

# HPLC バルブソリューション: 脱塩アプリケーション②

## モノクローナル抗体のイオン交換分離と TOF-MS 検出



### <要旨>

抗体分析ではイオン交換モードやサイズ排除モードによる分離分析が用いられます。一般的にこれらのモードで分析する際には、緩衝能や溶出力の強さからリン酸緩衝液や塩化ナトリウムなどの不揮発性の塩が使用されます。

不揮発性の塩を使用した分離条件で溶出した化合物の分子量を LC/MS で求めることはこれまで困難でした。

ここではイオン交換分離によるモノクローナル抗体 (mAb) 溶出を行い、ピークの画分をハートカットして揮発性移動相を用いて LC/MS 分離を行いました。

**Key Words:** バルブソリューション、不揮発性移動相の MS 検出、抗体、mAb、イオン交換

\*\*\*\*\*

### 1. はじめに

抗体やタンパク質の HPLC 分析にはリン酸緩衝液によるイオン交換分離が用いられることがありますが、リン酸塩や塩化ナトリウムなどの不揮発性の塩類は LC/MS に導入できません。

ここではリン酸緩衝液と塩化ナトリウムを用いたイオン交換クロマトグラフィにより intact mAb を溶出させ、ターゲットの溶出時間にバルブを動作させることで揮発性移動相の系に移送し、マススペクトルを採取しました。MassHunter BioConfirm ソフトウェアによりデコンボリューションを行い、mAb のデコンボリューションスペクトルを得ました。

### 2. 実験条件

intact mAb チェックスタンダードを 1 mg/mL に調製し試料としました。

Table I 分析条件

イオン交換分離	Agilent Infinity 1260 LC System
Column	Agilent Bio Mab, NP5, 2.1 x 250 mm, 5 μm
Mobile phase	A: phosphate Buffer, pH=6.0 B: A + 500mM NaCl
Gradient	0%B(0 min) -> 80%B(5min)
Injection volume	5 μL
Column temp	40 °C,
Flow rate	0.25 mL/min
DAD	280 nm
脱塩	2 position/ 6 port Valve + Pump
Column	Advance Bio RP-Mab Diphenyl, 2.1 x 50 mm, 3.5 μm
Mobile phase	A: 0.1% formic acid B: 80%IPA+20%ACN
Gradient	10%(0 min) -> 10%(7 min) -> 85%(10 min)
loop volume	100 μL
Valve Position	1 ->2 (0min), 1->6(7min)
Column temp	80 °C,
Flow rate	1.0 mL/min
TOF-MS	6560IM QTOF (TOF mode)
Gas Temp	350 °C
Gas flow	8 L/min
Neb pressure	45 psi
Sheath Gas Temp	400 °C
Sheath flow	12 L/min
Capillary Voltage	4000 V
Fragmentor	380 V
Range	m/z = 2000 - 6000
polarity	positive

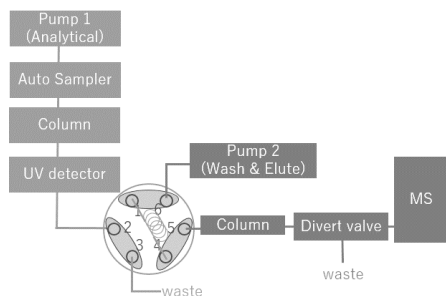


Fig. 1 システムの構成例

Pump(G1312B), Auto sampler(G1329B), TCC(G1316C),  
DAD(G1315C), 2<sup>nd</sup> Pump(G1312B), Valve(G1170A)

### 3. 結果および考察

UV 検出器による 1 次元目のクロマトグラムを Fig.2 に示しました。単一のピークが溶出することが確認されました。ピークが溶出する画分をハートカットし、LC/MS に導入しました。タンパク質由来のシグナルが観測されると思われる  $m/z=2000-4000$  の範囲で抽出したマスクロマトグラムを Fig.3 に示しました。不揮発性の塩類は二次元目の Diphenyl カラムの  $T_0$  付近に溶出し、測定対象であるインタクト mAb はカラムに保持され溶出したことが確認されました。

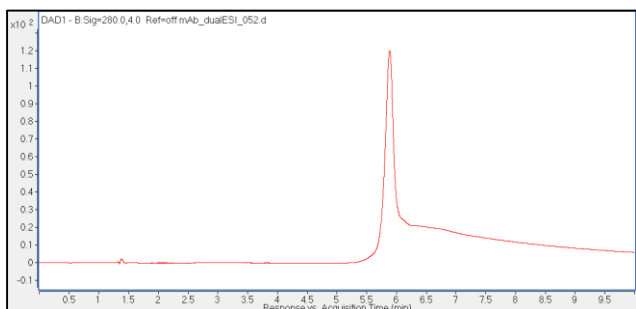


Fig. 2 mAb の UV クロマトグラム (UV:280 nm)

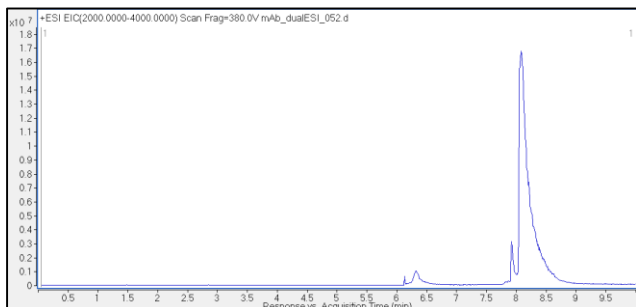


Fig.3 ハートカット後の TOF-MS によるマスクロマトグラム ( $m/z=2000-4000$ )

ハートカットし、LC/MS に導入されたピークのマスペクトルを Fig.4 に示しました。

MassHunter BioConfirm ソフトウェアによりデコンボリューションを行いました。デコンボリューションスペクトルを Fig.5 に示しました。

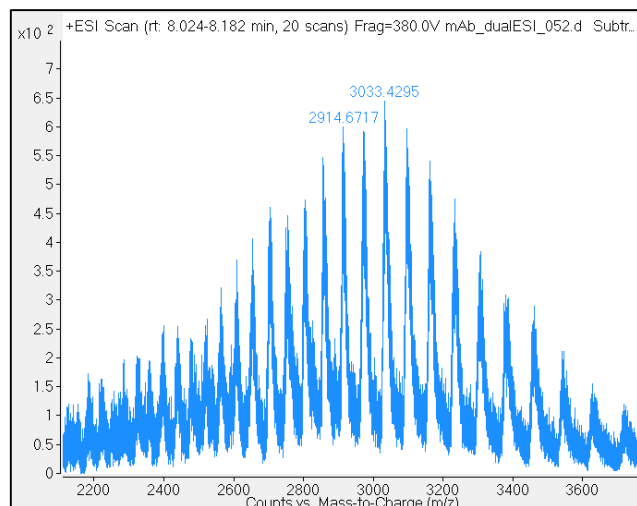


Fig.4 mAb のマスペクトル

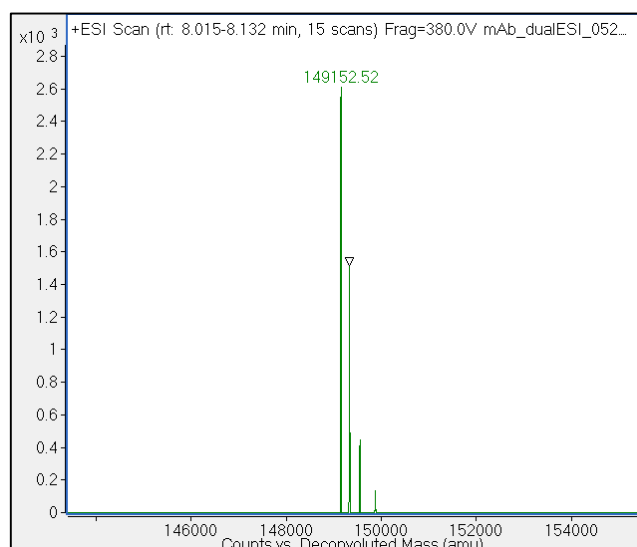


Fig.5 mAb のデコンボリューションスペクトル

### 4. まとめ

2 position/6 port バルブを用い、イオン交換モードによるインタクト mAb の HPLC 分析条件からターゲットピークのみを揮発性移動相の系に置換し、TOF-MS 検出を行いました。得られたマスペクトルに対しデコンボリューション処理を行い、分子量を確認することが可能となりました。このようなシステムを用いることで、抗体分析で一般的なイオン交換やサイズ排除モードによる分離とマスペクトル採取を同時に行うことが可能になりました。

#### 【LC-MS-201606HK-002】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

<http://www.agilent.com/chem/jp>