# 表面チャージハイブリッド (Charged Surface Hybrid: CSH) C<sub>18</sub>カラムと TFAを使用しない移動相を用いたペプチドマッピングおよび 低分子量タンパク質の分離

Matthew A. Lauber, Stephan M. Koza, Kenneth J. Fountain Waters Corporation, Milford, MA, USA

## アプリケーションの利点

- 他のC<sub>18</sub>カラムと比較して高いピークキャパ シティと独自の選択性
- ギ酸およびESI-MSとの適合性
- 約10kDaまでの分析種に対する高い分離能
- CSH130 C<sub>18</sub>はシトクロムcのトリプシン消化物 でQC試験済

## はじめに

バイオ医薬品のペプチドマッピングは、品質管理に使用される場合、UV吸収に よる検出が従来から用いられています。しかしながら、ペプチドマップで分析 種のキャラクタリゼーションを行う場合、LC分離をESI-MSと組み合わせなけれ ばならないことがよくあります。おそらく多くのC<sub>18</sub>カラムの性能が、ピーク形 状を向上させる強いイオンペア試薬に依存するため、ペプチドマッピングには トリフルオロ酢酸(TFA)を含有した移動相がほぼ例外なく使用されてきました。 LC/MSアプリケーションでは、イオンサプレッションの原因となるためTFAの ような強いイオンペア試薬の使用は避けることが推奨されます。TFAの使用に よりMS強度が一桁以上低減する可能性があり<sup>1-3</sup>、より感度の高い検出が可能 となるギ酸(FA)のようなイオンペアとしての特性が弱い酸性モディファイアー がLC/MSには推奨されます<sup>4-5</sup>。

別のアプリケーションノート<sup>6</sup>では、微量レベルのプラスチャージを導入した 新規C<sub>18</sub>固定相を充てんしたカラムの性能を、既存最新ペプチド分析用カラムと 比較しています。9種類のペプチドを混合したスタンダードを用いて表面チャー ジハイブリッド(Charged Surface Hybrid: CSH<sup>™</sup>)固定相が高いピークキャパシティ を示し、他の多くのカラムケミストリーと異なり、最適なピークキャパシティを 得るために強いイオンペア試薬にほとんど依存しないということを実証しま した。この特性から質量分析を用いたキャラクタリゼーションに必要とされる LCアプリーションに最適であることが示唆されます。

本アプリケーションでは、ギ酸移動相を用いたCSH130 C<sub>18</sub>の用途として、より 厳しい分離を要求される分析に関して検討を行いました。エノラーゼトリプシン 消化物のLC/MS分析についてCSH130 C<sub>18</sub>、BEH130 C<sub>18</sub>、表面多孔性C<sub>18</sub>カラムで 比較を行い、更に、これらカラムの12 kDaまでのポリペプチドへの適用可能性 についても評価しました。

# ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システム

Xevo<sup>®</sup> G2 Q-Tof<sup>™</sup> 質量分析計

ACQUITY UPLC CSH130 C<sub>18</sub>、1.7 µmカラム

Mass PREP™エノラーゼ消化物スタンダード

## キーワード

逆相、ペプチド、UPLC®、トリフルオロ酢酸、 TFA、ギ酸、FA、イオンペア、 表面チャージハイブリッド (Charged Surface Hybrid)、 CSH、C<sub>18</sub>、CSH130 C<sub>18</sub>、LC/MS、 ペプチドマッピング、低分子量タンパク質

実験方法							
LC条件		移動相:	A : 0.1	、:0.1%ギ酸(v/v)水溶液			
システム:	Waters ACQUITY UPLC H-Class Bio システム	B:0.1%ギ酸(v/v) アセトニトリル溶液					
検出:	ACQUITY UPLC TUV検出器 (500 nL分析フローセル)		C : 0.1 (v/ D : 0.1	%トリノ v)水溶洌 % TFA (v	ルオ 山 <sub>間</sub> 夜 //v)	IF政(IFA)	
	Xevo G2 Q-Tof 質量分析計		アt	セトニトリル溶液			
	(ペプチドマッピングにはMS検出 のみ使用。高分子量ペプチド/ 低分子量タンパク質にはUV およびMS検出両方使用)	0.1%ギ酸移動 <u>時間 (分</u> 0 1	相のグラ <u>) %A</u> 98.0 98.0	ラジエン <u>%B</u> 2.0 2.0	ト∶ <u>%C</u> 0.0 0.0	<u>%D</u> 0.0 0.0	
波長:	214 nm	61	50.0	50.0	0.0	0.0	
スキャン速度: カラム:	10 Hz C <sub>18</sub> 、2.1 × 150 mm、1.7 μm	0.1% TFA 移動相のグラジエント (図1 での比較にのみ使用):					
	表面多孔性 (コア1.25 μm、シェル 0.22 μm)、100 Å (他社製品)	<u>時間 (分</u> 0 1	<u>%A</u> 0.0	<u>%B</u> 0.0 0.0	<u>%C</u> 98.0 98.0	<u>%D</u> 2.0 2.0	
	ACQUITY UPLC BEH130 C <sub>18</sub> 2.1 $\times$ 150 mm, 1.7 $\mu$ m	61	0.0	0.0	50.0	50.0	
	全多孔性、130 A (製品番号 186003556) ACQUITY UPLC BEH300 C <sub>18</sub> 2.1 × 150 mm、1.7μ m 全多孔性、300 Å (製品番号 186003687) ACQUITY UPLC CSH130 C <sub>18</sub> 2.1 × 150mm、1.7μm	MS 条件					
		質量分析計:		Xevo G2	2 QTof		
		イオン化モード	:	ESI+			
		アナライザーモード:		分離能モード			
		スキャン速度:		10 Hz			
		キャピラリー電圧:		3.00 kV			
	全多孔性、130Å (想品委号 186006038)	コーン電圧:		25 V			
カラム泪度・	(梁阳田马 100000350)	ソース温度:		120℃			
	40 C	脱溶媒温度:		350℃			
サンフル温度:		コーンガス流速	<u>₹</u> :	0.0 L/h			
注人量:	10 µL (エノラーゼ消化物)、1 µL (高分子量ペプチド/低分子量 タンパク質)	脱溶媒ガス流速:		800 L/h			
汝·声·		キャリブレーション試薬:		Nal (2 μg/μL、 m/z 50 ~ 2000)			
加迷.	U.3 mL/min	データ取得率:		10 Hz ( <i>m/z</i> 50 ~ 1990)			
	データ管理:			MassLynx <sup>®</sup> ソフトウェア			

## サンプル詳細

Waters<sup>®</sup> Mass PREP エノラーゼ消化物スタンダード(製品番号 186002325)はトータルペプチド濃度が約0.05 mM になるように0.1% ギ酸水溶液に溶解しました。Sigma 社から入手した高分子量ペプチドおよび低分子量タンパク質は0.1% ギ酸水溶液に溶解し、各成分が1 mg/mL 含まれるように混合サンプルを作成しました。

#### 計算:

エノラーゼの消化ペプチド(T6、T10、T14、T23、T27、T35、T37、T38、T40、T42、T45、T51)を用いて ペプチド分離を評価しました。抽出クロマトグラムから各ピークの半値幅(Wh)を測定してその平均値を 計算し、以下の式に従ってピークキャパシティを計算しました。

$$P_{c,4\sigma} = 1 + \left[ \left( \frac{2.35}{4} \right) \left( \frac{t_{gradient}}{w_{h,avg}} \right) \right]$$

## 結果および考察

## ペプチドマッピング

逆相ペプチド分離は、ペプチドマッピングなど酵素消化したタンパク質の分析にルーチンで採用されています。 ペプチド分離へのC<sub>18</sub>カラムの実用性はエノラーゼトリプシン消化物などの消化物スタンダードを分析する ことで評価できます。エノラーゼトリプシン消化物スタンダードを用いてACQUITY UPLC CSH130 C<sub>18</sub>, 1.7 μm カラムの性能についてLC/MSベースのペプチドマッピングにより評価しました。図1 にはギ酸(青で図示)ま たはTFA(オレンジで図示)含有移動相を用いて得られたエノラーゼ消化物のトータルイオンクロマトグラム を示しました。MS感度に対してTFAが悪影響を及ぼすことは明白です。このLC/MS分析のモディファイアー としてギ酸の代わりにTFAを使用することで、MS感度が一桁低減しました。

9種類のペプチドを混合したスタンダードを用いた前報では、ペプチド分離に対するCSH130 C<sub>18</sub>の性能が TFAのような強いイオンペア試薬の使用にほとんど依存せず、ギ酸、TFAどちらを含有した移動相でも卓越 したピーク形状が得られることを示しました<sup>6</sup>。この最も重要な結論は、CSH130 C<sub>18</sub>はMSに適した条件下に おいても高いピークキャパシティのペプチドマッピングが可能である点です。この点について説明するため、 ギ酸移動相で得られたエノラーゼ消化物ペプチドマップのピークキャパシティを計算しました(計算について は実験方法を参照)。ピークキャパシティの計算には、図1に標識した幅広い保持時間に渡る12種類のペプ チドを使用しました。



図1 CSH130 C<sub>18</sub>、1.7 µmカラム を用いたエノラーゼトリプシン 消化物のLC/MS分析結果。0.1% ギ酸および0.1%TFA含有移動相 により得られたトータルイオン クロマトグラムは、それぞれ青 とオレンジで図示。どちらのク ロマトグラムも同じスケールで 表示。ピークキャパシティの計 算に用いたペプチドは標識。 この測定に基づくCSH130 C<sub>18</sub>、1.7 µmカラムのピークキャパシティは532で、ルーチンワークに適合した LC/MS プラットホームにおいては非常に高い数字です。大局的に見るため、充てん剤表面に微量レベルの プラスチャージを導入していない2種類の1.7 µm C<sub>18</sub>カラムを用いてエノラーゼトリプシン消化物のLC/MS分析 を同様に行いました(図2)。全多孔性のBEH130 C<sub>18</sub>、1.7 µmカラムのピークキャパシティは399で、表面 多孔性C<sub>18</sub>、1.7 µmカラムも同様のピークキャパシティ(405)を示しました。このように、新規CSH130 C<sub>18</sub> 固定相は本アプリケーションにおいて30%高いピークキャパシティという顕著な性能の優位性を示しました。

図2に示す3種類のカラム間でペプチドの保持および選択性も異なります。これについて示すためにエノラー ゼペプチドマップの初期部分を拡大したものを図3に示しました。6種類のペプチドに対応するピークを標識 しました。この比較の結果から下記2点がすぐに分かります:1)CSH130C<sub>18</sub>により最も良好なピーク形状が 得られる、2)CSH130C<sub>18</sub>は他の固定相よりも少し保持が弱い。標識したペプチドの溶出はCSH130C<sub>18</sub>で はBEH130C<sub>18</sub>より約5分早く、表面多孔性C<sub>18</sub>カラムより約2分早くなります。溶出強度の違いについては、 それぞれアセトニトリル濃度4%、2%分に相当すると概算されます。これらクロマトグラムをより詳細に解 析すると、CSH130C<sub>18</sub>カラムの独自の選択性が分かります。BEH130C<sub>18</sub>カラムからCSH130C<sub>18</sub>カラムに変更 すると、ペプチド溶出順序は非常に大きく変化します。図3に示す範囲では、最も選択性の変化が大きいペ プチドはT10とT19であると考えられます。T3、T5、T12、T40などほとんどのトリプシン消化ペプチドには、 N末端とC末端のリジンまたはアルギニン残基の計2箇所の塩基性部位があります。一方、ペプチドT10およ びT19には塩基性のヒスチジン残基もあるためさらに陽電荷を持ち、これが保持時間が比較的大きく変化し た理由として最も可能性が高いと考えられます。従って、CSH130C<sub>18</sub>でのペプチドの保持はそのチャージ(も しくはその電荷密度)により影響を受け、選択性に影響していると思われます。このことは、困難なペプチ ドマップを開発する際、特に重要な2つのペプチドピークを分離したい場合にはBEH130C<sub>18</sub>とCSH130C<sub>18</sub>の 両方のカラムでスクリーニングを行う事が効果的であることを示唆しています。



図2 0.1% ギ酸移動相条件下で3種類のカラムにより得られたエノラーゼトリブシン消化物のトータルイオンクロマトグラム



図3 保持と選択性の違いに焦点を当て、図2に示したエノラーゼペプチドマップから初期部分を拡大した図。3種類のカラムで得られたクロマトグラムに渡って6種類のペプチドについてピーク位置を確認。これらペプチドのシークエンスは図の上部に表で示した。

# 高分子量ペプチドおよび低分子量タンパク質の分析

任意のペプチド分離に最適なカラムケミストリーの選択には、多くのファクターが影響します。前述した 実験では表面チャージの顕著な影響について示しましたが、別のファクターとしてポアサイズがあります。 前述した実験結果から、CSH130 C<sub>18</sub>はトリプシン消化ペプチドの分離に非常に効果的です。ポアサイズは 130 Åですが、高分子量ペプチドおよび低分子量タンパク質の分離に対するCSH130 C<sub>18</sub>の使用についての 評価も興味深いものでした。

5

分子量範囲が1-12 kDaの6種類のポリペプチドを、直径で100-300Åの様々なポアサイズの固定相を充てんした4種類のカラムで分離しました(図4)。これらのクロマトグラムを比較すると、インシュリン(5.8 kDa)を含むほとんどのペプチドに対しCSH130 C<sub>18</sub>カラムで最も良好なピーク形状が得られることは明らかです。結果として、治療用インシュリンアナログのバイオアナリシスにCSH130 C<sub>18</sub>が固定相としてすでに選択されています<sup>7</sup>。



図4 0.1%ギ酸移動相条件下で4種類のカラムを用いて得られた高分子量ペプチド/低分子量タンパク質のクロマトグラム。ピーク はESI-MSで確認。

6

大きいポリペプチド、ユビキチン(8.6 kDa) とシトクロムc(12.4 kDa) は、充てん剤のポアサイズ(300Å vs. 130Å) によって違いが見られました。ユビキチンはCSH130 C<sub>18</sub>(130Å) とBEH130 C<sub>18</sub>(130Å) の両 カラムよりもBEH300 C<sub>18</sub>(300Å) カラムで若干ですが良好なピーク形状が得られました。一方、最も大き いポリペプチドであるシトクロムcはBEH300 C<sub>18</sub>で顕著に良好なピーク形状で分離されました。BEH300 C<sub>18</sub> カラムはシトクロムcを実際に複数のピークに分離でき、これはタンパク質の不均一性を示唆していました。 タンパク質分解消化により得られたペプチドマップなど多くのペプチド分離では、もしあったとしても、これ ほど大きいペプチドはごく少数しか含まれません。そのため、CSH130 C<sub>18</sub>のようなポアサイズ130Åの充て ん剤を使用する方が、表面積が大きくなり低分子量の親水性ペプチドがより強く保持されることで、より大 きいポアサイズの充てん剤を使用するよりもタンパク質消化物の分離により良好な影響を与えます。ポアサ イズ 300Å C<sub>18</sub>カラムなどポアサイズの大きい充てん剤は、例えば分子量が6kDa以上など高分子量の ペプチドを主に分析する際に推奨されます。例えば、低分子の非架橋ペプチドの保持・分離の効率がそれ ほど重要でない、lgGのLys-C消化によるジスルフィド架橋ペプチドについての研究などが挙げられます。また、 ペプチドマップの選択性変更のために異なるポアサイズが使用されることもあります<sup>8</sup>。

ポアサイズ100Åの表面多孔性カラムは、BEH130 C<sub>18</sub>カラムと同等のピーク幅およびピーク形状で最も分子 量の小さいペプチドを分離可能でした。しかしながら、より分子量の大きいペプチド(3 – 12 kDa)のピー ク形状は顕著に悪化しました。さらに、このカラムは最も分子量の大きい3種類のポリペプチドを分離する ことができませんでした。これらのデータから、この表面多孔性カラムの使用は分子量の小さいペプチドの 分析に限られるのに対し、CSH130 C<sub>18</sub>とBEH130/300 C<sub>18</sub>は幅広い範囲のペプチドや低分子量のタンパク質 も分離可能であることが示唆されます。

7

### 結論

TFAの代わりにギ酸を用いたペプチドマッピングはESI-MSでより 高感度な検出を可能にします。結果として、CSH130 C<sub>18</sub>はどち らの酸性モディファイアーを使用しても卓越した性能を示すため、 LC/MS ベースのペプチドマッピングに最適です。エノラーゼトリプ シン消化物のギ酸移動相を用いたLC/MS分析では、CSH130 C<sub>18</sub>、 1.7 µm カラムは同じ粒子径の一般的な全多孔性または表面多孔性 C<sub>18</sub>カラムと比べて30%高いピークキャパシティが得られました。さら に、エノラーゼトリプシン消化物の分析結果はCSH130 C18カラム がペプチド分離において独自の選択性を提供することも示しており、 ペプチドマップを開発する際には従来のC18と共にCSH130 C18も 評価することが望ましいと考えられます。高いピークキャパシティ が得られることに加え、重要なペプチドピークペアの分離に最適 な選択性が得られる可能性があります。最後に、高分子量ペプチ ドと低分子量タンパク質の分析結果から、ポアサイズが130Åの CSH130 C<sub>18</sub>カラムが分子量10 kDa程度のポリペプチドまでの分離 にも適していることが実証されました。

## 参考文献

- Kuhlmann FE, Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acidcontaining mobile phases. J Am Soc Mass Spectrom. 1995; 6 (12): 1221-1225.
- Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Goodley PC, Kuhlmann FE. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. J Chromatogr A. 1995; 712 (1): 177-90.
- Chakraborty AB, Berger SJ. Optimization of reversed-phase peptide liquid chromatography ultraviolet mass spectrometry analyses using an automated blending methodology. *J Biomol Tech.* 2005; 16(4): 327-35.
- Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* 2003; 49(7): 1041-4.
- 5. Temesi D, Law B. LC-GC Int. 1999; 17: 626-32.
- Lauber MA, Koza S, Fountain KJ. Increasing Peak Capacity in Reversed-phase Peptide Separations with Charged Surface Hybrid (CSH) C<sub>18</sub> Columns. Waters Application Note 720004568EN. 2013 Jan.
- Chambers EE, Legido-Quigley C, Smith N, Fountain KJ. Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge. *Bioanalysis*. 2013; 5 (1).
- Gillece-Castro BL, Wheat TE, Mazzeo JR. Waters Application Note 720001792EN. 2011 July.

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

 日本ウォーターズ株式会社
 www.waters.com

 東京本社 〒140-0001
 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

 大阪支社 〒532-0011
 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

 ショールーム
 東京 大阪 大阪

 テクニカルセンター
 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、UPLC および MassLynx は Waters Corporation の登録商標です。 CSH、Q-Tof、MassPREP および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。 その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。