

イオンペアクロマトグラフィーによる呉茱萸配合 漢方エキス製剤中の Synephrine の定量

大友乃里子^a, 上田 亜紀^a, 諏江 裕^b
浜谷 孝郎^c, 大澤 啓助^{*,a}

^a東北薬科大学, ^b国立仙台病院薬剤科, ^c仙台社会保険病院

Determination of Synephrine in Kampo Medicines Containing Evodiae Fructus by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography

NORIKO OHTOMO,^a AKI UEDA,^a HIROSHI SUE,^b
YOSHIROH HAMAYA^c and KEISUKE OHSAWA^{*,a}

^aTohoku College of Pharmacy, 4-1 Komatsushima 4-chome, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981, Japan

^bDepartment of Pharmacy, Sendai National Hospital,

8-8 Miyagino 2-chome, Miyagino-ku, Sendai, Miyagi 983, Japan

^cSendai Shakaihoken Hospital, 16-1 Tsutsumimachi 3-chome, Aoba-ku, Sendai 981, Japan

(Received July 19, 1995)

A simple and reliable ion-pair HPLC method was established for the determination of synephrine contents in kampo prescriptions containing Evodiae Fructus, by using sodium dodecyl sulfate (SDS) as an ion-pair reagent. The best procedure for extracting synephrine was to treat kampo medicines with H₂O-CH₃CN-SDS-H₃PO₄ (73:27:0.5:0.1) with stirring for 10 min. When an ODS column and SDS as an ion-pair reagent were used, synephrine was eluted within 31 min without interference from co-existing components. By using this method, kampo extract preparations containing Evodiae Fructus extract were examined for their synephrine contents. The results revealed that the synephrine contents in such kampo extract preparations were 8-13% of those in the corresponding pharmaceutical decoctions reported previously.

Keywords—synephrine; Evodiae Fructus; ion-pair high-performance liquid chromatography; kampo medicine; quantitative determination

呉茱萸は冷え症用薬とみなされる処方に配合される漢方処方用薬であり、厚生省監修の“一般用漢方処方の手引き”¹⁾に収載されている漢方処方210品目中5品目に配合されている生薬である。その成分についてはアルカロイドとして synephrine が知られており、この成分は陳皮、枳実など *Citrus* 属基原生薬に含まれる²⁾交感神経作用薬で血管収縮、血圧上昇、気管支筋弛緩等の薬理作用³⁾が知られている。

従って、synephrine の定量は、薬事衛生上及び品質管理の観点からも重要である。

近年、その投与、服薬の簡便さなどから漢方エキス製剤が急速に普及している。しかし、漢方エキス製剤は、その基原植物、生薬への調製加工法、保存法の相違などいわゆる生薬自体の変動に加えて、製剤工程によっても品質の変動が起こることが知られている⁴⁾。

著者らは既に呉茱萸が配合された漢方湯液中の synephrine の定量について報告しているが⁵⁾、今回はその時用いたイオンペア高速液体クロマトグラフ (IP-HPLC) 法

がエキス製剤にも適用可能か、また、synephrine の含量が各社の製品により差があるかどうかを明らかにすることを目的に本研究を行った。

実験の部

1. 標準品 dl-Synephrine は Sigma 社製のものを CH₃OH から再結晶して用いた。

2. 試薬 Sodium dodecyl sulfate (SDS) はナカライテスク (株) 製、CH₃CN は和光純薬工業 (株) 製の試薬特級を用いた。

3. 試料 呉茱萸配合漢方エキス製剤は3種類用いたが、呉茱萸湯、温経湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯すべてについて A~C 社製 (A, C 社はエキス細粒, B 社はエキス顆粒) を用い、3処方すべてについて A, B 社は医療用, C 社は市販の一般用を用いた。また、著者らが既に報告⁵⁾した呉茱萸配合漢方湯液中の synephrine の定量値を呉茱萸 1g に対応する量に換算した値 D も示した。各エキス製剤の1日量中の呉茱萸の配合量は、呉茱萸湯 A, B 社 (3.0

g), C 社 (1.5 g), 温経湯 A, B 社 (1.0 g), C 社 (1.5 g), 当帰四逆加呉茱萸生姜湯 A, B 社 (2.0 g), C 社 (1.0 g) であった。

4. 試料の調製 各漢方エキス製剤を粉碎器 SCM-40A (Sibata 製) で粉末とし、呉茱萸 1 g に対応する量 2.5~12.0 g を正確に秤り、溶離液 40 ml を加え 10 分間攪拌抽出した。次に TOMY LC-131 (トミー工業 (株) 製) を用いて、3,000 rpm で遠心分離し、上澄液をとり、さらに残渣に溶離液 2 ml を加え、遠心分離して洗浄操作を 2 回行った。上澄液とその洗浄液とを合わせ、溶離液を加えて全量 50 ml にしたものを試料溶液とした。

5. HPLC の装置及び測定条件 東ソー (株) 製 CCPD 型ポンプ, UV-8011 型 UV 検出器, CO-8010 型カラムオープン及び SIC Chromatocorder 12 インテグレーターを接続し、カラムは TSK gel ODS-120T (4.6 mm i.d.×250 mm) を使用した。フォトダイオードアレイ検出器は、大塚電子 (株) 製 MCPD-3600 型を使用した。測定条件については、著者らが既に報告⁵⁾したものと同様に行った。

6. 検量線 Synephrine について 5~50 µg/ml の濃度範囲で調製し、10 µl を HPLC に注入し、得られたピーク面積より検量線を作成した。ここに得られた検量線は良好な直線性を示した。

回帰直線式は次のとおりであった。

$$y = 4.24276 \times 10^{-8} x + (-1.90735 \times 10^{-5})$$

$$(r = 0.999)$$

7. 抽出溶媒及び試料溶液調製法の検討 呉茱萸湯 A 社について、抽出溶媒として MeOH, 50% MeOH, HPLC の溶離液及び水の 4 種を用いた。また、抽出方法として水中加熱還流、室温での攪拌及び超音波抽出を、それぞれ 15 分間行い、試料の調製の項と同様に調製したものについて定量を行った。

8. 抽出時間の検討 HPLC の溶離液を用いた攪拌抽出について、5, 10, 15, 30, 45 及び 60 分間それぞれ抽出を行い、試料の調製の項と同様に調製したものについて定量を行った。

9. 定量法 調製した各漢方エキス製剤の試料溶液は 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過後、10 µl を HPLC に注入し、標準溶液より得た回帰直線式に従い定量値を算出した。

結果及び考察

抽出溶媒及び試料溶液調製法の検討の項にしたがって行った synephrine の定量値を TABLE I に示した。この際、CH₃CN のみを使用すると、synephrine のピークは観測されなかった。また、HPLC の溶離液については、著者らが既に報告⁵⁾した湯液と同じ比率だと他の成分が synephrine のピーク (25 分) に重なり合ってくるため、H₂O-

TABLE I. Effect of Solvents and Methods on Extraction of Synephrine for 15 min from Gosyuyu-to^{a)}

Solvents	Synephrine content (mg)		
	Refluxing	Stirring ^{b)}	Ultrasonic
Mobile phase	0.49	0.52	0.48
Methanol	0.42	0.42	0.42
50% Methanol	0.50	0.50	0.41
Water	0.48	0.51	0.49

^{a)} Sample: Gosyuyu-to A Co., Ltd., 3.0 g (corresponding to 1 g of Gosyuyu).

^{b)} At room temp.

TABLE II. Effect of Extraction Time on Extraction of Synephrine from Gosyuyu-to^{a)}

Extraction time (min)	Synephrine content (mg)
5	0.50
10	0.54
15	0.52
30	0.53
45	0.53
60	0.53

^{a)} Sample: Gosyuyu-to A Co., Ltd., 3.0 g (corresponding to 1 g of Gosyuyu).

CH₃CN-SDS-H₃PO₄ の比率を (70:30:0.5:0.1) から (73:27:0.5:0.1) へ変更すると、synephrine のピークは 30 分前後に単一のピークとして認められた。ここで、HPLC の溶離液を抽出溶媒として攪拌抽出した場合、synephrine の抽出効果が最も良好であった。

次に、抽出時間の検討の項にしたがって検討した定量値を TABLE II に示した。10 分間抽出を行うことにより synephrine は充分抽出された。

以上の結果から、試料溶液の調製は HPLC の溶離液を用い、10 分間室温で攪拌抽出するのが最適であった。

Synephrine のピークは 30 分付近に現れており、いずれの漢方エキス製剤においても synephrine の定量に影響を及ぼすような妨害ピークは認められなかった。この場合、SDS 試薬を含まない溶離液を用いると、A 社の呉茱萸湯では 2.0~10.0 分の間にすべての成分が重なり合って溶出するため synephrine のピーク (2.5 分) は隠ぺいされてしまい、確認することは出来なかった。さらに、各エキス製剤中の各ピークの単一性はフォトダイオードアレイ検出器を用いて、三次元クロマトグラム、等高線クロマトグラムの測定及び各ピークを上昇部、頂上部と下降部の 3 つの部分に分けてそれぞれの吸収スペクトルが同一かどうかを確認することにより行った。

TABLE III に、本法によって定量した各社の各エキス製剤中の呉茱萸 1 g に対応する synephrine の定量値を示した。また、定量値の変動 (CV, *n*=3) は 0.01~2.60% と比較的精度の良い値を示した。各社の各エキス製剤中の synephrine の含量は、それぞれ呉茱萸湯は 0.04~0.54 mg,

TABLE III. Contents^{a)} of Synephrine in Kampo Medicines^{b)}

Sample	Corporation	Content (mg)
Gosyuyu-to (呉茱萸湯)	A	0.54
	B	0.50
	C	0.04
	D ^{c)}	2.88
Unkei-to (溫經湯)	A	0.58
	B	0.13
	C	0.30
	D ^{c)}	3.97
Toukishigyaku-ka- gosyuyusyokyou-to (当帰四逆加呉茱萸生姜湯)	A	0.29
	B	0.17
	C	0.48
	D ^{c)}	2.63

^{a)} Corresponding to 1 g of Gosyuyu.^{b)} Gosyuyu-to A, B Co., Ltd. (3.0 g), C Co., Ltd. (1.5 g), Unkei-to A, B Co., Ltd. (1.0 g), C Co., Ltd. (1.5 g), Toukishigyaku-ka-gosyuyusyokyou-to A, B Co., Ltd. (2.0 g), C Co., Ltd. (1.0 g).^{c)} Corresponding to 1 g of Gosyuyu in oriental pharmaceutical decoctions reported previously.⁵⁾

温經湯は0.13~0.58 mg, 当帰四逆加呉茱萸生姜湯は0.17~0.48 mgであり, 各社の各エキス製剤の synephrine の含量差を比べると当帰四逆加呉茱萸生姜湯では2.8倍と比較的バラツキが小さいが, 呉茱萸湯では13.5倍とメーカー間でバラツキが認められた。これら製剤中の synephrine の含有量の差は, 同一メーカーが3処方すべてについて一番高い値や, 低い値を示している訳ではないので, 原料生薬に起因するものではなく, エキス剤への製剤工程によるところが大きいと思われる。また, TABLE III に著

者らが既に報告⁵⁾した値Dとエキス製剤のA~C社の定量値の平均値とを比べると, その差の最も小さい呉茱萸湯では漢方湯液では2.88 mg, エキス製剤の平均値が0.36 mgと約13%, 定量値の差の最も大きい温經湯では漢方湯液では3.97 mgに対し, エキス製剤の値が0.34 mgと約8%の値を示し, 漢方湯液に比べエキス製剤の定量値は著しく低い値を示した。

以上のことから抽出溶媒としてHPLCの溶離液を用い, 10分間室温で攪拌抽出し, SDSをIP試薬としてHPLCを行うことにより3種類の呉茱萸配合漢方エキス製剤中の synephrine の定量が可能であることが明らかとなった。

また, synephrine の含量が各社の製品により2.8~13.5倍ものバラツキが認められた。エキス製剤においては, synephrine 含量は漢方湯液の場合と比べて8~13%程度の含量しか認められなかった。

引用文献

- 1) 日薬連漢方専門委員会, “一般用漢方処方の手引き”, 薬業時報社, 東京, 1988.
- 2) 木下武司, 鮫島美枝子, 三川 潮, 生薬, **33**, 146 (1979).
- 3) T. Nikaido, T. Ohmoto, U. Sankawa, T. Hamanaka, K. Totsuka, *Planta Med.*, **46**, 162 (1982).
- 4) 山路 昭, 前田義美, 廣谷芳彦, 紀氏汎恵, 大西 昇, 平岡栄一, 米田該典, 薬剤学, **43**, 175 (1983).
- 5) 大田育子, 水沼周市, 安田高明, 大澤啓助, 薬誌, **114**, 33 (1994).