

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 0211 及び 0221)

小出達夫・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛*

Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211 and 0221) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto*

The raw material of glycyrrhizic acid was examined for preparation of the "Glycyrrhizic Acid Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum: λ max, 251 nm; and specific absorbance ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in ethanol at 251 nm, 149.6 (Control 0211) and 145.7 (Control 0221); IR spectrum, specific absorptions of raw material were consistent with that of Standard (Control 001). 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 0.6%.

Based on the above results, the candidate materials were authorized as the Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211 and 0221) of the National Institute of Health Sciences.

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

第十四改正日本薬局方に収載されている「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 0211)」及び「グリチルリチン酸標準品 (Control 0221)」(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: 0.38%, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ max): 147.5, 液体クロマトグラフ (HPLC) による純度試験: 純度 99.4% (Control 0211)

水分: 0.60%, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ max): 149.3, HPLCによる純度試験: 純度 99.6% (Control 0221)

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 001; 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, CTO-6A型カラムオーブ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0.67 kPa以下, 五酸化リン, 50℃), その約4 mgを精密に量り, 希エタノール30 mlを加えて溶かした後, 希エタノールを加えて正確に100 ml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, 210~300 nm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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 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0.67 kPa以下, 五酸化リン, 50℃), その2 mgを量り, 赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム0.2 g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, 4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを

* 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

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5 mgを希エタノール2.5 mlに溶かし、試料溶液とする。この液0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5 mlを量り、希エタノールを加えてそれぞれ正確に50 mlとし、標準溶液1, 2, 3, 4, 5, 6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TLC法による試験を行う。

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

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：254 nm)

2) 薄めた硫酸 (1→2) を噴霧し、105 $^{\circ}$ 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1～6のスポットのそれと比較し、不純物量を推定する。

4) HPLC法による純度試験

標準品原料約5 mgを精密に量り、希エタノール5 mlを加えて溶かし、試料溶液とする。この液1 mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100 mlとし、標準溶液とする。標準溶液5 mlを正確に量り、希エタノール

を加えて正確に100 ml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HPLC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：254 nm)

カラム：TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm ϕ \times 150 mm)

カラム温度：30 $^{\circ}$ 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：0.7 ml/min

カラムの選定：グリチルリチン酸5 mg及びパラオキシ安息香酸プロピル1 mgを希エタノールに溶かして20 ml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

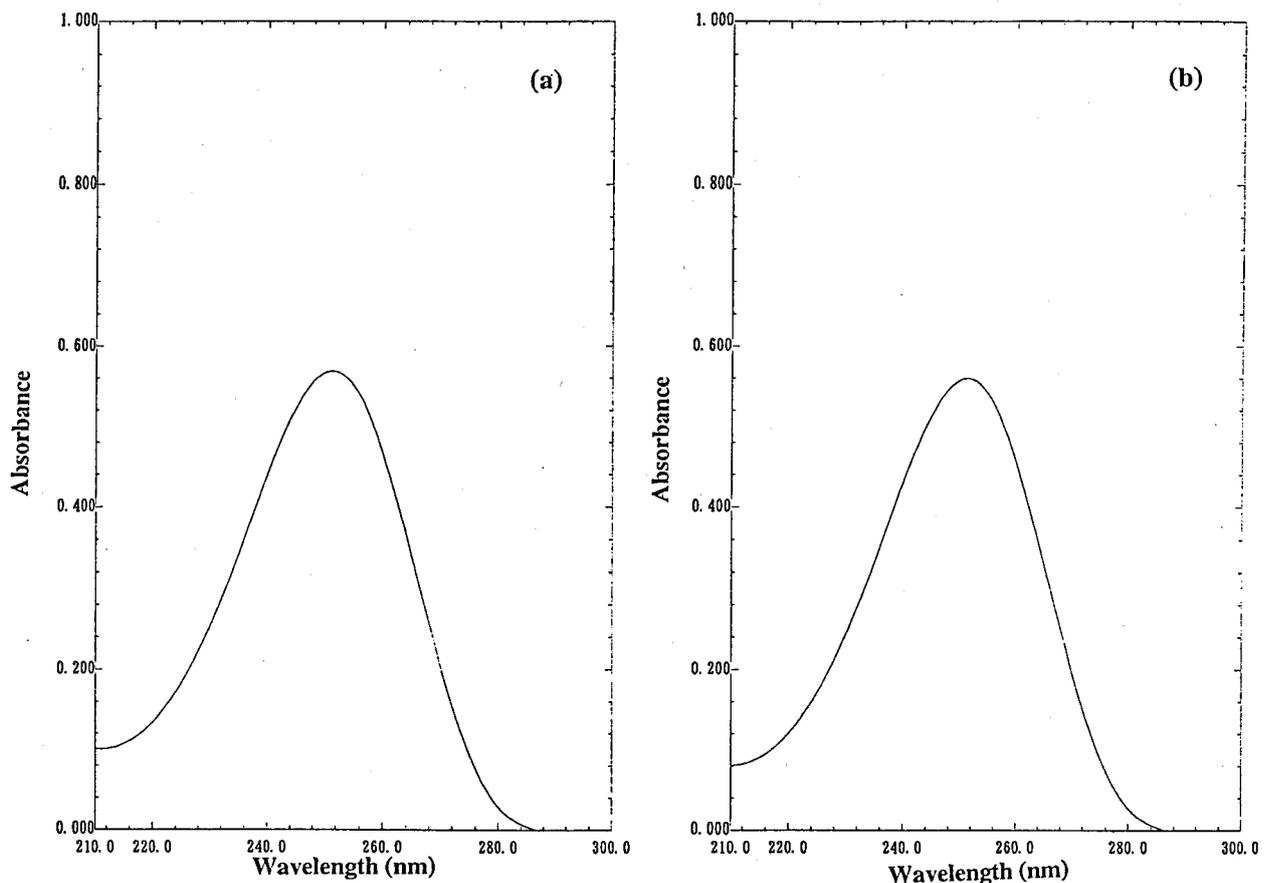


Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b)

20 μl 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5 mgを精密に量り，電量滴定法によるカ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。

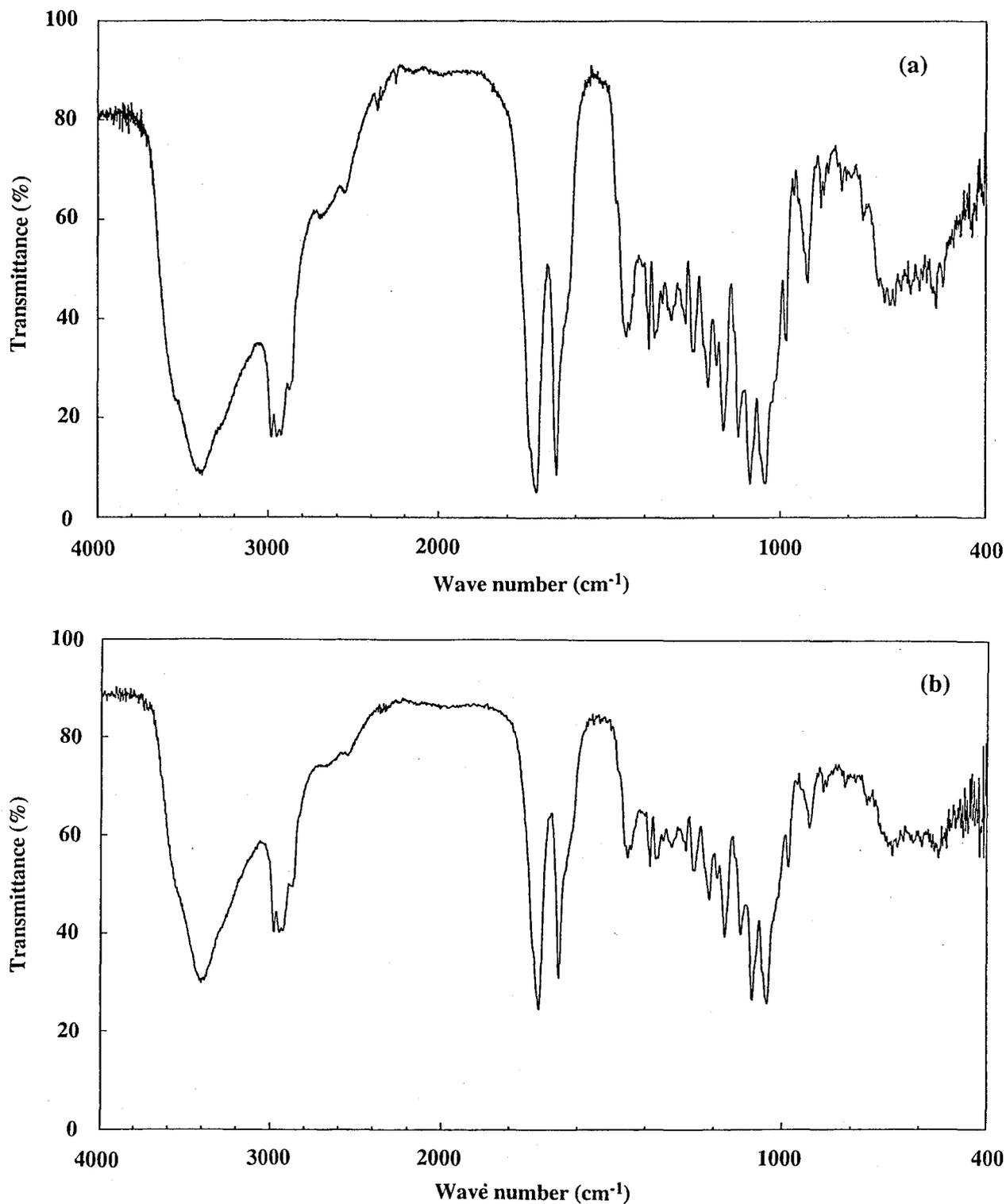


Fig. 2 Infrared absorption spectra of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b)

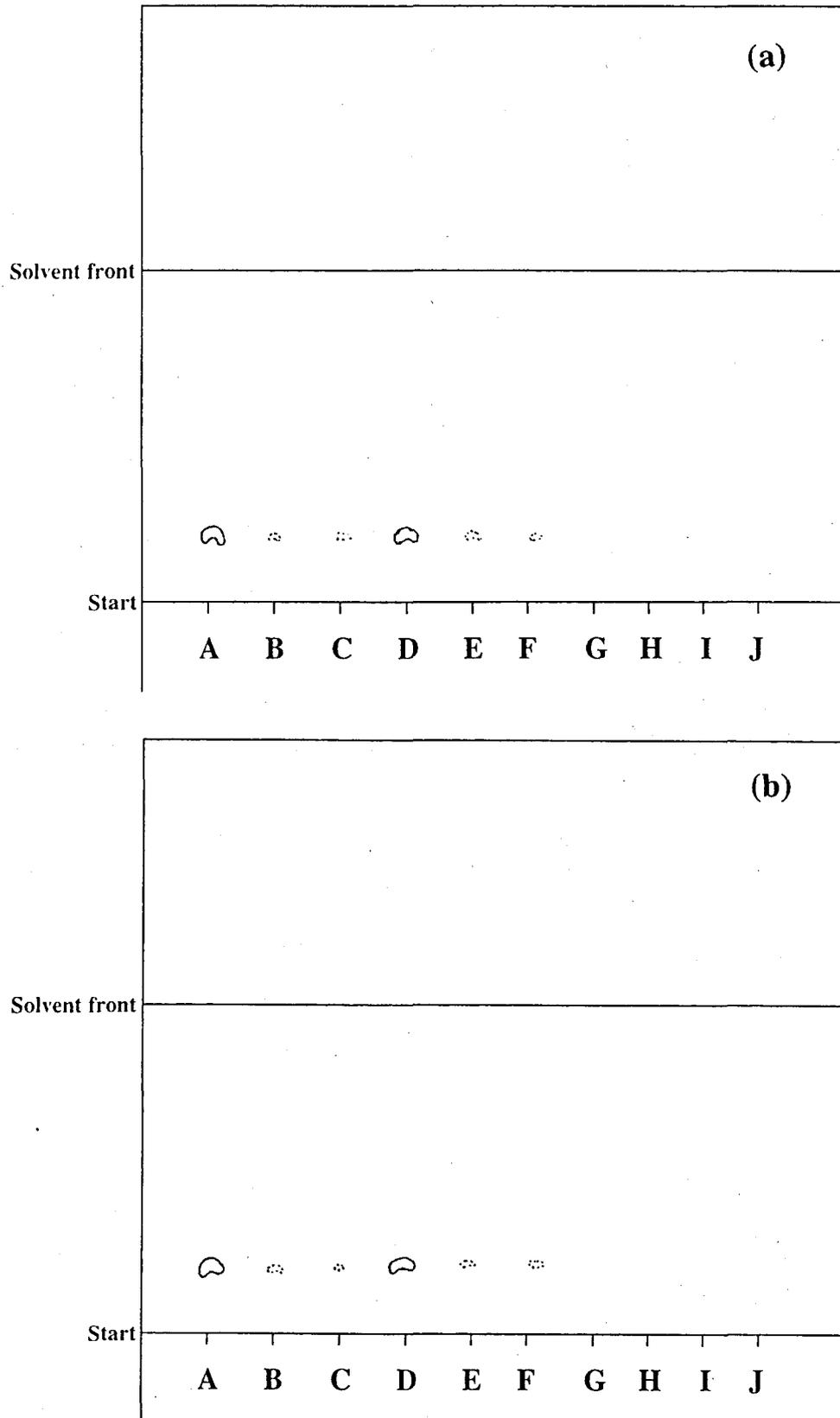


Fig. 3 Thin-layer chromatograms of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b) Spot: 20 μg (A), 0.2 μg (B) and 0.1 μg (C) of Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 001); 20 μg (D), 0.2 μg (E), 0.1 μg (F), 0.08 μg (G), 0.06 μg (H), 0.04 μg (I) and 0.02 μg (J) of the raw material.

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 251 nm 付近 (Control 0211 及び Control 0221) 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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (251 nm) は 149.6 ± 1.8 (Control 0211, $n=3$) 及び 145.7 ± 0.8 (Control 0221, $n=3$) であった。

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、 $0.1 \mu\text{g}$ 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

$0.52 \pm 0.01\%$ ($n=3$, Control 0211), $0.33 \pm 0.01\%$ ($n=3$, Control 0221), 日局標準品で 0.47% ($n=2$) と推定された。

4) 水分

標準品原料のカルフィッシャー法による水分含量は $4.5 \pm 0.17\%$ ($n=3$, Control 0211), $4.2 \pm 0.5\%$ ($n=3$, Control 0221) であった。

結 論

グリチルリチン酸標準品原料につき、日局標準品 (Control 001) を対照にその品質を比較検討した結果、これらに物質特性の差はなく、標準品原料の純度は 99.0% 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 0211 及び 0221 として製造・配布することとした。

文 献

- 1) Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 93-96 (2001)

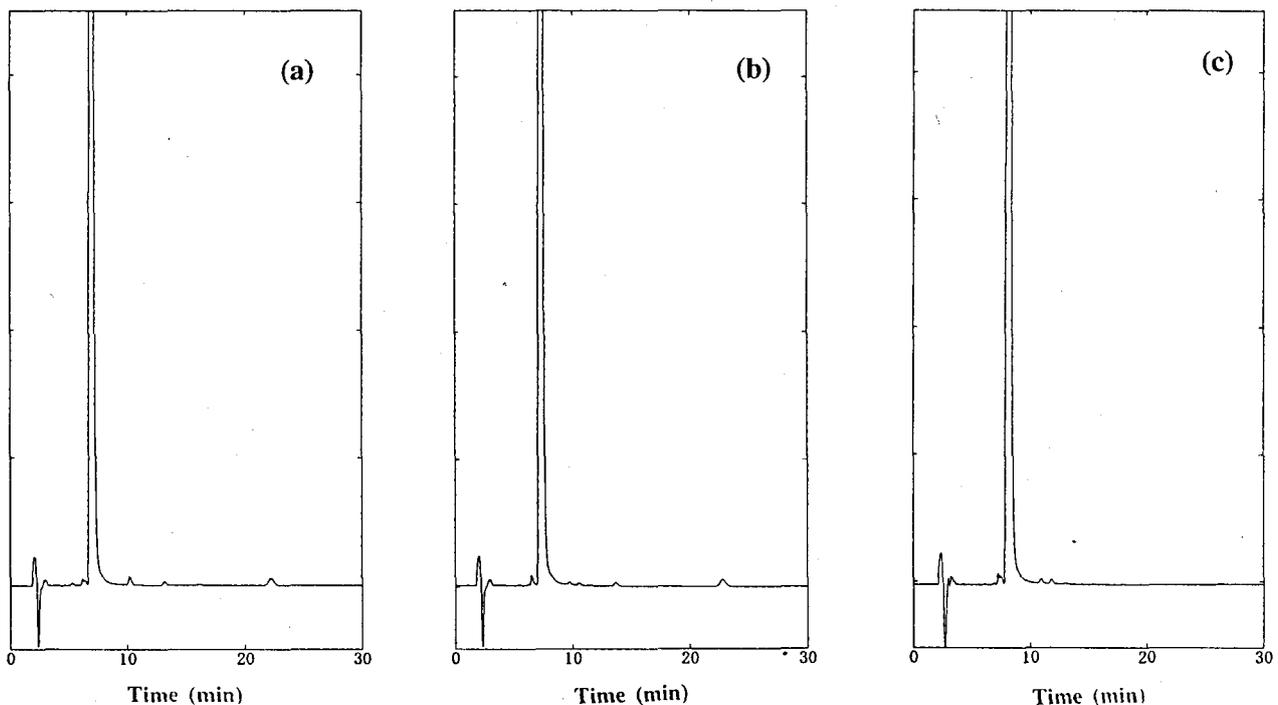


Fig. 4 High-performance liquid chromatograms of the raw materials (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b) and Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 001) (c)