

強化されたペプチド特性解析と安定性評価

Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計での UV-Vis 二次微分分光分析

著者

Suresh Babu C. V.
Agilent Technologies, Inc.

概要

ペプチド治療薬の安定性をモニタリングすることは、バイオ医薬品開発においてきわめて重要です。安定性試験で一般的に使用される、従来の紫外可視（UV-Vis）吸収分光分析技術では、特にタンパク質や DNA などの生体分子が通常示す幅の広いピークに対して、十分な波長分解能を提供できない場合が多くあります。これにより、スペクトル特性が重なる場合に特に顕著となる、微細な構造変化を検出することが困難になります。このアプリケーションノートでは、ペプチド特性解析と安定性評価の改善のため、Agilent Cary マルチセル 3500 UV-Vis 分光光度計を用いた UV-Vis 二次微分分光分析の利点を示します。Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計の高度な機能（マルチセル測定や標準搭載の微分計算など）は、データ取得と分析を効率化するため、バイオ医薬品アプリケーションにおけるペプチド安定性の研究に有用なツールとなります。

はじめに

合成ペプチドは、成長を続けている生物製剤の一種です。グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）作動薬は、天然の GLP-1 ホルモンを模倣した合成ペプチドであり、代謝調節において重要な役割を果たしており、インスリン分泌と減量促進の両方に役に立ちます。¹ GLP-1 分子は、さまざまな分解経路の影響を受けやすいため、GLP-1 ベースの治療薬の品質と安定性を評価することは、その有効性を確保するうえできわめて重要です。

ペプチドの安定性は、一般的に紫外分光分析で生成される吸収スペクトルの変化を観察することで測定されます。² この技術は非破壊的であるため、ワークフロー上大きな利点が得られます。例えば、貴重なサンプルは分析後も完全な状態のまま残されるため、液体クロマトグラフィー / 質量分析などの相補的技術により、その後の分析が実施可能です。さらに、UV-Vis 分光分析は高速かつ容易であるため、幅広いユーザーが利用しやすくなっています。

ただし、特に酸化ストレスなどの環境要因に曝露された生体分子においては、ピーク位置のわずかなシフトや微細な強度変動といった微細な変化をモニタリングする場合、従来の UV-Vis 吸収スペクトルの解釈が困難になる可能性があります。スペクトル特性の分解能が低いことも課題であり、生体分子のスペクトルが複数の重なり合う成分で構成される場合に特に顕著です。微分分光分析は、微細な特徴を増幅することにより、このような制限に対処する強力な技術であり、従来の吸収スペクトルでは区別できない重なり合ったピークを分離できます。

マルチセルモジュールを備えた Agilent 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計は、生体分子分析のための二次微分測定を用いた強力なツールです。この機器は、標準、サンプル、コントロールを含む、複数のサンプルを同一条件下で同時に測定することが可能です。Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計を制御する Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアには、吸光度測定後に二次微分スペクトルを自動的に生成する方程式機能が標準搭載されており、計算誤差を最小限に抑えて、データ処理を効率化します。

このアプリケーションノートでは、Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計の高度な機能と UV-Vis 二次微分分光分析を使用することにより、ペプチドおよび芳香属アミノ酸から採取された、重なり合う吸収ピークの分解能を向上させる方法を示します。

実験方法

材料

トリプトファン（W）、チロシン（Y）、フェニルアラニン（F）、 α -メラノサイト刺激ホルモン（MSH）、メリチン、リラグルチド、アンギオテンシン II、30 %（v/v）過酸化水素（H₂O₂）、およびリン酸ナトリウムは、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から入手しました。

サンプル前処理

トリプトファン（0.15 mM）、チロシン（0.5 mM）、フェニルアラニン（4.0 mM）を含むすべてのペプチドサンプルは、pH 7.4 のリン酸ナトリウムバッファで 1 mg/mL の濃度に調製しました。ストレス条件では、ペプチドを 0.07 % H₂O₂ とともに、室温で一晩インキュベートしました。UV-Vis 分析前のその他のサンプル前処理は不要でした。

使用装置

データ取り込みは、表 1 に記載のパラメータを用いて、Cary ワークステーションソフトウェアを搭載した Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計により実施しました。マルチセル設計により、参照サンプルとともに最大 7 サンプルの同時測定が可能です。測定には、光路長 10 mm の超マイクロポリウム長方形キュベット（部品番号 5062-2496）を使用しました。スペクトルは、再現性を確保してノイズを低減するために、複数回の分析（n = 5）の値を平均化しました。

表 1. Agilent Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計のメソッドパラメータ

パラメータ	設定値
収集モード	スキャン
スキャン範囲	200 ~ 500 nm
平均化時間	0.02 秒
データ間隔	1.00 nm
スキャン速度	3000 nm/min
スペクトルバンド幅	2.00 nm
導関数	二次微分
スムージングフィルタ	9

結果と考察

芳香属アミノ酸の UV-Vis スペクトル

トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンは芳香属アミノ酸で、ペプチドやタンパク質中に一般的に存在しており、特徴的な UV-Vis 吸収プロファイルを示します。図 1A は、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンの UV-Vis ゼロ次スペクトルを示しています。ゼロ次スペクトルにおけるピークの重なりにより、アミノ酸の微細なスペクトル特性を区別することが困難になります。

吸収スペクトルの分解能と精度を向上させるために、Savitzky-Golay メソッドに基づいて二次微分スペクトルを解析しました。図 1B、1C、1D は、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンの二次微分 UV-Vis スペクトルを示しています。サンプル測定値の取得後、Cary UV ワークステーションソフトウェアに標準搭載の計算機能により、二次微分スペクトルが自動

的に生成されました。二次微分スペクトルは、最大値と最小値（変曲点）を有するピークを示しており、これを利用して、さまざまな芳香属アミノ酸の異なるスペクトル吸収バンドを識別することができます。これにより、生体分子がストレス条件下に置かれた際に生じる微小なスペクトル変化の研究が可能になります。アミノ酸の吸収最大値は、以下のとおりでした。

- **トリプトファン**：吸収最大値波長：約 273、280、288 nm
- **チロシン**：吸収最大値波長：約 275、282 nm
- **フェニルアラニン**：吸収最大値波長：約 246、252、257、264、268 nm

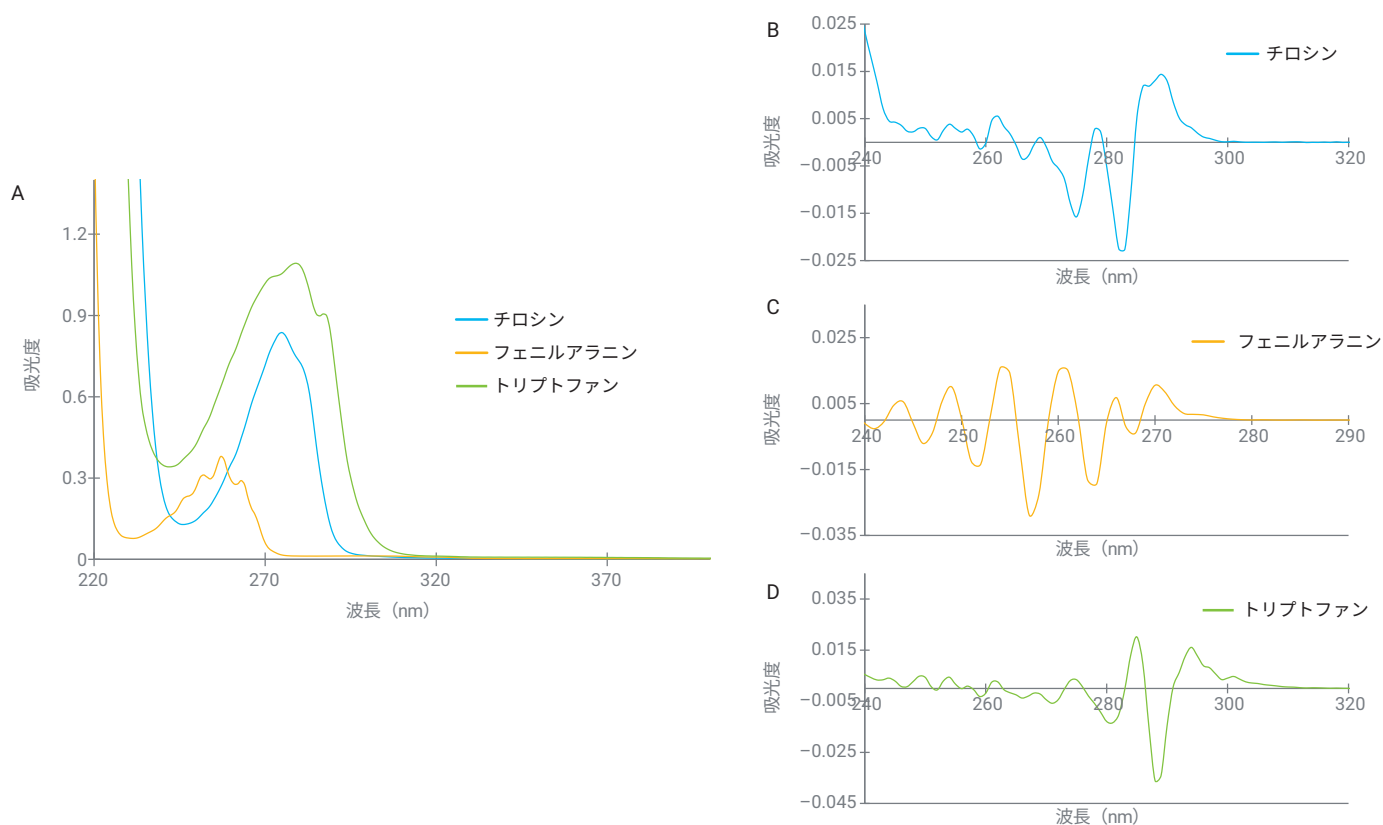


図 1. 芳香属アミノ酸の UV-Vis 吸収スペクトル。(A) ゼロ次、(B、C、D) 二次微分 UV-Vis 吸収スペクトル

ペプチドの UV-Vis スペクトル

比較用の異なる吸収スペクトルを生成するため、研究対象として選択されたペプチドは、芳香属アミノ酸の含有量が異なっていました。図 2 は、メリチン、MSH、アンギオテンシン II、リラグルチドの 4 種類のペプチドの二次微分吸収スペクトルを示しています。二次微分スペクトルにおけるピーク位置は、構成芳香属アミノ酸の既知の吸収特性と良好な相関を示しました。全体として、二次微分スペクトルにより、ペプチドのスペクトル特性を詳細に把握することができました。研究対象のペプチドに含まれる芳香属アミノ酸の数を、表 2 にまとめて示しています。メリチンは、

291、283、275 nm に特徴的なピークを示しており、これらは主にトリプトファンに起因していました。MSH とリラグルチドは、290、283、266 nm にピークを示しており、これらは 3 種類の芳香属アミノ酸すべてからの寄与を反映していました。アンギオテンシン II は、283、276、264、258、252 nm にピークを示しており、これはチロシンとフェニルアラニンの存在と一致していました。

表 2. 分析したペプチドのアミノ酸組成

ペプチド	配列	トリプトファン (W) の数	チロシン (Y) の数	フェニルアラニン (F) の数
リラグルチド	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIAWLVRRGRG	1	1	1
メリチン	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	1	0	0
α-メラノサイト刺激ホルモン (MSH)	YSMEHFRWGKPV	1	1	1
アンギオテンシン II	DRVYIHPF	0	1	1
物質 P	RPKPQQFFGLM	0	0	2

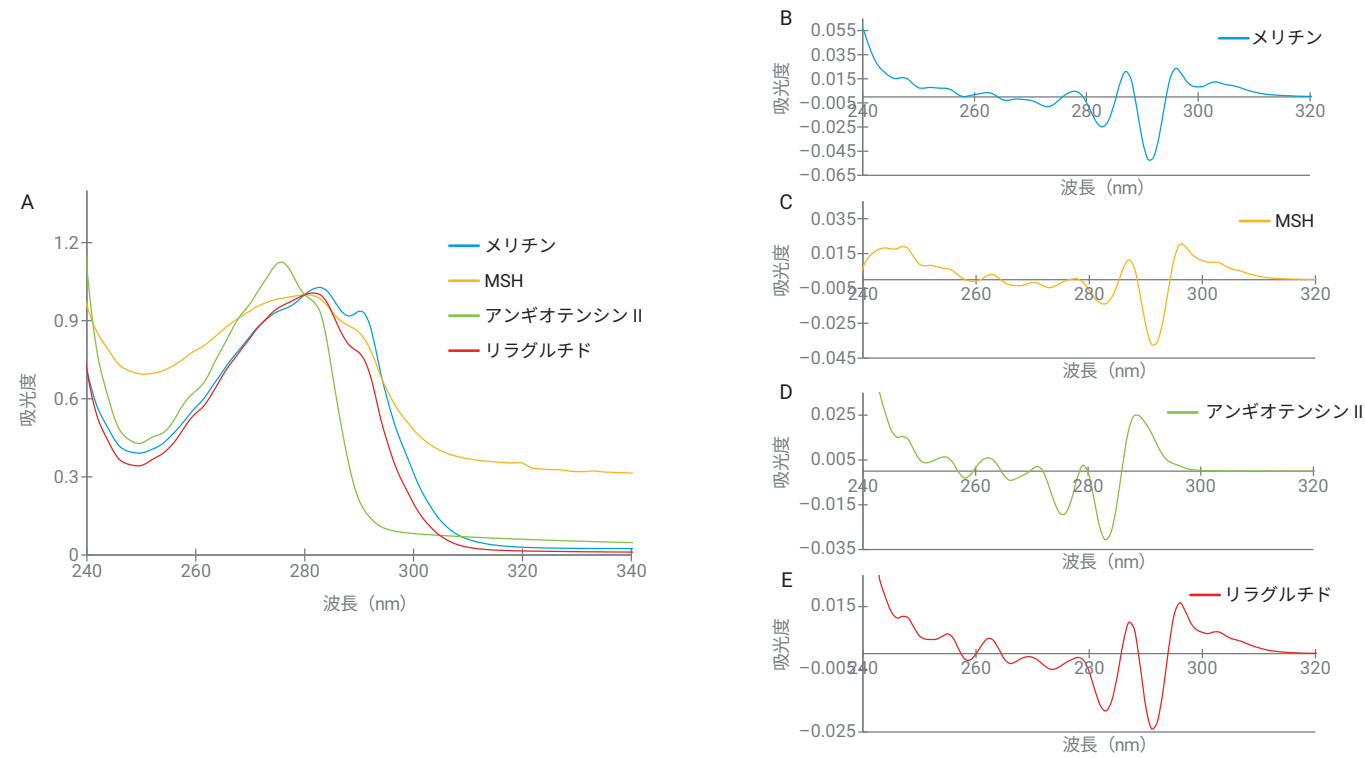


図 2. ペプチドの UV-Vis 吸収スペクトル。(A) ゼロ次、(B、C、D、E) 二次微分 UV-Vis 吸収スペクトル

酸化ストレス下におけるペプチド安定性のモニタリング

安定性モニタリングにおける微分分光分析の有用性を評価するために、ペプチドを H_2O_2 で処理しました。図 3 は、未処理ペプチドと H_2O_2 処理済みペプチドの二次微分 UV-Vis スペクトルを比較したものを示しています。 H_2O_2 処理によるペプチドの波長吸収率の微小な変化は、二次微分スペクトルで効果的に取得されました。アンギオテンシン II ペプチドは、トリプトファン残基が欠落しているため、 H_2O_2 処理後に 291 nm 領域付近で有意な変化は観察されませんでした。メリチンの二次微分スペクトルでは、最小限の変化しか観察されておらず、酸化の影響を受けにくいことを示しています。トリプトファン含有 MSH およびリラグルチドは、 H_2O_2 処理後に 291 nm のピークの強度が顕著に低下しました。これは、化合物

が酸化されやすいことを示しており、主にトリプトファン残基に影響を与えますが、さらにトリプトファン酸化の検出において、二次微分メソッドに特異性があることを実証しています。リラグルチドの酸化状態をさらに確認するために、 H_2O_2 処理したサンプルを、液体クロマトグラフィー四重極飛行時間型質量分析 (LC/Q-TOF-MS) で分析しました。図 4 は、 H_2O_2 処理したリラグルチドのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示しています。デコンボリューションした質量スペクトルにより、単酸化生成物および二酸化生成物に対応する +16 Da および +32 Da の質量シフトを示す酸化形態をそれぞれ確認しました。³

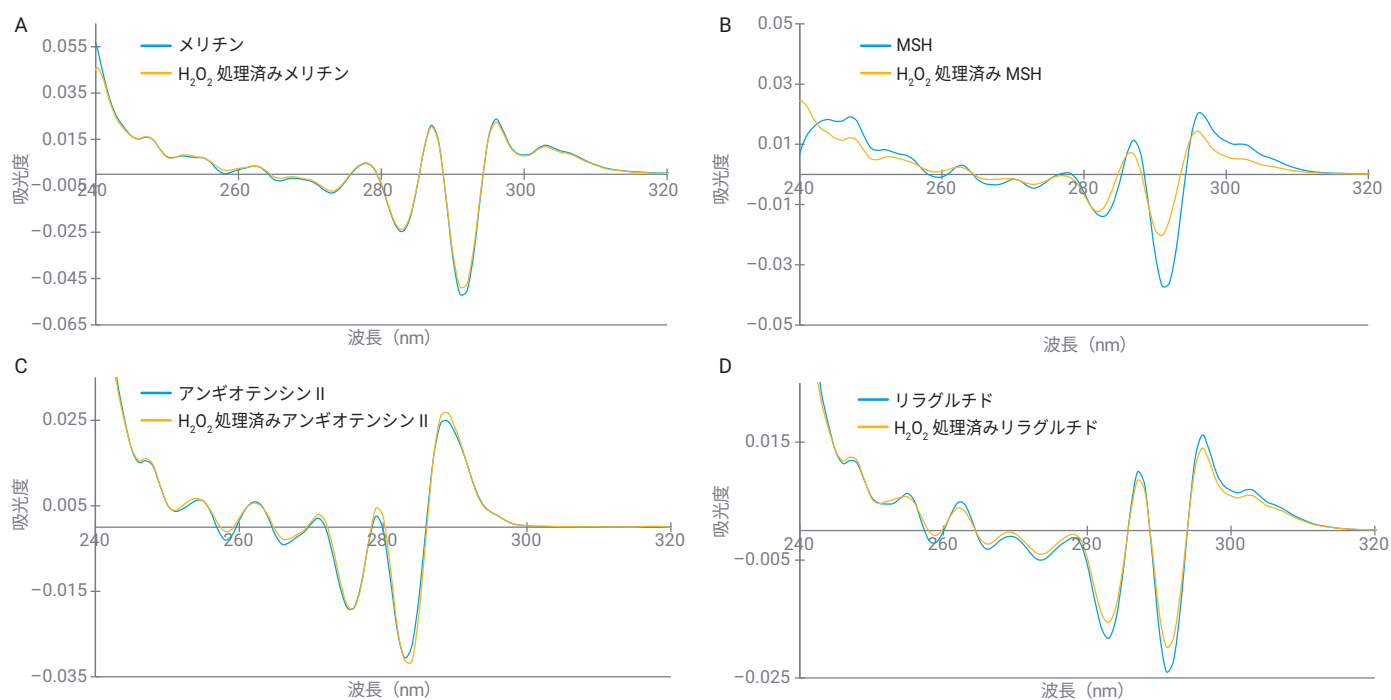


図 3. 未処理ペプチドと H_2O_2 処理済みペプチドの二次微分 UV-Vis 吸収スペクトル

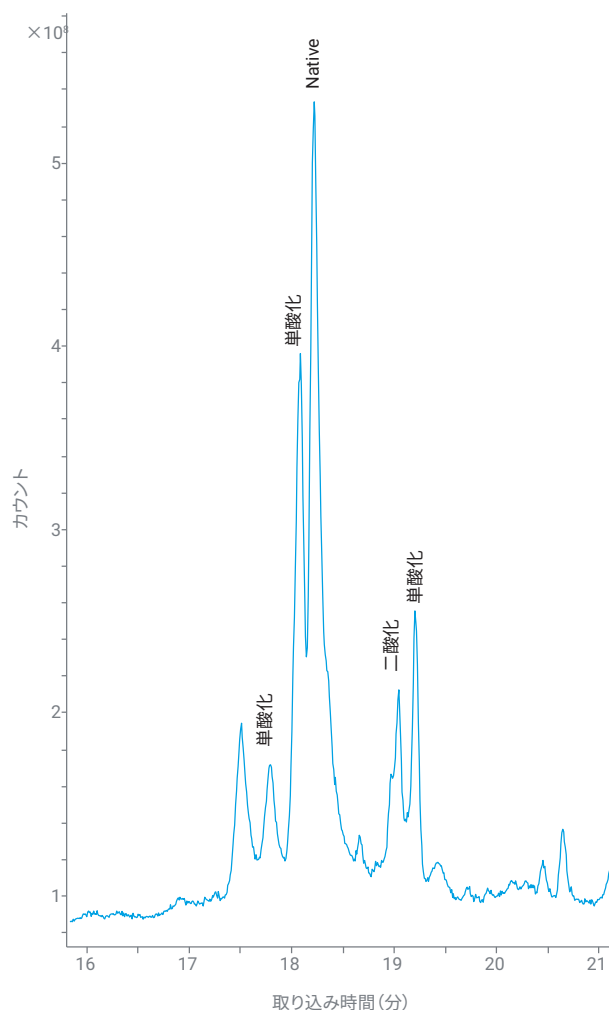


図 4. 酸化リラグルチドの LC/MS トータルイオンクロマトグラム

結論

本研究の結果は、UV-Vis 二次微分分光分析が、ペプチド中の芳香族残基の変化に起因する微小なスペクトルの違いを、正確に同定およびモニタリングできることを明らかに示しており、ペプチド安定性のモニタリングにきわめて有用なツールとなります。Agilent Cary マルチセル 3500 UV-Vis 分光光度計のマルチセル機能は、8 個のサンプルの同時モニタリングを可能にすることにより、測定時間を短縮します。標準搭載の計算機能は、自動計算により分析を効率化するため、ユーザーは容易にデータを解釈して意思決定を行うことができます。この機能は、医薬品開発と品質管理において、ペプチド安定性の正確で効率的なモニタリングがきわめて重要になる、バイオ医薬品分析で特に有用です。非破壊的な UV-Vis 分光分析は、相補的な LC-MS 分析などのその後の分析のためのサンプルを保ちます。Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計は、速度、使いやすさ、貴重なサンプルの再利用が最も重要になる、医薬品開発および品質管理 (QC) 試験ラボに最適な選択肢です。

参考文献

1. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; et al. Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). *Mol. Metab.* **2019**, 30, 72–130.
2. Liyanage, M. R.; Bakshi, K.; Volkin, D. B.; Middaugh, C. R. Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1088, 225–236.
3. Suresh Babu, C. V. Characterization of Forced Degradation Impurities of Glucagon-Like Peptide-1 Agonists by LC/Q-TOF Mass Spectrometry. Agilent Technologies application note 5994-7794EN. **2025**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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-008586

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, August 14, 2025

5994-8551JAJP