

HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 8 報)

—ウコン中の総クルクミノイドについて—

Study on shortening of analysis time in high performance liquid chromatography.VIII.

— Study on quantification of total Curcuminoids of Curcumaе rhizoma—

大根谷 章浩	小太郎漢方製薬株式会社	堀井 周文	クラシエ製薬株式会社
Akihiro DAIKONYA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	Chikafumi HORII	Kracie Pharma, Ltd.
奥野 康之	株式会社廣貫堂	田中 啓介	クラシエ製薬株式会社
Yasuyuki OKUNO	Kokando Co., Ltd.	Keisuke TANAKA	Kracie Pharma, Ltd.
野本 有沙	株式会社廣貫堂	菊池 菜々香	第一薬品工業株式会社
Arisa NOMOTO	Kokando Co., Ltd.	Nanaka KIKUCHI	Daiichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd.
横田 洋一	富山県薬事研究所		
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research		

緒 言

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要があるため、1 検体当たりの分析時間の短縮化が求められている。これまで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に使用する ODS カラムを第十六改正日本薬局方 (JP 16) 等の公定書で汎用される粒径 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm のカラム (以下、150 mm カラム) から粒径 3 μm 、内径 4.6 mm、長さ 75 mm のカラム (以下、75 mm カラム) に変更することで、分析時間の短縮化を図ってきた¹⁻⁷⁾。ウコン中の総クルクミノイドは、JP16 に記載されている分析法においてクルクミンの保持時間は約 11 分とされている。しかしながら、保持時間で約 70 分付近にも夾雑ピークが検出されるため、1 検体あたりの分析時間は非常に長く、分析時間の短縮化が望まれる。本研究ではウコン中の総クルクミノイドに着目し、分析時間の短縮を目的に検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬・材料

局方生薬試験用 (定量用) クルクミン Lot KPR3636 (和光純薬工業)

局方一般試験用 デメトキシクルクミン Lot AWQ5385 (和光純薬工業)

局方一般試験用 ビスデメトキシクルクミン Lot AWJ4558 (和光純薬工業)

日局ウコン (栃本天海堂、高砂薬業、松原粉末薬品より入手した。それぞれウコン①、②、③と記載)

2. 溶液調製

- システム性能溶液： クルクミン約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 50 mL とし クルクミン原液とした。デメトキシクルクミン及びビスデメトキシクルクミン約 2 mg ずつを精密に量り、クルクミン原液 10 mL に溶かしてシステム性能溶液とした。
- 標準溶液： クルクミン原液 5 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 25 mL とし、標準溶液とした。
- 試料溶液： JP16 ウコンの定量法の項に従い調製した。

3. HPLC 分析条件

- 検出器： 紫外吸光光度計（測定波長：245 nm 及び 420 nm）
- 移動相： 水／アセトニトリル／酢酸（100）混液（56：43：1）
- カラム温度： 40 °C
- 流量： 毎分 1.0 mL
- 注入量： 10 µL

実験 I：カラムの選定

分析時間短縮化の検討に用いる 75 mm カラムの選定を目的として、システム性能溶液、標準溶液および試料溶液に対し、150 mm カラムを用い、1 社で分析を行った。使用したカラムを Table 1 に示す。保持時間、シンメトリー係数、理論段数および分離度を評価項目として検討を行った。分離度はビスデメトキシクルクミンとデメトキシクルクミン及びデメトキシクルクミンとクルクミンのピークから算出した。また、ウコン中の総クルクミノイド含量についても評価した。

Table 1 実験 I に使用した 150 mm カラム

カラム名	メーカー名
L-column2 ODS	化学物質評価研究機構
Inertsil ODS - 3	ジーエルサイエンス
Wakosil - II 5C18HG	和光純薬工業
UnisonUS - C18	Imtakt
YMC - Pack ODS - A A - 302	YMC
YMC - Pack Pro C18	YMC
Develosil ODS - 5	野村化学
Mightysil RP - 18GP	関東化学
TSKgel ODS - 80T _M	東ソー
TSKgel ODS - 80T _S	東ソー

実験Ⅱ：分析時間の短縮化の検討

YMC-Pack Pro C18 の 150 mm カラムを対照カラムとし、実験Ⅰにおいて保持時間、シンメトリー係数、理論段数、分離度を評価し、3種の75 mm カラムを選定した。分離度が良好で入手可能な3種の75 mm カラムを用いて3社で分析を行った。評価項目は保持時間、シンメトリー係数、理論段数、分離度およびシステム再現性とした。

実験結果

実験Ⅰ：カラムの選定

Table 2 に 150 mm カラムにおけるシステム性能溶液の分析結果を示した。いずれのカラムにおいても ビスデメトキシクルクミン (以下、BC と記載) とデメトキシクルクミン (以下、DC と記載) 及び DC とクルクミン (以下、C と記載) の分離度は 2.0 以上と良好であった (Table 2)。実験Ⅰにおいて、各項目を総合的に判断し、また入手可能であった3種の75 mm カラム (Wakosil-II 3C18HG、YMC-Pack ProC18、Develosil ODS-3) を選定した。なお、TSKgel ODS-80T_M 及び 80T_S の 2 本は分離度等が良好であったが、同シリーズで長さ 75 mm、粒径 3 µm のカラムの販売がなかったため本試験では選定をしなかった。

Table 2 150 mm カラムにおけるシステム性能溶液の分析結果 (測定波長 245 nm)

カラム名	保持時間 (min)	シンメトリー 係数	理論段数	分離度 (BC/DC)	分離度 (DC/C)
L-column2	11.01	1.26	12814	3.80	3.75
Inertsil ODS-3	17.49	1.05	9186	3.21	3.20
Wakosil-II 5C18HG	10.72	0.99	11412	3.68	3.67
UnizonUS-C18	15.21	0.86	11977	3.38	3.37
YMC-Pack ODS-A	12.69	0.97	12963	3.55	3.52
YMC-Pack ProC18	14.40	0.96	12862	3.96	3.98
Develosil ODS-5	13.21	1.11	10275	3.27	3.26
Mightysil RP-18GP	11.63	0.74	7468	2.62	2.73
TSKgel ODS-80T _M	15.20	1.06	13681	3.77	3.84
TSKgel ODS-80T _S	15.16	1.03	15096	4.20	4.23

保持時間、シンメトリー係数及び理論段数はクルクミンのピークより求めた。

試料溶液においては、いずれのカラムにおいても BC、DC 及び C のピーク周辺に夾雑ピークを認めた。Fig. 1 に Wakosil-II 5C18HG (粒径 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm) のクロマトグラムの一例を示した。夾雑ピークは隣接し、移動相の溶媒組成変更による分離も困難であることが予想された。そのため、日本薬局方技術情報⁸⁾のウコンの項を参考に、測定波長 420 nm において分析を試みた結果、測定波長 245 nm で認められた夾雑ピークは消失し、分析可能であると考えられた。

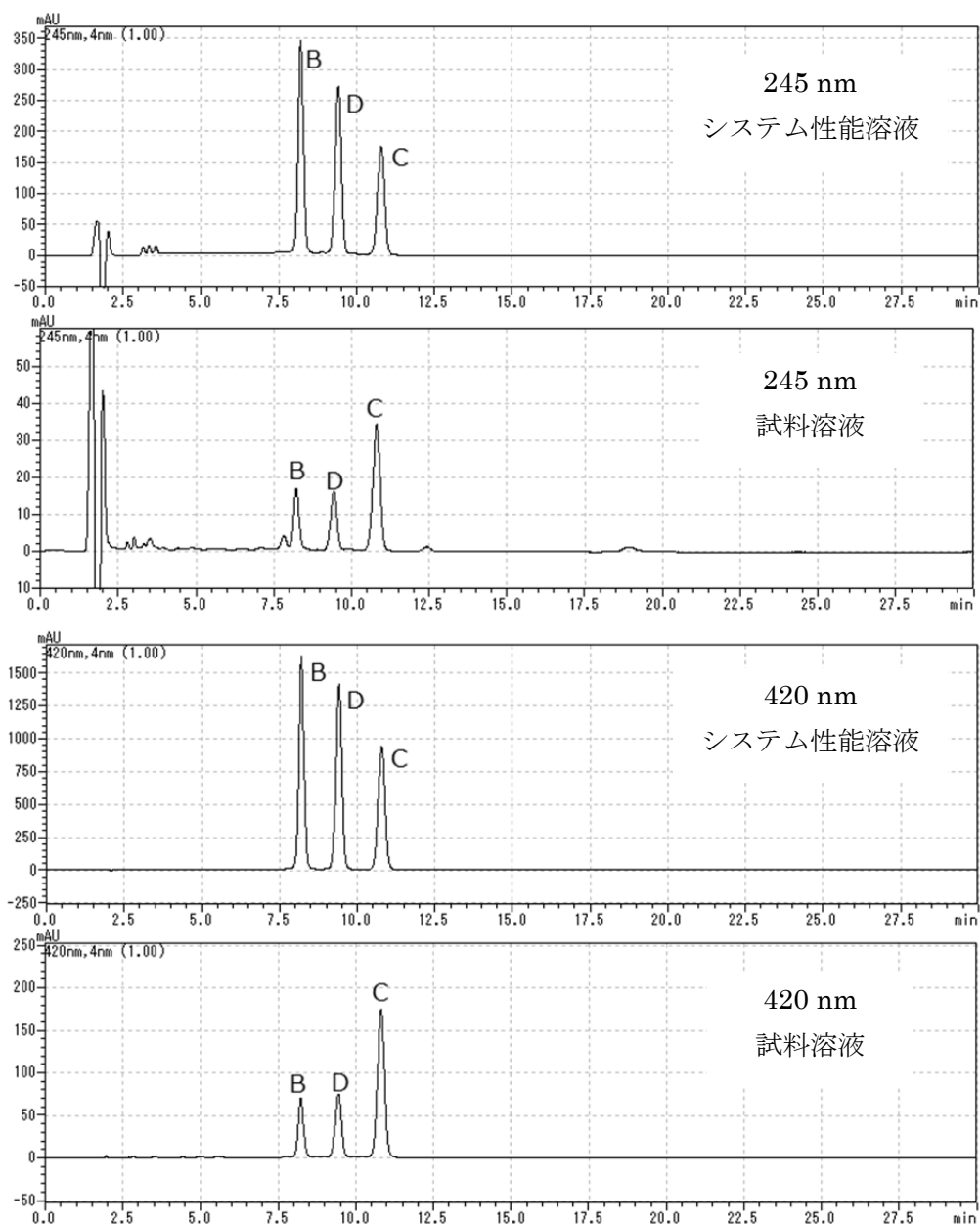


Fig. 1 Wakosil-II 5C18HG (粒径 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm) のクロマトグラム (上から検出波長 245 nm システム性能溶液、試料溶液、検出波長 420 nm システム性能溶液、試料溶液、B : ビスデメトキシクルクミン、D : デメトキシクルクミン、C : クルクミン)

同一試料溶液について、測定波長を 245 nm 及び 420 nm でそれぞれ測定し、総クルクミノイドの定量値を比較した (Table 3)。測定波長 420 nm では、245 nm と比較して総クルクミノイドの定量値は少し小さくなるという結果を示した。また、相対標準偏差は小さいことから、定量値のバラつきが改善されることがわかった。クロマトグラム及び定量値の結果より、分析時間の短縮化の検討に用いる測定波長を 420 nm と設定することとした。それに伴い、C のみを標準とし、モル吸光係数比を DC 及び BC のピーク面積に乗じて総クルクミンの含量を算出していたが、測定波長を変更したことにより、C、DC 及び BC 各標準物質によりそれぞれ定量値を算出し、合計することで総クルクミノイドの含量を算出することとした。

Table 3 測定波長 245 nm 及び 420 nm におけるウコン中の総クルクミノイドの定量値

測定波長	試料	ウコン中の総クルクミノイドの平均値 (%)	相対標準偏差 (%)
245 nm	ウコン①	1.71	4.45
	ウコン②	1.56	4.03
	ウコン③	2.68	3.24
420 nm	ウコン①	1.51	1.59
	ウコン②	1.44	1.59
	ウコン③	2.50	2.43

データは 150 mm カラム (10 種) の平均値

実験 II : 分析時間の短縮化の検討

Table 4 に選定した 3 種類の 75 mm カラムのシステム標準溶液の分析結果を示した。尚、対照カラムには YMC-Pack ProC18 (粒径 5 µm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm) を用いた。総クルクミノイドの定量にあたり、3 種類全ての 75 mm カラムにおいて、C、DC 及び BC が約 0.01 - 0.1 mg/mL の濃度範囲において、直線性を示すことを確認した。選定した 75 mm カラムの分離度は BC と DC 及び DC と C で 2.0 以上であり、良好な分離を示した。150 mm カラムから 75 mm カラムへカラムを変更することにより、理論段数は対照カラムよりも小さくなったものの、システム再現性の値は小さくなり、再現性が良くなることがわかった。C、DC 及び BC の各目的成分の保持時間は約 2/3 から半分程度に短縮されることがわかった。また、測定波長を JP16 記載の 245 nm から日本薬局方技術情報を参考にした 420 nm に変更することで、目的成分 (C、DC 及び BC) に隣接する夾雑ピークだけでなく、目的成分の後ろに検出されていた夾雑ピークも消失することがわかった (Fig. 2)。

Table 4 システム標準溶液の分析結果 (150 mm 対照カラム及び 75 mm カラム)

カラム名	サイズ	保持時間 (min)			圧力 (MPa)	理論段数		
		BC	DC	C		BC	DC	C
YMC -Pack ProC18 (対照カラム)	4.6×150 mm 粒径 5 μm	10.1	11.5	13.0	8.1	11197	11905	12338
YMC - Pack ProC18	4.6×75 mm 粒径 3 μm	5.9	6.8	7.8	7.3	6144	6144	7252
Wakosil- II 3C18HG		4.7	5.3	6.1	6.2	4628	5205	5716
Develosil ODS - 3		4.9	5.6	6.4	7.2	4278	4710	5118

カラム名	サイズ	シムトリー係数			分離度		システム再現性		
		BC	DC	C	BC/DC	DC/C	BC	DC	C
YMC - Pack ProC18 (対照カラム)	4.6×150 mm 粒径 5 μm	0.91	0.91	0.92	3.45	3.49	0.69	0.75	0.95
YMC - Pack ProC18	4.6×75 mm 粒径 3 μm	0.93	0.93	0.93	2.78	2.89	0.29	0.16	0.18
Wakosil - II 3C18HG		0.94	0.91	0.89	2.31	2.43	0.12	0.12	0.14
Develosil ODS - 3		1.12	1.10	1.08	2.19	2.21	0.31	0.20	0.24

(結果は分析した 3 社における平均値)

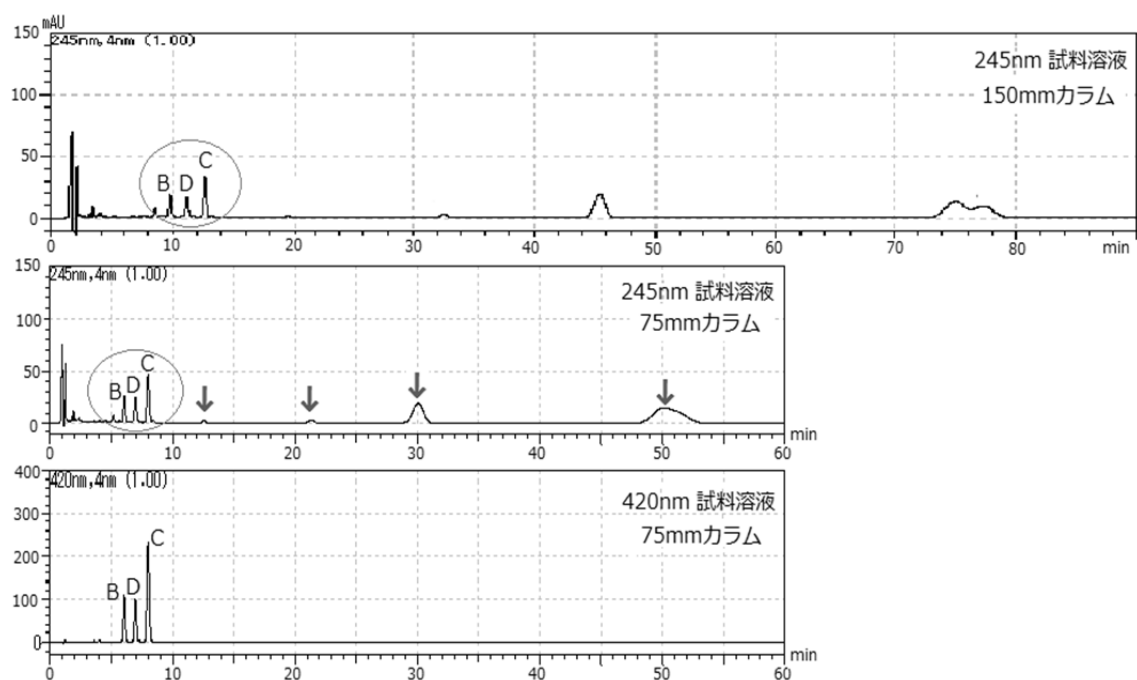


Fig. 2 試料溶液における各分析条件のクロマトグラム (YMC-Pack Pro C18 カラムを使用、B : ビスデメトキシクルクミン、D : デメトキシクルクミン、C : クルクミン)

Table 5 に対照カラムと 3 種類の 75 mm カラムの総クルクミノイド定量結果をまとめた。分析時間の短縮化の検討において、JP16のウコンの項の記載されている分析条件をもとに、測定波長を 420 nm に変更してウコンの総クルクミノイドを定量した。いずれの 75 mm カラムにおいても、総クルクミノイドの定量値は対照カラムと同等の値を示すことが認められた。標準偏差や RSD の値も良かった。A 社、B 社、C 社の室間再現性においてもバラつきは小さいことがわかった。

Table 5 対照カラム (150 mm) 及び 75 mm カラムの総クルクミノイド定量結果

対照カラム (YMC-Pack ProC18)	総クルクミンの含量(%)			平均(%)	標準偏差	RSD
	A 社	B 社	C 社			
ウコン①	1.48	1.44	1.48	1.47	0.019	1.29
ウコン②	1.42	1.37	1.41	1.40	0.022	1.54
ウコン③	2.41	2.35	2.42	2.39	0.031	1.29

Wakosil-II 3C18HG	総クルクミンの含量(%)			平均(%)	標準偏差	RSD
	A 社	B 社	C 社			
ウコン①	1.52	1.44	1.49	1.48	0.033	2.22
ウコン②	1.45	1.39	1.40	1.41	0.026	1.86
ウコン③	2.49	2.35	2.37	2.40	0.062	2.57

YMC-Pack ProC18	総クルクミンの含量(%)			平均(%)	標準偏差	RSD
	A 社	B 社	C 社			
ウコン①	1.48	1.45	1.46	1.46	0.012	0.85
ウコン②	1.43	1.39	1.41	1.41	0.016	1.16
ウコン③	2.42	2.37	2.42	2.40	0.024	0.98

Develosil ODS-3	総クルクミンの含量(%)			平均(%)	標準偏差	RSD
	A 社	B 社	C 社			
ウコン①	1.49	1.44	1.48	1.47	0.022	1.47
ウコン②	1.43	1.39	1.40	1.41	0.017	1.21
ウコン③	2.45	2.36	2.39	2.40	0.037	1.56

考 察

今回、ウコン中の総クルクミノイドの分析時間の短縮を目的として、150 mm カラムから 75 mm カラムへ変更した結果、目的成分の保持時間が短縮されることがわかった。また、測定波長を 245 nm から 420 nm に変更することで、目的成分に近接する夾雑ピークだけでなく、目的成分の後ろに検出されていた夾雑なピークも消失することがわかり、1 分析あたりの分析時間の短縮化が可能であることがわかった。対照カラムと総クルクミノイドの定量値も同等の値を示したことから定量性も認められた。これらの結果より、75 mm カラムを使用し、測定波長に 420 nm を用いることにより、ウコン中の総クルクミノイドの分析時間の大幅な短縮化と移動相溶媒の削減が可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 永井喜美ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.28、pp. 28–34 (2009) .
- 2) 安藤英広ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 2 報)
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.29、pp. 23–30 (2010) .
- 3) 堀井周文ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 3 報)
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.30、pp. 31–43 (2011) .
- 4) 中林佐知栄ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 4 報)
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.31、pp. 61–69 (2012) .
- 5) 前田典子ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 5 報)
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.32、pp. 19–27 (2013) .
- 6) 野本有沙ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 6 報)
－生薬成分について－ 家庭薬研究 No.33、pp. 19–27 (2014) .
- 7) 堀井周文ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 (第 7 報)
－無コウイ大建中湯エキスの[6]－ショウガオールについての基礎的検討－
家庭薬研究 No.34、pp. 25–30 (2015) .
- 8) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編、日本薬局方技術情報 2011、(株)じほう、東京、pp. 801–803 (2011) .