高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のロートエキスの定量¹⁾

中西裕幸,* 今森勝美, 岩佐 曜

エスエス製薬中央研究所

Determination of Scopolia Extract in Commercial Gastrointestinal Drugs by High-Performance Liquid Chromatography

Hiroyuki NAKANISHI,* Katsumi IMAMORI and Akira IWASA

Central Research Laboratory, SS Pharmaceutical Co. Ltd.,

1143 Nanpeidai, Narita-shi, Chiba, 286, Japan

(Received July 21, 1992)

Tropane alkaloids, contained in gastrointestinal drugs including Scopolia Extract, were determined using high-performance liquid chromatographic method. Tropane alkaloids in commercial drugs were extracted with 0.5 N hydrochloric acid test solution. This solution was adjusted to pH 10.0 with a strong ammonia solution, extracted with ethyl ether, and separated on TSKgel ODS-120T (4.6 mm i.d. × 15 cm; temperature, 30°C; flow rate, 1.5 ml/min; detector, UV 210 nm) with a mixture of 1/15 M sodium phosphate buffer (pH 2.5) and acetonitril (68 : 32) containing 12 mM sodium dodecyl sulfate. The contents of atropine in the gastrointestinal drugs were 0.25—0.34 mg (coefficient of variation=0.20—2.61%) a day.

Keywords—HPLC atropine; scopolamine; Scopolia Extract

ロートエキスの主成分はヒヨスチアミン (本文中では以下ヒヨスチアミンの名称をアトロピン (AT) に統一した) 及びスコポラミン (SC) 等のトロパンアルカロイドであり, 鎮痛, 鎮座薬として内服される. また消化液分泌抑制作用があり, 医薬品製造指針²⁾ によると胃腸薬では制酸剤の項に分類されており, 1 日の最大服用量は 30 mg に規制されている. 一方日本薬局方³⁾ によりロートエキス中の総アルカロイド含量は 0.90—1.09% であり, 1 日量の試料 (約 3.6—4.8 g) 中の含量は AT で約 0.27 mg, SC で約 0.03 mg と微量で, しかもその紫外部吸収が弱いことから検出感度的に難しい面がある. 一方アンモニア試液 (10%) 中 30 分間の残存率は SC で 63.6%, AT で 84.4% と不安定であり, 他の配合薬との関係から定量は極めて難しい. これまでトロパンアルカロイドの定量には蛍光光度法,⁴⁾ 薄層クロマトグラフ・デンストメトリー法,^{5,6)} ガスクロマトグラフ法,⁷⁻¹³⁾ 液体クロマトグラフ法^{1,8,14-21)} がある. 著者らはトロパンアルカロイドの紫外部吸収が弱いことから前処理操作として抽出方法を検討し, 抽出液を濃縮することで濃度を高め, 液体クロマトグラフ法 (HPLC) の紫外部検出を可能にした. 総合胃腸薬中のトロパンアルカロイドの抽出にはソックスレー抽出法,²²⁾ アンモニアアルカリ性でエーテル抽出³⁾ する方法が考えられる. 今回それら以外にアルカロイドの抽出に良いと言われる鉍酸で抽出²³⁾ した後, 強アンモニア水を加え pH 10.0 でエーテル抽出後, UV 検出器を用い HPLC で定量した. この方法で 1 日量 (ロートエキス 30 mg) 中, AT 含量 0.25—0.34 mg (変動係数=0.20—2.61%) と良好な値を得, 測定時間に関してもソックスレー抽出より約 4.5 時間, アンモニアアルカリ性でエーテル抽出するより約 2 時間短縮できたので報告する.

実 験 の 部

1. **標準品** 臭化水素酸スコポラミン及び硫酸アトロピンは和光純薬製, 臭化水素酸アニソダミン (anisodamine hydrobromide, AD) はシグマ社製.

2. **試薬** ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は和光純薬製試薬特級, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬製試薬一級及びエーテルは残留農薬試験用エーテル 300 (和光純薬製) を用いた.

3. **モデル処方及び市販胃腸薬** M-1: 炭酸水素ナトリウム 900 mg, メタケイ酸アルミン酸マグネシウム 900 mg, 沈降炭酸カルシウム 900 mg, ロートエキス 30 mg, シュクシャ末 240 mg, ウイキョウ末 60 mg, チョウジ末 30 mg, ショウキョウ末 75 mg, ガジュツ末 180 mg, リパーゼ AP6 120 mg, ビオタミラーゼ P-1500 45 mg, 結晶セルロース 300 mg, D-マンニトール 300 mg, 乳糖 270 mg, カルメロースカルシウム 100 mg, ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) 150 mg, 以上を混和し散剤を調製した. なおロートエキスは乳糖で 10 倍散として使用した.

市販胃腸薬: A-D 社の錠剤, B, C, E 社の顆粒, F, G 社の粉末を試料とした.

4. **HPLC 装置及び測定条件** 日立 L-6000 型ポンプ, 日立 L-4000 型 UV 検出器及びデーター処理装置島津 C-R6A クロマトパックを接続し, カラムは東洋曹達製 TSK gel ODS120-T (5 μ m) をステンレス製カラム (4.6 mm i.d. $\times$ 15 cm) に充てんしたものを使用した. 移動相は 12 mM SDS を含む 1/15 M リン酸一水素ナトリウム (リン酸で pH 2.5)-アセトニトリル混液 (68:32), カラム温度 30°C, 流量 1.5 ml/min, 検出波長 210 nm の条件で定量した.

5. **定量法の比較** 定量法-A は試料をまず塩酸酸性^{1,24)}にする方法で, 著者らが設定した定量方法である. 定量法-B は文献²²⁾に従って抽出し, 定量法-C は文献³⁾に従って抽出し, 抽出後, 定量法-A を準用する方法である.

(1) 定量法-A (Method-A)——市販胃腸薬のロートエキス約 5 mg に対応する量 0.6—0.8 g を精密に量り, 配合中の炭酸水素ナトリウムの量に応じ希塩酸 0—3 ml (炭酸水素ナトリウム 100 mg に対し約 1 ml) を加え, 次に 0.5 N 塩酸試液 20 ml を加え, 15 分間超音波処理した後, 遠心分離し, 上澄液を分取する. 残留物に 0.5 N 塩酸試液 20 ml を加え, 同様に操作した後, 両上澄液を合し 0.5 N 塩酸試液を加え, 正確に 50 ml とする. この液 20 ml を正確に量り, エーテル 30 ml を加えて振り混ぜ, 水層を分取する. エーテル層に 0.5 N 塩酸試液 5 ml を加えて振り混ぜ, 水層を分取し, 先の水層と合わせ (以下の抽出操作で分離の悪い検体²⁵⁾では塩化ナトリウム 2.5 g をあらかじめ加え溶解しておく) 強アンモニア水約 4 ml を加えて pH 約 10.0 に調整した後, エーテル 60 ml ずつで 3 回抽出し, 抽出液を合わせ, 無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後, ろ過し, ろ液を減圧で留去する. 残留物に内標準溶液 (BHA の移動相溶液 (1→83330)) 1 ml を正確に加えて振り混ぜた後, ろ過し, ろ液を試料溶液とする. 別に硫酸アトロピン及び臭化水素酸スコポラミン (各々別途乾燥減量を測定しておく) 約 0.05 g を精密に量り, メタノールを加えて溶かし, 正確に 100 ml とする. この液 2 ml を正確に量り, メタノールを加えて正確に 50 ml とする. この液 1 ml を正確に量り, 水浴上でメタノールを留去する. 残留物に内標準溶液 1 ml を加えて溶かし, 標準溶液とする. 試料溶液及び標準溶液 50 μ l につき, 4 の HPLC 条件で試験を行い, 内標準物質のピーク高さに対する SC 及び AT のピーク高さの比 Q_T 及び Q_S を求める.

(2) 定量法-B (Method-B)——市販胃腸薬のロートエキス約 5 mg に対応する量 0.6—0.8 g を精密に量り, ソックスレー抽出器の円筒ろ紙内にとり, アンモニア試液 3 ml, エタノール 10 ml, エーテル 20 ml を加えて室温で 3 時間放置した後, エーテル 100 ml を加えて 1.5 時間抽出する. 抽出液を濃縮し, エーテルを加えて正確に 50 ml とする. この液 20 ml を正確に量り, 0.5 N 塩酸試

液 20 ml を加え、以下定量法-A と同様に試験する。

(3) 定量法-C (Method-C)——市販胃腸薬のロートエキス 2 mg に対応する試料 0.2—0.3 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、アンモニア試液 15 ml を加えて振り混ぜる。これにエーテル 25 ml を加え、密栓して 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、エーテル層を分取する。水層はエーテル 25 ml ずつを用いて更にこの操作を 2 回行う。全抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ろ過し、ろ液を水浴上で留去する。残留物に 0.5 N 塩酸試液 20 ml を加え、以下定量法-A と同様に試験する。

結 果 及 び 考 察

1. 定量法-A による添加回収率

ロートエキス抜きモデル処方 (M-1) に SC 及び AT 0.05 mg を加え定量法-A に従い、試料溶液を調製し、4 の HPLC 条件で定量した。回収率は SC で 96.5% (変動係数=0.28%, $n=3$), AT で 97.6% (変動係数=0.47%, $n=3$) であった。

2. 検量線

SC で 1—25 $\mu\text{g/ml}$, AT で 10—50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲の標準溶液を調製し、各々 50 μl を HPLC に注入して得られたピーク高さより検量線を作成した。各成分の回帰直線は次のとおりであった。

$$\text{SC: } y=0.0670x+0.0056 \ (r=1.0000)$$

$$\text{AT: } y=0.0485x+0.0322 \ (r=0.9996)$$

y はピーク高さ比, x は濃度 ($\mu\text{g/ml}$), r は相関係数である。

3. モデル散剤の定量

定量法-A により 1 日量 (ロートエキス 30 mg) 中の SC は 0.030 mg (変動係数=2.87%, $n=3$), AT は 0.298 mg (変動係数=0.41%, $n=3$) であった。液体クロマトグラムを Fig. 1 (C) に示した。ここで SC のピークは AD との混合物 (SC の保持時間が 11.1 分るとき AD の保持時間は 10.7 分で分離度は 0.4) と考えられた。そこで SC の含量については SC の検量線より、AD の量も SC の量として合わせて計算した。

4. 市販胃腸薬の定量

定量法-A B, C により定量し、結果を Table I に、液体クロマトグラムを Fig. 2 に示した。SC の含量については前記同様 AD の量を SC の量として合わせて計算した。

Fig. 1. HPLC Chromatogram of Model Preparations

1, scopolamine; 2, atropine; 3, scopolamine and/or anisodamine; IS, butylhydroxyanisol.

(a) standard, (b) model preparation (M-1) without Scopolia Extract, (c) model preparation (M-1).

Column: TSKgel ODS-120T (4.6 mm i.d. $\times$ 15 cm); mobile phase, 1/15 M sodium phosphate buffer (pH 2.5) and acetonitrile (68 : 32) containing 12 mM SDS; flow rate, 1.5 ml/min; temperature, 30°C; detector, UV 210 nm.

TABLE I. Tropane Alkaloids Contents in Commercial Gastrointestinal Preparations
(mg/one day dose)

Maker	Method-A		Method-B		Method-C	
	SC	AT	SC	AT	SC	AT
A (Tablet)	0.028 ^{a)}	0.294	0.029	0.298	0.024	0.264
B (Tablet)	0.041	0.278	0.043	0.269	0.023	0.252
C (Tablet)	0.026	0.260	0.024	0.202	0.022	0.270
D (Tablet)	0.031	0.271	0.031	0.279	0.023	0.256
B (Granule)	0.039	0.300	0.040	0.305	0.032	0.293
C (Granule)	0.029	0.271	0.024	0.203	0.019	0.273
E (Granule)	0.020	0.257	0.019	0.250	0.011	0.239
F (Powder)	0.026	0.251	0.026	0.240	0.022	0.225
G (Powder)	0.036	0.335	0.037	0.339	0.028	0.316

a) Mean ($n=3$). The results of Table I were determined by Method-A, B, C. A 30 mg of Scopolia Extract was labeled content for one day dose on each preparation.

SC, scopolamine and/or anisodamine; AT, atropine.

Fig. 2. HPLC Chromatogram of Scopolia Extract Obtained from Commercial Gastrointestinal Preparations

HPLC condition were same as those in Fig. 1. 2, atropine; 3, scopolamine and/or anisodamine.

5. ロートエキス（原料）の定量

原料中に AD が存在するかを調べるためロートエキス 2 社、各 3 ロットを別の HPLC 条件^{20,21)}で定量したところ、3 ロットともロット間の差はなく、その平均値は A 社製品（韓国産：*Scopolia parviflora*）で AD=0.035%，SC=0.107%，AT=0.916% であり、B 社製品（中国産）で AD=0.035%，SC=0.106%，AT=0.902% と AD が存在した。

結 論

Table I の結果から市販製剤では C 社を除き定量法-A と定量法-B はほぼ同じ値であった。C 社の錠剤と顆粒は定量法-B のソックスレー抽出では使用されている賦形剤や結合剤の影響により抽出が十分でないことが考えられた。定量法-C では定量法-A, B に比較すると SC が明らかに低い値を示した。この原因として、アンモニア試液（pH 約 12.4）中 30 分間の残存率は SC で 63.6%，AT で 84.4% と不安定なことよりアルカリ加水分解したものと推定される。これに対し pH 10.0 中 30 分間の残存率は SC で 100.0%，AT で 99.0% であった。種々の成分が配合される市販製剤のロートエキスの定量で、定量法-A により AT は 0.25—0.34 mg（変動係数=0.20—2.61%）と AT に関しては精度良く定量できた。そして SC と AD の分離に関しては他の HPLC 条件^{3,20,21)}が必要であった。

謝辞 本研究に協力して下さいました本研究所 神戸英芳氏に深謝致します。

引用文献及び注

- 1) 中西裕幸，今森勝美，岩佐 曜，日本薬学会第 110 年会講演要旨集 3，札幌，1990，p. 259.
- 2) 日本公定書協会編，“医薬品製造指針 1991 年版”，薬業時報社，東京，p. 529.
- 3) 日本公定書協会編，“第十二改正日本薬局方解説書”，廣川書店，東京，1991，p. D-1053.
- 4) 佐藤和男，田中秀巳，米田良之助，外岡弘道，尾崎昭雄，小川俊郎，昭和 48 年度厚生科学研究報告，大阪生薬協会，p. 191.
- 5) 布浦由樹，岩上正臓，昭和 48 年度厚生科学研究報告，大阪生薬協会，p. 67.
- 6) 布浦由樹，岩上正臓，昭和 49 年度厚生科学研究報告，大阪生薬協会，p. 116.
- 7) 南川傳憲，薬誌，90，1457 (1970).
- 8) 勝井五一郎，河部 靖，大前雅彦，山野喜昭，林勇一郎，池谷 理，昭和 49 年度厚生科学研究報告，大阪生薬協会，p. 129.
- 9) 麻薬技術委員会，医薬品研究，5，420 (1974).
- 10) 木島正夫，野呂征男，久田陽一，奥田和代，生薬，32，43 (1978).
- 11) 西本喜重，加藤礼子，林 信一，薬誌，100，396 (1980).
- 12) United States Pharmacopeial Convention, INC., “USP XXII NF VII,” 1990, pp. 1238—1239.
- 13) 日本公定書協会編，“第十二改正日本薬局方解説書”，廣川書店，東京，1991，p. D-21.
- 14) 藤田登美雄，三上博久，第 10 回生薬分析討論会講演要旨，1981，p. 29.
- 15) 山田貞二，野田直希，早川順子，宇野圭一，薬誌，104，199 (1984).
- 16) 大島俊幸，相楽和彦，吉田継親，童 玉一，章 観徳，陳 毓亨，日本生薬学会第 35 回年会講演要旨集，新潟，1988，p. 26.
- 17) 久田陽一，川村智子，奥田和代，野呂征男，田中俊弘，酒井英二，畠山好雄，生薬，43，159 (1989).
- 18) T. Oshima, K. Sagara, Y. Y. Tong, G. D. Zhang, Y. H. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, 37,

- 2456 (1989).
- 19) 原田正敏編集, “繁用生薬の成分定量,” 廣川書店, 東京, 1989, p. 348.
  - 20) L. Y. He, G. D. Zhang, Y. Y. Tong, K. Sagara, T. Oshima, T. Yoshida, *J. Chromatogr.*, **481**, 428 (1989).
  - 21) L. Y. He, G. D. Zhang, Y. Y. Tong, T. Oshima, K. Sagara, 生薬, **44**, 162 (1990).
  - 22) 勝井五一郎, 河部 靖, 大前雅彦, 山野喜昭, 林勇一郎, 昭和 48 年度厚生科学研究報告, 大
阪生薬協会, p. 115.
  - 23) 糸川秀治監修, “テクニカルレポート No. 15 漢方薬の技術と市場,” 桂印刷, 東京, CMC,
p. 60.
  - 24) 日本公定書協会編, “第十二改正日本薬局方解説書,” 廣川書店, 東京, 1991, p. D-24.
  - 25) HPC 配合処方で分離が悪かった.