

MSD 분석을 위한 자동화 탈염 도구로서의 2D-LC

MS 비호환 USP 분석법에서 의약품 펩타이드의 직접 질량 선택 검출

응용 자료

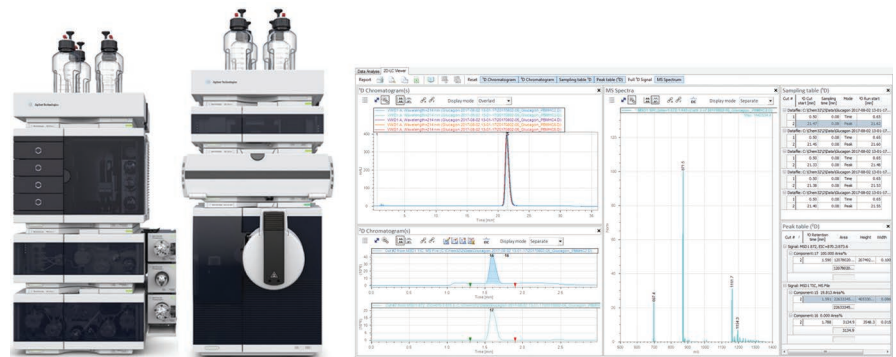
바이오 의약품 및 바이오시밀러

저자

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.

개요

펩타이드 및 단백질 치료제의 불순물 분석과 특성화에는 크로마토그래피 분리와 질량 선택 검출법을 함께 사용해야 합니다. 그러나 펩타이드와 단백질의 크로마토그래피 분리에는 종종 MS와 호환되지 않는 이동상이 사용됩니다. 이 응용 자료에서는 multiple heart-cutting(MHC) 2차원 액체 크로마토그래피 (2D-LC)를 질량 선택 검출을 위한 자동화 탈염 도구로 이용하는 것에 대해 다루고 있습니다. 1차원에서 펩타이드 글루카곤이 MS 비호환 이동상을 이용하여 USP 39 분석법에 따라 분석되었습니다. 그 후 2차원 분석에서 자동화 탈염 절차와 질량 선택 검출이 수행되었습니다.



Agilent Technologies

소개

제약 연구 및 개발 분야에서 펩타이드 치료제와 단백질 치료제에 대한 관심이 점점 더 높아져가고 있습니다. 이 큰 분자 물질들의 복잡한 불순물 프로파일 구조는 이들 물질의 특성화와 불순물 분석을 어렵게 만듭니다. 이러한 분자들의 분석 시에는 크로마토그래피 분리와 질량 선택 검출(MSD) 방법을 모두 사용해야 합니다. 펩타이드 및 단백질의 크로마토그래피 분리법에는 종종 농축된 염이나 비휘발성 완충 물질을 포함하고 있어 MS와 호환되지 않는 이동상이 사용됩니다^{1,2}. 이들 크로마토그래피 분석법을 위한 MS 검출이 가능하려면, MS 호환 이동상을 사용하는 분석법으로 이전을 하거나 탈염 후 오프라인 MS 분석 수행 및 분취 수집의 과정이 일반적으로 요구됩니다¹.

2차원 액체 크로마토그래피(2D-LC)에서는 2차원 분석이 MS 비호환 이동상을 사용하는 크로마토그래피 분석법과 MS 검출의 온라인 커플링을 가능하게 하는 효율적인 탈염 도구로 사용될 수 있습니다¹. Agilent InfinityLab 2D-LC Solution 및 2D-LC Software A.01.04는 분석법 설정부터 Agilent single quadrupole 질량 분석기를 이용한 2D-LC 데이터 분석에 이르기까지 통합적인 솔루션을 제공합니다. 전환 밸브가 1차원(1D) 이동상으로부터 유래한 염 또는 완충 물질을 자동으로 분리하여 모든 2차원(2D) 분석 전에 제거하는 도구로 사용될 수 있습니다. Agilent AdvanceBio Desalting-RP 카트리지는 2차원에서 빠르고 효과적으로 염을 제거하는 데 사용될 수 있으며, 이에 대해서는 이전에 발간된 응용 자료에서 다루고 있습니다³. 1차원 분리와 비교하여 선택성 차이를 제공하는 전장 컬럼 및 조건이 사용될 때, 2차원에서는 탈염 작용 뿐 아니라 더 진행된 분리 또한 가능합니다².

글루카곤은 29개 아미노산을 포함한 펩타이드계 호르몬으로 저혈당 증세에 대한 응급 처치에 사용됩니다⁴. USP 39에 따라, 글루카곤의 유기 불순물 분석이 LC와 UV 검출, 이동상 내 인산 칼륨 완충제를 이용하여 수행되었습니다⁵. 이 방법은 MS 검출과 호환되지 않습니다. 이 응용 자료에서는 1차원에서 multiple heart-cutting(MHC) 2D-LC를 이용하여 USP 39의 규정에 따라 글루카곤을 분석한 후, 2차원에서 자동화 탈염과 MSD를 진행하는 것에 대해 다루고 있습니다.

실험

기기

Agilent InfinityLab 2D-LC Solution은 다음과 같은 모듈로 구성되어 있습니다.

- Two Agilent 1290 Infinity II High Speed Pumps(G7120A)
- 냉각기(option #100)가 장착된 Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II Variable Wavelength Detector(G7114B), 표준 플로우 셀 설치됨(p/n G1314-60186)
- Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A), 2-위치/4-포트 듀오 밸브 헤드(2D-LC 밸브 1,300bar; p/n 5067-4244)
- 2개의 Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A), 40µL 루프가 장착된 multiple heart-cutting 밸브(p/n G4242-64000)
- Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A), 2-위치/6-포트 밸브 800bar(p/n 5067-4282)

Agilent Jet Stream ESI 소스(G1958-65538)가 장착된 Agilent 6150 Single Quadrupole LC/MS(G6150BA)를 질량 선택 검출에 사용되었습니다.

소프트웨어

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.07 SR3[465], 2D-LC Software version A.01.04.

컬럼

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 150mm, 3.5µm(p/n 959963-302)
- 카트리지 홀더(p/n 820999 901)가 장착된 Agilent AdvanceBio Desalting-RP, 2.1 × 12.5mm (p/n PL1612-1102)

화학품

모든 용매는 LC 등급을 사용했습니다. 아세토니트릴은 Merck(독일 다름슈타트)에서 구입하였습니다. 신선한 초순수는 0.22µm의 membrane point-of-use cartridge(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, EMD Millipore, 미국 메사추세츠 빌러리카). 제1 인산칼륨, 포름산 및 글루카곤(합성 분말, 테스트된 세포 배양)은 Sigma-Aldrich(독일 슈타인하임)에서 구입했습니다. 염산과 인산은 각각 Merck(독일 다름슈타트) 및 J.T Baker(네덜란드 데벤터)에서 얻었습니다.

시료

농도가 약 0.5mg/mL인 글루카곤 표준 용액은 0.01N의 HCl과 글루카곤을 혼합하여 재구성 되었습니다. USP 39에 따라 글루카곤 시스템 적합성 용액을 얻기 위해서⁵, 0.01N HCl과 그 속에 포함된 약 0.5mg/mL의 글루카곤을 50°C에서 48시간 방치하였습니다.

분석법

1차원	
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 150mm, 3.5µm
용매	A) 16.3g KH ₂ PO ₄ 를 800 mL의 물에 섞어 pH 2.7로 조절/200mL 아세트니트릴 B) 물/아세트니트릴(60/40)
Gradient	0분 - 33.80 %B 30분 - 33.80 %B 34분 - 88.00 %B 35분 - 88.00 %B 36분 - 33.80 %B
정지 시간	36분
포스트 시간	40분
모든 컷의 ² D 분석이 완료될 때까지 분석 시간을 연장하기 위해 정지 시간 및 포스트 시간이 ² D 펌프에 설정되었습니다.	
유량	0.500mL/분
온도	45°C
검출	VWD, 214nm, 신호 피크 너비: >0.025분(20Hz) 흐름 셀을 밸브 전환으로 인한 압력 펄스로부터 보호하기 위해, 압력 배출 키트(G4236-60010)가 VWD와 2D-LC 밸브 사이에 설치되었습니다.
주입	주입 부피: 15µL 샘플 온도: 8°C 니들 세척: 물/아세트니트릴(70/30)에서 3초

2차원	
² D 펌프가 0.075 × 340mm 제한 모세관(p/n 5067-4783)을 이용하여 2D-LC 밸브에 연결되어 충분히 낮은 역압(Backpressure)을 생성하였습니다.	
컬럼	Agilent AdvanceBio Desalting-RP, 2.1 × 12.5mm
용매	A) 물 + 포름산 0.1% B) 아세트니트릴 + 포름산 0.1%
Gradient	0.00분 - 5 %B 1.00분 - 5 %B 1.50분 - 80 %B 2차원 기울기 정지 시간: 2.00분 2차원 주기 시간: 3.00분
유량	0.400mL/분
온도	제어되지 않음
검출	질량 선택 검출(MSD) 흐름을 MSD로 유도하고 폐기하는 것을 조절하기 위해 2-위치/6-포트 밸브가 분리 밸브로 설치되었습니다.

MSD		
MSD 신호	극성 모드	양극성 스캔
	질량 범위	600-1,350m/z
	Fragmentor	100V
	Gain	1.00
	Threshold	150
	Step size	0.10
	피크 너비	0.10분
	데이터 보관	Full
	정지 시간	제한 없음
모든 컷의 ² D 분석이 완료될 때까지 분석 시간을 연장하기 위해 정지 시간이 제한 없음으로 설정되었습니다.		
스프레이 챔버	건조 가스 유량	10.0L/분
	Nebulizer	35psig
	건조 가스 온도	200°C
	Sheath 가스 온도	300°C
	Sheath 가스 유량	10.0L/분
	캐필러리 전압	2,500V
	노즐 전압	300V

피크 기반 multiple heart-cutting 2D-LC	
2D-LC 모드	Heart-cutting
샘플링 표	시간 기반 0.50분, 샘플링 시간 0.08분 피크 기반 19.00분, 샘플링 시간 0.65분 피크 기반 22.50분, 샘플링 시간 0.40분
피크 검출	피크 검출 모드: Threshold Threshold: 5mAU
전환 밸브	1.00분 후 MSD로 전환

시간 기반 multiple heart-cutting 2D-LC	
2D-LC 모드	Heart-cutting
샘플링 표	다음 샘플링 표는 참조 크로마토그램으로서의 글루카곤 시스템 적합 용액의 ¹ D 크로마토그램을 이용하여 설정되었습니다. 시간 기반 0.50분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 1.55분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 3.70분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 7.23분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 11.07분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 17.70분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 21.38분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 23.81분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 24.91분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 29.45분, 샘플링 시간 0.08분 시간 기반 30.25분, 샘플링 시간 0.08분
전환 밸브	1.00분 후 MSD로 전환

결과 및 토의

USP 39에 따라 글루카곤의 유기 불순물 분석이 LC, UV 검출 및 이동상 내 인산 칼륨 완충제를 이용하여 수행되었습니다⁵. 이 방법은 MS 검출과 호환되지 않습니다. 2차원 작업의 효과적인 탈염 도구로 활용하여

Multiple heart-cutting 2D-LC에서 LC 분석과 MS 검출을 온라인 커플링하는 데 사용되었습니다. 2D-LC Software A.01.04를 적용된 Agilent InfinityLab 2D-LC Solution은 Agilent single quadrupole 질량 분석기를 이용한 2D-LC와 MSD에 대해 완전히 통합적인 솔루션을 제공합니다.

그림 1에 나와 있듯이, MS 검출 전에 탈염 작용을 촉진하기 위해 전환 밸브가 1D 이동상으로부터 유래한 염 또는 완충 물질을 자동으로 분리하여 2D 분석 전에 제거하는 도구로 사용될 수 있습니다.

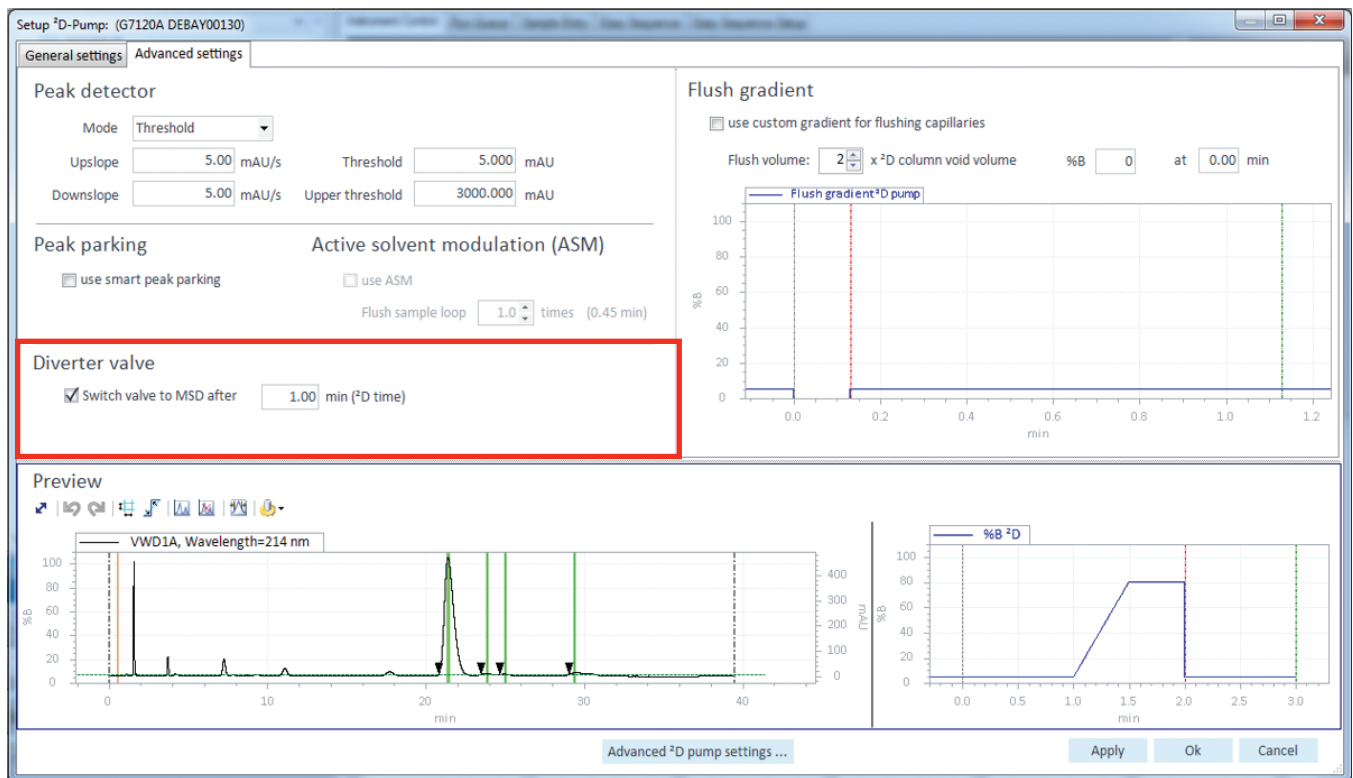


그림 1. 2D-LC 분석법에서 1D 이동상으로부터 유래한 염 또는 완충 물질을 자동으로 분리하도록 설정하여 모든 2D 분석 전에 제거가 이루어지도록 하였습니다.

그림 2는 2D-LC Viewer 내 글루카곤 표준 용액의 피크 기반 multiple heart-cutting 2D-LC 분석 결과를 보여줍니다. 2D-LC Viewer는 5개의 1D 글루카곤 표준 용액 크로마토그램 오버레이 및 그에 상응하는 1D 샘플링

표를 보여줍니다. 2D-LC Viewer는 또한 총 이온 크로마토그램(TIC)과 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 나타내는 글루카곤 피크의 단일 2D 분석의 2D MSD 크로마토그램과 그에 상응하는 질량 스펙트럼을 보여줍니다.

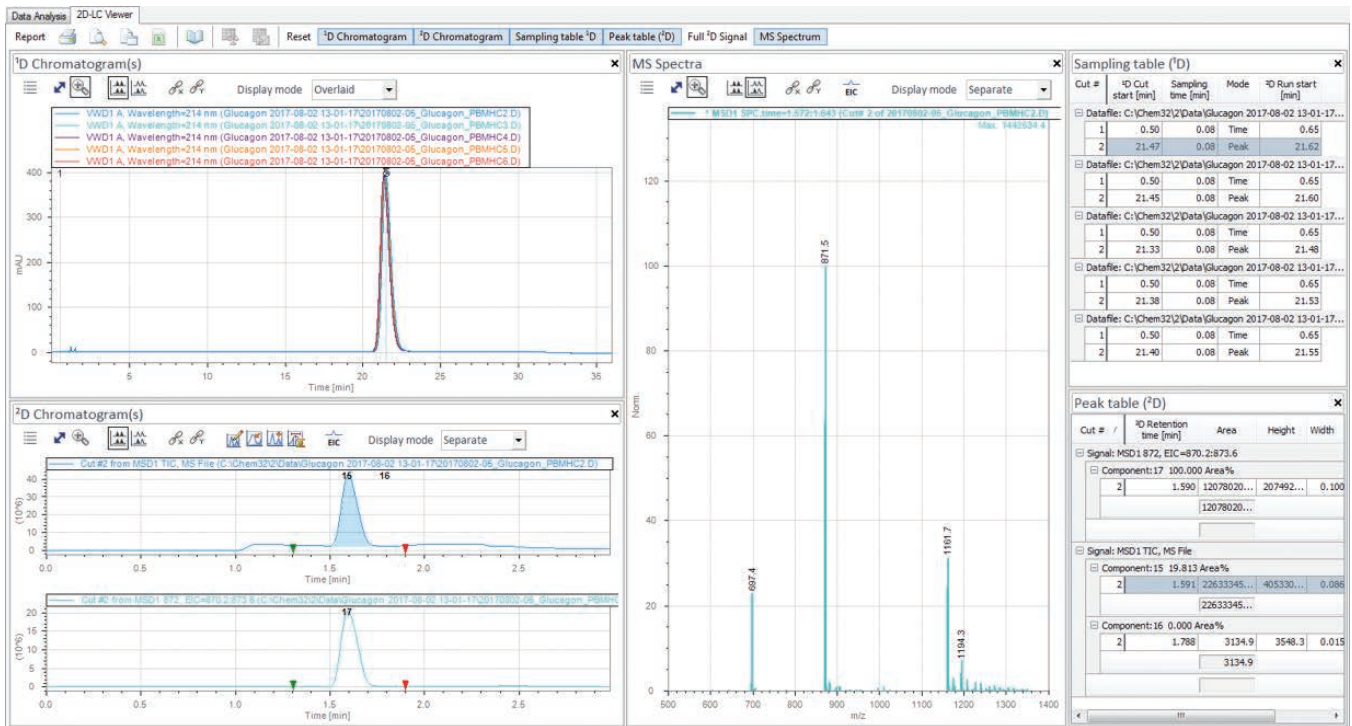


그림 2. 2D-LC Viewer가 글루카곤 표준 용액의 피크 기반 multiple heart-cutting 2D-LC 분석 결과를 보여줍니다.

USP 39에 규정된 글루카곤 분석 내용에서는 글루카곤 표준 분석 및 시스템 적합 용액의 분석과 관련된 특정 시스템 적합성 요건이 충족되도록 요구하고 있습니다. 그림 3은 글루카곤 표준 용액의 fivefold 분석 및 글루카곤 시스템 적합 용액 분석의 'D 크로마토그램을 보여주고 있습니다. 글루카곤 시스템 적합 용액에서 글루카곤 피크 이후 용출된 4개의 피크가 뚜렷하게 보이며, 이는 USP 39에 따르면 글루카곤의 탈아미드화에서 유래한 것입니다. 탈아미드화는 아스파라긴 또는 글루타민에서 암모니아가 소실되어 각각 아스파르트산 또는 글루타민산을 형성하는 것을 말합니다. 아미드 결합에서 유래한 이와 같은 카르복시산 잔기 결합의 생성은⁴ +1 Da의 질량 증가로 이어집니다. 예를 들어, 탈아미드화는 열 스트레스 하에서 단백질이 분해되는 일반적인 과정 중 하나입니다⁴. 펩타이드 글루카곤은 1개의 아스파라긴과 3개의 글루타민 잔기를 포함하고 있습니다.

표 1에는 USP 39에 따른 시스템 적합성 요건 및 2D-LC 분석법의 1차원 분석에서 이 요건들이 탁월하게 충족되었음을 요약하고 있습니다.

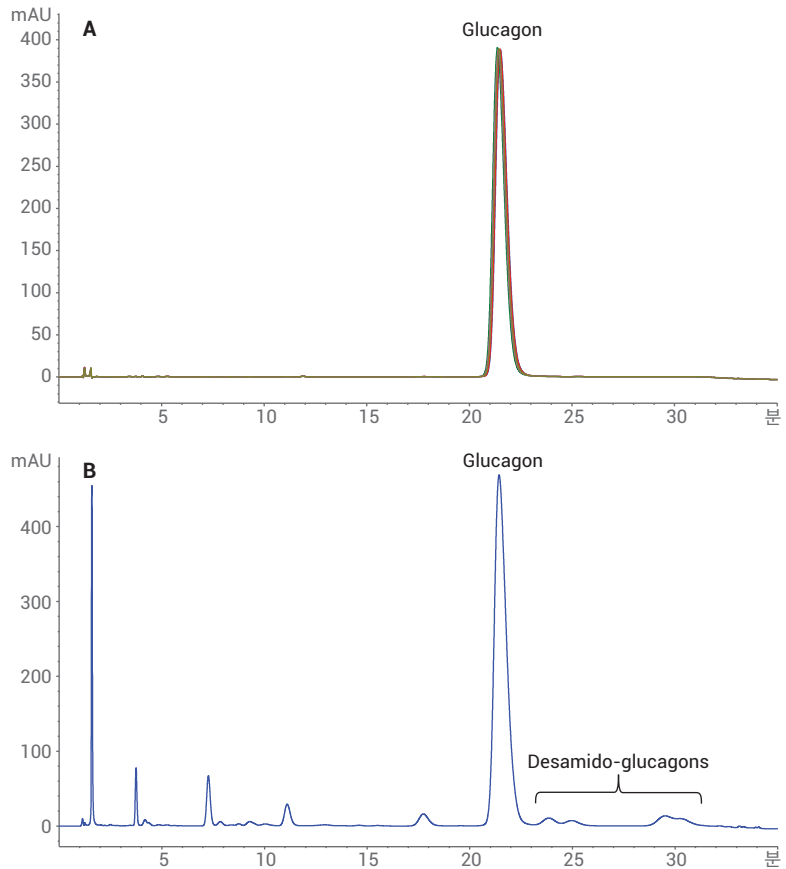


그림 3. USP 39에 따른 글루카곤 분석의 'D 크로마토그램. A) 글루카곤 표준 용액의 fivefold 분석 오버레이. B) 글루카곤 시스템 적합 용액 분석

표 1. USP 39에 따른 적합성 요건 및 2D-LC 분석법의 'D 분석 결과

적합성 요건 ⁵	결과
상대 표준 편차(RSD): NMT 2.0 %, 표준 용액	표준 용액 내 글루카곤(N = 5): RT RSD: 0.27 %, 면적 RSD: 0.11 %
Tailing factor: 글루카곤 피크에 NMT 1.8, 표준 용액	표준 용액 내 글루카곤: USP Tailing: 1.3
분해능(Rs): 데사미도 글루카곤에 해당하는 글루카곤 피크 후 용출된 4개의 피크가 뚜렷하게 보입니다. 주요 피크와 첫 번째로 용출된 데사미도 피크 사이에 분리된 것은 NLT 1.5 시스템 적합 용액입니다.	시스템 적합 용액: 글루카곤 피크 후 용출된 4개의 피크가 뚜렷하게 보입니다. 글루카곤과 첫 번째 데사미도 피크 사이의 분해능: 2.3

NMT = 이하
NLT = 이상

그림 4는 2D-LC Viewer가 보여주는 피크 기반의 글루카곤 표준 용액 multiple heart-cutting 2D-LC 분석의 1D 및 2D 크로마토그램입니다. 1D 글루카곤 피크의 피크 정상은 5mAU 및 0.65분의 샘플링 시간을 이용하여 heart-cut되어 2차원에서 분석되었습니다. 2D MSD 크로마토그램에서 글루카곤은 AdvanceBio Desalting-RP 카트리지에 효과적으로 트래핑된 후 검출되었습니다. 그림 5에서는 이에 상응하는 글루카곤 피크의 질량 스펙트럼을 보여줍니다. 글루카곤은 $[M+5H]^{5+}$, $[M+4H]^{4+}$ 및 $[M+3H]^{3+}$ 이온의 형태로 검출되었습니다. 다른 첨가 생성물은 검출되지 않았으며, 이는 2차원 분석에서 수행된 탈염 과정이 효과적으로 완수되었음을 의미합니다.

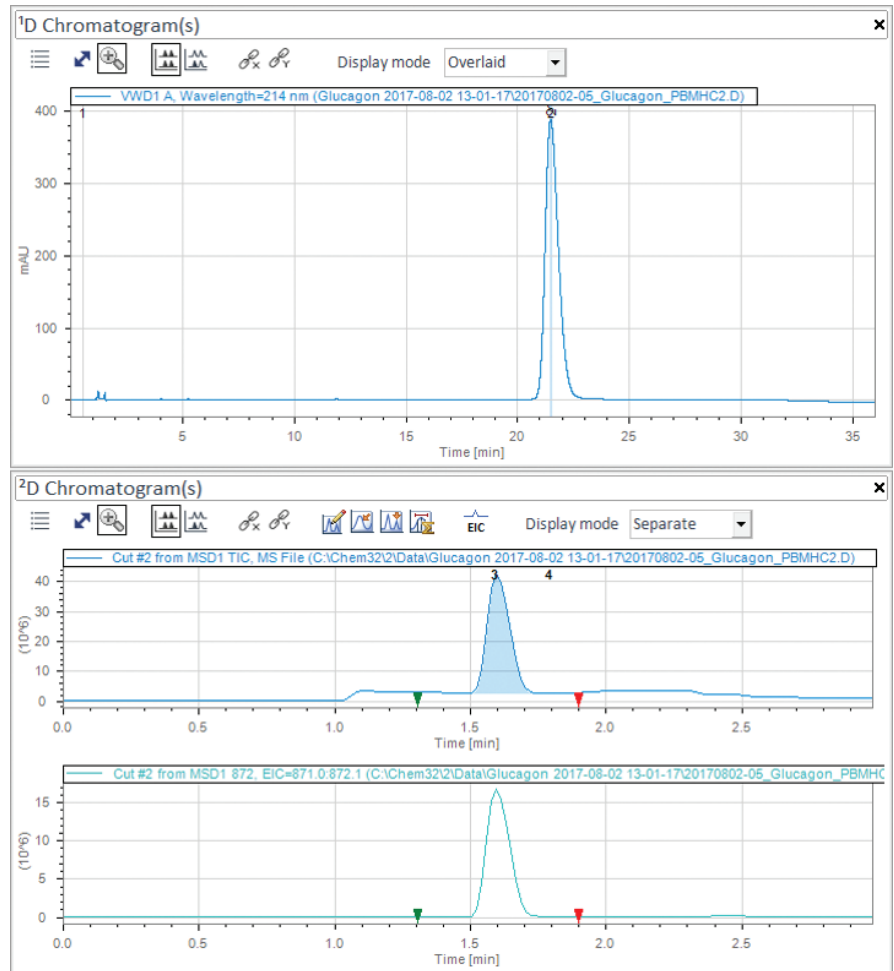


그림 4. 피크 기반 글루카곤 표준 용액 multiple heart-cutting 2D-LC 분석의 1D UV 및 2D MSD 크로마토그램(m/z 871.0–872.1의 TIC 및 EIC)

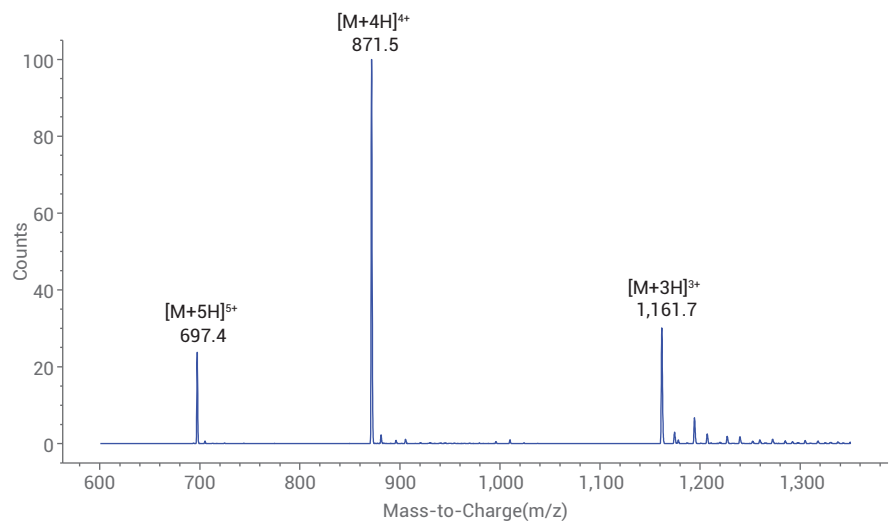


그림 5. 글루카곤 피크의 질량 스펙트럼

글루카곤 시스템 적합 용액의 경우, 피크 기반 및 시간 기반의 multiple heart-cutting 2D-LC 분석이 수행되었습니다. 피크 기반 multiple heart-cutting 2D-LC 분석의 목적은 글루카곤 피크와 글루카곤 탈아미드화에서 유래한 피크를 heart-cut으로 처리하여 이들 피크의 질량 정보를 알아내는 것입니다. 피크 기반 heart-cutting과 다른 샘플링 시간을 이용하여 다른 넓이의 피크가 피크 정상 부위에서 heart-cut될 수 있습니다. 그림 6A는 4번째 데사미도-글루카곤 피크가 3번째 데사미도-글루카곤 피크와 완전히 분리되지 않은 관계로 이러한 조건에서 heart-cut되지 않은 상황을 보여줍니다. 시간 기반의 multiple heart-cutting 2D-LC를 이용하면 글루카곤 피크, 글루카곤 탈아미드화에서 유래한 4개의 피크, 글루카곤 분해로부터 생성된 이후의 피크 등의 관심 피크를 heart-cut할 수 있습니다(그림 6B). 이 방법으로 2차원에서 탈염 과정을 거친 후 모든 표적 피크의 질량 정보를 얻을 수 있습니다.

그림 7은 피크 기반의 multiple heart-cutting 2D-LC 분석 후 얻어진 첫 번째 데사미도-글루카곤 피크의 질량 스펙트럼을 보여줍니다. 4개 데사미도-글루카곤 피크의 질량 스펙트럼은 비슷하게 나타납니다(데이터 표시 안 됨). 이들 피크에서는 $[M+5H]^{5+}$, $[M+4H]^{4+}$ 및 $[M+3H]^{3+}$ 이온의 질량이 글루카곤 피크에 비해 증가된 것으로 나타났으며, 이는 이들 피크가 글루카곤 탈아미드화에서 유래했다는 것을 의미합니다.

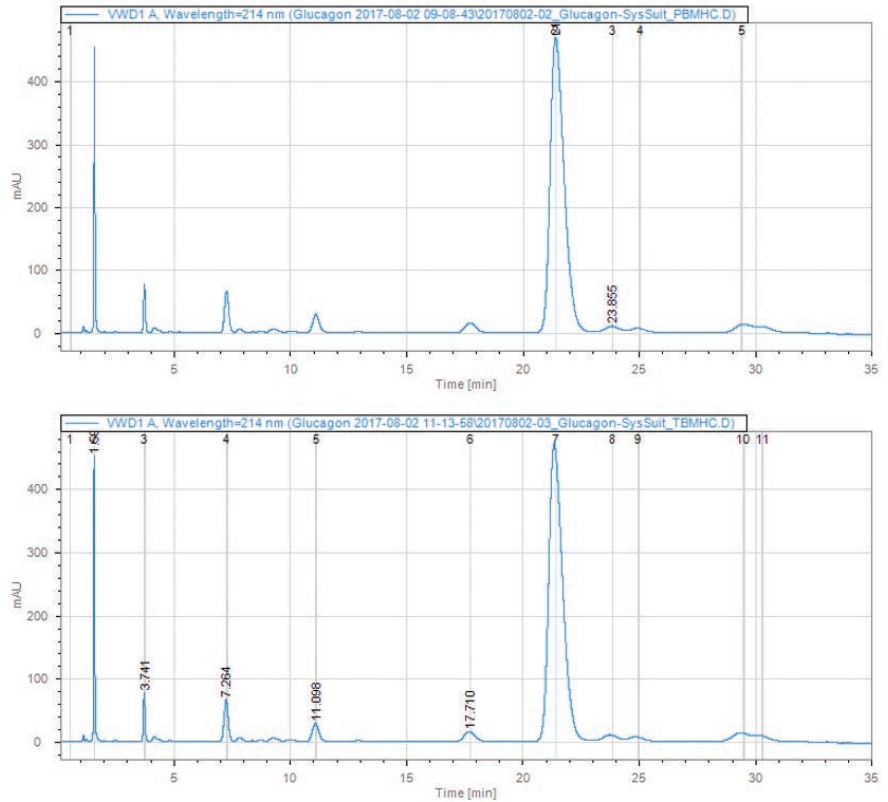


그림 6. (A) 피크 기반 multiple heart-cutting 2D-LC 과정 및 (B) 시간 기반 multiple heart-cutting 2D-LC에서 heart-cut된 글루카곤 시스템 적합 용액 분석의 1D 크로마토그램

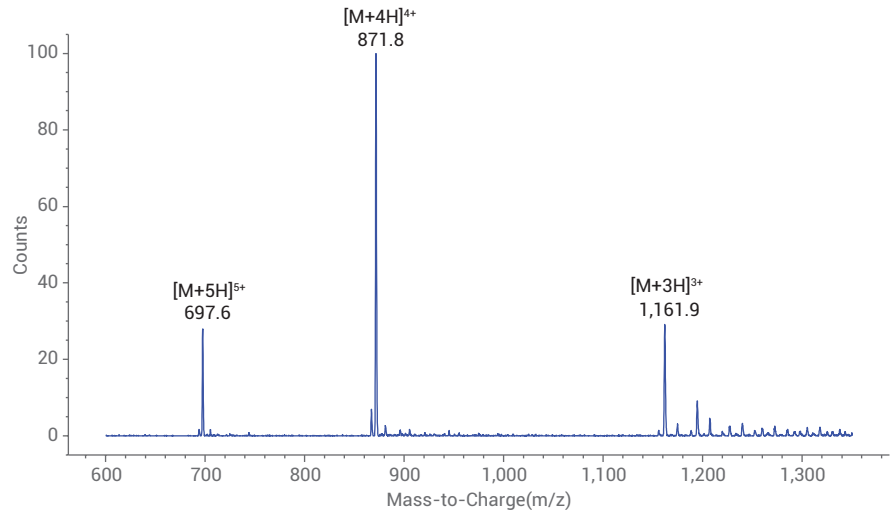


그림 7. 첫 번째 데사미도-글루카곤 피크의 질량 스펙트럼

결론

Agilent InfinityLab 2D-LC Solution을 적용된 Multiple heart-cutting 2D-LC는 MS 비호환 이동상을 사용하는 크로마토그래피 분석법과 MS 검출의 온라인 커플링을 가능하게 하는 효율적인 탈염 도구로 사용할 수 있습니다. USP 39에 따른 펩타이드 글루카곤 분석에서는 이동상 내에 인산 칼륨 완충 물질을 사용했습니다. 이 MS 비호환 크로마토그래피 분석법은 2차원 분석 과정에서 탈염 과정을 거친 후 질량 선택 검출법과 커플링되었습니다. 다른 첨가 생성물은 검출되지 않았으며, 이는 Agilent AdvanceBio Desalting-RP 카트리지에서 수행된 탈염 과정이 효과적으로 완수되었음을 의미합니다. 결과적으로 글루카곤 피크 및 글루카곤 탈아미드화로 인한 피크와 같은 표적 피크의 질량 정보를 성공적으로 얻을 수 있었습니다.

참고문헌

1. Luo, H.; et al. 2D-LC as an on-line desalting tool allowing peptide identification directly from MS unfriendly HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *137*, 139-145.
2. Petersson, P.; Haselmann, K.; Buckenmaier, S. Multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry: Towards real time determination of related impurities of bio-pharmaceuticals in salt based separation methods. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1468*, 95-101.
3. Suresh, Babu C. V.; Ravindra, G. Agilent AdvanceBio Desalting-RP Cartridges for Online Desalting in 2D-LC/MS mAb Analysis. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7066EN, **2016**.
4. Joshi, A. B.; Rus, E.; Kirsch, L. E. The degradation pathways of glucagon in acidic solutions. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *203*, 115-125.
5. "Glucagon" *Official Monographs USP* **2016** 39, December 1.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오.
진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017
2017년 9월 1일, 한국에서 발행
5991-8437KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies