

Technical Report

超高速メソッドスカウティング(2)

—メソッド探索プロセスの自動化による開発効率の向上—

Ultra fast method scouting (2)

— Maximizing the efficiency of method development —

國澤 研大¹、尾坂 裕輔¹、藤村 大樹¹、渡辺 覚¹、河野 慎一¹

Abstract:

分析条件の探索(メソッドスカウティング)には多大な時間を要するため、できるだけ手間なく時間短縮することが求められています。本レポートでは、メソッドスカウティングシステム Nexera Method Scoutingと、メソッドスカウティング専用ソフトウェア Method Scouting Solution Ver. 2を用いた9種のサルファ剤に対する一斉分析条件の探索を実施した例をご紹介します。また、専用ソフトウェア Method Scouting Solution Ver. 2は、LabSolutions DB/CSのマルチデータレポート機能を用いることで、膨大な分析結果から最適な分析条件を迅速に見つけることが可能になりました。本レポートでは、マルチデータレポート機能についてもご紹介します。

Keywords: Nexera Method Scouting、Method Scouting Solution、LabSolutions DB/CS、マルチデータレポート

1. はじめに

新規化合物に対する分析メソッドの開発は、主に4ステップで行います。

(1) シミュレーション

分析対象成分の構造式などの物性情報を元に、オフラインで保持挙動を予想する。

(2) メソッドスカウティング

種々のカラムや移動相を組み合わせた分析を試行し、カラムと移動相を網羅的にスカウティングする。

(3) メソッド最適化

メソッドスカウティングで選択したカラムと移動相を用いて、各種パラメータを最適化する。

(4) メソッドバリデーション

分析メソッドの頑健性を評価する。

Nexera Method Scoutingは、耐圧130 MPaを有する超高速液体クロマトグラフ Nexera X2をベースとしたメソッドスカウティングシステムで、その用途は左記のステップ2に該当します。8種類の移動相と12種類のカラムを用いた最大192通りの移動相とカラムの組み合わせを自動的に実行でき、網羅的な分析条件の探索を可能とします。

本レポートでは、Nexera Method Scoutingと専用ソフトウェア Method Scouting Solution Ver. 2およびLabSolutions DB/CSに搭載されたマルチデータレポート機能を用いて、さまざまな分析条件で測定した結果の比較、最適な分析条件決定までの実施例をご紹介します。



Fig. 1 Nexera Method Scouting

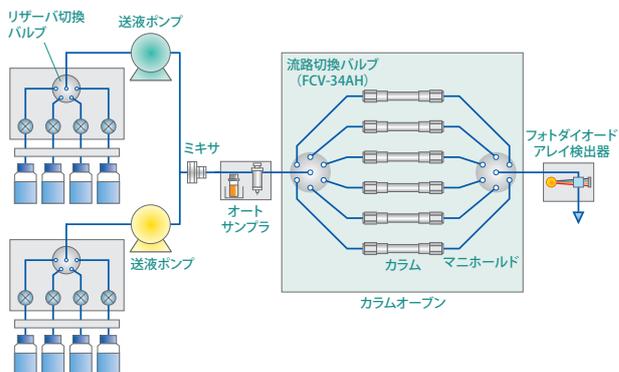


Fig. 2 Nexera Method Scoutingの流路図 (図はカラム6種の場合)

2. Method Scouting Solutionを用いたサルファ剤の一斉分析

本章では、合成抗菌剤や抗がん剤など医薬品などに用いられるサルファ剤の一斉分析条件の検討を実施した例をご紹介します。サルファ剤の初期検討条件をFig. 3に示しました。本分析では、移動相には溶媒AにpHの異なるりん酸（ナトリウム）緩衝液2種類、溶媒Bとしてアセトニトリルまたはメタノールを用い、これらの組み合わせで合計4種類の移動相を検討しました。カラムはShim-pack XRシリーズ3本を含めた6種類で検討しました。これらの4種の移動相と6種のカラムの合計24通りの分析を実施しました。

2-1. Method Scouting Solution

Method Scouting Solution Ver. 2の主画面をFig. 4に示します。カラムや移動相、サンプル情報やグラジエント条件などの各項目が主画面で確認でき、かつ各アイコンをクリックすることでパラメータの変更が簡単に行えます。

専用ソフトウェアでは、①データベースに登録済みのカラムや移動相を選択、②グラジエント条件を設定、③サンプル情報などのパラメータを入力、④バッチ作成ボタンをクリック、の操作で簡単にバッチ分析を実行（スカウティングを開始）できます。また、本ソフトウェアはLabSolutionsと連動して、装置起動時の分析準備（スタートアップ）から分析終了後の装置状態（シャットダウン）まで、メソッドスカウティングにおける一連の分析業務全体を自動化することが可能です。これにより、メソッドスカウティングの条件設定や分析実行に費やす時間や労力の大幅な軽減を実現します。

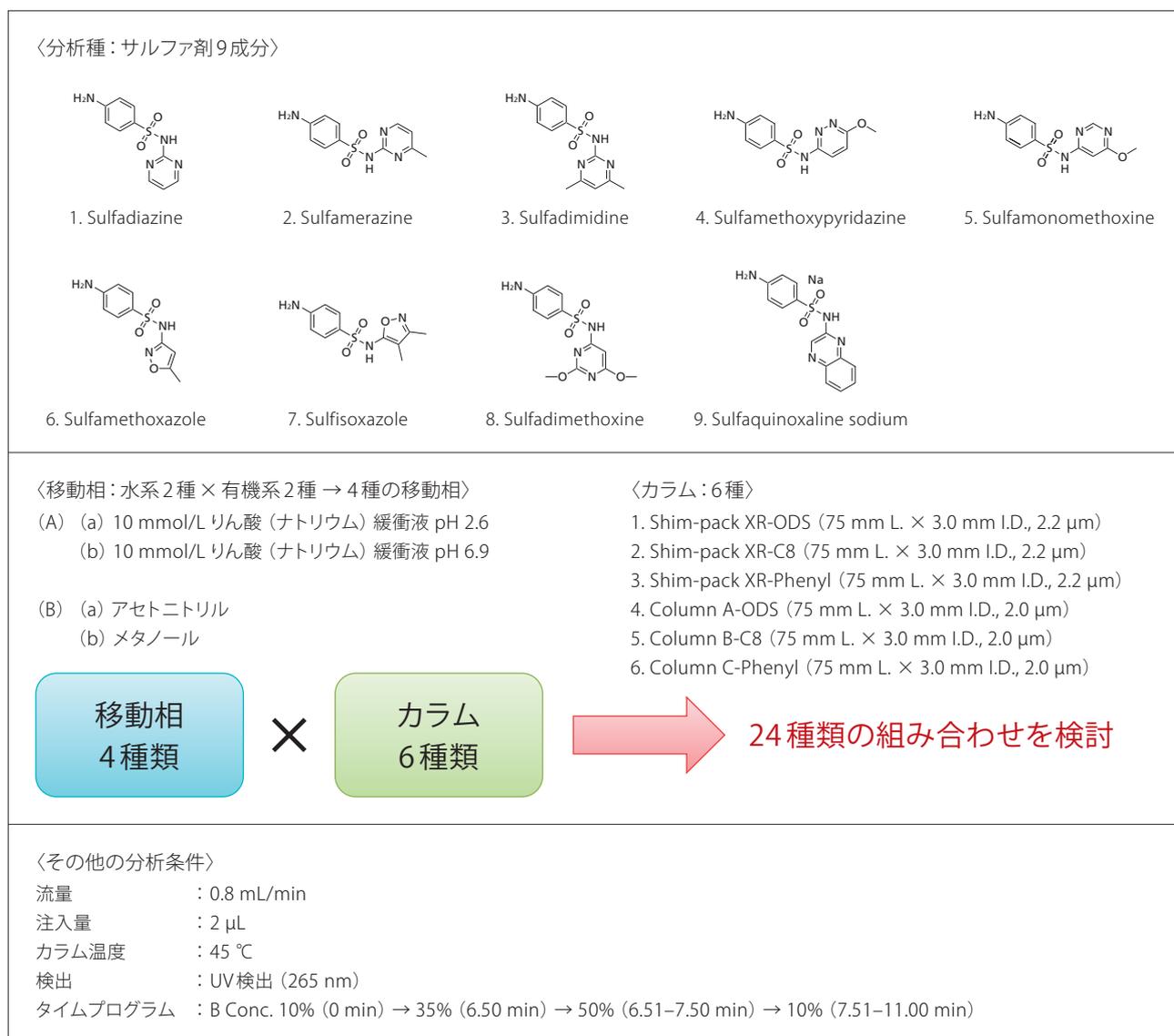


Fig. 3 サルファ剤の一斉分析条件検討

①移動相とカラムの選択 ②ベースメソッドの選択とグラジエント条件の作成 ③バイアルの選択とサンプル情報の入力

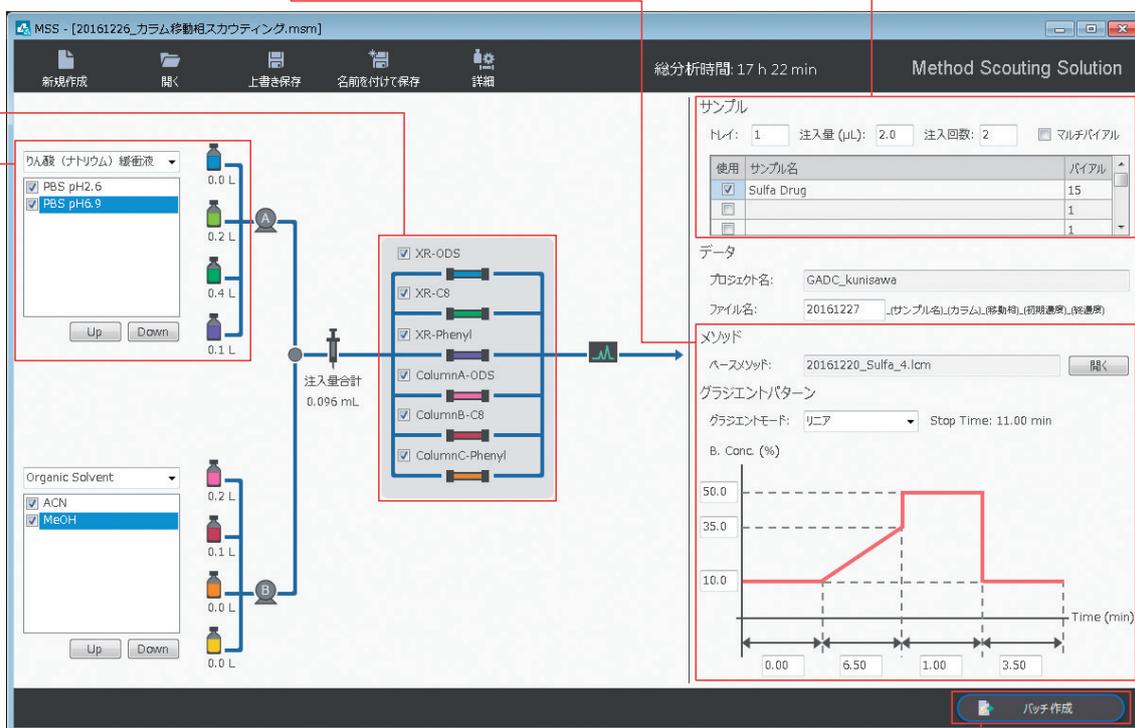


Fig. 4 Method Scouting Solution (主画面)

④バッチ作成とスカウティングの開始

2-2. カラムと移動相の選択および移動相自動調製機能(移動相ブレンディング機能)

Method Scouting Solutionで移動相やカラムのアイコンをクリックすると、データベースに登録されたカラムや移動相の一覧画面が表示されます (Fig. 5)。この画面から分析条件の検討に使用する移動相やカラムをそれぞれ選択します。

本システムで使用する移動相として緩衝液のpHや塩濃度が異なる移動相を複数用いて検討する場合、検討する移動相をそれぞれ調製する必要はありません。本システムは、2台の送液ポンプそれぞれに最大4種類の溶媒を自動混合する移動相自動調製機能(移動相ブレンディング機能)を有しています (Fig. 6)。この移動相ブレンディング機能により移動相のpHや塩濃度、酸の添加量などが自動調製できるため、分析開始前に準備する移動相の本数を減らせます。サルファ剤の分析に使用する10 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液の設定画面をFig. 7に示します。りん酸ナトリウム緩衝液を分析に用いる場合、水系送液ポンプ(ポンプA)には次の溶媒をセットします。

- A: 水
- B: 10 mmol/L りん酸
- C: 10 mmol/L りん酸二水素ナトリウム
- D: 10 mmol/L りん酸水素二ナトリウム

今回のサルファ剤の分析では、pH2.6のりん酸ナトリウム緩衝液を用いるため、BとCを50:50の割合で自動混合するように移動相のブレンディング条件を設定します*。また、pH6.9のりん酸ナトリウム緩衝液を調製する場合には、CとDを60:40の割合でブレンディング条件を設定します。さらに、Aの水の比率を変更することで、混合後の緩衝液の塩濃度を調整できます。このように移動相ブレンディング機能を使えば、面倒な移動相調製を自動的にソフトウェアが行うため、調製にかかる時間の削減、作業ミスのリスク回避、余分な移動相を調製する必要がなくなるなどのメリットが期待できます。なお、溶媒セットとして設定した移動相は、単一溶媒と同様にひとつの移動相として選択できます。

* 調製後のpHは理論に基づいた一例であり、周囲の環境により設定したpHにならない場合があります。

ID	グループ	名前	略称	シリアルナンバー	モード	使用時のP. Max (MPa)	上限温度 (°C)	ブランド	固定相	耐圧 (MP)
1	Any	Shim-pack XR-C8	XR-C8		SFC & LC	40.0	60	Shim-pack	C8	40.0
2	Any	Shim-Pack XR-ODS	XR-ODS		SFC & LC	35.0	60	Shim-pack	ODS	35.0
3	Any	Shim-pack XR-Phenyl	XR-Phenyl		SFC & LC	40.0	60	Shim-pack	Phenyl	40.0
6	Any	ColumnA-ODS	ColumnA-ODS		SFC & LC	55.0	60	A	C18	50.0
7	Any	ColumnB-C8	ColumnB-C8		SFC & LC	55.0	60	B	C8	50.0
8	Any	ColumnC-Phenyl	ColumnC-Phenyl		SFC & LC	55.0	60	C	Phenyl	50.0

Fig. 5 カラム選択画面

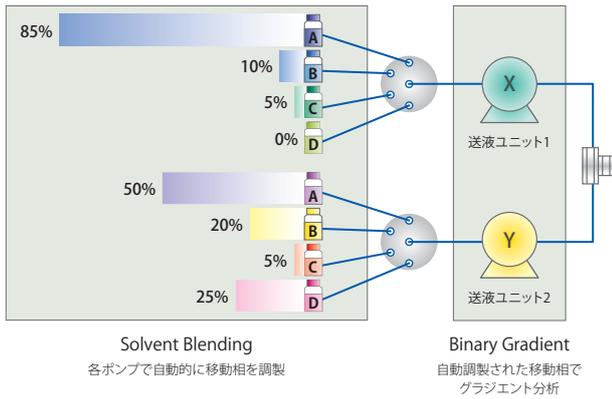


Fig. 6 移動相ブレンド機能

ブレンド条件

溶媒セット: りん酸 (ナトリウム) 緩衝液

濃度 (%): A 0.0 B 50.0 C 50.0 D 0.0

溶媒セット

セット名: りん酸 (ナトリウム) 緩衝液

溶媒A: 水

溶媒B: りん酸

溶媒C: 10 mM りん酸二水素ナトリウム

溶媒D: 10 mM りん酸水素二ナトリウム

Fig. 7 移動相ブレンド機能を用いた緩衝液の調製画面は pH2.6のリン酸 (ナトリウム) 緩衝液の例

2-3. 分析条件設定とグラジエントプログラム作成

Method Scouting Solution Ver. 2では、グラジエントモードとして従来のリニアグラジエントに加えて、マルチリニアグラジエント (多段グラジエント)、ステップワイズ (階段状グラジエント)、アイソクラティックに対応しました (Fig. 8)。グラジエントモードを選択後、各時間における有機溶媒濃度を入力することで、グラジエントプロフィールを自動で作成します。今回のサルファ剤の分析では、Fig. 4の②に示すリニアグラジエントモードを用いました。

なお、本システムではLabSolutionsで作成した基本メソッドを選択することで、分析に必要な基本パラメータ (流速やオープン温度、検出波長など) を使用します。そのため、基本メソッドに設定されているグラジエント条件をそのまま使用して分析条件の検討を行うことも可能です。

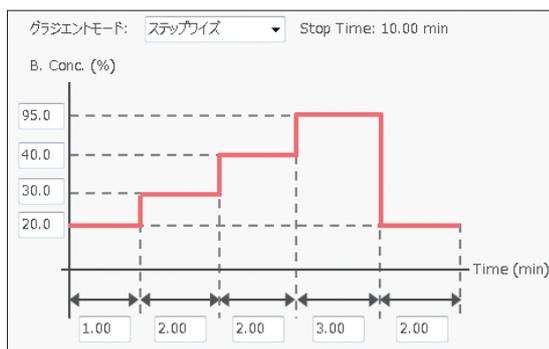
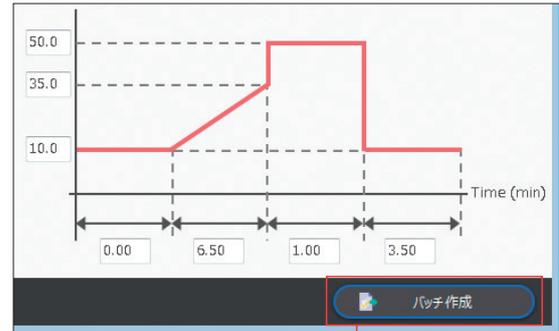


Fig. 8 ステップワイズモード (階段状グラジエント)

2-4. 移動相・カラムスカウティングの開始

移動相とカラムの選択、グラジエント条件やサンプル情報などの設定後、画面右下の [バッチ作成] ボタンをクリックすると、バッチ作成プレビュー画面が表示されます (Fig. 9)。内容を確認後、[バッチ作成と実行] ボタンをクリックしてスカウティングを開始します。このとき、LabSolutionsの特長である移動相ラインの自動置換やベースラインの安定性確認などの自動化機能を有効にしておくことで、さらなる分析業務の自動化が図れます。



[バッチ作成] ボタンのクリックでプレビュー画面を表示

プレビュー

表示形式: シングル - 全ての分析 総分析時間: 12 h 47 min

#	モード	サンプル名	移動相1	移動相2	カラム	グラジエント/ボタン
1	移動相置換		10 mM PBS pH 2.6	ACN		
2	カラム平準化		10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-ODS	
3	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-ODS	SpecifyMethod
4	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-ODS	SpecifyMethod
5	カラム平準化		10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-C8	
6	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-C8	SpecifyMethod
7	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-C8	SpecifyMethod
8	カラム平準化		10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-Phenyl	
9	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-Phenyl	SpecifyMethod
10	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	XR-Phenyl	SpecifyMethod
11	カラム平準化		10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnA-ODS	
12	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnA-ODS	SpecifyMethod
13	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnA-ODS	SpecifyMethod
14	カラム平準化		10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnB-C8	
15	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnB-C8	SpecifyMethod
16	LC	Sulfa drug	10 mM PBS pH 2.6	ACN	ColumnB-C8	SpecifyMethod

バッチ作成 バッチ作成と実行 キャンセル

Fig. 9 バッチ作成プレビュー画面

3. マルチデータレポートとブラウザ機能を用いた移動相・カラムのスクリーニング

メソッドスカウティングの実施により得られた膨大な量の分析結果から移動相・カラムの最適な組み合わせを決定することは容易ではありません。しかし、LabSolutions DB/CS搭載のマルチデータレポートとデータブラウザを使用すれば、最適な条件を迅速に見つけることができます。本章ではサルファ剤の一斉分析条件の検討として得られた24通りのメソッドスカウティング結果を示します。

ここでは、得られたクロマトグラムの分離状態を定量的に評価する目的で、次に示す評価式を採用しています（詳細はTechnical Report「メソッド開発の高速化によるR&D効率の向上(3)」(C190-0382)をご覧ください）。

$$E = P (R_{S1} + R_{S2} + \dots + R_{Sp}) \dots (式1)$$

この式1は、ピーク分離を重視して考案した評価式であり、クロマトグラムの「ピーク検出数:P」と「分離度:RS」を用いて「評価値:E」を算出しています。

Fig. 10にサルファ剤の条件検討における評価結果レポート例を示します。レポート上段の表には、各分析条件（データファイル名）で測定した際に検出されたピーク数、分離度、式1に基づいて計算した評価値とその順位が表示されます。結果の配列は、Fig. 10 (a)のように分析を実施した順にすることも、(b)のように評価結果の高い順に並べることができます。レポート下段には、各分析条件の評価値を棒グラフで表示することで、視覚的に評価値を判断できるようになっています。このように、マルチデータレポートを用いることで、膨大な量の分析結果から最適な分析条件を決めるための候補を絞ることができます。



Fig. 10 マルチデータレポート機能を用いたメソッドスカウティングの結果

各分析条件で測定したクロマトグラムは、データブラウザを用いることで、一覧で確認することができます。Fig. 11にサルファ剤の条件検討で得られた全クロマトグラムをデータブラウザに表示した例を示します。マルチデータレポートの評価値による判定に加えて、各クロマトグラムのピーク溶出状況を一覧表示することで、最適な分析条件が見目で判断できます。また、データブラウザに表示するクロマトグラムは、マルチデータレポートによる評価値判定結果をもとに、最適な分析条件の候補クロマトグラムを選択して表示できます。

マルチデータレポートおよびデータブラウザによる最適条件の判定から、サルファ剤9種の分析における最適な一斉分析条件を確立することができました。詳細な条件をFig. 12に示します。

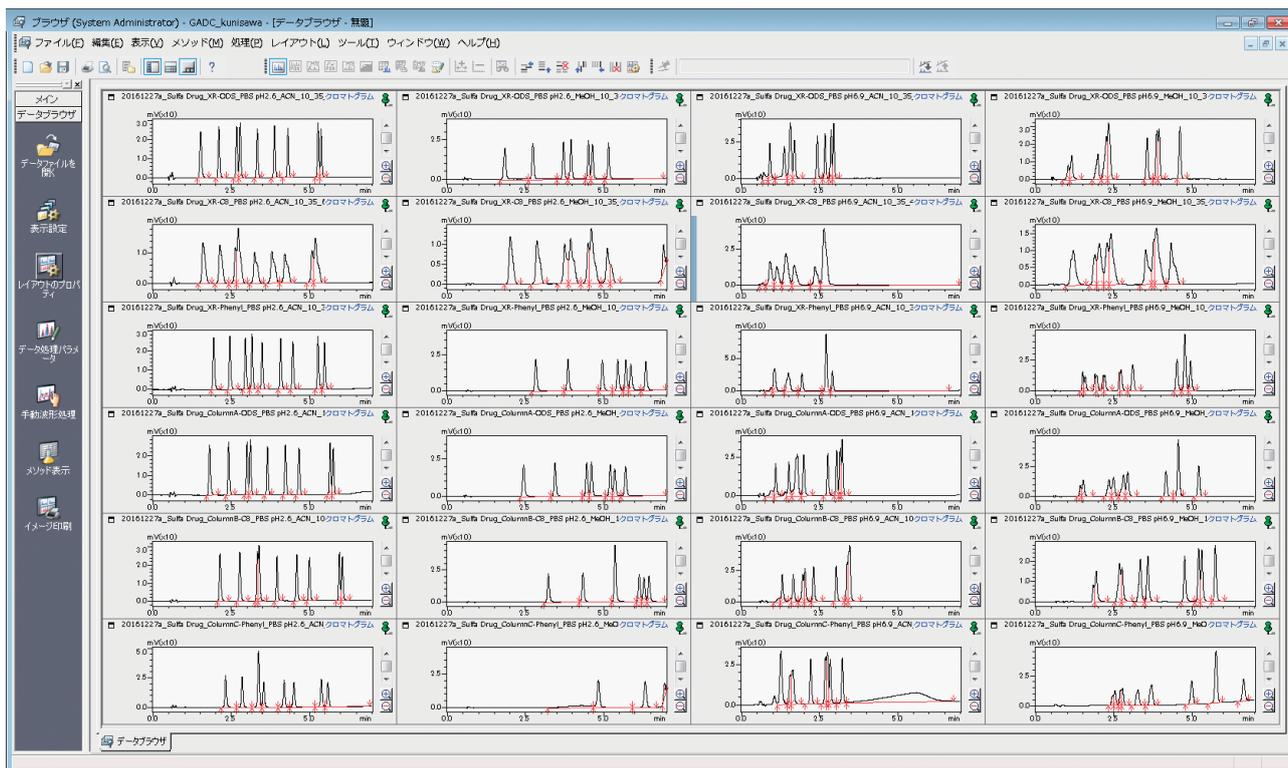


Fig. 11 ブラウザ機能を用いたクロマトグラムの比較

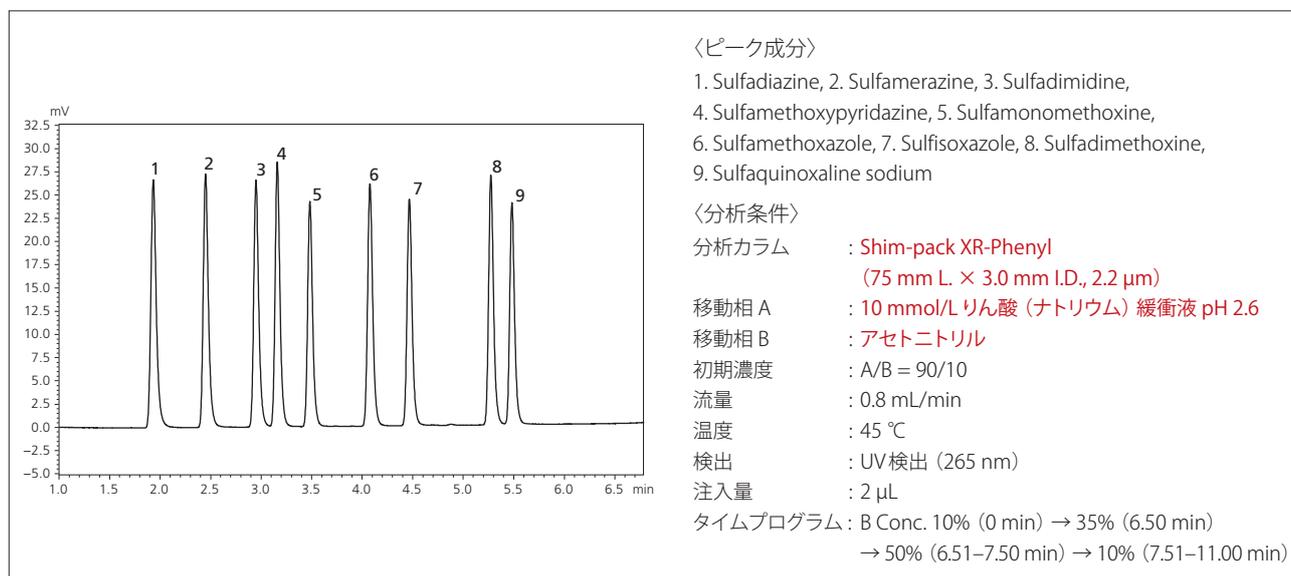


Fig. 12 サルファ剤一斉分析における、スカウティングにより決定した最適なカラム・移動相の組み合わせおよびそのクロマトグラム

4. グラジエント条件の最適化

メソッドスカウティングにおいては、最適な移動相とカラムの組み合わせを検討した後、さらなる分離向上や高速化を目的としてグラジエント条件を最適化することがあります。本章では、3章で決定した移動相とカラムを用いてグラジエント条件を最適化した例をご紹介します。

Method Scouting Solution 主画面中のグラジエントモード選択において「カスタム」を選択すると、複数のグラジエント条件が簡単に作成できます。Fig. 13に示す画面では、初期濃度、終濃度、洗浄濃度およびタイムプログラムを設定します。また、初期濃度と終濃度は複数の濃度パターンが設定できます。ここでは、初期濃度は5, 10, 15%, 終濃度は29, 32, 35, 38%としました。すべてのパターンを分析すると、12種類のグラジエント条件が検討できます。この12種のグラジエント条件の評価結果をTable 1に、得られた最適な分析条件とクロマトグラムをFig. 14に示します。グラジエント初期濃度および終濃度を最適化したことにより、SulfadimidineとSulfamethoxyipyridazine、SulfadimethoxineとSulfaquinoxaline sodiumの分離を向上することができました。

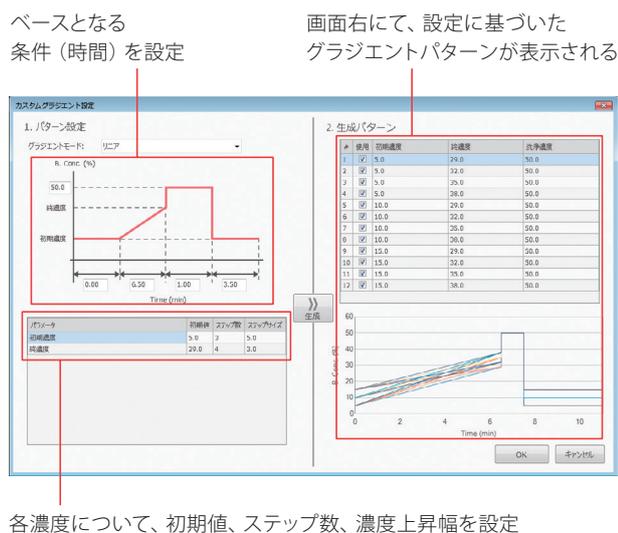


Fig. 13 グラジエント条件の設定画面

Table 1 グラジエント条件の評価結果

初期濃度 (%)	終濃度 (%)	評価値	順位
5	29	317.048	1
5	32	306.421	3
5	35	299.231	5
5	38	293.354	7
10	29	309.955	2
10	32	302.475	4
10	35	296.53	6
10	38	290.66	8
15	29	273.424	9
15	32	266.63	10
15	35	264.443	11
15	38	259.044	12

5. マルチデータレポート

LabSolutionsのマルチデータレポートは、Excelライクな操作方法で、通常の分析結果レポートに加えて含量均一性試験や類縁物質確認試験などの規格試験用レポートとして利用できます。Fig. 15にマルチデータレポートのテンプレート作成画面と出力レポートを示します。テンプレート作成画面は一般的な表計算ソフトウェアに近い構成となっており、各種数式や関数をセル内に入力、設定することで種々の計算が行えます。Fig. 15の①は、得られたデータに順位を付ける関数を入力したものです。クロマトグラムデータの保持時間、面積、理論段数、分離度などは、Fig. 15の②に示すように画面の左側にある項目を選択し、目的のセルにドラッグ&ドロップで配置できます。さらに、統計関数や文字列操作関数など使用頻度の高い関数についても画面左側から選択でき、該当する関数を直接入力する手間を省略します。作成したテンプレートファイルを分析時に指定しておくことで、分析終了後に紙もしくはPDFファイルにて自動的にレポート出力されます。

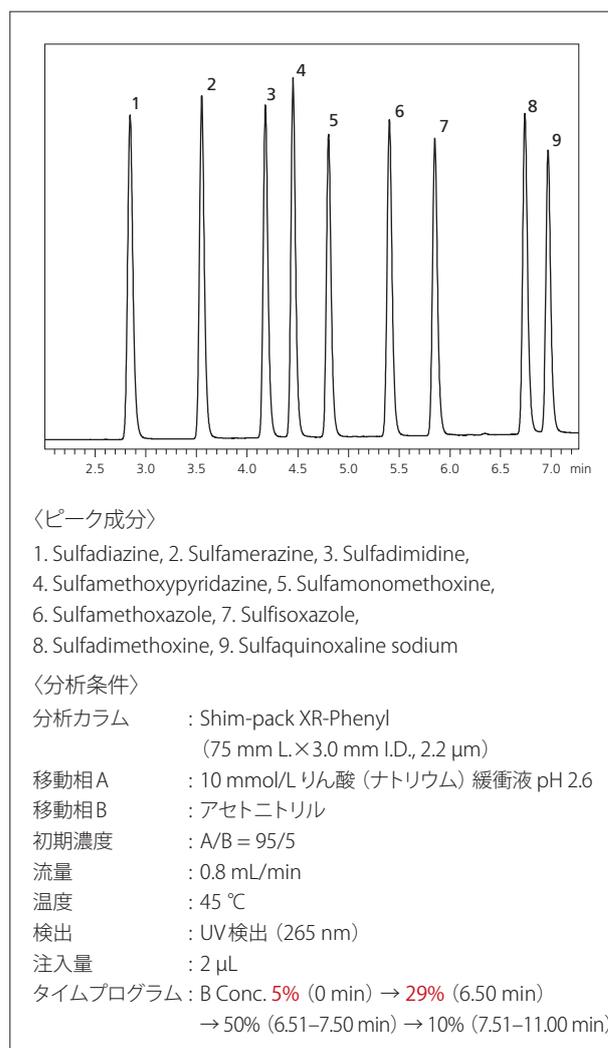


Fig. 14 最適化されたグラジエント条件およびクロマトグラム

①

Excel spreadsheet showing a '分離評価レポート' (Separation Evaluation Report) with a data table and a bar chart. A red arrow points to the formula bar containing the formula: `=IF(Z7=""",RANK(Z7,Z6:Z8,0))`.

②

Report template creation screen showing a list of parameters to be included in the report:

- ピーク#
- ID番号
- 保持時間
- 相対保持時間
- 高度
- 高度単位
- 面積
- 高さ
- ピーク開始時間
- ピーク終了時間
- ピーク開始高さ
- ピーク終了高さ
- ピーク面積
- ピーク高さ
- ピーク面積比
- ピーク高さ比
- 面積%
- 高さ%
- 化合物名
- マーク
- グループ#
- グループ名
- 理論段数(USP)
- 理論段数(USP2)
- 理論段数(JP)
- 理論段数(JP2)

レポートの出力例 (Sample Report Output) showing a bar chart and a data table with columns for No., 化合物名, 理論段数, and 分離度.

Fig. 15 マルチデータレポートの作成

6. おわりに

Nexera Method Scoutingを用いることで、簡単に、かつ迅速に最適な分析条件を導き出すことが可能です。また、得られた分析結果の評価値やクロマトグラムの一覧も容易に行えます。新規化合物の分析条件の検討や、開発した分析条件の頑健性確認、分析カラムのロット間差試験などにも応用することができ、分析業務の大幅な省力化が期待できます。

また、メソッドスカウティング専用ソフトウェア Method Scouting Solutionは、Nexera Method Scoutingに加えて、Nexera Quaternaryシステム（低圧グラジエントシステム）や一体型LCシステム i-Seriesに対応しています。既存の装置を活かしてメソッドスカウティングシステムへの拡張ができます。

* Nexera Quaternaryシステムやi-Seriesは、移動相ブレンド機能には未対応です。



Fig. 16 Method Scouting Solutionで制御可能な低圧グラジエントシステム

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2017年2月
© Shimadzu Corporation, 2017