

# LC/MS メソッド開発およびシステム適用準備 評価のための包括的ペプチド標準

## 著者

Randall Robinson and  
Tom Rice  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

バイオ医薬品ラボにおいて、研究や QC 分析での質量分析の重要性が高まり続けている中、この高感度で複雑な機器に適合したラボ消耗品やワークフローが求められています。ペプチド分析において、多特性解析メソッド (MAM) が広く使用されるようになってきていることから、単一の液体クロマトグラフィー / 質量分析 (LC/MS) 実験では、これまで非常に重要なタンパク質特性を評価するために使用されていた、さまざまな旧式のアッセイを置き換える必要があります。

Agilent 13 ペプチド LC/MS 標準 (部品番号 5191-4572) は、MAM 分析を考慮して開発されており、幅広い特性にわたるシステム性能を評価するための最適化された混合物を提供します。この標準混合物は、Agilent MAM ワークフローとの連携に加え、非常に多くの機器部品の最適な性能を検証するために使用することができます。対象となるのは、LC ハードウェアの設定、カラムおよび分離性能、MS の性能と調整です。この技術概要では、13 ペプチド LC/MS 標準の特長と用途について説明します。

## 主な特長

- 合成した抗体由来のトリプシンペプチド：この標準は、主に保存されている免疫グロブリン G1 (IgG1) 抗体領域からのトリプシン配列を含む合成ペプチドで構成されています。この配列は、幅広い分子量および疎水性をカバーしており、LC/MS ペプチドマッピングワークフローでのシステムの準備状況を評価するうえで、非常に重要な特性を有しています。ペプチド配列の完全なリストとその固有の特性を表 1 に示します。

- MAM ワークフローとの統合：13 ペプチド LC/MS 標準は、Agilent MAM ワークフローにおいて、LC/MS システムの準備状況を評価するために使用することができます。この標準は、アジレント機器、ソフトウェア、および消耗品とシームレスに統合しており、USP 1060 章のガイドラインに従って、システムの準備状況を評価できます。また、一般的な LC/MS ペプチドマッピングワークフローにも適しています。
- 幅広い分子量および疎水性：この標準は、300 ~ 2,100 Da の範囲のペプチドで構成されており、代表的な逆相ペプチド分離のリテンションタイムの範囲をカバーしています (図 1)。

表 1. Agilent 13 ペプチド LC/MS 標準中のペプチド配列とその固有の特性

配列	機能
VSK	短い親水性ペプチド。ポイドに近い量を溶出
EYK	短い親水性ペプチド。ポイドに近い量を溶出
SNFR	短い親水性ペプチド。ポイドに近い量を溶出
ALELFR	ミオグロビントリプシンペプチド。インソースフラグメンテーションが発生しやすい
FSGVPSR	中極性のペプチド。代表的な逆相クロマトグラムの中で溶出
DTLMISR	メチオニン含有ペプチド。サンプルの保管および分析中の酸化を評価するために使用
ALPAPIEK	鉄を含む付加物を形成することが可能。同位体標識変異体と組み合わせて、検出器のダイナミックレンジを評価するために使用
ALPAPIEK*	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> および <sup>15</sup> N <sub>2</sub> で同位体標識されたリジンを含む。非標識 ALPAPIEK と組み合わせて、検出器のダイナミックレンジを評価するために使用
VLQPGYLEVDY	マウス免疫グロブリン Superfamily メンバー 6 由来のペプチド。鉄付加物を形成することが可能
VVSVLTVLHQDWLNGK	アスパラギン含有ペプチド。脱アミド化されやすい
VVSVLTVLHQDWLDGK	VVSVLTVLHQDWLNGK と組み合わせて、脱アミド化ペプチドを分離するメソッドの能力を評価するために使用
TVAAPSVFIFPPSDEQLK	50 °C 未満ではピーク形状が悪化する、プロリン豊富なペプチド。カラム温度が一定であることを確認するために使用可能
VDNALQSGNSQESVTEQDSK	より長いペプチド。代表的な逆相クロマトグラムの中で溶出

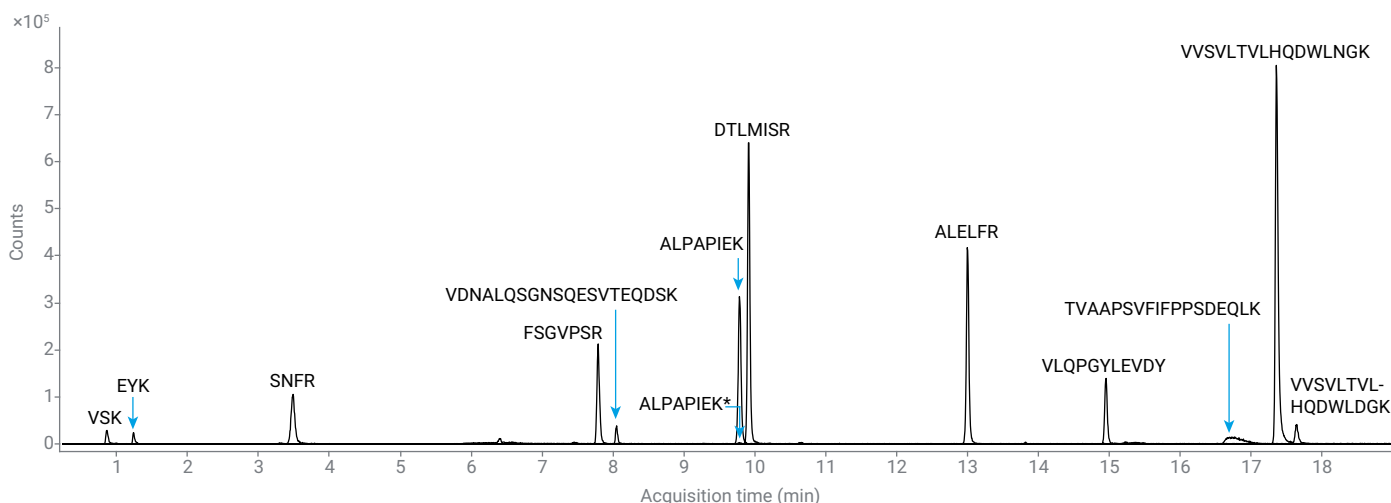


図 1. 13 ペプチド LC/MS 標準のアノテーション付き LC/MS クロマトグラム

- 同位体標識ペプチドペア：この製品には、C 末端リジンの  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  標識があるものとないもの両方の配列 ALPAPIEK が含まれています。安定同位体標識変異体は、MS データにおいて +8 Da の質量シフトを生成しており、非標識変異体と 1:100 の比で混合されているため、MS 検出器のダイナミックレンジを検証することができます (図 2)。

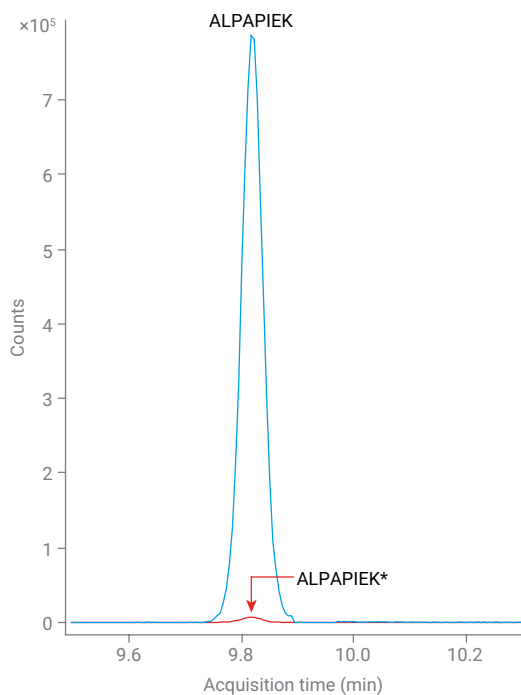


図 2. 同位体標識および非標識ペプチド ALPAPIEK の抽出イオンクロマトグラムの重ね表示

- 脱アミド化ペプチドペア：脱アミド化の分離および定量は、MAM ワークフローにおける重要な課題です。この標準には、天然および脱アミド化ペプチドペア VVSVLTVLHQDWLNGK および VVSVLTVLHQDWLDGK が含まれており、脱アミド化変異体は相対アブundance 約 6 % で調製されています。このペプチドペアを使用することにより、LC/MS メソッドが、脱アミド化をクロマトグラフィーにより分離および定量する能力をバリデーションすることができます (図 3)。

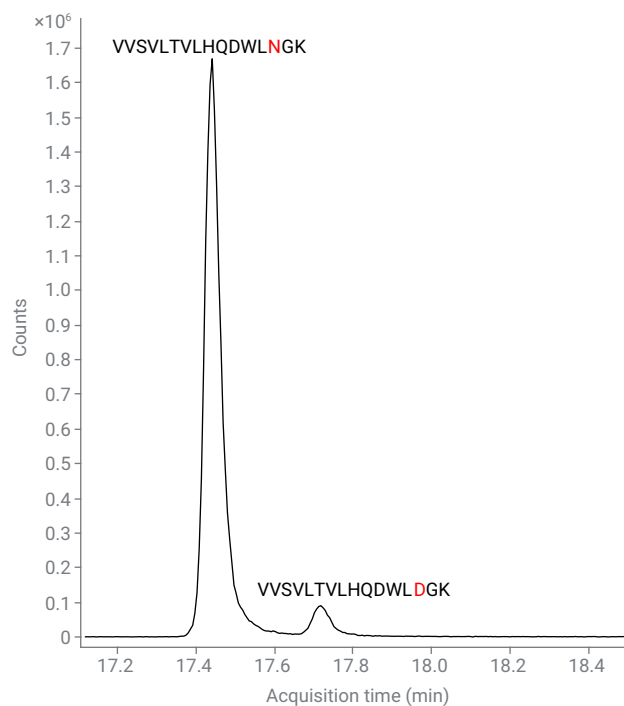


図 3. AdvanceBio ペプチドマッピング LC カラムにおける、脱アミド化ペプチドペアのクロマトグラフィー分離

- プロリン豊富なペプチド：プロリン豊富なペプチド TVAAPSVFIFPPSDEQLK の分離ピーク形状は、カラム温度によって変化します。カラム温度が 50 °C 未満の場合、ピーク幅が広くなり、分析シーケンスにおいて、カラム温度が一定であることを確認することができます (図 4)。

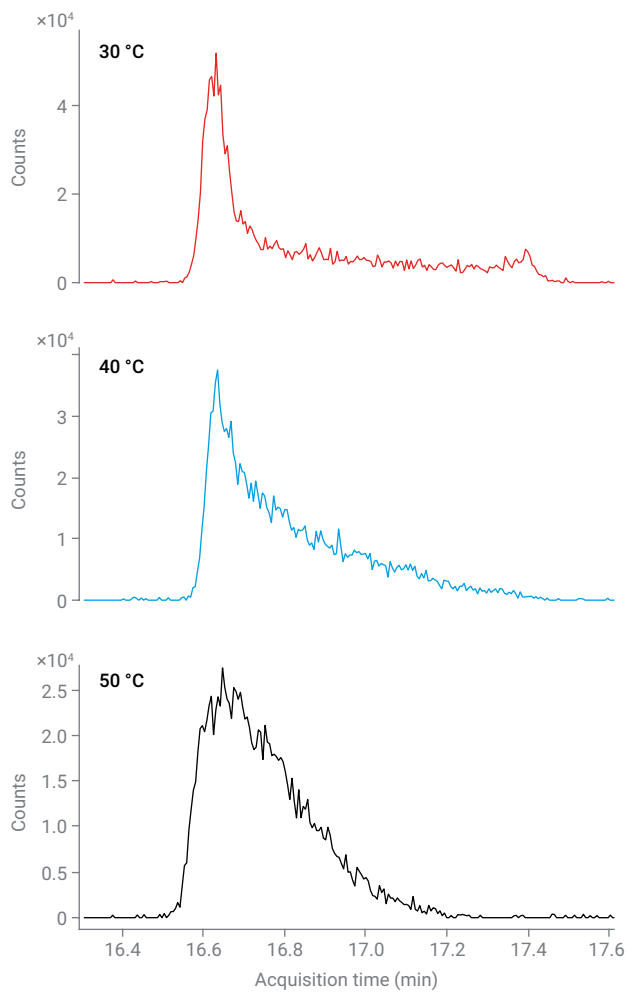


図 4. 30、40、および 50 °C における、ペプチド TVAAPSVFIFPPSDEQLK の分離ピーク形状の比較。50 °C 未満の温度では、ピークテーリングが大きくなります。

- 酸化されやすいペプチド：ペプチド DTLMISR 中のメチオニン残基は、酸化されやすい特性があります。サンプル保管中の酸化をモニタリングする場合は、必要に応じて、酸化された DTLMISR 変異体を定量することができます。または、サンプル溶媒で 0.04 % (v:v) の 2-(メチルチオ)エタノールを使用して、酸化を抑制することができます (図 5)。

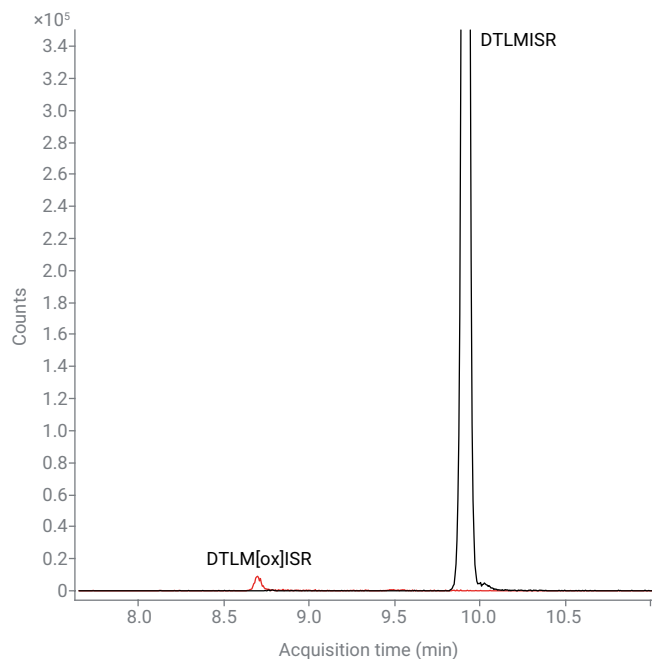


図 5. ペプチド DTLMISR の微量な酸化の検出

- 壊れやすいペプチド：インソースフラグメンテーションを最小限に抑えることは、MAM メソッド開発の非常に重要な側面です。ペプチド ALELFR は、インソースフラグメンテーションが発生しやすく、インソースフラグメントを最小限に抑えながら、イオン源条件を調整するために使用して、最適なシグナル強度を得ることができます (図 6)。
- バッチ固有の分析証明書：バッチ固有の分析証明書には、MAM システム性能チェック (SPC) ワークフローに使用される、ピーク面積および相対アバンダンス比が記載されています。データは、Agilent 1290 Infinity Bio LC と Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を使用して収集されています。

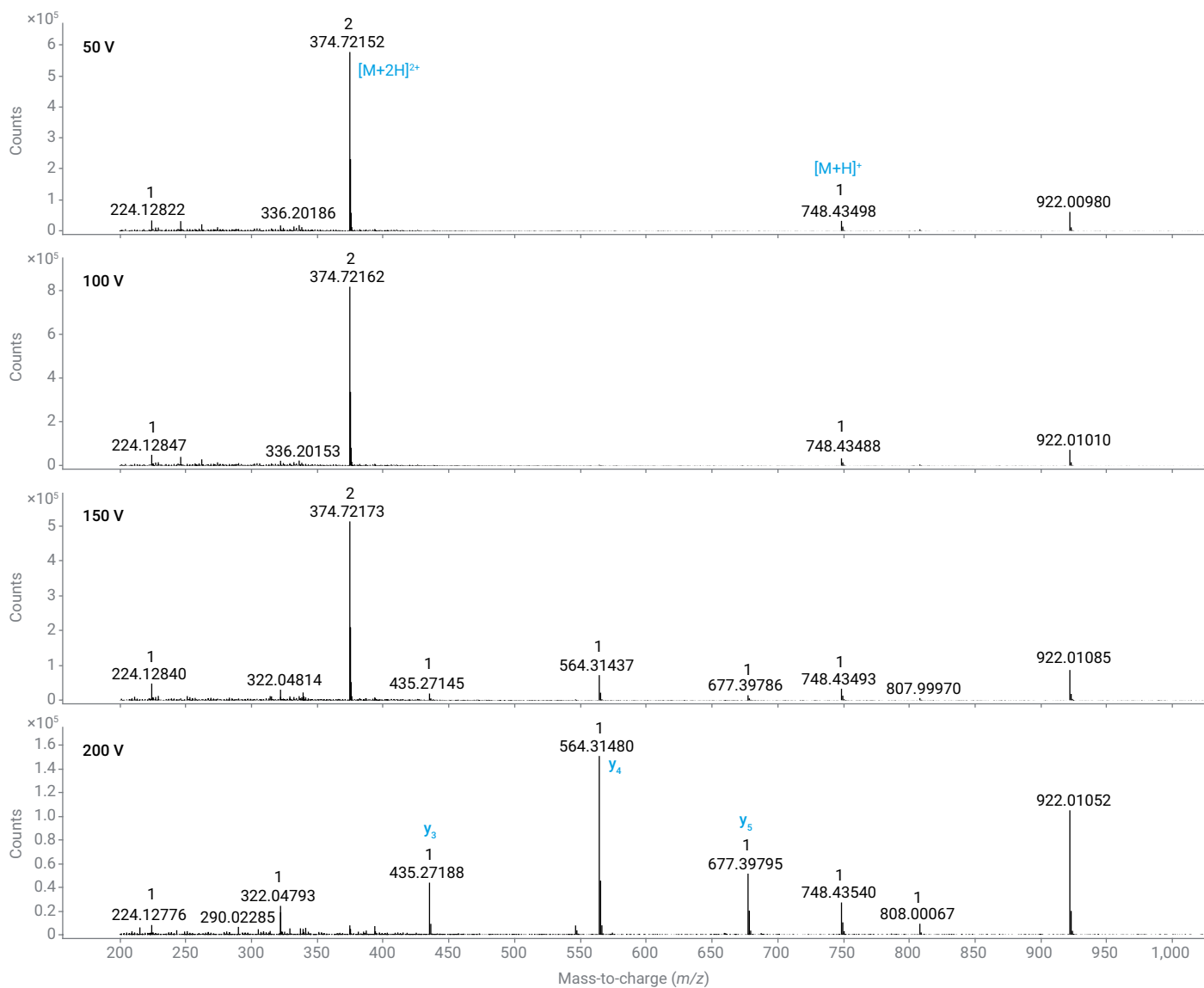


図 6. さまざまなフラグメンタ電圧における、ペプチド ALELFR の ESI スキャン。100 V を超えると、y イオンのインソースフラグメントが生成されます。

## 結論

Agilent 13 ペプチド LC/MS 標準は、LC/MS システムの性能を妥協することなく評価するための便利な混合物を提供します。このペプチド混合物は、USP 1060 章に従って性能を検証する Agilent MAM ワークフローの一部として使用する場合でも、または LC/MS システムの性能を検証およびモニタリングする必要があるその他のワークフローで使用する場合でも、幅広く対応しているため、生成されるデータの信頼性が高くなります。

## 付録

### 推奨される分析メソッド

標準は、通常、水に 200  $\mu$ L の 5 % アセトニトリル/1 % ギ酸を溶解させ、1  $\mu$ L を注入して分析を実施します。完全に溶解させるために、十分にボルテックスおよび転倒混和することを推奨します。必要に応じて、0.04 % (v:v) の 2-(メチルチオ)エタノールを添加することにより、ペプチド DTLMISR の酸化を抑制することができます。分析メソッドが、以下の参照メソッドと大きく異なる場合は、製品の希釈量や注入量を調整することが必要になる場合があります。

表 2. アジレントのクロマトグラフィー条件

パラメータ	値																
LC システム	1290 Infinity II Bio LC とバイナリポンプ (部品番号 G7132A)																
カラム	AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 x 150 mm (部品番号 653750-902)																
注入量	1 $\mu$ L																
移動相 A	0.1 % ギ酸水溶液																
移動相 B	0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液																
流量	0.4 mL/min																
カラム温度	50 °C																
グラジエント	<table border="1"><thead><tr><th>時間 (分)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>20</td><td>35</td></tr><tr><td>21</td><td>80</td></tr><tr><td>22</td><td>80</td></tr><tr><td>23</td><td>2</td></tr><tr><td>27</td><td>2</td></tr></tbody></table>	時間 (分)	%B	0	2	2	2	20	35	21	80	22	80	23	2	27	2
時間 (分)	%B																
0	2																
2	2																
20	35																
21	80																
22	80																
23	2																
27	2																

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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-015214

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2026  
Printed in Japan, June 1, 2026  
5994-9260JAJP

表 3. アジレントの質量分析条件

パラメータ	値
モデル	6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (部品番号 G6549A) と Jet Stream 技術
乾燥ガス温度	250 °C
乾燥ガス流量	13 L/min
ネブライザ圧力	35 PSI
ソースガス温度	300 °C
Vcap	3000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ電圧	95 V
スキマ電圧	35 V
オクタポール 1 RF 電圧 (Vpp)	750 V
スキャン速度	3 スペクトル/秒
スキャン範囲	m/z 200 ~ 2200
質量範囲	標準 (m/z 3200)
機器の状態	2 GHz、拡張ダイナミックレンジ
リファレンス質量	m/z 322.048121、922.009798

表 4. ペプチド質量および標準調製

配列	モノアイソトピック質量 (Da)	バイアルあたりの量 (pmol)
VSK	332.2060	200
EYK	438.2114	200
SNFR	522.2550	200
FSGVPSR	748.3868	200
VDNALQSGNSQESVTEQDSK	2134.9614	200
ALPAPIEK	837.4960	100
ALPAPIEK*	845.5104	0.95
DTLMISR	834.4269	200
ALELFR	747.4279	100
VLQPGYLEVDY	1294.6445	200
TVAAPSVFIFPPSDEQLK	1945.0196	200
VVSVLTVLHQDWLNGK	1806.9992	200
VVSVLTVLHQDWLDGK	1807.9832	11.9

\* このペプチドは、<sup>13</sup>C<sub>6</sub> および <sup>15</sup>N<sub>2</sub> リジンで同位体標識されています。