

(2) アウクビン

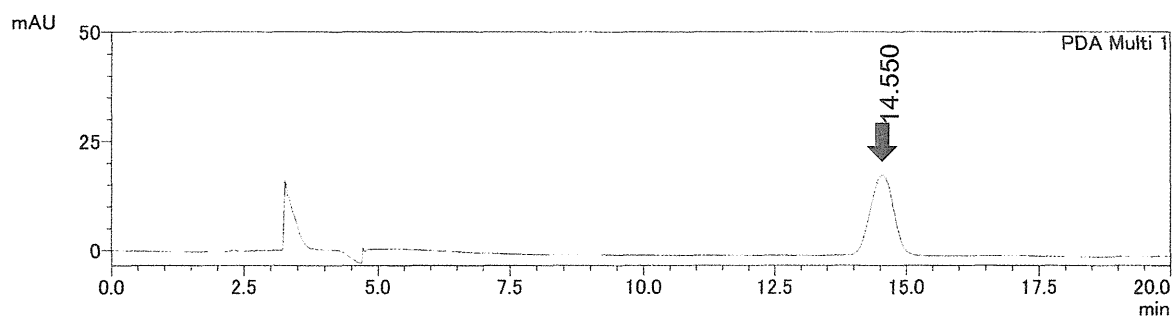
試験法の参考元とした文献(薬学雑誌, 44(1), 17~20, 1990)では, 生薬末を用いていることから, 試験法の再現性の確認のため, 今回の試験ではシャゼンソウ末も試料に加えた. シャゼンソウ末試料溶液の調製は文献の記載を参考に以下のとおり行った.

すなわち, シャゼンソウ末 250 mg を精密に量り, 共栓フラスコに入れ, 50%メタノール溶液 8 mL を加え, 30 分間超音波を照射し, 冷後, 60%メタノール溶液を加え, 正確に 10 mL とし, よく振り混ぜ, ろ過し, シャゼンソウ末試料溶液とした.

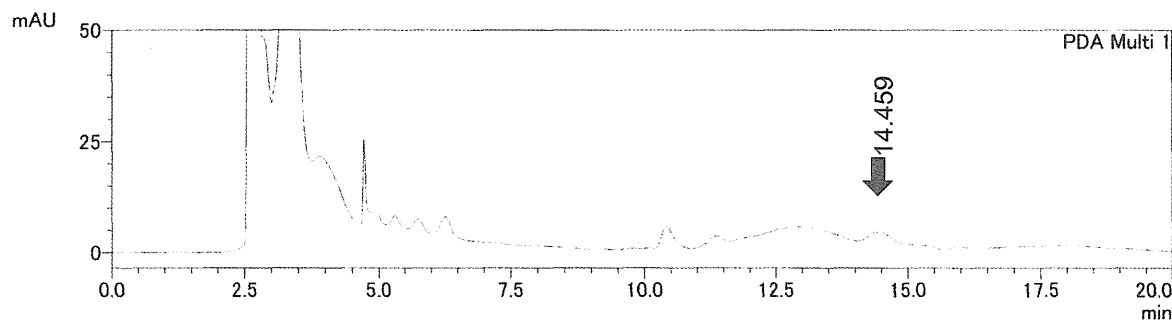
カラム: ジーエルサイエンス株式会社, Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4.6mm \times 250mm, S/N 7BI86346
以下にクロマトグラムを示した.

各クロマトグラムには主たるピークにその保持時間を付記した.

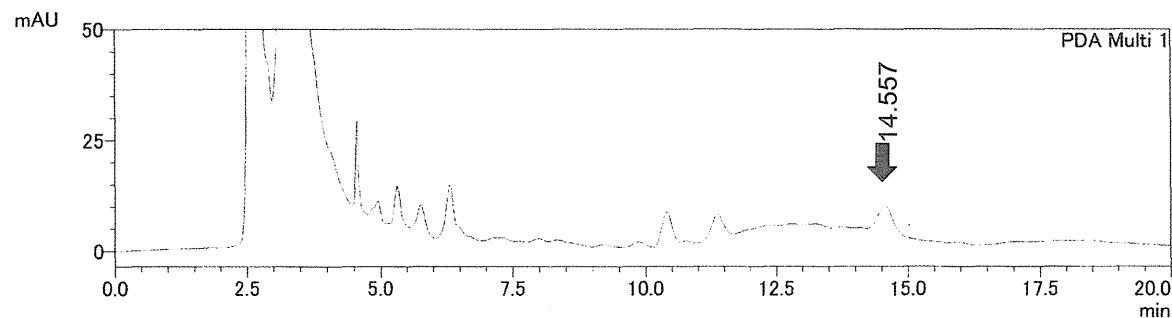
[標準溶液]



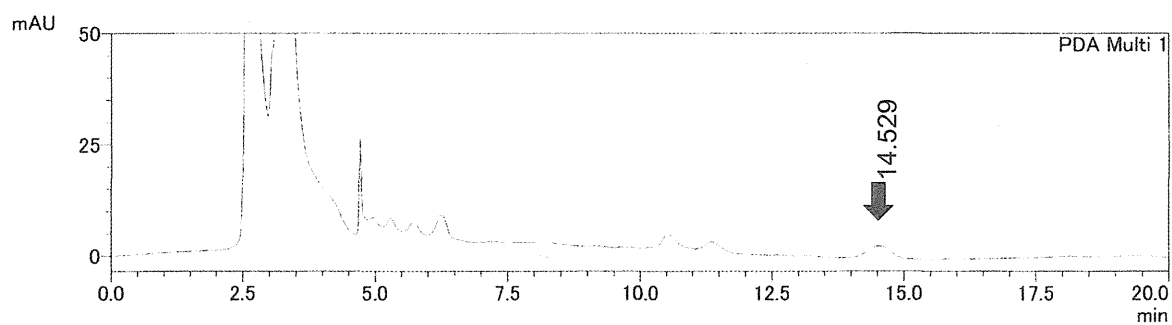
[エキス末試料溶液]



[標準煎剤試料溶液]



[シャゼンソウ末試料溶液]



エキス末試料溶液及び標準煎剤試料溶液において、アウクビンのピーク（矢印）が検出されたが、ベースラインが高く、夾雑成分の分離方法の検討が必要と考えられた。なお、シャゼンソウ末試料溶液においては比較的ベースラインが低くアウクビン単独のピークを検出できていることから、文献に記載の試験法は再現できていると考えられた。

センナエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：センノシド A, B (sennoside A, B), レイン (rhein)

日本薬局方 (JP) 「センナ」を参考に、確認成分、定量成分ともにセンノシド A, B を選定した。さらに定量成分として、文献を参考にレインを選定した。

2. 確認試験

日本薬局方 (JP) 「センナ」を参考にする。

乾燥エキス 1 g にテトラヒドロフラン/水混液 (7:3) 40 mL を加え、30 分間振り混ぜた後、遠心分離する。上澄液を分液漏斗に移し、塩化ナトリウム 13 g を加え、30 分間振り混ぜる。分離した水層を不溶の塩化ナトリウムと共に分取し、1 mol/L 塩酸試液を加えて pH1.5 に調整する。この液を別の分液漏斗に移し、テトラヒドロフラン 30 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後、分離したテトラヒドロフラン層を分取し、試料溶液とする。別にセンノシド A 標準品 1 mg をテトラヒドロフラン/水混液 (7:3) 5 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に 1-プロパノール/酢酸エチル/水/酢酸(100)混液 (40: 40: 30:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 365 nm) を照射するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た赤色の蛍光を発するスポットと色調及び Rf 値が等しい。

3. 定量法

(1) センノシド A, B

日本薬局方 (JP) 「センナ」を参考にする。

乾燥エキス約 0.05 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、薄めたメタノール(7→10) 25 mL を加え、30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は薄めたメタノール(7→10) 10 mL ずつで 2 回 10 分間振り混ぜて遠心分離し、上澄液を分取する。全抽出液を合わせ、薄めたメタノール(7→10) を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液とする。別にセンノシド A 標準品 (別途水分を測定しておく) 約 10 mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液 (1→100) に溶かし、正確に 20 mL とし、標準原液(1)とする。また、センノシド B 標準品 (別途水分を測定しておく) 約 10 mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1→100) に溶かし、正確に 20 mL とし、標準原液(2)とする。標準原液(1) 1 mL 及び標準原液(2) 2 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 50 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のセンノシド A 及びセンノシド B のピーク面積を測定し、含量を求める。

(標準煎剤)

標準煎剤をよく振り混ぜ、その 5 mL を正確に量り、メタノール 12 mL を加え、更に薄めたメタノール(7→10)を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：340 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：50°C 付近の一定温度

移動相：薄めた pH5.0 の 1 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1→10)/アセトニトリル混液 (17:8) 1000mL に臭化テトラ n-ヘプチルアンモニウム 2.45 g を加えて溶かす。

流量：センノシド A の保持時間が約 26 分になるように調整する。

カラムの選定：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、センノシド B、センノシド A の順に溶出し、その分離度は 15 以上で、センノシド A のピークの理論段数は 8000 段以上である。

試験の再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、センノシド A のピーク面積の相対標準偏差は 1.5%以下である。

(2) レイン

乾燥エキス約 0.05 g を精密に量り、水 80 mL を加え、よく振り混ぜて溶かし（超音波 15 分間照射）、更に水を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、塩化鉄(III)試液 20 mL を加え、還流冷却器を付けて水浴中で 30 分間加熱した後、塩酸 3 mL を加え、更に還流冷却器を付けて 30 分間加熱する。冷後、ジエチルエーテル 25 mL ずつで 3 回抽出し、全ジエチルエーテル層を合わせ、溶媒を減圧で留去した後メタノール 10 mL を正確に加えて溶かし、試料溶液とする。別に、レインをデシケーター（シリカゲル）で約 24 時間以上乾燥し、その約 5 mg を精密に量り、アセトンに溶かし、正確に 100 mL とする。この液 10 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 50 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のレインのピーク面積を測定し、含量を求める。

(標準煎剤)

標準煎剤をよく振り混ぜ、その 5 mL を正確に量り、水 80 mL を加え、よく振り混ぜて溶かし（超音波 15 分間照射）、更に水を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、以下、乾燥エキスと同様に操作し、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：278 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 25 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：50°C 付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル／リン酸混液 (650:350:1)

流量：毎分 1.0 mL (レインの保持時間約 22 分)

システム適合性

システムの性能：標準溶液 10 μ L につき，上記の条件で操作するとき，レインのピークの理論段数及びシンメトリー係数は，それぞれ 5000 段以上，1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，レインのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。加えて正確に 50 mL とし，標準溶液とする。

【参考資料】

・センノシド A

CAS Number: 81-27-6

JP に標準品として収載

・センノシド B

CAS Number: 128-57-4

JP に標準品として収載

・レイン

CAS Number: 478-43-3

JP に試薬 (薄層クロマトグラフィー用) として収載

・各国公定書での記載

JP	定性	呈色反応
	①	検出：遊離アントラキノン系化合物，及びその配糖体
	定性 ②	試験方法：TLC 展開溶媒：1-プロパノール／酢酸エチル／水／酢酸(100) 混液 (40:40:30:1) 検出法：UV (365 nm)→赤色の蛍光 マーカー化合物：センノシド A 標準品
定量	試験方法：HPLC カラム：ODS カラム 検出器：紫外線吸光光度計 (測定波長：340 nm) 移動相：薄めた pH5.0 の 1 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1→10) ／アセトニトリル混液 (17：8) 1000 mL に臭化テトラ n-ヘプ チルアンモニウム 2.45 g を加えて溶かす。 含量：総センノシド (センノシド A 及びセンノシド B) 1.0%以上	
CP	定性	呈色反応
	①	検出：アントラキノン系化合物
	定性 ②	試験方法：TLC 展開溶媒：1-プロパノール／酢酸エチル／水混液 (4:4:3) 検出法：UV (365 nm)→蛍光， 20%硝酸 + 120°C + 5%KOH→同一スポット マーカー化合物：センナ
定量	試験方法：HPLC カラム：ODS カラム 検出器：紫外線吸光光度計 (測定波長：340 nm)	

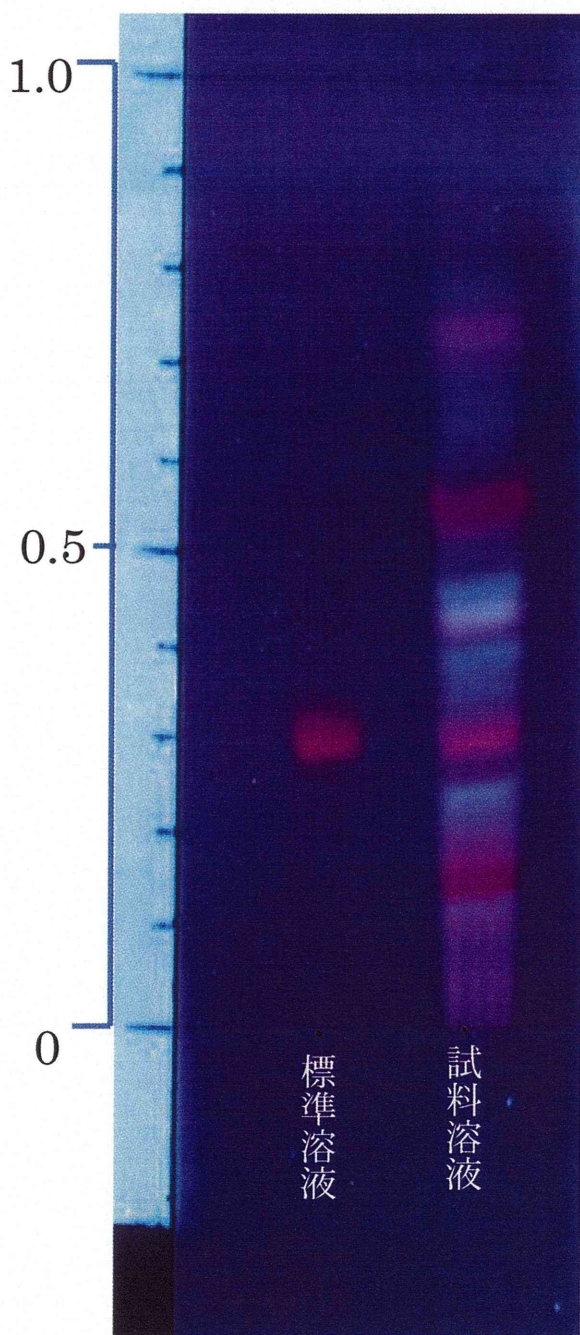
		<p>移動相：薄めた pH5.0 の 1 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1→10) / アセトニトリル混液 (65:35) 1000 mL に臭化テトラ n-ヘプチルアンモニウム 2.45 g を加えて溶かす。</p> <p>含量：センノシド A + センノシド B 1.1%以上</p>
EP/BP	定性	試験方法：TLC
	①	<p>展開溶媒：1-プロパノール / 酢酸エチル / 水 / 酢酸(100)混液 (40:40:30:1)</p> <p>検出法：20%硝酸 + 120°C + 5%KOH / 希エタ → 同一スポット</p> <p>マーカー化合物：センナエキス</p>
	定性	呈色反応
	②	検出：アントラキノン系化合物
	定量	<p>吸光度法 (515 nm)</p> <p>ヒドロキシアントラセングリコシド (センノシド B として) 2.5%以上</p>
USP36	定性	<p>呈色反応</p> <p>検出：アントラキノン系化合物</p>
	定量	<p>吸光度法 (515 nm)</p> <p>アントラキノングルコシド (USP センノサイド RS として) 2.5%以上</p>
HKCMMS	定性	未収載
	定量	未収載

【試験実施結果】

○試験検体

- ・乾燥エキス：収率 24.7%，原生葉対比 4.0:1
- ・標準煎剤：(センノシドA, B 定量用) センナ 1 日量 3g を熱湯 150 mL に加え，15 分間煎じ，温時布ごしし，冷後，常水を加えて正確に 150 mL とし，標準煎剤とする。
(レイン定量用) センナ 1 日量 6g を熱湯 150 mL に加え，15 分間煎じ，温時布ごしし，冷後，常水を加えて正確に 150 mL とし，標準煎剤とする。

○確認試験

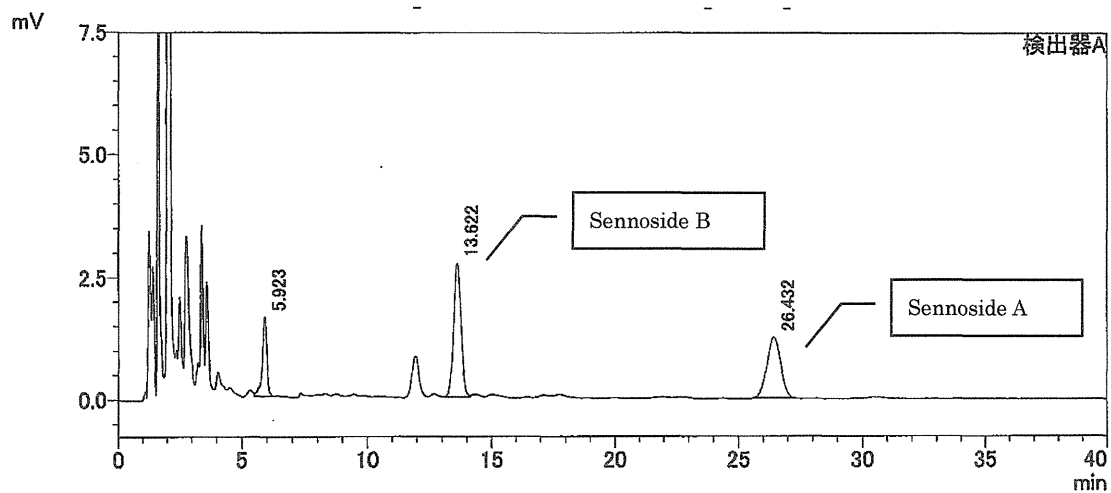


○定量法

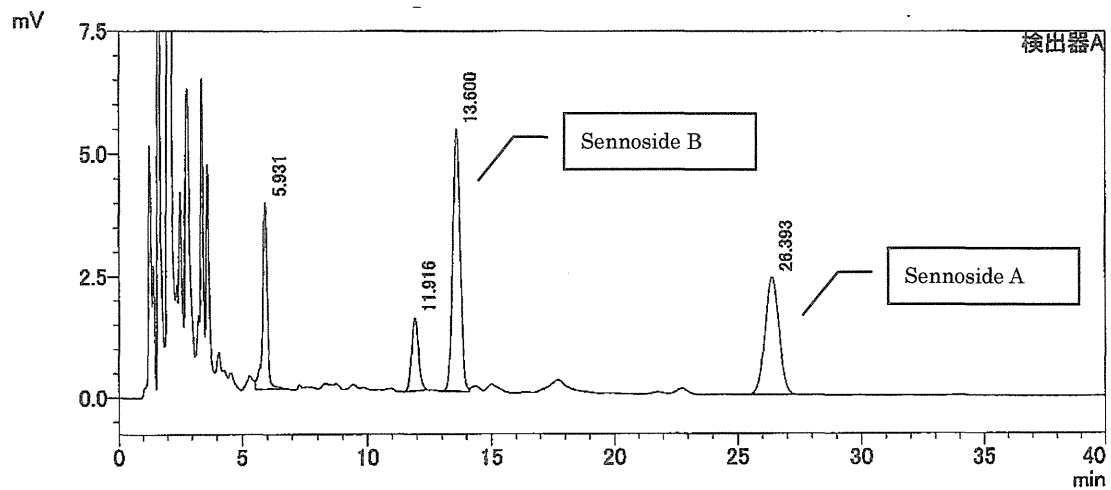
(1) センノシド A, B の定量

定量クロマト例

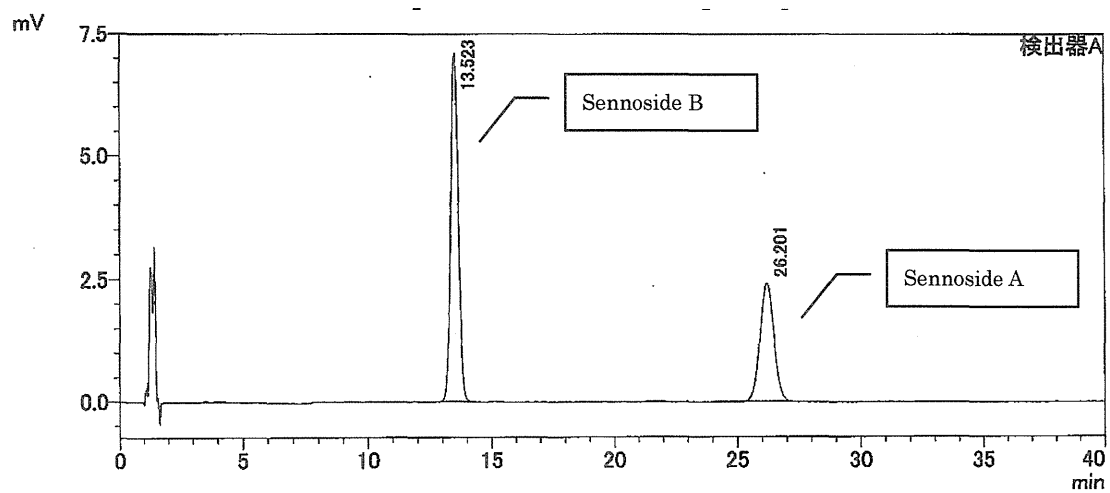
・標準煎剤



・乾燥エキス

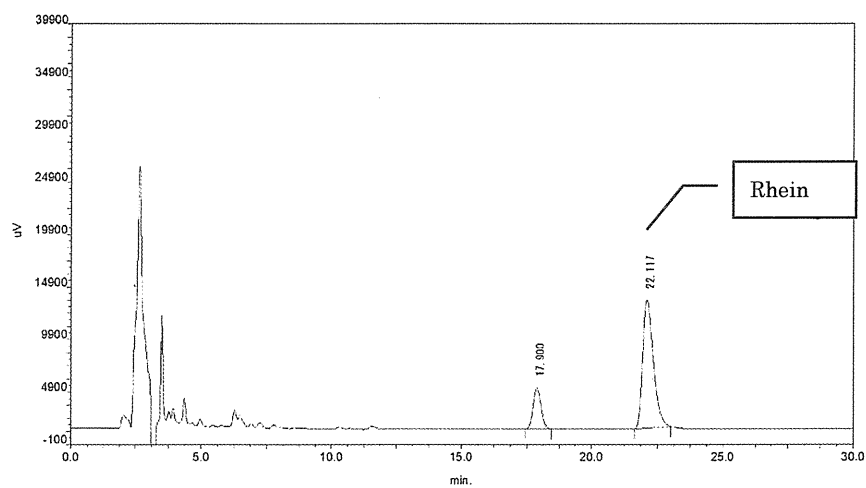


・STD

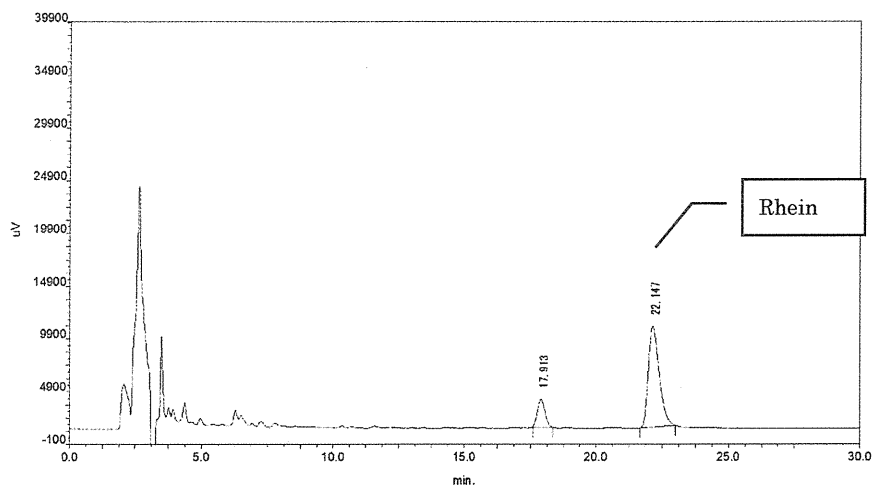


(2) レインの定量

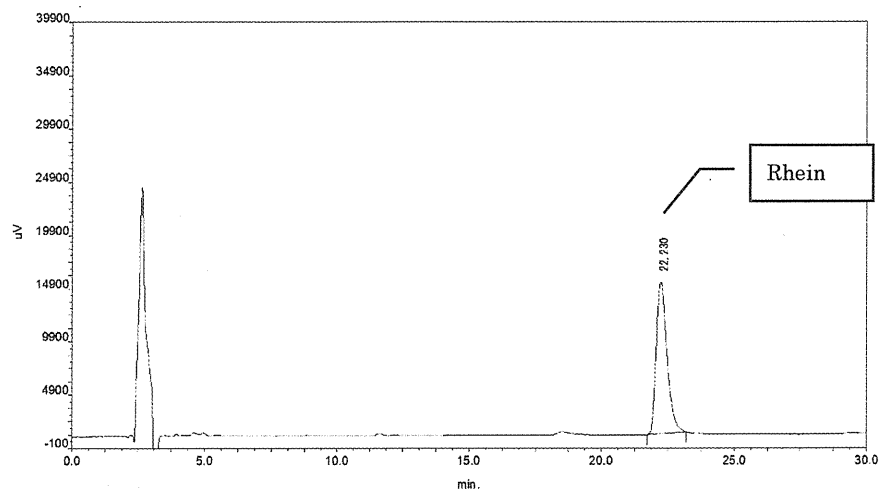
• 標準煎剤



• 乾燥エキス



• STD



○指標成分の定量値，含量について

原生薬 1 g あたり

指標成分	センノシドA+B	レイン
原生薬	12.50 mg	20.32 mg
標準煎剤	5.89 mg	8.83 mg
乾燥エキス (乾燥エキス 1g は原生薬 4.0g に相当する)	5.63 mg	6.82 mg

センブリエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：スウェルチアマリン (swertiamarin), ゲンチオピクロシド (gentiopicroside), スウェロシド (sweroside)

日本薬局方 (JP)「センブリ」を参考に確認成分並びに定量成分としてスウェルチアマリンを選定した。また、第2の定量成分としては、センブリに含まれていることが報告されている¹⁾ スウェロシド、ゲンチオピクロシド等が考えられるが、UV でより長波長側に吸収を持つゲンチオピクロシドを選定した。

想定される含量

文献	gentiopicroside (%)	swertiamarin (%)	試料
1	0.04-0.21	0.35-2.03	植物 (野生, 栽培)
2	0.03-0.35	0.17-2.57	生薬
	0.06-0.16	<0.01-2.45	野生品
3	0.30-1.95	-	生薬
4	0.45	-	生薬
	0.27-0.38	-	植物

1) Demizu S. *et al.*, *J. Chromatogr.*, 360, 307-311 (1986).

2) Sakamoto *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 31(1), 25-30 (1983).

3) 赤田 他, *薬学雑誌*, 100(6), 678-680 (1980).

4) Takido *et al.*, *Planta Medica*, 38(6), 351-355 (1980).

*文献 1 の実際の報告値はこの 1/1000 であるが、swertiamarin 含量から考えて単位の誤りと思われる。

2. 確認試験

日本薬局方 (JP)「センブリ」を参考にする。

乾燥エキス 0.2 g にメタノール 10 mL を加え、5 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にスウェルチアマリン 2 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲル (混合蛍光剤入り) を用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/1-プロパノール/水混液 (6:4:3) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (広域波長) を照射するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た赤色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

3. 定量法

(1) スウェルチアマリン

日本薬局方 (JP)「センブリ」を参考にする。

乾燥エキス 0.2 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール 40 mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物には更にメタノール 40 mL を加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とする。別にスウェルチアマリン標準品（別途水分を測定しておく）約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 20 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のスウェルチアマリンのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。

スウェルチアマリン($C_{16}H_{22}O_{10}$) の量 (mg) = $M_S \times A_T / A_S \times 5$

M_S : 脱水物に換算したスウェルチアマリン標準品の秤取量 (mg)

(標準煎剤)

センブリ 1.5 g を水 300 mL で半量になるまで煎じ、煎液を熱時ろ過する。ろ液を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：238 nm）

カラム：内径 4.6 mm，長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：50°C 付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル混液 (91:9)

流量：スウェルチアマリンの保持時間が約 10 分になるように調整する。

システムの適合性

システムの性能：スウェルチアマリン標準品 1 mg 及びテオフィリン 1 mg を移動相に溶かして 10 mL とする。この液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、テオフィリン、スウェルチアマリンの順に溶出し、その分離度は 10 以上である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、スウェルチアマリンのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

(2) ゲンチオピクロシド

以下の論文を参考にする。

野村 他，「ゲンチアナ，リュウタン，ジンギョウについて HPLC による分析法の検討と市場品の分析」，*生薬学雑誌* 68, 43-52 (2014)。

乾燥エキス 0.3 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール 40 mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物には更にメタノール 40 mL を加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とす

る。別にゲンチオピクロシド約 2 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のゲンチオピクロシドのピーク面積を測定し、含量を求める。

(標準煎剤)

センブリ 1.5 g を水 300 mL で半量になるまで煎じ、煎液を熱時ろ過する。ろ液を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：274 nm)

カラム：内径 4.6 mm，長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：50°C 付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル混液 (94:6)

流量：ゲンチオピクロシドの保持時間が約 18 分になるように調整する。

システムの適合性

システムの性能：標準溶液液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、ゲンチオピクロシドのピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ 5000 段以上、1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ゲンチオピクロシドのピーク面積の早退標準偏差は 1.5% 以下である。

【参考資料】

・スウェルチアマリン

CAS Number: 17388-39-5

JP に標準品として収載

・ゲンチオピクロシド

CAS Number: 20831-76-9

JP に試薬（薄層クロマトグラフィー用）として収載

・各国公定書での記載

JP	定性	試験方法：TLC 展開溶媒：酢酸エチル／1-プロパノール／水混液(6:4:3) 検出法：UV（広域波長） マーカー化合物：スウェルチアマリン
	定量	試験方法：HPLC カラム：ODS カラム 検出器：紫外線吸光度計（測定波長：238 nm） 移動相：水／アセトニトリル混液（91:9） 含量：スウェルチアマリン 2.0%以上
CP	定性	未収載
	定量	未収載
EP/BP	定性	未収載
	定量	未収載
USP	定性	未収載
	定量	未収載
HKCMMS	定性	未収載
	定量	未収載

【試験実施結果】

○煎液及びエキスの調製

煎液：日本薬局方 (JP)「センブリ」(大晃生薬, Lot 4B05) 1.59 g を水 300 mL で半量になるまで煎じ, 煎液を熱時ろ過した.

エキス：煎液 140 mL を凍結乾燥し, 乾燥エキス 372 mg を得た.

○標準溶液

以下の試薬を用いて調製した.

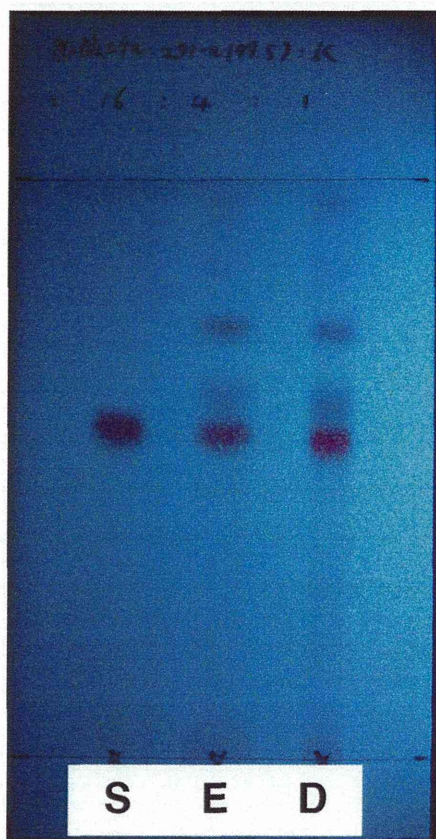
スウェルチアマリン, 薄層クロマトグラフィー用 (Wako, Lot SDF1772)

スウェルチアマリン, 生薬成分標準試薬 (米山薬品, Lot MBF1741)

ゲンチオピクロシド, 薄層クロマトグラフィー用 (Wako, Lot KPH6475)

○確認試験

試料溶液から得た数個のスポットのうち1個のスポットの色調及び R_f 値が, 標準溶液から得た赤色のスポットと等しかった.



S : 標準溶液 (スウェルチアマリン)

E : エキス試料溶液

D : 煎液試料溶液

Fig. 1 確認試験の TLC クロマトグラム

○定量法

(1) スウェルチアマリン

検出器：紫外吸光度計（測定波長：238 nm）

カラム：Inertsil ODS-3 (内径 4.6 mm, 長さ 15 cm, 粒子径 5 μm)

カラム温度：50°C

移動相：水/アセトニトリル混液 (91:9)

流速：1 mL/min

注入量：10 μL

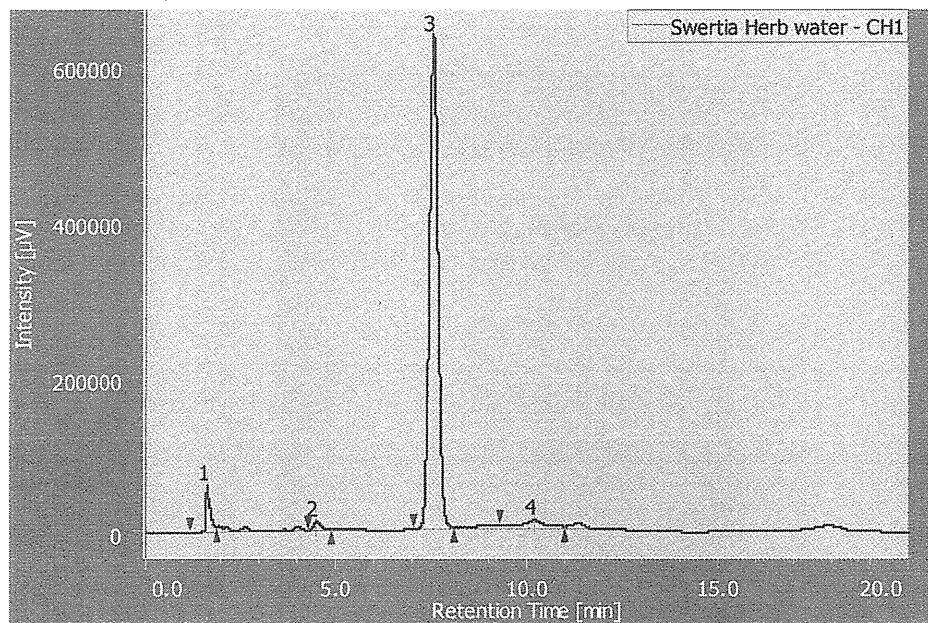


Fig. 2 センブリ標準煎液中のスウェルチアマリンの定量

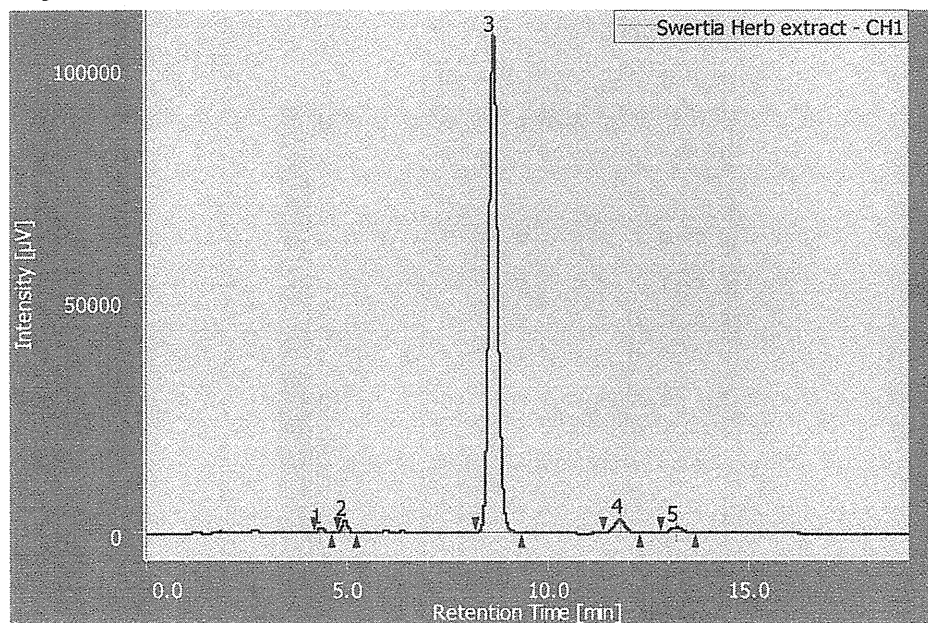


Fig. 3 センブリエキス中のスウェルチアマリンの定量

ピーク 3：スウェルチアマリン

(2) ゲンチオピクロシド

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：274 nm)

カラム：Inertsil ODS-3 (内径 4.6 mm, 長さ 15 cm, 粒子径 5 μm)

カラム温度：50°C

移動相：水/アセトニトリル混液 (94:6)

流速：1 mL/min

注入量：10 μL

*ゲンチオピクロシドの定量については、文献報告の条件では、ピークの重なりが見られたことから、溶媒組成を変更した。

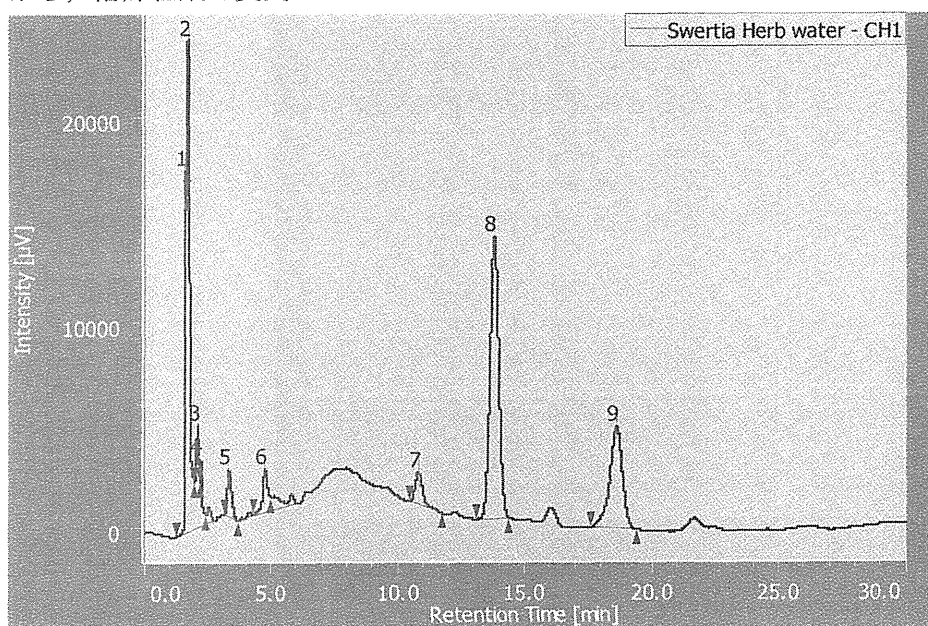


Fig. 4 標準煎液中のゲンチオピクロシドの定量

ピーク 8：スウェルチアマリン，ピーク 9：ゲンチオピクロシド

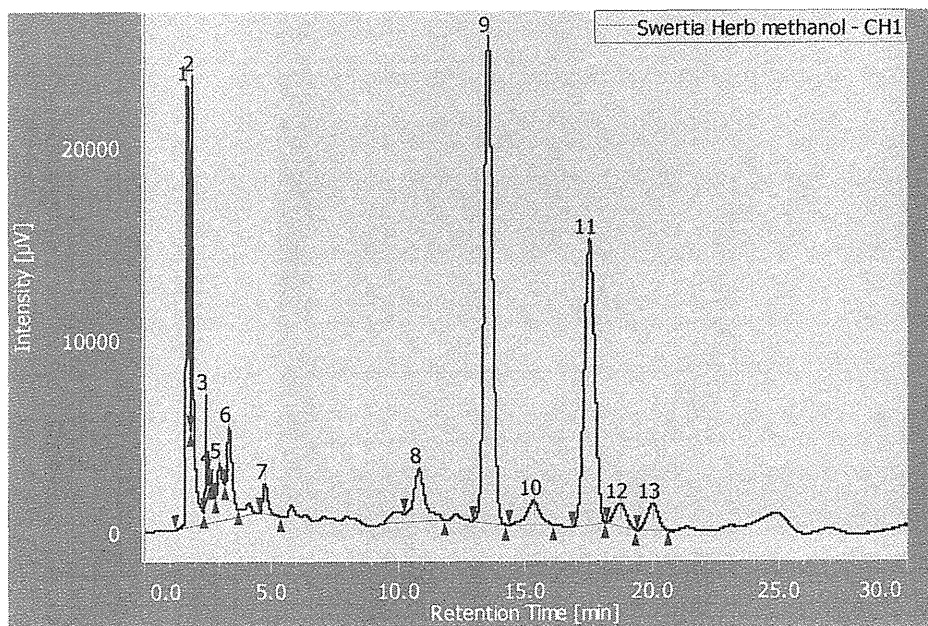


Fig. 5 センブリエキス中のゲンチオピクロシドの定量

ピーク 9：スウェルチアマリン，ピーク 11：ゲンチオピクロシド

○ 指標成分の定量結果 (原生薬 1g あたり)

	スウェルチアマリン	ゲンチオピクロシド
標準煎剤	64.9	59.8
乾燥エキス	0.78	0.76

ダイオウエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：センノシドA (sennoside A), レイン (rhein)

日本薬局方 (JP) 「ダイオウ」を参考に、確認成分はレインを選定し、定量成分にセンノシドAを選定した。さらに定量成分として、文献を参考にレインを選定した。

2. 確認試験

日本薬局方 (JP) 「ダイオウ」を参考にする。

乾燥エキス 0.5 g に水 10 mL を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用レイン 1 mg をアセトン 10 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 5 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/メタノール/水混液 (20:3:2) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た黄色のスポットと色調及び Rf 値が等しい。また、このスポットは、炭酸ナトリウム試液を均等に噴霧するとき、赤色を呈する。

3. 定量法

(1) センノシドA

日本薬局方 (JP) 「ダイオウ」を参考にする。

乾燥エキス約 0.15 g を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1 \rightarrow 1000) 50 mL を正確に加え、30 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にセンノシドA 標準品 (別途水分を測定しておく) 約 10 mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1 \rightarrow 1000) に溶かし、正確に 50 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1 \rightarrow 1000) を加えて正確に 20 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のセンノシドA のピーク面積を測定し含量を求める。

(標準煎剤)

標準煎剤 5 mL を正確に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1 \rightarrow 1000) 50 mL を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長: 340 nm)

カラム：内径 4~6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：40°C 付近の一定温度