

分析スケール分取精製システムの高機能化

- 界面活性剤の高回収率分取とフラクション再分析 -

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、このシステムを界面活性剤の分取に適用しました。捕集容器にはフラクション容量の小さいマイクロチューブを用いて、分取したチューブをそのまま LC/MS での再分析に供しました。

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
 G7167A マルチサンプラ
 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 CDS 2.8 ソフトウェア

試料調製

ディレイボリウムキャリブレーションには、Agilent 分取精製システム用ディレイおよびチェックアウトキャリブプラント (p/n : 5190-8223) を使用しました。試料として、界面活性剤の Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) を使用し、これをメタノールに溶解し、2 (w/v)% 濃度に調製し分析に供しました。

分析条件

分析条件を表 1 に示しました。HPLC カラムは内径 4.6 mm、長さ 250 mm の Agilent ZORBAX SB-C3 カラムを用いました。フラクションの捕集容器として今回は 1.5 mL 容量のマイクロチューブを使用しました。

表 1. 分析条件

カラム	ZORBAX SB-C3 内径 4.6 mm x 長さ 250 mm, 5 μm (Agilent p/n 880975-909)
移動相	A : 水 B : メタノール
移動相流量	1 mL/min
グラジエント	表 2 参照
カラム温度	40 °C
注入量	10 μL
検出波長	276 nm

表 2. グラジエント条件

時間 / min	%B
0	55
1	55
35	70
50	80

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うえで極めて重要です。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。

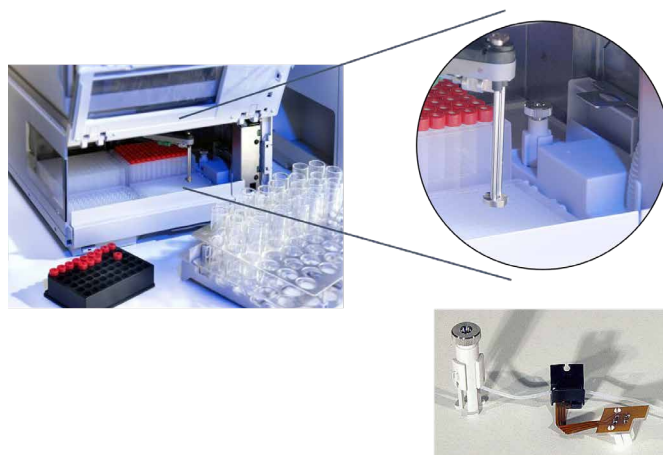


図 1. 分析スケールフラクションコレクタとディレイセンサ (右下)

図 2 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。

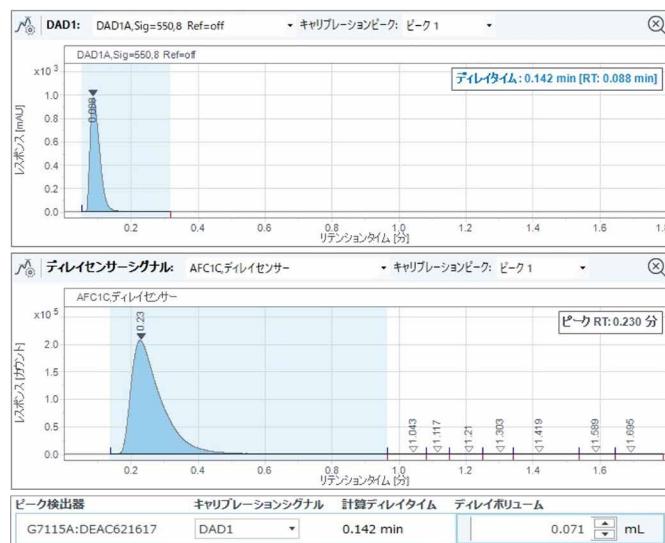


図 2. ディレイボリウムキャリブレーション結果
 (上: UV 検出器 下: フラクションコレクタ)

界面活性剤の分析スケール分取

図3には表1および表2に示した条件で Triton™ X-100 を分離し、ピーク強度の強かった二つのピークを分取した結果を示しました。この時フラクションは1.5 mLのマイクロチューブに採取しました(図5)。

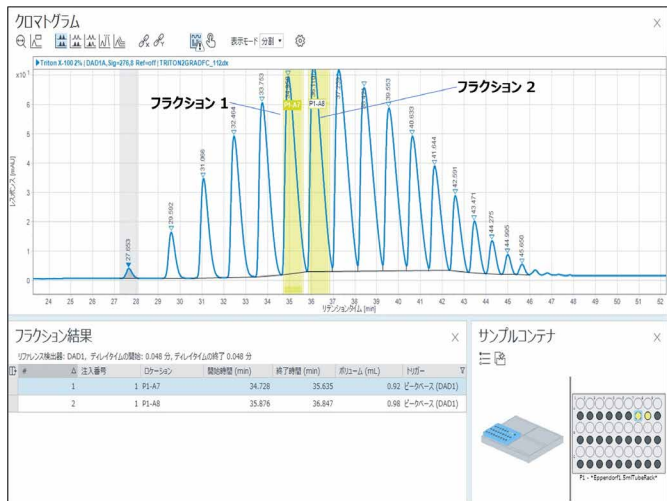


図3. 界面活性剤 (Triton™ X-100, 2 (w/v)% メタノール溶液) の UV クロマトグラムと分取結果. 分取条件: ピークトリガー (スレッシュホールド 241 mAU 以上) タイムテーブル併用

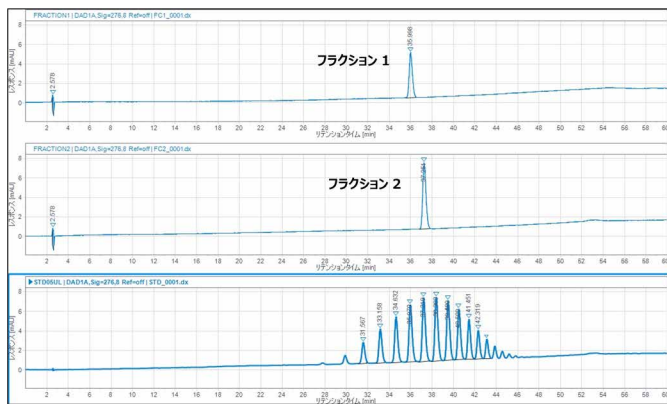


図4. 図3で得られたフラクションの再分析. 分析条件は図3と同じ
注入量: 50 μ L (最下段未分取サンプルは 0.5 μ L)

マイクロチューブに採取したフラクションをそのまま LC のオートサンブラにセットし、再分析した結果を図4に示します。得られたピーク面積値から回収率を算出したところ、フラクション1で85%、フラクション2で96%の高回収率が得られました。また、近接ピークの混入は確認されませんでした。

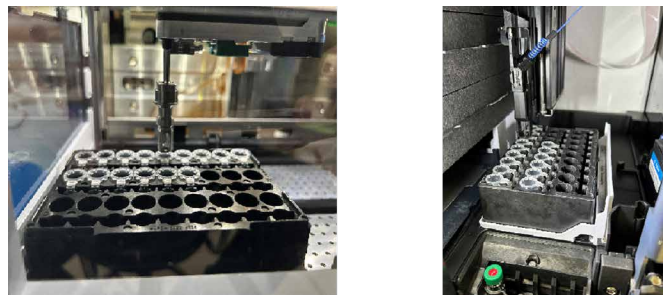


図5. マイクロチューブへの直接捕集 (左: フラクションコレクタ内部) と捕集トレイを直接使用した再分析 (右: オートサンブラ内部)

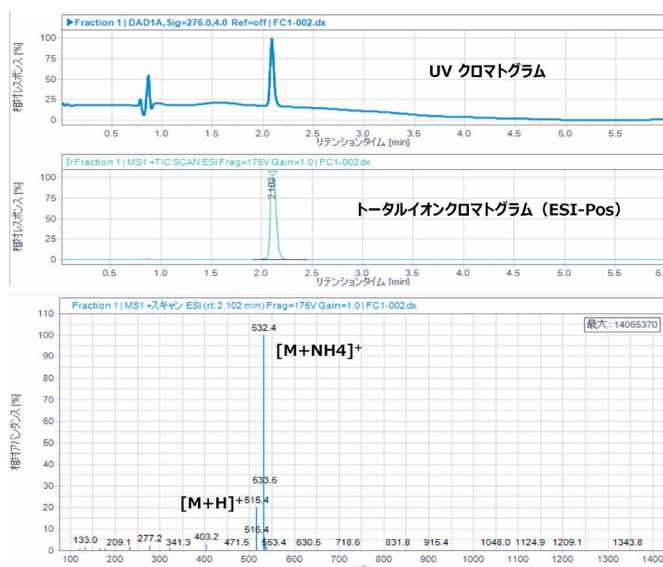


図6. 図5で得られたフラクション1の LC/MS による再分析
カラム: Agilent ZORBAX SB-C3 (3.0 x 100 mm, 1.8 μ m), 移動相: 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液/メタノール (グラジエント), 流速: 0.6 mL/min,
MS: Agilent InfinityLab LC/MSD iQ, イオン化: ESI-Positive, 注入量: 10 μ L

分取したフラクション1をシングル四重極 LC/MS で再分析したところ、図6の結果が得られ、この結果からフラクション1は重合度7の Triton™ X-100 であることも容易に確認できました。

まとめ

分析スケールフラクションコレクタを接続したアジレント 1260 Infinity II LC システムにおいて、その分取性能を界面活性剤の分取を行い確認しました。その結果、高い回収率が得られ、かつそれぞれのフラクションに近接するピークの混入は確認されませんでした。フラクションをマイクロチューブに捕集し、その容器を直接 LC および LC/MS での再分析のシステムに適用し、容易に再分析を行うことが可能でした。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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。

DE92940974

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, July 29, 2024
5994-7672JAJP