

ラピッドレゾリューション HPLC による キサンチン類のハイスループット分離 アプリケーション

生化学、食品飲料、製薬

著者

John W. Henderson and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

キサンチン類は、C18 カラムによる逆相 HPLC で最適に分離されることが分かっています。カラムを短くし粒子径を小さくすることで、分離能をそれほど落とさずに、検討したキサンチン類混合物の分離時間は 8 分から 1.5 分に短縮されました。シンプルなアイソクラティック HPLC メソッドを使用した、飲料（茶、チョコレートシロ

ップ、ココア）中に含まれるテオブロミン、テオフィリン、カフェインの分析について説明しました。

はじめに

キサンチン類は、穏和な興奮剤として、そして特に喘息治療における気管支拡張薬としての効能のために、よく使用されるアルカロイドの一群です。最も一般的なキサンチンはカフェインで、コーヒー豆、茶、コーラナッツなどの食品中で見つかり、カカオ豆中でも少量見つかります。驚くことに、チョコレートも弱い興奮剤であり、すべてメチルキサンチンであるテオブロミン、テオフィリン、カフェインが含まれています。これらのキサンチン類とその代謝物の化学構造式を図 1 に示します。

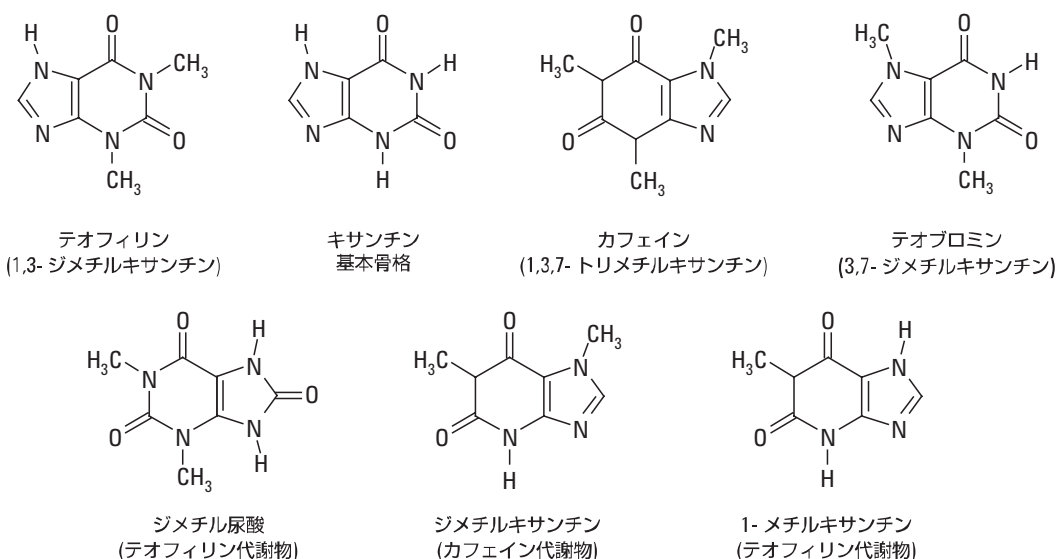


図 1. この研究で選んだキサンチン類とそれらの代謝物の構造

キサンチン類は体内ではほぼ 100% 吸収され、摂取後数分以内に血中に現れます。キサンチン類は中枢神経系を刺激し、循環器系に影響を及ぼし、気管支の筋肉を弛緩します。カフェインは、眠気と疲労を軽減するなどの、覚醒作用がよく知られています。これらの一般的なキサンチン類は、人体に生理作用を示す可能性のある色々な化合物に代謝されます。

キサンチン類はたいていの場合、C18 カラムによる逆相 HPLC (RP-HPLC) で分離されます[1-3]。キサンチン類の分離には、イオンペアクロマトグラフィーが使用されてきましたが[2]、緩衝液とアセトニトリルを使用した RP-HPLC では、必要とする移動相システムがよりシンプルになります。このアプリケーションノートでは、固定相の違いによりキサンチン分離の選択性にどの程度の違いが示されるかを明らかにし、分離速度に対して粒子径とカラム長の効果についても検討します。最後に、チョコレート飲料中のカフェインとテオブロミンの分析に使用したメソッドの例を示します。

キサンチン類分離用固定相の選択

HPLC により、可能な最短時間で対象ピークを分離することができます。適正な固定相を選択することは、メソッド開発における重要なステップです。これらの研究に適した固定相を選ぶために、最初にいくつかの異なる固定相を試しました。

ZORBAX StableBond [シアノ (CN)、フェニル、C18] と極性導入型固定相 (ZORBAX Bonus RP) を使用したキサンチン類混合物の分離を図 2 に示します。

Bonus カラムでは粒子径が他と異なりますが、この実験で我々の目的は最良の選択性と最短の保持時間を持つ固定相を選ぶことでした。用いられた条件下で、CN カラムは (アルキル鎖長のおかげで) 最小の保持時間を示しましたが、このカラムは対象キサンチンのうち 2 つの成分を分離できませんでした。SB-C18 カラムは最短時間で総合的に最良の分離を示したため、最終的にこの固定相を選択しました。

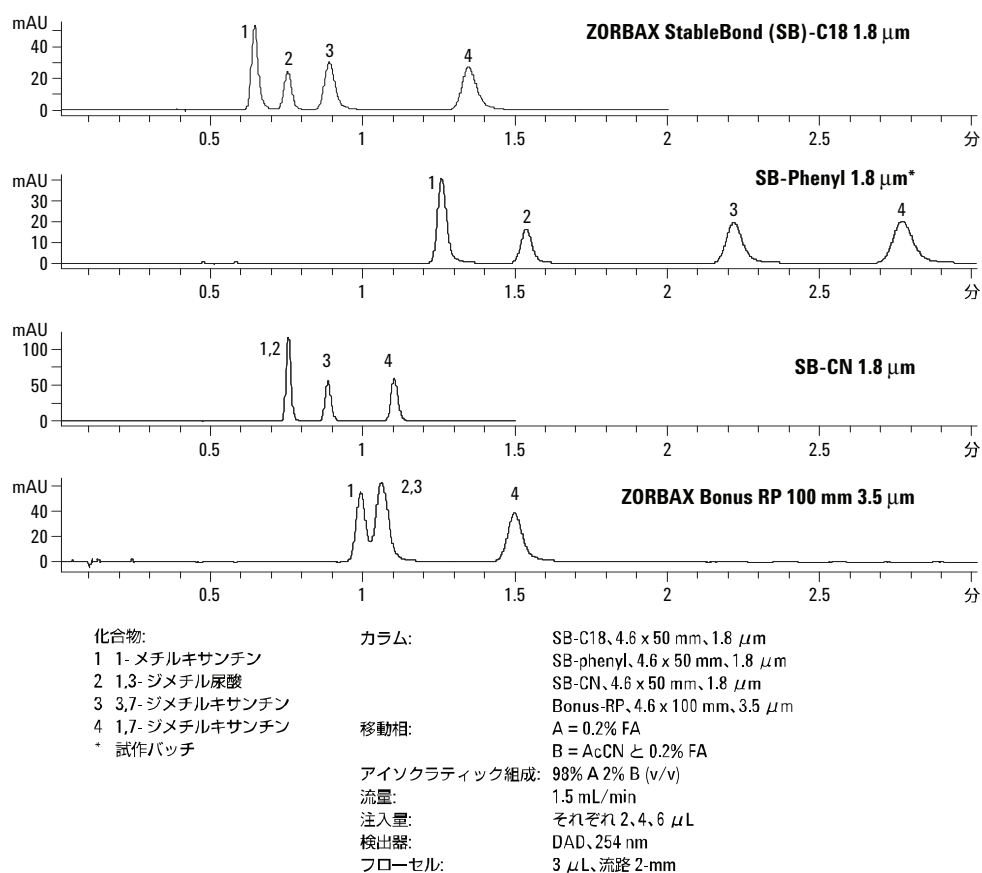


図 2. キサンチン類分析での ZORBAX 固定相の選択性の比較

以降の実験で使用するクロマトグラフ条件を下に示します。

LC 条件

カラム: ZORBAX SB-C18 (長さ、粒子径はクロマトグラムに表示したとおり)、
移動相: A= 0.2% ギ酸 (FA) 水
B= 0.2% ギ酸アセトニトリル溶液
アイソクラティック組成: 98% A 2% B (v/v)
流量: 1.5 mL/min; 注入量はクロマトグラムに表示したとおり
検出: DAD、254 nm
フローセル: 3 μ L、光路長 2-mm

キサンチン類分離における粒子径とカラム長の影響

HPLC の最近のトレンドは、小さな粒子径の短いカラムを使用することです。小さな粒子径の短いカラムを使用することにより、同等レベルの分離能でより迅速な分離が得られます。3 つの異なる粒子径の ZORBAX Stable-Bond C18 (それぞれ 5 μ m、3.5 μ m、1.8 μ m) を充填した 3 種類のカラム (それぞれ長さ 250 mm、100 mm、および 50 mm) でのキサンチン類混合物のアイソクラティック分離を図 3 に示します。カラム長が短くなると、短くなった分だけ保持時間も短くなることが期待されます。実際に、図 3 で示されるとおり、分析の所要時間は 8 分から 1.5 分に短縮されています。

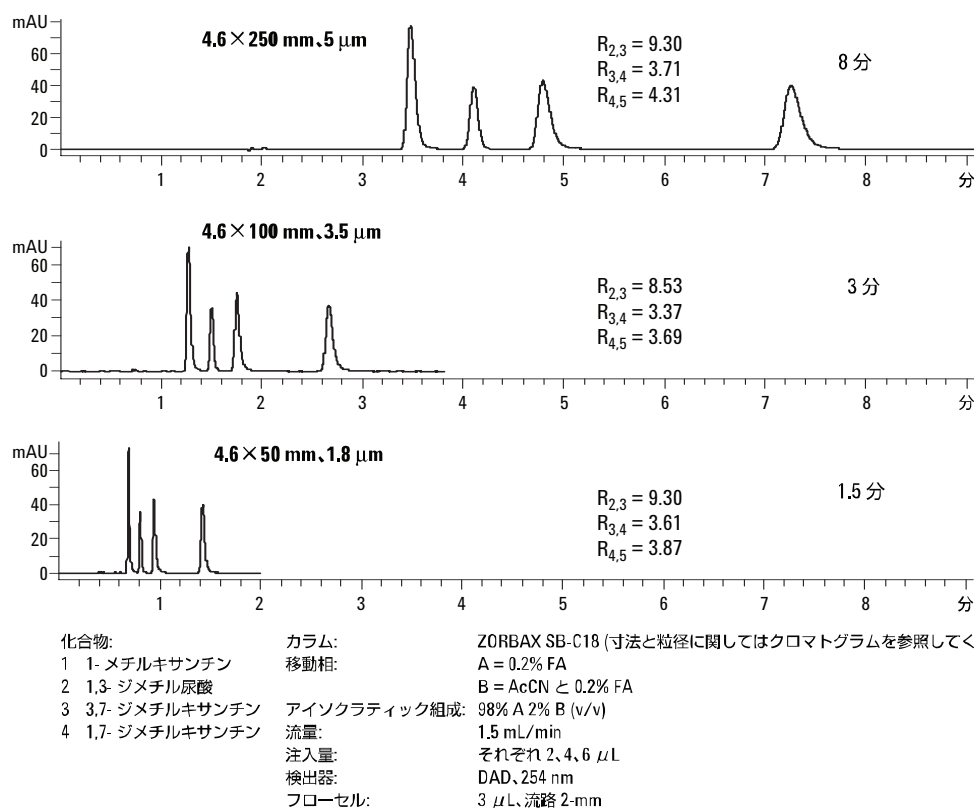


図 3. カラム・スケーラビリティ: 分離能を維持したまま、カラムサイズ、粒子径を変更して分析をスピードアップ

一方、カラム効率も低下するのではないかと心配されるかもしれませんが、しかしながら、粒子径を小さくすることで、全体的な効率と分離能はほぼ同じになっています。キサンチンのすべての組み合わせについて計算した分離度の値を図 3 に記します。これはラピッドレゾリューションのコンセプトで、短いカラムとより小さな粒子径の組み合わせにより、分離時間を大幅に短縮しても同等の分離結果が得られることを示しています。この場合流量 (1.5 mL/min) は同じであり、溶媒消費量はカラム長 (分析時間) に比例するため、トータルの費用も削減されます。短いカラムに切り換える別の利点として、ピークがシャープになることがあります。そのため、同じ絶対量の化合物が注入された場合、ピークはより高くなり、結果としてより高い感度が得られます。図 3 では、カラムの長さに比例してサンプル注入量を減少させ、ピークの高さがほぼ同じになるように保っています。

もちろん、カラムの粒子径を小さくするにつれて、カラム背圧は粒子径の二乗に反比例して増加します。そのため、同じ長さのカラムを使用した場合、同じ流量 (より正確には線速度) での圧力は、粒子径 5.0 μm のカラムに対し粒子径 3.5 μm では 2 倍に増加し、粒子径 1.8 μm ではおよそ 8 倍に増加します。しかしながら、より小さな粒子径のカラムでは理論段数もより増加するため、カラムを短くでき、実際の圧力上昇は表 1 のとおり、ほんの

わずかになります。Agilent 独自の粒度分布最適化技術により、1.8 μm カラムで一般に予想される値よりも、圧力をより低く抑えることができます。

表 1. 圧力と粒子径、カラム長の関係 *

粒子径 um	カラム長 mm	圧力 bar	圧力増加 (5.0 に対して)
5	250	181	1.0
3.5	100	155	0.86
1.8	50	264	1.46

* 図 3 の条件

カラム充填剤の粒子径の違いによる選択性への影響が僅かであることを検証するために、同じ長さで粒子径の異なるカラムを使用してキサンチン類混合物のアイソクラティック分離を調べました。図 4 に示されるとおり、保持時間の変化はきわめて僅かですが、5 μm から 1.8 μm のカラムにするとピーク幅は著しく狭くなります。別の言い方をすれば、1.8 μm カラムではカラム効率がより高くなり、その結果分離能も上がりましたが、選択性にはほとんど影響ありませんでした。HPLC 条件は、図 4 のクロマトグラムに併記してあります。

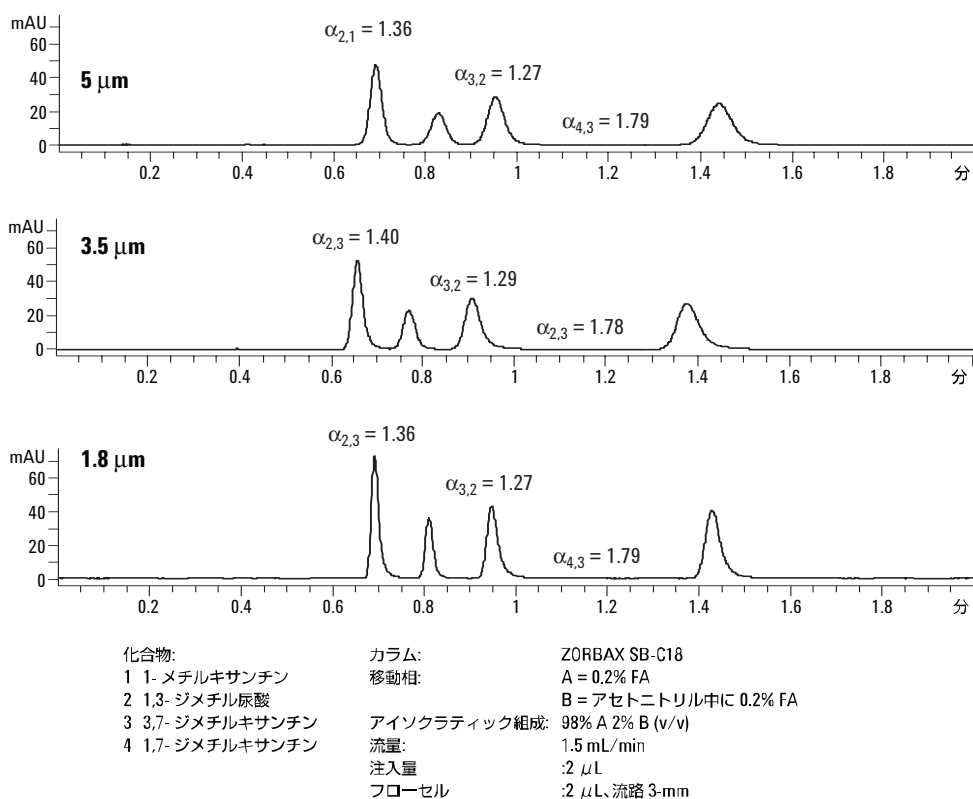


図 4. 粒子径とカラムの選択性

各種飲料中のキサンチン類分析

3つの最も一般的なキサンチンはカフェイン、テオフィリン、テオブロミンです。これらのキサンチンは、香料の一部として、または味覚の強調あるいは覚醒作用を上げるために添加され、さまざまな飲料中に存在する可能性があります。チョコレート飲料や茶の中に含まれている量を分析するために、シンプルなアイソクラティック・メソッドを作成しました。前述のクロマトグラフ条件を使用して、キサンチン標準品混合物がきれいに分離できました。図5を参照してください。

次に、商品パッケージに書かれた調理方法に従って（混合のために超音波処理を用いましたが）3種類の異なる液体飲料のホット・ココア、チョコレート・シロップ、紅茶（ティーバッグ）を調製しました。調製後、すべての溶液を遠心分離した後、水層部分を孔径0.45ミクロンのフィルタで濾過してHPLCカラムを詰まらせる恐れのある粒子を除去しました。特に、ココアには顕著な油脂層ができましたが、水層を分析試料としました。各サンプルについて、水溶性抽出物を3 μL 注入しました。分析結果を図6に示します。

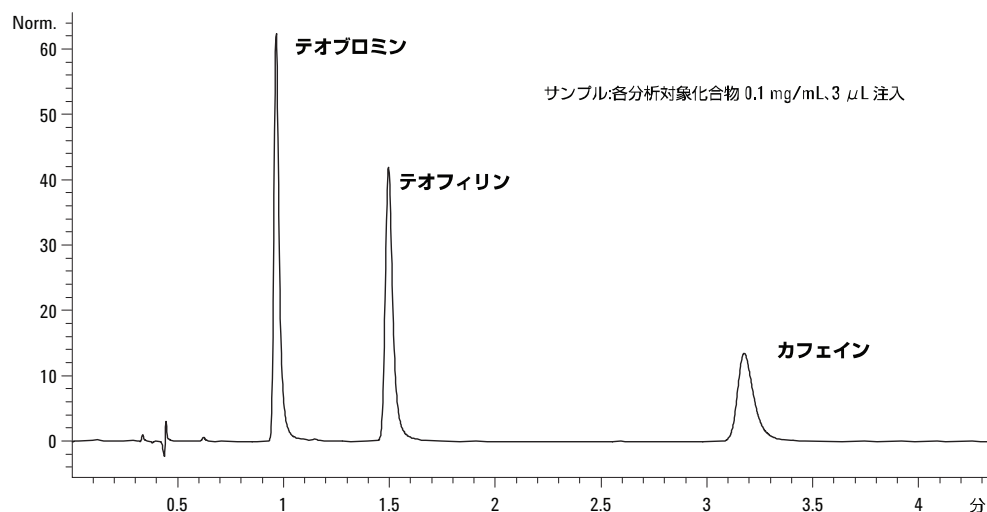


図5. キサンチン類標準品の分離

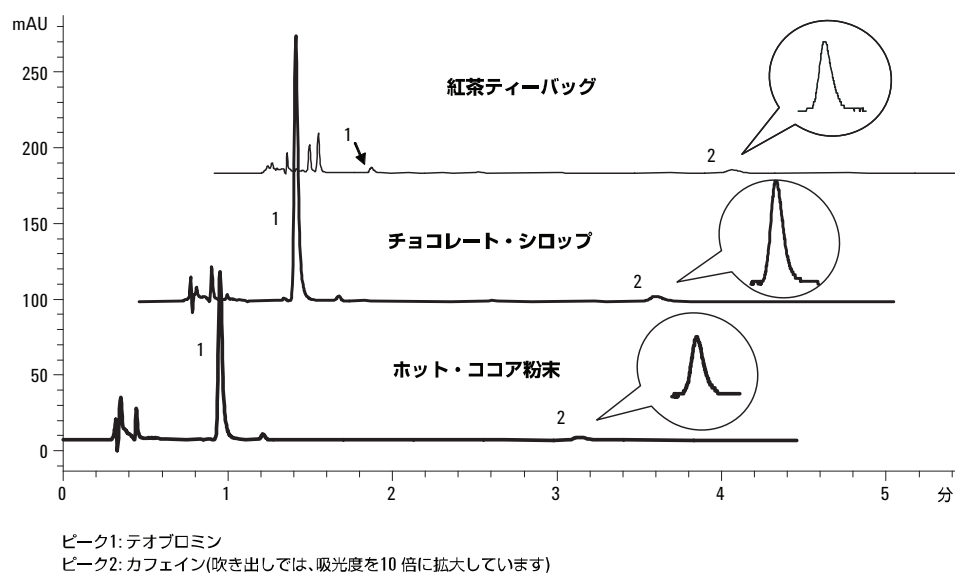


図6. 各種飲料中のキサンチン類分析

それぞれのピークの面積から、飲料中キサンチン類の半定量分析（一点検量線法）が可能です。表 2 から分かるように、チョコレート飲料では、相対的に高濃度のテオブロミンが測定されましたが、カフェインは少量でした。しかし、茶のサンプルではカフェインはかなり多く測定されました。表 2 の結果は重量パーセントで表しており、飲料溶液に含まれる全ミリグラム量ではありません。これらの結果は、製造業者の表示から予想される濃度範囲内でした。テオフィリンはいずれの飲料中にも測定されませんでした。

表 2. 各種飲料中のキサンチン類定量

飲料	テオブロミン (%, wt/wt)	カフェイン (%, wt/wt)
ホット・チョコレート	0.15	0.011
チョコレート・シロップ	0.13	0.011
茶	0.056	0.17

結論

キサンチン類は、C18 カラムの逆相 HPLC により最適に分離されることが分かりました。カラムを短くし粒子径を小さくすることで、分離能をほとんど損なわずに、検討したキサンチン類混合物の分離時間を 8 分から 1.5 分に短縮できました。シンプルなアイソクラティック PLC メソッドを使用した、液体飲料（茶、チョコレートシロップ、ココア）中に含まれるテオブロミン、テオフィリン、カフェインの分析について説明しました。

参考文献

1. U. Huber, “analysis of Antiasthmatic Drugs by HPLC”, Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.
2. R. Ricker, “High Speed Separation of Analgesics”, Agilent Technologies, publication 5988-6414EN, www.agilent.com/chem.
3. Q. Wang, “analysis of Xanthines in Serum”, Agilent Technologies, publication 5988-2523EN, www.agilent.com/chem.

詳細について

製品とサービスの詳細については、弊社ウェブ・サイトをご覧ください（www.agilent.com/chem）。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
March 6, 2006
5989-4857JAJP