

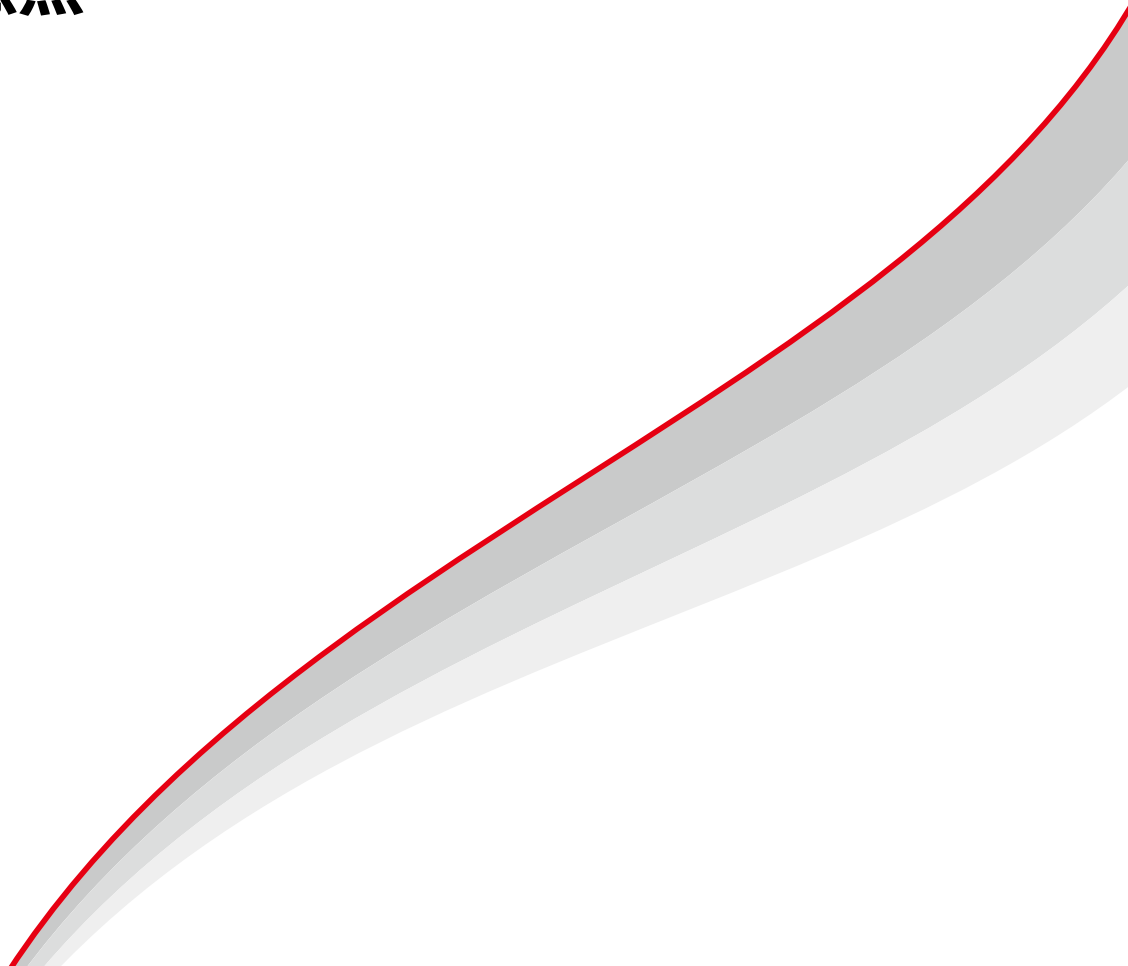
ペプチドのLC/MS分析の課題と対策

LC/MSの基礎とペプチド分析における留意点

2024年2月7日

株式会社島津製作所 分析計測事業部

中園 純菜



内容

LC/MSの基礎

LC/MS分析における留意点

カラム・バイアル製品のご紹介

LC/MSの基礎

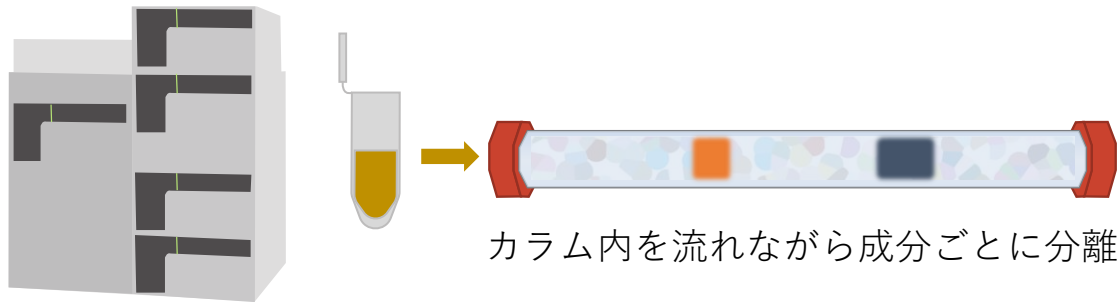
LC/MS分析における留意点

カラム・バイアル製品のご紹介

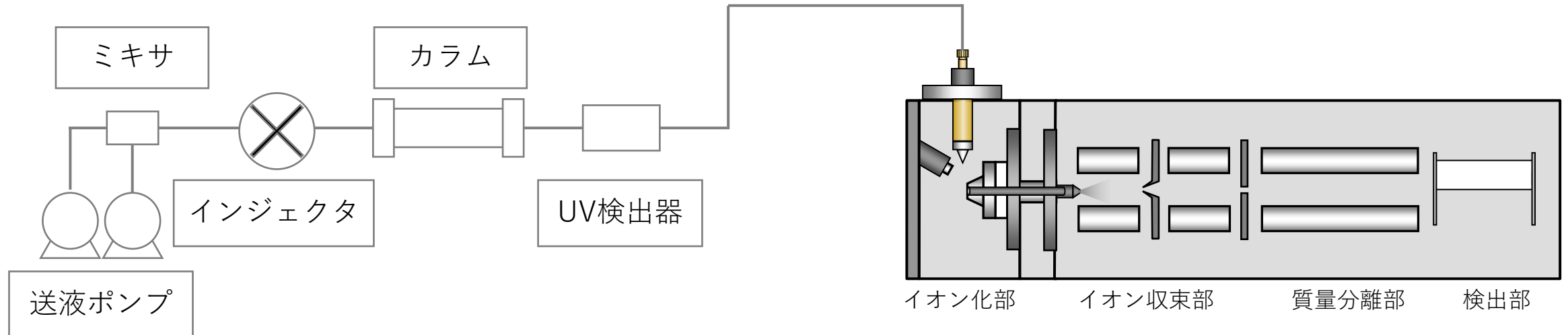
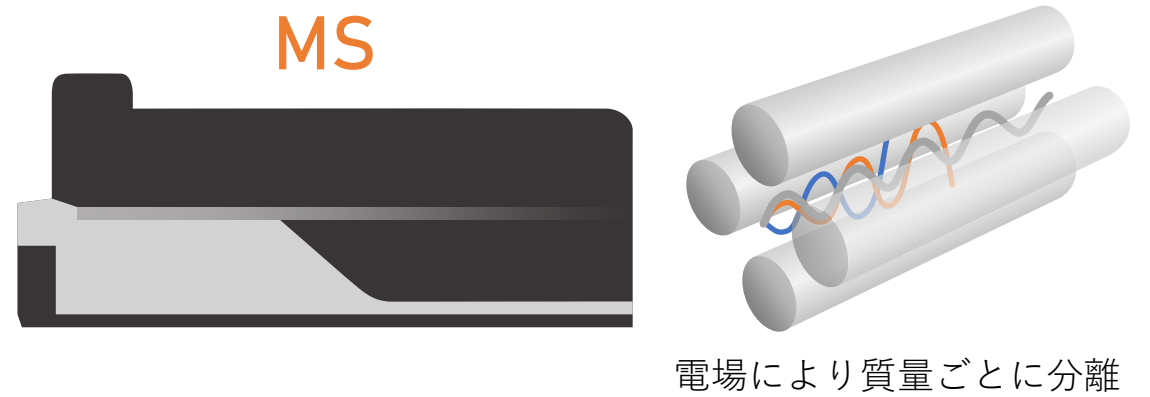
LC-MSの装置構成

HPLCシステムの後ろにMSを接続し、カラムから溶出した液を分析する

Chromatography



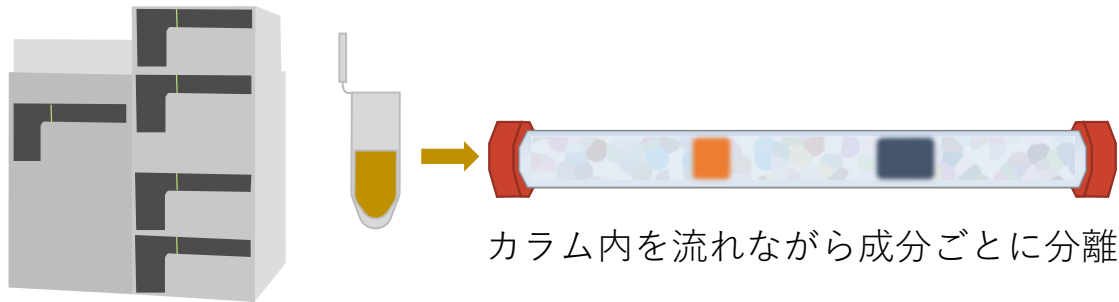
MS



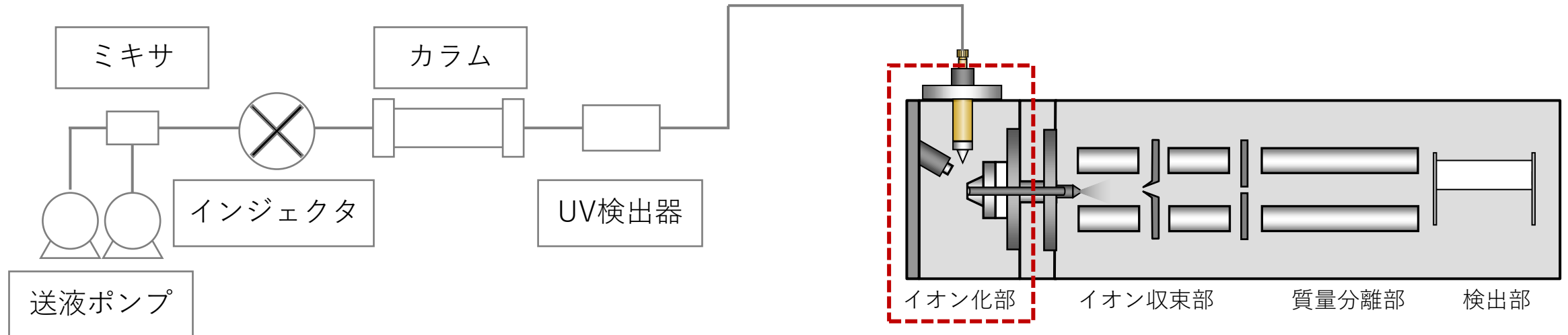
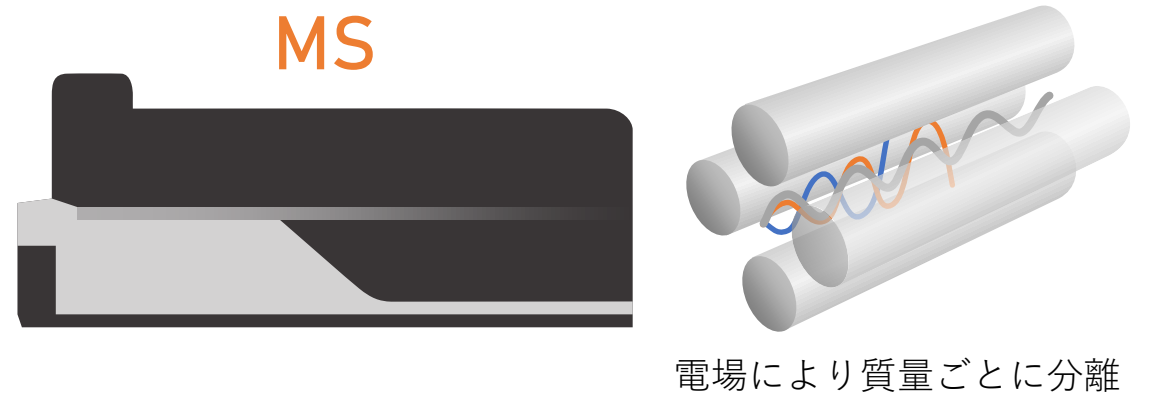
LC-MSの装置構成

HPLCシステムの後ろにMSを接続し、カラムから溶出した液を分析する

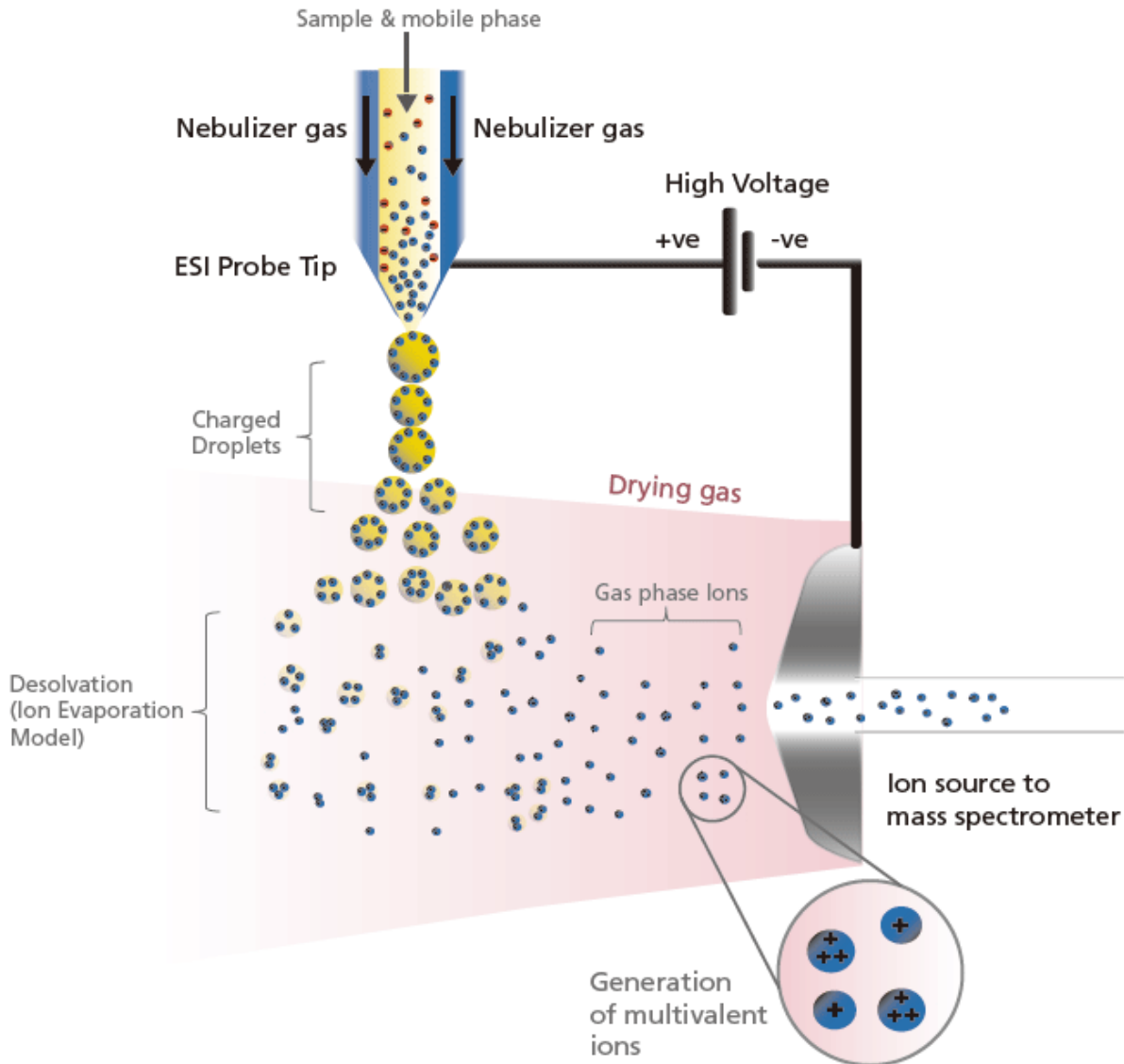
Chromatography



MS



ESI (Electrospray Ionization)



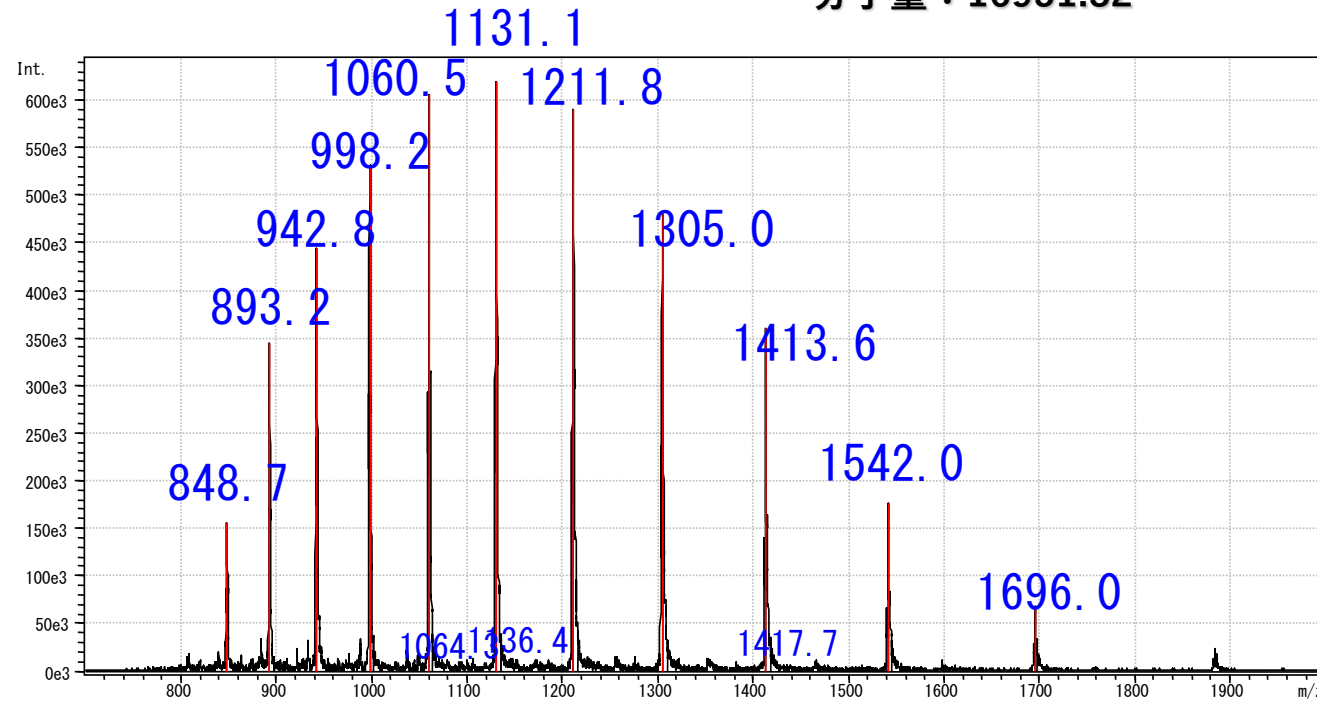
イオン化の流れ

1. キャピラリーに高電圧を印加することで、液体試料が先端から帯電液滴として噴霧される
2. 液滴微細化と脱溶媒のためネブライズガスと加熱ガスを供給
3. 大気中で脱溶媒が進み、粒径が小さくなり、クーロン力で分子イオンが液滴から放出される

- ESIは中極性～高極性の化合物のイオン化に適する
 - ESIでは多価イオンが生成する
- 分子量が大きい物質でも m/z が小さくなるので測定可能に

ミオグロビン

分子量：16951.32

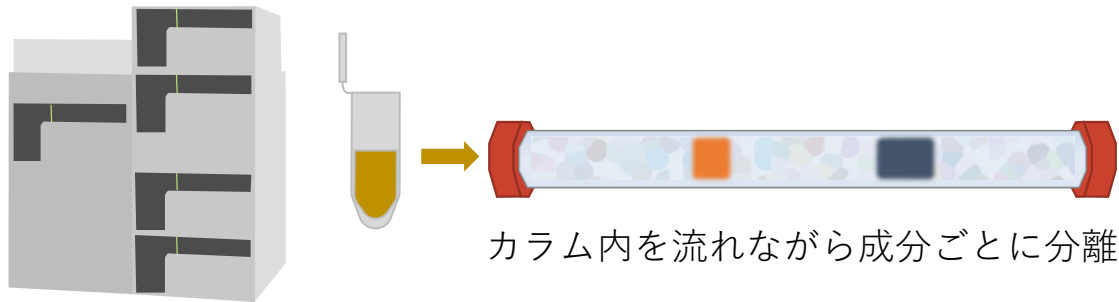


- ✓ タンパク質に含まれる塩基性アミノ酸の数に応じて多価イオンが生成
- ✓ 隣り合うイオンの m/z および電荷数情報からデコンボリューション解析（元の化合物の分子量が推定）が可能

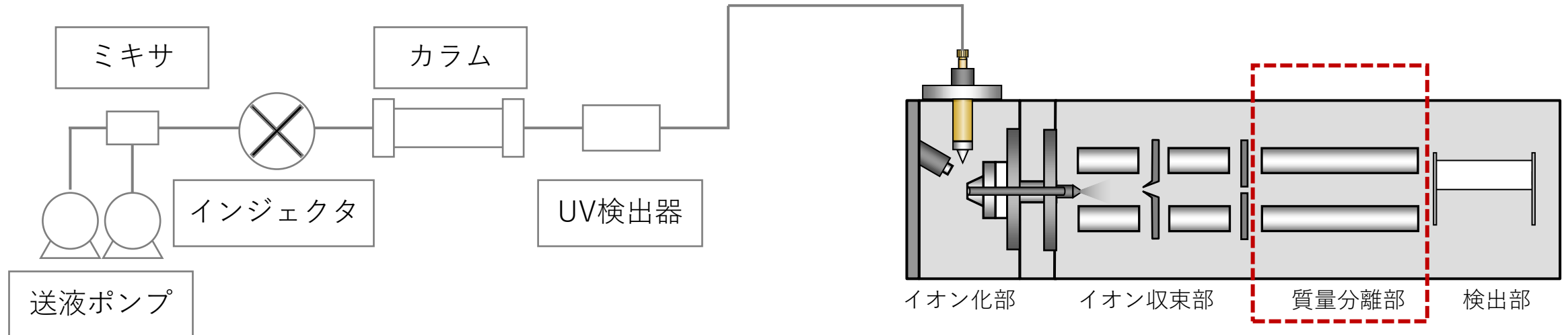
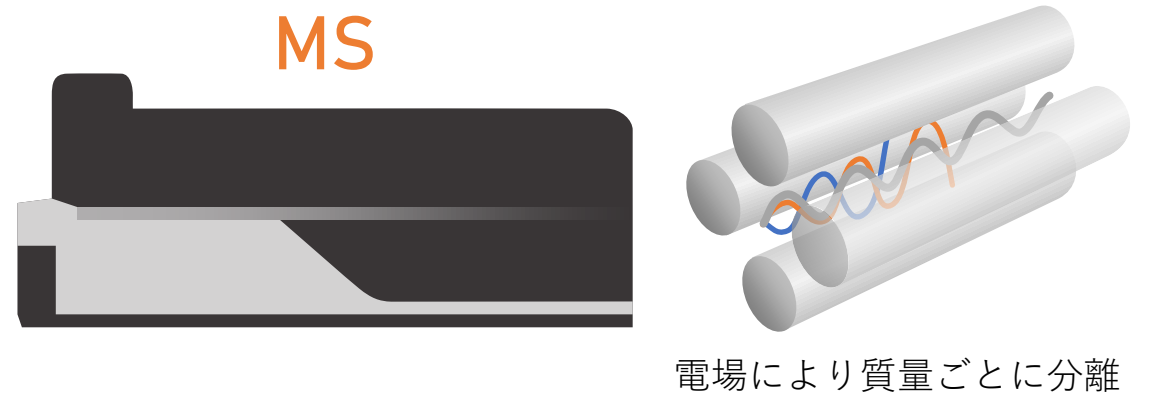
LC-MSの装置構成

HPLCシステムの後ろにMSを接続し、カラムから溶出した液を分析する

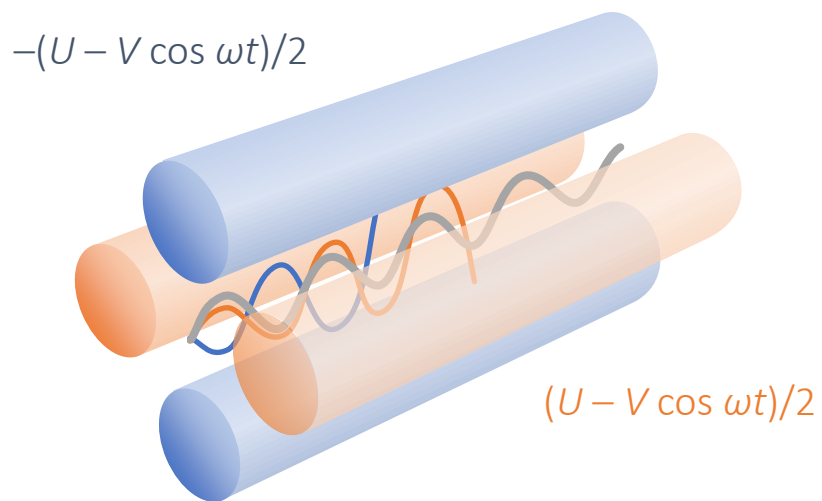
Chromatography



MS



四重極質量分析計 (Quadrupole mass spectrometer: QMS)

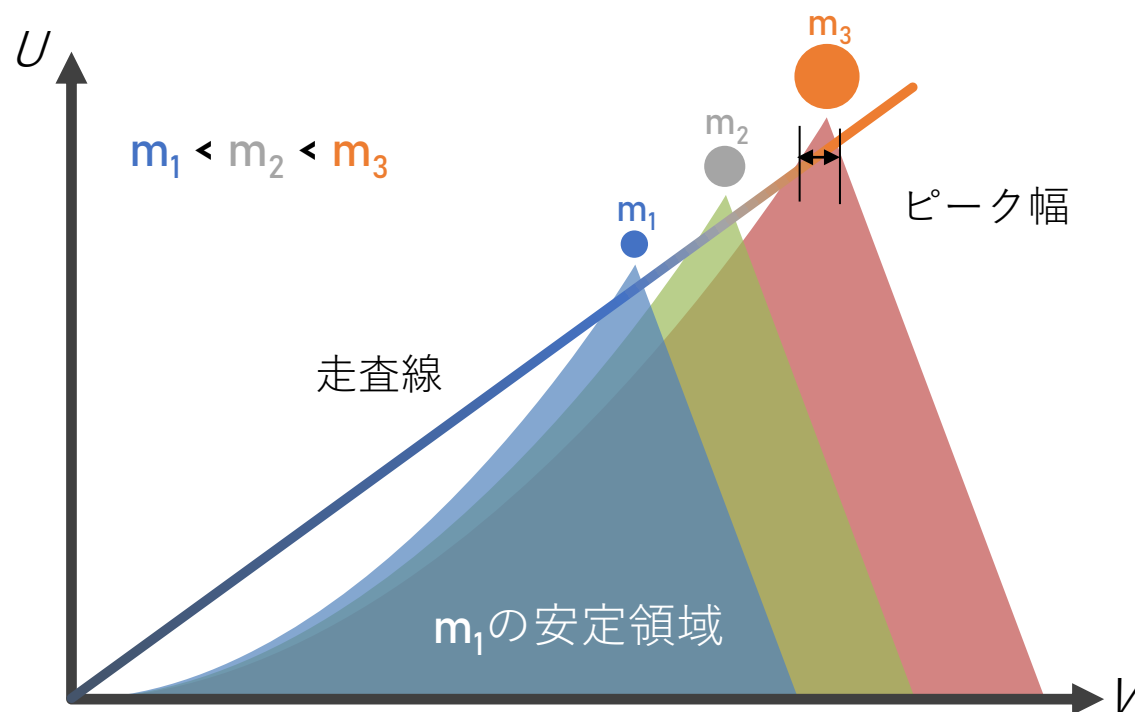


特徴

- 定量に適している
- 設置場所をとらない (Bench-Top)
- 測定スピードが速い
- △ 精密質量測定ができない (整数質量で分離)
- △ 質量範囲が限られる (m/z 2000くらいまで)

原理

- 質量ごとに、四重極内を安定に通過できる直流電圧 V と交流電圧 U の値の範囲が存在する
- 電圧値 V 、 U を変化させて、検出器まで安定して到達できるイオンを選択する

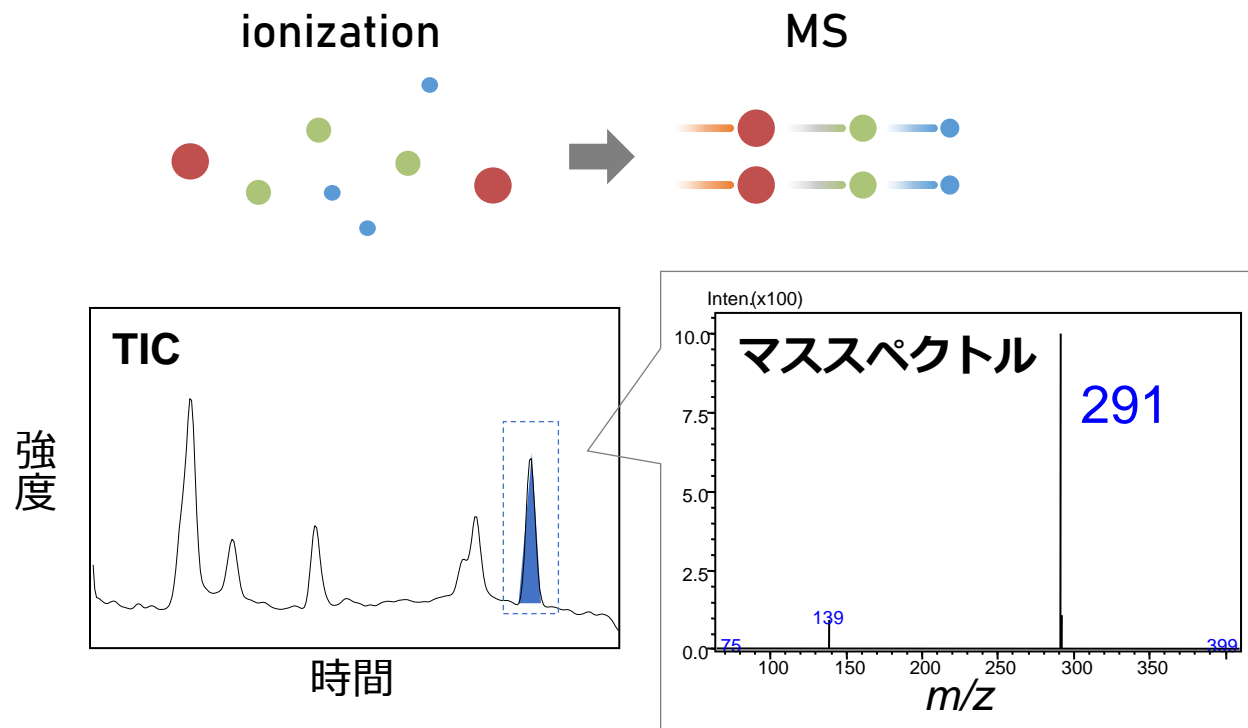


Scan と SIM (Selected Ion Monitoring)

Scan

一定範囲の m/z のイオンを逐次検出する方法

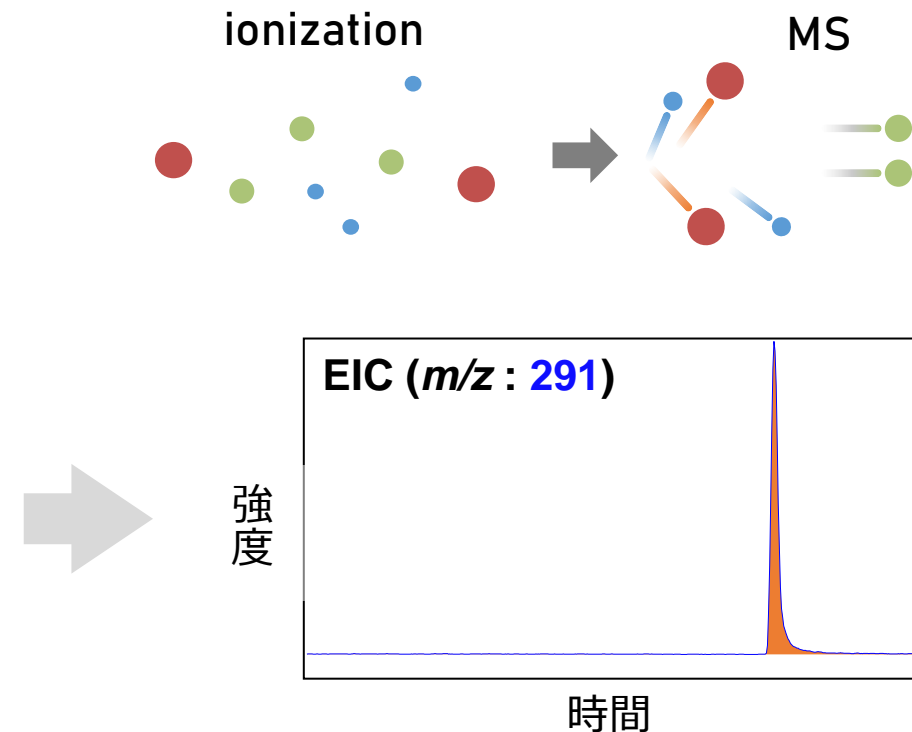
➤ **定性**：測定対象の m/z が不明な場合に用いる



SIM

特定の m/z のイオンのみを検出する方法

➤ **定量**：測定対象の m/z が既知の場合に用いる

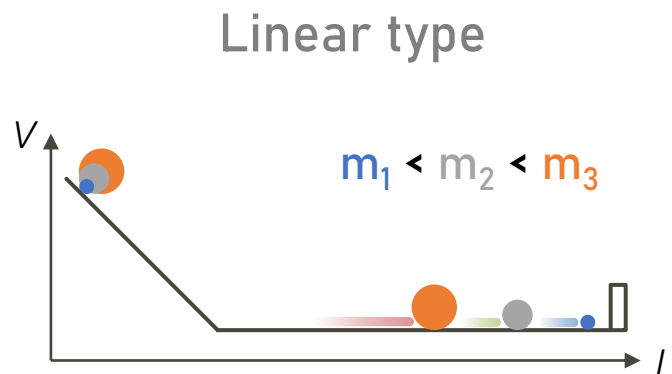


飛行時間型質量分析計 (Time-of-flight mass spectrometer : TOF-MS)

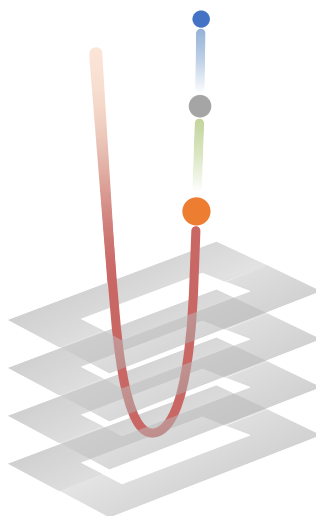
原理

- イオンに一定の電圧(V)をかけ、一定の距離(L)飛行させた時、飛行時間(t)が質量により異なることを利用する
- m/z の小さいものほど検出器に早く到達する
- まっすぐ飛行させるリニアTOFと、反射させて折り返すリフレクトロンTOFがある。距離を稼ぐことでより飛行時間の差が顕著に表れるため、分解能が高くなる

$$\begin{aligned} & \bullet \frac{1}{2}mv^2 = zeV \\ & \bullet v = L/t \end{aligned} \quad \rightarrow \quad t = L \sqrt{\frac{1}{2eV} \frac{m}{z}}$$



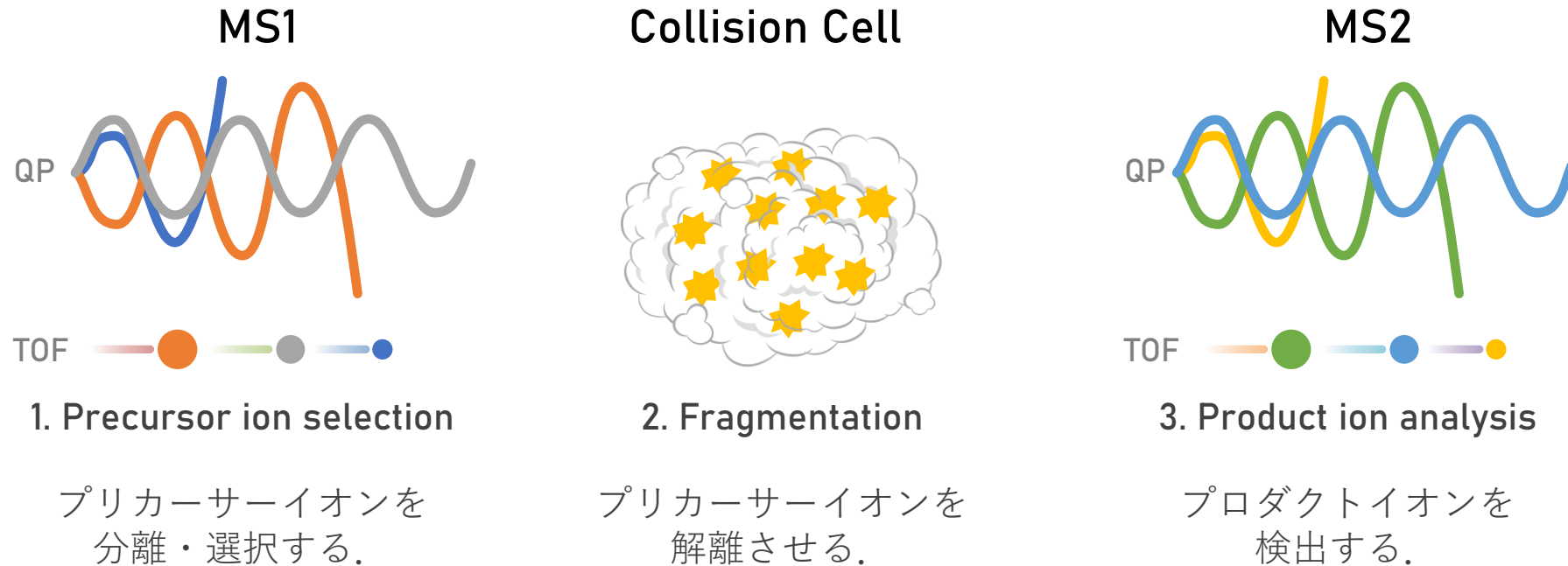
Reflectron type



特徴

- 精密質量測定が可能 (定性に適している)
- 質量範囲が広い ($m/z \sim 40000$)
- △ 設置スペースが比較的大きい

タンデム質量分析計 (tandem mass spectrometry)



MS/MSの目的

- 感度向上：2段階の分離を行うため、ノイズが低減しS/Nが大幅に向上する
- 構造解析：フラグメントパターンにより分子構造を推定する (ex. ペプチドのアミノ酸配列推定)

各種MSの特徴

種類	取り扱い	精密質量	定性	感度	定量
 <p>シングル四重極 (SQ)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・シンプルなユーザーインターフェイス ・UV検出器よりも高感度、高選択な定量 	◎	×	△	○	○ (SIM)
 <p>トリプル四重極 (TQ)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MRMで高選択かつ高感度な定量 ・多量成分の一斉分析に必要な高速性能 	○	×	△	◎	◎ (MRM)
 <p>四重極-飛行時間型 (Q-TOF)</p> <p>高い分解能と精密質量性を活かした未知化合物の同定や構造解析</p>	△	◎	◎	○	○ (SIM)

シングル四重極 (SQ) 型MSによるペプチド分析

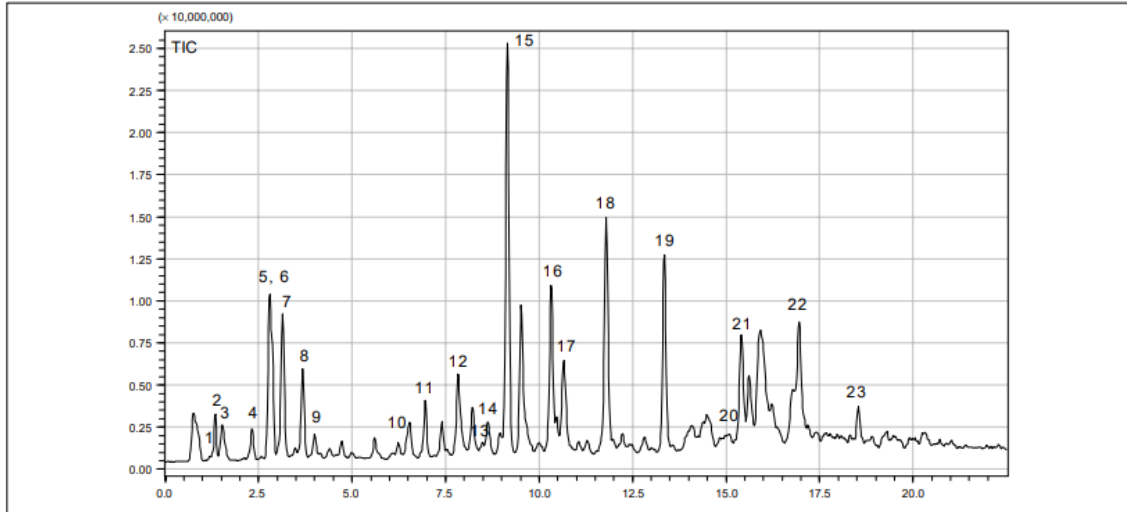


Fig.3 ミオグロビントリプシン消化物の全イオンクロマトグラム
Total ion chromatogram of tryptic digests of myoglobin horse heart.

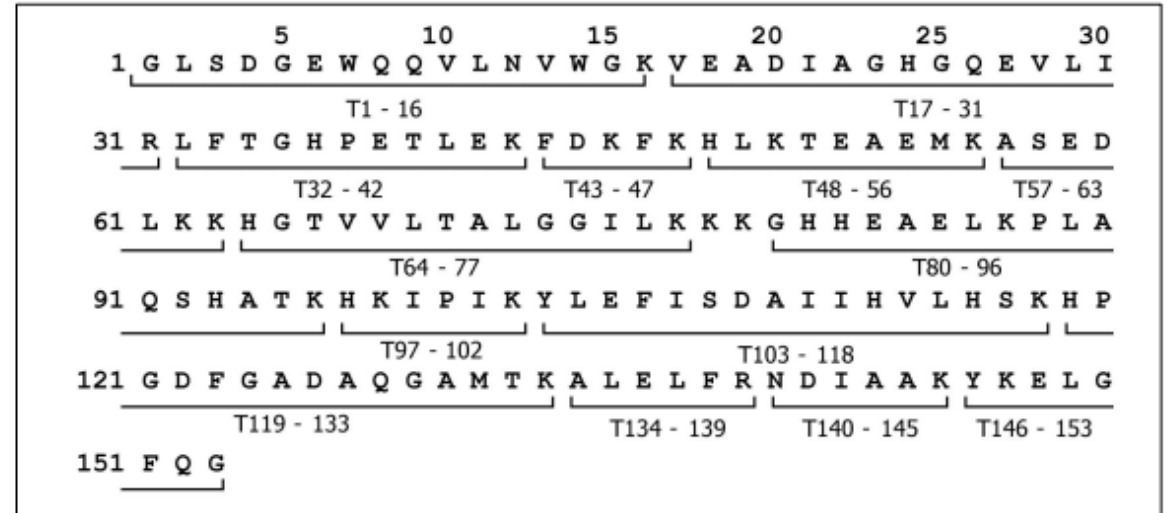


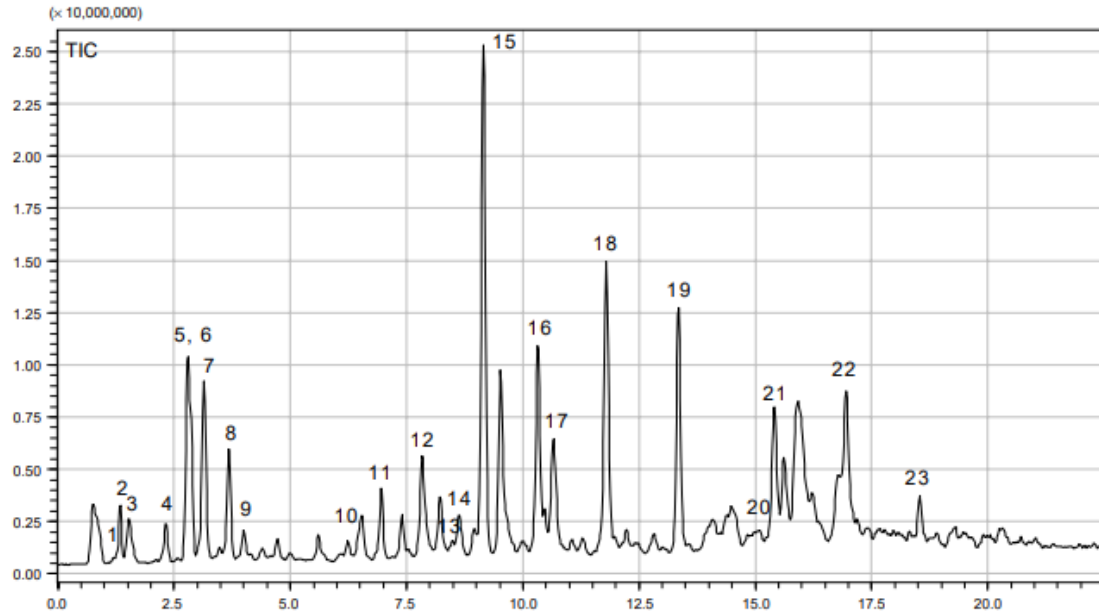
Fig.5 ウマ心筋ミオグロビンのアミノ酸配列
Amino acid sequence of myoglobin horse heart

サンプル： ミオグロビン消化物
 カラム： C18カラム (1.0 mmI.D. x 75mmL.)
 移動相A： 0.1%ギ酸-水
 移動相B： 0.1%ギ酸, 70%アセトニトリル-水
 グラジエント： B conc. 5%(0 min)→80%(30 min)

✓ 既知タンパク質のアミノ酸配列からトリプシン消化ペプチド断片を予測可能



シングル四重極 (SQ) 型MSによるペプチド分析



サンプル： ミオグロビン消化物
 移動相A： 0.1%ギ酸-水
 移動相B： 0.1%ギ酸, 70%アセトニトリル-水
 グラジエント： B conc. 5%(0 min)→80%(30 min)

- ✓ 既知タンパク質のアミノ酸配列からトリプシン消化ペプチド断片を予測可能

→MS1で分子量を確認

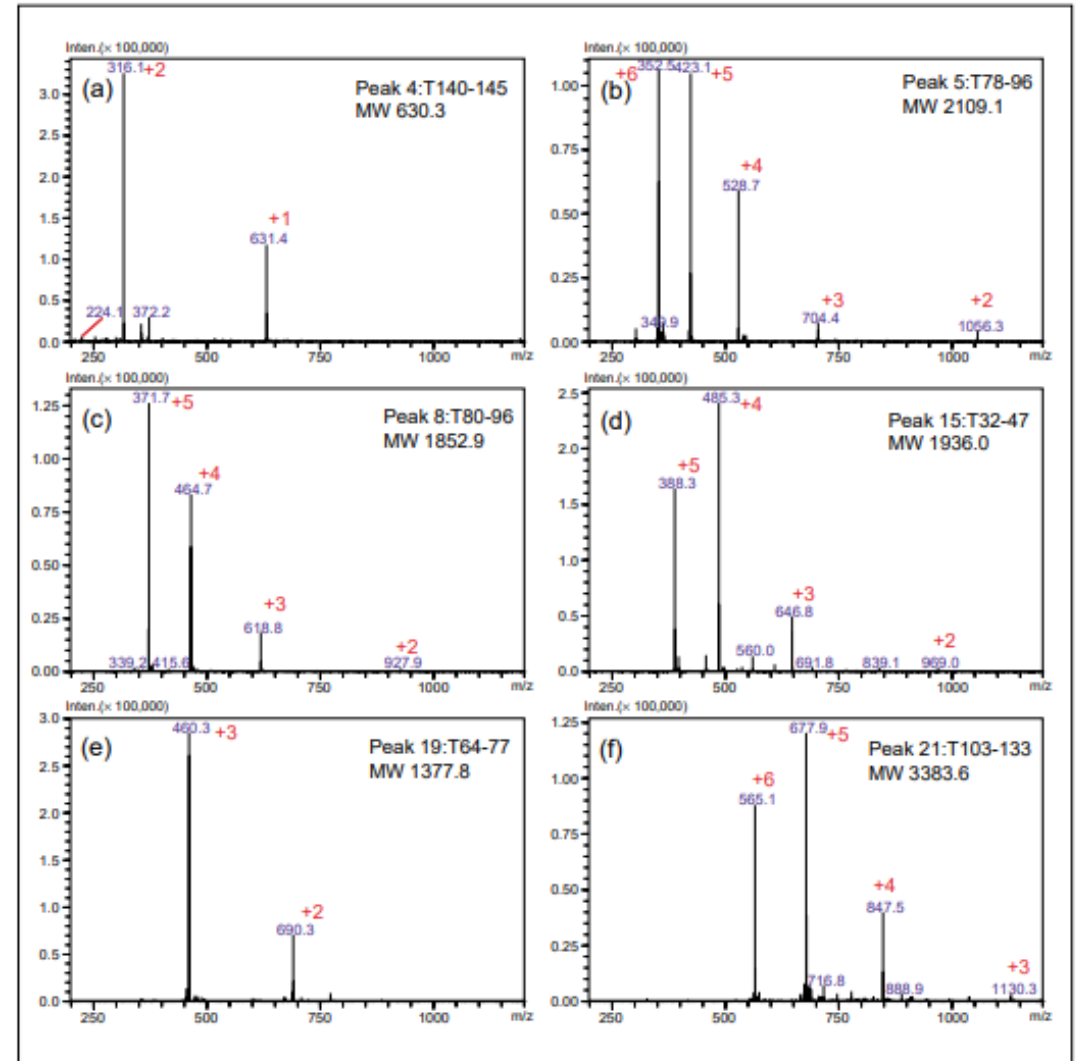


Fig.4 トリプシン消化ペプチド(T140-145, T78-96, T80-96, T32-47, T64-77, T103-133)のマススペクトル

シングル四重極 (SQ) 型MSによるペプチドの合成確認

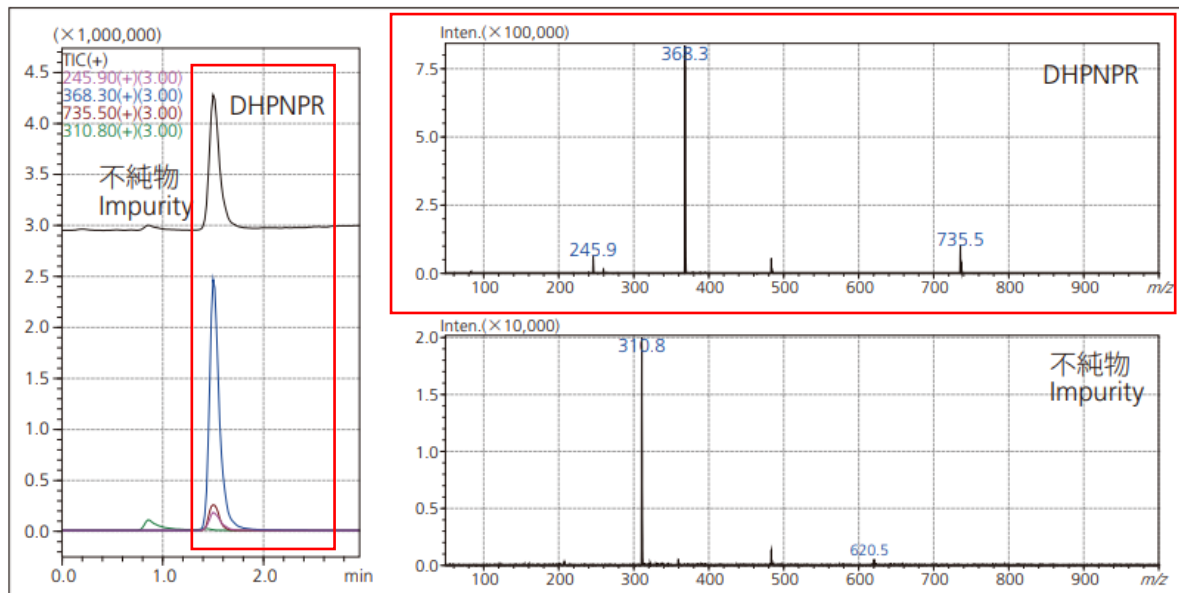


Fig. 1 合成ペプチド DHPNPR および不純物の TIC、EIC (左) およびマススペクトル (右)
Total Ion Current Chromatogram (TIC), Mass Chromatograms (left) and Mass Spectra (right) of Synthetic Peptide DHPNPR and Its Principal Impurity

- サンプルは合成ペプチド (DHPNPR, MW: 734)
- 1~3価のイオンが検出された

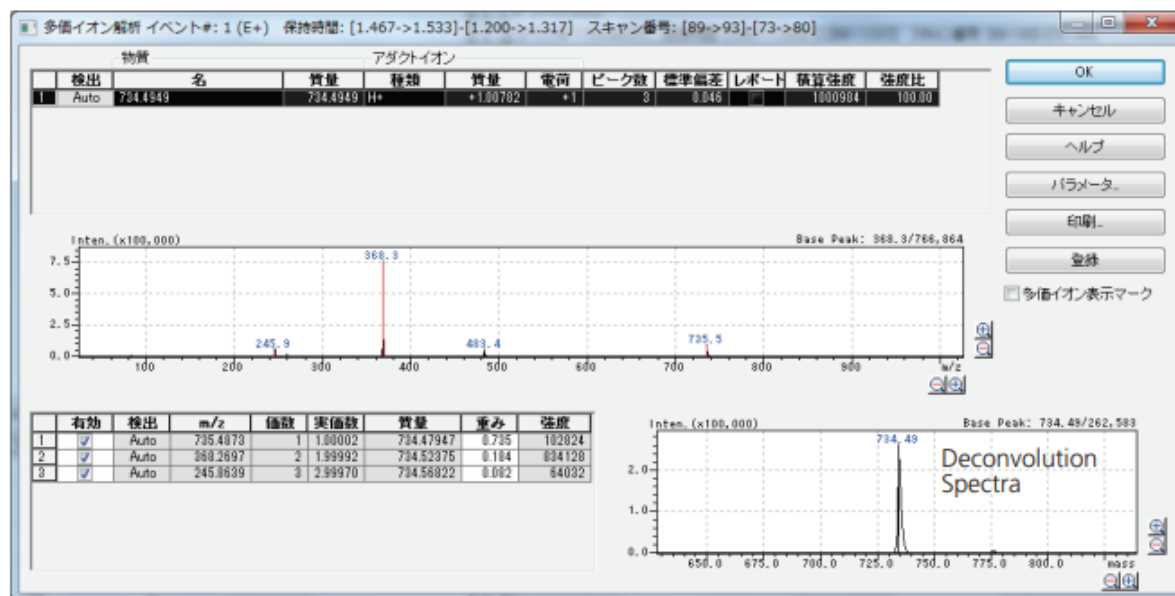


Fig. 2 DHPNPR の多価イオン解析結果
Result of Deconvolution for Peptide DHPNPR

多価イオン解析の結果理論分子量と比較して質量誤差1 Da以内で検出が確認可能

シングル四重極 (SQ) 型MSによるペプチドの合成確認

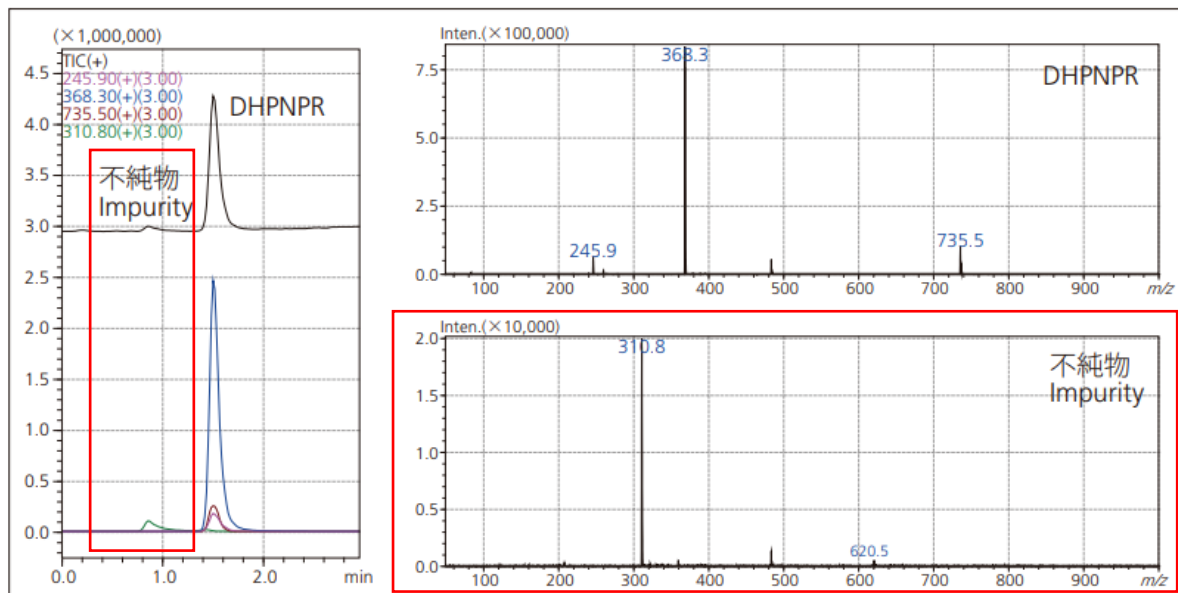


Fig. 1 合成ペプチド DHPNPR および不純物の TICC, EIC (左) およびマススペクトル (右)
Total Ion Current Chromatogram (TICC), Mass Chromatograms (left) and Mass Spectra (right) of Synthetic Peptide DHPNPR and Its Principal Impurity

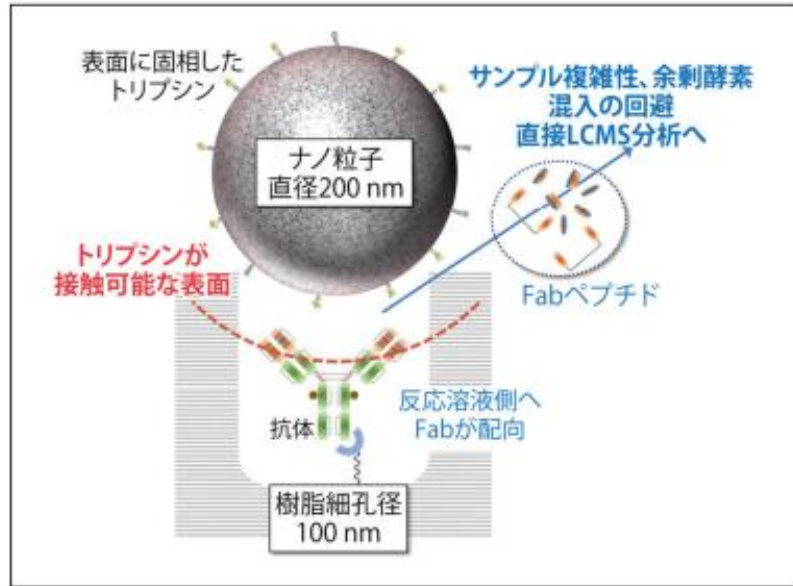
- 主成分より早い保持時間に不純物ピークが観察



Fig. 3 不純物の多価イオン解析結果
Result of Deconvolution with Respect to Major Impurity

不純物ピークの主成分 (DHPNPR, MW: 734) との質量差は115
→N末端のアスパラギン酸が外れたペプチド (HPNPR) と推定

トリプル四重極 (TQ) 型MSによる抗体の定量



nSMOL™
モノクローナル抗体定量用
LC/MS/MS 前処理キット



■ トラスツズマブ定量ペプチド

ペプチド	MRM transition	目的
P14R	512.1>292.3 (b3+)	定量用 (IS)
	512.1>389.3 (b4+)	構造確認用
	512.1>660.4 (b6+)	構造確認用
IYPTNGYTR	542.8>404.7 (y7++)	定量用
	542.8>808.4 (y7+)	構造確認用
	542.8>610.3 (y5+)	構造確認用

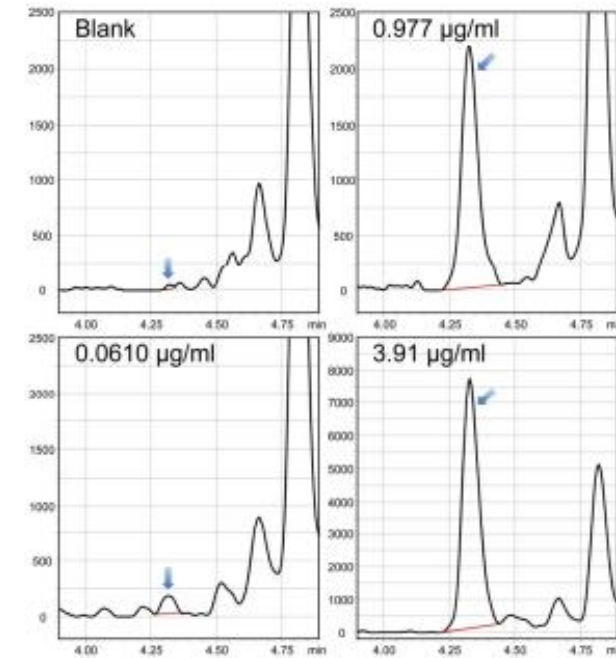


図2 IYPTNGYTR MRM クロマトグラム (ヒト血漿中)

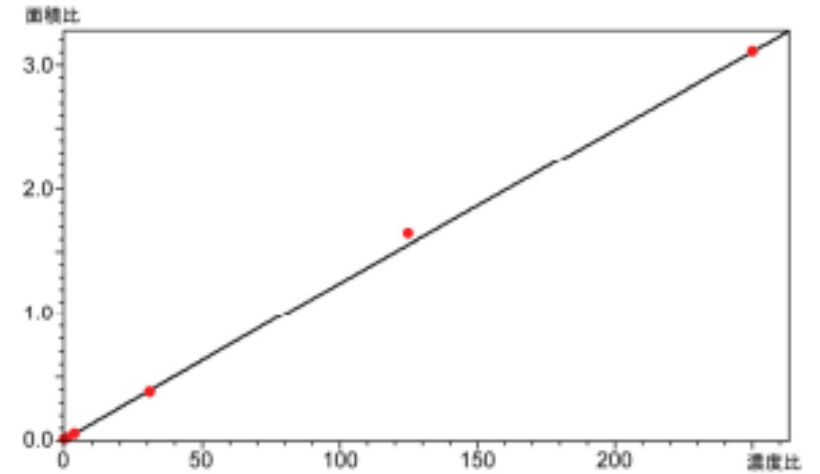


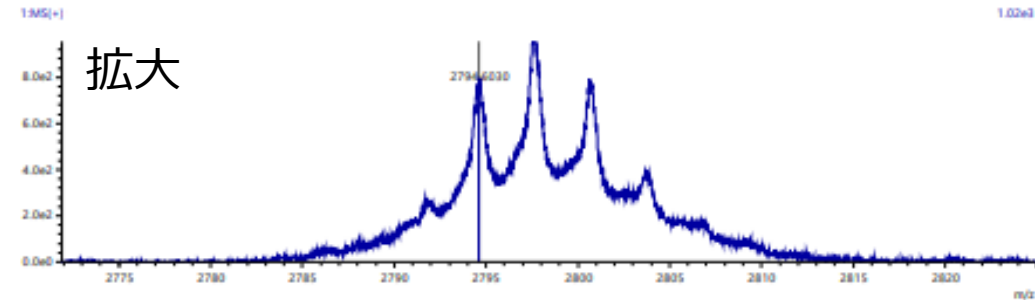
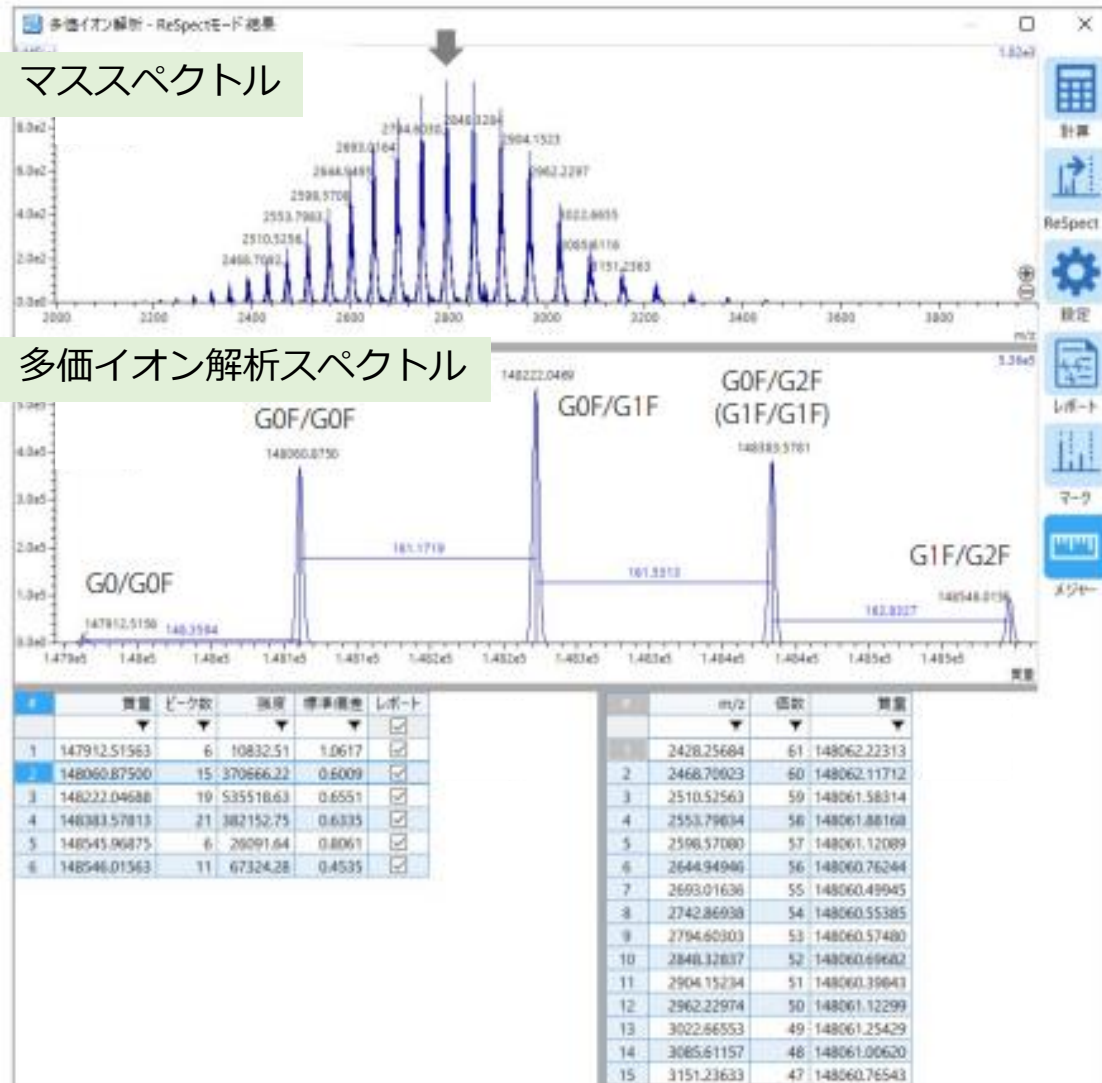
図3 トラスツズマブの検量線

【真度および精度】

設定濃度 [µg/ml]	データ平均 (N=15)	真度 (%)	CV (%)
2.93	2.58	88.1	8.2
200	211	106	5.6

本スライドに記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断医薬品として承認・認証等を受けておりません。記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

四重極-飛行時間 (Q-TOF) 型MSによる抗体のインタクト分析



抗体 (トラスツズマブ) のインタクト分析

- ・平均分子量約150kDa
- ワイドポア (ex. 30 nm) のC4カラムを使用
- ・複雑な同位体ピーク
- 高分解能MSが必要



内容

LC/MSの基礎

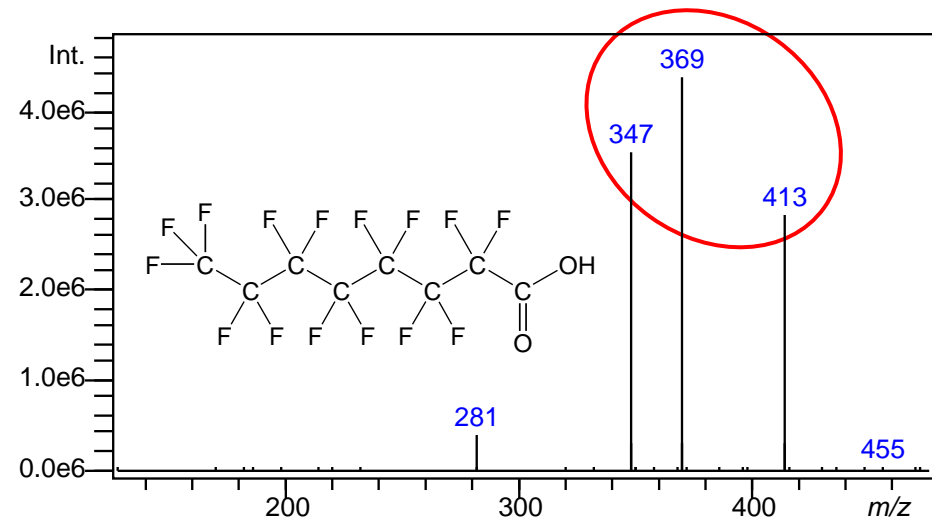
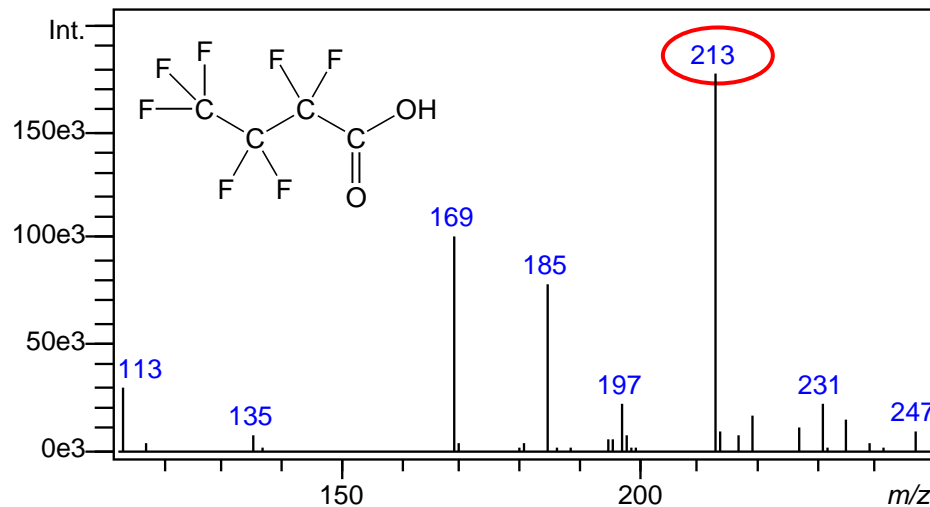
LC/MS分析における留意点

カラム・バイアル製品のご紹介

移動相 -イオンペア試薬の使用は避ける-

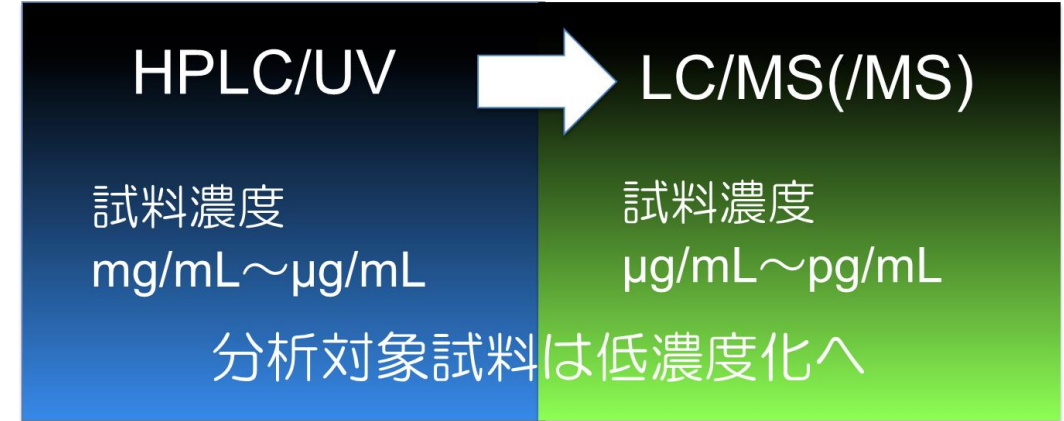
- LC流路、インターフェイスに残存する
 - イオンペア試薬由来のイオンが観察され、他の分析に悪影響を及ぼす
 - 使用后、流路洗浄、インターフェイス部品の洗浄、あるいは交換が必要になる
 - トリフルオロ酢酸（TFA）の場合、ネガティブイオン m/z 113, 227 が残りやすい

パーフルオロカルボン酸



吸着の種類と対策

- LC-MSはLC-UVと比較して分析対象試料がより低濃度化するため、吸着の影響が大きい
- 装置やカラム、器具類の対策することが重要

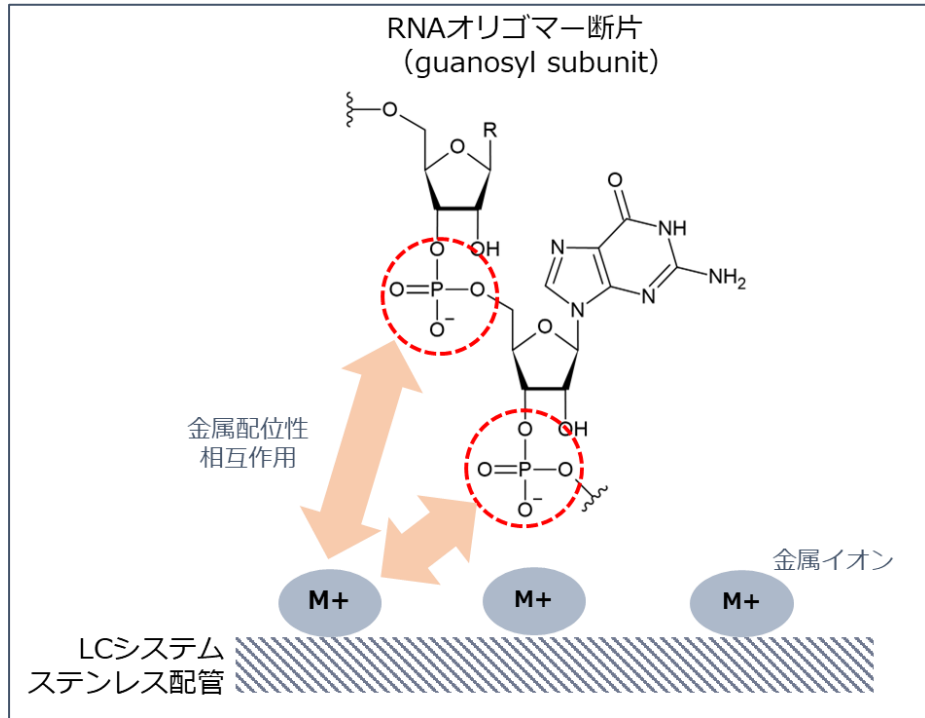


吸着の種類	試料の特徴や主な発生箇所	対策例
疎水性吸着 (疎水性相互作用)	疎水性の高い化合物 (ガラスバイアル、PPバイアル、ピペットチップ)	<ul style="list-style-type: none"> • 試料溶媒を有機溶媒にする • 疎水性吸着を低減するバイアルを使用する
イオン性吸着 (金属吸着以外)	塩基性化合物 (ガラスバイアル、カラム充填剤)	<ul style="list-style-type: none"> • PPバイアルを使用する • 酸性条件下にしてシラノールの解離を抑制する • 残存シラノール対策が施されたカラムを使用する
金属吸着	りん酸基含有化合物など、配位結合する化合物 (カラムボディー、オートサンプラー)	<ul style="list-style-type: none"> • メタルフリーカラムを使用する • 試料接液部の材質をメタルフリーにする

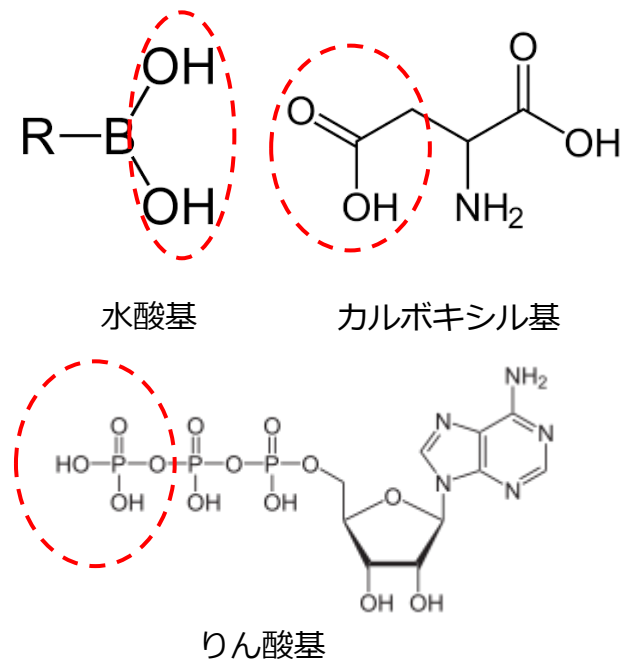
金属吸着

・ 試料の特徴

リン酸基含有化合物など配位結合する化合物
(ex. オリゴ核酸、リン酸化ペプチド)



金属吸着しやすい官能基



・ 対策例

試料接液部の材質をメタルフリーにする

UHPLC system

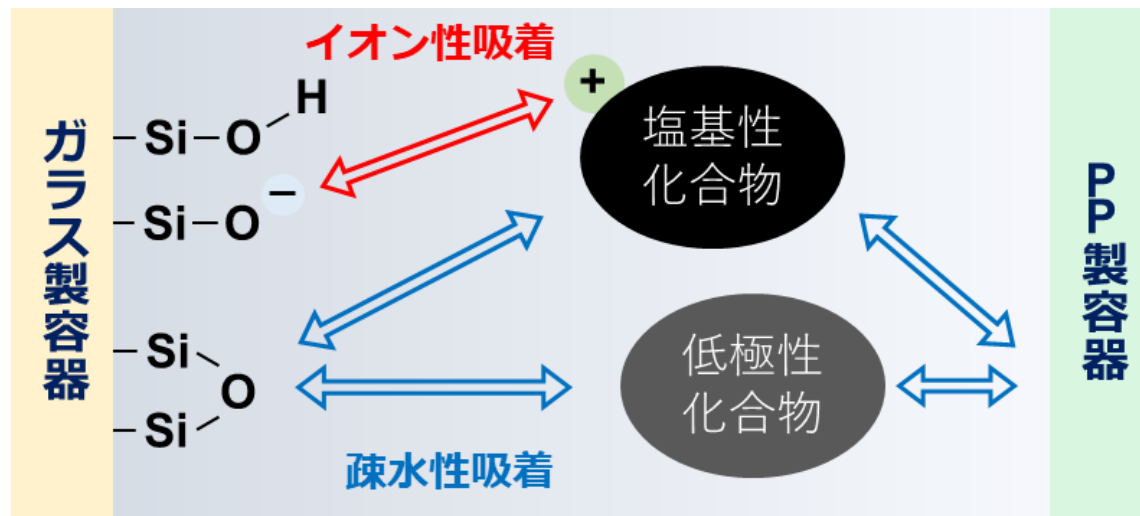
Nexera XS inert

Column

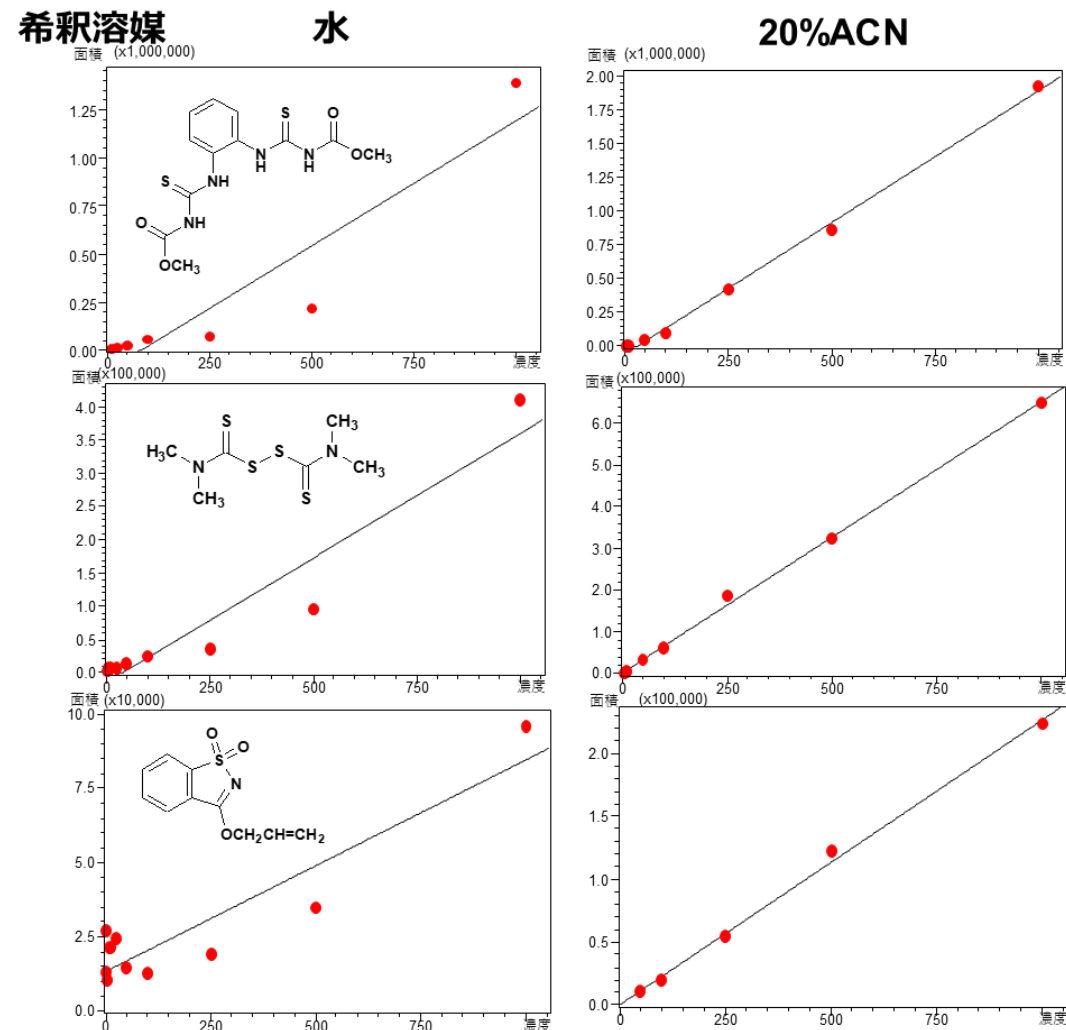
Shim-pack Scepter Claris



疎水性吸着、イオン性吸着



- ・ 試料の特徴
 疎水性吸着：疎水性の高い化合物
 イオン性吸着：塩基性化合物
- ・ 対策例
 試料溶媒を変更する、バイアルを変更する



内容

LC/MSの基礎

LC/MS分析における留意点

カラム・バイアル製品のご紹介

Shim-pack Scepter C4-300, Shim-pack Arata の紹介

Shim-pack Scepter C4-300

- 幅広い条件下での卓越した耐久性と性能
- 充填剤に含まれる金属イオンの影響を抑制
- 30 nm ポアサイズにより、抗体フラグメントなどの分析に最適

抗体の分析など、分子量の大きなタンパク質の分析には、細孔径が大きく疎水性相互作用が程よく弱いShim-pack Scepter C4-300がおすすめ。

Shim-pack Arata

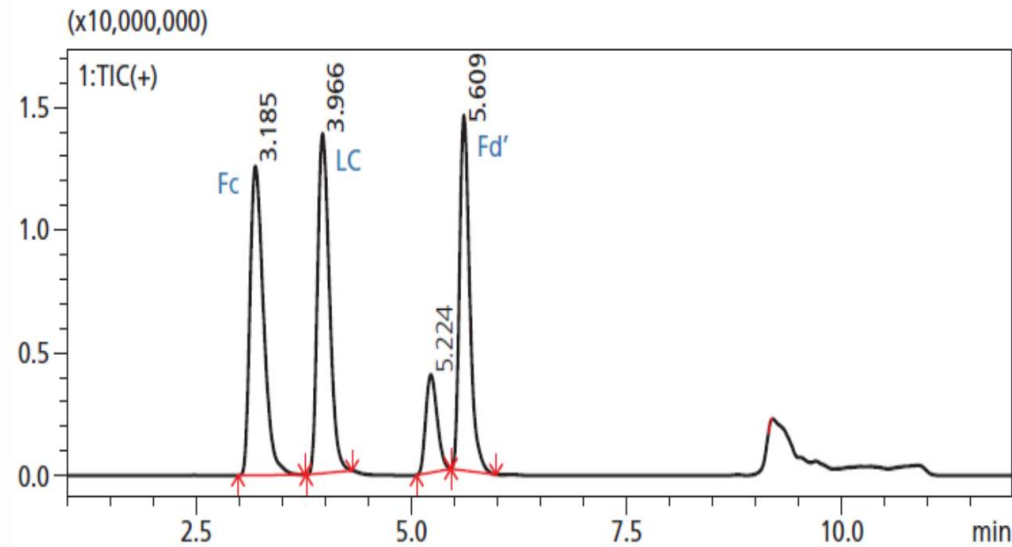
- 希薄有機酸移動相における塩基性化合物の卓越したピーク形状
- 希薄酸移動相における迅速なカラムの平衡化
- ペプチドに対する良好な分離性能

塩基性化合物の吸着を抑制するために開発と迅速なカラム平衡化とペプチドの高い回収率。ペプチド分析におすすめ。



Shim-pack Scepter C4-300 の分析例

抗体消化物のフラグメント分析例



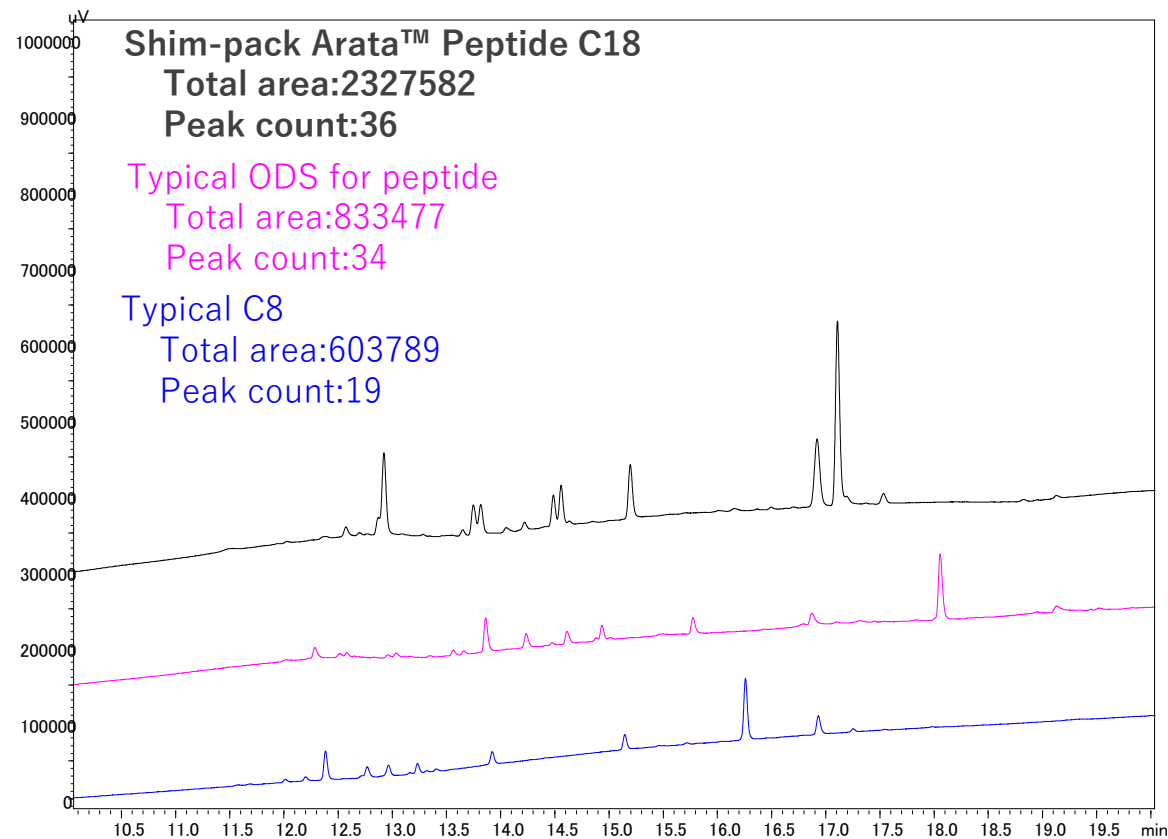
Column	: Shim-pack Scepter C4 (2.1 mm I.D. × 50 mm, 3 μm)
Mobile Phase	: A: 0.1% HCOOH in H ₂ O B: 0.1% HCOOH in CH ₃ CN
Gradient	: B conc. 1% (1min) → 25% (1.1min) → 40% (8min) → 95% (8.1-10min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min.
Detection	: LCMST TM -8060
Column Temp.	: 50 °C
Inj. Volume	: 1 μL
Sample	: IdeZ digested + DTT treated Adalimumab 0.2 mg/mL

Tips

- **初期移動相**
-> サンプルがカラムに保持するよう設定
- **グラジエント勾配**
-> 緩やかな勾配に設定

Shim-pack Arata の分析例：優れたペプチドの回収率

トリプシン消化ペプチド試料の分析例

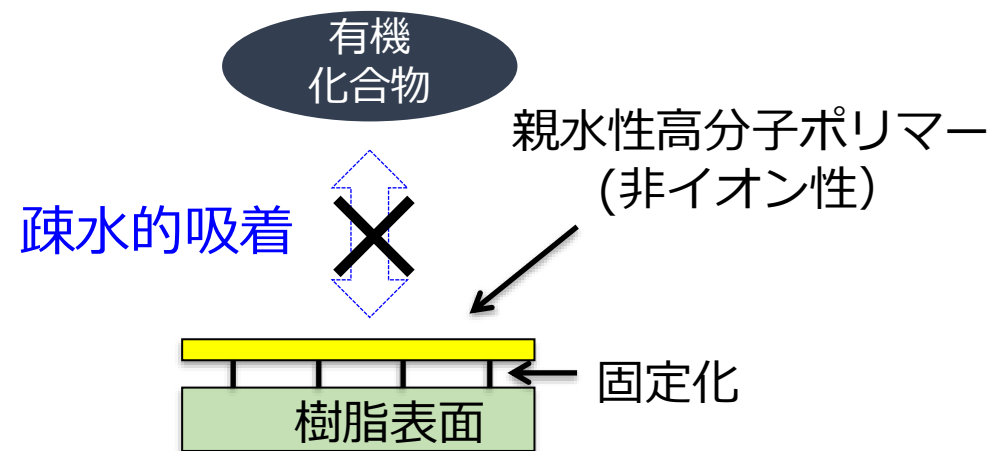


Column	: Shim-pack Arata Peptide C18 (2.0 mm I.D. × 150 mm)
	Typical ODS for peptide (2.1 mm I.D. × 150 mm)
	Typical C8 (2.0 mm I.D. × 150 mm)
Mobile Phase	: A:0.1%HCOOH in H ₂ O B:0.1%HCOOH in CH ₃ CN
	2%B (0-5 min.)→2-45%B (5-20 min.)→ 100%B (20.01-25min)→100-2%B (25.01 min.)→ 2%B (25.01-30min.)
Flow Rate	: 0.2 mL/min.
Detection	: UV at 214 nm
Column Temp.	: 40 °C
Inj. Volume	: 5 µL
Sample	: Myoglobin tryptic digest
Vial	: TORAST-H Bio Vial

低吸着樹脂製容器・器具のご紹介

特長

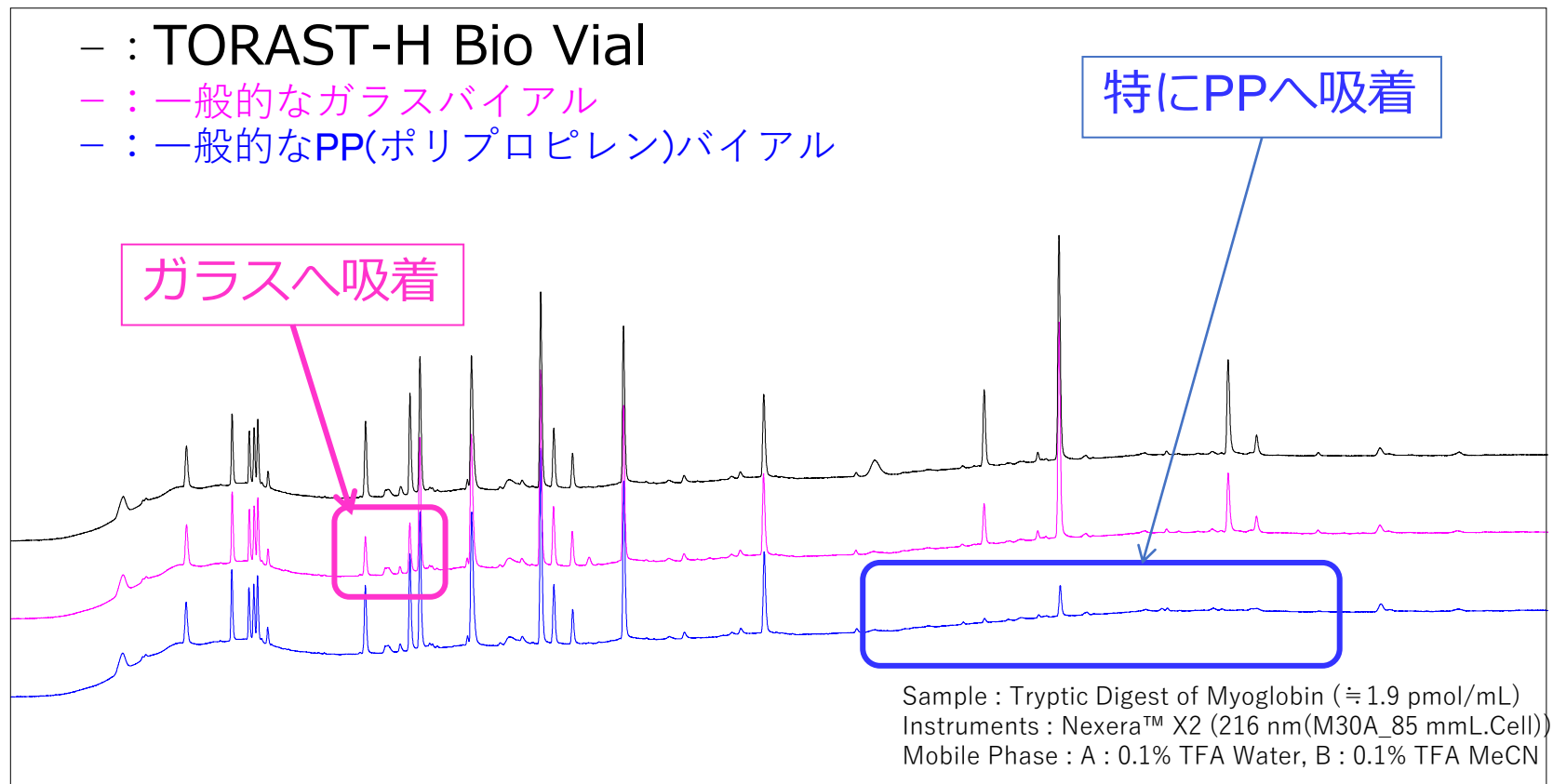
- ペプチドが極めて低吸着なPP製消耗品。
- 疎水性吸着を抑制することで、酸性、塩基性、疎水性ペプチドのすべての感度向上。



- 疎水性の樹脂表面と有機化合物の疎水的部分との疎水的吸着が主な吸着メカニズム
->非イオン性の親水性高分子ポリマーをPP表面に特殊な処理で固定化することで低吸着化。

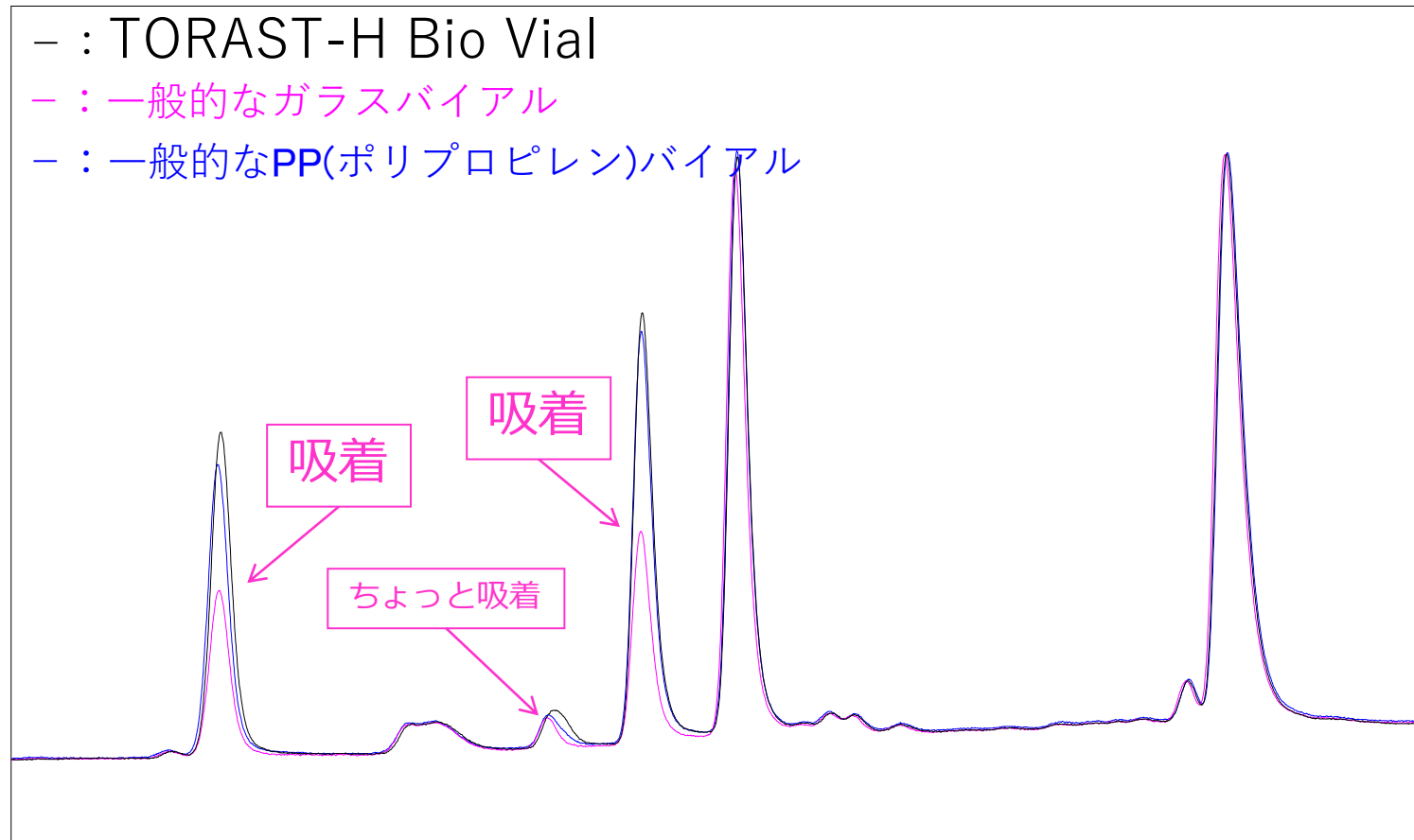
TORAST-H Bio Vial

- ミオグロビン消化ペプチドでバイアルを評価。
-> 他のバイアルと比べ7-8min, および13min 以降で特異性を確認。



TORAST-H Bio Vial (ガラス吸着)

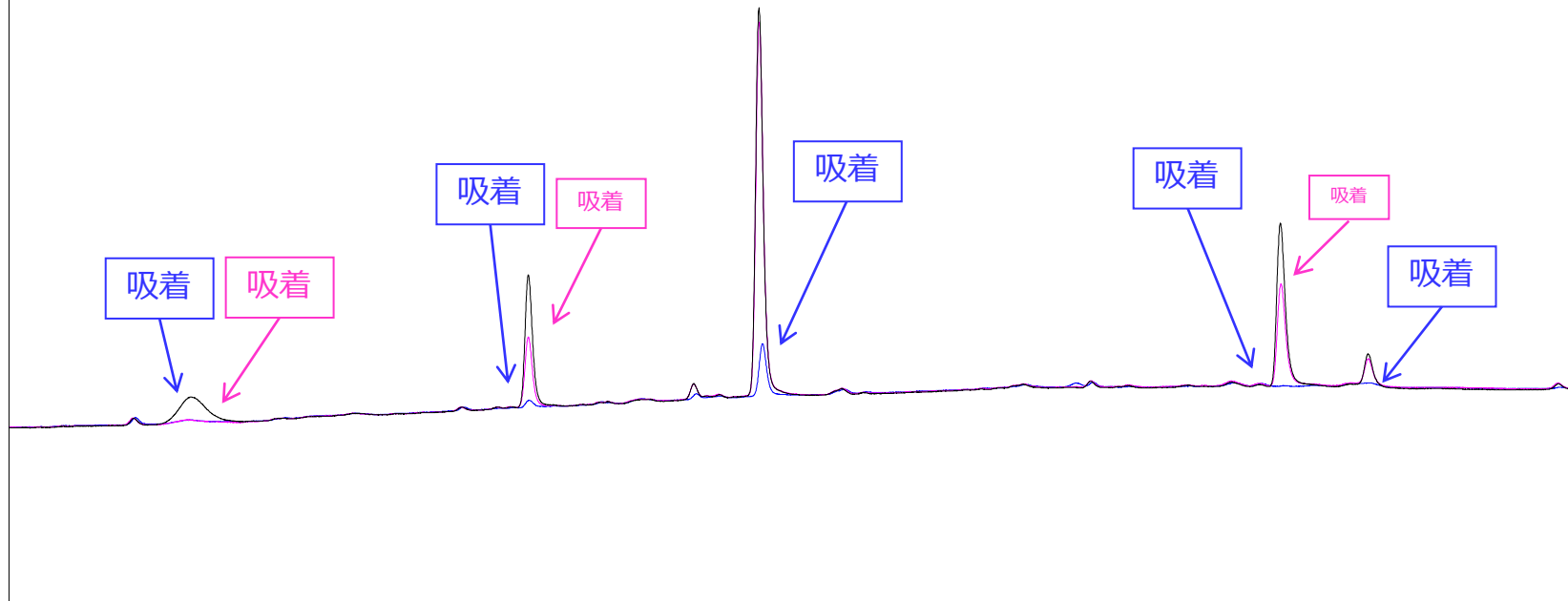
- 極性の高いペプチドはガラスの表面のシラノールイオンとの相互作用により吸着。



TORAST-H Bio Vial (疎水性吸着)

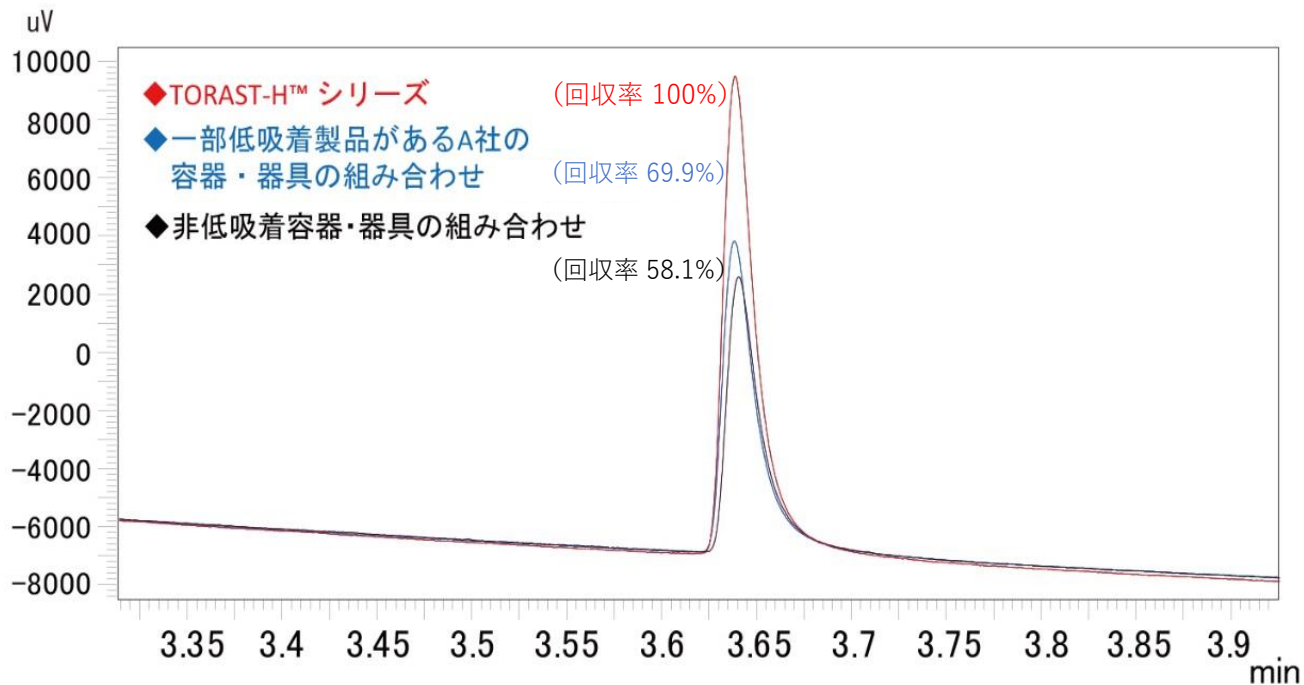
- 疎水性の高いペプチドはPPに疎水的相互作用で吸着。
- TORAST-H Bio Vial では疎水性相互作用を抑制し、回収率向上。

- : TORAST-H Bio Vial
- : 一般的なガラスバイアル
- : 一般的なPP(ポリプロピレン)バイアル

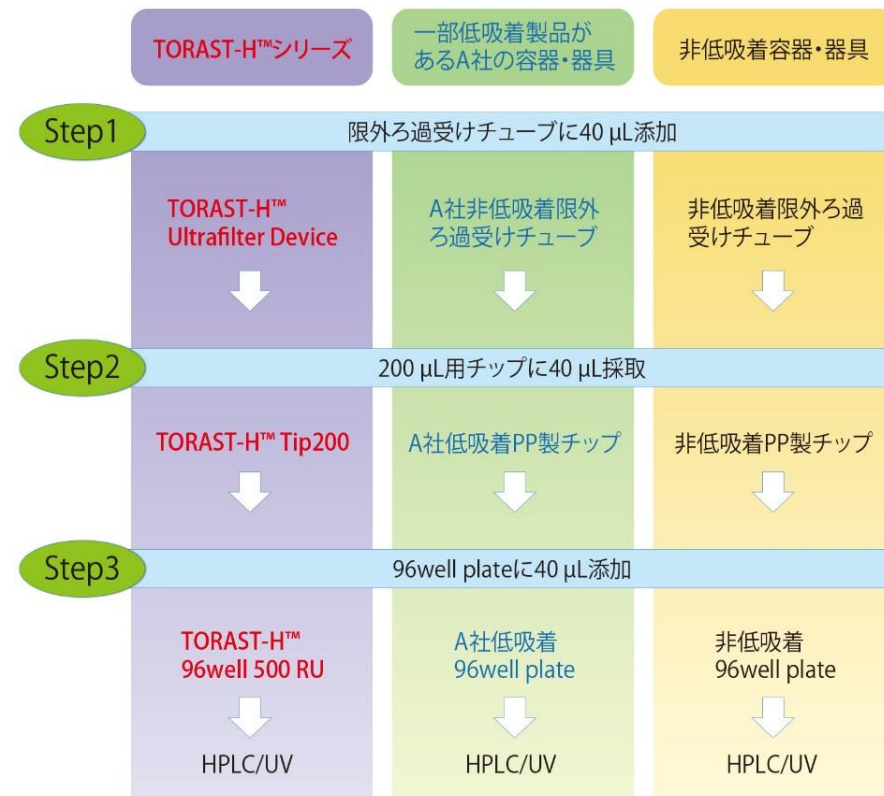


一連の試料調製を想定した吸着試験

● TORAST-H シリーズを組み合わせて使用することで、回収率は大幅に向上。

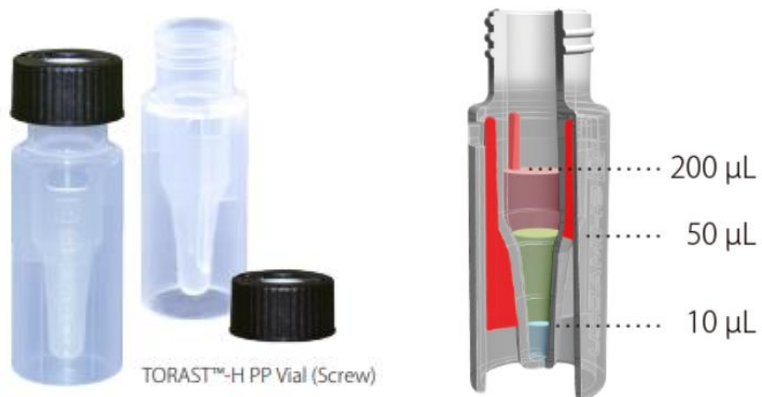


Instruments : Nexera X2
 Mobile Phase A : 0.1% HCOOH in H₂O
 Mobile Phase B : CH₃CN
 Time Program : 5% B(0 min) ⇒ 60% B(5 min) ⇒ 5% B(5.01-10 min)
 Flow Rate : 0.4 mL/min.
 Detection (UV) : 280 nm
 Temperature : 40 °C
 Sample : Insuline (50 μL/mL)



新製品 TORAST-H PP Vial (Screw)

		キャップタイプ	
		スクリュー型	スナップ型
低吸着タイプ	<p>New TORAST™-H PP Vial (Screw)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 分析時において吸着の影響が大きい低濃度試料の測定向き ◆ エアかみが起こりにくい設計 ◆ SIL-40 シリーズを用いることで効率的に温度管理することができる ◆ 容量目盛り付き ◆ LC/MS においてバイアル由来のブリードが少ない ◆ セブタム付きキャップであるため、試料の気密性が高い 	<p>TORAST™-H Bio Vial</p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ 分析時において吸着の影響が大きい低濃度試料の測定向き ◆ エアかみが起こりにくい設計 ◆ 遠心機にそのまま設置できる（エア抜き等が容易） ◆ キャップの装着が簡単 ◆ スクリューキャップに比べて安価 	



ご清聴ありがとうございました

LCMS、Nexera、nSMOL、Shim-pack Scepter、Shim-pack ArataおよびTORASTは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。
本発表内に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本発表中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。