

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第9報）

－八味地黄丸エキス・牛車腎気丸エキス中のロガニンの分析－

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

－ Study on analysis of Loganin in Hatimijiogan Extract and Gosyajinkigan Extract －

黒崎 之予	株式会社廣貫堂	堀井 周文	クラシエ製薬株式会社
Yukiyo KUROSAKI	Kokando Co., Ltd.	Chikafumi HORII	Kracie Pharma, Ltd.
奥野 康之	株式会社廣貫堂	小此木 明	クラシエ製薬株式会社
Yasuyuki OKUNO	Kokando Co., Ltd.	Akira OKONOGI	Kracie Pharma, Ltd.
横田 洋一	富山県薬事研究所	大根谷 章浩	小太郎漢方製薬株式会社
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research	Akihiro DAIKONYA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.

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。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¹⁻¹⁰。2013 年度は、JP 16 における定量法で保持時間が 25 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サンシュユ中のロガニンを分析した⁸。本年度はサンシュユのロガニンの分析の応用を考え、八味地黄丸エキスと牛車腎気丸エキスのロガニンの分析時間の短縮を検討した。

実験方法

1. 実験 I : カラムの選抜

1) 試薬及び生薬

試薬及び生薬	Lot.No.	メーカー
局方生薬試験用（定量用・薄層クロマトグラフィー用）ロガニン	Lot. KPF0396	和光純薬工業（株）
日局ジオウ	Lot. 005015007	（株） 栃本天海堂
日局サンシュユ	Lot. 004715003	（株） 栃本天海堂 ロガニン0.76%（試験成績書）
日局サンヤク	Lot. 004915004	（株） 栃本天海堂
日局タクシャ	Lot. 007215002	（株） 栃本天海堂
日局ブクリョウ	Lot. 009515008	（株） 栃本天海堂
日局ボタンピ	Lot. 010015002	（株） 栃本天海堂
日局ケイヒ	Lot. 002815005	（株） 栃本天海堂
日局ブシ末1	Lot. NDA122	三和生薬（株）
日局ゴシツ	Lot. 003715001	（株） 栃本天海堂
日局シャゼンシ	Lot. 005415001	（株） 栃本天海堂

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」¹⁾を参照にして調製）

(1) 八味地黄丸エキス粉末の調製

土瓶にジオウ 5g、サンシュユ 3g、サンヤク 3g、タクシャ 3g、ブクリョウ 3g、ボタンピ 3g、ケイヒ 1g、ブシ末 1g 及び水 440 mL を加え、蓋がない状態で加熱抽出後、熱時ろ過を行い 220 mL の抽出液を得た。これを凍結乾燥し八味地黄丸エキス粉末とした。

(2) 八味地黄丸サンシュユブランクエキス粉末の調製

土瓶にジオウ 5g、サンヤク 3g、タクシャ 3g、ブクリョウ 3g、ボタンピ 3g、ケイヒ 1g、ブシ末 1g 及び水 380 mL を加え、蓋がない状態で加熱抽出後、熱時ろ過を行い 190 mL の抽出液を得た。これを凍結乾燥し八味地黄丸サンシュユブランクエキス粉末とした。

(3) 牛車腎気丸エキス粉末の調製

土瓶にジオウ 5g、サンシュユ 3g、サンヤク 3g、タクシャ 3g、ブクリョウ 3g、ボタンピ 3g、ケイヒ 1g、ブシ末 1g、ゴシツ 3g、シャゼンシ 3g 及び水 560 mL を加え、蓋がない状態で加熱抽出後、熱時ろ過を行い 280 mL の抽出液を得た。これを凍結乾燥し牛車腎気丸エキス粉末とした。

(4) 牛車腎気丸サンシュユブランクエキス粉末の調製

土瓶にジオウ 5g、サンヤク 3g、タクシャ 3g、ブクリョウ 3g、ボタンピ 3g、ケイヒ 1g、ブシ末 1g、ゴシツ 3g、シャゼンシ 3g 及び水 500 mL を加え、蓋がない状態で加熱抽出後、熱時ろ過を行い 250 mL の抽出液を得た。これを凍結乾燥し牛車腎気丸サンシュユブランクエキス粉末とした。

3) 標準溶液及び試料溶液の調製方法

JP 16 八味地黄丸エキス及び牛車腎気丸エキスのロガニン定量法の項に従い、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。

(1) ロガニン標準溶液の調製

定量用ロガニン約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール(1 → 2)に溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とした。

(2) 試料溶液の調製

エキス粉末約 0.5 g を薄めたメタノール (1 → 2) 50 mL で 15 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とした。

4) 試験方法

ロガニン標準溶液、八味地黄丸エキス粉末、八味地黄丸サンシュユブランクエキス粉末、牛車腎気丸エキス粉末及び牛車腎気丸サンシュユブランクエキス粉末試料溶液に対し、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。評価項目は、含量を算出するとともにシステム適合性に従い、再現性、シンメトリー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、各試料溶液のロガニンの直前及び直後の未同定成分との分離度を算出しカラムの性能を評価した。

Table 1 分析に使用した 150 mm カラム

カラム	Lot.No.	販売元
TSKgel ODS-80Ts	0017201	東ソー (株)
Capcell pak C18 UG120	ACAB16345	(株) 資生堂
L-column2 ODS	E4515061-W	(一財) 化学物質評価研究機構
YMC-Pack ODS-A	0415118305 (W)	(株) ワイエムシィ
Wakosil-II 5 C 18 HG	05531	和光純薬工業 (株)
YMC-pack proC18	0415144513 (W)	(株) ワイエムシィ
Capcell pak MG	AKAB02449	(株) 資生堂
Mightysil RP-18 GP	8045691	関東化学 (株)

試験条件

JP 16 「八味地黄丸エキス」及び「牛車腎気丸エキス」のロガニン定量法に準じた。

検出器： 紫外吸光光度計 (測定波長 238 nm)

カラム温度： 50℃

移動相： 水/アセトニトリル/メタノール混液 (55 : 4 : 1)

流量： 毎分 1.2 mL

注入量： 10 μ L

評価項目： 再現性、シンメトリー係数、理論段数、分離度*、含量

*分離度はロガニンのピークとその前後の未同定成分のピークを評価した。

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 TSKgel ODS-80Ts 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 3) を使用し、各社それぞれで分析を行った。評価項目は実験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。

分析機器

A 社：LC 20 AD Prominence (島津製作所製)

B 社：LC-2010AHT (島津製作所製)

C 社：1260 infinity LC (アジレントテクノロジー製)

Table 2 検討に使用した 150 mm カラム及び 75 mm カラム

カラム	サイズ	Lot.No.	販売元
TSKgel ODS-80Ts 対照カラム	4.6×150 mm 粒径 5 μ m	0017201	東ソー (株)
Capcell pak C18 UG120	4.6×75 mm	ARAI01775	(株) 資生堂
Wakosil-II 3 C 18 HG	粒径 3 μ m	SAH8731	和光純薬工業 (株)
Mightysil RP-18 GP		917530	関東化学 (株)

実験結果

1. 実験 I : カラムの選抜

対照カラムである TSKgel ODS-80Ts カラムのクロマトグラムを 150mmカラムのクロマトグラムの一例として Fig 1 に示した。保持時間約 26 分にロガニンのピークが認められ、また、八味地黄丸サンシュユブランクエキス粉末及び牛車腎気丸サンシュユブランクエキス粉末の試料溶液からロガニンの保持時間にピークは検出されなかったことから、特異性があることを確認した。

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。分離度についてはロガニンの直前及び直後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 75 mm カラムでも問題なく分析できると推測するが、その中でも理論段数や直前及び直後の未同定成分との分離度が確保できており、保持時間が短い Capcell pak C18 UG120、Wakosil-II 5 C 18 HG、Mightysil RP-18 GPについて 75 mm カラムを検討することとした。

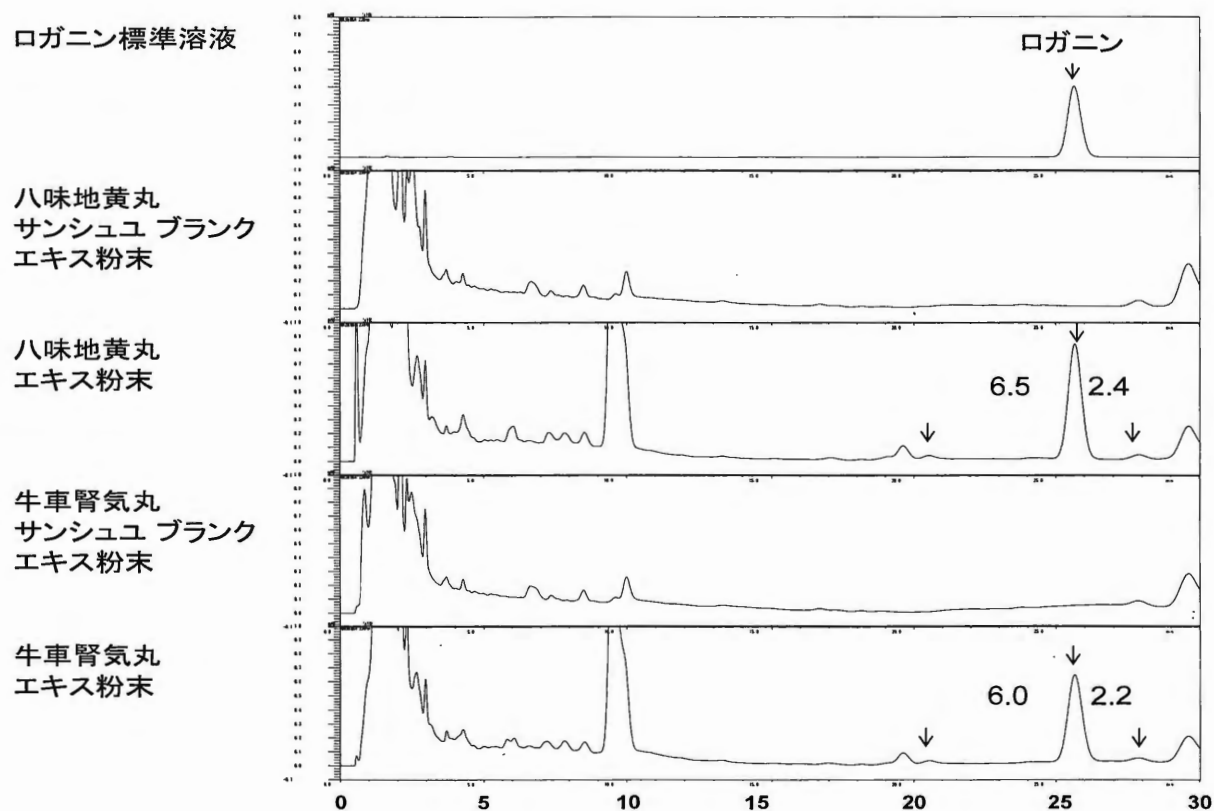


Fig 1 150 mm カラム (TSKgel ODS-80Ts) のクロマトグラム (数値は未同定成分との分離度を示す)

Table 3 150 mm カラムにおける八味地黄丸エキス粉末及び牛車腎気丸エキス粉末のロガニンの分析結果 (A 社)

サンプル	カラム	カラム 長さ (mm)	保持時間 (min)	相対標準 偏差 (%)	分離度 (1) *	分離度 (2) *	理論段数 (段)	シンメ トリー 係数	ロガニン 含量 (mg/day)
八味地黄丸 エキス粉末	TSKgel ODS-80Ts	150	25.7	0.10	6.5	2.4	13061	1.04	13.5
	Capcell pak C18 UG120		16.8	0.49	5.4	1.9	9783	1.07	13.3
	L-Column2		19.2	0.08	5.5	3.2	13376	1.03	13.5
	YMCpack ODS-A		20.3	0.04	7.2	3.2	14266	1.02	13.6
	Wakosil-II 5C18HG		18.1	0.88	5.8	2.5	10590	1.01	13.0
	YMCpack pro C18		23.6	0.19	8.2	4.6	15252	1.04	13.6
	Capcell pak MG		22.9	0.09	5.8	2.4	9867	1.07	13.8
Mightysil RP-18 GP	20.1	0.13	5.9	2.6	12883	1.03	13.6		
牛車腎気丸 エキス粉末	TSKgel ODS-80Ts	150	25.7	0.10	6.0	2.2	11465	1.04	14.9
	Capcell pak C18 UG120		16.8	0.49	5.4	1.9	9749	1.08	14.7
	L-Column2		19.2	0.08	5.5	3.3	12780	1.00	14.6
	YMCpack ODS-A		20.3	0.04	7.1	3.5	14561	1.03	15.0
	Wakosil-II 5C18HG		18.1	0.88	5.7	2.5	10458	1.00	14.5
	YMCpack proC18		23.5	0.19	8.0	4.6	15125	1.03	15.1
	Capcell pak MG		22.9	0.09	5.7	2.5	10206	1.05	14.4
Mightysil RP-18 GP	20.1	0.13	5.8	2.5	12840	1.03	14.9		

*分離度はロガニンのピークとその前後の未同定成分のピークをそれぞれ分離度 (1)、分離度 (2) として評価した。

2. 実験Ⅱ：分析時間短縮化の検討

実験Ⅰで得た 150 mm カラムのクロマトグラム及び実験Ⅱで得た 75 mm カラムのクロマトグラムの比較を Fig 2 に示した。150 mm カラムと 75 mm カラムのクロマトグラムはそれぞれ類似したパターンを示した。

対照カラム及び 75 mm カラムにおける分析結果を Table 4 及び 5 に示した。いずれの 75 mm カラムも、1.5 以下のシンメトリー係数を示し、相対標準偏差も 1.5% 以下を示した。Capcell pak C18 UG120 のみ、1 社で理論段数が 5000 段以下になる結果であったが、それ以外のカラムは 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。75 mm カラムの圧力は、対照の 150 mm カラムと大差なかった。

また、ロガニンの直前及び直後にある未同定成分のピークについてはそれぞれ分離度 1.5 以上を満たし、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 及び 5)。ロガニン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八味地黄丸エキス粉末では約 13.3 mg/day、牛車腎気丸エキス粉末では約 14.7 mg/dayであった。

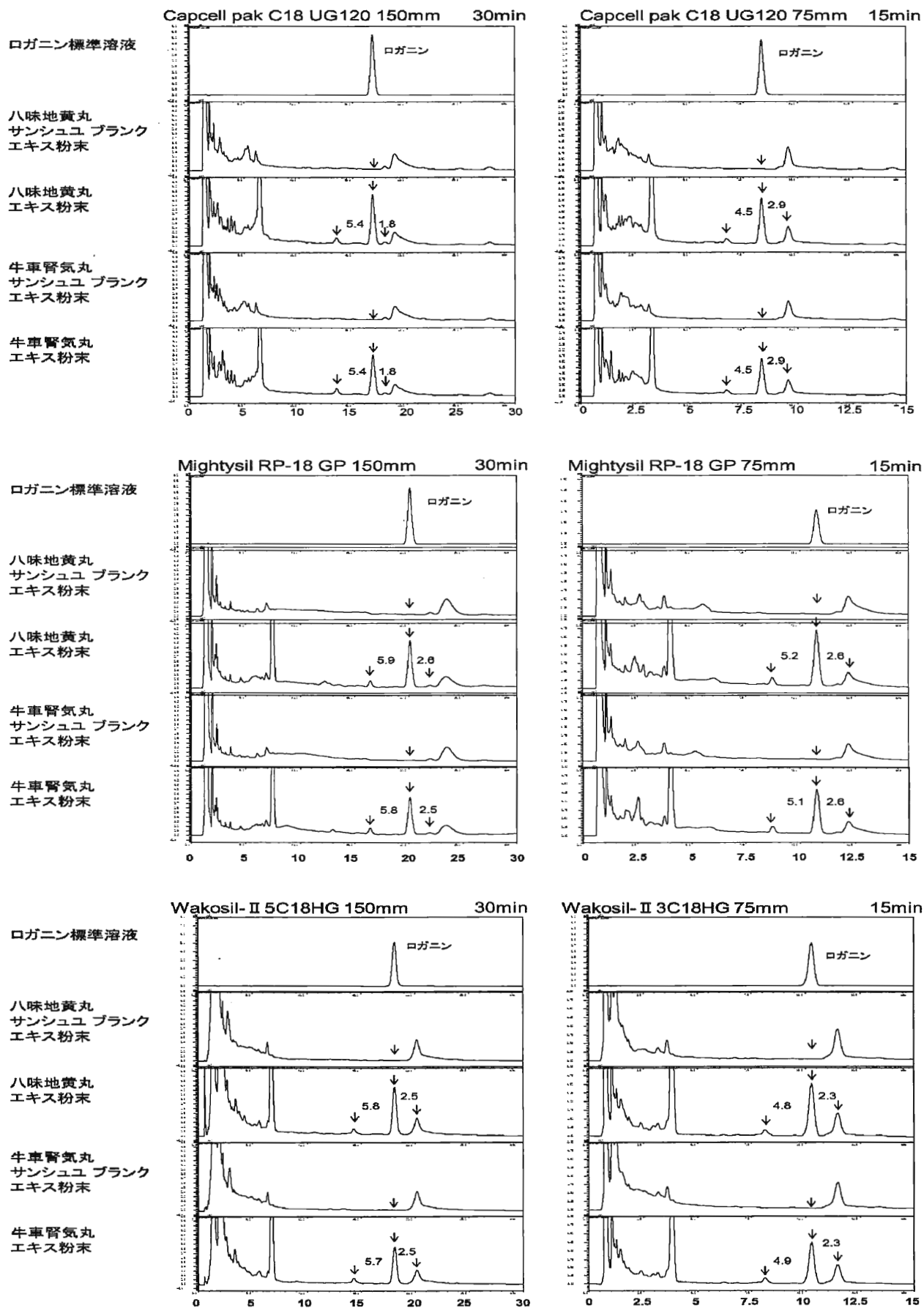


Fig 2 150 mm 及び 75 mm カラムのクロマトグラム (数値は未同定成分との分離度を示す)

Table 4 対照カラム及び 75 mm カラムにおける八味地黄丸エキス粉末のロガニンの分析結果

カラム	保持時間 (min)	圧力 (MPa)	相対標 準偏差 (%)	分離度 (1) *	分離度 (2) *	理論段数 (段)	シンメト リー係数	ロガニン 含量 (mg/day)	ロガニン 含量平均 (mg/day)	分析 担当
TSKgel ODS-80Ts	25.7	8.5	0.10	6.5	2.4	13061	1.04	13.5		A
4.6×150 mm、5 µm	22.1	8.5	0.07	6.3	2.1	12495	1.11	13.4	13.4	B
(対照カラム)	21.9	8.4	0.06	5.3	2.2	9548	1.13	13.3		C
Capcell pak C18 UG120	8.3	7.5	0.18	4.5	2.9	7832	1.08	13.6		A
4.6×75 mm、3 µm	8.4	7.1	0.04	4.3	3.3	7950	0.99	13.7	13.5	B
	8.1	7.2	0.11	2.9	2.5	4620	1.19	13.2		C
Wakosil-II 3 C18 HG	10.3	6.8	0.39	4.8	2.3	7091	0.92	13.2		A
4.6×75 mm、3 µm	10.4	6.5	0.05	4.9	2.6	8708	0.99	13.5	13.2	B
	10.0	6.7	0.21	3.7	2.2	5913	1.13	12.9		C
Mightysil RP-18 GP	10.8	8.5	0.08	5.2	2.6	9580	1.03	13.0		A
4.6×75 mm、3 µm	10.6	8.1	0.02	5.2	2.4	9848	1.01	13.5	13.2	B
	10.5	8.1	0.15	4.0	2.4	6607	1.14	13.1		C

*ロガニンのピークとその直前及び直後の未同定成分のピークとの分離度を、それぞれ分離度 (1)、分離度 (2) として評価した。

Table 5 対照カラム及び 75 mm カラムにおける牛車腎気丸エキス粉末のロガニンの分析結果

カラム	保持時間 (min)	圧力 (MPa)	相対標 準偏差 (%)	分離度 (1) *	分離度 (2) *	理論段数 (段)	シンメト リー係数	ロガニン 含量 (mg/day)	ロガニン 含量平均 (mg/day)	分析 担当
TSKgel ODS-80Ts	25.7	8.5	0.10	6.0	2.2	11465	1.04	14.9		A
4.6×150 mm、5 µm	22.1	8.5	0.07	6.4	2.1	12463	1.11	14.8	14.8	B
(対照カラム)	21.9	8.4	0.06	5.3	2.2	9540	1.13	14.7		C
Capcell pak C18 UG120	8.3	7.5	0.18	4.5	2.9	7570	1.08	14.6		A
4.6×75 mm、3 µm	8.4	7.1	0.04	4.3	3.3	7952	0.99	15.0	14.7	B
	8.1	7.2	0.11	2.9	2.5	4514	1.21	14.5		C
Wakosil-II 3 C18 HG	10.3	6.8	0.39	4.9	2.3	7191	0.92	14.7		A
4.6×75 mm、3 µm	10.4	6.5	0.05	5.0	2.6	8788	0.99	14.9	14.6	B
	10.0	6.7	0.21	3.9	2.2	6030	1.14	14.2		C
Mightysil RP-18 GP	10.7	8.5	0.08	5.1	2.6	9445	1.03	14.5		A
4.6×75 mm、3 µm	10.6	8.1	0.02	5.2	2.3	9841	1.01	14.9	14.6	B
	10.5	8.2	0.15	4.0	2.4	6534	1.15	14.5		C

*ロガニンのピークとその直前及び直後の未同定成分のピークとの分離度を、それぞれ分離度 (1)、分離度 (2) として評価した。

考 察

八味地黄丸エキス粉末及び牛車腎気丸エキス粉末中のロガニンの分析において、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 60% ~ 70% 短縮することができた。また、ロガニンの含量について、対象カラムと 75 mm カラムおける差は見られなかった。

今回選抜した 75 mm カラムは 150 mm カラムで検討した中で保持時間が短く、理論段数、分離度が小さいものであり、カラムの性能としては低いものを選択したが、分析時間の短縮化に成功した。従って、検討したその他の 150 mm カラムについても、75mm に変更することで分析時間短縮化も可能と推測する。

Capcell pak C18 UG120 の 75 mm カラムの結果について、C 社のみ理論段数が 5000 段以下となった。3 社の理論段数の計算に差は無く、カラムの劣化と推測した。カラムを使用した会社の順番は A 社 → B 社 → C 社であることから、A 社にカラムを送付し、再分析を行ったところカラムの理論段数は 5000 段以上であった。これは、C 社が使用した機器が他 2 社と違うメーカーであり、機器の特性による差が原因の 1 つとして推測した。今回の検討では理論段数 5000 を切った場合においても、ロガニンの含量値に差が見られず定量性が保持されているという点でも、75 mm カラムの適用が可能ではないかと考えられた。

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. 24、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 - 生薬成分について -
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） - 生薬成分について -
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） - 生薬成分について -
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） - 生薬成分について -
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） - 生薬成分について -
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） - 生薬成分について -
家庭薬研究 No. 33、19 - 27（2014）。
- 9) 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]
・ ショーガオール定量法についての基礎的検討 - 家庭薬研究 No. 34、25 - 30（2015）。
- 10) 大根谷章浩ら：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 - 家庭薬研究 No. 35、63 - 70（2016）。
- 11) 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）。