

【vol. 29】2 溶媒グラジエントで試料を分離できない場合はどうすればよいですか？

February 11, 2020

Bob Bickler

通常、2 溶媒あるいはバイナリーグラジエントを用いると、目的の化合物と副生成物や不純物を分離することができます。しかし、ある化合物が共溶出し、どんな 2 溶媒グラジエントでも分離できないような混合物に遭遇することがあります。

最近、ラベンダーの精油を精製しようとしてこのような状況に遭遇しましたので、この記事ではその解決方法についてご紹介します。

エッセンシャルオイルは一般的に心地よい香りがしますが、その化学的性質は非常に複雑で、多くの異なるテルペンとテルペノイドがブレンドされて独特の香りを作り出しています。残念ながら、これらの化合物の大部分は 210 nm 以上の波長で紫外線を吸収しないため、UV 検出を伴う TLC は最小限の価値しかなく、他の検出方法を検討する必要があります。

私の研究室では、TLC 染色やその他の誘導体化試薬を使用することができなかったため、メソッドスクアウトのために APCI ソースを備えたフラッシュマスシステム (Flash-MS system, Biotage® Isolera Dalton 2000) を使用することを選択しました。私はサンプルの質量分析を行い、最も豊富な化合物の質量を発見しました。これは、固体試料プローブ (ASAP) を使用して、オイルの小さな膜を APCI ソースに導入し、サンプルを加熱してイオン化することで行いました。検出された主な質量は、137、196、153 です。

多くのテルペンやテルペノイドを含むニンジン種子油の以前の研究では、ヘキサン/酢酸エチルグラジエントを使用していたので、そこから始めようと思いました。溶媒の消費量を最小限にするため、5 グラムの Biotage® ZIP-Sphere カートリッジを使用することにしました。

テルペンおよびテルペノイドは一般的に小さく親油性の分子で、極性溶媒 (酢酸エチル) の量が少ない順相フラッシュクロマトグラフィーで溶出するので、比較的浅いグラジエント (10 カラム容量 (CV) でヘキサンに 0~15% 酢酸エチル) から始めてみました。このバイナリーグラジエントでは、同じ質量/電荷比 (+m/z 137) の 2 つの主要ピークを分離することができましたが、+m/z 196 の化合物が、8 カラムボリューム (8 CV) で最初の質量検出ピークと共溶出しました (図 1)。

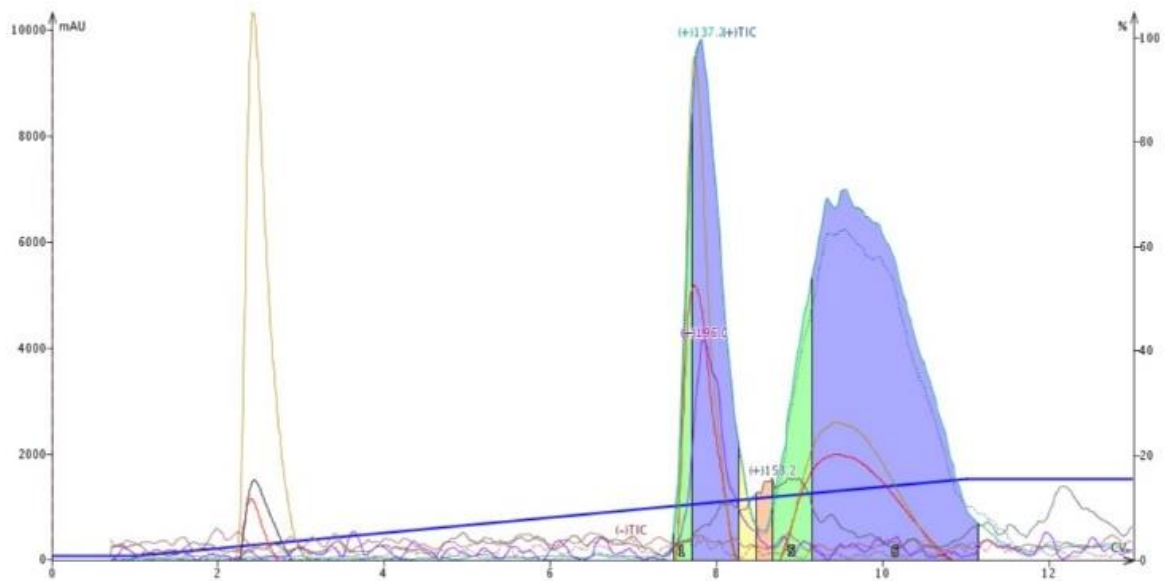


図 1.ヘキサン-酢酸エチル 0 - 15%の浅いグラジエントを用いたラベンダーオイルの分離では、2つの主要なテルペノイド (+m/z 137) が分離する一方、+m/z 196 の化合物が 8 CV のピークと共溶出します。

有機溶媒は異なる溶出力と選択性を持つので、選択性クラス 6 の酢酸エチルを選択性クラス 5 のジクロロメタンに置き換えて、分離が変わるかどうか試してみました。また、ジクロロメタンは酢酸エチルより溶出が弱い溶媒なので、20-100%ヘキサン/ジクロロメタンのグラジエントを作ると、確かに異なる結果が得られました。残念ながら、+m/z 196 のピークは、ある+m/z 137 のピークから別の+m/z 137 のピークに移動してしまいました (図 2)。最初の+m/z 137 ピークから+m/z 196 ピークを移動させましたが、今度は他のピークと共溶出してしまいました - さて、どうすればよいのでしょうか？

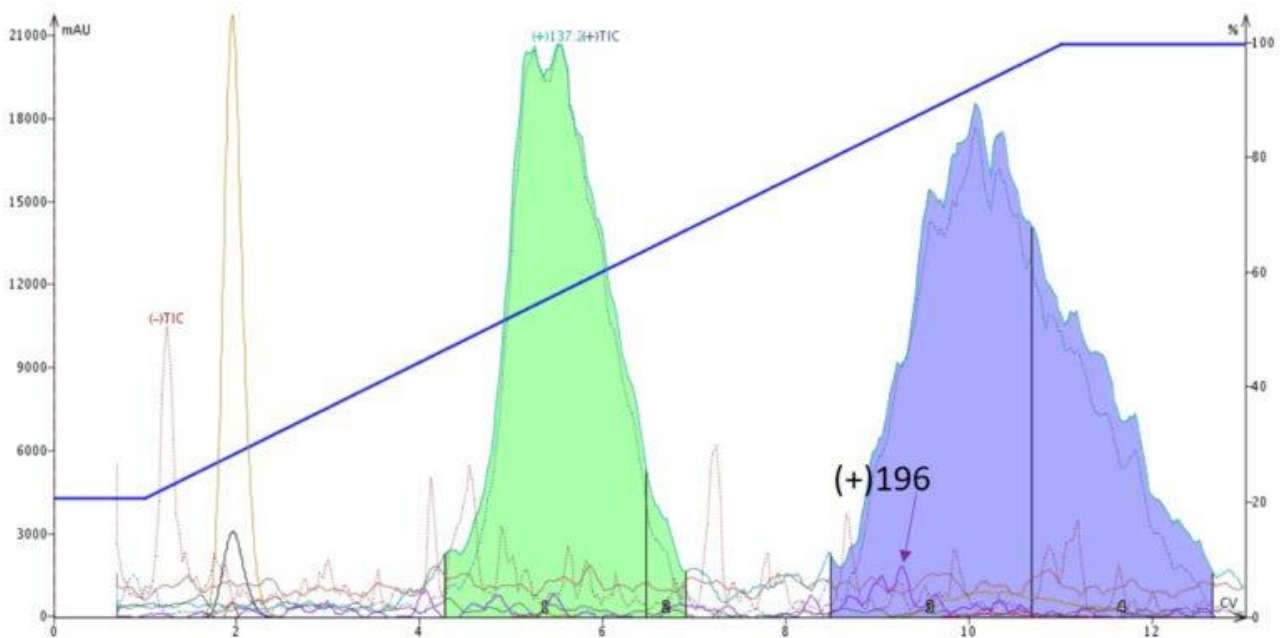


図 2. 20 - 100%ヘキサン-ジクロロメタングラジエントで精製したラベンダーオイルでは、2つの主要なテルペノイド (+m/z 137) が分離しますが、+m/z 196 の化合物は第 2 のピーク (青) 内に隠れてしまいました。

そこで、このデータを元に、3つの溶媒を使った擬似3成分系グラジエントを作ってみることにしました。酢酸エチルは比較的強い溶媒なので、グラジエントに占める割合を低くして、ジクロロメタンを3成分系溶媒として使うことにしました。0~10%のヘキサン/酢酸エチルのリニアグラジエントで、ジクロロメタンを様々な一定割合でブレンドしてみました。Isolera Dalton 2000の良いところは、この第3の溶媒をヘキサンや酢酸エチルと事前に混合することなく、一定の割合を維持してグラジエントメソッドに添加できることです。

図3, 4, 5のように、0-10%ヘキサン/酢酸エチルのグラジエントを維持しながら、15%、17%、20%のジクロロメタンのブレンドを試してみました。それぞれの3成分系ブレンドでは、2成分系グラジエントよりも+m/z 196と他のテルペノイドの分離が良くなりましたが、17%ジクロロメタンブレンドで最も良い結果が得られました。最初に検出された+m/z 137のピークは、分離が困難な同じ質量と類似した化学的性質を持つ多くのテルペノイドを含んでいるため、かなりブロードしていました。

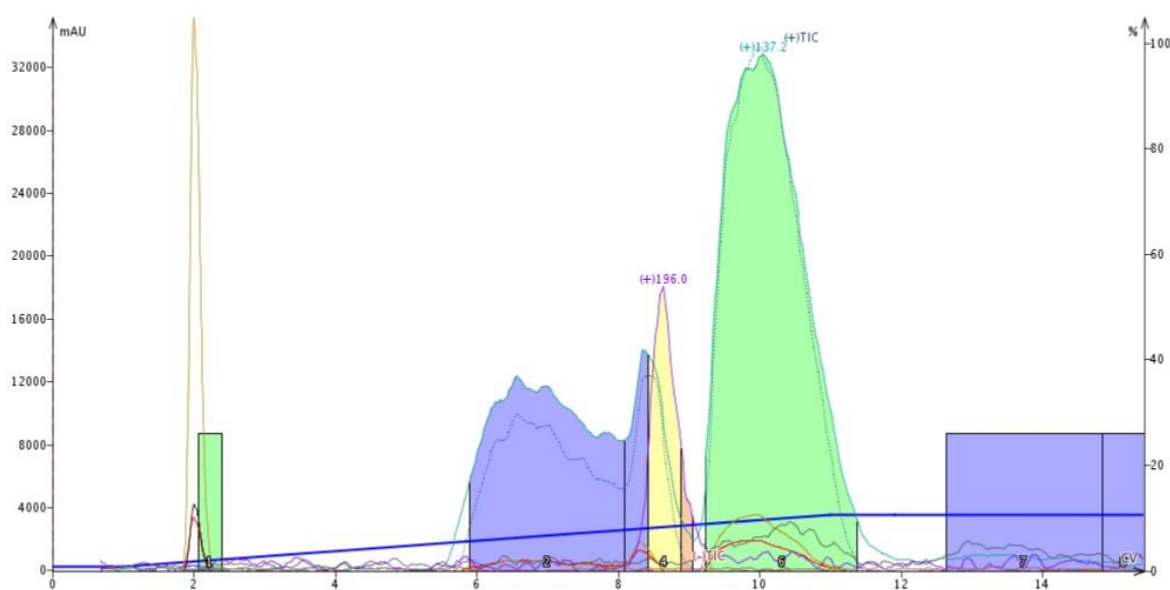


図3. 15%DCMブレンドを加えて0 - 10%ヘキサン-酢酸エチルグラジエントで精製したラベンダーオイルは、+m/z 196（黄色）が後から溶出したテルペノイド（緑）から離れ、最初に溶出したテルペノイド（青）に近づきます。

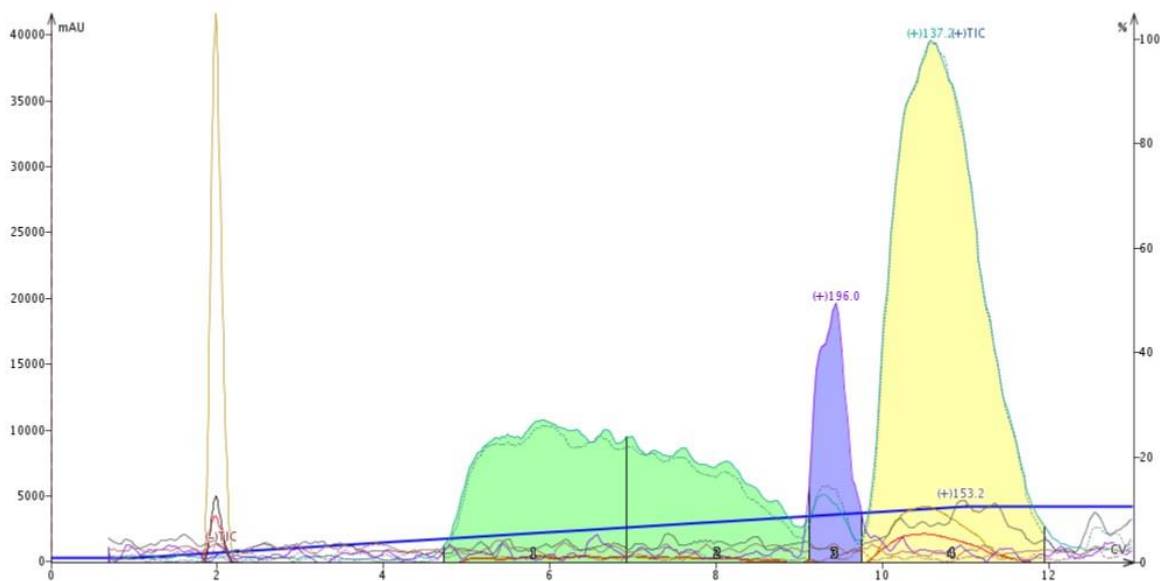


図 4. 0-10% ヘキサン-酢酸エチル + ジクロロメタン (17%) の三元溶媒グラジエントを用いたラベンダーオイル精製により、 $+m/z$ 196 の化合物と $+m/z$ 137 の二つのピークが分離されました。

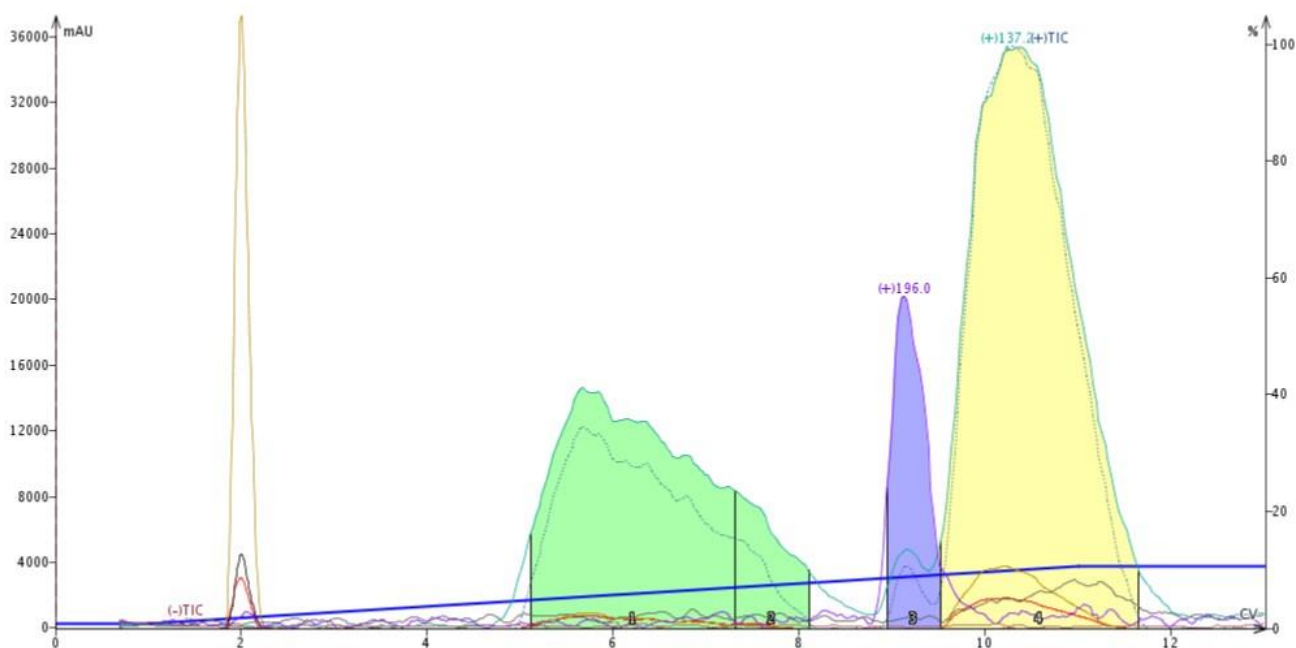


図 5. ジクロロメタンを 20% でアイソクラティックに混合しながら、0-10% の酢酸エチル-ヘキサングラジエントで精製したラベンダーオイルは、 $+m/z$ 196 と $+m/z$ 137 の 2 つのピークがほぼ完全に分離していることがわかります。

ここでのポイントは、困難なサンプルの精製に直面したら、「既成概念にとらわれない」考え方をし、精製方法の開発においてさまざまな溶媒系を試してみるということです。TLC が使えない場合は、できるだけ小さなフラッシュカラムを使って、溶媒と時間の消費を最小限に抑え、精製を向上させるために第 3 の溶媒を混ぜることを恐れなください。

このような困難な精製に遭遇したことがありますか？ その場合、どのように解決されたのでしょうか？

フラッシュクロマトグラフィーについてもっと知りたいですか？ フラッシュクロマトグラフィーの詳細については、ホワイトペーパー「Successful Flash Chromatography」をダウンロードしてください。

Learn More

元の記事 ; <https://selekt.biotage.com/blog/what-do-i-do-if-a-2-solvent-gradient-will-not-separate-my-sample>