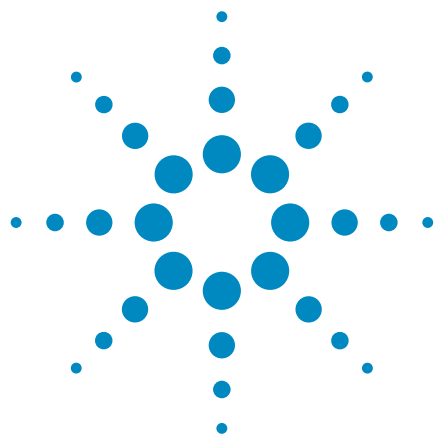




サブ 2 μm の表面多孔質 LC カラムによる タンジン (*Salvia miltiorrhiza*) 抽出物の フィンガープリントプロファイリング

アプリケーションノート

医薬品

著者

Rongjie Fu

Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.

概要

タンジン (*Salvia miltiorrhiza*) に含まれる疎水性および親水性成分をサブ 2 μm の表面多孔質 LC カラムを用いて UHPLC で分析しました。分析には、中国薬局方 (CHP) で規定されているサルビア総フェノール酸およびタンシノン類のフィンガープリントプロファイリングメソッドを、Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムによるメソッドに変換して使用しました。InfinityLab Poroshell 120、1.9 μm カラムは、より短い分析時間で非常に優れたピークキャパシティを実現し、複雑なサンプルの分析に適していることがわかりました。

はじめに

タンジンは *Salvia miltiorrhiza* の乾燥根で、漢方薬 (TCM) として血流の改善および血管疾患の治療に用いられています [1]。TCM マトリックスには非常に多くの化合物が含まれるため、1 つの有効成分を基準に TCM の品質や真正性を効果的に評価するのは困難です。TCM の品質を包括的に評価するために、現在、各 TCM に特有のクロマトグラムを特定し、それを該当する物質のフィンガープリントとして使用する方法が主流になりつつあります。TCM の品質管理には、HPLC または UHPLC フィンガープリント法が最も広く使用されています。それは、このメソッドがより多くのピークを検出すればするほどに、サンプルについてより多くの情報をもたらすからです。すなわち、フィンガープリントにもとづく TCM の品質管理では、ピークキャパシティと分解能が重要な要素となります。



Agilent Technologies

タンジンは、品質管理に HPLC フィンガープリントプロファイリングを使用することが CHP 2015 で規定されているサンプルの 1 つです。タンジンからは活性のある多数の薬効成分が分離されていますが、そのうち最も重要となるのがサルビアノール酸とタンシノン類です。CHP では、総フェノール酸およびタンシノン類の両抽出物を HPLC フィンガープリントプロファイリングにより確認することが定められています [2]。

このアプリケーションノートでは、総フェノール酸およびタンシノン類を分析する CHP メソッドを、新たに開発された粒子径 1.9 µm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC カラムを用いたメソッドに変換しました。

分析方法

試薬および溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリルおよびリン酸は J&K Scientific 社 (北京) から購入しました。サルビア総フェノール酸およびタンシノン類の抽出物と標準物質は、中国国内の製薬会社から入手しました。サルビア総フェノール酸の抽出物は、水に溶解して濃度 1 mg/mL にしました。タンシノン類の抽出物は、メタノールに溶解して濃度 1 mg/mL にしました。

UHPLC 分析には、次のコンポーネントで構成される Agilent Infinity 1290 LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A)

カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 mm × 100 mm、1.9 µm (p/n 695675-902)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 mm × 150 mm、1.9 µm (p/n 693675-902)

タンシノン類の UHPLC 分析条件

パラメータ	値		
移動相	A) 水 (0.026 % リン酸) B) アセトニトリル		
2.1 × 100 mm カラムの グラジエント	時間 (分)	% A	% B
	0	80	20
	4	40	60
	10	20	80
ストップタイム	13 分		
ポストラン	2 分		
2.1 × 150 mm カラムの グラジエント	時間 (分)	% A	% B
	0	80	20
	6	40	60
	15	20	80
ストップタイム	20 分		
ポストラン	3 分		
温度	25 °C		
流量	0.33 mL/min		
注入量	1 µL (100 mm カラム)		
	1.5 µL (150 mm カラム)		
検出	UV 270 nm		

サルビア総フェノール酸の UHPLC 分析条件

パラメータ	値		
移動相	A) 水 (0.05 % リン酸) B) アセトニトリル		
2.1 × 100 mm カラムの グラジエント	時間 (分)	% A	% B
	0	90	10
	3	80	20
	7	75	25
	9	70	30
	11	10	90
	14	10	90
ストップタイム	14 分		
ポストラン	2 分		
2.1 × 150 mm カラムの グラジエント	時間 (分)	% A	% B
	0	90	10
	4.5	80	20
	10.5	75	25
	13.5	70	30
	16.5	10	90
	21	10	90
ストップタイム	21 分		
ポストラン	3 分		
温度	30 °C		
流量	0.42 mL/min		
注入量	1 µL (100 mm カラム)		
	1.5 µL (150 mm カラム)		
検出	UV 286 nm		

結果と考察

CHP 規定の総フェノール酸およびタンシノン類の分析メソッドでは、従来型の 4.6×250 mm、 $5 \mu\text{m}$ カラムを使用することが義務付けられています。TCM サンプルからより多くの情報を引き出すには、サブ $2 \mu\text{m}$ の表面多孔質カラムなど、ピークキャパシティの高いカラムを TCM のフィンガープリントプロファイリングに使用することが推奨されます。ピークキャパシティとは、一定の分解能のグラジエント分析で分離可能なピークの数指し、分離性能を表す一種の指標になります。未知化合物および多様な分析対象物が含まれる複雑なサンプルの分離においてハイスループットなグラジエントの必要性が高まっていることから、より高いピークキャパシティを確保することが重要になっています。

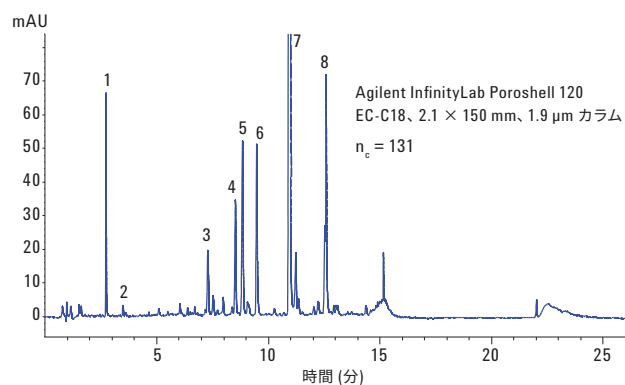


図 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×150 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムによるサルビア総フェノール酸のフィンガープリントプロファイリング。ピーク 5 (ロスマリン酸) およびピーク 7 (リソスペルミン酸 B) は標準物質を用いて同定しました。

このアプリケーションノートでは、CHP で定められているメソッドを、Agilent InfinityLab Poroshell 120、 $1.9 \mu\text{m}$ 、 150 mm および 100 mm カラムによるメソッドに変換して用いました。このメソッドでは、サブ $2 \mu\text{m}$ カラムの分析効率を最大限に高めるために線流量を 2 倍にし、カラム長と流量に応じてグラジエント時間を調整しました。結果のクロマトグラムを図 1 ～ 4 に示します。図 1 および図 3 のクロマトグラムで、CHP の標準クロマトグラム [2] に従って同定されているピークは、漢方薬としての要件を満たしたすべてのサンプルで検出される化合物です。

サブ $2 \mu\text{m}$ の表面多孔質粒子のカラムでは、UHPLC の圧力下できわめて優れた分離性能が得られ、短時間で分析することができました。また、 2.1×100 mm カラムと 2.1×150 mm カラムの比較から、カラムが長いほどピークキャパシティと分離能が向上し、サンプルからより多くの情報が得られることがわかりました。

条件付きのピークキャパシティは、次の式により求めました。

$$n_c = (t_{R,n} - t_{R,1})/w$$

ここで、 n は計算に用いたピークの数、 t_R はグラジエント時間です。また、 w は 4σ ピーク高さにおける平均ピーク幅で、次の式により求められます。

$$w = (W_{1/2}/2.35) \times 4$$

ここで、 $W_{1/2}$ はピークの半値幅です。

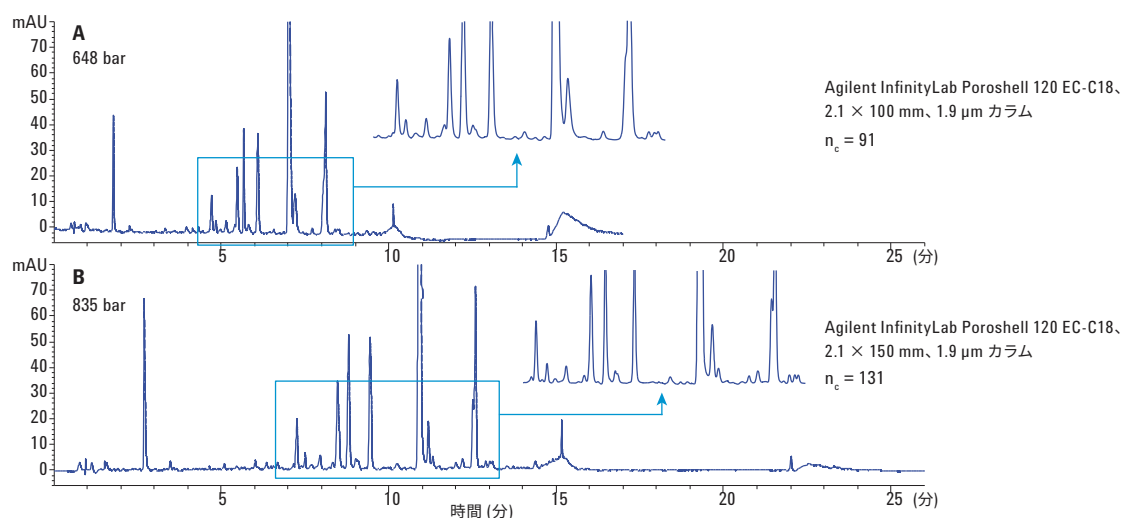


図 2. サルビア総フェノール酸のフィンガープリントプロファイリングにおける Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×150 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムと 2.1×100 mm カラムの比較

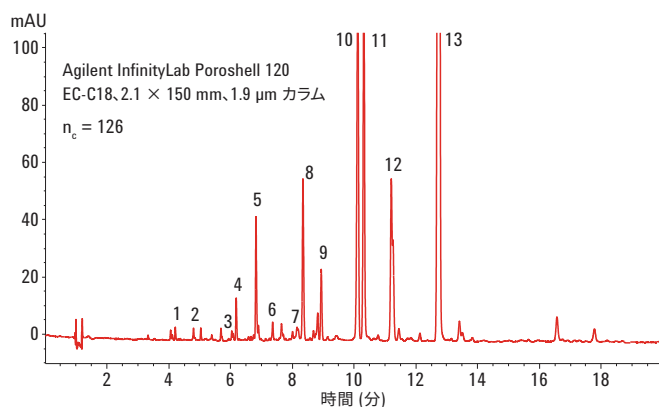


図3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、1.9 μm カラムによるタンニン類のフィンガープリントプロファイリング。ピーク 10 (クリプトタンニン) およびピーク 13 (タンニン II A) は標準物質を用いて同定しました。

参考文献

1. Tsai-Hui Lin, Ching-Liang Hsieh, Lin Hsieh. *Chinese Medicine* **5:22** (2010).
2. “Salvia Total Phenolic Acids and Tanshinones” *China Pharmacopoeia* **397**, (2015).

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。
アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

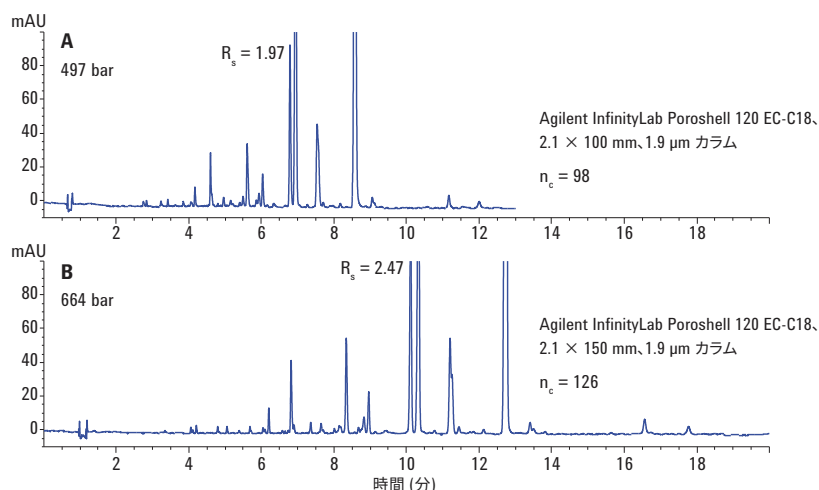


図4. タンニン類のフィンガープリントプロファイリングにおける Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、1.9 μm カラムと 2.1 × 100 mm カラムの比較

結論

サブ 2 μm の表面多孔質粒子カラムを用いることにより、UHPLC の圧力下できわめて優れた分離性能が得られ、短時間で分析を行うことができました。このことから、これらのカラムが複雑な TCM サンプルの分析を目的としたフィンガープリントプロファイリングに適していることがわかりました。また、長いカラムでは短いカラムより大幅に優れたピークキャパシティが得られ、複雑なサンプルからより多くの情報を引き出すことができました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, October 31, 2016

5991-7559JAJP



Agilent Technologies