

Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 分取 LC カラムによる 天然物の高速精製メソッドの開発

著者

Lakshmi Subbarao
Agilent Technologies, Inc.

概要

アシュワガンダ抽出物中のウィザフェリン A の高速かつ簡単な精製方法を、Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 分取 LC カラムを用いて開発しました。InfinityLab Poroshell 120 カラムは従来の分取カラムと比較して、優れた分離能を示し、分析時間を 45 % 短縮しました。InfinityLab Poroshell 分取カラムの性能上の利点は、特に高流量において、創薬ラボなどの高スループット環境のニーズに十分に対応できることです。

はじめに

表面多孔質粒子 (SPP) クロマトグラフィーカラムは、分析メソッド開発でよく用いられる選択肢です。SPP が充填されたカラムは、同等の全多孔質粒子 (TPP) よりも効率が高く、背圧を低く抑えられます。¹ 図 1 は、2 つの粒子タイプを比較したものです。¹ 表面多孔質粒子は、硬質シリカコアとそれを取り囲む多孔質外層で構成されています。硬質コアは、成分が粒子内に入り込みすぎるのを防ぎ、拡散経路を短縮するため、分離ピークを狭くできます。

Van Deemter 曲線を用いると、SPP カラムと TPP カラムの効率を簡単に比較できます。ポイドボリュームマーカークロマトグラフィー成分の混合物のイソクラティック分離を、広範囲の流量にわたって実行します。成分の効率、すなわち段数 (N) は、式 1 を使用して計算します。ここで、 t_r は成分のリテンションタイム、 $W_{1/2}$ は半値幅です。

$$N = 5.54 (t_r / W_{1/2})^2$$

式 1. USP 段数計算

N から、プレート高さ (H) を式 2 で計算できます。ここで、L はカラムの長さです。

$$H = L / N$$

式 2. プレート高さの計算

H を線速度 (u) に対してプロットします。線速度は、ポイドボリュームマーカークロマトグラフィー成分のリテンションタイム (t_0) から式 3 を使用して計算できます。

$$u = L / t_0$$

式 3. 線速度の計算

同じ寸法の 4 μm SPP カラムと 5 μm TPP カラムの Van Deemter 曲線を図 2 に示します。

H が N に反比例することを念頭に置くと、曲線の H の値が小さくなるほど性能が向上することになります。曲線を見ると、4 μm カラムの方が 5 μm カラムよりも優れていることがわかります。各曲線の最小値における線速度 (u_{opt}) は、カラムの効率が最も高くなる流量に対応します。SPP カラムの u_{opt} は TPP カラムの u_{opt} より 1.5 倍高速になっており、SPP カラムでは TPP カラムよりも短時間で優れた分離ができることを示しています。

次に、データを Van Deemter の式に当てはめると、A、B、および C の項が計算できます (式 4)。

$$H = A + B/u + Cu$$

式 4. Van Deemter の式

これらの定数は、バンドの広がりに対する主要な寄与を表しています。A 項 (多流路拡散) と B 項 (縦方向拡散) の影響は、低い線速度 (<0.5 mm/s) で顕著であり、他の文献で説明されています。² 通常か通常以上のクロマトグラフィー線速度 (>1.5 mm/s) では、C 項 (物質移動抵抗) がバンドの広がり の主要な要因となります。TPP カラムの場合、粒子内の成分の拡散経路が長くなるのでバンド幅が広がります。物質移動抵抗は、速度が増加するにつれて悪くなるだけです。対照的に、SPP カラムの多孔質層ははるかに薄くなっています。その結果、SPP カラムの H はかなり低くなり、高流量 (>3 mm/s) における Van Deemter 曲線の傾きは TPP カラムの場合よりも緩やかになります。H 値が低いと、性能を大幅に低下させることなく、SPP カラムをより高い流量で使用できます。

創薬ラボをはじめとする高スループット環境では、分取クロマトグラフィーを日常的に利用して、大量のサンプルを精製しています。そこでは下流の解析や特性解析のために、少量 (10 ~ 100 mg) の高純度のフラクションが必要とされます。これらの環境ではスピードが求められるため、メソッド開発に多くの時間を費やすことはできません。したがって、これらのお客様は、高分解能と高スループットを実現する SPP カラムの利点を活かせる可能性があります。

SPP カラムが分取 LC に広く採用されていないのには、いくつかの理由があります。多くの分析機器は、システムボリュームを最小限に抑え、400 bar を超えるような圧に耐える設計になっていますが、分取機器では通常、ポンプの過圧を防ぐためにシステムボリュームが大きくなっています。分取カラムで粒子径の細かい SPP を使用すると、過剰な圧力が発生する可能性があり、システムボリュームが大きいとクロマトグラフィーの利点が失われる恐れがあります。

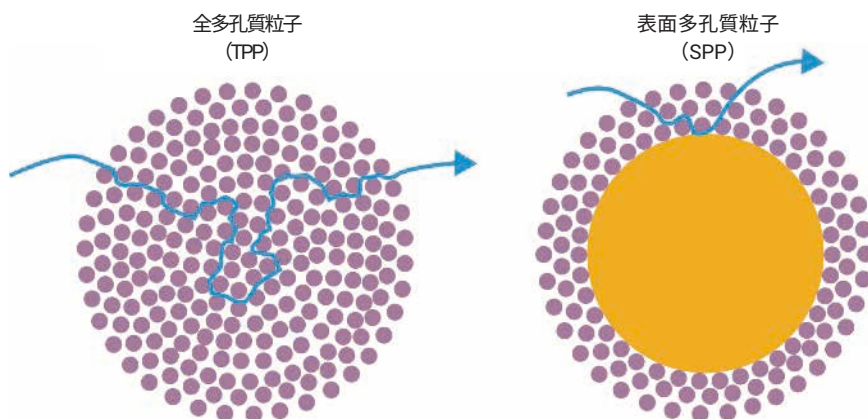


図 1. 全多孔質粒子と表面多孔質粒子における成分の拡散経路

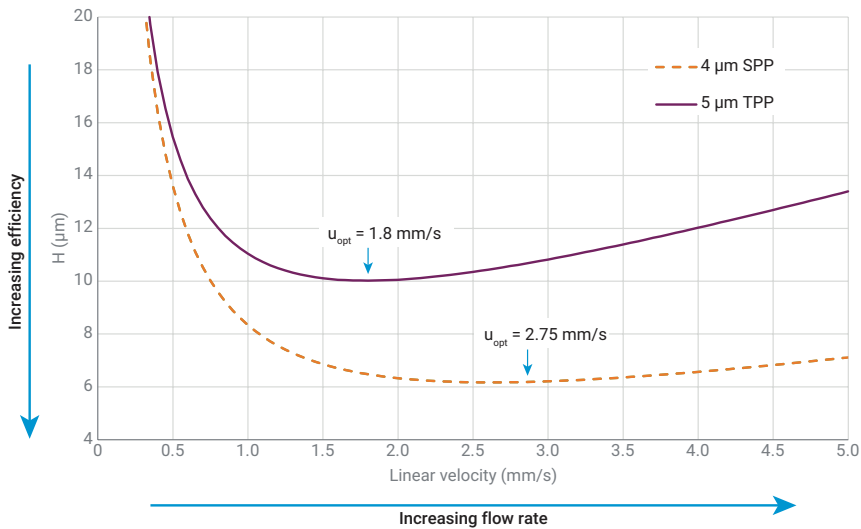


図 2. 4 μm 表面多孔質粒子 (SPP) および 5 μm 全多孔質粒子 (TPP) カラムの VanDeemter プロット

4 μm の表面多孔質粒子が充填された Agilent InfinityLab Poroshell 120 分取 LC カラムの新しい製品ラインは、これらの懸念を軽減します。この粒子サイズは、従来の分取機器の耐圧範囲内でバンドを大幅に広げることなく適切に動作するのに十分な大きさでありながら、従来の TPP 分取カラムと比べて特に高流量で優れた性能を発揮します。

天然物中の生理活性成分の精製には、不純混合物中の新薬候補物質の精製と同様の課題があります。すなわち、どちらも複雑なマトリックスを有することです。Withania somnifera (L) Dunal は、アシュワガンダとしてよく知られ、天然ステロイドであるウィザノリドを数多く含む植物です。ウィザフェリン A (WFA) は、アシュワガンダで最も生理活性の高いウィザノリドです。本研究では、4 μm SPP および従来の 5 μm TPP カラムの両方を用いて、標準および高流量における WFA の汎用的な精製方法の有効性に焦点を当てます。

実験方法

装置構成

すべての実験は、Agilent 1290 Infinity II オートスケール分取 LC システムで実施しました。

カラムと消耗品

精製メソッドを 2 つのカラムに対して開発しました。最初のカラムは、InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、21.2×150 mm、4 μm 分取 LC カラム (部品番号670150-902) です。もう一方のカラムは、従来の C18、19×150 mm、5 μm 分取 LC カラムです。2:1 エタノール：水 (100 mg/mL) 中のアシュワガンダ抽出物は Banyan Botanicals (アルバカーキ、ニューメキシコ州) から購入しました。ウィザフェリン A 標準は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入しました。溶媒は、LC グレードのものを Burdick & Jackson から購入しました。抽出物は、Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタ、0.2 μm (部品番号 5190-5116) を使用してろ過しました。

最適な流量でのグラジエント分離

各カラムの最適な流量は、それぞれの Van Deemter 曲線 (図示せず) によって決定しました。以前に公表されている分析メソッドを使用して移動相を選択しました。³ 両方のカラムで一般的なグラジエントを実行し、グラジエントのカラム容量の値が一定に保たれるようにグラジエント時間を調整しました。実験条件の概要を表 1 に示します。

表 1. 最適な流量におけるデータ取得パラメータのまとめ

パラメータ	アジレント	他社製品
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、21.2 × 150 mm、4 μm	他社製 C18、19 × 150 mm、5 μm
流量	25 mL/min	17 mL/min
移動相	A: アセトニトリル + 0.1 % 酢酸 B: 水 + 0.1 % 酢酸	
グラジエント	15 分で 5 ~ 95 % B	18 分で 5 ~ 95 % B
注入量	1,000 μL	
波長	220 nm	

高流量でのグラジエント分離

各カラムは、最適な流量より 50 % 高い流量で操作しました。グラジエントのカラム容量の値を一定に保つために、グラジエント時間を調整しました。実験条件の概要を表 2 に示します。

表 2. 高流量におけるデータ取得パラメータのまとめ

パラメータ	アジレント	他社製品
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、21.2 × 150 mm、4 μm	他社製 C18、19 × 150 mm、5 μm
流量	37.5 mL/min	25.5 mL/min
移動相	A: アセトニトリル + 0.1 % 酢酸 B: 水 + 0.1 % 酢酸	
グラジエント	10 分で 5 ~ 95 % B	12 分で 5 ~ 95 % B
注入量	1,000 μL	
波長	220 nm	

結果と考察

図3は、それぞれ最適な流量を用いた場合の双方のカラムを比較したものです。各カラムの総質量は100 mgです。WFAのピークは、Poroshell カラムでは8.59分、他社製カラムでは9.66分で溶出します。両方のカラムとも、WFAピークと隣接する不純物を分離します。Poroshell カラムでは、不純物とWFAはベースライン分離されています。しかし他社製カラムでは、不純物の1つがWFAピークのショルダーとして現れています。

流量を50%増加させると(図4)、Poroshell カラムではWFA(リテンションタイム = 5.77分)とその不純物との分離が維持されました。他社製カラムでは、先頭の不純物がWFAと部分的に共溶出し(リテンションタイム = 6.47分)、後続の不純物がターゲット化合物と完全に共溶出しています。

他社製カラムでは、最適な流量(18分グラジエント)でのみ不純物を分離できました。一方、Poroshell カラムではさらに高速なグラジエントで、すべてのピークを10分で分離でき、分析時間が45%短縮されました。

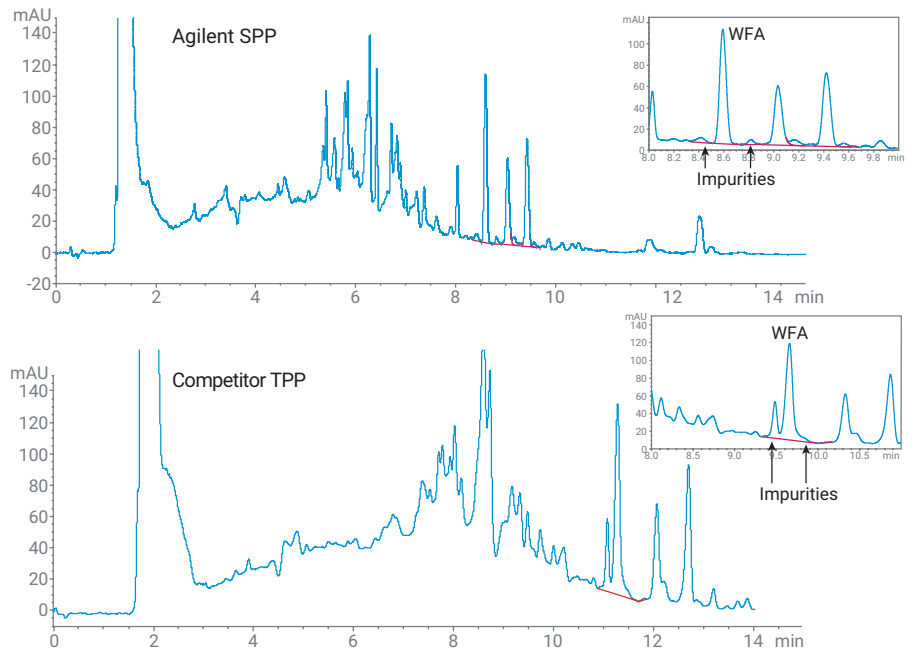


図3. 分取LCカラムによるウィザフェリンAの分離。グラジエント時間：アジレントー15～18分

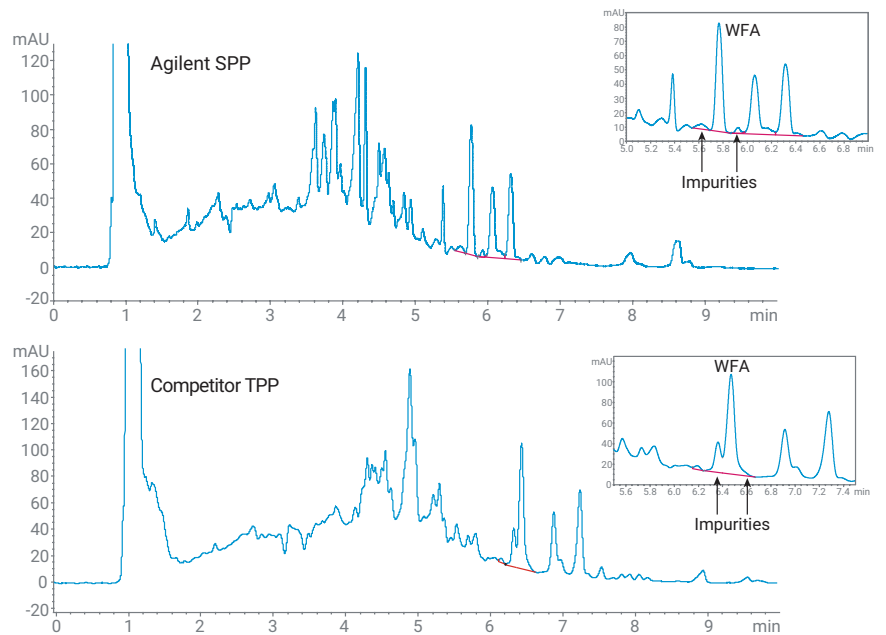


図4. 分取LCカラムによるウィザフェリンAの分離。グラジエント時間：アジレントー10～12分

結論

Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、21.2×150 mm、4 μm 分取 LC カラムを用いて、最小限のメソッド開発で隣接する不純物からウィザフェリン A を分離することに成功しました。最適な流量の 1.5 倍で分析した場合、InfinityLab Poroshell 120 カラムは分離を維持しましたが、他社製カラムではかなりの共溶出がありました。より高速な Poroshell メソッドにより、標準流量を用いた他社製メソッドと比べて分析時間が 45 % 短縮されます。InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、21.2×150 mm、4 μm 分取 LC カラムの速度とロード性能は、ハイスループットの創薬ラボのニーズに最適です。

参考文献

1. Gratzfeld-Huesgen, A.; Naegele, E. Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによる効率の最大化. *Agilent Technologies application note*, publication number 5990-5602JAJP, **2016**.
2. Alvarez-Suegura, T. Study of the Column Efficiency using Gradient Elution Based on Van Deemter Plots. *Journal of Chromatography A* **2019**, 1584(11), 126–134.
3. Bolleddula, J. Identification of Metabolites in *Withania somnifera* Fruits by Liquid Chromatography and High-Resolution Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26(11), 1277-1290.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, May 18, 2021
5994-3518JAJP
DE44313.2277662037