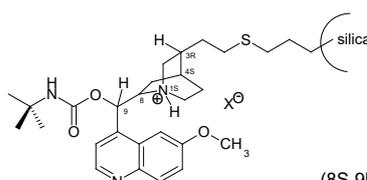
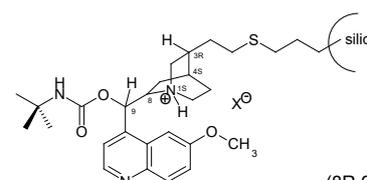




CHIRALPAK® QN-AX/QD-AX カラム 取扱説明書

ご使用の前に必ずお読み下さい

カラムの詳細

名称	CHIRALPAK® QN-AX	CHIRALPAK® QD-AX
不斉識別剤	O-9-(tert-butylcarbamoyl) quinine (シリカゲル化学結合型)  (8S,9R)	O-9-(tert-butylcarbamoyl) quinidine (シリカゲル化学結合型)  (8R,9S)
粒子径	5µm	
カラムエンド	ウォーターズタイプ	
出荷時の封入溶媒	100% メタノール	

(カラムは全て出荷前に品質検査を実施しています。検査条件と検査結果およびカラムロット番号は、同封の品質検査レポートをご参照下さい。)

**この取扱説明書は、本カラムについてのみ有効です。他のカラムへ絶対に適用しないで下さい。
下記のガイドラインに従ってお使いいただければ、本カラムを長期間安定してお使いいただけます。**

カラム使用条件

通液方向	カラムのタグに明示されています。
圧力 ^①	カラムを長くお使い頂くためには 15 MPa ^② 以下での御使用をお勧めします。 最大許容圧力 ^③ 18 MPa (カラムサイズによって流量を調節して下さい。)
温度範囲	0 ~ 40°C

- ① 使用可能な最大流量は移動相の粘度によって異なりますので、カラムの背圧が最大許容圧力(18MPa)以下となる範囲でご使用下さい。
 ② 15MPa 以下でのご使用はカラムを長くお使い頂くための最適な圧力範囲ですが、18 MPa まで安定してお使いいただけます。
 ③ 最大許容圧力とはカラム本体にかかる圧力を指しています。この数値は、カラムを HPLC 装置に接続した場合の系内全体の圧力から、同条件でカラムを接続しない場合の系内全体の圧力を差し引くことによって求められます。
 カラムを長くお使い頂くために、ガードカートリッジのご使用をお勧めします。
 分析サンプルおよび移動相 (特に逆相モードの場合) は、0.5 µm 程度のメンブレンフィルターで濾過してからご使用下さい。

カラムの仕様

CHIRALPAK® QN-AX と CHIRALPAK® QD-AX は、キニーネ(QN)及びキニジン(QD)の誘導体を不斉識別剤とする光学分割用カラムです。キニーネ、キニジンは、ともに不斉中心の近傍にキヌクリジン骨格を持ち、このキヌクリジン骨格が弱陰イオン交換体(AX)として作用することで、酸性キラル化合物を分割することが出来ます。またキニーネとキニジンはキヌクリジン骨格近傍の絶対配置が逆転しており、両者は擬似的なエナンチオマーの関係にあるため、二つのカラムの使い分けによって、ほとんどの場合で光学異性体の溶出順序を逆転させることができます。

CHIRALPAK® QN-AX と CHIRALPAK® QD-AX は、極性有機溶媒モード (有機酸と有機塩基を含む極性有機溶媒を移動相とし、水溶液を使用しないモード) 又は逆相(RP)モードで使用できます。これらのカラムは、酸性キラル化合物(カルボン酸、ホスホン酸、ホスフィン酸、リン酸、又はスルホン酸類)の光学異性体分離に優れています。また、弱酸性化合物 (例えばクマロールのようなフェノール類) の分離も可能です。

これらのカラムには、一般的に HPLC 用として用いられる溶媒 (メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、クロロホルム 等)は全てご使用いただけます。逆相系についても、酢酸塩、ギ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩水溶液を緩衝液として、pH=2~8 の広い範囲でお使いいただけます。また、揮発性の緩衝液(例えば、酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウム)を使用して光学分割を行いますので、キラル酸の LC-MS 分析に容易に移行できます。

これらのカラムは、一部の塩基性または中性キラル化合物の分離にもご使用いただけます。その場合、標準的には順相系移動相または水溶液の割合が高い逆相系移動相を用います。順相条件下ではこれらのカラムはブラシ型キラル固定相によく似た挙動を示します。

カラムの取扱い

カラムを御購入後、最初に使用される際には、カラムにメタノール/酢酸=99/1 (v/v)の移動相をデッドボリュームの 20 倍以上 (4.6 x 150 mm カラムの場合約 30 ml 以上)通液して下さい。その後、分析に用いる移動相をデッドボリュームの 20 倍以上通液してカラムを平衡化させてから、分析を開始して下さい。

カラム洗浄および再生手順

- クエン酸イオンやリン酸イオンのように、キラル識別剤に対して親和性の強い対イオンを移動相として使用した後、またはサンプル由来の多価イオン性物質がカラムに吸着されて溶出しにくい場合に、続けて酢酸イオンのようなキラル識別剤に対して親和性の弱い対イオンを含む移動相に換えて分析を行うと、分離の再現性不良などのトラブルが発生することがあります。このような場合は、親和性が弱い対イオンの移動相に切り替える前に、メタノール/トリエチルアミン(TEA) (100/2 (v/v))を 30ml 以上通液し、カラムを洗浄して下さい。洗浄後は、さらにメタノール/水 (50/50 (v/v))又はアセトニトリル/水(50/50 (v/v))で 30ml 以上通液した後、目的の移動相に置換してご使用頂くか、そのままカラムを保管して下さい。

疎水性が非常に強いサンプルも、カラムに吸着されることがあります。このような場合は、アセトニトリル/酢酸(100 /1 (v/v))でカラムを洗浄して下さい。特に吸着が強い場合は、アセトニトリルの代わりに、THF、ジオキサン、ジメチルスルホキシドを使用することも効果的です。カラムを洗浄した場合は、さらにメタノール/水(50/50 (v/v)) 又はアセトニトリル/水(50/50 (v/v))で 30ml 以上通液した後、目的の移動相に置換して御使用頂くか、そのままカラムを保管して下さい。

カラム保存条件

- 日々の分析終了時、緩衝液を含む移動相を使用した後に有機溶媒のみを流すと塩が析出する恐れがあるため避けて下さい。メタノール/水(50/50 (v/v))あるいは 100% メタノールまたはアセトニトリルでカラムを 5~10 分間洗浄することをお勧めします。
- カラムを長期間保管する場合は、デッドボリュームの 20 倍以上の 100% メタノール又はアセトニトリルで置換してからカラムを保管して下さい。メタノール/水又はアセトニトリル/水(50/50 (v/v))にて保管することも可能です。尚、カラムは室温で保管していただけます。

一般的な分析条件設定法

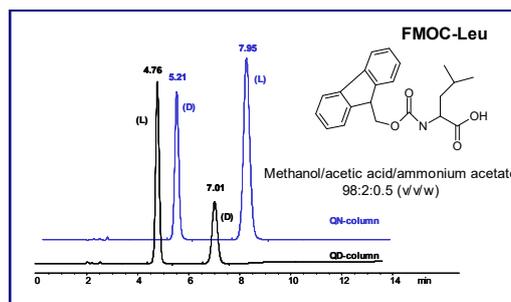
サンプルの性質によって分析条件を分類すると、次のようになります。

- **酸性キラル化合物**：極性有機溶媒系移動相(PO-mode)と逆相系移動相(RP-mode)をご選択いただけます。(分離モード 1 と 2 参照)
- **キラルスルホン酸、ホスホン酸、リン酸、ジカルボン酸、又はマルチカルボン酸**：逆相系移動相(RP-mode)をお勧めいたします (極性有機溶媒系移動相(PO-mode)を選択された場合、分析時間が非常に長くなる場合があります) (分離モード 2 参照)。
- **両性キラル化合物**：逆相系移動相(RP-mode)をお勧めいたします。但し、pHa^① = 2~8 の範囲で、pHa の異なる移動相を複数点お試し下さい。場合によっては流速を下げる (例えば、150 x 4.6 mm カラムの場合 0.5 ml/min)も分離に効果的な場合があります (分離モード 2 参照)。
- ① pHa とは、有機溶媒と水溶液の混合溶液の pH 実測値を示します。
- **中性または塩基性キラル化合物**：順相系移動相(NP-mode)をお勧めいたします。逆相系移動相 (RP-mode) でお使いの場合は、水溶液 (緩衝液) の混合比が高い領域でお試し下さい。

1. 酸性化合物の分離

1.1-極性有機溶媒系(PO-mode)：分離モード 1

- 1) まずメタノール/酢酸/酢酸アンモニウム=98 /2 / 0.5(ml/ml/g) (以後「98/2/0.5(v/v/w)」のように表記)の混合移動相をお試し下さい。流量は 1 ml/min (内径 2.1mm カラムの場合 0.1 ml/min)から、温度は 25°Cから始めて下さい。
 - 2) 分離が不十分な場合は、酢酸/酢酸アンモニウムの量比は変えず、メタノールの代わりにメタノール/アセトニトリル(50/50(v/v))をお試し下さい。場合によっては、THF の使用が効果的なこともあります。分離が向上するようであれば、その有機溶媒系にて有機溶媒の混合比を最適化して下さい。一般的に、N-保護アミノ酸ではメタノールが、ヒドロキシカルボン酸ではアセトニトリル/メタノール混合液が適当な場合が多いようです。
- ある程度の分離が得られた段階で、**溶出順序**を確認して下さい。ほとんどの場合、CHIRALPAK® QN-AX と QD-AX とでは溶出順序が逆転します。一般的に微量不純物が先に溶出するカラムを選択することで、より高感度な分析ができます。初期段階の適切なカラム選定によって、以後の条件の最適化がより効率的になります。
- 3) 上記の検討で、完全分離は得られたものの保持時間が長過ぎる場合は、下記のいずれかの方法で保持時間を調節できます。
 - a. **移動相中の酢酸/酢酸アンモニウム濃度を上げる**：酢酸/酢酸アンモニウム (又はその他の酸/塩基) の混合比が一定な場合、その濃度変化は分離係数にはあまり影響しませんが、保持時間には大きく影響します。一般的に、酸/塩基の濃度が高くなるほど、保持時間は短くなりますので、保持時間が長すぎる場合には、メタノール/酢酸/酢酸アンモニウム = 96/4/1 (v/v/w) , メタノール/酢酸/トリエチルアミン(TEA) = 100 /3/1 (v/v/v) , メタノール/酢酸/濃アンモニア水溶液(NH₃.conc) = 100 / 3 / 0.7 (v/v/v) などをお試し下さい。
 - b. **酸の種類を変更する**：酸の種類を変更すると、保持時間だけでなく、分離係数も大きく変化する場合があります。保持時間が長過ぎる場合、または分離が不十分な場合は、溶出力の強いギ酸 (例えば、メタノール/ギ酸/TEA = 100/1/3(v/v/v) 又は メタノール/ギ酸/NH₃.conc = 100/1/1.5 (v/v/v) など)をお試し下さい。
 - c. **酸 / 塩基の比率を変更する**：酸/塩基の比率(例えば酢酸/TEA, 酢酸/NH₃.conc の比率)を変えると、見かけの pH (pHa) が変化します。pHa の変化は、保持時間と分離係数に影響を及ぼします。一般的に、酸の比率を上げると保持時間が長くなり、ま



最適な分離が得られる比率は、サンプルの性質に依存します。酸/塩基の比率を変更する場合は、まず下表を参考に、pHa が 5、6、7 となるような移動相で分離を比較し、その結果を基に、酸/塩基の種類や比率をさらに最適化して下さい。

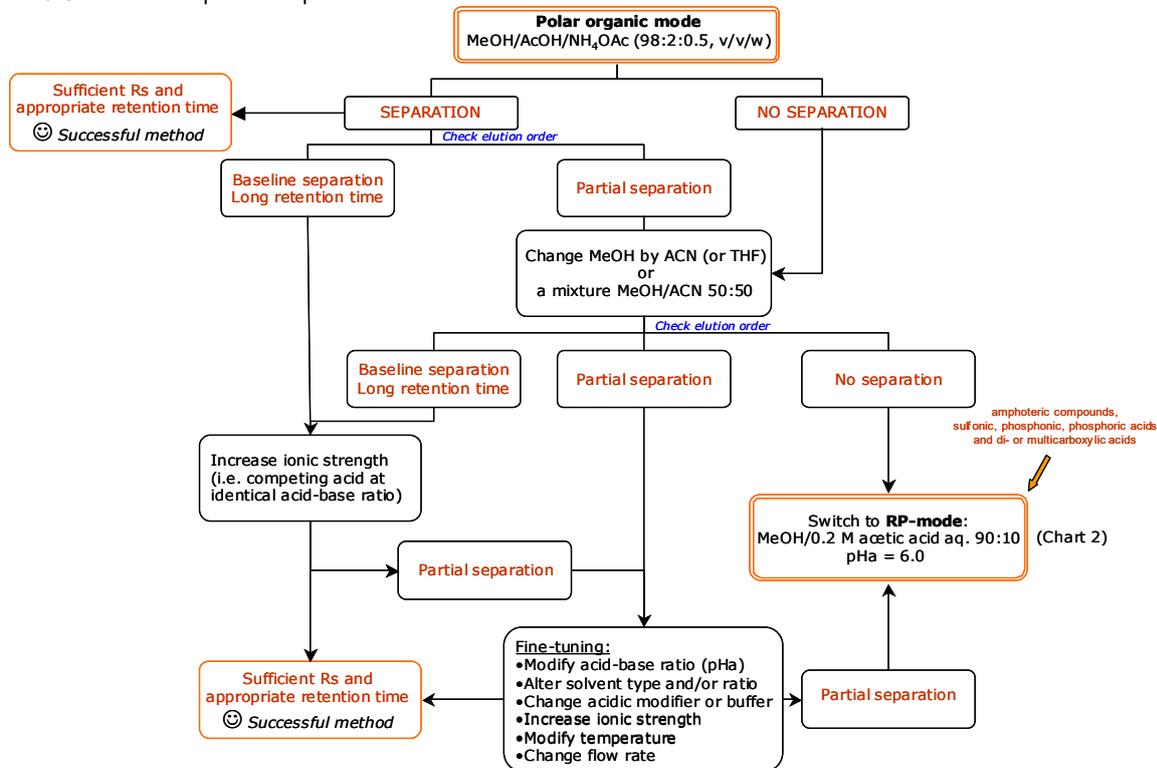
Acid-base ratios (example)	pHa<6	pHa=6	pHa=6.5	pHa>7
	Acetic acid/TEA	2 / 0.2	3 / 1 2 / 0.6 1 / 0.3	2 / 1.6 1 / 0.8
Acetic acid/NH ₃	2 / 0.2	3 / 0.7 2 / 0.5 1 / 0.2	2 / 1.2 1 / 0.5	2 / 2 1 / 1
Formic acid/TEA	0.5 / 0.5	1 / 3 0.5 / 1.5	1 / 3.5	1 / 4 0.5 / 1.8
Formic acid/NH ₃	0.5 / 0.3	1 / 1.5 0.5 / 0.8	0.5 / 1	0.5 / 1.5

Starting conditions

- d. **流速を最適化する**：最大許容圧力(18Mpa)を超えない範囲で、流速を最適化して下さい。流速を調節しても保持時間が長すぎる場合は、酸/塩基の濃度をさらに上げるか、種類を変更することにより保持時間を再調節して下さい。
- e. **カラム温度を上げる**：ほとんどのサンプルの場合、温度を上げると保持時間が短くなり、分離係数は低下します。カラム温度が 25°C で分離係数が十分大きく保持時間が長すぎる場合は、30°C (最高 40°C) でお試しください。
- f. **塩基種を変更する**：塩基種の変更は、酸種の変更に比べて影響が少ないため劇的な効果は期待できませんが、分離度がわずかに不十分な場合は、塩基種の変更をお試し下さい。

2) 上記の検討で十分な分離が得られない場合は、次の逆相系移動相 (分離モード 2) をお試しください。

Chart 1. Acidic compounds in polar mode.



Factors affecting elution times (examples)

To increase elution times	To decrease elution times
↓ Counter-ion concentration	↑ Counter-ion concentration
Acid-base ratio: ↓ base (PO)	Acid-base ratio: ↑ base (PO)
↓ pHa from 6 to 5 (RP) (even to 2, depending on pKa of compound)	↑ pHa from 6 to 8 (RP)
↓ Organic content (RP)	↑ Organic content (RP)
↓ Flow rate	↑ Flow rate
Change acid type retention: acetic acid > succinic acid ≥ formic acid > glycolic acid > malonic acid (PO)	
Change buffer type retention: acetate > formate > phosphate > citrate (RP)	

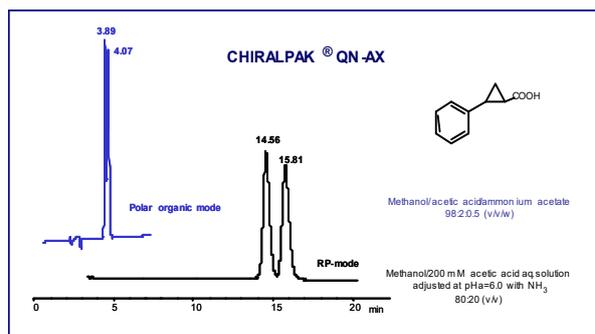


Fig.1 CHIRALPAK® QN-AX (150 x 4.6 mm) による逆相系での分離例 (流量: 1 ml/min, 25°C)

1-2. 逆相系 (RP-mode) : 分離モード 2

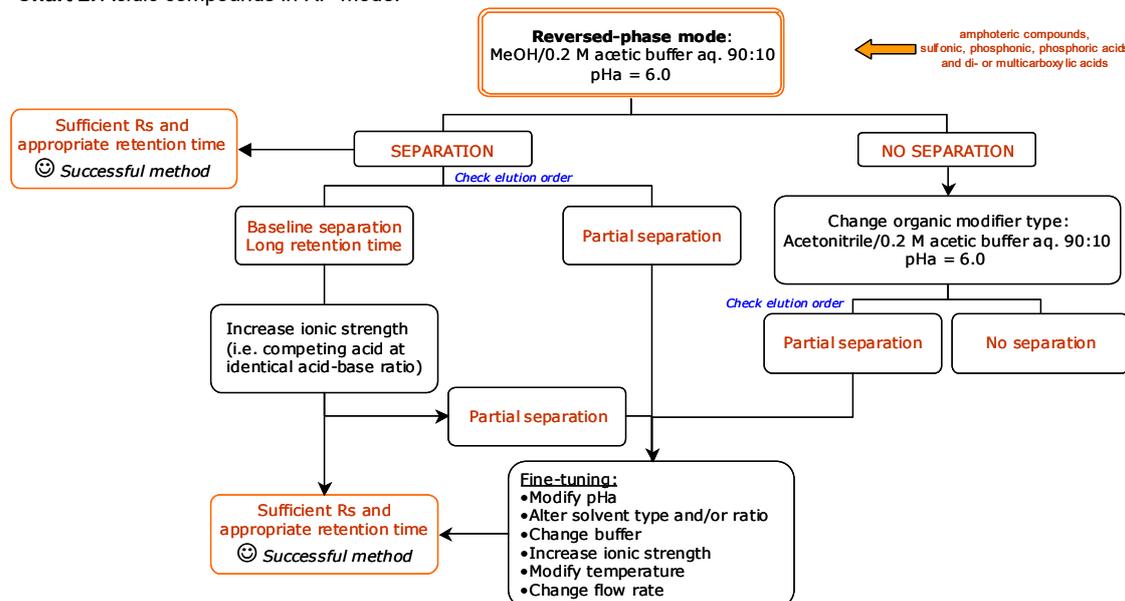
- 1) まずメタノール/0.2 M 酢酸水溶液 (90/10(v/v)) (高濃度アンモニア水で pH_a^① = 6 に調整した混合液)の移動相をお試し下さい。流量は 1 ml/min (内径 2.1mm カラムの場合 0.1 ml/min)から、温度は 25°Cから始めて下さい。なお分離モード 1 での検討の結果、メタノールよりアセトニトリル又はメタノール/アセトニトリルの混合液の分離が良好な場合は、メタノールの代わりにそれらの有機溶媒からお試し下さい。

① pH_a とは、有機溶媒と水溶液の混合溶液の pH 実測値を示します。

ある程度分離が得られた段階で、**溶出順序**を確認して下さい。ほとんどの場合、CHIRALPAK® QN-AX と QD-AX とでは溶出順序が逆転します。一般的に微量不純物が先に溶出するカラムを選択することで、より高感度な分析ができます。初期段階の適切なカラム選定によって、以後の条件の最適化がより効率的になります。

- 2) 上記の検討で、完全分離は得られたものの保持時間が長過ぎる場合は、下記のいずれかの方法で保持時間を調節できます。
- 溶離液中の緩衝液濃度を上げる**：緩衝液の濃度を上げると、保持時間が短くなります。例えば、メタノール / 0.5M 酢酸水溶液 (90 / 10 (v/v)) (高濃度アンモニア水で pH_a = 6 に調整した混合液) をお試しください。多価イオンサンプルを適度な時間で溶出させるためには、酢酸水溶液の濃度を 0.5M 以上にするか、酢酸水溶液の代わりに 1M 酢酸アンモニウム水溶液を必ずご使用下さい。ホスホン酸又はリン酸を分析する場合は、20 - 50mM のリン酸緩衝液 (pH_a=6)をお試し下さい。但しリン酸緩衝液を使用する場合、有機溶媒の比率が高すぎると塩が析出する恐れがありますので御注意下さい。
 - 酸の種類を変更する**：分離に最適な pH 値が 4 未満の場合、酢酸の代わりにギ酸のご使用をお勧めいたします。リン酸やクエン酸は溶出力が強すぎるため、十分な保持時間が得られない場合が多くなります。これらの酸は、ギ酸を高濃度で使用しても保持時間が長すぎる場合 (ホスホン酸、ジカルボン酸、マルチカルボン酸などの分離を行う場合) にのみお試しください。また移動相にリン酸やクエン酸を使用した場合は、使用後にカラム洗浄が必要です。[カラムの取扱い] (p.2) の手順に従ってカラムを洗浄して下さい。
 - 有機溶媒の比率を上げる**：有機溶媒の比率を 90~95%に増やしてお試し下さい。分離モード 1 の検討をされていない場合は、そちらも御検討下さい。
 - pH_a を調節する**：通常カルボン酸類の分離に最適な pH 範囲は pH=5~6 です。酸性度の高いサンプルでは低めの pH が、また両性化合物では高めの pH が最適範囲となります (但し使用可能範囲は pH=2~8)。pH=6~7 の範囲内で pH を上げていくと保持時間は短くなりますが、分離係数にはほとんど影響しません。一方 pH が 7 を超えると、分離係数が劇的に小さくなる場合があります。そのため、最初は TEA か NH₃.conc で pH 調整を行い、pH_a=5, 6, 7 の 3 種の移動相にて分離を比較してみてください。ホスホン酸やスルホン酸等の強酸性化合物では pH_a = 5 未満の領域も、両性化合物では pH_a=7 以上の領域についてもお試しください。
 - 流速を最適化する**：最大許容圧力(18Mpa)を超えない範囲で、流速を最適化して下さい。流速を調節しても保持時間が長すぎる場合は、塩濃度をさらに上げるか、種類を変更することにより保持時間を再調節して下さい。
 - カラム温度を上げる**：ほとんどのサンプルの場合、温度を上げると保持時間は短くなり、分離係数は低下します。カラム温度が 25°Cで分離係数が十分大きく保持時間が長すぎる場合は、30°C (最高 40°C)でお試しください。
 - 塩基種を変更する**：塩基種の変更は、酸種の変更に比べて影響が少ないので劇的な効果は期待できませんが、分離がわずかに不十分な場合は、塩基種の変更をお試し下さい。TEA を NH₃.conc に変更する (又はその逆にする) ことで、分離係数が向上する場合があります。
- 3) 上記の検討で十分な分離が得られない場合は、下記の方法をお試し下さい。
- 保持時間が非常に短い場合**：例えば $k' < 1$ のように保持時間が非常に短く十分な分離が得られていない場合は、酢酸の濃度を 1/2 ~ 1/5 に下げた上で、2)に記載の方法をお試し下さい。酢酸の濃度を下げても保持が不十分な場合は、有機溶媒の比率を 80~70 %に下げてください。
 - 保持時間が適度な範囲の場合 (1 ≤ k' < 10)**：有機溶媒の比率を 80~70 %に下げてください。完全分離が得られても保持時間が長すぎる場合は、2)に記載の方法で保持時間を調節して下さい。分離がほぼベースライン分割の場合は、流量を 0.5 ml/min に下げることや温度を下げることで、完全分離できる可能性があります。それらの操作で分析時間が長くなり過ぎる場合は、移動相中の酸濃度を上げて保持時間の再調整を試みて下さい。

Chart 2. Acidic compounds in RP-mode.



2. 塩基性化合物の分離

2.1-順相系モード

このカラムを順相系モードで使用する際には、下記の a)~c)の順に溶媒置換してからご使用下さい。

- メタノール/水 = 50/50 (v/v)を一晩以上通液
 - メタノール/TEA = 100/2 (v/v) を 30 分間通液
 - 2-プロパノールを 60 分以上通液
- まずヘキサン/2-プロパノール(90/10 (v/v))をお試し下さい。保持時間が短い場合にはヘキサン/2-プロパノール(99/1 (v/v))を、逆に保持時間が長すぎる場合はヘキサン/2-プロパノール(70/30 (v/v))をお試し下さい。(前者は、芳香族カルビノールのような保持の弱いサンプルを分離する場合に有効です。)
 - 1)で分離が全く見られない場合は、極性有機溶媒を代えてお試し下さい。例えば、2-プロパノールに代わりにエタノール、ジクロロメタン、ジオキサン等をお試し下さい。ヘキサンを含まない移動相に代えるだけでも、分離することがあります。
 - 塩基性化合物の分離の際にテーリングが見られる場合は、TEA 又は他の塩基性添加剤を 0.1%添加することをお勧めします。

2-2. 逆相系モード

何らかの理由で、有機溶媒+水系のような逆相条件を選択された場合は、下記の方法で条件の最適化をお試し下さい。

- 通常分析はイソクラティック条件で行いますが、適度な有機溶媒比率の見当を付けるために、まず水/アセトニトリル = 95/5 → 0/100 のリニアグラジエント条件 (30 分) で検討することをお勧めします。グラジエント用の HPLC が無い場合は、5 分刻みにマニュアルで 15% ずつアセトニトリルの比率を高めた移動相に交換するステップグラジエント試験をお試し下さい。なお塩基性サンプルの場合は、水の代わりに種々の pH 値の緩衝液を用いて同様のグラジエント試験を実施する必要があります (通常高い pH の緩衝液を使うほど保持が強まります。)
- 1)の結果、k'が 5~10 の範囲に入るような混合比率を選定し、イソクラティック条件にてお試し下さい。
- 2)の結果、分離が十分でない場合は、アセトニトリルの代わりにメタノールを使用して、同様の最適化を実施して下さい。
- 有機溶媒比率を 5%まで下げても、保持が弱すぎる場合や部分分割しか得られない場合は、流速を下げることをお勧めします。
- 上記の結果完全分割が得られない場合は、順相溶媒系でお試し下さい。

(参考) 換算表

□ 内径・流速 換算表

内径(mm)	2.1	3.0	4.6	10	20	30
流速(ml/min)	0.21	0.43	1.0	4.7	19	43

□ 圧力換算表

MPa	bar	kg/cm ²	psi
1	10	10.197	145.038
0.1	1	1.020	14.504
9.807×10^{-2}	0.981	1	14.223
6.895×10^{-3}	6.895×10^{-2}	7.031×10^{-2}	1

CHIRALCEL, CHIRALPAK, CROWNPAK は、日本、米国、EU、中国、インドにおいて登録された株式会社ダイセルの登録商標です。
日本における商標登録番号: CHIRALCEL (登録商標第 5413634 号)、CHIRALPAK (登録商標第 1814811 号)、CROWNPAK (登録商標第 5413635 号)

株式会社ダイセル

ライフサイエンス SBU :

〒108-8230 東京都港区港南 2-18-1 TEL: 03-6711-8222 FAX: 03-6711-8228
〒530-0011 大阪市北区大深町 3-1 TEL: 06-7639-7221 FAX: 06-7639-7228