Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Charged Surface Hybrid (CSH) カラムテクノロジーを用いたGoldenseal Root抽出物の分析性能向上

Mia Summers and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple St., Milford, MA, USA

利点

- 塩基性化合物のローダビリティとピーク形状の向上
- UPLC-ToF-MS を用いた複雑な混合物成分の迅速同定
- 分析法再開発の必要性を軽減するスケーリング可能なカラムケミストリを使用することで分析から分取スケールにシームレスに分析法移管

ソリューション

ACQUITY® UPLC システム
ACQUITY® UPLC CSH C_{18}カラム
XSelect® CSH C_{18}カラム
ACQUITY UPLCカラムカリュキュレータ
ウォーターズ分取カラムカリキュレータ
LCT Premier™ ToF 質量分析計
MassLynx™ソフトウェア

キーワード

分析法移管
分析法開発
分取HPLC
UPLC
天然物
漢方薬
アルカロイド
ベルベリン

はじめに

Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) は US 北東部やカナダ原産の植物で、多くの文化圏において伝統薬として使用されてきました。Goldenseal root 抽出物には berberine や hydrastine などのイソキノリンアルカロイドが含まれますが、これらの薬理作用については広く研究されています[1]。これらのアルカロイドは、低イオン強度移動相条件下で従来の逆相カラムを用いた場合、塩基性化合物の性質とサンプルのローダビリティが制限されていることにより良好なピーク形状が得られません。

本アプリケーションノートでは、高純度、全多孔性 C_{18} や表面多孔性 C_{18} カラムと比べて Goldenseal 抽出物中のアルカロイドのローダビリティを大きく向上させる Charged Surface Hybrid (CSH) カラムテクノロジーを使用した分析について説明します。サンプルのローダビリティを向上させることで、UV におけるアルカロイド検出のピーク形状、分離度、感度を改善し、飛行時間型質量分析計 (ToF-MS) を用いた成分の同定を容易に行えるようになります。Goldenseal の分離はスケーリング可能な CSH ケミストリを用いることで UPLC® から分取 HPLC に容易に分析法移管できるため、ターゲット化合物の精製のために分取 HPLC 分析法を最初から再開発する必要性が軽減されます。分取スケールでも同じ CSH 固定相を使用することで Goldenseal 分離の選択性とアルカロイドのピーク形状の向上が維持されます。

分析条件

全 LC システム（特に記載のない限り）

移動相：	A:0.1% ギ酸水溶液
	B:0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
ニードル洗浄液：	水：アセトニトリル　10:90
サンプルパージ：	水：アセトニトリル　90:10
シールウォッシュ：	水：アセトニトリル　90:10
カラム温度：	30 ℃
検出：	UV@254nm

ACQUITY UPLC 条件

カラム：	ACQUITY UPLC CSH C_{18}
	2.1×100mm, 1.7µm
	製品番号：186005297
流速：	0.4mL/min
注入量：	1µL
グラジエント：	0-40%B; 0-6 分 , 40%B;6-8 分 , 0%B; 8-10 分

結果と考察

Goldenseal の主要な二次代謝物には berberine や hydrastine などのイソキノリンアルカロイドが含まれます。これらの塩基性化合物は低イオン強度移動相条件下で従来の逆相カラムを用いた場合、良好なピーク形状が得られずローディングキャパシティが限定されます[2]。複雑な混合物の分析において、オーバーロードによるピークテーリングと分離度の低下により、ターゲット化合物であるかもしれない微量成分が簡単にマスクされてしまいます。Charged Surface Hybrid（CSH）カラムテクノロジーは、ハイブリッドパーティクルの表面に微量のチャージを加えることで、ギ酸などの添加剤を含む移動相における塩基性化合物の卓越したピーク形状およびローディングを実現します。

CSH C_{18} カラムでの Goldenseal 抽出物の分離を、表面多孔性 C_{18} カラムおよび BEH C_{18} カラムでの分離と ACQUITY UPLC システムで比較しました。結果のクロマトグラムを図 1 に示します。BEH C_{18} カラムと表面多孔性 C_{18} カラムはどちらも、主要な 2 つのピークについて重量オーバーロードを示すピーク形状が見られました。比較してみると、CSH C_{18} カラムでは Goldenseal 抽出物代謝物の UV による分析においてずっと良好なピーク形状が得られ、感度も向上しました。

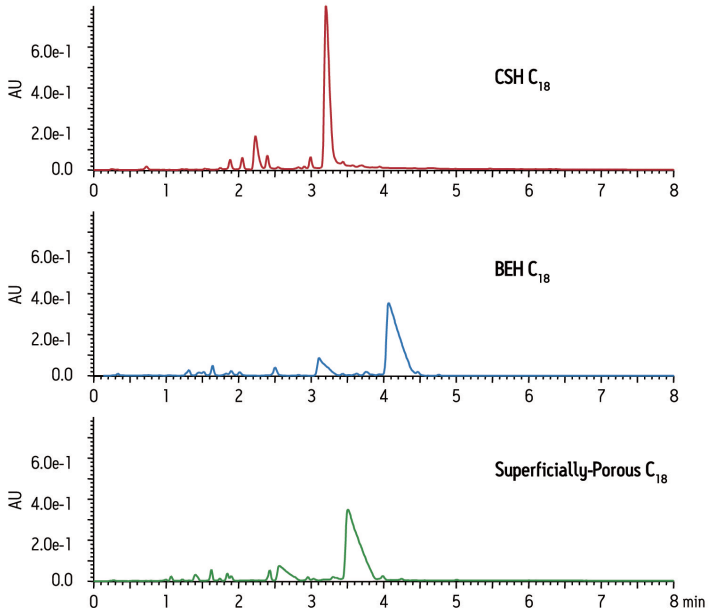

図1　Goldenseal抽出物のCSH C_{18}、BEH C_{18}、表面多孔性C_{18}での分離比較。カラムサイズと分析条件は全て同じ。

ターゲット化合物の同定

複雑な分離においては、ピークのテーリングや分離度が十分に得られないことで対象化合物の同定が妨げられます。UPLC-ToF-MS と CSH テクノロジーを組み合わせることで、複雑な化合物からターゲット化合物の迅速なワンステップ同定が行えます。本アプリケーションでは、二次代謝物を同定するために、Goldenseal 抽出物を CSH C_{18} カラムを使用した ACQUITY UPLC と ESI ToF 質量分析計により分析しています。トータルイオンクロマトグラムで見られた未知の主要および微量ピークの質量は Goldenseal 抽出物の既知二次代謝物と比較・評価しました。各成分の同定は MassLynx ソフトウェアの”Elemental Composition Calculator（理論計算質量との質量精度と安定同位体パターンを用いた組成演算計算ソフト）”を用いた精密質量分析により行いました（図 2）。

AUTO-PURIFICATION 分取 HPLC 条件

カラム : XSelect CSH C_{18} OBD 19×100mm, 5µm, 製品番号　186005421

流速 : 17mL/min

注入量 : 164µL

グラジエント : 0-40%; 0-11.6min, 40%B; 11.6-27min, 0%B; 27min-

ESI TOF-MS 条件

マススキャンレンジ : 150-500 amu

モード : ESI, V+ モード

キャピラリー電圧 : 3000V

コーン電圧 : 10V

脱溶媒温度 : 350L/hr

脱溶媒ガス : 700L/hr

標準試薬 : 200pg/mL leucine enkephalin in 50:50 水 : アセトニトリル

データマネージメント : Empower 2 CDS (UPLC および HPLC) MassLynx（UPLC-ToF-MS および分取 HPLC）

サンプル前処理

Goldenseal 抽出物 : 1605mg 凍結乾燥 Goldenseal root 粉末は 10mL 酢酸エチルを用いて室温で抽出。サンプルは 1 時間撹拌後 0.2µm ナイロンフィルターでろ過。

LCMS 分析の結果、UV クロマトグラムで見られた 2 つの主要なピークは hydrastine と berberine と同定されました（図 3）。CSH テクノロジーを用いてローダビリティとピーク形状が向上したことで、主要なピークに近接して溶出する微量成分の canadine、canadaline、berberastine の分離・同定が実現します。

Component	Experimental Mass (M+H⁺)	Calculated Mass (M+H⁺)	Error (PPM)	Formula (M+H⁺)
Berberine	336.1236	336.1236	0.0	$C_{20}H_{18}NO_4$
Hydrastine	384.1520	384.1447	0.8	$C_{21}H_{22}NO_6$
Canadine	340.1549	340.1549	0.0	$C_{20}H_{22}NO_4$
Berberastine	352.1182	352.1185	0.6	$C_{20}H_{18}NO_5$
Canadaline	370.1648	170.1654	1.6	$C_{21}H_{24}NO_5$

図2　Goldenseal成分の元素組成分析

LCMS 分析の結果、UV クロマトグラムで見られた 2 つの主要なピークは hydrastine と berberine と同定されました（図 3）。CSH テクノロジーを用いてローダビリティとピーク形状が向上したことで、主要なピークに近接して溶出する微量成分の canadine、canadaline、berberastine の分離・同定が実現します。

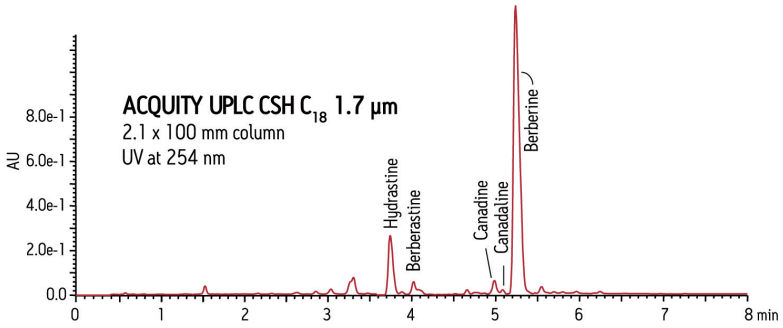

図3　Goldensealの二次代謝物はCSHテクノロジーおよびUPLC-ToF MSにより分離・同定

分析法移管

分析メソッド（UPLC または HPLC）は天然物抽出物からのターゲット化合物のスクリーニングに使用されます。対象とする化合物を分析するメソッドは目的成分の単離のために分取 HPLC にしばしばスケールアップされます。分析および分取分離において異なるカラム固定相を使用すると、選択性やピーク同定に影響し、分取スケールにおいて時間のかかる再分析法開発が必要になります。CSH 固定相では分析および分取どちらのカラムサイズも揃っているためピーク溶出順序を維持して分取スケールにスケールアップできます。さらに、CSH カラムでは BEH や表面多孔性カラムに比べてサンプルのローディングキャパシティが向上するため分取スケールの分離において大きな利点となり、ピークテーリングが抑えられることでよりきれいなフラクションを分画することができ、繰り返し行う精製ステップの回数を低減できます。

Goldenseal の分離は UPLC システムでの ACQUITY UPLC CSH C_{18} カラムから分取 HPLC システムで同じケミストリ（XSelect CSH C_{18} 19×100mm, 5µm）のカラムに移管しました。まず ACQUITY UPLC カラムカリキュレータを用いて HPLC に分析法移管し[3]、続いてウォーターズ分取カラムカリキュレータを用いて分取 HPLC に移管しました。カラム長さに対する粒子径の比（L/d_p）を一定に保って分離度を維持して 10 分の UPLC メソッドを HPLC に適切に移管するには、4.6×250mm, 5µm カラムが必要で、

結果として得られるメソッドは約 75 分になります。このような長時間かかる分析メソッドのかわりに、計算した HPLC メソッドは粒子径を考慮にいれずに一定の線速度でスケールアップし、直接分取 HPLC メソッドに移管しました。流速、注入量、グラジエント時間を調整して一定の線速度でスケールアップすることで、結果として僅かな分離度の低下のみで分取分離の時間が非常に短くなります。分析から分取のスケールアップに同じカラムケミストリを用い、CSH テクノロジーを用いることで UPLC でも分離において見られたローディングキャパシティの向上、ピーク形状および分離の向上が分取 HPLC においても維持されます (図 4)。

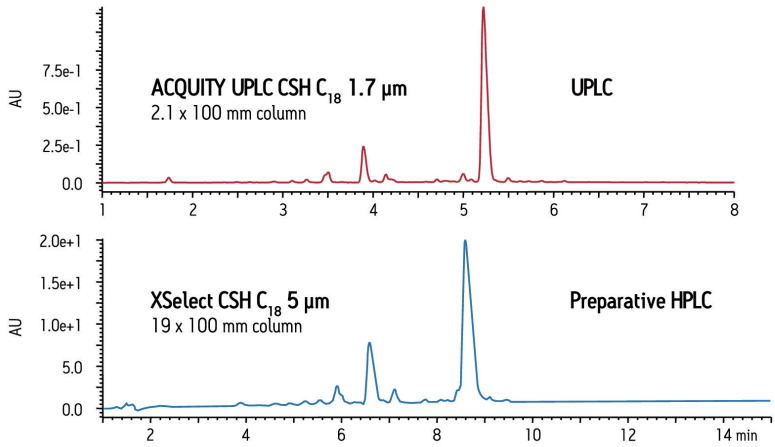

図4 Goldenseal 抽出物の254nmにおけるUPLCおよびHPLC分離

まとめ

■ Goldenseal 抽出物中のイソキノリンアルカロイドなどの塩基性化合物について、CSH テクノロジーを用いることでサンプルローディングの向上が見られました。従来の全多孔性または表面多孔性カラムと比べて、CSH カラムを用いることでピークテーリングが低減して検出感度が向上し、全体としてより良好な品質の分離が得られました。

■ CSH テクノロジーを用いた Goldenseal の分離ではピーク形状と分離度が向上し、ACQUITY UPLC と ESI ToF-MS を用いたより効率的な精密質量分析により主要および微量の二次代謝物が同定されました。

■ Goldenseal 分離の UPLC から分取 HPLC への分析法移管はどちらのスケールにおいても同じ CSH カラムケミストリを用いて行いました。結果として得られた分取分離では、分析法の再開発を行うことなしに選択性とピーク形状を維持しており、分析から分取 LC への迅速でより効率的な分析法移管が行えました。

参考文献

1. Weber, H.A. et al. *J. Agric. Food Chem*. 51: 7352 [2003].
2. McCalley, D. V. *Anal. Chem*. 78: 2532 [2006].
3. Jones MD, Alden P, Fountain KJ, Aubin A. *Implementation of Methods Translation between Liquid Chromatography Instrumentation,* Waters Application Note [2010], Part Number 720003721EN.

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

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、ACQUITY, ACQUITY UPLC および UPLC は Waters Corporation の登録商標です。CSH、XSelect、MassLynx、Empower、LCT Premier、OBD 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。

©2011 年 12 月 720004098JP