

Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 カラムを用いた ペプチド標準品の分析

LC/MS に適した移動相条件で高極性ペプチド標準品の
保持分離の改善を確認

著者

澤田 有司

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Agilent InfinityLab Poroshell 120 Aq-C18 カラムは、低背圧・高カラム効率の表面多孔質カラム Poroshell 120 シリーズの C18 カラムで、結合相のアルキル基の密度を最適化することで、高極性の分析種に対して優れた保持分離を示します。このアプリケーションノートでは、ペプチド標準品 10 種混合物を、ペプチド分析専用カラムである AdvanceBio Peptide Plus と Poroshell 120 Aq-C18 を用いて、LC/MS と LC/DAD でその性能を評価した結果を紹介します。Poroshell 120Aq-C18 は、LC/MS に適した低イオン強度のギ酸を添加した移動相のグラジエント分析において、前半に溶出する 5 種の高極性ペプチドの保持分離が大きく改善しました。さらにグラジエント条件を最適化することで、後半に溶出するペプチドの分離も改善し、分析時間も短縮されました。この条件は LC/MS、LC/DAD の双方で利用可能です。これらの検討結果から、Poroshell 120 Aq-C18 は高極性の分析種においても LC/MS 分析に適した条件で測定ができることが分かりました。

はじめに

表面多孔質の Poroshell 120 シリーズのカラムは、2.7 μm の粒子径サイズで全多孔質カラムのサブ 2 μm の粒子径と同等の分離性能と 50 % 程度低い背圧を示します。

この Poroshell 120 カラムシリーズの Aq-C18 は、充てん剤のアルキル基の密度を最適化することで従来の C18 カラムでは分析困難な高極性の分析種に対して優れた保持分離を示します。低極性から高極性の分析種を含む混合物の分析では、Poroshell 120 Aq-C18 の分離特性が有効です。

Poroshell 120 シリーズのペプチド分析専用カラムは、AdvanceBio Peptide mapping と AdvanceBio Peptide Plus です。AdvanceBio Peptide mapping は、残存シラノールとペプチド標準品の 2 次的な相互作用を防ぐために、イオン強度が高いトリフルオロ酢酸 (TFA) を利用します¹。TFA は、LC/DAD (ダイオードアレイ検出器) 分析では有効ですが、LC/MS では顕著なイオン化阻害が起こります。一方、充てん剤の粒子表面が正に荷電した AdvanceBio Peptide Plus は、LC/MS 分析に適したイオン強度の低いギ酸添加した移動相でペプチド分析が可能¹です。充てん剤粒子のアルキル基の密度を最適化し、高極性の分析種の分析に適した Poroshell 120 Aq-C18 は、同様のギ酸添加の移動相条件で高極性のペプチドの分離に有効であることが想定されました。

このアプリケーションノートでは、アジレントのペプチド標準品 10 種混合物を利用し、LC/MS に適したギ酸添加の移動相条件で AdvanceBio Peptide Plus と Poroshell 120 Aq-C18 の分離パターンを比較しました。さらに、高極性のペプチドで顕著な保持時間の増加がみられた Poroshell 120 Aq-C18 は分析時間を 50 % 削減したハイスループット条件で LC/MS と LC/DAD (ダイオードアレイ検出器) で分析を行いました。

システム

表 1. 装置構成

型番	装置名
G7117B	Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector (DAD)
G6470B	6470 トリプル四重極 LC/MS
G7167A	1290 Infinity II マルチサンブラ
G7120A	1290 Infinity II ハイスピードポンプ

実験方法

材料

ペプチド標準品には、アジレントの 10 種混合物を用いました (表 2)。移動相および試薬としてアジレントの InfinityLab Ultra-Pure LC/MS 用溶媒の超純水、アセトニトリルを使用しました (表 2、表 3)。ペプチド標準品と移動相に添加するギ酸は、関東化学から購入しました (表 2、表 3)。サンプル測定には、アジレントのバイアル、バイアルキャップ、インサートを使用しました (表 2)。

LC/MS 分析条件

ペプチド標準品は、100 μL の 0.1 % ギ酸水溶液に溶解し、不活性化ガラスインサートを挿入した茶色の 2 mL スクリューバイアルを用いて測定しました。表 3 の LC/MS 条件で 10 種のペプチド標準品を測定し、各ペプチド標準品の溶出時間を 2 種の HPLC カラム (AdvanceBio Peptide Plus、Poroshell 120 Aq-C18) で比較しました。さらに、高極性のペプチド標準品で優れた保持を示した Poroshell 120 Aq-C18 は、グラジエント条件を検討し、ダイオードアレイ検出器 (DAD) と MS で同時検出しました。

表 2. 試薬と消耗品

メーカー	型番	品名
アジレント	5191-4498	InfinityLab UltraPure LC/MS 用 純水
アジレント	5191-4496	InfinityLab UltraPure LC/MS 用 アセトニトリル
アジレント	5182-0717	一体型セブタム付きポリプロピレンスクリューキャップ
アジレント	5188-6535	スクリューバイアル、2 mL、茶色
アジレント	5181-8872	不活性化ガラスインサート
アジレント	5190-0583	10 Peptide std lyophilized 71 μg in 2 mL バイアル
関東化学	16233-97	ギ酸、高速液体クロマトグラフィー用、25 mL

表 3. LC/MS と LC/DAD の分析条件

パラメータ	分析
HPLCカラム	Poroshell 120 Aq-C18, 2.7 μm , 2.1 x 150 mm (P/N 693775-742) , AdvanceBio Peptide Plus 2.7 μm , 2.1 x 150 mm (P/N 695775-949)
移動相	移動相A : 0.1 % ギ酸 + LC/MS 用超純水 移動相B : 0.1 % ギ酸 + LC/MS 用アセトニトリル溶液
流速	0.4 mL/分
分析条件 1	%B : 0 分, 3 %; 2 分, 30 %; 35 分, 97 %; 40 分, 99 %; 43 分, 3 %; 50 分, 3 %.
分析条件 2	%B : 0 分, 5 %; 1 分, 5 %; 20 分, 60 %; 21 分, 99 %; 21.1 分, 5 %; 25 分, 5 %
注入量	1 μL
カラム温度	50 °C
MS 検出	イオンソース設定 乾燥ガス : 300 °C, 12 L/min シースガス : 250 °C, 12 L/min ネブライザ : 30 psi 極性 : ポジティブ キャピラリー電圧 : 3000 V スキャン設定 Scan type : MS2 scan Start Mass : 500 End Mass : 3000 Scan Time : 100 Fragmentor voltage : 135 V
DAD 検出	スキャン設定 : 190-400 nm, 5 Hz

表 4. ペプチド標準品の詳細

Peak No	Peptide Name	Peptide sequence
1	Bradykinin frag 1-7	RPPGFSP
2	Bradykinin	RPPGFSPFR
3	Angiotensin II (human)	DRVYIHPF
4	Neurotensin	Glp-LYENKPRRPYIL
5	Angiotensin I (human)	DRVYIHPFHL
6	Renin substrate (porcine)	DRVYIHPFHLVYS
7	[Ace-F-3,2 H-1] Angiotensinogen (1-14)	Ace-FFHDRVYIHPFHLVYS
8	Ser/Thr Protein Phosphatase (15-31)	EIFLSQPILLELEAPLK
9	[F14] Ser/Thr Protein Phosphate (15-31)	FEIFLSQPILLELEAPLK
10	Melectin (honey bee venom)	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ

結果および考察

このアプリケーションノートで分析したアジレントのペプチド標準品は、幅広い極性のペプチドを含む 10 種の混合物です (表 4)。このペプチド標準品を AdvanceBio Peptide Plus と Poroshell 120 Aq-C18 カラムを用いた分析条件 1 (表 3) で LC/MS 分析しました。この結果、AdvanceBio Peptide Plus は、10 種のペプチド標準品で良好な分離パターンを示しました (図 1A)。Poroshell 120 Aq-C18 は、前半に溶出される高極性のペプチドで良好な分離パターンを示しました (図 1B)。

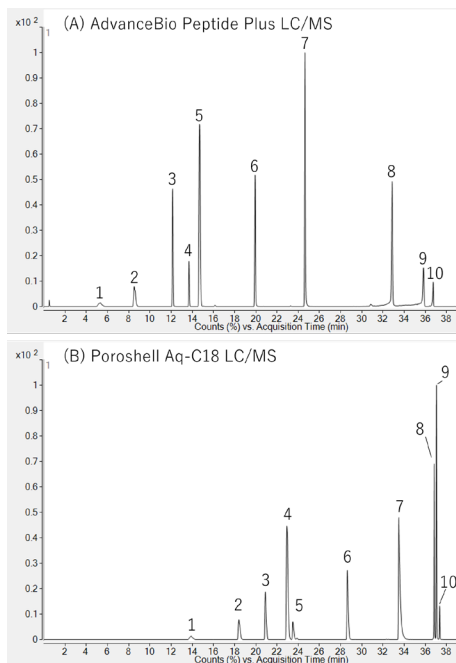


図 1. ペプチド標準品 10 種の LC/MS 分析。

これらの溶出時間を比較した結果、Poroshell 120 Aq-C18 は、AdvanceBio Peptide Plus と比較して前半の 5 種 (Peak No 1-5) で 1.6 倍から 2.6 倍に保持時間が増加しました (図 2)。高極性のペプチドで良好な保持を示した Poroshell 120 Aq-C18 は、グラジエント条件を変えることで、10 種のペプチドが短時間で分離できると考えられます。そこで、分析条件 2 (表 3) を用いて LC/MS と LC/DAD 分析を行った結果、分析条件 1 の約 50% の分析時間で 10 種のペプチドが分離できました (図 3)。

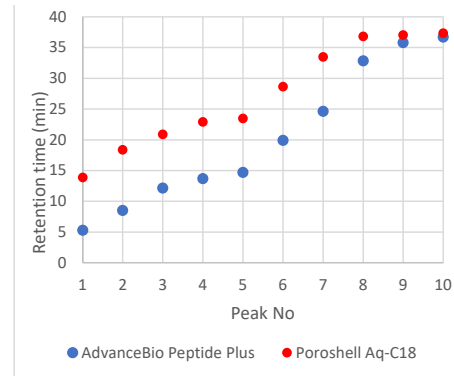


図 2. 10 種ペプチドの保持時間の比較。

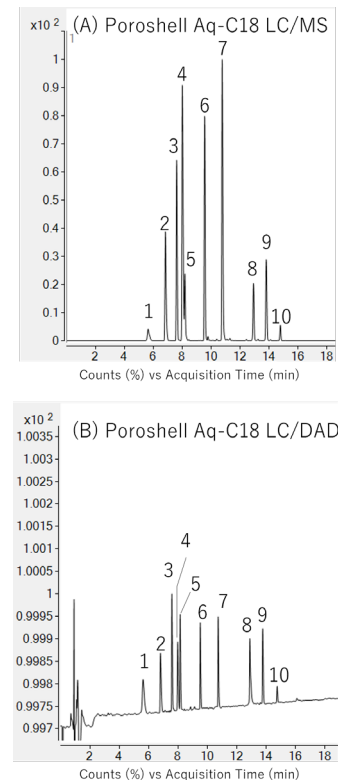


図 3. 10 種ペプチド標準品の LC/MS 分析 (A) と LC/DAD 分析 (B)。

結論

高極性の分析種に適した Poroshell 120 Aq-C18 は、高極性のペプチド標準品の分析に有効です。さらに、簡単なグラジエント条件の変更で LC/MS と LC/DAD の分析時間と移動相試薬の消費を 50 % 程度削減可能です。このように、Poroshell 120 Aq-C18 は、低極性から高極性の分析種を含む混合物の LC/MS および LC/DAD 分析に極めて有効なカラムです。

参考文献

- 1) Oscar Potter and Veronica, Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムによる脱アミド化ペプチドの分離, アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、5994-2971JAJP

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE61624333

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 1, 2023

5994-6979JAJP