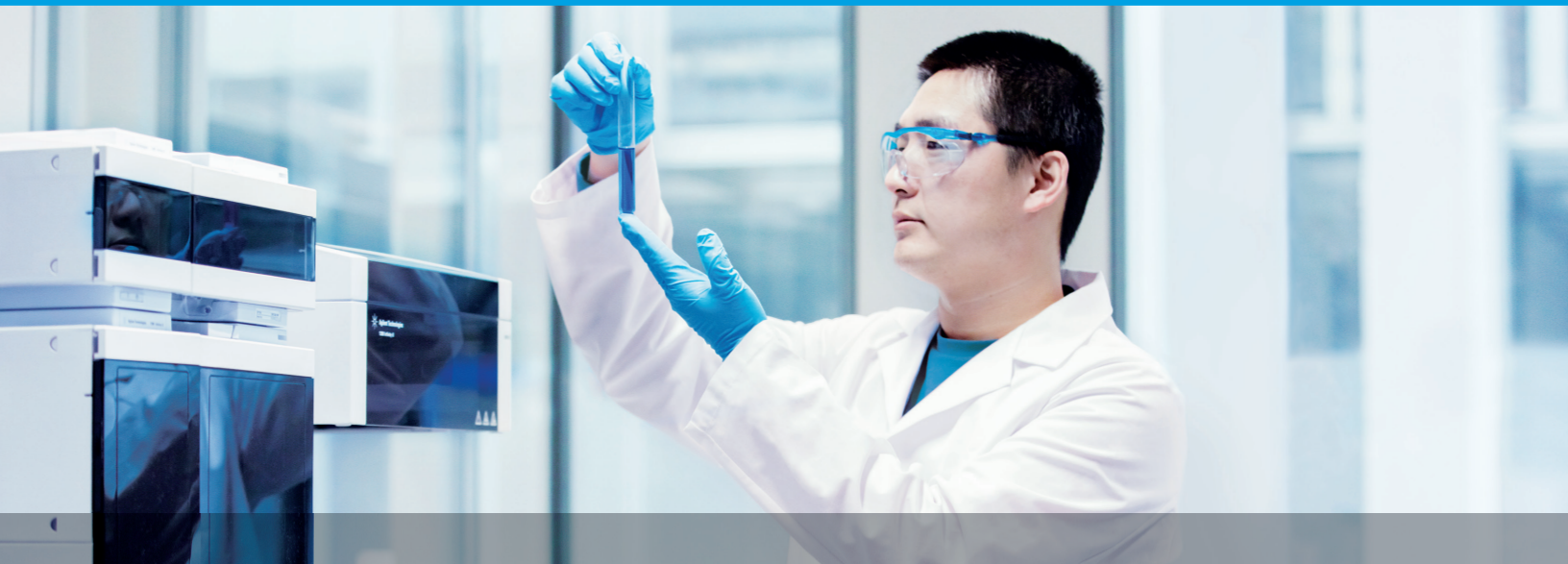


分取 LC の原理と実践

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	フラクショニングコレクション	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低い場合、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、栄養補助食品に用い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の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



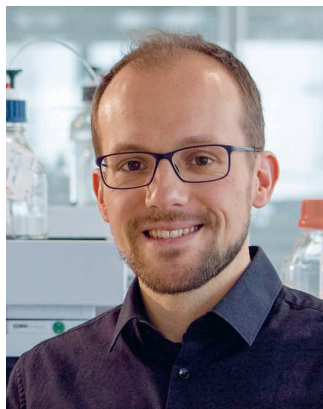
Dr. Helmut Schulenberg-Schell

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チル脂肪酸と細菌由来のホパノイドの単離、そしてウン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、バイオリジスト、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 とマススペ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 は流量とは関係がありません。nL/min または $\mu\text{L}/\text{min}$ 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するには、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 の分離で使用するクロマトグラフィー条件に近い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アオーバーのオートサンブ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。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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

