Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を用いたブロッコリー種子中のグルコラファニンの MS トリガーによる分取精製

Andrew Aubin
Waters Corporation, Milford, MA, USA

はじめに

ブロッコリーは長い間、健康的な食品であると考えられてきました。最近の研究と報道では、ブロッコリースプラウトを食べると脳卒中や高血圧、心臓血管疾患のリスクを軽減する可能性があることが報告されています。

最も頻繁にこれらの健康上の利点に関連付けられているフィトケミカル（植物化学物質）は、グルコラファニン（4- メチルスルフィニルブチルグルコシノレート、図 1）です。グルコラファニンは、ブロッコリーに含まれている最も一般的なグルコシノレートであり、前述の健康上の利点に加えてガンを予防する性質を持つと考えられてきました。

研究者はグルコラファニンの健康への影響を研究し続けており、活性物質としてのグルコラファニンの研究や、様々な野菜中のグルコラファニンの量を正確に測定するために、必要量のグルコラファニン標準物質を入手する必要があります。

ブロッコリーの種子はグルコラファニンが豊富（20 - 50 mg/g）で、入手も容易であり、分取スケールでのグルコラファニンの単離に最適であることが知られています。このアプリケーションでは 3100 MS 検出器（図 2）と Atlantis® 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）シリカカラムで構成された Waters® AutoPurification™（ウォーターズ自動分取精製）システムを用いた、ブロッコリー種子からのグルコラファニンの MS トリガーによる分取精製についてご紹介します。

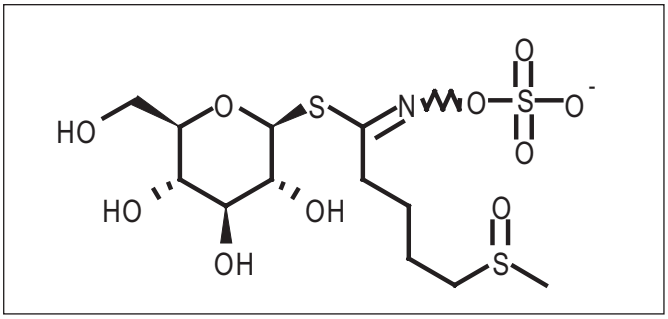

図 1　グルコラファニン $C_{12}H_{22}NO_{10}S_3$

図 2　3100 MS 検出器付きの自動分取精製システム

実験方法

グルコラファニンは Rochfort ら[1]と同様の方法で、ブロッコリーの種子から抽出しました。ブロッコリーの種子（25 g）を脱イオン水（250 mL）中で 5 分間煮沸し、その後スラリー状になるまでホモジナイズしました。30 分間の超音波処理の後、25 g のセライト 545 と混合し、スラリー全体をガラス繊維フィルターに通しました。クロマトグラフィーの前に、抽出物の容積を 10 分の 1 に減少させました。

最初に分析スケール（4.6 x 150 mm Atlantis HILIC シリカカラム、粒子径 5 µm、流速 2 mL/min）で、アイソクラティックの分離法を開発しました。分離条件は、次の計算式を使用して、分取カラムにスケールアップしました。

注入量のスケーリング

この式の Vol は注入量（µL）、D はカラムの内径（mm）、L はカラ

$$Vol_{PREP} = Vol_{HPLC} \bullet \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{HPLC}} \bullet \frac{L_{PREP}}{L_{HPLC}}$$

ム長（mm）を表します。4.6 x 150 mm HPLC カラムへの 5 µL 注入は、19 x 100 mm 分取カラムへの 57 µL 注入に相当します。

実験では、注入量 100 µL まではクロマトグラムのピーク形状を損なわずに分取カラムに注入できることが確認されました。さらに注入量を増加させると、主にサンプルの希釈に用いられる溶出力が強い溶媒が原因となって、ピーク形状にマイナスの影響を与えました。

流速のスケーリング

カラムサイズに基づいて、幾何学的に流量をスケールアップするために、次の式が使用されます。

$$F_{PREP} = F_{HPLC} \bullet \frac{D^2{}_{PREP}}{D^2{}_{HPLC}}$$

この式の F は流速（mL/min）、D はカラムの内径（cm）を表します。内径 4.6 mm のカラムでの流速 2.0 mL/min は、内径 19 mm のカラムの流速 34.1 mL/min に相当します。ウォーターズ Prep カリキュレーター（図 3）は、分析スケールの分離条件を分取スケールの分離条件に変換するために使用します。

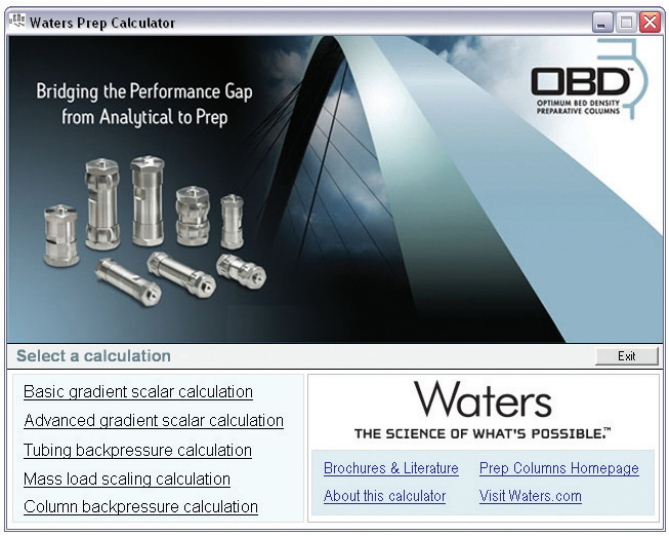

図 3 Prep カリキュレーターの初期画面

分取カラムから溶出するグルコラファニンは、MS 検出器の ESI ネガティブモードでモニターし、質量をトリガーとして分取を行います。繰り返し注入で得られたグルコラファニンの画分は、一つの容器にまとめて回収しました。集めた画分を真空下で乾燥した後、単離されたグルコラファニンの純度を確認するために、HPLC システム（UV 検出波長 220nm）を用いて分析を行いました。さらに単離された物質の精密質量の測定を、ウォーターズ LCT Premier™ 飛行時間型質量分析計を用いて行いました。測定で得られた m/z 436.0409 は、グルコラファニンの理論値 436.0406 の 0.7 ppm 以内でした。

元素組成解析の際には、i-FIT™ を使用しました。このアルゴリズムは、実測された同位体分布と推定された元素組成の理論的な同位体分布を比較するものです。それぞれの推定された化学式に対して測定された同位体分布と理論的な同位体分布の間の " 一致度 " をスコア化した i-FIT 値が算出されます。グルコラファニンの測定値は、二番目の候補化合物に i-FIT 値で 32 倍以上の差をつけてヒットしました。

LC条件（分析スケール）

LCシステム:	Alliance® HPLCシステム
検出器:	2996 PDA検出器
カラム:	Atlantis HILIC, 5 µm 4.6 x 150 mm
カラム温度:	25°C
流速:	2 mL/min （アイソクラティック 7% A, 93% B）
移動相A:	50 mM ギ酸アンモニウム, pH 6.5
移動相B:	アセトニトリル

LC条件（分取スケール）

LCシステム:	自動分取精製システム
ポンプ:	2545バイナリー グラジエントモジュール
インジェクター/フラクションコレクター:	2767サンプルマネージャ
検出器:	3100 MS検出器、2996 PDA検出器
フルイディクス:	システムフルイディクス オーガナイザー
カラム:	Atlantis HILIC Optimum Bed Density （OBD™）, 5 µm 19 x 100 mm
カラム温度:	室温
流速:	34 mL/min （アイソクラティック 7% A, 93% B）
移動相A:	50 mM ギ酸アンモニウム, pH 6.5
移動相B:	アセトニトリル

MS条件

MSシステム:	3100 MS検出器
イオン化モード:	ESIネガティブモード
キャピラリー電圧:	3400 V
コーン電圧:	25 V
脱溶媒温度:	500°C
脱溶媒ガス:	800 L/Hr
イオン源ヒーター:	150°C
スキャン範囲:	*m/z* 150 – 650

結果および考察

グルコラファニンは比較的極性の高い物質です。グルコラファニンがボイドボリューム近くに溶出するため、逆相クロマトグラフィーで他の関連するグルコシノレートおよびその他の極性抽出物からグルコラファニンを分離することは困難です。そこで、このような分離を実現するために親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を評価、使用しました。

HILIC は、極性、水溶性有機化合物を保持し、分離できる技術です。HILIC は、多くの場合、順相クロマトグラフィーの一種とされています。順相クロマトグラフィーでは、移動相は 100% 有機溶媒ですが、HILIC では極性化合物の保持、分離、溶出が可能となるように水（通常は 20%以下）が移動相有機溶媒（通常はアセトニトリルのような非プロトン性溶媒）に加えられます。

非常に極性の高い溶媒である水は、固定相に対して極性を持つ測定対象化合物と効果的に競合しています。初期条件で極性の充填剤に引き寄せられた極性化合物は、水の割合を増やして移動相の極性を増加させることによって溶出されます。分析対象物は親水性の増大、すなわち水に対するクロマトグラフィーの極性が低い順に溶出されます。ブロッコリーの種子からの抽出物の場合、グルコラファニンが HILIC を使用した際に強く保持される、最も極性の高いグルコシノレートです。

HILIC を使用した際の更なる利点は、溶出画分の有機溶媒比率が高いため、サンプルを乾燥するために要する時間を短縮できることです。通常、各画分が主に水から成る逆相と比べて、溶媒の蒸発と乾燥に要する時間を大幅に短縮できます。また、有機溶媒比率が高い場合に移動相の粘性が低くなるため、一般的にカラムの背圧が低くなるため、より速い流速での使用が可能になりハイスループットにつながります。

前述のように、分析スケールのメソッドは分取スケールのメソッドに移管できます。今回の分取は、質量をトリガーにしています。MS トリガー分取と呼ばれるこの手法では、カラムからの溶離液の一部をスプリットして MS 検出器に導入します。フラクションコレクター側にカラムからの溶離液が流れているタイミングで、MS 検出器からのデータを MassLynx™ ソフトウェアによって確実に処理できるよう、スプリットした溶離液の流速を増加させるためのメイクアップポンプを使用します。

質量分析計でユーザー定義の質量（グルコラファニンの場合、*m/z* 436）が検出されたときに、分取が行われます。対象の質量（または複数の質量）を含むピークのみを分取するので、非常に精密な分取が可能であり、少量で高純度の画分として回収できます。質量分析計の出力の例を図 4 に示します。ピンクの網掛け部分が回収を行ったピークの画分を表します。

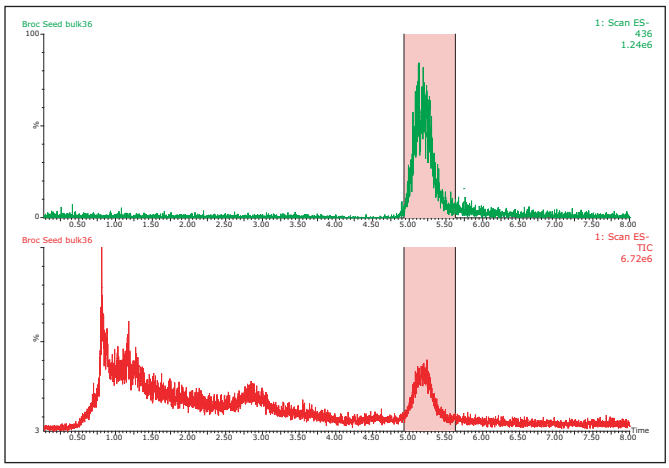

図 4 ブロッコリー種子抽出物の MS トリガー分取精製。網掛け部分は回収されたピーク画分

この分取精製の例では、濃縮された水溶性ブロッコリー抽出物 100 µL を 30 回連続注入しました。それぞれの注入では、移動相約 23 mL をグルコラファニンを含む画分として回収しました。繰り返し注入で得られたすべての画分は、一つの容器に回収しました。この画分を、139 mg になるまで乾燥させた後、飛行時間型質量分析計で測定した精密質量を使用して、単離した結晶がグルコラファニンであることを確認しました。

物質の純度は、220 nm の UV 検出による HPLC 分析法を用いて評価し、面積パーセントで純度 95%でした。同じ手法を用いて出発原料そのものの純度を評価すると、53%以下ということがわかりました。精製前後のクロマトグラムは、図 5 に示します。

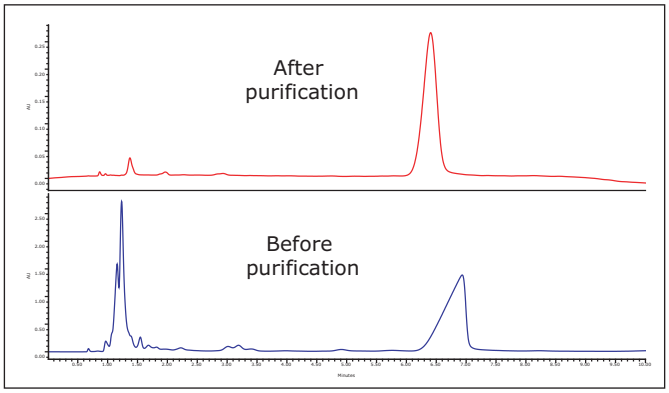

図 5 精製前（下）と精製後（上）のブロッコリー抽出物

結論

- 分取スケールの親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、極性の高いグルコラファニンの単離に有用な分離技術です。画分の乾燥時間が短縮されるため、よりハイスループットな分析が可能となり、さらに高流速で使用することも可能です。
- ブロッコリー種子からのグルコラファニンの単離を MS トリガー分取精製によって行い、純度を 53% から 95% へ増加させました。
- この例では合計 139 mg のグルコラファニンが単離され、この量は文献値と一致しました。
- 飛行時間型質量分析計で測定した精密質量によって、精製画分にグルコラファニンが存在することを確認しました。

参考文献

1. Rochfort et al. Journal of Chromatography A. 2006; 1120: 205-210.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters およびAlliance、Atlantis はWaters Corporationの登録商標です。AutoPurification、i-FIT、LCT Premier、MassLynx、ODB およびThe Science of What's Possible はWaters Corporationの商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年9月 720002699 JA PDF