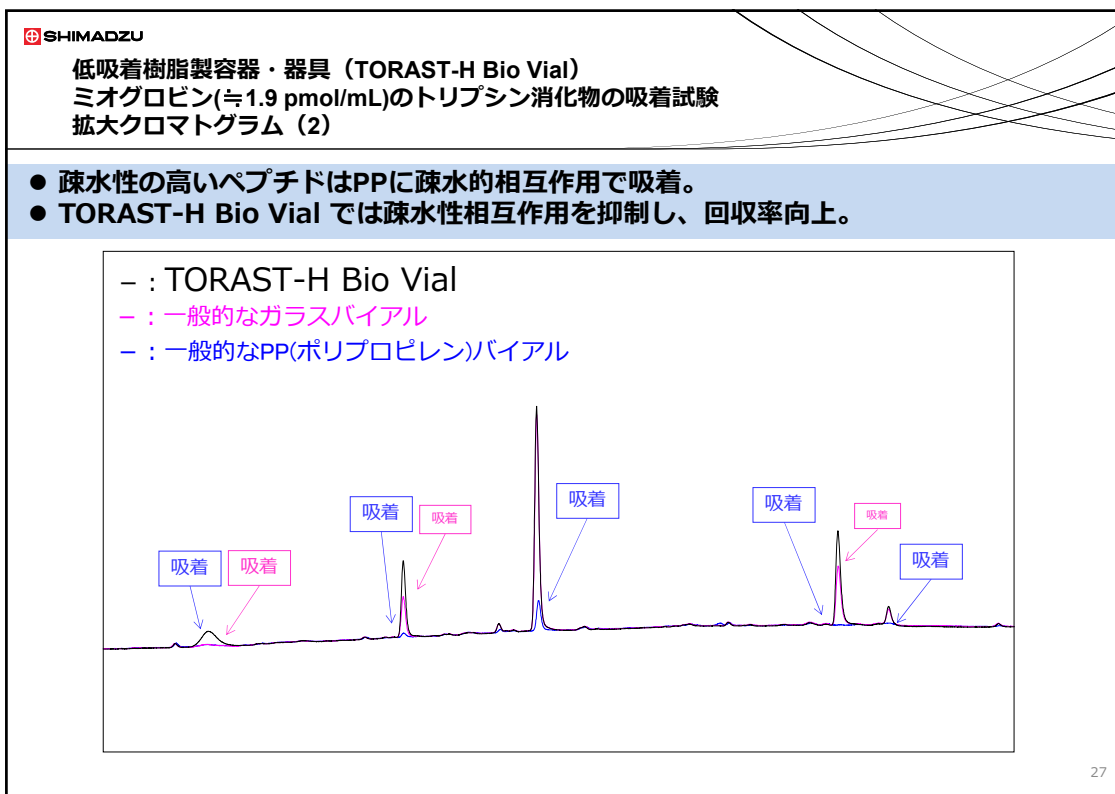
低吸着樹脂製容器・器具 (TORAST-H Bio Vial)

ミオグロビン(≒1.9 pmol/mL)のトリプシン消化物の吸着試験
 拡大クロマトグラム (1)

- 極性の高いペプチドはガラスの表面のシラノールイオンとの相互作用により吸着。



26



低吸着樹脂製容器・器具 まとめ

1. 一般にPPバイアルは疎水性相互作用による試料の吸着が
起こりうる。
2. TORAST-H Bio シリーズを用いることで疎水性や
イオン性のペプチドの回収率が向上する。

29

まとめ

島津が提供する各種ウェブページや資料・動画なども是非ご活用ください



**何かわからないことや不明なことがございましたら、
各代理店もしくは島津ジーエルシーまでお声がけください**

Shim-pack, Shim-pack Scepter, Shim-pack Arata, TORAST, Nexera は株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他海外における商標です。

30