

LCを用いた分取のススメ

微量成分の分取は L-column シリーズにお任せ！

分取液体クロマトグラフィー(Preparative liquid chromatography, 以下分取LC)は、試料(溶液)中の目的成分を分取し、純度を高める方法です。分取LCは遠心分離や液液抽出と比較し、高精度で目的成分を得ることができます。ここでは、LC(逆相クロマトグラフィーに限定)を用いた分取から、精製までの概要と、L-column シリーズを使った分取LC、分取で得られた成分の構造推定などを紹介します。

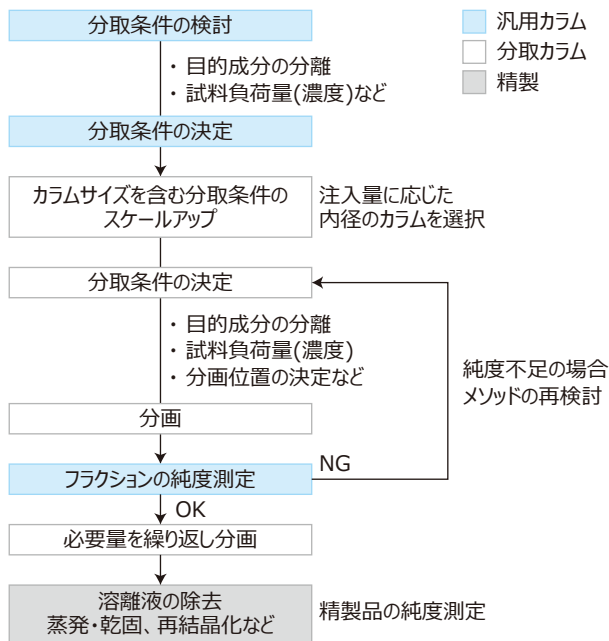
Keywords 分取 精製 分画 画分 フラクション 構造推定

LCを用いた分取から精製までの概要

LCを用いた分取から、精製までの概要です。

分取LCは、大量の溶媒と試料を消費します。そのため、内径の小さい汎用カラムで分取条件を決定し、その後内径の大きい分取カラムで目的成分を分画します。

汎用カラムを用いた分取条件の検討は、長さが短く、充填剤の粒子径が小さいカラムを用いると、作業の迅速化、溶媒や試料の削減ができます。



分取カラム

充填剤の粒子径が小さく、カラムが長いと、カラム圧力が高くなります。そのため分取カラムは分離が損なわれない範囲で粒子径が大きく、短いカラムを用います。

カラムのスケールアップのポイント
カラム内径の断面積に応じてスケールアップします。

内径	3 mm	4.6 mm	10 mm	20 mm
流量	0.4 mL/min	1 mL/min	5 mL/min	20 mL/min
注入量	8 μ L	20 μ L	100 μ L	400 μ L

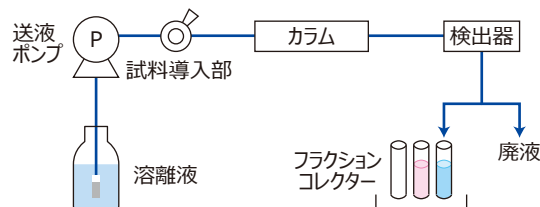
粒子径と移動相の最適線速度における理論段数は反比例します。2 μ mカラムの理論段数を「1」とした場合、同様の分離を得るには、下表のカラム長が必要になります。

粒子径	2 μ m	3 μ m	5 μ m
理論段数	1	2/3	2/5
カラム長さ	100 mm	150 mm	250 mm

(表中の数値は参考値です)

分取LC装置

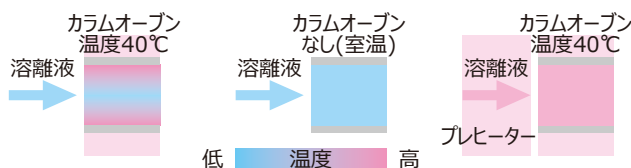
LCにフラクションコレクターが付いています。カラム内径に合わせた溶離液送液量、注入量に応じて配管の内径、サンプルループ、フローセルなどの容量を変える必要があります。



汎用カラムでの分析の場合、40℃に設定することが多いです。分取LCはカラムオープンを使わないのですか？

内径の大きいカラムをカラムオープンで40℃に設定した場合、室温の溶離液が大量にカラムに入ることになります。するとカラムの中心部分は40℃にならず、温度差が生じます。結果「分離が悪くなる」「再現性がない」といった不具合が起こることがあります。温度を調節する場合は、プレヒーターなどで溶離液をカラムオープンと同じ温度にします。

下図は温度のイメージです。カラムと同じ温度の溶離液を送液すればカラム内で温度は均一になります。室温及び分取LC周辺の温度管理も大切です。



用語説明(JIS K 0124:2011引用)

分画(fractionation)
カラムで分離され、溶出してきた成分を分け取る操作。
画分(fraction)^{※1}
分画操作によって取り分けられたカラム流出分、フラクションともいう。
カラムの分類
汎用カラム 内径3 mm以上、10 mm未満
セミ分取カラム^{※2} 内径10 mm以上、50 mm未満

LC Technical Report Vol.27では、以下のように称します。

※1 画分は「フラクション」

※2 セミ分取カラムは「分取カラム」

「分取」とは目的成分を取り出す操作で、精製工程の一部です。そのため「分取・精製」と一括りに呼ばれることがあります。このテクニカルレポートでは、LCによる分取工程と、LC以外の精製工程を明確にするために、「精製」は分画後のフラクションから溶離液を除去し、高純度にすることを示します。

LCを用いた分取から精製までの概要

溶離液

分取LCは溶離液送液量が多くなります。溶離液に使う溶媒は粘度が低い方がカラム圧力が低く、扱いやすくなります。分画後、溶離液を含んだフラクションを蒸発乾固して目的成分を取り出す精製工程がある場合、溶離液に使う溶媒は沸点が低い方が作業しやすくなります。

🐱 LCでよく使われる溶媒の性質

【粘度】低い ← (単一成分、同じ温度の場合) → 高い
アセトニトリル メタノール テトラヒドロフラン 水 エタノール

【沸点】低い ← (単一成分、同じ外圧の場合) → 高い
メタノール テトラヒドロフラン エタノール アセトニトリル 水

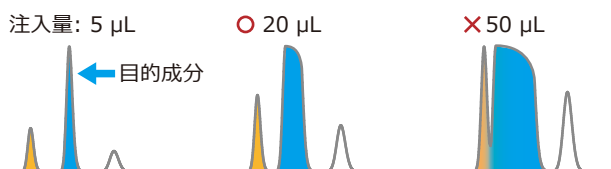
🐱 緩衝液やイオン対試薬を使う場合の注意点はありますか？

揮発性のものを用いた方が、精製が簡便になります。
不揮発性の塩を含む溶離液を用いる場合は、精製時に脱塩操作が必要になります。

注入量、負荷量

分取では「いかに分取効率を向上させるか」がポイントになります。注入量、試料負荷量を多くして、高濃度、高純度のフラクションを得ることが重要です。分取ではピーク形状が悪くても、目的成分が他の成分と分離していれば問題ありません。

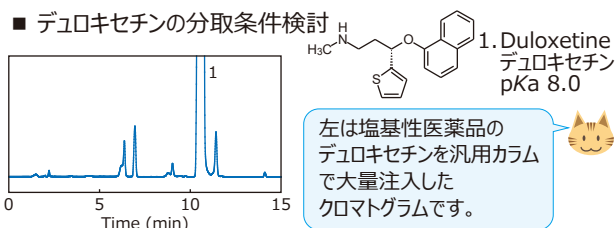
🐱 内径4.6 mmで注入量を増やしたときのクロマトグラムのイメージです。注入量が多くなるとピークトップが前にずれていきます。50 μ Lでは前のピークと重なって分離できていません。20 μ Lを最適注入量とすると、内径20 mmにスケールアップした場合は400 μ Lが注入量の目安となります。



試料溶媒

分取LCは注入量が多いので、試料溶媒がピーク形状に影響を及ぼすことがあります。ピークが崩れるようならば、溶離液と同じ、又は溶離液よりも溶出力の弱い溶媒に溶解させます。

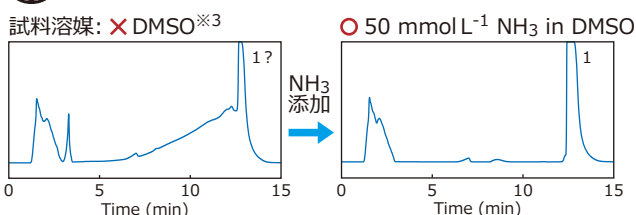
参考: LC Technical Report Vol.26
https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/technical_report/technical_report_26.pdf



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A: CH₃CN
B: 10 mmol L⁻¹ HCOOH+NH₃ in H₂O (pH 11)
A/B, 30/70-80/20 (0-15 min)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C
Detection: UV 230 nm; Inj. vol.: 20 μ L; Sample: Duloxetine (20 g/L)
Application No. L3013

🐱 イオン性物質の場合、イオン形・分子形が混在すると、ピーク形状が悪くなる場合があります。汎用カラムで問題なくても分取カラムでピークが崩れる場合は、試料溶媒を変えてみましょう。

🐱 試料溶媒をアルカリ性にしたらピーク形状が良くなりました。



[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 μ m; Size: 20 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A: CH₃CN, B: 10 mmol L⁻¹ NH₃ in H₂O
A/B, 30/70-80/20 (0-15 min)
Flow rate: 20 mL/min; Temp.: Room temperature
Detection: UV 230 nm; Inj. vol.: 4000 μ L; Sample: Duloxetine (10 g/L)

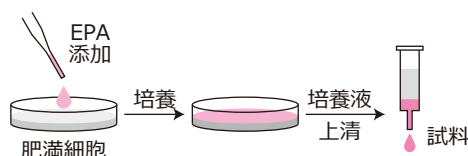
※3 DMSO(Dimethylsulfoxide, ジメチルスルホキシド)

実例① エイコサペンタエン酸(EPA)代謝物の分取と構造推定

エイコサペンタエン酸代謝物の分取

エイコサペンタエン酸(Eicosapentaenoic acid, EPA)は魚類や植物に存在している必須脂肪酸です。EPAから生成されるエイコサノイドにはロイコトリエンやプロスタグランジンなどがあり、様々な生理活性があります。

ここではEPA代謝物の単体での分離と構造推定を紹介します。

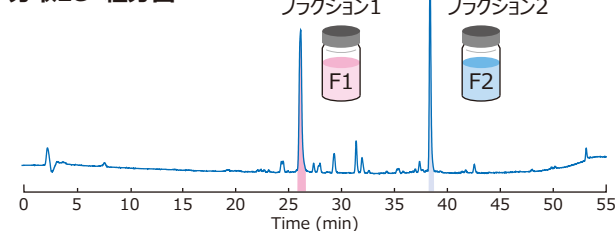


🐱 EPAを肥満細胞に添加後培養し、培養液上清を固相抽出したものを試料としました。

🐱 多くの代謝物が含まれるので、すべてを分離する条件の決定は不可能です。分取カラムで粗分画して、ピークのマスペクトルなどの情報と文献を照合して、構造推定していきます。混合物の場合は分離するメソッドを検討します。

🐱 ここではアプリケーション^{※4}で使用しているアセトニトリル/ギ酸溶離液を用いて分取LCで粗分画をしました。得られたフラクション1とフラクション2についてそれぞれ解析していきます。

分取LC 粗分画



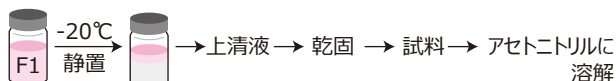
[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μ m; Size: 20 mm I.D., 250 mm L.
Eluent: A: CH₃CN, B: 0.1% HCOOH in H₂O
A/B, 20/80-80/20-95/5-95/5 (0-45-50-55 min)
Flow rate: 20 mL/min; Temp.: Room temperature
Detection: UV 254 nm; Inj. vol.: 2000 μ L

CERI News No.99; Application No. L2159

※4 Application No. L2102, L2103, L2109
https://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/L-column_application_data.html

実例① エイコサペンタエン酸(EPA)代謝物の分取と構造推定

■ フラクシンの精製



フラクシ1(F1)の解析

F1をLC/MSで定性分析した結果、 m/z 333のイオンが観測されました。ロイコトリエンB₅(Leukotriene B₅, LTB₅)が考えられますが、他と比較しピーク幅が広いので、異性体が同じ位置に溶出しているかもしれません。

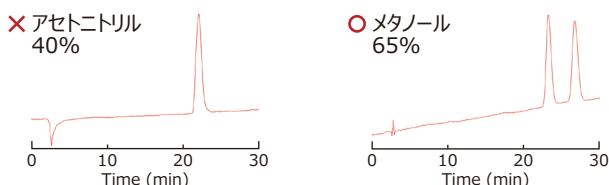


まずはF1に含まれる混合物を分離させるためのメソッドを検討します。内径4.6 mmカラムを使います。

■ メソッドスカウティング 溶離液



アセトニトリルでは分離しませんでした。メタノールを用いるとピークが2つに分かれました。さらに最適化していきます。

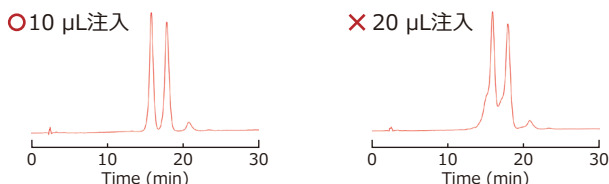


[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 250 mm L.
Eluent: A: CH₃CN or CH₃OH, B: 0.1% HCOOH in H₂O
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 25°C
Detection: UV 281 nm; Inj. vol.: 2 μ L

■ 最適化 溶離液有機溶媒比率、注入量と試料溶媒



20 μ L注入したらピークが崩れてしまいました...

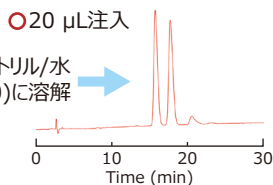


[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μ m; Size: 4.6 mm I.D., 250 mm L.
Eluent: CH₃OH/0.1% HCOOH in H₂O (68/32)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 25°C
Detection: UV 281 nm; Inj. vol.: 10 μ L or 20 μ L

注入量が多いとピークが崩れるようです。試料が析出しない範囲で試料溶媒に水を加えてみましょう。



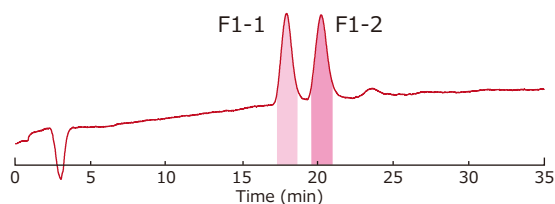
アセトニトリル/水 (70/30)に溶解



■ 分取LC 分画



F1-1とF1-2のフラクションが得られました。



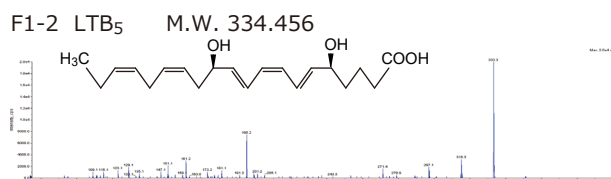
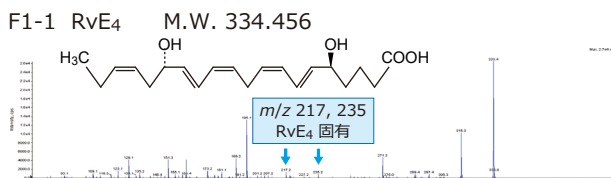
[Analytical conditions]
Column: L-column2 ODS, 5 μ m; Size: 20 mm I.D., 250 mm L.
Eluent: CH₃OH/0.1% HCOOH in H₂O (68/32)
Flow rate: 18 mL/min; Temp.: Room temperature
Detection: UV 281 nm; Inj. vol.: 2000 μ L

■ フラクシンのMS/MSスペクトルの測定



MS/MSスペクトルを確認しました。結果、F1-1はレゾルビンE₄ (Resolvin E₄, RvE₄)、F1-2はLTB₅と推定できました。

EPA代謝物のひとつであるレゾルビンは、細胞の炎症の抑制に関与していると多く報告され、新たな治療薬として注目されている物質です。

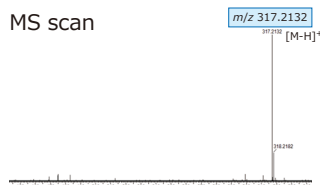


フラクシ2(F2)の解析

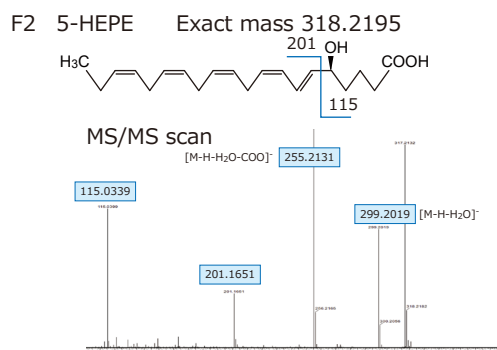
Q-ToF-MSを用いて精密質量による構造推定を行いました。得られた m/z から分子式を推定することができます。



MS scanの m/z から C₂₀H₃₀O₃ と推定、ヒドロキシエイコサペンタエン酸(Hydroxy eicosapentaenoic acid, HEPE)が考えられます。



さらにMS/MS scanのフラグメントイオンを確認します。結果、5-HEPEと推定できました。



お知らせ CERiの「HPLCによる分取・精製」について
CERiクロマト技術部では2025年4月から新たな受託試験として「HPLCによる分取・精製」を始めました。
分取LCのメソッド開発から目的成分の分取まで、さらに得られたフラクションの精製(エバポレーターや真空恒温乾燥器等を用いた蒸発・乾固、再結晶化)により高純度の精製品を納品します。
精製品の評価についてもサポートします。
・ 精製品のMS、NMR、FT-IR等による構造推定
・ 定量NMRIによる純度測定及び推定構造を用いた毒性評価
まずはご相談ください。

実例② 抗生物質の分取から精製まで

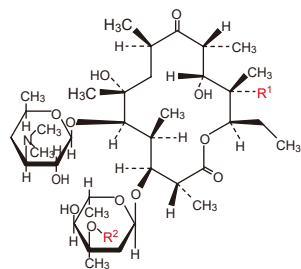
エリスロマイシン Erythromycin

マクロライド系抗生物質は細菌のタンパク質合成を阻害する抗生物質です。生物由来の抗生物質は類縁物質が多く含まれます。

	R ¹	R ²
1. Erythromycin A	OH	CH ₃
Erythromycin B	H	CH ₃
Erythromycin C	OH	H

Application No. L3033

Erythromycin
エリスロマイシン



エリスロマイシンはエリスロマイシンAを主成分としたエリスロマイシンB及びCの混合物です。ここではエリスロマイシンから、エリスロマイシンAの分取から精製まで行いました。



■ メソッドスカウティング ①水系溶離液

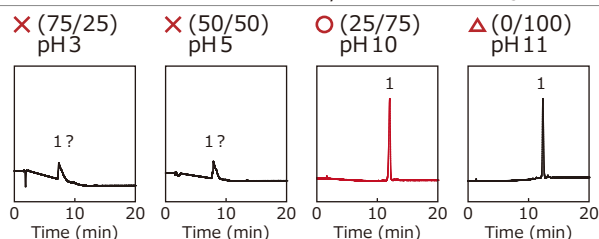


汎用カラムで分取条件を検討します。まずは溶離液です。

エリスロマイシンは塩基性物質です。溶離液のpHにより保持時間とピーク形状が変化します。水系溶離液にはピーク形状と夾雑物との分離が良好なアルカリ性溶離液で、かつカラムに優しい pH 10 を選択しました。



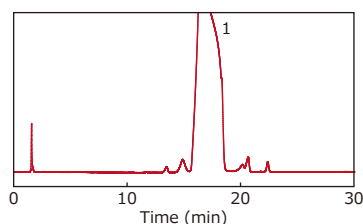
B: 10 mmol L⁻¹ HCOOH in H₂O / 10 mmol L⁻¹ NH₃ in H₂O



■ 最適化 ②注入量, グラジエント条件



メインピークと前後のピークの分離が損なわれない注入量とグラジエント条件を検討します。

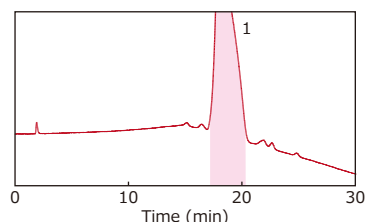


[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 µm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A: CH₃OH, B: Aqueous eluent
①A/B, 30/70-80/20-80/20 (0-10-20 min)
②A/B, 40/60-80/20-80/20 (0-20-30 min)
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 25°C
Detection: UV 210 nm; Inj. vol.: ①0.5 µL ②20 µL (500g/L in CH₃OH)

■ 分取LC 分画



内径10 mmにスケールアップして、エリスロマイシンAを分画します。



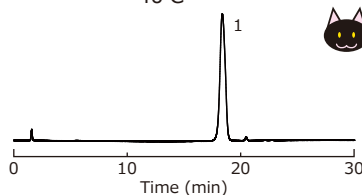
[Analytical conditions]
Column: L-column3 C18, 5 µm; Size: 10 mm I.D., 150 mm L.
Eluent: A: CH₃OH
B: 10 mmol L⁻¹ HCOOH in H₂O / 10 mmol L⁻¹ NH₃ in H₂O (25/75)
A/B, 40/60-80/20-80/20 (0-20-30 min)
Flow rate: 4 mL/min; Temp.: 25°C
Detection: UV 210 nm; Inj. vol.: 100 µL (500 g/L in CH₃OH)

■ 精製, 純度測定

得られたフラクションから溶離液を除去して精製します。溶離液のメタノール、ギ酸、アンモニアは揮発性なので、蒸発・乾固による目的成分の精製が容易です。



蒸発・乾固 40°C → メタノールで溶解 → 純度測定



元の純度: 95.5%
↓
精製後の純度: 98.6%
47.2 mgのエリスロマイシンAが得られました。



アルカリ性溶離液を用いた分取LCについて

塩基性物質の分取は、アルカリ性溶離液を用いると、試料負荷量が多く、分取効率が向上します。ここで用いたアルカリ性溶離液は、耐アルカリ性に優れた L-column3 しかできない分取条件です。



参考: JIS K 0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則
JIS K 0135:2003 分取液体クロマトグラフィー通則

リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。



一般財団法人 化学物質評価研究機構
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

<https://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部

e-mail chromato@cerij.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521

〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地