

## 医薬品中の胆汁酸の分析

西島あずさ\*, 片山 貴之\*, 赤崎 哲也\*, 朝長 洋祐\*, 池田 憲廣\*\*

### Analysis of Bile Acids in Medicine

Azusa NISHIJIMA\*, Takayuki KATAYAMA\*, Tetsuya AKASAKI\*, Hirotsuke TOMONAGA\*  
and Norihiro IKEDA\*\*

\* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance  
6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

\*\*Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center,  
605-10, Gose, Nara 639-2226 Japan

High performance liquid chromatography (HPLC) of fluorescent derivatives of bile acids was found to be a convenient method to find minute amounts of bear bile in medicinal preparations. Comparison of precisely determined quantities of ursodesoxycholic acid (UDC), one of the bile acids, before and after hydrolysis of the extract of each preparation, revealed the presence of even trace amounts of bear bile, thus distinguishing its preparation from other UDC-containing medicines. The limit of detection of reagent UDC was 0.3 pg/ $\mu$ l, when 20  $\mu$ l of sample solution was injected to the chromatograph.

### 1. 緒 言

熊胆（ゆうたん：熊の胆のう、クマノイ）及び熊胆を含む医薬品はワシントン条約附属書ⅡまたはⅠに該当するため、その含有の有無を分析により明確に判断することが求められる。

熊胆にはクマ特有の胆汁酸（ウルソデスオキシコール酸、以下UDCという、Fig.1）が主成分として含まれており、その胆汁酸は通常タウリンとペプチド結合した抱合型胆汁酸として存在している。UDCは、化学的にも合成され利胆薬として多くの医薬品に用いられており、合成のものは他の動物胆を原料としていることからワシントン条約の規制を受けない。

胆汁酸の定性分析には、薄層クロマトグラフ（TLC）法<sup>1)</sup>が用いられてきた。また、定量分析法としては、ガスクロマトグラフ（GC）法<sup>2)</sup>、フェナシルエステル化後UV検出器を用いた高速液体クロマトグラフ（HPLC）法<sup>3)</sup>などがある。また、UDCを蛍光ラベル化してHPLCにより簡便かつ高感度に定量する方法が報告されている<sup>4)</sup>が、製剤中に配合された微量の熊胆の確認については十分な報告がない。

そこで本報では、微量の胆汁酸を蛍光検出器を用いたHPLC

法により定量性を検証するとともに、製剤中に含まれる微量の熊胆の確認を検討した。

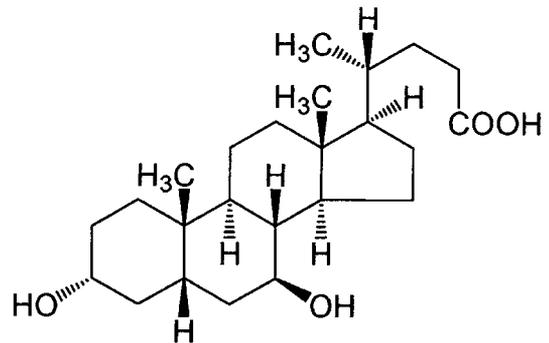


Fig.1 Ursodesoxycholic acid

### 2. 実 験

#### 2. 1 試料及び標準試薬

##### 2. 1. 1 試料（3種類）

UDC配合製剤（試料a, 市販品）

\* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

\*\*奈良県薬事研究センター 〒639-2226 奈良県御所市605-10

熊胆（試料b, 胆汁酸類が結晶状に固化したもの, インド産）

熊胆配合製剤（試料c, 市販品）

### 2. 1. 2 標準胆汁酸（4種類）

UDC（和光純薬製, 生化学用）

ケノデオキシコール酸（以下CDCという, 和光純薬製, 生化学用）

コール酸（以下CAという, 和光純薬製, 特級）

デオキシコール酸（以下DCという, 和光純薬製, 生化学用）

### 2. 1. 3 その他の試薬

NE-OTf（和光純薬製, 蛍光ラベル化用試薬）

18-クラウン-6（和光純薬製, 試薬）

無水フッ化カリウム（和光純薬製, 試薬特級）

ピレン（和光純薬製, 試薬特級）

アセトニトリル, メタノール, 塩酸及びりん酸は和光試薬特級を用いた。

## 2. 2 実験操作法

### 2. 2. 1 抱合型・遊離型胆汁酸類の抽出

各試料を粉末とし, 熊胆1mgに対応する量（熊胆配合製剤82mg, UDC配合製剤においてはUDC 0.12mgに対応する量=6mg）を精秤し, 20mlのナスフラスコに移し入れた後, メタノール10mlを加え, 沸騰水浴中で2時間加熱還流し抱合型胆汁酸を抽出した。冷却後, ろ紙でろ過し, ろ液を25mlのメスフラスコに入れてメタノールで定容したものを抽出試料溶液とした。

### 2. 2. 2 抱合型胆汁酸類のアルカリ加水分解

上記抽出溶液15mlを30mlのナスフラスコに正確に量り採り, 減圧乾固した。これに3mol/l水酸化ナトリウム溶液5mlを加えて溶かし, オートクレーブ中121℃で4時間加熱した。冷却後, 100mlの分液ロートに移し10%塩酸を加えて約pH7とした後, 0.1mol/l塩酸を加えてpH1とした。クロロホルム15mlで2回, 10mlで3回抽出し, クロロホルム層は綿栓ろ過により100mlのナスフラスコに移し, 減圧乾固した。このナスフラスコにメタノール15mlを正確に加えて溶かし, 加水分解試料溶液とした。

### 2. 2. 3 TLC法

薄層版 : Silica gel 60 (Merck社製)

展開溶媒 : クロロホルム : アセトン : 酢酸混液 (7 : 2 : 1)

スポット量 : 10  $\mu$ l

発色剤 : リンモリブデン酸1gをエタノール(99.5)5mlに溶解させた。

操作方法 : 試料溶液 (2.2.1及び2.2.2で得られた溶液) 5mlを減圧乾固して, メタノール0.5mlに溶解したものを薄層板上にスポットし, 展開溶媒で展開させた。展開後の薄層板を風乾, 120℃の恒温乾燥機中で30分間乾燥後, 直ちに発色剤を噴霧し, 更に120℃で2~3分間加熱して発色させた。胆汁酸標準溶液（標準試薬4種類各10mgをメタノール10mlに溶かし, 更にメタノールで10倍に希釈する）についても同様の操作を行い, 試料溶液のRf値と比

較し, 確認を行った。

### 2. 2. 4 HPLC法

装置 : HP1100 (Agilent社製)

カラム : L-column™ ODS (4.6mmI.D.×250mm) (化学物質評価研究機構製)

カラム温度 : 40℃付近の一定温度

検出器 : 蛍光検出器 (FLD) 励起波長259nm, 測定波長394nm

流速 : 1.0ml/min

移動相 : 0.1%りん酸 : アセトニトリル混液 (35:65)

注入量 : 20  $\mu$ l

操作法 : 試料溶液 (2.2.1及び2.2.2で得られた溶液) 3mlを20mlのナスフラスコに正確に量り採り, 減圧乾固した。これに内標準溶液（ピレン10mgをアセトニトリル100mlに溶かし, 更にアセトニトリルで20倍に希釈する）2mlを正確に加え, 次いで18-クラウン-6を20mg及び無水フッ化カリウム30mgを加えて混和し, 蛍光ラベル化剤 (NE-OTf 30mgをアセトニトリル10mlに溶かして調製した溶液) 1mlを正確に加えた。混和後, 超音波水槽中で20分間超音波を加えながら反応させ, 0.45  $\mu$ mの非水系フィルターでろ過し, ろ液を検液とした。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 TLC法

UDCは, Rf値が約0.64付近に青色のスポットが認められた。UDC配合製剤では, 加水分解の前後で共にUDCの存在が確認できるスポットを検出した。一方, 熊胆及び熊胆配合製剤では加水分解後のみUDCのスポットを検出した(Fig.2)。

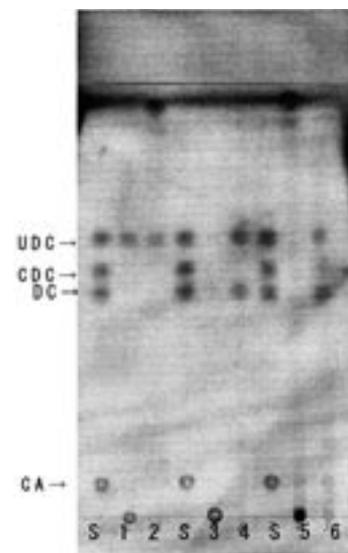


Fig.2 Thin layer chromatogram of bile acids:

S: Standard bile acids; 1: Extracted bile acids (extract) of sample a; 2: Hydrolyzed extract of sample a; 3: Extract of sample b; 4: Hydrolyzed extract of sample b; 5: Extract of sample c; 6: Hydrolyzed extract of sample c.

3. 2 HPLC法

胆汁酸類は特異なUV吸収を持たず、また蛍光も発しないため、蛍光ラベル化剤を用いて蛍光化合物へと誘導体化した後、HPLC法により分離し検出した。今回用いた蛍光ラベル化試薬であるNE-OTfは、胆汁酸のカルボキシル基に特異的に反応して、蛍光体へと誘導する。しかし、カルボキシル基がタウリンで封鎖された抱合型胆汁酸の状態ではこの反応が起こらないため、加水分解し、遊離型胆汁酸とした後、反応させる必要がある(Fig.3)。従って加水分解の前後で胆汁酸量をそれぞれ定量し比較すれば抱合型であるかどうかを確認可能である。

3. 2. 1 標準胆汁酸類の定量分析

(1) 内標準物質の検討

NE-OTfによる蛍光ラベル化操作中での溶媒の減失が無視できないことを考慮し、正確な定量を行うため、内標準法を検討

した。蛍光検出器を用いることから内標準物質としてベンゼン環を有する化合物を検討した。ビフェニルは、目的物質とピークが重なり適当ではなく、ジメチルナフタレンも蛍光強度がやや弱かった。これに対してピレンは、目的物質との分離や蛍光強度が十分であったため内標準物質として選択した。

(2) 検量線の作成

UDCを含む4種の標準胆汁酸の検量線(Fig.4)は、それぞれ1~10 μg/mlの濃度範囲ではほぼ原点を通る直線性を示し、相関係数はいずれも0.999以上であった(Table 1)。UDCの検出限界及び定量限界は、本方法での検出限界に近い濃度領域での繰り返し標準偏差と、同濃度での回帰直線の傾きから求めた。その結果、UDCの検出限界及び定量限界は、それぞれ0.3pg/μl及び1.1pg/μlであった。実際に0.3pg/μlに調製した溶液の測定でUDCが検出されたことから、この値が妥当であることが確認された。

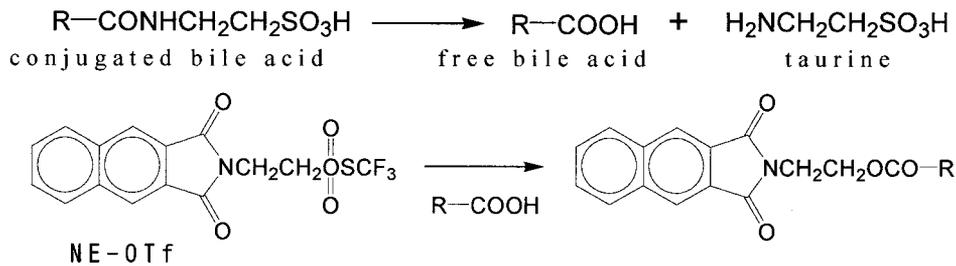


Fig.3 Fluorescent labeling reagent combines with carboxylic group

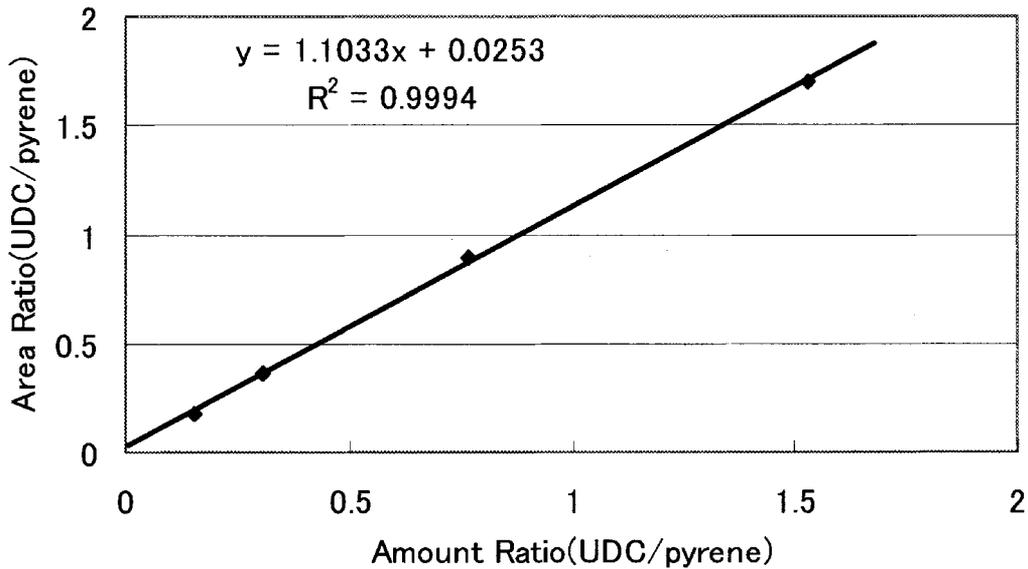


Fig.4 Calibration curve for standard UDC

Table1 Correlation coefficient of standard bile acid

standard bile acid	formula	R <sup>2</sup>
CA	y = 0.9862x + 0.0156	0.9996
UDC	y = 1.0033x + 0.0253	0.9994
CDC	y = 1.1486x + 0.0053	0.9999
DC	y = 1.1684x + 0.0036	0.9999

3. 2. 2 製剤中の熊胆由来胆汁酸類の確認

試料(3種)から胆汁酸類を直接メタノールで抽出したもの及び抽出後にアルカリ加水分解したものをそれぞれ蛍光ラベル化し、HPLC法により定量した。

(1) UDC配合製剤

UDC配合製剤のクロマトグラム及び分析結果をFig.5及び

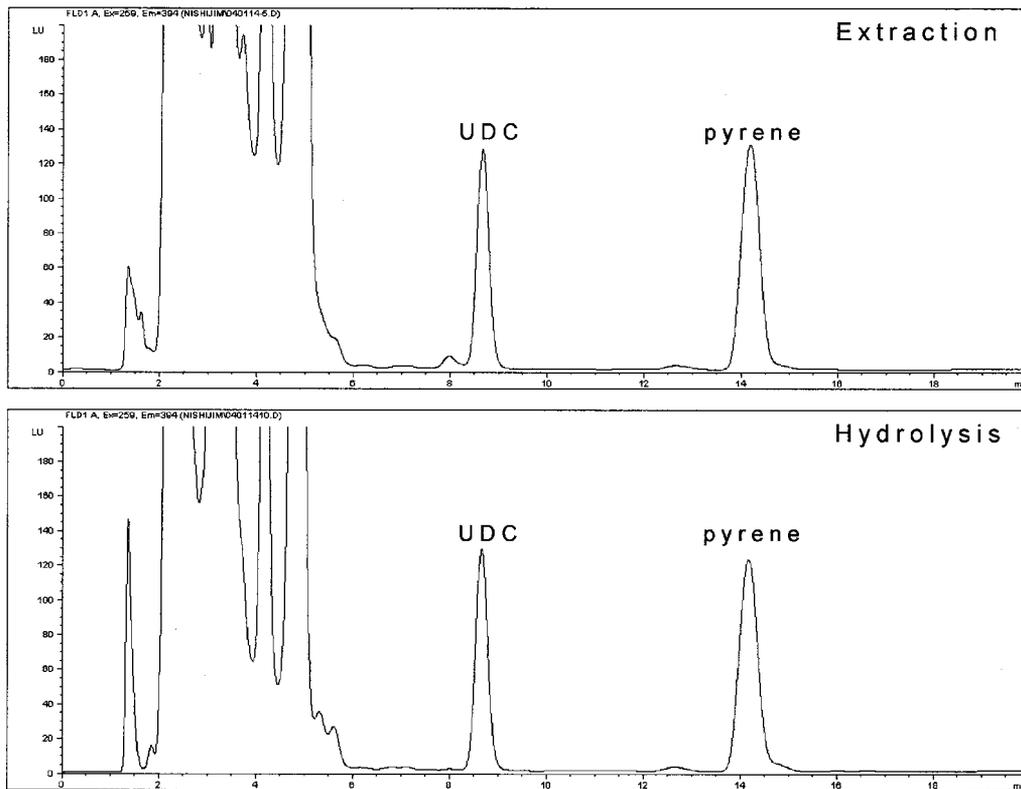


Fig.5 HPLC chromatograms for sample a

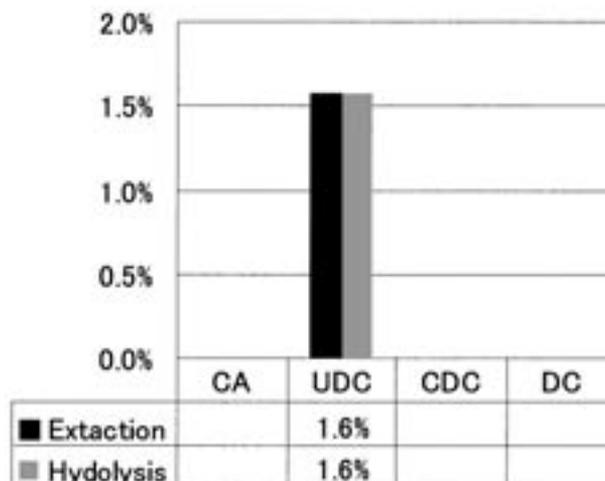


Fig.6 Concentration of bile acids in the extract and hydrolyzed extract of sample a

Fig.6に示す。加水分解の前後でUDCの量に変化は認められず、製剤中のUDCはすべて遊離型胆汁酸であることが確認された。

## (2) 熊胆

熊胆のクロマトグラム及び分析結果をFig.7及びFig.8に示す。加水分解前に比べて加水分解後ではUDCが増加しており、熊胆中のUDCが遊離型胆汁酸ではなく、ほぼ抱合型胆汁酸として存在していることが確認された。熊胆にはUDC以外にCDC、CAが存在する。それらほとんどすべてが抱合型胆汁酸として存在

する。この熊胆にはUDCが12.3%という割合で含まれていた。

## (3) 熊胆配合製剤

熊胆配合製剤のクロマトグラム及び分析結果をFig.9及びFig.10に示す。この熊胆配合製剤においてもUDCがほぼ抱合型胆汁酸として存在していることが確認された。しかし、配合された生薬類由来と推定されるピークも検出されることから、生薬類によってはUDCのピークと重なり定量を妨害する成分が存在する可能性もあるため、他の熊胆配合製剤に本法を適用でき

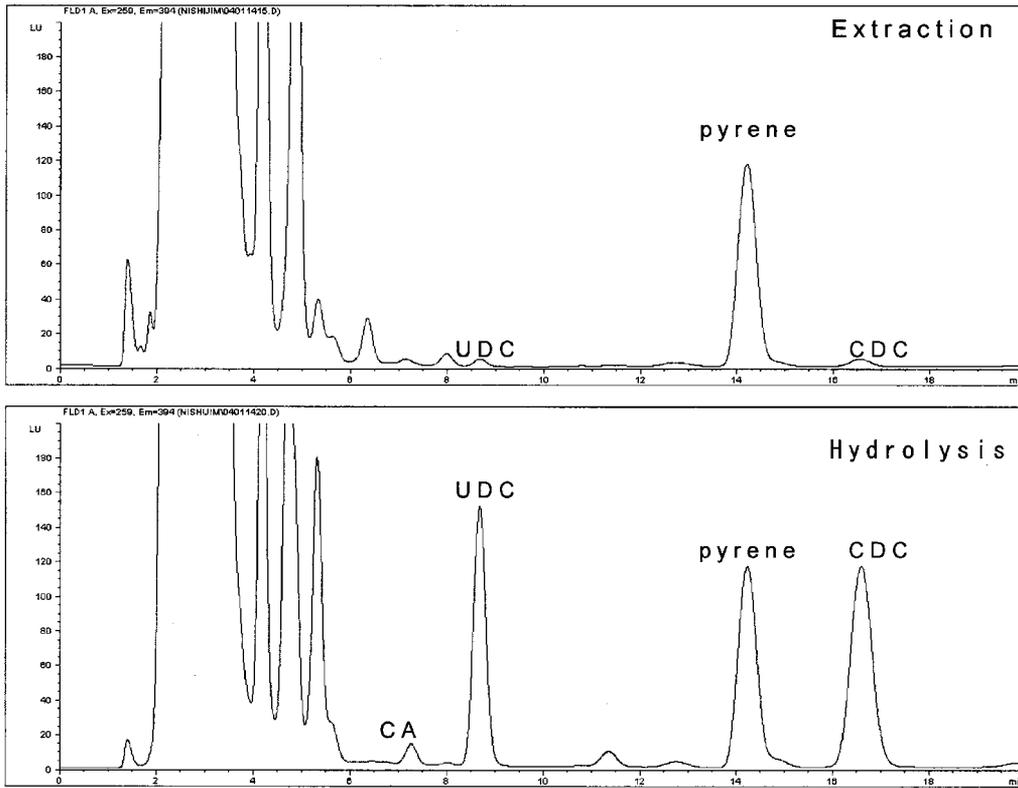


Fig.7 HPLC chromatograms for sample b

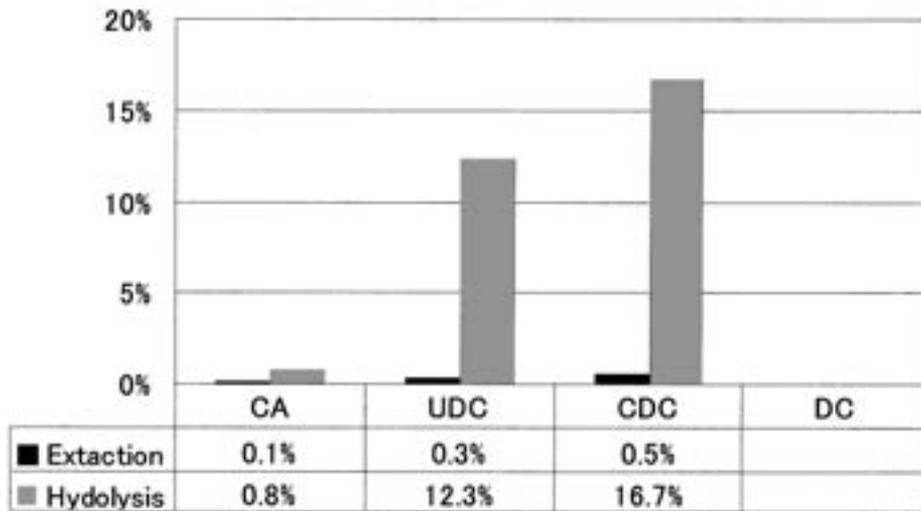


Fig.8 Concentration of bile acids in the extract and hydrolyzed extract of sample b

るかどうかは、今後更に検討を要すると思われた。なお、この熊胆配合製剤では熊胆の他に牛黄が配合されており、牛黄由来のDCが検出された。また牛黄に含まれるとされているCA、CDC及びDCに遊離のものが確認され、これは牛黄の胆汁酸が一部加水分解していたためと推測される。UDCについては熊胆と同様に大部分が抱合型として存在しており、今回試料として用いた熊胆配合製剤では、熊胆の配合を確認することが可能で

あり、UDC（遊離型）のみを配合した製剤と区別することができた。

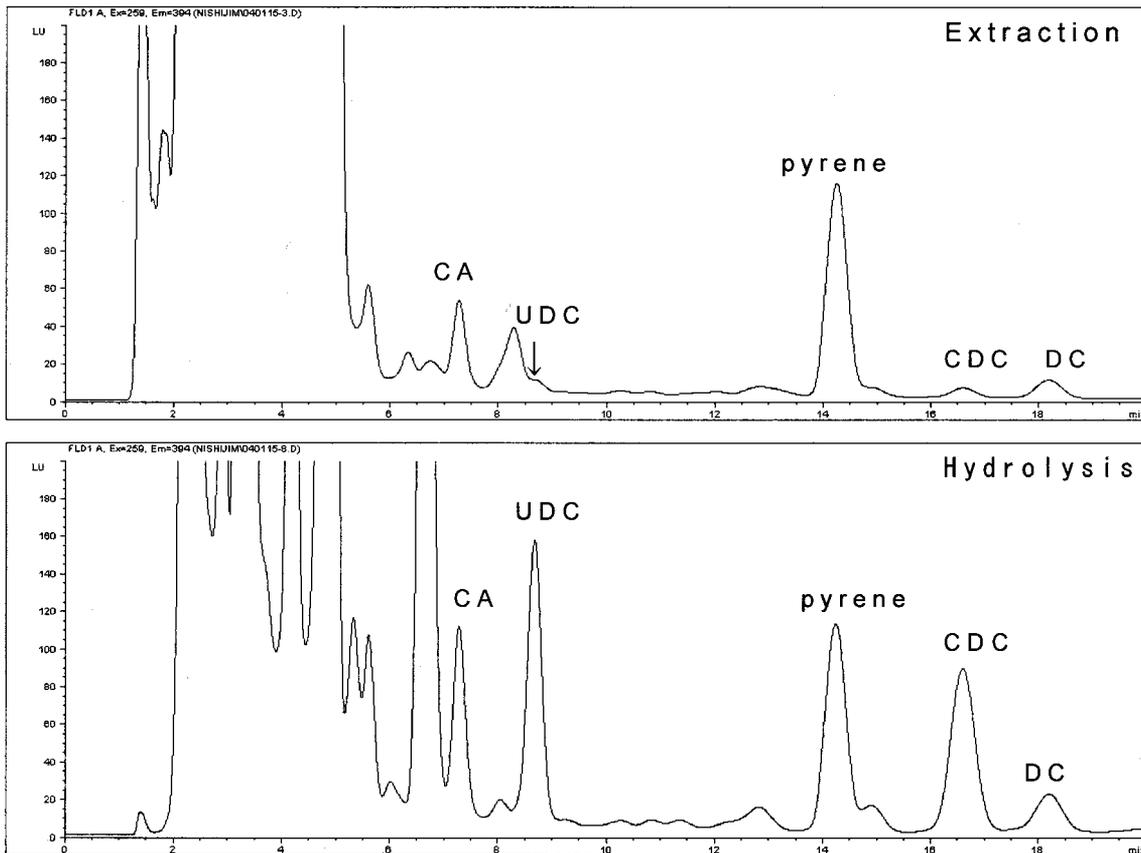


Fig.9 HPLC chromatograms for sample c

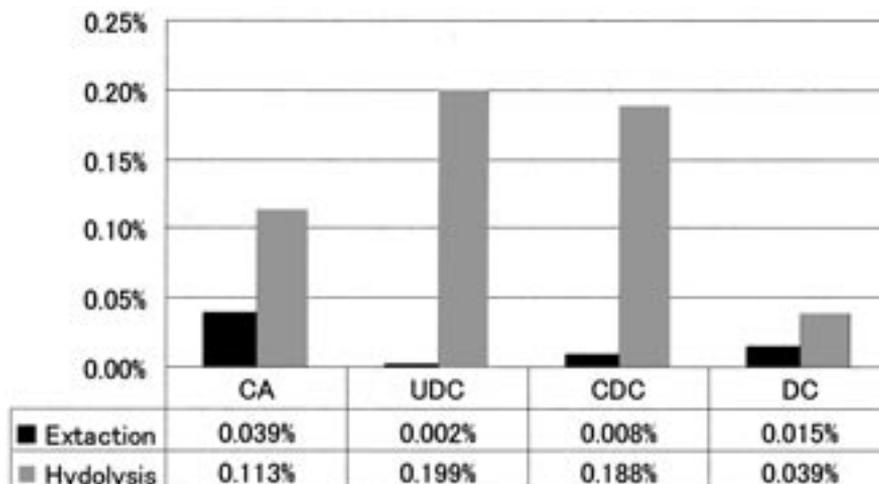


Fig.10 Concentration of bile acids in the extract and hydrolyzed extract of sample c

#### 4. 要 約

医薬品製剤中に配合された微量の熊胆を検出するために、蛍光検出器を用いたHPLC法による胆汁酸の定量法を検討した。その検出限界は、UDCとして $0.3\text{pg}/\mu\text{l}$ であった。熊胆配合製剤

においては加水分解前後のUDCの正確な定量から微量な熊胆でも確認することが可能であった。ただし、製剤に配合される生薬類によっては目的のピークが妨害を受ける場合もあり、今後更に検討が必要である。

## 文 献

- 1) 第十四改正日本薬局方解説書，第一部医薬品各条，C-238 (1996).
- 2) 宇部昭：生薬，**95**，22 (1975).
- 3) 横田洋一，石田美鈴，有沢みさを，村上守一，江尻千鶴子，斎藤晴夫：富山県薬事研究所年報，**16**，103 (1989).
- 4) 池田憲廣，大住優子，山本雅世，城尚信，井上雅成，中澤裕之：奈良県薬事指導所報告，**11**，33 (1994).