

# UHPLCによる中分子ペプチドのメソッド開発

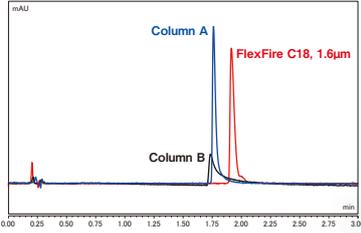
堀切 智<sup>1</sup> (野村化学株式会社)



## はじめに

ペプチドの分析においてLC/MSでの検出を考慮した場合、用いる移動相には酢酸およびギ酸またはそのアンモニウム塩をファーストメソッドとして選択するケースが多い。特に、低分子のペプチドであればこのような移動相であってもほぼ問題なく分析が可能であるが、分子量が大きくなるにつれてピークがブロード、潰れ、未検出となることがある。この正確な原因は不明であるが、我々の研究においてはカラムに依存する傾向があることを見出し、従来まではギ酸移動相を経てTFAを着地点とするメソッドが主となっていたが、ギ酸移動相においてもこれらの問題点を解決できるカラムの開発を行ったので報告する。

Fig.1 0.1%ギ酸移動相によるインスリンの分析

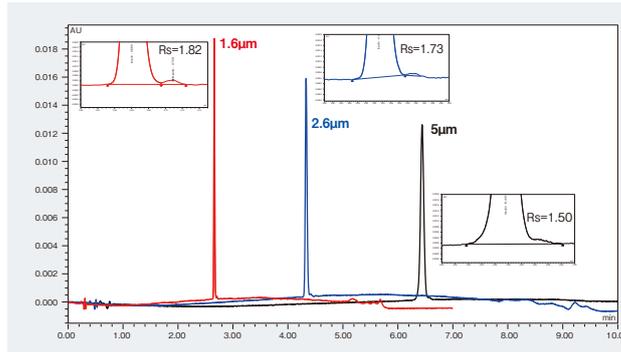


## 検出器と移動相

カラム	検出器	移動相
HPLC or UHPLC FlexFire	 画像提供: 日本ウォーターズ株式会社様	酢酸、酢酸アンモニウム ギ酸、ギ酸アンモニウム DFA, TFA
	 画像提供: 日本ウォーターズ株式会社様	酢酸、酢酸アンモニウム ギ酸、ギ酸アンモニウム (DFA, TFA)

最終の検出器がUVの場合にはイオンペア試薬を使用するリスクは低減できるが、MSの場合にはイオン源の汚染、ノイズの増加によって起こる感度低下を十分に考慮する必要がある。

## 粒子径の選択



Conditions;

Column : FlexFire C1, 1.6µm (2.0x50mm)  
FlexFire C1, 2.6µm (2.0x50mm)  
FlexFire C1, 5µm (2.0x50mm)

Mobile phase : A) Water + 0.1%TFA  
B) Acetonitrile + 0.1%TFA

Gradient	min	mL/min	%A	%B	Curve
2.6µm	0.00	0.5	80	20	6
	5.04	0.5	40	60	6
	5.05	0.5	80	20	6
5µm	0.00	0.2	80	20	6
	12.60	0.2	40	60	6
	12.63	0.2	80	20	6

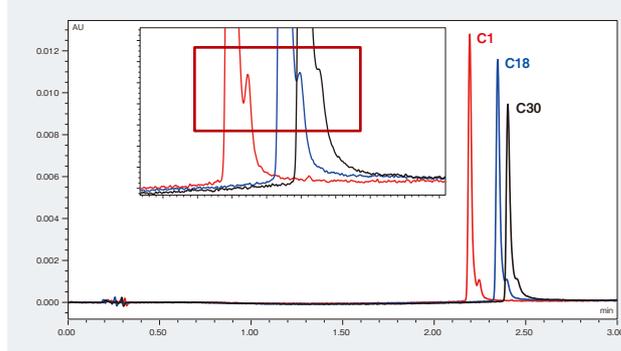
Temperature : 40°C  
Detection : UV280nm  
Sample : Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)  
Injection volume : 0.3µL  
System : Waters AQCQUITY UPLC H-Class PLUS  
Mixer : 100µL

UHPLCカラムに変更することで、分析時間の短縮に加え、分離度と感度が向上する。

1.6µmでの分析条件を元にソフトウェアを使用してメソッド移管



## アルキル鎖長の比較



Conditions;

Column : FlexFire C1, 1.6µm (2.0x50mm)  
FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm)  
FlexFire C30, 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase : A) 10mM HCOONH<sub>4</sub>, pH3.0  
B) Acetonitrile

Gradient	min	mL/min	%A	%B	Curve
2.6µm	0.00	0.5	80	20	6
	5.04	0.5	40	60	6
	5.05	0.5	80	20	6

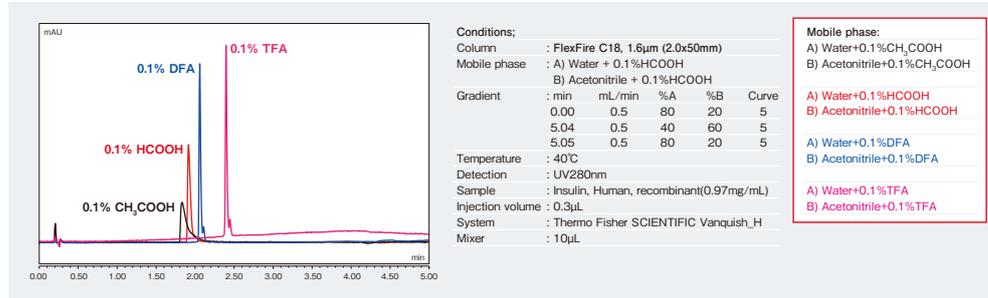
Temperature : 40°C  
Detection : UV280nm  
Sample : Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)  
Injection volume : 0.3µL  
System : Waters AQCQUITY UPLC H-Class PLUS  
Mixer : 100µL

ギ酸アンモニウム移動相にてインスリンの分析を実行。FlexFireシリーズはイオンペア試薬を用いなくてもシャープなピークを得ることができた。これはカラム・MSにおいて、耐久性やイオン源汚染を軽減することができるため大きなメリットとなる。また、特にC1カラムでは近接するピークとの分離も良好な結果となった。



画像提供: 日本ウォーターズ株式会社様

## 移動相の比較 インスリン



Conditions;

Column : FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase : A) Water + 0.1%HCOOH  
B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH

Gradient	min	mL/min	%A	%B	Curve
0.1% HCOOH	0.00	0.5	80	20	5
	5.04	0.5	40	60	5
	5.05	0.5	80	20	5

Temperature : 40°C  
Detection : UV280nm  
Sample : Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)  
Injection volume : 0.3µL  
System : Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish\_H  
Mixer : 10µL

Mobile phase:

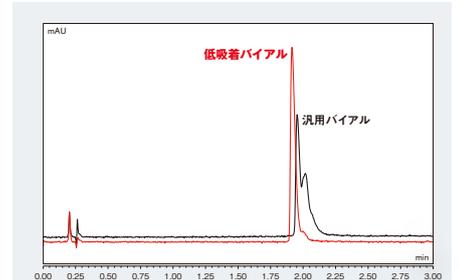
A) Water+0.1%CH<sub>3</sub>COOH  
B) Acetonitrile+0.1%CH<sub>3</sub>COOH

A) Water+0.1%HCOOH  
B) Acetonitrile+0.1%HCOOH

A) Water+0.1%DFA  
B) Acetonitrile+0.1%DFA

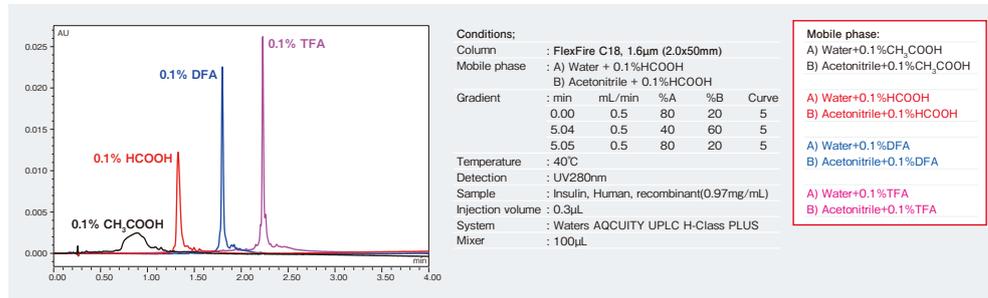
A) Water+0.1%TFA  
B) Acetonitrile+0.1%TFA

## ペプチド分析における注意点



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た。当初、サンプルの分解を疑い再調製等を行ったところ、分析初期は再現性が得られていたが徐々にピーク高さが減少する現象が見られた。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最終、再現性のあるデータを取ることができた。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視野にいれるのが望ましい。

## 移動相の比較 テリバラチド



Conditions;

Column : FlexFire C18, 1.6µm (2.0x50mm)

Mobile phase : A) Water + 0.1%HCOOH  
B) Acetonitrile + 0.1%HCOOH

Gradient	min	mL/min	%A	%B	Curve
0.1% HCOOH	0.00	0.5	80	20	5
	5.04	0.5	40	60	5
	5.05	0.5	80	20	5

Temperature : 40°C  
Detection : UV280nm  
Sample : Insulin, Human, recombinant(0.97mg/mL)  
Injection volume : 0.3µL  
System : Waters AQCQUITY UPLC H-Class PLUS  
Mixer : 100µL

Mobile phase:

A) Water+0.1%CH<sub>3</sub>COOH  
B) Acetonitrile+0.1%CH<sub>3</sub>COOH

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