

コアシェル型逆相HPLCカラムを用いた生薬成分分析 —センナ及びダイオウの品質評価法の開発—

西 博行^a, 川畑 公平^a, 稲垣 昌宣^a, 荒木 菜子^b, 泉田 莉菜^c

Analysis of Active Ingredients of Herbal Natural Medicines
by Reversed-phase HPLC with Core-shell Type Columns:
On the Development of Quality Evaluation Methods of *Sennae Folium* and *Rhei Rhizoma*

Hiroyuki NISHI^a, Kohei KAWABATA^a, Masanori INAGAKI^a, Saiko ARAKI^b, Rina IZUMIDA^c

^a安田女子大学薬学部薬学科

^b天草市立 牛深市民病院

^cイオンリテール株式会社

Abstract

This paper describes the development of the quality evaluation method of herbal medicines (crude drugs) by the reversed-phase (RP) HPLC with core-shell (CS) type columns, which have a core part and a superficial porous silica part, leading to high performance (high theoretical plate number) and relatively low column pressure drops. This time, fast quality evaluation methods for *Sennae Folium* (senna leaf) and *Rhei Rhizoma* (rhubarb), both are well well-known herbal medicines containing agents for promoting bowel movements (laxatives), have been investigated. Target active ingredients contained in these herbal medicines are sennoside A and sennoside B. Referring Japanese Pharmacopoeia (JP) 18th edition, the mobile phase for HPLC and the extraction solvent were optimized. By employing a mixture of diluted acetic acid (100) (1 in 80) and acetonitrile (4:1) as a mobile phase, and a solution of sodium hydrogen carbonate (1 in 1000) as an extraction solvent, successful separation and determination of sennoside A and sennoside B in these herbal medicines were obtained. Sennoside B and sennoside A eluted in this

order within 5 min, leading to a fast assay method. Further other agents having pharmacological effects in *Rhei Rhizoma*, rhein and emodin, were also successfully determined by the RP-HPLC with CS type columns. Obtained contents of sennoside A and B in powdered senna leaf (not less than 1.0%) and powdered rhubarb (not less than 0.25%) tested conformed with JP18 specifications.

Keywords : Senna leaf, Rhubarb, Sennoside A, Sennoside B, Phenyl-hexyl HPLC column

1. はじめに

医薬品開発では分析業務の効率化や生産性の向上を目的とした分析のハイスループット化が急務となっている。HPLC分析ではこれに対応すべく汎用タイプの充てん剤粒子径 (5 μm) より、更に小さな粒子径 (2 μm程度) の充てん剤を用いる超高速分析技術:UHPLC法 (Ultra-HPLC) が開発されている^{1), 2)}。UHPLCにおける充てん剤の微粒子化により、高性能化が可能となり、分析時間の短縮が図られている一方、カラム圧損が極めて大きいため、UHPLC専用装置が必要で、カラム寿

命や機器の保守上は不利となっている。

そこで、新たに非多孔質シリカゲル（コア層）の表面に多孔質シリカゲル層（シェル層）を被覆させた、コアシェル（core-shell, CS）型充てん剤が注目されている。2010年代から市販品が利用できるようになり^{3), 4)}、逆相系CS型カラムによる降圧剤ジルチアゼム的高速純度試験法^{4) - 6)}、シアノコバラミンとその光分解物の迅速分離分析⁴⁾、コルチコステロイド類の迅速一斉分離とクリーム剤の定量⁷⁾、パラベン類の迅速分離^{5), 8), 9)}、親水性相互作用系CS型カラムによる水溶性ビタミン類の一斉分離^{10), 11)}、有機酸類¹¹⁾ について報告した。

更に、我々のグループでは既存のHPLC装置で高性能が得られるCS型充てん剤の特性が生きる応用として、複雑な成分を含有する生薬を対象とした品質評価法の開発研究も進めている。従来のHPLCによる多様な成分を有する生薬成分分析では、長時間を要することが多く、迅速分析が困難なことが一般的である。また、天然物を対象とした有効成分の定量では、分析法バリデーションにおける真の値（添加回収実験）の取得は難しく、試料からの有効成分の抽出条件検討（最大抽出量）等が行われている。

既に、オウバク中のberberineとpalmatin¹²⁾、アヘンから見出されたcodeineとその還元体 dihydrocodeine¹³⁾、ショウキョウやカンキョウに含まれるgingerol及びshogaol類 4 成分に、コウボクに含まれるmagnololとhonokiolを加えた計6種類の活性成分のCS型カラムを用いた迅速一斉分離法¹⁴⁾ については報告した。今回は、汎用生薬であるセンナとダイオウを取り上げ、これらに含まれる活性成分sennoside A及びsennoside BのCS型カラムを用いた迅速分析法について検討する。

また、ダイオウについては、emodin及びrheinの迅速分離分析法の開発、更にこれらが含まれる生薬製剤や漢方製剤中の活性成分の含有量測定を行う。

センナ (*Sennae Folium*) はアフリカ（熱帯地域）原産のマメ科の植物で、薬用部位は葉である（図1参照）。活性成分であるsennosideは腸内で分解され、大腸を刺激してその運動を促し、飲食物からの水分の吸収を抑制する（瀉下効果¹⁵⁾）。Sennosideを有効成分（sennoside A・B calcium salt）とする医薬品は、医療用の瀉下剤としても汎用されており、便秘症や消化管の検査時、消化器の手術前後の腸管内の内容物の除去に使用される。センナは日本薬局方（日局）の第一版より収載されており、日局18「センナ」及び「センナ末」の含量規格では、換算した生薬の乾燥物に対して、総センノシド（sennoside A及びsennoside B）1.0%以上を含むとなっており、HPLC定量法が採用されている¹⁶⁾。

同じく日局第一版より収載されている、ダイオウ（大黃、*Rhei Rhizoma*）は、中国西部の高山に自生するタデ科の多年草で使用部位は根茎である（図2参照）。大半は海拔 3000 m以上の高山地帯に分布する野生株のため生育環境も多様で、さらに採取後の加工条件も異なるので個体のバラツキが大きい。瀉下作用、抗菌作用、向精神作用、鎮痛・消炎作用、腎不全改善作用などを有し、漢方の多くの処方に配合され、重要な生薬とみなされ、別名「将軍」とも呼ばれている¹⁷⁾。日局18「ダイオウ」及び「ダイオウ末」の含量規格では、換算した生薬の乾燥物に対して、sennoside Aのみ規定（0.25%以上含む）されており、HPLC定量法が用いられている¹⁸⁾。



図1 センナ（植物（花））とその薬用部位（葉（乾燥））



図2 ダイオウ（植物（花））とその薬用部位（根茎（輪切り））

2. 実験方法

2.1 試薬および試料

p-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル（エチルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-プロピル（*n*-プロピルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル（イソプロピルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル（ブチルパラベン）、ボイドポリユームのマーカ物質としてウラシル、また、臭化テトラ *n*-ヘプチルアンモニウム、緩衝液調製用に用いた酢酸（100）、酢酸ナトリウム、及び炭酸水素ナトリウム（NaHCO₃）、リン酸（85%）、水酸化ナトリウムは、富士フィルム和光純薬工業（株）（東京）の試薬特級を購入し、使用した。移動相は、水、あるいは緩衝液と有機溶媒（メタノール（MeOH）、テトラヒドロフラン（THF）、アセトニトリル（ACN））との混液とし、有機溶媒は同社のHPLC用を購入して用いた。水は、ElixUV純水製造装置（日本ミリポア社）を用いて精製したものを用いた。

生薬の試料としては、日局「センナ末」（健栄製薬（株）・（株）栃本天海堂）、日局「ダイオウ末」（日本ヘルス（株）・日本粉末薬品（株））、センノシド含有医薬品として、センノシド錠（センナリド[®]錠、サンド（株））、センノシド顆粒剤（アローゼン[®]顆粒、（株）ポーラファーマ）、ダイオウが配合されている漢方エキス顆粒剤として、大黃甘草湯（ツムラ）、大黃牡丹皮湯（ツムラ）、以上いずれも市販品を購入して用いた。標品としての、sennoside A、sennoside B、naringin、rheinは、富士フィルム和光純薬（株）の局方生薬試験用あるいは同社の生薬試験用を、emodinは同社試薬を購入して用いた。

これらの構造式を図3に示す。Sennoside Aと sennoside Bとは立体異性体であり、naringinは「ダイオウ」及び「ダイオウ末」において、システム適合性の試験で用いられている。

パラベン分離の検討に用いた混合試料溶液は、以下のように調製した。各パラベン及びウラシル 100 mgをとり、MeOHに溶かしそれぞれ 100 mLとし、各パラベンの原液とした。この原液それぞれ 5 mLをとり、水を加えて 50 mLとしてパラベン混合液（ウラシルを含む）を調製した（各成分 0.01 w/v%濃度）。分離検討用に用いたsennoside A及びsennoside Bの混合液は、以下のようにして調製した標準溶液を用いた。それぞれ 15 mgを精密に量り、NaHCO₃溶液（1→1000）を加えて溶かし正確に 50 mLとする。これらの溶液を正確に1：1に混合して、標準溶液（各成分 0.015 w/v%濃度）とした。

2.2 装置及びカラム

HPLC装置は（株）島津製作所（京都）のProminence装置一式（UHPLC対応）を使用した。ポンプはLC-20AB（耐圧上限40 MPa、約 400 kg/cm²）、オートインジェクターはSIL-20ACを用い、多波長検出器としてSPD-M20A、システムコントローラはCBM-20A、カラムオーブンはCTO-20Aを、また、デガッサーはDGU-20A3を使用した。なお、クロマトグラムのモニターは、波長 340 nmあるいは 254 nmで行い、カラムオーブンは、40℃一定温度とした。流速は原則、1.0 mL/minとした。なお、CS型カラムの性能を発揮させるためにカラム直後の配管は内径 0.1 mmのものを用いたが、検出器のセルは通常の 10 μLのものを使用し、スリット幅は 8 nm（他に 1.2 nm選択可能）

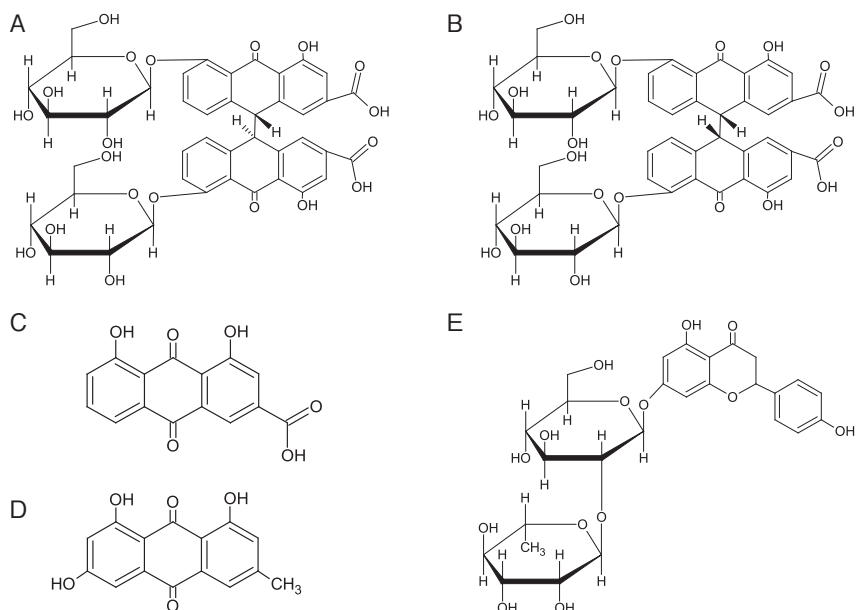


図3 検討に用いた標品の構造

A : sennoside A, B : sennoside B, C : rhein, D : emodin, E : naringin

とした。検出器の時定数（レスポンス）及びサンプリングタイムは、初期設定値（640 ms）から80 msとした。

直鎖型のCS型カラムとしては、(株)島津ジーエルシー（東京）から購入したKinetex C18（EVO）、平面性を有するCS型カラムとして、(株)島津ジーエルシーから購入したKinetex Biphenyl及びKinetex Phenyl-hexyl、ナカライテスク(株)（京都）から購入したCOSMOCORE Cholester（以上4種類のカラム全て2.6 μm 、4.6 mm i.d. \times 100 mm）を主に使用した（図4参照）。また、日局の試験を行うためにCS型で、カラムサイズと充てん剤粒子径が日局規定のものと同じKinetex 5C18（5 μm 、4.6 mm i.d. \times 150 mm）も使用した。

ピークの理論段数 N 、理論段高さ H 及び分離度 R_s は、(株)島津製作所（京都）のProminence装置一式に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。移動相は、日局「センナ」及び「ダイオウ」を参照して、有機溶媒と酢酸塩緩衝液、薄めた酢酸との混液を用い、使用前にメンブレンフィルター（0.45 μm ）でろ過し、分析に供した。

2.3 センナ末及びセンノシド含有医薬品の定量法

Sennoside A標品及びsennoside B標品、それぞ

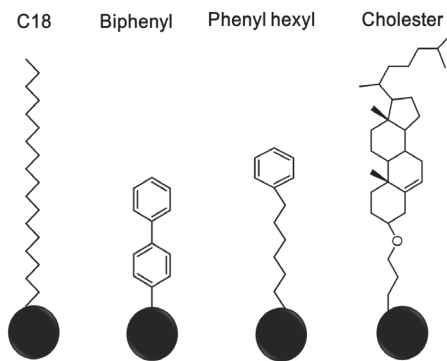


図4 検討に用いたカラムの固定相部位

れ15 mgを精密に量り、 NaHCO_3 溶液（1 \rightarrow 1000）で溶解し、正確に50 mLとする。それぞれの溶液を正確に1:1で混合したものを調製し、標準溶液とする（0.015 w/v%）。試料溶液の調製は以下の通りである。「センナ末」の場合は、約0.25 gを精密に量り、遠沈管に入れ、 NaHCO_3 溶液（1 \rightarrow 1000）25 mLを正確に加え、30分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。センナリド錠の場合は、1錠を50 mLのメスフラスコに入れ、 NaHCO_3 溶液（1 \rightarrow 1000）40 mLを加え、超音波処理を行う。その後、 NaHCO_3 溶液

(1→1000)を加えて正確に50 mLとして、よく振り混ぜ、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。アローゼン顆粒は、顆粒剤約0.5 gを精密に量り、遠沈管に入れ、NaHCO₃溶液(1→1000)25 mLを正確に加え、30分間振り混ぜる。この液をろ過し、ろ液を試料溶液とする。標準溶液及び試料溶液、各々10 µLを正確にとり、以下2.4記載の条件にて測定を行う。

2.4 ダイオウ末及びダイオウ配合漢方製剤中のセンノシドの定量法

標準溶液は、2.3で調整したものをを用いる。「ダイオウ末」あるいはダイオウ配合の漢方製剤約0.25gを精密に量り、遠沈管に入れ、NaHCO₃液(1→1000)25 mLを正確に加え、30分間振り混ぜる。この液をろ過し、ろ液を試料溶液とする。標準溶液及び試料溶液、各々10 µLを正確にとり、以下の表1記載のHPLC条件にて測定を行う。

3. 結果及び考察

3.1 パラベン (p-ヒドロキシ安息香酸エステル) 混合物の分離によるCSカラム評価

パラベン混合物は、中性化合物で安息香酸エステル部位の置換基がメチル基1つ違いのものや枝分かれのものが利用できるため、逆相HPLCカラムの性能評価に有用である^{8), 9)}。従来からある汎用タイプのC18カラムに加え、平面性を有する部位を持つ逆相型のカラムとして、Biphenylカラム、Phenyl-hexylカラム及びコレステロール基を固定化したCholesterカラムを用い、水/ACN=3:2 (ACN 40%)でパラベン混合物の分離を行った。パラベン混合物試料のなかで最後に溶出するBuPの保持時間が最も大であったCholesterカラム(5.5分)に対し、Biphenylカラムで3.6分、Phenyl-

hexylカラムでは4.1分、C18カラムでは4.8分であった。パラベン類に対してはBiphenylカラムとPhenyl-hexylカラムで保持が小さく、残り2つのカラムで保持が大きい結果となった。また、いずれのカラムでも5分前後で良好な分離が得られ、CS型のカラムの特性として10 cmカラムで数分の保持時間の試料に対して4種のカラムともほぼ同じ、約2万段の理論段数*N*が得られた。すなわちカラム性能*N*について4種のカラムで差はないと判断された。

3.2 移動相の検討

日局18「センナ」「センナ末」では、カラムとしてC18カラムを用い、臭化テトラ*n*-ヘプチルアンモニウムをイオン対試薬として用いる、イオン対HPLC法が採用されている。日局18「センナ」の定量法に準じて、粒径5 µm長さ15 cmのカラムを用いて試験を行ったときのクロマトグラムを図5に示す。カルボキシル基も持つsennoside類が4級アンモニウムとイオン対を作り、保持が増大して他の成分との分離が良好となっているが、sennoside Aの溶出が約25分と分析に時間を要する。一方、同じsennoside類を含有する生薬であるダイオウでは、日局18の定量法の移動相条件は、薄めた酢酸(100)(1→80)とACN混液(4:1)を用いており、sennoside Aの溶出が約15分になるように流速を設定することになっている。システム適合性の試験におけるシステムの選定では、sennoside Aに加えてnaringinを用い、これらがこの順に溶出し、分離度が3以上のカラムを用いることと規定されている。なお、図5に示したように逆相HPLCでは、ジアステレオマー関係であるsennosideはB、Aの順に溶出し(分離度*R_s*=21.5)、10及び10'位のがerythroであるsennoside Bより、threoであるsennoside Aの保持が極めて大で、分

表1 センナ及びダイオウ中のsennoside定量のためのHPLC条件

検出器	UV 検出器 (測定波長: 340 nm)
カラム	Kinetex C18 (EVO) (2.6 µm, 4.6 mm i.d. × 100 mm) 又は同等の性能を有するカラム
カラム温度	40°C付近の一定温度
移動相	薄めた酢酸 (100) (1→80) /ACN 混液 (4:1)
流量	1 mL/min

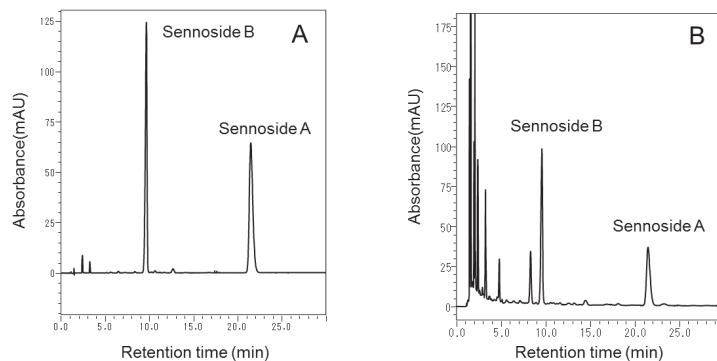


図5 日局18「センナ末」定量法に準じた方法によるHPLC分析
 A：標準溶液、B：「センナ末」(0.25 g/25 mL NaHCO₃溶液 (1→1000))、
 カラム：Kinetex 5C18 (4.6 mm × 15 cm)、カラム温度：40℃、
 移動相：薄めた1mol/L酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) (1→10) /ACN = 17/8
 (ACN32%) 5 mmol/L [CH₃(CH₂)₆]NBr、検出：340 nm、
 流速：1 mL/min

子の構造(長さ)の違いによると考えられた。

今回、センナ及びダイオウに含まれるsennoside類の迅速HPLC分離の検討にあたり、簡便性から両者で同じ移動相、カラムにはCS型の粒子径 2.6 μm、長さ10 cmのC18あるいは逆相系カラムを用いる分離法の開発を検討することとした。また、イオン対試薬は用いない条件が一般的に好ましいので、緩衝液としては日局18「ダイオウ」に用いられている薄めた酢酸(100)(1→80)とし、有機溶媒の選択性についてKinetex C18(2.6 μm、4.6 mm i.d.×100 mm)カラムを用いて検討を行った。その結果、緩衝液とTHFとの混液(4:1)では、naringinの保持が大きくなり、一方、緩衝液とMeOHとの混液(3:2)では、溶出順が逆になった。以上より、有機溶媒としては3者の中で最もカラム圧損が低く、「ダイオウ」のシステムの選定がそのまま採用できるACNを用いることとした。

次に緩衝液のpHに関しては、薄めた酢酸(100)(1→80)が無調整でほぼpH 3であったため、これを薄めたリン酸(1→10)あるいは1 mol/L水酸化ナトリウム液でpH 2及びpH 4としたものを調製し、ACNとの混液(4:1)を用いてシステムの選定の検討を行った。その結果、pH 2とpH 3(無調整)とではほとんど差がなく、pH 4ではセンノシド類の溶出がやや早くなったものの選択性に大差なかった。以上より、移動相として薄めた酢酸(100)(1→80)とACNの混液を用いるこ

ととした。

更に、有機溶媒ACN濃度のsennoside類及びnaringinの保持に及ぼす影響について、15%、20%及び25%の添加で、Kinetex C18(EVO)、Kinetex Biphenyl及びCOSMOCORE Cholesterの3種類のカラムを用いて検討した。その結果、20%添加で2分～8分に溶出し、Cholesterカラムを除いて「ダイオウ」のシステムの選定に適合した。なお、15%添加ではsennoside Aの保持時間が20分～40分と5%の減少で急激に大きくなり、有機溶媒濃度の保持に対する影響が大きな化合物であることが分かった。以上より、2.6 μm、4.6 mm i.d.×100 mmカラムにおいても、「ダイオウ」と同じくACN 20%付近が最適濃度と判断された。

3.3 センナ末、センノシド含有医薬品中のsennosideの分析

上記の検討より、「ダイオウ」の定量法条件である5 μm、4.6 mm i.d.×150 mmカラムサイズでの、薄めた酢酸(100)(1→80)/ACN混液(4:1)がそのまま2.6 μm、4.6 mm i.d.×100 mmカラムサイズでも適用可能であったことから、本条件を用いて「センナ末」及びセンノシド含有医薬品に含まれるsennoside類の定量に応用した。生薬の場合は、分析法バリデーションにおける添加回収実験等の実施が困難なことが多く、一般的には最大の抽出効率が得られる溶媒が用いられることが多い。今回、対象とした「センナ」「センナ末」と

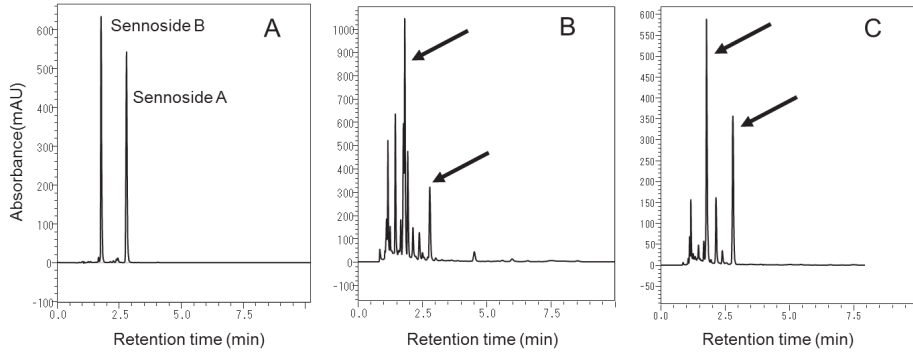


図6 「センナ末」及びセンノシド錠中のsennosideのHPLC分析

A：標準溶液、B：「センナ末」、C：センナリド[®]錠、カラム：Kinetex C18 (2.6 μ m、4.6 mm \times 100 mm)、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、移動相：薄めた酢酸 (100) (1 \rightarrow 80) /ACN 混液 (4 : 1)、検出：340 nm、流速：1mL/min

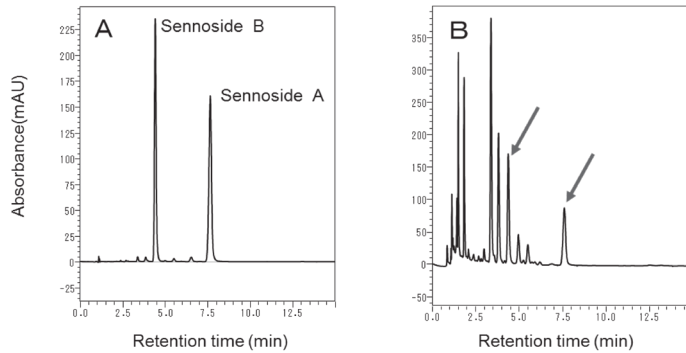


図7 「センナ末」中のsennosideのHPLC分析

A：標準溶液、B：「センナ末」、カラム：Cholesterolカラム (2.6 μ m、4.6 mm \times 100 mm)、他は図6と同じ

「ダイオウ」「ダイオウ末」の定量法における抽出溶媒は、前者では薄めたメタノール (7 \rightarrow 10) が、後者ではNaHCO₃溶液 (1 \rightarrow 1000) が用いられている。予備的な実験として「センナ末」及び「ダイオウ末」を試料として両抽出溶媒を用いて抽出を行い、HPLCでのsennoside類のピーク面積 (ピーク高さ) を比較したところ、大差なく、また夾雑成分のピークにもあまり差を認めなかった。また、生薬や漢方は元来煎じ薬として服用されることもあり、有機溶媒を用いない後者による抽出を行うこととした。図6にKinetex C18 (EVO) (2.6 μ m、4.6 mm i.d. \times 100 mm) を用いて、「センナ末」及びセンノシド含有医薬品としてアローゼン顆粒剤の定量を行った時のクロマトグラムを示す。

各ピークに関しては、保持時間と多波長検出器

によるUVスペクトルにより確認を行った。

Sennoside B、sennoside Aの順に、それぞれ保持時間 1.8 分 (質量分布比 $k=1.0$)、2.8 分 ($k=2.1$) で溶出し、両者の分離度 R_s は 13.7 であった。「センナ末」では、sennoside B付近の夾雑ピークとの分離がやや不十分であったが、センナリド錠では分離は良好で 3 分以内での定量が可能であった。定量結果を表2に示す。なお、Kinetex C18 (2.6 μ m) の 10 cmカラムでの「センナ末」の夾雑成分との分離改善を目的に、上記のパラベン類分離で保持の強かったカラムサイズが同じCholesterolカラムを用いて分離を行った結果を図7に示す。保持の増大とともに夾雑成分との分離が改善されている。本条件で流速を 2.0 mL/min で分析するとほぼ 3 分程度での定量が可能となる。

3.4 ダイオウ末、ダイオウ配合漢方製剤中の活性成分の分析

「ダイオウ末」及びダイオウ配合漢方製剤として大黃甘草湯エキス顆粒剤、大黃牡丹皮湯エキス顆粒剤につき、NaHCO₃溶液 (1→1000) による抽出を行い、Kinetex C18 (EVO) 及びPhenyl-hexylカラム (2.6 µm, 4.6 mm i.d.×100 mm) を用いて図6と同じ条件で定量を行った。両カラムで夾雑物分離との選択性等に大差はなかった。図8に後者のカラムによる「ダイオウ末」及び大黃牡丹皮湯エキス顆粒剤を分析したときのクロマトグラムを、定量結果を表2に示す。なお、各ピークに関しては、保持時間と多波長検出器によるUVスペクトルにより確認を行った。Sennoside Bとsennoside Aとの分離度Rsは13.3であった。

また、日局「ダイオウ」「ダイオウ末」の各条に

は、rheinの薄層クロマトグラフィー (TLC) による確認試験の規定があり、TLC用の標品が入手可能である。ダイオウの活性成分としては、その他にも多くの化合物が報告されているが、抗菌作用ほか多様な生理活性を有する入手可能なemodinと合わせてのHPLC分離分析法につき、検討を行った。標準溶液はそれぞれ5 mgを精密に量り、少量のNaOH試液で溶かし、NaHCO₃溶液 (1→1000) で正確に50 mLとした (0.01 w/v%溶液)。試料溶液は、sennoside類のものと同じ溶液を用いた。両成分はsennoside類と異なり、配糖体でないため脂溶性が大きく、ACN 50%条件で3分程度での分離が可能であった。図9に分離クロマトグラムを示す。各ピークは、保持時間と多波長検出器でのUVスペクトルにより確認を行った。両成分の分離度Rsは13.2であった。

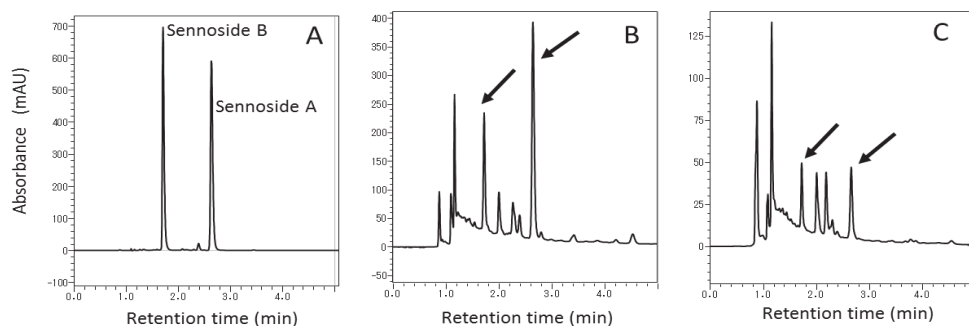


図8 「ダイオウ末」及び大黃牡丹皮湯中のsennosideのHPLC分析

A : 標準溶液、B : 「ダイオウ末」、C : 大黃牡丹皮湯、カラム: Phenyl-hexylカラム (2.6 µm, 4.6 mm i.d.×100 mm)、他は図6と同じ

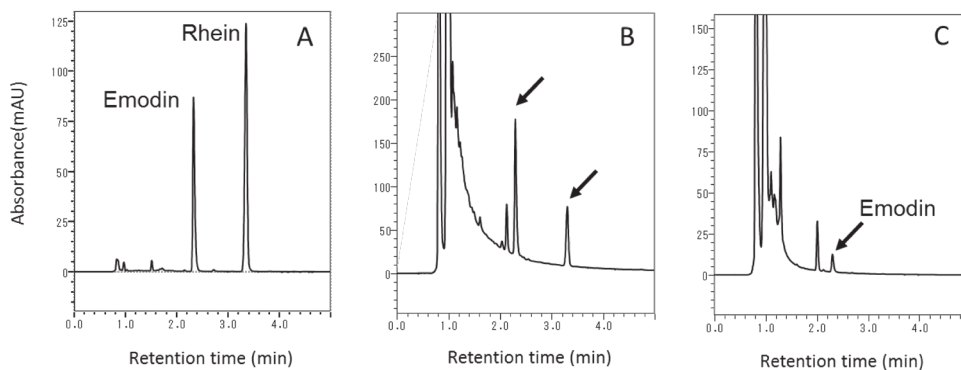


図9 「ダイオウ末」及び大黃牡丹皮湯中のemodin及びrheinのHPLC分析

A : 標準溶液、B : 「ダイオウ末」、C : 大黃牡丹皮湯、カラム: Phenyl-hexylカラム (2.6 µm, 4.6 mm i.d.×100 mm)、移動相: 薄めた酢酸 (100) (1→80)/ACN 混液 (1 : 1)、他は図6と同じ

表2 「センナ末」「ダイオウ末」センノシド含有医薬品中の活性成分分析の結果

試料	sennoside A	sennoside B	その他	規格等
「センナ末」	10.9 mg/g	23.6 mg/g	-	日局規定：センノシド ^o A及びセンノシド ^o B 1.0%以上：適合
センナリド ^o 錠	5.3 mg/錠	7.4 mg/錠	-	センノシド ^o A・B Ca 12mg/錠
アローゼン ^o 顆粒	7.5 mg/g	8.4 mg/g	-	センノシド ^o 10~20 mg/g
「ダイオウ末」	3.2 mg/g	4.8 mg/g	emodin:1.7 mg/g rhein:2.1 mg/g	日局規定：センノシド ^o A 0.25%以上：適合
大黃甘草湯	1.18 mg/g	1.63 mg/g	-	エキス1.5g(3.5 mg以上)/7.5g 製剤
大黃牡丹皮湯	0.79 mg/g	1.13 mg/g	-	エキス3.5g/7.5g 製剤

ダイオウ末での測定結果を表2に示す。今回の測定では、標品類の水分換算や定量値の最大化のための抽出溶媒の最適化を行っていないものの、ほぼ妥当な結果が得られた。ダイオウに関しては、sennoside類を含め、4成分の測定にはグラジエント溶出法の適用が有効で、20% ACNから70% ACN (5分直線勾配) 条件で10分程度での一斉分離が達成されている¹⁹⁾。また、活性成分の定量に関しては、最大抽出を目的とするか、実際の煎じ薬を考慮して水での抽出を考えるかは様々なアプローチがある。

4. ま と め

本論文では、コアシェル (core-shell、CS) 型充てん剤の特性を生かした応用として、複雑な成分を含有する生薬を対象とした品質評価法の開発研究の一環として、汎用生薬であるセンナとダイオウを取り上げ、これらに含まれる活性成分 sennoside A及びsennoside BのCS型カラムを用いた迅速分析法について検討した。また、ダイオウについては、emodin及びrheinの迅速分離分析法、更にこれらが含まれる生薬製剤や漢方製剤中の活性成分の含有量測定を行った。Sennoside類ではAとBはジアステレオマーであるが、threo体であるAの逆相HPLCでの保持がerythro体であるBと比較して極めて大きく、立体異性体の認識に優れていることが分かった。従来の分析サイズカラムでの分離時間 (20~30分) を、コアシェル (core-shell、CS) 型充てん剤を用いることで十分の一程度 (約3分) まで高速化可能であることが示された。

引用文献

1. Fekete, S., Schappler, J., Veuthey, J-L. and Guillarme, D. (2014) Current and future trends in UHPLC. Trends Anal. Chem., 63: 2-13.
2. De Vos, J., Broeckhoven, K. and Entlink, S. (2016) Advance in ultrahigh-pressure liquid chromatography technology and system design. Anal. Chem., 88, 262-278.
3. Sanchez, C., and Farkas, T. (2012) The latest trend in LC analysis. Am. Lab., 44: 11-14.
4. Nishi, H. and Nagamatsu, K. (2014) New trend in the LC separation analysis of pharmaceuticals -High-performance separation by ultra high-performance liquid chromatography with core-shell particle C18 columns-. Anal. Sci., 30: 205-211.
5. 永松久実, 西 博行. (2013) コアシェル型充てん剤を用いたUHPLC法によるジルチアゼムとその関連物質及びパラベンの一斉迅速分析法の開発. 安田女子大学紀要, 41: 477-486.
6. 西 博行, 川畑公平, 稲垣昌宣, 土井美歩, 澤田侑利. (2020) 平面性を有するコアシェル型逆相カラム-HPLCでのジルチアゼム類の分離選択性と迅速製剤分析法の開発. 安田女子大学紀要, 48: 339-350.
7. 西 博行, 川畑公平, 稲垣昌宣, 内田佳那, 永田智沙. (2021) コアシェル型逆相HPLCカラムを用いたコルチコステロイド類の迅速一斉分離での選択性の改善と外用剤の定量法開発. 安田女子大学紀要, 49: 305-316.
8. 永松久実, 西村基弘, 西 博行. (2012) UHPLC法によるパラベンの分離とジルチアゼム製剤の定量-薬品分析化学実習のHPLC法からUHPLC法への移管-. 安田女子大学紀要, 40: 403-411.
9. 西 博行, 稲垣昌宣. (2015) パラオキシ安息香酸アルキルエステル (パラベン) 類のコアシェル型C18によるUHPLC分離及びキャピラリー GC-MS分析-薬品機器分析学実習におけるパラベン試料の有用性-. 安田女子大学紀要, 43: 367-376.
10. 西 博行. (2018) 疎水性相互作用あるいは親水性相互作用を利用するコアシェル型カラムHPLC法による水溶性ビタミン類の分離分析. 安田女子大学

紀要, 49: 305-316.

11. Nishi, H. (2021) Development of fast and selective analytical methods of pharmaceuticals and herbal medicines by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatography*, 42, 1-16.
12. 野村彩乃, 河野早苗, 川畑公平, 稲垣昌宣, 西 博行. (2018) コアシェル型逆相HPLCカラムでのベルベリンとパルマチンの分離における選択性の改善. 日本生薬学会第65回年会 (安田女子大学) abstracts, p.261, 2P-64.
13. 西 博行. (2015) 鎮咳薬コデイン及びジヒドロコデインのUHPLC分離におけるテトラヒドロフラン (THF) の分離選択性改善効果-. 安田女子大学紀要 百周年記念号, 44: 371-379.
14. Sumida, Y., Kimura, M., Yorie, T., Soeshima, N., Kawabata, K., Inagaki, M. and Nishi, H. (2018) Simultaneous separation of active ingredients contained in ginger, processed ginger and Magnolia bark by reversed-phase HPLC with core-shell type columns. Application to Kampo products and food analysis. *Chromatography*, 39: 153-160.
15. 伊藤美千穂, 北山 隆監修, 原島広至著. (2007) 生薬単, pp.56-57, (株)NTS出版.
16. 第十八改正日本薬局方: 厚生労働省 (2021). 「センナ」「センナ末」 (pp.1979-1981).
17. 伊藤美千穂, 北山 隆監修, 原島広至著. (2007) 生薬単, pp.220-221, (株)NTS出版.
18. 第十八改正日本薬局方: 厚生労働省 (2021). 「ダイオウ」「ダイオウ末」 (pp.1985-1987).
19. 平安梨紗, 泉田莉菜, 荒木菜子, 川畑公平, 稲垣昌宣, 西 博行. (2018) コレスタールカラムによるセンナおよびダイオウに含まれる活性成分の一斉分離分析法の開発. 第25回クロマトグラフィーシンポジウム (弘前大学) abstracts, *Chromatography, Sup.1*, p.44, P-15.

[2021. 9. 16 受理]

コントリビューター: 大山 義彦 教授
(薬学科)