



全自動サンプル前処理 HPLC による 微量不純物の精製と濃縮



<要旨>

混合試料中の微量成分を単離する際に分取精製 HPLC が多用されます。分取精製 HPLC では内径の太いカラムを用いることにより、試料負荷量を増やすことができるメリットがありますが、移動相を高流量で送液するため、分画が希釈されるデメリットもあります。そこで本アプリケーションノートでは分取後オンライン濃縮を行うシステムを構築し、自動で高純度かつ高濃度の試料を得る前処理を検討、濃縮効果などを評価しました。

Key Words: 分取精製、濃縮、自動化、脱塩、前処理

1. はじめに

天然物や医薬品不純物など、混合試料に含まれる微量成分を単離する際に分取 HPLC システムが多用されます。通常の HPLC と比較すると内径の太いカラムに対し大量の試料を導入できることから、より多くの微量成分を高精度にかつ効率的に単離精製することが可能です。しかし高流量の移動相によりターゲット化合物ピークは希釈され、採取された画分は手作業による濃縮や再調整などが必要になるケースもあります。

そこで本アプリケーションノートでは不純物として 1%のカフェインを添加したアセチルサリチル酸溶液を試料とし、分取後オンライン濃縮を行うシステムを構築し、自動で高純度かつ高濃度の試料を得る前処理を検討し、濃縮効果などを評価しました。

2. システム構成及び実験条件

図 1 にシステム構成を示しました。大別すると二つのシステムから構成され (① 分取システム ② 捕集&溶出システム)、以下のステップで操作します。

① 分取システム：

試料の大量注入と単一ピークの繰り返し分取

② 捕集&溶出バルブシステム：

- i. ①の試料を捕集カラムに導入 (図 2. 捕集)
- ii. 捕集カラムから溶出させ分取 (図 2. 溶出)

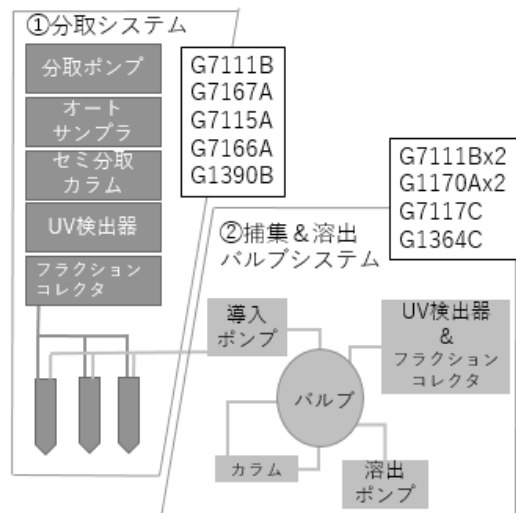


図 1. システム構成

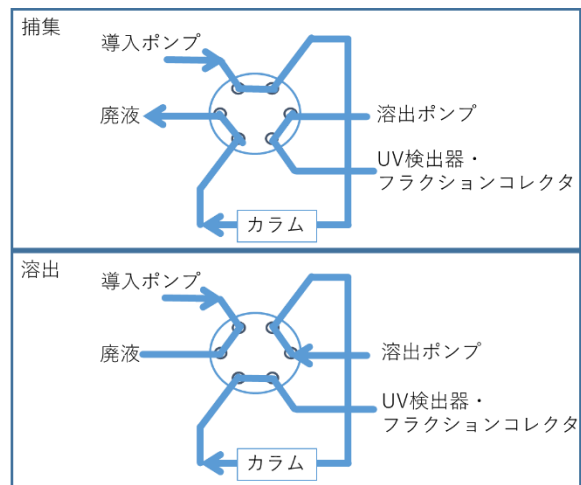


図 2. 捕集&溶出バルブシステム構成図



システムの評価には 1000 mg/L アセチルサリチル酸、10 mg/L 無水カフェインをアセトニトリルに溶解した試料を使用しました。

表 1. 分析条件

セミ分取HPLC条件	
流速	5 mL/min
移動相	0.2% phosphoric acid/Acetonitrile=60/40
カラム	ZORBAX SB-C18, 9.4x 150 mm, 5 μm
カラム温度	室温
注入量	100 μL
UV検出器	237/4 nm, 360/100nm
フラクションモード	Time Based
捕集条件	
捕集カラム	ZORBAX SB-C18, 4.6x 150 mm, 5 μm
試料希釈率	15%
流速	3 mL/min
捕集時間	18 min
溶出条件	
移動相A	水
移動相B	アセトニトリル
流速	1.0 mL/min
グラジエント	0 %B(0 min) -> 95%B(1 min)
フラクションモード	Peak Based
ソフトウェア	OpenLAB ChemStation edition C01.07SR3

セミ分取 HPLC 条件では短い分析時間内にターゲットピーク（カフェイン）とメインピーク（アセチルサリチル酸）が分離する分析条件を作成しました。これにより分取に用いる移動相を削減でき、採取される画分に含まれるターゲット化合物の総量を増やすことが可能です。

採取された画分を逆相系カラムに捕集する際に、カフェインとともに分取された溶離液の有機溶媒比率を希釈により下げる必要があります。ここでは水で希釈しながら捕集カラムに捕集し、カラム濃縮を行いました。

カラムに捕集されたカフェインピークを高回収率で溶出するため、ピークベースフラクション（UV トリガー）モードで分取しました。

1次元目のセミ分取 HPLC ではリン酸を用いた分取を行いました。捕集・溶出には移動相に添加剤を含まない水とアセトニトリルを使用しました。分離向上のためやむを得ず不揮発性移動相を用いる場合がありますが、本システムでは捕集や溶出

の際にそれらを除く（脱塩）することができます。

3. 結果及び考察

試料を 100 μL 注入し 5 回繰り返し分取しました。このときのクロマトグラムを図 2 に示しました。このときのカフェインピークの面積は 240(mAU*s)でした。

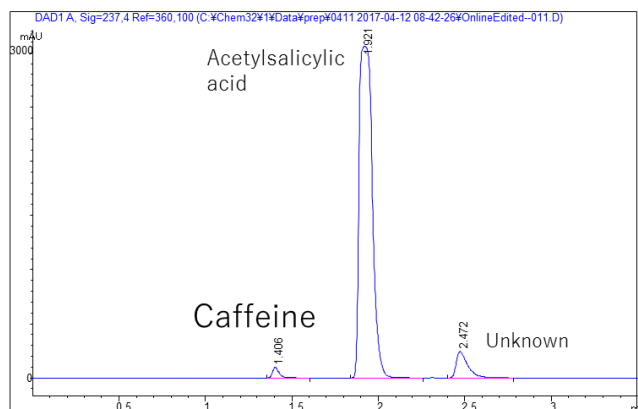


図 2. 分取を行った際のクロマトグラム

分取した画分を図 2 同様に 100 μL 注入し分析しました（図 3.B）。分取画分はカフェインピークのみが採取されていますが、試料を注入したクロマトグラム（A）と比較すると多量の移動相の影響で希釈され、ピーク強度は小さくなりました。分取画分にはターゲット化合物だけでなく、移動相として用いたリン酸も含まれており、そのまま濃縮すると NMR スペクトルやマススペクトルの採取には不向きです。そこで捕集・溶出では水とアセトニトリルを用いました。

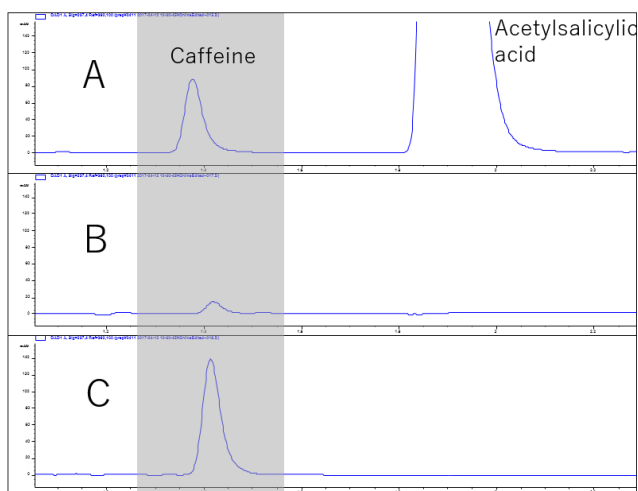


図 3. 分取時 (A)、分取後 (B) 及び濃縮後 (C) クロマトグラム

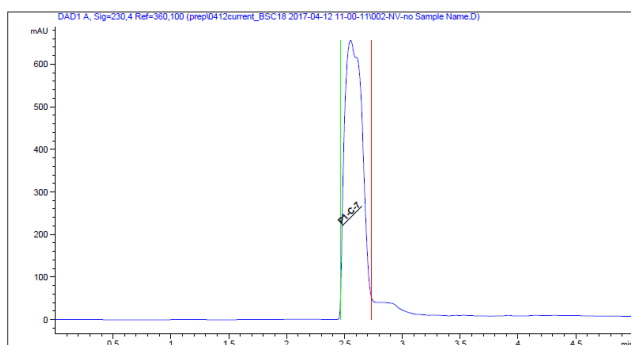


図 4. 溶出時のクロマトグラム

溶出の際のクロマトグラムを図 4 に示しました。5 回繰り返し測定、5 mL/min（セミ分取）から 1 mL/min（分析スケール分取）へのスケールダウンにより理論的には 25 倍濃縮されていると考えられます。濃縮後分取された画分は 293 μ L でしたが、確認のため再度 HPLC で分析しました（図 3.C）。このときの面積値は 385(mAU*s)でした。これらの結果から算出すると 94%の回収率で精製及び濃縮が行われたという結果が得られました。

[回収率：(濃縮後面積 x 採取量/注入量) / (分取時面積 x 繰り返し回数) x100]

4. まとめ

単一成分の精製に適切な分取及びオンライン濃縮バルブシステムを組み合わせた全自動前処理システムを開発しました。繰り返し分取、捕集（濃縮）及び溶出（再分離を含む）を全自動に行うことが可能です。比較的親水性が高いカフェインをターゲットピークとし、回収率を求めたところ、94%と良好な回収率となりました。

【LC-201706HK-001】

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies