

Application News

高速液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS™-2050

シングル四重極質量分析計を用いたペプチドの合成確認と不純物の分析

川嶋 美帆、栗木 智子

ユーザーベネフィット

- ◆ HPLCにシングル四重極質量分析計を組み合わせることで、既知化合物の確認や未知不純物の簡易的な分子量推定が可能です。
- ◆ LCMS-2050はメンテナンスが容易な設計のため、装置のダウンタイム、メンテナンス労力・時間の削減に貢献します。

■はじめに

ペプチドの分析において、HPLCによる純度分析では、トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む移動相を使用した分析条件がよく用いられます。本アプリケーションでは、TFAを使用した移動相条件にて市販のペプチド標準品をMS測定し、オプションの多価イオン解析ソフトウェアを用いた分子量確認および不純物解析を行った例を紹介いたします。使用した小型シングル四重極質量分析計 LCMS-2050 (図1) は使いやすさを追求し開発された装置で、HPLCと同様の操作感でありながら容易に質量情報が得られる強力なツールです。メンテナンスも容易な設計になっており、装置のダウンタイム、メンテナンス労力・時間の削減に貢献します。



図1 Nexera™, LCMS™-2050システム

■ 試料の前処理および分析条件

測定対象のペプチドを表1に示しました。これらの市販の標準品を超純水に溶解・希釈し、分析用試料としました。

表1 測定対象のペプチド

#	Compounds	Formula	Molecular weight
1	Somatostatin	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	1637.88
2	ACTH1-17 fragment	C ₉₅ H ₁₄₅ N ₂₉ O ₂₃ S	2093.41

分析条件を表2、3に示しました。

表2 LC分析条件 (Nexera™ X3)

Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 ^{†1} (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Temperature	: 40 °C
Mobile phase	: <TFAを使用した条件> A) 0.1% TFA in H ₂ O B) 0.1% TFA in Acetonitrile <ギ酸を使用した条件> A) 0.1% Formic acid in H ₂ O B) 0.1% Formic acid in Acetonitrile
Gradient	: B.Conc10 % (0.00-1.50 min) →80 % (5.00 min) →10 % (5.01-8.00 min)
Flow rate	: 0.4 mL/min

*1 P/N : 227-31012-03

表3 MS分析条件 (LCMS-2050)

Ionization	: ESI/APCI (DUIST™), Positive mode
Mode	: Scan (<i>m/z</i> 250-2000)
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
DL temperature	: 450 °C
Desolvation temperature	: 200 °C
Interface Voltage	: +3.0kV
Qarray voltage	: +20 V

■ TFA移動相とき酸移動相との比較

ペプチドの分析において、HPLCによる純度分析ではTFAを含む移動相を使用した分析条件がよく用いられる一方、質量分析計の場合はTFAの残存による影響を考慮し、装置のペプチド分析専用化やTFA以外の酸への変更が推奨されます。ただし、移動相に添加する酸を変更するとクロマトグラムの分離パターンが変わる可能性があり、条件の再検討が必要になる場合もあります。

ここではSomatostatinおよびACTH1-17 fragmentの標準溶液を、ギ酸またはTFAを含む移動相で測定し、結果を比較しました。PDA検出器から得られたクロマトグラムを図2、3に示します。Somatostatinについてはいずれの移動相条件においても比較的良好なピーク形状が得られました。これに対しACTH1-17 fragmentでは、TFA条件のピーク形状に対し、ギ酸条件ではピークがリーディングし、TFA条件で確認できた不純物ピークを検出できませんでした。

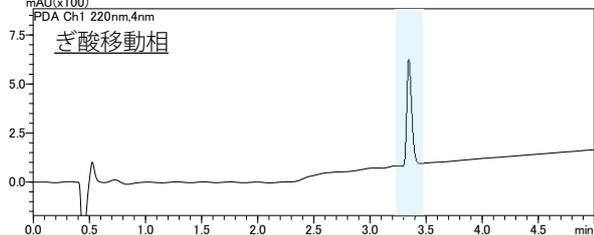
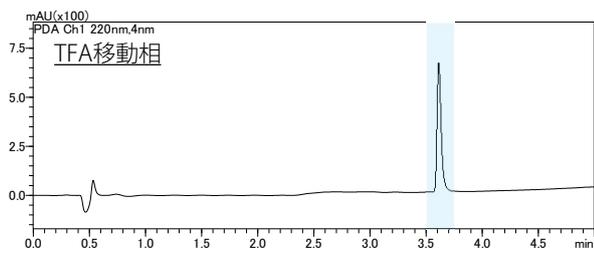


図2 Somatostatin 標準溶液 0.1 mg/mL (5 μ L注入)のクロマトグラム

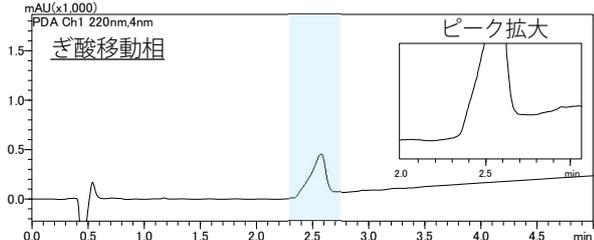
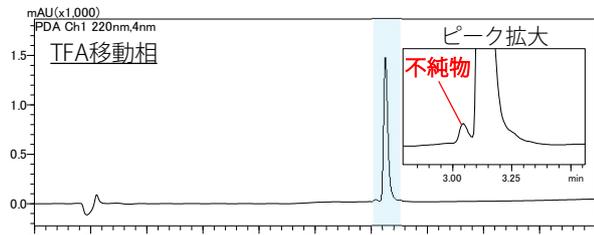


図3 ACTH1-17 fragment 標準溶液 2 mg/mL (10 μ L注入)のクロマトグラム

※本分析は一例であり、結果は測定対象化合物により異なります。必ずしもTFA移動相の使用でギ酸移動相よりも良好なピーク形状が得られるというものではありません。

ACTH1-17 fragmentについて、TFA条件から検出された不純物ピークのマススペクトルからは、 m/z 704.1のイオンがベースピークとして検出されました。マススペクトルおよび m/z 704.1で描いたマスクロマトグラムを図4に示します。マスクロマトグラムからは、PDA検出器のクロマトグラムから得られた不純物ピークと一致する位置にピークが確認されました。

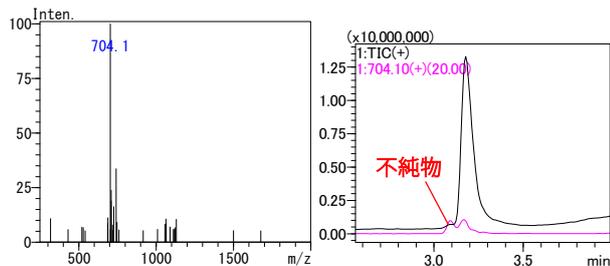


図4 ACTH1-17 fragment 標準溶液 2 mg/mL (10 μ L注入)から検出された不純物ピークのマススペクトルおよびマスクロマトグラム

■ペプチド標準品のスキャン分析

移動相にTFAを使用した条件で、Somatostatin および ACTH1-17 fragmentの標準溶液をスキャン分析しました。図5にSomatostatin、図6にACTH1-17 fragmentのTICおよびマススペクトルを示しました。それぞれ多価のプロトン化分子に帰属されるイオンが検出されました。

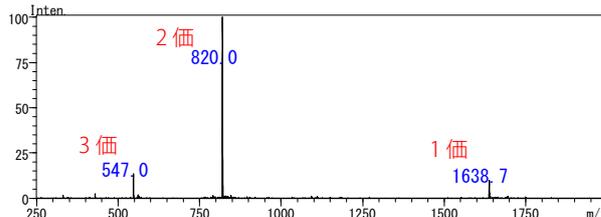
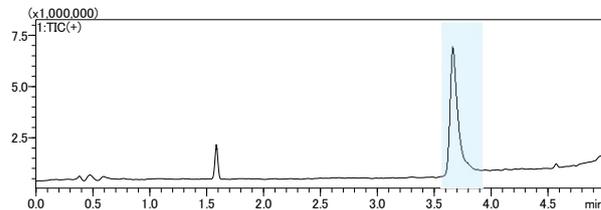


図5 Somatostatin標準溶液 0.1 mg/mL (5 μ L注入)の TICおよびマススペクトル

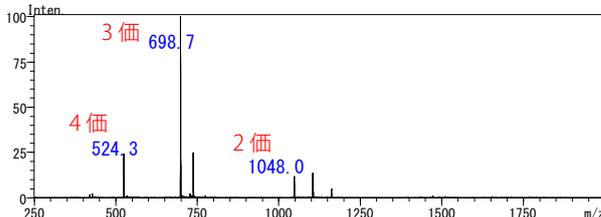
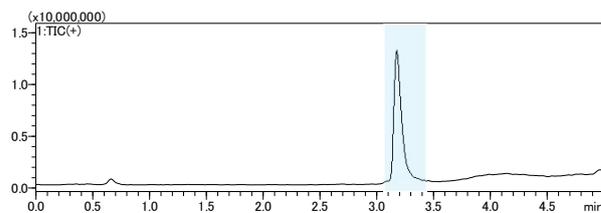


図6 ACTH1-17 fragment 2 mg/mL (10 μ L注入)の TICおよびマススペクトル

図5の結果に対し、多価イオン解析ソフトウェアを用いて分子量計算を行った結果を図7に示します。分子量は1637.6と算出され、理論分子量 (1637.88) と相違ない結果が得られました。

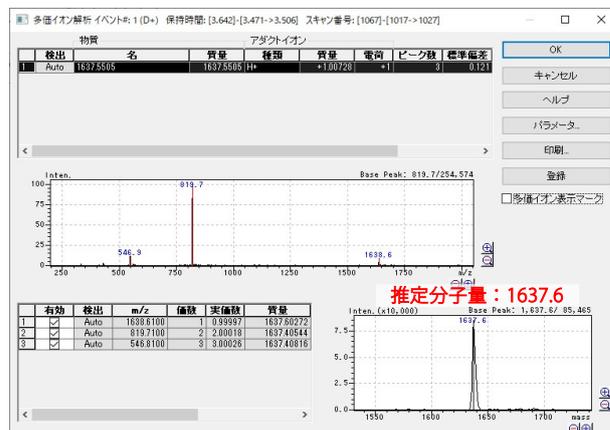


図7 Somatostatin の多価イオン解析結果

図6の結果に対し、多価イオン解析ソフトウェアを用いて分子量計算を行った結果を図8に示します。分子量は2093.4と算出され、理論分子量（2093.41）と相違ない結果が得られました。

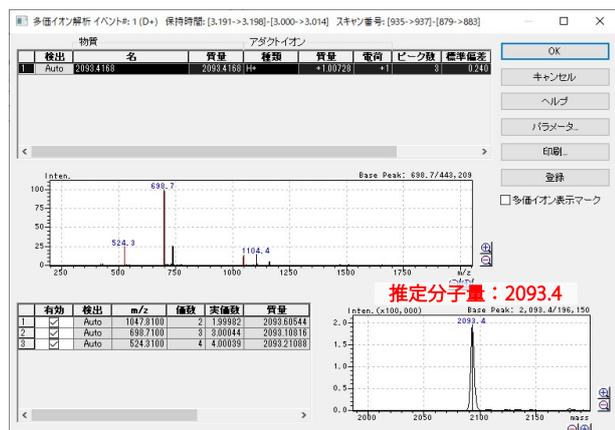


図8 ACTH1-17 fragmentの多価イオン解析結果

■ イージーメンテナンス

TFAを含む移動相を使用すると、移動相を変えた後もシステム内に残り、TFA自身のイオン化によるバックグラウンドの上昇やイオン化の抑制等、その後の分析に影響を及ぼす場合があるので注意が必要です。

TFA由来イオンの影響をなくすためには、HPLCは十分な流路の洗浄や接液部パーツの交換が、MSもパーツ交換やイオン輸送部（レンズ系）の洗浄が求められます。

LCMS-2050はインターフェイス周辺のメンテナンスが容易な設計になっています。サンプルを真空部へ導入する脱溶媒管（DL, Desolvation Line）は工具なしで交換可能で、真空停止の必要はありません（図9）。また、イオン輸送部は装置前面から簡単に取り出すことができ、ピーカーに入れて超音波洗浄が可能です（図10）。LCMS-2050は、装置のダウンタイム、メンテナンス労力・時間の削減に貢献します。

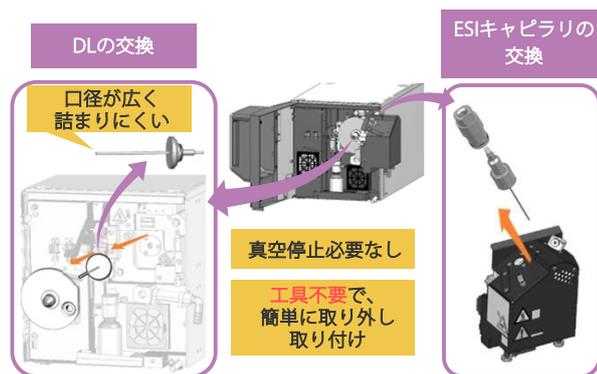


図9 DLおよびESICapillary交換のイメージ図

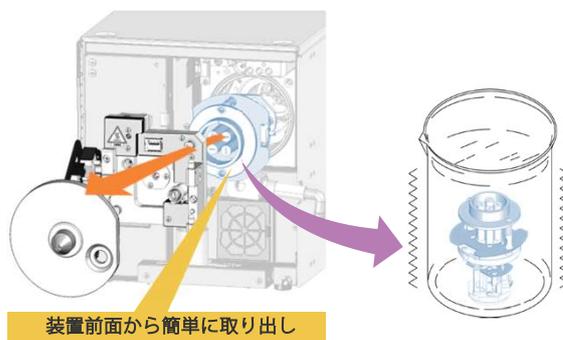


図10 イオン輸送部（レンズ系）メンテナンスのイメージ図

■ まとめ

TFAを含む移動相条件で市販のペプチド標準品を分析し、多価イオンソフトウェアを用いた分子量確認および不純物のマスペクトル確認を実施しました。その結果、目的ペプチド由来の多価イオンピークが観測され、それらを利用した分子量計算では理論分子量と相違ない値が得られました。シングル四重極質量分析計LCMS-2050を用いてペプチドの分子量確認が簡便に実施できることが確認されました。

TFAを含む移動相を使用後は、HPLCおよびMSの洗浄・メンテナンスが求められますが、LCMS-2050はメンテナンスが容易な設計のため、装置のダウンタイム、メンテナンス労力・時間の削減が期待されます。

LCMS、Nexera、Shim-pack Scepter、およびDUI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。

[> アンケート](#)

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



[> LCMS-2050](#)
シングル四重極質量分析計

関連分野

[> バイオ医薬品](#)

[> 価格お問い合わせ](#)

[> 製品お問い合わせ](#)

[> 技術お問い合わせ](#)

[> その他お問い合わせ](#)