

Application News

高速液体クロマトグラフ

Nexera™ X4 による信頼性の高いペプチドマッピング -緩やかなグラジエント条件下での優れた送液再現性-

藤崎 真一

ユーザーベネフィット

- ◆ Nexera X4の優れた送液性能により、長時間にわたる緩やかなグラジエント条件下においても、良好な保持時間再現性が得られます。
- ◆ シングル四重極質量分析計により得られた質量情報を、各ペプチド断片の定性情報として活用することで、データの信頼性を向上できます。

■はじめに

ペプチドマッピングはタンパク質の特性解析における一次構造の確認や、品質の恒常性の評価において重要です。LC（逆相クロマトグラフィー）を用いた分析では、消化により得られた多数のペプチド断片を分離するために、緩やかなグラジエント勾配により移動相中の有機溶媒比率を長時間にわたって徐々に増加させる送液方式が用いられます。有機溶媒比率が少しずつ変化することで、類似の疎水性を有するペプチドの相互分離が可能になりますが、有機溶媒比率を精密にコントロールする送液ポンプの性能が、保持時間の再現性を得るために非常に重要です。Nexera X4（図1）は、島津製作所のNexeraシリーズで培われた技術を継承し、最高クラスの分析性能を実現する次世代超高速液体クロマトグラフ（UHPLC）システムです。送液ポンプには、独立駆動のプランジャーと圧力フィードバック機構を搭載しており、長時間にわたる緩やかなグラジエント勾配においても、精密な送液を可能とし、良好な送液再現性を実現します。本稿では、Nexera X4を用いて、トリプシンによるBSA消化物を分析した事例をご紹介します。また、シングル四重極質量分析計LCMS™-2050を併用することで、各ペプチド断片の定性情報として質量情報の取得が可能なることも併せて示します。



図1 Nexera™ X4

■対象試料および分析条件

対象試料および分析条件を表1に示します。本稿では、ウシ血清アルブミン（BSA）のトリプシン消化物をモデルサンプルとしました（BSAを還元アルキル化後、トリプシン消化を実施：図2）。本サンプルに対して、移動相中の有機溶媒比率が0.78%/分で変化する緩やかな勾配のグラジエント条件を適用しました。

表1 対象試料および分析条件

Sample	: Tryptic digest of BSA
Mobile phase	
Pump A	: 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) in water
Pump B	: 0.1% TFA in Acetonitrile
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 *1 (100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)
Injection Vol.	: 1 μL (1000 mg/L)

LC Conditions

System	: Nexera X4
B Conc.	: 1%(0 min)→40%(50 min)→90%(50-55 min) →1%(55-85 min)
Column Temp.	: 70 °C
Flow rate	: 0.2 mL/min
Mixer	: MR180
Sample loop Vol.	: 15 μL
Detection	: 220 nm (SPD-M40 X4, STD cell)

MS Conditions

System	: LCMS-2050
Ionization	: ESI/APCI (DUIS™), positive mode
Mode	: SCAN (<i>m/z</i> 150-2000)
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 5.0 L/min
Heating gas flow	: 7.0 L/min
DL Temp.	: 200 °C
Desolvation Temp.	: 450 °C
Interface voltage	: +1.0 kV

*1 P/N : 227-31012-05

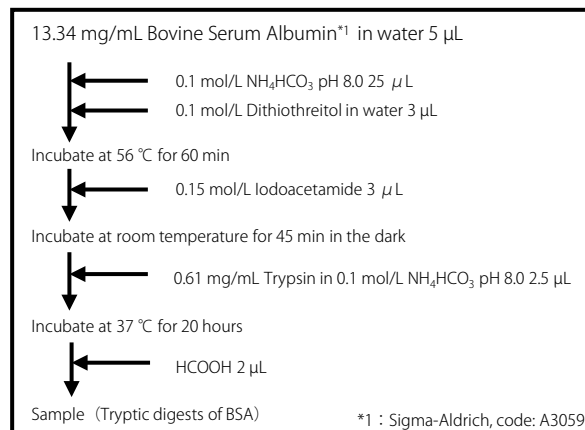


図2 トリプシンによるBSA消化手順

■緩やかなグラジエント条件での再現性

消化物に含まれる高極性ペプチドを適切に保持し、かつ、各ペプチド断片を十分に分離するために、グラジエント初期濃度が低く（1%）、50分にわたって移動相中の有機溶媒比率が0.78%/分で変化する緩やかな勾配のグラジエント条件を適用しました。

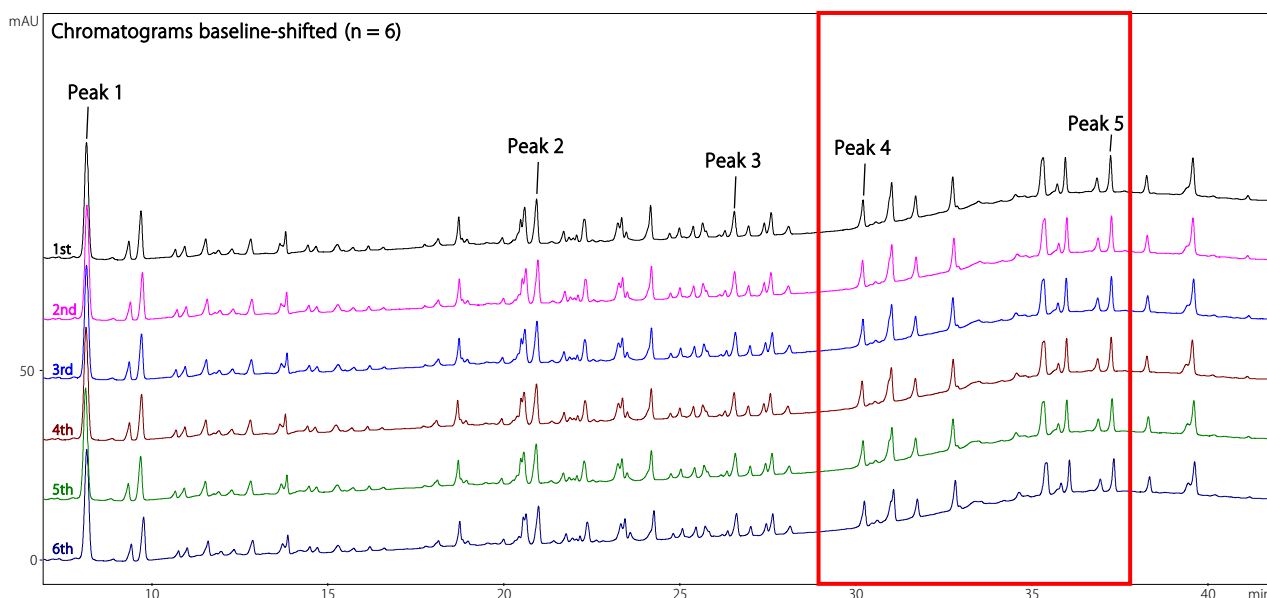


図3 繰り返し分析におけるUVクロマトグラム (n = 6)

6回の繰り返し分析により得られたクロマトグラム（ベースラインシフト表示）を図3に示します。消化により得られた多数のペプチド断片が分離できていることが分かります。図3中のPeak1~5は、各ペプチド断片の溶出範囲にわたって、異なる保持時間帯から選択した代表的なピークであり、これらの保持時間再現性（%RSD）を表2に示します。各ピークに対して良好な再現性が得られており、Nexera X4の優れた送液性能により、長時間にわたる緩やかなグラジエント条件下においても、良好な再現性が得られることが示されました。

表2 6回繰り返し分析における保持時間再現性（%RSD）

	Retention time
Peak 1	0.16
Peak 2	0.12
Peak 3	0.09
Peak 4	0.07
Peak 5	0.08

■ LCMS-2050による質量情報を用いた定性

図3中の赤枠範囲内でのUVクロマトグラムとMSクロマトグラムを図4に並べて示します。また、MSクロマトグラムの各ピークに対応するベースピーク m/z を図中に示します。UVクロマトグラムにて検出されたピークに対してMSクロマトグラムでもピークが得られており、保持時間に加えて質量情報も各ペプチド断片の定性情報として活用可能です。ペプチドマッピングでは、多数のピークが検出されるため、わずかな保持時間の変動が正確な同定の課題となりますが、保持時間の揺らぎに依存しない質量情報を併用することで、データの信頼性を向上できます。

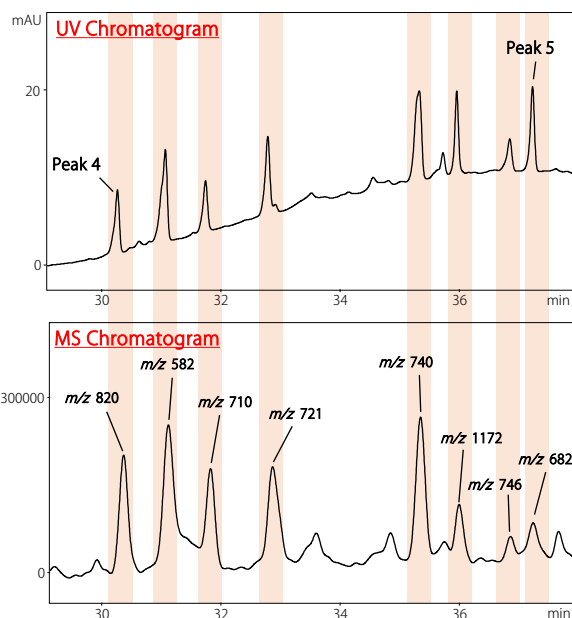


図4 MSクロマトグラムの質量情報を用いた定性

■ まとめ

トリプシンによるBSA消化物を用いたペプチドマッピング事例についてご紹介しました。ペプチドマッピングでは多数のペプチド断片を分離するために、有機溶媒比率を長時間にわたって徐々に増加させる緩やかなグラジエント条件が使用されるため、送液ポンプの性能が保持時間再現性を得るために非常に重要です。Nexera X4は、独立駆動のプランジャーと圧力フィードバック機構による精密な送液が可能であり、長時間にわたる緩やかなグラジエント勾配においても、良好な保持時間再現性を実現します。また、シングル四重極質量分析計LCMS-2050を併用することで、保持時間だけでなく質量情報も定性情報として活用できるため、データの信頼性の向上に貢献します。

Nexera、LCMS、DUIS、およびShim-pack Scepter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。



▶ Nexera™ X4
超高速液体クロマトグラフ



▶ LCMS-2050
シングル四重極質量分析計

関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

▶ ペプチド医薬品

▶ 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