

# Technical Report

## 超臨界流体クロマトグラフィーを用いた蛍光物質の異性体分離 ～分離に影響を与えるパラメータ～

Study of effective parameters for separation of isomers of fluorescent substance by supercritical fluid chromatography

松本 恵子<sup>1</sup>、舟田 康裕<sup>1</sup>

### Abstract:

ヒト患者体内の微小がん部位を短時間で検出するために、がん部位選択的なバイオマーカー酵素と反応することで初めて蛍光を発する分子である蛍光プローブの研究・開発が行われています<sup>1)</sup>。蛍光プローブの母核として汎用されているローダミンやフルオレセインは、典型的な方法で置換基が導入された分子を合成すると、ベンゼン環部位の置換位置が異なる異性体が生成されます。蛍光プローブの母核として使用するためには、これらの異性体を分離することが重要です。超臨界流体クロマトグラフ Nexera UC を用いて、蛍光物質のカルボキシテトラメチルローダミンの異性体分離の最適化を行いました。異性体の分離に影響を及ぼす要因についてご紹介します。

**Keywords:** 超臨界流体クロマトグラフィー、SFC、Supercritical fluid chromatography、メソッドスカウティング

### 1. 蛍光物質の異性体分離について

ヒト患者体内の微小がん部位を短時間で検出するために、がん部位選択的なバイオマーカー酵素と反応することで初めて蛍光を発する分子である蛍光プローブの研究・開発が行われています。蛍光プローブの母核として汎用されているローダミンやフルオレセインは、Fig. 1 に示す通りベンゼン環部位とキサンテン環部位から成る分子ですが、典型的な方法で置換基が導入された分子を合成すると、ベンゼン環部位の置換位置が異なる異性体が生成されます (Fig. 1 の物質の場合、カルボン酸が5位または6位に結合した異性体)。蛍光プローブの母核として使用するためには、これらの異性体を分離することが重要です。

異性体の分離には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の逆相モードや順相モードが用いられてきましたが、新たな分離手法として超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) が注目されています。SFCにおいてメインの移動相である超臨界流体二酸化炭素が有する1) ヘキサンに近い極性と2) 液体に比べ低粘性かつ高拡散性であるという特性が、UHPLCとは異なる分離選択性を生み出すことがあり、これまでHPLCでは分離が困難であった成分や試料の分離改善が期待できます。しかし、分離に影響を及ぼす要因については十分解明されていません。より良い分離を得るためには、分離に影響を及ぼすパラメータを知っておくことは重要です。

### 2. 蛍光物質

本報で用いた蛍光物質 カルボキシテトラメチルローダミンの化学構造をFig. 1に示します。本報では、カルボキシテトラメチルローダミンと、合成時に同時に生成された脱メチル体の異性体の分離を検討しました。

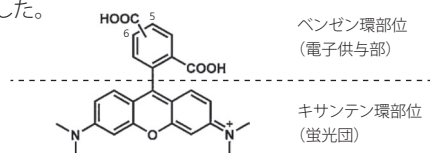


Fig. 1 5 (6) -カルボキシテトラメチルローダミンの化学構造

### 3. カラムスカウティング

カラムスカウティング条件および使用した固定相をTable 1、Table 2に示します。オクタデシル基やジオール基など典型的な固定相をはじめ、さまざまなカラムを用いて網羅的に検討しました。

Table 1 カラムスカウティング条件

Column	: Table 2参照 (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Methanol
Gradient	: 10% (0min) -50% (5-8min) -10% (8.01-11min)
Flow rate	: 3 mL/min
BPR pressure	: 10 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 40 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm LCMS-8060 (ESI, scan mode <i>m/z</i> :400-500)

Table 2 分析カラム

	カラム名	固定相
①	Shim-pack UC-Sil	Silica
②	Shim-pack UC-RP	Octadecyl Group+Polar Functional Group
③	Shim-pack UC-Choles	Cholesteryl Group
④	Shim-pack UC-PyE	Pyrenylethyl Group
⑤	Shim-pack UC-PBr	Pentabromobenzyl Group
⑥	Shim-pack UC-Diol	Diol Group

Fig. 2 に、6本の分析カラムの分離パターンを示します。オクタデシル基あるいはコレステリル基との疎水的相互作用が働くと考えられる逆相系カラム (②UC-RP, ③UC-Choles) では分離できませんでした。また、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用が期待できるピレニルエチル基 (④UC-PyE) では、強く保持されたまま溶出せず、ピーク検出できませんでした。一方、疎水的相互作用以外に臭素と分析対象の間で分散力が働くと考えられるペンタブロモベンジル基 (⑤UC-PBr) では、4つのピークが検出されました。カルボキシテトラメチルローダミンの異性体2種とその脱メチル体2種を分離できました。

順相系カラムでは、ジオールカラム (⑥UC-Diol) とシリカカラム (①UC-Sil) 共に4本のピークが検出できました。特に、Shim-pack UC-Silの場合に、明確に4つのピークに分離することができました。シリカカラムに多く存在する固定相の水酸基とカルボキシテトラメチルローダミンのアミノ基間に相互作用が働いたと推察されました。また、カルボキシテトラメチルローダミンの5位あるいは6位のカルボン酸の結合位置により、前記相互作用の強さに差が生じ、異性体が分離できたと考えられました。

固定相の種類により異性体の分離パターンが大きく異なりました。メソッド開発の初期においては、カラムの選択が重要となります。

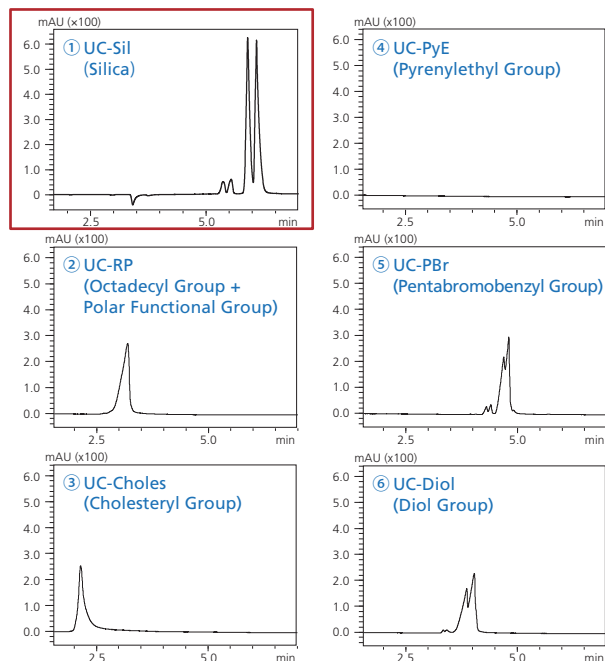


Fig. 2 6本の分析カラムによるカルボキシテトラメチルローダミンと脱メチル体の分離比較

Fig. 3のクロマトグラムに示したShim-pack UC-Silにより分離されたピークのMSスペクトルとPDAスペクトルをFig. 4に示します。ピークを同定するために、PDA検出器の後に質量分析計を接続してスキャン分析を行いました。MSスペクトルよりそれぞれプロトン付加体が検出されていて、前半の2ピーク (Peak1、Peak2) はカルボキシテトラメチルローダミン脱メチル体、後半2ピークはカルボキシテトラメチルローダミンであることが分かりました。

また、脱メチル体の $\lambda_{max}$ は共に534 nm、カルボキシテトラメチルローダミンは $\lambda_{max}$ は546 nmであることを確認しました。

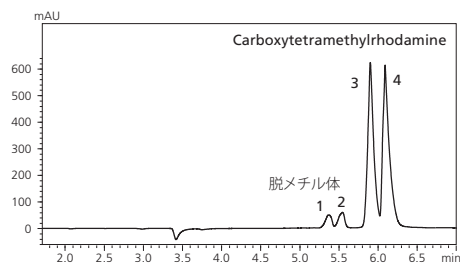


Fig. 3 Shim-pack UC-Silによるクロマトグラム

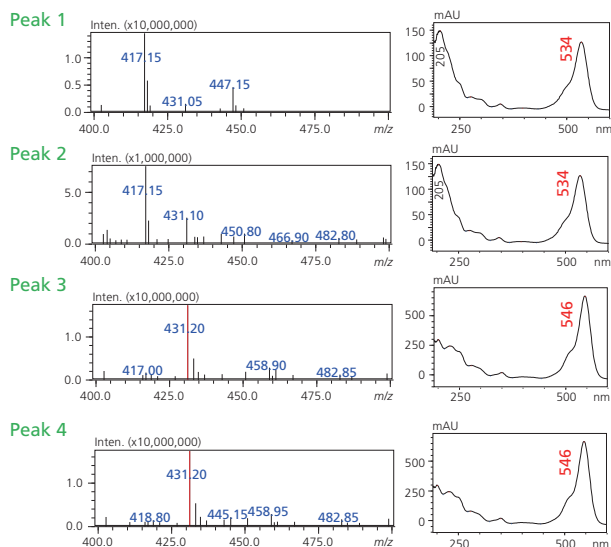


Fig. 4 各ピークのMSスペクトルとPDAスペクトル

#### 4. モディファイアの溶媒、添加する塩の影響

カルボキシテトラメチルローダミンの分離に最適なシリカカラム Shim-pack UC-Silを用いて、モディファイアに使用する溶媒や添加する塩の比較を行いました。分析条件をTable 3に示します。

Table 3 分析条件

Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mL L. × 4.6 mm I.D., 5 $\mu$ m)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Acetonitrile または0.1%TFA Methanol または0.1%Formic Acid Methanol
Gradient	: 10% (0min) -50% (5-8min) -10% (8.01-11min)
Flow rate	: 3 mL/min
BPR pressure	: 10 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 40 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm

有機溶媒として、アセトニトリルまたはメタノールを使用した場合のクロマトグラムをFig. 5に示します。アセトニトリルの場合は、メタノール使用時とは違い、非常にブロードなピークが得られました。アセトニトリルはSFCではメタノールより溶出力の小さい溶媒であるため、分析対象成分がカラムに強く保持され、十分溶出していないと推察できました。

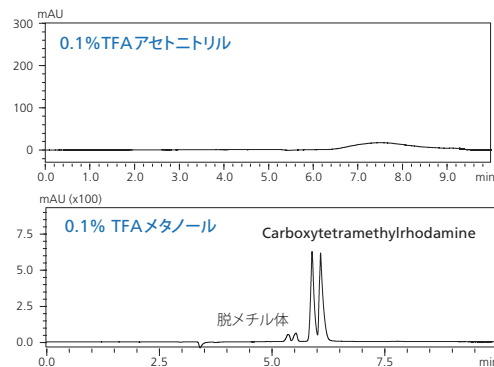


Fig. 5 各種モディファイアに使用する有機溶媒の比較

また、添加する塩としてTFA (Trifluoroacetic acid) を使用した際は異性体を分離できましたが、Fig. 6に示した通り、ギ酸の場合はピーク分離できず、PDAスペクトルより溶出順序が異なることを確認しました。添加する塩が溶出に影響を及ぼすことが分かりました。

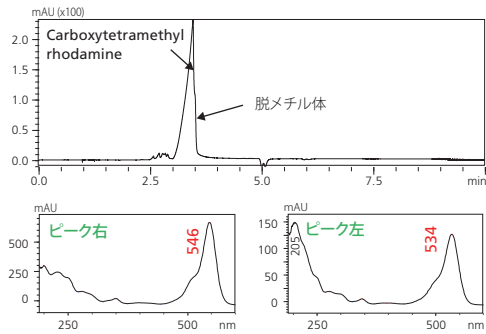


Fig. 6 0.1%ギ酸メタノール使用時のクロマトグラムとPDAスペクトル

SFCにおいて最も溶出力の高いモディファイアである水の少量使用が、ピーク形状や分離パターンに及ぼす影響を検討しました。水添加なし、水添加時のクロマトグラムをFig. 7に示します。モディファイアに水を添加することにより、よりシャープなピークが得られ、溶出時間の早い脱メチル体の方で顕著でした。水の少量添加が異性体間の分離を改善することが分かりました。

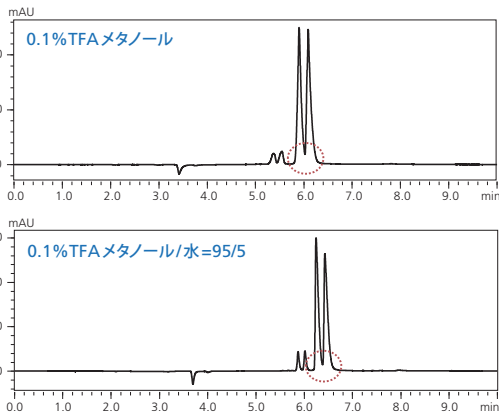


Fig. 7 モディファイアに水添加/無添加時のクロマトグラム

## 5. カラム温度の影響

Table 3の分析条件を用いて、カラムオープン設定温度の影響を調べました (Fig. 8)。設定温度20℃の際により分離しました。カラム温度を下げることで異性体間の分離が改善することを確認しました。

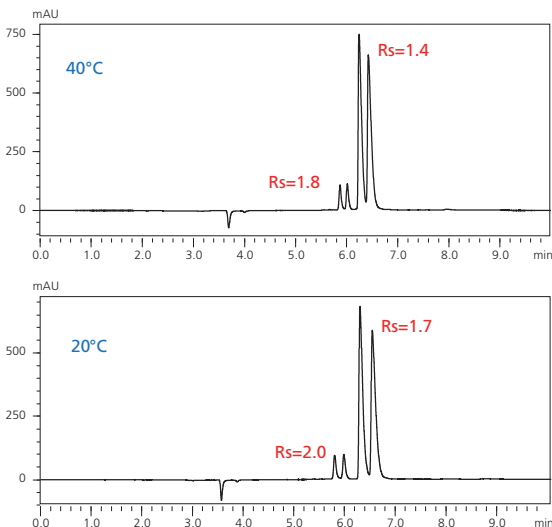


Fig. 8 カラムオープン設定温度2種のクロマトグラム (分離度RsはUSP法を使用)

## 6. 移動相流量の影響

SFCは、超臨界流体二酸化炭素が低粘性と高い拡散性を有するため、高速領域での分析においてもカラム負荷圧は低く、かつカラム効率は損うことなく分析の高速化が可能です。Table 4に示した分析条件を用いて移動相流量の影響を検討しました。各流量におけるクロマトグラムをFig. 9に示します。2 mL/minで最も良い分離度が得られました。さらに流量を増やしてもほとんど分離度を損わず、ピークがシャープになることが分かりました。

Table 4 分析条件

Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Methanol/Water=95/5
Gradient	: 10% (0min) -50% (5-8min) -10% (8.01-11min)
Flow rate	: 2, 2.5, 3, 3.5 mL/min
BPR pressure	: 10 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 20 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm

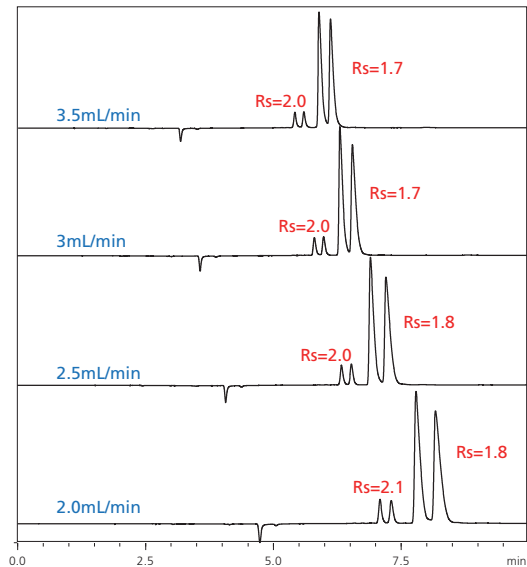


Fig. 9 各種移動相流量におけるクロマトグラム

## 7. 背圧の影響

SFCでは、超臨界流体二酸化炭素の圧力を背圧制御弁で制御します。Table 5の分析条件を用いて、背圧制御弁の設定圧力の影響を比較しました。Fig. 10に示したように10 MPaと15 MPa時において異性体の分離度に差は見られませんでした。15 MPa時によりシャープなピークが得られました。背圧を増やすとCO<sub>2</sub>密度が増加すると考えられ、それに伴い溶出が早まりシャープなピーク形状が得られたと考えられます。

Table 5 分析条件

Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Methanol/Water=95/5
Gradient	: 10% (0min) -50% (5-8min) -10% (8.01-11min)
Flow rate	: 3 mL/min
BPR pressure	: 10 MPa, 15 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 20 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm

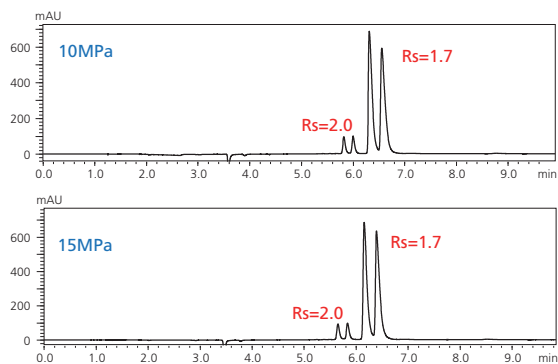


Fig. 10 各背圧におけるクロマトグラム

## 8. 複数溶媒をモディファイアに使用した分離改善

Table 6に示した分析条件を用いて、複数の有機溶媒をモディファイアに使用した際の比較を行いました (Fig. 11)。

Table 6 分析条件

Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Methanol/Water=95/5 0.1%TFA Methanol/Ethanol/Water=50/45/5 0.1%TFA Methanol/Isopropanol/Water=50/45/5
Gradient	: 10% (0min) -50% (5-8min) -10% (8.01-11min)
Flow rate	: 2 mL/min
BPR pressure	: 15 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 20 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm

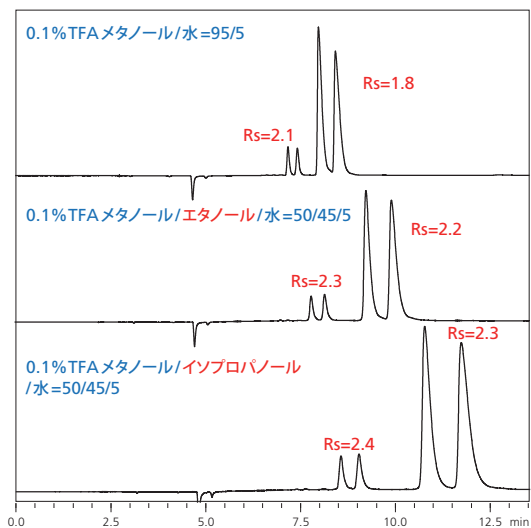


Fig. 11 複数有機溶媒使用時のクロマトグラム

メタノールより溶出力の小さい溶媒 (溶出力メタノール>エタノール>イソプロパノール) との混合液を用いることにより分離が改善しました。ただし、イソプロパノールでは、顕著なピークのブロード化が見られました。複数の有機溶媒を使用することにより、分離の調節が可能であることが分かりました。

## 9. HPLCとの比較

ここまでの検討では初期濃度10%から開始するグラジエント溶出を行っていましたが、分析対象化合物がモディファイア50%でホールドしている時間帯に溶出していたため、モディファイア50%のイソクラティック条件で検討し、分離に影響しないことを確認できました。Fig. 12に各種パラメータの最適値 (Table 7) を使用し、イソクラティック分析を行った時のSFCクロマトグラムを示します。合わせてTable 8の分析条件を使用したHPLCクロマトグラム (東京大学 薬学部 浦野研ご提供データ) を示します。

Table 7 SFC分析条件

Column	: Shim-pack UC-Sil (250 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile phase	: A; CO <sub>2</sub> B; Modifier: 0.1%TFA Methanol/Ethanol/Water=50/45/5 (Isocratic A/B=1:1)
Flow rate	: 2 mL/min
BPR pressure	: 15 MPa
BPR temp.	: 50 °C
Column temp.	: 20 °C
Detection	: Photo diode array detector (wave length = 190-600 nm) PDA Chromatogram 550 nm

Table 8 HPLC分析条件

Column	: ODS (250 mm L. × 4.6 mm I.D.)
Mobile phase	: A; 0.1%TFA Water B; 0.1%TFA Acetonitrile
Gradient	: 20% (0min) -100% (25min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Detection	: wave length 550 nm

SFCとHPLCでは、分析対象化合物の溶出順序に違いが見られ、SFCでは脱メチル体2種の溶出後、カルボキシテトラメチルローダミン2種が溶出したのに対し、HPLCでは脱メチル体とカルボキシテトラメチルローダミンが交互に溶出するという分離挙動の違いがみられました。

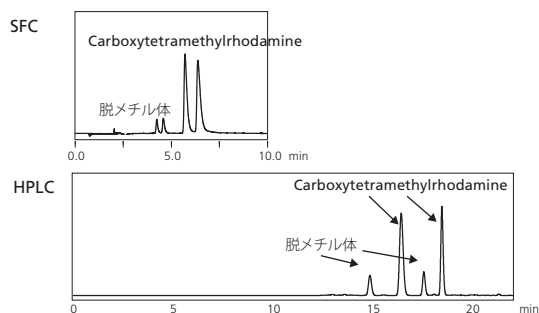


Fig. 12 カルボキシテトラメチルローダミンのSFCとHPLCクロマトグラム

## 謝辞

東京大学 大学院薬学系研究科 浦野 泰照 教授に、試料とデータをご提供いただきました。

## 参考文献

- 1) 神谷真子、浦野泰照、生体機能イメージングを実現する蛍光プローブの精密設計、DOJIN NEWS、No.138、2011

**株式会社 島津製作所**  
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2018年10月  
© Shimadzu Corporation, 2018