

26P1-pm2-044

スピнкаラムを用いた高疎水性ペプチドの前処理とLC分離のための条件の最適化

ジーエルサイエンス株式会社 ○太田 茂徳、国技巧、由井夕湖、佐藤勉



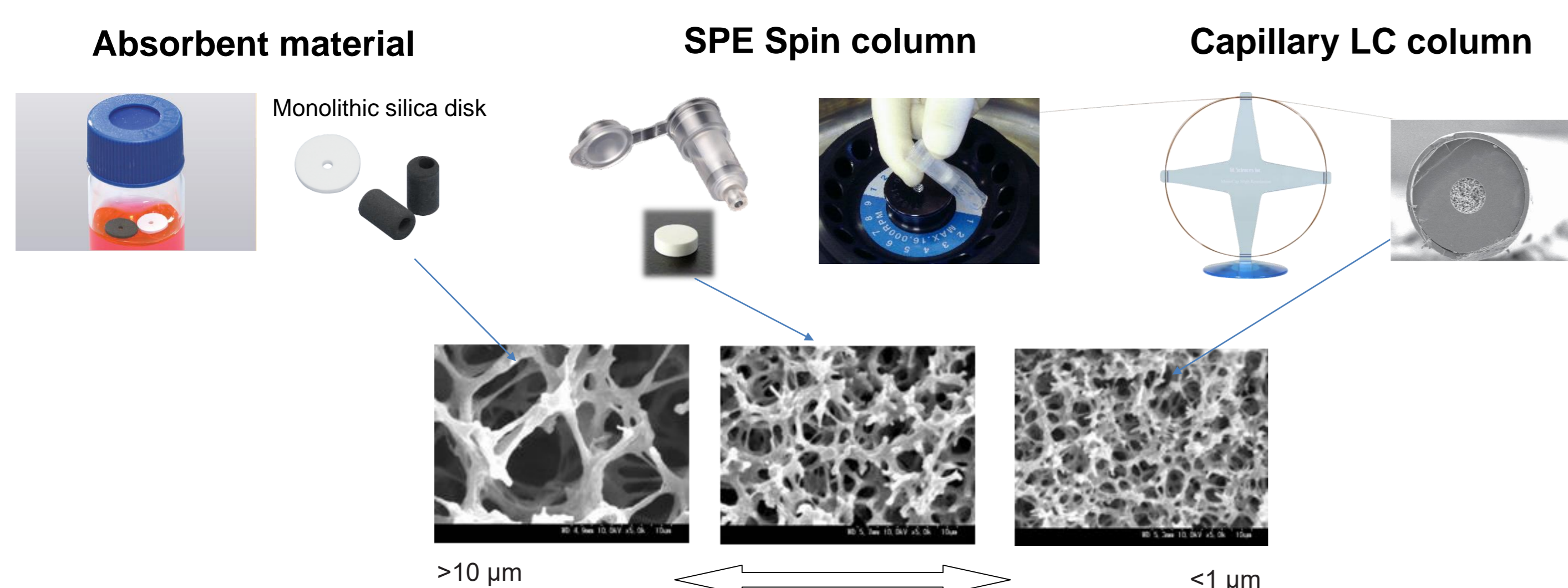
はじめに

ペプチドやタンパク質などの高分子量体をクロマトグラフィを用いて分析する際、高分離、高分解能、質量分析計にも組み合わせやすいという利点から、ODSなどの逆相クロマトグラフィ用カラムが最も用いられている。一方で、対象成分の疎水性の高さが影響し、ピーク形状の劣化や、回収率不良などの問題を生じる場合がある。

相分離を伴うゾルーゲル法によって調整される一体型素材であるシリカモノリスは、用途に応じて骨格や細孔の構造を独立して制御することが可能であり、様々な分離用途に用いられてきた。特に、細孔構造については、高い耐圧性を保ちつつ、大きな孔径を形成することができることから、ペプチドやタンパク質の分離、分析に適していると考えられている。

本研究では、高疎水性ペプチドであるシクロスポリンAを用いて、各種逆相カラムおよび各種修飾基を導入して調整したシリカモノリスカラムを用いて分離条件の検討を行った。前処理にはシリカモノリススピнкаラムを使用し、生体試料中からの回収方法を検討した。

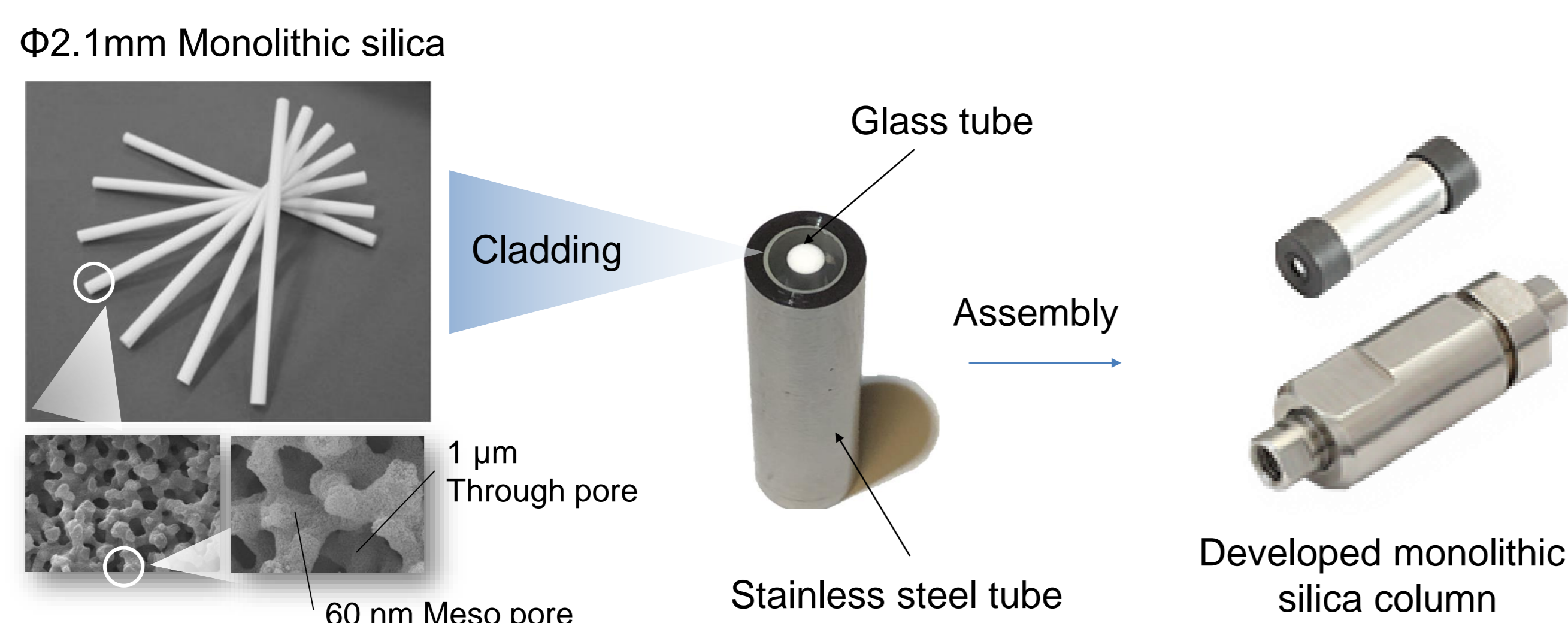
シリカモノリスカラムの応用範囲



方法

ガラス封入型シリカモノリスカラムの調整

φ2.1mm シリカモノリスゲルをガラスチューブへ固定化後、C4もしくはフェニル(Ph)基を有するシランカップリング剤、エンドキャップ試薬により表面の修飾を行った。得られたガラスクラッドカラムをステンレスチューブ内に封入し、LC用モノリスカラム(φ2.1 x 20mm)を調整した。



シリカモノリスガラスクラッドカラムの構造

MonoSpin C18, MonoSpin Phによる血清サンプルの前処理

サンプル調製

0.1%ギ酸 50%アセトニトリルで希釈し、400ppb STDを調製
血清試料：0.1%ギ酸水：STD=200 μL：190 μL:10 μL (Total 400μL) 濃度10ppb
10,000xg 1分遠心後の上清を試料として用いた。

スピнкаラムによる前処理

工程	溶液	液量
コンディショニング	アセトニトリル	200 μL
	0.1% ギ酸水溶液	200 μL
アプライ	上記調製試料	400 μL
洗浄	0.1% ギ酸水溶液	200 μL
溶出	0.1% ギ酸-80% アセトニトリル	200 μL
遠心力	3,000xg, 遠心時間	1 min

スピнкаラムによる遠心操作



LC-MS/MS条件

Column :
InertSustain AQ-C18 (1.9 μm 100 x 2.1 mm I.D.)
InertSustainSwift C8 (3 μm 100 x 3.0 mm I.D.)
InertSustain Phenyl (3 μm 50 x 2.1 mm I.D.)
MonoSelect RP-mAb (1 μm 20 x 2.1 mm I.D.)

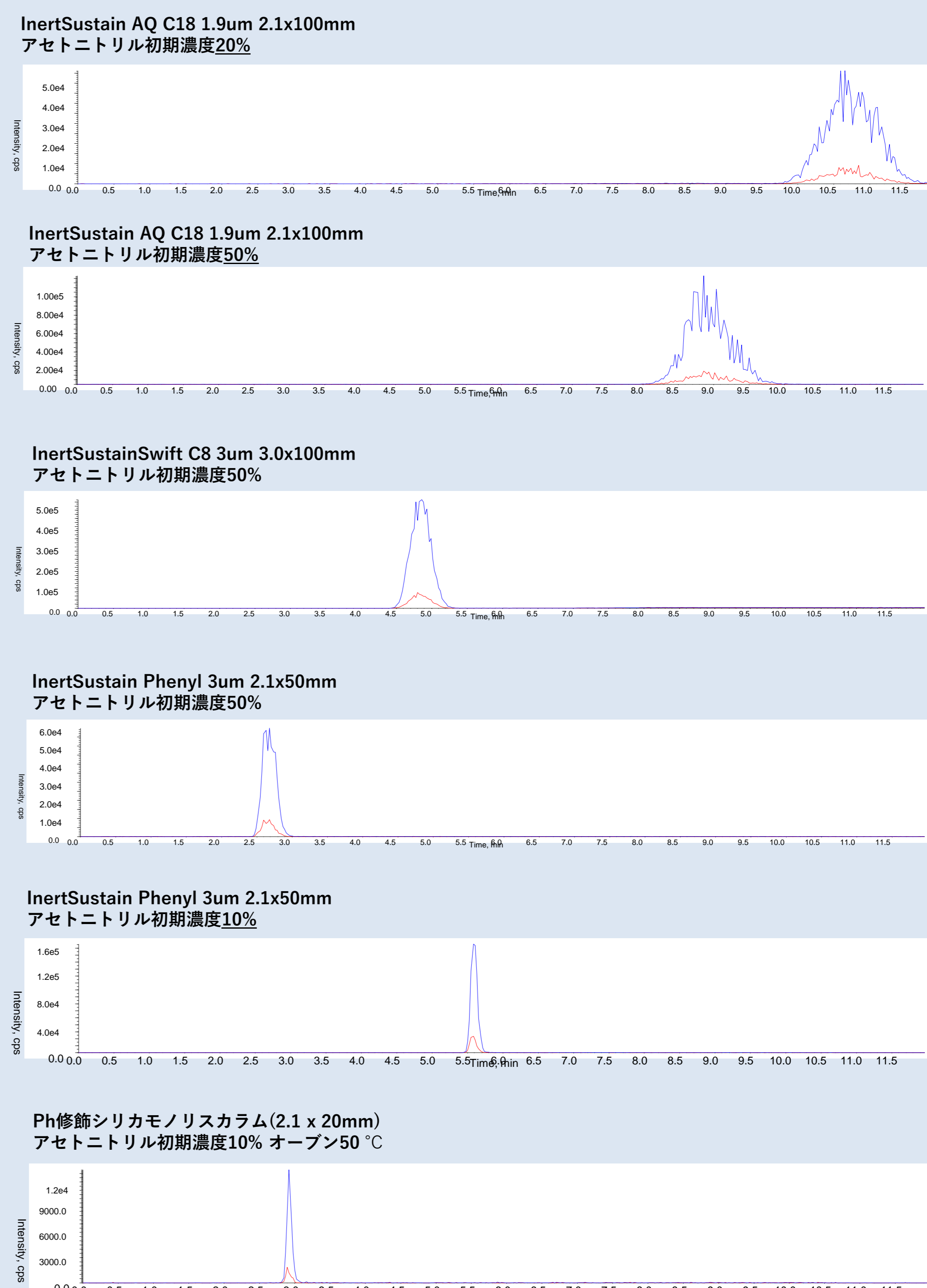
Flow Rate : 0.4 mL/min
Col. Temp. : 50 °C
Detection : MS/MS(SCIEX)
(QTRAP 6500+ : ESI, Positive, MRM)
Injection Vol. : 5 μL
Sample : Cyclosporin A
Q1/Q3 = 1220/1203
Q1/Q3 = 1220/1185

Eluent : A) CH₃CN
B) 0.1% HCOOH in H₂O

Time (min)	A (vol%)	B (vol%)
0.0	10	90
7.0	90	10
10.0	90	10
10.1	10	90
13.0	10	90

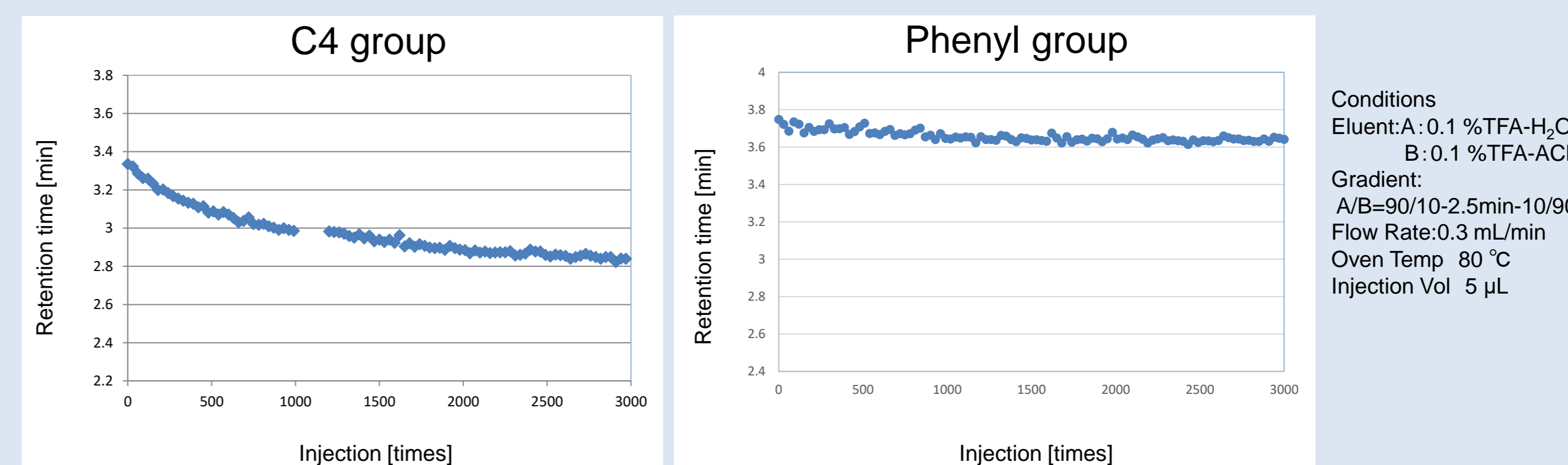
結果

シクロスポリンAの分離条件の最適化



対象成分として用いたシクロスポリンAは、疎水性が高いためInertSustain AQ-C18のようなODSカラムでは保持が大きく、ピークがブロードになる傾向にあった。初期移動相の有機溶媒濃度や測定温度、疎水性保持の弱いC8, Phを選択することで、ピーク形状に改善が見られた。中でもシリカモノリスカラムは最もシャープなピーク形状を与えた。

カラムの耐久性



ペプチドやタンパク質の分析では、測定温度が高いほどピーク形状はシャープになる。その際、カラムの熱耐久性が重要になる。シリカモノリスカラムへC4もしくはPh基を修飾し、高温(80°C)にて連続測定を実施した結果、C4に比べてPh修飾カラムは、保持時間の減少も見られず、高い安定性を示した。

血清サンプルからの回収

MonoSpin C18およびPhを用い血清中のシクロスポリンの回収を検討した。いずれのカラムにおいても良好な回収率が得られ、処理時間も10分以内に処理を完了することができた。

添加回収試験結果

Concentration	Column	Rec (%)	RSD(%)
		0.5 ng/mL	C18: 94.8
5 ng/mL	Ph	103.8	10.0
	C18	98.6	12.1
5 ng/mL	Ph	115.6	14.8

(試料中 0.5, 5 ng/mL, n=3)

まとめ

- ・シクロスポリンAの分離において、ODSやC8カラムと比較し、疎水性の低いPh基を修飾したカラムを用いることで、良好な分離が得られた。
 - ・Ph基を修飾したシリカモノリスカラムは80°Cの高温条件においても優れた耐久性を示した。
 - ・MonoSpin C18, Phを用いることで生体試料中から短時間でシクロスポリンを回収することができた。
- タンパク質、ペプチドなど、疎水性の高い対象成分の分析に対してシリカモノリス担体の有用性が示された。

COI開示

発表内容に関連し、過去3年間、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

筆頭責任者： 太田茂徳、責任発表者 佐藤勉