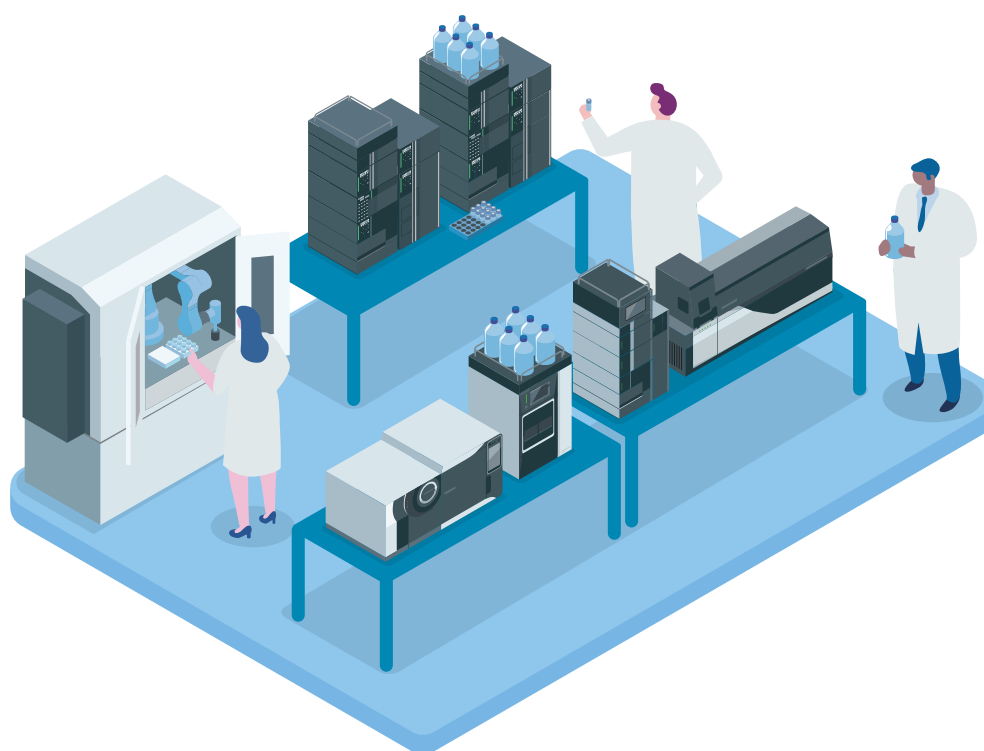


自動化/効率化ソリューション (HPLC、LC-MS)



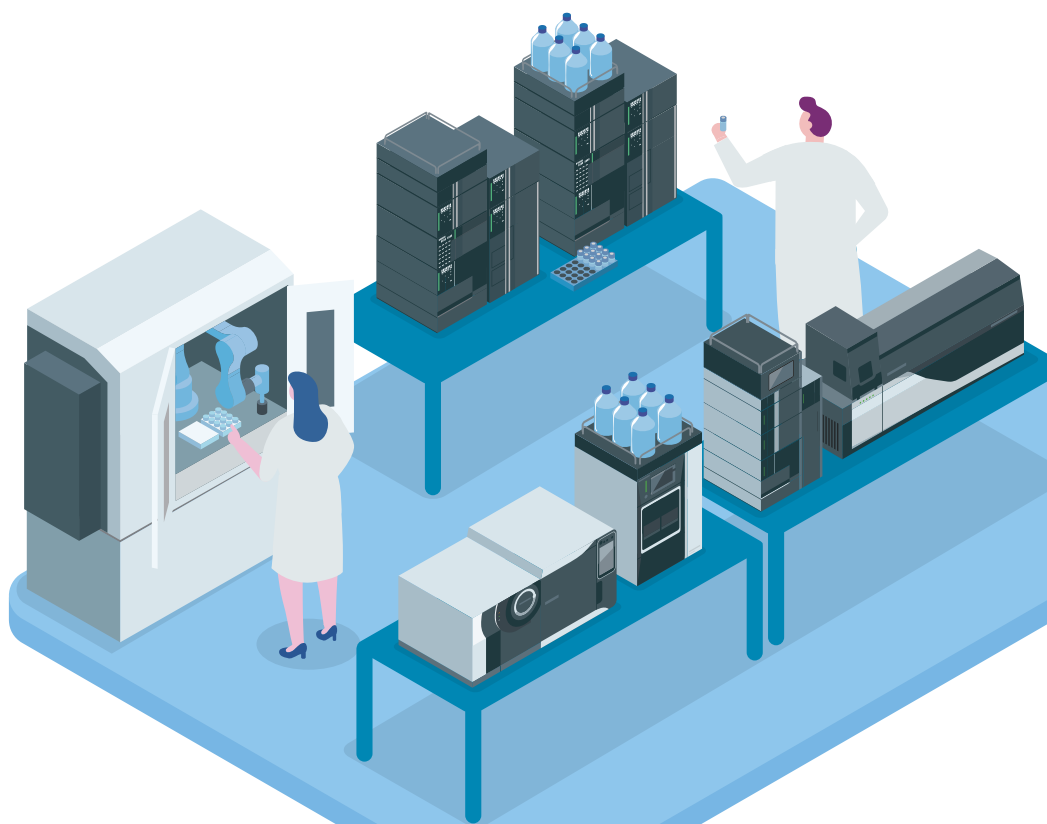
HPLC/LC-MS の分析ワークフロー

AI機能を搭載したロボットがこれからの生活を大きく変えようとしているように、進化を続けている島津製作所のHPLC、LC-MS、解析ソフトウェア、前処理装置 は日々の分析業務のありかたを大きく変えます。

01

試料前処理

抗体の修飾糖鎖解析に必要な前処理を自動化するなど、分析用途に合わせて自動化技術（液体分注、遠心、加温など）を組み合わせ可能です。作業ミスや前処理のバラツキを排除します。



02 装置の立ち上げ/管理

自動スタートアップ、移動相残量のモニター、送液ポンプの自己診断・復帰機能により、装置の立ち上げ/管理を効率化し、ラボ業務の生産性を向上します。

04 定量分析

オートサンプラーに備わる自動希釈機能により、煩雑なピペティング作業が必要だったサンプル希釈と検量線作成を自動化し、分析者の労力を軽減します。



03 メソッド開発

設定したクライテリア（分離度等）を満たすように、移動相・カラムを切換えて、グラジエント条件など各種パラメーターを自動で最適化します。



05

サンプリング

一定時間ごとに試料をサンプリングし、経時的な傾向の変化を確認する合成反応のモニタリングや、製剤溶出試験において、サンプリング及び分析装置への導入をフローバイアルオートサンプラーにより自動化し、負担を軽減します。



06

分取精製

分析スケールでの条件検討を支援する分析スケジュール自動生成機能、条件決定後のスケールアップ支援機能により、分取に不慣れな分析者でも迷いなく分取できるようにサポートします。

目次

試料前処理

抗体糖鎖自動前処理装置MUP-3100	P6
---------------------------	----

装置の立ち上げ/管理

FlowPilot機能による自動スタートアップが推進するワークフローの完全自動化	P8
移動相消費量のリアルタイム測定機能が推進する分析業務効率の最大化	P10
新Nexeraシリーズ送液ポンプの自己診断・自己復帰機能によるラボの生産性向上	P12

メソッド開発 (グラジエント条件)

LCメソッド開発におけるAIアルゴリズムを用いたグラジエント条件の自動最適化	P14
AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化	P16
～機能性成分一斉分析のLCメソッド開発への適用～	
AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化	P19
～合成ペプチドの不純物分析への適用～	
AIアルゴリズムによるグラジエント条件の自動最適化	P21
～不純物分析への適用～	

メソッド開発 (AQbD)

Analytical Quality by Designアプローチに基づく頑健な分析法開発の効率化	P23
医薬品の頑健な類縁物質試験法開発の効率化	P27
合成ペプチドの類縁物質試験法開発の効率化	P29

定量分析

オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡単操作による検量線作成の省力化	P34
オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡単操作による検量線作成の省力化 (2)	P37

サンプリング

Nexera FVを用いたフロー合成反応のオンラインモニタリング	P40
ロキソプロフェンナトリウム錠のオンライン溶出試験	P42

分取精製

一連の分取精製ワークフローを効率化する分析分取LC-MSシステム	P44
Nexera ASAPrepによる分取精製業務の効率化支援	P47

糖鎖自動前処理装置MUP-3100を用いた 培養上清中抗体のN-結合型糖鎖プロファイリング

岡嶋 麻友、中家 修一、西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ 培養上清と専用試薬キットをセットするだけで、抗体の精製から糖鎖の切り出し、蛍光標識まで全自動で行えます。
- ◆ 作業者をルーチンワークから解放するだけでなく、夜間に自動で前処理することも可能です。
- ◆ バリデートされた手法をさらに自動化することでラボの生産性を高めます。

■はじめに

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は、遺伝子組み換え技術や細胞培養技術を用いて製造され、生体由来ペプチドやタンパク質などを有効成分とする医薬品です。バイオ医薬品は、近年、医療用医薬品や診断薬として多くの企業で研究開発が進められています。

抗体医薬品中の抗体は翻訳後修飾によって付加されるN-結合型糖鎖を有しており、医薬品の安全性・有効性に影響を与えていると考えられているため、重要な品質特性に位置付けられています。また、製造に用いる細胞株や培養条件のわずかな変化によって糖鎖構造の不均一性が生じるため、抗体に付加している糖鎖は製造工程において厳しく管理されています。

糖鎖の特性解析は、構造上の特徴や安全性、有効性への影響を考慮し、目的に合った分析方法を選択することが重要です。

特性解析のひとつとして糖鎖プロファイル法があります。この方法は、酵素などを用いて抗体から遊離した糖鎖を蛍光標識したのち、HPLCやLC/MSなどによって分析する方法です。培養上清であれば抗体の精製も必要です。この抗体の精製、糖鎖の遊離、蛍光標識化には煩雑な操作が必要で、手技で行うと2日以上を要する場合があります、属人化の要因となっています。

本アプリケーションニュースでは、抗体糖鎖自動前処理装置MUP-3100（図1）を用いて、培養日数が異なるトラスズマブ培養液上清を前処理し、HPLCにて抗体上のN-結合型糖鎖のプロファイル確認を行った事例を紹介いたします。

■MUP-3100とは

抗体糖鎖自動前処理装置MUP-3100は、専用消耗品である“Auto-EZGlyco mAb-N Kit for SHIMADZU”と細胞培養上清などのサンプルを所定位置にセットし、コントロールソフトウェアから「Run」ボタンをクリックするだけで、抗体の精製から標識糖鎖調製までの工程を確実に迅速に全自動で実施できます。抗体のN-結合型糖鎖に対応し、最大24サンプルを6時間で処理できます。

MUP-3100は、以下の様々な機能を備え、安定稼働をサポートします。

- ✓ 画像処理による自動運転前の試薬類の設置確認
- ✓ センサーによるピペットチップの脱着確認
- ✓ トラブル発生時の動画保存
- ✓ 前処理レポートの自動生成

MUP-3100の詳細は、カタログ(C190-0573)をご参照ください。



図1 抗体糖鎖自動前処理装置“MUP-3100”の外観と自動前処理フローの概要

■ 培養上清中抗体糖鎖分析

培養液

トラスツマブ産生細胞（CHO-MK）株を培養し、培養日数3日目、4日目、5日目、7日目でサンプリングした培養上清を用いました。

試料の調製

MUP-3100に使用する抗体濃度は20-80 µg/1200 µLの範囲になるように培養上清を希釈しました。希釈液はAuto-EZGlyco mAb-N Kit for SHIMADZUの抗体捕捉溶液を用いました。

LC分析

MUP-3100で処理して得られた糖鎖試料を表1の条件にて分析しました。糖鎖は2-AB(2-アミノベンズアミド)標識されているため、検出には蛍光検出器を用いました。



表1 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ GIST-HP Amide [Metal free] (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm) ^{*1}
Mobile phases	: A) 100 mM Ammonium formate (pH4.4) : B) Acetonitrile
Time program	: B Conc. 77.5% (0 min)→68.5% (50 min)→50% (50.01-55 min)→77.5% (55.01-62 min)
Column temp.	: 40 °C
Flow rate	: 0.5 mL/min
Injection Volume	: 1 µL
Detection	: Fluorescence(Ex. 330 nm, Em. 420 nm) (using RF-20Axs, semi-microcell)
Vial	: TORAST PP Vial screw ^{*2}

*1 P/N: 227-30951-02

*2 P/N: 370-04050-01

培養上清サンプルのうち、培養3日目のサンプルを分析した際のクロマトグラムを図2に示します。検出されたピークの糖鎖構造は標準品との保持時間の一致、またはLC/MS分析によって確認しました。

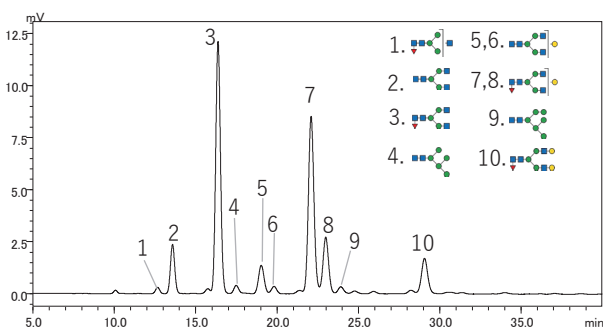


図2 トラスツマブ産生細胞の培養上清に含まれる抗体上のN-結合型糖鎖のクロマトグラム

● Mannose ▲ Fucose ● Galactose ■ N-Acetylglucosamine

前処理再現性

培養3日目のサンプル1Lotから6サンプル分をMUP-3100で前処理し、HPLCにて得られた各ピーク面積値を用いて前処理の再現性を評価しました。メジャー糖鎖のRSDは5%以下、マイナー糖鎖のRSDでも8%以下と良好な前処理再現性が確認できました（表2）。

表2 培養上清サンプルの前処理再現性
(糖鎖ピーク10個の面積値n=6回分の%RSD)

Peak No.	面積値平均	面積値%RSD	Peak No.	面積値平均	面積値%RSD
1	5193	7.11	6	8062	4.20
2	43765	4.27	7	201774	4.21
3	236938	4.16	8	65241	4.11
4	7414	7.48	9	7947	7.79
5	32348	4.97	10	44387	4.58

■ 培養日数による糖鎖プロファイル変化

培養日数3日目から7日目の糖鎖クロマトグラムを図3に、培養日数毎の糖鎖ピーク10個の面積値の総和に対する各糖鎖ピークの面積値比率の変化を図4に示します。培養日数3日目から5日目にかけて、複合型糖鎖においては非ガラクトシル化糖鎖であるNo.3の比率が増加している一方で、ガラクトシル化糖鎖や、非フコシル化糖鎖であるNo.2の比率が減少していることが分かりました。さらに、培養5日目から7日目にかけては、ハイマンノース型糖鎖であるNo.4とNo.9の糖鎖の比率が増加していることが確認できました。

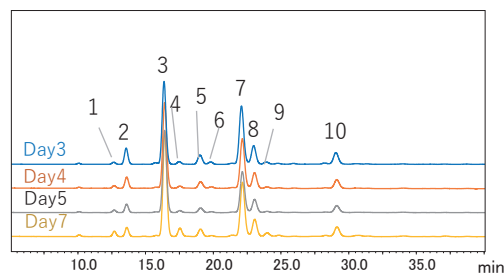


図3 培養経過日数ごとのクロマトグラム

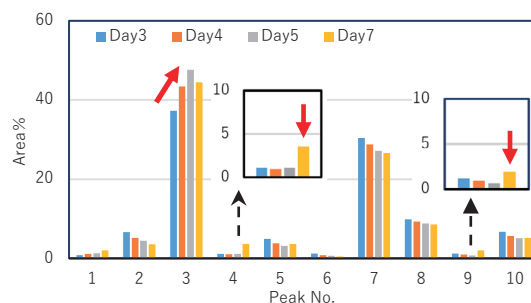


図4 培養経過日数ごとの糖鎖プロファイルの比較

■ まとめ

抗体産生細胞の培養上清24サンプルをMUP-3100により6時間で前処理し、得られたN-結合型糖鎖をNexeraにて分析した結果、培養日数の経過に伴い糖鎖プロファイルが変化することが確認できました。MUP-3100は手作業による前処理と比較して効率的なワークフローを実現し、抗体医薬品の製造プロセス開発を支援します。

<謝辞>

トラスツマブ産生細胞CHO-MK株は次世代バイオ医薬品製造技術研究組合よりご提供頂きました。本研究は、AMEDの課題番号(JP21ae0121014、JP18ae0101057)の支援を受けました。

LCMS、Nexera、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。

01-00811-JP

初版発行：2024年10月



Technical Report

FlowPilot 機能による自動スタートアップが推進するワークフローの完全自動化

Fully automated workflow for HPLC analysis using automatic startup with FlowPilot function

木原 隆幸¹、Davide Vecchietti¹

Abstract:

熟練の分析技術者は信頼性の高いデータを取得するために、分析システムを常に高いパフォーマンスで稼働し、これを維持するための知識と技術を有しています。分析の自動化と省力化が進む一方で、この点は未だにユーザーの技量に任されてきました。本レポートでは熟練分析技術者の技術を模して開発したFlowPilot機能による自動スタートアップからシステム適合性テスト (System Suitability Test : SST)、分析、シャットダウンまでの一連の分析ワークフローを完全自動化した事例についてご紹介します。

Keywords: 自動スタートアップ、FlowPilot 機能

1. 分析ワークフローの自動化

Nexera™シリーズは、分析ワークフロー全体のルーチン操作の自動化を実現するために自動スタートアップ、自動システム適合性試験 (System Suitability Test : SST)、自動シャットダウンなどの機能を備えています。

自動スタートアップには、FlowPilot 機能 (2 章) が含まれおり、この機能を用いることで、システムの自動起動からカラムオープン後の安定化、カラム温度と連動したウォームアップを行い、システムを分析可能な状態にすることが可能です。また、スタートアップを行う時間を設定することが可能なため、オペレータの予定に合わせて装置を起動することができます。また、自動 SST を用いることで、起動後に自動でシステムの評価を行うことも可能です (4 章)。シャットダウンでは分析終了後、自動でシステム全体を電源オフにし、省電力モードに切り替えることができます。

これらの機能を組み合わせることにより、分析ワークフロー全体 (シャットダウン→スタートアップ→SST→分析→結果レポート→シャットダウン) を完全に自動化することができます (Fig. 1)。

2. FlowPilot機能について

カラムが設定温度まで上昇する前に設定流量で移動相を送液することで、カラムに過度な圧力がかかります。この急激な圧力上昇によりカラム内に空隙を生じることがあり、カラムの寿命短縮、カラムの劣化を引き起こし、分析結果に影響を与える恐れがあります。この現象を回避するため、熟練のオペレータはカラムオープン温度に合わせて徐々に移動相流量を設定値まで上昇させます。

Nexera シリーズの送液ユニットは、オープン温度に合わせて流量を上げる FlowPilot 機能を搭載しており、上記のように従来は熟練技術者が手動で行っていた流量制御を自動で行うことができます (Fig. 2)。

FlowPilot の動作

- ① 設定流量の半分まで徐々に流量を上げる。
- ② カラムオープンが設定温度に達するまで、半分の流量を維持する。
- ③ オープン温度が設定値に達すると、メソッド設定値まで徐々に流量を上げる。

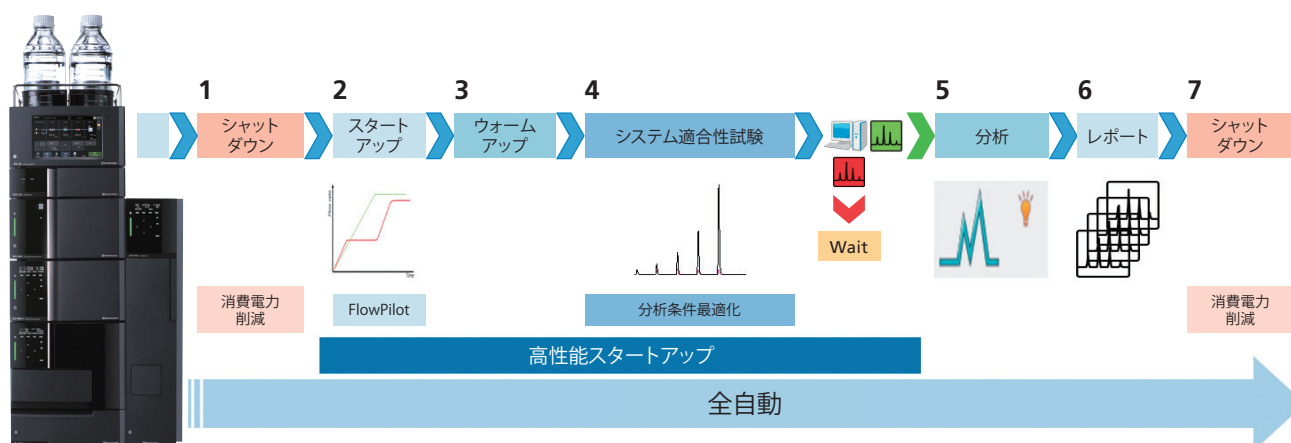


Fig. 1 Nexera システムの完全自動化されたワークフロー

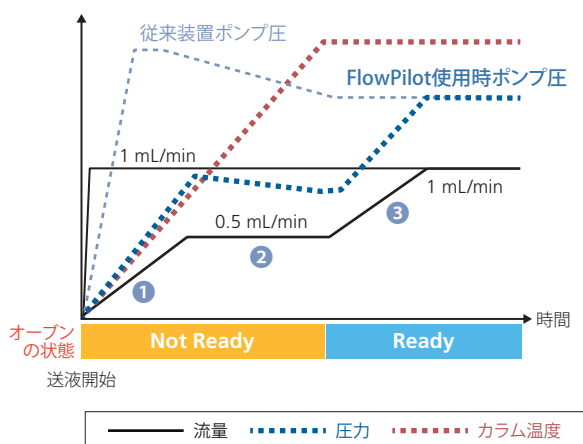


Fig. 2 FlowPilot 機能を用いたスタートアップの流量、カラムオープン温度、圧力変化のプロファイル

3. システム適合性試験 (SST)

SSTは、目的の分析を開始する前に「装置、分析操作および分析試料が目的のサンプルを正確に分析するのに適していることを確認する」ために実施する試験です。

SSTは、各局方試験や規制関連の試験では必須とされています。多くの場合、ピークの分離度や形状などを評価し、SSTの合格判定とします。そのためLCシステムには、分析の実行から結果の評価と合格判定までを、自動で速やかに行うことが求められます。

4. 全自動SST

LabSolutions™では、SST用の分析/解析パラメータをメソッドファイルに保存します。ユーザーは、分析メソッドを作成する際に、SST用のパラメータ設定（例えば、理論段数、シンメトリ係数、分離度、保持係数k）を合わせて設定することにより、バッチファイルを作成する際、任意のタイミングにSSTを挿入することが可能になります（Fig. 3）。例えば、バッチ開始時や何行目の分析後、終了時など必要なタイミングに挿入できます。

SSTの分析が完了した後、設定した合格基準に応じて「合格」または「不合格」が判定され、ユーザーの設定に合わせて結果に応じた動作が実行されます（Fig. 4）。

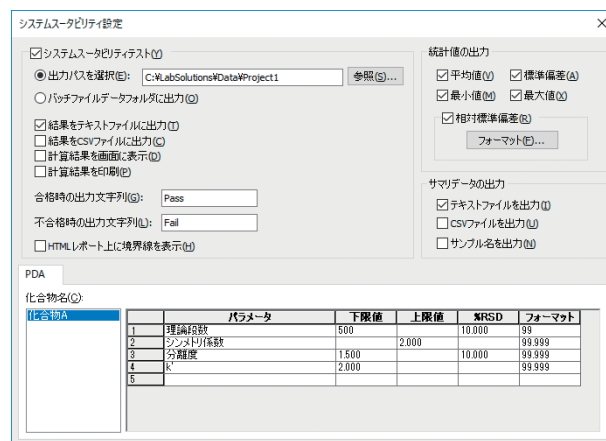


Fig. 3 SSTでの管理基準の設定例

Fig. 4は、4つの検量点と7つの未知試料を分析する際のバッチ例を示しています。このバッチファイルでは、スタートアップ後にSST試料を分析し、「合格」判定の場合は目的サンプル（検量線用サンプルおよび実試料）の分析を行います（Fig. 4, 5行目）。その後、連続分析終了時にシャットダウン機能を用いることで、標準試料やサンプルの分析終了後に自動で装置電源を切る（省電力状態）にすることができます。また、分析終了時に定量結果などのレポートを自動で出力することもできます。

SSTの結果が「不合格」判定の場合は、ブランクが注入され、SSTが再度実行されます（Fig. 4, 2, 3行目）。そして、再度「不合格」判定が出た場合には連続分析を中断し、装置は自動的に「待機」状態に切り替わります。

分析	バイアル番号	注入量	サンプル名	メソッドファイル	データファイル	レポート出力	システムステータス	アクション
1	1	5	SSTサンプル	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
2	2	5	Blank	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
3	3	5	SSTサンプル	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
4	4	5	Blank	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
5	5	5	標準試料001	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
6	6	5	標準試料002	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
7	7	5	標準試料003	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
8	8	5	標準試料004	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
9	9	5	標準試料005	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
10	10	5	標準試料006	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
11	11	5	標準試料007	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
12	12	5	標準試料008	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
13	13	5	標準試料009	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4
14	14	5	Blank	1-Water_KK.kcm	ファイル名生成	なし	開始	システムステータス-合格-Order 4

Fig. 4 バッチ分析作成時のシステム適合性試験設定

5. 結論

- スタートアップ機能とFlowPilot機能の組み合わせによって、分析前に行われるシステムのスタートアップやウォームアップのようなルーチン作業を自動化することができます。
- 自動SST機能を使用してルーチン分析時の妥当性評価を完全自動化することで、作業時間を短縮し、より信頼性の高い分析結果が得られます。
- サンプルの分析終了後にシャットダウン機能を用いることで、一連の分析ワークフローを完全自動化することができます。

Technical Report

移動相消費量のリアルタイム測定機能が推進する分析業務効率の最大化

Maximizing analytical efficiency with real-time measurement of mobile phase consumption

吉野 早紀¹、Davide Vecchietti¹

Abstract:

高速液体クロマトグラフの分析において、移動相量や種別の管理は重要です。分析中の移動相の枯渇は分析の失敗だけでなく、時には高価な分析カラムの破損を引き起こすこともあります。これを防ぐためには、分析開始前にあらかじめ必要な移動相量を見積り、十分な量を設置せねばなりません。特にグラジエント送液ではこの見積計算は面倒な作業です。また、計算ミスなどで分析中に移動相が枯渇してしまう可能性はゼロではありません。しかしながら、連続分析中に移動相残量の確認のため、何度もラボを訪れるのは作業効率の面で適切ではありません。

本レポートでは、移動相モニター MPM-40による移動相残量のリアルタイム測定や、スマートデバイスによる移動相残量の確認、さらに、LabSolutions™ソフトウェアと連動した自動動作による分析業務の効率化についてご紹介します。

Keywords: 移動相モニタリング、リアルタイム重量測定

1. 移動相モニター MPM-40

MPM-40は、島津製作所が開発した移動相の重量を測定するセンサーを搭載したユニットです (Fig. 1)。この技術が消費量から逆算した残量予測値ではなく、実際の移動相量のリアルタイム表示を可能にしました。

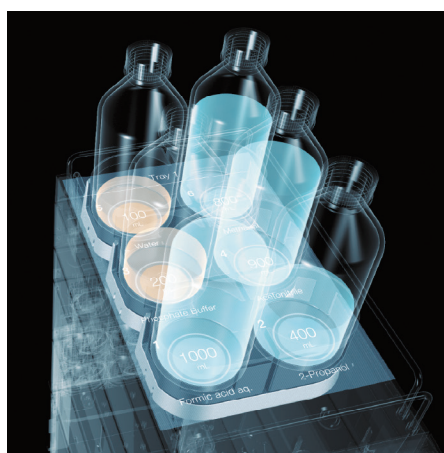


Fig. 1 MPM-40を搭載した新Nexeraシステム

このユニットは、移動相の重量を常に測定し、ワークステーションであるLabSolutionsやスマートデバイスとリアルタイムで情報を交換します。分析開始前には、一連の分析に必要な移動相量を自動で計算し、現在の移動相量と照合し、不足する場合にはアラートを表示します。移動相量は専用アプリケーションを通じてPCやスマートデバイスで確認でき、さらに移動相量がある一定のレベルを下回ると、警告やエラーを発したり自動で分析を停止することが可能です。これによって、連続分析中の移動相枯渇によるデータの損失を防ぐことができ、分析業務の効率化が図れます。

また、MPM-40は新Nexera™シリーズ以外のLCシステムにも搭載可能です。(LabSolutions以外のワークステーションをご使用の場合、消費量予測と照合など一部の機能は使用できません。)

2. 分析業務の効率化

LCシステムに接続したMPM-40は、同時に最大12個の移動相容器の重量をモニターし、LANネットワークを通じてPC、スマートデバイスやHPLC用ワークステーションを通じて、あらゆる場所や状況から移動相残量を確認することができます (Fig. 2)。MPMChecker™は、PCやスマートデバイスから移動相残量を常に確認する専用ソフトウェア/アプリケーションです。他にも、移動相モニターのパラメータ設定 (校正、アラートレベル設定、警告レベル設定など) が可能です。

また、この移動相モニタリング技術とSHIMADZU LabTotal™ Smart Service Net Asset Agentを連動させれば、移動相消費量から装置稼働状況をトラッキングすることができます。効率的なラボ内の資産運用のサポートにもお役立ていただけます。

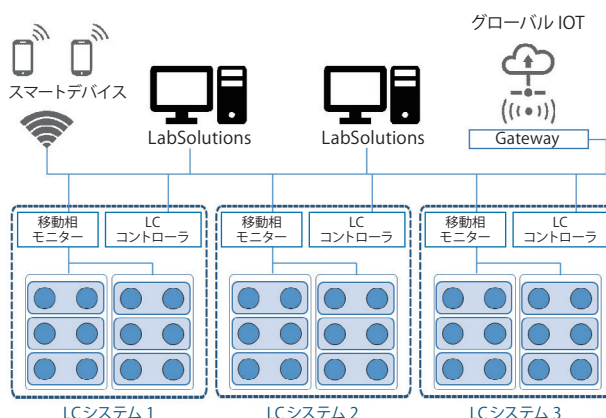


Fig. 2 ラボ内の複数システムと移動相モニター情報の統合

3. 移動相モニターの使用法

使用前に重量センサーの校正を行います。校正操作は、空のボトルの重量を測定し、次に溶液の入ったボトルを測定するだけです。ソフトウェアにウィザードが表示されるため、簡単に校正作業を進めることが可能です (Fig. 3)。また、校正の際に使用する移動相の種類や、使用する流路、警告を出す残量も設定できます (Fig. 4)。

LabSolutionsから分析を開始する際には、移動相の消費量を分析条件と分析回数から自動で計算し、移動相が不足すると計算された場合には警告を表示します (Fig. 5)。

移動相やリンス液など、すべての溶液の残量を移動相モニターでモニタリングすることによって、分析に使用するすべての溶液の消費量を管理し、溶液枯渇のリスクを排除して、分析業務の効率を向上させます。

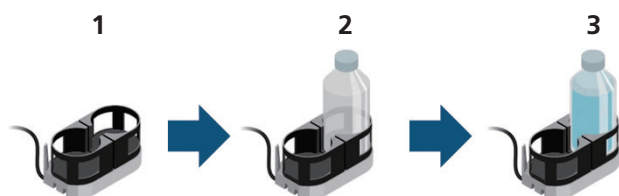


Fig. 3 重量センサーの校正方法



Fig. 4 移動相モニターのパラメータカスタマイズ画面

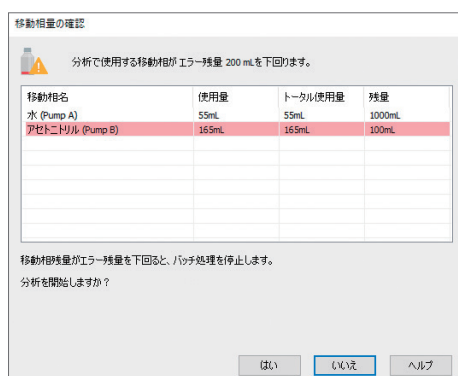


Fig. 5 分析開始前の警告表示例

4. リアルタイムモニタリング

分析中はMPMCheckerやLabSolutionsを用いて、スマートデバイスやPCから移動相消費量をリアルタイムで確認することができます。特に、スマートデバイスではワイヤレス設定を行うことで、ラボ外からでも移動相残量を確認することができ、また万が一の不足時には通知が送信され、わざわざラボへ残量を確認しに行く必要がなくなります (Fig. 6)。



Fig. 6 移動相モニタリング画面

5. 結論

- 移動相モニター MPM-40と専用ソフトウェア/アプリケーション MPMCheckerは、移動相の重量をモニターすることで実際の移動相残量をリアルタイムで表示し、PCやスマートデバイスに表示します。
- LabSolutionsと組み合わせれば分析開始前に移動相残量と今後の分析に必要な移動相量を自動で比較し、不足する場合にはアラートを出して分析の中断を事前に防ぎます。
- MPM-40はLCシステムを選ばず使用することができます。(LabSolutions以外のワークステーションをご使用の場合、消費量予測と照合など一部の機能は使用できません。)
- 移動相モニターによる移動相枯渇のリスクの排除により、分析中断を防いでラボ業務の一層の生産性向上に貢献します。

Technical Report

新Nexeraシリーズ送液ポンプの自己診断・自己復帰機能によるラボの生産性向上

Use of solvent delivery unit equipped with auto-diagnostics and auto-recovery functions to enhance lab productivity

五味 朋寛¹、Davide Vecchietti¹

Abstract:

昨今の分析ラボでは、生産性向上や分析業務の効率化を目的として、分析時間の短縮や定期的なメンテナンスによるシステム稼働率の向上が図られています。しかし、予測不能なトラブルによる分析業務の中断は、今なお解決すべき課題です。液体クロマトグラフ流路内でごく稀に発生する気泡は、圧力変動による保持時間の再現性不良やベースラインのうねり、ピーク形状の崩れなどさまざまな問題を引き起こす厄介なトラブルとして知られています。

本レポートでは、新Nexera™シリーズの送液ポンプに搭載した自己診断と自己復帰機能により、流路内で発生した気泡を自動で検知し、システムを正常な状態に復帰させるまでの流れについて解説します。気泡トラブルによる分析のやり直しを含めたシステムのダウンタイムを最小化し、ラボの生産性効率向上に貢献します。

Keywords: 自己診断、自己復帰、Nexera 送液ポンプ

1. 流路内の気泡形成

液体に溶解可能な気体の最大量は、温度や圧力、溶液の種類によって異なります（引用文献参照）。そのため、溶液組成や温度、圧力など溶液の状態変化によって、溶解する気体の飽和量が増減し、気体が溶解している量がその飽和量を超えたとき、気泡が発生します。

HPLC/UHPLCでも流路内に気泡が発生することが稀にあり、これが送液ポンプの内部に達すると送液不良を引き起こし、保持時間や面積値の変動やベースラインの不安定化、ピーク形状の崩れなどを誘引します。これらの現象は、分析対象成分の同定や定量、検出限界近くの対象成分の検出を困難にするなど分析結果に大きな影響を与え、正確なデータ採取を阻害します。

2. 自己診断・自己復帰機能

分析中に流路内に気泡が発生する理由として、移動相への界面活性剤の添加や室温の急激な変動などが考えられます。流路内に気泡が発生したときには、オペレータ自ら手動で進行中の分析を停止させ流路をパージするなどの対策を行う必要があります。そのため、装置の無人運転中に流路内に気泡が発生すると、正常なデータが得られず結果を正しく解析できなくなり、同じサンプルを再度分析する必要が生じます。

新Nexeraシリーズの送液ポンプに搭載した自己診断・自己復帰機能は、流路内に発生した気泡による異常な圧力変動を自動で検知し、ポンプのパージを行ってシステムを正常な状態に戻します（Fig. 2）。

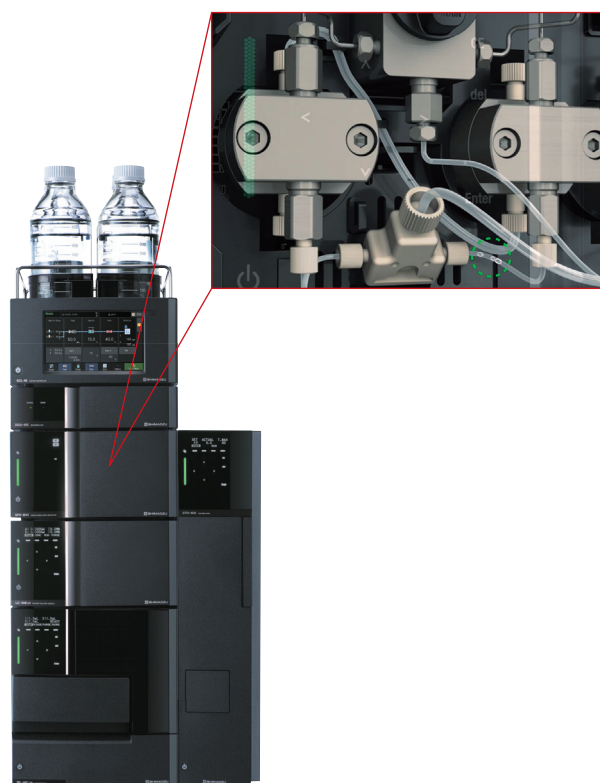


Fig. 1 Nexera送液ユニットの流路図

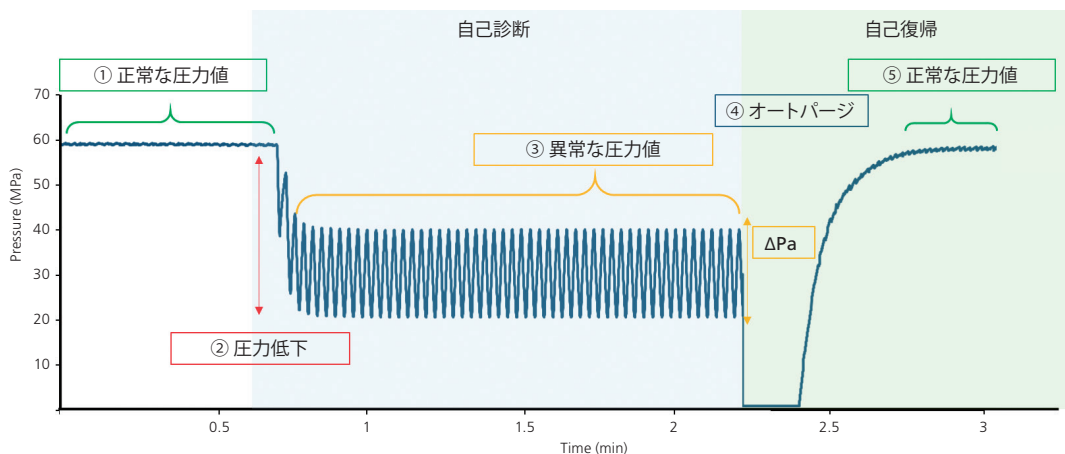


Fig. 2 自己診断・自己復帰機能のスキーム

3. 自己診断・自動復帰の動作

自己診断・自己復帰は以下のように行われます。

気泡がポンプ内に混入すると圧力低下が生じ (Fig. 2、②)、その後、異常な圧力変動が継続します (Fig. 2、③)。自己診断機能では、このときの圧力変動値 (ΔPa) が基準値と異なることを検知して、異常が発生していると認識して、自己復帰機能を開始します。

自己復帰機能が開始されると、進行中の分析後、自動でパージ動作が行われ、流路から気泡を取り除きます (Fig. 2、④)。その後、残留物を除くためカラムを洗浄し、再度サンプル注入せずメソッド条件で一度分析を行い、そのときの圧力変動を基準値と比較します (Fig. 2、⑤)。その圧力変動値が基準値と同等であれば、システムが正常になったと判断し、停止した分析を再度行い連続分析を再開します。なお、自己復帰後、中断した分析を再度実行するか、これをせずバッチの次の行から開始するかは、ソフトウェアで選択することができます。

4. 設定方法

自己診断・自己復帰機能の動作は、LabSolutions™で簡単に設定できます。まず、システムが圧力異常を検知した場合に、以下のどのような動作を行うのかを選択します。

- 自己復帰する：オートパージが実行されます。
- そのまま分析を継続する：何も実行されません。
- バッチ分析を中止する：分析は停止し、システムは待機状態になります。

その上で、自己復帰の際のパージ時間、リトライ回数や復帰後の動作など、自由にカスタマイズすることが可能です (Fig. 3)。

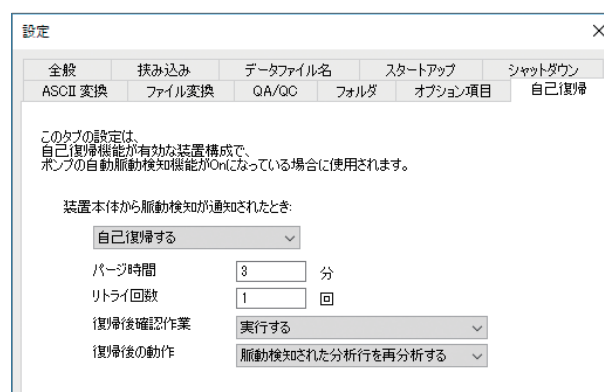


Fig. 3 LabSolutions 自動復帰の設定ウィンドウ

5. 結論

- 自己診断・自己復帰機能は、新Nexeraシリーズの送液ユニットで使用でき、LabSolutionsで機能をカスタマイズすることができます。
- 両機能は完全自動で行われ、手動操作を一切必要としないため、無人分析による分析業務全体の効率を向上します。

引用文献

- ・ S.R. Bakalyar, M.P.T Bradley, and R. Honganen, J. Chromatogr., 158, 277-293 (1978)
- ・ 化学便覧 基礎編Ⅱ 8.7溶解度, 日本化学会編 丸善出版株式会社 (1984)

Technical Report

LCメソッド開発におけるAIアルゴリズムを用いたグラジエント条件の自動最適化

Automated Gradient Optimization based on AI Algorithm for LC Method Development

藤崎 真一¹

Abstract:

メソッド開発におけるグラジエント最適化では、網羅的な検討のため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く最適条件の検討には「人」の介入が必要です。分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions™ MDはグラジエント条件の自動最適化のための独自のAIアルゴリズムを搭載しており、分離度のクライテリアを設定することで、これを満たすグラジエント条件を自動で探索します。本稿では、カテキン類、テアフラビン類、没食子酸の混合品（15種）をモデルサンプルとし、LabSolutions MDによりグラジエント条件最適化のワークフローを自動化した事例を紹介します。

Keywords: メソッド開発、分析法開発、AI、自動、LabSolutions MD

1. 背景

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。言い換えると、通常のメソッド開発においては「人」による介入が必要なため、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。LabSolutions MDはグラジエント条件の自動最適化のための独自の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」及び「改良された条件での分析」を繰り返すことで、条件を自動で最適化します。そのため、移動相やカラムの設置及び初期分析条件の設定といった「準備」と最終結果の確認だけで途中の「人」の介入をなくして、グラジエント条件の探索を可能とします。

2. LabSolutions MDによるグラジエント条件の自動最適化

メソッド開発のグラジエント条件の最適化において、通常のワークフロー及びLabSolutions MDのAIアルゴリズムを用いたワークフローの比較をFig.1に示しました。LabSolutions MDによるグラジエント条件の最適化ワークフローは下記3つのフェーズから成ります。

- 1) 初期設定 (Fig.1の①)
- 2) AIによるグラジエント条件の探索 (Fig.1の②)
- 3) 条件確定 (Fig.1の③)

「初期設定」フェーズでは、初期分析条件（複数のグラジエント条件）及び分離度のクライテリアの設定を行います (Fig.2及びFig.3)。「AIによるグラジエント条件の探索」フェーズでは、初期分析の結果に基づき、より高い分離が得られる条件の探索及び補正分析が実行されます (Fig.1②の条件探索及び補正分析)。この条件探索及び補正分析によるグラジエント条件の探索は、「初期設定」フェーズで設定した分離度のクライテリアが満たされるまで、自動継続されます。「条件確定」フェーズでは、AIにより探索されたグラジエント条件の確認を行い、最終条件を確定します。

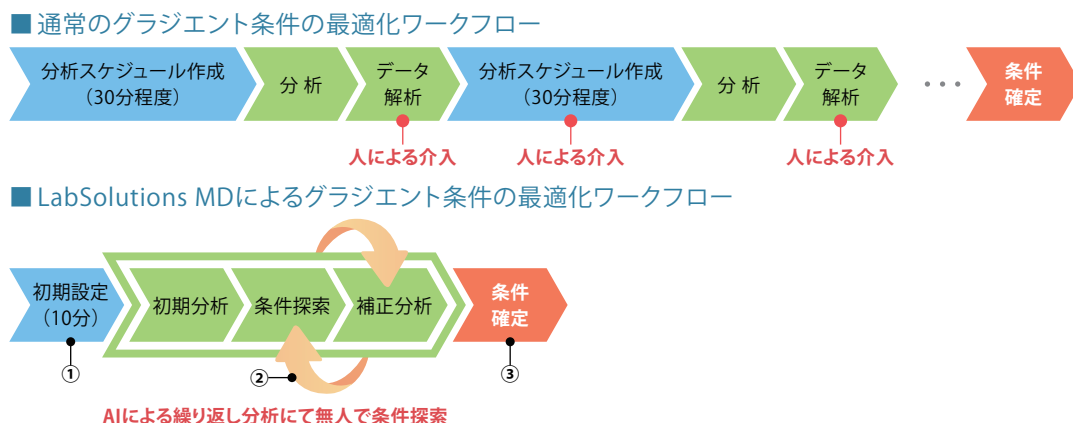


Fig. 1 通常のメソッド開発とLabSolutions MDによるグラジエント条件の最適化ワークフローの比較

LabSolutions MDによるグラジエント条件の自動最適化により得られる主な利点を、下記に示します。

- 一連のグラジエント最適化ワークフローの途中に「人」が介入する必要が無いため、大幅な省力化が可能。
- AIが分離度のクライテリアを満たすグラジエント条件を自動探索するため、クロマトグラフィーに対する経験の有無によらず誰でも最適化が可能。

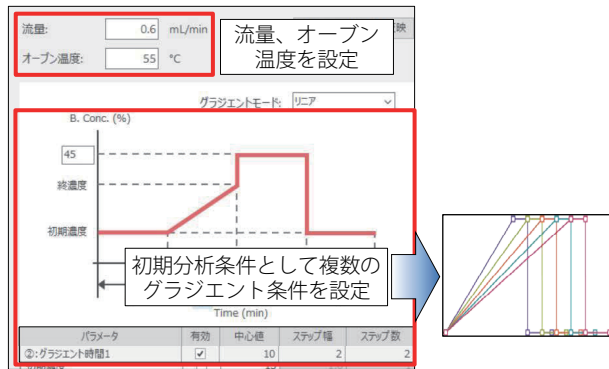


Fig. 2 初期分析条件の設定

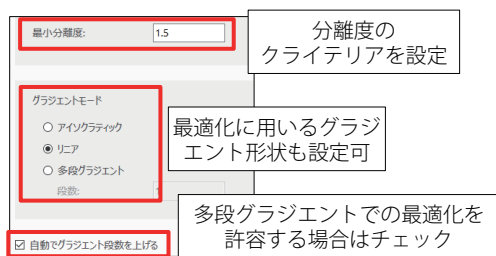


Fig. 3 分離度のクライテリアの設定

3. 食品中機能性成分への適用

機能性成分であるカテキン類、テアフラビン類、没食子酸の混合物（計15種）をモデルサンプルとし、グラジエント条件の自動最適化を適用した事例をFig.4に示します（初期分析条件はTable 1参照）。

Table 1 初期分析条件

System : Nexera™ X3	
Sample : Catechin, Theaflavin and Gallic acid (15 compounds)	
C1) Gallic acid	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) Gallic acid	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⁾ 227-30049-02 (島津 GLC 製品番号)	
Analytical conditions :	
B Conc. : 15 % (0 min) → 45 % (X min) → 15 % (X+5 min)	
*X = 6, 8, 10, 12, 14 (5 patterns)	
Column Temp. : 55 °C	
Flow rate : 0.6 mL/min	
Injection Vol. : 5.0 μL	
Detection : Max plot 240-280 nm (SPD-M40, UHPLC cell)	
Criteria of minimum resolution : 1.5	
Gradient mode for optimization : Linear	

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。

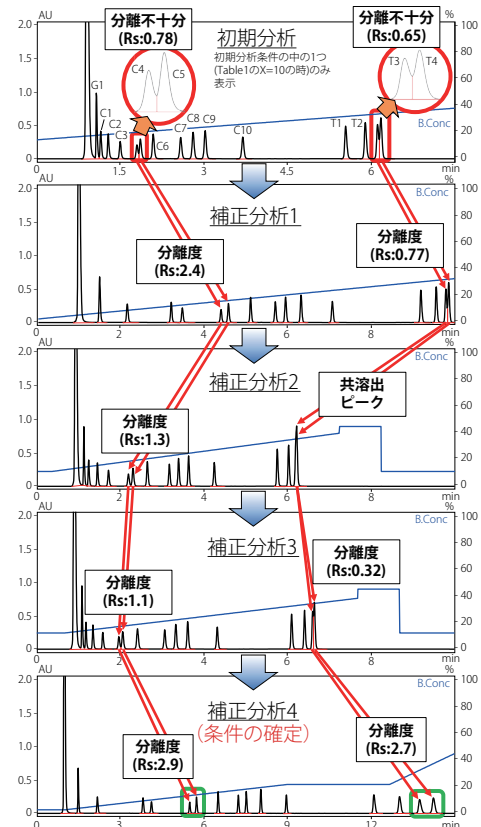


Fig. 4 グラジエント自動最適化機能によるグラジエント条件の自動探索
* 図中青線はグラジエント条件

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 (Fig.4 最上部の赤枠内) であることがわかります。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 (Fig.4 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が、通常このような条件探索では、データ解析における「人」の介入やクロマトグラフィーに対する知見が必要となります。一方、LabSolutions MDは、AIアルゴリズムにより分析者の勘や経験に依存せず、誰でも簡単にクライテリアを満たすグラジエント条件を探索できます。

4. まとめ

メソッド開発においてグラジエント条件を最適化する際は、分析スケジュールの作成やデータ解析のたびに、「人」による介入が必要なため、一連のワークフローの無人化・自動化が求められています。LabSolutions MDは、初期分析条件及び分離度のクライテリアの設定を行うだけで、これを満たすグラジエント条件を自動探索するため、作業の大幅な省力化が期待できます。

LabSolutions MDの
カタログ (C190-0575)
はこちら▶



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

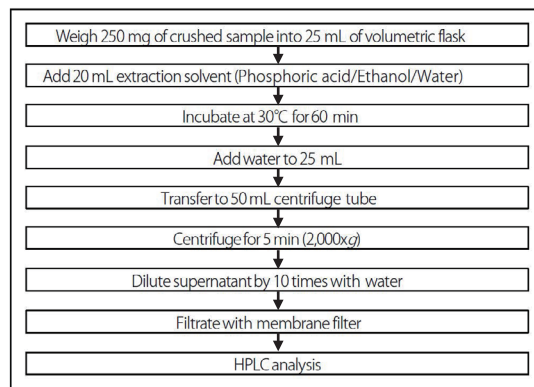


図1 茶葉の前処理手順

■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

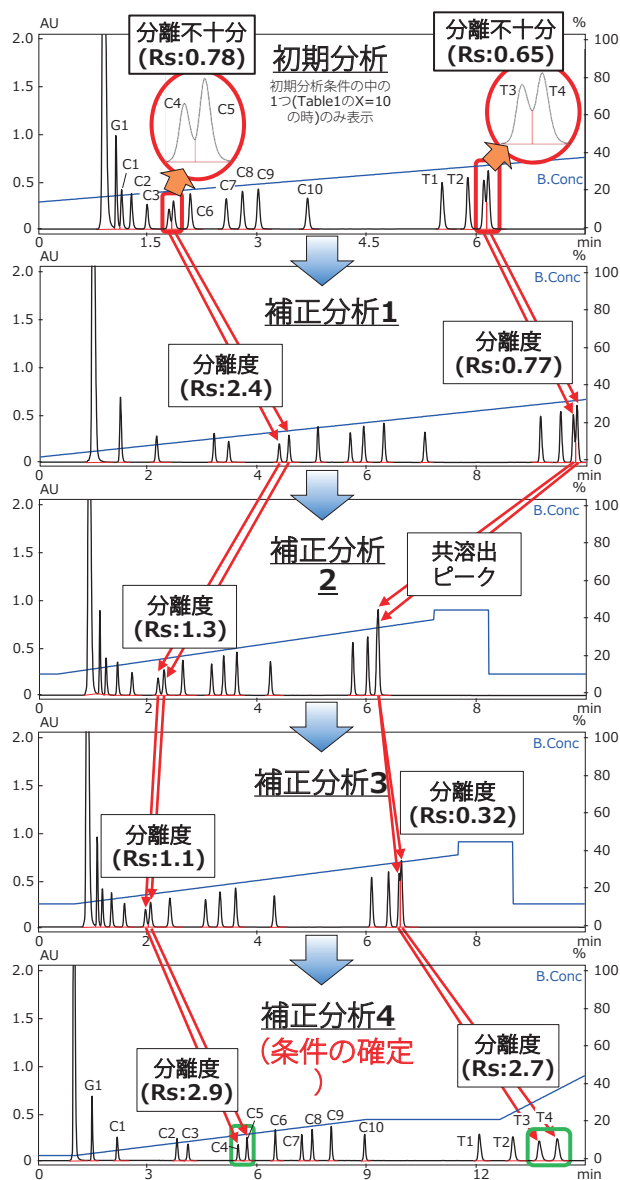


図3 グラジエント条件の自動探索
*図中青線はグラジエント条件

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。

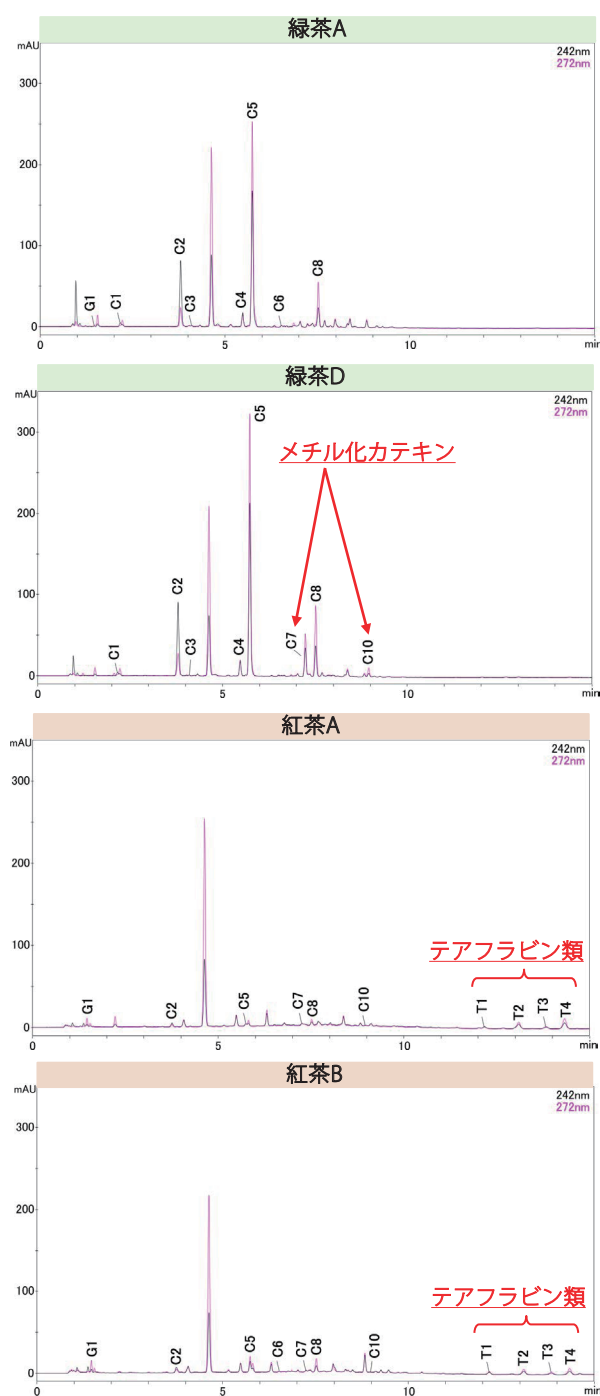


図4 代表的な茶葉抽出液のクロマトグラム

■ 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。

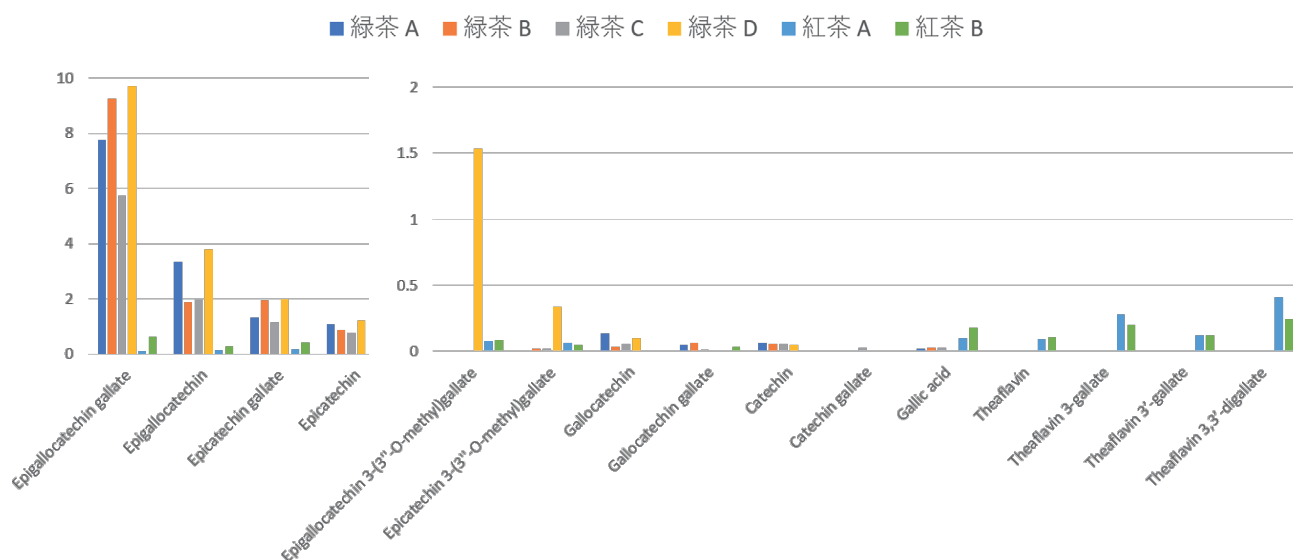


図5 茶葉中のカテキン類及びテアフラビン類 (g/100 g)

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

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)*2Criteria of automatic optimization of gradient conditions
Resolution : > 2.0 (FLP)

MS (LCMS™-2050)

Ionization	: ESI/APCI (DUIST™), positive mode
Mode	: SCAN (<i>m/z</i> 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

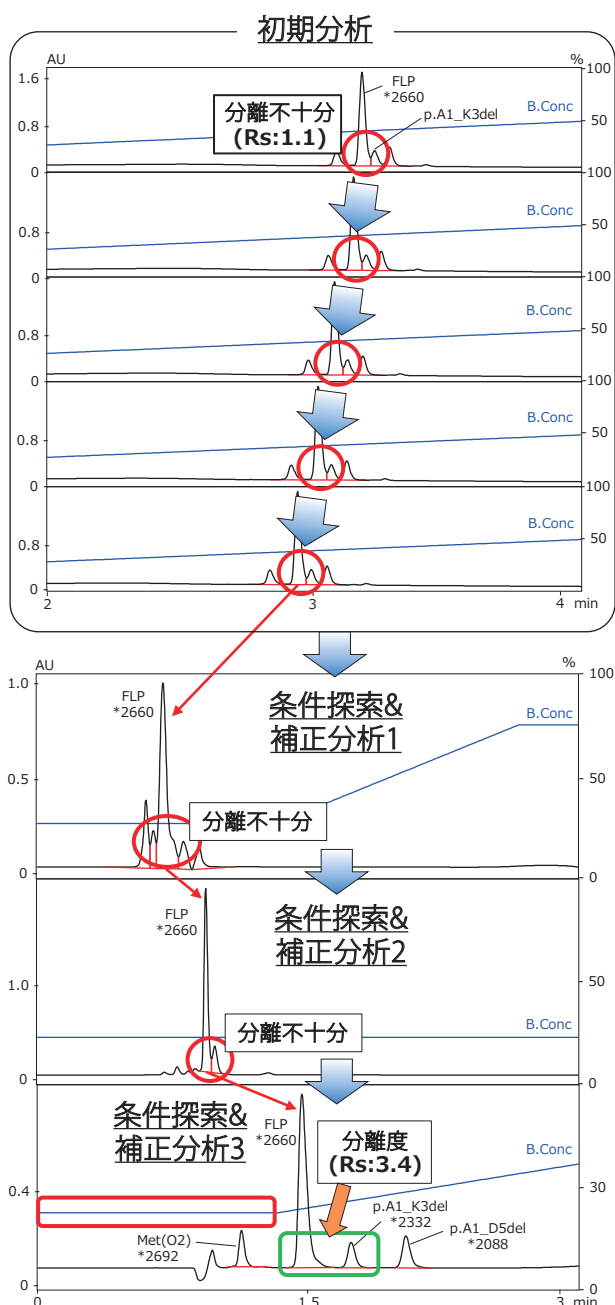


図3 グラジエント条件の自動最適化結果
(図中青線はグラジエント条件)

(* : 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)

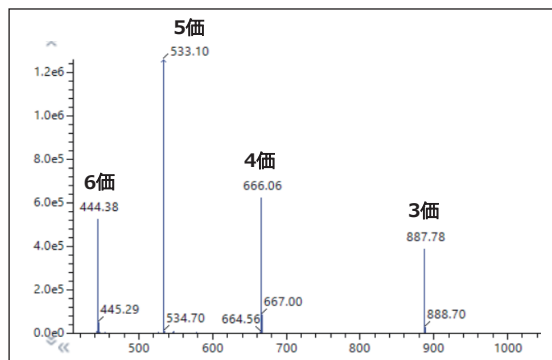


図4 FLPのMSスペクトル

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。

01-00814-JP

初版発行: 2024年11月

AIアルゴリズムによるグラジエント条件の
自動最適化

-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」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、医薬品であるmontelukastおよび類縁物質をモデルサンプルとし、これらの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。

■分析条件および対象成分

分析条件および対象成分を表1に示します。本稿では、montelukastおよび類縁物質に対して、分離度および最終ピークの溶出時間のクライテリアを設定し、これら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 分析条件および対象成分

System : Nexera™ X3	
Sample : montelukast	
Mobile phase	
Pump A :	0.15% formic acid in water
Pump B :	0.1% formic acid in acetonitrile
Column : Shim-pack Scepter™ Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm)*1	
Analytical conditions	
B Conc.	: 5%(0 min)→95%(X ² ~X+2 min) →5%(X+2~X+7 min) *2 : X = 8, 9, 10, 11, 12 (5 patterns)
Column Temp.	: 30 °C
Flow rate	: 0.5 mL/min
Injection Vol.	: 10 μL
Detection	: 238 nm (SPD-M40, UHPLC cell)
Criteria of automatic optimization of gradient conditions	
Resolution	: > 3.0 (montelukast and Impurities)
Time of last eluting peak	: < 15 min

*1 P/N : 227-31064-03 (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。今回は、montelukast（最大面積値のピークとして指定）と類縁物質に対する最小分離度を3.0、最終ピークの溶出時間を15分未満として、分析時間の短縮も考慮してグラジエント条件を自動探索しました（図2）。



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

最小分離度: 3.0

対象ピーク:
☐ 全ピーク
☒ 指定ピークのみ

設定

ピーク選択設定

☒ 面積で指定

対象ピーク: 最大ピーク

最大ピーク

☒ 最終ピーク溶出時間: < 15 min

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

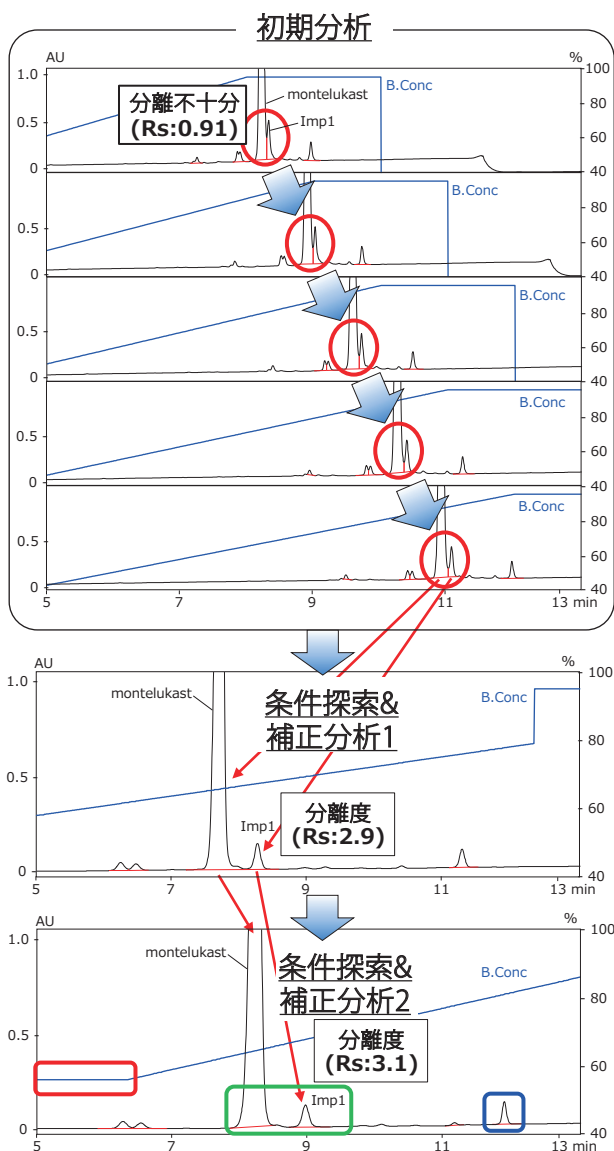


図3 グラジエント条件の自動最適化
*図中青線はグラジエント条件

グラジエント条件を自動探索した結果を図3に示します。5パターンのグラジエント条件（表1）で初期分析が実施された後に、2回の補正分析を経て、montelukastと類縁物質の分離が自動で最適化されました。初期分析結果においては、montelukastおよび類縁物質（Imp1）の分離が不十分（図3初期分析の赤丸内）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を満たすグラジエント条件が自動探索されました（補正分析2）。補正分析2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：3.0）を達成（緑枠内）できました。また、最終ピーク（青枠内）の保持時間もクライテリアである15分以内を満たすことができました。

■まとめ

montelukastおよび類縁物質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（「montelukastと類縁物質の最小分離度3.0」かつ「最終ピークの溶出時間を15分未満」）を満たすグラジエント条件が自動で探索されることを確認しました。LabSolutions MDを用いることで、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が自動で探索されるため、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、スクリーニングフェーズおよび頑健性評価フェーズまで含めた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。詳細はテクニカルレポート「[Analytical Quality by Designアプローチに基づく頑健な分析法開発の効率化（C190-0551）](#)」をご参照ください。

Technical Report

Analytical Quality by Designアプローチに基づく頑健な分析法開発の効率化

Efficient development of robust method based on Analytical Quality by Design

藤崎 真一¹、渡辺 寛¹、川瀬 智裕¹、藤田 雄一郎¹、松本 恵子¹

Abstract:

本稿では、分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions™ MDを用いたAnalytical Quality by Design（以下：AQbD）に基づく頑健な分析法開発の効率化について、低分子医薬品化合物の一斉分析条件の検討を通して紹介します。AQbDに基づいた分析法開発は、分析法の初期スクリーニング（Screening）、最適化（Optimization）、頑健性評価（Validation）というフェーズから成り立っています。これら各フェーズに対して、実験計画法を用いた分析の実施、分析結果に対するデザインスペースの構築、最適な分析条件決定後の頑健性評価を適用することで、一連の分析法開発のワークフローをLabSolutions MDで完結できます。

Keywords: LabSolutions MD、AQbD、分析法開発、メソッド開発、メソッドスカウティング、実験計画法

1. 背景

医薬品規制調和国際会議（ICH）より、ICH-Q14にてAQbDに基づいた分析法開発への取り組みが議論されています。AQbDに基づいた分析法開発では、実験計画法等の効率的な実験により得られたデータに基づき、分析結果に対するパラメーターの有効領域をデザインスペースとして可視化することが推奨されています。科学的な根拠とリスクをベースとしたアプローチにより、経験と勘に頼らない網羅的な分析法の検討がなされ、頑健で低リスクの分析法が開発可能となります。

2. LabSolutions MDの概要

LabSolutions MDは、AQbDに基づく一連の分析法開発のワークフローの効率化を支援します（Fig. 1）。本ソフトウェアは、移動相やカラムといった各種パラメーターの設定を行い、実験計画法を用いて分析を行う分析機能（Fig. 2）および得られたデータに対してデザインスペースや予測クロマトグラムの描画を行う解析機能（Fig. 3）により構成されます。分析機能に関しては、使用する移動相およびカラムを選択することで、自動でそれらを切換えながら分析を実施可能です。さらに、実験計画法を用いた分析回数の最適化により、分析法開発の更なる効率化が可能です。これら実験計画法を用いた分析スケジュール作成に関しては、Fig. 2の①～⑥の6つのステップだけで素早く実行できます。

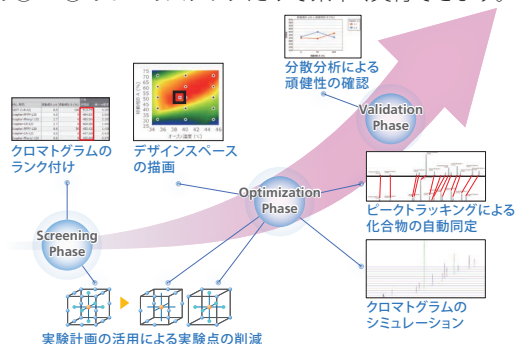


Fig. 1 LabSolutions MDによる分析法開発の効率化

使用する移動相やカラムは1クリックで選択でき、カラム平衡化も考慮した網羅的なスケジュールが自動で生成されるため、作業の効率化だけでなく、ミスの低減も可能です。解析機能に関しては、ピークトラッキング機能による対象化合物の自動同定、デザインスペースによる各種パラメーターの変動が分析結果に与える影響の視覚化、さらに、任意のパラメーターで分析した際のクロマトグラムのシミュレーションに対応しています。また、分散分析により分析結果に与える各種パラメーターの影響度合いの解析も可能です。本稿では、「初期スクリーニング」、「最適化」、「頑健性評価」といった各フェーズを通して、LabSolutions MDを低分子医薬品化合物の一斉分析条件の検討に適用した事例についてご紹介します。

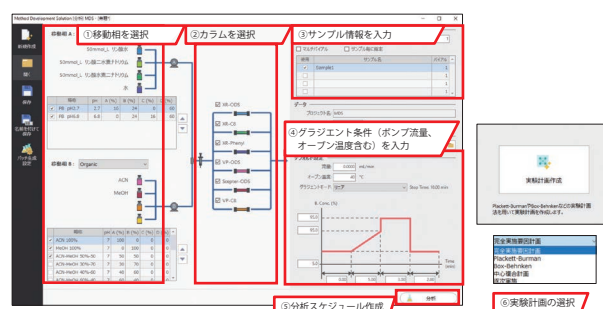


Fig. 2 分析画面

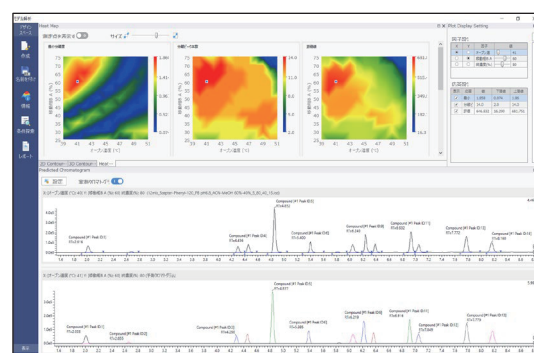


Fig. 3 解析画面

3. 分析

3-1. 分析対象成分

一斉分析条件の検討で対象とした医薬品成分と物性値をTable 1に示します。複数の分析種が存在する条件にて分析法開発を実施することを想定し、log PおよびpKaが異なる各種医薬品の混合物をモデルケースとして採用しました。

Table 1 対象成分

No.	Compounds	log P	pKa
1	Probenecid	3.21	3.4
2	(S)-(+)-Naproxen	3.18	4.15
3	Acetylsalicylic acid	1.19	3.49
4	Diclofenac sodium	4.51	4.15
5	Papaverine hydrochloride	3	6.4
6	Dibucaine hydrochloride	4.4	8.85
7	Amitriptyline hydrochloride	4.92	9.4
8	Indometacin	4.27	4.5
9	Antipyrine	0.38	1.4
10	Lidocain	2.44	8.01
11	Quinidine	3.44	8.56
12	Metoclopramide	2.62	9.27

3-2. 分析法の初期スクリーニング

初期スクリーニングでは、保持や分離に大きく影響を及ぼすパラメーターである水系移動相2種類、有機系移動相3種類、カラム6種類の計36点（完全実施要因計画）で分析を実施し、移動相およびカラムのスクリーニングを実施しました（分析条件：Table 2）。水系移動相のpHは酸性又は中性となるように移動相ブレンド機能を用いて自動調製しました。また、有機系移動相の混合も、同様の機能で自動調製しました。分析中に移動相およびカラムの切換も自動で実施されるため、手動で条件を変更して分析する場合に比べて、移動相の調製・置換、カラムの交換といった多くの作業を自動化可能です。

Table 2 移動相とカラムの初期スクリーニング条件

Mobile phase :			
Pump A Buffer ^{*1}			
A1	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.7)		
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)		
Pump B Organic solvent ^{*2}			
B1	Acetonitrile		
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50		
B3	Methanol		
Column :			
1	Shim-pack Scepter C18-120	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ³	
2	Shim-pack Scepter C8-120	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁴	
3	Shim-pack Scepter C4-300	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁵	
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁶	
5	Shim-pack Scepter PFP-120	(100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁷	
6	Shim-pack GIST C18 AQ HQ	(100 mm × 3.0 mm I.D., 2.0 μm) ⁸	
Analytical conditions :			
Time program : B.Conc. 5%(0 min) → 80%(8.01-11 min) → 5%(11.01-15 min)			
Flow rate : 0.7 mL/min			
Inj.vol. : 1.0 μL			
Temperature : 40 °C			
Detection : Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)			

*1 水系移動相は以下の組成にて移動相ブレンド機能により自動調製しました。

Solvent	A1 ratio	A2 ratio
A 50 mmol/L Phosphoric acid water	16%	0%
B 50 mmol/L Sodium dihydrogen phosphate water	24%	24%
C 50 mmol/L Disodium phosphate water	0%	16%
D Water	60%	60%

*2 有機系移動相は以下の組成にて移動相ブレンド機能により自動調製しました。

Solvent	B1 ratio	B2 ratio	B3 ratio
A Acetonitrile	100%	50%	0%
B Methanol	0%	50%	100%

*3 P/N 227-31013-03

*6 P/N 227-31064-03

*4 P/N 227-31034-03

*7 P/N 227-31054-03

*5 P/N 227-31176-03

*8 P/N 227-30808-02

3-3. 初期スクリーニングのクロマトグラム

得られたクロマトグラムの一例* (Shim-pack Scepter Phenyl-120) をFig. 4に示します。QuinidineとAcetylsalicylic acidに不純物が含まれており、最大で14本のピークが溶出しています。水系移動相のpH、有機系移動相組成、カラムが異なることで、保持や分離が大きく変わることが確認できます。

*その他のカラムで取得したクロマトグラムはアプリケーションニュース (01-00018-JP) に別途掲載しています。

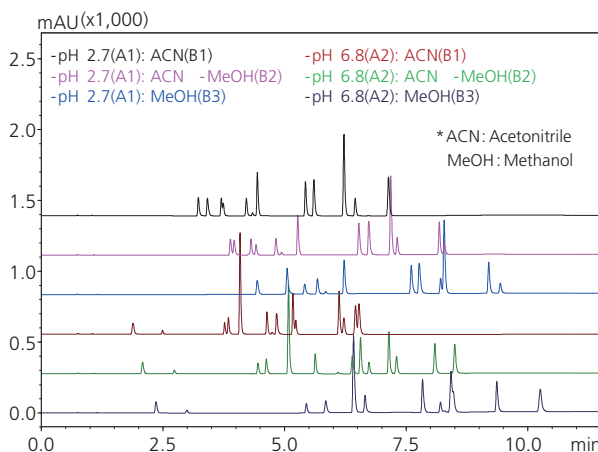


Fig. 4 Shim-pack Scepter Phenyl-120 のクロマトグラム

3-4. 膨大なデータから迅速に最適条件を特定

初期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。クロマトグラムを全て目視にて確認すると多くの時間がかかります。LabSolutions MDでは、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、素早く簡単に最適な条件を探し出すことができます。

$$(\text{評価値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_P) \dots (\text{式1})$$

評価値はピーク検出数 (P) と分離度 (Rs: 上限値3.0) の総和の積により算出されます。Fig. 5に初期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示します。水系移動相にはpH 6.8、有機系移動相にはアセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムにはShim-pack Scepter Phenyl-120を用いた場合に最も高い評価値が得られることが確認できました (Fig 4: 緑色クロマトグラム)。

カラム 略称	移動相A pH	移動相B A (%)	評価値	応答	最小分離度
Scepter-Phenyl-120	6.8	50	546.000		3.224
Scepter-C8-120	6.8	0	469.894		0.093
GIST-C18-AQ	2.7	0	465.124		1.075
GIST-C18-AQ	6.8	50	443.580		1.826
Scepter-C8-120	6.8	50	436.241		0.026
Scepter-Phenyl-120	2.7	50	419.659		1.743
Scepter-C18	2.7	0	419.338		1.518
Scepter-C18	6.8	50	396.000		4.326
Scepter-C4-300	2.7	0	394.239		0.402
Scepter-C18	6.8	100	384.553		2.046

Fig. 5 各条件の評価値による順位付け (評価値が高い順に表示)

3-5. 分散分析による分離に大きな影響を与えるパラメーターの特定

LabSolutions MD では、分散分析を用いることで、各種パラメーターが分離に与える影響の大きさを解析することが可能です。そのため、分散分析の結果をもとに、最適化する対象パラメーターの絞り込みの検討ができ、分析法開発の更なる効率化につながります。Fig. 6には各種パラメーターに対する分散分析の結果を示しており、赤枠内の要因である「移動相A pH×移動相B」および「カラム」に関しては、共にp値が0.05以下であることが分かります。p値が0.05以下である要因は、各水準の平均値が水準間で有意に異なると判断できるため、各水準ごとに異なる分離が得られている（分離に与える影響が大きい）と判断できます。

要因効果図	要因	平方和	自由度	平均平方	F値	p値
☒	移動相 A pH x 移動相 B (%)	44817.9	2	22408.9	6.72	0.0141
☒	カラム 略称	66312.0	5	13262.4	3.98	0.0302
☒	カラム 略称 x 移動相 A pH	35853.2	5	7170.6	2.15	0.142
☒	カラム 略称 x 移動相 B (%)	50149.0	10	5014.9	1.50	0.265
☒	移動相 B (%)	9123.7	2	4561.9	1.37	0.298
☒	移動相 A pH	3243.6	1	3243.6	0.973	0.347
	誤差	33336.5	10	3333.7		
	合計	242835.8	35			

Fig. 6 各種パラメーターが分離に与える影響の解析結果（分散分析）

3-6. 初期スクリーニング結果

初期スクリーニングにより得られた、評価値が最も高い条件を Table 3 に示します。水系移動相には pH 6.8、有機系移動相には アセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムには Shim-pack Scepter Phenyl-120 を用いた場合に最も良い分離が得られることが確認されました。そのため、3.7の最適化フェーズでは、これらの条件をもとに、ポンプのグラジエント条件やカラムオープン温度を含めた更なる検討を実施し、最も頑健性が高くなる分析法構築を行います。

Table 3 評価値が最も高かった条件

Mobile phase :	
Pump A	Buffer
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50
Column :	
4	Shim-pack™ Scepter Phenyl-120
Analytical conditions :	
Time program	: B.Conc. 5% (0 min) → 80% (8.01-11 min) → 5% (11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 µL
Temperature	: 40 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-7. 分析法の最適化

初期スクリーニングで選択された水系移動相の pH およびカラムに対して、有機系移動相組成を 5 点 (30%、40%、50%、60%、70%)、カラムオープン温度を 3 点 (35 °C、40 °C、45 °C)、グラジエント終濃度を 3 点 (75%、80%、85%) 設定し、分析法の最適化を実施しました。また、これらパラメーターの変動が最小分離度に与える影響を、縦軸を有機系移動相組成、横軸にオープン温度をとり、デザインスペースとして Fig. 7 に示します。

デザインスペースを構築することで、各種パラメーターの変動が最小分離度に与える影響を分布領域全体にわたって可視化できます。また、LabSolutions MD では、各種パラメーターの分布領域全体の中で最も頑健な条件を提示することが可能 (Fig. 7 内の黒枠内の点) ため、勘と経験に頼らない頑健な分析法の構築が可能です。最適化の結果、良好な分離度と高い頑健性を有する条件は有機溶媒の混合比率が 50%、カラムオープン温度が 39 °C、グラジエント終濃度が 80% であることが分かりました。ここで、デザインスペース内の任意の点 (Fig. 7 内の点 A) をクリックすると、各種パラメーターを変更した際のクロマトグラムの変化を視覚的に予測することも可能 (Fig. 8) であり、分析前に条件を任意に変更した際の分離挙動の確認等に活用できます。

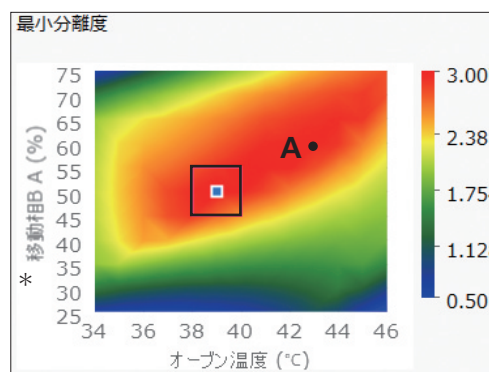


Fig. 7 最小分離度の分布（グラジエント終濃度 80% 時）
*「移動相 B A」：アセトニトリル

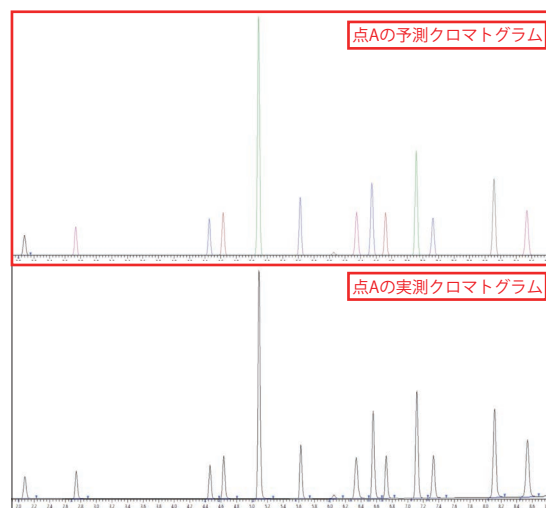


Fig. 8 点 A (Fig. 7) における予測クロマトグラムおよび実測クロマトグラム

3-8. ピークトラッキングによる化合物の自動同定

有機系移動相組成やカラムオープン温度といった各種パラメーターを変動させると、化合物の保持時間も変動するため分析ごとに同定を実施する手間がかかります。LabSolutions MD では、化合物の保持時間の変動に対して、スペクトルの類似度や面積値といった任意の指標を用いることで自動同定（ピークトラッキング）が可能です (Fig. 9)。各種パラメーターの変動により、ピークの溶出位置が変わった際も、すべてのデータに対して素早く、自動でピークを認識するため、同定の手間を大幅に削減することができます。

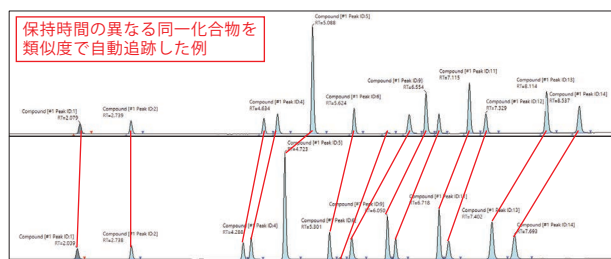


Fig. 9 ピークトラッキング機能による化合物の自動追跡

3-9. 最適化結果

最適化により決定された条件を Table 4 に示します。デザインスペースにより、有機系移動相はアセトニトリル/メタノール = 50 : 50、カラムオープン温度は 39 °C、グラジエント終濃度は 80% を用いた場合に良好な分離度と高い頑健性を有すると判断できました。3.10 の頑健性評価フェーズでは、この条件に対して、各種パラメーターを小さい範囲で変動させた際の分離に与える影響を確認することで、分析法の頑健性を評価します。

Table 4 最適化により決定された条件

Mobile phase :	
Pump A	Buffer
A2	20 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 6.8)
Pump B	Organic solvent
B2	Acetonitrile / Methanol = 50 : 50
Column :	
4	Shim-pack Scepter Phenyl-120 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm) ⁶
Analytical conditions :	
Time program	: B.Conc. 5%(0 min) → 80%(8.01-11 min) → 5%(11.01-15 min)
Flow rate	: 0.7 mL/min
Inj.vol.	: 1.0 μL
Temperature	: 39 °C
Detection	: Max plot 220- 400 nm (SPD-M40)

3-10. 分析法の頑健性評価

頑健性の評価は、各種パラメーターが変動した際に、測定値へ与える影響を理解し、分析法の信頼性を確保するために重要です。LabSolutions MD では、逐次実験計画を用いることで、最適化で決定された条件に対して、各種パラメーターを小さい範囲で変動させた際の分析スケジュールを自動生成し、分離に与える影響を評価可能です。具体的には、有機系移動相組成を 1% 刻み (49%、50%、51%) で、カラムオープン温度を 1 °C 刻み (38 °C、39 °C、40 °C) で変動させる (Fig. 10 の白丸) ことで、各種パラメーターの変動が保持時間および分離度に与える影響を確認しました。Fig. 11 に頑健性評価において得られたクロマトグラムを示します。最適化で決定された条件に対して各種パラメーターを変動させた際の分離度および保持時間の変動が極めて小さいことが確認でき、デザインスペースにより導かれた分析法の頑健性の高さが示されました。このように、頑健性の高い分析法を用いることで、典型的な分析能パラメーターである真度や精度の評価といった分析法バリデーションの効率化にも貢献します。

LabSolutions 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。

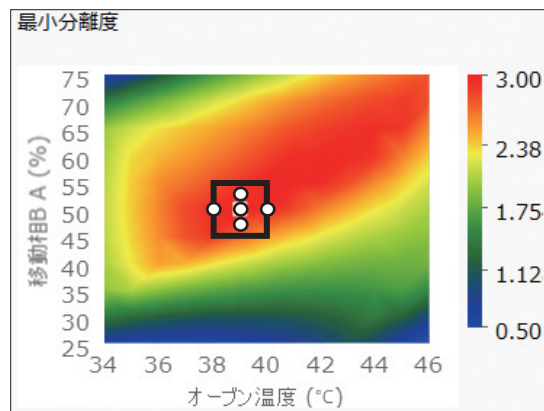


Fig. 10 頑健性評価の際の実験点
*「移動相 B A」: アセトニトリル

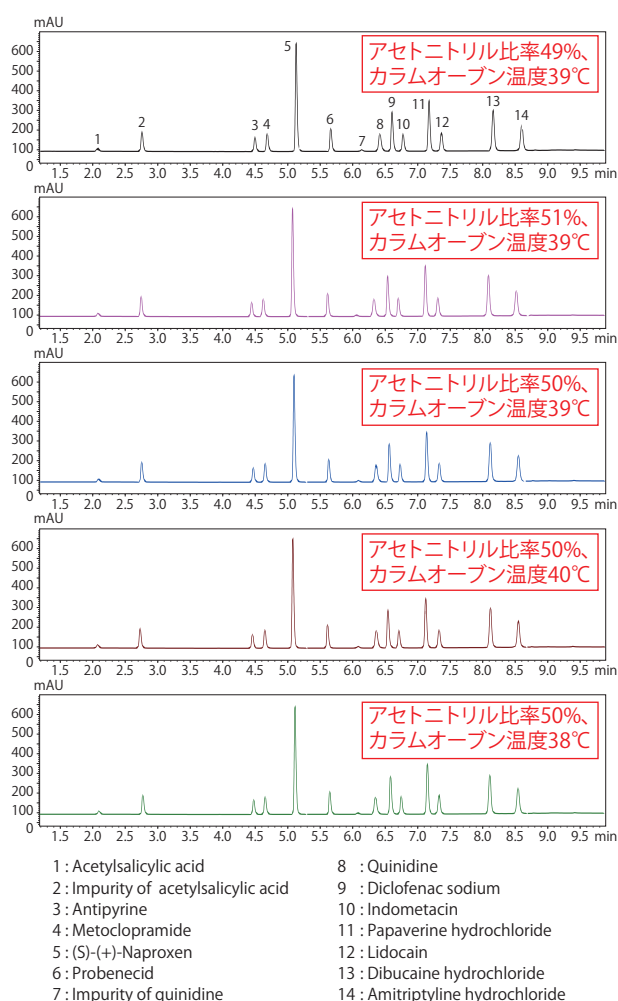


Fig. 11 頑健性評価の各実験点 (Fig. 10 の白丸) でのクロマトグラムと対象成分

医薬品の頑健な類縁物質試験法開発の
効率化

藤崎 真一、周 毅婷

ユーザーベネフィット

- ◆ 医薬品主成分と類縁物質の分離度と、移動相組成やカラムオープン温度といった各種パラメーターとの関係を視覚化することで、分離が良好でかつ頑健性が確保される条件を効率的に探索できます。
- ◆ カラムロットごとに頑健なパラメーター領域を視覚化及び比較することで、ロット間差に対する頑健性評価を効率化できます。

■はじめに

医薬品中の類縁物質は安全性確保のために厳格な管理が求められており、信頼性の高い分析法の開発が必要です。分析法開発支援ソフトウェアであるLabSolutions MDは、科学的な根拠とリスクを考慮し分析法を開発するAnalytical Quality by Design (AQbD) に基づいた、効率的な分析法開発を支援します。AQbDに基づいた分析法開発は、分析法の初期スクリーニング、最適化、頑健性評価というフェーズから成り立っています。本稿ではケトプロフェンの頑健な類縁物質試験法開発の効率化を目的とし、初期スクリーニングで選定されたカラム及び移動相に対して、最適化及び頑健性評価を適用した事例についてご紹介します。具体的には、移動相組成、カラムオープン温度、流量といった各種パラメーターを網羅的に変動させた際の各化合物の分離度を視覚化（デザインスペース）し、分析条件を最適化しました。また、最適化後の頑健性評価において、デザインスペースをロットの異なるカラムに適用し、各種パラメーターの変動が分離に与える影響を変動領域全体に渡って視覚化することで、カラムロット間差の頑健性評価を効率化しました。

■分析条件

ケトプロフェンと類縁物質の分離の最適化検討に用いた分析条件を表1に示します。分離に大きな影響を及ぼす移動相組成に加え、カラムオープン温度及び流量を変動させることで、ケトプロフェンと類縁物質の分離を網羅的に検討し、最適化しました。アセトニトリル比率を40%から60%まで5%刻みで（5水準）、カラムオープン温度を35℃から45℃まで5℃刻みで（3水準）、流量を0.6 mL/minから0.8 mL/minまで0.1 mL/min刻みで（3水準）変動させました。

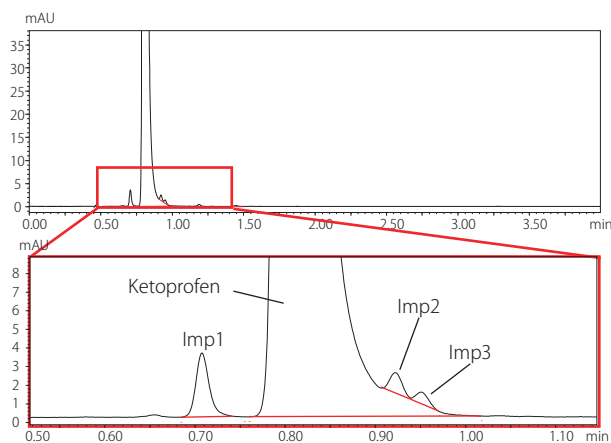
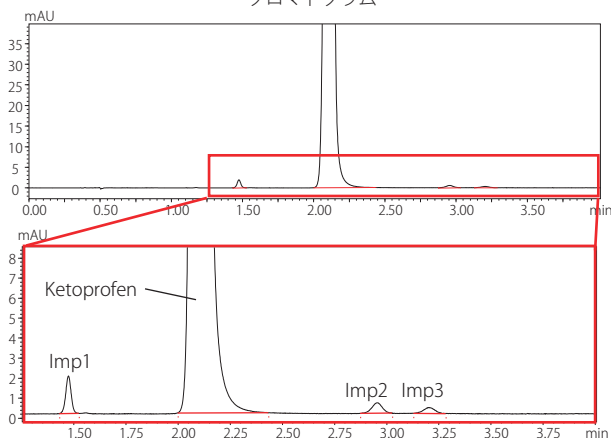
表1 最適化検討条件

System : Nexera™ X3 (Method Scouting System)	
Mobile Phase :	
Pump A :	0.1% Formic acid in water
Pump B :	Acetonitrile
Column :	
Shim-pack™ Velox C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.7 µm)*1	
Analytical Conditions (Isocratic)	
B Conc. (Acetonitrile)	: 40, 45, 50, 55, 60% (5 patterns)
Column Temp.	: 35, 40, 45 °C (3 patterns)
Flow Rate	: 0.6, 0.7, 0.8 mL/min (3 patterns)
Injection Vol.	: 0.1 µL
Detection (PDA)	: 254 nm (SPD-M40, UHPLC cell)

*1 P/N: 227-32010-03

■ケトプロフェンと類縁物質の分離

まず、アイソクラティック溶離時のアセトニトリル比率を60%及び40%に変化させた際のクロマトグラムを図1及び図2にそれぞれ示します（カラムオープン温度及び流量はそれぞれ40℃及び0.7 mL/min）。尚、クロマトグラム中のImp1~3は類縁物質であり、アセトニトリル比率が60%では、Imp2及びImp3がケトプロフェンのピークの裾野に溶出しました。一方で、40%では、それぞれのピークは相互に分離しており、移動相中のアセトニトリル比率は分離に顕著な影響を及ぼすことが示唆されました。引き続き、最適な分析条件を特定するために、アセトニトリル比率、カラムオープン温度、流量を網羅的に変動させた際のデザインスペースによる分離度の視覚化を実施しました。

図1 B Conc. 60%、オープン温度 40℃、流量 0.7 mL/minの
クロマトグラム図2 B Conc. 40%、オープン温度 40℃、流量 0.7 mL/minの
クロマトグラム

■ デザインスペースによる分離度の視覚化

図3にケトプロフェンとImp2、及びImp2とImp3の分離度のデザインスペースを示しました。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。LabSolutions MDは、各種パラメーターの変動領域全体の中で良好な分離と高い頑健性を有する条件を提示することが可能であり、ケトプロフェンとImp2、及びImp2とImp3の相互分離は、アセトニトリル比率40%、カラムオープン温度35℃、流量0.6 mL/minが最適な条件（図3内左下の青色点）であることがいずれにおいても示されました。デザインスペースにより、各種パラメーターの変動が分離度に及ぼす影響を容易に把握することができ、分析者の勘と経験に依存することなく科学的根拠に裏付けされた最適化を可能とします。

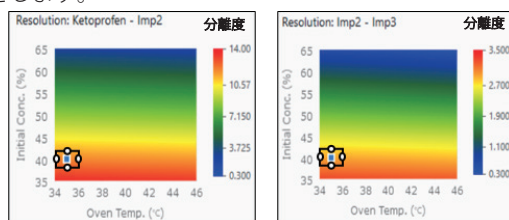


図3 ケトプロフェンとImp2の分離度のデザインスペース（左）
Imp2とImp3の分離度のデザインスペース（右）

*流量：0.6 mL/min時（LabSolutions MDが提示した最適値、
0.7、0.8 mL/min時のデザインスペースは省略）

*Initial Conc：アセトニトリル比率、*ロット1のカラムにて実施

■ 頑健性評価

ケトプロフェンと類縁物質の分離について、デザインスペースにより得られた最適条件（アセトニトリル比率40%、カラムオープン温度35℃、流量0.6 mL/min）に対して頑健性評価を実施しました。具体的には、アセトニトリル比率を1%刻み（39%、40%、41%）で、カラムオープン温度を1℃刻み（34℃、35℃、36℃）で変動（図3内の青色点及び白丸4点の計5点）させ、分離に与える影響を検証しました。図4は、ケトプロフェンとImp2、及びImp2とImp3の分離度をそれぞれデザインスペースにより視覚化した結果であり、図中全体で分離度が大きい領域（橙色及び赤色）が分布しています。これは、アセトニトリル比率及びカラムオープン温度の変動領域全体に渡ってケトプロフェンとImp2、及びImp2とImp3の分離が十分確保できていることを意味しており、デザインスペースにより最適化された分析法の頑健性の高さが示されました。さらに、カラムロット間差の頑健性も評価するため、追加で2ロットのカラムに対して同様にデザインスペースを作成しました（図5、図6）。その際に得られたクロマトグラムを図7に示します。図4～図6において、図中全体で分離度が大きい領域が分布していることが分かり、カラムのロットに関わらず、最適化した条件の頑健性の高さが示されました。

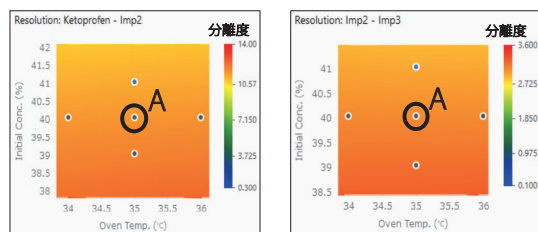


図4 ケトプロフェンとImp2の分離度のデザインスペース（左）
Imp2とImp3の分離度のデザインスペース（右）

*図中の丸印（計5点）は分析を実施した点（カラムロット1）

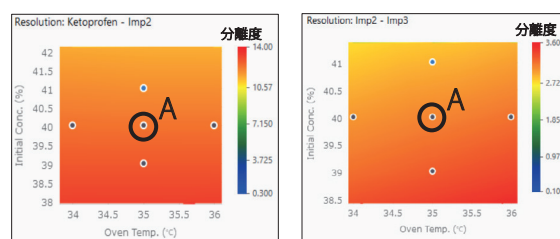


図5 ケトプロフェンとImp2の分離度のデザインスペース（左）
Imp2とImp3の分離度のデザインスペース（右）

*図中の丸印（計5点）は分析を実施した点（カラムロット2）

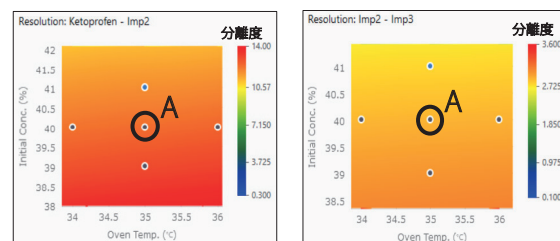


図6 ケトプロフェンとImp2の分離度のデザインスペース（左）
Imp2とImp3の分離度のデザインスペース（右）

*図中の丸印（計5点）は分析を実施した点（カラムロット3）

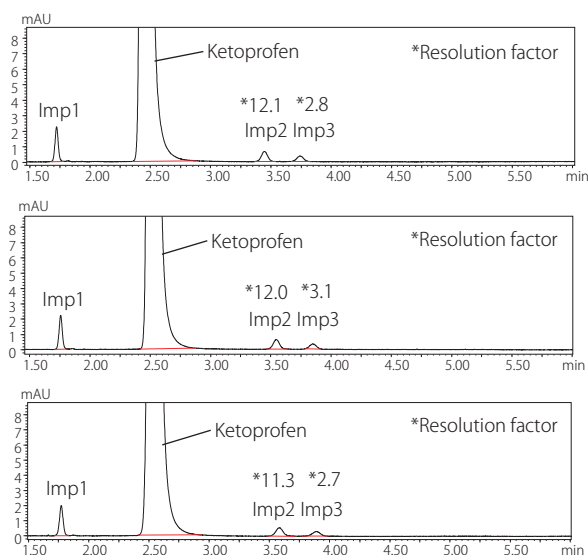


図7 ロットの異なるカラムで取得（図4～図6の点A）
したクロマトグラム

（上：ロット1、中：ロット2、下：ロット3）

■ まとめ

LabSolutions MDによる医薬品の類縁物質試験法開発の効率化事例についてご紹介しました。デザインスペースにより、各種パラメーターの変動に対する医薬品主成分と類縁物質の分離度を視覚化することで、勘と経験に依存することなく分析法の最適化及び頑健性評価を効率化します。また、デザインスペースをロットの異なるカラムの評価に適用することでカラムのロット間差の頑健性の評価を可能にします。本稿で紹介した類縁物質試験法開発の効率化プロセスは、分析法の信頼性の向上にもつながるため、分析法バリデーションの効率化にも貢献することが期待されます。

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™-2050I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。

表1 分析対象試料

名称	Sequence
FLP	AEKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1del	EKKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_E2del	KKDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_K3del	KDEGPYRMEHFRWGSPPKD
p.A1_D5del	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。

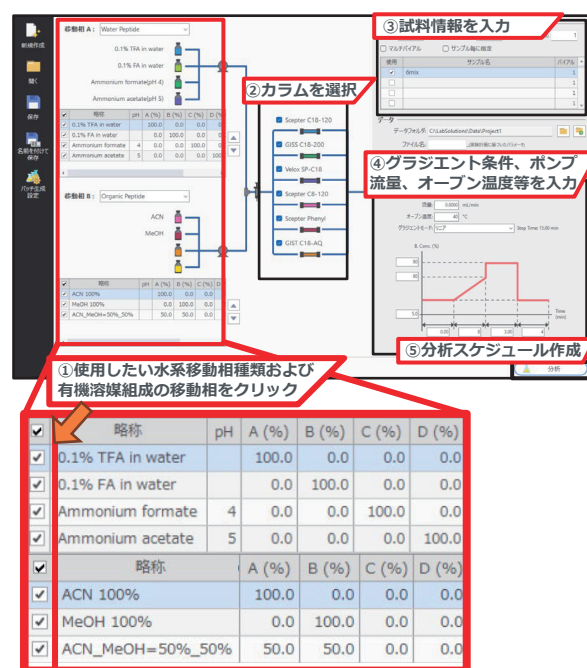


図1 分析スケジュール作成画面

表2 スクリーニング条件

System	: Nexera™ X3 (Method Scouting System)
Column 1	: Shim-pack Scepter™ C18-120 *1
Column 2	: Shim-pack™ GISS C18 *2
Column 3	: Shim-pack Velox™ SP-C18 *3
Column 4	: Shim-pack Scepter C8-120 *4
Column 5	: Shim-pack Scepter Phenyl-120 *5
Column 6	: Shim-pack GIST-HP C18-AQ *6 (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.9 μm : column 1, 2, 4~6) (100 mm × 3.0 mm I.D., 1.8 μm : column 3)
Temperature	: 40 °C
Injection volume	: 2 μL (FLP : 1000 mg/L, other impurities : 100 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
– Line C	: 10 mmol/L ammonium formate (pH 4) in water
– 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
Time program (%B)	: 10 % (0 min) → 60 % (10 min) → 10 % (10.01–15 min)
Detection	: 220 nm (SPD-M40, UHPLC cell)
System	: LCMS-2050
Ionization	: ESI/APCI (DUIS™), positive mode
Mode	: SCAN (<i>m/z</i> 300–2000)
Nebulizing gas	: 2.0 L/min (N ₂)
Drying gas	: 5.0 L/min (N ₂)
Heating gas	: 7.0 L/min (N ₂)
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 / 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。

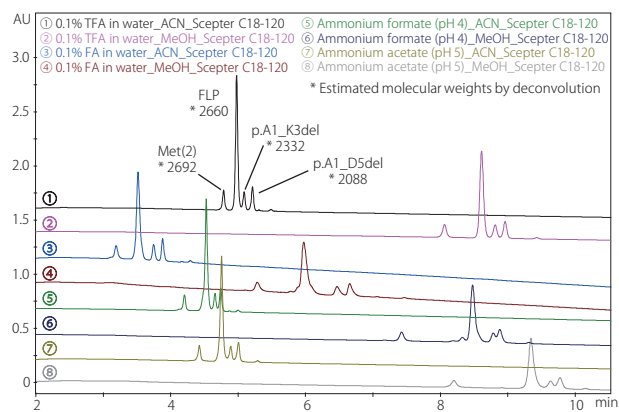


図2 Scepter C18-120に対するスクリーニング結果

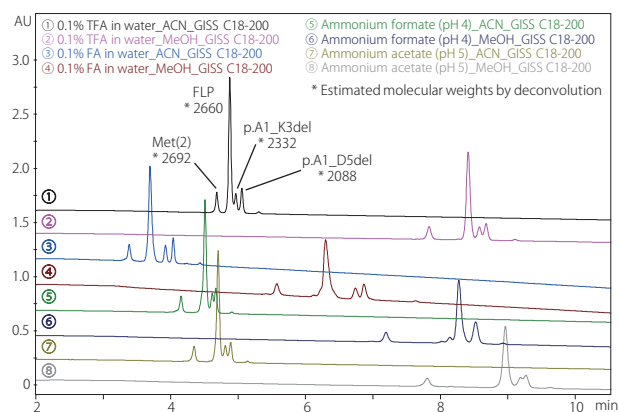


図3 GISS C18-200に対するスクリーニング結果

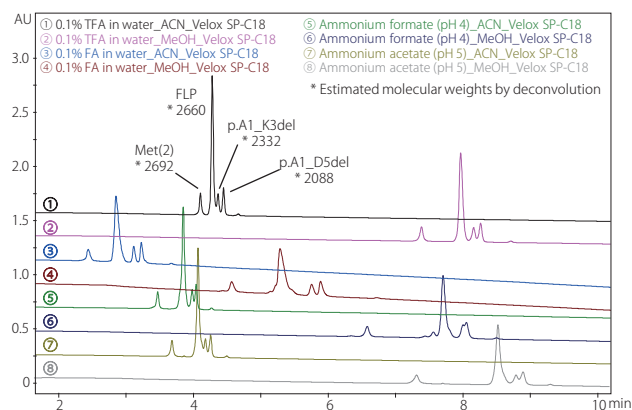


図4 Velox SP-C18に対するスクリーニング結果

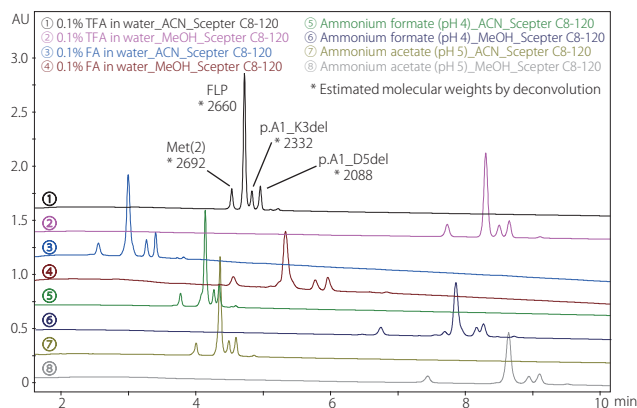


図5 Scepter C8-120に対するスクリーニング結果

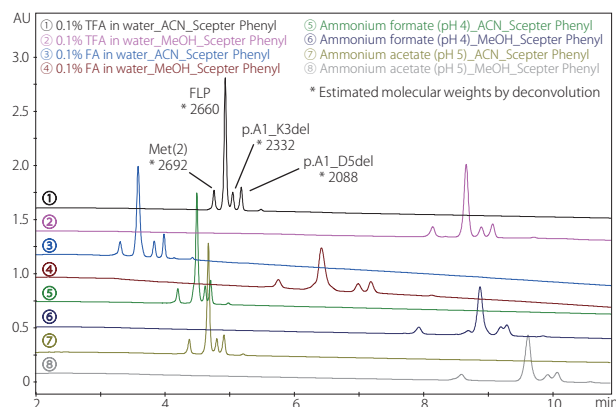


図6 Scepter Phenylに対するスクリーニング結果

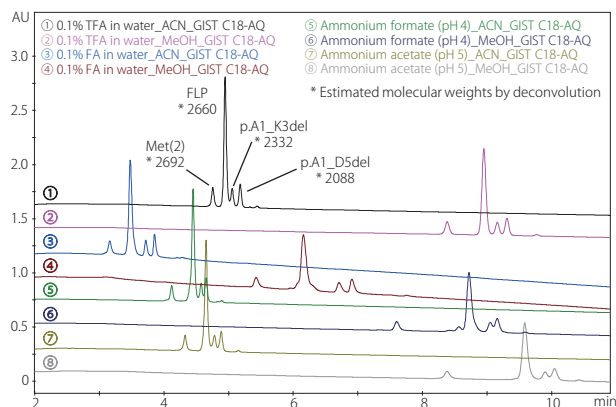


図7 GIST C18-AQに対するスクリーニング結果

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。

$$(\text{評価値}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_{P-1}) \dots \dots \text{(式1)}$$

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、pA1_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、さらにカラムオープン温度のスクリーニング (40、50、60、70、80 °C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

図8 各条件の評価値による順位付け
(評価値が高い順に上位10条件を表示)

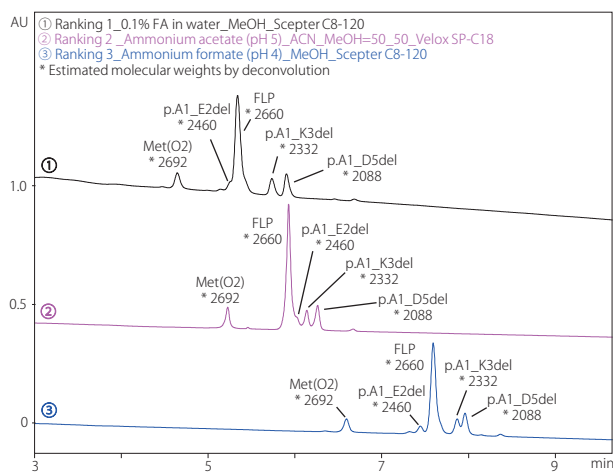


図9 評価値が高い上位3条件のクロマトグラム

■カラムオープ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、カラムオープン温度を40、50、60、70、80 °C (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。カラムオープ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、カラムオープ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、カラムオープン温度を高温にすることで、最も分離の厳しいpA1delとFLPの分離が改善されることが確認できました。図13に、pA1del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pA1del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)。

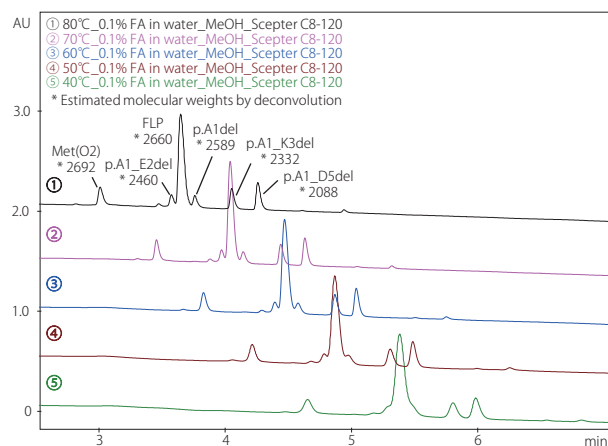


図10 カラムオープン温度を変動させたクロマトグラム
80 °C(①)、70 °C(②)、60 °C(③)、50 °C(④)、40 °C(⑤)
(0.1%ギ酸水 / MeOH / Scepter C8-120)

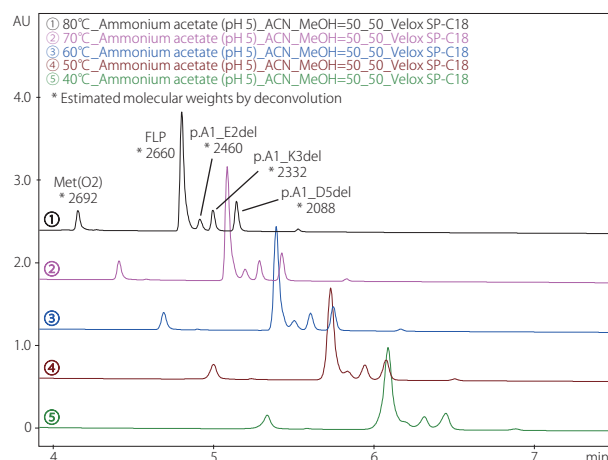


図11 カラムオープン温度を変動させたクロマトグラム
80 °C(①)、70 °C(②)、60 °C(③)、50 °C(④)、40 °C(⑤)
(10 mmol/L酢酸アンモニウム水 / ACN : MeOH=50:50 / Velox SP-C18)

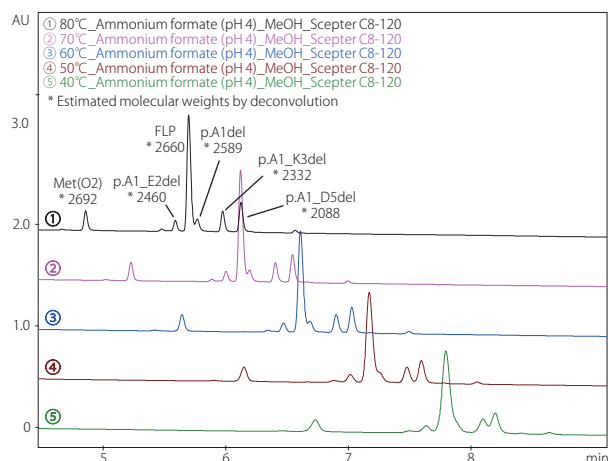


図12 カラムオープン温度を変動させたクロマトグラム
80 °C(①)、70 °C(②)、60 °C(③)、50 °C(④)、40 °C(⑤)
(10 mmol/Lギ酸アンモニウム水 / MeOH / Scepter C8-120)

移動相A 略称	移動相B 略称	カラム 略称	オープン温度	分離度 (pA1del)
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 pA1del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、カラムオープン温度：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間隔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。

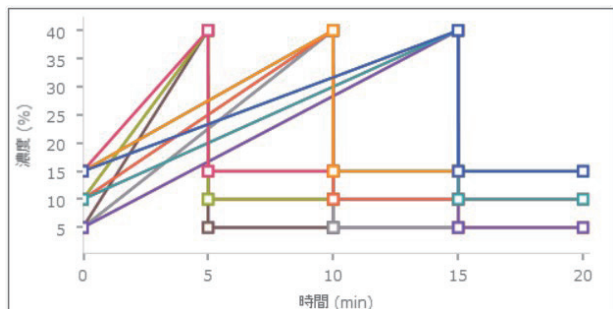


図14 最適化フェーズにおけるグラジエント条件の検討

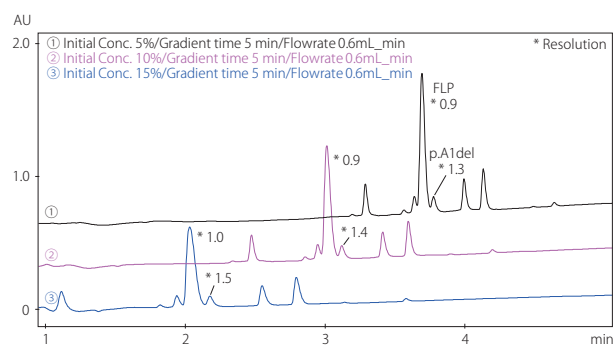


図15 グラジエント初期濃度を変動させたクロマトグラム
5% (①)、10% (②)、15% (③)

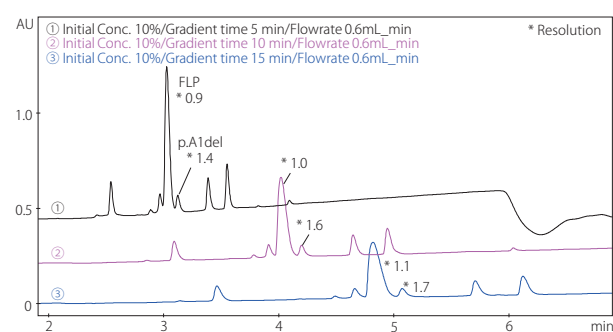


図16 グラジエント時間を変動させたクロマトグラム
5 min (①)、10 min (②)、15 min (③)

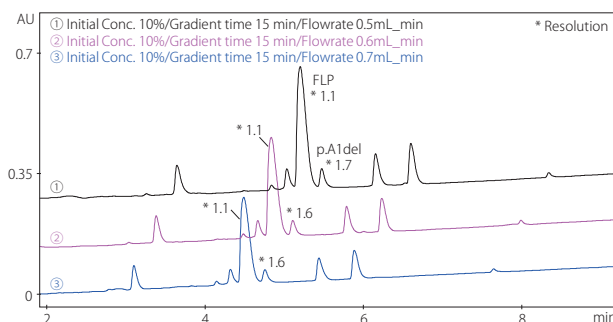


図17 流量を変動させたクロマトグラム
0.5 mL/min (①)、0.6 mL/min (②)、0.7 mL/min (③)

■ 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)、pA1del、pA1_E2del、pA1_K3del、pA1_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のため、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。

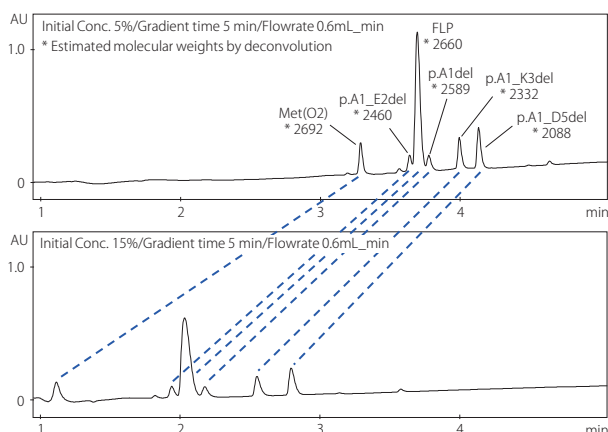


図18 グラジエント時間5 min、流量0.6 mL/min、グラジエント初期濃度5% (上) および 15% (下) のLCクロマトグラム
(点線は分子量による不純物のトラッキングを示す)

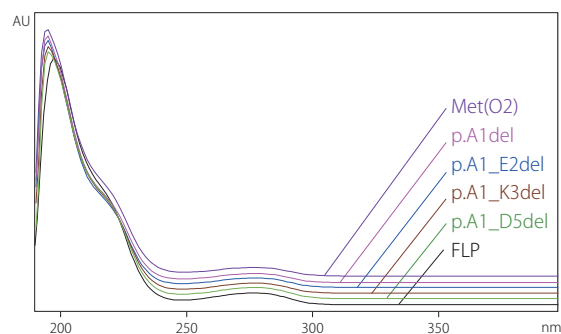


図19 FLPおよび各不純物のUVスペクトル

表3 FLPおよび各不純物の推定分子量および理論分子量の比較

名称	推定分子量	理論分子量
FLP	2660	2660
pA1del	2589	2589
pA1_E2del	2460	2460
pA1_K3del	2332	2332
pA1_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。

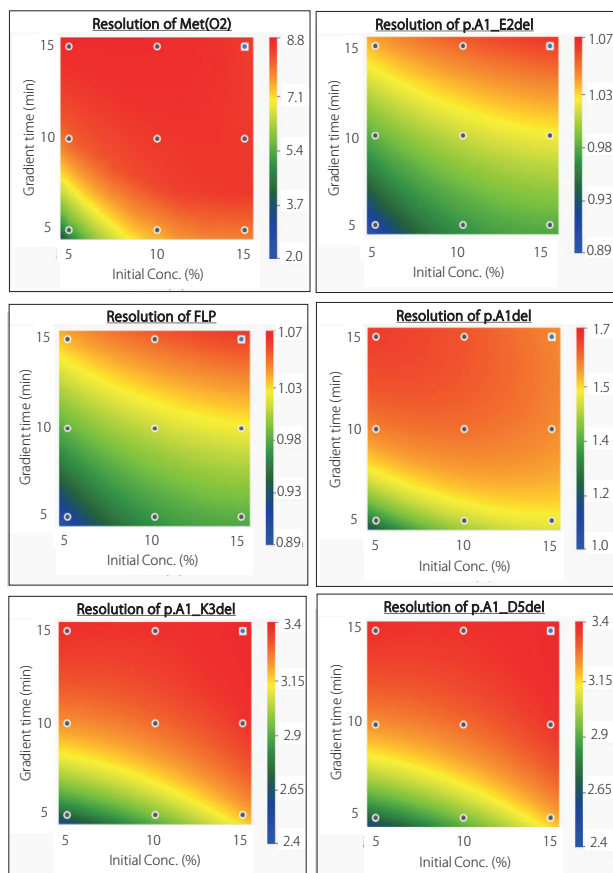


図 20 FLPおよび各不純物の分離度のデザインスペース
(流量：0.6 mL/min)

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。

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。

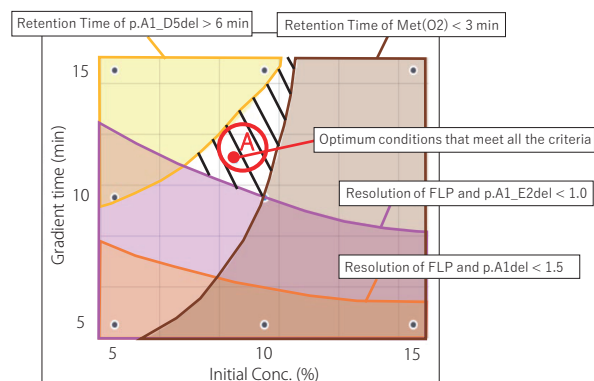


図 21 デザインスペースの重ね書きによる最適条件探索

■ 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。

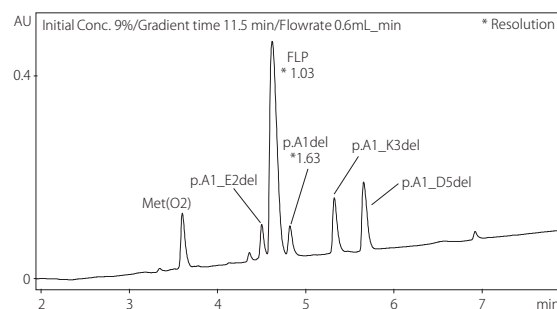


図 22 最適条件でのクロマトグラム
(水系移動相：0.1%ギ酸水 / 有機系移動相：MeOH / カラム：Scepter C8-120 / カラムオープン温度：80 °C)

■ 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、カラムオープン温度、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ペー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「[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 - 01-00814](#)」をご参照ください。

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

オートサンプラーの自動希釈機能を用いた 簡単操作による検量線作成の省力化

岩田 奈津紀、金丸 凌大

ユーザーベネフィット

- ◆ オートサンプラーの自動希釈機能により、手動での希釈調製の手間が省け、業務効率化と生産性向上が図れます。
- ◆ 同一のメソッドファイルを使用し、バッチテーブルで任意の希釈倍率を指定するだけの簡単な設定で、試料を自動希釈調製し、検量線を作成できます。
- ◆ 希釈倍率に依らずメソッドファイルが1つなので、HPLC条件を変更した際も設定や管理が容易です。

■はじめに

HPLCによる定量を行う際、標準液や試料溶液の希釈調製はピペットなどを用いて手動で行われますが、このような作業には労力と時間がかかります。近年、省力化を目的とした自動化が望まれており、これら希釈調製作業を自動化することができれば、業務の効率化や生産性の向上を図ることができます。

Nexeraシリーズのオートサンプラーには自動前処理機能が搭載されており、自動で希釈、試薬添加、共注入などを実施できます。自動希釈機能を用いることで任意倍率の希釈試料を自動調製し、そのまま分析カラムへ導入することが可能です。ここでは、オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡便な検量線作成方法についてご紹介します。

■前処理プログラムと動作概要

メソッドファイルには、装置パラメーター、解析パラメーター、前処理プログラム等の情報が集約されています。前処理プログラムを使用することで、100倍以上の高い希釈倍率であっても設定可能です。また、バッチアドイン（次頁、図2）を併用することで希釈倍率によらず1つのメソッドファイルを使用するため、設定ミス等の人為的エラーを防ぐことができます。

希釈倍率や混合動作に関する条件はワークステーション LabSolutions™ で設定します。オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面とコマンドを図1と表1に示します。本稿の希釈液には、リンス液を用いました。原液バイアルから希釈率に応じた量を吸引し、予めオートサンプラーに

セットしておいた空のバイアル（混合用バイアル）に希釈液と共に吐出します。その後、混合用バイアルの中で撹拌を行い、バッチテーブルに指定した注入量分だけ混合液を吸引し、カラムへ導入します。この時、自動希釈により得られる最終液量は100 µLです。

表1 前処理プログラムのコマンド（特許出願中）

Line	Command
1	a3=100/a2
2	n.drain
3	disp 600.0,rs
4	d.rinse
5	vial.n a0,a1
6	n.strk ns
7	aspir a3,ss
8	air.a 0.1,ss
9	d.rinse
10	vial.n rn,sn
11	n.strk ns
12	disp 100.1,rs
13	mix 1,5,40,ss,35
14	n.drain
15	disp 100.0,rs
16	d.rinse
17	inj.p
18	v.inj
19	wait 2.0
20	goto f0
21	end

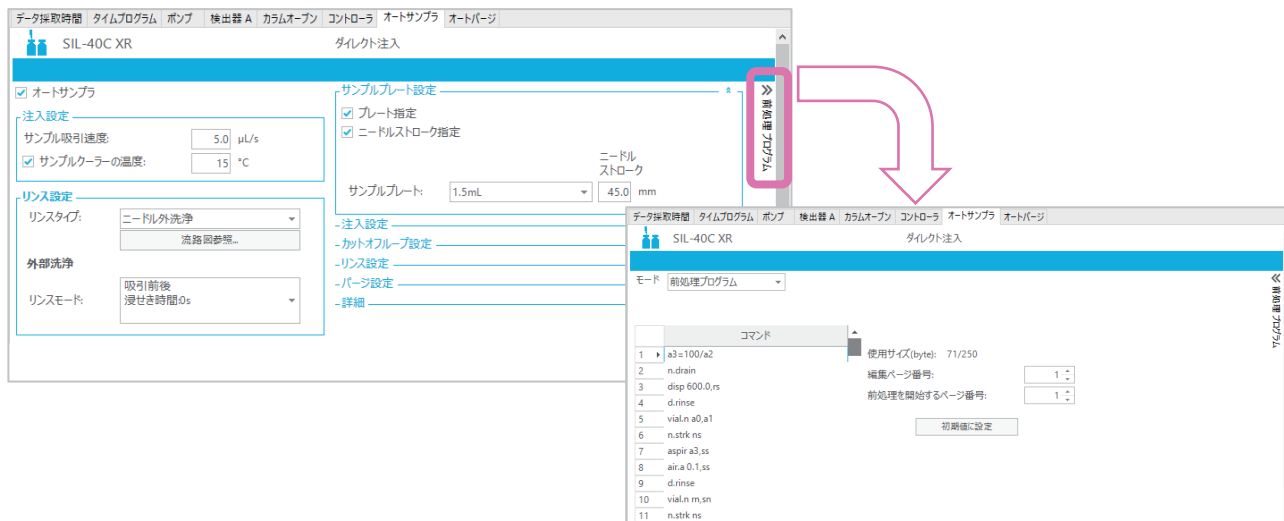


図1 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

■ バッチテーブルの設定方法

バッチ分析のテーブルに、原液を入れたバイアルの場所や任意の希釈倍率を設定するため、SIL前処理変数というバッチアドインをLabSolutionsに事前に適用します*1。図2にバッチテーブルのSIL前処理変数設定画面を示します。SIL前処理変数のA0～A2の欄に、原液を入れたバイアルのプレート番号（A0）とバイアル番号（A1）、希釈倍率（A2）を設定します。自動希釈用（混合用）の空バイアルは、バッチテーブルのトレイ番号およびバイアル番号で指定した場所にセットします。図2と同様に、サンプルタイプ（標準）とレベル番号を設定すると、分析終了後に検量線が自動生成されます（別途、解析パラメーターの設定が必要です）。

*1 詳細については、当社へお問い合わせください。

■ カフェイン標準液の自動希釈分析

250 mg/Lのカフェイン水溶液を用いて、自動希釈分析を行いました。表2に分析条件を示します。前処理プログラムは表1と同じです。混合用バイアルには1.0 mL ポリプロピレン製バイアルを、原液（標準および試料）バイアルには、セプタム付きバイアルを用いました。希釈液には、リンス液*2の超純水を用いました。図3に100倍希釈したカフェイン（自動希釈後の濃度：2.5 mg/L）のクロマトグラムを示します。

*2 マルチリンス機能を搭載したシステムについては、オートサンプラーの装置パラメータ設定で指定したリンス液を使用します。

表2 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ GIST C18*3 (75 mm×3.0 mm I.D., 2 μm)
Flow rate	: 0.6 mL/min
Mobile phase	: A) 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH 2.6) B) Methanol
Time Program	: 20%B (0 min)→23%B (3.30 min)→70%B (3.31-4.30 min)→20%B (4.31-5.50 min)
Column temp.	: 40 °C
Sample	: 250 mg/L Caffeine aq.
Injection volume	: 4 μL
Needle stroke	: 45 mm
Vial for mixing	: Shimadzu Vial, LC, 1 mL, Polypropylene*4
Vial for stock solution and sample	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*5
Diluent	: Rinse solution (Ultrapure water)
Detection	: 272 nm (SPD-M40)

*3 P/N: 227-30002-03, *4 P/N: 228-31600-91, *5 P/N: 227-34001-01

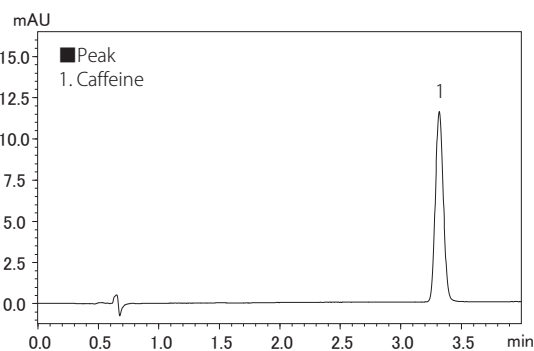


図3 自動希釈したカフェインのクロマトグラム
(希釈倍率：100倍、自動希釈後の濃度：2.5 mg/L)

■ 再現性

250 mg/Lのカフェイン水溶液を超純水で500倍に自動希釈した標準液（自動希釈後の濃度は0.5 mg/L）の6回繰り返し分析を行いました。表3にカフェインの保持時間と面積の再現性（%RSD）を示します。

表3 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Retention time	Peak area
0.02	0.96

■ 検量線

オートサンプラーの自動希釈機能を用いて、カフェインの検量線（濃度範囲：0.5～50 mg/L）を作成したところ、寄与率（ r^2 ）は0.999以上と良好な直線性が得られました。図4に検量線を示します。

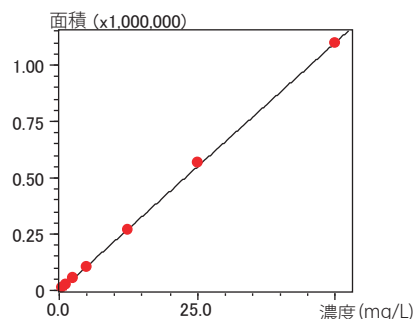


図4 検量線

分析	トレイ	バイアル番号	サンプル名	サンプルID	SIL前処理変数	データコメント	サンプルタイプ	レベル番号	注入量	メソッドファイル
1	1	1	Caffeine	500	A0=1;A1=53;A2=500	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準①	1	4	NS_GE3.lcm
2	1	2	Caffeine	200	A0=1;A1=53;A2=200	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	2	4	NS_GE3.lcm
3	1	3	Caffeine	100	A0=1;A1=53;A2=100	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	3	4	NS_GE3.lcm
4	1	4	Caffeine	50	A0=1;A1=53;A2=50	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	4	4	NS_GE3.lcm
5	1	5	Caffeine	20	A0=1;A1=53;A2=20	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	5	4	NS_GE3.lcm
6	1	6	Caffeine	10	A0=1;A1=53;A2=10	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	6	4	NS_GE3.lcm
7	1	7	Caffeine	5	A0=1;A1=53;A2=5	A0: Plate No., A1: Vial No., A2: Dilution ratio	1標準	7	4	NS_GE3.lcm

SIL前処理変数

Plate No. → A0: 1

Vial No. → A1: 53

Dilution ratio → A2: 5

A3:

A4:

A5:

A6:

A7:

OK

キャンセル

図2 バッチテーブルのSIL前処理変数設定画面

■ 飲料中カフェインの分析

試料は市販の緑茶とコーヒーを用いました。前処理は、緑茶とコーヒーをそれぞれ0.2 μmのメンブランフィルターでろ過しました。

前処理プログラムと分析条件は表1、2と同じです。図5、6にオートサンプラーの自動希釈機能を用いて100倍希釈した緑茶とコーヒーのクロマトグラムを、表4に分析結果（自動希釈後の濃度）を示します。

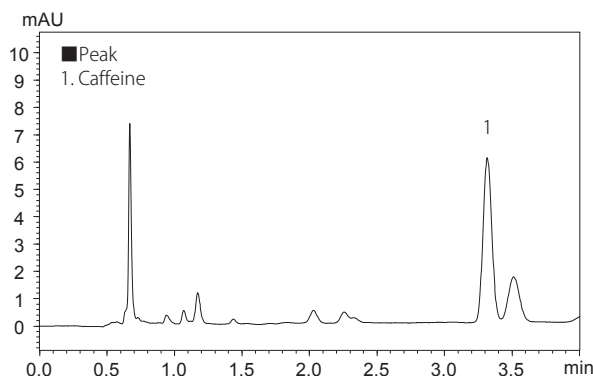


図5 自動希釈した緑茶のクロマトグラム
(希釈倍率：100倍)

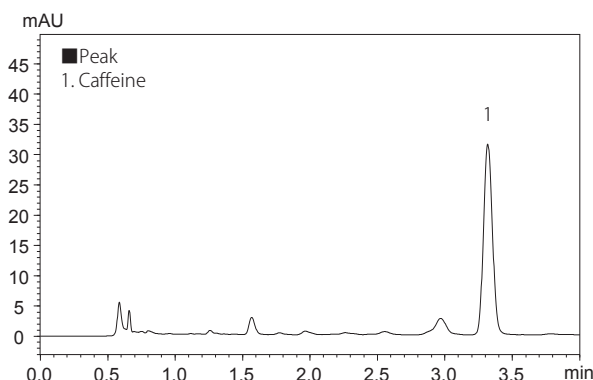


図6 自動希釈したコーヒーのクロマトグラム
(希釈倍率：100倍)

表4 分析結果 (n=6)

Sample	Concentration (mg/L)	%RSD
Green tea	1.32	0.72
Coffee	7.33	1.66

■ 成分含有量の自動計算および出力

バッチテーブルの希釈率セルに含有量を計算したい試料の希釈率を入力すれば、分析結果（濃度）には、自動希釈分析し得られた濃度ではなく、本来の試料に含まれる成分含有量としての濃度を表示することができます。図7にバッチテーブルの希釈率およびレポート自動出力設定画面、図8に緑茶分析を例に自動出力したレポートを示します。

サンプル名	希釈率	SIL前処理変数	レポート出力	レポートフォーマットファイル
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=500	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=200	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=100	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=50	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=20	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=10	☒	Report1sr
Caffeine	1	A0=1;A1=53;A2=5	☒	Report1sr
Blank	1	A0=1;A1=54;A2=10	☒	Report1sr
Coffee	100	A0=1;A1=52;A2=100	☒	Report1sr
Blank	1	A0=1;A1=54;A2=10	☒	Report1sr
GreenTea	100	A0=1;A1=51;A2=100	☒	Report1sr

図7 バッチテーブルの希釈率およびレポート自動出力設定画面

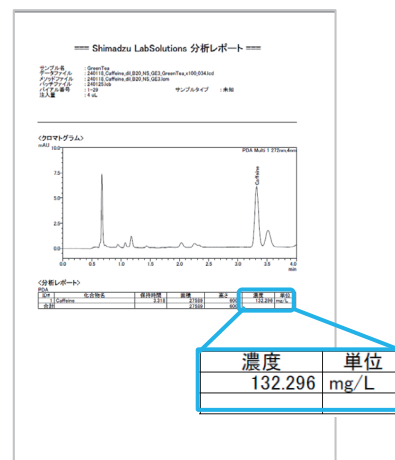


図8 レポート自動出力例（緑茶分析結果）

■ まとめ

任意の希釈倍率の検量線用試料を自動調製しそのまま分析に供することで、検量線を自動で簡単に作成することができました。標準液や試料溶液の原液のみを準備するだけで、その後の作業はHPLCにより自動で検量線作成から定量まで実施することができ、前処理作業の手間が省けました。本稿の検量線作成方法により、業務効率化と生産性向上を図ることができます。

バッチアラインの適用については、当社へお問い合わせください。

オートサンプラーの自動希釈機能を用いた
簡単操作による検量線作成の省力化（2）

岩田 奈津紀、金丸 凌大、馬場 栄里花

ユーザーベネフィット

- ◆ 手動での希釈調製の手間および有機溶媒の消費量を削減できます。
- ◆ 同一のメソッドファイルを使用し、バッチテーブルで任意の希釈倍率を指定するだけの簡単な設定で、試料を自動希釈調製し、検量線を作成できます。
- ◆ 希釈倍率に依らずメソッドファイルが1つなので、HPLC条件を変更した際も設定や管理が容易です。

■はじめに

HPLCによる定量を行う際、標準液や試料溶液の希釈調製はピペットなどを用いて手動で行われますが、このような作業には労力と時間がかかります。近年、業務の効率化や生産性の向上を図るため、省力化を目的とした自動化が望まれています。また、有機溶媒が希釈液の場合、メスフラスコを用いた検量線用標準液の調製に大量の溶媒を消費しますが、HPLC分析に必要な試料量は数十μL以下と小容量です。

Nexeraシリーズのオートサンプラーに搭載されている自動希釈機能を用いることで任意倍率の希釈試料を自動調製し、そのまま分析カラムへ導入することが可能です。アプリケーションニュースNo. 01-00717-JPでは、超純水を希釈液とした検量線作成法についてご紹介しました。ここでは、有機溶媒を希釈液とした分析例についてご紹介いたします。

■前処理プログラムと動作概要

メソッドファイルには、装置パラメーター、解析パラメーター、前処理プログラム等の情報が集約されています。前処理プログラムを使用することで、100倍以上の高い希釈倍率であっても設定可能です。また、バッチアドイン（次頁、図2）を併用することで希釈倍率によらず1つのメソッドファイルを使用するため、設定ミス等の人為的エラーを防ぐことができます。

希釈倍率や混合動作に関する条件はワークステーションLabSolutions™で設定します。オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面とコマンドを図1と表1に示します。本稿の希釈液には、リンス液を用いました。原液バイアル

から希釈率に応じた量を吸引し、予めオートサンプラーにセットしておいた空のバイアル（混合用バイアル）に希釈液と共に吐出します。その後、混合用バイアルの中で攪拌を行い、バッチテーブルに指定した注入量分だけ混合液を吸引し、カラムへ導入します。この時、自動希釈により得られる最終液量は100 μLです。

表1 前処理プログラムのコマンド（特許出願中）

Line	Command
1	a3=100/a2
2	n.drain
3	disp 600.0,rs
4	d.rinse
5	vial.n a0,a1
6	n.strk ns
7	aspir a3,ss
8	air.a 0.1,ss
9	d.rinse
10	vial.n rm,sn
11	n.strk ns
12	disp 100.1,rs
13	mix 1,5,40,ss,35
14	n.drain
15	disp 100.0,rs
16	d.rinse
17	inj.p
18	v.inj
19	wait 2.0
20	goto f0
21	end

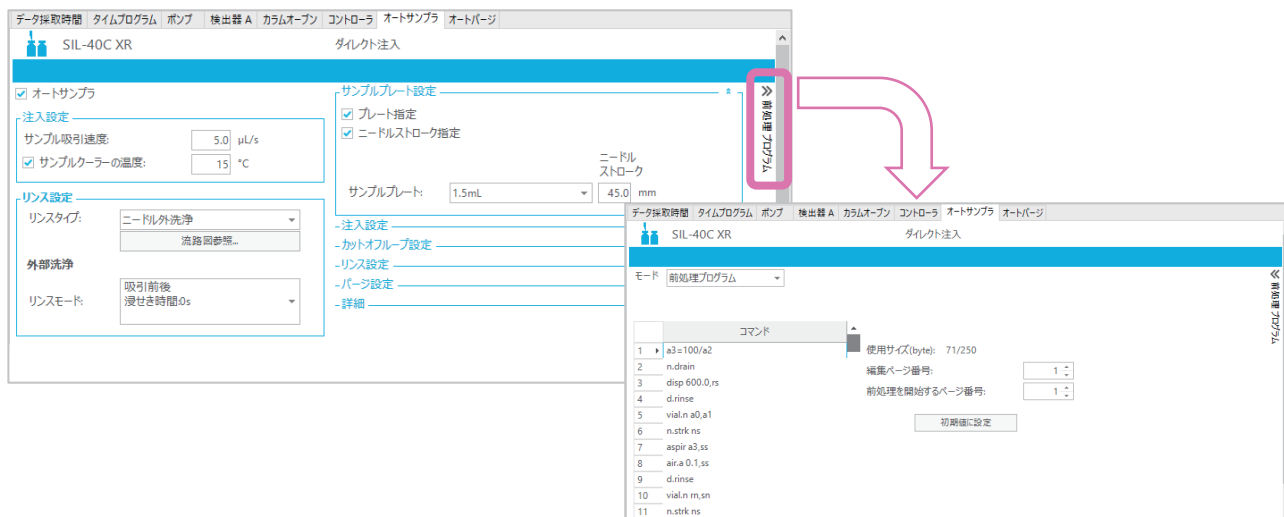


図1 オートサンプラーの前処理プログラムの設定画面

■ バッチテーブルの設定方法

バッチ分析のテーブルに、原液を入れたバイアルの場所や任意の希釈倍率を設定するため、SIL前処理変数というバッチアドインをLabSolutionsに事前に適用します*1。図2にバッチテーブルのSIL前処理変数設定画面を示します。SIL前処理変数のA0～A2の欄に、原液を入れたバイアルのプレート番号（A0）とバイアル番号（A1）、希釈倍率（A2）を設定します。自動希釈用（混合用）の空バイアルは、バッチテーブルのトレイ番号およびバイアル番号で指定した場所にセットします。図2と同様に、サンプルタイプ（標準）とレベル番号を設定すると、分析終了後に検量線が自動生成されます（別途、解析パラメーターの設定が必要です）。

*1 詳細については、当社へお問い合わせください。

■ 混合標準液の自動希釈分析

100 mg/Lのクマリンおよびシナマルアルデヒドの混合標準液（アセトニトリルに溶解）を用いて、自動希釈分析を行いました。表2に分析条件を示します。前処理プログラムは表1と同じです。混合用バイアルには1.0 mL ポリプロピレン製バイアルを、原液（標準および試料）バイアルには、セプタム付きバイアルを用いました。希釈液には、リンス液*2のアセトニトリルを用いました。図3に100倍希釈した混合標準液（自動希釈後の濃度：1.0 mg/L）のクロマトグラムを示します。

*2 マルチリンス機能を搭載したシステムについては、オートサンプラーの装置パラメータ設定で指定したリンス液を使用します。

表 2 分析条件

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack™ GIST-HP C18*3 (150 mm×3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Mobile phase	: A) Water B) Acetonitrile
Time Program	: 50%B (0-2.0 min)→60%B (4.0 min)→100%B (4.1-5.0 min)→50%B (5.1-5.5 min)
Column temp.	: 40 °C
Sample	: 100 mg/L Coumarin and Cinnamaldehyde in Acetonitrile
Injection volume	: 5 μL
Needle stroke	: 45 mm
Vial for mixing	: Shimadzu Vial, LC, 1mL, Polypropylene*4
Vial for stock solution and sample	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*5
Diluent	: Rinse solution (Acetonitrile)
Detection	: Ch1 (Coumarin): 276 nm, Ch2 (Cinnamaldehyde): 288 nm (SPD-M40)

*3 P/N: 227-30040-05, *4 P/N: 228-31600-91, *5 P/N: 227-34001-01

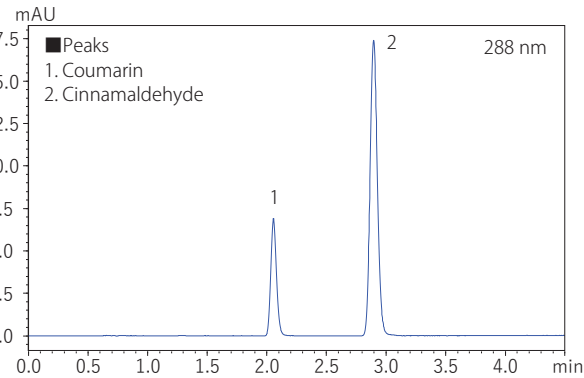
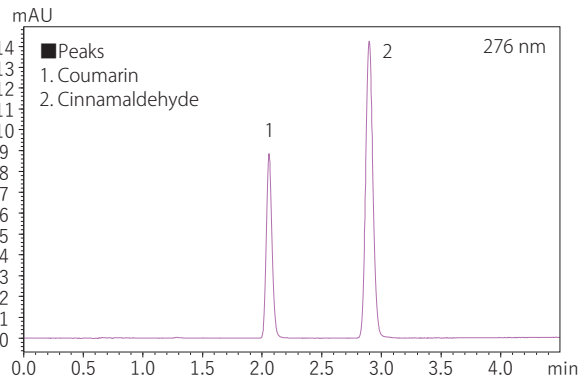


図 3 自動希釈したクマリンおよびシナマルアルデヒド混合標準溶液のクロマトグラム
(希釈倍率：100倍、自動希釈後の濃度：1.0 mg/L)

■ 再現性

自動希釈機能を用いて、混合標準溶液（希釈倍率：500倍、希釈後の濃度：各0.2 mg/L）の6回繰り返し分析を行いました。表3に保持時間と面積の再現性（%RSD）を示します。

表 3 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Compound	Retention time	Peak area
Coumarin	0.09	1.46
Cinnamaldehyde	0.06	1.82

分析	トレイ	バイアル番号	サンプル名	サンプルID	SIL前処理変数	サンプルタイプ	レベル番号	注入量	メソッドファイル
1	2	3	Standard	x1000	A0=2;A1=51;A2=1000	1:標準(1)	1	5	45_5.5m.lcm
2	2	4	Standard	x500	A0=2;A1=51;A2=500	1:標準	2	5	45_5.5m.lcm
3	2	5	Standard	x200	A0=2;A1=51;A2=200	1:標準	3	5	45_5.5m.lcm
4	2	6	Standard	x100	A0=2;A1=51;A2=100	1:標準	4	5	45_5.5m.lcm
5	2	7	Standard	x50	A0=2;A1=51;A2=50	1:標準	5	5	45_5.5m.lcm
6	2	8	Standard	x20	A0=2;A1=51;A2=20	1:標準	6	5	45_5.5m.lcm
7	2	9	Standard	x10	A0=2;A1=51;A2=10	1:標準	7	5	45_5.5m.lcm

SIL前処理変数

Plate No. → A0: 2
 Vial No. → A1: 51
 Dilution ratio → A2: 10

A3:
 A4:
 A5:
 A6:
 A7:

OK
 キャンセル

図 2 バッチテーブルのSIL前処理変数設定画面

■ 検量線

オートサンプラーの自動希釈機能を用いて、クマリンおよびシナマルアルデヒドの3回繰り返し分析による検量線（濃度範囲：0.1～10 mg/L）を作成しました。寄与率（ r^2 ）は0.9999以上と良好な直線性が得られました。図4に検量線を示します。

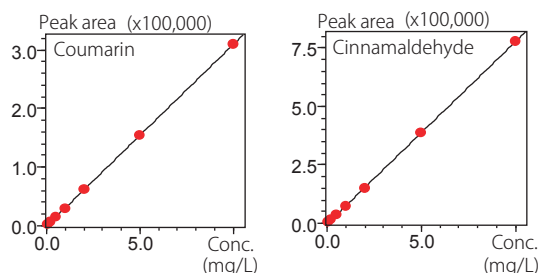


図4 検量線 (n=3)

■ シナモンの分析

試料は市販のカシアシナモンを用いました。前処理は、アプリケーションニュースNo. 01-00233-JP（図3）のフィルターろ過までの工程と同じです。なお、No. 01-00233-JPでは、前処理の最終工程にて、試料をアセトニトリルで希釈していましたが、本稿ではオートサンプラーで自動希釈しました。図5に前処理プロトコルを示します。抽出溶媒はアセトニトリルを用いました。脂質除去には、分散型固相抽出（dSPE）カートリッジ（Merck製Supel QuE Z-Sep+）を用いました。このカートリッジは試料負荷前のコンディショニングが不要であり、操作が簡便です。

図6にオートサンプラーの自動希釈機能を用いて100倍希釈したカシアシナモンのクロマトグラムを示します。対象の2成分と夾雑成分との分離は良好でした。表4に分析結果（自動希釈後の濃度）を示します。なお、表4には検量線試料の調製と前処理済シナモン抽出液のアセトニトリル希釈（100倍希釈）を手動で行った場合の分析結果を併せて示します。

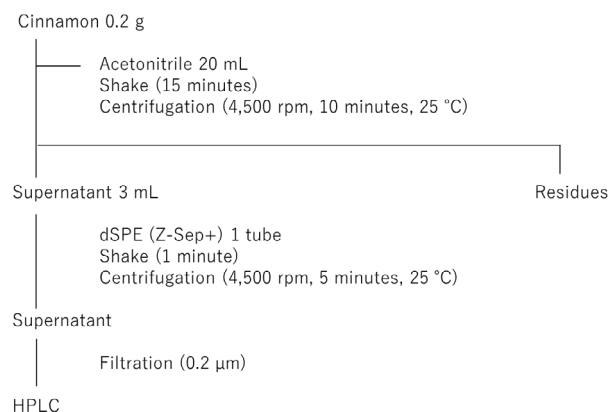


図5 前処理プロトコル

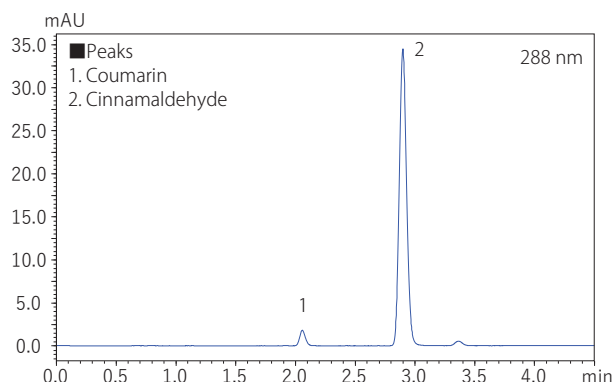
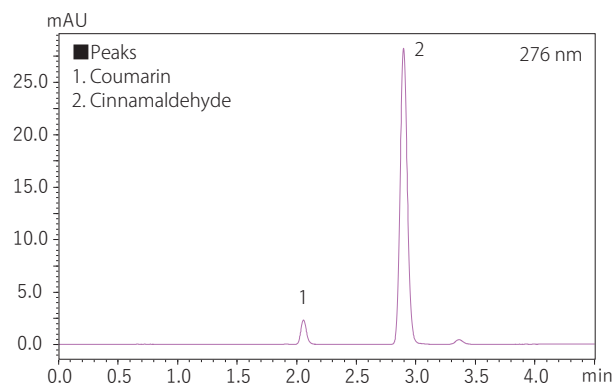


図6 自動希釈したカシアシナモンのクロマトグラム
（希釈倍率：100倍）

表4 定量結果 (n=3)

Compound	Concentration (mg/L) *6	
	Automatic	Manual
Coumarin	0.28 (0.72)	0.27 (0.38)
Cinnamaldehyde	1.90 (1.08)	2.02 (0.59)

*6 括弧の値は、%RSD, n=3を示す

■ まとめ

任意の希釈倍率の検量線用試料を自動調製しそのまま分析に供することで、検量線を自動で簡単に作成することができました。また、実試料の定量において、試料の希釈調製も自動で行うことにより、簡便な前処理のみで自動定量可能でした。本稿の検量線作成方法により、分析者の省力化、ならびにサステナブルの観点において省溶媒化が期待できます。

<関連アプリケーション>

1. 産地別シナモン中のクマリンおよびシナマルアルデヒド同時定量分析法 [Application News No.01-00233](#)
2. オートサンプラーの自動希釈機能を用いた簡単操作による検量線作成の省力化 [Application News No.01-00717](#)

バッチアドインの適用については、当社へお問い合わせください。

Nexera、LabSolutions、Shim-pack、およびSHIMADZU LabTotal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。

01-00807-JP

初版発行：2024年 9月

Nexera FVを用いたフロー合成反応のオンラインモニタリング

田邊 彩乃、坂本 勝正

ユーザーベネフィット

- ◆ フロー合成反応のオンラインモニタリングが実行できます。
- ◆ 専用ソフトウェアによる簡単操作で、指定時間でのサンプリングからモニタリング結果の出力まで自動で行えます。
- ◆ フロー合成装置にHPLCを使用することで、安定した実験系が構築可能です。

■はじめに

医薬品やファインケミカル業界では、効率化（省力/省人化）、品質および安全性の向上、環境負荷の低減を目的に、従来主流であったバッチ生産の手法から、連続生産へ切り替える動きが広がりつつあります。

原薬および製剤の連続生産のガイドライン ICH-Q13では、管理された状態を維持して製造することを目的としてプロセス解析工学（Process Analytical Technology: PAT）の適用を推奨しており、PATの需要が高まっています。

Nexera FVは、オートサンプラーにフローバイアルを搭載したオンライン分析用HPLCシステムです（図1）。反応液を連続的にフローバイアルへ送り込み、HPLC分析、レポート出力までの工程を自動化することができます。

本稿ではカルボン酸のエステル化反応をモデルケースとし、Nexera FVを用いたフロー合成反応のオンラインモニタリングを行った事例を紹介します。



図1 Nexera™ FV（フロー合成用）およびフローバイアル

■実験条件

酸性条件下でのエステル化反応について検討しました。脱水縮合によるエステル化は、カルボン酸とアルコールが反応してエステルを生成するプロセスで、酸触媒のもとで行われます。原料のカルボン酸として3-フェニルプロピオン酸、アルコールにはメタノールを用い、酸触媒は強酸性触媒であるAmberLyst 36WETを反応カラムに充填して使用しました（図2）。

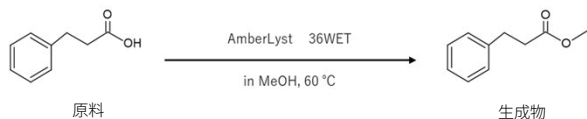


図2 フェニルプロピオン酸のエステル化反応

今回の実験では、50 mmol/L フェニルプロピオン酸のメタノール溶液を、60 °Cに加熱した反応カラム（AmberLyst 36WET）に流速0.1 mL/minで送液してエステル化させた反応液のオンラインモニタリングを行いました（図3）。

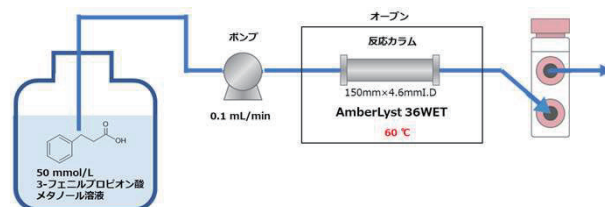


図3 フロー合成によるモニタリング流路

■Nexera FVによるオンラインモニタリング

Nexera FVではフロー合成装置から流れてくる反応液をフローバイアルに導入してサンプリングを行います。今回は、フロー合成装置として当社Nexera Seriesの送液ポンプLC-40DとカラムオープンCTO-40Cを用い、Nexera FVと接続して反応カラムから反応液をフローバイアルへ導入しました（図4）。送液開始前の状態を0分として、作成した分析スケジュールに従ってフローバイアルから自動でサンプリングを行い、HPLC分析に供しました。

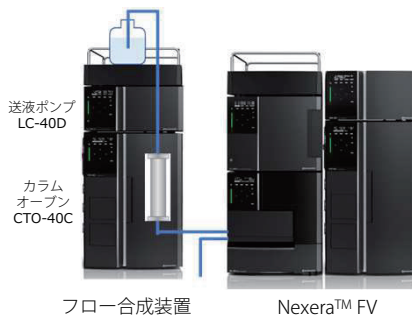


図4 フロー合成装置とのセットアップ

■LabSolutions™ FVによる簡便な分析スケジュール作成

オンラインモニタリング専用ソフトであるLabSolutions FVIは、反応モニタリング時の分析スケジュール作成や条件設定などの煩雑な操作を簡便に実施可能です（図5）。HPLC条件やサンプリング間隔などの情報を入力するだけで分析スケジュールが自動で作成され、手間なくオンラインHPLC分析を開始できます。バイアルへの分画や希釈操作にも対応しています。外部信号入力や指定した時間でのサンプリング開始にも対応しており、他システムとの連携も可能です。

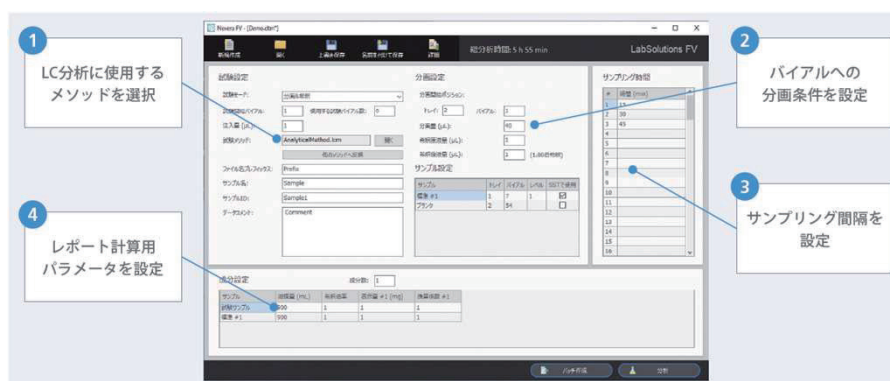


図5 LabSolutions FVの設定画面

■ 反応液の分析

今回のフロー合成反応のモニタリングでは、反応液をフローバイアルから直接HPLC流路へ注入する、ダイレクト注入方式で測定を行いました。表1にHPLC分析条件を、図6(a)に反応液(0分)のクロマトグラムを、図6(b)に反応液(300分経過時)のクロマトグラムを示します。フェニルプロピオン酸は0.49分に、生成物は1.15分にピークが検出されました。送液開始後 20~960分にかけて反応モニタリングを行った結果、本条件では、120分以降でエステル化した生成物が95~96%の純度で安定的に得られることを確認できました。

表1 HPLC分析条件

Column	: Shim-pack Velox™ C18 ^{*1} (50 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm)
Mobile phase A	: 0.5% Formic acid in Water
Mobile phase B	: Acetonitrile
Time program	: 30% (0 min)→95% (0.45-1.40 min)→ (%B) 30% (1.41-3.5 min)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection vol.	: 1 μL
Detection	: UV 254 nm

*1 P/N : 227-32001-02

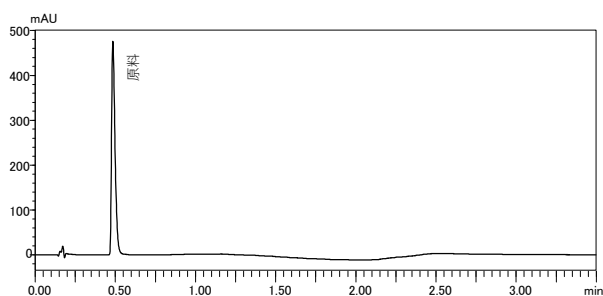


図6(a) 反応液 (0分) のクロマトグラム

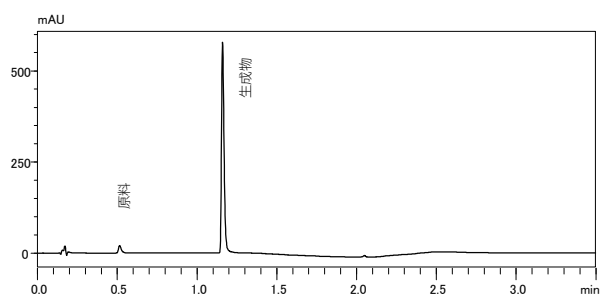


図6(b) 反応液 (300分経過時) のクロマトグラム

■トレンドプロットによる反応生成物の追跡

反応モニタリング結果より、フェニルプロピオン酸と生成物のピーク面積の増減についてLabSolutionsのマルチデータレポート^{*2}機能を用いて作成したトレンドプロットを示します(図7)。マルチデータレポート機能を用いることで、分析終了後に合成過程における収率や中間体の推移が視覚的に確認可能なレポートを自動出力(図8)できます。

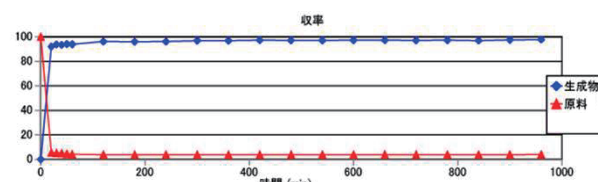


図7 フェニルプロピオン酸(原料)と生成物に関するトレンドプロット

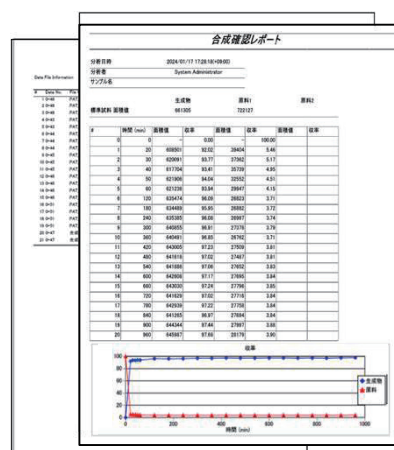


図8 マルチデータレポート例^{*2}

*2 マルチデータレポートはLabSolutions DB/CSの機能となります。

■ まとめ

Nexera FVを用いてフロー合成によるフェニルプロピオン酸のエステル化反応のオンラインモニタリングを実施しました。反応系とフローバイアルを接続することにより、分析スケジュールに従いサンプリングから分析までを自動で実行できました。また、マルチデータレポート機能により、分析後にトレンドプロットを自動作成することで原料と生成物に関する反応追跡が可能でした。Nexera FVとLabSolutions FVを用いることにより、分析スケジュール作成の簡便化、さらにサンプリングやレポート出力を自動化でき、作業時間の削減と効率化が実現できました。

Nexera、LabSolutions、およびShim-pack Velox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。

01-00779-JP

初版発行：2024年 8月

ロキソプロフェンナトリウム錠の
オンライン溶出試験

田邊 彩乃、松岡 佳那

ユーザーベネフィット

- ◆ 溶出試験のオンライン化により、試験液サンプリングからHPLC分析にかかる作業工数の大幅な削減が実現できます。
- ◆ フラクション分析モードは最短5分間隔の試験液サンプリングに対応し、省力化とヒューマンエラーの防止が期待できます。
- ◆ ダイレクト注入分析モードでは分画用バイアルを準備する必要がなく、コスト削減が可能です。

■はじめに

製剤の製造管理については、日本薬局方(JP)や米国薬局方(USP)などの規格によって崩壊試験や溶出試験が定められています。

Nexera FVは、製剤溶出試験の自動化を可能にするオンラインHPLCシステムです。溶出試験器と接続することにより、錠剤の投入から各サンプリング時間における試験液の分析、溶出率の算出、レポート出力まで自動化することができます。ヒューマンエラーを無くし、溶出試験の省力化と効率化の実現ができます。

本稿では、Nexera FVを用いてロキソプロフェンナトリウム錠のオンライン溶出試験を行った結果を報告します。

■ Nexera FVによる溶出試験のオンライン化

Nexera FVに溶出試験器のサンプリング装置とフィルタろ過装置を接続し、図1のようにオンライン溶出試験システムを構築しました。溶出試験器からサンプリングされた試験液は、フィルタ部でろ過された後、Nexera FVのオートサンブラに搭載されたフローバイアル(図2参照)に直接流れ込みます。フローバイアル内の試験液をオートサンブラのニードルから吸引してHPLC流路に注入することで、分析が開始されます。

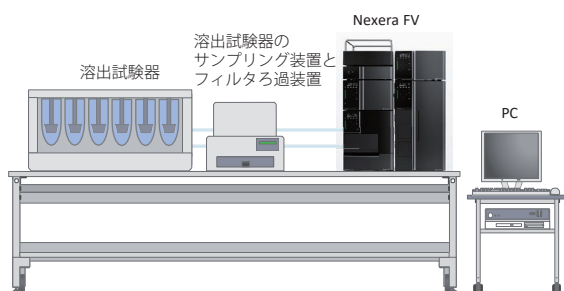


図1 Nexera FVを用いたオンライン溶出試験システム構成例

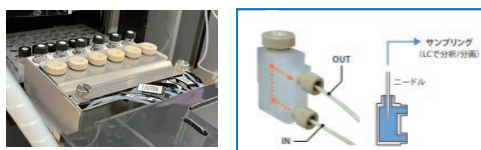


図2 フローバイアル

Nexera FVには、フラクション分析モードとダイレクト注入分析モードの2つのメソッドがあります。

フラクション分析モードは、溶出試験器からの試験液を一旦バイアル等へ分画するモードです。最短5分のサンプリング間隔に対応します。溶出試験終了後にまとめてHPLC分析を行うことや、サンプリングの合間に分析を挟み込むことも可能です。試験液の自動希釈や内部標準物質の自動添加にも対応している分析モードです。

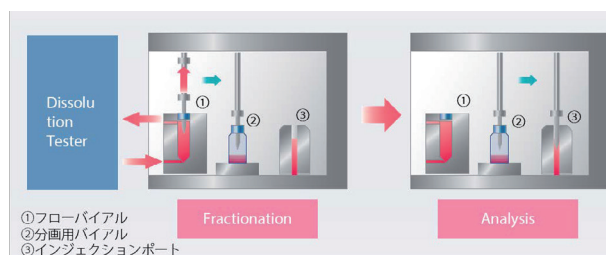


図3 フラクション分析モード

ダイレクト注入分析モードは、溶出試験器からの試験液をフローバイアルから直接HPLCへ注入するモードです。1つ目のフローバイアルの分析が終わってから、2つ目のフローバイアル内の試験液を吸引し分析を開始するという流れです。サンプリング間隔が大きい場合に有効です。

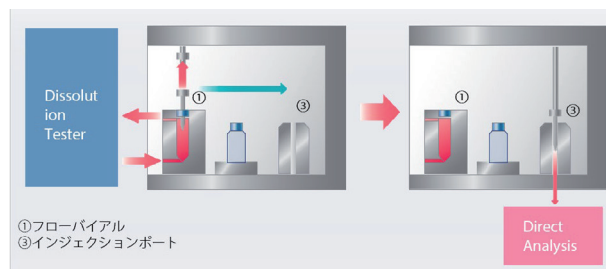


図4 ダイレクト注入分析モード

■ロキソプロフェンナトリウム錠の
オンライン溶出試験

ロキソプロフェンナトリウム錠のオンライン溶出試験を行いました。HPLC条件は第十八改正日本薬局方「ロキソプロフェンナトリウム錠」定量法収載の条件を参考に高速化を行い、ロキソプロフェンナトリウム錠の保持時間を約1分になるようにし、1分析あたりの分析時間を1.5分に短縮しました。表1に溶出試験条件を、表2にHPLC条件を示します。

表1 溶出試験条件

System	: NTR-6600AST (TOYAMA SANGYO CO., LTD.)
Dissolution method	: Paddle
Dissolution media	: Water
Media volume	: 900 mL
Rotation speed	: 50 rpm
Bath temperature	: 37 °C
Total time	: 30 min
Sampling time	: 5、10、15、20、25 and 30 min

表2 HPLC条件

Column	: Shim-pack™ XR-ODS II *1 (75 mm×3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: Methanol/Water/Acetic Acid/Triethylamine =600:400:1:1
Flow rate	: 0.8 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection vol.	: 2 μL
Detection	: UV 222 nm

*1 P/N : 228-41624-91

● 標準溶液の分析

1.5 mLバイアルを用い、ロキソプロフェンナトリウム標準溶液（60 mg/L）の6回連続分析を行いました。図5にクロマトグラムを、表3に再現性結果を示します。保持時間のRSD 0.07%、面積値のRSD 0.05%と、良好な結果が得られました。

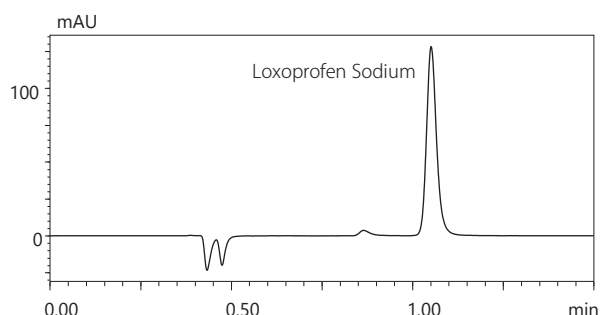


図5 ロキソプロフェンナトリウム標準溶液（60 mg/L）のクロマトグラム

表3 標準溶液の再現性（60 mg/L、n=6）

	Retention time (min)	Area
1st	1.051	248,209
2nd	1.052	248,265
3rd	1.053	248,129
4th	1.052	248,232
5th	1.052	248,380
6th	1.051	248,038
Averages	1.052	248,209
%RSD	0.07	0.05

● フラクション分析モードによる測定

試験液のサンプリングは5、10、15、20、25、30分の計6回行いました。図6にロキソプロフェンナトリウム錠試験液（表示量1錠あたり68.1 mg、溶出時間30分）のクロマトグラムを示します。

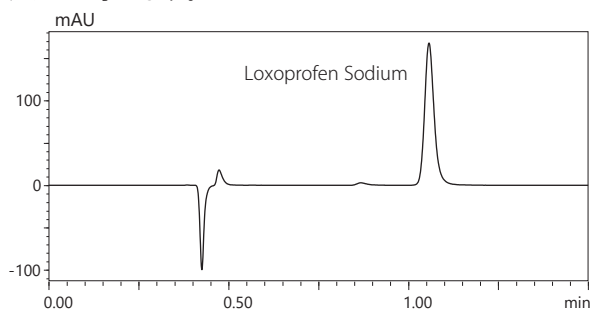


図6 ロキソプロフェンナトリウム錠試験液（溶出時間30分）のクロマトグラム

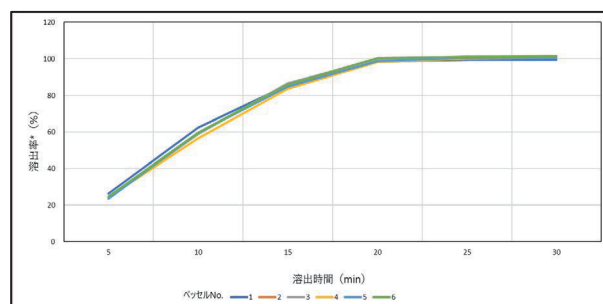
NexeraおよびShim-packは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

表4に各ベッセルにおける溶出率の経時変化を、図7にロキソプロフェンナトリウム錠の溶出曲線を示します。

第十八改正日本薬局方において、ロキソプロフェンナトリウム錠の30分間の溶出率が85%以上であることと規定されており、今回行った試験ではその基準を満たしました。

表4 各ベッセルにおける溶出率の経時変化（%）

Time (min)	5	10	15	20	25	30
Vessel No.						
1	26.28	62.34	85.67	98.45	99.53	99.49
2	23.88	59.71	84.98	99.07	101.08	100.89
3	23.90	58.78	86.68	99.80	101.27	101.18
4	24.33	56.44	83.55	98.18	100.25	100.64
5	23.54	59.62	84.81	98.77	100.54	100.61
6	24.77	59.54	85.97	100.41	101.15	101.59



*：溶出率(%)=濃度(mg/L)×試験液量 0.9(L)/表示量 68.1(mg)×100

図7 溶出曲線

● ダイレクト注入分析モードによる測定

次に、ダイレクト注入分析モードを用いたオンライン溶出試験を行いました。試験液のサンプリングは30分のみ行いました。表5に各ベッセルにおける溶出率を示します。ダイレクト注入分析モードにおいても、30分間の溶出率が85%以上となりました。

表5 各ベッセルにおける溶出率（%）

Time(min)	30
Vessel No.	
1	103.49
2	101.67
3	100.40
4	100.29
5	102.42
6	102.32

■ まとめ

本稿では、Nexera FVを用いたロキソプロフェンナトリウム錠のオンライン溶出試験の例をご報告しました。フラクション分析モードでは5分ごとのサンプリングに対応することができます。またダイレクト注入分析モードは分画用バイアルを準備する必要がなく、コストも低減できます。このように、Nexera FVは製剤溶出試験の自動化、効率化が実現できるオンラインHPLC分析システムです。

一連の分取精製ワークフローを効率化する 分析分取LC-MSシステム

藤崎 真一、増田 佑亮

ユーザーベネフィット

- ◆ 分析LCから分取LCへのスケールアップ及び純度/回収率確認を1システムで完結できます。
- ◆ 分取LCの分離条件検討を、LabSolutions MDの分析スケジュール自動生成機能により効率化できます。
- ◆ シングル四重極質量分析計 LCMS-2050により、分取対象化合物の質量情報が得られます。

■はじめに

分取LCは、混合物からの目的化合物の精製や天然物中の有効成分の探索、あるいは、不純物や未知化合物の構造解析等の用途で、医薬・食品・化学といった幅広い分野で使用されています。目的化合物を純度高く回収するには、他の成分や夾雑成分と分離した条件の確立が重要ですが、分取LC条件では、使用する試料量や移動相消費量が多いため、試料や移動相の消費を抑えられる分析スケールにて、分離条件を検討することが一般的です。条件検討においては、グラジエント条件等のLCパラメーターを複数パターン変動させることで最適分離を探索しますが、各条件におけるメソッド作成や分析スケジュールの作成には手間がかかります。また、分析スケールでの条件検討後に、スケールアップ及び目的化合物の分取を実施しますが、その後の純度/回収率確認では分取した画分を、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業が手間となります。本稿では、Nexera Prepシリーズの分析分取LC-MSシステムにより、分析スケールでの分離条件検討、スケールアップ及び分取、純度/回収率確認といった一連の分取精製ワークフロー（図1）を一つのシステムで実施した事例について紹介します。

分析スケールでの目的化合物の分離条件探索

探索された最適分離条件にて負荷量の検討

目的化合物の分取

純度/回収率の確認

図1 分取精製ワークフロー

■分析分取LC-MSシステムの概要

分析分取LC-MSシステムの流路図を図2に示しました。分析スケールでの分離条件検討、負荷量の検討、純度/回収率の確認では分析流路（図2上）が使用され、目的化合物の分取時には分取流路（図2下）が使用されます。分析用と分取用の2流路を併せ持ち、試験管等に分取した画分を直接分析流路へ注入できるリキッドハンドラー（LH-40）により、一連の分取精製ワークフローを本システムにて完結できます。また、LCMS-2050により、分離条件検討時には、目的化合物の質量情報が得られるだけでなく、分取時には、UV信号とMS信号を組み合わせてトリガーとして用いることが可能です。そのため、目的化合物をより純度高く回収できます。また、本システムはMSによる分取と検出を両立させるために分取流路をスプリットし、メイクアップポンプを用いて移動相の一部をMSに導入する構成となっています。

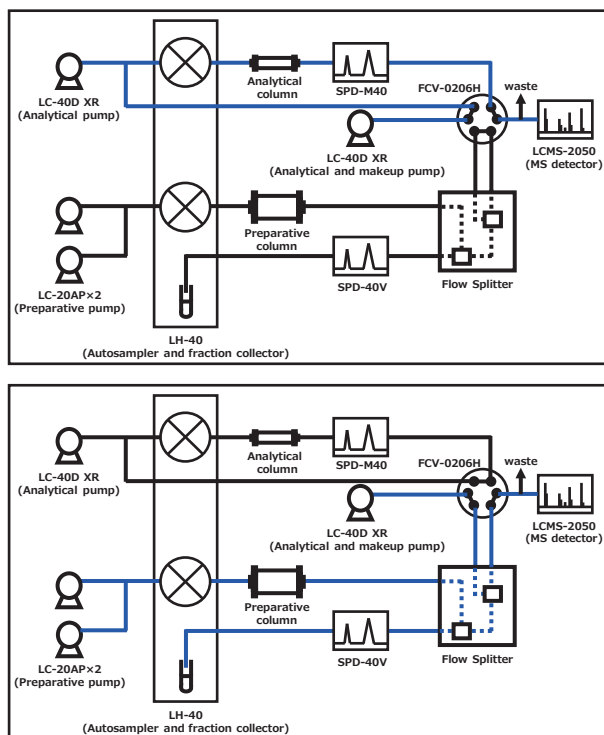


図2 分析流路（上）、分取流路（下）
*青色部分が使用する流路

以降では、本分析分取LC-MSシステムを用い、モデル化合物として、医薬品の7種混合標準品（分取対象化合物：Hydrocortisone）を用いて一連の分取精製ワークフローを効率化した事例について説明します。

■分析スケールでの分離条件探索

分析流路にて、分取対象化合物（Hydrocortisone）の分離条件の検討を行います。分離条件検討前のLCクロマトグラム（分析条件：表1）を図3に示します。Hydrocortisoneの近傍にはSalicylic acidが溶出しています。この条件を用いて負荷量を増加させると2化合物間の分離がさらに悪化し、回収時の純度が低下する恐れがあるため、分離の改善が必要です。ここでは、グラジエント条件を9パターン（初期濃度とグラジエントスロープを3パターンずつ）変動させることで、分離を検討しました。この際、各種LCパラメーターを網羅的に変動させた分析スケジュールを自動生成できるLabSolutions MDを用い、分離条件検討を効率化しました（図4）。得られたクロマトグラムを図5に示しており、初期濃度が15%、グラジエントスロープが20分（図5の③）の条件でHydrocortisoneとSalicylic acidの分離度が改善し最大となったため、次の負荷量の検討は、本条件をベースに実施しました。分離の検討時には、LCMS-2050により質量情報（Hydrocortisone：m/z 363.3）も同時に取得し、合成確認等の定性情報として活用しました。

表1 分析条件

Mobile Phase	: Pump A : 0.1% formic acid in water : Pump B : Acetonitrile
Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)*1
Sample	: (A) Hydrocortisone, (B) Salicylic acid, (C) Metoclopramide, (D) Lidocaine, (E) Furosemide, (F) Papaverine, (G) Quinidine
Sample Concentration	: 100 mg/L (Hydrocortisone), 10 mg/L (others)
Injection Volume	: 10 μL

LC Conditions

Time Program : B Conc. 25%(0 min)→45%(20 min)
→25%(20.01-25 min)

Column Temp. : Ambient
Flow rate : 1 mL/min
Sample loop size : 500 μL
Syringe size : 500 μL
Detection (PDA) : 245 nm (SPD-M40, conventional cell)

MS conditions

Ionization : ESI/APCI (DUIS™), positive and negative
Mode : SCAN (m/z 100-500)
Nebulizing Gas Flow : 2.0 L/min (N₂)
Drying Gas Flow : 5.0 L/min (N₂)
Heating Gas Flow : 7.0 L/min (N₂)
DL Temp. : 200 °C
Desolvation Temp. : 450 °C
Interface Voltage : 3.0/-2.0 kV (positive/negative)

*1 P/N: 227-31020-05

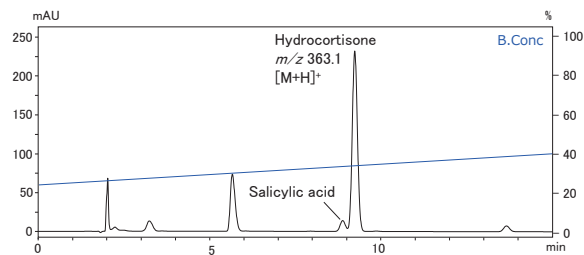
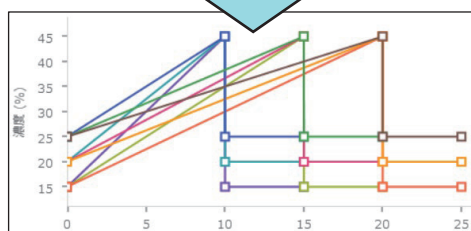
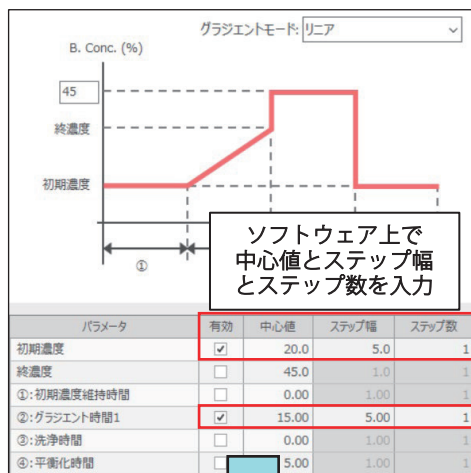


図3 分離条件検討前のLCクロマトグラム



カラム平衡化も反映した分析スケジュール
(初期濃度3パターン×グラジエントスロー
プ3パターン=9条件)を自動生成

図4 LabSolutions MDIによる分析スケジュール生成の自動化

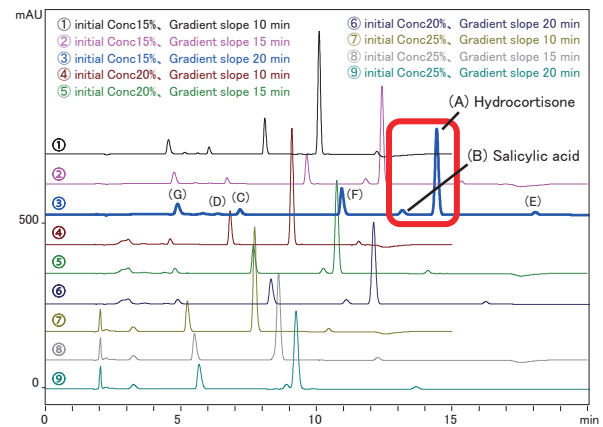


図5 LabSolutions MDIによる分離条件検討結果
*HydrocortisoneとSalicylic acidの分離が
最も良いのは③ (青色) のクロマトグラム

■ 負荷量の検討

分析スケールにて最適化された条件 (図5の③) で、Hydrocortisone (10000 mg/L) を用いて、10, 20, 30, 40, 50, 100 μLの注入量で負荷量の検討を実施しました (図6)。注入量が100 μLでは、HydrocortisoneとSalicylic acidの分離が悪化 (図中青丸内) しています。また、裾野には不純物と思われる微小ピーク (図中赤丸内) が重なりました。注入量が50 μLまでは、Hydrocortisoneが近傍のピークと一定の分離が得られています。そのため、注入量50 μLの条件にてスケールアップし、分取を実施することとしました。

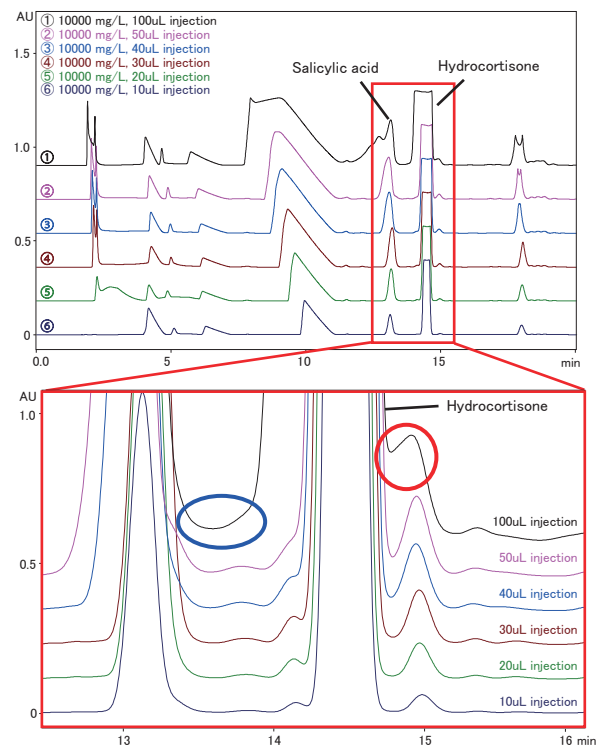


図6 負荷量の検討結果

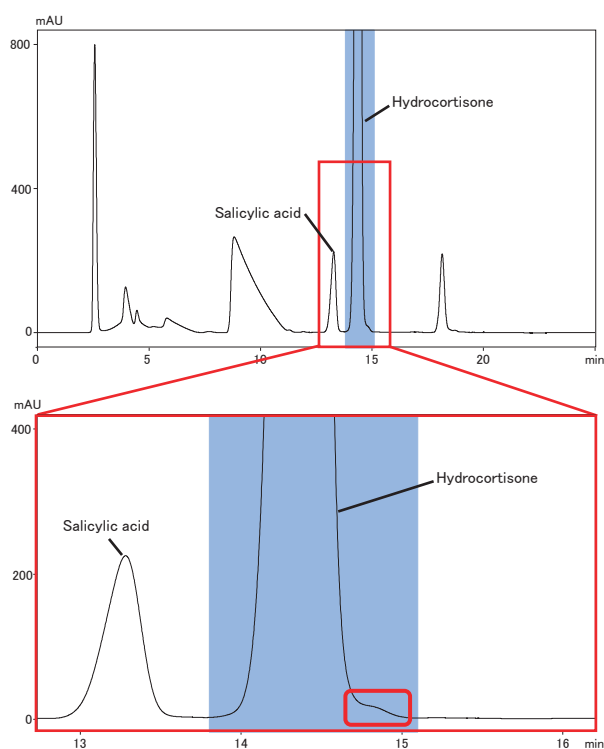
■ 目的化合物の分取

UVトリガーにてHydrocortisoneの分取を実施しました。分取条件を表2 (表1と異なるパラメータのみ記載) に、得られたLCクロマトグラムを図7 (青い領域が分取領域) に示します。分取カラム (内径20 mm) と分析カラム (内径4.6 mm) の断面積比 (約20倍) に基づき、流量を20 mL/min (線速度はスケールアップ前後で一定) に、注入量を1 mLにスケールアップしました。その結果、スケールアップの前後で同等の分離パターンが得られ、Salicylic acidとの分離を保ったままHydrocortisoneを分取することができました。

表2 分取条件

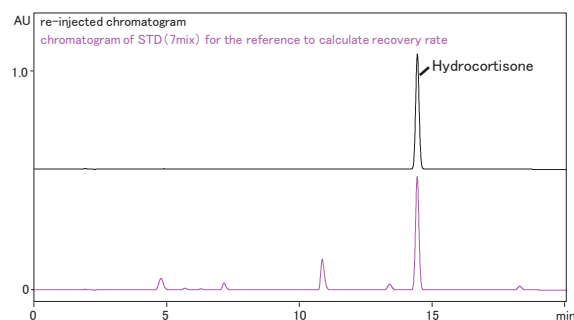
Column	: Shim-pack™ Scepter C18-120 (150 mm × 20 mm I.D., 5 μm)*1
Sample Concentration	: 10000 mg/L (Hydrocortisone), 1000 mg/L (others)
Injection Volume	: 1 mL
LC Conditions	
Flow rate (Prep)	: 20 mL/min
Flow rate (Makeup)	: 1.5 mL/min (Methanol)
Sample loop size	: 2 mL
Syringe size	: 5 mL
Detection (UV)	: 245 nm (SPD-40V, preparative cell)
MS conditions	
Desolvation Temp.	: 100 °C

*1 P/N : 227-31102-03

図7 UVトリガーによる分取クロマトグラム
*青い領域が分取領域

■ 純度/回収率の確認

分取したHydrocortisoneを分析流路に再注入した際に得られたクロマトグラム及び、分取したHydrocortisoneと同じ濃度になるように調製した混合標準品（回収率算出時のリファレンス用）のクロマトグラムを図8に示します。また、分取されたHydrocortisoneの純度及び回収率を表3に示します。純度は面積百分率で99%以上得ることができ、回収率も良好な結果となりました。

図8 純度/回収率確認時の再注入クロマトグラム（上）
混合標準品のクロマトグラム（下）表3 分取したHydrocortisoneの純度及び回収率
(n=3, 平均値)

	純度(面積%)	回収率(%)
Hydrocortisone	99.7	101.2

図7の下側には、Hydrocortisoneを分取した領域の拡大図を示していますが、Hydrocortisoneの裾野に、不純物と思われるピークが極微量ですが観察されています（赤枠内）。分取結果としては、UVトリガーのみの使用でも、99.7%の純度（表3）が得られていますが、本分析分取LC-MSシステムにおいては、MSトリガー分取にも対応しているため、MSの高い定性能力によって、不純物を回避し、さらに高い純度で目的化合物を分取することも可能です。MSトリガー分取の詳細については[アプリケーションニュース「01-00651-JP」](#)を併せてご参照ください。

■ まとめ

分取精製ワークフローである、分析スケールでの分離条件検討、スケールアップ及び分取、純度/回収率確認を分析分取LC-MSシステムを用いて完結できることをご紹介しました。分析スケールでの分離条件検討時では、LabSolutions MDの各種LCパラメータを変動させた複数条件の分析スケジュールの自動生成機能により、分取対象化合物の分離検討を効率化できます。また、LCMS-2050により質量情報も同時に取得可能です。さらに、リキッドハンドラーLH-40により、試験管等に分取した画分を直接分析流路へ注入できるため、分取した画分を、フラクションコレクターからオートサンプラーに移す作業無く、シームレスな純度/回収率確認を実現します。本分析分取LC-MSシステムを用いたMSトリガー分取の詳細については「[01-00651-JP](#)」をご参照ください。

Nexera ASAPrepによる分取精製業務の効率化支援

松田 倫太郎、増田 佑亮、寺田 英敏

ユーザーベネフィット

- ◆ 独自のスケールアップアルゴリズムに基づく最適分取条件の自動生成機能により、分取精製作業を効率化します。
- ◆ 直感的なUI設計とシステムの自動コンディショニングにより、作業者の経験によらず簡単に分取精製を実行可能です。
- ◆ サンプルの分取難易度を自動判定する機能により、作業者の経験に合わせた分取精製作業の割り振りを支援します。

■はじめに

化合物の合成時には、通常、主成分だけでなく不純物も生成されるため、後工程の精度向上の観点から精製作業が必要となります。精製作業には、分取精製液体クロマトグラフ（分取LC）も多用されますが、この作業にはノウハウや多大な工数が必要とされるため、効率化が求められています。

逆相精製自動スケールアップシステムNexera ASAPrep（Automated Scale-up from Analytical to Preparative）は、サンプルの分取難易度の自動判定機能や最適分取条件の自動生成機能を搭載しています。更に、直感的なUI設計と移動相切り替え時のシステムの自動コンディショニングにより、作業者の経験によらず誰でも容易に分取精製を実施できます。これらの特徴を通じて、本システムは分取難易度に応じた分取精製作業の振り分けを支援できるため、分取精製業務を効率化します。

本稿では、主成分と複数種類の副成分を含む3種類の混合試料をモデルサンプルとし、Nexera ASAPrepによる分取精製作業のワークフローを用いた実施例をご紹介します。

■HPLCを用いた分取精製作業のワークフロー

HPLCを用いた分取精製では、理想的には規定条件による分析を通じて分離状態の評価を行った後、フォーカス条件を用いた分析スケールでの分離最適化、最大負荷量の検討を経た上で、分取スケールでの再現確認や負荷量の調整を行います（図1緑矢印）。しかし、特に分離最適化を検討する過程において、分取LCのノウハウや多大な工数が必要とされます。そのため、精製作業を必要とする全ての合成物に上記のワークフローを適用させた場合には、ノウハウを有する分取LCの熟練者の業務の逼迫が懸念されます。

HPLCを用いた分取精製では、スループットの向上を目的として、規定条件での分析後、得られた目的成分の保持時間から分取条件を設定し、分取精製を実施するフローを取る場合もあります（図1赤矢印）。このフローでは、特に分離最適化の検討過程をショートカットするためにスループットの向上が見込める一方で、分取時に目的成分と不純物が共溶出してしまうリスクを避けられません。また、フローの選択をする際には、リスク低減のために分取LCの熟練者の判断が必要となるため、精製作業の属人性の解消は困難です。

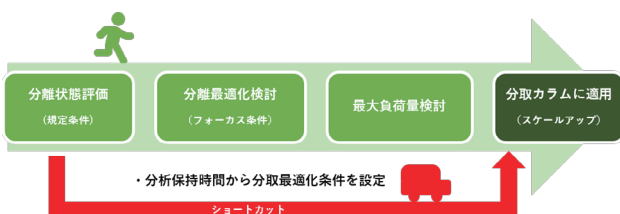


図1 LCを用いた分取精製の理想的なワークフロー（緑矢印）と精製フローショートカット時のワークフロー（赤矢印）

■HPLCを用いた分取精製業務の効率化

Nexera ASAPrepにおける分析分取自動スケールアップ機能の概略図を図2に示します。本システムでは、酸・塩基2種類の規定分析条件（分析時間：2分）を用いたサンプルの分析（スクリーニング分析）の結果を元に、当該サンプルの分取難易度が自動的に判定されます。具体的には、スクリーニング分析で目的成分の十分なピーク分離が達成できている場合（緑判定）、スクリーニング分析で目的成分の十分なピーク分離が達成できていないなど、分取時に不純物の混入が懸念される場合（黄判定）、スクリーニング分析で目的成分が検出できていない場合（赤判定）の3段階で3段階の判定の内、緑、黄判定の場合には、スクリーニング分析で得られた目的成分の保持時間から、目的成分由来のピーク付近の分離を最適化する分取条件が自動で生成されます。これらの機能を通じて、作業者はシステムに搭載されている規定条件を用いたスクリーニング分析を行うだけで、当該サンプルの分取難易度の判定結果と、自動生成された分取条件が得られます。そのため、緑判定のサンプル（難易度：低）においては、作業者が分取LCの熟練者による判断を必要とせず、分析スケールでの条件検討過程をショートカットして精製作業を行い、黄判定のサンプル（難易度：中）においては、自動生成された分取条件を基に、分取LCの熟練者が分離最適化を含む理想的な精製フローで精製作業を行う、といった業務の効率化を簡単に実施できます。

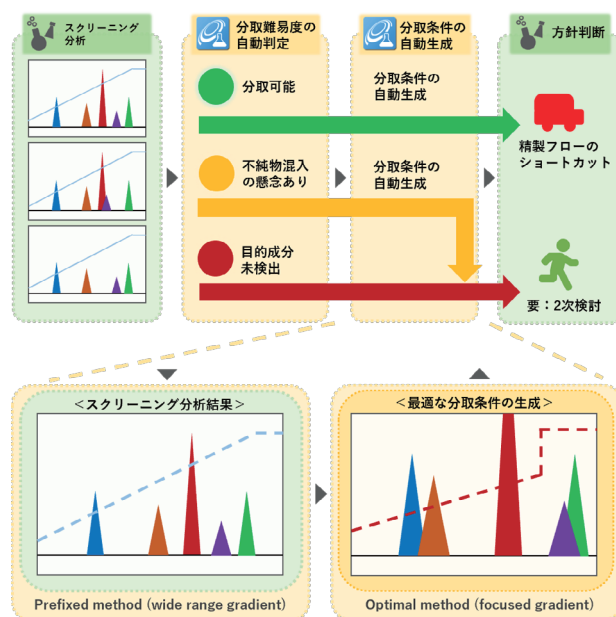


図2 Nexera ASAPrepの分析分取自動スケールアップ機能

■ 分析条件および対象成分

スクリーニング分析の条件と対象成分をそれぞれ表1、表2に示します。本稿では、主成分と複数種類の副成分を含む混合試料に対して、酸性条件・塩基性条件の2種類の規定分析条件を用いたスクリーニング分析をそれぞれ実施しました。

表1 スクリーニング分析条件

System	: Nexera ASAPrep_analytical system
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm×3.0 mm I.D., 3 μm ¹)
Sample Concentration:	Main: 10 mg/L
Mobile Phase	: Pump A: 0.05 % formic acid in water
(acidic condition)	: Pump B: 0.05 % formic acid in acetonitrile
Mobile Phase	: Pump A: 10 mmol/L ammonium hydrogen
(basic condition)	carbonate in water / acetonitrile = 90/10
	: Pump B: 10 mmol/L ammonium hydrogen
	carbonate in water / acetonitrile = 10/90
Injection volume	: 2 μL
LC Conditions	
Time program	: B.Conc 5 % (0 min)→5-90 % (0-1 min)→ 90 % (1-2 min)
Column Temp.	: 40 °C
Flow rate	: 1.5 mL/min
Detection (PDA)	: 190 - 800 nm (SPD-M40, semi-micro cell ²)
MS Conditions	
Ionization	: ESI/APCI (DUIS™), positive and negative
Mode	: SCAN (m/z 150-1000)
Nebulizing Gas Flow	: 2.0 L/min (N ₂)
Drying Gas Flow	: 5.0 L/min (N ₂)
Heating Gas Flow	: 7.0 L/min (N ₂)
DL Temp.	: 200 °C
Desolvation Temp.	: 450 °C
Interface Voltage	: 3.0/-2.0 kV (positive/negative)
	*1 P/N: 227-31015-01
	*2 P/N: 228-64725-41

表2 各混合試料中の主成分

	Mixture A	Mixture B	Mixture C
Main	Vanillin	Indomethacin	Bifonazole

■ スクリーニング分析

スクリーニング分析では、移動相と3種類の混合試料をスクリーニング分析用のシステムにセットした後、図3に示す手順に従って、「サンプルを設置した位置」、「サンプル名」、「注入量」、「ターゲットマス」の4項目の設定を行い、チェックマークのアイコンをクリックしました。以上の4項目の設定とアイコンのクリックを行うだけで、酸塩基2条件での各サンプルの連続分析だけでなく、条件の切替回数が最小となるよう分析順序を自動で調整したうえで、条件切替時には移動相置換とカラム平衡化が自動で実施されるため、作業者は簡単にスクリーニング分析を実行できます。

分析の結果得られたLCクロマトグラムと、分取難易度の判定結果をそれぞれ図4、図5に示します。各サンプルについて、分析時間2分の分析を酸塩基2種類の条件で行うことで、分取難易度の判定結果と分取時の初期B.Concが得られました。分取難易度の判定では、先述の緑、黄、赤の判定だけではなく、優先すべき条件（酸性または塩基性条件）や、ピーク分離についても併せて表示されます。そのため、難易度の判定結果が黄、赤のみで詳細な検討を必要とする場合であっても、判定理由を基にスムーズに検討を進めることができます。判定結果や分取時の初期B.Concは、自動でExcelファイルとして出力されます。



図3 スクリーニング分析の設定手順

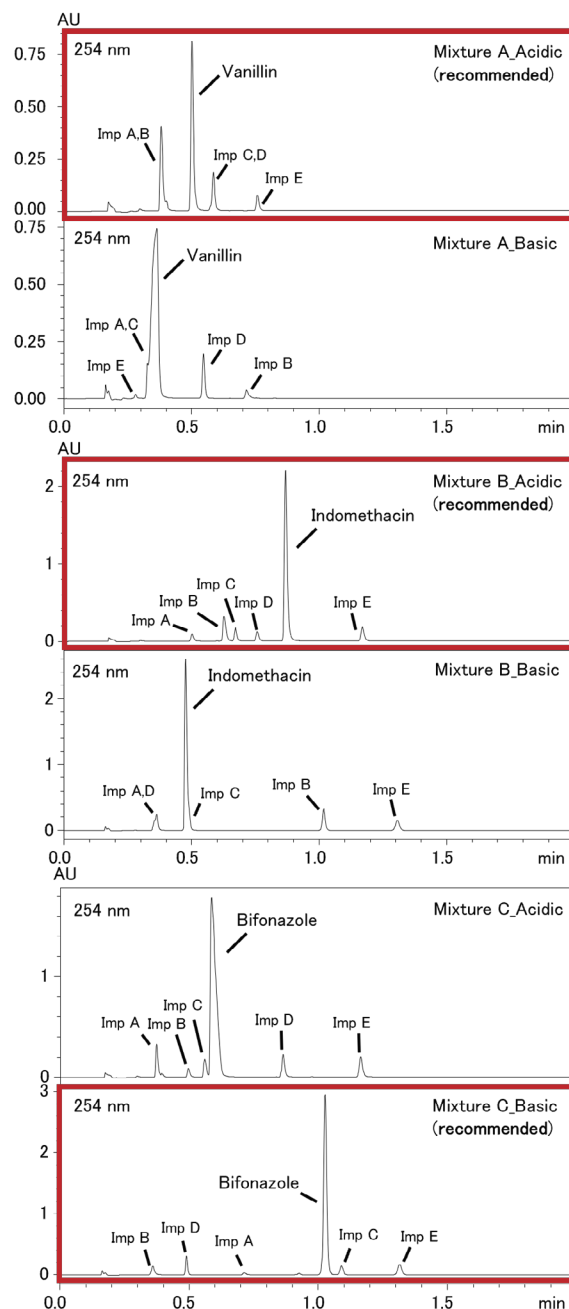


図4 スクリーニング分析で得られた各混合試料のLCクロマトグラム
(上) Mixture A、(中) Mixture B、(下) Mixture C

サンプル名	コメント	Mass Found	質量	判定	NH4HCO3 保持時間	NH4HCO3 B.Conc	NH4HCO3 スクリーニング理由	HCOOH 保持時間	HCOOH B.Conc	HCOOH スクリーニング理由
C5_Vanillin	sub: C8...	152.1	152.1	HCOOH	0.36	2.4	B.Concの値がしきい値以下です	0.5	15.8	成功
B4_Indomethacin	sub: C4...	357.8	357.8	HCOOH	0.48	12.4	優先される移動相はHCOOHです	0.87	47.5	成功
B16_Bifonazole	sub: C...	310.4	310.4	NH4HCO3	1.03	58.2	成功	0.59	20	優先される移動相はNH4HCO3です

図5 スクリーニング分析の結果に基づく分取難易度の判定結果

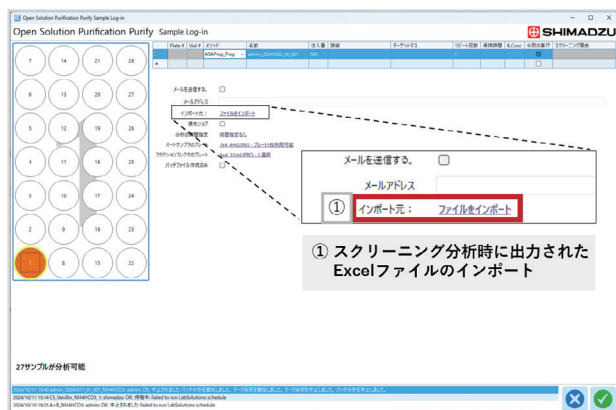
■ 分取の実行

スクリーニング分析の結果、表2に記載の全ての混合試料で分取が可能と判定され、VanillinとIndomethacinを主成分とする混合試料では酸性条件、Bifonazoleを主成分とする混合試料では塩基性条件が推奨されたため、それぞれ推奨条件での分取を実行しました。この時の分取条件を表3に示します。

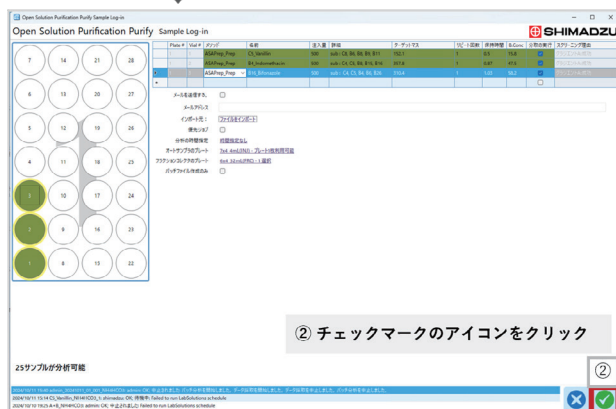
分取を実行する際には、移動相と3種類の混合試料を分取用のシステムにセットした後、図6に示す手順に従って、スクリーニング分析時に出力された分取難易度の判定結果をまとめたExcelファイルのインポートを行い、チェックマークのアイコンをクリックしました。上記作業により、サンプルごとに自動生成された分取条件を用いた連続分取精製が移動相や時間の消費を最も抑えた順番で実施されます。

表3 分取条件

System	: Nexera ASAPrep_preparative system
Column	: Shim-pack Scepter C18-120 (150 mm×20 mm I.D., 5 μm ³)
Sample Concentration	: Main: 10 mg/L
Mobile Phase (acidic condition)	: Pump A: 0.1 % formic acid in water Pump B: 0.1 % formic acid in acetonitrile
Mobile Phase (basic condition)	: Pump A: 10 mmol/L ammonium hydrogen carbonate in water / acetonitrile = 90/10 Pump B: 10 mmol/L ammonium hydrogen carbonate in water / acetonitrile = 10/90
Injection volume	: 500 μL
LC Conditions	
Time program	: B.Conc x ⁴ % (0 min)→x-x+20 % (0-9 min)→ 100 % (9-12 min)
Column Temp.	: Ambient
Flow rate	: 20 mL/min
Detection (PDA)	: 190 - 800 nm (SPD-M40, prep cell ⁵)
MS Conditions	
MS makeup	: Methanol
Flow rate (makeup)	: 1.5 mL/min
Desolvation Temp.	: 100 °C
Interface Voltage	: 3.0/-2.0 kV (positive/negative)
*3 P/N: 227-31102-03	
*4 x: Initial B.Conc. of focused gradient	
*5 P/N: 228-64727-41	



① スクリーニング分析時に出力されたExcelファイルのインポート



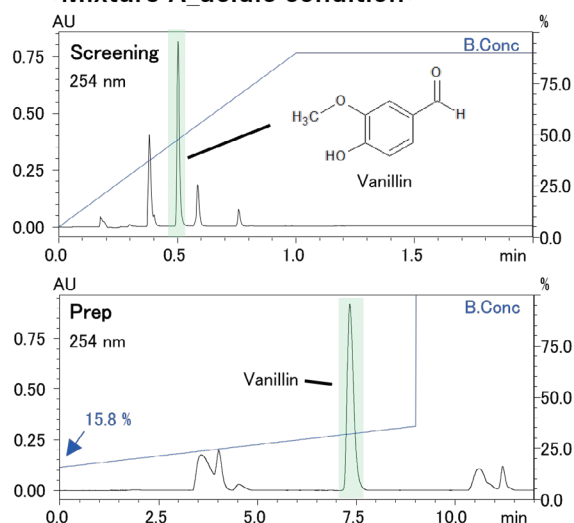
② チェックマークのアイコンをクリック

図6 分取の設定手順

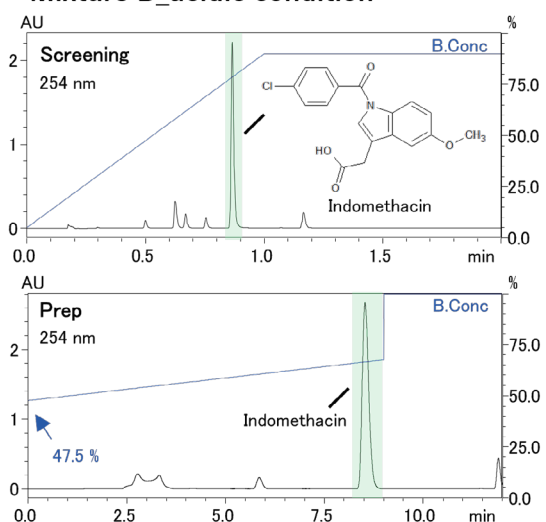
更に、移動相切替を伴う場合には移動相置換やカラム平衡化が自動で実施されます。そのため、作業者は簡単かつ効率的に分取を実行できます。

分取実行時に得られたLCクロマトグラムと、スクリーニング分析時に得られたLCクロマトグラムの比較を図7に示します。

< Mixture A_acidic condition >



< Mixture B_acidic condition >



< Mixture C_basic condition >

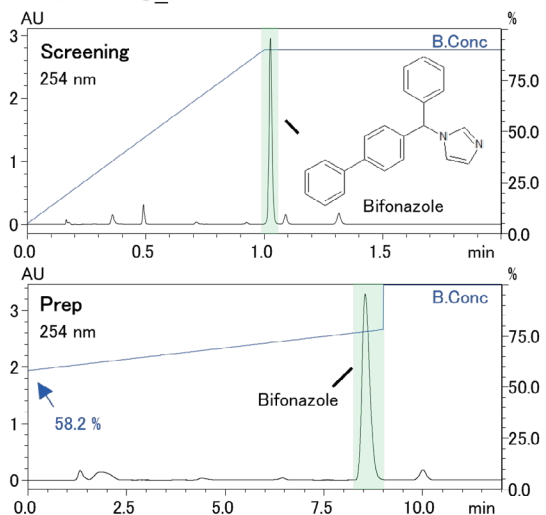


図7 分取時に得られた各混合試料のLCクロマトグラムとスクリーニング分析時に得られたLCクロマトグラムの比較
(上) Mixture A (酸性条件)、(中) Mixture B (酸性条件)、
(下) Mixture C (塩基性条件)

スクリーニング分析と同じ濃度のサンプルについて、250倍の注入量で分取を実施しましたが、全ての混合試料において、主成分由来のピークはスクリーニング分析時と比べて良好な分離が得られました。また、酸性化合物であるVanillinとIndomethacinでは酸性条件が、塩基性化合物であるBifonazoleでは塩基性条件がそれぞれ推奨されており、酸性（塩基性）化合物の分取時には酸性（塩基性）条件が適していることが示唆されました。

■まとめ

Nexera ASAPrepによる分取精製作業のワークフローを用いた実施例をご紹介しました。直感的なUI設計と移動相切り替え時のシステムの自動コンディショニング、分取条件の自動生成機能により、作業者の経験によらず誰でも容易にスクリーニング分析や分取精製を実施できます。また、スクリーニング結果に基づきサンプルの分取難易度を自動判定する機能により、分取スケールで主成分と不純物が共溶出するリスクを示すことができます。これらの機能を通じて、本システムは分取LCの熟練者による判断や分取条件の検討に要する工数を大幅に削減し、分取精製業務を効率化します。



本文書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。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。
本製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。
トラブル解消のため補修用部品・消耗品は純正部品をご採用ください。
外観および仕様は、改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

製品情報



価格お問合せ



東京支社 (官公庁担当) (03) 3219-5631 (大学担当) (03) 3219-5616 (会社担当) (03) 3219-5622	つくば支店 (官公庁・大学担当) (029) 851-8511 (会社担当) (029) 851-8515	名古屋支店 (官公庁・大学担当) (052) 565-7521 (会社担当) (052) 565-7531	広島支店 (082) 236-9652
関西支社 (06) 4797-7230	北関東支店 (官公庁・大学担当) (048) 646-0095 (会社担当) (048) 646-0081	京都支店 (官公庁・大学担当) (075) 823-1604 (会社担当) (075) 823-1603	九州支店 (官公庁・大学担当) (092) 283-3332 (会社担当) (092) 283-3334
札幌支店 (011) 700-6605	横浜支店 (官公庁・大学担当) (045) 311-4106 (会社担当) (045) 311-4615	神戸支店 (078) 331-9665	
東北支店 (022) 221-6231	岡山営業所 (045) 311-4615	岡山営業所 (086) 221-2511	
郡山営業所 (024) 939-3790	静岡支店 (054) 285-0124	四国支店 (087) 823-6623	
			島津コールセンター ☎ 0120-131691 (操作・分析に関する相談窓口) IP電話等: (075) 813-1691