薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (7) 496-502 (1992)

高速液体クロマトグラフィーによる医薬部外品中のグリチルリチン酸塩の 定量における異常挙動の解明

林 正人,* 門脇英二, 高松 翼, 松岡昌弘

(株) 資生堂 研究開発本部 安全性・分析センター 分析研究グループ

Elucidation on Abnormal Behavior of Glycyrrhizin Salts in High Performance Liquid Chromatography Determination for Quasi-Drug Products

Masahito HAYASHI,* Eiji KADOWAKI, Tasuku TAKAMATSU,
and Masahiro MATSUOKA

*Analytical Research Group, Safety & Analytical Research
Center, Shiseido Research & Development Headquarters,
1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223, Japan*

(Received March 2, 1992)

Glycyrrhizates such as monoammonium and dipotassium glycyrrhizates which are extracted from licorice, converted to easily water-soluble salts and refined have been formulated in many quasi-drug products as an anti-inflammatory agent.

A quantitative analysis of glycyrrhizates in quasi-drug products has usually and successfully been carried out by high performance liquid chromatography (HPLC). However, a slightly higher value than the actual content has sometimes been observed in daily analysis. As the result of our various studies to investigate these phenomena, we finally found that a minor constituent in commercial glycyrrhizates, which was identified as mono-methyl glycyrrhizate, was hydrolyzed after they were formulated in quasi-drug products and converted to glycyrrhizin which in turn was determined by HPLC as a higher value.

Keywords—glycyrrhizin; licorice; dipotassium glycyrrhizate; mono-ammonium glycyrrhizate; alkaline solution hydrolysis; HPLC; quasi-drug

緒 言

甘草から抽出、水易溶性塩として精製されるグリチルリチン酸及びその塩類は、育毛剤、薬用クリーム、乳液、化粧水及びパック、薬用シャンプー及びリンス、洗顔料、薬用石鹸等の広範囲な剤型の医薬部外品に消炎剤として配合されている。¹⁾ グリチルリチン酸の塩類には、モノアンモニウム塩、ジカリウム塩が日本化粧品原料基準に収載されているが、その純度の定量法にはいずれも吸光度法が規定されており、一部含まれているグリチルリチン酸の類縁化合物²⁾を合算した形で96%以上の純度とされている。

一方、医薬部外品中のグリチルリチン酸塩類の定量法には、その通常配合量が0.05—0.2%と少ないことから高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)が汎用されているが、高純度標準試薬のグリチルリチン酸を用いると定量値が類縁化合物の存在のため配合量の70%程度となり、³⁾ また、配合したグリチルリチン酸塩類を標準試料とすると定量値がやや高くなる等の異常な現象が日常分析において認められることが多い。しかしながら、このような現象は日常の分析試験の中では繰り返し

再現性が確保されていれば特に大きな問題とはならないため、見過ごされがちであるし、詳細な検討を実施した報告もない。

著者らは、医薬部外品に配合されているグリチルリチン酸塩についてその組成を詳細に検討すると同時に、広範囲な製剤剤型中のグリチルリチン酸塩の挙動を追跡することでこの異常な定量値挙動の原因の一部を解明することができたので報告する。

実 験 の 部

1. 試料, 標準物質及び試薬 グリチルリチン酸塩類は、丸善化成社よりモノアンモニウム塩を 5 ロット、ジカリウム塩を 3 ロット入手し、検討に用いた。これらは、いずれも日本化粧品原料基準に適合するものであり、その試験法である吸光度法による純度は、いずれも 98% 以上 (HPLC 法では約 70%) であった。高純度標準試薬グリチルリチン酸には和光純薬社製と栗田工業社製のものをを用いた。内標準物質プロピオフェノンは、東京化成工業社製試薬特級を用いたほか、試薬はすべて一般試薬特級を用いた。

2. 使用機器 HPLC 装置は島津製作所製 SPD-6A 型紫外外部検出器を装備した同社製 LC-6A 型を用いた。核磁気共鳴 (NMR) 装置は日本電子製 GX-400FT-NMR、質量分析 (MS) 装置は高速原子衝撃 (FAB) イオン化装置が結合された Finnigan MAT 社製 MAT-90 を用いて測定した。

3. HPLC 法によるグリチルリチン酸塩の定量 グリチルリチン酸塩として約 1 mg に相当する医薬部外品 (クリーム、乳液、液剤) を精密に量り、内標準溶液 (プロピオフェノン; 約 20 ppm) 5 ml を正確に加えた後、さらに、水、メタノール、アセトニトリルあるいはそれらの混液 40 ml を加え、液が均一になるまで適宜スパチュラ等のかき混ぜる等の操作を行いながら超音波分散を行った。不溶物はメンブランフィルター (0.45 μ m, ゲルマンサイエンス社製) でろ過し、ろ液を試験溶液とした。

試験溶液 15 μ l を HPLC 装置に導入した。カラムは資生堂製 Capcell Pak C18 SG (5 μ m, 内径 4.6 mm, 長さ 250 mm) を用い、カラム温度を 40°C とした。移動相にはリン酸で pH を 2.5 に調整したアセトニトリル及び水の混液 (40 : 60) を用い、流速 1.0 ml/min に調整した。検出は、紫外部 254 nm で行い、定量にはあらかじめ標準溶液 (約 12.5, 25.0, 37.5 ppm) を用いて求めた検量線を用いて行った。また、グリチルリチン酸塩の成分の分取には、カラムに資生堂製 Capcell Pak C18 SG (5 μ m, 内径 20 mm, 長さ 250 mm) を用いたほかは定量条件と同一の条件を用いた。

結 果 及 び 考 察

1. グリチルリチン酸塩の分析と医薬部外品中のグリチルリチン酸塩の定量

定量条件におけるグリチルリチン酸塩の高速液体クロマトグラムの例を Fig. 1 に示した。高純度標準グリチルリチン酸からは単一のピークのみを認め、グリチルリチン酸塩の主成分ピークの保持時間に一致した。また、Fig. 1 に示したように、約 6.3 分、11.2 分に溶出するピークについては既に同定が行われている (成分 1—3)。⁴⁾ そして、これら以外にも数々のピークが認められた。

Table I には、本研究の対象としたグリチルリチン酸塩 8 ロットの分析結果を示したが、日本化粧品原料基準に定められる定量法では、いずれも 98% 以上の定量値が得られたのに反し、高純度標準試薬を用いる内標準法による HPLC の定量では類縁化合物の存在のため配合量の 70% 程度の回収率しか得られなかった。そして、この値は製造ロットにかかわらず比較的安定したものであった。このことは、グリチルリチン酸塩のクロマトグラム上のピーク面積総和に占める主成分ピークの面積の割合が 80% 弱にしかならないことから、妥当と考えられた。

以上のように日本化粧品原料基準に定められるグリチルリチン酸塩は、類縁体を含む混合物であ

Fig. 1. HPLC Chromatograms of Pure Glycyrrhizin and Commercial Dipotassium Glycyrrhizinate

(a) pure glycyrrhizin, (b) commercial dipotassium glycyrrhizinate.

TABLE I. Analytical Results of Commercial Monoammonium and Dipotassium Glycyrrhizates

	Lot. No.	UV spectro- photometry ^{a)}	HPLC ^{b)}
Monoammonium glycyrrhizinate	04007N565	99.6 (%)	73.6 (%)
	13905N440	100.3	71.8
	24906N452	100.9	71.8
	30911N494	100.0	72.0
	05801N295	100.1	69.4
Dipotassium glycyrrhizinate	21007N858	99.6 (%)	72.7
	12004N850	98.8	72.1
	22006N855	99.4	70.4

a) The method described in the Japanese standards of cosmetic ingredients. b) Pure glycyrrhizin was used as a standard.

ることから、これらが医薬部外品に問題なく配合されているか否かを試験する上では、高純度標準試薬を用いて配合したグリチルリチン酸塩の純度を HPLC 法で求め、配合医薬部外品についての定量値を考察する方法ではなく、実際に配合したグリチルリチン酸塩を標準品として定量する方法も場合によっては適切と考えられた。すなわち、公定試験法においては、類縁体を含めた混合物全体を吸光度で純度規定しているが、医薬部外品中の定量については、HPLC 法が配合量が少ないために汎用されており、配合量の確認のための試験においては高純度標準試薬を用いる方法は一種の間接定量となり、不必要な分析誤差を生ぜしめる原因ともなると考えられた。

そこでこの同一の配合ロットを標準として用いる方法で剤型の異なる数種の医薬部外品の分析を実施した。結果を Table II に示したが、定量値は配合量の 98—106% であり高めの傾向を示すものが多く認められ、洗浄料においてその傾向は顕著であった。実験は 3 回の繰り返し測定により行われたが、繰り返し精度にはいずれの場合も問題はなかった。高純度標準試薬を標準試料として同時に行った実験結果も同様の傾向が認められ、グリチルリチン酸塩を医薬部外品に配合する際において何らかの変化が疑われたが、分解等のマイナス変化ではなく、プラスの変化であることが原因解明を複雑にさせた。

2. pH の影響

グリチルリチン酸塩の変化が予測されたこと、製品の pH が配合される脂肪酸石鹼のために 9—10 となる洗浄料で変化が顕著であったことから、まず pH の影響について検討した。すなわち移動相と同一組成のアセトニトリル及び水の混液 (40 : 60) にグリチルリチン酸ジカリウム及び高純度グリチルリチン酸を各々 250 ppm 濃度に溶解し、内標準としてのプロピオフェノンを 2.5 ppm 添加した後、リン酸、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム水溶液を適宜加えて pH を 5—10 に調整した。この液について直ちに HPLC 法により分析を行い、主成分ピークと内標準ピークとのピーク面積比の pH による変化を追跡した。pH 幅は実際の化粧品の pH として考えられる範囲を考慮して設定した。結果を Fig. 2 に示したが、高純度グリチルリチン酸にはほとんど変化が認められなかったのに反し、グリチルリチン酸ジカリウムは、pH 9 以上で急激なピーク面積比の増加が認められ、pH 2.5 におけるピーク面積比を 1.00 としたときの相対値は pH 10 で 1.03 となった。この実験で得られたクロマトグラムを注意深く観察すると

TABLE II. Analytical Results of Monoammonium and Dipotassium Glycyrrhizates in Quasi-drugs by HPLC Using Formulated Commercial Glycyrrhizates as Standards

		Amounts formulated (%)	Recovery (%) ^{a)}	Cv (%)
Emulsion	1	0.05	98.2	0.50
	2	0.05	101.3	0.56
Lotion	1	0.05	102.8	0.73
	2	0.05	98.0	1.12
	3	0.05	102.6	0.96
	4	0.05	100.9	0.42
Pack	1	0.1	102.7	3.30
	2	0.05	100.1	0.32
Cleansing product	1	0.1	103.2	0.55
	2	0.1	105.8	0.40
	3	0.1	104.1	1.09
Other	1	0.05	102.4	0.07
	2	0.05	101.2	1.97
	3	0.01	102.5	0.69

a) Average of 3 repeated analyses.

Fig. 2. Effect of pH on Peak Area Ratio [Glycyrrhizin/Propiophenone (I.S.)]

○—○, dipotassium glycyrrhizate; ●—●, pure glycyrrhizin.

pH 9 以上で保持時間約 17 分に溶出するピークが減少あるいは消失していることが確認できた。

pH 9 以上における変化を更に確認するために水酸化カリウム溶液を加えて、その濃度あるいは加熱処理及びその時間とピーク面積比の変化を観察した。結果の一例を Fig. 3 に示したが、1 N 相当の水酸化カリウムを加えて 80°C の水浴中で加熱するとピーク面積比は 1.06 にまであがった後、徐々に減少傾向が観察されたことから、定量値が高めとなる一因としてアルカリ側におけるグリチルリチン酸塩中の特定成分の変化を更に検討した。

3. 変化ピークの分取とその構造決定

保持時間約 17 分に溶出するピークを分取用カラムを用いて分取し、分取液をそのまま及び、それをリン酸ナトリウム溶液にて中和したものを、定量用条件で分析し、単一かつ同一のピークとして分取出来たことを確認した。これにリン酸ナトリウム溶液を加えて pH 10 に調整したもの、これをリン酸で再度 pH 2.5 としたもののクロマトグラムを Fig. 4 に示した。測定はいずれも pH 調整後直ちに行った。保持時間約 17 分に溶出するピークは、酸性側に置かれていても変化は見られないが、それが一度アルカリ側に置かれることでグリチルリチン酸に変化することが確認できた。Fig. 4 (b) で約 7 分に溶出するピークは、(a) の約 17 分に溶出するピークが後述の構造を示し、かつアルカリ側でグリチルリチン酸塩に変化することから、グリチルリチン酸のカルボキシ基が一部解離した状態のものであり、そのために保持挙動に変化が生じたものと推察した。したがって、pH を酸性にして解離を抑えることにより通常の保持挙動に戻ると考えられた。

次いで、分取物について ^{13}C 及び ^1H -NMR スペクトル並びに FAB-MS スペクトルを測定した。

NMR 測定より、 ^1H -NMR [in D_2O : CD_3OD (7 : 3)] δ : 3.74 (3H, $-\text{COOCH}_3$), ^{13}C -NMR (in CD_3OD) δ : 50.9 ($-\text{COOCH}_3$) が確認された。これより、カルボキシメチル基の存在が示唆され、それに伴うカルボニル基やグルクロン酸骨格由来の炭素の化学シフト値にも変化が見られた。

グリセリンをマトリックスとして用いた FAB-MS スペクトルからグリチルリチン酸モノメチル

Fig. 3. Effect of Alkali and Heat on Peak Area Ratio [Glycyrrhizin/Propiophenone (I.S.)]

Fig. 4. HPLC Chromatograms of Minor Constituent ($t_R=17$ min) from Glycyrrhizinate
(a) neutral solution (pH 7), (b) alkaline solution (pH 10), (c) acidic solution (pH 2.5).

Chart 1

TABLE III. Peak Area % of 4 in Commercial Glycyrrhizates by HPLC

	Lot. No.	Ratio (%)
Monoammonium glycyrrhizinate	04007N565	1.50
	13905N440	1.42
	24906N452	1.62
	30911N494	1.66
	05801N295	1.14
Dipotassium glycyrrhizinate	21007N858	1.07
	12004N850	1.47
	22006N855	1.05

エステルモノナトリウム塩 (分子量 859) を示唆する結果が得られた。すなわち、正イオンスペクトルでは m/z : 860 ($M+H$), 882 ($M+Na$) が、負イオンスペクトルでは m/z : 858 ($M-H$), 836 ($M-Na$) が認められた。さらに負イオンスペクトルで検出された m/z : 668, 645 はグルクロン酸メチル、さらにナトリウムの脱離を示していた。グルクロン酸メチルの脱離が見られたことから、この成分は末端のグルクロン酸がメチルエステルとなったものと考えられた。

ナトリウムは中和に使用した塩由来のものと考えられることより、この成分は、20 β -carboxy-11-oxo-30-norolean-12-en-3 β -yl-2-O- β -(6-methyl-D-glucopyranuronosyl)- α -D-glucopyranosiduronic acid (以下成分 4) と推定された (Chart 1)。

さらに、グリチルリチン酸ジカリウムに 10% 塩酸メタノールを加えて溶かし、室温に 16 時間放置したものを定量条件で分析したところ成分 4 が主成分的になっていることが確認され、このことからメチルエステルであることが実証された。

この成分 4 は、本研究の対象としたすべてのグリチルリチン酸塩の製造ロットから検出され、Table III にはピーク面積百分率法による定量結果を示したが、メチルエステルの量は比較的一定しており、約 1—1.6% であった。

ま と め

医薬部外品中のグリチルリチン酸モノアンモニウム、ジカリウム等のグリチルリチン酸塩の HPLC 法による定量の際に時折観察されてきた定量値が高めになる現象を検討し、その原因の 1 つがグリチルリチン酸塩中にピーク面積百分率で 1% 程度存在するメチルエステルが加水分解を受け、定量対象となっているグリチルリチン酸に加えられた結果であることを確認することが出来た。加水分解の程度は、配合される製品の pH あるいは製品の経時、温度履歴により異なることが、pH を 5—10 まで変えたグリチルリチン酸塩単純溶液の分析の結果から明らかとなったし、その変化も比較的短時間の間に生ずることが明らかとなった。

定量値の上昇は、多くとも 5—6% 程度と考えられたが、公定規格に適合するグリチルリチン酸塩の状況をピーク面積百分率法により分析した結果とは必ずしも一致しておらず、測定上の誤差以外にも、今回、存在を確認することができなかった成分 4 以外の微量なエステルの存在の有無、メチルエステルの分子吸光係数の変化など、さらに確認が必要な点も残されている。

このような、比較的小さな定量値の偏りは日常分析では見過ごされがちであるし、特に大きな問題とはならないが、より精度の高い分析を行う場合には十分に考慮すべき問題であり、配合したグリチルリチン酸塩を標準とし、検量線用標準溶液を製品と同雰囲気置くなどの何らかの対策が必要であると考えられた。

引用文献

- 1) 日本公定書協会編, “化粧品原料基準第二版注解,” 薬事日報社, 東京, 1984, pp. 344—347.
- 2) 日本公定書協会編, “第 11 改正日本薬局方解説書,” 広川書店, 東京, 1986, pp. D-198—D-205.
- 3) 岡田憲三, 田中 順, 宮下 晶, 井元勝恵, 薬誌, **101**, 822 (1981).
- 4) 常磐植物化学研究所, Japan Patent 14478 (1984); [赤田良信, 棚瀬弥一郎, 薬誌, **96**, 1035 (1976)].