

Technical Report

超臨界流体クロマトグラフィーにおける分離条件の最適化と分取サイズへのスケールアップ

Optimization of analytical condition and scale-up to a preparative scale using supercritical fluid chromatography

田中 健一朗¹、松本 恵子¹、舟田 康裕¹

Abstract:

高純度に分取するには対象ピーク同士を十分に分離する必要があり、網羅的に条件を検討して、分離条件の最適化（メソッドスカウティング）を行うことが重要です。特に超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）では、固定相の種類によって分離の挙動が大きく変化するので、様々なカラムを使って条件検討を行うことが有用です。一般的には分析スケールにてメソッドスカウティングを行って最適条件を確認し、その条件を元に、カラム断面積に比例して流量と注入量を増やすことによりスケールアップして分取を行います。本レポートではNexera™ UC（分析スケール）にて条件検討を行い、得られたメソッドをNexera UC Prep（分取スケール）へスケールアップした例を紹介します。

Keywords: 分取SFC、スケールアップ、スカウティング

1. 分析スケールでのメソッドスカウティング

分取SFCによる分取を行う際には、より純度良く分取するために最適条件を見つける必要がありますが、分取スケールでのメソッド検討はサンプルやモディファイア溶媒の消費量が多くなってしまいうため、最初に分析スケールにて分離メソッドを検討することが一般的です。

本報では5種の化合物（リナロール、イブプロフェン、ケトプロフェン、カフェイン、テオフィリン）の混合溶液を用いて検討を行いました。初めに分離が良好な分析条件を探索するため、Nexera UCキラルスクリーニングシステムを用いてメソッドスカウティングを行いました。カラムには超臨界流体クロマトグラフ用分析カラムShim-pack UCシリーズを使用しました。

スカウティングには専用ソフトウェアであるMethod Scouting Solution (Fig. 1) を使用しました。Method Scouting Solutionが自動生成するバッチテーブルを実行するだけで、初めての方でもスムーズにSFC分析のメソッドスカウティングを行うことができます。複数のモディファイア・カラムを用いる場合でも自動で切り換えを行い昼夜連続の実行が可能となります。

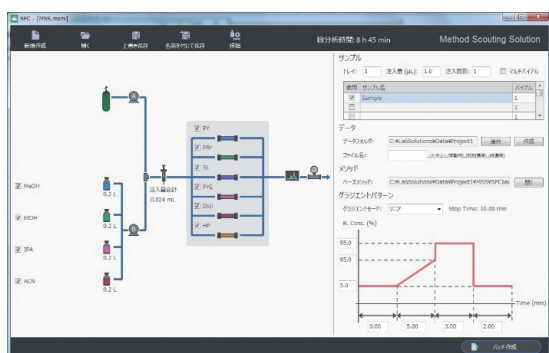


Fig. 1 Method scouting solution ver. 2

Method Scouting Solutionを使用する場合は、条件検討を行わない固定パラメータ（流量・波長・カラム温度など）の情報は予め標準ソフトウェアのLabSolutions上で指定し（ベースメソッド）、条件検討にて変更する可能性のあるパラメータ（カラム・モディファイアの種類・モディファイアの濃度・注入量・グラジエントプロフィールなど）はMethod Scouting Solution上で設定を行います。今回はTable 1に示す6種のカラムを用いてスカウティングを行いました。分析条件はTable 2に示します。

Table 1 使用したカラム

カラム名称	官能基
Shim-pack UC-Diol II	ジオール基
Shim-pack UC-Sil II	—
Shim-pack UC-HyP	3-ヒドロキシフェニル基
Shim-pack UC-Py	ピリジニル基
Shim-pack UC-PBr	ペンタプロモベンジル基
Shim-pack UC-PyE	ピレニルエチル基

Table 2 分析条件

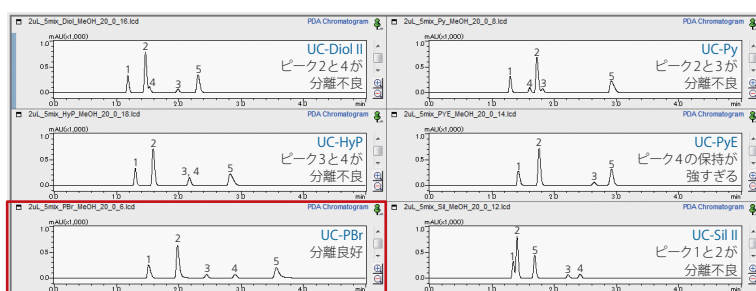
System	: Nexera UC (Analytical scale)
Column	: Shim-pack UC-Sil II Shim-pack UC-HyP Shim-pack UC-PBr Shim-pack UC-PyE Shim-pack UC-Py Shim-pack UC-Diol II (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Modifier	: Methanol
Modifier concentration	: 20 %
Flow rate	: 3.0 mL/min
Column temperature	: 40 °C
Injection volume	: 2 μL
Detection	: 225 nm
Cell	: High pressure cell for SFC (analytical)
BPR pressure	: 10 MPa
Sample	: Linalool, Ibuprofen, Ketoprofen, Caffeine, Theophylline (500, 50, 20, 5, 5 mg/mL in methanol, respectively)

2. スカウティング結果の確認

スカウティング後に分離が良好なデータを選択するには、データブラウザに複数のデータを並べて視覚的に確認する方法があります。

今回のメソッドスカウティングで得られたクロマトグラムをデータブラウザにおいて一覧表示させた結果をFig. 2に示します。それぞれの分離を確認した結果、Shim-pack UC-PBrにおいて全ての成分が良好に分離されていることが確認できました。

スカウティングにより得られたデータ数が多く、目視のみの確認では判断が難しい場合はマルチデータレポートを活用して各データの分離度をスコアリングして順位付けする方法もあります。マルチデータレポートを用いた確認方法については別報のテクニカルレポート「マルチデータレポートを用いたCMCにおける試験報告書作成の効率化 (C191-0083)」をご参照ください。



1. Linalool,
2. Ibuprofen,
3. Theophylline,
4. Caffeine,
5. Ketoprofen

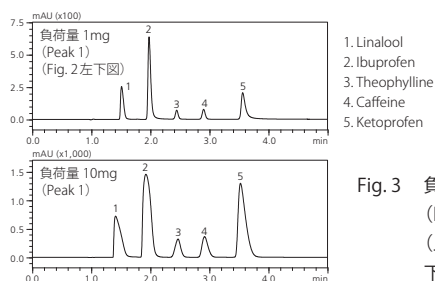
Fig. 2 メソッドスカウティングの結果 (データブラウザ)

3. 負荷量の検討 (分析スケール)

メソッドスカウティングにて得られた最適条件にて負荷量の検討を行いました。ピーク強度が飽和してしまうことを防ぐため、セルを分析用から分取用に変更して分析を行いました。注入量を増やしてもピークの崩れ、分離不良などが起こらないかを確認しました。分析条件をTable 3に、得られたクロマトグラムをFig. 3に示します。注入量を分析条件検討時の2uLから20uLに増やしてもピーク形状に大きな崩れはなく、Fig. 2と比べても各ピーク間の分離を保つことができることを確認しました。

Table 3 分析条件

System	: Nexera UC (Analytical scale)
Column	: Shim-pack UC-PBr (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Modifier	: Methanol
Modifier concentration	: 20 %
Flow rate	: 3.0 mL/min
Column temperature	: 40 °C
Injection volume	: 20 μL
Detection	: 225 nm
Cell	: High pressure cell for SFC (preparative)
BPR pressure	: 10 MPa



1. Linalool
2. Ibuprofen
3. Theophylline
4. Caffeine
5. Ketoprofen

Fig. 3 負荷量検討時のクロマトグラム (Nexera UC)
(上段: 負荷量増大前、2uL注入、
下段: 負荷量増大後、20uL注入)

4. スケールアップ

一般に分析スケールでの検討の後に、スケールアップを行います。カラムを分取サイズに変更し、それに伴い流量と注入量を変更します。基本的に流量と注入量はカラム断面積に比例して増やすことで同等の分離が得られます。例えば4.6mm内径カラムから20mm内径カラムにスケールアップする場合にはおよそ18.9倍にします。ここでは流量を18.9倍、注入量を25倍にしてスケールアップを行った例を示します。分析条件をTable 4に、得られたクロマトグラムをFig. 4に示します。同じ固定相のカラムを使用することにより、Fig. 3と同等の分離が得られていることが確認できました。

Table 4 分析条件

System	: Nexera UC Prep (Preparative scale)
Column	: Shim-pack UC-PBr (250 mm L. × 20 mm I.D., 5 μm)
Modifier	: Methanol
Modifier concentration	: 20 %
Flow rate	: 56.7 mL/min
Column temperature	: 40 °C
Injection volume	: 500 μL
Detection	: 225 nm
Cell	: High pressure cell for SFC (preparative)
BPR pressure	: 10 MPa

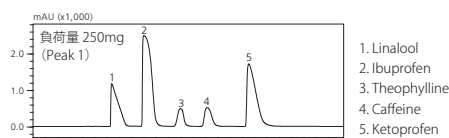


Fig. 4 注入量500uLでのクロマトグラム (Nexera UC Prep)

Nexeraは、株式会社島津製作所の商標です。