

最新製備型 HPLC 技術在樣品純化上的應用

The New Technologies of Preparative HPLC on the Applications of Sample Purification

周泳杉

Yun-Shan Chou

本文介紹三類製備型層析系統，分別用在新藥開發和製造領域中純化生物性分子和藥物有效成分。「分析放大系統」主要用於獲取實驗性樣品，以提供實驗室研發以及新藥開發之用；另外，該系統亦可獲取足夠的組成，供給結構分析、藥品測試以及臨床試驗使用。「高產率放大系統」可以藉由非線性超載，將製備能力放到最大；它是一桌上型高壓製備層析設備，主要協助實驗室純化臨床試驗或是生產所需的成分。「生產放大系統」則是用以作為生物性分子或是藥物有效成分的大量生產製造。這三類系統可以協助研究人員更了解人類蛋白質、藥物在分子結構、動力學以及功能上的特性，以提供在研究階段關鍵性的分析，並且可提供藥品有效成分或生物性藥品的量產。

This article introduces three kinds of preparative chromatography used in purifying bio molecules and active ingredient pharmaceutical compounds for drug discovery and manufacture. “Analytical Scale-up System” is used in the fields of purified of experimental compounds during laboratory research, drug discovery, or compounds in sufficient quantities for structure analysis, drug testing and clinical trials. The “High Throughput Scale-up System” can be scale-up in the nonlinear overload condition for maximizing capability. It is a bench-top preparative HPLC solution on helping laboratories purifies compounds for clinical trials prior to full-scale production. The “Process Scale-up System” is a complete preparative chromatography solution for purifying production volumes of bio molecules and active ingredient drug compounds used at pharmaceutical manufacturing. All these kinds of preparative HPLC design help scientists understand the structure, dynamics, and function of human proteins and prospective pharmaceutical compounds; perform critical analyses throughout the development process; and purify production quantities of active drug ingredients and bio-pharmaceuticals.

一、緒論

回顧當代化學分析儀器的發展史，我們不難發現，化合物分離 (separation) 設備的發明與改善，實在是帶動晚近各種後置檢測技術突飛猛進的關鍵性基礎。從 1903 年俄國植物學家茲維特 (M. S. Tswett) (圖 1) 第一次開創性地發表以碳酸鈣填充管柱在常壓下分離植物色素的報導⁽¹⁾，至今已經超過一個世紀，然而真正意義上的製備分離，卻是晚至上個世紀 30 年代，對葉綠素與胡蘿蔔素的分離研究。一百多年來，液相層析法 (liquid chromatography) 的發展與改良，在近代分析化學史的發展上，始終扮演舉足輕重的角色。從近年來商品化高效液相層析儀 (HPLC) 的趨勢來看，開發微量與巨量兩種極端流速的功能性需求，似乎已經成為當代市場開發的主流方向。

近年來許多研究人員試圖從自然資源當中，找尋更多具有生物活性的化合物，以成為新藥開發的候選物種，眾所週知的例如源於太平洋紫杉 (短葉紅豆杉，*Taxus brevifolia*) 的紫杉醇 (paclitaxel，商品名 Taxol)，在治療常規化療無效的卵巢癌和乳腺癌上，有顯著的療效；另外，青蒿素 (artemisinin) 所表現抗瘧疾活性，與抗癌方面的研究，也促使了學術界和工業界對天然物的萃取，引發高度的興趣，然而面對廣泛的天然物來源，快速、經濟且有效的篩選方法確實是有迫切的需要。舉凡從陸生植物、動物、海洋生物、微生物中，去發現新的先導化合物 (lead) 等，首要考慮的就是快速、有效且低成本



圖 1. 俄國植物學家 Tswett。

的樣品純化技術。而對於天然物、生化製藥與一般傳統中草藥研究來說，也只有先將新的天然物提純出來，才能進一步利用各種光譜技術，鑑定其化合物的化學結構，並測定其物理化學性質和生物活性。同時這些提純出來的樣品，也可以提供作為製藥原料、標準品，或者做為合成工作的起始原料。

據此，我們了解製備型高效液相層析儀在樣品純化與製備的需求上日益受到關注，目前無論是在新藥研發、生物醫學、中草藥萃取以及大分子分離純化的領域當中，製備型高效液相層析儀的應用需求均相當繁多。以新藥開發為例，先導化合物的篩選、前臨床與臨床試驗等，都需要純化大量樣品。除此之外，製備型高效液相層析儀也大量被應用在藥用生物活性蛋白、生物製劑與診斷試劑的大量生產，因為這些產品在應用上，被要求的純度都相當高。本文針對目前市面上製備型高效液相層析儀技術作一整合性的探討，分別介紹分析製備 (analytical preparative)、半製備 (semi-preparative)、製備 (preparative) 與生產級 (process) 液相層析儀，讓讀者對於這一類技術有概念性的了解。

二、常壓層析管柱分離

樣品的製備對於複雜的分離與純化相當重要，有適當的樣品前處理，可避免後續操作過程中的許多麻煩，這是一門專門的學問，其包括的方法很多，如選擇性溶劑提取、過濾、沉澱、透析、離心、固相萃取、超臨界流體與常壓液相層析管柱等。限於篇幅，本文並不打算對所有的樣品前處理方法進行討論，只選擇與製備型高效液相層析儀關係最密切的常壓液相層析管柱，作一概略性的介紹。

常壓液相層析管柱因為操作簡單、成本低廉，而得到廣泛的使用。但在實際應用上，常壓液相層析管柱有它的侷限性。首先它的分離速度比較緩慢，因為移動相完全依賴重力流動；其次，樣品可能與吸附劑發生不可逆的吸附，影響填料的使用壽命；再者，它也不適合充填小顆粒的吸附劑。以矽膠為例，一般常被使用的顆粒大小，通常介於 50–200 μm ，這樣大小的矽膠顆粒，每克約負載

30 mg 的樣品，而這種比例只能用來分離 R_f 值相差比較大的物質。為了克服上述的缺點，後來改良出乾柱層析 (dry column chromatography) 和減壓液相層析 (vacuum liquid chromatography) 等法，更進一步發展出快速層析法 (flash chromatography) 等。

以乾柱層析法為例，在管柱裡面以乾裝法填充固體吸附劑，再將欲分離的樣品溶液加到乾燥管柱的頂端，待樣品溶液滲入管柱之後，立即加入適當的溶劑淋洗，此時樣品組成會隨溶劑展開，當溶劑接近管柱末端時，立即終止展開，由於各組成與吸附劑之間作用能力不同，在管柱中彼此可得到分離，並依據組成本身的顏色或藉由其他方法進行鑑別。這一個方法的優點是節省大量溶劑，並且使分離時間縮短，其處理樣品的能量，可達克級的水準。然而對於製備分離的工作而言，經過常壓或減壓管柱等方法所得到的樣品，等於已經過初步的分離，這一點對於高壓製備而言，無疑是重要的樣品前處理。

三、快速層析法

快速層析法的概念是在 1979 年由哥倫比亞大學 Clark Still 教授所提出⁽²⁾，它是由常壓過渡到中高壓液相層析系統的產物，該裝置利用桶裝氮氣加壓，令系統壓力在小於 100 psi (7 bar) 的範圍操作，它的概念十分簡單，由於解析度 (resolution) 不及中壓液相層析，所以適合於解決簡單的分離問題。另外，快速層析法的分離較常壓管柱快速；有些天然產物經長時間在管柱中淋洗，可能會被分解而失去活性，或者產生譜帶嚴重脫尾的情形，這些狀況都必須求助於快速層析或者是中高壓系統，提供快速的分離方案。

如圖 2 所示，商品化的快速層析裝置，包含了一個簡單的溶劑輸液泵 (如圖 A)，其流速範圍通常介於 0–50 mL/min；B 部分是一個壓力控制模組；C 部分則是專為液體樣品所設計的手動進樣閥；D 部分是商品化的管柱，內部充填粒徑大小約為 40 μm 的各式吸附劑，管柱的長度一般可以選擇，當然長的管柱內部充填更多的吸附劑，一般來說如果樣品 R_f 值小於 0.05，則載樣量約可達吸附

劑質量的 1%；E 部分是專為固體樣品設計的進樣裝置，以拓展適用的樣品種類；F 部分是一簡單的固定波長 UV 檢測器，當然以快速層析法而言，檢測器未必是必須的，但配備檢測器則可以使操作更為便捷；G 部分則是收集器，收集被分離純化的組成。快速層析是簡單組成分離的利器，當然也可以作為粗的提取物或是混合物，初步純化的工具，其後續可以銜接其他具有更高解析度的技術來做進一步的純化。

四、高壓製備型液相層析系統引言

對層析管柱施加壓力所進行的液相層析法，通常稱為「加壓液相層析系統」。上文所述的快速層析法是其中的一類，依據所施加的壓力大小，一般還區分成低壓 (小於 7 bar/100 psi)、中壓 (7–20 bar/100–300 psi) 與高壓 (大於 20 bar/300 psi) 液相層析系統。當然系統的施壓和耐壓能力，反映到實際的應用層次，除了加速分離時間的意義之外，最關鍵的還在於分離效能的提升。舉例來說，一般液相層析法很難分離克數量級而且結構非常相近的化合物，對於高壓製備型液相層析系統而言，它可以採用更小粒徑的吸附劑，藉以增加其選擇性因子 (α)，以完成高難度的分離工作。對於小量難分的樣品 (α 值約等於 1)，一般採用小粒徑的固定相 (5–10 μm)，此時必須仰賴高壓系統來進行分離；對



圖 2. 快速層析法裝置。

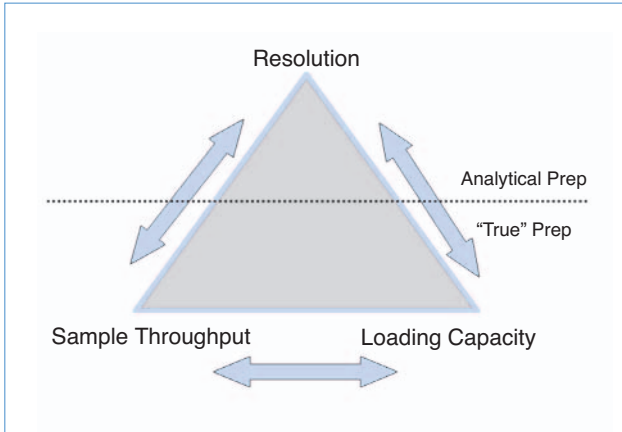


圖 3. 分析放大與製備放大關係。

於簡易的分離來說 ($\alpha > 1$)，可採用較大顆粒的固定相，並且可負載更大量的樣品，此時較低壓力的層析法就可以解決問題；甚至如果選擇性很大，以快速層析法就可以將問題解決。

加壓液相層析系統的效能取決於分離速度和解析度，對於製備型液相層析法而言，載樣量 (loading capacity) 是另一個重要的指標 (圖 3)。製備級層析與分析級層析的概念並不相同，舉例來說，分析級層析所關切的議題，如樣品的組成與出峰的對稱性等，在製備分離上並不會受到關注；而真正製備所關注的，可能是樣品純化的純度、產率，以及相對應的製程控制等，這一點是必須清楚。也就是說如果單純以製備的角度來看，解析度並不總是製備型液相層析系統首選的考慮因素⁽³⁾，如圖 3 所示，分離效能和製備速度以及載樣能力總是存在某種程度上的相互制約，對某一項分離參數進行最佳化的時候，常常會影響到其他的分離參數。例如，過多的載樣量，或是洗脫液流速的增加，都會因此而降低層析峰的解析度。若要顧全解析度，則又必須犧牲製備效率和載樣量等。因此在應用上就必須有所偏重，以下就應用上的偏重，將製備型高效液相層析系統分成三大類。

第一類稱之為「分析放大系統」(analytical scale-up system)，從應用的方向來看，這一類的製備分離偏重於獲取解析度，這一類製備通常發生於應付複雜組成的製備分離，由於著重於解析度，故而犧牲了部分的純化效能 (如圖 3 所示)，然而這一

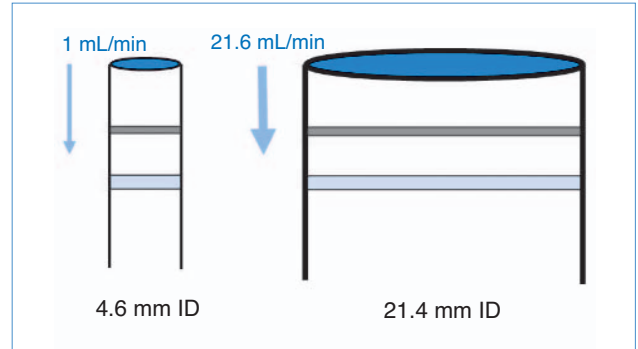


圖 4. 分析與製備分離管柱線性流速。

類的製備需求通常存在於從事研究開發的實驗室。

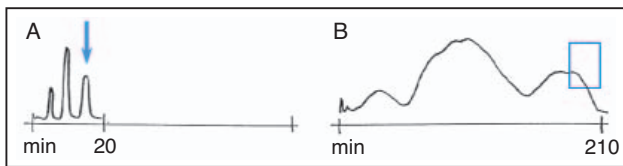
「高產率放大系統」(high throughput scale-up system) 這一類應用著重於樣品的快速分離，因此它所需要的是高的純化效能，換句話說，此類的分離必須犧牲部分解析度來爭取更大的樣品負載，或是更快的純化速度，這也造成了該系統對於過度複雜的樣品有應用上的限制，該系統通常使用於需要大量純化樣品的單位。

「生產放大系統」(process scale-up system) 顧名思義是用來作為生產設備的純化系統，在維持一定生產品質的前提下，產能與效率是這一類系統唯一關切的議題，因此它的特性與「高產率放大系統」相同，只有在量產化的生產廠房可以見到這樣的設備。下文將分別討論這三類系統。

五、分析放大系統原理

本系統所著重的觀點在於連結分析與製備型液相層析系統的分離工作。分析型高效液相層析系統是應用相當廣泛的分析儀器，爭取在最短的分析時間創造最佳的分離解析度，往往是使用者對分析型高效液相層析系統基本的工作要求，這意味著分析型高效液相層析系統對於層析圖譜所呈現的品質與數據處理系統的功能相當重視。現代分析型高效液相層析系統無論是在系統的性能上，或是管柱的搭配上，已經可以解決絕大多數複雜樣品分離應用的問題，這一個特徵對於研究開發實驗室而言，無疑是關鍵且重要的。以天然物或中草藥的研究為例，樣品的組成通常相當複雜，而其中微量的組成近年

表 1. 非線性分析到製備放大條件。



分析條件	A	B
填料粒徑	10 μm	40–150 μm
管柱長度	25 cm	65 cm
管柱直徑	4.6 mm	25 mm
流 速	1 mL/min	20 mL/min
操作時間	20 min	210 min
溶劑消耗	20 mL	4200 mL

來已漸漸開始吸引某些研究人員的目光，如何順利地將這些複雜的組成分開，並且進一步將感興趣的組成純化出來，提供後續研究使用，是許多研究人員相當關切的問題。

一般來說，分析到製備分離如果未經事前詳細的規劃，通常需要進行最佳方法的調整。如表 1 所示，從分析型高效液相層析系統得到的最適圖譜 A，放大成製備需求的圖譜 B 時，所有的條件幾乎都受到扭曲，這說明了放大的過程確實必須經過審慎的規劃。如何簡化分析到製備分離的方法轉移程序，將有助於簡化研究實驗室在樣品製備純化上的花費，並且有效提升純化的效率。欲實現這個目標確實是可能的，其前提必須是分析到製備的放大存在著對應的線性關係。以微觀的角度來看，樣品各組成在分析管柱與製備管柱當中，其內擴散阻力和吸附平衡關係必須一致；換句話說，在分析與製備管柱中，必須使用相同材質、相同粒徑大小的填料；此外，若能控制樣品組成在分析和製備管柱中表現出相同的線性流速，就能保證各組成的外擴散阻力也一樣。

如何在固定填料材質與粒徑的前提下，計算樣品在分析與製備管柱的線性流速？式 (1) 是典型的分析放大公式， r_a 和 r_p 分別是分析和製備管柱的半徑， X_a 和 X_p 分別指分析與製備高效液相層析系統的流速， C_L 則是製備管柱對分析管柱長度的比值。如果經過事前規劃，分析或製備管柱的尺寸會成為已知的參數，將已知參數移到式子的右邊，得

到式 (2)，只要掌握分析的流速，就可得到對應的製備流速。依此流速執行分析放大，即可確保樣品組成在分析與製備管柱中，得到相同的線性流速。例如選擇長度相同、直徑分別是 4.6 mm 與 2.14 cm 的分析和製備管柱，當分析管柱流速為 1 mL/min 時，可預測在製備管柱流速必須為 21.6 mL/min，方可維持相同的線性流速。(如圖 4 所示)

$$\frac{X_a}{r_a^2} = \left(\frac{X_p}{r_p^2} \right) \left(\frac{1}{C_L} \right) \quad (1)$$

$$\frac{X_a}{X_p} = \left(\frac{r_a^2}{r_p^2} \right) \left(\frac{1}{C_L} \right) \quad (2)$$

這種紙上規劃的好處不僅可以避免繁雜的方法開發，還可以藉此預測更多的製備訊息，如果我們固定分析與製備管柱的長度，則 C_L 等於 1，再把式 (2) 當中 X_a/X_p 置換成常數 f ，可再把公式可進一步簡化為式 (3)。

$$f = \frac{r_a^2}{r_p^2} \quad (3)$$

上式的 f 稱之為放大因子 (scale-up factor)，放大因子其實就是分析與製備管柱截面積的比值，它除了反應線性流速之外 (式 2)，它還可以反應樣品負載量，也就是說透過 f 值，我們可以藉由分析的數據，進一步預測製備的產率，因為這些數值都與管柱的放大成正相關。表 2 列舉了多組各種內徑的液相層析管柱，在典型 4.6 mm 內徑的分析型管柱中，樣品負載量可透過實驗求得，而其他管柱內的樣品

表 2. 放大因子與樣品負載量關係。

管柱直徑 (mm)	放大因子 (f)	樣品負載量
4.6	1	1–4 mg
10.0	4.7	5–25 mg
21.4	21.6	22–88 mg
1.4	81.0	81–324 mg
77	280	0.28–0.78 g
100	472	0.47–1.89 g
150	1060	1.06–4.24 g

負載，則可透過放大因子 (f) 求得。這樣的預測對於製備分離而言可謂是重要的，首先它簡化了分析到製備放大的方法開發程序，其次對於產率的預測和製備花費的估算，也頗具成本效益上的意義。

六、分析放大系統硬體需求

由上面的論述可知，透過放大因子 (f) 可以把分析和製備分離標準化，若將填料的種類與粒徑固定，除了管柱的尺寸之外，分析和製備分離其實並沒有差異。回顧分析放大的理論，我們可以歸納出兩大類的參數。第一類稱為可變因子 (scaleable factor)，顧名思義這一類因子在放大過程中是必須變動的，例如流速、樣品負載、輸液管線截面積、檢測器流動吸光槽 (flow cell) 體積、死體積 (dead volume)、溶劑消耗量等，當然這些參數並不是亂變，而是隨著放大因子 (f) 而呈倍數放大。另外，還有一些參數在分析到製備放大的過程中始終維持不變，這些因子稱為絕對因子 (absolute factor)，最明顯的就是管柱固定相的種類與粒徑，另外像是樣品的濃度、回收率、產物純度、溶劑梯度、或是實驗條件以及譜帶的滯留時間 (retention time) 等，這些因素在放大過程中，不允許受到任何改變。

如果說分析到製備的過程，圖譜發生了嚴重的扭曲，或是結果發生不可預期的變化，那就表示某些絕對因子已經遭受改變，或者是某些可變因子未被標準化。因此，在放大過程當中，適當地對這些因素作有效的控制，將是分析放大成敗的關鍵，然而這些控制與硬體的設計有著莫大的關聯。典型的



圖 5. 典型分析放大系統。

線性放大液相層析系統 (如圖 5 所示)，在硬體設計上必須考慮可變因子的變化與絕對因子在維持上的需求，其硬體在設計上的挑戰是多方面的，例如輸液泵浦 (solvent delivery pump) 如何在提供寬廣的線性流速下，還能維持輸液的準確度 (accuracy) 和精密度 (precision)? 針對複雜樣品的分析需求，泵浦頭 (pump head) 如何在高流速的操作下，仍然提供足夠的壓力耐受性，以符合填充小粒徑填料的管柱使用? 另外，檢測器流動吸光槽的死體積，如何在流速變大之後，也呈對應的放大? 諸如此類的問題，都考驗著系統在設計時的巧思。以下分別就輸液泵浦、檢測器以及系統週邊的管路系統，概略介紹分析放大系統的硬體結構。

七、分析放大系統輸液泵浦

為了適合在單一泵浦上完成分析到製備的放大，該系統的輸液泵浦除了必須涵蓋寬廣的流速範圍外，其輸液的準確度和精密度也必須在水準之上，否則將無法滿足分析放大對圖譜高品質的表現需求。然而我們知道，每一台泵浦在設計時都有其技術上一定的限制，它只在某一特定範圍內，才能表現真正的線性流速 (linear flow rate)，超過該範圍，無論是低流速還是高流速，泵浦所表現的輸液能力都是非線性的。為解決這樣的困境，瓦里安科技 (Varian Technologies) 公司設計了一系列可更換泵浦頭的輸液泵浦，而 PrepStar SD-1 (如圖 6 所示)、PreStar 218 和 ProStar 210 都是當中的代表作。

該系列輸液泵浦可透過更換泵浦頭，得到相當廣泛且準確的線性流速，以 PrepStar SD-1 為例，它流量最小的泵浦頭涵蓋從 $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 到 $50 \text{ mL}/\text{min}$ 的流量，最大的流量則是從 $0.1 \text{ mL}/\text{min}$ 到 $3.2 \text{ L}/\text{min}$ ，表 3 是 PrepStar SD-1 可更換式泵浦頭的技術參數。

由表 3 我們可以清楚看到，PrepStar SD-1 透過更換泵浦頭，可以將應用範圍從分析拓展到半製備 ($50 \text{ mL}/\text{min}$)、製備 ($500 \text{ mL}/\text{min}$)，乃至於生產 ($> 800 \text{ mL}/\text{min}$)，而且其泵浦頭的耐壓能力，一直到製備的應用，都有令人滿意的表現，其 $3,200 \text{ mL}/\text{min}$ 的泵浦頭，則可應用在中壓製備的領域。圖 7 所示的是 PrepStar SD-1 每一個泵浦頭其耐壓

表 3.

PrepStar SD-1 可更換式泵浦頭的技術參數。

泵浦頭	50	200	500	800	3,200
流量 (mL/min)	0.001–50	0.01–200	0.02–500	0.02–800	0.1–3,200
準確度 (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5
精密度 (%)	+/-0.1	+/-0.1	+/-0.1	+/-0.1	+/-0.3
耐壓 (bar)	685	410	170	100	25

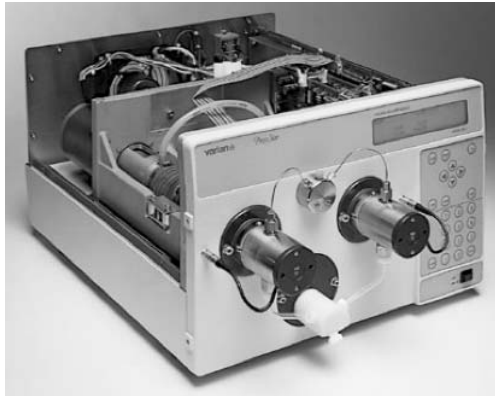


圖 6. 分析放大輸液泵浦。

能力與流速的關係圖，隨著泵浦頭流速範圍的擴展，其耐壓的能力也跟著降低，這是機械設計上的限制。以 200 mL/min 泵浦頭為例，在流速小於 150 mL/min 時，其最高的壓力操作範圍可以達到 6,000 psi，流速再上去，其耐壓能力會驟降至 4,020 psi。

這說明 PrepStar SD-1 可以應用的範圍相當廣泛。從層析法的原理來看，影響解析度的主要參數

是選擇性因子 (α)、容量因子 (capacity factor, k') 以及理論板數 (number of theoretical plates, N)，能夠增加選擇性因子 (α) 對於分離成功非常的重要。前面提過增加管柱的直徑等於增加樣品的負載量；而增加管柱的長度，也意味著載樣量提高和解析度的改善，但同時也會增加管柱的壓力，所以短的管柱一般可裝填粒徑較小的吸附劑，長的管柱則裝填粒徑較大的吸附劑。在相關文獻報導當中，有的學者傾向採用大直徑的管柱⁽⁴⁾，有的則偏好長的管柱⁽⁵⁾，但是對於難分的組成 ($\alpha < 1.2$)，則必須使用大直徑的管柱充填小粒徑的吸附劑，才能得到比較好的結果⁽⁶⁾，這與系統的耐壓極限有絕對密切的關聯性。雖然小粒徑的填料在成本上比較昂貴，又需比較大的系統操作壓力，但是面對複雜的天然物分離，更高壓的操作系統仍然是發展的一種趨勢⁽⁷⁾。

八、分析放大系統檢測器

檢測器流動吸光槽的體積，在分析放大的過程中，屬於可變因子當中的一項，在放大成製備分離

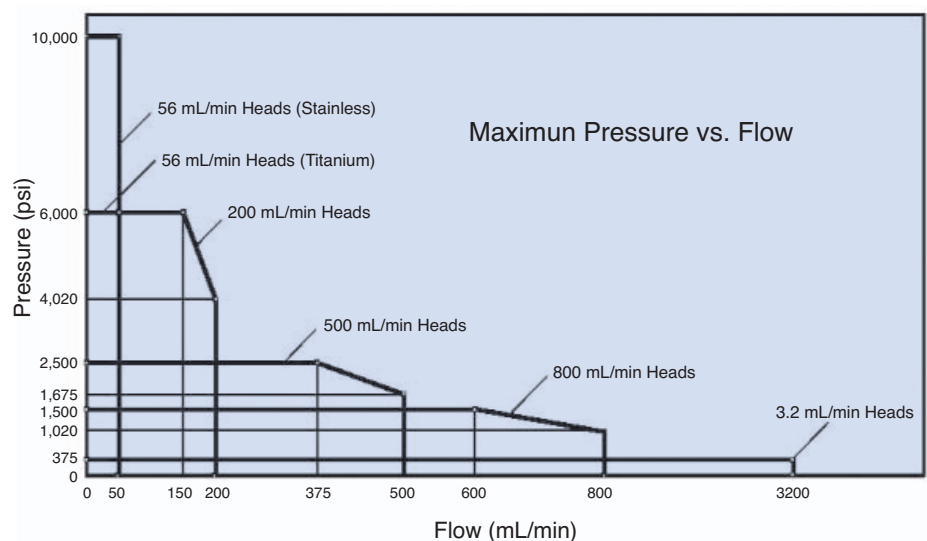


圖 7.

輸液泵浦耐壓與流速關係圖。

種類	Semi-Micro	Analytical	Preparative	Super Preparative
光程 / 光徑	4 mm / 單光徑	9 mm / 單光徑	9 × 1 mm / 雙光徑	4 × 0.5 mm / 雙光徑
最高流速	20 mL/min	100 mL/min	500 mL/min	10 L/min
適用管柱直徑	1 – 4 mm	2 – 8 mm	4 – 76 mm	8 – 152 mm

表 4. ProStar 325 UV/Vis 檢測器各種流動吸光槽技術參數。

之後，檢測器流動吸光槽的體積也必須放大，否則就必須選擇以分流器 (splitter) 來導入適量的溶劑。為了解決此問題，瓦里安科技公司所生產的 ProStar 325 紫外可見光 (UV/Vis) 檢測器和 ProStar 335 光二極體陣列 (photodiode array) 檢測器，使用了可更換式的流動吸光槽設計，該檢測器提供了四種尺寸的流動吸光槽，以因應不同類型的應用需求，表 4 是各種流動吸光槽的技術參數。

從表 4 中可以清楚看到分析級的流動吸光槽設計是單光徑 (single pathlength) 的，而製備以上則為雙光徑。為顧及死體積的問題，Semi-Micro 的光徑長度只有 4 mm，而體積也只有 1.5 μL ，它使譜帶拓寬的效應降到最低，令圖譜表現最佳的品質。反觀製備型流動吸光槽，它除了死體積增加之外，更採用了雙光徑 (dual pathlength) 的設計，我們知道死體積的增加，來自於分析放大後可變因子的改變，然而雙光徑的設計 (如圖 8) 卻是為了適應製備可能的樣品濃度過載 (concentration overload)。為了提高產率，製備分離通常必須考慮濃度過載或者是體積過載 (volume overload)，而濃度過載的關鍵在於樣品的溶解度。

圖 8(a) 所示的是流動吸光槽的光路圖，當中的透鏡是用來輔助通過的光線在流動吸光槽中聚焦，圖 8(b) 可以更清楚地看到有兩道光線通過流動吸光槽，上方的表示通過長光徑的部分，下方的表示通過短光徑的部分，根據比耳定律 (Lambert-Beer's law)，在固定吸收值的情況之下，光所通過的光程與樣品濃度成反比。換句話說，光徑越短，其所能夠檢測的線性濃度範圍就更為寬廣，如圖 9(a) 所示，下方方塊所位於的範圍，是正常的吸收值限度，當樣品濃度過載之後，通過長光徑的光會自動感應吸收值範圍不足，而自動關閉，只留下通過短光徑的光，此時吸收值範圍會被拓展 (如圖 9(a) 上方箭頭)，這樣的功能有助於操作者確認層析圖譜的出峰全貌 (如圖 9(b) 所示)。也因為雙光徑的設計，瓦里安科技公司在 ProStar 335 光二極體陣列檢測器上，必須採用雙陣列 (dual array) 設計，其檢測器由一對具有 1024 光二極體檢測器組成，包括一組樣品 (sample array) 與一組參比陣列 (reference array)，讓分析擴充到製備應用時，更具使用彈性。

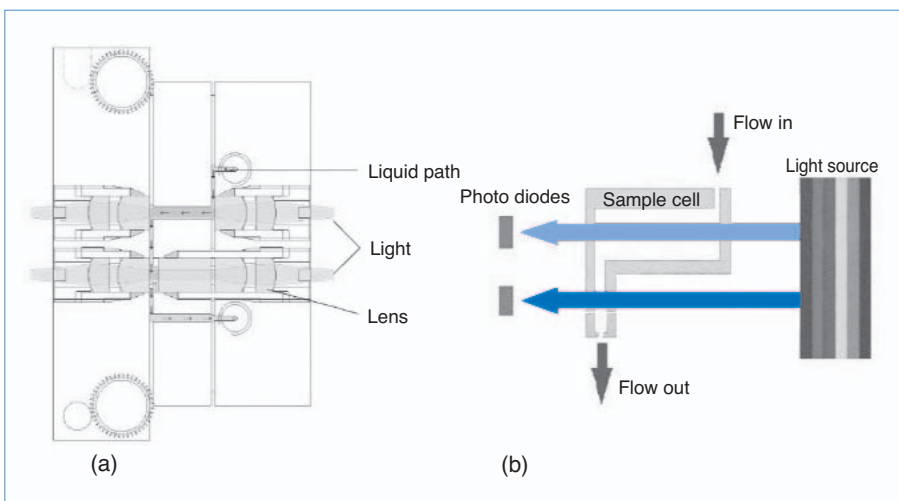


圖 8. 檢測器製備型流動吸光槽結構。

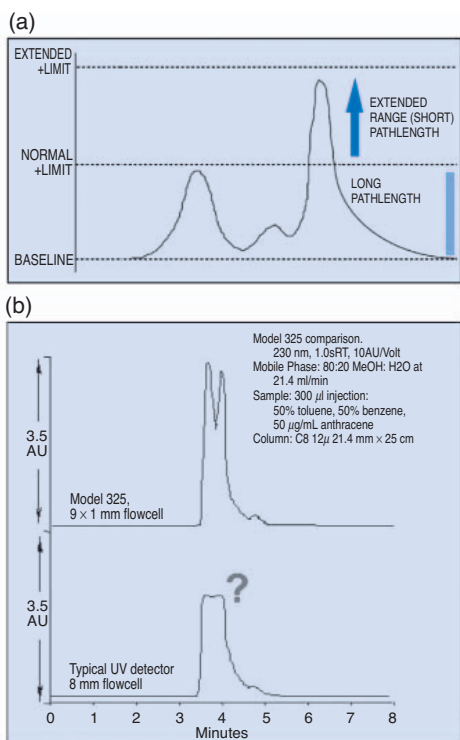


圖 9. 吸收值拓展效應。

九、分析放大系統管路設計

管路系統對於分析放大高效液相層析儀來說，也是至為重要的，欲實現在同一套液相層析儀中，同時涵蓋分析與製備功能，管路系統是需要放大的，設計一套便利的管路切換系統，能適度地降低使用者在操作上的麻煩。圖 10 所示的是進樣閥系統，A 是一個分析級的樣品進樣閥，其後所接的是分析級進樣環 (loop)，當使用者進行分析分離時，這一組管路會通往分析級分離管柱，再接到檢測器流動吸光槽；當完成分析分離之後，使用者只要將製備條件放大，切換圖 10 中 B 這一個三通閥，則管線系統立即由原來所走的 1/16" 分析管路，切換到 1/8" 的製備管路，此時使用者即可從 C 這一個製備進樣閥，執行製備進樣，其後面所接的就是直徑較大的製備型管柱 (如圖 10 D)。

如果輸液泵浦的流速太大，手動進樣不能滿足進樣的體積，亦可以採用進樣泵浦來代替手動進樣，圖 11 所示的系統，就包含了一套採用最高流速為 50 mL/min 的進樣泵浦。在進樣之前，輸液泵

浦必須設計一個減速的程序 (如圖 11 下方所示)，在進樣泵浦啟動，並以 20 mL/min 的流速進樣時，輸液泵浦完全停止，待進樣完畢，輸液泵浦再依固定的程序提高輸液速度，完成大量的製備進樣，這個過程完全可以透過軟體系統，自動化的來啟動。在圖 12 當中我們很清楚看到，以進樣泵浦配合二元高壓製備液相層析儀的管路切換系統，切換閥 (switch valve) 連結手動分析進樣閥和自動製備進樣輸液泵浦，以上連結對於某些從研發跨到生產的單位來說，是相當方便的生產工具。

十、高產率放大系統

以上介紹分析放大系統，對於從事研發工作的研究人員來說，該系統確實像是分析與製備的橋樑，它為分析到製備放大提供了簡單、可預測的途徑，對於多數從事研發工作的人來說，面對複雜樣品的分離，該系統不失為一個深具使用彈性、方便、簡單的選擇。然而，對於從事簡單樣品大量純化的單位來說，除了產品的純度之外，純化所需的成本與生產效率才是他們所關心的；因此，選擇一個可以降低生產成本，同時又可以提高生產效率的系統，遠比使用彈性更重要，因為對於大量生產純化的單位來說，往往不需要執行太多差異性太大的分離任務，大多數生產分離的條件，已經在研發的



圖 10. 分析放大系統進樣閥設計。

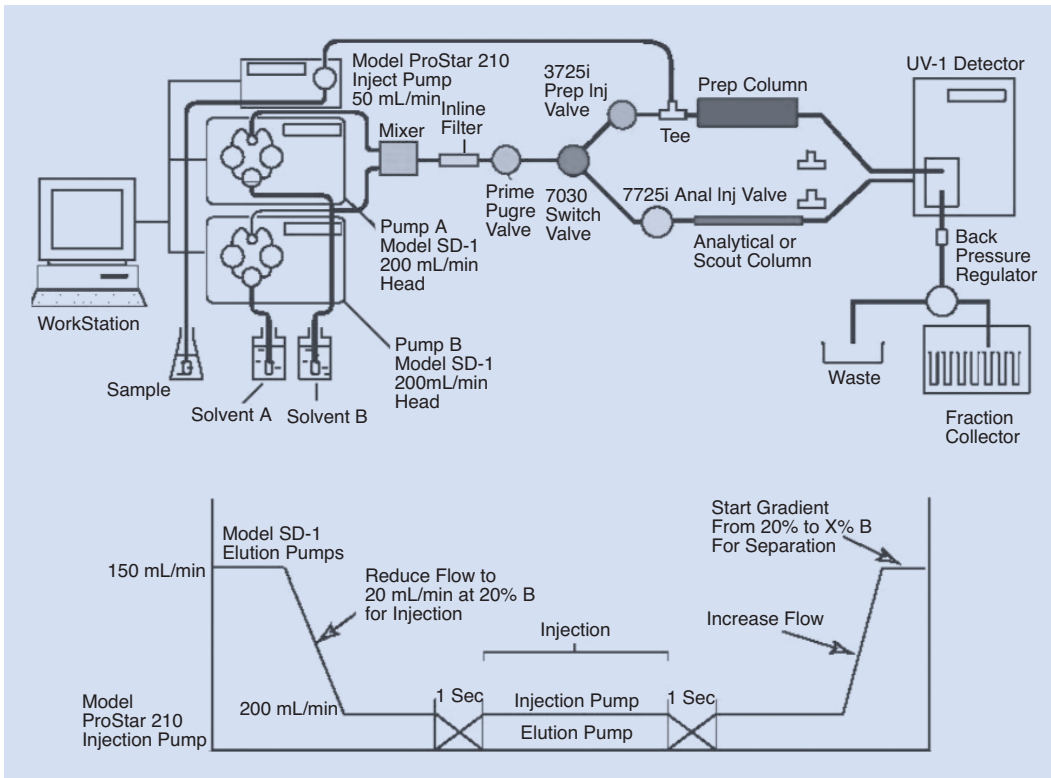


圖 11. 分析放大流路系統。

過程中受到適當的調整。當系統開始執行生產分離時，純化條件往往不會輕易更改，所以適合生產的製備型高效液相層析系統，它設計的出發點並非用來做製備條件的摸索，而是以最高的效率、最低的成本，來達到快速純化的目的，這就是接下來要介紹的「高產率放大系統」。

這一類系統相當重視產率，其實「提高產率」與「降低生產成本」原來就是一體的兩面，對於營利的生產機構而言，最佳的狀況當然是這兩者同時得到。如何提高產率與最佳方法的開發有密不可分的關係，總不外乎增加樣品的溶解度與提高選擇性因子 (α)，並且進行過載實驗 (overload study)，必須在非線性過載狀態下，開發出最大生產容量的放大方法。另外，必須改用大粒徑的填料，它的效果是使系統的背壓降低、輸液流速加快，這不但縮短製備時間，也大大降低了填料的成本。圖 13 所示的是製備成本的概念圖，以樣品純化的量來界定實驗室分離與生產分離，超過 10 g 級的純化，可視為生產的規模來看待，對於每克的純化成本來說，生產分離無論是在設備成本或勞力成本上，都呈現

類似指數曲線的降低，只有填料一項呈現大幅度的下降，這說明了生產製備所使用的大粒徑填料，對於花費上有相當顯著的節省。

由上述高效率放大系統的需求來看，開發一個最適當的方法是事先必須準備好的工作，與分析放大的原理類似，可以先找一支分析型分離管柱 (4.6 mm ID)，將製備分離的填料充填進去，找到最佳條件之後，再以放大因子 (f) 計算最接近的製備放大狀況。雖然這個方法是便捷的，但是製備分離畢竟與分析分離所關注的焦點不同，在考慮樣品過載、提高製備產率的前提之下，選擇性因子 (α) 是第一個應該被考慮到的因素。其次，樣品的溶解度往往是產率的限制因子，故選擇適當的移動相來解決溶解度的問題就相當關鍵，這也是為什麼一般製備分離，常考慮以正相溶劑來作為移動相的原因。基於成本與環境保護的考量，溶劑回收的問題成為製備分離另外一個衍生出來的重點，所以等元 (isocratic) 梯度的方法一般較受到製備分離的青睞，而該方法在天然物純化的表現上，並不見得比二元梯度的表現還差。

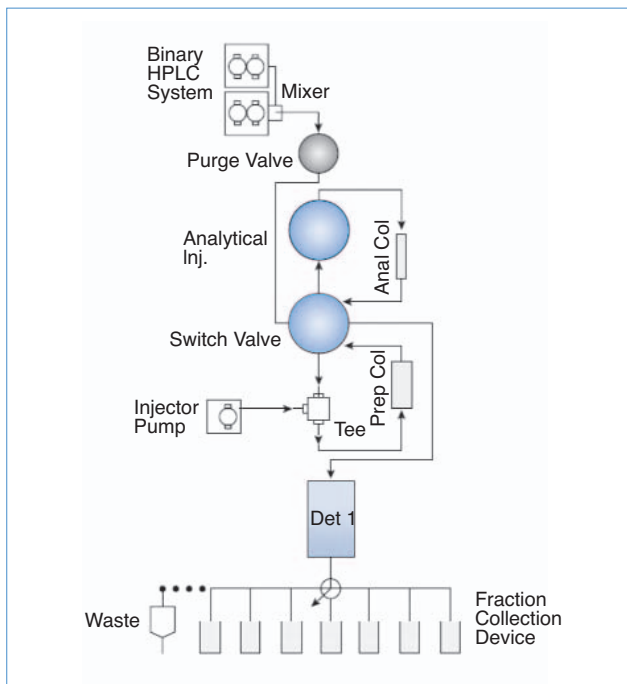


圖 12. 分析放大進樣閥流路系統。

十一、高產率放大系統硬體特徵

由於不需考慮分析放大的議題，高產率放大系統的輸液泵浦在設計上並不考慮在小流速下的使用精度，與溶劑混合比的準確度。瓦里安科技公司 PrepStar SD-2 輸液泵浦（如圖 14 A 所示），在輸液功能上提供了最高流速分別是 200 mL/min 與 800 mL/min 兩種規格的製備泵浦，它適合於高流速下操作，圖 14 是一個典型的二元高壓梯度高產率放大系統，B 部分是檢測器，C 是一個多功能的收集套件，D 是手動進樣器，E 是製備管柱，F 則是軟體控制系統。

對高產率放大系統而言，成本效益是廠家相當關切的議題，因此如何降低在硬體設計上的成本，顯得相對重要。在分析放大應用當中我們曾經提到，在流速太大的狀態下，必須以進樣泵來輔助大體積的進樣，這是一個額外的成本，但是在這個系統當中，進樣泵浦的功能由輸液泵浦來兼任，這樣的設計對於成本的降低有顯著的貢獻，而系統當中，手動進樣閥所扮演的角色，往往只是作為系統調節的功能而已，它並不具有實質進樣的用途。

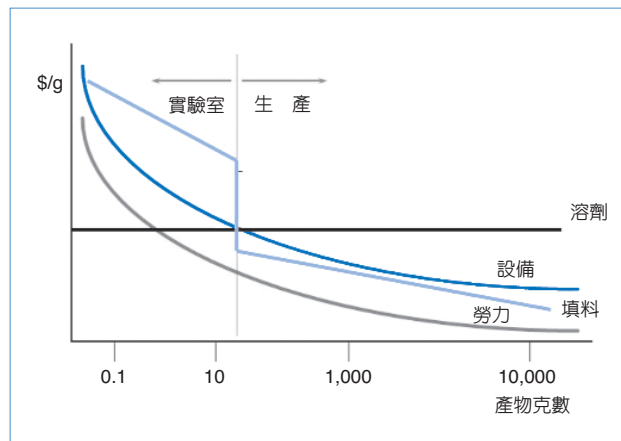


圖 13. 實驗室放大與生產系統成本比較圖。

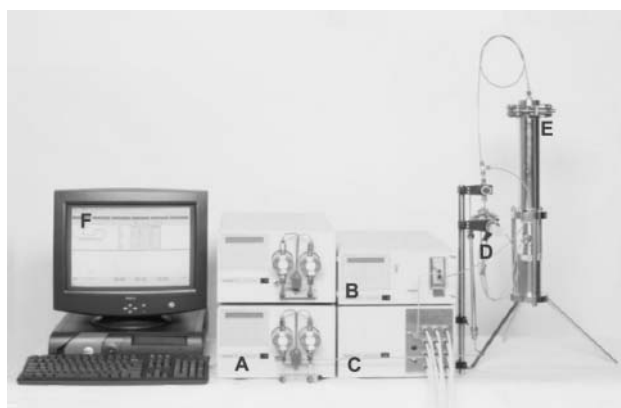


圖 14. 典型高產率放大系統。

圖 14C 可以說是該系統當中最關鍵的模組，它雖然名為收集套件，但是實質可發揮的功能，卻不僅僅是樣品的收集而已。該模組的產品型號為 PrepStar 530，它是一個複雜的切換閥系統，除了樣品收集之外，它還提供樣品進樣、溶劑選擇、樣品回收（recycle）、廢液出口與低壓梯度混液閥控制介面等功能。圖 15 所示是瓦里安科技公司 PrepStar 530 二元高壓梯度高產率放大系統的切換閥系統，圖中可清楚地看到樣品進樣是由 PA 輸液泵浦來完成，對於 PA 和 PB 兩個泵浦，PrepStar 530 各提供了四個溶劑（Solvent A1-A4, Solvent B1-B4）的應用選擇，當樣品通過管柱到達檢測器之後，不同組成即可選擇從不同的收集渠道流出（COL1-COL10），當然廢液則選擇從 Waste 閥排

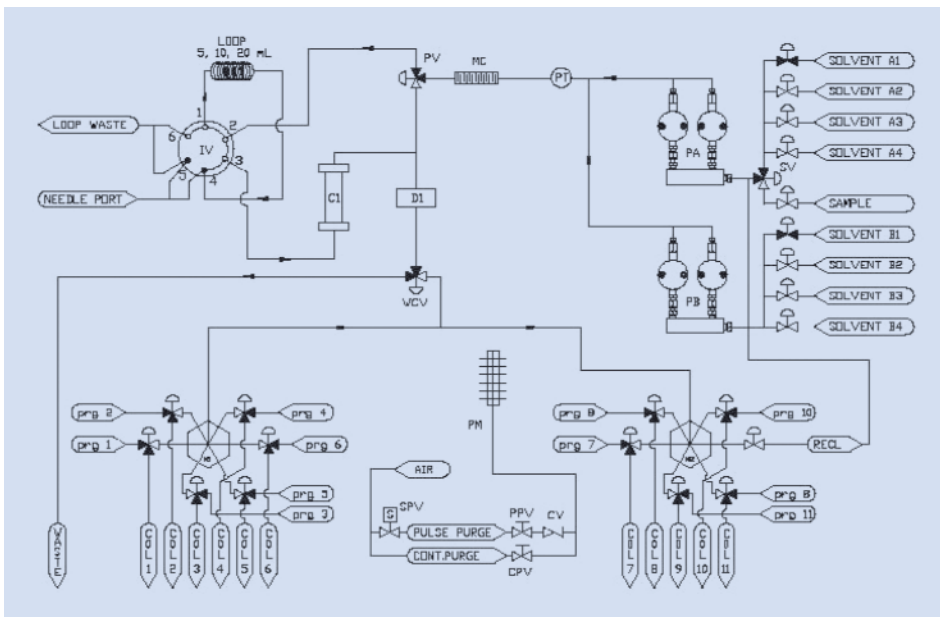


圖 15. 高產率放大系統閥件系統。

掉，此處要注意的是樣品回收功能，某一些組成在經過管柱分離之後，並無法得到很完美的分離結果，透過回收的功能，可以讓樣品再次通過管柱，以增加分離效率。

圖 15 RECL 閥是提供樣品回收使用，如圖 16 所示，在分析分離放大到製備分離的過程當中，有時因為組成之間的選擇性差，或者為了提高產率，而考慮到樣品的過載，都有可能造成不理想的分離效果，透過切割收集與循環的方式來做純化，是另外一種可行的選擇。如圖 16 的製備收集，從前端與後端都可以收到純的 a 和 b 組成，至於中間的部分，由於 ab 兩種組成並未分離，所以可以透過循環方式，再過一次分離管柱，這個時候由於樣品濃度降低，再加上管柱效率提高 (通過兩倍管柱長度)，可以讓分離效果更加完美。由這幾項功能，

我們確實可以了解分析放大和高產率放大在本質上的重點不同，前者是為了簡化分析到製備分離的程序，得到可以預測的結果，後者則是著重在高效率地提純出高純度的組成，這是系統在選擇時不能不留意的重點。

十二、生產放大系統

高產率放大系統在應用上的定位，比較偏重於毫克到公斤級的純化，也就是說在樣品純化的需求上，仍然偏重於實驗室的規模。在許多商業應用上，對於樣品的純化需求，往往超過數公斤級以上，這個時候，高產率放大系統必須再經過一次放大，而達到生產放大的尺度。一般來說，輸液泵浦的流速超過 1L/min，甚至更大的規模者，我們將

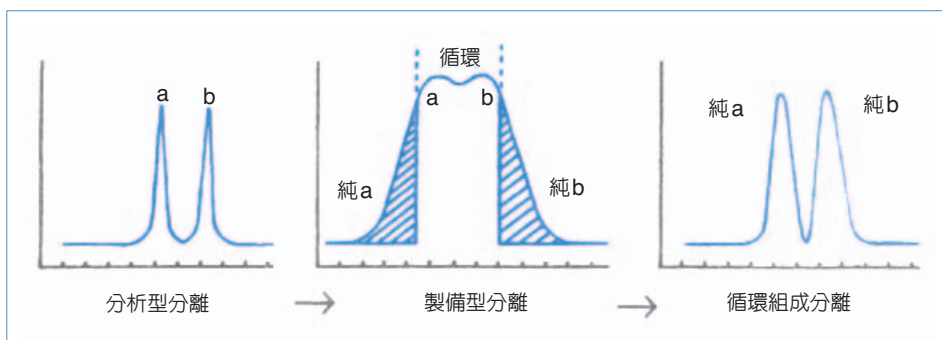


圖 16. 樣品回收循環圖例。



圖 17. 典型生產放大系統。

這一類系統規範成生產放大系統。顧名思義，這一類系統已經屬於生產設備的規範，它必須考慮到的是廠房現場的各項操作與安全性需求。就操作上來講，該設備的控制介面必須設計成遙控方式，因為在廠房的安全性設計上，必須考慮到防爆的設計，以降低意外災害發生的機率。因此對於儀器設備本身，也要做到防爆設計的要求，這一點和實驗室儀器設備的規範有所差異。再者，若是生產的產品涉及醫藥上的應用，還必須規劃完整的確效主計畫書 (validation master plan)，除了包括安裝驗證 (installation qualification)、操作驗證 (operational qualification) 與性能驗證 (performance qualification) 之外，這一類的設備由於設計上屬於客製化的系統，因此還必須檢附設計驗證 (design qualification) 計畫書。依照各國藥政主管機關的要求不同，有些國家要求製藥相關的分析與生產設備還需要符合電腦確效 (computer validation) 的要求，最令人熟知的是美國聯邦法規中，也就是 21 CFR Part 11 對電子簽章與電子文件的管理規範，不符合該規範的生產廠商，其所販售的商品將無法通過政府藥政單位的稽核。

因此對於生產放大系統而言，文件系統的建立是相當重要的一環，所以在系統採購之初，與供應商在設備的設計上就需要有充分的溝通，尤其必須先執行過載試驗，才能夠因此而得到準確的生產放大訊息。一個完整的放大訊息，對於生產放大系統

的設計非常重要，如果訊息不夠正確，可能會造成設計上過度成本的浪費。圖 17 所示的是瓦里安科技公司 Skid 生產放大液相層析系統，這樣的系統在輸液泵浦的設計上，可以達到每分鐘數十公升的流速範圍，這無疑會造成相當驚人的溶劑消耗，因此溶劑的管理也是一門不可忽視的學問。這樣的系統一般可以連接三個以上的檢測器，除了紫外光檢測器外，pH 檢測器、導電度檢測器、光二極體陣列檢測器等，都是常被使用的種類，在系統的耐壓上，一般可分成中高壓與中低壓兩種設計，端視應用的需求而定，然而耐壓需求越高，系統的成本也會隨之增加。

這樣的系統在組裝上，具有比較大的彈性，例如系統可以設計連結兩組以上的分離管柱，使流經第一支分離管柱的組成流入另一支後續的分離管柱，這樣有助於增加圖譜解析度和選擇性。此外，利用切換閥技術可讓樣品在進入第二支管柱後，利用當中分離的時間來清洗第一支管柱，節省管柱清洗的時間。在某些樣品過載的情況之下，經過第一支管柱切割下來的組成，可立即被引入第二支管柱，得到進一步的純化。類似這樣的應用彈性，在生產放大系統上，可以得到更適當的組合。目前生產放大系統已經廣泛地被應用在高附加價值組成的生產，最為人熟知的是紫杉醇，與多肽類的純化應用，由於當中涉及許多商業機密的問題，所以更多應用的相關參考文獻至今仍然相當稀少，不過我們相信，隨著天然物與中草藥越來越蓬勃的研究發展，生產放大系統所扮演的角色在將來勢必也越趨重要。

十三、製備分離管柱介紹

對於液相層析儀來說，討論儀器設備的硬體結構，其實只涉獵到系統的一部分，另外關鍵的部分就是分離管柱，好的分離管柱對系統的貢獻，絕不亞於好的硬體設備，因為組成的分離是發生於管柱裡面，它可以說與組成的分離息息相關。一般商品化 4.6 mm ID 的分析分離管柱，普遍為從事化學分析的人所熟知，然而對製備分離領域而言，由於流量、進樣量都比分析規模還大，所以製備分離管柱

在設計上，也必然遭受到與分析管柱不同的技術要求。

在分類上 Herbert⁽⁸⁾ 指出，製備型分離管柱直徑介於 25 – 150 mm 之間，大於 150 mm 的管柱則是屬於生產級的範疇，當然這一個劃分並不一定是絕對的，但是卻可以提供我們做參考。專為製備型高效液相層析系統所設計的商品化分離管柱，一般可分成兩種，第一種是事先充填好的商品化管柱 (如圖 18 所示)，另一種則是管柱充填裝置 (column packing station)，前者與分析管柱一樣，是事先充填好的，使用者買來即可立即使用，圖 18 A 是直徑為 41.4 mm 商品化製備分離管柱，B 是各種規格的保護管柱 (guard column)，C 是直徑為 21.4 mm 分離管柱，D 則是充填管柱的填料粉末。

瓦里安科技公司在其 Dynamax 製備分離管柱上，提供了一項專利的設計，它可以改善製備分離圖譜峰型的品質。我們知道製備型液相層析儀在使用上，其輸液泵浦的流速通常都比較快，在長期沖刷的情況下，分離管柱前端的填料容易出現凹陷 (如圖 19(a))，當管柱前端的填料出現異常，層析圖譜的出峰形狀就會產生拓展或是分裂的情況 (如圖 19(b))。而 Dynamax 製備分離管柱頂端有一個可供

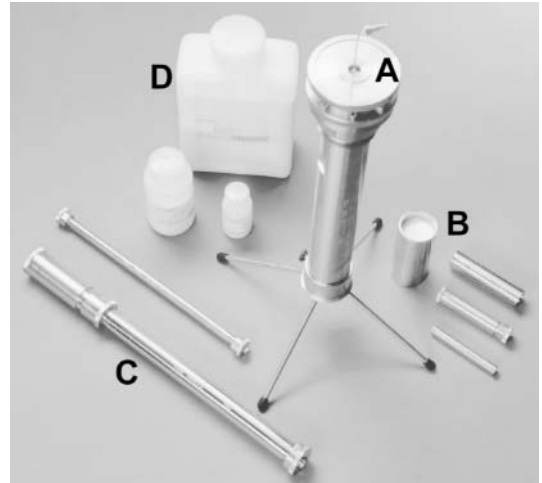


圖 18. 小型製備分離管柱。

旋轉的上蓋裝置，當使用者發現出峰形狀不理想時，可將上蓋往右旋轉 (如圖 19(c))，此時管柱的活塞 (piston) 會提供一個向下的軸向壓力 (axial compression)，消除原本凹陷的空間，令出峰更加完美 (如圖 19(d))，這對於分析放大的應用確實有很大的幫助。Cardellina 曾經報導利用 Dynamax Cyano (250 × 21.4 mm ID)，順利分開紫杉醇與另一個相當接近的類似物 cephalomannine⁽⁹⁾。

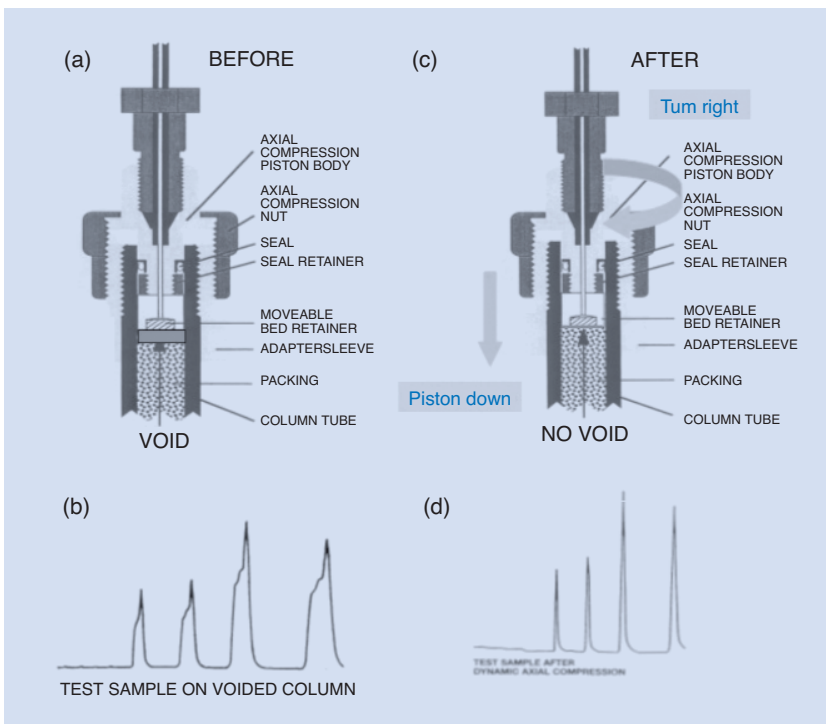


圖 19. Dynamax 製備管柱硬體設計。

十四、製備分離管柱充填裝置

雖然商品化的分離管柱相當方便，買來即可立即使用，但是對於大量的製備分離來說，卻不符合經濟效益，原因是製備分離管柱的直徑很大，裡面所充填的填料數量很多，相對的成本花費也比較高。然而在執行製備分離時，管柱的前端部分填料可能會隨使用次數的增加，而遭受到污染，如果只是因為部分污染，就將整支昂貴的管柱拋棄，那實在不符合經濟效益；所以，大量的製備分離往往借重於管柱充填裝置，來實現自我充填管柱的理念。瓦里安科技公司提供了兩種管柱充填裝置 (如圖 20 所示)，A 的商品名稱之為 RamPak™，B 則稱為 Load & Lock™，這兩款的管柱充填裝置，都提供了固定的充填技術，讓使用者可以將充填過程標準化，以維持固定的管柱充填品質。

RamPak™ 在使用上提供了動態軸相壓力 (dynamic axial compression) 的技術，其活塞推動的方向是由上往下，可以不斷維持管柱頂端填料的緊實，這一個效果與 Dynamax 製備分離管柱所強調的一致，都可以保證得到較佳的出峰解析度。但是 RamPak™ 可供選擇的尺寸比較有限，目前只提供 41 mm、77 mm、100 mm、和 150 mm 四種直徑，

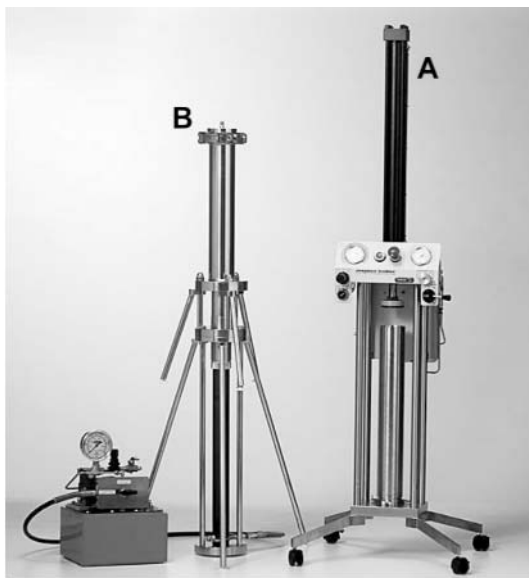


圖 20. 管柱充填裝置。



圖 21. Load & Lock™ 4010 管柱充填裝置。

而因為活塞作動的方向，也限制了 RamPak™ 管柱只能充填 60% 管柱高度。與 RamPak™ 相比，Load & Lock™ 確實展現更大的靈活性，由於活塞作動的方向是由下往上，Load & Lock™ 的管柱充填高度並未受到限制，再加上 Load & Lock™ 的尺寸可接受客製化訂作，所以，應用的層次自然比較廣泛。

圖 21 所示的是瓦里安科技公司 Load & Lock™ 4010 管柱充填裝置，其規格是 250 mm (10") ID × 1 m，A 部分是操作控制面板，B 部份是管柱不鏽鋼外管，填料經過 C 裝置充分混合震盪之後，由管柱頂端的開口倒入，再以封口蓋板將頂端開口封住 (未示於圖上)，最後驅動 D 活塞往上推擠，完成分離管柱充填作業。由於該裝置將近有三公尺高度，所以必須架設扶梯 E，以便使用者在管柱充填的操作。大型的製備管柱在製造上確實有許多關鍵的技術，值得一提的是，製備管柱在樣品的入口端需要加上一塊分配板 (distribution plate) (如圖 22 所示)。在分配板上有許多直線凹槽，當樣品從窄的管路流入管柱前端時，這塊板子可以加速樣品平均分配於管柱平面，這一個設計對於降低譜帶擴展效應居功闕偉，這也是製備分離是否成功的重要關鍵。

系 統	樣品負載量	樣品型態	典型效能	應 用
分析放大系統	Mg-g	非常複雜	低	實驗室複雜研發
高產率放大系統	Mg-kg	複雜	高	實驗室大量純化
生產放大系統	G-kg	複雜	高	大量生產

表 5.
三類製備液相層析系統關係與應用。

十五、結論

從常壓、中壓到高壓液相層析分離的發展歷史中，我們意識到了分離的議題一直在往複雜、快速以及高解析度的方向發展；正因為如此，製備系統所遭遇的問題也正日益複雜，所以分析放大系統在這樣的情況之下因應而生，它為複雜的研發分離工作，提供了相當有效益的放大預測方法，讓研究人員得以從有限的分析條件中，正確推估製備放大後的各項結果，這無疑加速了研發工作的效率，以及節省了大量條件摸索的時間與成本。由於分析放大系統是從分析過渡到製備的產物，它可視為分析與製備的橋樑，因此在設計上該系統會保留比較多分析分離的色彩，也就是說分析分離所在意的解析度、分析圖譜的品質等，也同時受到分析放大系統的重視，由於對於獲取高解析度的側重，所以分析放大系統自然必須犧牲樣品的純化效率，這就是該系統在應用上所採取的路線。然而在實際的應用範例上，越來越多藥廠以分析放大系統來作不純物的提純，或者是作標準品的製備。



圖 22. 製備分離管柱分配板。

任何研究開發的過程，其目的必然是想要獲致實際的應用成果，例如數量龐大的先導物質篩選，其最後目的僅僅是為一兩種新藥的產生作準備。所以我們可以預期的是，分析放大系統所支持的研發成果，最後必然會延伸到高效率放大系統甚至生產放大系統，以實現大量純化。在先進國家當中，越來越多高附加價值的藥物生產仰賴製備型高效液相層析系統來完成，原因是高效液相層析法能夠保證製造商獲取更高純度的產物，而在醫藥的應用上，藥品的高純度要求所代表的意義是安全性、是療效，更是市場價格與商業競爭力的指標。表 5 整理了三類系統在應用上的特徵，也為本文作一簡單的總結。

參考文獻

1. M. S. Tswett, *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci.*, 14 (1903).
2. C. Still, W., Kahn, and M. Mitra, *A. J. Org. Chem.*, **43**, 2923 (1978).
3. G. Guiochon and A. Katti, *Chromatographia*, **24**, 165 (1987).
4. A. W. J. DeJong, H. Potter, and J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, **148**, 127 (1978).
5. RPW Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr.*, **119**, 467 (1976).
6. K. Jones, *Chromatographia*, **25**, 547 (1988).
7. G. Franke and F. Verillon, *J. Chromatogr.*, **450**, 81 (1988).
8. N. R. Herbert, In: *Subramanian G(ed) Preparative and Process-Scale Liquid Chromatography*, New York: Ellis Horwood, 10 (1991).
9. J. H. Cardellina, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 659 (1991).

- 周泳杉先生為國立陽明大學生化碩士，現任美商亞洲瓦里安科技股份有限公司藥物分析市場專案經理。
- Yun-Shan Chou received his M.S. in biochemistry from National Yang-Ming University. He is the pharmaceutical project manager at Varian Technologies Asia, Inc.