

サブ 2 μm UHPLC 分離を用いた分取; 課題とソリューション

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

堀江 真之介¹, 藤 昌世¹, Andrew Aubin², Jo-Ann Jablonski², Wendy Harrop²

¹日本ウォーターズ株式会社; ²Waters Corporation

INTRODUCTION

液体クロマトグラフィーは低拡散システムと粒子径2μm以下のカラムテクノロジーにより分離性能が向上し、幅が狭くシャープで数多くのピークを分離できる恩恵を受けた。しかし、シャープなピークを捕集、特に複雑な混合物から分取する場合において従来の分取HPLC システムでは適切なソリューションを提供することが困難である。大きなシステム容量、あるいは分取容器間の分取ニードル移動速度が遅いことにより、キャリーオーバーが起きてしまうことは決して珍しくない。

CHALLENGES

ピーカ拡散 粒子径2μm以下のパーティクルを用いるクロマトグラフィーではピーク幅が2~5 秒のシャープなピークのベースライン分離は珍しくない。しかし、一般的なフラクションコレクターは配管、流路切替バルブ、分取ニードルなどの容量が大きく、ピークが拡散してしまうため、適切に分取することが困難である。(図1)

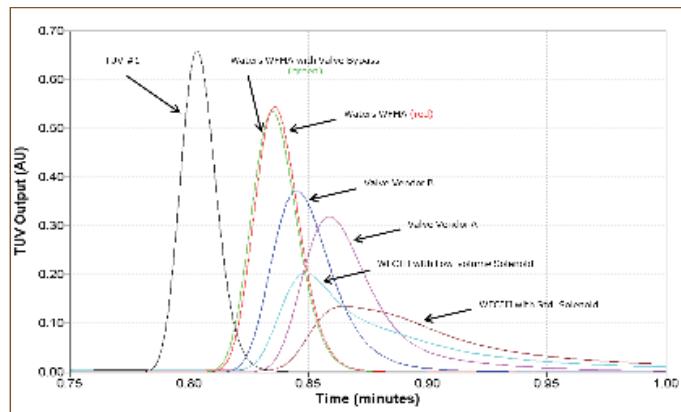


図 1. フラクションコレクターの各種バルブが引き起こすピーク拡散の比較

分取間のキャリーオーバー ピーク分取時に流路切替バルブや分取ニードルなどシステム内で化合物がトラップされてしまう可能性があり、そのためコンタミネーションを引き起こしてしまう恐れがある。これはピークがブロードになることでより顕著になる。

温度調節 多くのフラクションコレクターはオープンベッドデザインであるため、分取したフラクションは光やほこり、温度の影響を防ぐことはできないが、保護する機能があれば化合物の編成を抑えることができる。

液滴の形成 シャープなピークに対する実際の液量は非常に少ない。(流量 0.5 mL/min ≈ 8.3 μL/sec でピーク幅4 秒間の場合、液量はおよそ33 μL)。分取ニードルの先端が大きすぎる場合はピークが誤ったバイアルに分取されたり、ニードルが移動する際に飛散してしまう恐れもある。

コントロール フラクションコレクターは単独でコントロールされるものが多いが、一体化されたシステムの一部として組み込まれていることが望まれる。

METHODS

クオータナリーソルベントマネージャ、サンプルマネージャ-FTN、ACQUITY PDA 検出器とウォーターズフラクションマネージャアナリティカル (WFM-A) で構成されたACQUITY UPLC H-Class システムを使用し、以下の事例を得た。(図2.及び図3) ACQUITY UPLC BEH C₁₈ カラム (130 Å 1.7 μm、2.1 mm × 100 mm) を用いて、流量0.5 mL/min、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液を2%から30%の6 分間のグラジエント条件で緑茶の抽出液を分離し、275 nm にて検出した。(図4) 分取は時間とピークに基づき5 回繰り返して行い、その後、得られた分取溶液の再分析を実施した。(図5)



図 2. WFM-A (右下のモジュール) 付き ACQUITY UPLC H-Class システム



図 3. WFM-A のサンプルコンパートメント、洗浄シリンジ、流路切替バルブ

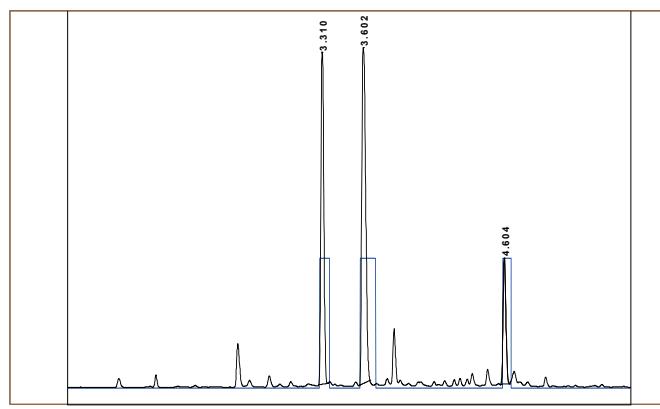


図 4. 緑茶抽出液のクロマトグラムと分取マーク (青線)

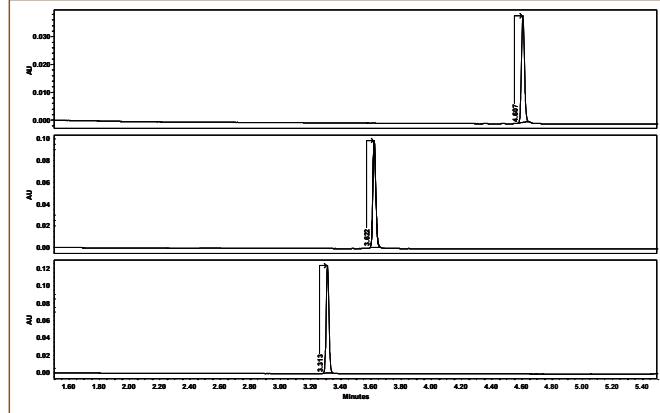


図 5. 緑茶抽出液各フラクション再分析時のクロマトグラム

SOLUTIONS

拡散への対応はシャープなピークを正確に分取するための鍵である。拡散の要因となる第一の要素は流路切替バルブである。分取時は容器側に、それ以外の時は廃液側に流路を切り替えることがバルブの目的であるが、拡散を抑えるためにはこのバルブを取り除くことが出来れば理想的である。バルブそのものを取り除けば、流路切替の間に近接し合うピークを分取し損なってしまうことがなくなる。しかし、その一方で望まない余分なフラクションを分取せざるを得なくなり容易ではない。そこでピーク拡散を最小限に抑えることを目的に最低限の内部容量に抑えるための流路と高速切替機能を持つ4方バルブを設計し、これをWFM-A に搭載した。(図6)

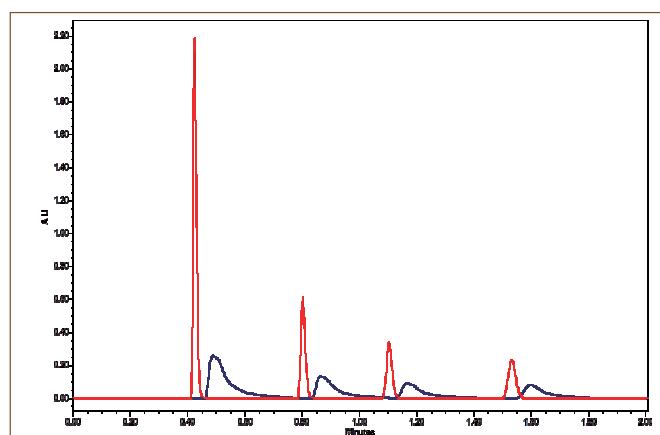


図 6. 従来のフラクションコレクター (青) と WFM-A (赤) のピーク拡散の比較。それぞれのバルブ通過直後の位置に ACQUITY TUV 検出器を配置し、クロマトグラムを得る。

この4 方バルブは洗浄シリンジの追加も可能にした。(図7) 流路切替によりニードルの中にトラップされてしまう溶液を追加されたシリンジによって押し出すことが出来るようになるため、押し出された溶液を容器に分取すればサンプル回収量の向上が、廃棄すれば純度の向上が期待でき、いずれの場合も分取間のキャリーオーバーを低減させる。

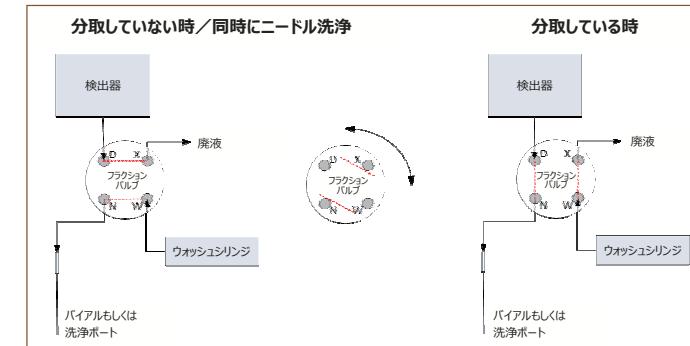


図 7. ウォーターズフラクションマネージャ-アナリティカル (WFM-A) 4 方バルブの流路

液滴の大きさや形を調整するため、ニードルの先端の形状はテーパーがつけられている。小さい液滴が生成されるようニードル内部及び外部の表面を研磨し、滑らかにした。(図8) 生成された小さな液滴の分取を補助するため、WFM-A のニードルの先端を低い位置、バイアルの中に入れて分取することもできる。ニードルはバイオイナートな金属製のため生体分子の分取にも適合する。

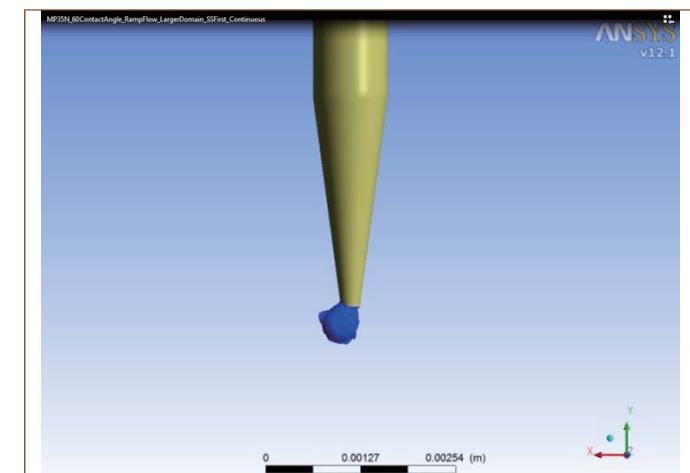


図 8. ウォーターズフラクションマネージャ-アナリティカルの分取時の先端

多くの場合、分取したフラクションは他のサンプルの分離、分取を行っている間など長時間フラクションコレクターの中に放置されがちである。分取した化合物が編成しないようWFM-A はサンプルコンパートメントの扉を開めることで光を遮断し、4°Cまで冷却する機能を持たせることで、光や温度の影響、あるいはほこりなどの混入を防ぐ構造になっている。

WFM-A は Empower3 クロマトグラフィーデータソフトウェア (CDS) に完全互換し、メソッドエディターの中に一つの装置として認識されている。

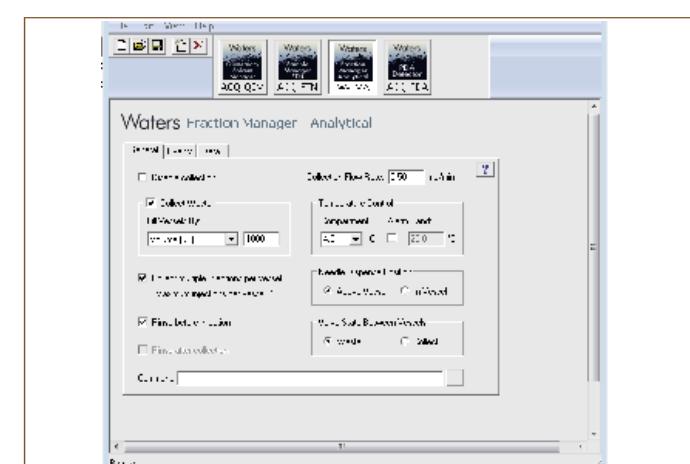


図 9. Empower3 CDS 内の WFM-A メソッドエディター

CONCLUSION

ウォーターズフラクションマネージャ-アナリティカルは現代の粒子径 2μm 以下のパーティクルを用いるクロマトグラフィーにより得られるシャープなピークを分取する時の限界に打ち勝つべく設計された。拡散を最小限に抑え、バルブ切替とニードルの動きを高速にし、キャリーオーバーを低減、分取後の化合物を編成させないよう、その全てを考慮し設計された。

References

Acknowledgments: Many thanks to Waters hardware and software engineering teams for their contributions to this poster especially: Josh Burnett, John Heden, John Lamoureux, Jim Usowicz, and Ed Aig.