Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

天然物分離に向けた迅速ファーストステップ精製としてのアイソクラティック分取液体クロマトグラフィーの利用

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

アプリケーションの利点

- 天然物などの複雑な混合物をより厳密に精製するステップの前の迅速なクリーンアップステップとして最適
- ターゲット化合物の純度をある程度達成しながら、分析時間と溶媒消費量を削減し、分取精製プロセスのスループットと費用効率を向上
- 堅牢で高い再現性

ウォーターズのソリューション

AutoPurification™ システム

MV-10 ASFE® システム

XSelect® カラム

XBridge® カラム

キーワード

分取液体クロマトグラフィー、
アイソクラティッククロマトグラフィー、
天然物単離、XSelect カラム、XBridge カラム、
フォーカスグラジエント

はじめに

分取クロマトグラフィーは、医薬品候補化合物、合成混合物中のターゲット化合物、天然物中の生理活性化合物など、様々な種類の化合物を単離・精製するための技術です。そのため、効率的かつ費用対効果も良く純粋なターゲット化合物を得るという最終的な目標に向け、分取クロマトグラフィーの基礎知識および装置の改善に関する研究的関心が継続的に持たれています。[1-6]

ほとんどの分取精製ストラテジーでは、グラジエント HPLC または UPLC を用いた分析スケールでの粗混合物のプロファイリングから始めて、セミ分取または分取レベルにスケールアップします。分析から分取への最も容易な分析法移管は、リニアグラジエントのカラムサイズに応じたスケールアップです。あるいは、ターゲット化合物の溶出する有機溶媒濃度の前後で緩やかなグラジエント勾配を採用したフォーカスグラジエントアプローチをターゲット化合物の単離に用います。これら 2 つのアプローチは一般的に適用可能ではありますが、サイクルタイムが長くなり溶媒消費量が増加してしまうことがあります。さらに、サンプルの複雑性と必要とする純度によっては、ターゲット化合物を得るために更に繰り返しのプロセスが必要な場合もあります。この複数ステップによる精製は、サンプルの複雑性から天然物の単離においては特に必要とされます。

本アプリケーションノートでは、より厳密な精製ステップの前に混合物を迅速かつ効率的に簡素化しターゲット化合物を濃縮する、最初の精製ステップとしてのアイソクラティッククロマトグラフィーの利用について説明します。単離および精製ワークフローを説明する例としてペパーミント抽出物中の極性化合物である eriositrin[7]（図 1）を使用しました。いくつかの異なる精製アプローチの純度と溶媒消費量を比較しました。提案するワークフローのより実際的な適用性を確認するために、ローズマリー抽出物中の比較的極性の低い化合物である carnosic acid[8]（図 1）の単離を行って更に分析法の有効性を実証しました。

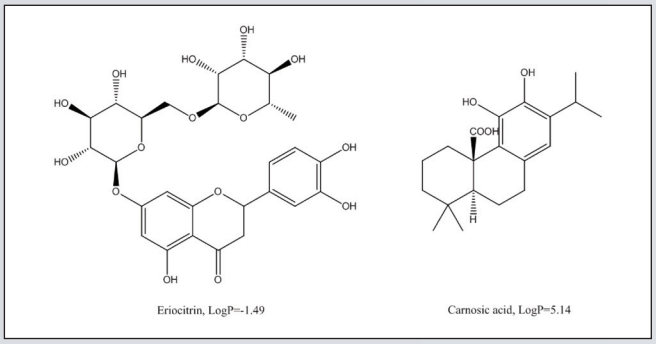

図 1.　本研究に用いた 2 種類の化合物、eriocitrin（MW=596.5）および carnosic acid（MW=332.4）の化学構造および LogP 値

実験方法

サンプル詳細

eriocitrin：　4.9 g の乾燥ペパーミントを 80:20 メタノール / 水 40 mL を用いて室温で 72 時間攪拌して抽出しました。上清を Acrodisc Syringe Filter（0.45 µm GHP Membrane、25 mm）でろ過し、最終抽出容量 29 mL としました。

カラム：　XSelect CSH™ C_{18} 5 µm、4.6 × 100 mm
XSelect CSH C_{18} OBD™ 分取 5 µm、19 × 100 mm

移動相 A：　0.1% トリフルオロ酢酸水溶液

移動相 B：　0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液

検出：　220 nm

流速：　分析 1.46 mL/min、分取 25 mL/min

グラジエント：　表 1 参照

注入量：　表 1 参照

分析		分取									
		ダイレクト スケーリング		フォーカス グラジエント		アイソクラティック（カラム洗浄無し）		アイソクラティック（カラム洗浄有り）		アイソクラティック（0%Bでローディング）	
Time (min)	%B	Time (min)	%B	Time (min)	%B	Time (min)	%B	Time (min)	%B	Time (min)	%B
0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	23.0	0.0	23.0	0.0	0.0
12.0	95.0	0.3	5.0	0.3	5.0	5.0	23.0	5.0	23.0	1.0	0.0
14.0	95.0	12.3	95.0	1.3	17.4			5.5	95.0	1.2	23.0
14.2	5.0	14.3	95.0	12.0	25.4			11.2	95.0	6.2	23.0
20.0	5.0	14.5	5.0	12.5	95.0			11.7	23.0	6.8	95.0
		20.3	5.0	17.5	95.0			17.4	23.0	11.8	95.0
				17.7	5.0					12.3	0.0
				25.7	5.0					17.3	0.0

表 1.　ペパーミント抽出物中 eriocitrin の分析および分取に用いた LC 分析法。分析の流速は 1.46 mL/min、分取の流速は 25 mL/min

Carnosic acid： carnosic acid の抽出は、ChromScope™ ソフトウェアでコントロールした Waters® MV10 ASFE システムを用いて超臨界流体抽出（SFE）により行いました。1.9 g の粉末にしたローズマリーを 5 mL の抽出ベッセルにロードしました。抽出は 6 mL/min の CO_2 と 0.2 mL/min のメタノールで 80℃、300 bar の抽出圧で 90 分間行いました。0.25 mL/min のイソプロパノールをメイクアップフローとして使用し、流出液を 20 mL のシンチレーションバイアルに収集しました。濁った黄色い抽出液 5.5 mL は Acrodisc Syringe Filter（0.45µm GHP Membrane、13mm）でろ過し、メタノール 1 mL を添加して最終抽出容量を 6.5 mL としました。

カラム： XBridge C_{18} 5 µm、4.6 × 150 mm

XBridge C_{18} OBD 分取 5 µm、19 × 150 mm

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

検出： 220 nm

流速： 分析 1.46 mL/min、分取 25 mL/min

グラジエント： 表 2 参照

注入量： 表 2 参照

分析		アイソクラティック分取	
Time	%B	Time	%B
0.0	5.0	0.0	70.0
18.0	95.0	7.0	70.0
21.0	95.0		
21.3	5.0		
30.0	5.0		

表 2. ローズマリー抽出物中 carnosic acid の分析および単離に用いた LC 分析法。分析の流速は 1.46 mL/min、分取の流速は 25 mL/min

装置

SFE は、ChromScope ソフトウェアでコントロールした Waters MV10 ASFE システムで実施しました。全ての LC 分離は MassLynx® ソフトウェアでコントロールした Waters AutoPurification システムで実施しました。

結果および考察

eriocitrin 単離に向けた様々な分取方法の比較

ペパーミント中に多く含まれるフラボン化合物である eriocitrin は、炎症、アレルギーや高血圧に治療効果があることが示されています。[7] 図 2 は一般的なグラジエントを用いた eriocitrin の HPLC/UV クロマトグラムを示しています。その極性（LogP = −1.49）から、ターゲット化合物は 3.67 分で溶出しました。

ターゲット化合物単離の最も一般的なアプローチは、分析グラジエントから分取へのカラムサイズに応じたダイレクトスケーリングです。カラムサイズに応じたダイレクトスケーリングを用いた分取クロマトグラムの代表例を図 3A に示しました。表 1 に記載したように、分析および分取システム間のシステムボリュームの（主にサンプルループサイズの違いによる）違いのため、分取分離のトータル分取時間は分析分離よりも若干長くなります。

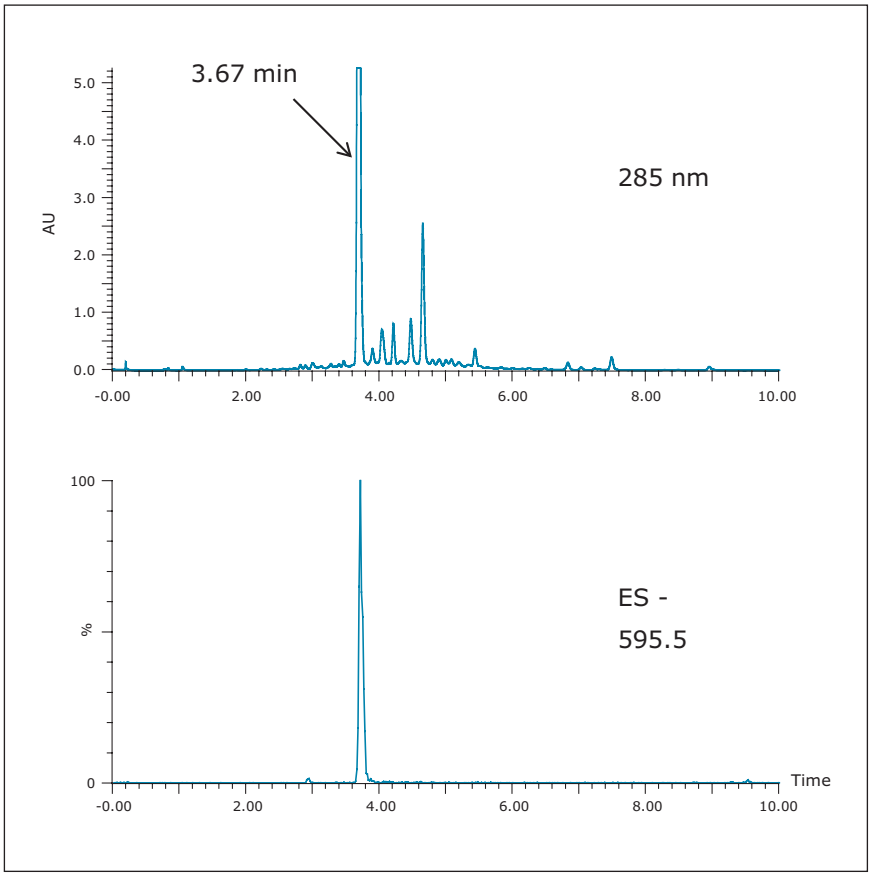

図 2.　粗ペパーミント抽出物の HPLC/UV クロマトグラム（上）と eriocitrin の抽出イオンクロマトグラム（下）。注入量は 10 µL

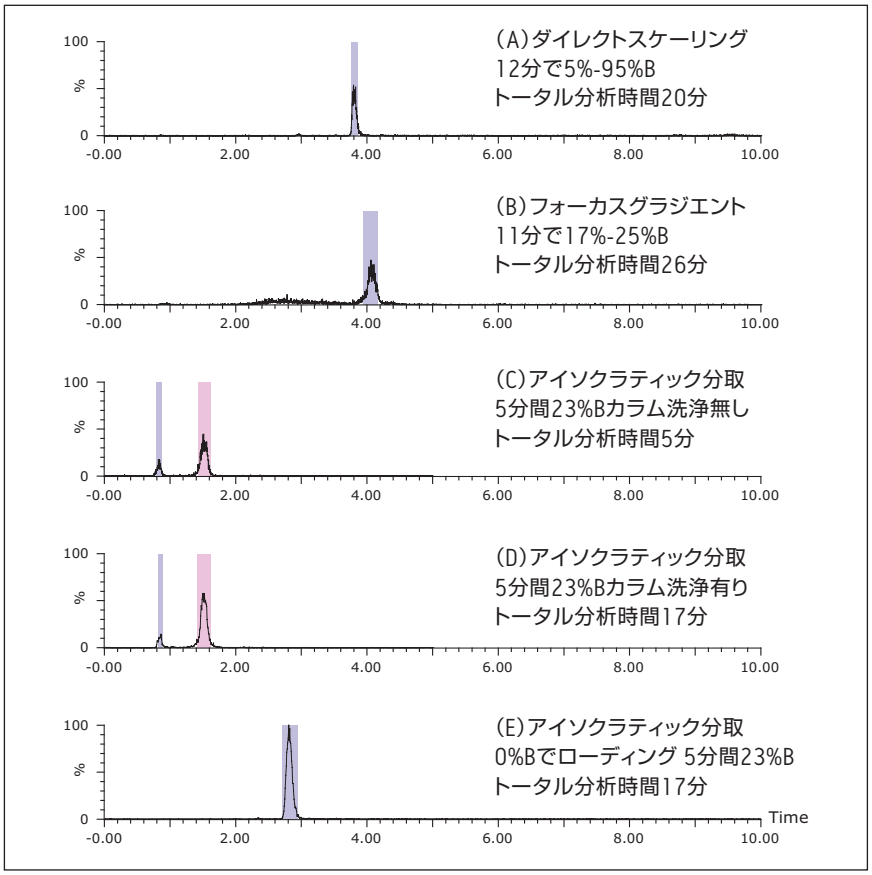

図 3.　5 種類の分取 LC による eriocitrin の抽出イオンクロマトグラム (XIC) 比較。全て注入量は 171 µL

あるいは、ターゲット化合物の単離にフォーカスグラジエントアプローチ [9] を用いることもできます。フォーカスグラジエントは、ターゲット化合物が溶出する有機溶媒濃度の前後にグラジエント勾配の緩やかな領域をとることで作成できます。ターゲット化合物の溶出する有機溶媒濃度は以下の通りに計算できます：

1. 分析 LC システムのシステムボリュームは 0.55 mL であることを実験的に求めました。
2. カラムボリュームは 1.39 mL
3. 従って、グラジエント形成されるところから検出器までの容積は

$$0.55\ mL + 1.39\ mL = 1.94\ mL$$

4. 溶媒が検出器に到達するのに必要な時間は：

$$\text{検出器までの時間} = \frac{\text{オフセット}\ (mL)}{\text{流速}\ (mL/min)} = \frac{1.94\ mL}{1.46\ mL/min} = 1.33\ min$$

5. ピークが溶出する移動相組成が形成されるのに実際にかかった時間：

$$\text{実際の組成形成時間} = \text{ピーク保持時間} - \text{検出器に到達する時間} - \text{グラジエントホールド}$$

$$= 3.67\ min - 1.33\ min - 0 = 2.34\ min$$

6. ピークが溶出した %B：

$$\%B = \frac{\text{実際の組成形成時間}}{\text{グラジエントセグメントの時間}} \times \text{グラジエントセグメントでの溶媒濃度変更}\ \% + \text{イニシャルグラジエント}\ \%B$$

$$= \frac{2.34\ min}{12\ min} \times 90\% + 5\% \cong 23\%$$

計算に基づいて、10.7 分で 17%B-25%B のフォーカスグラジエントを開発しました。フォーカスグラジエントの勾配はカラムボリュームあたり 0.7%B で、オリジナルの勾配、カラムボリュームあたり 7.2% B の 1/10 です。緩やかな勾配により抽出物中のターゲット化合物と隣接して溶出するピークとの分離が向上しました。フォーカスグラジエントを用いた分取分離（図 3B）では、ターゲット化合物が 4 分で溶出しました。このメソッドのトータル分析時間は、カラム洗浄および平衡化を含めて 26 分でした。

分析分離でピークが溶出した実際の %B（23%）をアイソクラティック分取メソッドに用いました。図 3C から図 3E は 23%B での異なる 3 種類のアイソクラティック分取の結果を示しています。図 3C および図 3D に示すように、1.5 分に溶出する eriocitrin のピークに加え、保持時間 0.8 分に小さなピークが見られました。この小さなピークには、少量の eriocitrin とその異性体やその他化合物が含まれていました。この小さなピークは、23%B でローディングを行っているために、保持の弱い化合物の破過により生じている可能性が高いと考えられます。前の方に溶出するピークによるターゲット化合物のロスに対処するため、メソッドを修正してイニシャルのローディング条件を 0%B にしました。イニシャルのローディング条件で 1 分間ホールドした後、%B を短時間で 23%B に上昇させました。結果のクロマトグラムは図 3E に示しています。明らかに、前の方に溶出するピークは消失しました。低濃度の %B でサンプルを注入することにより、保持の弱い化合物の破過を効果的に軽減できました。

メソッド	%B	時間（分）	%純度（UV）	計算溶媒B消費量（mL/分析）
ダイレクトスケールアップグラジエント	5 to 95	20	96	204
フォーカスグラジエント	17 to 25	26	100	194
アイソクラティック（カラム洗浄無し）	23	5	89*	116
アイソクラティック（カラム洗浄有り）	23	17	89	177
アイソクラティック（0%Bでローディング/カラム洗浄有り）	23	17	88	162

表 3.　様々な eriocitrin 精製 LC 分取メソッドのサイクルタイム、純度、計算溶媒 B 消費量の比較

表 3 に eriocitrin 精製に用いた 5 種類の分取メソッドの比較をまとめました。純度に関しては、2 種類のグラジエントメソッドはどちらもターゲット化合物の純度が 95%以上でしたが、3 種類のアイソクラティックメソッドは同様の純度で 89% でした。アイソクラティック分取メソッドにカラム洗浄および平衡化ステップを組み込むことで、トータルの分析時間は 17 分に増加しました（図 3D および 3E）が、ターゲット化合物の有意な純度向上には至りませんでした。溶媒消費に関して、全てのアイソクラティックメソッドは、グラジエントメソッドに比べて溶媒消費量が低減しました。ダイレクトスケールアップグラジエントメソッドおよびフォーカスグラジエントメソッドと比較すると、5 分間のアイソクラティックメソッドでは、溶媒消費量をそれぞれ分析あたり 88 mL、78 mL 低減できました。

アイソクラティックメソッドの堅牢性を評価するために、5 分間のアイソクラティック分析を 3 回繰り返し行いました。図 4 には注入間でカラム洗浄を行わずに 3 回連続分析を行った結果の重ね書きを示しました。収集された製品の想定される用法によって、記載アイソクラティックメソッドをより厳密な精製ステップ前のハイスループット、ファーストステップクリーンアップとして、もしくは最終精製ステップとして使用できます。このアイソクラティックメソッドは、分析時間を短縮し、溶媒消費量を削減することで生産性および費用効率を向上できます。

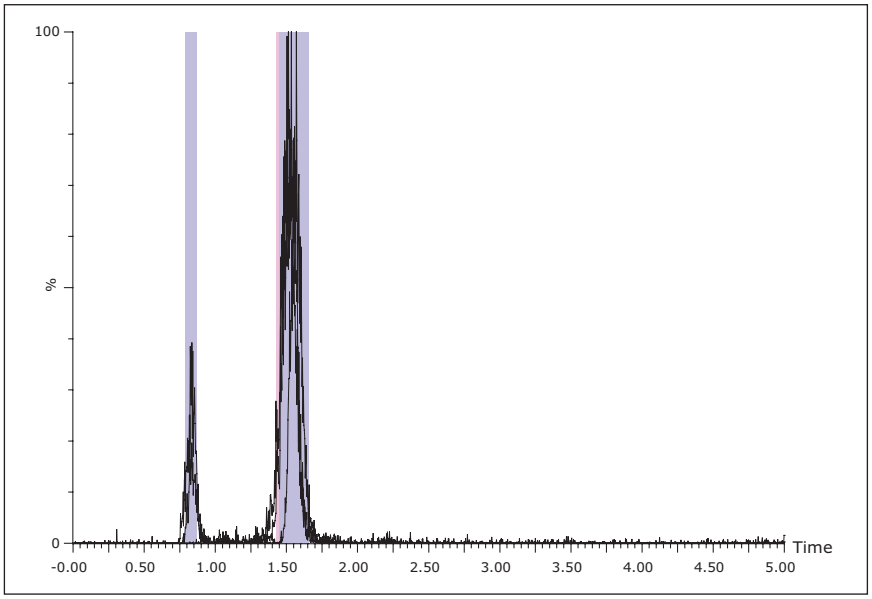

表 3.　様々な eriocitrin 精製 LC 分取メソッドのサイクルタイム、純度、計算溶媒 B 消費量の比較

Carnosic acid 単離に向けた迅速アイソクラティックメソッドの使用

記載アイソクラティックメソッドの適用性を確認するために、多年生植物であるローズマリー中の抗酸化化合物で LogP が 5.14 の carnosic acid 単離に同じワークフローを用いました。図 5 は XBridge C_{18} 5µm、4.6 × 150 mm（カラムボリューム 2.093 mL）を用いたローズマリーの SFE 抽出物の LC クロマトグラムを示しています。カラム長さから 30 分のスクリーニンググラジエントを用いている点にご留意下さい（表 2）。carnosic acid は 14.9 分に溶出しました（図 5）。前節に記載の手順と同じ手順で求めた carnosic acid 溶出アセトニトリル濃度は 70%でした。

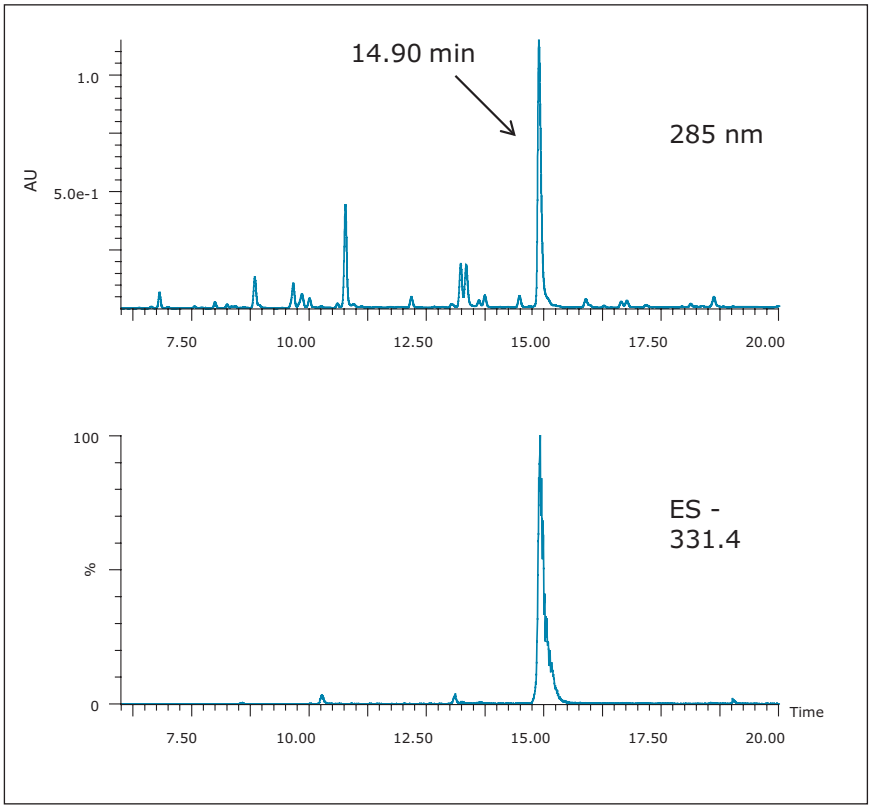

図 5.　粗ローズマリー SFE 抽出物の HPLC/UV クロマトグラム（上）と carnosic acid の XIC（下）。注入量は 10µL

図 6 は XBridge C_{18} OBD 分取 5 µm、19 × 150 mm カラムを用いてローズマリー SFE 抽出物を 70%B で分離したアイソクラティック分取クロマトグラフィーの結果を示しています。フラクションの容量により、ターゲット化合物は 2 つの試験管で収集されました。フラクション分析（図 7）から UV による純度確認により、フラクション 30 は純度 73%、フラクション 31 は純度 100% であることが明らかになりました。フラクション 30 では、13.6 分および 14.5 分の不純物ピークがそれぞれトータル面積の 2%、25% 含まれています。しかしながら、これら 2 つの不純物ピークは carnosic acid と十分に分離していました。次の精製ステップにより、比較的容易にこれら不純物は取り除くことができます。

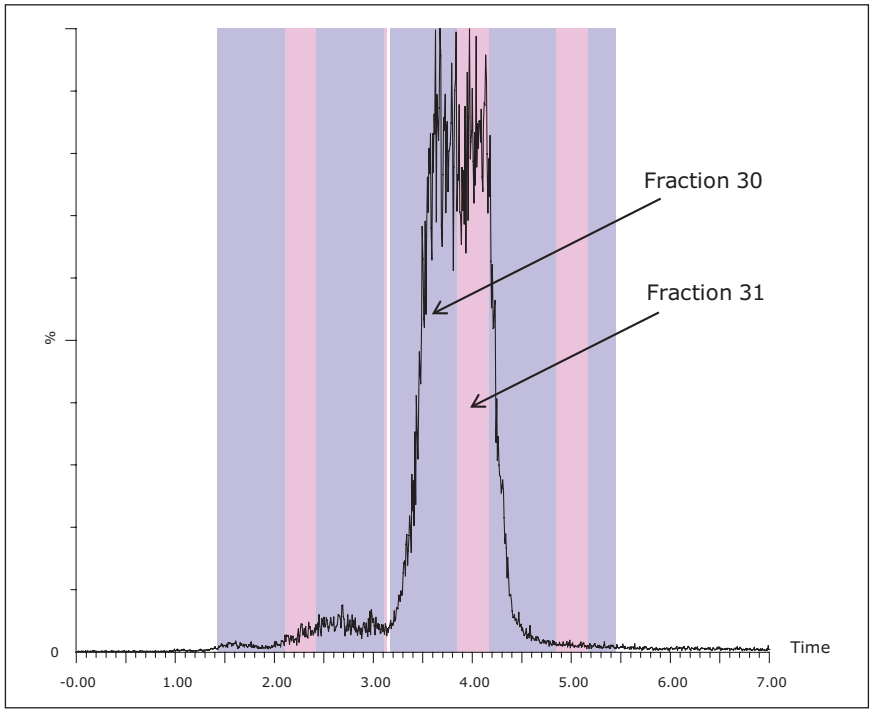

図 6 アイソクラティック分取クロマトグラフィーを用いた carnosic acid の XIC。注入量は 1700 µL

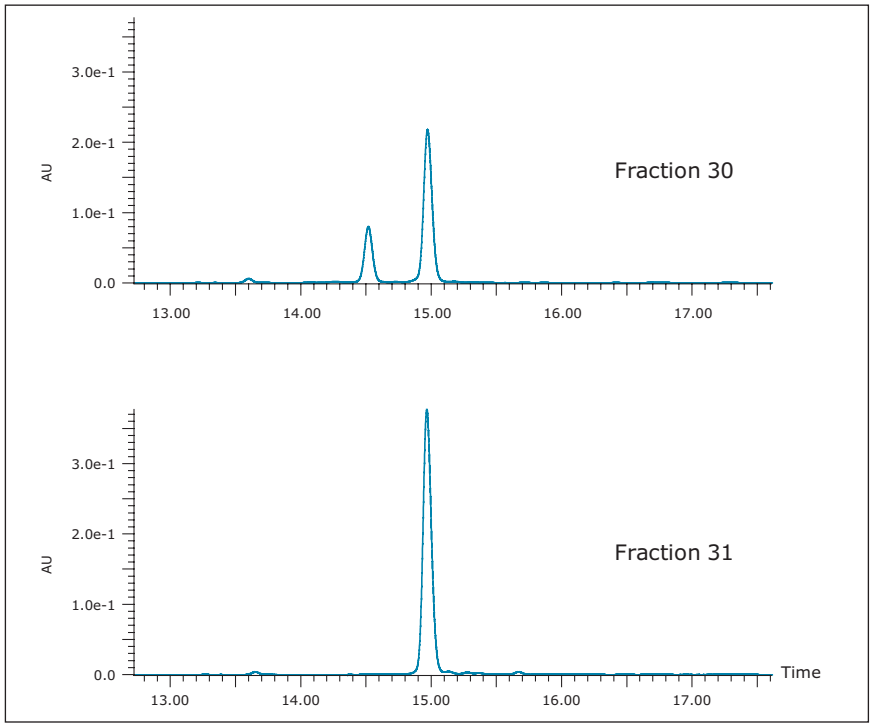

図 7.　carnosic acid アイソクラティック分取、2 つのメインフラクションの分析。クロマトグラフィー条件は表 2 に記載

結論

本アプリケーションノートでは、複雑な天然物中のターゲット化合物単離に向けたアイソクラティック分取 LC メソッドの系統的な開発ワークフローについて示しました。ワークフローはジェネリックな LC 分析から始めて、ここでターゲット化合物の溶出 %B を計算しました。次に、計算した %B を用いたアイソクラティック LC 分取メソッドを用いてサンプルからターゲット化合物を単離し、73-100% の純度でターゲット化合物を収集しました。このアイソクラティック分取 LC メソッドが堅牢で再現性があることも確認しました。一般的に用いられるグラジエントメソッドと比較して、アイソクラティック LC 分取クロマトグラフィーはトータル分析時間および溶媒消費量を劇的に削減し、結果として精製プロセス全体の生産性および費用効果を向上しました。提案したワークフローは天然物からのターゲット化合物単離に向けたマルチステッププロセスの迅速なファーストステップとして最適です。

参考文献

1. Shan Y, Seidel-Morgenster A. Analysis of the Isolation of a Target Component using Multicomponent Isocratic Preparative Elution Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2004; 1041:53-62.
2. Guan H, Broyles BS, Guiochon G. Modeling of the Influence of the Experimental Conditions on the Separation of the Components of a Binary Mixture in Isocratic Overloaded Elution Preparative Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1996; 734:49-62.
3. Zhou T, Zhao W, Fan G, Chai Y, Wu Y. Isolation and Purification of Iridoid Glycosides from Gardenia Jasminoides Ellis by Isocratic Reversed-Phase Two-Dimensional Preparative High-Performance Liquid Chromatography with Column Switch Technology. *Journal of Chromatography B.* 2007; 858:296-301.
4. Wong V, Shalliker RA. Isolation of the Active Constituents in Natural Materials by 'Heart-Cutting' Isocratic Reversed-Phase Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2004; 1036:15-24.
5. Felinger A, Guiochon G. Comparing the Optimum Performance of the Different Modes of Preparative Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1998; 796:59-74.
6. Koza P, Gonnot V, Pelleter J. Right-First-Time Preparative Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Purification. dx.doi.org/10.1021/co200197bIACS *Comb. Sci.* 2012; 14:273-279.
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. Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E. Green Processes for the Extraction of Bioactives from Rosemary: Chemical and Functional Characterization via UltraPerformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and In-vitro Assays. *Journal of Chromatography A.* 2010; 1217:2512-2520.
9. Jablonski JM, Wheat TE, Diehl DM. Developing Focused Gradients for Isolation and Purification. Waters Application Note 720002955en. 2009 September.

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、MV-10 ASFE、XSelect、XBridge、MassLynx 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 720004693JA PDF