[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ionKey/MSによる血漿中の治療薬および内因性の環状ペプチドの定量における高感度化およびサンプル使用量の削減

Mary E. Lame, Erin E. Chambers, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford MA, USA

アプリケーションのメリット

- 血漿100µLのみで、LOQ＜1pg/mLの高感度分析
- ionKey/MS を使用することで、血漿わずか 25 µL で、2.5 pg/mL の検出限界を達成
- ミックスモードの固相抽出（SPE）を用いることで、血漿抽出物のマトリックスによるレスポンスの抑制と促進を低減
- 96 ウェル µElution プレートは、吸着によるペプチドのロスを最小限にし、溶液状態でのサンプル濃縮を可能に
- 手間の掛かるイムノアフィニティー精製無しで、選択性のある迅速な SPE 抽出（＜30 分）
- 2.1 mm 内径のカラムと比較して溶媒の消費量が 1/40 となり、大幅なコスト削減

ウォーターズのソリューション

ionKey/MS™ システム
ACQUITY UPLC® M-Class システム
ionKey™ イオン源
Xevo® TQ-S 質量分析計
iKey™ カラムデバイス
Oasis® WCX 96 ウェル µElution プレート
ACQUITY® コレクションプレート
MassLynx® v. 4.1

キーワード

バイオアナリシス、Oasis、サンプル前処理、ペプチド定量、octreotide、desmopressin、vasopressin、UPLC、2D テクノロジー、血漿、ionKey/MS、iKey

はじめに

治療薬として使用されているペプチドやタンパクは、ここ数年で著しく増加しています。そのためトキシコキネティクス（TK）や薬物動態研究のための分析の必要性も同様に増加しています。

歴史的に、生物製剤はリガンド結合法（LBA）によって定量されてきました。しかし質量分析計（MS）と液体クロマトグラフィー（LC）技術の近年の進歩により、最近では生物製剤溶液におけるペプチド定量の最新のアプローチとして、LC-MS/MS が含まれるようになりました。これは、LBA 法で課題とされる、著しい交差反応と標準化の問題が解決されていないという現実によって、余儀なくされている面もあります。加えて LC-MS/MS には、非常に高い正確度と精度、広範なダイナミックレンジ、特異性、メソッド開発の迅速さといったメリットもあります。しかしながら、LC-MS/MS によるペプチドの正確な定量に、課題が無いというわけではありません。ペプチドは、多様な薬物動態プロファイルを持ち、多くの場合、血漿中を循環する濃度が低く（pg/mL）、一般に高い MS 感度に加え、内因性の同重体マトリックスによる抑制[1]からのクロマトグラフィー分離が必要です。そのため pg/mL の低濃度での定量下限値を得るには、多くの場合、大量の血漿試料量（0.2–1 mL）と試料注入量が、必要となります[2-6]。創薬研究において、この量は多くの場合、非現実的です。このように少ないサンプル量でのバイオアナリシスの要望がある一方で、感度の維持と向上が、非常に望まれています。

このアプリケーションは、治療薬および内因性の環状ペプチド（desmopressin、vasopressin、octreotide[7-9]）に求める試料量の削減と感度の改善について研究したものです。対象としたペプチドの一般特性を表 1 に示します。選択的な µElution ミックスモード SPE サンプル前処理に、最適な MS のプリカーサーとフラグメントの選択、さらに ionKey/MS システム（図 1 にイオン源の写真）を組み合わせて用いることで、血漿中で 1 pg/mL の定量下限が得られました。ionKey/MS システムの特性を充分に活用することで、25–100 µL にまで血漿試料を減少させることを容易にします。

実験方法

測定条件

UPLC条件

システム：　ACQUITY UPLC M-Class、バックフラッシュ溶出のトラップ接続

分析カラム：　HSS T3、1.7 µm、130 Å、150 µm × 100 mm iKey (p/n 720007261EN)

トラップカラム：ACQUITY UPLC M-Class Symmetry® C_{18}、5 µm、300 µm × 50 mm (p/n 720007498EN)

移動相 A：　0.1% ギ酸水溶液

移動相 B：　0.1% ギ酸含有アセトニトリル

ローディング溶媒：移動相 A : B = 98 : 2　25 µL/min、2 分

バルブ位置：　初期ポジション 1（トラップへのフォワードローディング）、2 分後ポジション 2 へ切り替え（トラップ溶出物をバックフラッシュで分析カラムへ）

分析グラジエント：表 2 参照

流速：　3.0 µL/min

カラム温度：　75℃

サンプル温度：15℃

注入量：　5 µL

サイクル時間：12.0 分

測定プレート：Waters 1 mL ACQUITY コレクションプレート

MS条件

システム：　Xevo TQ-S

イオン化モード：ESI ポジティブ

キャピラリー電圧：3.8 kV

ソース温度：　120℃

コーンガス流量：100 L/hr

コリジョンセル圧力：　5.5 × 10 (-3) mbar　コリジョンエネルギーは成分毎に最適化、表 3 参照

コーン電圧：　化合物毎に最適化、表 3 参照

データ管理

基本ソフト：MassLynx v 4.1

定量ソフトウェア：TargetLynx™

ペプチド	アミノ酸配列	MW	pI	HPLCインデックス
Octreotide	8Phe-Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol [Disulfide bridge: 2-7]	1019	9.3	40.8
Desmopressin	Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH2 [Disulfide Bridge: 1-6]	1069	8.6	16.8
Vasopressin	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH2 [Disulfide Bridge: 1-6]	1084	9.1	7.6

表 1. ペプチドの化学的性質

図 1. ionKey ソース

Gradient:	Time (min)	Profile %A	%B	Curve
	0.0	98	2	6
	5.0	50	50	6
	5.5	50	50	6
	7.0	10	90	6
	8.0	10	90	6
	9.0	98	2	6

表 2. LC グラジエント条件

試料調製

サンプル前処理

ヒト血漿 100 µL を 4 % リン酸水溶液で 1:1 に希釈し、混合しました。

Oasis WCXによるサンプル抽出

前処理した血漿試料を、図 2 のプロトコールに従って抽出しました。全ての溶液は容量で示されています。サンプルの入っている µElution プレートの全ウェルに対して、各抽出ステップを行いました。

Oasis WCX
µElution プロトコール

商品番号: 186002499
コンディショニング: 200 µL メタノール
平衡化: 200 µL 水
ロード: 200 µL 前処理した血漿試料
洗浄 1: 200 µL 5% アンモニア水
洗浄 2: 200 µL 10% アセトニトリル水溶液
溶出: 2 x 25 µL 2% ギ酸含有 アセトニトリル / 水=50:50
希釈: 50 µL 水

図 2. Oasis µElution WCX 抽出プロトコール

結果および考察

質量分析計

desmopressin（*m/z* 535.45）、vasopressin（*m/z* 542.75）、octreotide（*m/z* 510.30）の 2 価のプリカーサーを定量に用いました。表 3 に、それぞれに対応するフラグメントと最適な MS 条件を示します。この分析では、ペプチドのサイズが小さく環状であることから、特異性の高い b/y イオンに固有のフラグメントを使用することが、大きな課題となりました。desmopressin と vasopressin では、y31+ のイオンに相当する *m/z* 328.2 のフラグメントを選択しました。Octreotide は、フェニルアラニンのインモニウムイオンである *m/z* 120.1 のフラグメントを使用しました。

ペプチド	プリカーサー	MRMトランジッション	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）	プロダクトイオンタイプ
Desmopressin	$[M+2H]^{2+}$	535.4>328.2	40	12	$y3^{(1+)}$
Vasopressin	$[M+2H]^{2+}$	542.7>328.2	40	14	$y3^{(1+)}$
Octreotide	$[M+2H]^{2+}$	510.3>120.1	25	17	immonium ion (Phe)

表 3. 環状ペプチドの MS 条件

クロマトグラフィー分離

クロマトグラフィー分離は、これまでにないマイクロフローの分離デバイス（iKey）を用いて行いました。iKey（図 3）は、高圧での分析が可能で、UPLC® グレードの 2 µm 以下の粒子が充填されているため、高性能な LC 分離をもたらします。マイクロスケールの LC 部品を統合した一体型のデザインによって、マニュアルでのばらつき、液漏れや必要以上のデッドボリュームを含めてキャピラリー接続部に関連する問題を解消しています。HSS T3、1.8 µm、130 Å、150 µm × 100 mm iKey を使用することで、クロマトグラフィーにおける保持や優れたピーク形状、シャープなピーク幅（<ベースラインで 4.5 秒）、そして内因性マトリックスによる抑制成分との分離をもたらします。

図 3. iKey クロマトグラフィー分離デバイス

ペプチドの溶出は、2–50%B のリニアグラジエントを 5 分かけて行いました（表 2）。図 4 には、クロマトグラムの代表例を示しています。トラップとバックフラッシュ溶出を用いたことで、更に試料の精製を行い、（ペプチドの溶解性を維持するのに必要な）高い有機溶媒組成の SPE 抽出物 5 µL をロードしても対象成分が滑って保持しないという問題を回避することができます。さらに一般的な 2.1 mm 分析スケールの LC 分析におけるサンプル量を iKey に注入できるため、複雑なマトリックス中に含まれる数 pg/mL 濃度のペプチドやタンパクを確実かつ正確に検出するために要求される感度について、大幅な改善が可能です。

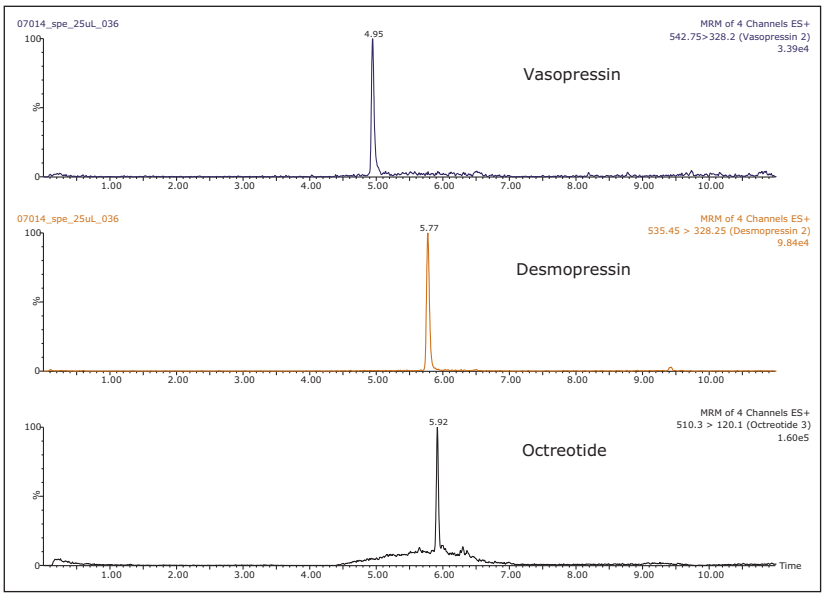

図 4. HSS T3, 1.8 µm、130Å、150 µm × 100 mm iKey を用いた desmopressin、vasopressin、octreotide の UPLC 分離

ionKey/MSによる感度の改善

分析スケール（2.1 mm I.D.）に対して、ionKey/MS は、高感度ペプチド分析に理想とされる全般的な感度の向上を可能にします。このことは、感度の維持または向上をする一方で、より少ないサンプル容量の使用においても有用です。図 5 と 6 では、ヒト血漿 25、100、200 µL の抽出物から、2.5 pg/mL の desmopressin と octreotide が、注入量 ≤10 µL で容易に検出されています。

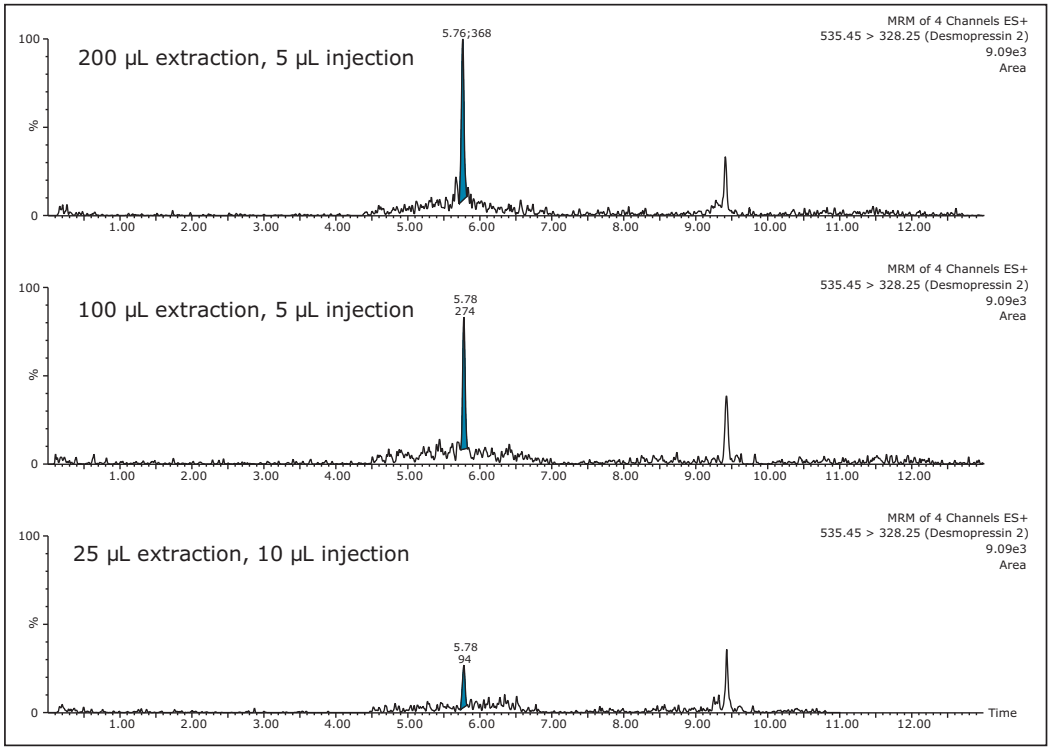

図 5. ionKey/MS による感度の向上：desmopressin（2.5 pg/mL）をヒト血漿から抽出する量による比較

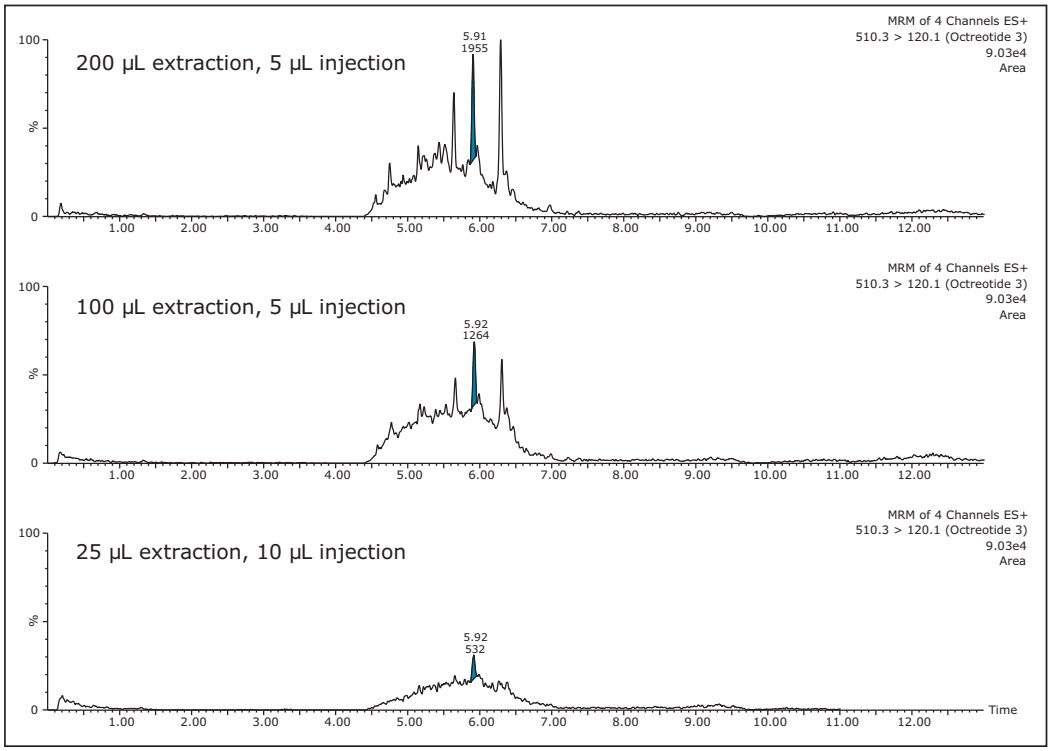

図 6. ionKey/MS による感度の向上：octreotide（2.5 pg/mL）をヒト血漿から抽出する量による比較

試料調製

SPE は、保持において逆相とイオン交換モードの両方を持ち合わせた Oasis WCX を用いて行いました。このようなミックスモード固相を使用することで、これらのペプチドに必要とされている選択性や感度の向上をもたらし、サンプルのより優れたクリーンアップを可能にします。Desmopressin、vasopressin、octreotide を、血漿にいくつかの濃度を添加し、混合しました。これらの試料を、4% リン酸で酸性にすることは、タンパク結合による吸着やサンプルの粘性を弱め、充填剤との接触時間の改善に役立ちます。

SPE にロードした試料は、5% アンモニア水に続いて 10% アセトニトリル水溶液で洗浄しました。最適な溶出溶媒は、有機溶媒 50%、水 25%、ギ酸 2% でした。

96 ウェルの Oasis µElution プレートフォーマットは、迅速な試料の処理（30 分未満）を容易にし、大部分の溶液操作をロボットシステムによる自動化にも対応しており、試料のスループットが向上します。さらに、このフォーマットは、極微量の試料量での溶出を可能とし、吸着によるペプチドの減少に対する可能性を最小限にするだけでなく、感度向上のために求められる試料の濃縮も行えます。

直線性、正確度、精度

ヒト血漿に最終濃度 1、2.5、5、10、25、50、100、250、500、1000、2000 pg/mL で添加した desmopressin、vasopressin、octreotide の直線性、精度と正確性を求めるため検量線を作成しました。添加した血漿サンプルの SPE は、上述の通りに行いました。検量線は、検量線試料のピーク面積を用いて 1/ 濃度（1/x）の重み付けによる直線の回帰モデルで作成しました。100 µL の血漿を用いて、それぞれのペプチドに対する検量線の結果を、図 7 の A、B、C に示します。

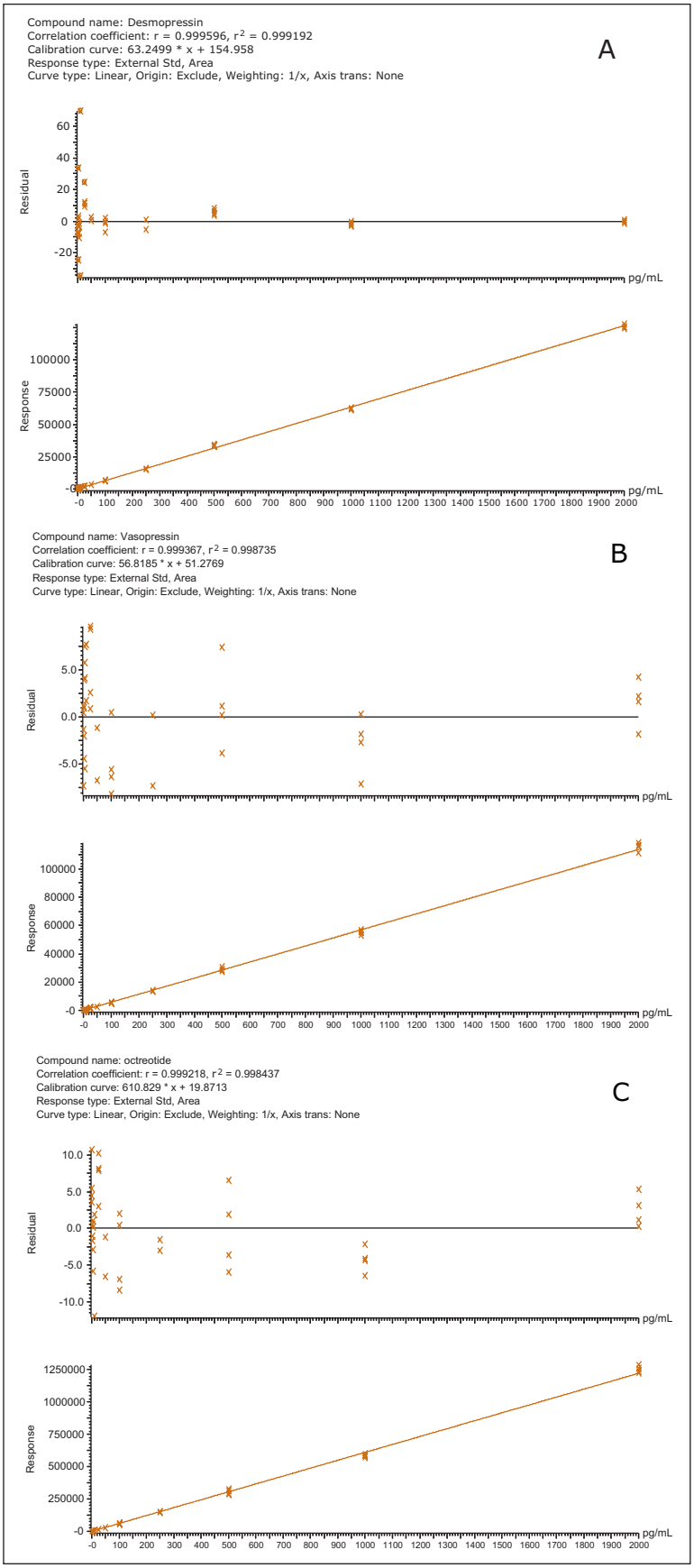

図 7. 血漿から抽出した desmopressin（A）、vasopressin（B）、octreotide（C）の検量線結果

検量線の結果サマリーを、表 4 に示します。1/X の重み付けを用いて、1–2,000 pg/mL の範囲における R^2 は、モニターした 3 つの全てのペプチドにおいて＞ 0.99 でした。血漿から抽出した Desmopressin、vasopressin、octreotide の標準試料のクロマトグラムの代表例を図 8 -10 に示します。

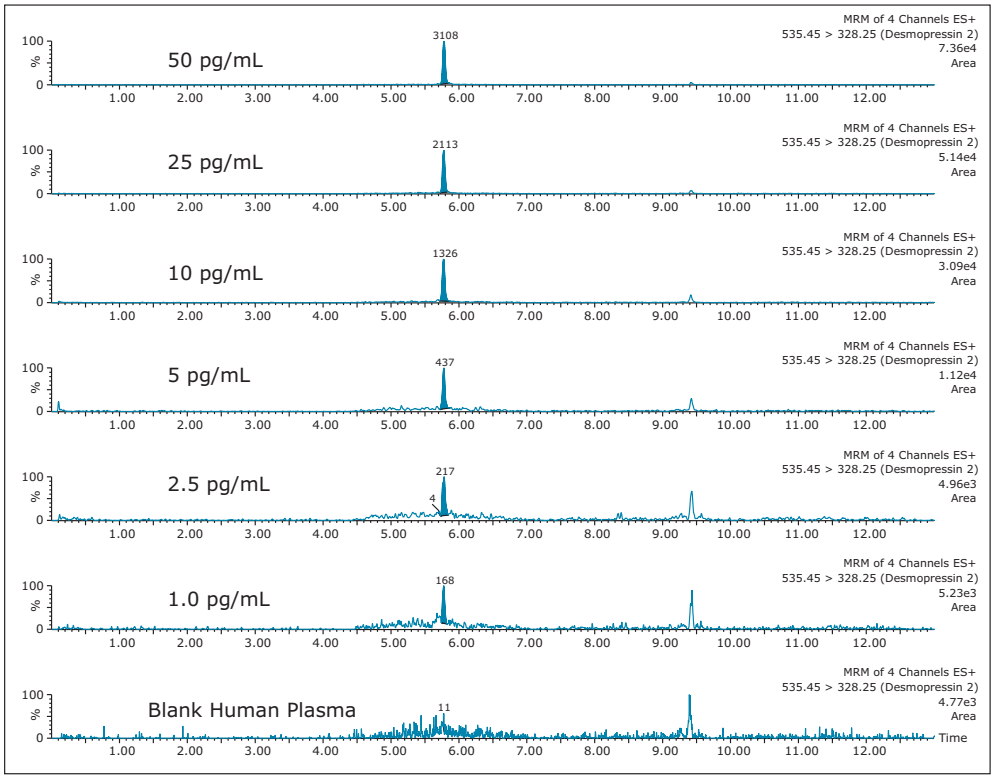

図 8. 血漿から抽出した 1、2.5、5、10、25、50 pg/mL の desmopressin とブランク血漿を比較したクロマトグラム例

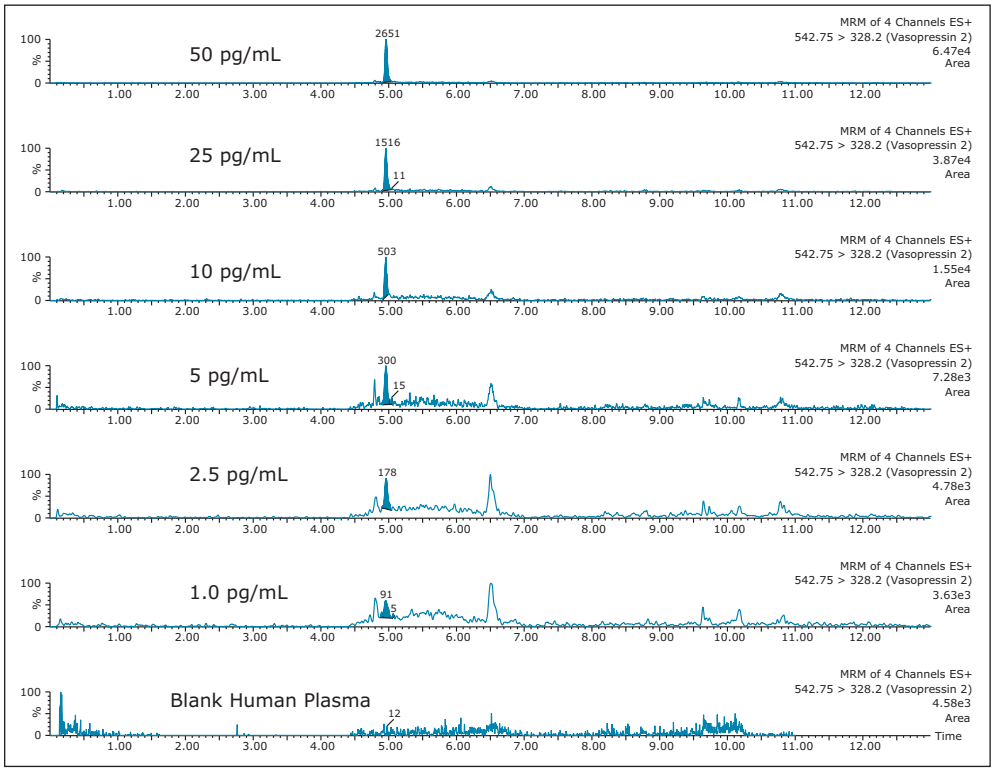

図 9. 血漿から抽出した 1、2.5、5、10、25、50 pg/mL の vasopressin とブランク血漿を比較したクロマトグラム例

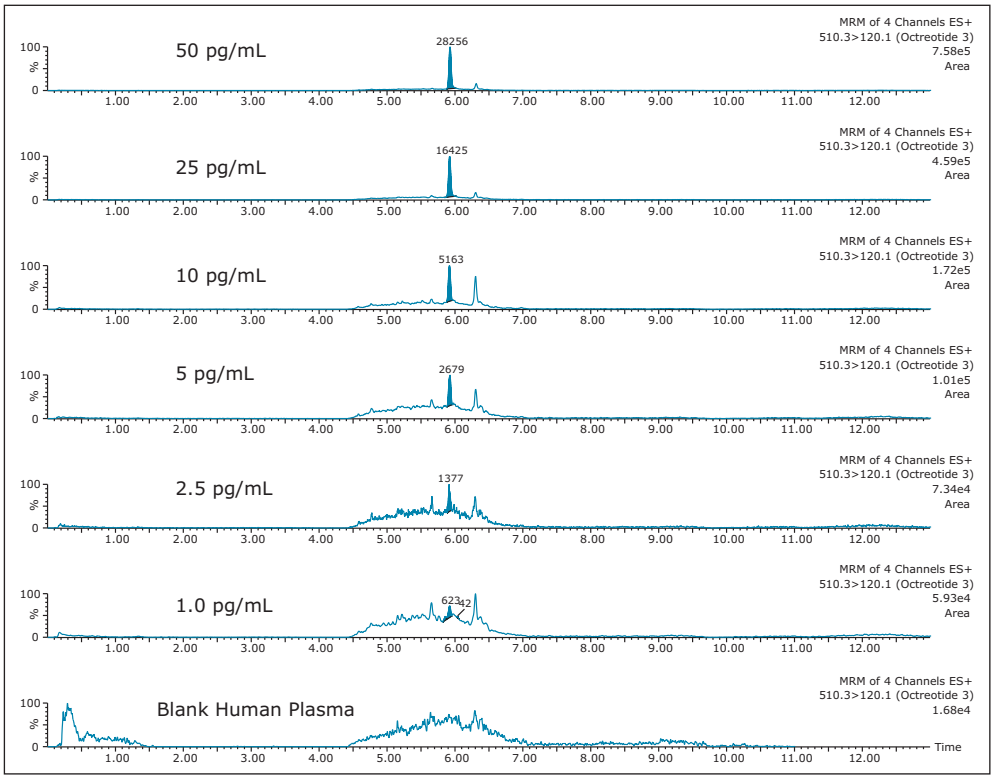

図 10. 血漿から抽出した 1、2.5、5、10、25、50 pg/mL の octreotide とブランク血漿を比較したクロマトグラム例

Desmopressin 血漿濃度 (pg/mL)	面積	Desmopressin 計算濃度 (pg/mL)	平均精度
1.0	215	0.95	94.8
2.5	319	2.58	103.5
5.0	453	4.70	94.3
10.0	898	11.75	117.5
25.0	1965	28.63	114.5
50.0	3363	50.70	101.5
100.0	6376	98.35	98.4
250.0	15625	244.60	97.9
500.0	33594	528.68	105.7
1000.0	62242	981.60	98.2
2000.0	126145	1991.95	99.6

Vasopressin 血漿濃度 (pg/mL)	面積	Vasopressin 計算濃度 (pg/mL)	平均精度
1.0	107	0.98	98.9
2.5	193	2.50	99.9
5.0	344	5.15	103.1
10.0	646	10.50	104.8
25.0	1551	26.38	105.6
50.0	2781	48.05	96.1
100.0	5454	95.08	95.1
250.0	13751	241.10	96.5
500.0	28805	506.05	101.2
1000.0	55252	971.53	97.2
2000.0	115450	2030.98	101.5

Octreotide 血漿濃度 (pg/mL)	面積	Octreotide 計算濃度 (pg/mL)	平均精度
1.0	668	1.06	106.0
2.5	1474	2.38	95.3
5.0	3017	4.91	98.1
10.0	5820	9.50	95.0
25.0	16404	26.82	107.3
50.0	29385	48.08	96.2
100.0	59131	96.77	96.8
250.0	149267	244.34	97.8
500.0	304504	498.48	99.7
1000.0	584899	957.52	95.8
2000.0	1251918	2049.51	99.7

表 4. 検量線結果のサマリー

結論

ionKey/MS とミックスモード µElution SPE の組み合わせにより、選択性を改善し、同時に試料量の著しい削減を求められる中で感度の向上が実現します。µElution フォーマットの SPE を使用することで、エバポレートの必要性がなく、吸着や非特異的な結合によるペプチドのロスを抑えます。内径 150 µm の iKey クロマトグラフィーデバイスは、vasopressin、desmopressin、octreotide を LOD ＜ 1pg/mL、1–2,000 pg/mL の検量線範囲で同時に検出するための高感度で低流量の定量 MRM 条件の開発を可能とします。この分析では、100 µL の血漿を用いて、分析スケール（2.1 mm I.D.）の S/N を超える著しい感度の改善をもたらします。

さらに 2.5 pg/mL の検出限界を、僅かに 25 µL の血漿から得ることができます。その上、ionKey/MS は、溶媒や試料の消費を抑えるため、コストを削減し、精度の改善や実行する為のサンプルの注入回数を増やすことも可能にします。

参考文献

1. Ewles M, Goodwin L, Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC–MS/MS. *Bioanalysis* (2011) 3(12), 1379–1397.
2. Jiang Y, Wang J, Wang Y, Du X, Zhang Y, Fawcett JP, Gu J, Determination of long-acting release octreotide, an octapeptide analogue of somatostation, in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; 21: 3982–3986.
3. Sidibé J, Varesio E, Hopfgartner G, Quantification of ghrelin and des-acyl ghrelin in human plasma by using cubic-selected reaction-monitoring LCMS. *Bioanalysis* May 2014, Vol. 6, No. 10, Pages 1373–1383.
4. Kim MK1, Lee TH, Suh JH, Eom HY, Min JW, Yeom H, Kim U, Jung HJ, Cha KH, Choi YS, Youm JR, Han SB, Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of goserelin in rabbit plasma. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 2235–2242.
5. Neudert, L, Zaugg M, Wood S, Struwe P, High Sensitivity Dual Solid Phase Extraction LC-MS/MS Assay for the Determination of the Therapeutic Peptide Desmopressin in Human Plasma. *Celerion eHistory*, accessed July 6, 2014, http://celerion.com/wordpress/wp-content/uploads/2011/09/A-High-Sensitivity-Dual-Solid-Phase-Extract-LC-MSMS-Assay-for-the-Determination-of-the-Therapeutic-Peptide-Desmopressin-in-Human-Plasma_2011.pdf
6. Morin LP, Landry F, Mess JN, Jonakin K, Aiello M, Misonne X, Gary Impey, Cardenas J and Garofolo F, Challenge in Trying to Reach Femtogram per Milliliter (fg/mL) Sensitivity in Plasma for the Quantification of a Cyclic Peptide: Desmopressin. Poster session presented at: 61st Annual Conference of the American Society for Mass Spectrometry; 2013 June 9–13; Minneapolis, MN.
7. JHP (2010) Vasopressin Injection United States drug package insert http://www.parsterileproducts.com/products/PI/00011052013/JHP-Pharmaceuticals-Pitressin-00011052013.pdf
8. Ferring (2008) Desmopressin United States drug package insert. http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM215090.pdf
9. Novartis (1988) Octreotide United States drug package insert http://www.pharma.us.novartis.com/cs/www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/sandostatin_lar.pdf

Waters

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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY UPLC、Xevo、Oasis、ACQUITY、MassLynx、Symmetry、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。ionKey/MS、ionKey、iKey および TargetLynx 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。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan.

2015年5月 720005128JA PDF