

Application News

No. C115

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LC/MSと多価イオン解析ソフトウェアを用いた合成ペプチドの分子量確認

Determination for the Molecular Weight of Synthetic Peptides by LC/MS with the Multi-Charged Ion Analysis Software

動物由来の自然毒には、その主要成分としてペプチド類が含まれているものが多く、これらペプチドの構造情報は、薬理的な視点から中毒メカニズムを探求するにとどまらず、神経科学、精神医学など広範囲な生命科学の基礎研究、あるいは新規薬剤の開発に利用されています。

ペプチドの研究には活性測定や機能解析のため、一定量の試料が必要になることが多く、天然物からの抽出に加えて、構造情報に基づいて合成された試料を用いる場合があります。この際に、合成確認および合成試料中に含まれる不純物解析が、純度の高いペプチド合成のために重要な要素となっています。感度、定性能力にすぐれたLC/MSは、ペプチド

の合成確認および不純物解析に広く用いられています。

ここでは、カモノハシ毒液に含まれるC型ナトリウム利尿ペプチド(OvCNP)のN末端側の部分断片であるAsp-His-Pro-Asn-Pro-Arg(DHPNPR)の合成品を、Nexera-iとLCMS-2020を用いて測定し、多価イオン解析ソフトウェアを用いて分子量確認ならび不純物解析を行った結果を、ご紹介します。

* 本分析に用いた試料は、筑波大学大学院数理物質科学研究科 北 准教授より、ご提供いただきました。

T. Goda

■合成ペプチドのNexera-iとLCMS-2020による分析

Analysis of the Synthetic Peptide Using LCMS-2020 with Nexera-i

Fig. 1に合成ペプチド(DHPNPR, M. W. 734)の全イオン電流クロマトグラム(TICC), マスクロマトグラムおよびマススペクトルを示します。1.5分にDHPNPR由来のピークが検出されました。

マススペクトルでは m/z 246, 368, 735のイオンが検出され、それぞれ3価, 2価, 1価のプロトン化分子と帰属されました。また、0.8分に不純物のピークが検出され、マススペクトルで m/z 311のイオンが検出されました。

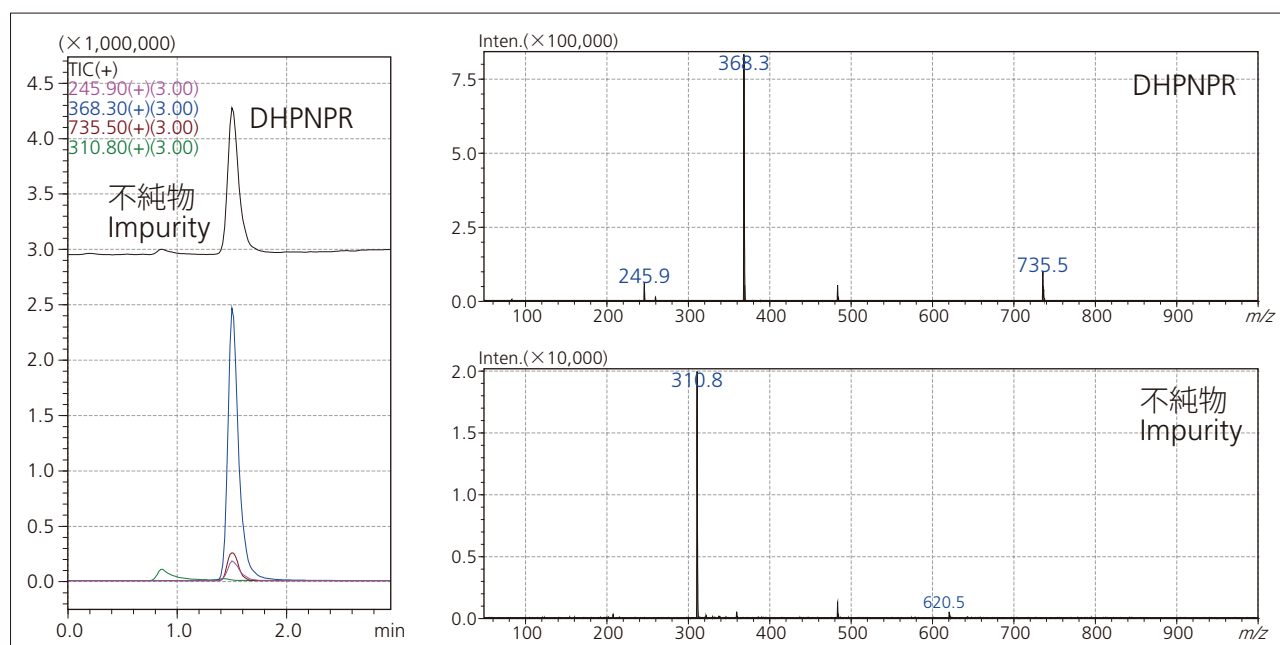


Fig. 1 合成ペプチド DHPNPR および 不純物の TIC, EIC (左) および マススペクトル (右)
Total Ion Current Chromatogram (TIC), Mass Chromatograms (left) and Mass Spectra (right) of Synthetic Peptide DHPNPR and Its Principal Impurity

■多価イオン解析ソフトウェアによるデコンボリューション解析

Deconvolution Analysis of Multiple Charged Ions by the Dedicated Software

Fig. 2 に多価イオン解析ソフトウェアを用いて DHPNPR のピークについて分子量計算を行った結果を示します。

Fig. 1 (右) に示したイオンを用いて計算を行った結果、

Fig. 2 右下のデコンボリューションスペクトルに示されているようにペプチドの分子量は 734 であることが確認されました。

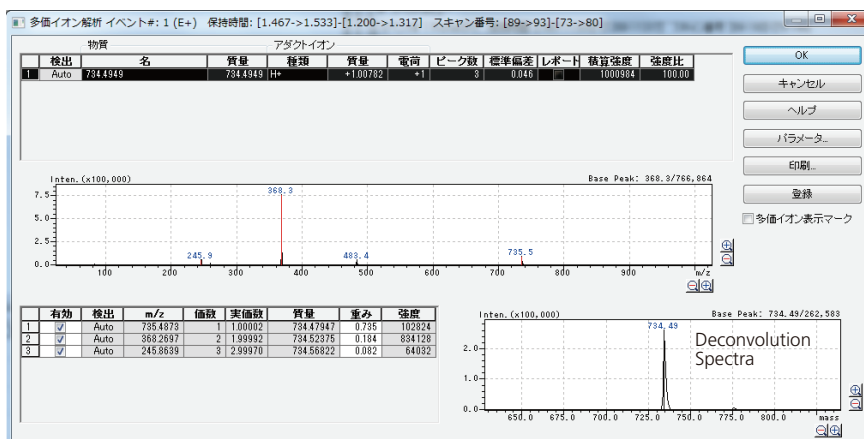


Fig. 2 DHPNPR の多価イオン解析結果
Result of Deconvolution for Peptide DHPNPR

さらに、不純物についても分子量計算を行いました。計算結果を Fig. 3 に示します。Fig. 1 に示した m/z 310 の他に m/z 620 のイオンが検出されており、それぞれ 2 価、1 価のプロトン化分子と帰属され、分子量 619 であることが分かりました。主成分との質量差が 115 であることから、不純物は

N 末端の Asp が外れたペプチド (His-Pro-Asn-Pro-Arg) と推定されました。このように、Nexera-i と LCMS-2020 を用いて測定したデータについて多価イオン解析ソフトウェアを用いて解析を行うことで、合成ペプチドの構造確認および不純物の構造推定に有用な情報を得ることが可能です。

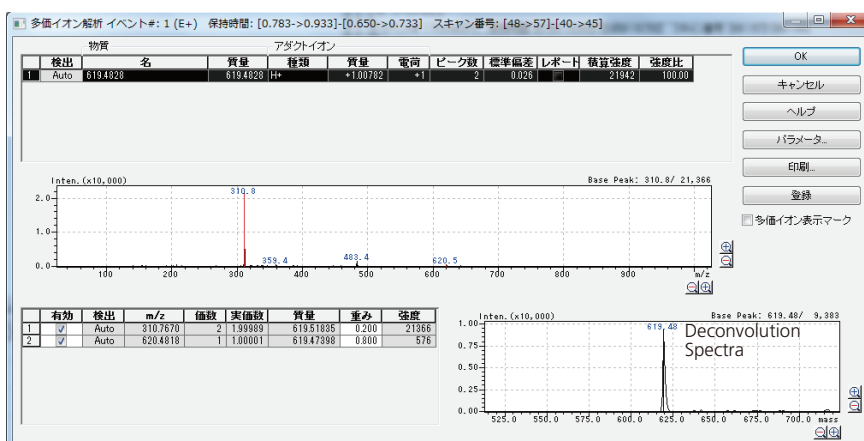


Fig. 3 不純物の多価イオン解析結果
Result of Deconvolution with Respect to Major Impurity

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

LCMS-2020 with Nexera-i system	
Column	: Shim-pack XR-ODS (30 mm L. × 2.0 mm I.D.)
Mobile Phase A	: Water containing 0.1 % Formic Acid
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Gradient Program	: 0 %B (0 min) → 20 %B (2 min) → 0 %B (2.01-3 min)
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Injection Volume	: 1 μL
Probe Voltage	: 4.5 kV (ESI-Positive mode)
DL Temperature	: 250 °C
BH Temperature	: 400 °C
Nebulizing Gas Flow	: 1.5 L/min
Drying Gas Flow	: 15 L/min
Analysis Mode	: Profile
Scan Range	: m/z 50-1000