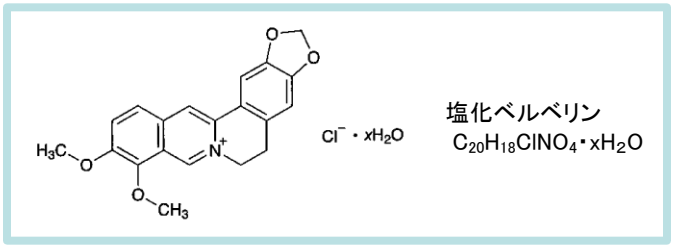
■UHPLCによる三黄片中の塩化ベルベリンの測定例

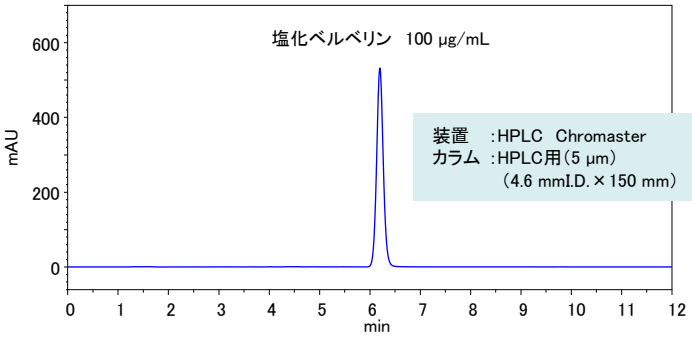
生薬とは、植物や動物、鉱物などの自然界にあるものでなんらかの薬効を持っているとして、体質の改善や病気の治療に利用されてきたものを指します。生薬の一例として、常緑の多年草オウレンの根茎や、落葉高木キハダの樹皮を乾燥したオウバクなどが挙げられます。これらには薬効成分として塩化ベルベリンなどのアルカロイド類が含まれています。また生薬を複数組み合わせて処方する薬を、一般的に漢方薬と言います。
今回は中国漢方薬の中から三黄片を取り上げ、その有効成分である塩化ベルベリンの測定をおこないました。
分析条件は中国薬典(2010年版)に従い、流量など一部変更を加えました。HPLCにHPLC用カラム(5 μm)を接続して測定した場合と、UHPLCにUHPLC用カラム(1.9 μm)を接続して測定した場合を比較しました。

(DADを接続した例です。)
(オプション、お客様準備品が含まれています。)

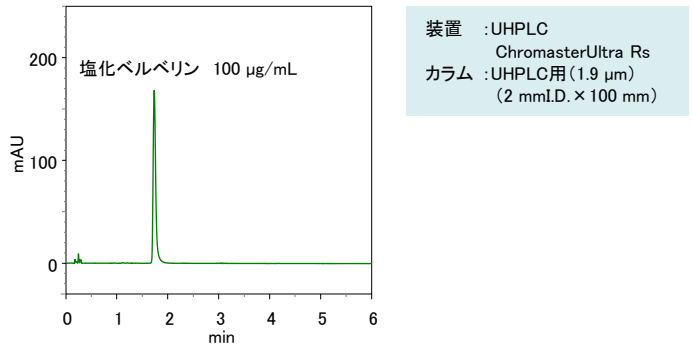


【塩化ベルベリン構造式】

■塩化ベルベリン標準試料測定例

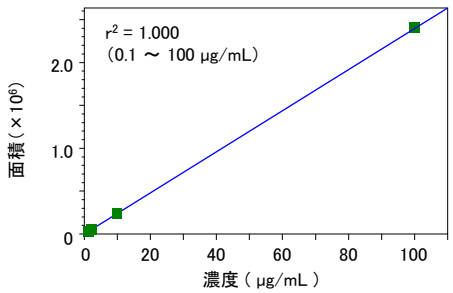


＜HPLC測定条件＞
カラム : LaChrom C18 (5 μm)4.6 mm I.D.×150 mm
溶離液 : アセトニトリル/水=1/1(v/v)
(ただし水1Lに対しリン酸二水素カリウム 3.4g、ラウリル硫酸ナトリウム 1.7gを加える)
流量 : 1.0 mL/min
カラム温度 : 25 ℃
検出波長 : UV265 nm
注入量 : 10 μL



＜UHPLC測定条件＞
カラム : LaChromUltra Ⅱ C18 (1.9 μm)2 mm I.D.×100 mm
溶離液 : アセトニトリル/水=1/1(v/v)
(ただし水1Lに対しリン酸二水素カリウム 3.4g、ラウリル硫酸ナトリウム 1.7gを加える)
流量 : 0.8 mL/min
カラム温度 : 25 ℃
検出波長 : UV265 nm(DAD)
注入量 : 1 μL

■塩化ベルベリン標準試料の直線性と繰り返し再現性(UHPLC条件)



【塩化ベルベリン 直線性】

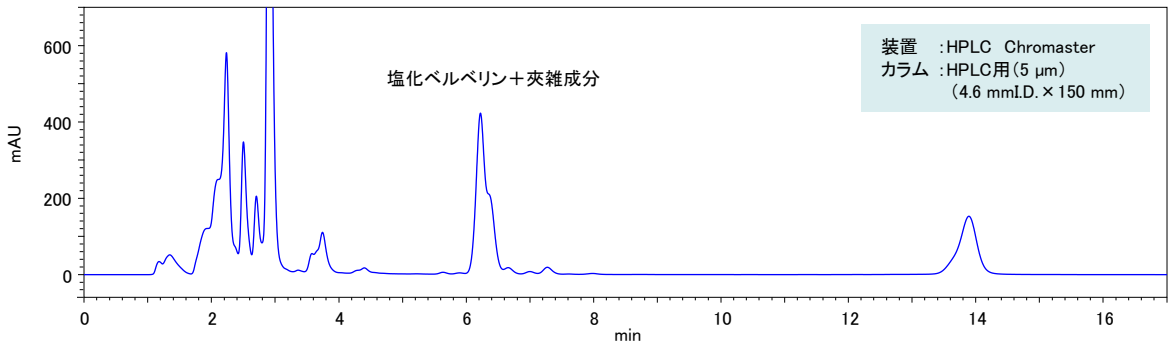
	塩化ベルベリン(100 μg/mL)	
	保持時間(min)	面積値
平均	1.734	2355833
%RSD	0.09	0.09

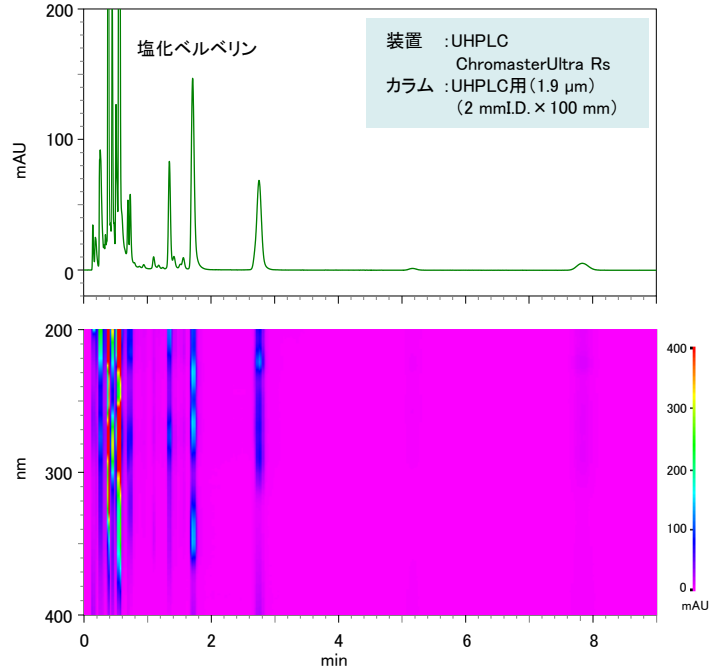
【塩化ベルベリン 再現性(n=5)】

塩化ベルベリンは、HPLCにHPLC用カラム(5 μm)を接続して測定した場合、保持時間約 6.1分に対し、UHPLCにUHPLC用カラム(1.9 μm)を接続して測定した場合は保持時間約1.7分と、約3.6倍の高速化ができました。UHPLC条件での直線性や再現性も良好な結果が得られました。

■UHPLCによる三黄片中の塩化ベルベリンの測定例

■三黄片中の塩化ベルベリン測定例





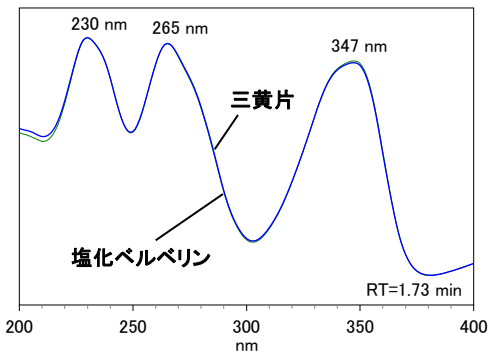
＜HPLC測定条件＞

カラム	:	LaChrom C18 (5 μm) 4.6 mm I.D.×150 mm
溶離液	:	アセトニトリル/水=1/1(v/v) (ただし水1Lに対しリン酸二水素カリウム 3.4g、 ラウリル硫酸ナトリウム 1.7gを加える)
流量	:	1.0 mL/min
カラム温度	:	25 ℃
検出波長	:	UV265 nm
注入量	:	10 μL

＜UHPLC測定条件＞

カラム	:	LaChromUltra Ⅱ C18 (1.9 μm) 2 mm I.D.×100 mm
溶離液	:	アセトニトリル/水=1/1(v/v) (ただし水1Lに対しリン酸二水素カリウム 3.4g、 ラウリル硫酸ナトリウム 1.7gを加える)
流量	:	0.8 mL/min
カラム温度	:	25 ℃
検出波長	:	UV265 nm(DAD)
注入量	:	1 μL

■スペクトルによる確認(UHPLC条件)



【検出されたピークと塩化ベルベリン標準試料のスペクトル】

■三黄片の前処理

＜試料の前処理＞

試料　10錠
↓
粉砕
↓
秤量　0.1 g
← メタノール/塩酸 = 500/1　20 mL
超音波　30 min
↓
ろ過
→ 初流 2mL廃棄
分析試料

三黄片を前処理して測定しました。塩化ベルベリン溶出後も夾雑成分が溶出するので、HPLCでは約16分、UHPLCでは約9分の分析時間が必要です。
HPLCにHPLC用カラム(5 μm)を接続して測定した場合、塩化ベルベリンと夾雑成分が分離できませんでした。これに対し、UHPLCにUHPLC用カラム(1.9 μm)を接続して測定すると、塩化ベルベリンのピーク形状から単一ピークと予想できました。検出器にDADを用いているので、スペクトルの形状を標準試料と比較し、単一成分と確認できました。

主な装置構成 : ChromasterUltra Rs DADシステム(6170 バイナリポンプ、6270 オートサンプラ、6310 カラムオーブン、
6430 ダイオードアレイ検出器、オーガナイザ) 6430 DAD用高感度フローセル

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。