

【原 著】

食塩負荷した脳卒中易発性高血圧ラット(SHRSP) における各種釣藤散製剤の脳卒中予防効果

Preventive Effects of some choto-san Preparations on Cerebral Apoplexy in Salt-loaded
Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)

松原利行 Toshiyuki MATSUBARA	上野美穂 Miho UENO
横田洋一 Youichi YOKOTA	斉藤晴夫 Haruo SAITO

富山県薬事研究所
Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

高血圧は脳血管障害および心筋梗塞などの合併症を伴い、今日の高齢化社会ではそれらの予防が重要な課題となっている。こうした背景から降圧剤の開発が、高血圧自然発症ラット(SHR)さらには脳卒中易発性高血圧ラット(SHRSP)などの病態モデルを用いて活発に行われている。一方、釣藤散は漢方薬の代表的抗高血圧薬であり、ヒトの本態性高血圧症に有効であること、¹⁾SHRで降圧作用を示すこと²⁾などが報告されているが、脳卒中予防効果についての報告はない。そこで我々は、SHRSPを用いて釣藤散の脳卒中予防効果について主に生存期間を指標に調べた。さらに、釣藤散は漢方では本来散剤として服用するものであり、また熱に不安定といわれている釣藤鉤が含まれているので、脳卒中予防効果に対する釣藤散の非加熱生薬混合末、自家製熱水抽出エキスおよび市販医療用エキス製剤の3種類の製剤の差異についても検討した。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

10週令の雄性SHRSPを1群5匹用い、短期間に脳卒中を発症させるため、1%食塩水を飲水として与えた。薬物は粉末飼料(船橋農場, MM-3)に、混ぜ、自由に摂食させた。

2. 使用薬物

石膏(中国, 青海省), 菊花(中国, 広東省), 陳皮(日本, 香川県), 人參(中国, 吉林省), 麦門冬(中国, 四川省), 防風(中国, 内モンゴ), 茯苓(中国, 四川省), 半夏(中国, 四川省), 甘草(中国, 山西省), 生姜(中国, 雲南省)は池田屋安兵衛商店より購入し、釣藤鉤(中国, 貴州省)については松浦薬業株式会社より供与されたものを実験に用いた。

3. 薬物含有飼料の調製

ヒトにおける釣藤散(「本事方」に準ずる)の1日量は、石膏5g、菊花3g、釣藤鈎3g、陳皮3g、人參3g、麦門冬3g、防風3g、茯苓3g、半夏3g、甘草1g、生姜1gである。熱水抽出エキス(自家製エキス)の調整法は、ヒトの1日量の4倍(124g)の刻み生薬に1700mlの水を加え、2,000mlのビーカーの中で1.5時間加熱抽出した後濾過し、濾液900mlを凍結乾燥することにより、25gの乾燥エキスを得た(収率20%)。一方、各刻み生薬を粉砕器(Cyclotec 1093 Sample Mill)を用いて粉末とした後、ヒトの1日量の4倍(124g)を上記の割合で混合し、釣藤散の粉末を調製した。これらのエキスおよび粉末を1日当たりの投与量がヒトの0.1日量/匹となるように飼料に添加した。一方、市販医療用エキス製剤(T社製, Lot No.9076881)については、業者から購入し、HPLCによる成分分析データから他の製剤の投与量に相当する量を換算し、1日当たりの投与量がヒトの0.3日量/匹となるように飼料に添加した。

4. 動物の観察および血圧測定

実験期間中、摂餌量、飲水量、体重を週1回測定するとともに動物の行動を毎日観察し、脳卒中発症日および死亡日を記録した。脳卒中発症の指標は、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、体重減少などの発現とした。血圧は、2週に1回小動物自動血圧測定装置(ウエダ製作所, UR-5000)を用いて tail cuff 法により測定した。

5. HPLC による釣藤散製剤の多成分解析

各製剤の0.1日量(釣藤散末0.31g, 自家製釣藤散エキス0.062g, 市販製剤エキス0.75g)を正確に秤量し、それぞれに15mlの70%メタノールを加え、30分間超音波抽出を行った。得られた懸濁液を遠心分離し(3,000rpm, 5 min), その上澄液を分取した。この操作を3回繰り返す、その上澄液を合わせたのち、さらに70%メタノールを加えて全量を50mlにし HPLC 用の検体とした。多成分同時解析の条件については以下に示す。

〈HPLC 条件〉

カラム: メルク社製 Hibar Lichrosorb

Rp-select B(4i.d.×250mm)

移動相: A液; 0.05M NaH₂PO₄/CH₃CN (9 : 1)

B液; 0.05M NaH₂PO₄/CH₃CN (4 : 6)

A液 (100%) → B液 (100%) 75分間の直線グラジエント

流量: 0.9ml/min

カラム温度: 45°

検出波長: 254nm

実験結果

1. 体重, 摂餌量, 飲水量に与える各薬物の影響

薬物投与開始時から最初の脳卒中発作が認められるまでの体重に関し、自家製エキス投与群では対照群との差異は認められなかったが、粉末投与群では対照群に比べ体重増加の抑制が認められた(Fig. 1)。なお、1日1匹当たりの摂餌量は18-20g, 1%食塩水の飲水量は70-90mlであり、対照群および薬物投与群にほとんど差は認められなかった。(Fig. 1)

2. 血圧にたいする各薬物の影響

血圧は対照群、薬物投与群とともに投与開始時には約200mmHgであったが、6週目には対照群で260mmHgに達した。粉末投与群および自家製エキス投与群においても対照群と同様の血圧上昇が認められた (Fig. 2)

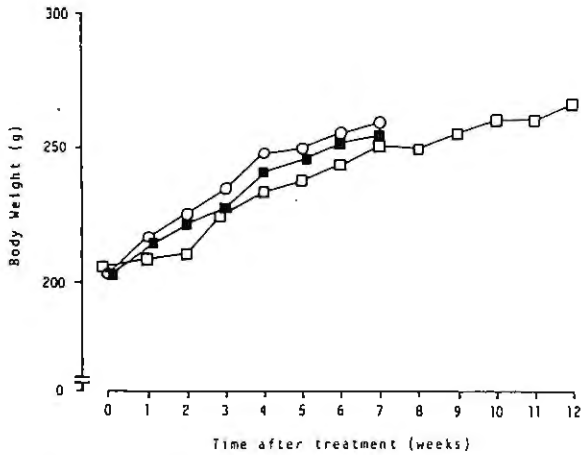


Fig. 1 Effects of two Choto-san preparations on body weight in salt-loaded SHRSP

○ : Control, ■ : Decocted Choto-san Ext.
□ : Powdered Choto-san(unheated).

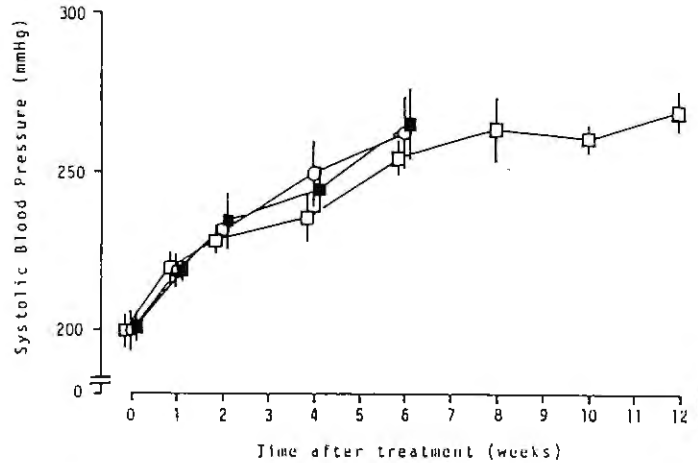


Fig. 2 Effects of two Choto-san preparations on systolic blood pressure in salt-loaded SHRSP

○ : Control, ■ : Decocted Choto-san Ext.
□ : Powdered Choto-san(unheated).

Each point and vertical bar represent the mean \pm S.E. of 4 to 5 animals

3. 生存期間に対する釣藤散末および自家製釣藤散エキスの影響

対照群は投与開始後6週目に最初の死亡例が認められ、11週で全例死亡した。自家製エキス投与群では9週目から死亡例が認められ、22週過ぎに全例死亡し、生存期間の延長傾向が認められた。一方、粉末投与群は対照群の全例が死亡した時点でも脳卒中の発症例は1例も認められず、明らかな脳卒中予防効果が認められた。各薬物投与群の生存曲線を Fig. 3 に示すとともに平均生存期間を Table. 1 に示す。(Fig. 3) (Table. 1)

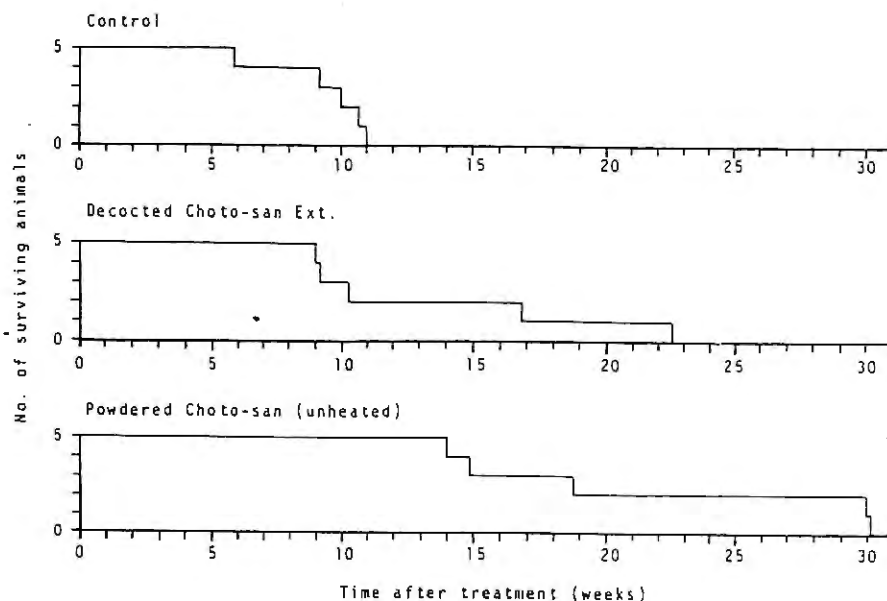


Fig. 3 Effects of two Choto-san preparations on survival time in salt-loaded SHRSP

Table.1 Effects of two Choto-san preparations on apoplexy appearance and survival time in salt-loaded SHRSP

Treatment group	No. of animals	Time of appearance of apoplexy (days) ^{a)}	Survival time (days) ^{a)}
control	5	53.6 ± 9.5	65.4 ± 14.5
Decocted Choto-san Ext. ^{b)}	5	81.2 ± 36.7	95.0 ± 41.9
Powdered Choto-san(unheated) ^{b)}	5	123.2 ± 40.6**	150.8 ± 55.9*

a) mean value ± SD.

b) A dosage to an animal per a day was 0.1 daily dose for human.

*: P<0.05, **: P<0.01, significantly different from control group(Student's t-test).

4. HPLC による各種釣藤散製剤の多成分解析

上記2種類の釣藤散製剤に市販エキス製剤を加えた3種類の製剤のHPLCによる成分解析パターンをFig. 4に示す。釣藤鈎、防風、陳皮、菊花、甘草に由来するピークをそれぞれ確認したのち、製剤間の差異を検討した。粉末と自家製エキスにおいては、個々の成分含量に若干の相違はあるものの大きな差異はなかった。一方、市販エキス製剤については、いずれのピークも上記2種類の製剤よりも低いことが明らかとなった。この結果から、市販エキス製剤の脳卒中予防効果の検討は釣藤散粉末製剤の3倍の用量を投与することとした。さらに、このHPLC分析により今回用いた市販エキス製剤には、釣藤散粉末に用いられた釣藤散鈎に含有されていたヒルスチン系アルカロイドが少ないことも明らかとなった。(Fig. 4)

5. 生存期間に対する市販釣藤散エキス製剤の影響

市販医療用エキス製剤について釣藤散粉末と同様の方法で脳卒中予防効果を検討したところ、Table. 2に示すように、対照群とほとんど生存期間が同じであり、釣藤散粉末でみられたような予防効果は認められなかった。(Table. 2)

考 察

食塩負荷したSHRSPに調製法の異なる3種類の釣藤散を長期投与したところ、釣藤散の本来の剤形に近い生薬投与群に生存期間の著明な延長が認められた。自家製の熱水抽出エキスを投与した群では対照群とほぼ同じ時期から脳卒中発症および死亡が観察され、生存期間も粉末投与群より短かった。

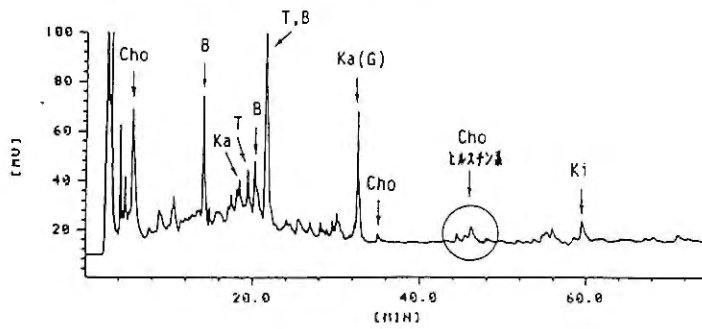
Table.2 Effects of commercial Choto-san preparation on apoplexy appearance and survival time in salt-loaded SHRSP

Treatment group	No. of animals	Time of appearance of apoplexy (days) ^{a)}	Survival time (days) ^{a)}
control	5	48.6 ± 6.1	59.6 ± 5.8
Commercial Choto-san ^{b)}	5	45.2 ± 8.0	56.6 ± 13.5

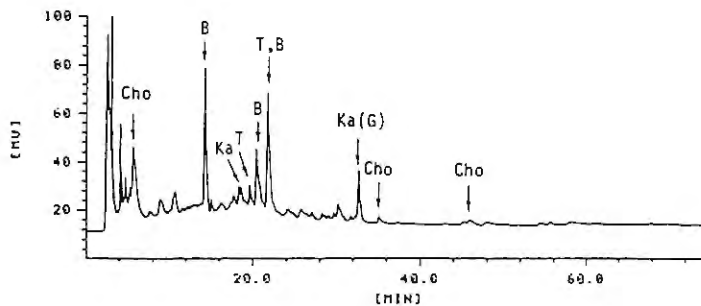
a) mean value ± SD.

b) A dosage to an animal per a day was 0.3 daily dose for human.

(A) Powdered choto-san(unheated)



(B) Decocted choto-san Ext.



(C) Commercial choto-san

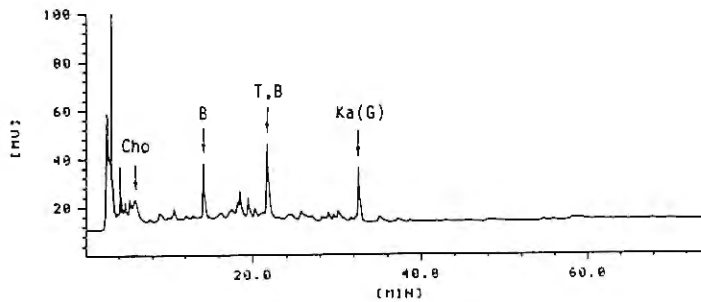


Fig.4 HPLC profile of some Choto-san preparations

Cho : 釣藤鈎 B : 防風 T : 陳皮 Ki : 菊花
Ka : 甘草 Ka(G) : 甘草 (グリチルリチン)

さらに、市販のエキス製剤投与群ではほとんど延命効果は認められず、同一処方でも方剤の調製法により薬効に大きな差異が生じた。原因を現時点で言及することは難しいが、この原因の一つに、加熱抽出の過程における有効成分の分解および揮散などが考えられる。例えば、釣藤散の構成生薬の一つである釣藤鈎は、血圧降下作用や鎮静作用を示すアルカロイドを含んでいるが、^{3, 4)}古くから長く煎じると効力がなくなるといわれている。⁵⁾さらに釣藤散は11種類の生薬から構成されており、いずれの生薬が関与するかについても不明である。この中には熱水抽出される水溶性成分以外にも精油成分や石膏に代表される無機成分など多様な成分が含有されている。したがって、生薬末と熱水抽出エキスの含有する成分は大きく異なってくる部分もある。この差異と薬理作用との関連については今後さらに検討しなければならない。また現在、市販の医療用漢方薬製剤はエキスとして製剤化されているが、今回の実験結果は漢方製剤のこのような一律の調製法に対する問題点を明らかにしたものとする。

一方、釣藤散の脳卒中予防効果の作用機序について、尾崎らは4週令の雄性 SHRSP に対して釣藤散エキス製剤を長期投与し、若干の抗高血圧効果がみられることを報告しているが、⁶⁾今回の我々の実

験条件である1%食塩水負荷した10週令雄性SHRSPでは、エキス投与群および粉末投与群ともに降圧作用は認められなかった。したがって、釣藤散粉末は、食塩負荷による急激な血圧上昇を抑制するには至らないがなんらかのメカニズムで脳、心臓および諸臓器の高血圧による臓器障害を改善し、生存期間を延長すると考えられる。また、家森は種々の食餌性因子(K, Ca, Mg, 蛋白質, 食物繊維, 多価および一価の不飽和脂肪酸)が高血圧あるいは脳卒中発症の予防に有効であることについて以下のように述べている。⁷⁻⁹⁾すなわち, KやCaは尿中へのNa排泄を促進し, 食物繊維は腸管内でNaを吸着して体内へのNa吸収を阻害し, Naの害に拮抗する。Mgは腸管からのNa吸収低下, 細胞膜への影響, Na, K-ATPaseの賦活でNaの害を防ぎ, さらにCa拮抗剤類似の作用で細胞内Ca²⁺の増加を防ぎ, 血栓症を抑制するとともに高血圧の重症化阻止に働く。蛋白質はその最終代謝産物である尿素がNaの尿中排泄を亢進するほか, タウリン, メチオニンなど含硫アミノ酸の多い蛋白質は交感神経を抑制する。さらに含硫アミノ酸の少ない大豆蛋白などでも血管壁の弾力性維持など物理的性状に好影響をもたらす。また, 多価および一価の不飽和脂肪酸はパルミトオレイン酸にみられるように血管細胞へ取り込まれ, 低酸素による障害防止に役立ち脳卒中予防に有効に働く。これらの食餌性因子の中には, 血圧の低下には効果がないにもかかわらず脳卒中の予防に有効なものもある。釣藤散に上記の食餌性因子がどの程度含まれているか不明であるが, これらと類似の作用機序により脳卒中を予防する成分を含有している可能性も考えられる。今後詳細な成分分析を実施するとともに薬理的作用機構について明らかにすることにより, 質の高い漢方医療に貢献するための漢方製剤の有るべき姿を見極めることにわずかでも寄与できればと考えている。

結 論

1%の食塩水を負荷したSHRSPに、釣藤散の各生薬の粉末混合物、熱水抽出したエキスまたは市販の釣藤散エキス製剤を添加した粉末飼料を長期投与し、調製法の異なる3種類の釣藤散製剤の脳卒中予防効果を調べた。その結果、釣藤散の本来の剤形である非加熱生薬末で構成した釣藤散に著明な脳卒中予防効果が認められたが、エキス製剤ではその効果は減弱もしくは消失した。

謝辞：本研究にあたり、釣藤散を供与していただきました松浦薬業株式会社に深謝致します。

文 献

- 1) 假野隆司, 石井権二, 黒部佳子, 芥川公昭, 安藤 一: 釣藤散と本態性高血圧症 —臨床研究第1報: 血圧と血中脂質および電解質に及ぼす影響について—, 和漢医薬学会誌, 3, 123-128(1986).
- 2) Ishii, K., Kano, T. and Ando, J.: Pharmacological effect of Diao-Teng-San, a blended traditional Chinese herb medicine, in spontaneously hypertensive(SHR) and normotensive Wistar-Kyoto(WKY) rats, J.Med.Pharm.Soc.WAKAN-YAKU, 4, 107-115 (1987).
- 3) 尾崎幸紘: 本邦産植物カギカズラおよびチョウジソウに含有されるインドールアルカロイドの薬理学的研究, 日薬理誌, 94, 17-26 (1989)
- 4) 漢薬の臨床応用, 釣藤鈞, 神戸中医学研究会編, 医歯薬出版, 東京, 1979, p.427.
- 5) 漢方業務指針, 煎出法, 日本薬剤師会編, 薬業時報社, 東京, 1978, p.119.
- 6) 尾崎正若, 太田 尚, 関根一郎: 釣藤散及び黄連解毒湯の脳卒中易発症ラット(SHRSP)の血圧

に対する作用, 和漢医薬学会誌, 2, 560-561(1985).

- 7) 家森幸男: 高血圧・脳卒中とマグネシウム—最新の実験・免疫研究の成果から, 医学のあゆみ, 154, 217-220 (1990).
- 8) 家森幸男: 高血圧モデルの心血管病予防への貢献, 心臓と血管の科学「生命と健康を守るために」, クバプロ, 東京, 1990, p.130 .
- 9) 家森幸男: 循環器疾患の予防と栄養因子, 日本家政学会誌, 39(3), 196-208 (1988).

【原 著】

ビタミンB群配合製剤の安定性に関する研究

— 一般用ビタミン基準 B₁, B₆, B₁₂ 主薬製剤の安定性 —

Studies on the Stability of Vitamin B Complex-Combined-Preparations

— Stability of Vitamin B₁ B₆ B₁₂ Preparations, Following Proprietary Standard —

富山県薬事研究会 製剤部会

Division of Pharmaceutics,
Toyama Pharmaceutical Research Association

朝日製薬(株)
Asahi Pharmaceutical Co.,Ltd

石倉英子
Eiko ISHIKURA

一柳恭子
Kyoko ICHIYANAGI

救急薬品工業(株)
Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd

島谷隆夫
Takao SHIMATANI

(株)廣貫堂
Kokando Co.,Ltd

江野本加壽雄
Kazuo ENOMOTO

第一薬品(株)
Daiichi Medicine Co.,Ltd

沢井美也
Miya SAWAI

第一薬品工業(株)
Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd

摩島裕之
Hiroyuki MAJIMA

中新薬業(株)
Chusinn Yakugyo Co.,Ltd

能沢由美子
Yumiko NOZAWA

東亜製薬(株)
Toa Parmaceutical Co.,Ltd

西本初博
Hatsuhiko NISIMOT

東亜薬品(株)
Toa Medicine Co.,Ltd

立田美佐
Misa TATEDA

(株)内外薬品商会
Naigai Medicine Co.,Ltd

宮島純子
Junko MIYAJIMA

(株)富士薬品
Fuji Medicine Co.,Ltd

萩原彰人
Akihito HAGIHARA

松井製薬(株)
Matui Parmaceutical Co.,Ltd

大間知幸子
Yukiko OMATI

明治製薬(株)
Meiji Parmaceutical Co.,Ltd

北野喜文
Yoshifumi KITANO

富山県薬事研究所
Toyama Prefectural Institute
for Pharmaceutical Research

川筋透
Toru KAWASUJI

緒 言

一般用医薬品製造(輸入)承認基準¹⁾により制定されているビタミン主薬製剤の、OTCにおける市場は大きく、現在さらに増え続けている。また、各メーカーにおいても広く製造されており、これら製剤の経時安定性についての関心が高まっている。そこで、ビタミン主薬製剤の中でも最も大きな市場を持っているビタミンB群(B₁主薬及びB₁、B₆、B₁₂主薬製剤)に関して各成分の特性と製剤における安定性を検討し、いくつかの知見を得たので報告する。

実験の部

1. 試 料

1) ビタミン

ベンフォチアミンは三共(株)製、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、シアノコバラミン、シアノコバラミン1000倍散、ニコチン酸アミドは日本ロシュ(株)製、パントテン酸カルシウムはアルプス薬品工業(株)製を用いた。

2) 素錠及び顆粒の添加剤

マンニットは東和化成工業(株)製、ヒドロキシプロピルセルロースは日本曹達(株)製のHPC-L、結晶セルロースは旭化成工業(株)製のアビセルPH-101、カルボキシメチルセルロースカルシウムはニチリン化学工業(株)製のECG-505、軽質無水ケイ酸はフロイト産業(株)製、ステアリン酸マグネシウムは日本油脂(株)製、コーンスターチは日本コーンスターチ(株)製を用いた。

3) コーティング剤

ヒドロキシプロピルメチルセルロース2910は信越化学工業(株)製のTC 5-RW、マクロゴール6000は日本油脂(株)製、精製白糖は日新製糖(株)製を、プルランは林原商事(株)製、ポリビニールピロイドンK-30は五協産業(株)製、沈降炭酸カルシウムは大平化学産業(株)製、タルクは林化成工業(株)製、酸化チタンは堺化学工業(株)製のA-110を用いた。

2. 試作方法

1) 糖衣錠

各成分を混合し、ハイスピードミキサー(深江工業製LFS-GS-1J型)を用いて湿潤剤とともに練合する。練合末を0.8mmφで円筒造粒((株)畑鉄工所製万能試作機)し、乾燥((株)岩黒製作所製棚式乾燥機607C型)する。乾燥末を20号篩で篩過し、滑沢剤等を混合して打錠(畑鉄工所製ロータリー式打錠機HT-P18、(株)岩黒製作所製単発式打錠機)する。打錠した素錠はフィルム及び糖衣コーティング((株)畑鉄工所製万能試作機、コーティングパン内径37cm)を行う。

2) フィルム錠

糖衣錠と同様の方法でフィルムコーティングまで行う。

3) 顆 粒

糖衣錠と同様の方法で乾燥まで行い、20号と48号篩で整粒し、セロニウムで分包((株)小松製作所製分包機KP-504型)する。

3. 各成分の混合末の安定性

B₁ (ベンフォチアミン), B₂ (リボフラビン), B₆ (塩酸ピリドキシン), B₁₂ (シアノコバラミン) 混合末の基本的な安定性をみるため, Table. 1 に示す処方により各成分 (B₁₂のみ1000倍散) を混合した試料を, 40°75%, 50°75%, 60°の各条件下で, 2カ月間の経時変化試験を行った。B₁₂1000倍散についても同様に試験した。各成分の定量は高速液体クロマトグラフ法により行った。なお, B₁₂の1000倍散は日本ロシュ製を使用した。Table. 2 にその組成を示す。

4. B₁₂の安定性に及ぼす他成分の影響

Table. 1 に示す配合割合で, B₁₂ 倍散末に B₁, B₂, B₆ を組み合わせた検体 (7種) 及び B₁₂ 倍散末を 50°75% の条件下で, 2カ月間の経時変化試験を行った。なお, B₁₂ 倍散末はマンニットへの流動層吸着法により製した1000倍散を用いた。

Table. 1 混合末配合処方

B ₁	50部
B ₂	10部
B ₆	50部
B ₁₂ 1000倍散	60部
計	170部

Table. 2 日本ロシュ製のシアノコバラミン1000倍散の組成

シアノコバラミン	0.1%
クエン酸ナトリウム	3.0%
クエン酸	1.0%
デキストリン	95.9%

5. 錠剤及び顆粒剤における安定性

1) B₁, B₂, B₆, B₁₂, ニコチン酸アミド及びパントテン酸カルシウムを配合した製剤の安定性

B₆と B₁₂を別顆粒にした2顆粒製剤と同一顆粒にした1顆粒製剤については糖衣錠と顆粒剤を試作した。錠剤はロータリー式で打錠した。糖衣錠はシリカゲルの入った瓶に入れ, 顆粒剤はセロニウムで分包し, 40°75%, 50°75%の各条件下で, 2カ月, 4カ月及び6カ月間の経時変化試験を行った。各製剤の処方を Table. 3, 4 及び 5 に示す。また, 経時変化の起こりやすい B₁₂ に関し

Table. 3 1顆粒製剤の処方

(3錠, 3g中)

	TA(素錠)	GA(顆粒)	GB(顆粒)
B ₁	100mg	100mg	100mg
B ₂	10	10	10
B ₆	50	50	50
B ₁₂ 倍散末	60	60	60
ニコチン酸アミド	30	30	30
パントテン酸Ca	—	—	15
マンニット	228	2180	2165
HPC-L	26	60	60
結晶セルロース	120	400	400
ECG 505	26	90	90
軽質無水ケイ酸	6	20	20
ステアリン酸マグネシウム	4	—	—
合計	660mg	3000mg	3000mg

Table. 4 2顆粒製剤の処方

(3錠, 3g中)

	TBC(素錠)		GCD(顆粒)	
B ₁	100mg	—	100mg	—
B ₂	10	—	10	—
B ₆	—	50mg	—	50mg
B ₁₂ 倍散末	60	—	60	—
ニコチン酸アミド	—	30	—	30
パントテン酸カルシウム	—	—	15	—
マンニット	69	159	1030	1135
HPC-L	13	13	30	30
結晶セルロース	60	60	200	200
ECG 505	13	13	45	45
軽質無水ケイ酸	—	—	10	10
小計	325mg	325mg	1500mg	1500mg
軽質無水ケイ酸	6		—	
ステアリン酸マグネシウム	4		—	
合計	660mg		3000mg	

Table.5 コーティング処方

(3錠中)

フ ィ ル ム 処 方	
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	15.43
マクロゴール6000	2.57
小 計	18mg
糖 衣 処 方	
精製白糖	369.69
プルランP1-20	3.39
ポリビニルピロリドンK-30	3.39
タルク	67.79
沈降炭酸カルシウム	135.58
酸化チタン	2.16
小 計	582mg
合 計	600mg

Table.6 2顆粒製剤の処方

(3錠, 3g中)

	TDEF, TDET(素錠)		GCD(顆粒)	
B ₁	100mg	—	100mg	—
B ₆	—	50mg	—	50mg
B ₁₂ 倍散末	0.6	—	0.6	—
ニコチン酸アミド	—	30	—	30
コーンスターチ	30.4	—	30.4	—
マンニット	109.5	159	1089	1140
HPC-L	13	13	30	30
結晶セルロース	60	60	200	200
ECG 505	13	13	45	45
軽質無水ケイ酸	—	—	5	5
小 計	326.5mg	326.5mg	1500mg	1500mg
軽質無水ケイ酸	3		—	
ステアリン酸マグネシウム	4		—	
合 計	660mg		3000mg	

て一部の試料について微生物定量試験を日本食品分析センターへ依頼した。

2) B₁, B₆, B₁₂及びニコチン酸アミドを配合した製剤の安定性

B₁₂の倍散末の製法をマンニットへの流動層吸着法からコーンスターチへの粉碎倍散法に変更し、さらにB₁₂の配合量を含量の均一性を図るために、一日量を60 μ gから600 μ gに増量したTable. 6に示す製剤を試作した。製剤のコーティング処方と包装形態及び加速条件は3.1)と同様に行なった。

3) B₁₂の配合量及び添加方法の違いによる安定性

B₁₂の倍散末の製法及び配合量を変えたTable. 7に示すフィルム錠を試作し、40%75%、50%75%の各条件下で、2カ月及び4カ月間の経時変化試験を行なった。製剤のコーティング処方と袋装形態は3.1)と同様に行なった。

B₁₂は、TFJ, THJがマンニットにフローコーターによりスプレー吸着し、TGJ, TIJはコーンスターチとボールミルにより粉碎倍散して用いた。

Table.7 フィルム錠の処方

(3錠中)

	TFJ, TGJ(素錠)		THJ, TIJ(素錠)	
B ₁	100mg	—	100mg	—
B ₆	—	50mg	—	50mg
B ₁₂	0.6	—	0.06	—
ニコチン酸アミド	—	30	—	30
コーンスターチ	20	—	20	—
マンニット	121.4	162	121.94	162
HPC-L	13	13	13	13
結晶セルロース	60	60	60	60
ECG 505	13	13	13	13
小 計	328mg	328mg	328mg	328mg
ステアリン酸マグネシウム	4		—	
合 計	660mg		660mg	

結果及び考察

各実験における結果は製造時の定量値を100%とした残存率で表した。なお、製造時の定量値はどの

試作品においても、添加量に対する理論値と一致していた。

1. 各成分の混合末の安定性

Table. 8 に各成分の混合末及び B₁₂倍散末の試験結果を示す。B₁, B₂, B₆は安定であった。B₁₂に関しては、かなりの含量低下が認められた。しかし、B₁₂の1000倍散単品では比較的安定であった。B₁₂の含量低下は60°保存での含量低下よりも、50°75%保存の方が著しいことより、B₁₂の含量低下には水分の存在が関与しているものと考えられる。

2. B₁₂の安定性に及ぼす他成分の影響

Table. 9 に各成分との組み合わせと B₁₂の試験結果を示す。いずれも B₆を配合した検体No. 2 ~ 5 に大きな含量の低下がみられた。特に B₁, B₆と配合した検体No. 4, 5 に顕著に現われた。これらの結果より、B₁₂は B₆と分けて配合する必要性があり、また、B₁と B₆も分けて配合することが望ましいと判明した。

3. 錠剤及び顆粒剤における安定性

1) B₁, B₂, B₆, B₁₂, ニコチン酸アミド及びパントテン酸カルシウムを配合した製剤の安定性

Table.10 にロット, 剤形, 配合組み合わせ及び B₁₂の試験結果を示す。また, Fig. 1 に他成分の

Table.8 B₁, B₂, B₆, B₁₂混合末の安定性

	配 合 末				(残存率%)	
	B ₁	B ₂	B ₆	B ₁₂	B ₁₂ 1000倍散	B ₁₂
40°75%	2 W	100	103	99	95	94
	1 M	99	103	97	88	93
	2 M	99	102	99	71	—
50°75%	2 W	100	104	101	80	89
	1 M	101	104	102	79	89
	2 M	98	105	101	24	78
60°	2 W	100	99	98	101	—
	1 M	98	99	99	89	—
	2 M	100	100	99	69	100

Table.9 配合組み合わせと B₁₂の安定性試験結果

	配 合 組 み 合 わ せ				(B ₁₂ 残存率%)	
	B ₁₂	B ₆	B ₂	B ₁	50°75%	1 M
1	○				98	96
2	○	○			56	29
3	○	○	○		60	34
4	○	○		○	42	10
5	○	○	○	○	49	15
6	○		○		98	91
7	○			○	95	92
8	○		○	○	94	90

Table.10 錠剤及び顆粒剤における B₁₂の安定性試験結果 I

ロット	剤 形	配 合 組 み 合 わ せ						(B ₁₂ 残存率%)		
		B ₁	B ₂	B ₁₂	B ₆	*1 MAA	*2 P-Ca	40°75%	50°75%	2 M
TA	糖衣錠 1顆粒	○	○	○	○	○		18(19)	2	nd
TBC	糖衣錠 2顆粒	○	○	○	●	●		55(83)	28	nd
GA	顆粒 1顆粒	○	○	○	○	○		57	7	3
GB	顆粒 1顆粒	○	○	○	○	○	○	47(65)	4	9
GCD	顆粒 2顆粒	○	○	○	●	●	●	65(80)	65	38

*1 ニコチン酸アミド

*2 パントテン酸カルシウム

○及び●で2顆粒製剤の配合組み合わせを表した。

(微生物定量)

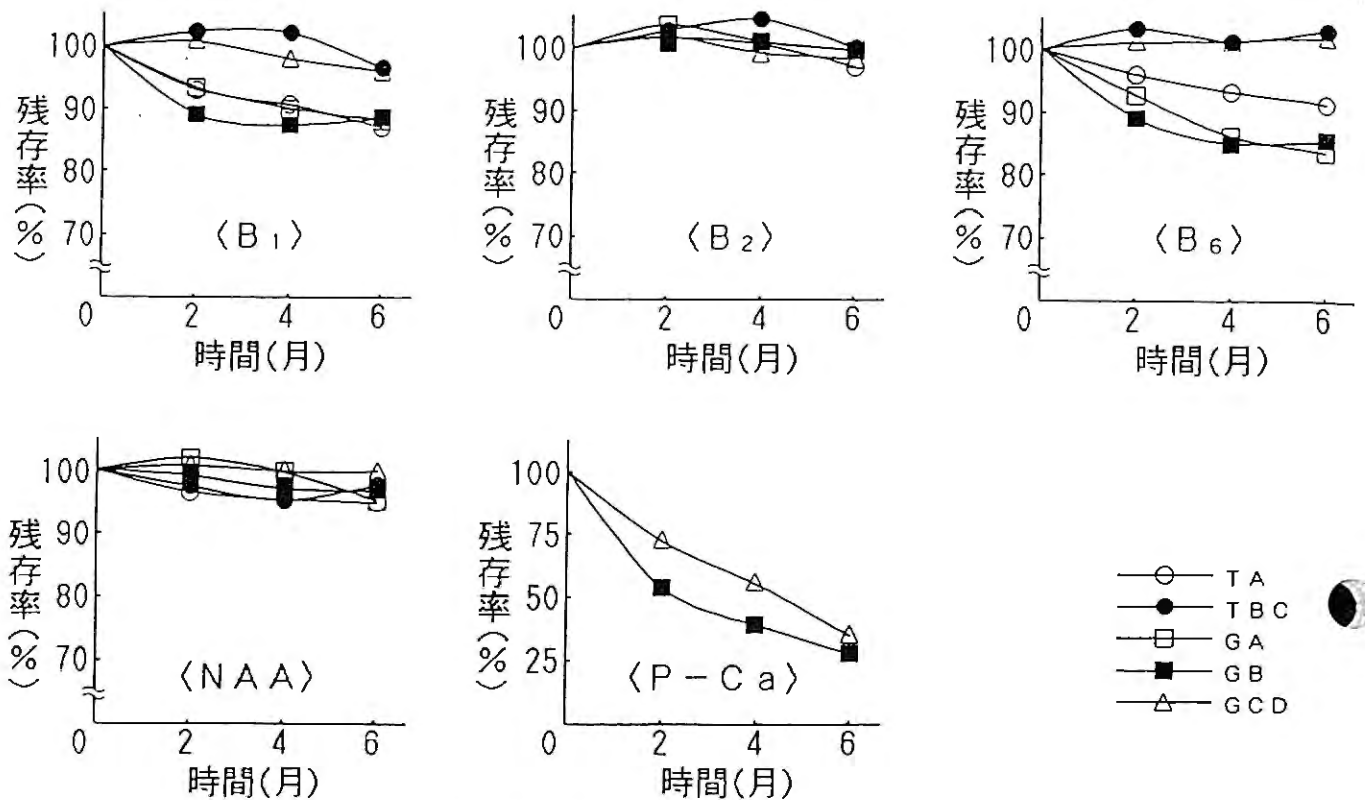


Fig.1 錠剤及び顆粒剤における B₁₂以外の安定性 I
(40°75% R Hにおける残存率)

Table.11 錠剤及び顆粒剤における B₁₂の安定性試験結果 2

(B₁₂残存率%)

ロット	剤形	配合組み合わせ					40°75%		50°75%
		B ₁	B ₂	B ₁₂	B ₆	MAA	2 M	6 M	2 M
TDEF	フィルム錠 2 顆粒	○	○	○	●	●	101	94	95
TDET	糖衣錠 2 顆粒	○	○	○	●	●	91	79	63
GEF	顆粒 2 顆粒	○	○	○	●	●	89	79	74

試験結果を示す。

B₆と B₁₂を一緒に配合した 1 顆粒製剤は予想どおり著しい含量の低下が認められた。しかし安定と思われた B₆と B₁₂を別々に配合した 2 顆粒製剤も含量が低下した。その他の成分ではパントテン酸カルシウムの含量低下が著しく、また 2 顆粒製剤の B₁, B₆は安定であったが、1 顆粒製剤では含量が若干低下した。B₂, B₆はいずれの製剤でも安定であった。B₁₂に関しては、高速液体クロマトグラフ法と微生物定量法による試験結果の比較では、製造時の値はほぼ一致していた。しかし、40°75% 2 カ月の定量値の低下している検体では、微生物定量試験の方が高い値を示す傾向が認められた。これは、高速液体クロマトグラフ法では化学構造や組成の変化により別物質として検出されるが、微生物定量法では、生物活性が残存している限り、B₁₂として測定されるためと考えられる。

2) B₁, B₆, B₁₂及びニコチン酸アミドを配合した製剤の安定性

3.1) では特に B₁₂とパントテン酸カルシウムが不安定であった。パントテン酸カルシウムについては配合変化に関する報告²⁾があるので、B₁₂の安定化を目的に検討することとし、B₁₂の配合量

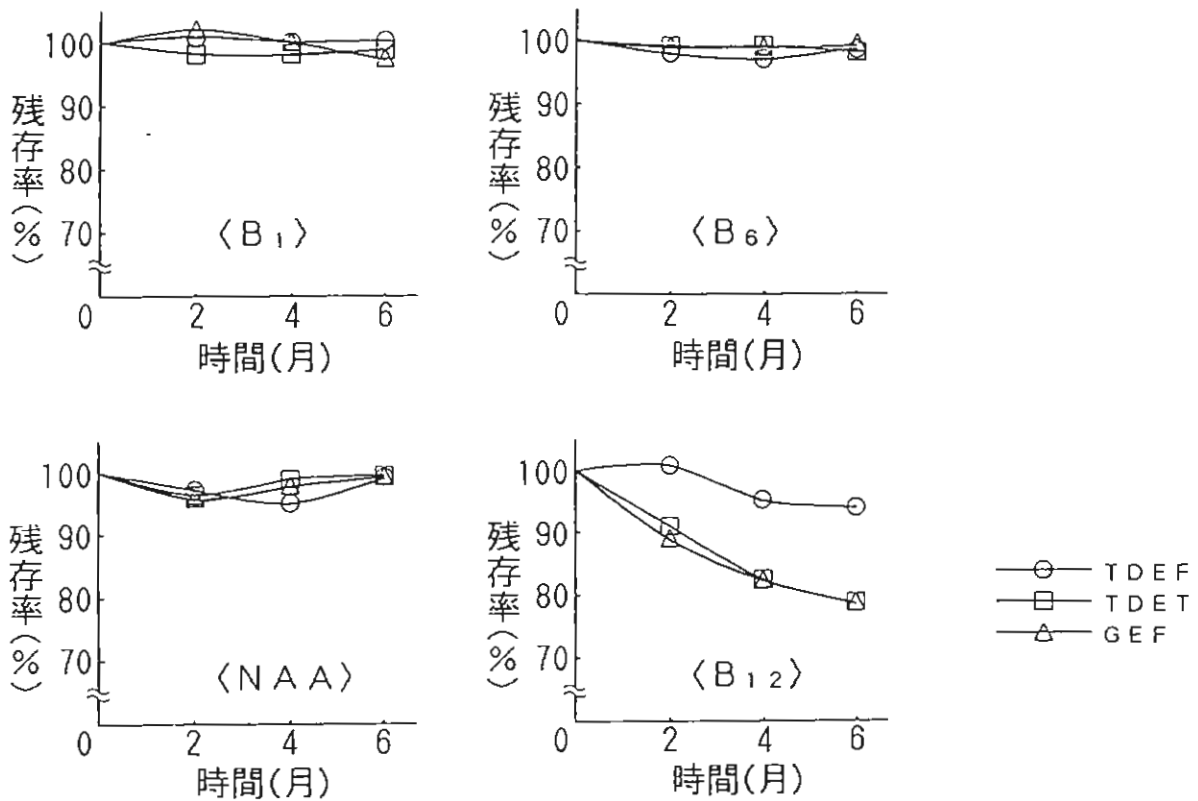


Fig.2 錠剤及び顆粒剤における B₁₂以外の安定性 2
(40°75% R Hにおける残存率)

と添加方法を変更して検討した。

Table.11にロット、剤形、配合組み合わせ及び B₁₂の試験結果を示す。又、Fig. 2に他成分の試験結果を示す。

B₁、B₆及びニコチン酸アミドは、すべての製剤において安定であった。B₁₂に関しては、糖衣錠、顆粒で含量低下が認められたが、フィルム錠は、ほぼ安定であった。

TDEF と TDET の B₁₂の安定性の違いは製剤中の水分が糖衣層に密閉されるためと考えられる。

同じ剤形である5.1) TBC と TDET の残存率には大きな違いが認められた。

この両製剤の添加剤及び試作方法は、ほぼ同一条件で行っていることから、安定性の違いは、B₁₂の配合量、添加方法等が考えられる。

3) B₁₂の配合量及び添加方法の違いによる安定性

配合量と添加方法の違いが B₁₂の安定性に与える影響を調べる目的でマンニットへの流動層吸着法 (60 μ g/3T) 及びコンスターチへの粉碎倍散法 (600 μ g/3T) により4種類のフィルム錠を試作し安定性を検討した。

Table.12にロット、B₁₂含有量、B₁₂倍散末調製法及び B₁₂の試験結果を示す。

Table.12より、B₁₂の添加方法による違いはほとんど無く配合量の多い方が安定であった。

Table.12 B₁₂の配合量及び添加方法の違いによる B₁₂の安定性
(B₁₂残存率%)

ロット	B ₁₂ 含有量 (3錠中)	B ₁₂ 倍散末調整法	40°75%		50°75%
			2 M	4 M	
TFJ	600 μ g	マンニットにスプレー吸着	99	94	91
TGJ	600 μ g	コンスターチと粉碎倍散	95	90	88
THJ	60 μ g	マンニットにスプレー吸着	92	88	78
TIJ	60 μ g	コンスターチと粉碎倍散	92	88	79

この結果から TBC と TDET の安定性の違いは B₁₂の添加方法によるものではなく配合量（すなわち B₁₂の濃度）によるものと示唆された。また、TDEF（フィルム錠）と GEF（顆粒）の違いも製剤中での B₁₂の濃度によるものと考えられる。

ま と め

ビタミン B 群の各成分の配合特性と製剤における安定性を検討した。フィルム錠においては安定な B₁ B₆ B₁₂ 主薬製剤が試作できた。糖衣錠及び顆粒では B₁₂が不安定であった。

一連の実験により、次に示す知見を得ることができた。これらの知見が、ビタミン B 群配合製剤の開発に際しての参考になれば幸いである。

シアノコバラミンに関して

- a) 一般に水の存在は不安定因子と言われているが、特にシアノコバラミンの場合は安定性に大きな影響を及ぼす。
- b) 塩酸ピリドキシンとの同時混合では安定性が悪く、配合する場合は別顆粒にするなどの配慮が必要である。
- c) シアノコバラミンが分解している場合、液体クロマトグラフ法より微生物定量法の方が高い値を示す。
- d) 配合量（製剤中の濃度）が安定性に影響を及ぼす。

その他の成分に関して

- a) ベンフォチアミンと塩酸ピリドキシンは若干の配合変化を示す。
- b) リボフラビンとニコチン酸アミドはかなり安定であったが、パントテン酸カルシウムは不安定であった。

謝 辞

この研究を進めるにあたり、分析用の HPLC カラムを提供していただいた(株)資生堂に深謝いたします。

文 献

- 1) 日本公定書協会編, 医薬品製造指針 '91, 579, (1991)
- 2) 高崎慎一ら, B 群ビタミンと共存するパントテン酸カルシウムの分解について, 家庭薬研究, 5, 54, (1986)

開胸モルモットに六神丸を十二指腸内投与した際の強心作用

Cardiotonic Action of Rokushingan in Open Chest Preparation of Guinea Pig

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

○上川 浩 (広貫堂)
Hirosi KAMIKAWA

寺崎 正之 (中新薬業)
Masayuki TERASAKI

酒井 弘一 (第一薬工)
Hiroichi SAKAI

篠原 達雄 (大東交易)
Tatsuo SHINOHARA

浦垣 俊孝 (リードケミカル)
Toshitaka URAGAKI

室井 正志 (共栄製薬)
Masashi MUROI

池田 大輔 (共栄製薬)
Daisuké IKEDA

松原 利行 (薬事研究所)
Toshiyuki MATSUBARA

緒 言

六神丸は富山県配置家庭薬業界の主要商品の一つである。しかし、その薬効を裏付ける基礎的研究は十分とはいえず、六神丸およびその構成生薬の薬理作用をより詳細に検討する必要がある。著者らは先に六神丸の強心作用を、ラット摘出心房筋標本を用い *in vitro* で検討したところ、センソに含まれるアドレナリンの効果が顕著で六神丸の薬効が正確に評価できないことがわかった。¹⁾六神丸の薬理効果は経口投与によらねばならないことが明確になったので、今回は、六神丸の強心作用について、麻酔したモルモットを用い、方剤および構成生薬をそれぞれ十二指腸内与し、心収縮力および心拍数の変化を調べ、若干の知見を得たので以下その詳細を報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

Hartley 系雄性モルモットを、三協ラボサービス(株)より購入し予備飼育ののち試験に供した。

2. 被験体

六神丸および構成生薬は養命製薬で用意したものを用いた。この製剤は前報¹⁾で用いたものと同一である。ブファリン(シグマ)、シノブファギン(シグマ)およびレジブフォゲニン(和光純薬)は、試薬を購入し実験に供した。

3. 薬物の調製

六神丸を乳鉢で摩砕後、超音波発生装置（日本精機製作所，Ultrasonic Generator US-150）を用い1% CMC-Na 液中に懸濁したものを試験液とした。また、センソ及びブフォステロイドも同様の方法で調製した。但し、ブフォステロイドは、ジメチルスルフォキシド（DMSO）に投与量の10倍を溶解し、この溶液を10倍希釈になるよう1% CMC-Na 液に懸濁し試験液とした。（DMSOの最終濃度は10%であった）

4. 収縮張力および心拍数の測定

モルモットにウレタン1.6g/kgを腹腔内投与して麻酔し、図1に示すように解剖板に背位固定して、十二指腸にポリエチレンチューブを約2cm挿入、挿入部をアロンアルファで固定後、切開部を縫合した。次に、気管を切開して、人口呼吸器（シナノ製作所，SN-480-7）を装着し、1回3mlの空気を50回/分の条件で人口呼吸を実施した。次に開胸した心膜を切開後心尖部をセルフインでつまみ、約4gの張力をかけ、アイソメトリックトランスジューサー（日本光電，TB-652T）とアンプ（日本光電，EF-601G）を介して心臓収縮力を測定した。また、心拍計（日本光電，AT-601G）を介して心拍数も測定し、2ペンレコーダー（ユニコーダー，U-228）で記録した。実験中心臓の乾燥防止のため、流動パラフィン飽和生理食塩水を心臓に滴下した。

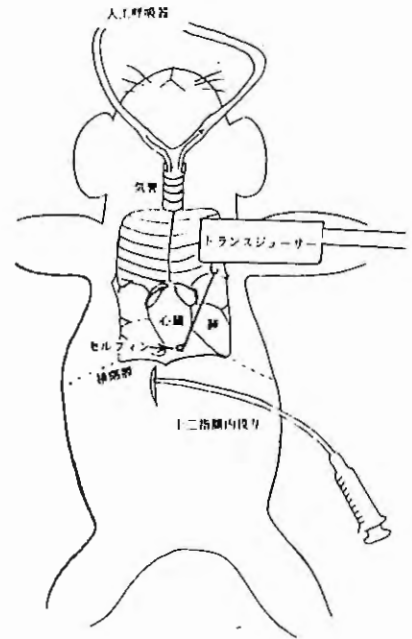


図1 モルモット心臓開胸標本

実験結果および考察

1. 六神丸の強心作用

用量1, 3, または10粒/kgの六神丸を十二指腸内に投与したところ、3粒/kgおよび10粒/kgの用量で、投与後10分前後から収縮力の増加が認められ1時間以上持続した。なお、溶媒1% CMC-Naのみの投与ではほとんど影響は認められなかった。20粒/kgの用量では動物の多くに不整脈が生じた。六神丸（10粒/kg）の投与時の収縮力増加の1例を図2に示し、投与前の振幅を100としたときの被験液投与後の変化を表1に示す。

表1 モルモットの開胸心臓標本における六神丸の十二指腸内投与による強心作用

用 量 (粒/kg)	動 物 数	収縮張力の変化率(%) ^{a), b)}		
		15min	30min	60min
0 ^{c)}	5	100.0±2.1	99.4±2.5	103.0±4.7
1	4	103.3±4.3	104.3±8.5	108.0±7.1
3	8	104.8±2.9**	110.6±7.3**	112.3±11.6
10	6	110.5±5.8**	118.3±15.1*	120.8±20.9

a) 投与前の心臓張力振幅を100%として、変化を百分率で表した。

b) 平均値±SD。

c) 溶媒の1%CMC-Naを投与した。

*, **: 溶媒対照との有意差検定 (Student's t-test), *: P<0.05, **: P<0.01。

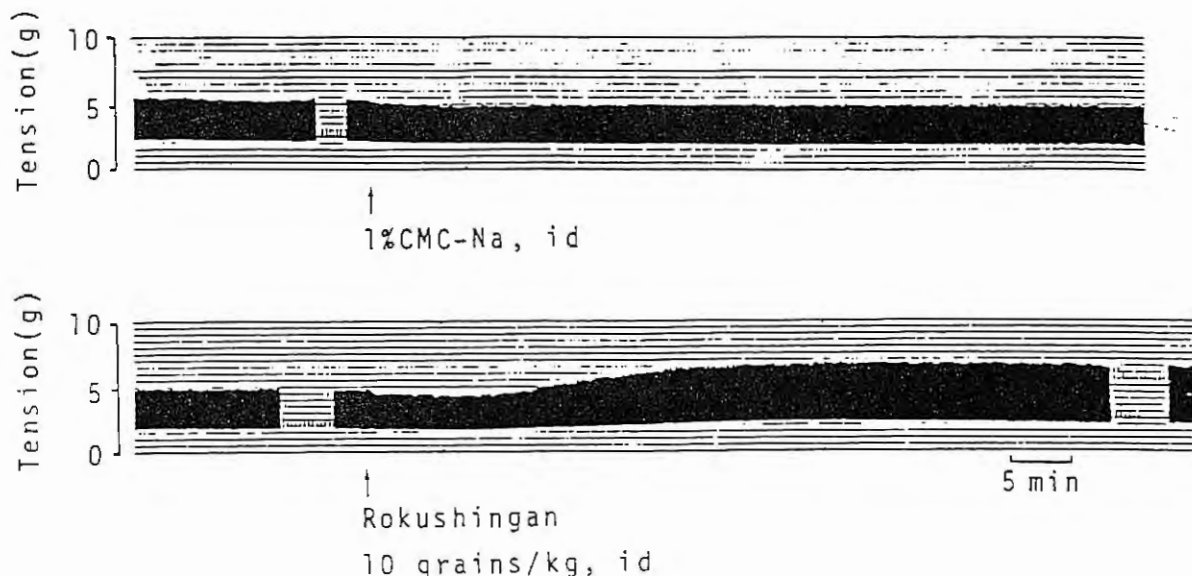


図2 モルモット開胸心臓標本における六神丸の強心作用

2. センソの強心作用

六神丸の構成生薬であるセンソを六神丸3粒/kg相当量で十二指腸内に投与したところ、六神丸と同程度の収縮力の増加が認められた(表2)。

表2 モルモットの開胸心臓標本におけるセンソおよびブフォステロイドの十二指腸内投与による強心作用

被験体	用量	動物数	収縮張力の変化率(%) ^{a), b)}		
			15min	30min	60min
1%CMC-NA	—	5	100.0±2.1	99.4±2.5	103.0±4.7
六神丸	3粒/kg	8	104.8±2.9**	110.6±7.3**	112.3±11.6
センソ	3粒/kg ^{c)}	8	106.3±3.2**	109.6±5.5**	110.9±10.7
ブファリン	0.433mg/kg ^{d)}	5	103.6±3.8	107.4±6.6*	116.0±12.1
シノブファギン	0.433mg/kg ^{d)}	8	98.6±4.8	101.0±5.9	104.0±7.3
レジブフォゲニン	0.433mg/kg ^{d)}	5	96.4±3.4	98.4±4.7	101.6±1.1

a) 投与前の心臓の張力振幅を100%として、変化を百分率で表した。

b) 平均値±SD。

c) 六神丸含有相当量で表した(センソ4.57mg/kg)

d) 3種類のブフォステロイドのセンソ中含有率は、ブファリン1.87%、シノブファギン4.69%、レジブフォゲニン2.91%であり、これらを合計すると9.47%となる。センソの4.57mg(六神丸3粒相当量)の9.47%は0.433mgであり、この量を基準として3種類のブフォステロイドを投与した効力を比較した。

*, **: 容媒対照との有意差検定(Student's t-test). *: P<0.05, **: P<0.01。

3. ブフォステロイドの強心作用

本実験に用いたセンソには、ブファリン、シノブファギンおよびレジブフォゲニンの3種のブフォステロイドが合わせて9.47%含有されており、¹⁾六神丸3粒相当量のセンソ中には、上記3種のブフォステロイドが計0.433mg含有されている計算になる。そこで、この3種類のブフォステロイドの効力を比較するため0.433mg/kgの用量で、強心作用を比較した。その結果、この用量では、ブファリンによりセンソと同様の収縮力の増加が認められたが、シノブファギンおよびレジブフォゲニンではほとんど収縮力増加が認められず、ブファリンのみに効果があることが示唆された(表2)。

4. 心拍数に対する影響

六神丸、センソおよびブフォステロイドはそれぞれ心拍数に対しては、ほとんど影響を与えなかった。

結 論

今回の実験から、六神丸の消化管内投与による強心作用の評価がモルモット開胸心臓本で可能であることが分かり、六神丸3粒/kg以上の経口量で認められる強心作用には、センソが大きく寄与していることが確認された。今後、センソの中のブフォステロイド類の関与、さらにセンソ以外の5種類の生薬についてもその配合の意義を明らかにしていきたい。

文 献

- 1) 上川 浩, 山本隆二, 篠原達雄, 寺崎正之, 森田次郎, 松原利行: 六神丸の強心作用とその評価法に関する研究 —ラット摘出心房筋に対する作用—, 家庭薬研究, 9, 44-51 (1990)

超音波抽出によるエキス含量測定法の検討

Studies of the Test for Extract Content by Sonication

花 木 晃
Akira HANAKI

原 田 聡 子
Satoko HARADA

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

日本薬局方の一般試験法の中の生薬試験法のエキス含量測定法は、試料の抽出時間が長く、結果が得られるまでに一日以上要する試験法である。

そこで、我々は試料の抽出時間を短縮するため、超音波による抽出を行い、エキス含量を測定する方法を検討した。さらにその結果を日局法によるエキス含量測定結果と比較検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 試 料

日局にエキス含量の規定されている生薬（カンゾウ、ゲンノショウコ、センブリ、ダイオウ及びニンジンの5種類）を粉末にして試料とした。なお同一生薬は総て同一ロットで試験を行った。

2. 抽出容媒および抽出機

容媒は日局で最も多く用いられている希エタノールを使用した。

超音波抽出機は、サインソニック UA-100型（神明台工業製 発振周波数36kHz, 出力100W, 振動子は槽外に直付）を使用した。また、抽出槽内の水位は一定とした。

3. 操作方法

試料を三角フラスコに入れ、希エタノール70mlを加える。それを超音波抽出機に入れて抽出を行ったあと、日局法と同様の操作を行いエキス含量を測定した（Fig. 1）エキス含量は、次式より求めた。

$$\text{エキス含量(\%)} = \frac{\text{エキスの重量(g)}}{\text{試料の重量(g)} \times \frac{100 - \text{試料の乾燥減量(\%)}}{100}} \times 2 \times 100$$

1) 抽出時間の影響

試料の抽出時間を30分、一時間及び2時間とした。

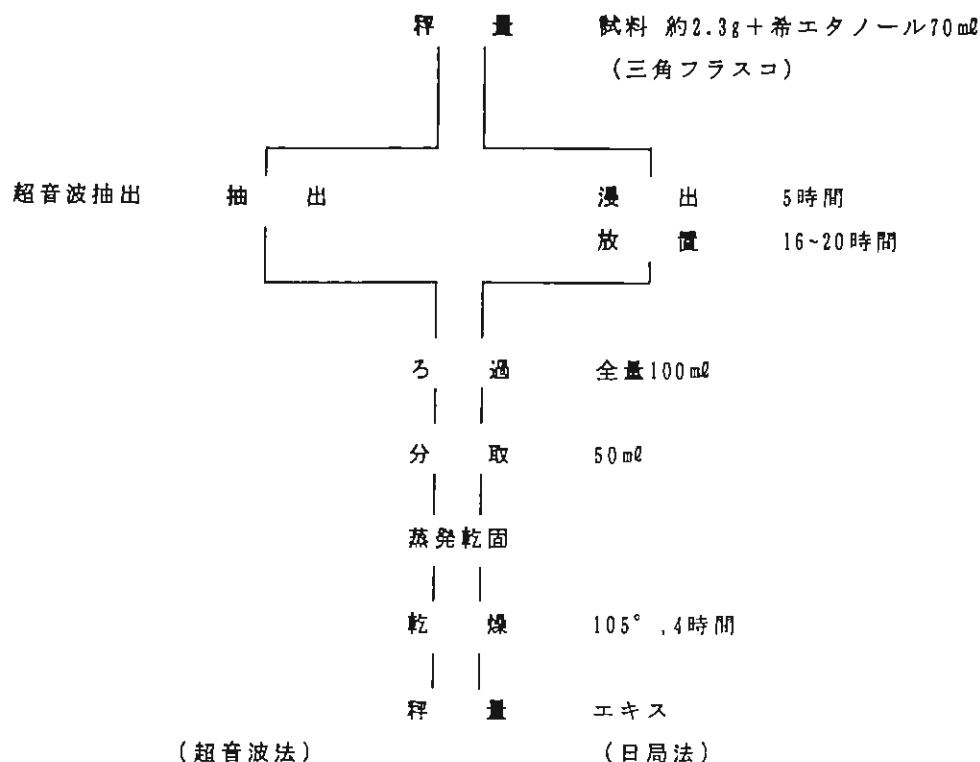


Fig.1 エキス含量測定の方法

2) 抽出温度の影響

超音波抽出槽内に冷却機をつけ、抽出時間を30分とし、槽内温度20°及び30°で抽出を行った。

3) 日局法との比較

試料を超音波抽出機で30分抽出したものと、日局に従って抽出したものとを比較した。

なお、試験は1群5回とし、有意差の検定には Student の t-検定を用いた。また表の値は、平均±標準誤差で示した。

実験結果

1. 超音波抽出時間の影響

安定したエキス含量測定が得られるためには試料をどのくらい超音波で抽出すればよいか検討した (Table. 1, Fig. 2)。その結果、これら5種類の生薬のエキス含量は、30分抽出時の平均値と、1時間及び2時間抽出時の平均値との間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。また抽出時間が20分以内

超音波抽出時間	30 分	1 時間	2 時間
カ ン ゾ ウ	33.56±0.56	34.56±0.81	33.47±1.13
ゲンノショウコ	24.45±0.78	25.01±1.08	26.10±1.33
セ ン ブ リ	24.57±0.65	24.32±1.15	24.48±0.96
ダ イ オ ウ	35.72±1.09	34.92±1.40	34.31±0.86
ニ ン ジ ン	29.48±1.11	29.03±0.78	29.31±1.04

平均±標準誤差 (n = 5)

Table.1 超音波抽出時間のエキス含量(%)への影響

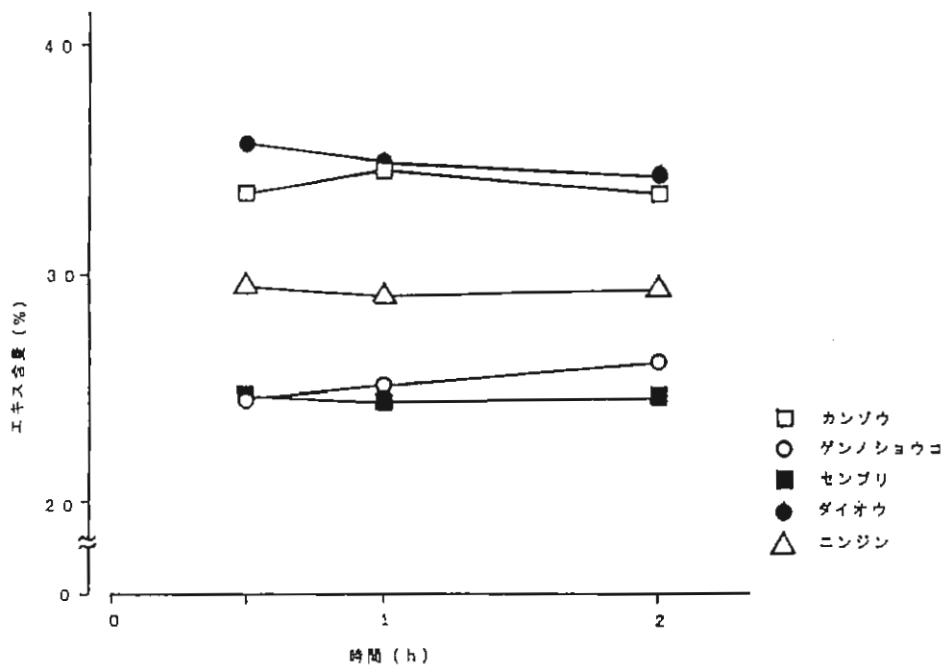


Fig.2 超音波抽出時間のエキス含量への影響

では測定値のばらつきが大きかったので、超音波抽出時間を以後30分と決めた。

2. 超音波抽出温度の影響

超音波抽出の操作時に抽出槽内の温度の上昇（1時間で約10°）がみられたので、抽出温度の影響を検討した (Table. 2, Fig. 3)。その結果、各々の生薬の抽出温度が20°での平均値と抽出温度が30°での平均値との間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。これより超音波抽出時の温度の上昇は、室温で30分抽出の場合は無視できると考えられる。

3. 超音波抽出法と日局法の比較

超音波抽出によるエキス含量と日局に従って測定したエキス含量ではどのような違いがあるか検討した (Table. 3, Fig. 4)。その結果、超音波抽出法の平均値と日局法の平均値との間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。

超音波抽出時間	20°	30°
カンゾウ	32.65±1.01	31.46±0.64
ゲンノショウコ	23.24±0.30	22.74±0.16
センブリ	24.15±0.96	23.05±0.30
ダイオウ	34.06±0.25	32.69±0.90
ニンジン	26.72±0.37	27.29±0.80

超音波抽出時間30分

平均±標準誤差 (n = 5)

Table.2 超音波抽出温度のエキス含量 (%) への影響

考 察

以上の結果から、これら5種類の生薬(カンゾウ、ゲンノショウコ、センブリ、ダイオウ及びニンジン)のエキス含量測定に関しては、次のように考えることができる。

超音波抽出の条件としては、時間は30分で充分で、その間の温度上昇は無視できるということがわかった。また、この方法により得られたエキス含量は、日局に従って

	超音波抽出時間	日 局 法
カンゾウ	33.56±0.56	35.08±0.35
ゲンノショウコ	24.45±0.78	25.16±0.71
センブリ	24.57±0.65	26.01±0.72
ダイオウ	35.72±1.09	36.43±0.77
ニンジン	29.48±1.11	29.36±1.05

超音波抽出時間30分

平均±標準誤差 (n = 5)

Table.3 超音波抽出法と日局法によるエキス含量 (%) の比較

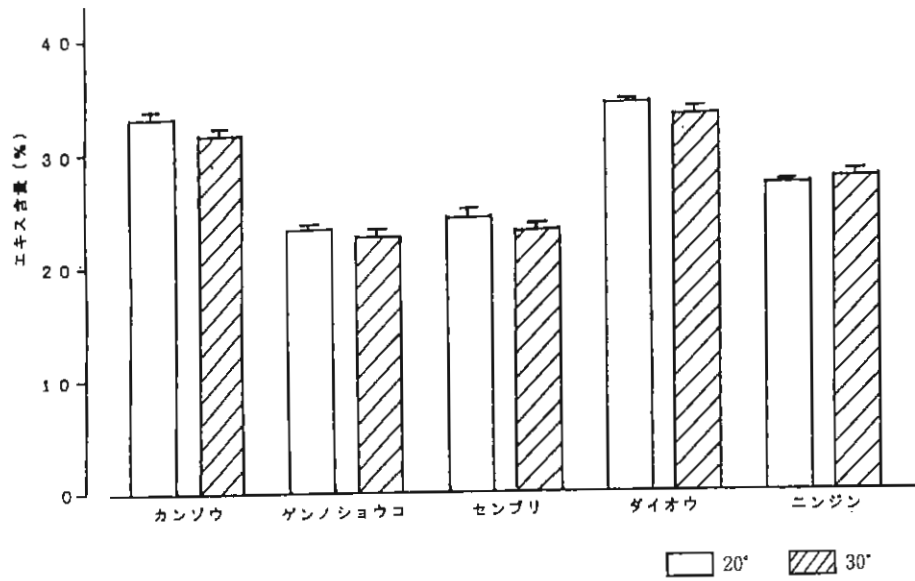


Fig.3 超音波抽出温度のエキス含量への影響
(抽出時間30分)

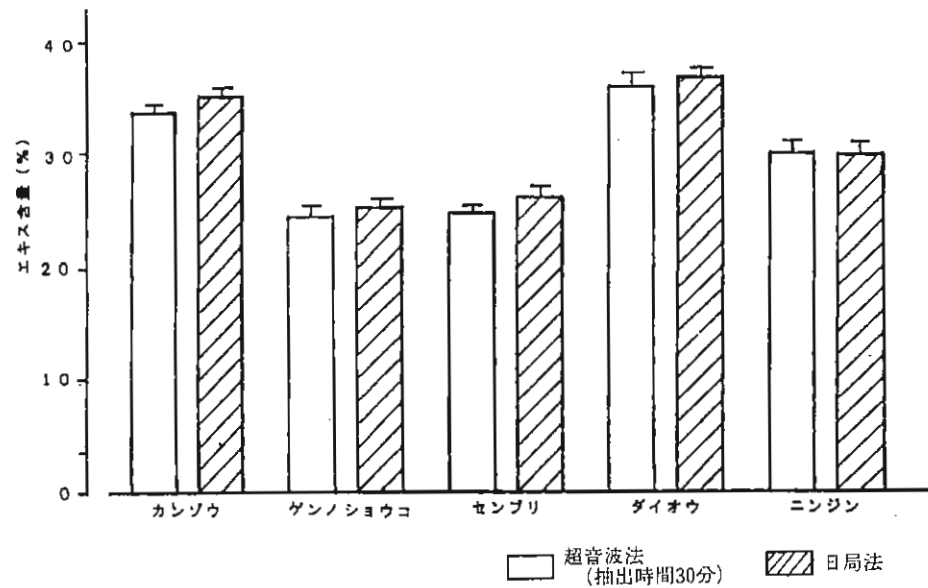


Fig.4 超音波抽出法と日局法によるエキス含量の比較

測定したエキス含量と差が認められなかった。従って、超音波抽出によるエキス含量測定法は、日局法の簡便法として用いることができると考えられる。

今後、試料を他の生薬やエキス製剤に、抽出容媒を他の容媒に変えて超音波抽出法と日局法との比較を行っていきたい。

【原 著】

経皮適用粘着剤の製剤学的評価

— 硝酸イソソルビドを指標として —

Evaluation Adhesives for Transdermal Application

— Isosorbide Dinitrate as Model Drug in Plasters —

南 木 朗

Akira MINAMIKI

大協薬品工業株式会社 研究開発部

Research and Development Division, Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.

緒 言

近年、経皮吸収による全身作用を目的とした貼付剤が開発され、ニトログリセリンや硝酸イソソルビド (ISDN) を含有する製剤が既に臨床的に汎用されている。

薬物を皮膚から吸収させるためには、何らかの方法で製剤を皮膚に固定し、薬物と皮膚との有効接触面積を確保することが最初の条件と考えられる。このような目的で粘着剤を応用し、薬物を直接粘着剤中に分散・溶解させた製剤においては粘着性を十分把握した上で薬物の放出性、皮膚透過性、経皮吸収性並びに皮膚刺激性の検討を行い、処方最適化がなされるべきである。そこで、製剤開発の基礎研究の一環として、粘着特性の異なるゴム系及びアクリル系の ISDN 含有貼付剤を試作し、ラット経皮吸収実験を行い、粘着特性との関係を検討した。

実験の部

1. 試料の作成

ゴム系の試料は同一の弾性体、可塑剤、粘着付与剤を用い、その組成比を変え、粘着特性の異なる3種類の貼付剤を溶媒法で試作した。

アクリル系の試料は化学的には同一系で架橋度の異なる溶剤タイプの粘着剤を用いて粘着特性の異なる3種類の貼付剤を試作した。

ポリエステルフィルムを支持体とし、薬物含量はすべて 1 m^2 (膏体40g) 中 8g とした (Table.1)。

Table.1 試料 (プラスター剤) の内容

試料群	粘着剤	支持体	試料数
BB	ゴム系	ポリエステルフィルム	3
CA	アクリル系	ポリエステルフィルム	3

2. 実験方法

1) 粘着特性試験

(1) 傾斜式ボールタック試験¹⁾

傾斜角 30° の斜面上に助走距離10cm, 試料粘着面5cmで一連のスチールボールをころがし, 粘着面上で5, 30, 60秒間転落を止め得る最大のボールNo.を求めた (Fig. 1 Table. 2)。

(2) 回転ドラム式ボールタック試験

一定速度で回転するドラムに試料を装着し, 粘着面にスチールボール (No. 5) を置き, 円周速度 $30\text{cm}/\text{min}$ でホルダーを介してボールに働く回転モーメントを測定した (Fig. 2)。

(3) プローブタック試験

レオメーター (不動工業製, NRM-2002J 型) により試験を行った。直径1cmの円盤状のプローブに試料を固定し, ガラス板, ベークライト板, ヒト前腕部皮膚 (被着体) に対する定荷重圧着後の引き剥し力を測定した。被着体装着部 (昇降台) の昇降速度は $6\text{cm}/\text{mni}$ とし, 設定荷重 850g に達した時点で直ちに降下させた (Fig. 3)。

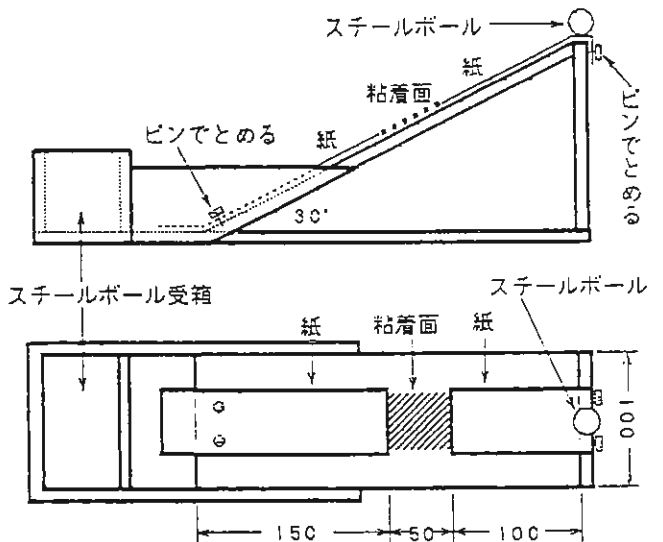


Fig.1 傾斜式ボールタック試験装置

Table.2 スチールボールの種類

No.	直径(inch)	重量(g)
1	4/32	0.13
2	6/32	0.45
3	8/32	1.0
4	10/32	2.0
5	12/32	3.5
6	14/32	5.6
7	16/32	8.3
8	18/32	11.9
9	20/32	16.3
10	22/32	21.7
11	24/32	28.2
12	26/32	35.8
13	28/32	44.8
14	30/32	55.0
15	32/32	66.7

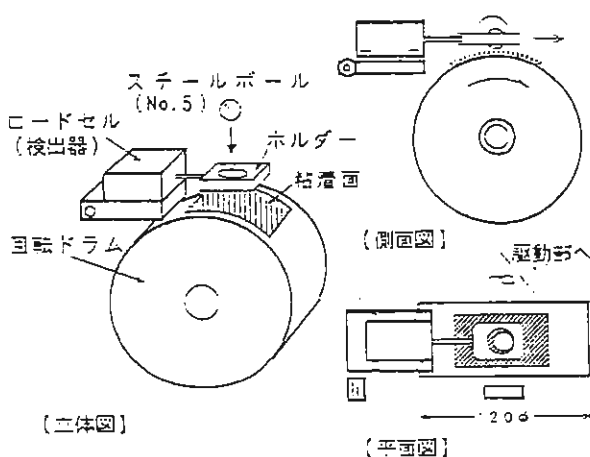


Fig.2 回転ドラム式ボールタック試験装置

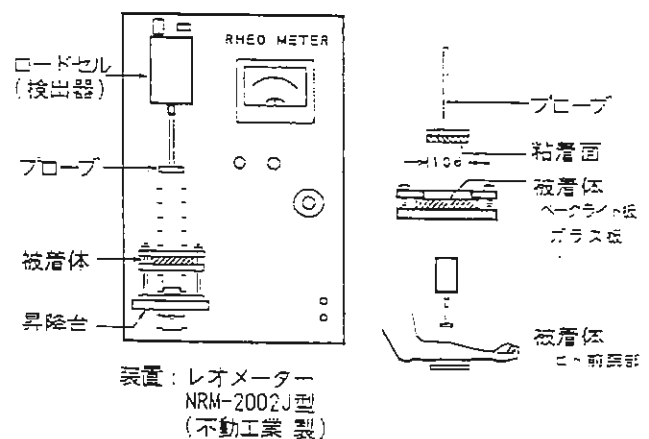


Fig.3 プローブタック試験装置

(4) 180°角定速剝離強度試験

日局絆創膏の粘着力試験に準じて試験を行った (Fig. 4)。

(5) T型凝集破壊強度試験

試料を12mm×60mmの大きさに2枚裁断し、この粘着面同志を850gのゴムローラーを用い、毎分30cmの速度で1往復して貼り合わせた(ただし、長辺方向の一端約1cmを残す)。これを37°の恒温槽中で30分間放置した後、直ちにレオメーターの上下のクランプに2枚の自由端をそれぞれ強く固定し、毎分30cmの速度で引き剥し、凝集破壊強度を測定した (Fig. 5)。

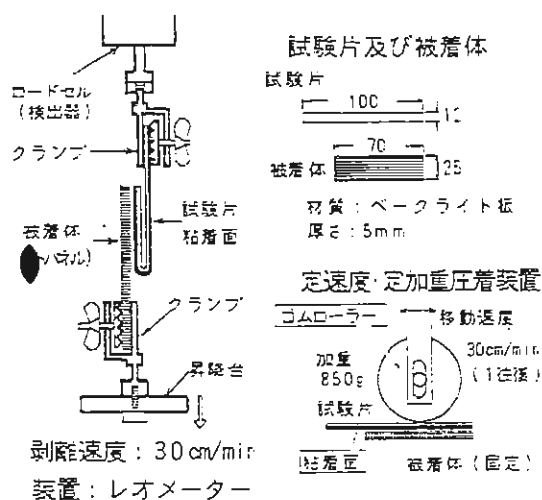


Fig.4 180°角定速剝離強度試験装置

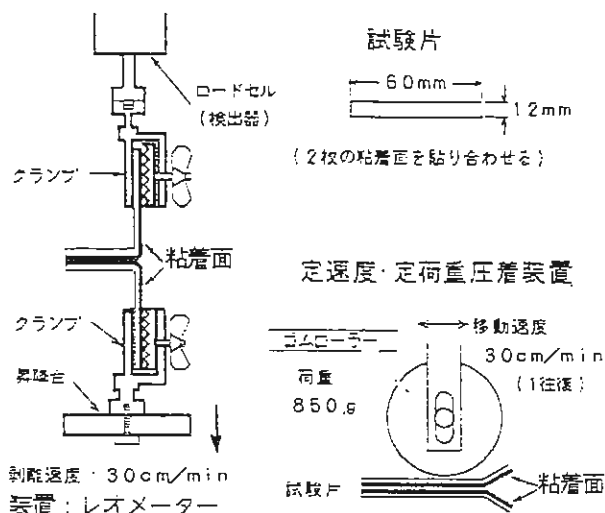


Fig.5 T型凝集破壊強度試験装置

2) ラット経皮吸収実験

(1) 実験動物及び飼育条件

体重約150gのウイスター/S T系雄性ラットを数日間馴化し、健康状態が良好なものを実験に使用した。ラットは金網床懸垂式ケージに5匹ずつ収容し、固形飼料(船橋農場, MM-1)及び水は自由に摂取させた。室温 $23 \pm 2^\circ$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 照明時間午前8時~午後8時で飼育した。

(2) 投与方法

ラットに25%ウレタン生理食塩液1ml/匹を腹腔内投与して麻酔し、背部をバリカン及びシェーバーで慎重に除毛した。正中線上の一箇所直径4cmの円形に打ち抜いた試料 (ISDN10mg)を貼付した。貼付1, 3, 6時間後に頸動脈より約0.6mlを採血し、毎分15,000回転で遠心分離した。

(3) 定量法

血漿0.3mlに内標準溶液として硝酸イソマンニド (IMDN) 酢酸エチル溶液 (100ng/ml) 0.3mlを加え、ヘキサン (和光純薬製, 残留農薬試験用試薬) 1mlで4回振とう抽出した。有機層を合わせて、窒素気流下に留去し、ヘキサン0.5mlを加えて5分間超音波抽出し、試料溶液とした。IMDNはHockett等の方法²⁾によりmannitolからisomannideを合成し、Jackson等の方法³⁾によりisomannideをニトロ化しisomannide dinitrateを合成した。これをメタノール中より再結晶し、mp $64.5 \sim 65.5^\circ$, 純度98%以上とし、内標準物質とした。

別に、無処置の血漿0.3mlに段階的濃度のISDN 酢酸エチル溶液 (25~150ng/ml) 0.3mlを加え、以下試料溶液と同様に操作して検量線作成溶液を調製した。ISDN標準品は市販の20%

ISDN 酢酸エチル溶液（中国化薬製）を減圧留去し、精製して純度99%以上のものを使用した（Fig. 6）。

試料溶液及び検量線作成溶液につき、次の条件でガスクロ法により試験を行った。

操作条件

装置：63Ni 装備 ECD 付ガスクロマトグラフ（島津製，GC-8AIE 型）

注入口：ソルベントレス試料導入装置（島津製）

注入量：6 μ l

カラム：メガボアキャピラリーカラム（J & W 社製，DB-5，内径0.53mm ϕ ×長さ15m）

カラム温度：150°注入口・検出器温度：200°

キャリアーガス：高純度窒素（純度>99.995%）

流量：ISDN の保持時間が約11分になるように調製した。

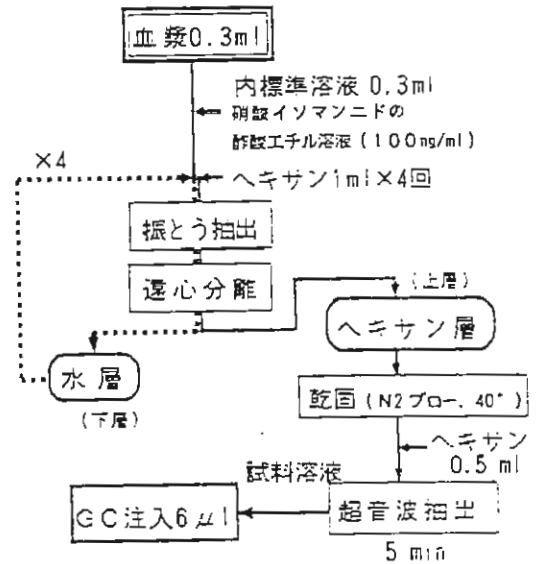


Fig.6 定量操作フローチャート

結果及び考察

1. 粘着性試験

Table. 3 に各粘着特性試験の結果を示した。粘着テープの粘着物性は主に初期粘着力 (tack)、剥離力 (peel adhesion)、保持力 (shear adhesion) の三特性で評価される。しかし、これらの特性値は厳密に物理化学的に定義されたものでなく、試験法によって規定されるものである。⁴⁾

従って、貼付剤としての実用的な価値を製剤設計する際には評価項目に対して、用いる試験法により得られる代用特性値が適当なものであるかを検討し、選択されるべきである。

今回は各試験法間の関連性を解析するに至らなかったが、ヒトに皮膚（前腕部）を被着体としたプローブタック試験は感覚的な粘着性を直接反映するものであり、官能試験に対する適切な代用特性になるものと考えられる。更に、経皮吸収性及び皮膚刺激性と粘着特性の関係を検討することにより、最適な粘着特性の設計が可能になるものと考えられる。

Table.3 粘着特性試験結果

試験法	粘着剤 製剤No.	ゴム系			アクリル系		
		BB-1	BB-2	BB-3	CA-1	CA-2	CA-3
傾斜式	判定5秒	6.4±0.5*	7.8±1.1	4.4±0.5	10.2±0.4	11.4±0.6	12.2±0.4
ボールタック試験 (ボールNo.)	判定30秒	4.0±0.7	5.2±0.8	4.2±0.4	10.0±0	11.2±0.4	11.6±0.5
	判定60秒	2.4±0.5	3.8±0.4	4.0±0	10.0±0	11.2±0.4	11.0±0
回転ドラム式ボールタック試験 (g)		12.6±3.0	16.5±5.0	30.8±6.8	46.3±7.0	50.6±10.1	49.6±9.6
プローブ タック試験 (g)	被着体：ガラス板	478±54	759±61	1130±133	1220±120	1364±162	2000±0
	：ベークライト板	253±36	402±57	716±95	1160±132	1380±150	2000±0
	：前腕部 被験者1	39±8	88±12	107±17	143±30	242±44	383±57
	被験者2	53±9	93±13	135±4	157±30	269±47	478±58
被験者3	52±14	96±17	140±39	160±33	264±42	455±80	
180°角定速剥離強度試験 (g)		121±20	183±20	210±28	1496±273	1178±192	1404±240
T型凝集破壊強度試験 (g)		110±22	118±17	184±19	670±81	616±79	1042±134

*平均値±標準偏差 (n=5)

2. ラット経皮吸収実験

1) 検量線

血漿中 ISDN 濃度が25~150ng/mlの範囲において良好な直線性を示した (Table. 4)。

2) 血漿中 ISDN 濃度の推移

Fig. 7に代表的な分析例を示した。血漿のバックグラウンドに妨害となるピークは認められず、良好な分離が得られた。

Table. 5に血漿中 ISDN 濃度の定量結果及び台形法により求めた6時間目までの AUC を示した。ラットの血漿中の ISDN 濃度の推移は Fig. 8に示すように、いずれの粘着剤においても貼付6時間では C max は確認できず、更に上昇する傾向が認められた。

Table.4 ISDN検量線データ

ISDN濃度 (ng/ml)	No.	重量比	平均値	ISDN 面積	IMDN 面積	面積比 y	平均値
0	1	0		0	380381	0	
	2	0	0	0	391514	0	0
	3	0		0	311528	0	
25	1	0.2412		58421	321546	0.1817	
	2	0.2540	0.2487	63520	302121	0.2102	0.2212
	3	0.2510		65545	241215	0.2717	
50	1	0.4824		122133	288173	0.4238	
	2	0.5079	0.4974	145892	322054	0.4530	0.4543
	3	0.5020		145891	300121	0.4861	
100	1	0.9647		272689	300125	0.9086	
	2	1.0158	0.9949	374515	401520	0.9327	0.9342
	3	1.0041		287844	299455	0.9612	
150	1	1.4471		401215	298451	1.3443	
	2	1.5238	1.4923	481526	332516	1.4481	1.4080
	3	1.5061		402589	281220	1.4316	
1次回帰式 平均: $y = 0.9481x - 0.0096$ $r^2 = 0.9983$							
1 : $y = 0.9468x - 0.0220$ $r^2 = 0.9987$							
2 : $y = 0.9541x - 0.0212$ $r^2 = 0.9992$							
3 : $y = 0.9421x + 0.0152$ $r^2 = 0.9995$							

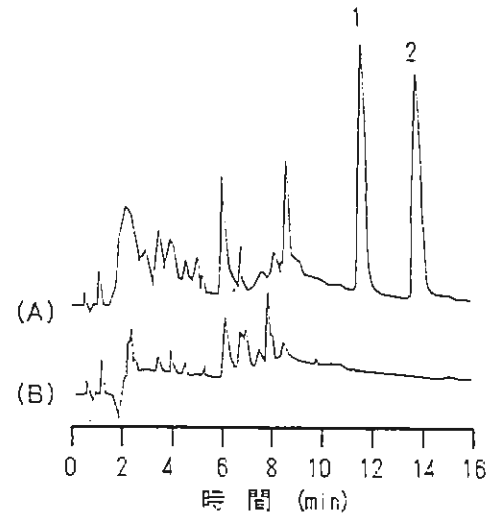


Fig.7 ラット血漿中のISDN分析例

(A): 試料溶液 ピーク1: ISDN
(B): ブランク溶液 ピーク2: IMDN

Table.5 ラット血漿中ISDN濃度
及びAUC(0→6hr)

製剤No	ラット血漿中濃度 [ng/ml]			AUC(0→6hr) [ng/ml·hr]
	投与1時間後	3時間後	6時間後	
BB-1	20.4±10.2*	46.0±22.7	62.9±22.3	240.0
BB-2	27.1±11.6	60.1±24.5	77.2±31.7	306.6
BB-3	53.9±22.1	77.3±30.0	80.2±28.8	394.3
CA-1	35.5±14.4	79.2±24.7	109.5±24.5	415.6
CA-2	43.7±20.6	87.5±27.4	108.0±28.1	446.2
CA-3	52.1±21.0	92.4±29.0	117.9±25.9	485.9

* 平均値±標準偏差 (n=6)

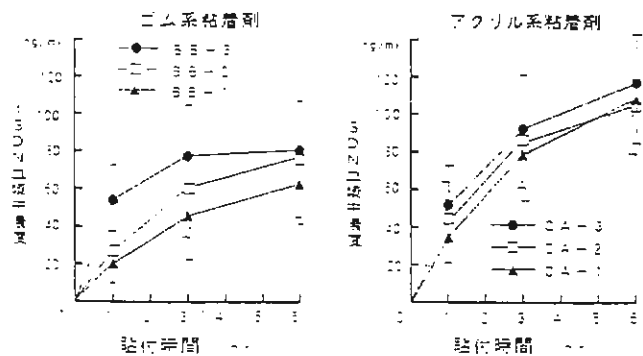


Fig.8 ラット血漿中ISDN濃度の推移

各点は平均値, 棒線は標準偏差を示す (n=6)

3) 粘着特性と経皮吸収性の相関

ゴム系, アクリル系の各粘着剤について, 粘着特性が異なる3種類の試料の AUC (0→6 hr)

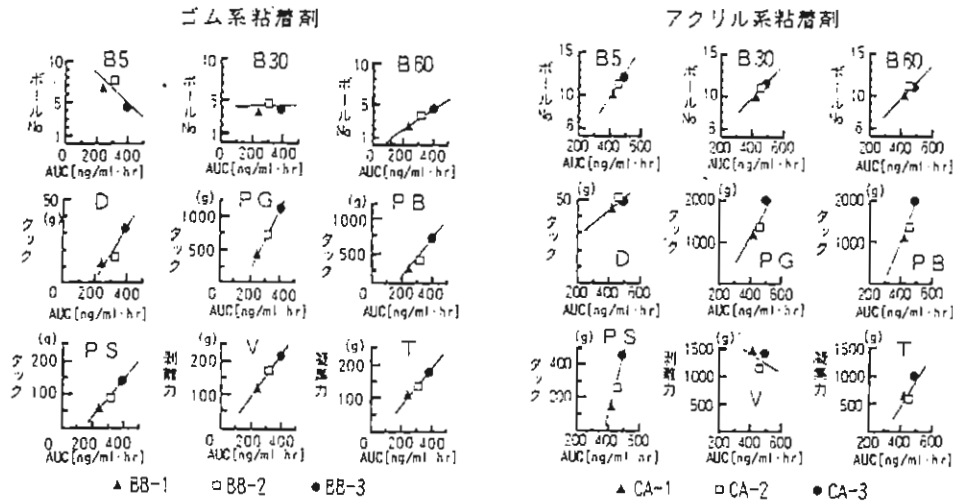


Fig.9 粘着特性試験値とAUC (0→6hr) との相関

B 5 : 傾斜式ホールタック試験 判定5秒 PG : プロブタック試験 被着体 : ガラス板 D : 回転ドラム式ホールタック試験
 B 30 : 傾斜式ホールタック試験 判定30秒 PB : プロブタック試験 被着体 : ベークライト板 V : 180°角定速剥離強度試験
 B 60 : 傾斜式ホールタック試験 判定60秒 PS : プロブタック試験 被着体 : ヒト前腕部 T : T型凝集破壊強度試験

とこれに対応する各粘着特性試験値との相関係数を求め、Table. 6 に示し、Fig. 9 に横軸を AUC、縦軸を粘着特性試験値としてプロットし、これに 1 次回帰直線を描いたグラフを示した。

Table.6 粘着特性試験値とAUCとの相関係数

試験法	AUC(0→6hr)	ゴム系 BB-1~3	アクリル系 CA-1~3
傾斜式ホールタック	判定5秒	-0.6472	0.9821
"	判定30秒	0.0773	0.9374
"	判定60秒	0.8835	0.7287
回転式ドラム式ホールタック		0.9714	0.6806
プロブタック被着体: ガラス板		1.0000	0.9625
" : ベークライト板		0.9923	0.9813
" : ヒト前腕部		0.9969	0.9957
180°角定速剥離強度		0.9547	-0.2088
T型凝集破壊強度		0.9470	-0.8442

テープ剤における ISDN の皮膚透過速度は粘着基剤中で ISDN が飽和濃度以下の場合、濃度に比例し、飽和濃度以上となった場合、粘着剤の種類によらず一定となることが小口等⁵⁾により報告されている。

これより本研究に用いた試料はすべて飽和濃度以上に設定したため、製剤本来の皮膚透過速度は一定と仮定して考察すると、粘着特性試験値と AUC (0 → 6 hr) との間に高い相関性が認められるものがあり、貼付 6 時間目までの経皮吸収の比較的初期段階において、粘着性が経皮吸収性に影響する可能性が示唆された。皮膚への粘着性が単に実用面だけでなく、経皮吸収性に対しても重要な要因であると考えられる。ただし、各試験法と粘着剤の組合せによっては全く異なった傾向を示す場合があり、特定の試験法で経皮吸収性を含めた粘着剤の評価は難しく、総合的な判定が必要である。

文 献

- 1) 日本公定書協会：医薬品製造指針，1991年版．薬業時報社，東京，1991．p.77
- 2) Hockett R., Fletcher H., Sheffield E., Goepf R., Soltzberg S.: Hexitol Anhydrides. The Structures of the Anhydromannitols of Brigl and Grüner. The Structure of Isomannide, J. Am. Chem. Soc., 68, 930-935 (1946)
- 3) Jackson M., Hayward L.: The Action of Pyridine on the Dinitrate Esters of 1,4;3,6-Dianhydrohexitols, Can. J. Chem., 38, 496-502 (1960)

- 4) 遠山三夫：粘着剤の機能とその評価，第9回「粘着技術研究会」講演要旨集（大阪），43-53（1988）
- 5) 小口真奈美，畑中朋美，杉林堅次，森本雍憲：経皮適用を目的とした感圧接着剤の製剤学的検討，日本薬剤学会第5年会講演要旨集（東京），118-119（1989）

【原 著】

パップ剤成分の抗菌作用

Antimicrobial effect of an ingredient contained in poultice

森 いずみ

Izumi MORI

西嘉山 久世

Nagayo NISHIKAYAMA

成 川 佳 美

Yoshimi NARIKAWA

笹 倉 貢

Mitsugu SASAKURA

楠 昭 一

Shoichi KUSUNOKI

リードケミカル株式会社 研究部

Research Department, Lead Chemical Co., Ltd.

緒 言

現在医薬品製剤の細菌汚染に関する規格試験としては、注射剤及び点眼剤に規定されている無菌試験、ならびに昭和51年度薬発第297号で規定された「内用液剤及びX線造影剤の菌数の限度及び試験法」がある。パップ剤については特に菌数限度等の規定はなく、使用上の注意として医療用、一般用ともに損傷皮膚や粘膜等に使用しない旨記載されている。しかし、誤って傷のある皮膚に使用される懸念もあり、医療用形成パップ剤GMPにも製品の品質確認の指標となる試験項目の例の一つとして微生物汚染試験があげられている。

今回成形パップ剤の細菌試験方法の検討を行い、パップ剤成分の抗菌作用ならびに市販製剤の細菌数について試験を行った。

実験の部

1. 実験材料

1) 被験物質

市販パップ剤9種のほか、一般にパップ剤に配合される精油成分として、dl-カンフル、l-メントール、サリチル酸メチルおよびハッカ油を用いた。

2) 抽出機器

ストマッカー (オルガノ製), ピーズ

3) 抽出溶媒

生理食塩水, 0.1%ペプトン・リン酸緩衝液およびポリソルベート80を5%加えた0.1%ペプトン・リン酸緩衝液を使用した。

4) 寒天培地

S C D寒天培地

5) 供試菌：黄色ブドウ球菌 (staphylococcus aureus)

2. 実験方法

1) 細菌数測定法の検討

細菌数の測定方法としては液体培地段階希釈法 (MPN法) や寒天平板混釈法があるが、予備試験の結果パップ剤抽出液は白濁を生じたため、MPN法を採用した場合、後培養を必要とし操作が煩雑であった。従って本試験では寒天平板混釈法を採用し抽出方法、抽出溶媒について検討を行った。

(1) 抽出機器の検討

軟膏やクリームでは一般にビーズとともに三角フラスコに入れて振り混ぜる方法が採用されているが、凝集性の高いパップ剤の場合、抽出不足が懸念される。そこで食品の細菌試験で用いられているストマッカーによる抽出方法をビーズによる抽出方法と比較検討した。

なお、抽出溶媒としては生理食塩水、培地はS C D寒天培地を用いた。

(2) 抽出溶媒の検討

損傷菌は生理食塩水中では死滅しやすく、一方、ポリソルベート80の添加により均一に混合されやすくなることから、抽出溶媒として生理食塩水、0.1%ペプトン・リン酸緩衝液ならびにこれにポリソルベート80を5%加えた液の3種につき、S C D寒天培地を使用し溶媒の適性を比較検討した。

なお、抽出機器としてはストマッカーを用いた。

2) 市販パップ剤の細菌数

市販パップ剤9種について抽出溶媒は生理食塩水、抽出機器はストマッカー、培地はS C D寒天培地を用いて細菌数を測定した。

3) パップ剤成分の抗菌作用

黄色ブドウ球菌約 10^2 個を含有する寒天培地を入れたシャーレを蓋側を下にして置き、dl-カンフル、l-メントール、サリチル酸メチルおよびハッカ油をそれぞれ蓋の中央に約0.5gを置いて菌に対する影響を検討した。

次いで同様に黄色ブドウ球菌約 10^2 個を含有する寒天培地にハッカ油を0% (v/v) から0.5% (v/v) まで各濃度に添加し、細菌に対する影響を検討した。

3. 実験結果

1) 細菌数測定法の検討

(1) 抽出機器の検討 (Table. 1)

ビーズ法とストマッカー法にほとんど差は認められなかったが、細菌数はいずれもストマッカー法の方に多い傾向が認められた。

(2) 抽出溶媒の検討

生理食塩水、0.1%ペプトン・リン酸緩衝液ならびにこれにポリソルベート80を5%加えた液のいずれも細菌数にほとんど差は認められなかったが、パップ剤の場合ポリソルベート80の添加によって膏体がくずれにくくなり抽出時間を延長する結果となった (Table. 2)。

2) 市販パップ剤の細菌数 (Table. 3)

市販パップ剤9種について細菌数を試験した結果によれば、生薬末を10%含むA製品が他製品に比較して著名に細菌数が多く (230cfu/g)、精油量が0.5%と比較的少ないC製品 (50cfu/g)

がこれに次いだ。一方、第二世代貼付剤は溶剤又は香料としての精油成分(ハッカ油, l-メントール等)の配合は少ないがいずれも細菌数は少なかった(15~30cfu/g)。

3) パップ剤成分の抗菌作用

シャーレ中にdL-カンフル, l-メントール, サリチル酸メチル及びハッカ油のいずれの精油成分を置いた場合も黄色ブドウ球菌はコロニーを形成しなかった(Table. 4)。

寒天培地にハッカ油を添加した試験では0.35% (v/v) 以上の添加により黄色ブドウ球菌はコロニーを形成しなかった(Table. 5)。

Table.1 ビーズ法とスタマッカー法の菌数比較

試料	抽出法	ビーズ法 (cfu/g)	スタマッカー法 (cfu/g)
A		<10	30
B		10	15
C		10	25

Table.2 抽出溶媒が及ぼす菌数への影響

抽出溶媒	培地	SCD寒天培地 (cfu/g)
生理食塩水		20
0.1%ペプトン・リン酸緩衝液		30
0.1%ペプトン・リン酸緩衝液にポリソルベート80を5%加えたもの		20

Table.3 市販パップ剤の細菌数

市販パップ剤	精油量(%)	その他の成分特徴	cfu/g
A	2.5	生薬末 10%	230
B	2.0		30
C	0.5	生薬エキス 1%	50
D	1.0		<10
E	1.3		<10
F	2.8	生薬末 1%	20
G	実測 0.8	第二世代 貼付剤	20
H	実測 1.5	第二世代 貼付剤	15
I	実測 0.8	第二世代 貼付剤	30

Table.4 黄色ブドウ球菌に対する精油成分の影響

試料	回	1	2	3	平均
空試験		237	237	245	240
dL-カンフル		0	0	0	0
l-メントール		0	0	0	0
サリチル酸メチル		0	0	0	0
ハッカ油		0	0	0	0

(単位: cfu/g)

Table.5 黄色ブドウ球菌に対するハッカ油の濃度の影響

ハッカ油濃度	回	1	2	3	平均
0 v/v%		70	67	67	68.7
0.25 v/v%		69	56	48	57.7
0.30 v/v%		60	47	63	56.6
0.35 v/v%		0	0	0	0
0.40 v/v%		0	0	0	0
0.50 v/v%		0	0	0	0

(単位: cfu/g)

考 察

細菌試験では含量既知の配合成分についての定性・定量試験と異なり、試験対象が定性的、定量的に未知であるだけに試験方法の精度の確認がむずかしく十分な検討が必要とされる。抽出が不十分な場合は事実に関係なく菌が検出されないこともあり得る。

第二世代貼付剤のE C各国への輸出に際し細菌試験法確立のため種々検討を行った結果、パップ剤の細菌数測定にはストマッカーを用いて生理食塩水で抽出した後S C D寒天培地で培養することにより、効率よく、より正確な結果が得られるものと判断した。

パップ剤中に配合される精油成分には一般に抗菌作用があるとされているが¹⁾、今回の試験の結果シャーレ中に揮散した精油成分により黄色ブドウ球菌は増殖せずその作用が確認された。また、市販パップ剤中の細菌数の差は配合された生薬中の細菌等にも影響されるようにも思われるが、その数はいずれも「内用液剤及びX線造影剤の細菌数限度 ($1.0 \times 10^3 / \text{g}$ 未満)」をはるかに下回った。また、この方法に準じて実施した大腸菌群 Coliform, 黄色ブドウ球菌 *staphylococcus aureus*, 緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*, サルモネラ菌 *Salmonella* についての定性試験結果も陰性で市販パップ剤の細菌汚染度は極めて低いと考えられた。

文 献

- 1) 栗田啓幸, 精油成分の抗菌作用に関する細菌の知見, 防菌防黴, 10, 7, 301-308 (1982)

【原 著】

漢方製剤の品質に関する研究 (第6報)

— 三黄瀉心湯 —

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine VI

— San'o-shashin-to —

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.

緒 言

三黄瀉心湯は高血圧の随伴症状や便秘，更年期障害，血の道症などに汎用される漢方処方である。原典「金匱要略」では「大黄，黄連，黄芩，右三味以水三升煮取一升 頓服之」¹⁾とあるように三黄瀉心湯の調製方法としては水を加えて煮沸し，約1/3量まで煮つめることとなっている。しかし，近代以降振り出し剤の用法を指示するものも見受けられ，また，エキス剤では一般に攪拌還流抽出法による調製が行われている。そこで，これら3種の抽出方法の違いによるエキス収率と指標成分の移行率ならびに抽出の時間的経過に伴う指標成分移行率推移につき検討したので報告する。

実験の部

1. 被験材料

大黄(北海道)，黄連(中国・四川省産)，黄芩(中国・河北省産)はいずれも市販の局方品を用いた。

なお，用いた生薬の指標成分の含有率(%)はTable. 1のとおりである。

Table. 1 被験材料

三黄瀉心湯構成生薬	指標成分名	含有率
大 黄(北海道産)	センノシドA	0.7%
黄 連(四川省産)	ベルベリン バルマチン	6.5% 1.3%
黄 芩(河北省産)	バイカリン	10.8%

2. 実験方法

1) 各抽出方法によるエキス収率

(1) 抽出方法

① 原典による抽出法

三黄瀉心湯 5 g (1日分：大黄2.0g，黄連，黄芩各1.5g) に120mlの水を加え，煮沸して，約1/3にまで濃縮し，布ごしろ過した。

② 振り出し抽出法

三黄瀉心湯 5 g (1日分：大黄2.0g, 黄連, 黄芩各1.5g)に100mlの熱湯を加え, 3分間煮沸し, 布ごしろ過した。

③ 攪拌還流抽出法

三黄瀉心湯100g (20日分：大黄40g, 黄連, 黄芩各30g)に水1000mlを加え, 攪拌還流しながら抽出し, 沸騰後30分, 1時間及び2時間後それぞれ布ごしろ過した。

(2) 濃縮・乾燥方法

布ごしろ過した各抽出液は遠心分離し, 40~50°で減圧濃縮後, 60°で24時間真空乾燥し, 得られた各乾燥エキスを秤量した。

2) 各抽出方法における指標成分の移行率

抽出方法及び濃縮・乾燥方法については1)の方法に準じた。

得られた各乾燥エキスはそれぞれ下記の試料溶液調製方法及び測定条件で液体クロマトグラフィーを行い各指標分量を求めた。

(1) 黄連中のベルベリン, パルマチンの試料溶液調製方法及び測定条件

試料溶液調製方法

各乾燥エキスを氷酢酸含有含水メタノールを加えて30分間超音波抽出し, 一定量にした液を試料溶液とした。

氷酢酸含有含水メタノール：メタノール・25%氷酢酸混液 (4 : 1)

測定条件 カラム：Cosmosil 5 C₁₈-AR Φ 4.6mm×150mm

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長345nm)

移動相：0.1N酒石酸・アセトニトリル・メタノール・ラウリル硫酸ナトリウム混液 (49.5 : 40 : 10 : 0.5)

流速：1.0ml/min.

カラム温度：40°付近の一定温度

(2) 大黄中のセンノシドAの試料溶液調製方法及び測定条件

試料溶液調製方法

各乾燥エキスを70%メタノールを加えて30分間超音波抽出し, 一定量にした液を試料溶液とした。

測定条件：カラム：Cosmosil 5C₁₈-AR Φ 4.6mm×150mm

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長340nm)

移動相：水・アセトニトリル・氷酢酸混液 (82 : 18 : 1)

流速：0.5ml/min.

カラム温度：40°付近の一定温度

(3) 黄芩中のバイカリンの試料溶液調製方法及び測定条件

試料溶液調製方法

各乾燥エキスを下記測定条件の移動相を加えて30分間超音波抽出し, 一定量にした液を試料溶液とした。

測定条件：カラム：Cosmosil 5 C₁₈-AR Φ 4.6mm×150

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長280nm)

移動相：0.1Mリン酸・アセトニトリル混液 (72 : 28)

流速：0.4ml/min.

カラム温度：40°付近の一定温度

3) 三黄瀉心湯湯液中の指標成分移行率の経時的推移

三黄瀉心湯100g (20日分：大黄40g, 黄連, 黄芩各30g) に水1,000mlを加え, 沸騰直後, 沸騰30分, 60分, 90分, 120分及び150分後に一定量を採取し, 2) の測定条件で各指標成分量を求めた。また, 大黄40g, 黄連30g, 黄芩30gをそれぞれ取り, これらに水1,000mlずつを加え, 三黄瀉心湯の場合と同様に操作し, 4種類の指標成分について定量を行った。

4) 三黄瀉心湯湯液での指標成分の移行が低率を示す要因の検討

黄連と黄芩, 黄芩と大黄, 大黄と黄芩の組合わせでそれぞれ湯液を等量ずつ混合して沈殿生成の有無等を観察した。

実験結果

1) 各抽出方法によるエキス収率

各抽出方法によるエキス収率を Table.2. に示した。

この結果, 原典による方法及び攪拌還流抽出ではエキス収率は25~27%とほとんど差はなかった。しかし, 振り出し法では抽出時間が短いためか約20%と若干減少した。

Table.2 各抽出方法によるエキス収率(%)

抽出方法	抽出時間	エキス収率
原典による方法	1 時間	25%
振り出し法	煮沸 3 分	20%
攪拌還流抽出法	1 時間	25%
〃	2 時間	27%

2) 各抽出方法における指標成分の移行率

各抽出方法における指標成分の移行率を Table.3. に示した。

Table.3 各抽出方法における指標成分の移行率(%)

抽出方法	センノシドA	ベルベリン	バイカリン
原典による方法	25	27	55
振り出し法	28	23	40
攪拌還流抽出法 30分	55	32	50
〃 60分	50	35	55
〃 90分	43	35	55

これによればバイカリンは各抽出方法で移行率に大差がないが, ベルベリンは攪拌還流抽出法の場合, その他の抽出法の約1.5倍, センノシドAは約2倍の移行率を示した。しかし, この場合センノシドAは抽出時間の延長に伴い移行率が低下する傾向が認められた。

3) 三黄瀉心湯湯液中の指標成分移行率の経時的推移

三黄瀉心湯湯液調製における指標成分移行率の推移をそれぞれの指標成分を含有する生薬湯液のそれと比較した。大黄中のセンノシドAについては Fig. 1, 黄芩中のバイカリンについては Fig. 2, 黄連中のベルベリンについては Fig. 3, パルマチンについては Fig. 4 にそれぞれ示した。

黄芩及び黄連湯液中のバイカリン, ベルベリン及びパルマチンの移行率がそれぞれ97%, 90%, 95%に達したのに比較して三黄瀉心湯湯液中ではそれぞれ53%, 36%, 42%といずれも沸騰開始60分後のピーク時で1/2量又はそれ以下であった。一方大黄中のセンノシドAは沸騰開始30分後に

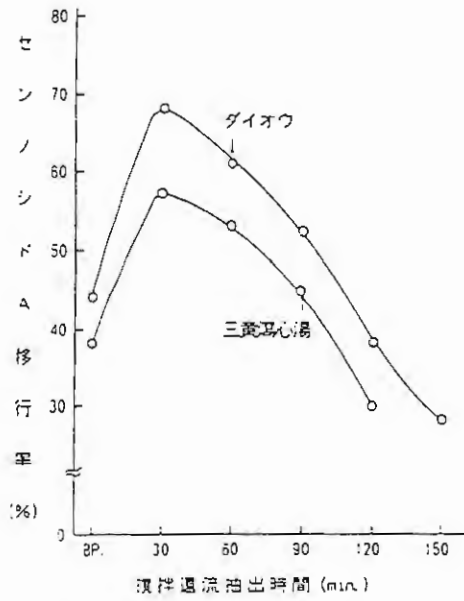


Fig.1 攪拌還流抽出液中のセンノシド A の移行率(%)

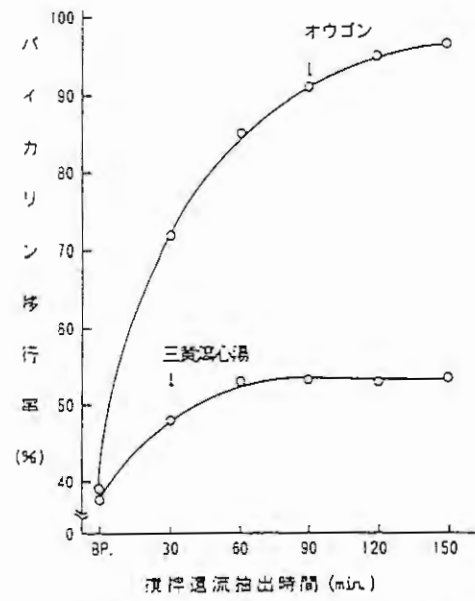


Fig.2 攪拌還流抽出液中のバイカリンの移行率(%)

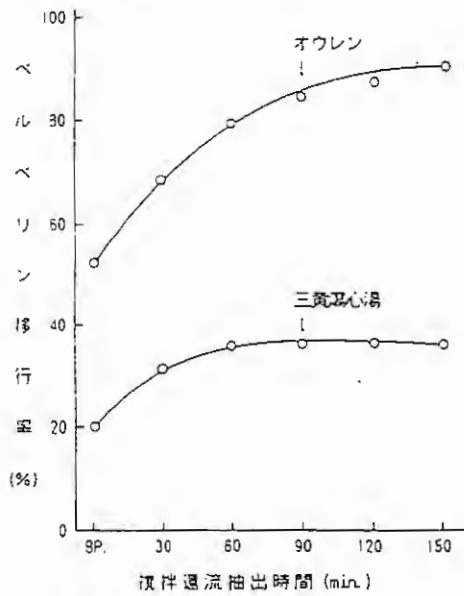


Fig.3 攪拌還流抽出液中のベルベリンの移行率(%)

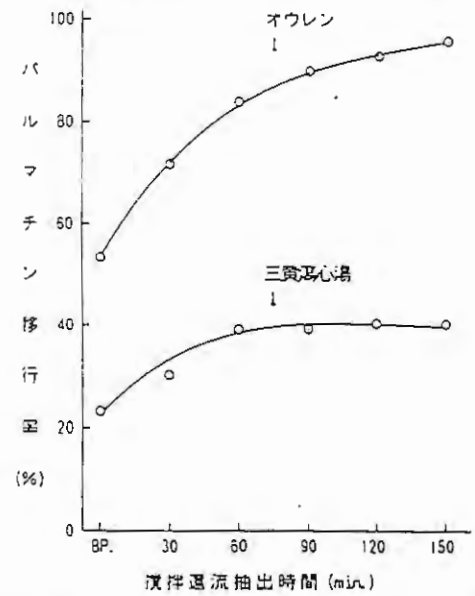


Fig.4 攪拌還流抽出液中のバルマチンの移行率(%)

大黄湯液は69%, 三黄瀉心湯湯液は56%の移行率でピークに達した後漸減して120分後にはピーク時の1/2量となった。

4) 三黄瀉心湯湯液での指標成分の移行が低率を示す要因の検討

黄連と黄芩, 黄芩と大黄, 大黄と黄連の組合わせでそれぞれ湯液を等量ずつ混合した場合の液

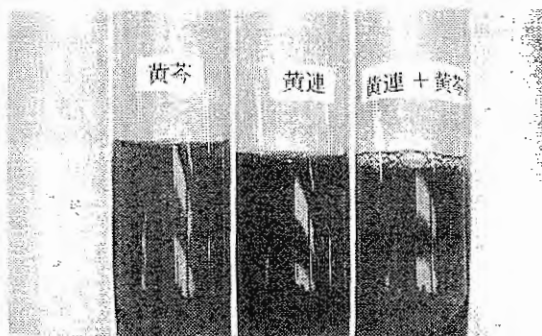


photo 1 黄芩湯液, 黄連湯液, 黄芩湯液+黄連湯液

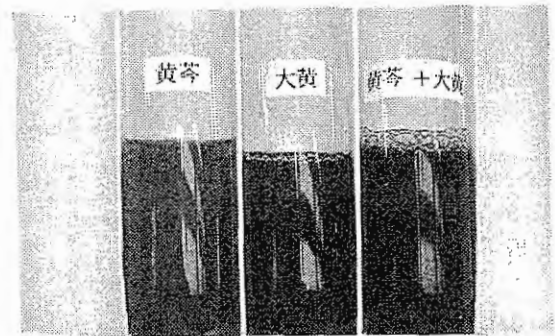


photo 2 黄芩湯液, 大黄湯液, 黄芩湯液+大黄湯液

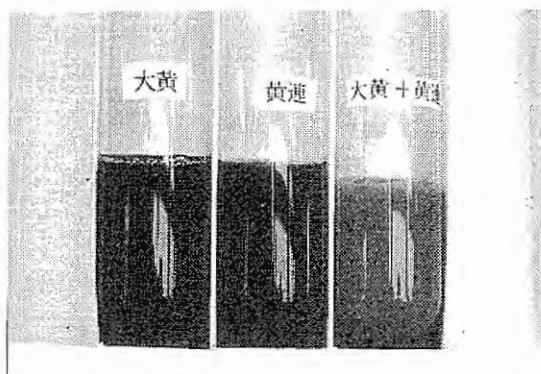


photo 3 大黄湯液, 黄連湯液, 大黄湯液+黄連湯液

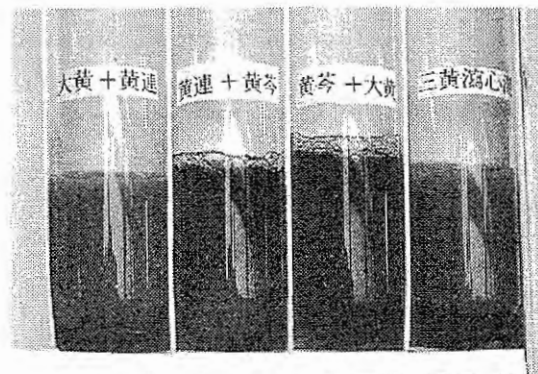


photo 4 大黄湯液+黄連湯液, 黄芩湯液+黄連湯液
黄芩湯液+大黄湯液, 三黄瀉心湯湯液

状につき Photo 1 ~ 4 に示した。黄連と黄芩, 大黄と黄連は著しく濁りを生じ, 黄連と黄芩の場合は沈殿物は速やかに沈下した。黄芩と大黄の場合は濁りや沈殿を生じなかった。

考 察

三黄瀉心湯は高血圧の随伴症状としてののぼせ気味, 精神不安, 便秘の傾向に用いられる漢方処方である。

本処方に関し, 原典では完全な煎剤としての調製法が示されているが近代以降振り出し剤としての用法を指示している向きもあり, また, 現在市販されているエキス製剤の場合は攪拌還流抽出法が主であるがその加熱条件等はメーカー毎で様々に行われているものと考えられる。

今回, 三黄瀉心湯につき各種抽出法を試みた結果, バイカリンについてはほとんど移行率に差はないが, センノシドAについては攪拌還流抽出法では他の方法の約2倍, ベルベリンは約1.5倍の移行率を示した。一方, 大黄中のセンノシドAの長時間加熱時の分解についてはすでに報告²⁾がある。

また, 三黄瀉心湯中の各指標成分が抽出中に示す動向を検討した結果, 黄芩中のバイカリン, 黄連中のベルベリン, パルマチンは約1/2~1/3の移行率で, これは黄芩中の成分と黄連中の成分, 大黄中の成分と黄連中の成分がそれぞれ反応して沈殿を生じることに起因するものと考えられる。また, 三黄瀉心湯中のセンノシドAの場合も大黄湯液中のそれと比較して低率であるが, 大黄湯液中のセンノシドAも69%の移行率にとどまり, また, 沸騰30分経過後は漸減するところから加熱による分解が進むものと考えられる。

バイカリン, ベルベリン, パルマチンの移行率から判断すれば, 沸騰60分程度が抽出条件として適当と考えられるが, センノシドAの安定性に配慮すれば沸騰後30~60分程度となる。今後はこれらの各成分分量及び配合比率が三黄瀉心湯としての効果にどのように影響するかを臨床の場で検討されることを期待する。

なお, 各生薬湯液の混合により生じた沈殿については今後解明したいと考えている。

文 献

- 1) 張中景: 金匱要略, 明刊俞子木本影印本, 燎原, 東京, 1977
- 2) 成川一郎: 漢方製剤の品質に関する研究(第3報) - 大黄甘草湯 -, 家庭薬研究, No. 8, P 47-51 (1989)

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討 (第五報)

— カプサイシンについて —

Studies on Standardization of Crude Drug Components (V)

—Capsaicin—

富山県薬事研究会分析部会 (カプサイシン分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

○島 谷 隆 夫 Takao SHIMATANI	救急薬品工業(株) Kyukyu Pharmaceutical Co.,LTD
金 田 千 果 Thika KANEDA	テイカ製薬(株) Teika Seiyaku Co.,LTD
横 田 洋 一 Youichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural institute for Pharmaceutical Research

(○論文執筆者)

[緒 言]

従来、漢方製剤の品質管理の一手段として生薬中の指標成分の定量が、実施されてきており、第12改正日局でも、液体クロマトグラフ法並びにガスクロマトグラフ法などが成分の定量に導入されている。しかし、全ての生薬に対してこれが規定されているわけではなく、今回我々が取り上げたトウガラシの薬効成分のカプサイシンについては、医薬品製造指針で定量が義務づけられているにもかかわらず、定量法並びにそれに伴う標準品の規格設定がなされていない。

本研究では、この点をふまえて、カプサイシンの標準品の調製法並びに規格設定を目的として共同研究を行い、若干の知見を得たので以下その詳細を報告する。

1. カプサイシン標準品の現状

本分析部会では、現在市販されている生薬試験用標準品の規格について先づ調査した。その結果Table. 1に示す。規定されている規格試験は、融点と、TCL法並びにHPLC法による純度試験のみで乾燥条件並びに含量規格などは、設定されてはいなかった。参考までにTable. 2にTCL法並びにHPLC法の操作条件を示すが、規格の統一はなされていない。

2. 実験方法

1) 標準品の規格並びに試験方法の設定

本部会による標準品の規格設定の項目は文献(1)(2)(3)(4)(5)を参考に、比吸光度、純度試験並びに定量法とし、従来の標準品の規格方法に準じて設定した。

2) 本標準品の調製方法

市販標準品は価格的に高価であるため、比較的廉価であるカプサイシンの試薬一級品 (カプシ

Table.1 市販生薬試験用標準品の規格及び試験方法

市販生薬試験用 標準品のメーカー		設 定 内 容			
		(1) 外 観	(2) 融 点	(3) TLC 法	(4) HPLC法
1	S 社		64~67°		
2	K 社			単一スポットを認める。	含量:98%以上
3	W 社	白色~わずかに微褐色の結晶~粉末	64~66°	単一スポットを認める。	含量:90%以上 [通常95%以上]

Table.2 市販生薬試験用標準品の純度試験方法

1) TLC法

設 定 項 目	設 定 内 容	
	W 社	K 社
1 薄 層 板	シリカゲル70F ₂₅₄ プレートワコー(20cm・5cm)	
2 展 開 溶 媒	ジエチルエーテル・メタノール混液(19:1)	
3 展 開 距 離	約12cm	
4 チャージ量	20 μ g/2 μ l (溶媒:メタノール)	
5 検 出 方 法	①紫外線照射→目視	
	②2.6ジプロモキノクロロイミド試液を噴霧後、アンモニアガスに放置→目視*)	
備 考	*)2.6ジプロモキノクロロイミド0.1g+メタノール10ml	

2) HPLC法

設 定 項 目	設 定 内 容	
	W 社	K 社
1 検 出 器	紫外吸光度計 [測定波長:281nm]	紫外吸光度計 [測定波長:281nm]
2 カ ラ ム	NUCLEOSIL 10C ₁₈ [4mm・25cm]	YWC-PACK A-312(ODS) [6mm・15cm]
3 カラム温度	30°	40°
4 移 動 相	薄めたリン酸(1→1000)・アセトニトリル混液(2:3)	0.05Mリン酸1ナトリウム試液・アセトニトリル混液(1:1)
5 流 量	1.0ml/min	1.0ml/min
6 注 入 量	2 μ g/20 μ l (溶媒:溶離液)	
備 考		

ノイド)を選択し、高圧分取用カラムを用いて、本標準品の製法を検討した。

3) 各標準品の品質

1) で設定した規格及び試験方法に基づいて、市販標準品並びに本標準品について品質評価の比較を行なった。

3. 結果及び考察

1) 標準品の規格並びに試験方法の設定

(1) 比吸光度

[設定条件]

試料溶液の調製：試料約10mg を精密に秤り，メタノールを加えて500mlとする。

測定波長：カプサイシンの吸収極大波長である280nm を利用。

(2) 純度試験 (TLC法)

[設定条件]

試料溶液の調製：試料約10mg をメタノール1 mlに溶解。

標準溶液の調製：試料溶液0.5mlにメタノールを加えて50mlとする。

薄層板：薄層クロマトグラフ用オクタデシルシリル化したシリカゲルを用いて調製

展開溶媒：メタノール・水・テトラヒドロフラン混液 (15 : 3 : 2)

展開距離：約10cm スポット量：10 μ l

検出方法：2, 6-ジプロモキノロンクロロイミド溶液を噴霧後，アンモニアガス中に放置する

(3) 定量法 (HPLC法)

[設定条件]

試料溶液の調製：約10mg を精密に秤り，メタノールを加えて10mlとする。

標準溶液の調製：試料溶液1 mlにメタノールを加えて100mlとする。

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：280nm)

カラム：内径4～6 mm,長さ10～30cmのステンレス管に粒子径5 μ 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填したものを利用。

カラム温度：40 $^{\circ}$ 付近の一定温度

面積測定範囲：溶媒のピークの後からカプサイシンの保持時間の約2倍までの範囲

検出感度：試料溶液1 mlを正確に秤り，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20mlにつき，上記の条件で操作するとき，カプサイシンのピークのスケーリングが約20%になるように検出器の感度を調製する。

<イオン抑制クロマトグラフ法>

流量：カプサイシンの保持時間が約12分になるように調整する

移動相：薄めたリン酸 (1 \rightarrow 1000)・アセトニトリル混液 (11 : 9)

<銀イオンペークロマトグラフ法>

流量：カプサイシンの保持時間が約18分になるように調整する

移動相：メタノール・水混液 (53 : 47) に0.03Mの硝酸銀を加えて溶かしたもの

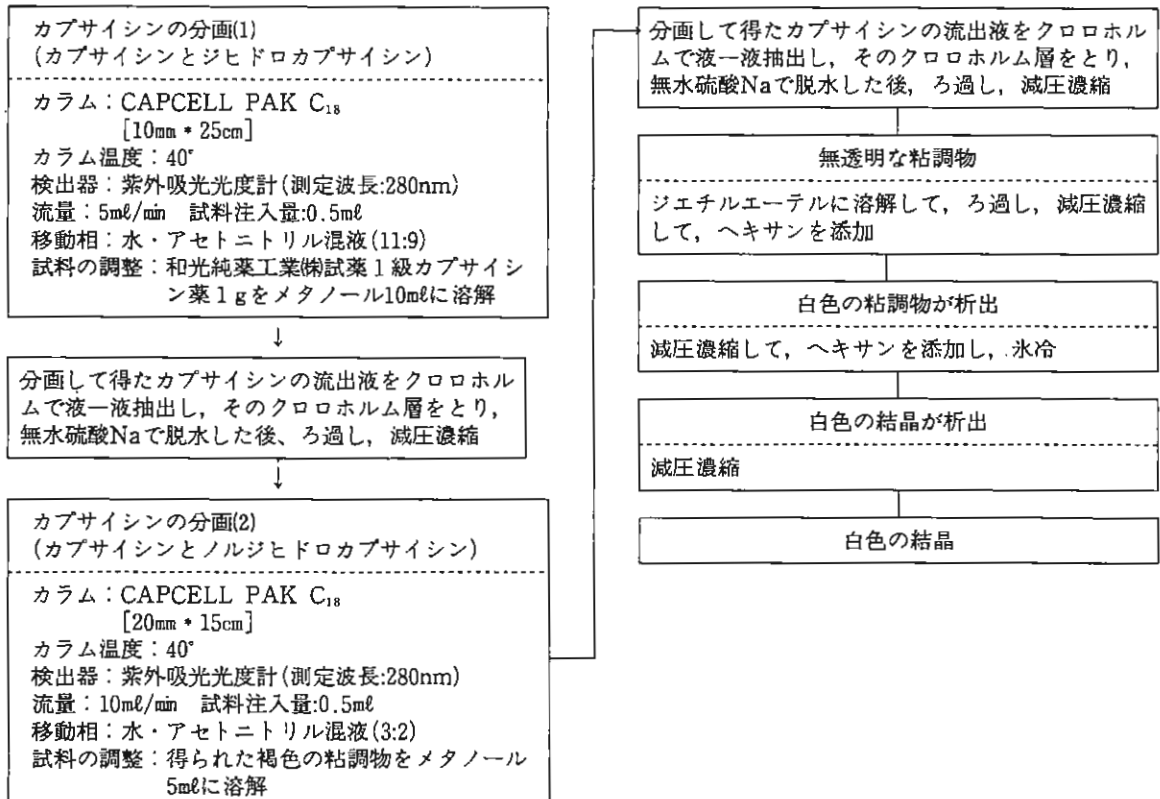
2) 本標準品の製法の検討

カプサイシン試薬1級品を出発原料に用いて，高圧分取クロマトグラフ法を2回繰り返して，分画後，有機溶媒による結晶化により，白色の結晶性の粉末が得られた。この本標準品の調製手順とクロマトパターンを Table. 3 並びに Fig. 1 に示す。

3) 標準品の品質評価

市販標準品並びに本標準品の品質評価の検討一覧表を Table. 4 に示し，それに伴う HPLC 法のクロマトグラムを Fig. [2, 3] に示す。

Table.3 [本標準品の製造フローシート(高压分取クロマトグラフ法)]



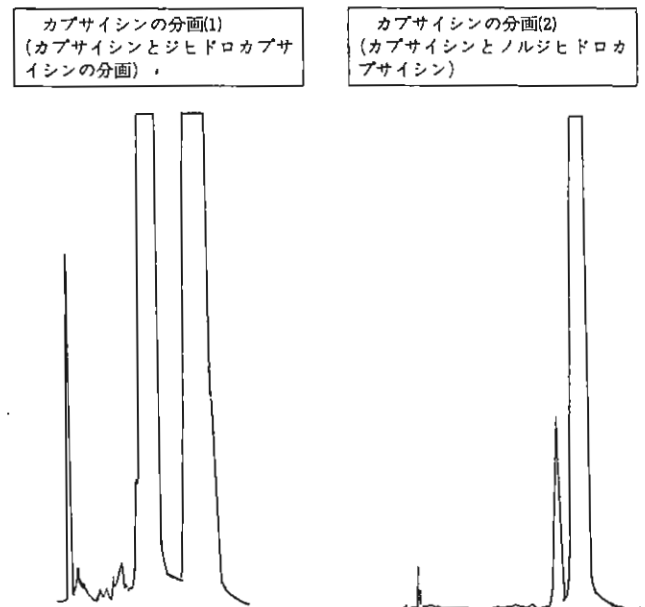
市販標準品は経時的に変化したためか, 含量はイオン抑制クロマトグラフ法において, 95%~98%とばらつき, いずれも99%以下であったが, 本標準品は, 99%以上の高い値を示した。しかし, 銀イオンペアークロマトグラフ法では, いずれもイオン抑制クロマトグラフ法よりもわずかに低い値であった。原因としては, カプサイシンのピークに重なっていたノニル酸ワニルルアミドが銀イオンペアークロマトグラフ法を用いることによりカプサイシンとノニル酸ワニルルアミドが分離し, 別のピークとなって出現し, カプサイシンの含量が見掛け上, 低下したものと推察される。

また, 純度試験は, 不純スポットは検出されず, 比吸光度では純度試験並びに定量法の結果に関係無く, 値がばらついていた。

4. まとめ

- (1) 各市販標準品といえども含量は一定しておらず, 99%以上(イオン抑制クロマトグラフ法)は存在しなかった。
- (2) 本標準品の調製方法では, 高压分取クロマトグラフ法を用い, 分画後, 再結晶を実施することで99%以上(イオン抑制クロマトグラフ法)になり, 市販標準品に比較して高純度のもの

Fig.1 [高压分取クロマトグラム]



(1) 比吸光度

繰り返し	分取精製品	S 社	K 社	W 社
1	103.6	108.7	107.6	113.5
2	104.6	109.6	109.7	108.9
\bar{X}	104.1	109.2	108.7	111.2

(2) 純度試験 (TLC法)

繰り返し	分取精製品	S 社	K 社	W 社
1	N.D	N.D	N.D	N.D
2	N.D	N.D	N.D	N.D
\bar{X}	N.D	N.D	N.D	N.D

※N.D: スポットを認めない

(3) 定量法 (HPLC法)

①イオン抑制クロマトグラフ法

繰り返し	分取精製品	S 社	K 社	W 社
1	99.77	98.31	95.25	95.29
2	99.32	98.23	95.05	95.05
\bar{X}	99.5	98.3	95.2	95.2

②銀イオンペアークロマトグラフ法

繰り返し	分取精製品	S 社	K 社	W 社
1	96.94	96.95	93.33	93.40
2	96.97	96.92	93.38	93.37
\bar{X}	97.0	97.0	93.4	93.4

Table.4 市販生薬試験用標準品並びに本標準品の品質評価結果

Fig.2 定量法のクロマトグラム [(1)イオン抑制クロマトグラフ法]

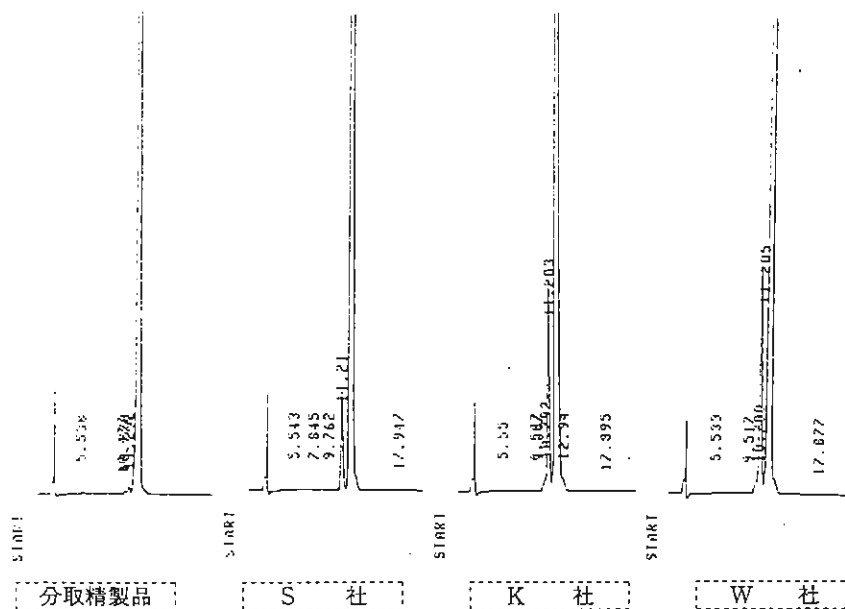
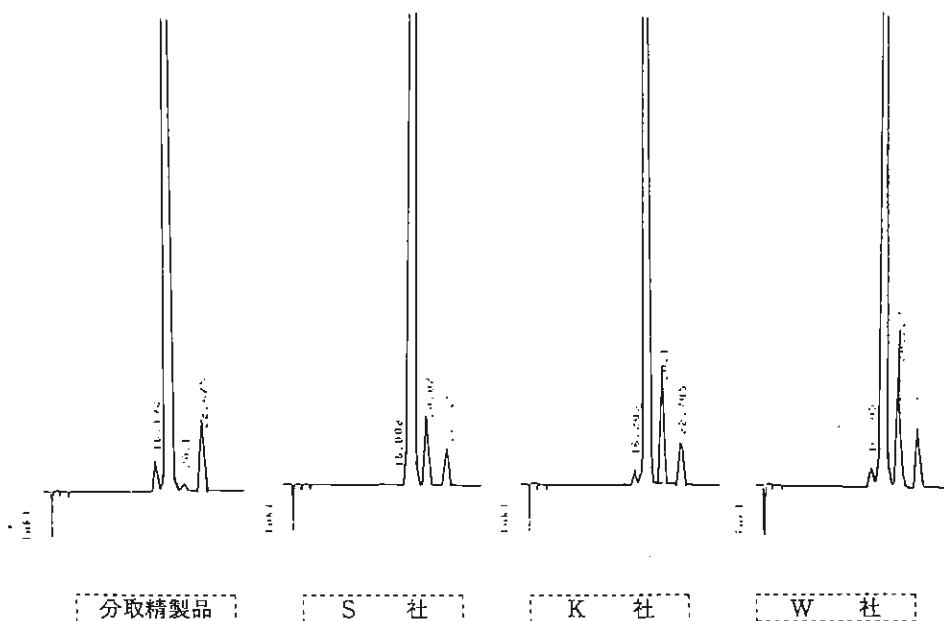


Fig.3 定量法のクロマトグラム [(2)銀イオンペアークロマトグラフ法]



が得られた。

- (3) 定量法 (HPLC 法) は, 銀イオンペークロマトグラフ法の方がイオン抑制クロマトグラフ法よりも分離能はよいが, カラムの耐久性並びにルーチン分析における簡便性を考慮すれば, 前者のほうが有用であると考えられる。

[謝 辞]

最後に, 本研究に多大な協力を受け賜った (元) テイカ製薬㈱, 明官紳一氏に感謝いたします。

[文 献]

- 1) 鈴木英世; 定量用生薬成分について, 第16回生薬分析討論会講演要旨集, 27, (1987)
- 2) 富山県薬事研究会分析部会: 生薬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)
- 3) 富山県薬事研究会分析部会: 生薬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)
- 4) 富山県薬事研究会分析部会: 生薬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 -, 家庭薬研究No.10, p.34(1991)
- 5) 富山県薬事研究会分析部会: 生薬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 -, 家庭薬研究No.10, p.41(1991)

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討（第六報）

— センノサイドについて —

Studies on Standardization of Crude Drug Components (VI)

— Sennoside —

富山県薬事研究会分析部会（センノサイド分科会）

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

○上 田 紀代美 Kiyomi UEDA	明治薬品(株) Meiji Yakuhin Co.,LTD.
小鍛治 まち子 Machiko KOKAJI	大和製薬(株) Taiwa Pharmaceutical Co.,LTD.
小 中 宏 子 Hiroko KONAKA	(株)内山薬品商会 Uchiyama Medicine Co.,LTD.
島 谷 隆 夫 Takao SHIMATANI	救急薬品工業(株) Kyukyu Pharmaceutical Co.,LTD.
正 川 仁 Hisashi SYOGAWA	共栄製薬(株) Kyohei Pharmaceutical Co.,LTD.
永 井 喜 美 Kimi NAGAI	(株)延 寿 堂 Enjudo Co.,LTD.
堀 地 茂 Shigeru HORICHI	東亜薬品(株) Toa Medical Co.,LTD.
宮 村 芳 昌 Yoshimasa MIYAMULA	中央薬品(株) Chuo Yakuhin Co.,LTD.
横 田 洋 一 Youichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

(○論文執筆者)

緒 言

センノサイドA, Bは、瀉下薬等に広く配合されるセンナ、ダイオウの成分であり、一般用漢方生薬剤中のセンナの定量用指標成分に指定されている。また、センナ、ダイオウ中のセンノサイドの定量も多数報告されており、数社から生薬試験用標準品が市販されているが、その品質についての報告は見当たらない。そこで、本部会では、センノサイド標準品の試験方法を設定し、市販標準品の品質評価を行うことを目的とし、共同研究を行った。また、センノサイドA, Bの溶液中での安定性についても若干の知見を得たので併せて報告する。

実験方法

1. 標準品の試験方法

市販センノサイド標準品の品質評価の検定項目として、HPLC法による定量法及びTLC法による純度試験で相対（クロマト）的純度を、比吸光度で絶対的純度を測定することにした。

2. 品質評価

1の方法により、市販標準品（センノサイドA 6種類、センノサイドB 4種類）の品質評価を行った。

3. 溶液中での安定性試験

溶解液は、1% NaHCO₃及び1% NaHCO₃・メタノール混液（1：1）の2種類とし、冷暗所に保存して、HPLC法による定量で経時変化を調べた。

結果及び考察

1. 標準品の試験方法

1) 定量法（HPLC法）

イオン抑制法及びイオンペア法で検討したが、イオン抑制法ではピーク割れが生じたため、イオンペア法を採用した。定量値は面積百分率法により求めた。

試験方法

試料溶液：センノサイドA, B 0.01g→10ml（1% NaHCO₃）

標準溶液(1)：試料溶液 1ml→100ml（1% NaHCO₃）

標準溶液(2)：標準溶液(1) 1ml→20ml（1% NaHCO₃）

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：270nm）

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

カラム温度：35°付近の一定温度

移動相：5mM テトラ-n-ブチルアンモニウム溶液（リン酸でpH6.5に調整）・メタノール混液（13：7）

流量：センノサイドAの保持時間が13～15分、センノサイドBが10～12分になるように調整する。

注入量：20μl

カラムの選定：センノサイドA及びセンノサイドB0.01gずつを1% NaHCO₃200mlに溶かす。

この液20μlにつき、上記の条件で操作するとき、センノサイドB、センノサイドAの順に溶出し、その分離度が2以上のものを用いる。

検出温度：標準溶液(2)20μlから得たセンノサイドのピーク面積が自動積分法により測定されるように調整する。また、標準溶液(1)20μlから得たセンノサイドのピーク高さがフルスケールの20%前後となるように調整する。

2) 純度試験（TLC法）

試料溶液の副スポットと、試料溶液を100倍希釈した標準溶液から得たスポットとの比較を行った。

試験方法

試料溶液：センノサイドA, B 2mg→1ml (5%トリエチルアミンのメタノール溶液)

標準溶液：試料溶液0.5ml→50ml (5%トリエチルアミンのメタノール溶液)

操作条件

薄層板：薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調整した薄層板

展開溶媒：酢酸エチル・n-プロパノール・水・氷酢酸混液 (19:17:12:2)

展開距離：約10cm

検出方法：25%硝酸を噴霧後、120°, 10分間加熱し、2% KOH のメタノール溶液を噴霧する。

スポット量：5 μl

3) 比吸光度 (E_{1%}^{1cm}値)

センノサイドAは、270, 335nmに、センノサイドBは、270, 310, 355nmにそれぞれ吸収極大を持つ。そこで、1% NaHCO₃に溶解した同一の試料溶液を施設の異なる6箇所測定し、各波長での比吸光度を求めた。

試料溶液の調製は、HPLC法による定量法で用いた試料溶液3mlを正確に量り、1% NaHCO₃を加えて正確に100mlとした。

メーカー	センノサイドA	センノサイドB
A	99.0%	97.5%
B	98.8%	95.6%
C	93.9%	94.8%
D	98.8%	96.7%
E	98.5%	— a)
F	95.1%	—

a) — : 未販売

Table.1 市販センノサイド標準品の定量結果

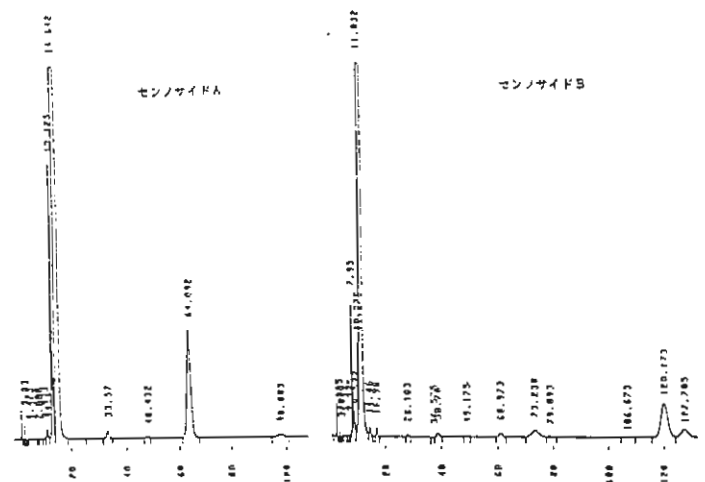


Fig.1 C社製標準品のHPLCクロマトグラム

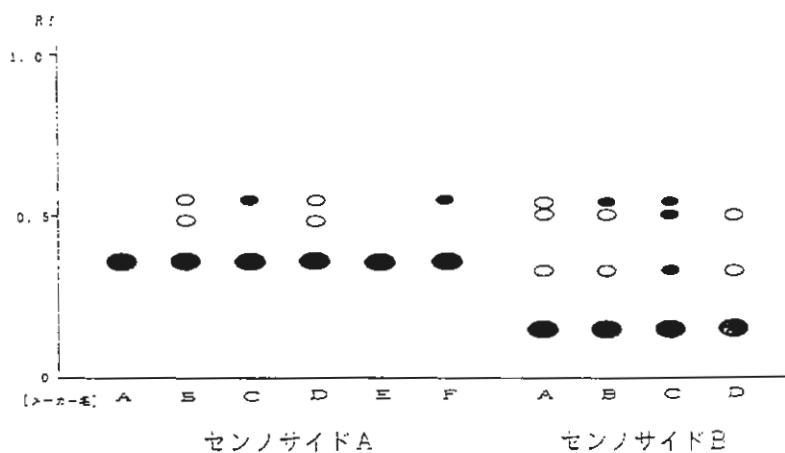


Fig.2 市販センノサイド標準品の純度試験結果

2. 品質評価

HPLC法による市販センノサイド標準品の定量結果を Table. 1 に示す。センノサイドA, B共に10mg 1万円前後と高価な標準品であるにもかかわらず、発売メーカーにより、センノサイドAは94~99%、センノサイドBは95~98%と定量値が大きくばらついていた。また、D社製標準品は、国産品よりも高価で、入手が困難な輸入品であるが、国産品であるA社製標準品と定量値はほぼ同程度であった。定量値の最も低かったC社製標準品のHPLCクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

TLC法による純度試験によって得られたクロマトグラムのパターンを Fig. 2 に示す。センノサイドAはRf値約0.4、センノサイドBはRf値約0.2で、それぞれの上にあるスポットが副スポットで、白抜きが標準溶液より薄いもの、黒が濃いものを表す。センノサイドAでは、定量値の低かったC, F社製標準品、センノサイドBでは定量値の低かったB, C社製標準品で標準溶液より濃い副スポットが認められ、HPLC法による定量法とTLC法による純度試験で相関性のある結果が得られた。

市販センノサイドA, B標準品の比吸光度を Table. 2, 3 に示す。センノサイドAは定量値の高かった4種類について測定したが、各施設間でのバラツキは小さかった。センノサイドBは Table. 3 に示す3種類について測定し、この他に、本部会で調製した定量値が99.5%という市販標準品より純度の高いセンノサイドBについても比吸光度を測定したが、310nmにおいて 156.4 ± 4.61 と市販標準品と差はなく、比吸光度と定量値との間に相関性は認められなかった。これは、定量法及び純度試験で認められた不純物が、センノサイドと同様な基本骨格を持ち、類似の吸収パターンを持つためと考えている。

メーカー	比吸光度 \pm SD ^{a)}	
	335nm	270nm
A	162.0 ± 2.31	209.5 ± 7.66
B	162.3 ± 1.87	210.0 ± 6.34
D	166.0 ± 4.77	217.5 ± 7.02
E	165.8 ± 2.39	214.7 ± 7.04

a) n=6

Table.2 市販センノサイドA標準品の比吸光度

メーカー	比吸光度 \pm SD ^{a)}		
	355nm	310nm	270nm
A	154.7 ± 6.32	160.1 ± 3.24	218.9 ± 6.49
B	154.6 ± 2.09	155.9 ± 2.89	214.1 ± 6.07
D	156.5 ± 5.56	160.9 ± 5.68	222.7 ± 7.38

a) n=6

Table.3 市販センノサイドB標準品の比吸光度

3. 溶液中での安定性試験

6箇月間の経時変化の結果を Table. 4 に示す。1% NaHCO₃中ではほとんど分解しなかったのに対し、1% NaHCO₃・メタノール混液(1:1)中では、181日後でセンノサイドAが約4%、センノサイドBが約10%とメタノールの混在により、若干分解したが、予想よりはわずかな低下率であった。

ま と め

- 市販センノサイド標準品は品質が一定ではなく、センノサイドBについては98%以上のものが市販されていないという結果が得られ、規格は設定できなかった。今後、本部会で純度の高いセンノサイドA, Bを調製し、今回検討した試験方法によって評価を行い、規格を設定することを考えている。

			試験開始時	11日後	31日後	103日後	181日後
センノサイドA	1%NaHCO ₃	定量値(%)	99.1	99.1	99.1	98.7	98.4
		残存率(%)	100.0	100.0	100.0	99.6	99.3
	1%NaHCO ₃ ・メタノール (1:1)	定量値(%)	99.1	99.0	98.5	97.4	95.5
		残存率(%)	100.0	99.9	99.4	98.3	96.3
センノサイドB	1%NaHCO ₃	定量値(%)	98.1	98.0	98.2	97.8	97.4
		残存率(%)	100.0	99.9	100.1	99.7	99.3
	1%NaHCO ₃ ・メタノール (1:1)	定量値(%)	98.2	97.1	96.0	91.8	88.0
		残存率(%)	100.0	98.9	97.8	93.5	89.7

Table.4 センノサイド標準品の冷暗所保存による経時変化

2. センノサイドA, Bは, 1% NaHCO₃中で冷暗所保存することにより, かなり安定であり, メタノールの混在により, 若干分解するという結果が得られた。