

分析分取LC-MSシステムを用いた 合成ペプチド分取精製ワークフローの効率化

鈴木 悠希、増田 佑亮

ユーザーベネフィット

- ◆ 多工程からなるペプチド分取精製ワークフローを1システムでシームレスに実行できます。
- ◆ LabSolutions MDを用いることで、目的化合物の分離条件を簡単に探索できます。
- ◆ LCMS-2050の優れた定性能力により、未精製試料から目的化合物を高純度・高回収率で分取できます。

はじめに

2000年代に、抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬品が台頭してきましたが、バイオ医薬品は遺伝子技術を用いて製造するため課題が多く、より分子量が小さい中分子医薬品が注目を浴びています。それらのひとつであるペプチド医薬品は、低コストでの製造が可能であるうえ、分子量が小さいため細胞内に取り込まれやすく、特定の立体構造をとらせることで、体内に取り込まれたときに分解を防ぐことができるという利点があります。このようなペプチドは、低分子医薬品と同様に化学合成によって製造されるため、最終合成品の精製、分取、純度確認が必須です。本稿では、アプリケーションニュース01-00650-JPおよび01-00651-JPをもとに、分取精製液体クロマトグラフNexera Prep (図1) を用いることで多工程からなるペプチド分取精製ワークフロー (分離条件検討、スケールアップ及び分取、純度/回収率確認) を1つのシステムでシームレスに実施した事例について紹介します。



図1 Nexera™ Prepのシステム構成例

分析分取LC-MSシステムの概要

本稿では、同一システム内に分析と分取の両流路を持つ分析分取LC-MSシステムを用いました。分析スケールでの分離条件検討、負荷量検討、純度/回収率の確認では分析流路が使用され、目的化合物の分取時には分取流路が使用されます。LCMS-2050により、質量情報の取得だけでなく、分取時にはUV信号とMS信号を組み合わせトリガーとして用いることが可能です。詳細はアプリケーションニュース01-00650-JPをご参照ください。

分析スケールでの分離条件探索

分析スケールにて、目的化合物である合成ペプチド (パラトルモン (1-34): PTH) を含むクルードな合成試料の分離条件を検討しました。分離条件検討前のUVクロマトグラム (分析条件: 表1) を図2①に示します。この条件では目的成分と夾雑成分との分離が不十分であり、負荷量を増加させると不純物との分離がさらに悪化するため、目的成分を高純度で回収するためには分離改善が必要です。

ここでは、LCパラメーターを網羅的に変動させた分析スケジュールを自動生成できるLabSolutions MDを用い、分離条件検討を効率的に行いました (グラジエント条件を25パターン: 初期濃度と終濃度を5パターンずつ変更)。

PTH (青い矢印) とクルードな合成試料に含まれる不純物との分離は、初期濃度25%、最終濃度35%の条件で最も良い結果となりました (図2の③)。

表1 分析条件

Mobile Phase	: Pump A: 0.1% TFA in water Pump B: 0.1% TFA in acetonitrile
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)*1
Sample Concentration	: 2 mg/mL in N-methylpyrrolidone
Injection Volume	: 10 μL
LC Conditions	
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)
MS Conditions	
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

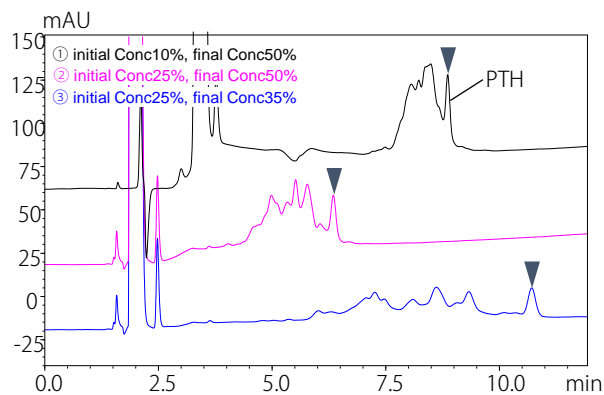


図2 分離条件の最適化結果

負荷量の検討

分析スケールにて最適化された条件 (図2の③) において、合成試料 (10 mg/mL) を用いて、5, 10, 20, 50 μLの注入量で負荷量の検討を実施しました (図3)。注入量を増やしてもPTHの分離は悪化しないことから、注入量50 μLの条件にてスケールアップし、分取を実施することとしました。

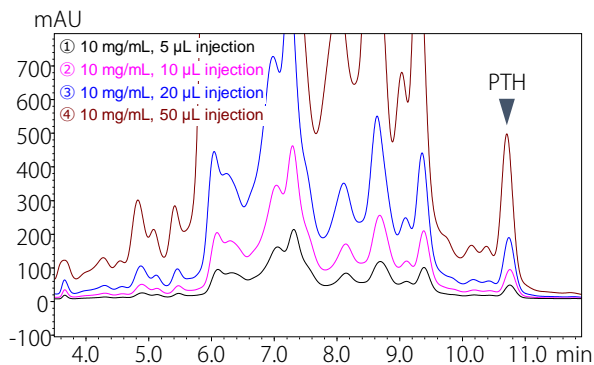


図3 負荷量の検討結果

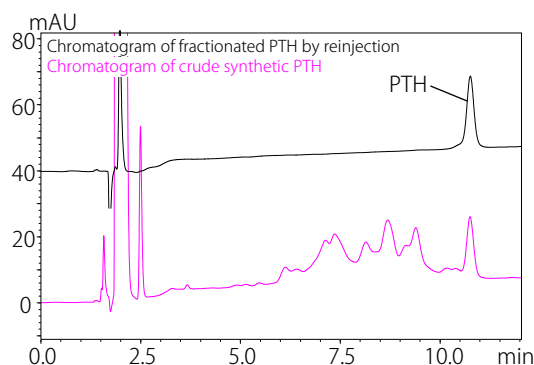


図5 分取したPTHの純度確認

■ 目的化合物の分取

UVおよびMSトリガーを用いてPTHを分画しました。分取条件を表2（表1と異なるパラメータのみ記載）に、得られたLCクロマトグラムを図4（青い領域が分取領域）に示します。分取カラム（内径20 mm）と分析カラム（内径4.6 mm）の断面積比（約20倍）に基づき、流量を20 mL/min（線速度はスケールアップ前後で一定）に、注入量を1 mLにスケールアップしました。

スケールアップの前後で同様の分離パターンが得られ、不純物との分離を保つことができました。MSとUVトリガーを組み合わせることで、高選択的にPTHを分取することができました。

表2 分析条件

Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm × 20 mm I.D., 5 µm)*1
Sample Concentration	: 10 mg/mL in N-methylpyrrolidone
Injection Volume	: 1000 µL
LC Conditions	
Flow rate (Prep)	: 20 mL/min
Flow rate (Makeup for MS)	: 1.5 mL/min (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

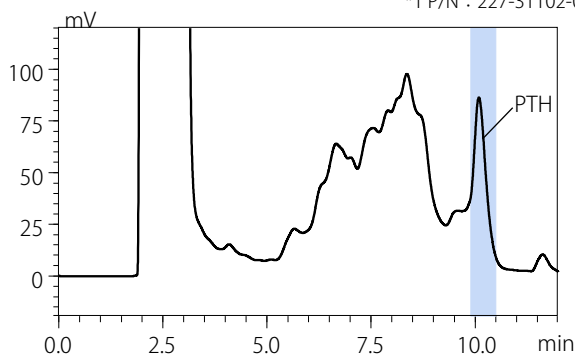


図4 UV+MSトリガーによる分取クロマトグラム
*青い領域が分取領域

■ 分取サンプルの純度確認

分取したPTHを分析流路に再注入した際に得られたクロマトグラム及び、分取したPTHと理論上同じ濃度になるように調製した分取前の合成試料のクロマトグラムを図5に示します。クロマトグラムの比較から目的成分であるPTHの高純度な分取精製に成功したことが示されました。

■ 標準試料を用いた純度/回収率の評価

本システムにおける分取性能（純度/回収率）の評価を標準試料（Angiotensin I）を用いて行いました。分取したAngiotensin Iを分析流路に再注入した際に得られたクロマトグラム及び、分取したAngiotensin Iと理論上同じ濃度になるように調製した標準試料のクロマトグラムを図6に、純度及び回収率を表3に示します。純度は面積百分率で100%を得ることができました。また、ピーク面積値の比較から算出された回収率も97.9%となり、目的のピークを確実に分取できることが示されました。

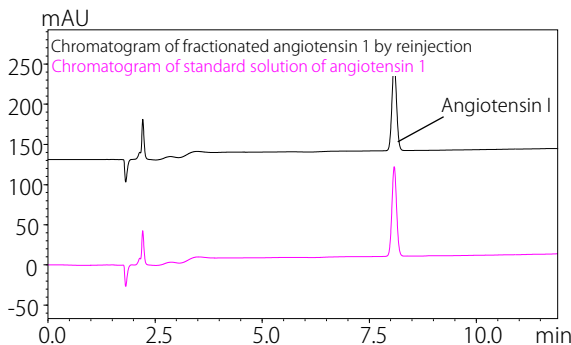


図6 Angiotensin Iの純度/回収率確認

表3 分取したAngiotensin Iの純度および回収率

	純度 (面積%)	回収率 (%)
Angiotensin I	100.0	97.9

■ まとめ

分取精製ワークフローを分析分取LC-MSシステムを用いてシームレスに実行できることを示しました。また、分析スケールにおける分離条件検討では、LabSolutions MDの各種LCパラメータを変動させた複数条件の分析スケジュールの自動生成機能により、分取対象化合物の分離条件検討を効率化できます。さらに、LCMS-2050を用いることでMSトリガーに基づき高選択的に目的成分の分取が可能です。本稿で用いた分析分取LC-MSシステムは、分析用と分取用の流路を併せ持つため、ペプチドの分取精製における合成確認も含めた、一連の分取精製ワークフローの効率化を可能とします。

<関連アプリケーション>

1. 一連の分取精製ワークフローを効率化する分析分取LC-MSシステム—[01-00650-JP](#)
2. 分析分取LC-MSシステムのUV/MSトリガーを活用した高純度な分取の実現—[01-00651-JP](#)

LCMS、Nexera、LabSolutions、Shim-pack ScepterおよびDUIは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

関連製品

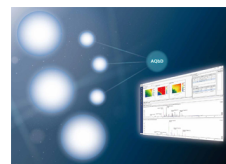
一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



＞ Nexera Prep
分取精製液体クロマトグラフ



＞ LCMS-2050
シングル四重極質量分析計



＞ 分析法開発支援システム
分析法開発支援ソフトウェア



Shim-pack
Scepter LC Columns
＞ Shim-pack Scepter
シリーズ

関連分野

＞ 医薬・バイオ医薬品

開発（タンパク質・ペプチド分析、糖鎖分析、観察、アジュバント）

＞ 価格お問い合わせ

＞ 製品お問い合わせ

＞ 技術お問い合わせ

＞ その他お問い合わせ