

—UHPLCを用いるペプチドの分析— —Analysis of Peptides with UHPLC—

はじめに

2018年10月に弊社より1.6 μ mパーティクルを採用した「Develosil UHPLCシリーズ」が発売となりました。新たに採用されたシリカゲル基材はこれまでの結果を大きく改善します。また、UHPLCを使用することで超高速分離を可能とするため、分析時間を大幅に短縮・溶媒の節約など様々なメリットがあります。

本レポートでは、イオンペア試薬を用いた事例の多いペプチドをターゲットに、イオンペア試薬を使用しない分析を試みました。Develosil UHPLCシリーズは移動相にはギ酸アンモニウムを使用しながらも十分な保持と適度な分離を与えることからLC/MSにおいても有用な結果を出すことが期待できます。

Nomura Chemistry and Develosil USA launched the Develosil UHPLC series adopting 1.6 μ m particles in October 2018. The newly adopted silica gel base material greatly improves the results so far and aims at ultra high speed separation by using UHPLC, so there are various merits such as shortening analysis time and saving solvents.

In this report, we tried analyzing peptides without using ion pair reagents. The Develosil UHPLC series gives sufficient retention and moderate separation while using ammonium formate for the mobile phase, and it can be expected to produce useful results in LC / MS.

従来のペプチド分析条件 -Previous peptides analysis conditions-

Column: Develosil HSR AQ C18, 5 μ m (4.6x150mm)

Develosil HSR AQ C18, 2 μ m (2.0x50mm)

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

Gradient: **5um**

min	mL/min	%B	Curve
0.00	1.0	0	5
10.0	1.0	25	5
20.0	1.0	25	5
20.1	1.0	0	5

2um

min	mL/min	%B	Curve
0.00	0.474	0	5
1.47	0.474	25	5
2.93	0.474	25	5
2.95	0.474	0	5

Temperature: 50 $^{\circ}$ C

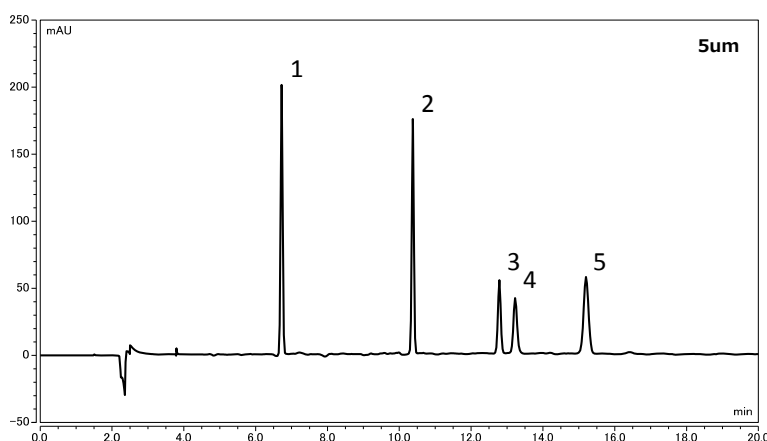
Detection: UV230nm

Sample: 1.Gly-Tyr 2. Val-Tyr-Val 3.Methionine-Enkephalin 4. Angiotensin II 5. Leucine-Enkephalin

Injection volume: 0.16 μ L

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

Mixer volume: 10 μ L



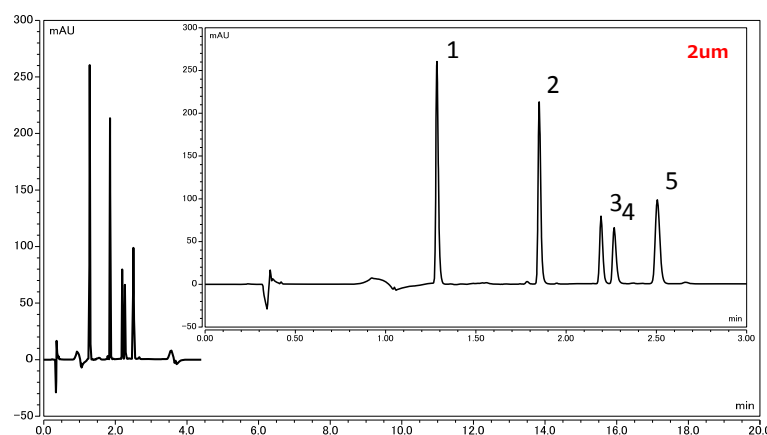
Thermo Fisher SCIENTIFIC社のソフトウェアを使用して、5 μ m \rightarrow 2 μ mへのメソッド移管を行いました。

20分で組まれたメソッドはUHPLCへ移管することにより、わずか3分へのメソッドへと大幅に分析時間を短縮することに成功しました。

しかし、イオンペア試薬で保持されたペプチドは、ギ酸もしくはギ酸アンモニウム移動相に変えると大幅な保持の減少が起こりますが、Develosil UHPLCシリーズではこのような条件であっても、良好な保持と分離を達成することができます。

This data was transferred from 5 μ m to 2 μ m using software of Thermo Fisher SCIENTIFIC. By transferring to the UHPLC method which was organized in 20 minutes, we succeeded in greatly shortening the analysis time to the method to just 3 minutes.

However, when the peptide held by the ion-pair reagent is changed to formic acid or ammonium formate mobile phase, significant retention decreases, but the Develosil UHPLC series achieves good retention and separation even under such conditions can do it.



Develosil UHPLCシリーズ用に構築されたメソッド - Methods built for Develosil UHPLC series -

Column: Develosil UHPLC C30, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Develosi UHPLC C18, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Develosil UHPLC C8, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Develosil UHPLC C1, 1.6 μ m (2.0x50mm)

Mobile phase: A) 10mM HCOONH₄, pH3.0 B) Acetonitrile/10mM HCOONH₄, pH3.0=90/10

Gradient:

min	mL/min	%B	Curve
0.00	0.5	15	5
1.47	0.5	35	5
2.93	0.5	35	5
2.95	0.5	15	5

Temperature: 40°C

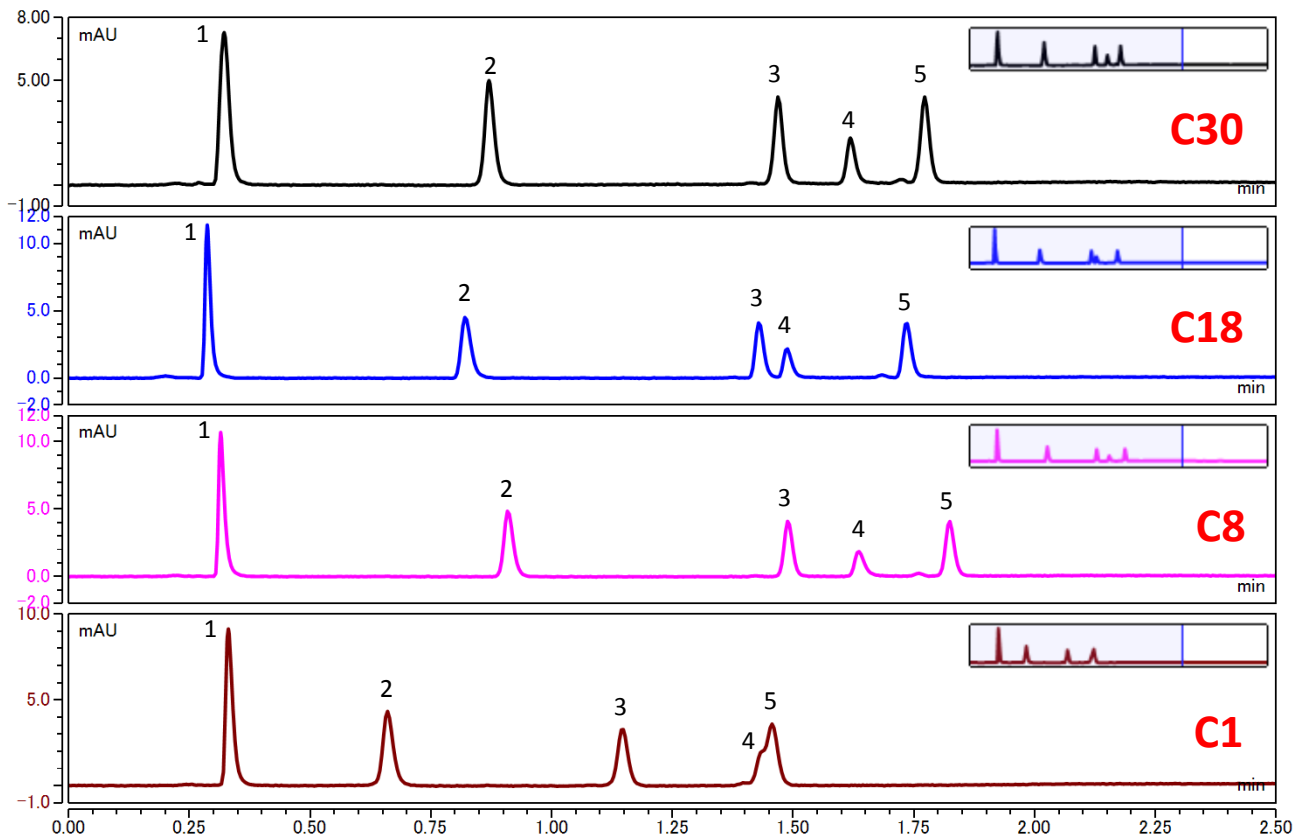
Detection: UV260nm

Sample: 1.Gly-Tyr 2. Val-Tyr-Val 3.Methionine-Enkephalin 4. Angiotensin II 5. Leucine-Enkephalin

Injection volume: 0.16 μ L

System: Thermo Fisher SCIENTIFIC Vanquish_H

Mixer volume: 10 μ L



イオンペア試薬を使用しない条件で構築されたメソッドであってもC1を除く逆相カラムにおいて5種のペプチドは完全に分離させることができました。有機溶媒組成を増やしながらも、0.1%TFA使用時と変わらない分析時間を確保しています。ギ酸アンモニウム移動相を使用することで、UHPLCで組んだメソッドがそのままLC/MSへ導入できるため、余計な検討事項を増やすことはありません。

また、揮発性の緩衝液を使用することから、カラム洗浄の高効率化に大きく貢献し、塩の析出を最大限に抑えることができます。システム内での析出・カラムの目詰まりを回避することができます。

Develosil UHPLCシリーズはいつものUHPLC分析に変化を与えます！

The method constructed without the ion pair reagent was able to completely separate the five peptides in the reverse phase column excluding C1. While increasing the composition of the organic solvent, analysis time is kept unchanged from that when using 0.1% TFA. By using ammonium formate mobile phase, you can introduce the method assembled by UHPLC directly to LC / MS, so we will not add extra consideration.

In addition, since volatile buffer is used, it greatly contributes to high efficiency of column washing, and salt precipitation can be suppressed to the utmost, thereby avoiding precipitation in the system and clogging of the column can do.

The Develosil UHPLC series will change the usual UHPLC analysis !

■オーダーインフォメーション/Order Information

Develosil UHPLC 1.6µm Series

Size	C30	C18	C8	C1	HILIC
2.0x35mm	201-I20035W	202-I20035W	203-I20035W	204-I20035W	205-I20035W
2.0x50mm	201-I20050W	202-I20050W	203-I20050W	204-I20050W	205-I20050W
2.0x75mm	201-I20075W	202-I20075W	203-I20075W	204-I20075W	205-I20075W
2.0x100mm	201-I20100W	202-I20100W	203-I20100W	204-I20100W	205-I20100W
2.0x150mm	201-I20150W	202-I20150W	203-I20150W	204-I20150W	205-I20150W

Develosil UHPLC 1.6µm Metal-free Series

Size	C30	C18	C8	C1	HILIC
2.0x35mm	201-I20035MFW	202-I20035MFW	203-I20035MFW	204-I20035MFW	205-I20035MFW
2.0x50mm	201-I20050MFW	202-I20050MFW	203-I20050MFW	204-I20050MFW	205-I20050MFW
2.0x75mm	201-I20075MFW	202-I20075MFW	203-I20075MFW	204-I20075MFW	205-I20075MFW
2.0x100mm	201-I20100MFW	202-I20100MFW	203-I20100MFW	204-I20100MFW	205-I20100MFW
2.0x150mm	201-I20150MFW	202-I20150MFW	203-I20150MFW	204-I20150MFW	205-I20150MFW

■お問い合わせ/Contact us



野村化学株式会社
〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
Tel: 0561-48-1853 Fax: 0561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Nomura Chemical Co., Ltd.
15, Hinode-cho, Seto, 489-0004, Japan
Tel: +81-561-48-1853 Fax: +81-561-48-1434
e-mail: info@develosil.net

Develosil USA

Develosil USA
10060 Carroll Canyon Rd. Ste. 100 San Diego, CA 92131
Phone: 858-800-2433
Web: <https://develosil.us/>