[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ペパーミント抽出物中の微量成分単離に向けた分取液体クロマトグラフィーにおける分離およびカラムローディングの系統的な向上

Jo-Ann M. Jablonski and Rui Chen
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- フォーカスグラジエントにより近接して溶出する成分の分離を向上することでカラムローディングを増加でき、より効率的なターゲット化合物の精製が可能
- 強溶媒大量注入によるピーク形状悪化と分離低下の影響を at-column dilution により軽減し、天然物単離における分離、カラムローディング、全体としての生産性を向上

ウォーターズのソリューション

AutoPurification™ システム

XSelect® CSH™ カラム

XSelect CSH C_{18} OBD™ 分取カラム

キーワード

分取液体クロマトグラフィー、天然物単離、フォーカスグラジエント、at-column dilution

はじめに

天然物は、医薬品、サプリメント、栄養補助食品、代替医療の業界において幅広く使用されています。[1-4] クロマトグラフィーは化学的フィンガープリント、構造解析、分取精製スケールでの生理活性物質の単離を含む天然物研究の不可欠な要素として長い間用いられています。天然物抽出物は通常、様々な官能基、酸・塩基特性、分子量をもつ多くの化合物種から成る複雑な混合物であるため、逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）は主にその汎用性から天然物の分析および精製として役に立つことが多い技術です。

分取高速液体クロマトグラフィー（分取 HPLC）の使用は、この 10 年間で非常に多くの種類の天然物単離において主流となりました。[4] ターゲット化合物の精製において、ターゲット化合物と近接する夾雑ピークとの十分な分離には良好な分取クロマトグラフィーが必須です。分離を向上させる典型的なアプローチとしては、異なる固定相・移動相・モディファイヤーの評価、分離温度の変更、グラジエント勾配の変更などがあります。しかしながら、分取クロマトグラフィーの最終的な目標は、望ましい純度のターゲット化合物を効率的に収集することです。そのため、全体の分析法開発ストラテジーにおいては、サンプル希釈溶媒や注入方法などの実験パラメーターと、溶媒消費量や生産性に対するそれらパラメーターの影響についても考慮する必要があります。[5] 特に、非常に複雑なマトリックス中に必要な化合物が低濃度で存在することが多い天然物の単離において必要です。そのために、at-column dilution（ACD）は従来の注入方法に対して実行可能な代案です。ACD によりクロマトグラフィーの一貫性と分離を維持したまま、強溶媒に溶解したサンプルを大量注入でき、その結果、全体として精製の生産性を向上できます。[6]

本アプリケーションノートではペパーミント抽出物 [7] を用いて、天然物中の微量成分単離に向けた典型的な分取 HPLC 分析法開発ワークフローと、系統的な分離およびサンプルローディングの向上について示しました。

実験方法

サンプル詳細

3.3 g の乾燥ペパーミントを 80 : 20 メタノール / 水 20 mL を用いて室温で 6 時間抽出し [7]、上清は Acrodisc Syringe Filter（0.45 µm GHP Membrane、25 mm）でろ過しました。

LC条件

システム：AutoPurification

カラム： XSelect CSH C_{18} 5 µm 4.6 × 100 mm

XSelect CSH Phenyl-Hexyl 5 µm 4.6 × 100 mm

XSelect CSH Fluoro-Phenyl 5µm 4.6 × 100 mm

XSelect CSH C_{18} OBD 分取 5 µm 19 × 100 mm

移動相 A：0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液

移動相 B： 0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）アセトニトリル溶液

UV 波長： 220 nm

流速： 分析 1.46 mL/min、分取 25 mL/min

本研究に用いた分析および分取グラジエント条件を表 1 にまとめました。ACD 注入では、ACD ポンプから直接注入バルブへアセトニトリルを一定に 1.3 mL/min（トータル流速の 5%）送液し、一方のグラジエントポンプからは溶離液を流速 23.7 mL/min でグラジエント送液して、カラムヘッドで両者を混合します。分取スケールにおけるクロマトグラフィーが分析スケールにおけるクロマトグラフィーと同一になるようにグラジエントセグメントあたりのカラムボリューム（CV）は 3 つの分析法全てで一定にしました。他の主要な分析パラメーターは各図の説明文に記載しました。

分析		分取 *通常の注入		分取 **ACD	
Time (min)	%B	Time (min)	%B	Time (min)	%B
0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	0.0
1.0	17.4	0.4	5.0	4.3	0.0
11.7	25.4	1.4	17.4	5.3	12.4
12.2	95.0	12.2	25.4	16.1	20.4
17.2	95.0	12.6	95.0	16.5	90.0
17.4	5.0	17.6	95.0	21.5	90.0
25.4	5.0	17.8	5.0	21.7	0.0
		25.8	5.0	29.7	0.0

* 2 mL ループ、システムボリューム = 6.3 mL

** 5 mL ループ、システムボリューム = 9.3 mL; ACDポンプ流速:1.3 mL/min、トータル流速:25.0 mL/min

表 1. 本研究に用いたグラジエント条件。分析の流速は 1.46 mL/min、分取の流速は 25 mL/min

結果および考察

カラムスクリーニングおよびフォーカスグラジエント

分取クロマトグラフィーの基本原理の多くは、分析クロマトグラフィーと同じです。そのため、分取 HPLC 分析法開発は多くの場合、分析 LC により開始しカラムサイズに応じて分取にスケールアップします。3 種類のカラムを用いたジェネリックグラジエント分析によるペパーミント抽出物の LC/UV クロマトグラムを図 1 に示しました。ターゲット化合物も粗抽出物中のその他微量化合物も XSelect CSH C_{18} カラムで最も良好に分離しました（図 1A）。そのため、これ以降の確認実験には XSelect CSH C_{18} カラムケミストリーを用いました。

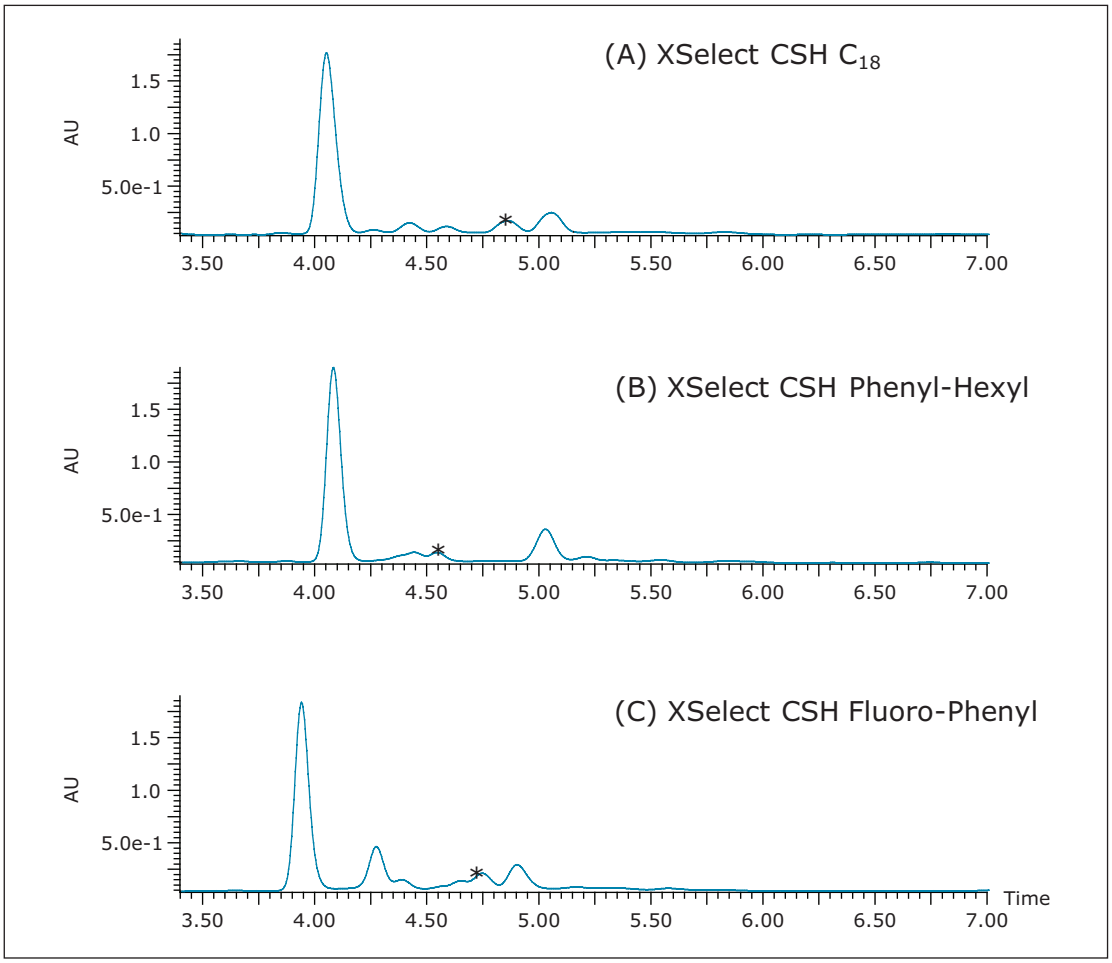

図 1　3 種類のカラムを用いて得られたペパーミント抽出物の LC/UV クロマトグラム：（A）XSelect CSH C_{18}（B）XSelect CSH Phenyl-Hexyl（C）XSelect CSH Fluoro-Phenyl アスタリスク（）はターゲット化合物のピークを示しています。全てのカラムサイズは 4.6 × 100 mm（粒子径 5 µm）。注入量は 10 µL。ジェネリックグラジエントとして 5-95%B（12 分間）を用い、トータル分析時間は 20 分でした。*

イニシャルのジェネリックグラジエントでは対象分析種は 22%B に溶出した（図 2A）ため、さらに分離を向上させるために 17-25%B の範囲のフォーカスグラジエントを採用しました（図 2B および 2C）。フォーカスグラジエントはカラムで近接して溶出する化合物の滞留時間を長くしてより良好に分配し、僅かに極性の異なる化合物間の選択性（α）を向上させます。[8] しかしながら、グラジエント勾配を緩やかにすると保持能（k）も増加し、その結果、ブロードなピーク、ピーク高さ低減、分析時間延長、分取クロマトグラフィーでの溶媒コスト増加につながります。そのため、フォーカスグラジエントを用いる際には、分離度と分析時間のバランスを保つように注意を要します。本研究では、0.72%B/CV（図 2C）の時にトータル分析時間 25 分で、ターゲットピークを全ての隣接ピークからはっきりとベースライン分離しました。分析時間を短くするためには、ターゲットピークを収集し終えたらすぐに有機溶媒濃度を上げてカラム洗浄ステップに移ります。

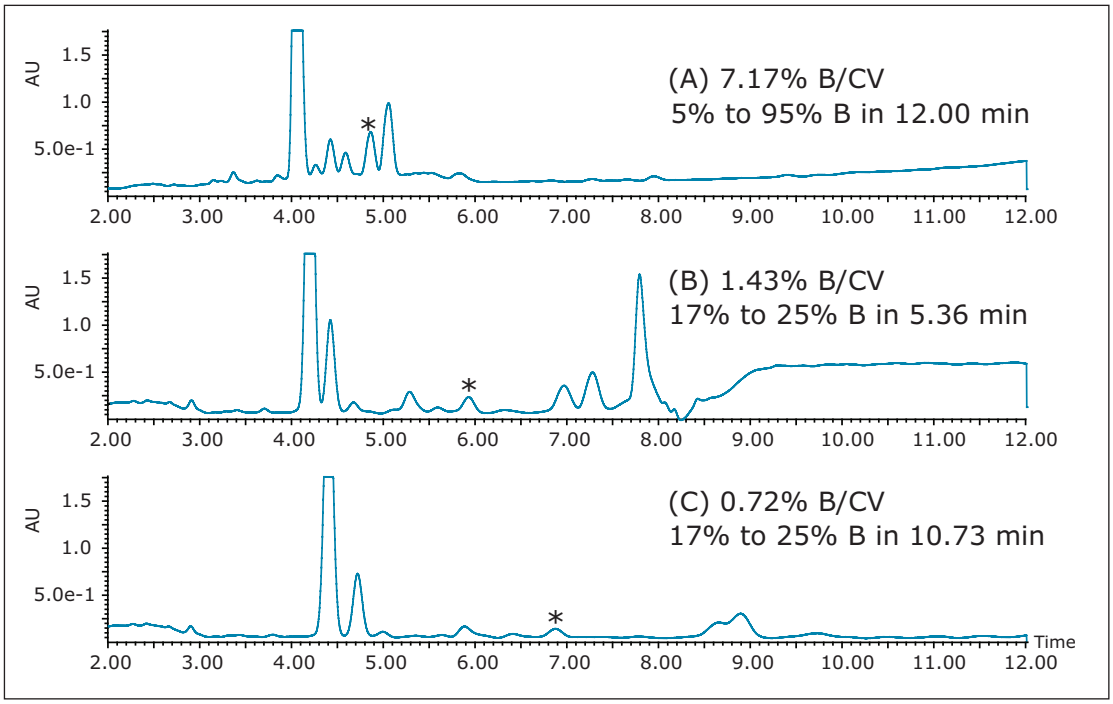

図 2.　3 種類の異なるグラジエントを用いた XSelect CSH C_{18} 4.6 × 100 mm、5 µm カラムでの LC/UV クロマトグラム

スケールアップ

分析から分取への適切なスケーリングには、クロマトグラフィーの各ステップにおいてグラジエント勾配（CV あたりの %B の変化）を維持する必要があります。[9] 流速と注入量はカラムサイズに応じてスケールアップしました。表 2 は、クロマトグラフィーを分析カラムから分取カラムにスケーリングする際に用いた流速と注入量をまとめました。適切にスケーリングしたフォーカスグラジエントは表 1 に示しました。

	分析	分取
カラムサイズ	4.6 x 100 mm	19 x 100 mm
カラムボリューム	1.4 mL	23.8 mL
流速	1.46 mL/min	25.0 mL/min
注入量	30 µL	512 µL
注入量	40 µL	682 µL

表 2.　スケールアップパラメーターまとめ

XSelect CSH C_{18} 4.6 × 100 mm カラムを用いたローディングの検討（ここでは記載しておりません）から、ターゲット化合物と不純物との分離を損なわずに注入できる最大量は 30 µL であることが示されました。カラムサイズに応じて計算すると、分析カラムへの注入量 30 µL は 19 × 100 mm カラムへの注入量 512 µL に相当します。従来の注入方法で、ターゲットピークは近接して溶出する夾雑から分離しました（図 3A）。さらに注入量を増加させると、表 2 に示す 682 µL 注入（結果は図 3B）のように、対象ピークと近接して溶出するピークとの分離度が低下します。そのため、本研究のペパーミント抽出物では、従来の注入方法を用いた場合、19 × 100 mm カラムへの実用的な注入量は 512 µL までに限定されています。実際の分離度の低下は、一つにはサンプル希釈溶媒として強溶媒を使用していることが原因です。天然物はサンプルマトリックスから抽出するために、メタノール、エタノール、アセトンなど逆相クロマトグラフィーに対して溶離力の強い有機溶媒の使用が必要な場合もあります。しかしながら、強溶媒の大量注入はクロマトグラフィーを悪化させ、結果として分離度が低下することが多くあります。強溶媒中のサンプル分子はカラムに保持せず、強溶媒が初期組成移動相で十分に希釈されて保持が促進されるまで、カラムの中を移動します。結果として、サンプルは幅広いバンドでカラムに保持されます。サンプルは幅が広く分離の悪いピークとしてカラムから溶出し、結果としてカラム効率と全体としての生産性が限定されます。

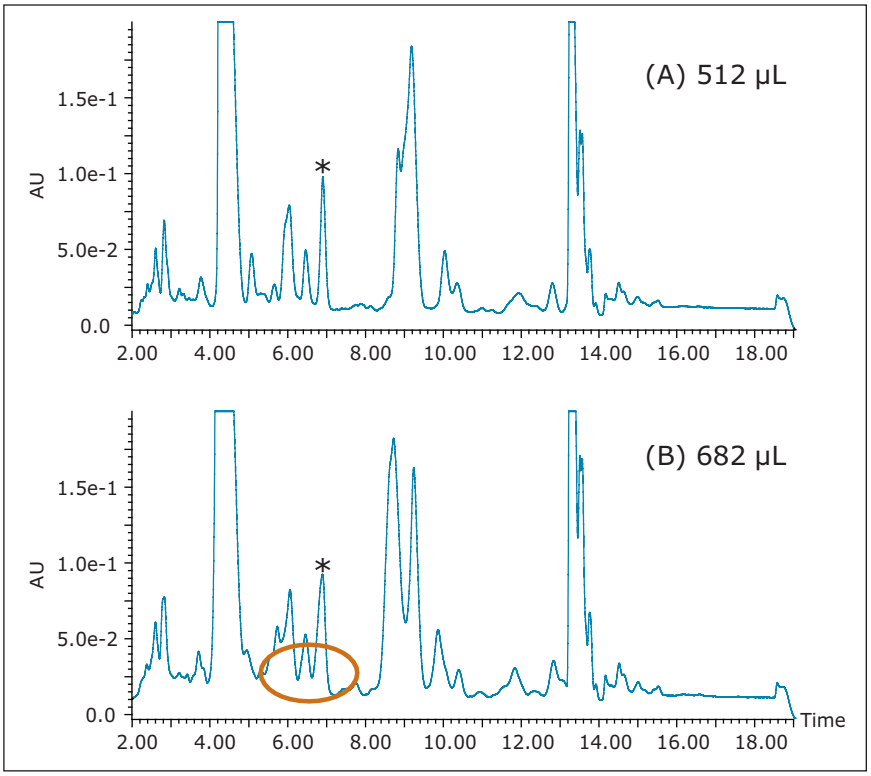

図 3. 通常配管の Waters® AutoPurification システムで XSelect CSH C_{18} OBD 分取 19 × 100 mm、5 µm カラムを用いたペパーミント抽出物の 512 µL および 682 µL 注入の結果

At-column dilution (ACD)

ACD により、強溶媒の大量注入が可能になり、同時にサンプルの溶解性、カラムローディング、分離度が向上します。[6] ACD では、強溶媒中のサンプルがカラムヘッドで水系移動相により希釈されるようにクロマトグラフィーシステムを配管します。希釈された溶媒中のサンプルはカラムに保持され、グラジエントによりサンプルの溶出が始まる前に強溶媒はカラムから洗い流されます。グラジエントが開始すると、サンプルの成分は幅が狭く、良好に分離したバンドとして溶出されます（図 4）。強溶媒の影響を効果的に軽減し、分離を維持できます。さらに、カラムヘッドで希釈されるところまでサンプルは有機溶媒中にあるため、サンプルの析出が起こりません。

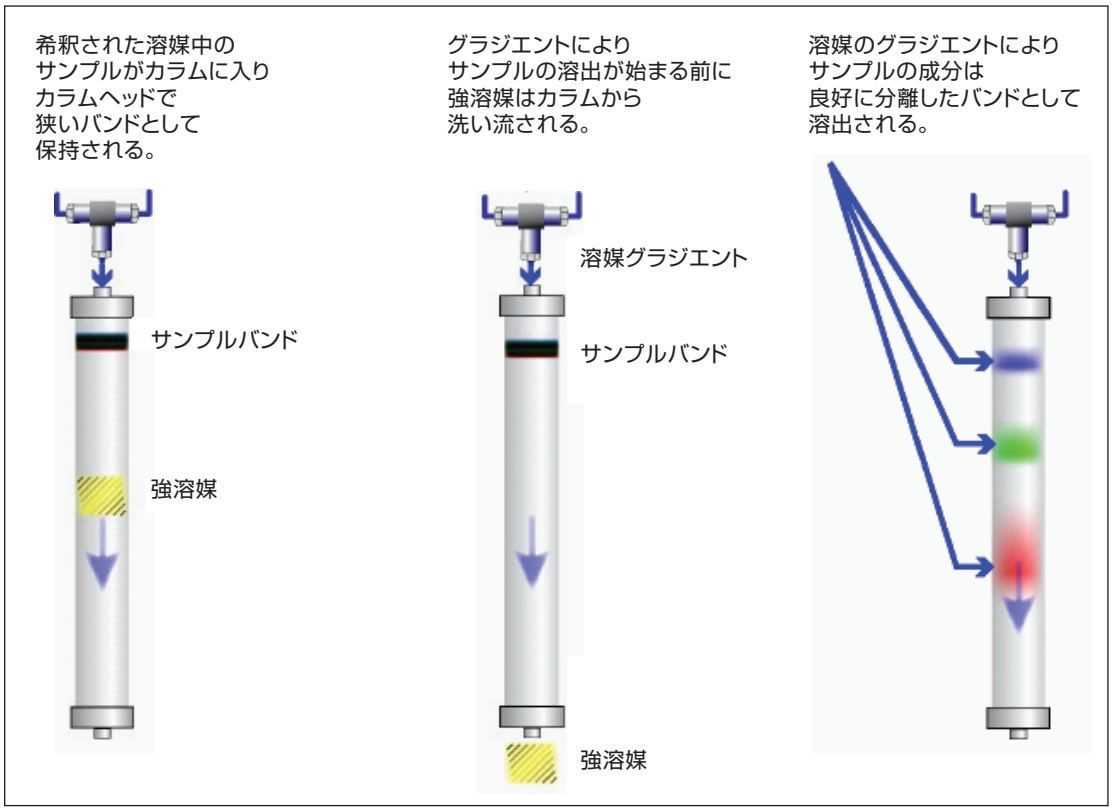

図 4.　at-column dilution の概略

図 5A および 5B は通常の注入方法および ACD で 682 µL 注入を行ったクロマトグラムを示しています。図 5B に示すように、ACD を用いた注入では、ターゲットピークと近接して溶出するピークとの分離が明らかに向上しました。図 5C に示すように、ACD では分離度を損なわずに最大 2.7 mL まで注入が可能です。これは、通常の注入方法を用いた場合の 512 µL に比べてカラムへのローディングが 5 倍増加することに相当します。

ACD メソッド最初のイニシャルホールドによりサンプルループを完全に洗い流すようにするのが重要です。例えば、図 5C の 2.7 mL 注入には 5 mL ループが使用されているため、流速 1.3 mL/min で 4 分のイニシャルホールドを追加しています（表 1）。

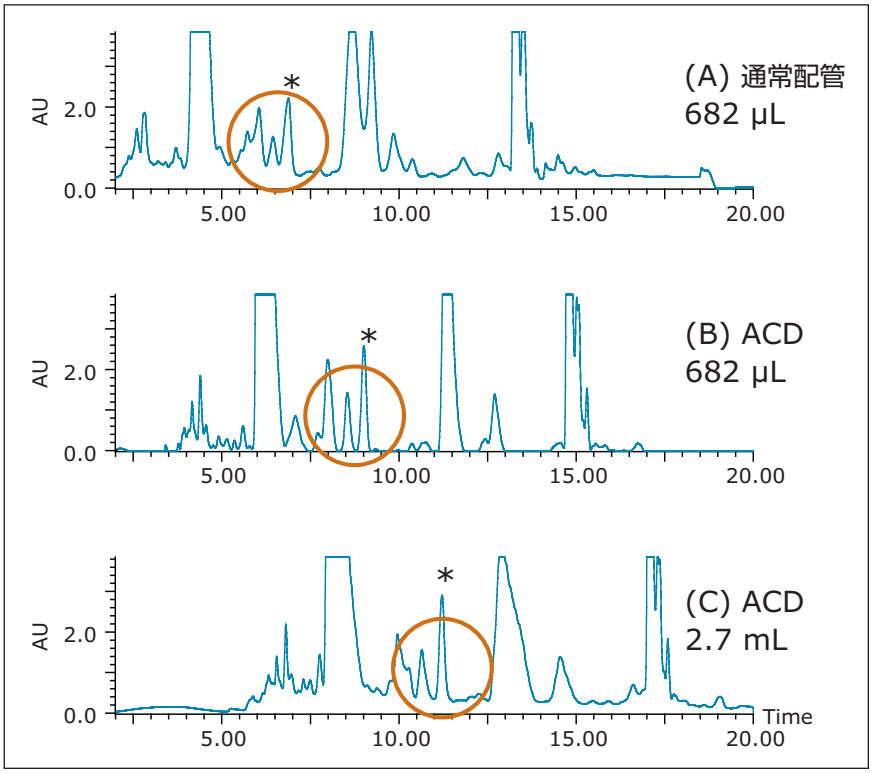

図 5 通常配管および at-column dilution モードの AutoPurification システムで XSelect CSH C_{18} 分取 OBD カラムを用いたペパーミント抽出物 682 µL 注入、2.7 mL 注入の分取 LC/UV クロマトグラム比較

2.7 mL 注入によりターゲット微量成分を 1 つのフラクションに十分に単離でき、UV分析による純度は 94% でした(図 6)。

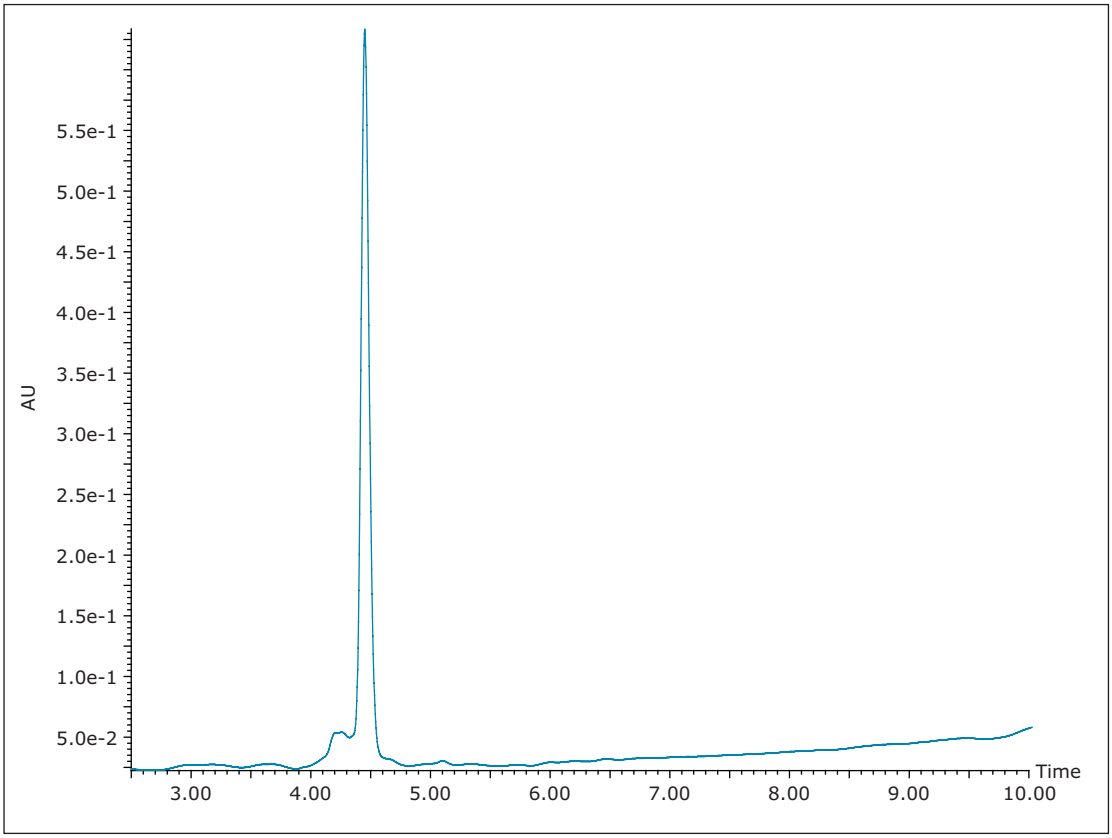

図 6.　ACD で 2.7 mL 注入により得られたフラクションの UV による純度分析

結論

本アプリケーションノートは、AutoPurification システムを用いてペパーミント抽出物中から微量成分を単離するための系統的な分取 HPLC 分析法開発について説明しました。全体のワークフローは、異なるカラムケミストリーのスクリーニング、フォーカスグラジエントの適用、スケールアップ、ACD 注入の採用から構成されます。最適化した分析クロマトグラフィーから適切にスケールアップし、ACD を採用することで、分取スケールにおいて分離を維持したままサンプルローディングを 5 倍向上しました。本アプリケーションで示した技術は分取 HPLC を用いてルーチンで天然物を単離しているラボにおいて汎用的に適用できます。

参考文献

1. Harvey AL. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today.* 2000; 5 (7):294-300.
2. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2008; 13 (19/20): 894-901.
3. Li JWH, Vederas JC. Drug Discovery and natural products: end of an era or endless frontier? *Science.* 2009; 325(10):161-165.
4. Latif Z, Sarker SD. Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (prep-HPLC). *Methods Mol Biol.* 2012; 864: 255-74.
5. Rathore AS, Velayudhan A. An overview of scale-up in preparative chromatography in Scale-up and optimization in preparative chromatography: principles and biopharmaceutical applications, Eds. Rathore AS, Velayudhan A, Marcel Dekker, Inc. 2003.
6. Thomas Wheat, *et al.* At-Column Dilution Application Notes. Waters Application Note 71500078010rA. 2003.
7. Fecka I, Turek S. Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 10908-10917.
8. Jablonski JM, Wheat TE, Diehl DM. Developing Focused Gradients for Isolation and Purification. Waters Application Note 720002955EN. 2009 September.
9. Aubin A, Cleary R. Analytical HPLC to Preparative HPLC: Scale-Up Techniques using a Natural Product Extract. Waters Application Note 720003120EN. 2009 June.

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、XSelect および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
AutoPurification、CSH および OBD 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10月 720004672JA PDF