

分取 HPLC による有用成分の受託精製

発表者：坂牧 寛 (クロマト技術部門)

1. はじめに

本機構は、1990 年に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用逆相カラムである *L-column* シリーズを開発して以来、ユーザーの多様なニーズに対応するため、製品ラインアップを拡充してきた。2007 年には微量分析に対する需要の高まりに対応し、低吸着特性を有する *L-column2* を、2017 年には耐久性を著しく向上させた *L-column3* を上市している。*L-column3* は、溶離液の使用可能な pH 範囲が広く、比較的高いカラム温度条件下においても長時間使用が可能であり、劣化しにくい点を特長とする。

本機構では、2024 年より HPLC 分析メソッド開発支援及び分取 HPLC による受託精製を開始した。分析メソッド開発支援では、検討工程の自動化と、本機構が有する豊富な知識及び経験を活用することで、目的に即した高精度な分析メソッドを提供している。分取 HPLC による受託精製では、分析メソッド開発により得られた知見を分取 HPLC へ応用し、*L-column* シリーズを分取カラムとして用いることで、高精度かつ高効率な分画を可能としている。

また、カラム製造を通じて蓄積された精製技術を活かし、99% 以上の高純度精製品の提供が可能である。さらに、得られたフラクション又は精製品については、高分解能質量分析計 (高分解能 MS) による構造解析及び核磁気共鳴装置 (NMR) による構造決定にも対応している。本技術報告では、これらの受託精製サービスのモデルケースとして、生薬中の有用成分の精製、標準試料の高純度化とその不純物分取、並びにバイオ生産物評価のための代謝物精製と構造解析について紹介する。

2. 分取 HPLC による分取の流れ

分取 HPLC を用いた有用成分の精製では、まず前処理として、目的有用成分を効率的に回収するため、抽出方法を検討し、抽出溶媒及び抽出条件を最適化する。得られた抽出物については、分析及び分取操作に適した溶解溶媒への転溶を含め、必要に応じて検討を行う。

次に、目的成分を高効率に分離するため、分取用 HPLC メソッド及び純度測定用 HPLC メソッドを開発し、移動相組成、グラジエント条件などを最適化する。併せて、目的成分の純度及び回収効率を考慮し、分取時の注入量を検討する。確立した条件に基づき、目的成分を得るために必要回数に分取 HPLC を実施する。

回収したフラクションについては、エバポレーター等による溶媒除去、析出、ろ過などの条件を適宜選択し、有用成分を回収する。得られた試料は HPLC により純度を測定

する。構造評価が必要な場合には、高分解能質量分析計 (MS) により精密質量情報取得して分子式を推定した後、赤外分光分析 (IR) 及び核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いて最終的な構造決定を行う。さらに本機構では、決定された構造情報に基づき、*in silico* 解析による毒性評価の提供までをワンストップで実施することが可能である。

3. 生薬中の有用成分の精製 (サンシシ末)

生薬などの天然物には多様な成分が含まれるため、高純度な目的成分を得る手段として、分取 HPLC による精製は有効である。本検討では、生薬サンシシ末中に含まれる有用成分であるゲニポシドを対象として、分取 HPLC 条件の検討を行った。

まず、分離条件の最適化を目的として、分析 HPLC によりゲニポシド及び隣接ピークとの分離度向上を目指し、カラム及び溶離液の検討を行った。その結果、*L-column3 C18* とアセトニトリル/水の組合せが最適であることを確認した。次に、自動分析ソフトウェアを用いた条件検討により、分析時間が短く、かつ良好な分離が得られる分析条件を選択した。

選定した分析条件を基に、内径 20 mm のカラムを用いた分取 HPLC ヘスケールアップを行った。カラム長の変更に伴い、流量の補正に加えてグラジエント時間の補正も行った。さらに、分離状態及び注入量の検討を行った結果、最大 2000 μL の注入量においても 99.9% の純度を有するゲニポシドが得られる条件を確立した。

回収したフラクションを減圧乾燥して精製したところ、1 回の注入あたり 8.46 mg のゲニポシドを純度 99.9% 以上で得ることができた (図 1)。以上より、分取 HPLC を用いることで、生薬由来の有用成分を高純度で分取・精製できることを示した。

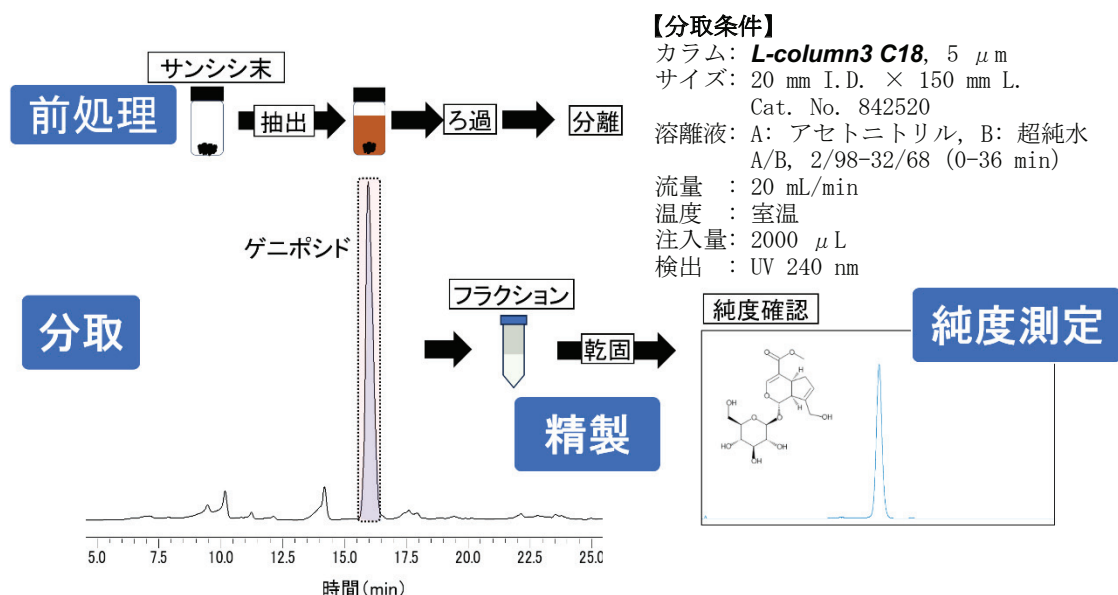


図 1 分取・精製結果 (ゲニポシド)

4. プラノプロフェンの高純度化とその不純物分取

標準品は分析における基準物質であるため、純度が同定及び定量結果の信頼性を大きく左右する。購入した医薬品の主成分であるプラノプロフェンは、HPLC の面積百分率法により純度 96.9% と評価された。本検討では、標準品の純度向上を目的として、分取 HPLC による精製を行った。

まず、標準品に含まれる不純物を分離可能な分析メソッドを検討し、次に内径 20 mm のカラムを用いた分取 HPLC へスケールアップした。このような標準品の高純度化を目的とした分取においては、試料を可能な限り高濃度で溶解させることが重要である。今回は DMSO を用いることで 200 mg/mL 以上の溶解が可能であったが、試料注入時に析出が生じたため、最終的に試料濃度 100 mg/mL、注入量 1000 μ L とした。その結果、1 回の注入で純度 99.1% のプラノプロフェンを 86.9 mg 得ることができた。また、不純物も同様に 1 回の注入で純度 97.2%、0.3 mg 得ることができた。

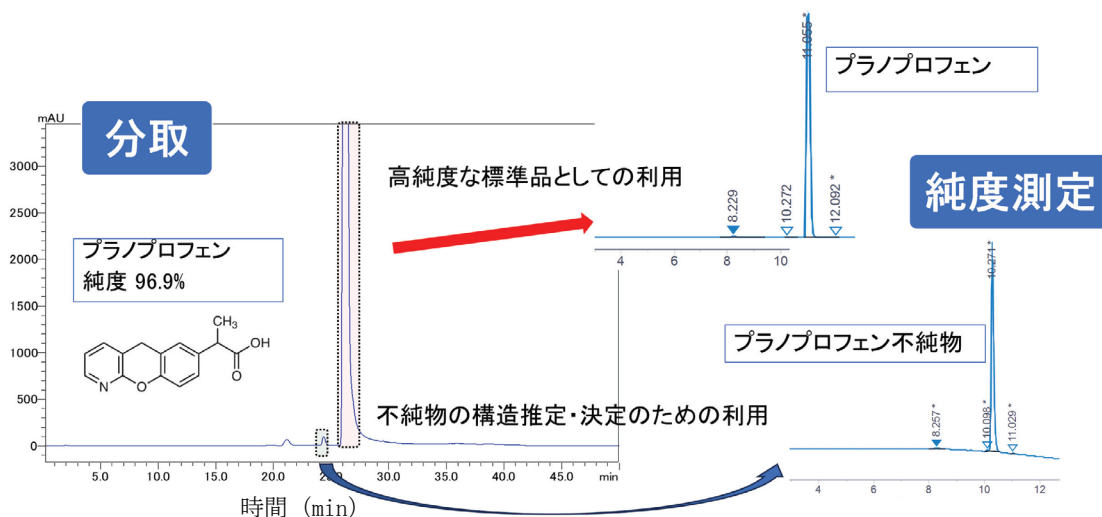


図 2 プラノプロフェンの高純度化

5. バイオ生産物評価のための代謝物精製と構造解析

高分解能 MS では、測定される精密質量に基づき、分析対象物の化学式を推定することが可能である。本検討では、細胞に EPA を添加して培養した後に得られた代謝物を試料とした。試料には高濃度成分から微量成分まで多様な成分が含まれており、直接高分解能 MS に注入すると装置汚染及び測定への悪影響が懸念される。

そこで、前処理として分取 HPLC により分画を行い、得られた画分を対象として高分解能 MS による構造推定を実施した。MS スキャン分析の結果、分子式 $C_{20}H_{30}O_3$ の成分が検出された。さらに、MS/MS スキャンによりプロダクトイオンを確認したところ、得られたフラグメントパターンが 5-ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (5-HEPE) と一致したことから、本成分は 5-HEPE であると推定された (図 3)。

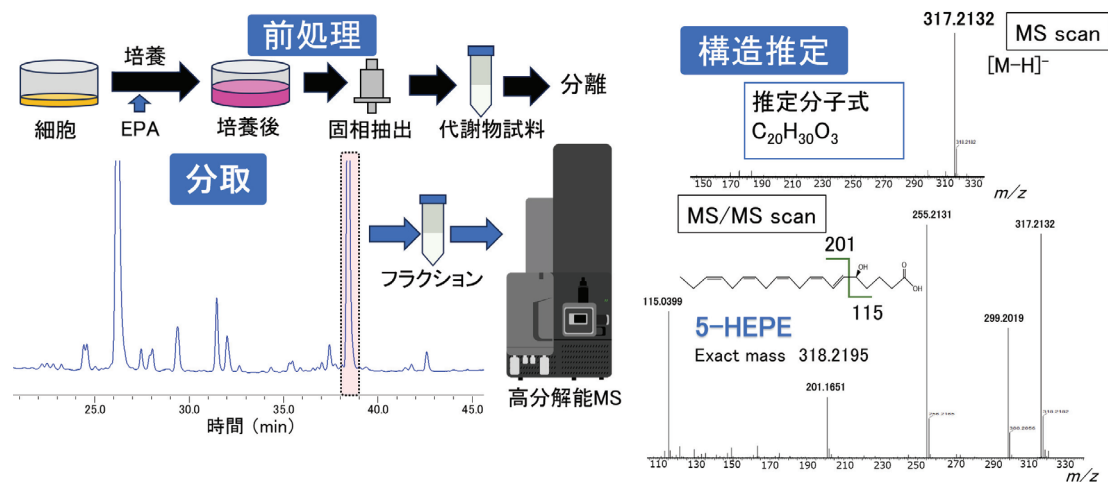


図 3 EPA 代謝物の測定

6. おわりに

本技術報告では、分取 HPLC を用いた精製について、複数のモデルケースを通じてその有効性及び実用性を示した。本手法は、医薬品原料、天然物など多様な試料に適用可能であり、目的に応じて高純度な目的成分の分取・精製を実現できる。

本機構は、従来のカラム製造に加え、分析メソッド開発支援及び分取 HPLC による受託精製を高付加価値サービスとして展開することを目指している。今後は、より多様な分析対象及び業界ニーズに対応するため、技術的知見の更なる蓄積及び試験体制の強化に取り組む予定である。