Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた親水性ペプチドの分取精製

Jo-Ann M. Jablonski, Christopher J. Hudalla, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

BEH Amide カラムは極性化合物の保持向上のためにデザインされ、極性化合物の分析、スケールアップ、分取精製が容易に行えます。

- 逆相では保持しない親水性ペプチドを、BEH Amide カラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィーで保持。保持向上による分離向上。
- BEH Amide 結合相は非修飾の HILIC 固定相よりも若干水系比率の高い移動相、サンプル希釈溶媒に対応し、親水性ペプチド分取精製のより有力な選択肢
- BEH Amide カラムでは極性ペプチドの負荷量が向上するため分取のための注入回数を低減しプロセスの効率を促進
- 分析および分取スケールで再現性の高いクロマトが得られることでターゲットペプチド同定における曖昧性を低減し BEH Amide カラムの分析法移管性を実証

ウォーターズソリューション

AutoPurification™ システム

XBridge™ BEH Amide カラム

キーワード

極性化合物単離、BEH Amide カラム、分取 LC、親水性相互作用クロマトグラフィー、HILIC、親水性ペプチド

はじめに

ペプチドの分析や分取には逆相カラムが一般的に使用されますが、C_{18} 固定相ではほとんどまたは全く保持しない親水性ペプチドもあります。固定相との相互作用が不十分な場合、ペプチドの単離が難しくなります。親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、分析種を液－液分配、吸着、イオン性相互作用、疎水性保持メカニズムの独自の組み合わせに基づいて分離を行う化合物の単離に役立つ代替クロマトグラフィー手法です。移動相の水系比率を低比率から高比率に上げるに従って、化合物はカラムから溶出します。

トリファンクショナル結合アミド固定相の BEH Amide カラムは、ACQUITY UPLC® システムで極性化合物を分析するために粒子径 1.7 µm の充てん剤が 2009 年にまず発売されました。親水性合成ペプチド、糖類、合成糖、糖ペプチドや天然物から抽出した極性化合物などの化合物を分析・分取できるカラムを求める声に対応し、分析・分取 HPLC アプリケーションで使用できる粒子径 5 µm の充てん剤の開発が推進されました。本アプリケーションノートでは、BEH Amide 充てん剤の親水性ペプチド分析・分取への有用性を実証します。

実験方法

LC条件

システム：	Waters 2525 バイナリーグラジエントモジュール、2767 サンプルマネージャ、カラムフルイディクスオーガナイザー、2996 フォトダイオードアレイ検出器、ZQ™ 2000 MS 検出器、2420 ELS 検出器
カラム：	XBridge BEH Amide 5 µm、4.6 × 150 mm 製品番号　186006595 XBridge BEH Amide 5 µm、19 × 150 mm 製品番号　186006605
カラム温度：	40 ℃
移動相 A：	20:80 アセトニトリル /10 mM ギ酸アンモニウム pH3
移動相 B：	90:10 アセトニトリル /10 mM ギ酸アンモニウム pH3
弱洗浄溶媒：	90:10 アセトニトリル / 水
強洗浄溶媒：	20:80 アセトニトリル / 水
シール洗浄：	50:50 アセトニトリル / 水
サンプル希釈溶媒：	15:5:3 アセトニトリル / メタノール / 水
流速：	図に記載
グラジエント：	図に記載
注入量：	図に記載

サンプル詳細

分析スケール

20 残基の極性ペプチド（以下のアミノ酸から構成：塩基性 4、非電荷極性 11、非極性 3、酸性 2）2 mg を 1.15 mL のサンプル希釈溶媒（15:5:3 アセトニトリル / メタノール / 水）に溶解し、濃度 1.77 mg/mL のペプチド溶液としました。粗ペプチド溶液は Vortex で攪拌し、サイズ 13 mm、孔径 0.45 µm の GHP シリンジフィルター（製品番号 WAT200516）でろ過しました。

分取スケール

極性ペプチド 31 mg は 2.3 mL のサンプル希釈溶媒に溶解し、Vortex で攪拌後にフィルターろ過して最終濃度 13.5 mg/mL に調製しました。

結果および考察

非常に親水性の高いシークエンスのペプチドは逆相で保持することが難しいため、極性ペプチドの分析および分取は困難なことが多くあります。親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、親水性の化合物を極性固定相との相互作用により分離する、逆相とは相補的なクロマトグラフィー分離手法で、液－液分配、吸着、イオン性相互作用、水素結合性保持メカニズムの組み合わせによってサンプルが保持され、移動相の極性を上げることでカラムから分析種が溶出します。固定相による化合物の選択性と保持力は、カラム充てん剤の特性によって決まります。図 1 に示すように、カラムサイズと分析条件を一定にしても、分析種の溶出プロファイルは 3 種類の HILIC 固定相でそれぞれ異なります。BEH Amide カラムは様々なタイプの化合物に対して最も保持が強く、他の 2 つのカラムと異なる選択性を示しました。類似した化合物は、多くの場合保持が向上することで化合物間の分離が向上します。

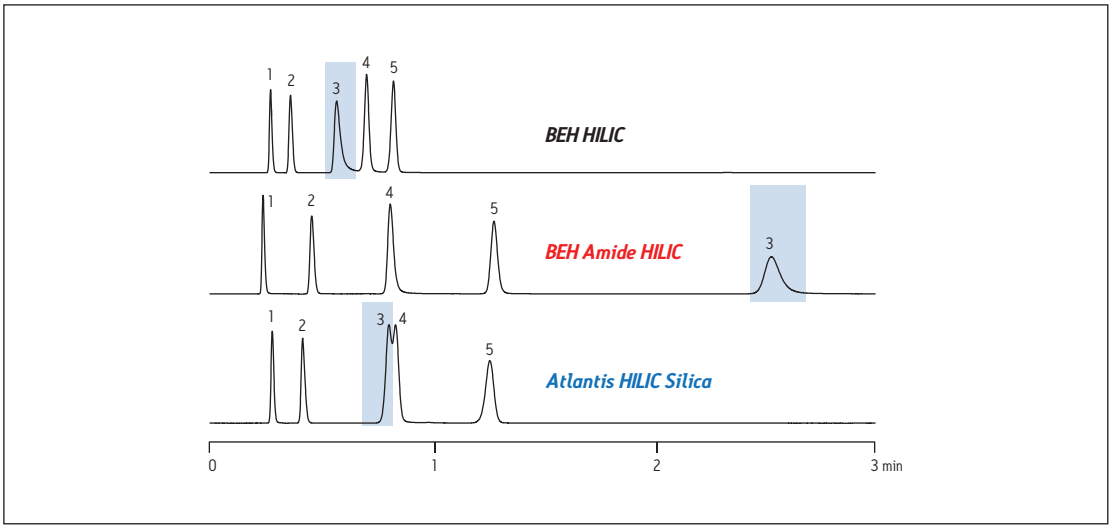


図 1. HILIC 固定相 3 種類の保持力および選択性の違いを示す代表的なクロマトグラム。Atlantis® HILIC シリカは（表面極性が高いため）BEH HILIC に比べて保持が強く、異なる選択性を示します。アミドカラムは様々なタイプの化合物に対して最も保持が強く、他の 2 つのカラムと異なる選択性を示します。
分析条件：アイソクラティック、12 mM ギ酸アンモニウム（pH3）添加 90% アセトニトリル溶液；検出 UV@254 nm。化合物：（1）acenaphthene,（2）thymine,（3）5-fluoroorotic acid,（4）adenine,（5）cytosine

効率的な分離において保持は重要ですが、化合物の単離を成功するにはターゲットとする分子の特性についても考慮する必要があります。欠損または失敗シークエンス、付加体などにより未精製サンプル混合物が複雑になり、ターゲットペプチドの単離が困難になります。サンプル希釈溶媒も保持において重要な役割を果たし、溶解性とピーク形状に影響します。従来からの非修飾タイプの HILIC 固定相では、有機溶媒比率の高いサンプル希釈溶媒と移動相が一般的に必要ですが、これはサンプル濃度の高い分取クロマトグラフィーにおいては極性化合物の溶解性の制限となります。例え 10-20%でも少量の水を添加すると、非修飾タイプの固定相では HILIC の初期組成移動相条件と適合しません。BEH Amide 結合相は水系比率の高い移動相や注入溶媒にも許容性が高く、分取クロマトグラフィーに適した濃度で極性ペプチドを溶解できます。

本研究で用いた 20 残基ペプチドのアミノ酸シークエンスは発色団を持たないため、UV でのペプチド検出は制限されます。ターゲット分子を確認できるように制限された UV 吸収や低い MS イオン化効率に代えることができる検出モードと共にシステムを構成しました。図 2 にはアミノ酸組成と計算したモノアイソトピック質量、本研究で用いたペプチドの多価イオンについて示しました。一般的に HILIC では有機溶媒比率の高い移動相が使用されるため、容易に脱溶媒され、分画したフラクションを迅速にエバポレートできるだけでなく質量分析におけるレスポンスが向上します。図 3 に示すように、このペプチドのアミノ酸シークエンスは発色団をもたないため 220 nm では僅かな吸収しか示しませんが、ELSD およびマスクロマトグラムは感度が高く、単離および分析が可能となります。

アミノ酸 20 残基

アミノ酸組成：
塩基性 4
極性（非電荷） 11
酸性 2
非極性 3

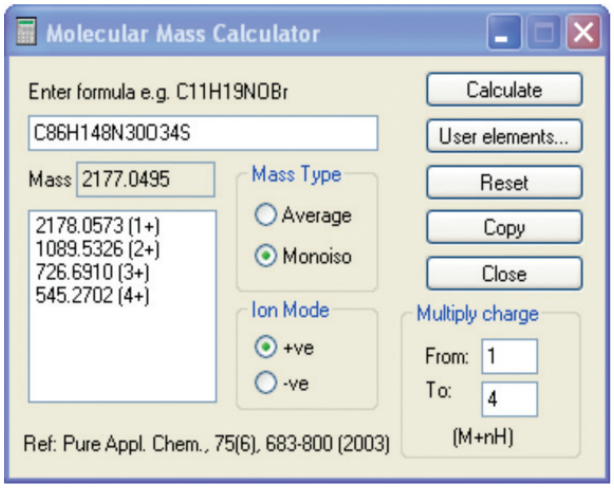
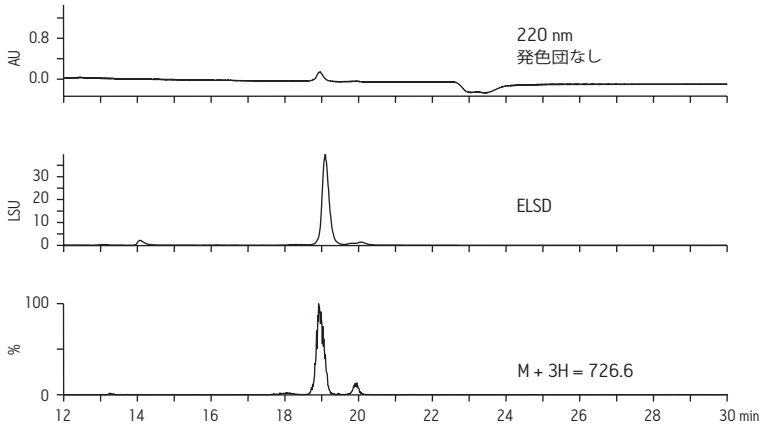


図 2. 親水性ペプチドのアミノ酸組成、計算したモノアイソトピック質量と多価イオン



18 分で 100%B – 100%A、3 分間ホールド、0.2 分で 100%B に戻して 8.8 分間平衡化

流速：1.46 mL/min
移動相 A：20:80 アセトニトリル / 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液　pH3
移動相 B：90:10 アセトニトリル / 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液　pH3
強洗浄溶媒：20:80 アセトニトリル / 水
弱洗浄溶媒：90:10 アセトニトリル / 水
サンプル希釈溶媒：75:25 アセトニトリル / メタノール ＋水 150 µL
サンプル濃度：13.5 mg/mL

図 3. 4.6×150 mm BEH Amide カラムで分析した親水性ペプチドの 3 種類の検出モード比較

分析法のスケールアップには、適切にグラジエントを移管するとともに分取スケールで分析スケールと同じカラムケミストリーを用いることが必要です。分取精製のスループットを向上するための選択肢を検討する際に、UPLC® を用いた迅速スクリーニンググラジエントにより合成未精製物分析に必要な時間を削減し、場合によっては、分画したフラクション分析の時間も削減できます。BEH Amide カラムは粒子径 2 µm 以下のサイズもラインアップしているため、ACQUITY UPLC を用いて合成未精製ペプチドを分析しました。UPLC と分取スケールでの分離度を維持するには、粒子径に対するカラム長さの比（L/dp）を一定にする必要があります。2.1 × 50 mm、1.7 µm の UPLC カラムでは L/dp は約 29,400 です。19 × 150 mm、5 µm の分取カラムの L/dp は 30,000 で、UPLC カラムの L/dp とほぼ同等です。予測した通り、注入量とクロマトグラフィー条件をカラムサイズと粒子径に応じて移管することで、ACQUITY UPLC で粒子径 2 µm 以下のカラムを用いたスクリーニング分析と同等の分取クロマトグラムが得られました。図 4 には、UPLC での迅速スクリーニンググラジエントの結果と単離のための分取精製の結果を比較することで BEH Amide カラムの分析法移管性を示しました。

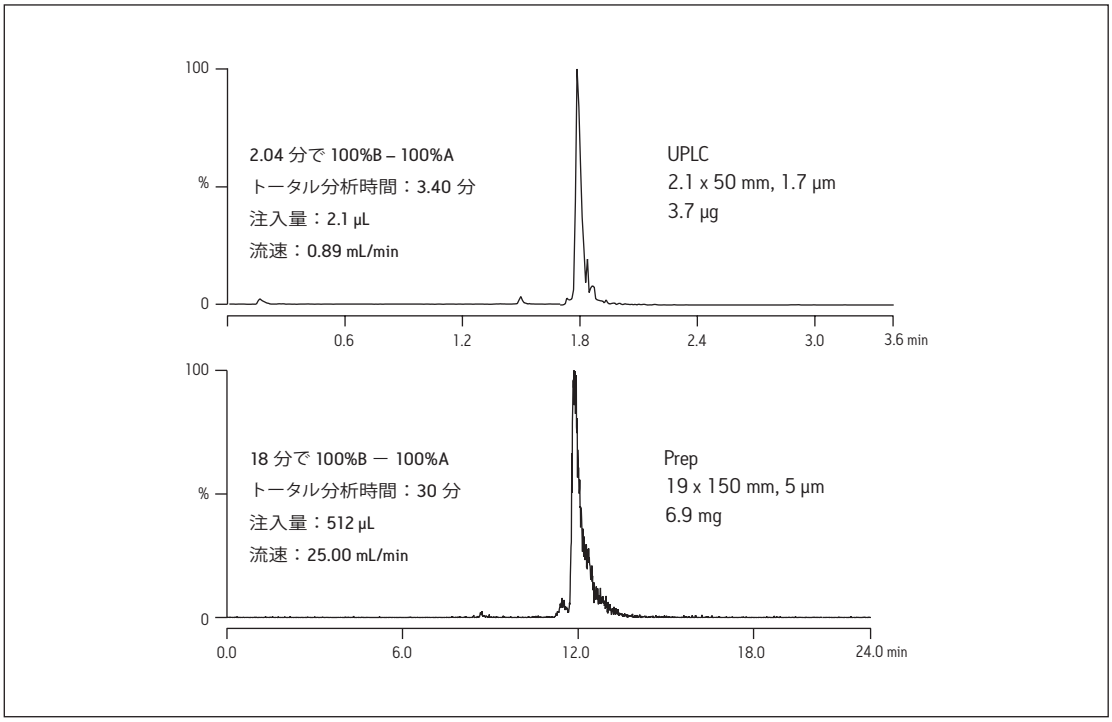


図 4. UPLC および分取スケールでの親水性ペプチドクロマトグラム

結論

- 逆相では保持できない親水性ペプチドを BEH Amide カラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィーで保持できる可能性があり、保持が向上することで分離が可能になります。
- BEH Amide 結合相では、非修飾タイプの HILIC 固定相と比べて若干水系比率の高い移動相とサンプル溶解溶媒にも許容性が高く、BEH Amide カラムは親水性ペプチド分析のより有力な選択肢となります。
- 分析および分取スケールで再現性の高いクロマトグラムが得られることでターゲットペプチド同定における曖昧性を低減し BEH Amide カラムの分析法移管性を実証しました。

参考文献

1. Grumbach E., Fountain K. *Comprehensive Guide to HILIC*, Waters Corporation [June 2010], Part Number 715002531.
2. Hudalla C., Cook J., Dion M., Iraneta P., Jenkins K., Smith P., Walsh D., Wyndham K. *UPLC Analysis of Carbohydrates; Applications for Saccharide Analysis in Food & Beverage Products and Pharmaceutical Excipients*, Waters Poster [2009], Part Number 720003214EN.
3. Fountain K.J., Hudalla C., McCabe D., Morrison D. *UPLC-MS Analysis of Carbohydrates*, Waters Application Note [October 2009], Part Number 720003212EN.
4. Diehl D.M., Xia F., Cavanaugh J., Fountain K., Jablonski J., Wheat T. *Method Migration from UPLC Technology to Preparative HPLC*, Waters Application Note [October 2007], Part Number 720002375EN.
5. Jablonski J.M., Wheat T.E., Diehl D.M. *Developing Focused Gradients for Isolation and Purification*, Waters Application Note [September 2009], Part Number 720002955EN.
6. Fountain K.J., Xu J., Diehl D., Morrison D. *J. Sep Sci.* 2010; **33**: 740-751.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、UPLC および ACQUITY UPLC は Waters Corporation の登録商標です。
AutoPurification、XBridge、ZQ および /The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年5月 720004283JA PDF