

Application News

LC分析法開発支援ソフトウェア LabSolutions[™] MD

合成ペプチドの類縁物質試験法開発の効率化

藤崎 真一

ユーザーベネフィット

- ◆ ペプチドおよび関連不純物の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。
- ◆ 移動相およびカラム切換バルブを活用することで、複数種の移動相とカラムのスクリーニングを自動化できます。
- ◆ ペプチドおよび関連不純物の分子量をシングル四重極質量分析計LCMS™-2050により推定し、正確にトラッキング可能です。

■はじめに

医薬品としてのペプチドは、その機能を有するために特 定のアミノ酸配列をもっており、低分子医薬品と同様に化 学合成によって製造が可能です。合成ペプチドの製造プロ セスでは、脱保護、活性化、結合といった複数のステップ を伴う処理後、固相担体からの最終配列を切断しますが、 ペプチド鎖の伸長反応の停止やアミノ酸の欠損などの不純 物が含まれる場合があるため、これらの適切な分離が課題 となっています。LC分析の場合、移動相およびカラムの選 択は、分析種の保持挙動に大きな影響を与えるため、最適 な分離を得るためには、複数種類の移動相とカラムに亘っ て検討することが理想的です。一方で、不純物の分離パ ターンはペプチドの鎖長や構成アミノ酸、修飾の有無等に よって異なるため、対象配列ごとに分離を最適化すること が求められますが、これには膨大な時間がかかります。本 稿では、分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions MDを活用し、鎖長および修飾の異なる合成ペプチドおよび 関連不純物に対して、「スクリーニング」および「最適 化」の各フェーズにて、最適分離条件探索を効率化した事 例についてご紹介します。

■分析対象試料

測定試料として用いた合成ペプチドの配列(計6種)を表 1 に示します。full length peptide (FLP: beta-Melanotropin)および、不純物としてN末端からそれぞれ1、 2、3、5残基欠損したp.A1del、p.A1_E2del、p.A1_K3del、 p.A1_D5del、メチオニン残基が酸化したMet(O2)の計6種の 混合試料を合成ペプチドのモデル配列として用いました。

12 11/1/12/14/1

名称	Sequence	
FLP	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD	
p.A1del	EKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD	
p.A1_E2del	KKDEGPYRMEHFRWGSPPKD	
p.A1_K3del	KDEGPYRMEHFRWGSPPKD	
p.A1_D5del	del EGPYRMEHFRWGSPPKD	
Met(O2)	AEKKDEGPYR{Met(O2)}EHFRWGSPPKD	

Note : Met(O2) = methionine sulfone

■移動相とカラムのスクリーニング

スクリーニング(分析条件:表2)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、移動相とカラムの 最適な組み合わせを検討しました。移動相に関しては、水 系移動相として、0.1%TFA水、0.1%ギ酸水、10 mmol/Lギ 酸アンモニウム水 (pH 4.0)、10 mmol/L酢酸アンモニウ ム水 (pH 5.0) の4種を、有機系移動相として、アセトニト リル中のメタノール比率が0、50、100%の3種を検討しまし た。カラムに関しては、固定相や細孔径の異なる6種のカラ ムを検討しました。これら移動相とカラムの計72 (4×3×6)パターンで網羅的な分析スケジュールを作成し、 最適な組み合わせを探索しました。LabSolutions MDは、移 動相やカラム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(図1の①~ ⑤のステップ)が可能です。また、切換バルブを用いるこ とで、対象の移動相(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、有機溶媒組成の変更は、移動 相ブレンディング機能を用いて自動調製にて実施しました。 使用する移動相をクリックして選択するだけで、選択され た有機溶媒組成にて移動相が自動調製されるため、手動で の調製作業の負担を大幅に削減するだけでなく、調製ミス も防げます。



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 : NexeraTM X3 (Method Scouting System) : Shim-pack ScepterTM C18-120 ^{*1} : Shim-packTM GISS C18 ^{*2} : Shim-pack VeloxTM SP-C18 ^{*3} System Ćolumn 1 Column 2 Column 3 Shim-pack Scepter C8-120 *4 Column 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120*5 Column 5 : Shim-pack GIST-HP C18-ÁQ ^{*6} Column 6 (100 mm \times 3.0 mm I.D., 1.9 μ m : column 1, 2, $4 \sim 6)$ (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μm : column 3) Temperature : 40 ℃ : 2 μL (FLP : 1000 mg/L, other impurities : 100 Injection volume mg/L) Sample solvent Water Mobile phases Pump A – Line A : 0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) in water – Line B : 0.1% formic acid in water : 10 mmol/L ammonium formate (pH 4) in water – Line C – Line D : 10 mmol/L ammonium acetate (pH 5) in water Pump B – Line A : Acetonitrile – Line B : Methanol Flow rate : 0.5 ml /min : 10 % (0 min) →60 % (10 min) Time program (%B) $\rightarrow 10\%$ (10.01-15 min) : 220 nm (SPD-M40, UHPLC cell) Detection : LCMS-2050 System : ESI/APCI (DUIS™), positive mode lonization : SCAN (*m/z* 300-2000) Mode Nebulizing gas : 2.0 L/min (N₂) : 5.0 L/min (N₂) Drying gas : 7.0 L/min (N₂) Heating gas DL temp. : 200 °C Desolvation temp. :450 °C Interface Voltage : 1.0 kV *1 P/N:227-31013-03、*2 P/N: 227-30049-02 *3 P/N: 227-32002-02、*4 P/N: 227-31034-03 *5 P/N: 227-31064-03、*6 P/N: 227-30808-02

(島津GLC 製品番号)

■移動相とカラムのスクリーニング結果

移動相とカラムのスクリーニング結果を、代表的なクロマトグラム(水系移動相:0.1%TFA水、0.1%ギ酸水、10 mmol/Lギ酸アンモニウム水、10 mmol/L酢酸アンモニウム水/1 (有機系移動相:アセトニトリル100%、メタノール100%)と共に、図2~7に示します。





移動相とカラムのスクリーニング結果により、水系移動相 の種類および有機系移動相の混合比率を変更することで、 FLPと各不純物の保持や分離が大きく変わることが確認でき ました。また、LabSolutions MDは、LCMS-2050の質量情報 を用いて各ピークの分子量を算出可能(MSスペクトルのデ コンボリューションにより推定)なため、既知化合物の確 認や未知不純物の簡易的な分子量推定として活用できます。

■スクリーニング結果から最適条件を迅速に 探索

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、分析者の勘 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。

(評価値) = P×(Rs1 + Rs2 + … + RsP-1) ・・・ (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8に示します。ま た、評価値が高かった上位3条件のクロマトグラムを図9に 示します。最も評価値が高い条件は、水系移動相が0.1%ギ 酸水、有機系移動相がメタノール、カラムがScepter C8-120でしたが、2番目と3番目に評価値が高かった条件にお いても、p.A1_E2delが検出されており、一定以上の分離が 達成できていたため、これら3条件に対して、さらにカラム オーブン温度のスクリーニング(40、50、60、70、80℃の 5水準で変動)を行いました。

移動相A 略称	移動相B 略称	カラム 略称	評価値 🚽
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	26.889
Ammonium acetate (pH 5)	ACN_MeOH=50_50	Velox SP-C18	26.328
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	26.073
Ammonium formate (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter-C8-120	25.948
Ammonium formate (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter C18-120	25.792
Ammonium formate (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	Scepter Phenyl-120	25.575
Ammonium formate (pH 4)	ACN_MeOH=50_50	GIST-C18-AQ	25.502
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter C18-120	25.318
Ammonium formate (pH 4)	ACN	Scepter-C8-120	24.890
Ammonium formate (pH 4)	ACN	Scepter Phenyl-120	24.860





■カラムオーブン温度のスクリーニング結果

移動相とカラムのスクリーニングで得られた上位3条件 (図9)に対して、カラムオーブン温度を40、50、60、70、 80 ℃(5水準)で変動させた際のクロマトグラムをそれぞ れ図10~12に示します。カラムオーブン温度を高くするこ とですべての条件にて分離の改善が見られており、カラム オーブン温度が分離の改善に有効であることが分かりまし た。また、カラムオーブン温度を高温にすることで、最も 分離の厳しいp.A1delとFLPの分離が改善されることが確認 できました。図13に、p.A1delとFLPの分離が高い順に並び 替えた結果を示します。水系移動相は0.1%ギ酸水、有機系 移動相はメタノール、カラムはScepter C8-120を用いた際 にp.A1delとFLPの分離が最も良好となることが分かりまし た(図10中①のクロマトグラム)。



0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	80	1.492
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	70	1.396
0.1% FA in water	MeOH	Scepter-C8-120	60	1.238
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	80	1.175
Ammonium formate (pH 4)	MeOH	Scepter-C8-120	70	1.172

図13 p.A1delとFLPの分離度が高い順に各条件を並び替えて表示

続いて、最適化フェーズとして、グラジエントプログラ ムや流量等の各種LCパラメーターの最適水準を検討するこ とで、さらなる分離の改善および、高い頑健性を有する条 件の探索を行いました。

■各種LCパラメーターの最適化

スクリーニングで最適分離が得られた図10中①の条件 (水系移動相:0.1%ギ酸水、有機系移動相:メタノール、 カラム:Scepter C8-120、カラムオーブン温度:80 ℃)に 対して、グラジエント初期濃度を5、10、15%(3水準:図 14)、グラジエント時間を5、10、15 min(3水準:図14)、 流量を0.5、0.6、0.7 mL/min(3水準)で変動させ、FLPお よび各不純物の分離を最適化しました。得られたクロマト グラムを図15~17に示します。グラジエント初期濃度が高 いほど、グラジエント時間が長いほど各ピークの分離度が 向上する傾向が見られた一方、流量は分離度に与える影響 が小さい傾向がみられました。次に、分離度をデザインス ペースにて視覚化するために、FLPおよび各不純物に対し てピークトラッキングを実施しました。







5%(①)、10%(②)、15%(③)







■不純物ピークのMSトラッキング

グラジエント時間が5 min、流量が0.6 mL/min、グラジエ ント初期濃度が5%および15%の条件で得られたLCクロマト グラムおよび各不純物の分子量を図18に、また、各不純物 のUVスペクトルを図19に示します。合成ペプチドの不純物 である Met(O2)、 p.A1del 、 p.A1_E2del 、 p.A1_K3del 、 p.A1_D5delはUVスペクトルの類似度が共に0.99以上で非常 に類似しており、UVスペクトルによるピークトラッキング が困難なことが示唆されています。一方、LabSolutions MD は、LCMS-2050の質量情報から算出した分子量(MSスペク トルのデコンボリューションにより推定)を用いたピーク トラッキングが可能なため、UVスペクトルが類似している 不純物に対しても、正確な同定を可能とします(図18中の 青色点線)。デコンボリューションにより分子量を推定し た結果、理論分子量との誤差は小さく(表3)、FLPおよび 各不純物の分子量を高精度に推定できることが確認できま した。



図 18 グラジエント時間5 min、流量0.6 mL/min 、グラジエント初期濃 度5%(上)および 15%(下)のLCクロマトグラム (点線は分子量による不純物のトラッキングを示す)





名称	推定分子量	理論分子量	
FLP	2660	2660	
p.A1del	2589	2589	
p.A1_E2del	2460	2460	
p.A1_K3del	2332	2332	
p.A1_D5del	2088	2089	
Met(O2)	2692	2692	

引き続き、FLPおよび各不純物の分離度をデザインスペースにより視覚化し、良好な分離かつ高い頑健性を有する最適分離条件の探索を行いました。

■デザインスペースによる最適分析条件探索

FLPおよび各不純物の分離度のデザインスペースを、縦軸 をグラジエント時間、横軸をグラジエント初期濃度とし、 図20にそれぞれ示しました。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、グラジエント初期濃度が高いほ ど、グラジエント時間が長いほど、良好な分離が得られる ことが分かりました。



図 20 FLPおよび各不純物の分離度のデザインスペース (流量:0.6 mL/min)

LabSolutions MDは、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を自動 探索することが可能です。例えば、FLPと各不純物の最適分 離条件を探索するために、FLPとp.A1delの分離度が1.5以上、 FLPとp.A1_E2delの分離度が1.0以上、分析時間短縮のため 最終ピークp.A1_D5delの溶出時間が6分以下、最初のピー クが適切に保持されるようにMet(O2)の溶出時間が3分以上 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21)。図21の 橙色内はFLPとp.A1delの分離度が1.5未満の領域、ピンク色 内はFLPとp.A1_E2delの分離度が1.0未満の領域、黄色内は 最終ピークの溶出時間が6分より長い領域、茶色内は最初の ピークの溶出時間が3分より短い領域を表しており、これら 以外の領域(黒線ハッチング)において、赤丸内の点Aが、 最適条件(グラジエント初期濃度:9%、グラジエント時 間:11.5 min、流量:0.6 mL/min) であると自動探索され ました。このように、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 21 デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索

■最適分離条件でのクロマトグラム

デザインスペースにより探索された最適条件(点A)での クロマトグラムを図22に示します。FLPとp.A1delの分離度 が1.5以上、FLPとp.A1_E2delの分離度が1.0以上、最終ピー クp.A1_D5delの溶出時間が6分以下、最初のピークMet(O2) の溶出時間が3分以上となっており、分析時間の短縮も考慮 して、分離を最適化することができました。デザインス ペースにて分離度を網羅的に視覚化することで、分析者の 勘と経験に依存することなく、分離の最適化が可能です。



■まとめ

合成ペプチドの分析においては、移動相組成やカラム種 類、さらにはグラジエント条件、カラムオーブン温度、流 量等の各種LCパラメーターの変動により、各不純物の分離 パターンが変化します。また、変化の挙動は合成ペプチド の鎖長、構成アミノ酸、修飾の有無等によっても異なるた め、対象配列ごとに分離を最適化することが求められます。 一方で、対象配列ごとに網羅的な分析を実施することや、 得られた膨大なデータを解析し、最適条件を探索すること は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、解析面ではピークトラッキングの自動化やデザインス -スによる効率的な最適条件の探索が可能です。これに より、合成ペプチドの分析法開発の一連のワークフローの 効率化を実現できます。本稿では、「スクリーニング」お よび「最適化」の各フェーズを通して合成ペプチドの最適 分離条件探索を効率化した事例についてご紹介しましたが、 LabSolutions MDは、AIアルゴリズムにより、ユーザーが任 意に設定した分離度のクライテリアを満たすグラジエント 条件の探索を自動化する機能も有しています。詳細はアプ リケーションニュース<u>「AIアルゴリズムによるグラ</u>ジエン ト条件の自動最適化 -合成ペプチドの不純物分析への適用-<u>:01-00814」</u>をご参照ください。

LabSolutions、LCMS、Nexera、Shim-pack、Shim-pack Velox、Shim-pack ScepterおよびDUIS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。

初版発行:2024年 10月 01-00780A-JP A改訂版発行:2024年12月

株式会社島津製作所 別析計測事業部 https://www.an.shimadzu.co.jp/ 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。



関連分野

