

AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化

～機能性成分一斉分析のLCメソッド開発への適用～

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。
- ◆ 異なる茶種や品種間における茶葉中機能性成分（カテキン類、テアフラビン類）の比較と評価が可能です。

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」による介入が必須であり、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、食品中機能性成分であるカテキン類、テアフラビン類、没食子酸の混合標準溶液（15種）をモデルサンプルとし、分析法開発支援ソフトウェア LabSolutions MDに搭載されたAIアルゴリズム（[Technical Report C190-0577](#)）を活用し、グラジエント条件の自動最適化を実施しました。更に、最適化したメソッドを茶葉分析へ適用し、茶種や品種間の比較を行いました。

分析条件及び対象試料

分析条件及び対象試料を表1に示します。茶葉に主に含まれる Epigallocatechin gallate、Epigallocatechin、Epicatechin gallate、Epicatechinを含むカテキン類10種に、テアフラビン類4種、没食子酸の計15成分を測定の対象としました。まず、混合標準溶液（酸化防止剤としてアスコルビン酸とEDTA-2Naをそれぞれ1.76 g/L、1.00 g/Lになるよう添加）を用いてLabSolutions MDによるグラジエント条件の自動最適化を実施しました。その後、最適化されたグラジエント条件を非発酵茶である緑茶4品種および発酵茶である紅茶2品種の計6種の茶葉の分析（茶葉の前処理手順：図1）に適用しました。

表1 分析条件及び対象試料

System : Nexera™ X3	
Sample : Catechin, Theaflavin and Gallic acid (15 compounds)	
C1) Gallocatechin	C8) Epicatechin gallate
C2) Epigallocatechin	C9) Catechin gallate
C3) Catechin	C10) Epicatechin 3-(3"-O-methyl) gallate
C4) Epicatechin	T1) Theaflavin
C5) Epigallocatechin gallate	T2) Theaflavin 3-gallate
C6) Gallocatechin gallate	T3) Theaflavin 3'-gallate
C7) Epigallocatechin 3-(3"-O-methyl)gallate	T4) Theaflavin 3,3'-digallate
	G1) Gallic acid
Mobile phase:	
Pump A : 0.2% phosphoric acid in water	
Pump B : Acetonitrile	
Column : Shim-pack™ GISS C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*1	
*1 P/N : 227-30049-02 (島津GLC 製品番号)	

Analytical conditions :	
B Conc.	: 15%(0 min)→45%(X*2 min) →15%(X~X+5 min) *2 : X = 6, 8, 10, 12, 14 (5 patterns)
Column Temp.	: 55 °C
Flow rate	: 0.6 mL/min
Injection Vol.	: 5.0 μL
Detection	: 242/272 nm (SPD-M40, UHPLC cell)
Parameters for automatic optimization of gradient conditions :	
Criteria of minimum resolution	: 1.5
Gradient mode for optimization	: Linear

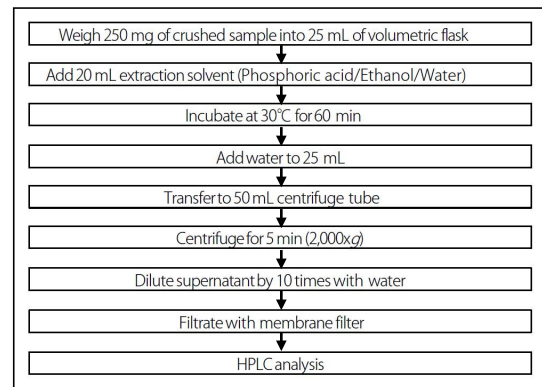


図1 茶葉の前処理手順

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2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、「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。カテキン類、テアフラビン類、没食子酸の混合標準品（計15種）に対し、最小分離度のクライテリアを1.5として、グラジエント条件を自動で探索しました（図3）。

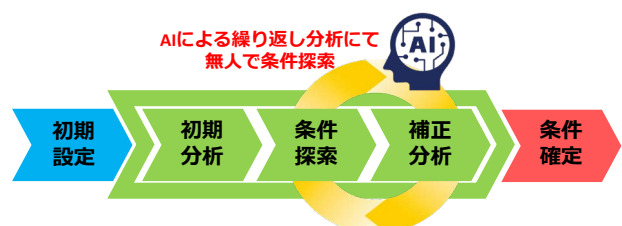


図2 LabSolutions MDのグラジエント条件自動最適化のワークフロー

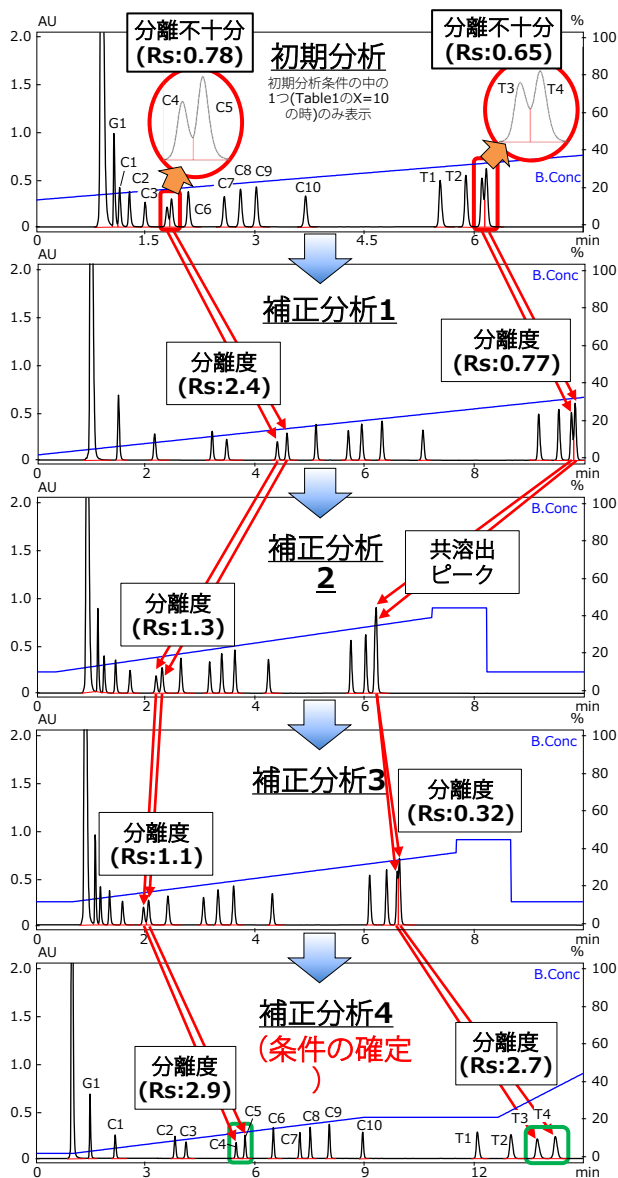


図3 グラジエント条件の自動探索
*図中青線はグラジエント条件

初期分析結果においては、C4及びC5と、T3及びT4の分離が不十分（図3最上部の赤枠内）であることが分かります。AIアルゴリズムによる補正分析の繰り返しにより、最終的にはクライテリア（最小分離度：1.5）を満たすグラジエント条件が自動探索（図3最下部の緑枠内）されました。T3及びT4は9分以降に一定組成（アイソクラティック）の領域を設けることで分離できました。

■ 茶葉分析への適用

最適化されたメソッドを、茶種・品種の異なる6種類の茶葉の抽出液の定量分析に適用しました。代表的な茶葉抽出液のクロマトグラムを図4に、分析対象試料15種の定量値を茶葉中の含有量に換算し比較したグラフを図5に示します。さらに、表2に茶葉抽出液に対して、検量線範囲、寄与率、定量値（緑茶A、紅茶A）、再現性試験結果（緑茶A、紅茶A）を一覧にした結果を示します。

緑茶A~Dからは主要な4種を含むカテキン類が紅茶より多く検出され、いずれの品種においても血糖上昇抑制作用が期待されるEpigallocatechin gallateが最も多い結果となりました。また、緑茶Dからは抗アレルギー作用を有して花粉症を軽減できるとして注目を集めているメチル化カテキン2種が検出されました。一方、紅茶A、Bからはテアフラビン類4種が検出されました。緑茶Dも紅茶Aも品種は“べにふうき”ですが、発酵に伴いカテキン類がテアフラビン類へ変換されたことが、両者の比較により示唆されました。

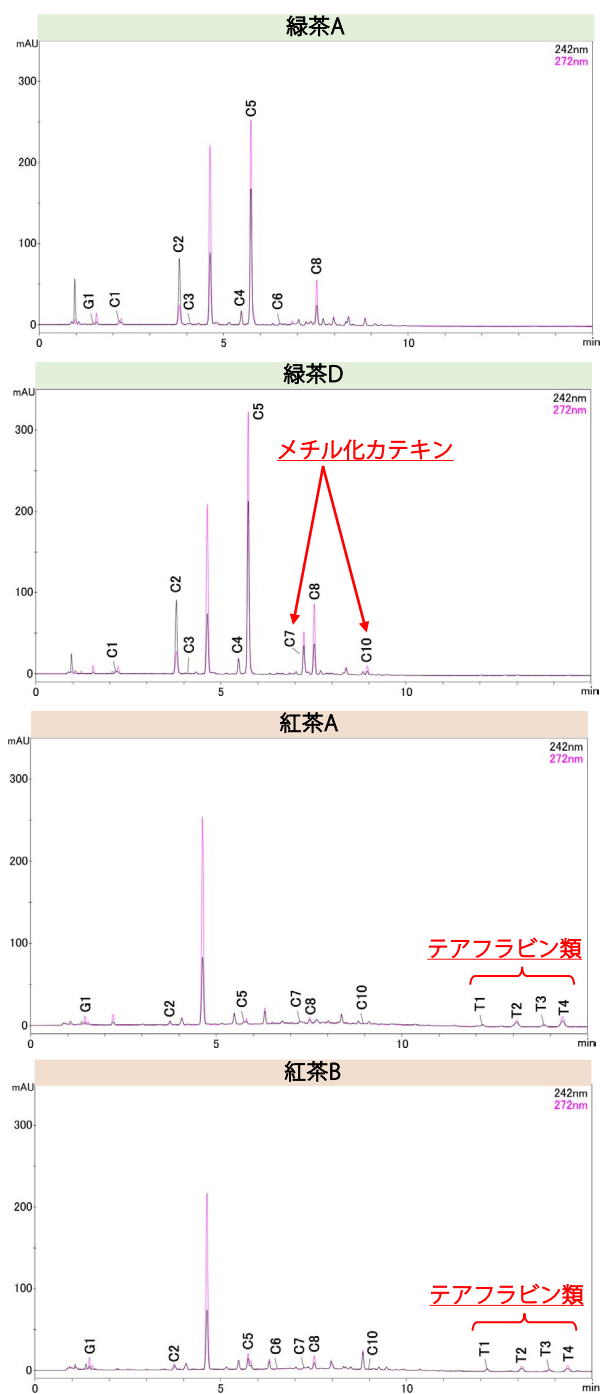


図4 代表的な茶葉抽出液のクロマトグラム

■ まとめ

食品中機能性成分であるカテキン類、テアフラビン類、没食子酸の計15種の混合標準溶液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（最小分離度1.5）を満たすグラジエント条件が自動で探索され、作業の大幅な省力化が可能となりました。さらに、茶葉分析へ最適化されたメソッドを適用し、茶種や品種間の機能性成分含有量の比較を行いました。本メソッドにより、カテキン類やテアフラビン類に関する様々な科学的な考察が可能になると考えられます。

<謝辞>

本研究で使用した茶葉は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構より提供いただきました。また、同研究機構の山本万里先生から多大な助言を賜りました。厚く感謝を申し上げます。

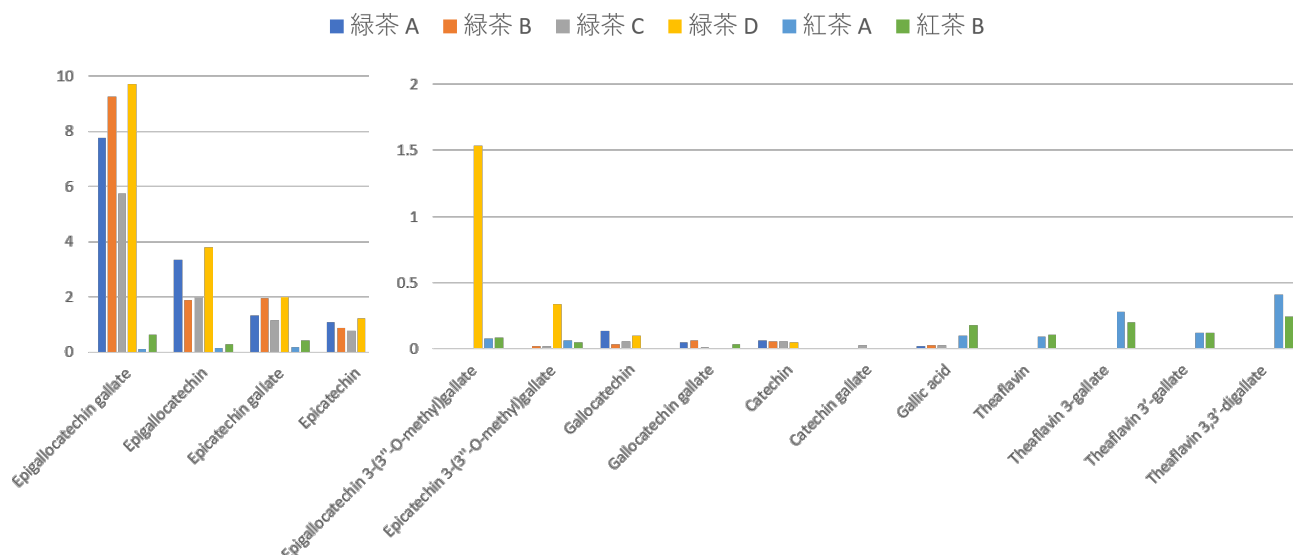


図5 茶葉中のカテキン類及びテアフラビン類 (g/100 g)

表2 検量線範囲、寄与率、定量値 (緑茶A、紅茶A)、再現性試験結果 (緑茶A、紅茶A)

Compound	Conc. Range (mg/L)	寄与率(r^2)	Quantity (g/100 g)		%RSD (n=6)		
			緑茶 A	紅茶 A	緑茶 A	紅茶 A	
C5	Epigallocatechin gallate	1~100	>0.9999	7.74	N.D.*	0.09	-
C2	Epigallocatechin	1~100	>0.9998	3.35	0.16	0.73	0.26
C8	Epicatechin gallate	1~100	>0.9999	1.32	0.18	0.14	0.60
C4	Epicatechin	1~100	>0.9999	1.09	N.D.	0.31	-
C7	Epigallocatechin 3-(3''-O-methyl)gallate	1~100	>0.9999	N.D.	N.D.*	-	-
C10	Epicatechin 3-(3''-O-methyl)gallate	1~100	>0.9999	N.D.	N.D.*	-	-
C1	Gallocatechin	1~100	>0.9998	0.14	N.D.	0.72	-
C6	Gallocatechin gallate	1~100	>0.9999	N.D.*	N.D.	-	-
C3	Catechin	1~100	>0.9999	N.D.*	N.D.	-	-
C9	Catechin gallate	1~100	>0.9999	N.D.	N.D.	-	-
G1	Gallic acid	1~100	>0.9999	N.D.*	0.10	-	1.17
T1	Theaflavin	1~100	>0.9999	N.D.	0.10	-	0.57
T2	Theaflavin 3-gallate	1~100	>0.9999	N.D.	0.28	-	0.57
T3	Theaflavin 3'-gallate	1~100	>0.9999	N.D.	0.12	-	1.53
T4	Theaflavin 3,3'-digallate	1~100	>0.9999	N.D.	0.41	-	0.86

* 0.1 g/100 g 未満

LabSolutions、Nexera、およびShim-pack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/>

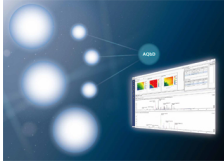
01-00664-JP 初版発行：2023年 11月

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

関連分野

＞ 食品・飲料

＞ 食品の栄養表示・機能性成分表示

＞ 化学

＞ 電気・電子

＞ 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