

【原 著】

市販センソの品質評価 — ブフォステロイドの分析について —

Evaluation of Commercial Toad-cake — On the analysis of bufosteroids —

横 田 洋 一^a 江 尻 千 鶴 子^a
Youichi YOKOTA Chizuko EZIRI
斉 藤 晴 夫^a 鈴 木 英 世^b
Haruo SAITO Hideyo SUZUKI

富山県薬事研究所^a

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical research^a

国立衛生試験所^b

National Institute of Hygienic Sciences^b

センソはシナヒキガエル等の毒腺の分泌物を乾燥したもので中国で生産され、六神丸等の家庭薬に配合される重要な動物性生薬である。主な成分は強心作用をはじめ多くの薬理作用を持つブフォステロイドで、薄層クロマトグラフ法¹⁾、ガスクロマトグラフ法²⁾、高速液体クロマトグラフ法³⁾等で分析されてきた。日本薬局方ではクロロホルムエキス含量を成分含量として18%以上と規定しているが、この方法はばらつきもあり品質評価法として満足のいくものではない⁴⁾。最近センソ中の主要ブフォステロイドであるブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンが市販され入手が容易となったので、これらの高速液体クロマトグラフ法による定量法を確立し、富山県薬事研究会分析部会(ブフォステロイド分科会)の協力を得て、市販センソの品質評価を行った。

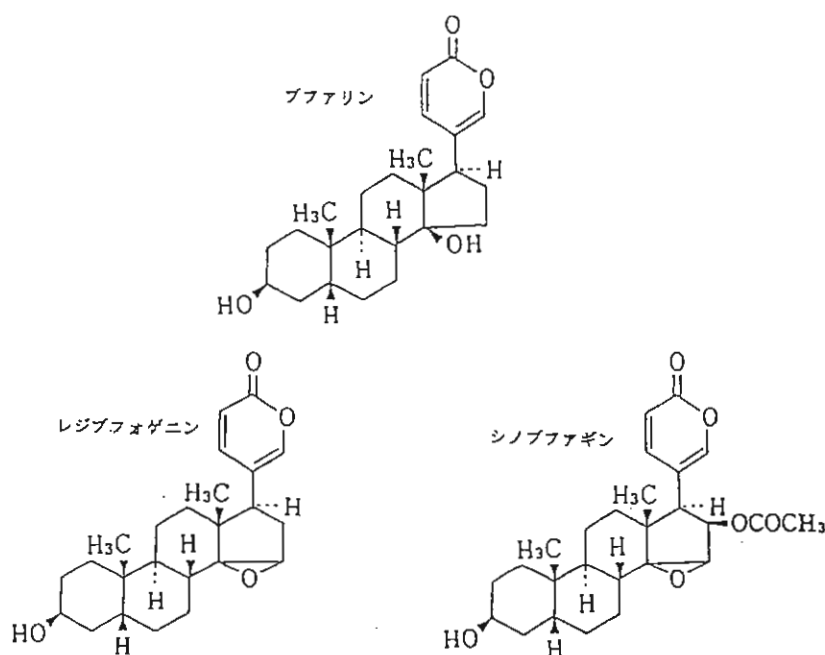


図1 センソ成分の化学

実験の部

試料のセンソは富山県で市販されたものの他、薬事研究所所有品及び供与品を用いた。

定量用標準品のブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンはいずれも和光純薬の生薬試験用標準品を用いた。

定量法：センソを粉末とし、 $300\ \mu\text{m}$ のふるいを通ったものをデシケータ（シリカゲル）で24時間乾燥し、恒量に達した事を確認し、その約 $0.5\ \text{g}$ を精密に量り、メタノール $50\ \text{ml}$ を加え、環流冷却器を付けて水浴上で1時間加熱し、冷後ろ過した。残留物は更にメタノール $30\ \text{ml}$ で洗い、洗液及びろ液を合わせ、これにメタノールを加えて正確に $100\ \text{ml}$ とした。この溶液 $10\ \text{ml}$ を正確に量り、内標準液 $5\ \text{ml}$ を正確に加えた後、メタノールを加えて正確に $25\ \text{ml}$ とし、試料溶液とした。別に、定量用ブファリン、定量用シノブファギン及び定量用レジブフォゲニンをデシケータ（シリカゲル）で恒量になるまで約24時間乾燥し、それぞれ約 $0.01\ \text{g}$ 、約 $0.02\ \text{g}$ 及び約 $0.02\ \text{g}$ を精密に量り、メタノールに溶解して正確に $100\ \text{ml}$ とした。この溶液 $10\ \text{ml}$ を正確に量り、以下試料溶液と同様に操作し、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液 $10\ \mu\text{l}$ につき、下記の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行った。それぞれの溶液の内標準物質のピーク面積に対するブファリンのピーク面積の比 Q_{TB} 及び Q_{SB} 、シノブファギンのピーク面積の比 Q_{TC} 及び Q_{SC} 並びにレジブフォゲニンのピーク面積の比 Q_{TR} 及び Q_{SR} を求め、次式によりブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンの量を計算し、それらの合計をブフォステロイドの量とした。

ブファリン ($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$) の量 (mg)

$$= \text{定量用ブファリンの量 (mg)} \times Q_{\text{TB}}/Q_{\text{SB}}$$

シノブファギン ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$) の量 (mg)

$$= \text{定量用シノブファギン量 (mg)} \times Q_{\text{TC}}/Q_{\text{SC}}$$

レジブフォゲニン ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4$) の量 (mg)

$$= \text{定量用レジブフォゲニン量 (mg)} \times Q_{\text{TR}}/Q_{\text{SR}}$$

なお内標準溶液はインドメタシンのメタノール溶液（1→4000）を用い、測定操作は下記の条件に従って行った。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長： $300\ \text{nm}$ ）

カラム：内径 $4\sim 6\ \text{mm}$ 、長さ $15\sim 30\ \text{cm}$ のステンレス管に $5\sim 10\ \mu\text{m}$ の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てん。

カラム温度： 40° 付近の一定温度

移動相：薄めたリン酸（1→1000）・アセトニトリル混液（11：9）

流量：内標準物質の保持時間が $16\sim 19$ 分になるように調整。

カラムの選定：標準溶液 $10\ \mu\text{l}$ につき、上記の条件で操作するとき、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン、インドメタシンの順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離するカラムを用いた。

HPLC条件

検出波長はブフォステロイドの α -ピロン環に由来する300nmを用いた。内標準物質には、この波長に吸収を持つインドメタシンを採用し、移動相は酸性物質であるインドメタシンを保持させるためリン酸で酸性とした⁵⁾。紫外部の吸光度特性曲線を図2に示す。

ブファリン (以下B), シノブファギン (以下C), レジブフォゲニン (以下R) 及び内標準物質 (インドメタシン) の分離条件については, TSKgel ODS 80T_M (東ソー), Shim-pack CLC ODS (島津) のようなエンドキャップされたカラムと Wakosil 5 C18N (和光純薬), ODS AL-302 (ワイエムシィ), LiChrosorb RP-18 (Cica-MERCK) 等のエンドキャップされていないカラムを移動相の比率を変えて比較した。その結果エンドキャップされているカラムより, されていないカラムのほうがCとRの分離が優れていることを見いだした。しかしCとRの分離には移動相の比率はほとんど影響しなかった。測定結果を図3に示す。そこで, Bより早く溶出する成分との分離も考慮し, 内径4.6mm, 長さ15cmのカラムを標準として, 希釈したリン酸とアセトニトリルの比率を11:9とした。図4に代表的なクロマトグラムを示す。

検量線

ブファリンは0.01~0.12mg/ml, シノブファギンは0.04~0.23mg/ml, レジブフォゲニンは0.02~0.25mg/mlの範囲でいずれも原点を通り, 良好な直線性を示した (図5)。

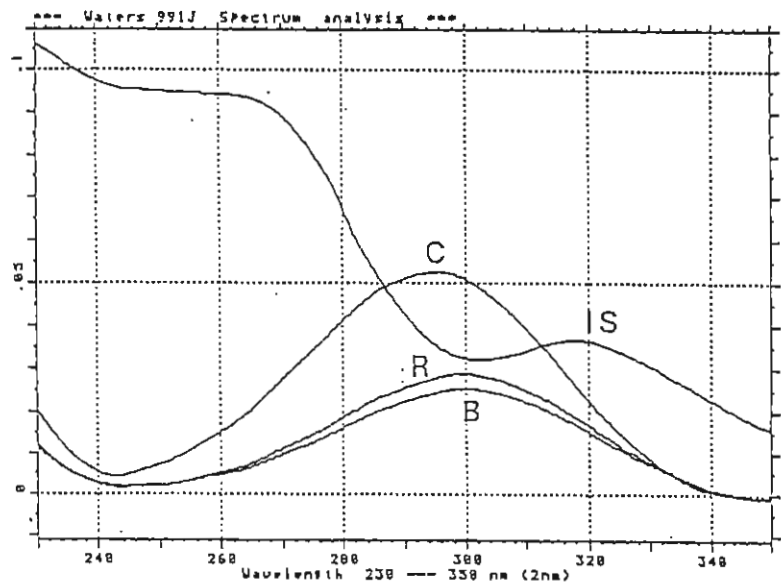
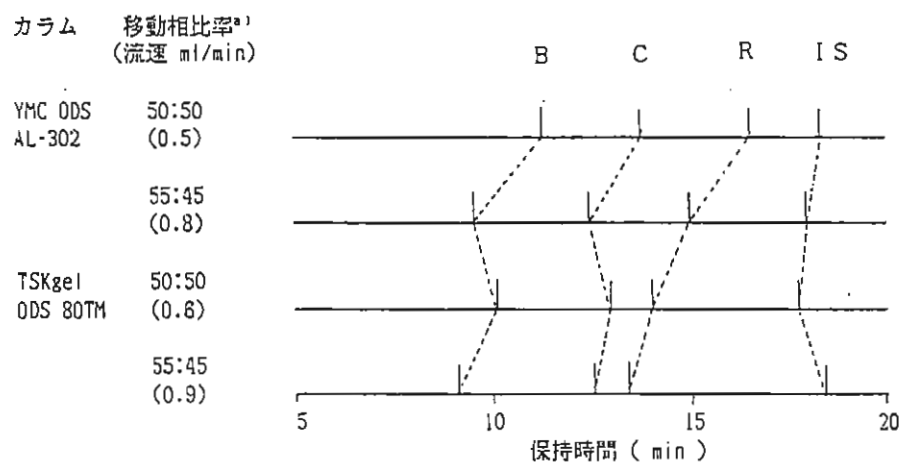


図2 センソ成分の吸光度特性曲線

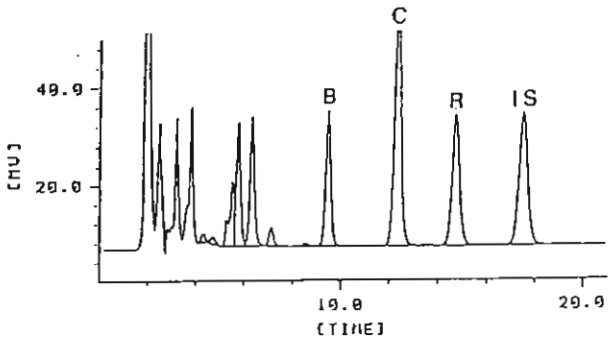
B: ブファリン C: シノブファギン R: レジブフォゲニン
IS: インドメタシン



a) 薄めたリン酸 (1→1000) : アセトニトリル

図3 カラム及び移動相と保持時間の関係

a) YMC AL-302 (end cappingなし)



b) TSK ODS-80T_H (end cappingあり)

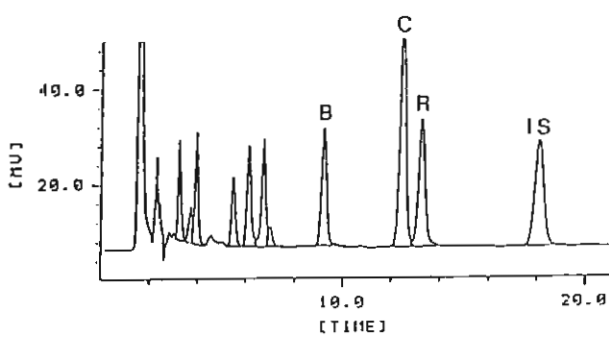


図4 センソのクロマトグラム

B: プファリン C: シノブファギン R: レジブフォゲニン
IS: インドメタシン

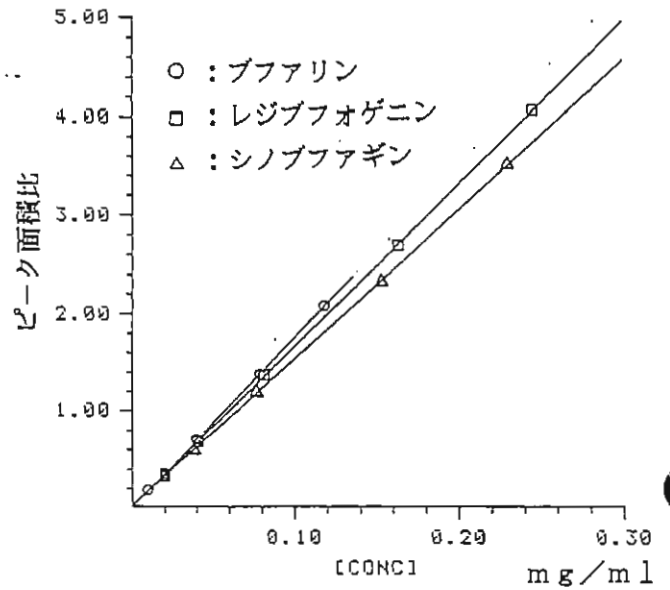


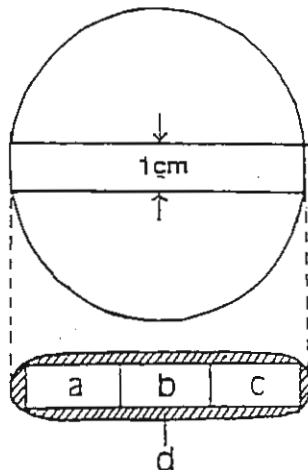
図5 センソ含有成分の検量線

抽出条件 センソを定量法に準じ、30分から2時間還流抽出したが、30分ではほぼ抽出され以後増加が見られなかったため、抽出時間は1時間とした。

結果及び考察

I. 採取部位

センソはシナヒキガエル等から採取後加工されたものであるから、試料を採取する部位により、ブフォステロイド含量が異なる可能性が考えられる。そこで、入手先の異なる2個の円盤状センソ



採取部位	センソ A	センソ B
a	1 2. 0 1	2. 6 1
b	1 1. 5 4	2. 6 0
c	1 1. 3 4	2. 6 2
d	1 1. 9 0	2. 7 8
平均	1 1. 7 5	2. 6 5
標準偏差	0. 3 0	0. 0 9

表1 各部位のブフォステロイド含量(%)

標品 (A, B) について表1の左に示す部位に分割し含量を測定したところ、それぞれ相対標準偏差が2.6%及び3.4%と各部位にばらつきはほとんど認められず、ブフォステロイドはセンソ中に均等に含有されていることが判明した。

II. 定量法の精度

同一のセンソ粉末について、ブフォステロイド分科会参加の各社で本法を用いて定量を行ったところ、各施設間にばらつきも少なく、本法は精度の良い方法であることが判明した。結果を表2に示す。

測定施設	ブアラリン(B)	シグマフィン(C)	レゾプロフェノン(R)	B+C+R
A	1.9	4.9	2.7	9.5
B	1.8	5.3	2.7	9.8
C	1.8	4.6	2.6	9.0
D	1.9	4.8	2.7	9.4
E	1.9	4.8	2.7	9.4
F	1.9	5.0	2.8	9.7
G	1.8	4.4	2.9	9.1
H	2.0	4.6	2.7	9.3
I	1.8	4.8	2.8	9.4
平均	1.9	4.8	2.7	9.4
標準偏差	0.071	0.260	0.087	0.240
C.V.(%)	3.7	5.4	3.2	2.6

表2 ブフォステロイド含量(%)の施設間の測定誤差

III. センソのブフォステロイド含量

最近のセンソ4ロットの供与品について、ブフォステロイド含量を求めたところ同一ロット内でも4%以下のものが混在するなど大きなばらつきを認めた(図6)。そこで最近富山県で販売されたセンソ中のブフォステロイド含量を求め、昭和56年以前に購入したセンソと比較したところ、従

来のセンソ(O:薬事研究所所有品)は10%前後と文献等に報告されている値と一致したが、最近の市販品(A~J:入手先)はかなりのばらつきが認められた(図7)。そこで従来のセンソも含め含量の分布を調べたところ、大部分が7~13%に納まることが判明したが、それ以下のものもかなり見られた(図8)。次にこれら3成分の組成比を調べたところ、Bについてはほぼ20%と安定していたが、CとRについては一定ではなかった。また、B、C及びRの含量の分布を調べたところB及びCについてはそれぞれ1.5~2.0%及び4~5%を中心に正規分布に似た分布を示したが、Rは含量の低いものほ

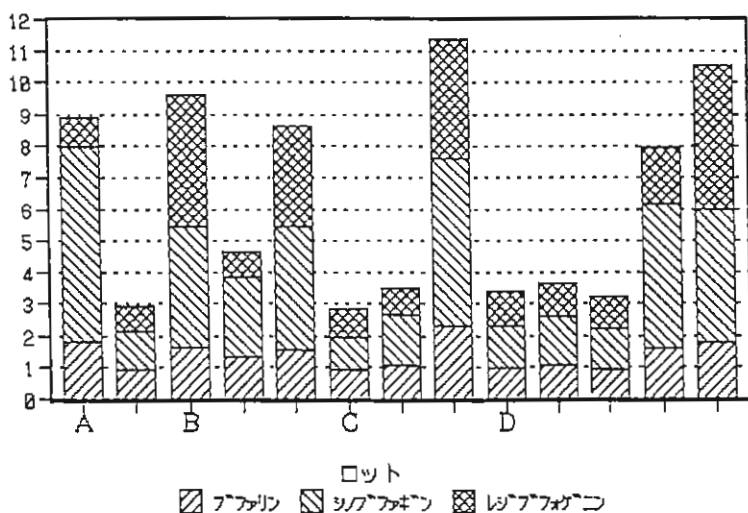


図6 センソ中のブフォステロイド含量

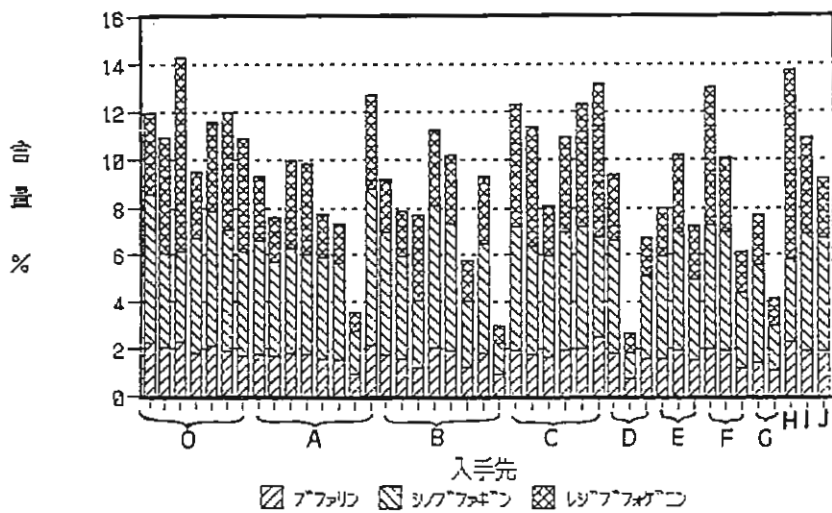


図7 富山県市販センソのプフォステロイド含量

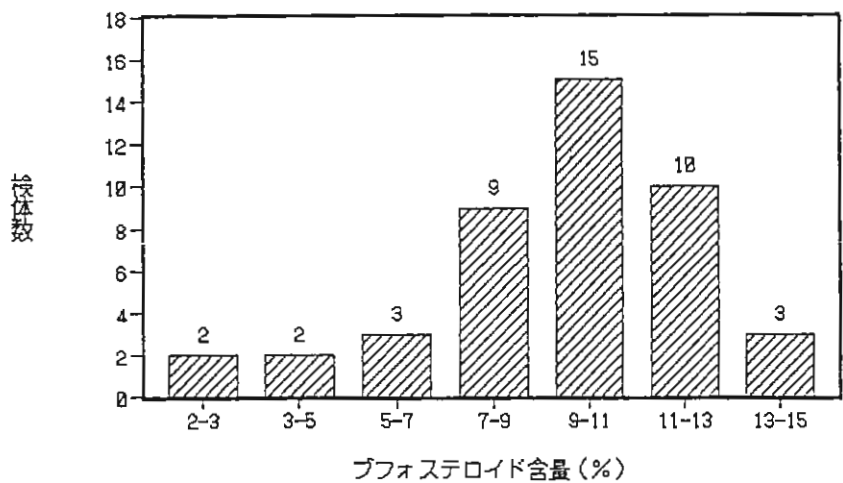


図8 市販センソのプフォステロイド含量の度数分布

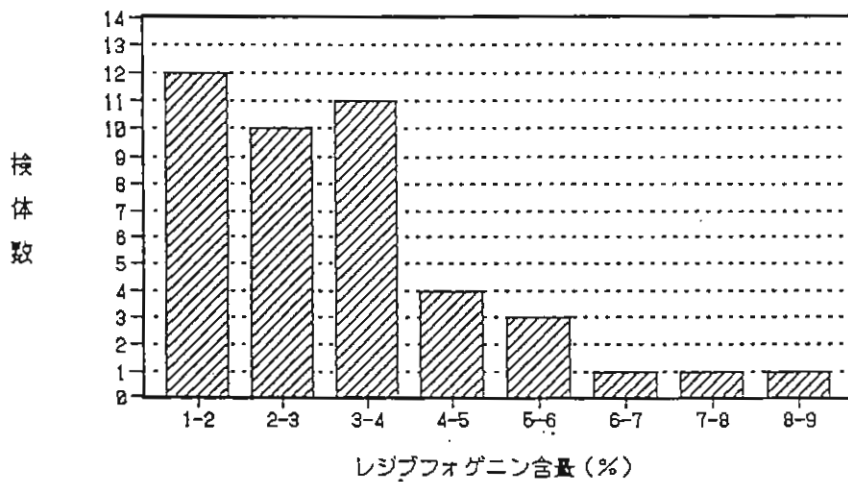


図9 富山県市販センソのレジプロゲニン含量頻度

ど多いという分布を示した(図9)。これはRが若干不安定であり、経時的に減少することによるのか、もともとこのような分布をしているのか不明であるが、センソの品質を調べる上で興味深いと思われる。

ま と め

センソ中の主要ブホステロイドであるブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンの高速液体クロマトグラフ法による簡易な定量法を確立し、最近の市販センソのブホステロイド含量を調査した。その結果これら3成分の和は10%前後で一定であるという従来の報告と異なり、大きなばらつきがあり、4%以下という低含量のセンソも見られた。このばらつきが、採取地域、採取時期あるいは製法等に起因するものと考えられるが、現在ではその詳細は不明であり、今後の検討課題である。また低含量のセンソについては他のブホステロイドやブホステロイド以外の成分の比較や薬理学的等の検討も必要と思われる。

謝 辞

この研究に協力いただいた富山県薬事研究会分析部会(ブホステロイド分科会)、試料を供与された養命製薬株式会社に深謝します。

引用文献

- 1) 小松曼蒼, 岡野定輔: 薄層クロマトグラムの濃度分析によるブホステロイドの定量, 分析化学, 15, 1115 (1966)
- 2) 久保喜一, 高桑徳太郎, 半田和敬, 塩刈 修, 吉田外美子: センソおよびセンソ製剤六神丸中に含まれるブホステロイド類の定量法, 厚生科学研究報告, p 375 (1974)
高木修造, 伊藤幸江: センソステロイド成分のガスクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーによる定量, 薬誌, 99, 322 (1979)
- 3) 横田洋一: HPLC法による六神丸のブホステロイドの定量法について, 富山県薬事研究所報 (1983, 1984), p 41
- 4) 村上守一, 杉本義則: センソの品質評価研究, 富山県薬事研究所報 (1975, 1976), p 84
- 5) 江島 昭, 立沢政義, 松田りえ子: クロマトグラフ法による製剤の試験法(第2報) インドメタシン製剤の分析, 医薬品研究, 15, 93 (1984)

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討 (第三報)

— ブフォステロイドについて —

Studies on Standardization of Crude Drug Components (III)

— bufosteroids —

富山県薬事研究会分析部会 (ブフォステロイド分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

秋 元 駿 一 Syunichi AKIMOTO	大同製薬(株) Daido Pharmaceutical Co.,LTD
浅 水 敬 子 Keiko ASAMIZU	明生薬品工業(株) Meisei Pharmaceutical Co.,LTD
新 木 康 子 Yasuko ARAKI	朝日製薬(株) Asahi Pharmaceutical Co.,LTD
今 村 暢 子 Nobuko IMAMURA	共栄製薬(株) Kyoei Pharmaceutical Co.,LTD
小八木 泰 弘 Yasuhiro KOYAGI	大東交易(株) Daito Koeki Co.,LTD
島 谷 隆 夫 Takao SHIMATANI	救急薬品工業(株) Kyukyu Pharmaceutical Co.,LTD
○ 正 川 仁 Hisashi SHOGAWA	共栄製薬(株) Kyoei Pharmaceutical Co.,LTD
長 島 美由紀 Miyuki NAGASHIMA	第一薬品(株) Daiichi Medicine Co., LTD
藤 田 博 子 Hiroko FUJITA	(株)内外薬品商会 Naigai Medicine Co., LTD
宮 村 芳 昌 Yoshinasa MIYAMURA	中央薬品(株) Chuo Medicine Co., LTD
横 田 洋 一 Youichi YOKOTA	薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

(○論文執筆者)

近年分析技術特に高速液体クロマトグラフ(HPLC)法がめざましく発達し、生薬中の有効成分並びに指標成分の定量には欠かせないものとなっている。しかし、その基準となるべき生薬試験用標準品の規格及び試験方法については統一的なものは少なく、各社の責任で行われているのが現状である。

薬事研究会分析部会ではこの現状を踏まえ、これまでにグリチルリチン酸¹⁾及び塩化ベルベリン²⁾標準品の規格設定を行ってきた。この一環として、今回はセンソの指標成分であるブフォステロイド標準品の規格設定を目的として共同研究を行ったので以下報告する。また、2次標準品の製法についても若干の知見を得たので併せて報告する。

実験の部

今回ブフォステロイド標準品の対象としたのは、セソンの含量も多く、最近各メーカーより市販もされ入手の容易なブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンとし、これら3成分を5種類(W社、T社、Y社、M社、K社の生薬試験用標準品)購入し実験を行った。規格及び試験方法の検討項目は性状、比吸光度、純度試験及び定量法とした。以下に試験方法を示す。

1. 試験方法

1) 比吸光度

測定波長はメタノール溶液の極大吸収、すなわちブファリン、レジブフォゲニンは300nm、シノブファギンは295 nmとし、吸光度が0.5付近になるよう濃度を調製した。

2) 純度試験(TLC法)

TLCの操作条件は文献³⁾を参考にし、ブフォステロイド3成分が完全に分離する展開溶媒を用い、標準溶液のスポットが確認できる濃度調製を行った。

薄層板：Kieselgel 60 precoated plate (メルク社製、厚さ0.25mm)

展開溶媒：シクロヘキサン・クロロホルム・アセトン混液(4 : 3 : 3)

展開距離：約14cm

試料溶液：8 mg/ml (クロロホルム)

標準溶液：試料溶液1 mlを正確にとり、クロロホルムを加えて正確に100mlとする。

スポット量：5 μ l

検出方法：硫酸噴霧後、100° で2～3分間加熱

判定：試料溶液から得た主スポット以外のスポットは、標準溶液から得たスポットより小さく、かつ濃くない。

3) 定量法(HPLC法)

定量方法に、HPLCによる面積百分率法を採用した。カラムはODS系のものを用い、測定波長は比吸光度と同様の波長とした。以下にブファリン標準品の設定したHPLC法の操作条件を示すが、他のブフォステロイド標準品もこれを準用した。

乾燥条件：デシケーター(シリカゲル)で24時間乾燥する。

試料溶液：1 mg/ml (メタノール)

検出器：紫外吸光光度計(測定波長300 nm)

カラム：内径4～6 mm、長さ10～30cmのステンレス管にオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度：40° 付近の一定温度

移動相：水・アセトニトリル混液(1 : 1)

流量：ブファリンの保持時間が約6分になるように調整する。

カラムの選定：ブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニン0.01 gずつを量って合わせ、メタノールに溶かし200mlとする。この液20 μ lにつき上記条件で操作するとき、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンの順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

検出感度：試料溶液1 mlを正確にとり、メタノールを加えて正確に100mlとし、感度標準溶液とする。この液20 μ lにつき、上記条件で操作するとき、ブファリンのピーク高さが記録計の

フルスケールの約10%になるように調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後からブファリンの保持時間の約2倍の範囲

自動積分装置の Analytical Parameter：感度標準溶液 5 ml を正確に量り、メタノールを加えて正確に 100 ml とする。この液 20 μ l から得たブファリンのピーク面積をカウントするように設定する。

2. プフォステロイドのメタノール溶液の安定性

市販プフォステロイド標準品 (K社製) を約 1 mg/ml のメタノール溶液とし、冷暗所で 1 カ月保存した。調製 2 日後、8 日後及び 1 カ月後に 1. 試験方法の定量法に従い、試験を行った。

3. プフォステロイドの分取方法

本標準品はそれぞれ 10 mg が 1 万円代と高価なため、日局センソを出発原料とし、2 次標準品を量多く得るため、次のような操作を行った。

1) 乾式カラムによる前処理

予試験的に乾式シリカゲルカラムによる分取⁴⁾を Chart. 1 に従って行った。しかし、この方法では量的に少なく、時間もかかることから乾式シリカゲルカラム 1 回を前処理とし、今必要とする 3 成分を多く含む Fr. 1 を HPLC で分取することにした。

2) HPLC 分取条件

Fr. 1 を減圧濃縮後、メタノールに溶解し 100 mg/ml の濃度に調製した。この液で以下の分取条件により最大負荷量の検討を行い、Fig. 1 に示したようにそれぞれの純度を損なわない範囲として、注入量 0.5 ml が適当であると判断し、プフォステロイド 3 成分の単離を行った。

(分取条件)

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：300 nm)

カラム：Wakosil 5C18N (ϕ 10 mm \times 250 mm)

移動相：水・アセトニトリル混液 (1 : 1)

流量：5.0 ml/min

カラム温度：40° 付近の一定温度

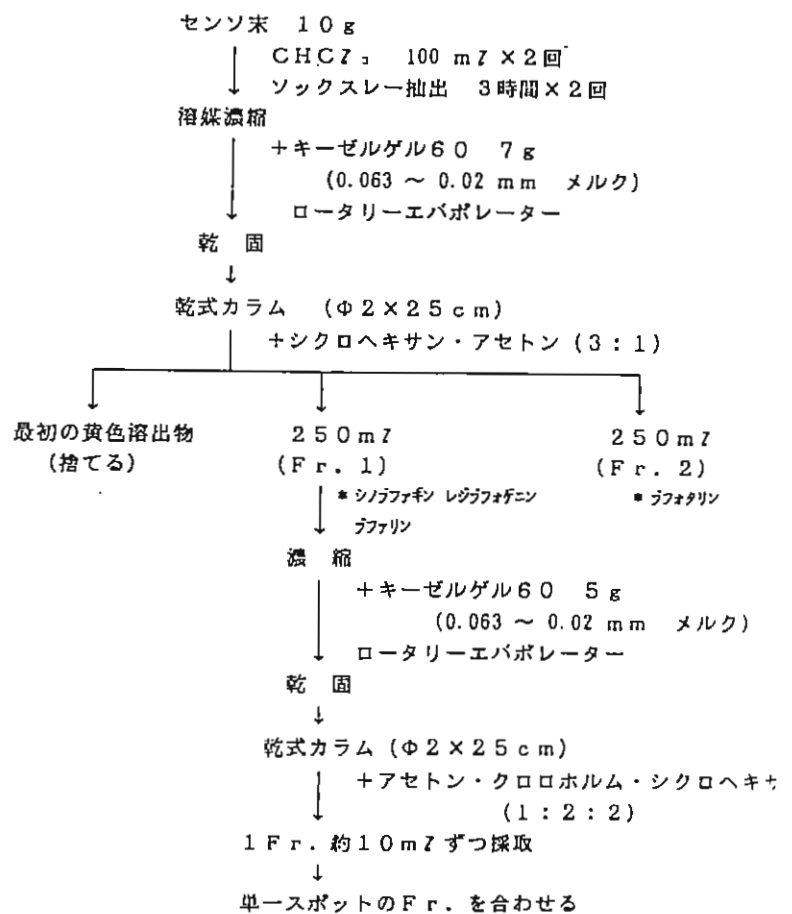


Chart. 1 乾式シリカゲルカラムによるプフォステロイド分取法

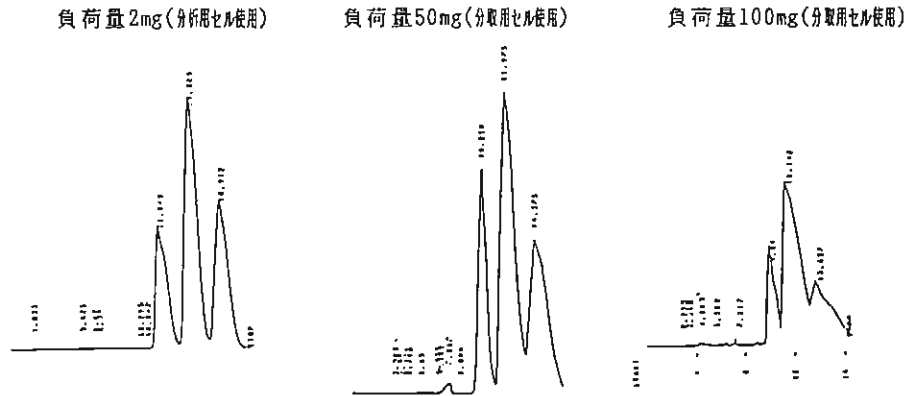


Fig. 1 分取HPLCの最大負荷量検討チャート

3) 後処理

得られた3種類のフラクションの溶液をそれぞれ分液ロートに入れ、クロロホルム50mlを加えて振り混ぜたのち、クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧濃縮した。ブファリンはこれで粉末化したが、他はオイル状となったため残留物をアセトンに溶解し、これにシクロヘキサンを5倍量加えて減圧濃縮するだけで容易に粉末化した。

なお再結晶は行わなかった。

結果及び考察

1. 市販標準品の試験結果

比吸光度は、同一の溶液を異なる施設3カ所で測定し、合計15の実測値が得られた。(Table. I) この実測値と日局の比吸光度の規格幅を参考にし、比吸光度の規格幅を平均値±標準偏差×2とした。

純度試験は、ブファリン、シノブファギンが全て適合していたが、レジブフォゲニンだけ2社において副スポットがあり不適であった。(Table. II)

定量値は、ブファリンは全て99.0%をクリアしており、シノ

ブファギン及びレジブフォゲニンは一部98%台のものがあったことから、現状を考え規格値をTable. IIのように設定した。また、HPLCのクロマトグラムをFig. 2に示した。

メーカー	ブファリン	シノブファギン	レジブフォゲニン
W社	147.6 ± 2.7*	130.6 ± 3.5	142.0 ± 2.8
T社	148.4 ± 0.3	131.4 ± 2.5	137.4 ± 3.7
Y社	150.2 ± 0.6	133.0 ± 1.1	142.3 ± 1.1
M社	149.0 ± 1.7	131.5 ± 4.3	135.6 ± 2.3
K社	144.6 ± 2.9	127.6 ± 1.0	135.1 ± 0.1
平均値	148.0 ± 2.5	130.8 ± 3.0	138.1 ± 3.4
最大値	150.8	135.7	144.2
最小値	142.5	126.7	133.2
規格	143~153	125~137	131~145

*平均±標準偏差 (n=3)

Table. I 市販標準品の比吸光度

メーカー名	成分名 (※)	定量値 (%)	TLC法
W社	B	99.9	副スポットなし
	C	99.9	副スポットなし
	R	98.9	副スポットなし
T社	B	99.8	副スポットなし
	C	99.4	副スポットなし
	R	99.9	副スポットなし
Y社	B	99.9	副スポットなし
	C	99.8	副スポットなし
	R	99.8	Rf値0.7付近に褐色のスポット有り
M社	B	99.9	副スポットなし
	C	99.4	副スポットなし
	R	98.2	原点から褐色のテリング有り
K社	B	99.9	副スポットなし
	C	98.8	副スポットなし
	R	98.6	副スポットなし

※ B: プファリン、C: シノプファギン、R: レジブフォゲニン

[定量値規格]

プファリン : 99.0%以上
シノプファギン、レジブフォゲニン : 98.0%以上

Table. II 定量値及びTLC法による純度試験

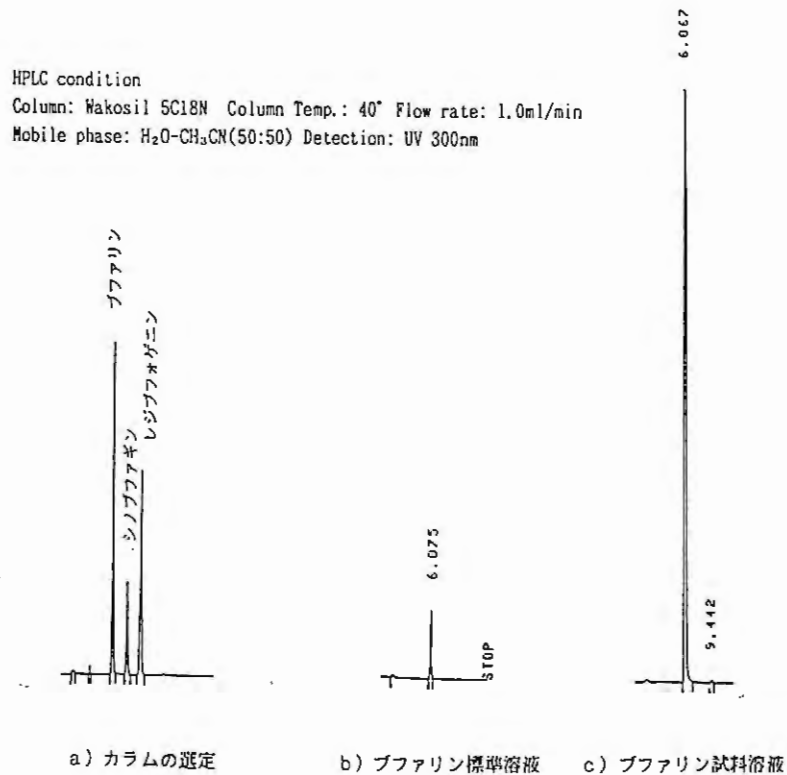


Fig. 2 定量法のクロマトグラムの一例

2. プフォステロイドのメタノール溶液の安定性

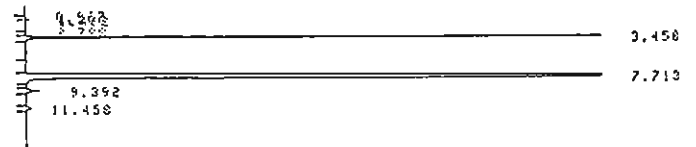
Table. IIIに示したようにシノブファギンのメタノール溶液は調製8日後に約90%，1カ月後には約70%にまで定量値が低下した。HPLCのクロマトグラムで見ると，約3.5分に溶出するピークが増加していた。(Fig. 3)したがって，シノブファギンはメタノール溶液として保存するには問題があることがわかった。

成分名	調製2日後	調製8日後	調製1ヵ月後
ブファリン	99.94%	99.91%	99.90%
シノブファギン	98.80%	89.40%	71.24%
レジブフォゲニン	98.80%	98.25%	98.31%

保存条件：避光・冷蔵

Table. III 各プフォステロイドのメタノール溶液の経時変化

シノブファギン調製8日後



シノブファギン調製1ヵ月後

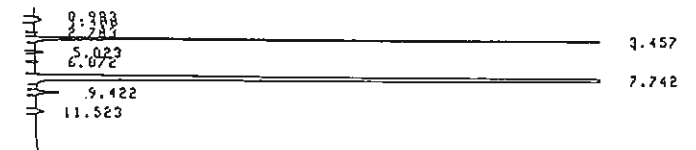


Fig. 3 シノブファギンのメタノール溶液のクロマトグラム

3. プフォステロイド分取品の検定結果

参加各社がそれぞれ同一の日局センソから1ロットずつプフォステロイドの分取を行った。センソ粉末10gからの収率をTable. IVに示す。前処理の仕方で大きく差がでたが，全体的に多量のプフォステロイドが得られた。また，これら分取品を先に設定した試験方法に基づき試験を行った。その結果，HPLCによる定量ではほとんどの分取品が規格をクリアしていた。(Table. V)しかしながら，絶対純度を示す比吸光度はシノブファギンはよかったが，ブファリンはほとんど規格幅の下限を下回り，レジブフォゲニンも半数が規格をはずれていた。(Table. VI)また，TLCによる純度試験も比吸光度と同様な結果であった。

ブファリン	0.2~0.8%
シノブファギン	1.8~4.0%
レジブフォゲニン	1.2~2.0%

Table. IV センソ粉末10gからのプフォステロイドの収率

Lot.No	ブファリン	シノブファギン	レジブフォゲニン
A	99.7%	99.3%	99.2%
B	99.4%	99.8%	99.7%
C	99.8%	98.7%	97.8%
D	99.6%	99.2%	98.4%
E	99.9%	99.8%	99.8%
F	98.7%	99.3%	99.5%
G	99.3%	99.6%	99.4%
H	98.9%	99.3%	98.5%
I	99.9%	99.6%	99.4%

【標準品規格】

ブファリン・・・99.0%以上

シノブファギン、レジブフォゲニン・・・98.0%以上

Table. V 分取品の液体クロマトグラフによる定量値

ま と め

今回我々は、セソ中の指標成分であるブフォステロイド標準品の規格及び試験方法の設定を行ったが、市販標準品はおおむね定量用として使用可能であると思われる。シノブファギンについては、メタノールに溶解すると経時変化を起こすので、保存にはアセトニトリル等を用いる方が望ましい。市販標準品は良質だが高価であり、日常繁用するにはコスト面で問題がある。そこで、2次標準品としての製法を検討し、得られた分取品がHPLCによる定量で良好な結果を示し、3成分の混在もみられなかったことから、純度チェックさえすれば分取品は日常の品質管理に有用であると考えられる。

謝 辞

本研究に対し種々の便宜をはかられた和光純薬工業株式会社に深謝いたします。

Lot.No	ブファリン	シノブファギン	レジブフォゲニン
A	142.7	121.2	128.1
B	142.3	130.2	134.2
C	142.4	128.5	145.5
D	125.0	128.8	120.0
E	122.9	132.0	138.9
F	117.2	127.9	131.2
G	123.8	120.0	124.9
H	143.7	135.9	143.1
I	110.1	125.6	138.4

【標準品規格】

ブファリン 143~153

シノブファギン 125~137

レジブフォゲニン 131~145

Table. VI 分取品の比吸光度

文 献

- 1) 富山県薬事研究会分析部会：生薬試験用標準品の規格設定に関する検討（第一報）—— グリチルリチン酸について ——，家庭薬研究No.9，p.58（1990）
- 2) 富山県薬事研究会分析部会：生薬試験用標準品の規格設定に関する検討（第二報）—— 塩化ベルベリンについて ——，家庭薬研究No.9，p.63（1990）
- 3) 日本薬局方外医薬品成分規格（薬業時報社）：ブホゲニン，p.870（1986）
- 4) 小松曼香，岡野定輔：シリカゲルの溶出乾式カラムクロマトグラフィーによるブホステロイドの分離，薬学雑誌 87(6)，712（1967）

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討 (第四報)

— 硫酸アトロピン及び臭化水素酸スコポラミン —

Studies on Standardization of Crude Drug Components (IV)

— Atropine Sulfate and Scopolamine hydrobromide —

富山県薬事研究会分析部会 (ロートエキス分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

○ 浅水 敬子	明生薬品工業(株)
Keiko ASAMIZU	Meisei Pharmaceutical Co., Ltd.
新木 康子	朝日製薬(株)
Yasuko ARAKI	Asahi Seiyaku Co., Ltd.
井上 勝	第一薬品工業(株)
Masaru INOUE	Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.
小八木 泰弘	大東交易(株)
Yasuhiro KOYAGI	Daito koeki KK
正川 仁	共栄製薬(株)
Hisashi SHOGAWA	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
藤田 博子	内外薬品商会(株)
Hiroko FUJITA	NAIGAI YAKUJIN Co., Ltd.
横田 洋一	富山県薬事研究所
Youichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

ロートエキスのアルカロイドであるヒヨスチアミン及びスコポラミン標準品の規格及び試験方法の設定を目的として共同研究を行った。ヒヨスチアミン及びスコポラミンの標準品には日局にも収載され入手の容易な硫酸アトロピン及び臭化水素酸スコポラミンを選んだ。これらの日局定量法は非水滴定法であるが、HPLC法による定量が一般化してきた近年、ロートエキス定量用標準品としては、これだけでは不十分であり、純度試験(TLC法及びHPLC法)を加えた試験方法の検討を行った。またこの試験方法に基づき市販試薬の品質評価を行った。更に、ロートエキス中のヒヨスチアミン及びスコポラミンの簡易な定量法について若干の検討を加えたので以下報告する。

硫酸アトロピン及び臭化水素酸スコポラミン標準品の現状

会員各社が実施している標準品の規格及び試験法を Table I に示す。ヒヨスチアミンは、*l*-ヒヨスチアミンまたはそのラセミ体であるアトロピンの硫酸塩、スコポラミンはその臭化水素酸塩が標準品として用いられている。乾燥条件は各社様々である。定量は滴定で行われている。クロマト的純度の設定はなかった。

実験の部

1. 規格及び試験方法の設定

1) 試料

硫酸アトロピン4検体(日局品1検体, 試薬特級3検体): A, B, C, D

臭化水素酸スコポラミン3検体(試薬特級2検体, 試薬一級1検体): A, B, C

2) 純度試験(TLC法)

日局「薄層クロマトグラフ用硫酸アトロピン」及び日局「ロートエキス・パパベリン・アネスタミン酸」確認試験のTLC条件を条件1及び2として比較検討した(Table. II)。市販試薬を検定した結果、両方法とも副スポットは認められなかった。また、条件2の検出方法で更に希硫酸を噴霧することによって検出感度が上がりスポット量を $10\mu\text{l}$ と少なくできたので条件2の方法を採用した。

試料溶液及び標準溶液は純度99.0%を目安として調整した。

試料溶液及び標準溶液は純度99.0%を目安として調整した。

TLC条件

試料溶液: 5 mg/ml
(エタノール)

標準溶液: 試料溶液

1 ml を正確に量り、

エタノールを加え

て正確に 100 ml とする。

薄層板: シリカゲルプレート

展開溶媒: クロロホルム・メタノール・アセトン・強アンモニア水混液 (73:15:10:2)

展開距離: 約 10 cm

スポット量: $10\mu\text{l}$

検出方法: 噴霧用ドラージェンドルフ試液噴霧後, 希硫酸を噴霧する。

1) ヒヨスチアミン標準品

	使用試薬	乾燥条件	定量法
A	定量用「硫酸アトロピン」	日局に従う	日局法
B	β -ヒヨスチアミン (東京化成規格特級)		中和滴定 ($0.2\text{ N H}_2\text{SO}_4$ - 0.2 N NaOH)
C	日局硫酸アトロピン	110° , 3時間	
D	β -ヒヨスチアミン (東京化成製)をエタノールより再結晶	デシケーター	

2) スコポラミン標準品

	使用試薬	乾燥条件	定量法
A	定量用「臭化水素酸スコポラミン」	日局に従う	日局法
B	日局臭化水素酸スコポラミン	110° , 3時間	
C	臭化水素酸スコポラミン (Merck社製)	デシケーター-24時間 105° , 3時間	

Table. I 標準品の現状

	条件1	条件2
試料溶液	硫酸アトロピン $0.01\text{ g} \rightarrow 2\text{ ml}$ (EtOH)	
標準溶液	試料溶液 $1\text{ ml} \rightarrow 100\text{ ml}$	
スポット量	$50\mu\text{l}$	
展開溶媒	クロロホルム・エチルアミン混液 (9:1)	クロロホルム・メタノール・アセトン・強アンモニア水 (73:15:10:2)
検出方法	塩化白金酸・ヨウ化カリウム 試液を噴霧する	噴霧用ドラージェンドルフ試液を 噴霧する
色調、Rf値	紫、0.40	黄赤色、0.28

Table. II TLC検討条件

条件1: 日局「薄層クロマトグラフ用硫酸アトロピン」
条件2: 日局「ロートエキス・パパベリン・アネスタミン酸」確認試験を準用

3) 純度試験 (HPLC法)

操作条件

試料溶液：1 mg/ml (移動相)

標準溶液(1)：試料溶液 1 ml を正確に量り，移動相を加えて正確に 100 ml とする。

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：210 nm)

カラム：内径 4～6 mm，長さ 15～30 cm のステンレス管に粒子径 5 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：40° 付近の一定温度

移動相：希釈リン酸 (1→4000) 600 ml にアセトニトリル 400 ml を加え，この混液にラウリル硫酸ナトリウム 1 g を溶解する。

流量：アトロピンの保持時間が約 11 分になるように調整する。

注入量：20 μ l

カラムの選定：硫酸アトロピン及び臭化水素酸スコポラミンの 0.01 g を移動相に溶かし 100 ml とする。この液 20 μ l につき上記の条件で操作するとき，それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

検出感度：標準溶液(1) 1 ml を正確に量り，移動相を加えて正確に 20 ml とし標準溶液(2)とする。標準溶液(2) 20 μ l から得たアトロピンのピーク面積が自動分析法により測定されるように調整する。

面積測定範囲：溶媒のピークの後から，アトロピンの保持時間の 3 倍とする。

4) 定量法

日局に準拠して行う。

2. ロートエキスの簡易定量法

12局原案に HPLC 法による定量法が内示されたが，この方法は Chart 1 に示すとおり，アンモニアアルカリ性でエーテル抽出 (以下 ammonia - ether 法) しており繁雑で時間がかかるので，直接移動相に溶解するだけで定量できる操作条件の検討を行った。

1) 試料：ロートエキス 1 検体

2) 硫酸アトロピン標準品，あらかじめ乾燥減量を測定しておく。

臭化水素酸スコポラミン標準品，あらかじめ乾燥減量を測定しておく。

3) 定量法

前処理方法を Chart 1 に示す。

試料溶液(A)：ロートエキス約 0.4 g を精密に量り，移動相を加えて溶かし，これに内標準溶液 2 ml を正確に加え，更に移動相を加えて正確に 50 ml とした。(Chart 1 の A 法)

試料溶液(B)：ロートエキス約 0.4 g を精密に量り，以下 Chart 1 の ammonia - ether 法に従って操作し，エーテル抽出物を得た。これに内標準溶液 2 ml を正確に加え，以下試料溶液(A)と同様に操作し，試料溶液(B)とした。(Chart 1 の B 法)

標準溶液：硫酸アトロピン標準品 0.05 mg/ml，臭化水素酸スコポラミン標準品 0.01 mg/ml 及び内標準物質 0.06 mg/ml の移動相溶液

内標準溶液：パラオキシ安息香酸ブチルの移動相溶液 (1.5→1000)

試料溶液 A，B 及び標準溶液 10 μ l について下記の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行った。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (210 nm)

カラム：内径4~6 mm, 長さ15~25cmにステンレス管に5 μm の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：40° 付近の一定温度

移動相：ラウリル硫酸ナトリウム10mMを含む0.05M NaH_2PO_4 (pH 3.5)・アセトニトリル混液 (62:38) ¹⁾

カラムの選定：標準溶液10 μl につき, 下記の条件で, 操作するとき, スコポラミン, アトロピン, 内標準物質の順に溶出し, それぞれのピークが完全に分離するもの

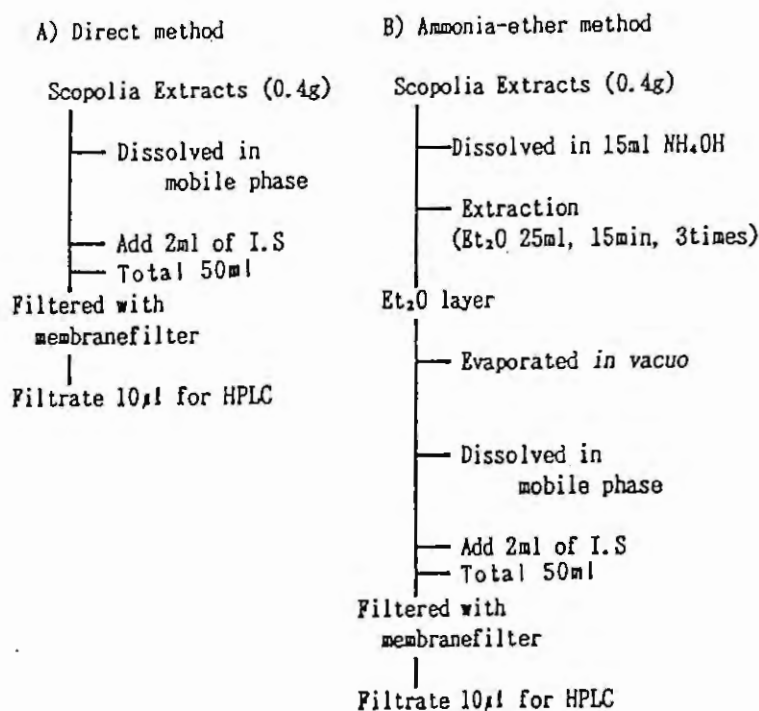


Chart. 1 Preparation of the Sample Solution

結果及び考察

1. 規格及び試験方法

硫酸アトロピンの結果を Table IIIに, 臭化水素酸スコポラミンの結果を Table IVに示す。

1) 純度試験 (TLC法)

硫酸アトロピンの市販試薬A, B, C, Dのすべてに, 副スポットは認めなかった。臭化水素酸スコポラミンの市販試薬A, B, Cにも, 副スポットはなかった。すなわち, 試料溶液の主スポット以外のスポットは標準溶液の主スポットより濃くないことを確認した。

2) 純度試験 (HPLC法)

クロマトグラムの一例を Fig. 1に示す。

HPLC法による面積百分率による相対純度は平均99.8%の高い値を示し, 試薬及びカラム間の変動も小さかった。試料溶液のアトロピン以外のピーク合計面積は標準溶液(1)のアトロピンのピーク面積より大きくないことを確認した。

純度試験 (1)

		A	B	C	D
R f 値	試料溶液	0.34	0.33	0.33	0.32
	標準溶液	0.29	0.28	0.29	0.28
副スポット		なし	なし	なし	なし

純度試験 (2)

カラム	A	B	C	D
Cosmosil 5C18AR	99.66%	99.80%	99.85%	99.66%
Inertsil ODS-2	99.77%	99.88%	99.90%	99.66%

定量

	A	B	C	D
含量 ⁿ	100.1%	100.9%	100.5%	100.3%

* n=3

Table. III 市販硫酸アトロピンの試験結果

純度試験 (1)

		A	B	C
R f 値	試料溶液	0.63	0.62	0.62
	標準溶液	0.62	0.61	0.62
副スポット		なし	なし	なし

純度試験 (2)

カラム	A	B	C
Cosmosil 5C18AR	99.96%	99.81%	99.96%
Inertsil ODS-2	99.99%	99.88%	99.83%

定量

	A	B	C
含量 ⁿ	100.4%	100.5%	100.5%

* n=3

Table. IV 市販臭化水素酸スコポラミンの試験結果

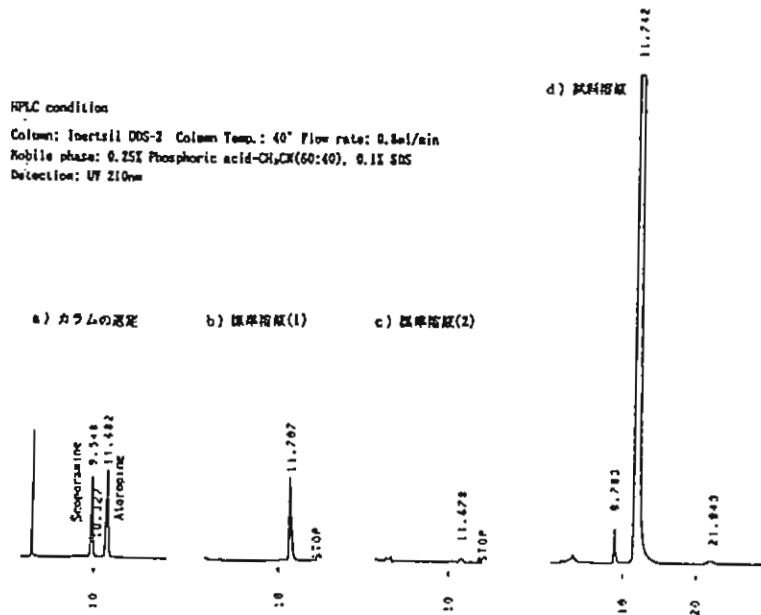


Fig. 1 硫酸アトロピン標準品のクロマトグラムの一例

3) 定量法

定量値は水分により影響を受けるので、日局に準じて乾燥し、その直後に秤量することにより、アトロピンは平均100.5%、臭化水素酸スコポラミンも平均100.5%の高い値を得られたので、含量規格を99.0%以上とした。

2. ロートエキスの簡易定量法

1) HPLC条件

標準溶液及び試料溶液A, Bのクロマトグラムを Fig. 2 に示す。分離操作なしの試料溶液Aのクロマトグラムには、成分ピークが数多くあったが、目的成分の分離はされており、定量可能である。

2) 検量線

硫酸アトロピン：0.06～0.14mg/ml, 臭化水素酸スコポラミン：0.005～0.025mg/mlの範囲で原点を通り、良好な直線性を示した。

3) 前処理の比較

同一のロートエキスについて、各社、種々のカラムを用いて、定量を行い、A法とB法の比較を行った結果を Table V に示す。A法の総アルカロイド量 (%) は、 1.02 ± 0.040 (平均±標準偏差), B法は、 0.99 ± 0.034 (平均±標準偏差) であった。両法に差があるとはいえず、簡易な(A)法でも定量可能法であると考えられる。しかし、ロートエキスにより、その成分含量は様々であるので、種々のロートエキスで試験法を検討する必要がある。

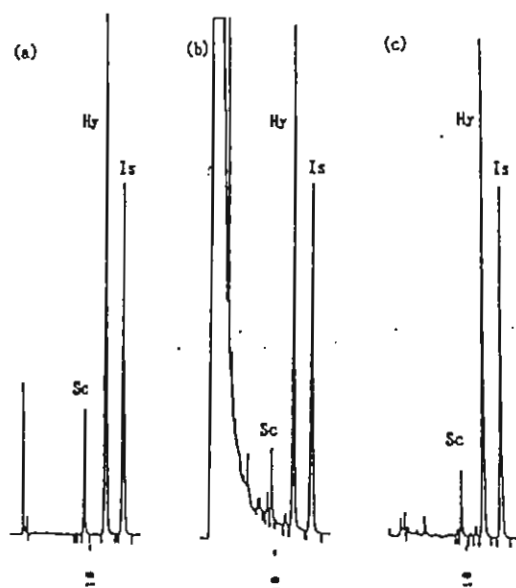


Fig. 2 Chromatograms of Standard and Scopolia Extracts Peaks Sc, scopolamine; Hy, hyoscyamine; Is, internal standard (p-hydroxy benzoic acid butyl ester)
Samples: (a), standard; (b), direct method; (c), ammonia-ether method
Column: TSKgel ODS-80TM column temp: 40 °
Flow rate: 0.9ml/min
Mobile phase: 50mM phosphate buffer (pH 4.5) - CH₃CH₂ (62:48), 10mM SOS
Detection: UV 210nm

まとめ

- 市販試薬は、そのまま標準品として使用できることを確認した。
- ロートエキスの簡易な定量法の1例を示した。

No.	Column	Contents (%)	
		direct method	ammonia-Et ₂ O method
1	TSK gel ODS-80TM	1.05	1.05
2	YMC pack ODS-A	0.98	0.98
3	Inertsil ODS	1.08	1.01
4	YMC pack ODS-AQ	0.99	0.97
5	Shim pack CLC-ODS	0.99	0.96
6	TSK gel ODS-80TM	1.01	0.97
mean		1.02 ± 0.040	0.99 ± 0.034

Table V Total alkaloid Contents (%) of Scopolia Extracts by Various Columns for HPLC

文献

- Oshima, T., Sagara, K., Tong, Y - Y., Zhang, G., Chen, Y - H. : Chem. Pharm. Bull. 37, 2456 - 2458 (1989)

【原 著】

動物生薬の薬理学的品質評価に関する研究

— 牛黄の循環器系に対する影響 —

Pharmacological Evaluation of Quality of Animal Crude Drugs

— Effects of Bezoar Bovis on cardiovascular system —

富山県薬事研究会 生物部会

Division of Pharmacology, Toyama Pharmaceutical Research Association

近 藤 弘 之 (大東交易) Hiroyuki KONDO	石 黒 龍太郎 (第一薬工) Ryutaro ISHIGURO	○ 浦 垣 俊 孝 (リードケミカル) Toshitaka URAGAKI
永 井 喜 美 (延寿堂) Kimi NAGAI	上 川 浩 (広貫堂) Hiroshi KAMIKAWA	室 井 正 志 (共栄製薬) Masashi MUROI
池 田 大 輔 (共栄製薬) Daisuke IKEDA	酒 井 弘 一 (第一薬工) Hiroichi SAKAI	篠 原 達 雄 (大東交易) Tatsuo SHINOHARA
寺 崎 正 之 (中新薬業) Masayuki TERASAKI	浅 水 敬 子 (明生薬工) Keiko ASAMIZU	松 原 利 行 (薬事研究所) Toshiyuki MATSUBARA

緒 言

牛黄は古来より「薬性論」に“卒中悪（脳卒中障害）を主する”，「日華子緒家本草」に“中風失音を療す”など脳卒中の予後に用いられたと思われる記述が認められているが，この作用を支持する薬理作用は報告されていない。そこで，我々は脳卒中易発症高血圧ラット（SHRSP）を用い，牛黄の投与が脳卒中発症から死亡に至るまでの過程にどのように影響するかについて検討した。岩城らはSHRに対して100mg/kgの牛黄の経口投与により投与後1週間から著明な降圧がみられることを報告している。¹⁾我々はこの報告に基づき牛黄の品質評価を急性降圧作用を指標として行うべく，SHRより血圧の高いSHRSPを用い，牛黄の血圧および心拍数に対する影響を調べた。

実験材料

1) 実験動物

実験に使用したSHRSPは，近畿大学医学部岡本耕造先生より分与を受け，薬事研究所で継代飼育した10週齢の雄性動物を用いた。

2) 使用薬物

牛黄はオーストラリア産のものを購入し試験に用いた。

3) 使用試薬

上記生薬以外に、carboxymethyl cellulose sodium salt (以下 CMC-Na と略す), sodium chloride, heparin sodium salt (以上和光純薬), pentobarbital sodium (ネプタール注射液, 大日本製薬) の各試薬を実験に用いた。

実験方法

1. SHRSP に対する牛黄の長期投与の影響

1) 投与用量

一日当たり 10 mg/kg, 100 mg/kg 投与群および対照群の 3 群で実施した。

2) 飼料調製

牛黄 1 g または 0.1 g に トウモロコシデンプンを添加して全量を 10 g とし, これをよく混和して 10 倍散または 100 倍散を作り, 粉末飼料 (船橋農場, MM-3) 100 g 当たりそれぞれ 1 g 添加した。対照群として 1% の トウモロコシデンプンを含む粉末飼料を用意した。

3) 動物の飼育

1 群 5 匹をエコノ PC ケージ (日本クレア) で飼育し, ケージは毎日交換した。給餌給水は, 薬物を含む粉末飼料をガラス製給餌器 (夏目製作所) に毎日約 100 g 入れ, さらに 1% 食塩水を自動給水装置から自由に摂取させた。飼育した動物の体重および 24 時間の摂餌量, 摂水量を週一度, 水曜日 から 木曜日にかけて測定した。

4) 動物の観察

実験期間中毎日朝夕動物を観察し, 脳卒中の発症日および死亡日を記録した。脳卒中発症は, 一方の前肢の持ち上げ運動, 歩行異常, 過敏, 自発運動の減少, 立毛, 尿失禁などの発現を指標とした。また, 死亡後には剖検を行い, 特に脳の出血および軟化, 心肥大, 腎硬化症などを肉眼的に観察した。

5) 血圧の測定

体重, 摂餌量および摂水量を測定後, 血圧をウエダ製作所製の小動物血圧測定装置 (U-1000) を用い tail cuff 法で測定した。

2. 無麻酔無拘束 SHRSP の血圧および心拍数に対する牛黄の単回投与の影響

1) 薬液の調製

牛黄を 1% CMC-Na に懸濁し, 100 mg/10 ml に調整した。

2) 実験動物

SHRSP 系雄性ラット (6~9 ヶ月令) を試験に供した。

3) 血圧測定

ラットをペントバルビタール (35 mg/kg, ip) で軽麻酔後, 血圧測定のため右頸動脈にカニューレ (ポリエチレンチューブ SP 45, 夏目製作所) を挿入し, 先端を皮下を通して背部に導出した。カニューレ内にはヘパリンナトリウム (100 units/ml) を充填し血液凝固を防止した。麻酔から完全に覚める約 2 時間後に薬物を経口投与し, その後経時的に血圧を圧トランスジューサー (Gould Statham, P 23 ID) および歪み圧力用アンプ (日本光電, AP-601 G) を介して熱ペン式記録紙上に描記した。心拍数は脈波より瞬時心拍計 (日本光電, AT-601 G) を介して血圧と同時に記録した。

3. ペントバルビタール睡眠に対する牛黄の影響

1) 薬液の調製

牛黄を1% CMC-Na に懸濁し、10mg/10mlまたは100mg/10mlに調整した。

2) 実験動物

6週齢の ddY 系雄性マウス (体重27-33 g) を三協ラボサービス(株)より購入し試験に供した。

3) 薬物投与

牛黄は10mg/kgおよび100mg/kgの2用量について単回投与と連続投与の計4群, 対照として1% CMC-Na の連続投与群を設けた。連続投与群は3日間毎日朝夕2回の投与を行った。4日目の朝, 牛黄または1% CMC-Na 経口投与20分後, ペントバルビタール50mg/kg (0.05ml/10g BW) を腹腔内投与し, 正向反射消失から回復までを睡眠時間とした。

実験結果

● SHRSPに対する牛黄の長期投与の影響

1) 体重に対する影響

牛黄10mg/kgおよび100mg/kgのいずれの投与群においても, 成長にともなう体重増加は対照群と差がなかった (図1)。

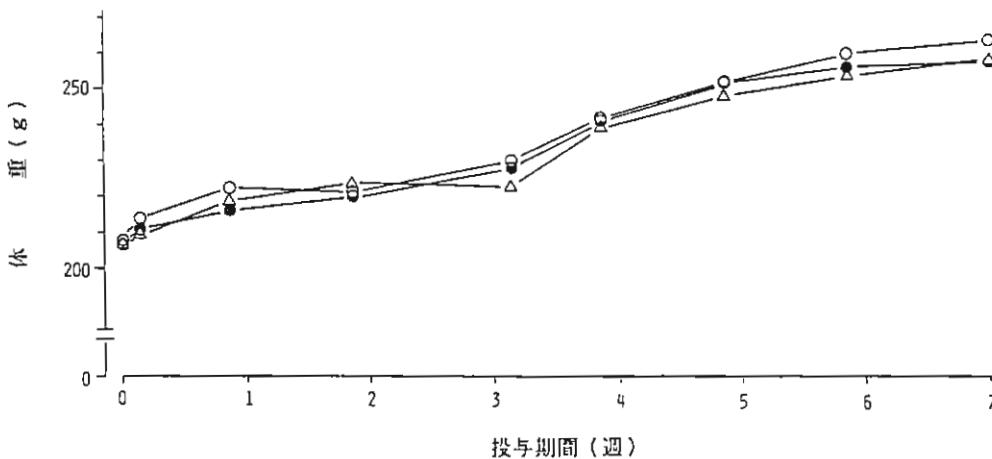


図1 1%食塩水負荷したSHRSPの体重に対する牛黄の影響
対象(○),
牛黄10mg/kg(△),
牛黄100mg/kg(●)
図中の各点は5例の平均値

● 2) 摂餌量に対する影響

摂餌量については測定日より若干増減するものの, 牛黄の10mg/kgおよび100mg/kg投与群のいずれにおいても対照群との差が認められなかった (図2)。

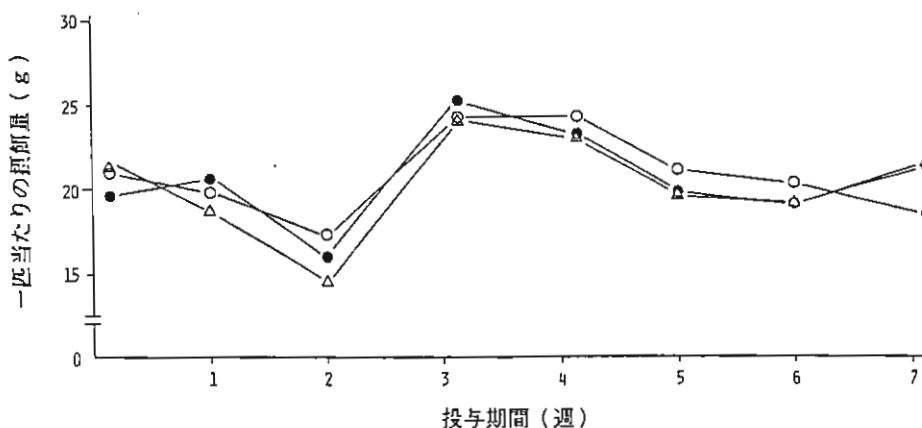


図2 1%食塩負荷したSHRSPの摂餌量に対する牛黄の影響
対象(○),
牛黄10mg/kg(△),
牛黄100mg/kg(●)

3) 1%食塩水摂取量に対する影響

食塩水摂取量については、牛黄の10mg/kgおよび100mg/kg投与群のいずれも対照群に比べて若干少ない傾向を示したが用量依存的ではなかった(図3)。

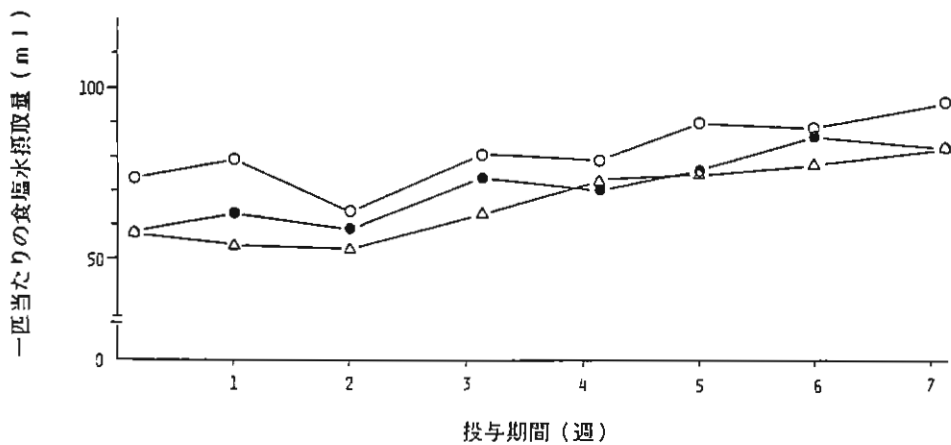


図3 SHRS Pの1%食塩水摂取量に対する牛黄の影響
対象(○),
牛黄10mg/kg(△),
牛黄100mg/kg(●)

4) 生存期間に対する影響

投与開始後8週過ぎから死亡例が認められ、16週までに全例死亡した(図4)。その平均生存日数は、牛黄投与群と対照群に差はなかった(表1)。また、脳卒中の発症日から死亡日までの期間についても、牛黄投与群と対照群のいずれも15日前後であり、牛黄の影響は認められなかった(表1)。

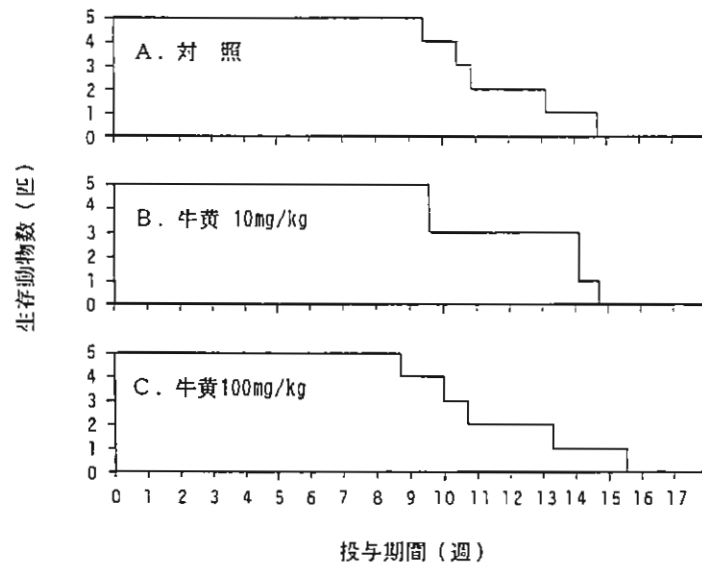


図4 1%食塩負荷したSHRS Pの生存期間に対する牛黄の長期投与の影響
A. 対照 B. 牛黄10mg/kg C. 牛黄100mg/kg

5) 血圧に対する影響

牛黄の10mg/kgおよび100mg/kgいずれの投与群においても、血圧上昇の抑制は認められなかった(図5)。

表1 牛黄を長期投与した1%食塩水負荷SHRS Pの生存日数および脳卒中発症から死亡するまでの期間

系物 ^{a)}	1日当たりの用量	動物数	生存日数 ^{b)}	発症後の生存日数 ^{c)}
対照	—	5	83.0 ± 15.1	15.0 ± 1.4
牛黄	10mg/kg	5	88.0 ± 18.3	14.8 ± 6.4
牛黄	100mg/kg	5	82.6 ± 19.2	15.7 ± 3.1

a) 牛黄は粉末飼料に混和した。

b) 1%食塩水および牛黄投与開始時からの平均生存日数 ± SD。

c) 脳卒中の発症を確認した日から死亡するまでの平均日数 ± SD。ただし、脳卒中発症が明確に判断できない動物があり、これを除いて集計した。

6) 心拍数に対する影響

心拍数については、投与後2週目から5週目にかけて、牛黄の10mg/kgおよび100mg/kg投与群のいずれも対照群に比し減少傾向を示したが有意差は認められなかった(図6)。

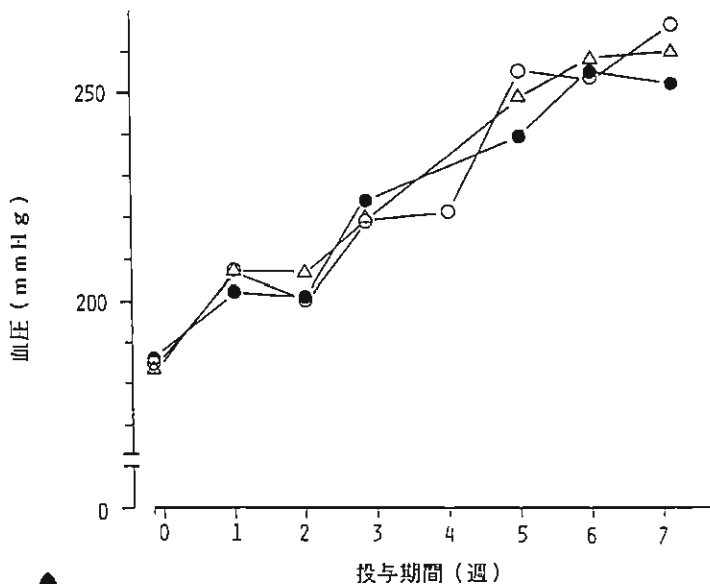


図5 1%負荷したSHRS Pの血圧に対する牛黄の影響

対象(○), 牛黄10mg/kg(△), 牛黄100mg/kg(●)

図中の各点は5例の平均値

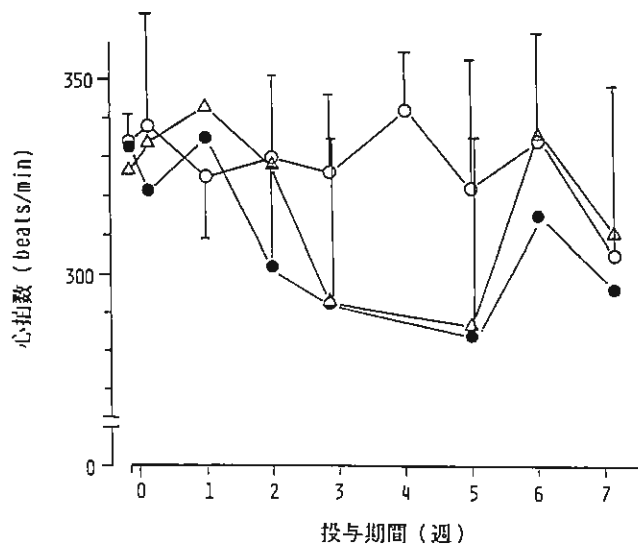


図6 1%食塩負荷したSHRS Pの心拍数に対する牛黄の影響

対象(○), 牛黄10mg/kg(△), 牛黄100mg/kg(●)

図中の各点は5例の平均値、また、一部の点にSDを付与した

表2 牛黄の無麻酔無拘束SHRS Pの血圧に対する影響

薬物	用量 (mg/kg)	動物数	投与前の血圧(mmHg) ^{a)}	血圧の変化量 (mmHg) ^{a)}				
				15min	30min	1 hr	2 hr	3 hr
1%CHC-Na	-	5	218±12	7±13	5±15	3±10	12±12	12±6
牛黄	100	8	215±21	-3±7	-3±11	8±11	5±13	6±13

a) 平均値±標準偏差。

表3 牛黄の無麻酔無拘束SHRS Pの心拍数に対する影響

薬物	用量 (mg/kg)	動物数	投与前の心拍数 (beats/min) ^{a)}	心拍数の変化量 (beats/min) ^{a)}				
				15min	30min	1 hr	2 hr	3 hr
1%CHC-Na	-	4	336±35	-2±13	-6±5	-2±15	-16±19	15±18 ^{b)}
牛黄	100	8	361±51	-7±32	-14±44	-13±27	-13±16	-10±24

a) 平均値±標準偏差。

b) 1例測定できず残りで平均値を求めた。

2. 無麻酔無拘束SHRS Pの血圧および心拍数に対する牛黄の単回投与の影響

表2, 3に示すように, 牛黄100mg/kgをSHRS Pに単回経口投与しても投与後15分から3時間まで血圧および心拍数に対しほとんど影響を及ぼさなかった。

3. ペントバルビタール睡眠に対する牛黄の影響

上述の実験からは牛黄に血圧を下げる作用は見出せなかったが, 牛黄が高血圧に良いと言われていた事実があるので, 高血圧随伴症状の改善効果に視点を換え, まず鎮静作用の有無についてマウスにおけるペントバルビタール睡眠に対する影響を調べた。

表4に示すように, 牛黄はペントバルビタール睡眠を延長する作用は認められず, 鎮静作用によ

る高血圧随伴症状の改善を示唆することはできなかった。逆に牛黄はペントバルビタール睡眠を短縮する傾向にあり、連続投与で有意差が認められた。この作用が、気付け、疲労回復感または解毒などに関連するかについては今後の検討課題と思われる。

表4 牛黄のペントバルビタール睡眠に対する影響

薬物	動物数	処理時間	一回の用量 ^{a)}	睡眠時間(分) ^{b)}
1%CHC-Na	8	3 days	—	86.8±6.9
牛黄	8	20 min前のみ	10 mg/kg	75.9±12.0
牛黄	8	20 min前のみ	100 mg/kg	72.1±5.5
牛黄	8	3 days	10 mg/kg	82.9±6.9
牛黄	8	3 days	100 mg/kg	63.0±3.0**

a) 20分前のみの一投与群以外はすべて朝夕の一日2回投与した。

b) 平均値±標準誤差。

** : 溶媒対照群との有意差検定、 $P < 0.01$ (Student's t-test)

考 察

牛黄は古来より高価な民間薬として用いられ、鎮静、降圧、利胆、肝臓保護、赤血球増加などの薬理作用を有すると言われている。²⁾ 最近の研究でも牛黄の薬理作用については以下に記述するような幾つかの報告がある。久保らは、牛黄の70%メタノールエキスについて実験的血栓症誘発による虚血性心臓障害に対する作用を調べ、 1×10^{-4} g/ml程度の高濃度において抗トロンビン作用および線溶活性化作用を有することを報告している。³⁾ また、森下らは、SHRの血圧低下作用、血小板凝集抑制作用、低酸素性脳障害保護作用、解熱作用、鎮痛作用、筋肉疲労回復作用のほか、水浸拘束ストレス潰瘍、実験的肝炎、正常体温、酢酸 writhing などに対する影響を検討し、牛黄の100mg/kg、100mg/kgの経口投与により4日目から顕著な血圧の低下が認められるとともに、血小板ADP凝集、KCN誘発昏睡時間の短縮(低酸素性脳障害保護)、解熱作用、酢酸 writhing 抑制作用が軽度に認められると報告している。⁴⁾ 我々は、これらの報告をもとに牛黄の薬効と密接な関係にあると思われる循環器系の中でも特に血圧に対する影響について着目するとともに、高血圧に起因して脳卒中を発症するSHRSPを用いて脳卒中予防効果についても検討することにより、我々が手掛けている動物生薬の薬理学的品質評価の確立を目指して今回の試験を実施した。しかしながら、結果で述べたように牛黄にそれらの薬理作用を見出すことはできなかった。今回の結果は、岩城らの報告¹⁾ および森下らの報告⁴⁾ と一致しなかったが、理由として、用いた動物がSHRより高血圧の進展が激しいSHRSPのため牛黄のようなマイルドな活性では抑制し得なかったとも考えられる。この問題を解決するには、次回は別の高血圧動物を選んで試験を実施することも必要と思われる。ただ、循環器系に対する牛黄の作用については、佐藤らも麻酔ラット、開胸犬、モルモットLangendorff標本、モルモット心房標本を用いて詳細に検討しているが、牛黄はこれらの循環動態に対しほとんど影響を与えなかったと報告している。⁵⁾ また、木村らが述べているように、牛黄の単独作用よりも六神丸製剤に配合された蟾酥や麝香との複合効果として薬理作用を検討しなければ顕著な作用は見出せないのかもしれない。⁶⁾ 以上、これらの幾つかの報告を十分考慮して、今後さらに牛黄の薬理学的品質評価法の確立を試行していきたい。

結 論

今回の実験から、餌に混ぜて連続投与した牛黄の1日10mg/kg、100mg/kgの用量では、1%食塩水負荷したSHRSPの血圧上昇および脳卒中の抑制は認められなかった。また、無麻酔無拘束SHRSPに牛黄100mg/kgを単回経口投与しても急性降圧効果は認められなかった。

文 献

- 1) 岩城利一郎, 森照明, 中川久夫: 牛黄およびコール酸カルシウムの高血圧動物に対する影響と一般薬理作用について, 薬誌, 85, 899-902(1965)
- 2) 中薬大辞典, 上海科学技術出版社編, 小学館, 東京, 1985, p.787
- 3) 久保道德, 松田秀秋, 有地滋: 動物生薬の薬理学的研究(第一報), 蟾酥, 牛黄, 麝香について(その1) 実験的血栓症誘発による虚血性心臓障害に対する作用, 生薬学雑誌, 38, 59-64(1984)
- 4) 森下信一, 斎藤隆, 庄司政満, 平井康晴, 田中陽: 牛黄, 人参, 靈黄参の薬理作用, 日薬理誌, 91, 129-140(1988)
- 5) 佐藤博, 大鳥居健, 豊口義夫, 菅原和信: 蟾酥, 麝香および牛黄の循環系に対する作用, 応用薬理, 33, 817-824(1987)
- 6) 木村正康, 長田永三郎, 脇功巳: 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究(第7報) 民間薬方剤“六神丸”構成生薬の心臓機能における複合作用について, 薬誌, 88, 125-129(1968)

【原 著】

軟膏基剤の検討第1報

—— カルボキシビニルポリマー基剤の特性 ——

Studies of Ointment Bases. I

Characteristic of Ointment Base with Carboxyvinylpolymer.

境 井 洋
Hiroshi SAKAI

上 川 浩
Hiroshi KAMIKAWA

正 川 康 明
Yasuaki MASAKAWA

株式会社 廣 貫 堂 研究開発部
Research and Development Division, Kokando Co., Ltd.

緒 言

カルボキシビニルポリマーはカルボキシル基を持った水溶性のビニルポリマーで、アクリル酸を主とし、これに少量のアリルシヨ糖などを配し各々のビニル基が付加重合した平均分子量が1,000,000~3,000,000の共重合体である。これはまた、バクテリアなどによる生物学的分解を受けにくく、比較的広い範囲のpHで稠度がほぼ一定であり、よく使用される原材類と高度の親和性を示す等の理由から、近年、化粧品及び薬品類に基剤として使用する例が見受けられる。

著者らは、カルボキシビニルポリマーを基剤としたゲル軟膏と従来から用いられている乳化軟膏の特性を簡単な測定装置で比較し、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 検体の調製

有効成分としてサリチル酸メチル10%、*l*-メントール5%を配合し、水分含量を等しくして、次の操作法により作製した。(Table. 1)

1) ゲル軟膏

カルボキシビニルポリマーを水で膨潤させ、トリエタノールアミンを添加して均一に混合し、これに他の成分をエタノールに溶解したものを加えて作製し、ゲル軟膏とした。

別に有効成分を除いたものを、同様の方法で作製し、ゲル基剤とした。

それぞれのpHはトリエタノールアミンの添加量で調製し、5.7, 6.5, 7.0及び7.7とした。

Table. 1 検体の処方

ゲル軟膏	(g)	乳化軟膏	(g)
<i>l</i> -メントール	5	<i>l</i> -メントール	5
サリチル酸メチル	10	サリチル酸メチル	10
カルボキシビニルポリマー	1	ステアリン酸	14.7
トリエタノールアミン	適量	オレイン酸	2
エタノール	18	水酸化カリウム	0.6
その他		その他	
精製水	50	精製水	50
合 計	100	合 計	100

2) 乳化軟膏

転相乳化法により作製した。¹⁾

2. 実験方法

1) 融点の測定

日本薬局方融点測定法の第3法により操作した。²⁾

2) 硬度の測定

(a) ゲル基剤又はゲル軟膏

をつめた軟膏つぼを上皿天秤の一方の皿にのせ、バランスをとった後、プランジャーを軟膏の表面に付着させた。その後、もう一方の皿に10 gの分銅をのせ、1 min後にプランジャーが検体にくい込む距離を天秤に取り付けた指針から換算し、硬度を比較した。

(b) ゲル軟膏及び乳化軟膏につき、(a)で用いた装置の10 gの分銅にかえ、6.0 g/minの速度で荷重を加え、プランジャーがくい込む距離を求め、各軟膏の硬度を比較した。(Fig. 1)

(c) 5 × 5 cm、重点7.60 gのガラス板に100mgの軟膏を付着させ、100 gの分銅をのせ、1 min後に検体が拡がった面積を測定した。(Fig. 2)

3) 延びの測定

測定装置は、「宮崎の延びの測定装置」^{3) 4)}を基に作製した。

軟膏をすりガラスではさみ、4 kgの荷重を1 min間かけ、均等な軟膏のフィルムを作り、過剰の検体はすりガラスの端でこすり落とした後、上側のすりガラスを58 gの荷重で動かした。この時、検体が薄く延ばされながら移動し、5 mm移動したときから15 mm移動するまでの時間を測定した。(Fig. 3)

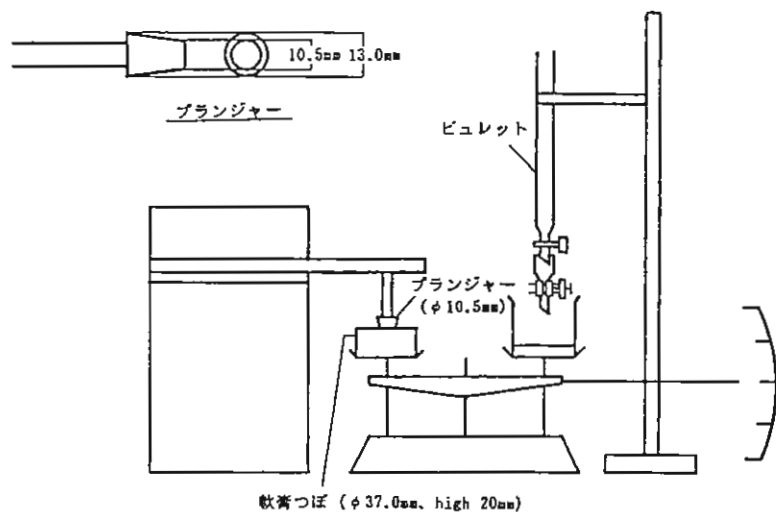


Fig. 1 硬度の測定装置(1)

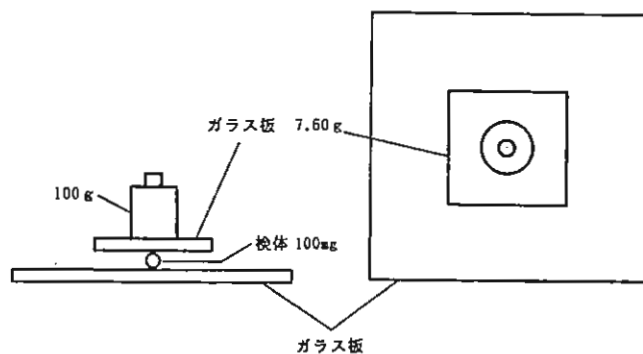


Fig. 2 硬度の測定装置(2)

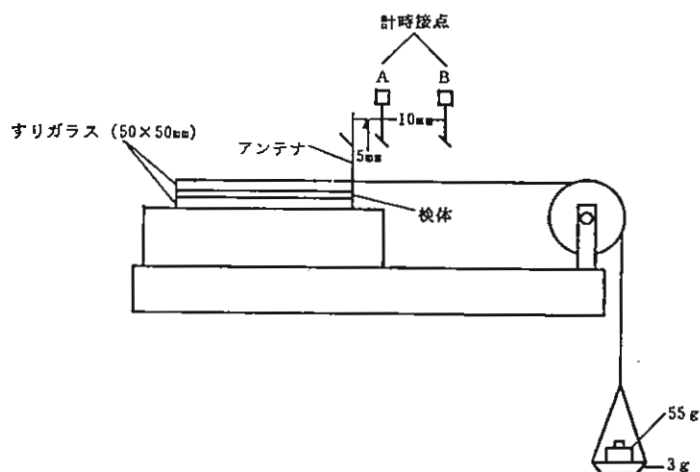


Fig. 3 延びの測定装置

実験結果

1) 融点

乳化軟膏の融点は、
52.5~53° 付近であり、
ゲル軟膏は、pH5.7、
pH6.5、pH7.0及び
pH7.7のいずれのpH
においても80° 以上で、
この装置の測定限界を
越えた。(Table. 2)

		1 回	2 回	3 回
乳化軟膏		53.0°	52.5°	52.5°
ゲル 状 軟 膏	pH7.7	80° 以上	80° 以上	80° 以上
	pH7.0	80° 以上	80° 以上	80° 以上
	pH6.5	80° 以上	80° 以上	80° 以上
	pH5.7	80° 以上	80° 以上	80° 以上

Table. 2 各軟膏の融点

2) ゲル基剤の硬度に及ぼす有効成分の影響

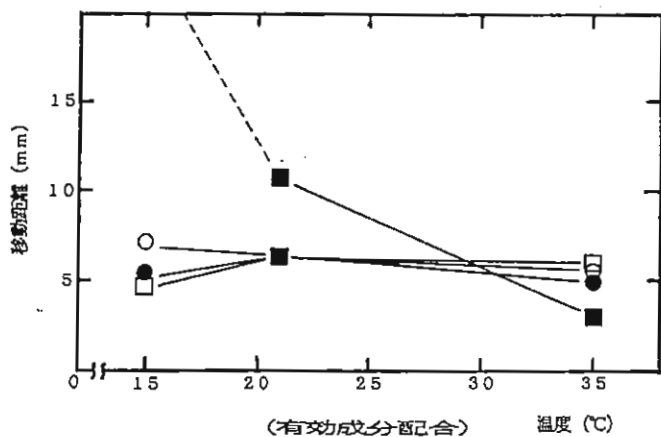


Fig. 4-a 荷重10gにおける温度と1分間後の移動距離

○ ゲル基剤 pH7.7 ● ゲル基剤 pH7.0 □ ゲル基剤 pH6.5
■ ゲル基剤 pH5.7

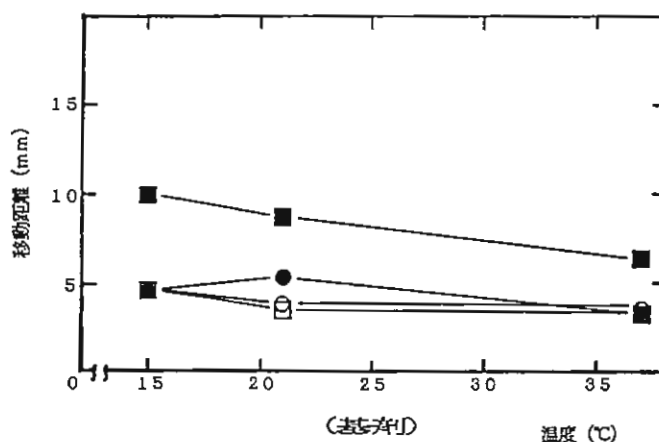


Fig. 4-b

○ ゲル基剤 pH7.7 ● ゲル基剤 pH7.0 □ ゲル基剤 pH6.5
■ ゲル基剤 pH5.7

pH7.7、pH7.0及びpH6.5のいずれのpHにおいても、ゲル基剤は有効成分の配合によって、移動距離が大きく変化した。このことから、硬度が低くなったことが明らかになった。また、pH5.7のゲル基剤は、有効成分配合による硬度の変化が、他のpHのゲル基剤より大きかった。pH5.7のゲル軟膏の15°の時には、1 min以内に軟膏つぼが最終到達地点に達する為、測定できなかった。(Fig. 4-a, b)

3) 軟膏の硬度の比較(1)

実験2. (b)の結果

pH7.7、pH7.0及びpH6.5のゲル軟膏は、15°、25°及び35°のいずれの温度においてもほぼ同一の硬度であり、温度による影響はほとんどなかった。pH5.7の

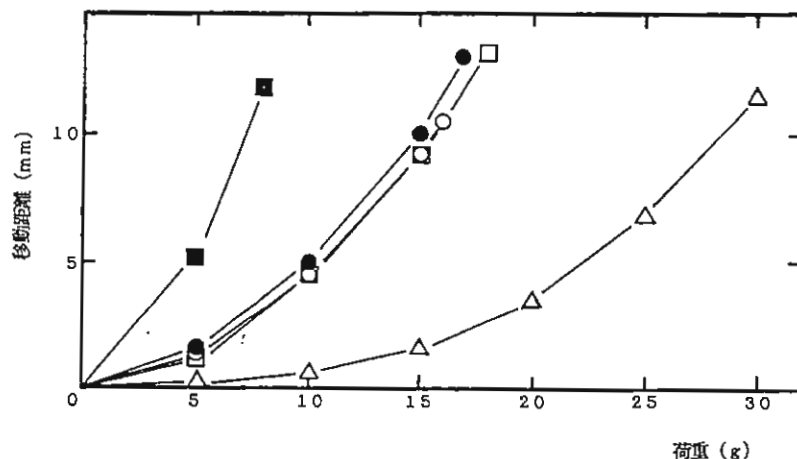


Fig. 5-a

ゲル軟膏は、温度の上昇に従って硬度が増加し、乳化軟膏は逆に、温度の上昇に従って硬度が低下し、35°ではゲル軟膏よりも硬度が低くなった。(Fig. 5-a, b, c)

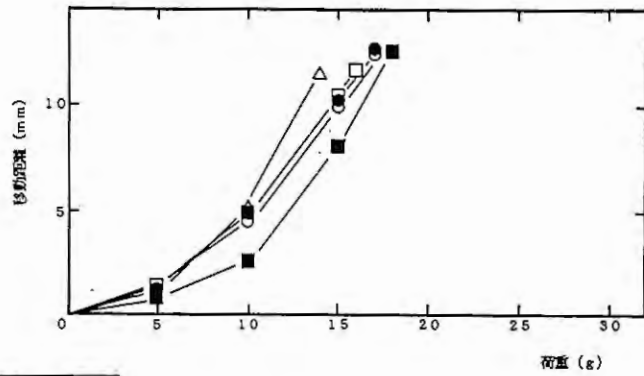


Fig. 5-b

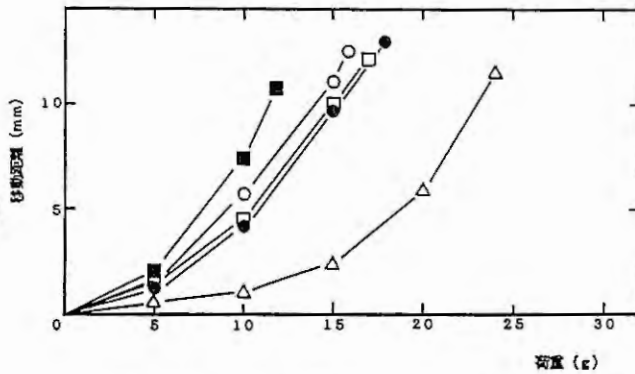


Fig. 5-c 各温度における荷重と移動距離

a 15° b 20° c 35°

○ ゲル軟膏 pH7.7 ● ゲル軟膏 pH7.0 □ ゲル軟膏 pH6.5
■ ゲル軟膏 pH5.7 △ 乳化軟膏

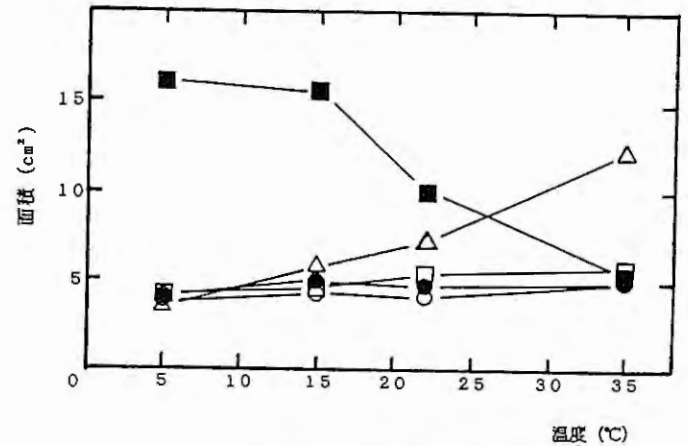


Fig. 6 各軟膏における温度と1分間後の拡がり

○ ゲル軟膏 pH7.7 ● ゲル軟膏 pH7.0 □ ゲル軟膏 pH6.5
■ ゲル軟膏 pH5.7 △ 乳化軟膏

4) 軟膏の硬度の比較(2)

実験2. (c)の結果

軟膏の硬度の比較(1)で得た結果と同様に、pH7.7, pH7.0及びpH6.5のゲル軟膏では、どの温度においても面積がほぼ一定であった。このことは、硬度に対して温度の影響が、少ないことを示している。

これに対し、pH5.7のゲル軟膏は、温度の上昇に従って硬度が増加し、乳化軟膏は逆に硬度が低下した。

(Fig. 6)

5) 延び

20°において、一番延びが良かったのは、pH5.7のゲル軟膏で、次いで乳化軟膏、pH7.0のゲル軟膏、pH7.7のゲル軟膏、pH6.5のゲル軟膏の順であった。(Table. 3)

		1回	2回	3回	4回	5回	平均±S.E.
乳化軟膏		4.7	4.6	4.5	4.5	4.3	4.52±0.07
ゲル軟膏	pH7.7	11.2	11.0	11.2	9.9	9.8	10.62±0.32
	pH7.0	8.0	7.5	7.3	7.7	6.8	7.46±0.20
	pH6.5	20.1	18.3	17.6	17.8	16.0	17.96±0.66
	pH5.7	0.47	0.38	0.31	0.31	0.30	0.354±0.03

単位: sec

Table. 3 A, B間を通過する時間(20°)

考 察

製造方法の難易度についてみると、ゲル軟膏は、加熱操作の必要がなく、簡単な攪拌、混合操作で作製することができた。一方、乳化軟膏は、あらかじめ水相の添加速度、攪拌数及び冷却速度等の条件を設定し、ホモミキサーのような高速攪拌機付の混合装置を用いれば均一な乳化状態のものできたが、プロペラ型攪拌機のような簡単な装置では、均一なものできなかった。

硬度において、pH5.7、pH6.5、pH7.0及びpH7.7のゲル基剤は、温度差による変化が少なく、このpH範囲では稠度の安定したものが得られた。しかし、有効成分を配合すると、pH7.7、pH7.0及びpH6.5のゲル軟膏は、温度差による変化は示さなかったが、pH5.7のゲル軟膏は、温度差による変化が著しかった。このことから、有効成分を配合することにより、ゲル軟膏の硬度が一定であるpH範囲は、基剤のそれよりも小さくなると考えられる。

軟膏の伸びについては、pH5.7のゲル軟膏は、一番伸びが良いという結果を得たが、温度による硬度の変化が著しい為、ゲル軟膏として使用する場合、不適當であると考えられる。乳化軟膏は、pH5.7のゲル軟膏に次いで伸びが良かったが、これも温度により硬度が著しく変化し、温度が低下すれば、チューブからの取り出し等に不便を生じるものと思われる。

以上のことより、カルボキシビニルポリマー基剤は、pH調整を慎重にすれば、展延性に富み、温度差による稠度の変化が少なく、また乳剤性基剤と比べて軟膏作製が容易であることが明らかになった。したがって、カルボキシビニルポリマーを使用した軟膏は、四季を通じて、また地域性による温度差に対して稠度等の変化を心配することのない軟膏であると思われる。

文 献

- 1) 美間博之、北森信之：製剤工学“医薬品開発基礎講座Ⅹ”「津田恭介、野上寿編」、地人書館、東京、(1971)、pp. 357-378
- 2) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書、廣川書店(1986)、B 381-391
- 3) 梅村甲子郎：製剤設計法(2)“医薬品開発基礎講座Ⅸ”「津田恭介、野上寿編」、地人書館、東京、(1971)、pp. 198-267
- 4) 内藤俊一：薬剤学、廣川書店、東京、(1977)、pp. 211-238

【原 著】

軟膏基剤の検討 第2報

サリチル酸メチル含有軟膏の浮腫抑制効果

Studies of Ointment Bases. II

Inhibitory Effect of Methyl Salicylate Ointment on Rat Paw Edema.

上 川 浩 沢 田 聡 美 正 川 康 明
Hiroshi KAMIKAWA Satomi SAWADA Yasuaki MASAKAWA

株式会社 廣 貫 堂 研究開発部
Research and Development Division, Kokando Co., Ltd.

緒 言

近年軟膏剤の基剤として、カルボキシビニルポリマーを用いたゲル基剤が比較的多く用いられている。前報¹⁾ではこのゲル基剤について、その物理的特性の面から検討を加え、硬さや伸びに対する温度の影響がほとんどなく、配置薬のように苛酷な条件下に置かれることの多い分野では、特に有用性が高いことを明らかにした。本報では、このゲル基剤を用いた軟膏剤について、その薬理効果の面から検討した結果について報告する。

実験の部

1. 検体の調製

10%サリチル酸メチル及び5%*l*-メントールを有効成分とするゲル軟膏及び乳化軟膏二種類、またそれぞれの基剤を試製し、実験に用いた (Table 1)、ゲル軟膏は前報と同様、カルボキシビニルポリマーをゲル化剤とした。また乳化軟膏は、非イオン性界面活性剤を乳化剤として用いたものを乳化軟膏A、前報で用いた高級脂肪酸のカリウム塩により乳化させたものを乳化軟膏Bとした。

2. 実験動物

Wistar / ST系雄
性ラット (6週齢,
体重約150g) を約
1週間予備飼育し、
異常がないことを確
認した後実験に使用
した。

ゲル軟膏 (g)	乳化軟膏A (g)	乳化軟膏B (g)
<i>l</i> -メントール 5	<i>l</i> -メントール 5	<i>l</i> -メントール 5
サリチル酸メチル 10	サリチル酸メチル 10	サリチル酸メチル 10
カルボキシビニルポリマー 1	非イオン型界面活性剤 7	ステアリン酸 14.7
トリエタノールアミン 1		オレイン酸 2
エタノール 18		水酸化カリウム 0.6
その他	その他	その他
精製水 50	精製水 50	精製水 50
合計 100	合計 100	合計 100

Table. 1 検体処方

3. 実験方法

炎症の動物モデルとしてラット足蹠カラゲニン浮腫法を用いた。²⁾

あらかじめ前日に、脱毛クリームにより除毛したラットの右後足蹠に、起炎剤として1%カラゲニン(λ-Carrageenan, 和光純薬工業)生理食塩水溶液0.1mlを皮下注射した。起炎剤注射前及び一定時間後の足蹠容積を水浸法により測定し、次式より浮腫率及び抑制率を求めた。

$$\text{浮腫率 (\%)} = \frac{\text{起炎剤注射後の足蹠容積} - \text{起炎剤注射前の足蹠容積}}{\text{起炎剤注射前の足蹠容積}} \times 100$$

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{対照群の浮腫率} - \text{検体塗擦群の浮腫率}}{\text{対照群の浮腫率}} \times 100$$

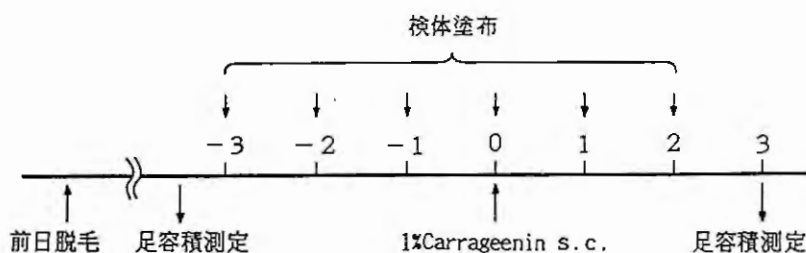


Fig. 1 実験スケジュール

検体は、効果をより強く発現させるために、起炎剤注射の3h前より1hおきに計6回、約150mgずつを足蹠にまんべんなく塗擦した。(Fig. 1)

なお、試験は1群10匹とし、有意差の検定にはStudentのt-検定を用いた。また図の値は、平均±S.E.で示した。

実験結果

1. カラゲニン浮腫の経時変化

起炎剤注射後の浮腫率はおよそ3hで最大に達した。(Fig. 2)。そこで以下の実験では起炎剤注射から足蹠容積測定までの時間を3hとした。

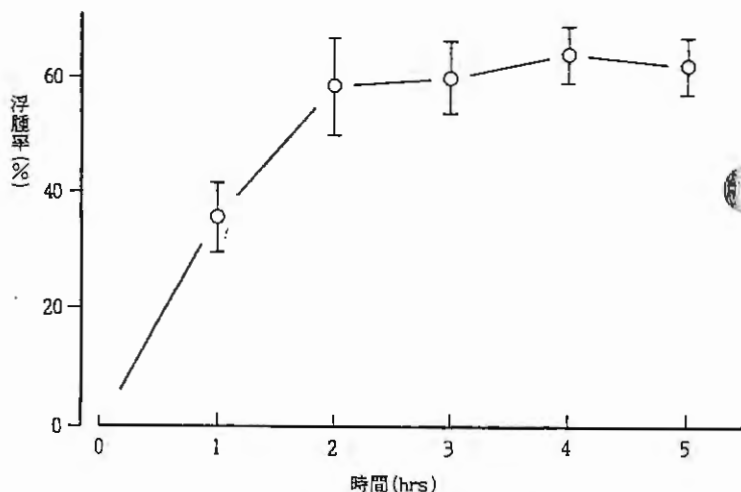


Fig. 2 カラゲニン浮腫の経時変化

2. ℓ-メントール及びサリチル酸メチルの浮腫抑制効果

基剤としてゲル基剤を用いた場合の、有効成分としてのℓ-メントール及びサリチル酸メチルの配合効果について検討した(Fig. 3)。その結果、ℓ-メントールのみを配合した場合、対照群に対する浮腫抑制率は18.0%、サリチル酸メチルのみでは23.5%で、有意な差が認められた。また両者を配合した場合の抑制率は36.2%とより強い効果がみられ、基剤のみを塗擦した群に対しても有意差が認められた。

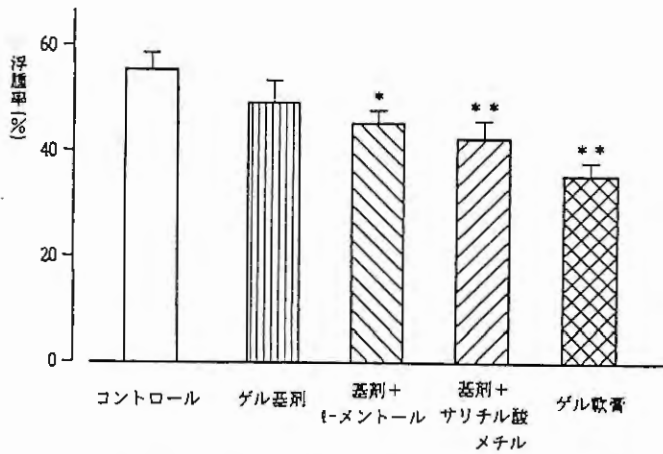


Fig. 3 l-メントール及びサリチル酸メチルの浮腫抑制効果

片側t-検定 * : P<0.05 ** : p<0.01

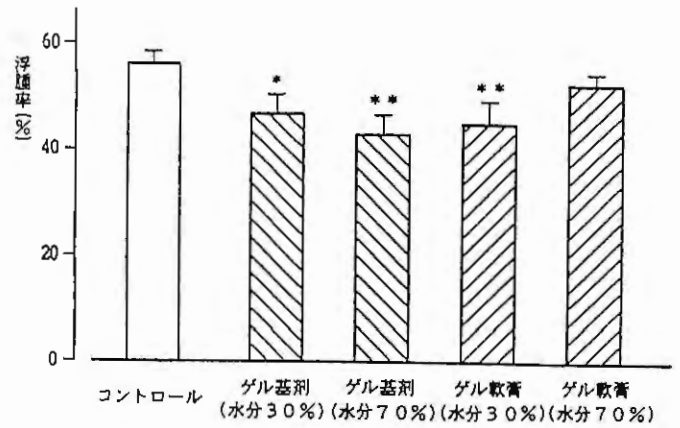


Fig. 4 浮腫抑制効果に及ぼす水分の影響

片側t-検定 * : P<0.05 ** : p<0.01

3. 浮腫抑制効果に及ぼす水分の影響

前の実験において、基剤のみでも若干の抑制傾向がみられた。そこで、軟膏中の水分が浮腫抑制効果に及ぼす影響について調べるため、水分含有量が30%と70%のゲル軟膏を調製して検討した (Fig. 4)。その結果、基剤のみでは水分量の多い方がより強い浮腫抑制効果を示した。しかし有効成分を配合したものでは、水分70%では逆にほとんど効果がみられなかった。これは、水分が多いと有効成分によって軟膏剤として非常に柔らかいものになってしまい、流れ落ちる等したため今回の方法では効果が出なかったものと考えられる。

4. ゲル軟膏と乳化軟膏との比較

有効成分及び水分の量を同一にしたゲル軟膏と乳化軟膏A、乳化軟膏B及びそれぞれの基剤について浮腫抑制効果を比較検討した。

基剤のみによる比較では、浮腫抑制率がゲル基剤で14.3%、乳化基剤Aで-3.2%、乳化基剤Bで11.5%であり、有意差はみられないものの、ゲル基剤が最も強い傾向にあった。(Fig. 5)

10%サリチル酸メチル及び5% l-メントールをそれぞれの基剤に配合した軟膏剤についての比較では、ゲル軟膏が36.2%、乳化軟膏Aが5.6%、乳化軟膏Bが29.3%の浮腫抑制率を示し、やはりゲル軟膏に最も強い作用が認められた。(Fig. 6)

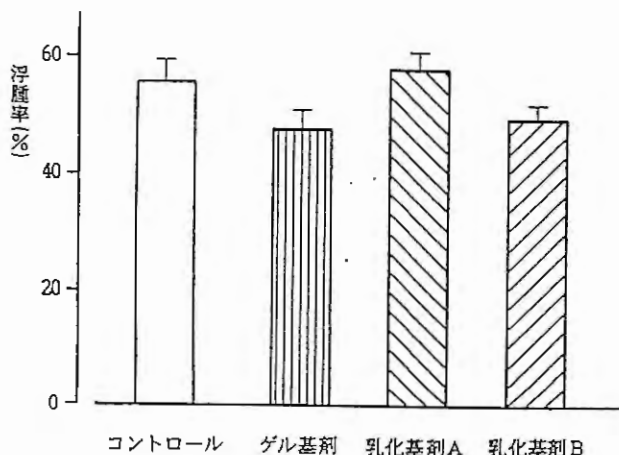


Fig. 5 各種基剤のカラゲニン浮腫に対する効果

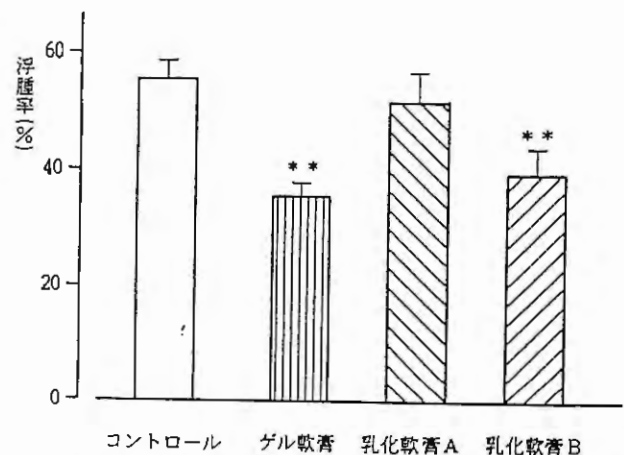


Fig. 6 各種軟膏のカラゲニン浮腫に対する効果

片側t-検定 * : P<0.05 ** : p<0.01

考 察

以上の薬理試験の結果からは、ゲル軟膏及び乳化軟膏Bが有効であるといえる。しかし製剤としてはゲル軟膏及び乳化軟膏Aは適当な硬さであったが、乳化軟膏Bは前報の結果からもわかるように硬く、使用感も良くなかった。従ってサリチル酸メチル含有の消炎軟膏剤としては、カルボキシビニルポリマーを用いたゲル軟膏が最も適していると推察できる。

文 献

- 1) 境井洋, 上川浩, 正川康明: 軟膏基剤の検討(第1報), 家庭薬研究No10 54-58 (1991)
- 2) 藤村一: 薬効の評価(1). “医薬品開発基礎講座V”, 「津田恭介, 野上寿編」, 地人書館, 東京, (1971), pp. 239-282

【原 著】

漢方製剤の品質に関する研究 (第5報)

—— 当帰芍薬散 ——

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine V

—— Toki - shakuyaku - san ——

○ 吉井美矢子
Miyako YOSHII

石田裕子
Yuko ISHIDA

中田るり子
Ruriko NAKADA

西本初博
Hatsuhiko NISHIMOTO

成川一郎
Ichiro NARIKAWA

東亜製薬株式会社 試験研究室

Research Institute, Toa Pharmaceutical Co., Ltd.

諸 言

当帰芍薬散は近年駆瘀血剤として桂枝茯苓丸などと共によく用いられている漢方処方である。当帰芍薬散はその原典「金匱要略」に「当帰、芍薬、茯苓、白朮、沢瀉、川芎、右六味杵為散取方寸七酒和日三服」¹⁾とあるように、元来は「散」として服用されていた。しかし、現在では「湯剤」、「エキス剤」として服用されることも多い。当帰芍薬散構成生薬中には当帰、朮、川芎など精油成分を多く含む生薬が配合されている。そこでわれわれは当帰芍薬散の製剤化を目的として、精油成分及び芍薬中の指標成分ペオニフロリンの安定性等につき検討した結果を報告する。

実験の部

1. 被験材料

生 薬：当帰、川芎（以上和産）、芍薬、茯苓、蒼朮、白朮、沢瀉、（以上中国産）はいずれも市販の局方品を用いた。

当帰芍薬散末：上記生薬の粉末を用い、当帰3、芍薬6、茯苓4、蒼朮（白朮）4、沢瀉4、川芎3の割合で混合したもの

当帰芍薬散末の造粒試作製剤：

乾式造粒製剤：当帰芍薬散末に賦形剤を加え、乾式造粒法により製した試作製剤

湿式造粒製剤：当帰芍薬散末に造粒液を加え、湿式造粒法により顆粒を製し、60°の棚式乾燥機で乾燥して製した試作製剤

保 存 方 法：厚さ9 μmのアルミニウム包材で分包し、室温及び医薬品製造指針の加速条件（40°，75%R.H.）下で6箇月間保存した。

当帰芍薬散の湯液：当帰芍薬散構成生薬24g（1日量）に水480mlを加え、約半量になるまで加熱し、布ごしし、ろ過したもの

市販当帰芍薬散製剤：A, B, C ————— 生薬末を用いて製した製剤
 D, E, F, G ——— エキスを用いて製した製剤（エキス製剤）
 H, I ————— エキス及び生薬末を用いて製した製剤
 東亜 ————— 東亜製薬(株)製の乾式造粒試作品

2. 試験方法

1) 精油成分のGCパターン比較

分析法：各被験材料（1/6日量）にエーテル100mlを加えて30 min振り混ぜて抽出し，抽出液は減圧下室温でエーテルを留去し，残留物にクロロホルム2 mlを加えて溶かし，試料とした。

GC条件：カラム OV-17 φ3 mm×2 m ガラスカラム
 検出器 FID
 カラム温度 80° で10 min 保持した後、毎分5° ずつ200° まで昇温し、その後10 min 保持する。

2) 芍薬中のペオニフロリンの定量方法

分析法：各被験材料（1/12日量）に50%メタノール40mlを加えて30 min超音波抽出し，正確に50mlとし，遠心分離し，HPLCの試料とした。

HPLC条件：カラム Cosmosil 5 C₁₈-AR φ4.6 mm×150 mm
 検出器 紫外線吸光光度計（測定波長：232 nm）
 移動相 H₂O・CH₃CN・AcOH（85:15:1）
 流速 1.0ml/min.
 カラム温度 室温

実験結果

1. 精油成分のGCパターン比較

1) 当帰芍薬散構成生薬中の精油成分のGCパターン

当帰芍薬散構成生薬中，精油成分の多い朮（蒼朮，白朮）川芎及び当帰それぞれのエーテル抽出液についてのGCパターン分析結果をFig. 1に示した。

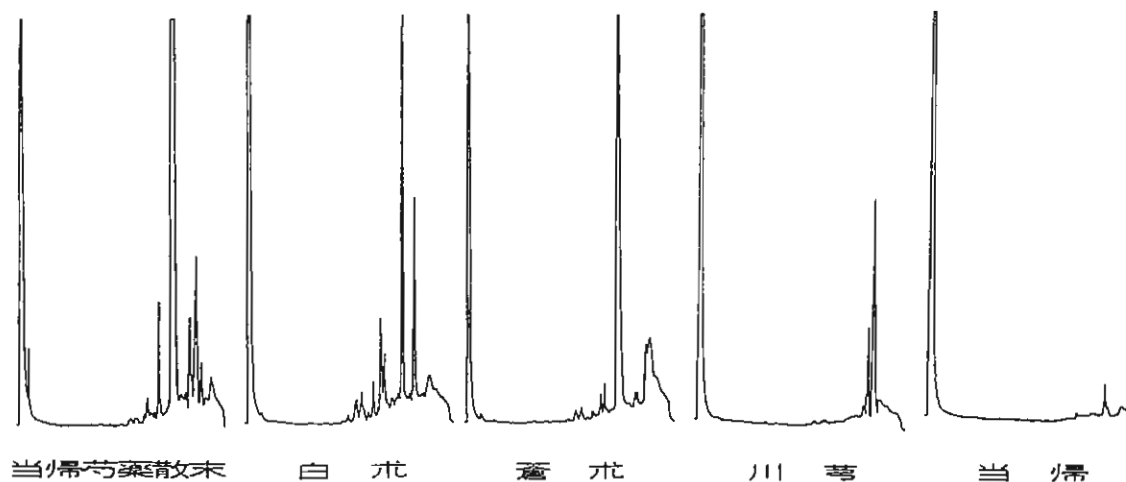


Fig. 1 当帰芍薬散構成生薬の精油成分 GC パターン

蒼朮のチャートでは保持時間約32~33 minに hinesol 及び β -eudesmol のピークが認められ、白朮には32~33 minに、又、川芎には37~38 min、当帰には38 minにそれぞれ固有のピークが認められた。これらは当帰芍薬散末の精油成分のGCパターンに現れるピークとよく一致した。

2) 造粒試作製剤の精油成分のGCパターン

当帰芍薬散末の造粒試作製剤の精油成分のGCパターンをFig. 2に示した。

乾式造粒製剤及び湿式造粒製剤いずれのチャートにおいてもFig. 1に示した各生薬固有のピークが確認され、更にピークの高さから大部分の精油成分の残存が確認された。また、製剤方法の違いによる差はほとんど認められなかった。

3) 当帰芍薬散の湯液中の精油成分のGCパターン

当帰芍薬散の湯液1日量から精油成分をエーテル抽出し、造粒試作製剤と同様に操作し、精油成分のGCパターンを求めた。朮として、白朮を用いた場合または、蒼朮を用いた場合のそれぞれの湯液の精油成分のGCパターンをFig. 3に示した。

湯剤の場合は、生薬末を用いた製剤の場合の4倍量の生薬を用いているにもかかわらず、いずれの場合も4~5個の比較的小さいピークが認められたのみで、精油成分のほとんどが消失した。

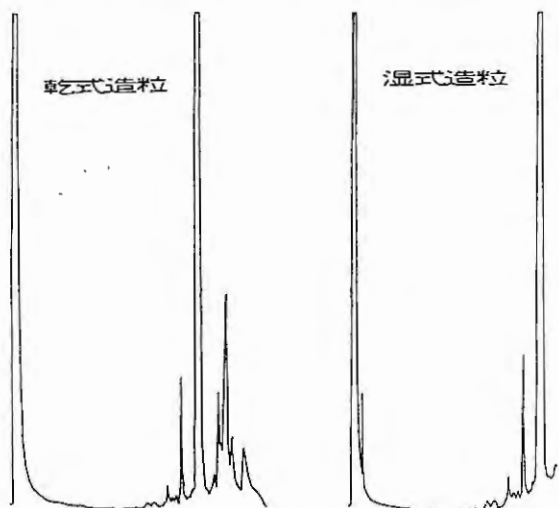


Fig. 2 当帰芍薬散生薬末製剤の精油成分 GC パターン

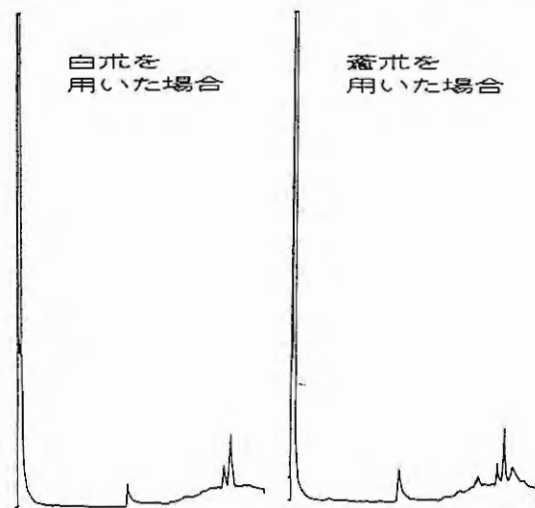


Fig. 3 当帰芍薬散湯液の精油成分 GC パターン

2. 当帰芍薬散末の造粒試作製剤の経時的変化

1) 精油成分のGCパターンの経時的変化

造粒試作製剤は厚さ9 μm のアルミニウム包材で分包し、室温及び医薬品製造指針の加速条件(40°, 75% R.H.)下でそれぞれ1箇月、3箇月、6箇月間保存し、造粒試作製剤の製造直後と6箇月後の精油成分のGCパターンについて比較し、その結果をFig. 4に示した。

これによると製造直後も加速条件下6箇月後もGCパターンにほとんど差は認められなかった。

2) 芍薬中の指標成分ペオニフロリンの経時的変化

造粒試作製剤は厚さ9 μm のアルミニウム包材で分包し、室温及び医薬品製造指針の加速条件(40°, 75% R.H.)下でそれぞれ1箇月、3箇月、6箇月間保存し、造粒試作製剤の製造直後、1箇月、3箇月及び6箇月後のペオニフロリンの経時的変化について比較し、その結果をTable. 1に示した。これによると製造直後も加速条件下6箇月後も定量値にほとんど差は認められなかった。

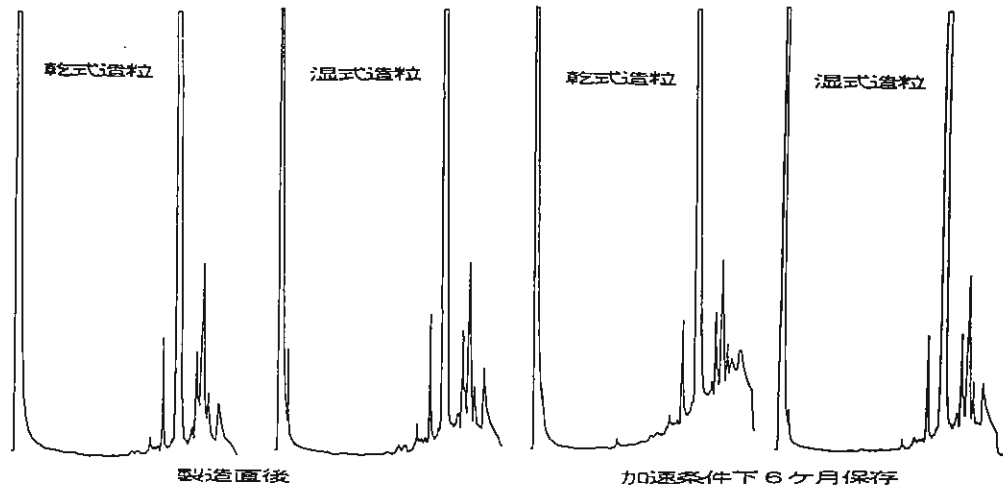


Fig. 4 生薬末製剤中の精油成分の安定性

試作製剤名	保存条件	製造直後	1箇月後	3箇月後	6箇月後
乾式造粒製剤	室温	36.8	36.7	37.0	36.6
	加速条件		36.6	37.1	36.8
湿式造粒製剤	室温	36.6	36.7	36.8	36.7
	加速条件		36.5	36.7	36.7

Table. 1 試作造粒製剤1日量のペオニフロリン定値量(mg)

3. 市販当帰芍薬散製剤中の成分比較

1) 市販当帰芍薬散製剤1日量中の生薬量

各市販当帰芍薬散製剤に使用されている生薬量(1日量)についてTable. 2に示した。

生薬末を用いた製剤の生薬使用量(1日量)は3.0~6.0g, エキス製剤の生薬使用量(1日量)は11.0~22.0g, また, 生薬末とエキスを用いた製剤の生薬使用量(1日量)は6.6~15.0gで, エキスを用いた製剤の場合は生薬末を用いた場合の約4倍の生薬使用量となっている。

原料区分 メーカー	生薬末のみ			処方エキス				生薬末+処方エキス				
	東	亜		D	E	F	G	H		I		
		A	B	C	エキス生薬量				生薬末	処方生薬	生薬末	処方生薬
芍薬	1,500	1,500	546	1,125	3,020	4,000	2,000	4,000	750	3,000	450	1,200
茯苓	1,000	1,080	546	750	3,020	4,000	2,000	4,000	500	2,000	300	800
薏苡	1,000	1,080	546	—	3,020	4,000	2,000	—	—	—	300	800
白朮	—	—	—	750	—	—	—	4,000	500	2,000	—	—
沢瀉	1,000	780	546	750	3,020	4,000	2,000	4,000	500	2,000	300	800
当帰	750	780	409	562.5	2,270	3,000	1,500	3,000	375	1,500	225	600
川芎	750	780	409	562.5	2,270	3,000	1,500	3,000	375	1,500	225	600
小計					16,620	22,000	11,000	22,000	3,000	12,000	1,800	4,800
エキス量	(5,500)				6,800	2,000	1,200	3,750		1,500		560
合計	6,000	6,000	3,002	4,500	16,620	22,000	11,000	22,000	15,000	6,600		
剤型	顆粒	散剤	錠剤	顆粒	細粒	顆粒	錠剤	錠剤	顆粒		丸剤	
回収率(%)	(25)				40.9	9.1	10.9	17.1		12.5		11.6

Table. 2 市販当帰芍薬散製剤1日量中の構成生薬量(mg)

2) 市販当帰芍薬散製剤の精油成分のGCパターン比較

生薬末を用いた製剤（東亜, A, B, C），エキス製剤（D, E, F, G），生薬末及びエキスを用いた製剤（H, I）それぞれの精油成分のGCパターンをFig. 5に示した。

Fig. 5によれば生薬末を用いた製剤（東亜, A, B）では20～30個のピークが認められ、ピーク高さは当帰芍薬散末に類した。エキス製剤（D, E, F, G）では湯液の精油成分のGCパターンと同様に、4～5個の小ピークが認められたのみであった。エキス及び生薬末を用いた製剤（H, I）ではTable. 2に示す通りエキスの割合が多い製剤ではエキス製剤ではエキス製剤のチャートに類し、生薬末の割合の多い製剤においては一部ピークが認められたが、ピーク高さは低かった。

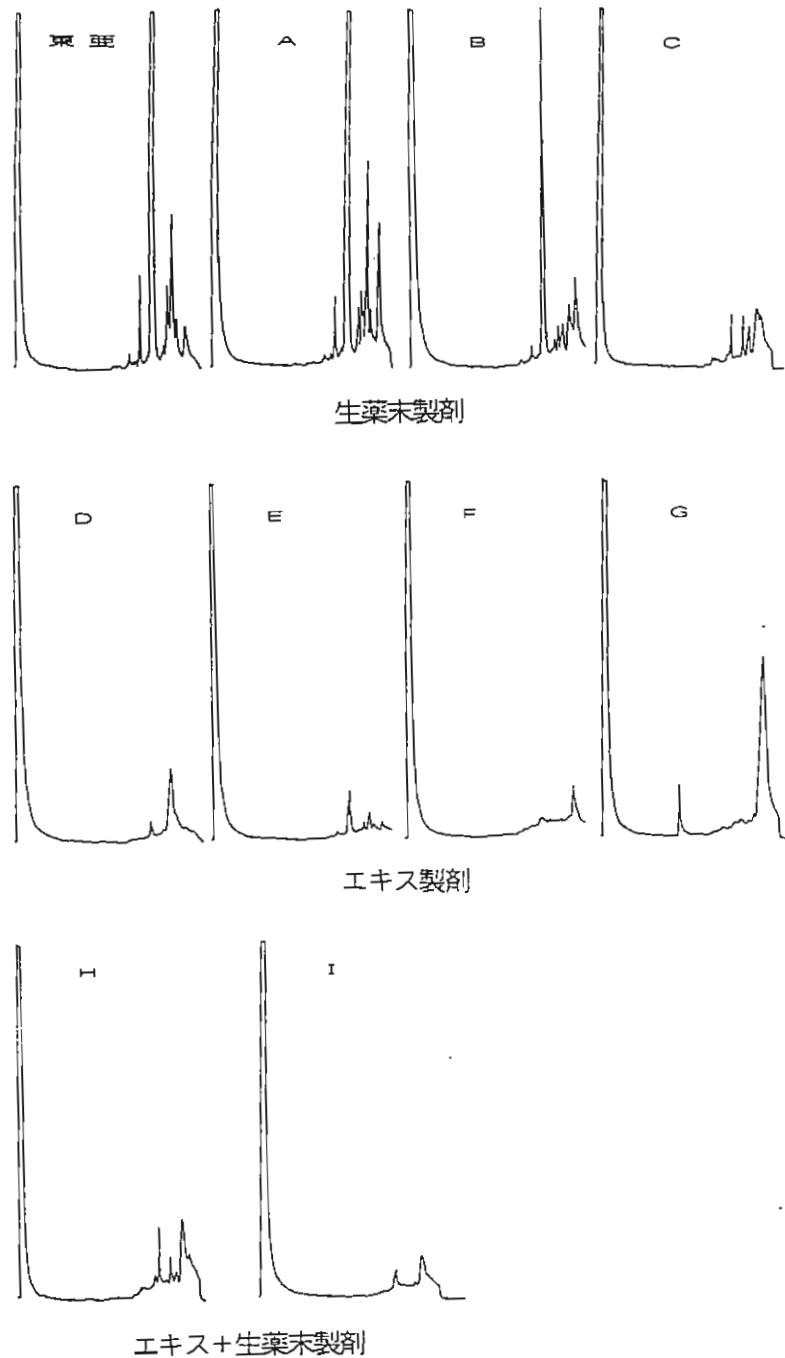


Fig. 5 市販当帰芍薬散の製剤の精油成分 GC パターン

3) 市販当帰芍薬散製剤1日量中のペオニフロリン含有量

市販当帰芍薬散製剤1日量中のペオニフロリン含有量を Table. 3 に示した。

Table. 3 によれば製剤原料として生薬末を使用した製剤(東亜, A, B, C)では製剤1日量中のペオニフロリン含量は19.0~37.1mgで芍薬中のペオニフロリン含有率に換算すると2.3~3.5%であった。エキス製剤(D, E, F, G)では1日量中のペオニフロリン含量は19.3~54.5mgであり、芍薬からエキスへのペオニフロリンの移行率を60%として芍薬中のペオニフロリン含有率に換算してみると1.0~3.0%となった。また、生薬末とエキスを用いた製剤ではペオニフロリン含量は30.6~45.5mgであった。

原料区分 メーカー	生薬末			エキス				生薬末+エキス		
	東亜	A	B	C	D	E	F	G	H	I
製剤1日量中の芍薬量(mg)	1,500	1,500	546	1,125	3,020	4,000	2,000	4,000	3,750	1,650
製剤1日量中のペオニフロリン含有量(mg)	37.1	35.0	19.0	31.4	54.5	23.5	19.3	28.6	45.5	30.6
製剤に使用された芍薬中のペオニフロリン含有率(%)	2.5	2.3	3.5	2.8	1.8 (3.0)	0.6 (1.0)	1.0 (1.7)	0.7 (1.2)	1.2 (1.8)	1.9 (2.6)

()内はペオニフロリンのエキスへの移行率を60%として換算した値

Table. 3 市販当帰芍薬散製剤1日量中のペオニフロリン含有量

考 察

当帰芍薬散末の乾式造粒製剤, 湿式造粒製剤の精油成分のGCパターンからは造粒方法の違いによるパターン変化は認められず, 湿式造粒時に使用する造粒液, 乾燥温度, 乾燥時間は製剤の品質にはほとんど影響しないものと考えられる。また, 室温及び加速条件下での6箇月保存後においても, 精油成分のGCパターンは製造直後とほとんど変化は認められずこれら製剤の一般流通環境下における安定性が確認された。このことは生薬末を原料とした市販当帰芍薬散製剤の精油成分のGCパターンに精油成分のピークが多く認められることとよく一致した。一方, 当帰芍薬散の湯剤においては精油成分のGCパターンのピーク数, ピーク高さとも原料生薬に比較して著しく減少しており, このことは市販のエキス製剤の精油成分のGCパターンとよく一致した。

ペオニフロリン含量についても, 当帰芍薬散末の各造粒製剤の場合は製造直後と加速条件下6箇月保存品はいずれも芍薬中ペオニフロリン含有率として2.5%で差は認められず安定であった。ところが市販製剤においては芍薬中ペオニフロリン含有率に換算した場合, 生薬末を原料とした製剤では2.3~3.5%の含有率が認められたが, エキス製剤ではエキス化の際の移行率を60%としてもペオニフロリン含有率が1.0~1.2%とかなり低くエキス製剤においては製造工程上もしくは生薬の使用に問題があるものと考えられる。

原典「金匱要略」に示されているように当帰芍薬散は元来「散」として用いられた処方であり, その構成生薬として精油成分を多く含む朮, 川芎, 当帰が配合されていることに留意し製剤化に取り組む必要があると考える。

文 献

- 1) 張中景: 金匱要略, 明刊兪子木本影印本, 燎原, 東京, 1977

コルヒチン含有製剤の皮膚透過性

Permeability of Colchicine Ointments

松 井 竹 史 石 黒 幸 男 ○ 折 橋 正 浩
Takeshi MATSUI Yukio ISHIKURO Masahiro ORIHASHI

テイカ製薬株式会社 開発部
Teika Pharmaceutical Co., Ltd. Reserch and Development Division

緒 言

コルヒチンは北アフリカ～ヨーロッパ原産のユリ科のイヌサフランの種子、球茎あるいは花から単離されたアルカロイドの一種であり、古来より痛風発作時の治療薬として使用されてきた。

このコルヒチンは微小管結合タンパク質に結合し、チューブリンが重合して微小管となるのを妨げることにより多核白血球の細胞を破壊し、結果的に痛風の発症を抑えるとされている。しかしながら、経口投与した場合に悪心、嘔吐、腸痙攣、下痢等の副作用が現れるため現在は他の痛風治療薬が用いられているのが現状である。

当社ではこのコルヒチンを経皮吸収製剤とすることにより副作用を軽減し、その有用性を高めたいと考え、まずコルヒチンの軟膏剤を数種試作しその皮膚透過性を検討し若干の成績を得たので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 試 料

実験にはコルヒチン、エタノール、ジエチレングリコール、ミリスチン酸イソプロピル、プロピレングリコール、アジピン酸ジイソプロピル、モノラウリン酸プロピレングリコール、尿素、クロタミトン、乳酸、プロピレングリコール400、デキサメタゾンおよびリンデロンV軟膏のほか、Table. 1 およびTable. 2～6 に示した軟膏剤およびゲル剤を用いた。

2) 使用動物

Wistar 系雄性ラットを室温21～25°，湿度40～80%の飼育室にて1週間以上の予備飼育の後、健全なものを用いた。

3) 摘出皮膚の調整法

実験の前日にラットの腹部皮膚を損傷しないように除毛し、実験の当日に経皮吸収実験用のセルと皮膚を接着剤で接着し摘出した。

Table. 1 クロタミトン含量 軟膏処方(g/100g)およびコルヒチンの皮膚透過性 12時間後

Lot.No.	FK01C0	FK02C0	FK03C0	FK04C0	FK05C0	FK06C0	FK07C0
クロタミトン	0	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0	15.0
コルヒチン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
白色ワセリン	25						
ステアリルアルコール	22						
グリセリン	12	75.25	75.15	74.75	74.25	70.25	60.25
p-ヒドロキシ安息香酸メチル	0.025						
p-ヒドロキシ安息香酸プロピル	0.025						
EDTA-2Na	0.2						
精製水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
合計	100	100	100	100	100	100	100
透過量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0.59	0.49	0.45	0.72	0.75	2.22	2.45
透過率 (%)	2.9	1.9	2.1	2.9	3.8	9.4	8.8
Flux ($\text{ng}/\text{ca}^2 \text{ hr}$)	49.2	40.8	37.5	60.0	62.5	185.0	204.2

Table. 2 軟膏1の処方 (g)

コルヒチン	0.1
クロタミトン	10
プラスチックベース	89.9
合計	100

Table. 3 軟膏2の処方 (g)

コルヒチン	0.1
クロタミトン	10
白色ワセリン	5.0
その他基剤	適量
合計	100

Table. 4 軟膏3の処方 (g)

コルヒチン	0.1
クロタミトン	10
白色ワセリン	40
セチルアルコール	18
その他基剤	適量
精製水	21.4
合計	100

Table. 5 ゲル剤1の処方 (g)

コルヒチン	0.1
クロタミトン	10
カルボキシビニルポリマー	1.5
エタノール	40
その他基剤	適量
精製水	36.4
合計	100

Table. 6 ゲル剤2の処方 (g)

コルヒチン	0.1
クロタミトン	10
カルボキシビニルポリマー	1.5
その他基剤	適量
精製水	76.9
合計	100

2. 実験方法

1) コルヒチンの皮膚透過実験法

摘出した皮膚を2チャンバー拡散セルに挟み、ドナーセルに種々のコルヒチン溶液またはコルヒチン製剤を投与し、レセプターセルには等張リン酸緩衝液 (pH7.4) を3 ml 加え恒温槽中で37° に保った。経時的にレセプターセルよりサンプリングし、その都度同じ溶媒を同量加え、容積を一定に保った。

2) コルヒチンの定量方法

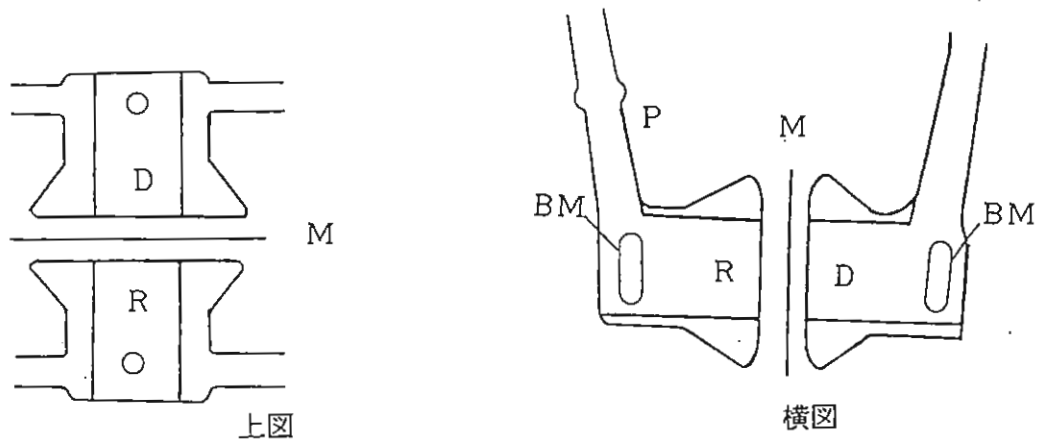
コルヒチンの定量は HPLC により行い、その条件は Table. 7 に示した。

Table. 7 HPLCの条件

カラム	マイクロボンドバックC ₁₈ (粒径 10μm)
カラム温度	室温
移動相	水:アセトニトリル=1:1
流量	1ml/min
検出波長	UV 245 nm

3) コルヒチンの透過促進剤のスクリーニング方法

Fig. 1 に示したセルを用いて実験を行った。ドナーセルにコルヒチン濃度が500 μg/ml 各試料が10% w/w の水溶液又は懸濁液を3 ml 加え、両側からスターラーをあて攪拌子を用いて、セル中の液を攪拌した。

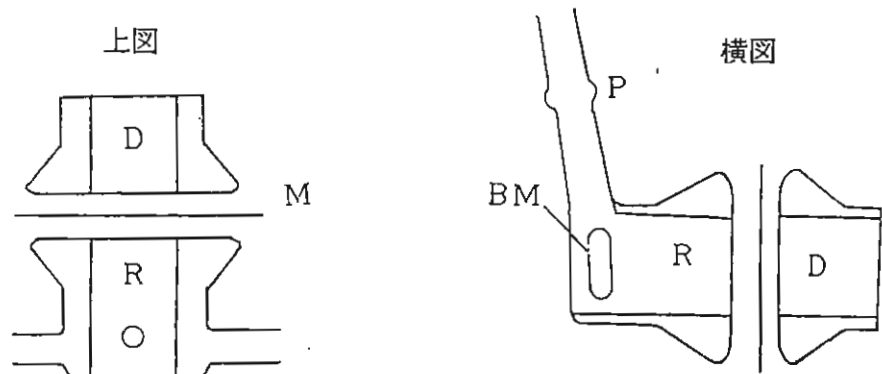


D ; ドナーセル, R ; レセプターセル, M ; ラットの皮膚
P ; サンプリング口, BM ; 攪拌子

Fig. 1 2チャンバー横型拡張セル

4) 親水軟膏剤からのコルヒチンの皮膚透過性試験

処方は Table. 1 に示した。軟膏剤を約50mg 投与し Fig. 2 に示したセルを用いて実験を行った。



D ; ドナーセル, R ; レセプターセル, M ; ラットの皮膚
P ; サンプリング口, BM ; 攪拌子

Fig. 2 横型拡張セル

5) 種々の軟膏剤及びゲル剤からのコルヒチンの皮膚透過性試験

処方 は Table. 2 ~ 6 に示した。各軟膏剤を約50mg投与し、Fig. 2 に示したセルを用いて実験を行った。

6) コルヒチンの白血球遊走抑制作用

ラットの背部の毛をバリカンで刈り、その皮下に空気を5 ml 注入し、24 h 後に作成した空気嚢にコルヒチン及びデキサメタゾンを0.1mg/ml となるように溶



Fig. 3 コルヒチンの抗炎症作用の確認試験 実験スケジュール

解した2%CMC溶液を5 ml 注入した。その3 h 後と6 h 後に浸出液を0.2ml ずつ採取した。採取した浸出液40 μl を生理食塩水1 ml に混和した後、0.05%のトロパンプルーを1 ml 加え混和染色後、Bürker-Türk 計算盤を用いて計算した (Fig. 3)。

薬物投与群と control 群間の比較はt-検定により行った。

7) コルヒチンゲルの白血球遊走に及ぼす効果

ラットの背部皮下に空気を5 ml 注入し、24 h 後に同じ部位に2%CMC液5 ml を注入した。CMC液注入の3 h 前、注入直後、注入の3 h 後の計3回軟膏剤を塗布する。1回当たりの投与量は薬物量として

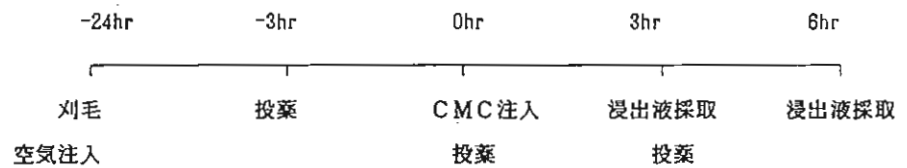


Fig. 4 コルヒチン含有ゲル製剤の抗炎症効果 実験スケジュール

約30 μg, 塗布面積は24cm², 擦り込み回数は30回とした。塗布後投与面をポリエチレンで覆った (Fig. 4)。

薬物投与群と control 群間の比較はt-検定により行った。

実験結果

1) コルヒチンの透過促進剤のスクリーニングの結果

現在、経皮吸収促進効果があるといわれている10種類の物質についてスクリーニングした結果を Table. 8 に示した。この結果12 h 後におけるコルヒチンの累積放出率は尿素、クロタミトン、乳酸を添加した試料に促進効果が認められた。特にクロタミトンが優れた透過促進剤になるものと考えられた。

2) 親水軟膏剤からのコルヒチンの皮膚透過性試験

クロタミトンの配合量を変えて7種の親水軟膏剤を作り、製剤中からのコルヒチンの皮膚透過性に及ぼす効果を検討した (Table. 1)。その結果クロタミトンの配合量が5.0%以下においては促進効果が認められなかったが、10.0及び15.0%配合した製剤ではコルヒチンの皮膚透過性が増大した。しかし、この2製剤の間には大きな差は認められなかった。これより製剤にした場合クロタミトンがコルヒチンの透過促進効果を示すのは10%以上配合された時と考えられる。

試料	透過率 (%) (対照比%)		
	3時間	6時間	12時間
対照	0.036 (100)	0.086 (100)	0.394 (100)
エタノール	0.004 (11.1)	0.090 (104.7)	0.108 (27.4)
ジエチレングリコール	N.D.	N.O.	0.007 (1.8)
ミリスチン酸イソプロピル	N.D.	0.023 (26.7)	0.077 (19.5)
プロピレングリコール	N.D.	0.008 (9.3)	0.140 (35.5)
アジピン酸ジイソプロピル	N.D.	0.097 (112.8)	0.364 (92.4)
モノラウリン酸ポリエチレングリコール	0.010 (27.8)	0.122 (141.9)	0.491 (124.6)
尿素	0.028 (77.8)	0.132 (153.5)	0.666 (169.0)
クロタミトン	0.197 (547.2)	0.619 (719.8)	2.105 (534.3)
乳酸	0.002 (5.6)	0.188 (218.6)	1.283 (325.6)
ポリエチレングリコール	0.016 (44.4)	0.040 (46.5)	0.104 (26.4)

N.D.:Not Detectable

Table. 8 コルヒチンの皮膚透過性のスクリーニング

3) 種々の軟膏剤およびゲル剤からのコルヒチンの皮膚透過性試験

ゲル剤1からのコルヒチンの累積透過率は他の製剤に比べて著しく高く、3h後で26.97%、6h後で55.08%、12h後で80.77%であった (Fig. 5)。

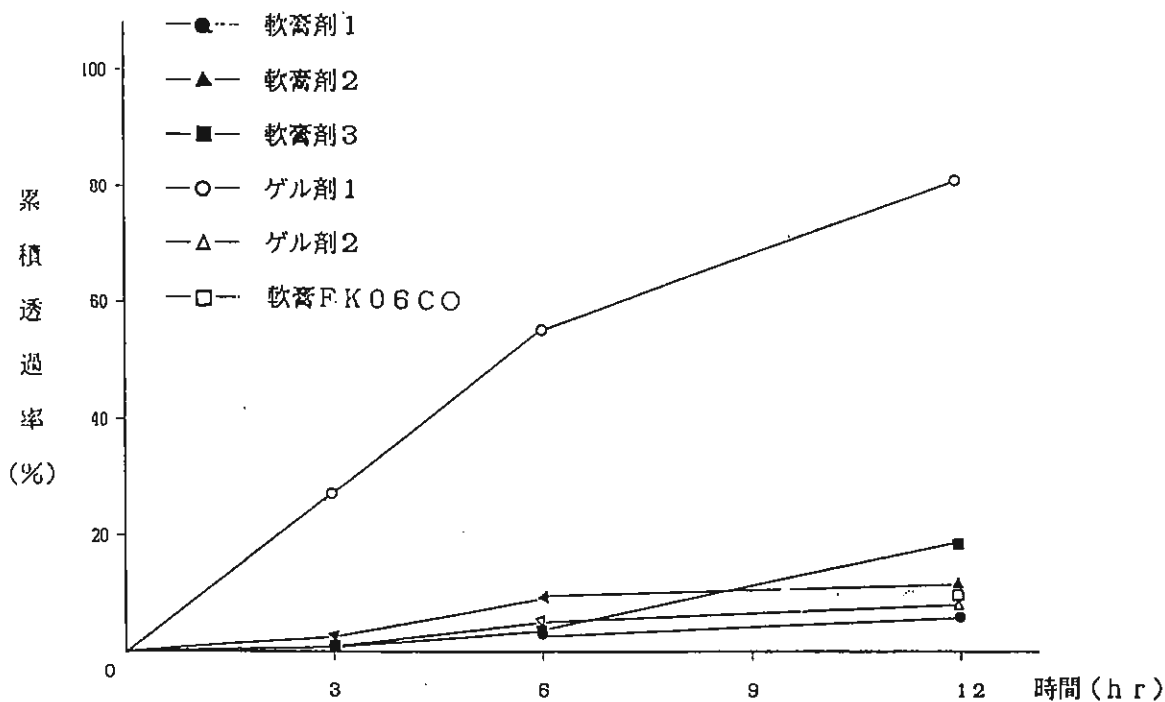


Fig. 5 種々の軟膏剤およびゲル剤からのコルヒチンの皮膚透過性

4) コルヒチンの白血球遊走抑制作用

コルヒチンを溶解したCMC液中への白血球遊走数は3h後および6h後において、それぞれcontrolに比べ有意に抑制された。また対照薬としてデキサメタゾンを溶解したCMC液中への白血球の遊走数も有意に抑制された。(Table. 9)。

5) コルヒチンゲルの白血球遊走に及ぼす効果

コルヒチンゲルを塗布した群においては6h後に、またリンデロンV軟膏を塗布した群では3h後及び6h後にそれぞれcontrolに比べ有意に白血球の遊走数が抑制された。(Table.10)。

Table. 9 コルヒチン嚢内投与による白血球遊走抑制作用

薬物	薬物投与量 (mg/pouch)	数	白血球数/mm ³ × 10 ³			
			3hr		6hr	
			平均 ±S.E.	抑制率(%)	平均 ±S.E.	抑制率(%)
control		6	0.44 ±0.02		11.89 ± 2.14	
コルヒチン	0.5	6	0.02** ±0.01	95.5	0.49 ** ± 0.09	95.9
デキサメタゾン	0.5	6	0.17** ±0.05	61.4	2.78 ** ± 0.26	76.6

**p<0.01 controlに対する有意差

Table. 10 コルヒチン含有ゲル製剤の抗炎症効果

薬物	薬物 投与量 (μg)	数	白血球数/mm ³ × 10 ³			
			3hr		6hr	
			平均 ±S.E.	抑制率(%)	平均 ±S.E.	抑制率(%)
control		6	2.02 ±0.40		15.41 ± 0.32	
0.1%コルヒチンゲル	30	6	2.04 ±0.70	-1.0	10.39* ± 1.28	32.5
0.12%リンデロンV軟膏 (吉草酸ベタメタゾン)	30	6	0.87* ±0.35	56.9	8.97* ± 0.85	41.8

* p<0.05 controlに対する有意差

考 察

液系でのスクリーニングによりクロタミトンにコルヒチンの皮膚透過促進効果のあることが認められ、実際に製剤にした場合においてもその効果が認められた。しかしながら、ゲル剤1にみられるコルヒチンの高い皮膚透過率はクロタミトンのみによる効果ではなく基剤中の他の物質の影響があると考えられる。

CMC嚢法によりゲル剤1が白血球の遊走を有意に抑制したことからコルヒチンが痛風治療を目的とする外用剤となりえる可能性が示唆された。今後、経皮吸収貼付剤としての研究を進めていきたい。

【原 著】

温感成分含有パップ剤のヒト血流に及ぼす影響

Effect of Poultice Containing Capsaicin
Congeners on Cutaneous Blood Flow in Human

上 田 俊 則 笹 倉 貢
Toshinori UEDA Mitsugu SASAKURA

リードケミカル株式会社 研究部
Research Department, Lead Chemical Co., Ltd.

諸 言

現在、肩こりや筋肉痛の対症療法として、温熱療法やマッサージによる局所血液循環の改善が行われており、トウガラシエキスやノニル酸ワニルアミドなどの温感成分配合のパップ剤も同様の目的で用いられている。

これまで、温感型パップ剤開発に当たり、温感成分配合量の決定には、主として官能試験（貼付時の温感の強度）のアンケート調査を参考にしてきた。ところが、温感の閾値には個人差があり、また、温感と実際の血流増加効果との関連性が明らかでないことから明確な判断はむずかしい実状にあった。

今回、温感型パップ剤の評価方法としてレーザー血流計を用い、ヒトについて温感と血流との関連性ならびに温感成分配合量の血流に及ぼす影響について検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 使用機器

ヒト血流の測定には半導体レーザー式血流計（バイオメディカルサイエンス（株）製、LBF-III）を用いた。

2. 被験薬剤

被験薬剤A、B、Cの有効成分については、Table. 1に示した。温感成分がA、B、Cにおいてほぼ4：2：1となるように設定した。それぞれ膏体を支持体10cm×14cmあたり14gの割合で展延して温感型パップ剤を調製し被験薬剤とした。

3. 被験者

当社従業員の中から無作為に選出して同意の得られた健常人男女17名（年齢22～59歳）を対象とした。

4. 試験方法

被験薬剤の中心部に直径約2 mmの穴を開け、被験者の肩に貼付した。次に被験薬剤の穴にレーザー血流計のセンサーを先端部が皮膚面に接するようにセットし、ビニールテープで被験薬剤ともに被験者の肩に固定した。

直ちに血流の変化を記録計により1 h後まで記録し、同時にTable. 2に示すアンケート用紙を用いて5 min毎に温感の程度を記録させた。なお、被験者は測定中、室温22~25°で座位に姿勢を保った。

被験薬剤		A	B	C
有効成分				
温感成分	ノニル酸ワニリルアミド	0.04	0.02	0.01
	トウガラシエキス (カプサイシン)	0.5 (0.01)	0.25 (0.005)	0.2 (0.004)
消炎・鎮痛剤	サリチル酸メチル	1.0	1.0	1.0
	サリチル酸グリコール	0.5	0.5	0.5
局所刺激剤	d l-カンフル	1.0	1.0	1.0
	l-メントール	0.3	0.3	0.3
抗ヒスタミン剤	サリチル酸 ジフェンヒドラミン	0.05	0.05	0.05

単位：g

Table. 1 被験薬剤（膏体100 g中の有効成分量）

性別： _____

アンケート

年齢： _____

5分毎に記入をお願いします。

(温感指数)

10. はがしたいくらい熱い	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9. たいへん熱い	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8. 熱い	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7. 少し熱い	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6. 熱みを感じ始める	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5. ちょうどよい	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4. やや物足りない	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3. 温感を感じるが物足りない	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2. わずかに温感を感じる	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1. 冷感と区別が無い	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

(分)

Table. 2 アンケート様式

結果及び考察

1. 温感と血流との関連性

パップ剤Aを用いて温感の強度と血流との関連性につき検討した結果を Table. 3 に示した。薬剤貼付時から血流増加効果が発現するまでの時間（以下「発現時間」）では、0～44 min，貼付前血流量に対する最大血流量比（以下「血流増加率」）では、3.7～33.6倍の個人差が認められた。一方、血流量の経時的推移にも著明な個人差が認められ、今回の試験結果では5種類のパターンに大別できると考えられた。各パターンの概略については Table. 4 に、それぞれの代表例については Fig. 1～5 に示した。

氏名	年齢	性別	発現時間 (分)	血流増加率 (倍)	血流最大値	血流最大時間 (分)	最大温感指数
S. G.	22	♂	40	3.7	88	58	9
M. T.	22	♀	29	11.8	94	52	9
H. Y.	23	♀	14	25.8	258	36	9
N. N.	27	♀	14	14.1	282	33	10
T. U.	27	♂	3	7.6	302	27	5
T. U.	28	♂	25	17.2	412	60	8
S. K.	30	♂	20	4.6	92	60	7
M. M.	32	♂	24	5.8	256	60	10
R. T.	38	♂	20	21.0	294	80	7
M. K.	39	♂	12	12.0	144	48	10
A. N.	40	♀	25	5.0	60	60	8
M. M.	42	♀	20	19.3	232	54	10
Y. A.	42	♀	13	33.6	336	60	9
N. H.	54	♂	0	6.0	168	60	7
E. M.	57	♀	5	16.7	200	80	7
Y. N.	57	♀	44	6.7	80	60	3
T. T.	59	♂	11	8.3	200	46	8
最大	-	-	44	33.6	412	60	10
最小	-	-	0	3.7	60	27	3

Table. 3 温感強度と血流増加効果

パターン	タイプ
I	25～30分付近より効果が発現し、その後、60分まで上昇し続けるタイプ
II	15分付近から、急激に血流が増加し、その後ほぼプラトーになるタイプ
III	20分付近から効果が現れ、一度ピークに達した後、徐々に下がり続けるタイプ
IV	貼付直後より効果が現れ、そのまま血流が維持されるタイプ
V	わずかに血流への影響が見られる程度のもので、効果が現れにくいタイプ

Table. 4 血流増加効果発現パターン

Fig. 1 パターンI

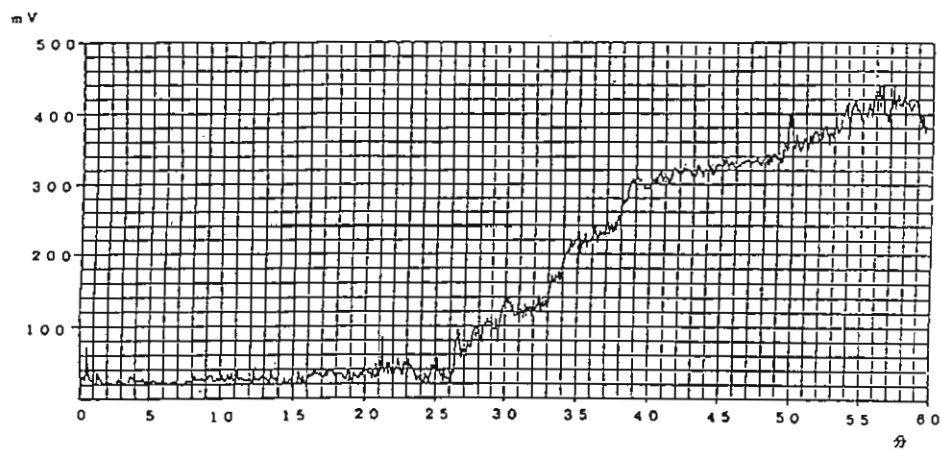


Fig. 2 パターンII

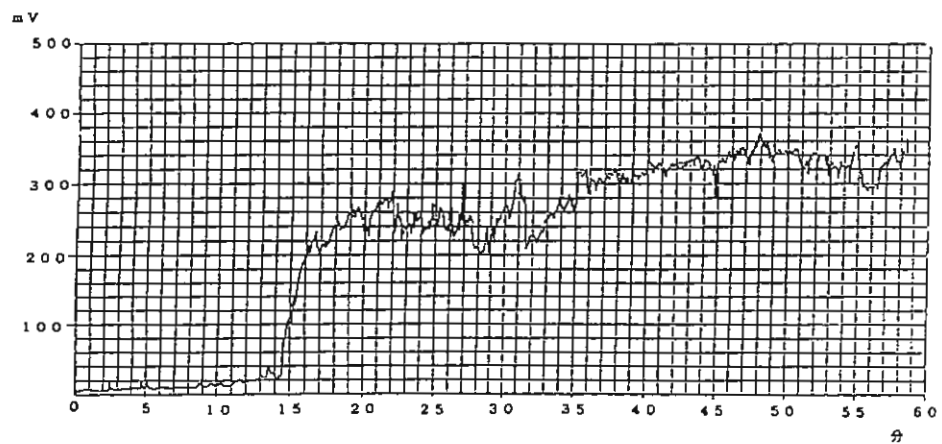


Fig. 3 パターンIII

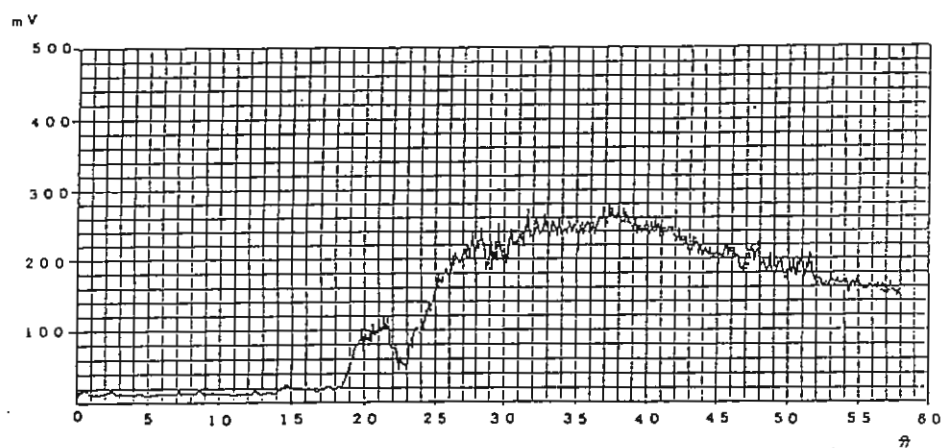


Fig. 4 パターンIV

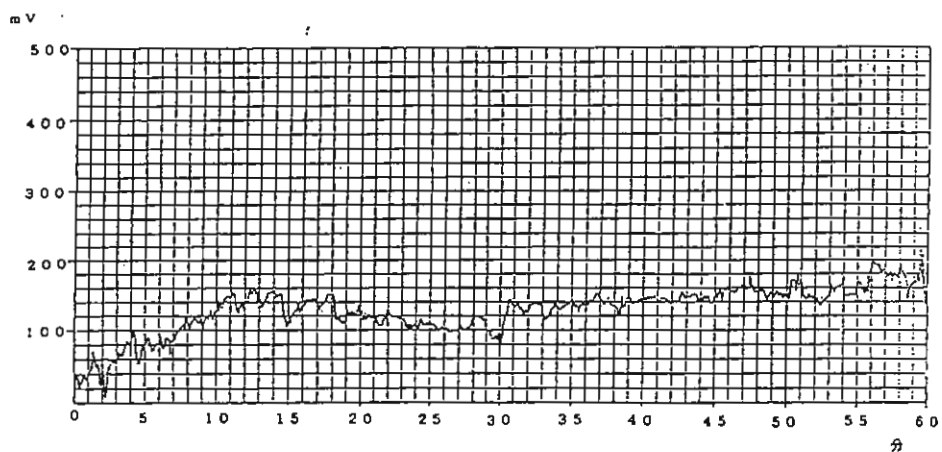
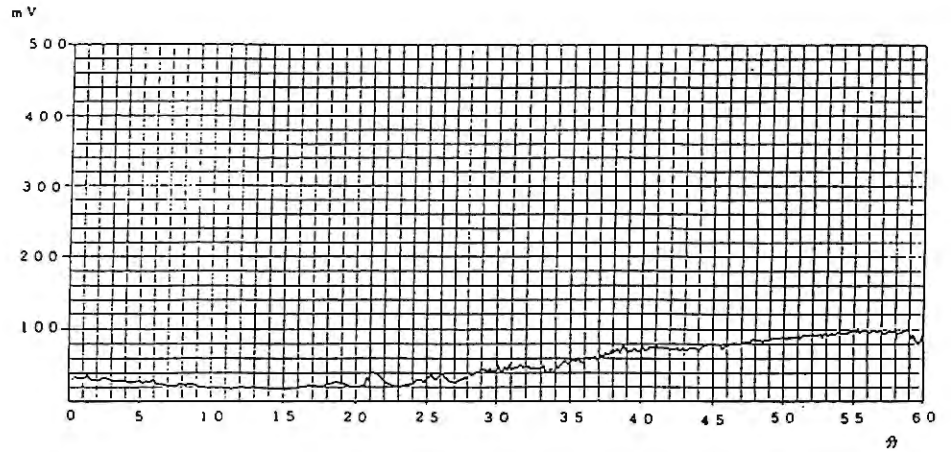


Fig. 5 パターンV



各人の温感と血流増加効果の指標となる血流増加率を総括して Fig. 6 に示した。温感が強力な場合は、高い血流増加効果が認められたが、血流増加率が10倍以下では温感と血流増加効果との相関性は認められなかった。これは温感閾値に個人差が存在するためと考えられた。

次いで、血流増加効果の年齢差及び性差について検討した結果を Fig. 7 及び Fig. 8 にそれぞれ示した。年齢差による血流増加効果の変動は認められなかった。性差については、やや女性の方に血流増加効果の現れやすい傾向が認められたが、有意な差ではなかった。

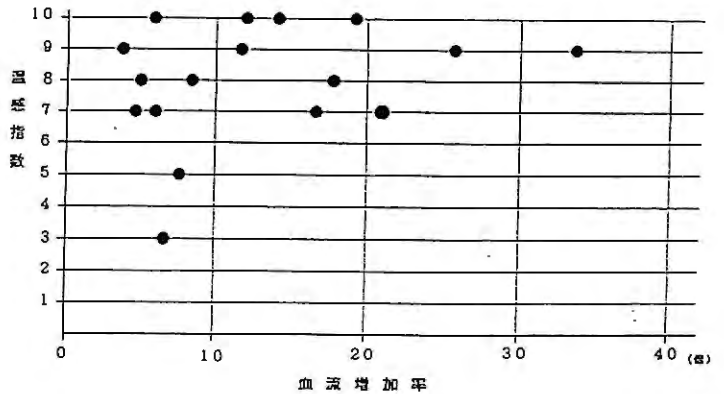


Fig. 6 温感強度と血流増加対策

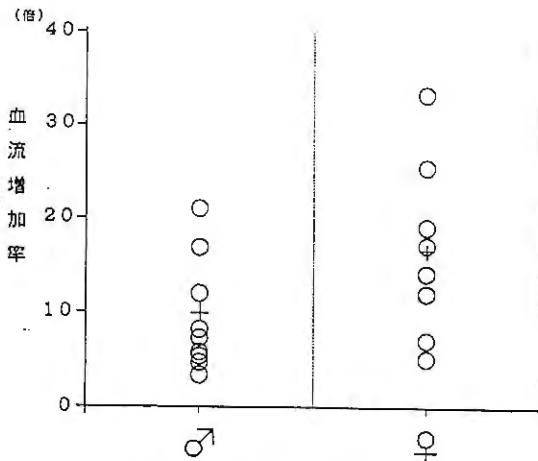


Fig. 8 血流増加効果の性差

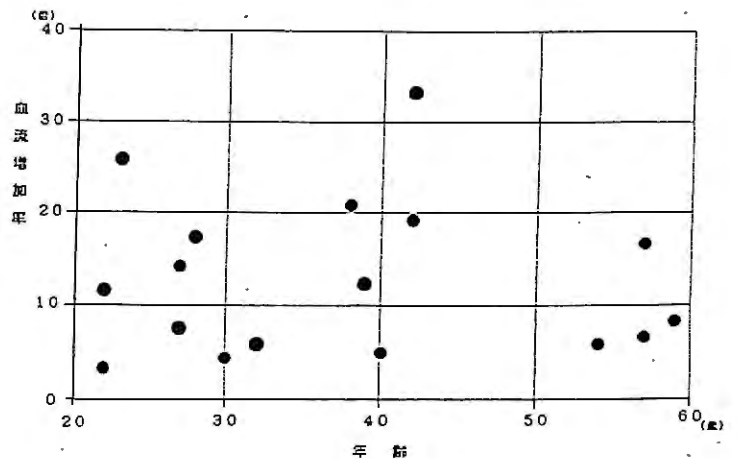


Fig. 7 血流増加効果の年齢差

2. 温感成分配合量の血流に及ぼす影響

被験薬剤A, B, Cを用いて温感成分配合量の変化に伴う血流増加効果, 温感の変動につき, 各パターンでの代表例で検討した結果を Table. 5 に示した。血流増加効果, 温感とも温感成分配合量の減少に伴って低下する傾向が認められた。被験薬剤Aの貼付時に「たいへん熱い」と感じ, 被験薬剤Aの使用に抵抗を感じた例につ

いては温感成分を1/4に減じた場合、温感は「少し熱い」または「ちょうどよい」となった。しかし、血流増加効果はいずれも認められ、温感型パップ剤としての薬効は十分に期待できると考えられた。

パターン	氏名	年齢	性別	製剤	発現時間 (分)	血流増加率 (倍)	血流最大値	血流最大時間 (分)	最大温感指数
I	T.U.	28	♂	A	25	17.2	412	60	8
				B	5	17.7	424	60	6
				C	8	9.1	244	53	5
II	Y.A.	42	♀	A	13	33.6	336	60	9
				B	24	16.7	242	60	9
				C	24	12.1	205	60	7
III	H.Y.	23	♀	A	14	25.8	258	36	9
				B	15	3.7	74	55	5
				C	31	2.1	84	60	5
IV	N.H.	54	♂	A	0	6.0	168	60	8
				B	23	2.8	68	60	7
				C	-	-	-	-	4
V	S.K.	30	♂	A	20	4.6	92	60	7
				B	4	2.0	68	60	5
				C	-	-	-	-	5

Table. 5 温感分配量の血流への影響

まとめ

温感型パップ剤の評価方法としてレーザー血流計を用い、温感成分のヒト血流に及ぼす影響ならびに温感と血流との関連性について検討し、以下の結果を得た。

- 1) 温感成分による血流増加効果には著しい個人差が認められ、血流量の経時的推移から5つのパターンに大別できた。
- 2) 各人の温感と血流増加効果については、温感が強力な例においては、高い血流増加効果が認められたが、血流増加効果が比較的著明でない例においては、温感閾値の個人差より、相関性は認められなかった。
- 3) 温感成分配合量の減少に伴って温感、血流増加効果ともに低下する傾向が認められたが、その低下率は必ずしも一致しなかった。ただし、温感が強力な例においては温感成分を1/4に減じた場合、温感貼付時に抵抗を感じない程度に低下した。一方、血流増加効果も低下したものの、効果は十分に期待できるものと考えられた。

以上により、温感の閾値ならびに温感型パップ剤貼付時の血流増加効果には個人差が著しいことが明らかとなり、したがって、温感型パップ剤の評価には、従来のようなアンケートによる評価にレーザー血流計を用いた評価を組み合わせ、発現パターンの個人差を前提として慎重に検討を行う必要がある。

また、今回の試験では、温感に過敏で、温感型パップ剤の貼付に抵抗を感じる例において、温感成分の少ない製剤に変え、温感をほど良くしても血流増加効果は十分認められた。よって、温感型パップ剤の使用にあたっては、温感に対して過敏な場合には、温感成分の比較的少ない製剤を選択し、温感を感じにくい場合は温感成分の多い製剤を用いるなど、各人の感受性に見合った使い分けにより、期待する効果と適度な温感が得られるものと考えられる。