

2次元LCおよび2次元LC/MSを用いた生体分子・ バイオ医薬品の分析技術

内 藤 厚 子

1 はじめに

近年抗体医薬品や核酸医薬品などのバイオ医薬品が広く用いられるようになり、研究開発も活発に行われている。高速液体クロマトグラフィー（HPLC、LC）はバイオ医薬品の開発には必須の技術であり、LCの分離パフォーマンスの向上は微小粒子径充填剤や表面多孔質充填剤を使用した超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）カラムによる分離効率の向上によってこれまで多く議論されてきた¹⁾。今日では、マトリクスの多様化やより複雑な組成のサンプルの分析が求められており、2次元LC（2D-LC）が高分離を実現する手法として注目されている。2D-LCは二つの異なる分析条件のLC分析をオンライン、またはオフラインで組み合わせる手法である²⁾³⁾。理想条件では2D-LCのピークキャパシティは1次元目（¹D）と2次元目（²D）のピークキャパシティの積となり、分離パフォーマンスを飛躍的に向上させることができる。

2D-LCは古くから行われてきた手法であり、例えば分取LCにより採取したフラクション（画分）を異なる分析条件で再分析することはオフライン2D-LCと言える。一方で、オンライン2D-LCはバルブを介して1次元目の溶出液を2次元目に導入する手法で、自動化が可能である。しかしながら従来のオンライン2D-LCは制御が複雑であり実用は困難であった。そこで弊社ではオンライン2D-LC専用のバルブや装置制御ソフトウェアにより、簡便に利用できるAgilent InfinityLab 2D-LCソリューションを開発した。2D-LCは、医薬品、食品、化学材料等の多岐にわたる分野で適用されているが⁴⁾、本稿では、複雑かつ多様な特性解析が求められる生体分子やバイオ医薬品に焦点を当て、Agilent InfinityLab 2D-LCソリューションの特長および2D-LC、2D-LC/MSによる測定例を紹介する。

2 装置概要

Agilent InfinityLab 2D-LCの流路構成を図1に示す。2D-LC専用バルブ（2pos/4port Duo）により、1次元目¹Dカラムからの溶出液をループに溜め、バルブを切

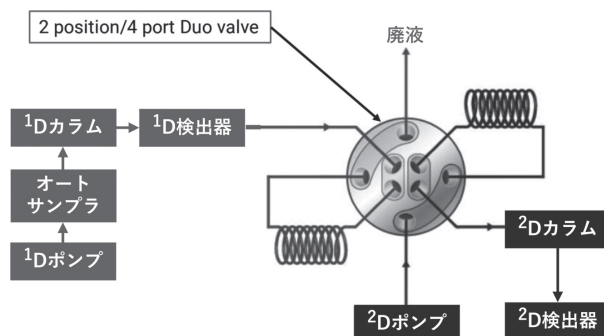


図1 Agilent InfinityLab 2D-LCの流路構成

り替えることにより²Dカラムに導入し分離、検出する。検出はUV検出器などのLCの一般的な検出器のほか、質量分析計（MSおよびMS/MS）も使用される。¹Dカラム分離の直後に検出器を接続し、¹Dクロマトグラムを得ることも可能である。

3 コンプリヘンシブ2D-LC

コンプリヘンシブ2D-LCは¹Dカラムからの溶出液すべてを²Dカラムに導入する手法であり、サンプルに含まれる化合物の全体像を包括的に把握するのに有効である。コンプリヘンシブ2D-LCでは、一方のループに¹Dカラムからの溶出液を溜めるのと同時に、もう一方のループに溜めた画分がただちに²Dカラムに導入され分離検出されて、バルブポジションが切り替わるという動作が繰り返される。このバルブが切り替わる周期をモジュレーションと呼ぶ。ループの容量は通常40～80 μL程度、モジュレーション時間はおおよそ20秒～1分程度であるため、1次元目は低流速、2次元目は超高速分析とする必要がある。したがって1次元目では低流速でも流量精度が高いポンプ、2次元目では超高速分析が可能なUHPLCシステムの使用が必須となる。

コンプリヘンシブ2D-LCのデータは一定のモジュレーション時間ごとの²Dクロマトグラムの集合体となるので、このクロマトグラムをモジュレーションごとに細分化し、横軸を¹D保持時間、縦軸を²D保持時間（モジュレーション開始からの時間）とする等高線プロットが得られる。図2に抗体医薬品のペプチドマッピング

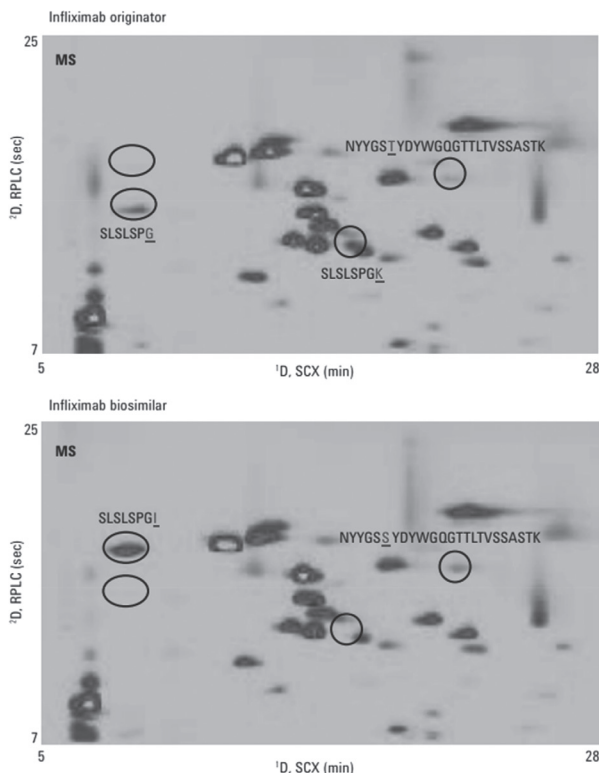


図2 コンプリヘンシブ 2D-LC によるペプチドマッピング
上段：インフリキシマブ，下段：バイオシミラー。
分析条件 1D：SCX（カラム：Agilent Bio SCX NP10）；2D：RP（カラム：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18）；検出：Q-TOF MS（positive）。

の例を示す⁵⁾。1次元目で強カチオン交換（SCX），2次元目で逆相（RP）分離を行い，等高線プロット上でインフリキシマブとそのバイオシミラーの差異を可視化した。Q-TOF MSにて差異ピークの配列確認を行った。

4 ハートカット 2D-LC

4.1 （シングル）ハートカット 2D-LC

ハートカット 2D-LC は 1D カラムからの溶出液の一部を，ループを介して 2D カラムに導入する手法であり，特定のピークを詳細に分析することができる。コンプリ

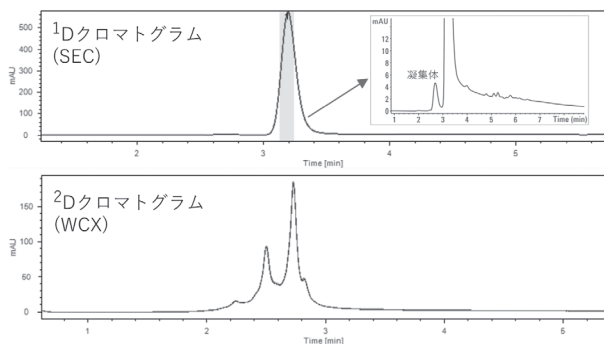


図3 ハートカット 2D-LC によるモノクローナル抗体の分析
分析条件 1D：SEC（カラム：Agilent AdvanceBio SEC 300A）；2D：WCX（カラム：Agilent Bio mAb WCX）；検出：UV 280 nm，ハートカット位置を灰色で示した。

ヘンシブ 2D-LC と異なりハートカット 2D-LC の 2 次元目は必ずしも超高速分析である必要はなく，1 次元目，2 次元目の分析条件の制約が少ない。

図3はモノクローナル抗体のサイズ排除（SEC）-弱陽イオン交換（WCX）の分析である⁶⁾。モノクローナル抗体をはじめとしたバイオ医薬品では安全性や効能を確保するために詳細な特性解析が重要であり，通常は複数の分析が必要とされる。2D-LC を用いて，SEC による凝集体分析，WCX による電荷変異体の分析を1回のインジェクションで行うことができた。

4.2 マルチハートカット（MHC）2D-LC

ハートカット 2D-LC の問題点として，1次元目で近接した時間に溶出する複数のピークを2次元目に導入し分離したい場合に，一度の測定では2次元目の分析が出来ないピークが発生することがある。そこで弊社では，2個のマルチループバルブにより1次元目の溶出液を貯留するループを増やしたマルチハートカット 2D-LC を開発した（図4）。これにより2次元目へ導入できるピークの数が増え，効率よくハートカット 2D-LC を行うことが可能となった。

図5にMHC 2D-LCによる合成核酸（オリゴヌクレオチド）の強陰イオン交換（SAX）-逆相（RP）の分析を示す⁷⁾。イオン交換クロマトグラフィーでは通常，不揮発性塩を含む緩衝液を移動相に用いるため，そのままMSに接続することは困難であるが，1次元目で溶出した各ピークを2次元目のRPにて脱塩を行いQ-TOF MSに導入することで，MSによる解析を可能にしている。MHC 2D-LCにより近接している複数ピークを1

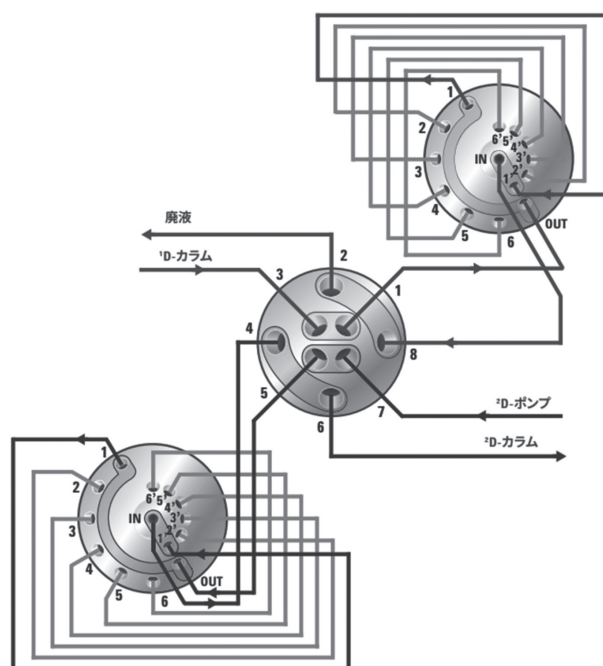


図4 マルチハートカット（MHC）2D-LC の流路図

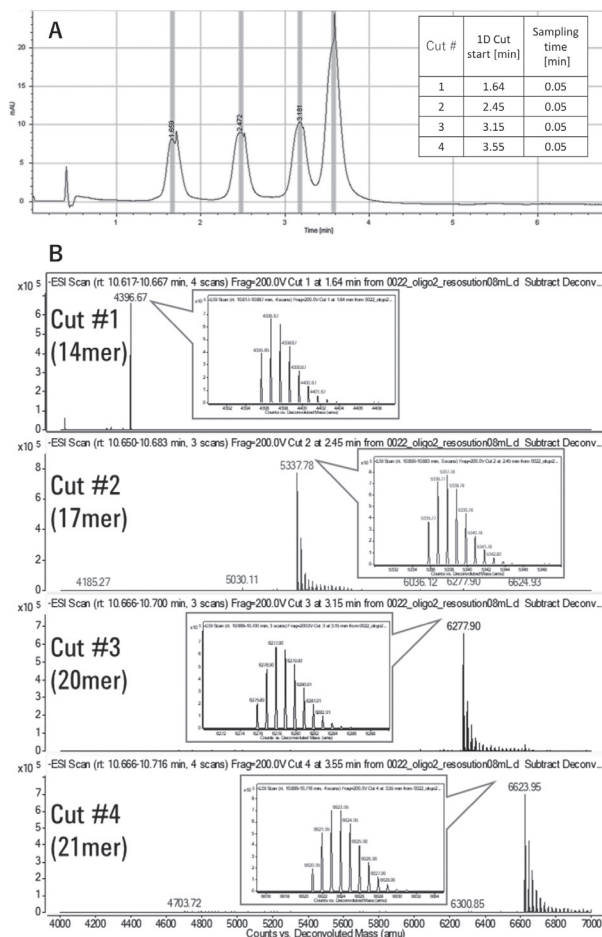


図5 MHC 2D-LCによる合成核酸のイオン交換分離及びオンライン脱塩

A: ¹Dクロマトグラム (ハートカット位置を灰色で示した); B: ピーク脱塩後のMSデコンボリューション結果.
分析条件 ¹D: SAX (カラム: Agilent Bio SAX); ²D: RP (カラム: Agilent AdvanceBio Oligonucleotide); 検出: UV 260 nm および Q-TOF MS (negative).

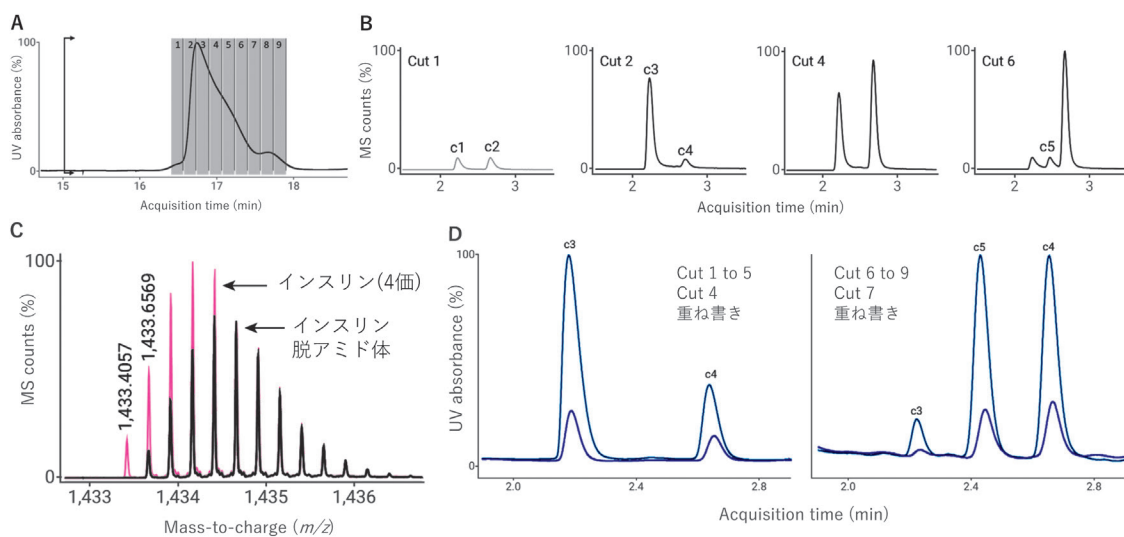


図6 HRS 2D-LCによる牛インスリンの分析

A: ¹DクロマトグラムとHRSカット位置; B: 各カットの²Dクロマトグラム; C: インスリンおよび脱アミド体のマススペクトル; D: マルチインジェクションを行った時の²Dクロマトグラム.
分析条件 ¹D: RP (カラム: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 移動相: 0.1% TFA/アセトニトリル グラジエント溶離); ²D: RP (カラム: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 移動相: 0.1% ギ酸/アセトニトリル グラジエント溶離); 検出: UV 214 nm および Q-TOF MS (positive).

回の測定で²Dカラムに導入して分析することが可能であった。

5 ハイレゾリューションサンプリング 2D-LC

5.1 ハイレゾリューションサンプリング (HRS) 2D-LC

MHC 2D-LCは1次元目の特定のピークを連続的に複数のループに貯留し2次元目へ導入することも可能であり、このような手法はハイレゾリューションサンプリング (HRS) 2D-LC もしくは選択的コンプリヘンシブ 2D-LC と呼ばれている。シングルハートカット 2D-LC ではターゲット成分の1次元目のピーク容量が2D-LCのループ容量を上回る場合、ピークの一部しか2次元目に導入出来ないが、HRS 2D-LCではピークを広範囲にわたって2次元目へ導入できるためピーク全体もしくは大部分の2次元分離が可能である。

図6にHRS 2D-LCによる牛インスリンのRP-RP分析を示す⁸⁾。1次元目で溶出したターゲットピークに対して、9画分を連続的に貯留し2次元目で分離を行った(図6A)ところ、主成分(c3)と4種の不純物を分離した(図6B)。Q-TOF MSにて不純物はアラニン欠損体(c1)および脱アミド体(c2,c4,c5)と同定された。

5.2 マルチインジェクション

HRS 2D-LCでは、ピーク全体または広範囲を2D-LC分析することが可能である一方で、ループに貯留している複数の画分をすべて2次元目に導入し測定するため分析条件の設定によっては測定時間が長大となる。そこで弊社はHRS 2D-LC分析時に貯留した複数のピー

クをまとめて2次元目に導入するバルブの制御プログラムを開発し、マルチインジェクション機能とした。これは大容量ループを使用したハートカット2D-LCを行うのと同じであるが、マルチインジェクションではループの付け替えを必要とせずソフトウェアによってループ容量を柔軟に設定できる。またマルチインジェクションは2次元目に導入される画分の容量が増大するため、後述のActive Solvent Modulation (ASM) と組み合わせるとより良い結果が得られやすい。

前述の牛インスリンのRP-RP分析において、1次元目でのピークの画分を1~5および6~9の二つのカットに分けてマルチインジェクションを行った結果を図6Dに示す。マルチインジェクションを行った場合でも²Dピークの保持時間は通常のHRS 2D-LCと同様であり分離能は損なわれなかった。またマルチインジェクションで得られた2Dピークの面積値は、HRS 2D-LCのカットごとのピーク面積の合計とほぼ一致した。一方で、通常のHRS 2D-LCと比較し分析時間を68分から39分に短縮することができた。

6 2D-LCの最新技術

6.1 2D-LCの最新技術

弊社のオンライン2D-LCソリューションは発表から約10年が経過したが、その間複数回のハードウェア、ソフトウェアの改良に加えて、測定モードの多様化、関連技術の開発等が進み、それに伴って適用分野が拡大してきた。2D-LCの最新技術として、本項ではActive Solvent Modulation (ASM)、ダイナミックピークパーキング、Bio 2D-LCを紹介する。

6.2 Active Solvent Modulation (ASM)

2D-LCでピークキャパシティをより大きくするには1次元目と2次元目で異なる分析条件を設定することが重要であり、中でも異なる分離モードを用いることは有効である。しかし異なる分離モードを組み合わせる場合に移動相の適合性が問題となることがある。1次元目に親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)、2次元目にRPを用いた2D-LCはその一例である。オンライン2D-LCではループと同容量の1次元目の移動相が2次元目に導入されるため、1次元目のHILICで用いられるアセトニトリル比率が高い溶出液が2次元目のRPに大量に導入されることになり、2次元目においてブレイクスルーやピーク形状の悪化が引き起こされる原因となる。この問題は1次元目の溶出液を適当な溶媒で希釈しながら²Dカラムに導入することで緩和できる。弊社では2次元目の移動相をスプリットしその一部で1次元目の溶出液を希釈しながら2次元目へ導入することができる2D-LC用バルブ (ASMバルブ) を開発した。このASMバルブにより、簡便に移動相の不適合を

緩和することが可能となった。図7にASMバルブの構造と概念、図8にペプチドをHILIC-RP (MHC 2D-LC) で測定した結果⁹⁾を示す。ASMを使用すると2次元目でブレイクスルーが生じず、ピーク形状も改善している。

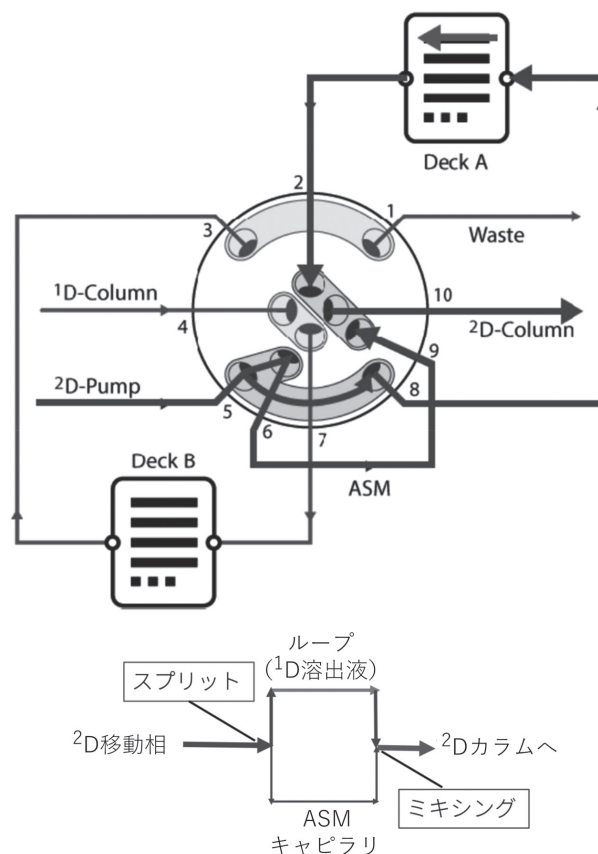


図7 ASMバルブの構造および概念図

ASMバルブに導入された²D移動相は、マルチループバルブ (Deck A/B) のループおよびASMキャピラリーにスプリット (分岐) され、再び合流しミキシングされる。これにより1次元目の溶出液は²D移動相に希釈されて²Dカラムに導入される。

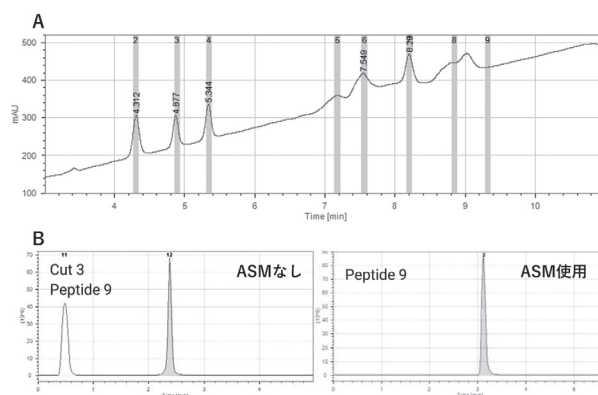


図8 ASMバルブを用いたMHC 2D-LCによるペプチドの分析
A: 1Dクロマトグラム (ハートカット位置を灰色で示した)、
B: カット3の²Dクロマトグラム。
分析条件 1D: HILIC (カラム: Agilent ZORBAX HILIC Plus);
2D: RP (カラム: Agilent AdvanceBio Peptide Mapping); 検出:
UV 220 nm および MS (positive)。

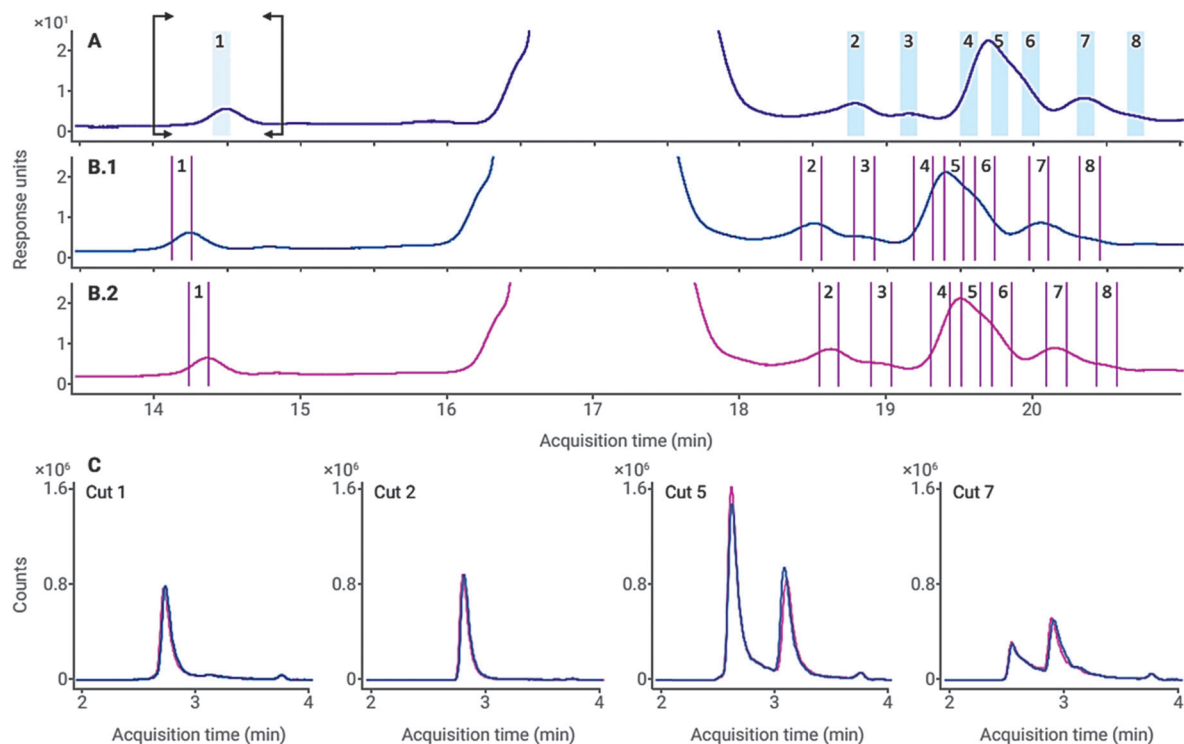


図9 ダイナミックピークパーキング機能を用いた MHC 2D-LC 分析

A: ^1D クロマトグラムおよび設定したハートカット位置; B.1 および B.2: 別日に測定した ^1D クロマトグラムおよびハートカット位置; C: 別日に測定した ^2D クロマトグラム重ね書き, 分析条件は図6と同様。

6.3 ダイナミックピークパーキング

ハートカットおよび HRS 2D-LC において1次元目のピーク保持時間が変動したとき、保持時間が想定と異なってしまう意図しない画分を2次元目に導入してしまうという問題がある。そこで弊社では、ソフトウェアで設定した内部保持時間標準ピーク (IRTS) の保持時間変動により、IRTS 以降のハートカットおよび HRS の画分のカット時間を補正する制御プログラムを開発し、ダイナミックピークパーキング機能とした。この機能は保持時間が変動しやすい生体分子の分析において特に重要である。図9はダイナミックピークパーキングを使用した牛インスリンとその不純物の RP-RP (MHC 2D-LC) 分析例である。図9Aのピーク1をその他のハートカット時間の IRTS として設定している。それぞれ別日に測定した結果を比較したところ、 ^1D ピークの保持時間が異なってもカット時間が補正され、同一の ^2D クロマトグラムが得られた。

6.4 Bio 2D-LC

生体分子やバイオ医薬品の中には、一般的な (U) HPLC に使用されているステンレス鋼 (SUS) に対して吸着する試料がある。対策として接液部に SUS を使用しないシステムが開発されており、弊社でもバイオイナート LC, Bio LC を開発している¹⁰⁾¹¹⁾。2D-LC においても Bio LC をベースとした Bio 2D-LC を開発した。Bio 2D-LC は SUS の代替として鉄を含まない合金

(MP35N) を接液部に使用している。前述の図6, 図9の分析は Bio 2D-LC を使用した分析である。

7 おわりに

オンライン 2D-LC は装置や周辺技術の進歩とともに適用分野が拡大している。分離能の高い手法である 2D-LC と、質量分析計を組み合わせることにより、サンプルのさらなる詳細解析が可能である。今後も Bio 2D-LC をはじめとした最新技術の進歩とともに、生体分子、バイオ医薬品を含めたさらに幅広いサンプルへの応用が期待される。

文 献

- 1) S. Feketea, E. Oláh, J. Feketea : *J. Chromatogr. A*, **1228**, 57 (2012).
- 2) D.R. Stoll, X. Li, X. Wang, P.W. Carr, S.E.G. Porter, S.C. Rutan : *J. Chromatogr., A*, **1168**, 3 (2007).
- 3) P. W. Carr, D.R. Stoll : TWO-DIMENTIO'NAL LIQUID CHROMATOGRAPHY-PRICIPLES, PRACTICAL IMPREMENTATION AND APPLICATIONS, Primer, 5991-2359EN, Agilent Technologies (2015).
- 4) B.W.J. Pirok, D.R. Stoll, P.J. Schoenmakers : *Anal Chem.*, **91**, 240 (2019)
- 5) Application Note : 5991-8077EN, Identifying Monoclonal Antibody Mutation Sites Using the Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Solution with Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies (2017).
- 6) Application Note : 5991-6906EN, Online 2D-LC Characterization of Monoclonal Antibodies with Size Exclusion and

Weak Cation Exchange Chromatography, Agilent Technologies (2016).

- 7) アプリケーションノート: LC-MS-202004NA-001, 2D-LC/MS を用いた合成核酸のイオン交換分離およびオンライン脱塩, アジレント・テクノロジー (2020).
- 8) Technical Overview: 5994-4743EN, Analysis of Peptide/Protein*-Related Impurities Using the Integrated Solution of Bio 2D-LC/Q-TOF in Agilent MassHunter Software (2022).
- 9) Technical Overview: 5991-8785EN, The Agilent InfinityLab 2D-LC Solution with Active Solvent Modulation, Agilent Technologies (2017).
- 10) Application Note: 5994-4392EN, Comparability Studies for the Analysis of Nucleotides on Four Different LC Systems,

Agilent Technologies (2021).

- 11) Application Note: 5994-4617EN, Enhanced Sensitivity for Phosphopeptide Analysis, Agilent Technologies (2022).



内藤 厚子 (Atsuko NAITO)

アジレント・テクノロジー株式会社
(〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1). 東京都立大学大学院理学研究科修士課程修了. 《現在の業務》HPLC, LC/MS セールスサポート, アプリケーション開発. 《趣味》旅行.

E-mail: atsuko_naito@agilent.com

会社ホームページ URL:

<https://www.chem-agilent.com>

関連製品ページ URL:

<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1006128>

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象: 以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情

報など

新規性: 本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません. 新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません. また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません.

お問い合わせ先:

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail: bunseki@jsac.or.jp]