

医薬・化粧品研究における質量分析
～構造解析・薬剤定量からオミクス研究まで～

**Mass Spectrometry in Pharmaceutical and Cosmetic Product Developments
– examples from structural analysis of small compounds to “omics” research –**

本山 晃

Akira MOTOYAMA

株式会社 資生堂 リサーチセンター

〒224-8558 横浜市都筑区早渕 2-2-1

TEL: 045-590-6057 (ex.4774)

E-mail: akira.motoyama@to.shiseido.co.jp

【はじめに】

この度、伝統ある TMS 研究会講演会にて研究発表させていただき、栄誉に預かり、嬉しくも大変気が引き締まる思いである。特に今回は、「MS のとどめのない潮流と想い―（志田保夫退職記念講演会）」とのタイトルからも明らかなように、いつにも増して質量分析を知り尽くした諸先生方が多く集う場となろう。斯様な会で皆様の鑑賞に堪える内容を紹介できる自信はないが、あえて毛色の違った内容を話題提供させていただき、偉大な先輩方にご指導いただく良い機会に、そして質量分析を始めて間もない方々へのエールになればと思い、我々の研究内容の一端を紹介させていただき、こととしたい。

私の所属する（株）資生堂に質量分析装置が導入されたのは比較的早く、70 年代の機器分析の萌芽期に遡る。以来、質量分析は、化粧品・医薬品の原料評価、薬剤の安定性確認、分解物・不純物の構造解析、経皮吸収性評価など、化粧品・医薬品の研究開発に活用され、言うまでもなく必要不可欠な分析手段となっている。また、健やかな肌の実現に向けた皮膚科学研究では、いわゆるオミクス研究などの網羅的解析も行っており、ここでも質量分析が活躍している。私自身といえば、医薬品研究開発部門に約 15 年間在籍し、前臨床、特に質量分析を活用した品質保証業務に携わってきた。2004 年から 2 年間の米国留学でプロテオミクスを学んだ後、化粧品開発の基礎・応用全般を支える分析部門に異動となり、質量分析を良き相棒に日夜格闘している。本講演では、いわゆる「化粧品会社」の研究所にて質量分析がどのように使われているかという視点で、最近の事例をいくつか紹介させていただきたい。

【概要】

トピックス 1：高分子量界面活性剤の詳細解析

界面活性剤というと一般的には洗剤のイメージが強いが、クリーム状の化粧品や医薬品の他、食品、塗料など、実は身近なものに意外に広く使われている。界面活性剤の役割は、水と油という、本来混じり合わないものを見かけ上均一にすること（＝乳化）である。明確な機能を持った原料であるが故、その品質を一定に保つことが極めて重要となる。一方、

化粧品製造の現場では、新たな質感や感触を得るなどの目的で、分子量数千～数万といった高分子量の界面活性剤が多用されている。高分子量になればなるほど、製造、品質管理、分析評価は困難になるため、必然として高度な解析手法の確立が重要となる。ここでは、MALDI-TOFMS 及び LC/High-ResolutionMS による解析法の確立で得られた知見を紹介する。

トピックス 2：同位体選択 MS/MS 法を利用した有機化合物の構造解析

一部の化粧品（正確には医薬部外品）には、有効成分として人体に対する作用が緩和な薬剤が配合されており、その多くは低分子量の有機化合物である。化粧品の製造販売は薬事法に則って行われるため、医薬品同様、薬剤の安定性の評価や分解物の同定、不純物の構造確認を行うことが必要となる。これらの仕事は、精密質量測定ができる装置が一般化したおかげで、従来に比べて格段に容易になった。一方、イオントラップ型や（三連）四重極型のように、原理的に精密質量を測ることはできないが、特有の機能や特徴から広く普及している質量分析計がある。同位体選択 MS/MS 法は、簡単な操作でフラグメントイオンの炭素数を推定する手法で、それらの装置でもより確度の高い構造解析が可能になる。一般的な LC/MS/MS 条件下にて、本手法の有用性・限界を検証した結果を紹介する。

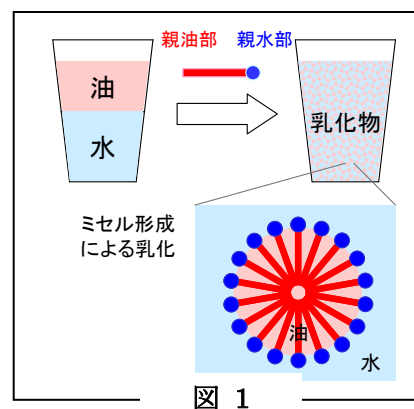
トピックス 3：皮膚科学研究のためのプロテオミクス技術

皮膚という臓器の理解は、化粧品会社にとっては極めて重要なテーマである。生体と外界のインターフェースを担う角層、その下層の表皮・真皮を含め、皮膚の主要な構成成分はタンパク質であり、その働きが皮膚の恒常性維持の鍵を握る。現在の科学技術では未だその全貌は見えないが、逆に未知のフロンティアともいえる。タンパク質を網羅的に分析するプロテオミクス技術は、この 15 年で急速に発達し、医薬品開発、マーカー探索、生体反応の理解などに広く活用されている。ここでは、皮膚科学研究に合わせてプロテオミクス技術を改良・活用してきた我々の試みを紹介したい。

【各論】

トピックス 1: MALDI-TOFMS 及び LC/High-Resolution MS による高分子量界面活性剤の詳細解析¹⁾

界面活性剤は、分子内に親水性と親油性の部位が共存することを構造上の特徴とし、界面張力を下げることで水と油を見かけ上相溶（＝乳化）させる化合物である（図 1）。そもそも化粧料とは、「肌上の余分な油分や汚れを取り去った（＝洗浄）後に、失われた油分・水分とアミノ酸などの天然保湿因子を補う役割を持たせるもの」と定義することができる。したがって、化粧料は化学的には水・油・保湿剤の混合物であり、これらを均一で滑らかな性状にする（＝乳化）目的で多くの場合に界面活性剤が配合されている。特に、分子量数千～数万の高分子量界面活性剤は、油分に水滴が浮いた形のいわゆる W/O 型製剤の調製や、新たな質感や感触を得るなどの目的で、近年、幅広く使われるようになっている。



界面活性剤の力、すなわち界面活性能は、HLB という指標で定義される（図 2）。HLB とは、Hydrophilic-Lyophilic Balance の略で、分子内の親水性基の質量と親油性基の質量の比に一定の係数をかけて表される無次元の値である。低分子量の有機化合物など、単分散の分子の HLB は、構造から一義的に求めることができる。一方、多くの界面活性剤は、親油性・親水性部位ともに、長さや分岐に分布を持つ場合が多く、これにより全体としては単一分子ではないことが殆どである（親油性部に天然由来の脂肪酸やシリコーン、親水性部には生体適合性の高いポリグリセリンやポリオキシエチレン（いわゆる PEG）などが多用される）。

EO鎖長分布とHLB （EO: エチレンオキシド）

（EO鎖長分布のイメージ）

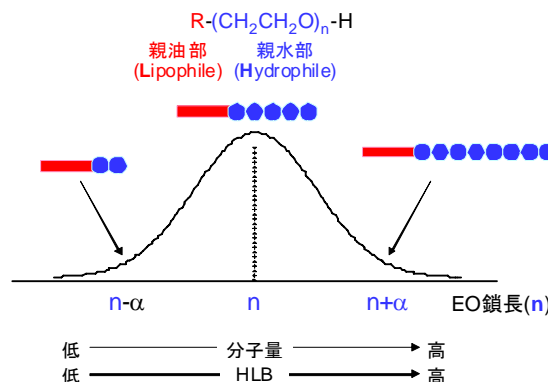


図 2 高分子量活性剤の分子種分布イメージ

高分子量界面活性剤の品質は、主に技術的な理由から、NMR や IR などの平均値を算出する手法で管理されている。一方、この方法には、分布の広さや形状が異なるものの平均値は変わらない場合を検出できないという問題があった。分布の広さや形状が異なるということは、構成分子種が違うということなので、全体としての界面活性能は大きく変化し、目的とする製品ができない・製品の安定性が悪い（水層と油層が分離する）などのトラブルの原因となる。さらに、多くの界面活性剤は、技術面やコスト上の理由から試薬のように高度に精製されていないケースが多く、未反応の粗原料（天然由来の脂肪酸や PEG などの親水性ポリマーなど）が混在している場合がある。従って、品質管理上、高分子の分布や混合物の組成を詳細に評価できる分析法は必須であり、分離能・特異性に優れた質量分析が極めて有力なツールとなる。

MALDI-TOFMS

高分子量界面活性剤の分布の形を俯瞰したい場合、測定 m/z レンジに理論上の上限がなく、1 価のイオンを主に生成する MALDI-TOFMS が最も有力な手法となる。しかしながら、幅広い分子量分布をもち、混在物も存在する界面活性剤の分析は、通常のポリマー分析以上に困難である。理由はいくつかあるが、最大の問題は、試料自体がマトリックスの結晶化を妨害しやすく、均一な共結晶を得にくい点である。実際、ターゲット上に載せた試料は、溶媒を飛ばす過程で不均一化しやすく、レーザー照射位置により得られるデータが大きく異なる場合が多い。この傾向は、シリコーン系の高分子量界面活性剤の場合に特に顕著であり、一般的な MALDI 試料調製法である Dried-droplet 法ではスペクトルが得られず、種々検討の結果、Solvent-free 法²⁾が有用であることがわかった。幸いな事に、ノニオン系の界面活性剤の親水基には、生体適合性の高さなどから、校正標準に汎用されるポリオキシエチレン鎖（PEG）が多用されており、PEG のイオン化に焦点を絞ってイオン化条件の最適化をすることが可能であった。

質量分析が有効であった例として、図 3 に、 C_{18} の脂肪酸とポリオキシエチレンがエス

テル結合した界面活性剤三種の MALDI-TOFMS スペクトルを示す。略称を示す SPG の後の数値 (40, 100, 150) は、設計上のポリオキシエチレン鎖の長さを示す。NMR での評価は、試料中に $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$ という構造の分子群のみが含まれていると仮定し、

$^1\text{H-NMR}$ にて、「ポリオキシエチレン部に特異的な、酸素に隣接するメチレンプロトン」と「脂肪酸部に特異的なメチルプロトン」の比を比較する。 $^1\text{H-NMR}$ は、一般的な有機化合物に対しては、ロット間差を簡便に比較できる優れた方法である。一方、高分子量界面活性剤の場合は、MALDI-TOFMS の結果から、

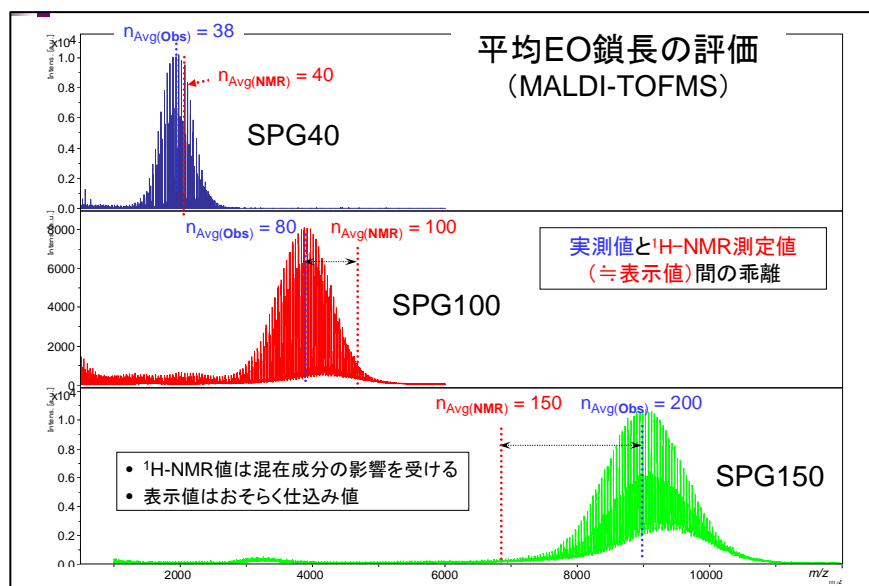


図 3 ステアリン酸 PEG 類の MALDI-TOFMS スペクトル (Bruker Autoflex III, Linear mode, CHCA+NaCl)

実態を全く反映していないことが明らかとなった (図

3)。図 3 では、 $^1\text{H-NMR}$ で得られた平均重合度を $n_{\text{Avg}}(\text{NMR})$ 、MALDI-TOFMS で得られた平均重合度を $n_{\text{Avg}}(\text{Obs})$ で示した。MALDI-TOFMS 測定により、重合度 100 と称した原料の重合度は実は 80 程度であり、重合度 150 とされた原料は重合度 200 であることが明らかとなった。製品処方設計者は、計算上の HLB を指標に系をデザインするため、想定と実際にこれだけの違いがあると、目算が狂いタイムロスの原因にもなる。MALDI-TOFMS は、高分子量界面活性剤の正確な情報を簡便に知るのに不可欠であり、ロットぶれの評価に有用といえる。

LC/HR-MS

$n=10$ 以上の長鎖のポリオキシエチレンは、アンモニウムイオンとの親和性が高いため、正イオン検出の ESI 下では NH_4^+ が複数個付加した多価イオンとして検出される。このことを利用し、平均分子量 9,000 近い高分子量界面活性剤であっても、上限 m/z 2,000 の通常の装置で効率よく検出することができる (図 4、5)。

ただし、ピーク同定の際、多価イオン群が重なった複雑なスペクトルになるため、高分解能な質

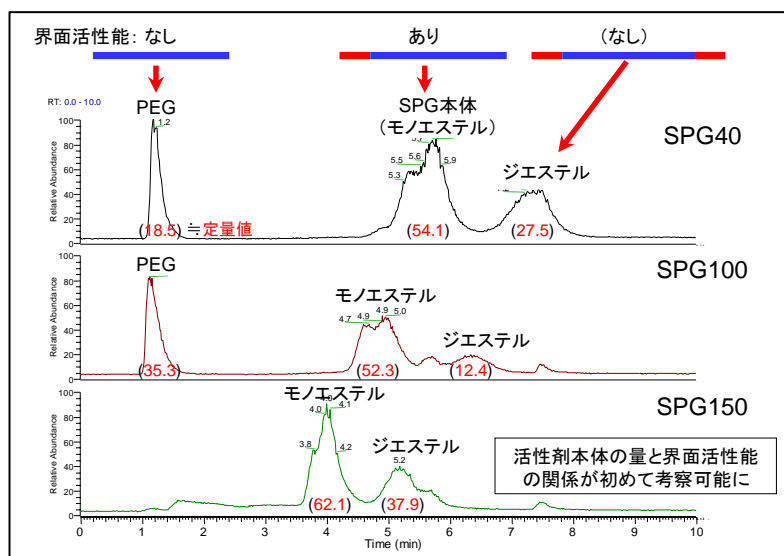


図 4 ステアリン酸 PEG 類の LC/HR-MS TIC クロマトグラム (LTQ-Orbitrap, m/z 150-2,000, $R=60,000$)

量分析計が不可欠となる（図 5）。この原料の場合、逆相 LC と組み合わせた LC/HR-MS により、未反応の PEG に加え、ジエステルが含まれていることが明らかとなった。また、それらの存在比は原料ごとに異なっており、これが $^1\text{H-NMR}$ で推定した鎖長と MALDI-TOFMS での観測値の大小の相違の原因であることが判明した（ $^1\text{H-NMR}$ では想定構造の分子種のみと仮定するため）。この場合、イオン化は PEG 部分にほぼ 100%依存していると考えられるため、各成分の感度係数が等しいと仮定すると、TICC の面積値から各成分の含量を推定できる。ここで重要なのは、界面活性剤の主体はモノエステルの本体のみである点である（PEG、ジエステルには海面活性がほとんどない）。このように、LC/HR-MS は、高分子量界面活性剤の本体の含量を指標に処方設計する上で不可欠の分析手法といえる。

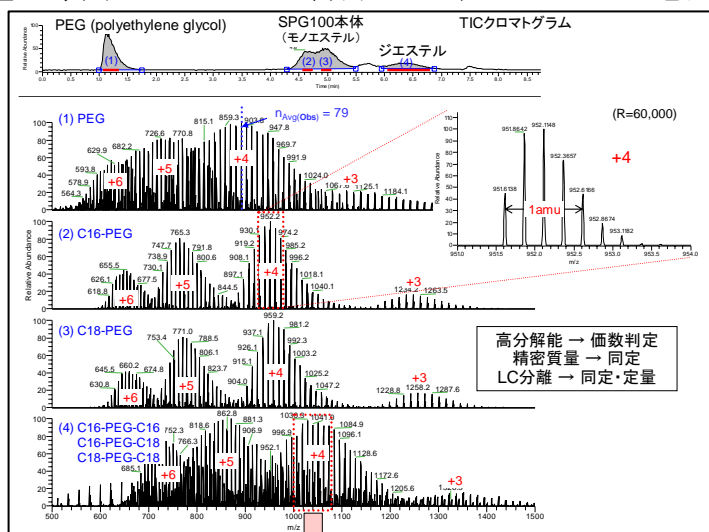


図 5 ステアリン酸 PEG100 の LC/HR-MS スペクトル

トピックス 2： 同位体選択 MS/MS 法を利用した有機化合物の構造解析³⁾

同位体選択 MS/MS 法とは、マススペクトル上の分子関連イオンあるいはフラグメントイオンにおいて、天然由来の ^{13}C を 1 個含む同位体イオン（いわゆる A+1 イオン）の MS/MS product ion 測定を行い、生じたフラグメントと脱離基への ^{13}C の分配比からそのフラグメントイオンの炭素原子数を推定する手法である（図 6）。本法は、1978 年に J.H.Beynon らによって初めて原理が報告され⁴⁾、1998 年に W.D.Lehmann らが概念を拡充し、同位体選択 MS/MS 法(Isotope-selective Tandem Mass Spectrometry)と名付けた⁵⁾。精密質量で得られる元素組成情報には及ばないが、

有機化合物は炭素を骨格とした分子であるため、フラグメントイオンの同定において炭素数がわかる利点は大きい。特に本法は、MS/MS が可能な装置であれば形式を問わず利用できるため、イオントラップ型や四重極型質量分析計など、原理上、高分解能・精密質量測定ができない装置の有効活用にも繋がる。フラグメントイオンの同定は、構造解析はもちろん、

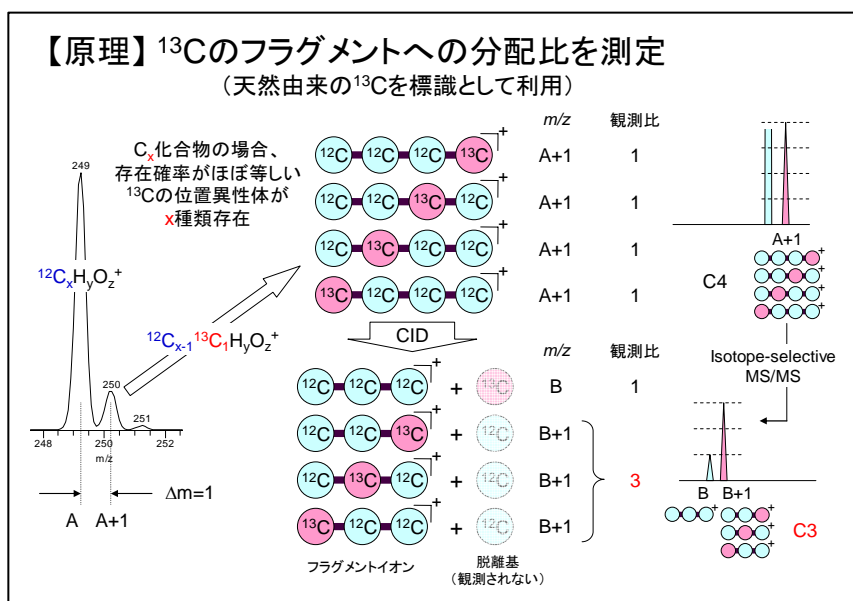


図 6 同位体選択 MS/MS 法の原理

安定同位体標識した内部標準物質を使う、SRM 定量分析においても極めて重要である。これらの利点にも関わらず、本法は、報告以後、広く活用されているとは言い難い。理由の一つとして、既報では積算回数の稼げるインフュージョンモードでの例しか示されておらず、汎用性に欠けることが考えられた。そこで、より一般的な LC/MS/MS 条件下での本法の有用性の評価を行った結果を紹介する。

<実験> 分子量及び元素組成の影響を考察するため、3-エチルアスコルビン酸($C_8H_{12}O_6$, FW 204)、アルギニン($C_6H_{14}N_4O_2$, FW 174)、ピンドロール($C_{14}H_{20}N_2O_2$, FW 248)、レセルピン($C_{33}H_{40}N_2O_9$, FW 608)を標準試料として用いた。LC/MS は、Nanospace SI-2 (資生堂) と LTQ-Orbitrap (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を組み合わせたシステムを用いた。なお、MS/MS product ion 測定は主にリニアイオントラップ型 MS (LTQ) で行い、Orbitrap は分子組成の確認・検証に用いた。分離カラムには Capcell Pak C_{18} MG-III(3 μ m, 2mm i.d. x 150mm)を用い、0.1%ギ酸を含む水またはアセトニトリルを移動相とするグラジエント分析を行った。

<結果> 同位体選択 MS/MS 法による 3-エチルアスコルビン酸のフラグメンテーション解析例を、図 7 に示す。測定は、LC 分離+フルスキャン MS、 m/z 205 及び 206 の MS/MS のトリプルプレイモード検出にて行い、3-エチルアスコルビン酸を 200ng on column で分析した。図のスペクトルは、約 30 秒幅の目的成分ピークの 5%高さ以上の全域を平均したもの

を示した。主要なフラグメントイオンである m/z 157 は、 $[M+H]^+$ から 48Da の成分が脱離した構造に該当する。フラグメンテーションの一般則及び解析ソフトウェア (Mass Frontier 4.0) による解析の結果、 m/z 157 は 3 位の C_2H_5 基と H_2O の逐次脱離により生成した $C_6H_5O_5^+$ であると推定された (図 8、上段)。一方、同位体選択

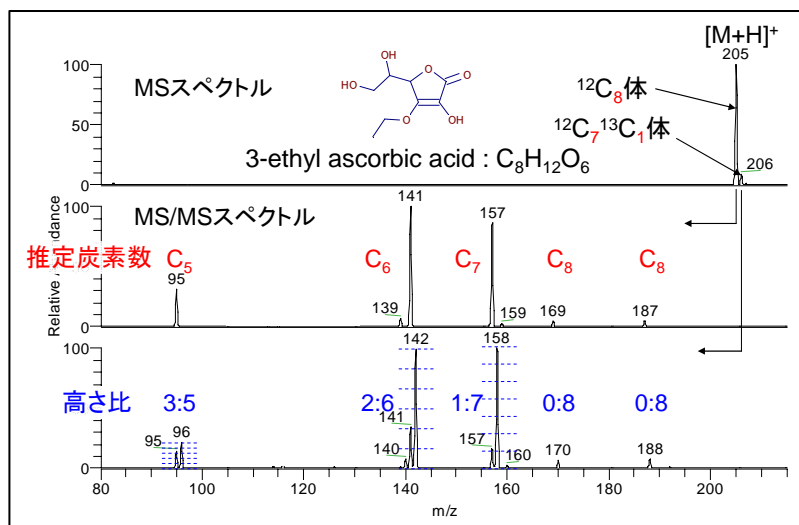
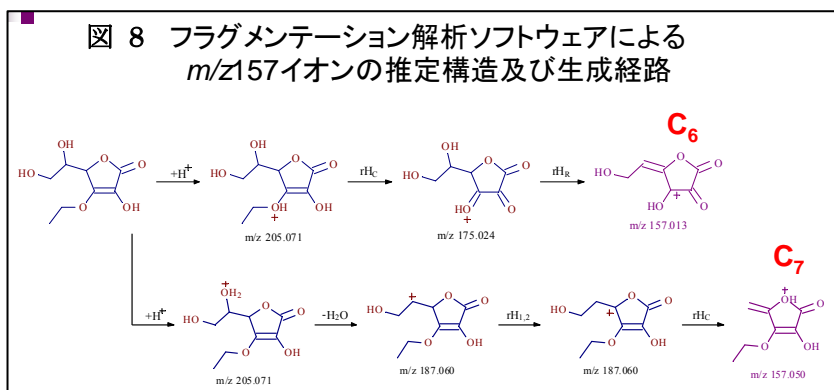


図 7 3-エチルアスコルビン酸の同位体選択 MS/MS スペクトル

MS/MS 測定の結果 (図 7, 最下段)、 ^{12}C のみを含む m/z 157 と ^{13}C を 1 個含む m/z 158 の強度比がほぼ 1:7 であるため、 m/z 157 は C_6 ではなく C_7 であることが示唆された。Orbitrap による m/z 157 の精密質量測定及び 2-エチル体等を用いたシフト法により解析を行った結果、 m/z 157 は $C_7H_9O_4^+$ に相



当し、4位の側鎖からH転移を伴いCH₄O₂が脱離することで生成したイオンであることが強く示唆された(図8下段)。このように、常法で解析した結果を検証する上で、同位体選択MS/MS法が極めて有用であることがわかった。また、今回の結果から、同位体選択MS/MS法が、積算回数が稼げない一般的なLC/MS/MS条件下でも有効であることが初めて明らかとなった(既報^{4,5)}は積算回数の稼げる直接試料導入またはインフュージョン測定)。

次に、検出下限付近での性能を評価すべく、[M+H]⁺のマスキロマトグラムのSNが5~10程度で、A+1イオンが区別できない状況での本法の有効性を評価した。図9に示すように、このような悪条件下であっても、MS/MSによる特異性の向上とノイズレベルの低下のため、プロダクトイオンの比は良好な精度を保てる事がわかった。また、A+1イオンを+1Daの標識とみなすことでのデータ依存型自動測定も可能であった。これにより、不純物の構造解析などで、一回の分析でより多くの情報を得ることができると考えられた。

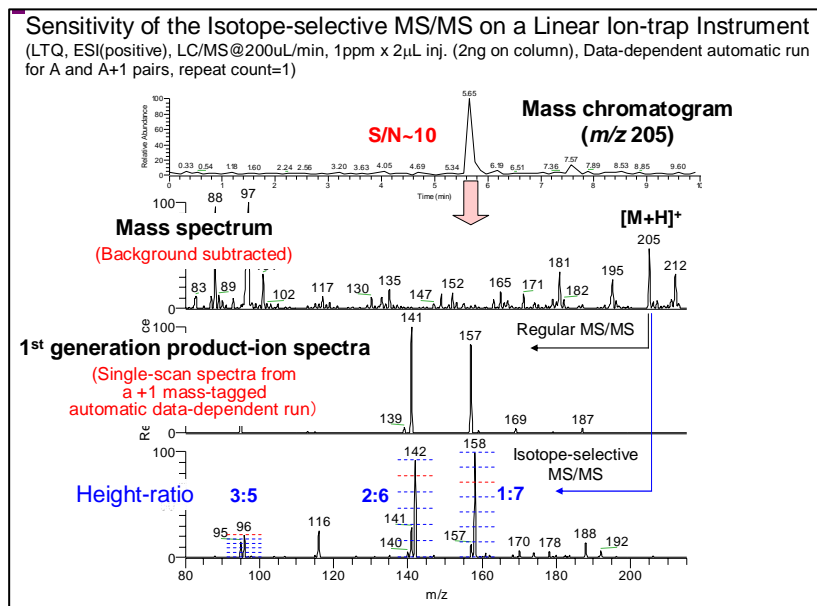


図9 同位体選択MS/MS法の感度評価結果

C原子数が多い場合の例として、レセルピン(C₃₃H₄₀N₂O₉, FW 608)を用いて同位体選択MS/MS法の有用性を検証した。分子量200~300程度の化合物と比べ、相対的に誤差は大きくなるが、得られる結果は原理的に「量子化」された値に収束するため、解釈は容易かつ正確であった。一方、N原子の存在比率が高い場合(アルギニン(C₆H₁₄N₄O₂, FW 174))では、¹³Cに対し約1/3の存在比を持つ¹⁵Nの影響が無視できなくなり、正しく解釈できなくなることがわかった。

高感度・高選択的定量に汎用される三連四重極型質量分析計での有用性を、4000Qtrap (Applied Biosystems, Inc)により確認した。CIDの様式の違い(多段衝突の有無)などから、感度・精度面ではイオントラップ型に劣るものの、三連四重極型でもほぼ同等の結果が得られることがわかった。フラグメントイオンの同定は、安定同位体標識した内部標準物質をデザインする際にも重要である。発表では、Isobaric fragmentsの存在が疑われる際の識別に活用した例も紹介する。

トピックス 3： 皮膚科学研究のためのプロテオミクス技術

生体試料中のタンパク質を網羅的に解析する、いわゆるプロテオミクス研究は、様々な生体反応を理解する重要なツールの一つである。我々は、皮膚を中心とした生体組織内のタンパク質分子を、できるだけ網羅的にかつ安定して測定できる分析手法の開発を目指し、ほぼ標準手法となったショットガン法を改良し活用してきた。質量分析の話題からは少し外れるが、当社で現在稼働中のシステムについて、分析科学的な観点からみた特徴を紹介するとともに、皮膚科学領域における代表的な活用例を報告する。

<実験>

ー改良型ショットガン分析システムの構築ー

Yates らが開発したショットガン分析用二次元キャピラリー LC/MS/MS システム(MudPIT; Multi-dimensional Protein Identification Technology⁶⁾) をベースに、高圧切り替えバルブによる

ベントシステム化、先端フリット化キャピラリーカラム(自作)の導入により、高感度・高分離を維持しつつ、連続自動分析が可能なショットガン分析システムを構築した。配管やユニオンには Upchurch 社等の市販品を、LC にはセミマイクロ LC (SI-2、資生堂) を用いた。トラップ及

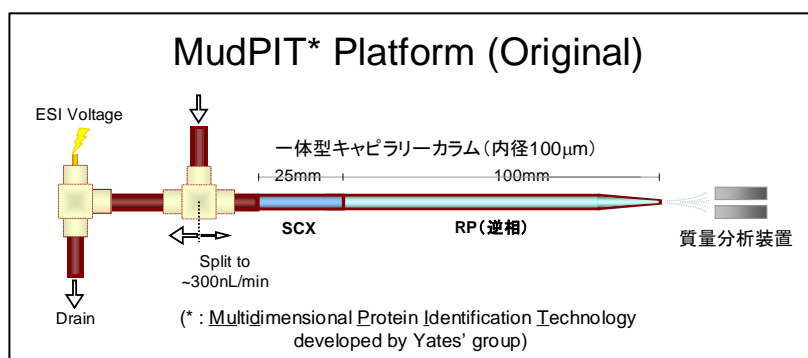


図 10 MudPIT システムの概略

び分析カラムは 0.1mm 内径のものに自家充填し、目的に応じたサイズや多次元化などの切り換えを容易にするため、手締めで簡単に交換できる構造とした。先端フリットは、シリカ水溶液にホルムアミドを加えた液を先端のみに吸い上げ、オープンにて焼結させることで作成した。二次元 LC の分離能を改善し、タンパク質の同定効率を最大化する方策として、一次元目の分離の標準となっている SCX の代わりに、SCX と弱アニオン交換樹脂(WAX)を混合させたものを用い、タンパク質及びリン酸化ペプチドの同定効率からその特性を評価した⁷⁾ (Yeast 全細胞破碎物(可溶化画分)及び HeLa 細胞破碎物のトリプシン消化物にて評価)。質量分析装置は、イオントラップ/静電場型 FT のハイブリッド型 (LTQ-Orbitrap: Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用い、Bioworks Ver 3.2 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 及び Mascot (Matrix Science, Inc.) にてタンパク質同定及びデータ解析を行った。タンパク質同定条件は、ペプチドの精密質量情報(5ppm 以下)を併用し、擬陽性同定の確率が 1%未満となるように設定した。

ー活用例-I： 毛髪や皮膚(角層)構成タンパク質の解析ー

毛髪や皮膚の物性・形状と構成タンパク質組成の関係を解析すべく、紫外線照射の状態等が異なるヒト毛髪・皮膚の解析を行った。毛髪・皮膚とも、先行文献(Lee et al. Mol. Cell Proteomics 5, 789- 2006) に準じた方法にてタンパク質を抽出し、還元アルキル化・トリプシン消化した試料につき、二次元 LC/MS/MS を行った。

－活用例-II： カスパーゼ 14 と相互作用する因子の同定－

カスパーゼ 14 は、皮膚で高発現しながらその機能に不明な点が多い。そこで、カスパーゼ 14 と相互作用する物質の同定を目的とし、ケラチノサイト（増殖期&分化誘導後）、ヒト角層、ヒト乾癬から得たタンパク質抽出液に、セファロースに結合させた活性化カスパーゼ 14 又はプロカスパーゼ 14 抗体を入れてインキュベートし、リンス・粗精製後に得られたタンパク質混合物の一次元 LC/MS/MS を行った。

<結果・考察>

開発した改良型ショットガン分析システムは、ナノフロー LC を使わないスプリットシステムながら、カラム流速約数 100nL/min のほぼ一定流速での分析を、安定かつ連続的に進めることがわかった（図 11）。

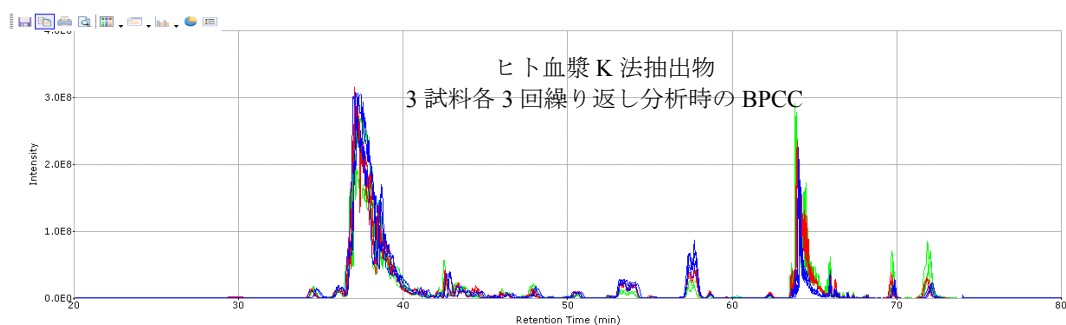


図 11 ヒト血漿 K 法抽出物の 1 次元 LC/MS/MS 時のベースピークカレントクロマトグラム(BPCC)

流速の安定化には、試料中の不溶分を除くインラインフィルターと、フリット化カラムの使用が特に重要であることがわかった。インラインフィルターは、トラップカラム先端に溜まった微粒子によるスプリット比の変化を効果的に防ぐことができる。フィルターの交換はマニュアル

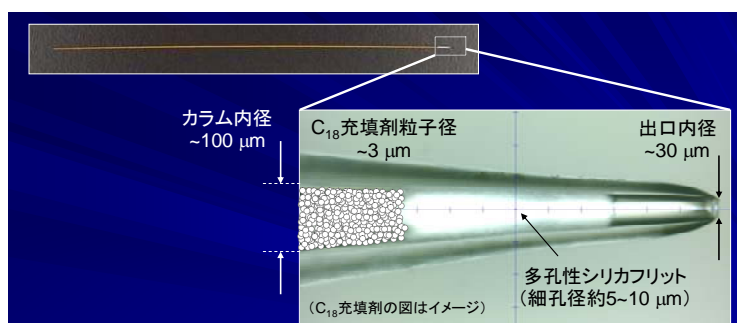


図 12 先端フリット化キャピラリーカラム

作業となるが、多検体分析途中でも随時交換できるよう、バルブでオフラインに切り替えられるようにした。先端をフリット化したカラム（図 12）は、キャピラリー先端にかかる不要な背圧を下げることで、一定流速の維持に高い効果を持つ。また、先端部での詰まりを劇的に減らす効果があり、難溶性成分が析出しやすい皮膚由来試料では、特に有用であることがわかった。キャピラリーカラムの先端の内径は、粒子径約 3~5 μm のカラム充填剤の流出を防ぐため、アーチストーンを形成する一定限度以上に広げることができない。これにより、先端の口径に依存した背圧がかかるため、抵抗管によるパッシブなスプリットシステムでは一定流速の設定・維持が困難となる。詰まりにも弱く、わずかでも詰まると抵抗が増して流速が落ち、さらに不溶化して流れが止まる悪循環に陥る。フリット化のメリットは、先端の口径を 30 μm 程度と大きめにできることであり、これにより背圧が下げられるだけでなく、詰まりによる分析停止のリスクをほぼゼロにすることができた。大

径化により詰まりにくくなることに加え、仮にどこかが詰まっても、常に別の流路が確保されるためと考えられた。

ベントシステム化の当初の目的は、オートサンプラーによる連続自動分析化であったが、ベント化に伴い採用した Upchurch 製汎用マイクロ配管部品は、結果的に皮膚試料の分析には特に有用であることがわかった。皮膚試料の分析では、大量に存在するセラチンがキャリーオーバーとなりやすく、カラムを試料ごとに交換する必要がある。開発したシステムは、トラップ／分析カラムの交換や、試料の複雑度に応じた多次元化が容易であり、流速の安定化とも相まって、毎度の流速調整をせずとも、ほぼ一定の保持時間のデータがルーティン的に取得できるようになった。

毛髪試料など、検出されるタンパク質の種類が多く、ダイナミックレンジも広い場合は、一次元分離では不十分で、二次元分離が必須となる。一次元目には SCX（強カチオン交換樹脂）を用いるのが一般的であったが、SCX と弱アニオン交換樹脂(WAX)を混合したものをを用いると、タンパク質の同定率が最大 100%と飛躍的に向上することを見いだした。この理由は、反対の電荷を持つ樹脂同士を共存させることで、局所的に Donnan 効果という現象が生じ、SCX 基に吸着されたペプチドの溶出に使う塩（カチオン）の、SCX 粒子近傍での見かけの活量が上がるためと推定された⁷⁾。ペプチドの回収率は、対 SCX で 1.7 倍に改善する他、WAX 粒子の導入により、これまで殆ど保持されなかった酸性ペプチドの保持が増加し、二次元分離の効率が向上することもわかった。又、本法は、酸性度の高いリン酸化ペプチドの同定率向上にも効果的であった。応用例の詳細については、本発表にて紹介する。

【参考文献】

- 1) K. Kishida, T. Ohmura, T. Fukuhara, T. Kimura, and A. Motoyama, “Detailed Characterization of Poly(oxyethylene)-based Polymer Surfactants by MALDI-TOFMS and LC/High-resolution MS”, *Annual Conference on Mass Spectrometry 2008*, 3P-53
- 2) Skelton, R., F. Dubois, and R. Zenobi, “A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers.”, *Anal Chem*, **72** (2000) 1707-10
- 3) A. Motoyama and M. Hayashi, “Application of Isotope-selective Tandem Mass Spectrometry Technique for Composition Analysis of Fragment Ions – Reevaluation of an Old Knowledge with Recent Instruments.”, *Annual Conference on Mass Spectrometry 2009*, 3P-0009
- 4) J.H. Beynon *et al.*, *Analyst*, **103** (1978) 613-622
- 5) W. D. Lehmann, *J. Mass Spectrom.*, **33** (1998) 164-172
- 6) Washburn, M.P. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **9** (2001) 242-247; Wolters, D. A. *et al.*, *Anal. Chem.* **73** (2001) 5683-5690
- 7) Motoyama, A. *et al.*, *Anal. Chem.* **79** (2007) 3623-3634