

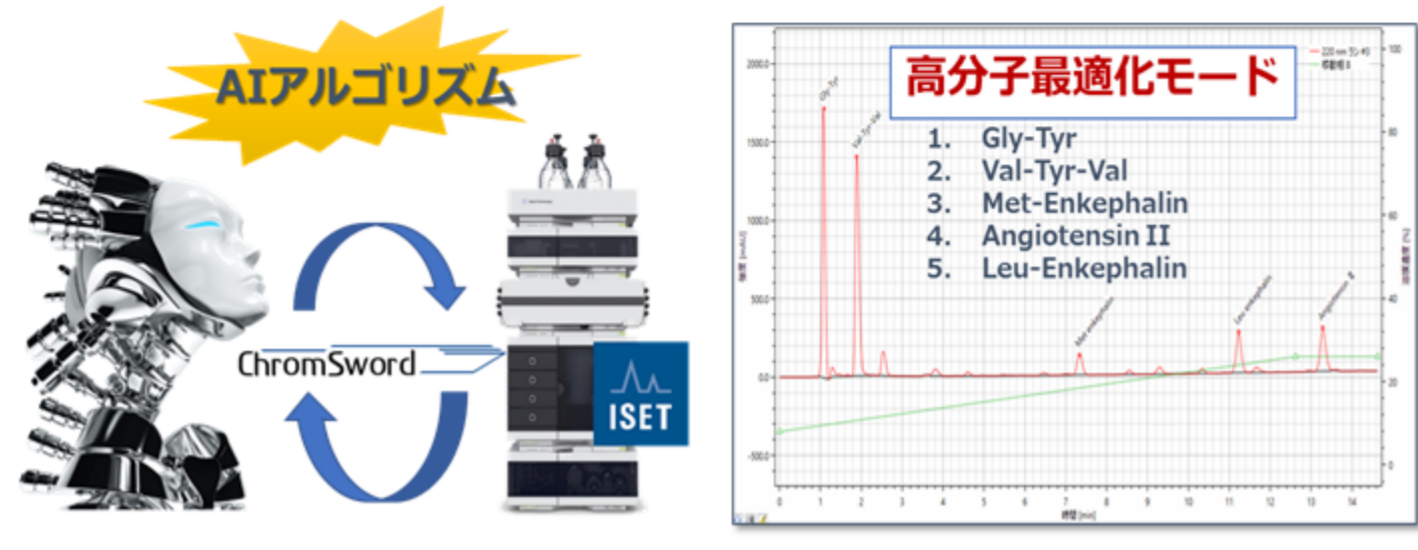
# ペプチド分解物を用いたHPLC自動メソッド開発

クロムソードジャパン株式会社/お問合せ : info@chromsword.co.jp

## サマリー

- HPLCの条件設定確立に効果的かつ大幅な時間短縮が可能である自動メソッド開発のトータルソリューションソフト、クロムソードAutoを用いて、独自のAIアルゴリズムを用いて自動でメソッド開発を行った。
- サンプルにペプチドミックスとそれらの分解物を用い、高分子迅速最適化モードによる3-5回の自動測定により、無人でメソッド開発ができた。

■ アジレントテクノロジー社の、様々なHPLCをエミュレートできる機能、\*ISET (Intelligent System Emulation Technology) を用いて、他機種に対応した最適なメソッドを自動で開発することが可能であった。



\*http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002079

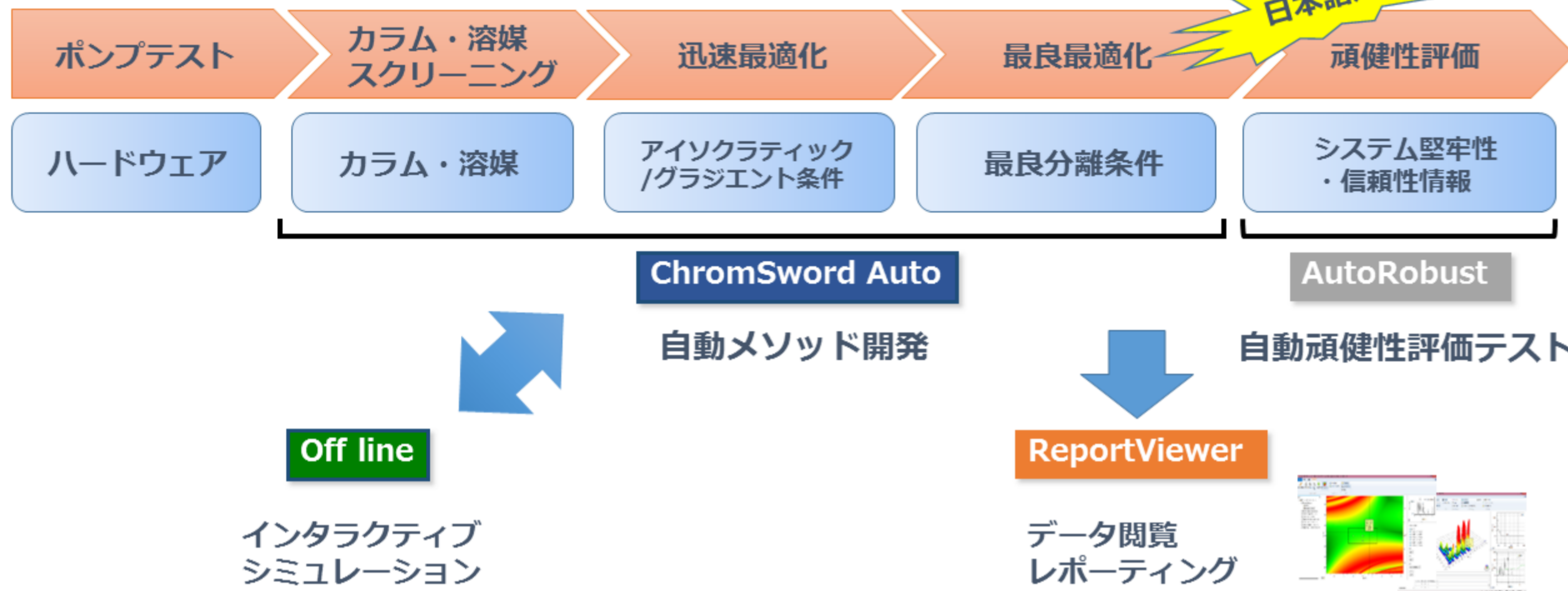
## 背景・目的

- 近年、医薬品ではもちろんのこと、様々な分野でHPLC(高速液体クロマトグラフィー)およびLC/MSはもはや欠くことのできない分析機器のひとつとなっている。
- 生物学的手法に加え、化学的手法を用いて生命現象を解明したり、そのためのケミカルツールの作成したりするケミカルバイオロジーの分野においても、分析・精製といった作業にHPLCやLC/MSは欠かせない。
- 最近、次世代の創薬ターゲット分子として期待されているペプチドをターゲットとするケミカルバイオロジー分野でも、HPLCやLC/MSを有効に活用するには、溶媒、カラム、流速、カラム温度、グラジエントといったパラメーターが最適化された分離・分析条件の容易かつ迅速な確立法が求められている。
- 全く新しくなったChromSword Auto 5.0では生体内高分子用のAIアルゴリズムが追加されており、ペプチドをはじめとした核酸、糖、タンパク質といった比較的高分子におけるHPLCのメソッド開発が自動で行えるようになった。本発表ではペプチドおよびその分解物を用いたHPLCの分析メソッド開発における効率化の例を紹介する。

## HPLCメソッド開発プロセス

■ ハードウェアのセッティング後、カラムや溶媒のスクリーニングプロセスから、初期移動相を設定し、条件最適化を行い、必要に応じて頑健性評価テストを行う。

■ 各プロセスは複雑で時間がかかり、属人的になりがちである。



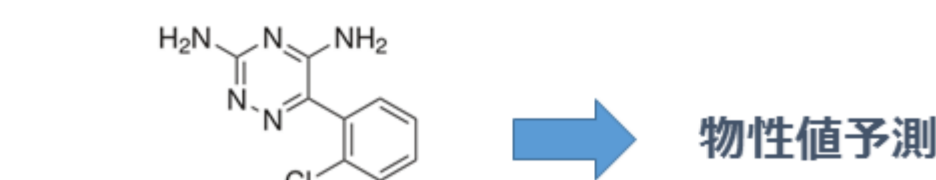
## メソッド開発の効率化ソリューション

### オートモード (ChromSword Auto)

■ LCを完全制御、クロムソードがもつAIアルゴリズムで、自動的にHPLCのグラジエント条件を作成

### オフラインモード (Off Line)

■ 構造式からクロマトグラムをシミュレーション



■ 分析結果をもとにクロマトグラムをシミュレーション



「生体内高分子」ペプチド、核酸、糖、タンパク質などに対応

3-5回の測定で最適グラジエント

開発タスク: 迅速最適化, 高分子化合物の迅速最適化, サンプルのアイソクラティック最適化, サンプルのアイソクラティック最適化, サンプルのアイソクラティック最適化, 最大ピーク分離

メインピークにフォーカスグラジエント

## 方法

■ HPLC : Agilent 1290 method development system (Quaternary pump) x 8 カラムスイッチングバルブ, x 12 溶媒選択バルブ フォトダイオードアレイ検出器

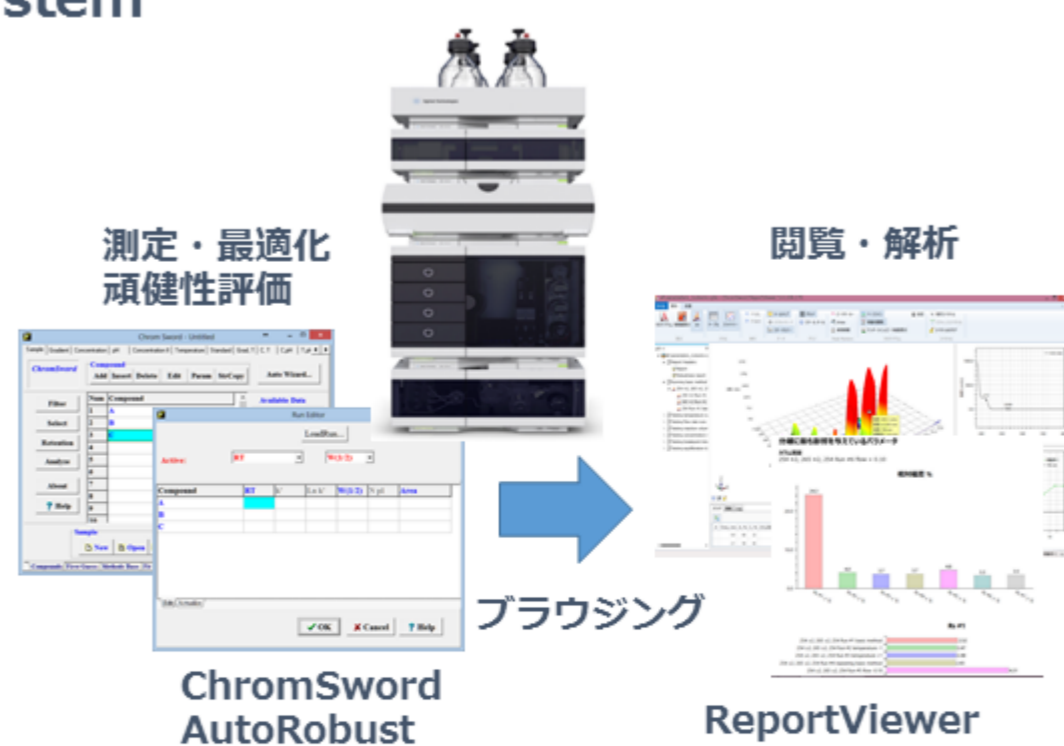
■ カラム : ZORBAX Eclipse Plus Silica C18

■ カラム温度 : 40℃

■ 移動相 : 0.1%TFA アセトニトリル/水

■ サンプル  
Sigma H2016 standard peptide mix

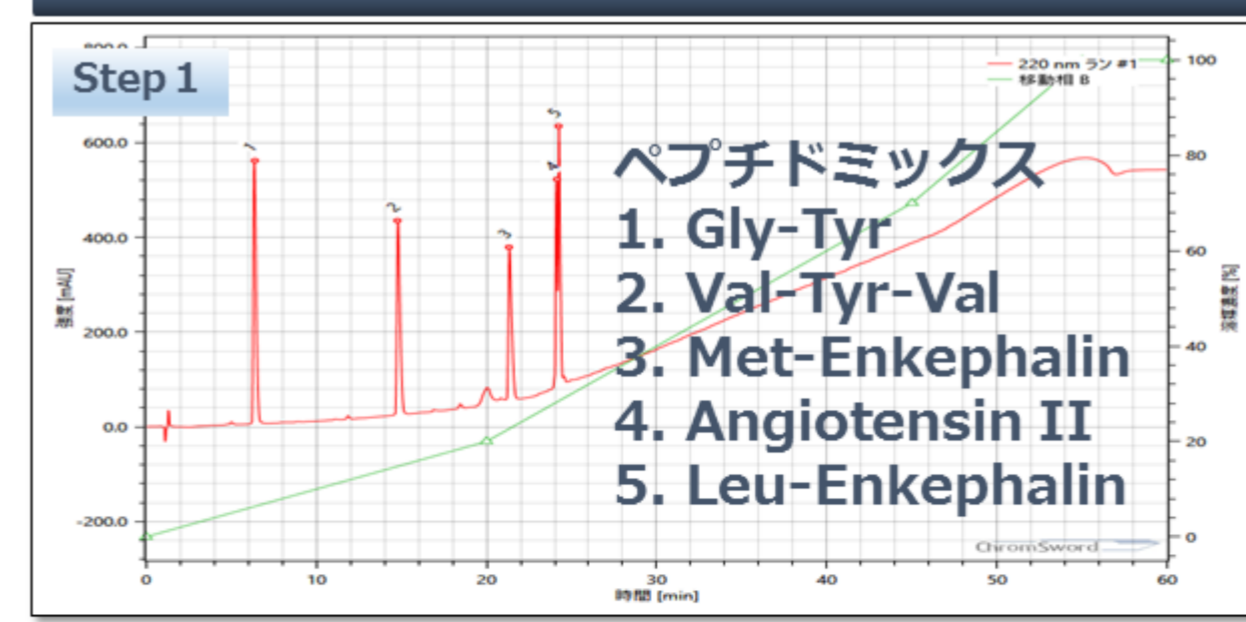
1. Gly-Tyr
2. Val-Tyr-Val
3. Met-Enkephalin
4. Angiotensin II
5. Leu-Enkephalin



ペプチド分解物

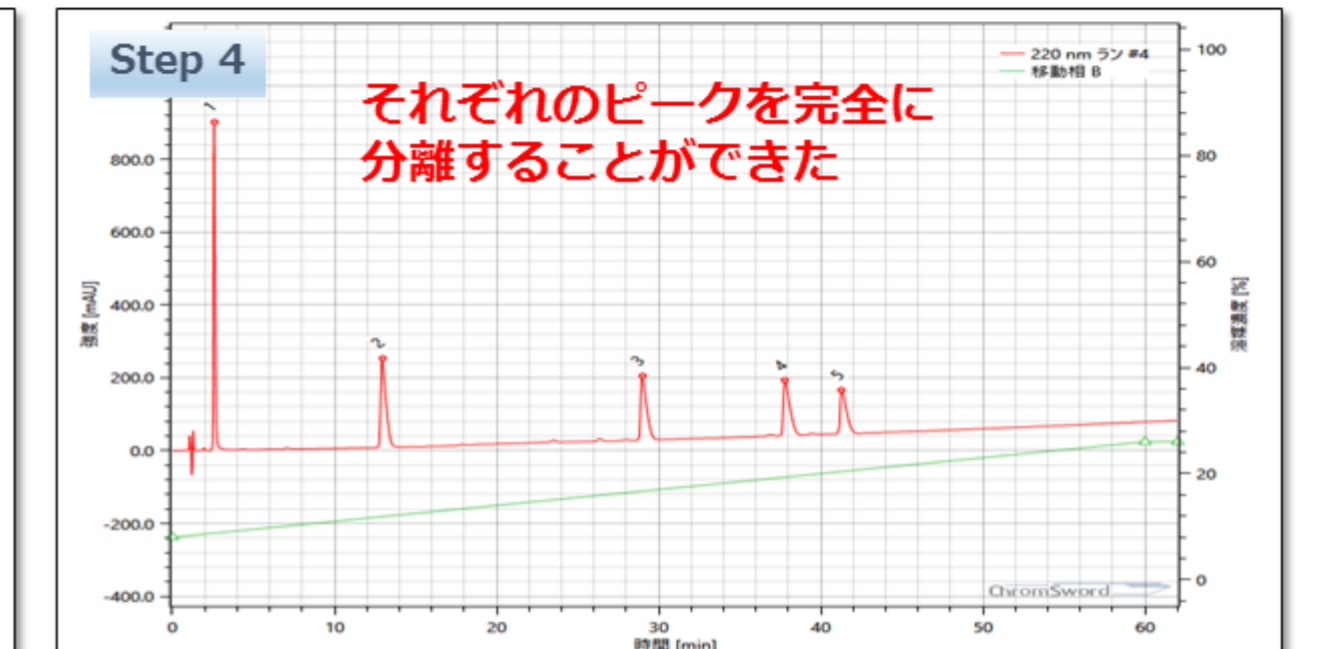
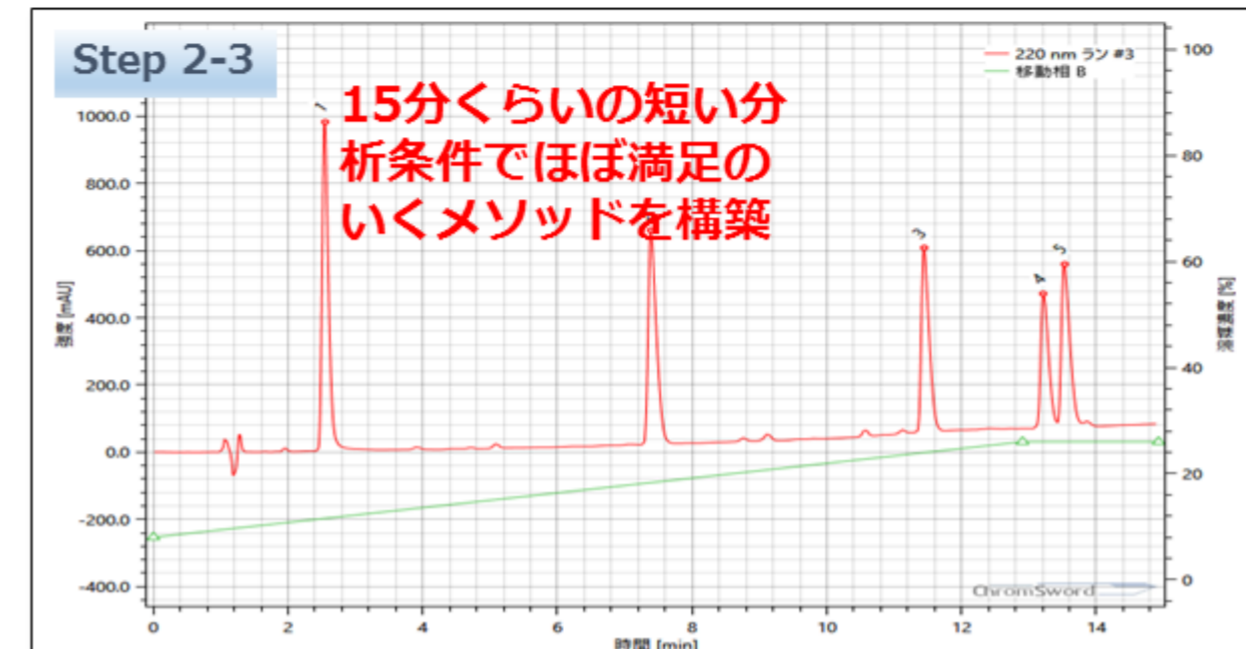
## ① 高分子迅速最適化モード(ペプチドミックス)

ChromSword Auto



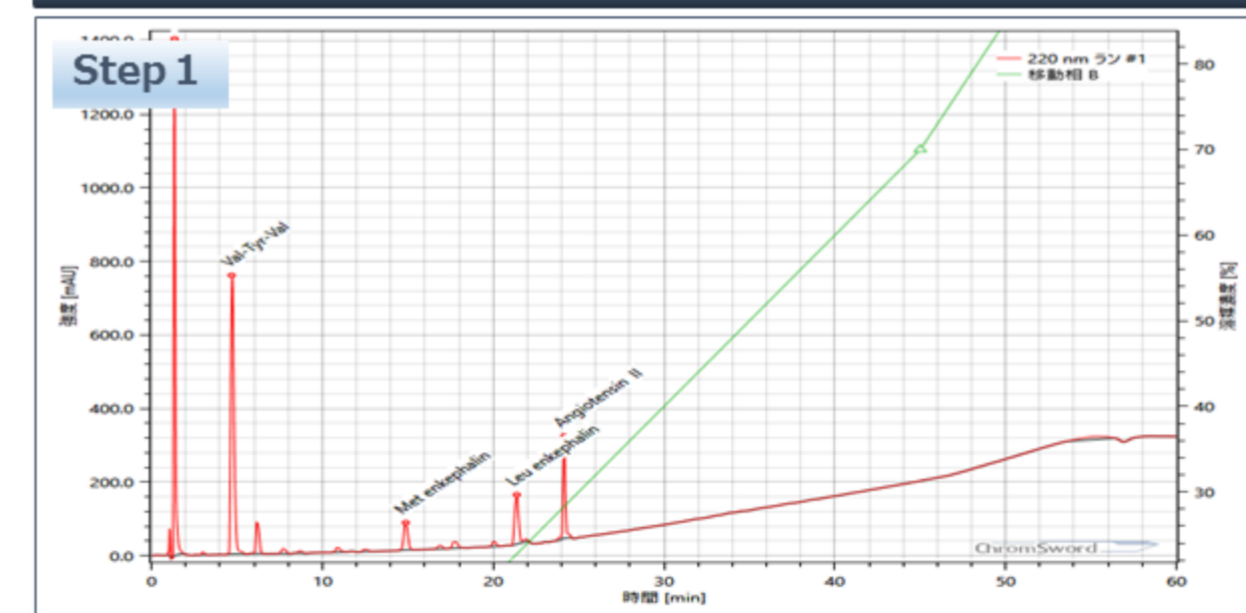
高分子モードを用い、高極性側に溶媒濃度範囲を8~26%にて設定することで、ペプチドのメソッド開発を簡単にできることが分かった

ZORBAX Eclipse Plus Silica C18  
0.1% TFA H2O/ACN, 1mL/min, 40℃



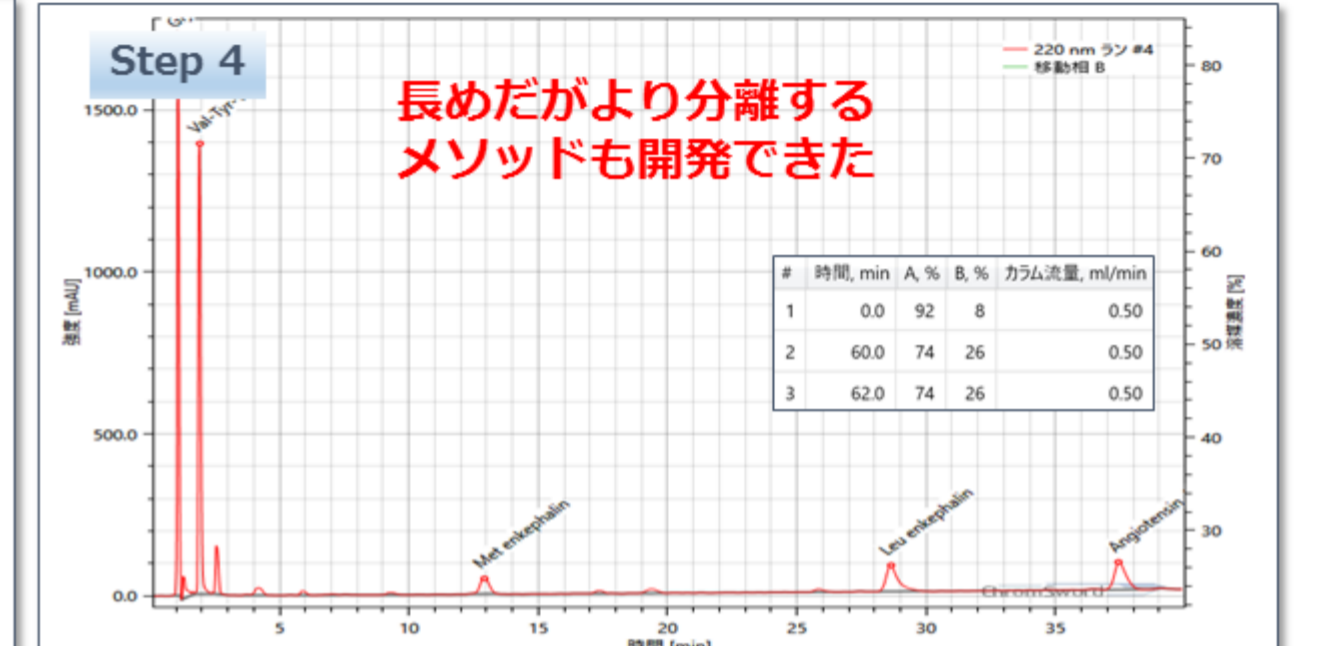
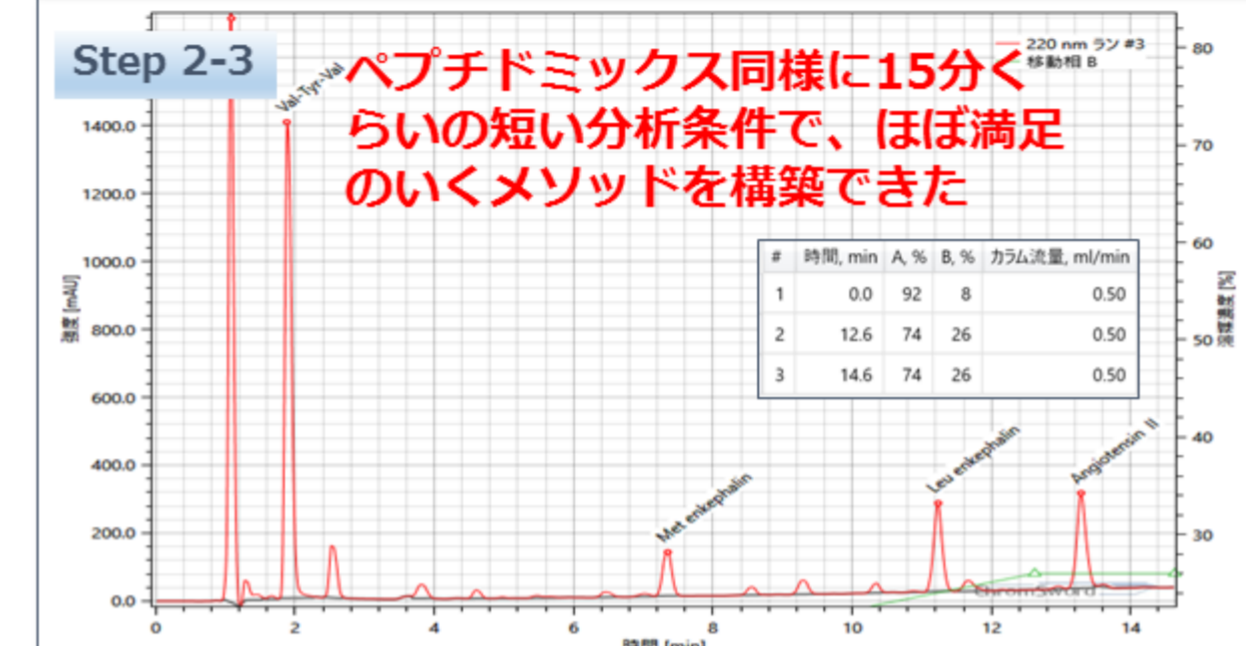
## ② 高分子迅速最適化モード(ペプチド分解物)

ChromSword Auto



含有物がより多いペプチド分解産物でも簡単にメソッド開発ができた。

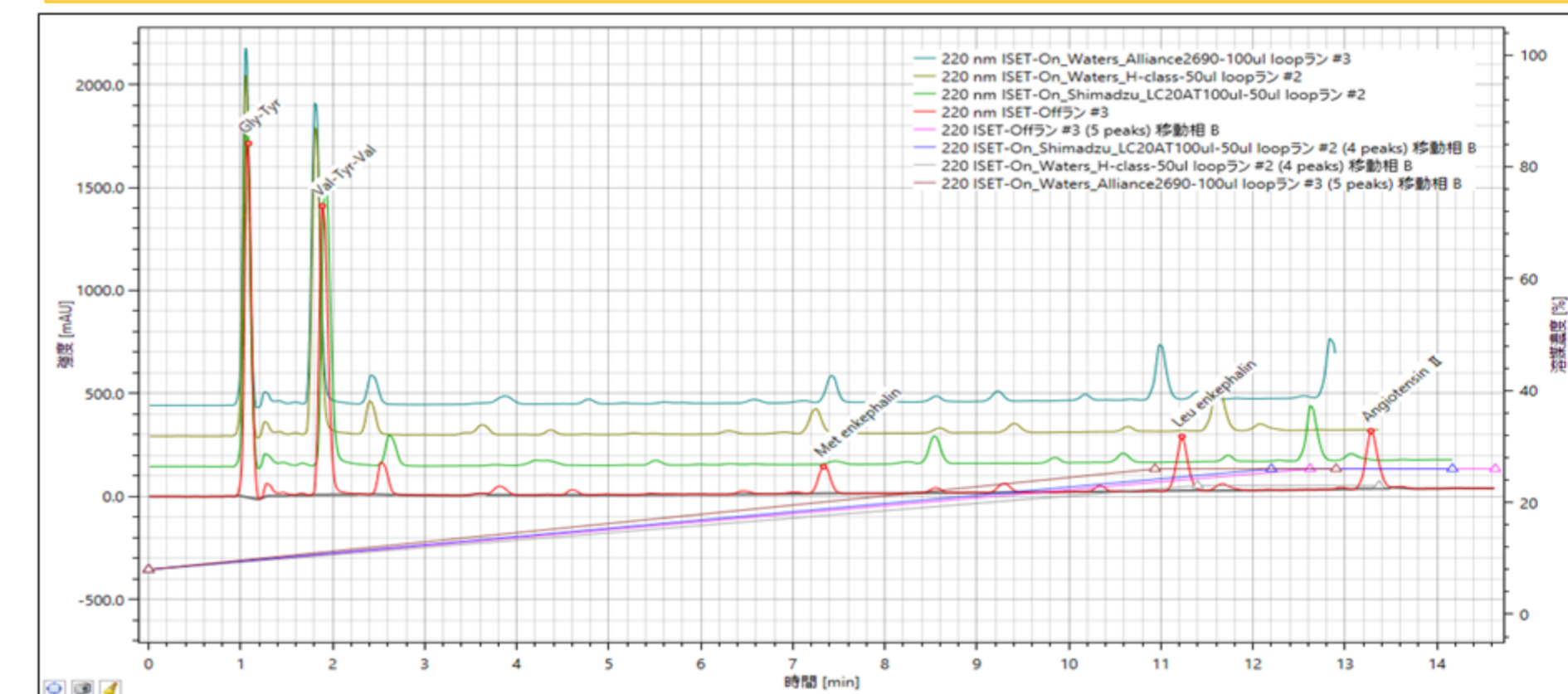
ZORBAX Eclipse Plus Silica C18  
0.1% TFA H2O/ACN, 0.5mL/min, 40℃



## ③ ISET\*機能を用いた、様々な機種でのメソッド開発

ChromSword Auto

ISET機能で様々な機種にエミュレートすることで、機種間差を加味した、それぞれの機種に最適なメソッドを簡単に開発することができた (1.5h x 4 systems)



機種	移動相	流速	カラム温度	検出器
ISET-Off	InfinityII	1.00	40	100
ISET-On	Shimadzu LC20AT	1.00	40	100
ISET-On	Waters H-class	1.00	40	100
ISET-On	Waters Alliance	1.00	40	100

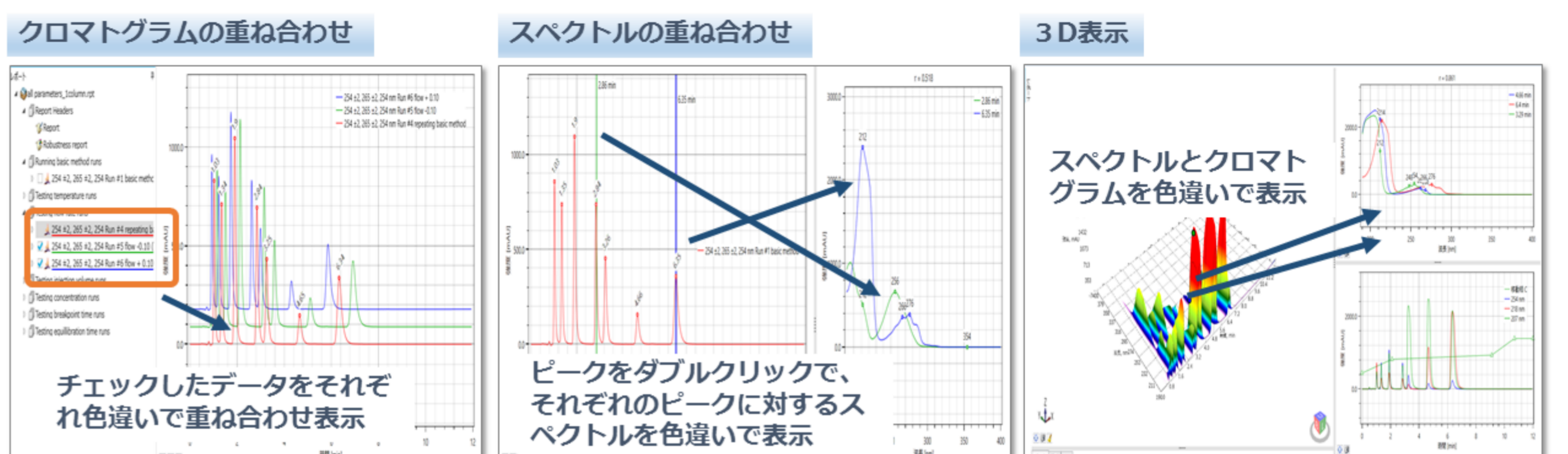
- \*ISET (Intelligent System Emulation Technology) とはアジレントテクノロジー社のハイエンドHPLC (超高速液体クロマトグラフィー) に搭載されている、同社はもちろんのこと、他社のHPLCをエミュレーションできる機能。
- ISETが搭載されているHPLCは、他のHPLC実機を持たなくても様々なHPLCをたった1台で再現することが可能であり、HPLCのメソッド移行では威力を発揮。
- クロムソードはISETをサポートし、他機種でのメソッドを自動で開発することが可能。

## 重ね合わせ、2D 3D表示

ReportViewer

■ クロマトグラムはデータウィンドウのチェックを入れることで、スペクトルも同時に、異なる色で重ね合わせ表示可能となり容易に比較することができた

■ 2D, 3Dともに、カーソルを合わせ、ダブルクリックすることで、それぞれにおけるスペクトル、クロマトグラムを異なった色で表示、より簡単にデータの比較・解析を行うことが可能であった



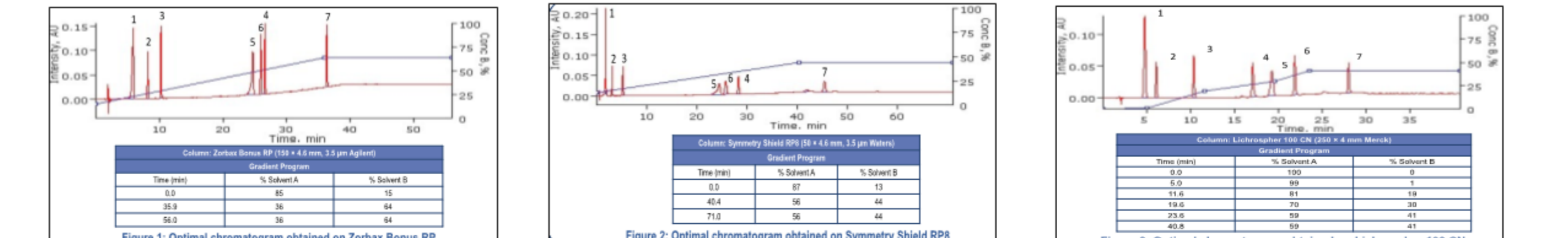
## 参考) 海外活用例

ChromSword Auto

### 自動メソッド開発 (API+不純物)

Software (ChromSword®) - Assisted HPLC Method Development for Separation of Process-Related Substances

Step1: カラム・最適な初期条件スクリーニング



Step2: OffLineシミュレーションでさらに最適化



■ ChromSword Auto+OffLineシミュレーションを組み合わせると、短時間で効果的にメソッドを開発