

HPLC における六神丸のブフォステロイドの分析(第一報)

—ジンコウの影響について—

Analysis of Bufosteroids in Rokusingan by High Performance Liquid Chromatography
· Effect of Jinkou ·

富山県薬事研究会分析部会 — センソ配合製剤の分析法バリデーション分科会 —
Division of Analytical Chemistry
Toyama Pharmaceutical Research Association

永井喜美

Kimi NAGAI

俣野豊

Yutaka MATANO

荒木安子

Yasuko ARAKI

宮崎由夏

Yuka MIYAZAKI

市井満美子

Mamiko ICHII

佐々木千恵

Chie SASAKI

松平薫

Kaoru MATSUHIRA

松田和歌子

Wakako MATSUDA

横田洋一

Yoichi YOKOTA

株延寿堂

Enjudo Co.,Ltd.

カネボウ株

Kanebo, Ltd.

カネボウ株

Kanebo, Ltd.

株廣貫堂

Kokando Co.,Ltd.

救急薬品工業株

Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd.

大光製薬株

Taikou Pharmaceutical Co.,Ltd.

大協薬品工業株

Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd.

第一薬品株

Daiichi Medicine Co.,Ltd.

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute

For Pharmaceutical Research

緒言

六神丸等の強心薬に使用されるセンソの指標成分であるブフォステロイド（ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン）は、製剤の薬効の要として重要な成分である。そのため、ブフォステロイドの分析を正確に行えるということは、センソ配合製剤の品質評価を行う上で欠かすことのできない要素である。

本分科会は、市販センソ配合製剤の分析法バリデーションの確立を最終目的として検討を行っている。HPLCによる、市販センソ配合製剤である六神丸のブフォステロイドの定量において、これまでの本分科会参加各社での検討結果によると、ジンコウが最も影響を与えることが確認されている。そこで、今回は、HPLCによる六神丸のブフォステロイドの分析の第一報として、18種類のジンコウの影響を検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験

各種ジンコウの検体について、シノブファギンとレジブフォゲニンの分離が良く、ブフォステロイドの分析に繁用されるエンドキャッピング処理をしていない6種類のODSカラムを用いてHPLCのパターンを比較検討した。また、エンドキャッピング処理を施した6種類のカラムについても検討した。

1. 試料

(株)延寿堂より購入した、ベトナム産10検体(A~J)、タイ産8検体(K~R)を用いた。

2. 標準品

和光純薬工業(株)製 生薬試験用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品

3. HPLC 条件

第14改正日本薬局方に準拠し、下記のとおりで検討した。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：300nm）

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：薄めたリン酸（1→1000）／アセトニトリル混液（11：9）

流量：ブファリンの保持時間が約8分になるように調整する。

カラム：内径4.6mm、長さ150mm以下のカラム

○エンドキャッピング処理なし ○エンドキャッピング処理あり

TSK-gel ODS-120A
YMC-Pack ODS-AL
Develosil ODS-A
Wakosil 5C18N
Richrosorb RP-18
Inertsil ODS-P

Phenomenex Luna 5uC18
YMC AM-302
Develosil ODS-5
Wakosil II 5C18HG
Mightysil RP-18GP
Inertsil ODS-3

注入量：20μL

4. 方法

粉碎機を用いて粉碎したジンコウを1gとり、メタノール40mLに溶かし、30分間超音波抽出する。その後更にメタノールを加えて正確に50mLとする。この液を遠心分離し、上澄液10mLを正確に量りとり、メタノールを加えて正確に50mLとし、ジンコウ試料溶液とする。

別に、ブファリン標準品を5mg、シノブファギン標準品10mg、レジブフォゲニン標準品10mgを正確にとり、メタノールを加えて正確に50mLとする。この液20mLをとり、メタノールを加えて正確に100mLとし、標準溶液とする。

それぞれのカラムにおいて、ジンコウ試料溶液及び標準溶液を20μLずつ注入し、それぞれのパターンを検討する。

結果及び考察

1. ジンコウのHPLCパターン分析

18種類のジンコウの HPLC パターンを分析した結果、いずれのカラムにおいても下記に示すような4つのパターンに分類することができた。

パターン1：A、D、E、H

パターン2：B、J、N、P、Q

パターン3：C、F、G、I、O

パターン4：K、L、M、R

パターン1及び3では、9検体中8検体（A、D、E、H、C、F、G、I）がベトナム産であり、パターン2及び4では9検体中7検体（N、P、Q、K、L、M、R）がタイ産であった。この中でパターン1を示すジンコウが最もピーク数が多く、その面積も大きく、センソのブフォステロイドの分析に大きな影響を与えることがわかった。

2. HPLC カラムの選択について

使用したエンドキャッピング処理されていない全てのカラムにおいて、センソ中のレジブフォゲニンのピークに、妨害となるジンコウ由来のピークがほぼ重なることがわかった。この妨害ピークとレジブフォゲニンのピーク位置は、カラムにより異なり、Richrosorb RP-18 と Inertsil ODS-P ではレジブフォゲニンピークの後に、また他の4カラムではレジブフォゲニンピークの前に溶出することが確認できた。レジブフォゲニンとジンコウ由来の妨害ピークとの保持時間の差は、TSK-gel ODS-120A と Inertsil ODS-P を用いたときに最大で、その差は約 0.55 分であった。なお、エンドキャッピング処理ありのカラムはいずれもレジブフォゲニンとの分離は、これらのカラムより悪かった。図1にブフォステロイド標準溶液及びジンコウAのクロマトグラム、図2、3にこれら2種類のカラムから得られた、ジンコウのクロマトグラムのパターンを示す。（←はレジブフォゲニン付近の妨害ピーク）

今後はこのピークとレジブフォゲニンとの分離について、分析条件の検討を行い、六神丸の分析法を確立する予定である。

図1 標準溶液とジンコウの HPLC チャート

使用カラム : TSK-gel ODS-120A

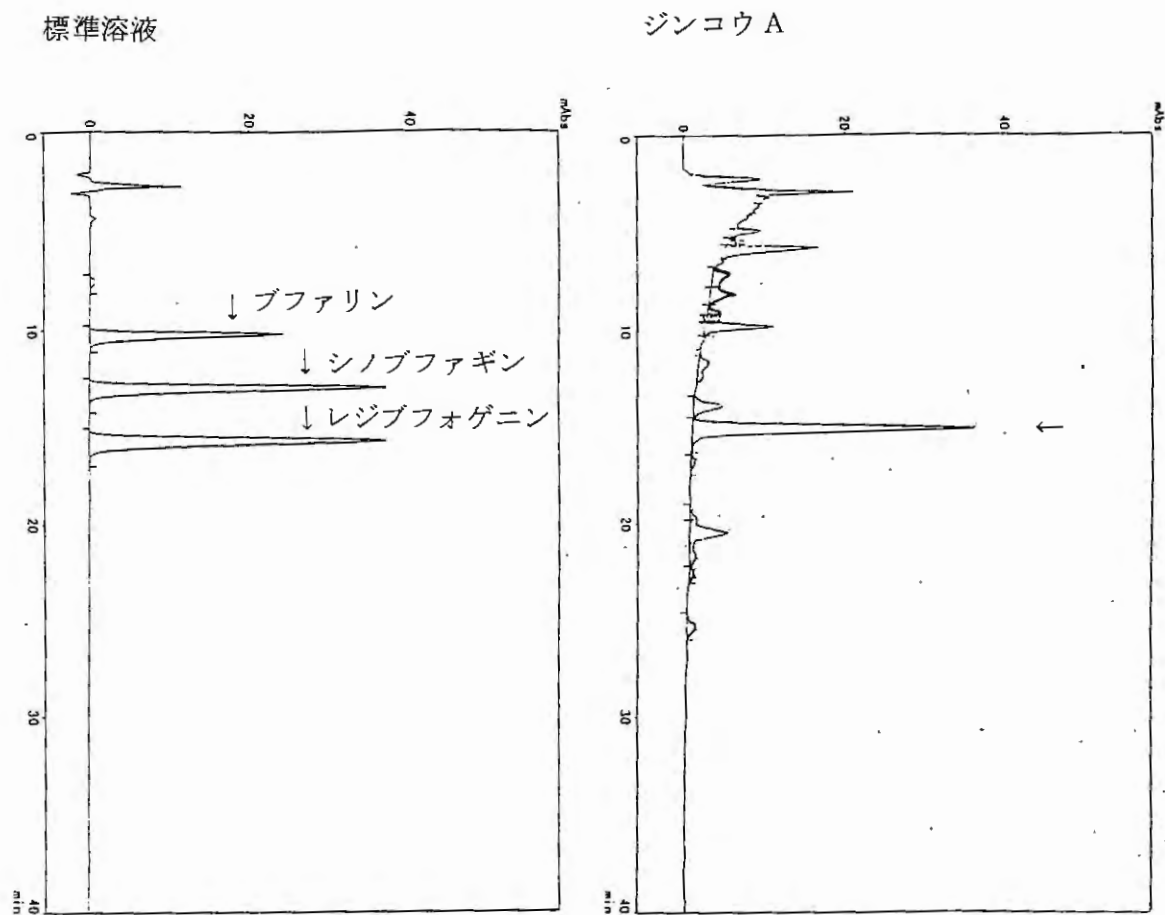
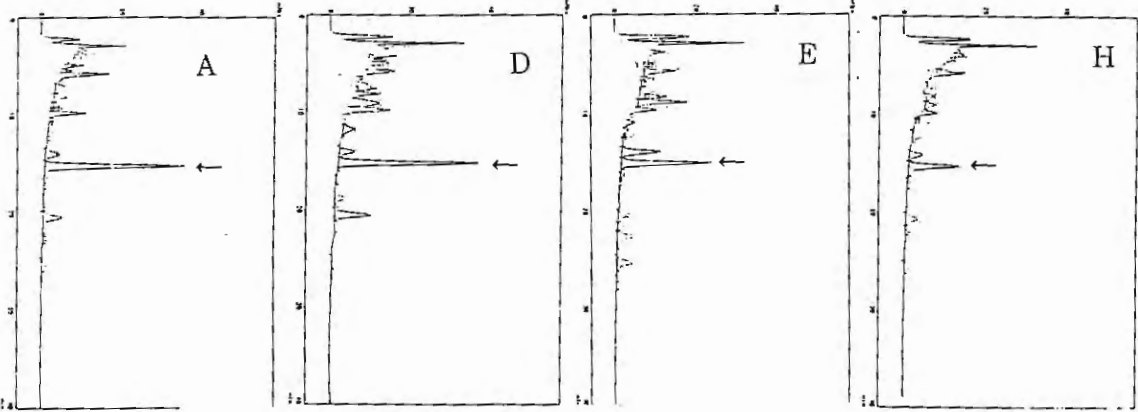


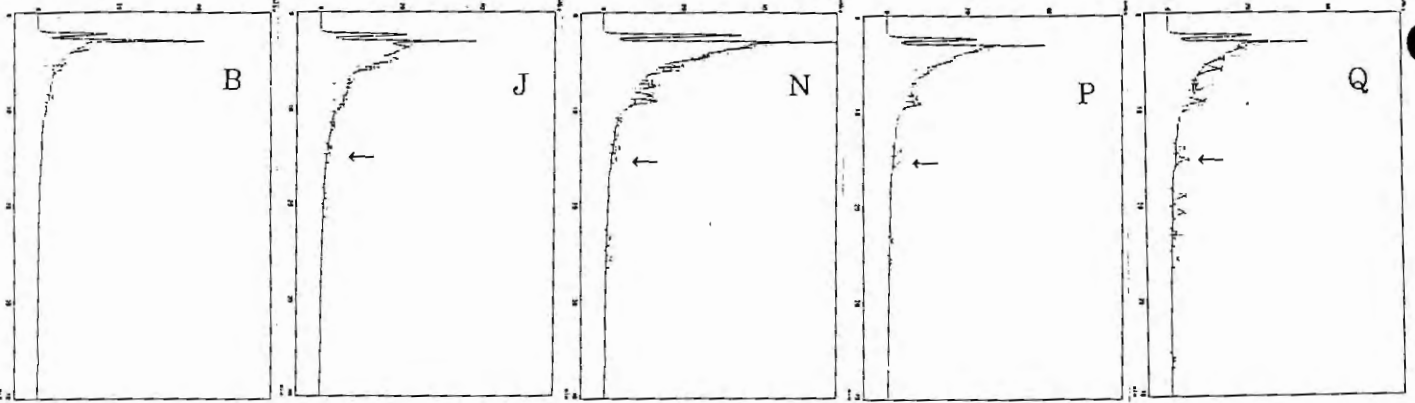
図2 各カラムにおけるジンコウの HPLC パターン 1

使用カラム : TSK-gel ODS-120A

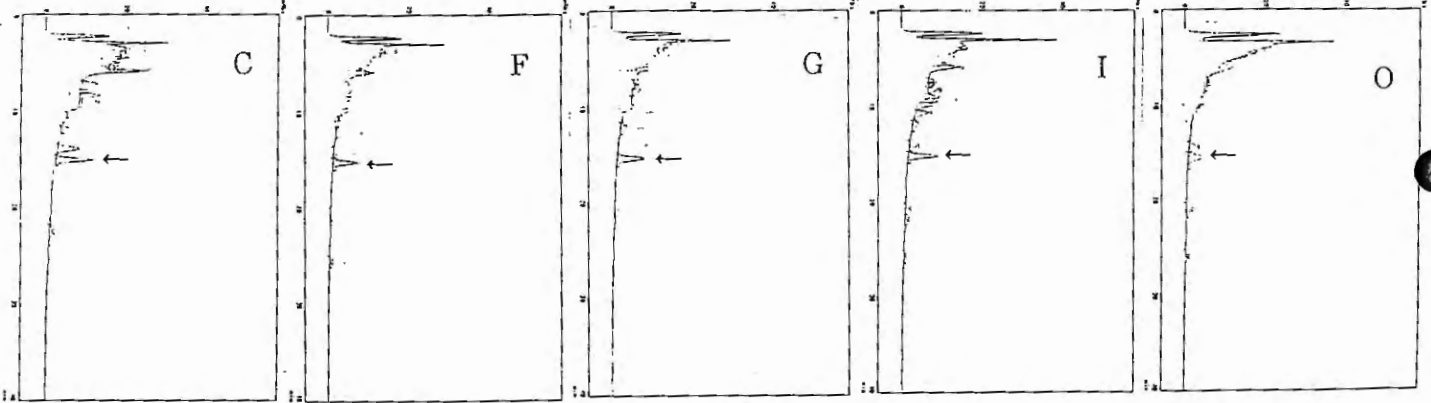
パターン 1



パターン 2



パターン 3



パターン 4

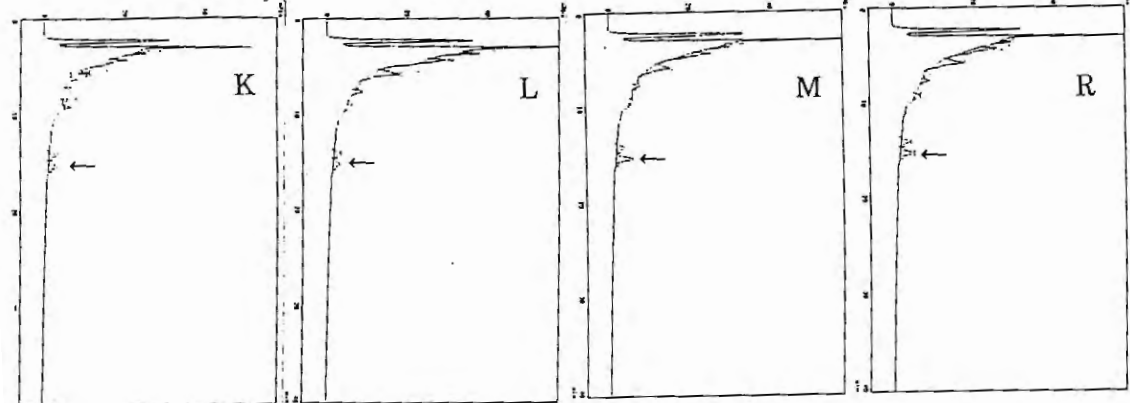
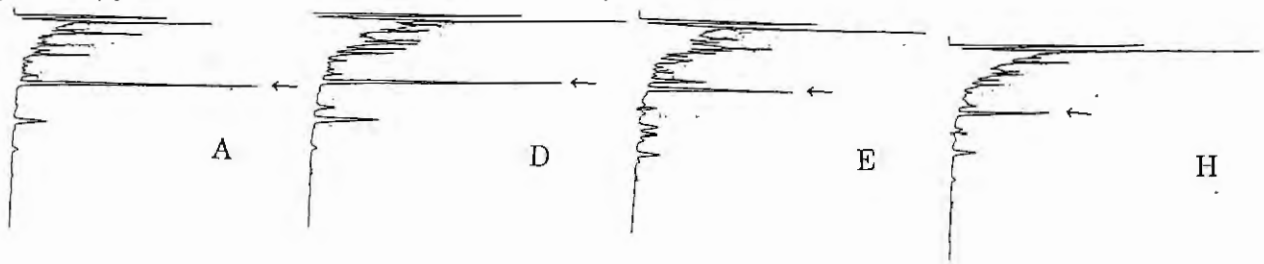


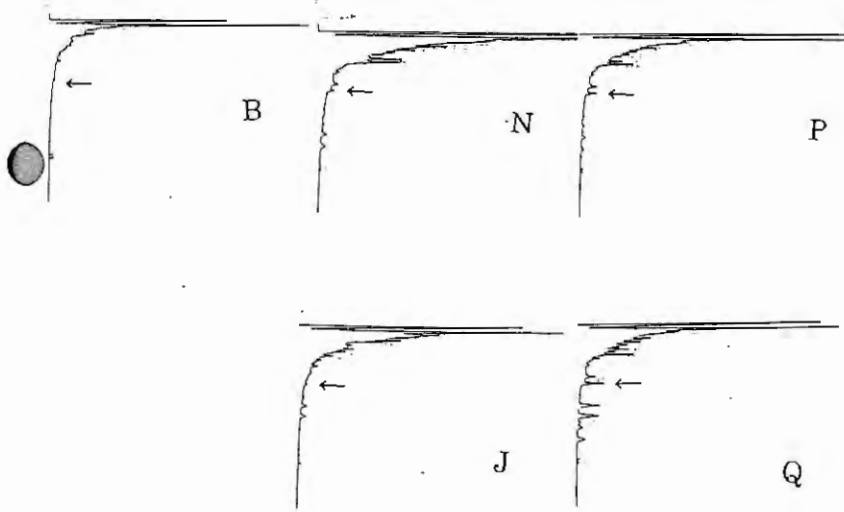
図3 各カラムにおけるジンコウの HPLC パターン2

使用カラム : Inertsil ODS-P

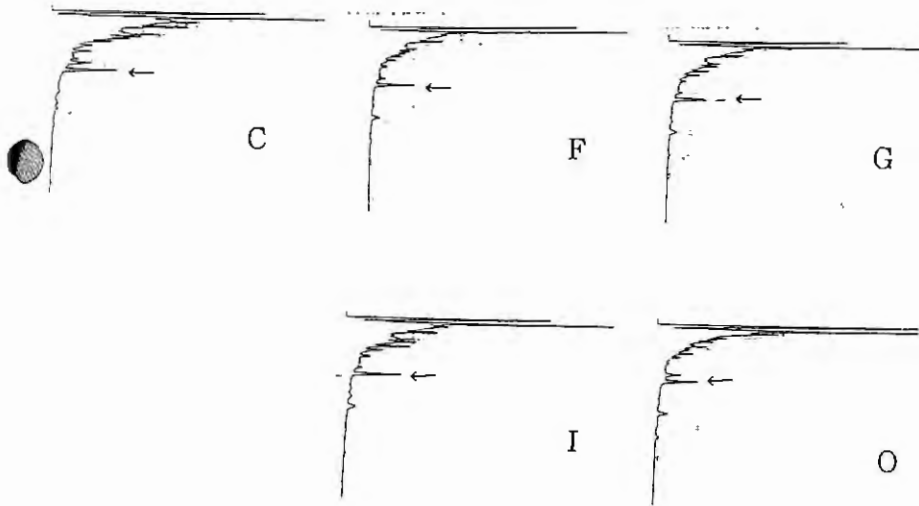
パターン1



パターン2



パターン3



パターン4

