

# Isolera™ Spektraフラッシュ自動精製システムにおけるアセトンの使用について

Bob Bickler, Senior Product Manager, Biotage  
Panagiotis Ioannidis & Christel Ellström, Application Developers, Biotage

Isolera™ Spektraフラッシュ自動精製システムでは、アセトンを順相フラッシュクロマトグラフィーの移動相として使用することができます。新たに搭載されたλ-All検出機能およびベースライン補正機能により、アセトンのUV吸収によるベースラインの上昇を最小限に抑え、ユーザーが指定する任意の波長範囲での化合物検出が可能です。

## バックグラウンド

アセトンは様々な有機化合物を溶解する優れた溶媒です。極性および非極性溶媒の両方と良く混和し、また、安価で毒性が比較的低く、低粘度で且つ沸点が低いという特性において、フラッシュクロマトグラフィーに最適と言えます。しかし、アセトンは220~330nm領域で強いUV吸収を示すため、同様に220~330nm領域でUV吸収を示す芳香族化合物や医薬品化合物の検出と干渉してしまうため、実際にはフラッシュクロマトグラフィーで使用することは困難でした。

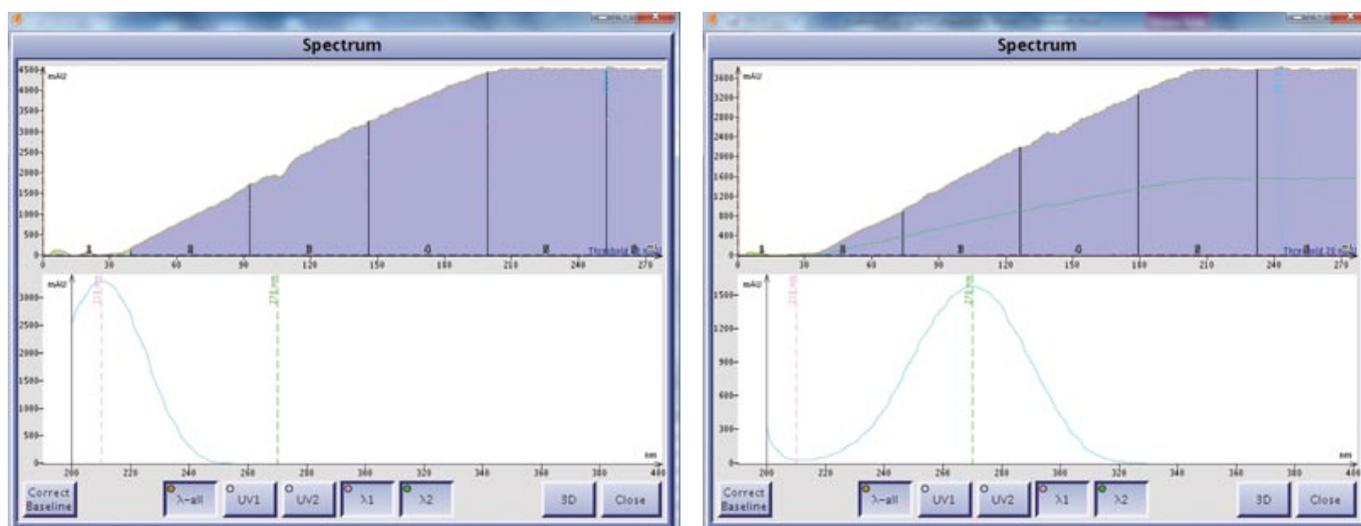
図1は、酢酸エチル/ヘキサンおよびアセトン/ヘキサンのグラジエント実行時のUV特性を示しています。吸収極大付近の波長(210nmまたは270nm)でモニターした場合、両者とも極性比率の上昇に伴いクロマトグラムのベースラインも上昇します。

このように、従来の精製方法においてアセトンを移動相に利用した場合、目的化合物のUV吸収がアセトンの吸収に妨げられることから全量分取を強いられ、結果として分取後のサンプル濃縮に多大な時間が必要となります。

そこで、バイオタージのIsolera™ Spektra が開発されました。即ち、ベースライン補正機能とλ-All検出機能を使用することにより、アセトンや他の溶媒によるUV吸収を補正し、この問題点を解決します。

このアプリケーションノートでは、Isolera™ Spektraによるアセトンを移動相に用いた順相クロマトグラフィーについて説明します。ベースライン補正機能でベースラインの上昇を抑え、λ-Allフラクション機能により全波長範囲で高感度かつ高純度に化合物を回収しています。

図1 酢酸エチル(左側)とアセトン(右側)を用いたグラジエントUV特性。芳香族化合物の検出範囲である240nm以上のUV透過率を考慮し、通常のフラッシュクロマトグラフィーでは酢酸エチルを移動相溶媒に用いる。UV吸収が補正されない限り、アセトンが示す220nm ~ 320nm領域でのUV吸収は分取の妨げとなる。



## 実験

アセトンは酢酸エチルよりもわずかに極性が高く、酢酸エチルを利用した場合より少し速い化合物溶出が予測されますが、物性が比較的類似していることから酢酸エチルの代替溶媒としての利用が可能です(表1)。

このアプリケーションノートでは、Isolera™ Spektra Fourを使用し、ヘキサン/酢酸エチルとヘキサン/アセトンのグラジエントにより、混在する4つの化合物の分離精製を検討しました。

### サンプル

各化合物0.1 gをアセトン1 mLに溶解

- ナフタレン
- 2-ニトロアニリン
- メチルパラベン
- 4-ニトロアニリン

### 使用溶媒

実験1	実験2
溶媒A: ヘキサン	溶媒A: ヘキサン
溶媒B: 酢酸エチル	溶媒B: アセトン

### TLCデータ

	実験1 (ヘキサン/酢酸エチル)	実験2 (ヘキサン/アセトン)
Strong solvent %	30%	30%
Naphthalene	0.81	0.81
2-Nitroaniline	0.48	0.45
Methyl paraben	0.30	0.30
4-Nitroaniline	0.29	0.21

### 精製条件

システム:	Isolera™ Spektra Four (可変波長UV)
カラム:	SNAP Ultra 10 g (Part# FSUL-0442-0010)
溶媒:	n-ヘキサン、酢酸エチル、アセトン
平衡化:	7% 溶媒B、100mL/min、3CV
グラジエント:	7% 溶媒B:1CV 7% 溶媒B—60% 溶媒B:10CV 60% 溶媒B:2CV
流速:	12 mL/min
検出:	λ-AII、波長254nmと340nmをモニタリング
ベースライン補正:	オン
波長範囲:	200nm~400nm
しきい値:	20 mAU
サンプルロード:	50 mg
TLC:	バイオタージ2.5 cm x 7.5 cm KP-Silプレート (Part# TLC-2575-FI)



表1. アセトン及び酢酸エチルの物性

溶媒	Selectivity group1	Solvent strength vs. SiO <sub>2</sub>	Boiling point	UV max	Absorbance range
アセトン	Vla	0.50	56 °C	270 nm	210-330 nm
酢酸エチル	Vla	0.43	77 °C	210 nm	< 200-255 nm

## 結果

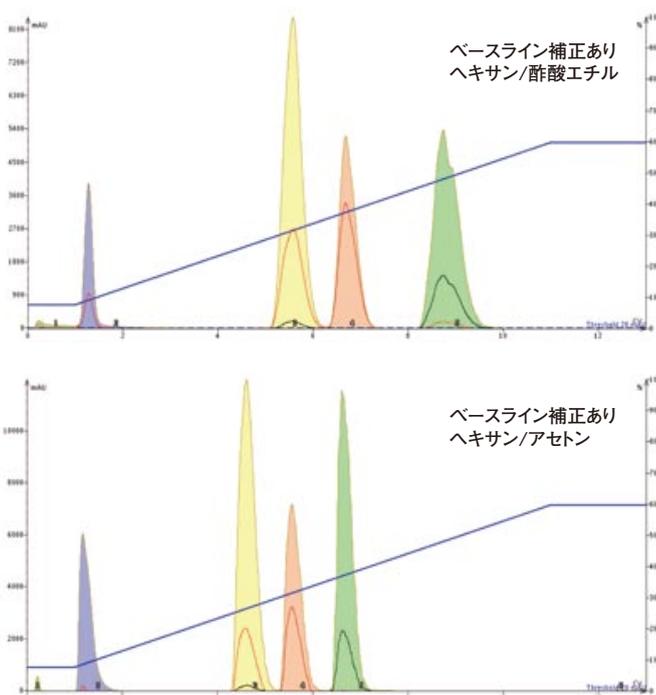
使用した溶媒系はいずれも波長領域200nm~400nmでUV吸収があるにもかかわらず、ベースライン上昇を補正することで、化合物の分離およびフラクション回収を良好に達成しました。アセトンを使用した系では、よりシャープで濃縮されたフラクションが得られ、溶媒留去時間の削減も期待できる結果となりました。

図2に示したとおり、ベースラインは平坦で、それぞれの溶出ピークは1本の試験管に回収されています。結果としてフラクション容量を節約し、フラクション濃度を最大化しています。

図1に示したとおり、UV検出のフラッシュクロマトグラフィーでは、移動相に使用する溶媒のUV吸収が問題となります。実際に、図3に示したとおりアセトンのUV吸収は本実験に使用した4化合物の分取において、使用溶媒量の増加(272mL vs. 221mL)、フラクションボリュームの増加、及びフラクション数の増加(16本 vs. 4本)という影響を与えます。

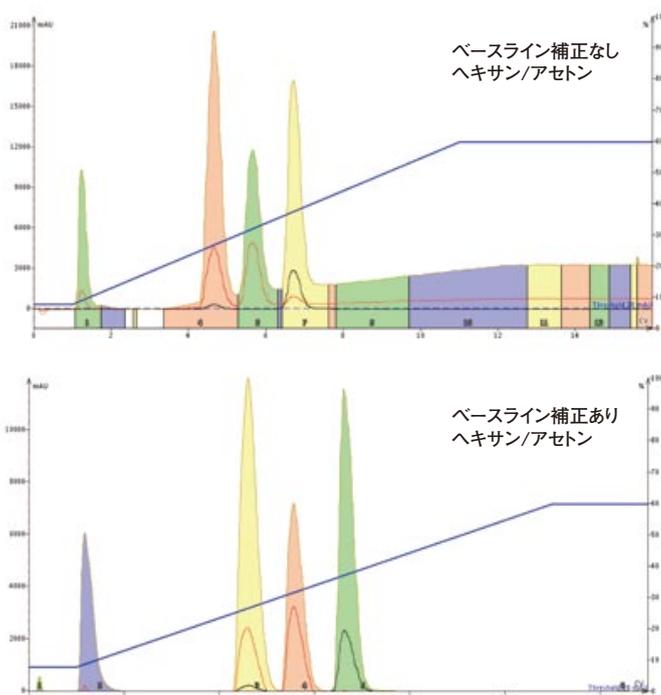
■ 図2

Isolera™ Spektra フラッシュ自動精製システムにおいて、λ-Allフラクション機能とベースライン補正機能を使用し、ヘキサン/酢酸エチル(上段)とヘキサン/アセトン(下段)の溶媒系で4化合物を分離した結果。ベースライン補正機能が溶媒のUV吸収によるベースライン上昇を抑え、フラクションボリュームを最小化している。



■ 図3

Isolera™ Spektraのベースライン補正機能を使用しなかったクロマトグラム(上段)とベースライン補正機能を使用したクロマトグラム(下段)の比較。ベースライン補正機能がアセトンのUV吸収を補正し、フラクション数、フラクションボリューム、及び使用溶媒量を減少させることが分かる。



## References

1. "Introduction to Modern Liquid Chromatography" by L. R. Snyder and J. J. Kirkland (Wiley: New York, 1979).
2. Sanderkok.com

## 結論

Isolera™ Spektraのベースライン補正機能を使用することにより、溶媒量、フラクションボリューム、分取時間などを増大することなく、比較的安価なアセトンをフラッシュクロマトグラフィーに用いることができます。アセトンは、シャープなピークが得られ、且つフラクション後の溶媒留去時間が短縮できるため、フラッシュクロマトグラフィーにおいて大変優れた溶媒と言えます。

## バイオタージ・ジャパン株式会社

本社：〒136-0071 東京都江東区亀戸1-14-4, 6F TEL 03-5627-3123 FAX 03-5627-3121  
 大阪：〒532-0011 大阪市淀川区西中島7-1-29, 6F TEL 06-6838-9311 FAX 06-6838-9312  
 URL: <http://www.biotage.co.jp> E-mail: [Japan\\_info@biotage.com](mailto:Japan_info@biotage.com)

© 2012.無断複写・複製・転載を禁じます。記載のブランド名および製品名はすべて各社の商標または登録商標です。本書に含まれる情報は予告なしに変更することがあります。