

# Application News

## No.L499B

超臨界流体クロマトグラフィー  
Supercritical Fluid Extraction / Chromatography

### オンライン SFE-SFC-PDA の 洗浄バリデーションへの応用

Application of On-line SFE/SFC/PDA for Cleaning Validation

洗浄バリデーションは医薬品製造所において高品質と安全性を確保するために非常に重要な工程です。スワブと呼ばれる布製のふき取り材を用いて、製造装置の該当部分をふき取り、このふき取り部分を全有機体炭素計 (TOC) や高速液体クロマトグラフ (HPLC) によって分析します。近年は個別分析が可能であることから、HPLC による評価が多く用いられています。分析に先立って、ふき取り部分の抽出操作が必要になります。前処理方法に関しては超臨界抽出 (SFE) を用いることにより、簡便かつ迅速な目的成分抽出が可能になります。また、分析もSFEのあとに超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) をオンラインで用いることにより、SFEに試料をセットするだけで、分析結果が得られるようになり、前処理から分析までのワークフローを統一することができます。尚、オンライン SFE/SFC システムの概要については、アプリケーションニュース L496 をご参照ください。ここでは、分析対象をアルキルベンゼンスルホン酸とし、第一段階としてNexera-UC キラルスクリーニングシステムを用いたカラム選択のプロセスからご紹介します。

Y. Watabe H. Terada

#### ■分析カラム選択

##### Analytical Column Selection

SFC 分析においては、試料に対する最適カラムの選択が分析の信頼性に影響する大きな要素です。ここでは、Table 1 および Fig. 1 に示した条件で 4 種のカラムについてアルキルベンゼンスルホン酸の SFC 分離を行い、ピーク形状の最も良好な Shim-pack UC-Sil を分析用カラムに用いることにしました。また、グラジエントのプロファイルの検討から、側鎖の長さの異なるアルキルベンゼンスルホン酸の性質上、勾配を大きくしなくてはピークの広がりが顕著になるため、定量性の確保のためには比較的急なグラジエントプロファイルが好ましいこともわかりました。

これらの情報から、Shim-pack UC-Sil を用いた条件の最適化を行い、ふき取り材のスワブからのオンライン SFE-SFC 分析を実施しました。

Table 1 カラム選択のための SFC 分析条件  
SFC Analytical Conditions for Column Selection

Column	: Shim-pack UC series columns (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm) (i) UC-RP (ODS with polar group), (ii) UC-GISil (ODS), (iii) UC-Sil, (iv) UC-Diol
Mobile Phase	: A: CO <sub>2</sub> ; B: Methanol
Time Program	: Shown in the figure
Flow Rate	: 3.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Back Pressure	: 15 MPa
Wavelength	: 220 nm
Injection Vol.	: Shown in figure

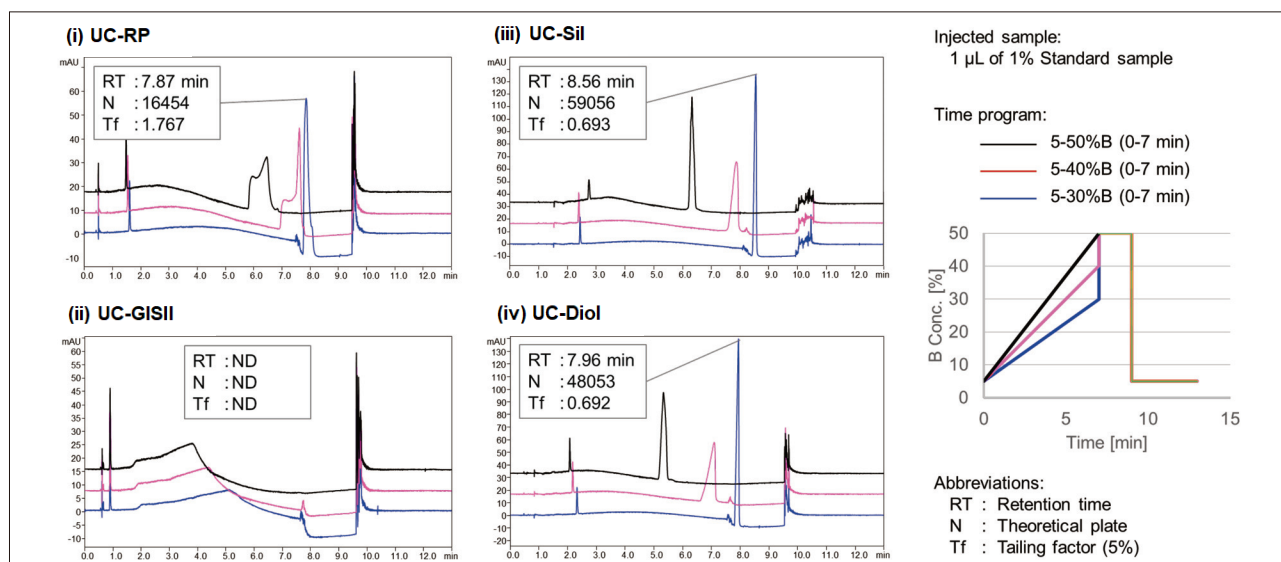


Fig. 1 4 種のカラムにおけるアルキルベンゼンスルホン酸標準品の SFC 分離比較  
Comparison of SFC Analyses for Standard Alkylbenzenesulfonates with Four Different Columns

## ■アルキルベンゼンスルホン酸を含む スワブのオンライン-SFE-SFC 分析

Online-SFE-SFC Analysis of Used Swab Containing Alkylbenzenesulfonate

スカウティングシステムによるカラム選択検討から、分析カラムを Shim-pack UC-Sil と決定し、オンライン SFE/SFC 分析での各種条件の最適化を行い、以下の Table 2 に示す条件で分析を行いました。

Table 2 オンライン SFE/SFC 用分析条件  
On-line SFE/SFC Analytical Conditions

[Sample Preparation]	
A total of 10 to 500 µg standard samples in methanol were dropped onto swabs.	
The swabs were enclosed into an extraction vessel and set to the SFE unit.	
[Static Extraction]	
Extraction Time	: 3 min
Mobile Phase	: A: CO <sub>2</sub> ; B: 0.1 % (w/v) Ammonium Formate in Methanol
B Conc.	: 10 %
Flow Rate	: 3.0 mL/min
Back Pressure	: 15 MPa
[Dynamic Extraction]	
Extraction Time	: 3 min
Mobile Phase	: A: CO <sub>2</sub> ; B: Methanol
B Conc.	: 10 %
Flow Rate	: 3.0 mL/min
Back Pressure	: 15 MPa
[SFC]	
Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
Mobile Phase	: A: CO <sub>2</sub> ; B: Methanol
Time Program	: 10 %B (0-2 min), 10-60 %B (2-7 min), 60 %B (7-9 min), 10 %B (9-13 min)
Flow Rate	: 3.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Back Pressure	: 15 MPa
Wavelength	: 220 nm

以下の Fig. 2 に示すように界面活性剤であるアルキルベンゼンスルホン酸のピークが良好に分離検出されています。Fig. 3 にはスワブに 100 ng 相当のアルキルベンゼンスルホン酸を添加した同一スワブから複数回の SFE/SFC 分析を行った結果を示します。2回目以降の抽出でアルキルベンゼンスルホン酸のピークが確認できないことから 1 度の SFE で、ほぼ完全に抽出作業が完了していることがわかります。Fig. 4 にはスワブに 10-500 µg の範囲でアルキルベンゼンスルホン酸を添加して、直線性の確認を行いました。この範囲での直線性を示す相関係数は 0.996 でした。Fig. 5 には、100 µg のアルキルベンゼンスルホン酸を添加したスワブの 5 回連続分析例を示します。抽出操作まで含め、保持時間の再現性は 0.19 %RSD、面積再現性は 5.76 %RSD でした。これらの結果から Nexera-UC オンライン SFE/SFC システムの本アプリケーションでの有用性が確認できました。

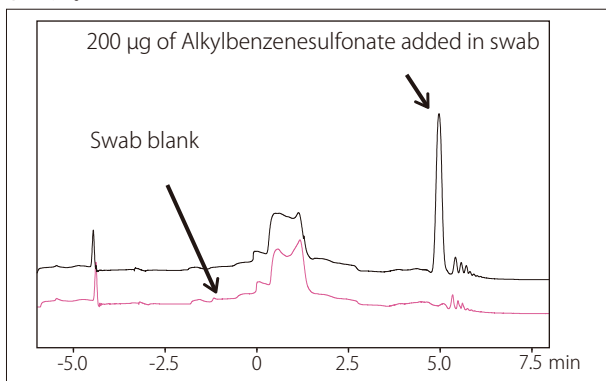


Fig. 2 アルキルベンゼンスルホン酸のオンライン SFE/SFC 分析  
On-line SFE/SFC Analysis of Alkylbenzenesulfonate

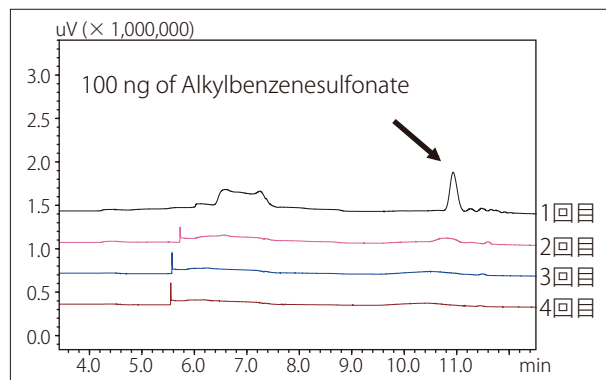


Fig. 3 オンライン SFE での抽出効率の確認  
Confirmation of On-line SFE Efficiency

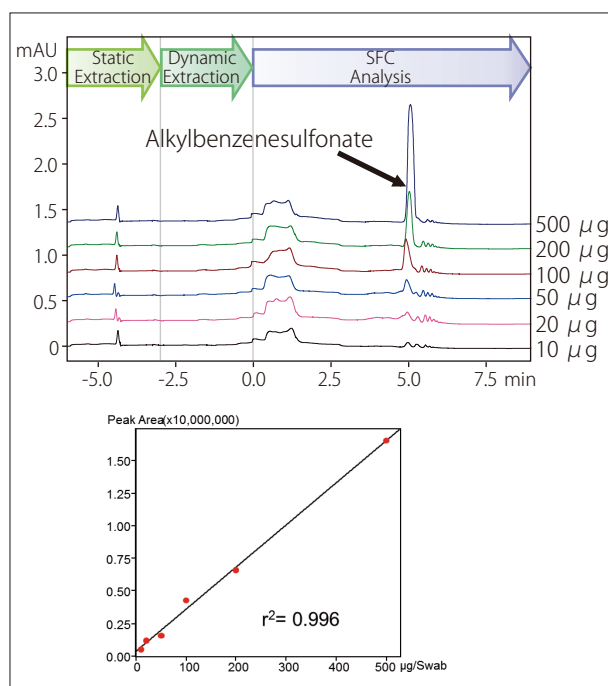


Fig. 4 スワブ分析でのオンライン SFE/SFC の直線性  
Linearity of On-line SFE/SFC Analysis for Swab

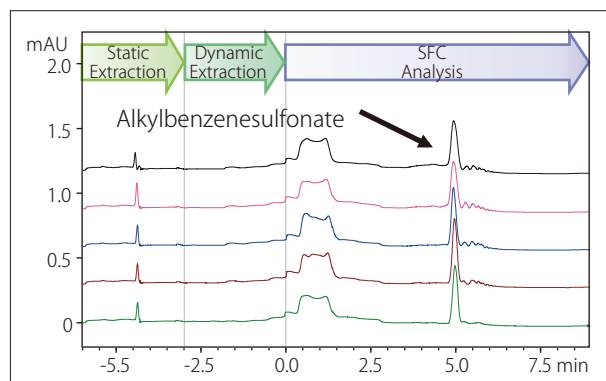


Fig. 5 スワブ分析でのオンライン SFE/SFC の再現性  
Reproducibility of On-line SFE/SFC Analysis for Swab

※スワブ試料は第一三共株式会社様よりご提供いただきました。

初版発行：2015年10月  
B改訂版発行：2022年12月