

Application News

No. B92

卓上型 MALD-TOF MS と QC Reporter ソフトウェアを用いた合成ペプチドの QC (Quality Control) 分析

バイオ医薬品の製造プロセスにおいて、品質管理 (QC) は高品質の製品供給を確保するうえで重要な役割を果たしています。製剤化における変化や製品劣化は、活性の低下や毒性の発現につながる可能性があります。合成された製品の品質を確認するために使われる分析手法の中でも、MALDI-TOF 質量分析計は、その迅速で簡単な操作、低いランニングコスト、化合物の分子量およびその構造、不純物/付加イオンや修飾体に関する情報を得ることが出来る感度、能力によって、広く用いられています。

製品劣化の結果生じる修飾の例としては、ペプチド、タンパク質の構成アミノ酸のうち、酸化を受けやすいメチオニン残基の酸化が挙げられます。

卓上型 MALDI-TOF 質量分析計 MALDI-8020 と QC Reporter ソフトウェアは合成製品のハイスループットで自動化された QC 分析のためのワークフローを提供します (図 1)。本アプリケーションニュースでは、合成ペプチドの QC 分析例を紹介します。

S. Salivo (K. Shima)

■ 試料と方法

Exendin-4 ペプチドは Sigma-Aldrich から購入しました。メチオニンの酸化は、1%過酸化水素水を用いて 37°C (15 分間) で行いました。酸化後、サンプルを ZipTip® C18 マイクロカラム (Millipore) を用いて精製しました。MALDI 分析のために、全てのサンプルを MALDI ターゲット上に α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA、5 mg/mL、1:1 アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸) とともにスポットしました。

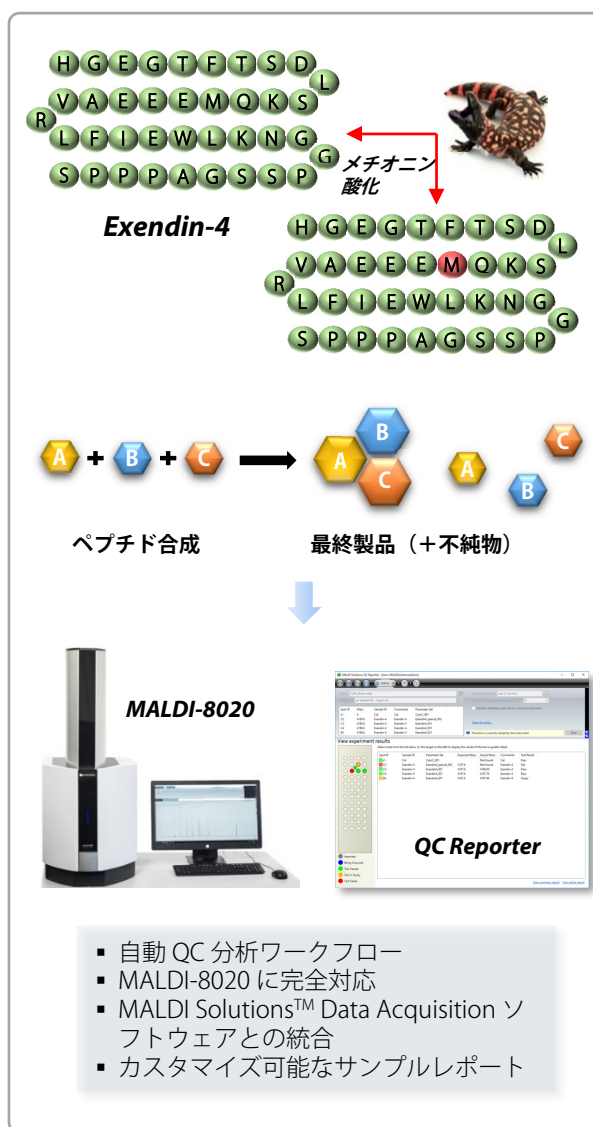


図 1 合成ペプチドの QC 分析ワークフロー

■ 結果

Exendin-4 は、アメリカドクトカゲ (*Heloderma suspectum*; 図1) の唾液中に存在する天然のペプチドです。合成型のペプチドは Exenatide として 2 型真性糖尿病の治療に使用されています。QC Reporter ソフトウェアを用いた典型的なルーチン QC 分析の一例として、Exendin-4 およびその修飾型の分析を行いました。劣化状態の Exendin-4 を人為的に調製するために、過酸化水素水を用いてペプチドを化学的に酸化させると、ペプチド内のメチオニンがスルホキシド型になり、+16 Da の質量シフトが観測されます。ペプチドの部分的な劣化を模倣するために、天然型およびメチオニン酸化型 Exendin-4 の混合物を調製しました。

図2は、QC分析の結果を色分けして表示する QC Reporter ソフトウェアのメイン結果画面を示しています。ターゲットの質量は 4186.6 Da に設定されており、これは天然の Exendin-4 の平均質量に相当します。この質量は、プロトン化 ([M+H]⁺) 型の理論質量を計算するために QC Reporter ソフトウェアによって使用され、取得されたマスペクトルで検索されます。図2の右下の挿入図は、QC分析の判定を行うための品質基準の設定画面を表示しています。これらは、ターゲットの質量に対する質量許容誤差、最大許容付加イオンおよび不純物レベル（ともにターゲット質量の面積の 50% に設定されています）を示しています。

View experiment results

Select a test from the list below (or the target on the left) to display the results of the test in greater detail.

Spot ID	Sample ID	Expected Mass	Actual Mass	Test Result
E2	Cal		Not found	Pass
E3	Exendin-4	4187.6	4187.55	Pass
E4	Exendin-4	4187.6	4187.85	Pass
D2	Exendin-4	4187.6	Not found	Fail
D3	Exendin-4	4187.6	4187.25	Query

QC Criteria

Select the criteria that constitutes a QC test. A QC test is marked as Pass if none of the Fail or Query criteria are met

Include in test	Criteria	Value	Measure	Fail	Query	Special Condit..
<input type="checkbox"/>	Mass tolerance is greater than	1	Da	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="checkbox"/>	S/N threshold is less than	50		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input type="checkbox"/>	Minimum resolution	1000		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Sum of adducts is greater than	50	%Area	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	Maximum impurity level	50	%Area	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Range Criteria						
<input type="checkbox"/>	S/N is within range			10	45	
<input type="checkbox"/>	Sum of adducts is within range		Apex(mV)	1	7	
<input type="checkbox"/>	Min > max acceptable impurity level		%Area	60	90	

Special Conditions - Optional additional specific criteria that may be applied

Mass NOT within tolerance but Adducts found: Fail Query

Define the Mass calculation Type: Monoisotopic Average

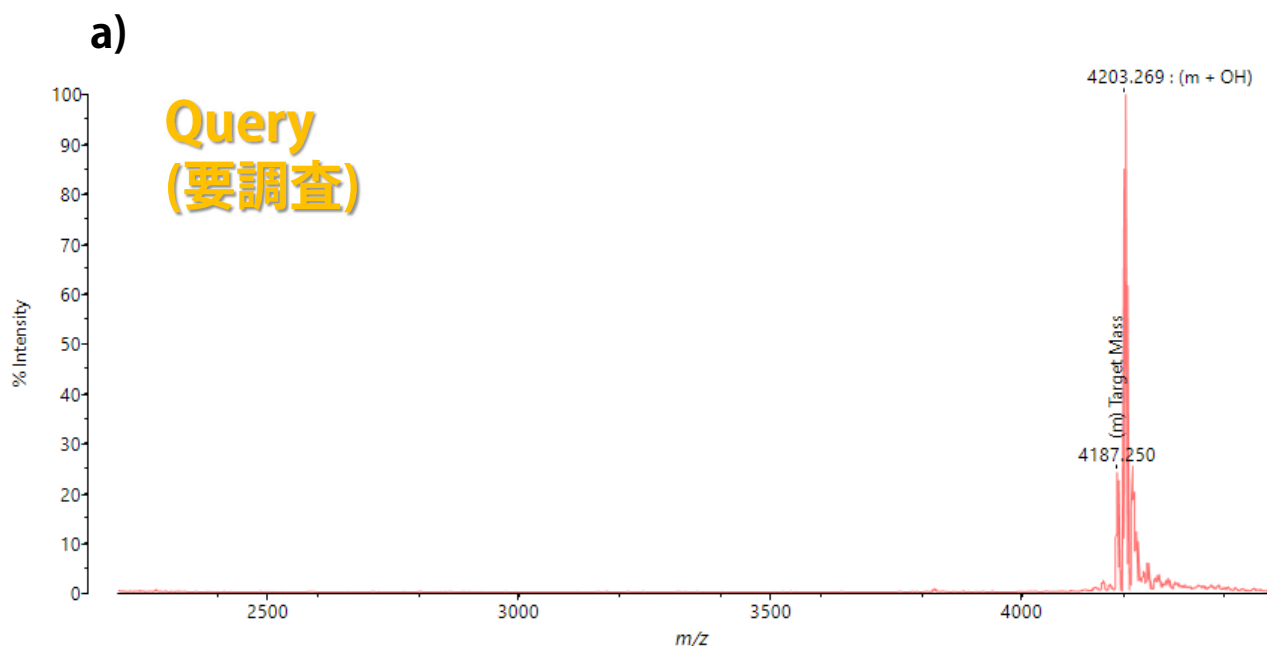
Define Adducts... 1 selected
 Define Amino Acids... 0 selected
 Define Matrix Ions... 0 selected
 Define Impurities... 0 selected

[View summary report](#) [View entire report](#)

図2 QC Reporter のソフトウェアメイン画面。色分けされたウェルや Spot ID は測定した Exendin-4 の QC 分析の結果を表す。(黄緑：合格、赤：不合格、黄色：要調査)。右下の挿入図は、結果の計算に使用された品質基準を示す。

図 4 a に、「Query (要調査)」と判定された、天然型の Exendin-4 とメチオニン酸化型の Exendin-4 の混合物の QC 分析の結果を示します。目的物のターゲット質量 (m/z 4187.6, $[M+H]^+$) が検出された一方で、メチオニン酸化型の

ピーク (m/z 4203.61, $[M+H]^+$) がターゲット質量のピーク面積の 50% を超えて検出されたことを示しています。この 50% という値は、サンプルレポートにも示されている QC 基準値にて指定されています (図 2 と図 4 b)。



b)

Detected Ions			
Ion Type	Description	Non-Ionised	Ionised
Target Adduct	OH	4202.27	4203.27
Impurities detected			
Non-Ionised	Ionised	Percent of target by area	Percent of target by intensity
4216.80	4217.80	146.88%	105.38%
2100.95	2101.95	10.78%	34.80%
4246.25	4247.25	5.39%	24.45%
Test criteria			
Criterion	Required value	Actual value	Result
Sum of adducts greater than/within range	50	557.45	Query
Maximum impurity level	50	163.04	Query

図 4 a) QC 分析後の MALDI マススペクトル。天然型と比べて酸化型のピークが顕著に検出された結果、「Query (要調査)」と判定された。b) 生成されたレポートから抜粋した QC 分析結果の詳細。ターゲット質量の面積の 50% を超える量の付加イオンが検出されていることを示す。

MALDI Solutions は KRATOS ANALYTICAL LTD. の日本およびその他の国における商標です。

ZipTip は、Merck KGaA の登録商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

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：2019年2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。