[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ペプチドのルーチンモニタリングを補完する ACQUITY QDa 検出器

Robert Birdsall, Eoin Cosgrave, and Sean M. McCarthy
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 相補的な検出技術をオンラインで利用することにより生産性を向上
- 規制に準拠した単独のソフトウェア内で効率的なデータ取り込み・分析を実施

ウォーターズのソリューション

ACQUITY® QDa® 検出器

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システム

ACQUITY UPLC TUV 検出器

ACQUITY UPLC Peptide CSH カラム

Empower® 3 ソフトウェア

キーワード

ペプチド、UV 検出、MS 検出、スクリーニング、モニタリング、バイオ医薬品 QC

はじめに

製薬企業で創出されたバイオ医薬品においては、製品の効能、同一性、純度が規制当局のガイドラインに適合していることを確認するため、製造工程の様々な段階でしばしばスクリーニングが行われます。生産性の改善や、開発コストの削減には、 重要品質特性（CQA）を評価するために実施される分析法がいかに目的に合致しているのかが大きく影響し、生産性を損なうことなく、最小限のコストと労力でデータの価値を高めることが可能な、相補的な技術が強く望まれます。

このような、スピードが求められる今日の医薬品業務環境の要求に合致するウォーターズのソリューションが ACQUITY QDa 検出器です。ACQUITY QDa 検出器は、光学検出に相補的な MS 分析技術をオンラインで組み合わせられるため、これまでの作業手順を変えることなく、一度の分析によりデータの生産性を向上させます。

ACQUITY QDa 検出器は、一度の分析で、しかも最小限の労力とコストで、MS スペクトルデータと光学データとの同時取得を可能にします。さらに、事前最適化されているため、MS で一般的、伝統的に行われてきたユーザーによるサンプルごとの最適化作業は不要で、シンプルにまた容易にお使いいただけます。さらに、ACQUITY QDa 検出器は既存の UPLC システムに容易に組み込めるよう設計されており（図 1）、バイオ医薬品製造環境における生産性の向上、品質保証の強化に非常に適した装置です。

図 1. ACQUITY QDa 検出器　コンパクトなサイズの QDa は既存の装置システムに容易に組み込むことができます。また電源を入れればすぐに使用可能なプラグ・アンド・プレイ設計により、光学検出に対して相補的な検出技術を最小限の労力で取り入れ、一括して分析できる統合されたシステムとワークフローを同時に取得することができます。

分析条件

LC条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class Bio

バイアル：　トータルリカバリーバイアル：12 × 32 mm、ガラス、スクリューネック、キャップ、スリットなし（p/n 6000000750CV）

カラム：　ACQUITY UPLC Peptide CSH 130 Å、C_{18}、1.7 µm、2.1 × 100 mm（p/n 186006937）

カラム温度：60℃

サンプル温度：4℃

注入量：　10 µL

UV 検出器：　ACQUITY UPLC TUV 検出器

検出波長：　215 nm

MS 検出器：　ACQUITY QDa 検出器

MS サンプリングレート：2 ポイント / 秒

MS レンジ：　200 -1250 Da

コーン電圧：7 V

キャピラリー電圧：0.5 kV

プローブ温度：600℃

移動相 A：　0.1% TFA 水溶液

移動相 B：　0.1% TFA / アセトニトリル

移動相 C：　0.1% ギ酸水溶液

移動相 D：　0.1% ギ酸 / アセトニトリル

グラジエント：

Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D
Initial	0.300	19	1	76	4
2.00	0.300	19	1	76	4
22.00	0.300	11	9	44	36
25.00	0.300	3	17	12	68
28.00	0.300	3	17	12	68
28.01	0.300	19	1	76	4
30.00	0.300	19	1	76	4

データ収集および解析

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア、SR2、MS 解析オプション

本アプリケーションでは、既知のペプチド混合試料を用いて ACQUITY QDa 検出器を光学検出器に対して相補的な検出器として使用する実例をご紹介します。光学（UV）検出器から得られるデータと MS スペクトルデータを一度の分析作業内で統合することが可能となります。

実験方法

サンプル調製

ACQUITY UPLC Peptide CSH カラム（130 Å、C_{18}、1.7 µm、2.1×100 mm）は、使用前に取り扱い説明書に従ってコンディショニングを実施。試薬はシグマアルドリッチ社より購入。angiotensin（frag. 1-7）、bradykinin、angiotensin II、angiotensin I、renin substrate、enolase T35、melittin を含むペプチド混合試料は初期移動相にて 0.3 mg/mL の濃度に調製。

結果および考察

相補的なオンライン検出技術によるピーク同定の確認

バイオ医薬品のタンパク質組成をモニターするために、しばしば光学検出器を用いてタンパク質分解産物の分析が行われます。従来のペプチド分析に揮発性の酸性移動相を使用することで MS 分析をスムーズに行うことができます。特に低濃度の TFA または TFA を含まない移動相を使用する際、ペプチドは、イオン化の過程で複数の電荷を帯びて多価イオンとなることが多く、しばしば分子量よりも小さな *m/z* で検出されます。ACQUITY QDa 検出器の *m/z* 30-1250 という検出範囲は、このような多価のペプチドの分析において相補的な MS データを取得するのに適した範囲といえます。

このことを確認するため、0.3 mg/mL に調製した 7 種のペプチドを含むペプチド混合試料を用意しました。光学検出器の後方に MS 検出器として ACQUITY QDa 検出器をオンラインで接続し、3 µg のペプチド混合試料を ACQUITY UPLC Peptide CSH カラムに注入し、20 分の逆相モードのグラジエントで分析しました（分析条件参照）。

図 2A に示したように、ACQUITY QDa 検出器により、各ペプチドを検出するのに十分な感度が得られています。Empower 3 ソフトウェアでは、検出されたピークから抽出された MS スペクトル（図 2 中枠）を、純度、積算、頂点（図 2 の表示）の 3 種のモードで確認できます。図 2B に示したように、相補的な MS データは光学データとシームレスに統合され、同定されたピークには、保持時間と並び最も強度が高いベースピークイオンの *m/z* が表示されます。

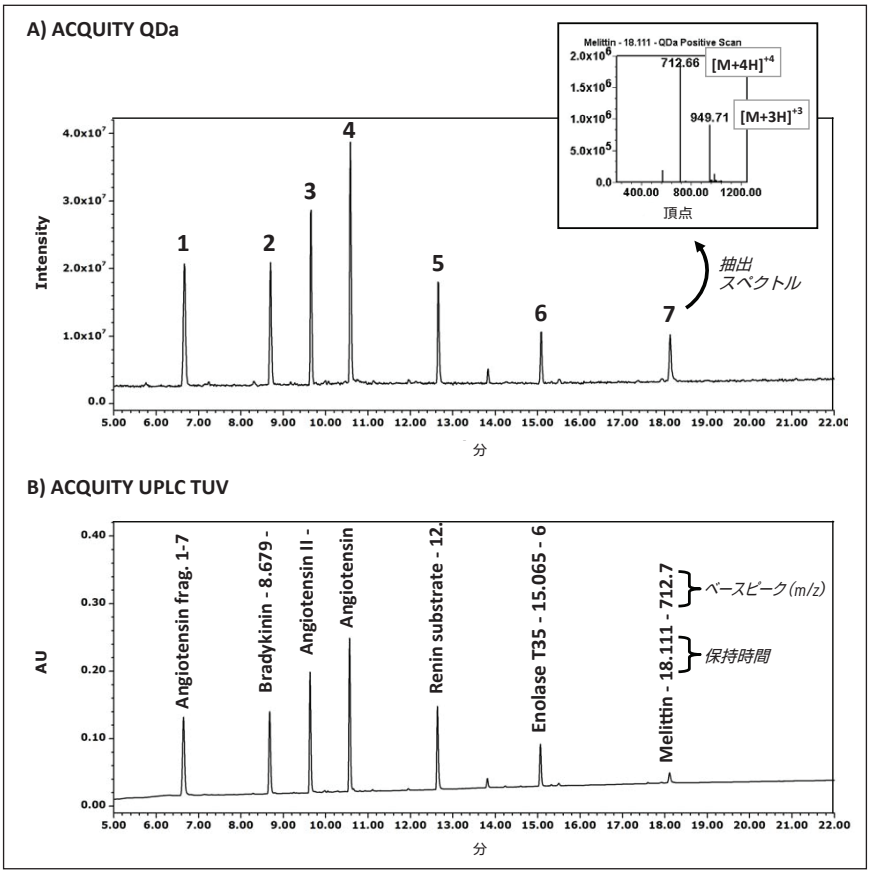

図 2. オンライン相補的検出技術。7 種のペプチドを含むペプチド混合試料 3 µg を 20 分の逆相グラジエントで分析。検出はオンラインで A) ACQUITY QDa、B) ACQUITY UPLC TUV にて実施。

	名前	保持時間（分）	面積（µV秒）	%面積	高さ（µV）	分割の種類	ベースピーク（m/z）
1	Angiotensin frag. 1-7	6.646	404491	17.88	116116	BV	450.5
2	Bradykinin	8.679	348049	15.39	122312	VV	531.0
3	Angiotensin II	9.632	434250	19.20	179209	BV	524.0
4	Angiotensin I	10.564	542397	23.98	227720	VV	433.2
5	Renin substrate	12.639	309110	13.66	123245	VV	587.4
6	Enolase T35	15.065	163047	7.21	62493	BV	625.4
7	Melittin	18.111	60868	2.69	15275	VB	712.7

表 1. 成分の一覧。Empower に内蔵されたコンポーネントマネージャにより自動的に同定ピークがラベルされ表形式で各値が示されます。

Peak	Peptide	Average mass (Da)	Charge state	Calculated (*m/z*)	Base peak (*m/z*)
1	Angiotensin (frag. 1-7)	899.02	$[M+2H]^{+2}$	450.5	450.5
2	Bradykinin	1060.22	$[M+2H]^{+2}$	531.1	531.1
3	Angiotensin II	1046.19	$[M+2H]^{+2}$	524.1	524.1
4	Angiotensin I	1296.49	$[M+3H]^{+3}$	433.2	433.2
5	Renin substrate	1759.04	$[M+3H]^{+3}$	587.4	587.4
6	Enolase T35	1873.21	$[M+3H]^{+3}$	625.4	625.4
7	Melittin	2847.49	$[M+4H]^{+4}$	712.9	712.7

表 2. 電荷数分析。Empower で同定されたベースピークのデータは、ACQUITY QDa 検出器によって 900-2800 Da の多価のペプチドを検出器のスペック内で検出できることを示しています。

Empower に内蔵されたコンポーネントマネージャのようなインフォマティクスツールを利用することにより、表 1 の表形式の表示とともに、光学検出により得られたクロマトグラムのピークが自動的に同定され対応するペプチド名が表示されますので（図 2B）、効率良くデータレビューができます。

Empower 3 ソフトウェアによるベースピークイオン情報を、ペプチドの平均分子量から計算した多価イオンの *m/z* の値と比較しました。表 2 に示したように ACQUITY QDa 検出器により 900-2800 Da にわたる各種ペプチドを容易に検出することが可能で、検出されたベースピークは $[M+2H]^{2+}$ から $[M+4H]^{4+}$ のペプチドの *m/z* と一致しました。3 回の繰り返し分析による検出精度は装置のスペックである± 0.2 Da 以内となりました。

ACQUITY UPLC H-Class システムを構成する ACQUITY QDa 検出器の性能は、Empower 3 ソフトウェアの能力を融合することにより光学データと MS スペクトルデータのシームレスな統合を可能にし、ACQUITY QDa 検出器は、特性が既知のバイオ医薬品のスクリーニングにおける生産性の向上に求められるオンラインで光学検出を補う検出技術を提供する、真のソリューションであることを示しています。

結論

規制当局によるバイオ医薬品の安全性に関するガイドラインに適合させるためには高額なコストが生じますが、製造工程での生産性を改善する効率的な分析法を採用することにより、コストを抑えて要求を満たすことも可能です。ACQUITY QDa 検出器は、ACQUITY UPLC H-Class システムに組み合わせて使用することにより、従来の作業手順を変更することなく光学検出とは異なる、またこれを補う MS 検出技術を提供し、最小限のコストと労力で生産環境におけるモニタリング能力の大幅な向上を実現させます。

電源を入れればすぐ使用できるよう設計され、Empower 3 ソフトウェアに内蔵された規制に対応するデータ取り込みおよび解析技術を採用する ACQUITY QDa 検出器は、バイオ医薬品の製造現場でのデータ解析における生産性、信頼性を高めるパワフルなツールです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY、ACQUITY UPLC、Empower、QDa および The Science of What's Possible は
Waters Corporation の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年12月 720005131JA 12A (SU)