

合成ペプチドとその不純物の分析

質量分析に対応した移動相と Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラム

著者

Andrew Coffey and
Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

概要

UV 検出を用いたクロマトグラフィーによるペプチド分離には通常、C18 逆相 HPLC カラムと、イオンペア試薬としてトリフルオロ酢酸 (TFA) を含む移動相が使用されます。ただし、TFA は分離度の向上には役立ちますが、質量分析 (MS) シグナルを抑制する可能性があります。ギ酸 (FA) は MS 検出に適したイオンペア剤ですが、従来の C18 カラムの多くで最適な分離結果を出せない可能性があります。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムを使用し、MS に適した FA を移動相調整剤として用いて合成ペプチドの不純物を分離する方法を説明します。

はじめに

大半のペプチド薬剤は、固相ペプチド合成により製造されます。合成ペプチドに関連する不純物は、原料または製造プロセスに由来するか、製造または保管時の分解により生成された可能性があります。¹ 従来の方法では、逆相カラムで移動相調整剤としてトリフルオロ酢酸 (TFA) を、検出器として UV を使用してペプチドを分離します。ただし、TFA は質量分析 (MS) シグナルを抑制する可能性があるため、MS に適しているとはいえません。

ギ酸 (FA) は、LC/MS メソッドで不純物のピークを同定する際に適した移動相調整剤ですが、従来の C18 カラムでは最適な分離結果を出せない可能性があります。

TFA (pKa 約 0.23) を使用すると pH が下がり、固定相表面の (不完全にアルキル化またはエンドキャップされた) 残留シラノール基がプロトン化され、正電荷ペプチドと相互作用する負電荷が残らないため、良好なピーク形状が形成されやすくなります。また、TFA アニオンによってイオンペアと正電荷ペプチドが形成されるため、疎水性が向上し、リテンションタイムが長くなります。一方、FA (pKa 約 3.77) は TFA よりも酸性度が弱いため、すべてのシラノール基をプロトン化できる程度まで pH を下げることができず、シラノールとペプチド間の相互作用が完全には除去されません。このためピークがブロード化し、テーリングが大きくなるため、調整剤として TFA を使用した場合よりも、全体的な分離度とピークキャパシティが低下します。

Agilent AdvanceBio ペプチドプラスの固定相表面はハイブリッドの正電荷であり、FA を調整剤として使用した場合のピーク形状と分離が従来の C18 カラムよりも優れています。このアプリケーションノートでは、FA を移動相調整剤として合成ペプチドの不純物を分離する LC メソッドについて説明します。FA は UV または MS 検出で利用できるため、LC/UV と LC/MS 間のメソッド移管が容易です。LC/MS と LC/MS/MS の両方を使用して、サンプル (合成ビバリルジン、図 1) に含まれる不純物の一部を同定します。

ビバリルジンは、トロンピンを可逆的に阻害する 20 種類のアミノ酸の合成ペプチドです。

合成ペプチドの品質管理には、不純物の同定と測定が必要です。ビバリルジンのアミノ酸配列 (FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL) のモノアイソトピック質量は 2178.9858 Da です。

このため、LC/MS によってペプチドの質量を正確に測定できるだけでなく、MS/MS 分析によって予測されるフラグメンテーションパターンを通じて配列を確認することもできます (表 1)。

H-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH

図 1. 合成ビバリルジンのアミノ酸配列

表 1. ビバリルジンで予測される MS/MS フラグメンテーションパターン

配列	番号	b	y	番号 (+1)
F	1	148.076	2179.993	20
P	2	245.129	2032.925	19
R	3	401.230	1935.872	18
P	4	498.282	1779.771	17
G	5	555.304	1682.718	16
G	6	612.325	1625.697	15
G	7	669.347	1568.675	14
G	8	726.368	1511.654	13
N	9	840.411	1454.632	12
G	10	897.433	1340.589	11
D	11	1012.460	1283.568	10
F	12	1159.528	1168.541	9
E	13	1288.571	1021.472	8
E	14	1417.613	892.430	7
I	15	1530.697	763.387	6
P	16	1627.750	650.303	5
E	17	1756.793	553.250	4
E	18	1885.835	424.208	3
Y	19	2048.899	295.165	2
L	20	2161.983	132.102	1

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

サンプル前処理

古い合成ペプチドビバリルジントリフルオロ酢酸水和物を Selleckchem から購入し、0.1 % の FA 水溶液で 1 mg/mL に再溶解しました。

装置構成

HPLC の実験には、次の構成の Agilent 1290 Infinity LC を使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (DAD) (G7115A)

LC/MS の実験は、同じ 1290 Infinity LC 構成に Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 検出器を追加して実施しました。

データ処理

LC/UV データは Agilent OpenLab 2.2 CDS で処理しました。LC/MS データは Agilent MassHunter BioConfirm B.08.00 ソフトウェアで処理しました。MS/MS スペクトルを使用して、合成ペプチドおよびその不純物の同定を確認しました。

メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm (p/n 695775-949)
移動相	A) 0.1 % 酢酸水溶液 B) 0.1 % 酢酸アセトニトリル溶液
グラジエント	0 分：17 % B 2 分：17 % B 22 分：37 % B 24 分：95 % B 26 分：95 % B 26.1 分：17 % B
ポストタイム	5 分
流量	0.4 mL/min
カラム温度	60 °C
注入量	5 µL (UV)、1 µL (MS)

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	350 °C
ドライガス流量	10 L/min
ネブライザガス	30 psi
ソースガス温度	275 °C
ソースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ	125 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	m/z 100 ~ 1,700 (MS)、 m/z 50 ~ 1,700 (MS/MS)
MS スキャンレート	8 スペクトル/秒
MS/MS スキャンレート	3 スペクトル/秒
取り込みモード	ポジティブ、拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
コリジョンエネルギー	3.6 × (m/z)/100 - 4.8

結果と考察

図 2 は、移動相調整剤として FA を使用した UV 検出による古いビバリルジンペプチドサンプルの分離プロファイルを示しています。表 2 に示すように、プロファイル内のいくつかの主要な不純物ピークを、LC/MS/MS を用いて非常に低い質量誤差で同定しています。

一般的な不純物としては、(個々のアミノ酸が失われた) 欠損配列、保護基の除去中に不完全に除去された保護基や変化したペプチド、水の損失などがあります。またこの特異なペプチド配列では、製造中や保管時に Asn が脱アミド化しやすくなります。

合計で 5 つのピークを選択して、LC/MS と LC/MS/MS の組み合わせによる同定の手法を説明します。

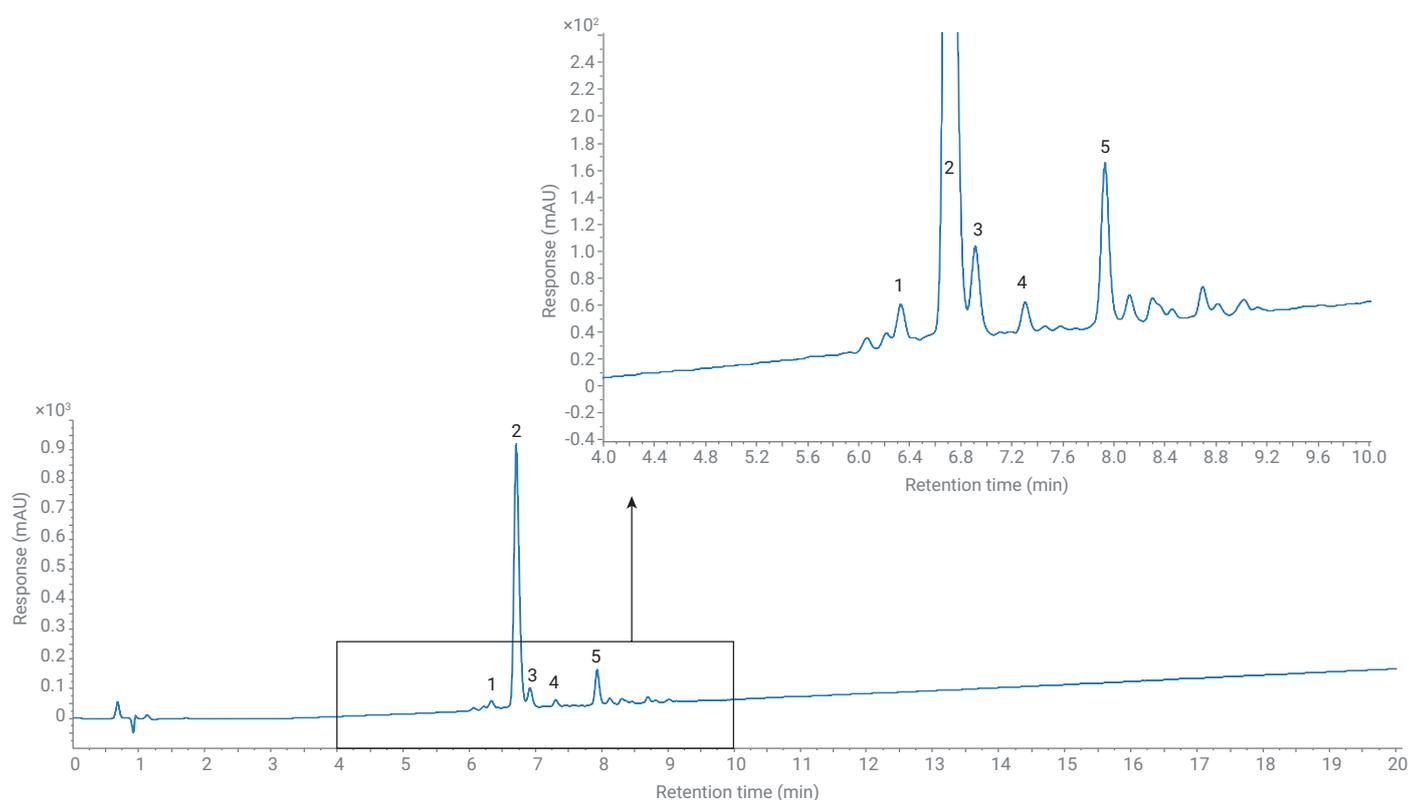


図 2. 合成ビバリルジンの LC/UV クロマトグラム。合成ビバリルジンのベースライン領域を拡大して示しています。

表 2. 古いビバリルジンペプチドおよび主要不純物のピーク同定

ピーク	質量 (Da)	ピーク ID	ターゲット質量 (Da)	質量誤差 (ppm)
1	2,049.9467	Glu の欠損	2,049.9432	1.71
2	2,178.9894	製品	2,178.9858	1.65
3	2,121.9663	Gly の欠損	2,121.9644	0.90
4	2,160.9764	H ₂ O の損失	2,160.9705	2.73
5	2,179.9742	脱アミド化	2,179.9698	2.02

LC/UV クロマトグラムの主要成分（ピーク 2）の MS スペクトルを図 3 に示します。これは $[M + 2H]^{2+}$ と $[M + 3H]^{3+}$ m/z に相当します。デコンボリュートした場合、質量はビバリルジンの全長ペプチド配列 (FPRPGGGGNGDFEEIPEEYL) に相当する 2178.9894 となります。

同様の方法で、先に溶出した不純物（ピーク 1）を同定します。この場合、得られる MS スペクトルは似ていますが（図 4A）、デコンボリューション後の不純物の質量は 2049.9467 です。-129 Da の質量差は、Glu の欠損を示します。LC/MS/MS スペクトルをより詳しく調べると、欠損した Glu 残基の位置を特定できます（図 4B）。

BioConfirm ソフトウェアによって、FPRPGGGGNGDFEEIPEYL（19 種類のアミノ酸配列）の b_{15} および y_4 フラグメントが同定されました。これは配列の 17 番目または 18 番目の Glu が欠損していることを示します。

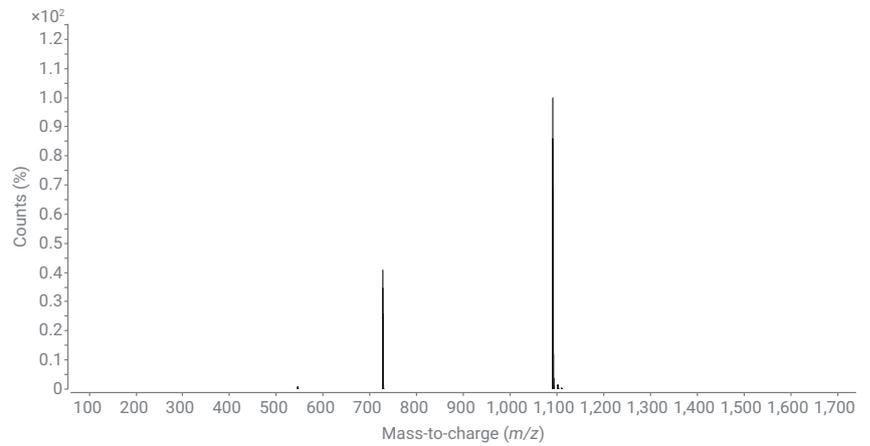


図 3. ビバリルジンペプチドのマスマスペクトル（ピーク 2）

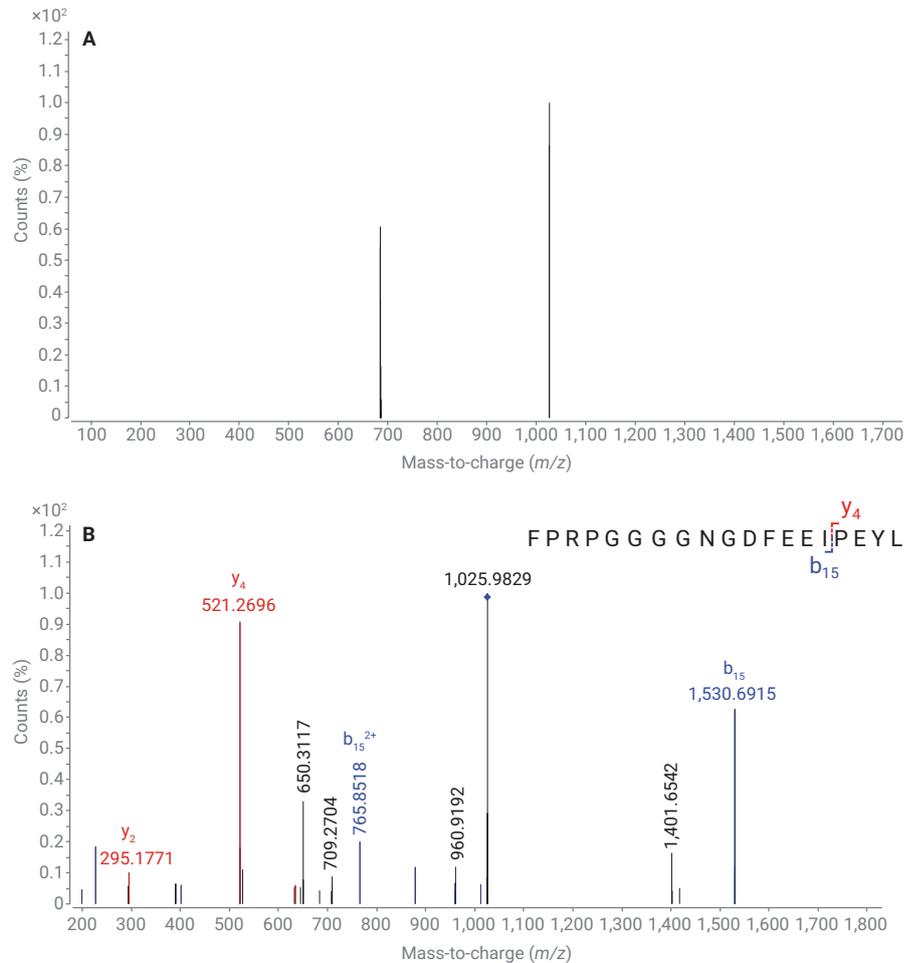


図 4. 不純物のマスマスペクトル（ピーク 1）
 (A) マスマスペクトル (B) タンデムマスマスペクトル

不純物のピーク 3 の分析で判明した質量差は -57 Da でした。これはグリシンの欠損を示します (図 5)。不純物のピーク 4 の質量差は 18 でした。これは H_2O の損失による脱水を示します (MS スペクトルは現れません)。

不純物のピーク 5 の分析で判明した質量差は $+1$ Da でした。これは脱アミド化を示します (図 6A)。この不純物の MS/MS データを詳しく調べた結果、位置 9 (N) の Asn が脱アミド化によって Asp (D) に変換されたことをソフトウェアが同定していたことがわかりました。

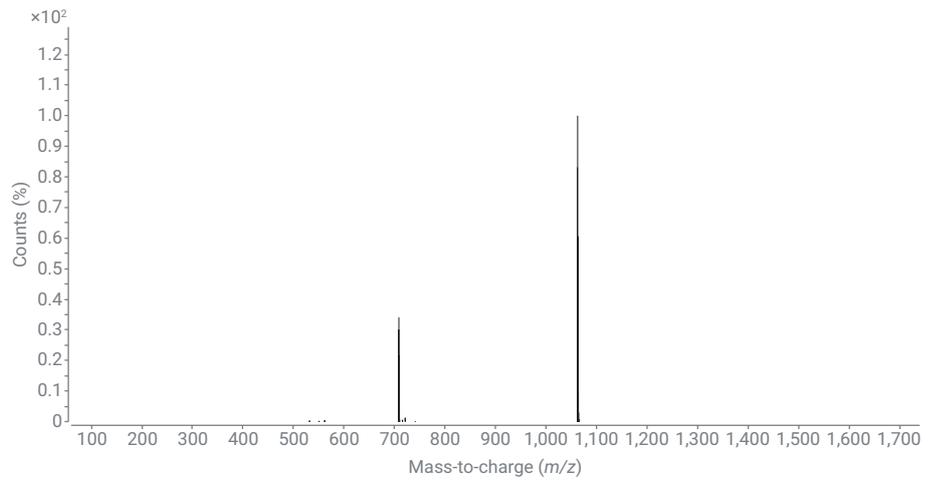


図 5. 不純物のマスペクトル (ピーク 3)

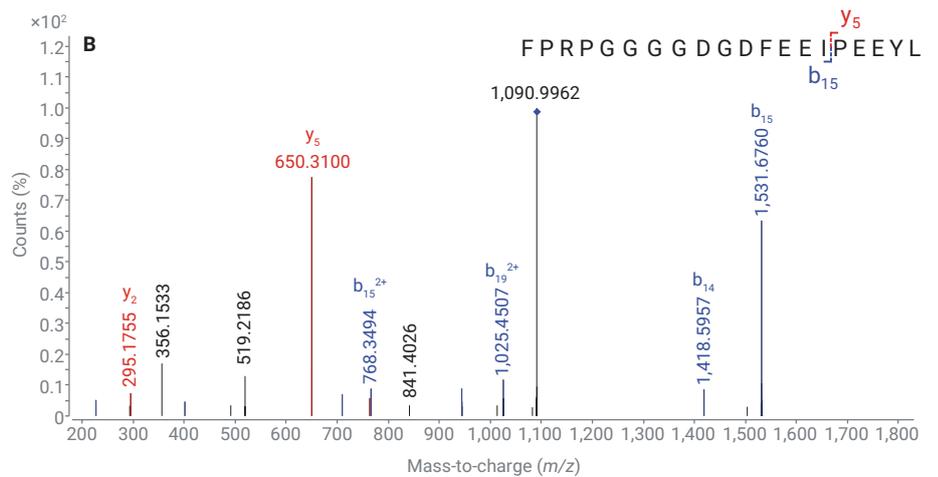
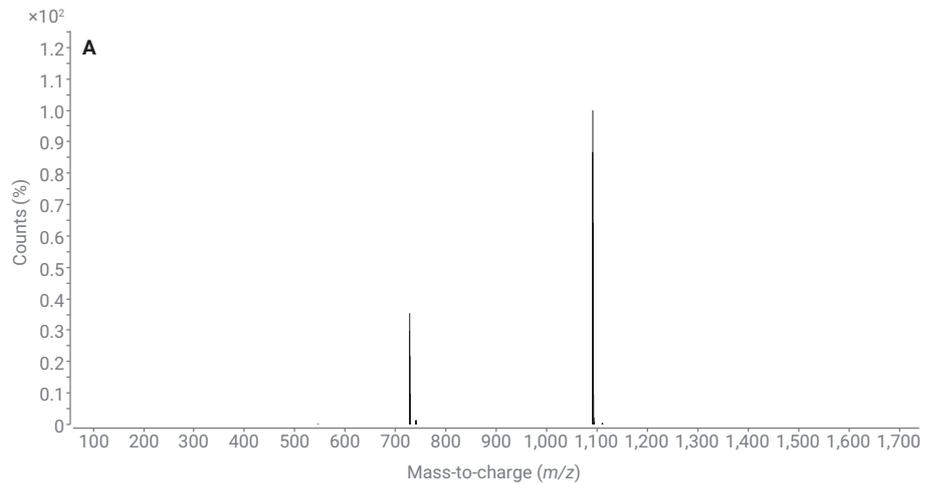


図 6. 不純物のマスペクトル (ピーク 5)
(A) マスペクトル (B) タンデムマスペクトル

結論

今回の実験では、Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムでギ酸を移動相調整剤として使用して、合成ペプチドとその不純物を分析しました。使用するメソッドは、LC/UV と LC/MS 間で簡単に移管できます。

参考文献

1. Eggen, I. *et al.* Control Strategies for Synthetic Therapeutic Peptide APIs Part III: Manufacturing Process Considerations. *Pharm. Technol.* **2014**, 38 (5) .

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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いません。
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. 2020

Printed in Japan, November 10, 2020

5994-2760JAJP

RA.2046990741

