

LC分析法の開発は簡単! 熟練者でなくても最適な分析法の開発を 可能にする最新の技術情報のご紹介

株式会社島津製作所 分析計測事業部

内容

概要

- 分析法開発における課題
- 分析法開発に関連したICHガイドラインの動向
- AQbDに基づいた分析法開発ワークフロー

機能紹介

- AQbDワークフロー対応ソフトウェアの紹介
- スクリーニング – 最適化 – 頑健性評価各フェイズでの効率化
- 分析法開発レポートおよびデータベース管理
- 分析法開発を支えるハードウェア性能

分析法開発における課題

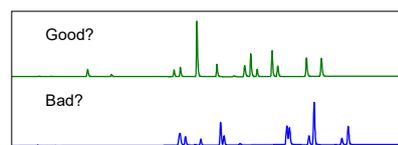
分析条件の検討に時間がかかる

- 移動相やカラムの付け外しが必要で効率よく検討を行うことができない
- メソッドや分析スケジュール等の多数の条件作成に手間がかかる



結果に個人差が発生する

- クロマトグラムの見た目で判断するため結果の解釈が個人により異なる
- 手法が統一されていないため経験やノウハウが蓄積されない



手間がかからず個人スキルに依存しない
分析法開発のワークフローが求められている

3/23

分析法開発に関連したICHガイドラインの動向

分析法開発の手法としてICHは体系的に分析法を評価/検証する考え方
"Analytical Quality by Design (AQbD)"を提唱している

AQbDの想定される利点

分析法の開発・バリデーション時

- 経験と勘に頼らない、網羅的な分析法開発検討がなされる
- 体系的なアプローチにより、ナレッジが蓄積され、分析法への理解が深まる
- 頑健で低リスクの分析法が開発可能となる

技術移転・試験運用時

- 試験のトラブル対応による工数の浪費を防げる
- 蓄積されたナレッジにより、試験法の継続的な改善が効率的に行える
- 誤った品質評価をするリスクを管理・減少させることができる

AQbDに基づいた分析法開発ワークフロー

分析法の性能に影響を与える要因を実験的/段階的に検証

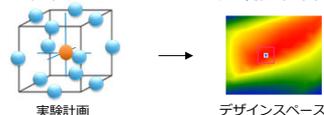
スクリーニングフェイズ

- 分析に影響を与える因子をスクリーニング



最適化フェイズ

- 絞り込んだ因子をベースに分離条件を最適化



頑健性評価フェイズ

- 得られた分析法に対して頑健性評価

因子	平方和	自由度	平均平方値	F値
要因	1108.25	6	184.71	0.926
残差	7976.86	40	199.42	-
全体	9085.11	46	-	-

分散分析(ANOVA)

全てのフェイズをサポートするソフトウェアが望まれている

5/23

内容

概要

- 分析法開発における課題
- 分析法開発に関連したICHガイドラインの動向
- AQbDに基づいた分析法開発ワークフロー

機能紹介

- AQbDワークフロー対応ソフトウェアの紹介
- スクリーニング – 最適化 – 頑健性評価各フェイズでの効率化
- 分析法開発レポートおよびデータベース管理
- 分析法開発を支えるハードウェア性能

6/23

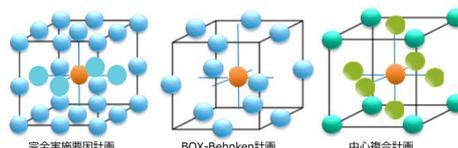
Method Development Solution

より効率的に、より信頼性の高いメソッド開発を実現

➤ 実験計画による実験の効率化

フェイズに応じた実験計画で

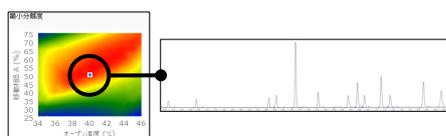
効率よく分析法開発が可能



➤ デザインスペースによる有効領域の視覚化

因子と応答の関係を応答局面として描画

最も頑健な分析条件を提案



➤ 実験結果のデータベース一括管理

実験計画・デザインスペース・クロマト

をまとめてレポート出力

データベース管理によりDIも担保



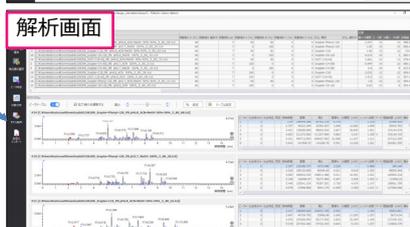
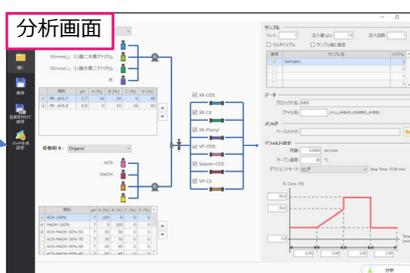
7/23

Method Development Solution全体像

分析から解析までのワークフロー全体をサポート



LabSolutionsと
シームレスに連携



- バッチファイル作成
- 実験計画作成
- 実験計画インポート

- クロマト閲覧
- ピーク同定
- 分散分析
- モデル解析
- レポート

8/23

実験計画の簡単作成

スクリーニングフェイズ

移動相とカラムのスクリーニングも容易

①移動相を選択

②カラムを選択

③サンプル情報を入力

④初期条件を入力

⑤実験計画作成

完全実施要因計画
Plackett-Burman
Box-Behnken
中心値計画
逐次実施

移動相 A	移動相 B	カラム	濃度	時間
移動相 A 略称	移動相 B 略称	カラム 略称	濃度	時間
10mM PB pH2.4	ACN	XR-ODS	20.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-ODS	30.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-ODS	40.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-C8	20.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-C8	30.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-C8	40.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-Phenyl	20.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-Phenyl	30.0,95.95	0.5,3.2,0.0
10mM PB pH2.4	ACN	XR-Phenyl	40.0,95.95	0.5,3.2,0.0

実験結果の総合評価

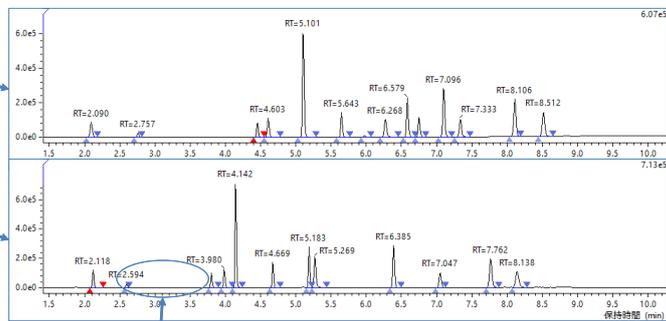
スクリーニングフェイズ

分離状態のランキング順にクロマトを確認

各分析条件及び評価値による順位付け

移動相 A pH	移動相 B B (%)	カラム 略称	応答 評価値
6.8	50	Scepter-Phenyl-120	858.926
2.7	100	Scepter-Phenyl-120	806.444
6.8	50	Scepter-C18	710.75
6.8	100	Scepter-C8-120	683.436
6.8	50	GIST-C18-AQ	678.087
2.7	0	Scepter-C4-300	669.122
2.7	100	Scepter-C4-300	615.931
6.8	0	Scepter-C18	609.077
6.8	0	GIST-C18-AQ	607.165
2.7	50	Scepter-Phenyl-120	594.407
6.8	0	Scepter-C8-120	593.484
2.7	100	GIST-C18-AQ	588.25

評価値が高いクロマトグラムと低いクロマトグラムの比較



評価値 E は
ピーク検出数 P × (分離度 (Rsn)の和)
として算出されます。

大きく離れたピークは分離度上限値によって値
が制限され、ピーク過大評価を防止します。

応答判定

計算方法: USF

評価値

分離度上限値: 5

OK キャンセル

影響を与える因子の統計的評価

スクリーニングフェイズ

分散分析により分離に影響を与えるパラメータを評価

三元配置分散分析による分散分析表

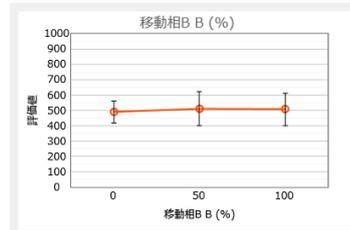
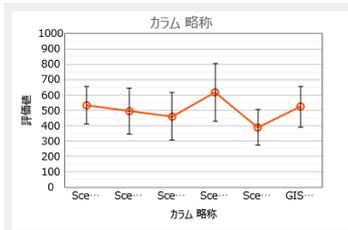
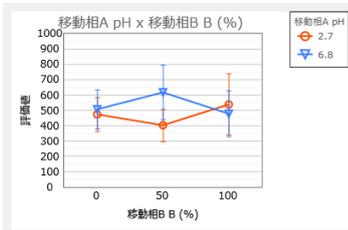
要因効果図	要因	平方和	自由度	平均平方	F値	p値
☑	移動相A pH x 移動相B B (%)	117486.336	2	58743.168	6.258	0.017
☑	カラム 略称	178379.99	5	35675.998	3.801	0.034
☑	カラム 略称 x 移動相A pH	172475.365	5	34495.073	3.675	0.038
☑	移動相A pH	34813.991	1	34813.991	3.709	0.083
☑	カラム 略称 x 移動相B B (%)	161331.148	10	16133.115	1.719	0.203
☑	移動相B B (%)	2911.865	2	1455.933	0.155	0.858
	誤差	93871.136	10	9387.114		
	全体	761269.831	35			

p値が0.05以下である要因は、要因によるばらつきが誤差によるばらつきに対して十分大きいと判断できるため

要因の値が変わると分析結果が誤差以上に大きく変わる = 分離に与える影響が大きい

と判断できます。

主要因および交互作用を要因効果図として確認

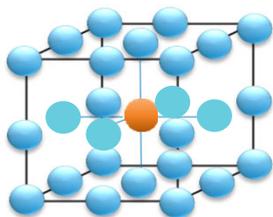


実験計画による実験の効率化

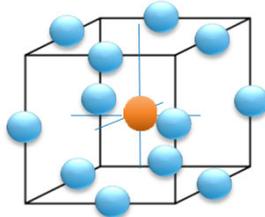
最適化フェイズ

全ての組み合わせを生成する完全実施要因計画と比較し効率よく実験が可能

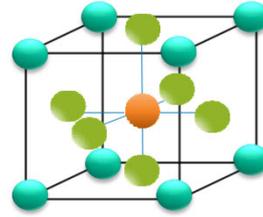
完全実施要因計画



Box-Behnken計画



中心複合計画



	必要な実験点	合計分析時間 (1分析10分の場合、平衡化時間含まず)
完全実施要因計画	81点	810分 = 13.5時間
Box-Behnken計画	27点	270分 = 4.5時間 (67%削減)
中心複合計画	26点	260分 = 4.3時間 (68%削減)

各実験計画法における必要な実験点の数の比較 (4パラメータ、3水準の場合)

ピークトラッキング

最適化フェイズ

類似度や面積値といった任意のパラメータを用いて同定が可能

化合物毎の基準値設定

#	化合物名	基準ピーク#	基準面積	基準高さ	基準面積%	基準高さ%
1	Compound [#1 Peak ID-1]	1	218454.392	92253.473	4.355	3.754
2	Compound [#1 Peak ID-2]	2	58620.451	30798.233	1.169	1.253
3	Compound [#1 Peak ID-3]	3	179016.57	96081.676	3.569	3.909
4	Compound [#1 Peak ID-4]	4	265944.394	121810.112	4.901	4.956
5	Compound [#1 Peak ID-5]	5	1149736.823	660963.971	22.859	26.894
6	Compound [#1 Peak ID-6]	6	278003.398	156240.916	5.542	6.337

対象ピークの絞り込み

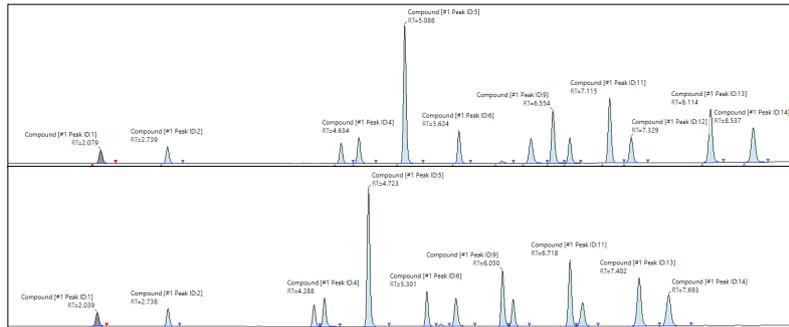
パラメータ	許容値
ピーク# 差	3
面積 ±	100000
高さ ±	10000
面積% ±	10
高さ% ±	10
類似度	0.9
保持時間 ±	1

指定パラメータでの同定

同定に使用する値:

- 類似度
- ピーク#
- 面積
- 高さ
- 面積%
- 高さ%
- 保持時間
- 保持時間差

保持時間の異なる同一化合物を類似度で自動追跡した例



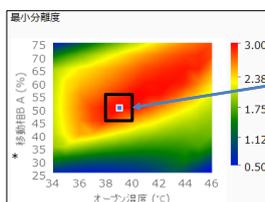
13/23

デザインスペースによる視覚化

最適化フェイズ

分析条件と分離の関係の視覚化し最適な分析条件を特定

デザインスペースによる結果の描画



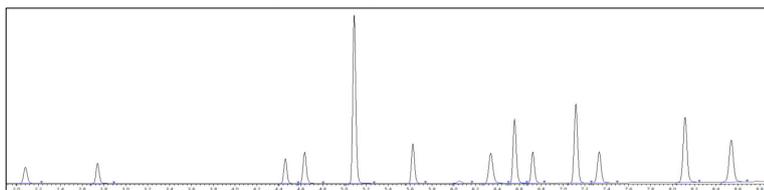
● 頑健性を満たす点を探索

因子	許容値
オープン温度 (°C)	1
移動相B A (%)	5

パラメータ (因子) に対して変動の許容範囲を入力すると、その許容範囲を満たす**頑健な分析条件を提案**することが可能

任意の分析条件でのクロマトグラムの予測が可能

最適点でのシミュレーションクロマトグラム



フレキシブルなモデル設定により精度の高い予測が可能

モデル式

変数設定	因子	変数名	ステップ幅	モデルタイプ
<input checked="" type="checkbox"/>	オープン温度 (°C)	x1	1	<input checked="" type="radio"/> 線形設定 次数: <input type="radio"/> 1 <input checked="" type="radio"/> 2 <input checked="" type="checkbox"/> 交互作用項を使用 <input type="radio"/> 詳細設定
<input checked="" type="checkbox"/>	流量 (mL/min)	x2	0.1	
<input type="checkbox"/>	時間2 (min)	x3	1	

式プレビュー

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3(x_1)^2 + a_4(x_2)^2 + a_5x_1x_2$$

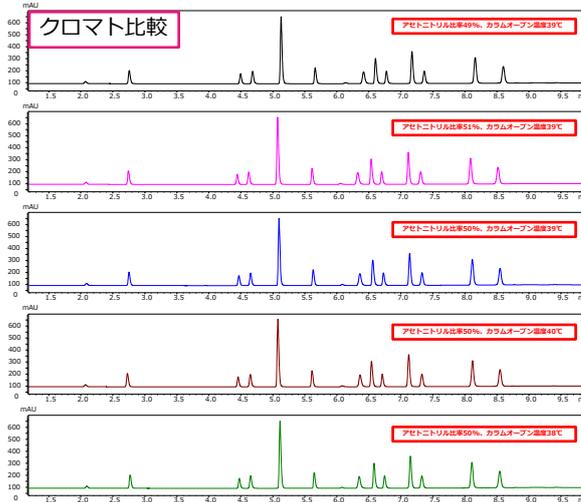
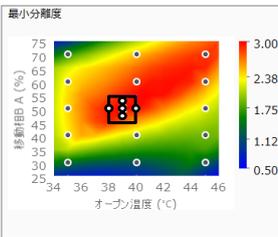
14/23

逐次実験による頑健性評価

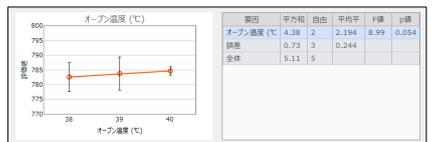
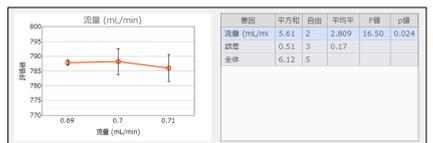
頑健性評価フェーズ

最適化で選定した分析条件に対して細かく値を変動させて評価
分離に影響を与えないことを確認

逐次実験



一元配置分散分析



分析法開発レポート

頑健性評価フェーズ

実験計画・クロマト・統計解析結果をまとめてレポート出力

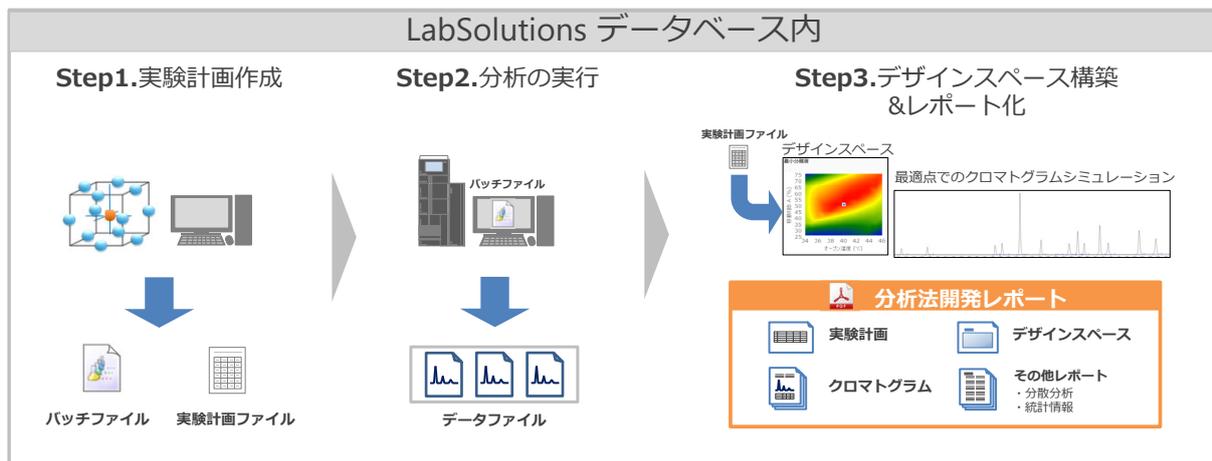
#	流量 (mL/min)	オープン温度 (°C)	最小分離度	ピーク数
1	0.69	39	2.942	14
2	0.69	39	2.837	14
3	0.7	39	2.936	14
4	0.7	39	2.936	14
5	0.7	39	2.964	14
6	0.7	39	2.932	14
7	0.7	39	2.932	14
8	0.7	39	2.796	14
9	0.7	39	2.936	14
10	0.7	39	2.837	14
11	0.7	40	2.936	14
12	0.7	40	2.417	14

要因	平方和	自由度	平均平方	F値	p値
オープン温度 (°C)	4.38	2	2.194	8.99	0.054
誤差	0.73	3	0.244		
全体	5.11	5			

LabSolutionsデータベースにPDFとして保存

実験結果のデータベース一括管理

実験計画・デザインスペース・クロマトをまとめてレポート出力
データベース管理によりデータインテグリティも担保

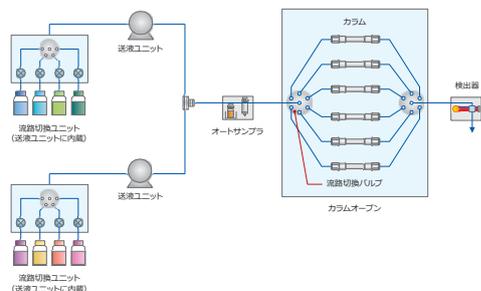


分析法開発を支えるハードウェア性能

分析法開発に必要な自動化・省力化・信頼性の高いデータを実現

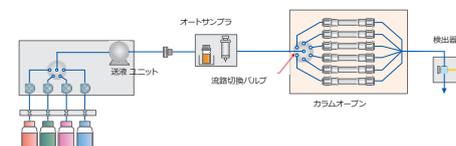
Nexeraシリーズ

最大耐圧130 MPa対応超高速液体クロマトグラフ
8種類の移動相と12種類のカラムを用いた
最大192 (4×4×12) 通りの組み合わせに対応



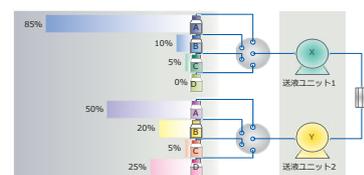
i-Series

最大耐圧70 MPaを有する一体型LCシステム
省スペース、低コストを実現



移動相ブレンドング

予め指定した混合比率で移動相を自動調整
pHや有機溶媒比率の検討に有効



まとめ

AQbDアプローチにより経験と勘に頼らない 網羅的な分析法開発検討が可能

- 体系的なアプローチにより、ナレッジが蓄積され、分析法への理解が深まる
- 頑健で低リスクの分析法が開発可能となる
- 実験計画法やデザインスペースといった統計的手法を用いて実験的に検証する

Method Development Solutionにより AQbDアプローチの全てのフェイズをサポート

- スクリーニング – 最適化 – 頑健性評価各フェイズでの効率化
- 実験計画・デザインスペース・クロマトをまとめてレポート出力
- データベース管理によりデータインテグリティも担保
- ハードウェア性能により信頼性の高いデータを実現