

超臨界流体クロマトグラフィーによる 合成ペプチド分離条件探索の効率化

増田 佑亮

ユーザーベネフィット

- ◆ 超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は親水性化合物であるペプチドの分析にも用いることが可能です。
- ◆ SFCを用いた最適分離条件探索の一連のワークフローをLabSolutions MDにより効率化できます。
- ◆ 移動相ブレンディング機能により、移動相の自動調製が可能であり業務効率化と再現性向上に貢献します。

■はじめに

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) は、移動相として用いる二酸化炭素の大きな拡散係数と低い粘度により、液体クロマトグラフィー (LC) よりも高流量での分析が可能であるため分析時間の短縮が期待でき、構造類似物質の分離に優れるなどの特長を有しています。SFCはキラル化合物の分析手法として発展してきましたが、近年ではアキラル化合物の分離分析にも適用範囲が広がっています。SFCは二酸化炭素の疎水性に基づき疎水性化合物の分離分析に優れていますが、移動相としてメタノールのような高極性の有機溶媒 (モディファイアー) を添加することで、親水性化合物の分析にも対応することが可能です。

代表的な親水性化合物であるペプチドは、一般的には逆相LCを用いて分析されますが、SFCも利用可能です。SFCはLCと異なる保持挙動を示すため、LCで分離できない化合物の分離が期待できます。

本稿では、超臨界流体クロマトグラフNexera UCおよび分析法開発支援ソフトウェアLabSolutions MDを活用し、ペプチド標準品の混合物をモデルサンプルとして用いた「スクリーニング」および「最適化」の各フェーズにおいて、分析条件探索を効率化した事例を紹介します。

■SFCカラムの選び方

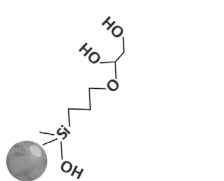

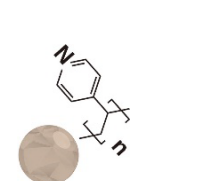
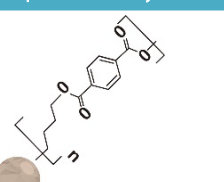
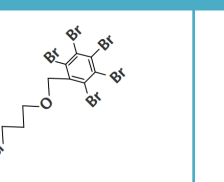
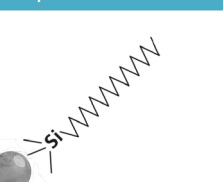
SFCとHPLCでは同じ固定相が異なる保持挙動を示すことが多く、HPLCデータからの保持予測が難しいので、分離条件の最適化にはカラムスカウティングが重要です。そのため、分離選択性を変更する際は、用いる固定相を変更することが有効です。分離選択性の異なるSFC用カラム (Shim-pack™ UCシリーズ) のパッケージである「6本カラムセット」は、分離条件探索のファーストチョイスに最適です。カラムの種類と特長を表1に示します。

■カラムスクリーニング

スクリーニングフェーズでは、保持や分離に大きな影響を及ぼすパラメーターとして、カラムとモディファイアー (酸塩基添加剤を含む) の最適な組み合わせを検討します。本稿では、分析条件検討に要する時間短縮のため、カラムスクリーニングで分離に適切なカラムを選択した後に、酸塩基添加剤を含むモディファイアースクリーニングを段階的に実施し、最適なカラムとモディファイアーの組み合わせを決定しました。

カラムスクリーニングでは、保持選択性の異なる「6本カラムセット」 (表1) と親水性化合物の分析に適した高極性の有機溶媒であるメタノールをモディファイアーに用いて分析を実施しました。分析条件を表2に示します。

表1 6本カラムセットの種類と特長

	Shim-pack UC-Diol II	Shim-pack UC-Sil II	Shim-pack UC-PolyVP
Chemistry			
Feature	分離モードは順相系。非特異的相互作用を抑制。	塩基性化合物の保持・立体構造の認識に優れる。	酸塩基無添加条件でも良好なピーク形状を発揮。
	Shim-pack UC-PolyBT	Shim-pack UC-PBr	Shim-pack UC-ODS
Chemistry			
Feature	π-π相互作用により、芳香族化合物の認識性に優れる。	ODSでは保持が小さい化合物の分離改善。	分離モードは逆相系。疎水性作用により保持。

LabSolutions MDは、カラムやモディファイアー等の各種パラメーターを組み合わせた多様な条件で、ミスなく分析スケジュールの自動生成が可能です。また、切換バルブを用いることで、対象のモディファイアー（図1の①）とカラム（図1の②）を自動で切換可能です。さらに、モディファイアーの組成は移動相ブレンディング機能を用いて自動調製可能です。事前に混合比率を設定しておくことで、分析スケジュールを作成する際には使用するモディファイアーをクリックして選択するだけで、選択されたモディファイアーの組成で移動相が自動的に調製されます。これにより、手動での調製作業の負担が大幅に削減されるだけでなく、調製ミスも防げます。

Nexera UCは最大7種類のモディファイアーとそれらの移動相ブレンディング機能による自動混合に対応しています。さらには最大12本のカラムを自動で切換え連続分析することができるため多様な条件での網羅的な分析条件探索が可能です。



図1 分析スケジュール作成画面

表2 スクリーニング条件

System	: Nexera UC
Column 1	: Shim-pack UC-SIL II*1
Column 2	: Shim-pack UC-Diol II*2
Column 3	: Shim-pack UC-PolyVP*3
Column 4	: Shim-pack UC-PolyBT*4
Column 5	: Shim-pack UC-PBr*5
Column 6	: Shim-pack UC-ODS*6
(250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm for all columns)	
Mobile phases A	: CO ₂
Mobile phases B	: Methanol
Flow rate	: 2.5 mL/min
Time program	: B.Conc. 5%(0 min) → 75% (8-10 min) → 5% (10-12 min)
Column temp.	: 25 °C
BPR pressure	: 10 MPa
Column temp.	: 50 °C
Injection volume	: 2 μL (1000mg/L for all compounds)
Compounds	: (A) lopinavir, (B) ritonavir, (C) angiotensin I, (D) angiotensin II, (E) insulin, (F) daptomycin, (G) pneumocandin B0
Sample solvent	: Dimethyl sulfoxide (DMSO)
Detection	: 220 nm (SPD-M40, high-pressure flow cell)

*1 P/N : 227-32607-22、*2 P/N : 227-32606-22
*3 P/N : 227-32509-02、*4 P/N : 227-32503-02
*5 P/N : 227-32602-22、*6 P/N : 227-32608-25

■スクリーニング結果から最適条件を迅速に探索

6種のカラムに対するスクリーニング結果を、図2に示します。スクリーニングでは検討した条件の数だけクロマトグラムが得られるため、どの条件で目的の分離が得られているかを評価する必要がありますが、これはクロマトグラフィーに対する知見と、多大な労力を要する作業です。LabSolutions MDは、各条件における分離の状態を以下の式1を用いて定量的に評価し順位付けできるため、分析者の勤や経験に依存せず、誰でも素早く簡単に最適条件を探索できます。

$$(\text{評価値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{p-1}) \quad (\text{式1})$$

評価値はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs) の総和の積により算出されます。移動相とカラムのスクリーニングで得られた評価値を高い順に表示した結果を図3に示します。最小分離度、ピーク本数などのパラメーターで順位付けすることも可能です。

赤枠内に示した、カラムにShim-pack UC-PolyVPを用いた場合に最も良好な評価値が得られました。しかしながら、ピーク検出本数 (6本) が分析試料中の成分数 (7成分) よりも少なく、検出された複数のピークにおいてはピーク形状が優れませんでした。そこでモディファイアーに酸あるいは塩基を添加することで分離およびピーク形状の改善を図りました。6種の添加剤 (①0.1% ギ酸、②20 mmol/L ギ酸アンモニウム、③0.1% TFA、④20 mmol/L TFAアンモニウム) をそれぞれ加えたメタノール溶液をモディファイアーに用いて追加スクリーニング分析を実施しました。

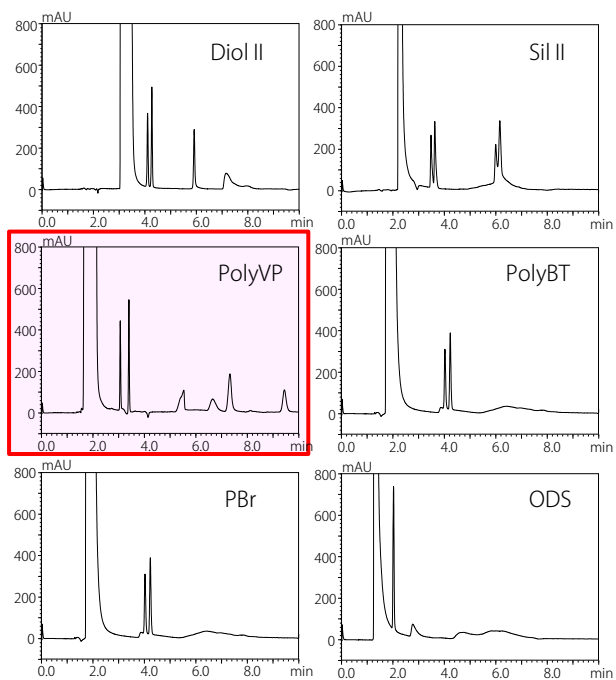


図2 カラムスクリーニングで得られたクロマトグラム

カラム略称	最小分離度	ピーク数	分離ピーク本数	評価値
PolyVP	2.02	6	6	120.778
SilII	1.416	5	3	62.147
DiolII	0.835	4	0	28.970
PBr	1.647	3	2	19.942
PolyBT	2.194	2	2	4.388
ODS	0	1	0	0.000

図3 各条件の評価値による順位付け

■ 酸性および塩基性の添加剤を加えた追加スクリーニング分析結果

6種の添加剤 (①0.1% ギ酸、②20 mmol/L ギ酸アンモニウム、③0.1% 酢酸、④20 mmol/L 酢酸アンモニウム、⑤0.1% TFA、⑥20 mmol/L TFAアンモニウム) をそれぞれ加えたモディファイアーを用いた追加スクリーニング分析においては、酸塩基の添加剤を用いない場合と比較して分離およびピーク形状の改善は確認されませんでした (図4)。

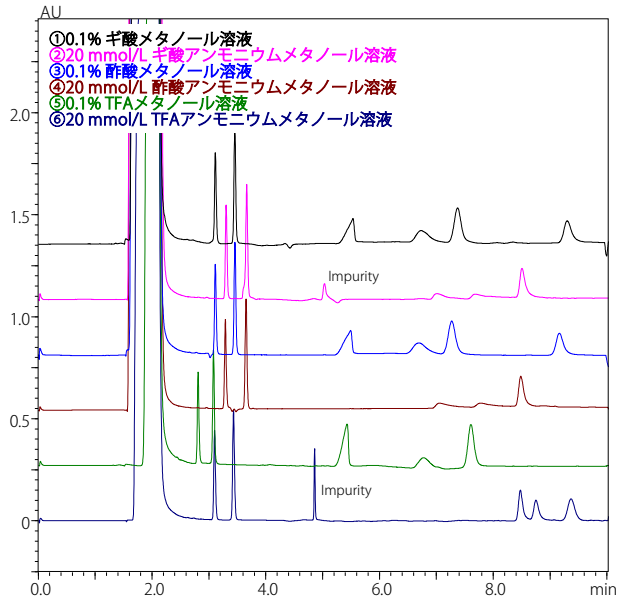


図4 添加剤を加えた追加スクリーニングで得られたクロマトグラム

■ モディファイアーへの水添加の影響

親水性化合物のSFC分析では、モディファイアーとして酸性または塩基性の添加剤に加えて、水を添加することがあり、モディファイアー中の水の比率の微細な違いが分離やピーク形状に大きな影響を与えます。SFCの主な移動相である二酸化炭素は水との相溶性を示さないため、水をそのままモディファイアーとして用いることはできませんが、水との相溶性を示す有機溶媒に対し微量添加することが可能です。

酸性および塩基性の添加剤を加えた追加スクリーニング分析結果のLabSolutions MDを用いた解析において最も高い評価値が得られた「0.1% 酢酸メタノール溶液」と、逆相LCのペプチド分析において良好な分離とピーク形状を示すことが多いTFAを添加した「0.1% TFAメタノール溶液」の2種類のモディファイアーに対して、水を添加することで分離とピーク形状が改善するか検討しました。SFC分析においてもLC分析と同様に分析時のカラム温度が分離やピーク形状に影響を及ぼすことが知られているため、カラムオープンの温度も同時に評価しました。

最適化フェーズとして、0.1% 酢酸メタノール溶液および0.1% TFAメタノール溶液それぞれに対して水の添加比率を0、1、2、3、4、5% (6水準)、カラムオープン温度を25、45、65 °C (3水準) に変動させ分析を実施しました。

カラムオープン温度25 °C において水の添加比率を変動させて得られたクロマトグラムを図5から図8に示します。(C) angiotensin Iと(D) angiotensin IIの分離度に注目すると、モディファイアーとして0.1% 酢酸アンモニウムメタノール溶液および0.1% TFAメタノール溶液のいずれを用いた場合にも、水の添加量の増大に伴い分離度が向上することがわかりました。

Nexera UCでは移動相ブレンディング機能により移動相を自動調整可能であるため、水の添加比率の僅かな差が分離に影響するような条件においても再現性よく分析できます。

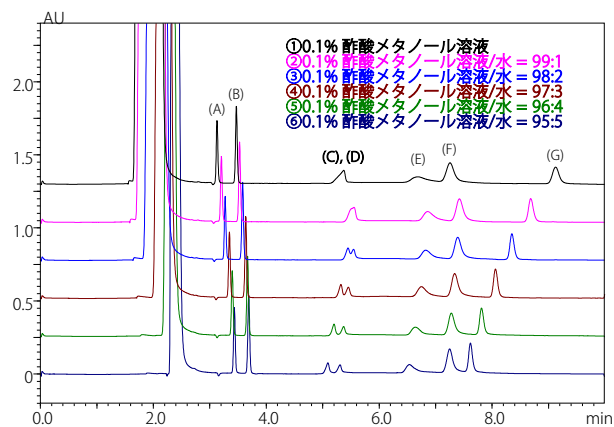


図5 水の添加比率を変更した場合のクロマトグラム
モディファイアー：0.1% 酢酸メタノール溶液

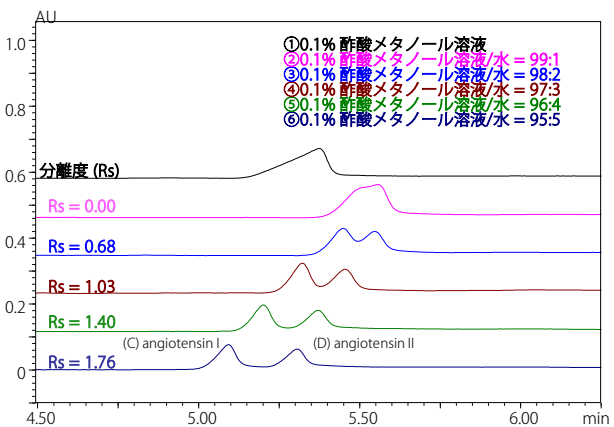


図6 (C) angiotensin Iと(D) angiotensin IIの溶出部分拡大クロマトグラムとそれぞれの分離度
モディファイアー：0.1% 酢酸メタノール溶液

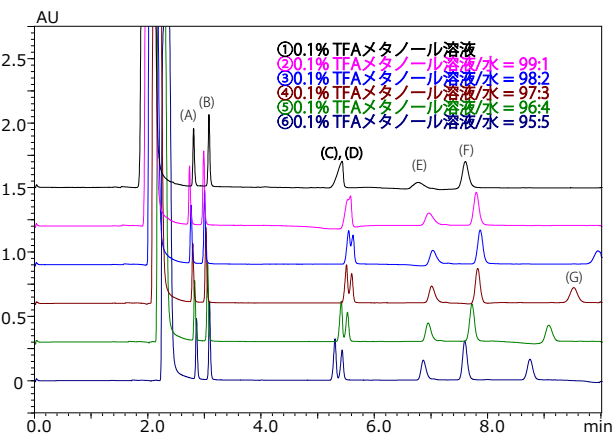


図7 水の添加比率を変更した場合のクロマトグラム
モディファイアー：0.1% TFAメタノール溶液

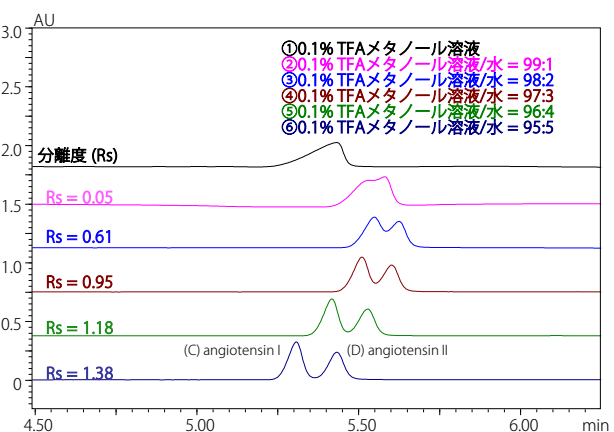


図8 (C) angiotensin Iと(D) angiotensin IIの溶出部分拡大クロマトグラムとそれぞれの分離度
モディファイアー：0.1% TFAメタノール溶液

■ デザインスペースによる分離度とピーク形状の視覚的評価

LabSolutions MDは、分析パラメータの変動が分離に与える影響をデザインスペースとして視覚的に描画可能です。0.1% 酢酸メタノール溶液をモディファイアーに用いた場合の (C) angiotensin I と (D) angiotensin II の分離度のデザインスペースを、縦軸をモディファイアーに対する水の添加比率、横軸をカラムオープン温度とし、図9に示しました。図中の赤色領域は分離度が大きく、青色領域は分離度が小さい領域を示します。デザインスペースの描画により、水の添加の添加量が多いほど、カラムオープン温度が高いほど良好な分離が得られることがわかりました。

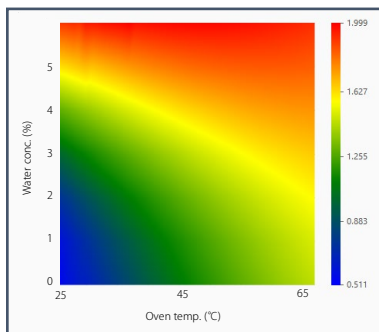


図9 (C) angiotensin I と (D) angiotensin II の分離度についてのデザインスペース

また、複数のデザインスペースを重ね書きすることで、複数のクライテリアを満たす最適条件の探索を効率化します。例えば、各ピーク間の分離とピーク形状が良好な条件を探索するために、各ピーク間の分離度が1.2以上、各ピークの10%高さにおけるテーリングファクターが0.8以上かつ1.8以下をクライテリアとし、これらを満たす条件領域をデザインスペースの重ね書きにより探索しました (図10)。図中の色付きの領域はいずれかのクライテリアから外れる領域であり、これら以外の領域 (緑線ハッチング) が、クライテリアを満たす領域となります。

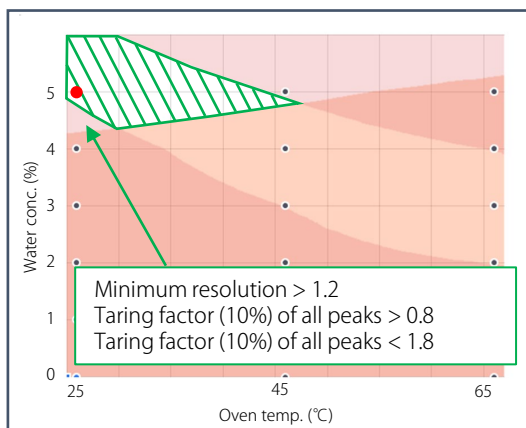
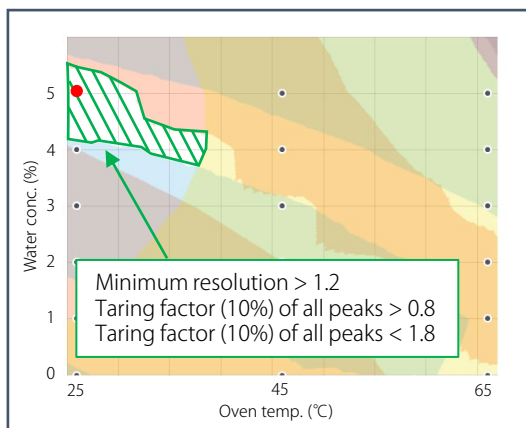


図10 デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索①
(上) 0.1% 酢酸メタノール溶液 (下) 0.1% TFAメタノール溶液

0.1% 酢酸メタノール溶液および0.1% TFAメタノール溶液のいずれのモディファイアーを用いた場合においても、水の添加比率が5%かつカラムオープン温度が25 °Cの場合 (図10中の赤丸) に最も良好な結果が得られることがわかりました。

さらに、図10よりも厳しい条件として、各ピーク間の分離度が1.2以上、各ピークの10%高さにおけるテーリングファクターが0.8以上かつ1.2以下をクライテリアに設定し、これらを満たす条件領域をデザインスペースの重ね書きにより探索しました (図11)。0.1% 酢酸メタノール溶液を用いた場合にはクライテリアを満たす領域が存在せず、一方で0.1% TFAメタノール溶液を用いた場合には、水の添加比率が5%かつカラムオープン温度が25 °Cの条件において (図11中の赤丸) 設定したクライテリアを満たし、より良好なピーク形状となることがわかりました。この最適条件において得られたクロマトグラムを図12に示します。

このように、LabSolutions MDを用いることでデザインスペースの重ね書きにより、複数ピークに対して任意に設定したクライテリアを満たす条件を簡単かつ迅速に探索可能です。

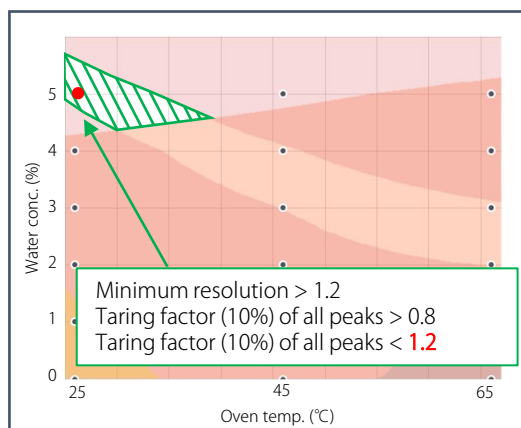
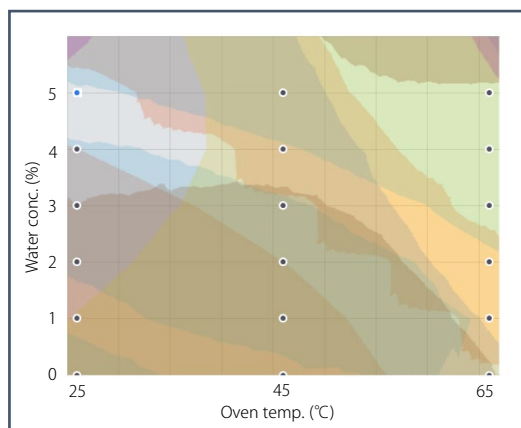


図11 デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索②
(上) 0.1% 酢酸メタノール溶液 (下) 0.1% TFAメタノール溶液

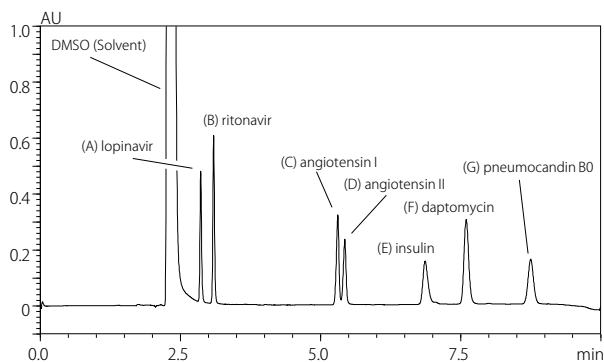


図12 0.1% TFAメタノール溶液を用いた場合の最適条件におけるクロマトグラム (図11中の赤丸の分析条件)
水の添加比率: 5%、カラムオープン温度: 25 °C

■まとめ

超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) はカラム・モディファイアー・添加剤を適切に選択することでペプチドのような親水性化合物の分析にも用いることが可能です。ペプチド混合物の分析においては、モディファイアーに水を添加することで分離とピーク形状が大きく改善しました。一方で、最適な分離条件の探索にはカラム・モディファイアー・添加剤の種類と比率など網羅的な分析を実施することもあり、分析スケジュール作成や得られた膨大なデータを解析するのに非常に手間がかかります。LabSolutions MDを用いることで、分析スケジュール作成や移動相調製を自動化でき、また、解析面では分離の状態の順位付けやデザインスペースによる効率的な最適条件の探索が可能となります。これにより、SFC分析法開発の一連のワークフローの効率化を実現可能です。

LabSolutions、NexeraおよびShim-pack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。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00805-JP 初版発行：2025年 1月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

＞ アンケート

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 UC

超臨界流体抽出／超臨界流体クロマトグラフシステム



＞ 分析法開発支援システム

分析法開発支援ソフトウェア

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）

＞ 低分子医薬品

＞ 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