



# 全自動サンプル前処理 HPLC によるクロルヘキシジン不純物の精製、濃縮及び再精製



## <要旨>

分取 HPLC では移動相を大量に使用するため分析時間に比例しランニングコストが高くなります。本アプリケーションノートではメイン化合物のショルダーピークをターゲットとし、夾雑を含むフラクションを採取しました。カラム濃縮後、溶出時にグラジエント分離を行うことにより、夾雑成分を除去し、ターゲットピークのみを分取精製しました。本システムにより従来の分取システムよりも高濃度かつ高純度の試料を得ることが可能でした。

Key Words: 分取精製、前処理、高純度、高濃度

\*\*\*\*\*

## 1. はじめに

分取 HPLC システムは比較的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、高収量の分取画分を得ることが可能です。大量の移動相を使用するため分析時間が長くなるとランニングコストが高くなりますが、分離が不十分の場合、得られる画分の純度が低下します。また、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繰り返し分取により得られた画分をカラム濃縮し、再溶出の際にグラジエント分離を行うことにより、高濃度かつ高純度の最終画分を得るための前処理システムを構築し分析を行いました。

## 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。二つのシステムで 3 つのステップを行いました。

### 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)

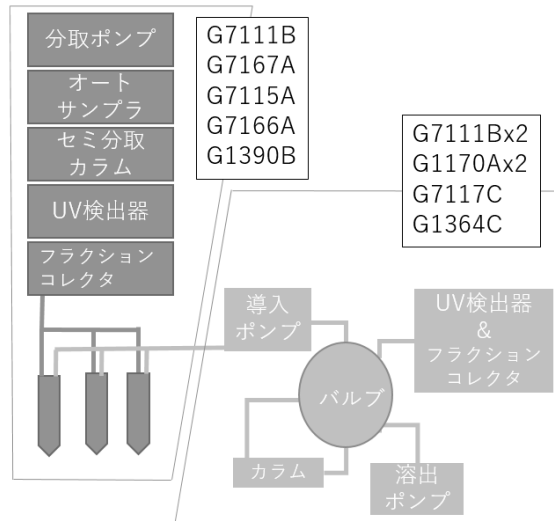


図 1. システム構成

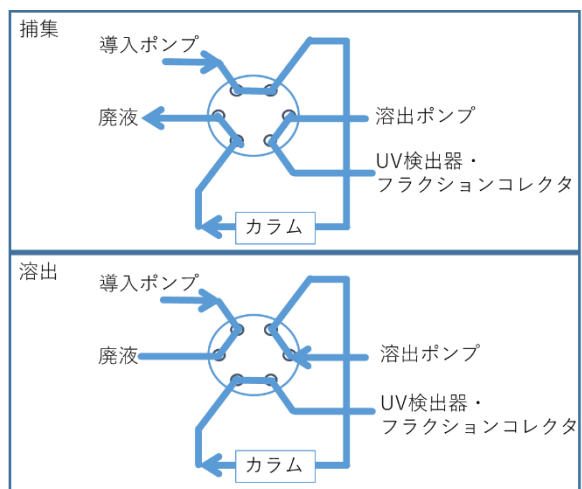


図 2. 捕集&溶出バルブシステム構成図



このシステムの評価には生化学実験グレードのクロルヘキシジンを用いました。

表 1. 分析条件

セミ分取HPLC条件	
流速	5 mL/min
移動相	0.1% formic acid in Water/MeOH=30/70
カラム	ZORBAX SB-C18, 9.4x 150 mm, 5 μm
カラム温度	室温
注入量	80 μL (0.2g/mL Chlorhexidine)
UV検出器	275/4 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 50 mm, 3.5 μm
試料希釈率	30%
流速	5 mL/min
捕集時間	10 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(5 min)
フラクションモード	Peak Based
ソフトウェア	OpenLAB ChemStation edition C01.07SR3

2 μL 注入により分取 HPLC 条件を最適化しました。短い分析時間内にピークを分離することにより溶媒消費量を最小化します (①)。採取された画分を逆相系カラムに捕集しました。このとき高回収率を目的とし、ターゲットピークとともに分取された溶離液を希釈しながら送液しました (②-i)。捕集された化合物は再度グラジエント溶離により単一ピークに分離され、分取されます (②-ii)。

### 3. 結果及び考察

図 3 に示すように 2 μL 注入では各ピークが良好に分離されましたが、80 μL 注入では過負荷の影響でピークがブロードになりターゲットピークとメインピークが一部共溶出しています。この画分を 10 回繰り返し分取し、得られた分取画分を再度分析したところ、ターゲットピークの存在比が高くなったものの、クロルヘキシジンピークの混入が確認されました (図 4 参照)。このようにランニングコストと収量を最適化すると、分取画分の純度が落ち、その後の過程の (NMR 分析な

ど) 精度に影響を与えます。また、ターゲットピークは分取の際に希釈され、濃度が低くなります。そのため、更なる処理として濃縮や再精製を行うことにより高純度・高濃度の試料を得ることが重要です。

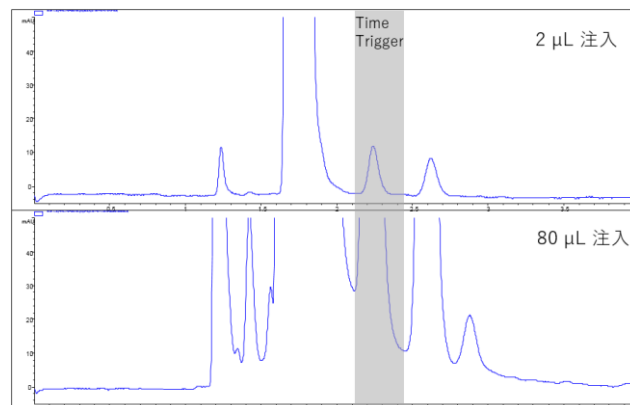


図 3. 2 μL および 80 μL 注入のクロマトグラム

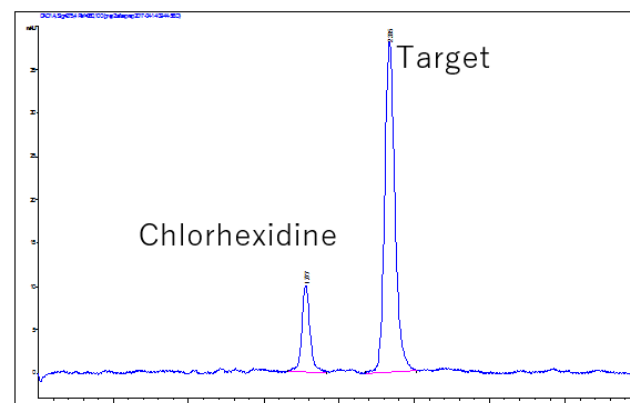


図 4. 分取後画分のクロマトグラム

捕集カラムへの導入の際に、回収率を上げるため得られた画分を水で希釈しながら送液しました。今回は 30% の希釈率で良好に保持されました。カラムへ保持されたターゲット化合物の溶出の際に夾雑との分離を行うことが可能なグラジエント条件を設定しました。最終画分は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。



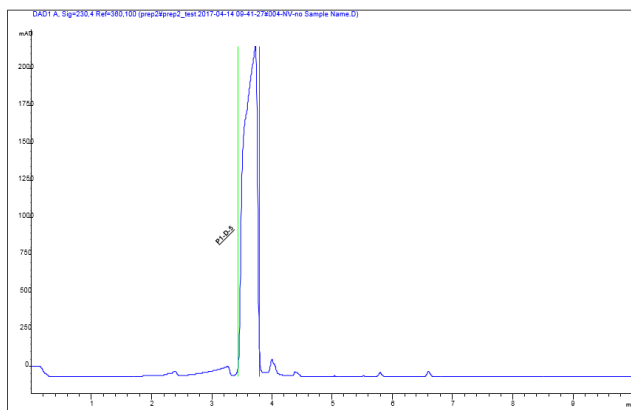


図 5. 溶出時のクロマトグラム

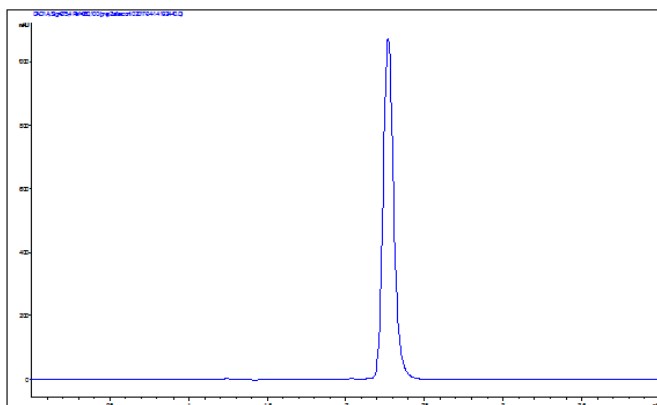


図 6. 最終画分を再分析したクロマトグラム

分取後と最終画分（図 4 と図 6）のクロマトグラムを比較すると約 30 倍（面積値）の濃縮が行われ、混入したメインピークの除去が行われたことが明らかになりました。

#### 4. まとめ

ランニングコストが高い分取 HPLC において分離とスループットの調節が必要な場合がありますが、本システムでは分取の際にやむを得ず混入する夾雑ピークを分離し、かつターゲットピークの濃縮を行い、高純度・高濃度の最終画分を得ることが可能でした。

#### 【LC-201706HK-002】

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