APPLICATION NOTE

elementar
EXCELLENCE IN ELEMENTS

쉽고 정확한
펩타이드 절대 함량 분석

도전

GMP를 준수하며
소량의 시료로 펩타이드 분석

펩타이드 1 mg을 주문할 때 펩타이드 물질이 60~80 %만 함유된 동결건조 분말 1 mg을 받는 것이 업계 표준입니다. 따라서 정확한 양의 펩타이드를 치료제에 포함시키려면 먼저 공급된 분말 내 펩타이드의 절대 양을 결정해야 합니다.

순 펩타이드 함량을 결정하는 데는 몇 가지 어려움이 있습니다: 우선, 펩타이드는 매우 소량으로 제조되는 경우가 많기 때문에 가능한 한 적은 시료로 분석을 수행해야 합니다. 둘째, 분말의 절대 펩타이드 함량은 활성 의약품 성분으로서 펩타이드의 정확한 투여량에 직접적인 영향을 미치기 때문에 매우 정확하고 정밀하게 측정해야 합니다. 이는 분석의 모든 측면이 GMP 가이드라인 및 약전 측정 방법을 준수해야 함을 의미합니다.

마지막으로, 각 펩타이드 배치에 대해 절대 펩타이드 함량을 측정해야 하므로 분석에 최소한의 수작업이 소요되어야 하고 분석당 비용이 저렴해야 합니다.

사용기기:
UNICUBE® trace / UNICUBE®

샘플:
- 0.4 mg 펩타이드 분말
- 20 µg N을 함유하는 용해 펩타이드 분말

상세설정:
- USP <1057>
- Ph. Eur. 01/2008:02533

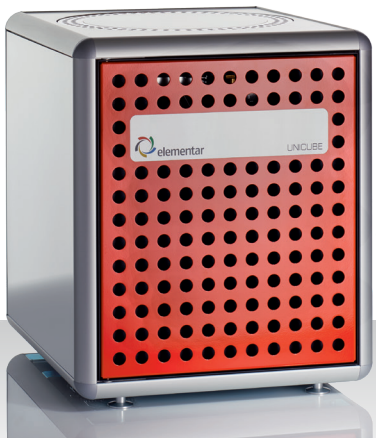
솔루션

UNICUBE® trace를 사용한 질소 분석

펩타이드 물질은 동결건조 분말의 유일한 질소 공급원입니다. 따라서 분말에 포함된 질소의 절대량을 알면 펩타이드의 절대량을 계산할 수 있습니다:

$$\text{펩타이드 절대량} = \text{펩타이드 분말내 질소 절대량} \times \frac{100}{\text{펩타이드 내 \%N}}$$

"펩타이드 내 %N"은 펩타이드의 화학식에서 유도된 알려진 값입니다.



펩타이드 분말의 질소 분석은 원소 분석기 UNICUBE® trace를 사용하여 쉽게 수행할 수 있습니다. 이 측정은 총 단백질 측정 절차에 대한 USP <1057> 메소드 7 절차 2 및 박사 논문 01/2008:02533 메소드 7B를 완전히 준수합니다. 3분간의 수동 시료 전처리를 제외하고 분석은 완전 자동화되어 있으며 5분이면 완료됩니다. 고품질의 순 펩타이드 함량 데이터를 얻으려면 1 밀리그램 미만의 펩타이드 분말이 필요합니다. 최대 시료 크기 측면에서 분석기는 시료당 최대 10 mg N까지 수용할 수 있습니다. 분석당 비용은 약 0.55€ 또는 $0.70입니다.

이 분석기는 유지보수가 빈번하지 않고 빠르며 별도의 도구가 필요하지 않도록 설계되었습니다. 또한 분석기는 몇 년 동안 유지되는 검량선과 함께 제공됩니다. 숙련된 서비스 엔지니어가 IQ / OQ / PQ를 실행하고 21 CFR 파트 11을 준수하는 소프트웨어를 사용할 수 있습니다.

UNICUBE® trace 의 작동 원리

시료의 무게를 측정하고 주석 호일로 시료를 감싼 후 분석기의 자동 샘플러에 넣습니다.

분석이 시작되면 시료당 5 분 이내에 질소의 절대량이 자동으로 측정됩니다. 분석기 내부에서는 다음 단계가 진행됩니다:
먼저 시료와 함께 분석기 내부로 유입되었을 수 있는 모든 주변 공기가 캐리어 가스와 함께 제거됩니다. 그런 다음 시료가 뜨거운 가열로에 떨어지면 연소되어 가스로 완전히 전환됩니다.

이제 시료의 질소는 N_2 가스로 완전히 존재합니다. N_2에서 다른 가스가 분리된 후 열 전도도 감지기로 감지됩니다. 이 검출기의 질소 신호는 분석기 소프트웨어에서 피크로 표시됩니다. 그런 다음 분석기는 피크 영역을 절대 질소량으로 변환합니다.

결과
펩타이드 실험 및 LOD/LOQ

UNICUBE® trace의 정확성과 정밀도를 입증하기 위해 Bachem의 제품 카탈로그에 있는 두 가지 펩타이드를 분석했습니다. 이 펩타이드는 펩타이드 분말의 질소 비율이 기재된 분석 데이터 시트가 함께 제공됩니다. 이를 통해 UNICUBE® trace의 분석 결과를 인증된 값과 비교할 수 있었습니다.

첫 번째 펩타이드($C_{23}H_{34}N_6O_6$, TFA 염, 제품 번호 4025806)는 암 및 염증 연구에 응용되는 광범위한 인간 매트릭스 메탈로-프로테아제 저해제입니다. 이 펩타이드 분말 중 0.4 mg의 무게를 측정하고 은박지에 싸서 UNICUBE® trace의 자동 샘플러로 옮겼습니다. 소프트웨어에서 분석이 시작되면 완전 자동화된 방식으로 진행됩니다.

펩타이드 분말의 질소 함량을 5회 반복 측정한 결과 평균값은 13.57 %, 절대 표준편차는 0.08 %였습니다 (표 1).
UNICUBE® trace를 통해 측정된 값은 Bachem의 13.60 %와 매우 잘 일치합니다.

알고 계셨나요?

UNICUBE® trace 외에도 순 펩타이드 함량을 UNICUBE®로도 쉽게 측정할 수 있습니다. 이 분석기는 질소 감도, 운반 가스 옵션 및 측정 가능한 원소 측면에서만 차이가 있습니다. UNICUBE® trace는 질소 및 탄소 전용 분석기로, UNICUBE®보다 질소 감도가 4배 더 높고 운반 가스로 헬륨이 필요합니다. 반면 UNICUBE®는 C, H, N, S, O*는 물론 Cl*까지 측정할 수 있고 헬륨 또는 아르곤을 운반 가스로 사용할 수 있다는 점에서 다재다능한 제품이라고 할 수 있습니다. 두 장비 모두 펩타이드 외에도 불소화 제약 화합물, 크로마토그래피 수지, 액체 연료 및 불균일 토양과 같은 다양한 시료를 분석할 수 있습니다.

*옵션 구성

두 번째 실험에서는 상처 치유와 같은 재생 의학에 응용되는 성장 조절 혈장 GHK 트리펩타이드($C_{14}H_{24}N_6O_4$, 아세테이트 염, 제품 번호 4000308)를 분석했습니다.

이 실험의 목표는 시료의 절대 질소 함량 대비 측정 정밀도를 입증하는 것이었습니다. 이를 위해 펩타이드 분말을 물에 용해하고 소량을 주석 호일 용기에 피펫팅했습니다. 열린 주석 호일용기를 70 °C의 드라이 오븐에 넣어 하룻밤 동안 건조시켰습니다. 다음날 용기를 접어서 UNICUBE® trace의 자동 샘플러에 삽입했습니다.
펩타이드 분말의 질소 백분율은 10 µg N, 20 µg N 및 60 µg N의 샘플을 사용하여 측정했으며 각 농도 수준에 대해 5 회 반복 측정을 수행했습니다.

표 1. 0.4 mg 펩타이드 분말의 반복 분석 결과
(인증 값: 펩타이드 분말 내 13.60 % N)

	펩타이드 분말 내 %N
반복 1	13.62 %
반복 2	13.60 %
반복 3	13.49 %
반복 4	13.65 %
반복 5	13.49 %
평균값	**13.57 %**
절대 표준편차	**0.08 %**
상대 표준편차	**0.56 %**

표 2의 결과는 UNICUBE® trace가 질소 절대량이 적은 시료에 대해서도 질소 함량을 매우 정확하고 정밀하게 측정할 수 있음을 보여줍니다.

인증된 값인 19.76 % N과 비교하여 60 µg N 및 20 µg N 시료에서 각각 19.82 ± 0.03 % N 및 19.83 ± 0.05 % N이 측정되었으며 이는 상대 표준 편차가 0.17 %(60 µg N 시료) 및 0.26 %(20 µg N 시료)인 것으로 해석할 수 있습니다.

또한 UNICUBE® trace의 검출 한계(LOD) 및 정량화(LOQ)가 결정되었습니다. 이러한 값을 계산하려면 분석기의 백그라운드 시그널과 명확하게 구분할 수 있는 가장 작은 질소 피크를 보여주는 반복 측정을 수행해야 합니다.

캐리어 가스와 주석 호일 용기 자체에는 질소 함량이 너무 낮아 피크가 관찰되지 않습니다. 따라서 토양 샘플을 주석 호일로 감싸서 질소 피크를 구별할 수 있는 최소 무게를 측정했습니다.

그 후, 결정된 무게로 토양 샘플을 10 회 반복 분석했습니다. 피크 영역은 보정 곡선을 사용하여 질소의 절대량으로 변환되었습니다. 이 보정에는 질소 농도가 인증된 아스파르트산 표준물을 물에 녹여 만든 용액을 사용했습니다.

표 2. 시료 내 질소 절대량 대비 정확도 및 정밀도 (인증값: 펩타이드 분말 내 질소 19.76 % N)

샘플의 절대 질소 함량	펩타이드 분말 내 %N	절대 표준편차	상대 표준편차
60 µg	19.82 %	0.03 %	0.17 %
20 µg	19.83 %	0.05 %	0.26 %
10 µg	20.14 %	0.28 %	1.39 %

10번의 토양 샘플 반복 분석으로부터 절대 질소 농도 값의 평균을 구하고 절대 표준 편차를 계산했습니다. 이 값을 바탕으로 UNICUBE® trace의 LOD 와 LOQ 를 계산했습니다:

LOD = 블랭크 값 + 3 × 표준 편차

LOQ = 블랭크 값 + 10 × 표준 편차

표 3에서 볼 수 있듯이 질소에 대한 LOD는 0.62 µg 이고 질소에 대한 LOQ는 1.00 µg 입니다.

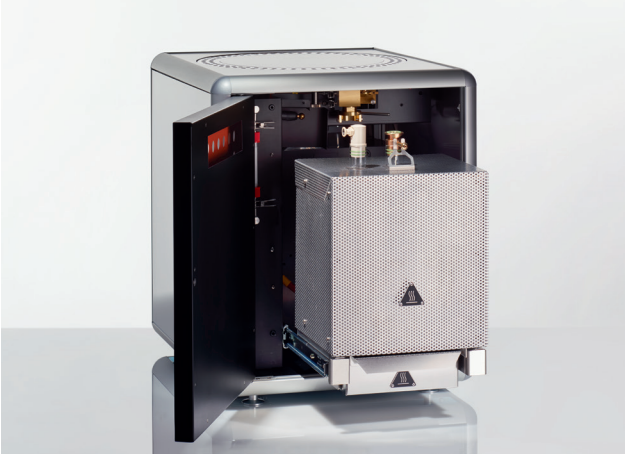


표 3. 22 mg 질소 결핍 토양 샘플의 10회 반복 측정에 따른 LOD 및 LOQ 측정 결과

	절대 질소량
반복 1	0.42 µg
반복 2	0.53 µg
반복 3	0.48 µg
반복 4	0.41 µg
반복 5	0.43 µg
반복 6	0.40 µg
반복 7	0.50 µg
반복 8	0.43 µg
반복 9	0.57 µg
반복 10	0.41 µg
평균값	**0.46 µg**
절대 표준편차	**0.05 µg**
LOD	**0.62 µg**
LOQ	**1.00 µg**

결론

동결건조 펩타이드 분말의 절대 펩타이드 함량은 UNICUBE® trace를 사용하여 쉽게 측정할 수 있습니다. 이 측정은 USP <1057> 메소드 7 절차 2 및 총 단백질 측정 절차에 대한 논문 01/2008:02533 메소드 7B를 완전히 준수합니다.

펩타이드 분말의 무게를 측정하고 주석 호일로 감싸는 것 외에는 분석이 완전 자동화되어 있으며 5 분 정도밖에 걸리지 않았습니다. 이 분석기의 높은 정확도와 정밀도는 Bachem의 제품 카탈로그에 있는 두 가지 펩타이드를 분석하여 펩타이드 분말의 측정된 질소 값과 인증된 질소 값을 비교함으로써 입증되었습니다. 이 분석에는 1 밀리그램 미만의 펩타이드 분말이 필요했습니다.

GMP를 완벽하게 준수하기 위해 숙련된 서비스 엔지니어의 IQ/OQ/PQ 실행과 21 CFR 파트 11을 준수하는 소프트웨어를 UNICUBE® trace에 사용할 수 있습니다.

Elementar – 뛰어난 원소분석을 위한 파트너
Elementar는 유기 및 무기 원소의 고성능 분석 분야에서 세계적인 선두 업체입니다. Elementar의 지속적인 혁신, 창의적인 솔루션 및 포괄적인 지원은 당사 제품이 80개 이상의 국가에서 농업, 화학, 환경, 에너지, 재료 및 법의학 분야 전반의 지속적인 과학적 진보를 보장합니다.

Elementar Analysensysteme GmbH
Elementarstraße 1 · 63505 Langenselbold (Germany)
Phone: +49 (0) 6184 9393-0 | info@elementar.com | www.elementar.com

이에이 코리아 주식회사
경기도 하남시 조정대로 150 하남지식산업센터 768호
전화 031-790-1308 | 팩스 031-790-1309
info@ea-korea.com | www.ea-korea.com

09 / 2021 A