

# Application News

No. 01-00758-K

Software for Efficient Method Development "LabSolutions™MD"  
Preparative Purification Liquid Chromatograph "Nexera™Prep / LH-40 / LCMS-2050"

## 분석/분취 전환 LC-MS 시스템을 활용한 합성 펩타이드의 효율적인 분취 및 정제 과정

Efficient Preparative Purification Workflow of Synthetic Peptide Using Analytical/Preparative Switching LC-MS System

Yuki Suzuki, Yusuke Masuda

### 사용자 활용 포인트

- ◆ 여러 단계의 합성 펩타이드 분취 및 정제 작업이 단일 LC-MS 시스템에서 수행될 수 있다.
- ◆ LabSolutions MD를 사용하여 목표 화합물의 최적 분리조건을 쉽게 최적화할 수 있다.
- ◆ LCMS-2050의 우수한 식별 능력에 기반하여 가공되지 않은 샘플에서 목표 화합물을 높은 순도와 회수율로 정제할 수 있다.

### ■ 서론

2000년대에 항체 의약품과 같은 바이오 제약이 등장하였으나, 유전 공학을 이용한 제조 과정에서 극복해야 할 많은 도전 과제가 있었다. 이에 따라 중분자 의약품(middle molecule drugs)에 대한 관심이 높아졌으며, 중분자 의약품 중 하나인 펩타이드 치료제는 저비용으로 제조가 가능하고, 분자량이 작아 세포 내로 쉽게 침투할 수 있으며, 특이적인 3차원 구조를 채택하기 때문에 인체에 들어갔을 때 분해가 방지되는 장점이 있다. 이러한 펩타이드는 소분자 의약품처럼 화학 합성으로 생산되기 때문에 최종 합성 제품의 정제, 분획 및 순도 확인이 필수적이다. 이 뉴스레터에서는 Application News 01-00650-EN 및 01-00651-EN을 기반으로 Nexera Prep 분취 및 정제용 액체 크로마토그래프를 사용하여 여러 단계의 원활한 정제 과정(분리조건 최적화, 스케일 확장, 분획화, 순도/회수율 확인)에 대한 펩타이드 분석결과를 제시하였다(그림 1).



그림 1. Nexera™ Prep 시스템

### ■ 분석/분취 전환 LC-MS의 개요

이 뉴스레터에서는 분석 및 분취 경로가 모두 장착된 분석/분취 전환 LC-MS 시스템을 이용하였다. 분석 경로는 분리조건, 로딩능력(loadability) 및 순도/회수율을 평가하는 데 사용되었고, 분취 경로는 목표 펩타이드를 분획할 때에 사용되었다. LCMS-2050은 분리조건 최적화 시 목표 화합물의 질량 정보를 제공할 뿐만 아니라 샘플 수집(MS 기반 분획 수집)에도 효과적으로 사용된다. 따라서 목표 화합물은 높은 순도로 회수될 수 있다. 자세한 정보는 Application News 01-00650-EN에서 확인이 가능하다.

### ■ 분석 스케일에서의 분리 조건 최적화

목표 합성 펩타이드(파라토르몬(1-34): PTH)가 포함된 가공되지 않은 합성 샘플의 분리조건이 분석 스케일에서 최적화되었다.

그림 2 ①은 분리조건 최적화 이전의 샘플 UV 크로마토그램(분석조건: 표 1)을 보여준다. 이러한 조건에서는 PTH와 공존하는 불순물 간의 분리가 충분하지 않았으며, 로딩량을 늘리면 불순물로부터의 분리가 더욱 악화될 것이므로, PTH를 높은 순도로 회수하기 위해 분리도 개선이 필수적이었다.

다양한 파라미터(25가지의 기술기 패턴과 5가지의 유기용매 초기 및 최종 농도 조합 패턴)를 사용하여 HPLC 분리 조건을 종합적으로 시험하기 위해 LabSolutions MD가 사용되었다.

합성된 가공되지 않은 샘플 중 PTH(파란 화살표)와 불순물의 분리도가 가장 우수한 결과는 유기용매의 초기 농도 25%, 최종 농도 35% 조건에서 얻어졌다(그림 2 ③).

표 1. 분석 조건

Mobile Phase	: Pump A: 0.1% TFA in water Pump B: 0.1% TFA in acetonitrile
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm)*1
Sample Concentration	: 2 mg/mL in N-methylpyrrolidone
Injection Volume	: 10 μL
<b>LC Conditions</b>	
Time program (%B)	: B Conc. X%(0 min) → Y%(10 min) → 90%(10.01-15 min) → X%(15.01-20 min) X: 10, 15, 20, 25, 30 Y: 30, 35, 40, 45, 50
Column Temp.	: Ambient
Flow rate	: 1 mL/min
Sample loop size	: 500 μL
Syringe size	: 500 μL
Detection (PDA)	: 220 nm (SPD-M40, conventional cell)
<b>MS Conditions</b>	
Ionization	: ESI/APCI(DUIS™), positive mode SCAN (m/z 500-2000)
Nebulizing gas Flow	: 2.0 L/min
Drying gas Flow	: 5.0 L/min
Heating gas Flow	: 7.0 L/min
DL Temp.	: 200 °C
Desolvation Temp.	: 250 °C
Interface Voltage	: 0.5 kV

\*1 P/N: 227-31020-05

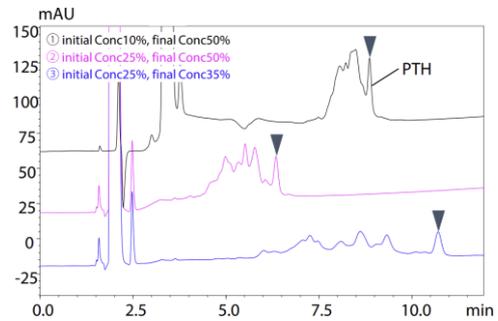


그림 2. 분리조건 최적화 결과

### ■ 로딩능력 평가

분석 스케일에서 최적화된 조건에서(그림 2 ③), 합성 샘플(10 mg/mL)을 사용하여 5, 10, 20, 50 μL의 주입량으로 로딩능력을 시험하였다(그림 3). 주입량이 증가해도 PTH의 분리가 저하되지 않았기 때문에, 50 μL의 주입량으로 규모를 확장하여 정제 분석을 수행하기로 결정하였다.

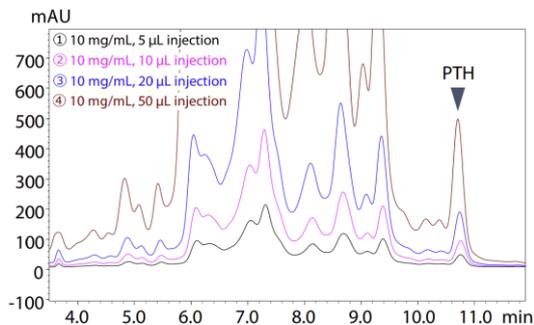


그림 3. 로딩능력 평가 결과

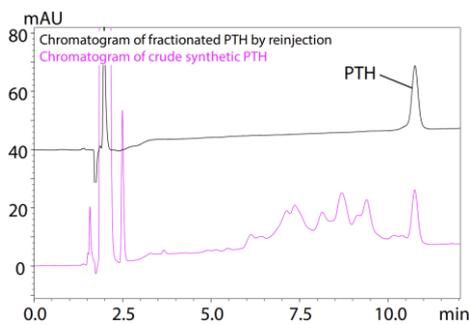


그림 5. 분획된 PTH의 순도 확인

### ■ PTH의 분획

PTH는 UV 및 MS 트리거를 사용하여 분획하였다. 분취 조건은 표 2에 나와 있으며(단, 표 1과 다른 파라미터만 표시함) 결과로 나온 LC 크로마토그램은 그림 4에 나타내었다(파란 영역이 분획된 구간). 분석용 컬럼(내경 4.6 mm)과 분취용 컬럼(내경 20 mm)의 단면적 비율(약 20배)을 기준으로 유속을 20 mL/min로 스케일을 확장하였으며(스케일 확장 전후의 선형 속도는 일정하게 유지), 주입 부피는 1 mL로 설정하였다. 스케일 확장 전후로 유사한 분리 패턴이 관찰되었으며, 불순물로부터의 분리는 유지되었다. MS와 UV 트리거의 조합 사용은 매우 선택적인 PTH 분획을 가능하게 하여 높은 순도의 PTH 회수가 이루어졌다.

표 2. 분석 조건

Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm x 20 mm I.D., 5 µm) <sup>*1</sup>
Sample Concentration	: 10 mg/mL in N-methylpyrrolidone
Injection Volume	: 1000 µL
<b>LC Conditions</b>	:
Flow rate(Prep)	: 20 mL/min
Flow rate	: 1.5 mL/min
(Makeup for MS)	(0.1% propionic acid in water/methanol=90/10)
Sample loop size	: 2 mL
Syringe size	: 5 mL
Detection(PDA)	: 220 nm (SPD-40V, preparative cell)

\*1 P/N: 227-31102-03

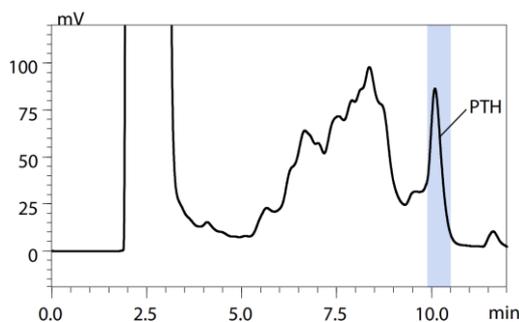


그림 4. UV+MS 트리거가 있는 분취 크로마토그램  
\*파란 영역은 분획된 구간을 나타냄

### ■ 수집된 분획의 순도 확인

그림 5에 분획된 PTH를 분석 경로에 재주입하여 얻은 크로마토그램과 분획 전 합성 샘플의 크로마토그램을 나타내었다. 두 샘플은 수집된 PTH 분획과 이론적으로 동일한 농도로 준비되었다. 크로마토그램을 비교한 결과, 목표로 한 PTH가 성공적으로 정제된 것을 확인하였다.

### ■ 표준 PTH를 사용한 순도 및 회수율 평가

이 시스템의 분취 성능(순도 및 회수율)은 표준 안지오텐신 I 용액을 사용하여 평가하였다. 그림 6은 분획된 안지오텐신 I를 분석 경로에 재주입한 후 얻은 크로마토그램과 수집된 안지오텐신 I 분획과 이론적으로 동일한 농도로 준비된 표준용액의 크로마토그램을 보여준다. 순도와 회수율은 표 3에 나타내었으며 순도는 면적 정규화 기준으로 100%였고, 피크면적 비교를 통해 계산된 회수율은 97.9%로 나타났다. 이는 신뢰할 수 있는 분획이 성공적으로 수행되었음을 의미한다.

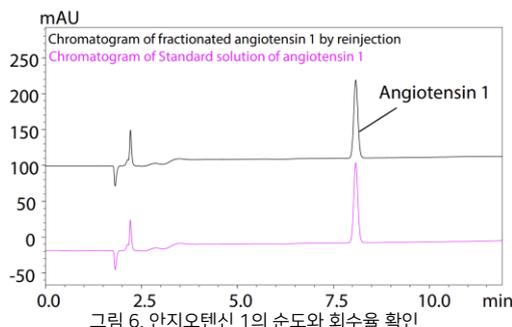


그림 6. 안지오텐신 I의 순도와 회수율 확인

	순도(면적%)	회수율(%)
안지오텐신 I	100.0	97.9

### ■ 결론

분석/분취 전환 LC-MS 시스템을 사용하여 원활한 분취 정제 절차를 실행할 수 있다. 또한, LabSolutions MD는 다양한 HPLC 파라미터 설정을 자동으로 최적화하는 분석 배치 스케줄을 생성하여 효율적으로 분리 조건을 최적화할 수 있다.

또한, LCMS-2050은 MS 트리거를 기반으로 목표 화합물을 매우 선택적으로 분획할 수 있다. 이 뉴스레터에서 사용된 분석/분취 전환 LC-MS는 분석 및 분취 흐름 경로를 모두 포함하여, 펩타이드의 합성 확인 과정을 포함한 분취 및 정제 절차를 효율적으로 수행할 수 있도록 한다.

<관련 응용자료>

1. Analysis of Impurities in Pharmaceuticals Using LCMS-9030 Quadrupole Time-of-Flight Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer 01-00017-EN
2. Screening Analysis of Metabolites in Red Wine 01-00329-EN