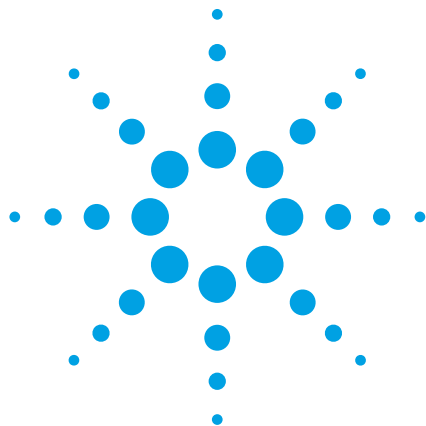




Agilent 1290 Infinity LC システムを用いた トリプシン消化分析

アプリケーションノート

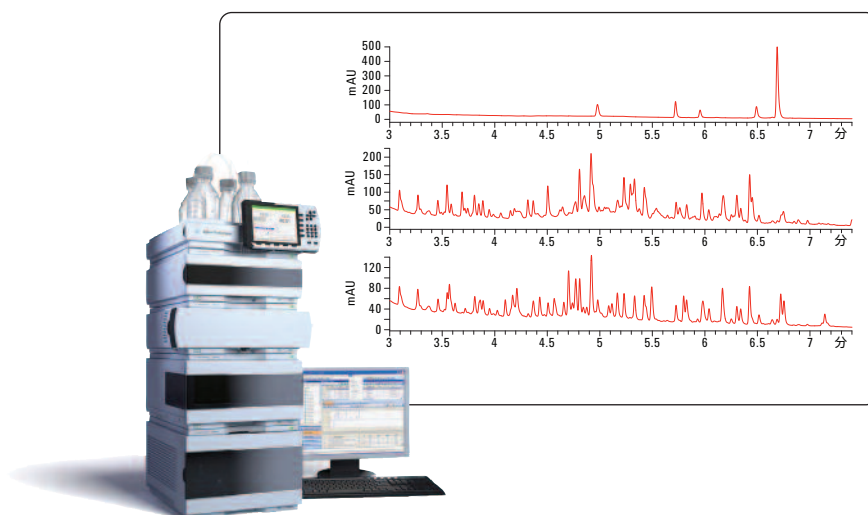
薬品開発、製造 QA/QC

著者

Gerd Vanhoenacker, Frank David, and Pat
Sandra
Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Koen Sandra
Metablys
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Bernd Glatz and Edgar Naegele
Agilent Technologies R&D and
Marketing GmbH and Co. KG
Hewlett-Packard-Str. 8
76337 Waldbronn
Germany



概要

本アプリケーションノートでは以下について説明します。

- Agilent 1290 Infinity LC システムを使用して、極めて複雑なペプチド混合物の分離を検討しました。
- 異なるグラジエントスロープおよび流量を使用し、250 mm × 2.1 mm (内径) × 1.7 μm (粒径) RP-LC カラムでウシ血清アルブミン (BSA) トリプシン消化物の分離を検討しました。
- 最大圧力 900 bar を適用し、総分析時間 8 ~ 260 分の範囲で、188 ~ 851 までのピークキャパシティを得ました。



Agilent Technologies

はじめに

治療用組み換えタンパク質の特性解析からプロテオミクスに基づくバイオマーカーの発見や検証まで、さまざまな分野においてペプチド分離は極めて重要です。サンプルは非常に複雑であり、バイオ医薬品の調合では通常数百のサンプルを扱い、プロテオミクスのサンプルには数千のペプチドが含まれています。そのため分離作業はたいへん困難です。

本アプリケーションノートでは、1290 Infinity LC システムを使用した超高压 LC (UHPLC) の分離能力を実証します。BSA トリプシン消化を 250 mm × 2.1 mm × 1.7 μm (粒径) カラムで分離を行いました。分離能を評価する 2 つの強力なメトリックである、ピークキャパシティおよびピークキャパシティプロダクティビティを異なるグラジエントスロープおよび流量で決定しました。

BSA 消化のコンピュータシミュレーションによると、不完全切断を 1 つまで許容し、非特異的切断を考慮しない場合、約 150 のペプチドが生成されます。

実験

機器およびメソッド

以下の構成で Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

サンプル

pH 8 の重炭酸アンモニウム緩衝液中で BSA のトリプシン消化を実施しました。酵素/基質の比率 1/50 でトリプシンを追加し、混合物質を 37 °C で終夜放置しました。もう 1 つの BSA サンプル (BSA RA と呼ぶ) は消化の前に還元およびアルキル化しました。どちらのサンプルも注入前に、移動相 A で濃度 3 nmol/mL まで酸性化させました。ピークキャパシティの計算を助けるために使用するペプチド標準混合液は、移動相 A で溶かしました。この混合液には、ブラジキニン 1-5 (5 nmol/mL)、アンギオテンシン II (3 nmol/mL)、ニューロテンシン (2 nmol/mL)、ACTH クリップ [18-39] (2.5 nmol/mL)、およびウシインスリン B 鎖 (12.5 nmol/mL) が含まれています。

結果と考察

内径 0.12 mm の 70 mm ステンレスキャピラリーを使用して 2 つのカラム (150 および 100 mm) を結合し、250 mm のカラム長にしました。比較的高速な 8 % B/min グラジエント分析により、消化の高速分析が得られました (図 1)。短いグラジエント時間 (6.25 min) で、約 190 のピークキャパシティが得られました。これは、毎分 30 ピークを超えるピークキャパシティ生成率に相当します。5 種類の標準ペプチドに対して決定したベース (4 σ) での平均ピーク幅でグラジエント時間を割ることにより、ピークキャパシティを計算しました (図 1)。本アプリケーションノートで使用したグラジエ

ントは、カラムから残りの BSA フラグメントを溶出するために実際に必要なグラジエントよりも長いものです。このようにする理由は、さらに保持力のあるペプチドを含む他の消化の分析にもこのグラジエントを適用したためです。溶出ウィンドウ (3 ~ 7.5 分) のみを計算に考慮した場合、136 のピークキャパシティが得られます。ただし、ピークキャパシティのプロダクティビティに影響はなく、毎分生成されるピーク数は変化しません。

より時間のかかる緩勾配のグラジエントを適用した場合、ピークキャパシティが増加するため、クロマトグラムに可視化される情報量も増加します。もちろん、その代償として分析時間を要します。図 2 は、4 種類のグラジエントスロープで分析した BSA 消化の結果を示しています。グラジエント時間が 6.25 分 (8 % B/min) から 50 分 (1 % B/min) へ増加すると、ピークキャパシティは、それぞれ、188 から 567 へと変化し 3 倍になります。50 分のグラジエントに対して BSA 消化の溶出ウィンドウのみを考慮する場合、39 分でピークキャパシティは 375 になります。さらに緩勾配のグラジエントでは、分析時間が許す限り、クロマトグラムにさらに詳細な情報が得られます。グラジエント時間がさらに増加すると、ピークキャパシティがより大きくなりますが、緩やかなグラジエントの効果は、定義点に比べると重要ではなくなり、ピークキャパシティのプロダクティビティはほぼ一定になります。この点については、図 3 にまとめています。グラジエント時間が 50 分から 100 分へ 2 倍に

部品番号	説明
G4220A	Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (一体型バキュームデガッサ搭載)
G4226A	Agilent 1290 Infinity オートサンブラ
G1316C	Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント
G4212A	Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器

メソッドパラメータ			
カラム	C18 150 mm × 2.1 mm 1.7 μm C18 100 mm × 2.1 mm 1.7 μm		
移動相	A = 0.10 % の TFA を混合した水/アセトニトリル 98/2 v/v 溶液 B = 0.08 % の TFA を混合したアセトニトリル溶液		
流量	0.4 mL/min または 0.2 mL/min		
グラジエント	0 ~ 50 % B 65 % B 0 % B	可変時間 10 分間 5 分間	(グラジエント溶出) (カラム洗浄) (カラム調整)
温度	60 °C		
注入	10 μL		
検出	DAD、シグナル 214/4 nm、リファレンス 400/60 nm、40 Hz		

なると、ピークキャパシティはおよそ 25 % 増加します (567 から 711)。しかし、グラジエント時間が 200 分まで増加すると、ピークキャパシティの増加は約 15 % に留まります (711 から 820)。後者の場合、分析時間が 3 時間を超えるので、繰り返し操作が現実的でなくなります。図 3 から、ピークキャパシティとピークキャパシティの妥協点として、100 ~ 150 分のグラジエント時間が得られます。

流量およびグラジエントスロープが、それぞれ 0.2 mL/min および 0.5 % B/min に減少すると、0.4 mL/min および 1 % B/min で実施した分析に比べ、ピークキャパシティが 567 から 645 に増加します。ただし、ピークキャパシティ生成率は、11.3 から 6.4 に減少します。一方、サンプルがより複雑になると、特に質量分析計などの高度な定性検出器を使用する場合、分離能が適度に増加したほうが、同種のサンプル間の軽微な違いを検出するために有効です。

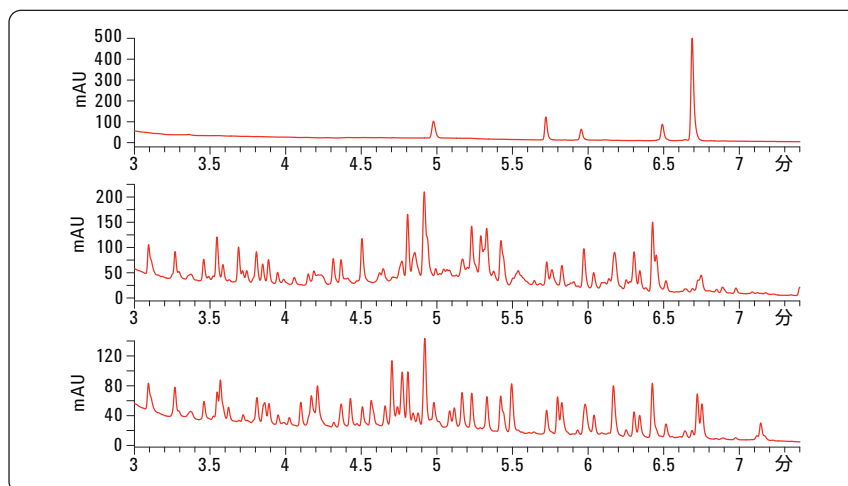


図 1
ペプチド標準混合物 (上)、BSA 消化 (中)、および BSA RA 消化 (下) の高速分析。流量: 0.4 mL/min、グラジエント: 6.25 分で 0 ~ 50 % B。

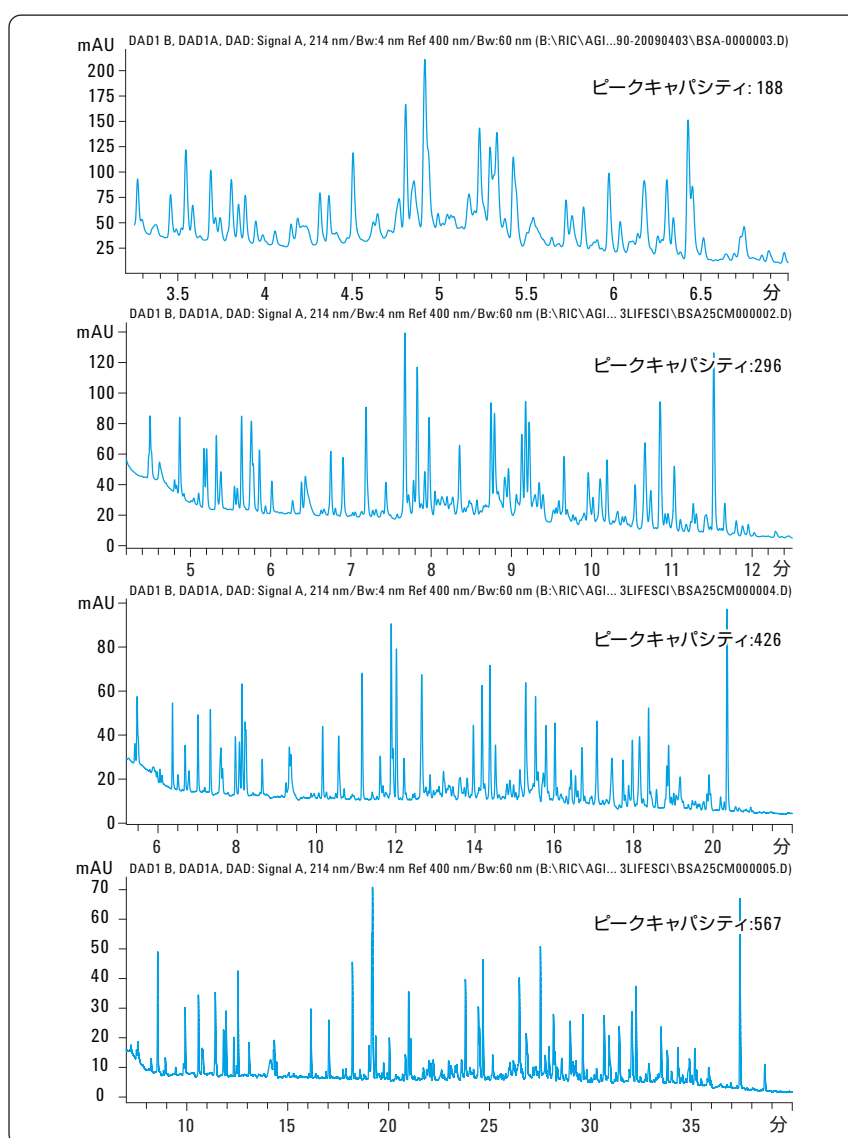
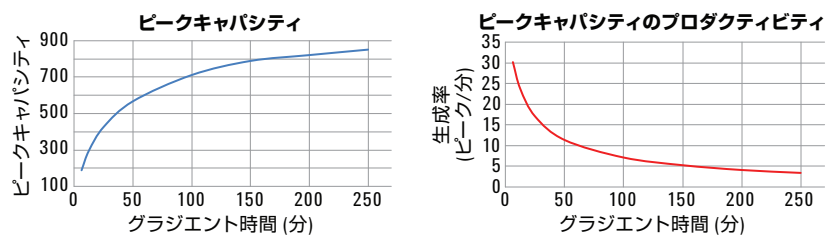


図 2
異なるグラジエントを使用した BSA 消化の分析。流量: 0.4 mL/min、グラジエント: 6.25 min (8 %/min)、12.5 min (4 %/min)、25 min (2 %/min)、および 50 min (1 %/min) で、0 ~ 50 % B。

結論

本アプリケーションノートでは、極めて複雑なペプチド混合物質の分離において、Agilent 1290 Infinity LC システムの優れた能力を実証しました。1.7 μm の粒子を充填した 250 mm のカラムを使用し、最大 900 bar の圧力でタンパク質の消化を分析しました。高プロダクティビティ (10 分未満で 188 のピークキャパシティ) または高分離能 (3 時間で 800 を超えるピークキャパシティ) が得られることが分かりました。



グラジエント時間 (分)	グラジエントスロープ (% B/分)	ピークキャパシティ	ピークキャパシティの プロダクティビティ(ピーク/分)
6.25	8	188	30.1
12.5	4	296	23.7
25	2	426	17.0
50	1	567	11.3
100	0.5	711	7.1
150	0.375	788	5.3
200	0.25	820	4.1
250	0.2	851	3.4

図 3
グラジエント時間の関数として表したピークキャパシティおよびピークキャパシティ生成率。

www.agilent.com/chem/1290:jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan, May 1, 2009
Publication Number 5990-4031JAJP



Agilent Technologies