

Application News

No. L486

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

前処理カラム Shim-pack MAYI-ODS を用いた On-line SPE による IgG 水溶液中ポリソルベート 80 の分析 -1

Analysis of Polysorbate 80 in IgG Aqueous Solution by On-Line SPE Using Shim-pack MAYI Column-1

医薬品の評価には様々な分析が求められますが、高分子たんぱく質を高濃度に含んだ試料を逆相 HPLC で分析する場合、一般的な ODS カラムでは充てん剤の劣化が懸念され、事前の除たんぱく処理が必要となります。充てん剤の細孔外表面を親水性ポリマーでコーティングした Shim-pack MAYI シリーズはたんぱく質を速やかに排出する On-line SPE カラムを各種ラインアップしていますので、カラムスイッチング HPLC と組み合わせると、除たんぱくから分析までのシームレスな自動処理により様々な成分の分析が可能になります。

MAYI シリーズの血漿や血清中の薬物分析への応用例については、既報のアプリケーションニュース No. L285, 286, 293, 305, 307, 315, 327 でもご紹介していますが、生体試料分析システム「Co-Sense for BA」で使用すれば、より高感度かつ高精度な測定が実現できます。

今回は、たんぱく質製剤などでたんぱく質の凝集や吸着を防ぎ、溶解度を増加させるため、しばしば添加剤として使用される界面活性剤ポリソルベート 80 を分析対象とした例についてご紹介いたします。

K. Yamabe K. Tanaka*

*Shimadzu Scientific Instruments, Inc.

Shim-pack MAYI カラム

Principle of Shim-pack MAYI Column

Shim-pack MAYI の充填剤の構造を Fig. 1 に示します。高分子は細孔内に入ることができず排除される一方、低分子は化学修飾された細孔内部にまで浸透しカラムに保持されます。

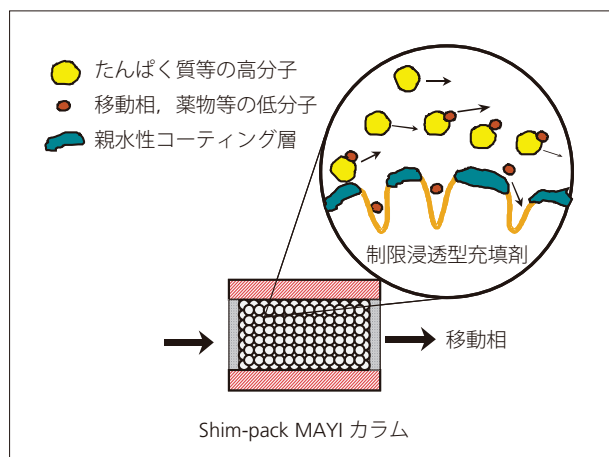


Fig. 1 Shim-pack MAYI カラムの除たんぱく原理
Principle of Deproteinization by Shim-pack MAYI Column

本カラムを Fig. 2 に示すカラムスイッチング HPLC 流路に組み込めば、オートサンプラから前処理カラムに導入されたたんぱく質は、カラムを通過してそのまま系外に排出されます。

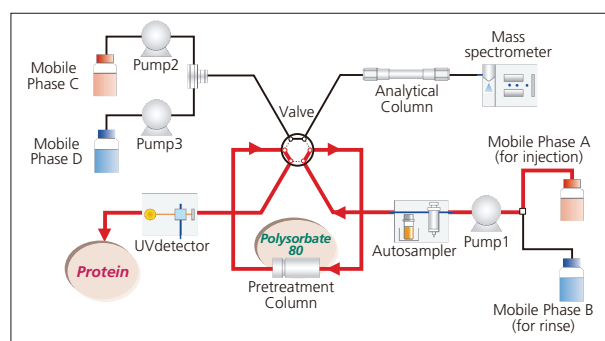


Fig. 2 流路図
Flow Diagram

IgG 含有モデル試料（後述）を注入した様子を UV 検出器（波長 280 nm）でモニターすると、Fig. 3 のようなクロマトグラムが得られ、たんぱく質（IgG）が速やかに排出されていることが確認できます。

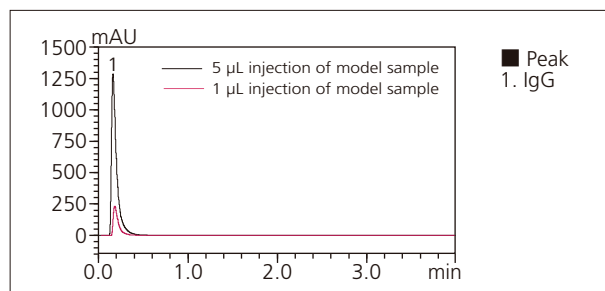


Fig. 3 Shim-pack MAYI カラムからのたんぱく質溶出の確認
Confirmation of protein elution from Shim-pack MAYI column

Table 1 分析条件（試料導入）
Analytical Conditions (sample loading)

Column	: Shim-pack MAYI-ODS (5 mm L. × 2.0 mm I.D., 50 µm)
Mobile Phase	: A: 10 mmol/L Ammonium Formate in Water B: 2-Propanol
Time Program	: Solvent switching A (0-1.5 min) → B (1.5-3.5 min) → A (3.5-9 min)
Flow Rate	: 0.6 mL/min
Extraction time	: 1 min
Injection Vol.	: 1 µL
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: UV280 nm (Semi-micro cell)

一方、ポリソルベート 80 を前処理カラム側に抽出するため、ここでは充填剤の細孔内部が C18（オクタデシル基）で化学修飾された Shim-pack MAYI-ODS を使用しました。たんぱく質を排出した後（ここでは 1 分後）、バルブを切り替

えて前処理カラムを分析流路に導入し、また、試料導入流路は洗浄を行い次の分析に備えるようにプログラムを作成しました。

標準試料の分析

Analysis of Standard Solution

ポリソルベート 80 (モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン) の構造式を Fig. 4 に示します。

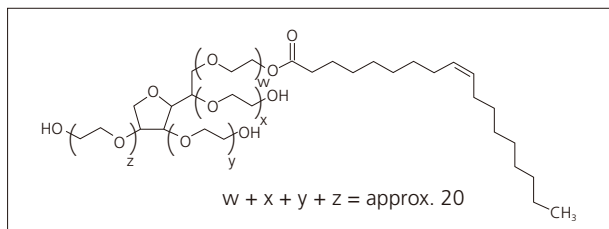


Fig. 4 ポリソルベート 80 の構造式
Typical Structure of Polysorbate 80

ポリソルベートの UV 吸収は弱いため、分析流路での検出には質量分析計を用いました。分析条件を Table 2 に、標準試料 (100 µg/mL) の TIC クロマトグラムを Fig. 5 に示します。一般にポリソルベートは多くの副生成物を含み、非常に強く保持されるものもあるため、最終移動相に 2-プロパノールを使用しました。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Kinetex 5u C18 100 Å (50 mm L. x 2.1 mm I.D., 5 µm)
Mobile Phase	: C: 10 mmol/L Ammonium Formate in Water D: 2-Propanol
Time Program	: D.Conc 5 % (0-1 min) → 100 % (6-7 min) → 5 % (7.01-9 min)
Flow Rate	: 0.3 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: LCMS-2020
Ionization Mode	: ESI Positive
Applied Voltage	: 4.5 kV
Nebulizer Gas Flow	: 1.5 mL/min
Drying Gas Flow	: 15 L/min
DL Temp.	: 250 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C
Scan Range	: m/z 300 - 2000

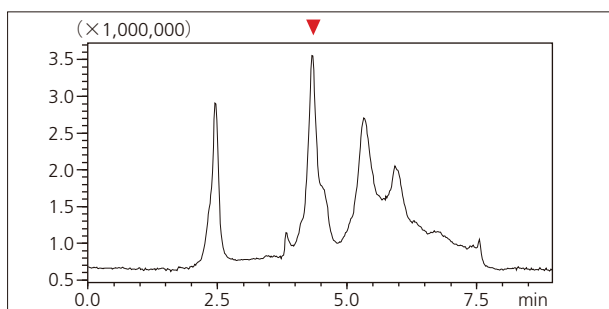


Fig. 5 ポリソルベート 80 100 µg/mL 標準品の TIC クロマトグラム
TIC Chromatogram of 100 µg/mL Polysorbate 80 Standard

保持時間約 4.4 分のピークのマスペクトルを Fig. 6 に示します。重合度の異なるポリオキシエチレンが含まれるため、多くのピークが観察されますが、今回は m/z 783 を 25 個の

ポリオキシエチレンを含むモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンにアンモニウムイオンが 2 個付加したものと帰属し、SIM で測定を行いました。(Fig. 7)

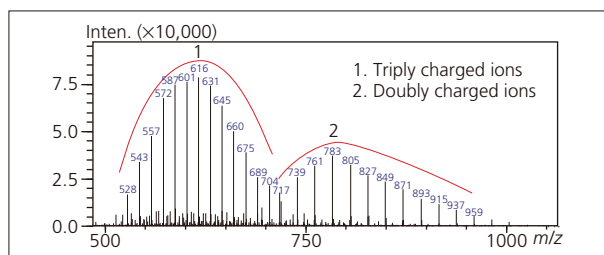


Fig. 6 Fig. 5 における保持時間 4.4 分のピークのマスペクトル
Mass Spectrum of the Peak at 4.4 min in Fig. 5

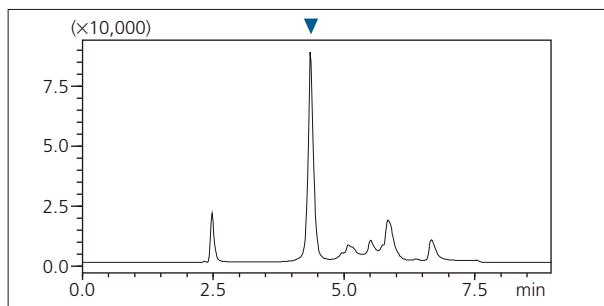


Fig. 7 ポリソルベート 80 100 µg/mL 標準品の SIM クロマトグラム
SIM Chromatogram of 100 µg/mL Polysorbate 80 Standard

その結果、10-200 µg/mL において、寄与率 (R²) 0.999 以上の直線性が得られたので、続いて本条件をたんぱく質含有モデル試料に適用しました。

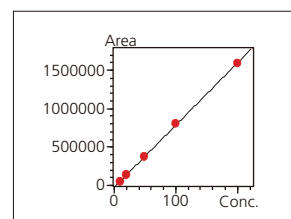


Fig. 8 直線性 (10 ~ 200 µg/mL)
Linearity (10-200 µg/mL)

抗体モデル試料の分析

Analysis of Antibody Model Sample

20 mg/mL の IgG を含む 10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) 溶液に、100 µg/mL になるようにポリソルベート 80 を添加して HPLC に注入しました。オンライン自動除たんぱく処理により、ポリソルベート 80 は回収率 99 %、再現性 (保持時間 0.034 % RSD, 面積 1.11 % RSD) で良好に測定できることがわかりました。

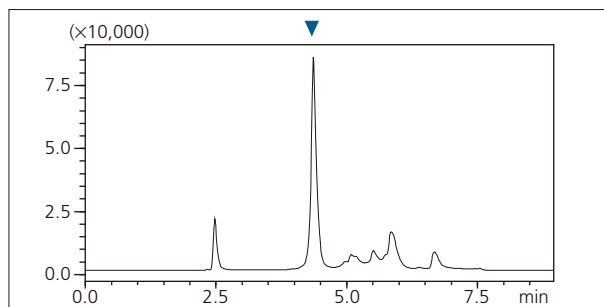


Fig. 9 抗体モデル試料の SIM クロマトグラム
SIM Chromatogram of Antibody Model Sample