

# Application News

## No. L469A

高速液体クロマトグラフィー  
High Performance Liquid Chromatography

### Nexera-e およびフォトダイオードアレイ 検出器 SPD-M30A を用いた葛根湯の分析(1)

Analysis of Kakkonto by Nexera-e and SPD-M30A Photodiode Array Detector (Part 1)

葛根湯（かっこんとう）は発汗促進作用や、消炎、鎮痛効果があり、風邪、頭痛、肩こりなどに効果があるといわれています。葛根、麻黄、甘草、芍薬などよりなる方剤で、多くの有効成分を含み、代表的なものとしては、エフェドリン、グリチルリチン酸、桂皮酸などが知られています。生薬では、品質管理などの目的で多成分を同定する必要がある場合があり、複雑な成分を相互分離するためには、包括的 2 次元液体クロマトグラフ Nexera-e の利用が有効です。

一般に、包括的 2 次元液体クロマトグラフィーでは、1 次元目と 2 次元目に異なる分離モードを選択してその分離選択性の差異によって、それぞれの次元の単独分析では分離困難であった成分の分離を改善します。ここでは、1 次元目に逆相中性条件によるセミマイクロスケールの分離、2 次元目には逆相酸性条件による超高速分離を組み合わせ、主に pH による選択性の違いを利用した包括的 2 次元分離を試みました。生薬類は比較的極性の大きな成分を多く含む場合が多いことから、pH 条件の設定は分離の最適化に重要なパラメータと考えられます。代表的な事例として、グリチルリチン酸 (Fig. 1 内の赤矢印で示す) の定量を行いました。

Y. Watabe

### ■ オートグラジエントプログラム機能による分離改善効果

Improved Separation by Auto-Gradient Program Function

1 次元目でグラジエント分離を行った場合、2 次元目に導入される画分の溶媒組成は 1 次元目のグラジエントに応じて変化します。その組成変化が 2 次元目における分離に、溶媒効果として影響し、その結果、ピーク形状の劣化、定量精度の低下を招く場合があります。その効果を低減するため、2 次元目グラジエントの初期濃度、最終濃度を経時的に変化させることが有効であり、この 2 次元目のグラジエントプログラムを 1 次元目のグラジエントプログラムと、分析時間などの設定から、自動的に作成する機能がオートグラジエントプログラム機能です。Fig. 1 左には、下方緑色に示す 2 次元目のグラジエントパターンが一定の条件、右には 2 次元目のグラジエントの初期、最終濃度を 1 次元目のグラジエントプログラムに応じて変化させた場合のプロットを示します。左右のプロットの青枠部分の拡大である赤枠内中心部で分離の改善が確認できました。

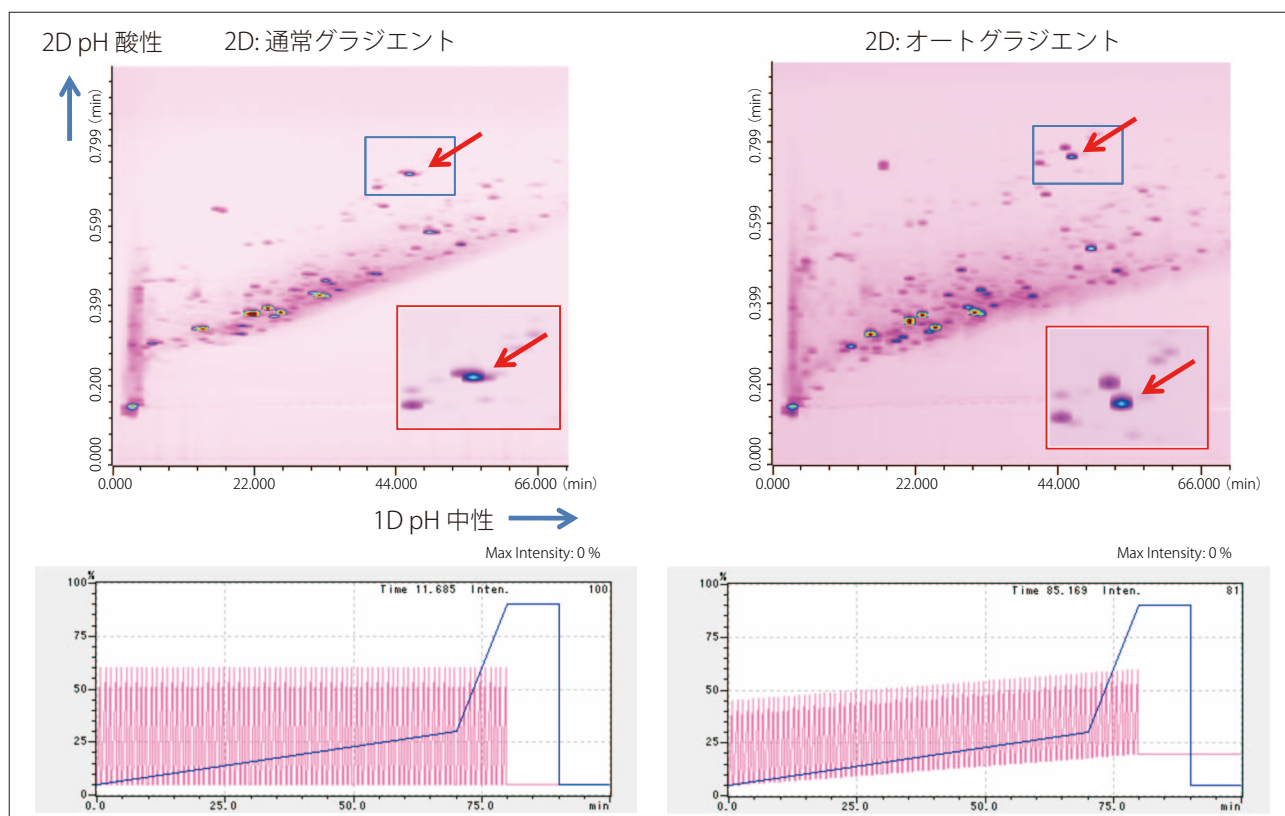


Fig. 1 葛根湯（市販漢方薬）のオートグラジエント機能の有無による包括的 2 次元分離比較  
Comprehensive-2D Separation of Commercial Kakkonto (Traditional Chinese Medicine) Product Obtained with/without  
"Auto-Gradient Program Function"

## ■葛根湯主成分グリチルリチン酸のピーク再現性および定量

### Repeatability Test of Peak Retention Time and Peak Area, and Quantitation of Glycyrrhizic Acid in Kakkonto

Table 1 に分析条件を示します。1次元目には中性りん酸緩衝液、2次元目には酸性りん酸緩衝液を用いて逆相×逆相による分離を試みました。また試料の前処理条件は Fig. 2 に示しました。

葛根湯抽出液では、薬効成分の一つであるグリチルリチン酸 (Fig. 1 赤矢印) が UV254 nm で検出されました。Fig. 3 に 50 - 1000 mg/L の範囲で、4 濃度の標準品により得られた検量線を示します。Table 2 に該当部分のピーク体積に相当する数値 (blob 面積) の 5 回繰り返し再現性 (%RSD) と、トータルおよび 2 次元目分離それぞれの保持間再現性、得られた検量線の寄与率 (R<sup>2</sup>) を示します。定量結果は試料濃度として、608.4 mg/L と計算されました。

Table 1 測定条件  
Analytical Conditions

1D Colum	: Shim-pack XR ODS II (100 mm L. × 1.5 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	A: 10 mM (sodium) phosphate buffer pH=6.8 B: acetonitrile
Flow Rate	: 0.05 mL/min
Time Program	: B Conc. 5 % (0 min) → 30 % (70 min) → 90 % (80 min) → 90 % (90 min) → 5 % (90.1 min) → STOP (110 min)
Column Temp.	: 40° C
Injection Vol.	: 2 μL
Loop Vol.	: 50 μL (Modulation time: 60 sec)
2D Column	: Phenomenex Kinetex XB-C18 (50 mm L. × 3 mm I.D., 2.6 μm)
Mobile Phase	A: 10 mM (sodium) phosphate buffer pH=2.6 B: acetonitrile
Flow Rate	: 2 mL/min
Time Program	Without Auto-gradirnt: B Conc. 5 % (0 min) → 60 % (0.75 min) → 5 % (0.76 min) → STOP (1 min) With Auto-gradient: Initial. B Conc. 5 % (0 min) → 45 % (0.75 min) → 5 % (0.76 min) → STOP (1 min) Final. B Conc. 20 % (0 min) → 60 % (0.75 min) → 20 % (0.76 min) → STOP (1 min) The initial and final B conc. has been changed by a stepwise method
Detector	: SPD-M30A Photo diode array detector (standard cell, wave length=254 nm)

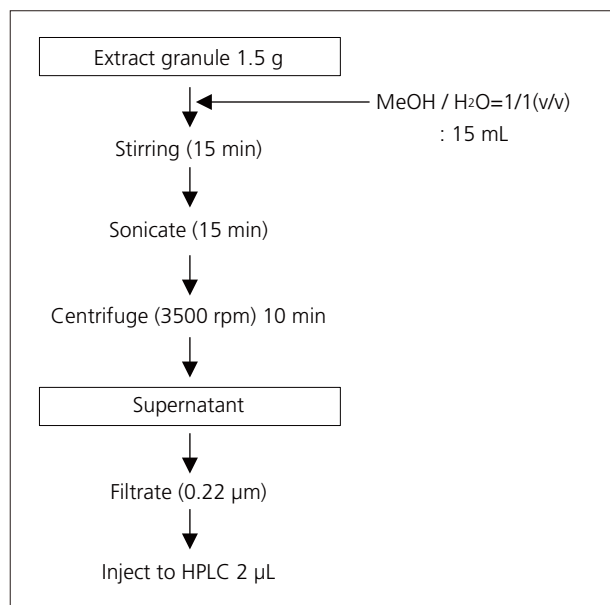


Fig. 2 試料前処理  
Sample Preparation

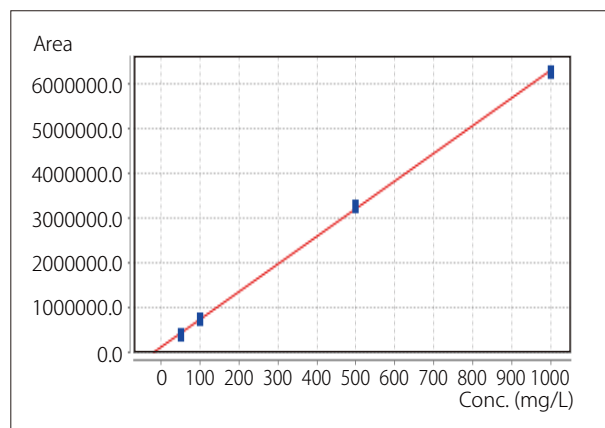


Fig. 3 グリチルリチン酸の直線性  
Calibration Curve of Glycyrrhizic Acid

Table 2 グリチルリチン酸に対する繰り返し 5 分析の再現性と 50 - 1000 mg/L における直線性  
Repeatability of 5 Replicate Analyses in %RSD and Linearity of 50-1000 mg/L for Glycyrrhizic Acid

Compound	Total retention time	Retention time (2D)	Area	R squared
Glycyrrhizic acid	0.007	0.37	5.4	0.999778

A 改訂版発行: 2015年3月  
初版発行: 2014年8月

株式会社 島津製作所 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。