

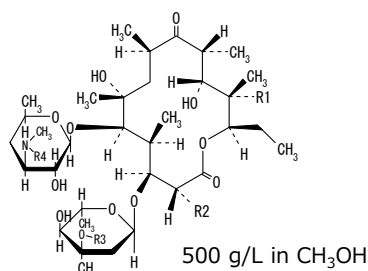
エリスロマイシンの分取精製 Preparative purification of Erythromycin

分取液体クロマトグラフィーによる精製は創薬、化学合成分野において欠かすことのできない工程であり、その精製効率のコストに直接関わるため非常に重要です。今回は、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシンの分取精製を行いました。まずは溶離液組成(pH)の最適化を行い、次に負荷量を上げたときの分離を確認しました。セミ分取カラムを用いてアルカリ性溶離液条件で精製を行ったところ、1回の精製で主成分エリスロマイシンA(純度98.6%)を47.2 mg得ることができました。このようにアルカリ性溶離液の使用は塩基性医薬品の精製効率向上に高い効果を発揮します。

キーワード : C18, ODS, オクタデシルシリル化シリカゲル, 分取精製, エリスロマイシン
Key words : Octadecyl silanized silica gel, Preparative purification, Erythromycin
Column : L-column3 C18 (USP category: L1)

[Method development conditions]

Column : L-column3 C18 (C18, 5 μ m, 12 nm); 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm L.; Cat. No. 822070
Eluent : A: CH₃OH; B: 10 mM HCOOH in H₂O/10 mM NH₃ in H₂O (v/v, 0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0)
A/B, 30/70-80/20-80/20 (0-10-20 min)
Flow rate : 1 mL/min
Temperature : 25 $^{\circ}$ C
Detection : UV 210 nm
Injection volume : 0.5 μ L (Fig.1), 20 μ L (Fig. 2)
System : NEXERA XR(SHIMADZU CORPORATION)
Sample : Erythromycin A containing related substances



	R1	R2	R3	R4
1. Erythromycin A	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2. Erythromycin B	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
3. Erythromycin C	OH	CH ₃	H	CH ₃

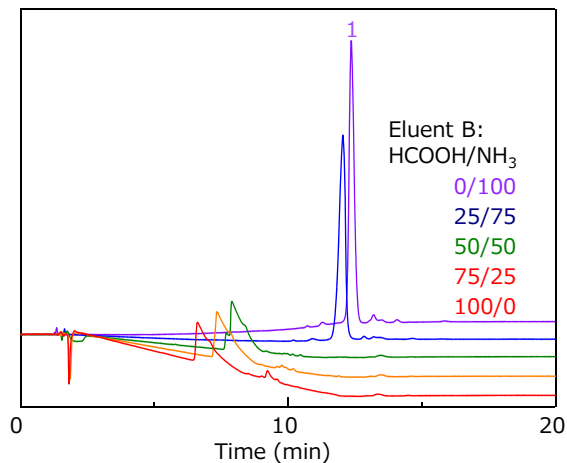


Fig. 1 The effect of eluent composition on the peak shapes.

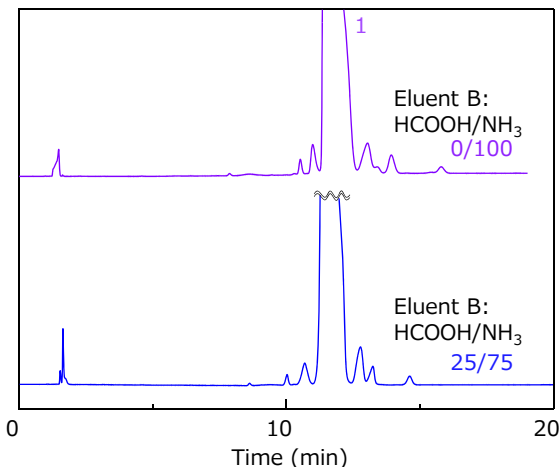


Fig. 2 The effect of eluent composition on the separation performance with high sample loads.

溶離液の組成(pH)を酸性からアルカリ性まで変化させると、主成分であるエリスロマイシンAのピーク形状がアルカリ性で非常にシャープになりました(Fig. 1)。アルカリ性溶離液条件で負荷量を上げエリスロマイシンAと類縁物質の分離を確認したところ、ギ酸/アンモニア溶液(25/75)で分離が良好でした(Fig. 2)。

このとき供した試料は、溶離液より溶出力の強い溶媒(メタノール100%)にエリスロマイシンを極力高濃度となるように調製しました。そのような試料条件にもかかわらず、アルカリ性溶離液条件ではピーク形状の崩れもなく類縁物質との良好な分離が得られました。

2020.07 Oba

[Purification conditions]

Column : L-column3 C18 (C18, 5 μ m, 12 nm); 10 mm I.D. $\times$ 150 mm L.; Cat. No. 842510
 Eluent : A: CH₃OH; B: 10 mM HCOOH in H₂O/10 mM NH₃ in H₂O (v/v, 25/75, 100/0)
 A/B, 40/60-80/20-80/20 (0-20-30 min)
 Flow rate : 4 mL/min
 Temperature : 25 $^{\circ}$ C
 Detection : UV 210 nm
 Inject volume : 100 μ L
 System : NEXERA XR (SHIMADZU CORPORATION)
 Sample : Erythromycin A containing related substances

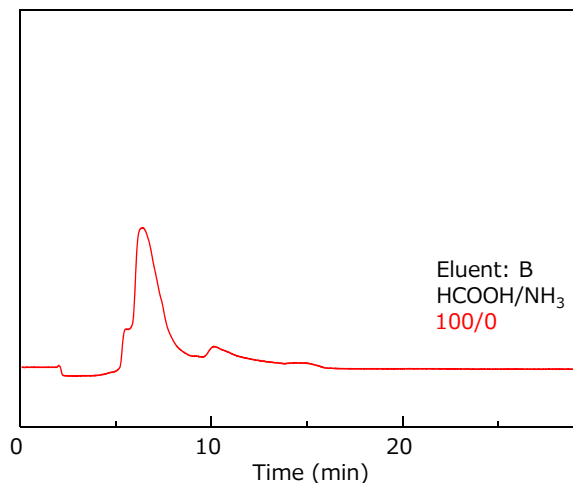


Fig. 3 Preparative purification of Erythromycin.
(Eluent A/B: 100/0)

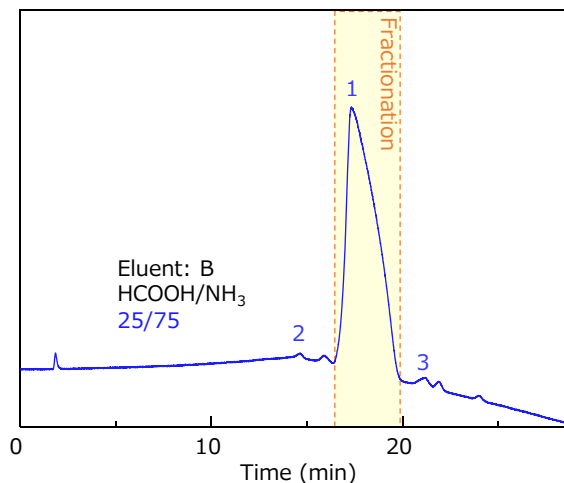


Fig. 4 Preparative purification of Erythromycin.
(Eluent A/B: 25/75)

セミ分取カラムを用いてエリスロマイシンAの分取精製を行いました。酸性溶離液ではメインピークの形状が悪く分画が困難であるのに対し(Fig. 3)、アルカリ性溶離液ではグラジエント条件を最適化することによりエリスロマイシンAと類縁物質を十分に分離することができました(Fig. 4, 2.エリスロマイシンB 及び3.エリスロマイシンC は質量分析により同定)。

[Purity test conditions]

Column : L-column3 C18 (C18, 5 μ m, 12 nm); 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm L.; Cat. No. 822070
 Eluent : A: CH₃OH; B: 10 mM HCOOH in H₂O/10 mM NH₃ in H₂O (v/v, 25/75)
 A/B, 40/60-80/20-80/20 (0-20-30 min)
 Flow rate : 1 mL/min
 Temperature : 25 $^{\circ}$ C
 Detection : UV 210 nm
 Inject volume : 20 μ L
 System : NEXERA XR (SHIMADZU CORPORATION)
 Sample : Fractionation

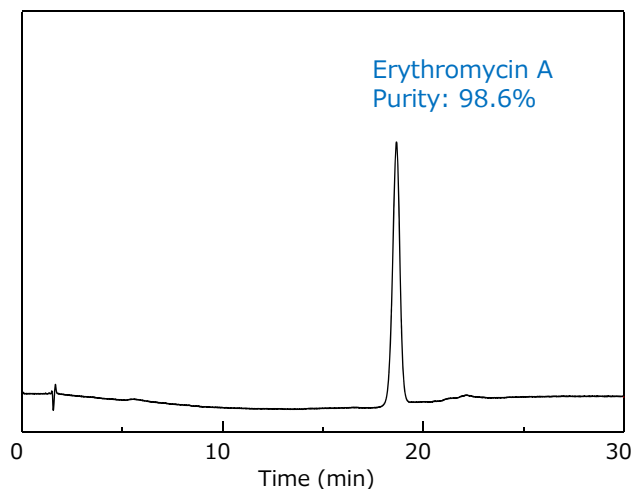


Fig. 5 Fractionation purity test.

分画物のエリスロマイシンAの純度及び蒸発乾固後の析出物量を確認しました(Fig. 5)。その結果、精製前試料(純度95.5%)に対して、1回の精製を行うことにより47.2 mgのエリスロマイシンA(純度98.6%)が得られました。

2020.07 Oba