Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた市販甘味料の分取精製

Jo-Ann M. Jablonski, Christopher J. Hudalla and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

BEH Amide カラムは HILIC によって極性化合物の保持を向上し、極性化合物の分析、スケーリング、分取精製を容易に行うためデザインされています。

- BEH Amide カラムでは親水性化合物が逆相固定相よりも強く保持して分離が向上することで、極性化合物を容易に単離
- BEH Amide 結合相は非修飾の HILIC 固定相よりも若干水系比率の高い移動相、サンプル希釈溶媒に対応し、糖やペプチドなど親水性化合物のより実用的な選択肢
- BEH Amide カラムでは極性化合物の負荷量向上により分取のための注入回数を低減しプロセスの効率を促進
- 分析および分取スケールで再現性の高いクロマトグラムが得られ、ターゲット化合物同定における曖昧性を低減し BEH Amide カラムの分析法移管性を実証

ウォーターズのソリューション

AutoPurification™ システム

XBridge™ BEH Amide カラム

GHP シリンジフィルター

キーワード

極性化合物単離、BEH Amide カラム、分取 LC、親水性相互作用クロマトグラフィー、HILIC

はじめに

多くのサンプルに対して逆相が一般的に選択されるクロマトグラフィーのモードですが、非常に極性の高い化合物は非極性のカラムには保持しないため分析が難しいことが多くあります。親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は親水性化合物を保持するために極性固定相を活用した相補的な技術です。分析種は、液－液分配、吸着、イオン性相互作用、水素結合性保持メカニズムの独自の組み合わせに基づいて分離されます。移動相の水系比率を低比率から高比率に上げるに従って、化合物はカラムから溶出します。トリファンクショナル結合アミド固定相の BEH Amide カラムは、ACQUITY UPLC® システムで極性化合物を分析するために粒子径 1.7 µm の充てん剤を使用した製品が 2009 年に発売されました。その後、糖類、合成糖、糖ペプチドや天然物から抽出した極性化合物などの化合物を分析・分取できるカラムを求める声に対応し、分析・分取 HPLC アプリケーションで使用できる粒子径 5 µm の充てん剤の開発が推進されました。本アプリケーションノートでは、BEH Amide 充てん剤の市販甘味料中ステビア関連化合物への有用性を実証します。

実験方法

LC条件

システム：　Waters 2525 バイナリー
グラジエントモジュール、
2767 サンプルマネージャ、
カラムフルイディクスオーガナイザー、
2996 フォトダイオードアレイ
検出器、ZQ™ 2000 MS 検出器、
2420 ELS 検出器

カラム：　XBridge BEH Amide、
5 µm、4.6 × 150 mm
製品番号　186006595

XBridge BEH Amide、
5 µm、19 × 150 mm
製品番号　186006605

カラム温度：25 ℃

移動相 A：　80：20
アセトニトリル /0.1% アンモニア水

移動相 B：　30：70
アセトニトリル /0.1% アンモニア水

弱洗浄溶媒：75：25　アセトニトリル / 水

強洗浄溶媒：20：80　アセトニトリル / 水

シール洗浄：50：50　アセトニトリル / 水

サンプル希釈溶媒：50：50　アセトニトリル / 水

流速：　図に記載

グラジエント：図に記載

注入量：　図に記載

サンプル調製

分析スケール

市販ステビア甘味料 1.2 mg を 50：50　アセトニトリル / 水 1 mL に溶解し、Vortex で攪拌後、サイズ 13 mm、孔径 0.45 µm の GHP シリンジフィルター（製品番号 WAT200516）でろ過しました。

分取スケール

市販ステビア甘味料 832 mg を 50/50 アセトニトリル / 水 20 mL に溶解し、Vortex で攪拌後、サイズ 25 mm、孔径 0.45 µm の GHP シリンジフィルター（製品番号 WAT200514）でろ過しました。

分析HPLC

逆相カラムに親水性化合物を保持することが難しいため、天然物からの極性化合物の分析と単離は困難であることが多くあります。親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、親水性の化合物を極性固定相との相互作用により分離する、逆相と相補的なクロマトグラフィー分離手法で、液－液分配、吸着、イオン性相互作用、水素結合性保持メカニズムの組み合わせによってサンプルが保持され、移動相の極性を上げることでカラムから分析種が溶出します。固定相による化合物の選択性と保持力は、カラム充てん剤の特性によって決まります。図 1 に示すように、カラムサイズと分析条件を一定にしても、分析種の溶出プロファイルは 3 種類の HILIC 固定相でそれぞれ異なります。BEH Amide カラムは様々なタイプの化合物に対して最も保持が強く、他の 2 つのカラムと異なる選択性を示しました。類似した化合物は、多くの場合保持が向上することで化合物間の分離が向上します。

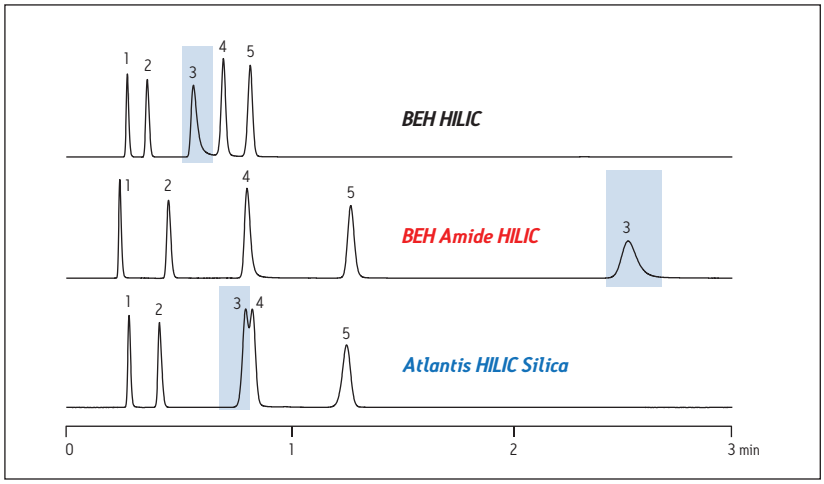

図 1. HILIC 固定相 3 種類の保持力および選択性の違いを示す代表的なクロマトグラム。Atlantis® HILIC シリカは（表面極性が高いため）BEH HILIC に比べて保持が強く、異なる選択性を示します。アミドカラムは様々なタイプの化合物に対して最も保持が強く、他の 2 つのカラムと異なる選択性を示します。
分析条件：アイソクラティック、12 mM ギ酸アンモニウム (pH3) 添加 90% アセトニトリル溶液；検出 UV @ 254 nm。化合物：(1) acenaphthene、(2) thymine、(3) 5-fluoroorotic acid、(4) adenine、(5) cytosine

極性化合物の保持が HILIC クロマトグラフィーを採用する第一理由ですが、保持においてサンプル希釈溶媒も重要な役割を果たし、溶解性とピーク形状に影響します。従来からの非修飾タイプの HILIC 固定相では、有機溶媒比率の高いサンプル希釈溶媒と移動相が一般的に必要ですが、これはサンプル濃度の高い分取クロマトグラフィーにおいては極性化合物の溶解性の制限となります。例え 10 - 20%でも少量の水を添加すると、非修飾タイプの固定相では HILIC の初期組成移動相条件と適合しません。BEH Amide 結合相は水系比率の高い移動相や注入溶媒にも許容性が高く、分取クロマトグラフィーに適した濃度で糖やペプチドのような極性化合物を溶解できます。さらに、一般的に HILIC では有機溶媒比率の高い移動相が使用されるため、イオン性化合物の質量分析計におけるレスポンスが向上し、分画したフラクションの脱溶媒の時間が低減します。

Stevia rebaudiana Bertoni はパラグアイやブラジルの山岳地帯に潅木として成育するハーブです。Stevia の天然の甘味は Stevioside および Rebauoside によるもので、この 2 種類の配糖体は Stevia 植物の葉から単離されます。Stevioside および Rebauoside は砂糖よりも約 300 倍甘いですが、ノンカロリーで糖質を含みません。これらの特徴のみでも、食品製品への Stevia の使用承認が促進されています。

図 2 に示すように、5 µm、4.6 × 150 mm BEH Amide カラムでの市販 Stevia 甘味料の分析結果から、メインピークの前に溶出する微量成分の存在が示唆されます。さらに検討を行ったところ、ステビア関連化合物が実際にこの甘味処方中の微量成分であったことが確認されました。混合物の組成をよりよく理解するため、同定に向けて微量成分を分取することが多くあります。次の分析に十分な量を効率的に分取するためには、サンプルを繰り返し注入することが通常必要になります。

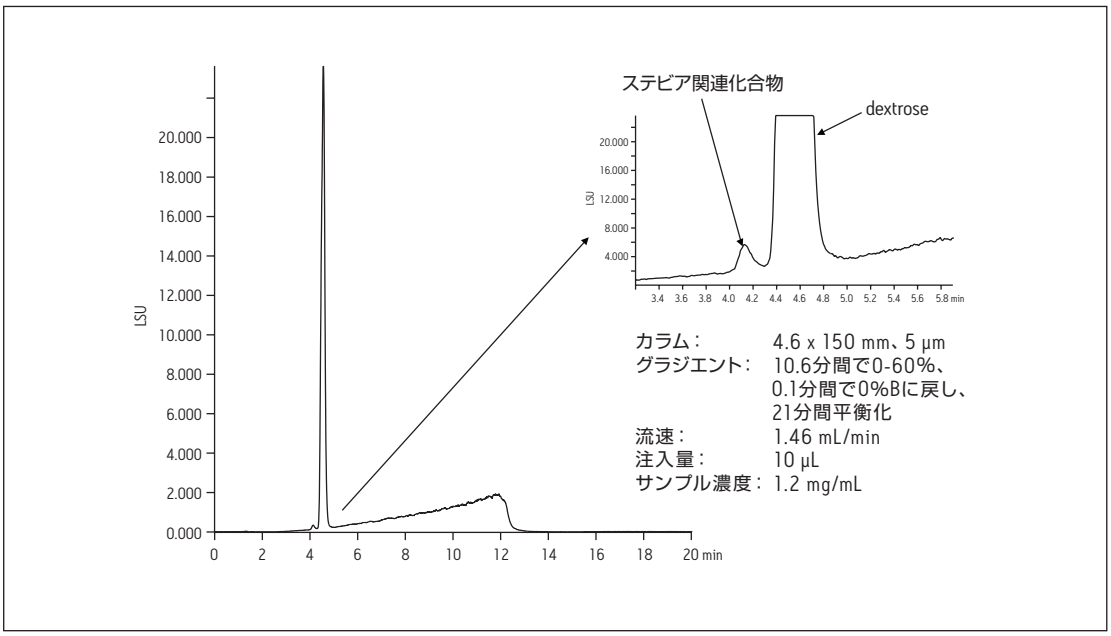

図 2. BEH Amide、4.6 × 150 mm、5 µm カラムでの市販 Stevia 甘味料の分析

分離度を妥協せずにカラムにロードできるサンプル量を確認するために分析スケールのカラムを使用してロード量の検討を行いました。ピーク分離度が向上すると、より多くのサンプルをロードでき、より純度の高い化合物を単離できます。図 3 は分析スケールのカラムで最大注入量 50 µL（サンプルロード量 2.1 mg 相当）まで検討を行った結果を示しています。

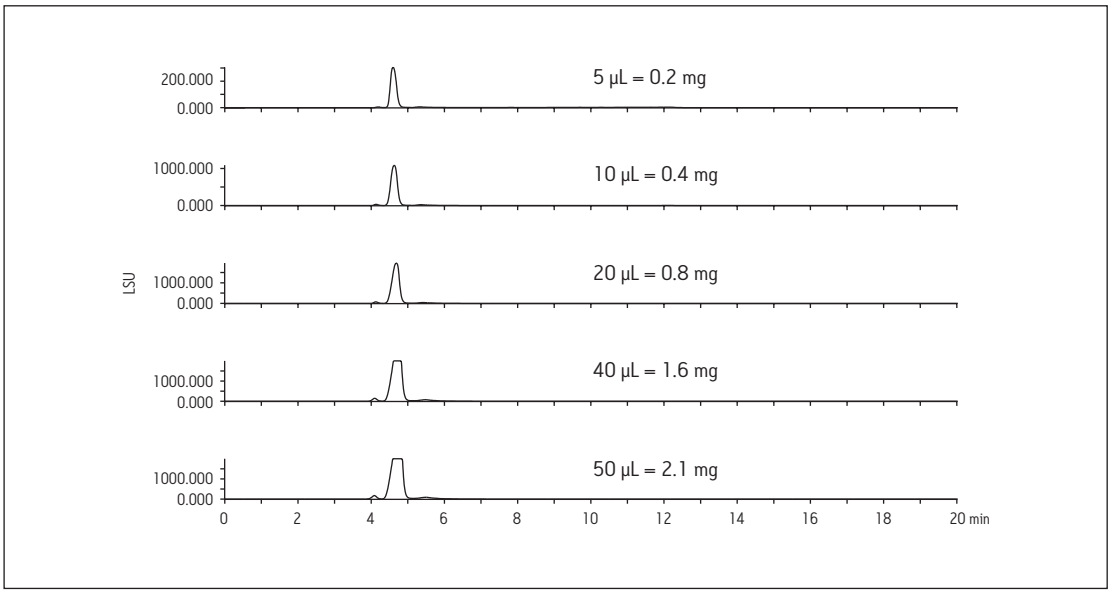

図 3. BEH Amide、4.6 × 150 mm、5 µm カラムで市販 Stevia についてロード量の検討を行った結果（ELS 検出）

分取HPLC

分析カラムのロード量 2.1 mg を内径 19 mm の分取カラムへスケールアップ計算すると約 36 mg ですが、微量成分と大きなメインピークとの卓越した分離から、内径 19 mm の分取カラムでより多くのロードが可能であることが示唆されます。

更なる検討は行わず、分析スケールのメソッドを 19 × 150 mm のカラムにスケールアップしました。図 4 に示すように、サンプル混合物 2 mL（サンプル 83 mg ロード）では微量成分とメインピークとの卓越した分離が得られました。注入量 3 mL（サンプル 125 mg ロード）の結果も、メインピークと対象となる微量成分との十分な分離を維持してここまで問題なくサンプルロードを増加できることを示していました。この分取カラムに 166 mg のサンプルロードは可能ですが、対象とするピークの分離が低下することで単離したピークの純度が低減する可能性があります。本研究における BEH Amide カラムの負荷容量は、同じサイズの逆相カラムへの推定負荷容量と同等です。

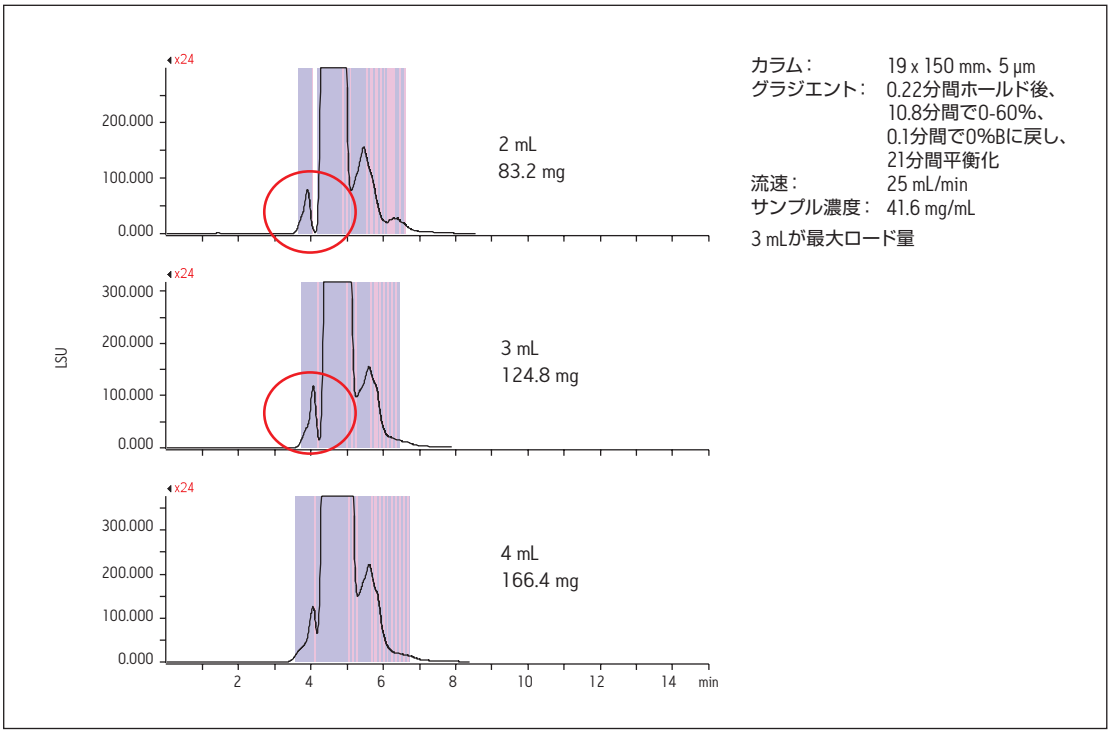

図 4. BEH Amide、19 × 150 mm、5 µm カラムでの市販 Stevia 甘味料の分析 (ELS 検出)。微量成分とメインピークとの良好な分離度により多量なサンプルロードが可能 .

分離をスケールアップするには、適切にグラジエントをスケーリングするだけでなく、分析と分取で同じカラムケミストリーを使用することが必要です。適切に分離をスケールアップすると、分析スケールのクロマトグラフィープロファイルと同じプロファイルがロード量を増加させた分取スケールでも得られます。図 5 には、分析スケールのグラジエント結果と単離のために分取スケールを用いて最大ロード量で行った結果のクロマトグラフィーを比較して BEH Amide カラムの分析法移管性を示しました。約 4 分に溶出する微量成分とメインピークがベースライン分離していることご留意ください。

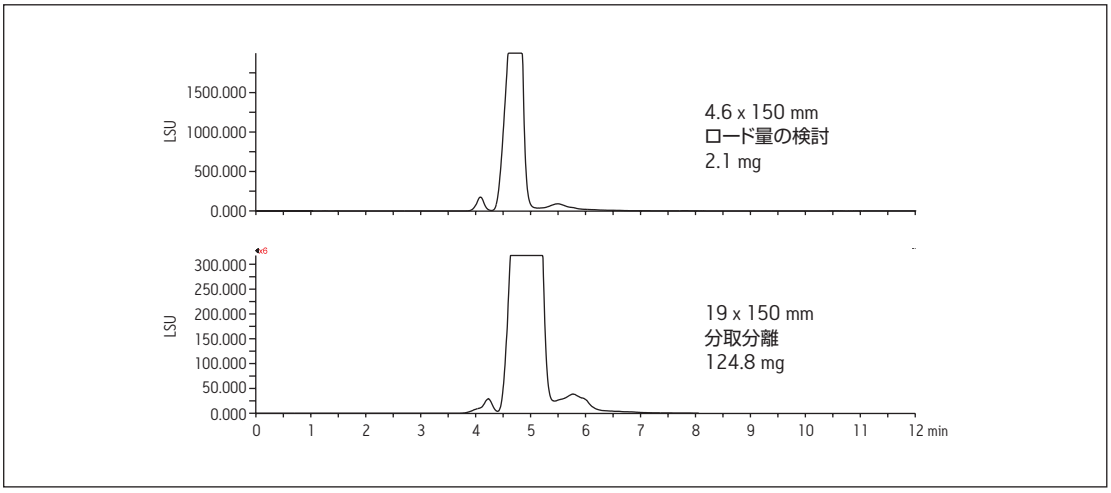

図 5. Stevia 甘味料の 4.6 × 150 mm カラムにおける最大ロード量での分析スケール分離 (上) と 19 × 150 mm カラムでの最大ロード量での分取スケール分離との比較。クロマトグラフィープロファイルはどちらのスケールでも同じ。

結論

- 親水性成分を逆相充てん剤よりも強く保持し分離するため、BEH Amide カラムでの極性化合物の分離はより容易です。
- BEH Amide 結合相では、非修飾タイプの HILIC 固定相と比べて若干水系比率の高い移動相とサンプル溶解溶媒にも許容性が高く、BEH Amide カラムは糖やペプチドなどの親水性化合物分析のより実用的な選択肢となります。
- BEH Amide カラムでは極性化合物のロード量が増加できるため、製品分取のための注入回数を低減し、プロセスの効率を促進できます。
- 分析および分取スケールで再現性の高いクロマトグラムが得られることでターゲット化合物同定における曖昧性を低減し BEH Amide カラムの分析法移管性を実証しました。

参考文献

1. Grumbach E., Fountain K. *Comprehensive Guide to HILIC*, Waters Corporation [June 2010], Part Number 715002531.
2. Hudalla C., Cook J., Dion M., Iraneta P., Jenkins K., Smith P., Walsh D., Wyndham K. *UPLC Analysis of Carbohydrates: Applications for Saccharide Analysis in Food & Beverage Products and Pharmaceutical Excipients*, Waters Poster [2009], Part Number 720003214EN.
3. Fountain K., Hudalla C., McCabe D., Morrison D. *UPLC-MS Analysis of Carbohydrates*, Waters Application Note [October 2009], Part Number 720003212EN.
4. Diehl D.M., Xia F., Cavanaugh J., Fountain K., Jablonski J., Wheat T. *Method Migration from UPLC Technology to Preparative HPLC*, Waters Application Note [October 2007], Part Number 720002375EN.
5. Fountain K.J., Xu J., Diehl D., Morrison D. *J. Sep. Sci.* 2010; **33**: 740-751.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
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 UPLC および Atlantis は Waters Corporation の登録商標です。
AutoPurification、XBridge、ZQ 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。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年5月 720004284JA PDF