

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] - ショーガオール定量法についての基礎的検討－

**Study on shortening of analysis time in high performance liquid
Chromatography.VII.**

- Fundamental study on quantification of [6] - Shogaol in Mukoi - Daikenchuto Extract -

堀井 周文	クラシエ製薬株式会社	竹脇 奈々子	株式会社パナケイア製薬
Chikafumi HORII	Kracie Pharma, Ltd.	Nanako TAKEWAKI	Panakeia Pharmaceutical Co., Ltd.
田中 啓介	クラシエ製薬株式会社	奥野 康之	株式会社廣貫堂
Keisuke TANAKA	Kracie Pharma, Ltd.	Yasuyuki OKUNO	Kokando Co., Ltd.
大根谷 章浩	小太郎漢方製薬株式会社	永井 喜美	株式会社延寿堂
Akihiro DAIKONYA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	Kimi NAGAI	Enjudo Co., Ltd.
古寺 篤子	小太郎漢方製薬株式会社	菊池 菜々香	第一薬品工業株式会社
Atsuko KODERA	Kotaro Pharmaceutical 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り、1 検体当たりの分析時間の短縮化が求められている。これまで当部会では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に使用する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 (以下、150 mm カラムと略す) のカラムから粒径 3 μm 、内径 4.6 mm、長さ 75 mm のカラム (以下、75 mm カラムと略す) に変更することで分析時間の短縮化を図ってきた¹⁻⁸⁾。本年度は、JP 16 に収載されている分析法で保持時間が約 30 分と長く、品質試験の現場においても分析時間の短縮が望まれる無コウイ大建中湯エキスの [6] - ショーガオールの分析に着目し、調製したエキスをを用いて分析時間の短縮化の基礎的な検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 実験 I : カラムの選抜

1) 試薬及び実験材料

局方生薬試験用 [6] - ショーガオール	Lot. AWR3744	和光純薬工業株式会社
局方生薬試験用 [6] - ギンゲロール	Lot. TLL2111	和光純薬工業株式会社
日局ニンジン	Lot. 220106	製造販売元 株式会社延寿堂 発売元 池田屋安兵衛商店
日局サンショウ	Lot. 110512	高砂薬業株式会社
日局カンキョウ*	Lot. 051613	高砂薬業株式会社

*試験成績書より [6] - ショーガオール含量は 0.147%

2) エキスの調製方法 (「医療用漢方エキス製剤の取扱いについて」⁹⁾ を参照にして調製)

無コウイ大建中湯エキス

土瓶に日局サンショウ 4 g、日局ニンジン 6 g、日局カンキョウ 10 g 及び生薬量の 20 倍量とした水 400 mL を加え、蓋がない状態で電気コンロにて約 30 分加熱抽出後、熱時ガーゼろ過を行い 200 mL の抽出液を得た。これを 2 回繰り返して得られた湯剤を合わせ、均一とした後、2 日間真空凍結乾燥を行ったものを無コウイ大建中湯エキスとした。

無コウイ大建中湯カンキョウブランクエキス

土瓶に日局サンショウ 8 g、日局ニンジン 12 g 及び生薬量の 20 倍量とした水 400 mL を加え、蓋がない状態で電気コンロにて約 30 分加熱抽出後、熱時ガーゼろ過を行い 200 mL の抽出液を得た。これを 2 回繰り返して得られた湯剤を合わせ、均一とした後、2 日間真空凍結乾燥を行ったものを無コウイ大建中湯カンキョウブランクエキス粉末 (以下、カンキョウブランクエキスと略す) とした。

3) 標準溶液及び試料溶液

JP 16 無コウイ大建中湯エキスの [6] - ショーガオール定量法の項に従い、上記の試料を用いて、以下の標準溶液及び試料溶液を調製した。なお、調製した標準溶液および試料溶液は各社同一のものを使用した。

[6] - ショーガオール標準溶液

定量用 [6] - ショーガオール約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (3 → 4) に溶かして正確に 100 mL とした。この液 10 mL を正確にとり、薄めたメタノール (3 → 4) を加えて正確に 50 mL とし、標準溶液とした。

[6] - ショーガオール・[6] - ギンゲロール混合標準溶液

[6] - ショーガオール約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (3 → 4) に溶かして正確に 100 mL とした。同様に [6] - ギンゲロールを約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (3 → 4) に溶かして正確に 100 mL とした。これらの液、10 mL ずつを正確にとり、薄めたメタノール (3 → 4) を加えて正確に 50 mL とし、混合溶液とした。

無コウイ大建中湯エキス及びカンキョウブランクエキス試料溶液

エキス粉末約 0.5 g を精密に量り、薄めたメタノール (3 → 4) 50 mL を正確に加えて 15 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。

4) 試験方法

[6] - ショーガオール標準溶液、[6] - ショーガオール・[6] - ギンゲロール混合標準溶液、無コウイ大建中湯エキス及びカンキョウブランクエキス試料溶液に対し、150 mm カラムで 1 社 (A 社) で分析を行った。使用したカラムを Table 1 に示す。評価に当たっては、JP 16 のシステム適合性に従い、再現性、シンメトリ係数および理論段数について確認を行った上で、分離度については、[6] - ショーガオールと [6] - ショーガオールの類縁体である [6] - ギンゲロールとの分離度をこれら 2 種の混合溶液から算出し、さらに無コウイ大建中湯エキスの試料溶液から直前の末同定成分との分離度を算出しカラムの性能を評価した。また、[6] - ショーガオールの含量についても評価した。

Table 1 実験 I に使用したカラム

カラム名	メーカー
Mightysil RP - 8 GP*	関東化学
YMC - Pack C8	YMC
Inertsil C8 - 3	ジーエルサイエンス
L-column C8	化学物質評価研究機構
Develosil C8 - UG - 5	野村化学

* Mightysil RP - 8 GP は日本薬局方技術情報 2011 に記載。

試験条件

検出器： 紫外吸光光度計 (測定波長 225 nm)

カラム温度： 50 °C

移動相： シュウ酸二水和物 0.1 g を水 600 mL に溶かした後、アセトニトリル 400 mL を加える。

流量： 毎分 1.0 mL

注入量： 20 μ L

2. 実験 II：分析時間短縮化の検討

日本薬局方技術情報 2011 に記載されている Mightysil RP - 8 GP の 150 mm カラムを対照カラムとし、実験 I で選抜したカラムの 75 mm カラム (Table 2) を使用し、各社それぞれで分析を行った。評価対象は実験 I と同様であり、分析時間を短縮しても良好に分析が可能であるか評価を行った。

Table 2 分析に用いた 150 mm カラム及び 75 mm カラム

カラム名	サイズ	メーカー
Mightysil RP - 8 GP	4.6 $\times$ 150 mm	関東化学
対照カラム	粒径 5 μ m	
Inertsil C 8 - 3	4.6 $\times$ 75 mm	ジーエルサイエンス
YMC - Pack C 8	粒径 3 μ m	YMC
Mightysil RP - 8 GP		関東化学

分析機器

A 社：L - 7000	(日立ハイテクノロジーズ製)
B 社：LC 20 AD Prominence	(島津製作所製)
C 社：LC 20 AD Prominence	(島津製作所製)
D 社：Alliance @ e2695	(ウォータース製)
E 社：LC 1260 infinity	(アジレントテクノロジーズ製)
F 社：Alliance @ e2695	(ウォータース製)

実験結果

1. 実験 I：カラムの選抜

Mightysil RP - 8 GP の 150 mm カラムにおける分析結果のクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す。保持時間約 32 分に [6] - ショーガオールのパークが認められ、また、カンキョウブランクエキスを試料溶液から [6] - ショーガオールにピークは検出されなかったことから、特異性が確認された。各カラムの分析結果を Table 3 に示した。この結果より、検討を行った 5 種すべてのカラムにおいて 5000 段以上の理論段数と 1.5 以下のシンメトリー係数が得られており、JP 16 のシステム再現性の相対標準偏差も 1.5% 以下を満たし、保持時間や含量に差が無いことを確認した。分離度については [6] - ショーガオールとの類縁体である [6] - ギンゲロールとの分離度、及び [6] - ショーガオール直前の未同定成分との分離度にも問題がないことを確認した。これらの結果から理論段数や直前の未同定成分との分離度が良好な Mightysil

RP - 8 GP、YMC - Pack C 8、Inertsil C 8 - 3 について 75 mm カラムを検討することとした。

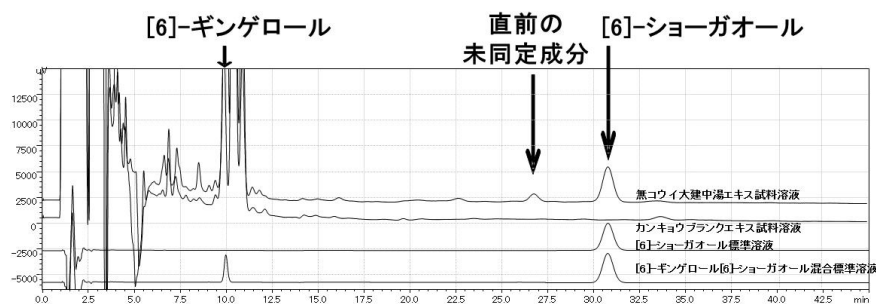


Fig.1 150 mm カラム (Mightysil RP - 8 GP)のクロマトグラム

Table 3 150 mm カラムにおける無コウイ大建中湯エキス中の [6] - ショーガオールの分析結果 (A 社)

カラム名	保持時間 (min)	圧力 (MPa)	相対標準 偏差	シメトリ 係数	理論段数	分離度 ^{a)}	分離度 ^{b)}	含量 (mg/day)
Mightysil RP - 8 GP	31.8	3.9	0.69	0.97	9634	25.5	4.05	0.60
YMC - Pack C 8	28.4	5.1	0.88	1.00	10046	25.1	4.26	0.57
Inertsil C 8 - 3	32.8	2.9	0.54	0.95	8951	23.9	4.31	0.62
L - column C 8	24.1	3.3	0.53	0.87	9245	23.0	3.90	0.60
Develosil C 8 - UG - 5	32.4	4.7	0.10	0.90	6870	21.8	3.47	0.60

^{a)} [6] - ギンゲロールとの分離度を示す。 ^{b)} 直前の未同定成分との分離度を示す。

2. 実験Ⅱ：分析時間短縮化の検討

いずれの 75 mm カラムも、5000 段以上の理論段数と 1.5 以下のシメトリ係数を示し、相対標準偏差も 1.5% 以下を示した。よって、JP 16 のシステム適合性およびシステム再現性を満たすことが判明した。また、[6] - ショーガオールの直前にある未同定成分のピークについて分離度 1.5 以上を満たし、[6] - ギンゲロールとの分離度も実験Ⅰと同様の結果であった。含量についても対照カラムと同じ値であり、定量には問題がないことが確認された (Table 4)。無コウイ大建中湯エキス中の [6] - ショーガオールの含量については対照の 150 mm カラム及び 75 mm カラムのいずれにおいても各社で約 0.6 mg/day であった。

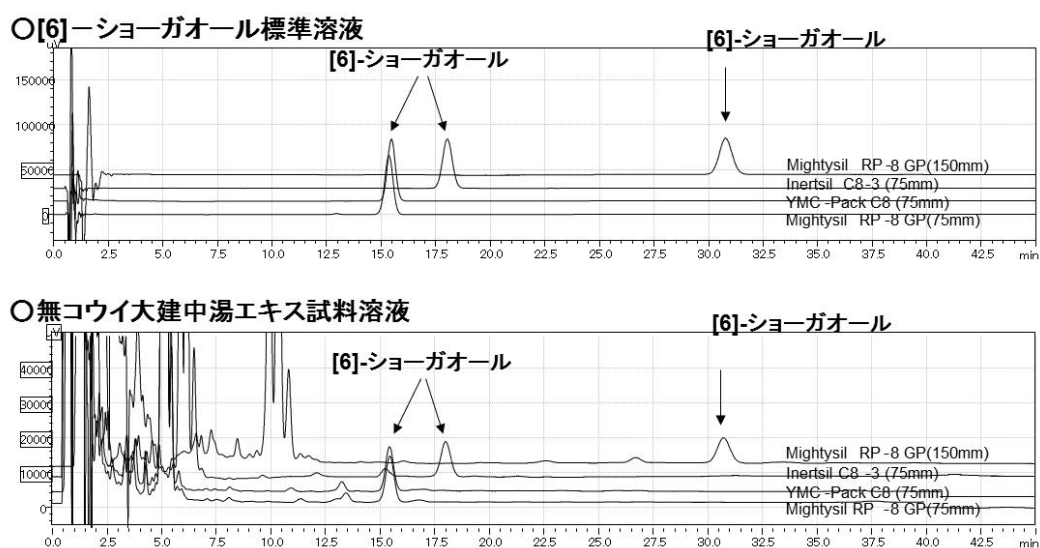


Fig. 2 150 mm と各種 75 mm カラムで [6] - ショーガオールを分析したクロマトグラムの比較

(上：[6] - ショーガオール標準溶液、下：無コウイ大建中湯エキス試料溶液) (B 社)

Table 4 対照カラム及び 75 mm カラムにおける無コウイ大建中湯エキス中の [6] - ショーガオール分析

カラム名	保持時間 (min)	圧力 (MPa)	相対標準偏差	シメトリ 係数	理論 段数	分離度 ^{a)}	分離度 ^{b)}	含量 (mg/day)	分析 担当
Mightysil RP - 8 GP (4.6×150 mm, 5 µm) 対照カラム	30.8	7.0	0.33	1.04	12634	28.4	4.12	0.54	B
	30.3	3.9	0.08	1.03	12164	28.2	4.00	0.61	C
	35.2	7.5	0.02	1.02	11722	28.4	3.83	0.58	D
	29.3	4.7	0.10	1.05	11428	27.0	3.84	0.58	E
	28.3	3.9	0.24	1.03	12077	27.6	3.80	0.62	F
Inertsil C 8 - 3 (4.6×75 mm, 3 µm)	18.0	7.7	0.10	1.02	7225	21.8	3.67	0.57	B
	18.5	4.6	0.14	1.03	7094	21.7	3.60	0.62	C
	20.6	7.3	0.03	1.04	6584	21.2	3.29	0.60	D
	17.4	5.4	0.10	1.04	6754	21.0	3.52	0.61	E
	16.5	4.6	0.18	1.02	6609	20.4	3.19	0.63	F
YMC - Pack C 8 (4.6×75 mm, 3 µm)	15.5	9.1	0.04	1.02	8036	23.1	3.50	0.59	B
	15.4	6.2	0.12	1.03	7905	22.7	3.44	0.61	C
	17.5	7.1	0.02	1.02	7747	22.6	3.34	0.59	D
	15.1	6.9	0.10	1.01	8085	22.9	3.44	0.61	E
	14.0	6.1	0.76	1.02	8140	22.3	3.10	0.62	F
Mightysil RP - 8 GP (4.6×75 mm, 3 µm)	15.5	7.6	0.56	1.03	7751	21.9	3.30	0.60	B
	15.8	4.8	0.05	0.96	6732	21.3	2.79	0.65	C
	20.6	5.8	0.09	0.98	6495	21.0	3.29	0.60	D
	14.7	5.3	0.10	1.00	7425	21.7	2.94	0.61	E
	14.1	4.6	0.28	1.00	7650	21.6	2.75	0.61	F

^{a)} [6] - ギンゲロールとの分離度を示す。 ^{b)} 直前の未同定成分との分離度を示す。

考 察

無コウイ大建中湯エキス中の [6] - ショーガオール分析において、150 mm カラムから 75 mm カラムに変更することにより、分析時間を約半分に短縮することができた。また、それぞれのカラムの特性としては、YMC - Pack C 8 および Mightysil RP - 8 GP は [6] - ショーガオールに対して強く、保持時間の延長傾向が見られた。

なお、無コウイ大建中湯エキス中の [6] - ショーガオールの規格値は、JP 16 で 1.4 mg/day - 4.2 mg/day とされているが、今回の無コウイ大建中湯エキスの定量値は 0.6 mg/day と低い値を示した。本検討で使用したカンキョウの [6] - ショーガオール含量は 0.147% であり、日局カンキョウの規格値 0.1% を満たしていることを考慮すると、この主な原因は、実験で使用了エキス粉末の調製にあたり、20 倍量の水を用いて約 30 分の加熱抽出を行ったことや、2 日間の真空凍結乾燥による [6] - ショーガオールの揮発によるものと考えられた。JP 16 の [6] - ショーガオールの規格に適合するエキスの調製については今後の検討課題ではあるが、今回、このエキスを用いた基礎的検討の結果、良好な含量の再現性が得られたことから、JP 16 の [6] - ショーガオール規格適合エキスについても 75 mm カラムを使用できることが示唆された。

引用文献

- 1) 永井喜美ら：HPLC における六神丸のブフォステロイドの分析(第一報)
家庭薬研究 No.22、23 - 30 (2003).
- 2) 俣野豊ら：HPLC における六神丸のブフォステロイドの分析(第二報)
家庭薬研究 No.22、19 - 26 (2005).
- 3) 永井喜美ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.28、28 - 34 (2009).
- 4) 安藤英広ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 2 報)ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.29、23 - 30 (2010).
- 5) 堀井周文ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 3 報)ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.30、31 - 43 (2011).
- 6) 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)ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.31、61 - 69 (2012).
- 7) 前田典子ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 5 報)ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.32、19 - 27 (2013).
- 8) 野本有紗ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 6 報)ー生薬成分についてー
家庭薬研究 No.33、19 - 27 (2014).
- 9) 厚生省薬務局審査第一、第二課長通知、昭和 60 年 5 月 31 日、薬審二第 120 号 (1985).