

# 「HPLCによる点眼剤中のコンドロイチン硫酸ナトリウムの定量」

Quantitative analysis of Sodium Chondroitin sulfate in Ophthalmic Solutions  
by High Performance Liquid Chromatography

富山県薬事研究会分析部会      コンドロイチン硫酸ナトリウム分科会  
Division of Analytical Chemistry  
Toyama Pharmaceutical Research Association

俣野 豊	カネボウ㈱
Yutaka MATANO	Kanebo, Ltd.
長谷川 修	共栄製薬㈱
Osamu HASEGAWA	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
藤枝 一彦	㈱廣貫堂
Kazuhiko FUJIEDA	Kokando Co., Ltd.
吉川 弘子	㈱廣貫堂
Hiroko YOSHIKAWA	Kokando Co., Ltd.
林 智子	大協薬品工業㈱
Tomoko HAYASHI	Taikyp pharmaceutical Co., Ltd.
松任 宏子	中央薬品㈱
Hiroko MATSUTOH	Chuo Medicine Co., Ltd.
有澤 洋子	テイカ製薬㈱
Yuko ARISAWA	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
南 涼子	東亜薬品㈱
Ryoko MINAMI	Toa Medicine Co., Ltd.
青木 真知子	明治製薬㈱
Machiko AOKI	Meiji Pharmaceutical Co., Ltd.
永坂 実子	明治薬品㈱
Yoshiko NAGASAKA	Meiji Yakuhin Co., Ltd.
横田 洋一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research

## 緒 言

コンドロイチン硫酸は、生体内で軟骨組織中に多く分布している酸性ムコ多糖類の一種である。そのナトリウム塩であるコンドロイチン硫酸ナトリウム(以下SCS)は医薬品分野において、注射剤、内服剤、点眼剤等に配合されており、その品質評価法としては従来からカルバゾール硫酸法が用いられてきた。しかし、その操作は煩雑であり、また、分解物であるD-グルクロン酸の含量を測定する間接的評価法である。一方、直接評価できるHPLCを用いる分析法については分子サイズの違いによる分離が考えられるが、用いるカラムが高価であることなどから、あまり一般的でない。

そこで今回は、汎用性のあるODSカラムを用いたHPLC法により点眼薬中の定量法の確立を目的として検討を行い、その結果、多少の知見を得たので報告する。

## 実 験

### HPLC条件の検討

#### [HPLC条件]

検出器:紫外吸光光度計(UV210nm)

カラム:L-Column ODS、4.6mmI.D.×250mm

移動相:水/アセトニトリル(4:1)混液(リン酸でpH2.3に調整)1000mLにSDSを加える。

流量:1.0mL/min

#### ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)濃度及びカラム温度の検討

上記移動相中のSDS濃度を0.01mol/L、0.05mol/L及び0.1mol/L、カラム温度を40℃、50℃及び60℃について、注入再現性及びピーク形状について検討した。

### モデル製剤 I (0.5%濃度)を用いた定量及び添加回収実験

モデル製剤10mLを正確にとり、水を加えて正確に20mLとした。この液10mLを正確にとり、Sep-Pak C<sub>18</sub>に付し、更に水10mLで溶出し、溶出液を合わせて、内標準溶液(IS)10mLを正確に加え、水を加えて正確に100mLとし、試料溶液とした。別に製剤原料SCS約500mgを精密に量り、水を加えて溶かし正確に50mLとし、標準原液とした。標準原液2.5mLを正確にとり、IS 10mLを正確に加え、水を加えて正確に100mLとし、標準溶液とした。また、ブランク溶液(モデル製剤からコンドロイチン硫酸ナトリウムを削除したもの)10mLをとって、標準原液5mL(4mL、6mL)を正確に加え、水で正確に20mLとした。この液10mLを正確にとり、以下試料溶液と同様に操作し、添加回収用溶液とした。

\*内標準溶液:薄めた無水カフェイン(1→25000)

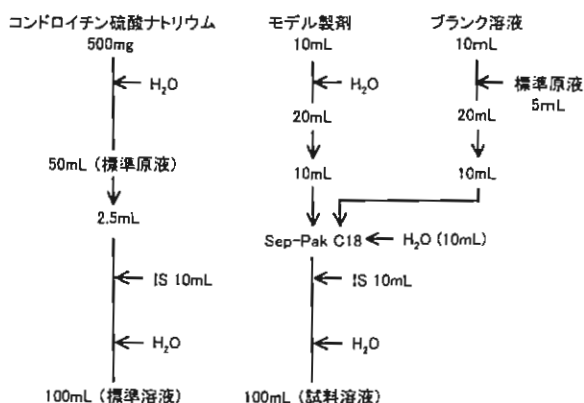
\*Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>:Waters社製、メタノール10mL通導後、水10mLで調製

Table 1

#### モデル製剤 I (0.5%濃度)の処方

塩酸テトラヒドロゾリン	250mg
グリチルリチン酸ジカルウム	2500mg
マレイン酸クロルフェニラミン	300mg
アミノエチルスルホン酸	10000mg
コンドロイチン硫酸ナトリウム	5000mg
ホウ酸	9000mg
ホウ砂	400mg
塩化ナトリウム	1200mg
濃塩化ベンザルコニウム液50	200mg
滅菌精製水	適量
全量	1000mL

Fig.1



モデル製剤Ⅱ (0.03-0.07%濃度)を用いた添加回収実験

製剤原料として用いたSCS約0.1gを精密に量り、水を加えて溶かし正確に50mLとし、標準原液とした。標準原液5mLを正確にとり、IS 2mLを正確に加え、水を加えて正確に20mLとし、標準溶液とした。また、ブランク溶液(モデル製剤からコンドロイチン硫酸ナトリウムを削除したもの)10mLをとり、標準原液5mL(3mL、4mL、6mL、7mL)を正確に加え、水で正確に20mLとした。この液5mLを正確にとり、Sep-Pak C<sub>18</sub>に付し、更に水10mLで溶出し、溶出液を合わせて、IS 2mLを正確に加え、水を加えて正確に20mLとし、添加回収用溶液とした。

\*内標準溶液: 薄めた無水カフェイン(1→10000)

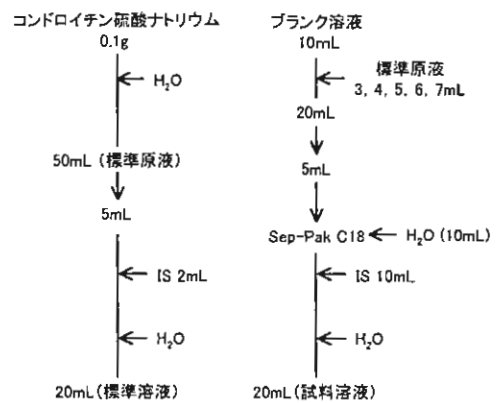
\*Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>: Waters社製、メタノール10mL通導後、水10mLで調製

Table 2

モデル製剤Ⅱ (0.03-0.07%濃度)の処方

塩酸テトラヒドロソリン	250mg
グリチルリチン酸ジカリウム	2500mg
マレイン酸クロルフェニラミン	300mg
アミノエチルスルホン酸	10000mg
コンドロイチン硫酸ナトリウム	300-700mg
ホウ酸	9000mg
ホウ砂	400mg
塩化ナトリウム	1200mg
濃塩化ベンザルコニウム液50	200mg
滅菌精製水	適量
全量	1000mL

Fig.2



市販点眼薬中のSCSの分析

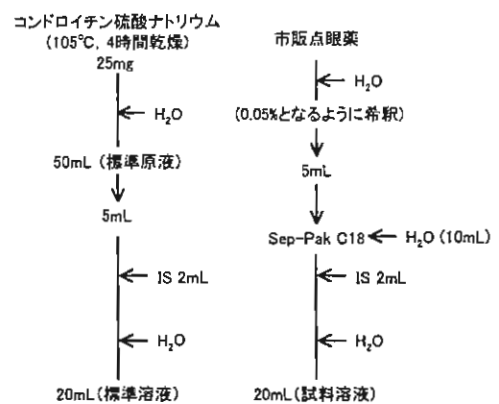
市販点眼薬のコンドロイチン硫酸ナトリウムの表示量から0.05%となるように水で希釈し、その液5mLを正確にとり、Sep-Pak C<sub>18</sub>に付し、更に水10mLで溶出し、溶出液を合わせて、IS 2mLを正確に加え、水を加えて正確に20mLとし、試料溶液とした。別にコンドロイチン硫酸Aナトリウム(105°C、4時間乾燥、生化学工業株式会社製、Super Special Grade)約25mgを精密に量り、水を加えて溶かし正確に50mLとし、標準原液とする。標準原液5mLを正確にとり、IS 2mLを正確に加え、水を加えて正確に20mLとし、標準溶液とした。

Table 3 市販点眼薬の分析

製品	一般点眼薬						
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
SCS (%)	0.1				0.2	0.25	0.5
容量 (mL)	14	15	10	14	10	15	14

製品	人口涙液	
	⑧	⑨
SCS (%)	0.5	
容量 (mL)	13	13

Fig.3



## 結果

### HPLC条件の検討

移動相についてはモデル製剤中の他の成分が保持されてSCSに影響を与えない、水/アセトニトリル(4:1)混液(リン酸でpH2.3に調整)とした。

また、上記条件ではシステムの再現性が良好でなかったことから、SDSを添加したところ、改善が認められ、その濃度並びにピーク形状に影響を及ぼすカラム温度の検討を行い、SDS濃度は0.05mol/L (Fig.4)、カラム温度は50℃及び60℃で、SCS及びISのピーク形状が良好なクロマトグラムが得られ、このうちカラム温度は実用性を考慮し、50℃とした。

### 特異性

標準溶液、モデル製剤及びブランク溶液(モデル製剤よりSCSを除いて調製した試料)の特異性について検討した。

その結果、ブランク溶液はコンドロイチン硫酸ナトリウムと同じ保持時間にピークを示さず、ブランク溶液由来成分の影響はないことが確かめられた(Fig.2)。

### モデル製剤 I (0.5%)の定量及び添加回収実験(室間再現性)

モデル製剤 I を用いて、参加各社間で定量及び添加回収実験についての結果を Table 4及び5に示す。

Table 4 モデル製剤 I の定量 (n=3)

	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	H社	平均値	CV(%)
対理論量 (%)	103.0	103.2	101.8	98.8	99.9	103.0	100.9	101.9	101.6	1.57
S.D.	0.10	0.00	0.15	4.60	0.21	0.23	0.76	0.51	0.82	

Table 5 モデル製剤 I の添加回収実験

	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	H社	平均値	CV(%)
回収率 (%)	99.7(80%) 99.4(100%) 99.9(120%)	94.4	99.5	102.3	98.9	100.1	98.5	99.9	99.1	2.24

定量値は各社とも理論量に対し、ほぼ100%の定量値を示し、添加回収においても良好な結果となった。

Fig.4

HPLC条件  
 検出器：紫外吸光度計(UV210nm)  
 カラム：L-Column ODS 4.6mmI.D.×250mm  
 移動相：水/アセトニトリル混液(4:1)(リン酸でpH2.3に調整)  
 注入量：5μL

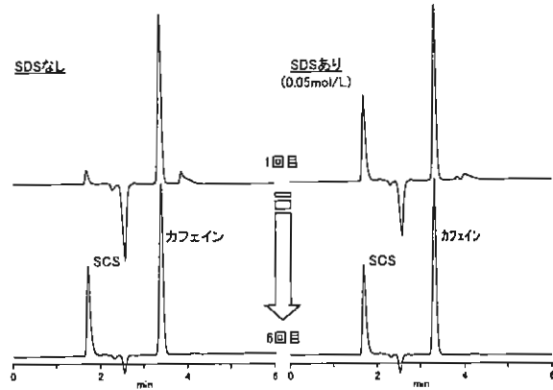
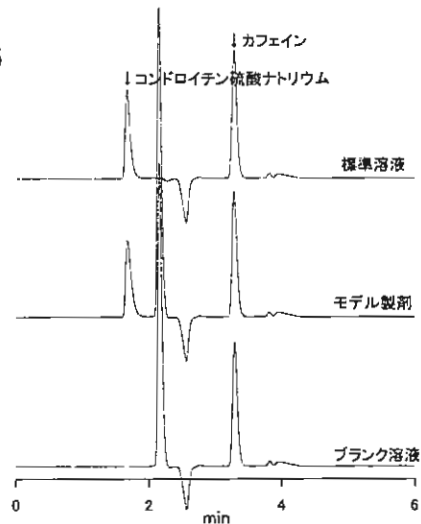


Fig.5



### モデル製剤Ⅱ(0.03-0.07%)の添加回収実験

製造指針によると、コンドロイチン硫酸ナトリウムの含量は眼科用薬で0.05～0.5%である。今回のモデル製剤Ⅰは最大濃度のモデルであり、同様の操作で市販薬を分析するためには、最小濃度に合わせた分析方法を設定する必要があった。そこで、これまでの試験法をもとに、試料溶液を最小濃度すなわち0.05%まで希釈する方法を検討し、添加回収実験を行った。その結果を Table 6に示す。

0.05%付近すなわち0.03～0.07%の5点で測定したところ、いずれの濃度においても、ほぼ100%の回収率を示したことから、測定試料はこの濃度まで希釈して試料溶液とする方法とした。

Table 6 モデル製剤(0.03-0.07%)の添加回収実験

SCS濃度	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07
回収率 (%)	98.4	97.9	98.5	98.8	98.5

次に、本方法を用いて、市販点眼薬9種について分析した結果を Table 7に示す。

Table 7 市販点眼薬の分析

製品	一般点眼薬							人口涙液	
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
表示量 に対する 含量 (%)	87.2	102.8	37.5* (103.7)	94.4	101.0	108.6	103.6	97.8	96.6
	89.3	104.4	37.2* (103.7)	96.7	99.3	113.4	98.1	98.7	100.9

\*ISに他成分が重なり、( )内は絶対検量線法による定量値を示した。

(1製品につき2社が測定)

測定の結果、製品③は、対理論量を大きく下回った結果となったが、ISに他成分が重なったことが原因と考えられ、絶対検量線法による算出では、ほぼ理論量通りとなった。これまでISとして無水カフェインを用いたが、これは注入量を補正する目的であるため、注入再現性が担保できていれば、内標準は特に使用する必要はないと考えられる。

また、製品①、⑥などについては理論値に対し若干の差が認められたが、これは配合されているコンドロイチン硫酸ナトリウムのグレードによるものではないかと推察される。

本試験法においては、用いるSCS原料のグレードによる差及びSCSの分解挙動が定かではなく、これらが定量に与える影響が把握できていないため、原料が明らかでない試料での定量及び安定性試験の評価は困難であると考えられた。

### まとめ

今回は、汎用性のあるODSカラムを用い、移動相中にSDSを添加することで、システムの再現性やモデル製剤における添加回収が良好なHPLC法を設定することができた。本法は、これまでのカルバゾール硫酸法よりは簡便で精度の高い方法であり、製剤の工程管理には有用な試験法である。

# ラット利胆作用に対する熊胆と生薬の併用効果

Combined Effect of Bear Bile and Some Crude Drugs on Bile Secretion in Rat

富山県薬事研究会生物部会

Division of pharmacology, Toyama Pharmaceutical Research Association

松井 泰治	松井製薬株式会社
Taiji Matsui	Matsui Seiyaku Co., Ltd.
中田 晶子	株式会社広貫堂
Akiko Nakata	Kokando Co., Ltd.
南 桂子	大協薬品工業株式会社
Keiko Minami	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
大野 護	テイカ製薬株式会社
Mamoru Ohno	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
乗安 浩克	東洋ファルマー株式会社
Hirokatu Noriyasu	Toyo Pharmar Co., Ltd.
松永孝之	富山県薬事研究所
Takayuki Matsunaga	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

## 緒 言

熊胆はヒグマ及び近縁動物の胆汁を乾燥したものであり、胃腸薬などとして古くから重用されている。構成成分としては胆汁酸の他、コレステロール、リン脂質及びビリルビンなどが含まれるが、熊胆に特徴的な成分はタウリン抱合型胆汁酸であるタウロウルソデオキシコール酸 (TUDC) である<sup>1)</sup>。これまで我々は、熊胆の薬効評価及び飼育熊胆の生物学的同等性を検討するため、利胆作用、肝障害抑制作用、胃潰瘍及び消化管運動に対する作用を検討し報告してきた。しかし、実際には熊胆は他の生薬と組み合わせられた配合処方として用いられる場合の方が多い。

そこで、消化器系の生薬配合薬に熊胆と組み合わせられて用いられることの多いニンジン、オウレン及び牛黄について、熊胆との併用時の利胆作用について検討した。

## 実験材料及び実験方法

### 1. 試料

本試験で用いた生薬は、天然熊胆（中国産）、牛黄（豪州産）、ニンジンエキス（アルプス薬品製）及びオウレンエキスであり、オウレンエキスについては、オウレン100gを1Lの水で2時間加熱抽出し、熱時濾過後冷却し、凍結乾燥して調製した。また、TUDC及びウルソデオキシコール酸（UDC、いずれもNa塩）は、カルビオケム製を用いた。各試料は、蒸留水または0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に溶解・懸濁して試験に供した。なお、牛黄及びビリルビンは、乳鉢で微細粉碎後懸濁して用いた。

### 2. 動物

ラット（6-7週令、雄性）を購入し、1-2週間の予備飼育の後に試験に供した。

### 3. 利胆作用の測定

一晩絶食したラットに25%ウレタン溶液（7ml/kg）を皮下投与して麻酔し、腹部の毛をバリカンで刈った後開腹した。十二指腸部を摘み出し、胆管乳頭部を結紮後胆管付近の脂肪組織を綿棒で剥離して胆管を露出させた。この胆管に眼科ハサミで切れ目を入れた後カニューレを挿入して結紮し、このチューブを体外に導いて胆汁流出管とした。また、胃幽門部付近からカニューレを十二指腸内まで挿入し、接着剤で固定して試料注入管とした。各臓器を腹腔内に収めた後胆汁の流出を確認し、実験を開始した。30分間の胆汁流出量を計測後試料を投与し、その後30分おきに2時間まで胆汁を採取した。胆汁の流出量は重量で、また、胆汁中の胆汁酸及びビリルビン量は市販測定キットを用いて測定した。

### 4. 統計処理

測定値の有意差検定は、Studentのt-検定を用いて行なった。

## 実験結果

### 1. 加温時のラット胆汁分泌に対する熊胆及び生薬との併用効果

ラットのウレタン麻酔時には体温が低下するため、生体機能も低下するものと思われる。そこで、加温して胆汁分泌に対する試験を行った[この時の直腸体温は、 $36.0 \pm 2.0$  (Mean $\pm$ SD)]。その結果、熊胆単独（0.5g/kg）あるいは牛黄、人参または黄連（各0.2g/kg）との併用時でも胆汁分泌に変化は見られなかった。また、胆汁中への胆汁酸分泌においても、熊胆単独あるいは各生薬併用時でも有意な変化は見られなかった（Table 1）。

Table 1 ラット利胆作用に対する熊胆と生薬の併用効果

	対照群	熊胆群	熊胆+牛黄群	熊胆+人参群	熊胆+黄連群
胆汁分泌量	478 $\pm$ 93	461 $\pm$ 55	488 $\pm$ 31	459 $\pm$ 58	483 $\pm$ 50
胆汁酸分泌量	392 $\pm$ 87	445 $\pm$ 46	443 $\pm$ 64	462 $\pm$ 67	398 $\pm$ 35

各値は、被検物投与前30分の分泌量に対する投与後2時間の積算%を示す。

Mean $\pm$ SD(n=4)

## 2. 非加温時のラット胆汁分泌に対する熊胆及び生薬との併用効果

次に、加温しないでマット上にラットをおいて試験した[直腸体温は、 $28.1 \pm 1.2$  (Mean  $\pm$  SD)]。その結果、熊胆の投与により2時間の胆汁分泌積算量は、39%と有意に増加した(Fig. 1)。また、牛黄を併用すると胆汁分泌積算量は91%有意に増加したが、人参あるいは黄連の併用時には有意な増加は見られなかった。さらに、胆汁中への胆汁酸分泌に対しては、より顕著な作用が認められた。即ち、熊胆単独でも163%の胆汁酸分泌の増加が認められ、人参あるいは黄連併用しても同程度の増加のみであるが、牛黄併用時には320%と顕著な増加が認められた。このように、体温低下時に熊胆単独あるいは牛黄との併用効果が顕著に現れることから、以降の試験はラットを加温しないで行った。

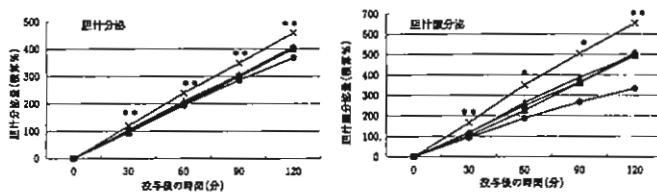


Fig.1 ラット利胆作用に対する熊胆と生薬の併用効果

●：対照群、▲：熊胆群、×：熊胆+牛黄群、■：熊胆+人参群、◆：熊胆+黄連群  
Mean  $\pm$  SD (n=5), \*, \*\* : p<0.05, 0.01 to Yutan only

## 3. ラット胆汁分泌に対する各生薬単独の効果

熊胆と牛黄の併用により胆汁分泌及び胆汁中への胆汁酸分泌が顕著に増加した。そこで、各生薬単独時の作用を検討したところ、熊胆により胆汁分泌及び胆汁酸分泌が増加するが、牛黄、人参及び黄連ではいずれに対しても作用は示さなかった(Table 2)。これらの結果から、熊胆の利胆作用を牛黄が増強することが示唆された。

Table2 ラット利胆作用に対する生薬の効果

	対照群	熊胆群	牛黄群	人参群	黄連群
胆汁分泌量	349 $\pm$ 24.5	381 $\pm$ 22.1	361 $\pm$ 50.9	357 $\pm$ 18.1	370 $\pm$ 34.2
胆汁酸分泌量	348 $\pm$ 20.7	408 $\pm$ 38.8*	357 $\pm$ 36.0	335 $\pm$ 11.1	369 $\pm$ 74.7

各値は、被検物投与前30分の分泌量に対する投与後2時間の積算%を示す。  
Mean  $\pm$  SD (n=5), \* : p<0.05

## 4. ラット胆汁分泌に対する胆汁酸と牛黄の併用効果

次に、熊胆に含有される相当量のTUDC及びその遊離型であるUDCと牛黄の併用効果を検討した。その結果、TUDC単独での胆汁分泌は、ほとんど対照群とかわらないが、牛黄と併用することにより30分及び60分後の胆汁分泌が有意に増加した(Fig. 2)。また、UDCではTUDCよりもさらに胆汁分泌が増加するが、牛黄との併用により、より顕著に増加した。



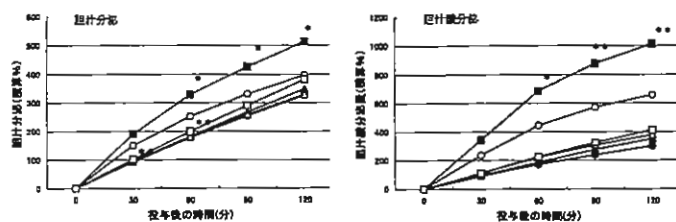


Fig.2 ラット利胆作用に対する胆汁酸と牛黄の併用効果

●：対照群、○：UDC群、▲：TUDC群、△：牛黄群、■：UDC+牛黄群、□：TUDC+牛黄群  
 Mean±SD(n=4)、\*、\*\*：p<0.05, 0.01 to bific acid only

また、胆汁への胆汁酸分泌もTUDCで増加傾向を示し、牛黄と併用することによりさらに増加するが有意ではなかった。さらに、UDCでは投与後急激に胆汁中への胆汁酸分泌が増加し、30分後に2.6倍に達した。これに牛黄を併用すると60分以降顕著に胆汁酸分泌が増加した。

### 5. ラット胆汁分泌に対するビリルビンの効果

牛黄は、ビリルビンを主成分とする色素胆石であり、その他胆汁酸やコレステロールを含むとされている。そこで、ビリルビンが熊胆の利胆作用を増強するか否かを検討した。その結果、ビリルビン単独(0.1g/kg)では胆汁分泌及び胆汁中への胆汁酸分泌には影響を与えないが、胆汁中へのビリルビン分泌は顕著に増加した(Table 3)。また、熊胆と併用した時も熊胆の利胆作用には影響を及ぼさないが、ビリルビン分泌は増加した。

Table3 ラット利胆作用に対する熊胆とビリルビンの併用効果

	対照群	熊胆群	ビリルビン群	熊胆+ビリルビン群
胆汁分泌量	379±36	383±34	367±27	383±22
胆汁酸分泌量	369±50	454±109 <sup>*)</sup>	351±32	394±42
ビリルビン分泌量	516±113	723±155	1031±413 <sup>*)</sup>	1364±465 <sup>**)</sup>

各値は、被検物投与前30分の分泌量に対する投与後2時間の積算%を示す。

Mean±SD(n=10-11)、\*、\*\*：p<0.05, 0.001

## 考 察

熊胆は、古くから健胃消化薬としてこれまで用いられてきたが<sup>2)</sup>、近年、肝炎にも有効であることが報告されている<sup>3)</sup>。これまで、熊胆は他の生薬と配合されて適用されることが多く、肝炎の治療にも熊胆と牛黄を併用すると治療効果が相乗的に向上することが指摘されている<sup>3)</sup>。そこで、熊胆の代表的な薬理作用である利胆作用に対する牛黄の他、人參及び黄連との併用効果を検討した。

利胆作用の測定はウレタン投与後行ったが、麻酔下では体温が低下するため保温して行ったところ、熊胆の利胆作用は見られず、胆汁酸分泌が若干増加するのみであった。また、熊胆と各生薬を併用しても有意な差は見られなかった。そこで、非保温時に同様に利胆作用を検討したとこ

ろ、熊胆投与により胆汁分泌及び胆汁中への胆汁酸分泌が有意に増加した。この体温の違いにより熊胆の利胆作用の発現に差が認められたのは次のように考えられる。即ち、体温が37℃の時は肝機能も十分機能しており、胆汁生成も行われているが、28℃と体温低下時は胆汁生成の効率も低下していると考えられる。このようなある種胆汁鬱滞時の方が熊胆の作用が、より顕著に発現したものと思われる。

さらに、熊胆と牛黄を併用すると顕著に胆汁及び胆汁酸分泌は増加したが、人参及び黄連の併用では熊胆単独時と同程度であった。そこで、各生薬単独時の利胆作用を検討したが、熊胆以外の牛黄、人参及び黄連には作用は認められなかった。このことから、熊胆の利胆作用を増強する牛黄自身には利胆作用はないことが明らかであり、他の異なる作用機序で熊胆の作用を増強していると考えられる。中島らは<sup>4)</sup>、熊胆の肝障害抑制作用に対して牛黄が相乗的に増強することを明らかにし、この効果は牛黄による肝血流量の増大によるものとしている。熊胆の利胆作用は、含まれるTUDCなどの胆汁酸によるものと考えられ、この胆汁酸は胆汁成分利胆をもたらすとされている<sup>5)</sup>。このため、牛黄により肝血流量が増大することにより肝臓へのTUDCなどの分布が増加し、利胆作用も増強されたものと推察される。牛黄は、牛の胆嚢に生成した胆石であり、ビリルビンを主成分とする色素胆石である<sup>6)</sup>。そこで、牛黄の相乗効果は主要成分であるビリルビンによるものか否か検討したが、熊胆とビリルビンとの併用による利胆作用の増強は見られなかった。このことから、ビリルビン以外の成分によるものと考えられる。

次に、熊胆に含まれる相当量のTUDC及びそれと等モルの遊離型のUDCの利胆作用に対する牛黄の影響を検討した。TUDCの利胆作用は、UDCに比べれば弱いものであったが、これは消化管での吸収様式の違いに起因するものと思われる<sup>7)</sup>。即ち、抱合型胆汁酸は回腸の下部より能動輸送により吸収されるのに対し、遊離型胆汁酸はその疎水性により受動拡散で空腸、回腸より取り込まれるので遊離型のほうがはるかに早く肝臓に到達するため利胆作用も早く、また強く出るものと思われる。一方、抱合型は回腸下部まで移行する必要があり、また、今回の実験では体温が低下しているため消化管運動も低下しており、抱合型胆汁酸及び熊胆の利胆作用は弱かったものと思われる。しかし、いずれの胆汁酸の場合でも牛黄による併用効果は程度の差はあれ認められた。

このように、生薬は種々配合されて用いられる場合が多く、その配合意義については今回のように、ある生薬が他生薬の組織分布を高める場合も考えられ、今回の熊胆と牛黄の併用はその一例であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 原田正敏他、和漢薬物学、第2版、高木敬次郎他編、南山堂、東京、1983年、p 242
- 2) 牧野勲、武部和夫、UDCAの歴史、東京田辺季刊誌、5 (1986)
- 3) 松本仁幸、動物生薬「牛黄・熊胆」の肝機能改善効果に関する臨床的・基礎的研究、京都府立医大誌、106、963 (1997)
- 4) Nakashima, T., Matsumoto, N. and Kashima, K.: Treatment with bovine gallstones exacerbates liver damage, but enhances hepatoprotection by bear gall powder in carbon tetrachloride-intoxicated rats, Jpn. J. Pharmacol., 76, 271(1998)
- 5) 仮家公夫、利胆薬、薬局、40、381 (1989)
- 6) 原田正敏他、和漢薬物学、第2版、高木敬次郎他編、南山堂、東京、1983年、p 135
- 7) Schiff, E.R., Small, N.C. and Dietschy, J.M.: Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat, J. Clin. Invest., 51, 1351(1972)

生薬製剤の品質管理における分析法の問題点について

— ベルベリン —

On the question of analytical methods for quality control  
of crude drug preparations

— Berberine —

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research

横田洋一, 寺崎さち子, 津野敏紀

Yoichi YOKOTA, Sachiko TERASAKI and Toshinori TSUNO

緒言

黄連, 黄柏は富山県の伝統薬である赤玉はら薬, 熊胆円などの胃腸薬に汎用される重要な生薬である。これらの黄連, 黄柏配合製剤においては, 通常ベルベリンが品質管理の指標成分として使用されるが, 最近, 承認書の吸光度法によるベルベリン型総アルカロイド含量が規格を上回る事例があった。<sup>1)</sup> 黄連, 黄柏のベルベリンの定量法は日本薬局方の第12改正以来HPLC法が採用され, 現在では品質管理等に広く用いられており, これらの企業もHPLC法を用いて製品のベルベリンを測定し, 品質管理をしていたと思われる。

一方黄連については, 第13局第1追補から日本産 (*C. japonica*) に加え, 中国の3種 (*C. chinensis*, *C. deltoidea*, *C. teeta*) の乾燥根茎が収載され, これらはそれぞれ, 味連, 雅連, 雲連などと称される。<sup>2)</sup> これら中国産のベルベリン型アルカロイド組成は日本産と若干異なり, 日本産は主アルカロイドがベルベリンであるのに対し, 中国産はコプチシン, パルマチンが日本産より多く含まれており, さらに同じベルベリン型アルカロイドであるエピベルベリンも含有されているとの報告がある。<sup>3)</sup> これらのことを考慮すると中国産の総アルカロイド量は日本産に比べかなり多いと考えられる。

現在では, 日本産に替わり, 価格の安い中国産が流通しているとされ, このことが吸光度法での規格を上回る一つの要因とも考えられた。黄柏についても, *P. amurensis* の他に *P. chinensis* が収載された。<sup>4)</sup> 現在では日本産の他に中国南部産, 中国東北部産などが流通しており, 主なベルベリン, パルマチンの含量には, ばらつきがあるという報告がある。<sup>5)</sup>

今回は, 黄連及び黄柏について, 日本産及び中国産の HPLC パターン及びアルカロイド含量を比較するとともに, 製剤原料の黄連, 黄柏エキスや胃腸薬に配合された黄連, 黄柏エキスについて, その基原を調査した。さらに吸光度法との関連を調べるため, フォトダイオードアレイ検出器を用いてベルベリンとベルベリン型総アルカロイド含量

との比較を行った。

## 実験

### 1. 実験材料

#### (1)黄連

中国産 12 検体 (味連 1 級 4 検体, 2 級 2 検体, 3 級 3 検体, 雅連 3 検体): 平成 15 年収集

日本産 5 検体 (富山 3 検体, 福井 1 検体, 岐阜 1 検体): 富山産 1 検体, 福井及び岐阜産は平成 15 年, その他の富山産は不明

薬事研究所 6 検体 (産地, 収集年不明)

#### (2)黄柏

中国産 5 検体 (南部, 東北, 湖南省, 湖北省, 遼寧省), 日本産 3 検体 (富山, 新潟, 岩手) 北朝鮮 1 検体, 日局品 1 検体: 富山産, 日局品は不明, それ以外は平成 6 年収集

#### (3)製剤

黄連流エキス: 3 検体 (A, B, C 社製), 平成 15 年収集

黄柏エキス: 1 検体, 平成 16 年収集

黄連・黄柏エキス配合胃腸薬 (ドリンク剤): 3 検体 (黄連配合), 1 検体 (黄柏配合), 平成 14 年収集

### 2. 方法

日本薬局方黄連の定量法<sup>2)</sup>に準じた。

黄連 (黄柏) を粉末とし, その約 0.25g を精密に量り, メタノール/希塩酸混液 (100:1)20mL で 30 分還流抽出し, ろ過する。更に 10mL で 2 回同様に操作し, 抽出液を合わせ正確に 50mL とする。この 1mL (黄柏の場合 2mL) を正確にとり, メタノール/希塩酸混液 (100:1) を加え正確に 10mL とし, 試料溶液とした。ドリンク剤及びエキスについては, 適宜メタノール/希塩酸混液 (100:1) で希釈したものを試料溶液とした。別に塩化ベルベリン標準品, 和光純薬製塩化パルマチン及び塩化コプチシン, それぞれ約 4mg を精密に量り, メタノールを加えて, 20mL とする。これらの液それぞれ 10, 4, 4mL を正確に量り, メタノールを加えて正確に 20mL とする。この液 3mL を正確に量り, メタノール/希塩酸混液 (100:1) を加え, 正確に 10mL とし, 標準溶液とした。これらの液 10 $\mu$ L につき日本薬局方オウレンの定量法に準じて HPLC 法を行い, ベルベリン, パルマチン, コプチシン含量を求めた。(ただし, 塩化物として未乾燥物中の含量)

また, ベルベリン以外の未知ピークについては, フォトダイオードアレイ検出器を用いて吸収曲線を測定し, ベルベリンの吸収曲線と類似したピークをベルベリン型アルカロイドとした。そしてベルベリンの吸収曲線と類似したすべてのピーク面積を合わせ, ベルベリン型総アルカロイド (塩化ベルベリンとして) として含量を

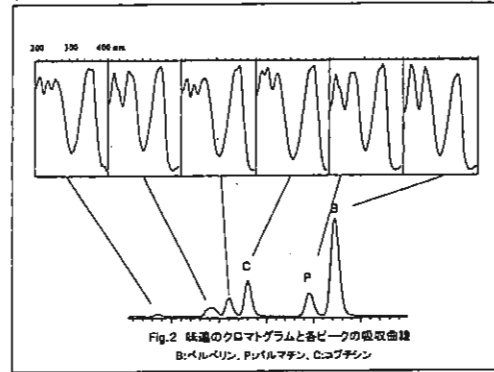
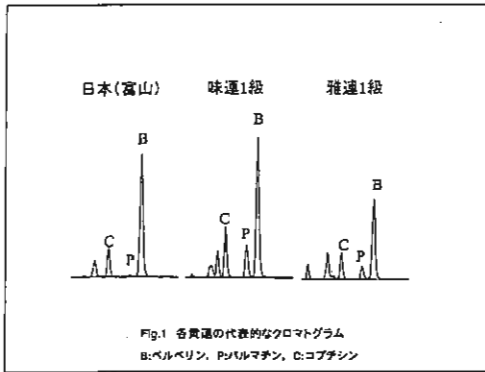
求めた。

## 結果及び考察

### 1. 黄連のクロマトグラムパターン

各種黄連について、HPLCパターンを比較するとともに、各アルカロイド含量を求めた。その結果、日本産はベルベリンのピークが主で、コプチシン及びその他アルカロイドが若干見られた。味連については1, 2, 3級品ともいずれも類似したパターンを示し、ベルベリンのピークが主ではあるが、コプチシン、パルマチン及びその他ベルベリン型アルカロイドは日本産より多く見られた。雅連は味連と類似していたがベルベリンのピークが小さい等、味連と若干異なるパターンを示した。

当所所有の産地不明黄連6検体のうち、4検体が中国産味連、2検体が日本産のパターンを示した。Fig. 1に各黄連の代表的なクロマトグラム、Fig. 2に味連の各ピークの吸収曲線を示す。なお、ベルベリン、パルマチン、コプチシン以外のピークは文献<sup>3)</sup>より、エピベルベリン、ヤテオリジン、ベルベラスチンなどと推定された。

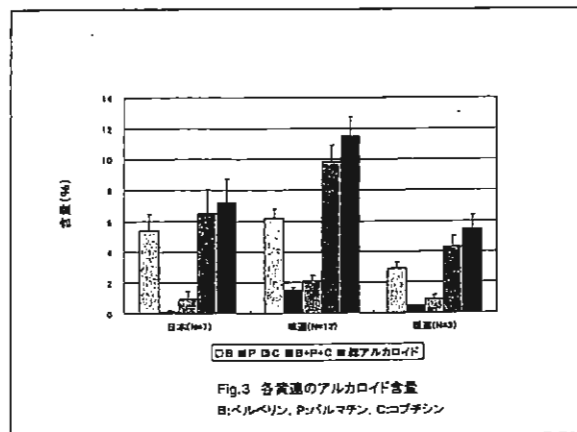


### 2. 黄連流エキス及び胃腸薬製剤

製剤原料の黄連流エキス3検体はいずれも味連と同様のパターンを示した。黄連エキス配合胃腸薬3検体のうち2検体は味連と同様のパターンを示した。他の1検体は日本産、中国産とも異なったパターンを示し、基原は不明であった。これらのことから、現在では味連と思われる中国産黄連が広く使用されていると考えられた。

### 3. 黄連のベルベリン型アルカロイド含量

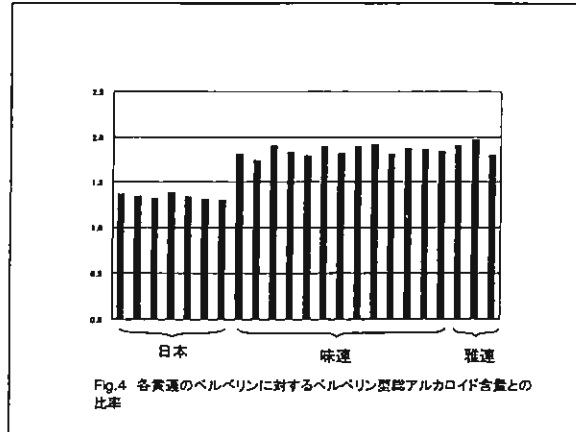
味連、雅連及び日本産とした黄連のベルベリン、パルマチン、コプチシン含量を求め、さらにフォトダイオードアレイ検出器でベルベリンと同様の吸収曲線を示すすべてのピーク面積を合わせ、ベルベリン型総アルカロイド含量を



求めた。(Fig.3)

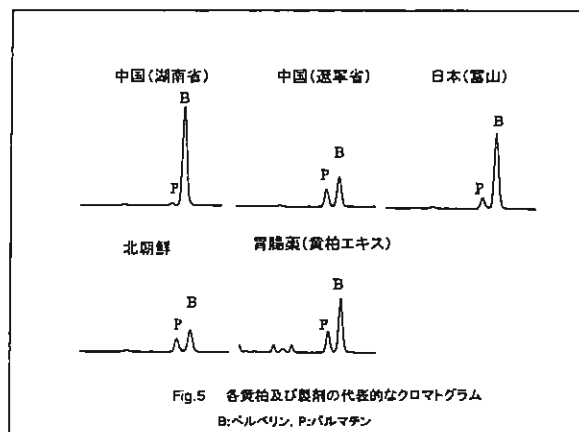
その結果、ベルベリン含量については、味連は日本産に比べ若干多かっただけだが、ベルベリン型総アルカロイド含量については平均 11.5%と、7.2%の日本産を大幅に上回った。雅連についてはベルベリン含量はかなり低いものの、その他のベルベリン型アルカロイドはかなり見られた。そこでベルベリン含量に対するベルベリン型総アルカロイド含量の比率を求めたところ、日本産については、1.3

～1.4であったが、味連では 1.7～1.9、雅連では 1.8～2.0と日本産と大きな差が見られた。(Fig.4)これらのことから中国産は日本産と比べ、ベルベリン以外のベルベリン型アルカロイドをかなり多く含有し、比色法によるベルベリン型総アルカロイド含量は HPLC によるベルベリン含量の 2 倍近くになることが予想された。



#### 4. 黄柏及び製剤のクロマトグラムパターン

日本産及び中国産南部産はベルベリンが主成分でパルマチンをほとんど含まず、その他アルカロイドもほとんど見られなかった。中国東北部、北朝鮮産のベルベリンのピークは中国南部及び日本産よりかなり小さく、逆にパルマチンは多い傾向を示し、クロマトグラムパターンは前者と完全に異なっていた。黄柏配合胃腸薬においては、日本産及び中国産南部産よりパルマチンの多いパターンを示した。Fig.5 に代表的なクロマトグラムを示す。







注意する必要があると思われた。また、標準品の入手が困難なベルベリン以外のベルベリン型アルカロイドの把握には、フォトダイオードアレイ検出器が有用であることが示された。

#### 謝辞

試料を供与された、(株)延寿堂、(有)松原粉末及び春陽堂に深謝します。

#### 文献

- 1) 医薬品試験課、平成 14 年度富山県薬事研究所年報 (30号) p69-70 (2003)
- 2) 第 14 改正日本薬局方解説書、廣川書店 (2001)、D-160
- 3) Ikuta, A. Kobayashi, H. Itokawa, Shoyakugaku Zasshi 38, 279-282 (1984)  
米田該典, 山形悦子, 華龍津, 水野瑞夫, 生薬学雑誌 42, 116-121 (1988)  
21 世紀の漢方・生薬製剤 (日本防菌防黴学会編), 繊維社 (1999), p98-100  
大住優子, 奈良県薬事指導所報告 (第 13 号) (2001), p48-50
- 3) 第 14 改正日本薬局方解説書、廣川書店 (2001)、D-144
- 4) 原田正敏編, 常用生薬の成分定量, 廣川書店 (1990), p63-66  
21 世紀の漢方・生薬製剤 (日本防菌防黴学会編), 繊維社 (1999), p98-100

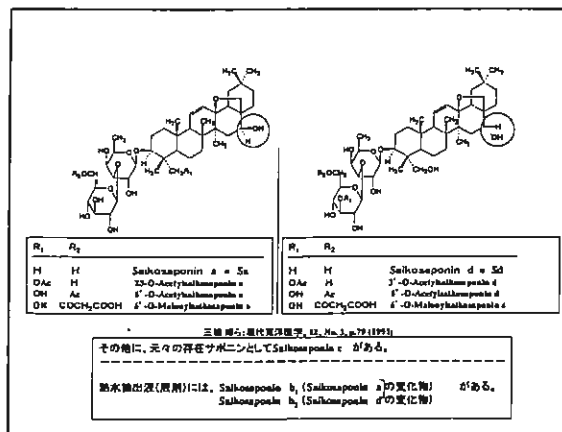
HPLCによるサイコの総サイコサポニン定量法  
Determination of Total Saponins in Bupleurum Root by HPLC

鈴木英世 寺崎さち子 横田洋一 津野敏紀 村上守一  
Hideyo SUZUKI Sachiko TERASAKI Yoichi YOKOTA Toshinori TSUNO Morikazu MURAKAMI  
富山県薬事研究所  
Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

サイコは各種漢方処方に配合され、その消費量が多いにもかかわらず、これまで日本薬局方などの公定の規格書で成分含量は扱われてなく、その定量法の設定に興味を持った。サイコのサポニン定量法については、学会誌では多くの研究報告があり、それらは二つに大別される。即ち、試料を溶媒(アンモニアを添加させることが多い)で抽出しその液を直接又は一部カラムで精製<sup>1,2)</sup>して高速液体クロマトグラフ(HPLC)測定する方法と、試料抽出液を塩酸酸性でアグリコン部D環における脱水反応を起こさせて検出しやすいジエン体<sup>2)</sup>にしてHPLC測定する方法とである。前者は精製法が不十分なこと及び短波長のUVで検出することのため妨害ピークが出現しやすい。また後者は脱水反応だけでなく糖部分の加水分解などの二次反応により定量性に問題がある<sup>3)</sup>。サイコ中には主成分のサイコサポニンa(Sa)、サイコサポニンd(Sd)等の他に、そのアシル体サポニンの存在<sup>4)</sup>も知られている(Fig.1)ので、その量が多ければアシル体も定量の対象にすることが当然考えられる。サイコ抽出液に積極的ケン化反応を施してして主サポニンの増加を確かめた報告<sup>4)</sup>はあるが、アシル体まで含んだ総サポニンとしての定量法を設定したという報告は未だないので、前報<sup>5)</sup>に引き続き検討を進めた。前報では、サイコの抽出にアンモニア水を加えてケン化していたが、分析妨害となる残存アンモニアを除くために減圧下加熱乾固する操作が必要であり、短時間に多数の試料を処理できない難点があった。そこで、今回はアンモニア水に替えて濃度調整のしやすい水酸化ナトリウムによるケン化を行い、更に中和条件、精製条件について検討し、簡便で迅速な成分含量測定法確立を目指した。これを市場生薬に適用する。

Fig. 1 サイコ中のサポニン



実験

- サイコ 日本産サイコサポニン、日本生薬協会提供品
- 試薬及び装置等

サイコサポニン a(Sa)、サイコサポニン d(Sd)及びサイコサポニン b<sub>2</sub> (Sb<sub>2</sub>) 和光純薬工業製標準品減圧 (2.0kpa 以下) 下 40℃で 5 時間乾燥した。

HPLC カラム ジーエル サイエンス工業製 Inertsil ODS-80A 5μm 4.6 x 150 mm

カートリッジカラム Merck 社製 Sep-Pack Plus C18 Cartridges Short Body、内径約 10mm、固相量約 0.35g; あらかじめ、メタノール 10mL を流出させ、次いで水 10mL を流出させるコンディショニング

を施して使用した。

メンブランフィルター ADVANTEC 製 DISMIC-13HP 孔径  $0.45\mu\text{m}$  HPLC に注入する溶液は、カートリッジカラムの処理をした場合を除き、すべてメンブランフィルターを通したものを用了。

標準溶液 Standard soln.I : Sa、Sd それぞれ  $10.0\text{mg}$  量り、メタノールに溶かして正確に  $50\text{mL}$  とした (濃度  $200\mu\text{g/mL}$ )。Standard soln.II : Standard soln.I を正確に  $5\text{mL}$  量り、メタノールを加えて正確に  $20\text{mL}$  とした (濃度  $50\mu\text{g/mL}$ )。

希水酸化ナトリウム試液 水酸化ナトリウム  $4.3\text{g}$  を水に溶かして  $1,000\text{mL}$  とした (約  $0.1\text{mol/L}$ )。

塩酸試液 塩酸  $9\text{mL}$  に水を加えて  $1,000\text{mL}$  とした (約  $0.1\text{mol/L}$ )。

中性緩衝液  $0.2\text{mol/L}$  リン酸二水素カリウム  $100\text{mL}$  に  $0.2\text{mol/L}$  水酸化ナトリウム  $69.4\text{mL}$  を加えた。

バキュームマニホールド Waters 製 Sep-Pack Vacuum Manifold ; カートリッジの上部に  $20\text{mL}$  の注射器外筒を利用したりザーバーを設置し、溶出速度約  $2\text{mL/min}$  になるように減圧度を調節した。

HPLC 装置 ポンプ : LC-10Atvp、検出器 : SPD-10Avp、デガッサー : DGV-12A、オートサンプラー : SIL-10Advp、カラムオープン : CTO-10Asvp、記録計 : C-R7Aplus (以上島津製)

移動相 水/アセトニトリル/メタノール混液 (3 : 2) を  $10$  分間超音波照射してから用了。

紫外可視分光光度計 島津製 UV-2400PC

%表示において、液体の場合は容量%で、また個体の場合は重量%である。

移動相調製の溶媒は HPLC 用のものを、また他の試薬は特級品を用了。

## 結果と考察

### 1. Sa、Sd 及び Sb<sub>2</sub> の HPLC 検出波長の検討

Sa、Sd、Sb<sub>2</sub> それぞれメタノールに溶かし、 $20\mu\text{g/mL}$  の濃度としたものについて紫外吸収スペクトルを測定した (Fig. 2)。Sa 及び Sd は  $240\text{nm}$  以上の波長で吸収を認めないので alkene 構造の  $\pi-\pi^*$  遷移に基づく  $206\text{nm}$  の波長を検出に用いることにした。一方 Sb<sub>2</sub> は  $230\text{nm}$  以上の波長で数個の吸収極大を持ち、その測定には  $254\text{nm}$  の検出波長が考えられた。

### 2. 検量線

Standard soln.I を順次希釈したものにつき、HPLC 測定し検量線を作成した (Fig. 3)。Sa 又は Sd の濃度  $20-100\mu\text{g/mL}$  の範囲で、濃度対出現ピーク面積とをプロットして得た検量線は、いずれも直線性を示した。Sa と Sd のピーク間隔の中間位置にピークが出現する内標準物質の選定が難しかったこと、及び天然物では内標準物質ピークの近傍に予知できない成分ピークの出現の可能性もあることから、定量法として内標準法をやめて絶対検量線法を採用した。

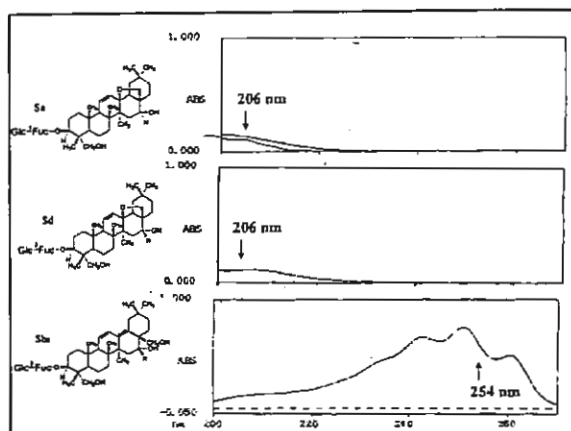


Fig.2 サイコサポニンの UV 吸収スペクトル

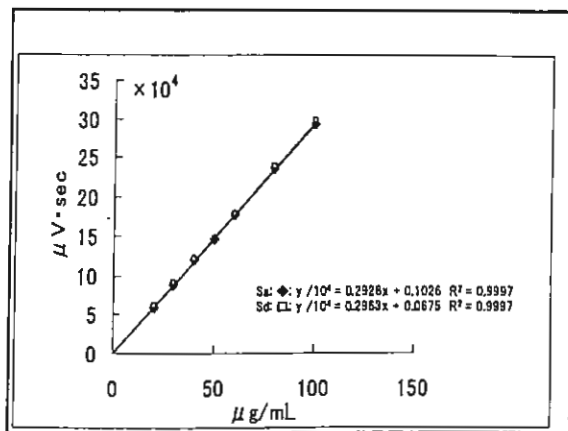


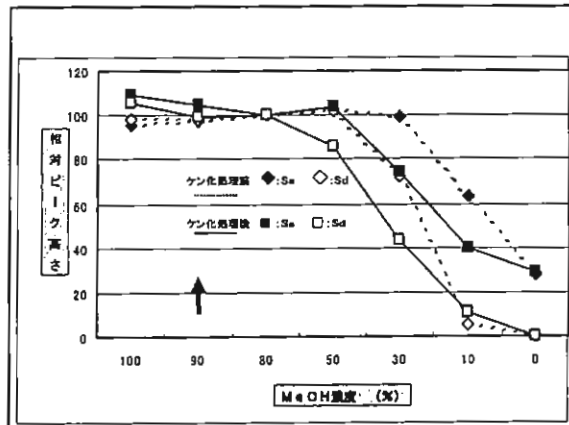
Fig.3 検量線

### 3. 抽出条件の検討

試料粉末 1.0g を各種濃度の水-メタノール系溶媒 15mL で 10 分間振とうし、3 分間遠心分離した (2 回)。上澄液を合わせ、メタノールを加えて全量を正確に 50mL とした (遊離型サポニン測定用試料溶液: F soln.)。次にこの各抽出液 1mL を正確に量り、希水酸化ナトリウム試液 0.5mL を加えて 50℃ の水浴で 1 時間加温した (総サポニン測定用試料溶液: T soln.)。各 F soln. 及び T soln. について HPLC 測定し、Sa 及び Sd の量をピーク高さの相対値で比較した (Fig. 4) (Fig.10 参照)。

未精製の試料溶液を直接 HPLC に注入すると妨害ピークの出現があり、サポニン抽出量比較は、ピーク面積法でなく、ピーク高さ法で行った。各抽出液を観察すると、それぞれに特徴があった。即ち T soln. の分析では、試料溶液の調製で、メタノール含量が高い溶媒によって得た抽出液は、HPLC でベースラインが蛇行する傾向があった。これは共存する脂肪様物質等の抽出が進んだためと考えられた。また 100%メタノールによって得た抽出液に希水酸化ナトリウム試薬を添加すると、薄く白濁することが観測された。一方、水が高含量の溶媒によって得た抽出液は、しばらく放置後すると、でんぷん様の物質が析出した。そこで、抽出時の溶媒として、サイコ中に含まれる油分と多糖類の抽出を少なくし、Free 及び総サポニンの高抽出性が期待される 90%メタノールを用いることとした。

Fig.4 抽出溶媒の選択

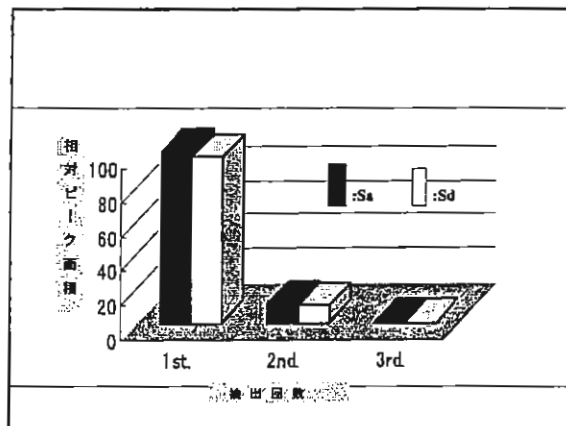


### 4. 抽出回数の検討

試料粉末 1.0g を 90%メタノール 20mL で 10 分間振とうし、遠心分離した。上澄液にメタノールを加えて全量を正確に 20mL とした。更に残留物について、同様な抽出を 2 回繰り返した。各回の抽出液について HPLC 測定し、Sa 及び Sd の含量をピーク面積の相対値で比較した (Fig. 5)。

その結果、以上のような抽出を 3 度行えば、Free サポニンの抽出はほぼ完結することがわかったが、抽出液を一定容量にする時に用いる定量フラスコとして JIS には 60-mL のものはないので、50-mL のものを用いる方法に設定変更した。即ち、3 回の使用溶媒量を、順に 20mL、15mL、15mL とし、各回の振とう時間を 15 分とし、全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 50mL とした。本抽出法を行うとき、測定値の相対標準偏差は、Sa 0.459% ; Sd 0.340% (4 回試行) で、安定した抽出が達成できた。

Fig.5 抽出回数検討



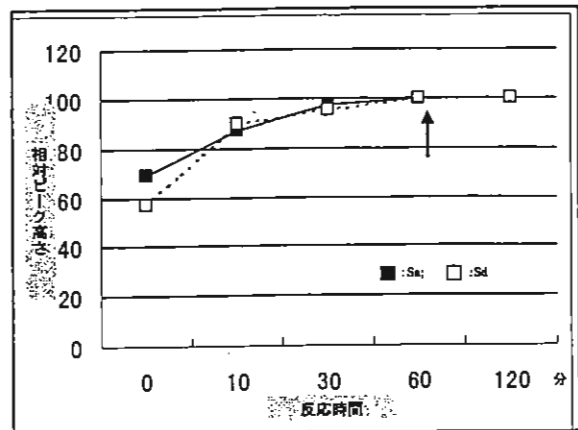
### 5. ケン化条件の検討

試料粉末 1.0g を 90%メタノールで抽出した F soln. から 5mL を正確にとり、希水酸化ナトリウム試薬 2.5mL を加えて 50℃の水浴中、加温時間を変えて反応させ (10、30、60、120 分)、次いで中性緩衝液 7.5mL を加えた。この液を Sep-Pack 処理し、これら画分につき HPLC 測定し、Sa、Sd の相対ピーク面積変化を調べた (Fig.6)。

サイコ中には複数のアシル体が存在する<sup>4)</sup>ので、ケン化条件設定には単離したアシル化サポニン個々について検討を行うべきであるが、単離品の入手は困難で検討できなかった。次善の策として、上記実験のように、ケン化後の HPLC 測定によって最も Sa 及び Sd のピーク面積が最も大きくなる条件を求めた。

その結果、加温時間 60 分のとき、反応性が高いと考えられ、加水分解では、試料溶液 5mL に対して希水酸化ナトリウム試薬 2.5mL を加え、50℃の水浴中 60 分放置する条件を設定した。

Fig.6 ケン化時間の検討



### 6. サイコサポニンの安定性

Standard soln. I 1mL に希水酸化ナトリウム試薬 0.5mL を加えて、室温 (20-30℃) で放置した。一定時間毎にサンプリングした反応溶液につき HPLC 測定し、Sa 及び Sd のピーク高さを求めた (Table 1)。Sa と Sd はアルカリ条件化で 3 日間安定であった。また Standard soln. は冷凍保存 1 ヶ月でも HPLC 測定面積の減少を認めなかった。以上より、酸性条件としない分析では二次的の反応は生じにくいことが分かった。

Table 1 定量法の適合性調査

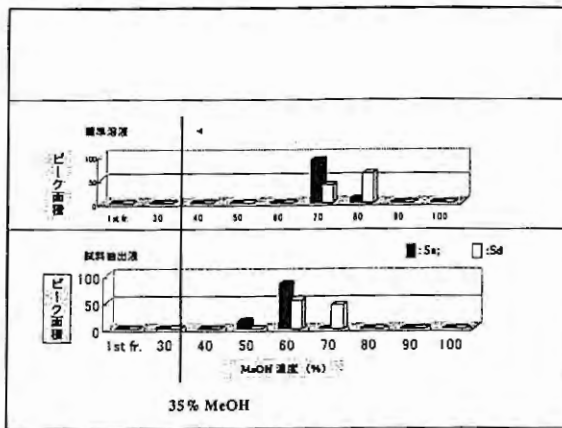
カートリッジ適合性 (--- 相対標準偏差で示す)				
標準溶液	---	Sa 0.63% Sd 0.60% (n=6)		
(Sa, Sd 50 µg/mL 相当)				
試料溶液	---	Sa 0.53% Sd 0.57% (n=5)		
試料溶液 + 標準溶液	---	回収率 Sa 101.1% Sd 98.8% (n=2)		
アルカリ溶液中での安定性				
時間	0h	2h	8h	3日
Sa	100	99	100	101
Sd	100	100	99	100
標準溶液 1mL + 希NaOH溶液 0.15mL、室温放置				

### 7. カートリッジによる精製条件

Standard soln. I 5mL を正確にとり、希水酸化ナトリウム試薬 2.5mL を加えて 50℃で 1h 加温し、次いで中性緩衝液 7.5mL を加えた。これをリザーバーに流し込み、最初の流出画分を分取した (1st fr)。次いで各種濃度のメタノール溶液 (30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%) それぞれ約 10mL を順に流出させて分取した。これら 9 画分につき HPLC 測定し、サポニンの溶出分布を調べた。生薬からの抽出液 (試料溶液) についても、同様に操作し、各画分へのサポニン溶出分布を調べた (Fig. 7)。

Standard soln.のカートリッジ精製では、70%メタノール画分からサポニンの溶出が始まったが、生薬抽出液では、50%メタノール画分から溶出が始まった。いずれも Sd よりも Sa の溶出が先行した。生薬抽出液を用いるカートリッジ精製では、試料の種類や量の多少の違いにより、ばらつきが起こる分かった。そこで本カートリッジ処理では、中和化溶液をカラムに負荷後、35%メタノール 10mL を用いて洗浄し、100%メタノール 10mL でサポニンを溶出することにした。

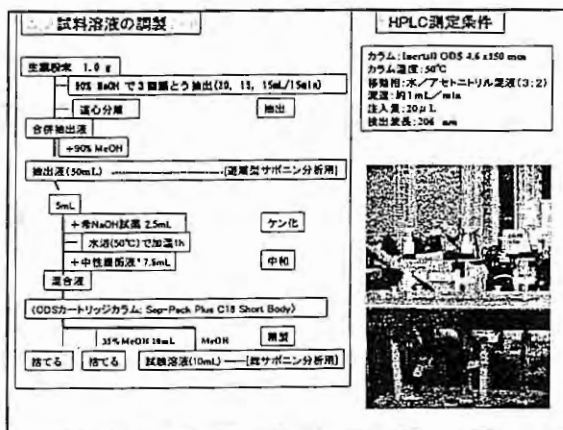
Fig.7 カートリッジカラムによる精製



8. システム適合性と定量法の設定

これまでに設定したケン化及び中和処理の後カラム処理によるシステム適合性を検討した。まず Standard soln.II について検討したところ、各サポニン定量値の相対標準偏差は Table 1 の通りだった。以上のように、試験の再現性及び定量値の信頼性が期待できることが分かった。そこで、試験方法を、Fig. 8 のように設定した。

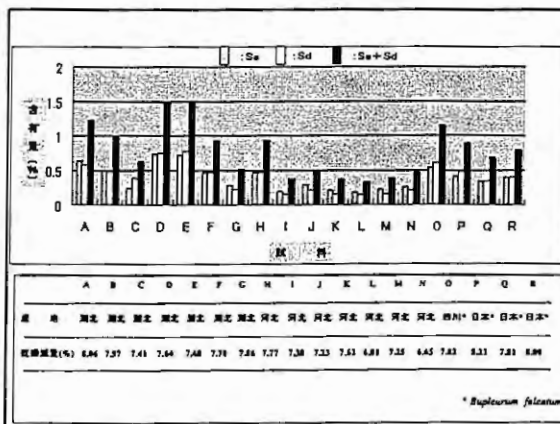
Fig.8 設定した試験方法



9. 定量結果

国内外のサイコ 18 種類を生薬乾燥物として測定して、Fig. 9 のような結果を得た。それぞれのサポニンは、Sa 0.19~0.72% (平均 0.40%)、Sd で 0.16~0.77% (平均 0.39%) として測定された。サイコ中のサポニンの定量成分として、Sa、Sd 以外にサイコサポニン c が測定されることがあるが、既報告<sup>3)</sup>を見ると、その含量は Sa や Sd の含量の 1/3 以下のことが多く、今回はサポニン評価の対象から外した。そして、総サポニンとして、Sa と Sd の含量和と定義するのが適当と考えられた。この度は、総サポニン 0.33~1.50% (平均 0.78%) として測定された。

Fig. 9 市場品の定量



最初の試料抽出液から得た抽出液から得た Sa、Sd 含量に対してカラム精製から得た試料溶液から得たサポニン含量は、ピーク高比較すると Sa で 1~1.4 倍、Sd で 1.2~2 倍増加していた (Table 2)。そのため、アシル化体サポニンの存在は無視できないことがわかり、総サポニン定量法でケン化処理の導入の意義が確認できた。また定量法各段階のクロマトグラムの推移を見ると、精製処理の効果が理解できる (Fig. 10)。

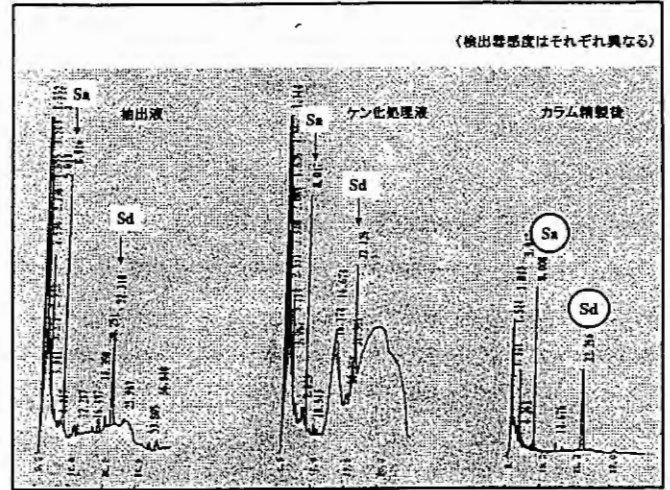
今後、実験室間の再現性等のバリデーションに関する実験を進めて行く予定である。

Table 2 ケン化処理によるサポニンピーク高の変化

ピーク高さの比: 総サポニン / 遊離型サポニン		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Sa		1.4	1.2	-	1.2	1.3	1.2	1.1	1.1	1.0
Sd		1.4	1.5	1.5	1.6	1.9	1.7	1.5	1.6	1.2
		J	K	L	M	N	O	P	Q	R
Sa		1.4	-	-	-	-	1.4	-	1.3	1.3
Sd		1.9	1.4	1.4	1.2	1.6	2.0	1.3	1.6	1.7

- : 遊離型サポニン測定時の定量妨害で測定できない。

Fig. 10 各段階のクロマトグラム推移



謝辞：本研究の一部は富山県深層水産業推進事業の費用を使用させて頂きました。

### 文献

- 1) 寺内正裕、金森久幸、坂本征則、齋池昭二三、加藤睦子、神田博史：高速液体クロマトグラフィーによるサイコ中のサイコサポニン-a、-c、-dの同時分析、生薬雑誌、41(2)、213-217(1993)
- 2) 原田正敏編集：繁用生薬の成分定量、161-169(1992)、廣川書店、東京
- 3) 漢方技術研究会、第21回生薬分析討論会要旨集、69-79(1992)
- 4) 三橋 博、栗原美也子、森田 誠：ミシマサイコの化学的品質評価、現代東洋医学、12(3)、79-86(1991)
- 5) 上野美穂、津野敏紀、鈴木英世：サイコサポニン定量におけるメタノール抽出液に対するアンモニア処理について、富山県薬事研究所年報、第29号、43-48(2002)