

Application News

No. 01-00625-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS™-2050

단일 사중극자 질량 분석기를 이용한 펩타이드 합성 확인 및 불순물 분석

Using a Single Quadrupole Mass Spectrometer to Check Peptide Synthesis and Analyze Impurities

Miho Kawashima and Tomoko Kuriki

사용자 활용 포인트

- ◆ 단일 사중극자 질량 분석기는 HPLC 시스템과 함께 사용하여 알려진 화합물을 확인하거나 미지 불순물의 분자량을 빠르게 예측할 수 있다.
- ◆ 손쉬운 유지관리를 위해 설계된 LCMS-2050 고성능 액체 크로마토그래프 질량 분석기는 기기 가동 중단 시간을 단축하고 유지관리에 필요한 시간과 인력을 줄이는 데 도움이 된다.

■ 서론

펩타이드를 분석할 때, 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유한 이동상은 HPLC로 순도 수준을 분석하는 데 일반적으로 사용된다. 이 뉴스레터에서는 TFA 기반의 이동상 조건과 옵션인 deconvolution 소프트웨어를 사용하여 MS로 분자량을 확인하고 불순물을 분석하기 위해 상업용 펩타이드 표준 샘플을 측정하는 예를 설명한다. LCMS-2050은 간편한 조작성을 위해 특별히 개발된 소형 단일 사중극자 질량 분석기(그림 1)이며, HPLC 시스템과 동일한 작동 방법을 사용하여 질량 정보를 쉽게 얻을 수 있는 강력한 도구이다. LCMS-2050은 또한 간편한 유지 관리를 위해 설계되어 기기 가동 중단 시간과 유지 관리에 필요한 시간과 노동력을 줄이는 데 도움이 된다.



그림 1. Nexera™ 및 LCMS™-2050 시스템

■ 시료 전처리 및 분석 조건

측정된 표적 펩타이드는 표 1에 나타내었다. 분석용 샘플은 상업용 펩타이드 표준 시료를 초순수에 용해하고 희석하여 준비하였다.

표 1. 펩타이드 측정

#	Compounds	Formula	Molecular Weight
1	Somatostatin	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	1637.88
2	ACTH1-17 fragment	C ₉₅ H ₁₄₅ N ₂₉ O ₂₃ S	2093.41

분석 조건은 표 2, 표 3에 나타내었다.

표 2. LC 분석 조건 (Nexera™ X3)

Column:	Shim-pack Scepter™ C18-120 [†] (50 mm×2.1mm I.D., 1.9 µm)
Temperature:	40°C
Mobile Phase:	Conditions for Using TFA A) 0.1 % TFA in H ₂ O B) 0.1 % TFA in acetonitrile Conditions for Using Formic Acid A) 0.1 % Formic acid in H ₂ O B) 0.1 % Formic acid in acetonitrile
Gradient:	B. Conc 10%(0.00 to 1.50 min) →80%(5.00 min) →10%(5.01 to 8.00 min)
Flow rate:	0.4 mL/min

*1 P/N: 227-31012-03

표 3. MS 분석 조건 (LCMS-2050)

Ionization:	ESI/APCI (DUIS™), Positive mode
Mode:	Scan (m/z 250-2000)
Nebulizing Gas Flow:	2.0 L/min
Drying Gas Flow:	5.0 L/min
Heating Gas Flow:	7.0 L/min
DL Temperature:	450°C
Desolvation Temperature:	200°C
Interface Voltage:	+3.0 kV
Qarray Voltage:	+20V

■ 트리플루오로아세트산과 포름산 이동상 비교

펩타이드를 분석할 때 TFA를 함유한 이동상은 일반적으로 HPLC로 순도 수준을 분석하는 데 사용된다. 그러나 MS를 사용할 때 잔류 TFA가 미칠 수 있는 영향을 고려할 때 펩타이드 분석에 특화된 기기를 사용하거나 TFA가 아닌 다른 산으로 변경하는 것이 좋다. 반면 이동상에 첨가된 산을 변경하면 크로마토그램에서 피크 분리 패턴이 변경될 수 있으며, 이는 분석 조건을 재평가해야 할 수 있다. 이 예에서 포름산 또는 TFA를 함유한 이동상을 사용하여 소마토스타틴 및 ACTH1-17 단편 표준 용액을 측정한 결과를 비교하였다. PDA 검출기로 얻은 결과 크로마토그램은 그림 2 및 3에 나타내었다. 소마토스타틴 용액의 경우 두 이동상 모두 비교적 좋은 피크 모양을 나타냈다. 그러나 ACTH1-17 단편 용액의 경우 포름산이 TFA보다 피크 프론팅이 더 크게 나타났기 때문에 TFA 기반 이동상으로 검출된 일부 불순물 피크를 포름산 기반 이동상에서는 검출하지 못하였다.

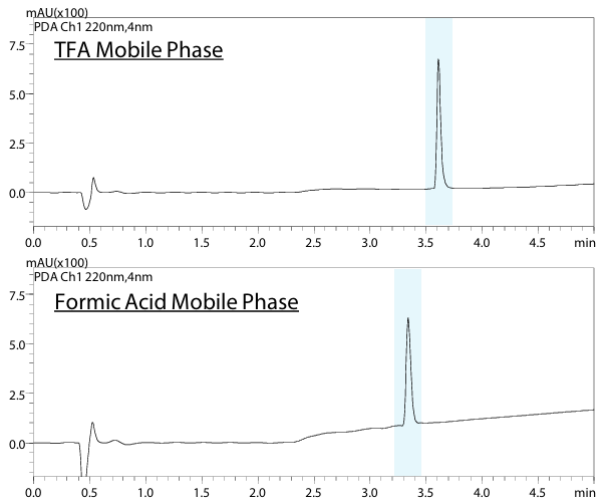


그림 2. 0.1 mg/mL 소마토스타틴 표준 용액의 크로마토그램 (5 μ L 주입)

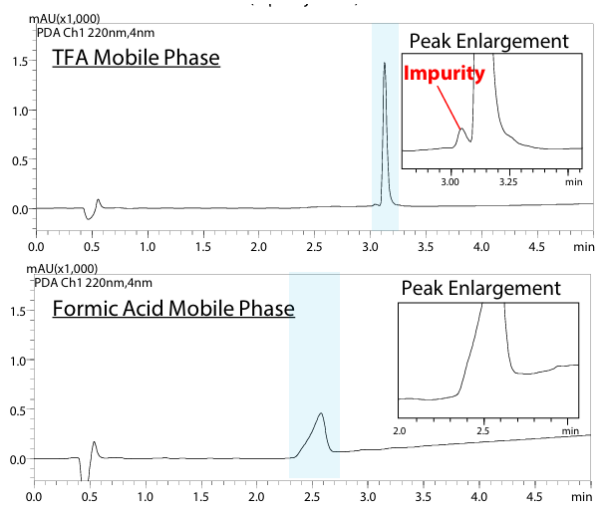


그림 3. 3.2 mg/mL ACTH1-17 표준 용액의 크로마토그램 (10 μ L 주입)

참고: 이 분석은 단일 예시이다. 실제 결과는 측정된 화합물에 따라 다르다.
TFA 기반 이동상이 항상 포름산 기반 이동상보다 더 나은 피크 모양을 보인다는 의미는 아니다.

ACTH1-17 단편 용액의 경우, m/z 704.1의 이온은 TFA 기반 이동상을 사용하여 불순물 피크에 대한 질량 스펙트럼에서 베이스 피크로 검출되었다. m/z 704.1의 질량 스펙트럼과 해당 질량 크로마토그램은 그림 4에 나타내었다. 질량 크로마토그램은 PDA 검출기 크로마토그램에 표시된 불순물 피크와 일치하는 위치에 피크를 보여준다.

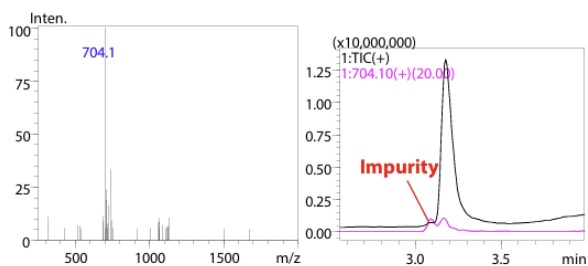


그림 4. 2 mg/mL ACTH1-17 단편 표준 용액에서 검출된 불순물 피크의 질량 스펙트럼 및 질량 크로마토그램 (10 μ L 주입)

■ 표준 펩타이드 샘플의 스캔 분석

소마토스타틴 및 ACTH1-17 단편 표준 용액은 TFA를 포함하는 이동상을 사용하여 스캔 분석 하였다. 소마토스타틴 용액의 TIC 및 질량 스펙트럼은 그림 5에 나타내었으며, ACTH1-17 단편 용액의 경우 그림 6에 나타내었다. 각각의 다중 전하 양성자와 분자에 기인하는 이온이 검출되었다.

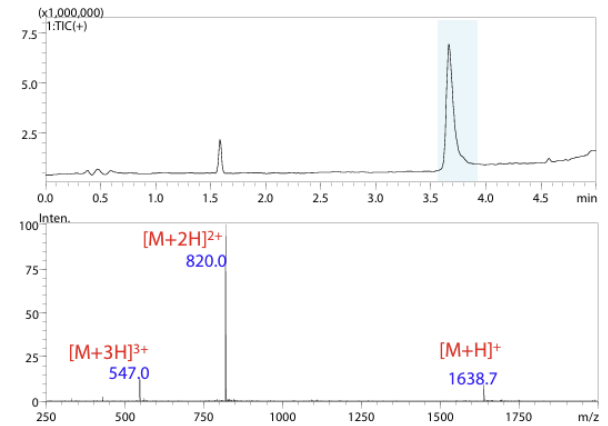


그림 5. 0.1 mg/mL 소마토스타틴 표준 용액의 TIC 및 질량 스펙트럼 (5 μ L 주입)

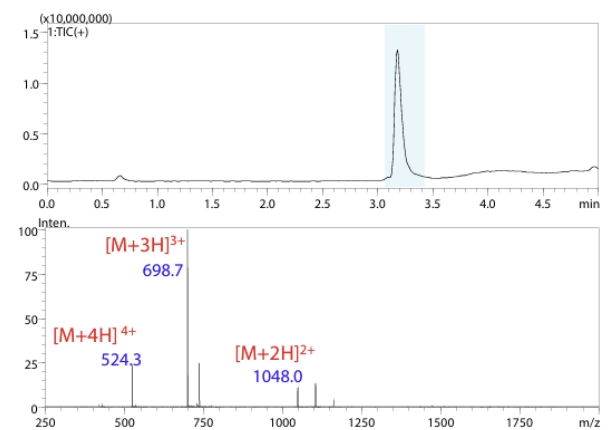


그림 6. 2 mg/mL ACTH1-17 단편 표준 용액의 TIC 및 질량 스펙트럼 (10 μ L 주입)

그림 7은 그림 5의 소마토스타틴 표준 용액의 분자량을 계산한 deconvolution 결과이다. 계산된 분자량 1637.6은 이론 분자량 (1637.88)과 일치한다.

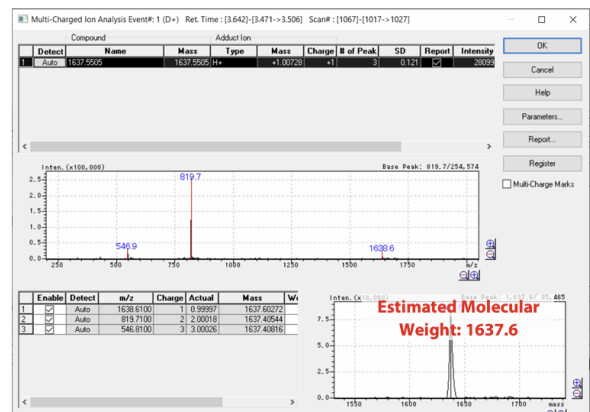


그림 7. 소마토스타틴의 deconvolution 결과

그림 8은 그림 6의 ACTH1-17 단편 표준 용액의 분자량을 계산한 deconvolution 결과이다. 계산된 분자량 2093.4는 이론 분자량 (2093.41)과 일치한다.

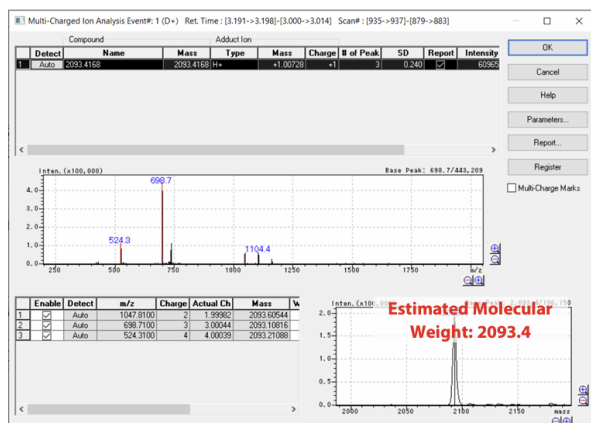


그림 8. ACTH1-17 단편 표준 용액의 deconvolution 결과

■ 간단한 유지 보수

TFA가 포함된 이동상을 사용하면 이동상이 변경된 후에도 TFA는 시스템에 남아 있게 된다. 따라서 바탕값이 높고 이온화가 억제되며 TFA 자체의 이온화로 인한 다른 결과와 후속 분석에 미칠 수 있는 영향으로 인해 특별한 주의가 필요하다.

TFA 유래 이온의 영향을 제거하기 위해서는 유로를 적절히 청소해야 하며, HPLC 장치에서 이동상에 접촉하는 부품은 교체해야 한다. 또한 MS 장치에서도 부품을 교체하고 이온 수송 장치(렌즈 시스템)를 세척해야 한다.

LCMS-2050은 인터페이스 주변을 쉽게 유지 보수할 수 있도록 설계되었으며, 진공 챔버에 샘플을 적재하는 데 사용되는 desolvation line(DL)을 도구 없이 진공을 유지한 채로 교체할 수 있다(그림 9). 이온 수송 장치는 기기 전면에서 쉽게 제거할 수 있으며 초음파 세척을 위해 비커에 넣을 수 있다(그림 10). LCMS-2050은 기기의 가동 중단 시간과 유지 보수에 필요한 시간과 노동력을 줄여준다.

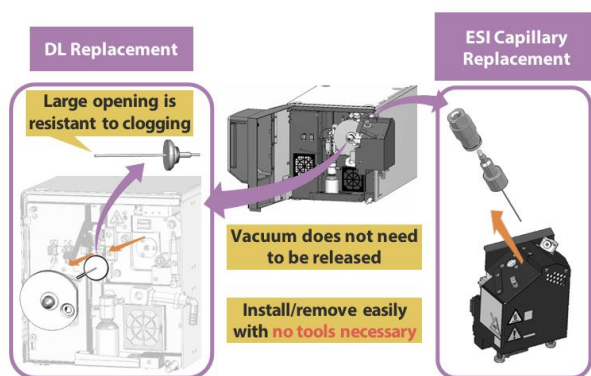


그림 9. DL 및 ESI Capillary 교체하는 방법

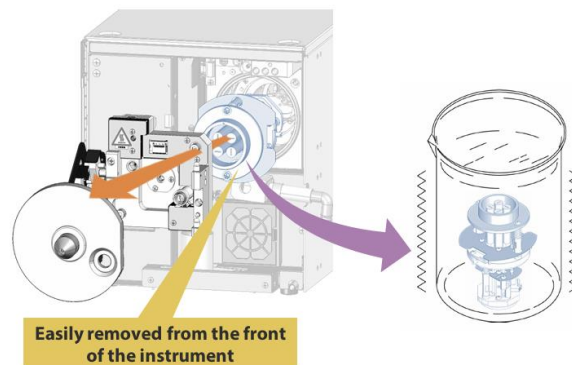


그림 10. 이온 수송 장치(렌즈 시스템)의 유지 보수하는 방법

■ 결론

상업용 펩타이드 표준 샘플은 TFA를 함유한 이동상을 사용하여 분석하였으며, deconvolution 소프트웨어를 사용하여 불순물에 대한 분자량과 질량 스펙트럼을 확인하였다. 표적 펩타이드에서 파생된 다중 전하 이온의 피크가 나타났고, 이론적인 분자량 값과 일치하는 계산된 분자량 값을 제공하였다. 이 테스트는 LCMS-2050 단일 사중극자 질량 분석기를 사용하여 펩타이드의 분자량을 빠르게 확인할 수 있음을 확인하였다.

HPLC 및 MS 시스템에서 TFA 기반 이동상을 사용한 후에는 일반적으로 세척 및 유지 보수가 필요하지만, LCMS-2050은 유지 관리를 쉽게 할 수 있도록 설계되었다. 결과적으로 장비 가동 중단 시간을 단축하고 유지 보수에 필요한 시간과 노동력을 줄일 수 있을 것으로 예상된다.