



Agilent Infinity II SFC/HPLC ハイブリッドシステムと ChromSword Auto を用いた SFC 分析メソッドの開発



〈要旨〉

SFC の分析メソッド開発には、多くの経験とスキルが必要です。また頑健性のあるメソッド開発には多くの時間を費やす必要があります。ここでは合成着色料の分析を SFC で行い、得られた結果を AI を搭載した HPLC メソッド開発支援ソフトウェア：ChromSword Auto でシミュレーションしました。その結果、簡単に、且つ短時間で SFC の分析メソッドを作成する事に成功した分析例をご紹介します。

Key Words: SFC、合成着色料、SFC/HPLC ハイブリッドシステム

1. はじめに

超臨界流体クロマトグラフィ（SFC, Supercritical Fluid Chromatography）を用いた分析法の開発は、通常の HPLC 分析法の場合と比べ、より多くのスキルを必要とする場合があります。HPLC 分析で得た経験や知識の多くが SFC 分析では使えないこともあります。これは水を使用しない移動相条件では、逆相 HPLC と SFC の挙動が劇的に違ってくることなどに起因しています。SFC メソッド開発のためには、「SFC の分析経験だけが役に立つ」と言っても過言ではありません。

そこで本報では、AI (Artificial Intelligence; 人工知能) を搭載したソフトウェア (ChromSword Auto) を用いて、効率的に SFC メソッド開発を行った例をご紹介します。サンプルは、指定外添加物の一種で合成着色剤であるズダン I-IV およびパラレッドを用いました。(図 1)

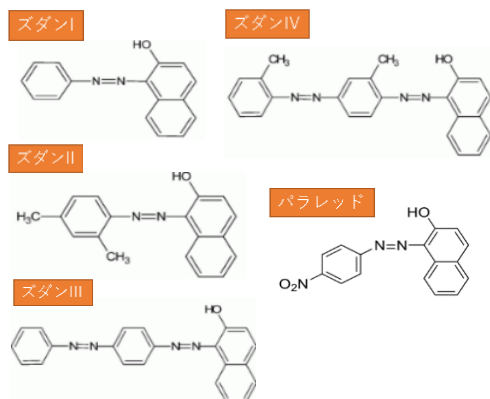


図 1. 実験で使用した合成着色料の化学構造式

2. 実験条件

装置は Agilent Technologies 製 Agilent Infinity II SFC/HPLC ハイブリッドシステムを用いました。このシステムは、同一シーケンス内で SFC と HPLC の測定を切り替えて行うことができるため、メソッドの最適化を簡便に行う事ができます。また、HPLC と SFC では同じカラムを用いた場合でも、異なる相互作用を利用して目的物を分離するため、偽陽性ピーク等が検出された場合の検証にも使用できます。

ズダン色素類およびパラレッドの分析は、逆相カラムである Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6*150mm, 5 µm)を用いて行いました。各々の分析条件は表 1 に示しました。標準品試薬はアセトニトリルおよび酢酸エチルに溶解し、1000 µg/ml 濃度に調製し保存液としました。測定時に保存液を 10 µg/ml の濃度にアセトニトリルで希釈しました。

表 1. SFC および HPLC の分析条件

SFC/HPLC 共通条件	
カラム	: Agilent ZORBAX SB C-18 (4.6*150 mm, 5 µm) [883975-902]
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 5 µL
波長	: 480 nm (20Hz)
HPLC システム	
移動相	: A ; 水 : B ; メタノール、ACN、or IPA
組成比	: 100, 95, 90, 85, or 80 % B (イソクラティック)
流速	: 1.0 mL / min



Agilent Technologies

SFC システム

移動相	: A ; 二酸化炭素
	: B ; メタノール、ACN、or IPA
組成比	: 2, 5, 10, 20, or 40 % B (イソクラティック)
BPR	: 140 bar / 60 °C
流速	: 5.0 mL / min
ソフトウェア	: Agilent OpenLAB CDS ChemiStation Edition (C.01.07) および ChromSword Auto 4.0 simulation mode

3. 結果および考察

SFC 分析

最初にモディファイアとして最適な有機溶媒を決定するため、イソクラティック条件で合成着色料を分析しました。図 2 にその結果を示しています。

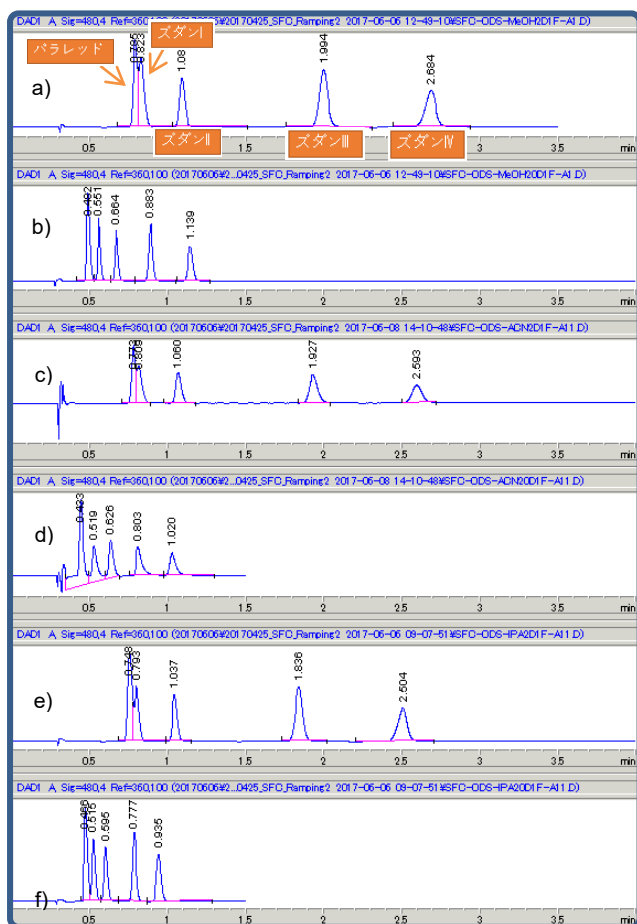


図 2 : 合成着色料を分析した SFC クロマトグラム。モディファイア条件は a) 2 % MeOH、b) 20 % MeOH、c) 2 % ACN、d) 20 % ACN、e) 2 % IPA、および f) 20 % IPA。

すべての有機溶媒において、その濃度が増えるに従い、すなわち無極性の二酸化炭素含量が減るに従い合成着色料が早く溶出する事が分かりました。このため SFC 分析では順相条件でサンプルを分離していると

考えられます。ピーク形状や分離のパターンより今回試した 3 つのモディファイアのうち、メタノールが最も分離に適していると思われます。

HPLC 分析

図 3 には合成着色料を HPLC で分析したクロマトグラムを示しています。HPLC 分析では、有機溶媒の比率が高くなるほど、すなわち高極性の水の比率が小さくなるほど合成着色料が早く溶出する事が分かりました。このため HPLC 分析では逆相条件でサンプルを分離していると考えられます。

図 2 および 3 に示した様に、SFC と HPLC 分離では同じカラムを用いてもその分離挙動が全く異なる事が示されました。しかしながら、SFC においても HPLC においても合成着色料の溶出する順番は同じでした。この事からも、SFC のメソッド開発には HPLC 分析とは異なる知識が必要になることが分かります。

そこで次に、ChromSword Auto を用い分析メソッドの最適化を行いました。

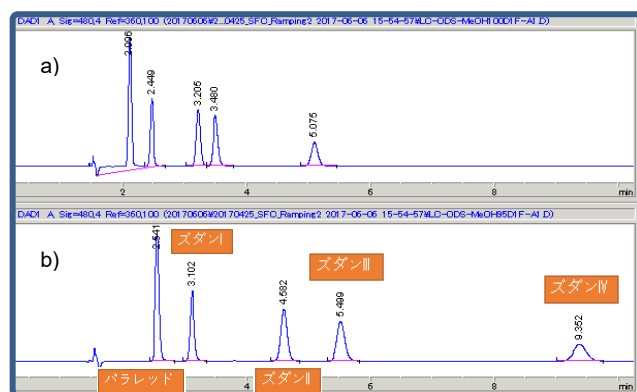


図 3 : 合成着色料を分析した HPLC クロマトグラム。移動相条件は 1) 100 % MeOH、および 2) 95 % MeOH。

ChromSword Auto によるメソッド最適化

これまで得られたデータを用いて、メソッド最適化を行いました。最適化に際し、一番早く溶出するパラレッドと二番目に溶出するズダン I の分離度 (R_s) が 1.5 以上となるよう条件を指定しました。これまでの測定がすべてイソクラティックだったため、シミュレーションはグラジエント条件を算出するよう設定しました。



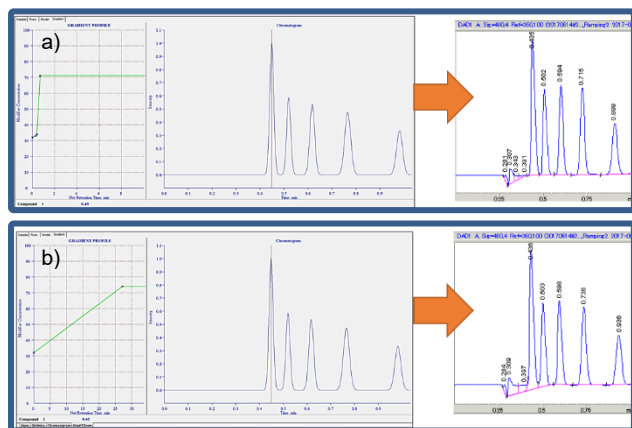


図 4：シミュレーション結果と実測したクロマトグラムの比較。モディファイアはメタノール。グラジエント条件はそれぞれ a) 0 min (32 %), 0.4 min (32 %), 0.7 min (71 %), 1.5 min (71 %)、b) 0 min (32 %), 5 min (40 %)。

図 4 にはシミュレーションで得られたクロマトグラムと実測で得られたクロマトグラムの比較を示しました。パラレッドとズダン I の分離度 (R_s) を実測したクロマトグラムから計算すると、それぞれ 1.73 と 1.65 でした。またシミュレーションで得られたクロマトグラムのパターンは、実測した場合と非常に類似していることが分かりました。どちらのグラジエント条件でも分析時間は 1 分以内でした。

IPA をモディファイアとして用いた場合は、パラレッドとズダン I の R_s は 1.2 程度が限界であり、1.5 を超える条件は見つかりませんでした。このような不十分な分離においても ChromSword Auto の結果は実測値と非常によく一致するが示されました (図 5)。このグラジエント条件において実測値より算出したパラレッドとズダン I の R_s は 1.15 でした。

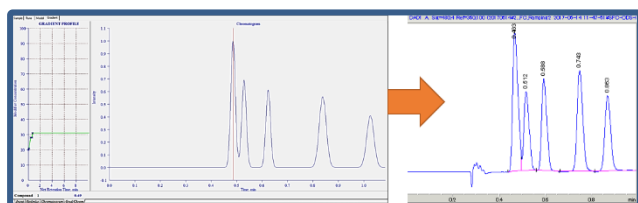


図 5：シミュレーション結果と実測したクロマトグラムの比較。モディファイアは IPA。グラジエント条件は 0 min (20 %), 0.7 min (31 %), 2.0 min (31 %)。

4. まとめ

SFC の分析メソッド開発には、多くのスキル・経験が必要であり、また多くの時間を費やす場合があります。このアプリケーションノートでは指定外添加物の一種である合成着色料の分析を SFC で行いました。得られた結果を HPLC メソッド開発支援ソフトでシミュレーションすることで、簡単に、且つ短時間で SFC の分析メソッドを作成する事に成功しました。Agilent Infinity II SFC/HPLC ハイブリッドシステムと ChromSword Auto ソフトウェアを用いることで、SFC のメソッド開発を加速する事が可能になります。

ChromSword Auto はドイツ ChromSword 社が開発した HPLC メソッド開発支援ソフトウェアです。ご購入の際は弊社販売代理店にご相談ください。

【LC-201708YD-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies