

ペプチドマッピングにおける クロマトグラフィー性能の向上

Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムの活用

著者

Jordy Hsiao, Mahsan Miladi,
Li Gu, Stephen Sciuto,
Guannan Li, and
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

概要

本研究では、Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムをペプチドマッピングに使用した場合の性能上の利点について調査しました。Altura カラムはステンレス製カラムと比べて、特に疎水性ペプチドと修飾ペプチドのピーク形状、再現性、分解能が優れています。合成 mAb ペプチドとトリプシン消化したハーセプチンの LC/MS 分析では、イナートカラムによって翻訳後修飾を確実に同定でき、脱アミド化ペプチドのピーク形状と分解能が改善されました。脱アミド化変異体に対する分離能の向上は、高感度かつ高精度を必要とするバイオ医薬品ワークフローにおいてイナートカラムを活用できることを示しています。

はじめに

ペプチドマッピングはバイオ医薬品開発における重要な技術であり、タンパク質配列の確認と翻訳後修飾（PTM）の同定に使用されます。ただし、液体クロマトグラフィー（LC）ハードウェア内での分析対象物と金属表面の相互作用により、特に荷電ペプチドやリン酸化ペプチドで感度や分解能が低下する可能性があります。最近の研究で、これらの問題を軽減するには不活性な流路やカラムハードウェアが重要であることが明らかになっています。^{1, 2}

以前の研究では、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを用いたペプチドマッピングメソッドを最適化し、ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラムと UHPLC システムのサブ 2 µm 粒子を活用して、分析時間を 2.5 時間から 1 時間に短縮しました。³ 分析時間の大幅な短縮にも関わらず、AdvanceBio ペプチドマッピングと ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラムの間のペプチド溶出パターンは同等でした。これは、カラム技術が異なってもメソッドを移管でき、分析結果の一貫性を確保できることを示しています。この改良により、性能を低下させずにサンプルスループットを上げ、溶媒の消費量を減らすことができます。

さらなる性能の向上のため、Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムにはウルトライナートテクノロジーが採用されています。ステンレス（SS）の機械的強度を維持しながら、金属と分析対象物間との相互作用を最小限に抑制できるよう設計されています。本研究では、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを使用して合成ペプチドサンプルと分解済みモノクローナル抗体（mAb）サンプルの LC/MS/MS 分析を実行し、Altura イナートカラムと従来の SS カラムの性能を比較します。

実験方法

サンプル前処理

前述のプロトコル⁴に従ってハーセプチンを分解し、修飾しました。具体的には、タンパク質と酵素の比率を 50:1 にして、トリプシンで分解しました。以前のプロトコルでは、トリプシン/LysC をタンパク質と酵素の比率を 25:1 として実施し、またサンプルクリーンアップ手順は行いませんでした。

LC/MS 分析の前に、C18 スピンカラムでサンプルをクリーンアップしました。これは不純物を除去し、カラム寿命を延ばすためです。

分析カラム

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラム、2.1 × 150 mm、1.8 µm（部品番号 959759-902）
Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラム、2.1 × 150 mm、1.8 µm（部品番号 204215-308）

機器

LC/MS 分析は、以下の機器構成を使用して実施しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ（G7132A）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ、サンプルサーモスタット付き（G7137A）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（G6549AA）

表 1. LC パラメータ

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム		
パラメータ	設定値	
移動相 A	水 + 0.1 % 酢酸	
移動相 B	アセトニトリル + 0.1 % 酢酸	
カラム温度	60 °C	
流量	0.4 mL/min	
サンブラ温度	8 °C	
合成ペプチドのグラジエント 1	時間（分）	%B
	0.00	2
	1.00	2
	7.00	38
	7.10	80
	9.00	80
	9.10	2
	14.0	2
ハーセプチントリプシン分解物のグラジエント 2	時間（分）	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

表 2. MS パラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
パラメータ	設定値
イオン源	デュアル AJS ポジティブ ESI
イオン源	
乾燥ガス温度	250 °C
乾燥ガス流量	10 L/min
シースガス温度	250 °C
シースガス流量	12 L/分
ネブライザ圧力	25 psi
キャピラリ電圧	3,500 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	95 V
スキマ電圧	50 V
データ取り込み - MS	

パラメータ	設定値
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	m/z 100 ~ 3,000
スキャン速度	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	121.0509、922.0098
データ取り込み - MS/MS	
取り込みモード	自動 MS/MS
質量範囲	m/z 100 ~ 3,000
スキャン速度	3 スペクトル/秒
選択幅 (MS/MS)	中 (~ 4 amu)
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	5
MS/MS のスレッシュホールド	6,000 カウントおよび 0.001 %
プリカーサ電荷	2+, 3+, > 3+
ターゲット	50,000 カウント/スペクトル

表 3. MS/MS コリジョンエネルギー
パラメータ

ランプコリジョンエネルギー		
電荷	傾き	オフセット
2	3.1	1
3	3.6	-4.8
> 3	3.6	-4.8

表 4. Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア、バージョン 12.1 処理パラメータ

ワークフローとシーケンシング		
ワークフロー	タンパク質分解物	
条件	還元	
シーケンス	ハーセプチン（直接アルキル化）、トリプシン	
変異体修飾	脱アミド化、G0、G0F、G0F-GlcNAc、G2、G2F、H5N3F1-1、メチル化、酸化（M、W）、pyroGlu（E）	
酵素	トリプシン	
ペプチド検出		
生体分子フィルタ	MS/MS スキャンを含む分子を表示	有効化
抽出	ピーク高を使用	≥ 600 カウント
イオン種	ポジティブイオン	H ⁺ 、Na ⁺ 、K ⁺ 、NH ₄ ⁺
電荷状態	同位体モデル	ペプチド
	割り当てられる電荷状態の制限範囲	1 ～ 5
ピークフィルタ（MS/MS）	高さフィルタ、絶対高が有効	≥ 50 カウント
一致許容範囲		
質量一致	± 5 ppm MS1、± 20 ppm MS2	
スコアリング	スコアが < 7.00 の場合は警告	
	スコアが < 5.00 の場合は不一致（配列カバー率）	
マッチングルール	MS/MS フラグメンテーションタイプ	CID
	切断ミスの数	2
	生体分子あたりの一致の最大数	3
	ペプチド長範囲	3 ～ 70
	N 末端または C 末端の切断のみ可	選択
	最大モジュール数	2

結果と考察

イナートカラムハードウェアによるクロマトグラフィー改良の評価

ペプチドマッピングワークフローにおける Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムハードウェアの性能上の利点を評価するため、これを SS ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラムと比較しました。1290 Infinity II Bio LC システムと 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の組み合わせを用いて、mAb 配列を含む合成ペプチド混合物を分析しました。

抽出イオンクロマトグラムの最初の重ね表示（図 1）では、両方のカラムのリテンションタイムは同等です。ただし、個々のペプチドを詳しく調べると、信号強度、ピーク形状、分解能が明確に異なることがわかります（図 2）。例えば、疎水性の塩基性ペプチド VVSVLTVLHQDWLNGK については、Altura カラムより SS カラムのほうが、ピーク幅が広く信号強度が弱くなっています。これは、SS ハードウェアにおける金属と分析対象物間の相互作用が、サンプル回収率やクロマトグラフィー性能に影響する可能性があることを示しています。

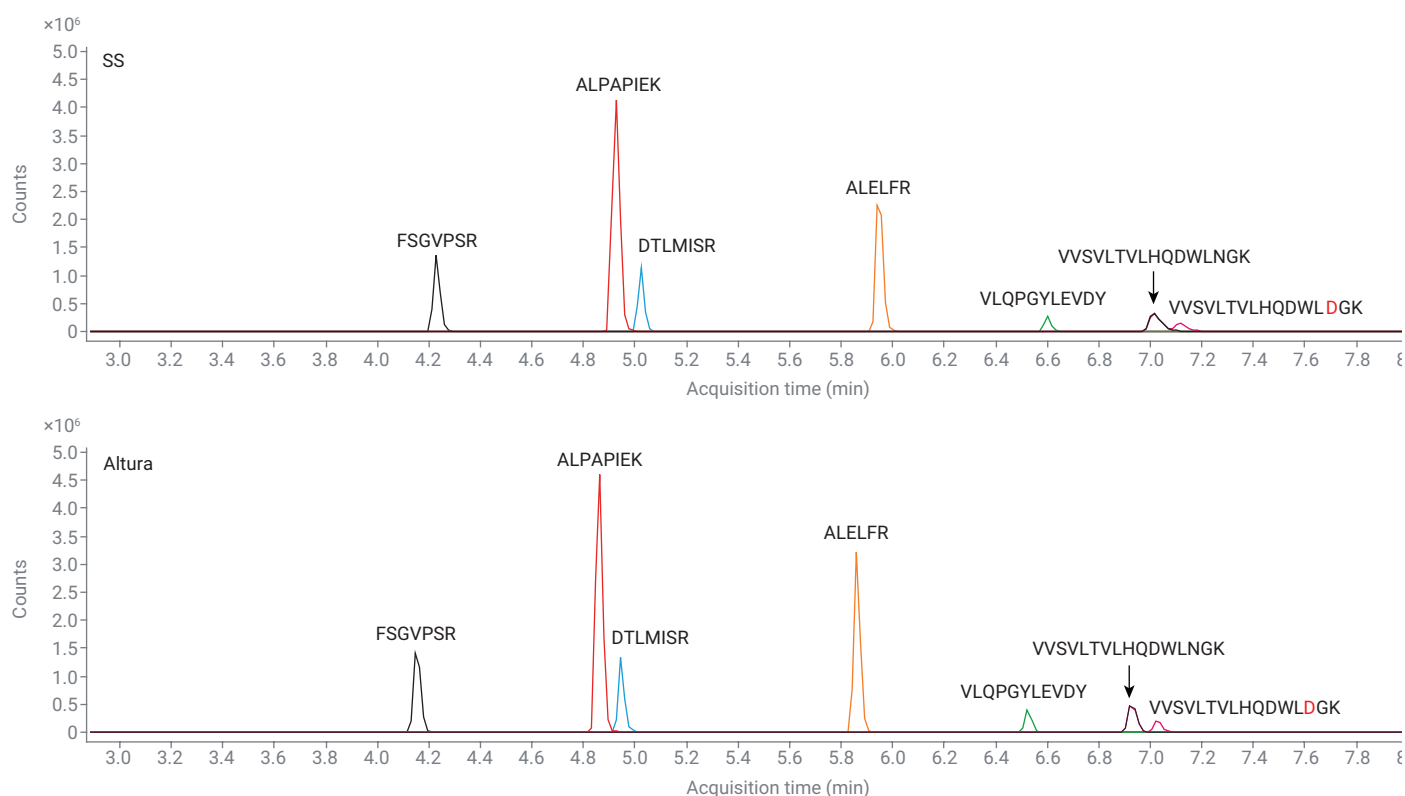


図 1. ステンレス製 (SS) カラムハードウェアと Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムハードウェアによる合成モノクローナル抗体ペプチドのクロマトグラフィー分離

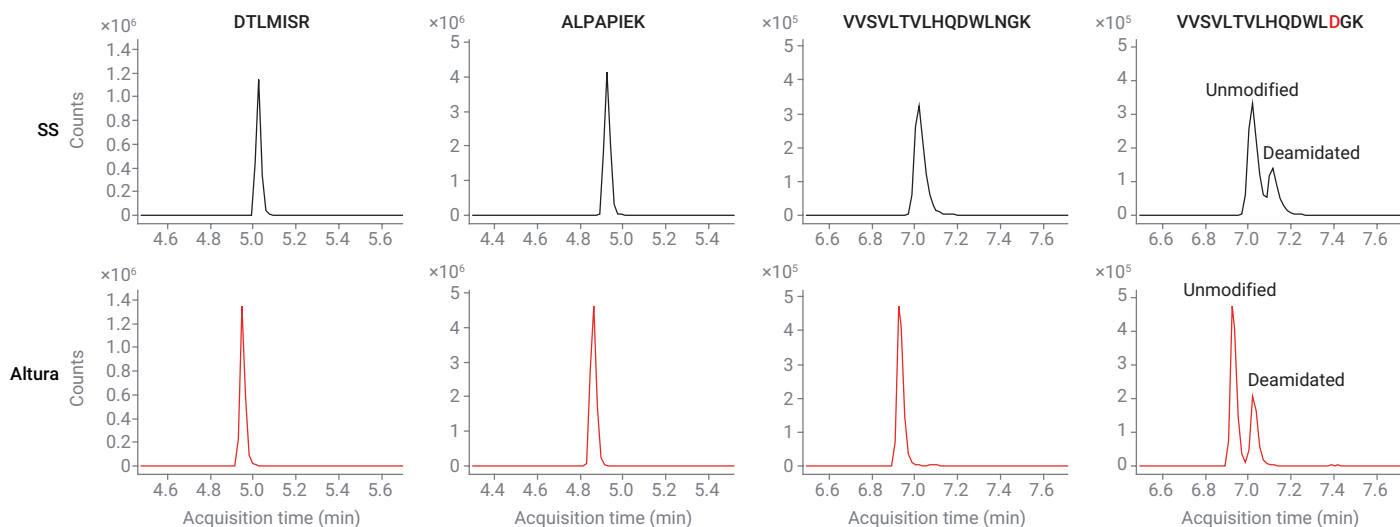


図 2. Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムハードウェアとステンレス製 (SS) カラムハードウェアによる脱アミド化ペプチド分析の比較。イナートカラムのほうがピーク形状と分解能が優れています。

ポジション 14 のアスパラギンがアスパラギン酸に変換されている脱アミド化変異体 VVSVLTVLHQDWLDGK をさらに解析したところ、Altura カラムを用いることで未修飾ペプチドとの分離が向上しました。このような分解能の向上は脱アミド化などの翻訳後修飾や化学修飾を検出するうえで特に役立ちます。これらの修飾は、バイオ医薬品の開発において特性評価が必須となる重要な品質要素です。

イナートカラムハードウェアのメリットの程度を特定するため、新しい SS カラムと Altura カラムに 1 回ブランクを注入して簡単にコンディショニングし、その後に合成 mAb ペプチド混合物を 30 回連続注入しました (図 3)。これらの結果から、ALPAPIEK と DTLMISR で SS カラムが Altura カラムと同等のピーク面積回収率を達成するには、10 回以上の注入が必要であることがわかりました。より疎水性/塩基性が高いペプチドである VVSVLTVLHQDWLNGK の場合、SS カラムで Altura カラムと同等の性能を達成するには、約 20 回の注入が必要でした。これはイナートカラムのほうが安定化が速く、再現性が高いことを示しています。

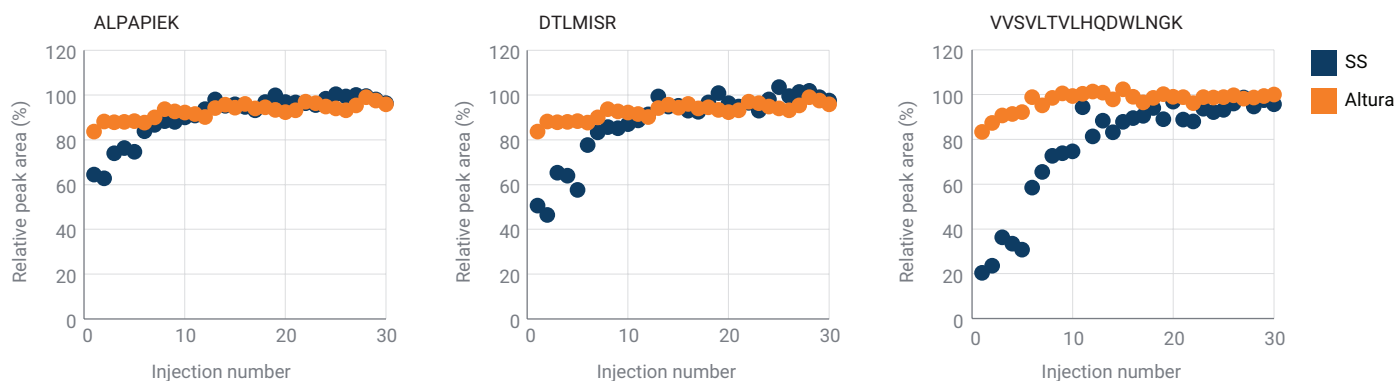


図 3. ステンレス製 (SS) カラムと Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムを用いた合成ペプチドの定量的比較。30 回注入して、相対ピーク面積のトレンドをプロットしています。特に疎水性ペプチドや塩基性ペプチドの場合、Altura ハードウェアのほうが SS カラムより安定化が速く、再現性が高いことがわかります。

クロマトグラフィー性能指標、例えばピークの非対称性の定量に使用されるテーリングファクター（TF）なども、同様の結果を示しています（図4）。ALPAPIEK と DTLMISR の TF は 2 種類のカラム間で類似しており、ピーク形状は同等でした。ただし VVSVLTVLHQDWLNGK の TF は、Altura カラムの結果（平均 TF = 1.3、n = 30）のほうが SS カラムの結果（平均 TF = 1.7、n = 30）よりずっと優れていました。これは図 2 の定性的観察と相関性が高く、イナートハードウェアを使用すると分析困難なペプチドのピーク対称性が向上することを示しています。

30 回の注入の TF をプロットした結果、SS カラムはコンディショニングにより徐々に改善され、最終的に Altura カラムの性能に近くなることがわかりました。ただし、SS カラムでは初期のピーク形状が悪いため、近接して溶出する分析対象物の分離に悪影響がありました（脱アミド化ペプチド VVSVLTVLHQDWLDGK と未修飾の同じ物質など）。図 4C のとおり、Altura カラムではこれらの変異体の間の分解能が高く、化学修飾をより確実に同定できます。

比較的急勾配（6 分間で 6 % B/min）のグラジエントを使用したにもかかわらず、Altura カラムは優れた分離能を達成しました。この結果は、グラジエントを延長するか、その傾きを緩やかにして分解能を上げることで、さらなる最適化の余地があることを示しています。全体的にこれらの結果から、Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムは PTM のクロマトグラフィー性能と化学修飾分解能の向上だけでなく、サンプルスループットと不純物プロファイリングの改善に役立ち、堅牢なペプチドマッピングワークフローに適していることがわかります。

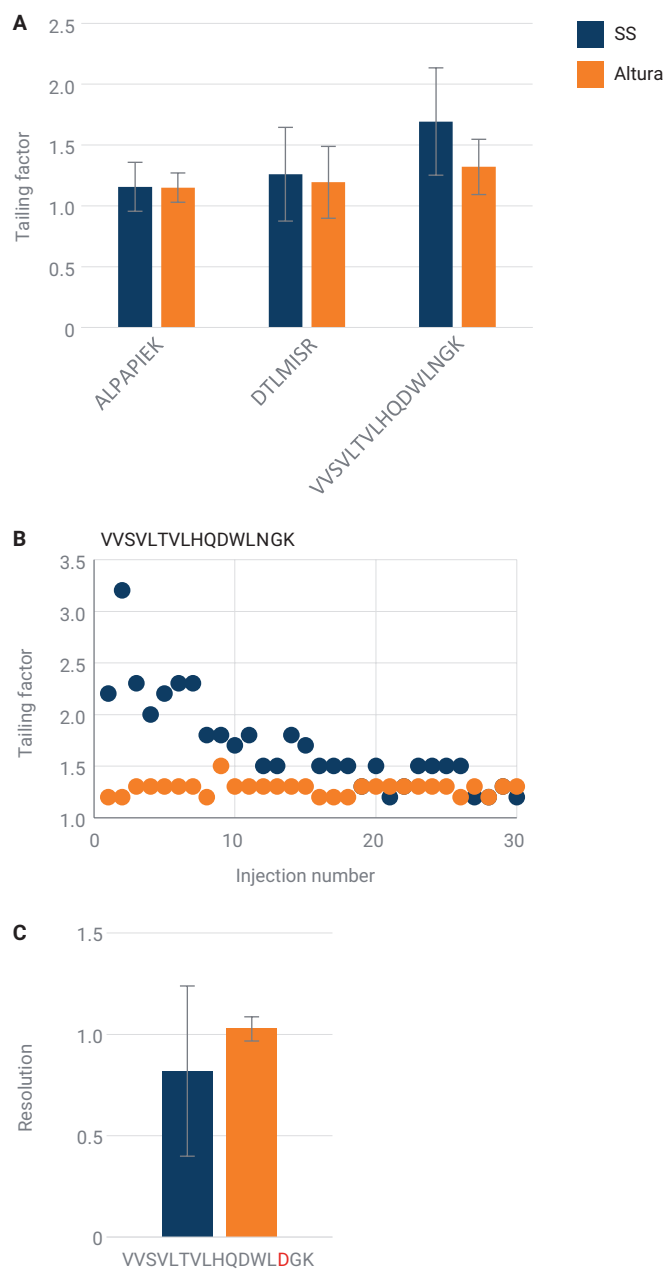
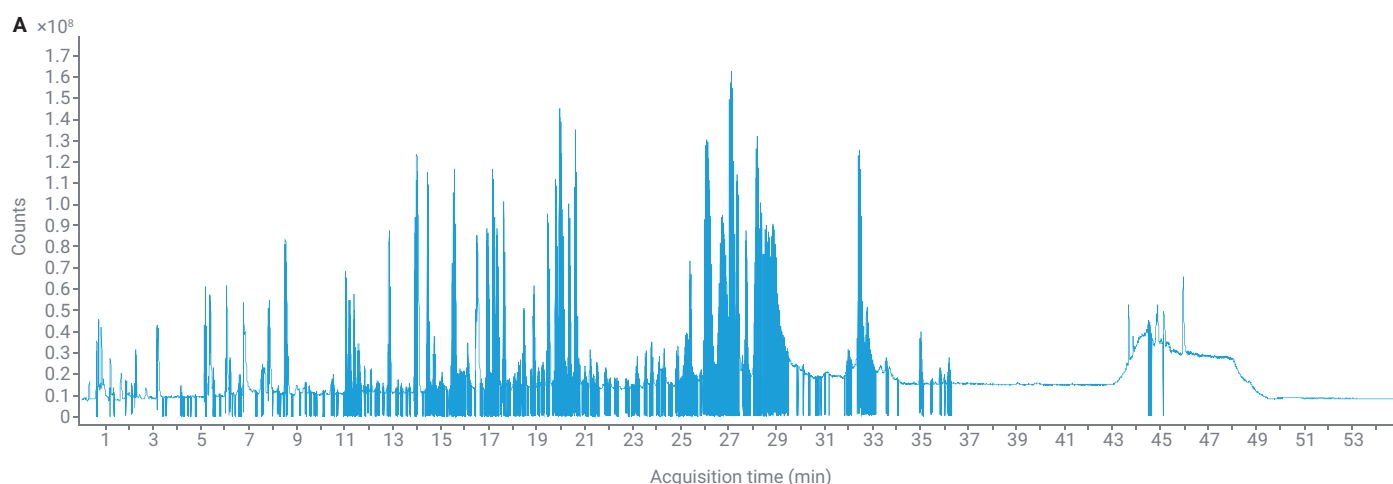


図 4. ステンレス製（SS）カラムと Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムを用いた合成ペプチドのクロマトグラフィー性能指標。
 (A) ALPAPIEK、DTLMISR、VVSVLTVLHQDWLNGK の平均テーリングファクター。
 (B) テーリングファクターは 30 回の注入でプロット。(C) 脱アミド化ペプチドのペア（VVSVLTVLHQDWLDGK と VVSVLTVLHQDWLNGK）の間の分解能。
 Altura カラムは SS ハードウェアと比べて、近接して溶出する変異体のピーク対称性と分離能が優れています。

トリプシン分解ハーセプチンのペプチドマッピング

Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムのメリットが明らかになったため、この技術をトリプシン分解ハーセプチンサンプルのペプチドマッピングに適用しました。分解したサンプルを LC/MS/MS と Altura カラムで分析しました。その結果のトータルイオンクロマトグラム (TIC) と配列カバー率は図 5 のとおりです。この分析の配列カバー率は 87.03 % で、実際に欠損トリプシンペプチドは短くなり、親水性が上がります。

これらの短い親水性ペプチドは、LC/MS/MS 分析の前に実行した C18 のクリーンアップ手順 (「実験方法」セクションを参照) が原因で喪失した可能性があります。この結果は、広範な配列カバー率を目指す将来の実験計画において考慮すべき重要事項を示しています。ハーセプチン分解物のサンプルクリーンアップを使用しなかった以前のアプリケーションノートでは、配列カバー率が 98 % 以下でした。⁴



B Peptide mapping of Herceptin with Trypsin (sequence coverage: 87.03%)

Heavy chain

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR
51	IYPTNGYTRY	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG
101	GDGFYAMDYW	GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
151	DYFPEPTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
201	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPG

Light chain

1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
51	ASFLYSGVPS	RFGSGRSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ
101	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
201	LSSPVTKSFN	RGEC			

図 5. Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムを用いたトリプシン分解ハーセプチンのペプチドマッピング。(A) トリプシン分解ハーセプチンの LC/MS/MS 分析のトータルイオンクロマトグラム (TIC)。(B) 同定されたペプチドを濃青色の文字で示した配列カバーマップ (カバー率 87.03 %)。欠損トリプシンペプチド (水色の文字) は短く親水性が高いという化学的特性があるため、C18 のクリーンアップ手順中にサンプルが喪失しやすくなります。

図 6 に、脱アミド化型のペプチド NTAYLQMDSLRL の CID MS/MS スペクトルを示します。フラグメントイオンデータにより、ポジション 8 で脱アミド化部位を確実に割り当てることができました。これは、翻訳語修飾と化学修飾の特性解析に MS/MS が役立つことを示しています。

脱アミド化ペプチドの特性解析におけるクロマトグラフィー分離の重要性を示すため、図 7 に NTAYLQMNSLR（ネイティブ型と脱アミド化型）の EIC を示します。脱アミド化変異体はマスシフトが 0.98 Da と小さく、信号強度が比較的低いため、これらの形態をクロマトグラフィーで分離することは重要です。質量分析だけではこれらの形態を効果的に分離できません。脱アミド化ペプチドのモノアイソトピックピーク（656.3221 m/z ）が、ネイティブ型ペプチドの 2 番目の同位体ピークと重なっているためです（モノアイソトピックピーク：655.8318 m/z 、2 番目の同位体ピーク：656.3328 m/z ）（差は 16 ppm）。したがって、ペプチドの脱アミド化の正確な同定と定量には、イナートカラムハードウェアによる高分解能のクロマトグラフィー分離が不可欠です。

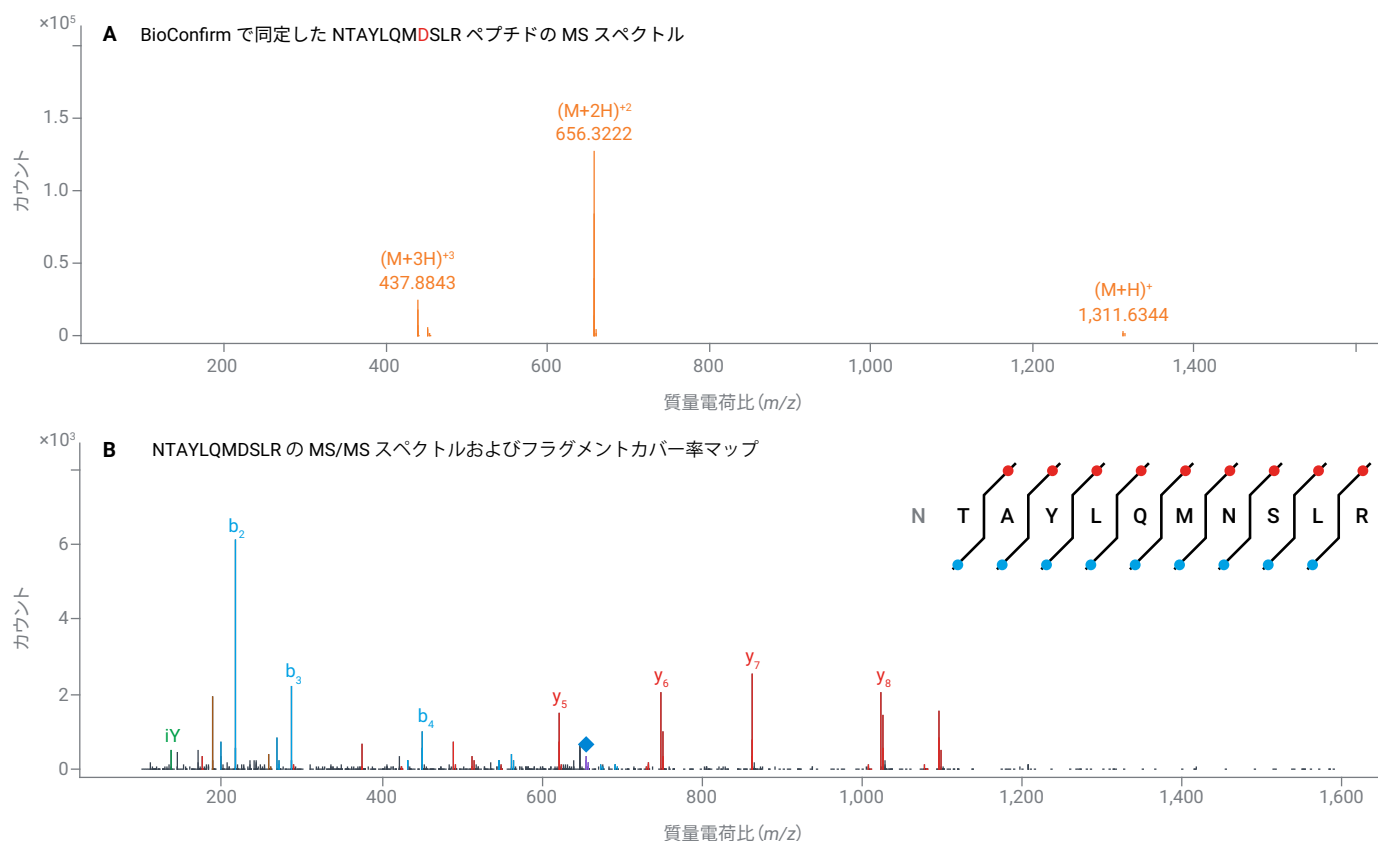


図 6. NTAYLQMDSLRL ペプチドの MS スペクトルおよびフラグメントカバー率マップ。Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いて、フラグメンテーションデータを使用してポジション 8 で脱アミド化を割り当てました。

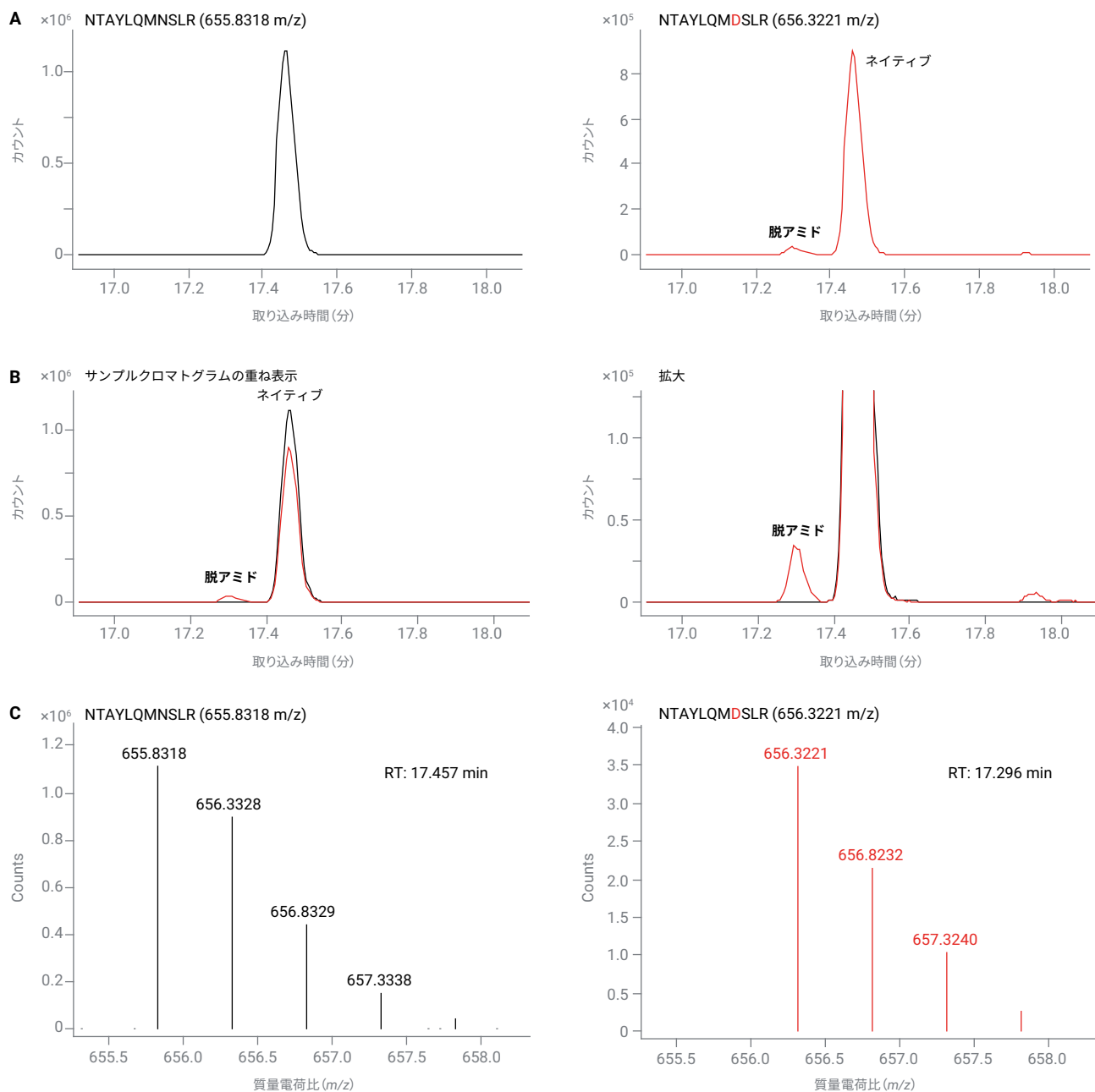


図 7. ネイティブ型と脱アミド化型の NTAYLQMNSLR ペプチドのクロマトグラフィー分離。(A) 2 価以上の電荷状態での、ネイティブ型 (655.8318 m/z) と脱アミド化型 (656.3221 m/z) のプリカーサ質量を用いた抽出イオンクロマトグラム。(B) 個々のクロマトグラムを重ねて、ネイティブ型ペプチドと脱アミド化型ペプチドの間のクロマトグラフィー分離を示した図。クロマトグラムの拡大図は、低濃度不純物の分離を示しています。(C) ネイティブ型ペプチドと脱アミド化型ペプチドの質量スペクトルを見ると、ネイティブ型から脱アミド化型をクロマトグラフィー分離する必要があることがわかります。質量スペクトルだけでは、これら 2 種類の型が共溶出した場合に区別できません。

結論

本研究では、Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムハードウェアをペプチドマッピングワークフロー、特に mAb ペプチドと翻訳後修飾および化学修飾の分析に使用する重要なメリットを実証しました。特に分析困難な疎水性ペプチドと修飾ペプチドの場合、Altura カラムは従来の SS カラムハードウェアよりも一貫してピーク形状が良好で、ばらつきが少なく、分解能が高くなりました。

30 回の連続注入の定量データから、Altura ハードウェアのほうがカラム安定化が速く、再現性が高いことがわかりました。また、テーリングファクターや分解能などのクロマトグラフィー指標から、近接して溶出する種の分離能も優れていることがわかりました。このようなメリットは、トリプシン分解ハーセプチンのペプチドマッピングでも実証され、Altura カラムで脱アミド化変異体を確実に同定できました。

つまり、Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 イナートカラムを 1290 Infinity II Bio LC システムや 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムと組み合わせると、ハイスループットなペプチドマッピングと修飾の特性解析に適した堅牢で信頼性の高いソリューションとなり、バイオ医薬品開発において高い分析精度と運用効率を達成できます。

参考文献

1. Hsiao, J.; et al. 不活性な HPLC カラムハードウェアによるクロマトグラフィー分離の改善. *アジレント・テクノロジーアプリケーションノート*, 5994-8618JAJP, **2025**.
2. Vanluchene, H.; et al. 低吸着性の流路での IP-RPLC-MS による mRNA マッピング. *アジレント・テクノロジーアプリケーションノート*, 5994-8055JAJP, **2025**.
3. Feith, A. Robust and Reliable Peptide Mapping. *Agilent Technologies application note*, 5994-2718EN, **2024**.
4. Sciuto, S. Peptide Mapping of Trastuzumab Tryptic Digests on an Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Agilent Technologies application note*, 5994-7969EN, **2024**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-010885

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, November 18, 2025

5994-8776JAJP