Sub-2µm 표면 다공성 LC 컬럼을 이용한 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 지문 프로파일링

응용 자료

제약산업

저자

Rongjie Fu
Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.

개요

단삼(*Salvia miltiorrhiza*)에서 소수성 및 친수성 성분의 추출물을 sub-2µm 표면 다공성 LC 컬럼을 이용해 UHPLC로 분석하였습니다. Agilent InfinityLab Poroshell 120을 이용한 이 분석법은 China Pharmacopeia(CHP)에서 샐비아 총 페놀산(Salvia Total Phenolic Acids) 및 탄쉬논(Tanshinones)의 지문 프로파일링을 위한 규제 대상 분석법에서 이전되었습니다. InfinityLab Poroshell 120, 1.9µm 컬럼은 짧은 분석 시간으로 매우 높은 피크용량을 얻을 수 있으며, 복잡한 시료의 분석에 적합합니다.

서론

*Salvia miltiorrhiza*의 마른 뿌리인 단삼은 한약(TCM)에서 혈액 흐름을 촉진시키고 혈관 질환을 치료하는 데 사용됩니다[1]. TCM 매트릭스에는 상당히 많은 화합물이 있기 때문에, 단일 활성 성분에 기초하여 한약의 품질과 진위를 평가하기는 어렵습니다. TCM의 품질을 종합적으로 평가하기 위한 최신 동향은 해당 물질의 지문으로서 사용될 고유한 크로마토그램을 찾는 것입니다. HPLC 또는 UHPLC 지문은 TCM 품질 관리에 사용되는 가장 인기 있는 기술입니다. 이 분석법을 이용하면 발견되는 피크가 많을 수록, 시료에 대해 더 많은 정보가 제공됩니다. 따라서, 피크 용량과 분리능은 품질 관리에서 TCM 지문의 활용을 위해 중요한 요소입니다.

Agilent Technologies

단삼은 품질 관리를 위한 HPLC 지문 프로파일링을 이용하여 CHP 2015에서 규제되는 시료 중 하나입니다. 활성 약물 효과를 가진 많은 성분이 단삼에서 분리되었으며, 그 중 살비아놀산(salvianolic acids)와 탄쉬논(tanshinones)이 가장 중요합니다. 총 페놀산과 탄쉬논의 추출물은 HPLC 지문 프로파일링에 의해 규제됩니다[2].

이 응용 자료에서는 총 페놀산 및 탄쉬논에 대한 CHP 분석법을 새로 개발된 1.9µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC 컬럼으로 전환했습니다.

재료 및 방법

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 분석 등급이었습니다. 아세토니트릴과 인산은 베이징의 J&K Scientific Ltd에서 구매했습니다. 샐비아 총 페놀산 및 탄쉬논과 참조 표준물질은 중국 현지 제조업체에서 제공했습니다. 샐비아 총 페놀산 추출물은 물에 녹여 1mg/mL의 농도를 만들고 탄쉬논 추출물은 메탄올에 녹여 1mg/mL의 농도를 만들었습니다.

UHPLC 분석은 다음을 포함한 Agilent Infinity 1290 LC 시스템을 이용해 수행되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary Pump(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity Autosampler(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment(G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector(G4212A)

컬럼

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

탄쉬논에 대한 UHPLC 조건

Parameter	Value		
Mobile phase	A) Water (0.026 % phosphoric acid) B) Acetonitrile		
Gradient for 2.1 × 100 mm column	Time (min)	%A	%B
	0	80	20
	4	40	60
	10	20	80
Stop time	13 minutes		
Post run	2 minutes		
Gradient for 2.1 × 150 mm column	Time (min)	%A	%B
	0	80	20
	4	40	60
	10	20	80
Stop time	20 minutes		
Post run	3 minutes		
Temperature	25 °C		
Flow rate	0.33 mL/min		
Injection volume	1 µL for 100 mm column 1.5 µL for 150 mm column		
Detection	UV 270 nm		

샐비아 총 페놀산에 대한 UHPLC 조건

Parameter	Value		
Mobile phase	A) Water (0.05 % phosphoric acid) B) Acetonitrile		
Gradient for 2.1 × 100 mm column	Time (min)	%A	%B
	0	90	10
	3	80	20
	7	75	25
	9	70	30
	11	10	90
	14	10	90
Stop time	14 minutes		
Post run	2 minutes		
Gradient for 2.1 × 100 mm column	Time (min)	%A	%B
	0	90	10
	4.5	80	20
	10.5	75	25
	13.5	70	30
	16.5	10	90
	21	10	90
Stop time	21 minutes		
Post run	3 minutes		
Temperature	30 °C		
Flow rate	0.42 mL/min		
Injection volume	1 µL for 100 mm column 1.5 µL for 150 mm column		
Detection	UV 286 nm		

결과 및 토의

CHP에서 규제되는 총 페놀산과 탄쉬논에 대한 두 분석법은 4.6 × 250mm, 5µm의 기존 컬럼이 필요합니다. TCM 시료로부터 더 많은 정보를 얻기 위해, TCM 지문 프로파일링에는 작은 입자 sub-2µm 표면 다공성 컬럼과 같은 높은 피크 용량을 가진 컬럼이 권장됩니다. 피크 용량은 성능 기준으로서 특정 분리능으로 기울기 실행 동안에 분리될 수 있는 피크 수를 나타냅니다. 알 수 없는 수와 다양한 분석물질을 가진 복잡한 시료의 분리에 고처리량 기울기 분석에 대한 요구가 증가하고 있기 때문에 더 높은 피크 용량 값이 중요합니다.

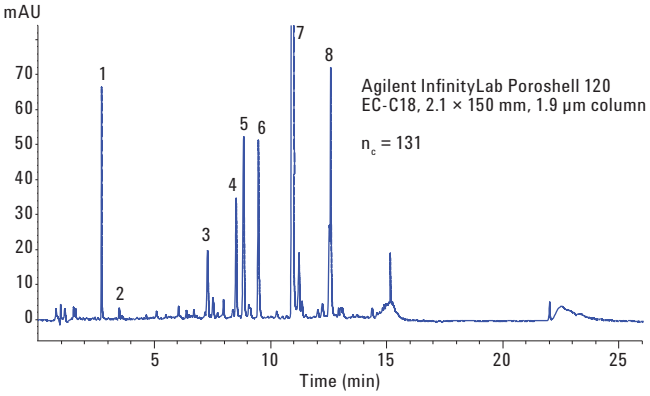

그림 1. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150mm, 1.9µm 컬럼에서 샐비아 총 페놀산 지문 프로파일링. 피크 5(rosmarinic acid) 및 7(lithospermic acid B)은 참조 표준물질을 이용해 식별되었습니다.

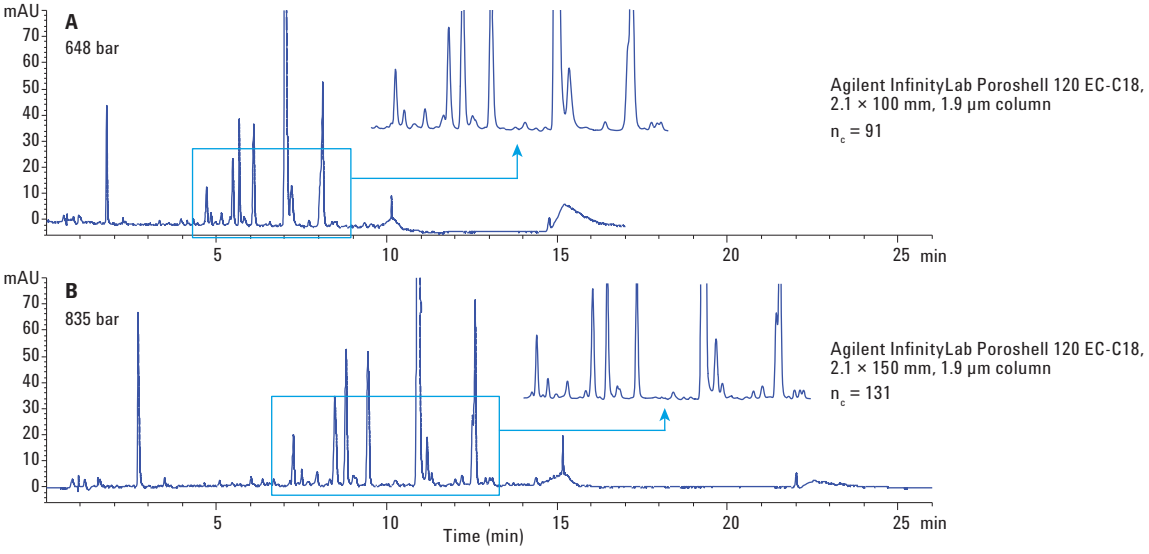

그림 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150mm, 1.9µm 및 2.1 × 100mm 컬럼에서 샐비아 총 페놀산 지문 프로파일링의 비교

이 응용 자료에서, 원래 CHP 분석법이 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 1.9µm, 150mm 및 100mm 컬럼으로 이전되었습니다. 선속도가 두 배로 높아져 sub-2µm의 최대 효율을 달성했으며, 기울기 시간은 컬럼 길이 및 유속에 따라 조절되었습니다. 그림 1, 2, 3 및 4는 크로마토그램을 보여줍니다. CHP [2]의 표준 크로마토그램에 따라 표시된 그림 1 및 3의 화합물은 검증된 모든 시료에서 나타나야 하는 피크였습니다.

sub-2µm 표면 다공성 입자 컬럼으로 UHPLC 압력에서 우수한 성능과 빠른 분석이 가능하게 되었습니다. 2.1 × 100mm 및 2.1 × 150mm 컬럼을 비교할 때, 더 긴 컬럼이 훨씬 더 높은 피크 용량과 높은 분리능을 얻을 수 있으므로, 시료에 대해 더 많은 정보를 제공합니다.

다음 방정식은 조건적 피크 용량을 계산하는 데 사용되었습니다.

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

여기서, n은 계산을 위해 사용된 피크 수이며, t_R는 기울기 시간이고, w는 4σ 피크 높이에서 측정된 평균 피크 너비입니다.

$$w = (W½/2.35) \times 4$$

W½ = 반높이에서의 피크 너비.

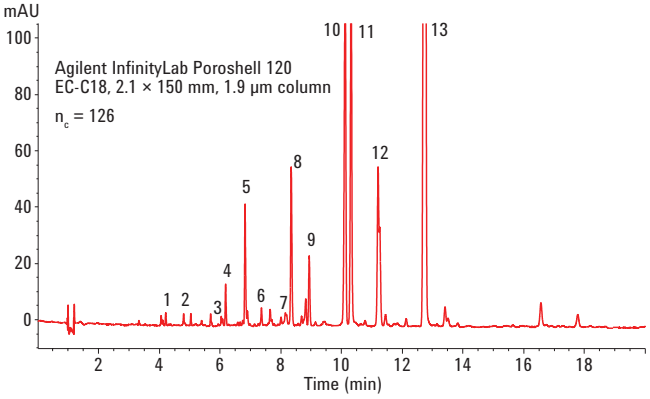

그림 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150mm, 1.9µm 컬럼에서 탄쉬논 지문 프로파일링. 피크 10(cryptotanshinone) 및 13(tanshinone IIA)은 참조 표준물질을 이용해 식별되었습니다.

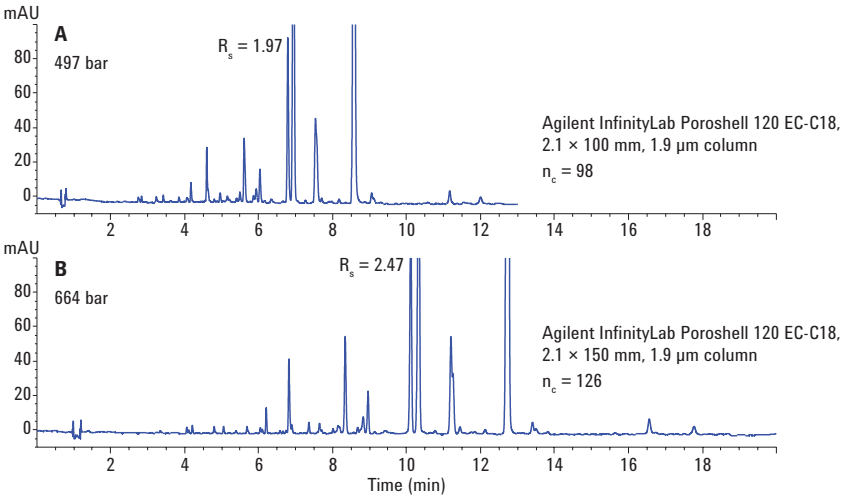

그림 4. Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 150mm, 1.9µm 및 2.1 × 100mm 컬럼에서 탄쉬논 지문 프로파일링의 비교

결론

sub-2µm 표면 다공성 입자 컬럼으로 UHPLC 압력에서 우수한 성능과 빠른 분석이 가능하게 되었습니다. TCM의 복잡한 시료 분석을 위한 지문 프로파일링에 적합합니다. 긴 컬럼은 짧은 컬럼보다 훨씬 높은 피크 용량을 얻을 수 있으므로, 복잡한 시료에 대해 더 많은 정보를 알려줍니다.

참고 문헌

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).

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹 사이트(www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 10월 31일 한국에서 인쇄
5991-7559KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies