

Application News

No. L488

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

“Nexera-i” による抗体医薬品のペプチドマッピング

Peptide Mapping of Antibody Drugs by “Nexera-i”

HPLCによるペプチドマッピングは抗体医薬品の一次構造を確認する重要な品質試験の一つです。抗体を酵素消化した後に逆相カラムなどを用いて分離を行います。非常に多くのピークを分離する必要があるため、近年ではペプチド分析用の微粒子カラムやコアシェル型カラム等の使用が広がってきています。また同一性や変異の確認として溶出プロファイルの比較を行うため、再現性の高いシステムが求められます。一体型UHPLCである“Nexera-i”はそのような分析に理想的なシステムと言えます。

今回は“Nexera-i”を用いて、IgG（ヒト免疫グロブリンG）のトリプシン消化物を分析した例をご紹介します。

K. Tanaka*

*Shimadzu Scientific Instruments, Inc.

■ IgG トリプシン消化物分析

Analysis of IgG Tryptic Digest

今回の検討ではIgGを還元、アルキル化した後、トリプシンで酵素消化したものを試料として用いました。Fig. 1に前処理方法を示します。

Table 1に分析条件を示します。今回は微粒子かつコアシェル型カラムである“Aeris 1.7 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å”を用いました。システムには一体型UHPLCの“Nexera-i”を用いました。移動相としてトリフルオロ酢酸水溶液とトリフルオロ酢酸添加したアセトニトリル溶液を用いているため、オプションのミキサー 300 μLを使用しました。またベースラインドリフトを抑えるため、トリフルオロ酢酸の濃度は移動相Aが0.1%、移動相Bが0.08%としました。

Fig. 2にIgGトリプシン消化物のクロマトグラムを示します。非常に数多くのピークが分離されていることがわかります。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column	: Aeris 1.7 μm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 mm L. × 2.0 mm I.D., 1.7 μm)
Mobile Phase	: A: 0.1 % Trifluoroacetic acid in water B: 0.08 % Trifluoroacetic acid in acetonitrile
Time Program	: B.Conc. 0 % (0 min) → 45 % (90 min) → 100 % (90.01-95 min) → 0 % (95.01-110 min)
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 60 °C
Injection Vol.	: 10 μL
Detection	: LC-2040C 3D at 215 nm
Flow Cell	: High-speed high-sensitivity cell

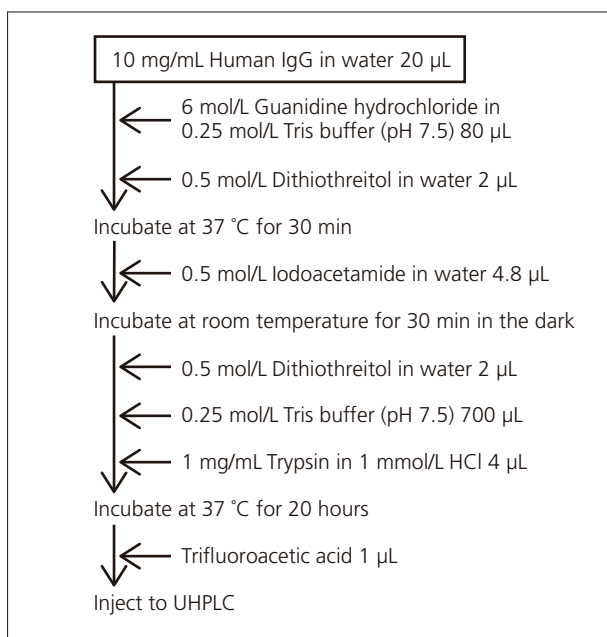


Fig. 1 サンプル前処理
Sample Preparation

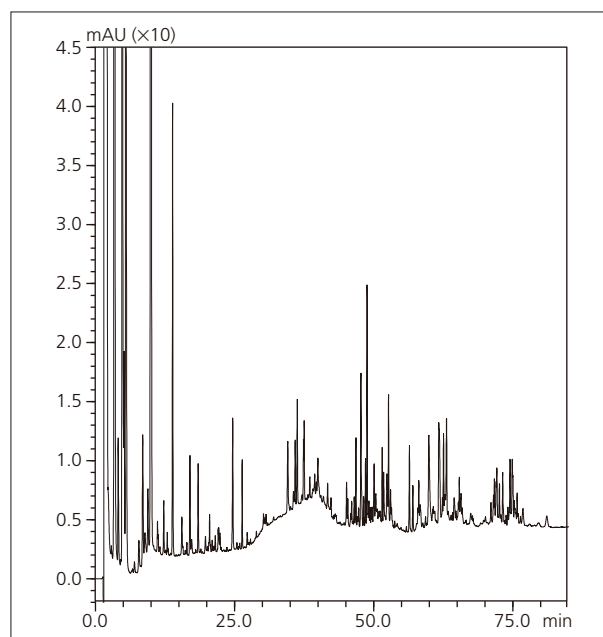


Fig. 2 IgGトリプシン消化物のクロマトグラム
Chromatogram of IgG Tryptic Digest

■再現性

Repeatability

ペプチドマッピングにおいては非常に多くのピークを分離する必要があるため、長く緩やかな傾斜のグラジエントが用いられます。今回の分析では90分間で移動相Bを0%から45%に変化させているので、傾斜は0.5%/minとなります。このような浅い傾斜のグラジエントでは、特に低圧グラジエントシステムを用いた場合、再現性が悪化する傾向があります。

Table 2と3にそれぞれ保持時間の日内再現性、日間再現性の結果を、Fig. 3にIgGトリプシン消化物のクロマトグラムの日内再現性を示します。クロマトグラムから主要なピーク（ピークa～f）を選び、それらの再現性を確認しました。日内再現性については連続6回の分析結果から計算を行いました。日間再現性については6日間、1日3回の分析を行い、3回の平均値から計算を行いました。Nexera-iを用いたペプチドマッピングでは、低圧グラジエントシステムにとって再現性が悪化しやすい条件でありながらも、良好な日内および日間再現性が得られていることがわかります。

Table 2 保持時間の日内再現性 (n=6)
Intraday Repeatability of Retention Time (n=6)

Peak	Avg. R.T. (min)	Std. Dev. (min)	%RSD (%)
Peak a	9.929	0.027	0.271
Peak b	24.669	0.047	0.192
Peak c	36.299	0.042	0.117
Peak d	48.815	0.033	0.068
Peak e	59.864	0.032	0.054
Peak f	74.535	0.043	0.057

Table 3 保持時間の日間再現性 (n=6)
Interday Repeatability of Retention Time (n=6)

Peak	Avg. R.T. (min)	Std. Dev. (min)	%RSD (%)
Peak a	9.907	0.016	0.159
Peak b	24.708	0.033	0.132
Peak c	36.355	0.034	0.093
Peak d	48.877	0.034	0.069
Peak e	59.901	0.027	0.046
Peak f	74.555	0.036	0.049

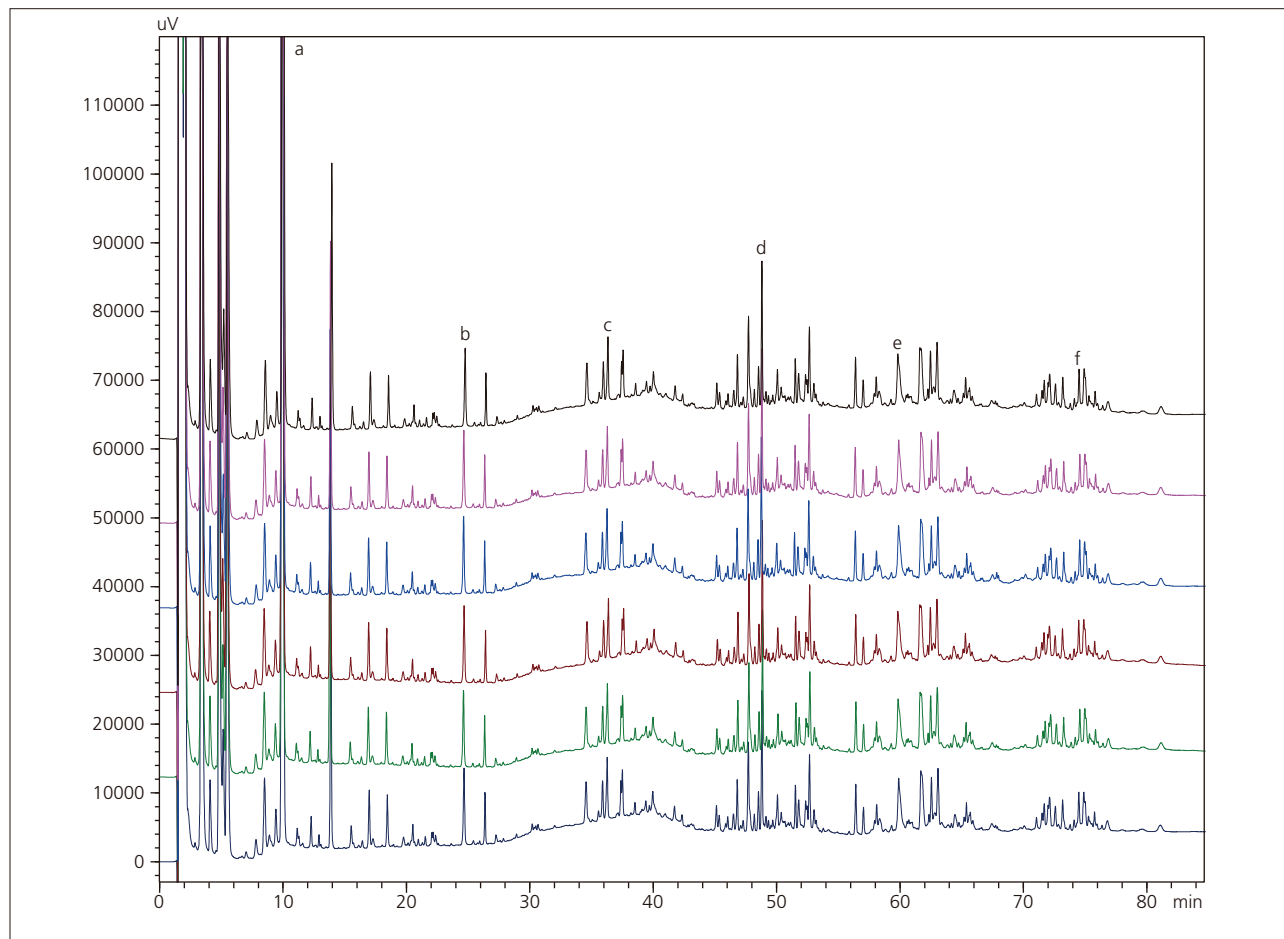


Fig. 3 IgGトリプシン消化物のクロマトグラムの日内再現性
Intraday Repeatability of Chromatogram of IgG Tryptic Digest

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。