

ミセル動電クロマトグラフィーの生薬分析への応用 (第4報)¹⁾
市販センノサイドA標準品の純度について岩上正藏^{a,*}, 沢辺善之^a, 中川照真^b^a大阪府立公衆衛生研究所, ^b京都大学薬学部Micellar Electrokinetic Chromatography for the Analysis of Crude Drugs (IV)
Purity Indication Assay of Commercially Available Sennoside A StandardsSHOZO IWAGAMI,^{a,*} YOSHIYUKI SAWABE^a and TERUMICHI NAKAGAWA^b^a Osaka Prefectural Institute of Public Health,
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received September 2, 1992)

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with a 10 mm borate-phosphate running buffer solution (pH 9) containing 75 mM of sodium taurocholate (TCA) as an anionic carrier was applied to the purity indication assay of commercially available sennoside A standards. The on-column UV detection was performed at 270 nm. The peak area for a given volume of an applied sample solution increased in proportion to the migration time, so that the peak area for the quantitation should be corrected with its migration time. The contents of sennoside A in six commercially available sennoside A standards thus corrected were 93.6~99.2% in peak area percentage.

Keywords—purity indication assay; sennoside A; sodium taurocholate; micellar electrokinetic chromatography

化学分析においては、標準品の純度が重要である。特に生薬成分の分析に用いられる標準品は、生薬そのものから単離、精製されるものが多いため、分子構造や物理化学的性質の類似した成分が不純物として混在する可能性が高い。これら生薬試験用標準品の品質管理は、従来薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行われている。一般に、HPLC による純度試験はメインピークの保持時間の約3倍までの範囲の不純物の有無を調べており、それ以上の保持時間を持つ成分については検討されていないことが多い。

一方、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)²⁾は、短時間で高い理論段数が得られること、荷電物質と非荷電物質の同時分析が可能であること、また逆相 HPLC ではきわめて脂溶性が高いために保持が強すぎる成分でも限られた時間内に溶出できることなどの特徴を有する新しい高分離能分析法である。著者らはすでに MEKC を用いた生薬および漢方エキス製剤中の成分分析について報告し^{1,3,4)}、あわせて MEKC が生薬成分の全体像の把握にも適した方法であることを述べた。今回著者らは生薬試験用標準品の品質管理への MEKC の適用を試み、瀉下薬として用いられる大黃やセンナの主要成分であるセンノサイドAの市販標準品の純度について検討した。

実験の部

1. 試薬及び試料

センノサイドA標準品 (HPLC による純度98%以上と記載のもの) は市販5社の合計6品目をそのまま使用した。リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムおよび四ホウ酸ナトリウムは和光純薬工業製試薬特級を用いた。

タウロコール酸ナトリウム (TCA) はシグマ社製を使用した。メタノールは HPLC 用を用い、その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

2. 試験溶液の調製

センノサイドA標準品 5 mg を pH 8 の 50 mM リン酸緩衝液⁵⁾ 5 ml に溶かし、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して試験溶液とした。

3. HPLC

HPLC によるセンノサイドAの分析法は、ジメチルアミノシリカカラムを用いる方法⁶⁾などが報告されているが、今回は ODS カラムを用いる方法^{7,8)}で行った。なお、移動相には10%酢酸溶液：メタノール混液 (13:7) を用い、流速は 1.0~1.3 ml/min の範囲で適宜変更した。検出波長は 270 nm とし、実験は室温で行った。

4. MEKC

装置にはアプライド・バイオシステムズ社 (ABI 社) の Model 270A キャピラリー電気泳動装置および実験室で作製した装置³⁾を用いた。支持電解質溶液にはいずれの場合も 10 mM ホウ酸-リン酸緩衝液 (pH 9) に TCA 75 mM を添加したものをを使用した。検出は 270 nm でオンカラムで行った。その他の条件は以下のとおりである。

i) ABI Model 270A キャピラリー電気泳動装置

分離用キャピラリーには、内径 50 μm 、長さ 720 mm (有効泳動長 500 mm) のフューズドシリカ管を用いた。試料の導入は正極側より減圧導入法によって 1.5 秒間行った。分離はすべて 35°C の空気恒温槽中で行い、印加電圧は 20 kV とした。なお、ピーク面積の測定には日立クロマトインテグレーター D-2500 を使用した。

ii) 自家製装置

既報³⁾ のものを用いた。分離用キャピラリーにはポリマイクロン社製の内面無処理のフューズドシリカ管 (内径 50

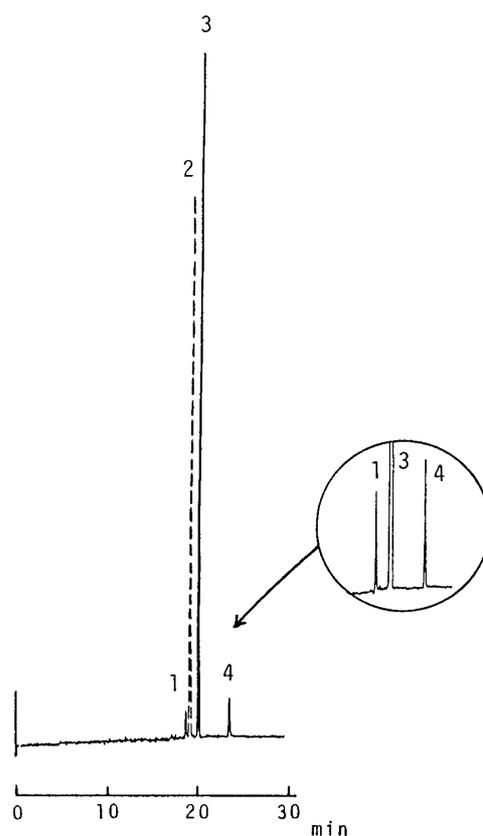


Fig. 1. Electrokinetic Chromatogram of Commercially Available Sennoside A Standard (Sample A)

Supporting electrolyte solution: 10 mM borate-phosphate buffer solution (pH 9) containing 75 mM sodium taurocholate (TCA), Total applied voltage: 12.5 kV, Total tube length: 70 cm (effective length: 50 cm), Sample introduction time: 10 s, Temperature: ambient, Detection wavelength: 270 nm. Peaks: 1, 4=impurity of Sennoside A, 2=Sennoside B, 3=Sennoside A.

μm , 長さ 700 mm, 有効泳動長 500 mm) を使用した. 試料の導入は正極側より落差法 (落差 10 cm, 10 秒間) を用いて行った. 実験はすべて室温で行い, 印加電圧は 12.5 kV 一定とした.

結果及び考察

実験室で作製した装置を用いて市販センノサイドA標準品の MEKC による分析を行ったところ, 数品目に明らかに不純物と考えられる2本のピークの存在が認められた. 一例として, A社製のセンノサイドA標準品のクロマトグラムを Fig. 1 に示した. また参考のためにセンノサイドB標準品のピーク位置を同じクロマトグラム上に破線で示した. さらに, 検出波長を変えてセンノサイドAとこれら二つの不純物のピークの比率を比較した結果, 測定した各波長 (220 nm, 254 nm, 270 nm および 340nm) においてほぼ同じ比率であることがわかった. このことから, これら二つの不純物はともにセンノサイドAと同じ基本骨格を有する化合物であると推定された.

次に, 同じ試料を ODS カラムを用いる逆相 HPLC で分析したところ, センノサイドAの保持時間よりやや早い位置と, センノサイドAの保持時間の約6倍の位置に不純物のピークが認められた. 一般的に, MEKC における試料成分の溶出順序は逆相 HPLC のそれに類似していることから, HPLC で溶出の早かった不純物のピークは MEKC でのピーク 1 (Fig. 1) に, また HPLC で溶出の遅かった不純物のピークは MEKC でのピーク 4 (Fig. 1) にそれぞれ相当するものと考えられる. これら二つの不純物のピークのうち溶出の遅いほうのピークは, メインピークの保持時間の約3倍までの範囲でしか不純物の有無を検討しない場合には見過ごされる可能性が高い. また, このピークは保持時間が長いためにブロードになり, メインピークがフルスケール内におさまるような条件下では, ピークとしての検出がやや困難であると思われる. これに対して MEKC では Fig. 1 のようにメインピークがフルスケール内におさまるような条件下で, 二つの不純物のピークを十分に分離確認できた.

MEKC による分離はキャピラリー内での各成分の移動速度の違いに基づいて行われる. したがって, HPLC における吸光度検出のように分離された各成分が等しい速さでフローセル中を通過する場合は異なり, MEKC では移

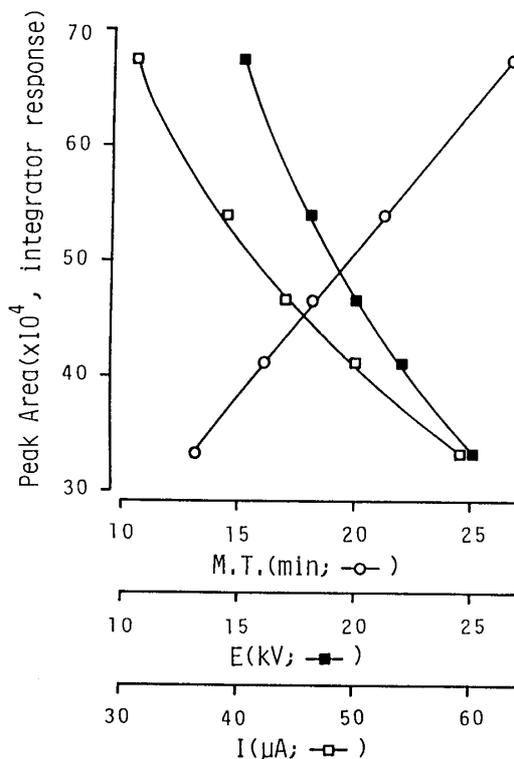


Fig. 2. Relationship between Migration Time (M.T.), Applied Voltage (E), Current (I) and Peak Area of Sennoside A (Sample E)

Supporting electrolyte solution: 10 mM borate-phosphate buffer solution (pH 9) containing 75 mM sodium taurocholate (TCA), Total applied voltage: 20 kV, Total tube length: 72 cm (effective length: 50 cm), Sample introduction time: 1.5 s under reduced pressure, Temperature: 35°C, Detection wavelength: 270 nm. Each point represents the average of 3 times measurements.

TABLE I. Reproducibility of Migration Time and Peak Area at Various Applied Voltage^{a)}

Applied voltage (kV)	Current (μ A)	Order of analysis	Migration time (min)		Peak area (integrator response)	
			mean \pm S.D.		mean \pm S.D.	
25	59	2	12.44		321838	
		6	12.99	13.17 \pm 0.83	327491	331906 \pm 12858
		15	14.08		346389	
22	50	5	15.61		401110	
		7	15.81	16.10 \pm 0.68	406025	409673 \pm 10857
		14	16.88		421883	
20	44	1	16.88		438571	
		8	18.22	18.07 \pm 1.13	466697	462971 \pm 22768
		13	19.12		483646	
18	39	4	20.20		521252	
		9	21.19	21.07 \pm 0.82	537616	536840 \pm 15214
		12	21.83		551651	
15	31	3	25.03		650916	
		10	26.86	26.35 \pm 1.15	676180	669614 \pm 16430
		11	27.16		681746	

^{a)} MEKC conditions, see Fig. 2.

TABLE II. Content of Sennoside A in Commercially Available Sennoside A Standards

Sample	Content (%)	C.V. ^{a)} (%)
A	94.5	0.2
B	94.0	0.3
C	99.1	0.3
C'	93.6	0.7
D	98.9	0.2
E	99.2	0.4

^{a)} Coefficient of variation ($n=3$).

動速度に依存してピーク面積が変化する。したがって、定量分析の場合には移動速度の変化に注意が必要である。また、今回の純度試験のように、面積百分率法を用いて複数のピークからその純度を算出する場合にも、ピーク面積の補正が必要になる。

市販の装置 (ABI 社 Model 270A) を用いて、一定量のセンノサイド A 標準品のピーク面積がその移動時間 (M. T. ; Migration Time), 印加電圧 (E) および電流 (I) によってどのように変化するかを調べた結果が Fig. 2 である。試料には E 社製のセンノサイド A を使用した。また, TABLE I には個々の測定値及び標準偏差を示した。さらに, この装置を用いて市販の 6 品目のセンノサイド A の純度を測定した結果を TABLE II に示す。純度の測定はメインピークの面積の 200 分の 1 以上のピークについて面積百分率法を用いて行った。なお, Fig. 2 から明らかなように, ピーク面積は移動時間に比例することを見出したので (相関係数 $r=0.998$, $n=15$; TABLE I 参照), 移動時間によるピーク面積の補正を行った。また, これらの不純物はメインピークと同じ基本骨格をもつ可能性が高いので, 類似した分子吸光係数を持つと考えられる。したがって, 検出感度に基づくピーク面積の補正は行わなかった。TABLE II から明らかなように, 実験に供した市販のセンノサイド A 標準品の含量は 93.6~99.2% の範囲のパラツキが見られ, 品質が一定ではないという結果が得られた。また, 同一メーカー品でもロットによって含量に差が認められた。

結 論

TCA を陰イオン性キャリアーとする MEKC を用いて、市販数社のセンノサイドA標準品の純度試験を行ったところ、センノサイドAの含量は93.6~99.2%と品質が一定していないことがわかった。さらに、同一メーカーのセンノサイドA標準品であってもロットによって含量が異なることが示された。

MEKC では試料物質の移動速度に依存してピーク面積が変化する。すなわち、一定試料量に対するピーク面積は移動時間に比例することが実験結果より明らかとなった。したがって、正確な定量を行うためには移動時間によるピーク面積の補正が必要である。また、MEKC は注入した試料成分が限られた時間内に溶出すること、従来のクロマトグラフィーを凌ぐ高分離能をもつことなどの特徴を有するので、化学分析における標準品の純度試験に適した方法であると言える。MEKC は特に低分子量化合物に対して高分離能を示す分離分析法であるが、紫外外部吸収検出法については HPLC の方が濃度感度が高いという利点がある⁹⁾。また、精製・分取には不向きである。今後は MEKC と HPLC のそれぞれの利点を生かすことによって、より正確な標準品の品質管理を行うことが望ましい。

引用文献及び注

- 1) 第3報：岩上正藏，沢辺善之，中川照眞，生薬，46，339 (1992).
- 2) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56, 111 (1984).
- 3) 岩上正藏，沢辺善之，中川照眞，生薬，45，232 (1991).
- 4) 岩上正藏，沢辺善之，中川照眞，生薬，46，49 (1992).
- 5) 原田正敏編，“繁用生薬の成分定量”，廣川書店，東京，1989.
- 6) Y. Ohshima, K. Takahashi, *J. Chromatogr.*, 258, 292 (1983).
- 7) S. Hayashi, A. Yoshida, H. Tanaka, Y. Mitani, K. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 406 (1980).
- 8) 瀬戸隆子，岩崎由美子，安田一郎，奥澤昌子，下平彰男，東京衛研年報，32-1，78 (1981).
- 9) 寺部 茂，ぶんせき，p. 599 (1991).