

## HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討（第 10 報）

### —JP17「カンゾウ」及び「カンゾウ末」中のグリチルリチン酸の定量法について—

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

Study on quantification of Glycyrrhizic acid in JP17「Glycyrrhiza」and「Powdered Glycyrrhiza」.

金井 恵子	第一薬品工業株式会社	堀井 周文	クラシエ製薬株式会社
Keiko KANAI	Daiichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd.	Chikafumi HORII	Kracie Phama,Ltd.
大根谷 章浩	小太郎漢方製薬株式会社	原井 健司	クラシエ製薬株式会社
Akihiro DAIKONYA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	Kenji HARAI	Kracie Phama,Ltd.
王 文婧	新新薬品工業株式会社	小此木 明	クラシエ製薬株式会社
Bunsei OU	Shinshin Pharmaceutical Co., Ltd.	Akira OKONOGI	Kracie Phama,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。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十七改正日本薬局方（JP17）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。<sup>1-11)</sup>

JP17 において、「カンゾウ」及び「カンゾウ末」のグリチルリチン酸定量法が改正された。JP16 までは移動相として薄めた酢酸（31）を使用し、グリチルリチン酸とその類縁体であるガラクトログリチルリチン酸が分離しないイオン抑制法が採用されていた。しかし、近年のカラムではイオン抑制法においてガラクトログリチルリチン酸とグリチルリチン酸が分離する可能性があることから、JP17 より酢酸アンモニウムと酢酸（100）を使用して、グリチルリチン酸とガラクトログリチルリチン酸を分離させる緩衝液法が採用された。その結果、グリチルリチン酸のみを定量することが可能となり、グリチルリチン酸の含量規格は「2.5%以上」から「2.0%以上」に改定された。<sup>12)</sup>

当部会では、以前にグリチルリチン酸の HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討<sup>5)</sup>を行っているが、JP17 でグリチルリチン酸の定量法が改正されたことから、本年度はグリチルリチン酸とガラクトログリチルリチン酸の分離が要求されるカンゾウのグリチルリチン酸の分析時間短縮化について検討を行った。

## 実験方法

### 1. 実験 I : カラムの選定

#### 1) 装置・カラム

検討に使用した HPLC 装置を Table 1、検討に使用した 150 mm カラムを Table 2 に示す。

Table 1 検討に使用した HPLC 装置

分析担当	α 社	β 社	γ 社	δ 社
装置	LC-2010CHT	LC-20A	Infinity1260	LC-2010CHT
HPLC メーカー	(株)島津製作所	(株)島津製作所	アジレント テクノロジー(株)	(株)島津製作所

Table 2 検討に使用した 150 mm カラム

カラム	ロット	メーカー
Inertsil ODS-3V	1B5162692	ジューエルサイエンス (株)
Wakosil-II 5C18HG	9283	和光純薬工業 (株)
YMCpack ProC18	0415113236(W)	(株)ワイエムシイ
Deverosil ODS-5	1808424	野村化学 (株)
YMCpack ODS-A	0415118305(W)	(株)ワイエムシイ
Mightysil RP-18GP	8045691	関東化学 (株)
Capcell pak C18 UG120	AOAB16345	(株)資生堂
L-column2 ODS	E4515061-W	(一財)化学物質評価研究機構
Capcell pak C18 MG	AKAB02449	(株)資生堂

## 2) 試薬・材料

検討に使用した試薬及び材料について Table 3 に示す。

Table 3 試薬及び材料

試薬・材料	メーカー
日局グリチルリチン酸標準品	(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団
グリチルリチン酸一アンモニウム (分離確認用)	和光純薬工業(株)
日局カンゾウ	A社製、B社製、C社製、D社製の日局カンゾウ (それぞれA社、B社、C社、D社とする)
日局カンゾウ末	A社製、B社製の日局カンゾウ末 (それぞれ、A社、B社とする)

## 3) 標準溶液、試料溶液及びシステム適合性溶液の調製

JP17「カンゾウ」及び「カンゾウ末」のグリチルリチン酸の定量法の項に従い、標準溶液、試料溶液及びシステム適合性溶液を調製した。

グリチルリチン酸標準溶液 : 日局グリチルリチン酸標準品約 25 mg を精密に量り、希エタノールに溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とした。

試料溶液 : 本品の粉末約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、希エタノール 70 mL を加えて 15 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物に希エタノール 25 mL を加え、同様に操作した。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に 100 mL とし、ろ過し、ろ液を試料溶液とした。

システム適合性溶液 : 分離確認用グリチルリチン酸一アンモニウム 5 mg に希エタノール 20 mL を加えて溶かし、システム適合性溶液とした。

## 4) 試験条件

試験条件及びシステム適合性を以下に示す。

### 試験条件

検出器	: 紫外吸光光度計 (測定波長: 254 nm)
移動相	: 酢酸アンモニウム 3.85 g を水 720 mL に溶かし、酢酸(100) 5 mL 及びアセトニトリル 280 mL を加える。
カラム温度	: 40 °C
流量	: 1.0 mL/min
注入量	: 10 µL

### システム適合性

システムの性能	: 分離確認用グリチルリチン酸一アンモニウム 5 mg に希エタノール 20 mL を加えて溶かす。この液 10 µL につき、上記の条件で操作するとき、グリチルリチン酸に対する相対保持時間 0.9 のピークとグリチルリチン酸の分離度は 1.5 以上である。
システムの再現性	: 標準溶液 10 µL につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、グリチルリチン酸のピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

評価項目はシステム性能、システムの再現性を確認した上で、理論段数、シンメトリー係数についても評価した。

## 2. 実験Ⅱ：分析時間の短縮化の検討

### 1) カラム

実験Ⅰにおいて選定した 3 種の 75mm カラムを Table 4 に示した。対照カラムには、実験Ⅰで検討した Inertsil ODS-3V (150 mm) を用いた。

Table 4 選定した 75 mm カラム

カラム	ロット	メーカー
Inertsil ODS-3V	6JI50193	ジーエルサイエンス(株)
Capcell pak C18 UG120	ARAI01826	(株)資生堂
L-column2 ODS	F1620019-W	(一財)化学物質評価研究機構

### 2) 材料

実験Ⅰにおいて選定した材料を Table 5 に示す。

Table 5 選定した材料

材料	メーカー
日局カンゾウ	B社製、C社製の日局カンゾウ (それぞれA社、B社、C社とする)
日局カンゾウ末	A社製の日局カンゾウ末 (A社とする)

### 3) その他

カラム及び材料以外の実験方法は、実験Ⅰと同様である。

## 実験結果

### 1. 実験 I : カラムの選定

分析時間の短縮化の検討に用いる 75 mm カラムの選定を目的として、まず、150 mm カラムを用いてグリチルリチン酸標準溶液及びシステム適合性溶液の分析を行った。尚、分析はαからγの4社で分担して行った。150 mm カラムの分析結果を Table 6、クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す。グリチルリチン酸に対する相対保持時間 0.9 のピークとグリチルリチン酸の分離度及び相対標準偏差は、すべてのカラムにおいて 1.5 以上、1.5% 以下であったことから、システム適合性を満たすことがわかった。保持時間は、Inertsil ODS-3V が 18.32min と最も保持時間が長く、Capcell pak C18 UG120 が 10.30min と最も保持時間が短く、約 8 分の差が認められた。分離度は、L-column2 ODS が 2.32 と最大であり、Capcell pak C18 UG120 が 1.73 と最小であった。シンメトリー係数、理論段数については、すべてのカラムで 1.5 以下、5000 段以上を示した。分析時間の短縮化の検討に用いる 75 mm カラムは、分離度が最も大きい L-column2 ODS、最も小さい Capcell pak C18 UG120、保持時間が最も長く標準カラムである Inertsil ODS-3V の 3 種を選定した。

150mm カラムで分析した日局カンゾウ及び日局カンゾウ末中のグリチルリチン酸の含量を Table 7 に示す。グリチルリチン酸含量を比較した結果、カラムメーカーの違いによる含量の差はほとんどみられなかった。今回、検討に使用した日局カンゾウ 4 種、日局カンゾウ末 2 種のグリチルリチン酸含量は 2.3%~5.5% であり、2.0% 以上であることから、JP17 の含量規格に適合することを確認した。分析時間の短縮化に用いる日局カンゾウ及び日局カンゾウ末は、グリチルリチン酸含量が最も高い B 社、最も低い C 社、カンゾウ末としてグリチルリチン酸含量が最も高い A 社の 3 種を選定した。

Table 6 グリチルリチン酸標準溶液及びシステム適合性溶液の分析結果 (150 mm カラム)

カラム名	保持時間 (min)	シンメトリー係数	理論段数	分離度	相対保持時間 (min)	RSD (%)	カラム圧 (MPa)	分析担当
Inertsil ODS-3V	18.32	1.26	6388	2.15	0.90	0.04	4.4	α 社
Wakosil-II 5C18HG	11.63	1.21	8586	1.95	0.92	0.37	6.0	
YMCpack ProC18	13.17	1.13	10184	1.92	0.93	0.14	8.1	
Deverosil ODS-5	13.83	1.27	7841	1.93	0.92	0.06	6.1	β 社
YMCpack ODS-A	14.38	1.28	11240	2.28	0.92	0.23	7.4	
Mightysil RP-18GP	11.63	1.29	8885	2.07	0.92	0.10	5.9	γ 社
Capcell pak C18 UG120	10.30	1.27	6156	1.73	0.92	0.15	5.2	
L-column2 ODS	12.81	1.28	9755	2.32	0.91	0.03	6.8	δ 社
Capcell pak C18 MG	14.48	1.16	7832	2.10	0.91	0.02	6.4	

保持時間、シンメトリー係数、理論段数はグリチルリチン酸標準溶液から算出した。

分離度及び相対保持時間はシステム適合性溶液から算出した。

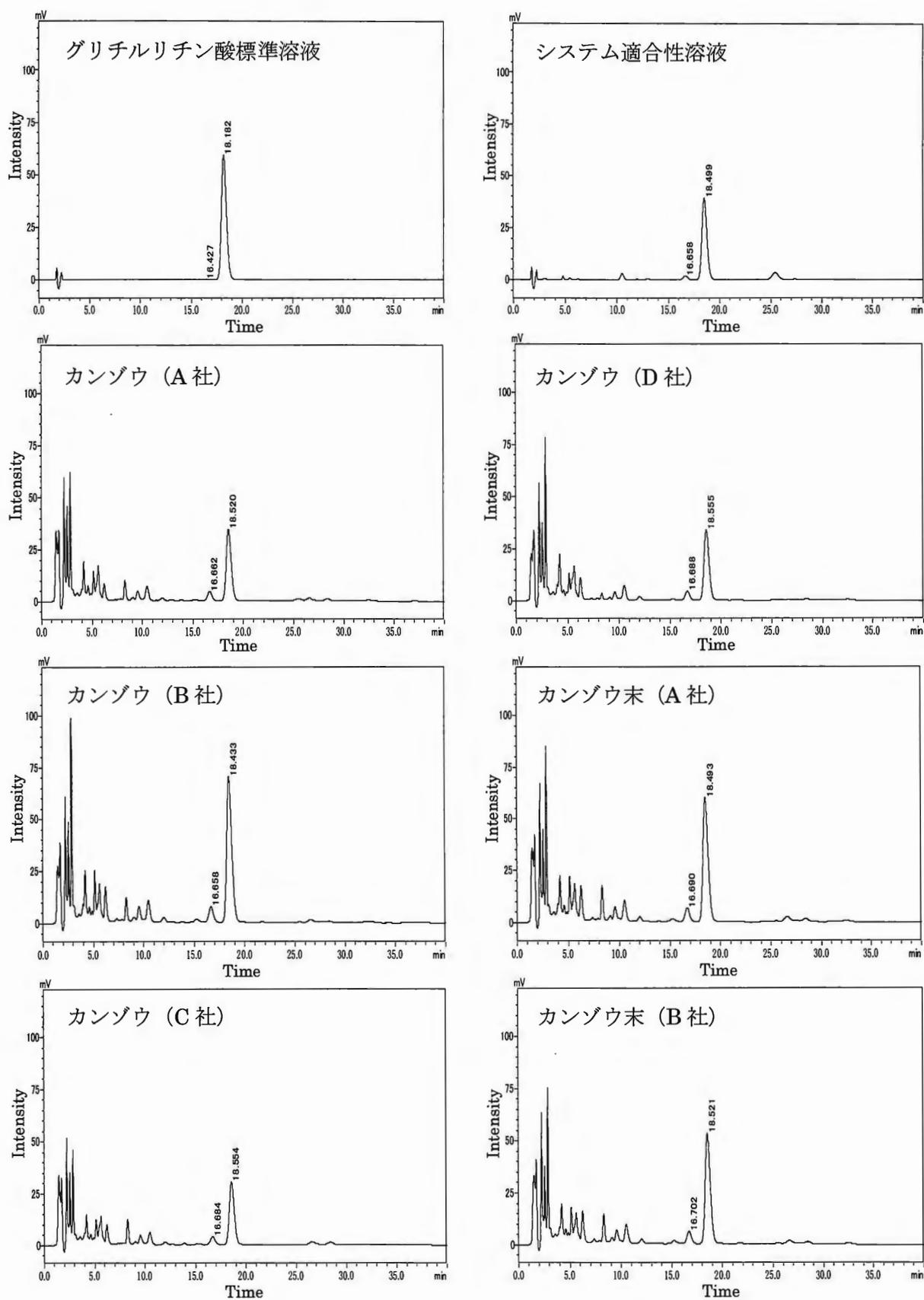


Fig.1 150 mm カラムのクロマトグラムの一例 (Inertsil ODS-3V、α社)

Table 7 日局カンゾウ及び日局カンゾウ末のグリチルリチン酸含量 (%) (150 mm カラム)

カラム名	日局カンゾウ				日局カンゾウ末		分析 担当
	A社	B社	C社	D社	A社	B社	
Inertsil ODS-3V	2.58	5.43	2.30	2.64	4.52	4.09	α社
Wakosil-II 5C18HG	2.60	5.46	2.32	2.68	4.56	4.12	
YMCpack ProC18	2.60	5.44	2.31	2.68	4.55	4.10	
Deverosil ODS-5	2.62	5.48	2.33	2.69	4.58	4.14	β社
YMCpack ODS-A	2.62	5.48	2.33	2.69	4.59	4.14	
Mightysil RP-18GP	2.60	5.46	2.31	2.69	4.57	4.13	γ社
Capcell pak C18 UG120	2.61	5.47	2.33	2.66	4.56	4.12	
L-column2 ODS	2.60	5.44	2.31	2.68	4.55	4.10	δ社
Capcell pak C18 MG	2.60	5.44	2.31	2.68	4.55	4.10	

## 2. 実験Ⅱ：分析時間の短縮化の検討

実験Ⅰにおいて3種の75mmカラムを選定し、Inertsil ODS-3V (150 mm) を対照カラムとして分析時間短縮化の検討を行った。分析は、αからδの4社で順番に行った。グリチルリチン酸標準溶液及びシステム適合性溶液の分析結果をTable 8に示す。いずれの75mmカラムも分離度及び相対標準偏差が1.5以上、1.5%以下を示し、JP17「カンゾウ」及び「カンゾウ末」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わかった。理論段数は、150mmカラムと比較すると低下するが、5000段以上を示した。保持時間は、対照カラムと比較して1/2～1/3に短縮された。シンメトリー係数は150mmカラムに比べて大きくなり、ピーク形状が悪化した。

75mmカラムによるカンゾウ及びカンゾウ末中のグリチルリチン酸の含量をTable 9、クロマトグラムの一例をFig. 2に示す。対照カラムのグリチルリチン酸の含量と比較すると、75mmカラムの分析から算出された定量値はカラムメーカーの差によらず、差はみられなかった。

## 考 察

JP17「カンゾウ」及び「カンゾウ末」のグリチルリチン酸の分析において、150mmカラムから75mmカラムに変更することにより、含量、相対保持時間及び分離度に影響なく、グリチルリチン酸の保持時間は1/2～1/3になり、分析時間の短縮化に成功した。また、グリチルリチン酸の含量について、対照カラムと75mmカラムおける差はみられなかった。今回、検討した75mmカラムは150mmカラムで検討した中でカラムの分離度が最も大きいL-column2 ODS、最も小さいCapcell pak C18 UG120、保持時間が最も長く、標準カラムであるInertsil ODS-3Vの3種を選定した。分離度や保持時間の差が大きい3種の75mmカラムを選定したが、いずれも分析時間の短縮化が可能であり、その他のメーカーの75mmカラムにおいても分析時間短縮化が十分可能であると推測された。

Table 8 グリチルリチン酸標準溶液及びシステム適合性溶液の分析結果 (75 mm カラム)

カラム名	保持時間 (min)	シンメ トリー 係数	理論 段数	分離度	相対保 持時間 (min)	RSD (%)	カラム圧 (MPa)	分析 担当
Inertsil ODS-3V (4.6φ×150 mm、 5μm) 対照カラム	17.17	1.26	7447	2.19	0.90	0.05	4.0	α社
	19.29	1.27	7681	2.31	0.90	0.14	4.3	β社
	16.71	1.23	7186	2.15	0.90	0.12	5.0	γ社
	17.64	1.24	7320	2.26	0.90	0.10	4.8	δ社
Inertsil ODS-3V (4.6φ×75 mm、 3μm)	8.98	1.48	5664	1.99	0.91	0.06	5.8	α社
	10.44	1.57	5851	2.07	0.91	0.03	6.1	β社
	8.80	1.45	5224	1.91	0.91	0.08	6.8	γ社
	9.22	1.53	5793	2.07	0.90	0.03	6.8	δ社
Capcell pak C18 UG120 (4.6φ×75 mm、 3μm)	5.90	1.42	6085	1.70	0.92	0.06	6.0	α社
	6.51	1.49	6339	1.79	0.92	0.12	6.3	β社
	5.68	1.39	6410	1.71	0.92	0.16	7.0	γ社
	6.30	1.41	5856	1.76	0.92	0.05	6.9	δ社
L-column2 ODS (4.6φ×75 mm、 3μm)	6.47	1.59	7668	1.92	0.92	0.04	7.1	α社
	7.25	1.71	8100	2.03	0.92	0.02	7.3	β社
	6.35	1.55	8212	1.96	0.92	0.13	8.0	γ社
	6.82	1.65	7270	1.96	0.92	0.02	8.1	δ社

Table 9 日局カンゾウ及び日局カンゾウ末のグリチルリチン酸含量 (%) (75 mm カラム)

カラム名	日局カンゾウ		日局カンゾウ末	分析 担当
	B社	C社	A社	
Inertsil ODS-3V (4.6φ×150 mm、5μm) 対照カラム	5.48	2.32	4.58	α社
	5.48	2.30	4.56	β社
	5.49	2.33	4.59	γ社
	5.48	2.32	4.58	δ社
Inertsil ODS-3V (4.6φ×75 mm、3μm)	5.47	2.33	4.57	α社
	5.44	2.32	4.54	β社
	5.51	2.34	4.60	γ社
	5.47	2.33	4.57	δ社
Capcell pak C18 UG120 (4.6φ×75 mm、3μm)	5.42	2.30	4.51	α社
	5.46	2.34	4.55	β社
	5.51	2.33	4.57	γ社
	5.42	2.30	4.51	δ社
L-column2 ODS (4.6φ×75 mm、3μm)	5.46	2.32	4.55	α社
	5.46	2.32	4.53	β社
	5.52	2.36	4.61	γ社
	5.46	2.32	4.55	δ社

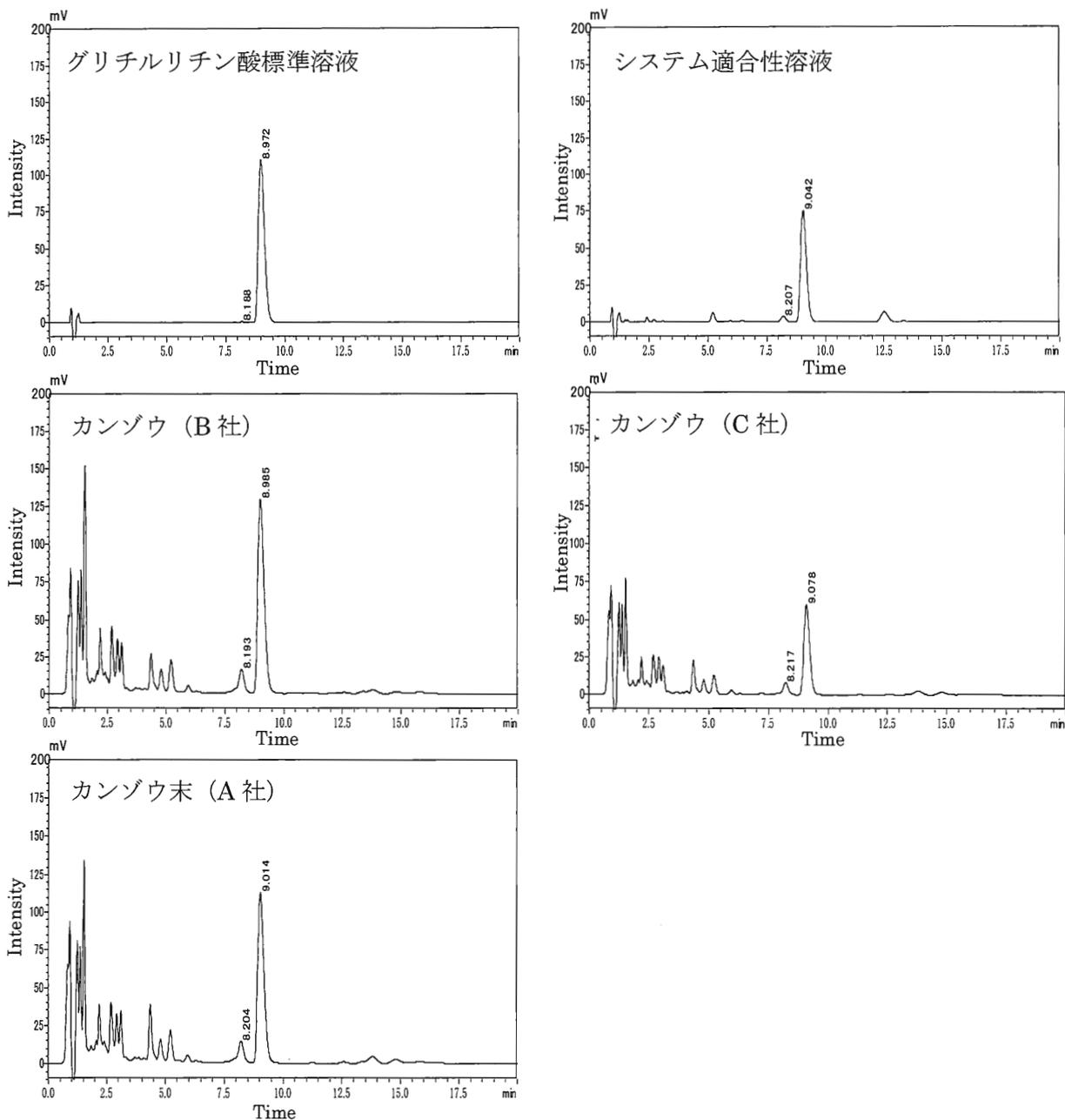


Fig.2 75 mm カラムのクロマトグラムの一例 (Inertsil ODS-3V、α社)

## 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) 黒崎之予ら、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－、家庭薬研究 No. 36、34-41 (2017)
- 12) 一般財団法人 医療品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編、第十七改正 日本薬局方 技術情報 JPTI 2016、(株)じほう、1191-1192 (2016)