

大量分取クロマトグラフィの開発

西 本 一 雄
中 原 康 博
浅 田 陸 夫

Large Scale Preparative Liquid Chromatography

Kazuo NISHIMOTO
Yasuhiro NAKAHARA
Rikuo ASADA

The outline of a large scale preparative liquid chromatograph, the Toyo Soda HLC-847 series, equipped with stainless-steel columns of more than 55 mm I. D. is described and the separation of steroid hormones on the large scale preparative column filled with TSK-GEL LS-410A ODS SIL is studied.

The characteristics of the large scale preparative column is compared with an analytical column and the effects of eluent composition and sample loading are investigated.

Based on the results obtained, it is suggested that the performance of the large scale preparative column is much the same as an analytical column.

1. はじめに

最近の著しい液体クロマトグラフィの進歩に伴い物質を分離精製する分取クロマトグラフィへの応用も盛んとなってきている。分取クロマトグラフィは構造解析や物性測定などを目的として高度に精製された少量の物質を分取する場合と工業的生産を目的とした場合の二つに大別できる。特に、後者は液体クロマトグラフィによる分離技術を製造プロセスに応用するものでありその開発が急がれている。

一般的に、工業的生産を目的としたカラムサイズは用途によって異なるが内径 50 mm 以上のものが多い¹⁾。分取カラムは充てん剤、カラム構造、充てん法などによりその性能が左右され、筆者らはすでに内径 55 mm および 108 mm のカラム構造および各種充てん剤による充てん法の開発を終了している。本報では内径 55 mm カラムを用いて高性能分取用充てん剤、TSK-GEL LS-410A ODS SIL、におけるステロイドホルモンの分取について検討したので分取装置の概要と合わせてその実験結果を報告する。

2. 特型分取装置 (HLC-847) の概要

HLC-847 はすでに発売中の全自動分取装置 HLC-827

(東洋曹達製)がカラム内径 21.5 mm 以下の分取専用機であるのに対してカラム内径 55 mm 以上の分取カラムを塔載する大型機種である。その構成は送液部、試料注入部、分離部、検出部および分取部から成り立っている。**Fig. 1** は特型分取装置 HLC-847 (東洋曹達製)の外観写真の一例であり、**Fig. 2** にそのフローダイアグラムを示す。

〔1〕送液部

送液部の主要部分にはステップワイズバルブ、エア-検出器、送液ポンプ、アキュムレータおよび圧力検出器などから構成される。

(1) ステップワイズバルブ

分取カラムへの洗浄液の供給あるいはステップワイズ操作法による溶離液条件の変更ができる溶媒切り換えバルブであり、ステップ数は2点または4点を備えている。

(2) エア-検出器

分取カラムに空気が混入するとその分離性能および寿命に好ましくない影響を及ぼす。分取装置の運転中に溶媒が不足して空気を吸引した場合は警報を発し、送液ポンプが自動的に停止する。

(3) 送液ポンプ

送液方法には定圧法と定量法があるが試料注入時のカラム内圧変化の影響を受けずに定量性が得られるプラン

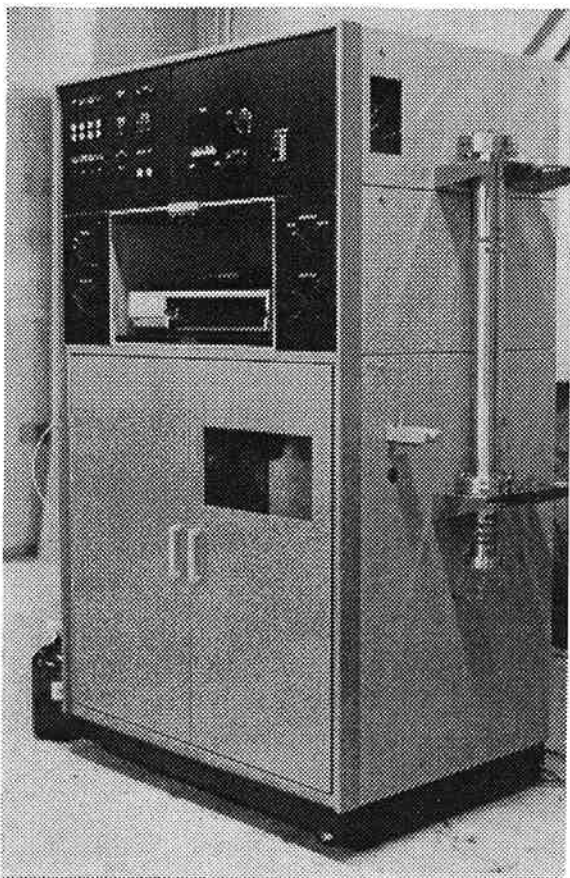


Fig. 1 General view of large scale preparative liquid chromatograph HLC-847

ジャ往復型定量ポンプを使用している。送液流量は分取カラムサイズ、充てん剤の種類、溶離液ならびに洗浄液

条件などによって異なるため定量ポンプの仕様はそれらの最適値を考慮して決定している。

(4) アクキュムレータ

使用するポンプがプランジャ往復運動であるため必然的に脈動を生じる。この脈動を吸収し平滑な送液を得るためにアクキュムレータを使用している。構造はペロー内臓型であり、液圧に応じてペロー内に設置したスプリング強度を調整する。

(5) 圧力検出器

ひずみゲージを用いたデジタル表示の電気式圧力計を採用している。フィルタの詰りなどによりあらかじめ設定したリリース圧以上の異常圧力になると警報を発生し送液ポンプが停止する。

[2] 試料注入部

試料注入部はインジェクションバルブ、サンプルループなどから成り、オプションとしてサンプルポンプ、サンプルエア検出器がある。サンプルループ容量は通常8~30 ml であり、インジェクションバルブを切り換えることにより試料がカラム内に送液される。インジェクションバルブは電動六方バルブを採用している。

大量の試料を注入する場合はインジェクションバルブの配管を変更することによりサンプルポンプによるオンカラム注入法もできる。試料注入量はサンプルポンプの吐出量と時間の積で表わされ、タイム設定により試料注入が自動化されている。

[3] 分離部

分離部は分取目的に合致した各種高性能分取用充てん

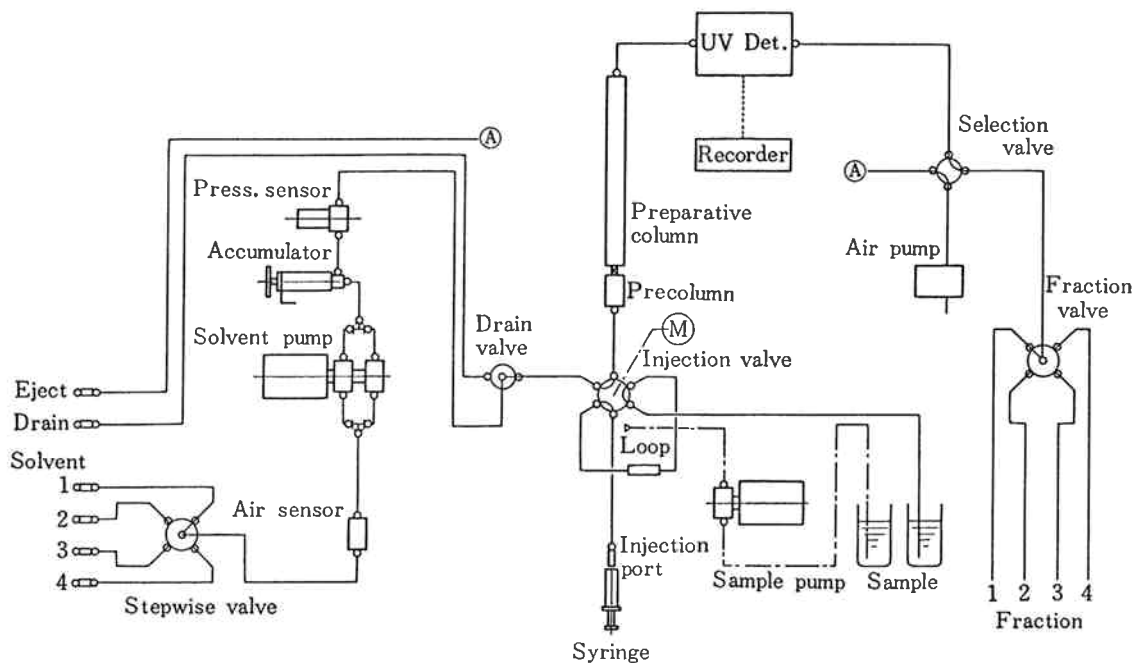


Fig. 2 Schematic flow diagram of HLC-847

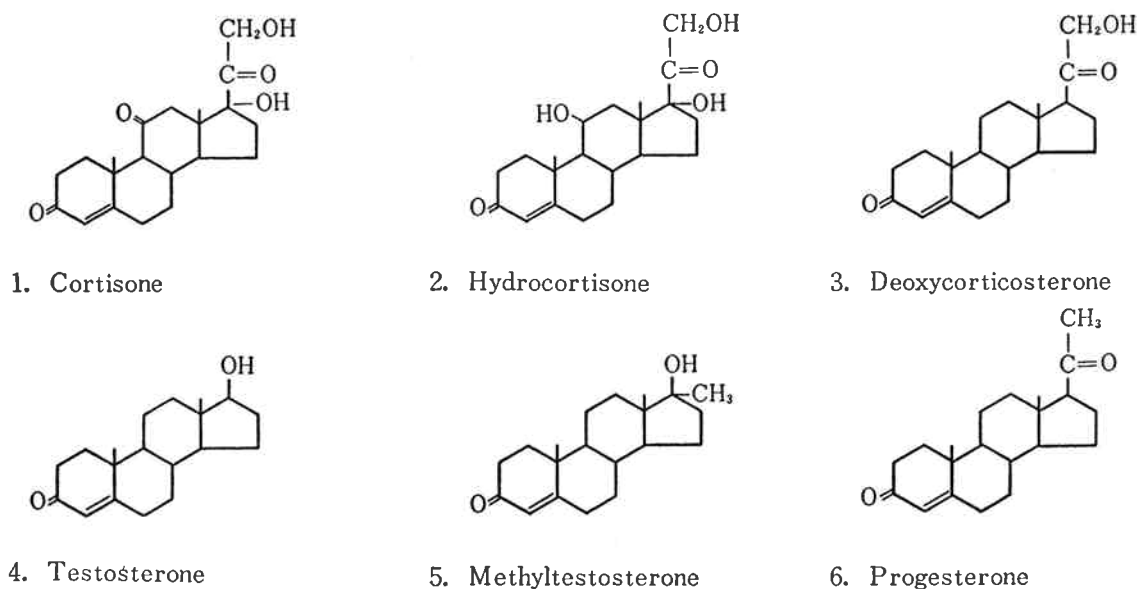


Fig. 3 Structural formula of steroid hormones

剤を詰めたプレカラムおよび分取カラムから成り、分取装置全体の心臓部にあたる。その分離性能は分析カラムに匹敵する高理論段数を有し、精密分取に最適である。標準カラムサイズは内径 55 mm, 長さ 600 mm と内径 108 mm, 長さ 800 mm の 2 種類がある。

〔4〕 検出部

Fig. 2 において、分取カラムを出た溶出液は紫外分光器 (UV モニタ) を通り溶質の濃度を紫外吸収の変化として記録計に表示する。UV モニタは 190~350 nm の多波長検出器を用い、特に、分取用は溶質濃度が濃いいため分析用検出器と比してその感度が 1/10 である光路長 1 mm のセルを用いている。

〔5〕 分取部

分取はセレクションバルブとフラクションバルブの組み合わせで行われ、分取数は 2 点から、6 点までそろえている。

3. 実 験

〔1〕 装置

実験に用いた装置の構成は Fig. 2 に示す HLC-847 の構成を簡易型としたものである。送液ポンプはデュアルプランジャ型パルスレスポンプ CML (日機装製) を使用し、その最大流量は 120 ml/min, 最大吐出圧力は 40 kg/cm² G である。検出器は光路長 1 mm の分取用セルを備えた UV-8 model II (東洋曹達製) を使用した。試料注入方式はサンプルループ方式を採用し、また、分取カラムはステンレス製 (内径 55 mm, 長さ 600 mm) であり、充填剤は TSK-GEL LS-410A ODS SiL を用いた。なお、実験温度は 14~31°C における室温で行

った。

〔2〕 試料

溶媒は工業用メチルアルコールとイオン交換水を用い、ステロイドホルモンは市販のコルチゾン (糖質副腎皮質ホルモン)、ヒドロコルチゾン (糖質副腎皮質ホルモン)、デオキシコルチコステロン (鉱質副腎皮質ホルモン)、テストステロン (男性ホルモン)、メチルテストステロン (男性ホルモン) およびプロゲステロン (黄体ホルモン) を用いた。これらの構造式を Fig. 3 に示す。

4. 結果と考察

〔1〕 分取カラムの分離性能

各種充てん剤の選定ならびに分離条件の探索を分取カラムで行うには大量の充てん剤、試料、溶媒および労力を費すため一般的には分離の初期条件を分析カラムで決定し、そのうち分取カラムへスケールアップする手法がとられている。従って、分取カラムの分離性能は分析カラムのものと同じパターンを示すことが望ましい。通常、分取カラムの充てん剤粒子径はローディングキャパシティを増大させるため分析カラムのものより大きいものが使われている。そのため、粒子径が大きくなるにつれ分取カラムの理論段数は低下する。一方、カラム径が大きくなると壁効果の影響が少なくなり分離に良い方向を与えるが²⁾、粒子径による依存性の方が大きく低負荷量領域 (分析レベル) で比較すると分取カラムの性能は分析カラムのものより若干劣る。なお、分析カラムでは分取レベルである高負荷量領域においてオーバロード現象を起すことが認められている。

TSK-GEL LS-410A ODS SiL の分析カラム (4 ×

Table 1 Loading studies on TSK-GEL LS-410A ODS SIL

Column size (mmID×mmL)	Analytical 4×300	Preparative 55×600		
Flow rate (ml/min)	0.6	47	47	47
Linear velocity (cm/min)	4.8	2.0	2.0	2.0
Sample load (mg each)	0.25	47	190	470
Measuring temp. (°C)	25	31	16	14
Resolution 1/2	1.2(1.6)*	1.7	1.4	0.8
3/4	2.0(2.8)*	3.0	1.9	1.4
5/6	3.7(5.3)*	4.7	2.9	2.2
Reference	Fig. 4a	Fig. 4b	Fig. 5a	Fig. 5b

Eluent ; MeOH/H₂O : 80/20

Detector ; UV 320 nm

Sample ; 1. Cortisone 2. Hydrocortisone 3. Deoxycorticosterone 4. Testosterone
5. Methyltestosterone 6. Progesterone

* estimated value equivalent to 600 mm length

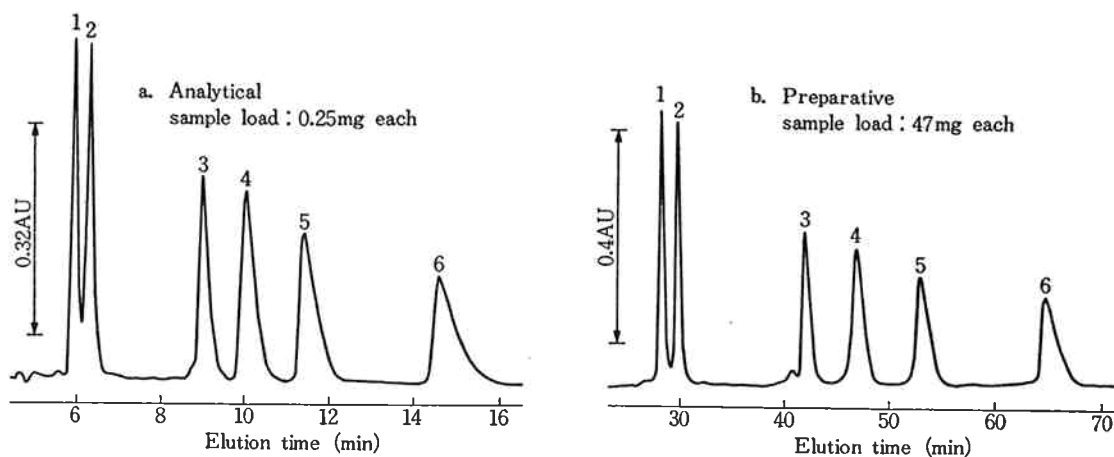


Fig. 4 Comparison of preparative column with analytical column

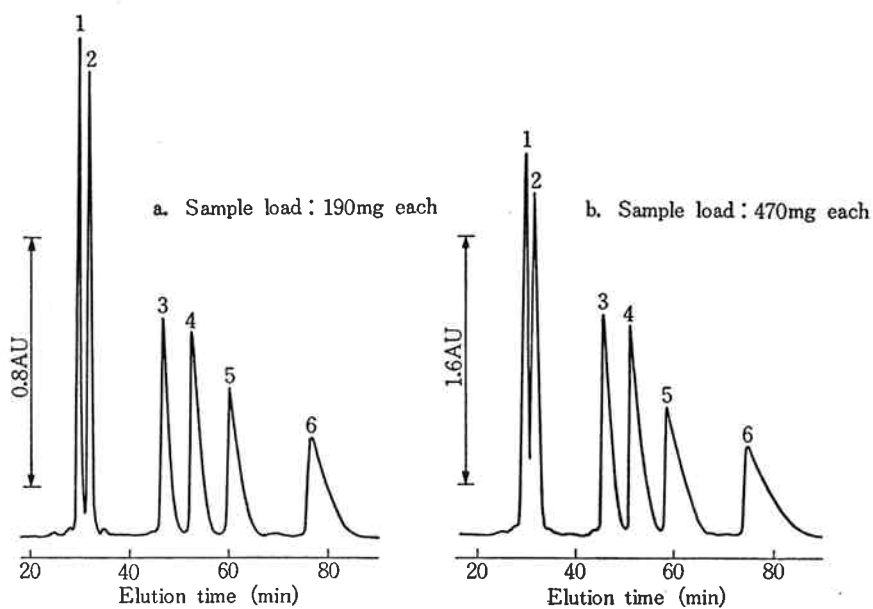


Fig. 5 Effect of sample load on preparative column

300mm) と分取カラム (55×600mm) におけるステロイドホルモンの低負荷量領域における分離性能を比較した結果を Table 1, Fig. 4 に示す。

分離性能を評価する因子として式(1)で表わされる分離度を採用した。

$$R_s = \frac{1.18(V_j - V_i)}{W_{1/2,i} + W_{1/2,j}} \quad (1)$$

ここで、

R_s は $i \sim j$ 成分間の分離度

V は保持容量

$W_{1/2}$ はピークの半値巾

i, j は成分名

試料負荷量をカラム断面積比例(約200倍)とし、カラム長さを2倍、線速を約半分とした Fig. 4 の条件では明らかに分取カラムの方が性能が良い。ここで、カラム長さを補正するために式(2)を用いる。

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k' - 1}{k' + 1} \right) \quad (2)$$

ここで、

H は理論段等価高さ

L はカラム長さ

α は分離係数

k' は保持比

分離度はカラム長さの平方根に比例するため、Fig. 4a から得られた分析カラムの分離度を分取カラムと同じ600 mm 長さに換算した値を Table 1 に合わせて示した。その結果、低負荷量領域において線速を約半分とした場合の分取カラムは分析カラムとほぼ同等の分離性能をもっていることが判明できる。

[2] 溶媒組成の影響

分離性能を左右する因子の一つに溶媒の種類、組成がある。溶媒としてメチルアルコールを用いた場合その水分組成の違いによる影響を Fig. 6 に示した。

TSK-GEL LS-410A ODS SiL はほとんど逆相クロマトグラフィとして使われ、水の含有率が高くなるにつれて溶媒の極性が増加し、ステロイドホルモンの保持容量が大きくなり分離性能が向上してくる。コルチゾンとヒドロコルチゾンあるいはテストステロンとメチルテストステロンはメチルアルコールのみでは Fig. 5a のクロマトグラムに示すようにほとんど分離しないか、あるいは、わずかに分離する程度である。この溶媒に水を添加し水 20 vol% にすると Fig. 5c のクロマトグラムに示すようにそれぞれが分離してくる。このように溶媒組成は分離条件を決定するうえで重要な因子となる。

[3] 試料負荷量の影響

分取を目的とした液体クロマトグラフィでは物質を分

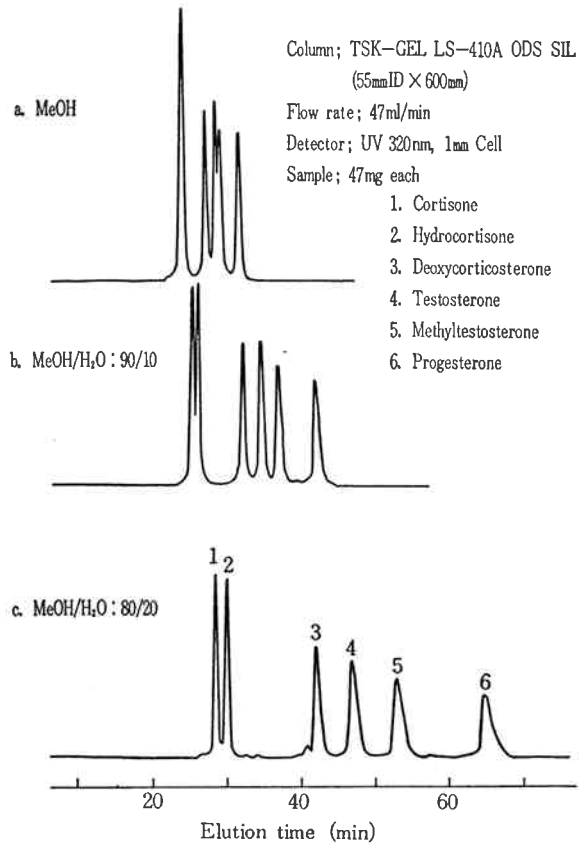


Fig. 6 Effect of eluent composition

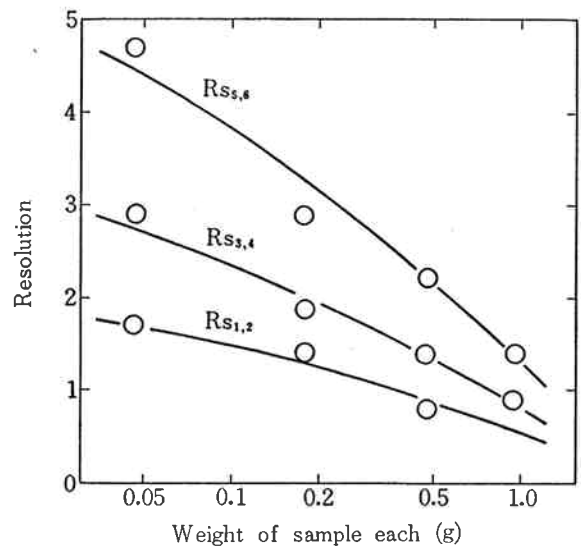


Fig. 7 Dependence of resolution versus sample loading

Column ; TSK-GEL LS-410A ODS SiL (55 mm ID × 600 mm)

Eluent ; MeoH/H₂O : 80/20

Flow rate ; 47 ml/min

Detector ; UV 320 nm, 1 mm Cell

Sample ; 1. Cortisone 2. Hydrocortisone

3. Deoxycorticosterone

4. Testosterone 5. Methyltestosterone

6. Progesterone

離精製することは当然であり、さらに、その処理能力が重要なポイントとなってくる。Table 1, Fig. 5, 7 に負荷量の影響を示した。

この結果から、ステロイドホルモンの場合—成分当りの最大試料負荷量は 0.5~1 g であり、分析カラム断面積比例よりも10~20倍多く処理できることがわかる。

5. おわりに

工業的生産を目的とした分取クロマトグラフィの開発過程において大量分取カラムの製造技術を確立しその評価を行った。

分取条件の設定は脱溶媒工程に起因する溶媒条件の制約、試料負荷量の重視など分析を目的とした場合と大きく異なる。しかしながら、本研究の結果、分取のソフト

開発は分析カラムを用いて容易に決定できることが判明した。また、工業化に際して考慮しなければならない分取カラムの再現性および耐久性などについても合わせて開発を行った。現在の市場ニーズは内径 55 mm 分取カラムが主流であるが、すでに内径 108 mm の大量分取カラムの納入実績も数件あり、今後、医薬、生化学分野などにおける展開が注目されている。

文 献

- 1) C. E. H. Knapman (Editor): *Developments in Chromatography-2*, Applied Science Publishers, London, 1980.
- 2) 原 昭二, 辻 章夫(編); “最新液体クロマトグラフィ—基礎と応用”, 南山堂, 1978.