

HPLC 分析メソッド開発支援と HPLC による受託精製

発 表 者：緒方 伸也（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）用の逆相カラム **L-column** シリーズを開発し、ユーザーのニーズに対応するためラインアップを拡充してきた。2007 年に微量分析に対するニーズの高まりに対応した低吸着な **L-column2** を、2017 年に耐久性が著しく向上した **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、カラム温度が比較的高い条件で長時間使用しても劣化しにくいことが特長である。本機構では、2024 年より HPLC 分析メソッド開発支援と HPLC による分取・精製の受託試験を開始した。一般的に、HPLC の分析メソッド開発はカラム、溶離液の種類、その組成や温度などの検討パラメーターが多く、膨大な時間を要する。さらに、これらの組合せを最適化するためにはノウハウも必要である。本機構のメソッド開発支援は検討の自動化と本機構の持つ豊富な知識・経験を活かし、目的に沿った高精度な分析メソッドを開発するものである。HPLC による分取・精製では、メソッド開発を分取クロマトグラフィー（分取 LC）に応用し、**L-column** シリーズを分取カラムに用いることで、高精度かつ高効率な分画を行うことができる。また、カラム製造によって得られた精製技術を活かし、高純度の精製品を提供可能である。さらに、得られたフラクション又は精製品を高分解能質量分析計（高分解能 MS）により構造解析することも可能である。本技術報告において、これらの試験のモデルケースを紹介する。

2. 塩基性医薬品の HPLC 分析メソッド開発

5 種の塩基性医薬品（図 1）の分析メソッド開発の例を示す。まず、最適な溶離液とカラムを選定するためのメソッドスカウティングを実施した。使用する溶離液は、水系にリン酸緩衝液及び酢酸アンモニウム溶液、有機溶媒系にアセトニトリル及びメタノールを選択した。カラムは **L-column2 ODS** 及び **L-column3 C18** を使用した。メソッドスカ

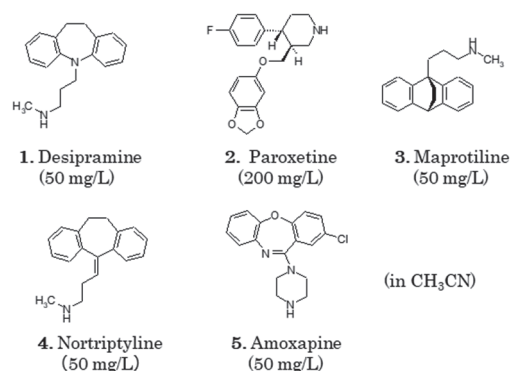


図 1 塩基性医薬品 5 種の構造式

ウティングでは自動分析ソフトウェアを用いてグラジエント条件を自動検討し、それぞれの組合せでピーク形状と分離度を評価項目とし総合的に判断した結果、リン酸緩衝液

及びアセトニトリルの溶離液と *L-column2 ODS* の組合せを選択した。次に溶離条件の最適化を行った。今回はスカウティングの結果を参考に、温度及び有機溶媒比率について網羅的に測定した。温度は 25℃から 55℃まで 5℃ずつ変更し、初期の有機溶媒比率を 25%から 35%まで変更して最適化を行った。このとき、ピーク 1 とピーク 2 の分離度を温度及び有機溶媒比率のデザインスペースにより視覚化した(図 2)。これにより、分離度に対する有機溶媒比率と温度の効果が明確になり、最終的に 1.5 以上の分離度と適切な分析時間が得られる条件を選択した(図 3)。

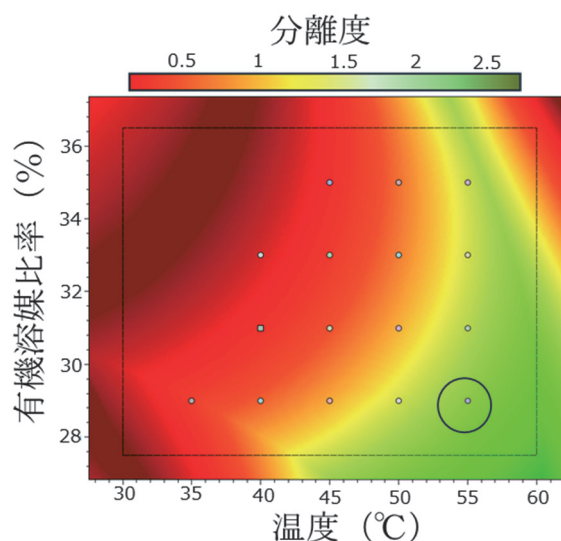
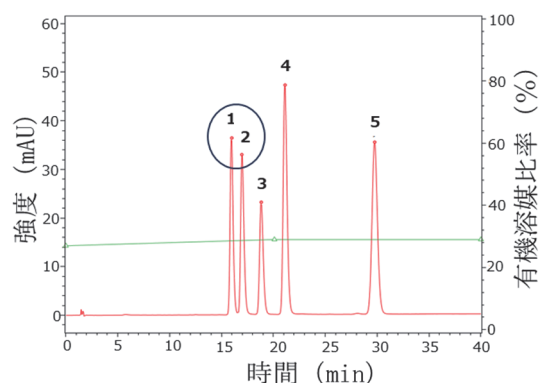


図 2 デザインスペース



【最終分析条件】

カラム: *L-column2 ODS*, 5 μ m
 サイズ: 4.6 mm I.D. × 150 mm L. Cat. No. 722070
 溶離液: A: アセトニトリル,
 B: 25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)
 A/B, 27/73-29/71-29/71 (0-20.1-40.0 min)
 流量: 1 mL/min
 温度: 55℃
 注入量: 1 μ L
 検出: UV 220 nm
 試料: 塩基性医薬品 5 種

図 3 最適化クロマトグラム (左) 及び最終分析条件 (右)

3. サンシシ末中の有効成分の分取・精製

生薬のなど天然物では様々な成分が含まれるため、高純度な目的成分を得るために分取クロマトグラフィーによる精製が有効な手段である。生薬のサンシシ末中の有効成分であるゲニポシドを得るために分取 LC 条件を検討した。まず分離条件の最適化のため、HPLC によりゲニポシドと隣接するピークの見離れ向上を目指して、6 つの分析条件を自動分析ソフトウェアで検討した(図 4)。その結果、分析時間が短かつ分離が良好な分析条件を採用し、分取 LC ヘスケールアップした。カラム長を変更したため、流量だけでなく、グラジエント時間も補正した。

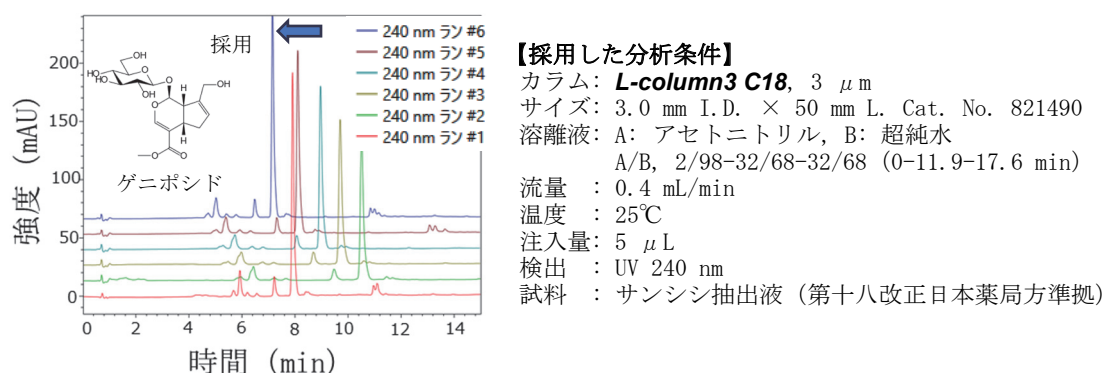


図 4 サンシシ末中の有効成分の分離条件の検討結果

分取スケールにおいてもゲニポシドの分離を達成し、フラクションを減圧乾燥し精製したところ 1 回の注入で純度 99.9% 以上のゲニポシドを 8.46 mg 得ることができた (図 5)。

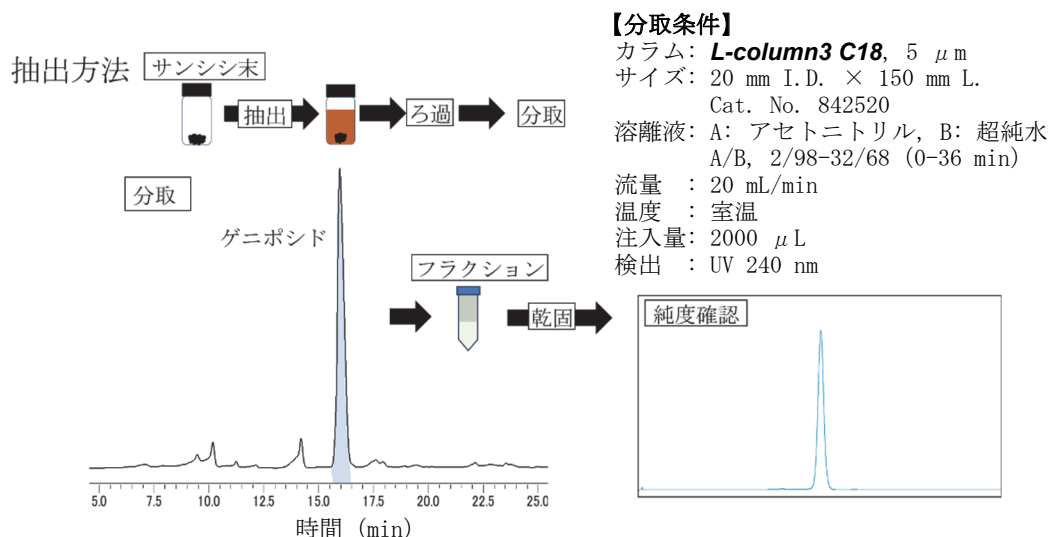


図 5 分取・精製結果 (ゲニポシド)

4. 高分解能 MS による構造推定

高分解能 MS では精密質量に基づき、分析対象物の化学式を推定することができる。今回は細胞にエイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) を添加後培養して得られた代謝物を試料とした。EPA 代謝物は様々な成分が含まれ、かつ微量であることから、分取 LC で分画し、高分解能 MS による構造推定を実施した。得られた分画を MS スキャン分析したところ、分子式が $C_{20}H_{30}O_3$ であると推定できた。次に MS/MS スキャンを実施して、プロダクトイオンを確認し、得られたフラグメントパターンから 5-ヒドロキシアエイコサペンタエン酸 (5-HEPE) であると推定した (図 6)。

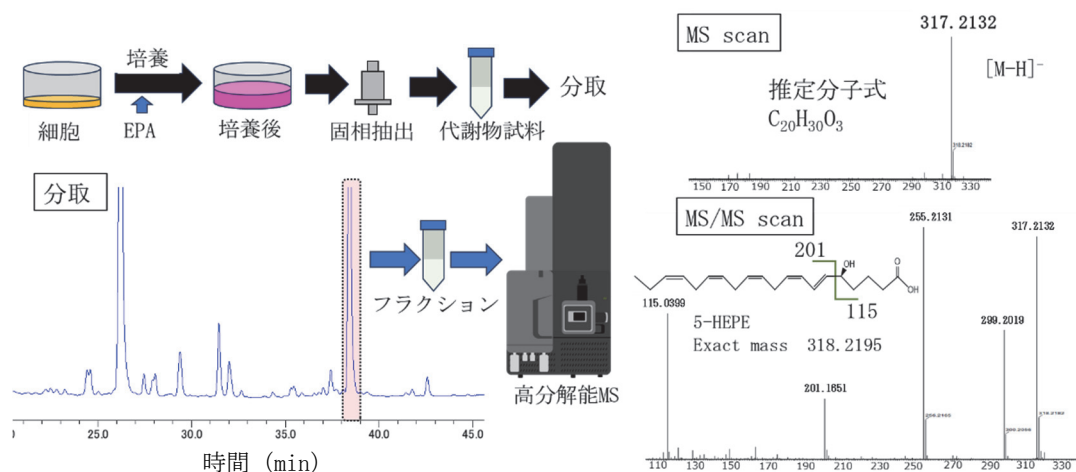


図 6 EPA 代謝物の測定

5. おわりに

本機構は新規受託試験メニューとして HPLC 分析メソッド開発支援と受託精製を開始した。本技術報告では、分析メソッドの開発及び分取精製のモデルケースを通じて、その有効性と実用性を紹介した。医薬品や天然物等の様々な試料に対して実施可能であり、目的に応じた最適な分析メソッドの提案と、高純度な目的成分の分取が可能である。本機構は、従来のカラム製造に加え、高付加価値なサービスとしての展開を目指している。今後は、より多様な分析対象や業界ニーズに対応するための技術的知見の蓄積と、試験体制の強化に努める。