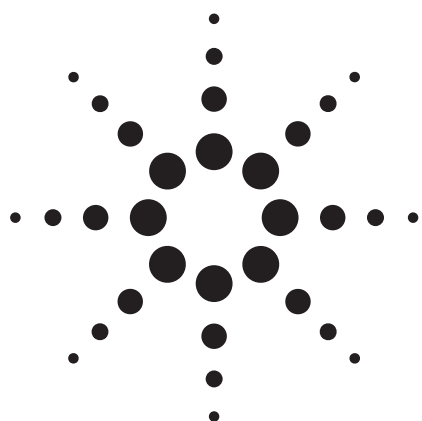
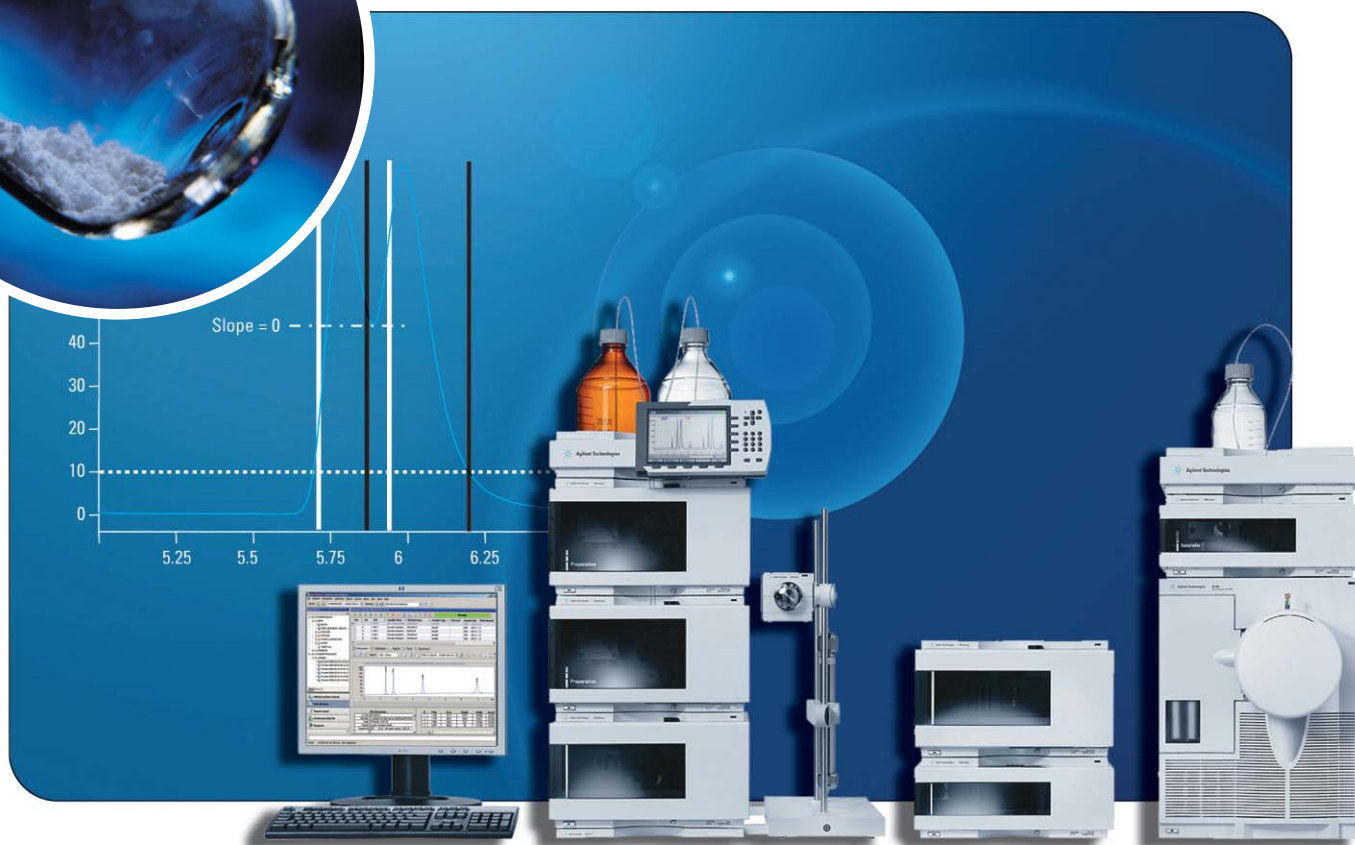
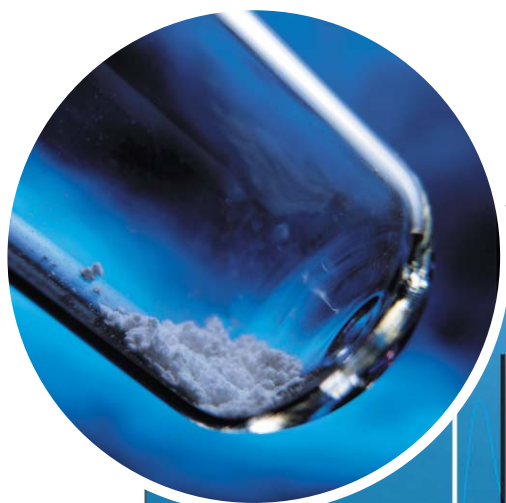




分取 HPLC のソリューション

アプリケーション集



Agilent Technologies

目次

アプリケーション	2-15
分取 HPLC による不純物の単離.....	2
前臨床尿サンプルからの放射性標識医薬品代謝物の単離と精製.....	4
人尿サンプルからの新薬候補物質の単離と精製.....	6
光学異性体の精製.....	8
化合物ライブラリのマスベースフラクションコレクション.....	10
天然物の精製.....	12
タンパク質精製と定性.....	14
分析手法	16-51
Agilent 6110/6120 Quadrupole LC/MS システムによるマスベースフラクションコレクション.....	16
マスベース分取精製システムの最適なコンフィグレーション.....	18
高流量条件下のマスベースフラクションコレクション.....	20
マスベースフラクションコレクションの最適化.....	22
デュアルループオートサンブラによる最適性能.....	24
アイソクラティック精製実験におけるマルチ注入.....	26
分析および分取向けの複合システム.....	28
注入ポンプシステム.....	30
リカバリーコレクション.....	32
高流量のマスベースフラクションコレクション.....	34
マスベースフラクションコレクションの最適化.....	36
一般的なフラクションコレクションの最適化.....	38
高回収率のためのシステム最適化.....	40
他社製検出器シグナルでのピークベースフラクションコレクション.....	42
メソッドスケールアップとスケールアップ計算.....	44
1 ~ 100 mL/min における分取ポンプ性能.....	46
ラボ生産性向上のためのリモートデータレビュー.....	48
精製方法	50-65
分取前分析による分取メソッドの最適化.....	50
医薬分子化学分野における化合物精製方法の開発.....	52
質量選択検出器搭載システムによる化合物精製.....	54
ベースライン分離されていないピークからの化合物の精製.....	56
ピークベースフラクションコレクションでのアップスロープ/ダウンスロープの使用法.....	58
自動フラクション再分析を行う際の誤差の考察.....	60
高濃度サンプルの注入.....	62
生産性を向上させるための Walk-up アクセス.....	64
精製システムバルブアプリケーション	66-71
リサイクルクロマトグラフィー.....	66
分取 HPLC におけるカラム再生の利用.....	68
リカバリーコレクションとタイムベースフラクションコレクション.....	70

広範囲の精製ニーズに応える、 優れたプラットフォーム

この資料では、Agilent 1200シリーズと 1100 シリーズ精製プラットフォームで行った分析例やアプリケーションをまとめて紹介します。分離と再分析、ピークベースとマススペースフラクションコレクションの他、精製システムの最適化について紹介しています。

本資料では、分取 HPLC に関して発行されたアジレントのアプリケーションノートの概要を示します。Agilent 1100 シリーズHPLCシステムを用いて行った分析は、Agilent 1200 シリーズ LC システムで検証し、同等、あるいは、より優れた結果を示しました。本資料で紹介するアプリケーション例／手法は、発行資料の内容を要約したものです。各資料の全文は、アジレントのホームページ、www.agilent.com/chem/purification からダウンロードすることができます。(資料中の使用装置名は、資料発行当時の型名をそのまま記載しています。また、詳細資料は一部を除いて英文となります)

1200シリーズ精製プラットフォームの利点

- 最大の回収率と純度を得るために、ポンプ、オートサンプラ、フラクションコレクタ、検出器、カラム、分取フローセルなど、豊富なモジュールから選択でき、アプリケーションに応じた最適化が可能
- μg から g まで、精製プロセスをサンプルサイズに合わせて拡張可能
- タイムベース、ピークベース、マススペースのフラクションコレクション
- Easy Access ソフトウェアにより、分析経験を問わず簡単な操作を提供
- すべての装置、消耗品、サポートを 1 社からトータルに提供

1200 シリーズ精製プラットフォームは、分析スケールと分取スケールアプリケーション用に 2 つの基本システムを提供します。

- 1200 シリーズ精製システム AS (分析スケール)
5 mL/min 未満の流量用
- 1200 シリーズ精製システム PS (分取スケール)
最高 100 mL/min の流量用

1200 シリーズ精製システム AS



1200 シリーズ精製システム PS



不純物プロファイリングでは、医薬品中の有機および無機不純物の検出、同定、構造解析、定量測定を目的とした一連の分析が行われます。このプロセスでは、まず初めにすべての不純物を検出します。最新の MS 機器を用いても、すべての化合物の完全な構造解析が可能とは限りません。これらの化合物は単離および精製した後、 ^1H および ^{13}C -NMR で同定する必要があります。MS で同定することができなかった一連の不純物の単離と精製を、本アプリケーションノートで説明します。

結果と考察

図 1 の不純物 A と D は、イオントラップおよび TOF 機器を使用した MS で同定することができました。しかし、不純物 B と C は、完全に同定することができず、そのため、さらに構造解析するために分取精製用 HPLC で単離しました。

メソッド最適化

MS 実験で使用する粒子径 $2\ \mu\text{m}$ 未満のカラムと、同じ充てん剤の種類の分取スケールカラム用の粒子径 $5\ \mu\text{m}$ のカラムを使用できるため、不純物 B と C の分離および分析時間の短縮に関してだけ、メソッドを最適化すればよいことになります。不純物 B と C を添加したサンプルの分析結果を図 1 に示します。

分取精製 HPLC による不純物の単離

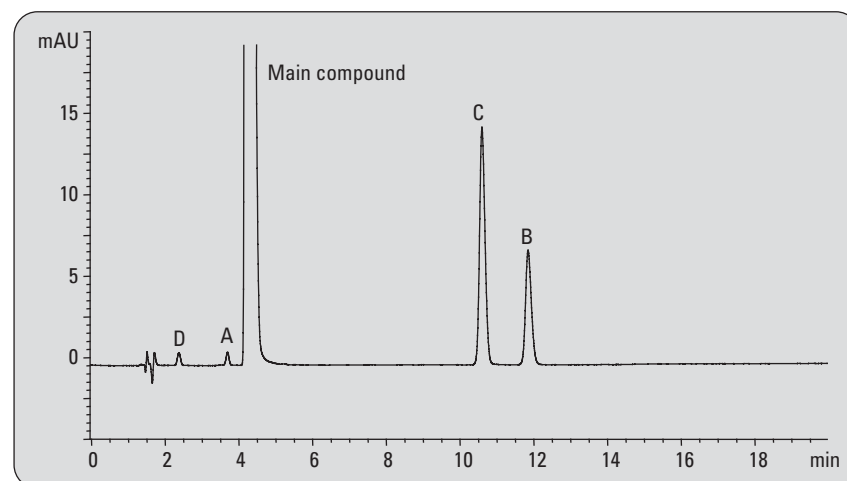


図 1
不純物 C と B に対して最適化されたメソッド

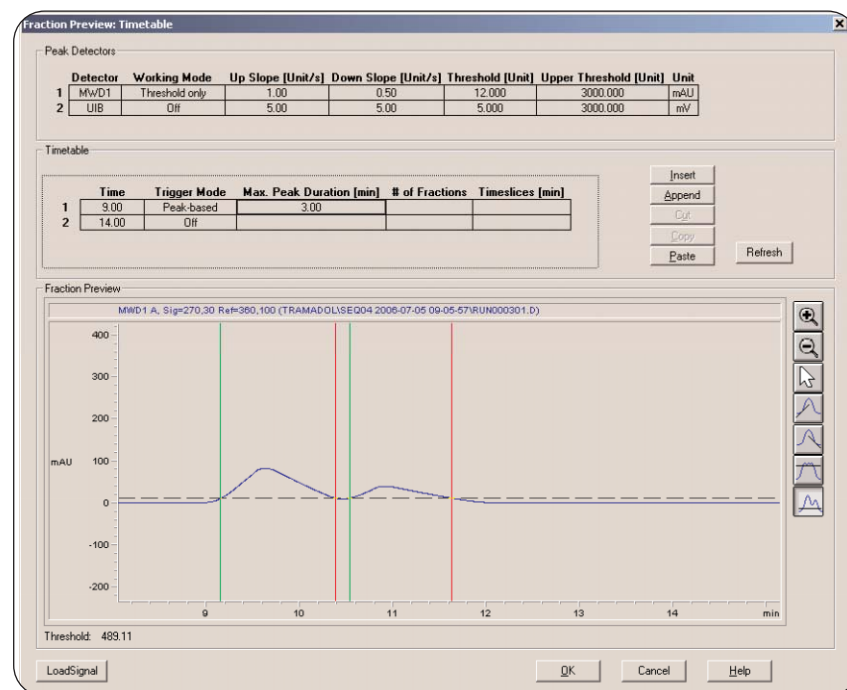


図 2
ChemStation フラクションプレビュー

精製パラメータ

フラクションコレクションパラメータを最適化するために、ChemStation のフラクションレビュー機能を用いました。図 2 のように、予備分析のクロマトグラムを読み込み、適切なフラクションコレクションが得られるように、スレッシュホールド、アップスロープ、ダウンスロープ、上限値などのフラクションコレクションパラメータを調整しました。このケースでは、タイムウィンドウ内 (9 ~ 14 分) の簡単なスレッシュホールドに基づいた捕集で良好な結果が得られました。図 3 にフラクションレビューを用いて最適化されたパラメータで分析された実際のフラクションコレクションの結果を示します。図 4 に 連続10回精製分析し、そのフラクションの分析の結果を示しました。不純物 C と B を含む十分な量を捕集した後、NMR 分析 (データはここでは示していません) により、図 4 の構造式を解明することができました。

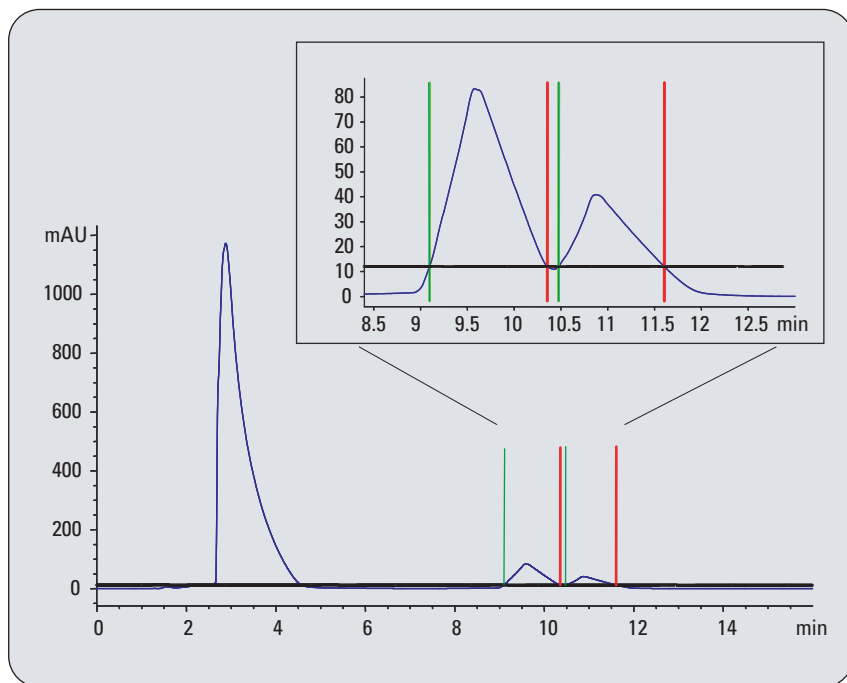


図3
フラクションコレクションの結果

まとめ

本アプリケーションノートでは、Agilent 1200 シリーズ RRLC システムで作成された高分離分析メソッドから始め、2 つの不純物の単離と精製について説明しました。分析用の粒子径 $2\ \mu\text{m}$ 未満のカラムと、同じ固定相の標準的な分取用の粒子径 $5\ \mu\text{m}$ のカラムを使用できるため、標準の Agilent 1200 シリーズから Agilent 1200 シリーズ分取システムへの移行をスムーズに行えました。そのため、最適化後のメソッドをスケールアップし、分取カラムでさらにメソッドを最適化することなく、実験を直接行うことができました。捕集したフラクションの純度、回収率が高く、不純物の構造解析を容易に行うことができました。

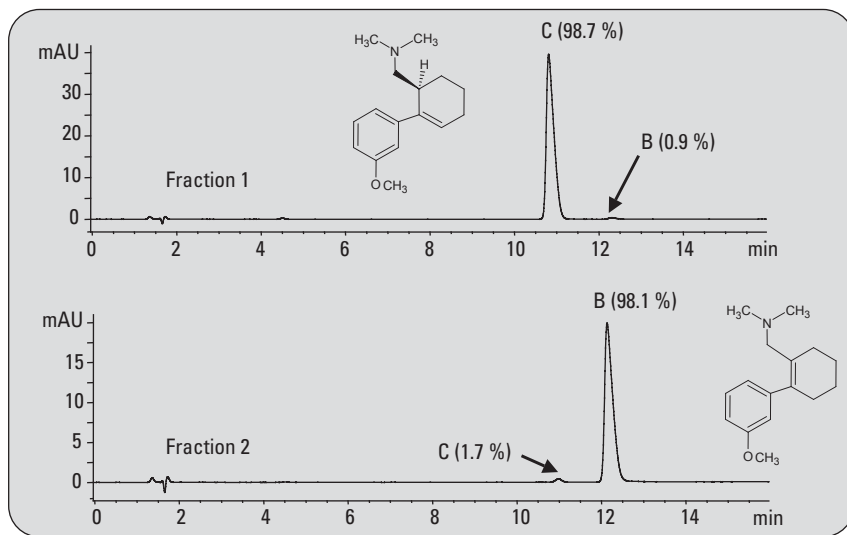


図4
合成医薬品の不純物の同定

Agilent 1200 シリーズ LC/MS システムを用いた不純物プロファイリング - パート 2: 分取精製 HPLC を用いた不純物の単離、資料番号 5989-5618EN。

新薬候補物質の代謝物の同定は医薬品開発プロセスの基礎となる部分です。創薬初期段階でのリード化合物の最適化において重要な役割を担い、より有益な薬物動態および体内動態特性を持つ新薬候補物質の発見につながります。医薬品開発の後半のフェーズでは、実験動物およびその後のヒトでの医薬品代謝物の同定が、安全性テストの裏付けとして規制当局から求められます。医薬品開発において、医薬品代謝物研究は、放射性標識新薬候補物質を用いて通常行われるため、医薬品関連代謝物の同定は放射化学検出を用いることで簡単になります。代謝物は、尿、胆汁、血漿などの非常に複雑なマトリクス中に低濃度で存在することが多く、核磁気共鳴 (NMR) 分析法などの技術で確実な同定を行うためには、代謝物を単離、精製することが必要になります。

前臨床尿サンプルからの放射性標識医薬品代謝物の単離と精製

イギリス、*GlaxoSmithKline* の
Gordon Dear 氏との共著

結果と考察

GSK 新薬候補物質の非標識標準試料の注入

貴重な生体サンプルの注入前に、クロマトグラフシステムを検査するため、新薬候補物質の標準試料を、インジェクションポンプを用いて、10 mL ($\sim 1 \mu\text{g/mL}$) 注入しました。化合物の保持時間は図1 のとおり 36.3 分でした。

犬の尿サンプルの注入

図 2 には、放射性標識の新薬候補物質とその代謝物を含む犬の尿サンプル 10 mL を注入した場合の放射線化学検出器 (RD) と DAD のクロマトグラムを示します。これらの物質は RD シグナルで簡単に同定することができます。代謝物を単離するために、RD を用いたタイムベースフラクションコレクションまたは RD シグナルに基づいたピークベースフラクションコレクションのどちらかを用いました。

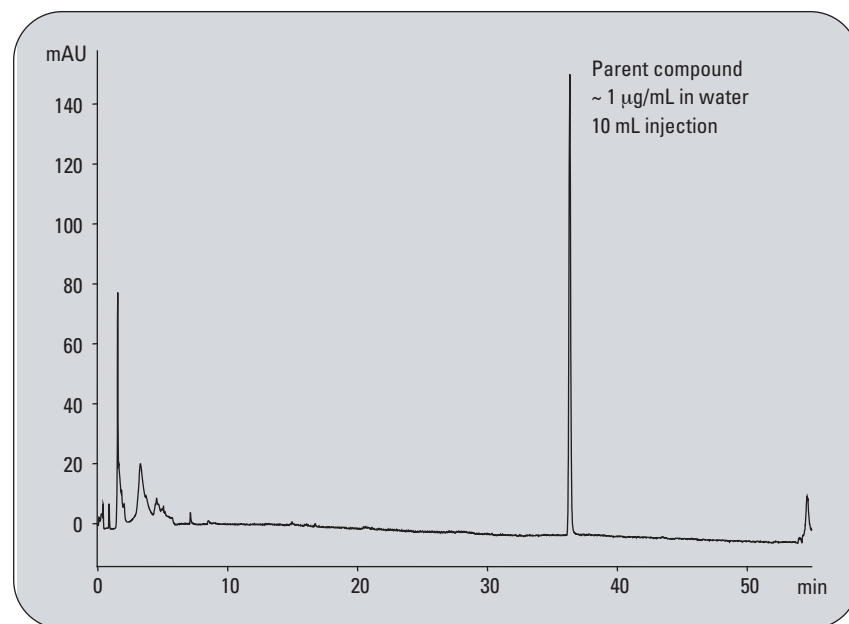


図1
標準試料の注入

RD シグナルでのピークベースフラクションコレクション

RD からの出力でトリガがかかるように、Agilent 1100 シリーズモジュールには、ユニバーサルインタフェースボックス (UIB) を CAN ネットワークで接続しました。フラクションコレクタにトリガがかからなかった場合でも代謝物が失われなかったことを確認するために、リカバリコレクタをシステムに設置しました。ピークベースフラクションコレクションの結果は図 2 のとおりです。

まとめ

本アプリケーションノートでは、一般的な DMPK サンプルから放射性標識医薬品代謝物を単離および精製するために最適化された精製システムのセットアップとコンフィグレーションを説明しました。コンフィグレーションで最も重要な点は、インジェクションポンプシステムを用いることにより、試料の大量注入が可能になり、放射線検出器を用いることにより代謝物を含むフラクションの同定が可能になることです。さらに、GlaxoSmithKline (イギリス) の DMPK グループで行われた、代謝研究の実際のサンプルを用いたフラクションコレクション方法を示します。

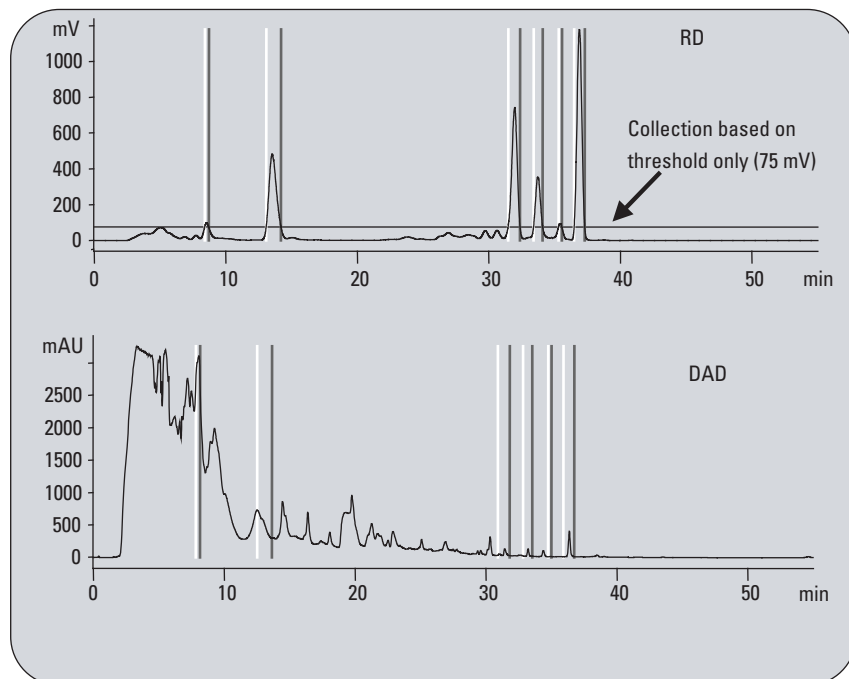


図 2
RD シグナルでのピークベースフラクションコレクション

新薬候補物質の代謝物の同定は、医薬品開発プロセスの基礎となる部分です。創薬初期段階でのリード化合物の最適化において重要な役割を担い、より有益な薬物動態および体内動態特性を持つ新薬候補物質の発見につながります。医薬品開発の後半のフェーズでは、実験動物およびその後のヒトでの医薬品代謝物の同定が、安全性テストの裏付けとして規制当局から求められます。実際のヒトの代謝に関する研究では一般的に、臨床研究の分野で放射性標識医薬品をヒトに投与することがあります。臨床試験のフェーズ I の一部として、ボランティアの被験者へ新薬候補物質を投与し、予備的なヒトの代謝データを捕集します。核磁気共鳴 (NMR) 分析法などの技術で確実に構造決定するためには、大量の生体マトリクスから (この場合は人尿から) 代謝物を単離することが必要となります。

人尿サンプルからの 新薬候補物質の単離と精製

イギリス、*GlaxoSmithKline* の
Gordon Dear 氏との共著

GSK 新薬候補物質の標準試料の注入

貴重な生体サンプルの注入前にクロマトグラフシステムを検査するために、新薬候補物質の認定標準試料を、インジェクションポンプを使用して、50 mL の試料 (おおよそ 1 $\mu\text{g/mL}$) を注入しました。

タイムベースフラクションコレクションを用いた人尿サンプル分取

インジェクションポンプシステムを用いて、50 mL の人尿サンプルを 0.5 分ごとに 12 mL の試験管にフラクションを捕集した、タイムベースフラクションコレクションの結果を図 2 に示します。捕集されたフラクションを、その後の NMR やさらに LC/MS を用いた構造解析に用いることができます。

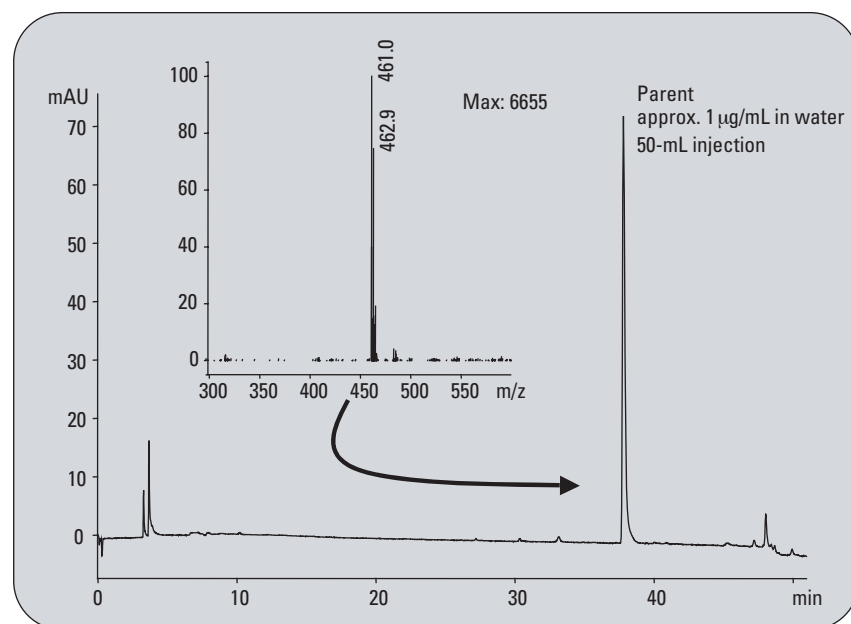


図 1
新薬候補物質標準試料のクロマトグラムと MS スペクトル (ネガティブイオンモード)

医薬品とその代謝物を含むフラクションの 同定

既知の質量の新薬候補物質とその代謝物のいくつかは、MSD シグナルで同定することができました。ディレイタイムを用いて DAD と MSD の各シグナルのフラクションチェックマークを揃えることができるため、5 つの化合物を含むフラクションを簡単に同定することができました。

まとめ

本アプリケーションノートでは、インジェクションポンプシステムを用いた人尿サンプル50 mLの注入の他、Agilent 1100 シリーズ分取精製システムでの新薬候補物質とその代謝物のタイムベースフラクションコレクションについても説明しました。フラクションコレクションの結果は MSD でモニタリングされ、抽出イオンクロマトグラムを用いて、新薬候補化合物の他、4 つの代謝物を検出することができました。化合物を含むフラクションを簡単に同定することができ、さらに分析するためにフラクションを半精製することができました。

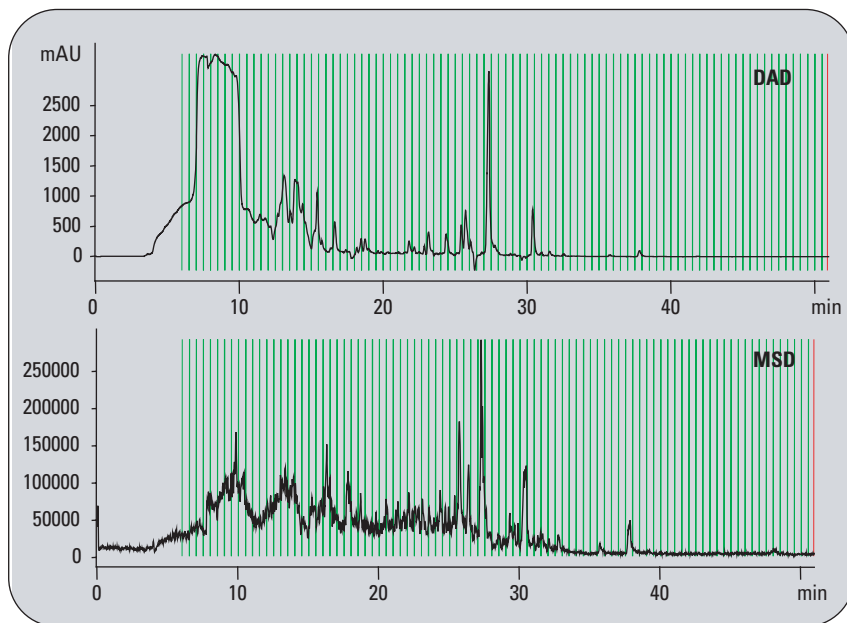


図 2
人尿サンプルでのタイムベースフラクションコレクション

医薬品の立体異性組成は今日の医薬品開発において重要な問題です。医薬品登録には、2つの光学異性体の薬効、毒性、または薬物動態の差を評価するために新薬候補物質選択段階中に高純度の医薬品光学異性体が必要となります。開発初期では、少量の医薬品が当該実験に必要なため、分取用液体クロマトグラフは、ラセミ混合物から純粋な光学異性体を単離するのに適したツールです。本アプリケーションノートでは、呼吸器新薬候補物質のラセミ化合物のグラム単位の分離について説明します。Agilent 1100 精製システムを用いて分離を行いました。

光学異性体の精製

ドイツ、Boehringer Ingelheim の
Volkmar Körner 氏と共著

結果と考察

分析メソッド

光学異性体 E1 と E2 を分離する分析メソッドは、Chiralpak AD-H 5 μm カラム (4.6 x 150 mm) を用いて開発しました。このメソッドは、フラクションの純度および鏡像体過剰率をコントロールする精製プロセスにも使用しました。そして、分析カラムに負荷することができるサンプルの最大量を測定する実験を行いました。

分取メソッド

分析カラムでの過負荷実験の結果に基づき、分取カラムへのスケールアップを検討しました。スループットを増やすために、注入量は900 μL のまま、エタノール溶液中のサンプル濃度は50および200 mg/mL に上げました。分析結果を図1に示します。

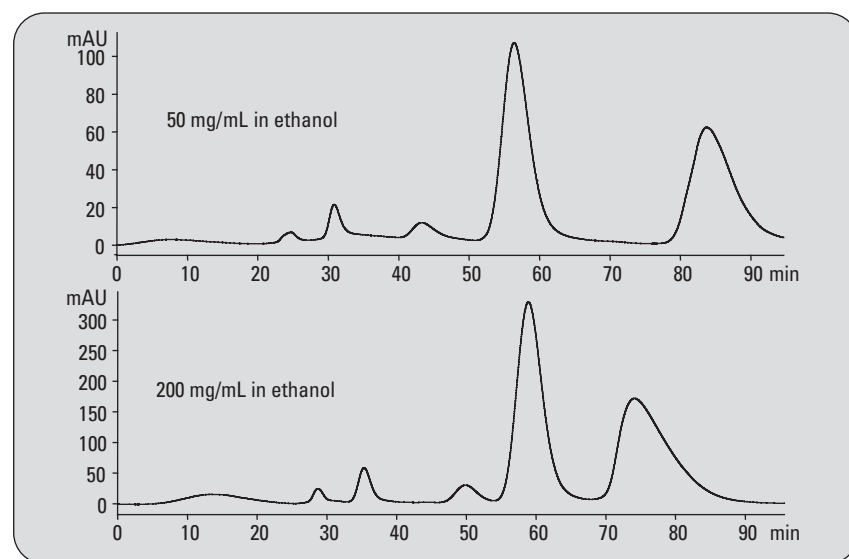


図1
サンプル負荷量を変えて採取したクロマトグラムの例

捕集した一連のフラクションの分析

捕集した一連のフラクションは分析メソッドの項で説明したメソッドを用いて分析しました。図 2 のとおり、非常に高い純度で両方の光学異性体を単離することができました。

まとめ

Boehringer Ingelheim (ドイツ、Biberach) 社で行われた、Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いた呼吸器疾患用の 2 つの新薬候補物質の光学異性体の精製について説明しました。分析用カラムでメソッドを開発し、負荷実験を行った後に分取用カラムにスケールアップしました。分取メソッドの調整後、グラム単位で精製し、エナンチオマーの光学純度を測定するために捕集した一連のフラクションを再分析しました。

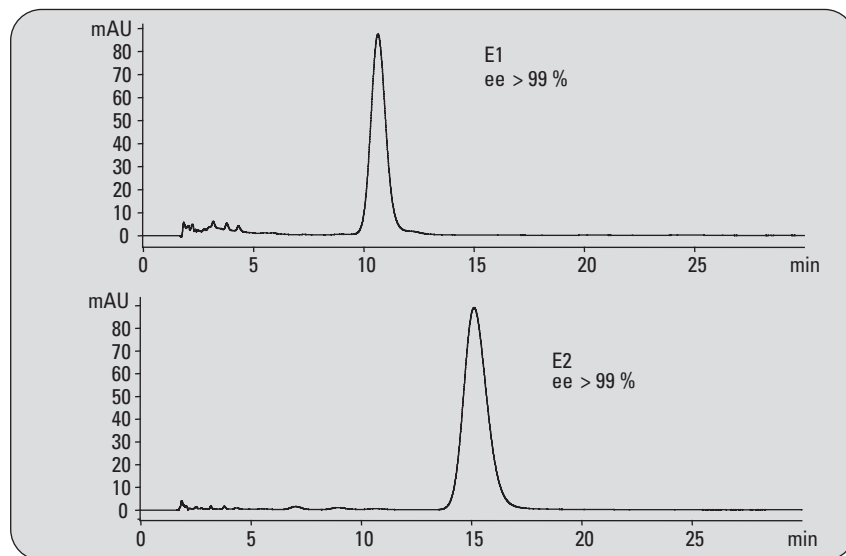


図 2
複合フラクションの再分析

化合物ライブラリとは、生物活性のスクリーニングに必要な構造類似体のことをいいます。コンビナトリアルケミストリは、従来の合成化学と比較して合成プロセスを簡素化しますが、不純物や反応副生成物から目的化合物を精製する必要があります。

装置

システムは 2 つの流路から構成されます。メインフローは、バイナリポンプからオートサンブラ、カラムコンパートメント、ダイオードアレイ検出器、アクティブスプリットを通り、フラクションコレクタに到達します。質量選択検出器 (MSD) は破壊型の検出器であり、かつエレクトロスプレーイオン源にとってメインフローは高流量であるため、アイソクラティックポンプを用いてメークアップフローを流します。アイソクラティックポンプから送液されるこのメークアップフローは、MSD に到達する手前でアクティブスプリットに接続します。質量検出を容易にするために、アクティブスプリットによりメインフローと MSD へのメークアップフローにスプリットします。

化合物ライブラリのマスペースフラクションコレクション

結果と考察

サンプル前処理

Agilent 1100 シリーズ精製プラットフォームを用いたマスペースフラクションコレクションを行うために、フェノチアジンの誘導体である 17 種類の関連化合物から構成されるライブラリを作成しました (図 1)。

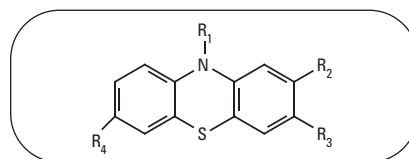


図 1
フェノチアジン誘導体の構造

マスペースフラクションコレクション

ソフトウェア上で、17 種類の混合物のそれぞれに対してフラクションコレクションのターゲットマスを設定しました。フラクションコレクションは 1 価の正イオンでトリガをかけました。図 2 を参照してください。

まとめ

事前に設定した質量でトリガをかけるフラクションコレクションは、従来の選択性の低い検出器よりも以下の点で有利です。

- 目的化合物だけが捕集されます。
- 捕集したフラクションから、目的化合物を選び出す必要がありません。
- アジレント特許のディレイキャリブレーションにより、高い信頼性でサンプルを回収することができます。

Agilent 1100 シリーズは、時間とリソースを有効に活用できるマスペースフラクションコレクションのための精製プラットフォームを提供します。

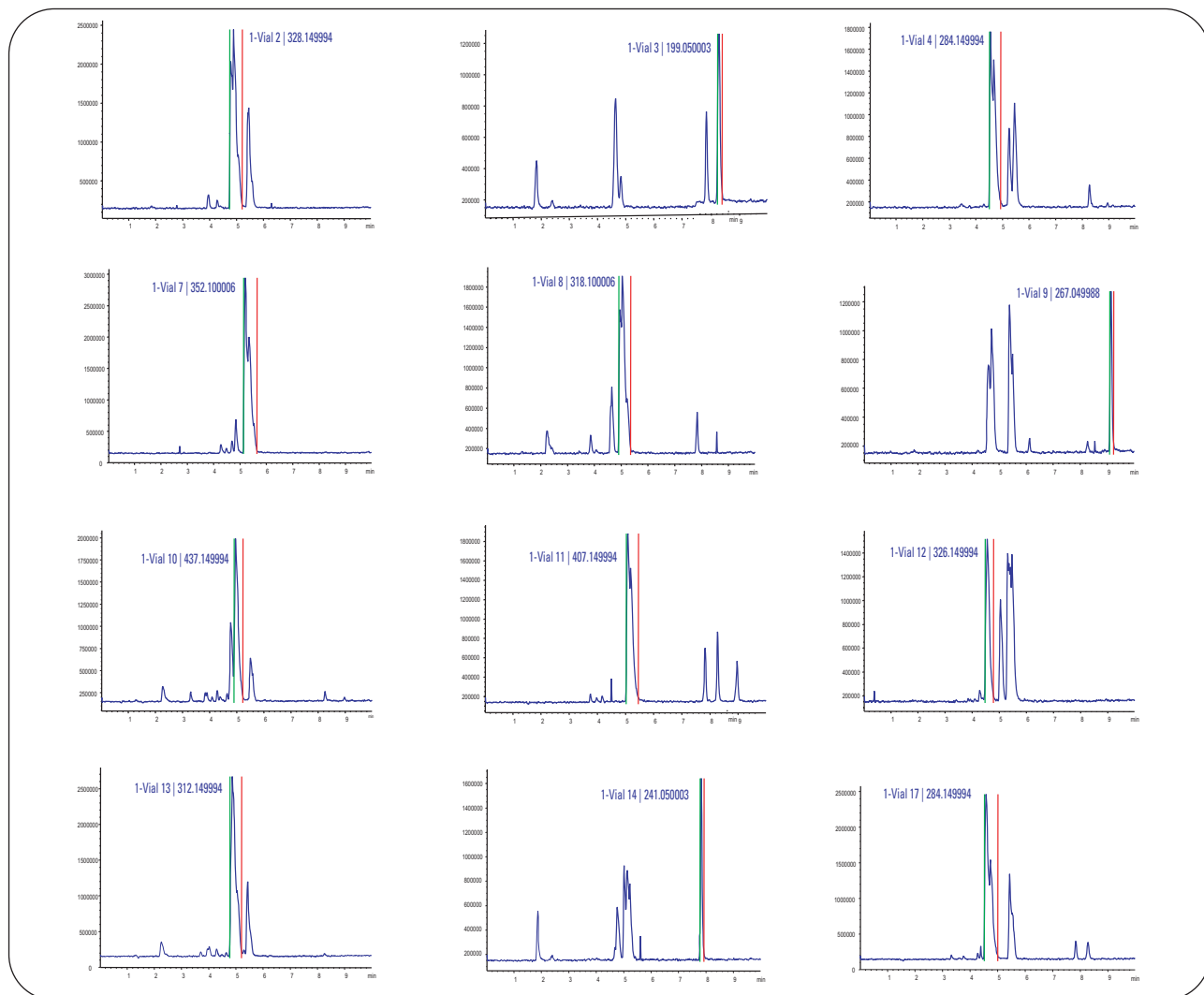


図 2
選択した12のマスクロマトグラム。

『Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いた化合物ライブラリのマススペースフラクションコレクション』、
資料番号 5989-1656EN

Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いた、分析スケール (AS) および分取スケール (PS) での、ムラサキツメクサからのホルモノネチンとその他のフェトエストロゲンの分離の例を紹介します。

結果と考察

容量過負荷実験

化合物を単離するための条件検討において、ムラサキツメクサ抽出物の濃度が固定されていて濃度過負荷実験は不可能だったため、容量過負荷実験を行いました。最高 50 μL の未処理抽出サンプルを注入した場合でも、分析スケールの精製に十分な分離が得られました。

分析スケールでのフェトエストロゲンの単離

複雑な天然抽出物から化合物を単離する一般的な方法は、タイムベースにより分画する方法です。しかし、過負荷実験で良好な分離が得られたため、ムラサキツメクサ抽出物にはピークベースの捕集を行いました。

多量の化合物の単離

より多くのフェトエストロゲンを捕集するために、複数の分析からのフラクションのプーリングを行いました。これは 1 本のサンプルバイアルから繰り返し注入を行い、同じフラクションを同じバイアルに捕集する機能です。50 μL 注入を 9 回行うことにより、合計 450 μL のサ

天然物の精製

ンプルを注入し、それぞれのバイアルに自動的にプーリングされます。図 1 のフラクションの再分析のクロマトグラムは、装置およびソフトウェアの優れた性能を示しています。

より多くの物質を短時間で精製するには、より大きなカラムにスケールアップする方法があります。分析スケールのカラムの過負荷実験に基づき、1 回の注入で 450 μL 注入するために、スケールアップ計算を行い、流量 7 mL/min で 9.4 x 150 mm カラムを用いました。Agilent 1100 シリーズウェルプレートオートサンプラ AS は上限流量が 5 mL/min であるため、分取スケール PS にて精製しました。

分取スケールでのフェトエストロゲンの単離

さらに多量のサンプルを精製するために、21.2 x 150 mm カラムを用い、メソッドをさらにスケールアップしました。このスケールでは、1 回の注入で 2,300 μL のサンプルを注入することが可能でした。クロマトグラムは図 2 のとおりです。フラクションの再分析の結果から、フラクションの純度を低下させることなくスケールアップが可能であることが確認できました。

まとめ

分析スケールアップメソッドを用い、Agilent 1100 シリーズ分析スケール精製システム AS にて、組成の複雑な未処理植物抽出物中から化合物を分離することが可能です。このメソッドに基づき、ピークベースフラクションコレクションを用いて分析スケールでの分取を行いました。

- より多くのフェトエストロゲン物質を得るために、Agilent 1100 シリーズ精製システムのプーリング機能を用いました。
- 得られた化合物の純度を、フラクションの再分析で確認しました。
- 分析スケールの結果に基づき、メソッドをスケールアップしました。
- 1 回の分析で必要な化合物をより多量に得るために、Agilent 1100 シリーズ分取スケール精製システム PS の 2 つの異なるカラムを用いて、再度精製を行いました。

分取スケールにおいても、分析スケールシステムでの結果と同等の結果を得ることができました。

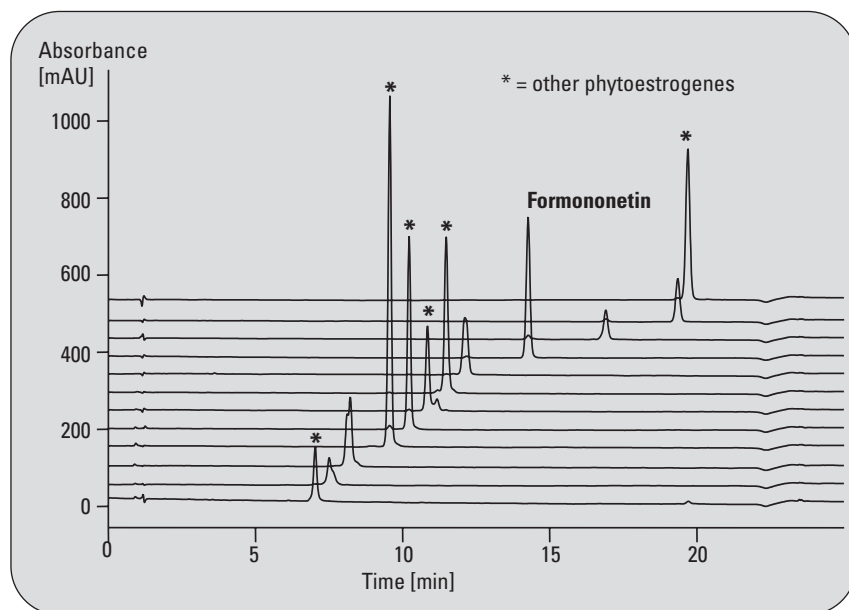


図 1
プーリングからのフラクションの再分析

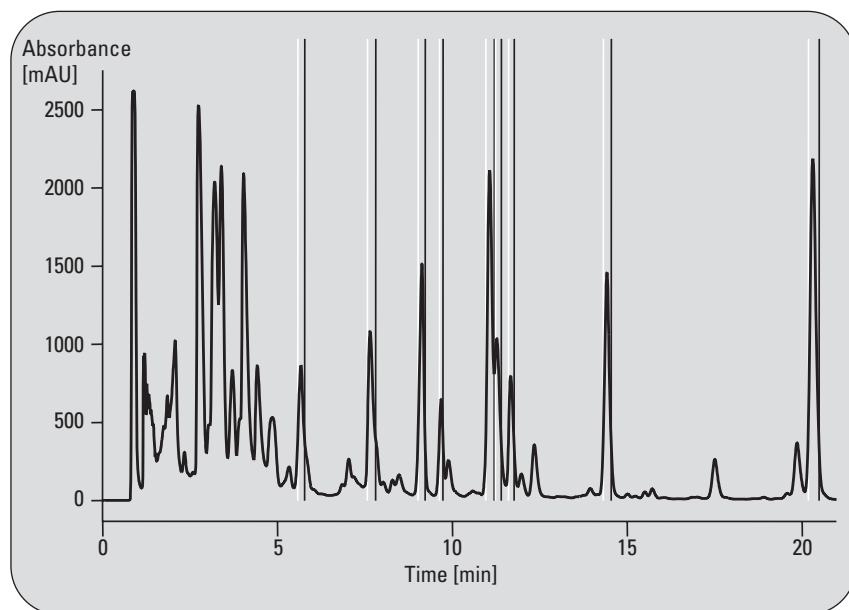


図 2
21.2 mm 分取カラムでの分離

『Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いたムラサキツメクサからのホルモノネチンとその他のフェトエストロゲンの単離』、
資料番号 5989-5747EN

タンパク質の収率と純度は、分取精製プロセス成功のための重要な基準です。効率のよいクロマトグラフィー条件だけでなく、より安定した信頼性の高い機器を用いることも分取精製の成功に寄与します。分取スケールの逆相 (RP) HPLC は、その高い分離能力により、ペプチドや小さな親水性タンパク質の分取精製のワークフローの最後の行程でしばしば使用されます。RP-HPLC で用いられる移動相条件は、タンパク質構造を変性させることが知られていますが、小さなタンパク質に好ましい条件に調整することで、回復できることがよくあります。Agilent 1100 シリーズ精製システムは、逆相クロマトグラフィーに最適で安定したシステムです。

結果と考察

最初の分析段階で、目的のタンパク質が 56 kDa かどうか、またそれを定量するために、わずか 4 μ L の粗精製したサンプルを、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて測定しました。図 1 には、分析のエレクトロフェログラムとゲルイメージを示しました。エレクトロフェログラムの 28 秒付近のピークが、総タンパク質濃度の 20% の強度を持つ 58.6 kDa のタンパク質に相当し、ゲルイメージでもそれが明らかとなりました。これは、明らかにサンプル中に目的のタンパク質が存在することを示しています。

タンパク質の精製とキャラクタライゼーション

RP-HPLC を用いて残りの物質をさらに精製しました。図 2 に、Agilent 1100 分取精製システムを用いた、粗精製サンプルの RP-HPLC 分取精製のクロマトグラムを示しました。クロマトグラム中の縦線は、フラクションコレクションの開始および終了を示し、横線はフラクショントリガのしきい値を表しています。さらに、フラクションコレクタ中のそれぞれの捕集したバイアル位置が、各フラクションに表示されています。

目的の 56 kDa のタンパク質を含むフラクションを同定するために、分取した 3 つすべてのフラクションを凍結乾燥し、PBS 緩衝液にて溶解し、Agilent 2100 バイオアナライザを用いて分析しました。図 3a に、出発物質および 3 つのフラクションのエレクトロフェログラムを示します。対応するゲルイメージを図 3b に示しました。エレクトロフェログラムのデータおよびそのゲルイメージから、目的の 56 kDa のタンパク質は、フラクション 2 に分取されたことが分かります。図 4a に、フラクション 2 の RP-HPLC での再分析結果を示しました。非常に正確なデイレイボリウムキャリブレーションにより、およそ 11.5 分に単一のピークを再分析したクロマトグラムにより確認できました。この結果は、純粋なタンパク質の存在を意味しますが、フラクション 2 のエレクトロフェログラム

(図 4b) では、20 kDa 付近に微量の不純物の存在を示しています。2100 バイオアナライザソフトウェアで算出されたこのタンパク質の純度は、456 μ g/mL のタンパク質との相対濃度で 76% でした。Agilent 2100 バイオアナライザでは、RP-HPLC と異なる原理でタンパク質を分離することから、この結果は容易に理解することができます。RP-HPLC は疎水性の違いにより分離しますが、2100 バイオアナライザではタンパク質をその大きさの違いによって分離します。このため、図 4b では不純物を検出することができました。RP-HPLC クロマトグラムでは、ピークは 2 つの異なるタンパク質から構成されています。純粋なタンパク質を得るために、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィーのような相補的な手法を用いた精製ステップが必要な場合があります。

まとめ

サンプルを高純度で分取精製する必要がある場合、複数の分析手法が必要となる場合があります。アジレントは、効率よく、かつ信頼性の高いタンパク質精製およびキャラクタライゼーションを共に可能にする 1100 シリーズ分取精製システムや 2100 バイオアナライザといったトータルソリューションを提供しています。

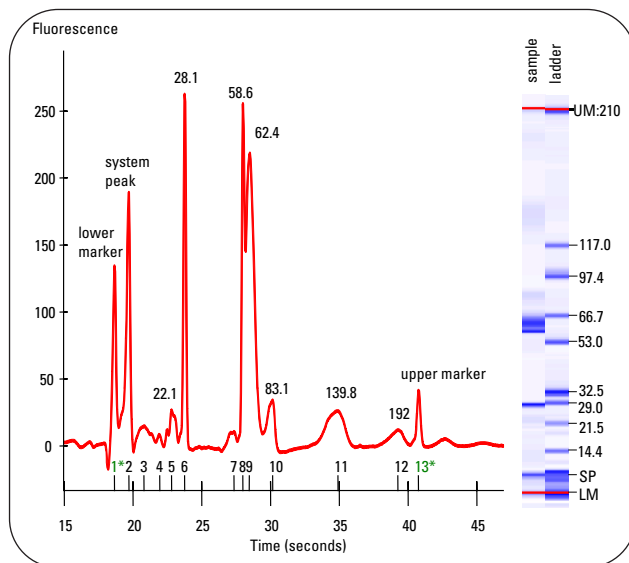


図 1
Protein 200 Plus アッセイを用いた Agilent 2100 バイオアナライザでの粗精製タンパク質サンプルの分析。エレクトロフェログラムとゲルイメージを示しました。数字は kDa 単位の分子量を示します。目的の 56 kDa タンパク質は、58.6 kDa に相当する 28 秒の移動時間でした。

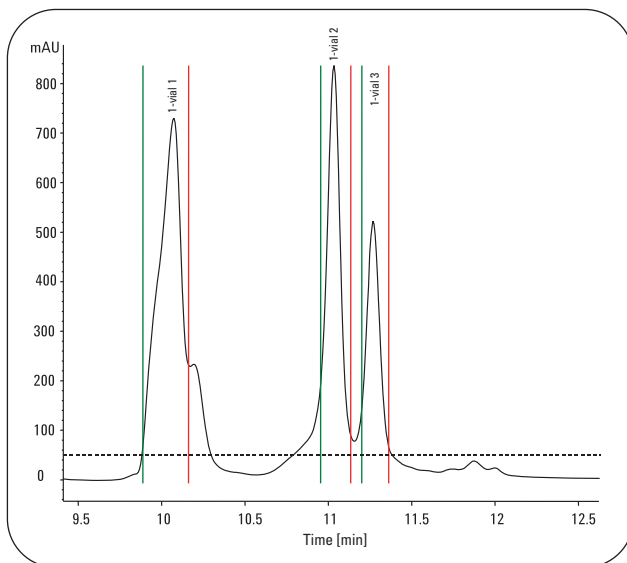


図 2
粗精製タンパク質サンプルの分取精製クロマトグラム。クロマトグラム中の縦線はそれぞれフラクションコレクションの開始と終了を示します。横線は、280 nm の UV シグナルのピークトリガのしきい値を示します。さらに、数字はフラクションコレクタ中の捕集したフラクションのバイアル位置を示しています。

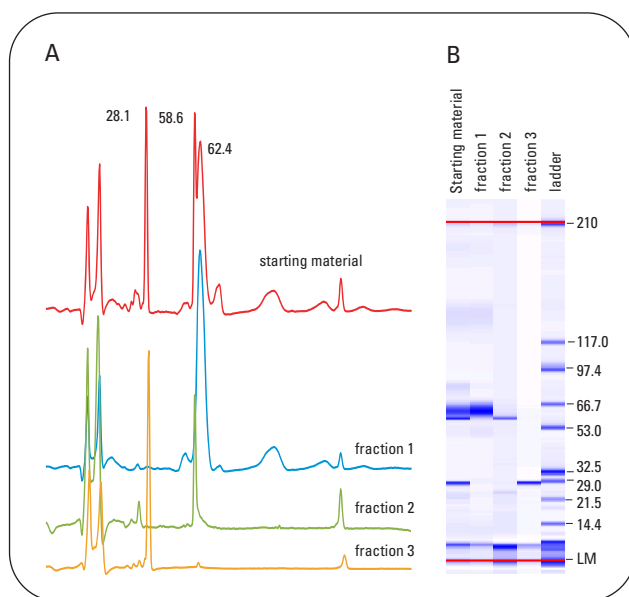


図 3a/b
Protein 200 Plus アッセイを用いた Agilent 2100 バイオアナライザでの、分取精製システムで分取された 3 つのフラクションの分析。エレクトロフェログラム (A) とゲルイメージ (B) が示されています。数字は kDa 単位の分子量を示します。目的の 56 kDa タンパク質はフラクション 2 に存在することが確認されました。

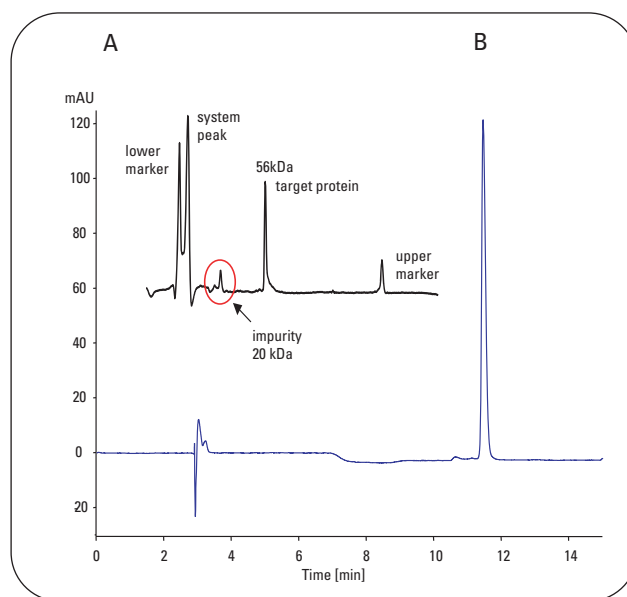


図 4a/b
フラクション 2 のクロマトグラム (A) とエレクトロフェログラム (B)。RP-HPLC は純粋なタンパク質を示しますが、エレクトロフェログラムではまだ 20 kDa 周辺に少量の不純物を存在を示しています。

Agilent 1200 シリーズ分取精製システムは、医薬およびハイスループット合成での化合物ライブラリの化合物の精製に非常に有効なツールです。ターゲット化合物に対して高純度かつ優れた回収率での捕集が可能です。Agilent 6110/6120 シリーズ MSD は、簡単かつ信頼性の高いマスベースフラクションコレクションだけでなく、マルチモードイオン源や、ポジティブ/ネガティブ極性切換を用いた、より洗練された分取精製作業をも可能にする次世代のシングル四重極型質量分析計です。

Agilent 6110/6120 Quadrupole LC/MS システムによるマスベースフラクションコレクション

結果と考察

マルチモードイオンソースを用いたマスベースフラクションコレクション

Agilent 6120 MSD では Agilent マルチモードイオンソースを用いることにより、エレクトロスプレーイオン化と大気圧化学イオン化を同時に行うことが可能です。化合物が、ESI または APCI のどちらかでイオン化が可能であればイオンを生成し、フラクションが開始されます。マスベースフラクションコレクション分析の結果は図 1 のとおりです。

マルチモードイオンソースおよびポジティブ/ネガティブ極性切換を用いたマスベースフラクションコレクション

Agilent 6120 MSD では 1 回の分析でポジティブ/ネガティブ切換を行うことが可能です。そのため、目的化合物がポジティブまたはネガティブモードの ESI または APCI のどちらかでイオン化すれば、イオンが生成されます。マスベースフラクションを行う場合には、通常、 $[M+H]^+$ や $[M-H]^-$ のような付加イオンをメソッドで指定します。マスベースフラクションコレクション実験の結果を図 2 に示します。

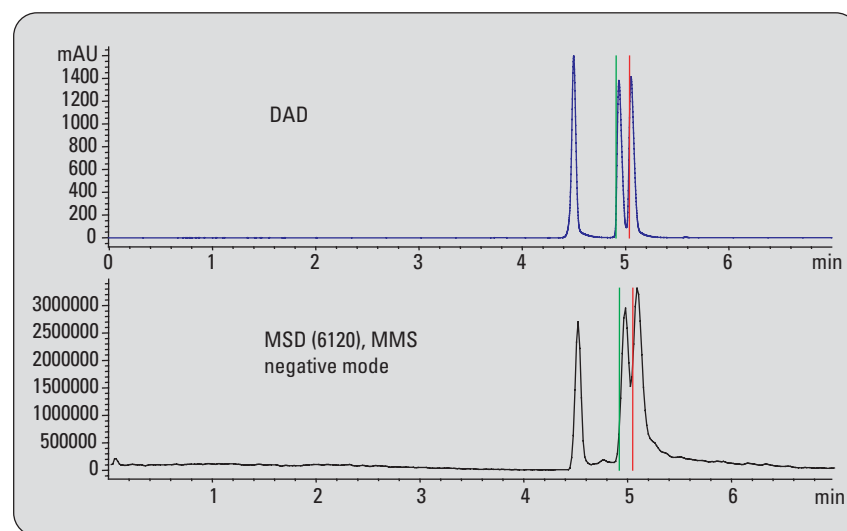


図 1
マスベースフラクション、マルチモードイオンソース、ネガティブイオン化モードの結果

まとめ

本アプリケーションノートでは、ネガティブおよびポジティブイオン化モードで、ESI と APCI のような異なるイオン法を用いた、Agilent 6110/6120 MSD によるマスベースフラクションコレクションを示しました。Agilent 6110 MSD では、ポジティブまたはネガティブイオン化モードのどちらかを、ESI または APCI のどちらかのイオン化法を用いることが可能です。Agilent 6120 MSDでは、ポジティブ/ネガティブ極性切替や、ESI と APCI を同時に行うマルチモードイオンソースを用い、簡単かつ信頼性の高いマスベースフラクションコレクションを行うことができます。

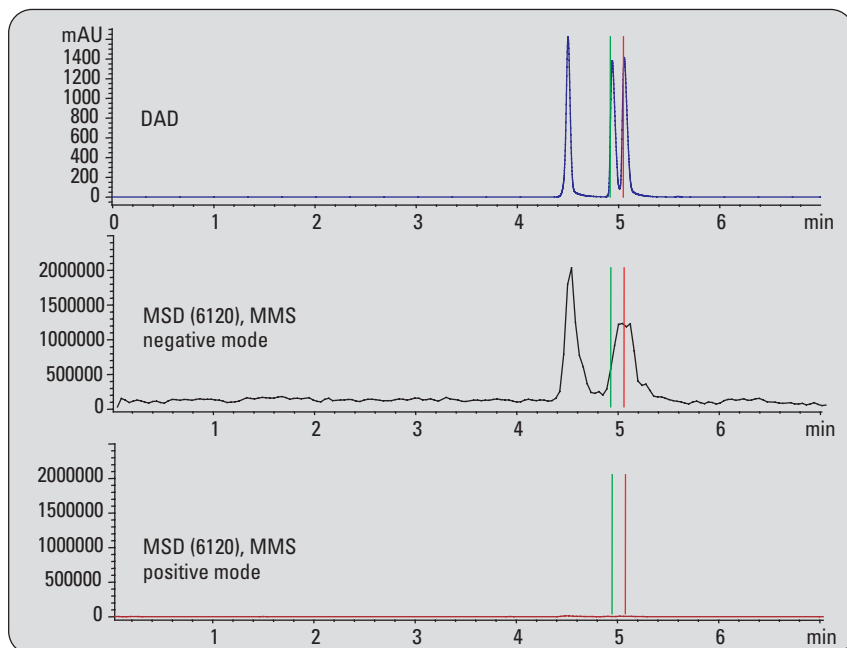


図 2
マスベースフラクション、マルチモードイオンソース、ネガティブおよびポジティブイオン化モードの結果

『マルチモードイオンソースを搭載した Agilent 6110/6120 Quadrupole LC/MS システムによるマスベースフラクションコレクション』、資料番号 5989-5673EN

医薬品またはハイスループット合成から得られる化合物の分子量は通常既知であるため、マスベースフラクションコレクションを用いた分取 HPLC が最適な分取精製メソッドです。マスベースフラクションコレクションシステムでは、捕集したフラクションの純度にも非常に大きな影響を及ぼすフロープリッタが重要となります。スプリッタデザインの影響と、システム中でのフロープリッタの正しいコンフィグレーションを本アプリケーションノートで説明します。

マスベース分取精製システムの最適なコンフィグレーション

ドイツ *Grünenthal GmbH* の
Martin Fuhr、*Judith Steffens* と
共著

スプリット比はバルブの切換周期により決まります。

結果と考察

スプリッタデザイン

最も一般的な市販のフロープリッタは、パッシブスプリッタです (図 1a)。さまざまな長さや内径のチューブを使用することにより、背圧を変化させてスプリットします。Agilent アクティブスプリッタ (図 1b) は、高速でバルブをスイッチングすることにより、一定量の移動相をメインフローからメークアップフローに送液するという独自の作動原理を持ちます。

コンフィグレーション 1: スプリッタの手に UV 検出器

パッシブスプリッタの場合、UV 検出器のフローセルで非常に高い背圧を生じるため、アクティブスプリッタの場合のみ、図2のコンフィグレーションが可能です。UV、MS、および UV と MS を組み合わせた分取の純度結果を表1に示します。

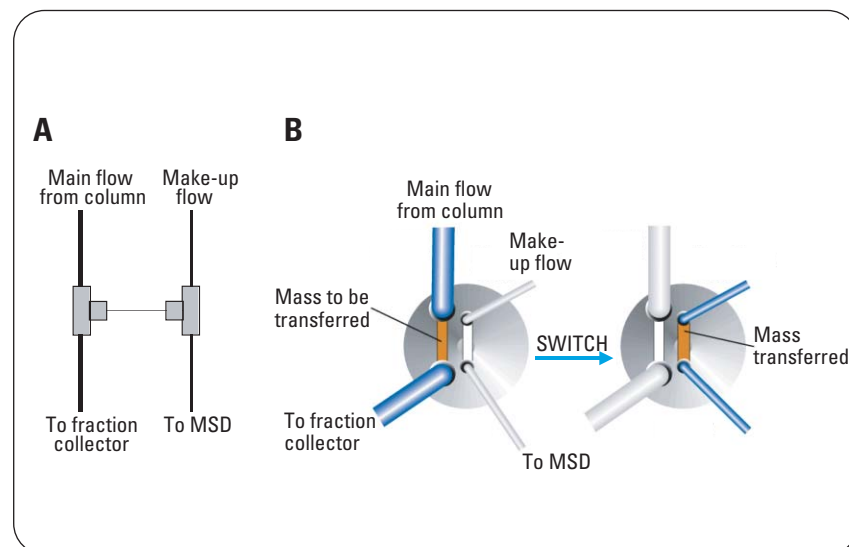


図1
A) パッシブスプリッタ、B) アクティブスプリッタ

コンフィグレーション 2:

スプリッタと MSD の間に UV 検出器

コンフィグレーション 2 を用いた実験を、アクティブおよびパッシブスプリッタを用いて行いました。結果を表 2 に示しました。パッシブスプリッタを用いて得られた純度結果はアクティブスプリッタを用いた場合よりもわずかに低くなりました。また、マススペースフラクションコレクションを行った場合、純度はコンフィグレーション 1 よりも低くなりました。

コンフィグレーション 3:

UV および MS 検出器への 2 番目のスプリッタ

このコンフィグレーションでは、アクティブまたはパッシブスプリッタからのフローを、3 方 ティーを使用して UV および MS 検出器にスプリットしました。スプリット比は検出器の背圧に依存し、決定することはできませんでした。コンフィグレーション 3 を用いた実験は、アクティブおよびパッシブスプリッタを用いて行いました。結果を表 3 に示しました。

まとめ

マススペースフラクションコレクションの場合、最高の純度結果が得られるコンフィグレーションは、UV 検出器の後にスプリッタを設置する方法です。しかし、パッシブスプリッタにより生じる背圧が UV フローセルには高過ぎるため、アクティブスプリッタを使用した場合に限り、このコンフィグレーションを用いることが可能です。純度実験の結果を図 3 に示しました。

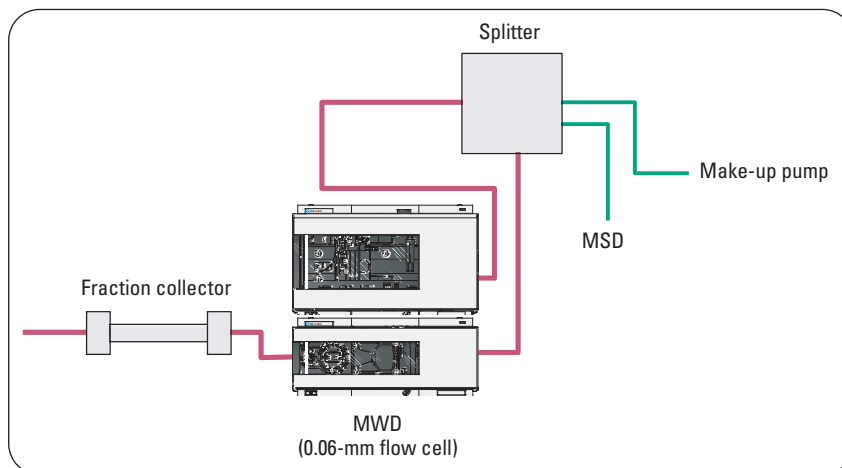


図 2
コンフィグレーション 1: スプリッタの前に UV 検出器

スプリッタ	コレクション	ニモジピン純度
アクティブ	UV	99.4 %
	MS	92.1 %
	UV および MS	98.8 %

表 1
純度結果コンフィグレーション 1

スプリッタ	コレクション	ニモジピン純度
アクティブ	UV	98.3 %
	MS	89.2 %
	UV および MS	95.2 %
パッシブ	UV	98.2 %
	MS	83.1 %
	UV および MS	94.2 %

表 3
純度結果コンフィグレーション 3

スプリッタ	コレクション	ニモジピン純度
アクティブ	UV	98.4 %
	MS	85.4 %
	UV および MS	94.5 %
パッシブ	UV	97.3 %
	MS	81.0 %
	UV および MS	93.0 %

表 2
純度結果コンフィグレーション 2

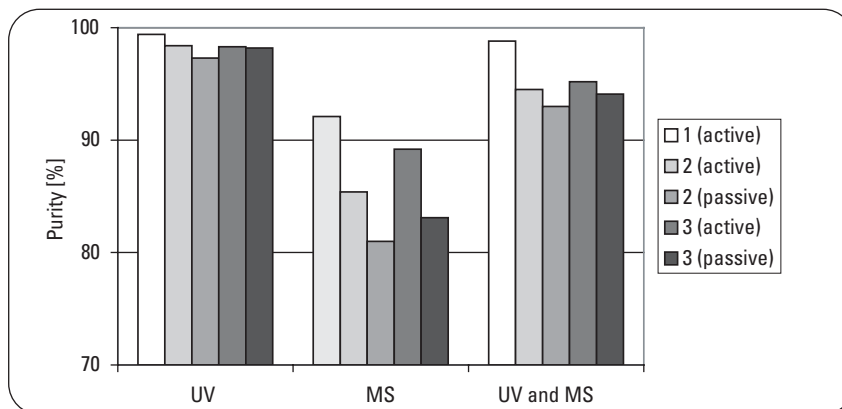


図 3
分取精製実験の結果

『最高の純度を得るためのマススペースフラクションコレクションシステムの構成』、資料番号 5989-4845EN

創薬のためのコンビナトリアルケミストライブラリは、自動分取 LC/MS システムにより、ルーチンで精製されます。30 ~ 50 mg の混合物のサンプルを、マスベースフラクションコレクションを用いて、流量 20 ~ 35 mL/min、内径 20 mm のカラムで分離します。これまで、化合物ライブラリの合成に必要な数グラムの出発物質の精製には、結晶化またはシリカゲルを用いた手動フラッシュクロマトグラフィーのような、古典的な分取精製メソッドに頼る必要がありました。本アプリケーションノートでは、内径 50 mm のカラムを用いて 1 回の分析で最高 4 g の粗生成物を精製するための、移動相流量 100 mL/min のマスベースフラクションコレクションモードでの Agilent 1100 シリーズ分取精製システムの操作について解説します。

高流量条件下でのマスベースフラクションコレクション

結果と考察

移動相流量 100 mL/min でのマスベースフラクションコレクションのためのシステムコンフィグレーション

100 mL/min の高流量を実現するために、内径 0.7 mm のキャピラリーを用いて、分取ポンプ、デュアルループオートサンブラ、そしてカラムを接続しました。光路長 0.06 mm の分取用フローセル、と同梱された内径 0.8 mm のキャピラリーを用いて、カラムと UV 検出器を接続しました。MSD とフラクションコレクタの間に約 5 秒の時間差が必要であるため、

アクティブスプリッタとフラクションコレクタの間に 10 mL キャピラリーを接続しました。多量のサンプルを注入するために、10 mL サンプルループをデュアルループオートサンブラに接続しました。

内径 0.8 mm の分取用チューブキット (G1364-68711) および高流量用ニードル (G1364-87202) を用いて分析スケールフラクションコレクタを変更し、大容量捕集を行うために、40-ファネルトレイ (G1364-84512) を使用しました。

グラムオーダーの分取精製

およそ 4 g の精製を行うために、テスト混合物 A (DMSO 12,000 μ L 中に各化合物 1,333 mg) を、Agilent Prep-C18 固定相を充てんした 50 x 200 mm カラムに注入しました。図 1 のように、ニモジピンは、強いナトリウム付加 (418 に加え、予測される付加体 $[M+Na]^+$ が 441 のトリガマスを与える) を示すため、441 のトリガマスに基づき捕集しました。

図 2 のように、捕集したフラクションの再分析によって、ニモジピンの純度は 96.2% (UV シグナルの面積パーセントに基づく) でした。

まとめ

本アプリケーションノートでは、100 mL/min の移動相条件で、内径 50 mm のカラムを用いた数グラム単位の化合物のマスベース分取精製を説明しました。わずかなシステム変更のみで、ベースライン分離されていないピークに対しても、化合物を高純度で単離精製することができました。非常に短い光路長の分取用フローセルを使用しても、UV シグナルでは分離することができませんでした。

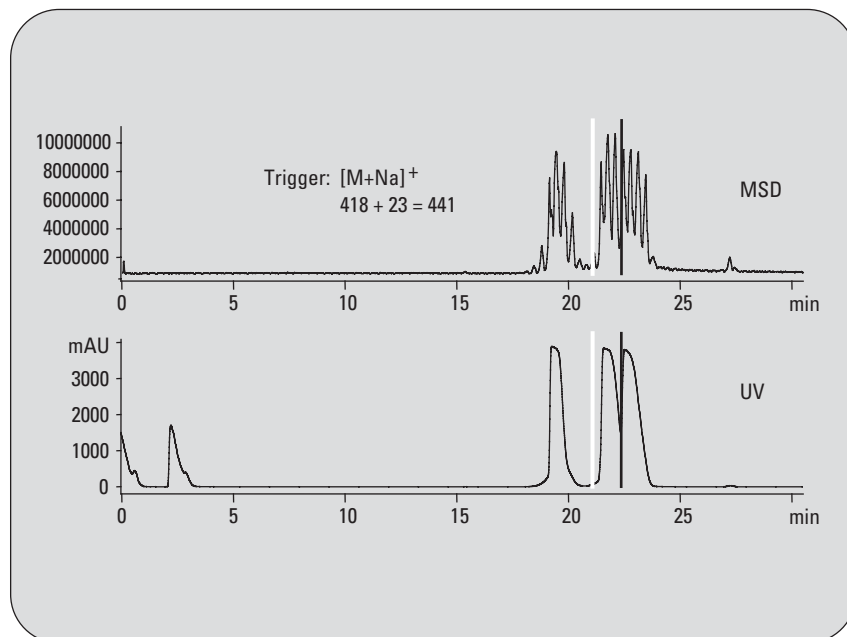


図 1
マスベースフラクションコレクションの結果

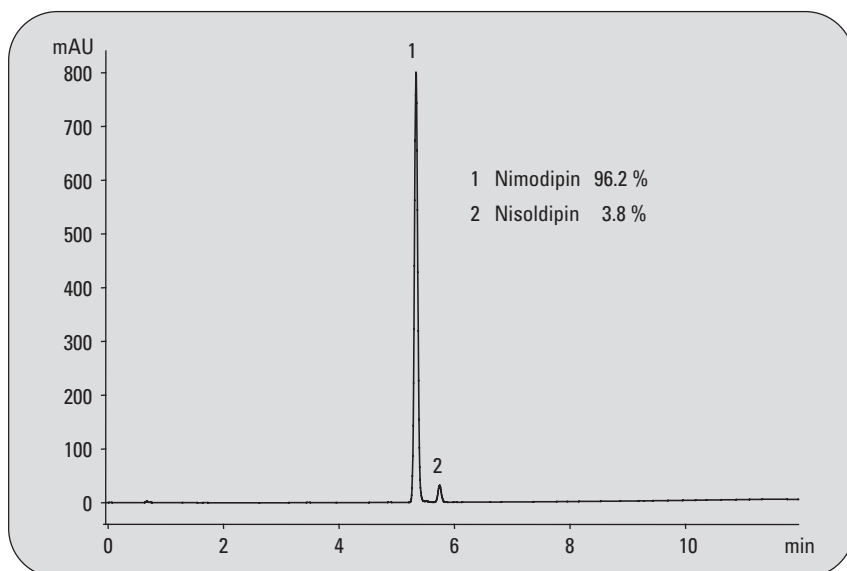


図 2
捕集したフラクションの再分析

『グラムスケールでの化合物精製のための高流量条件下でのマスベースフラクションコレクション』、資料番号 5989-2469EN

リテンションタイムウィンドウ、検出器のシグナル、または MSD を用いたマスベースの精製システムを用いて、フラクションコレクションを行うことが可能です。MSD では分取するフラクションの数を少なくすることができる高い選択性と、必要な目的化合物のみを含むフラクションを得ることができる利点があります。

本アプリケーションノートでは、ピークベースおよびマスベースフラクションコレクションのためのさまざまなフラクショントリガ技術を、必要な生成物の純度と回収率に関して比較し、各トリガ技術の長所と短所を説明します。

マスベースフラクションコレクションの最適化

結果と考察

マスベースフラクションコレクション

マスベースフラクションコレクションでは、カラムから分離、溶出されたサンプルをフラクションコレクタと MSD に分割するフロースプリッタを用いる必要があります。スプリッタおよび周辺配管の長さ、太さを含むデザインに応じて、MSD のピークの広がりが大きくなったり、小さくなったりします。ピークの広がりには MSD 本体に由来する場合もあります。MSD は高感度を得るために設計された濃度依存検出器であるため、高濃度の分取用サンプルがシステムに導入される場合は、常に過負荷状態となります。

UV および MSD シグナルの両方によるフラクションコレクション

MSD の選択性を維持することによる純度と回収率に関する最高の精製結果を、図 1 のように UV および MSD シグナルの両方が検出された場合で実現することができます。UV と MSD の両方の基準が満たされた場合にピークが捕集されます。ターゲットの質量が検出されない限り、UV シグナルのピークは捕集されません。

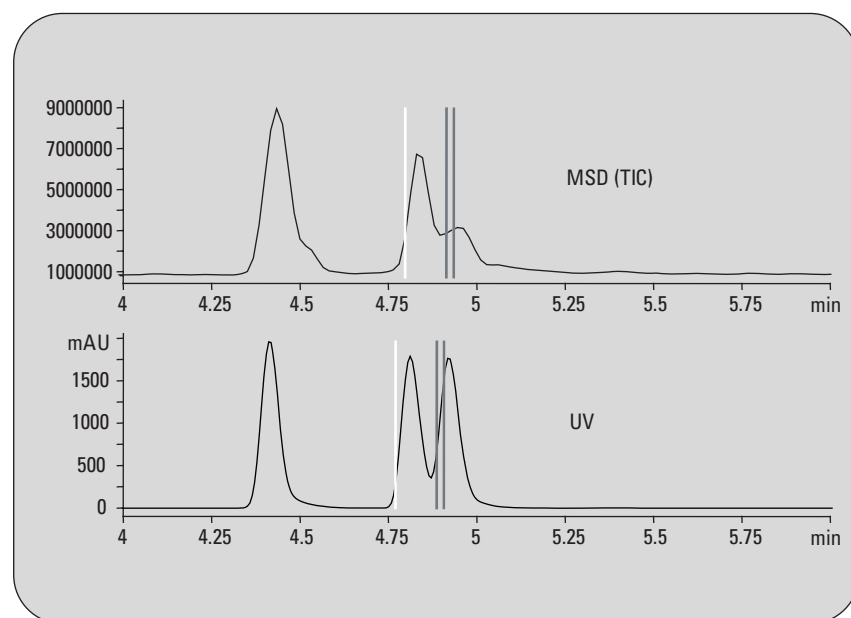


図 1
UV および MSD の両方が検出された場合でのフラクションコレクションの結果

2 つの化合物の分離に応じて、1 つまたは 2 つのフラクションが捕集されます。目的化合物の大部分は高純度で最初のフラクションに存在し、目的化合物の残りは、いくつかの不純物と一緒に 2 番目のフラクションで捕集されます。フラクション 1 と 2 の再分析 (図 2A と 2B) は、フラクション 1 が 9.76 mg のニモジピンを含むことを示しました。これは、純度 95.8% で回収率 92.5% と同等です。フラクション 2 は 0.01 mg のニモジピンを含んでいました。これにより、全体的な回収率は 92.6% になりました。

まとめ

さまざまなトリガモードの長所と短所を表 1 にまとめました。UV 検出器を用いた場合では、フロープリッタを用いず検出器をカラムの後に直接接続した場合、ピークベースフラクションコレクションで最大の純度と回収率が得られます。MSD を用いることで、システムの実験性が増しますが、フロープリッタや MSD 本体により生じるピークの拡散のために、捕集したフラクションの純度は低下します。UV および MSD シグナルの両方が検出された場合を用いて、MSD の選択性と良好なピーク形状を持つ UV 検出器を組み合わせることで、最高の結果を実現することが可能です。これは、UV 検出器を分離カラムの後ろではなくスプリッタの後ろに直接システムに背圧を生じさせないフロープリッタを用いることで可能となります。

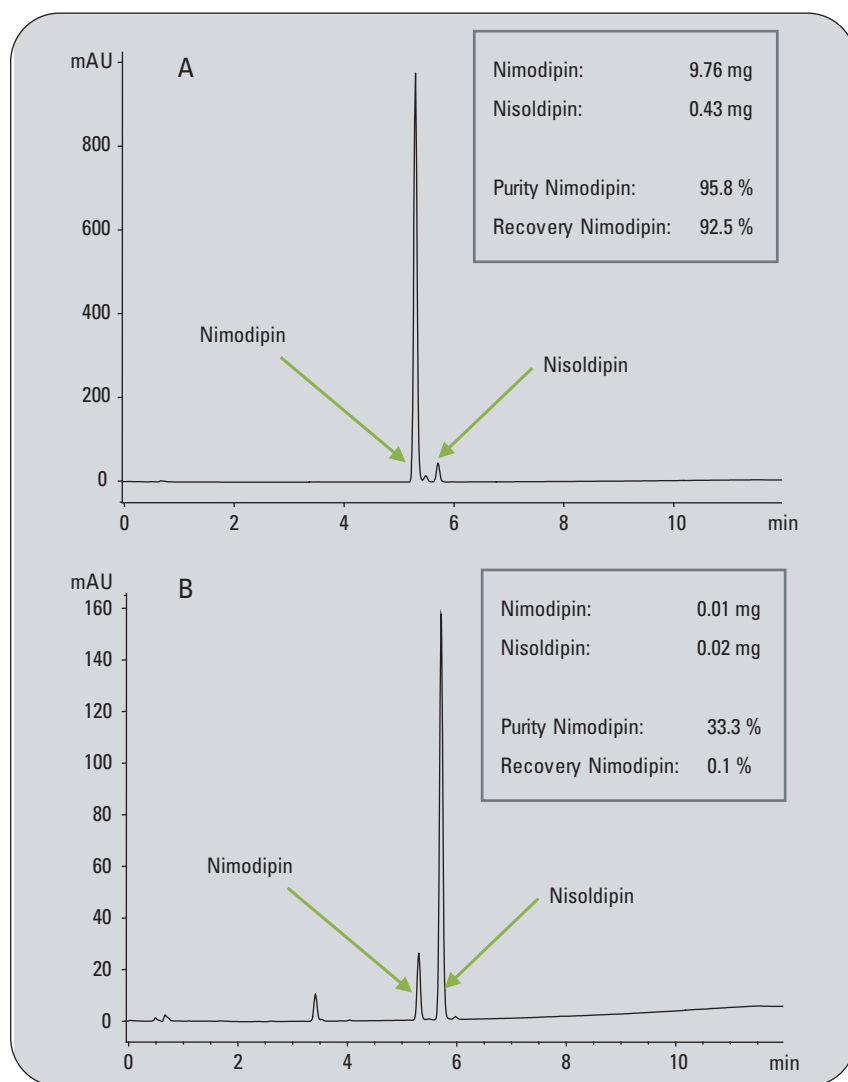


図 2
A) フラクション 1 の再分析、B) フラクション 2 の再分析

トリガモード	長所	短所
ピークベース	最高の純度と回収率	- 多くの無用なフラクションの捕集 - 目的化合物含むフラクションを同定する必要がある
マスベース	- 選択性が高い - 回収率が高い	不純物が近くに溶出するとフラクションの純度が低下
2 つの質量でのマスベース	簡単なマスベースフラクションコレクションよりも純度が良い	- 異性体の分離が不可能 - 目的化合物と不純物が共溶出する場合、完全に化合物が損失 - パラメータ (スレッシュホールドなど) を分析から推定する必要がある
UV および MSD の両方が検出された場合	- マスベースフラクションコレクションに対して優れた純度結果 - 一般的なアプローチ - カラムで分離された場合異性体を単離することが可能	- カラム直後に UV 検出器を設置する必要がある - 背圧を生じないスプリッタが必要

表 1
フラクショントリガモードの比較

『ブール理論を用いた、UV シグナルと組み合わせて最高純度を得るためのマスベースフラクションコレクションの最適化』、資料番号 5988-2014EN

デュアルループオートサンプラ (DLA) の注入原理は、他の Agilent 1100 シリーズオートサンプラとは異なります。

DLA では、サンプルはバッファループ内に吸引された後、低圧計量デバイスを用いてサンプルループに導入されます。

その後、サンプルループは高圧流路に切り換えられます。このいわゆる固定ループ注入原理により、以下の 2 つの操作モードが可能です。

- 部分ループ注入。サンプルを失うことなく、サンプルループ量よりも少ないサンプル量を注入します。
- 完全ループ注入。高精度ですが、吸引サンプルの大部分を無駄にします。

部分ループ注入は分取に適しており、完全ループ注入は分析に適しています。

デュアルループオートサンプラによる最適性能

動作原理

完全および部分ループ注入

DLA の固定ループ方式により、2 つの注入モード、完全および部分ループ注入が可能になります。高い注入精度が必要な場合には完全ループ注入を使用する必要があり、サンプルループ量よりも多いサンプル量をサンプル容器から吸引する必要があります。注入精度が重要ではなく、サンプルを無駄にしないことが重要な場合、部分ループ注入が最適なメソッドとなります。サンプルループ量よりも少ないサンプル量がサンプル容器から吸引され、ループに吐出されます (図 1)。完全および部分ループ注入の長所と短所の要約:

- 完全ループ注入
 - サンプルループに過剰に充てん (3 ~ 5 倍) する必要があり、サンプルの大部分が無駄になります
 - 高精度→ 分析作業に最適
- 部分ループ注入
 - 吸引したサンプルすべてがカラムに注入されます
 - 精度が低い (サンプルループサイズ、サンプル量、吸引速度などにより異なる)→ 分取作業に最適

性能

1. 完全ループ注入

完全ループ注入は、分析 HPLC に求められる高精度注入に適したメソッドです。最小過剰充てん係数 1 の場合は、正確な注入が行えません。図 2 には、1 ~ 7 の異なる過剰充てん係数に対するピーク面積が示されています (50 μ L サンプルループ)。3 ~ 5 の過剰充てん係数までピーク面積が大きく増加することが分かります。3 未満の過剰充てん係数を用いた場合、サンプルは完全には注入されません。

2. 部分ループ注入

分取 HPLC では、サンプル容器から吸引されたサンプル量を完全にカラムに注入することが重要となりますので、注入精度はあまり問題になりません。

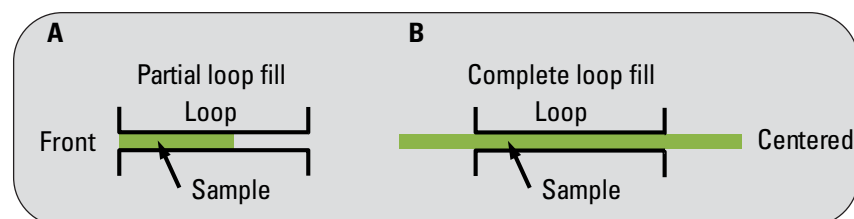


図 1
部分および完全ループ注入

サンプルループ充てん係数

図 3 には、同じサンプルループ (500 μL) を用いて、さまざまな注入量で複数回注入した結果を示しました。点線で印が付けられた、充てん率が約 50% まで、ピーク面積は直線的に増加します。サンプルのロスをも最小限に抑えるために、最大充てん量はサンプルループ量の 50% 以上にならないようにする必要があります。

吸引および吐出速度

吸引および吐出速度は面積精度に影響を及ぼしませんが、図 4 のように回収率への影響があります。

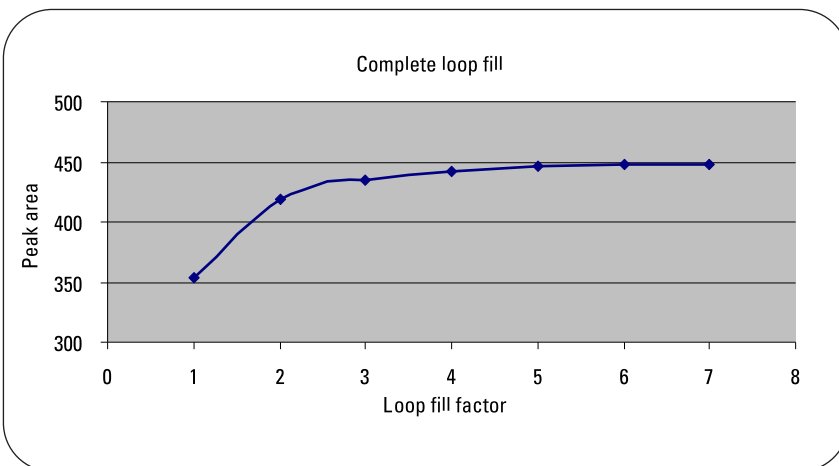


図 2
さまざまな過剰充てん係数に対するピーク面積

まとめ

Agilent 1100 シリーズデュアルループオートサンプラの最高性能を得るためには、以下について留意する必要があります。

完全ループ注入

- 高い面積精度と最高の分析結果を得るには、完全ループ注入方法を使用する必要があります。
- 最高の注入真度および精度を実現するには、過剰充てん係数を 3 ~ 5 にする必要があります。

部分ループ注入

- 分取作業のために部分ループ注入を用いる必要があります、この場合、サンプル容器から吸引したサンプル全量がカラムに注入されます。
- 最高の注入精度と最高のサンプル回収率を得るために、サンプルループにはサンプルループ量の 50% 以下の充てん率にする必要があります。

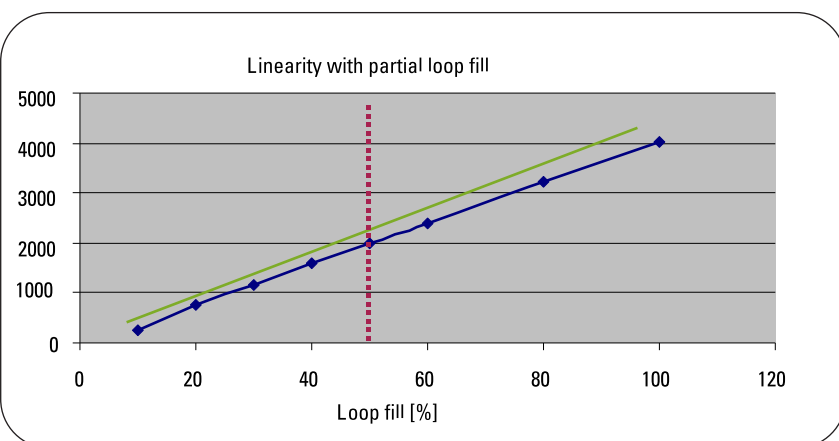


図 3
部分ループ注入に対するピーク面積の直線性

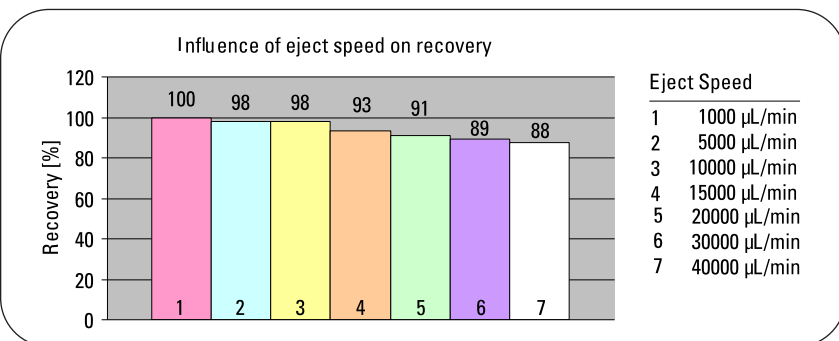


図 4
部分ループ注入性能 - 吸引/排出速度の影響

『Agilent 1100 シリーズデュアルループオートサンプラ PS - 大容量のサンプルを注入した場合の最適な性能』、資料番号 5989-1714EN

分取 HPLC は、創薬における化合物の精製に最適なメソッドです。10分程度の短く急勾配のグラジエントの一般的なメソッドを用いて、多くの未処理サンプルが精製されます。これらのメソッドを用いて多くの化合物を単離することが可能ですが、立体異性体またはジアステオマーの単離と精製には、アイソクラティック条件、または非常に緩い勾配のグラジエントで、より長い分析時間が必要となります。本アプリケーションノートでは、1 回の分析内でサンプルを複数回注入することでサンプル処理数を増やし、貴重な時間と移動相の節約に関して説明します。

アイソクラティック精製におけるマルチ注入

結果と考察

マルチ注入

最初の異性体が約 25 分後に溶出し、サンプル中の他の不純物が検出されなくなる一定時間後に、カラムにさらにサンプルを注入することが可能です。この時間は、最初のピークの始点と 2 番目のピークの終点の時間の差により決まり、この

場合約7分でした。5 回連続注入の結果を図1に示しました。

5 回の注入の総分析時間は 70 分で、1,470 mL の移動相を消費しました。単独の分析 5 回と比較して (175 分、3,675 mL)、時間と移動相を約 60% 節約したことに相当します。

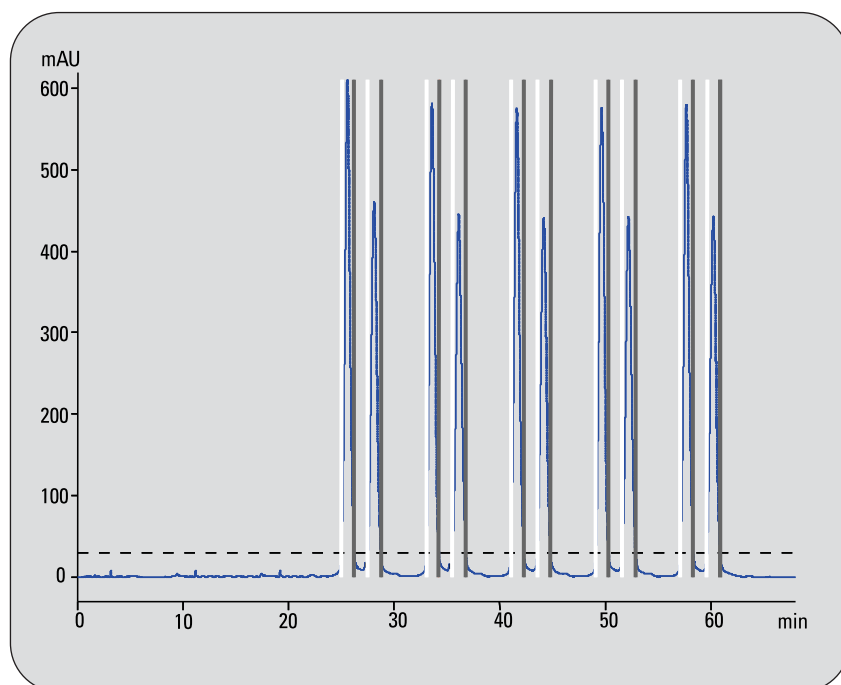


図1
マルチ注入

注入プログラム

マルチ注入用の注入プログラムは 10 行から構成され、サンプルをサンプルループに排出した後のニードル表面の洗浄および、ニードル、ニードルシート、ニードルシートキャピラリ、バルブなどのフラッシングが含まれます。1 回の分析で行う注入回数に応じて、これら 10 個のコマンドのコピーを行う必要があります。

制限項目と禁止項目

- サンプル溶媒として移動相を用いる必要があります。
- マルチ注入に使用されるサンプルループは、「ループを使用」のインジェクタの設定で設定する必要があります。
- インジェクタプログラムの行数は 60 ステップに限定されます。
- インジェクタプログラムの行数を減らすために、REPEAT/END REPEAT コマンドを使用することが可能です。

まとめ

異性体または鏡像異性体を分離、精製するために、1 回のアイソクラティック分析でマルチ注入を行うことで、貴重な時間と移動相を節約することが可能です。Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いてインジェクタプログラムを設定することにより、マルチ注入を簡単に行うことが可能です。

分析と分取の複合システムの性能は、キャピラリの内径などのハードウェアの性能に常に影響を受けます。本アプリケーションノートでは、最適なコンフィグレーションを持つシステムのセットアップについて説明します。

結果と考察

基本的な考え方

モード選択

メソッドを選択することで、分析または分取モードを切り替えます。分析または分取に対して少なくとも 1 つのメソッドを設定します。分析および分取モードの切り換えには切換バルブを使用し、クォータリポンプまたは分取ポンプからのフローをデュアルループオートサンブラに送ります。分取モードでは、メークアップポンプとしてクォータリポンプを使用します。

分析および分取スケールの複合システム

アクティブスプリッタ

分取モードではスプリッタを用い、メークアップフローの送液のためにクォータリポンプを使用します。分析モードでは、スプリッタを使用しません。クォータリポンプからのフローは、デュアルループオートサンブラ、分析カラム、ダイオードアレイ検出器、Agilent アクティブスプリッタのメークアップフローセクションなどから MSD に送られます。

システム配管

システムの配管を図 1 に示しました。分析スケールでは、デュアルループオートサンブラから選択バルブを接続する配管は内径の大きいキャピラリ（内径 0.5 mm）を用います。分析スケールでの流路に使用されるその他すべてのキャピラリは、内径の小さいキャピラリ（内径 0.18 mm）です。

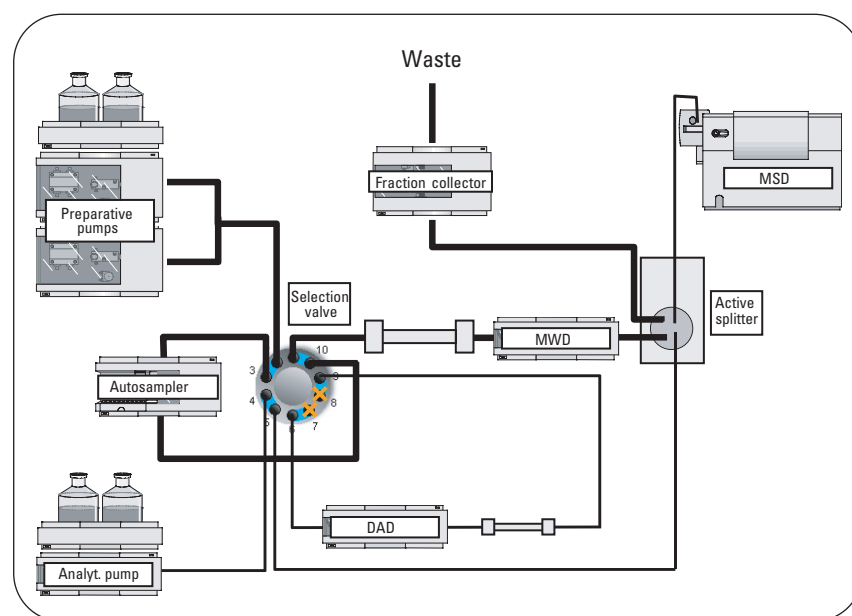


図 1
システム配管図

デュアルループオートサンプラ

デュアルループオートサンプラは 2 つの注入ループから構成されています。分取スケールでは、2,000 μL のループにて、部分ループ注入法を用いました。分析スケールでは、50 μL のループを用い、分析サンプルの濃度に応じて部分または完全ループ注入法にてサンプルを注入しました。

アプリケーション例

前述したシステムコンフィグレーションで、次のようなアプリケーションを実行しました。フラクションは、分取スケールでは、両方のシグナルが検出された場合をトリガとして、UV ベース（スロープのみ、アップスロープ 150 mAU/s、ダウンスロープ 150 mAU/s）およびマスベース（スレッシュホールドのみ、150,000 カウント）の組み合わせに基づき捕集しました。結果を図 2 に示しました。

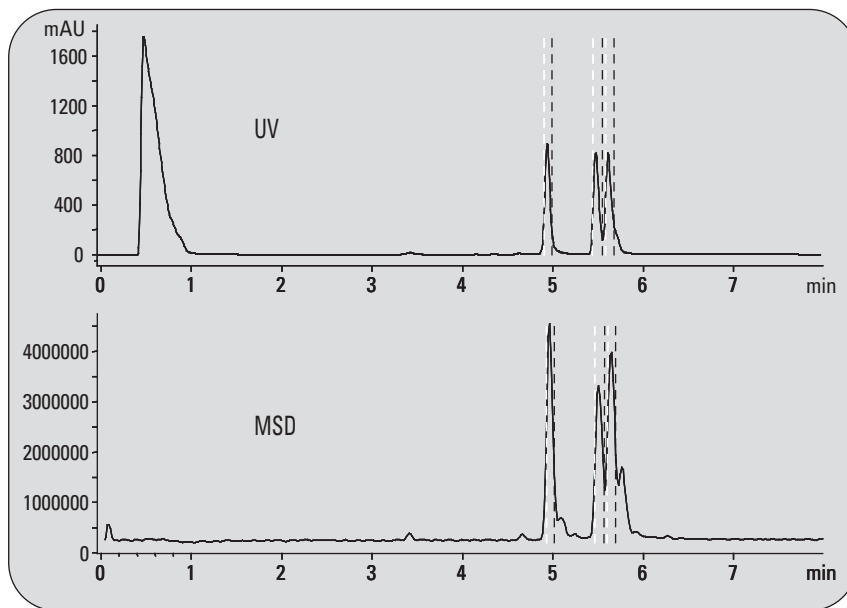


図 2
アプリケーション例

まとめ

本アプリケーションノートでは、分取スケールおよび分析スケールに適したシステムのコンフィグレーション、セットアップ、オペレーションを説明しました。使用するモードは、特定のメソッドをサンプルに適用して決定します。一般的なアプローチであれば、ChemStation (ChemStation リビジョン A.10.02以上) のみ、または (ChemStation リビジョン A.10.02以上) ピュリフィケーションソフトウェア、Easy Access などのソフトウェアをアドオンし、システムを使用することも可能です。それでもなお、分析および分取用の複合システムでは、流路に関しては最適ではない場合があります。本アプリケーションノートでは、最善のシステムコンフィグレーションについて説明しました。

化合物の溶解度に応じて、数 μL ～数 L までサンプル注入量は変化します。5 mL までの少量のサンプルの場合はオートサンブラを用いて簡単に注入することが可能ですが、より大量のサンプルを注入する場合は、通常注入ポンプを用いて注入します。高圧注入ポンプを用いた場合、サンプルをカラムに直接送ることが可能です。本アプリケーションノートでは、高圧注入ポンプとして Agilent 1100 シリーズアイソクラティックポンプを含む精製システムについて説明します。

結果と考察

システムコンフィグレーション

システムのコンフィグレーションを図 1 に示しました。2 ポジション/6 ポートバルブを用いて、グラジエント用分取ポンプと注入ポンプを切り替えました。精製ステップは以下の 3 段階から構成されます。

ポンプシステム

1. はじめに、注入バルブはポジション 1 にあり、グラジエントポンプからのフローはカラムに、注入ポンプのフローは廃液へ流れます。
2. 分析を開始すると、注入バルブはポジション 2 に切り替わり、注入ポンプからのフローがカラムに送られます。
3. サンプルがカラムに送られた後、注入バルブはポジション 1 に戻り、グラジエントが開始されます。グラジエントの間、適切な溶媒を用いて注入ポンプと注入バルブを洗浄します。

イギリス、GlaxoSmithKline の
Graham Foster、Richard
O'Hanlon 氏との共著

サンプル注入システム

サンプル注入システムは、注入ポンプと 12 ポジション/13 ポートバルブから構成されており、バルブの出口側をポンプに接続します。グラジエント開始時の移動相 (溶媒 A)、サンプル、洗浄溶媒を、以下の順でバルブの注入口側に接続します (図 2)。

- ポジション 1: 初期位置、溶媒 A (グラジエント初期移動相組成)
- ポジション 2: サンプル
- ポジション 3: サンプルをバルブ、注入ポンプ、カラムへ送る溶媒 A
- ポジション 4: 注入バルブと注入ポンプを洗浄する洗浄溶媒
- ポジション 5: 注入ポンプと注入バルブから洗浄溶媒を除去する溶媒 A

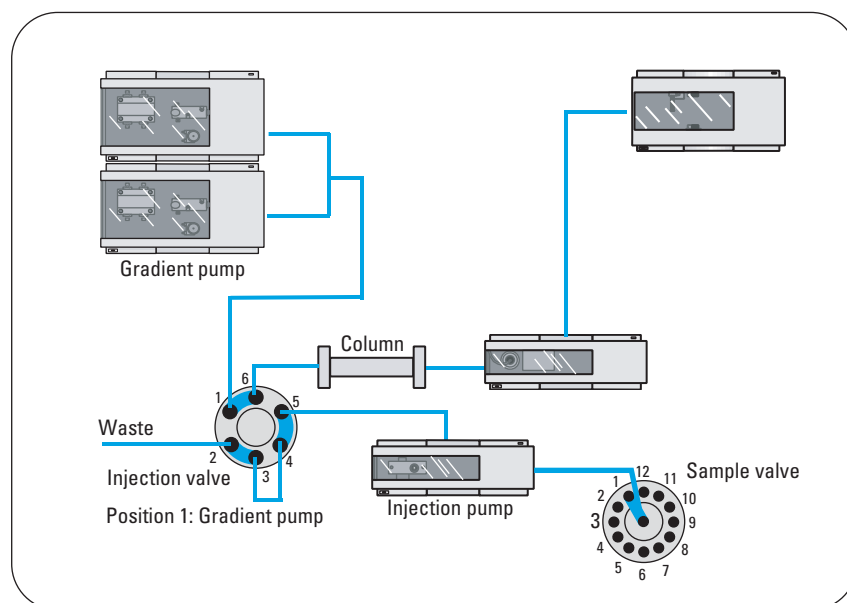


図 1
システムコンフィグレーション

ポンプとバルブのタイミング

グラジエントポンプ、注入ポンプ、注入バルブ、サンプルバルブに対してタイムテーブルを設定し、「サンプル注入システム」で説明したワークフローを実行します。

システム範囲と制限

- Agilent ChemStation によりシステムを操作します。
- タイムベース、ピークベースフラクションでは、シーケンスを用いて分取することが可能です。マスベースフラクションコレクションでは、シングルラン（ランメソッド）の場合のみ可能です。
- 注入サイクルは、グラジエントポンプ、注入ポンプ、注入バルブ、サンプルバルブのタイムテーブルにより制御されます。
- ディレイボリウムキャリブレーションの機能は使用できません。
- アイソクラティックポンプの最大流量は 10 mL/min です。
- 高濃縮されたサンプルには、アイソクラティックポンプのパージバルブ PTFE フリットを取り外すことをお勧めします（アイソクラティックポンプ取扱説明書、部品番号 G1310-90003 に手順を記載）。

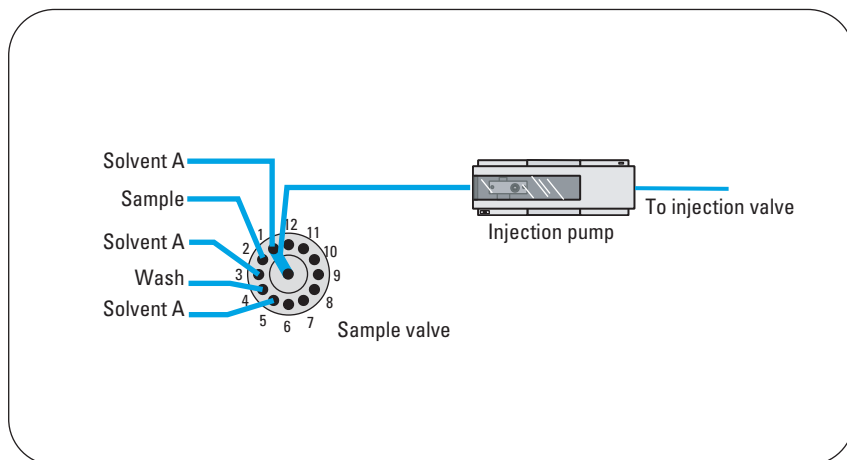


図2
サンプル注入システム

まとめ

本アプリケーションノートでは、アイソクラティックポンプとサンプル注入のためのバルブソリューションを含む Agilent 1100 シリーズ精製システムのセットアップとコンフィグレーションを示しました。ポンプとバルブのタイムテーブルを使用したメソッドセットアップを説明しています。

トリガ機構に関わらず、サンプルから目的化合物だけでなくその他のすべての部分もリカバリーロケーション (図 1) と呼ばれる専用容器に捕集するのが望ましいことがあります。リカバリー溶液を乾燥、再溶解、再注入することで、サンプル中に存在していても、最初の精製分析で捕集されなかった化合物を回収することが可能です。

考察

リカバリーコレクション - 理由

最初の精製分析においてフラクショントリガのかからなかったサンプルから回収するために、リカバリー溶液を用いることが可能です。また、精製システムが期待したようにフラクションを捕集しなかった場合、目的化合物を回収する安全機能でもあります。

リカバリーコレクション - 方法

フラクションコレクタの廃液ラインからリカバリー溶液の捕集を行う必要があります。1 台以上のフラクションコレクタがシステムにセットアップされている場合、リカバリーコレクションに流れる前に廃液ラインを組み込む必要があります。

リカバリーコレクション

Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いたリカバリーコレクション

Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いて、以下の 3 つの異なる方法でリカバリーコレクションを行うことが可能です。

- フラクションコレクタの廃液ラインに 12 ポジション/13 ポートバルブを設置
 - 12 のリカバリーロケーション
 - ソフトウェアにより、基本的なリカバリーロケーションをトラッキング
- 他社製フラクションコレクタと外部接点出力ボード
 - リカバリーロケーションの数はフラクションコレクタにより異なります
 - ソフトウェアによるリカバリーロケーショントラッキングなし

Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタ

- ファネルトレイを用いて最大 120 のリカバリーロケーション
- 完全なリカバリーロケーションのトラッキング

12 ポジション/13 ポートバルブ

フラクションコレクタの廃液ラインをバルブの入口に接続し、12 の出口をリカバリー容器に接続します。注入ごとに、バルブが自動的に次の位置に切り換えられます。

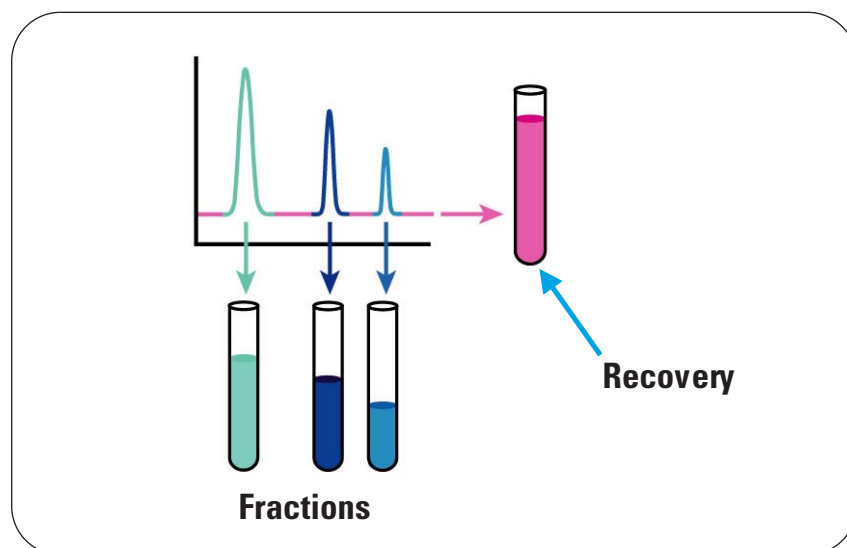


図 1

他社製フラクションコレクタと外部接点出力ボード

オートサンプラに挿入した 外部接点出力ボードは、オートサンプラのボトル番号に対する 外部接点出力と、4 つの外部リレー接点を提供します。一般用外部接点ケーブルを用いて、外部装置と接続し、外部接点を外部装置に出力します。ChemStation のインジェクタプログラムを用いて4 つの接点を開閉し、他社製フラクションコレクタを注入後に次の位置に移動させ、ダイバータバルブを切り換えることが可能です。



図2
フラクションコレクタに設置されたファネルトレイ

Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタ

リビジョン A.10.01 以降のChemStation では、リカバリーコレクション用に Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタをシステムに設定することが可能です。このフラクションコレクタでは、バイアル、ウェルプレート、試験管用のトレイの他、新しいファネルトレイも使用可能です。ファネルトレイは、チューブの付いた 40 個のファネルから構成されています (図 2)。このチューブは、大きなガラスボトルなどの様々な容器を接続することが可能です。フラクションコレクタには最大 3 枚のファネルトレイを設置することが可能ですので、最大 120 のリカバリーロケーションが得られます。

まとめ

Agilent 1100 シリーズ精製システムでは、3つのリカバリーコレクション方法をとることができます。最も簡単な方法は、12 ポジション/13 ポートバルブをフラクションコレクタの廃液ラインに接続する方法です。

外部接点出力ボードの外部接点を用いて、他社製フラクションコレクタを ChemStation インジェクタプログラムを用いて制御することも可能です。

最も洗練されたアプローチは、Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタを Agilent ChemStation でリカバリーコレクタとして設定して用いる方法です。バイアル、ウェルプレート、試験管用トレイに加え、新しいファネルトレイにより、非常に多くのリカバリーコレクションを捕集することが可能です。

ニフェジピン、ニモジピン、ニソルジピンは 1,4- ジヒドロピリジン構造を持つ抗狭心症薬です。これらは、筋緊張亢進、不整脈、狭心症の場合に、カルシウム拮抗薬として使用されます。医薬品精製の応用例として、混合物からのこれら 3 つの化合物の単離を示します。このアプリケーションでは、1 回の分析で、各化合物を 20 mg を精製し、必要な化合物だけを含む 3 つのフラクションを得ました。

結果と考察

システムセットアップとコンフィグレーション

21.2 x 50 mm ZORBAX SB-C18 カラムを用い、流量 25 mL/min の一般的なメソッド用にシステムをセットアップしました。カラムからのフローは UV 検出器の後で、フラクションコレクタに流れるメインフローと、MSD に流れるフローにスプリットしました。サンプルは DMSO で溶解し、目的化合物の前に DMSO が必ず溶出するように、メソッドを作成しました。そのため、グラジエント開始前に、水/アセトニトリル 90:10 を 2 分間カラムに送りました。DMSO による MSD の汚染を防止するために、分析の最初の 2 分間は、MS の切換バルブを廃液側に設定しました。

高流量のマスベースフラクションコレクション

マスベースフラクションコレクション

3 つの化合物の分子量は、ニフェジピンが 346.34、ニモジピンが 418.45、ニソルジピンが 388.42 です。3 つの化合物すべてが、ポジティブイオン化モードでフラグメンテーションを示しました。そのため、ニモジピンの分取は 418 の分子量関連イオンをトリガとせず、342 のフラグメントイオンイオンをトリガに設定しました。図 1 に、 $[M+H]^+$ イオン (ニモジピンはフラグメントイオン) をトリガに設定したマスベースフラクションコレクションの結果を示しました。

フラクションの再分析

精製分析の性能を確認するために、事前に標準試料で作成したメソッドを用いて、捕集したフラクションを分析 HPLC システムにて再分析しました。フラクションのクロマトグラムを図 2 に示しました。また、分析結果を表 1 に要約しました。ニフェジピン、ニモジピン、ニソルジピンの注入量は、それぞれ 19.43 mg、19.05 mg、18.92 mg でした。

まとめ

3 つの医薬品化合物を流量 25 mL/min のマスベースフラクションコレクションを用いて精製しました。捕集したフラクションの再分析の結果から、過負荷の状態でカラムを用いても、1 回の分析で、高い回収率および 90% 以上の純度で、各化合物約 20 mg を精製することができることが分かりました。この結果は、高流量に対応した MSD を搭載した Agilent 1100 シリーズ精製システムの優れた性能を証明するものです。

	ニフェジピン [mg]	ニモジピン [mg]	ニソルジピン [mg]		
フラクション 1	18.90	0.11	0.16	ニフェジピン純度	98.6 %
フラクション 2	0.29	17.66	0.77	ニモジピン純度	94.4 %
フラクション 3	0.49	1.66	18.36	ニソルジピン純度	89.5 %
回収率 [mg]	19.68	19.43	19.29		
回収率 [%]	101.3	102.0	101.9		

表 1
フラクション再分析の結果

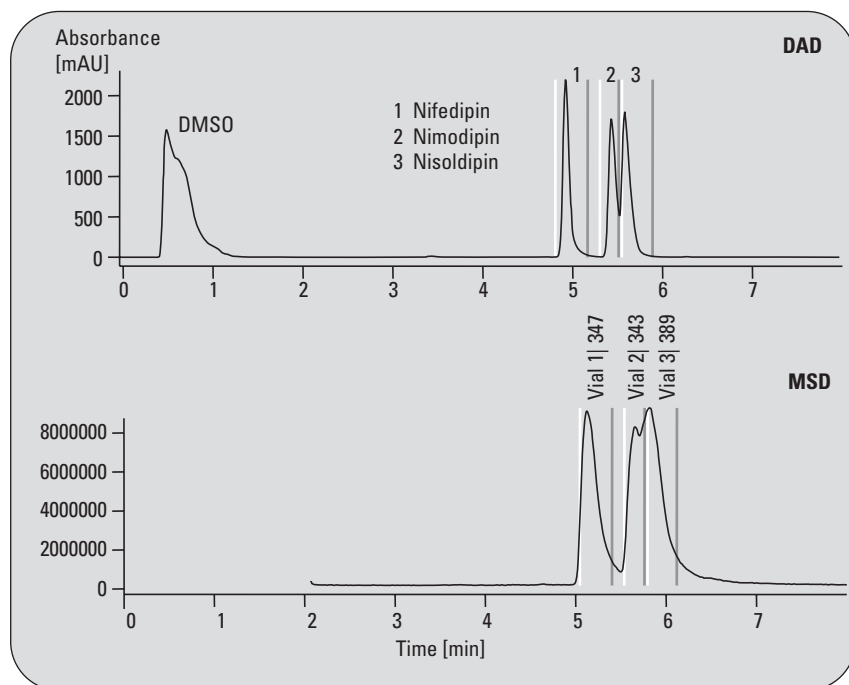


図 1
マススペースフラクションコレクションの結果

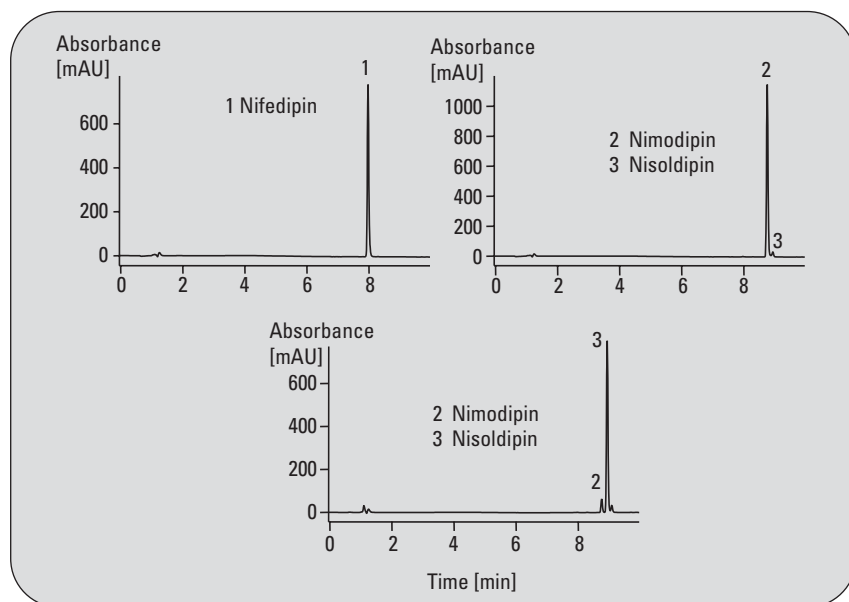


図 2
フラクションの再分析

『高流量のマススペースフラクションコレクションによる医薬品の精製』、資料番号 5988-7113EN

化合物の更なる高純度化の高まりにより、合成化学者は通常、有機合成の問題に専念し、合成生成物の分析や精製に費やす時間を最小限に抑えることを望んでいます。Agilent 精製/分析プラットフォームの重要な部分であるアクティブスプリッタとディレイセンサにより、効率化と操作性が増し、更なる分析の柔軟性が得られます。

結果と考察

精製の生産性の向上

製薬業界の創業初期段階での精製への応用に、アクティブスプリッタやディレイセンサが非常に有効です。高純度な化合物を多量に必要とする合成有機化学者や医薬品化学者は、下記を可能にする生産性向上のためのツールを求めています。

- 化学式または分子量が既知の合成生成物の純粋なサンプルを捕集する
- $\mu\text{g} \sim \text{mg}$ オーダーの量を捕集する
- 新規化合物の分析と精製に費やす時間を最小限に抑える
- サンプルを捕集するために必要な費用、労力、知識、技能を削減する
- 化学者とラボの効率を上げる

図 1 に、これらを実現するために使用されるシステムを示しました。

一般的なフラクションコレクションにおける最適化

柔軟な操作を行うためのアクティブスプリッタ

このシステムでは、Agilent アクティブスプリッタが非常に重要な要素となります。このスプリッタは、HPLC フローの一部を質量分析計へのフローへ送ります。このプロセスを図 2 に示しました。

アクティブスプリッタの主な機能は以下のとおりです。

- バルブの切換周期を変えることにより、異なるスプリット比を選択することが可能。さらに、アクティブスプリッタソフトウェアにより、各メソッドによる指示のとおり、バルブを自動的に始動と停止。
- さまざまなメソッドを、再配管せずに異なるスプリットを行うことが可能
- 特別なディレイ（配管を追加延長するなど）を追加することなく、シンプルな装置構成
- システムコンポーネントの寿命を延ばす最小限の背圧
- シール交換の予定を立てるのに役立つ、アクティブスプリッタパラメータのソフトウェアコントロールとアーリーメンテナンステナンスフィールドバック機能 (EMF)

ディレイセンサにより、システム精度が向上し、容易なセットアップ

このシステムの使用をより簡単に、そしてより信頼性高くするもう 1 つの重要な機能は、ボリュームのディレイを測定するプロセスです。貴重なフラクションの損失を防止するために、対象ピークがフラクションコレクタに到達する前に、トリガとなる検出器に到達することが、マス

ベースシステムでは不可欠です。これには、チューブが所定の位置に設置されており、各検出器がピークを検出する時間から、それがフラクションコレクタに到達する時間までの再現性の高いディレイを提供することが必要です。より簡単に達成するために、フラクションコレクタには内蔵のディレイセンサ (FDS) が搭載されています。分注アーム自体がセンサの上に位置し、ファームウェアにより、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精密に計算されます。

ディレイセンサの利点は以下のとおりです。

- ピーク検出とフラクションコレクションの間のディレイの正確な計算
- メソッドやフラクションコレクタコンフィグレーションに正確なディレイボリュームを自動的に保存

LC/MSD では、ディレイセンサにより、LC/MSD でのピーク検出とピークがフラクションコレクタに到達するまでの時間を計算します。UV 検出器と違い、このディレイはメークアップポンプ流量の他、HPLC ポンプ流量の変更による影響も受けます。そのため、このディレイを各メソッド流量に対してリキャリブレーションする必要があります。分取精製用カラムを通さずに、色素とカフェインを含むサンプルを用いて行います。UV 検出器および FDS にて色素を検出し、 m/z 195 のカフェインのイオンを LC/MSD でモニタリングします。ディレイセンサのデータは、その他の 2D 検出器と同様にモニタリングおよび保存されます。

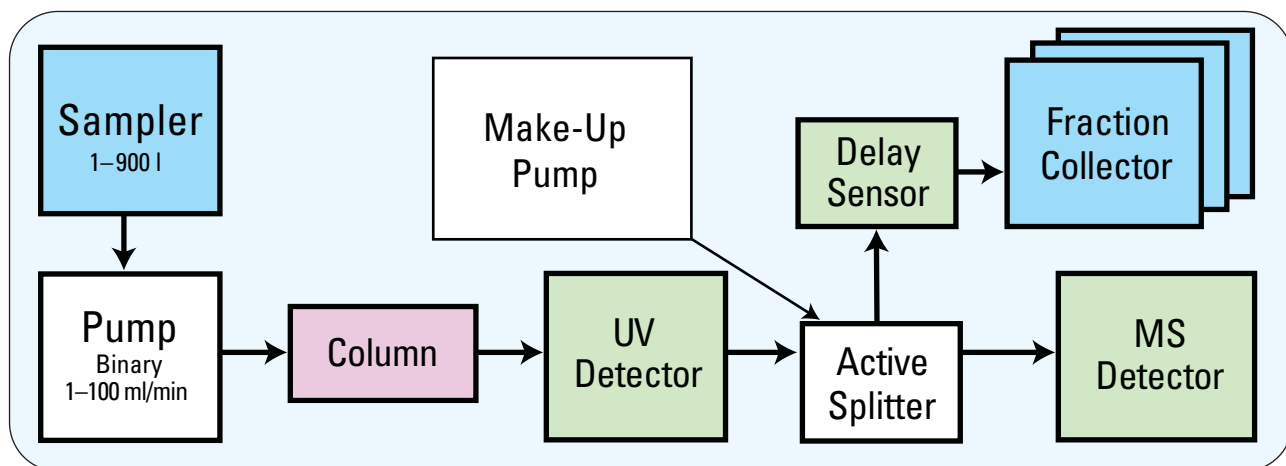


図 1
精製フローチャート

まとめ

Agilent アクティブスプリッタとディレイセンサにより、化合物分析や精製を行うラボの効率を大幅に向上させることが可能です。アクティブスプリッタにより、さまざまなマトリクスからの化合物の分析および捕集の最適化に、より高い柔軟性を提供します。ディレイセンサにより、貴重なフラクションが適切に捕集されることを保証し、かつ、システムセットアップを簡素化します。

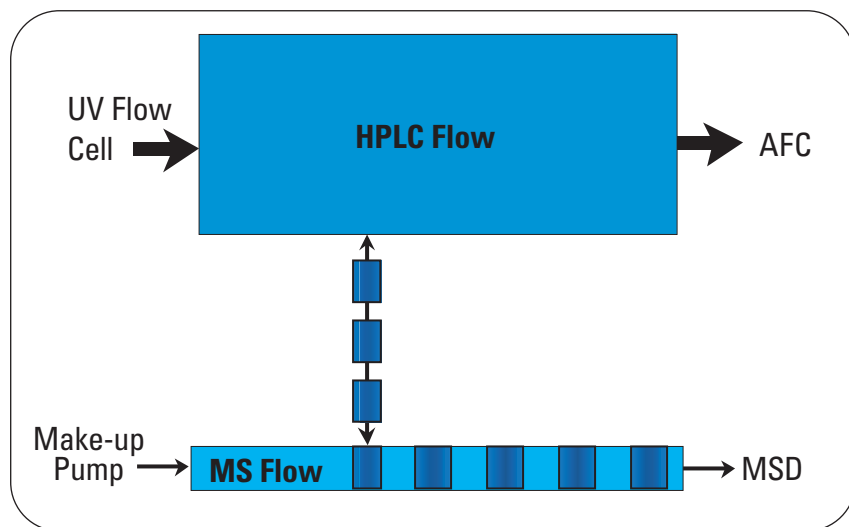


図 2
アクティブスプリッタの操作

『アクティブスプリッタとディレイセンサを用いた、LC/MSD システムによるフラクションコレクションの最適化』、
資料番号 5988-7610EN

理想的なシステムでは、フラクションコレクタニードル先端からフラクションとして溶出する分析目的化合物は、検出器シグナルに一对一で対応し、検出器で測定されたクロマトグラムとフラクションニードルから溶出する化合物のクロマトグラムは同一のものとなるはずです。しかしながら、ディレイボリューム、拡散、システムレスポンスが化合物回収率や回収の信頼性に大きな影響を与えます。**Agilent 1100** シリーズ精製プラットフォームは、これらすべてがクロマトグラフィ結果に及ぼす影響を考慮に入れて設計されています。

結果と考察

ディレイボリュームキャリブレーション

目的化合物分子が検出器セルからフラクションコレクタに移動するのに要する時間は、ディレイタイムと呼ばれます。フラクションの開始と終了を確実にするために、ディレイタイムを決定する必要があります。このディレイタイムは流量に依存しないディレイボリュームに簡単に変換することが可能です。これまでの方法では、染料を注入し、フラクションコレクタニードル先端に見えるまでの時間を測定することで、ディレイタイムを決定していました。この方法によるディレイタイムの測定は面倒だけでなく、不正確でもあります。そのため、**Agilent 1100** シリーズ精製システムにはディレイボリュームキャリブレーション機能が装備されており、この機能により、ディレイボリュームの測定を完全自動かつ正確に行うことができます。

一般的なフラクションコレクションの最適化

UV 検出器に加えて、ディレイセンサーが 2 台目の検出器としてフラクションコレクタに内蔵されています。ディレイキャリブレーション用サンプルのシグナルを、常に両方の検出器が記録します。2 つのシグナルの間の時間の遅延 (内部で計算され、電磁弁とフラクションディレイセンサーの間の移動時間を差し引く) がディレイタイムです。キャリブレーション手順に使用される流量に応じて、正確なディレイボリュームがシステムにより自動的に計算され、フラクションコレクタメモリに保存されます。システムにより、すべての流量に対応した正確なディレイタイムを計算することが可能です。再度キャリブレーションを行うことは必要ありません。

拡散

検出器からフラクションコレクタへの移動中の化合物の分布に影響を及ぼすにもかかわらず、よく見落とされてしまう現象が拡散です。拡散はピークの広がりとなり、クロマトグラムにおける分離能を悪化させる原因になります。**Aris-Taylor** の方程式によると、帯域の広がりにはチューブ内径の 4 乗に比例する以外に、流量やチューブ長に直接比例します。この効果を図 1 に示します。結果として、不適切な内径のチューブで検出器をフラクションコレクタに接続すると、回収率の低下や化合物の再混合などの精製結果の悪化につながります。そのため、広範囲の流量に対して設計されたフラクションコレクタは、高流量(カラム内径25 mm

以上)では満足のいく結果をもたらすかもしれませんが、低流量の場合(カラム内径 9 mm 以下)は、回収率と純度を犠牲にすることになります。そのため、アジレントはそれぞれの精製規模に対して最適化されたフラクションコレクタを提供します。高い化合物純度と回収率を得るために、専用の流量範囲やカラム内径で最適な性能に到達できるようなフラクションコレクタを設計製造しています。

システム統合インテリジェンス

システム統合インテリジェンスにより、幅広い **Agilent 1100** シリーズモジュールから、ニーズに合ったモジュールでシステムをセットアップすることが可能だけでなく、リアルタイムデータ処理も行うことができます。リアルタイムデータ処理は、瞬間的に作動するフラクションや、PC 電源やネットワークの停止の場合にでも安全かつ信頼性高くシステムを操作するために特に重要です。この機能の柔軟性とシステム操作を維持するために、すべての **Agilent 1100** シリーズモジュールはコントローラエリアネットワーク (CAN) を通じて通信します。その結果、完全に PC から完全に独立したシステム操作になります。ネットワークトラフィック、CPU がビジーになっているなど、システムと PC の間の通信が支障をきたした場合にでも、フラクショントリガはリアルタイムで続行します。このため、クロマトグラムに示されているように、フラクションは確実に回収されます。CAN 接続の他に、各 **Agilent**

1100 シリーズモジュールは、システムが PC からの命令を受け取るとすぐにアクティブになり、スタートするという機能をそれぞれ有しています。PC はまさにお客様と機器の間のインタフェースに相当します。その機能は実験結果のモニタリングおよび評価に反映されます。

まとめ

精製システムは、目的化合物の純度や回収率に重大な影響を及ぼします。これらの化合物の純度を確認するために、精製したサンプルの再分析が行われることがあります。これは、精製されたサンプルの組成が対応するクロマトグラムと異なる場合があることが認識されているからです。溶出液は、捕集したフラクションの組成に非常に大きな影響を及ぼす検出器からフラクションコレクタへの移動中に拡散の影響を受けやすくなります。1100 シリーズ精製システムの革新的な機能として以下が挙げられます。

- 目的化合物を安定した状態でフラクションできます。
- 高純度と高回収率を得るために重要な検出器とフラクションコレクタの間のディレイボリウムを、特許取得したディレイボリウムキャリブレーションにより、正確に測定することができます。

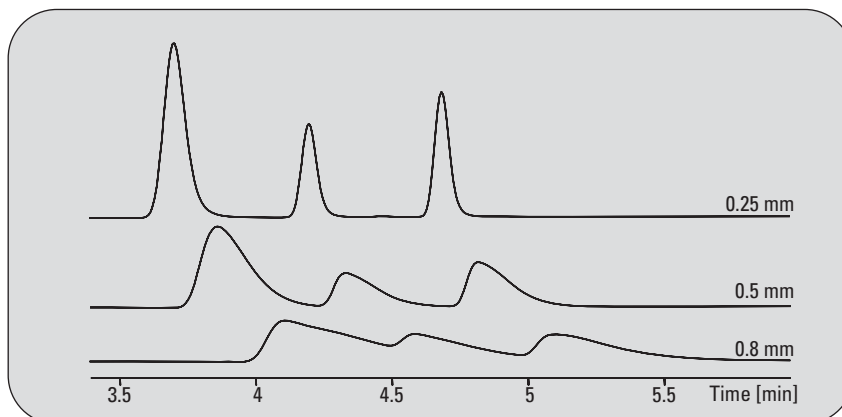


図1
クロマトグラフ分離能への配管内径の影響（サンプル量、配管長、流量は一定）

- 洗練された流路デザインは拡散を最小限に抑制し、すでに分離したピークを再混合することなく、高いクロマトグラフ分離能に貢献します。
- アジレントのシステム統合インテリジェンスによるリアルタイムのデータ処理により、高速で信頼性の高い正確なフラクションコレクションが可能です。

アジレントは幅広いアプリケーションで、ほぼ100%回収率を達成できる高性能精製システムを提供します。

Agilent の 1100 シリーズフラクションコレクタは、最高のフラクションコレクション性能を実現するためにディレイボリュームが最小限になるよう設計されています。これは低流量での精製に特に重要となります。図 1 に、2 つのディレイボリューム V_{D1} および V_{D2} を示したフラクションコレクタのブロック図を示します。

ピークが検出された時、フラクションコレクタはピークが検出器のフローセルからダイバータバルブまで移動するまで待ってから、フラクション側にバルブを切り替える必要があります。そのため、ディレイタイム t_{D1} をピークの開始時間 t_0 に追加する必要があります。すべてのピークを回収するため、フラクションコレクタはピーク終了時間 t_E にディレイタイム t_{D1} および t_{D2} を加えた時間で廃液側にバルブを切り換えます。このようにすることで、ピークの最後はフラクションコレクションニードルの先端にきちんと到達することができます。

結果と考察

回収率へのディレイボリューム V_{D1} の影響
ピークが配管内を移動する時に、配管断面での移動相速度の違いにより、拡散が

高回収率のためのシステムの最適化

生じます。これは、移動相と配管内壁との相互作用により生じるため、拡散は配管の長さや内径によって異なります。図 2 には、ディレイボリューム V_{D1} の増加に伴う検出器からフラクションコレクタに移動するピークの拡散を示します。 V_{D1} を増やすために、長さが異なっている、内径が同じ配管をフラクションコレクタの標準配管 (内径 0.25 mm) として使用しています。

フラクションのトリガは検出器シグナルに基づいており、フラクションの幅が検出器で測定されるピーク幅で決定されることを意味します。ピークがフラクションコレクタに到達すると、拡散により広がりますが、ダイバータバルブがピーク幅で決定された時間の間だけ回収位置に切り替わります。これにより、ピークの開始時と終了時の化合物の損失が生じます。よって、ディレイボリューム V_{D1} が大きくなるにつれて、より多くの化合物が失われます。Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタはこの効果を最小限に抑えます。1100 シリーズシステムを組み上げた後、フラクションコレクタの注入口配管をできるだけ短くすることでディレイボリューム V_{D1} をより小さく

くすることができるように設計されています。

分離能へのディレイボリューム V_{D1} の影響

カラムで分離されたピークの再混合による拡散の影響も重要な因子です。2 つのピークの間隔を測るパラメータは、5 シグマメソッドを使用して計算される分離能です。ピークのベースラインに近い、5 シグマ高さ (ピーク高さの 4.4%) のピーク幅を明らかにするため、このメソッドを選択しています。

分離能におけるディレイボリューム V_{D1} の影響を示すため、検出器とフラクションコレクタでピークを測定しました。2 つの異なる内径 (0.25 および 0.8 mm) のチューブを追加して、ディレイボリュームを増加させています。相対分離能を示すために、フラクションコレクタと検出器のピークの間隔を比較しました。図 3 では、ディレイボリューム V_{D1} が増加すると、相対分離能が低下することが分かります。また、同じディレイボリュームでも配管の内径が増加すると相対分離能が低下することも分かります。これは、半径が 2 乗される配管断面面積の分離能に影響するためです。

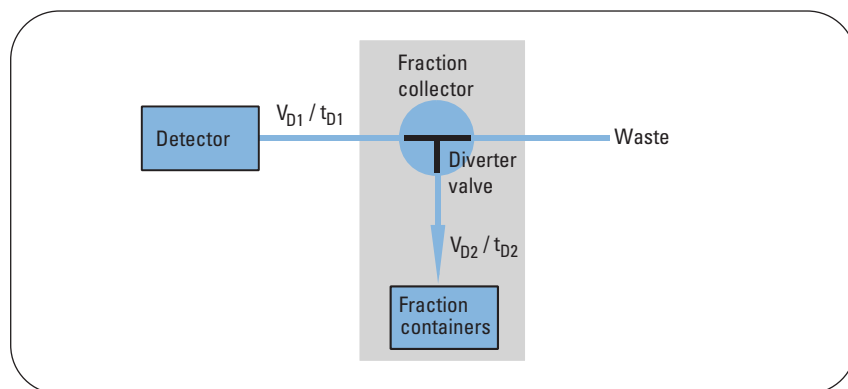


図 1
UV ベース精製システムにおけるフラクションコレクタのブロック図

まとめ

本テクニカルノートでは、異なるディレイボリュームの影響、検出器のシグナルディレイ、ディレイボリュームの自動測定方法について示しました。

最大の回収率を得るために様々なディレイボリュームを用いてピークをトリガします。回収率の減少や拡散により分離されたピークの再混合を防止するために、ディレイボリューム V_{D1} を最低限に抑えました。

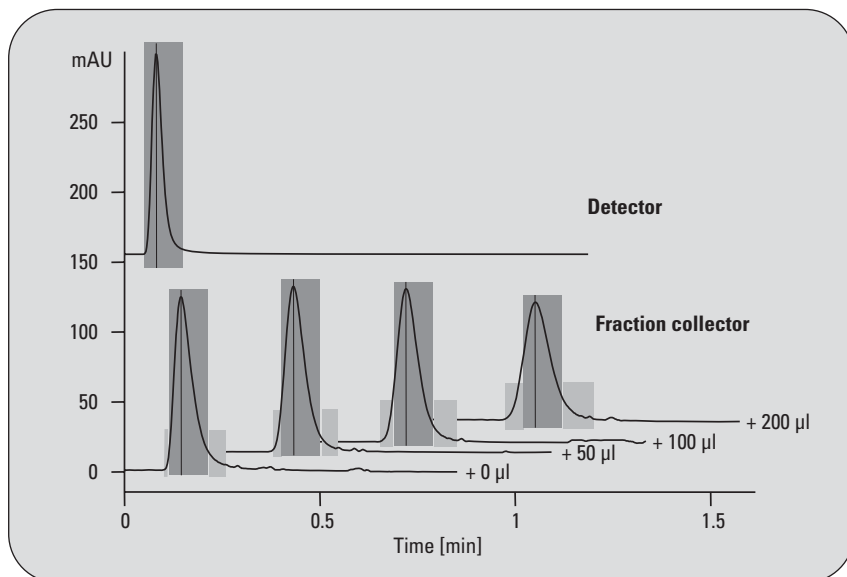


図 2
配管容量の増加に伴う拡散

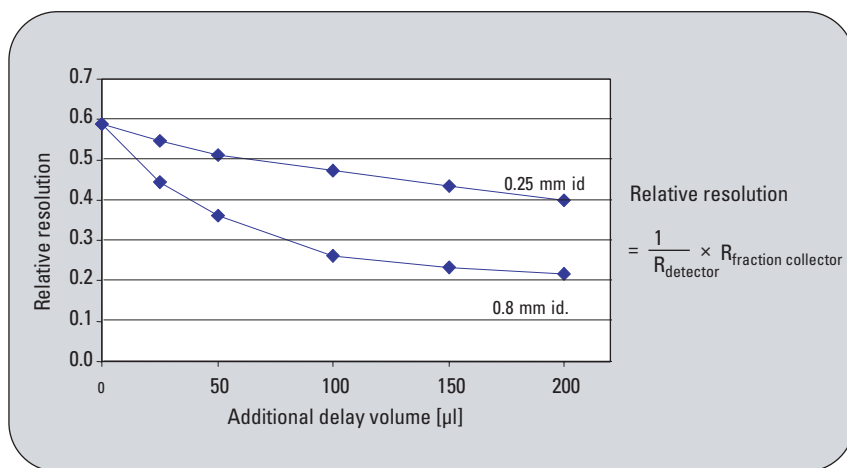


図 3
異なる 2 つの内径の配管に対する相対的分離能

『Agilent 1100 シリーズ精製システム AS を用いたピークベースフラクションコレクション - 回収率へのディレイボリュームの影響』、資料番号 5988-5746EN

蒸発光散乱検出器 (ELSD) は、製薬業界で一般的に使用される検出器です。発色団を持たない化合物を検出することが可能で、検出器レスポンスは溶出した化合物の量に依存するため、純度チェックに最適です。

ELSD の他、アジレント製以外の他社検出器も 1100 シリーズ精製システムへの統合が可能になります。例として、4 つのグルココルチコイド標準試料の分離を示します。システムの精製性能を説明するために、フラクションを再分析しています。

装置

システムセットアップとコンフィグレーション

ELSD は破壊型検出器であるため、スプリッタ (Agilent 1:10/1:20 スプリッタ) を使用して流路に接続しています。メインフローはフラクションコレクタに流れ、スプリットフローは ELSD に流れます (図 1)。

ELSD でのフラクションをトリガとするために、検出器のアナログ出力をユニバーサルインタフェースボックス (UIB) に接続します。UIB は、CAN ケーブルを通じて 1100 シリーズモジュールに接続します。Agilent 1100 シリーズ精製システムを用いて、ピークベースフラクションコレクションを行うために、アナログ出力を備えたアジレント以外の他社検出器もこの方法でセットアップすることが可能です。

他社の検出器によるシグナルでのピークベースフラクションコレクション

ELSD に対するディレイボリウムキャリブレーション

フラクションを適切に回収するために、ELSD とフラクションコレクタのダイバートバルブの間のディレイタイムを測定する必要があります。フラクションコレクタに内蔵された Agilent フラクションディレイセンサーを用いて、測定が可能です。ディレイキャリブレーション手順は、Agilent 1100 シリーズ精製システムユーザガイドに記載されています。標準ディレイキャリブレーション化合物 (G1946-85020) と ChemStation の標準ディレイキャリブレーションメソッドを使用してキャリブレーションを実施します。スプリットフローの中の必要な化合物がメインフローの中でフラクションコレクタに到達する前に、ELSD に到達することが絶対に必要のため、ディレイキャリブレーションで、ディレイボリウムを正の値にする必要があります。負のディレイボリウムが測定される場合は、化合物が ELSD に届く前にフラクションコレクタに到達しているため、フラクションが開始される前に廃液に目的化合物が到達してしまいます。負のディレイボリウムを防ぐため、スプリッタと ELSD の間の配管をできるだけ短く保ち、小さな内径の配管を使用する必要があります。ELSD に接続する配管を短くすることができない場合、スプリッタからフラクションコレクタに接続する配管を長くします。しかし、これによりフラクションコレクション性能を低下させる拡散を増やすことになるため、注意する必要があります。

結果と考察

ELSD シグナルをトリガとしたフラクションコレクション

ELSD シグナルをフラクションコレクションのトリガとするために、ChemStation のフラクションコレクタのセットアップウィンドウにてピーク検出器として、UIB を選択する必要があります。UV 検出器に対して、アップスロープ、ダウンスロープ、スレッシュホールドなどのパラメータを選択することが可能です。グルココルチコイド標準試料を単離するために、表からアップスロープとダウンスロープの値を削除し、70 mV のスレッシュホールドのみでトリガを設定しました。図 3 には、グルココルチコイド標準試料の DAD、デュアルチャンネル A/D インタフェース、UIB シグナルを示し、縦線は回収したフラクションにフラクションマークを付けています。

精製結果を確認するために、スプリッタを使用せずに同じシステムでフラクションを再分析した結果、不純物なしに、4 つの化合物を純度よく分離できたことが分かりました。これにより、他社の ELSD と接続した Agilent 1100 シリーズ精製システムの優れた性能が確認されました。

まとめ

この例では、ピークベースフラクションコレクションの開始に、Sedere Sedex モデル 75 ELSD を使用しました。アナログシグナル出力端子を持っている他社検出器を同じ方法でセットアップすることが可能です。例として、分析スケールの分取 HPLC での 4 つのグルココルチコイド標準試料の分離を示しました。

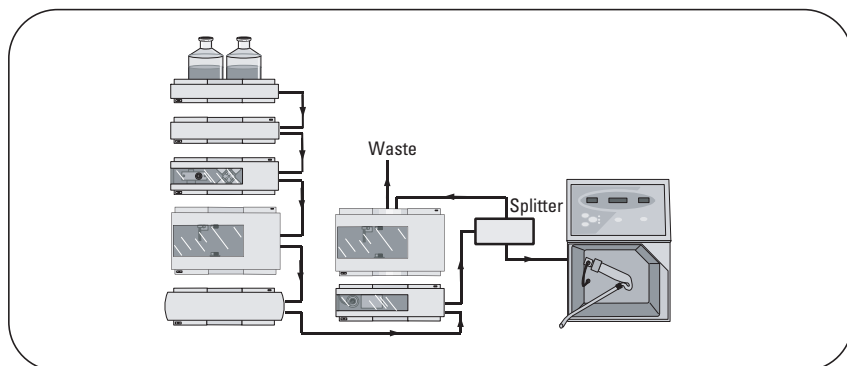


図 1
流路にスプリッタを用いた ELSD のセットアップ

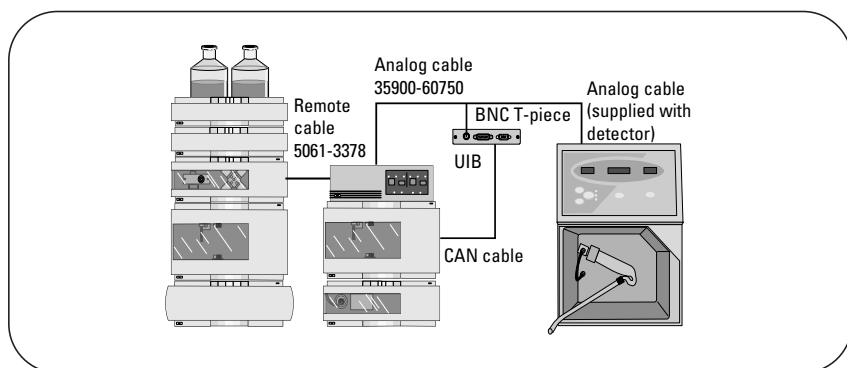


図 2
UIB とデュアルチャンネル A/D インタフェースボックスを用いたセットアップ図

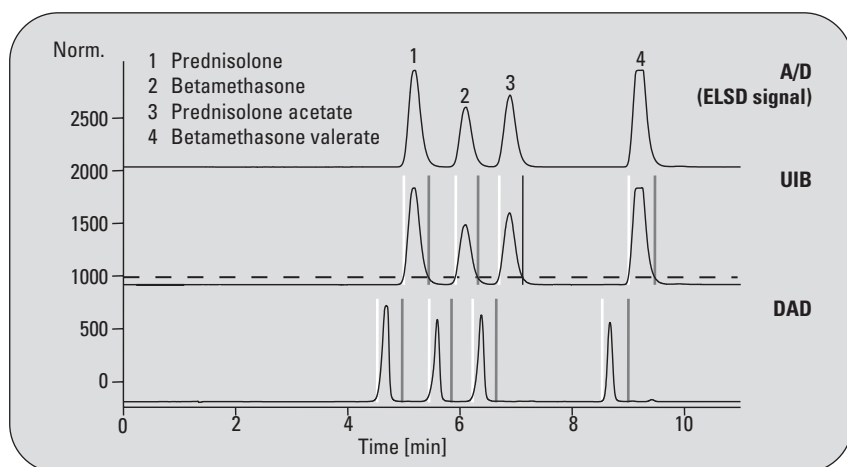


図 3
ELSD シグナルでのピークベースフラクションコレクション

『Agilent 1100 シリーズ精製システムと蒸発光散乱検出器を用いたピークベースフラクションコレクション』、
資料番号 5988-5816EN

医薬品における創薬および医薬品開発では、活性測定のために化合物を精製する必要があります。合成医薬品においてハイスループット合成およびハイスループットスクリーニングを行うためには、分取 TLC や結晶化のような従来の低ハイスループット分取技術では、限界がありました。化合物精製のために完全自動化された最新の技術が分取 HPLC です。創薬の初期段階では、通常、多数の化合物が微量で合成されます。そのため、分取精製を内径 5 mm 以下のカラムで行うため、分析スケール分取 HPLC と呼んでいます。創薬と医薬品開発分野の後期では、精製する化合物量が増え、そのためカラム内径も大きくなります。

アジレントは、最高 40 MPa で最大 100 mL/min の送液が可能な 1100 シリーズ精製システム PS 分取ポンプを開発しました。Agilent 1100 シリーズ分取ポンプの優れた性能により、5 mL/min 未満の流量で高精度な送液も可能です。

本アプリケーションでは、Agilent 1100 シリーズ精製システム PS のコンフィグレーションを変更せずに、内径 3 mm カラムで流量 0.35 mL/min 及び、内径 50 mm カラムで流量 100 mL/min のモデルサンプルのグラジエント分析を示します。

メソッドスケールアップとスケールアップ計算

結果と考察

分析スケールでのメソッド開発

グラジエント分析を行うために 2 台の Agilent 1100 シリーズ分取ポンプを含むシステムで、3成分のモデル化合物を分析するためのメソッドを開発しました。内径 3.0 mm の ZORBAX SB-C18 カラムを用い、流量 0.35 mL/min で分析した結果、図 1 のピークは良好な分離能とピーク形状を示しており、Agilent 1100 シリーズ分取ポンプが低流量でも高精度の送液が可能であることを示しています。

スケールアップ計算

図 2 の式に従って、スケールアップの計算を行います。まず初めに流量 0.35 mL/min と内径 3.0 mm を上の式に代入します。下の式を用いて、注入するサンプル量を計算します。高流量および注入するサンプル量に従い、光路長 3 mm の SST 分取用フローセルから、光路長 0.3 mm の石英製セルに変更しました。これにより、注入量を 10 倍増加させることができます。すべてのカラムとフローセルに対して計算した流量と注入量を表 1 にまとめました。

Analytical column	Preparative columns
$\frac{\dot{V}_1}{\dot{V}_2} = \frac{r_1^2}{r_2^2}$	
Flow	→
Inj. volume	→
$\frac{x_1}{\pi \times r_1^2} = \frac{x_2}{\pi \times r_2^2} \times \frac{1}{C_L}$	
V_1 = flow column 1	V_2 = flow column 2
r_1 = radius column 1	r_2 = radius column 2
x_1 = inject. vol. column 1	x_2 = inject. vol. column 2
r_1 = radius column 1	r_2 = radius column 2
C_L = ratio lengths of columns = 1	

図 2
スケールアップ計算に使用される計算式

分析および分取スケールの精製

表 1 で示した流量と注入量を用いて、異なる 4 本のカラム (内径 4.6 mm、内径 9.4 mm、内径 21.2 mm、内径 50 mm) で分析および分取スケールの分析を行いました。図 3 に示すクロマトグラムから Agilent 1100 シリーズ分取ポンプは広い流量範囲にわたり非常に高精度な送液が可能であること、分離能を失わずに ZORBAX カラムをスケールアップすることが可能であることがわかります。これはメソッドを再開発せずにスケールアッププロセスを迅速に行うには非常に重要です。

まとめ

Agilent 1100 シリーズ分取ポンプは、0.35 ~ 100 mL/min の流量範囲にわたり高精度の送液が可能です。

- このポンプは、ChemStation の OQ/PV および EMF (Early Maintenance Feedback) 機能に完全に適合します。
- 分離能を落とさずに、内径 3 mm の ZORBAX カラムから内径 50 mm のカラムに、アプリケーションをスケールアップすることが可能です。これにより、メソッドを再開発または調整するために必要な時間を短縮でき、スループットも上がります。

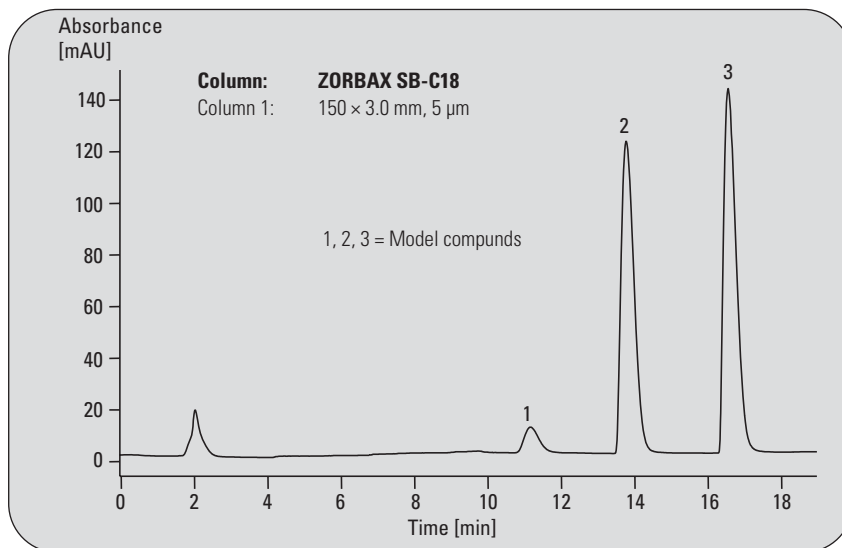


図 1
流量 0.35 mL/min のクロマトグラム

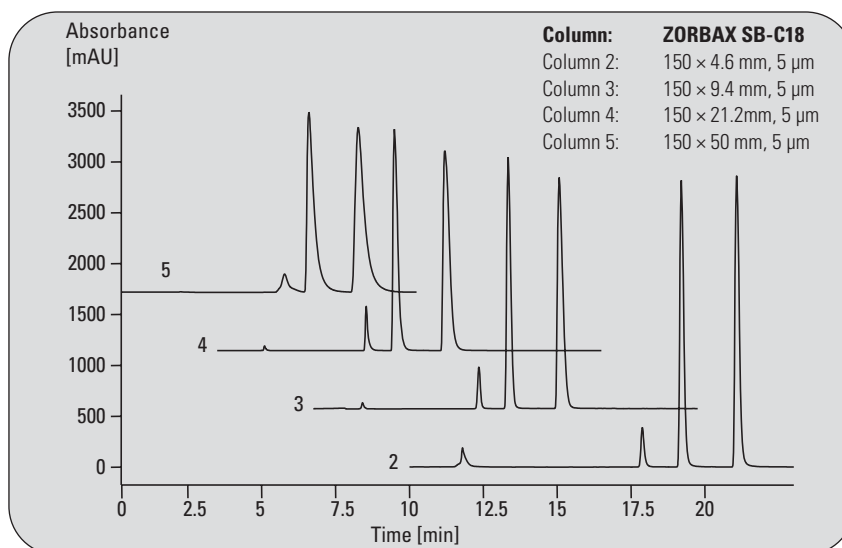


図 3
スケールアップ計算の結果

カラム	寸法	流量	注入量	検出器セル
1 (図 1)	150 x 3.0 mm	0.35 mL/min	0.8 μL	3 mm SST
2 (図 3)	150 x 4.6 mm	0.85 mL/min	2.0 μL	3 mm SST
3 (図 3)	150 x 9.4 mm	3.5 mL/min	80 μL (8 μL x 10)	0.3 mm 石英
4 (図 3)	150 x 21.2 mm	18 mL/min	400 μL (40 μL x 10)	0.3 mm 石英
5 (図 3)	150 x 50 mm	100 mL/min	2200 μL (220 μL x 10)	0.3 mm 石英

表 1
さまざまなカラムサイズに対する流量、注入量、検出器セル

『Agilent 1100 シリーズ精製システム PS を用いた分析スケールから分取スケールへのメソッドスケールアップ』、
資料番号 5988-6979EN

Agilent 1100 シリーズ分取ポンプは、2 つの平行ピストンを備えたアイソクラティック高性能ポンプです。ポンプヘッドを変更することなく、耐圧 40MPa で 100 mL/min までの送液を実現します。低容量ミキサで 2 台のポンプを接続することにより、ディレイボリウムはわずかに約 0.7mL の高圧グラジエント混合システムを組むことが可能です。ポンプにはベリスタルティックポンプと自動電磁パージバルブを用いた自動シールウォッシュ機能が標準で搭載されています。ポンプシステムは最高 100 mL/min の流量に対して設計されていますが、低流量でも非常に高精度な送液が可能です。

注:

全ての実験は、アジレントのラボでの日常業務に使用されているシステムで行いました。システムの稼働時間の違いによって、テスト結果は変わる可能性があります。

1 ~ 100 mL/min における分取ポンプ性能

結果

1. 流量精度 - アイソクラティック

流量精度はリテンションタイムの精度に重要なパラメータです。ポンプ流量は、分取ポンプファームウェアの補正アルゴリズムで制御されるため、流量精度は背圧に依存します。

流量精度テスト設定

- 流量精度は、5 分間溶媒（水）を捕集することで測定します。捕集した水を秤量し、それを密度で除算して決定します。
- テストは、流量 25 mL/min で行います。
- 精度は 3 つの異なる背圧（10MPa 未満、10 ~ 20 MPa、20MPa 超）で測定します。
- 各圧力で分析を 5 回行い、精度を測定します。
- すべての実験で、カラムの代わりに、リストリクションキャピラリーを使用します。

流量精度テストの結果

図 1 に、アイソクラティック流量精度テストの結果を示します。流量精度の相対標準偏差が記入されています。どの背圧でも、相対標準偏差は 0.3% 未満です。

2. 流量精度 - グラジエント

流量精度テスト設定

- 流量精度は、7 分間溶媒（水、メタノール）を捕集し、捕集量を秤量することで測定しました。
- テストは、流量 10 mL/min で行います。
- グラジエント: 100% 水（1min）、100% 水から 100% MeOH（5min）、100% MeOH（1min）
- 精度は 3 つの異なる背圧範囲で測定します。
- 各圧力で分析を 5 回行い、精度を測定します。
- すべての実験で、カラムの代わりに、リストリクションキャピラリーを使用します。

流量精度テストの結果

図 2 に、グラジエント流量精度テストの結果を示します。流量精度の相対標準偏差は、どの背圧設定でも 0.4 % 未満です。

まとめ

- 1100 シリーズ分取ポンプのパフォーマンスを、0.35 から最高 100 mL/min までの流量範囲で示しました。
- 5 mL/min 未満のパフォーマンスは、1100 シリーズクォータナリポンプなどの分析ポンプとほぼ同様です。
- 高流量に必要な内径の大きいキャピラリーは、全体的なシステムパフォーマンスを低下させます。

そのため、アジレントは、単独で広い流量範囲に対応するシステムの代わりに、キャピラリーから分取スケールまで、それぞれに最適な専用システムを提供します。これにより、広範囲のアプリケーションでの性能の低下という問題を回避し、特定アプリケーションに対して最高の性能を提供します。

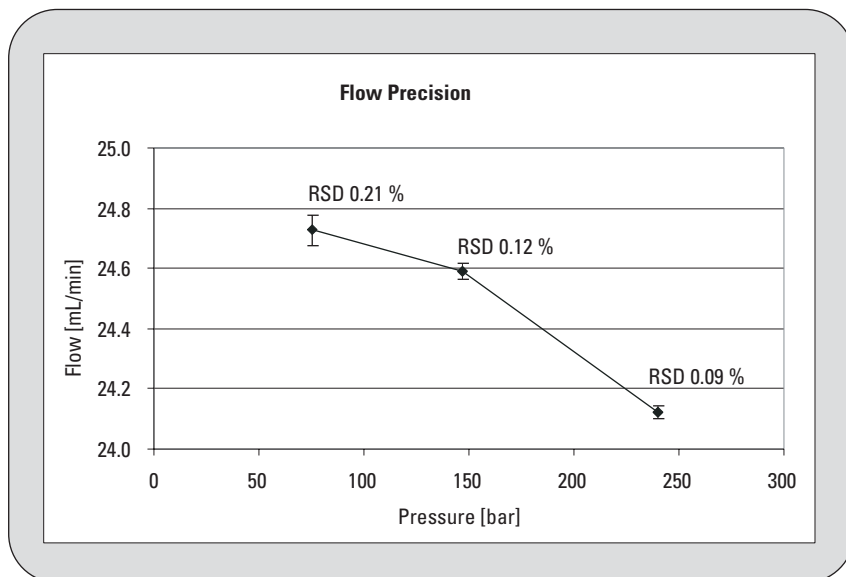


図 1
異なった背圧設定でのアイソクラティック流量精度の相対標準偏差

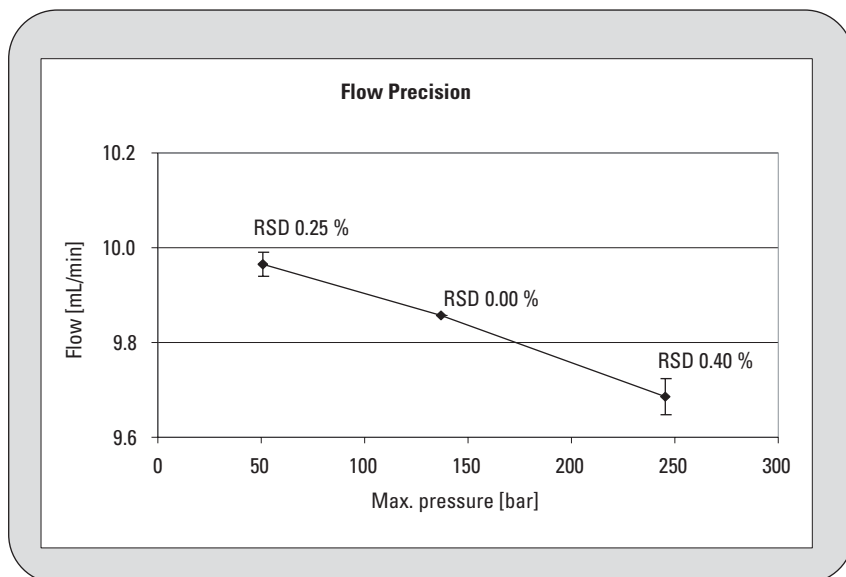


図 2
異なった背圧設定でのグラジエント流量精度の相対標準偏差

最新の創薬ラボでは、分析および精製が必要な新薬の数が驚異的に増えています。有機化合物、医薬品を取り扱う研究者は、まず共用している LC/MS システムに「Walk up」し、サンプルを登録します。その後、自分のラボに戻って、再び合成を行います。サンプル数の急増に伴い、研究者は LC/MS に寄らずに、自分のラボで個人の PC からデータを閲覧したい、というニーズが大幅に増えています。

ラボ生産性向上のための リモートデータレビュー

新しい Agilent ChemStation Data Browserは、遠隔で、簡単かつ効率的にデータの確認を行うことができます。オリジナルデータを取り込むシステム上で、中間ファイル (.AEV ファイル) が作成され、その後、この .AEV ファイルはサーバまたは電子メールを通じてリモート PC で閲覧できるようになります。Browserは創薬分野をターゲットにしていますが、あらゆるラボで、LC、LC/MS ChemStationデータシステムの効率的なデータファイル閲覧を実現します。

Data Browserの主要機能

創薬ラボでのBrowserの主用途は、多数のサンプルに対して、できる限り迅速に以下の疑問に答えることです。

期待した化合物を合成できたか? その場合、おおよそどんなレベルの純度で合成されたか?

メインスクリーンは一連の表示から構成されています。表示される内容は、アプリケーションによって異なり、ユーザがカスタマイズすることも可能です。図 1

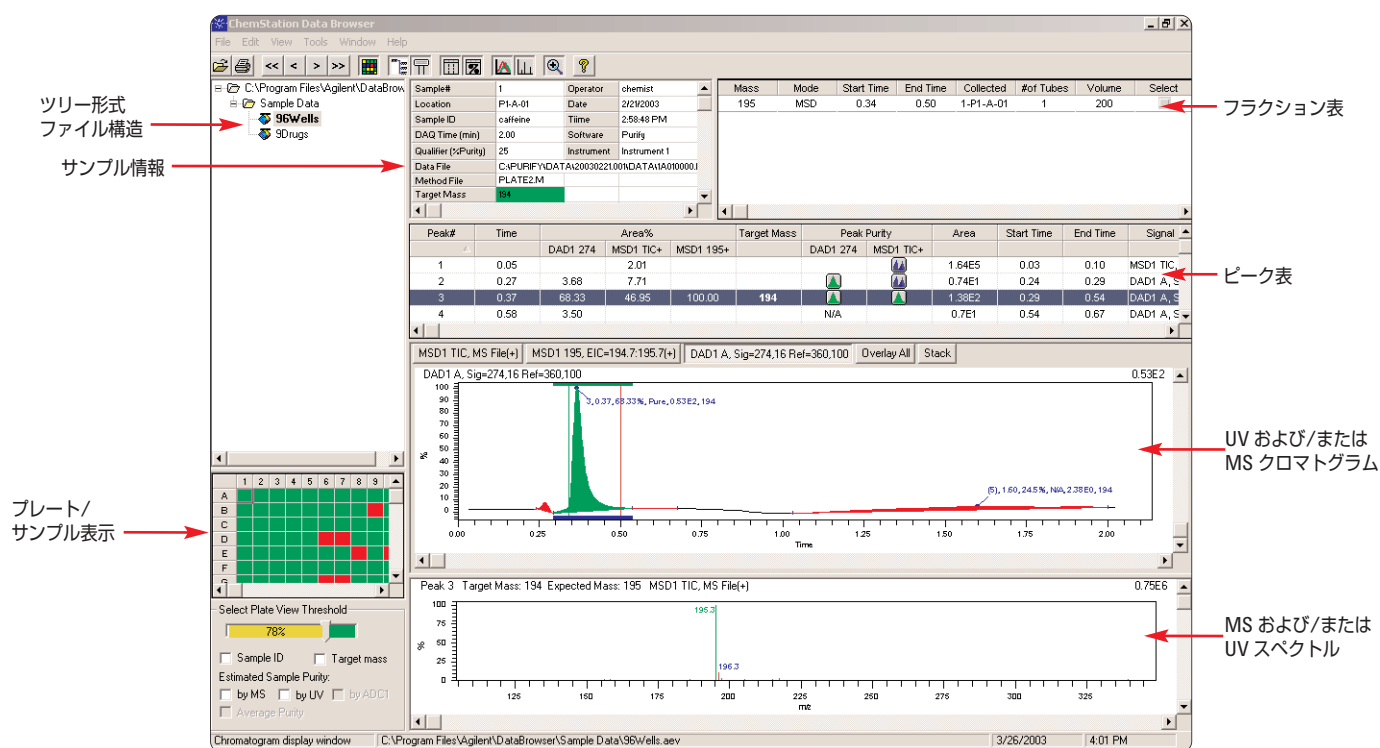


図 1
ChemStation Data Browser のメインスクリーン

には、創薬ラボ向けの一般的なコンフィグレーションによるマイクロプレート上の目的化合物反応混合物のレビュー画面を示します。この画面の左下のプレート表示は、マイクロプレートや、Agilent 1100シリーズオートサンプラの100ポジションレイのバイアル位置を示しており、各位置のサンプル結果をグラフィカル表示して一目で結果を確認することができます。

図1では、指定スレッシュホールドに基づき、緑色の部分はターゲット質量が検出されたことを示し、赤色の部分はターゲット質量が検出されなかったことを示します。UVやMSクロマトグラムなどのさらに詳しいサンプル情報を確認するには、その部分をクリックします。サンプル精製が行われた場合、フラクション情報がフラクションテーブルに表示されます。

医薬品開発で適切な決定を行い次の段階に移行するために、Data Browserは、以下の項目で、その威力を発揮し、迅速に答えを提供します。

さらに、Browserには以下の機能が搭載されています。

- ピークの純度（共溶出する成分の数）に関する情報の提供
- 1表示画面ですべてのデータの確認が可能
- 画面上の個別ウィンドウで複数サンプルの比較が可能
- カスタマイズできるレポートの提供

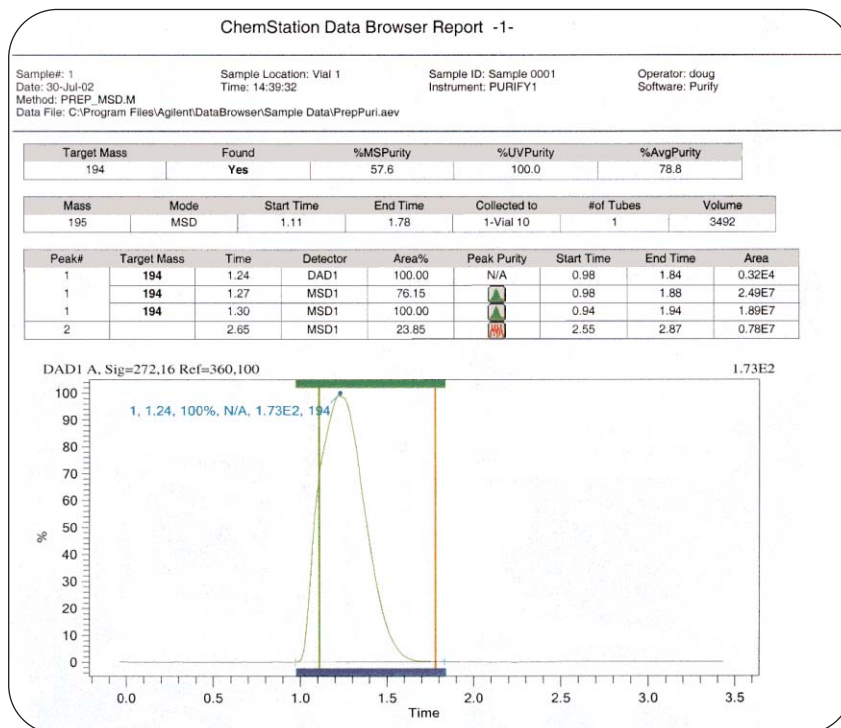


図2 Data Browserソフトウェアのカスタマイズレポートの例

レポート作成

データのレポート作成は、創薬において重要な機能です。ChemStation Data Browserは、レポートに記載する項目を自由に選択することができ、レポートの最適化が行えます。図2は、創薬で重要な、目的化合物が存在しているかどうかを示すレポート例です。

5 ～ 95% の有機移動相の一般的なグラジエントは、精製分析によく使用されますが、目的化合物に対して必ずしも十分な分離につながるとは限りません。分離能を上げるために、目的化合物が溶出する溶媒組成付近でグラジエントのカーブを緩やかにすることで、最適化したメソッドを使用しました。分取前分析で得られた化合物のリテンションタイム幅に従って、分取メソッドを選択します。

分取前分析による分取メソッドの最適化

結果と考察

リテンションタイム幅を決めるメソッドを作成するために、分析メソッドを用いて、いくつかの標準化合物のリテンションタイムを測定しました。さらに、これらの標準試料のリテンションタイムと実際の溶出組成の関係を示すグラフを作成しました。分析により得られたリテンションタイムの表から化合物の溶出組成を抽出または計算することができます。リテンションタイム幅での初期および最終グラジエント組成でも、同じアプローチによって得ることができます。本アプリケーションノートでは、8 つのアジレント標準試料に対する溶出組成に対する分取メソッドを、以下の4 段階で簡単に設定可能であることを示します。

1. 分析メソッドを用いてアイソクラティックテストサンプルおよびエレクトロスプレー LC デモサンプルを測定。
2. 測定リテンションタイムと既知のグラジエント溶出組成の関係を示すグラフを作成。
3. グラフから、初期および最終グラジエント組成を計算または抽出し、分取メソッドを最適化。
4. 各分取メソッドに対して専用グラジエントを決定。

精製例

目的化合物のスルファニルアミド 2 を精製するために、一般的なグラジエントと最適化したグラジエントを用いて、サンプルを分取カラムに注入しました。結果は図 1 (A, B) のとおりです。

一般的なグラジエントを用いると、目的化合物の一部は前のピークと共溶出しましたが、最適化したメソッドを用いると、ベースライン分離が可能となりました。先のピークとスルファニルアミド 2 の分離能は 2 倍以上で、スルファニルアミドとその後のピークとの分離能も約 50% 上がっています。

まとめ

本アプリケーションノートでは、分取前分析のリテンションタイム幅での分取メソッドの最適化について説明しています。アイソクラティックテストサンプルとエレクトロスプレー LC デモサンプルの分析メソッド設定をわずか4ステップで1時間も要せずに終了することが可能です。最適化したグラジエントを用いることで、目的化合物や、近くのピークとの分離をさらに向上できます。

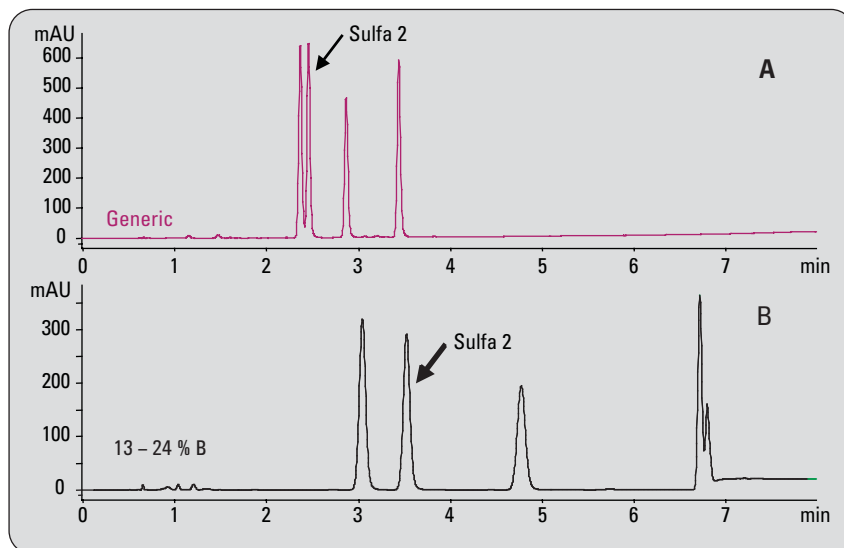


図 1
一般的メソッド (A) および最適化したメソッド (B) による分取分析

本アプリケーションノートでは、医薬分子化学分野における精製方法の開発について説明します。精製方法の開発目的は以下のとおりです。

- シンプルなワークフロー
- 化合物のサンプル前処理およびメソッド選択のガイドライン
- 不溶性サンプル、極性サンプル、イオン化しにくいサンプルの精製
- 取り扱うサンプルの 80 ~ 90% に適用できる標準メソッド
- 一般的な精製メソッド

医薬分子化学分野における化合物精製方法の開発

Boehringer Ingelheim (Austria) の Darryl McConnell 氏、Georg Egger 氏と共著

結果と考察

不溶性化合物の注入

グラジエントの初期移動相組成に不溶性化合物を注入する場合は有機相注入またはサンドイッチ注入法の 2 つの注入技術を利用できます。

極性化合物の精製

極性化合物専用のメソッドを用いました。極性化合物が DMSO ピークと共溶出をするのを防ぐために以下の処理を行いました。

- グラジエント初期移動相条件に 5% アセトニトリルを設定します (標準メソッドでは 10% を使用)
- 2.5 分間、初期移動相組成を保持します
- グラジエント終了条件に 50% アセトニトリルを設定します (標準メソッドでは 95% を使用)

アプリケーション

このセクションでは、実際の未処理反応混合物の精製を示します。未処理反応混合物を、Agilent 1100 シリーズ分析システムで分析した結果、シス、トランス異性体の混合物として目的生成物が存在していることがわかりました。クロマトグラムを図 1 に示します。2 つの異性体を分離するため、今回は UV と MS シグナルの AND 構文によるピークベース分取により、未処理製品を再度精製しました。図 2 のように、このメソッドを使用することで、異性体は 2 つの個別フラクションにうまく分離されました。

まとめ

本アプリケーションノートでは、医薬分子化学分野に対応した精製方法を示しました。分取HPLC-MS 精製によるシンプルなwalk-upワークフローが確立されました。取り扱うサンプルの80 ~ 90% に対応した標準メソッドを用いることで異なるサンプルタイプに対する5種類のメソッドを確立しました。さらに、不溶性サンプル、極性サンプル、イオン化しにくいサンプルに対応するメソッドも作成しました。追加されたメソッドは、UVとMS シグナルのAND構文によるピークベース分取を利用しました。

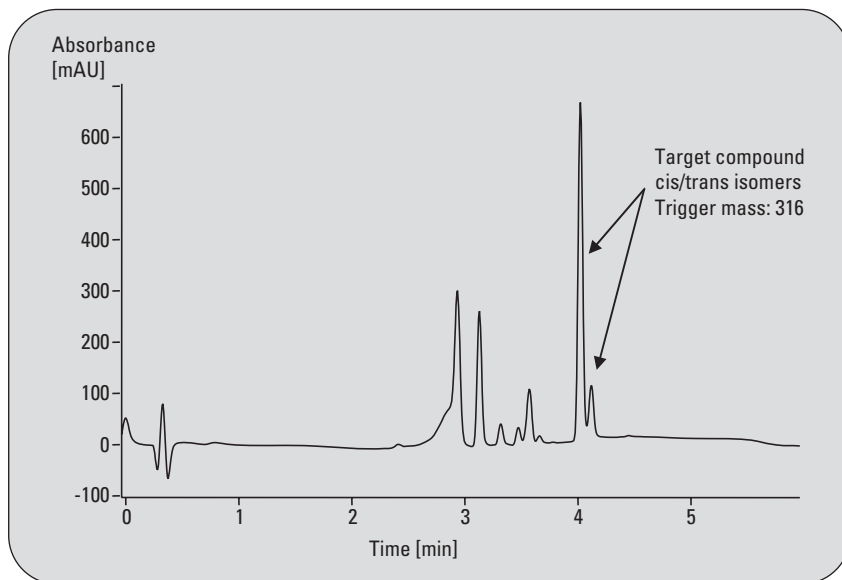


図1
未処理反応混合物のクロマトグラム

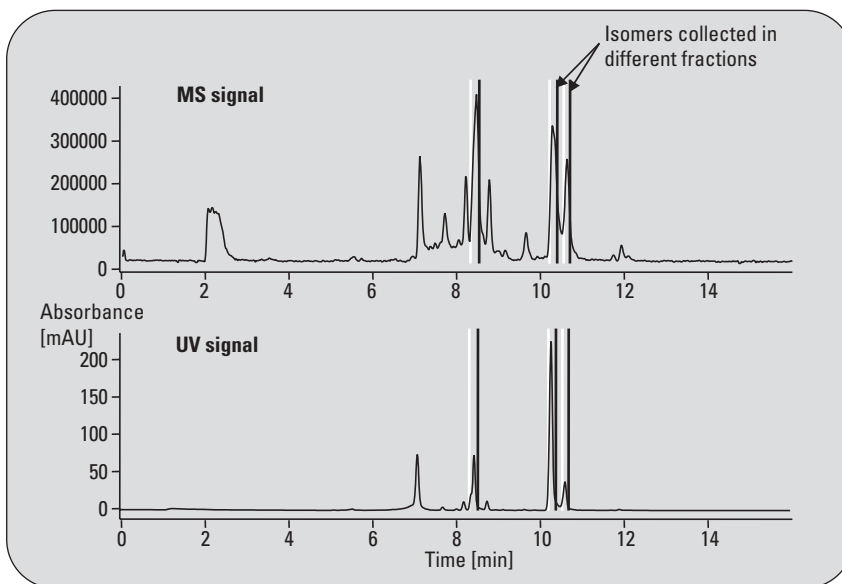


図2
UVとMSシグナルのAND構文によるピークベースフラクションコレクション

以下の 3 つのフラクションコレクション方法により、注入サンプルを高い回収率、または低回収率で、複数フラクションまたは 1 つのフラクションに分取することができます。3 つの方法すべてで、必要な目的化合物を同定するためにフラクションを再分析する必要はありません。これは 1100 シリーズ質量選択検出器 (MSD) を Agilent 1100 シリーズ精製システムに接続することで実現されます。

結果と考察

本アプリケーションノートでは、以下の 3 つの精製方法を示します。

1. MSD でモニタリングするタイムベースフラクションコレクション
2. MSD でモニタリングするピークベースフラクションコレクション
3. マスベースフラクションコレクション

1. MSD でモニタリングするタイムベースフラクションコレクション

タイムベースフラクションコレクションでは、注入したサンプルはほとんど失われることなく回収されます。

図 1 はタイムベースフラクションの例です。2 ~ 7.5 分の間に 80 個のフラクションを捕集しました。クロマトグラム中の縦線は、捕集したフラクションの開始マークです。

質量選択検出器 (MSD) 搭載システムによる化合物精製

目的化合物 (ターゲットマス 241 amu) を含むフラクションを同定するために、質量 242 ($[M+H]^+$) の抽出イオンクロマトグラム (EIC) とトータルイオンクロマトグラム (TIC) と一緒に表示しました。図 2 は、ウェルプレートの B-02 ~ B-06 の位置にターゲットマスを含むフラクションがあることを示しています。

目的化合物を含むフラクションを同定するために、質量 242 ($[M+H]^+$) の EIC と TIC を重ね合わせました。

2. MSD でモニタリングするピークベースフラクションコレクション

2 番目の方法を用いて、50 mAU をスレッシュホールドとした UV シグナルのピークに基づき、フラクションを捕集しました。これにより、サンプルの主要なピークは捕集されますが、タイムベースフラクションコレクションと比較して、フラクションの数は劇的に削減されます。

3. マスベースフラクションコレクション

マスベースフラクションコレクションを使用した場合、MSD のピークが目的化合物の質量を含み、かつ EIC のシグナルが設定したスレッシュホールドを超えた場合だけフラクションが捕集されます。これにより、サンプル分析 1 回あたりに目的化合物を含む 1 つのフラクションだけが捕集されることになります。デメリットは、注入したサンプルの大部分が回収されないことです。マスベースフラクションコレクションの結果を図 3 に示します。

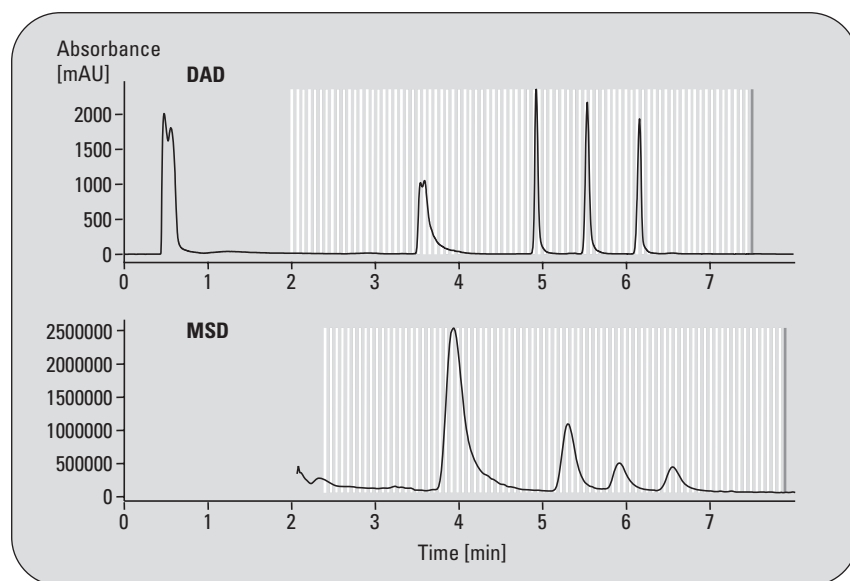


図 1
タイムベースフラクションコレクションの結果

図 3 に示すとおり、ターゲットマスを含む 1 つのフラクションだけがバイアル番号 1 に捕集されました。そのため、捕集したフラクションの数は 1 に減りましたが、サンプルの 95% が回収されないことになります。

まとめ

MSD はタイムまたはピークベースのフラクションコレクションには必須ではありませんが、目的化合物を含む物を見つけ出すための長時間にわたるフラクション再分析が不要になります。TIC と目的化合物のターゲットマスの EIC とを重ね合わせることで、必要なフラクションを簡単に同定できます。

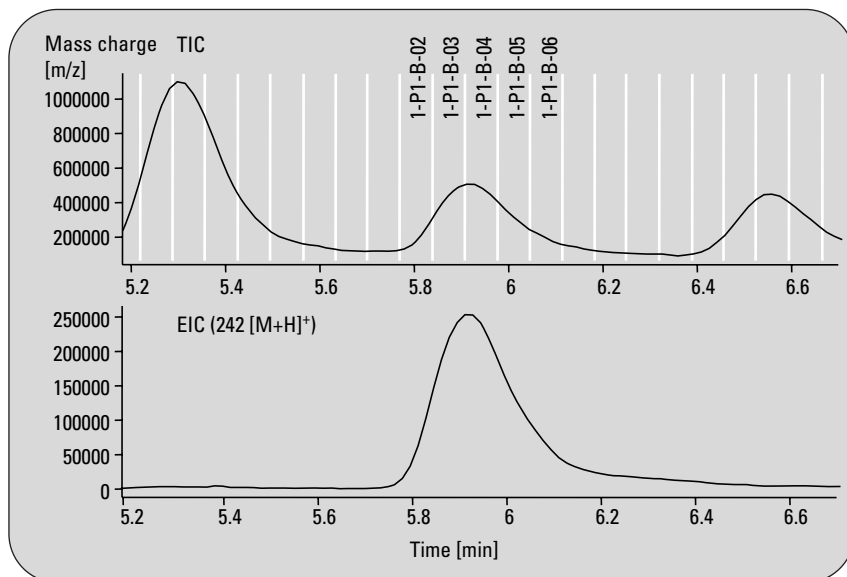


図 2
TIC と EIC の照合によるフラクションの同定

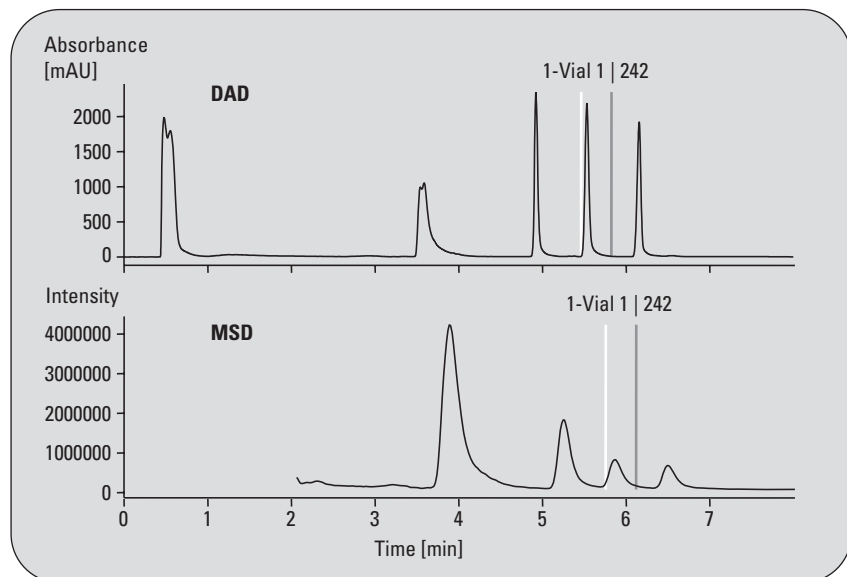


図 3
マスベースフラクションコレクションの結果

ここでは 4 つのフラクションコレクションの方法を説明します。

1. スレッシュホールドを高く設定したピークベースフラクションコレクション
2. ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレクション
3. ピークのタイムスライスを用いたピークベースフラクションコレクション
4. マスベースフラクションコレクション

結果と考察

1. スレッシュホールドを高く設定したピークベースフラクションコレクション

ピークベースフラクションコレクションで、最も簡単な方法は、スレッシュホールドのみを設定する方法です。これは、検出器シグナルが設定した値を超えるとすぐにフラクションが開始され、シグナルがスレッシュホールドを下回ると終了します。この種類のピークベースフラクションコレクションは、大部分の精製アプリケーションで有用です。ベースライン分離されていないピークも分離することが可能ですが、スレッシュホールドをかなり高い値に設定する必要があります。これにより、ピークの開始と終了時に化合物の一部をカットオフすることになり、回収率が低下します。

2. ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレクション

ピークの開始と終了時の損失を防ぐために、Agilent ChemStation では、ピークベースフラクションコレクションのパラメータとして、ピークのアップスロープ/ダウンスロープを設定することができます。これらのパラメータが設定されると、アップスロープとスレッシュホールドの両方のパラメータが上回った場合に、フラクションコレクションが開始されます。シグナルが 1 つの基準を満たす、つまり、スレッシュホールドを下回るか、指定したダウンスロープを下回ると、フラクションコレクションを終了します。結果

ベースライン分離されていないピークからの化合物の精製

として、スレッシュホールドをかなり低い値に設定することが可能で、ピークの開始および終了時のフラクションの損失が小さくなり、ベースライン分離されていないピークを 2 つのフラクションに分離することが可能になります。

3. ピークのタイムスライスを用いたピークベースフラクションコレクション

ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレクションにより、上記のように良好な回収率と純度を得ることができます。しかし、ピークの重なりが大きくなると、捕集した 2 つのフラクションの純度は著しく低下します。この場合、より良い方法は、ピークベースフラクションコレクションにより、フラクションコレクションを開始し、ついで、タイムベースフラクションコレクションにより 2 つのピークを複数のフラクションに分割する手法です。Agilent ChemStation ソフトウェアでは、フラクションコレクタの

セットアップの中の補助設定で、“*Max. fill volume per location*” を利用することにより可能です。この機能を用いて、予め設定したフラクション容器あたりの最大捕集量をメソッド内で変更することができます。

図 2 の例では、フラクション容器としてディープウェルプレートを使用し、捕集量は 2 mL に指定しました。ポンプの流量は 20 mL/min だったため、6 秒ごとに 1 つのウェルが満杯になります。2 つのピークのピーク全幅は約 45 秒で、ピークは 8 つのウェルに振り分けられます。フラクションコレクタのニードルが次のウェルに移動する際の化合物の損失を防ぐために、コレクションモードを連続フローに設定しました。ウェルプレートをフラクション容器として使用する場合、このモードでは、ニードルが次の位置に移動する際にダイバータバルブは廃液位置に切り替わりません。フラクションコレクションの結果を図2に示します。

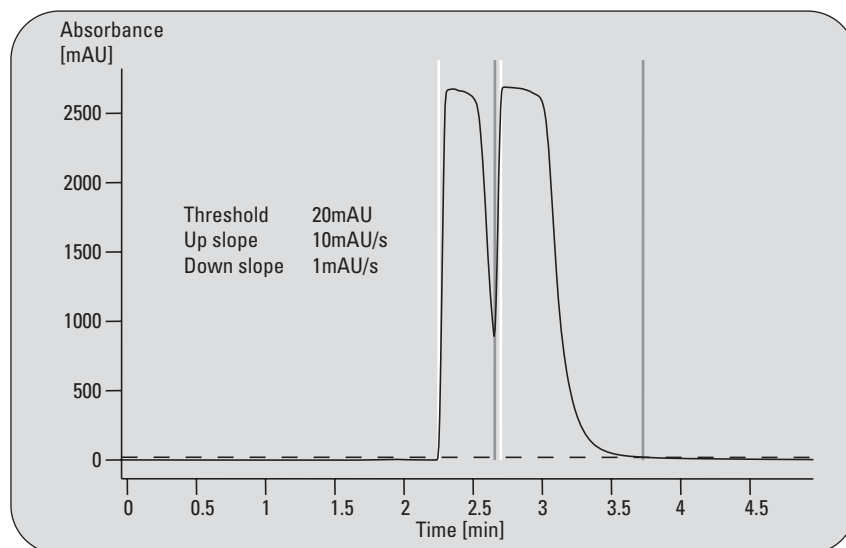


図1
ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレクション

4. マスベースフラクションコレクション

ベースライン分離されていないピークから目的化合物を精製するもう 1 つの手法は、マスベースフラクションコレクションです。高いアバンダンスを持つターゲットマスがフラクション開始の基準となるため、2 番目のターゲットマスが優勢になるとすぐに 2 番目のフラクションが開始されます。フラクションコレクションの結果は図 3 のとおりです。捕集したフラクションを再分析し、得られた回収率と純度は、ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレクションと同様の結果を示します。

まとめ

スレッシュホールドだけによるピークベースフラクションコレクションは、2 つの化合物を分離する最も簡単な方法ですが、設定値を高く設定する必要があるため、ピークの開始と終了時に化合物回収の低下によるサンプルの損失につながる可能性があります。ChemStation ソフトウェアのピークのアップスロープ/ダウンスロープ機能を使用することで、これを防止することが可能です。ピーク幅が広く、重なりも大きい場合、タイムスライスを併用したピークベースフラクションコレクションを使用することが可能です。これには、適切なフラクション捕集量に関する手動計算が必要で、フラクション数が多くなります。MSD を搭載した精製システムによりマスベースフラクションコレクションを行うことが可能となり、目的化合物 2 つだけのフラクションになります。

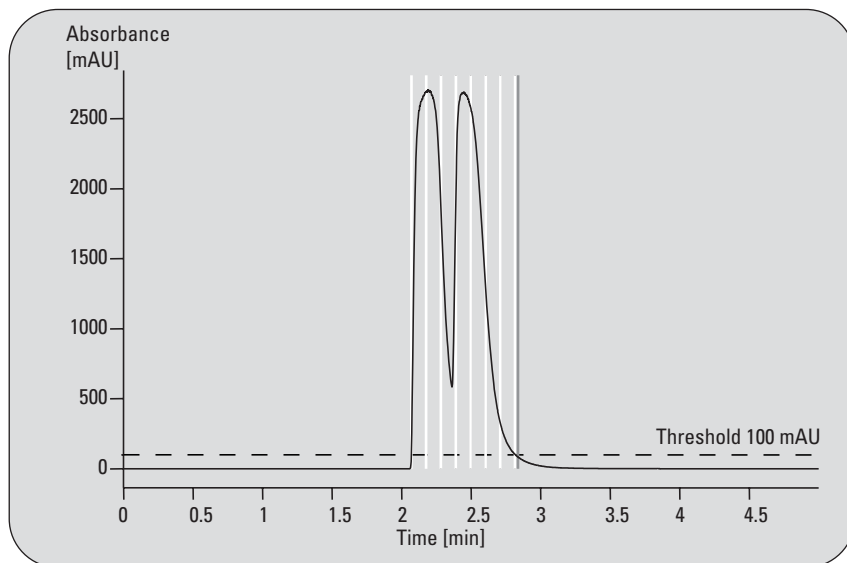


図 2
ピークのタイムスライスをを用いたピークベースフラクションコレクション

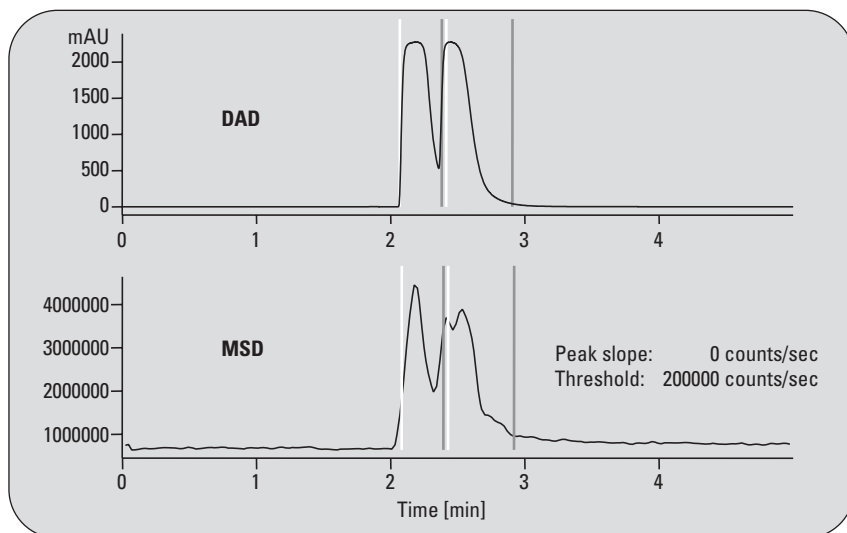


図 3
マスベースフラクションコレクション

ピークのアップスロープ/ダウンスロープとは何か、フラクションを開始するため、それはどのように使用されるのか、また、どのようなアプリケーションに必要なのかについて説明します。

結果と考察

1. 「ピークのアップスロープ/ダウンスロープ」に基づくフラクショントリガ決定

「ピークのアップスロープ/ダウンスロープ」とは何か？

ピークのスロープとは、図 1 に示したようなシグナルの一次導関数です。スロープ値は、ベースラインではゼロとなり、最初の変曲点の最大値まで上昇し、ピーク頂点でゼロになり、2 番目の変曲点で負の最大値になり、ピークの後のベースラインで再びゼロになります。

ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いる場合のフラクショントリガ決定

図 2 に、捕集したフラクションに対して開始および終了マークの付いたクロマトグラムを示します。スレッシュOLDとアップスロープの設定値を超えた場合、フラクションが開始されます (マーク 1)。シグナルがスレッシュOLDを下回るか、ダウンスロープの設定値を満たした場合に、フラクションが終了します。極小点ではスロープがゼロに等しいため、マーク 2 でダウンスロープの基準が満たされるため、フラクションが終了されました。この点では、スレッシュOLDの設定値よりシグナルは高くなっています。マーク 3 で、ダウンスロープが再び設定値を超え、スレッシュOLDもまだ設定値より高くなっています。最終的にマーク 4 でシグナルはスレッシュOLDの設定値を下回り、そのため、ダウンスロープの設定値が満たされているかどうかに関わらずフラクションは終了します。

2. アプリケーション

大きなピークと小さなピークの分離

ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いることで、大きなピークから小

ピークベースフラクションコレクションでのピークのアップスロープ/ダウンスロープの使用法

なピークを分離することが可能です。図 3 に、より小さなピークからより大きなピークを容易に分離できることを示します。これを行うために、フラクションコレクション開始前に、ピークのアップスロープ/ダウンスロープの値を知る必要があります。これは、試験分析を行える場合に限り可能です。

ベースライン分離されていないピークの分離

2 つのピークがベースライン分離されていない場合、良好な回収率と純度で 2 つのピークを別々のフラクションとして捕集する方法がいくつかあります。1 つはピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いたピークベースフラクションコレ

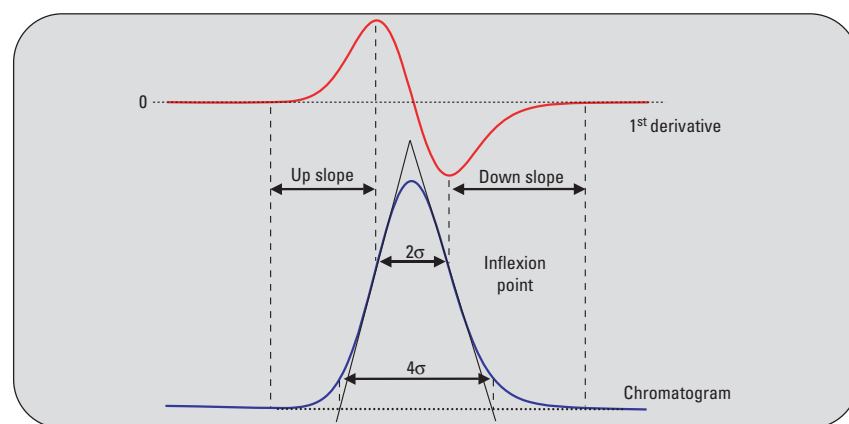


図 1
スロープはピークの一次導関数です。

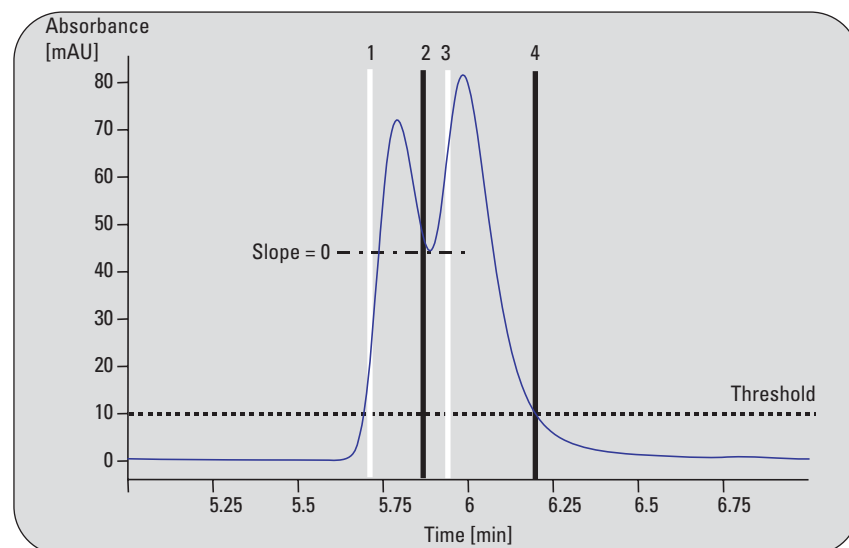


図 2
フラクショントリガ決定

クションです。ピーク間のスロープの最小値は 0 になるため、シグナルがスレッシュホールドを下回らない場合でも、ピークを 2 つのフラクションに分割することが可能です。

ベースラインがドリフトしているクロマトグラムでの化合物の精製

ベースラインがドリフトしているクロマトグラムでは、スレッシュホールドだけのピークベースフラクションコレクションは適していません。ベースラインが上方へドリフトする場合、スレッシュホールドを上回るすべてがフラクションとして捕集されます。ベースラインが下方へドリフトする場合、仮にあったとしても、ピークのわずかな部分だけが捕集されます。そのため、ピークのアップスロープ/ダウンスロープを適切な値に設定する必要があります。図 4 には、ベースラインが上昇するクロマトグラムでのピークベースフラクションコレクションの結果を示します。

まとめ

ピークのアップスロープ/ダウンスロープを使用して、ピークベースフラクションコレクションでのフラクションを開始することが可能です。2 つのスロープパラメータを設定した方が、1 つのスロープパラメータよりも明らかに利点があります。多くのアプリケーションでは、スレッシュホールドのみを設定したピークベースフラクションコレクションで対応できますが、ピークのアップスロープ/ダウンスロープも必要なアプリケーション例を示しました。

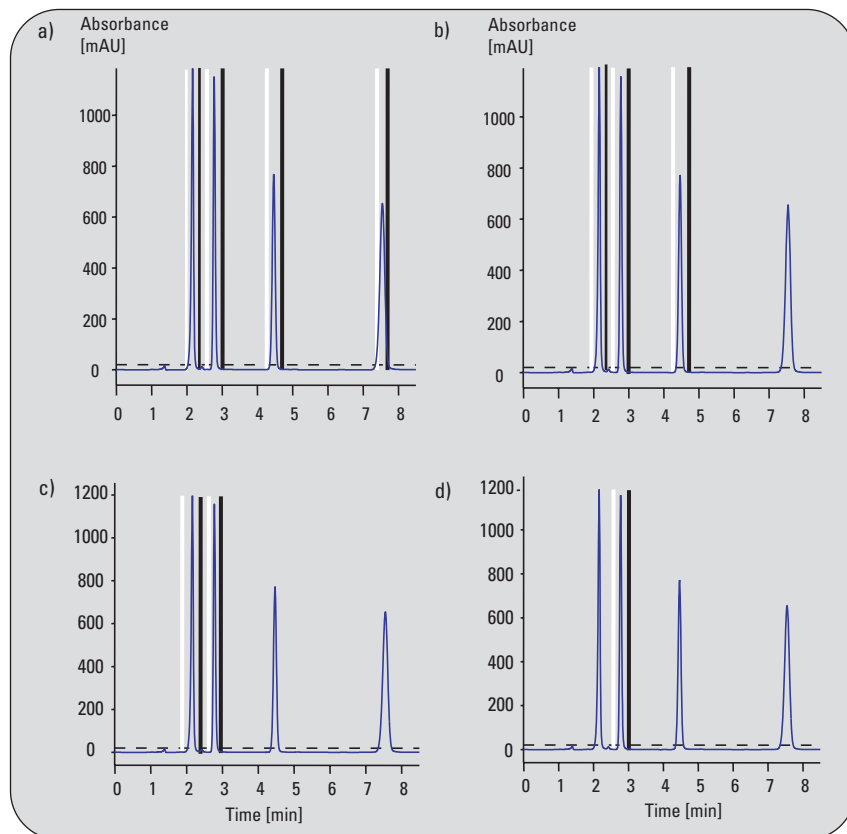


図 3

a) ピークのアップスロープ/ダウンスロープ: 30 mAU/s、b) ピークのアップスロープ/ダウンスロープ: 120 mAU/s
c) ピークのアップスロープ/ダウンスロープ: 250 mAU/s、d) ピークのアップスロープ/ダウンスロープ: 400 mAU/s

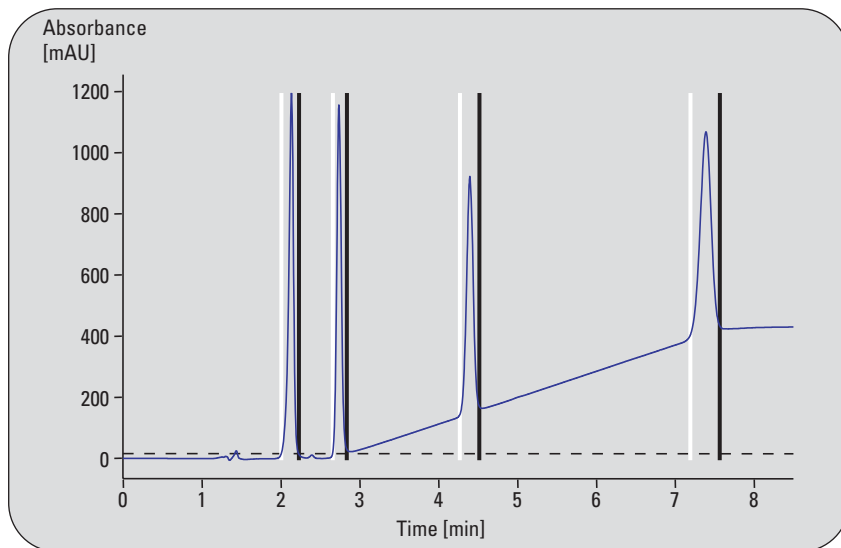


図 4

スレッシュホールド設定: 15 mAU、ピークのアップスロープ/ダウンスロープ: 15 mAU/s

『洗練されたピークベースフラクションコレクション - ピークのアップスロープ/ダウンスロープを用いた手法』、
資料番号 5989-0511 EN

フラクションコレクションした直後ではなく、ある程度の時間静置した後に、専用 HPLC システムにより純度確認のために再分析を行う方が良い理由について、1100 シリーズ精製システムのユーザーの経験を紹介します。

結果と考察

典型的なワークフロー

創薬だけでなく、作物の研究などで活性化合物の調査をしている分野での典型的なワークフローは、次の 6 つのステップで説明することができます。

1. 未精製サンプルの準備
2. 分取 HPLC システムでの精製
3. フラクションコレクション
4. 溶媒の乾固および精製した化合物の計量
5. 精製した化合物をある濃度に再溶解
6. 溶液の一部で活性試験を実施

活性試験（ステップ 6）では、使用する化合物が必要な純度（通常、90 ～ 95% 以上）であることが必要で、上記ワークフローのある段階で確認します。

自動フラクション再分析を行う際の誤差の考察

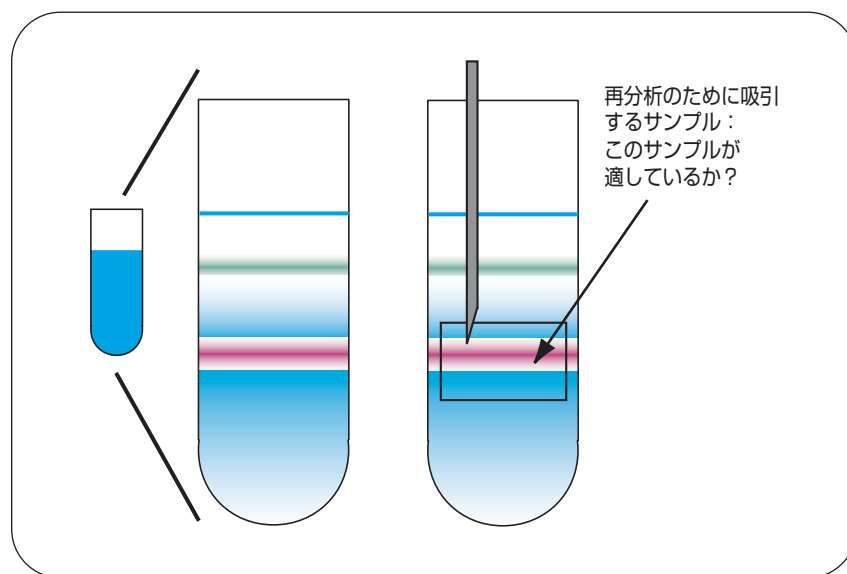


図1
濃度勾配による誤差

1. 濃度勾配

目的化合物は、フラクション内で濃度勾配が起こるようにカラムから溶出します。フラクション容器内での濃度勾配が認められます。（図 1）。再分析のために、少量が容器から直接吸引される場合、吸引されたサンプルは活性試験に使用されるサンプルとして適していないことがあります。

2. 結晶化

サンプルを完全に溶解させるため、サンプルは移動相として使用される溶媒ではなく、DMSO や DMF のような溶解力の強い溶媒で溶解され、精製システムに注入されます。しかし、逆相 HPLC に使用される移動相は、通常、水とアセトニトリルまたはメタノールです。注入したサンプル量や溶解度に応じて、目的化合物は移動相の中から結晶化が始まります。純度確認のためのサンプルを原液から吸引する場合、このサンプルもまた活性試験を行うサンプルとして適していません。

3. 溶媒乾固による分解

精製後、目的化合物を含むフラクションの移動相を除去する必要があります。これは、遠心分離エバポレータ、または加熱しながら窒素ガスを吹き付ける方法のいずれかで行われます。残渣の計量後、DMSO または DMF などの適切な溶媒を用いて特定の濃度に再溶解する必要があります。目的化合物の純度確認をフラクション容器から直接行うことで、溶媒除去中に目的化合物が分解する可能性がある場合でもそれを回避することができます。最悪の場合、乾固体により活性の高い化合物を失う恐れがあります。

純度再分析を行うのにふさわしいステップはどちらか？

フラクションコレクション直後ではなく、ある程度の時間静置した後に再分析を行う場合、前述した 3 つの問題は起こりません。再溶解した化合物の一部で活性試験 (ステップ 6) を行うため、同じ溶液の残りを分析や純度試験に使用することができます。これにより、活性試験を行ったサンプルとまったく同じサンプルで再分析を間違いなく行うことができます。

まとめ

自動フラクション再分析は、完全な自動精製ソリューションのためのもう 1 つのステップになり、以下のような特徴があります。

- 自動化のメリットはあるが、測定結果の信頼性は犠牲になります
- 濃度勾配やフラクション容器での結晶化の可能性により、測定された純度は悪い結果になる恐れがあります。また、溶媒乾固中の分解により活性化合物を完全に失う恐れもあります。

サンプル精製や活性試験工程の後段で純度確認の分析を分析 HPLC システムで別に行う場合、上記のような問題点をすべて解決することができます。

ここでは、カラムへのローディング量を増やすための溶剤フラッシュ（サンドウィッチ）法と有機相注入の2つのアプローチ方法について説明します。

高濃度サンプルの注入

結果と考察

溶剤フラッシュ（サンドウィッチ）法

溶剤フラッシュ法では、サンプル溶媒の2つのプラグでサンプルを挟み込んで注入します。化合物がDMSOで溶解されている場合、DMSOのプラグでサンプルの前後を挟み込みます。サンプルが移動相と混合し始める場合、混合はサンプル濃度がゼロのプラグの末端から始まります。そのため、サンプルの析出が起こるのを防ぐことができます。Agilent ChemStation では、注入プログラムを用いて溶剤フラッシュ法を簡単に行うことが可能です。

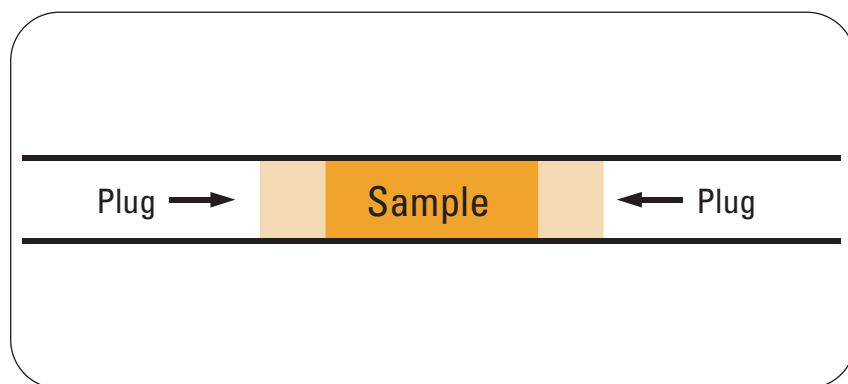


図1
溶剤フラッシュ法

溶剤フラッシュ法の長所

- サンプルがカラムに到達するまで移動相と接触しません。そのため、流路内で析出が起こるのを防ぐことができます。
- ハードウェアを再構成する必要はありません。注入プログラムを用いて、標準システムで溶剤フラッシュ法を行うことが可能です。

溶剤フラッシュ法の短所

- サンプルを、かなり狭いバンドでカラムに保持する必要があります。サンプルとプラグ溶媒が強いため、カラム先端でサンプルの帯域は著しく広がってしまいます。
- カラム容量と比較してプラグとサンプル量の比率が大きすぎると、化合物の一部が溶媒先端とともにカラムに保持されずに溶出する恐れがあります。
- プラグとサンプル溶媒が、固定相の平衡を妨げる可能性があります。

有機相注入

有機相注入には、分取ポンプやインジェクタの再配管が必要です。インジェクタを、水系および有機系移動相の混合位置と有機溶媒を送液するポンプの間に接続します。このため、サンプルはTコネクタやプレカラムに到達するまで、有機相とのみ接触します。そのため、オートサンプリングのバルブなどの流路の重要な部分で析出が起こるのを防ぐことができます。析出が起こる前にサンプルがプレカラムの先端に到達できるように、Tコネクタとプレカラムをできるだけ近接して接続する必要があります。

有機相注入の利点

- ピークが広がる、またはカラムに保持しないでサンプルが溶出してしまうような強いサンプル溶媒が必要ありません。
- グラジエント仕様の Agilent 1100 シリーズ分取ポンプは 2 台のポンプから構成されているため、グラジエントプログラミングが非常に簡単です。標準コンフィグレーションに関しては同じ方法で設定可能で、フローグラジエントプログラミングは必要ありません。

有機相注入の欠点

- オートサンプラのバルブはサンプルの析出にとって重要な部分ですが、Tコネクタまたはプレカラムの先端で析出による詰まりが発生する可能性があります。通常、カラム先端の析出は圧力が上昇するだけですが、Tコネクタの詰まりは部品交換等の必要が起こります。
- 移動相を注入するために精製システムを再配管する必要があります。このため、ハードウェアの変更なしに同じシステムで有機相および標準試料の注入を行うことはできません。

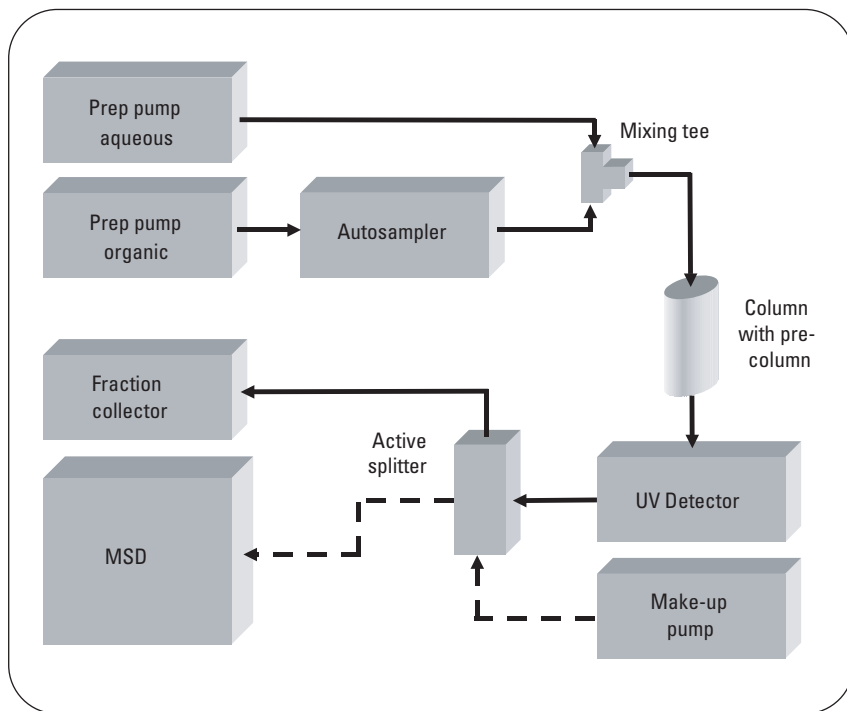


図2
有機相注入

まとめ

- ソルベントフラッシュ（サンドウィッチ）法を用いる場合、サンプルを純粋な溶媒の 2 つのプラグで挟み込むことで、サンプルとグラジエント開始条件の移動相の混合を防止できます。これは、Agilent ChemStation のインジェクタプログラムを用いることで簡単に達成することが可能です。

- 有機相注入を行う場合、オートサンプラは水系移動相との混合位置の前で、有機系移動相の流路に接続されます。このため、オートサンプラバルブ部分では混合および析出は起こらず、プレカラム先端で起こります。

近年の合成有機化学の飛躍的な成長により、多数の新しい化合物の分子量を分析および確認するために、使いやすく、堅牢で、迅速な分析システムに対する需要が高まっています。通常、合成化学者は有機合成の問題にフォーカスし、化合物分析に要する時間を最小限に抑えることを望んでいます。ここで説明する Agilent LC/MS Easy Access ソフトウェアにより、サンプル情報の入力、メソッドリストから選択、サンプルをセットし、その後ラボで分析結果の電子メールを待つという、シンプルなプロセスの構築が可能です。

LC/MS Easy Access ソフトウェアの主要機能

- ChemStation Data Browserで電子メールデータを確認することが可能
- システムが稼働している間、フラクションを連続して取り出すことが可能なため、フラクションコレクタのリセットは不要
- 非常にシンプルで簡単なサンプル登録と状況確認
- 分子量および対象イオンの存在の迅速な確認
- Agilent 1100 シリーズウェルプレートサンプラとオートサンプラをサポート
- メソッド変更時の自動事前平衡化
- データとレポートの自動電子メール配信
- ユーザアクセス、サンプルキュー（登録）のトラッキング、プロジェクト管理等、柔軟性の高い管理ツール
- 機器がデータベースを共有することができるようになる複数の機器ネットワーク化により、各機器で不要なコンフィグレーション管理の必要性を排除し、管理業務を軽減

生産性を向上させる Walk-upアクセス

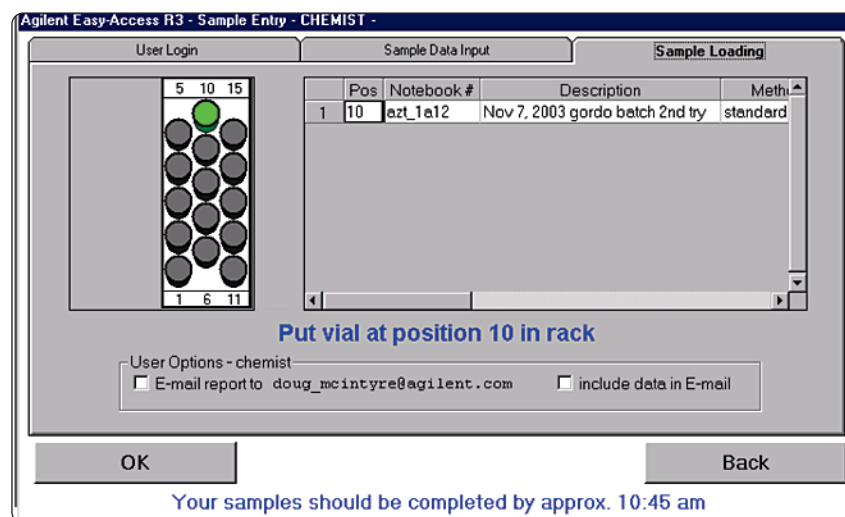


図 1
サンプルの位置を指示し、完了時間を示します。

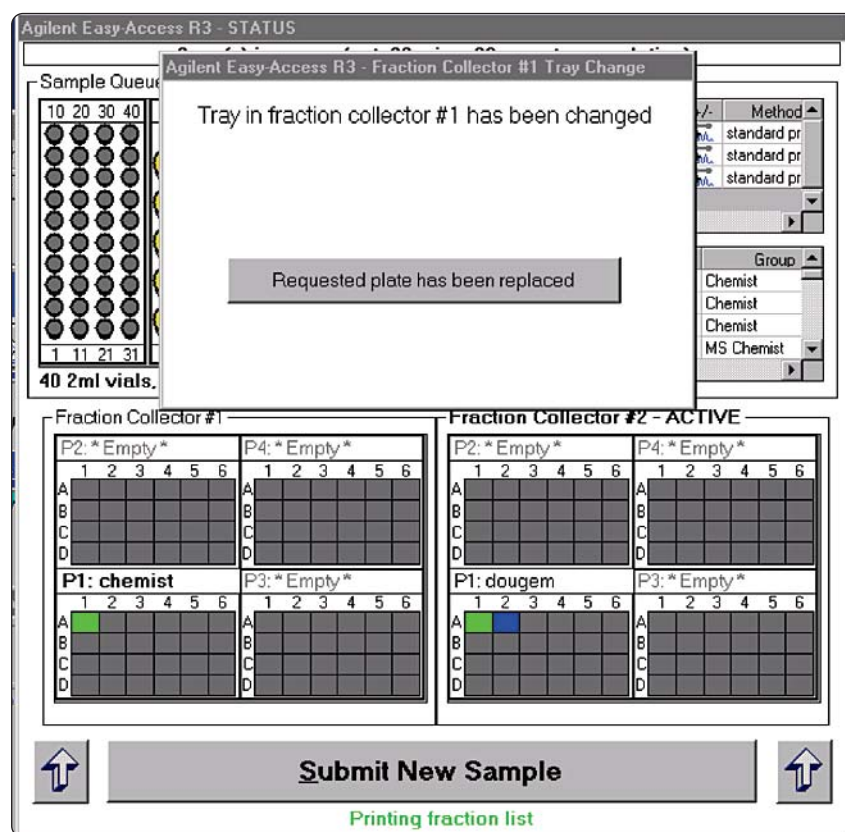


図 2
次のユーザのためにスペースが常に利用できるよう、システムはユーザにフラクションを取り出した後にプレート交換を促します。

結果と考察

パスワード(セキュリティのためのオプション)を入力してログインした後、サンプル情報の入力、リストから割り当てられたメソッドを選択すると、システムはサンプルをセットすべきサンプラの位置を示します(図1)。図2に、システムの全体状況と、以下の重要な情報を表示する状況画面を示します。

- 現在のサンプルとキューのおおよその残り時間
- 現在分析中のメソッドと最終登録者の名前
- ChemStation、オートサンプラ、UV/Vis ランプの状況

システム管理

システム管理者には Easy Access システムの全般的な管理権限があります。重要な機能は以下のとおりです。

- オプションのパスワード、メソッドアクセス、ChemStation の利用可能性を含むユーザとグループ管理
- 優先サンプルの割り込みを含むサンプルキュー管理
- ユーザが使用できるメソッドを設定するメソッド管理

電子メール送信される結果

電子メールで選択したユーザに分析結果を送信するように、システムに指示することが可能です。右記は、受信した情報の例です。さらに、電子メールには、対象質量の存在の有無、クロマトグラム、スペクトルを示す添付レポートも含めることが可能です。

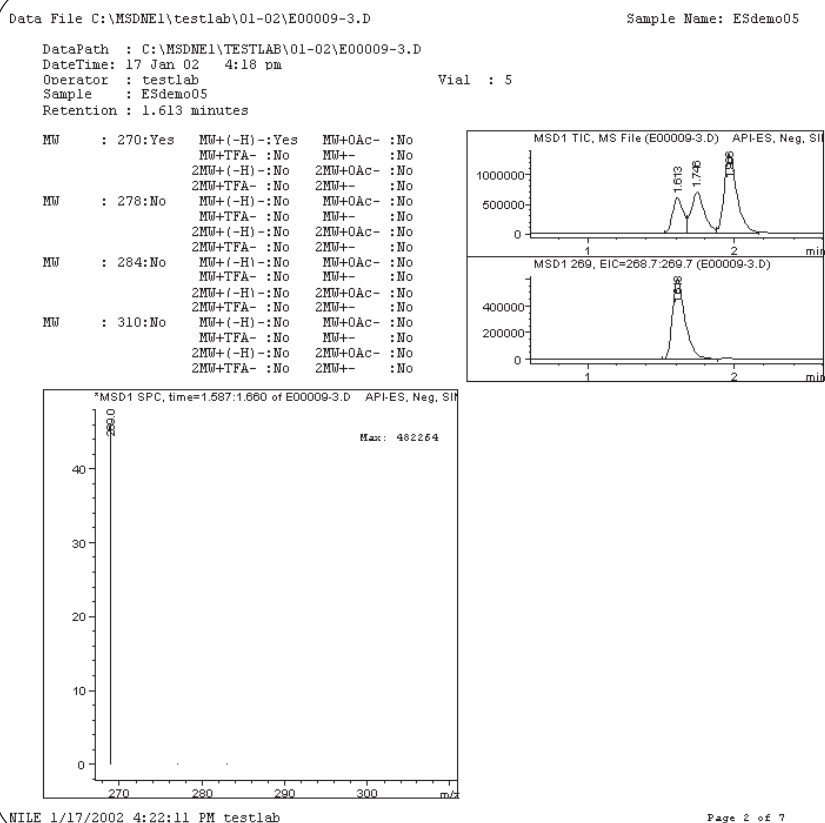


図3
 m/z 270 の対象質量の存在を確認するレポート例

Your sample run has been completed.
Sample:ESdemo05i
Info:Sulfa Drugsi
Target masses: 270 278
284 310
Method:Loop2
Info:Loop SIM ES, multi signal
Data file:E00009-3.D
=====

A message generated by
the Agilent Easy-Access
system

まとめ

LC/MS Easy Access は非常に効率的なツールで、分析の専門知識をあまり必要とせずに短時間に化合物の同一性を確認することで、ラボの生産性向上をサポートします。

製薬分野においては、立体異性体、ジアステレオ異性体、光学異性体の分離は重要な要素ですが、化合物の精製は困難で、しばしば化合物の一部のみしか分取できないということが発生します。良い分離能を得るために長いカラムを使用すると、カラムによる背圧が高くなってしまいます。そのため、十分な分離が達成されるまで繰り返し同じカラムで化合物を分離するために、リサイクル技術が開発されました。本アプリケーションノートでは、Agilent 1100 シリーズ精製システムでリサイクルクロマトグラフィーをどのように行うかを説明します。

リサイクルクロマトグラフィー

結果と考察

動作原理

リサイクルクロマトグラフィーの動作原理は、移動相の流れの方向にカラムを移動させることです (図 1)。注入後、化合物はカラム 1 から溶出し、カラム 2 で

保持されます。カラム 2 で化合物が分離される間、切換バルブを用いて、カラム 1 がカラム 2 の後ろに移動します。化合物がカラム 2 から溶出した後、カラム 1 で保持し、カラム 2 はカラム 1 の後ろに移動します。

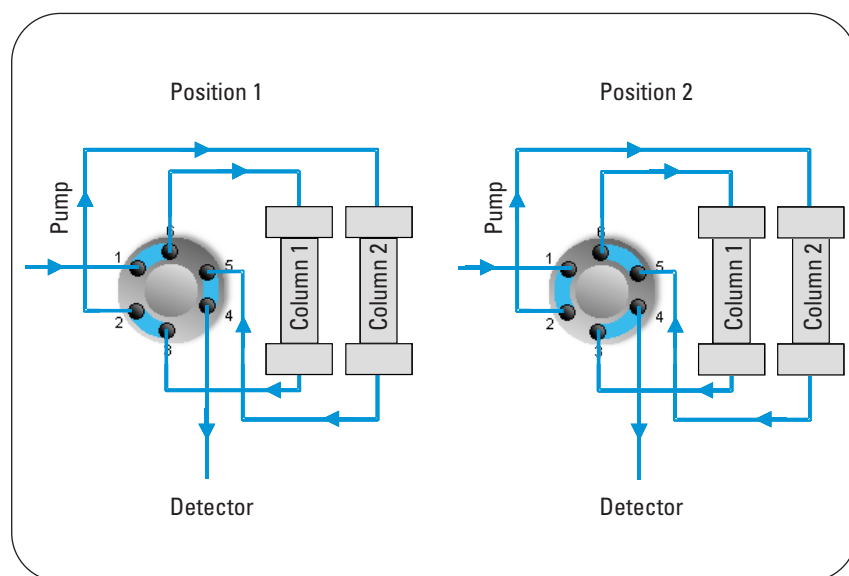


図 1
リサイクルクロマトグラフィーの動作原理

分析結果

より多くのカラムを用いた場合のクロマトグラフィー結果は図 2 のとおりです。これからも分かるとおり、1 つのカラムではほとんど分離されない化合物も、バルブを4回切り替えて、カラムでの分離を6回行うことで、ベースライン分離を達成することが可能となります。

制限

- リサイクルクロマトグラフィーは、光学異性体、ジアステレオ異性体、立体異性体などリテンションタイムがほぼ同じである化合物のアイソクラティック分析による分離にのみ使用できます。グラジエント分析には適していません。
- サイクル数は、1 つのカラムでの 2 つの化合物の保持時間により制限されます。

精製

リサイクルクロマトグラフィーによりカラムでの分離を6回行ったフラクションコレクションにより、図3 のように純度 100%の2つのフラクションを得ることができました。

まとめ

本アプリケーションノートでは、光学異性体、立体異性体、ジアステレオ異性体を分離するために、2 ポジション/6 ポートバルブを用いた Agilent 1100 シリーズ精製システムでのリサイクルクロマトグラフィーの方法について説明しました。

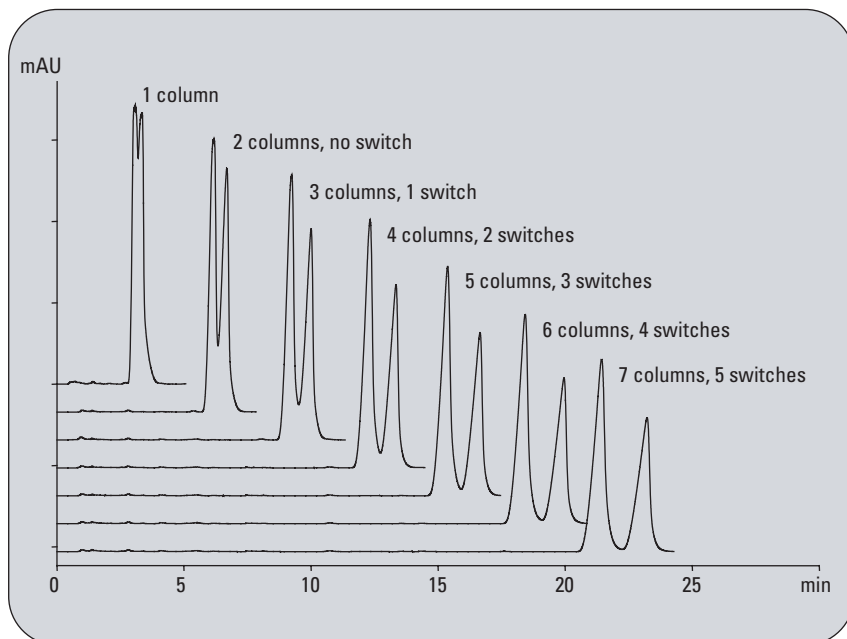


図 2
リサイクルによる分離

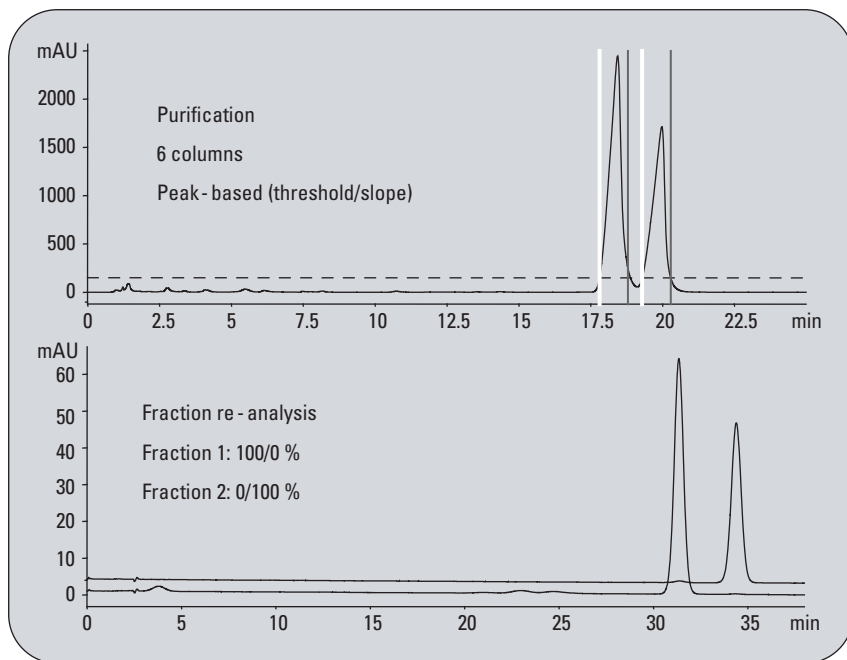


図 3
リサイクルクロマトグラフィーによるピークベースフラクションコレクション

2 ポジション/10 ポートバルブを用いて、分取スケール HPLC のカラム再生を行うことが可能です。

バルブやキャピラリーコネクション、ポンプのメソッド設定は、内蔵バルブと外付バルブとで同一です。ソフトウェア上で設定画面のみ異なります。

結果と考察

バルブセットアップ

外付 2 ポジション/10 ポートバルブは、図 1 に示したバルブセットアップウィンドウから制御されます。自動カラム再生のために、“分析後次の位置へ (Next position after run)” チェックボックスにチェックを入れる必要があります。位置は、自動的に現在値 (Use current) の使用、に設定されます。この設定により、分析完了後にバルブを次のカラムに自動的に切り換え、分析開始時にこの位置が保たれます。キャピラリーコネクションの設定など、詳細はヘルプを用いて確認できます。

シーケンス分析

カラム再生を行わない場合は、図 2 のように、精製分析のステップ「吸引および注入」、「グラジエント分析」、「カラム洗浄」、「カラム平衡」が行われます。これにより、本アプリケーションで使用されるメソッドの総サイクルタイムは、13 分です。

分取 HPLC におけるカラム再生の利用

アイソクラティック再生ポンプを用いたカラム再生

カラム再生のためにアイソクラティックポンプを使用する場合、2 番目のカラムで次の精製を行っている間に、「カラム平衡」のステップを行うことが可能です (図 2)。ポンプとバルブの間が確実にグラジエント開始組成の移動相で満たされるようにするためには、カラム洗浄後に洗浄時間を追加する必要があります。この洗浄持続時間は、オートサンプラのディレイボリュームなどのシステムセットアップにより異なります。図 3 の例では、サイクルタイムを 10.5 分に短縮することができました。

精製システムでのカラム再生に、以下のアイソクラティックポンプを使用することが可能です。

- Agilent 1100 シリーズアイソクラティックポンプ (20 MPa で最大流量 10 mL/min)
- Agilent 1100 シリーズ分取ポンプ (40 MPa で最大流量 100 mL/min)

グラジエント再生ポンプを用いたカラム再生

再生ポンプとしてグラジエントポンプを用いた場合、2 番目のカラムで次の精製が行われている間に、「カラム洗浄」および「カラム平衡」のステップを行うことが可能です (図 4)。その後、グラジエント完了直後に洗浄時間を追加する必要があります。精製システムでのカラム再生に、以下のグラジエントポンプを使用することが可能です。

- Agilent 1100 シリーズ 12 ポジション/13 ポート溶媒切換バルブを搭載した Agilent 1100 シリーズアイソクラティックポンプ (20 MPa で最大流量 10 mL/min)
- Agilent 1100 シリーズクォータリポンプ (20 MPa で最大流量 10 mL/min)

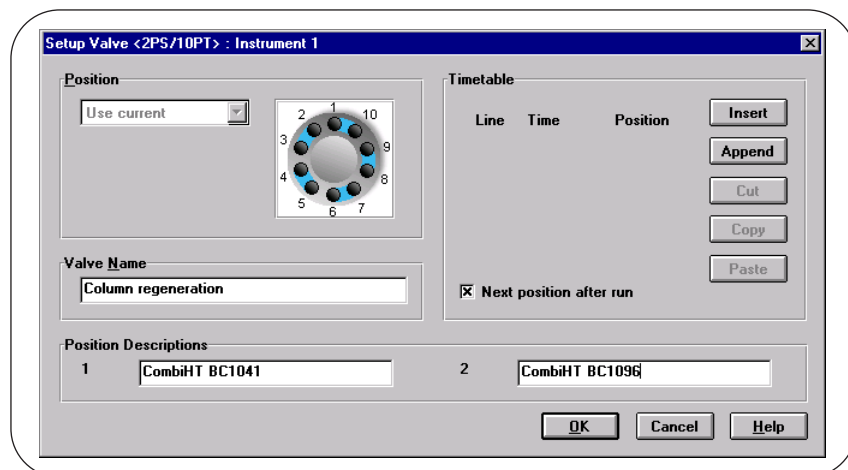


図 1
バルブセットアップウィンドウ

グラジエント再生ポンプとオーバーラップ注入を用いたカラム再生

Agilent 1100 シリーズ分取オートサンブラのオーバーラップ注入機能を用いると、前の精製分析が行われている間に、次のサンプルを吸引することが可能です。特に、大容量のサンプルを注入する必要があり、数回の吸引が必要な可能性のある分取 HPLC では、大幅に分析時間を節約することができます (図 5)。

まとめ

Agilent 1100 シリーズ 2 ポジション/10 ポートバルブによるカラム再生を用いることで、ハイスループット精製分析を行うことが可能です。再生ポンプの種類に応じて、2 番目のカラムで次の精製分析が行われている間に、カラム洗浄またはカラム平衡のいずれかが行われます。さらに、オートサンブラによるオーバーラップ注入が可能であるため、注入量が多く、注入時間が長い分取 HPLC では、サイクルタイムをさらに短縮することが可能です。

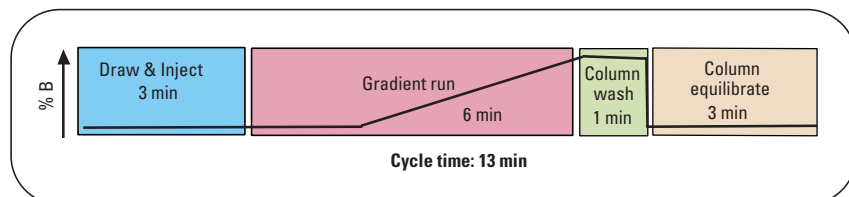


図 2
連続分析

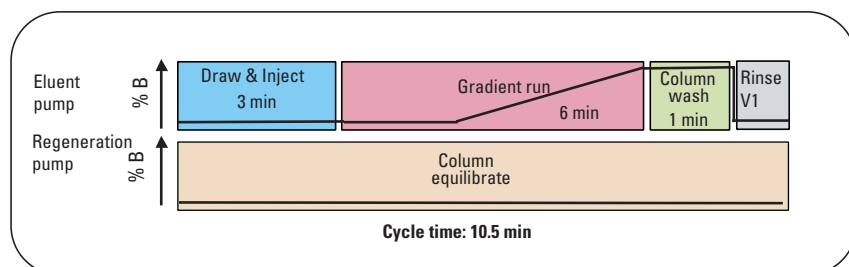


図 3
アイソクラティック再生ポンプを用いたカラム再生

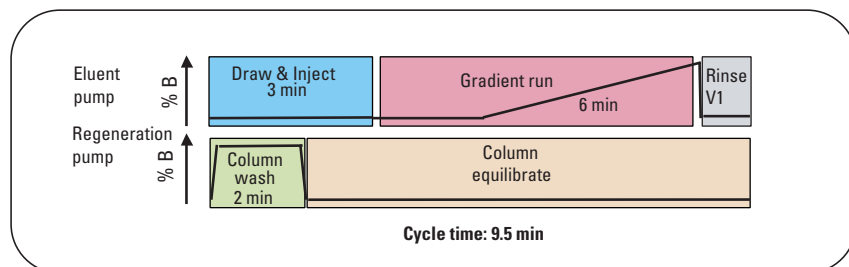


図 4
グラジエント再生ポンプを用いたカラム再生

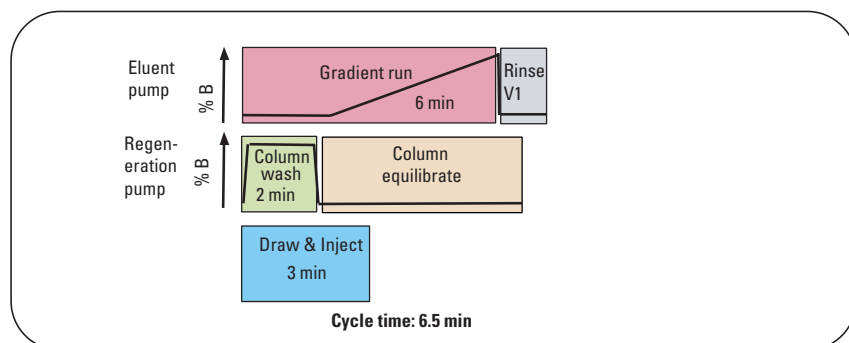


図 5
グラジエント再生ポンプとオーバーラップ注入を用いたカラム再生

『分取ハイスループット HPLC - Agilent 1100 シリーズバルブソリューションを用いたカラム再生』、
資料番号 5988-8085EN

2 つのアプリケーション例を用いて、Agilent 1100 シリーズ精製システムの 12 ポジション/13 ポートバルブの使用法を説明します。まず、フラクションとして捕集されないサンプルの残留物が専用容器に捕集されるリカバリーコレクションが可能となります。不適切なパラメータ設定などにより精製が失敗した場合、サンプルは廃液に向かわず、回収できる位置に向かいます。次に、バルブを利用したタイムベースフラクションコレクションが可能なシンプルな精製システムを説明します。

結果と考察

リカバリーコレクション

ChemStation ソフトウェアによりリカバリーコレクションが可能です。フラクションとして捕集されない成分は、回収用の専用コンテナに流れます (図 1)。リカバリーコレクションのために、ファネルトレイ (G1364-84502) を搭載した Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタ AS を使用する必要があります。1100 シリーズフラクションコレクタ PS のニードルは短いため、ファネルを使用することができません。フラクションコレクタ AS または PS の両方で、フラクションコレクタの廃液チューブに 12 ポジション/13 ポートバルブを設定することでも、リカバリーコレクションを行うことが可能です。

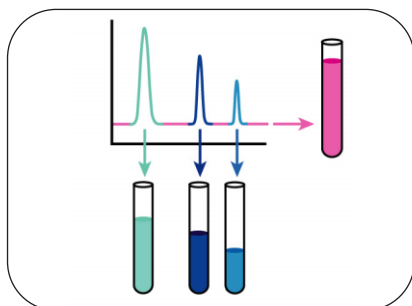


図 1
リカバリーコレクション

リカバリーコレクションと タイムベースフラクションコレクション

この場合、リカバリーコレクションのために、“分析後、次のポジションへ (Next position after run)” チェックボックスにチェックを入れる必要があります。これにより、“自動的にポジションは現在のポジション” (Position to use current) の使用、に設定されます。この設定により、分析完了後にバルブが次のポジションに自動的に切り換わり、次の分析開始時にこの位置が保たれます。このため、サンプル 1 の回収物は位置 1 に捕集され、サンプル 2 は位置 2 に捕集されます。最初の分析を開始する前に、バルブを位置 1 に手動で切り換えることが必要です。12 ポジション/13 ポートバルブを用いることで、最高 12 個のサンプルの回収物を捕集することが可能です。さらに回収位置が必要な場合、12 ポジション/13 ポートバルブをバルブの 1 番目の出口に取り付けることが可能です。唯一の制限は、システムに取り付けることが可能なバルブの最大数が決まっていることと、接続したバルブそれぞれに複雑なメソッドセットアップが必要なことです。分析完了後およびポストラン開始前にバルブが次の位置に切り換わるため、分析に、カラム平衡のためなどのポストラン時間を含めることをお勧めします。そのため、カラム洗浄や平衡中のカラムの移動相は、そのサンプルのリカバリーロケーションに捕集され、次のサンプルのリカバリーロケーションには捕集されません。メソッド例は表 1a および 1b のとおりです。

タイムベースフラクションコレクション

Agilent 1100 シリーズフラクションコレクタの代わりに、Agilent 1100 シリーズ 12 ポジション/13 ポートバルブを接続して、シンプルなフラクションコレクタとして使用することが可能です。タイムテーブルを用いてバルブを切り換えることで、時間スライスによるフラクションを捕集することが可能です (図 3)。分析が行われていない時に、移動相を捕集するための廃液位置として最終位置を使用します。メソッドで開始位置が固定されるため、分析完了後にバルブはこの位置に戻ります。そのため、平衡、注入サイクルなどの間は、カラムから来るすべての移動相は廃液位置に向かい、フラクションを希釈したり、汚染することはありません。1 つのシーケンスで、これらのバルブ設定のメソッドを用いて、複数のサンプルバイアルからの注入によるプーリングを行うことが可能です。Agilent 1100 シリーズ 12 ポジション/13 ポートバルブを用いたタイムベースフラクションコレクションは、ChemStation ソフトウェアとのみで動作可能です。

まとめ

1100 シリーズ精製システムと 1100 シリーズ 12 ポジション/13 ポートバルブを使用することにより、以下のことが可能になります。

- フラクションコレクションの廃液ラインに接続してのリカバリーコレクション
- フラクションコレクタの代わりに、シンプルな精製システムでのタイムベースフラクションコレクション

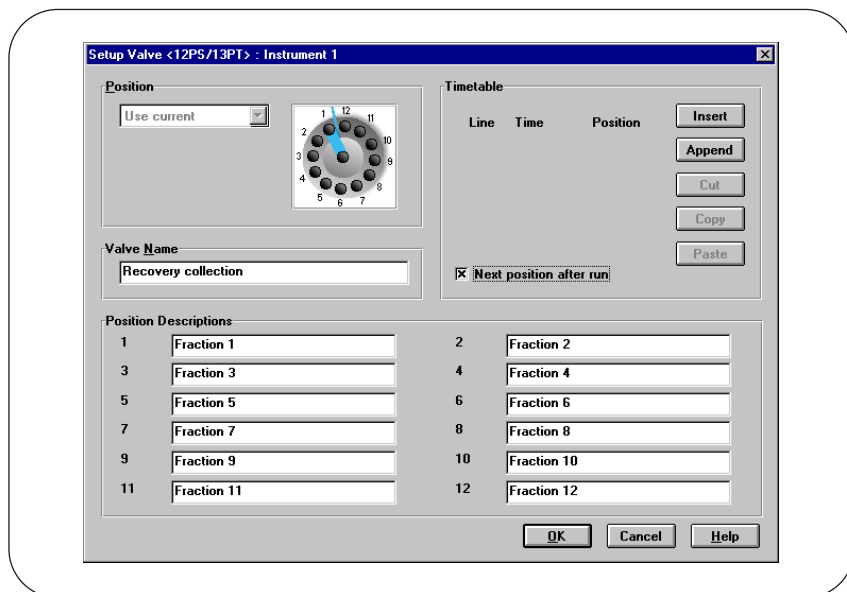


図 2
バルブセットアップウィンドウ

ポストタイムあり

グラジエント: 10 % B (0min)
90 % B (9min)
90 % B (10min)
ストップタイム: 10 分
ポストタイム: 3 分

表 1a

平衡のためのポストタイムを用いたグラジエント分析

ポストタイムなし

グラジエント: 10 % B (0min)
90 % B (9min)
90 % B (10min)
10 % B (10.1min)
10 % B (13min)
ストップタイム: 13 分
ポストタイム: オフ

表 1b

分析時間に平衡時間を含める場合

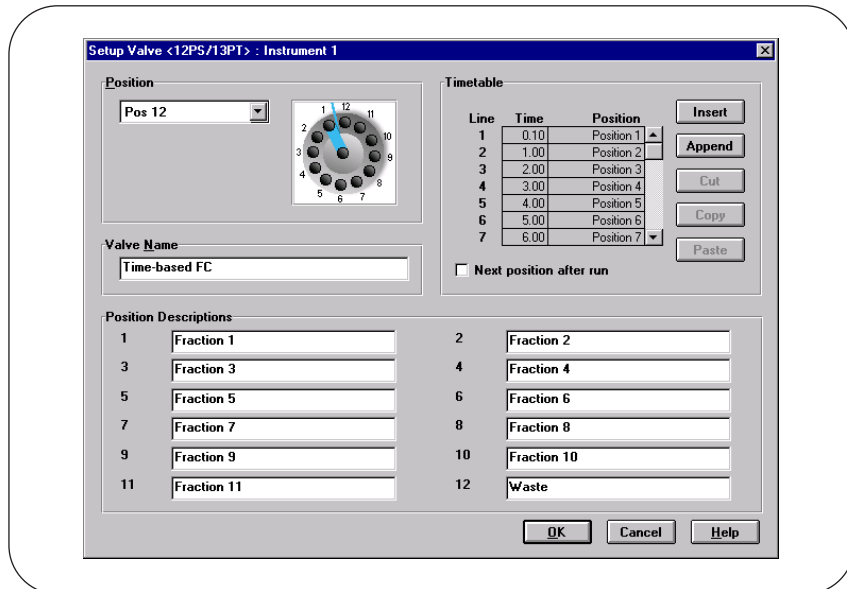


図 3

12 ポジション/13 ポートバルブを用いたタイムベースフラクションコレクション

『リカバリーコレクションとタイムベースフラクションコレクション - Agilent 1100 シリーズバルブソリューションを用いた分取 HPLC』、資料番号 5988-8225EN

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、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。

著作権法で許可されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

Copyright © 2007 Agilent Technologies

Printed in Japan
November 1, 2007
5989-5948JAJP



Agilent Technologies