

PDA-ELSD分取LCシステムによる 生薬含有成分に対する網羅的分取

中嶋 康介

ユーザーベネフィット

- ◆ 光吸収性の無い化合物を取り逃がさず、網羅性の高い分取が可能です。
- ◆ グラフィカルなユーザーインターフェースにより、分取に関わるパラメータ設定の労力を削減します。
- ◆ 分析LCと同じソフトウェアで制御できるため、分析LCによる条件検討からスムーズに分取精製に移行できます。

はじめに

分取LCは混合物から目的化合物を精製する手段として広く知られています。一般的な分取LCでは、検出器として紫外吸光 (UV) 検出器やフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器が用いられますが、これらは目的成分に光吸収性が無い化合物を検出できないため、すべての化合物を漏れなく分取精製することはできません。

本稿ではPDA検出器に加え、蒸発光散乱検出器 (ELSD) を併用したPDA-ELSD分取LCシステムを構築し、UV吸収を示さない化合物を含めた網羅的分取の実施例を紹介します。

ELSDによる分取精製の利点

一般的な分取LCでは汎用性の高い紫外吸光 (UV) 検出器や、多波長の紫外吸収を一度に観測できるフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器が用いられます。これらの検出器は、化合物の光吸収性を利用して対象成分を検出するため、構造中に光吸収性を有する部位が無い化合物についてはクロマトグラム上で観測することができません。化合物の光吸収性を利用しない検出器としては示差屈折率 (RI) 検出器も知られていますが、グラジエント溶離ではベースラインの変動が大きいため、幅広い性状の化合物の一斉分取には適さないという問題があります。

蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) は化合物を含む移動相を噴霧・蒸発し、粒子に対する光の散乱を検出する装置で、対象の揮発性が低ければ、その分子構造によらずに化合物を検出することができます。このような特性をもつELSDを分取LCと組み合わせることで、これまでは検出が困難であった化合物を容易に分取することが可能となります。

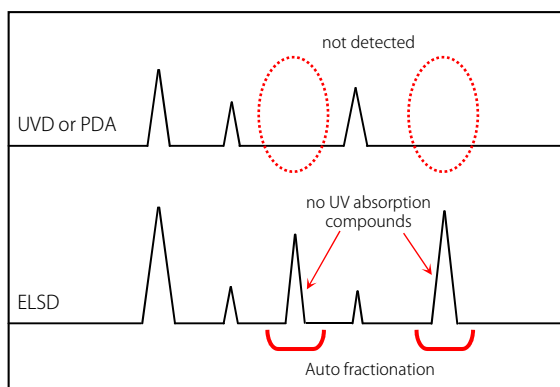


図1 ELSDによる網羅的な分取精製の概要

PDA-ELSD分取LCシステムの概要

使用した装置の流路を図2に示します。ELSDは対象化合物の検出時に移動相を噴霧、揮発するため、導入された化合物を回収することができません。PDA-ELSD分取LCシステムでは、分取流路を分岐し移動相の一部をELSDに導入することで、分取と検出を両立させています。

弊社分取精製液体クロマトグラフ“Nexera™ Prep”は、分析用のLCのワークステーション“LabSolutions™”で制御可能です。このソフトではグラフィカルなユーザーインターフェースによる分取シミュレーションが可能で、分取に関わるパラメータ設定の労力を削減します。図3ではPDAとELSDで得られたクロマトグラムを並列して表示しつつ、自動分画機能によって目的のピークを分取している様子が示されています。

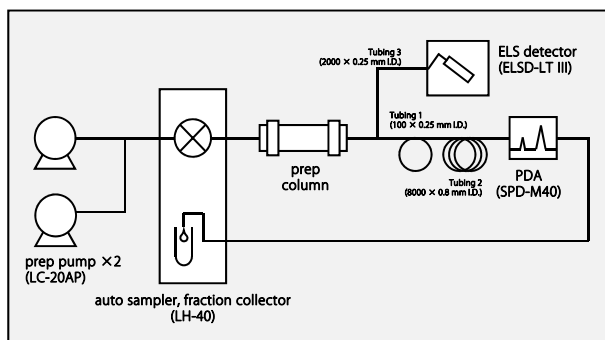


図2 PDA-ELSD分取LCシステムの流路図

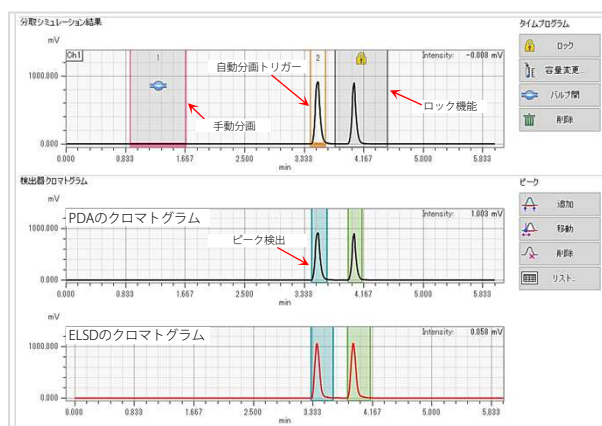


図3 LabSolutions上での分取シミュレーション画面

■生薬“オウゴン”抽出液の分取条件設定

生薬は薬効を持つ天然物を利用する薬の総称で、その多くは成分の精製をすることなく用いられます。生薬には多数の有効成分が含まれており、これらの精製と同定は新たな薬理活性成分の探索に重要と言えます。ここでは生薬の一種で、抗菌作用を持つ“オウゴン”に含まれる成分の網羅的分取のため、分析LCによる条件検討を行いました。

オウゴン原末から含有成分を抽出した前処理手順を図4に示します。検討の結果、得られた分析条件を表1に、結果を図5に示します。分析時間15分の間に、様々な含有成分を分離、溶出することができました。

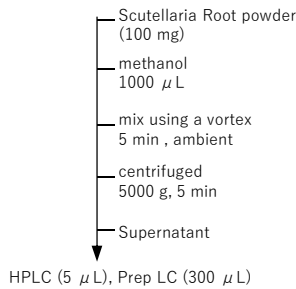


図4 前処理プロトコール

表1 分析条件

| | |
|----------------|--|
| Column | : Shim-pack™ PREP-ODS(H) Kit *1 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : A: water (containing 0.1 % (v/v) formic acid) B: acetonitrile/tetrahydrofuran = 1:1 |
| Flow rate | : 1 mL/min |
| Time program | : B conc. 25 % (0-5 min) → 100 % (10-15 min) → 20 % (15.01-20 min) |
| Column temp. | : Ambient |
| Injection vol. | : 5 μL |
| Detection | : PDA; 250 nm ELSD; drift tube=40°C, gain=wide, filter=2 sec |

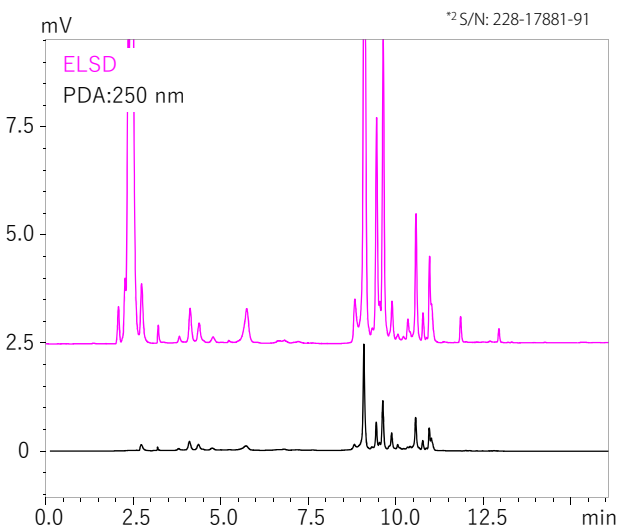


図5 オウゴン抽出液の分析クロマトグラム

■オウゴン含有成分の網羅的分取

分析LCにより得られた分析条件を、PDA-ELSD分取LCシステムに適応しました。本システムは分析LCのメソッドをベースに、分取LCのメソッドを作成することができます。また、使用したカラムShim-pack PREP-ODS(H) Kitには、同一ロットの充填剤を使用した分析用カラムと分取用カラムが同梱されており、流速を変更するだけで分析条件を分取条件にスケールアップできます。

使用した分取条件を表2に、得られた分取クロマトグラムを図6に示します。オウゴンに含まれる主な有効成分であるバicalinに加え、糖類、植物性ステロール類といった光吸収性を示さない化合物を自動分画機能によって網羅的に分取することができました。

表2 分取条件

| | |
|----------------|--|
| Column | : Shim-pack PREP-ODS(H) Kit *2 (250 mm × 20 mm I.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : A: water (containing 0.1 % (v/v) formic acid) B: acetonitrile/tetrahydrofuran = 1:1 |
| Flow rate | : 20 mL/min |
| Time program | : B conc. 25 % (0-5 min) → 100 % (10-15 min) → 20 % (15.01-20 min) |
| Column temp. | : Ambient |
| Injection vol. | : 300 μL |
| Detection | : PDA; 250 nm (prep cell) ELSD; drift tube=40°C, gain=3, filter=3 sec |

*2 S/N: 228-17881-91

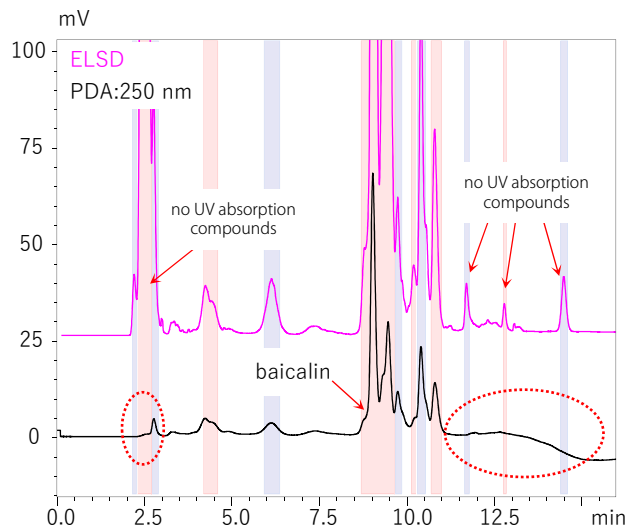


図6 オウゴン抽出液の含有成分における網羅的分取

■まとめ

本稿では分析LCとPDA-ELSD分取LCシステムを組み合わせ、生薬中の含有成分を網羅的に分取した例を紹介しました。生薬に代表される天然物には、薬理活性を持ちつつも精製や同定などがなされていない未知の化合物が多く存在します。分析LCによる条件開発とELSDによる網羅的分取によって、これまで精製が困難であった新規化合物の探索や機能評価などへの応用が期待されます。

Nexera、LabSolutionsおよびShim-pack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。

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

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。

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。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。

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

閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club に登録ください。

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