[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

表面チャージハイブリッド（Charged Surface Hybrid: CSH）C_{18}カラムを用いた逆相ペプチド分離のピークキャパシティ向上

Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 高いピークキャパシティの逆相ペプチド分離
- ギ酸移動相との適合性
- UPLC® およびHPLC粒子径どちらもラインアップ
- CSH130 C_{18}カラムはシトクロム cのトリプシン消化物でQC試験済

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システム

Xevo® G2 QTof 質量分析計

ACQUITY UPLC CSH130 C_{18}、1.7 µmカラム

XSelect™ CSH130 C_{18} ***XP***、2.5 µmカラム

MassPREP™ ペプチドスタンダードMix

キーワード

逆相、ペプチド、トリフルオロ酢酸（TFA）、ギ酸（FA）、イオンペア、charged surface hybrid（CSH）、ピークキャパシティ

はじめに

ボトムアッププロテオミクス[1]によるタンパク質の研究においても、ペプチドマッピング[2]によるバイオ医薬品の十分なキャラクタリゼーションにおいても、ペプチドの分離は非常に重要です。これらの分析ではサンプルが非常に複雑であるため、比較的分離効率が高く質量分析計（MS）に容易に接続できる逆相（RP）クロマトグラフィーが分離モードとして選択されます。

グラジエント逆相クロマトグラフィーに最も関連がある性能指標はピークキャパシティ、つまりグラジエント時間内に分離できる最大ピーク数です[3]。興味深いことに、小さい粒子径を使用することに加え、固定相の化学修飾もピークキャパシティに大きく影響します。例えば、表面チャージハイブリッド（Charged Surface Hybrid: CSH™）C_{18}カラムケミストリーはエチレン架橋型ハイブリッド（BEH）C_{18}固定相[4]を進化させたもので、C_{18}結合相に加え表面修飾により微量レベルのプラスのチャージを含有しています[5]。この修飾によりイオン化した低分子化合物についてはピーク形状、ローディング、ピークキャパシティが向上することが示されています[5-10]。

一般的に、ペプチド分析で用いられる酸性移動相条件下でほとんどのペプチドはプラスのチャージを持ち、低分子の場合と同様に表面チャージによるクロマトグラフィー性能の向上が期待されるため、ここではペプチド分離用にCSH130 C_{18}カラムを評価しました。ペプチド分析における他の最新固定相と比較して、この新規固定相はピークキャパシティが大きく向上し、独自の選択性を示し、またMSシグナルサプレッションの原因となる強いイオンペア試薬を使用しなくても良好な結果を示すことを本アプリケーションは実証しています。

実験方法

LC 条件

システム：
Waters® ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
20 または 30 cm カラムヒーター付（150 mm カラムには 20 cm カラムヒーター、250 mm カラムには 30 cm カラムヒーター）

検出：
ACQUITY UPLC TUV 検出器（500 nL 分析フローセル）
Xevo G2 QTof 質量分析計

波長：
214 nm

スキャン速度：
10 Hz

カラム：
ACQUITY UPLC BEH130 C_{18}
2.1 × 150 mm、1.7 µm
全多孔性、130 Å
（製品番号 186003556）

ACQUITY UPLC CSH130 C_{18}
2.1× 150 mm、1.7 µm
全多孔性、 130 Å
（製品番号 186006938）

XSelect CSH130 C_{18} ***XP***
2.1 × 150 mm、2.5 µm
全多孔性、130 Å
（製品番号 186006943）

C_{18}、2.1 × 250 mm、5 µm
全多孔性、300 Å（他社製品）

C_{18}、2.1 × 150 mm、1.7 µm
表面多孔性（コア 1.25 µm、シェル 0.22 µm）、
100 Å（他社製品）

カラム温度：
40 ℃

サンプル温度：
10 ℃

注入量：
10 µL

流速：
0.3 mL/分

移動相：
A：0.1% ギ酸（v/v）水溶液
B：0.1% ギ酸（v/v）アセトニトリル溶液
C：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）（v/v）水溶液
D：0.1% TFA（v/v）アセトニトリル溶液

グラジエント：
アセトニトリル濃度 2%で 1 分間ホールドした後、60 分間でアセトニトリル濃度を 50%上昇（移動相 A/B および C/D の比率を合わせることで酸組成比コントロール）

MS条件

質量分析計：
Xevo G2 QTof

イオン化モード：
ESI+

アナライザーモード：
分離能モード

キャピラリー電圧：
3.00 kV

コーン電圧：
25 V

ソース温度：
120 ℃

脱溶媒温度：
350 ℃

コーンガス流速：
0.0 L/h

脱溶媒ガス流速：
800 L/h

キャリブレーション試薬：
NaI（2 µg/µL、*m/z* 50 ～ 2000）

データ取得率：
10 Hz（*m/z* 50 ～ 1990）

データ管理：
MassLynx® ソフトウェア

サンプル詳細

表1に示すMassPREPペプチドスタンダードMix（製品番号 186002337）は、トータルペプチド濃度が約0.6 mg/mLになるように0.1%ギ酸水溶液に溶解しました。

	ペプチド	シークエンス
1	RASG-1	RGDSPASSKP
2	Angiotensin 1-7	DRVYIHP
3	Bradykinin	RPPGFSPFR
4	Angiotensin II	DRVYIHPF
5	Angiotensin I	DRVYIHPFHL
6	Renin Substrate	DRVYIHPFHLLVYS
7	Enolase T35	WLTGPQLADLYHSLMK
8	Enolase T37	YPIVSIEDPFAEDDWEAWSHFFK
9	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

表1　MassPREP ペプチドスタンダードMix

計算：

各カラムのピークキャパシティは2から7のペプチドについてピーク幅を測定して計算しました。ペプチド8および9はカラムによって共溶出しているものがあったため、計算からは除外しました。同様に、ペプチド1（RASG-1）は0.1%ギ酸移動相を用いた場合CSH130 C_{18}カラムではボイドボリュームの近くに溶出したため計算からは除外しました。UVクロマトグラムから各ピークの半値幅（Wh）を測定してその平均値を計算し、引き続き以下の式に従って4σのピークキャパシティに換算しました。

$$P_{c,4\sigma} = 1 + \left[\left(\frac{2.35}{4}\right)\left(\frac{t_{gradient}}{w_{h,avg}}\right)\right]$$

結果および考察

ペプチド分離

MassPREPペプチドスタンダードMixはアミノ酸組成や質量、長さ、極性の異なる9種類のペプチドから構成されています。各ペプチドのシークエンスは表1に示しました。このスタンダードは多様なペプチドから構成されているため、クロマトグラフィー性能だけでなく質量分析で評価するためにも有効です。そのため、ペプチド分析に一般的に使用される他の固定相に対するCSH130 C_{18}の分離性能の指標として採用しました。スタンダード中のペプチド（全て分子量が3000 Da以下）を効率的に分離するために十分な大きさの孔径（100-300 Å）の固定相を本アプリケーションでは使用しました。別のアプリケーションノートではCSH130 C_{18}を使用して、その130 Åの孔径によるさらに大きいポリペプチドの分離について検討しています[11]。妥当性確認のため、スタンダード中の各ペプチドの負荷量は、抗体のペプチドマッピングで一般的な条件（20-50 µgのLys-Cまたはトリプシン消化物が一般的に内径2.0または2.1 mmカラムで分析される[2, 12-13]）に近くなるように調製し、イオンペア効果の強いTFA、イオンペア効果の弱いギ酸、またはそれらの混合を含む移動相を用いて分離を行いました。逆相ペプチド分離は一般的に質量分析計とも組み合わせて使用されるため、これら様々な条件下での性能は興味深いものとなります。質量分析を組み合わせたアプリケーションでは、より感度の高い検出が可能となるため、TFAよりもギ酸が移動相添加剤として推奨されることが多くあります[14-15]。

図1には、異なる移動相条件下で5 μmシリカC_{18}カラムを使用して得られたMassPREPペプチドスタンダードMixのクロマトグラム3種を示しました。TFA条件の分離では一般に良好な形状のピークが得られました。ほとんどのピークがブロードになったりテーリングしたりすることはありませんでした。しかしながら、ギ酸含有移動相ではピーク形状が非常に悪化しました。また、ピークがあまりにもブロードになっているかまたは単に溶出しなかったために、スタンダード中で最も分子量の大きいペプチド（melittin）は、検出されませんでした。このような結果はHPLCベースのペプチド分離で典型的なものです。

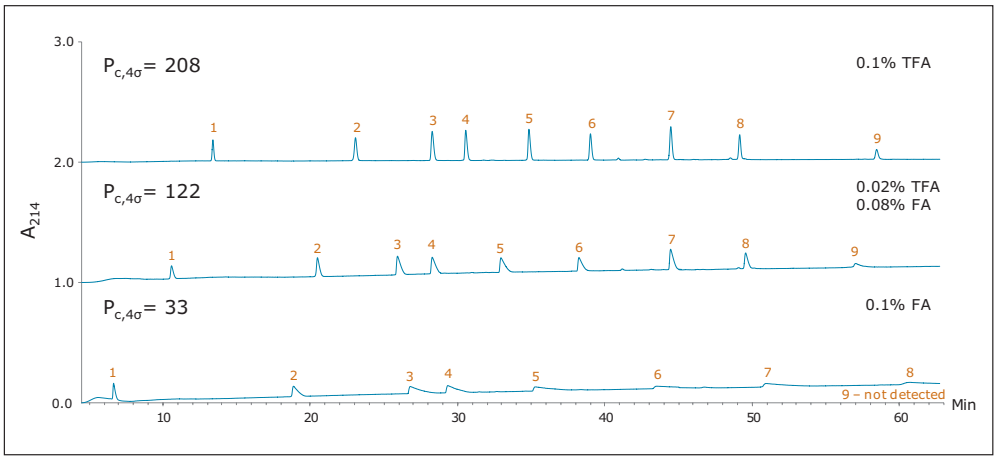

図1　異なる3種類の移動相条件を用いた全多孔性シリカC_{18}、5 μmカラムでの MassPREP ペプチドスタンダードMixの分離。ペプチドはMSにより同定し、表1 に照らして標識。

粒子径2 μm以下の充てん剤はペプチド分離に利点をもたらします。どちらも1.7 μmの充てん剤を充てんした2種類の異なるカラムにより得られたクロマトグラムを図2および3に示しました。具体的には、図2は表面多孔性C_{18}カラムを用いて得られたクロマトグラムです。TFA移動相条件ではピーク形状は良好で、図1に示した5 μm全多孔性C_{18}カラムで得られたよりも概して幅の狭いピークが得られました。移動相中にTFAが少ないまたは全くない場合、ピークはブロードになり顕著なテーリングを示しました。図3に示すように、全多孔性BEH130 C_{18}カラムでは試した全ての条件で表面多孔性C_{18}カラムと同等の分離が得られました。

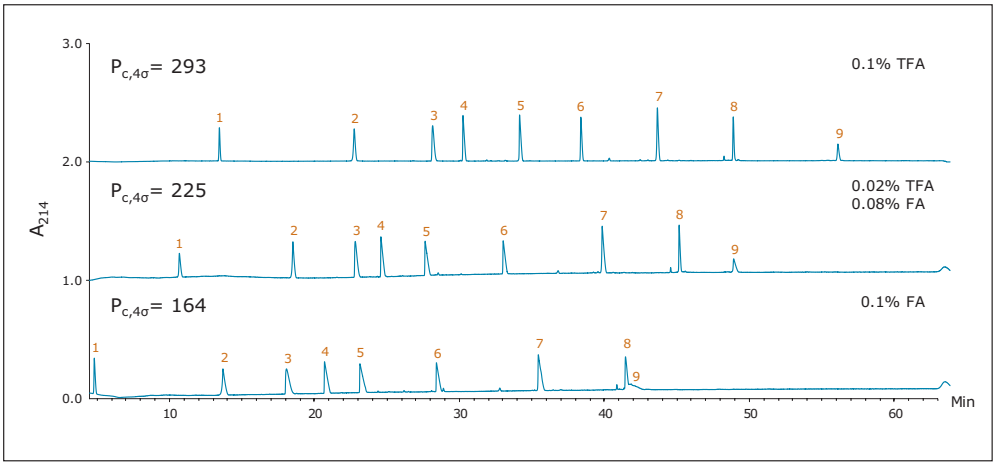

図2　異なる3種類の移動相条件を用いた表面多孔性C_{18}、1.7 μmカラムでの MassPREP ペプチドスタンダードMixの分離。

図1から3に示した分離は、ペプチド分析におけるCSH130 C_{18}、1.7 µmカラムの性能の指標となります。CSH130 C_{18}、1.7 µmカラムを用いたクロマトグラムは図4に示しました。図1から4までの比較により、他のカラムと異なりCSH130 C_{18}ではTFAおよびギ酸のどちらを含有した移動相でも最良のピーク形状が得られることが明確に示されています。さらに、特に移動相からTFAを除くと、CSH130 C_{18}カラムは独自の選択性を示すことが明らかです。例えば0.1%ギ酸移動相では、本研究に用いたカラムの中でCSH130 C_{18}以外はどのカラムでもペプチド8と9が十分に分離しませんが、CSH130 C_{18}カラムではどちらのペプチドも良好なピーク形状を示し、3分以上離れて溶出しています。カラム間で保持の違いも見られ、特に、本実験で用いた他の各カラムに比べ、CSH130 C_{18}は少し保持が弱いという結果を示していました。これは、CSH130 C_{18}カラムだけが意図的に微量レベルのプラスの表面チャージを導入している充てん剤であるという事と一致しています。プラスにチャージしたペプチドとCSH130 C_{18}表面との間のクーロン反発により保持が低減する可能性があります。図4にはCSH130 C_{18}カラムを用いた0.1%ギ酸グラジエントの最初の部分を挿入していますが、この条件下では最も親水性の高いペプチド：RASG-1（ペプチド1）がボイドマーカー（V_0）の近くに溶出しています。平均して、CSH130 C_{18}カラムではBEH130 C_{18}カラムと比較すると2%-4%低アセトニトリル濃度でペプチドが溶出していました。保持の違いは0.1%TFA移動相条件の時に最も小さく、0.1%ギ酸移動相条件下で最も顕著でした。従って、非常に極性の高いペプチドを分析する場合、CSH130 C_{18}カラムでのイニシャルグラジエント条件は調整を必要とする可能性があります。

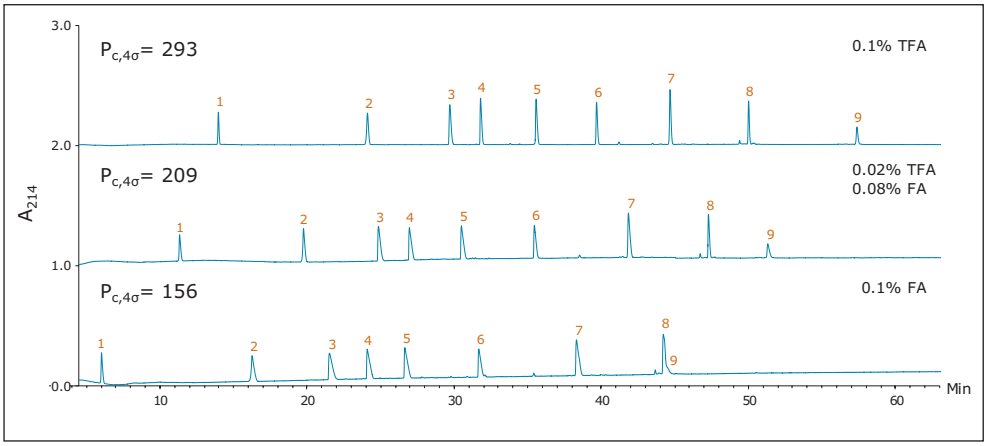

図3　異なる3種類の移動相条件を用いたACQUITY UPLC BEH130 C_{18}、1.7 µmカラムでの MassPREP ペプチドスタンダードMixの分離。

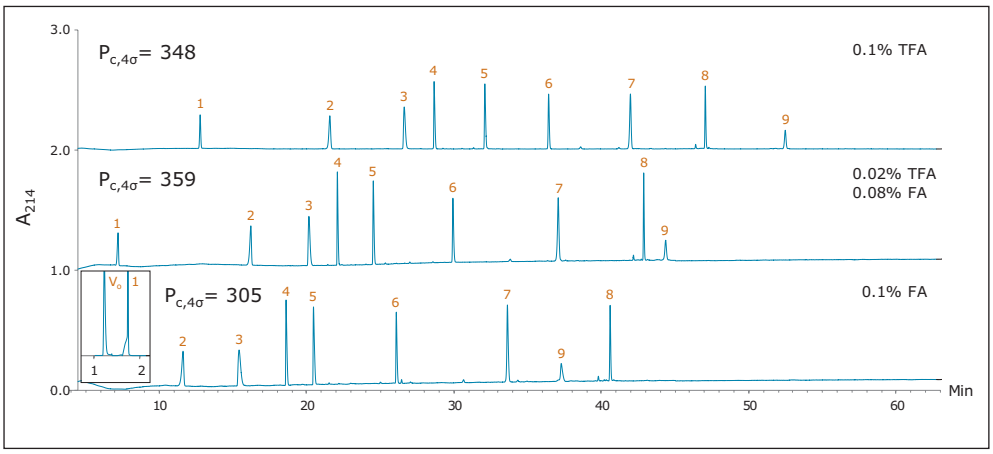

図4　異なる3種類の移動相条件を用いたACQUITY UPLC CSH130 C_{18}、1.7 µmカラムでの MassPREP ペプチドスタンダードMixの分離.

ピークキャパシティおよびMSシグナル

これら分離の定性的な比較によりCSH130 C_{18}が他のカラムに比べて高い性能を発揮することは示しましたが、定量的な比較はより説得力があります。各分離のピークキャパシティは実験方法の項に示した通りに計算しました。図5Aには、酸性モディファイアーの組成比と各カラムで得られたピークキャパシティの関係を示しています。図5の左側はギ酸のみでTFAを添加しない移動相条件で得られた分離のピークキャパシティの値を示しています。X軸を右方向に進むに従い、ギ酸の濃度を減少させTFA濃度を増加させた条件下でのピークキャパシティの値になります。CSH130 C_{18}カラムの優位性は容易に視覚化できます。0.1%TFA条件では、CSH130 C_{18}カラムは他の1.7 µm C_{18}カラムよりも20%高いピークキャパシティが得られます。一方、0.1%ギ酸条件ではCSH130 C_{18}カラムは他の1.7 µm C_{18}カラムよりも90%高いピークキャパシティが得られます。このように、CSH130 C_{18}カラムでは他のカラムに比べて高いピークキャパシティが得られるだけでなく、その性能がTFAの使用にほとんど依存しません。これから導き出される重要な結論は、CSH130 C_{18}が質量分析計を用いる分析に非常に適しているということです。これら分析におけるペプチドのMS検出に対するTFAの影響は図5Bに示しています。エレクトロスプレーイオン化においてTFAが顕著なイオンサプレッションを引き起こすことはよく知られています[16-17]。ここでは、ギ酸の代わりにTFAを使用することでMSシグナルが1/12に低減しています。CSH130 C_{18}では最適なピークキャパシティのためにそれほど多くのTFAが必要でないため高感度が必要なLC/MSアプリケーションに最適です。

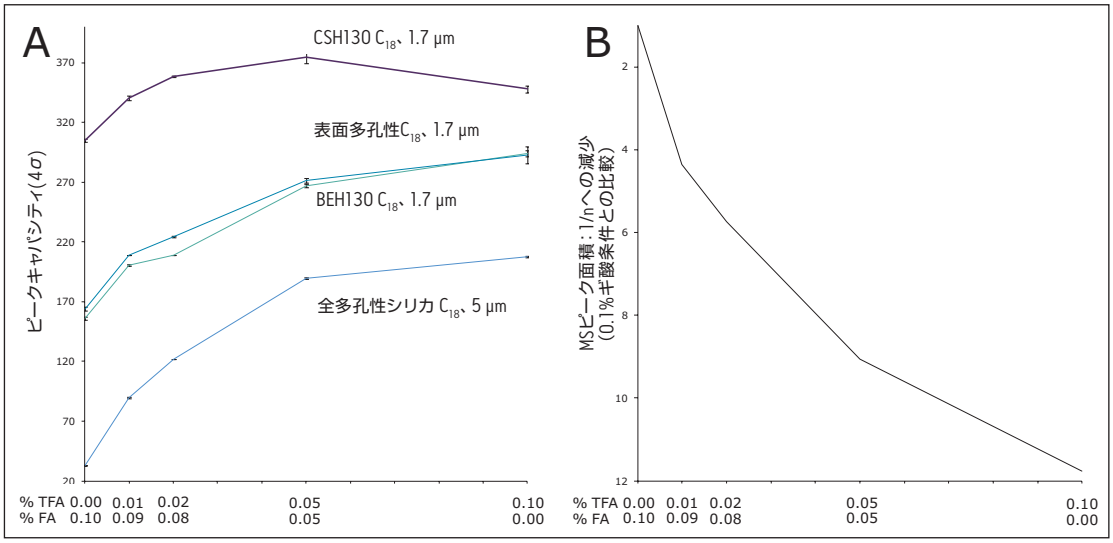

図5　ピークキャパシティおよびMSシグナルへのTFAの影響。(A) 酸性モディファイアーに対するピークキャパシティ。値は2回繰り返し分析を行った平均値。(B) 酸性モディファイアーに対するMSピーク面積。

粒子径および UPLC/HPLC スケーラビリティ

多くのペプチド分離が現在も従来のHPLCシステムで行われています。粒子径2 µm以下のパーティクルを充てんしたカラムは背圧が高くなるため、従来のHPLCシステムでの使用は適していません。CSH130 C_{18}、1.7 µmカラムで得られた高いピークキャパシティのペプチド分離がCSH130 C_{18}、2.5 µm ***XP***カラムに良好に移管できるかどうかを確認するために、1.7 µmカラムの分析法から計算してHPLC対応の2.5 µm ***XP***カラムの分析法を作成しました。この計算はACQUITY UPLCカラムカリキュレーターで示されるように、流速を1/1.5に低減し、グラジエント時間を1.5倍にすることで行いました[18]。図6には1.7 µmカラムから2.5 µm ***XP***カラムに良好に移管した分離を示しています。表2に示すように、分離係数(選択性）の一貫性からもはっきりと示されています。2.5 µm ***XP***カラムを用いた分離では1.7 µmカラムの場合に比べてかなり背圧が低く（～3,000 vs. ～8,000 psi)、CSHテクノロジーがUPLC、HPLCどちらのシステムを用いた高いピークキャパシティのペプチド分離にもすぐに使用できることを実証しています。

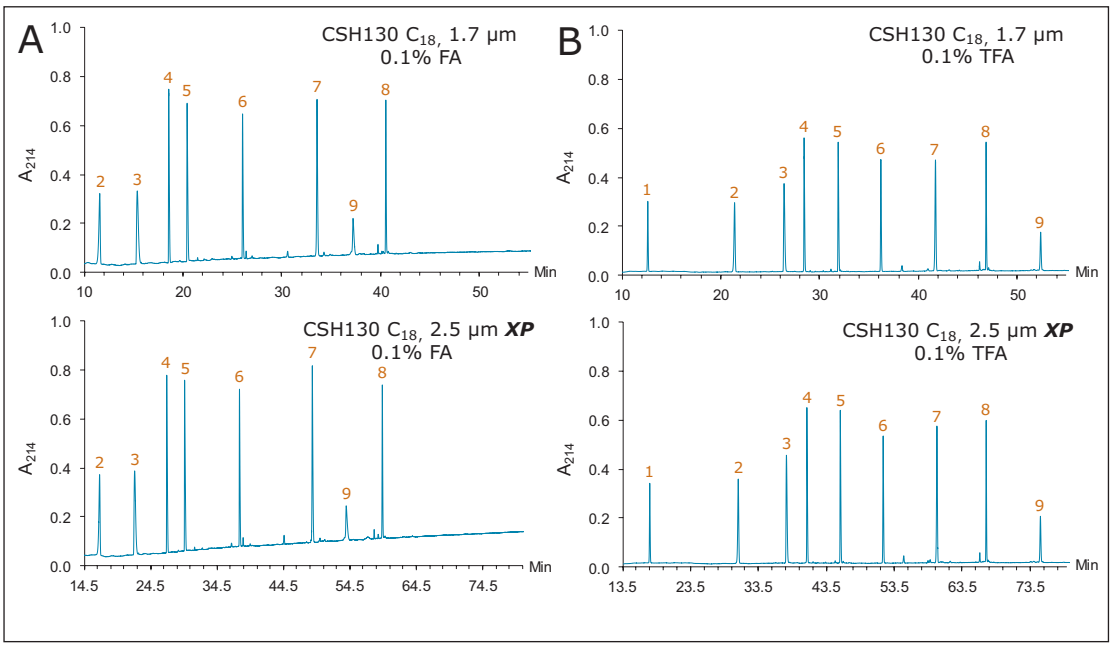

*図6　CSH130 C_{18}カラムの UPLC/HPLC (粒子径1.7/2.5 µm) スケーラビリティ。(A) 0.1% ギ酸および (B) 0.1% TFA含有移動相での Waters MassPREP ペプチドスタンダードMix (P/N 186002337) クロマトグラム。CSH130 C_{18}、2.5 µm **XP** カラムの分析法はACQUITY UPLCカラムカリキュレーターを用いてCSH 130 C_{18}、1.7 µmの分析法を流速1/1.5、グラジエント時間1.5倍にスケーリング。*

	0.1% FA	
	CSH130 C_{18} 1.7 µm	CSH130 C_{18} 2.5 µm *XP*
$\alpha_{2,3}$	1.36	1.35
$\alpha_{3,4}$	1.22	1.24
$\alpha_{4,5}$	1.11	1.11
$\alpha_{5,6}$	1.29	1.30
$\alpha_{6,7}$	1.30	1.30
$\alpha_{7,9}$	1.11	1.11
$\alpha_{9,8}$	1.09	1.10

	0.1% TFA	
	CSH130 C_{18} 1.7 µm	CSH130 C_{18} 2.5 µm *XP*
$\alpha_{1,2}$	1.76	1.83
$\alpha_{2,3}$	1.25	1.25
$\alpha_{3,4}$	1.08	1.08
$\alpha_{4,5}$	1.13	1.13
$\alpha_{5,6}$	1.14	1.14
$\alpha_{6,7}$	1.16	1.16
$\alpha_{7,8}$	1.12	1.12
$\alpha_{8,9}$	1.12	1.12

表2　図6に示した分離の分離係数（選択性）

結論

微量レベルのプラスチャージを導入したCSH 130 C_{18}カラムにより良好なペプチド分離が実現することが実証されました。9種類のペプチドを混合したスタンダードの分析で、CSH130 C_{18}カラムでは意図的にプラスチャージを導入していないC_{18} 固定相のカラムと比較して高いピークキャパシティが得られました。また、CSH130 C_{18}カラムの性能は、エレクトロスプレーイオン化のサプレッションの原因となるTFAなどの強いイオンペア試薬の使用にはほとんど依存しないことも示されました。さらに、CSH130 C_{18}、1.7 µmカラムにより得られる分離は、分析時間は犠牲になりますが、UPLCに比べ耐圧の低いHPLC条件でCSH130 C_{18}、2.5 µm ***XP***カラムに移管できることも示されました。CSH130 C_{18}カラムでは異なる粒子径をラインアップしているため、HPLCシステムしかないラボにおけるルーチン使用へのUPLC分離の適合を容易にするだけでなく、耐圧9,000-12,000 psiのUHPLCシステムの能力を拡大します。

参考文献

1. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009; 11: 49-79.
2. Richardson J, Shah B, Xiao G, Bondarenko PV, Zhang Z. Automated in-solution protein digestion using a commonly available high-performance liquid chromatography autosampler. *Anal Biochem.* 2011; 411(2): 284-91.
3. Neue UD. Theory of peak capacity in gradient elution. *J Chromatogr A.* 2005; 1079(1-2): 153-61.
4. Wyndham KD, O'Gara JE, Walter TH, Glose KH, Lawrence NL, Alden BA, Izzo GS, Hudalla CJ, Iraneta PC. Characterization and evaluation of C_{18} HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Anal Chem.* 2003; 75(24): 6781-8.
5. Iraneta PC, Wyndham KD, McCabe DR, Walter TH. Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography. Waters White Paper 720003929EN. 2011.
6. Berthelette KD, Summers M, Fountain KJ. Modernization of the USP Assay for Clarithromycin Using e***X***tended Performance (***XP***) Column Technology. Waters Application Note 720004461EN. 2012.
7. Fountain KJ, Hewitson HB, Iraneta PC, Morrison D. Practical Applications of Charged Surface Hybrid (CSH) Technology. Waters Application Note 720003720EN. 2010.
8. Summers M, Fountain KJ. A Quality by Design (QbD) Based Method Development for the Determination of Impurities in a Peroxide Degraded Sample of Ziprasidone. Waters Application Note 720004072EN. 2011.
9. Summers M, Fountain KJ. Rapid Method Development through Proper Column Selection. Waters Application Note 720004353EN. 2012.
10. ACQUITY UPLC CSH Columns. Waters Applications Notebook 720003537EN. 2010.
11. Lauber MA, Koza SM, Fountain KJ. Peptide Mapping and Small Protein Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C_{18} and TFA-Free Mobile Phases. Waters Application Note. 720004571EN. 2013.
12. Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. Human IgG1 hinge fragmentation as the result of H2O2-mediated radical cleavage. *J Biol Chem.* 2009; 284(51): 35390-402.
13. Yu XC, Joe K, Zhang Y, Adriano A, Wang Y, Gazzano-Santoro H, Keck RG, Deperalta G, Ling V. Accurate determination of succinimide degradation products using high fidelity trypsin digestion peptide map analysis. *Anal Chem.* 2011; 83(15):5912-9.
14. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* 2003; 49(7): 1041-4.
15. Temesi D, Law B. LC-GC Int. 1999;17: 626-32.
16. Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC, Kuhlmann FE. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *J Chromatogr A.* 1995;712(1): 177-90.
17. Kuhlmann FE, Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1995; 6 (12): 1221-1225.
18. Jones M D, Alden P, Fountain KJ, Aubin A. Waters Application Note 720003721EN. 2010.

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、ACQUITY UPLC、Xevo、UPLC および MassLynx は Waters Corporation の登録商標です。
XSelect、CSH、MassPREP 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3月 720004568JA PDF