

分取 LC 精製の戦略

著者

Ron Guilliet, Sami Chanaa,
and Lakshmi Subbarao
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE

はじめに

分取 LC は、混合物から 1 つ以上のターゲット化合物を単離または精製する優れた手法です。創薬ラボや医薬品開発ラボにおいては、反応物のクリーンアップ、天然物の精製、不純物の単離など、精製の主要な手段として用いられるようになりました。多くの場合、分取 LC ではまず分離を行い、サンプル内のターゲット化合物の存在を確認します。適切な分離ができると、純度、回収率、スループットについてメソッドを最適化してから、分取スケールにスケールアップします。

このホワイトペーパーでは、分析スケールから分取スケールにスケールアップする際の重要な手順の概要について説明します。本書の基本的なクロマトグラフィー原理と数学的原理を適用することで、予測可能な形でシームレスに分取精製へと移行できます。

適切な分離モードと固定相の選択

研究者はまず、適切なクロマトグラフィーモード、つまり分離モードを選択することになります。選ぶべきモードは、分析対象物の化学的性質や物理的性質によって異なります。表1に、一般的に使用されるクロマトグラフィーモードを示します。

分離の最適化: 移動相

移動相は次の点を考慮して選択します。

- 分離に最適な選択性
- 溶媒純度 (低濃度の非揮発性混入物でベースラインノイズが増大する可能性)
- 検出器の種類 (UV透過、MS互換性)
- 揮発性 (単離したフラクションからの除去が容易)
- 粘度 (粘度が高いと背圧が上昇)
- 化合物に対する溶解能 (移動相中のサンプルの溶解)
- コスト

表1. 一般的なクロマトグラフィーモード

逆相	順相	イオン交換	サイズ排除	キラリティ
ほとんどの有機物質	油、脂肪、脂質などの脂溶性物質	酸、塩基、ペプチド、タンパク質、核酸などのイオン	タンパク質、核酸を含むポリマー	エナンチオマー
メタノールまたはアセトニトリル、添加剤と水溶液の混合物	有機溶媒	水溶性緩衝液、イオン溶液	水溶性緩衝液、有機溶媒	水溶性溶媒または有機溶媒

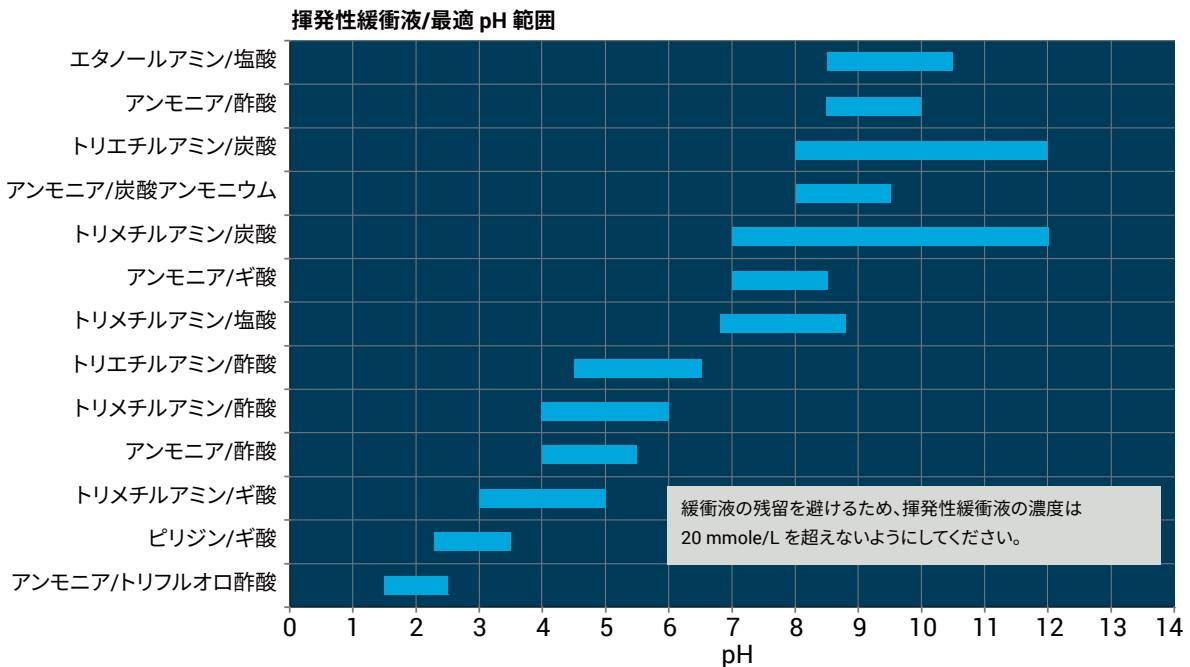


図1. HPLCに一般的に用いられる揮発性緩衝液

スループットの最適化: サンプル注入量と オーバーロードのタイプ

分取 LC では一般的に、スループットを向上させるためにカラムをオーバーロードします。オーバーロードにより、ピーク形状がガウス分布から三角形に近い形へと変わります。しかし、むやみにオーバーロードすると、不純物との共溶出が発生する場合や、分析対象物が溶液から沈殿する場合があります。適切なサンプル量を求めるには、ロード量の検証を実施します。分析カラムでロード量を検証することで、貴重なサンプルを節約でき、溶媒消費量や廃液量を最小限に抑えられます。

カラムのオーバーロードには、次の 2 つの方法があります。

- **濃度(質量)のオーバーロード:** 注入できる最大濃度を求めるために、低濃度から高濃度まで数段階の濃度のサンプル溶液をカラムに注入します。このとき注入量は一定にします。ピークの割れ(サンプル沈殿の兆候)や共溶出が発生しない最も高い濃度を使用してください。
- **注入量のオーバーロード:** サンプルの可溶性が低い場合は、注入量のオーバーロードを推奨します。同じサンプルを数段階の容量で注入します。共溶出が起きない最も多い量を使用してください。

この 2 つの方法を組み合わせることも可能です。実用性の観点から言うと、一般的には濃度のオーバーロードの方が、注入量のオーバーロードより適しています。これは、採取したフラクションから蒸発や凍結乾燥によって除去される溶媒量が少ないためです。

こうした分析スケールでの試験の結果から、分取スケールで可能なロード量を求めることができます。

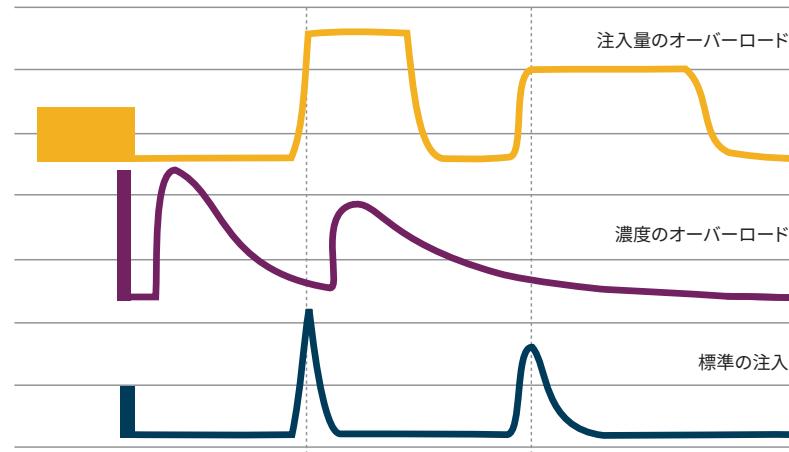


図 2. 注入量と濃度のオーバーロードによるピーク形状

メソッドのスケールアップ

分取 LC の結果を判定する 3 つの重要なパラメータは、純度、回収率およびスループットです。この 3 つのパラメータは相互依存しているため、分取メソッドを 3 つのパラメータすべてについて同時に最適化することはできません。最適化すべき最も重要なパラメータは、アプリケーションによって異なります。

図 3 に示すクロマトグラム 1 の分取 HPLC は、非常に高いスループットとなっていますが、2 つの化合物の分離が不十分です。各化合物について高純度のフラクションがある程度得られる可能性はありますが、回収率はかなり低くなります。クロマトグラム 2 では、ピークの分離が良好であるため、両方の化合物を高純度および高回収率で得られる可能性があります。しかし、スループットは非常に低くなっています。クロマトグラム 3 は、3 つのパラメータすべてのバランスが取れた最適な分取 HPLC と言えます。

分析スケールから分取スケールへの迅速かつ簡単な直線的スケールアップを実現するためには、分析カラムと分取カラムの両方に同じ固定相と粒子サイズを充填して使用する必要があります。これは次の 3 つの手順によって可能になります。

- 分析条件の改善:** pH、移動相、固定相などの適切な分析スカウティング条件を特定し、分解能を最適化します。
- サンプルローディングの最大化:** 分解能が限界に達するまで注入量を増やすことで、分析カラムへのサンプルローディングを決定します。

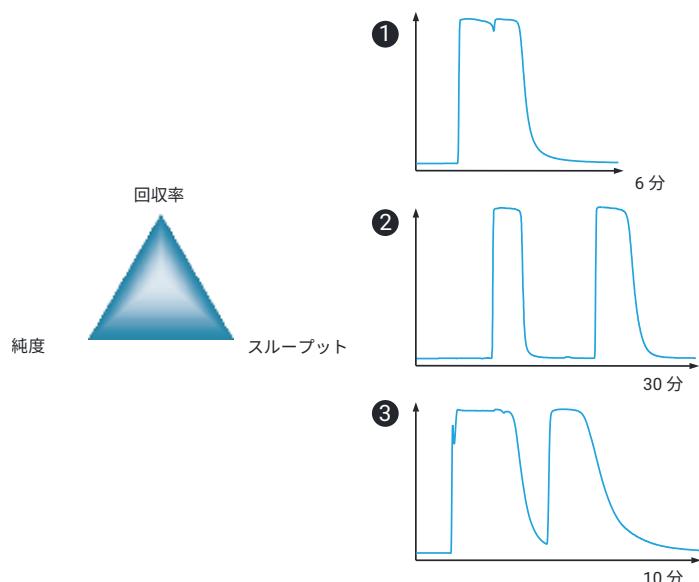


図 3. 分取 LC の目標

3. 計算と直線的スケールアップ式の適用:

内径が小さいカラム（分析）から内径が大きいカラム（分取）に移行するときにスケールアップしなければならないパラメータは、流量と注入量の 2 つです。粒子サイズ、固定相、移動相など、他のすべてのパラメータは一定にする必要があります。

流量と注入量の直線的スケールアップ係数を方程式 1 および 2 を用いて求めます。

こうしたスケールアップ係数を正しく適用して注入すると、予測可能な形でシームレスに分取スケール精製へ移行できます。

$$f_{p,p} = f_{a,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

ここで:

$f_{a,A}$ = 分析カラムの流量

d_p = 分取カラムの内径

d_A = 分析カラムの内径

$$V_{inj,p} = V_{inj,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

ここで:

$V_{inj,A}$ = 分析カラムの注入量

d_p = 分取カラムの内径

d_A = 分析カラムの内径

方程式 1. 流量の分取スケールへのスケールアップ

方程式 2. 注入量の分取スケールへのスケールアップ

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. 2018

Printed in Japan, May 1, 2018

5991-9229JAJP