

漢方薬中のオレアノール酸および ウルソール酸の正確な定量分析

高分離能サンプリング 2D-LC

著者

Rongjie Fu and Xinlei Yang
Agilent Technologies, Inc.

概要

漢方薬 (TCM) 業界において、品質管理は最も重要な作業の 1 つです。TCM 中の主な化合物の量を HPLC メソッドで測定する必要があります。TCM サンプルは複雑であるため、HPLC 分離時にターゲット化合物が他の微量化合物と共溶出することがあります。2D-LC システムは、直交型カラムケミストリと移動相を使用して複雑なサンプルを分離するための強力なメソッドとなり得ます。このアプリケーションノートでは、Pteroccephali Herbra (翼首草) 中のオレアノール酸およびウルソール酸の定量分析用に開発した高分離能サンプリング 2D-LC メソッドについて説明します。

はじめに

漢方薬 (TCM) の分析は、単一生薬または併用薬の前処理で扱う成分が複雑であるため、困難な作業です。TCM の品質を管理するため、中国薬局方 (CHP) の規制に従った HPLC メソッドにより、主要化合物の量を測定するように規定されています。他の化合物はターゲット化合物と共溶出することがあるため、定量の真度に影響を与えます。Pterocephali Herbra は、オレアノール酸とウルソール酸という 2 つのターゲット化合物 (図 1) の量を HPLC で測定する必要がある CHP の一例です。この研究では、他の複数の化合物がオレアノール酸およびウルソール酸と共溶出するため、これらの化合物の定量では既存のメソッドが不適切であることが明らかになりました。

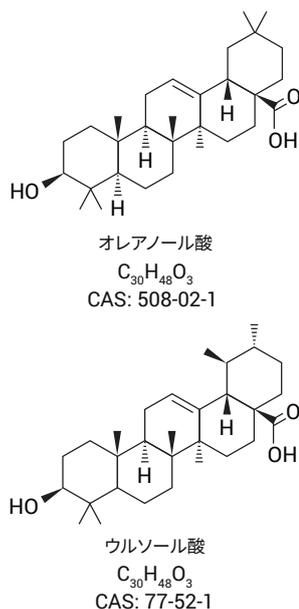


図 1. 本実験のターゲット化合物

このアプリケーションノートでは、直交型の分離を達成するために、高分離能サンプリング 2D-LC において 2 つの Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラム (EC-C18 および Phenyl-Hexyl) と異なる移動相条件を使用しました。2 つのターゲット化合物は、選択した時間範囲にわたっていくつかの小さいフラクションを収集することで測定し、1D クロマトグラムの 1 つのピーク領域全体が対象となるように設定しました。各カットがサンプリンググループ内で貯められ、すべてのカットが連続して二次元目で分析されました。このモードで、選択した化合物の総量が二次元目に確実に送られ分析されました。このように、選択した共溶出化合物を二次元目での分析用として、高分離能サンプリングプロセスに導入しました。こうすることにより、以前に発表された技術概要¹に従って、信頼性の高い定量が可能になりました。

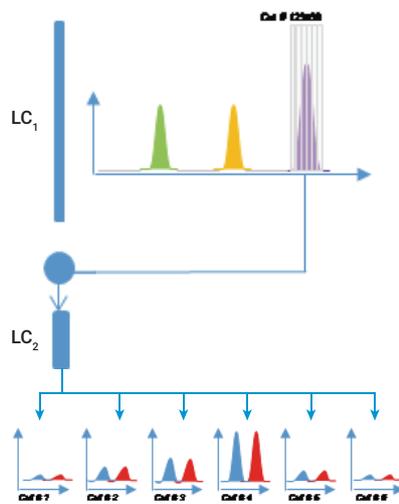


図 2. 高分離能サンプリング 2D-LC の説明図

実験方法

試薬およびサンプル

すべての試薬と溶媒には、HPLC グレードのものを使用しました。アセトニトリルおよびメタノールは、JT Baker (米国) から購入しました。酢酸アンモニウムは J & K (北京、中国) から購入しました。超純水は、純水製造装置メーカーの ELGA (レーンエンド、英国) で精製しました。Pterocephali Herbra の抽出物とオレアノール酸およびウルソール酸の標準は、中国国内の医薬品企業から入手しました。濃度をそれぞれ 2.3 mg/mL および 2.0 mg/mL にするために、メタノール中にオレアノール酸およびウルソール酸を溶解して、標準のストック溶液を調整しました。

装置

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC は、次のモジュールで構成しました。

- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、サンプル冷却システム (オプション #100) を搭載
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II MCT (G7116B)
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)、10 mm Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) と 60 mm Max-Light カートリッジセル (G4212-60007) を搭載
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/4 ポート デュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、G4236A) を搭載
- 2 台の Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、40 μ L ループ付き マルチハートカットバルブ (G4242-64000) を搭載

高分離能サンプリングのための メソッド設定

高分離能サンプリング用のメソッド設定については、以前に発表された技術概要¹を参照しました。図 3 に、Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムの高分離能サンプリング構成を示します。このシステムは 12 のサンプリンググループを保持する 2 個のマルチハートカットバルブに接続された 2 ポジション/4 ポートデュオバルブで構成されています。このセットアップにより、最大 10 の連続するカットをサンプリングして分析するまで貯めておくことができます。高分離能サンプリングでは、サンプル損失を防ぐために 80 % 以下のループ充填を推奨しています。図 4 は 2D ポンプで使用されるメソッド設定を示しています。最初に、サンプルの 1D-LC 分離を実行し、クロマトグラムをリファレンス信号プレビューウィンドウとしてロードしました。高分離能サンプリングを目的のピークについて、ピーク幅全体をカバーする 8 つのカットによって時間ベースで設定しました。提供された 1D 条件では、8.63 秒のサンプリング時間は 72 % のループ充填に相当します。

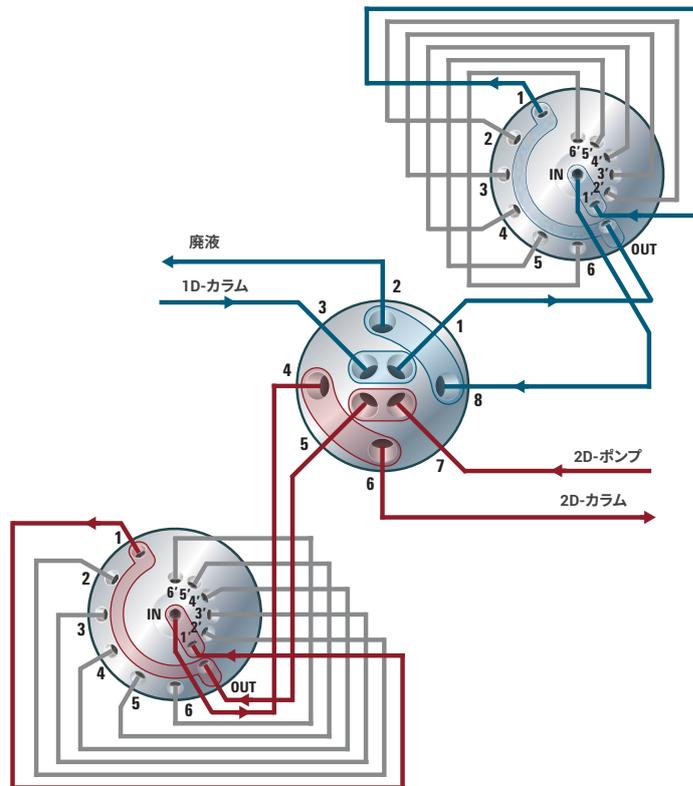


図 3. 12 のサンプリンググループを保持する Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムの構成

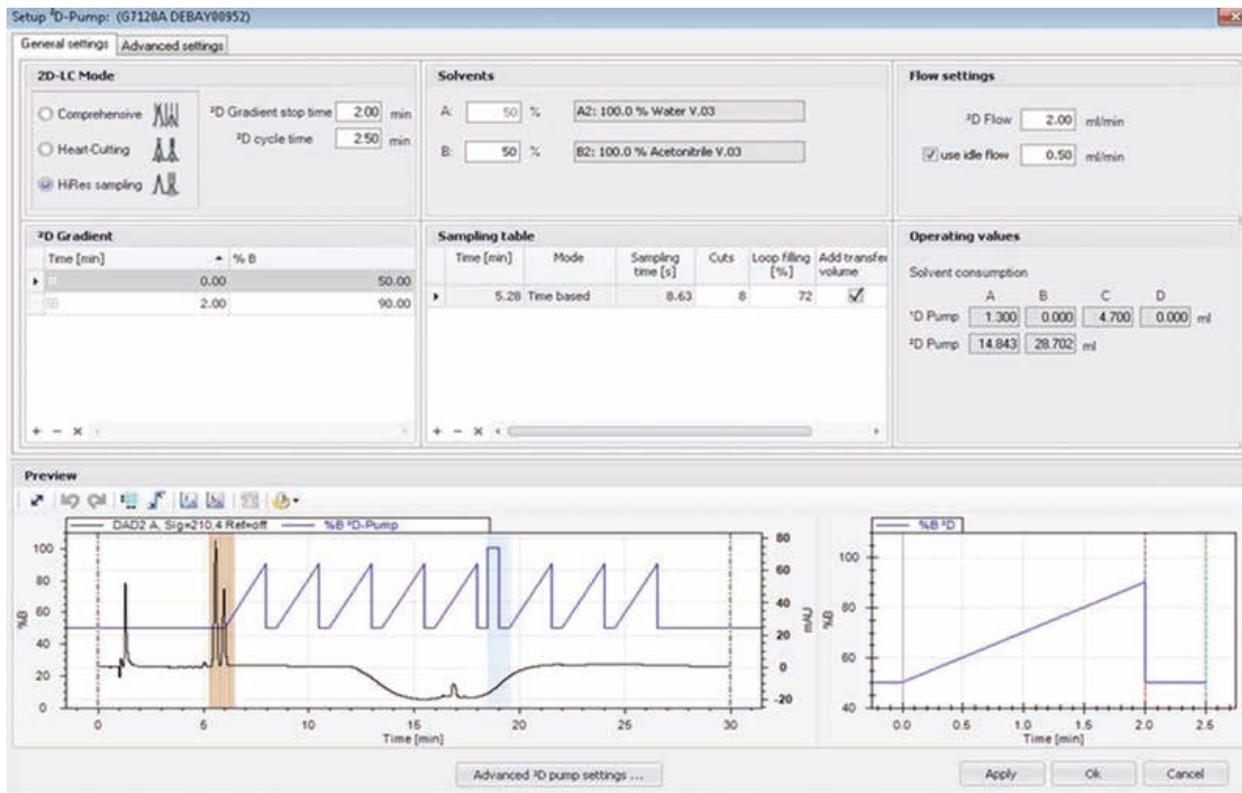


図 4. 2D ポンプのメソッド設定

このアプリケーションノートでは、次の LC カラムを使用しました。

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm (p/n 695675-912)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 50 mm, 2.7 μm (p/n 699975-302)

システムコントロールとデータ解析に使用したソフトウェアは次のとおりです。

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition リビジョン C.01.07 SR2 [255] と Agilent 2D-LC ソフトウェアアドオン製品、バージョン A.01.03 [025]

結果と考察

分離

図 5 に、CHP メソッドに従って最適化したメソッドを用いて、Pteroccephali Herbra 中のオレアノール酸とウルソール酸を分析した代表的なクロマトグラムを示します。InfinityLab Poroshell 120 4 μm を用いたこのメソッドは、標準において高い分離能を達成している一方、サンプルが極端に複雑であるため、干渉している化合物からターゲット化合物を適切に分離できませんでした。その結果、ターゲット化合物は従来の 1D-LC 分離では定量することができませんでした。

これら 2 つのターゲット化合物を適切に定量するために、高分離能サンプリング 2D-LC を使用し、干渉している化合物からターゲット化合物を分離しました。この分離には、選択性が互いに異なるカラムケミストリを使用しました。2.7 および 1.9 μm 表面多孔質粒子用の多数のケミストリを導入することにより、InfinityLab Poroshell 120 カラムは 2D HPLC 分離に必要な直交型分離を達成するのに最適なカラムになります。この研究では、一次元目として Phenyl-Hexyl カラムを使用しました。図 6A に示したように、2 つのターゲット化合物であるオレアノール酸とウルソール酸は、Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm カラムでベースライン分離されました。サブ 2 μm

表 1. オレアノール酸とウルソール酸の分析に使用した高分離能サンプリング 2D-LC メソッド

カラム	
一次元目	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 1.9 μm
二次元目	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm
1D ポンプ	
溶媒 A	10 mM 酢酸アンモニウム水溶液
溶媒 B	メタノール
流量	0.2 mL/min
グラジエント	0 分: 75 %B 8 分: 75 %B 8.1 分: 100 %B 12.0 分: 100 %B 12.1 分: 75 %B
2D ポンプ	
溶媒 A	0.05 % H ₃ PO ₄ 水溶液
溶媒 B	アセトニトリル
流量	2 mL/min
グラジエント	0 minutes - 50%B 2 minutes - 90%B
2D グラジエントストップタイム	2.0 分
2D サイクル時間	2.5 分
ストップタイム	30 分
高分離能サンプリング	
タイムベース	5.28 分
サンプリング時間	8.63 秒
カット数	8
マルチカラムサーモスタット	
一次元目	30 °C
二次元目	40 °C
マルチサンブラ	
注入量	1 μL
ニードル洗浄	メタノール:水 50:50 で 5 秒
1D ダイオードアレイ検出器	
波長	210 nm/4 nm
データレート	40 Hz
フローセル	10 mm Max-Light カートリッジセル
2D ダイオードアレイ検出器	
波長	210 nm/4 nm
データレート	80 Hz
フローセル	60 mm Max-Light カートリッジセル

表面多孔質粒子 Poroshell カラムでは、2 つの化合物について効率的に高い分離能が得られ、ピーク幅が狭く、2D 分離サンプリングを容易に実行できます。二次元目の分離では、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm カラムを使用しました。これらのカラムは背圧が低いため、高流量を使用することで、共溶出した化合物をター

ゲット化合物から即座に分離できます。高分離能サンプリングを使用して、オレアノール酸とウルソール酸を含むピークの時間範囲で 8 つのカットをサンプリングし (図 6A)、二次元目に注入して分析しました (図 6D)。

HPLC

パラメータ	設定値
移動相	15% 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液/85% メタノール
流量	1 mL/min
注入量	5 μ L
温度	25 $^{\circ}$ C
検出器の定義	UV 210 nm

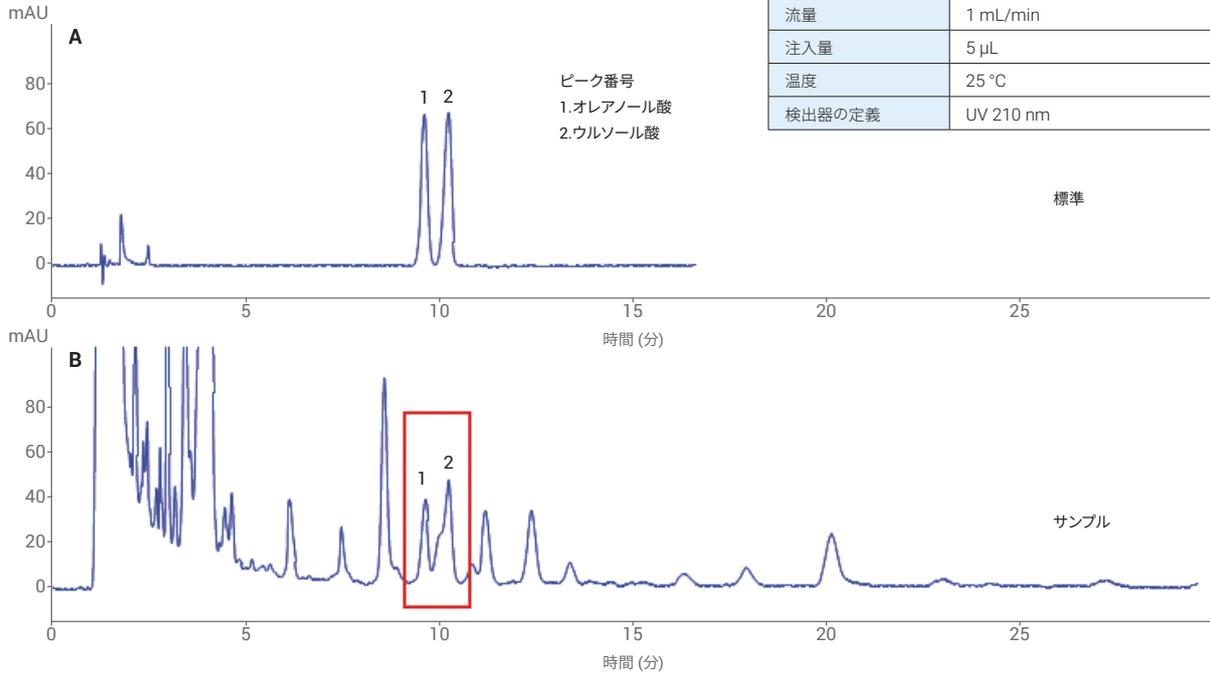


図 5. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、4.6 \times 150 mm、4 μ m カラムを用いて分析した Pterocephali Herbra 中のオレノール酸とウルソール酸のクロマトグラム

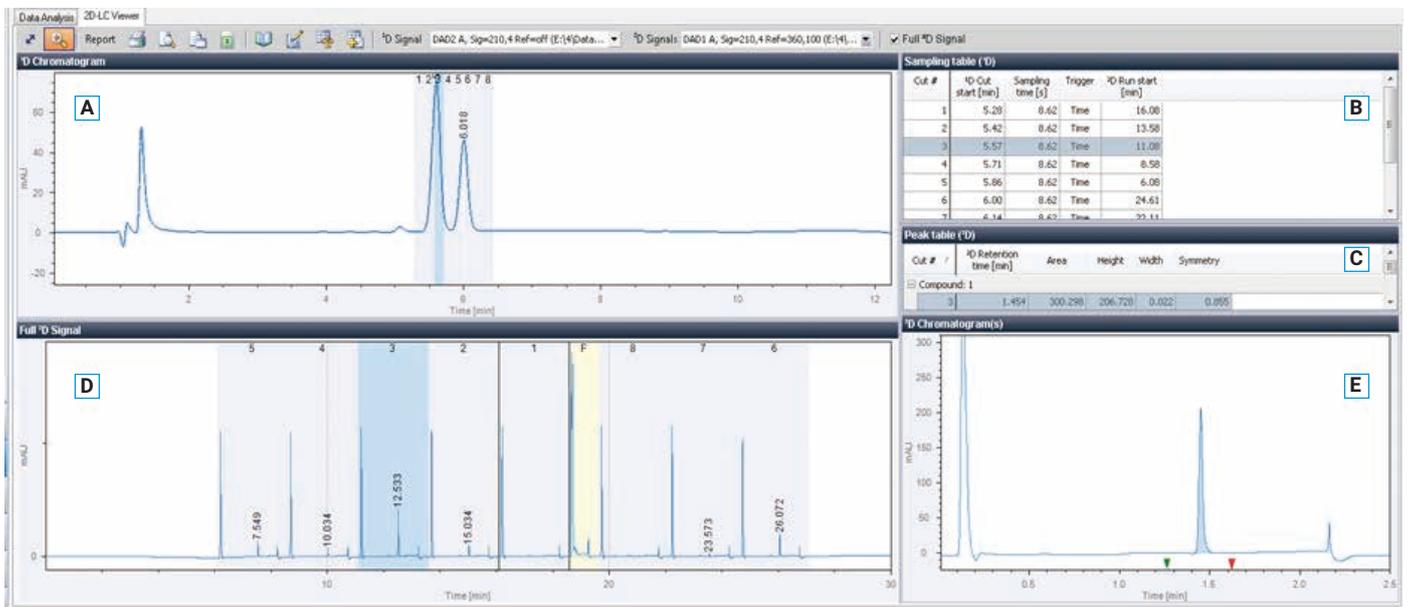


図 6. 2D-LC Viewer。A) 2つのピークの幅全体にわたる8つの連続したカットによる1Dクロマトグラム。B) 一次元目から得られた8つのカットのサンプリング表。C) 選択したカットとそのピーク面積およびその他のパラメータのピーク表。D) 8つのカットのすべての2Dクロマトグラムの概要。E) 選択した各カットのクロマトグラム

図 7 は、オレアノール酸標準溶液の 2D クロマトグラムの重ね表示であり (カット 1 ~ 4)、図 8 はウルソール酸標準溶液の 2D クロマトグラムの重ね表示です (カット 5 ~ 8)。オレアノール酸とウルソール酸の全ピークを個別にサンプリングしてから、二次元目に導入して分析しました。この手法では、サンプル中で共溶出する可能性のある化合物を二次元目で分離できます。図 9 は、オレアノール酸を単離した TCM サンプルの 2D クロマトグラムの重ね表示です。サンプルでは、オレアノール酸といくつかの小さいピークが良好に分離されました。図 10 では、2D 分離により、ウルソール酸が、TCM サンプルの 1D クロマトグラムで観察されたその他のいくつかの化合物から良好に分離されたことを示しています。

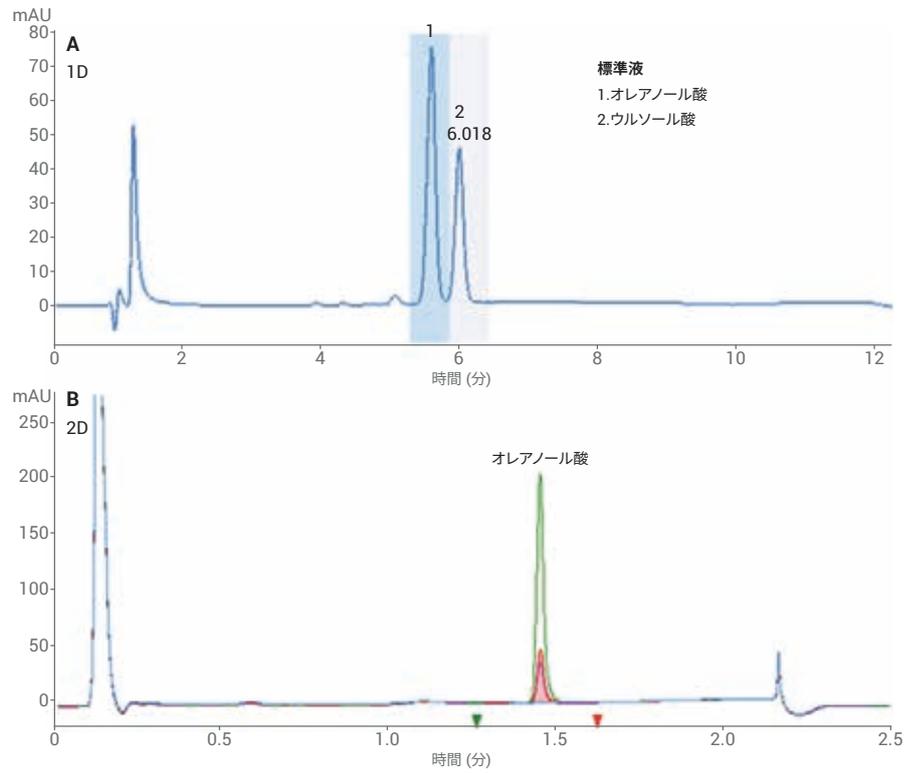


図 7. オレアノール酸のカット 1~4 の 2D クロマトグラムの重ね表示

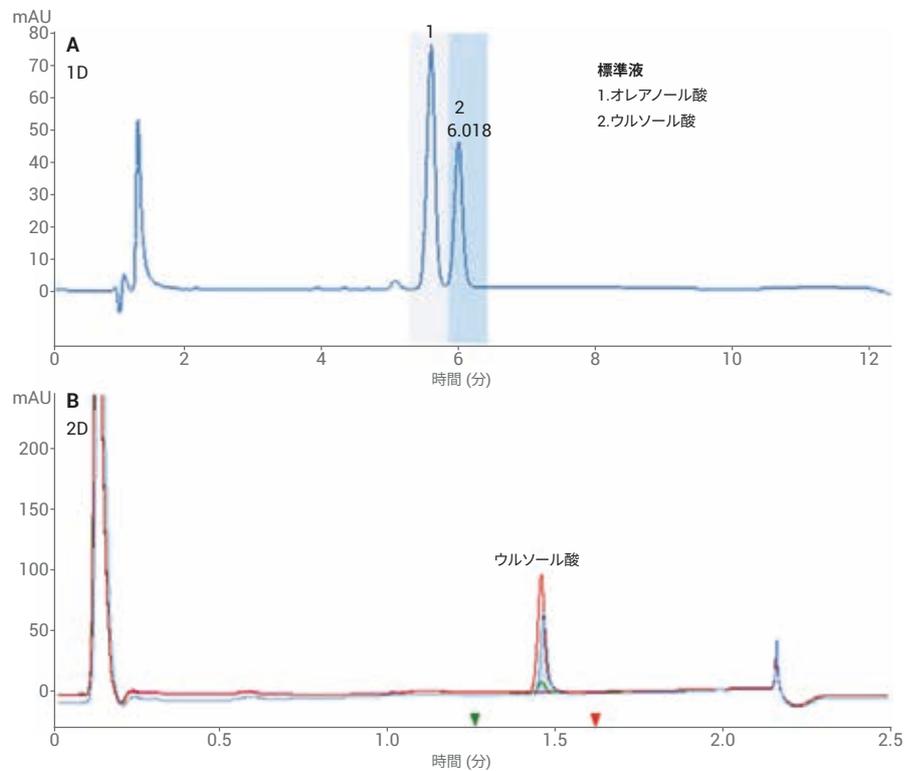


図 8. ウルソール酸のカット 5~8 の 2D クロマトグラムの重ね表示

定量

濃度 57.5 ~ 1,150 µg/mL のオレアノール酸標準溶液と濃度 50 ~ 1,000 µg/mL のウルソール酸標準溶液を、上述のメソッドとサンプル溶液を用いて 3 回分析しました。定量に関しては、1 つの化合物のピークをソフトウェアにより 2D クロマトグラムで積分し、化合物ごとに合計ピーク面積を計算して検量線を作成しました。図 11 から、全キャリブレーション範囲にわたって良好な直線性が得られており、両方の化合物の R^2 値が 0.999 を超えていることがわかります。測定サンプルで計算した量 (3 回の分析の平均値) は、オレアノール酸が 95.6 µg/mL でウルソール酸が 258.9 µg/mL でした。

再現性

高分離能サンプリング 2D-LC メソッドの再現性を確かめるために、230 µg/mL のオレアノール酸および 200 µg/mL のウルソール酸が含まれる標準混合液を連続して 6 回分析しました。オレアノール酸とウルソール酸の合計ピーク面積は、2D クロマトグラムから測定しました。相対標準偏差 (RSD) は、オレアノール酸が 0.8 %、ウルソール酸が 1.3 % でした。

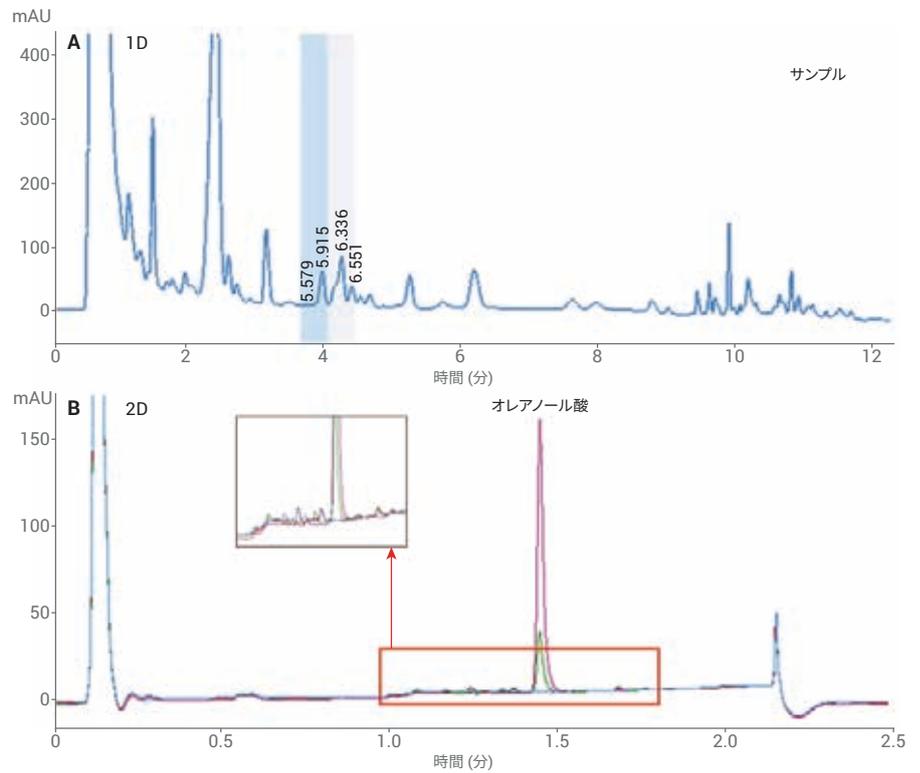


図 9. オレアノール酸のカット 1~4 の 2D クロマトグラムの重ね表示

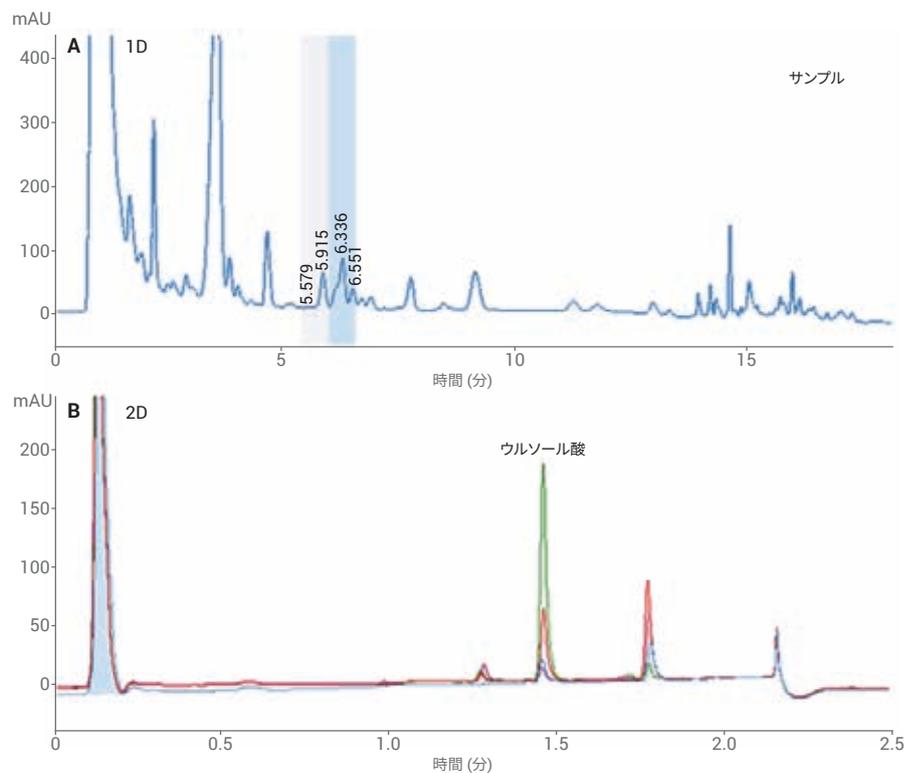


図 10. ウルソール酸のカット 5~8 の 2D クロマトグラムの重ね表示

結論

このアプリケーションノートでは、複雑な TCM 分析用の高分離能サンプリング Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューションについて説明しました。一次元目で干渉している化合物を適切に分離できるため、同じ分析内で高分離能サンプリング 2D-LC によりターゲット化合物を確実に定量できます。2D 分析の各手順で必要な分離を達成するために、Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラムは最適な粒子サイズを提供しています。適切な 2D-LC 分離に必要な直交型分離を達成するために、これらのカラムは異なる有機相で使用可能な幅広い選択性オプションも提供しています。このアプリケーションノートで開発した高分離能サンプリング 2D-LC メソッドを使用することにより、複雑な TCM で信頼性の高い定量が実現します。

参考文献

1. Stephan, S. High-Resolution Sampling 2D-LC with the Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Solution. Agilent Technologies Technical Overview, publication number 5991-7637EN, 2016.

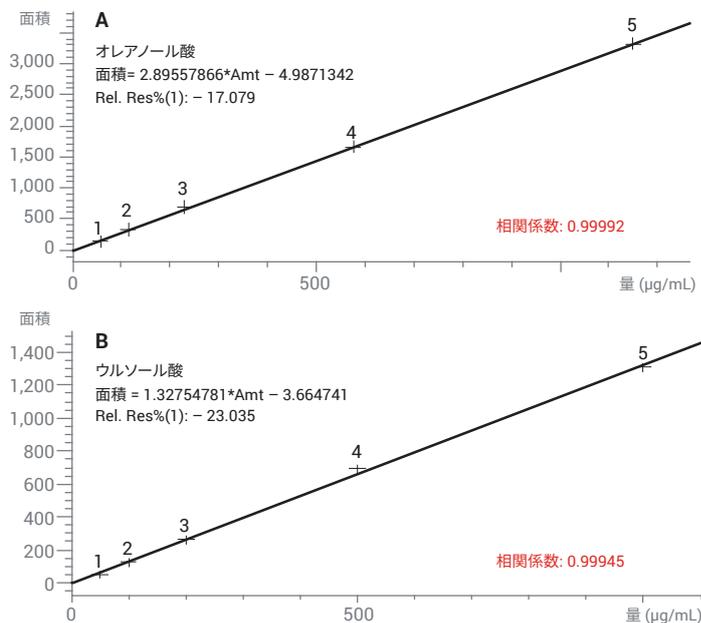


図 11. オレアノール酸とウルソール酸の 2D ピークの合計から得られた検量線

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

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. 2018
Printed in Japan, March 8, 2018
5991-9114JAJP