SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

包括的2次元液体クロマトグラフ Nexera™-e

包括的2次元LC Nexera-eを用いた葛根湯の分析

周 毅婷

ユーザーベネフィット

- ◆ 包括的2次元液体クロマトグラフNexera-eは、通常の1次元LCで分離困難な成分を分離でき、多成分を含む複雑な試料を網羅的に分析可能です。
- ◆ Nexera-eを用いることにより、複雑な試料から目的成分を分離し、定量することが可能です（グリチルリチン酸）。

■はじめに

葛根湯（かっこんとう）は発汗促進作用や、消炎、鎮痛効果があり、風邪、頭痛、肩こりなどに効果があるといわれています。葛根、麻黄、甘草、芍薬などよりなる方剤で、多くの有効成分を含み、代表的なものとしては、エフェドリン、グリチルリチン酸、桂皮酸などが知られています。生薬では、品質管理などの目的で多成分を同定、定量する必要があり、複雑な成分を相互分離するためには、包括的2次元液体クロマトグラフNexera-eの利用が有効です。

図1にNexera-eの外観（a）と流路図（b）を示します。包括的2次元LCシステム構成では、一般的に2つのポンプと2つのカラムが使用され、1次元目からの画分が連続的に2番目のカラム（2次元目）に導入されます。この導入は、完全に同期したバルブ切り替えによって2つ同じ容量のループを交互に充填することによって行われます。

一般に、包括的2次元クロマトグラフィーでは、1次元目（1D）と2次元目（2D）で異なる分離モードが選択されます。それにより、それぞれの次元の単独分析では分離が困難であった成分の分離を改善します。葛根湯などの漢方薬には、比較的極性の高い化合物が多く含まれているため、移動相のpHも分離を検討する際に重要なパラメーターです。

本稿では、葛根湯の包括的な2次元LCの分離例についてご紹介します。1Dではセミミクロスケールの逆相モードのカラムと中性pHの移動相、2Dでは超高速分析用の逆相モードのカラムと酸性pHの移動相を用いました。薬効成分の一つであるグリチルリチン酸の標準溶液を分析し、検量線を作成しました。その後、異なるメーカーの市販葛根湯エキス顆粒3種を分析し、含まれるグリチルリチン酸を定量しました。

■分析条件

表1に分析条件を示します。一般的に、1Dと2Dの両方を逆相モードを用い、1Dでもグラジエント分析を行う場合に、2Dに導入されるために捕集されたループ内の画分中の有機溶媒の濃度が高くなるため、2D分析では溶媒効果により分離やピーク形状が劣化することがあります。LabSolutions™には、上記の溶媒効果を低減する 「オートグラジエントプログラム機能」 が搭載されています。1Dのグラジエントプログラムに合わせて2Dのグラジエントプログラムを経時的に変更することにより、溶媒効果を低減することが可能なグラジエント条件を簡単に作成できます。本稿もオートグラジエントプログラム機能を使用して分析しました。図2に1Dと2Dのグラジエントのタイムプログラムを示します。

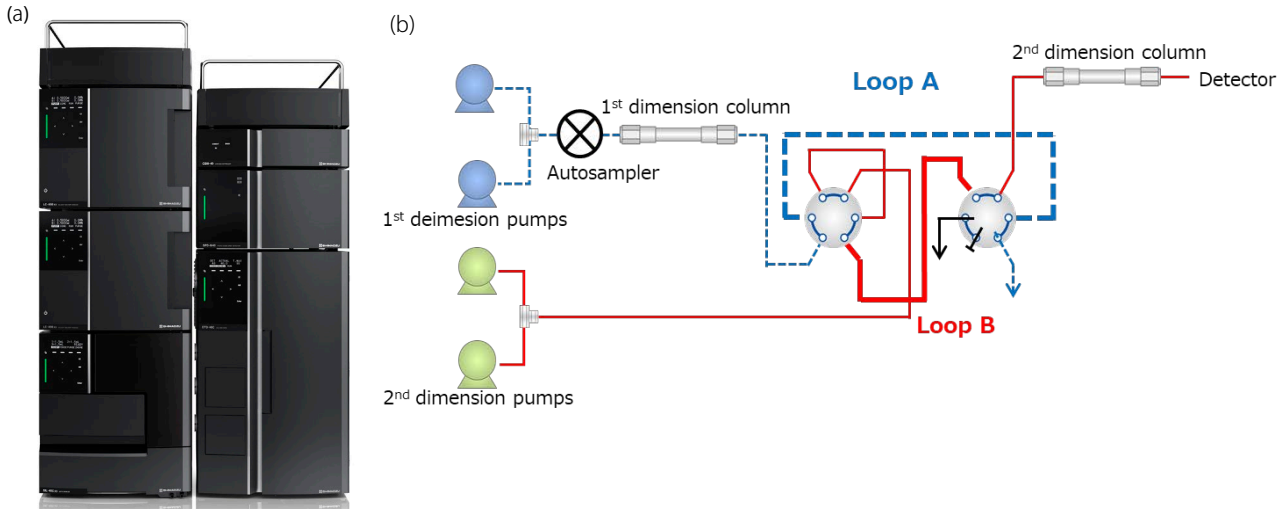


図1　Nexera™-e システム
（a）外観　（(b）流路図

表1　分析条件

System	: Nexera-e
<1D>	
Column	: Shim-pack™ XR-ODSII (100 mm × 1.5 mm I.D., 2.2 µm)*1
Mobile Phase A	: 10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH: 6.9)
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Flow Rate	: 0.05 mL/min
Time Program	: B Conc. 5% (0 min) - 30% (70 min) - 90% (80-90 min) - 5% (90.01-110 min)
<2D>	
Column	: Shim-pack Velox C18 (50 mm × 2.1 mm I.D., 2.7 µm) *2
Mobile Phase A	:10 mmol/L (Sodium) phosphate buffer (pH: 2.7)
Mobile Phase B	: Acetonitrile
Flow Rate	: 1.5 mL/min
Time Program	: Initial B Conc. 5% (0.01 min) - 45% (0.5 min) -5% (0.51-1.00 min) Final B Conc. 20% (0.01 min) - 65% (0.5 min) -20% (0.51-1.00 min)
Loop Vol.	: 50 µL
Modulation Time	: 1 min
Column Temp.	: 40 ˚C
Injection Vol.	: 2 µL
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ Vial for LC 1.5 mL, Glass *3
Detection	: 254 nm (SPD-M40)

*1 P/N：228-59907-94, *2 P/N： 227-32009-02, *3 P/N：227-34001-01

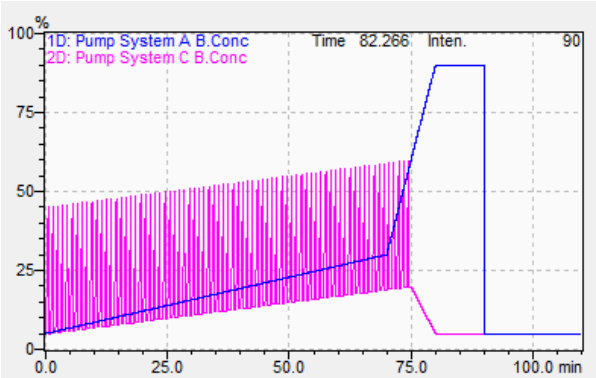


図2　1D（青）と 2D（ピンク）グラジエントのタイムプログラム

■ グリチルリチン酸の再現性と検量線

50 mg/Lグリチルリチン酸標準溶液の2次元等高線プロットを図3に示します。2次元等高線プロットは専用のソフトウェアChromSquareによって作成し表示できます。横軸は1Dの保持時間、縦軸は2Dの保持時間を示しています。グリチルリチン酸のブロブ*は黒い枠で囲まれています。表2に、50 mg/Lグリチルリチン酸標準溶液の6回繰り返し分析における1Dおよび2Dの保持時間再現性、ブロブ面積値の再現性を示します。ブロブ面積値の再現性は3.59%、1Dの保持時間再現性は0.01%であり、2Dは0.01%以下でした。図4にグリチルリチン酸の検量線を示します。50～1000 mg/Lの濃度範囲における濃度に対するブロブ面積値をプロットし、検量線を作成しました。寄与率r^2=0.9996で良好な直線性が得られました。

*ブロブ：近接するモジュレーション（バルブが切り替わる周期）で、同じピークの始点と終点をつなげることで得られる図形で、2 次元マップ上の信号の盛り上がりです。

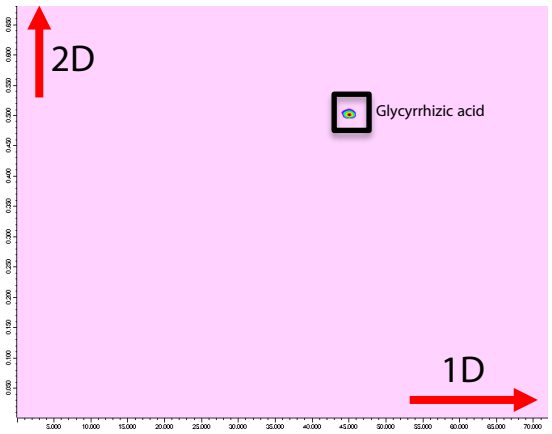


図3　グリチルリチン酸標準溶液の2次元等高線プロット

表2　保持時間とブロブ面積値の再現性（n=6）

Compound	Retention Time (1D)(%RSD)	Retention Time (2D)(%RSD)	Blob Area (%RSD)
Glycyrrhizic acid	0.01	<0.01	3.59

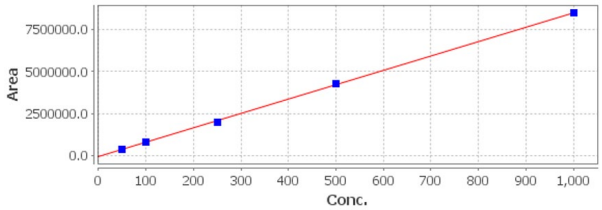


図4　グリチルリチン酸の検量線（50 ~ 1000 mg/L）

■ 葛根湯エキス顆粒中のグリチルリチン酸の定量分析

3種類の市販葛根湯エキス顆粒を用いてグリチルリチン酸の定量分析を行いました。

試料の前処理プロトコルを図5に示します。葛根湯エキス顆粒1.5 gを15 mLの50%メタノール水溶液で抽出した後、遠心分離しました（3500 rpm、10分）。その後、上澄みを0.2 µmのメンブレンフィルターでろ過し、2 µLをLCに注入しました。

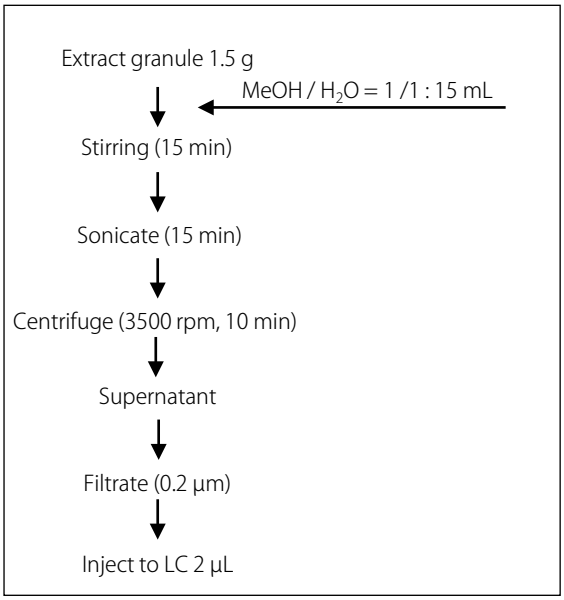


図5　試料の前処理プロトコル

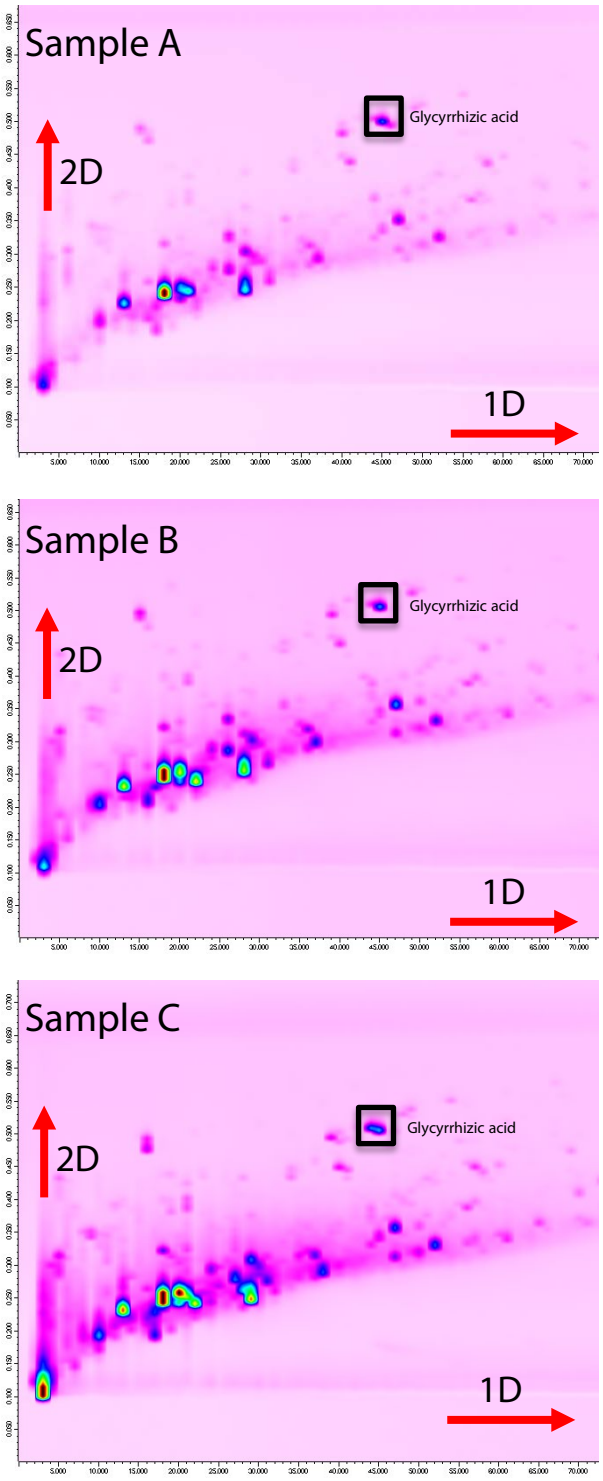


図6　試料A、試料Bと試料Cの2次元等高線プロット

表3　試料A中のグリチルリチン酸の再現性（n=6）

Compound	Retention Time (1D)(%RSD)	Retention Time (2D)(%RSD)	Blob Area (%RSD)
Glycyrrhizic acid	0.83	0.94	0.59

図6に3種の葛根湯エキス顆粒の2次元等高線プロットを示します。各プロットに複数のピークが観察され、クロマトグラムのパターンは2次元等高線プロットから確認でき、異なる製品間でパターンが異なっていることが容易に確認できました。

試料Aについては6回の繰り返し分析を行いました。保持時間の情報を用いてグリチルリチン酸を同定しました。表3に試料A中のグリチルリチン酸の保持時間とブロブ面積の再現性を示します。ブロブ面積値の再現性は0.59%、1Dの保持時間再現性は0.83%であり、2Dは0.94%であり、実試料の分析においても良好な再現性が確認されました。

その後、葛根湯エキス顆粒に含まれるグリチルリチン酸を定量しました。3種の葛根湯に含まれるグリチルリチン酸の定量値を表4に示します。なお、これらの値は前処理後の濃度となります。

表4　葛根湯エキス顆粒中のグリチルリチン酸の定量値

Sample	Quantitative Value (mg/L)
Sample A*1	528.7
Sample B*2	557.6
Sample C*3	982.8

*1 n=6, *2 n=3, *3 n=3

■まとめ

包括的2次元LC Nexera-eシステムを用いて、葛根湯の分析を紹介しました。50 mg/Lのグリチルリチン酸標準液を6回繰り返し分析し、再現性を確認しました。ブロブ面積値の繰り返し再現性が3.59%であり、1Dの保持時間再現性が0.01%、2Dが0.01%以下の結果となりました。最後に、市販の葛根湯エキス顆粒3種類を分析し、含まれるグリチルリチン酸を定量しました。実試料の分析においても良好な再現性が確認されました。

Nexera-eは通常の1次元LCで分離困難な葛根湯のような多成分を含む複雑な試料を網羅的に分析でき、目的成分を定量することが可能です。

Nexera、LabSolutions、Shim-packおよびSHIMADZU LabTotal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

01-00405-JP　初版発行：2022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」、「®」を明記していない場合があります。

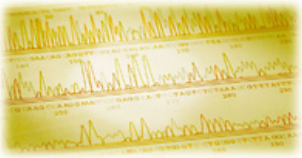
本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



Nexera-e
二次元液体クロマトグラフ

関連分野

- 価格お問い合わせ
- 製品お問い合わせ
- 技術お問い合わせ
- その他お問い合わせ