

イオンクロマトグラフを用いた 合成ペプチドのカウンターイオンの定量

田邊 彩乃¹、栗木 智子¹、山本 洋子²

1 株式会社島津製作所、2 株式会社島津テクノロジー

ユーザーベネフィット

- ◆ イオンクロマトグラフを用いて合成ペプチドの純度確認が行えます。
- ◆ トリフルオロ酢酸と塩化物イオンを同時に定量することができます。
- ◆ 医薬品に含まれる無機陰イオンの不純物測定など高感度分析と併用する場合はサプレッサ式、コストパフォーマンスを重視する際は装置構成がシンプルなノンサプレッサ方式と、目的に応じてシステムを選択することができます。

■はじめに

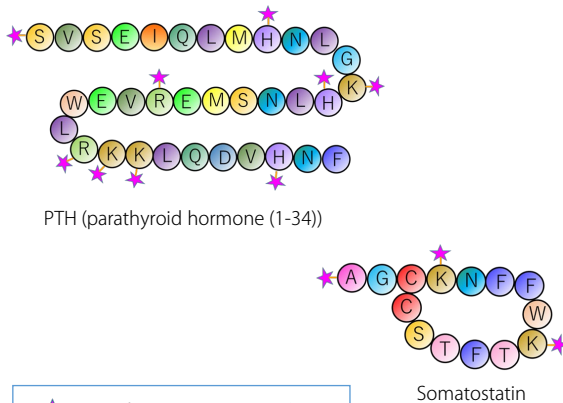
次世代の創薬モダリティとして中分子医薬品が注目を浴びています。中分子医薬品はバイオ医薬品よりも分子量が小さく、オリゴヌクレオチドを用いる核酸医薬品、ペプチド骨格をもったペプチド医薬品があります。そのなかでもペプチド医薬品は、低コストでの製造が可能であるうえ、分子量が小さいため細胞内に取り込まれやすく、特定の立体構造をとらせることで体内に取り込まれたときに分解を抑制することができるという利点があります。ペプチドは低分子医薬品と同様に化学的に合成することで製造されるため、最終合成品の精製、分取、純度確認が必須となります。

合成後のペプチドを固定相から抽出する際にトリフルオロ酢酸 (TFA) を用いるため、回収されたペプチドはTFAがイオン結合したペプチド・TFA塩になります。凍結乾燥後のペプチドの重量にはこのTFAの重量も含まれ、実際のペプチドの含有量に大きな影響を与えます。またTFAはバイオアベイラビリティに影響を与える場合があり、塩酸塩などへ塩置換を行う必要があります。このため、合成ペプチドの純度確認には、カウンターイオンの定量が必須と考えられます。

本稿では、粗精製した直鎖型、環状型の合成ペプチドを用い、イオンクロマトグラフ (IC) を使用したカウンターイオンの分析例を報告します。

■対象ペプチド

測定対象のペプチド2種、PTHとSomatostatinのアミノ酸配列を図1に示します。星印は、ペプチドのN末端および塩基性アミノ酸の側鎖でカウンターイオンが付く部分を示しています。



★ ←ペプチドのN末端および塩基性アミノ酸の側鎖 (カウンターイオンの付加部分)

図1 測定対象ペプチドのアミノ酸配列

■サプレッサ式イオンクロマトグラフ

サプレッサ式イオンクロマトグラフは、溶離液のバックグラウンド伝導度を下げて感度向上を図るサプレッサが搭載された、 $\mu\text{g/L}$ オーダーの高感度分析に対応したイオンクロマトグラフです。

図2に電気透析型サプレッサ式イオンクロマトグラフHIC-ESPの流路図を示します。分析条件を表1に、塩化物イオン (Cl) 5 mg/L、トリフルオロ酢酸 (TFA) 10 mg/L混合標準液のクロマトグラムを図3に示します。

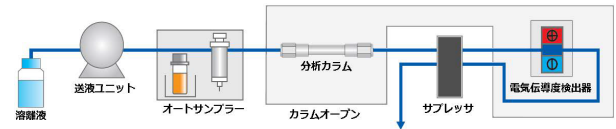


図2 サプレッサ式イオンクロマトグラフ HIC-ESPの流路図

表1 分析条件 (HIC-ESP)

Column	: Shim-pack™ IC-SA2 ¹ (250 mm × 4.0 mm I.D., 9 μm) : Shim-pack IC-SA2(G) ² (10 mm × 4.6 mm I.D., 9 μm)
Mobile Phase	: 12.0 mmol/L Sodium Hydrogen Carbonate 0.6 mmol/L Sodium Carbonate
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Injection Vol.	: 5 μL
Detection	: Conductivity

¹ P/N : 228-38983-91, ² P/N : 228-38983-92

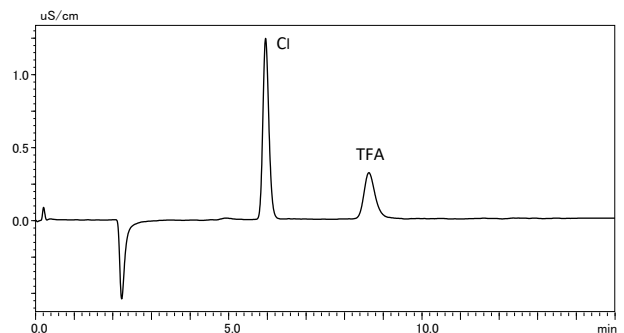


図3 Clイオン、TFA 混合標準液のクロマトグラム (HIC-ESP)

■ ノンサプレッサ式イオンクロマトグラフ

ノンサプレッサ式イオンクロマトグラフはサプレッサを有しないイオンクロマトグラフで、mg/Lオーダーの分析に対応しています。消耗品であるサプレッサを使用しないため、コストパフォーマンスに優れています。

図4にノンサプレッサ式イオンクロマトグラフHIC-NSの流路図を示します。表2に分析条件を、図5に塩化物イオン、トリフルオロ酢酸 混合標準液 (各10 mg/L) のクロマトグラムを示します。

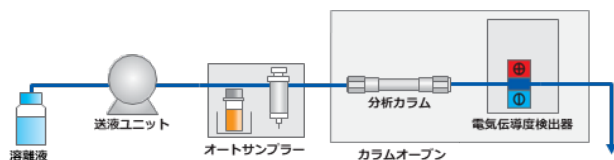


図4 ノンサプレッサ式イオンクロマトグラフ HIC-NSの流路図

表2 分析条件 (HIC-NS)

Column	: Shim-pack IC-A3 ³ (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm) : Shim-pack IC-GA3 ⁴ (10 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile Phase	: 8.0 mmol/L <i>p</i> -Hydroxybenzoic Acid 3.2 mmol/L Bis-Tris ⁵ 50 mmol/L Boric Acid 50 mL/L Acetonitrile
Flow Rate	: 1.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 50 μL
Detection	: Conductivity

³ P/N : 228-31076-91, ⁴ P/N : 228-31076-92
⁵ Bis-(2-hydroxyethyl) iminotris(hydroxymethyl) methane

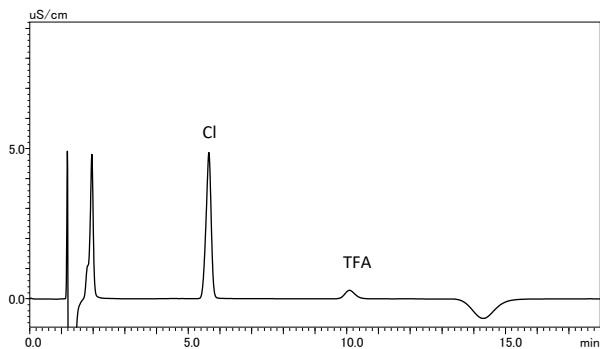


図5 塩化物イオン、トリフルオロ酢酸 混合標準液 (各10 mg/L) のクロマトグラム (HIC-NS)

■ 合成ペプチドの分析

実試料として、PTH (Bachem AG code:H-4835.001) と Somatostatin (Bachem AG code:H-1490.005) を用いてTFAおよびClイオンの定量を行いました。検量点は定量値を中心に約20倍の濃度範囲で3~4点設定しました。

なお、Clイオンへ塩置換したペプチドについてはHPLCを用いて定量を行い、その定量値をカウンターイオン濃度の計算に用いました。

TFAの分析

PTHとSomatostatinをそれぞれ超純水に溶解し、TFAの定量を行いました。PTHのクロマトグラムを図6に、Somatostatinのクロマトグラムを図7に、TFAの定量結果を表3に示します。いずれのペプチドについても、実際の定量値と構造から算出されるTFA理論値との比が0.9~1.2と、ほぼ一致することを確認しました。また、ノンサプレッサ式、サプレッサ式ともに同様の結果が得られました。

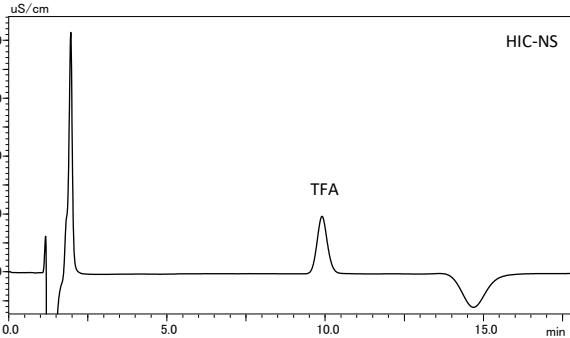
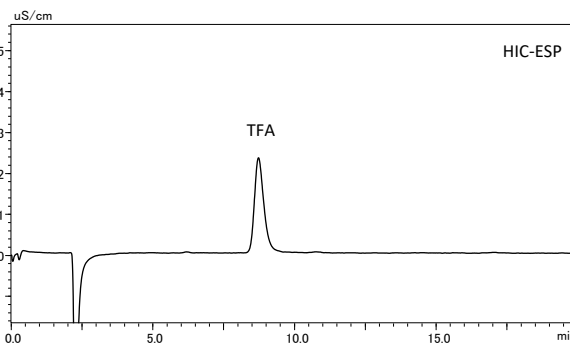


図6 PTHのクロマトグラム (上段: HIC-ESP、下段: HIC-NS)

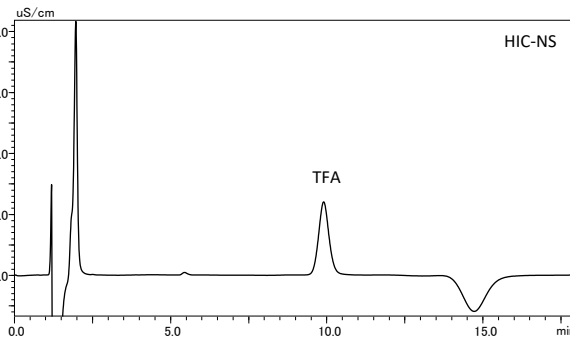
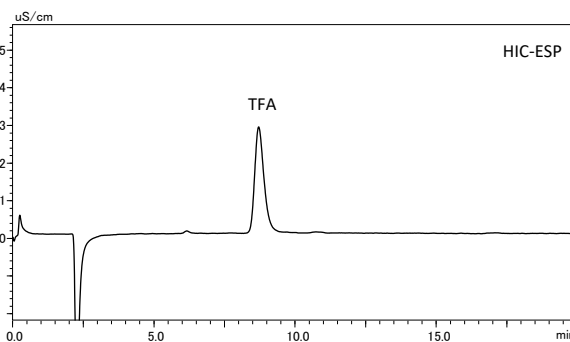


図7 Somatostatinのクロマトグラム (上段: HIC-ESP、下段: HIC-NS)

表3 TFAの定量結果 (原液換算値)

	カウンターイオン付加数	試料濃度 (mmol/L)	TFA理論濃度*6 (mmol/L)	サプレッサ		
				定量値 (mmol/L)	TFA比率	
					ペプチド	定量値/理論値
PTH	9	0.2142	1.9281	1.70	7.94	0.9
Somatostatin	3	0.5564	1.6693	2.06	3.7	1.2

	カウンターイオン付加数	試料濃度 (mmol/L)	TFA理論濃度*6 (mmol/L)	ノンサプレッサ		
				定量値 (mmol/L)	TFA比率	
					ペプチド	定量値/理論値
PTH	9	0.2142	1.9281	1.685	7.87	0.9
Somatostatin	3	0.5564	1.6693	2.04	3.67	1.2

*6 TFA理論濃度 = 試料濃度 ×カウンターイオン付加数

Clイオンの分析

PTHとSomatostatinをそれぞれ超純水に溶解し、塩酸を加え凍結乾燥を行いました。それらを超純水に再溶解した溶液を用いて、Clイオンを分析しました。PTH Cl塩のクロマトグラムを図8に、Somatostatin Cl塩のクロマトグラムを図9に、Clイオンの定量結果を表4に示します。どちらのペプチドについても定量値とClイオン理論値の比が1.1とほぼ一致することを確認しました。またノンサプレッサ式、サプレッサ式ともに同様の結果が得られました。

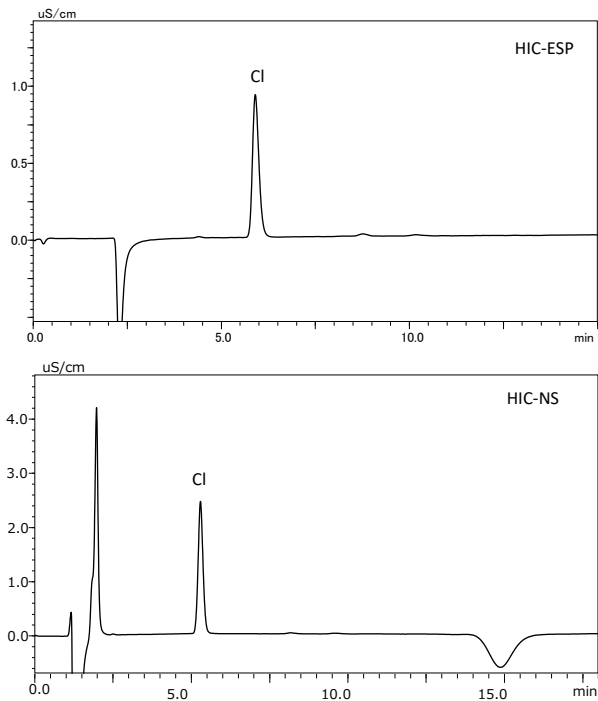


図8 PTH Cl塩のクロマトグラム
(上段：HIC-ESP、下段：HIC-NS)

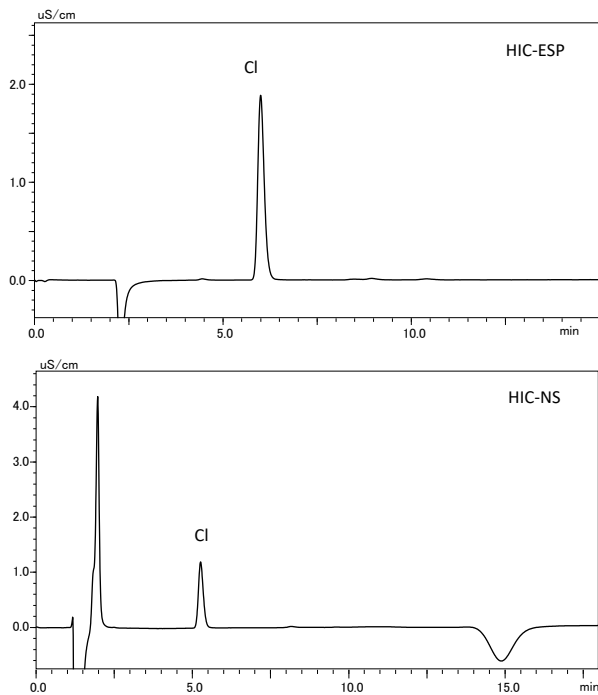


図9 Somatostatin Cl塩のクロマトグラム
(上段：HIC-ESP、下段：HIC-NS)

表4 Clイオンの定量結果

	カウンターイオン付加数	試料濃度*7 (mmol/L)	Clイオン理論濃度*8 (mmol/L)	サプレッサ		
				定量値*9 (mmol/L)	Clイオン比率	
					ペプチド	定量値/理論値
PTH	9	0.014	0.126	0.146	10.07	1.1
Somatostatin	3	0.0213	0.0639	0.072	3.15	1.1

	カウンターイオン付加数	試料濃度*7 (mmol/L)	Clイオン理論濃度*8 (mmol/L)	ノンサプレッサ		
				定量値*9 (mmol/L)	Clイオン比率	
					ペプチド	定量値/理論値
PTH	9	0.014	0.126	0.144	10.29	1.1
Somatostatin	3	0.0213	0.0639	0.072	3.43	1.1

*7 再溶解液をHPLCを用いて定量した値

*8 Cl理論濃度=試料濃度×カウンターイオン付加数

*9 前処理環境由来の操作ブランク補正後

■まとめ

合成ペプチドの純度確認を目的とし、ICを用いてカウンターイオンの定量を行いました。サプレッサ式、ノンサプレッサ式どちらのICでも同様に、ペプチドの構造から算出される理論値とほぼ同じ定量値が得られることが確認できました。よって本分析を行う際、医薬品に含まれる無機陰イオンの不純物測定など高感度分析と併用する場合はサプレッサ式、コストパフォーマンスを重視する際は装置構成がシンプルなノンサプレッサ方式と、目的に応じてシステムを選択することができます。

今回の結果から、ペプチドのアミノ酸配列や鎖長の違いに依存することなく、複数のカウンターイオンの定量を安定して行えることを確認しました。カウンターイオンの定量値を求めることにより、ペプチドの正確な合成量を算出することができるため、本法は合成ペプチドの純度確認において有用な手法であると言えます。

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。

＞ 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。



＞ 陰イオン分析用サブ
プレッサイオンクロマトグ
ラフ HIC-ESP

陰イオンクロマトグラフ



＞ ノンプレッサイオ
ンクロマトグラフ HIC-
NS

陽イオン分析システム

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）

＞ ライフサイエンス

＞ 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