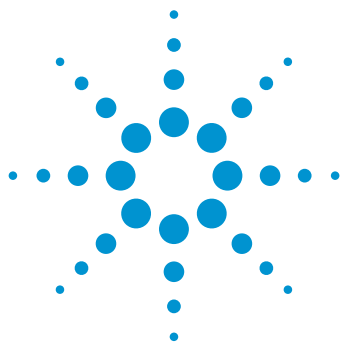




MS 分析のための脱塩処理を自動化する Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューション

医薬品ペプチドの 2D-LC MS 分析

アプリケーションノート

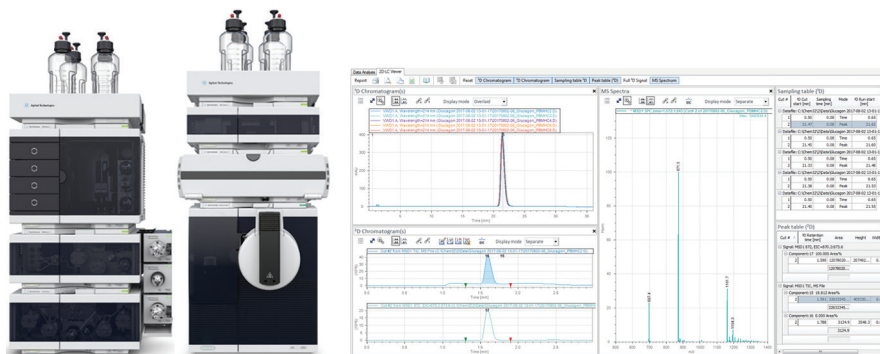
生物製剤・バイオシミラー

著者

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.

概要

治療用ペプチドと治療用タンパク質の特性分析および不純物分析には、質量選択検出と組み合わせたクロマトグラフィー分離が必要になります。しかし、ペプチドやタンパク質のクロマトグラフィー分離メソッドでは、MS 分析に対応していない移動相を用いる場合が多々あります。このアプリケーションノートでは、MS 分析のための脱塩処理を自動化するマルチハートカット (MHC) 二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) の使用について説明します。一次元目で USP 39 に従って、MS 分析に対応していない移動相を用いてペプチドグルカゴン进行分析しました。続いて二次元目で自動で脱塩し、MS 分析を実施しました。



Agilent Technologies

はじめに

医薬品の研究開発において、治療用ペプチドおよび治療用タンパク質に対する関心が高まっています。これら高分子化合物の複雑な構造および不純物のプロファイルは、化合物の特性解析や不純物分析に関する課題となっています。この課題に対応するためには、高分子化合物の分析に質量選択検出器 (MSD) を組み合わせたクロマトグラフィー分離を行う必要があります¹。ペプチドやタンパク質のクロマトグラフィー分離メソッドには、MS 分析に対応していない移動相、例えば、高濃度の塩や非揮発性の緩衝液を含む移動相を使用する場合があります^{1,2}。このようなクロマトグラフィーメソッドで MS 検出を可能にするには、MS に対応する移動相にメソッド変換するか、または脱塩後オフラインの MS 分析でのフラクションコレクションが一般的に必要です¹。

二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) では、二次元目を効果的な脱塩ツールとして用いると、MS に対応していない移動相でも MS 検出とクロマトグラフィーメソッドをオンライン接続できます。2D-LC ソフトウェア A.01.04 が搭載された Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションは、Agilent シングル四重極質量分析装置を用いた MSD と 2D-LC でメソッド設定からデータ解析まで行う完全統合型ソリューションです。一次元目 (¹D) の移動相からの塩または緩衝液が、二次元目 (²D) 分析の始めに廃液に流れるように、ダイバータバルブで自動的に切り替えます。以前のアプリケーションノート³で示したように、Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジを用いると、二次元目で高速かつ効果的に脱塩することができます。一次元目の分離と比較して選択性の異なる全長カラムと条件を用いると、二次元目で脱塩だけでなく、さらなる分離が可能になります²。

グルカゴンは 29 のアミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、低血糖の応急処置に使用されます⁴。USP 39 に従って、有機不純物のグルカゴンのアッセイと分析を、移動相にリン酸カリウム緩衝液を用いて LC と UV 検出によって実施します。この移動相は MS 検出に対応していません。このアプリケーションノートでは、一次元目で USP 39 に従ったグルカゴンの分析を行い、二次元目で自動脱塩と MSD 分析を行うマルチハートカット (MHC) 2D-LC の使用について説明します。

実験方法

装置

Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションは、次のモジュールで構成しました。

- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、冷却システム (オプション #100) 付き
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、標準フローセル (p/n G1314-60186) 付き
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/4 ポートデュオバルブヘッド (2D-LC バルブ、1,300 bar (p/n 5067-4244)) 付き
- 2 台の Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、40 µL ループ付きマルチハートカットバルブ (p/n G4242-64000) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/6 ポートバルブ、800 bar (p/n 5067-4282) 付き

質量選択検出は、Agilent Jet Stream ESI ソース (p/n G1958-65538) を装着した Agilent 6150 シングル四重極 LC/MS (G6150BA) を用いて実施しました。

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition Rev. C.01.07 SR3 [465] と 2D-LC ソフトウェア、バージョン A.01.04

カラム

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 × 150 mm、3.5 µm (p/n 959963-302)
- Agilent AdvanceBio 脱塩 RP、2.1 × 12.5 mm (p/n PL1612-1102)、カートリッジホルダ (p/n 820999 901) 付き

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。アセトニトリルは Merk (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、EMD Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。一塩基性リン酸カリウム、ギ酸、グルカゴン (合成粉末、細胞培養テスト済み) は Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。塩酸とリン酸はそれぞれ、Merk (ダルムシュタット、ドイツ) と J.T. Baker (デーフエンテル、オランダ) から入手しました。

サンプル

約 0.5 mg/mL のグルカゴンの標準溶液は、グルカゴンを 0.01 N HCl に再溶解して調製しました。USP 39 のガイド⁵に従い、グルカゴンのシステム適合性溶液を得るために、0.01 N HCl 中の約 0.5 mg/mL のグルカゴン溶液を 50 °C で 48 時間静置しました。

メソッド

一次元目	
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 × 150 mm、3.5 µm
溶媒	A) 16.3 g の KH ₂ PO ₄ を 800 mL の水に溶解し、 pH 2.7 に調整/200 mL アセトニトリル B) 水/アセトニトリル (60/40)
グラジエント	0 分 – 33.80 %B 30 分 – 33.80 %B 34 分 – 88.00 %B 35 分 – 88.00 %B 36 分 – 33.80 %B
ストップタイム	36 分
ポストタイム	40 分
² D ポンプのストップタイムとポストタイムを設定し、すべてのカットの ² D 分析が完了するまで、分析時間の延長が可能	
流量	0.500 mL/min
温度	45 °C
検出	VWD、214 nm、シグナルピーク幅: >0.025 分 (20 Hz) バルブの切り替えによる圧力変動からフローセルを保護するために、圧力リリースキット (G4236-60010) を VWD と 2D-LC バルブの間に設置
注入量	注入量: 15 µL サンプル温度: 8 °C ニードル洗浄: 水/アセトニトリル (70/30) で 3 秒

二次元目	
背圧を高くするため、0.075 × 340 mm のリストリクションキャピラリー (p/n 5067-4783) を用いて ² D ポンプと 2D-LC バルブを接続	
カラム	Agilent AdvanceBio 脱塩 RP、2.1 × 12.5 mm
溶媒	A) 水 + 0.1 % ギ酸 B) アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
グラジエント	0.00 分 – 5 %B 1.00 分 – 5 %B 1.50 分 – 80 %B 2D グラジエントストップタイム: 2.00 分 2D サイクルタイム: 3.00 分
流量	0.400 mL/min
温度	コントロールせず
検出	質量選択検出器 (MSD) 流れを MSD と廃液に切り替えるダイバータバルブとして 2 ポジション/6 ポートバルブを設置

MSD		
MSD シグナル	極性	ポジティブ
	モード	スキャン
	質量範囲	600 ~ 1,350 <i>m/z</i>
	フラグメンタ	100 V
	ゲイン	1.00
	スレッシュホールド	150
	ステップサイズ	0.10
	ピーク幅	0.10 分
	データ保存	フル
	ストップタイム	制限なし
ストップタイムを制限なしに設定し、すべてのカットの ² D 分析が完了するまで、分析時間の延長が可能		

スプレーチャンバ	乾燥ガス流量	10.0 L/min
	ネブライザ	35 psig
	乾燥ガス温度	200 °C
	シースガス温度	300 °C
	シースガス流量	10.0 L/min
	キャピラリー電圧	2,500 V
	ノズル電圧	300 V

ピークベースのマルチハートカット 2D-LC	
2D-LC モード	ハートカット
サンプリング表	タイムベース 0.50 分、サンプリング時間 0.08 分
	ピークベース 19.00 分、サンプリング時間 0.65 分
	ピークベース 22.50 分、サンプリング時間 0.40 分
ピーク検出	ピーク検出器モード: スレッシュホールド
	スレッシュホールド: 5 mAU

ダイバータバルブ	1.00 分後 MSD に切り替え
----------	-------------------

タイムベースのマルチハートカット 2D-LC	
2D-LC モード	ハートカット
サンプリング表	次のサンプリング表を設定し、グルカゴンのシステム適合性溶液の ¹ D クロマトグラムを用いて以下のリファレンスクロマトグラムを作成
	タイムベース 0.50 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 1.55 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 3.70 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 7.23 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 11.07 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 17.70 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 21.38 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 23.81 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 24.91 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 29.45 分、サンプリング時間 0.08 分
	タイムベース 30.25 分、サンプリング時間 0.08 分

ダイバータバルブ	1.00 分後 MSD に切り替え
----------	-------------------

結果と考察

USP 39 に従った有機不純物のグルカゴン分析を、移動相としてリン酸カリウム緩衝液を用いて LC と UV 検出で実施しました⁵。この移動相は MS 分析に対応していません。マルチハートカット 2D-LC を用いると、二次元目を効

果的な脱塩ツールとして使用し、MS 検出とこの LC メソッドをオンライン接続できるようになります。2D-LC ソフトウェア A.01.04 が搭載された Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションは、Agilent シングル四重極質量分析装置を用いた MSD と 2D-LC の完全統合型ソリューションで

す。図 1 に示すように、MS 検出の前に脱塩ができるように、¹D 移動相からの塩または緩衝液が、²D 分析の始めに廃液に流れるように、ダイバータバルブで自動的に切り替えます。

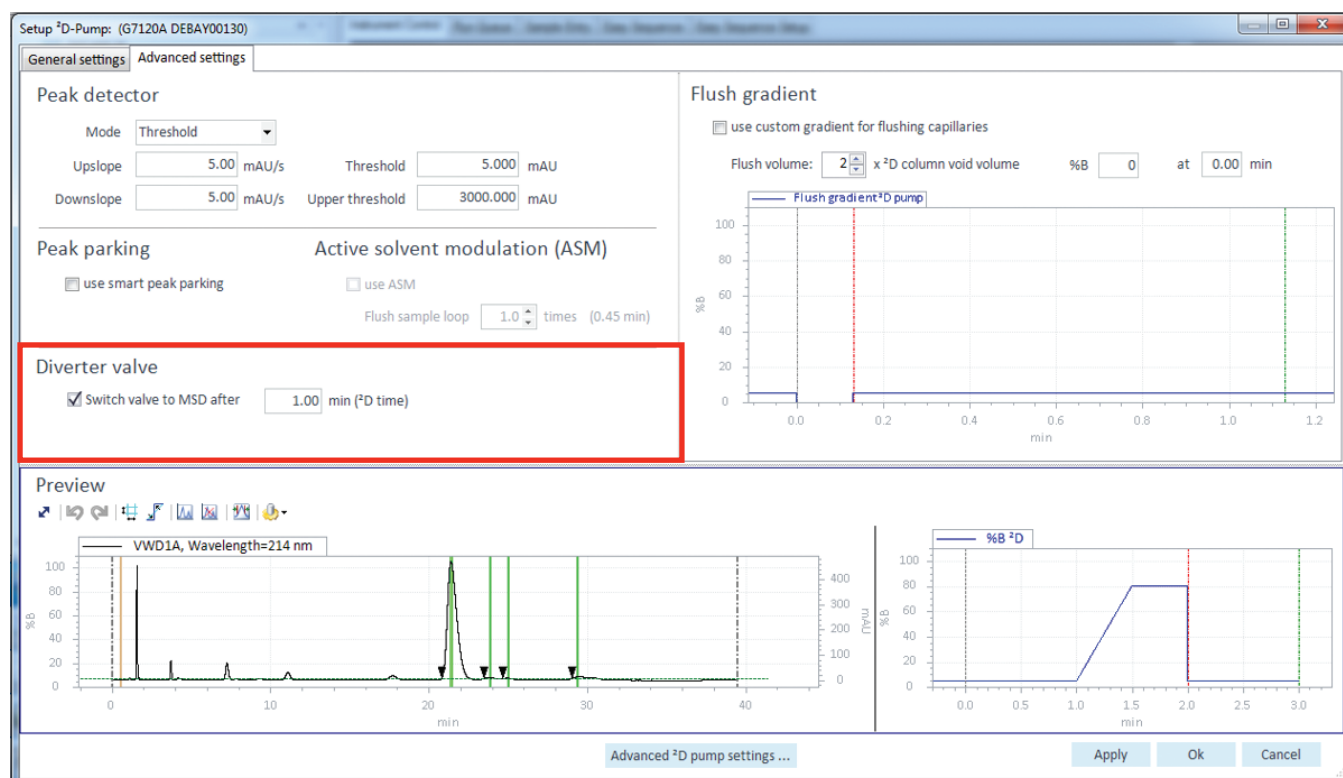


図 1. ¹D の移動相からの塩または緩衝液が、²D 分析の始めに廃液に流れるように自動的に切り替えるよう設定した 2D-LC メソッド

図 2 に、2D-LC Viewer におけるグルカゴン標準溶液のピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析の結果を示します。2D-LC Viewer は、グルカゴン標準溶液の 5 つの ^1D クロマトグラムを重ね表示とそれぞれの ^1D サンプルング表を表示しています。2D-LC Viewer には、グルカゴ

ンピークの 1 つのカットの ^2D 分析における ^2D MSD クロマトグラムも表示され、そのトータルイオンクロマトグラム (TIC) および抽出イオンクロマトグラム (EIC) とその質量スペクトルも表示されます。

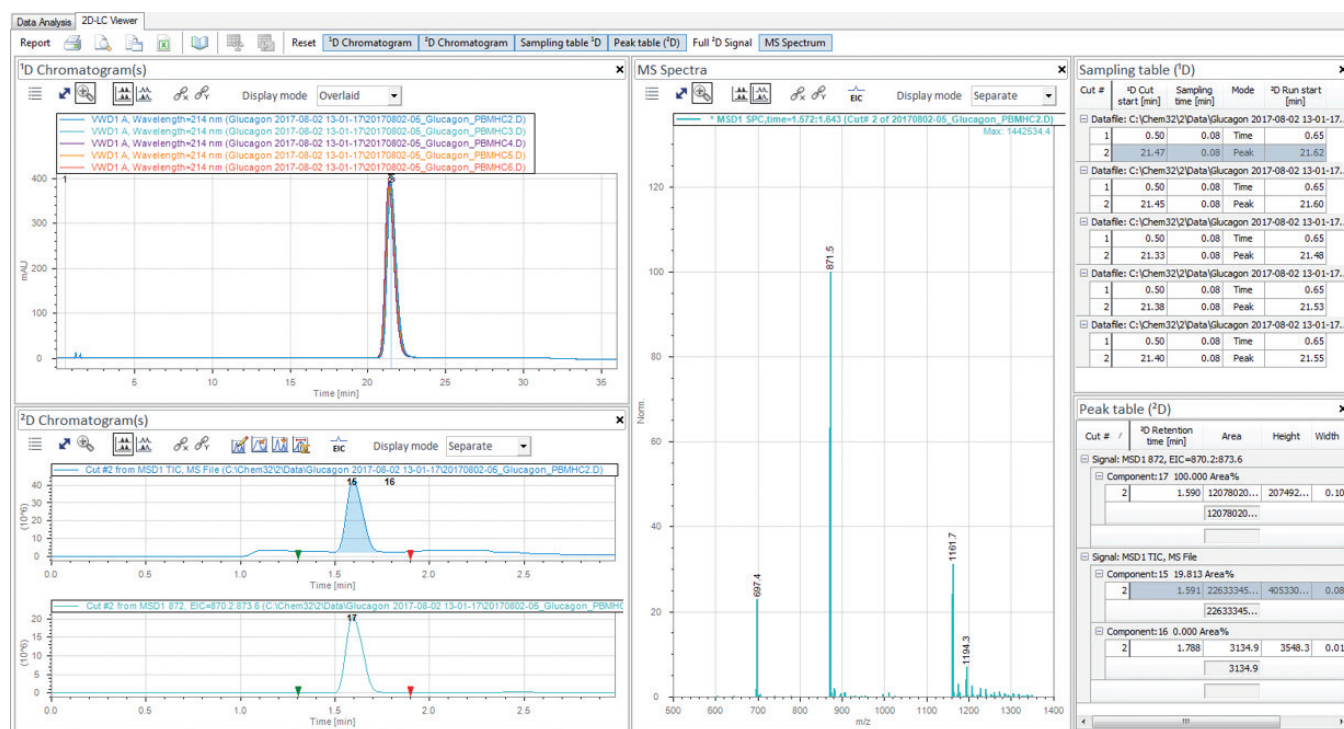


図 2. グルカゴン標準溶液のピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析の結果を示す 2D-LC Viewer

USP 39 に従ったグルカゴン分析では、グルカゴン標準溶液とシステム適合性溶液の分析に関する特定のシステム適合性要件を満たす必要があります。図 3 にグルカゴン標準溶液の 5 回分析およびグルカゴンシステム適合性溶液の分析の ¹D クロマトグラムを示します。グルカゴンシステム適合性溶液のクロマトグラムでは、グルカゴンピークの後に溶出される 4 つのピークがはっきりと見えます。このピークは USP 39 に従ったグルカゴンの脱アミド化によるものです。脱アミド化により、アスパラギンまたはグルタミンからアンモニアがなくなり、それぞれアスパラギン酸またはグルタミン酸が生成されます。アミド側鎖⁴からカルボン酸側鎖が形成されることで、+1 Da 質量が増えます。例えば、脱アミド化は、タンパク質の通常の分解過程であり、熱的ストレスによって引き起こされます⁴。ペプチドグルカゴンは 1 つのアスパラギン残基と 3 つのグルタミン残基からなります。

表 1 に USP 39 に従ったシステム適合性要件を要約します。2D-LC メソッドの一次元目で実施した分析がこの要件をよく満たしていることが示されています。

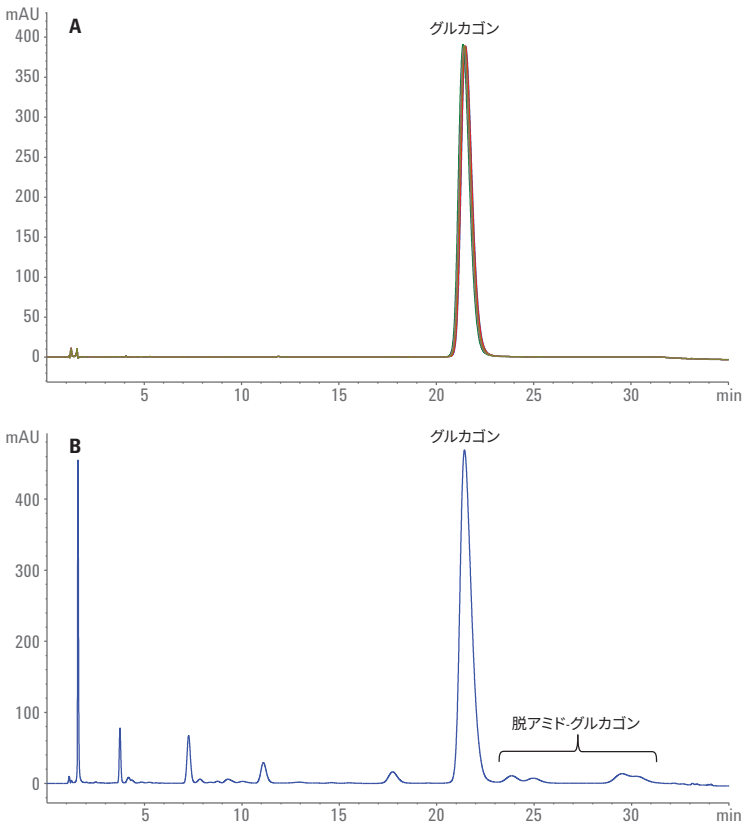


図 3. USP 39 に従ったグルカゴン分析の ¹D クロマトグラム。A) グルカゴン標準溶液の 5 回分析の重ね表示。B) グルカゴンのシステム適合性溶液の分析

表 1. USP 39 に従ったシステム適合性要件と 2D-LC メソッドの ¹D 分析の結果

システム適合性要件 ⁵	結果
相対標準偏差 (RSD): NMT 2.0 %、標準溶液	標準溶液中のグルカゴン (N = 5): RT RSD: 0.27 %、面積 RSD: 0.11 %
テーリングファクター：標準溶液の グルカゴンピークで NMT 1.8	標準溶液中のグルカゴン: USP テーリング: 1.3
分離能 (Rs): グルカゴンピークの後に溶出される 脱アミド-グルカゴンに相当する 4 つのピークが 明らかに認められます。システム適合性溶液では、 メインピークと最初に溶出される脱アミドピークの 分離能は NLT 1.5 です。	システム適合性溶液: グルカゴンピークの後に溶出 される 4 つのピークが明らかに認められます。 グルカゴンと最初に溶出される脱アミドピークの 分離能: 2.3
NMT = 以下 NLT = 以内	

図 4 に、2D-LC Viewer におけるグルカゴン標準溶液のピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析による ^1D および ^2D クロマトグラムを示します。5 mAU のスレッショールドと 0.65 分のサンプリング時間を用いて、 ^1D グルカゴンピークの頂点をハートカットし、二次元目で分析しました。 ^2D MSD クロマトグラムでは、AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジで効果的にトラップした後、グルカゴンが検出されました。図 5 にグルカゴンピークの質量スペクトルを示します。グルカゴンは、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ イオンとして検出されました。付加体は検出されなかったことから、二次元目で脱塩が効果的に行われたことが示されました。

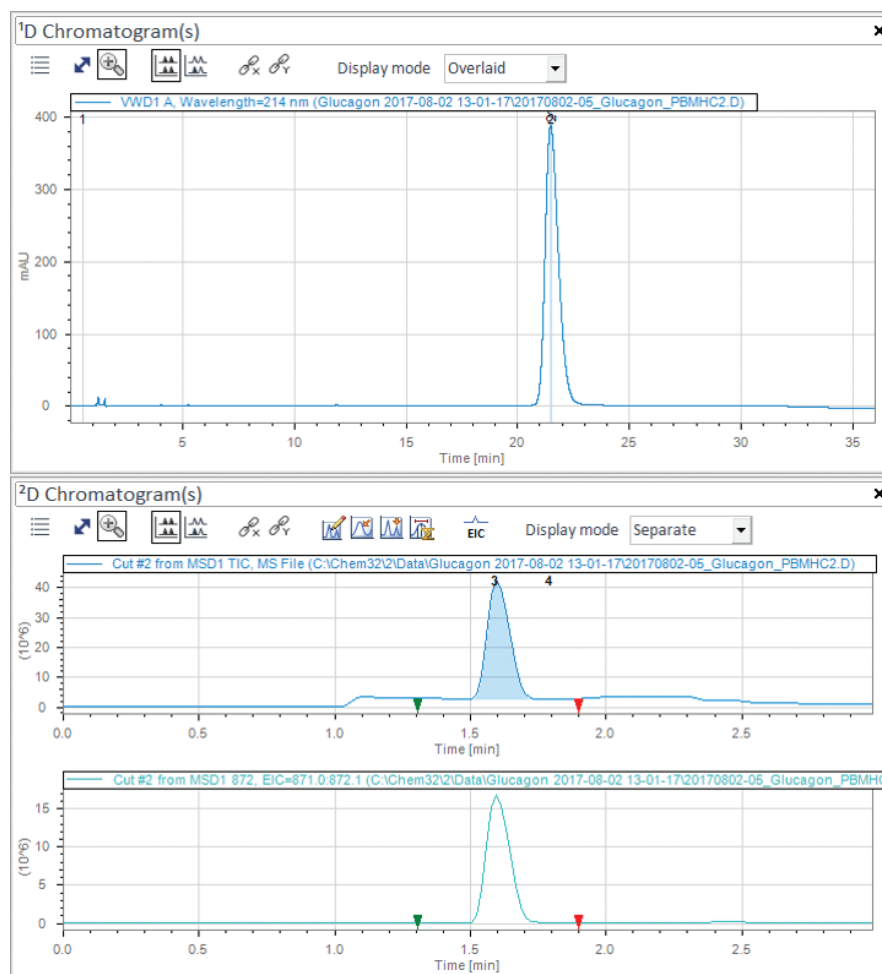


図 4. グルカゴン標準溶液のピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析の ^1D UV および ^2D MSD クロマトグラム (m/z 871.0 ~ 872.1 の TIC および EIC)

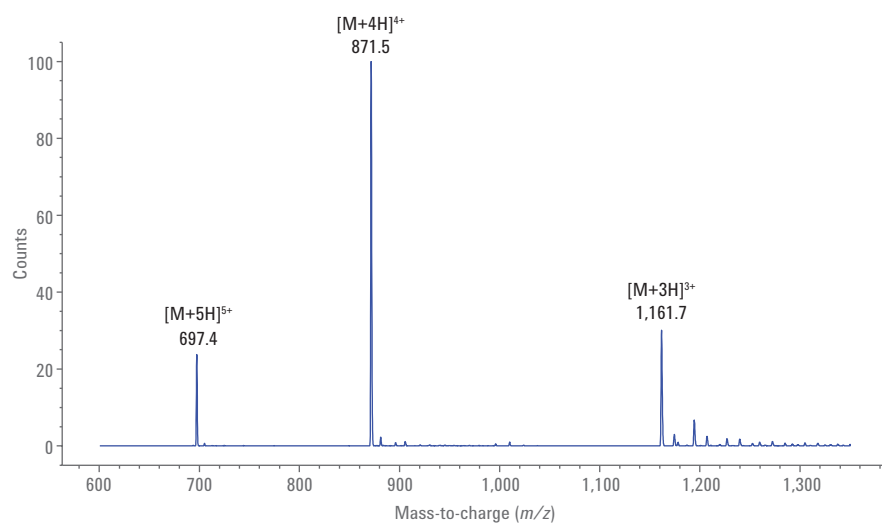


図 5. グルカゴンピークの質量スペクトル

グルカゴンのシステム適合性溶液で、ピークベースと時間ベースのマルチハートカット 2D-LC 分析をしました。ピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析の目的は、グルカゴンピークとグルカゴンの脱アミド化により生じたピークをハートカットし、これらのピークの質量情報を得ることでした。ピークベースのハートカットは異なるサンプリング時間を用いて、異なるピーク幅のピークをピーク頂点付近でハートカットできます。図 6A は、4 番目の脱アミド-グルカゴンピークが3 番目の脱アミド-グルカゴンピークと完全に分離しなかったため、この条件下で4 番目の脱アミド-グルカゴンピークをハートカットできなかったことを示しています。時間ベースのマルチハートカット 2D-LC を用いて、グルカゴンピーク、グルカゴンの脱アミド化により生じた 4 つのピーク、さらにグルカゴンの分解生成物から生じたピークなどの目的のピークをハートカットできます (図 6B)。この方法で、二次元目の脱塩後のすべてのターゲットピークにおける質量情報を得ることができます。

図 7 は、最初の脱アミド-グルカゴンピークの質量スペクトルがピークベースのマルチハートカット 2D-LC 分析後に得られたことを示しています。4 つの脱アミド-グルカゴンピークの質量スペクトルは類似しています (データは非表示)。これらのピークで検出された $[M+5H]^{5+}$ 、 $[M+4H]^{4+}$ 、 $[M+3H]^{3+}$ イオンは、グルカゴンピークと比較して質量が増えているため、これらのピークがグルカゴンの脱アミド化により生成されたことを裏付けています。

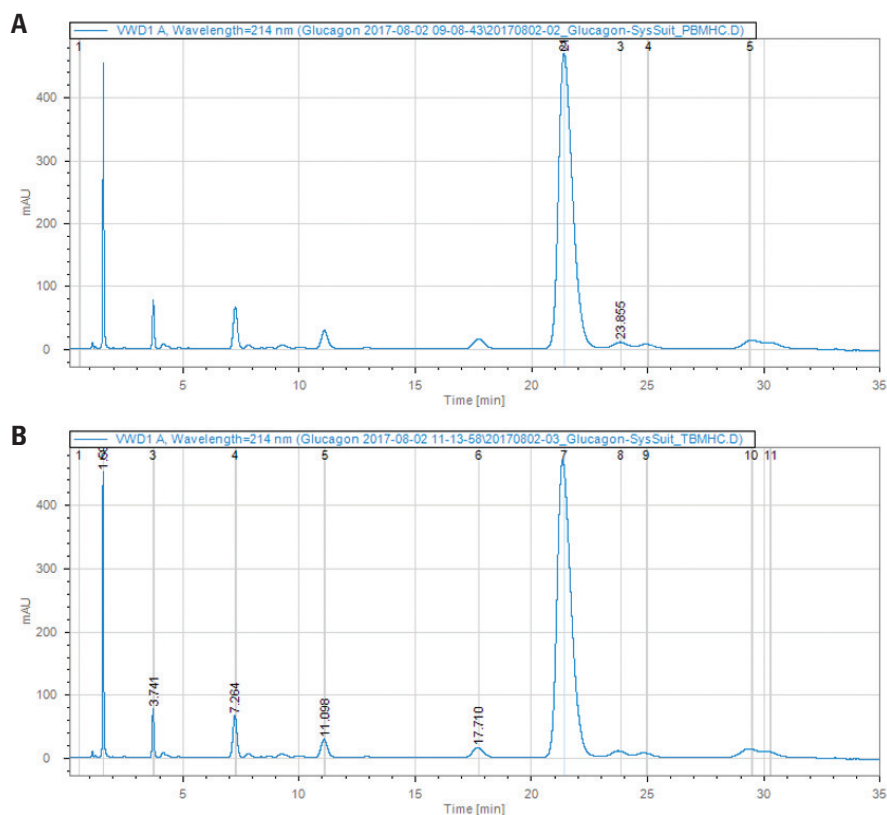


図 6. グルカゴンのシステム適合性溶液の分析においてハートカットした 1D クロマトグラム (A) ピークベースのマルチハートカット 2D-LC、(B) タイムベースのマルチハートカット 2D-LC

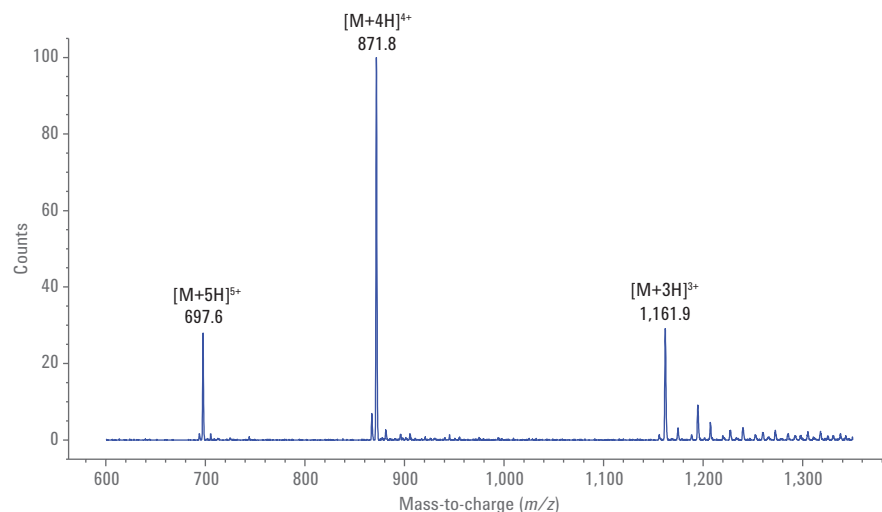


図 7. 最初の脱アミド-グルカゴンピークの質量スペクトル

結論

Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションのマルチハートカット 2D-LC は、効果的な脱塩ツールとして使用することができます。MS 分析に対応していない移動相を使用していても、MS 検出にオンライン接続できます。このアプリケーションノートでは、USP 39 に従ったペプチドグルカゴンの分析に移動相としてリン酸カリウム緩衝液を用いますが、二次元目で脱塩することにより、MS 分析に適用できました。結果より、付加体が発見されなかったことから、Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジによって脱塩が効果的に行われたことが示されました。グルカゴンピークやグルカゴンの脱アミド化により生じたピークなどのターゲットピークの質量情報が得られました。

参考文献

1. Luo, H.; *et al.* 2D-LC as an on-line desalting tool allowing peptide identification directly from MS unfriendly HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, 137, 139-145.
2. Petersson, P.; Haselmann, K.; Buckenmaier, S. Multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry: Towards real time determination of related impurities of bio-pharmaceuticals in salt based separation methods. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1468, 95-101.
3. Suresh, Babu C. V.; Ravindra, G. Agilent AdvanceBio Desalting-RP Cartridges for Online Desalting in 2D-LC/MS mAb Analysis. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7066EN, **2016**.
4. Joshi, A. B.; Rus, E.; Kirsch, L. E. The degradation pathways of glucagon in acidic solutions. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, 203, 115-125.
5. "Glucagon" *Official Monographs USP* **2016** 39, December 1.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, September 1, 2017

5991-8437JAJP



Agilent Technologies