

テクニカルレポート No.27

UHPLCによる中分子ペプチドの分析

1. はじめに

ペプチドの分析において移動相の選択は、悩みの種となることはないでしょうか？特に、イオンペア試薬を使用するかしないかでカラムやMSに与えるリスクは気になるところだと思います。簡単にまとめますと、イオンペア試薬を使用することで、

- ・カラムを専用化
- ・イオンサプレッション
- ・システム汚染

が懸念されることはないでしょうか？

本レポートではイオンペア試薬の有無で結果に与える影響およびリスク低減に向けたメソッド開発を提案していきたいと思います。

2. メソッド開発について

弊社での受託分析サービスの中のメソッド開発は研究開発⇔品質管理を考慮して構築していきます。特にヒューマンエラーが起こるリスクを最大限に削減し、誰がやっても同じ結果を得られる【再現性】を重視します。そこで、最も重視するのが移動相の調製になります。移動相の調製は再現性を維持するために重要なファクターでありヒューマンエラーも発生する率が高いため、簡潔な調製が望ましいと思われれます。

その例として、本レポートでは添加剤のみで調製された移動相でのメソッド開発を試みました。

3. インスリンの分析

インスリン、ヒト、組換え体 (M.W.=5807.57)をターゲットとし、下記のメソッドを構築しました。

Conditions:

Column: FlexFire C18, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1%HCOOH

B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH

Gradient:	min	mL/min	%A	%B	Curve
	0.00	0.5	80	20	5
	5.04	0.5	40	60	5
	5.05	0.5	80	20	5

Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV280nm

Sample: Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)

Injection volume: 0.3 μ L

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

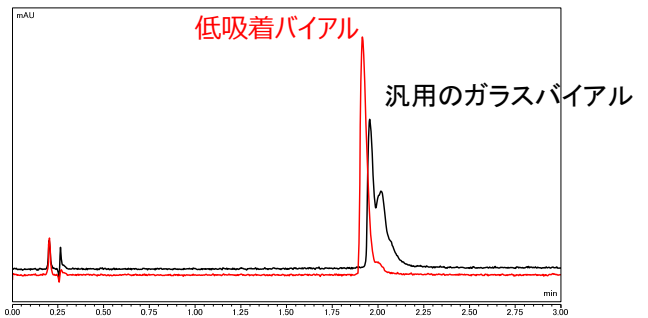
Mixer: 10 μ L



0.1%ギ酸移動相は最もシンプルな移動相で、pHの調製を必要としないため、イレギュラーが起こった際にも移動相の調製を疑うことはほぼありません。また、最終の検出器がLC/MSを選択するケースが多いため、ギ酸移動相を使用したメソッドの構築は大きなメリットがあるといえます。

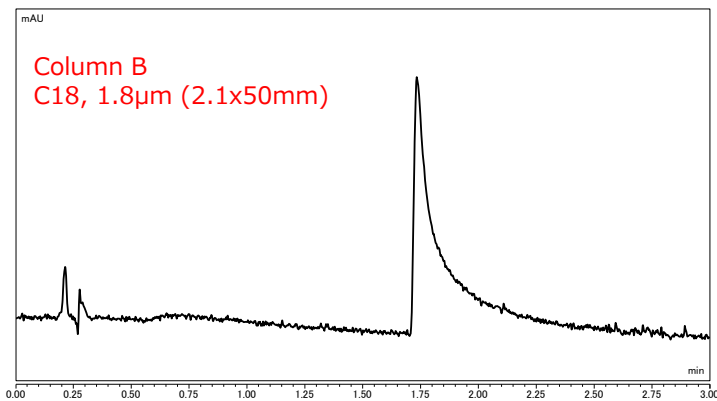
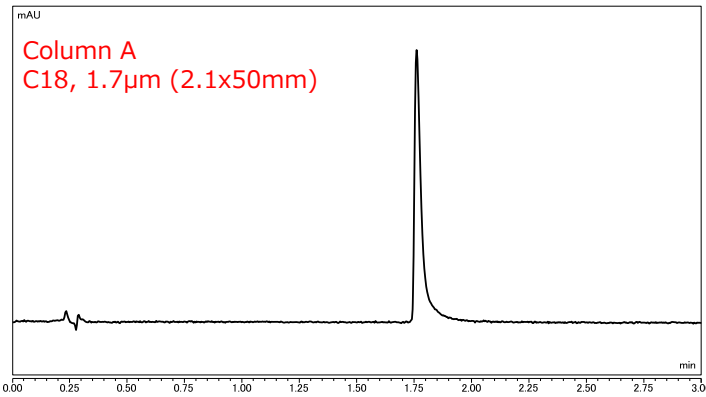
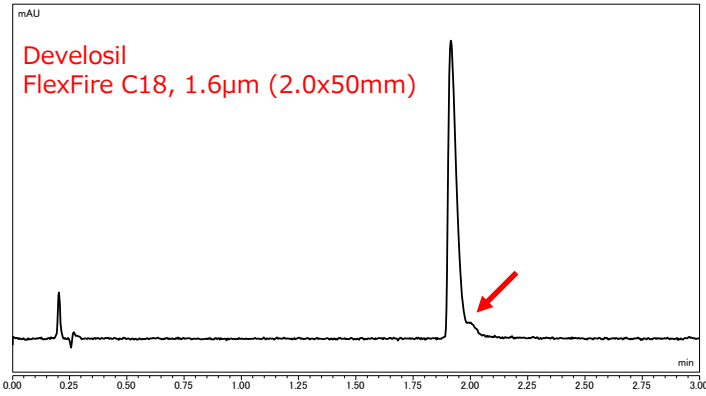
低分子ペプチドでは、分離の程度は様々ですが、ピーク形状で問題になることはあまり見かけません。しかし、分子量が大きくなるにつれてピークのつぶれ、テーリングなどが起こってくるカラムも存在しはじめます。また、試料が低濃度になった場合でもこのような傾向が見られます。

使用するバイアルに注意！！

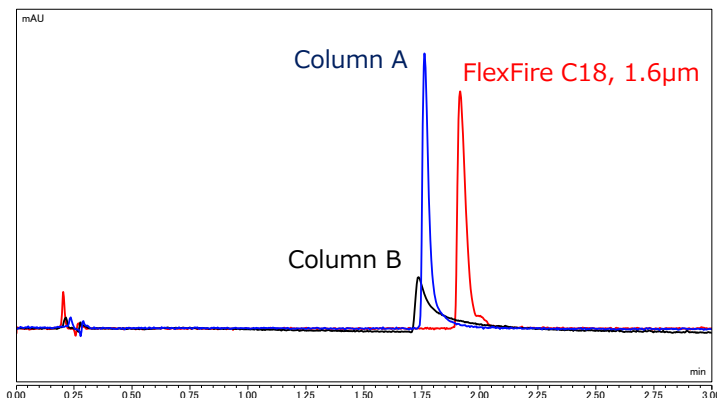


今回、インスリンを分析するにあたり、繰り返し測定をするなかでピーク高さが減少する傾向がみられました。当初、サンプルの分解を疑い再調製等行ったところ、分析初期は再現性が得られていましたが徐々にピーク高さの現象が見られました。最終的にバイアルを汎用のガラスバイアルから低吸着バイアルへ変更することで終始、再現性のあるデータを取ることができました。

もし、ペプチド分析において再現性が得られなくなった場合には、低吸着バイアルへの変更も検討してみてください。



クロマトグラムの重ね書き



4. ギ酸以外の添加剤

ギ酸以外の添加剤として、酢酸、DFAおよびTFAを用いて同条件にて検証しました。

Conditions:

Column: FlexFire C18, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Mobile phase: A) Water + 0.1% HCOOH

B) Acetonitrile + 0.1% HCOOH

Gradient:	min	mL/min	%A	%B	Curve
	0.00	0.5	80	20	5
	5.04	0.5	40	60	5
	5.05	0.5	80	20	5

Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV280nm

Sample: Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)

Injection volume: 0.3 μ L

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

Mixer: 10 μ L

Mobile phase:

A) Water+0.1%CH₃COOH

B) Acetonitrile+0.1%CH₃COOH

A) Water+0.1%HCOOH

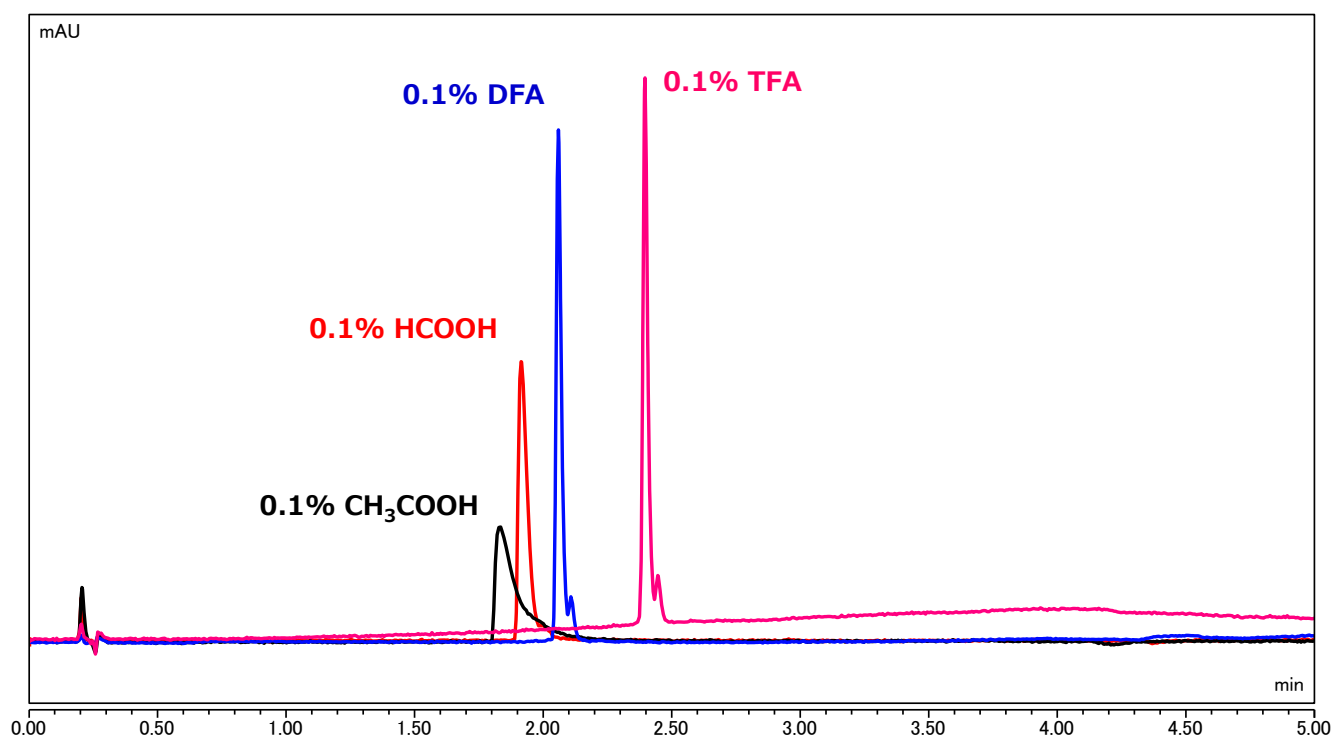
B) Acetonitrile+0.1%HCOOH

A) Water+0.1%DFA

B) Acetonitrile+0.1%DFA

A) Water+0.1%TFA

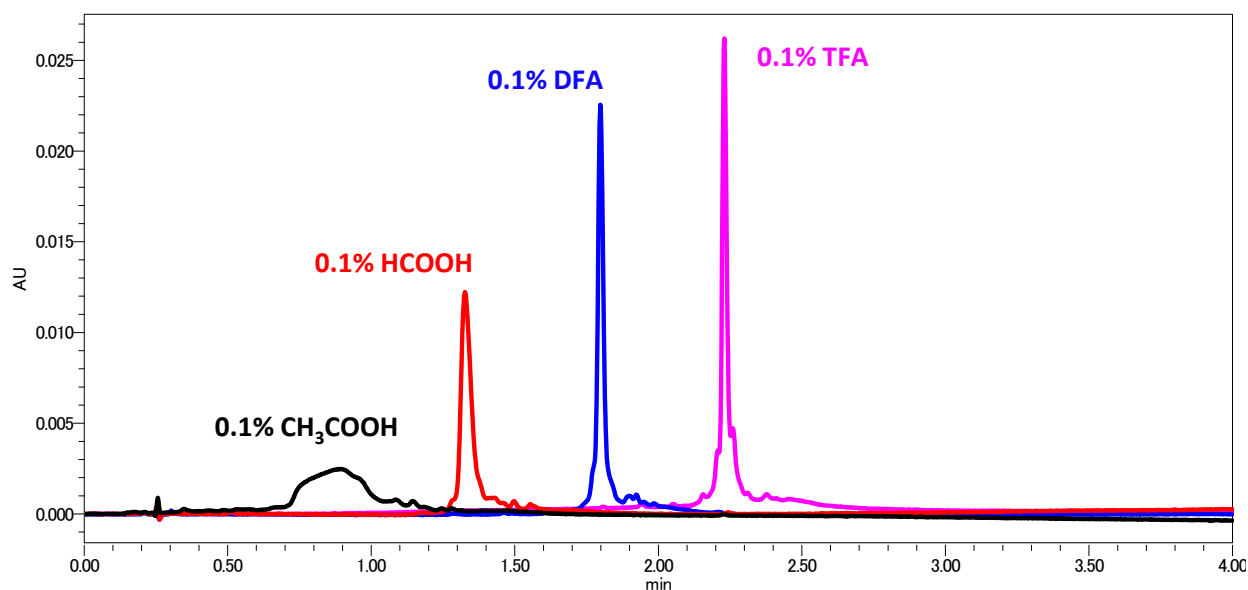
B) Acetonitrile+0.1%TFA



DFA、TFAなどのイオンペア試薬を使用することで、保持時間、ピーク形状、ピーク高さの全てが向上します。LC/MSの使用における制限がなければ、イオンペア試薬をメソッドに入れるのも一つの手段です。

5. テリパラチドの分析

テリパラチド (M.W.=4117.72) をターゲットにインスリンと同条件にて分析を実施しました。



System: Waters ACQUITY UPLC H-Class Plus

0.1%酢酸ではピークがつぶれてしまっていますが、0.1%ギ酸、0.1%DFA、0.1%TFAにおいては良好なピークが得られています。FlexFire C18を用いて中分子ペプチドを添加剤のみで検討した場合には、0.1%ギ酸をファーストメソッドとして構築することが可能となります。これは、カラム平衡化や分析時間の短縮を含めた分析全体の時間短縮につながります。

Develosil FlexFire C18 価格表

内径(mm)	長さ(mm)	粒子径(μm)	ステンレスカラム		メタルフリーカラム	
			価格(円)	商品コード	価格(円)	商品コード
2.0	35	1.6μm	73,000	301-I20035W	96,000	301-I20035MFW
			73,000	301-I20050W	96,000	301-I20050MFW
			75,000	301-I20075W	98,000	301-I20075MFW
			78,000	301-I20100W	101,000	301-I20100MFW
			83,000	301-I20150W	106,000	301-I20150MFW
			—	—	—	—
	50	2.6μm	63,000	301-L20035W	86,000	301-L20035MFW
			63,000	301-L20050W	86,000	301-L20050MFW
			65,000	301-L20075W	88,000	301-L20075MFW
			68,000	301-L20100W	91,000	301-L20100MFW
			73,000	301-L20150W	96,000	301-L20150MFW
			78,000	301-L20250W	101,000	301-L20250MFW
	75	5μm	58,000	301-520035W	81,000	301-520035MFW
			58,000	301-520050W	81,000	301-520050MFW
			60,000	301-520075W	83,000	301-520075MFW
			63,000	301-520100W	86,000	301-520100MFW
			68,000	301-520150W	91,000	301-520150MFW
			73,000	301-520250W	96,000	301-520250MFW

※価格に消費税は含まれておりません。

