

L-column と AI を組み合わせた HPLC の 分析メソッド開発

発表者：坂牧 寛 (クロマト技術部門)

1. 背景及び目的

本機構は、1990 年に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のカラムである **L-column ODS** を開発し、ユーザーのニーズに併せてラインナップを増やしてきた。微量分析の重要性が高まる中、より高性能なカラムが求められ、2007 年に **L-column2** を開発した。しかし、このようなカラムでもシリカ基材の溶解のため、アルカリ性移動相は使用できないという問題があった。これを改善するために、2017 年に pH 1 から pH 12 まで使用可能な **L-column3** を開発した。

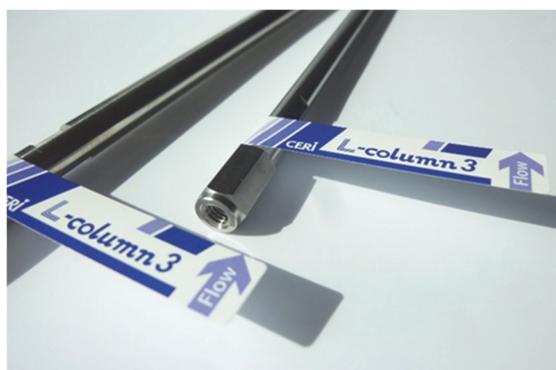


図 1 L-column3

HPLC の分野においても情報技術の進歩により、AI を搭載した HPLC の分析メソッド開発を自動で行うソフトウェアが開発されている。本機構は、HPLC の自動メソッド開発などが可能なソフトウェアを導入している。このソフトウェアは分析した結果を AI が判断し、次の分析を自動で行う。これを数回から数十回繰り返すことにより、分析メソッドが最適化される。ヒトが思いつかないような複雑な移動相組成が選出されることもある。一方で必要以上の検討を続けることがあり、膨大な時間がかかることもある。

本機構は HPLC カラムの開発・製造のみならずユーザーとして長年蓄積した知識・経験により、化合物の構造や物性から分析条件や検討項目を推測することができる。そこで、①高性能でラインナップが豊富な **L-column** シリーズ、②AI による自動分析、③開発・製造、ユーザーとしての知識・経験を活用可能である。これらを最大限活用することにより、短期間に頑健性の高い分析メソッド開発が実施できるようになった。HPLC の分析メソッド開発の事業化を目前に控え、本発表では、そのモデルケースとして、コルチゾンの不純物分析のメソッド開発について紹介する。

2. 方法

2.1 試料

用いた試料は、コルチゾン (500 mg/L) を主成分として、プレドニゾロン (25 mg/L) 及びヒドロコルチゾン (25 mg/L) を不純物としたものである。コルチゾンとの構造上の違いは、11 位のケトンが水酸化されているものがヒドロコルチゾンで、さらに A 環に二重結合が追加されているものがプレドニゾロンである。このようなわずかな構造上の違いにより化合物を HPLC で分離する条件を決めることは困難である。

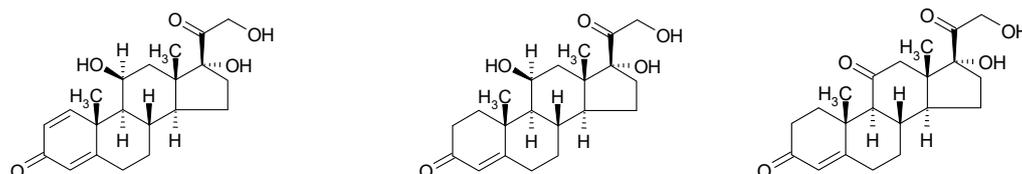


図 2 1. プレドニゾロン

2. ヒドロコルチゾン

3. コルチゾン

2.2 使用機器

HPLC は Agilent 1260 Infinity II Prime LC を使用した。この HPLC は 80 MPa 耐圧、低圧グラジエント、移動相切替バルブ (12 液)、カラム切替バルブ (4 種) の仕様である。3 種の有機溶媒と 12 種の緩衝液、4 種のカラムを使用でき、最大 144 種の移動相・カラムの条件検討が可能である。検出はフォトダイオードアレイ検出器で波長 245 nm を選択し、注入量は 10 μ L とした。メソッド移管先の HPLC は、移動相の混合原理が異なるポンプと熱源の異なるカラムオープンから構成される NEXERA である。

2.3 分析メソッドの最適化

本分析メソッドの最適化は今までの知識・経験を活かして図 3 の検討スキームを用いて、実施した。頑健性評価は流速、有機溶媒比率、温度、注入量などを変動させ、それらの影響を評価した。さらに分析メソッドの保持時間やピーク面積のばらつきについて評価した。

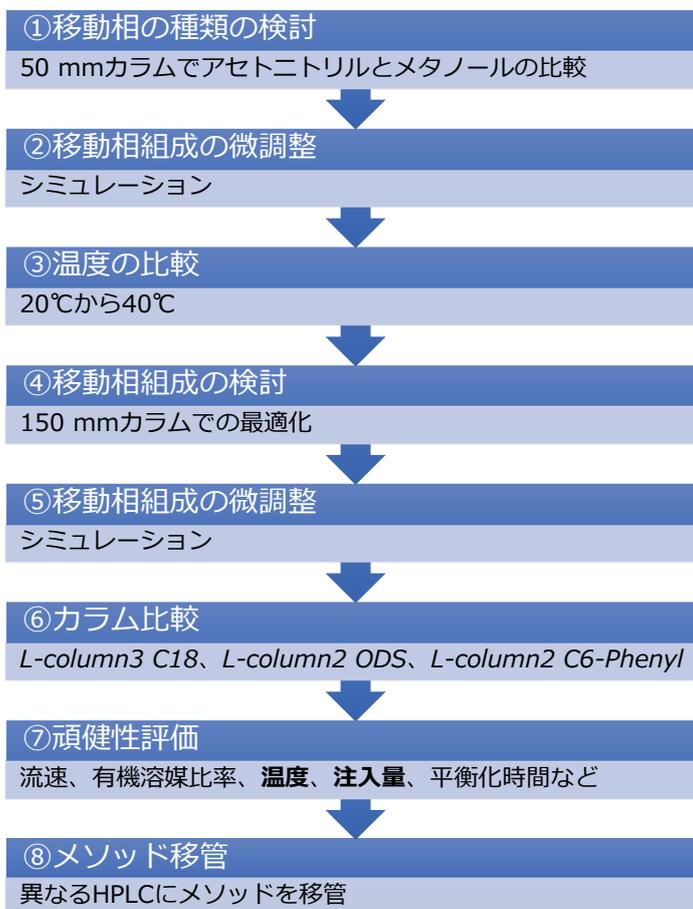


図 3 検討スキーム

3. 分析メソッド開発

3.1 移動相の検討

流速 1.5 mL/min、温度 40°C、**L-column3 C18** (粒子径 5 μm , 4.6 mm I.D., 50 mm L.) を用いて、アセトニトリル/水とメタノール/水の比較を AI により自動検討させた。いずれの移動相においても 3 回の自動分析では、3 成分を完全に分離させることはできなかった (図 4)。しかし、アセトニトリル/水の移動相の 3 回目の分析では、コルチゾンのピークの前にヒドロコルチゾンのピークが確認された。そこで、その結果を用いて、シミュレーションした結果、アセトニトリル/水では、ヒドロコルチゾンとコルチゾンがわずかに分離した。今回の試料は、移動相の pH による保持時間の変化がないため、緩衝液は必要ないと判断した。

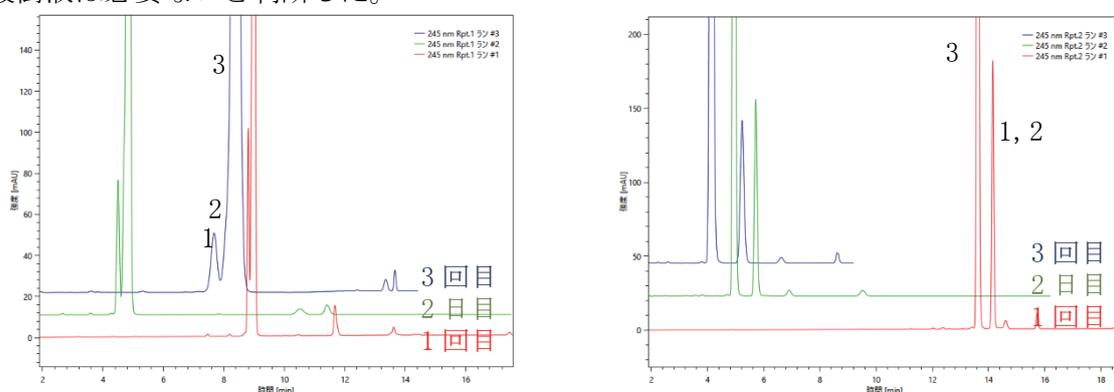


図 4 移動相の有機溶媒の比較 左)アセトニトリル、右)メタノール

3.2 分離条件の最適化

前項のシミュレーション結果を用いて、温度の比較 (20°C、30°C、40°C) を実施した。温度が 20°C と 30°C のときに 3 成分が分離した (図 5)。構造が類似する化合物は、温度を低くすることで分離が達成できることが多く、経験的に得られた知見とも一致する結果となった。

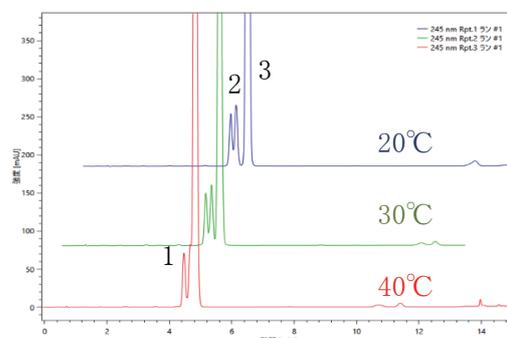


図 5 温度の比較

3.3 カラムの検討

次にカラムを粒子径 5 μm 4.6×150 mm、流速を 1 mL/min に変更し、20°C と 30°C の温度でそれぞれ自動検討させた。この結果を用いたシミュレーションにより、温度は 30°C とし、150 mm カラムでの分離条件を決定した。カラムの比較として、**L-column3 C18**、**L-column2 ODS**、**L-column2 C6-Phenyl** を比較した。また、注入量を 2 倍の 20 μL として注

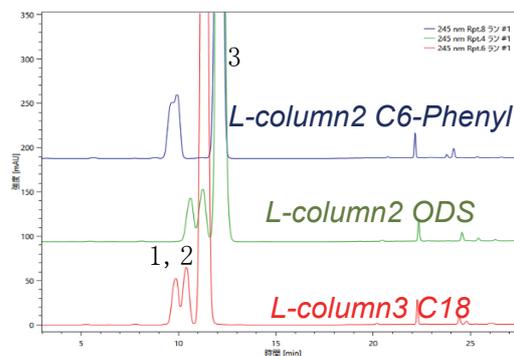


図 6 カラムの比較

入量の影響を確認した。**L-column2 C6-Phenyl** はヒドロコルチゾンとコルチゾンの分離は良いが、プレドニゾロンとヒドロコルチゾンの分離が不十分であった。これに対して、**L-column3 C18** はすべての成分でバランスよく分離された (図 6)。

3.4 頑健性評価

前項で決定した分析条件で頑健性評価を実施した。頑健性評価は、分析メソッドの再現性と分析条件の変動が結果に影響を与えない性能を意味する。これまでの検討により、試料負荷と温度が分離に影響を与えることが想定されたことから、その程度を把握するために重点的に実施した。注入量が増えると分離度が低下し、温度が上昇すると、プレドニゾロンとヒドロコルチゾンの分離度 ($Rs_{1,2}$) が増加し、ヒドロコルチゾンとコルチゾンの分離度 ($Rs_{2,3}$) が低下すること (図 7) が把握できた。また、本分析メソッドにおける保持時間及びピーク面積の変動係数はそれぞれ 0.1% 以下及び 1.1% 以下であり、良好な再現性が得られた。

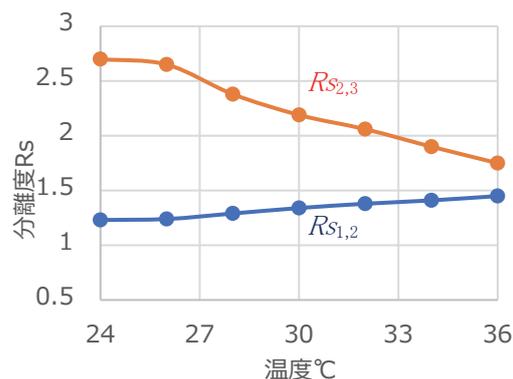


図 7 分離度と温度

3.5 メソッド移管

メソッド移管とは、異なる HPLC システムに分析メソッドを移行することであり、温度とカラム外体積、ミキサー容量のわずかな違いが分離に影響することが知られている。今回開発した分析メソッドを NEXERA に移管し、比較した。保持時間及び面積比率は概ね一致する結果が得られた (表 1)。

表 1 メソッド移管結果

HPLC	プレドニゾロン		ヒドロコルチゾン		コルチゾン	
	保持時間/分	面積%	保持時間/分	面積%	保持時間/分	面積%
NEXERA	9.16	4.5	9.67	5.5	10.6	89.2
Agilent1260	9.26	4.4	9.78	5.3	10.7	89.4

4. 結論

本機構では、①高性能でラインナップが豊富な **L-column** シリーズ、②AI の自動分析、③開発・製造、ユーザーとしての知識・経験を活用することにより、短期間に分析メソッド開発が可能である。今回のモデルケースであるコルチゾンの不純物分析はメソッド移管を含めて 1 週間ほどで分析メソッド開発が終了した。今後は、中分子化合物やより複雑な混合物の試料に対応できるように準備し、2023 年秋ごろから、HPLC のメソッド開発の受託分析の業務を開始する予定である。