

分取 LC の原理と実践

入門書



分取 LC の原理と実践

入門書

目次

| | |
|--|-----------|
| 1 序文 | 4 |
| 2 はじめに | 5 |
| 3 著者について | 6 |
| 4 記号と略語 | 8 |
| 5 分取 LC の概要 | 10 |
| 5.1 分析 LC と分取 LC の相違点 | 10 |
| 5.2 化合物の精製における優先事項の設定 | 11 |
| 6 分取カラムの選択 | 13 |
| 6.1 分離カラムの選択 | 13 |
| 6.2 大規模スケールの分取カラムの選択 | 15 |
| 7 分取スケール LC システムのコンポーネント | 18 |
| 7.1 送液 | 19 |
| 7.2 サンプル注入 | 21 |
| 7.3 フロースプリット | 36 |
| 7.4 検出 | 38 |
| 7.5 フラクションコレクション | 41 |
| 7.6 リカバリコレクション | 55 |
| 7.7 システムに関する考慮事項 | 56 |
| 8 スケールアップの戦略⁸⁻¹⁰ | 61 |
| 8.1 スケールアップの開始点としての分析クロマトグラフィー | 61 |
| 8.2 分析カラムから分取カラムへのリニアスケールアップの計算式 | 63 |
| 8.3 フォーカスグラジエントによる効率の向上 ¹¹⁻¹⁴ | 66 |
| 8.4 スケールアップワークフロー全体の説明 ¹⁵ | 70 |
| 9 分取 LC の実践ガイドラインと詳細な手順 | 74 |
| 9.1 SAC/DAC カラムの充填手順 | 74 |
| 9.2 システムのデュエルボリュームの測定 | 78 |
| 9.3 カラムボイドボリュームの測定 | 80 |
| 9.4 カラムの平衡化と流量の最適化 | 84 |
| 9.5 カラム過負荷 | 87 |
| 10 参考文献 | 92 |

1 序文

ケミスト、バイオロジスト、またはエンジニアにとって、化学物質の特性評価等の研究は職務の1つです。この目標を達成するには、担当している分野で最先端の研究に挑み続ける必要があります。その結果、ワークフローでの重要度が高いにも関わらず、自身の主たる研究分野ではないため、割ける時間が短くなってしまう作業があります。このような作業の代表的なものが、化学物質の単離と精製です。

対象となる化合物の純度が高くない場合、その化合物を精製する必要があります。この場合に考えられるのは、複数の段階で化合物を合成する際の中間の段階として精製を使用するシナリオや、合成が複雑すぎて手間がかかるときには天然資源から化合物を単離する、というシナリオです。精製技法が必要になる他のシナリオとしては、例えば、フラッシュクロマトグラフィーが目的の純度を実現できなかった場合や、結晶化が期待したとおりに作用しなかった場合があります。

むしろ、高純度化合物の単離は液体クロマトグラフィーの本来の目的であり、それによって20世紀の間に分離科学の開発が推進されました。これは、天然資源や新しい合成経路の発見に密接に関連しています。医薬品、農薬、栄養補助食品に用られる価値の高い化合物のニーズが高まった結果として、精製プロセスの最適化に対してさらなる取り組みが必要になっています。

現在の分取クロマトグラフィーは、もはや推測に基づく作業ではありません。ルールを文書化し、それに基づいて最適な結果を得るために方法が確立されています。適切な初期条件を検討し、スループット、回収率、純度を最適化することは、基本的な考察事項です。目的のサンプルスループットに応じて優先事項が決定されます。少数の異なるサンプルに対して高回収率を達成する場合は回収率を最適化する必要があり、多数の異なるサンプルをミリグラムスケールで処理する場合は適切な自動化が求められます。

本書の目的は、他の文献を詳細に調べることなく、分取LCの基礎について説明することです。本入門書は分取LCの理論的背景を完全に理解するための教科書という位置づけではなく、最適な結果を得る方法を具体的に説明するユーザーマニュアルや、教科書では不足している点を補います。

分析スケールの液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーは純度測定に適した技法であり、精製プロセスの進捗状況を確認するために不可欠なツールです。できれば、本書に目を通す前にこれらの技法について理解しておいてください。また本書では、LC メソッド開発の一環として適切なカラム充填剤を選択する際の考え方についても説明します。

液体クロマトグラフィーに関してすでに高度な専門知識をお持ちの方にお伝えしたいことは、分取クロマトグラフィーでは、スループット、純度、回収率の最適化を図るうえで、別のルールと優先事項が存在するということです。化合物の効率的な精製を重視しているすべての方に、本書がお役に立つことを願います。

2 はじめに

本書では、分取 LC の基本的な原理について紹介し、精製システムの構成要素について説明します。続いて、フラクションを収集する手法について説明し、一般的な化合物の精製における実用的なソリューションを示します。

はじめに、分析 LC と分取 LC の相違点を、従来のようなカラム寸法や流量の観点からではなく、特定のアプリケーションに対するソリューションの現代の視点から再定義します。

3 著者について



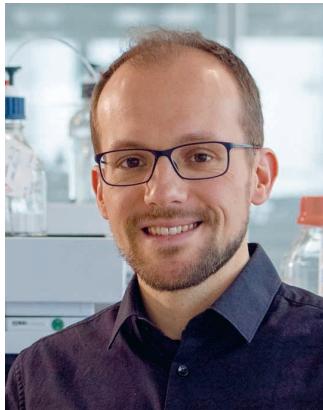
Dr. Helmut Schulenberg-Schell

Helmut Schulenberg-Schell は、ドイツのミュンスター大学で化学の修士号と生物化学の博士号を取得しました。まず、天然物中のシクロペンテニル脂肪酸と細菌由来のホパノイドの単離、そしてウシ脂質結合タンパク質の精製を実施し分取精製クロマトグラフィーに触れました。その後、膜分離技法とバイオテクノロジーを組み合わせた技術に携わりました。過去 25 年にわたって、ヒューレット・パッカードとアジレント・テクノロジーのさまざまな役職において製品と市場の開発に従事し、ケミスト、バイオロジスト、エンジニアに対して新しい技術と製品に関する教育を行ってきました。現在、アジレント・テクノロジーにおいて HPLC のビジネス開発ディレクターを務めています。



Dr. Andreas Tei

Andreas Tei は、ドイツのハイデルベルク大学で有機化学の修士号と自然科学の博士号を取得しました。業界での経歴は大手科学機器メーカーから始まり、LC/MS および GC/MS システムについて、テクニカルサポート、アプリケーションサポート、販売・マーケティング等、さまざまな役職を歴任しました。長年アプリケーションケミストとして、創薬化学ラボ向けのマスベースの分取精製システムに携わってきました。Tei は 2011 年、分取クロマトグラフィーシステムの製品マネージャとしてアジレントに入社し、新しいモジュールの設計と自動化ソフトウェアについて担当しました。その後、医薬品低分子のマーケティング部門マネージャを務め、現在はアジレントの顧客ポートフォリオマネジメントを行っています。



Dr. Florian Rieck

Florian Rieck は、ドイツのカールスルーエ工科大学（KIT）で食品化学の修士号と分析化学の博士号を取得しました。博士号の研究は新しい植物の生物活性性代謝物の検出と特性解析で、この時初めて分取 LC を使用しました。Rieck は 2015 年にアジレント・テクノロジーに入社し、ドイツのヴァルトブロンで液体クロマトグラフィーのアプリケーションケミストとして業務を開始しました。一般的な LC アプリケーションプロジェクトを担当したのち分取 LC とマスベース分取のアプリケーションに従事しています。



Ronald Guilliet

Ronald Guilliet は、オランダのフリッシンゲンの応用科学大学で分析化学について学びました。科学機器と消耗品のメーカーからキャリアを始め、HPLC カラムの生産とマーケティングを担当しました。その後、大規模（プロセス）精製に従事しました。ビジネス開発マネージャおよび販売スペシャリストとして、医薬品の大規模ワークフローをグローバルな視点で捉え、特に力を入れているインドとアジアにおいて、プロセス精製のトータルソリューションの提供を成功させました。Guilliet は 2010 年、分取クロマトグラフィーおよび超臨界流体クロマトグラフィーのプロダクトマネージャとしてアジレントに入社し、現在は、Agilent InfinityLab LC 分取精製ポートフォリオを担当しています。

4 記号と略語

記号

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| A | 吸光度 [AU] |
| c | 濃度 [mol/L] |
| d | 光路長 [cm] |
| d_A | 分析カラムの直径 [mm] |
| d_P | 分取カラムの直径 [mm] |
| ε_λ | モル吸光係数 |
| f_{a,A} | 分析システムの流量 [mL/min] |
| f_{p,P} | 分取システムで提案される流量 [mL/min] |
| k | 保持係数 |
| k_e | 有効保持係数 |
| L_A | 分析カラムの長さ [mm] |
| L_P | 分取カラムの長さ [mm] |
| N | 理論段数 |
| p_A | 分析システムのカラム粒子径 [μm] |
| p_P | 分取システムのカラム粒子径 [μm] |
| t_R | 保持時間 [s] |
| t_{D,A} | 分析システムのデュエルタイム [s] |
| t_{I,A} | 分析システムの汎用グラジエントの初期保持時間 [s] |
| t_{c,A} | 分析システムのカラム通過時間 [s] |
| t_{D,P} | 分取システムのデュエルタイム [s] |
| t_{I,P} | 分取システムのグラジエントの初期保持時間 [s] |
| t_{c,P} | 分取システムのカラム通過時間 [s] |
| v_{D,A} | 分析システムのデュエルボリューム [mL] |
| v_{c,A} | 分析システムのカラムボイドボリューム [mL] |
| v_{D,P} | 分取システムのデュエルボリューム [mL] |
| v_{inj,A} | 分析システムの注入量 [μL] |
| v_{inj,P} | 分取システムの注入量 [μL] |
| w_h | ピークの半値幅 (時間単位) [s] |

略語:

| | |
|-------------|----------------|
| DAC | 動的軸圧縮 |
| DMF | ジメチルホルムアミド |
| DMSO | ジメチルスルホキシド |
| EIC | 抽出イオンクロマトグラム |
| id | 内径 |
| IPA | イソプロピルアルコール |
| SAC | 静的軸圧縮 |
| TIC | トータルイオンクロマトグラム |

5 分取 LC の概要

本章では、分取 LC の概要について説明します。最初に分取 LC と分析 LC の相違点を明確にした後、混合物からターゲット化合物を濃縮または精製する必要が生じた際にラボが直面するさまざまな課題について説明します。

5.1

分析 LC と分取 LC の相違点

分析 LC は、化学物質または生物学的に生成された分子の混合物の調査を行う科学者やエンジニアが必要とするスタンダードな技法です。このような混合物中の成分を詳細に定性または定量するために、クロマトグラフィーによって分離して選択的に検出します。

その一方で、分取 LC の採用と導入は、詳細な調査や商業上の目的のために混合物からターゲット化合物を濃縮または精製する必要が生じた場合となります。何世紀にもわたり、有益な物質を抽出または濃縮するためにさまざまな手法が開発されてきました。20世紀末頃、食品業界や医薬品業界で非常に高い純度の化合物が求められるようになり、分取 LC 手法を進歩させる必要性が高まりました。

分析が目的の LC と分取が目的の LC の違いは、次のようにまとめられます。

「分析 LC では手間をかけて分離した化合物を廃液としてしまうか、または破壊的検出手法により化合物が失われてしまいますが、分取 LC では分離した化合物を個別の容器に収集してさらに調査を行うことが可能です。」

分析クロマトグラフィーと分取クロマトグラフィーをカラム寸法や流量の観点から区別する従来のアプローチは、現在では適切ではありません。

5.2 化合物の精製における優先事項の設定

総合的な観点から見ると、分取 LC の使用がどれほど一般的なことであるのかがわかります。分取 LC は流量とは関係ありません。 nL/min または $\mu L/min$ の流量で微細なタンパク質フラクションを収集する際や、高流量でタンパク質を工業規模で精製する際にも分取 LC が用いられます。

本書では、混合物から 1 種類以上のターゲット化合物を分離して抽出するためのシンプルながらも洗練された技法である分取 LC について説明します。混合物サンプルは、固定相を充填した管（カラム）に一回ごとに移送されます。このプロセスにより、混合物は各組成成分に分離されます。その後、溶出液からターゲット化合物を捕集します。

例えば、複雑な天然物中にごくわずかのみ存在する物質を捕集する場合は、ナノリットル (nL) またはマイクロリットル (μL) 程度の低流量で分取 LC を実行します。ライフサイエンス分野の新規化合物の発見に役立っています。

一方、数 L/min という高流量は一般的に、製造プロセスにおける有効成分の精製で使用されます。クロマトグラフィーを正しく理解している経験豊富なプロセスエンジニアが、正確なスケールアップ手順に従ってフラクションを厳密に捕集すると、数キログラムの純粋な化合物を得ることができます。

創薬または農薬研究ラボの合成化学者は、日常的にサンプルのスループット、回収率、純度の折り合いをつけながら作業を行っています。通常、未精製サンプルの注入量は 100 ~ 500 mg の範囲です。主要な製薬ラボでは、毎日 1 システムあたり 50 ~ 100 種類の異なるサンプルを精製する場合があります。システムを大幅に自動化することにより、経験が浅い研究者でも、自身で貴重なサンプルを精製できるようになります。

すべての化学者がサンプルを迅速かつ安全に精製し、化学合成に再び取り掛かることができるようになるには、非常に堅牢なシステムが必要です。大量の異なるサンプルが存在する場合は、プロセスを自動化していない限り、精製パラメータを個別に最適化することは不可能です¹⁻⁴。

プロセス開発では、ケミストやエンジニアは主に、数グラム～数キログラムの試験規模の中間体、ファインケミカル製品、または生体化合物に関する精製に従事しています。同じ化合物を大量に繰り返して精製する必要がある場合は、プロセスを全面的に調整する必要があります。そのため、経験豊富なクロマトグラファーは、化合物ごとのスケールアッププロセスを慎重に作り上げます。最適化されたグラジエント条件と、個々に条件を調整したフラクションコレクションによる精製が、一般的な手法です。通常、精製された化合物は貴重なものです。一日に精製されるサンプル数は少量ですが、その化合物の価値は非常に大きなものです。したがって、収益性の高いビジネスモデルを持続するには、効率的な精製プロセスが必須となります。

生体マトリックス中の代謝物などの複雑なサンプルを分離する際に最も優先度が高いのは、クロマトグラフィー分離です。これらの課題に対しては、カラムサイズが 4.6 × 150 mm で粒子サイズが 3 ~ 5 μm または場合によっては 2 μm 未満であることが必要になると同時に、一般的な分析 LC の分離で使用されるクロマトグラフィー条件に近いかまたは同一の条件が必要になります。勾配の緩やかなグラジエント条件と低キャリーオーバーのオートサンプラおよびフラクションコレクタを組み合わせて使用することにより、分離した化合物の純度と回収率を大幅に高めることができます。通常、未精製サンプル中のターゲットの濃度は低いものです。したがって、大量の希釈サンプル（尿など）から化合物を濃縮するか、または少量の生体組織から最大の回収率で化合物を回収する必要があります。

6 分取カラムの選択

分取 LC では、まず分析を行い分離を確認します。最初に、サンプル中にターゲット化合物が存在していることを確認する必要があります。次に、サンプルから回収できるターゲット化合物の推定量が、続いて行う精製作業に対して十分であるかどうかを評価する必要があります。本章では、分離カラムについて詳細に解説し、精製要件に基づいたカラム選択の決定基準を示します。

6.1

分離カラムの選択

指定された時間内に回収する必要がある純物質の量から、分離カラムのサイズ（内径、長さ）を決定し、次にこれらのサイズから精製システムの処理能力を決定します。例えば、分析カラムが必要な量の純物質を分取するのに十分な大きさの場合は、フラクションコレクタを分析システムに追加するだけで済みます。

1 日または 1 週間あたりのサンプル数から、精製システムで必要な自動化と処理能力のレベルを決定します。1 日あたりのサンプル数が多い場合は、メソッドを最低限の時間で最適化し、すべてのサンプルに対して一般的なメソッド設定を行う必要があるため、自動サンプル導入が最適です。

1 種類の化合物を大量に精製する場合、特に日常的に同じターゲット化合物を精製する必要がある場合は、回収率と純度を最適化する必要があります。この場合、低コストの手法について検討する必要があります。必要な純化合物量が少量の場合には、少量を繰り返し注入する方法を用います。

図 1 に、分取 LC で一般的に用いられるカラムサイズごとに推奨される流量とサンプル量の概要を示します。示されている精製範囲は未精製サンプルの量に対応しており、純度または回収率とは無関係です。

| 精製範囲 [mg] | 分析 | | セミ分取 | | 分取 | |
|------------|---------------------|----------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| | 1~15 | 7~70 | 30~300 | 64~640 | 180~1800 | 400~4000 |
| カラム内径 [mm] | 4.6 mm | 0.8~2.0 mL/min | | | | |
| | 9.4 mm (0.5 インチ) | | 4~10 mL/min | | | |
| | 21.2 mm (1 インチ) | | | 18~42 mL/min | | |
| | 30 mm | | | | 34~85 mL/min | |
| | 50 mm (2 インチ) | | | | | 94~236 mL/min |
| | 75 mm (3 インチ) | | | | | 212~931 mL/min |

図 1. 一般的なカラムサイズで推奨される流量 (mL/min) とサンプル量 (mg) の概要

通常、未精製サンプルの量は、充填剤の重量の 0.1 ~ 1.0 % の範囲で変動します。推奨値は、密度 0.6 g/mL、カラムまたはベッド長 150 mm の逆相系充填剤を基にしています。21.2 × 150 mm のカラムには、約 32 g の充填剤が充填されています。

一般的な科学者が抱えている次のような要件について考えてみます。「1 回の注入あたり 100 mg の未精製原料を精製する必要があります。推奨されるカラムサイズと流量はどれくらいでしょうか。」

図 1 の推奨値は、この要求を満たすには 5 ~ 10 μm の粒子サイズの内径 21.2 mm のカラムを使用する必要があることを示しています。これにより、大半の精製作業で良好な結果が得られます。目的的注入量に合わせて、カラム長を 50 ~ 250 mm の間で選択する必要があります。内径 21.2 mm のカラムに適した長さを選択するルールは簡単です。試料の注入量が 50 mg の場合は 50 mm、250 mg の場合は 250 mm を選択します。

分離が非常に困難な場合は、注入する未精製試料量を減らすか、または固定相の量を増やす必要があります。注入する試料量を減らす際には、必ず最初に注入量を減らし、次に濃度を低くします。固定相の量を増やすには、カラム径かカラム長、またはその両方を長くします。

流量については、 $21.2 \times 100\text{ mm}$ のカラムを選択する場合、内径が 4.6 mm の分析カラムの場合の一般的な分析流量 1 mL/min からスケールアップして、最大 21 mL/min の流量を用います。これは、文献内で詳細に説明されているスケールアップの式と一致しています。グラジェント時間を短くするか、または 1 日のスループットを高める必要がある場合は、流量を最大 42 mL/min まで上げます。通常、これにより純度と回収率が大幅に低下することはありません。

6.2

大規模スケールの分取カラムの選択

内径 30 mm 超、長さ 50 mm 以上の大口径カラムの場合は、時間の経過とともに充填状態が変化しカラム空隙が増加する傾向があります。これは、充填剤がさらされる圧力、流量、温度、他の溶出状態などのクロマトグラフィー条件が変化した結果です。カラムが十分慎重に取り扱われていない場合、移送（カラムの持ち運び）も充填状態の変化の主な要因となります。

カラム充填プロセスにおいて、軸圧縮により充填剤の粒子が強制的に密な状態にされた結果として、ベッド（カラム中の充填剤容積）の安定性が維持されます。カラム充填技術で用いられる軸圧縮には、静的軸圧縮と動的軸圧縮の 2 つのタイプがあります。静的軸圧縮 (SAC) では、カラムベッドが圧縮され、ロッキングメカニズムにより圧縮ピストンが静的位置に保持されます。一方、動的軸圧縮 (DAC) では、充填剤ベッドを一定の圧縮状態下に維持したままカラム充填剤を充填します。

一般に、粒子が球状で粒子サイズが $5\sim10\text{ }\mu\text{m}$ の充填剤は相当の圧縮力に耐えることができるため、大規模な精製アプリケーションに使用されます。このようなタイプの充填剤の場合、Agilent Load & Lock カラムのような分取 LC カラムは SAC および DAC の両方のモードで充填できます（図 2 を参照）。

一方、粒子サイズが $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上であるか、または充填剤が動的圧縮によって損傷しやすいと考えられる場合には、静的圧縮の使用を推奨します。例えば、 300 \AA の粒子は、動的圧縮で一般的に使用される油圧循環時に簡単に破壊され、いわゆる微粒子になってしまいます。静的圧縮を行う別の例として、生体アプリケーションでの不規則な形状の粒子や繊細なゲルを使用する場合などがあります。



図 2. Agilent Load & Lock カラムは、内径 1、2、3 インチから選択可能です。パッキングステーションは取り扱いが簡単で、SAC および DAC の両方のモードで利用できます。

SAC/DAC カラムは、必要な化学物質がバルク材料として使用できる場合の選択肢となります。このような充填剤は、コンタミによりピーク形状が悪化した場合、または充填剤ベッドが損傷を受けている場合に再生利用可能になることがあります。カラム内の充填剤を取り出し、その充填剤を洗浄して再充填できます。Agilent Load & Lock カラムの充填は簡単に習得でき、多少の経験があれば 1 mあたり 30,000 段を超えるカラムを充填できます。

例えばベッドの摩耗が原因で、分離能の点から見た SAC パックドカラムでの分離効率が低下し始めている場合でも、Agilent Load & Lock カラムは簡単に再圧縮できます。これを実行するには、カラムをパッキングステーションに配置して再圧縮し、保持機構を再ロックします。

6.2.1 圧縮システムの選択

SAC カラムと DAC カラムでは、充填剤の充填作業と取り出し作業用の圧縮システムが必要になります。単一のシステムで、内径 1、2、3 インチの 3 種類のラボスケールカラムサイズのオンサイトパッキングステーションとして機能することが理想的です。パッキングステーションは複動式の油圧シリンドラで構成され、圧縮空気駆動の定圧油圧式ポンプによって制御されています。この圧縮システムは、静的軸圧縮と動的軸圧縮の両方に有効です。油圧式ポンプを駆動するには、約 6 bar (90 psi) の圧縮空気源が必要です。

ポンプ、リザーバ、シリンダ、コントロールパネル、カラム取り付け固定具などの油圧部構成要素をすべて、1 つの移動式装置に取り付ける必要があります。一般的な軸圧縮カラムでは、カラムと同じ軸に対して垂直に单一の油圧式シリンダが取り付けられています。ただし、2 つのシリンダをカラム軸と並列にカラムの両側に取り付ける方がより有効であるため、直径が小さいシリンダを使用しやすくなり、システムの全体の高さが低くなります。床面積とドアサイズが制約要因となるラボ環境内で、このような大型の装置を取り扱う場合には、システムを移動しやすくし、高さを抑えた構成にすることが、重要になります。

6.2.2 SAC/DAC カラムの充填

Agilent Load & Lock カラムは、カラムベッドの物理的長さまたは目的の充填剤の量に応じて、異なるメソッドで充填できます。このタイプのカラムで高性能の充填剤を充填するのに使用される 2 つのメソッドは、高速充填メソッドと吸引メソッドです。

最も一般的なメソッドは、使用可能なカラムベッド長の 60 % 以下を利用してスラリー充填を行う高速充填メソッドです。このメソッドでは、リザーバは必要ありません。スラリーをカラムに導入してエンドキャップを取り付け、油圧圧縮によりスラリー溶媒を取り除きます。指定した圧縮圧力に達すると、圧縮ピストンが所定の位置にロックされます。この充填メソッドの実行には数分を要しますが、残留物はなく、充填剤がすべて使用されます。

一方で低速で充填を行う吸引メソッドでは、通常、使用可能な全ベッド長を利用します。これはカラム容量の最大 90 % に達する可能性があります。したがって、このメソッドでは大量の充填剤スラリーを必要とするためカラムの上部にプラスチック製のリザーバを追加する必要があります。スラリーを一定量導入してから、真空アスピレータを用いて下部から溶媒を取り除きます。ベッドを乾燥させた後、余分な充填剤をカラムの上部から取り除いてキャップを取り付け、ベッドを圧縮します。指定した圧縮圧力に達すると、圧縮ピストンが所定の位置にロックされます。このメソッドでカラムを充填するのに必要な時間は、カラム長、充填剤のタイプ、スラリー溶媒のタイプ、使用可能な吸引状態に応じて異なり、30 分から数時間程度となります。ベッドにおける機械的圧力に対する油圧の比を表 1 に示します。

表 1. 充填剤ベッドでの機械的圧力に対する油圧の比（充填ベッド密度 0.59 g/mL の C18 充填剤）

| カラム内径 | 1 インチ (27 mm) | 2 インチ (50 mm) | 3 インチ (75 mm) |
|-------------|---------------|---------------|---------------|
| 機械的圧力 [psi] | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 油圧 [psi] | 400 | 1,500 | 3,000 |
| 油圧/機械的圧力の比 | 1:2.5 | 1.5:1 | 3:1 |

7 分取スケール LC システムのコンポーネント

分析スケール LC システムは、フラクションコレクタを追加するだけで簡単に分取精製が行えます。分析スケール LC システムと分取スケール LC システムで、ポンプから検出器までの流路構成は基本的に同じです。送液システムでは、リザーバの溶媒を混合して送液を行います。高流量の場合は、溶媒の消費量が多くコストがかかりります。安全上の理由から、溶媒保管容器をラボ外部に設置する場合もあります。適切なサイズの溶媒ビンに溶媒を移し、ラボ内のポンプで送液することになります。オートサンプラ、スイッチングバルブシステム、カラム、検出器、フラクションコレクタ間を、チューブで正しく接続します。チューブの内径を大きくすることで、拡散が増加しますが、背圧を抑制することができます。反対にチューブ内径が小さいと、拡散を抑制できますが、背圧が増大します。分取精製システムの全体的なパフォーマンスに、個々のコンポーネントが影響します。

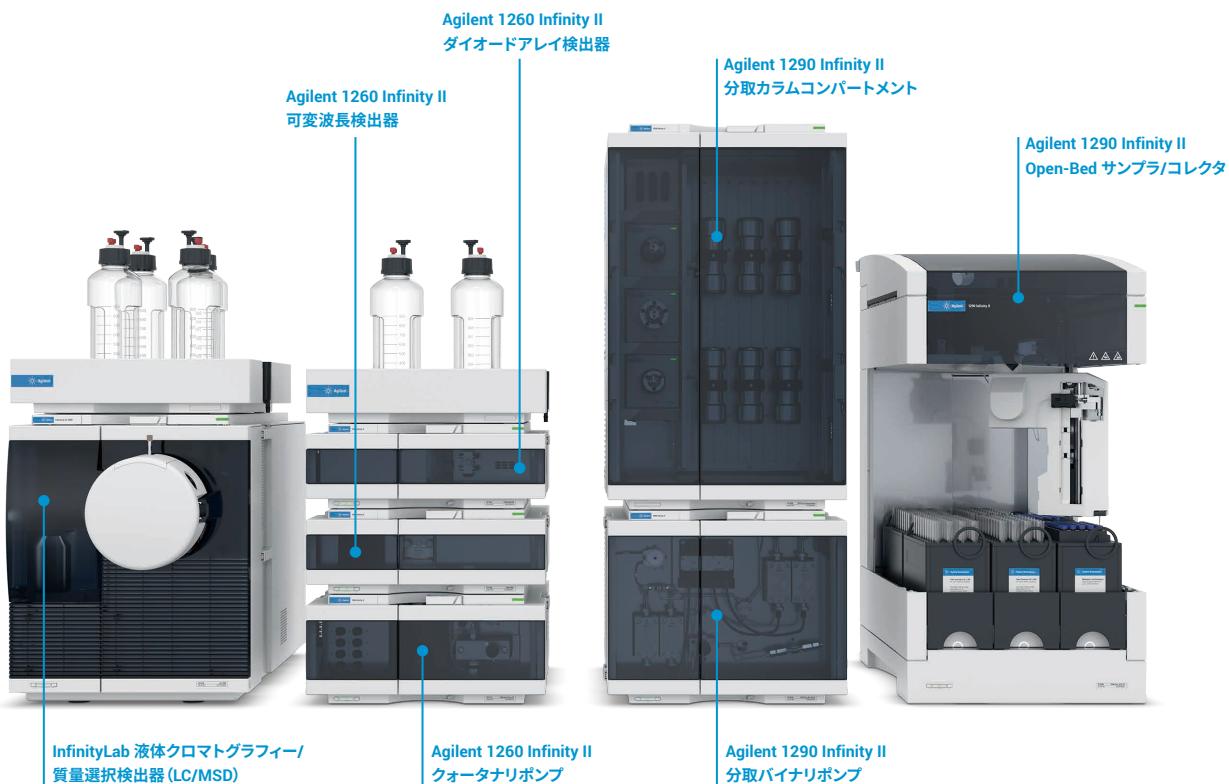


図 3. Agilent 1290 Infinity II オースケール分取 LC/MSD システム

7.1 送液

7.1.1 低圧混合グラジエント

この送液メソッドでは、溶出液の組成がプロポーショナルバルブによってコントロールされ、混合チャンバの低圧側で混合されてから、ポンプのシリンダ内で加圧されます。流量が 10 mL/min 以下の場合は、真空デガッサを使って脱気する必要があります。さらに高流量の送液では、ヘリウムページを使用する場合があります。ただしヘリウムページはヘリウムをタンクからパイプライン経由で直接溶媒ボトル等の容器に導入する必要があり、使用が困難です。市販の外付け真空デガッサを使用することも可能です。低圧混合は高圧混合と比べて投資コストが少なく、4 液グラジエント送液が行えるという利点や、溶離液フローに添加剤を直接添加できるといった汎用性があります。セミ分取低圧混合システムの主な難点は、デュアルボリュームが大きい、脱気の問題、グラジエント性能が少し劣る、という点です。

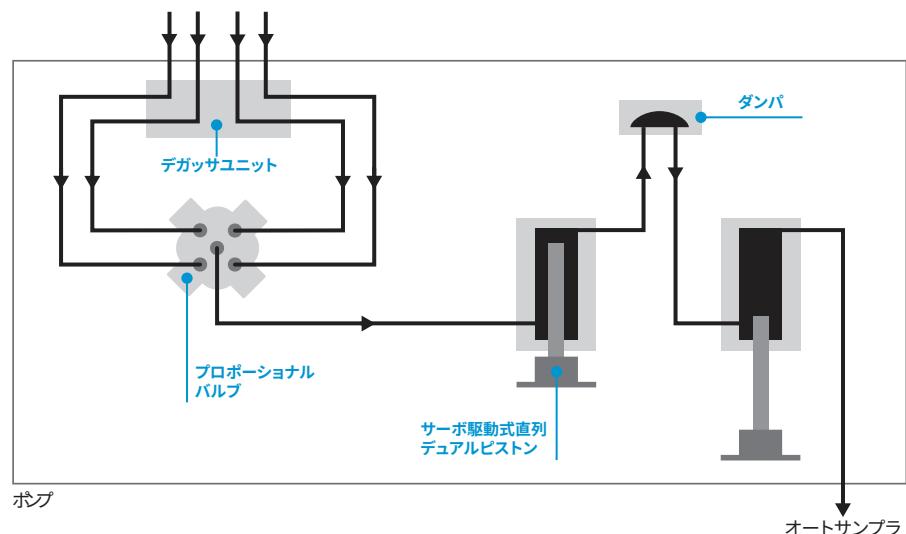


図 4. グラジエントの低圧混合送液システムの概略図。デガッサユニット、プロポーショナルバルブ、ポンプシリンダについて表示。

7.1.2 高圧混合グラジエント

この送液方法では、溶媒チャネルごとに独立した専用ポンプが装備されており、個別ポンプで各移動相で送液を行い、グラジエントプロファイルを形成します。高圧で混合され、移動相毎にポンプで送液をコントロールするため、より高い精度で送液が行えます。パッシブミキサーは一般的にフリットまたはステンレスのボールが使用されるのに対し、アクティブミキサーでは回転式のスターラを使用します。高圧で混合する場合は通常、溶媒の脱気は不要です。ただし、約 3 bar (40 psi) 以上の圧力がかかる状態で送液することが必要です。フローセルアウトレットの背圧やバックプレッシャーレギュレータの背圧によって、検出器内の気泡が抜けなくなってしまうことがあります。



図 5. Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプ

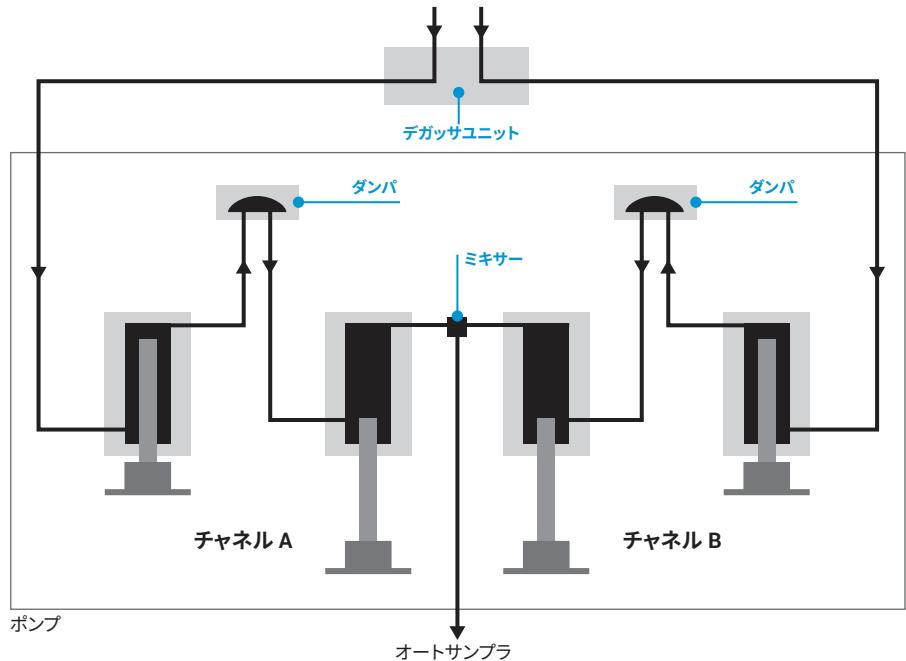


図 6. 高圧混合グラジエント送液システムの概略図。2 つの溶媒チャネルによる、バイナリグラジエント送液

7.2

サンプル注入

分取 LC では、多彩なサンプル種への対応や幅広い注入量への対応が要求されます。マニュアル注入、オートサンプラによる注入、注入ポンプといった注入方法があり、アプリケーションに合わせて検討/選択します。オートサンプラには、フロースルーニードルと固定ループの 2 種類の注入方式があります。

7.2.1 オートサンプラのフロースルーニードル方式

フロースルーニードルは注入量が可変であり、幅広い注入量に対応できる構造になっています。また、サンプル損失がありません。一方、サンプルループと計量デバイスのサイズによってデュエルボリュームが大きくなるといった問題点があります。デュエルボリュームは分取モードで大きくなります。このような問題点はありますが、フロースルーニードルはワークフローを簡素化し、サンプル損失を防ぐのに有効な技術です。図 8 に、フロースルーニードル方式の流路概要を示します。

数 mL といった大容量注入を行う場合、ニードルシートとスイッチングバルブ間のシートキャピラリーの容量を増やす必要があります。容量を追加したシートキャピラリーにサンプルを複数回注入し、大容量注入を行う方法をマルチドロー方式といいます。シートキャピラリーの容量が増えることで、デュエルボリュームが増加します。サンプル注入後にバイパスモードに切り替えることで、デュエルボリュームを低減することができます。



図 7. Agilent 1290 Infinity II 分取 Open-Bed サンプラ/コレクタ

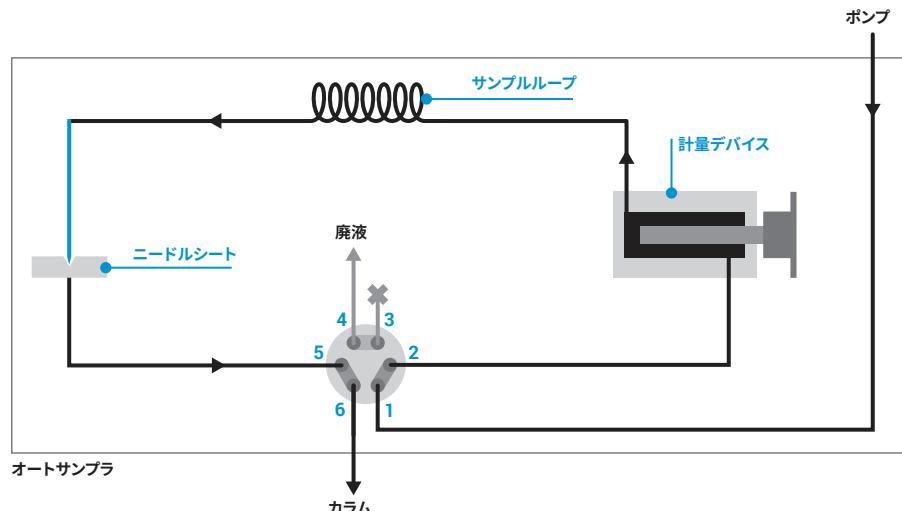


図 8. オートサンプラの注入バルブがメインパスの状態では、送液はスイッチングバルブ、計量デバイス、サンプリングループ、注入ニードルおよびニードルシートを経由し、再度注入バルブを通ってカラムに到達します。

サンプル注入後、スイッチングバルブをバイパスモードに切り替えることで、溶離液はポンプから直接カラムに流れます。計量デバイス、サンプリングループ、注入ニードルは流路から外れるため、次のサンプル注入の準備を行うことができます（図 9 を参照）。

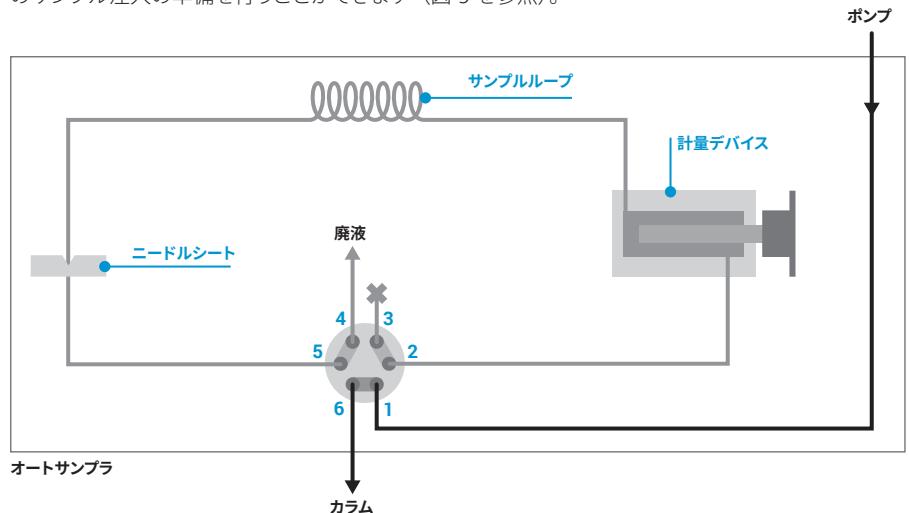


図 9. オートサンプラをバイパスモードにすることで、ポンプからのフローは直接カラムに流れるため、流路から外れた計量デバイスや注入ニードルでサンプリングを開始することができます。

バイパスモードに入ると、注入ニードルがニードルシートから離れてサンプル容器に挿入されます。計量デバイスが、サンプルをサンプリングループに吸引します。（図 10 を参照）。

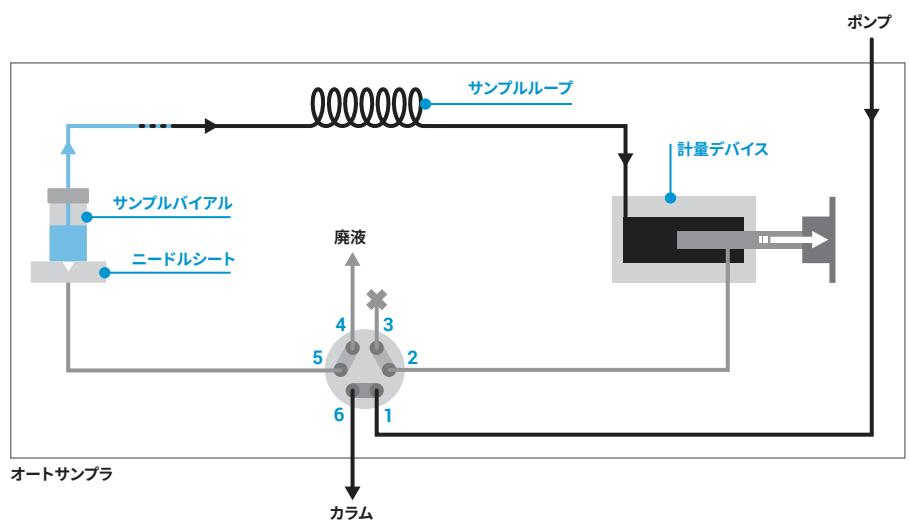


図 10. サンプルがサンプリングループに吸引されます。

必要な量のサンプルがサンプリングループに吸引されると、ニードルはニードルシートに移動します。スイッチングバルブがメインパスに戻り、サンプルはニードル経由でカラムに送られます（図 11 を参照）。

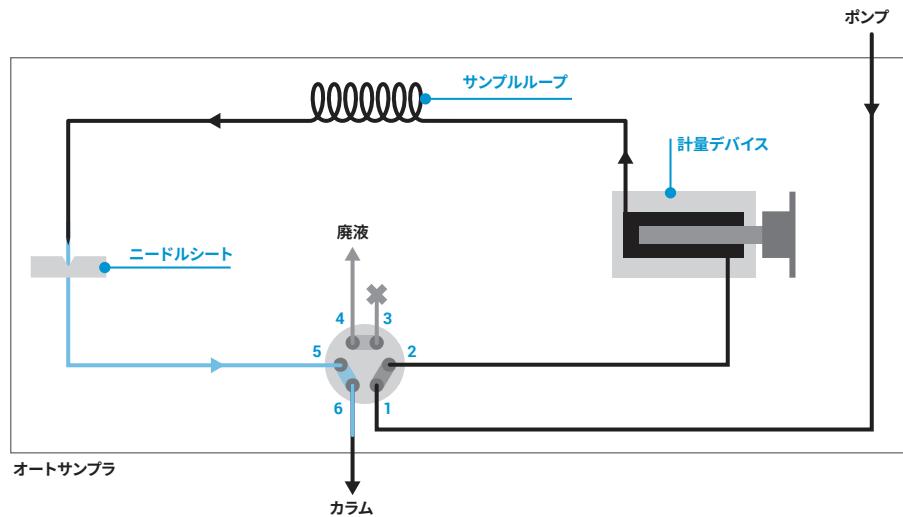


図 11. メインパスに切り替わりサンプルがカラムに送られます。

サンプルがカラムに移送直後にバイパスモードに切り替えることでデュエルボリュームを減らすことができます。機器によっては、設定したフラッシュアウト時間が経過した後、自動的にバイパスに切り替わるインジェクタプログラムやメソッドオプションが用意されています。そのような機能の有無にかかわらず、サンプルの移送時間を正確に計算して、サンプルがバルブやニードルシートに残らないようにすることが重要です。

7.2.2 固定ループ方式オートサンプラー

1 台のオートサンプラで分析と分取両方のスケールに対応した注入を行う場合、フロースルーニードル構造のオートサンプラではサンプリングループのサイズがデュエルボリュームに大きく影響します。デュエルボリュームが大きいシステムで分析スケールの分析を行うと、パフォーマンスが大幅に低下します。このようなアプリケーションには、分析用ループと分取用ループの 2 種類のサンプリングループを備えた固定ループ構造のオートサンプラが適しています。スイッチングバルブを使って、分析用ループと分取用ループを切り替えます。

多くの場合、分析用、分取用の2種類のループを備えたオートサンプラーは、分析用ループで注入を行っている間は分取用ループがバイパス流路になります。分取用ループで注入を行う場合は分析用ループがバイパスになります。特殊なバルブ設計の機器では、分析用、分取用の専用バイパス流路が設けられています。分析用、分取用の専用バイパス流路があるオートサンプラーでは、ループ容量や内径がそれぞれのスケールで最適化されており、柔軟性が向上します。例えば、分取モードでメインパスからバイパスに切り替えるときの流路の閉塞による大きな圧力変動のリスクを解消することができます。

固定ループ式オートサンプラーでは、部分ファイルまたはオーバーフィルの方法で注入を行います。(図12と図13を参照)。部分ファイルによる注入方法が一般的です。テイラー分散により、ループ内の溶媒とサンプルとの接触面は平坦ではなく放物線状になります。このため、ループに充填できるサンプル量はループ容量の60%以下にすることを推奨します。ループ容量と同等の量を注入すると、サンプルがループから流出してしまい、サンプル損失につながります。色付きのサンプルで、この現象を簡単にチェックできます。

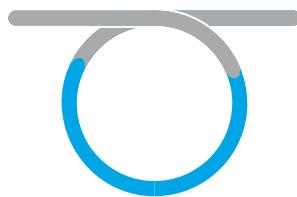


図12. サンプルループの部分ファイル

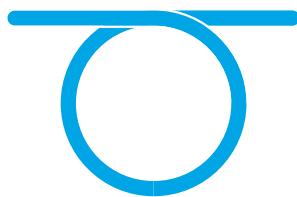


図13. サンプルループのオーバーフィル

テイラー分散を最小限にするために、ループ内の溶媒とサンプルの間にエアプラグを入れる方法があります。キャピラリー内の気液界面が平坦になることで、注入可能なサンプル容量が、分取用サンプルループ容量の75%以上になります。

定量分析の精度を上げるには、オーバーフィルまたはフルループ注入方法が適していますが、この方法は貴重なサンプルを大量に損失してしまうため、分取スケールの分析での使用は推奨しません。

ループはシステム流路の一部であるため、ループサイズの増加はデュエルボリュームの増加につながります。そのため、流量とのバランスを考慮し、できるだけサンプルループ容量を小さくすることを推奨します。経験則として、適切なクロマトグラフィー性能を得るには、システム全体のボイドボリュームと流量の比率が 2:1 以下になるよう調整してください。

分析用流路と分取用流路が独立しているオートサンプラは、分析スケール LC と分取スケール LC の両方に適したサンプル注入が行えます。分析スケール、分取スケールに適したループを個別で装備しているため、注入システムの合計デュエルボリュームを最小限に減らすことができます。また、分取スケールへのスケールアップ前に行う、分析スケールでの分離条件検討にも適した注入を行うことが可能です。

固定ループ式オートサンplaは、サンプルを吸引してループに移送する方式として push-to-fill (プッシュ式フィル) と pull-to-fill (プル式フィル) の 2 種類の方法が行えるよう設計されています。ニードルチップと計量デバイス間の流路は高圧流路からは独立しているため、どちらの原理においても注入流路を満たす補助溶媒が必要です。

図 14 に push-to-fill の原理を示します。分取スケール注入の場合は、バルブが分取スケールにおけるバイパス位置に切り替わると、分析ループが高圧流路の一部となります。ニードルがサンプルバイアルに移動し、計量デバイスによってサンプルが吸引され、ニードルを通ってサンプリングループにサンプルが入ります。

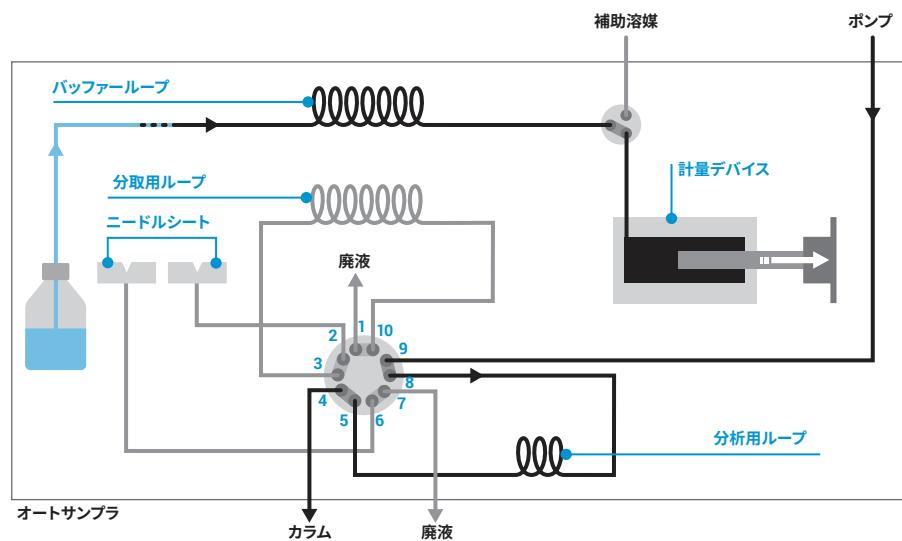


図 14. 固定ループ式オートサンplaでの push-to-fill 原理によるサンプル吸引

サンプルがサンプリングループに吸引されると、ニードルはサンプルバイアルからニードルシートに移動します。計量デバイスがサンプルをサンプリングループから押し出し、サンプルはサンプリングループに移動します（図 15 を参照）。

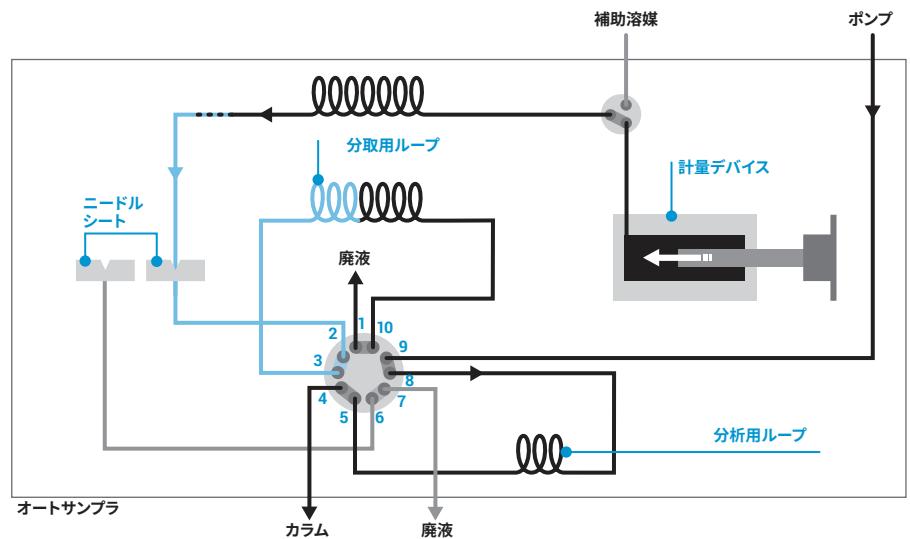


図 15. 分取用サンプルループにサンプルを移動。

スイッチングバルブが分取メインパスに切り替わると、サンプルは分取用ループからカラムに移動します（図 16 を参照）。

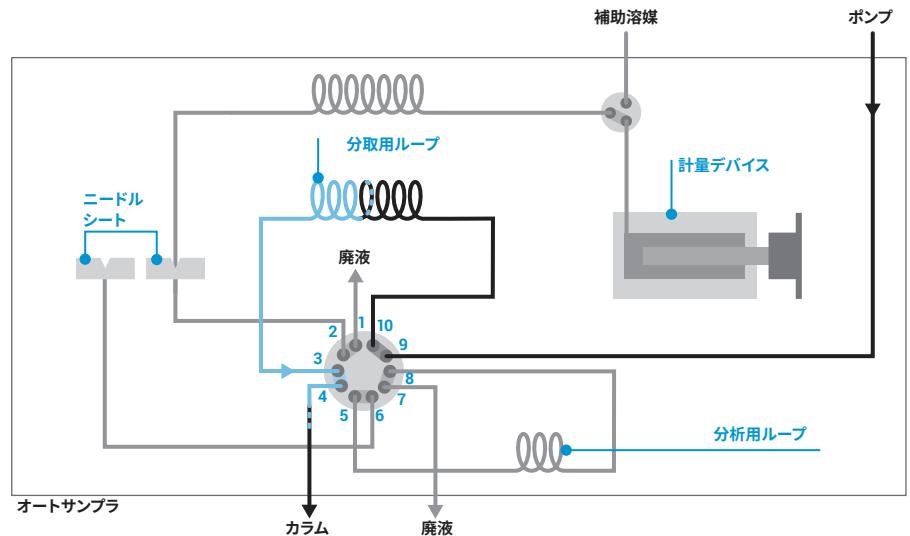


図 16. 分取メインバスにバルブが切り替わり、サンプルはカラムに移動。

計量デバイスがサンプルをサンプリングループに吸引、 PUSHしてサンプルループにサンプルを押し出す方式であるため、 push-to-fill と呼んでいます。この 方式の問題点は、2 つの流路にそれぞれ専用のニードルシートが必要であるという点です。一方、 pull-to-fill 方式では、この問題点が解消できます。

push-to-fill 方式と比較した場合、 pull-to-fill 方式でもサンプリングパスが高圧流路からは独立しているという点は共通しています。ただし、 pull-to-fill 方式の場合は、ニードルと計量デバイスは直接接続されておらず、注入バルブを経由して接続されています（図 17 を参照）。

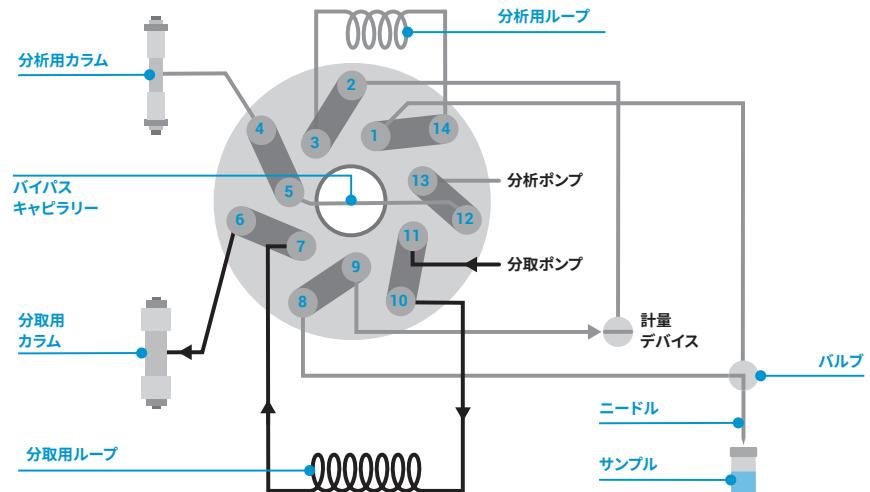


図 17. Pull-to-fill 方式オートサンプラーの分取メインパスポジション。送液はループを経由してカラムに到達します。ただし、ニードルと計量デバイスは流路から独立しています。

pull-to-fill 方式サンプリングプロセスでは、バルブはバイパスに切り替わると、ニードルはサンプルバイアルに移動し、計量デバイスによりサンプルを分取ループに吸引します（図 18 を参照）。

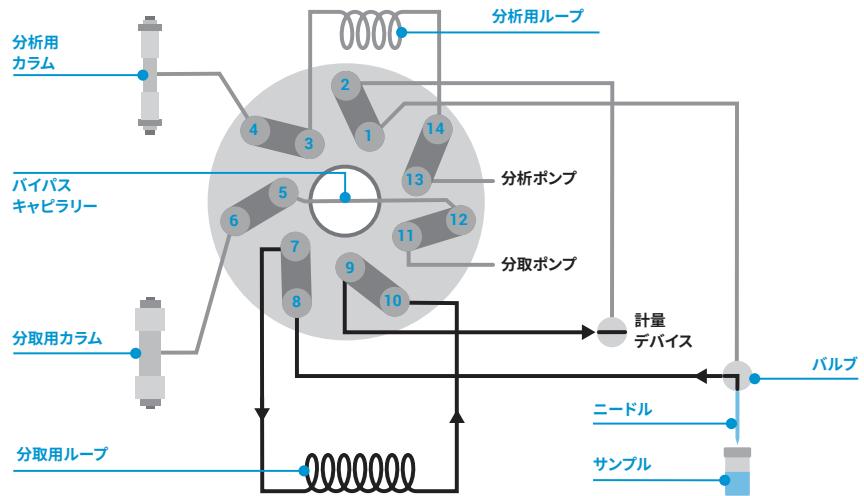


図 18. pull-to-fill 方式オートサンプラ分取バイパスポジションでのサンプル吸引

サンプルが吸引されるとニードルはサンプルバイアルから離れます。計量デバイスはニードル、ニードルチューブ、バルブグローブ内の液がループに移動するまで吸引を継続します。バルブがメインパスに切り替わることで、分取用ループも高圧流路内に切り替わり、サンプルはカラムに移動します(図 19 を参照)。

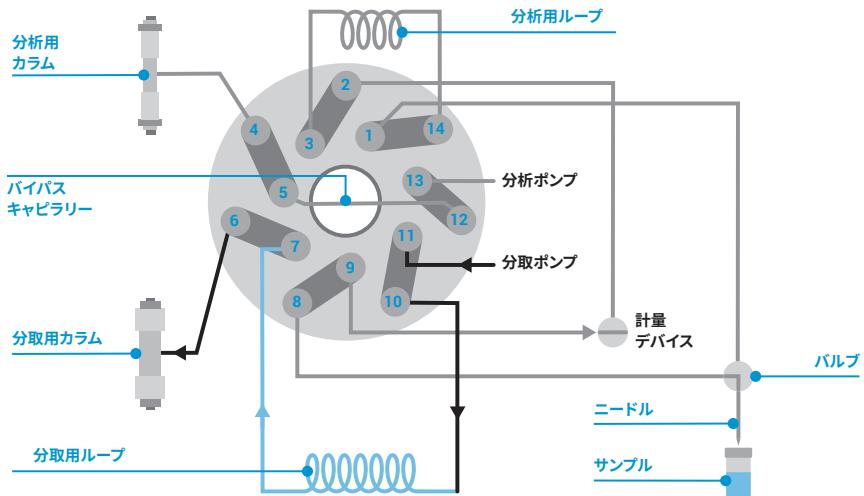


図 19. 分取メインパスポジションにバルブが切り替わり、サンプルは分取カラムに移動します。

固定ループ式オートサンプラでは、サンプリングループとニードルチューブを十分に脱気した補助溶媒でフラッシュし、ニードル外面を 10 秒以上洗浄する機能が求められますこの機能により、サンプルキャリーオーバーと、ループ内の気泡発生を防ぐことができます。

分取スケールクロマトグラフィーでサンプル回収率を最大化するには、ニードルとチューブ内部の洗浄が必須です。特に高濃度サンプルや非極性サンプルは、チューブに吸着しやすい特性があります。サンプル吸引後に 100 % 溶媒を吸引することで、回収率を向上させることができます（図 20 を参照）。一部のオートサンプラでは、ポストサンプルプラグまたはサンプルポジショニングプラグの自動生成を行える機能を装備しています。移動相として強溶媒を使用している場合、高濃度サンプルを注入するには、別タイプの溶媒プラグを使用します。このような特殊な注入手法については、次のセクションを参照してください。

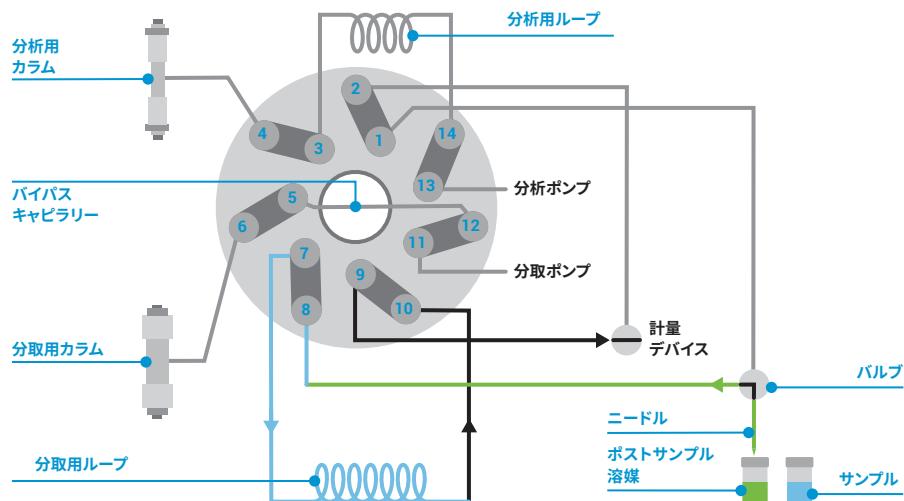


図 20. 100 % 溶媒のポストサンプルプラグをサンプルの後に吸引して、粘着性の高い残留物をループに移動することができます。

7.2.3 特殊な注入手法

最高のクロマトグラフィー性能を実現するために、化合物の溶解性やサンプルの前処理状態を考慮して溶媒を検討/選択することが必要な場合があります。このような場合のために、特殊なサンプル注入手法が開発されました。

サンプルサンドイッチ

サンドイッチ注入は、サンプルが初期組成の移動相と接触して析出してしまう場合に適用できます。この方法により、インジェクタのニードル、バルブ、キャピラリーのつまりを防ぐことができます。適切な溶媒の 2 つのプラグでサンプルを挟み込む（「サンドイッチ」する）プログラムをオートサンプラに設定することで、サンプルループ内での析出を防ぐことが可能です（図 21 を参照）。水と混ざらない DMSO などの溶媒を使用します。分析スケールの注入では、クロマトグラフィー性能を維持ために、注入する DMSO の量をできるだけ少なくする必要があります。5 μL のプラグで挟み込むことを推奨します。分取スケールの注入量では、経験上、合計注入量の約 10 % を合計プラグ量として使用することを推奨します。

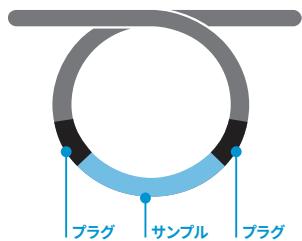


図 21. サンプルループや接続キャピラリーでの析出を防ぐための、適切な溶媒プラグによるサンドイッチ注入。

強有機溶媒の大容量注入

有機合成化合物の多くが、DMSO や DMF に高い溶解性があります。これらの溶解性が高く、溶出強度が高い溶媒は、クロマトグラフィーの分離を妨げる可能性があります。この現象は特に、極性が比較的高く、保持が弱い化合物の分析で見られます。

必要量が特定のカラムサイズの最大注入量を超える場合は（表 2）、有機相注入を推奨します。具体的には、100 % 有機溶媒に溶解したサンプルを注入するために、インジェクタとポンプの有機チャネルを接続し、カラムの直前で水系溶媒を導入して希釈します。

表 2. 強溶媒の推奨注入量。最大注入量を超えると、クロマトグラフィー性能に影響します。サンプルの一部が初期の溶媒ピークと共に溶出してしまう場合があります。

| カラム寸法 (内径 × 長さ (mm 単位)) | 2.1×150 | 4.6×150 | 9.4×150 | 21×150 | 30×150 | 50×150 |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| 推奨注入量 [μL] | 2 | 10 | 100 | 500 | 1000 | 2000 |
| 最大注入量 [μL] | 5 | 20 | 200 | 1000 | 2000 | 3000 |

カラム直前に T コネクタを追加することで、この方法での注入が可能です。100 % 有機溶媒に溶解したサンプルを注入する場合は、チャネル B の流量は全流量の 5 % 以上に設定します。チャネル A の水系溶媒を、T コネクタ経由で追加します（図 22 を参照）。

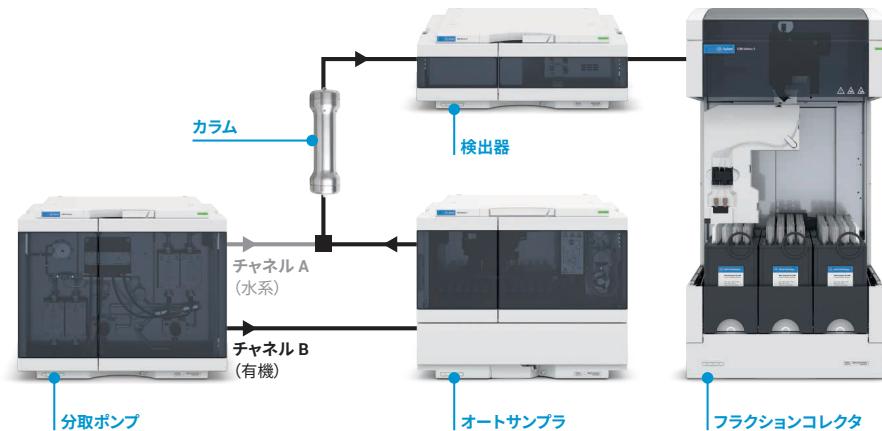
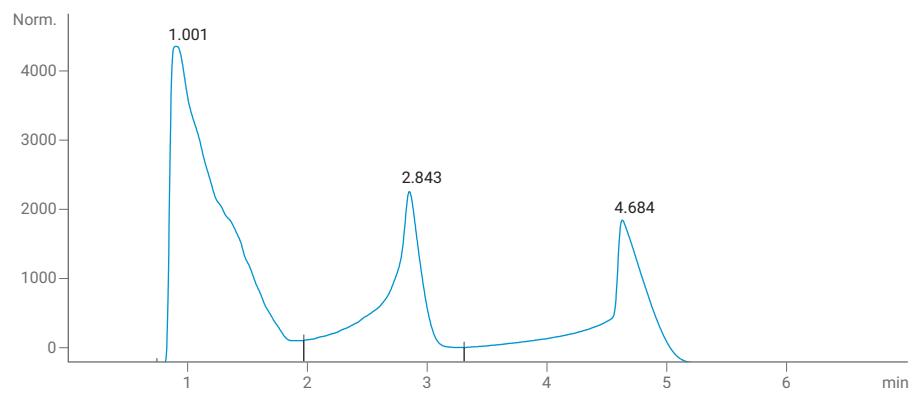


図 22. 有機相注入システム構成の概略図

図 22 のシステムでは、混合ポイント（T コネクタ）とカラム間の距離をできるだけ短くして、サンプルの析出を防ぐことが重要です。

注入後は、サンプルがカラムに移送されてから、サンプル溶媒がカラム外に排出されるまで、移動相組成をイソクラティックホールドすることを推奨します。グラジエント送液が開始され、カラムから化合物が溶出します。この方法で、粘性の高い溶媒に溶解したサンプルを大容量注入した時に発生する圧力変動を抑制することも可能です。サンプル負荷のプロセスがスムーズになり、カラム寿命が長くなります。また分離能を下げずにカラムの負荷量を増やすことが可能です。

図 23 に、強溶媒に溶解したサンプルを標準的な注入方法で大容量注入したクロマトグラムを示します。ピーク形状が歪んでしまい、分取精製時にサンプルの損失の原因となります。有機相注入モードを使用することで、カラム先端で極性化合物の濃縮が行われ、ピーク形状を改善できます（図 24 を参照）。

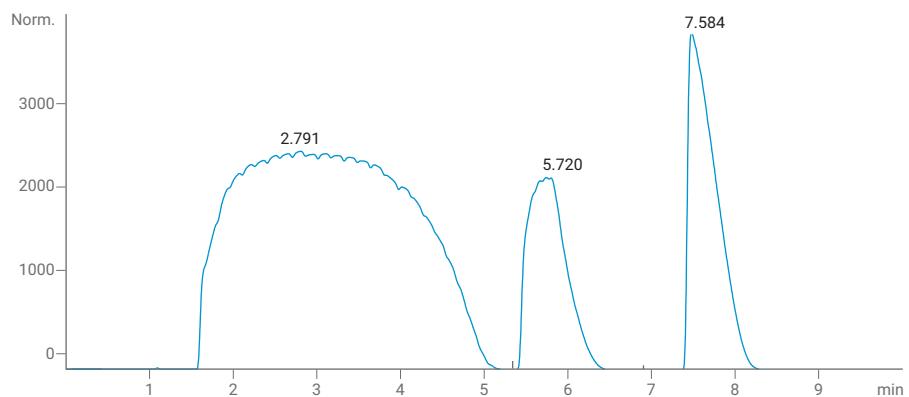


サンプル: 5000 μL の DMSO に 50 mg のアセトアミノフェンと 50 mg のカフェイン
カラム: Agilent ZORBAX SB C18, 21.1 \times 150 mm, 5 μm

標準注入モードで適用されるグラジエントプロファイル:

| 時間 | 流量 | % A | % B |
|-----|----|-----|-----|
| 0 | 37 | 93 | 7 |
| 0.6 | 37 | 93 | 7 |
| 6.0 | 37 | 78 | 22 |
| 6.1 | 37 | 2 | 98 |
| 9.0 | 37 | 2 | 98 |
| 9.1 | 37 | 93 | 7 |
| 14 | 37 | 93 | 7 |

図 23. 標準注入モードでの強溶媒溶解サンプルの大容量注入。2.84 分と 4.68 分のピーク形状が歪んでいます。1.00 分の溶媒ピークに保持されなかったサンプルが共溶出しており、回収率が低下してしまいます。



サンプル: 5000 μL の DMSO に 50 mg のアセトアミノフェンと 50 mg のカフェイン
カラム: Agilent ZORBAX SB C18、21.1 \times 150 mm, 5 μm

有機相注入モードで適用されるグラジエントプロファイル -サンプルをカラムに移送するためにグラジエントが開始されるまでのイソクラティックホールド時間を延ばす必要があります

| 時間 | 流量 | % A | % B |
|------|----|-----|-----|
| 0 | 37 | 93 | 7 |
| 4.0 | 37 | 93 | 7 |
| 10.0 | 37 | 78 | 22 |
| 10.1 | 37 | 2 | 98 |
| 13.0 | 37 | 2 | 98 |
| 13.1 | 37 | 93 | 7 |
| 16.0 | 37 | 93 | 7 |

図 24. 有機相注入を用いた強溶媒溶解サンプルの大容量注入。ブロードな溶媒ピークはカラムから排出された DMSO です。5.72 分と 7.58 分の 2 つの化合物はカラムに保持され、ベースライン分離されています。回収率を大幅に改善することができます

注入ポンプによる大容量注入

水系溶媒中の低濃度サンプル分析では、サンプルループ容量以上に大容量注入が必要な場合があります。この場合は、注入ポンプでサンプルをカラムに負荷します。サンプルキャリーオーバーを防ぐために、サンプルがカラムに移送された後に、注入ポンプ、バルブ、およびすべてのキャピラリー接続をフラッシュすることができます。

注入ポンプを用いた注入は、エナンチオマー分離などのアプリケーションに使用されています。サンプル注入時の流路とサンプル分析時の流路をバルブで切り替えることで、連続分析が可能です。図 25 に、サンプル注入時の流路とサンプル分析時の流路を示します。

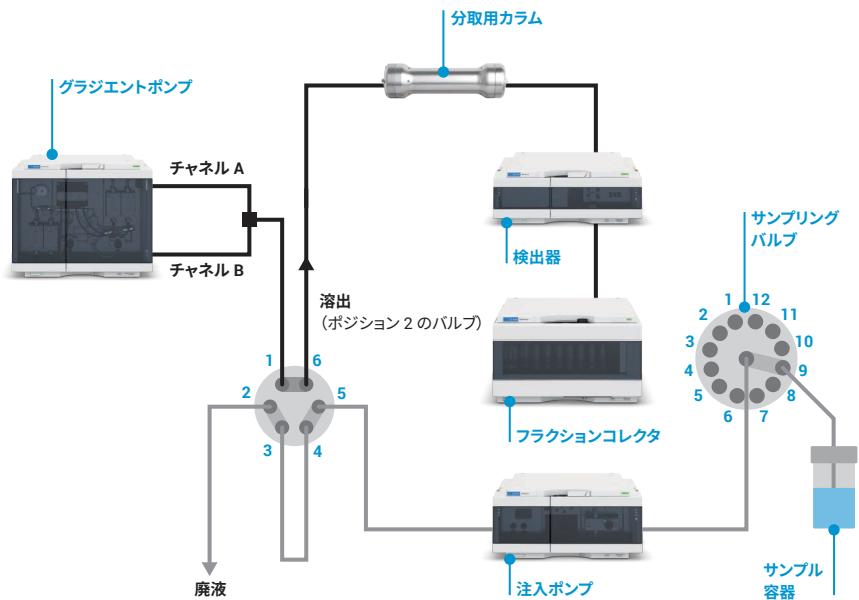
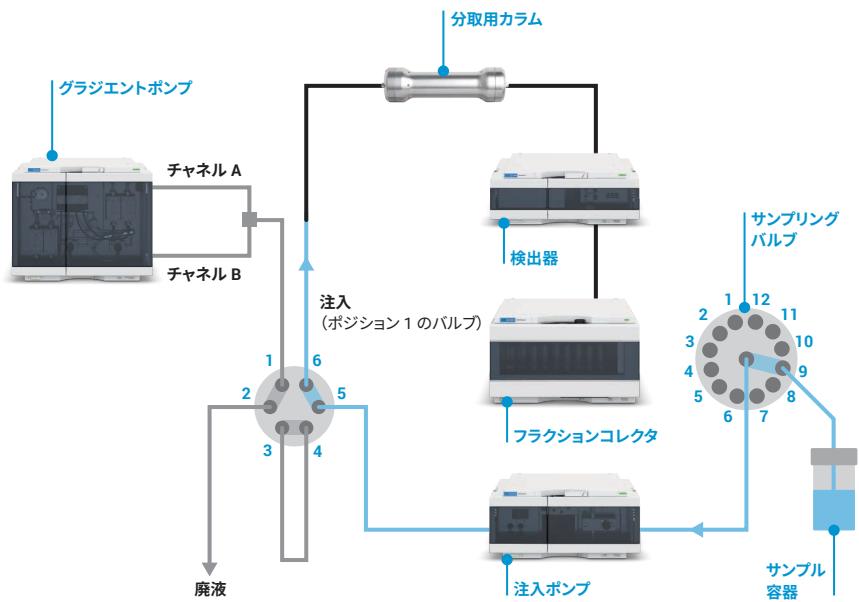


図 25. ポンプによる大容量注入システムの概略図。バルブポジションが 1 の時に、注入ポンプがサンプルを吸引し、カラムに負荷します。バルブポジションが 2 に切り替わり、分離用のメインポンプによりグラジエント送液が開始します。

溶媒選択バルブが搭載されている分取バイナリポンプの場合は、1つのポンプモジュールでサンプル導入と、分離用溶媒送液の両方を行うことができます。溶媒選択バルブを用いることで水系溶媒チャネルの一方を分離用、もう一方をサンプル負荷用に使用することができます（図 26 を参照）。溶媒選択バルブ搭載のポンプにより、サンプル負荷と分離送液に切り替えた時に、流路の重要な部分（バルブアウトレット、ポンプヘッド、およびバルブ、ポンプヘッド、カラム間の接続部分など）を自動的に洗浄することができます。

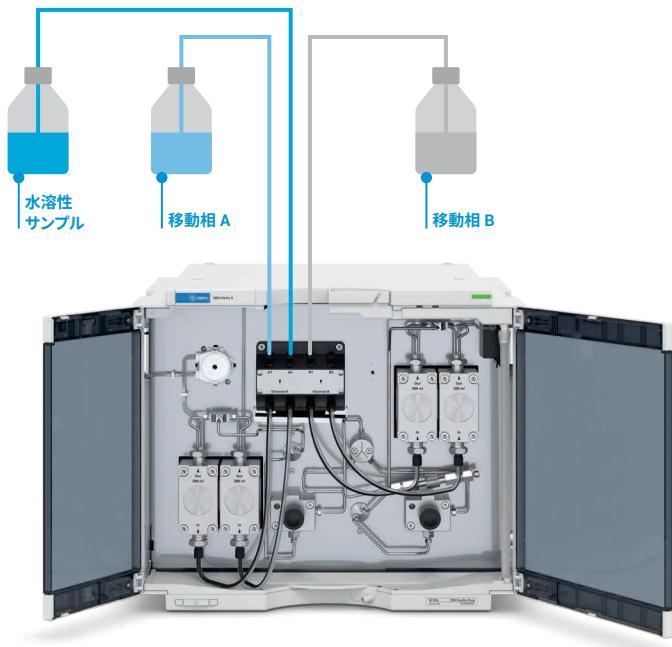


図 26. Agilent 1290 Infinity II 分取バイナリポンプでの溶媒選択バルブによるサンプル負荷と分離送液切り替えの概略図⁵

7.3

フロースプリット

分取 LC で破壊型検出器を使用する場合は、検出器とフラクションコレクタに分岐するためのスプリッタが必要です。検出器のフローセルが高流量に対応していない場合も、仕様内の流量になるよう、流量をスプリットします。スプリットとメーカーアップフローを組み合わせることで、フローの大部分はフラクションコレクタに送り、検出器の感度に合わせたサンプル希釈をメーカーアップフローで行うことができます。スプリット方法を次に示します。

7.3.1 T コネクタを用いたパッシブスプリッタ

T コネクタを用いて、低成本でスプリットする方法です（図 27 を参照）。1 つの T コネクタのみでスプリットします。

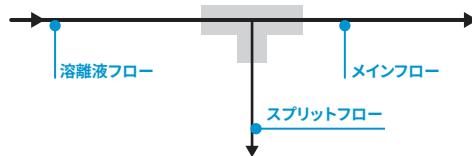


図 27. T コネクタを用いたパッシブスプリッタ – スプリット比は背圧によって変わります。
背圧はアウトレットキャビラリーの寸法によって決まります。

スプリット比は、メインストリームとスプリットストリームの出口での背圧比率によって決まり、アプリケーションのニーズに合わせてマニュアルで調整する必要があります。異なる長さと内径のキャビラリーを用いて背圧比を調整します。

7.3.2 T コネクタを 2 つ用いたパッシブスプリッタ

分取スケールでのマスベース分取において、T コネクタを 1 つ用いたパッシブスプリッタでは、化合物濃度が高過ぎる、またはバッファの濃度が高過ぎるために、質量選択検出器にスプリットフローを直接接続することが適さない場合があります。このような場合は、スプリットフローをメーカーアップ溶媒で希釈する必要があります（図 28 を参照）。メーカーアップ溶媒でエレクトロスプレーイオン化を促進したり、スプリットフローの流速アップと安定化を行えます。

質量選択検出器による分取アプリケーションにはメーカーアップ溶媒が必要です。

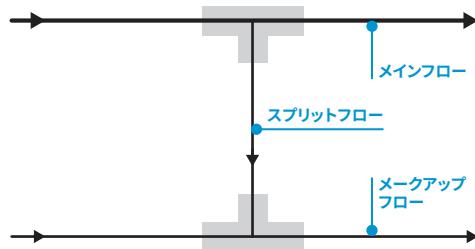


図 28. T コネクタを 2 つ用いたパッシブスプリッターメーカアップ流量が必要な場合に使用。
スプリット比は背圧によって決まります。

T コネクタを 2 つ用いたパッシブスプリッタのスプリット比は複数のパラメータに影響されますが、主にはメイン流量とメーカーアップ流量間の圧力差で決まります。グラジエント分離では、移動相組成の変化とともに粘度も変わるため、スプリット比に影響します。T コネクタによるパッシブスプリッタの場合、使用する流量に合わせて、実験を繰り返してスプリット比を確認、調整する必要があります。さまざまな流量で、さまざまな抵抗管を用いて実験し、圧力差を 6 bar (90 psi) になるように調整します。この圧力スプリッタはグラジエントモードでも機能します。グラジエント送液では、溶媒組成の粘度によってメインフローの圧力が変わります。市販のパッシブスプリッタは、スプリット比に合わせて、さまざまな内径と長さのキャビラリーがプリセットされています。ニードルバルブで圧力比率を調整できるスプリッタもあります。ただし、パッシブスプリッタのスプリット比は推定値であり、実際の値とは異なりますが、T コネクタによるパッシブスプリッタを使用することで、リアルタイムでスプリットを行うことができます。

7.3.3 アクティブスプリッタ

アクティブスプリッタである Agilent 1290 Infinity II MS フローモジュレータ（図 29）により、メインフローから少量を機械的に精度よくスプリットすることができます（図 30 を参照）。



図 29. Agilent 1290 Infinity II MS
フローモジュレータ

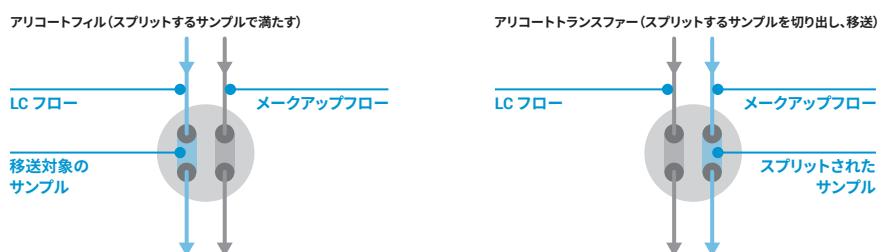


図 30. アクティブスプリッタの概略図。スプリット時のバルブの動作を示しています。

スプリット比はバルブの切り替え周波数、バルブグローブの容量、流量によって変わります（式 1 を参照）。流量によって設定可能なスプリット比をソフトウェアが計算し、適切な周波数とグローブサイズが選択されます。

$$\text{スプリット比} = \frac{\text{LC 流量} [\mu\text{L}/\text{min}] / \text{バルブグローブ容量} [\mu\text{L}]}{\text{切り替え周波数} [\text{Hz}] \times 60}$$

式 1 アクティブスプリッタスプリット比計算。

メーカーアップ流量は、検出器のシグナル感度や、ディレイタイムに影響を与える重要なファクターです。質量選択検出器は高流量で感度が低下します。その他の検出器は 1 mL/min 以上の流量にも対応しています。

フラクションコレクションを実施する時のみスプリッタを稼働させることで、スプリッタ内ローターシールの寿命を延ばすことができます。カラムページや平衡化、および注入サイクルが終わってからスプリッタの動作を開始させることができます。ローターシールの寿命が伸び、点検の頻度を減らすことができます。

7.4 検出

液体クロマトグラフィーの最も一般的な検出タイプは、紫外線 (UV) と可視光の吸収に基づく検出です。固定波長の検出器が最も経済的です。分析スカウティングには、図 31 のようなダイオードアレイ検出器 (diode array detector : DAD) を使用すると安心です。その後の精製プロセスで、採取した UV スペクトル情報を用いて化合物を同定し、ピーク純度を測定し、検出に最適な波長を選択できます。図 32 に、ダイオードアレイ検出器の光学システムを示します。



図 31. Agilent 1260 Infinity II DAD-WR

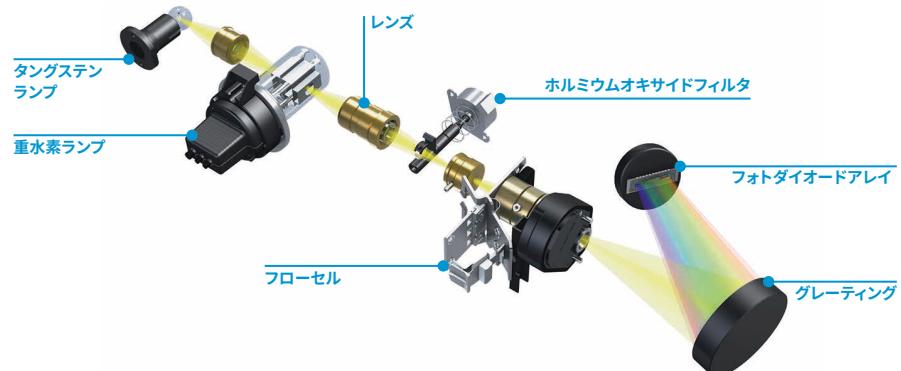


図 32. ダイオードアレイ検出器の光学システムの概略図

ダイオードアレイ検出器は、フルスペクトルの UV および可視領域に対応しています。サンプリング周波数は 240 Hz と高速で、感度の低下もありません。ほとんどの分取アプリケーションでは、20 Hz のデータレートで良い結果を得ることができます。対象化合物のスペクトルがまったく異なる場合は、ダイオードアレイ検出器で広いバンド幅を設定すると、1 つのクロマトグラムとしてモニタリングしやすくなります。例えば図 33 のように UV スペクトルが多様な色素は、検出波長を 420 nm、バンド幅を 400 nm に設定して分析できます。この例では、220 ~ 620 nm の連続的なバンドを適用することで、吸収極大が異なる化合物を検出し、1 つのクロマトグラムに表示しています。その一方で、特定の波長の狭いバンド幅を使用して、化合物を選択的に検出することもできます。

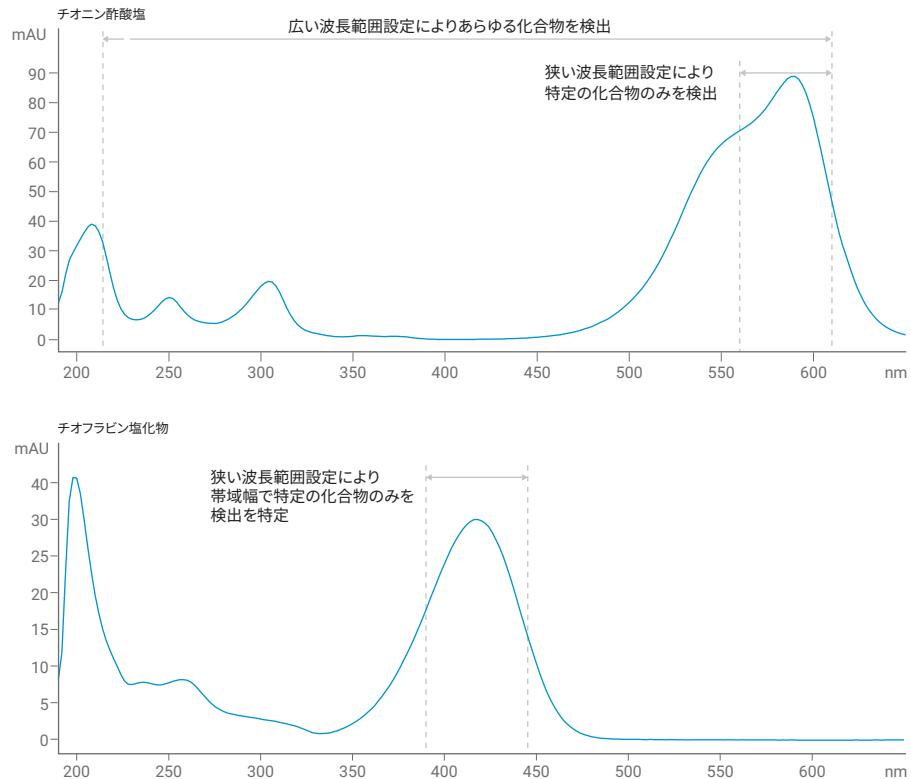


図 33. UV スペクトルが異なる 2 種類の化合物。広いバンド幅を使用してデータを取り込むと、このようなさまざまな化合物を 1 つのクロマトグラムでモニタリングしやすくなります。代わりに狭いバンド幅を使用すると、その中の 1 つの化合物のみを選択的にモニタリングできます。

7.4.1 濃度範囲とダイナミックレンジの一致

サンプル濃度にはばらつきがあり、検出器の光学系に変更が必要となる場合があります。不純物は分析スカウティング中、吸光係数が低い場合でも検出する必要があります。反対に、高純度かつ高負荷で作業する場合は、ターゲット化合物の濃度を高くすることができます。

Lambert-Beer の法則（式 2）によると、感度を左右するパラメータは、フローセルの光路長です。

$$A = \varepsilon_\lambda cd$$

式 2. Lambert-Beer の法則。

| | |
|-----------------------|------------|
| A | 吸光 |
| ε_λ | モル吸光係数 |
| C | 濃度 [mol/L] |
| d | 光路長 [cm] |

分析作業では一般的に、10 mm の光路長が使用されます。ただし一般的に、精製の分析スカウティングでは分析作業よりサンプル濃度が高くなります。このような場合は、まず光路長が 1 ~ 3 mm のフローセルを使ってください。内径 21 mm のカラムには、0.3 mm の光路長を使用します。

大量のサンプルを、高流量により大きい内径のカラムに流すには光路長 0.06 mm のセルの使用を推奨します。

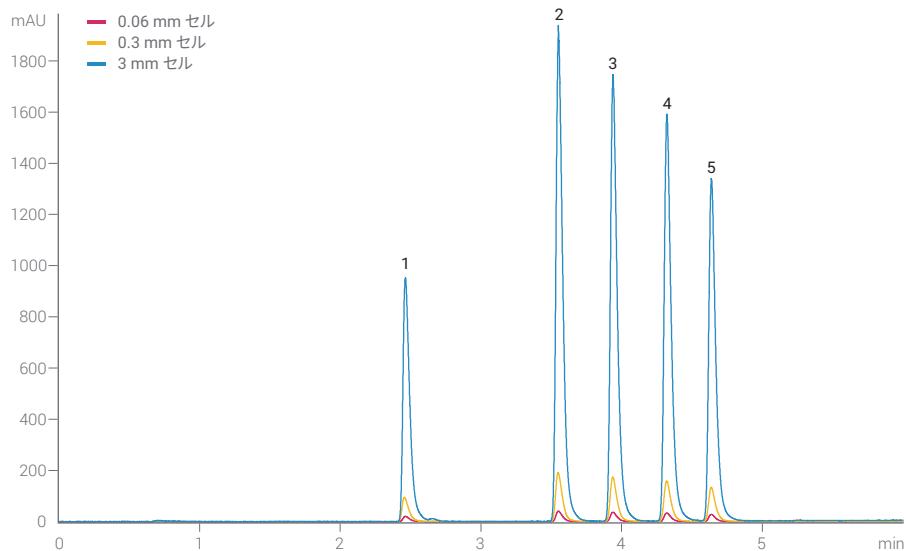


図 34. フローセルの光路長が短いと、ピーク面積が小さくなります。1 カフェイン、2 メチルパラベン、3 エチルパラベン、4 プロピルパラベン、5 ベンジルパラベン

7.5

フラクションコレクション

分析 LC システムと分取 LC システムの違いは、流量やポンプ容量に関係なく、フラクションコレクタの有無によってのみ決まります。手動によるフラクションコレクションではオペレータがコレクションを開始および停止する適切なタイミングを決定します。時間ベースのコレクションでは、特定の時間内のすべての関連するフラクションが捕集されます。この方法は多数のフラクションを捕集し、分析および処理する必要があるため、捕集後の仕事量が増える可能性があります。また、さまざまなピークが同じバイアルに捕集されると、フラクションの純度が下がります。選択的検出器のシグナルに基づいてフラクションコレクションをトリガーすると、処理するフラクション数が減り、ラボの効率が上がります。

7.5.1 手動によるフラクションコレクション

もしサンプルが特別な価値や予期しない挙動を示す場合は、オペレータが個別に対応したほうがよい場合もあります。オペレータはグラフィカルユーザーインターフェースのオンラインシグナルプロットを使用して、1回のクリックでフラクションを制御できます。

7.5.2 時間ベースのフラクションコレクション

シンプルなコレクションモードでは、一定の時間間隔または容量スライスによるタイムベースのフラクションコレクションが実行されます。このモードではフラクションが等間隔に捕集されます（図 36 を参照）。このコレクションモードは、複雑な混合物（植物抽出物からの天然化合物など）を精製する場合によく適用されます。



図 35. Agilent 1290 Infinity II 分取 Open-Bed フラクションコレクタ

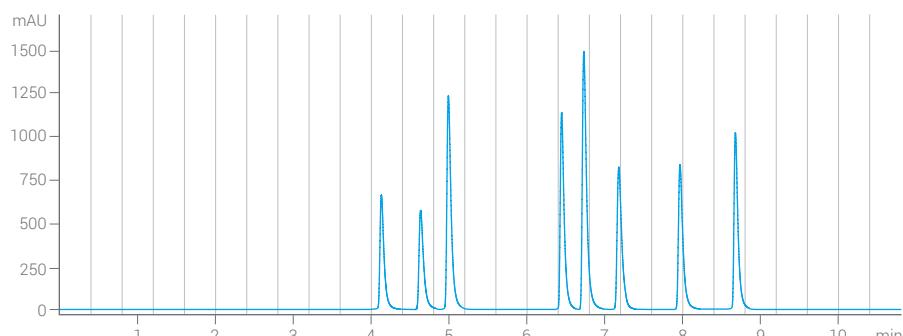


図 36. タイムベースのフラクションコレクション。0.40 分ごとにフラクションが収集されます。

7.5.3 UV 検出に基づくフラクションコレクション

ピークベースのフラクションコレクションの場合、化合物は検出器（UV 検出器や蒸発光散乱検出器など）からのシグナルに基づいて捕集されます。2 つのパラメータ（シグナルスレッショルドとスロープ）を個別にまたは組み合わせて使用して、フラクションコレクションをトリガーできます。次のセクションでは、これらのパラメータをいつ使うか、どのように使うかを説明します。

実際のサンプルを精製する前に、以前に採取した分取クロマトグラムをフラクションプレビューツールに読み込んで、コレクションパラメータを設定できます。このクロマトグラムには、標準化合物が実際のサンプルに近い濃度で含まれる必要があります。クロマトグラムが表示され、フラクションコレクションのパラメータを設定できます（図 37 を参照）。

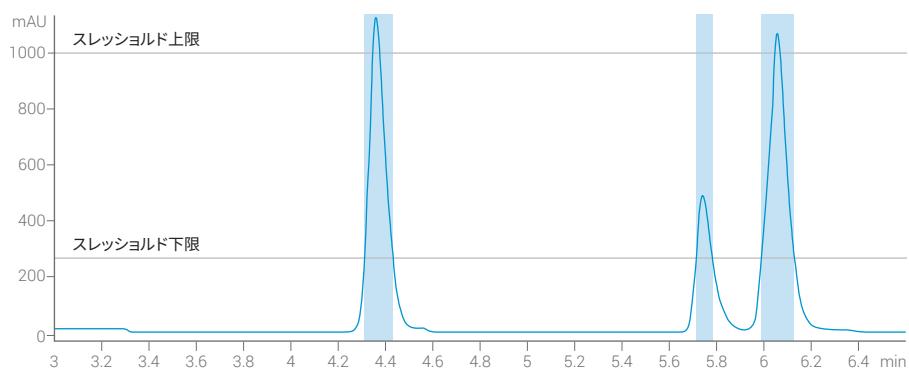


図 37. フラクションプレビューツール – トリガー用のスレッショルドとスロープのパラメータを設定できます。

スレッショルドレベルの設定

シグナル強度が所定のスレッショルドレベルより高くなると、フラクションコレクションが開始されます。シグナルがスレッショルドより低くなると、フラクションコレクションが停止します（図 38 を参照）。

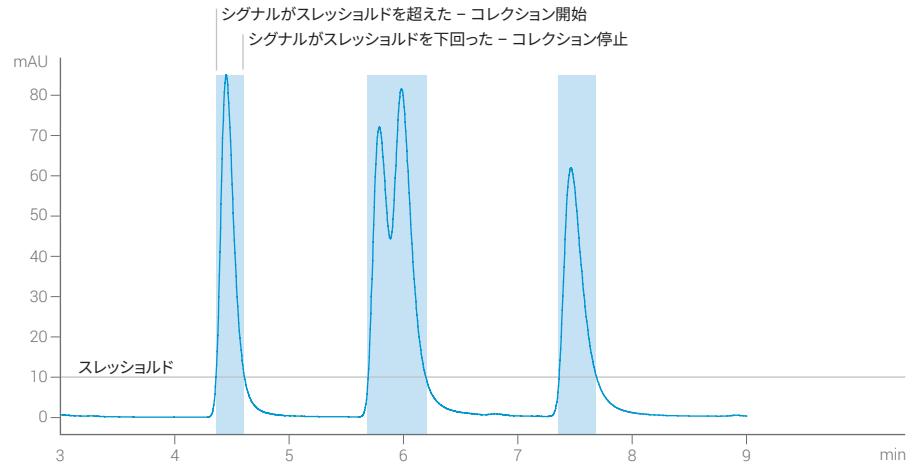


図 38. スレッショルドの設定によってトリガーされたフラクションコレクション

スロープパラメータの設定

クロマトグラフィートレースの傾きは一次微分として計算でき、溶出ピークを示すのに適したパラメータです。ベースラインでは、シグナルのスロープはゼロです。ピークが溶出すると、ピークの最初の変曲点に達するまでは、この一次微分が使用されます。ピークの曲線を頂点と 2 番目の変曲点に沿って動かすと、一次微分が小さくなつて負の値になります。ピークの 2 番目の変曲点の後に、一次微分が開始値に達します（図 39 を参照）。

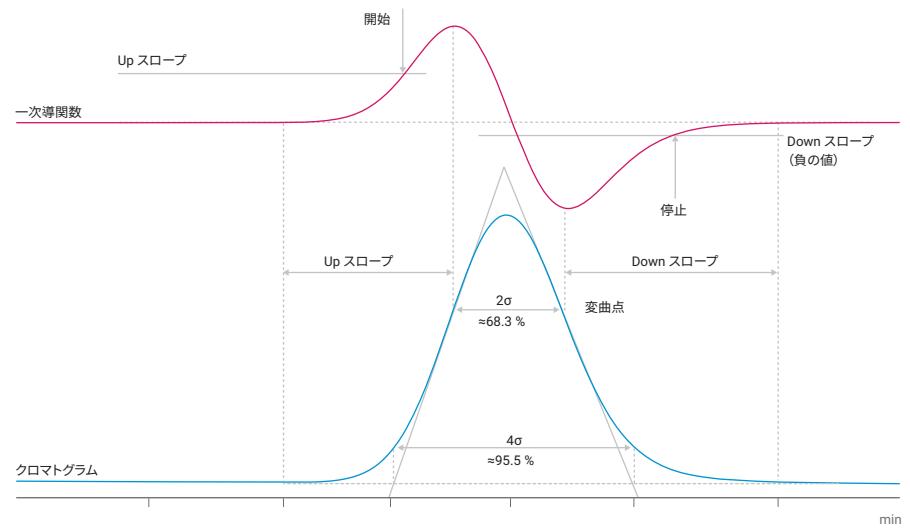


図 39. クロマトグラフィートレースの一次微分を用いた傾きの識別

溶媒グラジエントによるベースラインのゆるやかな上昇（ベースラインドリフト）が見られる場合は、フラクションコレクションのアップスロープとダウンスロープの設定によって、ベースラインがスレッショルドを超えたためにフラクションが開始してしまうことを防ぐことができます。またこれらの設定によって、分離が不十分なピークを分離できます。具体的には、シグナルが所定のスレッショルドより低くならなくても、スロープの下りと上りによって新しいフラクションがトリガーされます（図 40 を参照）。

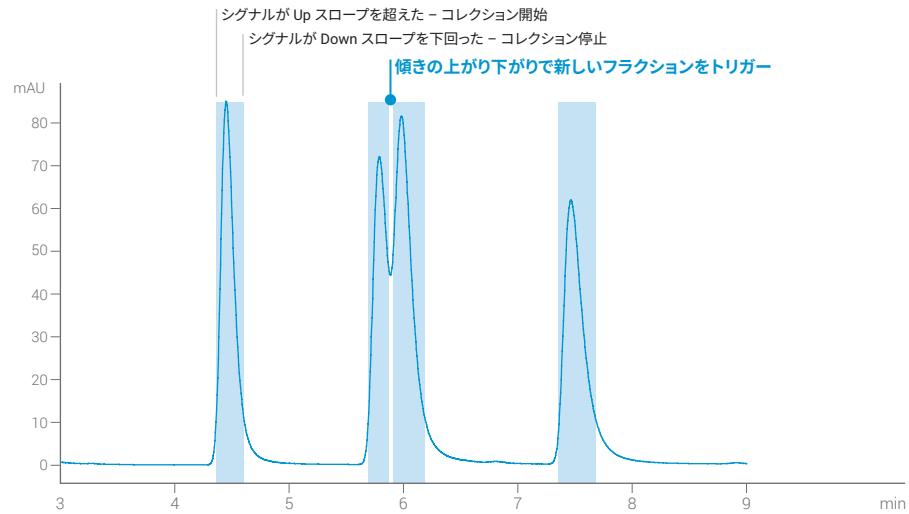


図 40. スロープ設定によってトリガーされたフラクションコレクション

上限スレッショルドの設定

試料負荷量や吸光係数が大きいと、検出器のエレクトロニクスが飽和してピークが平らになりますが、シグナルのゆらぎも発生している可能性があります。このようなゆらぎがピークとして認識され、フラクションコレクタのアップスロープとダウンスロープのアルゴリズムによって、フラクションコレクションがトリガーされることがあります。上限スレッショルドの設定によって、このようなトリガーを防止できます。上限スレッショルドを超えるピークの傾きの変化は、フラクションコレクタによって無視されます（図 41 を参照）。通常、上限スレッショルドは飽和が発生する前の最大シグナル強度の約 90 % に設定されます。検出器シグナルが常時飽和限界に達している場合は、短いフローセルで光路長を短くし、ピークベースのフラクションコレクションが行えるように感度を落とすことを推奨します。サンプル注入量を減らすという方法もあります。

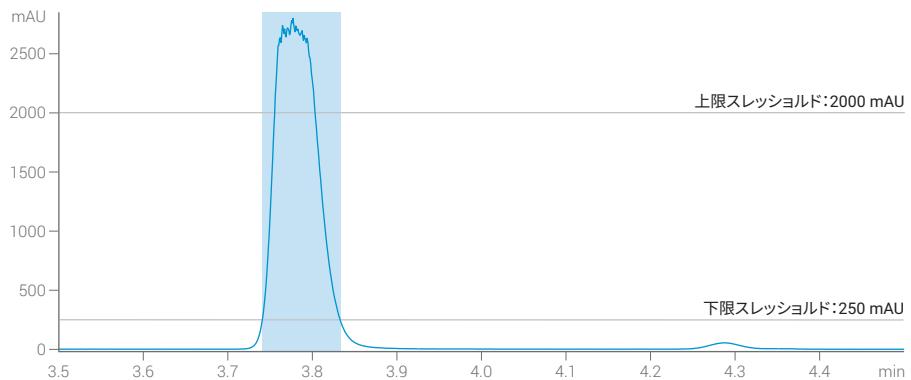


図 41. 上限スレッショルドの設定によって、検出器の飽和が発生しても、検出器のシグナルのゆらぎによるフラクショントリガーを防止できます。

7.5.4 蒸発光散乱検出に基づくフラクションコレクション⁶

ダイオードアレイや他の UV 検出器を用いた検出では、ターゲット化合物が UV や可視光線を吸収することが前提条件となります。ターゲット化合物に発色団構造が含まれない場合は、代わりに蒸発光散乱 (evaporative light scattering : ELS) 検出が使用できます（図 42 を参照）。ELS 検出は UV 検出の補完的手法として有用なことが証明されています。特に、天然物の抽出物、農薬、脂質、油脂、およびその他の脂肪族化合物などの未知の混合物の分析に適しています。質量分析においても、ターゲット化合物のイオン化が困難な場合、あるいは抑制される場合は、ELS 検出を利用できます。

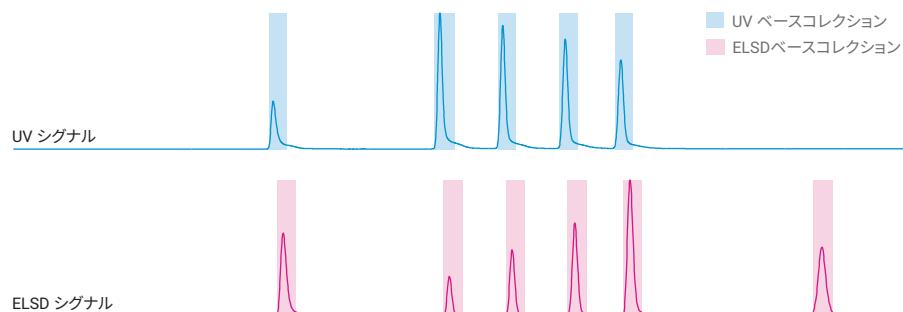


図 42. UV および ELS に基づくフラクションコレクション。コレクションは両方のピーク検出器でトリガーされました。青色の領域は UV 検出器によって捕集されたフラクション、赤色の領域は ELS 検出器によって捕集されたフラクションを示しています。補完的な ELS 検出によってフラクションコレクションがトリガーされなければ、最後の化合物は検出されずに失われていました。

溶離液が蒸発するときに光散乱が起こり、乾燥ガス中では溶質は、残留溶媒とともに粒子や液滴を理想的には形成します。ELS 検出器のダイナミックレンジは、フラクションコレクタと ELS 検出器の間の適切なフロースプリットによって満たされる必要があります（セクション 7.3 「フロースプリット」を参照）。図 43 に、UV 検出器と ELS 検出器を含むシステムの流路を示します。

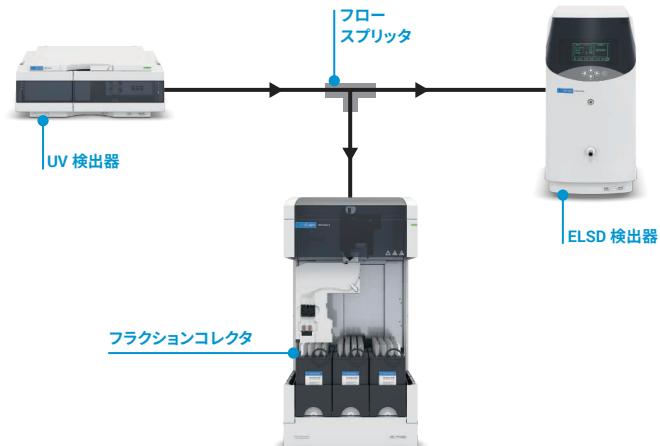


図 43. 補完的検出手法を用いたシンプルな T スプリッタの概略図

7.5.5 フラクションディレイ

ピークベースのフラクションコレクションが有効なシステムでは、検出器シグナルを処理し、溶離液を捕集容器と廃液のどちらに流すかを決定する必要があります（図 44 を参照）。

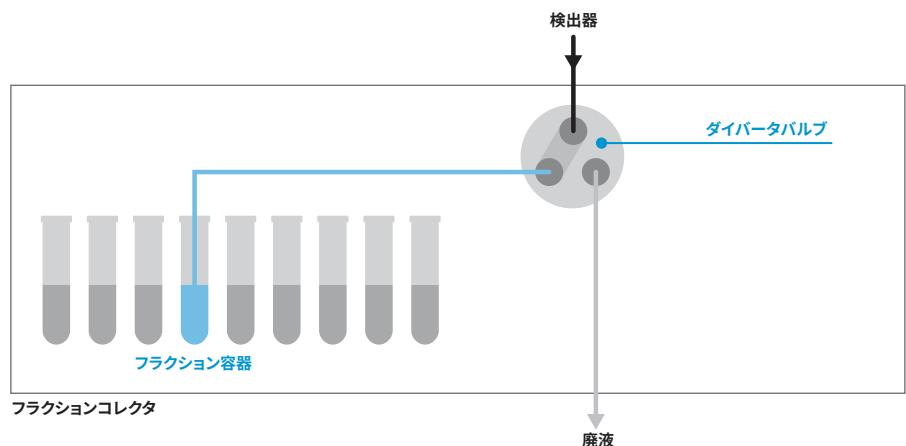


図 44. フラクションコレクタの基本的な稼働部品の概略図

検出器シグナル処理中に、フラクションは、検出器のフローセル出口とフラクションコレクタのダイバータバルブの間のチューブ内を移動します。システムがフラクション容器側にダイバータバルブを切り替えるかどうかを決定するまで、フローセル出口とダイバータバルブ間のチューブには、対象ピークがチューブ内に保持できるだけの十分な容量が必要です。この決定にかかる時間は、検出器のレスポンスタイムによって変わります。ほとんどの UV ベースのシステムでは、検出器とフラクションコレクタの間のディレイボリュームが、シグナル処理に必要な時間より大きくなります。

網状ディレイコイル

質量選択検出器を使用するシステムでは、追加のディレイボリュームが必要になる場合があります。フラクションディレイボリュームを増やすには、検出器のアウトレットとフラクションコレクタのインレットの間のキャピラリーボリュームを増やすだけでは不十分です。テイラーフィルタにより、層流のストレートキャピラリーではピーク形状が著しく悪化します。この結果、検出器応答で得られるフラクションの開始および終了時間が、フラクションコレクタでの実際の開始および終了時間とは異なるものとなり、フラクションのかなりの部分が失われます。

キャピラリー中で放物線状のフロープロファイルになるテイラーフィルタを防ぐには、フローを乱流にする必要があります。このためには網状ディレイコイルを使用します。このコイルは内径が細いためフローが乱流になり、ピーク拡散を最小限に抑えることができます（図 45 を参照）。

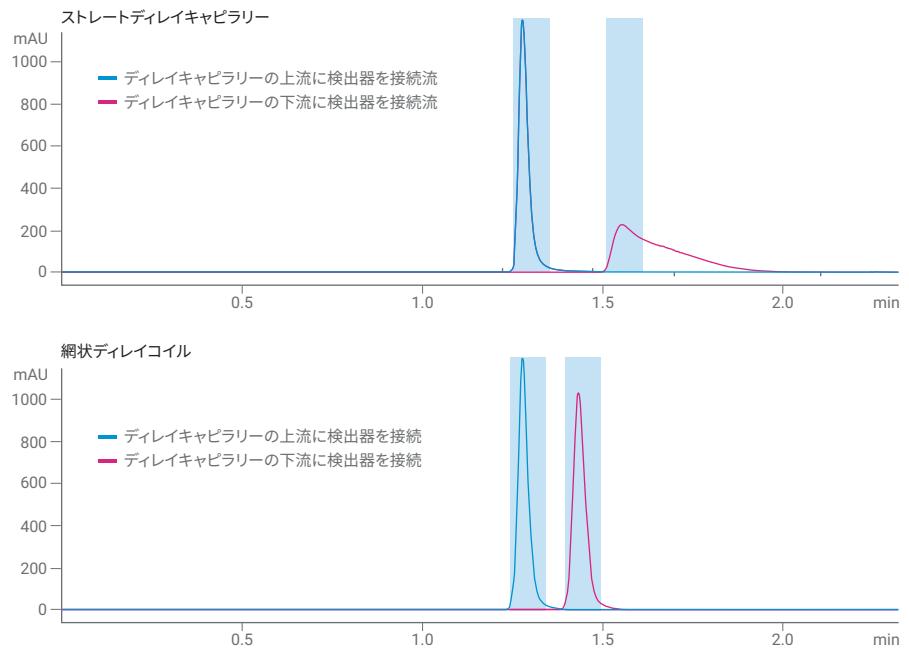


図 45. ストレートディレイキャピラリーと網状ディレイキャピラリーの比較。青色のシグナルは、ディレイキャピラリーの上流の UV 検出器が検出したシグナルを表します。赤色のシグナルはディレイキャピラリーの下流にある 2 番目の UV 検出器で記録したもので、フラクションコレクタに入る化合物を疑似的に示しています。最初の UV 検出器が定義されるフラクショントリガーウィンドウは青色で強調表示され、2 番目の検出器シグナルにもそのまま同じウィンドウが適用されます。ピーク拡散により、ストレートキャピラリーでのサンプル損失は 50 % を超えてしまう可能性があることを示唆しています。

フラクションディレイセンサ

検出器出口とフラクションコレクタのダイバータバルブの間の容量を知るためには、検出とフラクションコレクションの間の正確なディレイを測定する必要があります。ほとんどのシステムで、この容量はキャピラリーの長さに基づいて計算されるか、色素などを利用しての目視によって実験的に測定されます。製造上のばらつきや手作業などの問題があるため、いずれのメソッドも正確ではありません。

検出器のフローセルとダイバータバルブの間の正確なディレイタイムを測定するため、アジレントのフラクションコレクタにはフラクションディレイセンサが搭載されています（図 46 を参照）。このデバイスはキャリプレーションプロセス実行時に、検出器から（ダイバータバルブに隣接する）ディレイセンサまでのピークの移動時間を測定します。

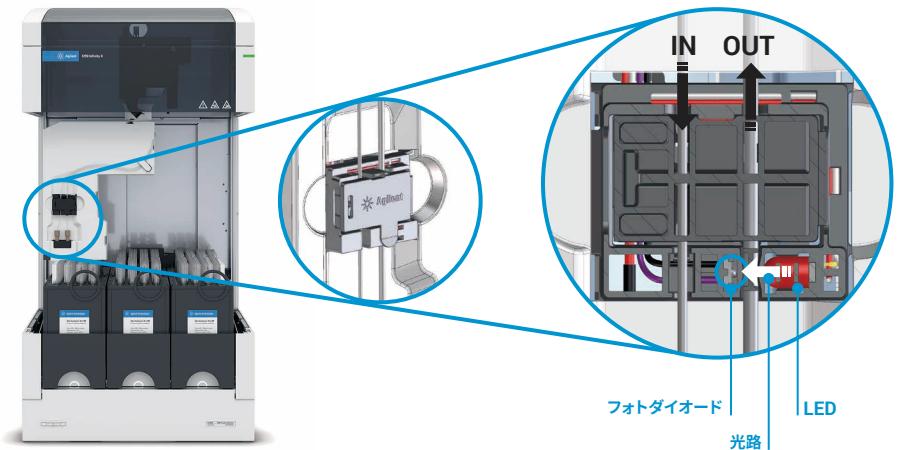


図 46. Agilent 1290 Infinity II 分取 Open-Bed フラクションコレクタのフラクションディレイセンサの位置

測定された時間差は、適用されているポンプ流速からディレイボリュームに変換されます（図 47）を参照）。ディレイボリュームの値はフラクションコレクタのファームウェアに保存され、別の流量の使用時にディレイタイムの計算に使用されます。配管が同じままであれば、ディレイタイムキャリブレーションを繰り返し行う必要はありません。

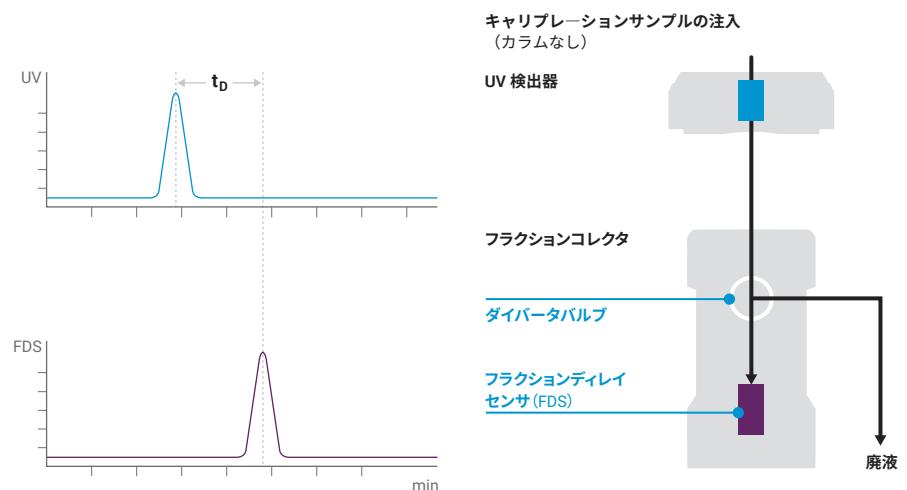


図 47. 検出器とフラクションディレイセンサの間の時間差。キャリプレーションプロセス実行時に、ソフトウェアによってディレイボリュームが自動的に計算されます。

7.5.6 質量選択検出に基づくフラクションコレクション

質量ベースのフラクショントリガーは特異性と選択性があるため、分取精製ワークフローの効率が大幅に向上します。質量選択トリガーを使用すると、捕集されるフラクションの数が大幅に減少します。このため、非選択的な UV ベースのコレクションで 1 日あたりのサンプル数を処理しきれなくなった場合は、このメソッドを使用することを推奨します。捕集した化合物を、迅速かつ明確に特性解析できます。捕集した各フラクションの少量を採取し、これを別の LC/MSD システムで同定する必要はありません。

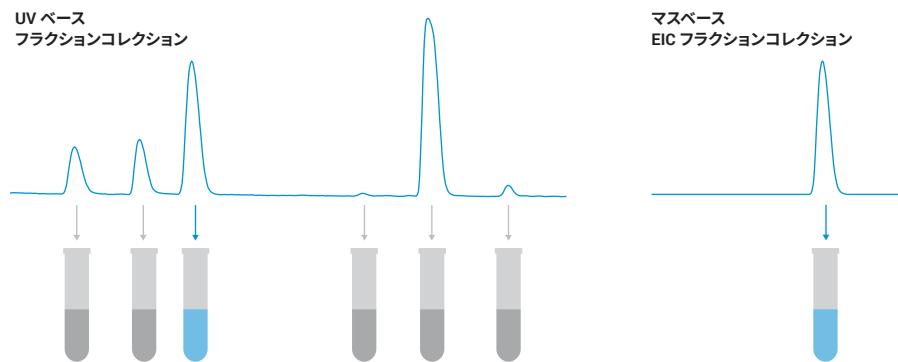


図 48. マスペースの分取精製は選択的メソッドであり、UV ベースのコレクションと比べて捕集されるフラクションの数が少なくなります。

非選択的 UV 検出器と選択的質量検出器のシグナルを組み合わせてフラクションコレクションをトリガーすることが、一般的な方法です。AND論理 を適用することで超高純度を実現できます。この論理では、両方のシグナルで化合物が検出された場合にのみフラクションが捕集されます。メインで使用される UV シグナルは、MSDのシグナルより良好に分離されています。良好に分離されたシグナルを使用してフラクショントリガーを制御すると、捕集されるフラクションの純度が向上します。質量選択検出器シグナルによって選択性が追加されます。

ターゲット化合物の質量は、分析 LC/MSD の結果から入手するか、合成から予測できます。このため、生産性の高い質量選択検出器 (mass selective detector : MSD) でフラクションコレクションをトリガーできます。複数の異性体が異なるタイミングで溶出しない限り、この方法によるフラクション数は限定的、または 1 つになります。フラクション純度の分析とブーリングは非常に容易です。ただし、質量選択検出器でターゲット化合物を検出できるようにするには、クロマトグラフィー条件下でのターゲット化合物のイオン化（図 49）が必要です。トリガーには、（平均ではない）モノアイソトピック質量の使用が不可欠であり、ソフトウェアでは付加体情報を入力が必要です。ターゲットマスと付加イオンの合計が、MS ベースフラクションコレクションのトリガーイオンになります。UV 検出器または ELS 検出器を MSD と組み合わせて使用する場合、それぞれのディレイタイムが検出器シグナルに同期することを考慮する必要があります。アジレントのフラクションコレクタのフラクションディレイセンサでは、このようなさまざまなディレイボリュームを測定でき、最大の純度と回収率を実現できます。

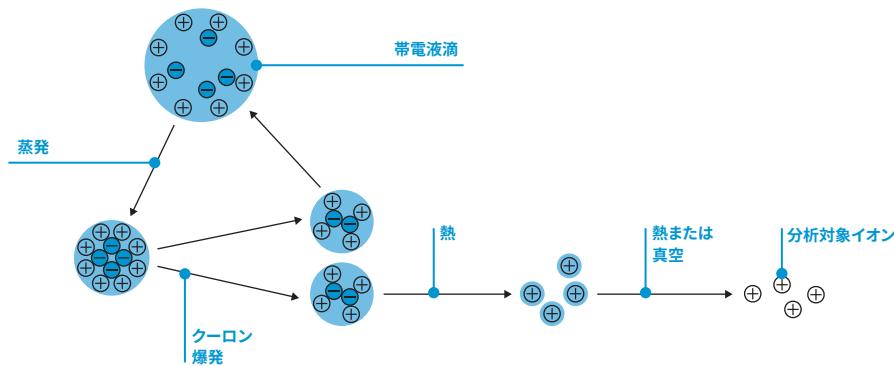


図 49. エレクトロスプレーイオン化プロセス。溶媒の蒸発後、遊離イオンが気相に放出されるまでは、液滴内の電荷密度が上昇します。イオン化プロセスは、気化させる溶離液の量、液滴内のバッファやマトリックス化合物の濃度による影響を受けます。これらの要素がイオン化プロセスを抑制するためです。

図 50 に UV 検出器と質量選択検出器、およびフラクションディレイセンサの間の時間差を示します。MS トリガーのディレイタイムは、キャリプレーションプロセスを経てソフトウェアで計算されます。スプリッタによってメインフローから少量が分岐され、メークアップ溶媒で希釈されます。

メークアップ溶媒の流量が 0.5 mL/min を超える場合は、MSD インレットの前にもう 1 つ T スプリッタが必要な場合があります。高流量では検出器の感度が低下するので、イオン源内の流量をほぼ 0.5 mL/min に維持するためです。イオン化プロセスは、使用するメークアップ溶媒によって異なります。エレクトロスプレーイオン化では、まず 70 % のメタノールまたはアセトニトリル、29.9 % の水、0.1 % のギ酸の混合液を使用することを推奨します。

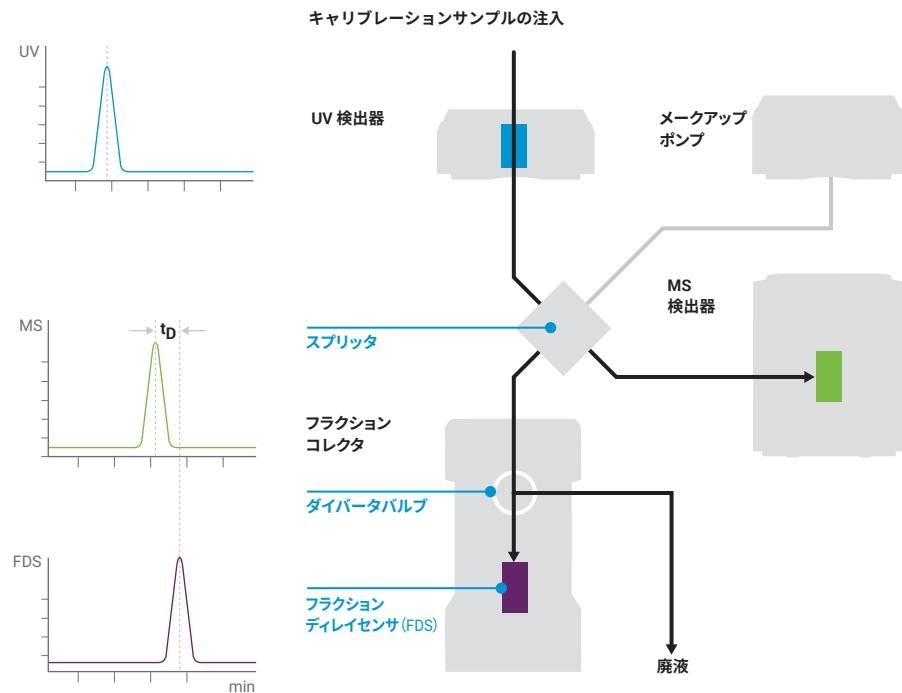


図 50. UV 検出器と MSD 検出器、およびフラクションディレイセンサの間の時間差

負電荷イオンと正電荷イオンのどちらが生成されるかは、分子自身の特性によって決まります。塩基性の化合物はプロトン化しやすいという特性があります。このため、正イオンが生成されることが予想されます。化合物に酸性基が含まれると、脱プロトン化しやすくなります。この場合は、負イオンが生成されることが予想されます。また、使用するバッファの強度がイオン化モードに影響する場合もあります。

低濃度のギ酸と酢酸を使用すれば、どちらのイオン化モードも使用できます。トリフルオロ酢酸(TFA)などの強いモティファイナーを使用すると負イオン化が抑制されるだけでなく、溶質とのイオンペアの形成により、正イオン化も妨げられます。

水やメタノールなどの溶媒でのイオン形成は効率的です。溶媒の極性が低くなるほど、イオン化プロセスの効率も低下します。特にヘキサンや酢酸エチルなどの順相溶媒は、エレクトロスプレーモードでの化合物のイオン化には適していません。ポストカラムメイクアップ溶媒を使用すれば、この状況に対応できます。例えば、イソプロピルアルコールとメタノールの混合液（1:1）にモディファイヤーとして0.1%のギ酸、またはジクロロメタンとメタノールの混合液（1:1）と0.1%のギ酸のモディファイヤーをさまざまな非極性溶媒と混合すると、溶液中で所定のイオンが生成されます。

LC/MSDでは正イオン化モードのみを使用することがまだ一般的ですが、プロトンとの親和性が低い場合、多くの化合物を検出できないというリスクがあります。

イオン化プロセスを最大限に効率化するには、（トリフルオロ酢酸をモディファイヤーとして使用せずに）正負のデュアルイオン化モードを使用することを推奨します。この場合、サンプルに関する信頼性の高い補足情報を得ることができます（図51を参照）。

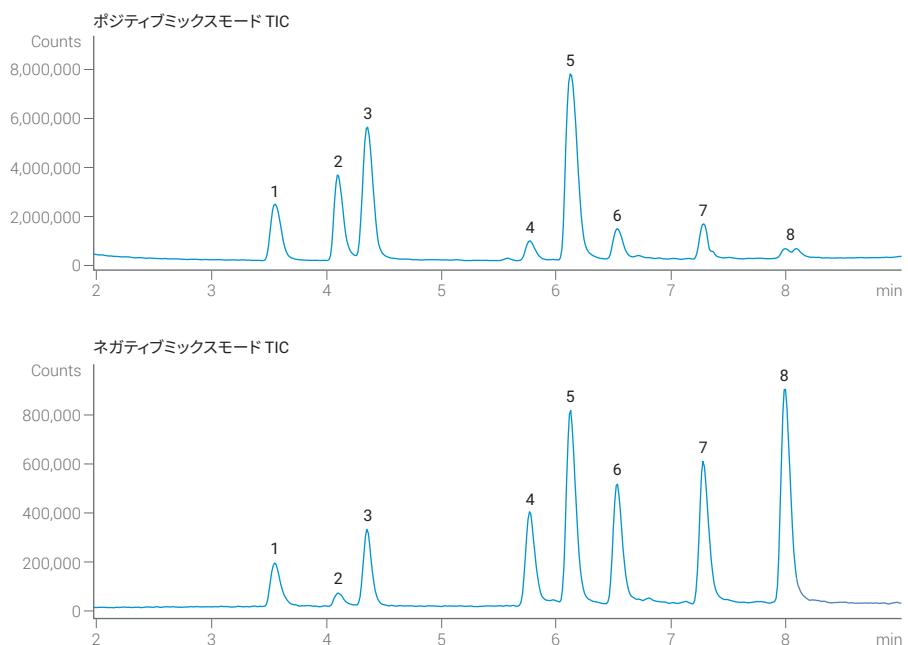


図51. デュアルイオン化モードでは信頼性の高い補足情報を得ることができます。
1 アセトアミノフェン、2 カフェイン、3 スルファメラジン、4 メチルパラベン、5 スルファジメトキシン、
6 エチルパラベン、7 プロビルパラベン、8 ベンジルパラベン

スキャンモードで採取すると、トータルイオンカレント (total ion current : TIC) クロマトグラムが取得されます。TIC クロマトグラムは、ターゲット化合物固有の質量選択的なシグナルではありません。図 52 の 3 番目のピークは、ターゲット化合物であるスルファメラジン ($M = 264 \text{ g/mol}$) を示しています。

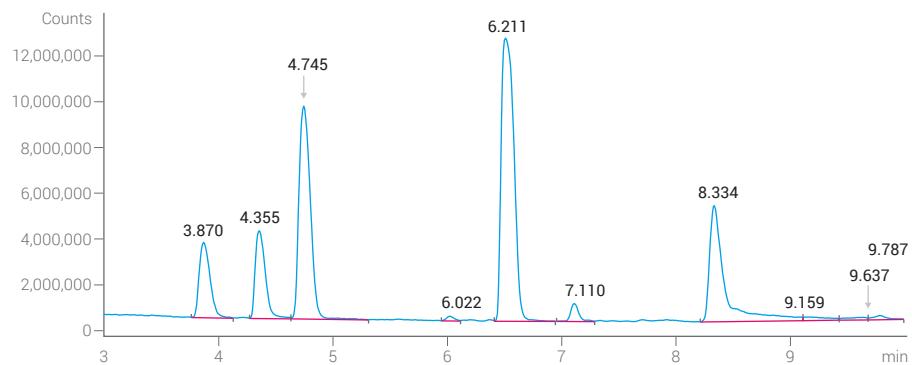


図 52. 化合物固有の情報が取得されていない TIC クロマトグラム

スルファメラジンの分子質量を入力すると、抽出イオンクロマトグラム (extracted ion chromatogram : EIC) がバックグラウンドでリアルタイムに生成されます（図 53 を参照）。データシステムによって選択した付加体（ほとんどの場合はプロトン）が追加され、EIC が $m/z = 265$ でモニタリングされます。フラクションコレクタをトリガーするには、観測されるシグナル強度がこのシグナルのスレッショルドレベルを超える必要があります。

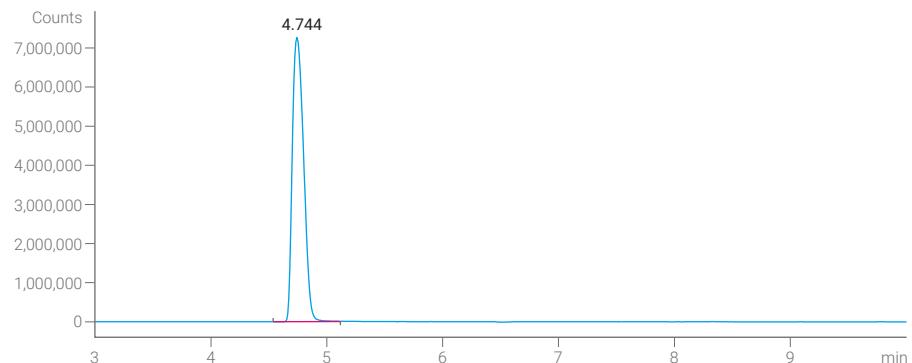


図 53. ターゲット化合物に関して $m/z = 265$ で選択的に抽出されたイオンクロマトグラム

7.5.7 複数検出器の構成によるフラクションコレクション

1つの分取精製システムが複数の検出器で構成される場合は、フラクショントリガーを正しく設定する必要があります。ユニバーサルインターフェースボックスによって、さまざまな検出器からの信号を捉えることができます。1台以上の検出器が溶出ピークを認識すれば、フラクションを捕集できます。このステップでは AND/OR 論理を使用できます。

7.6

リカバリコレクション

分取精製作業の目的は、リテンションタイムによる同定、特定の波長での UV シグナル強度、またはターゲット質量のアバンダンスに基づいて、すべての目的対象化合物を捕集することです。目的対象化合物を捕集できない原因としては、次のような内容が考えられます。

- フラクションコレクションの設定（ターゲット質量、上限、下限スレッショルド）が不適切
- 質量選択検出器でイオン化されない
- ウォークアップ環境などでの不適切なメソッド選択
- 機械的な故障またはソフトウェアのエラー

サンプルが完全に失われるのを防ぐため、一部の精製システムでは、サンプルリカバリーのロケーションやリカバリー専用のフラクションコレクタが捕集用フラクションコレクタの廃液ラインに接続されています（図 55 を参照）。サンプルごとに別々の場所に廃液を収集できるようにするのが理想的です。リカバリー位置はサンプル情報と一緒に報告することが望まれます。そうすることで、捕集したフラクションとサンプルとの関連性を分析者が把握することができます。



図 54. 1290 Infinity II 分取 Open-Bed フラクションコレクタと 1260 Infinity II 分取バルブベースリカバリコレクタ

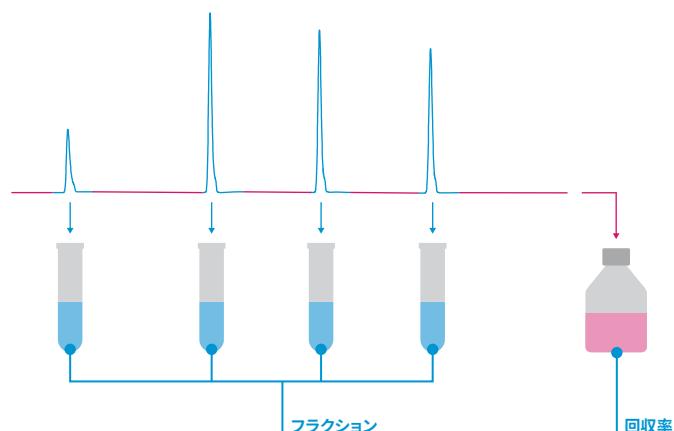


図 55. リカバリコレクション – メインフラクションコレクタで捕集されない溶媒は、リカバリコレクタによって回収されます。

7.7

システムに関する考慮事項

分取精製システムでは、スケール調整することで、幅広いカラムサイズや流量に対応することができます。さまざまなサンプルサイズに柔軟に対応するには、スケーリングが必要です。ただし、スケールアップはチューブの寸法とシステムの内部容量に大きく影響します。この結果、システム内の拡散がクロマトグラフィー性能、およびターゲット化合物の純度と回収率に影響します。分析条件のサイズをスケールアップする場合は、システムデュエルボリュームを考慮する必要があります。

インジェクタのループサイズを増やすと多くの量を注入しやすくなるため、1回の分析で精製できるサンプル量が増えます。内径の大きいキャビラリーを使用すれば、高流量による背圧に対応できます。これら2つのステップによって分析 LC システムを分取作業に適用することは理にかなっています。ただし、このような方法はアプリケーションの分離効率に大きく影響する可能性があります。

7.7.1 システムデュエルボリュームとカラムボイドボリューム⁷

システムボイドボリュームには、流路のボリュームとカラムボイドボリュームが含まれます。デュエルボリュームは、2種類の溶離液の混合ポイントからカラムヘッドまでのボイドボリュームとして定義されています。デュエルボリュームとカラムボイドボリュームの測定方法については、セクション 9.2 「システムのデュエルボリュームの測定」とセクション 9.3 「カラムボイドボリュームの測定」を参照してください。

図 56 に、システムデュエルボリュームがクロマトグラフィー性能に与える影響を示します。デュエルボリュームが小さいシステムでは、早く溶出する化合物の分離度が低くなる可能性があります。この現象は特に大量のサンプルが注入され、注入直後にグラジエントが開始される場合に顕著です。イソクラティックホールドのステップによって、クロマトグラムの最初の部分での分離が改善されます。

デュエルボリュームが大きいシステムでは、保持の大きい化合物の分離度は低くなり、同じ流量では、すべての化合物を溶出させるためのサイクル時間が長くなります。クロマトグラフィー結果分離が悪い場合、改善する唯一の方法は、デュエルボリュームを減らすことです。

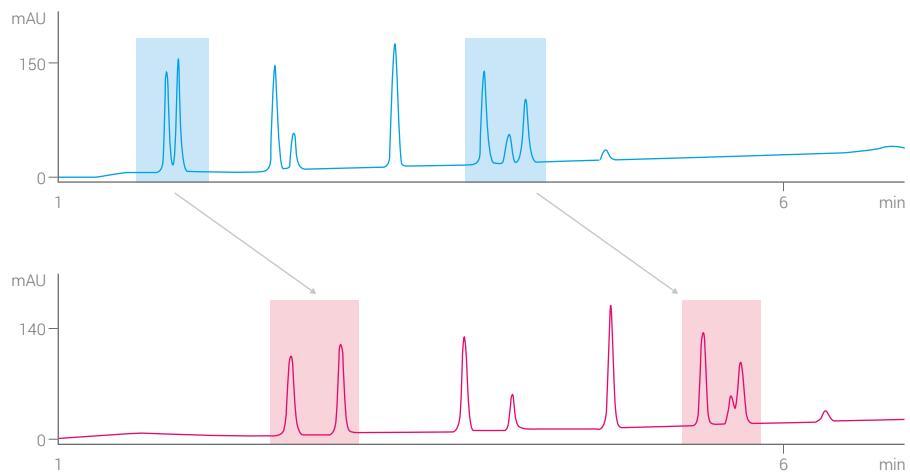


図 56. システムデュエルボリュームが分離効率に与える影響。上のクロマトグラムは、デュエルボリュームが小さいシステムで取得したものです。反対に下のクロマトグラムは、デュエルボリュームが大きいシステムで取得したものです。

最適なシステム設定の条件

適切な構成の分取 LC システムは、内径 4.6 mm のカラムでの分析スカウティングと、内径 50 mm の分取カラムでの精製の両方に使用できます。この場合、グラジエントモードでの作業時に良好な結果を得るには、システムデュエルボリュームをできるだけ小さくする必要があります。

一般的に、デュエルボリュームとカラムボイドボリュームの比率が 1 以下であれば、システム最適化を実現できます。また、適切なクロマトグラフィー性能を得るには、システム全体のボイドボリュームと適用される流量の比率を 2:1 以下にしてください。

比率がこれより大きいとクロマトグラムが長くなり、クロマトグラフィー性能が低下します（図 56 を参照）。キャピラリー、ミキサー、注入ループの容量はデュエルボリュームに大きく影響します。このため、ループサイズをできるだけ小さくするか、分析スケールと分取スケールの作業に 2 種類のループと流路を使用することが重要です。また、適用される流量に適したキャピラリーを使用してシステムボイドボリュームを減らし、ピーク拡散をできるだけ減らす必要があります。一般的なキャピラリー内径、推奨流量の範囲、およびその結果発生する背圧の概要については、表 3 を参照してください。

表 3. さまざまな流量向けに推奨されるステンレスキャピラリーの内径 (*メタノール/水 1:1 の溶媒を用いて背圧を計算)

| 色 | 内径 [インチ] | [mm] | 推奨 流量 [mL/min] | ボイドボリューム [μL/cm] | 最大推奨流量でのメートルあたりの 背圧の計算結果 [bar]* |
|-----|-------------|-------|-------------------|---------------------|------------------------------------|
| 黒 | 0.003 | 0.075 | 0.1~0.5 | 0.044 | 196 |
| 赤 | 0.005 | 0.127 | 0.2~1.5 | 0.127 | 72 |
| 緑 | 0.007 | 0.178 | 0.8~3.0 | 0.249 | 37 |
| グレー | 0.012 | 0.30 | 4~8 | 0.707 | 10 |
| 白 | 0.02 | 0.50 | 15~40 | 2.027 | 8 |
| — | 0.024 | 0.60 | 40~80 | 2.83 | 6 |
| — | 0.037 | 0.94 | 80~200 | 6.94 | 5 |

カラムボイドボリューム

分取カラムを使用すると、カラムボイドボリュームがシステム全体のボイドボリュームに占める割合が大きくなります。カラムボイドボリュームには、充填剤の容量を除いたカラムハウジング内の容量が含まれます（図 57 を参照）。カラム内部の容量だけでなく、粒子の多孔性も考慮する必要があります。Agilent ZORBAX SB-C18 カラムの多孔性係数は 0.53 です。表 4 を参照してください。

再現性の高いリテンションタイムを得るには、カラム平衡化に十分な時間をかけることが必要です。カラムページ後、カラムボイドボリュームの 3 倍にデュエルボリュームの 2 倍を追加した容量でカラム平衡化を実施することを推奨します。適切にページするには、カラムボイドボリュームの 2 倍の容量が必要です。システムデュエルボリュームとカラムボイドボリュームの測定手順については、それぞれセクション 9.2 「システムのデュエルボリュームの測定」およびセクション 9.3 「カラムボイドボリュームの測定」を参照してください。



図 57. カラムボイドボリュームの数学的測定

表 4. Agilent ZORBAX SB-C18 の各種カラムのカラムボイドボリューム。ZORBAX SB-C18 の素材の多孔性は 0.53 です。

| 内径 [mm] | 長さ [mm] | 粒子径 [μm] | 多孔性 | ボイドボリューム [μL] |
|---------|---------|-----------------------|------|----------------------------|
| 2.1 | 50 | 5.0 | 0.53 | 0.092 |
| 3.0 | 50 | 5.0 | 0.53 | 0.187 |
| 4.6 | 50 | 1.8 | 0.53 | 0.440 |
| 4.6 | 50 | 3.5 | 0.53 | 0.440 |
| 4.6 | 50 | 5.0 | 0.53 | 0.440 |
| 4.6 | 100 | 5.0 | 0.53 | 0.881 |
| 4.6 | 150 | 5.0 | 0.53 | 1.321 |
| 9.4 | 50 | 5.0 | 0.53 | 1.839 |
| 21.2 | 50 | 5.0 | 0.53 | 9.354 |
| 21.2 | 100 | 5.0 | 0.53 | 18.708 |
| 21.2 | 150 | 5.0 | 0.53 | 28.063 |

7.7.2 システム通信

Agilent LC システムは通信にコントローラエリアネットワーク (controller area network : CAN) を使用します (図 58 を参照)。分取精製にはピークトリガーや、信号トレースの同時モニタリングが必要であり、それらはワークステーションに大きな負荷をかけます。ダイオードアレイ検出器や質量選択検出器などのデータ量の多いデバイスを使用する場合は、特にこの傾向が顕著です。ウィルススキャンやソフトウェアの更新/ダウンロードなどが、フラクションコレクションプロセスの妨げとなる可能性があります。Agilent CAN 通信は Windows ベースのソフトウェアから独立して動作するため、さまざまなシステムモジュール間での迅速かつ堅牢性の高い直接的な通信が可能です。サンプル分析を一度開始してしまえば、PC とシステム間の接続が中断されてもフラクションコレクションはピークトリガーを行います。また CAN 通信による分取精製システムにより、ポンプで送られる実際の流量に基づいて UV 検出器とフラクションコレクタの間の遅延時間の自動計算が可能です。

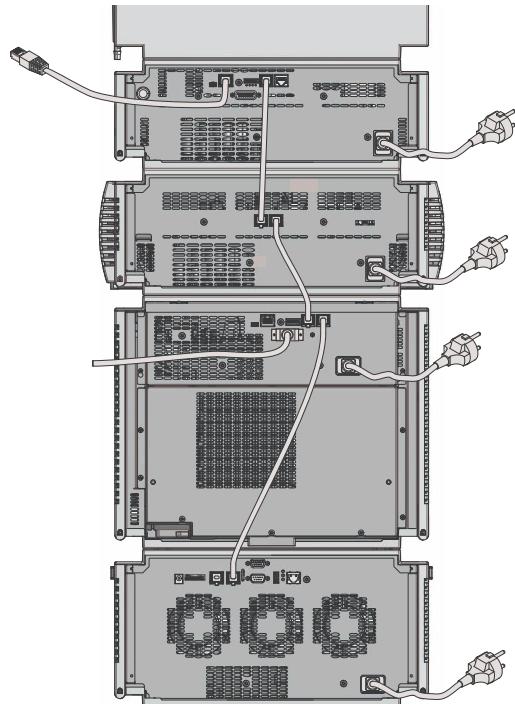


図 58. CAN 通信回線 –
ホストソフトウェアから独立したモジュール間の
高速直接通信が可能です。

7.7.3 安全対策

分取スケール LC 分析は、分析スケールと比較して有機溶媒の使用量がはるかに多いため、潜在的な危険性もずっと大きくなります。リーク発生時は特に注意が必要です。また、フラクションされた容器から揮発性有機溶媒の蒸気が発生するため、ラボ内で事故が発生する危険性が高まります。分取精製システムに適切な安全機能を装備することで、ラボのスタッフや機器に危険が及ぶ状況を回避することができます。システムのリークは、サンプル損失にも繋がります。

各モジュール搭載したリークセンサーがリークを感知すると、ポンプを停止しサンプル分析を中断します（図 59 を参照）。ドレインシステムでリークを排液容器に回収します。溶媒蒸気は、排気ファンで排気ライン（ドラフトなど）に排出します（図 60 を参照してください）。

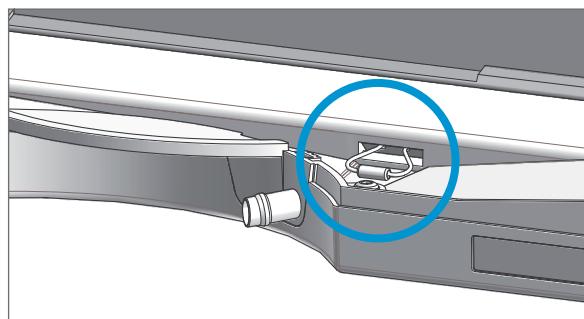


図 59. リークセンサーとリーク処理。ドレインシステムによってリークした溶媒を廃液容器に回収します。

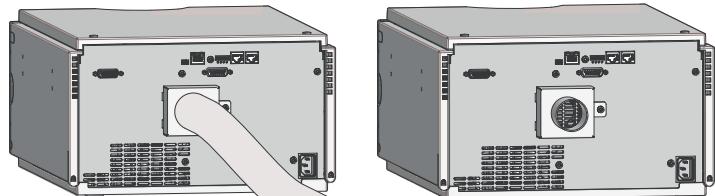


図 60. フレクションコレクタ背面のアダプタにより蒸気を強制排出可能

8 スケールアップの戦略⁸⁻¹⁰

本章では、汎用溶出グラジエントから始めて、4.6 × 150 mm 分析カラムから 21.2 × 150 mm 分取カラムへのスケールアップについて説明します。同じ結合相、pH 条件、粒子サイズ、カラム長が使用された場合のみ、2 つの異なるカラム形状間での適切なスケールアッププロセスが可能になります。

8.1

スケールアップの開始点としての分析クロマトグラフィー

ターゲット化合物の存在や、選択したクロマトグラフィー条件下で他の化合物からターゲット化合物を分離できるかどうかを確認するための最初のステップとして、分析クロマトグラフィーが求められます。一般的に、さまざまな化合物に適応させるためには、有機物含有量が 2 ~ 98 % まで上昇するグラジエントプロファイルが最適です。注入直後のイソクラティックステップの追加により、初期に溶出する化合物が確実に保持されます（特に、DMSO などの溶解性に優れ溶出強度が高い溶媒にサンプルが溶解している場合）。このステップのモニタリングには、UV シグナルまたは質量選択検出器の TIC を使用できます。

長さ 150 mm のカラムには、10 % B/min の汎用グラジエントプロファイルを使用できます。長さ 50 mm のカラムの場合は、可能な限り効率的にするために、グラジエント勾配を 30 % B/min まで増加させることができます。一方、長さ 250 mm のカラムでは、勾配を 6 % B/min に減少させる必要があります。選択したカラムの直径に合わせて適切な流量を使用し、グラジエント勾配の傾斜を変えることによって分離能を向上させることができます。

アジレントのシステムで実施した実験では、4.6 × 150 mm、5 µm カラムを使用した場合、流量 1.5 mL/min で最高の分離能と最大の理論段数が得られることが示されました。この流量の値は、この後のすべてのスケールアップ計算の開始点です。

分取システムへの切り替えには、流量の変更、イソクラティックホールドの追加、グラジエント勾配の変更、注入量と分析時間の調整が必要です。ここでは、分取グラジエントプロファイルは、分析グラジエントプロファイルと同じプロファイルになっています。

図 61 に、分析スカウティング実行時のグラジエントプロファイルを示します。図 62 には、分析システムから、デュエルボリュームと流量の比がより小さい分取システムにメソッドを移行した後のグラジエントプロファイルを示します。イソクラティックホールド時間は、システム間の違いを補完するために適用する必要があります。分析システムから分取システムへのメソッド移行は、セクション 8.2 「分析カラムから分取カラムへのリニアスケールアップの計算式」に記載した式を使用して行いました。

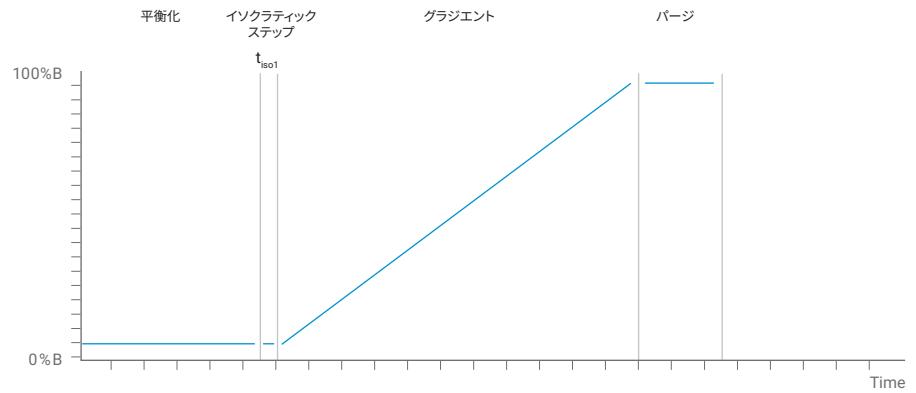


図 61. 内径 4.6 mm のカラムを使用して分析スカウティングを実行するためのグラジエントプロファイル（注入、オプションのイソクラティックホールド、グラジエント勾配、ページの各ステップで構成）

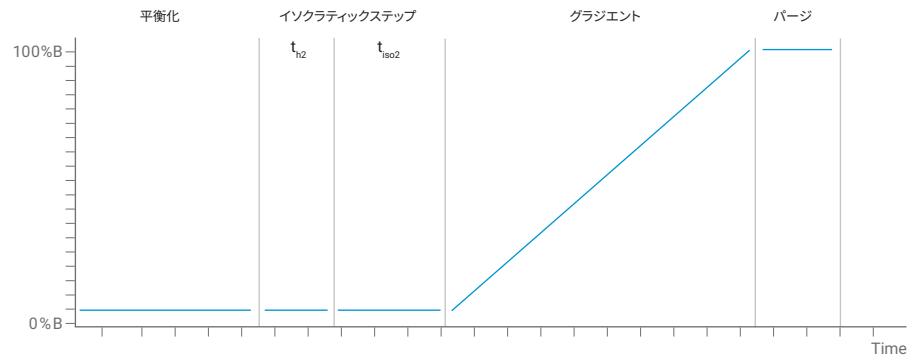


図 62. 内径 21.2 mm カラムへのスケールアップ後のグラジエントプロファイル（分析システムと分取システム間のデュエルボリュームの相違に関して適用流量を補完するためのイソクラティックステップの延長を含む）

8.2

分析カラムから分取カラムへの リニアスケールアップの計算式

流量をスケールアップするには、分析カラムと分取カラム両方の直径と粒子サイズを考慮する必要があります。粒子サイズを一定のままとした場合、内径 4.6 mm カラムでの流量 1.5 mL/min は、内径 21.2 mm のカラムでの流量 31.86 mL/min となります（式 3 を参照）。

$$f_{p,P} = f_{a,A} \frac{d_A^2}{d_P^2} \frac{p_A}{p_P}$$

式 3. 分析から分取へのスケールアップ時の流量の計算

- d_A 分析カラムの直径
- d_P 分取カラムの直径
- $f_{a,A}$ 分析システムの実際の流量
- $f_{a,P}$ 分取システムで提案される流量
- p_A 分析システムのカラム粒子サイズ
- p_P 分取システムのカラム粒子サイズ

初期イソクラティックホールド時間は、分析システムと分取システム間のデュエルボリュームの違いを補完します。さらに、式 4 に沿って条件が満たされる場合は、異なるシステム間でグラジエントを移行できます。

$$\frac{t_{D,A} + t_{I,A}}{t_{c,A}} = \frac{t_{D,P} + t_{I,P}}{t_{c,P}}$$

式 4. グラジエントの移行条件

- $t_{D,A}$ 分析システムのデュエルタイム
- $t_{I,A}$ 分析システムの汎用グラジエントの初期イソクラティックホールド時間
- $t_{c,A}$ 分析システムのカラム通過時間
- $t_{D,P}$ 分取システムのデュエルタイム
- $t_{I,P}$ 分取システムのグラジエントの初期イソクラティックホールド時間
- $t_{c,P}$ 分取システムのカラム通過時間

分取グラジエントのイソクラティックホールド時間は、システムデュエルボリュームとカラムポイドボリュームの1回の測定を基に決められます（式5を参照）。

$$t_{I,P} = \left(\frac{t_{I,A} f_{a,A}}{V_{c,A}} + \frac{V_{D,A}}{V_{c,A}} - \frac{V_{D,P}}{V_{c,P}} \right) \frac{V_{c,P}}{f_{a,P}}$$

式5. イソクラティックホールド時間の計算

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| $f_{a,A}$ | 分析システムの実際の流量 |
| $f_{a,P}$ | 分取システムの実際の流量 |
| $t_{I,A}$ | 分析システムの汎用グラジエントの初期イソクラティックホールド時間 |
| $t_{I,P}$ | 分取システムのフォーカスグラジエントの初期イソクラティックホールド時間 |
| $V_{D,A}$ | 分析システムのデュエルボリューム |
| $V_{c,A}$ | 分析システムのカラムポイドボリューム |
| $V_{D,P}$ | 分取システムのデュエルボリューム |
| $V_{c,P}$ | 分取システムのカラムポイドボリューム |

より大きなボリュームの固定相を含むカラムへのメソッドの移行時は、シンプルな式を使用してカラムへの負荷量または注入量を計算することができます（式6を参照）。

$$V_{inj,P} = V_{inj,A} \frac{d^2_P}{d^2_A} \frac{L_P}{L_A}$$

式6. カラムへの負荷量を求めるためのスケールアップの計算

| | |
|-------------|------------|
| d_A | 分析カラムの直径 |
| d_P | 分取カラムの直径 |
| L_A | 分析カラムの長さ |
| L_P | 分取カラムの長さ |
| $V_{inj,A}$ | 分析システムの注入量 |
| $V_{inj,P}$ | 分取システムの注入量 |

図 63 に、本セクションの式を適用した後のメソッド移行の結果を示します。

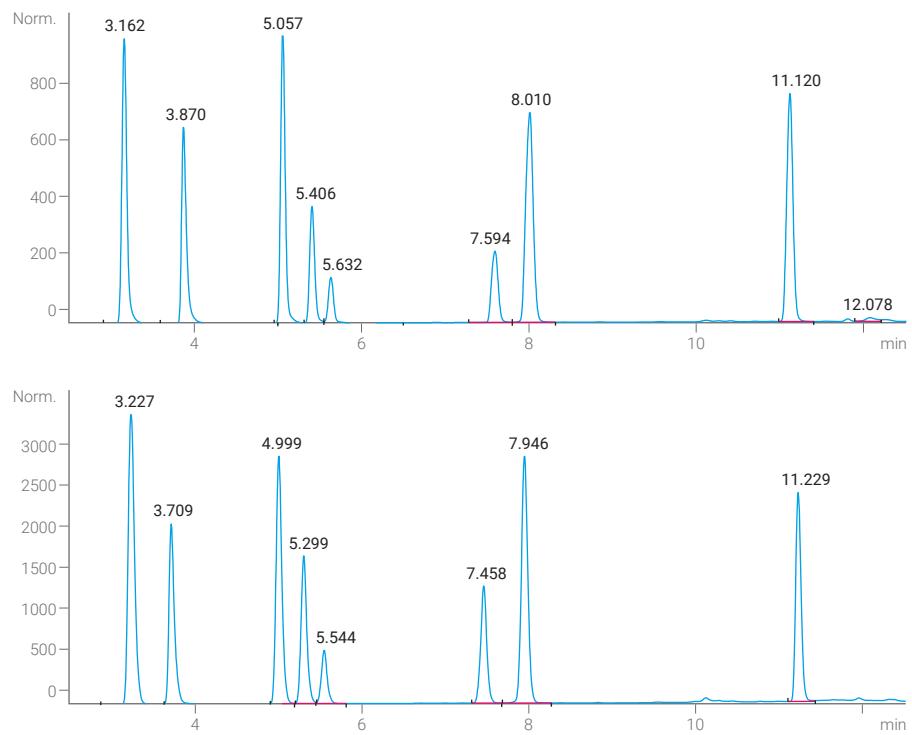


図 63. 4.6 × 150 mm、5 µm 分析カラムから 21.2 × 150 mm、5 µm 分取カラムへのリニアスケールアップの結果。両方のカラムのリテンションタイムが類似しています。上段のクロマトグラム：注入量 500 µL および流量 31.8 mL/min で分析。下段のクロマトグラム：注入量 5 µL および流量 1.5 mL/min で分析

デュエルボリュームを測定した後、スケールアップの式を使用して内径 4.6 のカラムから 21.2 mm のカラムにメソッドを移行します。両方のクロマトグラムですべての化合物でほぼ同等のリテンションタイムとなっています。

8.3

フォーカスグラジェントによる効率の向上¹¹⁻¹⁴

最大効率を得るには、カラムへの負荷量を最大にして、分析時間を最短にする必要があります。しかし、カラムへの負荷量が増大すると、ピーク幅が広くなるため、分離能が低下します。高い負荷量、十分な分離能、この結果としての最大の回収率による高純度フラクションを可能にするには、ターゲット化合物の分離効率をさらに高めることが求められます。

8.3.1 フォーカスグラジェントの概念

隣接するピークのグループ間の分離能は、ターゲットピークにフォーカスした勾配の緩やかなグラジェントプロファイルを使用して増大させることができます。本セクションでは、さまざまなフォーカスグラジェントプロファイルと、これらの作成方法を説明します。

異なる極性の化合物が混合された高濃度サンプル中のすべての化合物の溶解性への考慮が堅牢な分離メソッド構築を行うための重要なポイントになります。フォーカスグラジェントプロファイル中の開始条件はターゲット化合物の極性から導かれます。同時に、ターゲット化合物よりも高い極性を持つすべての化合物が保持される必要があり、可能な限り低い濃度の有機溶媒 B が求められます。サンプル中の最も極性の高い化合物によっては、フォーカスグラジェントの開始条件が変動することがあります（図 64 を参照）。初期のイソクラティックホールドの後、急勾配のグラジェントステップを使用して各ゾーンのフォーカスグラジェントの開始点まで上昇させます。一方、フォーカスグラジェントプロファイルでは勾配を緩めて、ターゲット化合物に接近して溶出する不純物との分離度を向上させることができます。

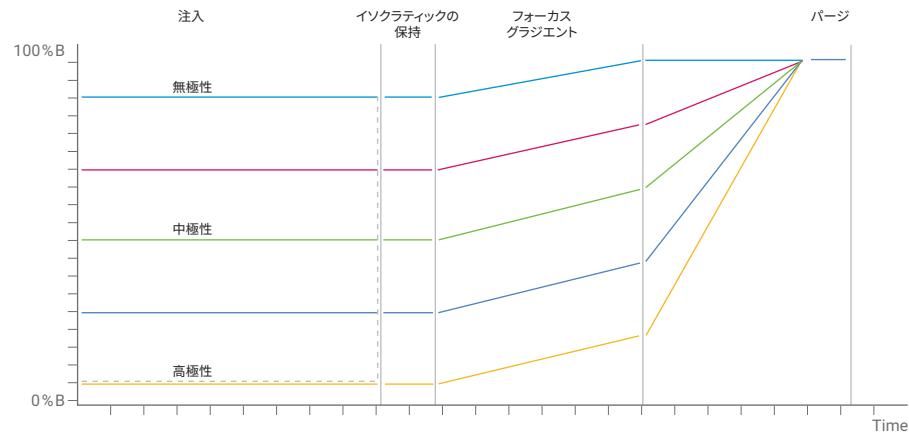


図 64. 異なる極性を持つターゲット化合物のフォーカスグラジェントプロファイル。点線は代わりとなるステップグラジェントプロファイルを表します。

無極性化合物の場合、溶媒 B の割合が大きくなると可溶性が高くなります。溶出ゾーンに適用されるグラジエントプロファイルの初期条件と開始条件を同等にすることで、注入中の沈殿やキャピラーの詰まりのリスクを低減させることができます。サンプルがカラムへ適切に移送された後、勾配の緩やかなグラジエントプロファイルで目的の化合物が溶出されます。これらの化合物の溶出後、カラムは即座に洗浄され、他のすべての化合物が溶出されます。プロセスは分析時間を短縮できるように最適化されています。

8.3.2 フォーカスグラジエントの開発

フォーカスグラジエントの開発プロセスでは、まず 2 ~ 98 % の有機溶媒を使用したリニアグラジエントプロファイルを用いて、分析スカウティングを実行します。分析スカウティングの実行により、ターゲット化合物のリテンションタイムが得られます。システムのデュエルボリュームとカラムデッドボリュームは事前に測定します。スカウティングの結果から、個別のターゲット化合物が溶出するグラジエント条件が計算されます。カラムヘッドでの実際の溶媒組成と、プログラムされた溶媒組成との間のオフセット時間は、ボイドボリュームを流量で除算して計算します。リテンションタイムからオフセット時間を引いたポイントのグラジエント組成から事実上の溶出点が算出されます。この溶出点はピーク検出時の実際の溶媒組成を反映します。

ターゲット成分の事実上の溶出点を計算した後、新たに勾配が緩やかなグラジエントまたはフォーカスグラジエント勾配を適用させます。通常、フォーカスグラジエントステップを事実上の溶出点より 15 % 低いポイントで開始し、計算で求めた溶出点よりも 5 % 高くまで上昇させることで、良好な結果が得られます。より一般的には、新しいグラジエントステップでは、グラジエントの長さの約 75 % に、ターゲット化合物の事実上の溶出点が来るよう計算されます。

勾配は、主にカラムの長さを基に変化します。次のカラム長について、スカウティング流量が 1.5 mL/min の場合の勾配を示します。

- 250 mm カラム = 10 分、勾配 = 2.0 % B/min
- 150 mm カラム = 6 分、勾配 = 3.33 % B/min
- 100 mm カラム = 4 分、勾配 = 5.0 % B/min
- 50 mm カラム = 2 分、勾配 = 10.0 % B/min

この概念では、保持の弱い化合物では、グラジエント開始を有機溶媒比率 2 % にすることから始めます。この場合、各カラムでの最も低い溶出点は 17 % B です。化合物がもっと早く溶出する場合は、ターゲット化合物をより遅く溶出させる別のクロマトグラフィー条件（溶媒組成、pH、結合相）を特定することを推奨します。

8.3.3 自動精製ソフトウェアによってフォーカスグラジエントを作成する シンプルなアプローチ

OpenLab CDS ChemStation Edition と自動精製ソフトウェア¹⁶

Agilent OpenLab CDS は、精製プロセスの完全制御を支援します。このソフトウェアのインターフェースによって、メソッド開発や、精製の分析から分取規模へのスケールアップが簡単になります。時間、ピーク、マスペース（またはその組み合わせ）による分取や、任意の検出器シグナルによるトリガーが可能です。インテリジェントなリアルタイムデータ処理により、正確で高精度なフラクションコレクションを容易に実現します。スケールアップの式を使用してデュエルボリュームを決定した後、内径 4.6 mm のカラムから 21.2 mm のカラムにメソッドを移行できます。両方のクロマトグラムのすべての化合物で同じリテンションタイムが得られます。

Agilent Automated Purification Software (OpenLab CDS ChemStation Edition 用アドオンソフトウェア) を使用すると、分析から分取スケールへの精製メソッドの自動的な移行を容易に実現できます。アドオンによってプロセスステップ間でのデータ転送が自動化され、ワークフローを効率的に遂行できます。アルゴリズムにより、ターゲット化合物ごとのフォーカスグラジエントを即座に計算し、分取スケールの分取精製実行時に非常に高い純度でのフラクションコレクションを実現します。

クリック数回だけで、必要な分析カラムと分取カラムの組み合わせを選択できるとともに、分析結果のアップロードと処理、精製の実行、精製結果の確認が可能です。エキスパートモードでは、すべての機能を使いこなすことができます。また、まれにしか使用しないユーザーの場合は、プリセットメソッドも用意されています。

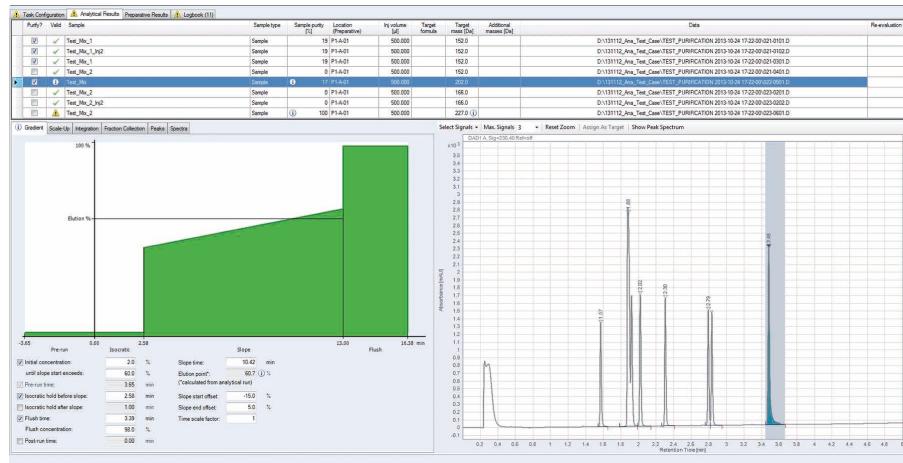


図 65. 分析クロマトグラム中で強調表示された検出ターゲット化合物について計算したグラジェントプロファイル

Automated Purification Software は完全自動化されたワークフローもサポートしています。*.txt または *.csv フォーマットでデータをインポートできます。プログラムにより、分析スカウティングのシケンステーブルを簡単に作成できます。さらに、ターゲット化合物の確認が自動化され、精製ステップ用のフォーカスグラジエントが即座に計算されるため、分離能の最適化と分析時間の大大幅な短縮が可能になります。フラクション結果ブラウザで、収集したフラクションの位置を短時間で明確に表示できます。各収集フラクションの純度は、UV および質量スペクトルデータをブラウザ画面から確認できます。フラクション選択ツールを使用すると、採取したフラクションをリキッドハンドリングシステムで再分析するためのシケンステーブル作成が数回のクリックで行えます。

8.4

スケールアップワークフロー全体の説明¹⁵

精製ワークフローの中で最も重要なステップが、分析カラムサイズからセミ分取または分取カラムサイズへのスケールアッププロセスです。フォーカスグラジエントの開発が負担であったり、スケールアップを検討しなければならないサンプルが多すぎる場合は、汎用グラジエントプロファイルを用いると短時間でのスケールアップが可能です。ただし、最大性能が必須の場合は、フォーカスグラジエントが最良の選択です。

自動化システムを導入して数回のクリックでグラジエント計算を実行することができますが、手動でのスケールアップワークフローはここで説明するスキームに従って実行できます。図 66 に示すように、4 つの異なるステップに要約できます。計算には、ジュネーブ大学のスプレッドシートベースのスケールアップカリキュレータを使用しました。

https://ispsso.unige.ch/labs/fanal/hplc_calculator.en (2019 年 4 月 1 日時点では有効) から無料でダウンロードできます。

| ステップ 1 | ステップ 2 | ステップ 3 | ステップ 4 |
|--------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| pH、移動相、結合相などの正しい分析スカウティング条件の決定 | フォーカスグラジエントの適用による分離能とカラムロードの最適化 | 分析カラムへの最大ロード量の決定 | 分取スケールでの注入およびフラクションコレクションのためのスケールアップ |

図 66. スケールアッププロセスの 4 ステップ

スケールアップ時に基本的な問題となるのは、使用した溶媒でのサンプルの可溶性です。DMSO や DMF などの強力な溶媒は、大半の化合物を溶解し、高濃度の溶液を生成します。しかし、極性化合物の溶液を大量に注入すると、クロマトグラフィーの分離能に悪影響を及ぼす可能性があります。どの溶媒が化合物の溶解に最適であるかについて適切な考え方を知っておくことが有用です。セクション 7.2.3 「特殊な注入手法」を参照してください。

8.4.1 ステップ 1 – 正しい分析スカウティング条件の決定

サンプルから最初のクロマトグラフィー情報を得るために、一般的な分析容量である 1 ~ 5 μL を、2.1、3.0、または $4.6 \times 50 \text{ mm}$ UHPLC または HPLC カラムに注入することを推奨します。ターゲット化合物の保持係数 k は、2 ~ 9 の値のとします。保持係数が小さすぎると、化合物は保持されません。保持係数が大きすぎる場合は、グラジエントプロファイルのページ段階で化合物が溶出され、ピーク幅が広がりやすくなります。

酸性の溶媒を使用すると、塩基性化合物がプロトン化されます。注入された分子をすべてプロトン化できるほど溶媒の濃度が高い場合、ピークの形状が左右対称になることが予想されます。使用する溶媒の濃度が低すぎる場合、注入サンプルのすべての分子がプロトン化されるわけではありません。多くの場合、この組み合わせはピーク割れやピーク形状不良の原因となります。サンプル溶解時に酸を加えると、この現象を低減することができます。

低 pH 条件下でリテンションと分離能の不良が観察される場合、0.5 % のアンモニアを溶媒として使用し、高 pH 条件に耐性のあるカラム結合相、例えば ZORBAX Extend C18 と組み合わせて、高 pH でサンプルを分析する価値があります。アンモニアは質量ベースの精製ワークフローにおいてエレクトロスプレーイオン化に適していることに留意してください。

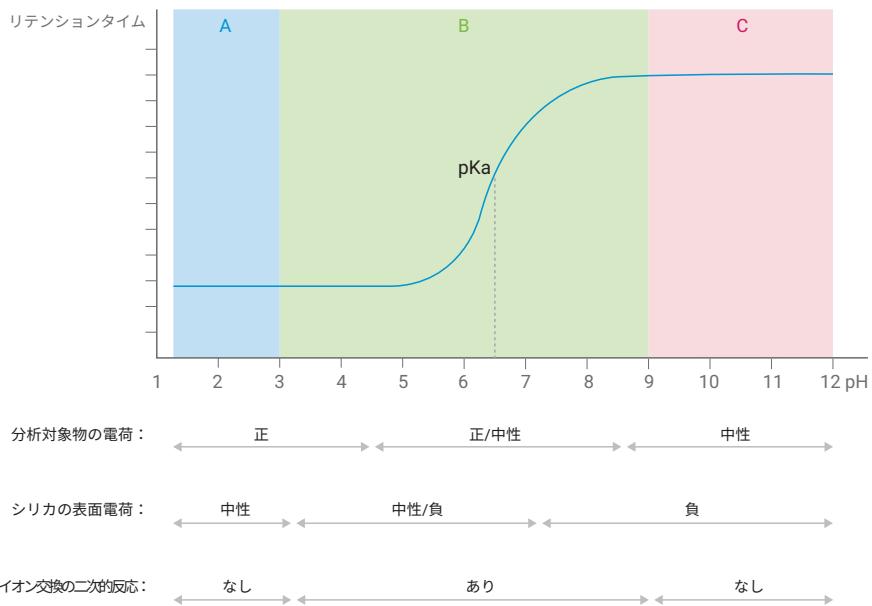


図 67. 異なる pH 範囲ごとに推奨される結合相。ZORBAX SB C18 カラムと ZORBAX Extend C18 カラムにより、それぞれ低 pH および高 pH 条件下で内径 4.6 mm から 21.2 mm へのスケールアップが容易に実現できます。

8.4.2 ステップ 2 – フォーカスグラジェントの適用

第7章「分取LCシステムのコンポーネント」に記載されているように、フォーカスグラジェントは、汎用グラジェントの条件下で達成される純度、負荷量、回収率を上回るサンプル量の場合に有用です。サンプル数の増大に伴い、グラジェントの開発のためのセミ自動化、または可能であれば完全自動化が必要となります。完全自動化の場合、スカウティング分析と分取システムやカラムのサイズに基づいて、ソフトウェアが自動的に分取メソッドを計算します。

8.4.3 ステップ 3 – 最大カラム負荷量の決定

カラム負荷量は、精製の成功に不可欠な要素です。過負荷モードでラングミュアの吸着等温線を超えてカラムを使用すると、分析カラムでフォーカスグラジェントプロファイルを入念に作成しても、分取クロマトグラフでは分離が不十分になってしまう場合があります。DMSOなどの非常に強力な溶媒を注入すると、注入量の過負荷によって、ピーク形状と分離能に非常に重大な影響が生じます。図68に、カラムへの負荷量を分離能の限界まで増大させた調査の結果を示します。

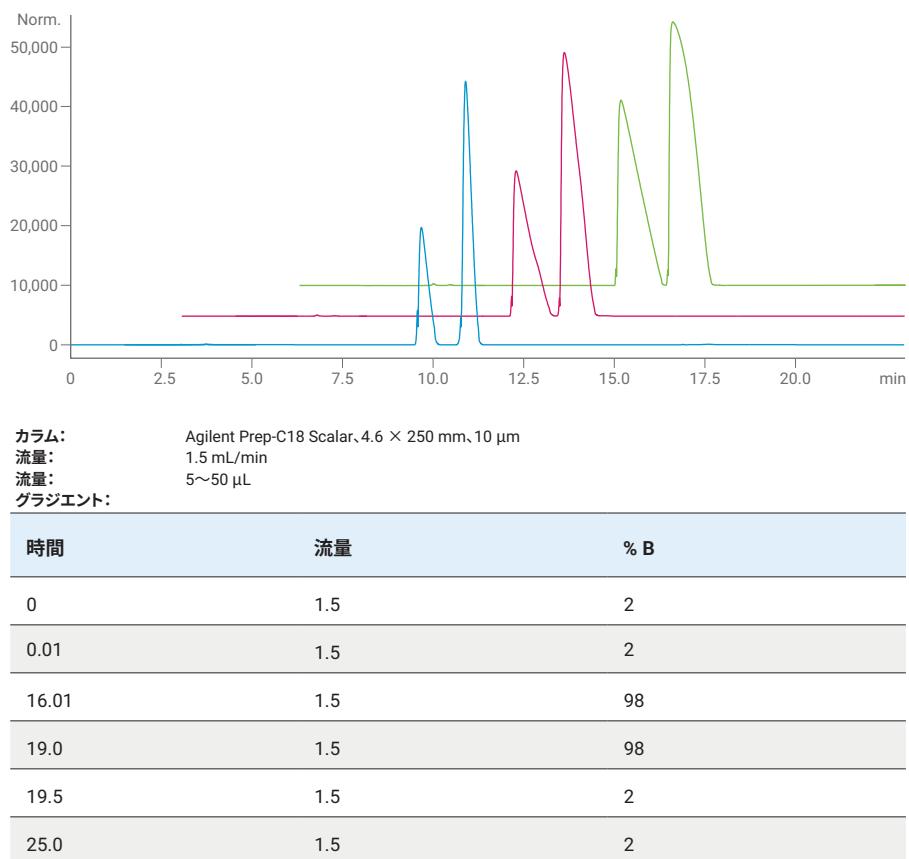


図 68. 負荷調査の結果 - 分離能の限界に達するまでカラムへの負荷量を増大

フォーカスグラジエントを分析カラムに適用するために、注入量を $5 \mu\text{L}$ ずつ增量してカラムへの負荷量の限界値を求めます。 $40 \mu\text{L}$ (18.7 mg) に達したとき、2つの化合物の分離では 1.11 の R_s 分離能がまだ得られています。

内径 50 mm カラムでの精製ステップの最終注入量は、カラムスケールアップの式を使用して計算しました（セクション 8.2「分析カラムから分取カラムへのリニアスケールアップの計算式」を参照）。 $4500 \mu\text{L}$ または 2.11 g の混合物の注入後、内径 50 mm のカラムで同じ分離能が得られます。

8.4.4 ステップ 4 – 分取注入とフラクションコレクションのためのスケールアップ

図 69 に、スケールアップの計算後のクロマトグラムを示します。セクション 8.2「分析カラムから分取カラムへのリニアスケールアップの計算式」の計算式を適用することによって、分取クロマトグラムを的確に予測できます。両方の化合物がベースライン分離され、 95% 以上の純度で収集されました。

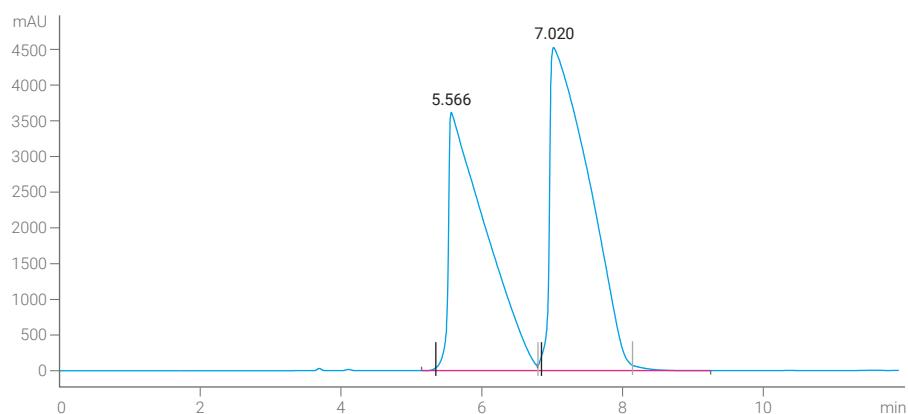


図 69. 分取スケールクロマトグラム。目盛りは収集したフラクションを示しています。内径 4.6 mm の分析カラムでの負荷量の調査から得られた結果を基に、メソッドをスケールアップして内径 50 mm カラムでの流量、グラジエントプロファイル、注入量に適合させています。このクロマトグラムは、 $4500 \mu\text{L}$ が注入された後の 2 つのターゲット化合物の分離を示しています。

9 分取 LC の実践ガイドラインと詳細な手順

本章では、カラムの充填、デュエルボリュームの測定、カラム平衡化、カラムローディングの手順など、分取 LC の実践ガイドラインを示します。

9.1

SAC/DAC カラムの充填手順

以下のステップで SAC/DAC カラムの準備、充填を行います。

1. 充填に必要なカラム容量、カラムの内径と長さに基づいて、適切な量の充填剤を算出して計量します。大半の媒体は、すぐに利用できるように乾燥粉末で提供されます。
2. カラムの容量の計算：

$$V_{col} = \left(\frac{id}{2} \right)^2 \times \pi \times L_{bed}$$

V_{col} カラムの容量

id 内径

π 3.14159265359

L_{bed} 充填ベッドの長さ

3. 必要な充填剤の量の計算：

$$m = V_{col} \times \rho$$

ρ 密度

m 質量

V_{col} カラムの容量

4. 充填剤の密度 (M) の計算：

$$\rho = \frac{m}{V}$$

ρ 密度

m 質量

V 容量

5. 充填溶媒 2 mL に対し乾燥させた充填剤 1 g の比で充填溶媒中に材料を分散させます。充填溶媒は通常、イソプロパノール (IPA) です。媒体が完全に分散し、塊がないようにするために、約 5 分間、充填スラリーを振とうまたはボトルで回転します。すべての HPLC 媒体と同様に、粒子が碎かれ微粒子の生成を招くため、マグネットクスターは使用できません。スラリーを十分に混合することが重要です。固定相の特性（例えば、粒子サイズ、形状、官能基の性質など）には違いがあるため、充填剤メーカーに助言を求めて最適なスラリー溶媒および圧縮圧を決めてください。特定の充填剤でのカラム充填の経験を積むにつれて、充填の状況を調整して結果を最適化できるようになります。これで、充填スラリーを使用するための準備が整いました。
6. 均一で流動性のあるスラリーを、組み立てたカラムに連続的にすばやく注ぎ込みます。
7. カラムの組み立てを完了し、提供された指示書に従って充填ステーションを操作します。100 Å のポアサイズを持つ逆相充填剤には、約 1000 psi の機械圧を推奨します。このため 1500 psi の油圧が必要です。使用するカラムの内径と充填ステーションの組み合わせに対応した適切な比を用いて油圧が設定されていることを確認してください。
8. カラムの充填が完了すると、充填溶媒の流れを止め、ポンプを停止して、カラムを 10 分間静止/平衡化させます。カラムは、クロマトグラフィー溶出に移る準備ができています。必要な場合は、カラムプランジャーを圧縮位置にロックし、SAC モードでカラムを操作できます。
9. これで、充填カラムが準備できました。充填ステーションに取り付けた状態でも使用できます。またはドッキングを外して精製装置で使用することもできます。

ベンチトップ Load & Lock カラム内の 10 μm 逆相シリカ媒体の代表的なカラム効率は 30,000 段数/mです。

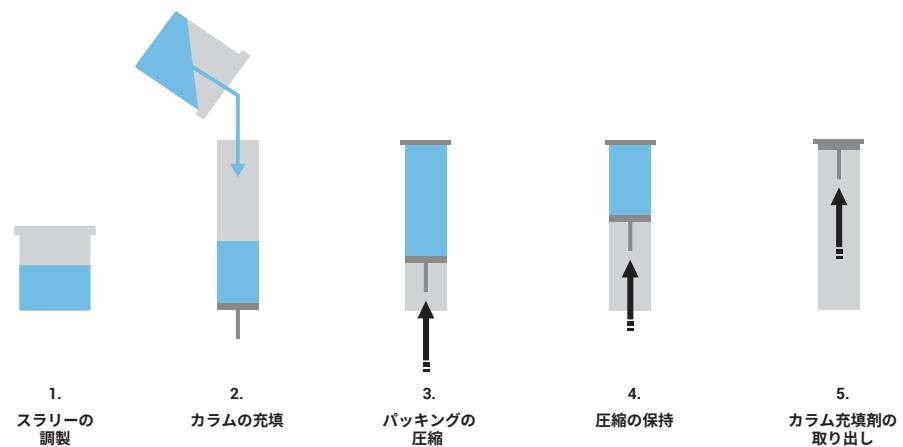


図 70. DAC/SAC カラムの基本的な充填および取り出しの手順

表 5. DAC/SAC カラムの充填時に必要な樹脂量。ポリマーベースのカラムについては、圧力上限を大幅に低くしてください。

| 内径 [mm] | 長さ [mm] | 容量 [mL] | 溶媒の量 [g] (シリカベース $\rho = 0.60 \text{ g/mL}$) | 溶媒の量 [g] (ポリマーベース $\rho = 0.33 \text{ g/mL}$) |
|---------|---------|---------|---|--|
| 27 | 100 | 57.28 | 34.37 | 18.90 |
| | 250 | 143.20 | 85.92 | 47.25 |
| 50 | 100 | 196.43 | 117.86 | 64.82 |
| | 250 | 491.07 | 294.64 | 162.05 |
| 75 | 100 | 441.96 | 265.18 | 145.85 |
| | 250 | 1104.91 | 662.95 | 364.62 |

9.1.1 クロマトグラフィーの理論段数の測定

カラムの充填後、カラムの効率テストが必要となります。カラムにアセトニトリルと水の 80:20 混合溶液を通液し、カラムの寸法に適切な流量で平衡化します。カラムを平衡化するために、カラムボイドボリュームの 4 倍以上、デュエルボリュームの 2 倍以上通液することを推奨します。本書の例では、イソクラティックモードで流量 100 mL/min を使用し、トルエン 1 % のアセトニトリル溶液を 500 μL 注入しています。理論段数は式 7 を用いて算出できます。算出された理論段数は、30,000 段/メートルを超えるはずです。

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

式 7. 理論段数の計算

N 理論段数の数

t_R リテンションタイム

w_h ピーク半値幅 (時間単位)

カラムは DAC モードで圧力を加えた状態で充填ステーションに保持できます。または、SAC モードを用いて充填ステーションから取り外すことができます。ポリマー充填剤を用いる場合は、充填剤の圧力上限内に維持することが重要です。上限を超えると使用不可となってしまいます。この場合、SAC モードが必要です。

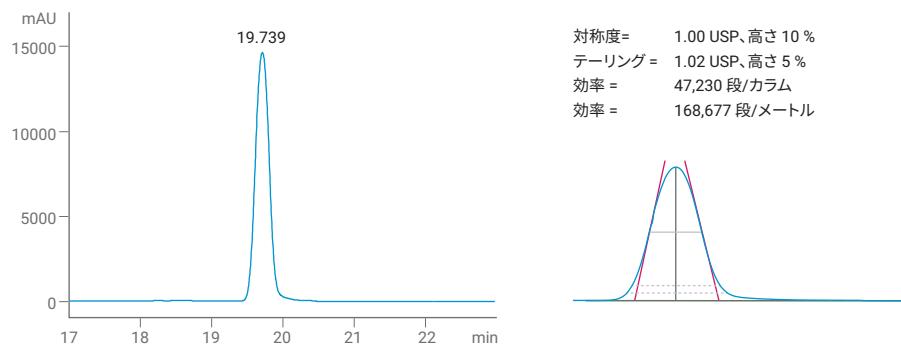


図 71. クロマトグラフィー理論段数を測定するためのトルエン 1 % のアセトニトリル溶液の注入

9.1.2 カラム充填剤の取り出し

カラム充填剤を取り出す前に、IPA を溶媒として使用し、カラムボリュームの 4 倍以上通液することを推奨します。カラムをパッキングスタンドに取り付け、上蓋を取り外します。これで、油圧ピストンを用いてベッドを取り外すことができます。残りの固定相を IPA で洗浄しエバポレーターで乾燥させている間に、汚染されたカラム充填剤を除去することができます。粒子の吸入は有害である可能性があるため、特に注意が必要です。

9.2

システムのデュエルボリュームの測定

システムデュエルボリュームの測定には、2 つの異なるメソッドを利用して行いますが、1 mL/min など非常に正確な分析流量を提供できるシステムであれば、直線グラジエントプロファイルを用いたメソッドの方がステップメソッドよりも正確な結果を得られます。このメソッドは、カラムボイドボリュームの測定にも使用できます。

9.2.1 分析システムのデュエルボリュームの測定

次の手順で、正確な流量を提供できる分析システムのデュエルボリュームを決定します。

1. 溶媒 A (100 % 水) を調製します。
2. 溶媒 B (99 % アセトニトリルとトレーサとして 1 % アセトン) を調製します。
3. システムに溶媒 A と溶媒 B を準備します。
4. 検出波長を 263 nm に設定します。
5. カラムを低デッドボリュームリストリクションキャビラリーに交換します (50 bar の背圧を維持)。
6. 0 ~ 10 分まで、流量 1 mL/min で 5 ~ 95 % B まで上昇させて、直線グラジエントを実行します。
1 mL を超える容量の分取サンプルループを使用する場合は、適切な時間内にデュエルボリュームの測定が終了するように流量を増やす必要があります。適切な妥協案は流量をループサイズと同じに保つことです。
7. 50 % の溶媒組成でのグラジエントでのプログラムした溶出時間と実際の溶出時間の差 (t_{dwell}) を測定します。
8. v_{dwell} は $v_{\text{dwell}} = t_{\text{dwell}} \times f$ から算出できます。

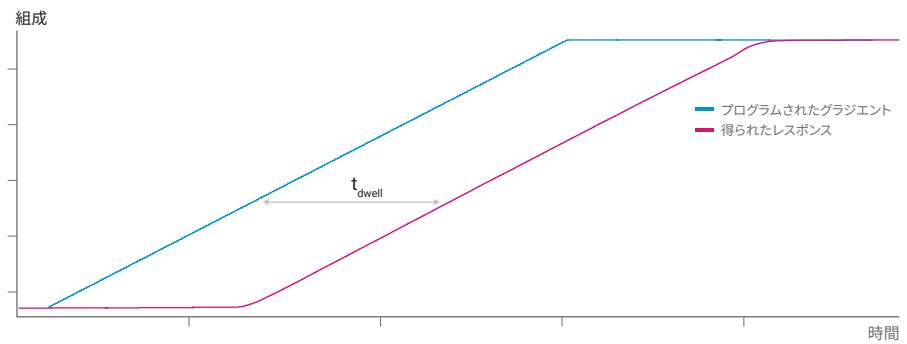


図 72. 分析システムのシステムドゥエルボリュームの測定

9.2.2 分取システムのデュエルボリュームの測定

次のステップグラジエントメソッドを用いて、分取ポンプシステムのデュエルボリュームを測定します。

1. 溶媒 A (100 % 水) を調製します。
2. 溶媒 B (99 % アセトニトリルと 1 % アセトン) を調製します。
3. カラムを内径 0.005 インチ (内径 0.12 mm) × 750 mm リストリクションキャピラリーに置き換えます。
4. 検出波長を 263 nm に設定します。
5. 流量 2 mL/min で、4 分で 10 ~ 90 % B まで上昇させるステップグラジエントを実行します。5 mL を超える容量のサンプルループを使用する場合は、流量を増やす必要があることに留意してください。適切な妥協案は流量をループサイズと同じに保つことです。
6. プログラムされたグラジエントと実際のシグナルカーブの溶媒組成 50 % の位置での時間差 (t_{dwell}) を測定します。
7. V_{dwell} は $V_{dwell} = t_{dwell} \times f$ から算出できます。

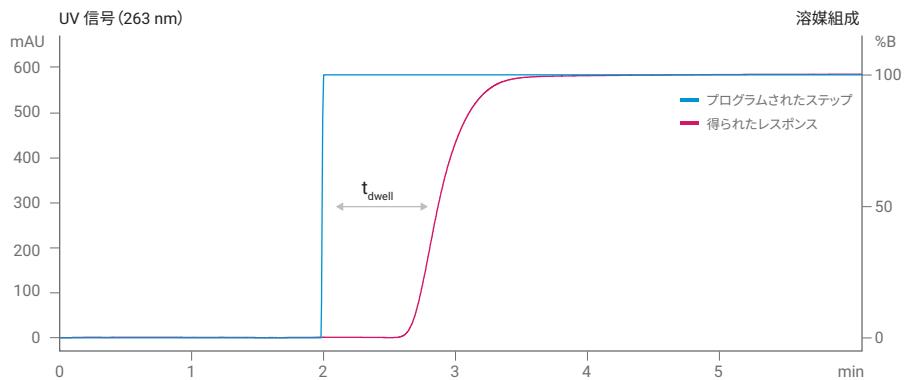


図 73. 分取システムのシステムドゥエルボリュームの測定

9.3

カラムボイドボリュームの測定

カラムボイドボリュームを測定する手順は 2 つあります。1 つは短時間で結果を得られる簡素化された手順です。もう 1 つの手順は、より高度で、より正確な結果を提供します。

9.3.1 カラムボイドボリュームを測定する簡素化された手順

1. 溶媒 A (100 % アセトニトリル) を調製します。
2. 溶媒 B (99 % アセトニトリルとトレーサとして 1 % アセトン) を調製します。
3. システムに溶媒 A と溶媒 B を準備します。
4. 検出波長を 263 nm に設定します。
5. カラムを設置します。
6. ベースラインが安定するまで 95 % A と 5 % B でシステムを平衡化します。
7. 0 ~ 10 分まで、流量 1 mL/min で 5 ~ 95 % B まで上昇させる、直線グラジエントを実行します。

算出した全システムボリューム（サンプルループとカラム）が 3 mL を超える場合は、適切な時間内にデュエルボリュームの測定が終了するように、流量を上げることを推奨します。適切な妥協案は流量を算出したシステムボイドボリュームと同じに保つことです。

8. 50 % 溶媒組成での、プログラムされた溶出時間と実際の溶出時間の差 (t_{dwell}) を測定します。
9. $v_{dwell\ total}$ は $v_{dwell\ total} = t_{dwell\ total} \times f$ から算出できます。
10. カラムを低デッドボリューム リストリクションに交換します (50 bar の背圧を維持)。
11. 0 ~ 10 分まで、流量 1 mL/min で 5 ~ 95 % B まで上昇させて、直線グラジエントを実行します。
12. 50 % 溶媒組成での、プログラムされた溶出時間と実際の溶出時間の差 (t_{dwell}) を測定します。
13. v_{dwell} は $v_{dwell} = t_{dwell} \times f$ から算出できます。
14. $v_{dwell\ total}$ からシステムデュエルボリュームの v_{dwell} を引いてカラムボイドボリュームを算出します。

9.3.2 カラムボイドボリュームを測定する高度な手順

以下に示す溶媒等が、スタンドアローンの分析システムと分取システムの両方に、また分析と分取の複合システムに必要です。

- 溶媒 A：水（ギ酸 0.1 % を添加可能）
- 溶媒 B：アセトニトリル（ギ酸 0.1 % を添加可能）
- ニードルおよびページ洗浄溶液（超音波洗浄器で脱気する）：80 % アセトニトリルまたは他の適切な溶液

マーカー化合物として、アセトニトリルと水の混合溶媒 (75:25) に溶解させたチオ尿素が必要です。その濃度は、使用する UV セルの光路長（感度と等価）を考慮して決定します。検出器シグナルが飽和してしまうことは回避してください。最高のカラム性能と寿命を得るために、サンプルを再生セルロースシリングフィルタ（アジレント部品番号：5190-5108）でろ過してから使用することを推奨します。

後述のカラムボリュームの特性解析は、保持されない化合物（マーカー）として使用したチオ尿素の溶出に基づいています。最初のステップで、カラムをゼロボリュームユニオンと交換し、信頼できる性能を得るために可能な限り低い流量でマーカーを溶出します。このような設定でのリテンションタイムにより、注入部から検出部までの配管のデッドボリュームが得られます。2番目のステップでは、ターゲットカラムを取り付けて75%アセトニトリルで平衡化します。カラムがある場合とない場合のマーカーのリテンションボリューム間の違いから、ターゲットカラムボリュームを求めます。

最高の結果を得るために、可能な場合はスタンドアロン分析 LC システムでカラムボリュームを測定します。次に、スタンドアロン分析システムのカラムボリュームの特性解析の手順を説明します。チオ尿素を用いたカラムボリュームの特性解析は、ZORBAX SB-C18 カラム用に最適化しました。別のカラムタイプでは、溶媒組成の調整、または別のマーカー化合物が必要となる可能性があります。

1. 検出器のフローセルの光路長に合わせて、チオ尿素サンプルを次のいずれかの濃度で準備し、サンプルバイアルをオートサンプラに配置します。
 - 3 mm フローセル : 0.5 mM チオ尿素、75% アセトニトリル溶液
 - 10 mm フローセル : 0.2 mM チオ尿素、75% アセトニトリル溶液
 - 60 mm フローセル : 0.03 mM チオ尿素、75% アセトニトリル溶液
2. 使用する前に再生セルロースのシリジフィルタで、サンプルをろ過します。
3. カラムをゼロデッドユニオンに交換します。
4. 溶媒および洗浄溶液を調製し、溶媒ラインをページします。
 - 溶媒 A : 水 (ギ酸 0.1% を添加可能)
 - 溶媒 B : アセトニトリル (ギ酸 0.1% を添加可能)
 - ニードル洗浄溶液 : 80% アセトニトリルまたは他の適切な溶液
 - 溶媒ラインを新しい溶媒でページ

5. メソッドをセットアップします。
 - すべてのモジュールにおいてストップタイムを無制限に設定（無限の分析時間）
 - 溶媒 B を 75 % に設定
 - タイムテーブルを消去
 - 注入量を 1 μL に設定
 - UV 検出波長を 242 nm、4 nm バンド幅に設定、リファレンスなし
6. 242 nm での UV プロファイルをオンラインプロットに表示します。
7. 2 分間 1 mL/min の流速で、75 % B でシステムを平衡化します。
8. 流量を 0.2 mL/min に設定します（必要に応じて、既知のボリュームのリストリクションキャビラリーを使用して背圧を 15 bar 以上に保ってください。）
9. サンプル情報画面を開きます。
 - サンプルバイアルの場所を入力
 - 分析名を入力
 - メソッドを実行
10. マーカーピークが記録された後に分析を終了します。
11. 分析を 2 回繰り返します（合計 3 回分析）
12. ターゲットカラムを設置します。
13. 圧力と UV 吸光度が安定するまで、カラムを平衡化します。
14. 1 分より後にマーカーが溶出するように、0.2 ~ 4 mL/min の範囲で適切な流量を設定します。予測されるカラムボリュームは寸法によるカラムボリュームの約 1/2 倍（つまり、断面積に長さをかけた値）のため、流量が mL 単位でカラムボリュームの約 1/2 倍になるように設定します。例えば、寸法によるボリュームが $4.6 \times 50 \text{ mm}$ のカラムは $(3.14 \times 2.3 \times 2.3 \times 50) / 1000 = 0.83 \text{ mL}$ で、流量は $(1/2 \times 0.83) \text{ mL} / 1 \text{ min} \approx 0.4 \text{ mL/min}$ となります。
15. 注入量を、適用される流量（とカラムボリューム）に適合させます。
 - 流量 0.2 ~ 0.5 mL/min、注入量 1 μL
 - 流量 0.5 ~ 1 mL/min、注入量 2 μL
 - 流量 1 ~ 2 mL/min、注入量 5 μL
 - 流量 > 2 mL/min、注入量 10 μL

16. 適用流量と注入量を書き留めます。
17. マーカーピークが検出された後に分析を終了します。
18. 繰り返して一貫性をチェックします。
19. データを評価します。
 - ピークの頂点すべての溶出時間を記録
 - カラムのない場合の溶出ボリュームを算出：
 - カラムのない場合のデータの平均溶出時間を算出
 - 算出した時間に流量を乗算する
 - リストリクションキャピラリーを使用した場合はキャピラリーのボリュームおよび注入量の 1/2 倍の量を減算する
 - 最終カラムボリュームを算出：
 - カラムがある場合の平均溶出時間を算出
 - 算出した時間に流量を乗算する
 - カラムを使用しない溶出ボリュームおよび注入量の 1/2 倍の量を減算する

9.4

カラムの平衡化と流量の最適化

9.4.1 カラムの平衡化とページ

再現性の高いリテンションタイムを得るには、カラム平衡化に十分な時間をかけることが必要です。各カラムページの後にカラムボイドボリュームの 4 倍とデュエルボリュームの 2 倍の平衡化を推奨します。適切なカラムページには、少なくとも 3 倍以上のカラムボイドボリュームが必要です。

9.4.2 流量の最適化

精製システムでの分析スカウティングに適した最適な流量とは何でしょうか。

答えは単純な数値ではなく、むしろ総システムボイドボリュームと流量の比で得られます。経験上、2:1 の比で良好な結果が得られます。つまり、スカウティングに UHPLC システムと内径 2.1 mm のカラムを使用する場合、流量が大幅に減少することがあります。総システムボイドボリューム（カラムを含む）が大きくなるほど、高品質な結果を実現するために必要な流量が増大します。アジレントは、このルールを分析と分取の統合システムで実験的にテストしました。

4.6 × 150 mm 分析カラムを用い、テストサンプルをマニュアルスケールアップシステムに注入しました。トータルシステムボイドボリューム（デュエルおよびカラムボイドボリューム）は約 3 mL です。流量 1 mL/min、有機溶媒 B を 2 から 98 %、10 % B/min のグラジエントで送液を実施しました（図 74 を参照）。流量を 1.5 および 2 mL/min に上げて実験を行いました（図 75 および 図 76 を参照）。

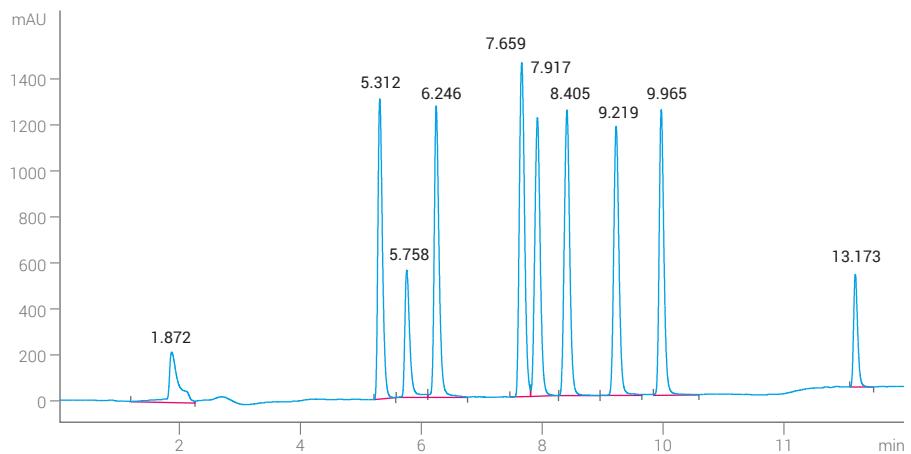


図 74. 最適な流量の決定のための、1 mL/min (4.6 × 150 mm, 5 μm カラム) でのクロマトグラム

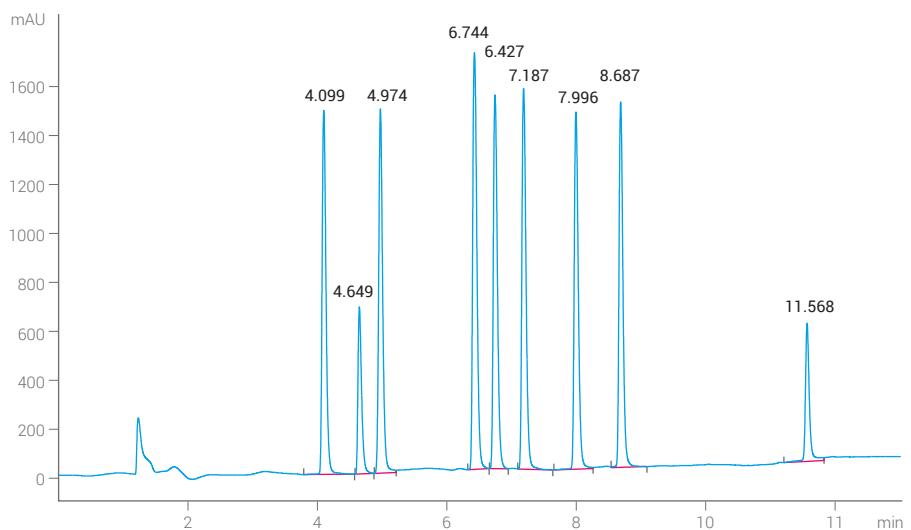


図 75. 最適な流量の決定のための、1.5 mL/min (4.6 × 150 mm, 5 μm カラム) でのクロマトグラム

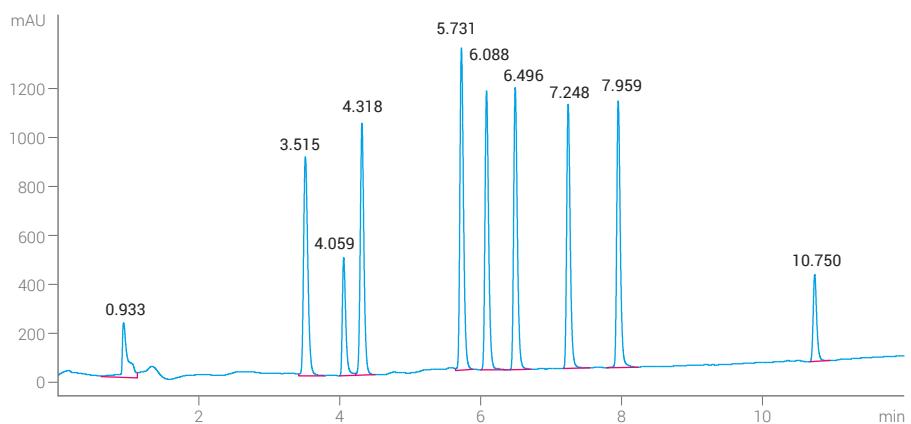


図 76. 最適な流量の決定のための、2.0 mL/min (4.6 × 150 mm, 5 μm カラム) でのクロマトグラム

クロマトグラムの取得後、図 74 の 7.659 分と 7.917 分のピークの間の分離度と理論段数を算出しました。最高の理論段数と分離度は、流量 1.5 mL/min で得られました。表 6 にすべての結果をまとめています。

表 6. クロマトグラフィー分離度、ピーク幅、理論段数。流量 1.5 mL/min が適切であり、本システムで最高の分離度が得られます。

| 流量 [mL/min] | 分離度 (先行ピーク) | 分離度 (後続ピーク) | ピーク幅 | 段数 |
|----------------|----------------|----------------|---------|-------|
| 1.0 | 1.594 | 2.955 | 0.09708 | 36843 |
| 1.5 | 2.943 | 4.108 | 0.06208 | 65792 |
| 2.0 | 2.892 | 4.012 | 0.06292 | 64092 |

分析時間と溶媒消費量の比較

前述の実験における分析時間、溶媒消費量、ピーク幅を比較すると、流量 1.5 mL/min で最高の結果が得られます（表 7 を参照）。1.5 から 2 mL/min への流量の増大により、実行時間はさらに 10.7 % 短縮できましたが、溶媒消費量は 20.3 % 増大しており、好ましくありません。しかし、サンプルスループットのために分析時間の短縮が必要な場合は、溶媒コストの上昇を許容する必要があります。

表 7. 流量の違いが分離度と分析時間に与える影響（測定に使用したシステムから得られた結果に基づく）

| 流量 [mL/min] | ターゲット化合 物の RT [min] | 溶媒 消費量 [mL] | 時間の 短縮 | 溶媒消費量の 上昇 [%] | ピーク幅 | 備考 |
|----------------|------------------------|----------------|-----------|------------------|---------|----------|
| 1.0 | 7.917 | 7.917 | | | 0.09708 | 分離度の低下 |
| 1.5 | 6.744 | 10.116 | 18.1 | 27.77 | 0.06208 | 最高の分離度 |
| 2.0 | 6.088 | 12.170 | 10.7 | 20.3 | 0.06292 | 溶媒消費量の増加 |

9.5

カラム過負荷

高純度化合物が大量に必要な場合、スループット向上の必要性が増大します。この課題に対処するには、複数回の注入または注入 1 回あたりのカラムへの負荷量を増大します。濃度または注入量の過負荷として、カラムの過負荷が生じる可能性があります。濃度の過負荷では、注入量は同一ですが、サンプル濃度が高くなります。注入量の過負荷では、濃度は一定ですが、注入量が増えます。残念なことに、不純物やターゲット化合物の溶解性がクロマトグラフィーの要件に合わないなど、サンプル自体が問題となることがあります。これらの課題に対処するために、さまざまな手段を用いることができます。本セクションでは、注入量の過負荷がピーク形状と分離度にどのように影響を与えるかを解説します。

9.5.1 注入量の過負荷

図 77 に、DMSO に溶解したサンプルを $10 \mu\text{L}$ 注入した後に、 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ カラムで得られたクロマトグラムを示します。すべての化合物が分離度の許容範囲で分離し、良好なピーク形状を示しています。

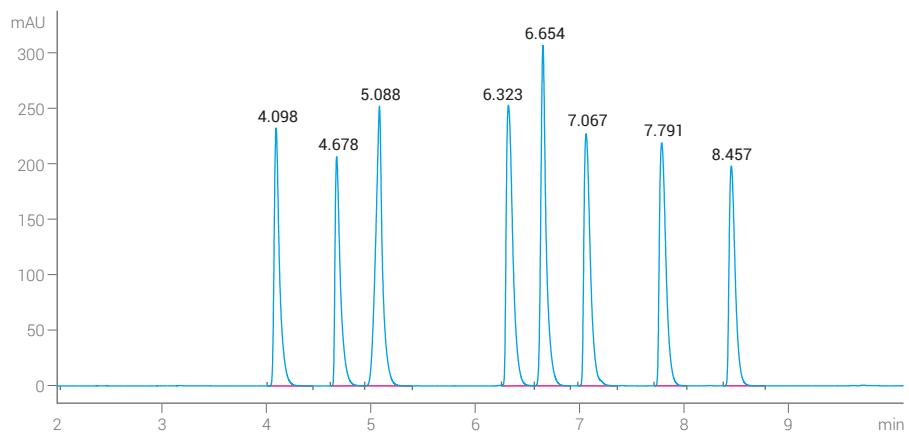


図 77. $4.6 \times 150 \text{ mm}$ カラムへの $10 \mu\text{L}$ のサンプル混合物 DMSO 溶液の注入。すべての化合物が分離され、良好なピーク形状を示しています。

図 78 に、同じサンプルを $20 \mu\text{L}$ 注入した場合のクロマトグラムを示します。塩基性の窒素化合物の 2 つのピークには、強いリーディングが示され、ピーク割れが起こっています。

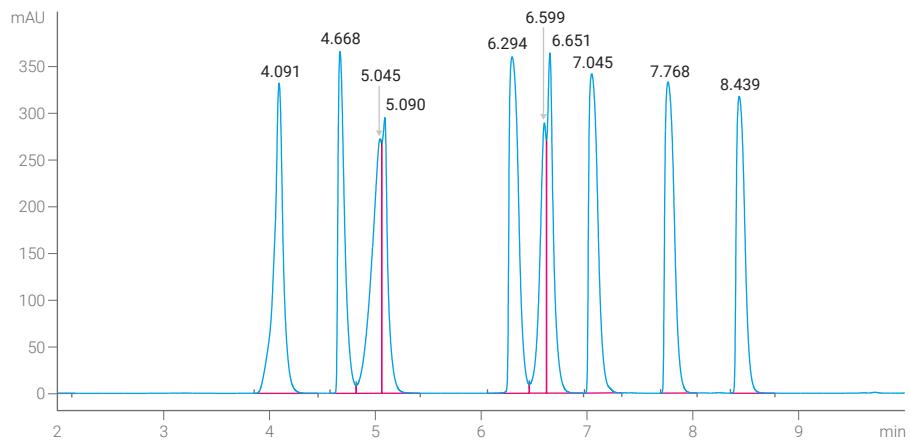


図 78. 同じサンプルを $20 \mu\text{L}$ 注入した場合に、3 種類の塩基性化合物のうち 2 種類で強いリーディングとピーク割れが示されています。

図 79 に、サンプルを $30 \mu\text{L}$ 注入した場合のクロマトグラムを示します。3 つのピークに、深刻なリーディングとピーク割れが示されています。特にスロープ認識パラメータの感度が高い場合、強いリーディングとピーク形状不良がトリガープロセスに影響を与えます。

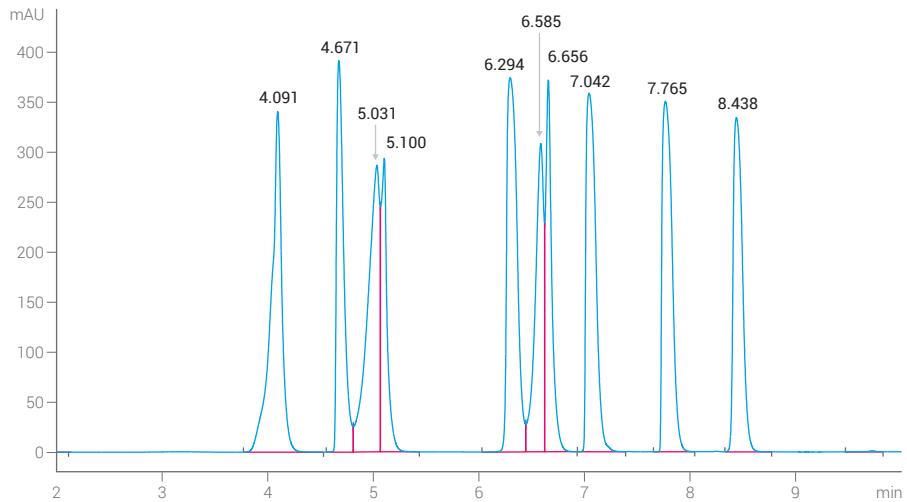


図 79. 注入量を $30 \mu\text{L}$ にした場合、4 分、5 分、6.5 分辺りに溶出した塩基性化合物にみられるように、より深刻な影響が示されます。

9.5.2 カラムの負荷量

表 8 は、カラムのサイズ別の固定相の量と、負荷量ごとに推奨されるサンプルサイズを示しています。

クロマトグラフィーでは、多くの場合 0.1 ~ 1 % の負荷量が適用されます。クロマトグラフィー分離が難しくなるほど、許容されるカラム負荷量は少なくなります。一方、シンプルまたは高スループットの分離を得るために、固定相の最大 5 % の質量のカラム負荷量を使用できます。

表 8. 分取 LC カラム用のスループットの計算。固定相の密度 : 0.6 g/mL

| | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 内径 [mm] | 4.6 | 10.0 | 21.2 | 30 | 50 |
| 長さ [mm] | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| 容量 [mL] | 2.49 | 11.78 | 52.97 | 106.07 | 294.64 |
| 流量 [mL/min] | 1.5 | 7.09 | 31.86 | 63.8 | 177.22 |
| おおよその必要な吸着材 [g] | 1.5 | 7.07 | 31.78 | 63.64 | 176.79 |
| 非常に高い効率である 0.1 % 注入 [g/run] | 0.001 | 0.007 | 0.032 | 0.064 | 0.177 |
| 1 % 注入の負荷と 効率 [g/run] | 0.015 | 0.071 | 0.318 | 0.636 | 1.768 |
| スループットを重視した 5 % 注入 [g/run] | 0.075 | 0.353 | 1.589 | 3.182 | 8.839 |
| 分析時間 [h]に対する 分析時間15 分の割合 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| 1 % 注入でのスループット[g] 24 時間/日 | 1.4 | 6.8 | 30.5 | 61.1 | 169.7 |
| スループット [kg] 365 日/年、24 時間/日 | 0.524 | 2.477 | 11.136 | 22.3 | 61.945 |

これらの計算により、0.6 g/mL の充填剤密度を用いて、異なるカラムサイズの充填剤の量を推定することができます。場合によっては、30 × 150 mm カラムを 64 ~ 640 mg の前処理されていないサンプルの分析で使用できます。多くの場合、前処理されていないサンプルには溶解性の問題があるため、下記で推奨している注入量では限界に達することがよくあります。これらのカラムサイズでは、DMSO の注入を 2000 μL 未満にすることを推奨します。最も大きな制限要素は、化合物の溶解性です。

表 9 は、カラムのサイズおよび長さごとに推奨される DMSO の注入量を示します。すべての推奨値は経験とラボでの実験に基づいています。

表 9. カラムサイズ別の固定相の量と、推奨されるサンプル負荷質量

| カラム寸法 | 注入量 [μL] | 密度 0.6 g/mL での固定相 [g] | カラム負荷 [mg] 0.1 % | カラム負荷 [mg] 0.5 % | カラム負荷 [mg] 1.0 % |
|-------------------|----------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 2.1 × 50 mm、C18 | 1.75 | | | | |
| 4.6 × 150 mm、C18 | 25 | | | | |
| 10 × 100 mm、C18 | 79 | 5 | 5 | 24 | 47 |
| 10 × 150 mm、C18 | 118 | 7 | 7 | 35 | 71 |
| 10 × 250 mm、C18 | 197 | 12 | 12 | 59 | 118 |
| 21.2 × 100 mm、C18 | 354 | 21 | 21 | 105 | 210 |
| 21.2 × 150 mm、C18 | 531 | 32 | 32 | 160 | 320 |
| 21.2 × 250 mm、C18 | 885 | 53 | 53 | 265 | 530 |
| 30 × 100 mm、C18 | 706 | 42 | 42 | 210 | 420 |
| 30 × 150 mm、C18 | 1063 | 64 | 64 | 320 | 640 |
| 30 × 250 mm、C18 | 1772 | 106 | 106 | 530 | 1060 |
| 50 × 100 mm、C18 | 1969 | 118 | 118 | 590 | 1180 |
| 50 × 150 mm、C18 | 2953 | 177 | 177 | 885 | 1770 |
| 50 × 250 mm、C18 | 4922 | 295 | 295 | 1475 | 2950 |

より多量の注入が必要な場合は、有機相注入メソッドの使用を推奨します。セクション 7.2.3「特殊な注入手法」を参照してください。別のアプローチとして、注入する溶媒の強度を低減する方法があります。例えば、化合物が溶解する場合は DMSO をメタノールに置き換えます。あるいは、化合物を最初に少量の DMSO に溶解させた後、メタノールまたは他の強度の低い溶媒で希釈します。

10 参考文献

1. Muhlebach, A., Adam, J., Schon, U., Streamlined approach to high quality purification and identification of compound series using high resolution MS and NMR, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 2983–2988.
2. Koppitz, M., Maximizing Efficiency in the production of compound libraries, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 573–579.
3. Isbell, J., Changing requirements of purification as drug discovery programs evolve from hit discovery, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 150–157.
4. Guth, O., et al., Automated modular preparative HPLC-MS purification laboratory with enhanced efficiency, *J. Comb. Chem.*, **2008**, 10, 875–882.
5. Rieck, F., Hippler, J., Fast and Easy Injection of Large Sample Volumes in Preparative HPLC, *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-0742EN, **2019**.
6. Penduff, P., Sample Purification Triggered With The Agilent 1260 Infinity Evaporative Light Scattering Detector, *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-4041EN, **2014**.
7. The LC Handbook, *Agilent Technologies primer*, publication number 5990-7595EN, **2013**.
8. Guillarme, D., et al., Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particles. Part II: Gradient experiments, *Eur J Pharm Biopharm*, **2008**, 68, 430–440.
9. Schellinger, A.P., Carr, P.W., A practical approach to transferring linear gradient elution methods, *J Chromatogr A*, **2005**, 1077, 110–119.
10. Schoenmakers, P. J., et al., Gradient Selection in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J Chromatogr A*, **1978**, 149, 519–537.
11. Snyder, L.R., Dolan, J.W., High Performance Gradient Elution, *Wiley*, **2007**.
12. Jablonski, J-A.M., Wheat, T.E., Diehl, D.M., Developing focused gradients for isolation and purification, *Waters application note*, reference number Z20002955en, **2009**.
13. Tei, A., Penduff, P., Guilliet, R., Schulenberg-Schell, H., Using focused gradients on a combined analytical/preparative HPLC system to optimize the scale-up process from 4.6 to 50 mm columns, *LCGC Europe*, **2013**, 26, 315–315.
14. Dolan, J.W., Making the Most of a Scouting Run, *LCGC North America*, **2013**, Volume 31, Issue 1, 30–35.
15. Penduff, P., Analytical to Preparative HPLC Method Transfer, *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-2013EN, **2013**.
16. Penduff, P., Tei, A., Automated Generation of focused Gradient Profiles in preparative liquid chromatography, *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5991-6146EN, **2015**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, October 15, 2019
5994-1016JAJP

