

Technical Review

逆相分取 HPLC を用いる効率的な精製方法

表 正克、山下智恵、森下 潔、小路庸子、栗山尚浩

Effective preparative purification method for peptides and proteins using silica based reversed phase packing materials

Masakatsu Omote, Chie Yamashita, Kiyoshi Morishita

Noriko Shoji, Naohiro Kuriyama

YMC CO., LTD., 5-28 Kokufudai Komatsu-shi, Ishikawa, 923-8557, Japan

Abstract

Reversed phase HPLC is an essential tool for analytical and preparative separation of peptides and proteins. Purification in preparative scale, it is important to choose optimum pore size and ligand. We discuss the difference between analytical and preparative HPLC, and show actual method developments effectively in preparative scale.

We also show chemically durable packing material, named Exphere series which is suitable for peptides separation. The material is using complete sphere and mono dispersed silica which enables higher mechanical strength than conventional gel in repacking evaluation.

Keywords: preparative chromatography, peptides and proteins separation, cost effective

1. 緒言

高速液体クロマトグラフィには一般的にラボ用の分析 HPLC から少量用のセミ分取 HPLC、さらに生産に使用される工業用の分取クロマトグラフィが含まれるが、近年、工業用の分取クロマトグラフィが国内外で使用されるケースが増加している。これは付加価値の高い医薬をはじめとする生産物の製造が増加していること、とりわけクロマトグラフィが必須とされるペプチド、タンパク質の医薬品が急速に増加していることも要因の一つと考えられる。また近年は先進国のみならず、発展途上国での使用頻度も増加している。このため分取対象物は新薬のみならず、ジェネリック品でも使用さ

れるようになっている。さらに抗生物質、発酵生成物などを含め対象物質が増加しつつあるため、ますます分取クロマトグラフィの適用分野は広がり、その役割は重要になってきている。

分析では、“より正確に検出する”ことが目的であるのに対し、分取では“目的純度以上で分け取る”ことが目的であるため、その手法は全く異なる。特に実製造のような大量スケール生産では条件設定が重要であり、製造原価、生産効率にも大きく影響する。

本稿ではより高純度にかつ安全、安価に化合物を分け取ることを目的とする逆相分取クロマトグラフィへのスケール

株式会社ワイエムシ研究開発部
〒923-8557 石川県小松市国府台 5-28
Tel: 0761-47-8010
Fax: 0761-47-8018
E-mail: m-omote@ymc.co.jp

アップを、ペプチド等の工業用分取を実例にそれらのファクター、注目すべきポイント、手順などを紹介する。

また、我々はより効率的な分取を進めるための分取用充填剤、分取用クロマト装置やシステムソフトの開発を進めてきた。その中から、最近開発した高機械強度かつ酸性耐久性を持つ新規分取用充填剤である弊社 Exphere シリーズの特長も併せて報告する。

2. 分析 HPLC と分取 HPLC の違い

分析 HPLC と分取 HPLC では、要求されるファクターが大きく異なる。分析にて要求されるファクターは、分離能、定量性、ピーク形状、感度であり、目的化合物を高精度に定性・定量することが目的となる。これに対し分取で要求されるファクターは、純度、回収率、生産効率、回収方法、安全性となり、目標とする純度で、より効率よく目的物を回収することが必要とされる。分取方法にも、単カラム法、リサイクル分取法、SMB 法（擬似移動床式クロマト分離法）、SFC 法（超臨界流体クロマトグラフ法）等があり、それぞれの長所短所がある。なかでも単カラム法は、効率やコスト面で優れるため、本稿ではこの方法に着目して紹介する。

分取における、スケールアップの流れを Scheme 1 にまとめた。実際の分取に至るまで、4段階に分かれており、さまざまなファクターを考慮する必要がある。各段階での検討項目を、逆相系を分離モードに選んだときを実例に、以下にまとめる。

Step 1：まず分析スケールで基本となる分取用分離条件を選定する。目的化合物と不純物を分離するためには、分析用分離と同様に適切な溶離液、充填剤種類を選択する必要がある。一例として、ジアステレオマー分離での溶媒選択例を Figures 1 に示す。アセトニトリル系では、2つの異性体ピークが重なり分離不可であったのに対し、メタノール系ではベースライン分離した。溶媒選択について、大量分取では多

量の溶離液を使用するため、溶媒コストも考慮しなければならない。実際の分取ユーザーではコスト低減のため、価格の高いアセトニトリルを使用せずに、アルコール系溶媒を選定するケースも見られる。また、国により特定の溶媒が認可されにくいこともあるため、注意が必要である。アセトニトリルは分取クロマトグラフィでも汎用的な溶媒ではあるが、環境意識の向上に伴いアルコール系への代替が求められている。

さらに、温度により分離挙動が異なる場合には、注意が必要である。一般に50 mm I.D.以上のカラムを使用する場合、均一な温度制御が難しいといわれている。これは、分取カラム中心部と側壁付近の温度勾配が形成されることが原因である。このため、カラム内の試料の流れが不均一となり、結果としてテイリングやピーク割れが起きてしまう。このような現象を起こさないためにも、スケールアップ時には温度制御が可能な室温下での分取が望まれる。

最初の段階で分離条件を検討することは分析時と同じである。ただ、上記のような分取（＝スケールアップ）を前提とした条件設定をすることが求められる。また、分取では有機溶媒等、危険物の取扱量が増えるため、安全性や後処理面を十分に考慮した上で作業を進めたほうがよい。

Step 2：基本分離条件の次には、分取用充填剤の選択、分取カラムサイズを検討する。

分取用充填剤は、Step 1 での分離挙動と同じ分離挙動の充填剤を選ぶ。特殊なカラムで条件設定すると、バルクで同じ充填剤が入手できないこともあるため注意が必要である。

分取用充填剤の粒子径は、カラム段数（分離度）、圧力損失の兼ね合いで決定する。小さな粒子径ではコストが高くなるため、許容できる分離の範囲で大きめの粒子径の充填剤選択を推奨している。

分取クロマトグラフィでは、必要量に応じたスケール（分取カラムサイズ）を選択する。カラム内径に応じだまかに分類すると、分析カラムを用いた少量分取、10～30 mm I.D.でのセミ分取スケール、50～100 mm I.D.のパイロット分取スケール、200 mm I.D.以上の実生産分取スケールに分けられ

Step 1 分析スケールでの分離条件の検討

- ☐ 分離モードの選択
- ☐ 溶離液条件の選択
- ☐ 分離の温度依存性の確認

Step 2 分取スケールの選択

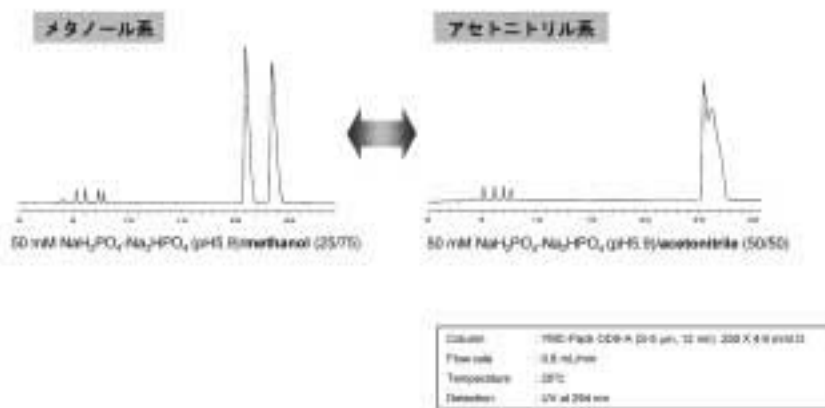
- ☐ 充填剤粒子径の選択
- ☐ カラムサイズの選択

Step 3 分取条件の最適化

- ☐ 負荷量の検討
- ☐ 装置仕様の決定

Step 4 分取の実施

Scheme 1. スケールアップの基本的な流れ



Figures 1. ジアステレオマー分離における溶媒選択例

る。カラムサイズは、試料の負荷量（処理量）により決定する。負荷量が数10 mg～数100 mg なら10～20 mm I.D.、数100 mg～数 g なら50 mm I.D.、数 g 以上ならば100～200 mm I.D. 以上のカラム内径を選択することになる。弊社で推奨する負荷量に対する粒子径・カラム内径の組合せを Table 1 にまとめた。実際に使われる粒子径は、粗分取では50 μm 以上、精密分取では10～30 μm 粒子を使用することが多いようである。

Step 3：最後に分取条件の最適化を進めることになる。これまでの検討で基本条件是確立されているので、実スケールで回収することを前提にした微調整を行う。具体的には、分取レベルで十分な分離が得られるよう溶離液の組成を改善したり、洗浄頻度、インジェクションサイクル（運転プラン）の設定が必要となる。以上のような調整の後、生産性向上のための負荷量検討を行う。

分取作業を効率よく進めるには、目標とする純度の化合物を（基本的には）1回のクロマト操作で出来るだけ多く分ける必要がある。このため実スケールでの最大負荷量を確認してから、作業を始めるようにする。最大負荷量とは、カラム評価でサンプルインジェクション量を徐々に増やしたとき

の目的純度が得られる負荷量のことである。負荷量検討時のクロマトグラムを Figures 2 に示す。

クルードサンプルを0.4 mg から順に負荷量を増加させ、影のついた部分を回収し、純度を確認した。負荷量を上げると全般的にピーク幅が広がるため、目的化合物ピークと前後不純物ピークとの重なりが増え、結果として目的物の純度は低下する。目標純度が高い場合には、回収量を犠牲にして分取範囲を狭くする必要があるが、それほど高くない場合には広く分取して回収率を上げることも可能である。また、目的ピークを細かくフラクションすることで、高純度で得ることも出来る。

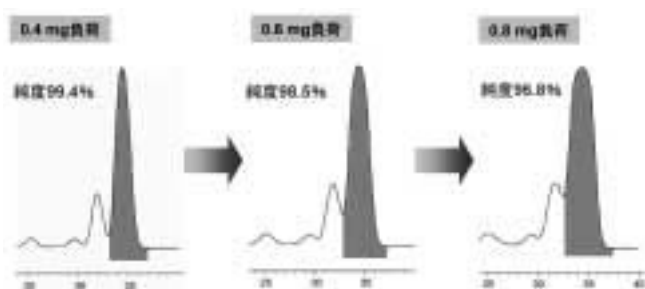
一般に負荷量は、分取用カラム内に充填されている充填剤量に依存する。ただし、ペプチド・タンパク質のような生体高分子の場合、吸脱着による分離機構、充填剤細孔径による分子サイズふるい効果があるため、低分子化合物の分離とは異なるため注意が必要である。充填剤選定の仕方については、改めて次項でまとめる。

以上のステップ1～3を経た後に実際の分取作業を行うことになる。プラントスケール（kg スケール以上）でのコストは、イニシャルコスト（装置、充填剤）よりもランニングコスト（溶離液、人件費）の方が高額になる場合も多いため、作業開始前の綿密な試算が必要になる。

Table 1. 負荷量に対する推奨粒子径・カラム内径の組合せ

負荷量の目安(スケール)	カラム内径 (mm)	カラム内径 粒子径 (μm)				
		5	10	10-20	15-30	50~
数10 mg (少量分取)	4.6/6.0	◎	○			
数100 mg (中量分取)	10/20	◎	◎	○		
数 g (大量分取)	50	○	◎	◎	○	
数100 g 以上 (実製造)	100-200		○	◎	◎	○
	300以上		○	◎	◎	◎

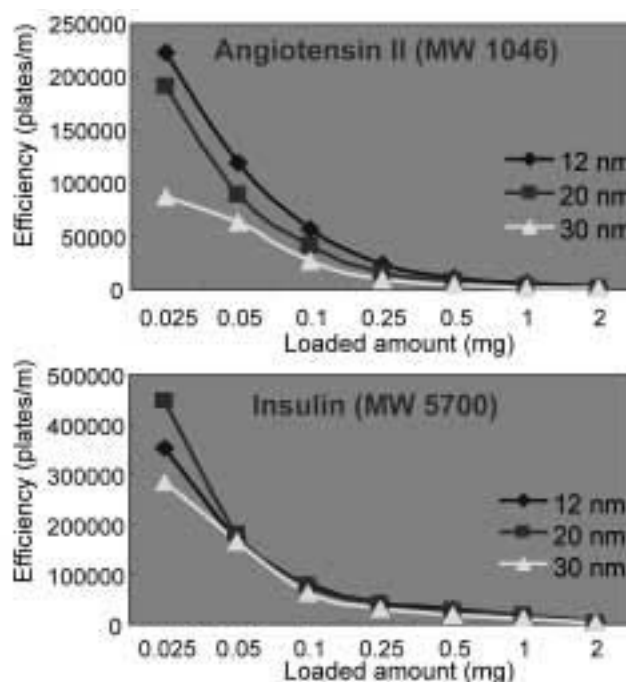
◎:最適 ○:目的に応じて



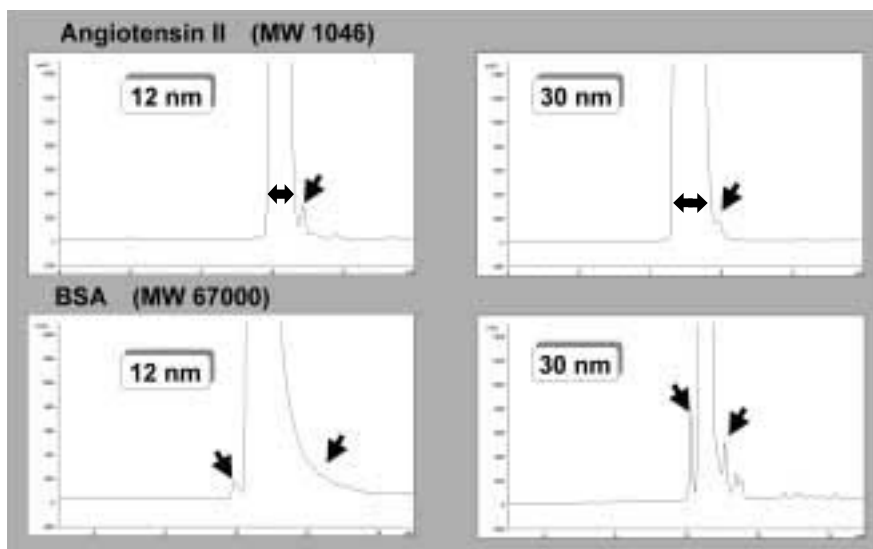
Figures 2. 植物由来成分中の目的化合物の分取（目標純度 $\geq 95\%$ ）

3. ペプチド・タンパク質分離における充填剤選定方法

逆相 HPLC にてペプチド・タンパク質を分離する際、用いる充填剤の細孔径は分離に大きな影響を及ぼす。例えば、タンパク質のような大きな分子量の化合物を分離する場合、



Figures 3. 細孔径がカラム効率に与える影響



Figures 4. 細孔径がピーク形状に与える影響

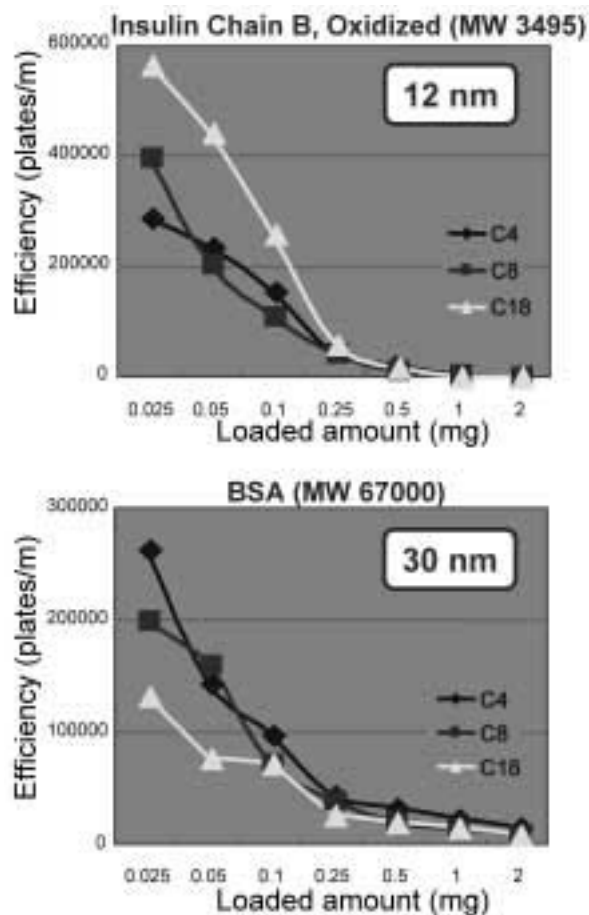
小さな細孔の充填剤を選んでしまうとタンパク質分子が細孔内に入り込むことが出来ないため、適切な分離能や分離選択性が得られない場合がある。

アンジオテンシンII (MW1046) 及びインスリン (MW 5700) について、C4官能基を修飾した3種類の細孔径 (12 nm, 20 nm, 30 nm) を用い、負荷量に対するカラム効率を評価した。結果を Figures 3 に示す。

分子量の小さなアンジオテンシンIIでは12 nmが高効率を、また分子量が5700のインスリンでは20 nmが高効率を示した。さらに分子量が10000以上のサンプルでは、30 nm細孔径が最も高段数を示した (30 nmのデータは省略)。以上の検討から、より良い分離を得るには、サンプル分子量に対し最適な細孔径を選ぶ必要があることが示唆された。実例として、アンジオテンシンIIとウシ血清アルブミン (MW 67000, 以後、BSAと略) を、C4官能基を修飾した2種類の細孔径 (12 nm, 30 nm) で測定した。クロマトグラムを Figures 4 に示す。

アンジオテンシンIIの場合、12 nmではメインピーク幅が (30 nmよりも) 狭いため、近接して溶出する不純物ピークとの分離が良好であった。一方、BSAでは30 nmで測定した場合にピーク形状、分離ともに優れていた。このことから、化合物の分子量に相応した細孔径選択が必要であることがわかる。

次に官能基がカラム効率に与える影響を調べるため、C4, C8, C18官能基を修飾した2種類の細孔径 (12 nm, 30 nm) を用い、酸化型インスリンB鎖 (MW3495) 及びBSAを測定した。負荷量とカラム効率の関係を Figures 5 に示す。その結果、小さなタンパク質、ペプチドでは疎水性の大きい官能基 (C18) が高いカラム効率を示した。一方、分子量数万程度のタンパク質では疎水性の小さい官能基 (C4) が高い値を示した。以上、細孔径と官能基について充填剤選択の



Figures 5. 各細孔径 (12, 30 nm) において官能基がカラム効率に与える影響

目安をまとめると、Table 2 のようになる。

試料の分子量が5000程度までは12 nm, C18の組合せ、分子量5000から20000程度までは20 nm, C8の組合せ、分子量

試料の 分子量	官能基 細孔径	C18	C8	C4
5000	12 nm	◎	○	△
20000	20 nm	○	◎	○
100000	30 nm	△	○	◎

◎: excellent ○: good △: moderate

Table 2. ペプチド・タンパク質分離における充填剤選択の目安

が20000以上10万以下では30 nm, C4の組合せが、それぞれの分子量に対し最適な細孔径と官能基の組合せと考えられ、これら組合せをもとに充填剤を選択し、条件の最適化を進めることで効率的な分取が可能になると考えられる。

4. 分取実例

分取実例として、合成反応後の目的化合物の精製例を示す (Schemes 2)。未精製原料のクロマトグラムでは目的ピーク前後に不純物が現れるため、非常に困難な分取の一例として紹介する。純度95%以上を目標に分取を試みた。

分析カラムにて、溶離液 (有機溶媒の種類や濃度)、添加物 (酸や塩の種類) を検討した結果、Scheme 2-1 左側クロマトグラムの条件にて目的物前後の不純物とのベースライン分離が得られた。粒子径を大きくすると、不純物との分離が悪くなったため、セミ分取スケールでの条件を最適化し (有機溶媒比率変更)、純度95%以上で目的物が得られた (Scheme 2-1 右側クロマトグラム)。

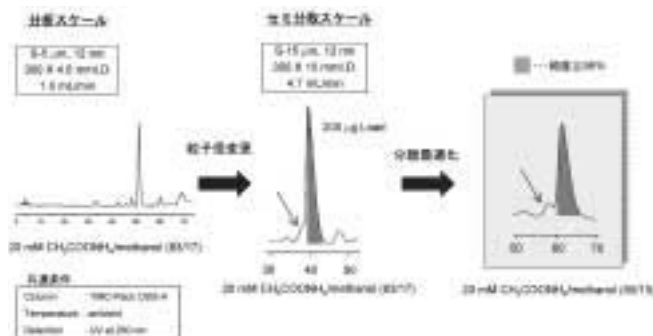
さらに負荷量検討を行ったところ (Scheme 2-2)、10 mm 内径では1.8 mg まで負荷することができた。この負荷量を本精製に適用したところ、ピークの影付き部分を回収し純度97.6%の目的物を得た。

5. 高耐久性 分取用充填剤の開発

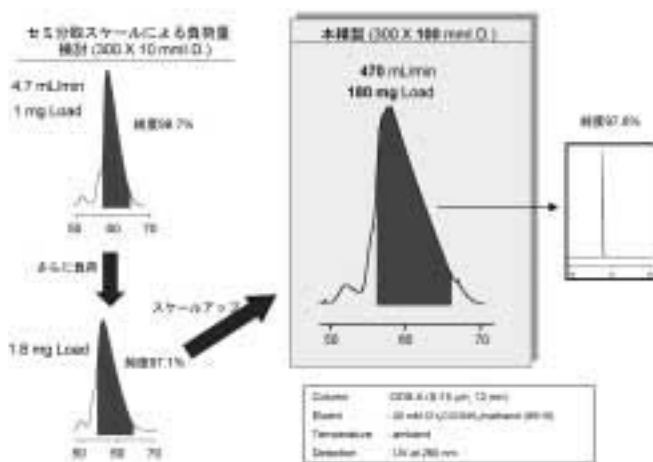
ペプチド・タンパク質分離を初めとする分取クロマトグラフィが増えるに従い、分取メソッドの安定化や充填剤の機械的、化学的長寿命化がますます求められている。

実生産スケールにおいてはコストダウンを図るため、大型の可動栓式カラムを用いた分取クロマトグラフィが近年多用されているが、カラム内が高度に圧縮された条件下で使用するため充填剤粒子が粉碎し、カラム圧力が上昇することもある。このような粒子の粉碎を防ぎ使用回数を向上させることは、充填剤コストを改善する上での課題となっている。

また、酸性の溶離液条件への耐久性や吸着性不純物のアル



Scheme 2-1. スケールアップ検討



Scheme 2-2. 負荷量検討

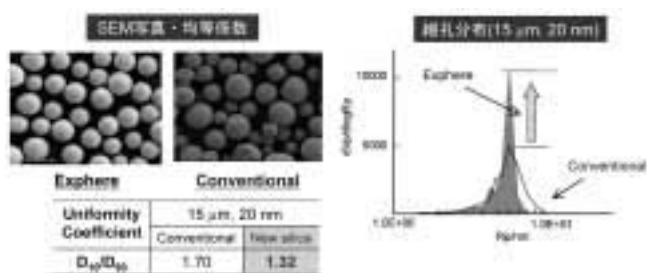
Scheme 2 分取精製の実例

カリ洗浄によって充填剤の寿命を延ばすことも重要な課題である。

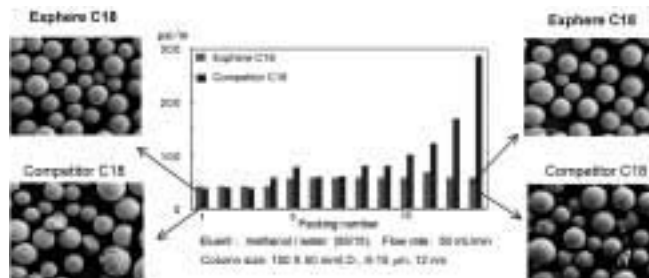
以上のような現状から、弊社では高強度の新開発シリカゲルに独自の化学修飾を施した高耐久性充填剤、Exphere (エクスフェア) シリーズを新たに開発した。このシリカゲルのSEM写真ならびに物性値を Figures 6 に示した。

SEM写真において、従来品シリカゲルと比較するとより球状で、凹凸面が見られずスムーズな表面となっている。また従来品と比べ粒度分布、細孔分布が狭いことが特長である。このシリカゲルを ODS 修飾し、可動栓式カラムによる繰り返し充填評価に供した。一般に可動栓式カラムの繰り返し充填は数回程度までであるが、今回は有意差が現れるまで試験を実施した。評価は他社従来品とカラム圧力の変化を比較した。結果を Figures 7 にまとめた。

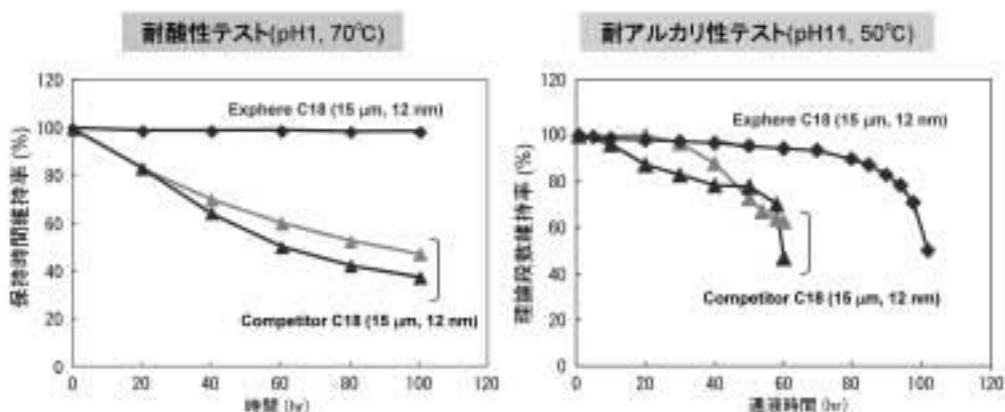
従来品は充填1回目から粒子が割れ始めている。数回までは許容範囲内の圧力上昇であるが充填を繰り返し続けると、10回目以降から急激にカラム圧が上昇し、13回目以降は充填できなくなった。この原因はSEM写真から見られるように、粒子が割れてしまい、圧力が上昇したと考えられる。一方、Exphere は13回目までカラム圧はほとんど変わらず、ま



Figures 6. 新開発シリカゲルのSEM写真、ならびに細孔分布



Figures 7. 繰り返し充填によるカラム圧力の変化ならびに充填剤SEM写真



Figures 8. Exphere シリーズの耐酸、耐アルカリ性テスト

た粒子の割れも見られなかったことから、充填剤として機械強度に優れることが分かった。

Exphere シリーズにおいては耐酸性のみならず、従来の弱点であったアルカリ性での耐久性も向上させるため、独自の分子設計・最適化による新開発のポリメリック修飾・エンドキャップ修飾方法を採用した。他社品との耐酸、耐アルカリ性テスト比較を Figures 8 にまとめた。

耐酸性テスト (Figures 8 左側) にて、Exphere は100時間経過後も初期の保持時間の値を維持した。また耐アルカリ性テストでも理論段数が長時間にわたり安定していたため、従来品と比較し2倍以上の耐久性を持つことが期待される。

6. 結言

以上、分取クロマトグラフィでは分析 HPLC とは異なる視点が必要であり、適切な充填剤選択、最適な分取条件の設

定が効率的な分取精製に不可欠であることが理解していただけたと思う。

スケールアップ例・分取実例では大量分取を中心に解説した。実生産でのコストを考えると、初期投資である分取装置や充填剤に気を取られがちではあるが、実際にはランニングコストである溶離液や人件費がかなりの部分を占めることも多い。このため、実作業を始める前に十分な計画をたてる必要がある。

分取クロマトグラフィの展望としては、充填剤寿命が延びるよう、さらに高い化学的耐久性の材料が期待されている。このため我々は、ポリマー充填剤の良さを併せ持ち、Exphere 以上の高アルカリ耐久性の充填剤開発を進めている。

弊社では創業以来、高品質なクロマト関連商品を安定供給できるよう、開発・生産・サポートを進めてきた。今後も次世代の充填剤や分取装置を開発し、分取クロマトグラフィの発展に寄与するつもりである。