

## Technical Report

# グラジエント遅れの補正によるメソッド移管の効率化

Simple method transfer by adjustment of dwell volume

國澤 研大<sup>1</sup>、藤村 大樹<sup>1</sup>、尾坂 裕輔<sup>1</sup>

### Abstract:

目的成分やその不純物の定性、定量には高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が広く用いられています。複数のHPLC装置を導入している企業では、既存のメソッドを移管し、他機種で分析するという場面が多くみられます。しかしながら、メソッド移管を実施する場合、装置間のシステム容量やポンプの性能、送液方式の違いなどにより、意図した結果が得られないことがあります。

ここでは、まずシステム容量の差から生じるグラジエント遅れと分離への影響について説明します。次に、アルキルフェノンやUV吸収剤を試料として、グラジエント遅れの補正によるメソッド移管の例をご紹介します。また、最適なメソッド移管をサポートする当社の一体型LCシステムi-Seriesと、最新のLabSolutions LCに搭載されたACTO（Analytical Condition Transfer and Optimization）機能についてご紹介します。

**Keywords:** HPLC、メソッド移管、ACTO、i-Series

## 1. 背景

医薬品や食品などさまざまな分野において、目的成分やその不純物の分析にはHPLCが広く用いられています。こうした企業では、自身で検討した分析条件や試験法に記載された分析条件をもとにメソッドを作成し、すべての装置について同一メソッドを用いて分析することが多いです。そのような場合、測定ごとの再現性はもちろんのこと、異なる装置間での再現性（互換性）も重要となります。

しかしながら、複数のHPLCシステムを用いて分析をする際には、同一メソッドで分析しているにも関わらず、同じクロマトグラムが得られない場合があります（Fig. 1）。この問題はグラジエントを用いた分析によく見られ、保持時間や分離度などさまざまな結果に影響を与えてしまいます。例えば、既存の分析メソッドを用いて異なる装置で分析した場合、マトリクス由来のピークや不純物ピークとの分離が得られなくなることがあります。こういったケースでは、分離条件を個別の装置ごとに検討する必要が生じることがあり、大変非効率です。このような保持のずれや分離パターンの変化が生じる原因は、システム容量やポンプ性能にあります（詳細は2章で説明します）。特に、超高速分析においてはカラムの内部容量が小さく、わずかなシステム容量の違いであってもずれは大きくなります。

さらに、医薬品や食品の分野などでは試験法が法律などで明確に決められている場合には、分析条件を変更できないこともあるため問題になる場合があります。

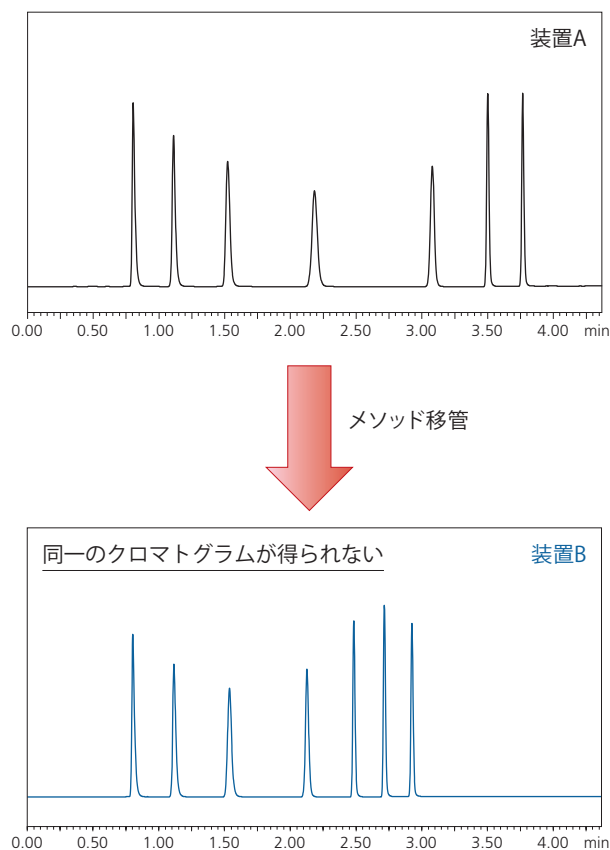


Fig. 1 メソッド移管において生じる問題点

## 2. システム容量とグラジエント遅れ

ある機種から他機種へメソッドを移管する際には、機種間のシステム容量差に注意する必要があります。

Fig. 2は、移動相ボトルからカラムまでの流路図を示しています。グラジエント遅れ容量とは、グラジエント分析において、溶離液が混合される部分からカラムに到達するまでのシステム容量を指します。Fig. 2からわかるように、低圧グラジエントシステムと高圧グラジエントシステムのグラジエント遅れ容量は異なります。また、同じグラジエントシステムであっても、機種間で配管の長さや内径が異なるため、結果としてグラジエント遅れ容量は異なることがあります。

Fig. 3にシステム容量差により生じるグラジエントの違いについて簡単に示しました。通常、メソッド内のタイムプログラムではグラジエントがかかり始めていたとしても、グラジエント遅れ容量の分だけカラムへの移動相組成比の変化の到達は遅れます。システム容量の大きい装置 (Fig. 3右図) では、システム容量が小さい装置 (Fig. 3左図) と比較してグラジエントのかかり始めが遅れます。これにより、装置間で分離パターンが異なる場合があります。

従って、メソッドを他機種に移管する際にはシステム容量差を考慮して、イニシャルホールド時間 (グラジエント開始時間) を調節するためにグラジエントプログラムを変更する必要があります。しかしながら、試験法により分析条件が厳密に定められている場合には、グラジエントプログラムを変更することはできません。

## 3. グラジエント遅れの補正

ここまではメソッド移管の際に生じるクロマトグラムの違いと、その原因について述べてきました。ここからはシステム容量の異なる複数のLCシステムを用いた分析例、メソッド移管例をご紹介します。

### 3-1. アルキルフェノールの分析例

アルキルフェノールは芳香族ケトンであり、逆相クロマトグラフィーで分析できます。ここでは、システム容量の異なる2つのシステムを用いてアルキルフェノールを分析し、分離の違いを確認しました。また、イニシャルホールドの追加によって保持時間のずれを調整しました。

分析結果をFig. 4に掲載しました。まず最初に上の2つのクロマトグラムを見ると、7つのピークのうち後半のピークが大きくなっているのがわかります。この2つのクロマトグラムは同一条件で行った分析であり、異なるのはシステムのみです。ここで、システム1のシステム容量は1155  $\mu\text{L}$ 、システム2のシステム容量は505  $\mu\text{L}$  です。従って、これら2つのシステムには650  $\mu\text{L}$  のシステム容量差があり、これが原因となって分離パターンの違いを生み出していることがわかります。一方、システム2の分析時に、イニシャルホールドを650  $\mu\text{L}$  分追加した結果がFig. 4の一番下のクロマトグラムです。このクロマトグラムがシステム1の結果とほぼ一致していることから、システムが異なる場合でも、システム容量差を補正することで同等の結果が得られることが確認されました。

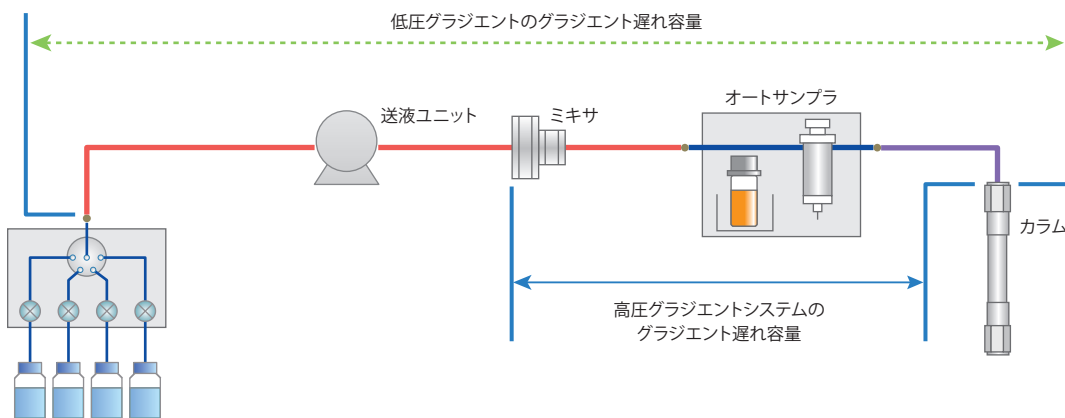


Fig. 2 グラジエント遅れ容量 (システム容量)

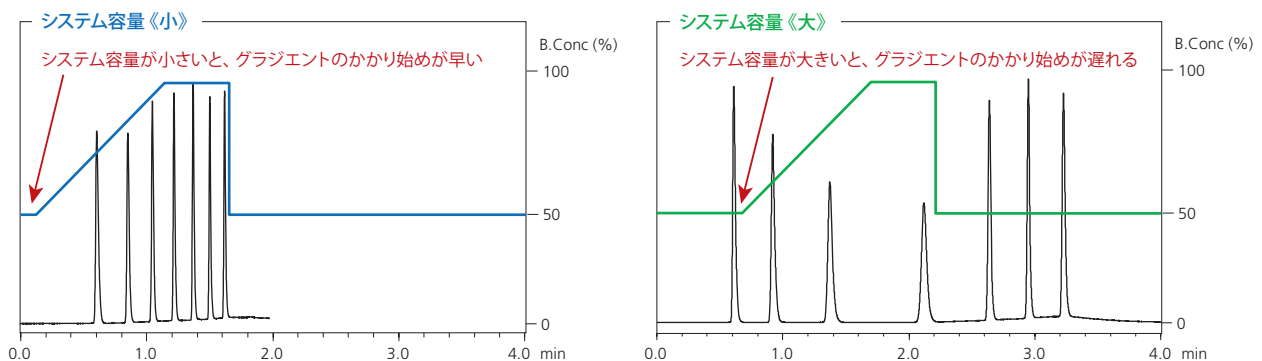


Fig. 3 システム容量とグラジエント遅れ

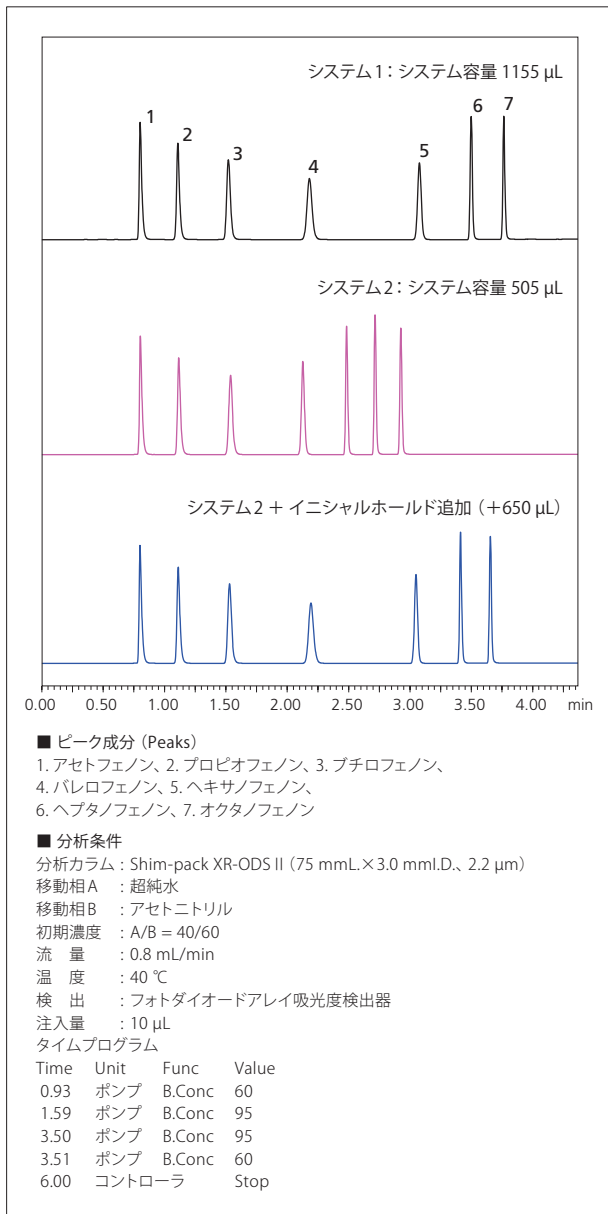


Fig. 4 システム容量差による保持時間の違いと  
イニシャルホールド追加による補正 (アルキルフェノン)

### 3-2. UV吸収剤の分析

ここでは、紫外線吸収剤として知られるサンスクリーン剤を用いて、他社装置から当社装置へのメソッド移管例をご紹介します。

Fig. 5aのクロマトグラムは、サンスクリーン混合試料を当社装置Nexera-i MTと他社装置で分析したものです。この2つの分析は同じメソッドを用いていますが、10分以降のピークが一致していません。これは先ほどの分析と同様に、システム容量が2つの装置間で異なることが原因と考えられます。

当社のワークステーション (LabSolutions) に搭載されているグラジエント開始タイミングの補正機能を用いて、グラジエント開始時間をACTO機能 (後述) によりシステム容量差分だけ調整して行った分析では、Fig. 5bのクロマトグラムおよび表からわかるように、すべてのピークについて保持時間がほぼ同等になりました。

このように、グラジエント開始時間を調整することによって、他社装置との互換を維持することができます。従って、グラジエント開始時間を調整することで、メソッド移管をよりスムーズに実施できることがわかりました。なお、イニシャルホールドの時間を調整することは、USP (米国薬局方) において許容されているので、USPの管理下におけるイニシャルホールドの調整はメソッド変更にあらず、再バリデーションの必要はありません。

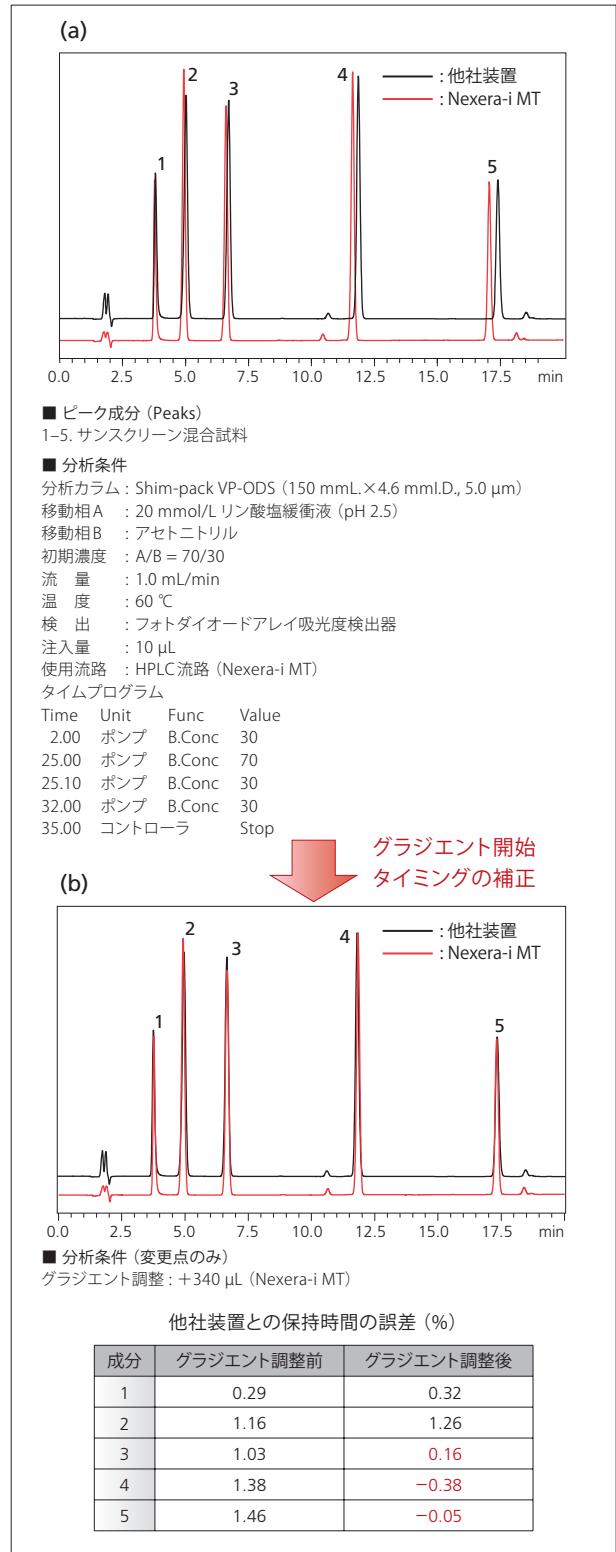


Fig. 5 グラジエント調整によるメソッド移管例  
(サンスクリーン混合試料)

## 4. 一体型液体クロマトグラフ i-Seriesと ACTO機能

ここまで、機種間のシステム容量差に起因する保持時間のずれと、イニシャルホールドの調整（グラジエント開始時間の調整）について例を挙げて説明しました。ここからは、さまざまなメソッド移管をサポートする当社の一体型液体クロマトグラフ「i-Series」と、当社ワークステーション「LabSolutions」に搭載されるACTO機能についてご紹介します。

### 4-1. 一体型液体クロマトグラフ i-Series

i-Seriesは、当社が提供する一体型液体クロマトグラフであり、LC分析に必要なすべての機能をコンパクトな機体に結集し、加えて操作性やメンテナンス性を最適化したシステムです。i-Seriesでは、標準配管またはオプションの互換キットを取り付けることで、他の当社装置や他社装置とシステム容量に互換を持たせることができます。これにより、既存のメソッドを用いた分析において、高い装置間再現性を示します。

また、当社のワークステーションには、次にご紹介するi-Series専用の「ACTO機能」が搭載されており、この機能によってメソッド移管がよりスムーズに行えます。



Fig. 6 一体型LCシステム i-Series (Nexera-i)

### 4-2. ACTO機能

最新のLabSolutionsに搭載されているACTOは、当社が提供するメソッド移行/移管ツールです。ここでは、ACTOの1つの機能である「グラジエント開始時間の調整機能」についてご紹介します。

既存のLCシステムで分析したメソッドを他のシステムに移管して分析する際、システム容量や送液ユニットの性能差により保持時間が合わない場合があります。そのような問題は、ACTOの「グラジエント開始時間の調整機能」を用いることで解決します。グラジエント調整機能はメソッド作成時に設定します。機種間のシステム容量差を入力することで、分析時に自動的にイニシャルホールド時間を容量差の分だけ追加または削除するので、移管前のシステムと同等のクロマトグラムが得られます。また、互換キットでは合わせきれない微妙な誤差（ポンプの性能、送液方式など）を調整することができ、最適な互換性を実現できます。なお、この調整はメソッド内の項目として自動で設定されますが、タイムプログラムとは別の項目なので既存のタイムプログラムを再編集する必要がありません。

従って、当社装置 i-SeriesとACTO機能を使用することで、さまざまな分野において、より効率よく確実なメソッド移管が可能となります。

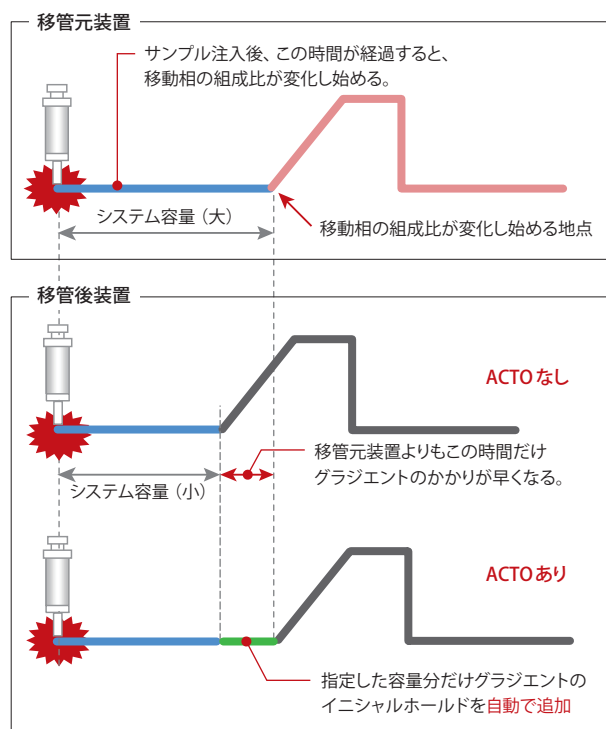


Fig. 7 グラジエント開始時間の調整