

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 001)

小出達夫・岩田美保・前川京子・斎藤博幸
谷本 剛[#]・岡田敏史

Glycyrrhizinic Acid Reference Standard
(Control 001) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito,
Tsuyoshi Tanimoto[#], and Satoshi Okada

The raw material of glycyrrhizinic acid was examined for preparation of the "Glycyrrhizinic Acid Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum: λ max, 251 nm; and specific absorbance ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) in ethanol at 251 nm, 146; IR spectrum, specific absorptions at 1714, 1655, 1215, and 1170 cm^{-1} ; and the spectrum of raw material was consistent with that of Standard (Control 991). Also, thin-layer chromatography, no impurity was detected; high-performance liquid chromatography, several impurities were detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.2% and total amount of impurities was less than 0.4%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 001) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: glycyrrhizinic acid, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方に記載されている「カンゾウ」, 「カンゾウ末」, 「カンゾウエキス」及び「カンゾウ粗エキス」中のグリチルリチン酸含量の定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「グリチルリチン酸標準品 (Control 001)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は丸善製薬株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。水分: 0.65%, 比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (λ max): 148.5, HPLCによる純度試験: 純度 99.7%。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方グリチルリチン酸標準品 (Control 991; 日局標準品と略称¹⁾)を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

3. 装置

本標準品原料の品質評価試験にあたり, 下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC。

赤外分光光度計: 日本分光, FT-IR VALOR-III。

水分測定器: 平沼産業, AQ-6型。

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-10A 型検出器, CT0-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc。

4. 試験方法

特に記すもののほかは, 日局一般試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料をデシケーター中で 12 時間以上乾燥し (減圧 0.67kPa 以下, 五酸化リン, 50°C), その約 4mg を精密に量り, 希エタノール 30ml を加えて溶かした後, 希エタノールを加えて正確に 100ml とし, 試料溶液とする。この液につき, 希エタノールを対照にして吸光度測定法により, 210 ~ 300nm の波長範囲における吸収スペクトルを測定し, 吸収極大波長における吸光度より比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ を求める。

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料をデシケーター中で 12 時間以上乾燥し (減圧 0.67kPa 以下, 五酸化リン, 50°C), その 2mg を量り, 赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム 0.2g と混合, 磨砕した後, 打錠する。この臭化カリウム錠剤につき, 空気を対照に 4000 ~ 400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定する。

3) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

標準品原料 5mg を希エタノール 2.5ml に溶かし, 試料溶液とする。この液 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5ml を量り, 希エタ

[#] To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

ノールを加えてそれぞれ正確に50mlとし、標準溶液1, 2, 3, 4, 5とする。試料溶液及び各標準溶液10 μ lにつき、以下の条件で薄層クロマトグラフ法による試験を行う。

薄層板：メルク社製プレコート薄層板シリカゲル60 F₂₅₄ (厚さ, 0.25mm)。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸(100)混液(7:2:1)。

展開距離：10 cm

検出：1) 紫外線照射(主波長：254nm)

2) 薄めた硫酸(1→2)を噴霧し、105°C, 10分間加熱

不純物スポットの蛍光または呈色の強さを標準溶液1～5のスポットのそれと比較し、不純物量を推定する。

4) 液体クロマトグラフ(HPLC)法による純度試験

標準品原料約5mgを精密に量り、希エタノール5mlを加えて溶かし、試料溶液とする。この液1mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100mlとし、標準溶液とする。標準溶液5mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100mlとし、希釈標準溶液とする。試料溶液、標準溶液及び希釈標準溶液20 μ lにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピーク面積に対する相対面積百分率を求める。

操作条件

検出器：紫外吸光度計(測定波長：254nm)

カラム：TSK-GEL ODS-80Ts(4.6mm ϕ × 150mm)

カラム温度：30°C付近の一定温度

移動相：薄めた酢酸(100)(1→50) / アセトニトリル混液(3:2)

流量：0.7ml/min

カラムの選定：グリチルリチン酸5mg及びパラオキシ安息香酸プロピル1mgを希エタノールに溶かして20mlとする。この液20 μ lにつき、上記の条件で操作するとき、グリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸プロピルの順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

検出感度：希釈標準溶液20 μ lにつき分析するとき、グリチルリチン酸のピーク面積が自動積分法により確実にカウントされるように調整する。また、標準溶液20 μ lから得られるグリチルリチン酸のピーク高さがフルスケールの20%前後となるようにデータ処理装置の感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、グリチルリチン酸の保持時間の3倍の範囲

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき、試験を5回繰り返すとき、グリチルリチン酸のピーク面積の相対標準偏差は1.5%以下である。

5) 水分

標準品原料約5mgを精密に量り、電量滴定法によるカールフィッシャー水分測定法により本候補品中の水分含量を測定する。

5. 試験結果

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料の希エタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長251nm付近に吸収の極大が観察され(Fig. 1)、極大吸収波長における比吸光度(251nm)は146.3 \pm 1.0(n=11)であった。

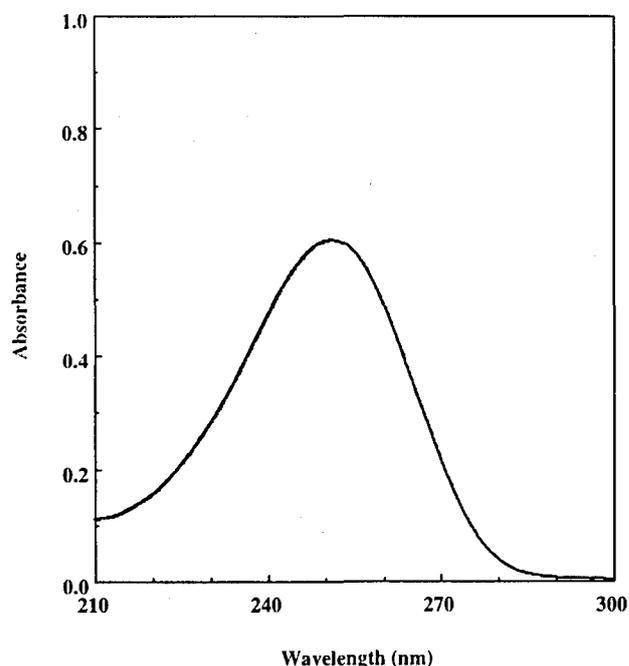


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルをFig. 2に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

3) 純度試験

(a) TLC法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示した。標準品原料及び日局標準品とも、それらの試料溶液からは主スポット以外のスポットは検出されなかった。また、本法によるグリチルリチン酸の検出限界は、0.06 μ gであった。

(b) HPLC法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムをFig. 4に示した。標準品原料及び日局標準品とも、微量の不純物ピークが観察された。面積百分率で0.01%以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で0.32 \pm 0.02%(n=3)、日局標準品で0.30%(n=2)と推定された。

4) 水分

標準品原料のカールフィッシャー法による水分含量は1.35 \pm 0.08%(n=3)であった。

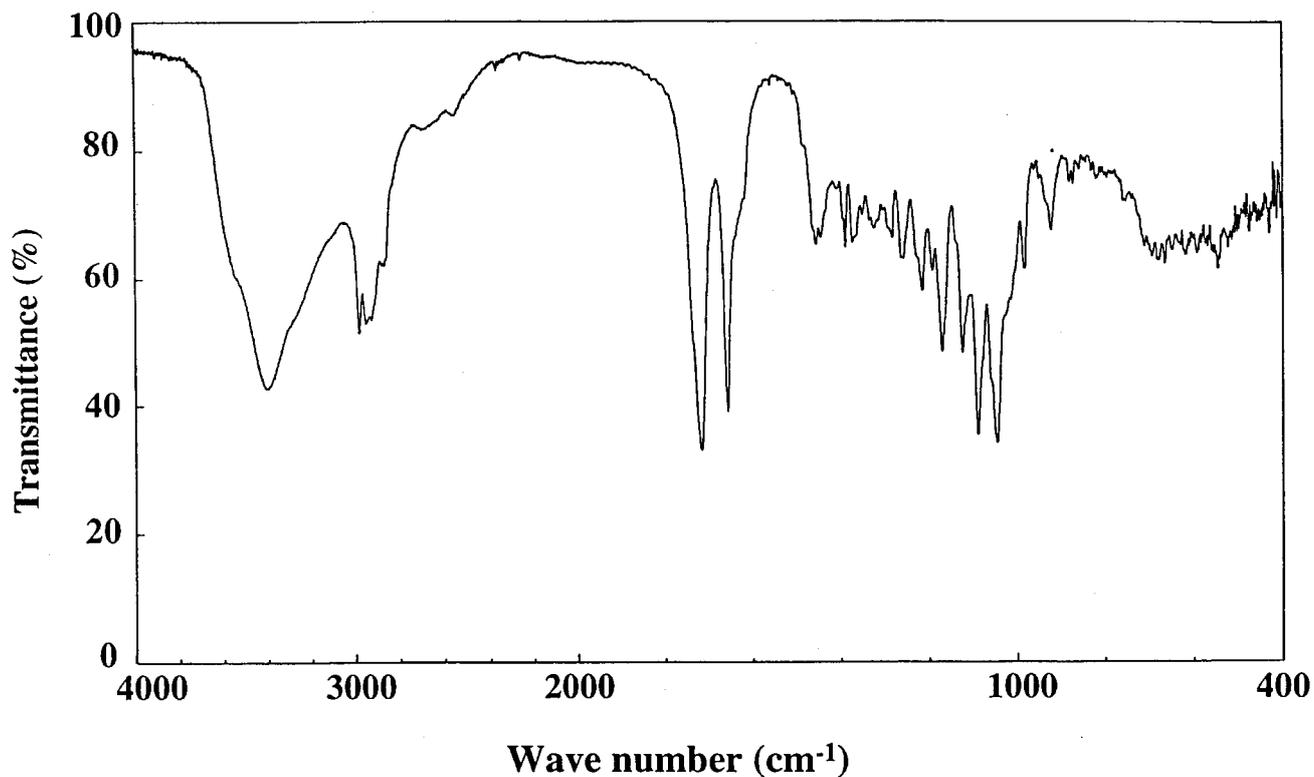


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizinic Acid Reference Standard

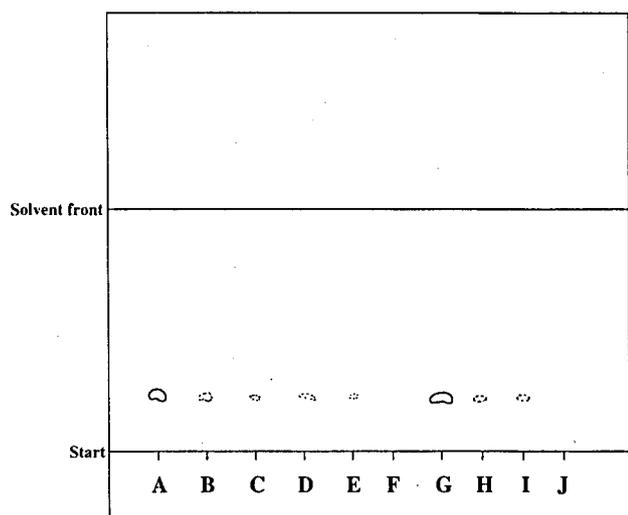


Fig.3 Thin-layer chromatograms of the raw material for Glycyrrhizinic Acid Reference Standard

Spot : 20 μg (A), 0.2 μg (B), 0.1 μg (C), 0.08 μg (D), 0.06 μg (E) and 0.04 μg (F) of the raw material; 20 μg (G), 0.2 μg (H), 0.1 μg (I) and 0.04 μg (J) of Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 991).

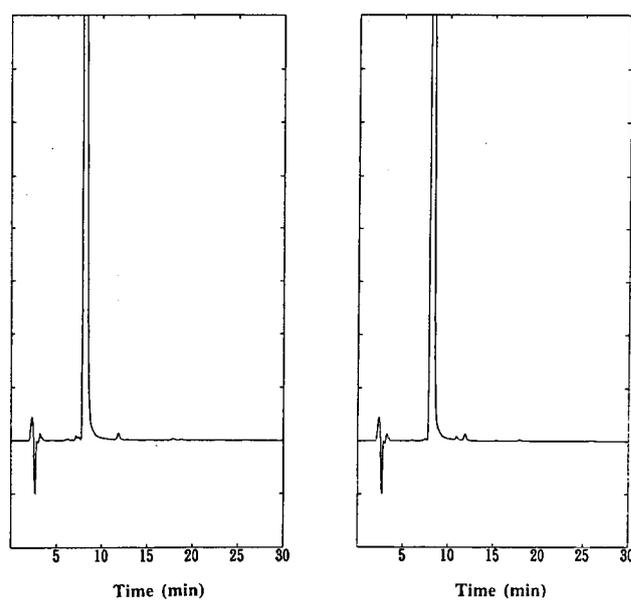


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 991) (B)

結 論

グリチルリチン酸標準品原料につき、日局標準品 (Control 991) を対照にその品質を比較検討した結果、両者の間に物質特性の差はなく、標準品原料の純度は99.5%以上であることを認めた。これらの結果から、本標準品原料は国立医薬品食品衛生研究所標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有するものと認定し、Control 001として

製造・配布することとした。

文 献

- 1) Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto, and Satoshi Okada : *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 195-198 (1999)