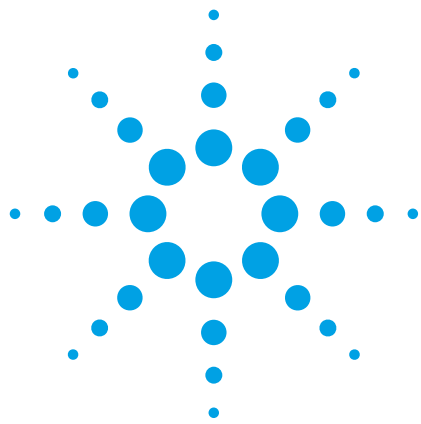




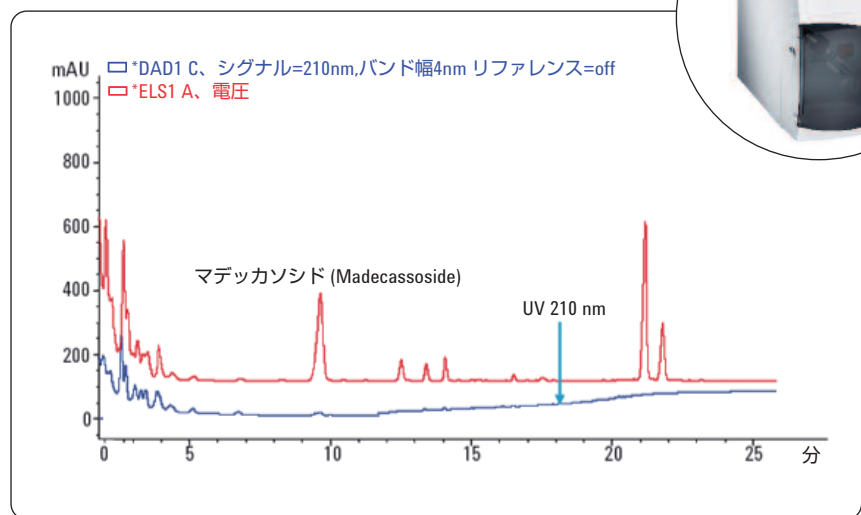
Agilent 1200 シリーズ 蒸発光散乱検出器 (ELSD) による 生薬製剤 (漢方薬原料) の分析

アプリケーション

製造 QA/QC

著者

Zhixiu Xu
Agilent Technologies
Shanghai, China



概要

本アプリケーションノートでは、バイモ (貝母、*Bulbus Fritillariae Thunbergii*)、チモ (知母、*Rhizoma Anemarrhenae*)、サンキンヘン (三金片、*Sanjin Tablet*)、ジフシ (地膚子、*Fructus Kochiae*)、フウ (路路通、*Fructus Liquidambaris*) という 5 つの生薬とその製剤を対象として開発された HPLC 分離メソッドについて説明します。各 HPLC メソッドの分離能は各製剤の最大成分数に合わせて最適化されたものです。サンプルの前処理法についても説明します。



Agilent Technologies

はじめに

2005 年度版中国薬局方では、蒸発光散乱検出器 (ELSD) による生薬 (漢方薬原料) やその製剤の分析法がいくつか発表されました¹。生薬の成分には発色団を持たないものや UV 吸収の極めて弱いものもあるため、そうした成分の定量には ELSD のような万能型検出器の使用が規定されています。以前に発行されたアプリケーションノート²では、中国薬局方で必須医薬品に指定されているハクカ (白果、Ginkgo) と オウギ (黄耆、Astragali) の ELSD 分析メソッドを示しました。このほか、2005 年度版中国薬局方で ELSD による分析の規定された有効成分を含んでいる漢方薬には、パイモ (貝母、Bulbus Fritillariae Thunbergii)、チモ (知母、Rhizoma Anemarrhenae)、サンキンヘン (三金片、Sanjin Tablet)、ジフシ (地膚子、Fructus Kochiae)、およびフウ (路路通、Fructus Liquidambaris) があります。

分析の開始手順と定量分析については、すでに前 2 件のアプリケーションノート^{2, 3}で紹介しました。定量分析に関して薬局方に規定されているデータ点の数は 2 つだけで、その 2 点の対数変換値によって定量グラフを作成せよという極めて単純なものです。このため、本アプリケーションノートでは定量分析の結果を示しません。分離結果を簡潔にまとめて、グラジエントや機器のパラメータと共に紹介します。

生薬、漢方薬の成分はかなり複雑であるため、ダイオードアレイ検出器 (DAD) だけでも ELSD だけでも成分をすべて検出することはできません。本アプリケーションノートでは、各サンプルを可能な限り詳しく分析するために、またピークの出していない成分がないかをモニターするために、DAD と ELSD を直列につないで使用しました。フィンガープリントク

ロマトグラムを使用して未知成分を分析するときには、最大ピーク数に合わせて分離能を最適化しておくことも有効です。

本アプリケーションでは Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution (RRLC) LCシステムを使用しました。このシステムでは、サンプルの分析要件に合わせて、サブ 2 ミクロン粒子径充填剤を使用した RRLC カラムと従来型の HPLC カラムとの切り替えを簡単に行うことができます。内径の狭いカラムを使用する場合には、ピーク幅が狭くなるため、RRLC 用のネブライザ (アジレント部品番号 G4218-20004) が必要です。本アプリケーションノートに示されている各例は、分離能とサンプル処理数を検討して双方のバランスを取ったものですが、別のカラムへの変更も簡単に行えます。たとえば、充てん剤は同じでも内径や長さの異なる別のカラムを使用すれば、個々の要件に合わせて分離の高速化やピーク容量を拡大することができます。

実験手法

標準溶液とサンプル

路路通酸 (Liquidambaric acid)、コキオシド Ic (kochioside Ic)、マデッカソシド (madecassoside)、サルササポゲニン (sarsasapogenin)、ペイミン (peimine)、およびペイミニン (peiminine) は中国薬品生物製品検定所 (中国北京) から購入しました。各生薬製剤のサンプルは上海の漢方薬局店で購入したものです。

使用機器

従来の分析条件および RRLC の分析条件の開発のいずれにおいても Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution (RRLC) LCシステムを使用しました。システムの構成は次の通りです。

• Agilent 1200 シリーズ オンラインデ

ガッサ

- Agilent 1200 シリーズ バイナリポンプ SL
- Agilent 1200 シリーズ 高性能オートサンブラ SL
- Agilent 1200 シリーズ カラムコンパートメント SL
- ミクロフローセル (容量 2 μ L、光路長 3 mm) を搭載した Agilent 1200 シリーズ ダイオードアレイ検出器 SL
- 標準ネブライザを搭載した Agilent 1200 シリーズ 蒸発光散乱検出器 (ELSD)
- Agilent ChemStation B.03.02 (システムコントロール、データの採取、評価に使用)

サンプル前処理

各生薬製剤の前処理は以下の手順で行いました。

フウ (路路通、Fructus Liquidambaris) :
サンプルの粉末を正確に 0.6 g 計量してバイアルに入れ、20 mL の無水エタノールを加えて、その混合液の重量を計り、15 分間超音波処理しました。混合液を冷却して、再度正確な重量を計り、溶媒の目減り分を無水エタノールで補充し、サンプルをよく攪拌してからろ過しました。このろ液を正確に 10 mL とって乾固させ、無水エタノールに再溶解し最終的に 2 mL の量になるまで無水エタノールで希釈しました。この溶液を 0.22 μ m のナイロン膜フィルターでろ過してから直接注入しました。

ジフシ (地膚子、Fructus Kochiae):
サンプルの粉末を正確に 0.5 g 計量してバイアルに入れ、10 mL のメタノールを正確に計量して加え、この混合液を正確に計量して一晩置きました。その後、30 分間超音波処理して冷却し、再度計量して目減り分をメタノールで補充しました。溶液をよく攪拌したあと 0.22 μ m のナイロン膜フィルターでろ過してから直接注入しました。

サンキンヘン (三金片、Sanjin Tablet):
錠剤の外側のコーティングを取り除いたサンキンヘン錠を砕いて細かな粉末にし、正確に 0.5 g 計量してバイアルに入れ、10 mL のメタノールを正確に計量して加えました。この溶液を 30 分間超音波処理し、冷却したのち、よく攪拌してからろ過しました。ろ液を正確に 5 mL 計量し、5 mL の量のアンモニアで 2 回、計 10 mL のアンモニアで抽出しました。回収した溶液を真空乾燥させ、メタノールに再溶解し、よく攪拌して 0.22 µm のナイロン膜フィルターでろ過してから直接注入しました。

チモ (知母、Rhizoma Anemarrhenae):
サンプルの粉末を正確に 0.5 g 計量してキャップ付きのバイアルに入れ、10 mL のエタノールを正確に計量して加えました。これを計量し、一晩置いてよく馴染ませた後 40 分間超音波処理し、冷却したのち、再度計量して目減り分をエタノールで補充しました。サンプルをよく攪拌した後、10 mL の水と 1 mL の濃塩酸を加え、この混合液を 2 時間加熱還流しました。サンプルを冷却してから、40 % 水酸化ナトリウム溶液をオレンジ色になった黄色から赤味の強いオレンジ色になるまで振りながら少しずつ加えました。この溶液を 5 mL の量のクロロホルムで 2 回、計 10 mL のクロロホルムで抽出しました。回収した溶液を真空乾燥させ、メタノールに再溶解し、最終的に 5 mL の量になるまで希釈しました。この溶液をよく攪拌した後 0.22 µm のナイロン膜フィルターでろ過してから直接注入しました。

バイモ (貝母、Bulbus Fritillariae Thunbergii):
サンプルの粉末を正確に 2 g 計量してキャップ付きのバイアルに入れ、4 mL の強アンモニア水を加え、1 時間置いてよく馴染ませました。次に、20 mL のクロロホルム/メタノール混合液 (混合比 4:1) を正確に計量して加えてサンプルを計量し、80 °C で 2 時間加熱還流しました。サンプルを冷却し、再度計量して目減り分を上記の混合液で補充しました。この溶液をろ過し、ろ液を 5 mL 正確に計量して蒸発皿で真空乾燥させました。乾固したサンプルをメタノールに再溶解し、バイアルに移して最終的に 10 mL の量になるまでメタノールで希釈しました。この溶液を 0.22 µm のナイロン膜フィルターでろ過してから直接注入しました。

分析条件

フウ (路路通、Fructus Liquidambaris):

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse C18、4.6 x 150 mm、1.8 µm
溶媒: A = 0.1 % 酢酸、
B = メタノール
流量: 0.8 mL/min
グラジエント: 0min, 80%B; 10min, 85%B; 30min, 100%B
UV 検出器: 210 nm、254 nm
ELSD 温度: 40 °C
ELSD 圧力: 50 psi
ELSD ゲイン: 9
ELSD フィルター: 3 s

ジフシ (地膚子、Fructus Kochiae):

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse C18、4.6 x 100 mm、3.5 µm
溶媒: A = 0.1 % 酢酸、
B = メタノール、
90 %B アイソクラティック
流量: 0.8 mL/min
UV 検出器: 210 nm、254 nm
ELSD 温度: 40 °C

ELSD 圧力: 50 psi
ELSD ゲイン: 9
ELSD フィルター: 3 s

サンキンヘン (三金片、Sanjin Tablet):

カラム: Agilent ZORBAX SB-C18、
3 x 150 mm、5 µm
溶媒: A = 水、B = メタノール
流量: 0.6 mL/min
グラジエント: 0 min, 45 %B; 10 min, 55 %B; 20 min, 100 %B
UV 検出器: 210 nm、254 nm
ELSD 温度: 40 °C
ELSD 圧力: 50 psi
ELSD ゲイン: 9
ELSD フィルター: 3 s

チモ (知母、Rhizoma Anemarrhenae):

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse C18、3 x 50 mm、1.8 µm
溶媒: A = 水、B = メタノール
流量: 0.6 mL/min
グラジエント: 0 min, 40 %B; 5 min, 45 %B; 10 min, 80 %B; 15 min, 100 %B
UV 検出器: 210 nm、254 nm
ELSD 温度: 45 °C
ELSD 圧力: 50 psi
ELSD ゲイン: 9
ELSD フィルター: 3 s

バイモ

(貝母、Bulbus Fritillariae Thunbergii):

カラム: Agilent ZORBAX Eclipse C18、3 x 50 mm、1.8 µm
溶媒: A = 0.03 % アンモニア水 (pH 9)、B = アセトニトリル
流量: 0.6 mL/min
グラジエント: 0 min, 45 %B; 5 min, 45 %B; 10 min, 70 %B
UV 検出器: 210 nm、254 nm
ELSD 温度: 45 °C
ELSD 圧力: 50 psi
ELSD ゲイン: 9
ELSD フィルター: 3 s

結果と考察

フウ (路路通、Fructus Liquidanbaris)

図 1 は、UV-254 nm チャンネルと ELSD チャンネルによるフウのクロマトグラムを重ね書きしたものです。路路通酸のピークをラベルで示します。2 つのチャンネルを比較すると、感度に差のあることが判ります。路路通酸は、UV-254 nm チャンネルではレスポンスがありませんが、ELSD チャンネルでは良好なレスポンスを示します。溶出時間の早い他の成分のなかには、ELSD にはレスポンスを示さずに 254 nm の UV 検出にはレスポンスを示すという成分もあります。210 nm チャンネルは表示ピークの数が少なく表示成分の割合も低いいため、ここでは示していません。

図 1 では、2 組のピーク対にそれぞれ 1 と 2 というラベルを付けています。LC メソッドは、この 2 つのピーク対の分離に合わせて最適化しています。これらの成分の正確な構造は不明ですが、210 nm の UV 検出よりも ELSD に対してレスポンスが良く、定量分析する場合に ELSD での検出が要求される可能性があります。

ジフシ (地膚子、Fructus Kochiae)

図 2 は、ELSD チャンネルと UV-210 nm チャンネルでの各ジフシ成分の分離を示したものです。210 nm の UV 吸収率が極めて低い成分、コキオシド Ic (kochioside Ic) のピークをラベルで示します。ELSD では UV 検出器よりも多くのピークが検出されました。このことから、ジフシには発色団のない成分が多く含まれていることが分かります。したがって、こうした成分を検出するには、2 台の検出器を直列につなげて両方のチャンネルから同時に情報を採取する必要があります。溶出時間の早い成分のなかには、発色団がないために ELSD チャンネルでしかレスポンスを示さなかった成分もありました。

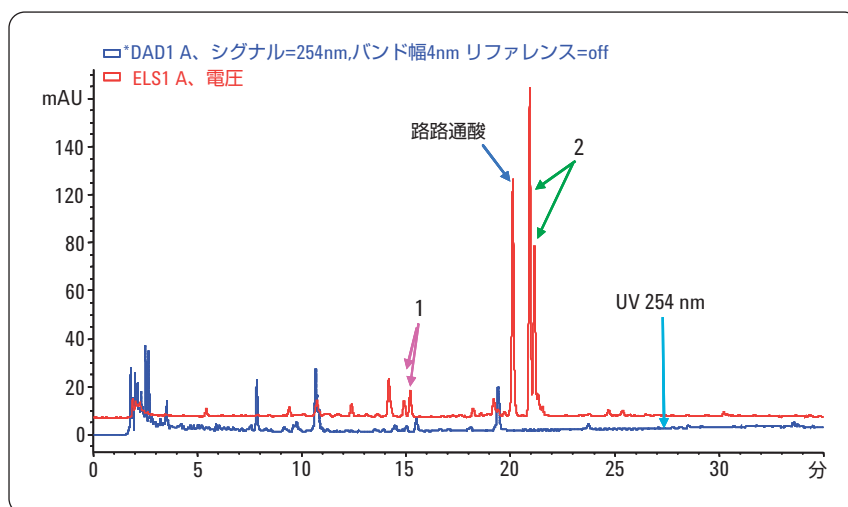


図 1
フウのクロマトグラム (ELSD 検出器 (赤) と UV チャンネル (青) のクロマトグラムの重ね書き)

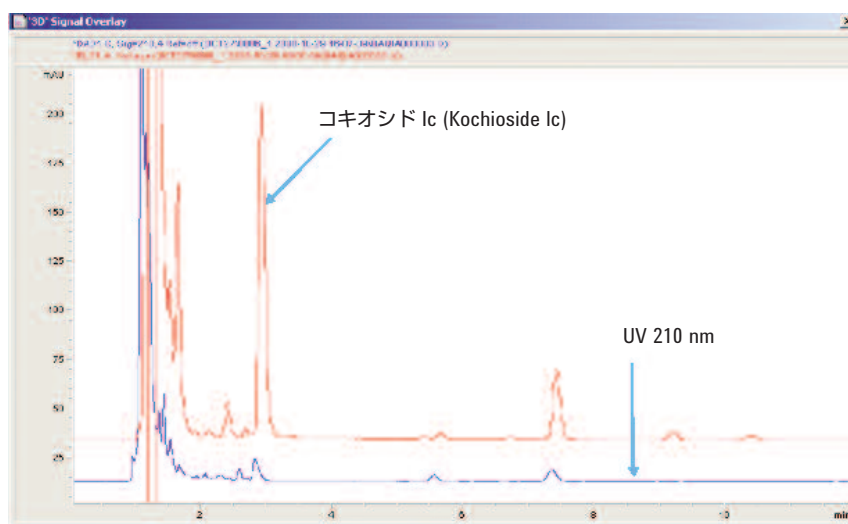


図 2
ジフシのクロマトグラム (ELSD チャンネル (赤) と UV-210 nm チャンネル (青) のクロマトグラムの重ね書き)

サンキンヘン (三金片、Sanjin Tablet)

図 3 は、ELSD チャンネルと UV-210 nm チャンネルによるサンキンヘンのクロマトグラムを重ね書きしたものです。有効成分、マデカッソシドのピークをラベルで示します。大部分の成分には発色団がないため、UV-210 nm チャンネルのピーク数は ELSD チャンネルに比べて僅少でした。また、溶離液の吸光度がグラジエントに伴って変化するため、UV-210 nm シグナルのベースラインはフラットな状態を維持できません。ELSD を使用していなければ、サンキンヘンのピークについてこれほど多くの情報は得られず、また品質管理用のフィンガープリントも作成できなかったことになります。

チモ (知母、Rhizoma Anemarrhenae)

ELSD チャンネルのクロマトグラムを見ると、サルササポゲニンのピークが小さく、今回漢方薬局店で購入した製剤はそれほど高品質のものでないことが分かります。210 nm の UV シグナルでは、サルササポゲニンのレスポンスはありませんでした。その他のチモ成分に関しては、ELSD チャンネルでは UV-210 nm チャンネルよりも多くのピークが検出され、2つのクロマトグラムが異なるプロフィールを示しました。チモの成分を詳しく分析するには、この相補的な 2 台の検出器を併用する必要があります。

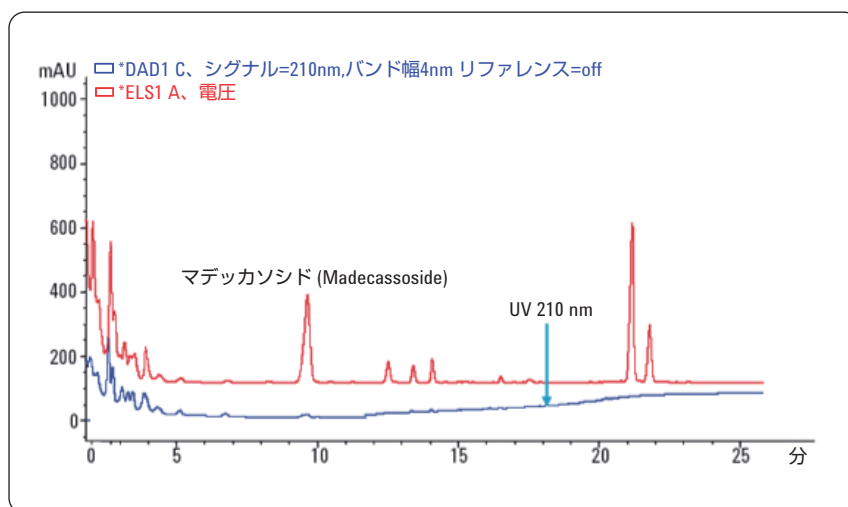


図 3
サンキンヘンのクロマトグラム (UV-210 nm チャンネル (青) と ELSD チャンネル (赤) のクロマトグラムの重ね書き)

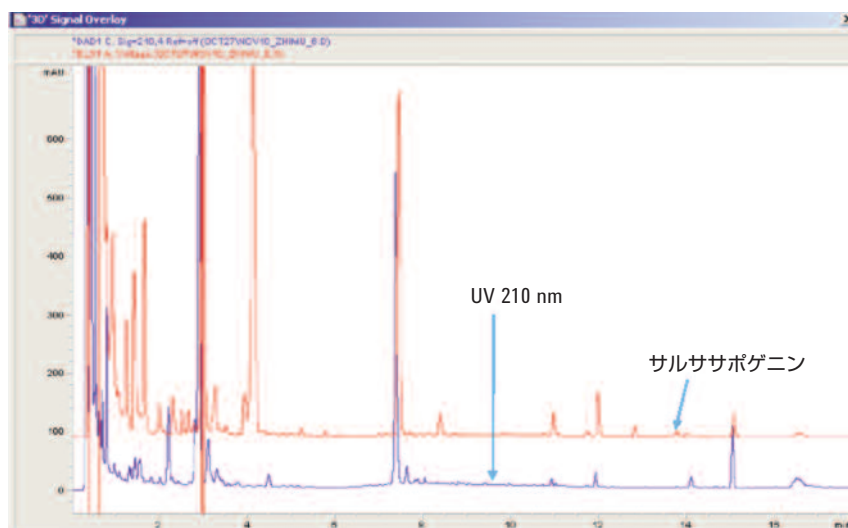


図 4
チモのクロマトグラム (ELSD チャンネル (赤) と UV-210 nm チャンネル (青) のクロマトグラムの重ね書き)

バイモ

(貝母, *Bulbus Fritillariae Thunbergii*)

ペイミン (Peimine) と ペイミニン (Peiminine) はバイモの最重要成分です。210 nm の UV トレースには極めて僅少なピークしか見られません。一方で ELSD のクロマトグラムには、この 2 つの有効成分の良好な分離が見られます。サブ 2 ミクロン粒子径充填剤を使用した RRHT カラムと Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution (RRLC) LC システムによる分離は 12 分で完了しています。2 つの成分は、現行のメソッドで簡単に分離できます。ピークキャパシティが問題とされない場合には、Agilent 1200 シリーズ RRLC システムにより分析を高速化し、サンプルの処理件数を増やすことができます。

結論

前回²と今回のアプリケーションノートでは、2005 年度版中国薬局方で ELSD による検出が規定される各生薬 (漢方薬原料) とその製剤の分析メソッドを開発しました。各サンプルについてサンプル前処理法と機器パラメータを検討しました。

ELSD は、発色団のない化合物の分析には最適な選択肢です。分析対象化合物に UV 吸収力の高い官能基がない場合には、ELSD の使用によってその化合物のレスポンスを高めることができます。また、UV 吸収を持つ溶媒を移動相に使用する場合には、ELSD の使用によってベースラインの安定性を高めることができます。

UV と ELSD のどちらか一方だけではピークのすべてを検出することはできないため、双方の検出器を直列につなげて両方のチャンネルからシグナルを得る必要があります。本アプリケーションノートでは、品質管理部門でのメソッドの実施を考慮して各メソッドに関する詳細な情報

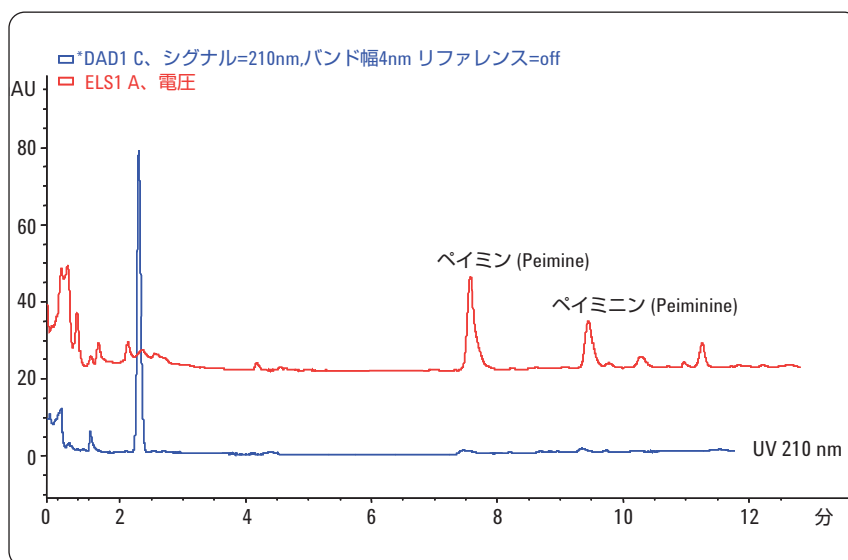


図 5
バイモのクロマトグラム (ELSD チャンネル (赤) と UV-210 nm チャンネル (青) のクロマトグラムの重ね書き)

を示しました。

参考文献

1.

Pharmacopoeia of the People's Republic of China, volume 1, China Pharmacopoeia Commission, People's Medical Publishing House, **2005**.

2.

Z. Xu, "Analysis of traditional Chinese medicines with the Agilent 1200 Series evaporative light scattering detector," Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-8922EN, **2008**.

3.

Z. Xu, H. Huang, X. Zhang, 「蒸発光散乱検出器と Agilent 1200 シリーズ LC システムを用いた生薬 (漢方薬原料) (柴胡 Radix Bupleuri) の分析」 アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、資料番号 5989-9834JAJP, **2008**.

www.agilent.com/chem/jp

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。本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published August 18, 2009
Publication Number 5990-3412JAJP



Agilent Technologies