

Application News

No. L567

高速液体クロマトグラフィー

ELSD-LT III を用いた目薬中の コンドロイチン硫酸エステルナトリウムの分析

コンドロイチン硫酸はムコ多糖の一種であり、細胞や軟骨などの多くの組織に含まれています。コンドロイチン硫酸は角膜保護や関節痛改善などの効果があることから、コンドロイチン硫酸エステルナトリウム（一般名、総称はコンドロイチン硫酸ナトリウム、以下 SCS）として目薬やサプリメント中にしばしば含まれています。

SCS は UV 吸収がほとんどないため、HPLC の検出器としてよく用いられる紫外可視吸光度 (UV) 検出器では検出できず、示差屈折率検出器 (以下 RID) や蒸発光散乱検出器 (以下 ELSD) が用いられます。ELSD は不揮発性試料であればほぼ全ての物質で分析することが可能であり、汎用性が高い検出器です。グラジエント溶離も可能なため、RID 使用時と比較し、分析時間の短縮や感度の向上を図ることが出来ます。そのため、糖類や脂質など様々な分析に用いられています。

ここでは検出器に ELSD-LT III を搭載した Nexera™ シリーズでの目薬中の SCS の分析例をご紹介します。

K. Matsuoka, N. Iwata

■ ELSD による SCS 標準品の分析

表 1 に ELSD を用いた SCS 標準品 (東京化成工業株式会社製、CAS 番号 9082-07-9) の分析条件を、図 1 にクロマトグラムを示します。ここではタンパク質などの分析に適しているノンポーラス ODS カラム、グラジエント溶離法を用いて SCS を分析しました。検出は ELSD で行いました。ELSD-LT III の新機能、Wide 機能により、感度に関するパラメータが自動で最適化され、低濃度から高濃度まで試料濃度に関わらず同じメソッドでデータを採取することが可能になりました。

表 1 分析条件

System	: Nexera lite
Mixer	: Mixer MR 20 μ L*1
Column	: Imtakt Presto FF-C18 (150 mm \times 4.6 mm I.D., 2 μ m)
Mobile Phase	: A) Water/Triethylamine/Acetic Acid=100 : 1.1 : 0.5 B) Acetonitrile
Time Program	: B conc. 5% (0 min) \rightarrow 55% (7 min) \rightarrow 100% (7.10 - 9 min) \rightarrow 5% (9.10 min - 18 min)
Flow Rate	: 0.35 mL/min
Column Temp.	: 35 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 1 μ L
Vial	: LabTotal for LC 1.5 mL, Glass*2
Detection	: ELSD-LT III
	Gain : Wide
	Filter : 4 sec
	Drift Tube Temp. : 100 $^{\circ}$ C
	Nebulizer Gas : N ₂
	Gas Pressure : 350 kPa

*1 P/N : 228-72652-41

*2 P/N : 227-34001-01

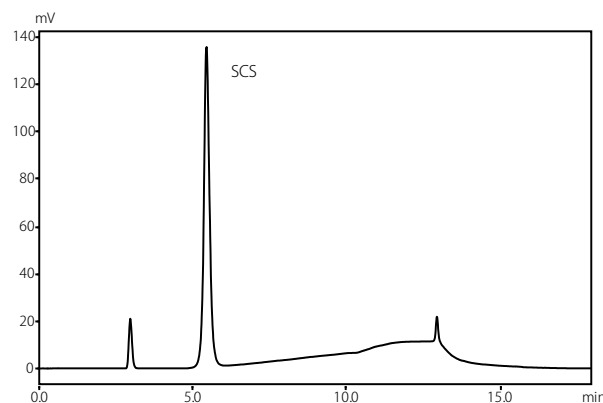


図 1 SCS 標準品 (1000 mg/L) のクロマトグラム (ELSD)

■ 直線性と再現性

250、500、750、1000 mg/L の 4 点の SCS 標準品の検量線を作成しました。ELSD のレスポンスは濃度の対数に対して指数応答のため両対数軸でプロットします。

図 2 に検量線を、表 2 に再現性を示します。再現性は 250 mg/L についての繰り返し分析 (n=6) で確認しました。直線性については r^2 が 0.9999 以上であることから良好であるといえます。また、保持時間、面積値について、相対標準偏差 (%RSD, n=6) が 0.11、2.08 であることから、保持時間再現性、面積再現性ととも良好でした。

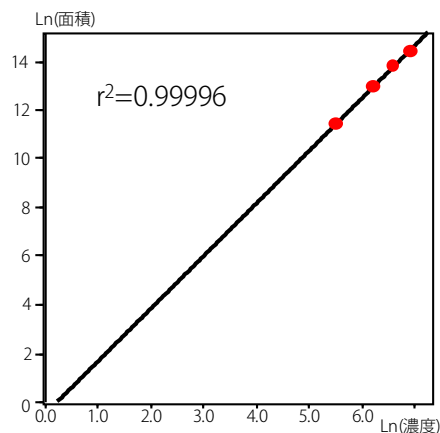


図 2 検量線 (ELSD)

表 2 再現性 (250 mg/L 標準品) (ELSD)

Compound	Retention Time (%RSD)	Area (%RSD)
Sodium Chondroitin Sulfate	0.11	2.08

■ ELSD による目薬中 SCS の分析

分析条件は表1と同じです。目薬は水で10倍希釈した後、0.2 μm のメンブランフィルターでろ過して分析に用いました。図3に目薬のクロマトグラムを示します。10倍希釈した目薬中のSCS定量値は629.4 mg/Lでした。定量には図2の検量線を用いました。実際に適用する際は、SCSの分子量分布が標準品と試料で異なる可能性がありますので、原薬を標準品として用いることをおすすめします。

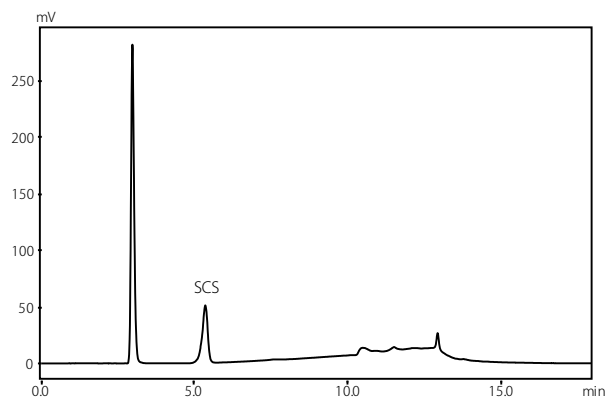


図3 目薬 (10倍希釈) のクロマトグラム (ELSD)

■ RID による目薬中 SCS の分析

表3にRIDを用いた目薬中のSCSの分析条件を示します。RIDに適した分析条件にするため水系SEC (GFC) 用カラムを用いました。また、ピークを確実に検出するため、注入量は50 μLにしました。目薬の前処理法は前述の通りです。

表3の条件で目薬を分析したクロマトグラムを図4に示します。RIDでは検出器の性質上、グラジエント溶離法を用いることができないため、目薬中の成分を分離することができませんでした。

これに対し、ELSDを用いた分析では、グラジエント溶離法を用いることが出来るため、分離良好、分析時間短縮、感度良好等の利点があります。

表3 分析条件 (RID)

System	: Nexera lite
Mixer	: Mixer MR 180 μLII*1
Column	: Shodex OHpak SB-806M HQ (300 mm × 8.0 mm I.D., 13 μm)
Mobile Phase	: 50 mmol/L Sodium Sulfate aq. : Methanol=95 : 5
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Vol.	: 50 μL
Vial	: LabTotal for LC 1.5 mL, Glass*2
Detection	: RID-20A
	Polarity : +
	Cell Temp. : 40 °C
	Response : 1.5 sec

*1 P/N : 228-72652-44

*2 P/N : 227-34001-01

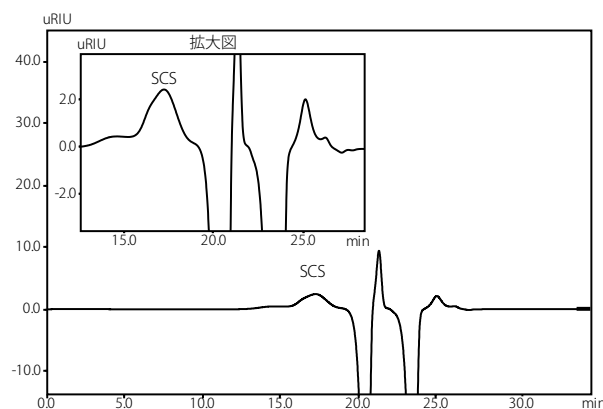


図4 目薬 (10倍希釈) のクロマトグラム (RID)

■ まとめ

目薬中のSCSの分析を行いました。ノンポーラスカラムで分離し、ELSD-LT IIIで検出しました。ELSDを用いた分析ではグラジエント溶離法を用いることでRIDを用いた分析では上手く分離することができなかった目薬中の成分を分離し、SCSを定量することができました。

また、ELSD-LT IIIのWide機能により、感度に関するパラメータが自動で最適化され、試料濃度に関わらず同じメソッドでデータを採取することができました。

Nexera は、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

OHpak は、昭和電工株式会社の登録商標です。

その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。

本文中では「TM」、「®」を明記していません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。