

Technical Report

固体オートサンプラーを用いた分取SFCの効率化 ～オンラインSFE-SFCシステムの応用～

An improvement in preparative SFC efficiency utilizing online SFE-SFC system as a "solid autosampler."

吉岡 拓哉¹、高良 智尋¹、松本 恵子¹、舟田 康裕¹

Abstract:

分取SFCは分取LCと比較して後処理が簡便、分析時間の短縮が可能、異なる分離選択性を有する点など様々なメリットを有する画期的な分離精製技術です。分取SFCでは回収量を上げるため多量の試料を導入することがしばしば求められますが、単純に注入体積を増やすと試料溶媒の影響を受けピーク形状が悪化し、分離不良となる懸念があります。これを避けるため、試料溶媒の影響を受けずに試料を大量注入できる方法が求められています。ここでは、オンラインSFE-SFCシステムを用いた、固体試料を溶解することなく固体のまま試料を導入する手法「固体オートサンプラー」をご紹介します。オンラインSFE-SFCはSFEユニット内で弱溶媒である超臨界CO₂にて試料中の目的化合物を抽出し、その抽出物をオンラインでSFCに導入します。弱溶媒に溶解した目的化合物は、ピーク形状を維持したまま大量注入が可能となり、目的化合物の回収に要する時間の短縮や溶媒消費量の削減が期待できます。

Keywords: オンラインSFE-SFCシステム、固体オートサンプラー

1. 分取クロマトグラフィーの課題

有用な化合物の探索や、医薬品中の不純物の解析、化学合成など様々な分野で化合物の単離・精製技術が求められており、分取液体クロマトグラフ (LC) や分取超臨界流体クロマトグラフ (SFC) が主に使用されています。特に分取SFCはCO₂が気化し回収画分の容積が小さくなる上、逆相クロマトグラフィーによる分取精製に比べ回収画分に含まれる水の割合が少ないため、後処理の濃縮乾固が簡便になる、LCと比較して分離に要する時間が短い、LCと異なる分離選択性が得られる点など、多くのメリットを有しており、近年使用される場面が増えてきています。分取LC/SFCでは、精製したい試料量があらかじめ決まっている場合が多いですが、1度の注入で全量を注入できない場合は、注入と分画を繰り返す必要が生じ、分取精製の効率悪化を招きます。分取SFCにおいて、カラムへの注入量が制限されるケースを下記に示します。

1) 試料溶媒によるピーク滑り

1回の分取精製プロセスにおける対象化合物の回収量を増やす最も単純な方法は注入体積を増やすことですが、その際ピーク形状悪化による分離不良が懸念されます。これは、注入体積が大きいと試料溶液が移動相で十分に希釈されず、溶出力の強い試料溶媒が対象化合物のカラム先端濃縮を妨げ、化合物がカラム内で「ピーク滑り」を起こし、ピーク形状が悪化するためです。この現象は試料溶媒が移動相より強溶媒であるほど顕著になります (Fig. 1)。逆相クロマトグラフィーを用いる分取LCでは、試料を弱溶媒である水に溶解する、試料溶液を水と共注入するなどの方法でこのピーク滑りを軽減できますが、分取SFCにおいて

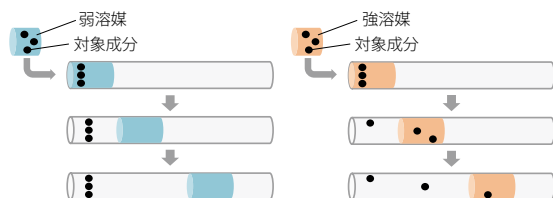


Fig. 1 ピーク滑りが起こるメカニズム

はあらゆる溶媒が超臨界CO₂よりも強溶媒になるため、同様の回避策を取ることができず、注入体積を上げられない場合がしばしばあります。

2) 試料の溶解性

試料溶液の濃度を上げることで1回の注入によるカラムへの導入量を増やせますが、試料の溶解度には限界があります。特に植物や微生物の抽出物などから物性不明の未知成分を精製するような場合、溶解度の低い成分も含めて漏れなく溶解する必要があるため、結果的に低濃度の溶液になりがちです。

3) 試料の析出

試料溶媒と移動相との溶解度の差が大きい場合、両者が混ざった際に流路内で試料溶媒に溶けていた化合物が析出してしまふことがあります。その場合、装置のメンテナンスにコストがかかるだけでなく、貴重な試料を失ってしまう事にもなるため、注入量を少なく設定する必要があります。

本稿では、1)～3)の課題を解決する、オンラインSFE-SFCを用いた手法をご紹介します。前処理後の試料溶液を注入する従来法に比べ、分取SFCによる精製業務を効率化します。

2. オンラインSFE-SFCシステムの固体オートサンプラーとしての利用

オンラインSFE-SFCシステムはSFEユニットにて試料中の目的成分を抽出して直接カラムに導入し、SFCにて分離を行うシステムです。すなわちSFEユニットは、固体を装置にセットするだけで目的成分を自動でSFCに導入する、「固体オートサンプラー」であるとも言えます。

前述の通り、SFCにとって弱溶媒である超臨界流体CO₂で抽出・溶解させた抽出物をSFCに導入すれば、ピーク形状を維持したまま大量注入が期待できます。また、注入溶媒と移動相が同じであることから、流路内での析出のリスクも軽減できます。

オンラインSFE-SFC（固体オートサンプラー）の動作は以下の通りです（Fig. 2）。

1. スタティック抽出

超臨界CO₂を抽出容器に導入します。容器内が満たされた後は容器内に通液せず静置状態で抽出します。

2. ダイナミック抽出

スタティック抽出の後に抽出容器に超臨界CO₂を通液しながら抽出しつつ、抽出液は抽出容器からカラムへと導入されます。

3. 分離・分画

抽出容器は流路から切り離され、カラムへのモディファイアを含む移動相送液が開始されます。目的化合物はカラム内で濃縮・分離され、モディファイアやメイクアップ溶液と共にフラクションコレクターに回収されます。（Nexera™ UC Prepの気液分離機構についてはテクニカルレポート「分取超臨界流体クロマトグラフィー用気液分離機構 LotusStream™の性能評価」を参照）

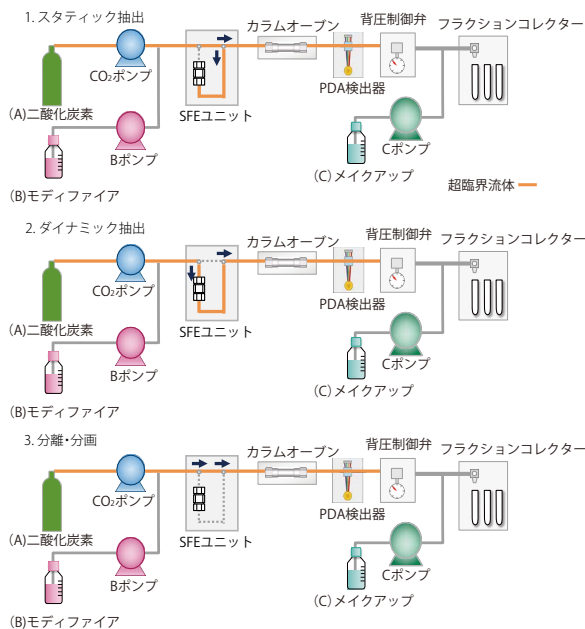


Fig. 2 オンラインSFE-SFCの動作

オンラインSFE-SFCによるピーク形状改善可否を評価するため、Table 1の条件でケトプロフェンを分析し、液体（メタノール）注入（2 mL）とのピーク形状を比較しました。抽出容器にケトプロフェン粉末を入れて実施するオンラインSFE-SFCの方が、シャープなピーク形状が得られていることがわかります（Fig. 3）。分取精製の場合、オンラインSFE-SFCを用いることで、隣接ピークのコンタミネーションを抑制しつつ目的成分を分画することが可能です。

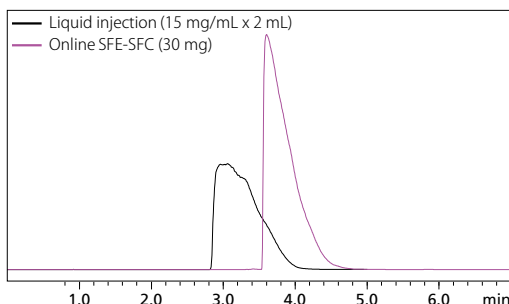


Fig. 3 液体注入とオンラインSFE-SFCの比較

Table 1 分析条件

<SFE条件>	
Extraction vessel	: 5 mL
Mobile phase	: CO ₂ / Methanol = 95:5
Flow rate	: 60 mL/min
Extraction time	: 2 min (Static 1 min, dynamic 1 min)
BPR pressure	: 15 MPa
Extraction temp.	: Ambient
<SFC条件>	
Column	: Shim-pack™ UC-Py (250 mm x 20 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: CO ₂ / Methanol = 80:20
Flow rate	: 60 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Heat exchanger	: 40 °C
BPR pressure	: 15 MPa
Detection	: PDA (227 nm)
Flow cell	: High pressure preparative flow cell

3. 抽出時間による試料負荷量の調整

カラム負荷量は、試料溶液では試料濃度や注入体積で調整するのに対し、固体試料の抽出・注入ではダイナミック抽出の時間で調整します。Fig. 4に、ダイナミック抽出の時間とイブプロフェン 500 mgのピーク面積の関係を示します。ダイナミック抽出が長くなるほど負荷量が増加し、1.5 min程度で全量が負荷されたため面積が頭打ちになっていることがわかります。ダイナミック抽出の時間を長くすることで多量の試料を負荷することが可能です。なお、分析条件はTable 2の通りです。

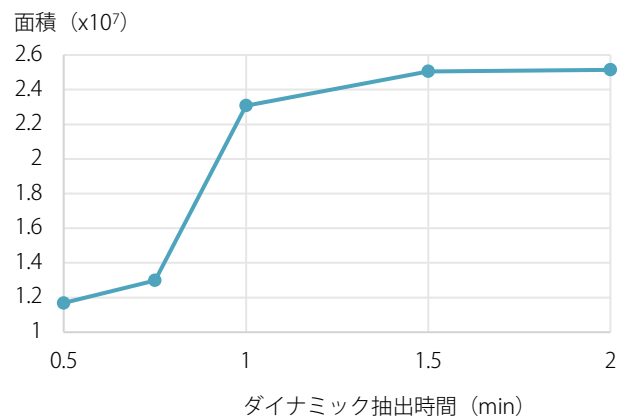


Fig. 4 ダイナミック抽出時間によるピーク面積の変化

Table 2 分析条件

<SFE条件>	
Extraction vessel	: 5 mL
Mobile phase	: CO ₂ / Methanol = 95:5
Flow rate	: 60 mL/min
Extraction time	: Static 1 min, dynamic 0.5, 0.75, 1, and 1.5 min
BPR pressure	: 15 MPa
Extraction temp.	: Ambient
<SFC条件>	
Column	: Shim-pack UC-Py (250 mm x 20 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: CO ₂ / Methanol = 80:20
Flow rate	: 60 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Heat exchanger	: 40 °C
BPR pressure	: 15 MPa
Detection	: PDA (227 nm)
Flow cell	: High pressure preparative flow cell

4. 繰り返し分取時のスループットの向上

オンラインSFE-SFCにより、分取精製のスループットの向上も期待できます。

1) カラム注入と画分回収の回数低減

液体注入による分取SFCでは溶解度や注入量、ピーク滑りなどの兼ね合いから試料導入量が制限されてしまいます。超臨界CO₂への溶解性が高い化合物の場合、オンラインSFE-SFCによりカラムへの負荷量を増やすことで、注入と回収の回数を低減し効率良く分取精製業務を行うことが可能です。

2) 前処理時間の短縮

前処理による試料溶液の調製には、適切な溶媒の選択や溶解性の評価などが必要で、時間と労力を要します。オンラインSFE-SFCは前処理不要で固体試料をセットするだけで分析分取を開始でき、前処理の時間を削減します。

オンラインSFE-SFCによる分取スキームの効率化を評価するため、イブプロフェンとケトプロフェンの混合品500 mgをモデル試料としてTable 2の条件にて各成分を単離し、液体注入とオンラインSFE-SFCで要した時間を比較しました。液体注入の場合、飽和濃度付近の5%(w/v)試料溶液(メタノール溶液)を作成するのに10分、2 mL注入で5分のみ分取精製工程を5サイクル回し(Fig. 6)、合計35分を要しました。一方、オンラインSFE-SFCでは、あらかじめ抽出時の溶媒でカラム内を満たしておく必要があるため、カラムの平衡化に時間がかかるものの、3サイクルの分析でほぼ全ての試料を処理することができ(Fig. 5, Fig. 6)、合計21分を要しました。オンラインSFE-SFCを使用することで、カラムへの試料導入量を増やすことができ、今回の例では液体注入と比較して所要時間を40%削減できました(Fig. 7)。

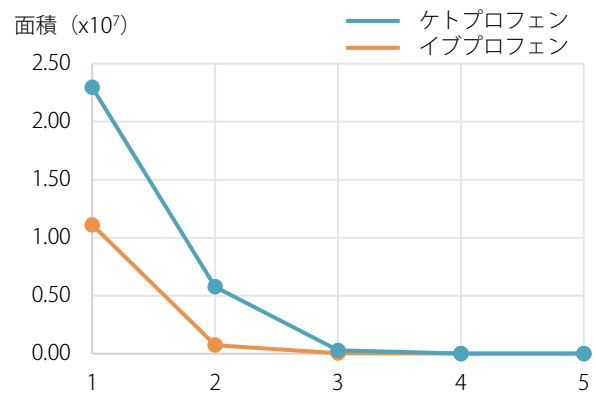


Fig. 5 ピーク面積の推移

Table 3 分析条件

<SFE 条件>

Extraction vessel : 5 mL
 Mobile phase : CO₂ / Methanol = 95:5
 Flow rate : 60 mL/min
 Extraction time : 2 min (Static 1 min, dynamic 1 min)
 BPR pressure : 15 MPa
 Extraction temp. : Ambient

<SFC 条件>

Column : Shim-pack UC-Py (250 mm x 20 mm I.D., 5 μm)
 Mobile phase : CO₂ / Methanol = 80:20
 Flow rate : 60 mL/min
 Column temp. : 40 °C
 Heat exchanger : 40 °C
 BPR pressure : 15 MPa
 Detection : PDA (227 nm)
 Flow cell : High pressure preparative flow cell

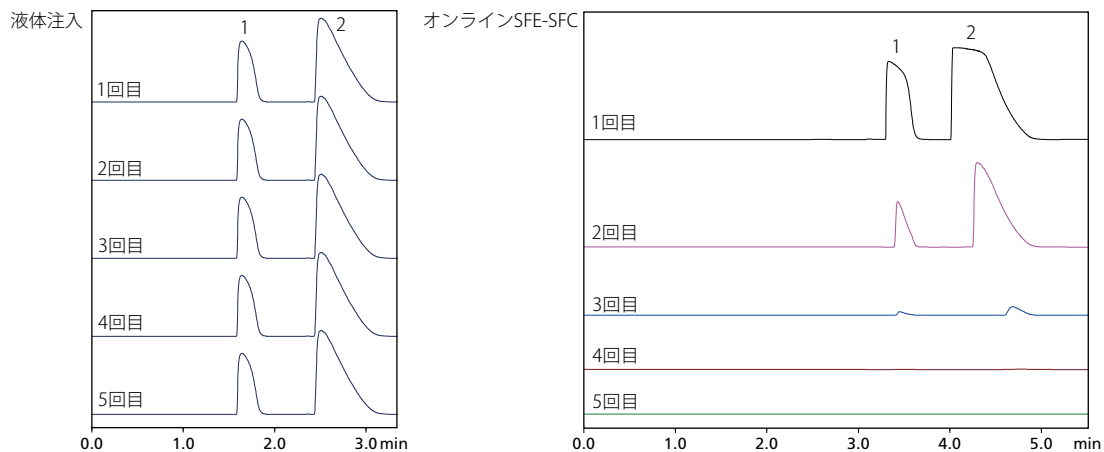


Fig. 6 液体注入(左)とオンラインSFE-SFC(右)のクロマトグラム(1: イブプロフェン、2: ケトプロフェン)

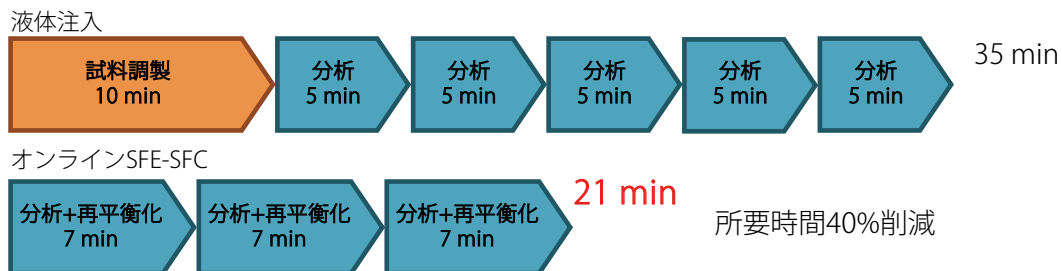


Fig. 7 試料の前処理と分画に要する時間の比較

5. オンラインSFE-SFC使用時の注意点

オンラインSFE-SFCでピーク形状を良好に維持するためには、Table 4に挙げた推奨条件を参考に、最適な抽出条件を選択する必要があります。

(1) 極力小さな容量の容器を使用する

小さな容量の抽出容器を使用するとダイナミック抽出の時間を短くできるため、ピーク滑りの軽減が期待できます。抽出容器の容量がピーク形状に与える影響を評価するため、容量の異なる抽出容器にてケトプロフェン30 mgを分析しました。その結果、小さい0.2 mL抽出容器の方がピーク形状が良い結果が得られました (Fig. 8)。0.2 mL容器には30 mg程度の試料が入るため、それ以下の試料量であれば0.2 mL容器を推奨します。それ以上であれば5 mL容器になりますが、中にスペーサーを入れることで、1 mL容器として使用することも可能です (Fig. 9)。

(2) ダイナミック抽出中のピーク滑りに注意する

ダイナミック抽出中は移動相と抽出された目的成分がカラム内を流れるため、特にモディファイア比率が高い、ダイナミック抽出時間が長い、カラム内径が細い条件ではピーク滑りを引き起こす恐れがあります。したがって、適切なモディファイア比率、ダイナミック抽出時間、カラム内径の組み合わせの選択が必要になります。

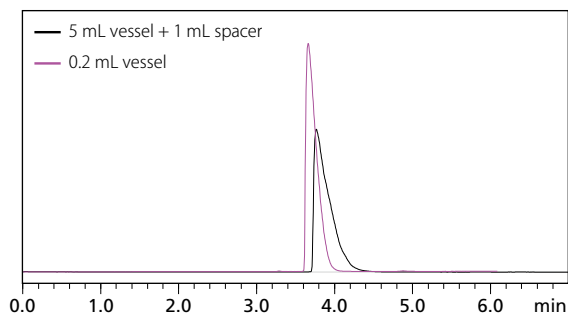


Fig. 8 抽出容器の比較



Fig. 9 1 mLスペーサーの使い方

6. まとめ

本稿では、オンラインSFE-SFC (固体オートサンプラー) による分取スキームの効率化の事例を紹介しました。オンラインSFE-SFCを使用することで、①ピーク形状が改善し、分離の向上や、より濃縮された状態での分画が可能になる、②大量の試料をSFCに供することが可能となり、分析回数の削減が期待できる、③試料溶媒の検討や試料を溶媒に溶解する操作が不要になる、④試料溶媒と移動相との溶解度差による析出のリスクが低減できる、といった様々なメリットがあります。

また、この手法は分取スキームにかかる時間の削減だけでなく、分析回数の削減による溶媒消費量の削減も期待できます。特に、分取スケールにおいては1回の分析に必要な溶媒量が非常に多いため、その効果は顕著になります。

このオンラインSFE-SFCは効率面、環境面において非常に優れた手法であることから、有用な化合物の探索や、医薬品中の不純物の解析、化学合成など様々な分野での応用が期待できます。

Table 4 推奨の条件

システム	カラム内径	流速	モディファイア濃度	抽出時間 (スタティック抽出/ダイナミック抽出)	容器	試料
SFE-30A (分析スケール)	4.6 mm	3 mL/min	5 %	0.5 min/0.2 min	0.2 mL	< 30 mg
		5 mL/min		0.5 min/0.2 min	0.2 mL	< 30 mg
	10 mm	5 mL/min		2 min/2 min	5 mL*	> 30 mg
SFE-40P (分取スケール)	20 mm	15 mL/min		2 min/2 min	5 mL*	> 30 mg
		60 mL/min		1 min/1 min	5 mL*	> 30 mg

* 容積に余裕がある場合、1 mL スペーサー (S228-69904-41) を入れることを推奨します。

Nexera、LotusStream および Shim-pack は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://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著者に帰属しており、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：2023年7月
© Shimadzu Corporation, 2023