

【コラム vol.31】フラッシュカラムクロマトグラフィーを用いたペプチド精製におけるグラジエントの最適化

December 3, 2020

Elizabeth Denton

ペプチドの精製をもっと早く（そして安く）できないかと考えたことはありませんか？私たちペプチド研究者は、高純度のペプチドを得るために、ほとんど逆相 HPLC に依存しています。

しかし、このプロセスは非常に時間がかかり、成功させるためには高価なカラムと溶媒を必要とすることがほとんどです。そこで[逆相フラッシュカラムクロマトグラフィーを用いてペプチド精製を行えば](#)、わずかな時間とコストで精製を完了させることができます。

ここでは、逆相フラッシュカラムクロマトグラフィーによるペプチド精製におけるグラジエントの最適化について紹介し、標準的な HPLC 精製の方法論との類似点を強調したいと思います。

私は、全自動 LC/MS でペプチドを精製した経験がありますが、一方で、手動でサンプルを注入し、手動でフラクションを回収するという昔ながらの大変な手間がかかる方法でペプチドを精製した経験もあります。今回、Biotage でキャリアをスタートさせ、フラッシュカラムクロマトグラフィーに触れたことで、標準的な HPLC におけるグラジエント最適化のルールがフラッシュカラムクロマトグラフィーにも適用できるかどうか試してみることにしました。

そこで、全自動ペプチド合成装置 Biotage[®] Initiator+ Alstra™ で 28 アミノ酸のペプチドを 200 μmol スケールで合成し、約 400mg の粗生成物を得られました。LC/MS の分析結果では、ペプチドは 25%-30% のアセトニトリルで溶出し、目的のペプチドを確認しました。

この時点で、私は以前オートサンプラー付きの HPLC をセットアップし、粗ペプチドを何度も（しばしば何度も）注入するプロセスを実施していました。しかし、今回は逆相フラッシュクロマトグラフィーシステムに切り替えてペプチドを精製しました。

私はまず、最小限の量でカラムに最大限ロードできるように、[ペプチドを DMSO に溶かしました](#)。精製中の Cys や Met 残基の酸化が心配な場合は、DMF を代替の高濃度での注入溶媒として試してみてください。

私は、最適な移動相グラジエントを特定しながら、12g の Biotage® Sfär C18 カートリッジに 50mg の粗サンプルをロードすることにしました。50 mg の負荷量はカートリッジの C18 の 0.4% に相当し、一般的な RP-HPLC カラムと比較して 4 倍の負荷量となります。

最初の注入では、標準的な条件の逆相グラジエントを少し変更して、流速を 12 mL/min から 50 mL/min に増やしました（図 1）。流速を上げることで、ポンプの作用によるピークの分解を最小限に抑えつつ、カートリッジの圧力制限の範囲内に収めることができます。グラジエントは、10%のアセトニトリルから 100%のアセトニトリルまで、10 カラムボリューム（6.36%/分）で設定しましたが、その理由は 2 つあります。

1 つは、分析用 HPLC カラムを使用した場合と同様のペプチド溶出条件を確保するためです。すべての C18 カラムが同じように作られているわけではなく、粒子径、ポアサイズ、シリカが分子保持に劇的な影響を与えることがよく知られています。

2 つ目の理由は、グラジエントを評価するためのフレームワークを確立しなかったからです。グラジエントの長さが変わると分離効率の比較が難しくなるため、グラジエントの条件を一定にしました。

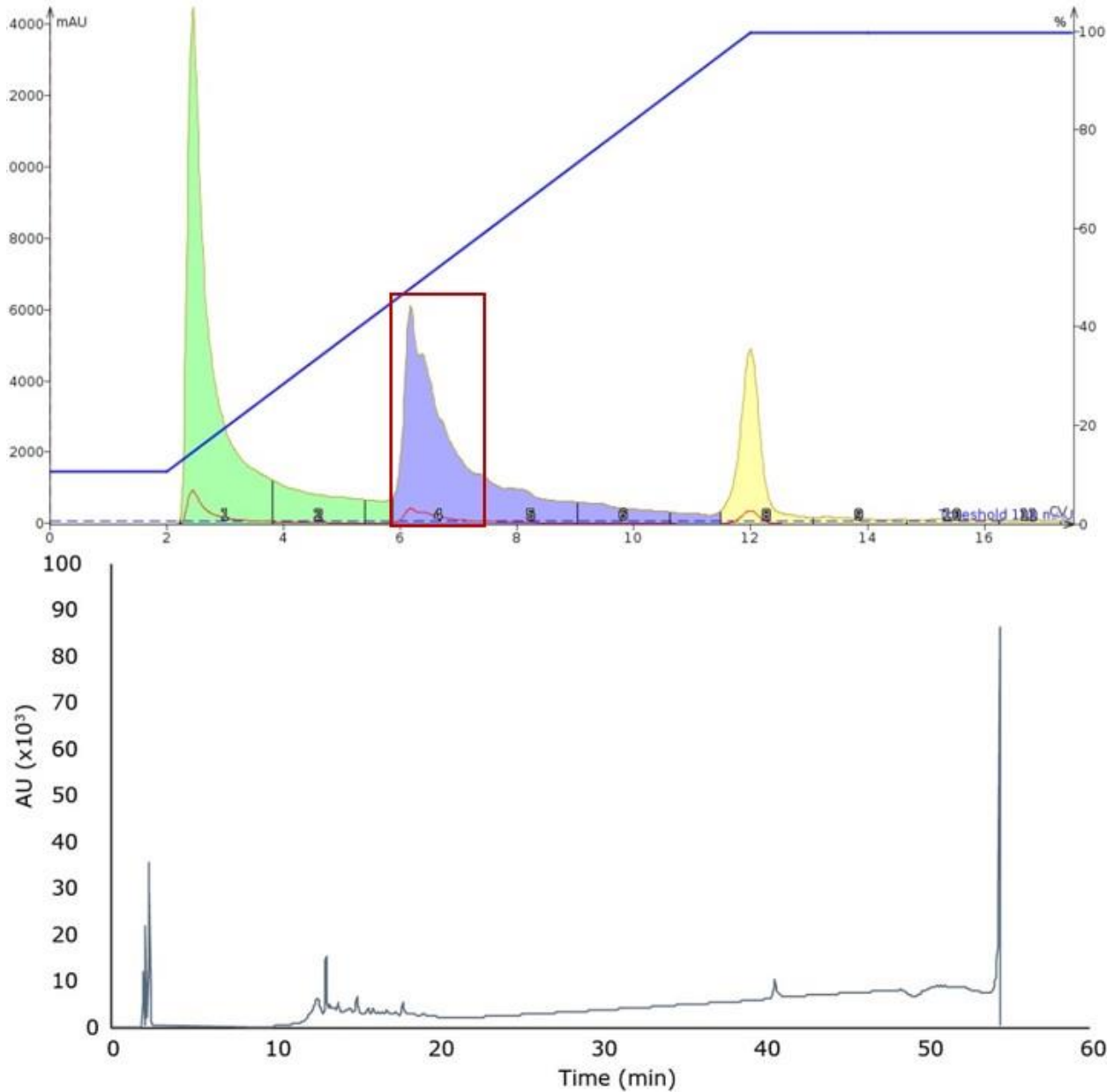


図1：10%から100%のアセトニトリルの初期グラジエントで観察されたペプチド溶出結果（上）および分取したフラクションの分析用HPLCクロマトグラム（下）。目的の生成物は、質量分析によりメインピーク（保持時間約12分）で同定されました。

ピーク形状は比較的シャープですが、後方の肩の部分は、サンプル中に欠損ペプチドなどが存在することを示唆しています。混合しているペプチド配列をさらに分離するために、グラジエントの勾配を下げ、20%から60%のアセトニトリルまで10 CV (2.82%/分) で実施しました (図2)。

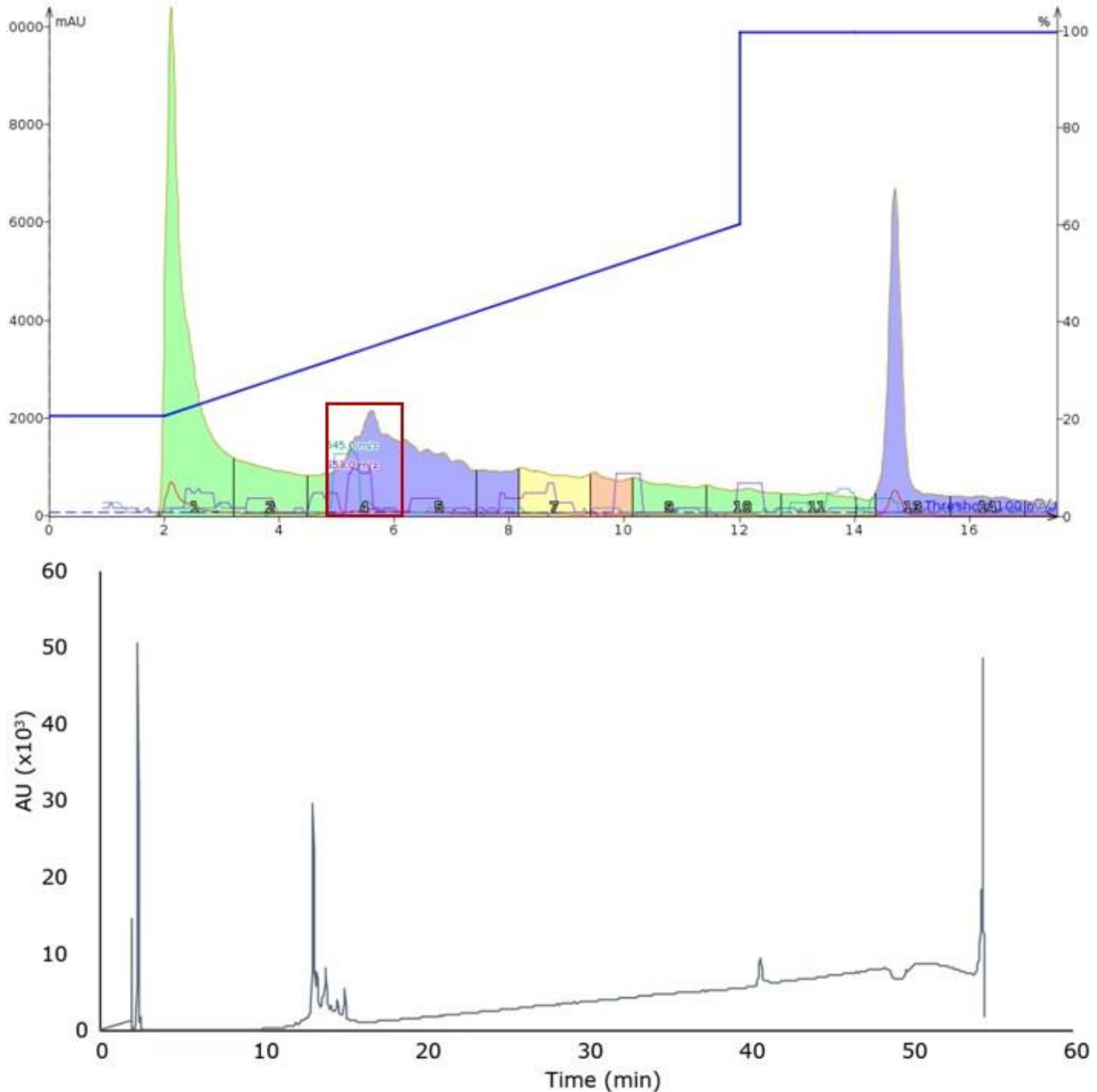


図2：20%から60%のアセトニトリルを含むグラジエントで観察されたペプチド溶出結果（上）およびメインピークである分取したフラクションの分析用HPLCの結果（下）。

元のピーク形状は明らかに悪化していますが、注入1と注入2で分離されたメインピークフラクションの分析HPLC/MSの比較（図2）から、分離と全体のフラクションでの純度が改善されたことがわかります。このことから、フラッシュカラムクロマトグラフィーにおいても、通常のRP-HPLCと同様に、浅いグラジエントと高い流速を使用することで、ペプチドサンプルの純度を向上できることが示唆されました。

3 回目の注入では、グラジエントの傾きをさらに小さくし、移動相の濃度変化を HPLC で使用するのと同様の速度に抑えました。このグラジエントは、20%から 30%のアセトニトリルまで 10CV (0.706%/分) で行われ、これまでのグループの中で最もひどいクロマトグラフィーとなりましたが、目的のペプチド生成物を含む最もきれいなフラクションも得られました (図 3)。

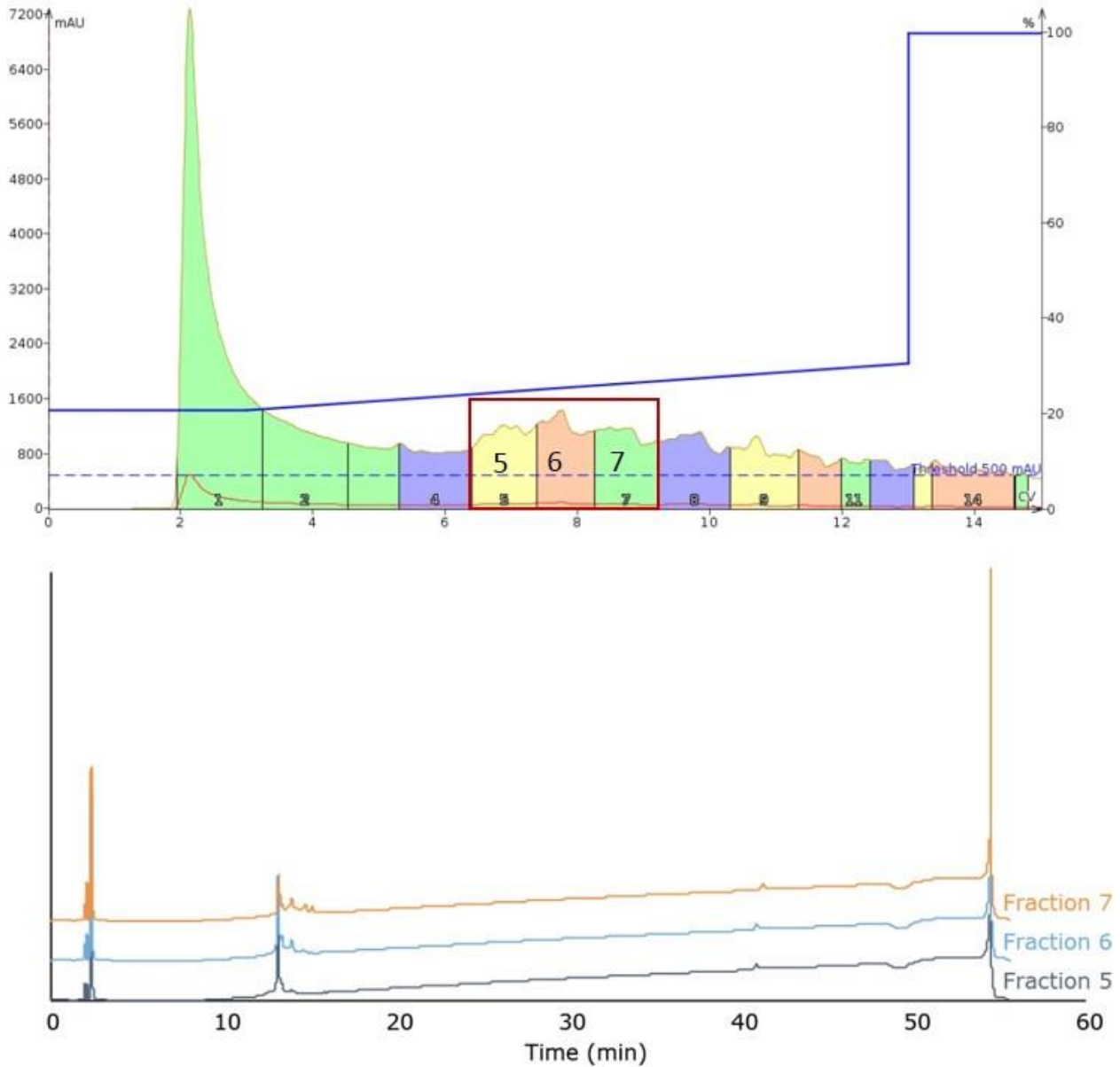


図 3 : 20%から 30%のアセトニトリルを含む移動相グラジエントによるペプチドの溶出結果 (上)。ピーク幅が広いため、フラクション5、フラクション6、フラクション7 (下) の分析用 HPLC 分析が必要である。メインピークには、すべてのフラクションで目的の生成物が含まれている)。

この最適化されたグラジエントを手にして、私は残りの 200 mg のペプチドをできるだけ迅速に精製しようと思いました。フラッシュクロマトグラフィーでのリニアグラジエントに通常適用されるルールに従って、60g の SNAP Ultra C18 カートリッジを選択し、分取時間を維持するために流速を上げ、800 μ L の DMSO 中で 200mg すべてをカートリッジに注入しました（図 4）。粗ペプチドは、注入量を大幅に増やしても、クロマトグラフィーの挙動が維持できていることが注目し値します。これは、少ないロード量で最適化されたグラジエントが今回のロード量での精製に容易に移行できることを示しています。

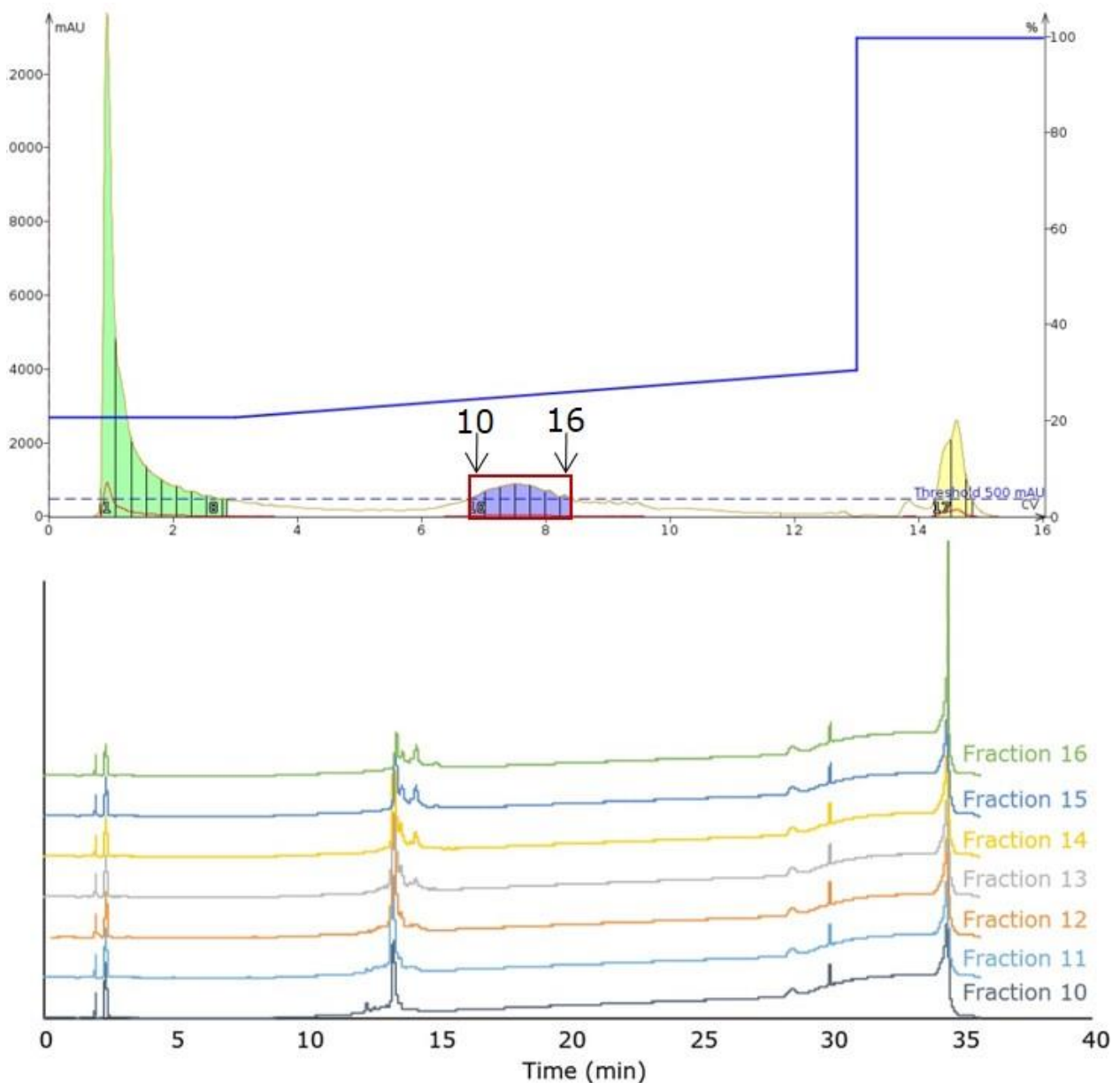


図4：大きなロード量（200 mg）および最適化された移動相グラジエントを用いた精製

時に観察されたペプチドの溶出結果（上）。メインピークに含まれる各フラクションの分析用 HPLC 結果（下）。

分取した各フラクションを分析用 HPLC で確認すると、フラッシュカラムクロマトグラフィーによるペプチド精製で迅速に実施でき、目的に合わせた純度の高いペプチドが得られました。最初の数フラクションはすぐに使用できる可能性があります。後のフラクションは、初期の結果から予想されるように、適切な純度レベルに達するためにさらに HPLC 精製が必要になります。また、各フラクションの採取量を減らすことで、純度の高いペプチドの回収率を向上させることができます。

各フラッシュクロマトグラフィーによるペプチド精製は、カラムの平衡化と洗浄を含めて約 25 分で完了し、粗ペプチド混合物の大部分は 1 時間未満で精製されたことは重要なポイントになります。

今回の結果から導き出される重要な結論がいくつかあります。

1. グラジエント最適化のための標準的な HPLC 精製は、フラッシュカラムクロマトグラフィーに容易に移植可能である。
2. ペプチド精製のための逆相精製に、サンプル負荷のスケールアップのルールを適用することができる。
3. 大量の粗ペプチドサンプルを迅速に精製することができ、粗ペプチドを完全に精製するのに要する時間を大幅に短縮することができる。

フラッシュカラムクロマトグラフィーを用いてペプチドを精製された方はいらっしゃいますか？ また、溶出グラジエントを最適化する際に、どのようなテクニックが効果的でしたか？

ペプチドサンプルの精製にフラッシュクロマトグラフィーの使用を考慮したことがありますか？

高純度ペプチドを得るための様々な戦略についてご覧になりたい方は、[リンク](#)を参照してください。

Holistic Peptide Workflow

About Biotage

Biotage is a global Life Science company that develops innovative and effective solutions for separation within organic and analytical chemistry, as well as for industrial applications.

[Go To Biotage Japan Web site ...Click here](#)



元の記事：

<https://www.biotage.com/blog/optimizing-a-mobile-phase-gradient-for-peptide-purification-using-flash-column-chromatography>