

LC/MS/MS によるポリソルベート酸化 副生成物スクリーニングの複雑さの低減

Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング
HPLC カラムの使用

著者

Wendi A. Hale
Agilent Technologies, Inc.

Jeremy P. Koelmel and
Krystal J. Godri Pollitt
School of Public Health,
Yale University

概要

バイオ医薬品製剤における界面活性剤の酸化は、ますます顕在化しており、重大な懸念事項となってきました。界面活性剤の酸化が観察された場合に、軽減策を開始するためのスクリーニングメソッドを確立することは非常に重要です。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング HPLC カラムを用いた、新しい LC/MS/MS ワークフローを紹介します。

はじめに

界面活性剤、特にポリソルベートは、タンパク質ベースの治療薬の安定化において非常に重要な役割を果たしています。残念なことに、界面活性剤は酸化しやすく、その原因は残留過酸化物、光への曝露、または遷移金属（特に鉄）などの浸出物です。¹ポリソルベートの酸化は、反応性分解生成物の形成につながり、生物製剤の安定性を損なう可能性があるため、生物製剤とその配合物の効能と安全性を維持するうえで課題となります。

製剤緩衝液中の酸化分解マーカーを迅速かつ明確に同定できるスクリーニングメソッドを確立することが重要になります。²⁻⁸スクリーニングメソッドを確立することにより、科学者は鉄汚染や酸素曝露の低減などの軽減策を決定して、バイオ医薬品の長期安定性を確保することができます。このアプリケーションノートでは、AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング HPLC カラム、Agilent 6546 LC/Q-TOF システム、Agilent MassHunter Qualitative Analysis 12.0 ソフトウェア、および PolyMatch⁹ ソフトウェアを用いた、ポリソルベート酸化マーカーを同定するためのワークフローを紹介します。

実験方法

材料とサンプル前処理

すべての試薬は Sigma-Aldrich から購入し、移動相はすべて LC/MS グレードのものを使用しました。ポリソルベート 80 を、移動相 A で最終 w/v が 0.02 % になるように希釈しました。ポリソルベート 80 を、3 % (w/v) の過酸化水素とともに、40 °C に加熱したウォーターバス内で一晩インキュベーションしました。

装置構成

Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムを、Agilent 6546 LC/Q-TOF システムに結合しました。以下が含まれています。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II サーモスタット付カラムコンパートメント (G7116B)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ソフトウェア
- PolyMatch⁹ ソフトウェア

LC/MS/MS 分析とデータ処理

LC/MS/MS 分析は、1290 Infinity II UHPLC とデュアル Agilent Jet Stream イオン源付き 6546 LC/Q-TOF システムを組み合わせ実施しました。データの収集には、Agilent MassHunter Acquisition (11.00) ワークステーションソフトウェアと Auto MS/MS メソッドを使用しまし

た。ターゲット分析には、MassHunter Qualitative Analysis 12.0 ソフトウェアと、Find by Formula (FBF) アルゴリズムおよび Personal Compound Database and Library (PCDL) Manager B.8.00.00 を使用しました。サスペクト化合物のスクリーニング分析には、PolyMatch Flow と Visualizer を使用しました。⁹ポリエチレングリコール (PEG) とポリオキシエチレン (POE) は、化学的に同義語です。PCDL の項目には POE という用語が使用されていますが、これはポリソルベートの成分を説明する際に一般的に使用される用語です。PolyMatch は、すべてのポリマーを分析できるように設計されているため、PEG という用語を使用しています。そのため、このアプリケーションノートでは、両方の用語を互換的に使用しています。

メソッド条件

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング 300 Å、3.5 µm、2.1 × 100 mm (部品番号 861775-907)、ガード (部品番号 821126-927) 付き
移動相 A	10 mM 酢酸アンモニウム
移動相 B	メタノール
流量	0.3 mL/min
注入量	2 µL
カラム温度	50 °C
LC グラジエント	時間 (分) %B 0 ~ 1 5 1 ~ 10 5 ~ 91 10 ~ 14 91 14 ~ 14.1 91 ~ 5 14.1 ~ 15 5
ポストタイム	3 分
ニードル洗浄	20:80 メタノール:水、10 秒

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF パラメータ。

パラメータ	設定値
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	200 °C
ガス流量	12 L/min
ネブライザ	30 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧 (VCap)	3,500 V
ノズル	0 V
フラグメンタ	145 V
リファレンス質量	121.0509、922.0098
取り込みレート (MS、MS/MS)	5 および 3 スペクトル/秒
MS および MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 3,000
1 サイクルあたりの最大プリカーサ数	5
コリジョンエネルギー	10、20、40 V

結果と考察

ポリソルベートの酸化は複雑なプロセスですが、その一因はポリソルベートの不均一な構造にあります。ポリソルベートは POE 基の 4 つの異なる鎖から構成されており、20 個の POE 部位が 4 つの鎖に分かれています。さらに、各鎖が脂肪酸で終端することができます。酸化は、遊離脂肪酸の不飽和部位と 20 個の POE 部位のいずれかで発生する可能性があります。さらに複雑なことに、酸化は急進的に誘導されて、伝播し続けるため、多数の潜在的な分解生成物が生じる可能性があります。高分解能精密質量液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析 (LC/MS/MS) は、この複雑な問題を明確に同定するためにしばしば選択されるメソッドです。このアプリケーションノートでは、酸化副生成物の同定数を最大化するための 2 つのアプローチについて説明します。

データ取り込み

ポリソルベートの酸化は複雑であるため、LC/MS/MS の分析時間が長くなる傾向があります。AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムは、ポリソルベート成分の高分離能分析を短時間で実施するために設計されました。長さ 100 mm のカラムを選択して、18 分のメソッドで高分離能を実現しました。データが、ターゲット化合物とサスペクト化合物のスクリーニングの両方のアプローチに適していることを確認するために、データを Auto MS/MS で取り込みました。Auto MS/MS はデータ依存型のメソッドであり、スペクトルごとに上位 5 個のピークが MS/MS のターゲットとなり、アクティブな排除が適用されます。コントロールサンプルは購入した直後ではなく、多少、光に曝露されていたため、若干の酸化が発生した可能性があります。人工的な酸化条件に曝露された酸化サンプルは、より酸化が進んでいることが予想されます。図 1 において、トータルイオンクロマトグラムは、繰り返し分析間で高い再現性を示しています。特に酸化クロマトグラムでは、モノエステル、ジエステル、トリエステルが溶出する際のシグナルが減少し、クロマトグラムの初期にシグナルがわずかに増加していることから、何らかの分解が発生していることがわかります。

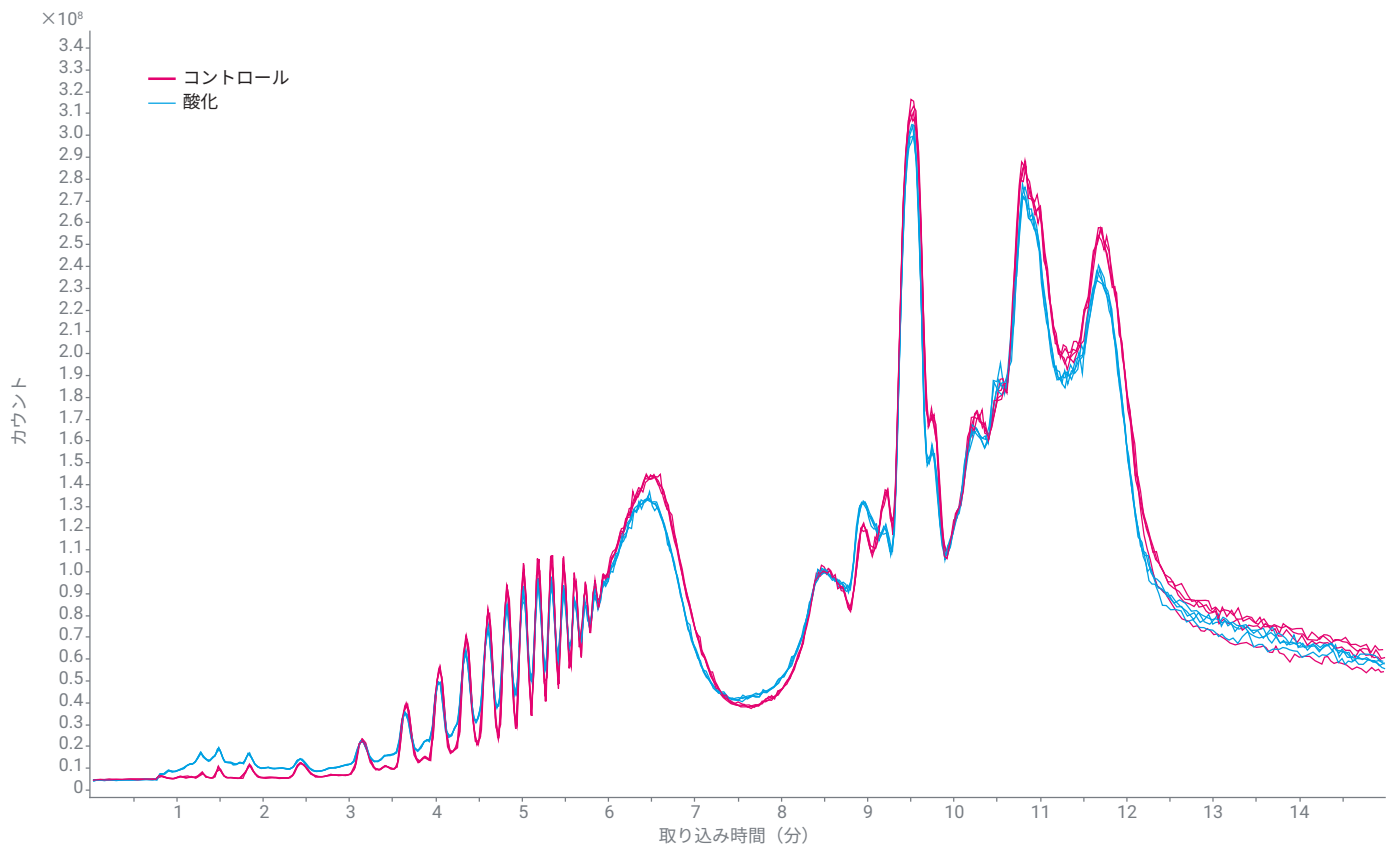


図 1. コントロールサンプルと酸化サンプルのトータルイオンクロマトグラムを比較することにより、何らかの分解が発生していることがわかります。

ターゲット分析

先に述べたように、ポリソルベートの不均一性と急進的に開始された酸化プロセスの両方により、何百、場合によっては何千もの潜在的な分解生成物を伴う複雑なシナリオがもたらされます。既知の分解物が以前に観察されていれば、ターゲットアプローチを使用することができます。既知のポリソルベート分解生成物に関する文献は増え続けており、これらの論文から得られたデータをターゲットアプローチに組み込むことができます。最近発表された論文には、4,800 を超える潜在的な分解生成物が含まれており、各生成物の診断 MS/MS イオンが示されています。²このリストに基づいて、PCDL をコンパイルし、Qualitative Analysis 12.0 ソフトウェアの FBF アルゴリズムに組み込みました。FBF アルゴリズムは、質量精度、同位体アバンダンス、スペーシングに基づいて化合物をスコア化します。さらに、このアルゴリズムには、MS/MS イオンに化学式を割り当てる機能が備えられています。

図 2 と 3 は、同定された化合物の一例である、POE1 モノスベリン酸塩を示しています。コントロールサンプルと酸化サンプルそれぞれについて、4 回の繰り返し分析でデータを収集しました。コントロールは、少量のこの化合物の存在を示しており、FBF アルゴリズムで確認されています。ただし、コントロールでのアバンダンスは、MS/MS をトリガーするほど高くはありません。コントロールサンプルの酸化ピークのアバンダンスは低いと予想されます。コントロールのリテンションタイムは酸化サンプルのリテンションタイムと一致しており、FBF スコアは 100 中の 82.5 であるため、この化合物は高い信頼性で同定できます。これは低アバンダンスの化合物であるため、同位体忠実度がわずかに低下しており、FBF スコアが 90 台ではない理由を説明しています。酸化サンプルは、コントロールサンプルと比較すると、POE1 モノスベリン酸塩のアバンダンスが 1 桁増加しており、FBF スコアは 99.5 と非常に高くなっています。参考文献²の診断 MS/MS イオンが、追加アノテーションされた MS/MS ピークとともに存在しています。

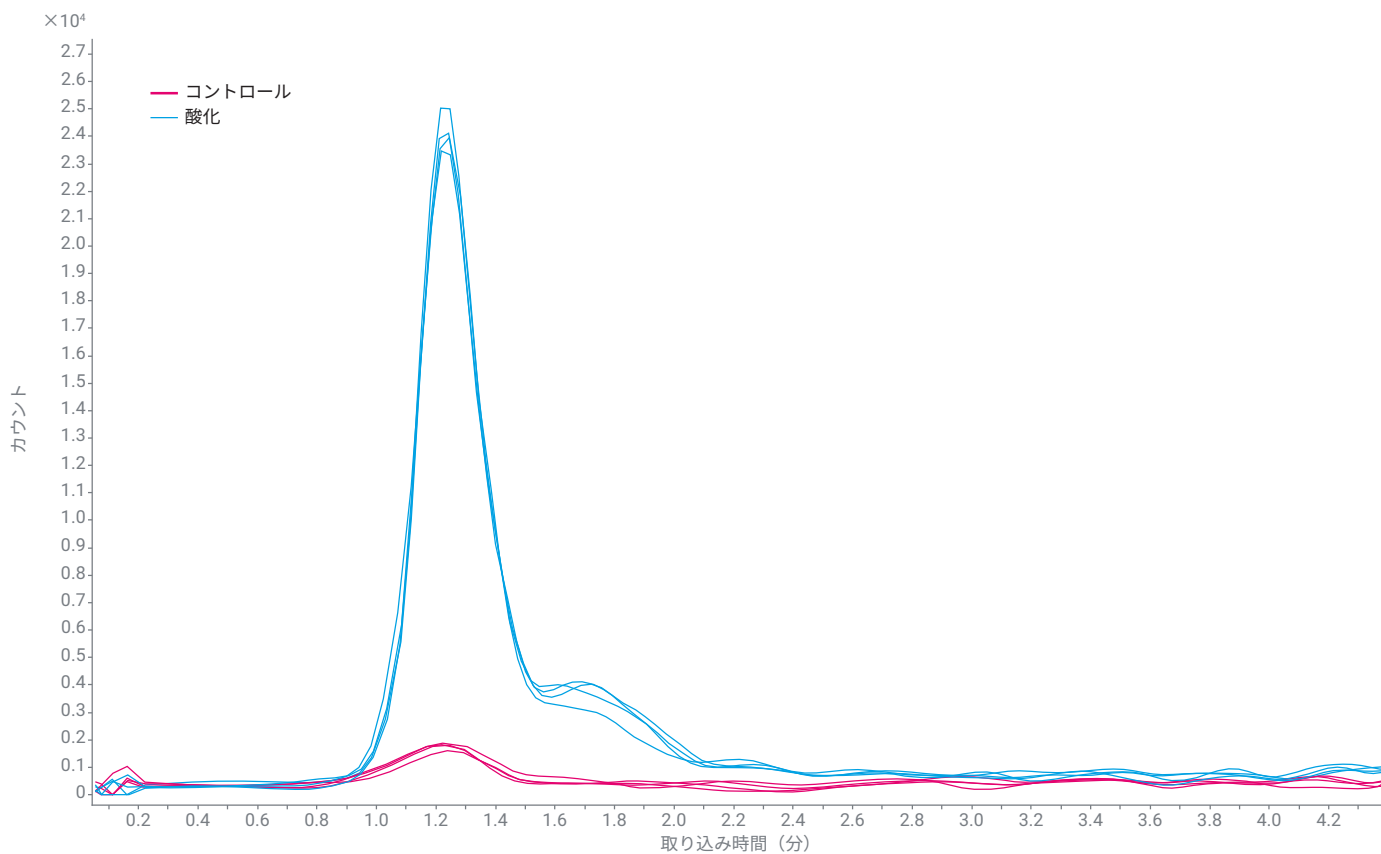


図 2. コントロールサンプルと酸化サンプルの POE1 モノスベリン酸塩の抽出イオンクロマトグラム。繰り返し分析では、それぞれ 13.4 % と 1.9 % という高いピーク面積精度を示しています。

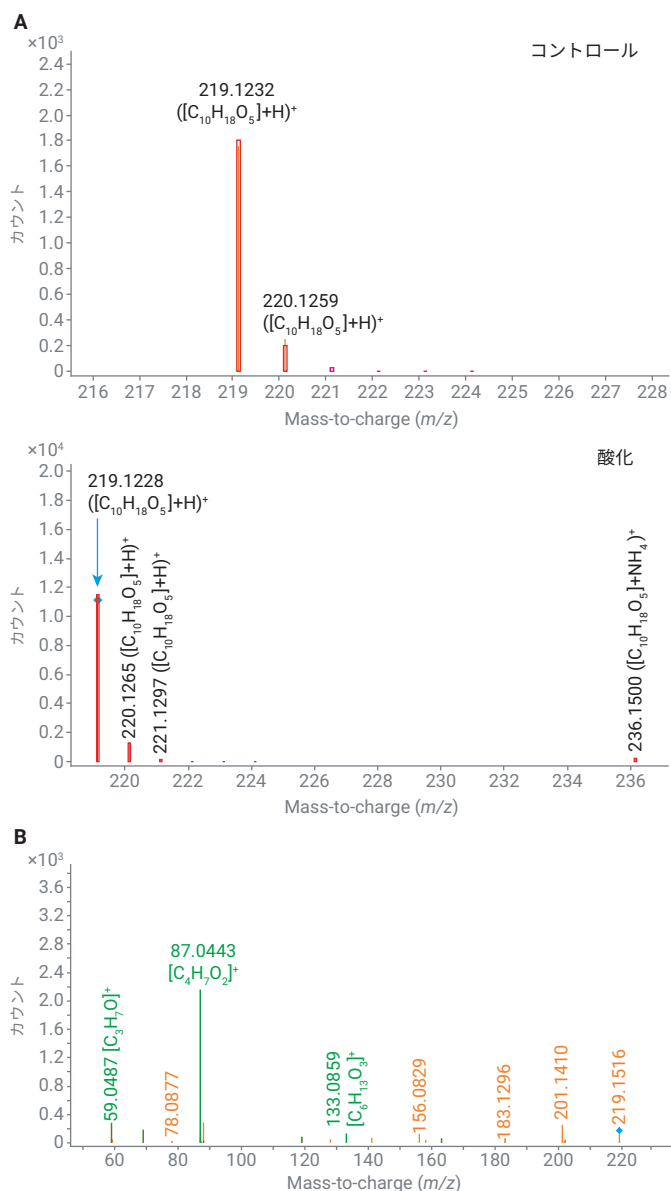


図 3. (A) POE1 モノスベリン酸塩について FBF アルゴリズムでアノテーションした、MS1 のみのスペクトル結果。酸化サンプルは、アンモニウム付加物を含む化合物のエビデンスも示しています。酸化サンプルのみが、MS/MS をトリガーするのに十分なアバundanceでこの化合物を有していました (B)。

同定された化合物の 2 番目の例は、一連の同族種である、POE11 ~ POE15 モノヒドロペルオキシオレイン酸塩であり、それぞれが単一の POE 基によって異なります。この一連の FBF スコアはすべて非常に高く、96.3 ~ 99.7 の範囲であり、平均は 98.8 です。図 4 に示すように、5 つの化合物の 8 回の繰り返し分析すべての質量誤差は 1 ppm 未満です。コントロールサンプルでは、ヒドロペルオキシオレイン酸塩種がいくつか検出されていますが、酸化サンプルでは、ヒドロペルオキシオレイン酸塩種が一貫して増加しています。ピーク面積の再現性はすべての繰り返し分析で維持されており、1.9 ~ 5.9 % RSD の範囲です。図 5 は、酸化サンプルの 1 つにおける POE13 モノヒドロペルオキシオレイン酸塩の一例を示しています。ターゲットアプローチを使用することには、いくつかの利点があります。名前と分子式が提供されていれば、PCDL の設定は簡単です。FBF アルゴリズムは迅速に処理を行い、サンプル間の差異を明確に視覚化します。ただし、ライブラリから除外されたターゲットは同定されません。代替のデータ解析メソッドは、補完的な利点を提供します。

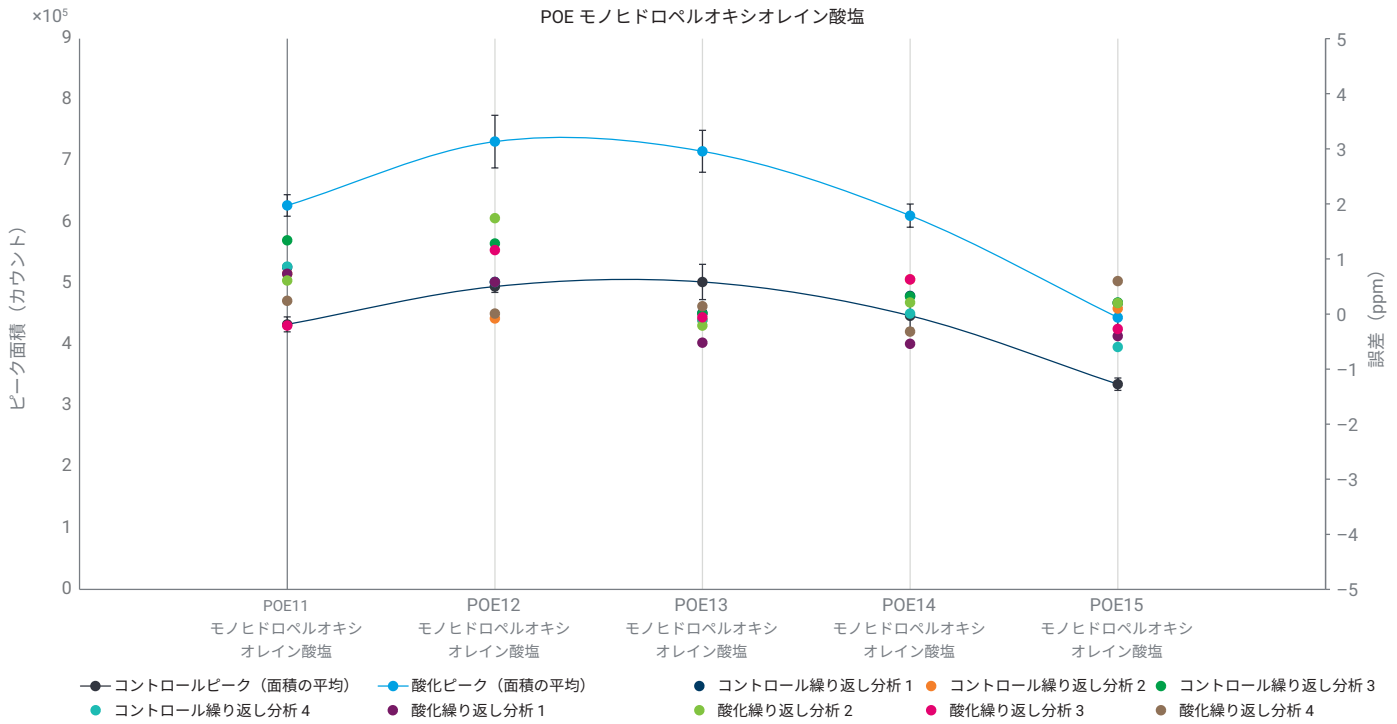


図 4. POE(n) モノヒドロペルオキシオレイン酸塩系列の概要。分解生成物は酸化サンプルで増加しており、優れた再現性を示しています。すべての繰り返し分析において、96.3 ~ 99.7 の範囲の高い FBF スコアを示しており、1 ppm 未満の質量誤差の影響を受けています。

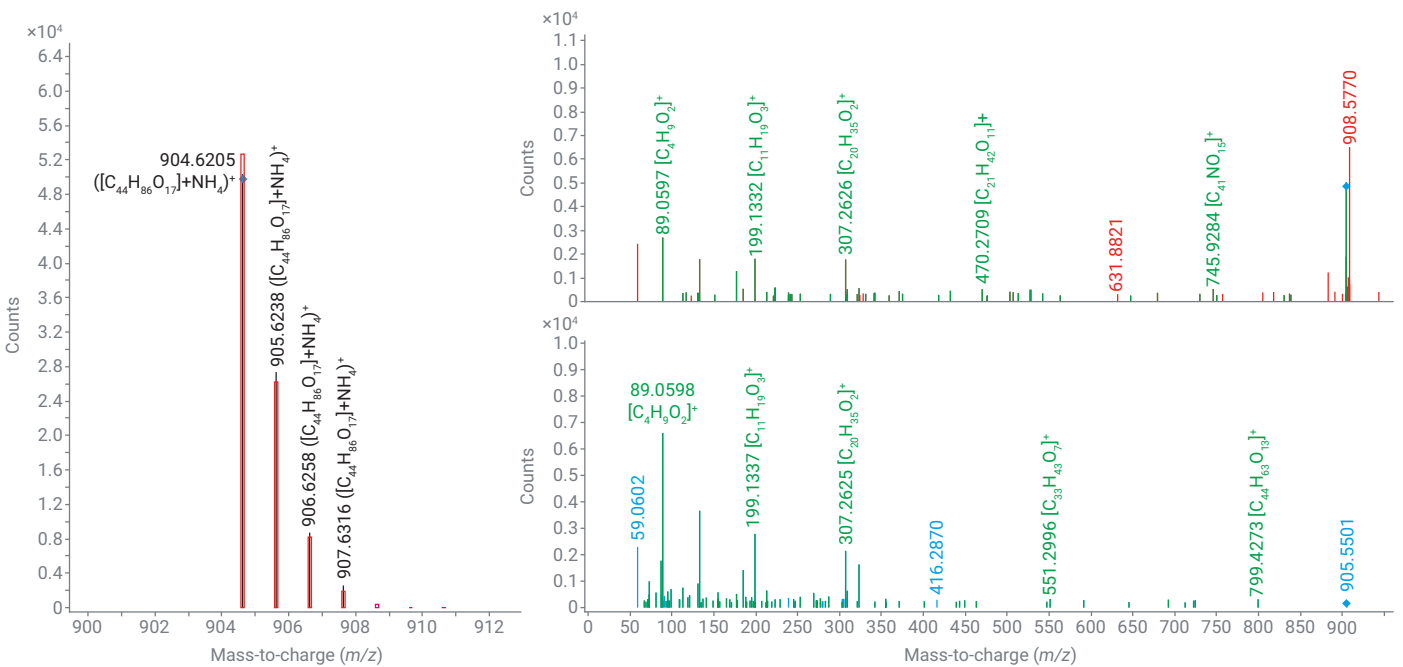
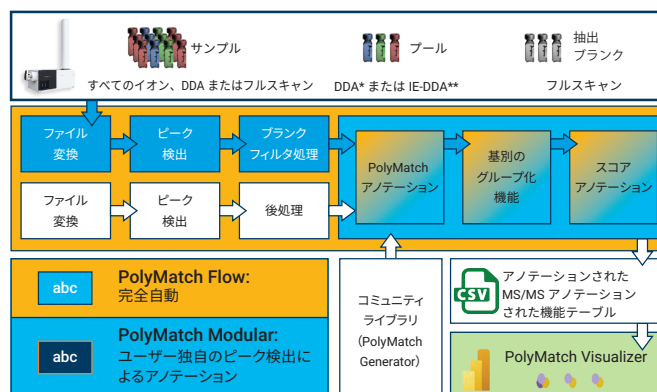


図 5. 酸化サンプルの 1 つに含まれている POE13 モノヒドロペルオキシオレイン酸塩の一例であり、FBF スコアは 98.4 です。診断 MS/MS イオン 307.2632 は、3 つの MS/MS スペクトルのうち 2 つに存在しており、質量精度は -2.3 ppm 以下です。もう 1 つの MS/MS イオン 323.2572 は、下側のスペクトルに存在しており、酸化を示しています。

サスペクト化合物のスクリーニング分析

ポリソルベートの酸化を分析する場合、ターゲットアプローチは優れた開始点となりますが、リテンションタイム、タンデム質量スペクトルデータ、質量欠損など、いくつかの特徴を考慮したノンターゲットアプローチは、より信頼性が高く、新たな分解生成物を同定することができます。PolyMatch は、質量欠損、リテンションタイム、精密質量など、ポリマーを分類するための幅広いエビデンスを統合しており、これらのエビデンスを同族列とともに使用することにより、同じクラスに属する可能性の高い化学物質群を集めてまとめることができます。MS/MS エビデンスは、クラスレベルまたは種レベルの割り当てに関連する構造情報を提供することができます。⁹

現在、PolyMatch は、フラグメントスクリーニング、同族列検出、および「一般化」ライブラリを通して、酸化種を含む未知のポリマーの検出に使用することができます。PEG 関連フラグメントのフラグメントスクリーニングによる同族列検出は、既知のポリマー構造を含む PolyMatch ルールベースのライブラリに含まれているかどうかに関係なく、PEG 化単位を持つすべてのポリマーを検出します。さらに、「一般化」ライブラリは、酸化ポリマーも取り込みます (図 6)。このライブラリには、二重結合等価物、さまざまな官能基や付加物の添加、PEG 化単位のサイズ、CH₂ 基の存在などを特徴とするポリマーが含まれています。図 7 は、PolyMatch ライブラリに含まれている PEG とその特徴の例を示しており、図 10 で同定されたいくつかの構造の図も含まれています。PolyMatch ライブラリには、特定の酸化ポリソルベート種とそのフラグメンテーションパターンはまだ含まれていませんが、この機能は将来ライブラリの拡張とともに追加される予定です。このソフトウェアプログラムには、自動ピーク検出、ブランクフィルタリング、アノテーション、視覚化が備えられています。⁹



*DDA = Data-dependent acquisition,
**IE-DDA = Iterative exclusion data-dependent acquisition

図 6. PolyMatch ワークフローの概要。この実験では、完全に自動化された PolyMatch Flow インタフェースを使用しました。

シミュレートされた PEG : 64,450 種		
例	定義	内蔵範囲
n = 3	PEG 単位の数	3~44
NH ₄ ⁺	付加物	NH ₄ ⁺ , Na ⁺ , H ⁺
CH ₂ = 6	炭素の数 (非 PEG)	0~19
DBE = 4	二重結合等価物	0~6
(4-OH)	官能基	OH (0~4)、NH ₃ (0~2)、=O (0~2)

構造と命名規則:

HO(CH2O)8CH2OH ポリソルベート_PEG-8
HO(CH2O)6CH2OH PEG_PEG-6
CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O(CH2O)8CH2OH ポリソルベート-R1_FA(16:0)_PEG-6
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O(CH2O)8CH2OH ポリイソソルピド-R1_FA(18:0)_PEG-9
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O(CH2O)8CH2OH ポリソルベート-R1_FA(18:2)_PEG-9

図 7. PolyMatch ライブラリには、PEG/POE などの構造や官能基が含まれています。表示されている構造は、PolyMatch により作成された SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) ファイルから生成された後、<https://www.cheminfo.org> から描画されました。

質量欠損は、ポリソルベート中の繰り返し POE 基を利用するため、特に強力です。PolyMatch は分解生成物の系列を確認して、視覚的に明確に表示することができるため、偽陽性の除外が容易になります。図 8A は、一連のポリソルベート成分とその繰り返し POE/PEG 単位を示しており、ポリソルベート-R1_FA(16:0)-PEG(n) として同定されています。PolyMatch の命名規則は PCDL とは異なります。そのため、ポリソルベート-R1_FA(16:0)-PEG(n) は、図 4 と 5 で参照した POE(n) モノヒドロペルオキシオレイン酸塩と同じ構造および系列です。

AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムと PolyMatch ソフトウェアを組み合わせることの利点は、図 8B で強調して示されています。図 8A は、関連するポリソルベート成分の単一系列を示していますが、図 8B では、質量欠損系列内でクロマトグラフィーにより分離された異性体のセットが明確に示されています。LC カラムの選択性により、長時間のメソッドを必要とせずに異性体を分離します。図 9 に、異性体の各セットから得られた MS/MS スペクトルの一例を示します。上側のスペクトルは後期に溶出したセットのものであり、フラグメントはほぼアノテーションされています。下側のスペクトルは初期に溶出したセットのものであり、同

じアノテーションがいくつかあります。ただし、この下側のスペクトルには、 m/z 323.2576 という、まだアノテーションされていない高アバンドンスのピークが含まれており、上側のスペクトルとは大きく異なっています。文献によると、この MS/MS イオンはケトオレイン酸であり、ポリソルベートの酸化のエビデンスとなります。これは、PolyMatch ライブラリに追加される予定のイオンの一例です。^{4~6}

本研究では、主にポリソルベート成分の 1 セットに注目しましたが、他にも多くの成分が検出されました。PolyMatch では、A ~ E という文字によるスコアシステムを採用しています。A スコアの化合物は、精密質量とクラス固有のフラグメンテーションパターンに基づいて、非常に信頼性の高い同定とみなされます。A スコアの化合物は 261 種類ありました。図 10 に、これらの高スコア化合物の質量欠損と、対応するリテンションタイム対 m/z のプロットを示します。ポリソルベートの酸化は複雑で急進的なプロセスであるため、酸化の程度を判断するには強力なソフトウェアツールが不可欠です。さらに、データ取り込みプロセスを迅速化する、AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムを使用することは非常に有用です。

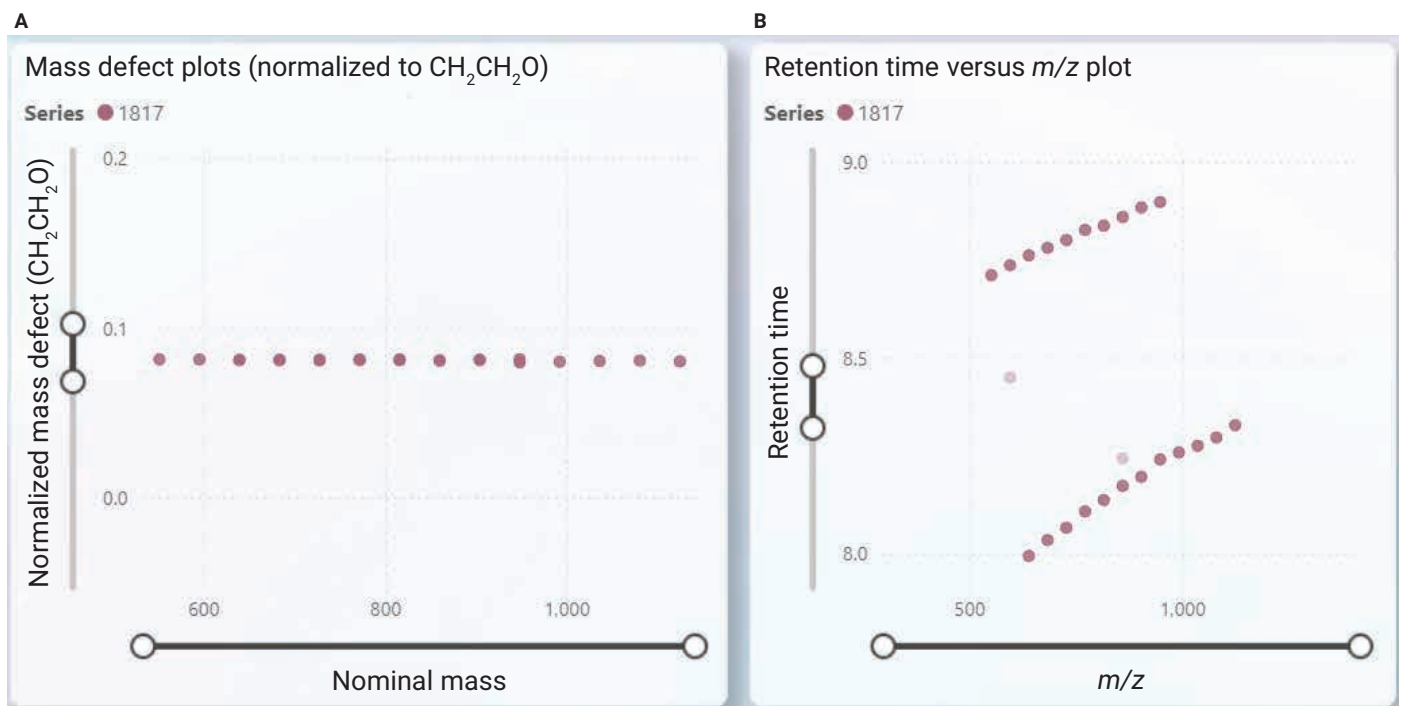


図 8. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ に正規化された Kendrick 質量プロット (A) は、ポリソルベート-R1_FA(16:0)-PEG(5-18) として同定された一連のポリソルベート成分を示しています。リテンションタイム対 m/z のプロット (B) は、質量欠損系列内でクロマトグラフィーにより分離された異性体のセットを示しています。

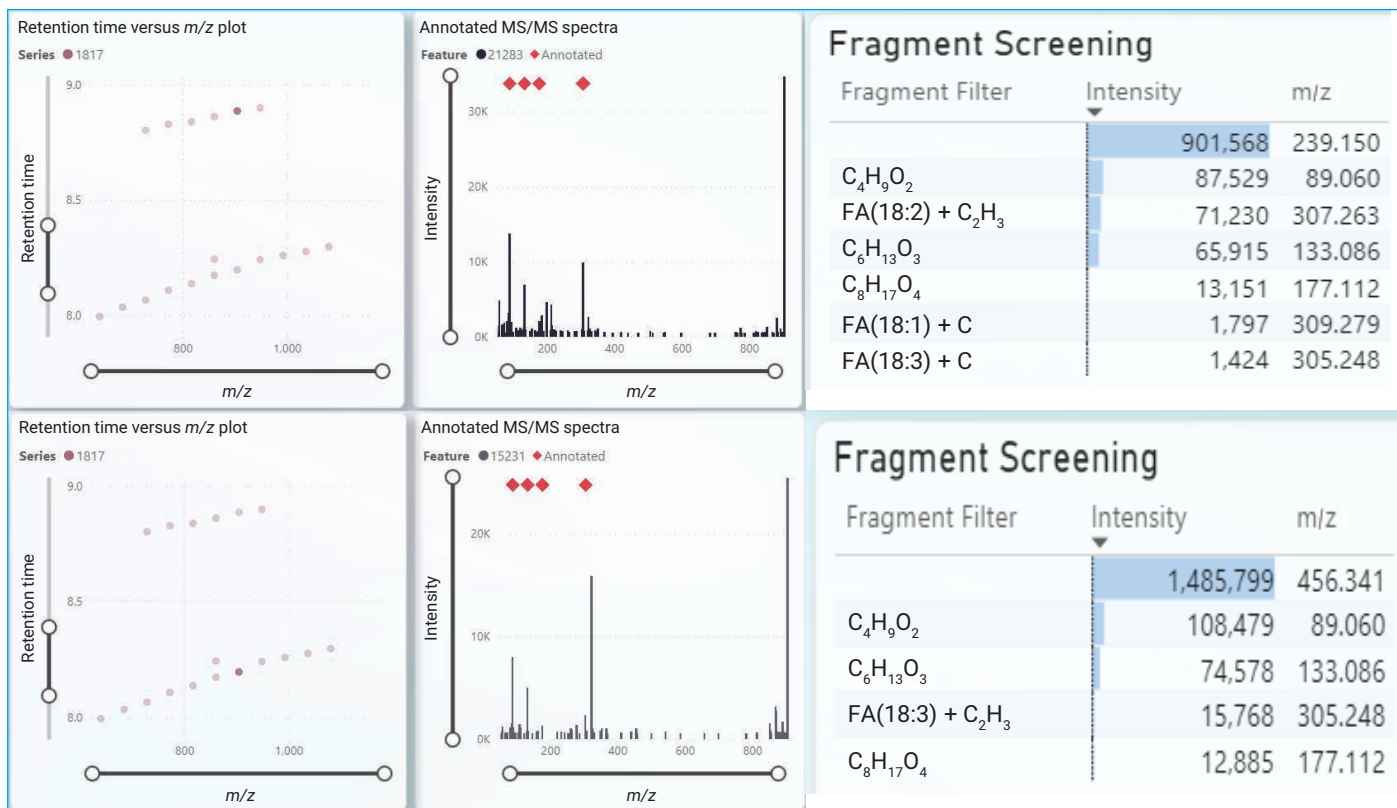


図 9. 各異性体セットの MS/MS スペクトルとアノテーションされたフラグメントの例。MS/MS では、診断イオン m/z 323.2576 により、下側の化合物が酸化されていることが確認されています。

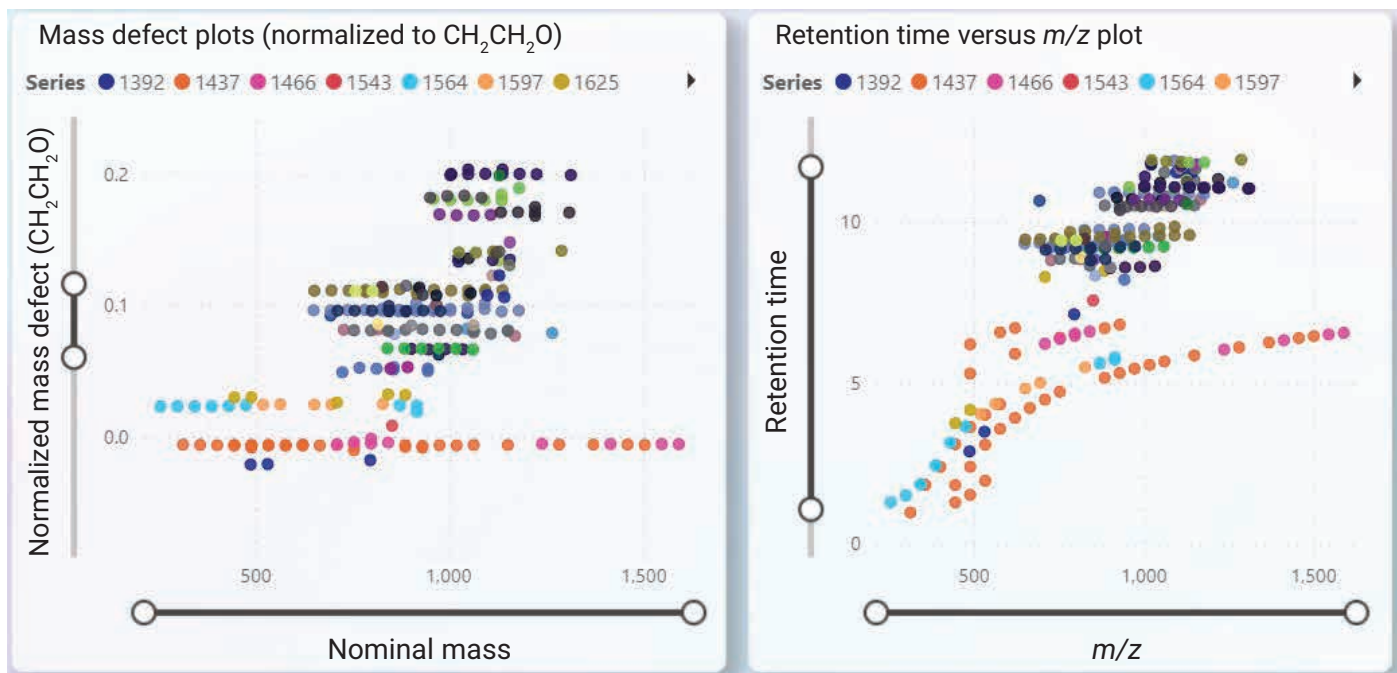


図 10. すべての高スコア化合物の質量欠損と、リテンションタイム対 m/z のプロット

結論

生物製剤や配合物の安定性をモニタリングするラボ向けのスクリーニングツールとして、ポリソルベート酸化副生成物を同定するためのLC/MS/MSワークフローを開発しました。Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムでは、ポリソルベート成分の高分離能分析を短時間で実施できます。Agilent 6546 LC/Q-TOF システムは、分解生成物を同定するための優れた同位体忠実度により、高分離能の精密質量データを生成します。Agilent MassHunter Qualitative 12.0 Find by Formula (FBF) アルゴリズムは、完全なターゲットアプローチに使用することができ、PolyMatch ソフトウェアは、よりノンターゲットなサスペクト化合物のスクリーニングアプローチに最適です。

参考文献

1. Weber, J.; Buske, J.; Mäder, K.; Garidel, P.; Diederichs, T. Oxidation of Polysorbates: an Underestimated Degradation Pathway? *Int. J. Pharm.* **2023**, *6*, 100202–100232. DOI: 10.1016/j.ijpx.2023.100202.
2. Li, X.; Wang, Z.; Zheng, B.; Wang, Y.; Zhang, J. Novel Strategy to Rapidly Profile and Identify Oxidized Species of Polysorbate 80 Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 9156–9163. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c04956.
3. Kranz, W.; Wuchner, K.; Corradini, E.; Berger, M.; Hawe, A. Factors Influencing Polysorbate's Sensitivity Against Enzymatic Hydrolysis and Oxidative Degradation. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 2022–2032. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.01.006.
4. Borisov, O. V.; Ji, J. A.; Wang, Y. J. Oxidative Degradation of Polysorbate Surfactants Studied by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 1005–1018. DOI: 10.1002/jps.24314.
5. Hvattum, E.; Yip, W. L.; Grace, D.; Dyrstad, K. 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.* **2012**, *62*, 7–16. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.12.009.
6. Liu, H.; Jin, Y.; Menon, R.; Laskowich, E.; Bareford, L.; de Villmorin, P.; Kolwyck, D.; Yeung, B.; Yi, L. Characterization of Polysorbate 80 by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Understand Its Susceptibility to Degradation and Its Oxidative Degradation Pathway. *J. Pharm. Sci.* **2022**, *111*, 323–334. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.08.017.
7. Kishore, R. S. K.; Pappenberger, A.; Dauphin, I. B.; Ross, A.; Buerge, B.; Staempfli, A.; Mahler, H.-C. Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 721–731. DOI: 10.1002/jps.22290.
8. Brovc, E. V.; Pajk, S.; Sink, R.; Mravljak, J. Protein Formulations Containing Polysorbates: Are Metal Chelators Needed at All? *Antioxid.* **2020**, *9*, 441–453. DOI: 10.3390/antiox9050441.
9. Koelmel, J. P.; Stelben, P.; Oranzi, N.; Kummer, M.; Godri, D.; Qi, J.; Rennie, E. E.; Lin, E.; Weil, D.; Pollitt, K. J. G. PolyMatch: Novel Libraries, Algorithms, and Visualizations for Discovering Polymers and Chemical Series. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, *35*, 413–420. DOI: 10.1021/jasms.3c00313.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-004223

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, February 12, 2025

5994-8140JAJP