[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

UNIFI 天然物アプリケーションソリューションを使用した 2メーカーの Shuanghuanglian 経口飲料の化学成分比較

Lirui Qiao,[1] Rob Lewis,[2] Alex Hooper,[2] James Morphet,[2] Xiaojie Tan,[1] Kate Yu[3]
[1] Waters Corporation (Shanghai), Shanghai, China; [2] Waters MS Technology Center, Manchester, UK;
[3] Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

UNIFI® 天然物アプリケーションソリューションのバイナリー成分比較ワークフローを使用したこのアプリケーションノートでは、メーカー 2 社が製造する Shuanghuanglian 経口飲料に含まれる化学成分の類似点と相違点の迅速かつ正確な検出手法を紹介します。 このソリューションにより、研究者は異なる企業が製造した同製品の成分の比較解析能力を向上することができます。また、単一メーカーでのバッチ間における製品のより精密な品質管理が可能になります。UNIFI ソフトウェアは類似したサンプル間のバイナリー比較に対して、簡単で有効なアプローチを提供します。

ウォーターズのソリューション

UNIFI 天然物アプリケーションソリューション

ACQUITY UPLC® I-Class

Xevo® G2-S QTof MS

UNIFI 科学情報システム

Waters® 分析用スタンダードおよび試薬

キーワード

生薬ライブラリー、天然物のバイナリー比較、UPLC®/QTof MS、Shuanghuanglian 経口飲料、天然物品質管理、製品バッチ比較

はじめに

生薬は、何千年もかけて発展してきた歴史を持ち、驚異的であると同時に複雑です。しかし、生薬製品の信頼性および品質を評価するための、広く認められた体系的で科学的なメソッドはまだありません。例えば、生薬の原材料の有効な成分を管理する一貫した有効なメソッドは存在していません。植え付け技術や場所、あるいは収穫時期、処理方法が異なる原材料を評価するメソッドについても同じことが言えます。

近年、医薬分野の研究者は生薬の品質基準を向上する目的で多くの研究を行っており、すでに相当な量の経験とメソッドが蓄積されています。しかしながら、一般的には生薬のバイナリー比較には時間とコストがかかります。さらに、科学的根拠に欠け、十分に客観的ではないメソッドもあります。このアプリケーションノートでは、UNIFI 天然物アプリケーションソリューションを使用した高度な分離と検出技術を組みあわせた、新しいアプローチを紹介します。

産地が異なる原材料での化学的成分の類似点と相違点、異なるメーカーにより製造された同製品における相違点、同じメーカーによる異なるバッチ間の製品品質確認には類似したサンプル間の比較が必要になります。目的は、各サンプル中の化学成分の相違点を特定し、その後の研究開発に明確な方向性を提供することです。分析技術の継続的な進化により、UPLC/QTof MS などの高分離・高分解能 LC/MS 装置は着実に適用範囲を広げています。 これらの技術の応用により、分析時間の短縮と、分離効率の向上が実現しています。UPLC/QTof MS は幅広い適応性、高い特異性、低い検出限界、注入量の削減、溶媒消費の削減、高度に自動化されたワークフロー、高い同定性能を実現します。その結果、UPLC/QTof MS による分析技術は生薬の品質管理により重要な役割を果たすようになってきています。

実験

サンプルの調製

200 µL の Shuanghuanglian 経口飲料を 2 mL の H_2O に溶解（10 倍希釈）して使用しました。
注入量は 1 µL です。

LC 条件

LC システム：　ACQUITY UPLC I-Class
（FTN サンプルマネージャ）

カラム：　ACQUITY UPLC HSS T3
2.1 x 100 mm、1.8 µm

カラム温度：　40 ℃

サンプル温度：　15 ℃

移動相：　A：水（0.1% ギ酸含有）、
B：アセトニトリル

グラジエント：

時間	流速 (mL/min)	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)	曲線
0	0.5	95	5	
1	0.5	90	10	6
8	0.5	55	45	6
12	0.5	45	55	6
13	0.5	5	95	6
15	0.5	95	5	1

MS 条件

MS システム：　Xevo G2-S QTof MS

取り込み範囲：　100 ～ 1500 Da

スキャン時間：　0.1 秒

取り込みモード：ESI+、ESI-。分解能モード。MS^E

ロックマス：　ロイシンエンケファリン（LE）1 ppm
（0.3 秒間スキャン、間隔：15 秒）

キャピラリー電圧：　3 kV（ESI+）/2.5 kV（ESI-）

コーン電圧：　100 V

コリジョンエネルギー（eV）：低 CE：6 / 高 CE：20-50

ソース温度：　120 ℃

脱溶媒温度：　500 ℃

コーンガス流量：　60 L/h

脱溶媒ガス流量：1000 L/h

取り込み時間：　15 分

データ取り込み、解析、およびレポート作成

UNIFI 科学情報システム

このアプリケーションノートでは、UNIFI 天然物アプリケーションソリューションを使用したメーカー 2 社の Shuanghuanglian 経口飲料の比較を紹介しています。 このソリューションは ACQUITY UPLC I-Class システム、Xevo G2-S QTof MS、生薬ライブラリーを組み合わせ、UNIFI のバイナリー比較ワークフローを使用して類似サンプルを比較し、2 つのサンプルの相違点を迅速に同定します。それにより、良好な品質管理と、品質基準の設定に貢献します。 結果として、生産性が大幅に改善し、分析者に高い専門性レベルが求められなくなります。

Shuanghuanglian 経口飲料には 3 種類の薬草が含まれています。スイカズラ（中国名 JinYinHua、学名 *lonicerae japonicae flos*）、オウゴン（中国名 HuangQin、学名 *scutellariae radix*）、レンギョウ（中国名 LianQiao、学名 *forsythiae fructus*）。この製品は、上気道感染、へんとう炎、咽頭炎、およびウイルス性肺炎などの、ウイルスおよび細菌感染症の緩和に効果があります。この経口飲料に含まれる有効成分は Baicalin、forsythin、および wogonin などの化合物です。 この製品は市場で一般的であるため、中国では多くのメーカーが製造しています。 そのため UNIFI 天然物アプリケーションソリューションを使用したバイナリー比較ワークフローを紹介するために、この一般的な飲料を例として使用することにしました（図 1）。

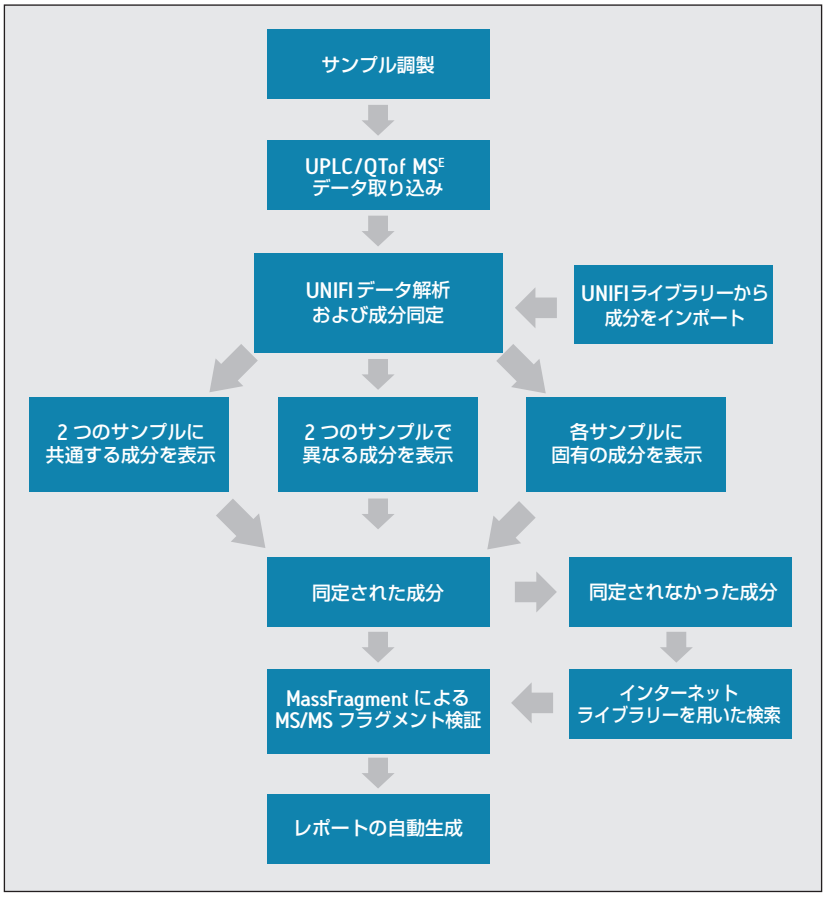

図 1. UNIFI 天然物アプリケーションソリューションのバイナリー比較のワークフロー

結果および考察

メーカー 2 社が製造する Shuanghuanglian 経口飲料に含まれる化学成分の分析データの取り込みに、UPLC/四重極 - 飛行時間型質量分析計（QTof MS）を使用しました。 データ解析には、UNIFI 天然物アプリケーションソリューションのバイナリー比較ワークフローと、生薬ライブラリーを使用しました。 得られた結果には共通成分のサマリープロット、異なる成分のサマリープロット、各サンプルに固有の成分のテーブルを明確に表示することが可能です。 その結果、forsythiaside A、orsythiaside B、dextrorotaion hydroxyl forsythiaside A、arctin、rutin などの成分含有量はメーカー 1 の製品が高く、baicalin などの成分含有量はメーカー 2 の製品が高いことが示されました。

UNIFI 天然物アプリケーションソリューションには 5 種類のバイナリー比較ワークフローテンプレートと、1 種類のレポートテンプレートが準備されており、データ収集からピークピッキング、ライブラリー検索や（MassFragment™ によるフラグメントイオンの）構造解析、さらには最終レポートの生成までの分析プロセス全体を自動化できます。

2 種類の Shuanghuanglian 経口飲料の UPLC/QTof MS ベースピークイオン（BPI）クロマトグラムが図 2 のようにミラー（バイナリー）プロットで示されます。このプロットは、複雑な天然物の分析に UPLC を使用するメリットが明確に示されています。UPLC により分析時間が短縮されるだけでなく（実際の分離時間は 12 分）、分離効率およびピークキャパシティも向上します。 一方、QTof MS では精密質量 MS データを取得します。さらに、図 2 で示したように、2 種類のサンプル中の化学成分は複雑であるだけでなく、非常に類似しています。 そのため、専用の情報プラットホームなくして、サンプルの類似点および相違点を迅速かつ正確に同定することは、非常に困難で複雑な作業となります。

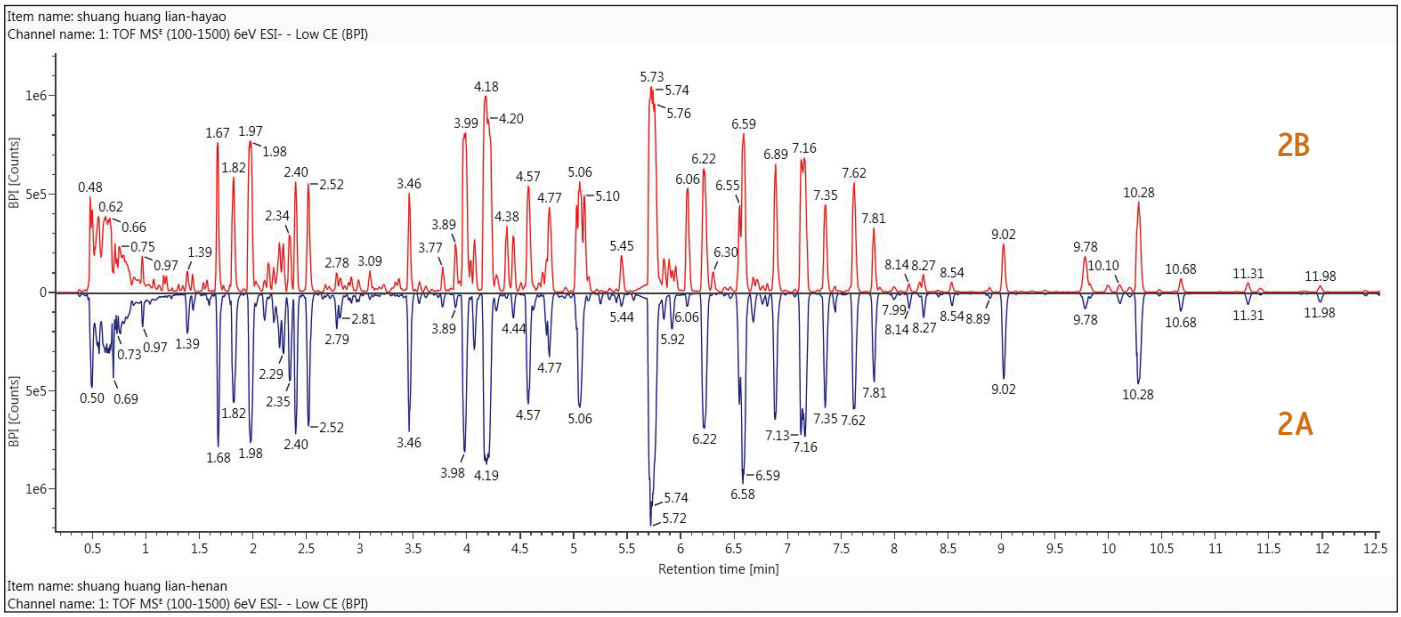

図 2. 2 種類の Shuanghuanglian 経口飲料の UPLC/QTof MS ベースピーク BPI イオンクロマトグラムのミラープロット（図 2A、メーカー 1 の製品　図 2B、メーカー 2 の製品）

天然物分野では、単一サンプルからの化学成分の定性 / 同定、または 2 つの異なるサンプルの成分比較のいずれにおいても、成分の詳細を明確に理解していることが研究の今後のステップの基礎となります。 前述のアプリケーションノート [1] では、既知の植物サンプルからの成分同定の分析ワークフローを紹介しました。 このワークフローの後に、3 種類の薬草（スイカズラ、タツナミソウ属、レンギョウ）に関連する化学成分すべてが、データ解析のために生薬ライブラリーの成分リストにインポートされました。その後、前述のアプリケーションノートに記載の方法で同定された成分を検証しました [1]。個別の結果は UNIFI の [レビュー] 画面で、5 種類のすでに登録されているバイナリー比較テンプレートのいずれかをクリックすることで、簡単に表示できます。例えば、図 3 は [Binary-Overview Plot] テンプレートをクリックして表示される結果を示しています。

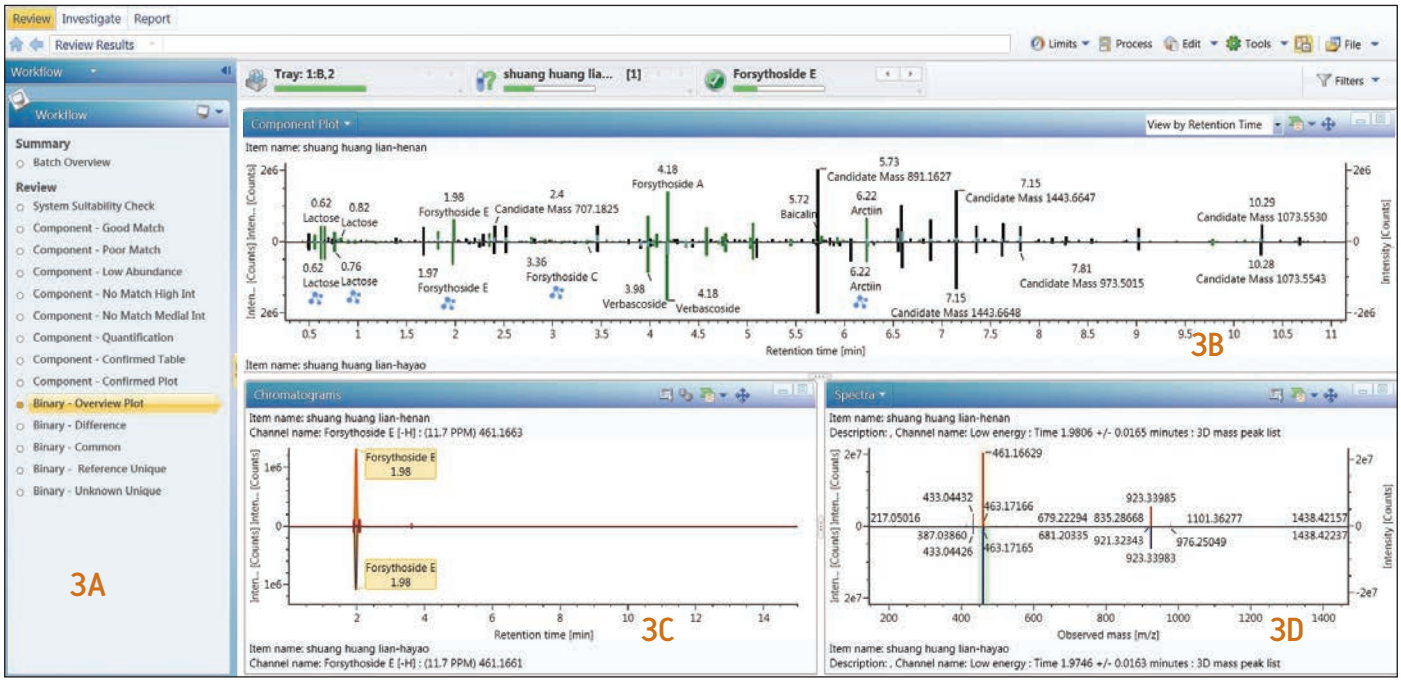

図 3. メーカー 2 社が製造する Shuanghuanglian 経口飲料の UNIFI によるデータ解析後に得られたバイナリー比較結果

図 3A は UNIFI にすでに準備されている 14 種類ワークフローを示しています。 図 3B はメーカー 2 社のサンプルの UPLC/QTof MS 成分サマリープロットの比較を示しています。緑色のバーはマッチがあり、生薬ライブラリーと自動的に同定された成分を表しています。黒色のバーはマッチがなく、自動的に同定できなかった成分を表しています。 図 3C は、ユーザーが図 3B でクリックした任意の成分に対応したイオンクロマトグラム（XIC）のミラープロットを示します（ここでは、保持時間 1.98 分の forsythoside E の XIC ミラープロットを表示しています）。図 3D は 2 種類のサンプルの成分（3C に表示）の低エネルギー MS スペクトルのミラープロットです。

これら 2 種類のサンプルのさらなる類似点および相違点は [Binary-Common] ワークフローまたは [Binary-Difference] ワークフローのいずれかをクリックすることで理解することができます。このワークフローで 2 種類のサンプル中の共通または異なる成分を直接確認することができます。 例えば、図 4 は [Binary-Common] ワークフローで得られる結果を表示しています。図 4A は 2 種類のサンプルに共通する成分を一覧表示しています（解析結果より合計 1978 成分）。図 4B は 2 種類のサンプル中の MS レスポンスのレベルを、図 4A に一覧しているそれぞれの成分について示したもので、各サンプル内の成分の相対的な量を反映しています（この場合は Rutin）。[Binary-Difference] ワークフローをクリックすると類似の情報が表示され、表示される結果は 2 つのサンプル間で異なる成分です（解析結果により合計 408 成分）。

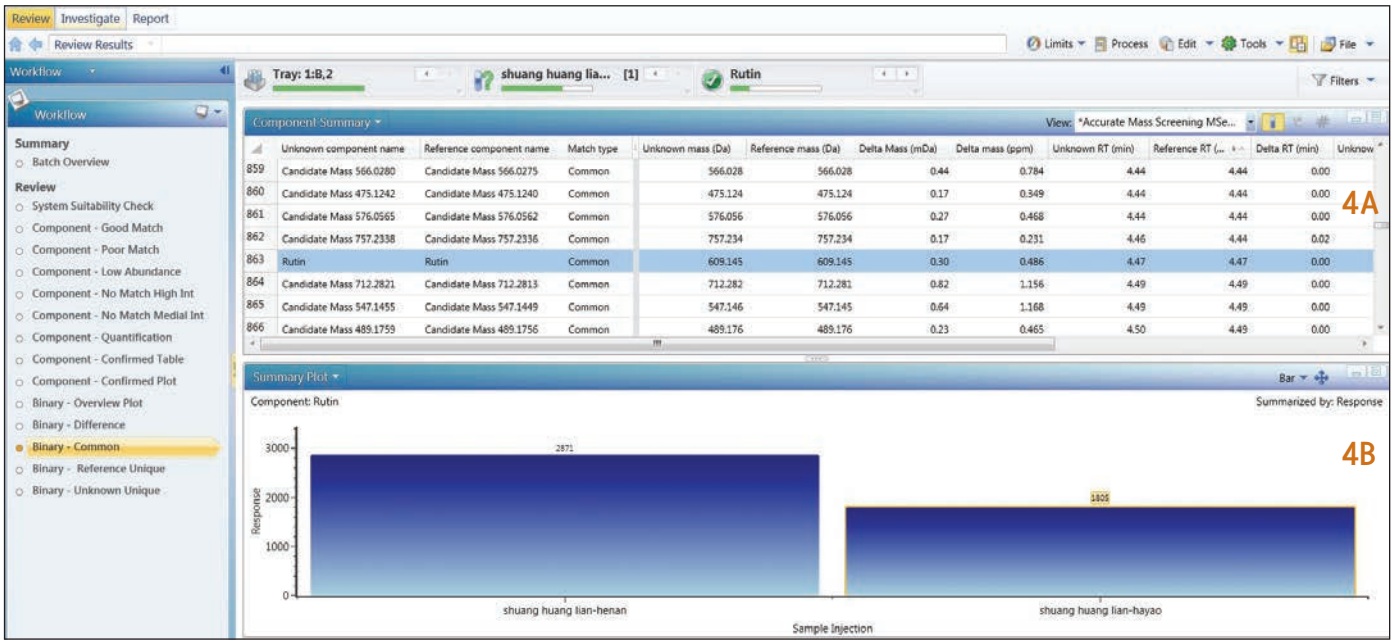

図 4. [Binary-Common] テンプレートをクリックして得られる結果

[Binary-Common] および [Binary-Difference] ワークフローテンプレートを使用して、共通する成分および異なる成分を、より直感的な棒グラフで表示することも可能です。 例えば、[Binary-Difference] をクリックして得られた 2 つのサンプルの異なる成分は、[Component Summary] リストの [Component Summary Plot] をクリックすることで簡単に表示できます (図 5)。このプロットにより、研究者は 2 サンプルの相違を明確かつ直感的に確認できます。

これら 2 つの生薬飲料の分析結果から、メーカー 2 の baicalin 含有量はメーカー 1 に比べて非常に多く、forsythiaside A、forsythiaside B、dextrorotaion hydroxyl forsythiaside A などの含有量はメーカー 1 のほうがメーカー 2 よりも多いことが分かりました。図 5 ではまた、生薬ライブラリーと一致せず、同定されなかった成分があることが明確に示されています。この場合、必要に応じて UNIFI の構造解析ツールを使用することで、更なる同定ができます。

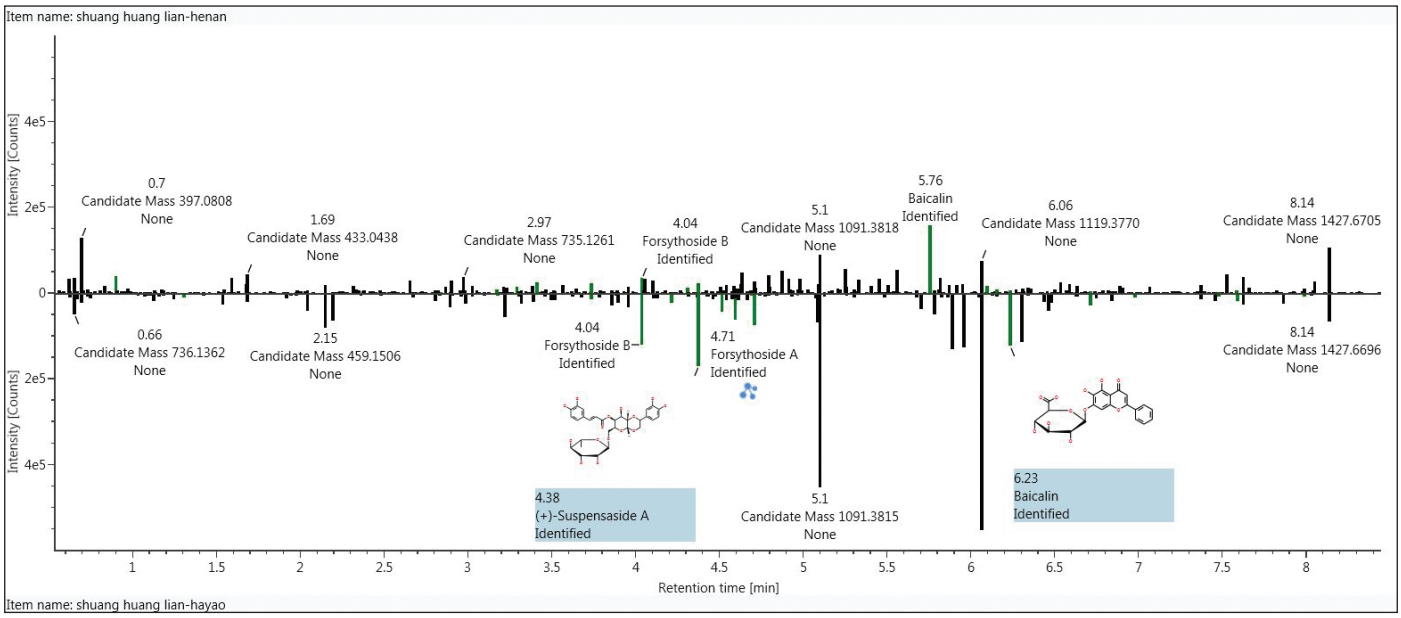

図 5. 2 つの生薬飲料のバイナリー比較後、異なる成分を示すサマリープロット

2 つのサンプルの異なる成分の詳細は、[Binary-Reference Unique] または [Binary-Unknown Unique] テンプレートのいずれかを適用して、さらに確認できます。 それぞれのサンプルに固有の成分の詳細を確認できます。UNIFI バイナリー比較では、あるサンプルを参照サンプル（クロマトグラムまたは MS を上に表示）として、他のサンプルを未知のサンプル（クロマトグラムまたは MS を下に表示）として定義します。 この例では、メーカー 2 のサンプルを参照として、メーカー 1 のサンプルを未知として定義しました。 図 6 の [Binary-Unknown Unique] をクリックするだけで、メーカー 1 のサンプルに含まれる固有成分をさらに確認することができます。その結果、メーカー 1 のサンプルに固有の成分が 193 成分あるということが示されました。

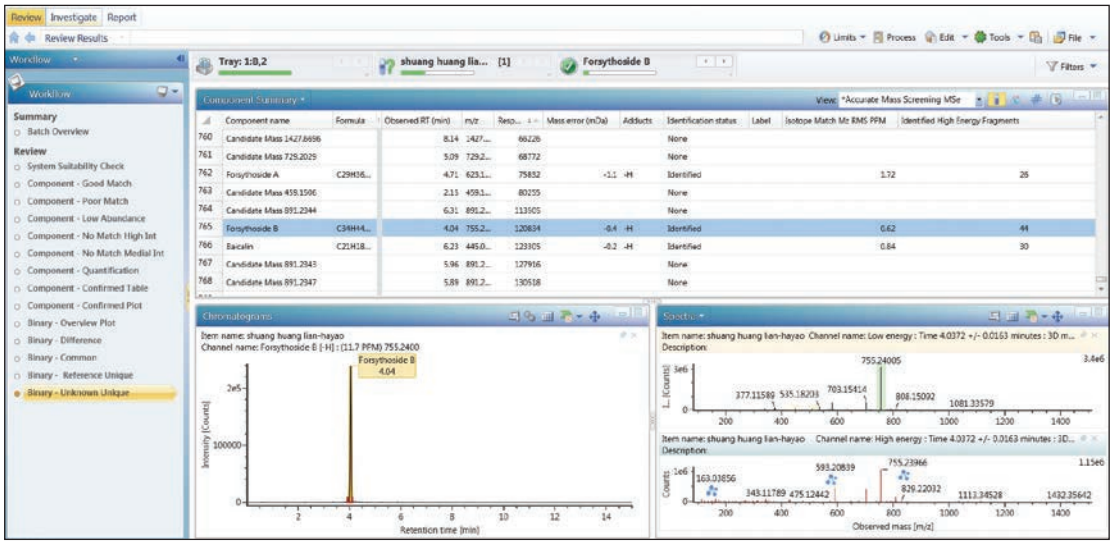

図 6. [Binary-Unknown Unique] を選択して得られたメーカー 1 のサンプルに含まれる固有成分

確認した結果が満足できるものである場合、[NP Binary] テンプレートを使用して簡単にレポートを作成、印刷できます。 このレポートにはサンプル調製、データ収集、解析メソッド、2 種類のサンプルに共通する成分および異なる成分の詳細などが記載されます。 図 7 は、このレポートの別の部分、2 種類のサンプルの BPI ミラープロットを示しています。ここでは、ピーク同定が自動的にラベル付けされ、結果が視覚的かつ直感的に表示されています。

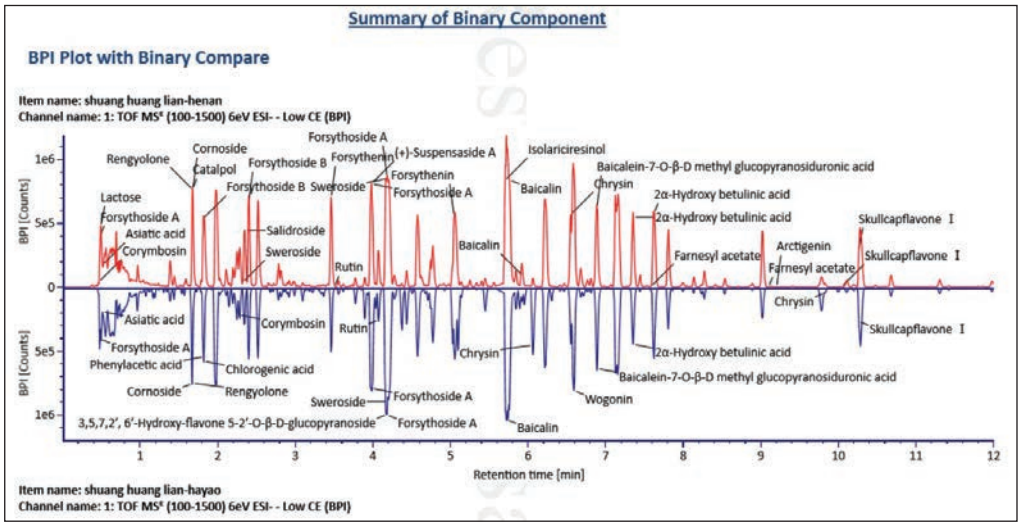

図 7. [NP Binary] テンプレートをインポートして自動的に得られたレポート

結論

このアプリケーションノートでは、UNIFI 天然物アプリケーションソリューションのバイナリー比較ワークフローを適用して、メーカー 2 社の Shuanghuanglian 経口飲料の成分で、類似する成分および異なる成分を比較する方法について系統的に紹介しています。 このワークフローは UPLC/QTof MS によるデータ取得に基づき、生薬ライブラリーおよび UNIFI の自動構造解析機能を使用しています。 このソリューションは天然物分析に新しく包括的なアプローチを提供します。

このソリューションは、異なる産地の原料の比較、同じ産地で栽培時期や処理方法が異なる原料の比較などの一連の課題の解決に適用できます。また、異なるメーカーの同製品の品質管理、または同メーカーでバッチが異なる同じ製品の品質管理などにも有用です。

バイナリー比較ソリューションには、5 種類のバイナリー比較ワークフローテンプレートと 1 種類のレポートテンプレートを準備しています。 UNIFI を使用することで、研究者がサンプルを効果的かつ迅速に比較して、サンプル間の類似点や相違点を理解することが可能になり、将来の製品調査の基礎情報が得られます。最終結果として、生薬の調査および品質管理における効率および生産性の目覚ましい向上がもたらされます。

Reference

1. UNIFI 天然物アプリケーションソリューションを使用した緑茶抽出物の化学成分の同定 Waters アプリケーションノート、2014 年 10 月、720004837JA.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、The Science of What's Possible、UltraPerformance LC、UPLC、ACQUITY UPLC、UNIFI、および Xevo は Waters Corporation の登録商標です。MassFragment は Waters Corporation の商標です。
その他すべての商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年10月 720004842JA PDF