[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107(9) 683-689 (1987)]

ラボラトリーロボットシステムを用いた Simplex 法による反応条件の最適化

松田りえ子,* 石橋無味雄, 内山 充

国立衛生試験所薬品部

Simplex Optimization of Reaction Condition Using Laboratory Robotic System

RIEKO MATSUDA,* MUMIO ISHIBASHI, and MITSURU UCHIYAMA

National Institute of Hygienic Sciences, Drug Division, 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan

(Received March 31, 1987)

An automated system was constructed for the optimization of the experimental conditions of a color developing reaction. This system consists of a laboratory robot system and a spectrophotometer which are connected with a personal computer by a remote control interface through RS-232C and by a GP-IB interface, respectively. The procedure for the color developing reaction was carried out with the robot system while the measurement of the absorbance of a sample and the transmission of the value to the computer were carried out automatically with a spectrophotometer. The personal computer controls the robot system and the spectrophotometer, and calculates the optimal value according to the super modified simplex (SMS) algorithm based on the transmitted absorbance value.

This system was applied to the reaction of phosphotungstic acid and the drugs with a phenothiazine ring in the molecule. The optimal conditions were searched for chlorpromazine hydrochloride and levomepromazine maleate.

Keywords—automated optimization; simplex method; laboratory robot; chlorpromazine; levomepromazine

緒 言

近年、数種のラボラトリーロボットシステムが開発され、実験室における作業の自動化が図られており、分析の分野にも応用されてきている。ラボラトリーロボットシステムの大きな特徴は、産業用ロボットに比べて、プログラミングが容易であり、使用者がその目的に応じて簡単にソフトウェアを作成できることである。また適当な外部機器と組合せることにより、多くの系に応用することができる。

ロボットシステムによる自動分析の利点は、多数の試料を連続的に処理することができ、その作業の再現性が良いことである。また、人体に有害な試薬を用いるような場合にも有用である。医薬品分析の分野では、再現性の良さを利用した、製剤の定量、含量均一性、溶出試験といった品質管理におけるルーチンワークで、試料の前処理、又は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の分析機器と接続して全分析を行うような応用の例が多い。しかし、このような試料前処理装置としての使用法以外に、分析法そのものの開発にロボットシステムを使用することも可能である。

一般に、分析法の確立には分析条件の最適化のプロセスが不可欠である。例えば、HPLC における移動相の溶媒組成、機器分析における各種の操作条件、抽出溶媒の pH、反応における試薬濃度、反応温度、反応時間などのパラメータの最適な組合せを見出すことが重要である。従来は、経験的な値、文献値などから出発して、試行錯誤を繰り返す方法 (trial-and-error), あるいはより系統的なやり方として、他のパラメータをすべて固定してある条件、例えば試薬 A の濃度、のみを変化させる方法を繰り返して、最適値を見出す方法が行われている。前者では最適値を見出すまでの過程は分析者による個人差が大きく、また得られた値が真の最適値かどうか確かめることはできない。後者の方法では、個々のパラメータが独立ではなく相互に影響があるような場合には、真の最適条件を見出せない場合もある。多くのパラメータについてすべての組合せを行う方法 (lattice method) では、最

最終的に真の最適値が得られるが、最適な組合せに到達するまでには、膨大な量の実験を行わなくてはならない。ラボラトリーロボットにこのような実験計画を与えて逐次的に実行させることも可能であるが、その大部分は意味の無いパラメータの組合せであり、最適な組合せを見出すまでの、時間、試薬の消費も多い。

パラメータの最適な組合せを捜す他の統計的な方法として **simplex** 法が多くの系での最適化に利用されている。**Simplex** とは、 n -次元空間において $n+1$ の頂点をもつものである。**Simplex** 法による最適化とは、 n -次元空間におけるある関数の極値に **simplex** を近づけていくことに他ならない。実際にはパラメータの数が n の場合には、任意に選定したパラメータの組合せで $n+1$ 回の操作を行い、 $n+1$ 個の測定値を得る。この中で最も期待値から離れた値(測定値を最大にしたい場合には最小値)を与えた条件を、一定のアルゴリズムに従って変換して条件を設定し新たな **simplex** を求めて測定を行う。こうして1つの操作を行う毎に、よりよいパラメータの組合せを予測して、順次最適値に接近してゆく。新たな **simplex** の頂点を求める方法として、Nelder¹⁾ ら、Routh²⁾、van der Wiel^{3,4)} によって幾つかのものが提唱されている。Kleeman⁵⁾ らは **simplex** 法を用いて、 α -ketol steroid と blue tetrazolium の反応の5つのパラメータの組合せについて最適化を試みている。その他、HPLC の移動相組成の最適化を行った報告もある。^{6,7)}

Simplex の演算は通常の実験室のパーソナルコンピュータで容易に行えるが、次々に異なるパラメータに従って、再現性良く実験を行うのは用手法では困難である。しかしロボットシステムとパーソナルコンピュータを組合せることにより、自動的にある反応系における最適条件を見出すシステムを作成することが可能である。我々は、ロボットシステム、パーソナルコンピュータ及び分光光度計をインターフェースを介して接続し、相互間でデータを転送することによって、呈色反応の条件を最適化するシステムを試作すると共に、その応用の一例として、Ramappa⁸⁾ により報告されたフェノチアジン骨格を持つ薬物と、リンタングステン酸の反応条件の最適化を試みた。

実 験 の 部

1. 装置 ロボットシステムとしては Zymate II (Zymark Co.) を使用した。システムに含まれる装置の配置を Fig. 1 に示す。

Zymate II の本体は固定された垂直方向の回転軸にアームがついたもので、アームが回転、上下、水平方向の3軸にそって動き、空間内の位置をこの3軸の座標として controller のメモリに記憶する。**Controller** には位置の座標の他、他の外部装置の制御コマンド、プログラムも記憶され、ロボットシステム全体の制御を行う。アームの先端には **hand** が取り付けられる。**Hand** には試験管などをもってラックから取り出すような目的に使用される、**general purpose hand** と、シリンジにより液体を分取したり、注入するために使用される **syringe hand**

Fig. 1. Architectural Diagram of Optimization System

があり、目的によりつけかえることができる。本体の他は、液体を分注する master laboratory station, 電源及びスイッチのオン・オフを行う power & event controller 及び vortex mixer を使用した。

パーソナルコンピュータは PC-9801 (日本電気), 分光光度計は UV-160 (島津製作所) を使用した。Zymate II の controller と PC-9801 はパーソナルコンピュータの RS232C インターフェースを介して Remote control interface (Zymark) により接続し、分光光度計とパーソナルコンピュータは GP-IB インターフェースにより接続して、データの転送を行った。

PC-9801 のプログラムは N88BASIC (MS-DOS, Ver 3.1) で、Zymate II のプログラムは Zymate EasyLab language により作成した。

2. 試験 塩酸クロルプロマジン (CP), レボメプロマジン (LP) は局方品を使用し, 0.01 N 硫酸に溶かして 0.1 mg/ml 濃度の溶液とした。リンタンングステン酸 (PT) は特級品 (和光純薬) を使用し, 15% 溶液として用いた。

3. 呈色反応操作 呈色反応操作は Zymate II により行った。Syringe hand により, 試験管にコンピュータから指示された量の PT 溶液を加え, 更に薬物溶液 1 ml を加える。Hand を general purpose hand にかえて,

Fig. 2. Block Diagram of Optimization System

試験管をラックから取り出し、master laboratory station から総液量が 6 ml になるように水を加え、vortex mixer により振り混ぜる。内蔵のタイマーにより、指示された時間反応させた後に吸収極大波長 (CP は 538 nm, LP は 580 nm) における吸光度を測定する。ブランクについては、条件を変化させても常に吸光度はほぼゼロであったので、測定は行わなかった。

4. Simplex 法 本実験の最適化のアルゴリズムには Routh 等²⁾ の super modified simplex (SMS) 法を用いている。Simplex の移動の基本的な原則は、simplex の頂点の中で、最低値を示す点 W を他の頂点の中心 C を対称心として反転させる。この対称点 R について測定値を求め、W, R を比較することにより新たな頂点が求められるが、その手法により modified simplex (MS), SMS などがある。SMS では W, C, R の 3 点について 2 次式をあてはめて、最大値を与えると予測される点を、新たな simplex の頂点とする。Routh 等は SMS と MS を比較して、SMS の方が最適値に至るのが早く、誤った最適値を与えることも無いと報告している。

実験上の制約から、個々のパラメータについては、予めその最小値及び最大値を設定しておく必要がある。したがって、対称点 R 又は新たに求められた頂点のパラメータがこの境界値を越えた場合には、何等かの対処が必要となる。MS においては、範囲外のパラメータを持つ点に対しては測定値として非常に小さい値を与えて、simplex を境界値内に戻す。SMS では通常は W, C を結ぶ直線の延長線上でパラメータが境界値に対応する点を求め、その点での他のパラメータの値を計算して、測定を行う。しかし、このようにして得られた R と C の距離が小さい場合 (WC の距離の 1/2 以下の時) には W と C の中点を R とした。

最適値に到達したか否かの判定 (収束条件) は、simplex の各頂点における測定値間の相対標準偏差 (RSD) が既定の値以下になったと時とした。

5. システムの構成 システム全体のフローチャートを Fig. 2 に示す。

Zymate II は remote controll interface を介して、controller に記憶されている絶対位置の名前又はプログラム名を送信することにより外部コンピュータから制御することができる。Zymate II の controller は処理速度が遅く、またその言語である Easylab は複雑なループや判断文を含むプログラムを作成することは困難であるので、ロボットシステムと分光光度計の制御、simplex の計算及び収束の判定、は PC-9801 で行い、呈色反応操作部のプログラムのみを Easylab で作成した。

個々のパラメータの初期値、境界値、収束条件は PC-9801 のキーボードから入力する。パラメータの値が PC-9801 から Zymate II に転送され、その値に従って、呈色反応操作が行われる。処理が終了すると、Zymate II から PC-9801 に終了の信号が送られ、吸光度測定のスブルーチンに入る。PC-9801 が UV-160 のシッパを作動させ、試料溶液がフローセル内に吸入される。吸光度が測定され、PC-9801 に転送される。得られた測定値により収束の判定が行われ、収束していれば実験を終了し、収束していなければ次の simplex の頂点が計算され、新たなパラメータを Zymate に転送し実験が継続される。

結 果 及 び 考 察

本システムの応用例として、フェノチアジン骨格を持つ薬物と、PT の反応条件の最適化を試みた。今回の実験では、反応は室温で行い PT 溶液の量、反応時間の 2 つのパラメータを最適化した。

最適値に到達したか否かの判定は simplex の各頂点における測定値間の RSD により行っている。Zymate システムによる液体分注の精度については、香取ら⁹⁾ によって検討されており、master laboratory station から水を分注する場合の RSD は 0.03%, syringe hand による分注量の RSD は 0.3% と報告されている。Table I に CP において PT 溶液量 2.5 ml, 反応時間 20 分で 6 回操作を行って得られた吸光度の平均値及び RSD を示した。RSD はほぼ 0.5% であった。同様の反応を最終溶液量が 25 ml となるように変更して用手法で行った場合の RSD もほぼ 0.5% であり、Zymate システムによる再現性は用手法と同程度であった。この結果より、simplex の各頂点の値の RSD が 0.5% 以下を収束の判定条件とした。

TABLE I. Repeatability of Absorbance Obtained with Zymate System

No.	A (538 nm)
1	0.254
2	0.256
3	0.254
4	0.257
5	0.256
6	0.257
MEAN	0.255
RSD (%)	0.482

Conditions: volume of PT 3 ml; reaction time 30 min.

CP 及び LP において PT 液量 0.5—4 ml, 反応時間 0—30 分の範囲で順次変化させて 30 種類の条件で操作を行い, 得られた吸光度から等高線図を描いたものを Fig. 3 に示す. CP では実験を行った範囲内では PT 量に対して吸光度は単調に増加しており, PT 量 3 ml 以上では反応時間が若干の影響を示している. したがって, 最大の吸光度を与える点は PT 量の最大境界値である 4 ml となる. LP では, PT 量 2—3 ml, 反応時間 0—20 分の範囲で最高の吸光度が得られ, 最適値と考えられる. 等高線の形は PT 量が最適値より小さい部分では CP と同様の形を示しているが, PT 量が最適値以上になると形が複雑になっている.

Figure 4, 5 は CP 及び LP において, 初期値 (0.5 ml-0 分, 3.5 ml-5 分, 1 ml-25 分) から出発した simplex が移動して, 最適値に至るまでの動き, 及び simplex の各頂点において得られた吸光度を示している. CP は 8 回, LP は 10 回で収束したが, 6—7 回目の頂点で最適値にほぼ近付き, 以後の吸光度の変化はわずかである. 最終的に得られた最適値は, CP は PT 量 3.8 ml, 反応時間 23 分, LP では PT 量 2.7 ml, 反応時間 1.5 分であった. これらの値は Fig. 3 で得られた結果から, 妥当なものと思われる.

Fig. 3. Contour Plot of the Response Surface for (a) CP and (b) LP Obtained from 30 Experiments with the Robotic System

Fig. 4. (a) The Movement of Simplexes and (b) the Response at Each Vertex for CP

Initial conditions for the volume of PT and reaction time: 1. 0.5 ml, 0 min; 2. 3.5 ml, 5 min; 3. 1 ml, 25 min.
Obtained optimal conditions: 3.8 ml, 23 min.

Fig. 5. (a) The Movement of Simplexes and (b) the Response at Each Vertex for LP

Initial conditions are same as Fig. 4. Obtained optimal conditions: 2.7 ml, 1.5 min.

Fig. 6. The Movement of Simplexes for Reaction of CP from Different Initial Conditions

Initial conditions: (a) 1.5 ml and 10 min, 1.5 ml and 20 min, and 2.5 ml and 15 min; (b) 0.5 ml and 5 min, 1 ml and 0 min, and 1.5 ml and 5 min; (c) 3 ml and 0 min, 4 ml and 5 min, and 3 ml and 10 min.

Figure 3 に示したように、CP においては PT 量の境界値上で最大値が認められ、測定範囲内では明らかな極値を示していない。このような場合には MS では、simplex が境界に近付いたときに急速に収縮することが多い。SMS ではこのような条件下でも迅速に最適値に到達することが、Routh らにより示されているが、²⁾ 本実験においても同様に迅速な最適化が見られた。SMS では、境界値を越えた点が示された場合にも、境界値内に移動させて測定を行うことにより、MS に比較して境界値付近での正確な値が得られるためであると考えられる。

Figure 6, 7 は Fig. 4, 5 に比較して、小さな範囲の初期 simplex からの移動と得られた最適値を示したものである。最初の simplex が小さいと、simplex の動きが小さくなり、最適値に近づくまでの実験数がふえる (Fig. 6 (a), (b)). また、十分に最適値に接近しない内に simplex が縮小してしまうために、各頂点における値の RSD が小さくなり、吸光度の変化が緩やかなところで、収束してしまう場合もある (Fig. 6 (c), Fig. 7 (b)). このため、パラメータの初期値は、境界値の範囲内なるべく広い範囲にわたるよう選ぶ法がよいと考えられる。また、大きな範囲の初期値から出発して、simplex の動きを検討すれば境界値の範囲内における大まかな展望を得ることが可能である。

Fig. 7. The Movement of Simplexes for Reaction of LP from Different Initial Conditions

Initial conditions are same as Fig. 6.

今回の実験では、いずれの初期値から出発しても、かなり最適値に近い点で収束している。最適化においては初期値への依存性が認められることが多いが、本実験ではパラメータの数が2と少なく、また局地的な最大値も存在しないため初期値の影響が明かでなかったものと思われる。

この反応系では、最適値付近では吸光度の変化は緩やかであり、広い範囲で同じ吸光度を与えるので、より厳密な最適値を得るためには、収束の判定条件を厳しくしなくてはならない。しかし、反応の再現性以下に判定基準を設定することは、いたずらに収束までの実験数を増加させるだけで意味が無い。また、反応条件の最適化という目的には現在の程度に終点を示されれば十分と考えられる。

結 論

ラボラトリロボットと simplex 法を組み合わせたシステムにより、反応条件の最適化が自動的に短時間で行えることが示された。このシステムで与えられた最適値は、単に最大の吸光度を与える点というに過ぎず、分析法として確立するためには、更に安定性、検量性を検討しなくてはならないということ言うまでも無い。しかし、この実験の目的は最適と考えられる条件を自動的に検索することであり、このような目的には充分使用できることが認められる。また、このシステムを使用すれば、試薬の製造者、lot による変化が起こった時にも、容易に最適な条件系を再構成することができる。

今後は、更に多くのパラメータをもつ系での最適化、初期値の影響、及び吸光度測定以外の機器、例えば HPLC のための誘導体化などへの応用を検討したい。

引 用 文 献

- 1) J. A. Nelder, R. Mead, *Comput. J.*, **7**, 308 (1965).
- 2) M. W. Routh, P. A. Swartz, M. B. Denton, *Anal. Chem.*, **49**, 1922 (1977).
- 3) P. F. A. van der Wiel, *Anal. Chim. Acta*, **122**, 421 (1980).
- 4) P. F. A. van der Wiel, R. Maassen, G. Kateman, *Anal. Chim. Acta*, **153**, 83 (1983).
- 5) W. P. Kleeman, L. C. Bailey, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 655 (1985).
- 6) J. C. Berridge, *J. Chromatog.*, **244**, 1 (1982).
- 7) J. C. Berridge, E. G. Morrissey, *J. Chromatog.*, **316**, 69 (1984).
- 8) P. G. Ramappa, H. S. Gowda, A. N. Nayak, *Microchem. J.*, **28**, 586 (1983).
- 9) 香取典子, 松田りえ子, 武田 寧, 内山 充, 衛試報告, **104**, 25 (1987).