

Technical Report

スタックインジェクションを活用した分取超臨界流体クロマトグラフィーによる異性体の分取業務効率化

Improved productivity of preparative supercritical fluid chromatography with stacked injection for the isomer

田中 健一朗¹、松本 恵子¹、舟田 康裕¹

Abstract:

新規合成化合物からシードやリード化合物を選び出すスクリーニング、医薬品の不純物や天然物中の機能性成分の構造解析などを目的に、様々な分野で分取業務が行われています。分取超臨界流体クロマトグラフィー（分取SFC）は分析時間の短縮や簡便な後処理を実現できることから、製薬業界をはじめとして幅広く使用されています。キラル化合物等の異性体の分離など、ピークの本数が限られている分析においてはスタックインジェクションにより、分取精製の効率を向上させることが可能となります。本レポートでは分取超臨界流体クロマトグラフィシステムNexera UC Prepにおいて、スタックインジェクション機能を活用して分取業務の効率化を図った事例をご紹介します。

Keywords: 分取SFC、スタックインジェクション

1. SFCによる分析時間の短縮

SFCは超臨界CO₂が低粘性と高い拡散性を有するため、高流量であっ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。HPLCに比べて分析時間の大幅な短縮が期待できます。

Fig. 1にオメプラゾールのキラル分離における、分取LCと分取SFCの分析時間を比較した例を示します。分取SFCでは分取LCに比べて分析時間が4分の1に短縮されていることがわかります。

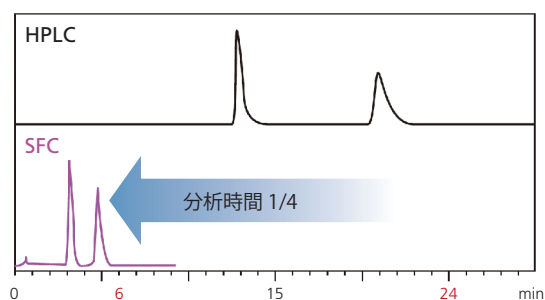


Fig. 1 HPLCとSFCによるオメプラゾールのキラル分離（分取）

Table 1 分析条件

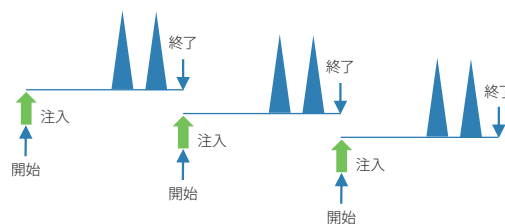
Column	: CHIRALPAK IC (250 mm L. × 20 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: Hexane/Ethanol=70/30 (LC) CO ₂ /Methanol=75/25 (SFC)
Flow rate	: 20 mL/min (LC) 120 mL/min (SFC)
Column temperature	: Room temperature (LC) 40 °C (SFC)
Injection volume	: 500 μL
Detection	: 303 nm
Cell	: High pressure cell for SFC (preparative)
BPR Pressure	: 15 MPa (SFC)

2. スタックインジェクション

スタックインジェクションは連続的に注入を行うことで、ピークが溶出するまでの待ち時間を活用して、効率的に分取を行うための手法です。この機能はオートサンプラSIL-40や注入回収ユニットFRS-40に搭載されています。Fig. 2にスタックインジェクションの概要を示します。スタックインジェクションを設定する際には以下のポイントに注意が必要となります。

- 分離モードはアイソクラティックのみ。
- ピーク同士が重ならないように注入間隔を設定する。

通常の注入方式→分取ピーク数：6本



スタックインジェクション→分取ピーク数：12本

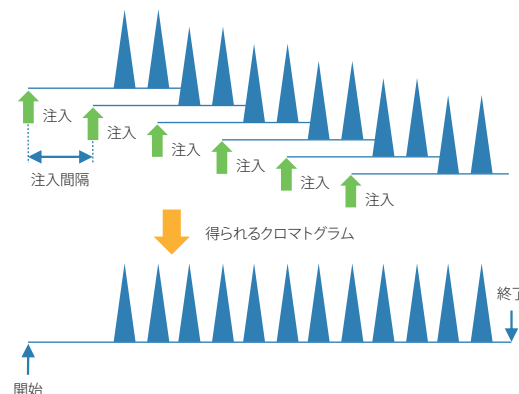


Fig. 2 スタックインジェクションの概要

3. スタックインジェクションの設定

スタックインジェクションは、ワークステーションLabSolutionsで簡単に設定できます。注入間隔、注入回数、待ち時間を設定し (Fig. 3)、シングル分析の結果 (クロマトグラム) を使って、注入間隔に応じたシミュレーションを行うことで、ピーク重複有無を簡単に確認できます (Fig. 4)。連続して注入するためにサンプルループからサンプルが抜けてから、サンプルループをロード状態 (Fig. 5、右図) に戻す必要があるため、適切な待機時間を設けます (Fig. 5)。

スタック注入(S)

注入間隔(I): min

注入回数(N):

次の前処理までの待機時間(W): sec

Fig. 3 スタックインジェクションの設定 (Fig. 4のケース)

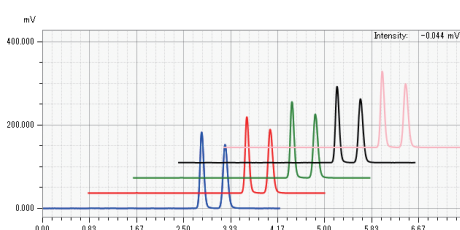


Fig. 4 スタックインジェクションのシミュレーション (LabSolutions)

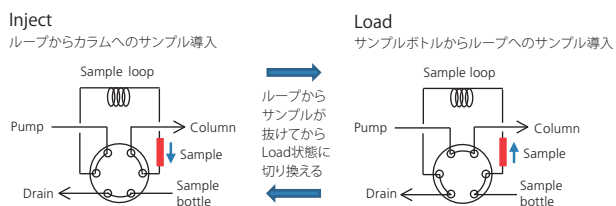


Fig. 5 サンプルバルブの動作 (FRS-40)

データ採取時にはシングル分析時の分析時間に、注入間隔と注入回数を積算した時間を合計した値より大きな数値を入力します。例えば注入間隔0.8分、注入回数9回の場合はシングル分析の時間+7.2分以上を設定します (Fig. 6)。

データ採取(PDA)

サンプリング(G): Hz

80 msec

開始時間(S): min

終了時間(T): min

Fig. 6 データ採取時間 (SPD-M40)

スタックインジェクションでは同じ化合物のピークは1本の回収ボトルにまとめて分取します。1注入サイクル毎にフラクションバルブをイニシャルポジションに戻すことで、同じピークを同じ回収ボトルに分取することができます。タイムプログラムによる分画を行う場合は、シングル分析でのタイムプログラムを入力するだけで、2回目以降は注入間隔に応じて自動的に分画時間が設定されます (Fig. 7, 8)。

スタック注入設定(D)

リセット時間(R): min

Fig. 7 スタックインジェクションリセット時間

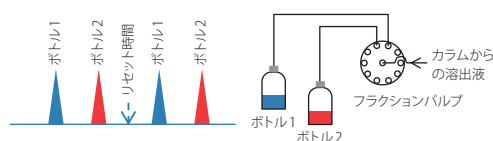


Fig. 8 分取区間とリセット時間の関係

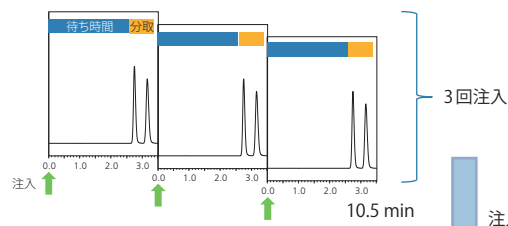
4. 医薬品キラル分離におけるスタックインジェクションの活用

ここでは実際に医薬品のキラル分離においてスタックインジェクションを活用した例を紹介します。サンプルには10 mg/mLのワルファリン (メタノール溶液) を用いました。分析条件をTable 2に、得られたクロマトグラムをFig. 9に示します。スタックインジェクションを活用することにより、10.5分の分析時間内に通常インジェクションでは3回であった注入を9回まで増やすことができ、分取効率が3倍向上することが示されました。

Table 2 分析条件

Column	: CHIRALPAK IC (250 mm L. × 20 mm I.D., 5 μm)
Modifier	: Methanol
Modifier concentration	: 30 %
Flow rate	: 60 mL/min
Column temperature	: 40 °C
Injection volume	: 200 μL (Loop size: 400 μL)
Detection	: 200 nm
Cell	: High pressure cell for SFC (preparative)
BPR Pressure	: 10 MPa
Injection interval	: 0.80 min
Number of injection	: 9
Wait time	: 5 sec

通常のインジェクション



スタックインジェクション (9回繰り返し)

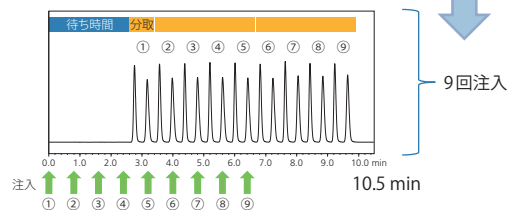


Fig. 9 ワルファリンの分離例