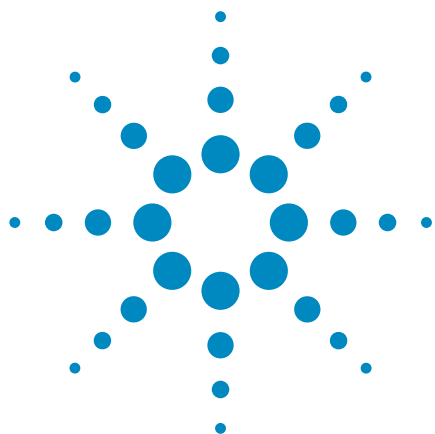




細辛 (Asari Radix Et Rhizoma) 中の アサリニンの測定

Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、1.9 μm カラム

アプリケーションノート

製薬

著者

Rongjie Fu
Agilent Technologies
Shanghai

概要

細辛 (Asari Radix Et Rhizoma) 中の活性化合物アサリニンをサブ 2 μm の Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと従来の 5 μm カラムの両方を用いて分析しました。サブ 2 μm カラムにより分解能が向上し、分析時間が短縮しました。

はじめに

漢方薬 (TCM) の品質を管理するため、中国薬局方 (CHP) では、HPLC メソッドによって主要化合物の濃度を測定するように規定しています。漢方薬である細辛中の活性化合物アサリニンは、CHP の規定に従って HPLC と従来のカラムを使用して測定する必要があります [1]。

表面多孔質粒子 LC カラムは、高圧を生じることなく、同じサイズの全多孔質粒子よりも高い効率を実現します。新たに開発されたサブ 2 μm 表面多孔質粒子カラムは、効率がさらに高まっており、分析時間を短縮できます。

アジレントはCHP メソッドを、従来の Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C18、4.6 $\times$ 250 mm、5 μm カラムの使用から、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 $\times$ 100 mm、1.9 μm カラムおよび 2.1 $\times$ 150 mm、1.9 μm カラムの使用に変換しました。変換により改善したものには、分解能の向上、分析時間の短縮があります。



Agilent Technologies

試薬と実験方法

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。アセトニトリルは、米国の JT Baker 社から購入しました。漢方薬細辛とアサリニン は、中国国内の製薬会社から入手しました。標準溶液は、濃度が 50 µg/mL になるようにアサリニンをメタノールで溶解しました。

HPLC と UHPLC 分析には、次のコンポーネントで構成される Agilent 1290 Infinity LC 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 サーマスタット付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 (DAD) (G4212A)

表 1 は、UHPLC システム構成の詳細を示しています。表 2 は、LC メソッドパラメータを示しています。

表 1. Agilent 1290 Infinity LC システムの構成

パラメータ	設定値
Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A):	35 µL 溶媒ミキサー: Agilent Jet Weaver、35 µL/100 µL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A):	シートアセンブリ、低分散、Agilent 1290 Infinity オートサンブラ用 (G4226-87020) オートサンブラとヒーター: キャピラリ、ステンレス製、0.12 × 300 mm (G1316-87318) 茶色のスクリュートップバイアル、ラベル付き、認定済み、2 mL、100 個 (5182-0716) 青のスクリュキャップ、PTFE/赤色シリコンセブタム、100 個 (5182-0717)
Agilent 1290 Infinity サーマスタット付カラムコンパートメント (G1316C):	熱交換器、1.6 µL、L (G1316-80003) ヒーターとカラム: A-Line クイックコネクトフィッティングアセンブリ、105 mm、0.12 mm (5067-5957) カラムとフローセル: キャピラリー、赤 PEEK、0.13 × 300 mm、5 m (5042-6461)
Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G4212A):	Max-Light カートリッジフローセル、10 mm、1 µL (G4212-60008)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition、リビジョン C.01.07 [27]:	G4226A: A.07.01 [001] G4220A: A.07.01 [0006] G1316C: A.07.01 [001] G4212A: B.07.01 [0005]

表 2. HPLC/UHPLC メソッドパラメータ

カラム	移動相	流量 (mL/min)	グラジエント		注入量 (μL)	サンプル前処理	TCC (°C)	DAD
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 mm × 100 mm、1.9 μm (p/n 695675-902)	A) 水	0.42	時間 (分)	% B	0.8	細辛パウダー 0.5 g を計量して 15 mL の メタノールを加えます。45 分間の超音波 処理によって抽出した後、0.2 μm フィルタ (5190–5277) を用いてろ過します。	40	287 nm、 40 Hz
	B) アセトニトリル		0	50				
			4	50				
			5.2	100				
			7.2	100				
			7.3	50				
			9	50				
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 mm × 150 mm、1.9 μm (p/n 693675-902)	A) 水	0.42	時間 (分)	% B	1.2		40	287 nm、 40 Hz
	B) アセトニトリル		0	50				
			6	50				
			7.8	100				
			10.8	100				
			10.95	50				
			13.5	50				
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6 × 250 mm、5 μm (p/n 959990–902)	A) 水	1.0	時間 (分)	% B	10		40	287 nm、 10 Hz
	B) アセトニトリル		0	50				
			20	50				
			26	100				
			36	100				
			36.5	50				
			45	50				

結果と考察

この CHP-規定メソッドは、従来の 4.6×250 mm、 $5 \mu\text{m}$ カラムを用いて細辛中のアサリニンの量を測定するよう定められています。このメソッドを Agilent ZORBAX Plus C18、 4.6×250 mm、 $5 \mu\text{m}$ カラムを用いて実行した後、Agilent InfinityLab Poroshell 120、 $1.9 \mu\text{m}$ の 150 mm カラムと 100 mm カラムを用いて実行しました。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 倍にしました。カラムの長さや流量に応じてグラジエント時間を調整しました。

図 1 のクロマトグラムは、 $5 \mu\text{m}$ カラムがアサリニンの定量分析に適した分解能を備えていることを示しています。しかし、InfinityLab Poroshell 120、 2.1×100 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムを用いた場合は、分析時間が 40 分から 10 分に短縮し、アサリニンの分解能もわずかに改善しています。

通常、定量分析に必要な最小分解能は 1.5 です。ZORBAX Eclipse Plus-C18、 4.6×250 mm、 $5 \mu\text{m}$ カラムと InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1

$\times 100$ mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムを使用したどちらのメソッドも、定量分析の要件は満たしています。しかし、定量分析において十分な分解能ではありませんでした。より長いサブ $2 \mu\text{m}$ カラムを使用する利点としては、特に重要なピークについてピークキャパシティが高まり、分解能が向上するという点が挙げられます。しかし、カラムが長くなると、生じる圧力も高くなります。今回の分析では、より長い InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×150 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムを使用しました (図 1)。これにより、アサリニンの分解能は 1.6 から 2.9 へと大幅に向上し、ピークペアが 1.3 から 1.6 へとわずかに向上しました。圧力は約 600 bar で、カラム圧リミットの 1,300 bar よりもかなり低く、このため Agilent 1290 Infinity LC の使用に適していました。図 2 に示すように、 $1.9 \mu\text{m}$ の小さい粒子の表面多孔質粒子カラムでは、 $2.7 \mu\text{m}$ カラムよりも優れた効率と分解能が得られました。

図 3 は、InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×150 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムを用いたメソッドが、細辛中のアサリニンの定量分析に適していることを示しています。

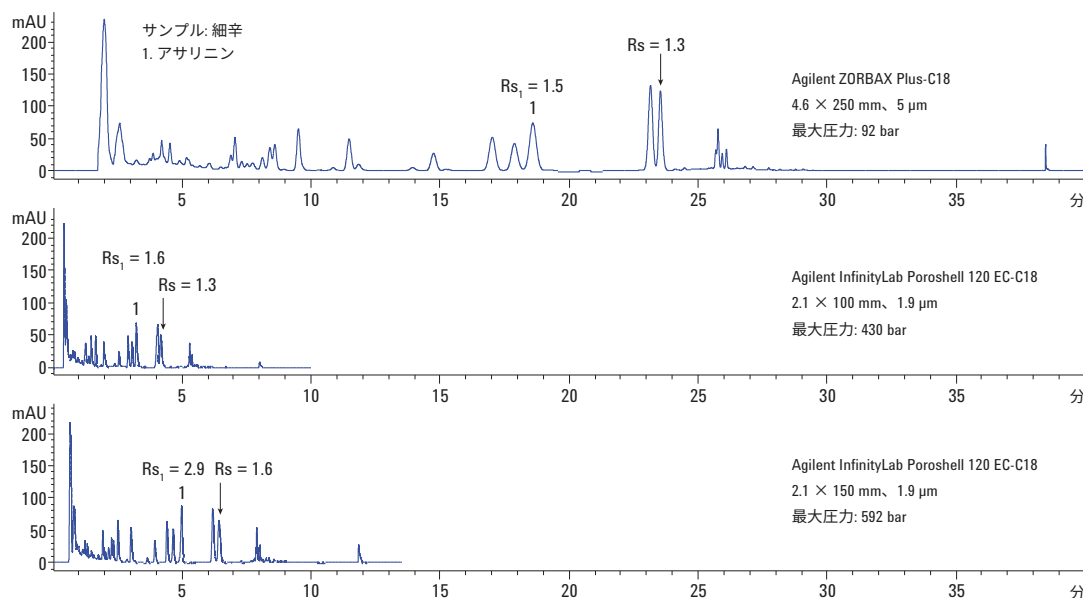


図 1. Agilent ZORBAX Eclipse Plus-C18 カラム、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×100 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムおよび 2.1×150 mm、 $1.9 \mu\text{m}$ カラムを用いた細辛の分析のクロマトグラム

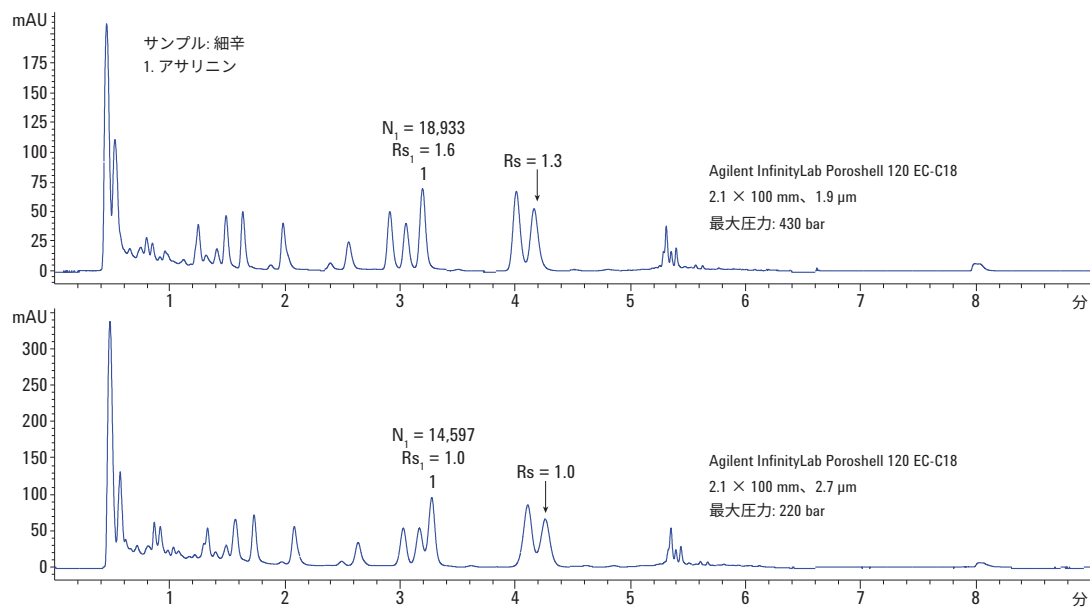


図 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、1.9 μm カラムと Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm カラムを用いた細辛の分析から得られたクロマトグラムの比較

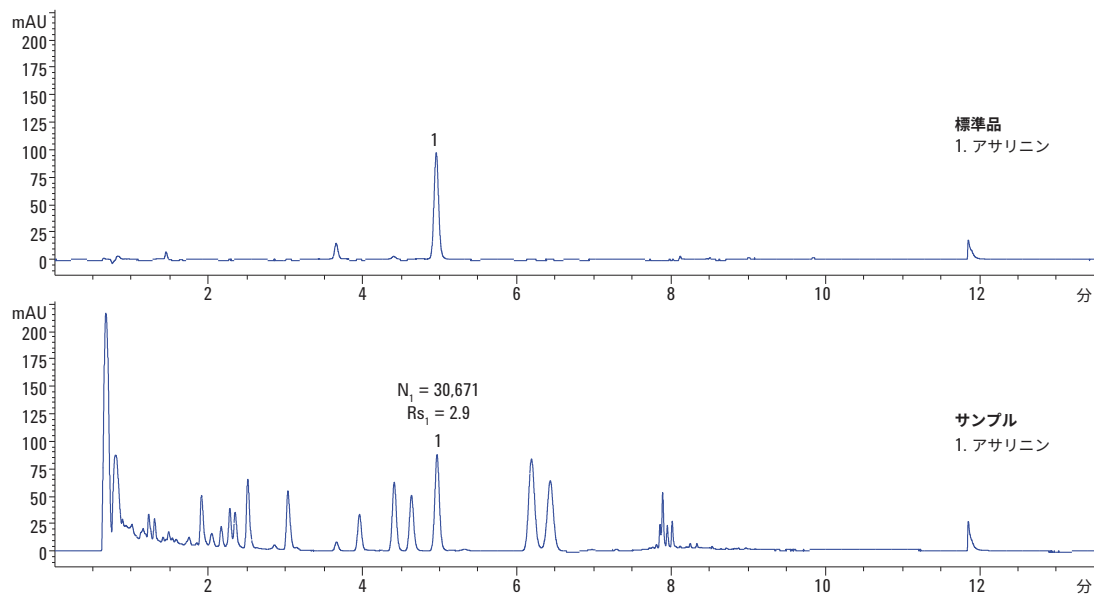


図 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、1.9 μm カラムを用いた細辛中のアサリニンの定量分析

結論

サブ 2 μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 表面多孔質粒子カラムは、UHPLC の圧力下できわめて優れた性能と高速分析を実現します。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、ターゲット化合物の測定に適した十分な分解能を得ることができます。

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。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, April 10, 2017

5991-8013JAJP



Agilent Technologies