

AIアルゴリズムによるグラ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-

藤崎 真一

ユーザーベネフィット

- ◆ LabSolutions MDのAIアルゴリズムによりグラジエント条件を自動で最適化でき、LCメソッド開発にかかる作業を大幅に省力化できます。
- ◆ クロマトグラフィーに関する知見の有無によらず誰でもグラジエント条件の最適化が可能です。
- ◆ 任意のピーク（主成分とその不純物など）に対して、設定した分離度のクライテリアを満たす条件を自動で探索します。

■はじめに

一般的なLCのメソッド開発では、移動相やカラムの設置、分析スケジュールの作成といった「準備」を行い、「分析」を開始します。その後、得られたデータの「解析」を実施し、次の分析のための「準備」を再度行い、再び「分析」を仕掛けます。この作業の繰り返しでメソッド開発は進行しますが、分析者にとっては、繰り返しの分析スケジュールの作成に膨大な時間を要するだけでなく、得られたデータの解析結果に基づき最適条件を探索する過程では、クロマトグラフィーに対する知見も要求されます。つまり、通常のメソッド開発においては「人」の介入が必須であり、一連のメソッド開発の無人化・自動化による作業の省力化が望まれています。本稿では、鎖長、修飾の異なる合成ペプチドおよび関連不純物に対して、分離度のクライテリアを満たすグラジエント条件を、分析法開発支援ソフトウェアLabSolutions MD ([Technical Report C190-0577](#))にて自動探索した事例についてご紹介します。

■分析対象試料および分析条件

分析対象試料として用いた合成ペプチドの配列（計4種）を表1に示します。full length peptide (FLP) および、不純物としてN末端からそれぞれ3、5残基欠損したp.A1_K3del、p.A1_D5del、メチオニン残基が酸化したMet(O2)の計4種の混合試料をモデルサンプルとして用いました。また、分析条件を表2に示します。本稿では、FLPに対して分離度のクライテリアを設定し、これを満たすグラジエント条件をLabSolutions MDにより自動探索しました。

表1 分析対象試料

名称	Sequence
FLP	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_K3del	KDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_D5del	EGPYRMEHFRWGSPPKD
Met(O2)	AEKKDEGPYR{Met(O2)}EHFRWGSPPKD

Note : Met(O2) = methionine sulfone

表2 分析条件

LC (Nexera™ X3)	
Mobile phase	
Pump A :	0.1% TFA (Trifluoroacetic acid) in water
Pump B :	Acetonitrile
Analytical conditions	
B Conc.	: 5%(0 min)→60%(X ¹ ~X+2 min) →5%(X+2~X+7 min)
Column Temp.	: 80 °C
Flow rate	: 0.6 mL/min
Injection Vol.	: 2 µL
Detection	: 220 nm (SPD-M40, STD cell)

Column : Shim-pack Scepter™ C8-120

(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 µm)^{*2}

Criteria of automatic optimization of gradient conditions

Resolution : > 2.0 (FLP)

MS (LCMS™-2050)

Ionization : ESI/APCI (DUIST™), positive mode

Mode : SCAN (m/z 300-2000)

Nebulizing gas flow : 2.0 L/min

Drying gas flow : 5.0 L/min

Heating gas flow : 7.0 L/min

DL Temp. : 200 °C

Desolvation Temp. : 450 °C

Interface voltage : +1.0 kV

*1 X = 3, 4, 5, 6, 7 (5 patterns)

*2 P/N : 227-31034-03 (島津GLC 製品番号)

■グラジエント条件の自動最適化

LabSolutions MDのグラジエント条件の自動最適化ワークフローを図1に示します。LabSolutions MDは、独自のAIアルゴリズムを搭載しており、初期分析の結果に基づき、「AIによるグラジエント条件の改良（条件探索）」および「改良された条件での分析（補正分析）」を繰り返すことでクライテリアを満たす条件を自動で探索します。クライテリアに関しては、「任意のピークに対する分離度」、および「最終ピークの溶出時間」について設定可能です。LabSolutions MDは、MSスペクトルのデコンボリューションにより分子量を算出可能なため、分離を最適化したい化合物の分子量を入力（図2）するだけで、簡単に最適化対象のピークを指定可能です。今回は、FLPとその近傍に溶出する類縁物質との分離を最適化するために、FLP（分子量：2660）を最適化対象のピークとして指定しました。また、最小分離度のクライテリアは2.0（図2）に設定しました。



図1 LabSolutions MDのグラジエント条件自動最適化のワークフロー



図2 グラジエント条件自動最適化におけるクライテリアの設定

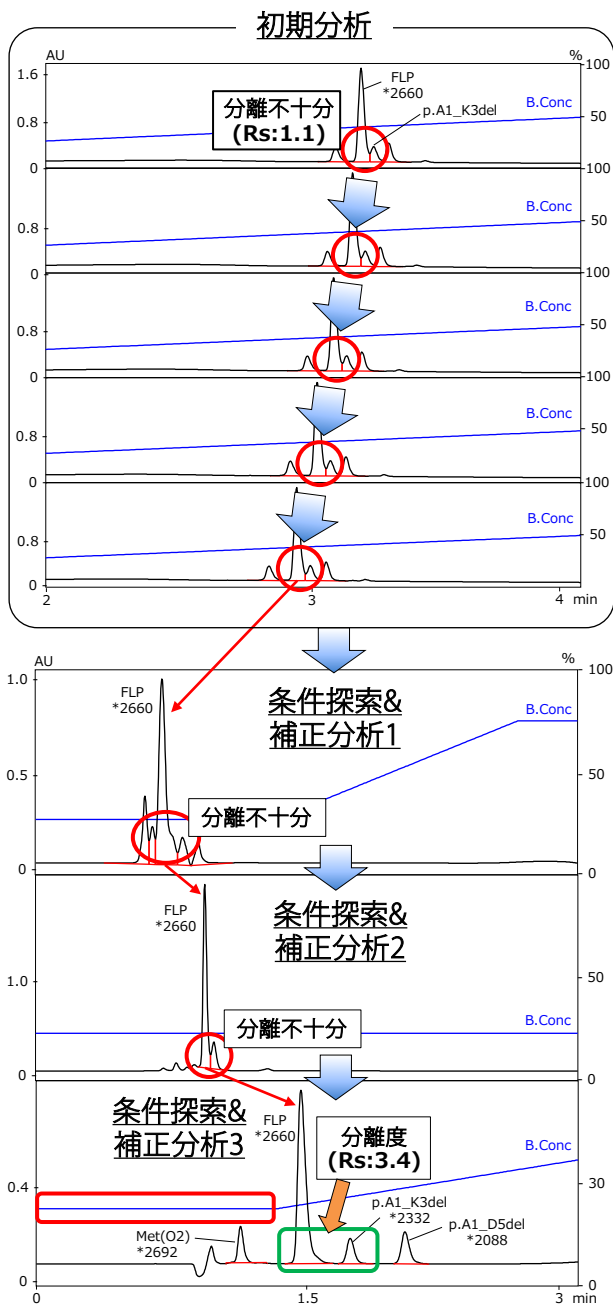


図3 グラジエント条件の自動最適化結果
(図中青線はグラジエント条件)

(* : MSスペクトルのデコンボリューションにより算出された分子量)

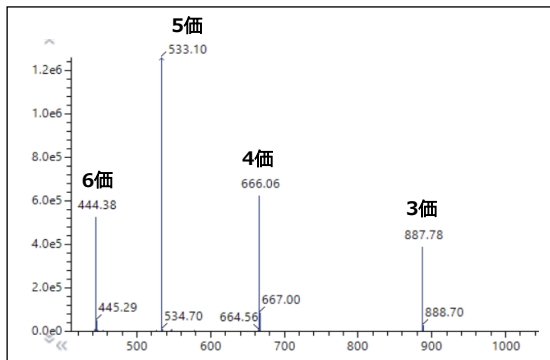


図4 FLPのMSスペクトル

グラジエント条件を自動探索した結果を図3に、FLPのMSスペクトルを図4に示します。FLPに対して、3~6価の多価イオンが検出されており、デコンボリューションにより分子量(2660)が算出されました。これにより、FLPが分離最適化対象のピークと認識され、クライテリアを満たすグラジエント条件が自動で探索されました。5パターンのグラジエント条件(表1)での初期分析結果においては、FLPおよび類縁物質(p.A1_K3del)の分離が不十分(図3初期分析の赤丸内)でした。その後、AIアルゴリズムによる補正分析の繰り返し(3回)により、最終的にはクライテリアを満たすグラジエント条件が自動で探索されました(補正分析3)。補正分析3においては、一定組成(アイソクラティック)の領域(赤枠内)を設けることで分離度のクライテリア(分離度:2.0)を達成(緑枠内)できました。LCMS-2050を組み合わせて最適化を行うことで、各化合物の分子量情報も得られるため、最適化過程におけるピーク溶出順序の入れ替わり等も見逃すことなく確実な分離検討が可能となります。

■まとめ

合成ペプチドの混合試料をモデルサンプルとし、LabSolutions MDのAIアルゴリズムにより、グラジエント条件の自動最適化を実施しました。その結果、クライテリア(FLPと類縁物質の最小分離度2.0)を満たすグラジエント条件が自動で探索され、メソッド開発に対する大幅な省力化が期待できることが示されました。本稿では、メソッド開発におけるグラジエント条件の自動最適化事例についてご紹介しましたが、LabSolutions MDは、移動相とカラムのスクリーニングも含めた合成ペプチドの一連のメソッド開発のワークフローの効率化も支援します。詳細はアプリケーションニュース「[合成ペプチドの類縁物質試験法開発の効率化:01-00780](#)」をご参照ください。

LabSolutions、Nexera、LCMS、DUIS、およびShim-pack Scepter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/>

01-00814-JP 初版発行: 2024年 11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。



▶ 分析法開発支援システム
分析法開発支援ソフトウェア



▶ Nexera™シリーズ
超高速液体クロマトグラフ



▶ LCMS-2050
シングル四重極質量分析計

関連分野

▶ 医薬・バイオ医薬品

▶ バイオ医薬品

▶ 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