

Technical Report

Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムによる 分離向上とメソッド開発の効率化

Improving separation and method development efficiency using UHPLC/SFC Switching System

寺田 英敏¹、内方 崇人¹、松本 恵子¹、山口 忠行¹、舟田 康裕¹

Abstract:

製薬、食品および環境などさまざまな分野では、キラル化合物や構造異性体の分離など多様な分離手法が求められています。超臨界流体二酸化炭素と有機溶媒を用いたSFCはUHPLCと異なる分離選択性を示すことから、新たな分離手法として近年期待されています。

UHPLCとSFCを統合させたNexera UC/s UHPLC/SFC切替システムは、1システムでUHPLC分析とSFC分析を両立することができます。SFCはUHPLCと分離特性が異なるため、異性体間の分離の改善を期待できます。メソッド開発時にUHPLCとSFCの2種類の分離手法を用いてスクリーニングすることで、短時間でより良い分析条件を構築することが可能になります。

Keywords: 超臨界流体クロマトグラフィー、SFC、Supercritical fluid chromatography、UHPLC、切替

1. 超臨界流体クロマトグラフィーとは

超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）は主たる移動相として超臨界流体を用いた分離分析手法です。超臨界流体は低粘性・高拡散性などの特性を有することから、従来のUHPLCによる分離分析と比較してカラム背圧が低く、高流量領域での送液による高速分析や高分離分析などを実現します。

一般的に、SFCの超臨界流体として超臨界流体二酸化炭素が使われます。超臨界流体二酸化炭素はヘキサンと同程度の極性を有することが知られています。超臨界流体二酸化炭素だけではカラムから目的成分を溶出することが困難なため、移動相にモディファイアと呼ばれる有機溶媒を加えることにより、移動相の極性を変化させてカラムから目的成分を溶出させる手法が用いられます。

製薬、食品および環境などさまざまな分野では、キラル化合物や構造異性体の分離など多様な分離手法が求められています。超臨界流体二酸化炭素と有機溶媒を用いたSFCはUHPLCと異なる分離選択性を示すことから、新たな分離手法として近年期待されています。また、SFCに必要なユニットを既存のUHPLCシステムに追加して、UHPLC/SFC切替システムにアップグレードすることも可能になりました。メソッド開発時にUHPLCとSFCの2種類の分離手法を用いてスクリーニングすることで、短時間でより良い分析条件を構築することが可能になります。

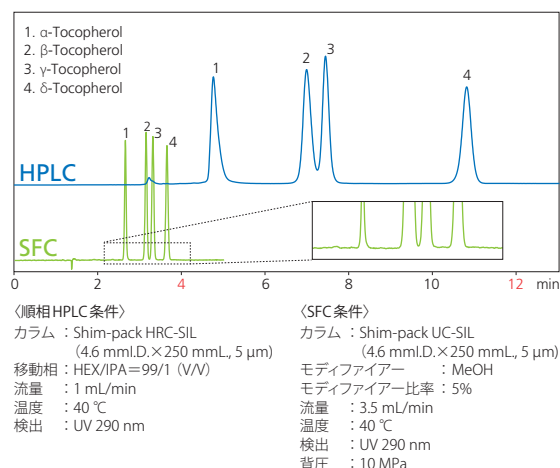


Fig. 1 HPLCとSFCの比較

(2) 溶出順序

HPLCとSFCでは溶出特性が異なります。Fig. 2に、3種の医薬品成分の分離例を示します。HPLC、SFC共にODSカラムを使用していますが、溶出順序が異なります。HPLCで保持の強い成分をSFCで早い保持時間で溶出させることにより、シャープなピーク形状でより感度良く検出することが可能になります。また、重なった夾雑成分と溶出位置を変える際もSFCは有効です。

2. HPLCとSFCの分離特性の違い

SFCはHPLCに比べて、高流量においてもカラム効率を損なわないため、(1) 高速分析を可能とし分析時間の短縮が図れる一方で、(2) 溶出順序、(3) 分離選択性が異なります。HPLCで分離困難であった化合物も、SFCを適用することで改善が期待できます。

(1) 分析時間の短縮

SFCは、超臨界流体二酸化炭素が低粘性と高い拡散性を有するため、高流速領域での分析においてもカラム負荷圧は低く、かつカラム効率を損なうことなく分析の高速化が可能です。Fig. 1のように、HPLCと同じ粒子径の充てん剤カラムを用いて分析した場合、分離を損なうことなくHPLCに比べて3～5倍程度の分析時間の短縮化を実現することができます。

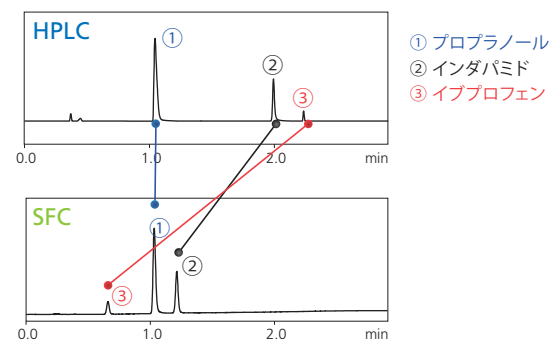


Fig. 2 3種の医薬品成分の分離（上段HPLC、下段SFC）

(3) 分離選択性の改善

SFCはHPLCと分離パターンが異なるため、異性体間の分離の改善も期待できます。Fig. 3に示す構造異性体について、HPLCとSFCの両分離手法を用いて検討した例を示します。HPLCの場合に分離不十分であったトリテルペン類のオレアノール酸とウルソール酸を、SFCを用いることによって分離できています。HPLCとSFCの異なる分離選択性を有効に活用することにより、これまで分離が困難であった異性体同士や夾雑成分との分離を改善することが期待できます。

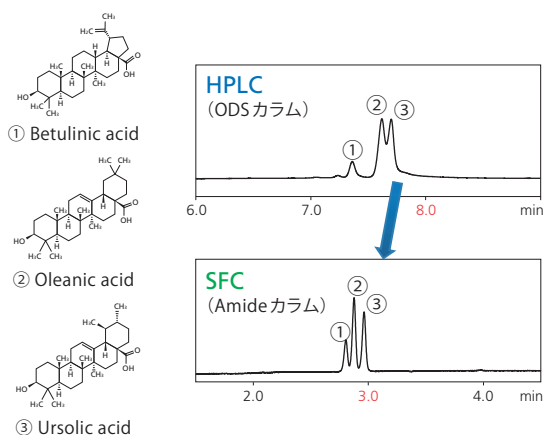


Fig. 3 構造異性体3種の分離

3. UHPLC/SFC切替システムとは

分離条件を検討する際に、UHPLCとSFCを両方使うことができれば、より良い分離条件を見出すことができます。1つのシステムでUHPLCとSFCの両方の分析モードを使用することを可能にしたシステムが、Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムです。UHPLCとSFCを1つのシステムに統合した本システムの流路図をFig. 4に示します。標準的なUHPLCシステムに、超臨界流体二酸化炭素送液ユニットと背圧制御弁ユニットを追加したシステム構成です。送液ユニットの切替と背圧制御弁の圧力制御のON/OFF設定を変更することにより、UHPLC分析とSFC分析を両立することができます。

送液ユニット1台(有機溶媒送液用)、オートサンプラ、カラムオープンおよび検出器をUHPLC分析とSFC分析で共有できるため、スペースと導入コストを抑えられるとともに装置稼働率の向上が図れます。既存UHPLCシステムからのアップグレードも可能です。さらに、移動相溶媒切替バルブとカラムスイッチングバルブを併せて用いることにより、最大12本のカラムに対して自動的かつ連続的に移動相条件を変更して網羅的な測定を可能とし、メソッド開発の効率化を実現します。

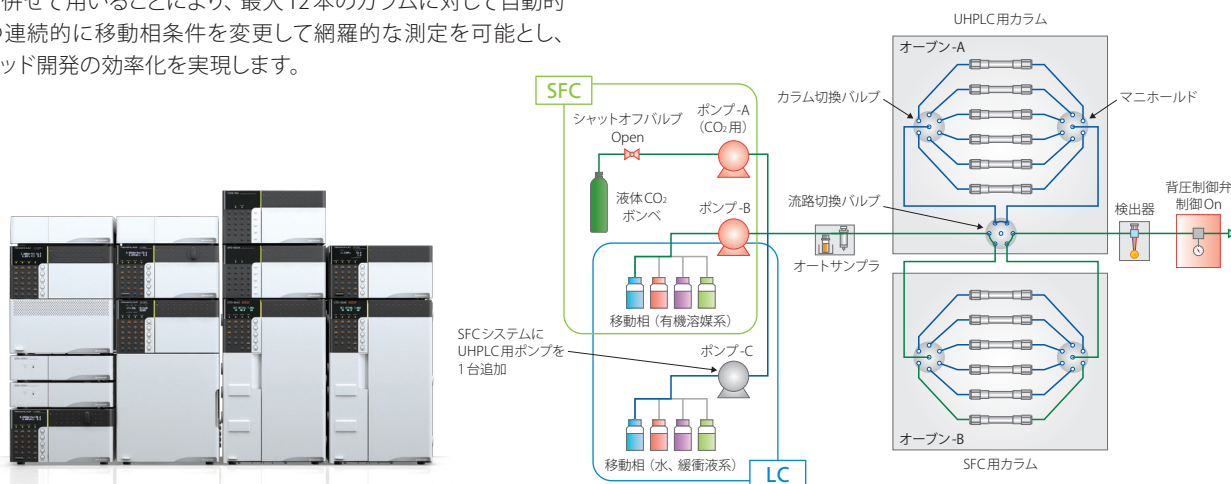


Fig. 4 Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムおよび流路図 (緑ラインはSFC使用時)

4. 2種類の分離手法を用いた光学異性体の分離検討

製薬分野における創薬合成では、光学異性体を効率的に分離することが求められています。多種多様なカラムから最適なカラムと移動相を見出すことは、多大な労力と時間を要するため、より効率的なメソッドスクリーニングが期待されています。

UHPLC/SFC切替システムを用いてメソッドスクリーニングの迅速化を図った事例を紹介します。キラル化合物2種 (Omeprazole、Warfarine) について、Nexera UC/s UHPLC/SFC切替システムを用いて分離条件の自動最適化を行いました。UHPLC、SFC共に6種のキラルカラム (CHIRALPAK®シリーズ)、移動相はTable 1、2に示した3種を用い、UHPLC、SFCそれぞれ18種類、合わせて36種の組み合わせについて、自動かつ網羅的に連続測定を行いました。

Omeprazoleのメソッドスクリーニング結果をFig. 5に示します。いくつかのUHPLCまたはSFC条件において、2つのキラル化合物を分離することができました。LabSolutionsの定量ブラウザ機能を用いるとFig. 5に示すような視覚的なクロマトグラムの比較を容易に行えます。

Table 1 UHPLC キラル分析条件

No.	Mobile phase (上段:A、下段:B)	Others
1	Hexane Ethanol	B Conc. (%) : 20% (Isocratic)
		Flow Rate : 2 mL/min
2	Hexane Isopropyl alcohol	Column Temp. : 40 °C
		Inj. Vol. : 1 µL
3	Methyl tertiary butyl ether Ethanol	Detection : PDA@220 nm
		Step GE
		0 - 6 min : 20% : Analysis
		6 - 8 min : 40% : Column washing
		8 - 12 min : 20% : Equilibration

Table 2 SFC キラル分析条件

No.	Modifier	Others
1	Methanol	Modifier Conc. (%) : 20% (Isocratic)
		Flow Rate : 3 mL/min
2	Ethanol	Column Temp. : 40 °C
		Inj. Vol. : 1 µL
3	Acetonitrile / Ethanol = 75 / 25 (v/v)	BPR Press : 10 MPa
		Detection : PDA@220 nm
		Step GE
		0 - 5 min : 20% : Analysis
		5 - 7 min : 40% : Column washing
		7 - 10 min : 20% : Equilibration

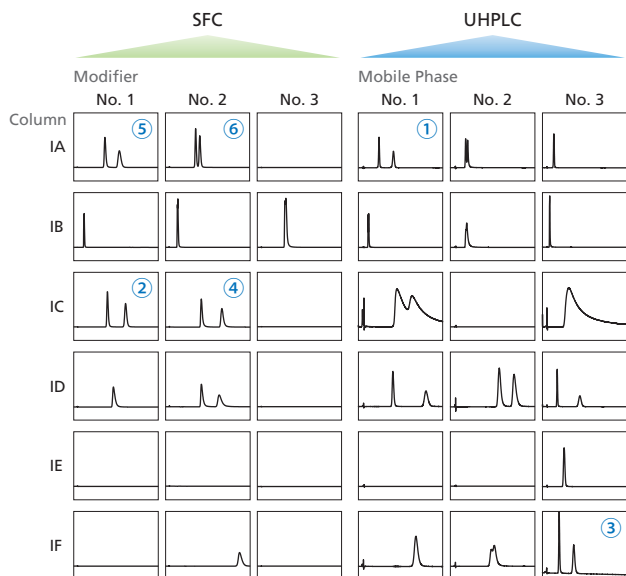


Fig. 5 36種の分析条件を用いたOmeprazoleのクロマトグラム
 (※クロマトグラム右上の番号はTable 3のランキングを記載)

クロマトグラムを用いた視覚的な比較の他に、分離度など数値情報を使って分離評価を行うことが可能です。Table 3に、マルチデータレポートソフトウェアにより分離評価を行った結果を示します。本ソフトウェアでは、基準（この場合、1.5）以上の分離度を示すクロマトグラムを自動判断して分離度の順位付けを行います。マルチデータレポートを使った分離条件の評価により、OmeprazoleについてはTable 3で示したようにUHPLC条件で最も良い分離が得られることが分かりました（最適条件におけるクロマトグラムはFig. 6）。同様にWarfarinについて評価を行ったところ、最も良い結果が得られたのはSFC条件であることを確認しました（Fig. 7）。

分離条件の検討が煩雑なキラル分析においても、UHPLCとSFCの両方を用いてシームレスにメソッドスカウティングを行うことで、より良い分離条件を効率よく得ることができます。

Table 3 マルチデータレポートを使ったOmeprazoleの分離条件の評価

Ranking	①	②	③	④	⑤	⑥
	UHPLC	SFC	UHPLC	SFC	SFC	SFC
	IA	IC	IF	IC	IA	IA
Analytical Condition	Mobile Phase No. 1	Modifier No. 1	Mobile Phase No. 3	Modifier No. 2	Modifier No. 1	Modifier No. 2
Resolution	6.24	5.60	5.55	5.40	3.43	1.59
Selectivity	1.92	1.65	2.22	1.69	1.57	1.17
Symmetry Factor (Peak 1)	1.06	1.39	1.20	1.90	1.46	1.32
Symmetry Factor (Peak 2)	1.05	1.27	1.19	1.64	1.31	1.28
Retention Factor (Peak 1)	3.18	4.71	2.42	5.05	4.30	4.10
Retention Factor (Peak 2)	6.11	7.76	5.38	8.51	6.75	4.80
Area % (Peak 1)	51.04	50.06	50.66	50.06	50.15	49.46
Area % (Peak 2)	48.96	49.94	49.34	49.94	49.85	50.54
Detected Peaks	2	2	2	2	2	2

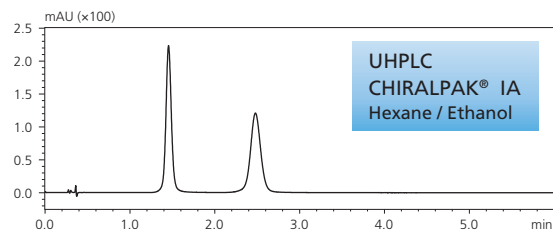


Fig. 6 最適条件によるOmeprazoleのクロマトグラム

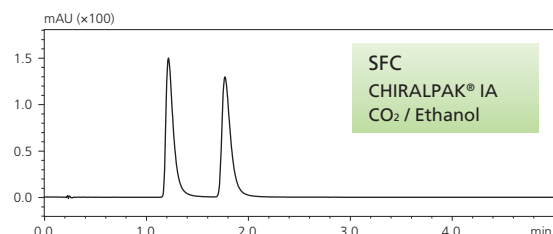


Fig. 7 最適条件によるWarfarinのクロマトグラム

5. UHPLC/SFC切換に対応した専用ソフトウェア

Nexera UC/s UHPLC/SFC切換システムでは、流路を接続しなおす必要なくUHPLC分析とSFC分析を両立できます。一方、連続的にUHPLC分析とSFC分析を行うためには、以下を自動実行できる機能を備えています。

- 1) 前分析モードの移動相を流路から排出する
- 2) 流路を切換えて、次の分析モードの移動相でカラムを液置換、平衡化する

UHPLC/SFC切換に対応した専用ソフトウェアMethod Scouting Solutionは、切換のために必要になる前移動相の排出や移動相の置換を、ソフトウェアが自動生成するバッチテーブルを実行するだけで実施できます。

カラムと移動相の組み合わせごとにメソッドを作成するなど煩雑な操作をすることなく、使用する①移動相、②カラム、③バイアル、④分析時のベースにするメソッド、⑤グラジエントの条件（初期濃度、終了濃度、勾配）を指定すると、メソッドスカウティングに使用するバッチテーブルの自動生成が可能のため、初めてのほうでもスムーズにUHPLC/SFC分析の自動切換が行えます。

また、使用するカラムや移動相はデータベース管理できるため、管理効率が向上すると共に複数のオペレータが使用する場合も操作ミスを低減することができます。

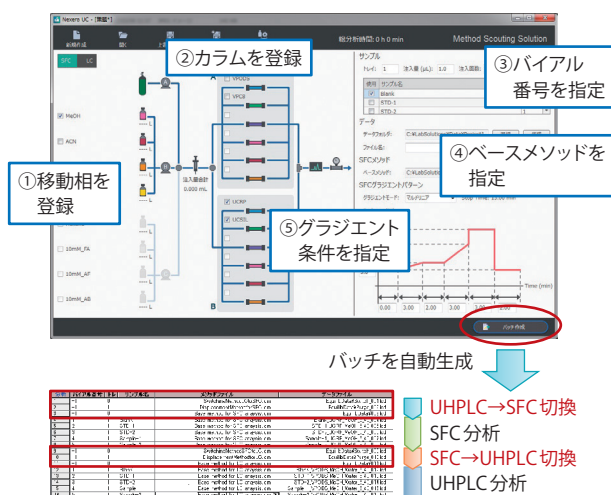


Fig. 8 Method Scouting Solution

6. UHPLC/SFC切換の原理

6-1. 動作原理

Nexera UC/s UHPLC/SFC切換システムを用いたUHPLC分析からSFC分析への切換動作をFig. 9に示します。UHPLCとSFCは約10分で切換えることができます。5章で説明した前分析に使用した移動相の排出と、次分析の移動相によるカラムの液置換、平衡時の動作について説明します。

(1) UHPLCからSFCへ切換

UHPLC分析からの切換時の動作フローは以下です。

- ①UHPLC分析完了後、移動相の送液を停止
- ②流路液置換メソッドを用い、流路に有機溶媒のみを送液してUHPLC分析時の移動相を排出。超臨界流体二酸化炭素と混和しない水や緩衝液、析出する塩などUHPLC移動相を十分に排出するために、メタノールのようなUHPLCとSFCの両方において相溶性のある有機溶媒を用いて排出。
- ③超臨界流体二酸化炭素の供給と背圧制御を開始し、同時に流路切替バルブを切替えて、SFC分析で使用するカラムに移動相を送液しカラムの液置換、平衡化を行う。合わせてサンプルループを洗浄するためにメタノールを注入する。

(2) SFCからUHPLCへ切換

SFCからUHPLCへの流路切替も、同様に行うことができます。SFC分析からの切換時は分析流路内に残っている超臨界流体二酸化炭素を排出するために、流路液置換メソッドを用い流路に有機溶媒のみを送液します。メタノールのようなUHPLCにおいても相溶性のある有機溶媒を用います。流路液置換終了後、流路切替バルブで流路を切替えて、UHPLC分析で使用するカラムに移動相を送液してカラムの液置換と平衡化を行います。

UHPLC分析用メソッドとSFC用メソッドは、送液ユニットと背圧制御弁の設定が異なります。送液ユニットについては、3つの送液ユニットのうち、UHPLCとSFC分析においてそれぞれで使用しないポンプの濃度設定を“0%”に設定します。背圧制御と超臨界流体二酸化炭素供給については、UHPLCでは実施しない、SFCでは実施するよう設定します。

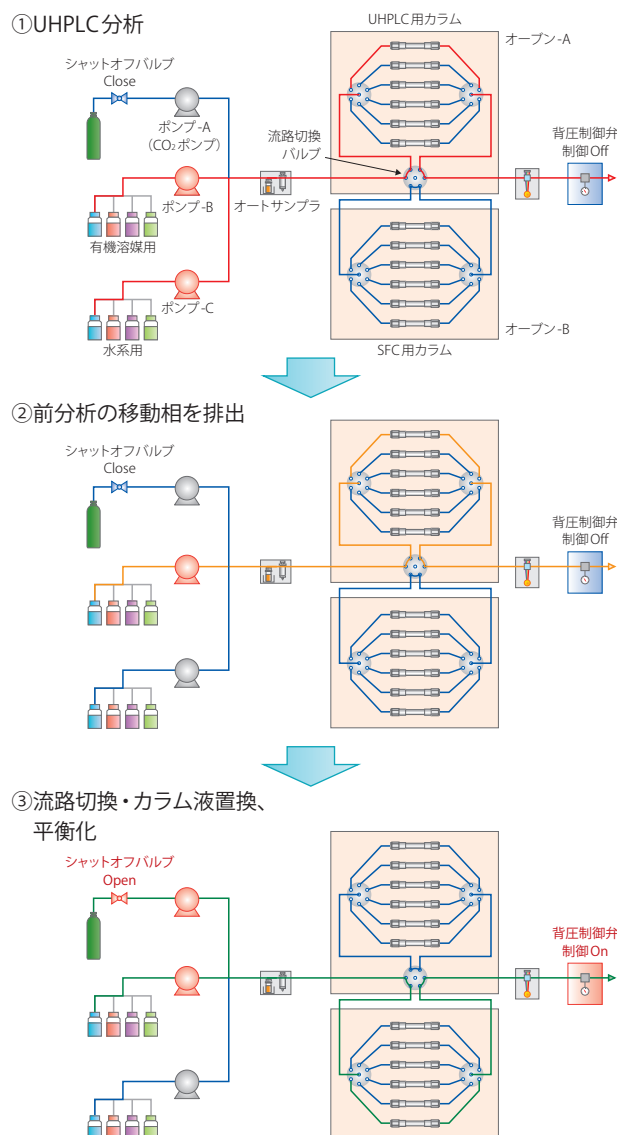


Fig. 9 UHPLC分析からSFC分析への切換動作

6-2. 連続切換における再現性

本切換システムを用いて、医薬品3成分のUHPLC分析とSFC分析を3回切換えて連続分析した際のクロマトグラムをFig. 10に示します。移動相、分離特性ともに大きく異なる場合も、流路切替の影響を受けず、安定した分析結果が得られます。

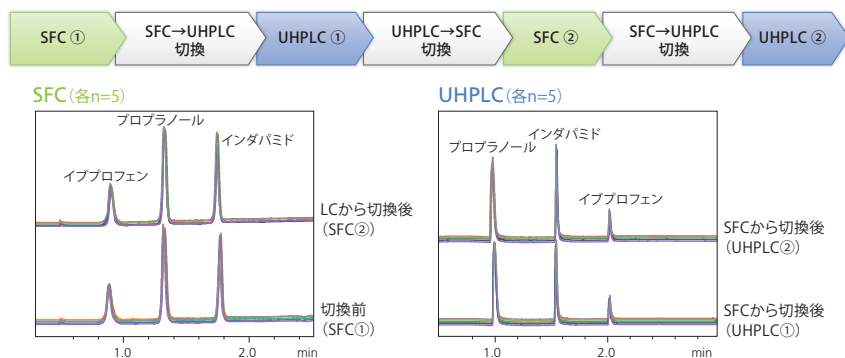


Fig. 10 医薬品3成分のUHPLCとSFC切換分析時のクロマトグラム

* CHIRALPAK®は株式会社ダイセルの登録商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2017年3月
© Shimadzu Corporation, 2017