

芍薬含有製剤中のペオニフロリンの定量

福島 悦子, 矢崎 廣久, 久門 勝利

Determination and Extraction of Paeoniflorin in Pharmaceutical Preparations Including Paeony Root by High Performance Liquid Chromatography

Etsuko FUKUSHIMA, Hirohisa YAZAKI and Katsutoshi KUMON

I はじめに

近年、漢方処方製剤の需要が多くなり、その品質評価法として原料生薬抽出液中に含まれる薬効成分、あるいは特異成分の含有量を指標として化学分析を行う手法が、採用されるようになった。代表的生薬である芍薬は、古くから鎮痛、鎮静、抗炎症薬などの薬理作用が知られ、最も繁用されている。芍薬を評価する為の指標成分としては、ペオニフロリン (pae) を利用した分析方法の報告例が多数ある。¹⁾⁻¹¹⁾

今回、著者らは芍薬含有製剤を用いて、その製剤中に含まれる pae を簡便で精度良く測定することを目指し、抽出方法、並びに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた定量方法を検討したところ、良好な結果を得たので報告する。

II 実験方法

1. 試料

芍薬：日本薬局方収載品 (1989年入手大和産, 1992年入手大和産, 新潟産), 計3検体を使用した。

表1 芍薬含有製剤の製造承認書記載組成

No	一般名	組 成 (g)
1	葛 根 湯	カッコン8, マオウ4, タイソウ4, ケイヒ末3, シャクヤク末3, カンゾウ末2, ショウキョウ末1 25g (100T*)
2	葛根湯加川弓辛夷	カッコン2.0, マオウ2.0, タイソウ1.5, ケイヒ1.0, シャクヤク1.0, カンゾウ1.0, ショウキョウ0.5, センキョウ1.5, シンイ1.5 エキス2.04g/4.8g (12T)
3	荊芥連翹湯	コウキ0.75, シャクヤク0.75, センキョウ0.75, ジオウ0.75, オウレン0.75, オウゴン0.75, オウバク0.75, サンシシ0.75, レンギョウ0.75, ケイガイ0.75, ポウフウ0.75, ハッカ0.75, キジツ0.75, カンゾウ0.75, ビャクシン1.25, キキョウ1.25, サイコ1.25 エキス2.4g/4.8g (12T)
4	桂 枝 湯	ケイヒ2.2, シャクヤク2.2, タイソウ2.2, ショウキョウ0.55, カンゾウ1.1 エキス2.15g/6g (18T)
5	桂枝加芍薬湯	ケイヒ3.07, ショウキョウ0.77, タイソウ3.07, カンゾウ1.53, シャクヤク4.60 エキス6.6g/7.2g (18T)
6	桂枝茯苓丸	ケイヒ2.1, ブクリョウ2.1, シャクヤク2.1, トウニン2.1, ボタンビ2.1 エキス1.2/6g (18T)
7	七物降下湯	ジオウ1.5, トウキ1.5, センキョウ1.5, シャクヤク1.5, オウバク2.0, オウギ1.5, チョウトウコウ2.0 エキス2.15/6g (18T)
8	芍薬甘草滴	シャクヤク末12.5, カンゾウ末12.5 /25g (100T) シャクヤク3.0, カンゾウ3.0 エキス2.25g/2.97g (9T)
9	小 青 龍 湯	マオウ1.5, シャクヤク1.5, カンゾウ1.5, ケイヒ1.5, サンシシ1.5, ゴミシ1.5, ハンゲ3.0, カンキョウ1.5 エキス1.08g/5.4g (18T)
10	当 帰 芍 薬 散	トウキ0.75, センキョウ0.75, シャクヤク1.5, ブクリョウ1.0, ソウジュツ1.0, タクシャ1.0 エキス2.5ml トウキ末0.188, センキョウ末0.188, シャクヤク末0.375, ブクリョウ末0.25, ソウジュツ末0.25, タクシャ末0.25 エキス+末/2.7g (9T) トウキ末0.409, センキョウ末0.409, シャクヤク末0.546, ブクリョウ末0.546, ソウジュツ末0.546, タクシャ末0.546 /4.8g (12T) トウキ1.813, センキョウ1.813, シャクヤク2.418, ブクリョウ2.418, ソウジュツ2.418, タクシャ2.418 エキス5.44g/7.2g (18T)
11	防 風 通 聖 散	トウキ0.6, シャクヤク0.6, ハッカ0.6, センキョウ0.6, サンシシ0.6, レンギョウ0.6, ケイガイ0.6, ポウフウ0.6, マオウ0.6, ショウキョウ0.2, ダイオウ0.75, ビャクジュツ1.0, キキョウ1.0, オウゴン1.0, カンゾウ1.0, セッコウ1.0, 乾燥硫酸ナトリウム0.37, カッセキ1.5 エキス2.4g/4.8g (12T)
12	芍 薬	大和産 (1989) 大和産 (1992) 新潟産 (1992)

* : Tは錠剤を表す

千葉県衛生研究所
(1993年11月20日受理)

芍薬含有製剤：1992年11~12月に千葉県内で入手した市販薬11処方, 18検体を用いた。表1に各メーカーの医薬品承認書に記載された生薬の組成及び分量を示した。

2. 試薬

定量用指標物質：ペオニフロリンは和光純薬(株)製生薬試験用を用いた。

抽出及びHPLC用溶媒：関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィ用溶媒を用いた。

3. 装置及び機器

HPLC装置：日本分光工業(株)製LC800型ポンプ，MULTI-340型ホトダイオードアレイ検出器（データ処理機付き）

超音波発生器：カイジョウ電気製SONO CLEANER 100

粉碎器：柴田製SCM-40A

4. 試験溶液の調製

超音波抽出法：試料を粉碎器により細末とし，均質になるよう充分攪はんした後，その0.1gを精秤し20mlのアセトニトリル-水（15+85）を加え，20分間超音波抽出した後，0.45μmメンブランフィルターを通して，HPLC用試験溶液とした。

5. HPLCによる定量法

1) HPLC条件

カラム：日本ミリポア製PursilC₁₈，4.6φ×15cm

移動相：アセトニトリル-水（15+85）

流速：1.0ml/min

波長範囲：200-350nm（定量は230nmで行った）

2) 定量法

pae標準品2.0mgを精秤し，移動相と同じ溶媒10mlに溶かし検量線作成用とした。試験溶液は，その10μlをHPLCに注入し，ピーク面積を求め，あらかじめ作成した検量線から製剤中のpae含有量を算出した。

III 結果及び考察

1. 試験溶液調製方法の検討

芍薬（局方品生薬）を用い，超音波抽出時の溶媒組成及び抽出時間について検討した。抽出溶媒として50%メタノール（MeOH），水（H₂O），アセトニトリル-水（ANW）の各溶媒系で10，20，30，40分間抽出を行った。また，抽出率を比較する基準として第12改正日本薬局方生薬試験の項に準ずる還流抽出法¹⁾により調製した試験溶液のpae含有量を測定した。還流抽出による抽出率を100%とした時，超音波抽出による抽出率は，表2に示す通りほぼ同等かそれを上回る値（97.2~105.3%）を示した。とりわけ，50%MeOH，ANWで良好な結果が得られた。従って，市販製

剤の試験については，定法通りHPLC移動相（ANW）を抽出溶媒とし，抽出時間は30分とした。

2. HPLC測定条件の検討

カラムは，Inertsil ODS，TSKgelなどについて検討したが，市販薬分析の際にゴーストピークなどがほとんど見られないPursil C₁₈を用い移動相はMeOH-水，AN-水系の比を変えて試験を行った。その結果，アセトニトリル-水（15+85）が最も分離状態が良く，純度の良いピークを得ることが出来た（図1-3）。なお，カラム温度は30℃，定量波長は230nm，試験溶液注入量は10μl，流速は1.0ml/minの条件が最適であった。

表2 抽出溶媒と時間による抽出率の差

抽出法	抽出時間		抽出溶媒の組成		
	時間(分)	回数	50%MeOH	H ₂ O	AMW
超音波	10	1	14.4	14.2	14.3
		2	13.9	14.5	14.0
		3	14.0	14.0	14.2
		平均値	14.10	14.23	14.17
		抽出率	97.2	98.1	97.7
	20	1	15.3	14.7	14.9
		2	14.8	14.4	15.3
		3	14.0	14.3	15.0
		平均値	15.03	14.47	15.07
		抽出率	103.7	99.8	103.9
	30	1	15.4	14.9	15.1
		2	15.1	14.5	15.4
		3	14.9	14.6	15.3
		平均値	15.13	14.67	15.27
		抽出率	103.7	101.2	105.3
	40	1	14.7	14.5	14.8
2		15.1	14.3	14.9	
3		14.9	14.9	15.2	
平均値		14.90	14.57	14.97	
抽出率		102.8	100.5	103.2	
還流	30 x 2	1	14.7		
		2	14.2		
		3	14.6		
		平均値	14.50		
		抽出率	100.0		

単位：mg/g

MeOH：メタノール

ANW：アセトニトリル-水（15+85）

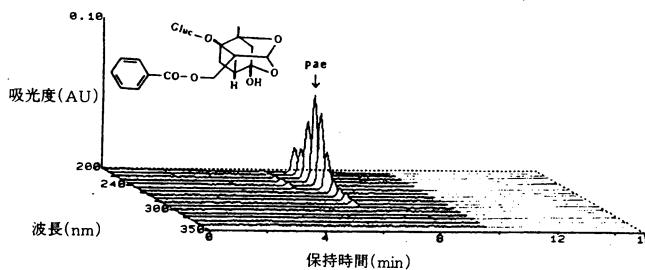
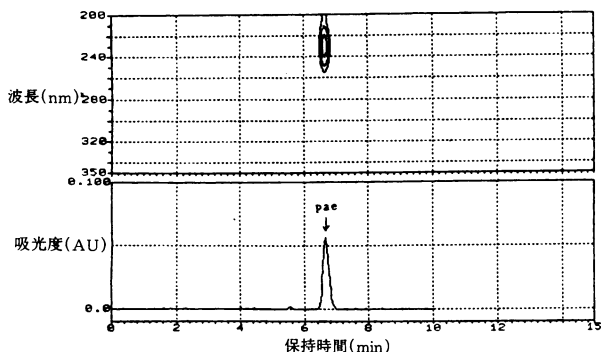


図1 ペオニフロリン標準液の濃度等高線と3次元クロマトグラム

芍薬含有製剤中のペオニフロリンの定量

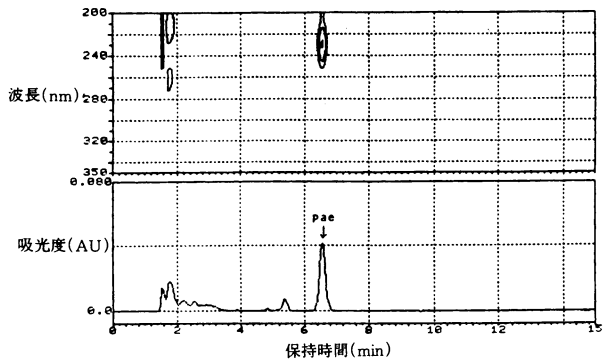


図2 芍薬(局方品生薬)抽出液の濃度等高線と3次元クロマトグラム

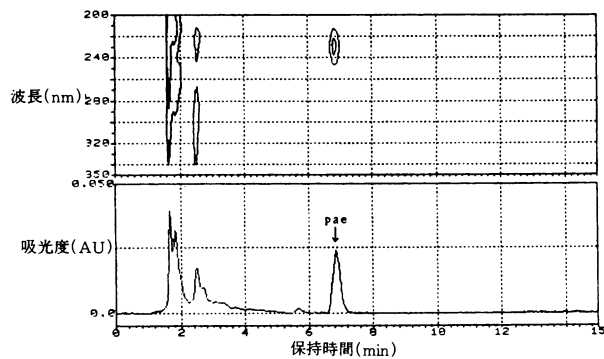
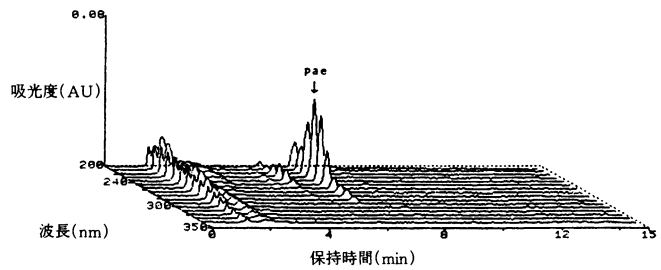
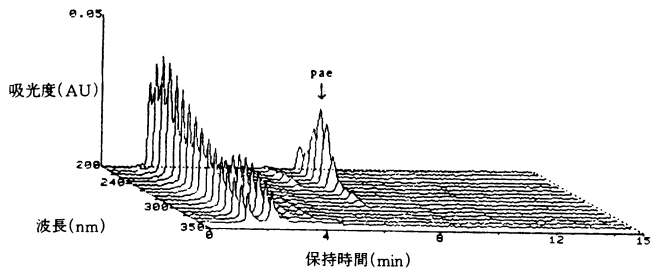


図3 当帰芍薬散(市販品)抽出液の濃度等高線と3次元クロマトグラム



3. 検量線の作成

ペオニフロリン標準品4.0mgを精秤し、10mlの移動相に溶解し標準原液とした。この原液を適宜希釈し標準系列(40, 60, 80, 100, 200 μ g/ml)を調製した。各濃度標準液10 μ lをHPLCに注入した時のピーク面積から検量線を作成した。その結果0.4 μ g~4 μ gの範囲で直線性を示した(図4)。

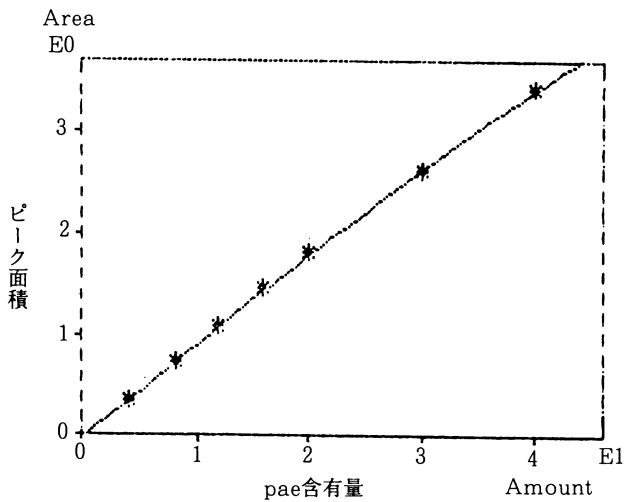


図4 ペオニフロリンの検量線

4. 添加回収実験

標準添加法によりpaeの回収率を調べるため、芍薬単品と芍薬含有製剤にpae標準液0.5 μ g, 1.0 μ gを加えた試験溶液を調整し、その分析を行ったところ、いずれも良好な結果を得た(表3)。

表3 芍薬及び芍薬含有製剤への添加回収(標準添加法)

	回数	添加量(μ g)	回収量(μ g)	回収率(%)
局方芍薬	1	0.5	0.48	96
	2	0.5	0.50	100
	3	0.5	0.50	100
	4	1.0	0.98	98
	5	1.0	1.01	101
	6	1.0	1.02	102
	平均値			99.5
芍薬含有製剤	1	0.5	0.49	98
	2	0.5	0.51	102
	3	0.5	0.48	96
	4	1.0	1.00	100
	5	1.0	1.04	104
	6	1.0	0.99	99
	平均値			99.8

5. 市販製剤中のペオニフロリン含有量調査

1992年11~12月に千葉県内の薬局及び医薬品等販売業者の店頭にて収集した芍薬含有漢方製剤(錠剤, 丸剤, 散剤)について、本分析法による定量試験を行った。まず製剤中のpae量を測定し、その製剤に含まれる芍薬の量から、成分の抽出率を100%と仮定して芍薬中のpae量を算出した。その結果を表4に示す。

局方¹⁾では、芍薬中のpae含量は2~6%, 坂井ら²⁾の報告によれば1~4%, そして赤田ら³⁾は製剤中のpaeは0.1~1.5%と報告している。今回の調査は、これらの報告とはほぼ同様の結果であった。

表4 市販製剤中のペオニフロリン含有量

試料No.	製剤のpae		芍薬中のpae	
	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(%)
1	5.0	41.7	4.17	
2	3.5	16.8	1.68	
3	2.0	12.8	1.28	
4	6.5	17.7	1.77	
5	16.7	26.1	2.61	
6	6.7	19.1	1.91	
	4.4	16.6	1.66	
7	3.7	11.8	1.18	
8	16.5	34.0	3.40	
	15.1	15.1	1.50	
9	4.2	15.1	1.51	
10	7.9	11.4	1.14	
	8.1	11.7	1.17	
	5.4	47.4	4.74	
	6.6	19.6	1.96	
11	2.2	19.8	1.98	
	1.6	10.3	1.03	
	2.7	17.3	1.73	
12		15.3	1.53	
		28.2	2.82	
		25.9	2.59	

IV まとめ

市販されている芍薬含有製剤の有効成分含有量調査を行う為、超音波抽出試験法について検討を行った。また、HPLCでペオニフロリンの定量を行ったところ、ピーク純度の良い結果が得られた。これらのことから超音波抽出-HPLC法は、簡便、迅速かつ精度の良い方法であり、日常検査法として十分に適用出来る方法であることが、確認された。また、今回試験した試料(11処方)のペオニフロリン含有量は、ほぼ適正な値であったことから、市販薬の品質、有効性は、十分に期待できると思われる。

V 文献

- 1) 日本薬局法解説書第12改正：広川書店(1991)
- 2) 原田正敏編集，常用生薬の成分定量：広川書店(1989)
- 3) 浜野朋子，安田一郎，高橋奈穂子，高野伊知郎，瀬戸隆子，渡辺四男也，秋山和幸：漢方製剤の薬剤学的研究(1)，生薬47，79-83，1993.
- 4) 赤田良信，河野貞子，棚瀬弥一郎：高速液体クロマトグラフ法による医薬品の分析(第5報)，薬誌，99(8)，858-861，1979.
- 5) 赤田良信，河野貞子，棚瀬弥一郎：高速液体クロマトグラフ法による医薬品の分析(第12報)，薬誌，100，958-961，1980.
- 6) 清水岑夫，橋本竹二郎，石川 慧，黒崎文也，森田直賢：高速液体クロマトグラフィーによる生薬成分の分析(第1報)，薬誌，99(1)，432-435，1979.
- 7) 長尾弓郎，藤岡章二，山本 馨，岩田昭夫，松岡俊郎：芍薬の品質と栽培に関する研究(その1)，武田研報，35(3/4)，146-150，1976.
- 8) 坂井至通，清水英徳，大平恵美子，今井準二：市場に流通する生薬の品質調査(第2報)，衛生化学技術協議会，第29回，1992.
- 9) 山本恵一，近藤由美子：防風通聖散の三次元クロマトグラム，百味筆筒第2号，14-16，1987.
- 10) 齊藤雄二：漢方製剤中のペオニフロリンの定量，百味筆筒第6号，30-31，1980.
- 11) 鈴木英世：定量用生薬成分について，第16回生薬分析討論会講演要旨，27-34，1987.
- 12) 漢方技術研究会：各種指標成分を用いた漢方エキス剤の分析法と品質管理，ibid，35-40，1987.