

機関番号：33905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790043

研究課題名（和文）天然物質の効率的分離精製を目指した高速向流クロマトグラフィー質量分析法の開発

研究課題名（英文）Development of HSCCC/MS for the efficient purification of natural actives.

研究代表者

井之上 浩一 (KOICHI INOUE)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：30339519

研究成果の概要（和文）：本研究では、天然由来の機能性物質を対象とした効率的かつ高精度な分離・精製を目指して、高速向流クロマトグラフィー/質量分析法（HSCCC/MS）の開発を行った。HSCCC/MS は、液-液分配の原理に基づき、大量注入したサンプルを効率的に分離精製ができ、同時に質量分析・解析ができる新規の分析技術となり得た。本方法は、天然由来の抗生物質、食品添加物などに応用でき、薬学全体への波及効果も高いものと考えられる。また、実際には、抗生物質であるゲンタマイシン、エンラマイシンなどへ応用でき、いずれも数 mg 単位で単離精製を行いながら、MS 解析も達成でき、本研究としての一つの目標を達成した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop useful purification utilized with mass spectrometric monitoring for high-speed counter-current chromatography (HSCCC), which is free of irreversible adsorption and offers high resolution comparable to column chromatography. HSCCC has been widely used in preparative separation and purification of natural, medical and biochemical products. Our study was reported that HSCCC system was efficiently applied to separation of the gentamicin and polypeptide using on-line mass spectrometric monitoring with electrospray ionization. This technique would be useful purification of bioactive compounds for continuous mass spectrometric data acquisition, and 'target'-guided fractionation of small/large molecular. In this report, the HSCCC coupled with mass spectrometry technique was developed for the purification of bioactive compounds in natural extracts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 物理系薬学

キーワード：高速向流クロマトグラフィー、質量分析法、天然機能性物質、単離精製

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いて、天然由来の様々な化学物質の衛生化学的評価となる測定法の構築を遂行してきた。それらの研究を推進していく中で、天然由来の機能性物質における効率的かつ高精度な分離・精製技術および同時解析の必要性を感じ、本研究の提案と実施について行うこととした。その理由として、天然由来の機能性物質に対する標準品は、殆ど無く、正確な定量的評価が不可能であること また、各成分の構造情報取得は、別途分析法による非効率的な解析となることが挙げられる。上記の問題点を解決するためには、新たな概念に基づく分離技術とモニタリングにおける分析技術の供給とその応用・展開が望まれた。そこで、申請者が現在までに質量分析法を応用した研究の経緯を基盤として、新たな分析技術である HSCCC/MS を構築することとした。

### 2. 研究の目的

本計画を3年として、研究を実施した。各年度における目標を下記に示す。

平成20年度：初年度は、HSCCC法の基礎的な検討およびMSへの連結などのハード面での研究を遂行する。具体的には、HSCCC法を利用して、従来通りの分離精製が遂行できるのか、または、MSをモニタリング手法とした場合、HSCCCで揮発性溶媒や緩衝塩をどのように利用するのかを検討し、HSCCCからのMS連結に関する問題点の解消を研究目的とする。

平成21年度：初年度に構築したHSCCC/MS法の応用を目指して、天然由来抗生物質のエンラマイシンについて、実際的な分離や単離に関する検討を実施したうえで、本技術の有用性を示すこととした。

平成22年度：HSCCC/MSの更なる有用性を検討する。そこで、アプリケーションとして、高極性物質であるゲンタマイシンやアバメクチンの単離精製を目指して、HSCCC/MSを利用した。また、更に天然由来添加物や食品

からの抽出物（コーヒー）などのプロファイリングを目指すこととした。

### 3. 研究の方法

本研究を達成するためには、HSCCC/MSに関するハード開発・改良および汎用性を示す応用・有用を計画的に遂行しなければならない。具体的には、HSCCCでの分離を考慮して、MSのイオン化効率を向上できる溶媒系の探索や効率的な溶媒スプリットバルブを検討する必要がある。また、構築できたHSCCC/MSが、薬学分野における有用な位置付けとなるように様々な天然由来の機能性物質に応用できることを示さなければならない。そのため、初年度では、ハード面などのHSCCC/MSの構築に関して、検討を重点的に行う。そして、2年目では、天然物および衛生薬学的分野における有用性を示す機能性物質の分離・精製を精力的に進める。3年目では、構築できたHSCCC/MSの更なる発展を目指して、スクリーニング評価などへ応用する。

### 4. 研究成果

HSCCC/MSのハード開発について、検討を実施した。実際のシステムを図1に示す。

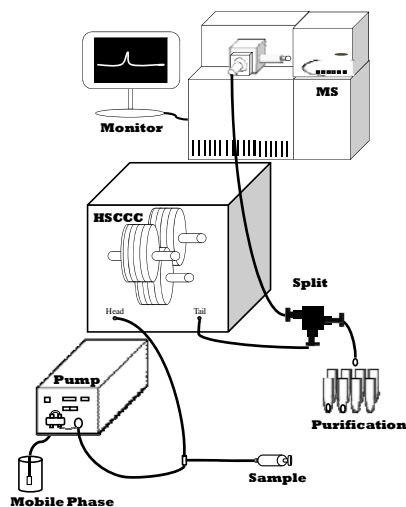


図1 HSCCC/MSのシステム

実際には、エレクトロスプレーイオン化法

(ESI)を採用した。また、実際の HSCCC と MS の連結に関して、図 2 に示す。今回、バックプレッシャーや流量調整を行うため、連結部のチューブは 0.25mm を採用し、更に流量調整には、GL サイエンス社製 Micro-splitter を用いた。また、ESI に導入する際には、Solvent filter を用いた。

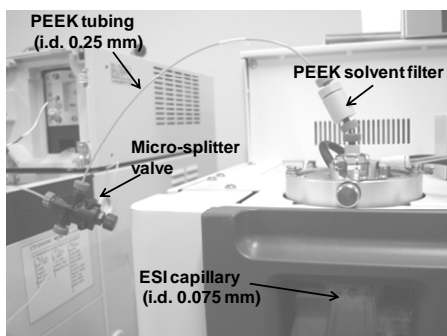


図 2 HSCCC と MS の連結部分

以上のシステムより、HSCCC/MS が開発できた。本方法を用いて、応用を試みることにした。

「エンラマイシンの単離精製」

HSCCC/MS 条件：

装置: HSCCC model CCC-1000

二相溶媒系: n-ブタノール/ヘキサン/0.05% TFA 水溶液 (43/7/50, V/V)

移動相: 下相

流速: 1.0 mL/min

回転数: 950 rpm

注入量: 15 mg

MS 装置: 島津社製 LCMS-2010EV

イオン化法: ESI ポジティブモード SCAN  $m/z$  100~2000

本手法により、主成分であるエンラマイシン-A 及び-B を単離精製しながら、MS モニタリングすることに成功した。その際の結果を図 3 に示す。

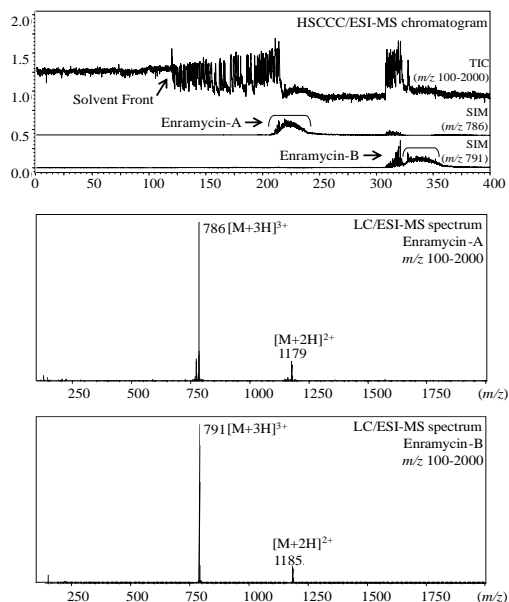


図 3 エンラマイシンの HSCCC/MS のクロマトグラムとスペクトル

「ゲンタマイシンの単離精製」

HSCCC/MS 条件：

装置: HSCCC model CCC-1000 (Pharma-Tech Research Co.)

島津社製 LCMS-2020EV

二相溶媒系: 1-ブタノール/

10% アンモニア水溶液 (5/5, V/V)

移動相: 下相

流速: 1.0 mL/min

回転数: 980 rpm

注入量: 30 mg

固定相の保持率: 43%

モニタリングイオン(ポジティブ):

ゲンタマイシン C1 ( $m/z$  478)、C2/C2a ( $m/z$  464)、C1a ( $m/z$  450)

本手法により、ゲンタマイシンの主成分である C1、C2、C1a を単離精製することが達成できた。その際の結果を図 4 に示す。

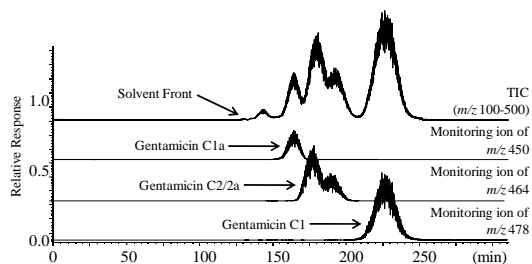


図 4 ゲンタマイシンの HSCCC/MS のクロマトグラム

「アバメクチンの単離精製」

アバメクチンの主成分である B1a および B1b について、従来の標準品では 2 種類混合されている。一方で、それぞれを単離した研究報告はなく、今回が初めての結果である。図 5 にその単離精製された HSCCC/MS のデータを示す。

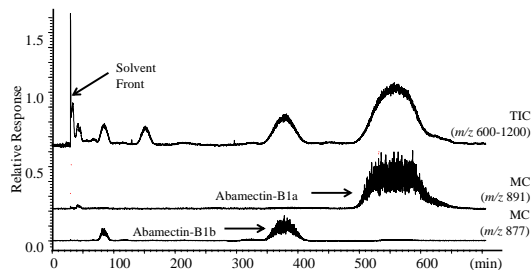


図 5 アバメクチンの HSCCC/MS のクロマトグラム

「天然由来成分の単離精製」

ベニバナ黄色色素では HPLC と比較して、その主成分が異なることが判明した。そのため、本手法の有用性の一つを示すことができた (図 6)。

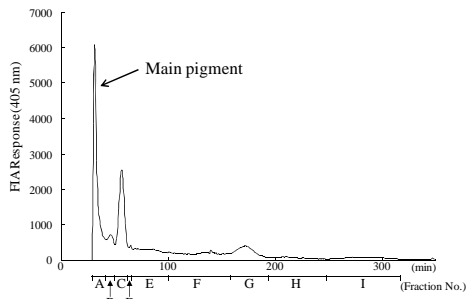


図 6 ベニバナ黄色の HSCCC クロマトグラム

また、現在ではコーヒーのプロファイリングも実施しており、未知物質など単離精製しながら、MS 解析ができるようになってきた (図 7)。

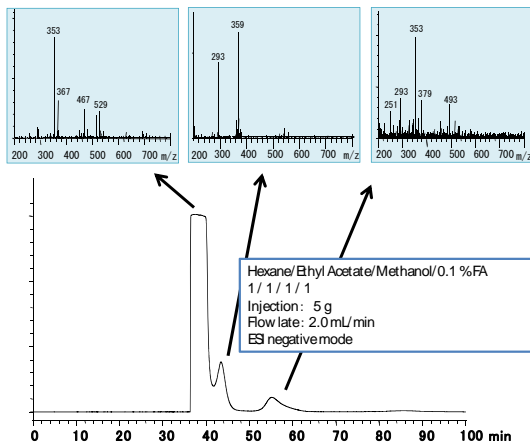


図 7 コーヒー成分のプロファイリング単離精製

以上の結果より、HSCCC/MS は様々な点検由来成分の解析に利用することができ、更なる応用性と可能性を秘めているが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① K. Inoue, M. Kitade, T. Hino and H. Oka  
"Screening assay of angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from complex natural colorants and foods using high-throughput LC-MS/MS." (査読有)  
*Food Chem.*, 126, 1909-1915 (2011)

② 井之上浩一、伊藤有香、服部靖子、堤内 要、伊藤澄夫、日野知証、岡 尚男  
"Efficient purification of xanthomonasin A and B from *Monascus yellow colorant* by high-speed countercurrent chromatography" (査読有) *日本食品化学学会誌*, 17, 185-191 (2010)

③ K. Inoue, Y. Hattori, T. Hino and H. Oka  
"An approach to on-line electrospray mass spectrometric detection of polypeptide antibiotics of enramycin for high-speed counter-current chromatographic separation." (査読有) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51, 1154-1160 (2010)

[学会発表] (計 6 件)

① 服部靖子, 井之上浩一, 日野知証, 岡 尚男  
「天然由来有効成分の効率的単離精製を目指した高速向流クロマトグラフィー質量分析法の開発」日本薬学会第 131 年会 (静岡) 2011 年 3 月 28-31 日

② 服部靖子, 井之上浩一, 日野知証, 堀江正一, 岡 尚男  
「高速向流クロマトグラフィー/質量分析法によるゲンタマイシン C1, C2, C1a の単離精製およびその抗菌活性の測定」第 100 回 日本食品衛生学会学術講演会 (熊本) 2010 年 9 月 16-17 日

③ Koichi Inoue, Erika Baba, Yasuko Hattori, Tomoaki Hino and Hisao Oka  
"Strategy of High-speed Countercurrent Chromatography Purification of Specific Antioxidants from Natural Products Based on On-Line HPLC Method with Radical Scavenging Assay" The 6th International Conference on Countercurrent Chromatography (Lyon, France) 2010 年 7 月 26-30 日

④ 服部靖子, 井之上浩一, 日野知証, 岡 尚男  
「高速向流クロマトグラフィー質量分析法

による動物用医薬品構成成分の効率的分離  
精製法」日本食品化学学会第 16 回総会・学  
術大会（大阪）2010 年 6 月 9-10 日

⑤服部靖子、井之上浩一、日野知証、岡 尚  
「高速向流クロマトグラフィー／質量分析  
法によるゲンタマイシン類の単離精製」日本  
薬学会第 130 年会（岡山）2010 年 3 月 28－  
30 日

⑥服部靖子、井之上浩一、日野知証、岡 尚  
男  
「高速向流クロマトグラフィー/ESI-MS に  
よる抗菌剤エンラマイシン異性体の単離精  
製法の検討」第 34 回 日本医用マススペクト  
ル学会年会（近畿大学）2009 年 9 月 10-11 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井之上 浩一(KOICHI INOUE)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：30339519