高速液体クロマトグラフィーによるキョウニン水中の マンデルニトリルの定量

宮地澄子, 森田多賀史, 岡本光美, 二村昭辰, 後藤滋夫, 玉置誠吾

岐阜県立多治見病院薬剤部*

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Mandelonitrile in Apricot Kernel Water

SUMIKO MIYACHI, TAKASHI MORITA, MITSUYOSHI OKAMOTO,
AKIYOSHI FUTAMURA, SHIGEO GOTO, SEIGO TAMAOKI

Department of Pharmacy, Gifu Prefectural Tajimi Hospital*

(Received December 25, 1986)

Mandelonitrile in Apricot Kernel Water was studied by high-performance liquid chromatography using an octadecyl bonded stationary phase. According to the Kawai method, 0.5 ml of Apricot Kernel Water is treated with 0.3 ml of 1% hydroxylamine hydrochloride solution, which react with free benzaldehyde. After an excess of hydroxylamine is removed by adding 0.2 ml of acetone, the mixture is treated with 0.3 ml of 10% ammonia solution. And then, the aqueous solution is saturated with NaCl, and the benzaldehyde produced corresponding to mandelonitrile is extracted with 2 ml of ethyl acetate containing 0.6 mg of α -(o-tolylazo)- β -naphthylamine as an internal standard. This method was applied to analysis of a colored preparation composed of Apricot Kernel Water, Senega Syrup and M. Verdau I (3:5:5) or Apricot Kernel Water, Liquid Brocin and M. Verdau I (3:5:10). With this method, the amount of benzaldehyde produced corresponding to mandelonitrile was determined within 1.68% error over the range from 0.5-5.0 μ g/ml.

Keywords—Apricot Kernel Water; benzaldehyde; high-performance liquid chromatography; mandelonitrile

結 言

キョウニン水は鎮咳去痰薬として日本薬局方に収載され、その有効成分はアミグダリンがキョウニン蛋白中、酵素エムルシンの作用により水の存在のもとに分解して生じるマンデルニトリル (Man) であると考えられている。著者らは、院内で調剤されたキョウニン水含有製剤 (Table 1) が、患者の手に渡ってから、服用までの間の保存条件等により、その有効成分とされる Man の経時変化状態を懸念した。したがって、Man の測定は pharmacokinetics, bioavailability の研究、究明等の目的で重要と思われる。Man の測定に関しては、クロマトグラフ的な分離、分析が有効と考えられる。Man にアンモニアを作用させるとベンズアルデヒドとシアン化ア

ンモニウムを定量的に遊離することから、遊離したベンズアルデヒドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析を試みたので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬および試液

特に述べるもの以外はすべて市販の試薬 (特級) を用いた。内部標準含有抽出液: α -(o-tolylazo)- β -naphthylamine (東京化成) をデシケーター (シリカゲル) で4時間乾燥し、その約 100mg を精秤して、酢酸エチルを加えて溶解後、正確に 100ml とする。その 10ml を正確にとり、酢酸エチルを加え正確に 30ml とする (0.3 mg/ml)。メタノール: 液体クロマトグラフ用 (和光純薬), Man (Aldrich), ベンズアルデヒド (和光純薬), 院内調剤キョウニン水含有製剤 (Table 1) を使用した。

2. 装置および器具

* 岐阜県多治見市前畑町 5-161; 5-161, Maehata-cho, Tajimi-shi, Gifu, 507 Japan

Fig.1. Liquid Chromatogram of Benzaldehyde
Produced Corresponding to Mandelonitrile
Extracted from Apricot Kernel Water

Operating conditions :

Packing ; Fine pack SIL C₁₈

Column ; 250×4.6mm I.D.

Mobile phase ; MeOH : H₂O (7 : 3 v/v)

Flow rate ; 0.8ml/min

Detection ; 242nm

A : benzaldehyde,

B : α -(o-tolylazo)- β -naphthylamine (i.s.)

波長可変 UV モニター付日本分光 Twinkle 高速液体
クロマトグラフ, ハミルトン製マイクロシリッジ, およ
び KUBOTA KS-3000P 遠心機を使用して行った。

3. 液体クロマトグラフィー条件

カラム ; 日本分光 Finepak SIL C₁₈, 4.6mm I.D. ×

250mm. 溶解液 ; メタノール : 水 (7 : 3 v/v). 流速 ;
0.8ml/min. 測定吸収波長 ; 242nm. 測定温度 ; 室温.

4. 定量法

試料の一定量 (0.5ml) を 10ml の遠沈管にとり, 1 %
塩酸ヒドロキシルアミン溶液 0.3ml を加え, 室温で 10
分間放置する. 次に, アセトン 0.2ml を加え, 振り混
ぜ 5 分間放置し, 10% アンモニア試液 0.3ml を加えて再
度 5 分間放置する. 次に食塩を飽和させ, 内部標準含有
抽出液 2ml で抽出し, 必要ならば遠心分離する. 内部
標準含有抽出液層の一定量を HPLC に付す. 内部標準
物質に対するピーク面積比を求め, 別に作成した検量線
よりベンズアルデヒドの量を算出する.

結果および考察

1. 吸収スペクトル

液体クロマトグラフィー条件の溶解液組成比, メタノ
ール : 水 (7 : 3 v/v) にベンズアルデヒドを溶解させ,
吸収スペクトルを描いたところ 242nm 付近に最大吸収
がみられたので, 検出波長を 242nm とした.

2. 溶解液の検討

ベンズアルデヒドのクロマト挙動を Finepak SIL
C₁₈ カラムを使用して, メタノール・水, エタノール・
水, アセトニトリル・水のそれぞれの条件下で検討し
た. その結果, 保持時間, 分離条件の点からメタノール
・水 (7 : 3 v/v) とした.

3. 内部標準物質の選択

定量法操作について, まず内部標準物質を入れないで
全操作を行い, Table 2 に示した物質のピークが出ない
ことを確認後, 内部標準物を選択した. その結果, 保持
時間, および安定性の点から α -(o-tolylazo)- β -naph-
thylamine を採用した. なお, この際得られたクロマト
グラムを Fig.1 に示す.

4. 検量線および精度

河合の報告²⁾を準用して, ベンズアルデヒドの検量線
を定量法条件下で作成した. その結果, ベンズアルデヒ
ド濃度が 0.5—5.0 μ g/ml の濃度範囲で, 相関係数が
0.9993 と良好な結果を示した (n=10). また本法の測定
精度をベンズアルデヒド 1.0 μ g/ml 溶液を用い, 標準添
加法を併用し検討した結果, 11 回の試行で変動係数 0.67
% という値を得た.

5. アルカリ濃度の検討

河合の報告²⁾を準用して Man の 定量的分解に用いる
アルカリ濃度について, キョウニン水を用い検討した.
すなわち, キョウニン水 10ml を精秤し, 水 50ml, ヨ
ウ化カリウム試液 1ml およびアンモニア試液 (または水

Table 1.

M. HUST		INF. SENEGA		M. VERDAU I	
Liquid Brocin	5.0 ml	Senega Syrup	10.0 ml	Saccharated Pepsin	0.50 g
Apricot Kernel Water	3.0 ml	Apricot Kernel Water	6.0 ml	Diluted hydrochloric Acid	0.34 ml
M. Verdau I	10.0 ml	M. Verdau I	10.0 ml	Simple Syrup	4.00 ml
Purified Water		Purified Water		Purified Water	
	100.0 ml		100.0 ml		10.00 ml

Table 2. Relative Retention Data

Compounds	t_R (compound) / t_R (benzaldehyde)
Benzaldehyde	1.00
1-Methylnaphthalene	1.30
2-Methylnaphthalene	1.37
o-Hydroxydiphenyl	1.02
p-Hydroxydiphenyl	1.02
o-Dichlorobenzene	1.00
m-Dichlorobenzene	1.26
p-Dichlorobenzene	0.98
1,2,3-Trichlorobenzene	1.30
1,2,4-Trichlorobenzene	1.63
1,3,5-Trichlorobenzene	1.40
o-Benzoyl benzoic acid	0.60
Pentobarbital sodium salt	1.02
p-Dimethylaminocinnamaldehyde	1.02
α -(o-Tolylazo)- β -naphthylamine	1.49
1-Phenylazo-2-naphthylamine	1.35

酸化ナトリウム試液)の一定量を加えて、持続する黄色の混濁を生じるまで 0.1N 硝酸銀で滴定した (Table 3).

ここで10%アンモニア試液 (5.88M) 0.5mlを加えた滴定検液の pH は約9.74であり、1N 水酸化ナトリウム 0.19mlを加えた場合の pH 9.79 とほぼ等しい値を示す。しかし、Table 3 からは、10% アンモニア試液 0.5ml で Man の分解率が100%であるのに対し、1N-水酸化ナトリウム試液 0.19ml では Man の分解率が65%と低値を示した。1N-水酸化ナトリウム 1.00mlを加えた条件で、Man の分解率100%を示すのは Man の分解が定量的に進行していることを示している。また、この場合の pH は 11.81 であった。水酸化ナトリウム濃度

をさらに高くしても、硝酸銀滴定量に変化はなく、10% アンモニア試液 0.5ml 添加の場合と一致していた。したがって、Man の分解に関与する要素は、pH で表現されるアルカリ性の強度ではなく、 NH_3 の濃度が有効であることが示唆された。すなわち、pH 濃度が高くなってもアンモニア試液を使用した場合は、水酸化ナトリウム試液を使用した場合と異なり、反応は進行することが示唆された。

6. 本法のキョウニン水含有製剤分析への応用

Table 1 に示した院内製剤である M.Hust および Inf.Senega を 5°C 冷暗所、室温、50°C のそれぞれの保存条件下で35日間放置し、各製剤中のキョウニン主成分の変動を Fig.2, Fig.3 にそれぞれ示した。Fig.2,

Table 3. Activity of Basic Compounds on Decomposition of Mandelonitrile

Amount of basic compound added	(ml)	PH of test solution (measured)	Amount of 0.1N AgNO ₃ (ml)	Rate of composition of mandelonitrile (%)
10 % NH ₃	0.50	9.74	2.02 2.04	100
	0.40	9.67	2.02 2.00	100
	0.30	9.55	2.01 2.00	100
	0.20	9.37	1.93 1.90	96
	0.166	9.29	1.77 1.80	88
	0.10	9.10	1.20 1.20	59
1N NaOH	0.19	9.79	1.31 1.30	65
	0.50	10.51	1.62 1.64	80
	1.00	11.81	2.02 2.01	100
	1.50	12.21	2.05 2.00	100
	2.00	12.38	2.02 2.05	100

Fig.2. Relationship of Temperature and Benzaldehyde Concentration in M. Hust

Fig.3 からみられるように、50℃で35日間保存条件下ではキョウニン水主成分が初期濃度の50%程度であった。

以上のように、HPLC によるキョウニン水中 Man の定量法を確立した。着色合剤、すなわち、今回検討したようなキョウニン水、セネガシロップ、プロチン液などのような試料では、局方の Liebig-Deniges 法による滴定ではその適用が困難であったが、今回検討したHPLC では他の成分との分離、保持もよく、かつ着色合剤にも

適用可能であり、本法の有用性が示唆された。さらに、今回実験の対象としたキョウニン水含有製剤の各保存条件下では、温度の高い条件下と比較して、温度の低い条件下においてキョウニン水主成分 Man の分解率が低かったことから、キョウニン水含有製剤の保存には、特に夏季の場合、冷蔵所保存が必要と思われた。

謝辞 温かいご助言を賜りました岐阜薬科大学分析学教室助教授、河合 聡 先生に深謝いたします。

Fig. 3. Relationship of Temperature and Benzaldehyde Concentration in Inf. Senega

引用文献

- 1) “第十改正日本薬局方解説書”，広川書店，東京，1981, D-230.
- 2) 河合 聡，宇治昭子，大野武男：分析化学，28, 193 (1979).