

分析スケール分取精製システムの高機能化

- 384 ウェルプレートへの直接分取 -

著者

澤田 浩和
林 慶子
野田 莉帆

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

分取 LC は、複雑な混合物から目的成分を単離精製するための欠かせない手段です。一般的な分取 LC では、内径 20 mm 以上の分取用カラムを使用し、移動相流速も数十 mL/min 以上を送液可能なシステムを使用します。一方で試料量が制限される場合や、分析目的で HPLC または UHPLC の分離を維持しつつ分取を行いたい場合は、分析スケールで条件を最適化する必要があります。本アプリケーションノートでは、分析スケール HPLC システムにフラクションコレクタを接続したシステムを用い、捕集容器にはフラクション容量の小さい 384 ウェルプレートを使用し、その適合性を検証しました。

測定システム

Agilent 1260 Infinity II LC システム
 G7111B クォータナリポンプ
 G7129A バイアルサンプラ
 (カラムコンパートメント内蔵)
 G7115A ダイオードアレイ検出器
 G1364F 分析スケールフラクションコレクタ
 (0.15 mm インナーチューブ使用, p/n G1364-68601)
 Agilent OpenLab 2.8 ソフトウェア

試料調製

384 ウェルプレートへのフラクション性能を確認するための試料として、3 種類の色素を含む Agilent Delay and Checkout Calibrant (p/n : 5190-8223) を使用しました。LC 分析前にこの溶液をメタノールで 2 倍希釈しました。

分析条件

分析条件を表 1 に示しました。HPLC カラムは内径 3.0 mm、長さ 100 mm の Agilent Pursuit XRs 3 C18 カラムを用いました。フラクションの捕集容器として 384 ウェルプレートを使用しました。

表 1. 分析条件

| | |
|--------|---|
| カラム | Pursuit XRs 3 C18 内径 3 mm x 長さ 100 mm (Agilent p/n A6001100X030) |
| 移動相 | A : 0.1 % ギ酸水溶液 B : アセトニトリル |
| 移動相流量 | 0.5 mL/min |
| グラジエント | 表 2 参照 |
| カラム温度 | 40 °C |
| 注入量 | 3 µL |
| 検出波長 | 410 nm |
| 捕集容器 | 384 ウェルプレート (Agilent p/n 5043-9315) |

表 2. グラジエント条件

| 時間 / min | %B |
|----------|----|
| 0 | 12 |
| 6 | 95 |
| 10 | 95 |

結果

ディレイボリウムキャリブレーション

分取精製のスケールに関わらず、検出器とフラクションコレクタ間のディレイボリウムを正確に把握することは、高回収率の分取を実現する上で極めて重要です。アジレントのすべてのフラクションコレクタにはディレイセンサ (図 1) が内蔵されており、オートサンプラから注入した色素サンプルをピークとして検出することができます。

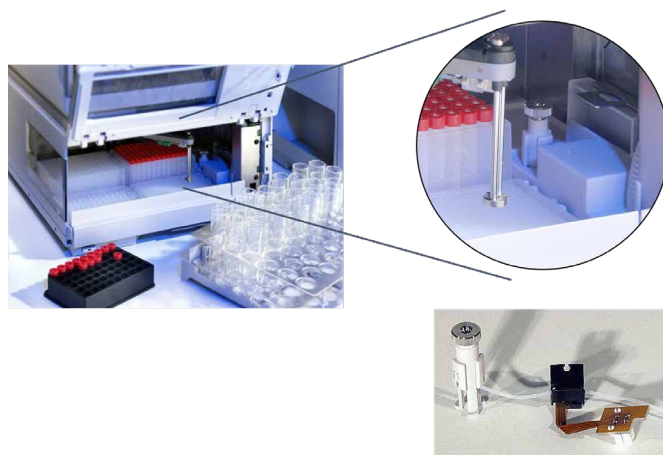


図 1. 分析スケールフラクションコレクタとディレイセンサ (右下)

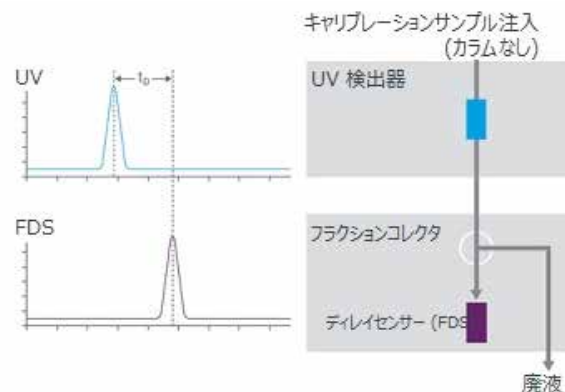


図 2. ディレイボリウムキャリブレーションの概念図

図 2 にはディレイボリウムキャリブレーションの概念図を示します。カラムなしの状態でもオートサンプラから注入されたキャリブレーションサンプル (色素サンプル) を UV 検出器およびフラクションコレクタでピークとして検出することができます。これにより正確なディレイタイムを実測することが可能になります。図 3 には、本システムでのディレイボリウムキャリブレーションの結果を示しました。検出器とフラクションコレクタ間の時間差を実測し、その結果からディレイボリウムを自動算出します。また、正確なディレイボリウムを知ることができるのみでなく、フラクションコレクタでの試料バンドの拡散の程度をあらかじめ視覚的に確認することも可能になります。

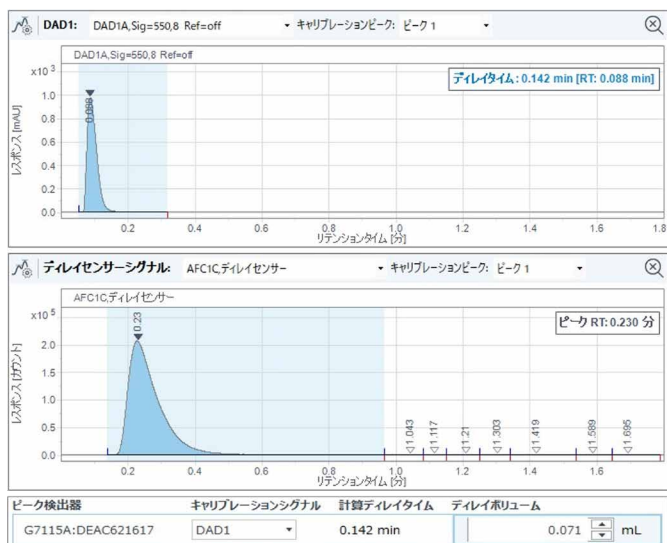


図 3. デレイボリュームキャリブレーション結果
(上: UV 検出器 下: フラクシオンコレクタ)

384 ウェルプレートへのフラクシオン

デレイキャリブレーションでも使用した 3 種類の色素混合サンプルを表 1 の条件で分析しました。得られたクロマトグラムを図 4 に示しましたが、検討した分析条件下で 3 種類の色素は良好に分離できました。これをピークトリガー条件 (スレッシュホールドのみ、214 mAU 以上、最大ピーク採取時間 20 秒) で、384 プレートへのフラクシオンを行い、その結果も図 4 に示しました。

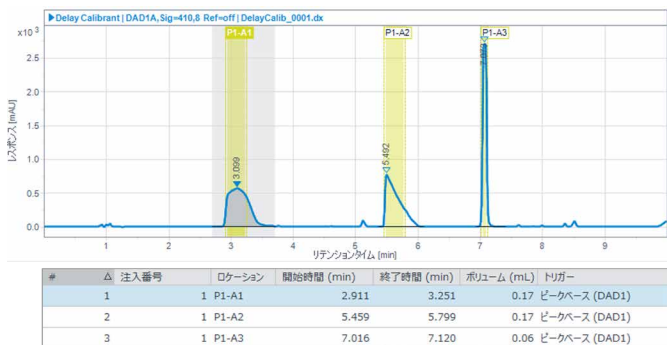


図 4. Agilent Delay and Checkout Calibrant (3 種色素混合溶液) の UV クロマトグラムと分取結果

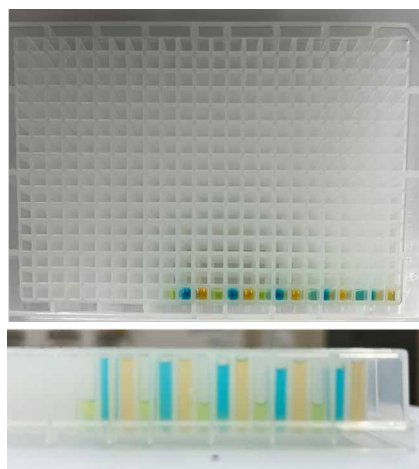


図 5. Agilent Delay and Checkout Calibrant (3 種色素混合溶液) の連続 5 回分析の 384 プレートへのフラクシオン

図 5 には実際に Agilent Delay and Checkout Calibrant (3 種色素混合溶液) の連続 5 回分析を行った際に各成分を分取した 384 プレートの写真を示しました (計 15 フラクシオン)。非常に小さいウェル容量ながら (今回の場合 180 μ L)、正確に各ウェルにフラクシオンされていたことが分かりました。

まとめ

分析スケールフラクションコレクタを接続した Agilent 1260 Infinity II LC システムにおいて、捕集容器としての 384 ウェルプレートの適合性を確認しました。3 種の色素混合溶液を用いて検証した結果、分析スケールの流量域で 384 ウェルプレートが使用可能であることが分かりました。今回のような比較的低流速領域において、一般的なバイアルや 96 ウェルプレートに加え、捕集容器の選択肢の幅をさらに広げられることが確認できました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE19589528

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, May 8, 2024
5994-7460JAJP