[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

CORTECS 2.7 µm カラムおよび ACQUITY QDa 検出器を用いた天然物 Goldenseal の特性解析

Kenneth D. Berthelette, Thomas Swann, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 正確なサンプルの特性解析を可能にする、CORTECS® 2.7 µm カラムによる複雑なマトリックスからの分離
- ACQUITY® QDa® 検出器を使用した質量情報による分析時間 5 分の迅速な化合物同定

ウォーターズのソリューション

CORTECS C_{18}+ カラム

Alliance® HPLC

Empower® 3 CDS

LCMS 品質証明マキシマムリカバリーバイアル

ACQUITY QDa 検出器

キーワード

Alliance HPLC、CORTECS C_{18}+、
Goldenseal、ACQUITY QDa 検出器、天然物

はじめに

天然の植物由来のサプリメントは、肉体的不調の治療に広く使用されています。サンプルの原産地や加工工程によって、含有する天然成分の数や種類、濃度が異なります。数え切れないほどの原料から正確にサンプルの特性解析を行えることは、サプリメントの品質を管理する上で非常に有用です。しかしサンプルが複雑でまた多様であることから、分析のスピードを犠牲にしない、カラム効率の高いカラムが必要になります。CORTECS 2.7 µm カラムは、背圧を低減しながら高いピークキャパシティを実現できるソリッドコアパーティクルを充塡し、従来の HPLC での使用に最適なカラムです。CORTECS 2.7 µm カラムを用いることで天然由来の混合物分析をより簡単におこなうことができます。

Goldenseal はカナダ南部とアメリカ北部に自生する植物で、古くから、消化や粘膜、胆汁分泌のほか様々な身体機能をサポートするために使用されてきました。本アプリケーションでは、異なる４社の製造先、異なる 2 種類の採取部位、異なる 2 種類の製剤マトリックスの、計 5 種類の Goldenseal をサンプルとして分析しました。この様に様々なサンプルを分析した目的は、それぞれのサンプル間での違いや全てのサンプルに共通して存在する化合物があるかどうかを確認するためです。個々のサンプルは Alliance HPLC システムで CORTECS C_{18}+、2.7 µm、3.0 × 50 mm を使用して分析しました。検出には、UV 検出器と、サンプル中のピークについて迅速かつ信頼性が高い質量情報が得られることで、天然物の特性解析においてさらに有用な情報をもたらす ACQUITY QDa 検出器を使用しました。

実験方法

LC条件

システム： Alliance

カラム： CORTECS C_{18}+、2.7 µm、
3.0×50 mm（P/N 186007400）

移動相 A： 0.1% ギ酸水溶液

移動相 B： 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエント： 7-30%B; 0-5 min
30-7%B; 5-5.1 min
7%B; 5.1-6.1 min

流速： 1.0 mL/min

カラム温度：30℃

検出（UV）： 300 nm

ACQUITY QDa 検出器の設定：
ESI+ モード、
フルスキャン：150 -1250 amu

注入量： 1.0 µL

サンプルバイアル：
LCMS 品質証明マキシマム
リカバリーバイアル
（P/N 600000670CV）

データ管理：Empower 3 CDS

サンプル調製

カプセルサンプル[1]

カプセルから取り出した 20 mg の粉末サンプルを 10 mL 遠沈管に入れ、0.1% ギ酸含有 90% メタノール水溶液 2.5 mL を加えました。サンプルは 15 分間超音波処理し、4000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄みを別のバイアルに移しました。抽出はさらに 3 回行い、抽出液は 0.1 µm ナイロンフィルターでろ過して分析に供しました。

液体サンプル

液体の Goldenseal 溶液を 2 滴、0.1% 含有の 90：10　メタノール：アセトニトリル溶液 10 mL に加え、0.1 µm ナイロンフィルターでろ過して分析に供しました。

結果および考察

特性解析のために、5 種類の市販の Goldenseal サンプルを入手しました。表 1 はそれぞれのサンプルの採取部位と形状をまとめたものです。

サンプル	部位	形状
Goldenseal Liquid	根	液体
Goldenseal Herb	茎、花、葉	カプセル
Goldenseal Root	根	カプセル
Goldenseal Extract	根	カプセル
Goldenseal	根茎 / 根	カプセル

表 1. 今回の実験で用いた 5 種類の Goldenseal サンプル一覧

サンプル調製後、分析したサンプルから UV と質量データを得ました。図 1 は 5 種類のサンプルにおけるフルスケールの分析結果です。

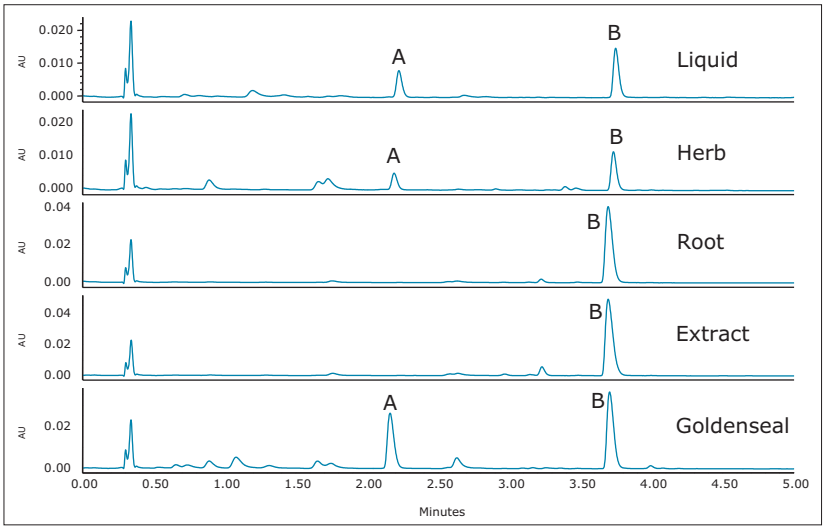

図 1. CORTECS C_{18}+、2.7 µm、3.0 × 50 mm カラムによる、5 種類の Goldenseal サンプルの分析結果（検出：UV 300 nm）。化合物 A と B が主成分であることが示唆される。この分析における最大背圧は 2600 psi。

図 2 は、サンプル中の低濃度成分を示すために拡大したクロマトグラムです。

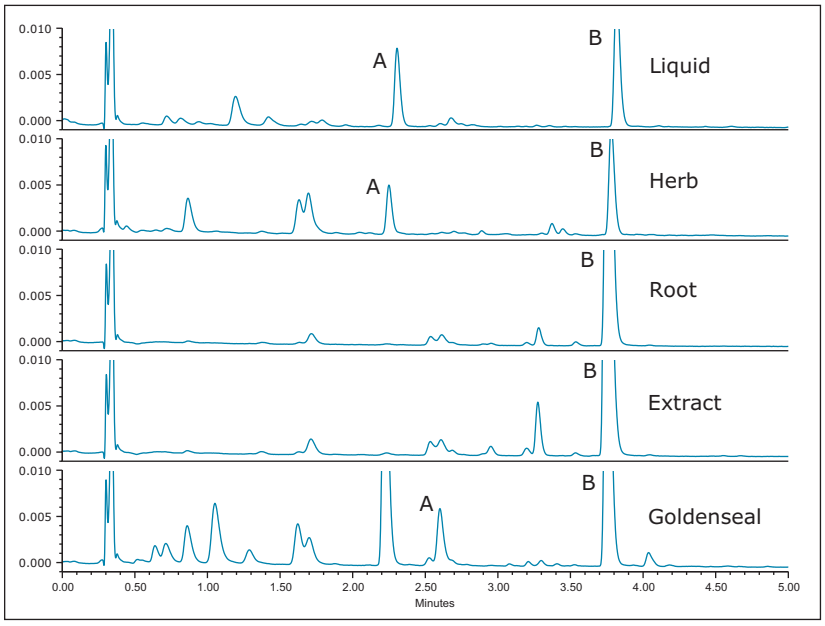

図 2. 図 1 から 5 種類のサンプルの UV クロマトグラムを拡大したもの

カラム効率の高い CORTECS カラムで分析して得られた UV クロマトグラムから、異なる 5 種類のサンプルで顕著な違いがあることが示されました。ピーク B の強度は 0.04 - 0.02 AU と異なり、これは即ちサンプル毎で特定の化合物の含有量が異なることを示唆しています。さらなるサンプルの特性解析には、さらに多くの情報が必要となります。そのため、ACQUITY QDa のマススペクトルデータを検証し、文献から得られた Goldenseal のデータと比較しました [2]。その結果、7 種のアルカロイドが同定されました（表 1 ならびに図 3 を参照）。

化合物	質量（M+H）
Dihydro Berberine	338.1
Canadine	340.3
Berberine	336.1
Isocorypalmine	370.1
Methyl Hydrastine	398.4
Hydrastine	384.1
Palmatine	352.2

表 2. 同定されたアルカロイドと文献で示された質量データ一覧

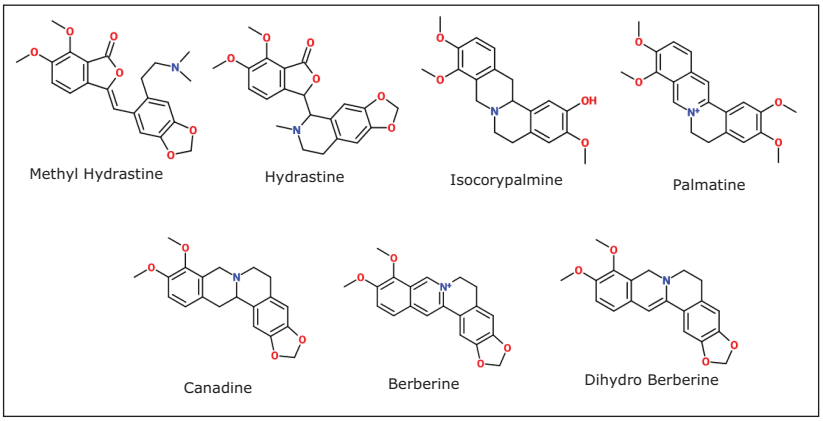

図 3. 同定されたアルカロイドの構造

UV クロマトグラムで見られたいくつかのピークは ACQUITY QDa 検出器によって同定されました。液体サンプルでは最も多くピークが同定され、表 2 で示した 7 種類全ての化合物が存在していました。それ以外のサンプルでは、それぞれ 2 つ以上のピークが同定されました。Berberine は、最も豊富に含まれる構成成分で、全てのサンプルに存在する唯一の成分でした。図 4 は抽出イオンクロマトグラム（EIC）による液体サンプルのピーク同定結果を示しています。

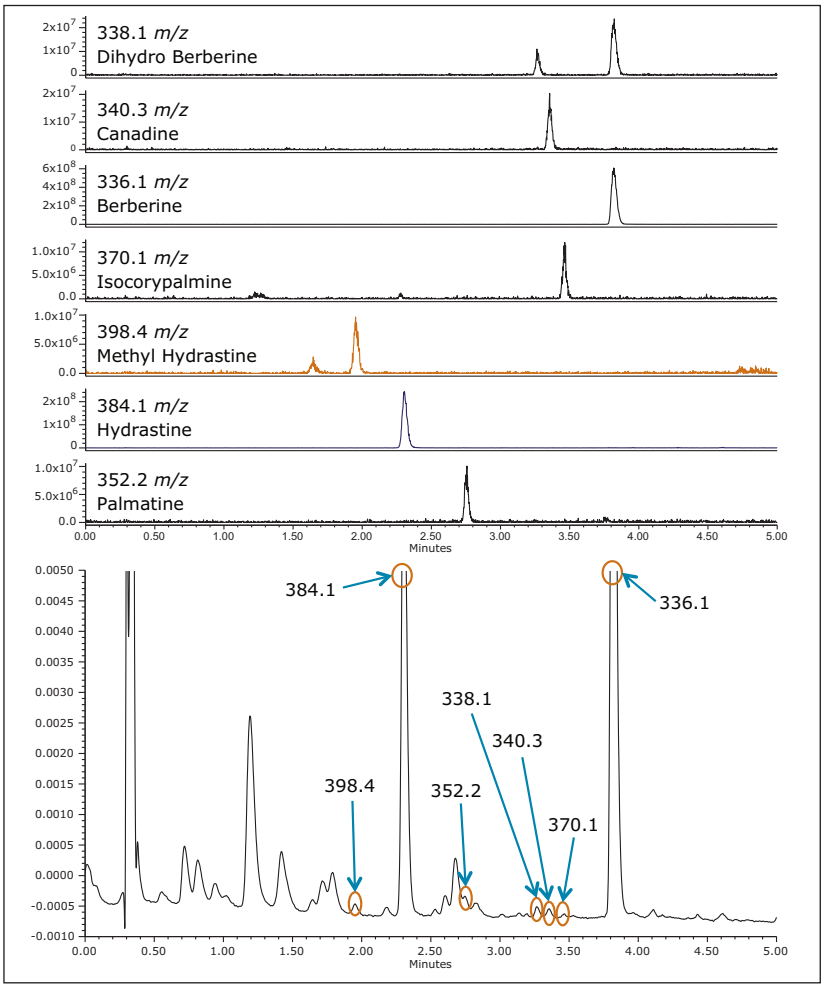

図 4. m/z 値による Goldenseal 液体サンプルの UV ピーク同定

ACQUITY QDa 検出器によって、2 つの主要成分のピーク（図 1 ならびに 2 におけるピーク A と B）はそれぞれ Hydrastine と Berberine と同定されました。それ以外の 5 成分も同定され、UV クロマトグラムのピークとリンクさせました。全く同じ成分組成のサンプルは 1 つもなく、つまり各分析結果はそれぞれの Goldenseal サンプルの特性を示す一種の”フィンガープリント（指紋）”を表しています。このようなフィンガープリントは、採取部位の違いだけでなく、異なる製造業者の Goldenseal の比較においても有用です。CORTECS 2.7 µm カラムの高いカラム効率により、Goldenseal のような複雑なサンプルの迅速分析が可能となります。UV によるデータを ACQUITY QDa 検出器で得られたデータと組み合わせることで、それぞれのサンプルについて、最小限の労力で有益な情報が得られる、十分な特性解析が可能となります。

結論

天然由来の成分分析とその特性解析は、サンプルそのものが複雑であることから困難な場合が多くあります。本アプリケーションで紹介している Goldenseal の様な複雑なサンプルの特性解析では、より速く信頼性の高いデータを得ることが非常に重要になります。CORTECS C_{18}+ 2.7 µm カラムを使用することで、複雑な分離を容易に達成できます。CORTECS 2.7 µm カラムは、従来の HPLC システム耐圧の範囲で分析しながら、高いカラム効率を提供します。この最新カラムテクノロジーと新しい質量検出テクノロジー（ACQUITY QDa）を組み合わせることで、5 種類の Goldenseal サンプルについてシンプルな 5 分間の分離で、7 種類の化合物を同定しました。

参考文献

1. Avula, B *et al*. Quantitative Determination of Alkaloids from Roots of Hydrastis canadensis L. and Dietary Supplements Using UltraPerformance Liquid Chromatography with UV detection. *Journal of AOAC International*. Vol 95 (2012) 5:1398–1405.
2. Pillai, M *et al*. LC-MS Based Workflows for Qualitative and Quantitative Analysis of Homeopathic Preparation of Hydrastis canadensis. *Chromatographia* (2014) 77: 119–131.

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、CORTECS、Alliance、Empower、ACQUITY、QDa および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年2月 720005229JA PDF