

Agilent Infinity II 分取精製システムを使用したピークトリガー分取



Authors

野田 莉帆

林 慶子

澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

複雑な混合物である試料を分取精製する際に、用途や目的により、複数波長による UV 検出が有効なケースがあります。複数波長の組み合わせにより、網羅的、または選択的なピーク検出が可能となります。

また、分析条件によって、ピーク形状やベースラインが変化することがあります。そのような場合には、特定の時間ごとにピーク検出の設定を変更することで、より適切なピークの分取が可能となります。

本アプリケーションノートでは、Agilent Infinity II 分取精製システムを用いて、複数波長を用いたピークトリガー分取およびタイムテーブルを用いてピークトリガーを最適化した例を紹介します。

Key words： 分取精製、ピークトリガー

システム

システム

1260 Agilent Infinity II HPLCシステム
1260 Infinity II Quaternary Pump (G7111B)
1260 Infinity II Multisampler (G7167A)
1260 Infinity II Diodearray Detector (G7115A)
1260 Infinity II Fraction Collector (G1364F)
OpenLAB CDS ChemStation C01.08

複数波長を用いたピークトリガー分取

複雑な混合物である試料を分取精製する際に、用途や目的により、複数波長によるUV検出が有効なケースがあります。複数波長でのデータ採取により、単一波長では検出できなかったピークの検出が可能になり、ピークの取りこぼしを回避することができます。また、ターゲット化合物に特異的なUVクロマトグラムを採取することで選択性の高い検出が可能です。

分析条件

表1. 分析条件

HPLC	
移動相A	0.1%ギ酸
移動相B	アセトニトリル
流速	5.0 mL/min
グラジエント	10%B (0min)→95%B (5min)
分析時間	5分 (ポストラン2分)
カラム	ZORBAX SB-C18, 9.4×150 mm, 5μm (P/N:728975-302)
カラム温度	室温
注入	1μL
検出	A: 600 nm, B: 500 nm, C: 400 nm, D 310 nm

試料

Agilent Delay and Checkout Calibrant (P/N:5190-8223)を分析に供しました。この溶液はpatent blue VF sodium, sudan orange G及びsunset yellow FCFの2 mg/mLのDMSO溶液です。

Patent blue VF sodium は 600 nm に、Sudan orange は 500 nm に、Sunset yellow FCF は400 nm に吸収を持ち、310 nm では全ての色素が検出されます。

トリガー設定

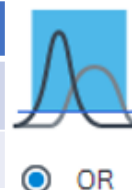
ピークトリガーの設定を表2、3に示します。

条件①では、青色色素と橙色色素を分取するために、シグナルA 600 nm,および シグナル B 500 nm をトリガーシグナルとして使用しました。

トリガーの設定は表2に示すとおりで、ピーク検出の組み合わせはORとしました。ORの場合は、どちらかのシグナルでピークが設定値を越えると分取が行われます。

表2. 条件① 網羅的なピークトリガー

Signal	A 600 nm	B 500 nm
ピーク検出モード	Threshold	Threshold
Threshold	100mAU	100mAU

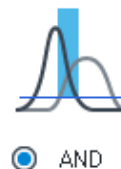


条件②では、青色色素のみを選択的に分取するために、シグナルA 600 nm及びシグナルD 310 nmを使用しました。

トリガー条件は表3に示す通りで、ピーク検出の組み合わせにはANDを用いました。ANDの場合は、トリガーとして使用した全てのシグナルで設定値を越えた時のみ分取が行われます。

表3. 条件② 選択的なピークトリガー

Signal	A 600 nm	D 310 nm
ピーク検出モード	Threshold	Threshold
Threshold	100mAU	100mAU



結果

本分析条件におけるクロマトグラムを図1に示します。

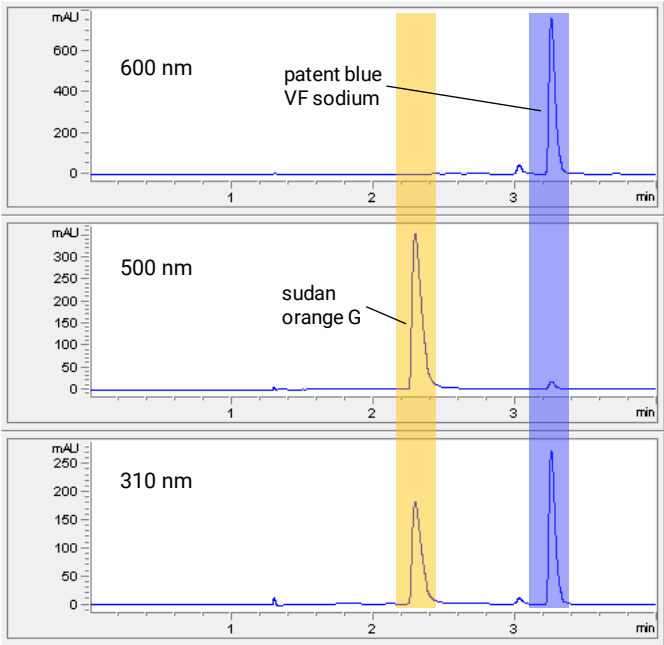


図1. 色素混合液 クロマトグラム

600 nm, 500 nm ではそれぞれの色素の特異的な検出が、310 nmでは全ての色素が検出されていることが確認できました。

条件①分取結果

フラクションの結果画面を図2に示します。シグナルA 600 nmで100mAU を超えた青色色素と、シグナルB 500 nmで100mAU を超えた橙色色素がそれぞれ良好に分取されました。

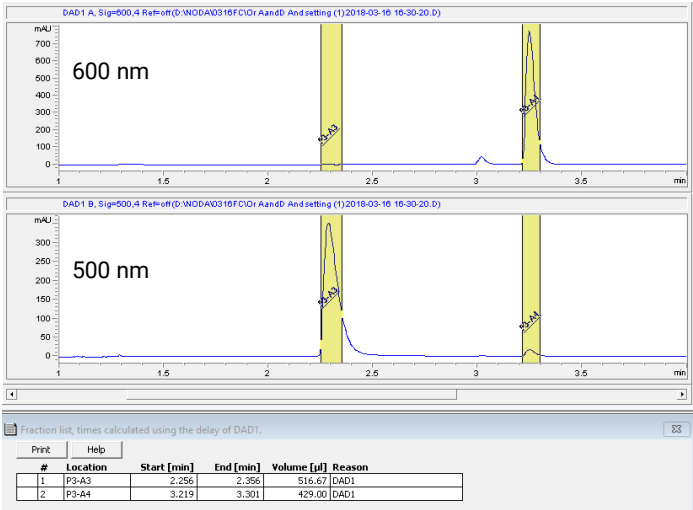


図2. 条件① フラクション結果画面



図3. 条件①分取バイアル

条件②分取結果

条件②におけるフラクションの結果画面を図4に示します。シグナル A 600 nm で 100 mAU 以上、かつシグナル B 310 nmで100 mAU 以上のシグナルを得た、青色色素のみが良好に分取されました。

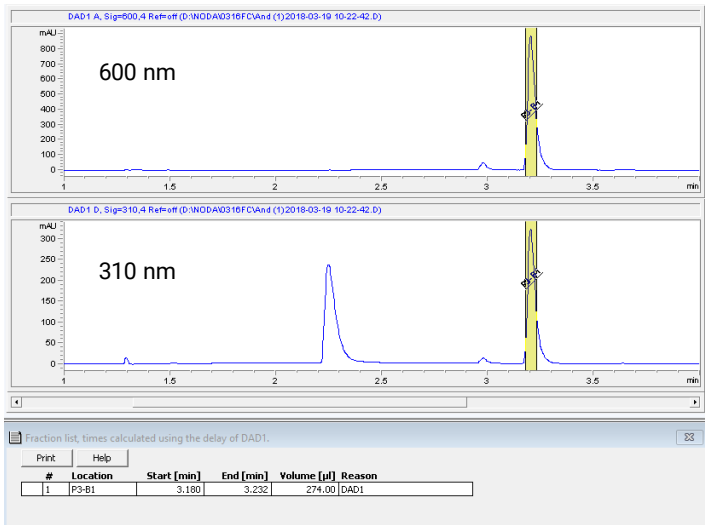


図4. 条件② フラクション結果画面

まとめ

色素混合サンプルを用いて、複数波長を用いたピークトリガー分取を行いました。複数波長をトリガーとすることにより、単一波長では難しい、網羅的なピーク分取を行うことが出来ました。また、複数波長をピークトリガーとして設定することでより、選択性の高いピーク分取を行うことも可能であることが示されました。

タイムテーブルを用いたピークトリガーの最適化

アイソクラティック条件では、一般的に溶出時間の早いピークはシャープに、溶出時間の遅いピークはブロードになる傾向にあります。

また、グラジエント分析において、UV検出器で短波長を用いる場合、移動相にギ酸やメタノールなどを用いると、移動相組成に伴いベースラインが変動することがあります。

これらの場合には、タイムテーブルを用いてピークトリガーの設定を変更することで、全てのピークを良好に分取することが出来ます。

分析条件

アイソクラティック条件を分析条件③、グラジエント条件を分析条件④としました。

表4. 分析条件③（アイソクラティック分析）

HPLC	
移動相	0.1% ギ酸/ アセトニトリル = (45/55, v/v)
流速	1.0 mL/min
分析時間	5 分
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×50 mm, 5 µm (P/N: 959946-902)
カラム温度	室温
注入	1 µL
検出	A: 210 nm

表5. 分析条件④（グラジエント分析）

HPLC	
移動相A	0.1% ギ酸
移動相B	アセトニトリル
流速	1.0 mL/min
グラジエント	30%B (0min)→90%B (5min)
分析時間	7分（ポストラン2分）
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×50 mm, 5 µm (P/N: 959946-902)
カラム温度	室温
注入	1 µL
検出	210 nm

サンプル

Agilent Isocratic Standard (P/N: 01080-68704) を分析に供しました。このサンプルは dimethyl phthalate 1.192 g/L, diethyl phthalate 1.189 g/L, biphenyl 0.0793 g/L, o-terphenyl 0.238 g/L のメタノール溶液です。

トリガー設定の最適化

条件③におけるクロマトグラムを図5に示します。2分より前に溶出するピークはシャープに、4分以降のピークはブロードに溶出していることが確認できます。

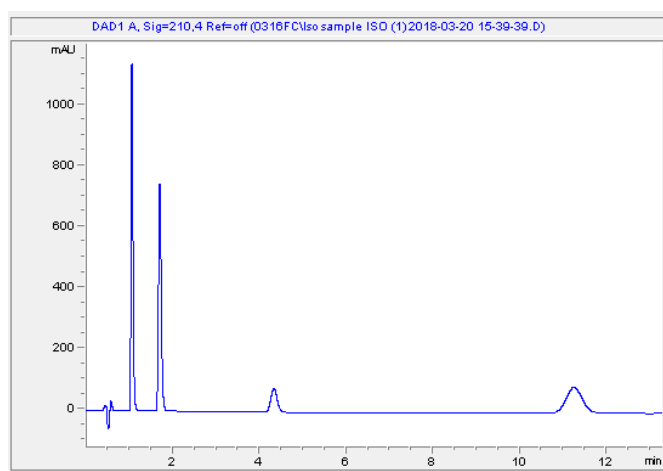


図5. 条件③ アイソクラティック分析におけるクロマトグラム

条件④におけるクロマトグラムを図6に示します。移動相Aにギ酸を用いたため、B比率が上がるに従って、ベースラインが下がっていることがわかります。

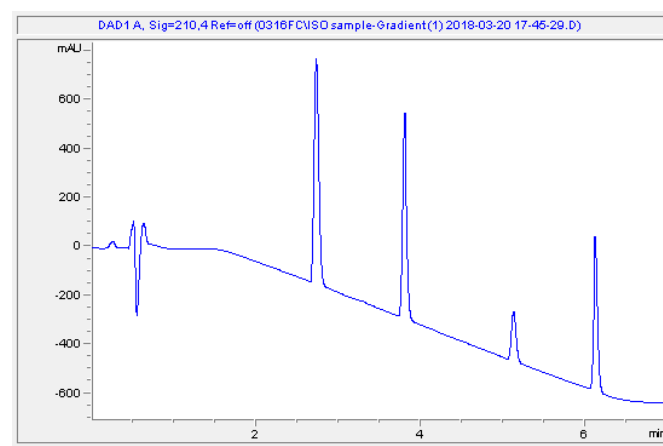


図6. 条件④ グラジエント分析におけるクロマトグラム

採取したクロマトグラムを用いて、Agilent Infinity II分取精製システムに標準装備のフラクションプレビューを用いて分取条件を設定しました。

まず、条件③について下記表6にあるようにピークトリガーを設定しました。その際のフラクシオンプレビューを図7に示します。

前半部分のピークは良好に分取されますが、後半部分が分取されない設定になっていることが確認できます。

表6. ピークトリガー設定①

Signal	210 nm
ピーク検出モード	Slope
Up Slope	20 mAU /s
Down Slope	5 mAU /s

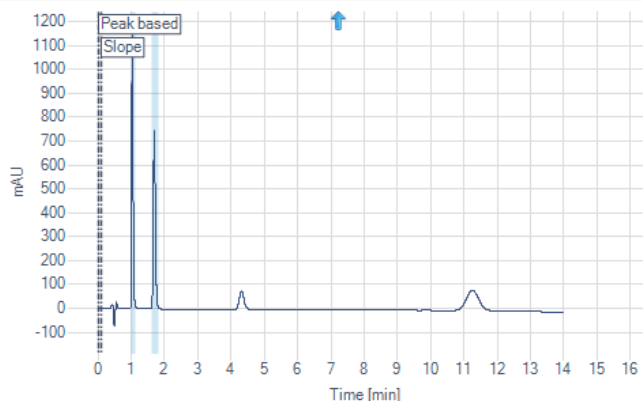


図7. ピークトリガー設定①におけるフラクシオンプレビュー

次に、後半のピークを分取するため、トリガー設定を表7のように設定しました。その際のフラクシオンプレビューを図8に示します。

後半のピークは良好に分取されますが、前半のインジェクションショックや不要な不純物ピークも分取される設定となっていることが確認できました。

表7. ピークトリガー設定②

Signal	210 nm
ピーク検出モード	Slope
Up Slope	1 mAU /s
Down Slope	1 mAU /s

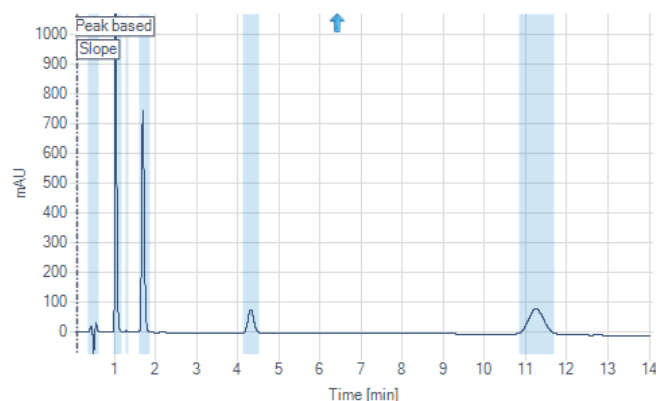


図8. ピークトリガー設定②におけるフラクシオンプレビュー

ピークトリガー設定①、②をもとに、タイムテーブルを用いて0-3分は表6と同様に、3分以降は表7となるように設定しました。

次に、条件④のグラジエント分析について、表8のようにピークトリガー設定を行いました。その際のフラクシオンプレビューを図9に示します。

前半部分のピークは良好に分取されますが、不要なインジェクションショック部分が分取されること、後半のピークが殆ど分取されないことが確認できます。

表8. ピークトリガー設定③

Signal	210 nm
ピーク検出モード	Threshold and Slope
Threshold	1 mAU
Up Slope	50 mAU /s
Down Slope	5 mAU /s

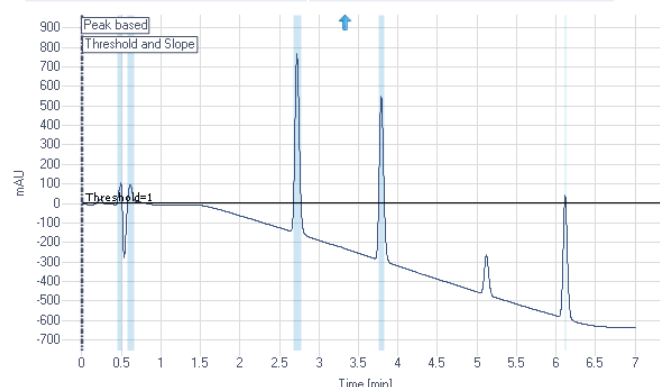


図9. ピークトリガー設定③におけるフラクシオンプレビュー

次に、インジェクションショックを分取せず、後半の2つのピークを良好に分取するため、タイムテーブルを用いて表9のように時間ごとに設定を行いました。その際のフラクシオンプレビューを図10に示します。全てのピークが良好に分取される設定になっていることが確認できました。

表9. ピークトリガー設定④

Time/min	0-1.0	1.0-4.5	4.5-
ピーク検出モード	Off	Threshold and Slope	Threshold and Slope
Threshold	-	1 mAU	- 500 mAU
Up Slope	-	50 mAU /s	50 mAU /s
Down Slope	-	5 mAU /s	5 mAU /s

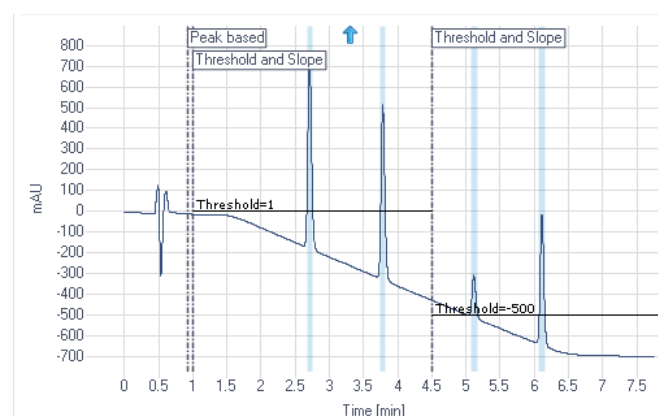


図10. ピークトリガー設定④におけるフラクシオンプレビュー

結果

条件③におけるフラクション結果を図11に示します。全てのピークが良好に分取出来ました。

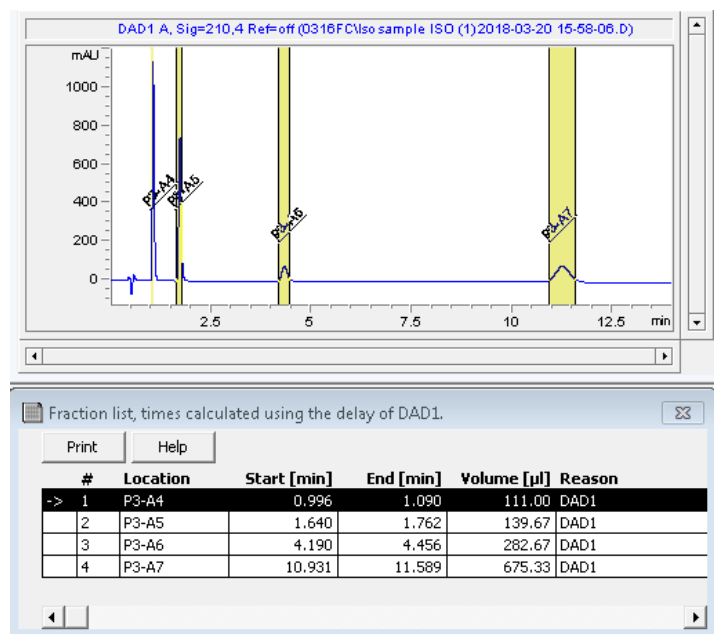


図11. 条件③ フラクション結果画面

次に、条件④におけるフラクション結果を図12に示します。全てのピークが、図10に示したフラクションプレビューと同様に良好に分取出来ていることが確認出来ます。

また、本システムを用いた場合、フラクション位置はグラフィックにおいても確認可能です。

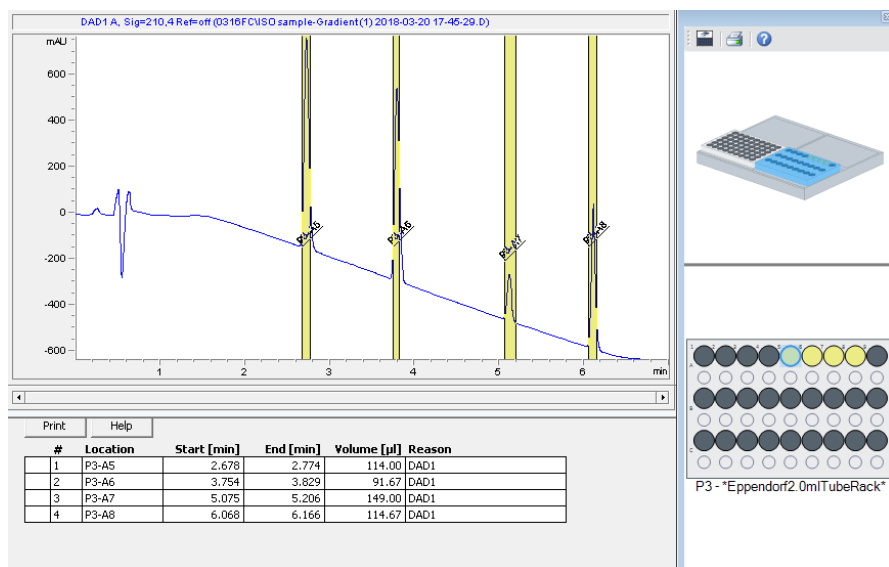


図12. 条件④ フラクション結果画面

まとめ

Agilent Infinity II 分取精製システムを用いて、複数シグナルを用いたピークトリガー分取、タイムテーブルを用いたピークトリガー設定の最適化を行いました。

複数シグナルを用いて分取する事により、網羅的・選択的な分取の設定が容易に出来ることが示されました。また、フラクションプレビュー機能とタイムテーブルを用いてピークトリガーの設定を時間に応じて変更することにより、様々な分析条件に対応可能であることが示されました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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おりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, March 29, 2018

LC-201803ND-001