

Technical Review

クロマトグラフ手法開発の為に汎用的な自動データ収集、解析、 条件決定ツール：ACD/AutoChrom

兼城昌敏、八藤後隆行、古田一匡

A Versatile System for Automating Method Development Data Collection, Interpretation, and Modeling : ACD/AutoChrom

Masatoshi Kaneshiro, Takayuki Yatogo, Kazumasa Furuta

Bio-Chemical Project, BioIT Business Development Group, Fujitsu Limited

9-3 Nakase 1-chome, Mihama-ku, Chiba-shi, Chiba 261-8588, Japan

Abstract

The principles behind computer-assisted chromatographic method development are well established. Experiments are performed in which one or more parameters are modified, and the changes in retention time for each peak are used to predict the best conditions under which to work. Predicted experiments are performed, and the model is refined as necessary. The result is generally a better chromatographic method developed in a shorter time frame. However, for particularly challenging samples, the experiment/prediction cycle may involve a large number of iterations, and a concurrently large amount of time and effort for the chromatographer in terms of data review and management, method design, and instrument configuration. Attempts have been made to fully automate this process, hampered mainly by an inability to track (particularly impurity) peaks. In addition, the tools have typically lacked versatility, such that established method development routines were required to be amended in order to fit the capabilities of the tool. This presentation will illustrate a solution to this problem, by combining versatile instrument control with chemometric evaluation of secondary detection techniques. The tool uses both UV-Vis and MS detection to track peaks unequivocally, developing methods resolving even trace impurities. The software is designed to interface directly with LC/MS/DAD instruments, in order to alleviate issues with manual instrument control, but also has unique data handling and storage systems designed to drastically reduce the time required for data review and report creation. A very wide array of instrument configurations and method development approaches are supported by this system.

Keywords : automating method development, chromatographic data collection, predicting and optimizing chromatographic condition

1. 緒言

従来、HPLC手法開発の現場ではコンピューターを利用する試みが行われてきました。コンピューターを用いた手法開発の目的は明確で、最適な条件を見つけ出すまでの実験数を減少し、研究者の経験に頼ること無く、手法開発を成功に導

くことにあります。しかし、ソフトウェアを利用する際の一般的な障害として、装置からソフトウェアへのデータ取り込みの困難さがありました。また、近年、ダイオード・アレイや質量分析計、UPLC等が一般的となり、手法開発の際に、より多くの情報を収集し、考慮することができるようになり

千葉市美浜区中瀬 1-9-3

富士通株式会社 バイオIT事業開発本部バイオケミカルプロジェクト室

TEL : 043-299-3680

FAX : 043-299-3019

E-mail : acd-fj@strad.ssg.fujitsu.com

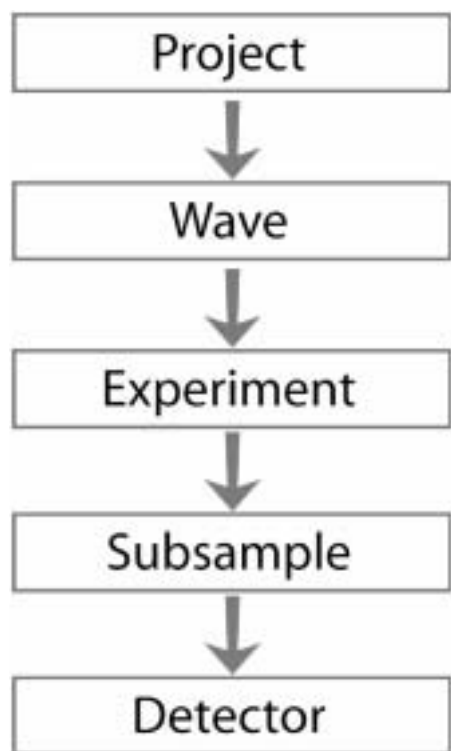


Figure 1. The AutoChrom data hierarchy. See the text for definitions of the terms.

ましたが、データ処理の負担増加や、効率的な情報管理・利用を行わなければ、直ぐにハードディスクが一杯になってしまうなど、新たな問題も出てきました。ACD/AutoChromはこれらの問題に対応する為に、クロマトグラフ装置の制御、ケモメトリックなデータ分析、手法開発のプロジェクト管理、実験のモデリング等のツールを組み合わせ、手法開発を総合的に支援するソフトウェアです。このソフトウェアはまた、様々なデータフォーマットや検出器に対応しており、幅広い環境で利用することが可能です。

2. 手法開発フローの構築

実際には、クロマトグラフ手法開発は研究所毎に異なります。しかし、アプローチの大部分は、カラム等のリストからの最適条件の選択と、温度等の連続して変化する条件をいかに最適化するかに集約されます。ACD/AutoChromでは、各条件の最適化を目的とする一連の実験を“Wave”と定義して段階的に管理し、各Waveで最適化した条件を次の段階に適用していくことで、複雑な条件にも対応可能です。実験毎にユーザによって定義された条件の制約や目的に基づいて、最適化条件の選択と、2パラメータまでの同時最適化を行うことができるように設計されています。

AutoChromのデータ階層はFigure 1 のようになっています。手法開発プロジェクト (Project) は複数の“Wave” (固定相の選択、溶媒選択、グラジエントの最適化等) から構成されます。“Experiment” は、各Waveにて行われた一連のイ



Figure 2. Building a method development strategy. In the method development strategy, shown on the left, first the stationary phase is selected, then the solvent system is selected, and finally, gradient and temperature are optimized. Buffer screening (shown in the middle column) is not a part of this strategy, but may be added if necessary.

ンジェクションを意味します。“Subsample” は、様々な実験から得られた任意の化合物の分離条件を意味します。これを組み合わせることで、実際には無いサンプルデータを擬似的に作成することも可能です。また、“Detector” は一回のインジェクションから得られたLC, LC/MS, LC/UV-Visデータなどを意味します。

手法開発フローの構築例をFigure 2 に示します。

3. AutoChromの装置コントロール・インターフェース

手法開発の為の一連の実験条件はAutoChromにて作成され、Agilent社のChemStationやWaters社のEmpowerへ転送されます。実験終了後にはAutoChromへデータが戻され、もしデータが不足しているとAutoChromが判断した場合、新たな実験条件がさらに追加され、AutoChromから装置端末に転送されます。この様にして自動的に次の実験 (あるいはWave) を実行します。この動作についてはFigure 3 に示しています。2つのシステム間でのデータ転送は自動で行われる為、時間の節約と、転送エラーを防ぐことが出来るようになっていきます。なお、AutoChromは実験計画法を基にして一連のインジェクションを設計・最適化しています。AutoChromの一連の作業の概略をFigure 4 に示します。

4. 共通ピークの自動マッチング (MAP)

クロマトグラフ・データ間のピーク・マッチングは、コンピュータを用いた自動手法開発においては非常に重要、かつ重大な課題です。スペクトルから得られる情報はそれほど多くはありませんが、検出器が安く非常に丈夫であるという理由から、UV、あるいはダイオード・アレイ検出器が広く一般的に利用されています。AutoChromには、2つ以上のLC

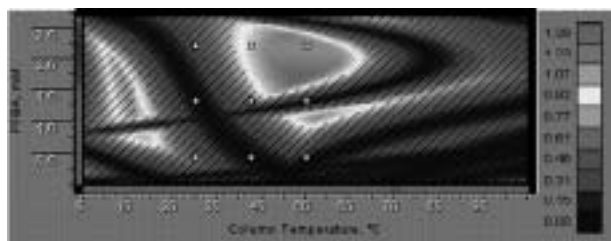


Figure 6. The 3D Resolution Map is the map of minimal resolutions that are calculated as a function of two parameters. This optimization result of experimental chromatographic data according to two parameters is temperature and buffer additive (HFBA).

Note that the black hatches denote the critical zones that do not suit our requirements and the white points on the 3D resolution map denote the experimental condition. You can see that we have just several suitable zones that conform to our parameters to some degree.

Table 1. Comparing the experimental and retention times of the compounds.

Compound	tR (exp), min	tR (calc), min	Error, min
imp	6.44	6.37	0.07
Phosphoric Acid	7.34	7.26	0.08
Citric Acid	8.01	7.94	0.07
Malonic Acid	9.11	9.08	0.03
Malic Acid	9.55	9.62	0.07
Succinic Acid	12.16	12.29	0.13
Lactic Acid	12.81	12.96	0.15
Formic Acid	13.94	14.07	0.13
Acetic Acid	15.73	15.77	0.04
Pyroglutamic Acid	16.85	17.36	0.51

ソフトウェアによって、どの分離条件が有効であるかが提示されるので、手法をより効率的に開発していくことが可能です。さらに最適化の際には条件に関する制限（最小レゾリューションや測定時間等）を考慮することもできます。

AutoChromでの条件最適化の例をFigure 6 に示します。この例では、タバコ葉中に含まれる有機酸の分離条件における2つのパラメータ（温度とバッファー添加剤“HFBA”濃度）を最適化した例です。実際の測定は、カラム温度領域25～50℃（中間点：37.5℃）、溶媒（heptafluorobutyric acid, HFBA）濃度範囲0.4～2.2 mM（中間点：1.3 mM）の9点にて測定し、最適化を行いました。また、AutoChromでの予測精度を

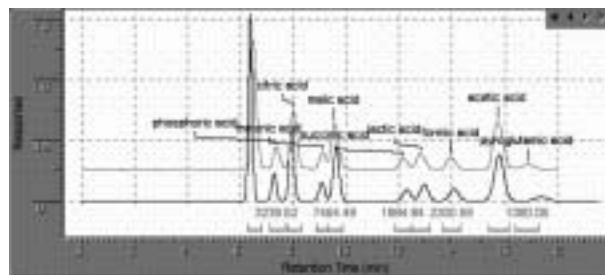


Figure 7. Comparing experimental and optimized chromatogram. The experimental (Pink line) and optimal (Black line) conditions are $t=42^{\circ}\text{C}$ and HFBA=1.8 mM.

確かめるために、予測されたクロマトグラムと実測したクロマトグラム^[3]を比較した結果をFigure 7、Table 1 に示します。

7. まとめ

ACD/AutoChromはクロマトグラフ手法開発分野における斬新かつ強力なソフトウェアです。このソフトウェアの利用により、データ転送や処理に掛かる時間を短縮し、データの入力ミスを減少することが可能となります。さらに、装置の再構成をほとんどすることなく、手法開発プロジェクトを管理しながら、短期間で最適な手法を開発することができるようになります。

今後、測定装置から得られるデータはますます複雑化し、その解析を、より短時間で効率良く行うにはコンピュータの助けが不可欠となります。ACD/AutoChromのようなツールを利用する開発戦略の管理・運用は、今後、非常に広範囲なクロマトグラフ手法開発ワークフローに適用されていくものと考えます。

8. 参考文献

- [1] Bogomolov, A., and McBrien, M. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 490, 41–58.
- [2] ACD/IntelliXtract. www.acdlabs.com/IntelliXtract/. Accessed June 13, 2006.
- [3] Jinshu Qiu, Xiaohong Jin. “Development and optimization of organic acid analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection.” *J. Chromatogr. A*. **2002**, 950, 81–88.
- [4] http://www.acdlabs.com/download/publ/2006/hplc_06_md.pdf