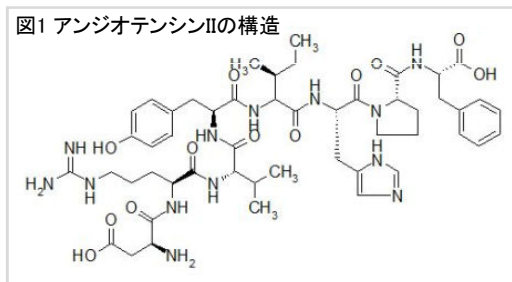


LC-MS/MS分析サンプル前処理

ヒト血漿及び血清中ペプチド分析のための サンプル前処理

はじめに

ヒト生体マトリックス中に存在するある種のタンパク質とペプチドは、疾患の診断マーカーとなり得ます。血中に含まれる低濃度ペプチドの検出とモニタリングは、臨床における病態評価や薬物投与量のコントロールに役立てることができ有用です。このアプリケーションノートで説明するサンプル前処理法はポリマーベース充填剤 EVOLUTE ABNを使用した固相抽出法で、LC-MS/MSによる血漿中または血清中ペプチド分析の感度を大幅に向上させます。固相抽出ステップでの溶出溶媒を2通り提示していますので、分析するペプチドの種類に応じて選択(あるいは最適化)してください。



ポリマーベース充填剤 EVOLUTE ABNについて

EVOLUTE ABNは、生体サンプル(血漿、血清、尿など)から塩基性、酸性、中性の多様な分析薬物を抽出するポリマーベースの固相抽出(SPE)用充填剤です。タンパク質、塩類、リン脂質などの夾雑物を除去し、クリーンなサンプル前処理を提供します。

実験

分析対象のペプチドをヒトプール血漿およびヒトプール血清にそれぞれ添加し(添加後濃度10 μg/mL未満)、2%トリフルオロ酢酸で希釈(1:1 v/v)した後、EVOLUTE ABNを使用して前処理を行い、LC-MS/MSで濃度を測定した。平均回収率はペプチドを添加したマトリックスブランクに基づき算出した。

分析ペプチド

アンジオテンシン フラグメント(1-7)、アンジオテンシンII、α-エンドルフィン(ヒト)、血管作動性腸管フラグメント(1-12)、ヘリコバクター・ピロリ(2-20)、ACTH(1-24)(ヒト)、エラフィン、及びミエリン糖タンパク質フラグメント(35-55)(ラット)

EVOLUTE ABNによる抽出メソッド

使用製品:	EVOLUTE ABN 25mg 96ウェルプレート (Part#600-0025-P01)
サンプルの希釈:	血漿または血清100 μLに、2%トリフルオロ酢酸水溶液(TFA) 100 μLと内部標準物質を加え、ボルテックス攪拌する。
コンディショニング:	メタノール 300 μL
平衡化:	2% TFA 300 μL
サンプルロード	2% TFAで希釈したサンプル 200 μL (軽くバキュームまたは加圧する)
洗浄1:	HPLCグレードH ₂ O 300 μL
洗浄2:	2% TFA 300 μL
(溶出溶媒は、分析するペプチドに応じてペプチド溶出Iまたはペプチド溶出IIから選択する)	
ペプチド溶出I:	メタノール:TFA (98:2), 2 x 200 μL, 流速1mL/min
ペプチド溶出II:	イソプロパノール:水:TFA (50:50:2), 2 x 200 μL, 流速1mL/min
溶出液希釈:	HPLCグレードH ₂ O 400 μL*
備考:	*オートサンプラー等を利用してLC-MS/MSに直接サンプルを注入できます。エバポレーション・再溶解の工程実施は任意です。なお、水400 μLを加えることによりサンプルを安定化できます。

■ HPLC条件

機器: Agilent 1200 Liquid Handling System (Agilent Technologies, Berkshire, UK)

カラム: Biotage Resolux[®] 120 C18, 4.5 μ m 分析用カラム, 150 x 2.1 mm id (Part# R1-1021-1185, Biotage AB, Uppsala, Sweden)

移動相: 溶媒A: 0.1%-ギ酸 水-アセトニトリル (98:2)
溶媒B: 0.1%-ギ酸 アセトニトリル-水 (98:2)

注入量: 5 μ L

グラジエント:

Step	Time (min)	Flow Rate (μ L/min)	%A	%B
1	0.0	200	100	0
2	0.50	200	100	0
3	15.6	200	50	50
4	16.0	200	50	50
5	17.0	400	0	100
6	18.0	400	0	100
7	20.0	400	100	0
8	21.0	200	100	0
9	26.0	200	80	0

■ MS条件

機器: Turbo Ionspray[®]インターフェイス装備Applied Biosystems/MDS Sciex 4000 Q-Trap
トリプル四局重極型質量分析装置(Applied Biosystems, Foster City, CA.)

イオン源温度: 350 $^{\circ}$ C

表 1. MRMトランジション(ポジティブモード/ターボイオンスプレー法)

Scan Function	Analyte	MRM Transition	Declustering Potential (DP)	Collision Energy (CE)	Cell Exit Potential (CXP)
1	アンジオテンシン II	516.2>769.3	40	33	16
2	アンジオテンシンフラグメント	450.2>619.3	40	35	16
3	α -エンドルフィン	873.4>874.0	40	38	16
4	血管作動性腸管フラグメント	476>411	40	38	16
5	ミエリン糖タンパク質フラグメント	646.4>774.8	40	40	16
6	ACTH	490.1>537.6	40	25	16
7	ヘリコバクター・ピロリ	581.1>617.2	40	40	16
8	エラフィン	1001.2>1152.6	40	45	16

■ 結果

表2. 血漿及び血清に添加したペプチドと添加後の濃度

No.	Peptide	Amino Acid (residues)	Molecular Weight (Da)	Matrix Spike Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	アンジオテンシンフラグメント (1-7)	7	899	2.3
2	アンジオテンシンII	8	1,031	2.3
3	血管作動性腸管フラグメント (1-12)	12	1,425	0.45
4	α -エンドルフィン(ヒト)	16	1,745	1.1
5	ヘリコバクター・ピロリ(2-20)	19	2,321	9.1
6	ミエリン糖タンパク質フラグメント(35-55)	21	2,582	4.5
7	ACTH (1-24)	24	2,934	4.5
8	エラフィン	57	6,001	1.4

図2 血漿から抽出し、Biotage Resolux 120 C18 分析用カラムで分析したペプチド群の典型的な抽出イオンクロマトグラム。

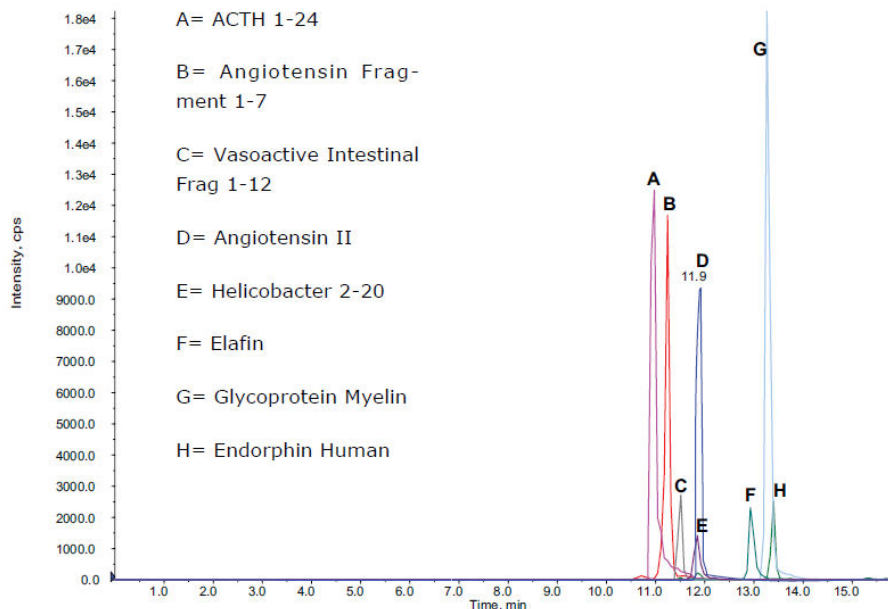


図3 血漿及び血清にペプチドを添加し(添加後濃度 $10\mu\text{g/mL}$ 未満)、EVOLUTE ABNを使用したサンプル前処理工程において、溶出オプションI (2% TFA-メタノール $400\mu\text{L}$)で溶出した場合の回収率。

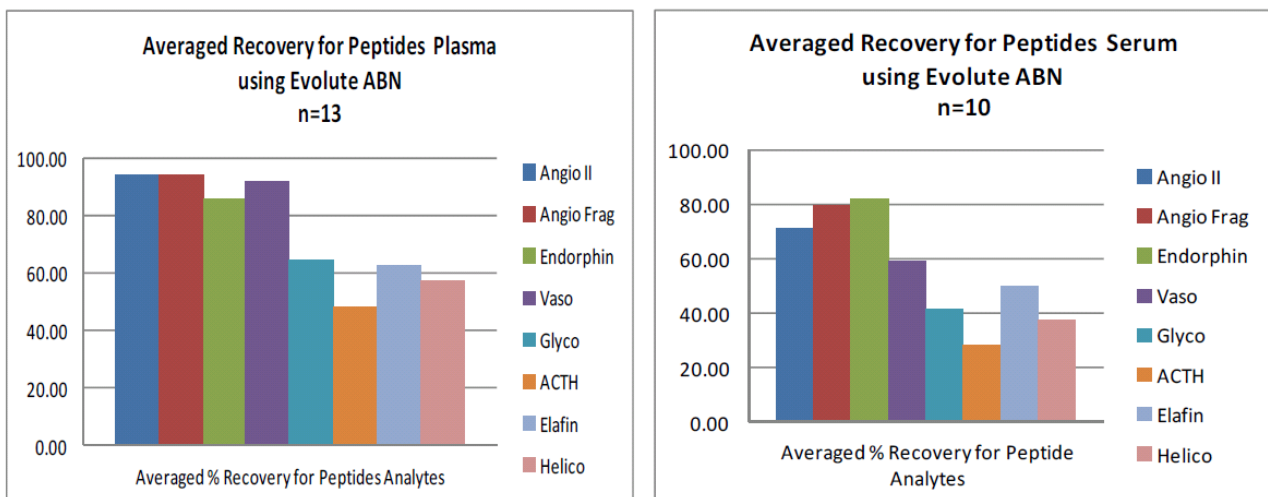


図4 血漿及び血清にペプチドを添加し(添加後濃度10 µg/mL未満)、EVOLUTE ABNを使用したサンプル前処理工程において、溶出オプションII(イソプロパノール:水:TFA (50:50:2) 400 µL)で溶出した場合の回収率。

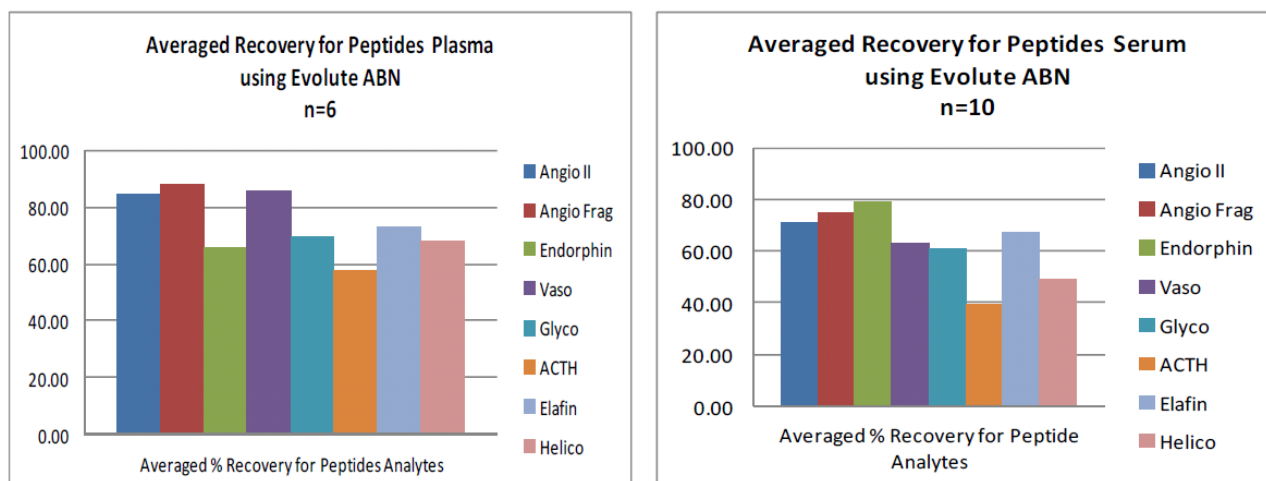


図2は、血漿を前処理し、Resolux 120 C18 分析用カラムに直接注入したペプチド群のイオンクロマトグラムです。ペプチド溶出後のエバポレーションと再溶解のステップが不要なため、サンプル前処理の効率化に貢献します。

図3は、溶出オプションI(メタノール/TFA)による各ペプチドの平均回収率プロットです(同一測定内RSD10%未満)。アンジオテンシンII、アンジオテンシンフラグメント、エンドルフィン、及び血管作動性腸管フラグメントについては、血漿での回収率が>80%を達成しており、血清での回収率は>60%です。また、より高分子のペプチドである糖タンパク質とエラフィンの回収率は血漿において60%を超えています。一方で、他の分析については回収率60%未満となっており、これはおそらく蓄積した残渣の官能基性効果によります。この相関関係は現在調査中で、後続のアプリケーションノートで報告する予定です。

図4は、溶出オプションII(イソプロパノール/水/TFA)による各ペプチドの平均回収率プロットです。同一測定内RSDは血漿中エラフィンおよびACTHと、血清中エラフィン及びヘリコバクター・ピロリで15%未満、その他の分析については10%未満です。溶出オプションIIでは、血漿と血清の両方においてACTH、エラフィン、ヘリコバクター・ピロリの回収率が向上しています。

このアプリケーションノートで説明したサンプル前処理方法は、溶出後のエバポレーションと再溶解を行うことなく、Resolux 120 C18 ペプチド分析用カラムに直接注入することができます。また、HPLCカラムとの互換性を考慮して、通常のようにエバポレーション・再溶解を行うことも可能です。

■ 使用製品一覧

Part number	Description	Quantity
600-0025-P01	EVOLUTE ABN 25 mg 96-well Plate	1
PPM-96	PRESSURE+96 Positive Pressure Manifold 96 Well	1
R1-1021-1185	Resolux 120 Peptide column C18,2.1x100mm	1

参考文献

このアプリケーションノートは、2012年5月にASMS(カナダ、バンクーバー)で発表された以下のポスターに基づいています。

‘Fast and Clean Extraction of Peptide Mixture from Biological Matrices with no Dry Down Steps Using EVOLUTE ABN Solid Phase Extraction prior to LC-MS/MS Analysis.’, V. Vandell et. al.,

バイオタージ・ジャパン株式会社

本社: 〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4,6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121
 大阪: 〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29,6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: Japan_info@biotage.com

