VVOTERS THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.

ハイブリッドパーティクルC₁₈カラムと酢酸移動相を用いた 高負荷量ペプチド分析

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

- 独自の選択性をもつ2種類のハイブリッド パーティクルカラムケミストリー(BEH130 C₁₈ & CSH130 C₁₈)
- BEH130 C₁₈ および CSH130 C₁₈ はそれぞれ最適濃度の酢酸添加移動相条件下で、0.1%TFA 添加移動相条件下に比べて幅の狭いターゲットピークを生成し分離度が向上。これにより薬学的観点から許容可能なカウンターイオンを用いて、より少ない精製ステップでペプチドを獲得可能
- BEH130 C₁₈ および CSH130 C₁₈ はシトクロ ム c のトリプシン消化物で QC 試験実施

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC[®] H-Class Bio システム XSelect[®] CSH130 C₁₈、5 µm XBridge[®] BEH130 C₁₈、5 µm MassPREP[™] ペプチドスタンダードミックス

キーワード

逆相 (RP) 、ペプチド、酢酸、表面チャージハイ ブリッド (Charged Surface Hybrid: CSH) 、CSH130 C₁₈、BEH130 C₁₈、分取クロマトグラフィー、 peptide separation technology (PST)

はじめに

ペプチドは治療薬としてもバイオマーカーとしても非常に有用であることが証明さ れています。こういった用途には分取逆相クロマトグラフィーによりペプチドを精製 するのが一般的な方法です。ほとんどの場合、精製プロセスで高純度のペプチド を得ることが不可欠です。コンタミネーションによりバイオアッセイの結果が不明瞭 になり、実際の原薬中に存在した場合には深刻な問題となります。このため、ター ゲットペプチドと化学的に非常に類似していることの多い不純物の共溶出を最小限 にするために高いクロマトグラフィー分離が必要です。また、スループットと生産 性の最適化を確かなものとするために、卓越したローダビリティのカラムケミスト リーも必要です。一般的に、ペプチドはトリフルオロ酢酸(TFA)などの強いイオン ペア試薬を含む移動相を用いて分離されます。しかしながら、TFA 含有移動相を用 いた場合、更なるステップが必要となります。トリフルオロ酢酸塩(TFA塩)は、そ の毒性から除去または置換する必要があります。¹より毒性の低いカウンターイオン、 特に酢酸塩が推奨されます。実際、ほとんどのペプチド医薬品は酢酸塩または酢 酸塩含有の液剤です。²⁻³可能であれば、TFA 含有移動相の使用を避けて、代わり に酢酸移動相を使用することは好都合であると思われます。未精製合成ペプチド⁴⁵ など、TFA 溶液中のペプチドは酢酸移動相とアイソクラティック逆相クロマトグラ フィーで分離するとある程度以上酢酸塩に置換されることがすでに示されています。 一方、より完全な酢酸塩への置換には、高濃度の酢酸塩バッファーを用いた短い 洗浄ステップを組み込んだグラジエント分離が採用されます。⁷結果的に、酢酸移動 相を用いた効率的な精製プロセスにより、望ましいカウンターイオンを用いたペプ チドをより少ないステップで得ることができます。

分取ペプチド分離のために BEH C₁₈ および CSH^M C₁₈ 両方を用いて検討を行いました。BEH C₁₈ はエチレン架橋型ハイブリッド (BEH) を基材とする有機シリカ C₁₈ 固定相で、その頑健性とpH耐久性で知られています。表面チャージハイブリッド (Charged Surface Hybrid: CSH) C₁₈ は BEH C₁₈ の更なる進化で、BEH に酸性条件下での微量レベルのプラスチャージを導入しています。以下のデータでは各固定相が TFA および酢酸移動相どちらの条件下でも高負荷量のペプチド分離に適していることを実証しています。また、BEH C₁₈ とCSH C₁₈ 両方とも、0.1% TFA 移動相よりもそれぞれに最適な濃度の酢酸移動相条件下で、高負荷量のサンプルロードにおいてより幅の狭いターゲットピークが得られることも示しています。

実験方法

サンプル詳細

MassPREP ペプチドスタンダード Mix (製品番号 186002337 詳細は表 1 に記載)は(移動相組成に応じて) 0.1%TFA 水溶液または 0.1% 酢酸水溶液に溶解し、(サンプルロード量に応じて)トータルペプチド濃度を 0.6 または 2.0 mg/mL に調製します。純度の低い(< 70%)合成ペプチド(DFVGYGVKDFVGVGVK)は 0.1%TFA 水 溶液または 0.1% 酢酸水溶液に溶解し、濃度 1 または 4 mg/mL に調製。

分析法条件 (特に記載のな	よい限り使用)	流速:	1 mL/min (UV 検出器 約 20 µL/m	居の後ろ nin を MS	でスプリットし、 S ソースに注入)
LC条件 システム: 検出:	ACQUITY UPLC H-Class Bio システム ACQUITY UPLC TUV 検出器 (500 nL 分析フローセル) Xevo [®] G2 Q-Tof [™] 質量分析計	移動相: グラジエント:	グラジエン MassPREP イ A:0.1%(B:0.1%(アセトニト または	ノトテー ペプチド v/v) IFA v/v) IFA ヽリル (ノ	ブル参照 スタンダード Mix 水溶液 in 90:10 ACN) / 水
波長:	214 nm および 250 nm		A:0.1% (v/v) 酢酸	被水溶液
スキャン速度: カラム:	2 Hz (時定数 1 s) XBridge BEH130 C ₁₈ 、 4.6 × 100 mm、5 µm、全多孔性、 130Å (製品番号 186003579) XSelect CSH130 C ₁₈ 、4.6 × 100 mm、 5 µm、全多孔性、130Å (製品番号 186007077)		B:0.1% (v ACN/水 時間(分) 0 1 61 62 65 65	v/v) 酢酸 %A 99.5 99.5 40.0 10.0 10.0 99.5	<pre>% in 90:10 %B 0.5 0.5 60.0 90.0 90.0 0.5</pre>
カラム温度:	40°C		85	99.5	0.5
	100				

サンプル温度: 10℃

注入量: 50 – 1000 µL, 負荷量は以下に記載

DFYGYVKDFVGVGVK の フォーカスグラジエント				
A:0.1% (v/v) TFA 水溶液				
B:0.1% (ACN/ 水	v/v) TF	A in 90:10		
時間(分)	%A	%В		
0.0	90	10		
3.0	90	10		
4.0	80	20		
24.2	60	40		
29.2	10	90		
32.2	10	90		
33.2	90	10		
52.0	90	10		
A:0.1% (v/v) 酢酸水溶液				
	v/v) =			
B:0.1%(ACN/水	v/v) 酢	酸 in 90:10		
B:0.1%(ACN/水 または	v/v) 酢	酸 in 90:10		
B: 0.1%(ACN/水 または A: 99:1(v/v) 酢 v/v) 酢 v/v) 水	·酸 in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸		
B:0.1%(ACN/水 または A:99:1(B:90:9:1 酢酸 - 1%	v/v) 酢 v/v) 酢 (v/v) 水 (v/v)	酸 in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 /		
B:0.1%(ACN/水 または A:99:1(B:90:9:1 酢酸 - 1% 時間(分)	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 (v/v) 酢酸 %A	酸 in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/水 / %B		
B:0.1%(ACN/水 または A:99:1(B:90:9:1 酢酸-1% 時間(分) 0.0	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 (v/v) 酢酸 %A 90	win 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 / %B 10		
B:0.1%(ACN/水 または A:99:1(B:90:9:1 酢酸-1% 時間(分) 0.0 3.0	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 (v/v) 酢酸 %A 90 90	www.in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 / %B 10 10		
B: 0.1%(ACN/水 または A: 99:1(B: 90:9:1 酢酸 - 1% 時間(分) 0.0 3.0 3.3	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 作酸 %A 90 90 87	we in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 / %B 10 10 13		
B:0.1%(ACN/水 または A:99:1(B:90:9:1 酢酸-1% 時間(分) 0.0 3.0 3.3 23.5	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 (v/v) 酢酸 %A 90 90 87 67	www.in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 / %B 10 10 13 33		
H 0.1%(B: 0.1%(ACN/水 または A: 99:1(B: 90:9:1 酢酸 - 1% 時間(分) 0.0 3.0 3.0 3.3 23.5 29.2	v/v) 酢 v/v) 水 (v/v) 水 (v/v) 酢酸 %A 90 90 87 67 10	we in 90:10 / 酢酸 - 1% 酢酸 ACN/ 水 / %B 10 10 13 33 90		

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:	Resolution $\mp - F$
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:	Nal
	$(1 \mu g/\mu L \cdot m/z 50 \sim 2000)$
データ取得率:	2 Hz (<i>m/z</i> 50 ~ 1990)

データ管理:

時間(分)	%A	%B
0.0	90	10
3.0	90	10
3.3	87	13
23.5	67	33
29.2	10	90
32.2	10	90
33.2	90	10
52.0	90	10

MassLynx[®] ソフトウェア v4.1

結果および考察

ペプチドスタンダードミックス (9種類のペプチド)を用いたロード量検討

ペプチドマッピングなど、分析レベルのペプチド分離へ CSH130 C₁₈ および BEH130 C₁₈ を適用したアプリ ケーションについては、以前の報告で広く検討を行いました。⁸⁻⁹ 簡単に言うと、CSH130 C₁₈ はその新規の 表面プラスチャージにより、他のペプチド分析用逆相カラムケミストリーに比べてピーク形状およびロー ダビリティが向上しているとこが分かりました。特に移動相にイオンペア試薬をほとんど、または全く利 用しない場合に、分析アプリケーションでは最大 90%までのピークキャパシティの著しい向上が認められ ました。CSH130 C₁₈ の表面プラスチャージによって、BEH130 C₁₈ に比べて独自の選択性と少し弱い保持も 得られるため、この 2 種類の卓越したカラムケミストリーはペプチド分離開発において最適な分離を得る ために対での検討を推奨いたします。

分取分離における CSH130 C₁₈ と BEH130 C₁₈ の性能について検討するため、いくつかのペプチドについて ペプチド製造で一般的に使用される移動相、すなわち TFA または酢酸含有移動相を用いてロード量の検討 を行いました。この検討試験は粒子径 5 μm の分析 (4.6 mm 内径) カラムを用いて行いました。

表1に示す9種類のペプチドを含む MassPREP ペプチドスタンダード Mix を検討する最初のサンプルとして 用いました。図1には、BEH130 C18 および CSH130 C18 を用いて2種類の移動相(0.1% TFA 含有移動相ま たは 0.1% 酢酸移動相) でセミ分取レベルのロード量で分析を行った一連のクロマトグラムを示しています。 0.1% TFA 条件では BEH カラムの平均 4 σ ピーク幅は 0.8 分でした。0.1% 酢酸条件では、平均ピーク幅は約 2 倍の 1.5 分に増加しました。酢酸は TFA に比べてずっと弱い酸で、イオン強度とイオンペア効果がずっ と低い、より弱酸性の移動相が生成されます。結果として、TFA の代わりに酢酸を用いると、ほとんどの C18 カラムでピーク形状が大きく悪化することが予測されます。図1に示すように、BEH130 C18 を用いたセ ミ分取レベルのロードではこの仮定が当てはまります。しかしながら、CSH130 C18 カラムでは TFA から酢 酸に変えてもピーク形状はかなり良好に維持されます。CSH130 C18 カラムで 0.1%TFA および 0.1% 酢酸移 動相を用いた平均 4 σ ピーク幅はそれぞれ 0.5 分と 0.6 分です。これらピーク幅のデータは図 2 にまとめ ましたが、ここではカラムタイプと移動相条件による、スタンダード Mix 中の各ペプチドのピーク幅を図 示しました。セミ分取レベルのロードのデータに加え、分析レベルのロードで得られたデータも示してい ます。この図は、0.1%TFA 移動相での分析レベルのサンプルロードなどいくつかの条件下では BEH130 C₁₈ および CSH130 C₁₈ で同様のピーク形状が得られることを明らかにしています。しかしながら、それ以外の 0.1%酢酸移動相におけるセミ分取レベルのロードなどの条件下では CSH130 C₁₈ でずっと幅の狭いピーク が得られます。以前に報告したように⁸⁻⁹、CSH130 C₁₈ではイオンペア試薬をほとんどまたは全く添加しな い酸性移動相条件でペプチドの非常に良好なピーク形状が得られますが、今回のデータは、分析分離にルー チンで用いられるよりも20倍のサンプルロードでも更に大きく改善されることを示しています。

	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

4



図 1 セミ分取サンプルロード (混合物 500µg) で MassPREP ペプチドスタンダードミックスを BEH130 および CSH130 C₁₈、5 µm、4.6 × 100 mm カラムで分析したクロマト グラム



図2 MassPREP ペプチドスタンダードミックス中を分析レベル (混合物 30 µg) およびセミ分取レベル (混合物 500 µg) でロードした各分析種のピーク幅

純度の低い合成ペプチド

分取分離は分析分離に比べてサンプルロードを 1000 倍まで増加させて実施されることが多く、またそれ以上で 実施されるケースもあります。純度の低い合成ペプチド (DFVGYGVKDFVGVGVK, pl 6, 1.7 kDa) を用いて、この範 囲およびそれ以下のサンプルロードで検討を行いました。分析時間短縮のためにフォーカスグラジエントを用い、 全てのピーク形状を評価するために低い感度の波長 (250 nm) による検出で、BEH および CSH 両方のカラムを用 いて分離を実施しました。

0.1% 酢酸移動相条件を用いたセミ分取および分取レベルのサンプルロードでまず分析を実施しました(図3)。 BEH カラムでのセミ分取ロード(50µg)では、ターゲットペプチドは顕著なオーバーロード(よく見られるラングミュ ア型等温線と相応)を示すピークになりました。逆に、分取ロード(1mg)では、アンチラングミュア型等温線の 特徴を示す若干リーディングしたピークとして溶出されました。アンチラングミュア型等温線はペプチドが両性イ オン型として存在する場合に起こることが知られています。¹⁰そのため、0.1% 酢酸移動相がこの合成ペプチドの カルボキシル基を完全に分子型にするのに十分なだけ酸性でなかったと考えられます。このペプチドは陽イオン 型および両性イオン型の両方で存在していたと推定されます。サンプルロード増加に従って、特にターゲットペ プチドの濃度が移動相の緩衝能を超え、両性イオン型の相対量が増加したと予測されます。これにより BEH カラ ムでロード量増加によってピーク形状が大きく変わったことが説明できます。

興味深いことに、図3に示すように0.1% 酢酸移動相条件下の分取サンプルロードではBEH130 C₁₈ で幅の狭い ターゲットペプチドのピークが得られました。この条件では、BEH カラムで CSH カラムよりも幅の狭いターゲット ペプチドのピークが得られました。実際、CSH130 C₁₈ カラムでは、0.1% 酢酸移動相条件でどちらのレベルのサ ンプルロードでもリーディングしたピークが観察されました。CSH 表面のプラスチャージがペプチドで起こるオー バーロードを最小限に抑えている⁸⁹ ことを考えると、これは驚くことではありません。このように、そのリーディ ングしたピーク形状はより容易に分かります。ピークオーバーロードがないため、分取サンプルロードでのターゲッ トピークのピーク幅は実際、BEH カラムよりも CSH カラムで広くなりました。



図3 純度の低い合成ペプチド DFVGYGVKDFVGVGVK (pl 6, 1.7 kDa)のセミ分取レベル(50 µg)および分取レベル(1 mg)サンプルロードでのクロマト グラム。囲った部分のの拡大クロマトグラムは図4に示した。

6

この結果に基づいて、CSH130 C₁₈ および BEH130 C₁₈ はそれぞれ異なる移動相条件下で最適なピーク形状が得られると予測されます。そのため、10 倍濃度の酸 (1%酢酸) を添加した移動相でも分離を実施しました。中間の濃度については評価を行っていませんが、分取分析法の開発においては、評価を行う価値があります。この移動相組成の変更によって CSH カラムのピーク形状は大きく向上しましたが、BEH カラムではピーク形状が悪化しました (図 3 参照)。それぞれの最適濃度の酢酸移動相で、BEH (0.1% 酢酸) および CSH (1%酢酸) カラム どちらも幅の狭いピークを溶出しました (半値幅はそれぞれ 0.5 分と 0.6 分)。これら結果を評価する基準として、イオンペア試薬として 0.1%TFA を添加した移動相でも分離を実施しました (図 3 の一番右)。TFA 条件では、CSH130 C₁₈ のピーク幅は 1.1 分でした。カラムケミストリーに関わらず、最適濃度の酢酸移動相を用いることで TFA 含有移動相に比べて顕著に幅の狭いターゲットピークがえられました。これら結果は、酢酸移動相がペプチド分取クロマトグラフィーにとって有用であることを示しています。

幅の狭いターゲットピークは、多くの場合、不純物とのより良好な分離と一致しており、結果としてより高い 純度のフラクションを収集できるようになります。DFVGYGVKDFVGVGVK の分取ロードにおけるカラムケミスト リーと移動相添加剤の影響を図4に再度示しましたが、ここでは、ターゲットピークから MS で同定した複数 の不純物を分離するために、各分離におけるキャパシティとクロマトグラムのベースラインに焦点を当ててい ます。前述したように、酢酸移動相では幅の狭いターゲットピークが観察されました。

図4は、モニターした不純物の共溶出も酢酸移動相の使用により最小限に抑えられていることを示しています。 さらに、異なる移動相添加剤と2種類のカラムケミストリーを用いることで、ターゲットペプチドと不純物と のクロマトグラフィー選択性が大きく変わることも明らかです。このロード量検討で評価したパラメータにつ いては、1%酢酸移動相でCSHカラムを用いた場合に最も幅の狭いターゲットペプチドのピークが得られ、モ ニターした不純物との共溶出が最小限に抑えられましたが、0.1%酢酸移動相でBEHカラムを用いた場合にも 同等の分離が実現しました。異なる選択性のカラムケミストリーと最適添加剤濃度の利用は困難な分取分離を 開発する際に有効です。



図4. BEH130 C₁₈ および CSH130 C₁₈ を用いてそれぞれ最適濃度の酢酸添 加移動相または 0.1%IFA 添加移動相 を用いて、DFVGYGVKDFVGVGVK の分 取レベルサンプルロード(1mg) で分 析したクロマトグラム。ターゲットペ プチドおよび番号を振った不純物の保 持時間は ESI-MS で確認しました。確 認した不純物について、それぞれ以 下の質量シフトが認められました:(1, -147.1 Da), (2, -263.1 Da), (3,-470.2 Da), (4, +548.4 Da), (5, -227.2 Da), and (6, +988.6 Da).

7

[APPLICATION NOTE]

ここまでは、合成ペプチド (DFVGYGVKDFVGVGVK) の適度な分取サンプルロード (1 mg) における結果につい て述べてきました。このペプチドを 4 mg ロードして得られたクロマトグラムを図 5 に示しました。これは、 内径の大きい 50 mm ID カラムに 0.5 g サンプルを注入するのに相当し、注入毎の生産性が非常に高いこと になります。これらのデータから、CSH および BEH カラムはどちらも高いサンプルロードが可能であるこ とが明らかです。CSH カラムでセミ分取 (50 μg) から分取 (1 mg) ロードまでピークプロファイルが非常に 一貫しているのは注目すべき点です。このようにスケールアップが予測可能であることは、大量のサンプ ルを消費することなしに分取分析法を開発する必要がある場合に有用です。



図5 最適化した酢酸移動相を用いた BEH130 C18 および CSH130 C18 カラムへの高負荷量のサンプルロード (4 mg まで)

まとめ

分析レベルのカラムを用いたロード量の検討から、5 µm BEH130 C₁₈ および 5 µm CSH130 C₁₈ の使用により TFA または 酢酸移動相を用いて、容易な分取ペプチド分離を期待できる ことが示されました。BEH130 C₁₈ および CSH130 C₁₈ カラムケ ミストリーはどちらも有用な特徴を備えています。酸性条件 下で、CSH130 C₁₈ は BEH130 C₁₈ に比べてローダビリティが向 上し、多くの場合、幅の狭いターゲットピークが得られます。 そのため、CSH130 C₁₈ ではより少ない量で画分が得られ、次 に続く精製や溶媒除去ステップを容易にするため利用できます。 一方、BEH130 C₁₈ は中性/塩基性条件下の分取クロマトグラ フィーに非常に適していますが、これはこの pH 領域での長い カラム寿命と温度耐久性によるものです。最後に、CSH130 C₁₈ とBEH130 C₁₈ は独自の選択性を示すため、困難な不純物/ター ゲットペプチドの分離に対し、対で検討を行うことが有効です。

これら前述の特徴よりもおそらく興味深い点は、各固定相が 異なる移動相添加剤濃度で最適化され、例として挙げた合成 ペプチドの分取ロードにおいて 0.1%TFA 移動相よりも酢酸移 動相で最適化され最良のピーク形状が得られたことです。酢酸 移動相を用いるということは、薬学的観点から許容可能なカ ウンターイオンを用いてより少ないステップでペプチドを得ら れるため、これらハイブリッドパーティクル C₁₈ カラムを効率 的な分取精製プロセスに活用できる可能性を示唆しています。

Reference

- Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Mulvey TB, Cooper GJ, Reid IR. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *Am J Physiol.* 1999; 277 (5 Pt 1): E779-83.
- Pini A, Lozzi L, Bernini A, Brunetti J, Falciani C, Scali S, Bindi S, Di Maggio T, Rossolini GM, Niccolai N, Bracci L. Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions. *Amino Acids.* 2012; 43(1): 467-73.
- 3. Reichert JP, Tartat A, Dunn MK. Development trends for peptide therapeutics: A comprehensive quantitative analysis of peptide therapeutics in clinical development. Peptide Therapeutics Foundation. 2010.
- Fields GB, Carr SA, Marshak DR, Smith AJ, Stults JT, Williams LC, Williams KR, Young JD. In Techniques in Protein Chemistry IV. Hogue-Angeletti R, Ed. San Diego, 1993; 229-237.
- 5. Kent, SBH. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; (57): 957-989.
- Roux S, Zekri E, Rousseau B, Paternostre M, Cintrat JC, Fay N. Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches. *J Pept Sci.* 2008; 14 (3): 354-9.
- Alon H, Butilca GM, Eidelman C, Elster S, Ivchenko A, Shusman S, Tovi A, Zaoui GA. Counterion Exchange Process for Peptides. Patent Pending, 2006; 2010.
- Lauber MA, Koza SM, Fountain KJ. Peptide Mapping and Small Protein Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C₁₈ and TFA-Free Mobile Phases. Waters Application Note <u>720004571en</u>. 2013 January.
- Lauber MA, Koza SM, Fountain KJ. Increasing Peak Capacity in Reversed-Phase Peptide Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C₁₈ Columns. Waters Application Note <u>720004568en</u>. 2013 January.
- Gritti F, Guiochon G. Adsorption behavior of the three species of the biprotic peptide Phe-Ala onto an end-capped C₁₈-bonded organic/inorganic hybrid stationary phase. *Anal Chem.* 2009; 81(24): 9871-84.

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE. $^{\circ}$

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 大阪市芝川区西中島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、ACQUITY UPLC、Xevo、MassLynx、XSelect、XBridge および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。CSH、MassPREP および Q-Tof 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。