

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 991)

齋藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛*・岡田敏史

Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 991) of National Institute of Health Sciences

Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto*, and Satoshi Okada

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; specific absorbance ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in ethanol at 251 nm, 146; IR spectrum, specific absorptions at 1716, 1656, 1215, and 1170 cm^{-1} ; and the spectrum of raw material was consistent with that of Standard (Control 941). Also, thin-layer chromatography, no impurities detected; high-performance liquid chromatography, three impurities detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.1%, and the total amount of impurities was less than 0.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 991) of the National Institute of Health Sciences.

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

第十三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 991)」（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: 0.8 %, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ_{\max}): 148.7, 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 941; 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-6A 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 °C), 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 °C), その 1 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, 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 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 0.1, 0.3, 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,

* 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

2, 3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 F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)。

展開溶媒：n-ブタノール/水/氷酢酸混液 (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 1~3 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 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：紫外吸光光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (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 (1 \rightarrow 50) / アセトニトリル混液 (20:11)

流量：グリチルリチン酸の保持時間が約 10 分になるように調整する。

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 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 5 mg 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 251 nm 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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (251 nm) は 145.9 ± 1.3 (n=8) 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, 同一波長のところに同様の強度の吸収が認められた。

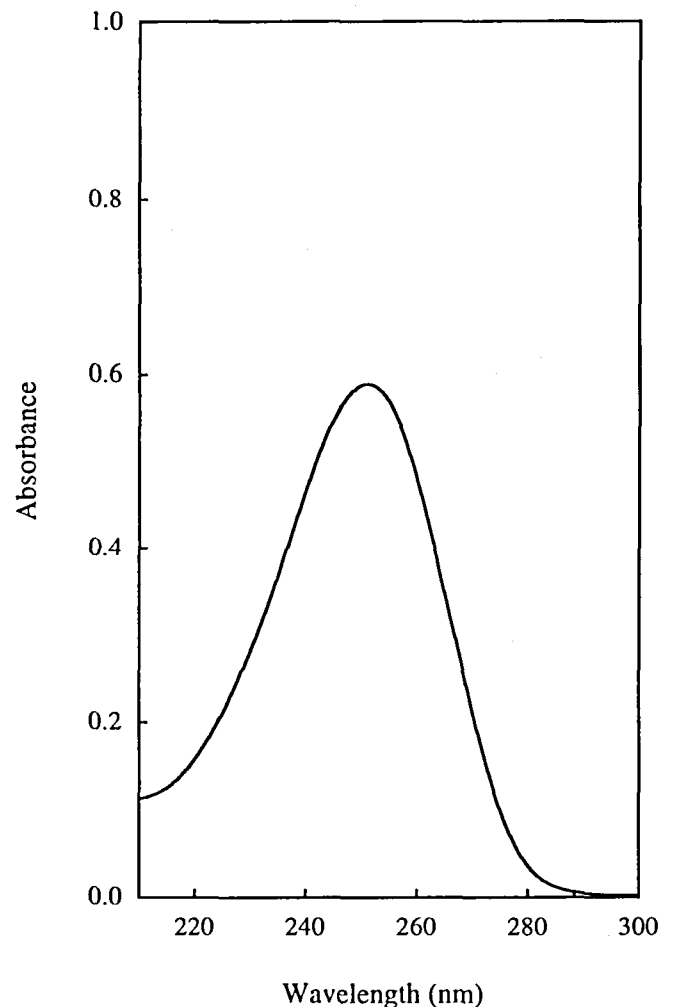


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard

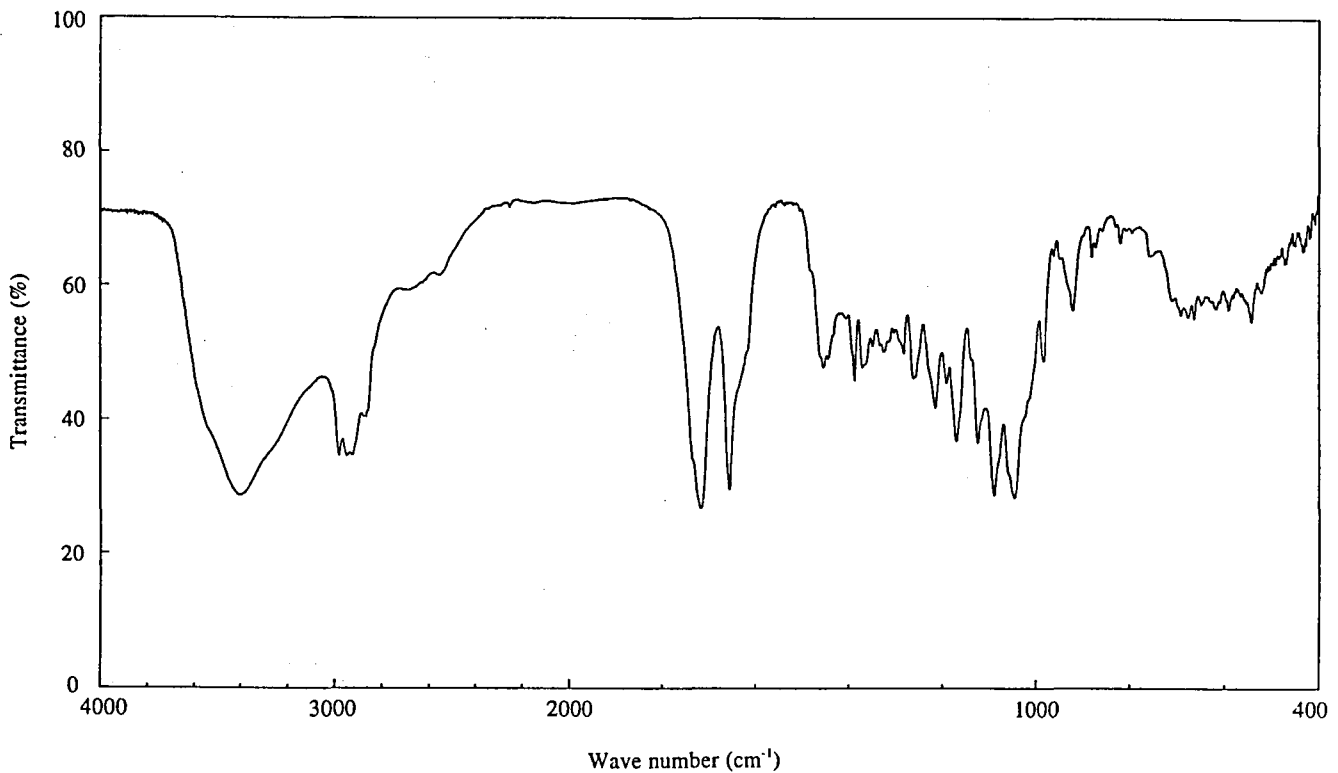


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard

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、 $0.04\mu\text{g}$ 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 0.05 % 以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で $0.15 \pm 0.03\%$ ($n=6$)、日局標準品で $0.11 \pm 0.03\%$ ($n=6$) 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 $2.03 \pm 0.09\%$ ($n=5$) 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 941) 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 991 として製造・配布することとした。

文 献

- 1) 岡田敏史, 北島 文, 谷本 剛, 鈴木英世, 佐竹元吉: 衛生試報, **113**, 114 (1995)

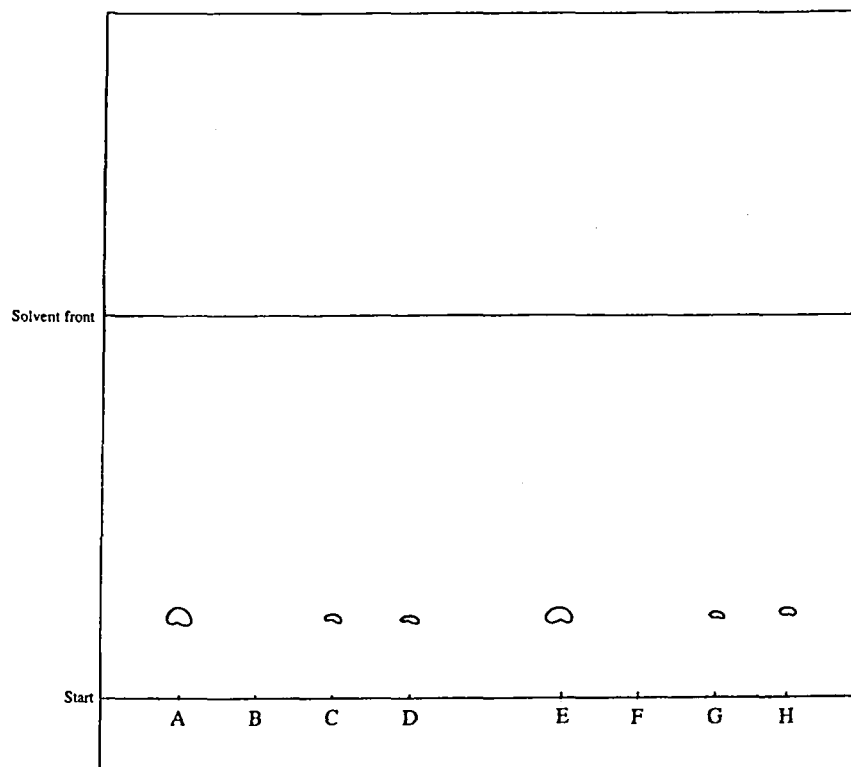


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard
Spot: 20 μg (A), 0.04 μg (B), 0.12 μg (C), and 0.2 μg (D) of the raw material; 20 μg (E), 0.04 μg (F),
0.12 μg (G), and 0.2 μg (H) of Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 941).

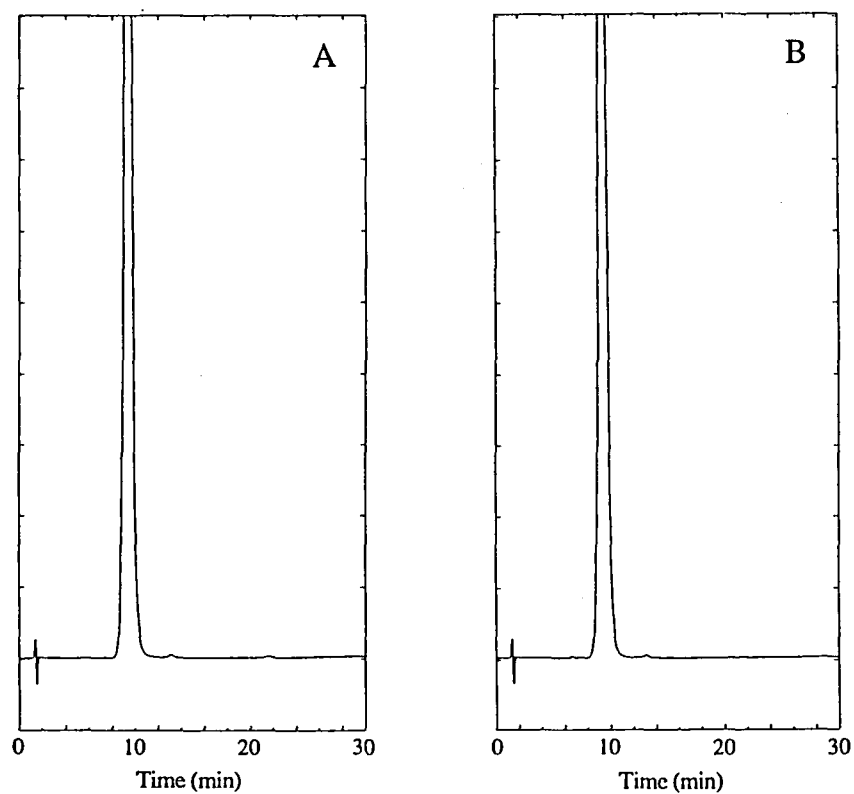


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 941) (B)