

分取の上手な使い方

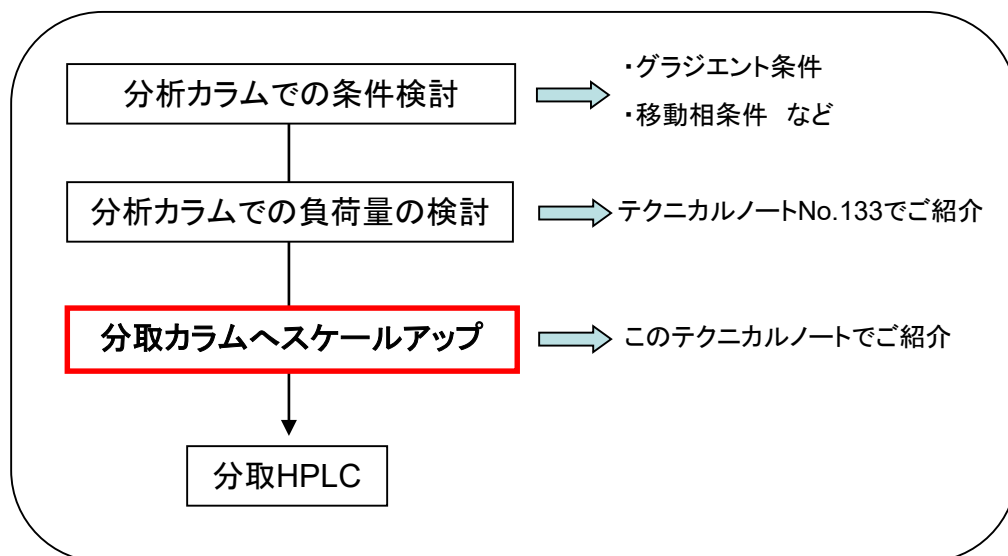
その2 スケールアップについて

最適な分取HPLC条件を探し出すのは容易なことではありません。特に、分取においては、条件検討時に消費する溶媒量は相当なものになり、さらに、貴重なサンプルも大量に無駄にしまう可能性があります。そのため、分取の条件検討はまずは分析カラムで検討することをおすすめします。分取カラムと同じゲルを充填した内径の小さいカラムで条件を検討することで、溶媒やサンプルの消費を最小限に抑えて分取条件を決定することが可能になります。

今回は、テクニカルノートNo.133に引き続き、Inertsil ODS-3 内径4.6 mmの分析カラムを例にとり分取カラムへスケールアップする手順についてご紹介します。

(K. Kanno)

分取メソッドを作成するにあたって、まずは、分析サイズのカラムで条件を検討するのが一般的です。分析カラムを使用して分取メソッドを作成する場合は、次のようなフローで行います。

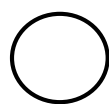
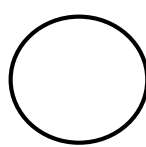
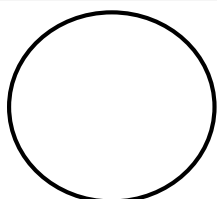


＜スケールアップする上で重要な考え方＞

スケールアップする上で重要なことは分取カラムの断面積が分析カラムの断面積の何倍かということです。重要なポイントは次の2点です。

ポイント1 スケールアップ時の流量は断面積に比例

ポイント2 スケールアップ時の負荷量(注入量)も断面積に比例

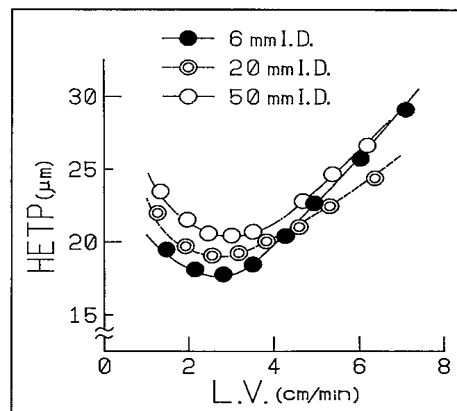
					
カラム内径	4.6 mm	10 mm	14 mm	20 mm	30 mm
カラム断面積	16.6 mm ²	78.5 mm ²	154 mm ²	314 mm ²	707 mm ²
断面積比※1	1	4.7	9.3	18.9	42.5

※1 断面積比は内径4.6 mmのカラムの断面積を基準にした場合

ポイント1 スケールアップ時の流量は断面積に比例

右図は10 μm 粒子径のカラム内径が異なる3本のカラムの線速度とHETPの関係になります。HETPは小さいほど分離のよいピークが得られます。

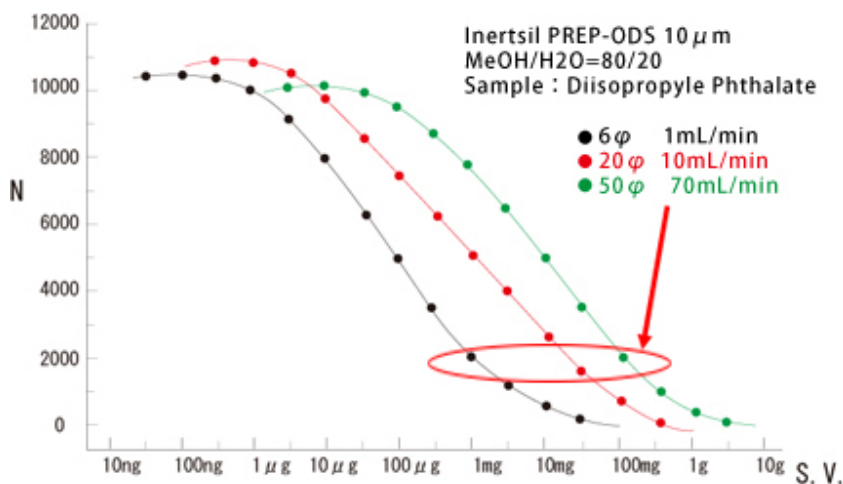
右図から10 μm 粒子径カラムでは、カラム内径によらず最適線速度は3.0 cm/min(0.5 mm/sec)となります。よって、10 μm 粒子径カラムの場合は、カラム内径によらずスケールアップしたときは線速度が3.0 cm/minになるように流量を設定すればよいことになります。言い換えれば、断面積に比例して流量をアップさせればスケールアップすることができます。最適線速度は粒子径や分離モードによって変わります。



ポイント2 スケールアップ時の負荷量(注入量)も断面積に比例

下図は内径が異なる3本のカラムで試料負荷量に対する理論段数の関係を示したものです。ここで、例えば理論段数2000段のところを見てみると、そのときの試料負荷量は次の通りです。したがって、試料負荷量も断面積に応じて増やせば同程度の理論段数になると考えられます。

内径 6 mm 約 1 mg
 内径 20 mm 約 10 mg
 内径 50 mm 約 70 mg



＜スケールアップで変更する項目について＞

内径4.6 mmの分析カラムから内径20 mmの分取カラムへスケールアップする場合、断面積は約18.9倍になります。よって、流量と負荷量（注入量）を18.9倍にすればスケールアップできます。**赤字**で示した部分がスケールアップする際に変わる項目になります。ただし、サンプル濃度は一定とします。

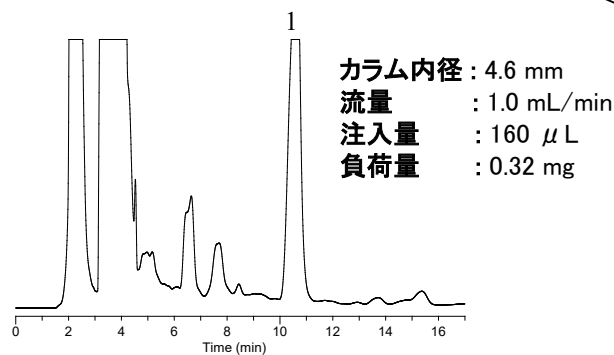
カラム	: Inertsil ODS-3 (10 μ m, 4.6 mmI.D. × 250 mm)	スケールアップ	カラム	: Inertsil ODS-3 (10 μ m, 20 mmI.D. × 250 mm)
移動相	: A) アセトニトリル B) 水 A/B = 40/60, v/v		移動相	: A) アセトニトリル B) 水 A/B = 40/60, v/v
流量	: 500 μL/min		流量	: 9.5 mL/min (9500 μ L/min)
カラム温度	: 40 °C		カラム温度	: 40 °C
検出	: UV 270 nm		検出	: UV 270 nm
注入量	: 500 μL		注入量	: 9.5 mL (9500 μL)

流量&注入量を約18.9倍
それ以外はそのまま

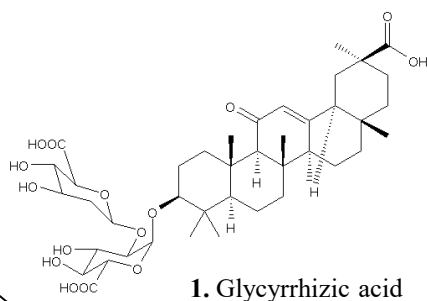
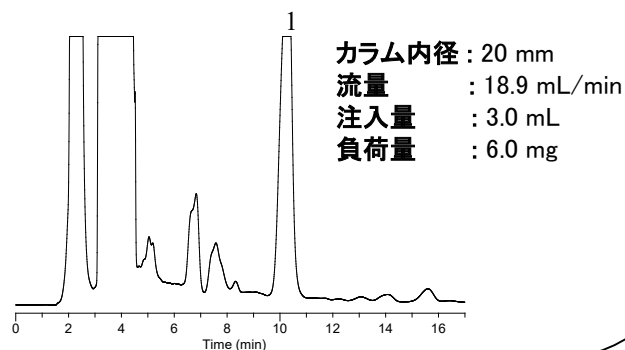
＜スケールアップの例＞

内径4.6 mmカラムから内径20 mmカラムへスケールアップした例です。

条件
カラム : Inertsil ODS-3
 (5 μ m, 長さ 250 mm)
カラム内径 : 各クロマトグラムに記載
溶離液 : A) CH₃CN B) 0.1 % TFA
 A/B = 40/60, v/v
流量 : 各クロマトグラムに記載
カラム温度 : 40 °C
検出 : UV 270 nm
サンプル : 市販甘草抽出液
 (2.0 mg/mL)



負荷量 約18.9倍！



断面積に比例してスケールアップした場合、ほぼ同等（保持時間など）のクロマトグラムが得られます。

その他、サンプルの調製方法やカラムの選択方法など分取HPLCに関するノウハウは弊社Webページに公開しております。

https://www.gls.co.jp/technique/technique_data/lc/usage_of_prep/index.html

分取HPLCの上手な使い方 目次

I 章 分取HPLCについて

1. はじめに >	2. 分取の例 >
3. 分取カラムの種類 >	4. 分取カラム >

<分取HPLCシステム例>



分取HPLC: PrepAce

番号	品名	型式
1	シリンジポンプ(単検体)	SL763
2	送液ポンプ	PU914
3	低圧Grユニット	
4	フラクションコレクター	FC906
5	UV検出器	UV10D
6	コントロールボックス	SC909

