

【原 著】

和漢薬配合胃腸錠の製剤研究

—— 原料生薬の品質評価 ——

Studies on Pharmaceutical Preparation of Gastrointestinal Remedies
Containing Oriental Drugs

—— Quality Evaluation of Material Crude Durgs ——

○日水裕子 石黒文子 西浦桂子
Yuko HIMIZU Fumiko ISHIGURO Keiko NISHIURA

大協薬品工業株式会社
Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd

小貫峰男 前川利玄
Mineo ONUKI Toshiharu MAEKAWA

株式会社 陽進堂
Yoshindo Co.,Ltd

緒 言

アロエ、アカメガシワ、ガジュツ及び動物胆など漢薬を有効成分とする胃腸薬錠剤の製剤化を目的とし、原料生薬の品質評価、薬理学的研究を行った。

本研究では、アロエ末、アカメガシワ及びガジュツ末の確認試験及び定量試験を行い、産地及び形態による品質の違いを評価した。

アロエ末は、ケープアロエ (*Aloe felox* MILL. を主とする。) の葉から得られる液汁を乾燥、固化した後、粉碎したもので、主成分であるバルバロインを指標成分として確認試験及び液体クロマトグラフにより定量試験を行った。

アカメガシワは、トウダイグサ科 (*Euphorbiaceae*) のアカメガシワ *Mallotus japonicus* MUELL. ARG. の樹皮を乾燥したもので、樹皮に含まれるベルゲニンの抗潰瘍作用について報告がある。ベルゲニンを指標成分として、確認試験及び液体クロマトグラフにより定量試験を行い、アカメガシワ末及び各エキスの違いを評価した。

ガジュツ (*Cucuma zedoaria* Roscoe) は、ショウガ科 (*Zingiberaceae*) に属し、根茎を乾燥後、粉碎したもので、中国産または台湾産が多く、日本では屋久島で栽培されている。ガジュツは、芳香性健胃薬として胃腸薬に配合され、シネオール、ピネンなどのモノテルペノイドとセスキテルペノイドを含む。セスキテルペノイドは、胆汁分泌促進作用¹⁾ や抗潰瘍作用²⁾ について報告されている。このモノテルペノイド及びセスキテルペノイドについて薄層クロマトグラフ及びガスクロマトグラフにより比較し、産地による品質の違いを評価した。

実 験 の 部

実験材料:

アロエ末 (4社から購入した、局方品を用いた。)

アカメガシワ末 (局外生規)、乾燥エキス及び軟エキス。(4社から購入した。日本四国又は九州産)

ガジュツ末 (4社から購入した局方品を用いた。中国広西省、四川省産及び台湾産)。

日本屋久島産ガジュツ末を配合した市販胃腸薬。

試 薬:

バルバロイン (Sigma社)、ベルゲニン標準品 (松浦薬業)、 α -ピネン (Aldrich社)、シネオール、d ℓ -カンフ

ル及びカンフェン（東京化成）。

測定機器：

液体クロマトグラフ装置 島津製作所製ポンプ（LC-6A）、カラム恒温槽（CTO-6A）、UV検出器（SPD-6A）及びデータ処理装置（CR-5A）。

ガスクロマトグラフ装置 島津製作所製GC-14A及びデータ処理装置（CR-3A）。

実験方法

1. アロエ末

日本薬局方及び文献³⁾に準じて、確認及び定量試験を行った。

1) 確認試験

標準溶液：バルバロイン10mgに1.6mMシュウ酸・メタノール溶液10mlを加えて溶かし、標準溶液とする。

試料溶液：アロエ末200mgに1.6mMシュウ酸・メタノール溶液10mlを加えて5分間振り混ぜた後、ろ紙でろ過し、ろ液を試料溶液とする。

試料溶液及び標準溶液の10 μ lにつき、薄層クロマトグラフにより試験を行う。

TLC条件

薄層板：シリカゲル薄層板（蛍光剤入り）

展開溶媒：クロロホルム・エタノール・水混液（30：15：1）

展開距離：10cm

検出方法：紫外線（主波長365nm）照射

2) バルバロインの定量

標準溶液：バルバロイン（Sigma社、減圧5mmHg以下、24時間乾燥）約20mgを精密にとり、1.6mMシュウ酸・メタノール溶液を加えて溶かし、正確に20mlとする。この液5mlを正確に量り、1.6mMシュウ酸・メタノール溶液を加えて正確に50mlとする。この液5mlを正確に量り、内標準溶液2mlを正確に加えて振り混ぜ、標準溶液とする。

試料溶液：アロエ末約200mgを精密にとり、1.6mMシュウ酸・メタノール溶液70mlを加えて、30分間激しく振り混ぜた後、更に1.6mMシュウ酸・メタノール溶液を加えて正確に100mlとする。この液を遠心分離し、上澄液5mlを正確に量り、内標準溶液2mlを正確に加えて振り混ぜ、試料溶液とする。

内標準溶液：p-ジメチルアミノベンズアルデヒドの1.6mMシュウ酸・メタノール溶液（1 \rightarrow 50,000）。

試料溶液及び標準溶液10 μ lにつき、液体クロマトグラフにより試験を行う。

HPLC条件

検出器：紫外吸光光度計（354nm）

カラム：YMC ODS-A 6.0mm \times 150mm

移動相：薄めたリン酸（1 \rightarrow 1,000）・アセトニトリル混液（17：5）

カラム温度：40 $^{\circ}$

流速：1.0ml/min

2. アカメガシワ

局外生規及び文献⁴⁾を参考にして、確認及び定量試験を行った。

1) 確認試験

標準溶液：ベルゲニン10mgにメタノール10mlを加えて溶かし、標準溶液とする。

試料溶液：アカメガシワ末500mg又はアカメガシワ500mgに対応する乾燥エキス又は軟エキスにメタノール10mlを加えて5分間加熱する。冷後、ろ紙でろ過し、ろ液を試料溶液とする。

試料溶液及び標準溶液10 μ lにつき、薄層クロマトグラフにより試験を行う。

TLC条件

薄層板：シリカゲル薄層板（蛍光剤入り）

展開溶媒：クロロホルム・メタノール・水混液（6：4：1）

展開距離：10cm

検出方法：紫外線（主波長254nm）照射

2) ベルゲニンの定量

標準溶液：ベルゲニン標準品約20mgを精密にとり、メタノールを加えてとかし、正確に50mlとする。この液5mlを正確に量り、内標準溶液5mlを正確に加え、更に移動相を加えて50mlとし、標準溶液とする。

試料溶液：アカメガシワ末約200mg、乾燥エキス又は軟エキス約100mgを精密にとり、移動相70mlを加えて15分間超音波抽出した後、更に移動相を加えて正確に100mlとする。この液を遠心分離し、上澄液10mlを正確に量り、内標準溶液5mlを正確に加え、更に移動相を加えて50mlとし、試料溶液とする。

内標準溶液：4-Hydroxy-3-methoxy benzoic acidの移動相溶液（1→5000）。

試料溶液及び標準溶液10 μ lにつき、液体クロマトグラフにより試験を行う。

HPLC条件

検出器：紫外吸光光度計（272nm）

カラム：YMC ODS-AM 6.0mm×150mm

移動相：薄めたリン酸（1→1000）・アセトニトリル混液（9：1）

カラム温度：40°

流速：0.8ml/min

3. ガジュツ末

1) 精油含量の測定

日本薬局方。一般試験法。生薬試験法の精油含量の項に準じて行う。

2) 確認試験

1)で得られたキシレン液1 μ lにつき、薄層クロマトグラフにより試験を行う。

TLC条件

薄層板：濃縮ゾーン付きシリカゲル薄層板（蛍光剤入り）

展開溶媒：トルエン・ギ酸エチル混液（9：1）

展開距離：15cm

検出方法：氷酢酸・硫酸・p-アニスアルデヒド混液（100：2：1）噴霧後、105° 5分間、加熱。

3) セスキテルペノイド

文献⁹⁾に準じて行った。

精油分画試料の調製：ガジュツ末10gにメタノール60mlを加え、還流抽出器を付け50°の水浴で3時間抽出した後、ろ紙でろ過する。この操作を3回繰り返す。メタノール抽出液を合わせ、減圧（25°以下）で留去し、メタノール抽出物を得る。このメタノール抽出物にメタノール5mlを加えて溶かし、n-ヘキサン50mlで5回抽出する。n-ヘキサン抽出液を合わせ、減圧（25°以下）で留去し、n-ヘキサン抽出物を得る。次に、n-ヘキサン抽出物にn-ヘキサン5mlを加えて溶かし、SEP-PAK SILICA（Waters社製）に通し、更にn-ヘキサン20ml及びn-ヘキサン・エーテル混液（4：1）5mlを通す。全流出液を合わせ、減圧（25°以下）で留去する。得られた精油分画試料の重量を測定する。

セスキテルペノイドの確認試験：得られた精油分画試料にメタノール2mlを加えて溶かす。この10 μ lにつき2)のTLC条件に従って薄層クロマトグラフ法により試験を行う。

4) モノテルペノイドの定量

標準溶液： α -ピネン、シネオール、dl-カンフル及びカンフェンをそれぞれ約100mgずつ精密にとり、n-ヘキサンを加えて溶かし、正確に50mlとする。この液20mlを正確に量り、内標準溶液5mlを正確に加えて振り混ぜ、標準溶液とする。

試料溶液：ガジュツ末約50gを精密にとり、精製水700ml及びシリコーン樹脂1mlを加え、n-ヘキサン15mlで2時間ずつ3回水蒸気蒸留を行う。抽出後、n-ヘキサン層を分離し、正確に50mlとする。この液20mlを正確に量り、内標準溶液5mlを正確に加えて振り混ぜ、試料溶液とする。

内標準溶液：n-ヘプチルアルコールのn-ヘキサン溶液（1 \rightarrow 125）。

試料溶液及び標準溶液1 μ lにつき、ガスクロマトグラフ法により試験を行う。

GC条件

カラム：J & W社製、DB-WAX（30m \times 0.53mm ID）

カラム温度：初期温度60 $^{\circ}$ 、10分間保持。昇温速度5 $^{\circ}$ /minで110 $^{\circ}$ まで昇温。110 $^{\circ}$ で20分間保持。

キャリアガス：窒素

流量：n-ヘプチルアルコール（内標）の保持時間が約22分になるよう調整する。

実験結果

1. アロエ末

1) 確認試験

Rf値約0.3付近に赤色のスポットを認める（バルバロイン）。

4社から購入した日局アロエ末は、いずれも同様のTLCパターンを示し、目立った違いは見られなかった。（Photo.1）

2) バルバロインの定量

アロエ末中のバルバロイン含量は、Table 1に示す通りである。

アロエ末は、日本薬局方で *Aloe ferox* MILL. など起源植物が限定されているが、バルバロインの含量は、ばらつきがみられた。

Photo.1 アロエ末の確認試験

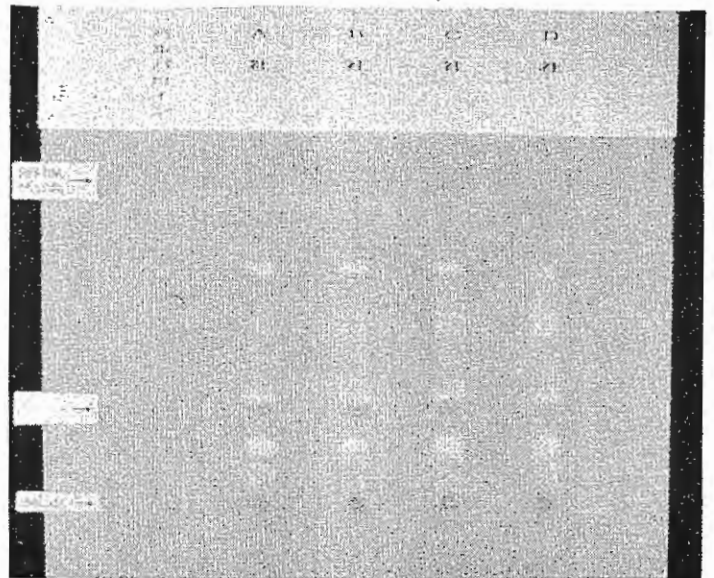


Photo. 1

Table 1 アロエ末中のバルバロン含量 (%)

	A 社	B 社	C 社	D 社
ロット 1	6.14 %	6.14 %	4.20 %	4.53 %
2	7.25	5.34		
3	6.43	3.98		
平均	5.50 \pm 1.18 %			

Table 2 ベルゲニンの含量 (%)

	A 社		B 社	
	アカメガシワ末	乾燥エキス (8:1)	乾燥エキス (8:1)	乾燥エキス (10:1)
ロット 1	2.95 %	14.66 %	14.67 %	13.00 %
2	2.84	14.69	14.22	12.82
3	2.47	12.13		13.13
平均	2.75±0.25 %	13.83±1.47 %	14.36±0.44%	12.98±0.15%
1日最大分量 中のベルゲニン	41.3 mg	86.4 mg	89.8 mg	64.9 mg
	A 社	B 社	C 社	D 社
	軟エキス (10:1)	軟エキス (4:1)	軟エキス (10:1)	軟エキス (5:1)
	11.75 %	4.34 %	8.58 %	6.74 %
1日最大分量 中のベルゲニン	57.25 mg	54.25 mg	42.9 mg	67.4 mg

2. アカメガシワ

1) 確認試験

Rf値約0.4付近に青色のスポットを認める（ベルゲニン）。

アカメガシワ末は、乾燥エキス及び軟エキスに比べてベルゲニン以外のスポットが多く見られたが、大きな違いは見られなかった。また、産地による違いはなかった。(Photo.2)

2) ベルゲニンの定量

アカメガシワ末、乾燥エキス及び軟エキス中のベルゲニンの含量は、Table 2に示す通りである。ベルゲニンの含量は、1日最大分量中のベルゲニンの量として比較し、アカメガシワ末は1500mg、エキスは原生約5000mgに換算した量である。

原生薬：エキスの比の違いによって、ベルゲニンの含量に違いがみられ、乾燥エキスは軟エキスに比べてベルゲニンの含量が高い。

乾燥エキスでは、産地によるベルゲニンの含量の違いはなく、同じエキス中のロット間のばらつきは小さい。

Photo.2 アカメガシワの確認試験

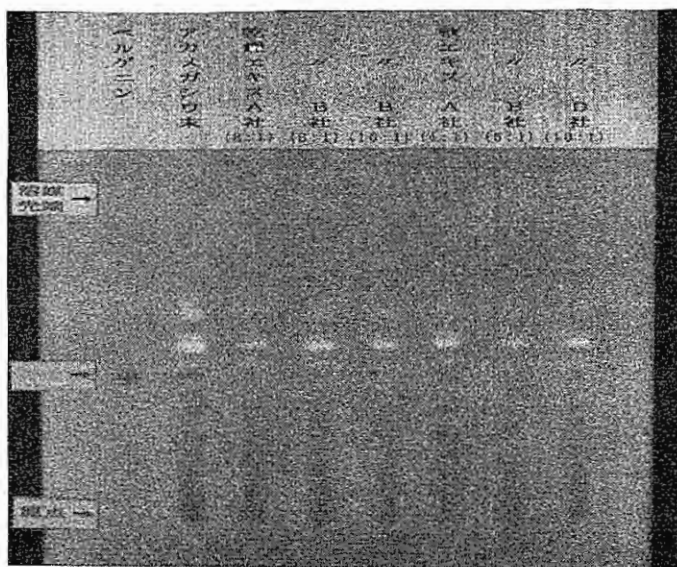


Photo. 2

3. ガシュツ末

ガシュツ末の結果は、Table 3に示す通りである。

1) 精油含量

精油含量は、サンプルⅠ～Ⅲ（中国、広西省産）、サンプルⅣ～Ⅵ（中国、四川省産及び台湾産）の順に多く、サンプルⅦ（屋久島産ガシュツを使用した製剤）が最も多い。また、キシレン液の色は暗紫色又は黄色を呈した。

2) 確認試験

得られたキシレン液について薄層クロマトグラフにより試験を行ったところ、Ⅰ～ⅢとⅣ～Ⅶは、それぞれ異

Table 3 ガジュツ末

サンプル	I	II	III	IV	V	VI	VII
	A社	B社	D社	C社	A社	A社	ガジュツ 配合胃腸薬
産地	中国 広西省	"	"	中国 四川省	台湾	台湾	日本 屋久島
精油含量 (色)	0.12 ml 暗紫色	0.28 ml 暗紫色	0.20 ml 暗紫色	0.32 ml 黄色	0.32 ml 黄色	0.35 ml 黄色	0.48 ml 暗紫色
セスキテルペノ イド(%)	0.42 %	0.73 %	0.53 %	1.72 %	1.33 %	1.25 %	1.71 %
モノテルペノ イド(%)	0.067 %	0.096 %	0.059 %	0.033 %	0.032 %	0.031 %	0.101 %
(主成分)	カンフル 58.0 %	カンフル 51.3 %	カンフル 56.9 %	カンフル 49.3 %	シネオール 55.2 %	シネオール 51.4 %	

Photo.3 ガジュツ末の確認試験

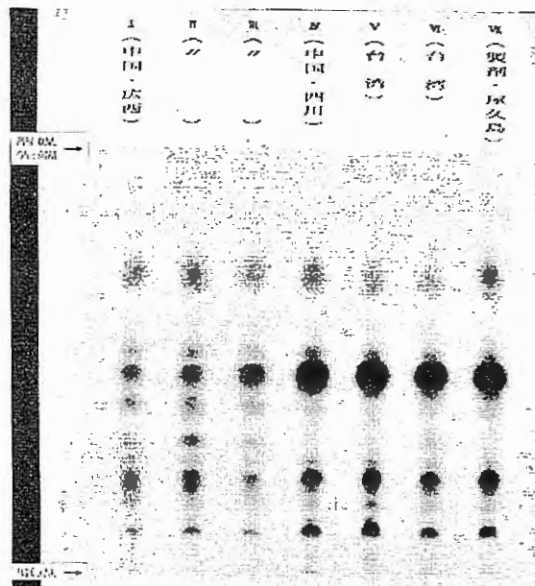


Photo. 3

なるパターンを示した。(Photo.3)

Rf値0.45~0.53にみられる3個のスポットは渡辺、柴田らの報告²⁾により抗潰瘍作用を示すfuranodienone, curzerenone, furanogermeroneと推定されるが、I~IIIとIV~VIIでは含量の差が明確だった。また、その他のスポットについて、I~IIIではRf値約0.4に赤紫色のスポットが見られるがIV~VIIでは小さい。

- 3) セスキテルペノイド(精油分画試料の重量)
1)の精油含量で比較したセスキテルペノイドを精油分画としてガジュツ末より分離し、重量を比較した。その結果、サンプルI~III(中国広西省産)約0.4~0.7%、V・VI(台湾産)約1.3%、IV(中国四川省産)及びVII(製剤、屋久島産)約1.7%となり、1)精油含量の結果とほぼ一致した。

また、セスキテルペノイドの薄層クロマトグラフは、2)確認試験と同様のパターンを示した。

4) モノテルペノイド

α -ピネン、シネオール及びd ℓ -カンフルなどモノテルペノイドの含有率は、サンプルI~IIIが多く、セスキテルペノイドを多く含むIV~VIIではI~IIIの約1/2と少なかった。

また、I~IV(中国産)の主成分はd ℓ -カンフルで、V・VI(台湾産)の主成分はシネオールだった。

VIIは、モノテルペノイドの含有率が多いが、製剤であるためガジュツ末由来のものであるかどうかは不明である。

以上の結果より、ガジュツは産地により2種類に分けられ、含まれる成分の比に違いがあった

ま と め

1. アロエ末

日本薬局方で起源植物が限定されているが、バルバロインの含量にばらつきがみられた。

2. アカメガシワ

原生薬：エキスの比によって、ベルゲニンの含量に違いがあった。

乾燥エキスは、軟エキスに比べてベルゲニン含量が高く、ばらつきはわずかだった。また、産地による違いはなかった。

3. ガジュツ末

産地により、ガジュツ末中に含まれるセスキテルペノイド及びモノテルペノイドの含量に違いが見られた。

台湾産、中国四川省産及び日本・屋久島産はセスキテルペノイドの含量が多い。

モノテルペノイドは、中国広西省産の方が多い。

以上の結果を胃腸薬の原料生薬及び産地の選定、また規格範囲設定の参考として、製剤研究を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) 前田 初代, 砂金 信義, 久保田 和彦: ガジュツ末の消化器系におよぼす薬理作用, 薬誌, 104, 640-643, (1986)
- 2) 渡辺 和夫, 柴田 昌裕, 矢野 真吾ら: 屋久島産ガジュツ抽出物及び単離成分の抗潰瘍作用, 薬誌, 106, 1137-1142, (1986)
- 3) 鈴木 弥生, 森田 武, 羽田 正利ら: アロエ中のバルバロインの高速液体クロマトグラフィーによる定量及び同定, 医薬品研究, 17, 984-990, (1986)
- 4) 浜野 朋子, 安田 一郎, 瀬戸 隆子ら: 高速液体クロマトグラフィーによるアカメガシワ含有無承認無許可医薬品中のベルゲニンの定量, 東京衛研年報, 38, 73-79(1987)
- 5) 渋谷 博孝, 吉原 実, 北野 栄作ら: 中国, 台湾及び屋久島産ガジュツ精油成分の Gas Liquid Chromatography - Mass Spectrometry 法による定性及び定量分析, 薬誌, 106, 212-216, (1986)

和漢薬配合胃腸錠の製剤研究

—— ラット急性胃潰瘍に及ぼす影響 ——

Studies on Pharmaceutical Preparation of
Gastrointestinal Remedies Containing Oriental Drugs

—— Effect on Acute Gastric Ulcer in Rat ——

○ 西 浦 桂 子 石 黒 文 子 日 水 裕 子
Keiko NISHIURA Fumiko ISHIGURO Yuko HIMIZU

大協薬品工業株式会社
Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd.

小 貫 峰 男 前 川 利 玄
Mineo ONUKI Toshiharu MAEKAWA

株式会社 陽進堂
Yoshindo Co.,Ltd.

緒 言

アロエ、アカメガシワ、ガジュツ及び動物胆など和漢薬を有効成分とする胃腸薬錠剤の製剤化を目的とし、原料生薬の品質、薬理的及び製剤学的研究を行った。

本研究では、アカメガシワ（以下AK）の抗潰瘍作用に注目し、アカメガシワ単独及びアロエ（以下AL）、ガジュツ（以下GA）、牛胆（以下GU）を添加した場合の抗潰瘍作用の評価を行った。

アカメガシワはトウダイグサ科（Euphorbiaceae）のアカメガシワ（*Mallotus japonicus* M_{JELL.} A_{RG.}）の樹皮を乾燥したもので胃腸薬製造（輸入）承認基準には、粘膜修復剤の欄に記載されている。

実 験 の 部

1. 処方及び被験薬

処方及び被験薬は Table 1 に示す通り。

Table 1 処方及び被験薬

生 薬 名	1 日 量 mg	メ ー カ ー	L o t
アカメガシワエキス 原生薬：エキス = 8 : 1	320	アルプス薬品工業㈱	4 D 1 9
ガ ジ ュ ツ 末	300	日本粉末薬品㈱	F H 3 1 0 7
ア ロ エ 末	150	アルプス薬品工業㈱	4 G 6 2 K
牛 胆	100	㈱ 折 本 天 海 堂	C B 3 6 9

アカメガシワは日本・四国産、ガジュツは中国・広西省産、アロエはアフリカ産、牛胆はアメリカ産のものを用いた。

2. 実験方法

1) 塩酸・エタノール胃損傷に対する抗潰瘍作用

(1) AKの抗潰瘍作用

24時間絶食したWistar系雄性ラット(体重150~210g)にAKを経口投与し、1時間後に150mMの塩酸を含む60%エタノール溶液(塩酸エタノール)を5ml/kgの割合で経口投与した。

塩酸エタノール投与の3時間後にペントバルビタールNa60mg/kgの割合で麻酔し、胃を摘出。胃内に10%ホルマリン生理食塩水を6ml注入後、同液に浸漬しホルマリン固定した。

大弯に沿って切開し、腺胃部に発生する損傷を実体顕微鏡下で観察した。

損傷の長さ(mm)を測定し、1匹あたりの損傷の長さの合計を損傷強度の指標とし、抑制率を求めた。

AKは水に懸濁し、25~100mg/mlに調整し、10ml/kgの割合で投与した。

(2) AKとGA, AL, GUとの相互作用

(1)と同様に実験を行い損傷強度を求めた。

AKは250mg/kgの割合となるように、配合生薬は本製剤の処方と同率、及びその1/2用量を添加した。(Table.2)

Table 2 AKとGA, AL, GUの配合量

	処 方 (mg)	AK × GA (mg/kg)		AK × AL (mg/kg)		AK × GU (mg/kg)	
AK	320	250	250	250	250	250	250
GA	300	234.4	117.2				
AL	150			117	58.5		
GU	100					78	39

2) 拘束水浸ストレス潰瘍に対する抗潰瘍作用

24時間絶食したWistar系雄性ラット(体重140~180g)に1)-(2)と同様に経口投与し、30分後にストレスケージに入れ剣状突起の下まで21℃の水槽に浸漬し6時間後に屠殺して胃を摘出した。ホルマリン固定後、腺胃部に発生する潰瘍を観察した。潰瘍の個数及び潰瘍の長径を測定し、1匹当たりの潰瘍の長さの合計を損傷強度とした。

被験薬の投与はTable 3のように行った。

Table 3 拘束水浸ストレス潰瘍モデルにおける被験薬

	処 方 (mg)	AK 単 独 (mg/kg)			AK × GU (mg/kg)	
AK	320	250	500	750	250	250
GU	100				78	39

3. 統計処理

対照群との有意差検定はStudentのt-testを用いて行った。

実験結果及び考察

1. 塩酸・エタノール胃損傷に対する抗潰瘍作用

1) AKの抗潰瘍作用

AKの抗潰瘍作用について用量依存的な傾向がみられた。

Lichfield Wilcoxon法によりED₅₀値を算出するとAKのED₅₀(95%信頼限界)275.0mg/kg(166.7~435.8)となった。(Table 4)

Table 4 塩酸・エタノール胃損傷に対するAKの抗潰瘍作用

用 量 (mg/kg)	抑 制 率 (%)
水	0.0
250	53.4
375	80.0†
500	91.2††
750	87.9††
1000	90.2†

* < 0.05 ** < 0.01

2) AKとGA, AL, GUとの相互作用

AKとGAの組み合わせではAKの抗潰瘍作用を抑制する効果がみられた。

特にGA117.2mg/kgを添加したものについては危険率5%で有意差が得られた。(Table 5)

Table 5 AKとGAの相互作用

被験薬 (mg/kg)	例 数	損 傷 強 度 (mm) (mean ± S.E.)
水	5	23.1 ± 7.7
AK 250	6	3.2 ± 1.1
AK 250+GA 234.4	5	12.3 ± 4.8
AK 250+GA 117.2	5	13.8 ± 3.7†

* < 0.05

AKとALの組み合わせでもAKの抗潰瘍作用を抑制する効果がみられた。AL117.0mg/kg添加したものに
いては危険率0.1%で有意差が得られた。(Table 6)

Table 6 AKとALの相互作用

被験薬 (mg/kg)	例数	損傷強度 (mm) (mean ± S.E.)
水	5	49.7 ± 11.5
AK 250	6	10.9 ± 2.7
AK 250+AL 117.0	5	38.7 ± 2.2***
AK 250+AL 58.5	5	20.8 ± 7.7

*** < 0.001

一方、AKとGUの組み合わせにおいては、AKの抗潰瘍作用を増強させる傾向がみられた。しかしGU78mg/kg、39mg/kgのどちらの場合にも有意差は得られなかった。(Table 7)

Table 7 AKとGUの相互作用

被験薬 (mg/kg)	例数	損傷強度 (mm) (mean ± S.E.)
水	5	19.5 ± 6.5
AK 250	5	13.2 ± 2.7
AK 250+GU 78.0	5	2.1 ± 1.1
AK 250+GU 39.0	5	6.2 ± 3.2

これらのことから、GA、AL、GUと潰瘍の生成について検討した。

GA234mg/kg、AL117mg/kg、GU120mg/kgの割合で投与し塩酸エタノール胃損傷モデルに対する試験を行った。

GAは損傷強度を増大させる傾向を示したが有意差は認められず、ALは5%の危険率で有意差が認められた。また、GUは損傷強度を低下させる傾向があったが有意差は認められなかった。(Table 8)

Table 8 GA、AL、GUと潰瘍の生成

被験薬 (mg/kg)	例数	損傷強度 (mm) (mean ± S.E.)
水	6	22.4 ± 8.2
GA 234	5	46.7 ± 17.8
AL 117	5	52.9 ± 8.6*
GU 120	5	5.5 ± 1.8

* < 0.05

2. 拘束水浸ストレス潰瘍に対する抗潰瘍作用

AKは250 mg/kg, 750 mg/kgの用量で, 拘束水浸6時間によるストレス潰瘍に対してそれぞれ抑制作用を示した。500 mg/kgでは, 抑制傾向を示したが, 有意差は認められなかった。(Table 9)

Table 9 拘束水浸ストレスモデルにおけるAKの抗潰瘍作用

被験薬 (mg/kg)	例数	損傷強度 (mm) (mean ± S.E.)
水	5	9.7 ± 2.1
AK 250	4	2.3 ± 0.5*
AK 500	4	3.5 ± 1.5
AK 750	4	0.7 ± 0.4**

* < 0.05 ** < 0.01

AKとGUの相互作用においては, AK単独, AK + GU78 mg/kg, AK + GU39 mg/kgの間に差はなく, いずれもcontrolに対して有意差が認められた。(Table 10)

Table 10 拘束水浸ストレスモデルにおけるAKとGUの相互作用

被験薬 (mg/kg)	例数	損傷強度 (mm) (mean ± S.E.)
水	4	17.2 ± 2.8
AK 250	3	5.4 ± 2.1*
AK 250+GU 78.0	4	7.8 ± 1.7*
AK 250+GU 39.0	3	7.6 ± 2.2*

* < 0.05

ま と め

1. アカメガシワが顕著な抗潰瘍作用を示すことを実験により確認した。
2. アカメガシワの抗潰瘍作用は, 今回使用した健胃効果のある生薬との併用では効果がなかった。
3. 利胆剤である牛胆も潰瘍生成を抑制する傾向がみられたが, アカメガシワとの相互作用については確認できなかった。

謝 辞

本研究に対し, ご指導を賜りました富山県薬事研究所齊藤晴夫所長, 松原利行主任研究員に深謝致します。

ウサギ血小板凝集に対する各種和漢薬の影響

—— 黄連解毒湯を中心に ——

Effects of Traditional Chinese Medicines on Rabbit Platelet Aggregation

—— A detailed study of Oren-gedoku-to ——

富山県薬事研究会 生物部会

Division of Pharmacology,

Toyama Pharmaceutical Research Association

沢田 聡 美 Satomi SAWADA	株式会社 廣貫堂 Kokando Co.,Ltd.
笹 倉 貢 Mitsugu SASAKURA	リードケミカル株式会社 Lead Chemical Co.,Ltd.
永 井 喜 美 Kimi NAGAI	株式会社延寿堂 Enjudo Co.,Ltd.
寺 崎 正 之 Masayuki TERASAKI	中新薬業株式会社 Chushin Yakugyo Co.,Ltd.
浅 水 敬 子 Keiko ASAMIZU	明生薬品工業株式会社 Meisei Pharmaceutical Co.,Ltd.
青 城 優 Masaru AOKI	日本医薬品工業株式会社 Nihon Iyakuhin Kogyo Co.,Ltd.
篠 原 達 雄 Tatsuo SHINOHARA	ダイト株式会社 Daito Co.,Ltd.
池 上 良 一 Ryoichi IKEGAMI	
松 原 利 行 Toshiyuki MATSUBARA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

三大死亡原因のうち心臓病と脳卒中の循環器系疾患を合わせれば、1位のガンを上回り、これからさらに進む高齢化社会において、これら循環器系疾患の予防・治療は重要な課題である。近年、心筋梗塞や脳梗塞の原因である血栓の形成に血小板が重要な役割を果たすことが明らかになるにつれて抗血小板剤の研究が進み、生薬においても、桂皮、人參、当歸、牡丹皮などに抗血小板作用が見出だされている。今回、我々は駆瘀血剤を中心に各種和漢薬のウサギ血小板凝集抑制作用を調べるとともに、作用の顕著な和漢薬の構成生薬についてもその関与の程度を調べ、さらに最近注目を集めている細胞内Ca濃度の変化および凝集抑制機序も若干検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 実験動物

日本白色種雄性ウサギ（体重3.0～4.0kg）を三協ラボサービス(株)より購入して用いた。

2. 使用薬物

オウレン、オウバク、オウゴン、サンシシ、ケイヒ、ブクリョウ、シャクヤク、ボタンビ、トウニン、トウキ、センキュウ、ビャクジュツ、タクシャ、サイコ、カンゾウ、ショウキョウ、ハッカ、ボウショウ、ダイオウ、コレイなどの生薬は池田屋安兵衛商店から購入した。また、ADP-2Na (オリエンタル酵母)、塩化カルシウム (和光純薬)、コラーゲンリエージェント“ホルム”(NYCOMED)、PAF (フナコシ薬品)、牛血清アルブミン (BSA、シグマ)、アデノシン (和光純薬)、インドメタシン (和光純薬)、CV3988 (和光純薬) A23187 (和光純薬)、塩酸ベルベリン (和光純薬)、PGE₁ (シグマ)、EDTA-2Na (同仁化学)、HEPES (同仁化学)、Fura-2AM (同仁化学)、クエン酸ナトリウム (和光純薬) については試薬を購入して使用した。

3. 和漢薬・生薬エキスの調製

黄連解毒湯、桂枝茯苓丸、当帰芍薬散、加味逍遙散、桃核承気湯または五苓散のそれぞれについてヒトの3日量に500mlの蒸留水を加え、市販の漢方煎じ器 (栃本天海堂) で50分間煎じたのち、ガーゼ3枚を用いて熱時濾過しその濾液を凍結乾燥した。また、黄連解毒湯 (1日量: オウレン3g, オウバク2g, オウゴン2g, サンシシ2g) の構成生薬について、それぞれの生薬10日量に300mlまたは400ml (オウレンのみ) の蒸留水を加え、上記同様の方法により乾燥エキスを得た。収量は、オウレン6.7g (22.3%), オウバク4.42g (22.1%), オウゴン7.4g (37%), サンシシ5.38g (26.9%) であった。

4. ウサギ血小板の調製

ウサギをエーテル麻酔下、3.8%クエン酸ナトリウムを1容入れたディスポ注射筒に心臓穿刺により血液を9容採取した。この血液を1,100rpmで10分間遠心し、上層の多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を得るとともに、下層を更に3,000rpmで10分間遠心し、乏血小板血漿 (platelet poor plasma: PPP) を得た。PRPの血小板数を自動血球計数器 (セルタック、日本光電) で測定し、血小板数が $5 \sim 6 \times 10^5$ 個/ μ lとなるよう自己のPPPにて希釈した。以下、この血小板を調製PRPと称す。

5. 血小板凝集能の測定

Bornの方法³⁾に従い、血小板凝集を細胞内カルシウム測定装置 (日本分光, CAF-100) を用いて測定した。すなわち、微小回転子が1,200rpmで回転攪拌する37°Cのキュベットに、調製PRP 400 μ lを入れ2分間前後安定させた。次に被験液50 μ lを加え、2分後下記の凝集誘発剤50 μ lを加え凝集能を測定した。凝集能は調製PRP, PPPの光透過率をそれぞれ0%, 100%とした時の最大光透過率 (最大凝集率) で示した。また、凝集抑制率は次式から求めた。

$$\text{凝集抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{薬物添加時の最大凝集率}}{\text{溶媒添加時の最大凝集率}} \right) \times 100$$

今回の実験では、凝集誘発剤として主に以下の3種類を用いた (濃度は終濃度で表示した)。

- 1) 生食に溶かした10 μ MのADP-2Na (凝集促進のため5mMのCaCl₂を前処置した)。
- 2) SKF bufferに溶解した10 μ g/mlのコラーゲン。
- 3) 0.25% BSAを含む生理食塩水に溶解した3~10ng/mlのPAF。

6. 血小板の細胞内Ca濃度の測定

唐木らの方法²⁾により検討した。すなわち、上記の方法と同様の操作によりPRPを得たのち、活性化を防ぐため1 μ M PGE₁を添加し、さらに2,200rpm \times 8minで遠心した (KUBOTA 5100型)。得られた沈渣に1 μ M PGE₁を含む血小板栄養液 (145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 0.5mM NaH₂PO₄, 5mM Glucose, 0.001mM EDTA, 10mM HEPES; NaOHによりpH7.4に調整) 5mlを加え、ピペットで吸引・排出を繰り返し血小板を均一に再浮

遊させた。この浮遊液に1 μ M Fura-2 AMを添加し、37°Cで10分間インキュベートすることにより蛍光指示薬のFura-2を細胞内に導入した。2,200rpm \times 4minで遠心後上清を捨て、血小板栄養液の添加による再浮遊と、2200rpm \times 4minでの遠心分離を2回繰り返す、余分のFura-2 AMを除去した。最後に血小板栄養液5mlを加え血小板を再浮遊させ、血小板数を約 5×10^5 個/ μ lに調整し、Fura-2負荷洗浄血小板を得た。

測定は、微小回転子の入ったキュベットにFura-2負荷洗浄血小板400 μ lをいれ、安定した後、被験液または溶媒(蒸留水)50 μ lを加えた。2分後PAF溶液50 μ lを加え、凝集能と同時に細胞内Ca濃度変化を細胞内カルシウム測定装置(日本分光, CAF-100)を用いて励起波長340nm, 蛍光波長500nmで測定した。

7. 黄連解毒湯, オウレン, オウバク各エキスに含有されるベルベリンの定量

正確に秤量した黄連解毒湯, オウレン, オウバク各エキス(200mgまたは500mg)を100mlのメタノールに溶解し、10分間超音波処理したのち、0.45 μ mのメンブレンフィルターで濾過し試料溶液とした。標準溶液および試料溶液について、以下に示すHPLC条件によりそれぞれのピーク面積を測定しベルベリン含量を求めた。

[HPLC条件]

- カラム: カプセルパックC18UG120(資生堂) ϕ 4.6 \times 20mm
- 移動相: 10mMラウリル硫酸ナトリウム/アセトニトリル, 56/44
- 流量: 1.5ml/min
- カラム温度: 40°C
- 測定波長: 345nm
- 試料注入量: 20 μ l

実験結果および考察

1. 血小板凝集に対する各種和漢薬の影響

今回の実験では、各被験薬の 10^{-4} g/mlおよび 10^{-3} g/mlの2種類の終濃度について検討した。黄連解毒湯エキスは、高濃度でコラーゲン凝集およびPAF凝集を50%程度抑制した。また、ADP凝集も25%抑制した。これらの作用は低濃度ではかなり減弱するかもしれない。桂枝茯苓丸エキスも、高濃度でコラーゲン凝集を顕著に抑制するとともに、ADP凝集も抑制したが、PAF凝集に対しては抑制効果は若干認められたのみであった。他の4種類のエキスについては、高濃度で抑制効果が認められたが、その効果はいずれも顕著なものではなかった。また、低濃度については、いずれの凝集においてもほとんど影響が認められなかった。黄連解毒湯エキスのPAF凝集に対する抑制作用の一例を図1に示すとともに、各和漢薬エキスの凝集抑制率を表1に示す。

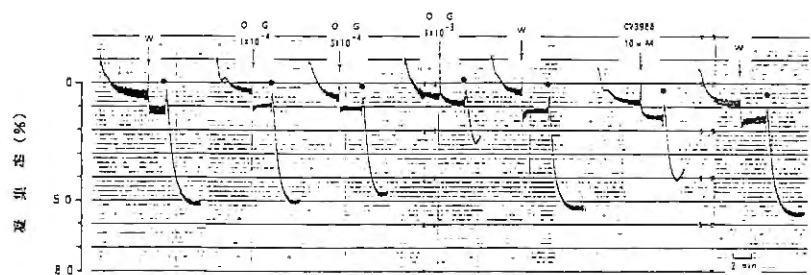


図1 ウサギ血小板のPAF凝集に対する黄連解毒湯エキスの影響

● PAF 10 ng/ml, ○ G, 黄連解毒湯(g/ml); W, dist. water.

表1 ウサギ血小板凝集に対する各種和漢薬の影響

試 験 薬	終 濃 度 (g/ml)	凝集抑制率 (%) ^{a)}		
		A D P (1.0 μ M)	コラーゲン (1.0 μ g/ml)	P A F (1.0 ng/ml)
蒸留水(対照)	-	0	0	0
黄連解毒湯エキス	10^{-4}	9.0 \pm 4.9	15.5 \pm 13.9	0.4 \pm 8.1
	10^{-3}	27.0 \pm 3.7	54.0 \pm 13.2	45.3 \pm 18.4
桂枝茯苓丸エキス	10^{-4}	10.7 \pm 5.9	5.7 \pm 10.3	0.8 \pm 3.0
	10^{-3}	24.3 \pm 8.1	43.3 \pm 5.7	10.3 \pm 6.6
当帰芍薬散エキス	10^{-4}	2.0 \pm 3.5	6.0 \pm 7.3	1.5 \pm 4.2
	10^{-3}	16.5 \pm 7.4	20.0 \pm 4.0	14.8 \pm 7.5
加味逍遙散エキス	10^{-4}	6.7 \pm 6.9	9.4 \pm 10.3	1.7 \pm 2.9
	10^{-3}	19.3 \pm 2.3	28.7 \pm 2.6	11.6 \pm 8.1
續命湯エキス	10^{-4}	2.8 \pm 13.7	9.4 \pm 8.6	-5.7 \pm 10.0
	10^{-3}	14.0 \pm 3.3	22.8 \pm 13.2	10.4 \pm 7.3
五苓散エキス	10^{-4}	3.2 \pm 5.3	0.5 \pm 3.4	-8.7 \pm 5.1
	10^{-3}	10.8 \pm 8.5	18.5 \pm 6.6	11.8 \pm 5.6
アデノシン	2.0 μ M	45.3 \pm 11.5	-	-
インドメタシン	5 μ M	-	50.2 \pm 14.8	-
CV-3988	1.0 μ M	-	-	30.2 \pm 10.0

a) mean value \pm SD of 4-5 samples.

2. 黄連解毒湯およびその構成生薬の血小板凝集抑制作用

黄連解毒湯の4種類の構成生薬について、黄連解毒湯

の 10^{-3} g/mlに相当する濃度での凝集活性に対する影響を比較したところ、オウレンおよびオウバクエキスがコラーゲンまたはPAFによる血小板凝集を顕著に抑制した。一方、オウゴンおよびサンシシエキスによる抑制はほとんど認められなかった(表2)。

さらに、オウレンエキスにベルベリンが3.6%含有されることから、 1×10^{-4} g/ml オウレンエキスと 3.6×10^{-4} g/ml ベルベリンの凝集抑制活性を、PAFの濃度を種々変えて比較したところ、ベルベリンでも顕著な抑制作用が認められたが(表3)、オウレンの抑制より若干弱い傾向を示し、オウレンの凝集抑制作用にはベルベリン以外の物質も関与していることが示唆された。

表2 ウサギ血小板凝集に対する黄連解毒湯および構成生薬の影響

試 薬	終 濃 度	凝集抑制率 (%) ^{a)}		
		コラーゲン (10 μ g/ml)	P	A F
蒸留水(対照)	—	0	0	
黄連解毒湯エキス	1.0×10^{-3} g/ml	50.5 \pm 18.0	62.3 \pm 25.5	
オウレンエキス	3.2×10^{-4} g/ml ^{b)}	28.8 \pm 4.9	51.3 \pm 13.8	
オウバクエキス	2.1×10^{-4} g/ml ^{b)}	31.0 \pm 6.1	18.0 \pm 12.5	
サンシシエキス	2.6×10^{-4} g/ml ^{b)}	2.5 \pm 3.1	3.5 \pm 3.3	
オウゴンエキス	3.5×10^{-4} g/ml ^{b)}	8.5 \pm 3.1	0.5 \pm 5.5	

a) 4例の平均値 \pm S.D.

b) 黄連解毒湯エキスの 1.0×10^{-3} g/mlに相当する濃度。

表3 ウサギ血小板凝集に対するオウレンエキスおよび塩酸ベルベリンの影響

試 薬	終 濃 度	凝集率 (%) ^{a)}		
		P A F の 終 濃 度		
		3 ng/ml	6 ng/ml	10 ng/ml
蒸留水(対照)	—	53.6 \pm 5.4	94.3 \pm 5.7	94.8 \pm 3.1
オウレンエキス	1.0×10^{-4} g/ml	38.6 \pm 4.7	66.6 \pm 14.7	78.5 \pm 3.0
塩酸ベルベリン	3.6×10^{-6} g/ml ^{b)}	44.0 \pm 12.0	78.7 \pm 8.4	91.5 \pm 2.5
塩酸ベルベリン	3.6×10^{-5} g/ml	29.3 \pm 12.8	—	74.7 \pm 2.2

a) P A F の 30 ng/ml による凝集活性に対する百分率を示す。3 ~ 5例の平均値 \pm S.E.

b) オウレンエキスの 1.0×10^{-4} g/mlに相当する濃度。

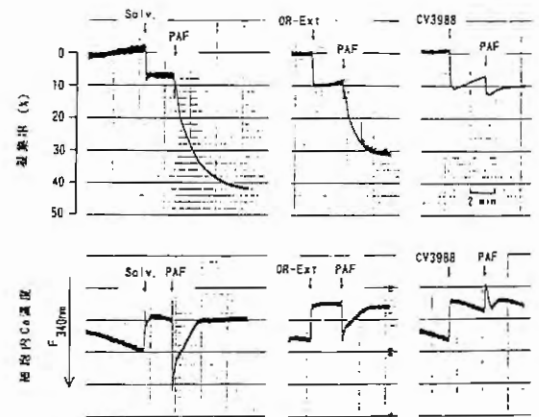


図2 Fura-2負荷したウサギ血小板標本の凝集活性および細胞内Ca濃度に対するオウレンエキスの影響

Solv., 蒸留水; PAF, 10ng/ml Platelet activating factor;

OR-Ext, 1×10^{-4} g/ml オウレンエキス; CV3988, 10 μ M CV3988.

3. 細胞内Ca濃度に対するオウレンの影響

オウレンによる血小板凝集の抑制が認められた時、血小板細胞内Ca濃度の上昇も抑制された。また、陽性対照であるCV3988の前処理より、凝集および細胞内Ca濃度の上昇がオウレンよりさらに強く抑制され、細胞内Ca濃度の上昇が抑制されることにより凝集が抑制されたことが明らかとなった(図2)。

4. 各種刺激剤により惹起される凝集に対するオウレンの影響

オウレンの作用点の解明のため、アラキドン酸、トロンボキサンA₂の安定誘導体のU46619, さらにカルシウムイオノフォアのA23187により惹起される凝集についても検討したところ、オウレンはいずれの凝集も抑制した(図3)。このように、オウレンは、PAF, コラーゲン, U46619などの受容体

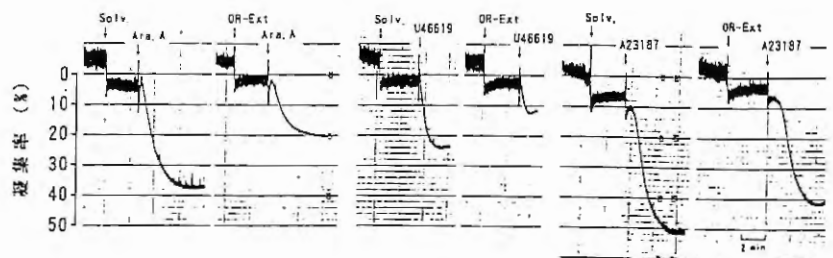


図3 各種刺激剤によるウサギ血小板凝集に対するオウレンエキスの影響

Solv., 蒸留水; OR-Ext, 1×10^{-4} g/ml オウレンエキス;

Ara. A, 200 μ M アラキドン酸-Na; U46619, 4 μ M; A23187, 10 μ M.

活性化薬による凝集，さらには細胞膜に働き直接Caイオンを細胞内に流入させるA23187に惹起される凝集に対しても抑制することが分かった。このように各種刺激剤による凝集が非特異的に抑制されることから，オウレンの作用点については，受容体拮抗作用に基づくと考えより血小板膜のカルシウム透過性に影響を与えている可能性が大きいと思われる。

結 論

ウサギ血小板凝集に対する黄連解毒湯，桂枝茯苓丸，当帰芍薬散，加味逍遙散，桃核承気湯，五苓散の各エキスの影響を調べたところ，黄連解毒湯および桂枝茯苓丸エキスに顕著な抑制効果が認められ，これらの漢方薬が脳卒中や心筋梗塞などの血栓症の予防に寄与する可能性が示唆された。さらに，黄連解毒湯の構成生薬の影響を調べたところ，オウレンおよびオウバクに凝集抑制作用がみられるとともに，これら生薬に含有されるベルベリンがこの抑制作用に大きく関わっていることも明らかとなった。

文 献

- 1) Born, G.V.R. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, Nature, 194, 927-929 (1962)
- 2) Karaki, H., Mitsui, M., Nagase, H., Ozaki, H., Shibata, S. and Uemura, D. : Inhibitory effect of a toxin okadaic acid, isolated from the black sponge on smooth muscle and platelets, Brit. J. Pharmacol., 98, 590-596 (1989)

漢方製剤の品質に関する研究 (第9報)

—— 桂枝中のケイアルデヒドの動向 ——

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine IX

—— The Changes of the Cinnamic aldehyde Contents in Cinnamon Bark ——

○吉井美矢子 石田裕子 中田るり子
Miyako YOSHII Yuko ISIDA Ruriko NAKADA
西本初博 成川一郎
Hatsuhiko NISHIMOTO Ichiro NARIKAWA

東亜製薬株式会社 試験研究室
Research Institute, Toa Pharmaceutical Co., Ltd.

緒 言

桂枝は一般用漢方210処方中62処方に配合され、発汗、解表、鎮痛、健胃剤として重要な役割を果たしている。しかし、桂枝中の主成分であるケイアルデヒドは揮散性があり、湯液の調製あるいはエキス製剤製造時には著しく揮散することが考えられる。そこで、その実際的な動向を経時的に確認した。

実 験 の 部

1. 被 験 材 料

葛根湯構成生薬（1日量17g：葛根4g、麻黄3g、大棗3g、桂枝2g、芍薬2g、甘草2g、生姜1g）はいずれも市販の日局品を用いた。

なお、桂枝については、以下2種類を用いた。

広南産桂枝（ケイアルデヒド含有率 2.68%）

ベトナム産桂枝（ケイアルデヒド含有率 4.77%）

2. 実 験 方 法

1) 抽出液及び留出液中のケイアルデヒドの動向

(1) 広南産桂枝とベトナム産桂枝との比較

桂枝20gに水1,700mlを加え、Fig. 1の装置を用いて抽出し、沸騰開始時及び以後30分、60分、90分、120分経過時にそれぞれ抽出液及び留出液中のケイアルデヒド含量を求めた。

(2) 広南産桂枝とこれを配合した葛根湯との比較

桂枝170g及び葛根湯170g(10日分)のそれぞれに水1,700mlを加え、(1)と同様に操作して抽出液及び留出液中のケイアルデヒド含量を求めた。

2) 葛根湯を土びん煎出した場合のケイアルデヒドの動向

葛根湯85g(5日分)を土びんに入れ、水850mlを加えて加熱抽出し、沸騰開始時及び以後30分、60分経過時にそれぞれ抽出液中のケイアルデヒド含量を求めた。

3) 抽出液濃縮時のケイアルデヒドの動向

葛根湯85g(5日分)に水850mlを加えて60分間土びん煎出した液を熱ろ過し、ろ液をエバポレーター(40~

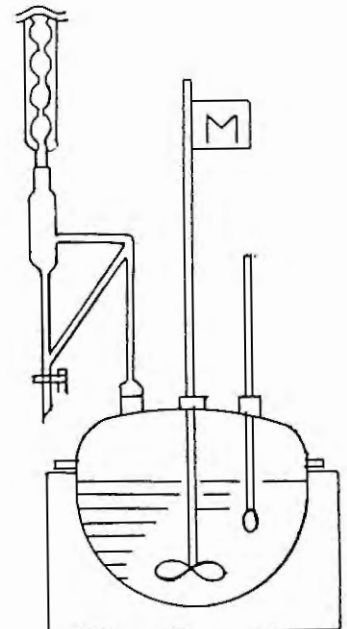


Fig. 1 精油定量装置付き還流抽出装置

60°) で1/2量にまで濃縮後, 抽出液中のケイアルデヒド含量を求めた。

3. 測定条件

HPLC法 (絶対検量線法)

カラム: Cosmosil 5C₈AR φ4.6mm×150mm

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長: 274nm)

移動相: 水・メタノール混液 (1:1)

実験結果

1. 抽出液及び留出液中のケイアルデヒドの動向

1) 広南産桂枝とベトナム産桂枝との比較

広南産桂枝及びベトナム産桂枝をそれぞれ還流抽出したときのケイアルデヒドの経時的動向をFig. 2で比較した。抽出液中のケイアルデヒド含量はいずれも沸騰開始30分後に最高値を示し, 留出したケイアルデヒド量は沸騰開始後しだいに増加し, いずれも沸騰開始90分後には抽出液中濃度を上回った。又抽出液中のケイアルデヒド含量及び留出したケイアルデヒド量ともに, いずれの時点においても広南産桂枝がベトナム産桂枝よりも高い値を示した。

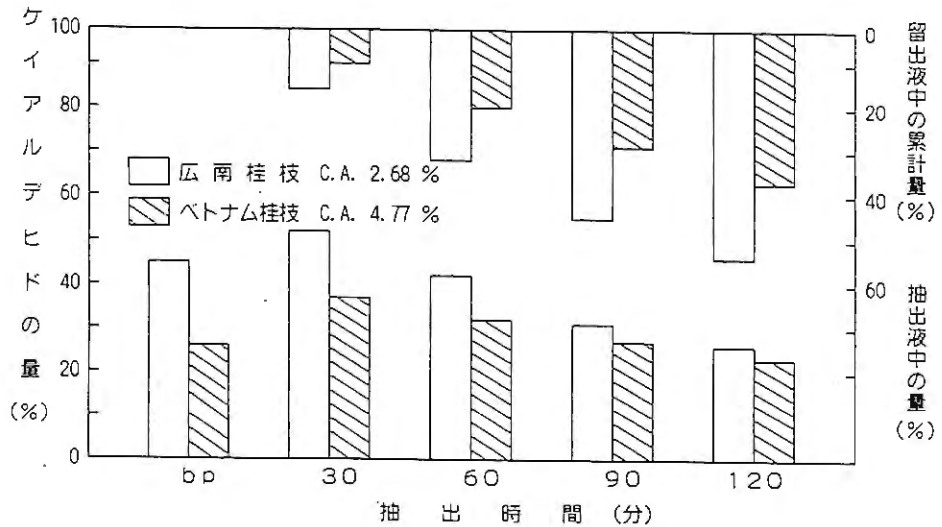


Fig. 2 桂枝中のケイアルデヒドの抽出率 (%)

2) 広南産桂枝とこれを配合した葛根湯との比較

広南産桂枝及びこれを配合した葛根湯をそれぞれ還流抽出したときのケイアルデヒドの経時的動向をFig. 3と比較した。抽出液中のケイアルデヒド含量は沸騰開始時を除き, 桂枝と葛根湯はほぼ同程度の値を示した。留出したケイアルデヒド量はいずれも沸騰開始90分後には抽出液中の濃度を上回った。

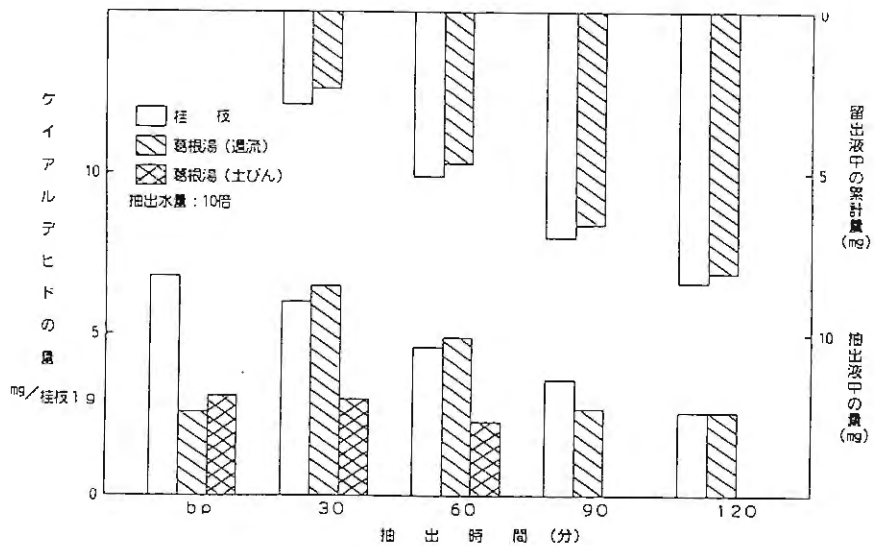


Fig. 3 桂枝中のケイアルデヒドの動向

2. 葛根湯を土びん煎出した場合のケイアルデヒドの動向

葛根湯を土びん煎出したときのケイアルデヒドの経時的動向をTable 1及びFig. 3に示した。抽出液中のケイア

ルデヒド含量は沸騰開始時から以後60分経過時まで3.0mg前後のほぼ一定量を示した。

Table 1 広南桂枝、葛根湯（還流）、葛根湯（土びん）中のケイアルデヒド（mg/桂枝1g）

抽出液		抽出時間(分)				
		bp	30	60	90	120
広南桂枝		6.8	6.0	4.6	3.6	2.6
葛根湯	還流抽出	2.6	6.5	4.9	2.7	2.6
	土びん煎出	3.1	3.0	2.3	-	-

3. 抽出液濃縮時のケイアルデヒドの動向

葛根湯を土びん煎出した抽出液を1/2量にまで濃縮した液からケイアルデヒドはほとんど検出されなかった。

考 察

Table 2にFig. 3の結果をケイアルデヒドの利用率(%)として取りまとめた。葛根湯を還流抽出した場合は沸騰開始30分後抽出液中のケイアルデヒド量は最大24%となり、以後減少した。しかし、古来一般的湯液調製法である土びん煎出では沸騰開始時から以後60分後まで約10%と低レベルながらほぼ一定値を示した。葛根湯中の主成分麻黄アルカロイドやグリチルリチン酸を効果的に利用するための最適な煎出時間についてはすでに漢方処方抽出条件とエキス量(第1報)¹⁾及び甘草中のグリチルリチンの湯液への移行率(第1報)²⁾で約1時間と報告したが、今回のケイアルデヒドについても1時間煎出で特に問題はないものとする。ところがこの湯液を濃縮することによりケイアルデヒドのほとんどが揮散消失することが判明した。エキス製剤とする場合は、濃縮・乾燥の工程は避けられない。ケイアルデヒドが漢方処方それぞれの効果にどのように関わっているかは明らかではない。しかし、漢方湯液をエキス製剤とする場合可能な限り湯液に近い品質を目指すならば、せめて土びん煎出の場合のケイアルデヒド濃度は確保したいものとする。しかし、現実の葛根湯エキス製剤の薄層クロマトグラフ展開ではわずかなケイアルデヒド残存量は認められるものの、通常の液体クロマトグラフ法では検出が困難なくらいまでに揮散してしまう。ともかく今回の実験結果によれば漢方処方をエキス製剤とする場合の品質に限界を認めざるを得ない。これがエキス製剤は煎じ薬よりも効率的に落ちるのではないと言われる原因のひとつなのかも知れない。天産物の生薬を原料とした製剤の品質設計のあり方について“限界を容認したままに放置するか”それとも“何らかの方法で是正して、より湯液に近いものにするか”あらためて検討すべきであるとする。

Table 2 桂枝中のケイアルデヒドの利用率(%)

抽出液		抽出時間(分)				
		bp	30	60	90	120
広南桂枝		25	22	17	13	10
葛根湯	還流抽出	10	24	18	10	10
	土びん煎出	12	11	9	-	-

注) 抽出水量10倍

参 考 文 献

- 1) 漢方処方の抽出条件とエキス量(第1報) 家庭薬研究 No.1
- 2) 甘草中のグリチルリチンの湯液への移行率(第1報) 家庭薬研究 No.5

液体クロマトグラフィーのデータベース化について

Construction of Image-Database for
High Performance Liquid Chromatography

富山県薬事研究会 分析部会
Division of Analytical Chemistry,
Toyama Pharmaceutical Research association

江野本 加壽雄 Kazuo ENOMOTO	株式会社 廣貫堂 Kokando Co.,Ltd
川 島 剛 Tsuyoshi KAWASHIMA	富士薬品工業株式会社 Fuji Chemical Industries,Ltd
○河 原 康 映 Yasuaki KAWAHARA	大協薬品工業株式会社 Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd
島 谷 隆 夫 Takao SHIMATANI	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co.,Ltd
高 橋 浩 美 Hiromi TAKAHASHI	株式会社内外薬品商会 Naigai Medicine Co.,Ltd
館 智 恵 Tomoe TACHI	株式会社内外薬品商会 Naigai Medicine Co.,Ltd
館 利 明 Toshiaki TACHI	明治薬品株式会社 Meiji Yakuhin Co.,Ltd
花 染 功 Isao HANAZOME	東亜薬品株式会社 Toa Medicene Co.,Ltd
横 田 洋 一 Youichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

医薬品の分析条件の設定は、似通った製剤の分析例などを参考にしておこなう場合が多いものと考えられるが、その際、過去におこなった分析チャートを探すのに大変苦勞することがある。またカラムメーカーから送られてくるアプリケーション集やダイレクトメールにも有益な情報が掲載されているが、いざ参考にしようとするときと所在がわからない……ということもある。

一方、パーソナルコンピュータの普及には目覚ましいものがあり、医薬品のFD申請が導入されることもあって、すでに導入済みの医薬品メーカーも多いことと思われる。しかし、これまでのコンピュータの利用は文書の作成、計算などが主であり医薬品の開発に対して積極的な利用はなされてなかったのではないかと考えられる。

そこで、医薬品の分析条件の検討に要する時間を短縮するためこれらの条件、特に分析方法として主流である液体クロマトグラフィーでの分析条件を中心としてデータの蓄積を行い、コンピュータを利用して必要なときに必要な情報を検索、表示できるデータベースを構築することを目的として検討を行ったので報告する。

実験の部

1. ハードウェアの構成

使用したハードウェアの構成・機器名をFig. 1に示した。パーソナルコンピュータとしては、現在もっとも一般的と考えられるPC-9801シリーズを用い、本体、ハードディスクとプリンターという構成で行った。

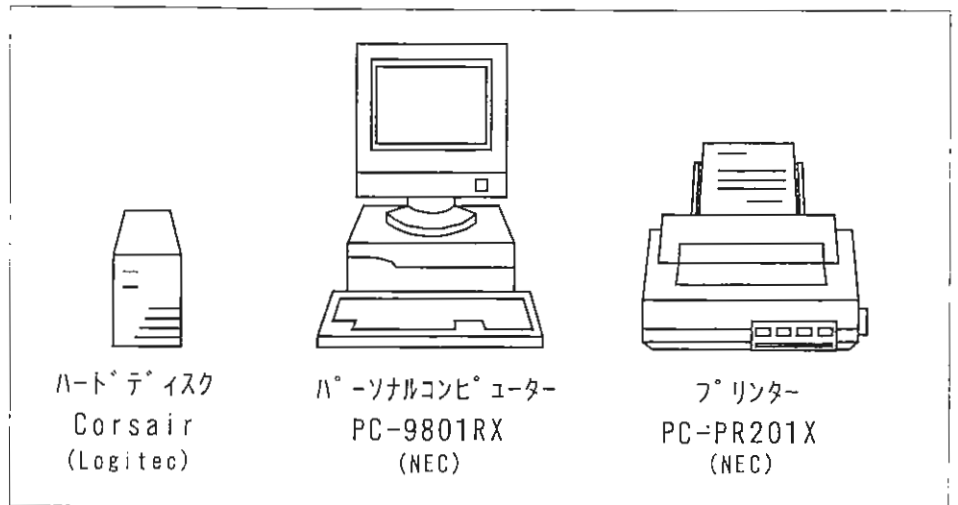


Fig. 1 使用したハードウェア・機器名

2. 市販 HPLC データ

ベースを用いた検討

データベースの構築に際しては立ち上げがもっとも大変であり、その膨大なデータの入力に労力が費やされる。そこで、既にデータの蓄積が行われている市販の液体クロマトグラフィーデータベースを用い、それにデータを追加することによって目的とするデータベースを構築する可能性について検討した。データベースとしては高速液体クロマトグラフィー分析例データベース（株式会社ウォータークロス製）、高速液体クロマトグラフィーデータベース（株式会社アイピーシー製）を用いた。

3. データベースの構築に関する検討

成分の保持時間、溶出順序などがただ数字で示されるだけよりは、クロマトグラムが表示された方が理解しやすいと考えられた。そこで、チャートを画像として読み込み、この画像をデータベース化する可能性について調査を行ったところ、可能であると考えられたので以下の検討を行った。

1) ハードウェア

コンピュータの入力方法としてはキーボードからの入力が一般的であるが、今回の画像を読み込むことはキーボードからでは不可能である。そこで、イメージスキャナーで画像の入力を行うこととした。イメージスキャナーとしてPC-IN503GをRS-232Cでコンピュータと接続した。¹⁾

2) ソフトウェア

データベースソフトウェアを調査したところ、画像データも管理できるソフトウェアが市販されており、画像・文字を共にデータベース化し管理することは可能と考えられた。

今回は、それらのうち比較的安価なデータベースソフトであるF-Card（株式会社クレスト製）を用いた。

また、画像を読み込むためのソフトとしてはZ²STAFF Kid98（株式会社ツァイト製）を用い、ベタファイルとして保存した。

3) 入力フォーマット

データの検索を行うためには、現在のところ文字（キーワード）によるしか方法が無い。しかし、キーボードからの入力の手間がかり、非能率的である。そこで、イメージスキャナーでの入力に重点をおき、キーボードからの入力は極力少なくした。

4) ファイルサイズと画像形式

一般に画像ファイルは通常の文書等に比較してそのファイルサイズが大きくなる。今回使用したKid98では、ベタ・ファイルの場合R、G、B、Eの4ファイルが作成される。そこで、ファイルサイズを小さくするために

ファイル圧縮ソフトの利用について検討を行い、Diet²⁾を使用した。また、画像形式について検討を行い、1ファイルで利用可能なMAG形式とし、これを表示させるソフトとしてMagd³⁾を使用した。

5) 画像の出力

表示した画像の印刷方法としては、ハードコピー、すなわちディスプレイに表示されている画像をそのまま印刷する方法を用い、そのためのソフトとしてDigital Tools (Digital Wave Inc.)を使用した。

結果及び考察

1. 市販HPLCデータベースの評価

2種類の市販HPLCデータベースをテストした。

高速液体クロマトグラフィー分析例データベース(株式会社ウォータークロス製)は表計算ソフトであるロータス1-2-3(ロータス株式会社製)上で稼働するデータ集であり、高速液体クロマトグラフィーデータベース(株式会社アイピーシー製)は単独で稼働しデジタイザによるチャートの入力も可能である。しかしながら、いずれも機能、操作性の点で今回の目的には不向きと考えられた。

2. データベースの構築

画像をデータベース化することは可能と考えられたことから、本データベースの概略をFig 2に示す通りとし、導入コストがかからず、さらに操作性に優れたものにしたと考えた。

1) ハードウェア・ソフトウェア

コンピュータとしてはPC-9801RXを主として使用した。速度の点で違いはあるものの、PC-9801シリーズ(または互換機)であれば本データベースの利用は可能である。本データベースが稼働したコンピュータをTable 1に示す。ただし、データサイズが大きくなることからハードディスクは必要と考えられる。

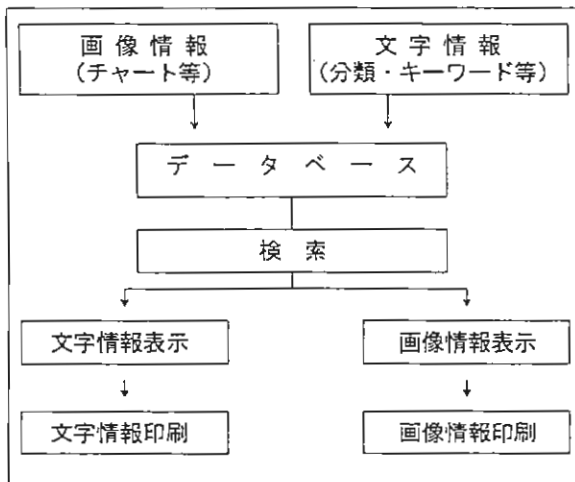


Fig. 2 データベースの概略

Table 1 本システムの動作確認機種

メーカー	機種	OS
NEC	PC-9801RX	MS-DOS Ver. 3.3D
	PC-9801EX	MS-DOS Ver. 5.0
	H98SModelU8	"
	PC-9801SX/E	MS-DOS Ver. 3.3C
	PC-9801NS/A	MS-DOS Ver. 5.0
EPSON	PC-286NOTE f	MS-DOS Ver. 2.1
	PC-386NOTE A	"

ハードウェアとしてイメージスキャナを追加したが、実際にスキャナーで入力を行ってみると、キーボードからの入力に比べてその労力ははるかに少なくてすむ。さらに本来ならキーボードから入力するのが普通である分析条件等もチャートに書き込む、あるいは張り付けることによってキーボードからの入力を減らし、キーボードから入力するのは検索に最低限必要な事項にとどめ手間をはぶく工夫をした。

また、データベースソフトとして今回はF-Cardを使用した。このソフトは外部プログラムの実行機能⁴⁾があり、書式に画像表示プログラム(今回はMagd)を指定すれば、SHIFTキー+リターンキーで画像表示プログラムが立ち上がり画像が表示される。したがって重要なのは外部プログラムの実行機能であり、この機能が付属す

るデータベースソフトであれば、文字データのわずかな変更で本システムの運用が可能と考えられる。この際、別のファイルになっている画像情報には何ら影響を与えない。

2) 入力フォーマット

イメージスキャナーによる画像の読み込みを採用したこともあって、キーボードからの入力は検索に必要な最低限の項目とし、Table 2に示すようなフォーマットで行うこととした。これらの項目のうち不可欠であるのはチャートファイル名とキーワードの2項目である。検索はキー

Table 2 入力フォーマット

93/06/10		【HPLC DATABASE】		No.	54
A	番号		54		
B	分類1		ビタミン		
C	分類2		水溶性ビタミン		
D	キーワード		ハスA、リジン、パ、ンカ、B12、B6、B1、B2		
E	キーワード2				
F	カラム名				
G	チャートファイル名		b:¥shiseido¥cap_054.mag		
H	メカ・資料名		資生堂 カラム・充填剤総合カタログ第1版		

ワード(成分名)、分類(薬効)で絞り込みを行い、チャートファイル名の項でSHIFTキー+リターンキーを押せば外部プログラム実行機能が働きチャートが表示されることになる。

3) ファイルサイズと画像形式

今回使用したKid98では、ベタファイルの場合拡張子がR、G、B、Eの4ファイルが作成され⁹⁾、サイズはそれぞれ32,000 bytes、合計128,000 bytesが必要となる。これはフロッピーディスク1枚に9枚の画像しか入らないことを意味する。そこで、4ファイルのうち表示に必要でない拡張子がEのファイルを削除し、さらにファイルを圧縮するソフト

Table 3 Digによる圧縮の効果

圧縮前					圧縮後				
CAP_001	B1	32000	94-***	9:15	CAP_001	B1	2883	94-***	9:15
CAP_001	R1	32000	94-***	9:15	CAP_001	R1	2883	94-***	9:15
CAP_001	G1	32000	94-***	9:15	CAP_001	G1	2883	94-***	9:15
CAP_001	E1	32000	94-***	9:15					
CAP_002	B1	32000	94-***	9:17	CAP_002	B1	3084	94-***	9:17
CAP_002	R1	32000	94-***	9:17	CAP_002	R1	3084	94-***	9:17
CAP_002	G1	32000	94-***	9:17	CAP_002	G1	3084	94-***	9:17
CAP_002	E1	32000	94-***	9:17					
CAP_059	B1	32000	94-***	15:01	CAP_059	B1	5949	94-***	15:01
CAP_059	R1	32000	94-***	15:01	CAP_059	R1	5949	94-***	15:01
CAP_059	G1	32000	94-***	15:01	CAP_059	G1	5949	94-***	15:01
CAP_059	E1	32000	94-***	15:01					
CAP_060	B1	32000	94-***	15:03	CAP_060	B1	3141	94-***	15:03
CAP_060	R1	32000	94-***	15:04	CAP_060	R1	3141	94-***	15:04
CAP_060	G1	32000	94-***	15:04	CAP_060	G1	3141	94-***	15:04
CAP_060	E1	32000	94-***	15:04					
240 ファイル 640000 Bytes					180 ファイル 54297 Bytes				

Dietを用いることにより、1枚の画像に要するファイル容量を約10分の1に減らすことができた。Table 3に圧縮の前後を比較した例を示した。この例では60枚分の画像で圧縮前は240ファイル、64万バイト必要であったが圧縮後は180ファイル5万4千バイトとなり圧縮の効果がみられる。Dietは、メモリに常駐し圧縮された画像ファイルは読み出しの際、展開・表示されるためその存在を意識する必要はなく初心者にも利用しやすい。

当初は前述したKid98のベタファイル形式でデータの蓄積を進めたが、画像200枚、300枚と多くなるにつれ、ファイル管理が複雑になり、また、データのサイズも大きくなってきた。そこで画像ファイルの形式について検討を行った。検討の結果、1ファイルで画像表示が可能なMAG形式を採用しそれまで蓄積したデータの変換を行った。画像ファイル形式としてMAG形式を用いることにより従来は1枚の画像について3ファイル必要であった

ものが1ファイルですむようになりファイル管理が容易になった。また、それにつれて必要なファイルサイズも約2分の1になった。Table 4に画像形式変換前後のファイル数を比較した例を示した。ここに示した例では60枚の画像分で180ファイル5万4千バイトであったものが変換することにより60ファイル2万バイトになったことを示しており、ファイル管理は容易に行えるようになった。

Table 4 画像形式によるファイル数の変化

ベタファイル形式				MAG形式				
CAP_001	B1	2883	94-***-***	9:15	CAP_001	MAG	3201 94-***-***	8:56
CAP_001	R1	2883	94-***-***	9:15				
CAP_001	G1	2883	94-***-***	9:15				
CAP_002	B1	3084	94-***-***	9:17	CAP_002	MAG	3496 94-***-***	8:57
CAP_002	R1	3084	94-***-***	9:17				
CAP_002	G1	3084	94-***-***	9:17				
CAP_003	B1	3042	94-***-***	9:21	CAP_003	MAG	3640 94-***-***	8:57
CAP_003	R1	3042	94-***-***	9:21				
CAP_003	G1	3042	94-***-***	9:21				
CAP_059	B1	5949	94-***-***	15:01	CAP_059	MAG	6613 94-***-***	9:05
CAP_059	R1	5949	94-***-***	15:01				
CAP_059	G1	5949	94-***-***	15:01				
CAP_060	B1	3141	94-***-***	15:03	CAP_060	MAG	3599 94-***-***	9:04
CAP_060	R1	3141	94-***-***	15:04				
CAP_060	G1	3141	94-***-***	15:04				
180 ファイル 54297 Bytes				60 ファイル 20549 Bytes				

4) 画像の出力

Fig 3に出力した画像の例を示した。左側が入力した画像、右側が出力した画像で、出力した場合画質としてはかなり荒くなるが、理解することはできると考えられる。出力に用いたDigital Toolsは、様々な画面でハードコピーを取ることができ、一部のソフトでは利用できない可能性もある。

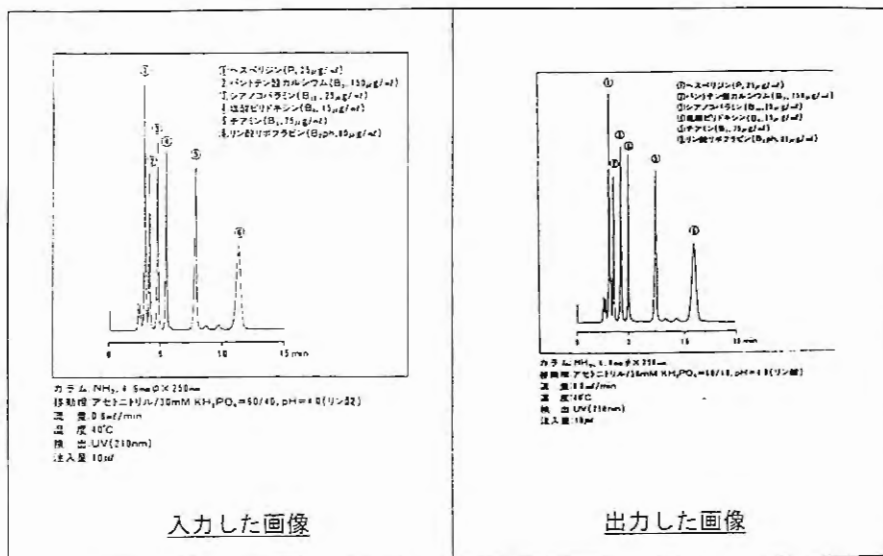


Fig. 3 画像の例

5) 構築したシステムと利用

以上の検討の結果構築した本データベースシステムの機器ソフトの構成をFig 4に利用の手順をFig 5に示す。

ま と め

今回の検討により、比較的安価なソフトウェアやフリーソフトウェアを利用し十分実用に耐える画像データベースの構築をおこなうことができた。本データベースはデータを画像情報として表示するため、ピークの形状・分離の状態もわかり理解しやすいものとなった。さらに、今回おこなったHPLC以外にもGCなどのデータを追加することもでき、汎用性の高いシステムとすることができた。

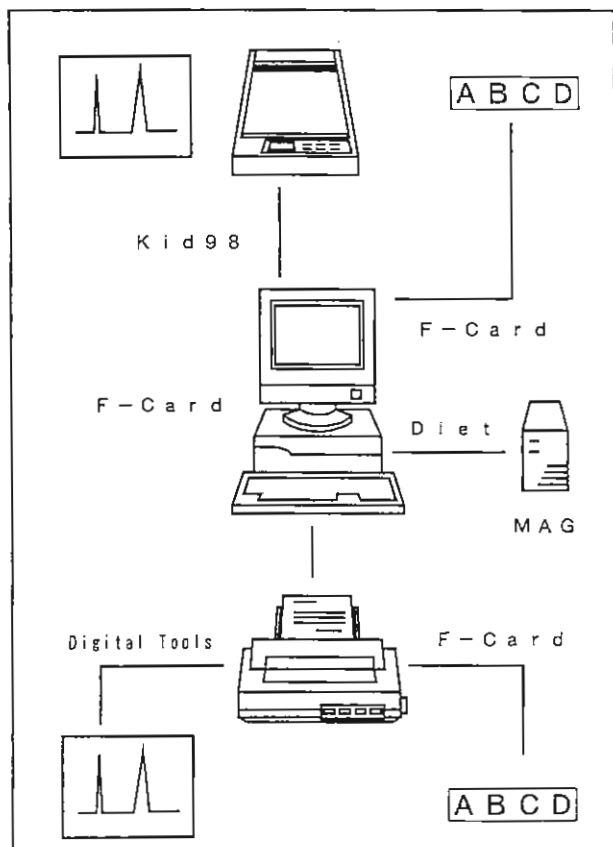


Fig. 4 機器・ソフトの構成

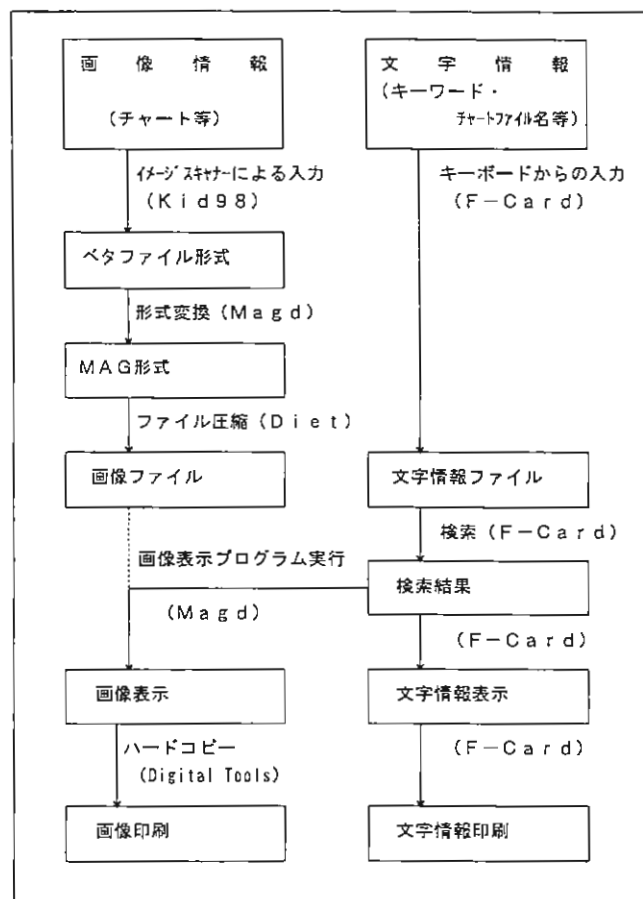


Fig. 5 本システムの利用手順

文 献

- 1) PC-IN503G取扱説明書, 日本電気株式会社, 1988
- 2) 秀作フリーソフトウェア100選 PART3, 株式会社アスキー, 1992
- 3) 秀作フリーソフトウェア100選 PART2, 株式会社アスキー, 1993
- 4) F-Card V5取扱説明書, 株式会社クレスト, 1993
- 5) Z*STAFF Kid98リファレンスマニュアル, 株式会社ツァイト, 1993

本文, 図表中の機器, ソフトウェアはそれぞれの会社の製品名です。

MS-DOSは米国マイクロソフト社の登録商標です。

DietはTeddy Matsumoto (松本孝) 氏の著作物, MagdはTAK/ARAKAWA Laboratory 氏の著作物です。

フルルビプロフェンの経皮適用後の組織移行性の検討

— ラット *in situ* 試験 —

Study of Distribution into Subcutaneous
Tissue of Flurbiprofen after Topical Application

— Rat *in situ* test —

○ 浜本 哲和 笹倉 貢
Tetsukazu HAMAMOTO Mitsugu SASAKURA
松澤 孝泰 住吉 晴美
Takayasu MATSUZAWA Harumi SUMIYOSHI
玉沖 英垣
Hidetsune TAMAOKI

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

緒 言

一般に経度適用後の薬物は速やかに真皮中の血管より吸収され全身へと送られると考えられている。しかしながら一方で、薬物適用部位直下の組織内濃度が非適用部位に比べて有意に高いことが明らかにされている。このことは、皮膚から吸収された薬物の一部が血流に乗らずに直接組織に移行することを示唆する¹⁾。

今回我々は局所適用消炎鎮痛剤であるフルルビプロフェンを用いて薬物適用部位直下への薬物移行について検討するためラット *in situ* 試験を行ったので報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

1) 使 用 動 物

生後9～10週齢のウイスターST系雄性ラットを使用した。ラットはあらかじめ室温 $22 \pm 1^\circ$ 、湿度50～60%の動物飼育室で一週間予備飼育し、飼料としてラット用固形飼料（船橋農場製，MM-3）を用いて、飼料、水ともに自由摂取させた。

2) 使 用 薬 物

サリチル酸（和光純薬工業）

フルルビプロフェン

以下、フルルビプロフェンをFP、サリチル酸をSAと省略する。

3) 被 験 薬 剤

FPおよびSAを以下に示す処方方でゲルを調整した。（w/w%）

Drug	1
ℓ -Menthol	2
EtOH	30
PVA	5
H ₂ O	62

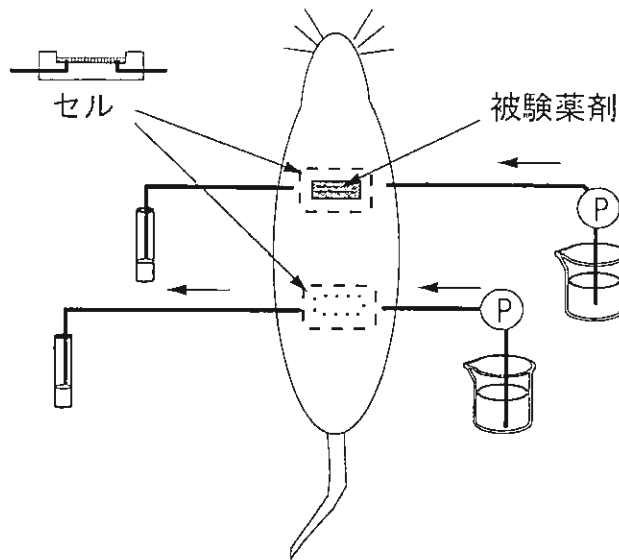


Fig.1 *In situ* system

2. 実験方法

1) *in situ* 試験

ラットを1群3匹使用し、背部を電気バリカンでせん毛後、背部皮膚の中央部を切開しアクリル製フローセル（拡散有効面積 2 cm^2 ）を皮下に2個挿入した。（Fig. 1）一方を薬物適用部位とし、他方を対照とした。ラットをボールマンケージ内に固定した後、ペリスターポンプを用いて各々のフローセルに pH7.4 の等張緩衝液を 3 ml/h で灌流した。一方のセルに薬物用量 10 mg/kg を適用した後、経時的に両セルの灌流液および尾静脈より血液を採取し、各々の薬物濃度を HPLC で測定した。

2) 薬物速度論的パラメーターの解析

ラット（ 350 g ）を1群3匹使用した。大腿静脈より薬物 1 mg/kg を投与後、経時的に採血し HPLC で測定した。

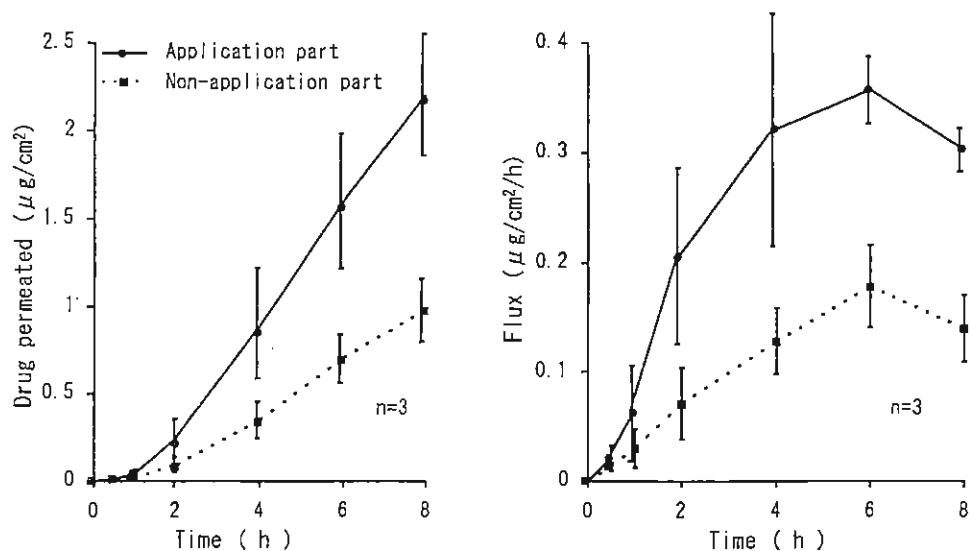


Fig.2 Permeation profile of FP to subcutaneous tissue after topical application

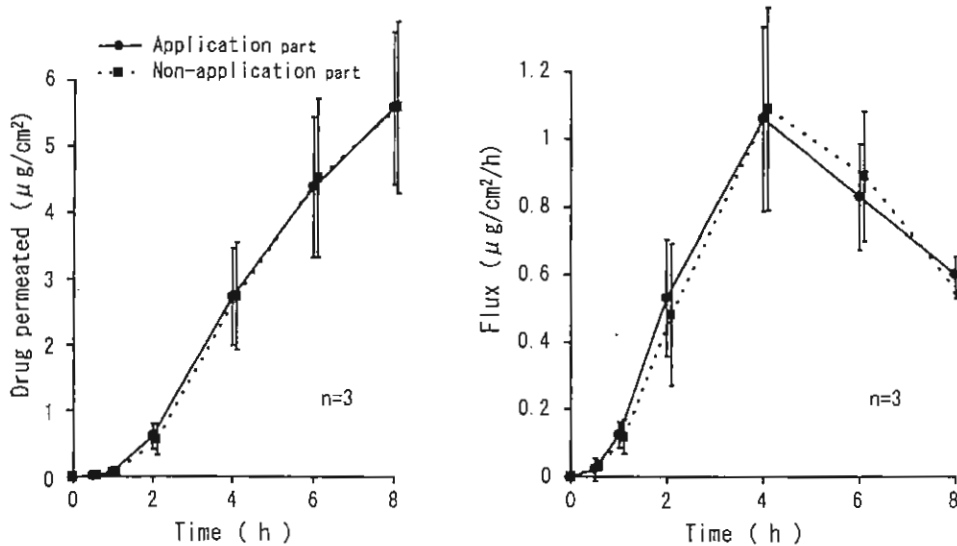


Fig.3 Permeation profile of SA to subcutaneous tissue after topical application

結 果

1. 灌流液中薬物濃度

FPとSAの薬物経皮適用後の灌流液中への累積移行量と移行速度の結果をFig. 2, 3に示す。薬物適用部位のセル灌流液中FP量は非適用部位のそれに比べて2倍量移行した。移行速度も非適用部位と比べて適用部位のほうが約2倍高かった。一方、SAでは累積移行量、移行速度ともに適用部位と非適用部位に有意な差は認められなかった。

2. 血漿中薬物濃度の時間的推移

FPとSAの薬物適用後の血漿中濃度の時間的推移をFig. 4に示す。FPゲルの経皮適用後の血漿中濃度は2時間で定常状態 (C_{max} 10.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, T_{max} 5.3 h) になったが、SAゲルの血漿中濃度は4時間で最大 (C_{max} 33.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, T_{max} 4.7 h) となった。

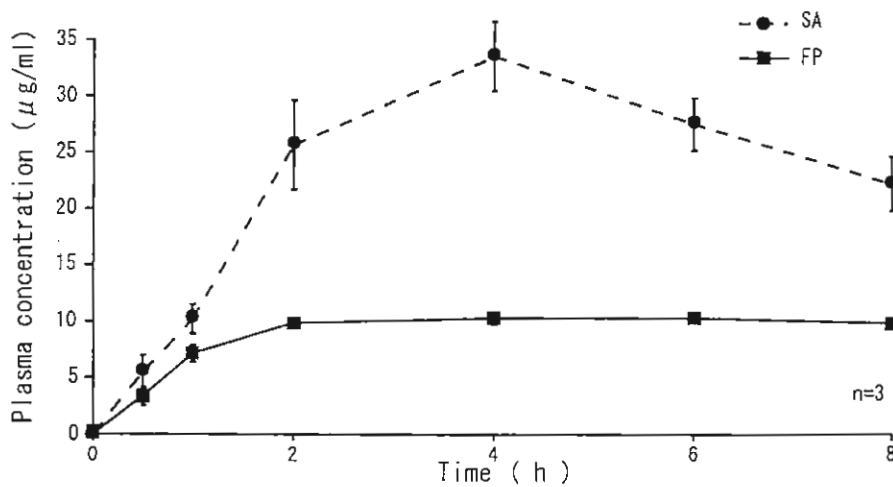


Fig.4 Plasma concentration of FP and SA after topical application

Table 1 Pharmacokinetic parameters of FP and SA after intravenous administration (n=3)

	Dose (mg/kg)	A	α (h ⁻¹)	B	β (h ⁻¹)	Ke (h ⁻¹)	Vc (ml)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)
FP	1.0	3.560	4.034	9.808	0.2940	0.3890	75.00	105.4
		\pm 0.336	\pm 1.293	\pm 0.582	\pm 0.0040	\pm 0.0151	\pm 3.79	\pm 5.0
SA	1.0	4.984	29.74	8.630	0.1220	0.2630	64.16	373.7
		\pm 1.616	\pm 3.840	\pm 0.508	\pm 0.0149	\pm 0.1077	\pm 26.73	\pm 13.2

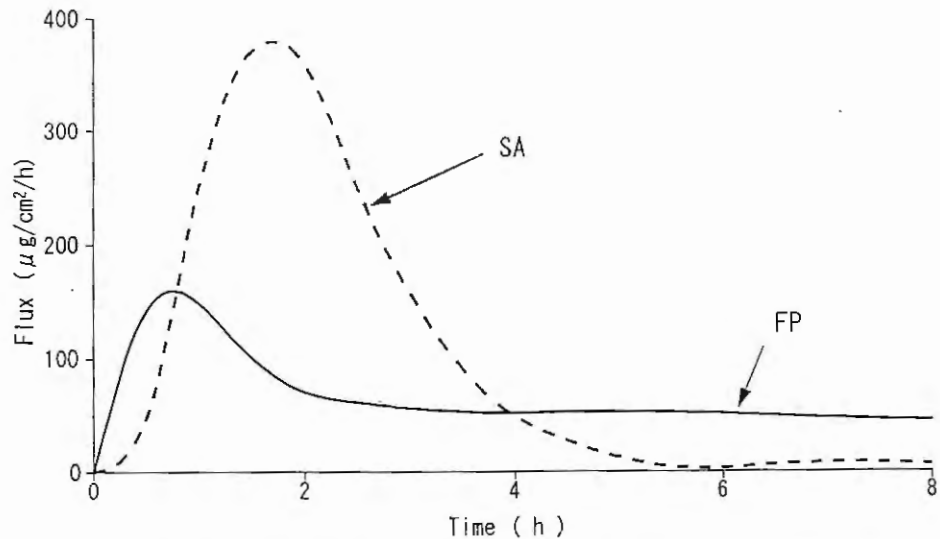


Fig.5 Calculated skin permeation profile by deconvolution

Table 2 Pharmacokinetic parameters of FP and SA after topical application (n=3)

	FP	SA
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10.4 \pm 0.6	33.8 \pm 3.9
T _{max} (h)	5.3 \pm 0.9	4.7 \pm 0.9
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	105.5 \pm 5.0	373.8 \pm 13.2
absorption ratio (%)	8.6	15.8
application part		
F _{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0.40 \pm 0.08	1.06 \pm 0.39
T _{max} (h)	6.0 \pm 1.6	4.7 \pm 0.9
non-application part		
F _{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	0.18 \pm 0.05	1.11 \pm 0.40
T _{max} (h)	5.3 \pm 0.9	4.7 \pm 0.9

3. 全身血への薬物移行速度

薬物静脈内投与により求めた薬物速度論的パラメーター (Table 1) を用いて、経皮適用後の血漿中薬物濃度推移により薬物の血中への移行速度を求めた。(Fig.5)

FPの移行速度は薬物適用後45分で最大となり2～8時間の間ほぼ一定の速度を維持した。SAの移行速度は薬物適用後2時間で最大となり以降徐々に低下し、6時間後にはほとんど吸収が終了していることが確認された。また、薬物の吸収率はFPが8.6%でSAが15.8%だった。(Table 2)

考 察

今回の実験により、累積移行量の推移と血漿中薬物濃度の推移からFPはSAに比べて局所適用による深部組織への移行性が高い薬物であると考えられる。そこで、局所適用による深部組織への移行性は薬物により異なり、その移行速度は必ずしも全身血への移行速度に依存しないと考えられる。

今後の課題として、局所適用後の直接皮下組織への移行性と薬物の物理化学的性質の関係、および皮下組織移行メカニズムについて検討していきたいと考えている。

文 献

- 1) 斎藤晴夫, 元山貢: *Ther Res* 10 : 977-979, 1989

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討（第八報）

—— 市販抱合胆汁酸標準品の品質評価 ——

Studies on Standardization of Crude Drug Components (VIII)

—— Evaluation of Commercial Conjugated Bile Acids ——

富山県薬事研究会分析部会（抱合胆汁酸分科会）

Division of Analytical Chemistry,

Toyama Pharmaceutical Research Association

長谷香織 Kaori HASE	共栄製薬（株） Kyoei Pharmaceutical Co.,LTD
大塚明美 Akemi OTSUKA	第一薬品（株） Daiichi Medicine Co.,LTD
石田貴日 Takahashi ISHIDA	
吉崎真由美 Mayumi YOSHIZAKI	第一薬品工業（株） Daiichi Pharmaceutical Co.,LTD
○中野秀子 Hideko NAKANO	大同製薬（株） Daido Pharmaceutical Co.,LTD
藤田博子 Hiroko FUJITA	中央薬品（株） Chuo Yakuhin Co.,LTD
大間知幸子 Yukiko OMACHI	松井製薬（株） Matsui Pharmaceutical Co.,LTD
青木真知子 Machiko AOKI	明治製薬（株） Meiji Pharmaceutical Co.,LTD
浅水敬子 Keiko ASAMIZU	明生薬品工業（株） Meisei Pharmaceutical Co.,LTD
横田洋一 Youichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

動物胆は胆汁酸分泌促進、整腸などの薬理作用があり、古くから胃腸薬等に数多く配合されている。動物胆中の胆汁酸は、ほとんどがタウリン及びグリシン抱合体であるため、これまで動物胆の品質評価法としては、抱合胆汁酸を加水分解後、各種の誘導体とし、液体クロマトグラフ法やガスクロマトグラフ法により定量する方法が知られているが、これらの方法は非常に煩雑であり、加水分解率にも問題があるという報告もある。最近、抱合体のまま胆汁酸を液体クロマトグラフ法により定量する方法も報告されているが、基準となる標準品の規格設定はなされていない。

そこで我々は、製剤に配合されることの多い熊胆及び牛胆の主抱合胆汁酸である、タウロウルソデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロケノデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、グリココール酸、グリコデオキシコール酸（以下、TUDC、TC、TCDC、TDC、GC、GDCと略す）の6成分につき、標準品の試験方法と市販標準品の品質評価を目的とし、共同研究を行った。

実験の部

1. 試験法の設定

1) TLC法 横田ら¹⁾の方法に準じて、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。

(1) 試料溶液の調製

試料溶液 各抱合胆汁酸 6mg → 2ml (メタノール)

標準溶液 試料溶液 1ml → 100ml (メタノール)

(2) 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製した薄層板

展開溶媒：トルエン・氷酢酸・水混液 (10:10:1)

展開距離：約10cm

スポット量：10 μ l

検出方法：バニリン0.8gを硫酸・エタノール混液 (4:1) 10mlに溶かした液を均等に噴霧後105° 10分加熱

2) HPLC法 横田ら²⁾の方法に準じて、面積百分率法により求めた。

(1) 試料溶液の調製

試料溶液 各抱合胆汁酸 15mg → 5ml (移動相)

標準溶液(1) 試料溶液 1ml → 100ml (移動相)

標準溶液(2) 標準溶液(1) 1ml → 20ml (移動相)

(2) 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：210nm)

カラム：内径4~6mm, 長さ10~30cmのステンレス管に5~10 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。

カラム温度：40°付近の一定温度

移動相：0.02Mリン酸-水素カリウム液 (pH3.0)・メタノール混液 (33:67)

流量：各保持時間がTUDC約7分, TC約9分, GC約12分, TCDC約15分, TDC約18分, GDC約25分になるように調整する。

注入量：10 μ l

検出感度：標準溶液(2)10 μ lから得た各抱合胆汁酸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)10 μ lから得た各抱合胆汁酸のピーク高さが記録計のフルスケールの約20%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各抱合胆汁酸の保持時間の約3倍の範囲

3) 比吸光度 (E値)

測定波長は吸収極大である207nm及びHPLC測定波長である210nmとし、吸光度が0.5付近になるように濃度を調整する。

4) 滴定法

電位差滴定法 (グリシン抱合体)：GC, GDC 各々0.1gをとり、非水滴定用氷酢酸50mlに溶解し、0.02N過塩素酸で滴定を行った。

中和滴定法 (タウリン抱合体)：標準品がNa塩となっていることから、強酸性陽イオン交換樹脂でイオン交換し、0.01N水酸化ナトリウム液で滴定した。

5) 融点

日局一般試験法・融点測定第一法により試験した。

2. 品質評価

1.の方法により、S社・N社の市販標準品の品質評価を行った。

結果及び考察

1. 試験法の設定

1) TLC法

展開温度により分離が悪くなるが、約30°で展開したところ、良好な分離が得られた。

2) HPLC法のカラムの選定

繁用性の高いODS系カラムを中心にカラムの選定を検討した結果を図1に示す。今回評価を行う6成分に加えて、グリコウルソデオキシコール酸(GUDC)、グリコヒヨデオキシコール酸(GHDC)、グリコケノデオキシコール酸(GCDC)の3成分を加えた合計9成分の混合液を調製し、前記の操作条件に従って数本のカラムで分離を検討した。

STR-ODS II (島津テクノロジー), L-column

(化学品検査協会), CAPCELL PAK C18 (資生堂), Wakosil 5C18-200, Wakosil-II 5C18 HG (和光純薬工業), Lichrospher Rp-SelectB (MERCK) で比較的分離も良く、分析時間も30分以内と良好だった。その性質にはあまり関係無く、広い範囲のカラムで分析が可能であることがわかった。

3) 比吸光度 (E値)

吸収極大である207nm付近では実験者間のばらつきが非常に大きかったため、波長を210nmに設定して測定したが表1のように、ばらつきが大きく信頼できる結果が得られなかった。吸収曲線のピークが非常にシャープなこと、数値自体が小さいこと、測定波長が低波長であるために、測定機関による差が大きく現れることなどが原因と考えられる。

4) 滴定法

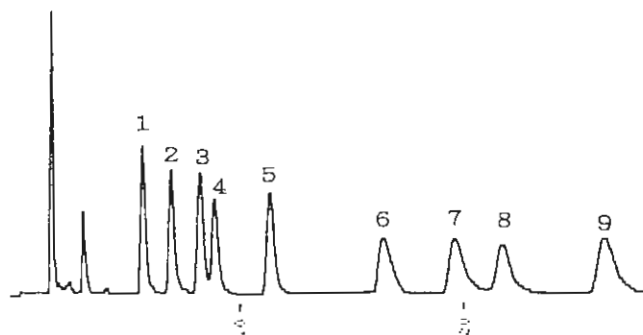
比吸光度にかわる絶対的純度を求める方法として滴定法の検討を行った。グリシン抱合体であるGCとGDCでは、電位差滴定で良好な結果が得られるが、タウリン抱合体では終点が読みとれな

(210nm)

実験者	TUDC*	TC*	TCDC*	TDC*	GC	GDC
a	16.13	14.33	15.50	14.89	12.40	28.32
b	15.11	14.34	13.22	13.72	10.83	26.05
c	13.15	12.33	13.00	17.00	12.04	25.28
d	13.10	11.93	12.19	11.98	10.67	25.09
平均	14.373	13.233	13.478	14.398	11.485	26.185
SD	1.500	1.284	1.419	2.107	0.864	1.483
CV	10.43%	9.71%	10.53%	14.63%	7.52%	5.66%

図1 カラムの選定クロマトグラムの一例

HPLC condition
 Column: STR-ODSII φ4.6×150mm Column Temp.: 40°
 Flow rate: 0.7ml/min
 Mobile phase: 0.02M K₂HPO₄(pH3.0)-CH₃OH (33:67)
 Detection: UV 210nm



1. TUDC 2. TC 3. GUDC 4. GHDC 5. GC
 6. TCDC 7. TDC 8. GCDC 9. GDC

		HPLCによる定量値 n=6(%)	TLC判定* n=6
TUDC	S社	99.1	△
	N社	97.2	△
TC	S社	99.5	△
	N社	97.7	△
TCDC	S社	98.4	△
	N社	93.7	△
TDC	S社	98.7	○
	N社	98.9	○

		滴定による定量値 n=6(%)	HPLC純度 n=6(%)	TLC判定* n=6
GC	S社	99.2	97.5	×
	N社	99.2	98.3	△
GDC	S社	99.1	96.6	×
	N社	99.2	97.7	△

* ○ 副スポットなし △ 副スポット標準溶液より濃いもの1~2個
 × 副スポット標準溶液より濃いもの3個以上

表1 各抱合胆汁酸の比吸光度 (E値)

表2 市販標準品試験結果

った。そこで前記のように中和滴定を行った結果105%という高めの値が得られ、タウリンやアミノ酸の混在が考えられたが、タウリンを定量してみると極わずかで滴定に影響のない程度であり、アミノ酸も検出されなかったため、なぜ高い値がでるのかわからなかった。

5) 融 点

温度を上昇させると途中で発泡し、さらに温度を上げると再び凝固してしまうため、融点を明確に読みとることはできなかった。

以上の結果より、グリシン抱合体は純度試験としてTLC法及びHPLC法、定量法として電位差滴定を用い、タウリン抱合体は、純度試験としてTLC法、定量法としてHPLC法を用いることにし、それぞれ試験法を設定した。

2. 市販標準品の品質評価

2社の市販標準品の6成分の試験結果を表2に示した。HPLC法による定量又は純度試験ではカラム間、実験者間の変動は小さかったが、99%以上のものは少なく、胆汁酸の種類によってばらつきがあり、N社のTCDCのようになりかなり低いものもあった。TLC法による純度試験では、そのほとんどに標準溶液より濃い副スポットがあり、不純物が多いことがわかった。また、HPLC法で99%以上のものでも副スポットがあり、HPLC法では検出されない不純物の確認ができたものと考えている。しかし、GCもGDCも滴定による定量値は99.1%、99.2%と高い値を示し、これは、HPLC法やTLC法で認められた不純物が胆汁酸と同様に酸基を持つものであり、これらがすべて滴定されるためと考えられる。クロマトグラムを図2、図3に示す。

図2 N社製標準品(タウリン抱合体)の液体クロマトグラム

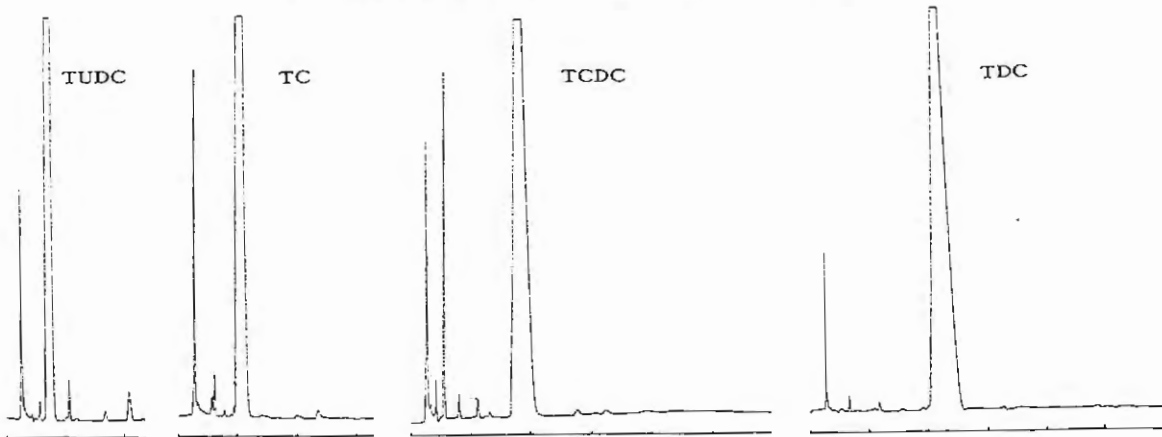
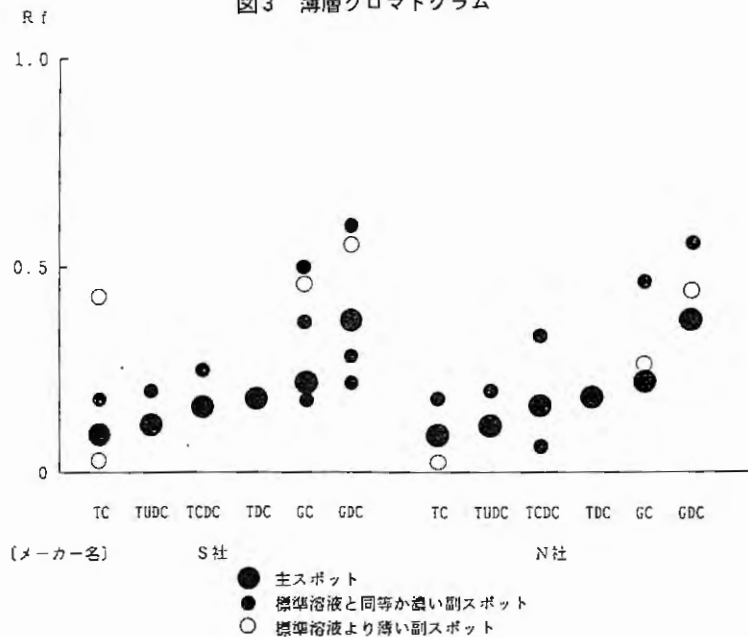


図3 薄層クロマトグラム



ま と め

1. 以上のように抱合胆汁酸の試験法を設定したが、タウリン抱合体に関しては絶対的純度を求める方法が設定できず、今後の検討が必要である。
2. 2社の市販標準品について品質評価を行ったが、純度99%以上のものは少なく、高価であるにもかかわらず、メーカーによっても、胆汁酸の種類によっても品質にばらつきがあり、標準品として使うには若干問題のあるものもみうけられた。他のメーカーのものについても、その品質評価を検討していく予定であるが、今後これらを使用する際には注意が必要である。

文 献

- 1) 富山県薬事研究所所報（昭和63年度）：高速液体クロマトグラフ法による市販熊胆及び牛黄中の胆汁酸の分析，横田洋一ら，p.103
- 2) 富山県薬事研究所所報（平成2年度）：高速液体クロマトグラフ法による市販動物胆中の抱合胆汁酸の分析，横田洋一ら，p.88