

Application News

No. L487

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 -2

Analysis of Polysorbate 80 in IgG Aqueous Solution by On-Line SPE Using Shim-pack MAYI Column-2

ポリソルベートには、たんぱく質の変性を防ぎ安定性を保つ役割があるため、たんぱく質製剤にしばしば添加されますが、製剤の品質や安定性を評価するうえで、ポリソルベートの品質評価も必要になっています。ポリソルベートは、重合度の異なるポリオキシエチレン鎖をもつポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル混合物の混合物であるだけでなく、多くの副生成物を含んだ複雑な組成をもち、その不純物が、たんぱく質製剤の安定性に影響するともいわれます。そのため、その品質をモニターするには、HPLCによる高分離と質量分析計の利用が有効と考えられます。

アプリケーションニュース No. L486 では、除たんぱく処理を自動化し抗体モデル試料中のポリソルベート 80 の定量的な分析が可能であることを確認しましたが、今回このシステムを用いて、さらに高分離化を行うことで、ポリソルベート 80 の副生成物と考えられる成分の検出とマススペクトルの測定を行いました。

K. Yamabe K. Tanaka*

*Shimadzu Scientific Instruments, Inc.

3分後に前処理カラムを分析流路に組み込んでポリソルベート 80 の溶出を開始し、定量分析時（アプリケーションニュース No. L486）より長いカラムを使用し、緩やかなグラジエント溶離で分離を行いました。検出には LCMS-8050 を用いました。（Fig. 1, Table 2）Fig. 2 に、特に緩やかな勾配で溶離させた保持時間 35 分までの TIC クロマトグラムを示します。

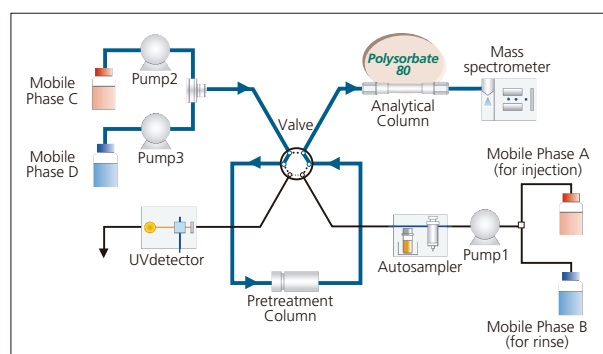


Fig. 1 流路図
Flow Diagram

■抗体モデル試料の測定

Analysis of Antibody Model Sample

Table 1 の条件により、100 µg/mL のポリソルベート 80 を添加したモデル試料 (20 mg/mL IgG) の注入を行いました。

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 (0-3.5 min) → B (3.5-5 min) → A (5-110 min)
Flow Rate	: 0.6 mL/min (0-5 min, 95.01-110 min) 0.1 mL/min (5.01-95 min)
Extraction Time	: 3 min
Injection Vol.	: 5 µL
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: UV280 nm (Semi-micro cell)

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Kinetex 5µm C18 (100 mm L. × 2.1 mm I.D., 5 µm)
Mobile Phase	: C: 10 mmol/L Ammonium Formate in Water D: 2-Propanol
Time Program	: D.Conc 3 % (0-3 min) → 15 % (35 min) → 100 % (100 min) → 3 % (100.01-110 min)
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: LCMS-8050
Ionization Mode	: ESI Positive
Applied Voltage	: 4.5 kV
Nebulizer Gas Flow	: 2 mL/min
Drying Gas Flow	: 10 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min
Interface Temp.	: 300 °C
DL Temp.	: 250 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C
Scan Range	: m/z 300 - 2000

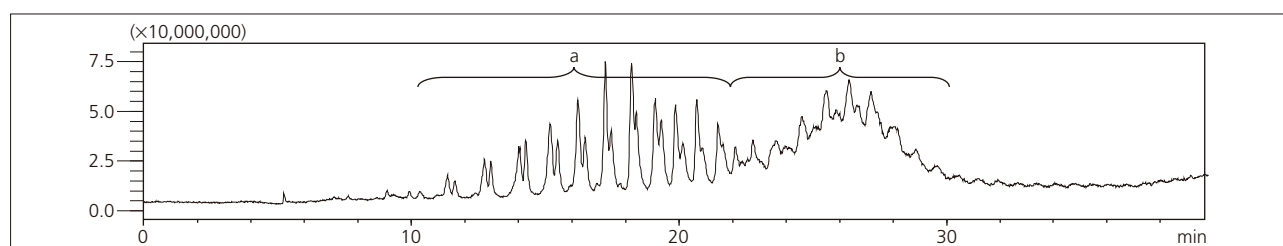


Fig. 2 モデル試料の 0-35 分の TIC クロマトグラム
TIC Chromatogram of Model Sample (0-35 min)

■マススペクトルの確認

Confirmation of Mass Spectra

TIC クロマトグラムを Fig. 5 に、マススペクトルを Fig. 3, 4, 6 に示します。主成分と見られる TIC クロマトグラムにおけるピーク d は、アプリケーションニュース L486 で定量対象とした成分と、スペクトルが一致しました。

ピーク a では、質量差 44 と 22 をもつピークが 2 系列検出され、文献からポリオキシエチレンイソソルビドまたはポリオキシエチレン由来と推定しました。後半に溶出するピーク e も類似スペクトルを示し、このエステル体である可能性が考えられます。

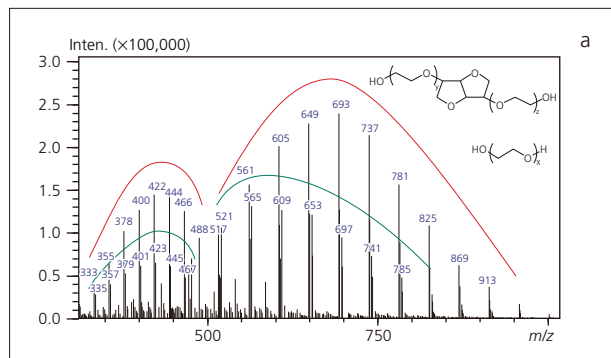


Fig. 3 ピーク a のマススペクトル
Mass Spectrum of the Peaks (a)

ピーク b では、主成分であるピーク d と同様の 2 価と 3 価のピークが検出され、文献からエステルの加水分解で生じるポリオキシエチレンソルビタン由来と推定しました。後半に溶出する c, f, g 各ピークのマススペクトルも同じ特徴の系列をもっており、主成分とはオレイン酸結合数や脂肪酸種が異なるエステル体と考えられます。

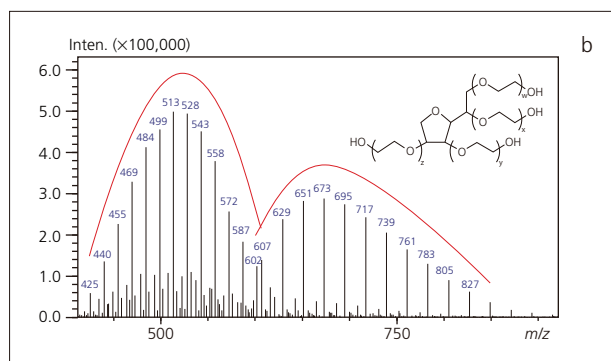


Fig. 4 ピーク b のマススペクトル
Mass Spectrum of the Peaks (b)

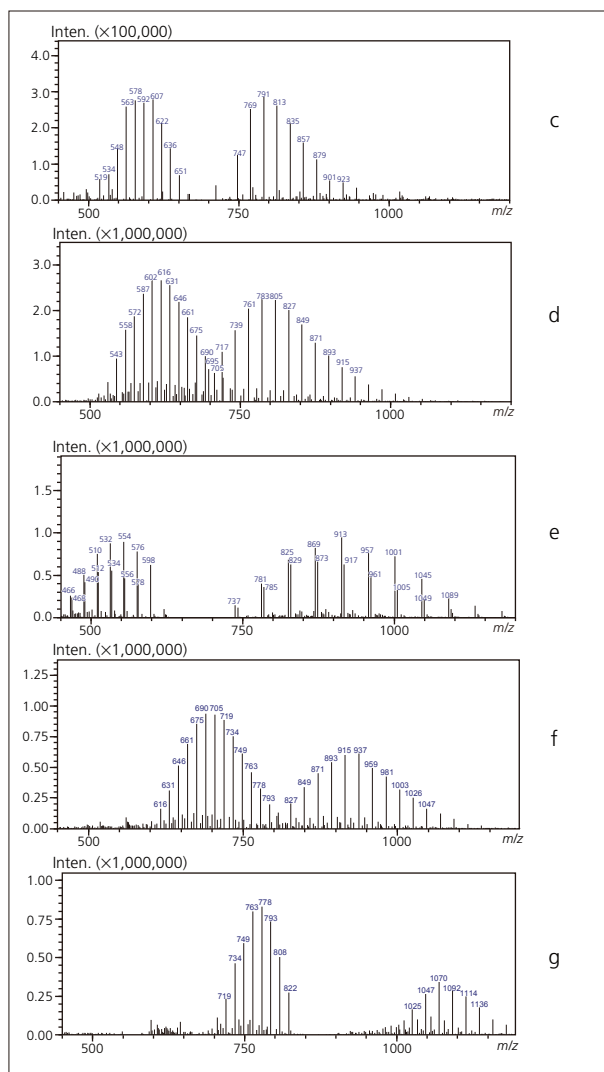


Fig. 6 Fig. 5 のピーク c ~ g のマススペクトル
Mass Spectra of the Peaks (c-g) in Fig. 5

On-line SPE システムと高分離分析によって、各副生成物の含量の確認や定性が可能となり、酸化や加水分解等による劣化状態のモニターに適用できると考えられます。

[参考情報]

E. Hvattum, W.L. Yip, D. Grace, K. Dyrstad, Characterization of polysorbate 80 with liquid chromatography mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy: Specific determination of oxidation products of thermally oxidized polysorbate 80, J Pharm Biomed Anal 62, (2012) 7-16

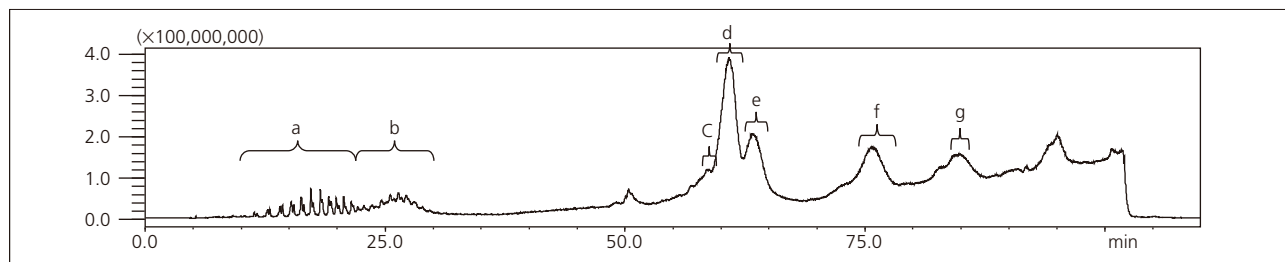


Fig. 5 モデル試料の TIC クロマトグラム
TIC Chromatogram of Model Sample

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2014年12月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。