

標準品の安定性（第1報）

—グリチルリチン酸—

Studis on Stability of Standard in Solvent (I)

—Glycyrrhizic Acid—

富山県薬事研究会分析部会（標準品の安定性分科会）

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Reserch Association

小 中 宏 子	株式会社内山薬品商会
Hiroko KONAKA	Uchiyama Medicine Co.,LTD
広 田 奈穂美	救急薬品工業株式会社
Naomi HIROTA	Kyukyu Pharmaceutical Co.,LTD
畔 京 子	第一薬品株式会社
Kyouko KURO	Daiichi Medicine Co.,LTD
塚 本 あ い	第一薬品工業株式会社
Ai TSUKAMOTO	Daiichi Pharmaceutical Co.,LTD
野 坂 ゆかり	第一薬品工業株式会社
Yukari NOSAKA	Daiichi Pharmaceutical Co.,LTD
松 山 直 美	株式会社内外薬品商会
Naomi MATSUYAMA	Naigai Medicine Co.,LTD
○ 山 崎 比呂美	株式会社富士薬品
Hiromi YAMAZAKI	Fuji Medicine Co.,LTD
横 田 洋 一	富山県薬事研究所
Youichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

製剤の定量分析に使用する標準品には高い純度が要求され、一般に、そのような目的で使用される標準品には高価なものが多い。近年、かなりの生薬においてもその指標成分による定量を義務づけられており、標準品にもより高い純度が要求されてきている。一方、生薬成分の定量に使用する標準品に特に高価なものが多いのが現状である。このような高価な標準品をより有効に使用するためには溶液保存できることが望ましいが、溶液保存時の経時に対する安定性はよく把握されていない場合が多い。

そこで本分科会では、比較的使用頻度が高く、高価でかつ安定性に興味を持たれる標準品の溶液保存における安定性について検討することとなった。今回その第1報として、グリチルリチン酸について安定性の検討を行ったので報告する。

実 験

1. 予試験としての虐待試験

溶液保存のグリチルリチン酸が経時的にどのように変化するかを予測するために、予試験として虐待試験を行った。溶媒には汎用されている2種類を用いた。

溶 媒：メタノール、希エタノール

濃 度：2 mg/mL

標 準 品：和光純薬工業株式会社製 グリチルリチン酸標準品

保存形態：無色アンプル管に充填・密封し、アルミホイルにて遮光した。

虐待条件：60℃ 2週間

試験方法：第12改正日局成分含量測定用グリチルリチン酸^①の試験方法を準用した。

試験項目：比吸光度、純度試験（TLC法、HPLC法）、定量

虐待後、-25℃保管品を対照として虐待による変化の様子を調べた。

2. その他の溶媒についての虐待試験

実験1の結果に基づき、他の溶媒を用いて1と同様の虐待試験を実施した。

溶 媒：アルコール系…メタノール、エタノール、1-プロパノール

非アルコール系…薄めた酢酸（1→15）・アセトニトリル混液（3：2）〈移動相〉

水・アセトニトリル混液（3：2）

濃 度：約1 mg/mL

試験項目：HPLC法による面積百分率、定量

その他の項目については、実験1と同様に行った。

3. メタノール溶液、希エタノール溶液の安定性試験

汎用されているメタノール、希エタノール中で実際にはどのくらいの期間、高純度を維持できるのかを調べる安定性試験を行った。

濃 度：1 mg/mL

保存条件：5℃、25℃、40℃の各条件下で4週間毎24週間まで

60℃の条件下で2週間毎12週間まで

試験項目：HPLC法による面積百分率、定量

その他の項目については、実験1と同様に行った。それぞれの検体は、保存期間終了後-25℃にて保管し、全保存期間終了後、-25℃保管品と同時に分析・比較することで安定性の評価を行った。

結果及び考察

1. 予試験としての虐待試験

実験1の結果をTable 1に示す。

虐待後のグリチルリチン酸は、メタノール溶液、希エタノール溶液ともに比吸光度において対照品とほとんど変化が認められなかったが、他の試験項目においては顕著な変化が認められた。

(n = 1)

試験項目	溶 媒	
	メタノール	希エタノール
比吸光度	変化なし	変化なし
TLC法による純度試験	主な不純スポット : 1個	主な不純スポット : 4個
HPLC法による純度試験	主な不純ピーク : 2本	主な不純ピーク : 2本
HPLC法による定量 (面積百分率)	89.60%	89.57%

Table 1 予試験の結果

HPLCクロマトグラムにおいてはかなりの不純ピークが認められ、メタノール溶液、希エタノール溶液のいずれも面積百分率で約90%まで低下した。しかも両者の不純ピークのパターンは異なるものであった (Fig. 1)。フォト・ダイオード・アレイ検出器を用いて各ピークの吸収曲線を測定したところ、主ピークと不純ピークの吸収曲線がほぼ一致したことから (Fig. 2)、生成した不純物はグリチルリチン酸と構造上よく似た物質であることが推測された。

また、虐待による生成物のピークは主なもの2本を含む3本まで確認でき、希エタノール中の生成物の方がメタノール中の生成物より保持時間が遅れていることから、これらの生成物がグリチルリチン酸の3つのカルボキシル基のエステル化によるものではないかと予想された。

2. その他の溶媒についての虐待試験

実験1の結果から、グリチルリチン酸の安定性にアルコールが影響を及ぼしている可能性が考えられたので、溶媒をアルコール系と非アルコール系に分けて同様の虐待試験を行った。

その結果、アルコール系溶媒中では虐待後にそれぞれ保持時間の異なる不純ピークが2~3本現れ、これらの保持時間はメタノール、エタノール、1-プロパノールの順に遅くなった (Fig. 3)。これに対し、非アルコール系溶媒中では不純ピークは少なく (Fig. 4)、虐待後も99%以上の高い残存率を示した (Table 2)。

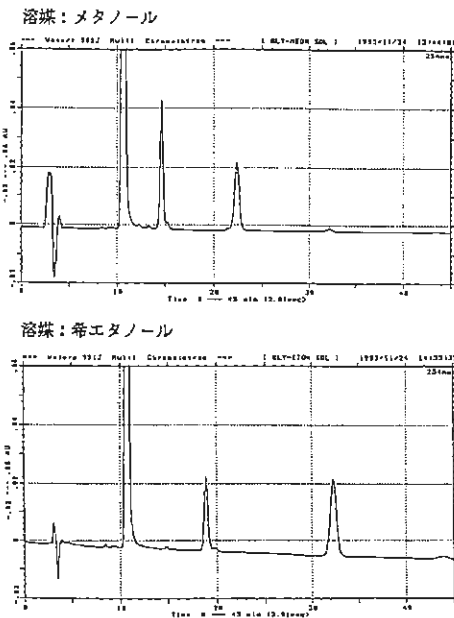


Fig. 1 虐待後のクロマトグラム

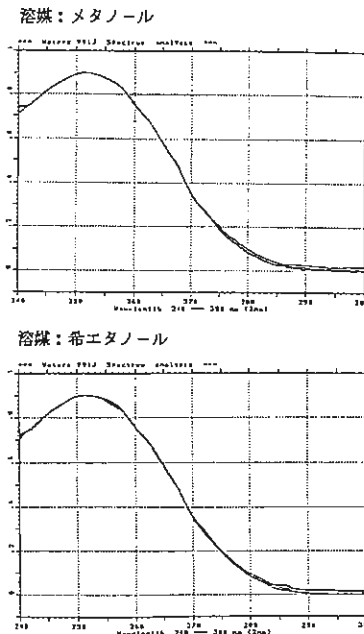


Fig. 2 主ピーク及び主な不純ピークの吸収スペクトル

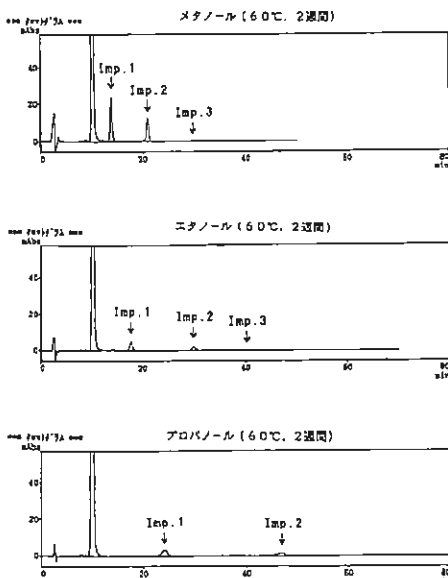


Fig. 3 アルコール系溶媒における虐待後のクロマトグラム

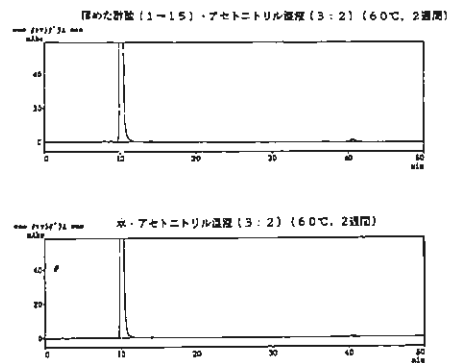


Fig. 4 非アルコール系溶媒における虐待後のクロマトグラム

(n = 4)

溶 媒		面積百分率による残存率 (%)
アルコール系	メタノール	94.64
	エタノール	98.43
	1-プロパノール	97.88
非アルコール系	移動相	99.23
	水・アセトニトリル	99.49

Table 2 虐待後のグリチルリチン酸の残存率

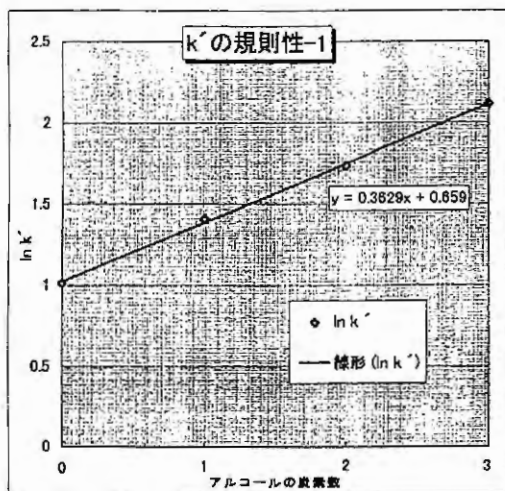


Fig. 5 アルコールの炭素数と第1不純物の保持比の関係

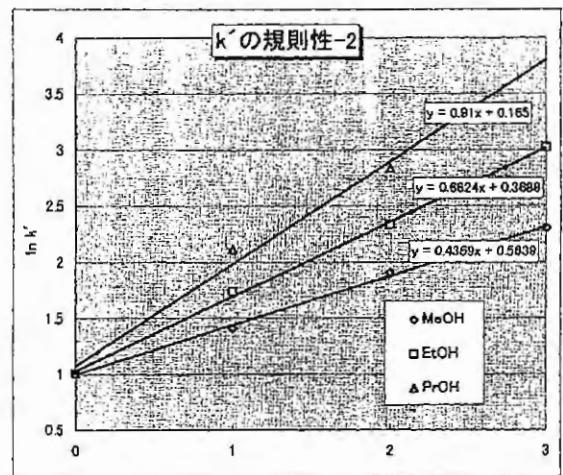


Fig. 6 各溶媒における主な不純物と保持比の関係

また、アルコール系溶媒におけるグリチルリチン酸と主な不純物のピークの保持比 (k') を算出し、その自然対数をグラフに表したところ、溶媒のアルコールの炭素数と各溶媒の1番目の不純物 (Fig. 3 : Imp. 1) の k' 値の相関は直線で表され、その切片グリチルリチン酸の k' 値にほぼ一致した (Fig. 5)。 k' のこうした直線性は分子量 (脂溶性) が規則的に変化したことを表しており²³⁾、グリチルリチン酸と1番目の不純物の間のこの規則性はアルコール系溶媒中におけるエステル化の予測を裏付けるものであると考えられる。

なお、各溶媒におけるグリチルリチン酸と1、2、3番目 (1-プロパノールにおいては1、2番目) の不純物 (Fig. 3 : Imp. 1 ~ Imp. 3) の k' 値も、横軸を等間隔にプロットした場合に直線傾向があった (Fig. 6)。このことから、溶媒毎のグリチルリチン酸と主な生成物の間にも、脂溶性の変化に規則性のあることがうかがわれ、3つのカルボキシル基に対し順次エステル化の起こった可能性が考えられたが、今回の実験では不純物の構造や分子量の確認には至っておらず、詳細についてはさらに検討が必要である。

3. メタノール溶液、希エタノール溶液の安定性試験

実験1の虐待試験においてメタノール溶液、希エタノール溶液にかなりの含量低下が認められたので、これら溶液の通常の保存条件下での安定性を調べた。

各溶媒中のグリチルリチン酸の面積百分率と含量の経時変化をTable 3、Table 4に示す。-25℃保管品の値を開始時とし、これを100%とした残存率で表している。これをグラフに表したのがFig. 7、Fig. 8である。

GLY・(メタノール)残存率(%)<面積百分率>(n = 4)

	0 W	2 W	4 W	6 W	8 W	10 W	12 W	14 W	16 W	18 W	20 W	22 W	24 W
5°	100.00		99.75		99.59		99.53		99.44		99.34		99.14
25°	100.00		98.55		97.28		95.75		94.76		93.72		94.29
40°	100.00		94.17		86.42		84.00		77.71		70.05		66.77
60°	100.00	90.77	86.77	79.48	74.11	67.37	59.81						

GLY.(希エタノール) 残存率(%)<面積百分率>(n = 4)

	0 W	2 W	4 W	6 W	8 W	10 W	12 W	14 W	16 W	18 W	20 W	22 W	24 W
5°	100.00		99.74		99.59		99.54		99.27		99.20		98.86
25°	100.00		98.60		97.16		95.86		94.65		92.52		91.83
40°	100.00		94.25		88.56		81.75		75.04		69.98		67.95
60°	100.00	92.00	85.50	78.91	75.25	70.11	63.83						

GLY.(メタノール)残存率(%)<含量> (n = 4)

	0 W	2 W	4 W	6 W	8 W	10 W	12 W	14 W	16 W	18 W	20 W	22 W	24 W
5°	100.00		98.49		100.69		99.43		100.59		98.45		99.54
25°	100.00		96.05		97.31		96.27		94.55		95.62		94.66
40°	100.00		95.36		88.56		84.06		75.97		69.64		66.35
60°	100.00	91.01	87.02	79.77	73.19	66.12	60.86						

GLY.(希エタノール) 残存率 (%) <含量> (n = 4)

	0 W	2 W	4 W	6 W	8 W	10 W	12 W	14 W	16 W	18 W	20 W	22 W	24 W
5°	100.00		99.61		99.63		99.17		98.10		98.30		98.25
25°	100.00		96.72		95.53		94.01		94.02		91.55		90.53
40°	100.00		91.84		85.56		79.21		73.07		68.00		65.88
60°	100.00	92.23	84.73	78.73	74.73	70.86	63.16						

Table 3 メタノール溶液中のグリチルリチン酸の安定性

Table 4 希エタノール溶液中のグリチルリチン酸の安定性

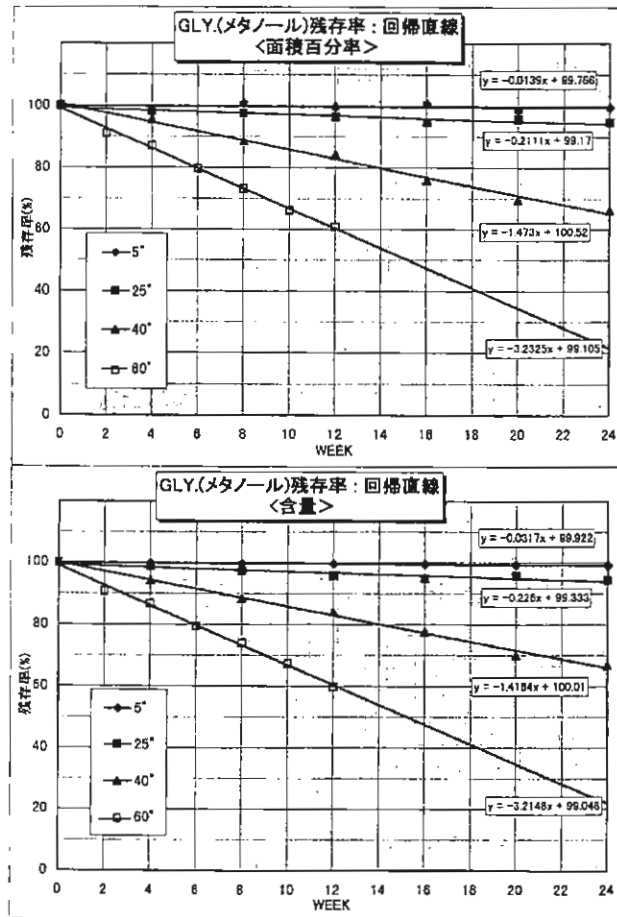


Fig. 7 メタノール溶液中のグリチルリチン酸の安定性

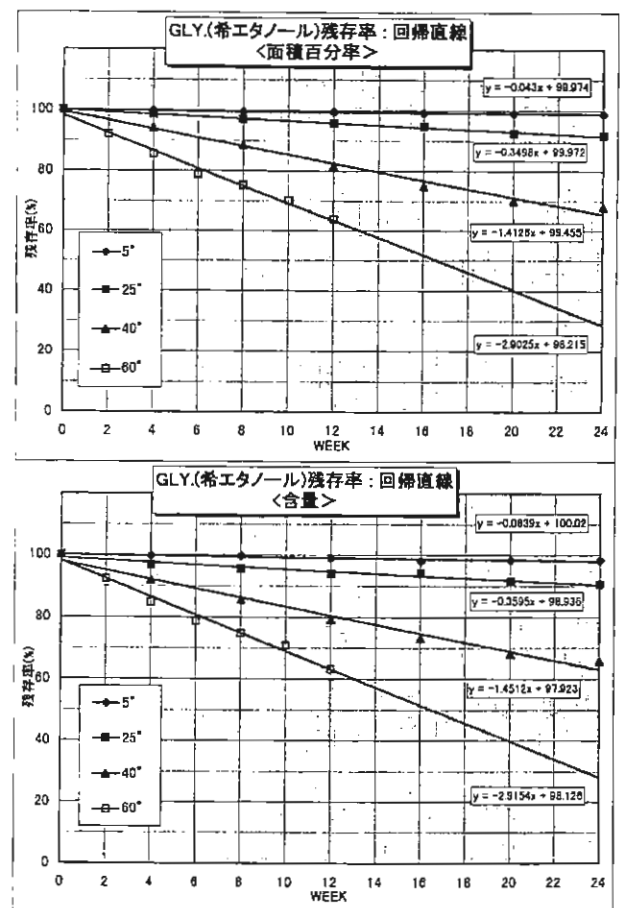


Fig. 8 希エタノール中のグリチルリチン酸の安定性

これによると、安定性においてメタノールと希エタノールの間にほとんど差は認められず、いずれもグリチルリチン酸の含量は直線的に低下し、その速度には温度依存性があった。5°C保存では24週間で開始時より約1%含量低下しており、より高純度を維持するためには、十分な密封状態でさらに低温で保存することが望ましいといえる。

また、どちらの溶媒においても面積百分率による残存率と含量による残存率にほとんど差がなく、このことから、グリチルリチン酸に関しては試験方法に定めるHPLCの分析条件がグリチルリチン酸の経時変化による生成物をほぼ網羅していること、いいかえれば、クロマトグラムに現れる以外には定量値に影響を与えるような著明な生成物はほとんどないことがうかがえる。したがって、グリチルリチン酸のメタノール溶液、希エタノール溶液では面積百分率を純度におきかえることが可能であると考えられる。

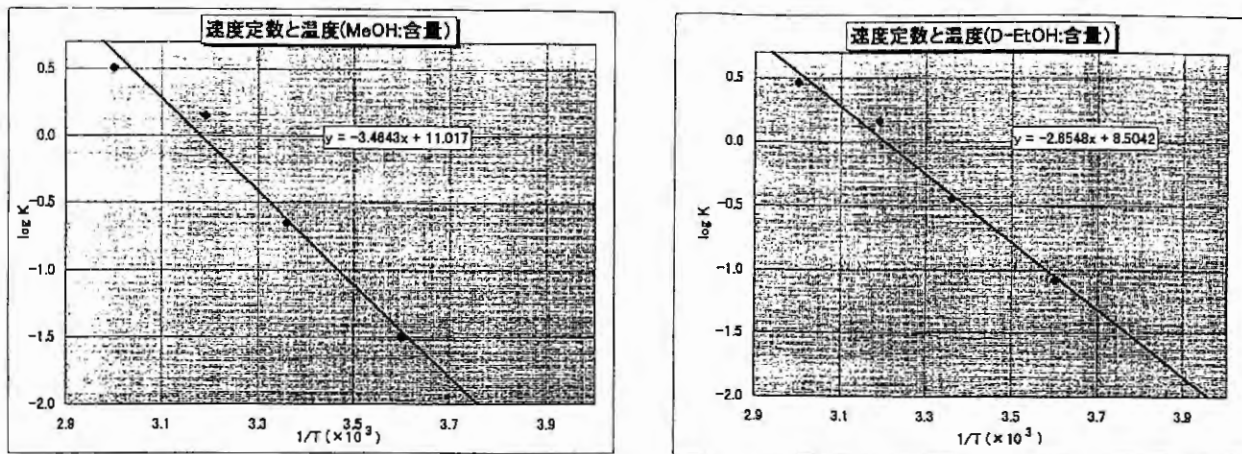


Fig. 9 保存温度と含量の低下速度との関係

虐待試験結果 (希エタノール) :面積百分率 (%) (n = 4)

	0 Week	2 Week	4 Week	6 Week	8 Week	10 Week	12 Week
Gly.	99.13	91.20	84.76	78.22	74.60	69.50	63.27
Imp. 1	0.05	2.47	4.63	6.63	7.78	9.37	11.07
Imp. 2	0.18	4.14	7.86	11.19	13.08	15.44	18.09
Imp. 3	0.00	0.28	0.47	0.72	0.90	1.44	2.19
Imp. 4	0.00	0.05	0.29	0.66	1.21	1.44	2.22
Imp. 5	0.00	0.00	0.00	0.02	0.04	0.54	0.28
Imp. 6	0.00	0.17	0.41	0.75	0.97	1.51	2.01

Table 5 希エタノール溶液60°C保存品における主なピーク的面積百分率の推移

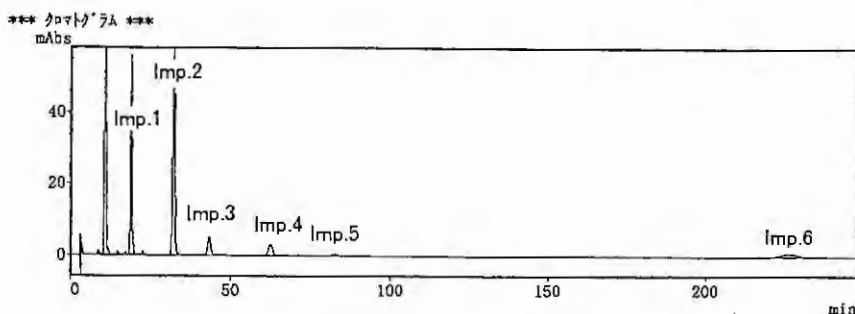


Fig.10 希エタノール溶液60°C12週間保存品のクロマトグラム

Fig. 7、Fig. 8におけるグラフの傾きは含量の低下速度を表すと考えられるが、保存温度（絶対温度）の逆数とこの低下速度の対数の関係はFig. 9のように直線傾向を示し、経時的な変化がほぼ Arrhenius式に従って進んだことを確認することができた。この関係式から、今回実験で用いた保存条件以外の温度においてもグリチルリチン酸の含量低下のおおよその速度を予測することができる。

なお、今回、希エタノール溶液の60°C保存品において第2週目より試験方法に定める面積測定範囲外の位置にピークが検出され (Table 5、Fig.10 : Imp. 6)、この保持時間がグリチルレチン酸と同じであることが確認されている。12週間保管品においてその面積百分率は約2%であった。これがグリチルレチン酸であった場合、エステル化以外の反応も起っていることを意味するが、その量はわずかであり、通常の保存条件においてはほとんど問題とならない量であると考えられた (Table 5)。

ま と め

グリチルリチン酸の溶液保存時の安定性について、通常用いられているアルコール系溶媒ではエステル化と思われる反応が起こり、純度が低下することがわかった。メタノールと希エタノールの溶媒差はほとんどなく、いずれも5℃保存24週間で約1%の純度の低下がみられた。密封状態で冷凍庫保存すればより長期間の保存が可能であると考えられる。

非アルコール系溶媒中では比較的安定性の良いことが示唆されたが、実際に安定性試験を実施して検討する必要があると思われる。

また、面積百分率と含量の残存率にほとんど差が認められなかったことから、通常の保管条件下では、メタノール溶液及び希エタノール溶液のグリチルリチン酸の純度を面積百分率で表すことができると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 日本公定書協会：第12改正日本薬局方（1991）
- 2) 野村 昇ら：RPLCにおけるアルキルフェノール類の保持比の近似計算法，第37回液体クロマトグラフ研究会講演要旨集，17-20（1994）
- 3) 矢澤 到ら：リガンドカバレッジの異なるODSカラムの特性，第37回液体クロマトグラフ研究会講演要旨集，23-28（1994）
- 4) 中垣正幸，有田隆一：製剤物理化学，92-94，朝倉書店（1968）

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討（第九報）

バルバロインについて

Studies on Standardization of Crude Drug Components (IX)

Barbaloin

富山県薬事研究会分析部会（バルバロイン分科会）

Barbaloin of Analytical Chemistry,

Toyama Pharmaceutical Research Association

岩 城 暁 子	(株)ケロリン屋本店
Akiko IWAKI	Kerorinya Co.,LTD.
松 平 薫	大協薬品工業(株)
Kaoru MATUHIRA	Taikyo Pharmaceutical Co.,LTD.
江野本 加壽雄	(株)廣貫堂
Kazuo ENOMOTO	Kokando Co.,LTD.
○ 南 泉 介	(株)富士薬品
Sensuke MINAMI	Fuji Medicine Co.,LTD.
安 倍 房 江	東亜薬品(株)
Fusae ABE	Toa Medicine Co.,LTD.
春 日 香 織	共栄製薬(株)
Kaori KASUGA	Kyoei Pharmaceutical Co.,LTD.
横 田 洋 一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

アロエは、*Aloe ferox* Miller 等の葉の液汁を乾燥したもので、古くから健胃薬、緩下薬として広く使用されており、日本薬局方では、初版以来続けて収載されている。

医薬品製造指針では、アロエの定量成分としてバルバロインが指定されており、生薬標準品として各社から販売されている。しかし、標準品の規格及び試験方法には定まったものがなく、日本薬局方第13改正では、TLC法による純度試験が記載してあるだけである。

また、公定書の試験規格も、相対純度試験と融点があるだけで、標準品メーカーによってその規格もばらばらであることがわかった。

我々は、HPLC法によるバルバロイン含量規格の設定、薄層クロマトグラフ法による純度試験規格の設定、吸収曲線の極大波長を利用して比吸光度の設定を目標とし、検討を行った。

実験の部

1. 試験法の設定

1) HPLC法 文献¹⁾²⁾記載方法に準じて、面積百分率法により求めた。

(1) 試料溶液の調製

- ・試料溶液 市販標準品25mgをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で25mLにした。
- ・標準溶液 試料溶液1mLをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で100mLにした。
- ・検出感度用溶液 標準溶液5mLをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で100mLにした。

試料溶液及び標準溶液の調製については、シュウ酸を添加する事によりバルバロインの分解が抑えられるとの文献¹⁾に従い、溶媒にシュウ酸を添加したものをを用いる事にした。

(2) 操作条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長296nm)
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化シリカゲルを充てんしたもの。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：アセトニトリル・水・氷酢酸(26:74:1)

流量：バルバロインの保持時間が10分前後になるように調整する。

注入量：10 μ L

カラムの選定：バルバロイン1mg及びm-ニトロアニリン1mgをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)100mLに溶かす。この20 μ Lにつき、上記の条件で操作するとき、バルバロイン、m-ニトロアニリンの順に溶出し、完全に分離するものを用いる。

検出感度：標準溶液20 μ Lから得たバルバロイン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：溶媒ピークの後ろからバルバロインの保持時間の約4倍の範囲。

最小ピーク面積：標準溶液5mLを正確に量り、シュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)を加えて正確に100mLとする。この20mLから得たバルバロイン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。

2) TLC法 日局13改正薄層クロマトグラフ用バルバロインの純度試験法に準じて、試料溶液の副スポットとの比較を行った。

(1) 試料溶液の調製

- ・試料溶液 市販標準品25mgをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で25mLにした。
- ・標準溶液 試料溶液1mLをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で100mLにした。

(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：クロロホルム・エタノール・水混液(30:15:1)

展開距離：10cm

スポット量：30 μ L

検出方法：紫外線(主波長365nm)を照射

3) 比吸光度(E値)バルバロインの吸収曲線を求め、その吸収極大波長について、吸光度を求めた。

(1) 試料溶液の調製

- ・市販標準品4mgをシュウ酸のメタノール溶液(0.2→1000)で200mLにした。

(2) 分光光度計の検定

- ・日局13改正の波長及び目盛りの校正により検定した機器を使用。

2. 品質評価

1. の方法により、市販メーカー(6社)のバルバロインを減圧下室温で24時間乾燥したものを試料として、品質評価を行った。

3. 標準品の安定性

1. の試験法により、面積百分率法により求めた。HPLC試験用に調製した各社のバルバロイン試料溶液を冷暗所で4ヶ月間保存し、その残存率を求めた。

結果及び考察

1. 試験法の設定

1) HPLC法による定量法の設定

文献²⁾記載の移動相についてアセトニトリル：水：氷酢酸 26：74：1とメタノール：水 57：43という条件で予試験を行ったところ、アセトニトリル系の方が良い分離を示し、この条件を基に、バルバロインの溶出時間が10分前後になるように流量設定を行い試験することとした。

TSK-gel ODS80TM (東ソー)、イナートシルーODS (ジールサイエンス)、Wakosil 5C18N (和光純薬工業)のODSカラムを用い、カラムの選定を検討するために、バルバロインに、エテンザミド、m-ニトロアニリン、パラオキシ安息香酸エチルをそれぞれ加え、調製し、前記の操作条件に従って分離を検討した結果を図1に示す。その結果、最も分離の適当な、m-ニトロアニリンを、カラム選定物質として選定した。

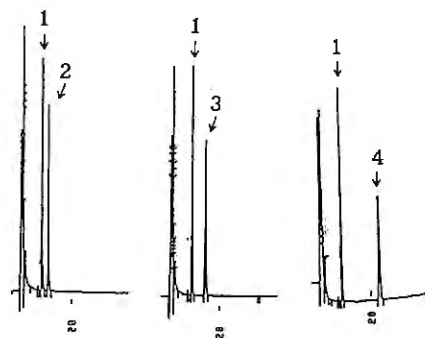
また、カラムの性質にはあまり関係なく、広い範囲のODSカラムで分析が可能であることが分かった。

2) TLC法による純度試験法の設定

日局13改正薄層クロマトグラフ用バルバロインの純度試験法の条件で良好な分離が得られるが、スポット量が10 μ Lでは、スポット濃度が薄いため、スポット量を30 μ Lとした。

3) 比吸光度 (E値)

バルバロイン標準品の吸収曲線を測定した結果を図2に示す。358nm、296nm、269nm、に極大吸収が認められ、これは、文献の値とほぼ一致した。E値の測定には、極大吸収の吸光度値の大きさから、358nm、296nm、の2点について検討を行うこととした。



1はバルバロイン
2はエテンザミド
3はm-ニトロアニリン
4はp-オキシ安息香酸エチル

図1 カラム選定物質の検討

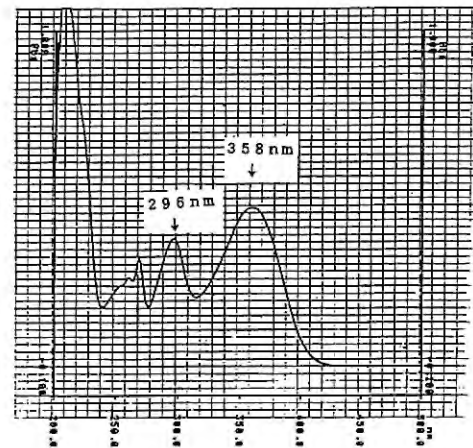


図2 バルバロインの吸収曲線

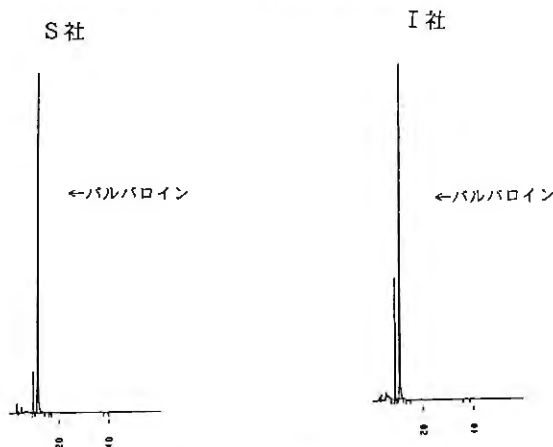


図3 バルバロイン分析チャート

表4 市販バルバロインの定量値 (%)

	A社	B社	C社	D社	平均	C V 値
W社	99.0	98.7	98.8	98.6	98.8	0.15
Y社	99.4	98.6	98.9	98.6	98.9	0.33
T社	99.4	98.5	98.6	98.6	98.8	0.37
S社	99.2	99.0	99.4	98.9	99.1	0.19
I社	97.5	97.3	96.9	96.8	97.1	0.29
E社	99.1	98.7	98.6	98.4	98.7	0.26

2. 市販標準品の品質評価

各社のバルバロイン標準品の含量を測定した結果を図3、表4に示す。図3はS社とI社のクロマトグラムを示したもののだが、メーカーによって、そのチャートに違いがあることが分かる。表4を見るとI社、1社を除いて99%前後の含量であることが分かった。この結果から、含量規格を98.5%以上と設定することとした。

TLC法による純度試験法の結果を図5に示す。I社には、Rf値0.15の副スポットが見られず、S社ではこのスポットは標準溶液の主スポットよりも薄いものであった。他のメーカーについては、標準品の主スポットと同等の濃度でこの副スポットが確認された。

358nm、296nm、の2点について各社のE値を測定した結果を表6に示す。358nmの比吸光度が若干高く、CV値も小さかったため、規格の選定には358nmの方を採用することにした。

試験の結果についてまとめたものを表7に、設定した規格についてまとめたものを表8に示す。表7を見るとI社のTLC試験の結果は、良好であるにもかかわらず、含量値が低いことが分かった。このことより、TLC法では、充分に不純物を、分離できないと考えられます。

以上の結果から、含量規格は、98.5%以上、純度試験は、TLC法で、試料溶液から得た主スポット以外のスポットが標準溶液から得たスポットより濃くないこととし、E値は、358nmで、257から269の範囲とした。

3. 標準品の安定性

安定性を確認した結果を図9に示す。バルバロインの分解反応はシュウ酸が入っていることで抑制されるようだが、徐々に分解しており、4ヶ月で1%強の分解が認められた。また、それとちょうど対照的に、異性体であるイソバルバロインのピークは、0%から2%まで増加してくることが分かった。このような結果が得られたことから、バルバロインは、シュウ酸を加えても溶液中では不安定であることが分かり、今後、安定性について検討の必要がある。

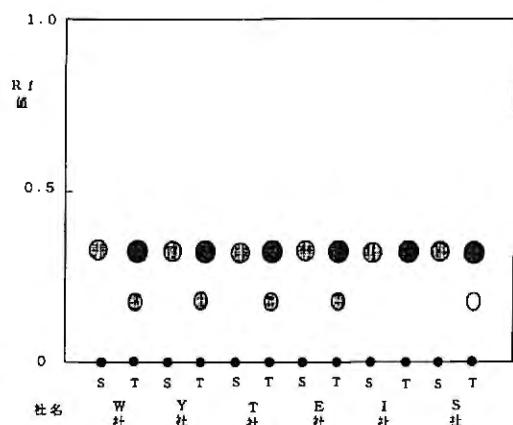


図5 薄層クロマトグラフ

表7 市販バルバロイン標準品の試験結果

	含 量 (HPLC法) n=4	比吸光度 E値 n=3		TLC判定 n=4
		358nm	平均値	
W社	98.8	262.5		○
Y社	98.9	262.9		○
T社	98.8	264.5		○
S社	99.1	261.4		◎
I社	97.1	263.1		◎
E社	98.7	263.4		○

◎副スポットなし、又は1/100以下の濃さ ○副スポットが1/100程度

表6 バルバロイン比吸光度測定結果 比吸光度 296nm

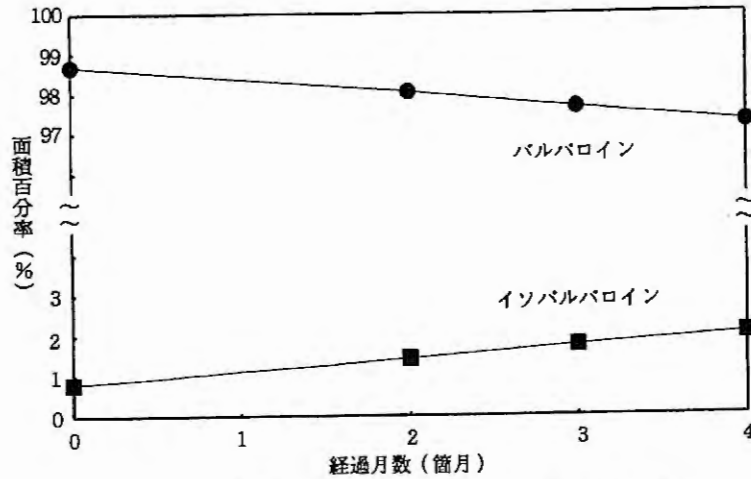
	A社	B社	C社	平均	CV
W社	212.0	210.0	213.0	211.7	0.72
Y社	215.0	209.8	212.5	212.4	1.22
T社	215.2	212.2	213.0	213.5	0.73
S社	213.4	211.3	211.8	212.2	0.52
I社	224.1	212.8	206.8	214.6	4.09
E社	221.7	210.7	211.8	214.7	2.82

比吸光度 358nm

	A社	B社	C社	平均	CV
W社	265.0	260.5	261.9	262.5	0.88
Y社	265.2	261.2	262.4	262.9	0.78
T社	266.7	262.7	264.0	264.5	0.77
S社	262.6	260.5	261.1	261.4	0.41
I社	267.4	263.0	258.8	263.1	1.63
E社	266.1	261.2	263.0	263.4	0.94

表8 規格設定

	試験方法	規 格
含 量	HPLC法	98.5%以上
純度試験	TLC法	試料溶液から得た主スポット以外のスポットは標準溶液から得たスポットより濃くない。
比吸光度	E値 358nm測定	257~269



バルバロイン標準溶液：バルバロイン0.025gをシュウ酸メタノール溶液
(0.2→1000) 25mLに溶かし冷暗所に保存したもの。

図9 バルバロイン標準溶液の安定性

ま と め

1. 以上のようにバルバロインの試験法を設定することができた。今後、アロエ原料中のバルバロインの定量と市販処方中のバルバロインの定量について検討する予定である。
2. 本来、標準品の含量規格は99.0%以上であることが望ましいが、今回測定した市販バルバロイン標準品で、99.0%以上の含量が得られたものは1社だけであり、市販品の供給のことなどを考えると、含量規格は98.5%以上とせざるをえなかった。しかし、ほとんどのメーカーで、含量99.0%前後を得ており、成分含量測定用標準品としては、充分なものとして評価できる。
3. バルバロインは溶液状態で、非常に不安定であるという知見を得たことから、今回、予試験的に安定性を調査したが、前記のように、メタノールにシュウ酸を加えた溶媒を用いても、バルバロインの分解を完全に押さえることはできないようである。今後、溶媒、添加物、加速条件などを変更してバルバロインの残存状況を調査する予定である。

文 献

- 1) 嶋田康男, 山本邦彦, 今西俊恵: 日本生薬学会第35回年会 (1988) : 生薬分析用試薬バルバロインの安定化について P.23
- 2) 和光純薬工業(株) : バルバロイン標準品添付の試験法

和漢薬の薬効評価

— 活性酸素及びH⁺, K⁺-ATPaseに対する作用 —

Pharmacological study of Wakan-Yaku

Action on oxygen radical production and H⁺, K⁺-ATPase

篠原達雄、上川 浩

Tatsuo Shinohara, Hiroshi Kamikawa

ダイト株式会社

Daito Co-Ltd.

Summary : We studied the action of several medical herbs on gastric mucosal oxygen radical production and H⁺, K⁺-ATPase, which related acid secretion. Malloti Cortex and Zaryophyllis Flos strongly inhibited the gastromucosal Myerperoxidase and Xanthine oxidase in vitro. And they inhibited the increasing activity of Myerperoxidase which caused by compound 48/80 in mice. Further, Malloti Cortex and Zaryophyllis Flos inhibited the H⁺, K⁺-ATPase and its 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was 5.3 and 14.5 μg/ml respectively. Lansoplazole, a protonpump inhibitor, strongly inhibited H⁺, K⁺-ATPase and its IC₅₀ was 0.64 μg/ml. The inhibitory effect of Zaryophyllis Flos was not influenced by valinomycin and nigericine stimulation, but the inhibitory effects of Malloti Cortex and lansoprazole were evidently increased in both stimulation. These results suggest that Malloti Cortex has inhibitory effect via gastric mucosal oxygen radical production and on H⁺, K⁺-ATPase. But further investigation including mechanisms is necessary.

Key words : Myerperoxidase, Xanthine oxidase, H⁺, K⁺-ATPase, Malloti Cortex, Zaryophyllis Flos.

緒 言

胃粘膜が何らかの原因で障害を受けた場合、粘膜組織中の活性酸素生成酵素は亢進され、それに伴って活性酸素の生成が増強されて障害を増悪化させることが知られている。この活性酸素に対してある種の和漢薬は消去作用（いわゆるスカベンジャー作用）を有することが報告されている。一方、胃酸は胃粘膜障害の一因であり、この胃酸分泌に対してある種の和漢薬は抑制することが知られているが、その酸分泌抑制機構についての詳細な検討はあまりされていない。そこで今回、健胃生薬として古くから経験的に使われている和漢薬の粘膜障害抑制作用の作用機序を解明することを試みる為、粘膜中活性酸素に対する影響を検討するとともに、粘膜障害の一因とされる胃酸に対する影響を、酸分泌の最終段階をつかさどる壁細胞中のH⁺, K⁺-ATPaseを指標に検討した。

実 験 方 法

動 物 ; 実験動物には生後6週齢のwistar系雄性ラット、生後4週齢のddy系雄性マウス及び体重3kg前後の日本白色種雄性家兎（何れも日本エスエルシー）を購入し、室温24±1℃、湿度55±5%、換気（オールフレッシュ）、12時間明暗の飼育室で1週間以上予備飼育して体重減少の認めなかった動物を選んで実験に供した。尚、飼料及び水道水は自由摂取させた。

試 薬 ; 試験薬物として、赤目柏 (Malloti Cortex)、アロエ (Aloe)、鬱金 (Curcuma Rhizoma)、黄柏 (Phellodendri Cortex)、黄連 (Coptidis Rhizoma)、甘草 (Glycyrrhizae Radix)、枳実 (Aurantii Fructus Immaturus)、玄参 (Gentiana Radix)、和厚朴 (Magnoliae Cortex)、生姜 (Zingiberis Rhizoma)、蒼朮 (Atractylodis Lanceae Rhizoma) 丁子 (Zaryophyllis Flos) 及び陳皮 (Aurantii Nobilis Pericarpium) の乾燥エキスを用いた。尚、これら生薬は何

れも日本粉末薬品工業より購入した。また、一部の試験でランソプラゾール及びシメチジンを使用した。その他の試薬としてXantine oxidase (オリエンタル酵母)、Compound48/80、Superoxidedismutase、ウアバイン、バリノマイシン、ナイジェリシン (何れもSigma)、アスピリン、テトラメチルベンチジン、ヒドロキシルアミン、ATP、p-nitrophenyl phosphate (以下p-NPPと略す) 及びキサントシン (何れも和光純薬) を用いた。

方 法

1. 各種実験モデル潰瘍による活性酸素生成酵素の変化

一夜絶食したラットにCompound48/80 (1 mg/kg i.p.)、アスピリン (300mg/kg p.o.) 及び150mM塩酸含有60%エタノール (5 ml/kg p.o.) を投与した後、1 又は3 時間後に動物を頸椎脱臼によって殺し、直ちに開腹して胃を摘出した。摘出した胃は氷冷下にて大湾部に沿って切開し、冷水で洗浄後胃底部粘膜を分離した。粘膜は尾辻ら⁹⁾の方法に準じて50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) 1 mlを加えてホモジナイズした後、遠心分離 (0℃、10,000×g、30min) し、上清部を分取する。上清部を透析チューブ (MWCO; 12-14,000) に入れ、同緩衝液に対して一夜透析して酵素液を調製した後、Myeloperoxidase活性 (以下MPOと略す) 及びXantine oxidase活性 (以下XOD略す) を測定した。酵素活性は後記の方法に準じて行い、蛋白当たりの比活性を求めた。尚、蛋白量は微量ビュレット法を用いて定量した。MPO活性はSuzukiら⁹⁾の方法に準じ、1.6mMテトラメチルベンチジン、0.3mM過酸化水素、80mMリン酸水素ナトリウム (pH5.4)、8%N, Nジメチルホルムアミド、40%PBSからなる反応液0.5mlに酵素液10 μlを加えて37℃で3分間インキュベートした後、200mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.0) 1.7mlを加えて反応を停止した。この液につき655nmにおける吸光度を分光光度計 (U-1000; 日立製作所) を用いて測定した。酵素活性は蛋白1 mg当たり1分間の吸光度の変化が0.001を1 Uとして表した。一方、XOD活性はOyanagi⁹⁾の方法を改良して行った。すなわち、0.25mM塩酸ピドロキシルアミン、0.25mMキサントシン及び0.025mM EDTA を含む20mMリン酸緩衝液 (pH8.2) 200 μlに酵素液50 μlを加えて37℃、30分間インキュベートし、その後1.7mMスルファニル酸、0.02mMナフチルエチレンジアミン及び17%酢酸からなる呈色液100 μlを加えて室温に20分間放置後、570nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (MPR -A 4 i; 東ソー) を用いて測定した。尚、酵素活性は蛋白1 mg当たり1分間の吸光度の変化が0.001を1 Uとして表した。

2. In Vitroでの活性酸素生成酵素に対する影響

1. MPO活性に対する作用

一夜絶食したラットにCompound48/80を1 mg/kg腹腔内投与し、3時間後に胃を摘出して前記した方法でMPO酵素液を調製した。この酵素液を用い、蒸留水に溶解或は懸濁した試験薬物0.1mlにつき前記した測定法に準じて測定を行ってMPOに対する阻害作用を検討した。

2. XOD活性に対する作用

試験薬物0.5mlに0.25mM塩酸ヒドロキシルアミン、0.25mMキサントシン及び0.025mM EDTAを含む20mMリン酸緩衝液 (pH8.2) 0.1ml及びXantine oxidase (10,000U/ml) 0.2mlを加え、37℃、30分間インキュベートした後、1.7mMスルファニル酸、0.02mMナフチルエチレンジアミン及び17%酢酸からなる呈色液2 mlを加えて20分間室温で放置する。その後550nmにおける吸光度を測定してXODに対する阻害作用を検討した。

3. Compound48/80潰瘍における粘膜MPO及びSOD活性に対する作用

18時間絶食したマウスにCompound48/80を3 mg/kg腹腔内投与する。30分後、試験薬物を経口投与し、その2.5時間後にマウスを頸椎脱臼により殺して開腹し、胃を摘出する。摘出した胃は冷水で洗浄後、冷50mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.4) を加えてホモジネートした後、遠心分離 (0℃、10,000×g、30min) し、上清部を酵素液とした。酵素液につき、MPO活性及びSOD活性を前記方法にて測定した。尚、SOD活性はSOD標準品を用いて検量線を作成して求めた。

4. H^+ , K^+ -ATPaseに対する作用

酵素液の調製；家兔を空気栓塞により殺し、直ちに胃を摘出した。摘出した胃は小湾部に沿って切開し、胃底部粘膜を剥ぎ取った。粘膜は直ちに $-80^{\circ}C$ に凍結して保存し、使用時に解凍して酵素液を調製した。ミクロソーム分画の調製は、粘膜に0.25Mショ糖溶液を加えてホモジネートし、 $0^{\circ}C$ 、 $12,500 \times g$ 、15分間遠心分離して上清部を分取した。この液に88mM塩化カルシウム液を加え、氷冷下にて5分間放置後、 $0^{\circ}C$ 、 $27,000 \times g$ 、15分間遠心分離する。遠心分離後、沈殿物に0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) を加えてホモジネートし、再度 $0^{\circ}C$ 、 $27,000 \times g$ 、15分間遠心分離する。この操作を2度行い、沈殿物に同緩衝液を加えて酵素液とした。尚、酵素液は使用時迄 $-80^{\circ}C$ で保存した。

酵素活性測定法；酵素活性測定は友井⁹及びSaccomani⁹ら2法により行った。すなわち、試験薬物0.1mlに10mM PIPES-Tris緩衝液 (pH7.0)、175mMショ糖、2mM $MgCl_2$ 、50mM $MgSO_4$ 及び酵素液 (全量0.9ml) からなる反応液を $37^{\circ}C$ 、30分間プレインキュベートした後、20mM ATP100 μ lを加えて $37^{\circ}C$ 、15分間インキュベートし、直ちに20%トリクロロ酢酸1mlを加えて反応を停止する。その後遠心分離 (3,000r.p.m.、10min) して上清部を分取した。上清部1mlにElon試薬及び3%硫酸ならびに2%モリブデン酸アンモニウムを加えて15分間放置後、660nmにおける吸光度を測定した。これとは別に、10mM PIPES-Tris緩衝液 (pH7.4)、5mM $MgSO_4$ 、0.1mMウアバイン、10mM KCl 、酵素液及び試験薬物を加えた反応液を $37^{\circ}C$ 、30分間プレインキュベートした後、100mM p-NPPを加えて $37^{\circ}C$ 、10分間インキュベートする。その後1N-NaOHを加え、410nmにおける吸光度を測定した。尚、 H^+ 、 K^+ -ATPase活性は何れの方法においても KCl 添加時の活性から KCl 非添加時の活性を差し引いて求めた。

イオノフォアにより刺激される H^+ 、 K^+ -ATPase活性に対する影響；10mM PIPES-Tris緩衝液 (pH7.4)、5mM $MgSO_4$ 、10mM KCl 及び酵素液にイオノフォア (バリノマイシン40 μ g 或はナイジェリシン1 μ g) 及び試験薬物を加え、前記の方法に準じて H^+ 、 K^+ -ATPase活性を測定した。 H^+ 、 K^+ -ATPase活性はイオノフォア添加時の活性から非添加時の活性を差し引いて求めた。

5. 統計処理

得られた結果は、平均値 \pm 標準誤差もしくは平均値で示した。また、反応曲線から50%抑制濃度 (IC_{50}) を算出するにはプロビット法を用いて行った。また、一部の試験において有意差検定を行うに際してはstudentのt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 各種実験モデル潰瘍による活性酸素生成酵素の変化

ラットにCompound48/80、アスピリン或は塩酸・エタノールを投与した場合、胃粘膜は明らかな障害を受け、その障害度はCompound48/80>塩酸・エタノール>アスピリンの順であった。一方、これら障害を受けたラット胃粘膜中の活性酸素生成酵素であるMPO並びにXODの酵素活性を測定した結果、Compound48/80投与群のMPO及びXOD酵素活性は対照群と比較して著明 ($P < 0.01$) に亢進しているのが認められた。また、塩酸・エタノール投与群のこれら酵素活性はCompound48/80投与群よりも軽度ではあるが有意 ($P < 0.05$) に亢進していた。一方、アスピリン投与群のMPO並びにXOD酵素活性に対照群と比較して有意な差は認められなかった (Table I)。

2. In Vitro での活性酸素生成酵素に対する影響

MPOに対し、赤目柏、アロエ及び丁子は用量依存的で強い阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ、4.8、6.7及び9.3 μ g/mlであった。また、黄柏、黄連、枳実ならびに和厚朴も阻害作用を示したが、その作用は前のものよりも弱いものであった。尚、それ以外の試験薬物に作用は認められなかった (Table II)。一方、XODに対する作用を検討した結果、試験薬物中 赤目柏、黄連、和厚朴及び丁子にXOD阻害作用が認められ、それぞれの IC_{50} 値は29.0、11.8、51.5及び43.8 μ g/mlであった。また、他の薬物にXODに対する阻害作用は認められなかった (Table II)。

3. Compound48/80潰瘍における粘膜MPO及びSOD活性に対する作用

マウスにCompound48/80を腹腔内投与した場合、その程度はラットと異なって弱いものであるが、胃粘膜中のMPO活性は 220.3 ± 30.3 Uと上昇するのが認められる。この上昇したMPO活性は赤目柏300及び900mg/kgの経口投与によ

り 134.8 ± 20.6 及び 88.2 ± 28.5 Uと有意に低下するのが認められた。一方、アロエ、黄柏、和厚朴及び丁子の300或は900 mg/kg経口投与によっても胃粘膜中のMPO活性に有意な変化は認められなかった。次に粘膜中SOD活性を測定した結果、Compound48/80投与により粘膜中SOD活性は低下傾向を示すのが認められた。この低下するSOD活性は丁子300 mg/kg投与により有意に改善されたが、その作用に用量依存性は見られなかった。また、他の試験薬物にも有意な変化は見られなかった (Table III)。

4. H^+ , K^+ -ATPaseに対する作用

最初に各生薬の H^+ , K^+ -ATPaseに対する作用の有無の検討を行う目的で各生薬 (100 μ g/ml終濃度) につき試験を行った。その結果、赤目柏及び丁子に比較的強い阻害作用が認められたが、他の生薬は H^+ , K^+ -ATPaseに対して有意な影響を及ぼさなかった。そこで、赤目柏及び丁子につきその IC_{50}^+ 値を求めた結果、それぞれ5.3 (4.4~6.5) 及び14.5 (12.5~16.7) μ g/mlであった (Fig. 1)。一方、対照薬であるランソプラゾールの IC_{50}^+ は0.64 (0.44~0.94) μ g/mlと強いものであった。また、ヒスタミン H_2 容体拮抗剤であるシメチジンは H^+ , K^+ -ATPaseに対しては何等影響しなかった (Fig. 2)。次に赤目柏及び丁子の H^+ , K^+ -ATPase阻害作用につき、イオノフォアにより刺激される H^+ , K^+ -ATPase活性に対する影響を検討した。その結果、赤目柏はナイジェリシン刺激によるATPase活性に対し、無処置のものと比較して明らかに強い阻害作用を示したがバリノマイシン刺激によるATPase活性に対してはあまり影響しなかった。また、丁子はバリノマイシン或はナイジェリシン刺激によるATPase活性に対して大きな影響を及ぼさなかった。一方、ランソプラゾールは何れのイオノフォアによって刺激される H^+ , K^+ -ATPase活性に対し、無処置のものと比較して明らかに強い阻害作用を示し、特にナイジェリシン刺激によるATPase活性に対して強く阻害した。

考 察

胃粘膜が何らかの原因で障害を受けた場合、粘膜中の活性酸素生成酵素が亢進し、それに伴って活性酸素が増加して更に障害が増悪化すると考えられている。そこで、活性酸素生成系に対する和漢薬の作用を検討することとした。最初に粘膜が障害を受けた場合、粘膜中の活性酸素生成酵素類がどのように変化するかを潰瘍モデルラットを用いて検討した。アスピリン潰瘍においては腺胃上に出血を伴った潰瘍が発生するが、粘膜中の活性酸素生成酵素であるMPO及びXOD活性に有意な変化は見られなかった。一方、塩酸・エタノール潰瘍ではアスピリンよりも明らかに強い潰瘍が発生し、粘膜中MPO及びXOD活性も明らかに亢進して有意な活性増加が認められた。更にCompound48/80潰瘍においては胃底部全体に出血を伴った強い潰瘍が発生するとともに粘膜中MPO及びXOD活性は著明に増加した。アスピリン潰瘍はプロスタグランジン生合成阻害作用に基づく潰瘍と考えられているが、それ以外にアスピリンの直接的な作用も考えられる。一方、塩酸・エタノール潰瘍は酸分泌が関与しないエタノールによる直接的な胃粘膜の破壊であり⁶⁷⁾、Compound48/80潰瘍はCompound48/80の化学伝達物質遊離作用により、肥満細胞から遊離したセロトニンにより潰瘍が発生するものと考えられる^{9,10)}。活性酸素生成酵素活性の変化が障害の結果として生じたか或は活性酸素の増加が障害を増悪化したかは不明であるが、今回の結果においても、障害の程度に依存して酵素活性が増加することから、粘膜障害時においては活性酸素が何らかに関与しているものと考えられた。次にこれら活性酸素生成酵素に対する和漢薬の影響を検討した。最初に Cl^- 存在下において H_2O_2 を介して ClO^- の生成に関与するMPO¹¹⁾に対する作用を検討した。その結果、赤目柏、アロエ及び丁子に用量依存的な阻害作用が認められた。次に O_2^- と H_2O_2 の生成に関与するXODに対する作用を検討した。その結果、赤目柏、黄連、和厚朴及び丁子にXOD阻害作用が認められた。赤目柏及び丁子は2種の酵素に対して阻害作用を示すことから、これら生薬は粘膜組織中のMPO並びにXODを直接的に阻害する可能性が示唆された。黄連解毒湯の抗潰瘍作用にはこれら酵素に対する阻害作用が報告されていることから¹²⁾、これら生薬がそれに基づく抗潰瘍作用を示す可能性が示唆された。そこでCompound48/80潰瘍モデルを用い、潰瘍形成に伴う活性酸素に関与する酵素の変化に対する影響をマウスを用いて検討した。Compound48/80投与によりマウスのMPO活性は増加した。この増加に対して赤目柏は用量依存的な抑制を示し、明らかなMPO阻害作用を示した。一方、潰瘍発生に伴ってSOD活性は低下するが、このSODの低下に対し、丁子のみが有意な抑制を示した。今回の試験においてはin vitroとin vivoの結果に明確な相関性は得られなかった。この原因として今回in vivo実験においてマウスを用いていることから、

Compound 48/80に対する応答性の動物種差が起因している可能性が考えられるが、今後検討する必要がある。次に胃粘膜障害の一因である胃酸につき、酸分泌の最終段階をつかさどる壁細胞中の H^+ , K^+ -ATPaseに対する影響を検討した。その結果、赤目柏及び丁子に比較的強い阻害作用が確認された。赤目柏は種々のモデルを使った潰瘍モデルにおいて酸分泌を抑制することが知られているが、今回の結果から赤目柏の酸分泌抑制に本酵素阻害作用が関与する可能性が考えられる。しかしながら、赤目柏及び丁子の H^+ , K^+ -ATPase阻害作用態度をランソプラゾールと比較した場合、その作用態度は明らかに異なっていた。すなわち、 K^+ のみ透過させるバリノマイシン刺激で、 H^+ , K^+ -ATPaseにより小胞内に H^+ を蓄積させる方法により検討した結果、赤目柏及び丁子は H^+ , K^+ -ATPase阻害作用を示すもののその阻害は無処置のものと比較して僅かに強いか或は変化を示さないが、ランソプラゾールの阻害作用は明らかに強くなった。また、 H^+ と K^+ を交換するナイジェリシン刺激により小胞内に H^+ を蓄積させない方法により検討した結果、赤目柏は明らかに強い作用を示すが丁子は全く変化しなかった。一方、ランソプラゾールはより強力な阻害作用を示した。このことから、赤目柏の H^+ 輸送阻害は H^+ , K^+ -ATPase阻害が一部関与すると考えられるが、丁子は H^+ , K^+ -ATPase阻害はするものの H^+ 輸送を阻害するかについては疑問が残り、今後詳細な検討が必要かと思われる。オメプラゾールなどのプロトンポンプ阻害剤は壁細胞中においてスルホンアミド体に変化して H^+ , K^+ -ATPase阻のSH基とジスフィド結合することにより阻害作用を示すと考えられているが^{12,13,14,15)}、赤目柏及び丁子の阻害作用がそれらと同じか否かは不明であり、今後成分分析を含めた詳細な検討が必要であろう。

以上の結果から、健胃作用を有する和漢薬の中でも赤目柏には、障害を増悪化させる活性酸素に対して阻害作用を有するばかりでなく、障害の原因物質である胃酸の酸分泌をつかさどる H^+ , K^+ -ATPaseに対しても阻害作用を示す可能性が示唆された。このことから、赤目柏の示す薬理効果にはこれらの作用が関与するものと思われる。

尚、本研究は富山県医薬品共同研究助成事業テーマの一貫として行ったものである。

参 考 文 献

- 1) Otsuji, K ; Effect of oral admisitation of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract gastric mucosal lesion in compound 48/80-treated rats. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 9, 229-235, 1992
- 2) Suzuki, K ; Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leuckocytes. Anal Biochem. 132, 345-352, 1983
- 3) Oyanagi, Y ; Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem 142, 290-296, 1984
- 4) Tomoi, M ; Effect of omeprazol and famotidine on (H^+ , K^+) -ATPase and acid secretion in rabbit gastric glands. Folia. Pharmacol . 92, 105-111, 1988
- 5) Saccomani, G ; Characterization of gastric mucosalmembrans. Biochimica, Biophysica Acta, 465, 311-330, 1977
- 6) Hollander, D ; Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury. Scand. J. Gastroenterol. 19, 97-102, 1984
- 7) Oate, P ; Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. Gastroenterology. 94, 10-20, 1981
- 8) Takeuchi, K, Enhancement by necrotizing agents of gastric motility and the inhibition by 16,16-dimethyl prostagrandin E_2 in rats. Gastroenterology. 86, 1275, 1984
- 9) Kobayashi, T ; Preventive action of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) extract on compound 48/80-induced gastric mucosal lesions. .J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 10, 222-230, 1993
- 10) Takeuchi, K ; Pathogenesis of compound 48/80-induced gastric mucosal lesions in rats. .Dig. Dis. Sci, 31, 392-400, 1986
- 11) Krawitsz, J ; Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. ;

- Gastroenterology, 87, 1344–1350, 1984
- 12) Wallmark, B ; Evidence for acid-induced transformation of omeprazole into an active inhibitor of (H^+, K^+) -ATPase within the parietal cell. Biochimica, Biophysica Acta, 778, 549–558, 1984
 - 13) Lorentzon, P ; Inhibition of (H^+, K^+) -ATPase by omeprazole in isolated gastric vesicles requires proton transport. Biochimica, Biophysica Acta, 817, 25–32, 1985
 - 14) Figala, V ; Acid activation of (H^+, K^+) -ATPase inhibiting 2-(2-pyridylmethylsulphonyl) benzimidazoles: isolation and characterization of thiophilic active principle and its reactions. J. Chem. Soc. Chem. Commun, 20, 125127, 1986
 - 15) Lindberg, P ; The mechanisms of action of the gastric acid secretion inhibitor omeprazole. J. Med. Chem, 29, 1327–1329, 1986

Table I Change of gastric mucosa Myerperoxidase and Xanthine oxidase activity, oxygen product enzyme, stimulated by aspirin, HCl-Ethanol and compound 48/80 induced in rats.

Stimulation agent	Enzyme activity (U/mg protein)	
	Myerperoxidase	Xanthine oxidase
Normal	32.3±6.2	1.75±0.36
Aspirin	22.3±4.8	2.48±0.47
HCl-Ethanol	70.6±8.5 * *	3.82±0.41 * *
Compound 48/80	160.7±36.7 * *	8.23±1.27 * *

Each value is a mean±S.E. (n = 5). Significantly different from normal group at * * ; P<0.01

Table II Effect of test compounds on gastric mucosa Myerperoxidase and Xanthine oxidase activity in vitro.

Test compound	Inhibition (IC ₅₀ ; µg/ml)	
	Myerperoxidase	Xanthine oxidase
Malloti Cortex	4.8 (3.6~6.3)	29.0 (25.0~34.8)
Aloe	6.7 (5.8~7.5)	N.C.
Curcuma Rhizoma	N.C.	N.C.
Phellodendri Cortex	69.7 (50.4~96.2)	N.C.
Coptidis Rhizoma	149.5 (73.8~303.1)	11.8 (10.5~13.5)
Glycyrrhizae Radix	N.C.	N.C.
Aurantii Fructus Immaturus	74.1 (43.6~125.8)	N.C.
Gentiana Radix	N.C.	N.C.
Magnoliae Cortex	20.9 (15.9~27.3)	51.5 (29.4~90.1)
Zingiberis Rhizoma	N.C.	N.C.
Atracyloidis Lanceae Rhizoma	N.C.	N.C.
Zaryophyllis Flos	9.3 (7.2~11.9)	43.8 (37.4~51.4)
Aurantii Nobilis Pericarpium	N.C.	N.C.

IC₅₀; Calculated by Probit method. () ; 95% C.L.

Table III Effect of test compounds on gastric mucosa Myerperoxidase and Superoxide dismutase sutimulated by compound 48/80 induced in mice.

Test compound	Dose (mg/kg)	Activity (U/mg protein)	
		Myerperoxidase	Superoxide dismutase
Normal	---	103.2±30.0 *	0.874±0.089
Control	---	220.3±30.3	0.727±0.076
Malloti Cortex	300	134.8±20.6 *	0.822±0.045
	900	88.2±28.5 * *	0.618±0.092
Aloe	300	227.8±45.7	0.738±0.105
	900	244.4±22.4	0.711±0.168
Phellodendri Cortex	300	167.8±31.0	0.851±0.132
	900	231.4±29.5	0.371±0.022 *
Magnoliae Cortex	300	197.8±34.3	0.842±0.034
	900	135.6±29.1	0.549±0.083
Zaryophyllis Flos	300	227.8±45.7	1.161±0.126 * *
	900	172.1±37.2	0.520±0.064

Each value is a mean±S.E. (n=10~20). Significantly different from normal group at * ; P<0.05 and * * ; P<0.01 respectively.

Fig.1 Inhibition of test drugs on the activity of H,K-ATPase isolated from rabbit gastric mucosa.

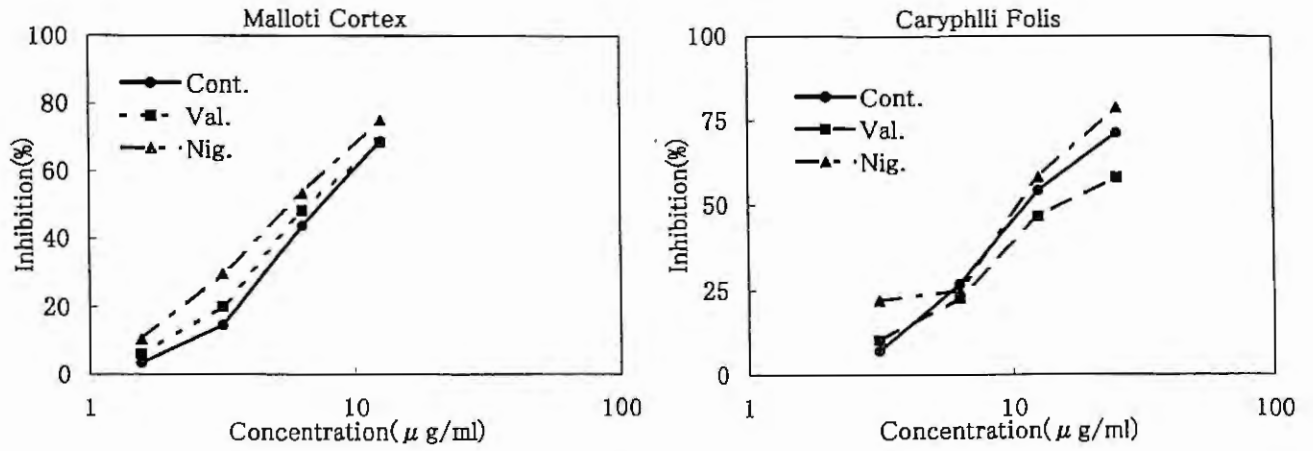
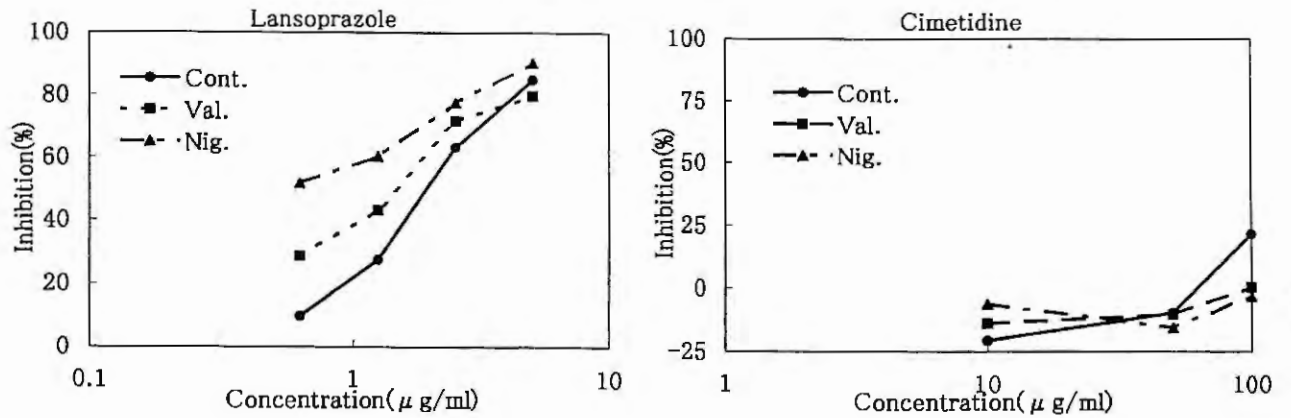


Fig.2 Inhibition of test drugs on the activity of H,K-ATPase isolated from rabbit gastric mucosa.



水溶性コーティング基剤の特性 (第2報)

Properties of Aqueous Film Coating Agents II.

— 錠剤の物性に及ぼす影響 —

Estimation for Coated Tablets.

富山県薬事研究会 製剤部会

Division of Pharmaceutics,

Toyama Pharmaceutical Research Association

正川 仁	共栄製薬(株)
Hisashi SHOGAWA	Kyoei Pharmaceutical Co.,Ltd
花木 晃	(株)廣貫堂
Akira HANAKI	Kokando Co.,Ltd
高橋 葉子	第一薬品(株)
Yoko TAKAHASHI	Daiichi Medicine Co.,Ltd
河口 学	第一薬品工業(株)
Manabu KAWAGUCHI	Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd
日水 裕子	大協薬品工業(株)
Yuko HIMIZU	Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd
中嶋 義徳	タイト(株)
Yoshinori NAKAJIMA	Daito Co.,Ltd
金田 行宏	東亜薬品(株)
Yukihiro KANEDA	Toa Medicine Co.,Ltd
堀田 良晴	富士化学工業(株)
Yoshiharu HORITA	Fuji Chemical Industry Co.,Ltd
萩原 彰人	(株)富士薬品
Akihito HAGIHARA	Fuji Medicine Co.,Ltd
鉛山 晃	陽進堂(株)
Akira NAMARIYAMA	Yoshindo Co.,Ltd
嶋田 健一	
Kenichi SHIMADA	
立花 栄文	
Eige TACHIBANA	
堀内 環	リードケミカル(株)
Tamaki HORIUCHI	Lead Chemical Co.,Ltd
川筋 透	富山県薬事研究所
Toru KAWASUJI	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

コーティング用医薬品添加物として現在多くの種類のものが市販されているが¹⁾ 基礎的な特性を同時に比較した報文は少ない。これまで我々は、水溶性基剤のヒドロキシプロピルメチルセルロース及びヒドロキシプロピルセルロースについてのキャスト膜を作製し、引っ張り強度、溶解性及び透湿性などを検討し報告した²⁾。今回、これらの基剤の錠剤物性に及ぼす影響を評価するため、コーティング錠を作製し、硬度、崩壊性、滑り出し斜度及び吸湿性などを検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 試 料

1) コーティング基剤。

ヒドロキシプロピルメチルセルロース (TC-5 MW、信越化学工業)

ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-SL、日本曹達)

2) その他の試料

マクロゴール6000、シリカゲル (中粒状)、塩化カルシウム及び塩化カリウムは和光純薬製、乳糖造粒物はフロイント産業製の乳糖G、ステアリン酸マグネシウムは日本油脂製を用いた。

2. 使用機器

打錠には(株)岩黒製作所製の単発式打錠機または畑鉄工所製のロータリー式打錠機HT-P18、コーティングには畑鉄工所製の万能試作機HU型、真空乾燥には石井商店製の石井真空検体乾燥機を用いた。また、恒温恒湿器は日立製のEC-80-HHCG、崩壊試験器は富山産業製のNT-2HS型、硬度試験には三力製作所製の硬度計を用いた。

3. 素錠処方の設定

Table 1 に示す各成分をポリエチレン袋で混合し、単発式打錠機を用いて打錠して3種の素錠を作製した。作製した素錠の40° 75%での重量変化を測定し、素錠処方の検討を行った。

なお、シリカゲルはKalita製の粉碎機で粉碎し、30号篩を通過したものを用いた。

4. 錠剤吸湿性の評価方法の検討

シリカゲル含有錠について、40° 75%、30° 75%、40° 真空、70° 真空での重量変化を測定し、錠剤吸湿性の評価方法の検討を行った。

5. コーティング錠の物性評価

1) コーティング方法

TC-5 MW及びHPC-SLの2種についてマクロゴール6000を0、10、20%配合したもの計6種類のコーティングをTable 2 に示す条件で60分間行った。また、コーティング途中の20分、40分にも約50gのサンプリングを行った。

2) 物性の評価方法

作製したコーティング錠及び素錠について硬度、崩壊性、滑り斜度及び吸湿性を測定した。

崩壊性の評価では、試験液に37° 精製水を用い、錠剤6個の最大及び最小崩壊時間を求めた。

滑り出し斜度は、ステンレス板に錠剤をのせ、徐々に傾斜を与え、錠剤が滑り出すときの斜度とし、10錠平均値と標準偏差を求めた。

吸湿性は、錠剤を40° 真空で一度乾燥した後、40° 75%での重量変化を測定し、評価した。

Table 1 素錠処方

成分	1	2	3
乳糖造粒物	90部	90部	90部
シリカゲル	10部		
塩化カルシウム		10部	
塩化カリウム			10部
ステアリン酸マグネシウム	0.5部	0.5部	0.5部

Table 2 コーティング条件

素錠仕込量	1.0kg
コーティング液濃度	10%
スプレ-空気圧	2.5kg/cm ²
ノズル径	1.0mm
スプレ-速度	約10g/min
コーティングパン径	38cm φ
パン回転数	40rpm
給気風量	0.8m ³ /min
給気温度	80±2°C

結 果

1. 素錠処方の設定

3種類の素錠の重量変化率をFig. 1に示す。

シリカゲル含有錠では、2時間で重量比で2.2%となる最大の吸湿を示した。

その後、僅かながら徐々に重量を減少させた。

塩化カルシウム含有錠では、長時間にわたって吸湿し続け、9時間で最大5.2%に達し、その後、僅かながら徐々に重量を減少させた。また、打錠中においても吸湿を起し、連続打錠が困難なものであった。

塩化カリウム含有錠は、まったく吸湿性を示さなかった。

以上の結果から、打錠時の操作性及び素錠の吸湿性を考慮し、シリカゲル含有の処方を用いることとした。

2. 錠剤吸湿性の評価方法の検討

種々の条件下でのシリカゲル含有素錠の重量変化率をFig. 2に示す。

錠剤の重量は、70° 真空では6時間後、40° 真空では12時間後にはほぼ一定となった。また、40° 75%、30° 75%では一度重量が最大に達した後、僅かながら減少していった。吸湿量では40° 75%が30° 75%よりも大きい値を示した。以上の結果から、40° 真空で一夜乾燥した後に、40° 75%での経時的な重量変化を測定することにより吸湿性の評価を行うこととした。

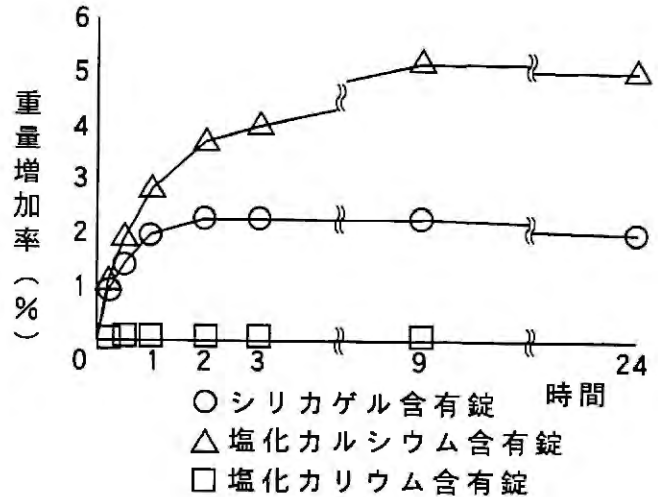


Fig. 1 素錠の重量変化率

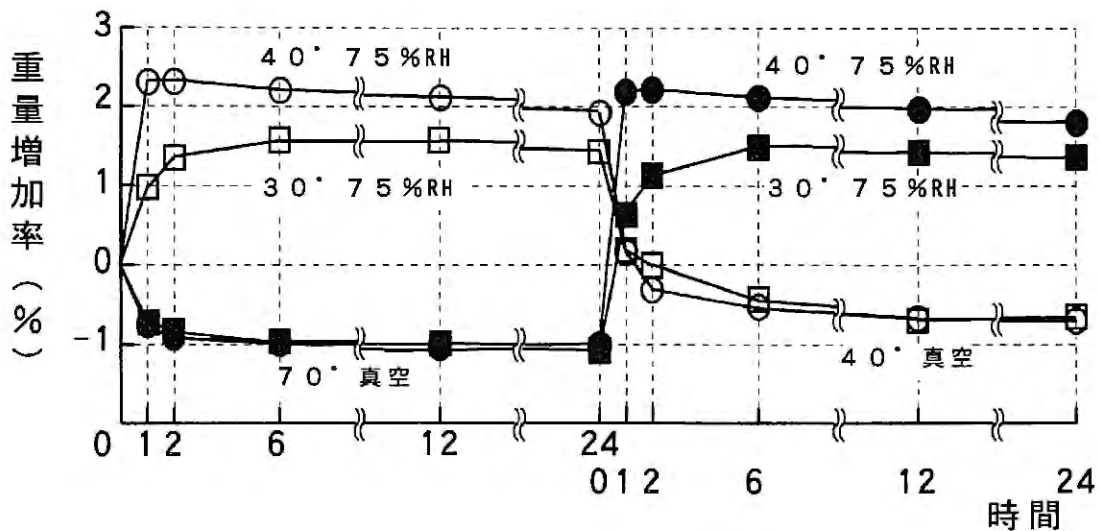


Fig. 2 シリカゲル含有素錠の重量変化率

3. コーティング錠の物性評価

1) 硬度

TC-5 MW及びHPC-SLコーティング錠の硬度をFig. 3及びFig. 4に示す。

TC-5 MWではコーティング量が増すと硬度が高くなり、マクロゴール6000の添加により低くなる傾向がみられた。HPC-SLについても同様の傾向であったが、TC-5 MWに比べて硬度上昇の程度は少なかった。

2) 崩壊性

各コーティング錠の崩壊時間をFig. 5 に示す。

崩壊性については、TC-5 MW及びHPC-SLによる差及びマクロゴール6000添加量による差はほとんど認められなかった。

3) 滑り出し斜度

TC-5 MW及びHPC-SL 60分コーティング錠の滑り出し斜度をFig. 6 に示す。

HPC-SLではTC-5 MWに比べて滑り出し斜度が大きく滑りにくくなっていたが、マクロゴール6000の添加により、小さくなった。TC-5ではマクロゴール6000添加による差は認められなかった。

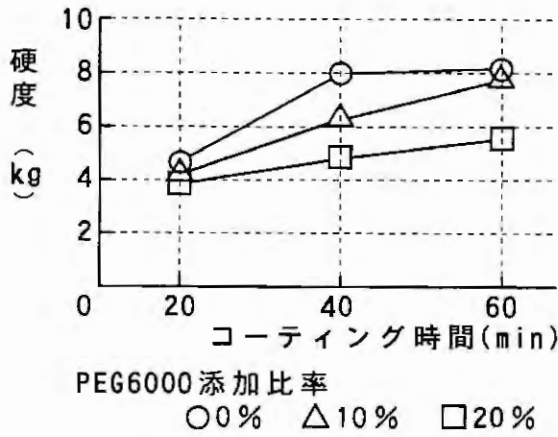


Fig. 3 TC-5 MWコーティング錠の硬度

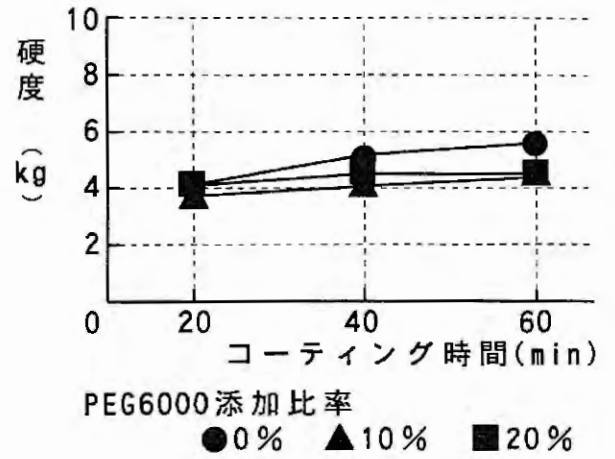


Fig. 4 HPC-SLコーティング錠の硬度

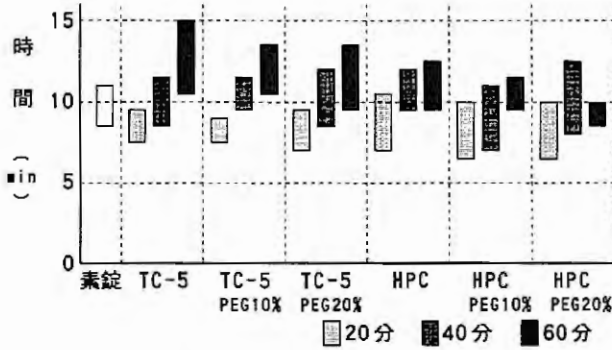


Fig. 5 各コーティング錠の崩壊時間

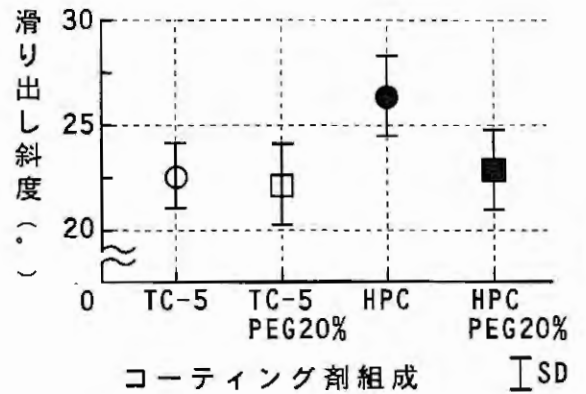


Fig. 6 各コーティング錠の滑り出し斜度

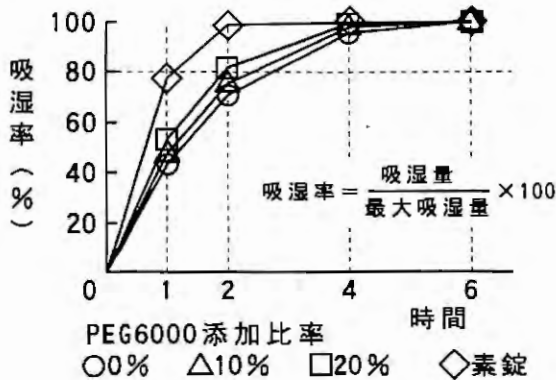


Fig. 7 TC-5 MWコーティング錠の吸湿性

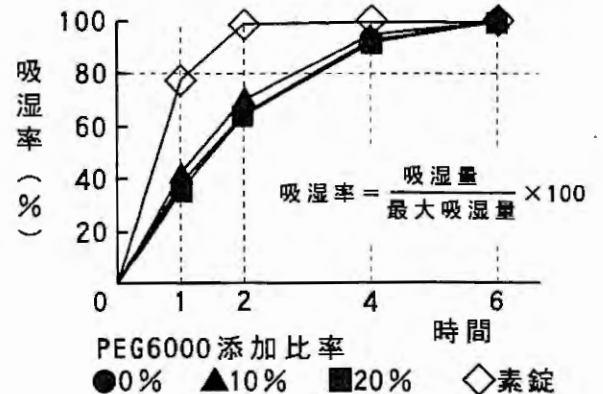


Fig. 8 HPC-SLコーティング錠の吸湿性

4) 吸湿性

TC-5 MW及びHPC-SL 60分コーティング錠の吸湿率をFig. 7及びFig. 8に、吸湿率80%までの所要時間をTable 3に示す。

HPC-SLはTC-5 MWに比べ、吸湿性が若干低い傾向にあった。また、マクロゴール6000の添加による差は比較的少なかったが、添加量が多いほど所要時間が短い傾向にあった。

Table 3 吸湿率80%までの所要時間 (分)

素 錠		6 4 . 6		
		コーティング時間		
コーティング基剤	PEG添加量	20分	40分	60分
TC-5 MW	0%	91.5	115.0	164.5
	10%	102.0	109.8	141.9
	20%	81.3	98.1	116.6
HPC-SL	0%	102.1	136.4	185.6
	10%	101.2	123.3	168.6
	20%	104.6	160.0	164.6

考察及びまとめ

今回のコーティング錠における評価によって、HPCはTC-5より若干透湿性が小さく、強度が低いという結果が得られた。また、2基剤ともマクロゴール6000の添加によって強度が低下する傾向があった。これらの物性変化は、キャスト膜における実験結果とほぼ一致していたことから、キャスト膜での物性評価は、錠剤でのコーティング膜の性質を理解するのに役立つと思われる。また、HPCにマクロゴール6000を添加した場合は、錠剤の滑り特性が向上する傾向がみられた。

これらの結果が、処方設定などの製剤検討に参考になればと考える。

文 献

- 1) 高岸靖 長田俊治 医薬品の開発 第12巻 製剤素材I 一番ヶ瀬尚 廣川書店 東京(1990) p198~214
- 2) 富山県薬事研究会製剤部会 水溶性コーティング基剤の特性——キャスト膜の調製と物性評価——家庭薬研究No.15 41(1996)

β遮断薬の眼圧降下作用におけるサーカディアンリズムの影響

Interaction between Circadian Rhythm of Intraocular Pressure
and Ocular Hypotensive Effect of β-blocker.

○ 西尾 健一 塩田 聡 竹内 秀達
Ken-ichi NISHIO Satoshi SHIOTA Hidetatsu TAKEUCHI
木村 隆仁 石黒 幸男
Takahito KIMURA Yukio ISHIKURO
小森 誠一 勇伊 実
Seiichi KOMORI Minoru YUUI
テイカ製薬株式会社 研究開発本部

Department of Research and Development, Teika Pharmaceutical Co., Ltd.

緒 言

眼圧が日内変動を起こすことは古くから知られており、緑内障患者の日内変動が正常者より顕著であることもよく知られている。眼圧日内変動の動物モデルとしてはRowlandらの家兎を用いた報告が有名で12時間毎の明暗サイクルで飼育することにより眼圧に一定のリズムが発現すること、特に暗時に高い眼圧を示すことが示されている¹⁾。又、このような日内変動に交感神経の興奮が関与することも報告されている^{2)~5)}。

今回、我々は代表的な緑内障治療薬であるβ遮断薬 timololの眼圧降下作用とサーカディアンリズムにおける交感神経系緊張状態との関連性について検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 使用動物

日本白色種家兎（雄性、体重 2.2~3.5 kg）

12時間明暗サイクル下で飼育した。

昼夜通常サイクル（6:00~18:00 明、18:00~6:00 暗）

昼夜逆転サイクル（21:00~9:00 明、9:00~21:00 暗）

尚、昼夜逆転サイクルの飼育条件下では4週間以上の馴化期間を設けた。

2) 使用薬物

(1) Timolol maleate solution

Timololとして0.5%配合の市販品を用いた。

(2) Phenylephrine hydrochloride solution

Phenylephrine hydrochlorideとして0.003及び0.01%となるように生理食塩液に溶解して調製した。

(3) Isoproterenol hydrochloride solution

Isoproterenol hydrochlorideとして0.01、0.1及び1.0%となるように生理食塩液に溶解して調製した。

3) 眼圧測定方法

Oxybuprocaine hydrochloride solution 0.4% 40 μ l点眼後、pneumatic tonometer (アルコン社製) を用いて、眼圧を測定した。

尚、暗時における眼圧測定は、赤色ランプ点灯下で行った。

実験結果

1) 昼夜逆転サイクル飼育条件下における家兎の眼圧の変化

昼夜逆転サイクル飼育条件下における家兎の眼圧の変化をFig. 1 に示した。家兎の眼圧は明らかに暗時において高値を示した。この現象は明暗通常サイクル条件下でも生じ、眼圧は明暗サイクルに依存してサーカディアンリズムを持つことが明らかになった。

2) Timololの眼圧降下作用に対する明暗の影響

明時及び暗時におけるtimolol 0.5%点眼による眼圧降下作用をFig. 2 に示した。

Timololは明時よりも暗時においてより強い眼圧降下作用を示した。

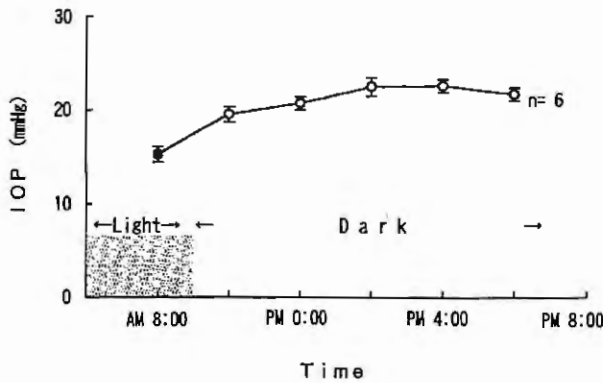


Fig. 1 明暗サイクル(12時間:12時間)の飼育条件下における家兎の眼圧(IOP)の日内変動

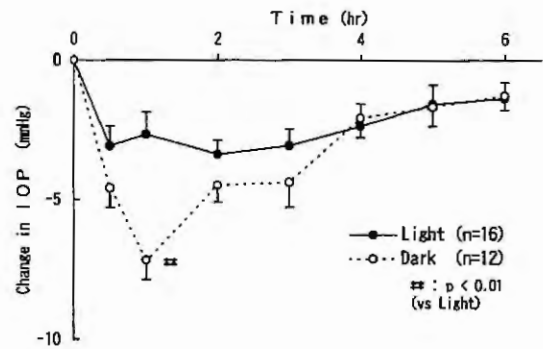


Fig. 2 明時及び暗時におけるtimololの眼圧(IOP)降下作用の違い

3) 水負荷高眼圧家兎におけるtimololの眼圧に及ぼす効果

暗時においては明時に比べ、薬剤点眼前の眼圧値が既に高いため、点眼時における眼圧の基礎値がその眼圧降下作用に影響する可能性が考えられる。そこで、サーカディアンリズムとは無関係の高眼圧状態を作成するために家兎に水負荷を施した。水負荷は37°Cに温めた水120mlをカテーテルを用いて強制経口投与することによって行った。尚、薬剤点眼は水負荷前30分に行い、結果をFig. 3 に示した。水負荷後15分で生理食塩液点眼群とtimolol点眼群とで眼圧変化量の差が約5 mmHgと最も差があった。しかし、この差はFig. 2における明時でのtimololの最大眼圧降下量と大きな差がなく、その他の時点では有意な差はみられず、眼圧上昇のピーク値においても有意な差は認められなかった。

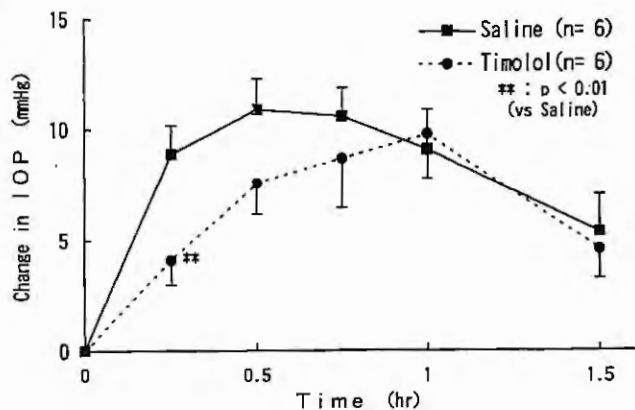


Fig. 3 水負荷による高眼圧モデル家兎のtimololの眼圧(IOP)降下作用(明時)

4) 交感神経刺激薬点眼による眼圧の変化

眼組織での交感神経の緊張がチモロールの眼圧降下作用にどのような影響を及ぼすかについて交感神経刺激薬を用いて検討した。 α_1 刺激薬のphenylephrine及び β 刺激薬のisoproterenolを用い、それぞれの点眼による眼圧の変化を検討した。その結果をFig.4に示した。Phenylephrine点眼では眼圧上昇作用が認められ、isoproterenol点眼では眼圧降下作用が認められた。又、phenylephrineの眼圧上昇に対するtimololの影響について検討したが、timolol点眼（1時間前処置）によってphenylephrineの眼圧上昇は抑制されなかった（Fig.5）。

5) 上頸神経節切除家兎（SCGX）におけるtimololの眼圧に及ぼす影響

中枢の交感神経の影響を検討するために上頸神経節を切除した家兎を用い、timololの眼圧降下作用を検討した。上頸神経節切除はpentobarbital麻酔下で上頸部を切開し、神経節部を露出させ、外科的に切除した後、術後2週間の回復期間において実験に使用した。実験結果をFig.6に示した。上頸神経節を切除することによってtimololの眼圧降下作用は有意に減弱した。

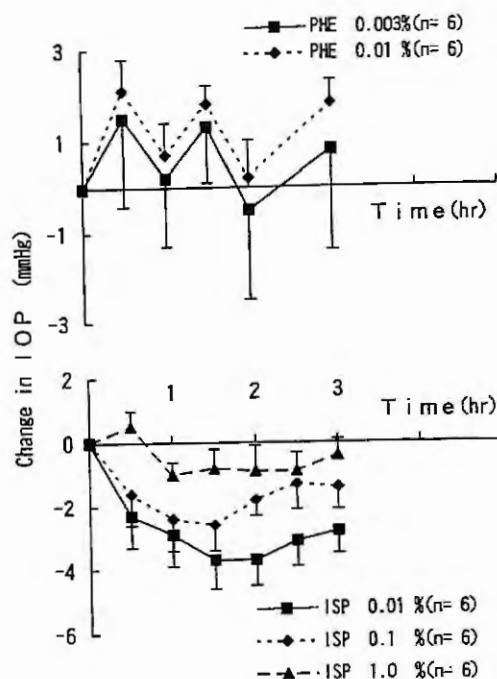


Fig. 4 Phenylephrine (PHE) 及びisoproterenol (ISP) の家兎眼圧 (IOP) に及ぼす影響 [明時]

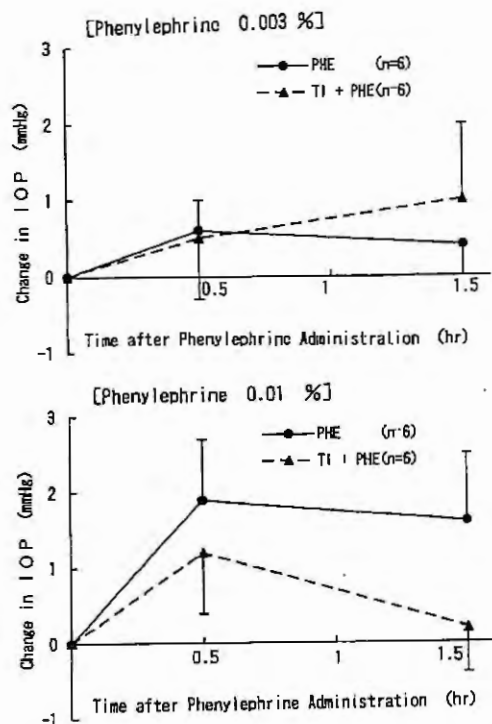


Fig. 5 家兎における phenylephrine (PHE) による眼圧 (IOP) 上昇に及ぼす timolol (TI) の影響 [明時]

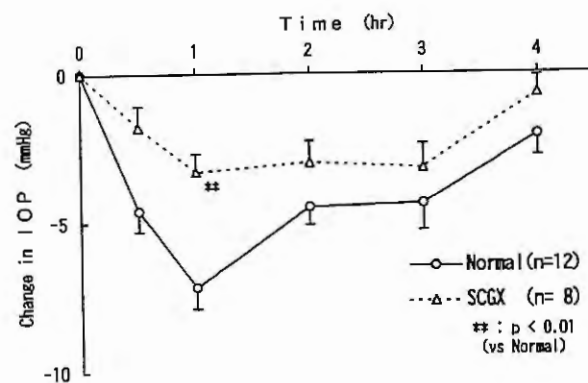


Fig. 6 上頸神経節切除家兎 (SCGX) における眼圧降下作用の影響 [暗時]

考 察

種々の動物における様々な生理的変化がサーカディアンリズムを示すことはよく知られている。眼圧もそのひとつでウサギのような夜行性動物では明時に低く、暗時に高くなることが知られている。

多くのサーカディアンリズムにみられるようにその変化には交感神経系と副交感神経系のバランスあるいはその時間的変動が重要な役割を果たしているが、眼圧のサーカディアンリズムについては高眼圧時における交感神経系の関与を示唆する結果が多く報告されている^{1)~4)}。今回、我々が行った実験においても明暗を逆転させて馴化飼育した家兎において眼圧に明らかなサーカディアンリズムを有することが確認された。 β 遮断薬timololの眼圧降下作用は暗時における高眼圧状態に対しより顕著な影響を示した。更に、交感神経系とは無関係な水負荷による高眼圧状態には、timololが弱い影響しか示さなかったことからサーカディアンリズムにおける高眼圧では交感神経系における β 受容体の興奮が重要な影響を及ぼしていることが示唆された。Gregoryもtimololの眼圧降下作用が暗時においてのみ発揮されることから、サーカディアンリズムの発現に β 受容体が関与していると報告している⁵⁾。一方、サーカディアンリズムの発現と交感神経系 α 受容体との関連性についても研究され、 α 遮断薬bunazosinの眼圧降下作用が暗時においてより顕著に認められることから高眼圧の発現に α 受容体の興奮が重要であることが報告されている⁶⁾。今回行った実験においても、点眼による眼圧上昇は α 刺激薬phenylephrineにおいて認められ、 β 刺激薬isoproterenolでは眼圧降下しかみられず、timololはphenylephrineの眼圧上昇に対し抑制作用を示さなかったことから、眼局所においては α 受容体の興奮が眼圧上昇に影響を及ぼしていると考えられた。又、timololの暗時における眼圧降下作用が交感神経切除によって有意に減少したことから、 β 遮断薬の眼圧降下作用は眼局所における β 受容体よりも交感神経節あるいは中枢神経系における β 受容体に作用して発揮されていると思われた。即ち、サーカディアンリズムにおける高眼圧状態は上位交感神経における β 受容体の興奮が重要な役割を示し、更にこれに加えて眼局所においては交感神経終末より遊離したノルアドレナリンによる α 受容体刺激が眼圧上昇に寄与していると考えられた。Braslowらも交感神経節前繊維の切除により暗時における高眼圧が顕著に抑制されたことから、サーカディアンリズムの発現には中枢神経系の興奮が重要であることを報告しており⁷⁾、Innemeerらは末梢における眼圧上昇には α 受容体の刺激が重要であることを報告している⁸⁾。

以上、今回の実験は眼圧のサーカディアンリズムの発現には上位交感神経の β 受容体の興奮が重要であること、timololは β 受容体拮抗作用により交感神経興奮を抑制し眼圧降下作用を発揮することを示したものであるが、緑内障治療における β 遮断薬の重要性及び今後の治療薬開発の方向性（例えば、 α 遮断作用を持った β 遮断薬でより強い眼圧降下作用が得られる可能性）をも示唆する結果と思われる。

文 献

- 1) Rowland, J.M., Potter, D.E. & Reiter, R.J. : Circadian rhythm in intraocular pressure: A rabbit model. *Curr. Eye Res.* 3 : 169-173 (1981)
- 2) 吉富 健志、木内 良明、Douglas S. Gregory : 眼圧の日内変動と α 、 β アドレナリン受容体 あたらしい眼科 9(5) : 807-809 (1992)
- 3) Y. Kiuchi, T. Yoshitomi and D.S. Gregory : Do α -adrenergic receptors participate in control of the circadian rhythm of IOP ? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33 : 3186-3194 (1992)
- 4) P.A. Braslow and D.S. Gregory : Adrenergic decentralization modifies the circadian rhythm of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28 : 1730-1732 (1987)
- 5) D.S. Gregory : Timolol reduces IOP in normal NZW rabbits during the dark only. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 : 715-721 (1990)
- 6) H.C. Innemeer, A. de Jonge, J. C.A. van Meel, P.B.M.W.M. Timmermans and P. A. van Zwieten : The effect of selective α_1 - and α_2 -adrenoceptor stimulation of intraocular pressure in the conscious rabbits. *Nounyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 316:294-298 (1981)

製剤（パップ剤）のにおい分析について

Analysis of the Odor of the Poultices

○ 川合美貴子 鷹田 裕子 越井 智
Mikiko KAWAI Yuko TAKATA Satoshi KOSHII

リードケミカル株式会社 研究開発部

Research and Development Department, Lead Chemical Co., Ltd.

緒 言

医薬品には、配合される成分によって強いにおいを有する製剤がある。特に成型パップ剤や軟膏等の外用剤においては、有効成分のサリチル酸メチルやカンフルなどの特有のにおいのため、周囲への影響や衣服においが付く等の理由から職場や公共の場での使用が好まれない場合がある。そこで、著者らは成型パップ剤を試料とし製剤のにおいの測定を試みた。従来より、においの分析に関しては官能試験や機器分析としてガスクロマトグラフあるいはガスセンサーなどの方法が用いられている¹⁾ (Table 1)。しかしながら、それらの測定法にはそれぞれ問題点があり、人が感じる嗅覚との関連づけが困難であった²⁾。最近、人の鼻の粘膜細胞をモデルとした膜を利用し、におい物質について調べるセンサーが開発され、特に有機系のにおい物質について生体の嗅覚に近い分析が可能になった³⁾。著者らはこのセンサーを用い、市販のパップ剤や有効成分、賦形剤の配合量の異なるパップ剤を試料としてにおいを分析し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 試 料

市販のパップ剤及び有効成分（l-メントール、dl-カンフル、サリチル酸メチル及びサリチル酸グリコール）や賦形剤の異なるパップ剤を調整し、測定試料とした。

2. 実験方法

1) 測定装置

実験に用いた装置は水晶振動子式においセンサー SF-525 FREGRANCE SENSOR（相互薬工K.K.製）である。

2) 測定原理

水晶振動子式においセンサー全体をFig. 1に、センサーの素子の構造をFig. 2に示す。

センサー素子は水晶表面にヒトの嗅覚細胞をモデルとして合成された二分子膜が固定されている。空気中のにおい分子は合成二分子膜との親和性によって、ある一定の割合で膜に吸着しにおい物質の質量により振動数が変化し数値化 (Hz) される。また、本実験ではにおいの質の識別が可能な5種

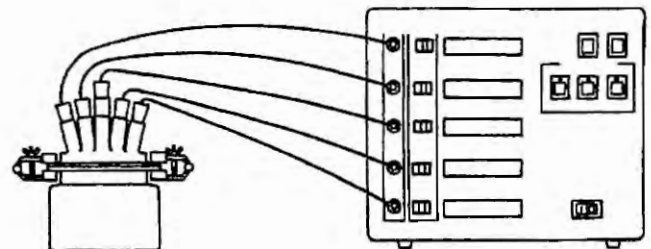


Fig. 1 水晶振動子式においセンサー マルチチャンネル

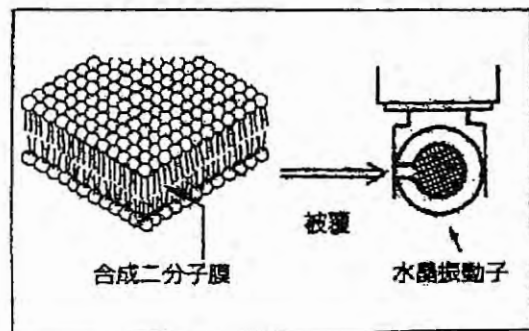


Fig. 2 センサー素子の構造

類のセンサー素子を用いた。Table 2 に 5 種類のセンサー素子の特徴を示す³⁾。

3) 実験操作

① 試料測定

試料のパップ剤は10×2 cmに裁断したものを5枚、また、有効成分はパップ剤中に配合されている量をシャーレに取り、試料をシャーレごとガラス製の測定用容器の中に入れ、指示値が一定値に達する5分後の値を測定値とした。なお、測定温度は室温約20～22℃である。

② 官能試験

においセンサーによる測定結果とヒトの嗅覚との相関性を調べるため、官能試験も並行して行った。試験には社内のボランティア20名を任意に選び、パップ剤のにおいの強さと種類について「強い」「普通」「弱い」及び「好き」「普通」「嫌い」の3段階での評価を行った。

4) 測定項目及び解析方法

センサー素子の特徴に基づき (Table 2)、5種のにおいの質に関して測定した。なお、すべての試料において453AAは値が低く、また反応するにおいがアンモニア系であるため³⁾、この素子の測定値は本報告においては除外した。解析は測定値をレーダーチャートにし、そのパターンをもとに行った。

結果及び考察

(1) 有効成分の測定及び官能試験の結果

まず、パップ剤に一般的に配合されている有効成分の測定を行った (Fig. 3)。その結果、メントールでは151AJの測定値が最も高く、カンフルは151AJが他の指標に比べて2倍の大きな値を示した。また、わずかに112AJ値がメントールよりもカンフルの方が低くなった。サリチル酸メチルはすべて高い値を示し、特に353ANが高く面積の大きいグラフであった。また、112AJ値はメントールよりも高かった。一方、サリチル酸グリコールは全体的に値が低く、112AJ値が0となり、面積の小さいグラフであった。これら4つの有効成分はそれぞれ異なる特徴的なグラフパターンを有することが明らかになった。

官能試験では、においの強さにおいてメントール、カンフルは「強い」と感じる人が多くおり、サリチル酸メチルは「普通」という結果であった (Table 3)。種類ではメントールは「好き」と感じている人が多いのに対し、カンフル及びサリチル酸メチルは「嫌い」と感じる人が多かった。測定の結果と併せると、353ANが高いあるいは112AJが低いと「嫌い」と感じられる傾向がみられる。

(2) 試作パップ剤No.1の測定及び官能試験の結果

Table 4 に有効成分の配合量 (%) を示す。Fig. 4 に結果を示すが、これらのグラフパターンは2つに分かれた。1つはモデル試料のように183AKが低く、353AN値が極端に高い面積の大きいグラフで (Fig. 4-1、3、5、7)、他の1つは、基剤にみられる面積の小さいグラフである (Fig. 4-2、4、6、8)。モデル型パターンを示す試料はすべてサリチル酸メチルが配合され、サリチル酸メチルと同じグラフを示した。一方、基剤型パターンの試料はメントール、カンフルが配合されているが、それらの測定グラフとは異なり、小さい面積であった。このことから、この試料のグラフパターンはサリチル酸メチルの配合に大きく影響されることが推察される。また、モデル型の4つのグラフでは353ANの値のみが変化した。モデル型と試料7を比較すると、353AN値は試料7の方が高くなり、サリチル酸メチルの配合による変化であることがわかる。しかし、サリチル酸メチルのみの配合にメントールを加えたカンフル抜き試料5では353ANの値はさらに高くなった。それに対し、メントールを加えた場合ではサリチル酸メチルのみの試料7とほとんど差は認められなかった。

さらに、サリチル酸メチルを配合した試料は「嫌い」と感じる人が多く、サリチル酸メチル単独での官能試験と一致した (Table 5)。また、「嫌い」なにおいでも試料5は「強い」においであったが、他のサリチル酸メチルを含む製剤は「普通」の強さという結果であった。基剤型のサリチル酸メチルを配合しない試料は「普通」のにおいの強さと種類と答えた人が最も多かった。

(3) 試作パップ剤No.2の測定及び官能試験の結果

試作パップ剤No.1の結果を参考にし、さらに①精油量の増加、②カンフル量の増加、③メントール量の増加の試料を作成し、測定した (Table 6)。

① Fig. 5 に測定結果を示すが、これらのグラフは精油を含まない試料2以外、353ANが最も高く、次いで151AJ、112AJというパターンであった。精油量を増加させると、353ANが増加しその面積は大きくなった。官能試験では、精油量5倍の試料11を最も「強い」「嫌い」とする人が多かった (Table 7)。最も「弱い」においとされたのは1倍の試料1で、においの種類は「普通」であった。結果No.1で述べたように353AN値が高いと「嫌い」であることがこのことから支持された。また、面積が大きいと「強い」においであることと一致した。

②-1 メントール及びカンフルを配合しない試料7 (Fig. 4-7) にカンフルのみを増加させたとき、その面積はわずかであるが減少する (Fig. 6)。この場合も他の指標はほとんど変化しないが353ANの値のみが低くなった。官能試験によってカンフル量4倍の試料13が最も「強い」、1倍の試料3は最も「弱い」という結果になった (Table 8)。また、種類では試料13のみが「嫌い」で他は「普通」と多くの人が感じていた。①の結果より、においが「強い」時は面積も大きいことが推測された。しかし、最も面積が大きい試料7は「弱い」においであり、これはカンフルが配合されていないことによるものと思われる。一方、面積の小さい試料13が「強い」においとされたのはカンフル量が4倍であることから考えられる。

②-2 カンフルなしの試料15にカンフルのみを増加させた結果をFig. 7に示す。これも先のカンフル量増加の結果と同じく増加に反比例し、面積は小さくなった。においは面積が大きいほど弱くなり、面積の小さい試料17が「好き」、試料16が「嫌い」、試料15が「普通」という結果になった (Table 8)。試料17が「強い」にも関わらず、「好き」なにおいであったのは、サリチル酸メチルとメントールがカンフルの配合によりマスキングされている可能性があると考えられる。

③ サリチル酸メチルのみの試料7にメントールを増加させると、Fig. 8に示す結果になった。グラフパターンでは353AN値だけが変化した。特に1倍の試料5で353AN値は最も高くなり、面積は最大であった。最小面積の試料15は官能試験で「強い」においと感じる人が多かった。これはメントールの増加が原因として考えられる (Table 9)。

(4) 市販パップ剤の測定及び官能試験の結果

Table 10に有効成分の配合量 (%) を示す。結果は試作パップ剤のように、2つのパターンに分かれた (Fig. 9)。1つはいずれのセンサーにおいて高い値であったが、特に151AJと353ANで高く、面積が大きいパターンであった (Fig. 9-B, D)。もう一方は、151AJと112AJが高く、353ANは低いA、C、E、F及びGのグラフパターンであった。これらの官能試験ではB、D、E、Gは「嫌い」と評価する人が多く、Aは「普通」の強さで「好き」と感じられ、Cは「弱い」が「嫌い」なにおい、さらにFは「普通」の強さと種類という結果になった (Table 11)。測定で151AJ、353ANが高く、大きな面積を示したB及びDは「強く」「嫌い」であり、グラフとの相関性がみられた。しかし、151AJ、353ANが低いAとEでは好き嫌いの傾向は必ずしも一致しない。また、同一の有効成分を使用した試料においても異なるグラフパターンを示し、官能試験でも差異が認められた。

ま と め

においの計測については、工業生産における悪臭や異常監視あるいは品質管理などで多く行われている。品質管理の場合には、においの強度だけでなくにおいの識別が必要である。松野ら (1992) により、水晶振動子式PVCブレンド脂質膜においセンサーでの5種の異なる膜を用いたセンサーの応答パターンからアミルアセテートなどの6種類のおいの識別が可能であることが確認されている²⁾。また、有機ガスの測定からそれらのグラフパターンの比較におい物質の比較が可能であることも報告されている³⁾。しかしながら、成型パップ剤や軟膏などの外用剤におけるにおいの計測についての報告はなされていない。

本実験により、水晶振動子式においセンサーでの測定結果と官能試験の結果との間には一定の相関性が認められた。

また、同一あるいは類似処方試料において、それらのグラフパターンの面積はにおいの強さに比例することが示唆された。有効成分の単独の測定から、l-メントール、dl-カンフル、サリチル酸メチル及びサリチル酸グリコールはそれぞれ特徴的なグラフパターンを有することが明らかになった。さらに測定結果において、センサー素子の指標112AJ値が高い場合、その試料においては「好き」と評価され、112AJが低いあるいは353ANの値が高いと「嫌い」なにおいとして認識されることがわかった。また、サリチル酸メチルとメントールのにおいてはカンフルの配合によりマスキングされることが推察できるが、これはさらに詳しく検討する必要がある。

今後は原料や香料を分析することにより、においセンサーの素子が感知するにおい物質と官能試験による嗜好との関連性を調べることが必要である。また、有機ガスと同じくパップ剤における製剤のグラフパターン化することにより、製剤や原料の品質管理あるいは安定性試験に応用できると考えられる。

謝 辞

本研究に対し、懇篤な指導と助力を賜りました富山大学教育学部教授、手塚昌郷先生に深く感謝し、お礼申し上げます。

文 献

- 1) 松野 玄；「においセンサーの開発」、機能材料Vol.16 No.6 pp.14-20 (1996)
- 2) 松野 玄、山崎大輔、荻田英治、御厨健太、植田敏嗣；「水晶振動子式PVCブレンド脂質膜においセンサー」電気学会電子回路研究会資料 ECT-92, No.34-40 pp.49-57 (1992)
- 3) 相互薬工；「*FREGRANCE SENSOR* においセンサー製品案内」、相互薬工株式会社
- 4) 村松ほか；「圧電素子を用いる臭いセンサーの開発」、Polymer Preprints, Japan Vol.38, No. 9 pp.3050-3052 (1989)

Table 1 においの分析方法¹⁾

方法	官能試験	機器分析	ガスセンサー	半導体式 においセンサー	水晶振動子式 においセンサー
例	調香師	GC/MS	半導体式 接触燃焼式	酸化物半導体式 有機半導体式	二分子式 天然脂質膜式 合成脂質膜式
特長	直接的 特殊装置の 不要	精密な成分 分析	測定が簡易 安価	長寿命 無機ガスに対 応	感度特性が嗅 覚に近い 多目種同時測 定
問題点	主観の影響 数値化が困 難	感覚量との 対応性がな い 測定時間が 長い	低感度 対象ガスに 制限がある	嗅覚との対応 性がない 出力がリニア でない	無機ガス測定 に難 寿命が短い
原理	ヒトの嗅覚	化学分析	抵抗変化など	抵抗変化	共振周波数変化

Table 2 センサー素子の特長²⁾

素子名	特長
151A J	あらゆるにおい物質に対して反応
183A K	湿度影響を受けにくく、高含水量の試料の測定に有効
353A N	有機溶剤に感度が高い
112A J	低級脂肪酸に感度が高い
453A A	アンモニア系に対し高い感度を示す

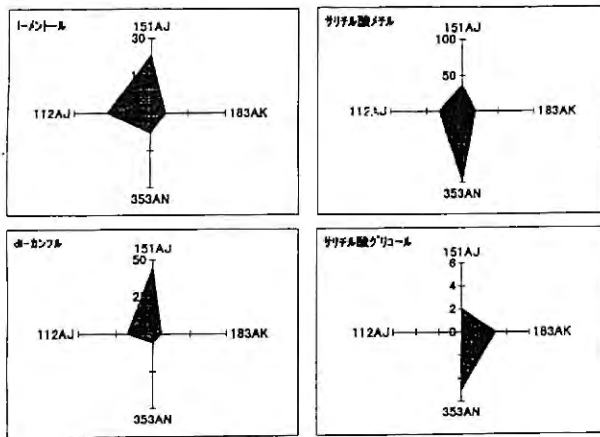


Fig. 3 有効成分の測定結果

Table 3 有効成分の官能試験結果 (%)、N=20

成分名	においの強さ			においの種類		
	強	普通	弱	好き	普通	嫌い
メントール	53	33	13	50	40	10
カンフル	80	13	7	0	33	67
サリチル酸メチル	27	60	7	0	47	53
サリチル酸グリコール	0	0	100*	0	0	100*

* : サリチル酸グリコールににおいがあると答えた人の回答

Table 4 試作パップ剤の有効成分の配合量 (%)

試料名	1	2	3	4	5	6	7	8
メントール	0.4	-	-	0.4	0.4	0.4	-	-
カンフル	0.3	-	0.3	0.3	-	-	-	0.3
サリチル酸メチル	1.27	-	1.27	-	1.27	-	1.27	-
サリチル酸グリコール	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63

Table 5 試作パップ剤No. 1の官能試験結果 (%)、N=20

試料名	においの強さ			においの種類		
	強	普通	弱	好き	普通	嫌い
1	35	45	20	20	30	55
2	0	0	100	15	50	35
3	35	45	20	20	25	50
4	15	55	30	30	40	30
5	60	25	10	20	5	75
6	10	60	30	35	30	35
7	25	40	35	10	45	45
8	10	55	35	20	45	35

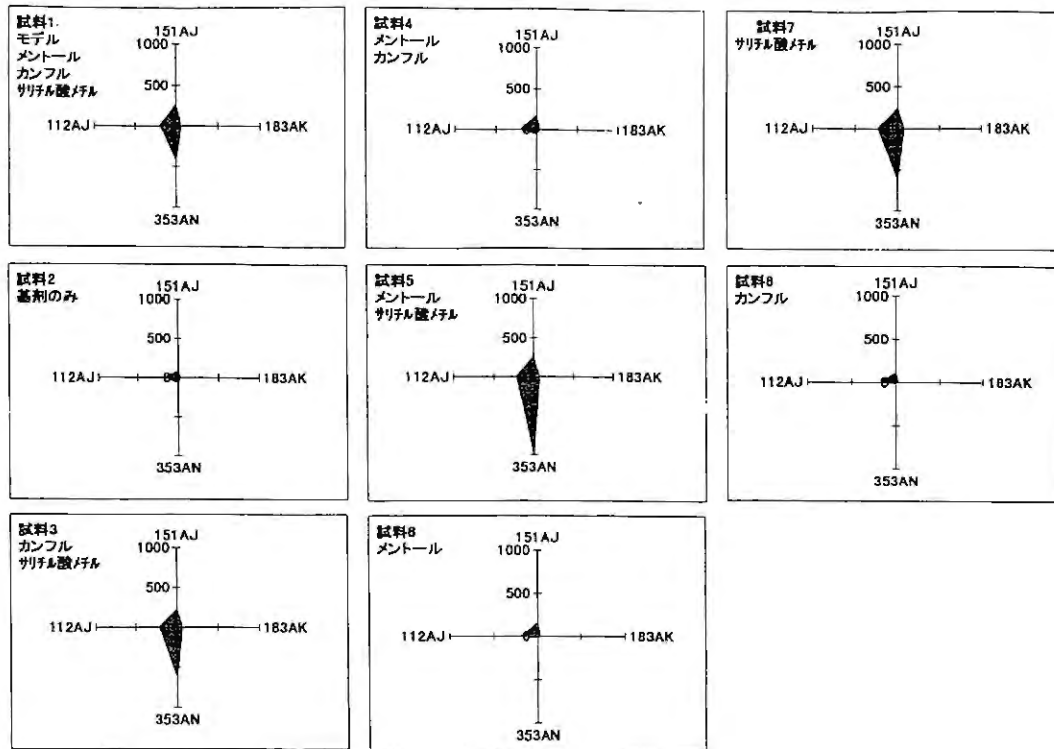


Fig. 4 試作パップ剤No. 1の測定結果

Table6 試作パップ剤No. 2の有効成分の配合量(%)

試料名 成分名	9	10	11	12	13	14	15	16	17
メントール	0.8	1.2	2.0	-	-	0.8	1.2	1.2	1.2
カンフル	0.3	0.9	1.5	0.6	1.2	-	-	0.6	1.2
サリチル酸 メチル	1.27	3.81	6.35	1.52	1.52	1.27	1.27	1.27	1.27
サリチル酸 グリコール	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63

Table7 試作パップ剤No. 2①の官能試験結果(%), N=20

項目 試料名	強さの順位				においの種類		
	1	2	3	4	好き	普通	嫌い
1	20	35	30	15	15	46	38
9	20	20	15	40	16	50	33
10	25	20	30	25	9	45	45
11	55	15	15	15	0	33	66

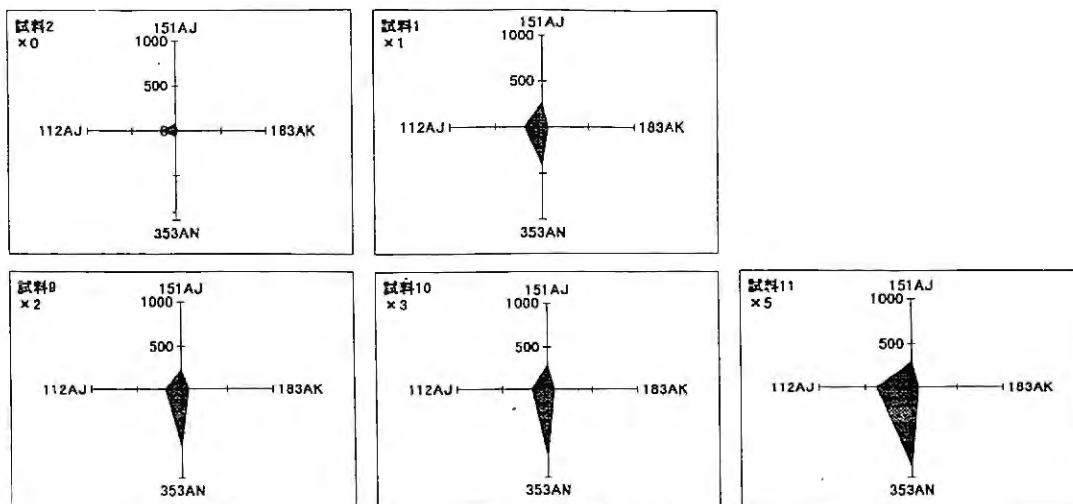


Fig. 5 試作パップ剤No. 2①精油量の変化 測定結果

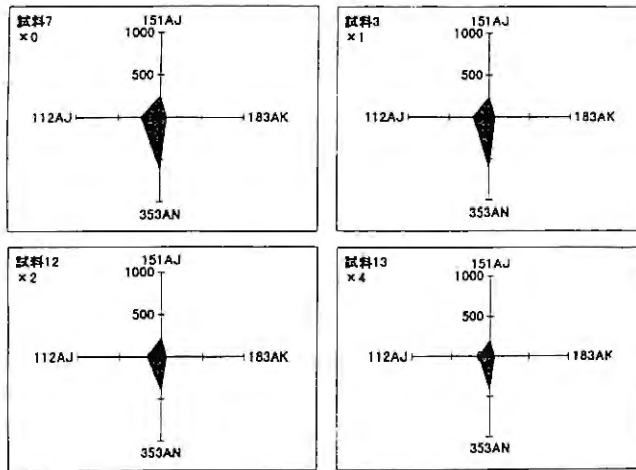


Table 8 試作パップ剤No. 2 ②の官能試験結果(%), N=20

項目 試料名	強さの順位				においの種類		
	1	2	3	4	好き	普通	嫌い
7	20	30	10	40	0	55	45
3	10	50	40	0	0	66	33
12	10	40	40	10	11	55	34
13	80	0	0	40	0	33	66
15	10	30	60	0	14	57	28
16	20	60	20	0	12	38	50
17	70	20	10	0	50	38	12

Fig. 6 試作パップ剤No. 2 ②-1 カンフル量の変化 測定結果

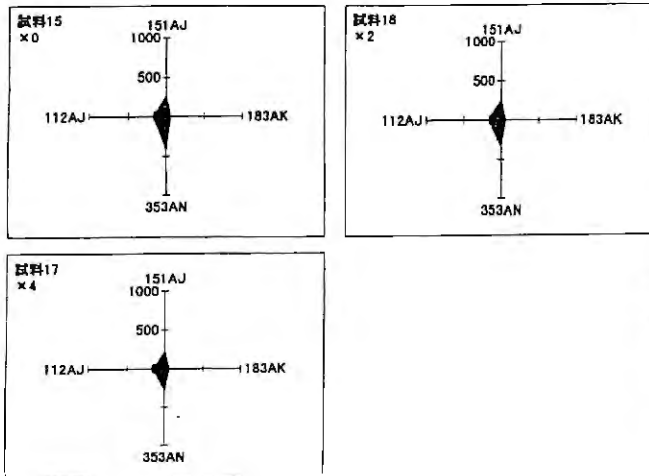


Table 9 試作パップ剤No. 2 ③の官能試験結果(%), N=20

項目 試料名	強さの順位				においの種類		
	1	2	3	4	好き	普通	嫌い
7	20	20	25	35	8	58	33
5	5	25	25	45	8	61	31
14	30	35	30	20	16	41	41
15	45	20	20	15	0	57	43

Fig. 7 試作パップ剤No. 2 ②-2 カンフル量の変化 測定結果

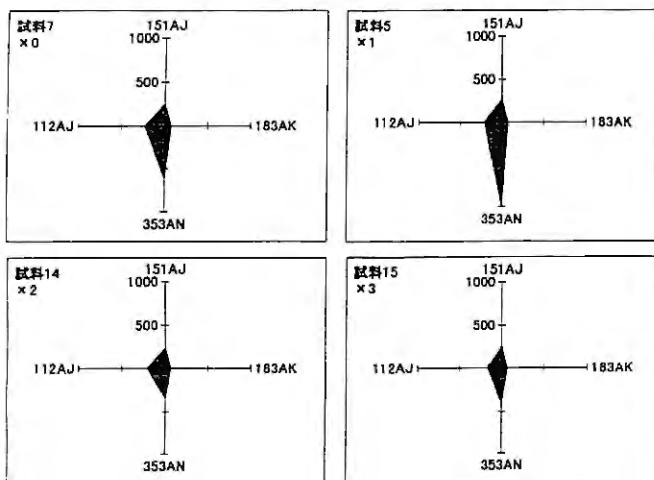


Fig. 8 試作パップ剤No. 2 ③メントール量の変化 測定結果

Table10 市販バップ剤の有効成分の配合量(%)

資料名 成分名	A	B	C	D	E	F	G
メントール	0.15	0.3	0.36	0.625	1.28	1.0	1.0
カンフル	-	-	-	0.5	1.28	0.3	0.5
サリチル酸 メチル	1.25	0.5	1.0	-	-	1.25	1.5
サリチル酸 グリコール	-	1.0	-	2.0	0.64	-	-

Table11 市販バップ剤の官能試験結果(%), N=20

項目 資料名	においの強さ			においの種類		
	強	普通	弱	好き	普通	嫌い
A	30	45	25	50	35	15
B	65	30	5	5	35	60
C	15	35	50	20	35	45
D	80	20	0	10	25	65
E	50	40	10	10	35	55
F	20	45	35	35	55	10
G	55	20	25	10	20	70

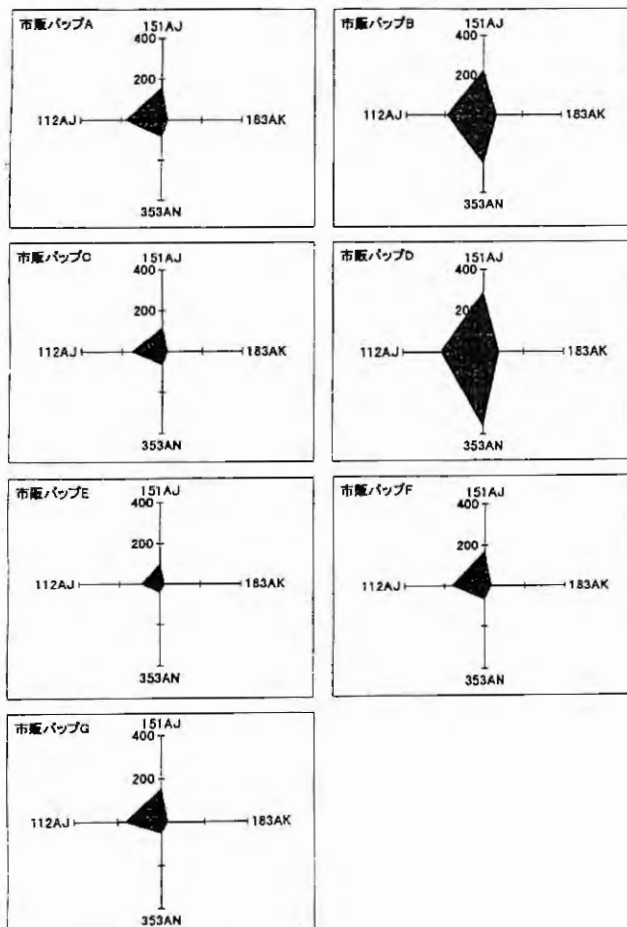


Fig. 9 市販バップ剤 測定結果