

苦味をマスクした総合感冒薬の開発とウィスカーについて

The development of cold medicine no bitter flavor and Whisker

津 幡 泰 三 長 森 八 郎 能 登 満
Taizo Tsubata Hatiro Nagamori Mitsuru Noto
東亜薬品(株) 医薬研究部
Medical Reserch Department, Toa Medicine Co.,Ltd.

緒言

製剤とは、薬物を投与し易くしたり、味を良くしたり、期待される効果を予定通りに作用させるため、加工するものである。つまり、製剤化とは、個々の配合する成分の性質を理解し、プラスの部分伸ばし、また、マイナス部分を限りなくゼロに近づけるため、加工することであると考えている。

そこで、今回、苦味を有する経口総合感冒薬を開発するにあたり、製剤化に種々工夫を加えて、期待通りの成果が得られたので報告する。

経口剤の苦味のマスクングは、高分子フィルムでコーティングしたもの、また、糖衣などがあるが、作業が複雑になり、コストが大きくなるのが一般的である。

本検討では、コーティングすることなしに、薬物のマイナス部分である苦味を簡易にマスクングすることを目的に製剤設計を行った。

検討の部

1. 味の検討

味を構成する要素にはいくつかの味覚があり、複雑多彩な感覚が微妙なバランスで全体の味がつくられており、人はそのバランスで“味”を判断している。また、香料は嫌なにおいを同系の香りを付けることによって、軽減されると言われている。苦味も同様に、配合成分によって軽減するものと考えた。

苦味を有する経口総合感冒薬の基本処方Table 1をもとに、苦味のマスクングを検討した。

配合成分によって苦味をマスクングすると考えられる、Table 2に挙げる成分3種類について検討した。酸味を有する成分として無水クエン酸、苦味を有する成分としてカカオ末及び苦味マスクング剤の大豆レシチンを用いた。

なお、大豆レシチンは花王社製のBMI-60を用いた。これに含まれるリン脂質が舌の苦味を感じるレセプターをブロックし、マスクングするという添加物である。

Table 1 総合感冒薬の処方

規格	成分名	mg/day	味
日局	アセトアミノフェン	900.0	苦い
日局	マレイン酸クロルフェニラミン	7.5	苦い
日局	リン酸ジヒドロコデイン	24.0	苦い
日局	dI-塩酸メチルエフェドリン	60.0	苦い
日局	無水カフェイン	75.0	苦い
日局	リボフラビン	12.0	苦い
日局	ゴオウ	2.0	初め僅かに苦く、後にやや甘い
日局	ニンジン	300.0	初め僅かに甘く、後にやや苦い

第十三改正日本薬局方の性状 などより

Table 2 苦味をマスキングすると考えられる成分

規格	成分名	味
日局	無水クエン酸	においはなく、強い酸味
薬添規	カカオ末	チョコレートのようにおいがあり、味はやや苦い
薬添規	大豆レシチン	わずかに特異なにおい及び味がある

医薬品添加物事典より

これらの添加物に主薬成分を配合した3処方で形成し、それぞれ、苦味マスキングの効果を粉末で確認した。

評価方法は、10人のボランティアに『苦味マスキングの効果』、『におい』、『味の総合評価』(全体の味の評価)について5段階(数値が大きいほど好ましい)で評価した。

1-1. 苦味の結果

ボランティアによる評価の結果Table 3より、これらの3処方のうち、苦味をマスクしていたものは、大豆レシチンとカカオ末を添加したものであった。大豆レシチンは苦味をマスクしていたが、大豆の匂いや油臭さがあったのに対し、カカオ末を添加したものは、薬物の苦味が抑えられ、本検討では最も好ましい添加物であった。よって、苦味マスキング剤として、カカオ末を選択し、製剤化を検討した。

Table 3 10人のボランティアによる評価

	無水クエン酸 添加品	カカオ末 添加品	大豆レシチン添加品
苦味	2	4	4
臭い	5	5	1
総合評価	2	4	2
コメント	苦い。舌を刺激することで苦味を軽減されている感がある。酸味が強い。	後味は苦味が感じられる。苦味の角が取れた様な感がある。	苦くない。大豆特有の匂いや油臭さがある。不味い。

2. 造粒の検討

処方は、Table 4のように、主薬とカカオ末を添加したものに、矯味剤(サッカリン、アスパルテーム、塩化ナトリウム)および結合剤(HPC-L)を添加し、造粒の検討を行った。

なお、本検討では剤形は顆粒剤とし、押し出し造粒法にて調製した。

2-1. 造粒方法の検討1

(押し出し造粒法)

押し出し造粒法はFig.1のように、原料を攪拌造粒機で混合、溶媒を加え練合

Table 4 造粒処方

規格	用途	成分
日局	主薬	アセトアミノフェン
日局	主薬	マレイン酸クロルフェニラミン
日局	主薬	リン酸ジヒドロコデイン
日局	主薬	d-塩酸メチルエフェドリン
日局	主薬	無水カフェイン
日局	主薬	リボフラビン
日局	主薬	ゴオウ
日局	主薬	ニンジン
薬添規	矯味剤	カカオ末
食添	矯味剤	サッカリン
薬添規	矯味剤	アスパルテーム
日局	矯味剤	塩化ナトリウム
日局	結合剤	ヒドロキシプロピルセルロース
日局	賦形剤	白糖
別紙規格	香料	香料(チョコレート)

した。次に練合したものを押し出し造粒機で円筒形の顆粒とし、整粒、乾燥した。再度整粒し、顆粒剤を調製した。

得られた顆粒剤は、目的とする苦味をマスクされたものになった。

2-2. 苛酷結果1(押し出し造粒法)

2-1で調製した顆粒を苛酷試験(条件:40℃-75%RH、50℃)にかけた結果、保存1箇月目では顆粒の退色が認められ、その後、時間の経過と共に顆粒表面上にカビが生えているような感じの、白色の針状結晶が顆粒の表面上に確認された。さらに3箇月目(Fig.2)では、顆粒同士が付着し、流動性が悪いものとなった。

顆粒の表面から発生していたものは、結晶の形状より、『ウィスカー』と考えられた。

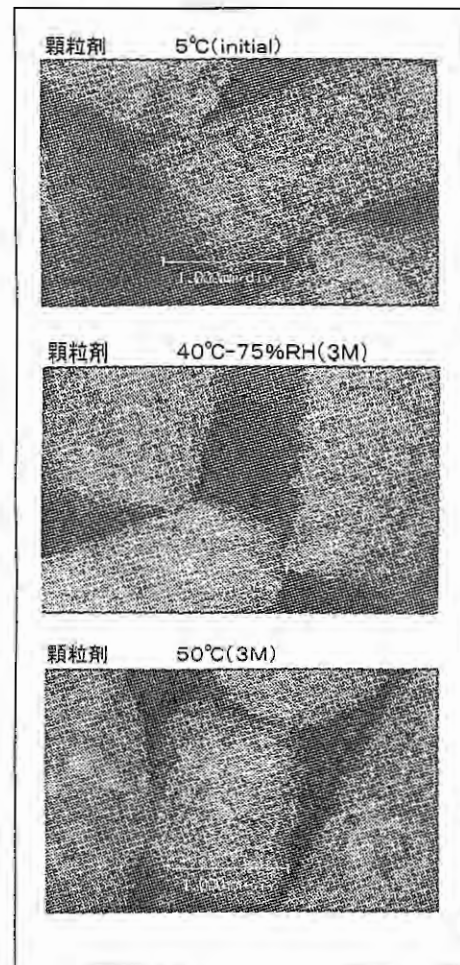


Fig2 3箇月後の苛酷試験結果
(押し出し造粒法)

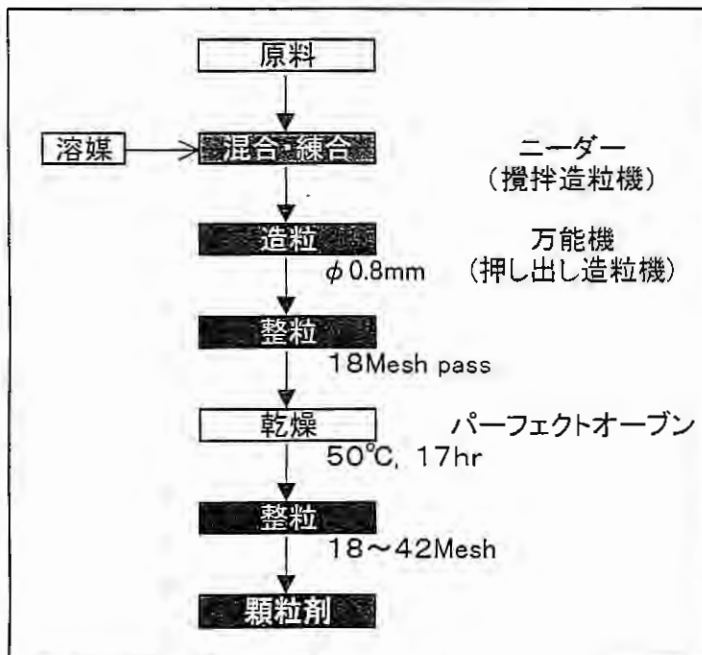


Fig.1 押し出し造粒法

3. ウィスカーの検討

『ウィスカー』とは、英名で、日本語にすると『あごヒゲ』である。結晶の形状からこの様に呼ばれている。

本製剤のウィスカーは、昇華性の高いカフェインが押し出し造粒の製剤工程で、何らかのエネルギーを受けて不安定な状態となり、形成すると推察した。

押し出し造粒にて製した造粒品はバスケット内で羽根が回転し、練り混みながらバスケットの穴から顆粒を押し出す方法であり、何らかのストレスが掛かったと考えられ、この防止方法として、工程中のストレスが少ないと考えられる『流動層造粒法』で検討した。

3-1. 造粒方法の検討2 (流動層造粒法)

流動層造粒法はFig.3のように、原料をほぐすため篩下を行い、造粒機で混合、溶媒を噴霧し造粒、乾燥した。乾燥品を整粒し、細粒剤を調製した。

この細粒剤も同様に、目的とする苦味をマスクされたものとなった。

3-2. 苛酷試験結果2 (流動層造粒法)

3-1で製した細粒剤を、顆粒剤と同一条件の40°C-75%RH及び50°Cで苛酷試験を行い、3箇月後の外観を確認した。

結果は、Fig.4のように40°C-75%RHおよび50°Cの両条件ともに、3箇月経過しても針状様の結晶である「ウィスカー」は確認されなかった。

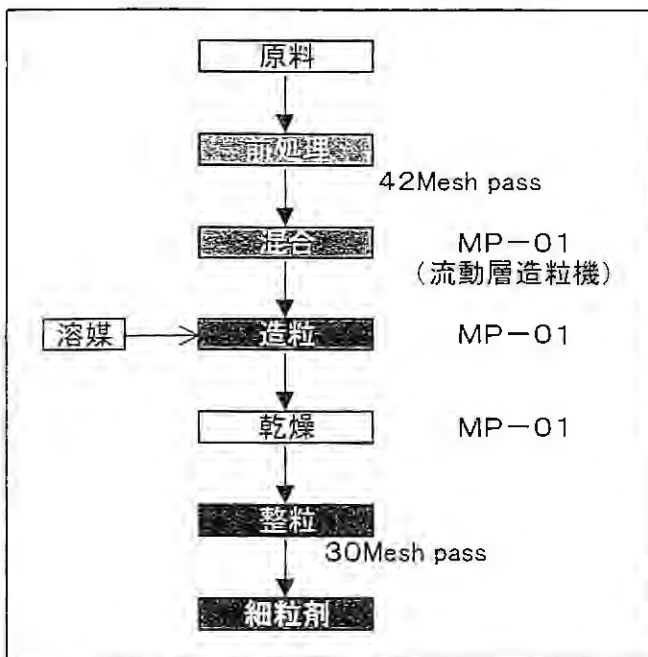


Fig.3 流動層造粒法

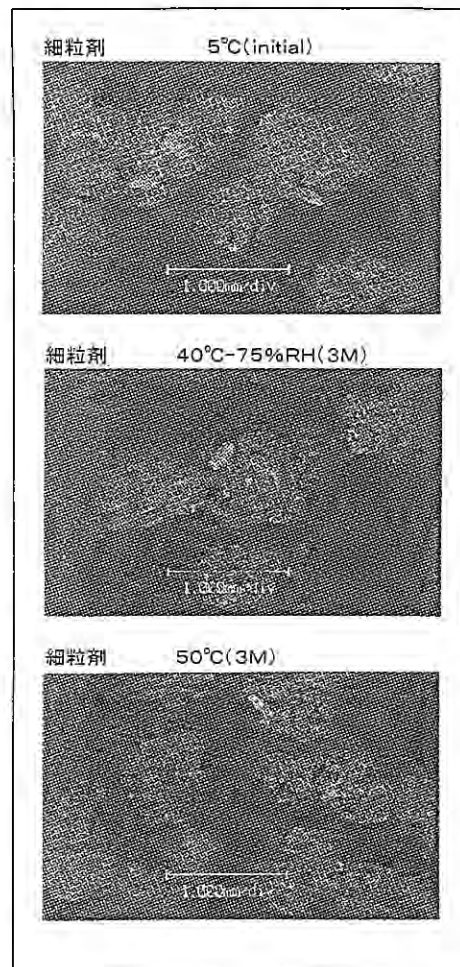


Fig.4 3箇月後の苛酷試験結果 (流動層造粒法)

まとめ

本検討の経口総合感冒薬の処方では、カカオ末を添加することで、苦味をマスクする事が可能であった。

また、押し出し造粒法から流動層造粒法への造粒方法の変更より、経時的にウィスカーの発生しない、安定な製剤が得られた。

参考文献

- 1) 湯浅宏ら, 打錠圧力のウイスキー析出に対する影響, 薬剤学, Vol 41. No.3, PEGE155-160(1981)
- 2) 湯浅宏ら, エテンザミドウイスキーの発生・成長に及ぼす多成分の影響, 薬剤学, Vol 41. No. 4, PEGE237-244(1981)
- 3) 湯浅宏ら, 製剤と粒子設計 医薬品製剤とウイスキー析出現象, Pharm Tech Japan, PEGE679-686(1995)
- 4) 山田正幸ら, カフェインwhiskaer(ヒゲ状結晶)の顆粒剤からの発生機構, 薬学雑誌, Vol 96. No. 10, 1223-1228(1976)

水虫治療薬における尿素配合の意義について

Signification of compounded urea in athlete's foot remedy

酒井 宏子 小池 淳平
Hiroko SAKAI Jumpei KOIKE
折橋 正浩 木村 隆仁
Masahiro ORIHASHI Takahito KIMURA
テイカ製薬株式会社 研究所
Research Laboratory, Teika Pharmaceutical Co. Ltd.

緒言

水虫治療の目的で抗真菌薬を皮膚に適用した場合、薬物の皮膚透過性および原因菌(白癬菌: *Trichophyton mentagrophytes*)が繁殖する表皮中への滞留性が治療効果に大きく影響する。また、近年、水虫治療薬の一般用承認基準が新たに設けられ、抗真菌剤に様々な有効成分を配合して製剤化することが容易になった。

これらを受けて今回、我々は経皮吸収促進剤である *l*-メントールおよび皮膚軟化剤である尿素に着目し、これら2つの成分と抗真菌剤であるチオコナゾールを配合した製剤を用いて、チオコナゾールの有効性への影響を検討した。

実験の部

1. 検体 配合量 (%)

	基本製剤	+ <i>l</i> -メントール	+ <i>l</i> -メントール+尿素
チオコナゾール	1	1	1
<i>l</i> -メントール	—	2~3	2~3
尿素	—	—	5
基本処方	適量	適量	適量

2. 実験内容

1) 皮膚透過性試験

(1) 使用動物

ヘアレス雄性ラット(約210g)

(2) レシーバー液

PBS pH5.0

リン酸水素二ナトリウム溶液(4.73g/1000mL)にリン酸水素カリウム溶液(4.54g/1000mL)を加えて、pH5.0に調整した

(3) 実験方法

ペントバルビタール麻酔下でラット皮膚を摘出し脂肪層を取り除いた。真皮側をレシーバーセルに装着しセル内にレシーバー液4.5mLを入れ、表皮側に検体を投与した。検体投与後15分、30分、1時間、2時間および4時間後にセル内のレシーバー液1.5mLを取り出し、代わりに1.5mLのレシーバー液を加えた。なお、セル内の温度は常に37°Cになるようにした。採取したレシーバー液0.75mLに内標準溶液0.25mLを加えてよく攪拌し、試料溶液とした。各採取時間におけるセル内チオコナゾール量を液体クロマトグラフ法により測定し、累積皮膚透過量を算出した。

(4) 測定条件

検出器: 紫外吸光光度計(260nm)

カラム： CAPCELL PAK C18 4.6φ×250mm
カラム温度： 40℃付近の一定温度
移動相： アセトニトリル/ラウリル硫酸ナトリウム溶液^{注)}/リン酸混液(1250:1000:1)
注)ラウリル硫酸ナトリウム2.02gを水1000mLに溶かした
注入量： 50μL
内標準溶液： パラオキシ安息香酸ヘプチルのメタノール/水混液(3:1)のメタノール溶液
(1μg/mL)

2)皮膚滞留性試験

(1)使用動物

ヘアレス雄性ラット(約150g)

(2)実験方法

実験前日にラットの腹部皮膚を電気カミソリにより除毛した。

実験当日、2×2cm²の薬包紙に検体約20mgを秤り取り、ペントバルビタール麻酔下において除毛したラットの腹部に投与した。薬包紙は粘着テープにより固定した。

薬剤投与から4時間後にペントバルビタール麻酔下において薬包紙および粘着テープを外し、残留している薬剤を生理食塩液にて除去後、投与部位の皮膚を摘出した。皮下組織を除去後細切りし、2mLの1mol/L水酸化カリウム溶液に一晩浸漬した。

翌日、浸漬しておいた組織をホモジナイズし、酢酸エチル6mLを加えて10分間振盪し、チオコナゾールを抽出した。毎分3000回転、10分間の遠心分離の後、酢酸エチル層5mLを分取した。酢酸エチルを留去後、内標準溶液2mLを添加し、試料溶液とした。試料溶液中のチオコナゾール量を液体クロマトグラフ法により測定し、皮膚滞留量を算出した。

(3)測定条件

検出器： 紫外吸光光度計(230nm)
カラム： CAPCELL PAK C18 4.6φ×250mm
カラム温度： 40℃付近の一定温度
移動相： アセトニトリル/ラウリル硫酸ナトリウム溶液^{注)}/リン酸混液(1250:1000:1)
注)ラウリル硫酸ナトリウム2.02gを水1000mLに溶かした
注入量： 10μL
内標準溶液： パラオキシ安息香酸ヘプチルのメタノール/水混液(3:1)のメタノール溶液
(2μg/mL)

3)治療効果試験

(1)使用動物

Hartley系雄性モルモット(400~500g)

(2)実験方法

Sakai¹⁾らの方法で行った。すなわち、モルモット背部を脱毛し、酒精綿で皮膚表面を消毒後、乱刺刀を用いて皮膚に6ヵ所、うすく血がにじむ程度に格子状の傷をつけた。この部位に*T. mentagrophytes*順天株の分生子懸濁液(8~20×10⁶ cfu/mL)を1ヶ所につき0.03 mL 塗布接種して感染させた。

投与は、感染3日後から1日1回または1日3回、1回約0.05mLの検体を感染部位に滴下し、これを7日間行った。評価は、肉眼評価と逆培養試験の2つの評価方法を用いた。

(3)評価方法

①肉眼評価

検体の7日間投与を終了した翌日に、感染部位の状態を肉眼的に観察した。感染部位の病的状態は鱗屑、痂皮によって区分しスコア化することで評価した。それぞれの病的状態は次のようにスコア化した。

鱗屑

0：無症状 1：軽度(部分的に鱗屑が認められる状態) 2：中度(感染部位全面に鱗屑が拡大した状態) 3：重度(感染部位全面に強い鱗屑が見られる状態)

痂皮

0：無症状 1：軽度(部分的に痂皮形成が認められる状態) 2：中度(感染部位全面に痂皮形成が見られる状態) 3：(感染部位全面に厚い痂皮形成が見られる状態)

②逆培養試験

肉眼評価終了後、感染部位を酒精綿で消毒し、感染部位が中心となるように皮膚組織を約1cmの大きさに切り取りこれを4等分する。切り出した皮膚を表皮が下(培地側)になるように20mg/mLクロラムフェニコールを含むサブロー寒天培地に置き、30℃で7日間培養した。切り出した皮膚組織全体のうち白癬菌の生育が認められなかった割合を陰性率として評価した。

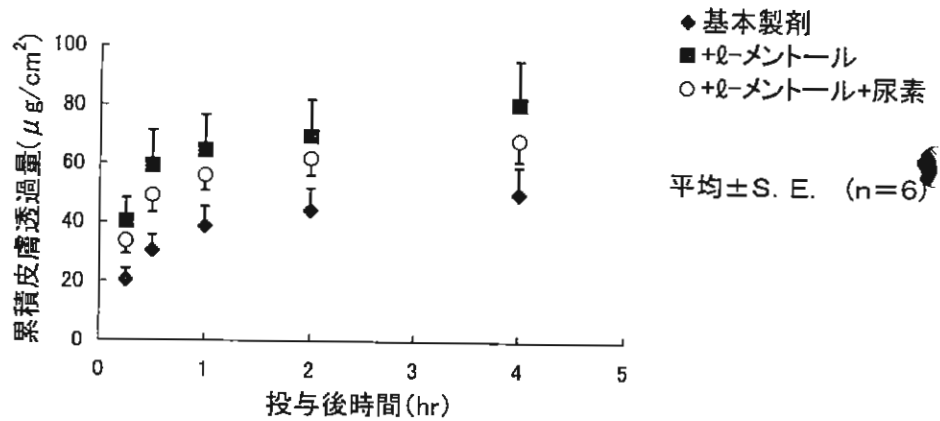


Fig.1 皮膚透過性試験

実験結果

1) 皮膚透過性試験

+l-メントール製剤の累積皮膚透過量が一番多く、次いで+l-メントール+尿素製剤、基本製剤の順であった。(Fig.1)

2) 皮膚滞留性試験

+l-メントール+尿素製剤が $9.54 \pm 1.18 \mu\text{g/g tissue}$ と一番高く、次いで基本製剤 $6.72 \pm 1.33 \mu\text{g/g tissue}$ 、+l-メントール配合製剤 $4.98 \pm 0.53 \mu\text{g/g tissue}$ の順であった。(Fig.2)

3) 治療効果試験

肉眼的観察では症状の改善に大きな差はみられなかった(Table1)。しかし、逆培養試験では1日1回投与で+l-メントール+尿素製剤の治療効果が最も強く、1日3回投与では全ての製剤においてほぼ100%の治療効果が認められた(Table2)。

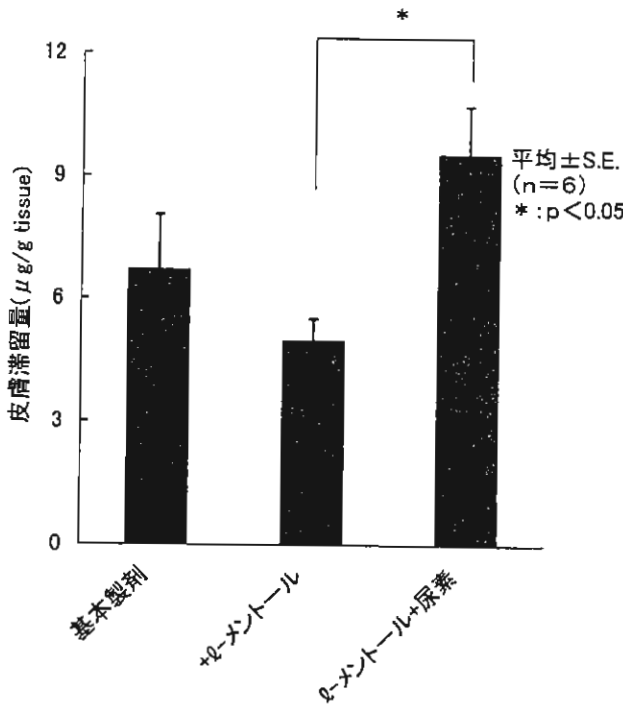


Fig.2 皮膚滞留性試験

考察

一般用の水虫治療薬は抗真菌剤だけではなく、種々の有効成分が配合されている。*l*-メントールや尿素も有効成分として配合され、前者は爽快感、消臭あるいは鎮痒などを期待して、後者は感染部位の皮膚症状の改善などを目的として配合されている。

このような作用とは別に、*l*-メントールには薬物の経皮吸収促進作用があり^{2),3)}、尿素には皮膚組織の軟化⁴⁾作用があることから、これらの作用が抗真菌剤の薬効に影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。今回、抗真菌剤チオコナゾールの皮膚組織への移行性および薬理作用が*l*-メントールや尿素によってどのように影響されるのか検討を行った。チオコナゾールの経皮吸収性は*l*-メントールを配合することにより増加する傾向が認められた。さらに、時間経過に伴い*l*-メントールを含む製剤と基本製剤の差が広がっていることから、*l*-メントールはチオコナゾールの吸収を促進していることが示された。薬物の吸収は表皮の角質層が関門となっており、*l*-メントールの効果はこの点で重要であると考えられる。また一方、尿素の存在によりチオコナゾールの皮膚滞留性は*l*-メントールのみを配合したものに比べ明らかに増加した。

l-メントールに経皮吸収促進作用があるにも関わらず、*l*-メントール単独の配合製剤におけるチオコナゾールの皮膚滞留量が最も低かったのは、薬物の皮下組織への透過促進作用が強く発揮され、一定時間を経過した後に薬物は皮下組織に多く存在するためと考えられる。これに対し、*l*-メントールと尿素を配合したものは*l*-メントールにより経皮的に薬物の移行を増加させ、さらに表皮内での薬物の拡散も増加させ、これにより組織内濃度が増加すると考えられた。このような変化は、尿素が持つ薬物透過性と拡散性の亢進作用^{5),6)}に由来するものと思われるが、詳細な機序については今後の検討課題と考えられた。

また、薬効を評価する目的から、治療効果試験を行ったが、肉眼評価は症状の治癒に大きな差は認められなかった。これは皮膚に傷をつけたことにより起こった炎症および障害が完全に治癒する期間をとらなかつたためと考えられる。このことは、皮膚症状があまり改善されていないにも関わらず、逆培養試験において白癬菌の生存がほとんど認められなかったことから推察される。1日1回投与による白癬菌の陰性率は*l*-メントールと尿素を配合した製剤で最も効果があり、皮膚滞留性の結果が反映されていると考えられた。

白癬菌は表皮付近に感染しているため、表皮内部に薬物を透過させ、さらに長く滞留させようとするならば、*l*-メントールと尿素の配合は抗真菌剤の薬効を高める上で効果的であることが示唆された。

文献

- 1) Sakai S, Studies on chemotherapy of Trichophyton infection, J.sci.Res.Inst, 50:253-269(1952)
- 2) 杉林 堅次, 薬物の経皮吸収型製剤に関する研究, 薬剤学 57:14-16(1997)
- 3) Kitagawa S, Hosokai A, Kaseda Y, Yamamoto N, Kaneko Y, Matsuoka E, 安息香酸誘導体の抽出モルモット背部皮膚透過性および*l*-メントールの影響, Int.J.Pharm. 161(1):115-122(1998)
- 4) 安野 洋一, 加藤 則人, 皮膚疾患治療薬の最近の傾向 (1)皮膚外用薬の使い方 皮膚軟化薬, 医学と薬学, 41(5):853-858(1999)
- 5) Feldmann RJ, Maibach HI, Percutaneous penetration of hydrocortisone with urea, Arch Dermatol, 109(1):58-59(1974)
- 6) Wohlrab W, Effect of urea on the penetration of prednisolone into the human skin, Dermatol Monatsschr, 172(9):523-527(1986)

Table1 治療効果1 (肉眼観察)

評点	平均±S.E.					
	基本製剤		+ <i>l</i> -メントール		+ <i>l</i> -メントール+尿素	
	鱗屑	皸皮	鱗屑	皸皮	鱗屑	皸皮
1回/日	1.33 ± 0.33	0.83 ± 0.33	1.33 ± 0.33	1.33 ± 0.33	1.33 ± 0.33	1.80 ± 0.33
3回/日	1.83 ± 0.71	1.17 ± 0.31	1.83 ± 0.31	1.33 ± 0.21	1.67 ± 0.33	1.33 ± 0.21
無症状:0 軽度:1 中度:2 重度:3						n=6

Table2 治療効果2 (逆培養試験)

	白癬菌陰性率(%)		
	基本製剤	+ <i>l</i> -メントール	+ <i>l</i> -メントール+尿素
1回/日	75.5 ± 7.6	65.5 ± 14.4	87.5 ± 5.1
3回/日	100	100	100
平均±S.E. (n=6)			

生姜配合製剤の薬理作用

Pharmacological action of Zingiberis Rhizoma and its formulation.

有 沢 典 子 篠 原 達 雄
Noriko Arisawa Tatsuo Shinohara
ダイト株式会社 研究所
Research laboratory, Daito Co. , Ltd.

緒言

「神農本草経」の中薬に記載されている生姜は、漢方処方に頻用されている生薬であり、和漢薬においても風邪薬及び胃腸薬等に多く配合され使われている。生姜についてはその成分であるGingerol及びShogaol或は生姜エキスについて、抗潰瘍作用^{1,2)}、鎮吐作用^{3, 4,5)}、解熱・鎮痛作用^{6,7,8)}等種々の薬理作用が報告されているが、生姜そのものの薬理効果については検討がなされていないのが実状である。また、Gingerol或はShogaolを薬に配合して用うことは皆無と思われることから、生姜を配合する製剤を開発するに際しては、生姜そのものの薬理効果を検討することは重要であると考えられた。そこで今回、生姜の薬理効果を検討することとした。

試験薬物

以下の薬物を試験に用いた。

生姜、黄芩乾燥エキス(以上松浦薬業株)、黄連エキス、黄柏乾燥エキス(以上日本粉末薬品)、及び牛胆汁(佐世保食肉センター)を使用した。また、その他の試薬として β -NAD⁺、アルコール脱水素酵素(ADH)、キサンチンオキシダーゼ(XOD)、乳酸脱水素酵素(LDH)及びスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)(何れもオリエンタル酵母株)を用いた。

投与薬物の調製に際しては蒸留水を用いて試験薬物を溶解或いは懸濁した。また、投与量は原生薬換算で表した。尚、各薬物の組成をTable1に示した。

試験動物

生後4週齢のddy系雄性マウス(静岡実験動物)を購入し、温度25±1℃、湿度55±5%の飼育室にて1週間以上予備飼育した健康なマウスを使用した。

Table1. Component of Test Drugs

	Crude drug	Drug A	Drug B	Drug C	Drug D	Drug E
1	生姜(Zingiberis Rhizoma)	○			○	○
2	黄連(Coptidis Rhizoma) 黄柏(Phellodendri Cortex) 黄芩(Scutellariae Radix)		○		○	○
3	牛胆汁(Ox Bile Acid)			○		○

実験の部

1) エタノール投与後の血中エタノール濃度、血糖値及び乳酸値に対する作用

一夜絶食した5週齢のマウスに試験薬物を0.1mL/10gの割合で経口投与し、その30分後に30%エタノールを0.4 mL/匹経口投与した。エタノール投与後1、3及び6時間に心臓穿刺によりヘパリン含有注射筒を用いて0.7mL採血した。採血液0.4mLに冷1M過塩素酸0.4mLを加えて混合し、遠心分離後上清部を血中エタノール濃度及び乳酸値測定のための試料とした。残りの血液0.3mLを遠心分離し、その上清部を

血糖値測定の試料とした。エタノール濃度は、0.1Mグリシン緩衝液(pH10.3)3.0mLに試料0.05mL及びNAD(2.5mg/mL)0.1mLを加えて340nmの吸光度(A0)を測定する。その後、ADH(250 U/ml)0.1mLを加え、25℃にて正確に20分間インキュベートした後、340nmにおける吸光度(A1)を測定して吸光度の差(A1-A0)を求め、検量線より濃度を算出した。乳酸濃度は、0.1Mグリシン緩衝液(pH10.3)3.0mLに試料0.1mL及びNAD(5mg/mL)0.05mLを加えて37℃で10分間放置後、340nmの吸光度(A0)を測定する。その後、LDH(500U/mL)0.05mLを加えて正確に10分間インキュベートした後、340nmにおける吸光度(A1)を測定して吸光度の差(A1-A0)を求め、検量線より濃度を算出した。血糖値は試料0.02mLに蒸留水0.2mLを加えて希釈し、その0.25mLにつきグルコース測定キットB-和光を用いて血糖値を測定した。

2) エタノール投与後のアルコール代謝酵素に対する作用

上記マウスのエタノール投与後1及び6時間のマウスより肝臓を摘出し、冷水を加えてホモジナイズし、遠心分離(0℃、10,000 g、30min)して上清部を分取し、酵素液とした。酵素活性は、0.1Mグリシン緩衝液(pH10.3)3.0mLに酵素液0.1mL及びNAD(2.5mg/mL)0.1mLを加えて340nmの吸光度(A0)を測定する。その後、10%エタノール或いは10%アセトアルデヒドを0.01mLを加えて25℃にて正確に10分間インキュベートした後、340nmにおける吸光度(A1)を測定して吸光度の差(A1-A0)を求め、吸光度の時間的変化を測定した。ADH及びALDH活性は1分間当りの吸光度の変化が0.001を1 Uとし、蛋白1mg当りの比活性として表した。また、蛋白量はビュレット法により測定した。

3) 胃粘膜障害に対する影響

金網製ケージにて18時間絶食した生後6週齢のマウスに、試験薬物を0.1mL/10gの割合で経口投与し、その30分後に150mM塩酸含有60%エタノールを0.2mL/匹経口投与した。エタノール投与90分後に動物より胃を摘出した。摘出した胃は2群に分け、1群の胃には10%ホルマリンを1mL注入して胃を固定後、大湾部に沿って切開し、胃底部に発生した潰瘍を測定した。また、他の1群は胃底部を細片後、冷水1mLを加えてホモジナイズし、遠心分離(0℃、10,000 g、30min)して上清部を分取して酵素液とし、Myeloperoxidase (MPO)及びSuperoxide dismutase (SOD)活性を測定した。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、15mM過塩素酸、80mMリン酸緩衝液(pH5.4)、8%ジメチルホルミド、40%PBSからなる液0.1mLをウェルに入れ、これに酵素液0.05mLを加え、37℃で20分間インキュベートした後、200mM酢酸(pH5.4)を0.1mL加えて反応を停止させた。この液につき、650nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。MPO活性は1分間当りの吸光度の変化が0.001を1 Uとし、蛋白1mg当りの比活性として表した。SOD活性はOyanagi¹⁰⁾の方法に準じ、0.25mMキサンチン、0.25mM塩酸ヒドロキシルアミン、0.025mM EDTAを含む20mMリン酸緩衝液(pH8.2)に酵素液0.01mLを加えた後、XOD(25 U/ml)を0.1mLを加え、37℃で45分間インキュベートした後、エチレンジアミン及びスルファニル酸からなる酢酸溶液0.1mLを加えて反応を停止させ、570nmにおける吸光度を測定した。酵素活性は牛血清SODを用いて標準曲線を作成し、それより蛋白1mg当りの比活性を求めた。また、蛋白量はビュレット法により測定した。

4) 肝機能障害に対する作用

熊沢ら¹¹⁾の方法に準拠し、5週齢のマウスに試験薬物を5日間経口投与した後、一夜絶食する。マウスにオリーブ油を用いて溶解した0.75%四塩化炭素を0.1mL/10g腹腔内投与し、更に2日間試験薬物を投与した後、心臓穿刺によりヘパリン含有注射筒を用いて採血した。採血液を遠心分離して血清を分取し、中性脂肪(TG)、血糖値、トランスアミナーゼ(GOT及びGPT)を測定した。TGは血清0.1mLにつきトリグリセライドテスト-和光を用いて測定し、血糖値は1)の項で記載した方法により測定した。また、GOT及びGPTはReitman-Frankel変法により測定した。

5) 統計処理

有意差検定にはStudent's - t 検定を用いた。

結果

1) エタノール投与後の血中エタノール濃度、血糖値及び乳酸値に対する作用

30%エタノールを0.4mL/匹経口投与した場合、血中エタノール濃度は投与後1時間で最高に達し、その後減少するが、投与後6時間においても高い血中アルコール濃度を示した。これに対し、各薬物投与群では投与後1時間及び3時間の血中アルコール濃度に対照群と比較して変化はなかったが、投与後6時間の血中アルコール濃度は有意に低下しているのが認められた (Table2)。一方、マウスを一夜絶食した場合、血糖値は著明に低下する。このマウスに30%エタノールを0.4mL/匹経口投与した場合、血糖値はエタノール投与後1時間に一過性の増加を示し、その後低下していくのが観察された。この現象に対し、薬物A、薬物B及び薬物Dは影響を与えなかった。薬物Cは投与後1時間における血糖値の上昇を抑制するのが見られるが、その後の低下に対しては何ら作用を示さなかった。これに対し、薬物Eはエタノール投与後1時間における血糖値の上昇を抑制するばかりでなく、その後低下していく血糖値を有意に抑制した (Table3)。尚、乳酸値に対して各薬物は影響を与えなかった (結果は省略)。

Table2. Effect of Test Drugs on Blood Ethanol Concentration after Oral Administration at a Dose of 30% Ethanol(0.4mL/animal). ($\mu\text{g/mL}$)

Test Drug	Dose (mg/kg)	Time After Administration		
		1hr	3hr	6hr
Control	--	1555.4 \pm 50.6	1231.8 \pm 64.3	138.8 \pm 30.2
A	300	1710.1 \pm 109.7	958.6 \pm 98.2	23.8 \pm 2.0*
	900	1857.5 \pm 136.7*	1083.1 \pm 77.2	19.0 \pm 2.6*
B	300	1538.4 \pm 114.7	1115.9 \pm 124.3	26.9 \pm 16.0*
	900	1592.6 \pm 85.3	952.8 \pm 51.8	63.4 \pm 18.3
C	300	1508.9 \pm 138.9	1029.7 \pm 63.6	22.1 \pm 7.9*
	900	1377.6 \pm 65.6	792.9 \pm 91.5	2.3 \pm 9.5*
D	300	1298.7 \pm 95.6	1047.8 \pm 57.3	8.5 \pm 6.0*
	900	1528.0 \pm 38.9	951.9 \pm 86.5	9.5 \pm 4.9*
E	300	1159.1 \pm 196.9	1841.5 \pm 555.8	19.7 \pm 6.1*

Each value represents the mean \pm S.E. of 5 to 20 mice.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$; significant difference from control group.

Table3. Effect of Test Drugs on Blood Glucose Concentration after Oral Administration at a Dose of 30% Ethanol(0.4mL/animal). (mg/dL)

Test Drug	Dose (mg/kg)	Time After Administration			
		0hr	1hr	3hr	6hr
Normal	--	170.5 \pm 6.0			
Control	--	101.3 \pm 6.4	141.9 \pm 6.0	102.5 \pm 6.2	81.4 \pm 7.3
A	300		131.3 \pm 11.6	88.8 \pm 7.0	77.1 \pm 3.5
	900		119.4 \pm 11.5	95.3 \pm 4.2	85.2 \pm 13.1
B	300		134.5 \pm 15.5	83.2 \pm 10.6	64.0 \pm 4.9
	900		145.0 \pm 20.5	91.5 \pm 9.6	61.9 \pm 5.1
C	300		111.7 \pm 11.7*	83.8 \pm 7.8	85.2 \pm 11.9
	900		98.5 \pm 11.0**	89.1 \pm 15.5	88.0 \pm 9.9
D	300		139.2 \pm 34.0	103.6 \pm 7.0	98.0 \pm 17.5
	900		146.1 \pm 17.3	104.0 \pm 4.5	95.8 \pm 16.4
E	300		124.7 \pm 16.3*	102.3 \pm 12.6	129.2 \pm 12.2**

Each value represents the mean \pm S.E. of 5 to 20 mice.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$; significant difference from control group.

2) エタノール投与後のアルコール代謝酵素に対する作用

エタノールを経口投与した場合、ADH及びALDH活性は投与後1時間で投与前に比較して低下し、6時間では回復するのが見られた。投与後1時間のADH並びにALDH活性の低下に対し、薬物A及び薬物Bは抑制傾向を示したが、薬物Cは何ら影響を与えなかった。一方、薬物Eは何れの酵素活性の低下を有意に抑制した。尚、投与後6時間のADH並びにALDH活性に対しては、何れの薬物も影響を示さなかった(結果は省略)。

3) 胃粘膜障害に対する影響

塩酸・エタノールを投与した場合、腺胃には出血を伴った著明な潰瘍が発生する。これに対し、各薬物を投与した場合、強い抑制作用が観られ、特に薬物Aで顕著な抑制作用を示した。一方、潰瘍の発生に伴って胃粘膜中MPO活性の著しい上昇が認められるが、この上昇は薬物A、薬物B及び薬物E投与によって著明に抑制され、正常群の酵素活性に近いものであった。また、薬物C投与群のMPO活性は正常群のそれよりも有意に低下しているのが認められた。オメプラゾール投与群ではMPO活性の上昇に対しては抑制傾向にあるものの有意ではなかった。胃粘膜中SOD活性は潰瘍の発生に伴って低下するのが見られるが、この低下は各薬物の投与によって有意に抑制されたが、オメプラゾールは抑制傾向を示すものの有意ではなかった。一方、薬物Cの投与において、胃粘膜中蛋白量の有意な減少が認められた(Table4)。

Table4. Effect of Test Drugs on HC I /Ethanol-Induced Gastric Lesions and Change of Enzyme Activity in mice.

Test Drug	Dose (mg/kg)	Parameter			
		Lesion index	Protein (mg/mL/stomach)	MPO activity (U/mg protein)	SOD activity (U/mg protein)
Normal	--	0±0	48.35±5.49 ^{NS}	2.55±0.91**	4.62±1.12*
Control	--	6.4±1.0	56.71±2.32	8.91±1.13	2.04±0.16
Omeprazole	30	2.7±0.8*	56.63±5.93 ^{NS}	5.30±1.63 ^{NS}	3.84±0.99 ^{NS}
A	300	0.8±0.4**	53.25±5.56 ^{NS}	3.20±1.08**	4.77±1.36*
B	300	2.0±0.5**	56.74±1.53 ^{NS}	1.45±0.53**	3.47±0.33**
C	300	0.9±0.4**	35.61±7.33*	0.38±0.08**	5.75±1.31**
E	300	1.1±0.5**	44.97±6.48 ^{NS}	1.09±0.38**	4.14±0.93*

Each value represents the mean±S.E. of 10 mice.

NS ; not significant difference from control group.

*p<0.05 and ** p<0.01 ; significant difference from control group.

4) 肝機能障害に対する影響

マウスに四塩化炭素を投与した場合、投与後48時間で血清中TGの著明な増加が観られる。この増加に対し、薬物A、薬物B及び薬物Eは血清TGの増加を有意に抑制した。一方、フェノバルビタール投与群では正常群と比較して有意に低下していた。血糖値は四塩化炭素の投与により正常群と比較して有意に低下するが、この低下は薬物A、薬物B及びマロチラートの投与により正常群の値までに改善した。また、フェノバルビタール投与群においては対照群のそれよりも有意に低下しているのが認められた。一方、肝障害の発生に伴って血清中GOT及びGPTは増加するが、この増加は薬物投与によって抑制されたが弱いものであった。(Table5)。

Table5. Effect of Test Drugs on CC 1 4-Induced Liver Injury in mice.

Test Drug	Dose (mg/kg)	Parameter			
		Triglyceride (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	GOT (U)	GPT (U)
Normal	--	277.7±19.9	197.4±12.2	455.8±51.6	106.8±12.6
Control	--	519.9±27.3**	152.2±8.2**	589.5±28.2*	221.8±19.0**
Phenobarbital	50	164.8±7.1**	112.0±11.4**	1039.7±91.9**	1265.8±129.0**
Malotilate	300	394.5±25.3**	179.3±7.8 ^{NS}	518.9±51.0 ^{NS}	163.0±15.2*
A	300	303.5±17.3 ^{NS}	179.9±9.3 ^{NS}	458.4±22.3 ^{NS}	175.5±11.7**
B	300	263.9±8.4 ^{NS}	183.2±7.9 ^{NS}	433.2±53.4 ^{NS}	191.8±19.3**
C	300	207.2±22.1*	175.3±6.8*	444.0±48.6 ^{NS}	179.8±11.2**
E	300	295.8±17.9 ^{NS}	160.8±8.1**	0497.7±35.2 ^{NS}	188.7±20.8**

Each value represents the mean±S.E. of 10 mice.

NS ; not significant difference from normal group.

*p<0.05 and ** p<0.01 ; significant difference from normal group.

考 察

生姜については、これまでその成分であるGingerol或はShogaolを用いて種々の薬理効果が検討されている。また、古典において「生姜汁は薬毒を解し、瘀血を散し、胃気を調え、冷痰を消し、胃を開く、菌や諸物の毒を解す」との記述があることから¹²⁾、生姜には薬物代謝に対して何らかの作用を有することが示唆される。しかしながら、生姜そのものの薬理効果については殆ど検討されていない。そこで今回、生姜の薬理効果につき、二日酔いの薬として古くから用いられている黄連解毒湯の構成成分である黄連・黄柏・黄芩並びにアルコールの吸収阻害作用を有する牛胆汁を比較対照として検討することとし、薬物代謝に対する作用をエタノール代謝に及ぼす影響から検討した。エタノールを多量に投与した場合、血中エタノール濃度は急激に増加しその後暫時減少していくが、投与後6時間においても高濃度に体内に残留しているのが認められた。これは、投与されたエタノール量が多いため、肝臓中でのエタノール代謝に必要な補酵素(NAD⁺及びNADP⁺)の供給不足が生じて酵素が作用できなくなる為と考えられている¹³⁾。このような現象に対し、生姜或いは黄連・黄柏・黄芩混合物を前投与したマウスではエタノール投与後1及び3時間の血中エタノール濃度に変化は認められなかったが6時間後のエタノール濃度は有意に低下しているのが認められた。そこでその作用機序を推測する目的で、エタノール投与後のADH並びにALDH活性に対する影響を調べた。その結果、エタノール投与後1時間のADH及びALDH活性は投与前と比較して有意に低下していたが、生姜及び黄連・黄柏・黄芩混合物或いはそれら混合物の投与により抑制されるのが認められた。一方、牛胆汁にそのような作用は認められなかった。Sasaki¹³⁾らはアロエ等種々の生薬の血中エタノール濃度低下作用につき検討し、その作用機序は生薬がNAD或いはNADPの供給を促進することにより、ADH及びALDH活性低下を抑制するからであると推定している。このことから、生姜或いは黄連・黄柏・黄芩のエタノール濃度低下作用は、アロエ等の作用機序に類似した作用による可能性がある。尚、牛胆汁にADH或いはALDH活性に対する影響がないことから、牛胆汁のエタノール濃度低下作用の作用機序はそれら生薬と異なり、むしろ牛胆汁のエタノール吸収阻害からくるものと思われる¹⁴⁾。

次に、エタノール投与による血糖値の変化に対する影響を調べた。飲酒した場合、血糖値が低下することが知られているが、マウスにエタノールを投与した場合、血糖値はエタノール投与後1時間で一過性に増加し、その後を減少していくのが認められる。これに対し、生姜或いは黄連・黄柏・黄芩混合物は何ら影響しなかった。一方、牛胆汁はエタノール投与後1時間の血糖値の増加を抑制したが、その後の低下に対しては影響しなかった。これに対して生姜、黄連・黄柏・黄芩及び牛胆汁混合物はエタノール投与後の血糖値増加及びその後の低下を有意に抑制した。混合物のエタノール投与後1時間における血

糖値増加抑制は牛胆汁のエタノール吸収阻害からくるものと推定されるが、その後の血糖値低下抑制は混合物の配合効果によるものと推定される。

エタノール投与により胃粘膜は障害を受けるが、これに対する生姜の影響を潰瘍実験モデルの一つである塩酸・エタノール潰瘍を用いて検討した。塩酸・エタノール潰瘍は酸が十分にることから、アルコールによる胃粘膜障害であり、このモデルに対して作用する薬物は胃粘膜保護作用を有することが知られている。この潰瘍に対して生姜は強い抑制作用を示し、黄連・黄柏・黄芩及び牛胆汁も同様の作用を示したが、 H^+, K^+ -ATPase阻害作用で酸分泌抑制により抗潰瘍作用を示すオメプラゾールの作用は比較的弱かった。このことより、生姜、黄連・黄柏・黄芩及び牛胆汁には胃粘膜保護作用があると考えられた。生姜成分であるGingerol或はShogaolには酸分泌抑制に基づく潰瘍抑制作用^{1,2)}が知られているが、胃粘膜保護作用がそれらの成分によるかは今後の課題である。そこで胃粘膜障害保護作用の作用機序につき、胃粘膜中の活性酸素の生成・消去系の酵素であるMPO活性及びSOD活性に対する作用を調べた。MPO活性の亢進により胃粘膜障害は増悪化し、それに伴ってSOD活性が低下することが知られている¹⁵⁾。生姜はこれら酵素に対して黄連・黄柏・黄芩と同様な明らかな作用を示し、その作用はオメプラゾールと異なっていた。黄連解毒湯はこれら酵素に対する作用により胃粘膜保護作用を示すことが知られていることから¹⁶⁾、生姜の胃粘膜保護作用は黄連解毒湯の作用に類似するものかもしれない。

四塩化炭素を投与した場合、四塩化炭素が代謝されてフリーラジカルが生成され、そのフリーラジカルによって肝実質細胞が破壊されて肝障害が誘発される。また、酵素誘導作用のあるフェノバルビタールを投与すると、代謝酵素が活性化されることから四塩化炭素の代謝が促進する為、フリーラジカルが大量に生成されるので肝障害が増悪化する。この四塩化炭素による肝障害は、生姜の投与により明らかに抑制された。Gingerol類或はShogaol類には初代培養ラット肝細胞を用いた研究で四塩化炭素及びガラクトサミンによる肝細胞障害を抑制することが知られていることから¹⁶⁾、今回得られた結果は、それらGingerol類或はShogaol類の作用を裏付けるものと思われる。尚、その作用機序が生姜のフリーラジカルに対する作用によるのか或いは実質細胞の保護作用によるかは今後の検討課題である。

以上のことから、生姜は肝機能及び胃粘膜に対して明らかな作用を有することから、古典における「生姜汁は薬毒を解し、瘀血を散し、胃気を調え、冷痰を消し、胃を開く、菌や諸物の毒を解す」についての科学的検証がなされたものと思われる。

尚、本研究に際して終始適切な御助言を戴きました、故荻田善一富山医科薬科大学名誉教授に深謝致します。

参考文献

- 1) J. Yamahara. , M. Mohizuki. , H. Q. Rong. , H. Matsuda. , H. Fujimura. : J. Ethnology 23 299(1988)
- 2) 山原條二、畠山祥子、谷口久美子、河原芽理、吉川雅之 : 薬学雑誌 112 645(1992)
- 3) J. Yamahara. , H. Q. Rong. , M. Iwamoto. , G. Kobayashi. , M. Matsuda. , H. Fujimura. : Phytotherapy Research 3 71(1989)
- 4) 山田有 : 岐阜大学医学部紀要 1 301(1955)
- 5) T. Kawai. , K. Kinoshita. , K. Koyama. , K. Takahashi. : Planta Med. 60 17(1994)
- 6) 油田正樹、石毛敦、湯浅和典、須藤和彦、新保真澄、池谷幸信 : Proc. Sympo. WAKAN-YAKU 15 162(1982)
- 7) M. Suekawa. , A. Ishige. , K. Yuasa. , K. Sudo. , M. Aburada. , E. Hosoya. : J. Pharm. Dyn. 7 836(1984)
- 8) 笠原義正、斎藤恵利子、ヒキノヒロシ : 生薬学雑誌 37 73(1983)
- 9) K. Suzuki. , H. Ota. , S. Sasagawa. , T. Sakatani. , T. Fujikura. : Anal. Biochemistry 112 145(1983)
- 10) Y. Oyanagi. : Anal. Biochemistry 142 290(1984)
- 11) 熊沢紀子、大田節子、石塚修、松井信子、鴨川旭、篠田雅人 : 薬学雑誌 110 950(1990)
- 12) 油田正樹 : 現代東洋医学 8 45(1987)
- 13) K. Sasaki. , Y. Saitho. , C. Ikawa. , T. Nishihata. : Chem. Pharm. Bull. 37 155(1989)
- 14) 篠原達雄、近藤弘之、荻田善一 : 和漢医薬学会誌 7 392(1990)
- 15) 尾尻和彦、小林好次、篠原力雄、永田稔、石黒伊三雄 : 和漢医薬学会誌 9 229(1992)
- 16) H. Hikino. , Y. Kiso. , N. Kito. , Y. Hamada. , T. Shioiri. , R. Aiyama. , H. Itokawa. , F. Kiuchi. , U. Sankawa. : J. Ethnopharmacology 14 31(1985)

ブフォステロイドの安定性

Studies on Stability of Bufosteroids in Solvent

富山県薬事研究会分析部会 — センソ配合製剤の分析法バリデーション分科会 —

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

永井喜美	(株)延寿堂
Kimi NAGAI	Enjudo Co.,Ltd.
佐賀一典	(株)廣貫堂
Kazunori SAGA	Kokando Co.,Ltd.
松原健	(株)富士薬品(株)
Ken MATSUBARA	Fuji Medicine Co.,Ltd.
市井満美子	救急薬品工業(株)
Mamiko ICHII	Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd.
高道誠	共栄製薬(株)
Makoto TAKAMICHI	Kyoei Pharmaceutical Co.,Ltd.
石原珠貴	キョクトウ(株)
Tamaki ISHIHARA	Kyokuto Co.,Ltd.
佐々木千恵	大光製薬(株)
Chie SASAKI	Taikou Pharmaceutical Co.,Ltd.
松平薫	大協薬品工業(株)
Kaoru MATSUHIRA	Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd.
森川和歌子	第一薬品(株)
Wakako MORIKAWA	Daiichi Medicine Co.,Ltd.
石井雅恵	鶴居薬品工業(株)
Masae ISHII	Tsurui Pharmaceutical Co.,Ltd.
市川哲大	明治薬科(株)
Tetsuhiro ICHIKAWA	Meiji Pharmaceutical Co.,Ltd.
横田洋一	富山県薬事研究所
Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

結 言

六神丸等の強心薬に使用されるセンソの指標成分であるブフォステロイド(ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン)は、製剤の薬効の要として重要な成分である。そのため、ブフォステロイドの分析を正確に行えるということは、センソ配合製剤の品質評価を行う上での欠かすことのできない要素である。

本分科会は、市販センソ配合製剤の分析法バリデーションの確立を最終目的として検討を行っているが、その上でまず必要となるのは、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品の品質評価、特にそれらの溶液中での安定性を調査し、安定条件を確立することである。そこで今回は、ブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニン標準品の溶液中での安定性について検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験

1. 予試験

溶媒に溶解させた標準品がどのような経時変化を示すのかを予測するために、予試験として下記の条件にて、ブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンの3成分それぞれについて虐待試験を実施した。使用する溶媒として、冷蔵庫中保管での短期間の経時変化の報告¹⁾が有り、日本薬局方においてブフォステロイドの定量の標準・試料溶媒に使用されているメタノールと、データでは示されていなかったが溶媒に使用すると安定との報告¹⁾が有るアセトニトリルを採用した。

溶 媒：①メタノール ②アセトニトリル

試料濃度：0.2mg/mL

標 準 品：和光純薬工業(株)製 生薬試験用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品

保存温度：-25℃、5℃、25℃

保存期間：0~2週間

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。

試験方法：保存期間終了後に、-25℃保存品を対照として、以下のHPLC条件にて、面積百分率を求めた。

《HPLC条件及び虐待試験計画》

検 出 器：紫外吸光光度計(測定波長：300nm)

カラム温度：40℃付近の一定温度

移 動 相：薄めたリン酸(1→1000)/アセトニトリル混液(1：1)

流 量：ブファリンの保持時間が約8分になるように調整する。

カ ラ ム： A：LiChrosorb RP-18(φ4.6mm×25cm)

B：YMC-Pack ODS-A(φ4.6mm×15cm)

C：Develosil ODS-5(φ6mm×20cm)

2. 長期安定性試験

予試験の結果を考慮に入れて、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン、それぞれの成分について長期安定性試験計画(Table 1, Table 2, Table 3)を立て、試験を開始した。

溶 媒：①メタノール ②アセトニトリル

試料濃度：0.2mg/mL

標 準 品：和光純薬工業(株)製 生薬試験用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニン標準品

保存温度：-80℃、-15℃、5℃、25℃

保存期間：0~24週間

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。

試験方法：保存期間終了後に、-80℃保存品を対照として、以下のHPLC条件にて、面積百分率を求めた。HPLC条件は、第13改正日本薬局方 成分含量測定用ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンの試験方法を準用した。

《HPLC条件及び長期安定性試験計画》

検 出 器：紫外吸光光度計(測定波長：シノブファギンは295nm、その他は300nm)

カラム温度：40℃付近の一定温度

移 動 相：水/アセトニトリル混液(1：1)

流 量： ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンの各成分の分析につき、それぞれ保持時間が約6分、7分、9分になるように調整する。

カ ラ ム： A：TSK-gel ODS-120A (株東ソー製、φ4.6mm×15cm)
 B：YMC-Pack ODS-AL (株YMC製、φ4.6mm×15cm)
 C：Develosil ODS-A (野村化学(株)製、φ4.6mm×15cm)
 D：Wakosil 5C18N (和光純薬工業(株)製、φ4.6mm×15cm)

Table 1 ブファリンの長期安定性試験計画

保存期間(週)	0	1day	3day	2	4	8	12	24
-80℃	○●							
-15℃								
5℃					○●	○●	○●	○●
25℃								

○:アセトニトリル溶液 ●:メタノール溶液

Table 2 レジブフォゲニンの長期安定性試験計画

保存期間(週)	0	1day	3day	2	4	8	12	24
-80℃	○●							
-15℃					●	●	●	●
5℃				●	○●	○●	○●	○●
25℃								

○:アセトニトリル溶液 ●:メタノール溶液

Table 3 シノブファギンの長期安定性試験計画

保存期間(週)	0	1day	3day	2	4	8	12	24
-80℃	○●							
-15℃				●	●	●	●	●
5℃				●	○●	○●	○●	○●
25℃		●	●					

○:アセトニトリル溶液 ●:メタノール溶液

結果

1. 予試験

予試験の結果をFig.1、Fig.2及びFig.3に示す。

Fig中のAは、LiChrosorb RP-18、Bは、YMC-Pack ODS-A、Cは、Develosil ODS-5での定量結果である。

《ブファリン》

ブファリンは、60℃という虐待条件下でも、メタノール及びアセトニトリルを溶媒に使用すると、100%の面積百分率の維持を確認することができた。このことから、長期安定性試験に移行してもかなりの安定性が推測できるので Table 1のように長期安定性試験のサンプリング点を少なめに設定した。

《レジブフォゲニン》

レジブフォゲニンは、アセトニトリルを溶媒に使用するとブファリンと同様に100%の面積百分率を維持した。また、メタノールを溶媒に使用すると2週間後には、約90%に面積百分率の低下が確認できた。このことから、Table 2のように長期安定性試験ではブファリンの試験計画と比較してメタノール溶媒の-15℃のサンプリング点を追加し、且つ、5℃ 2週目にもサンプリング点を設定した。

《シノブファギン》

シノブファギンは、アセトニトリルを溶媒に使用すると、他の2成分と同様に100%の面積百分率を維持した。しかし、メタノールを溶媒に使用すると1週間後で約65%、2週間後で約50%に面積百分率の低下が認められた。

他の2成分と比較して面積百分率の低下が著しいため、長期安定性試験ではTable 3のようにサンプリング点を多めに取り、特に、室温中での日常の連続分析においてどのくらいの影響が見られるのかを確認するために、25℃ 1日目・3日目のサンプリング点を設定した。

また、予試験でのHPLCチャートから、エンドキャッピング処理を施されていないカラムの方がピークの分離が良好なことが確認できたため、長期安定性試験ではその系統のカラムを使用することにした。

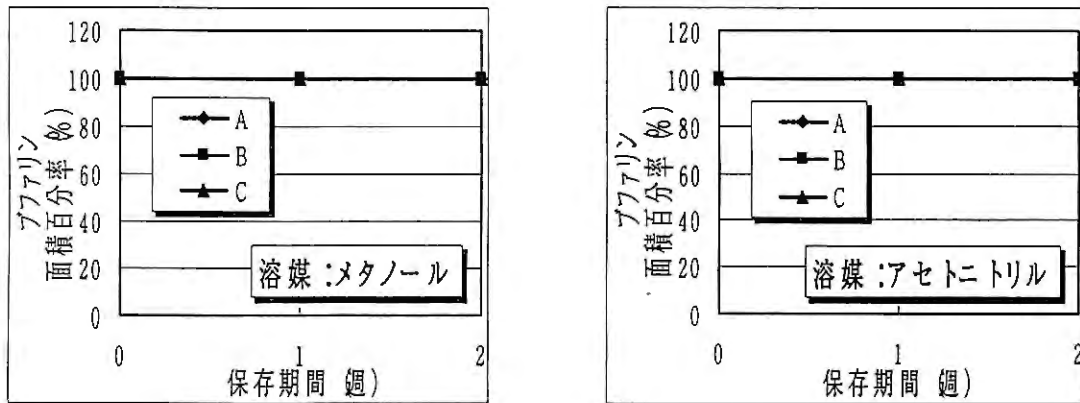


Fig.1 ブファリンの予試験結果

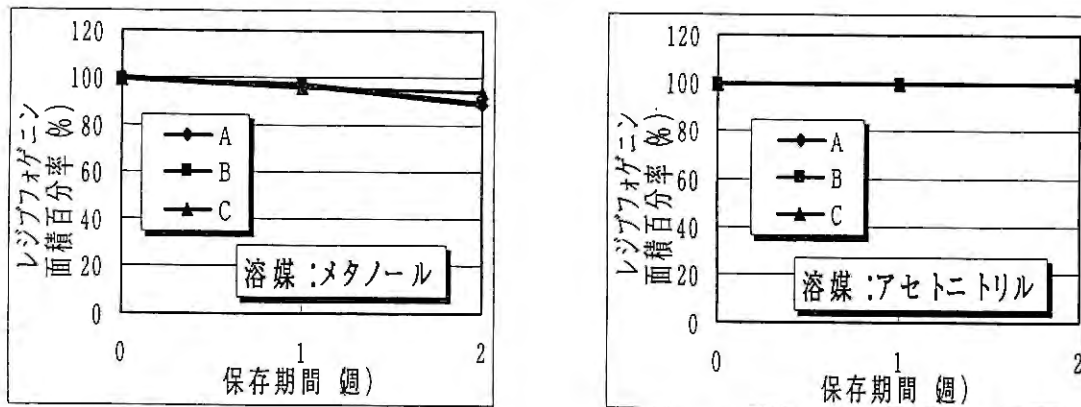


Fig.2 レジブフォゲニンの予試験結果

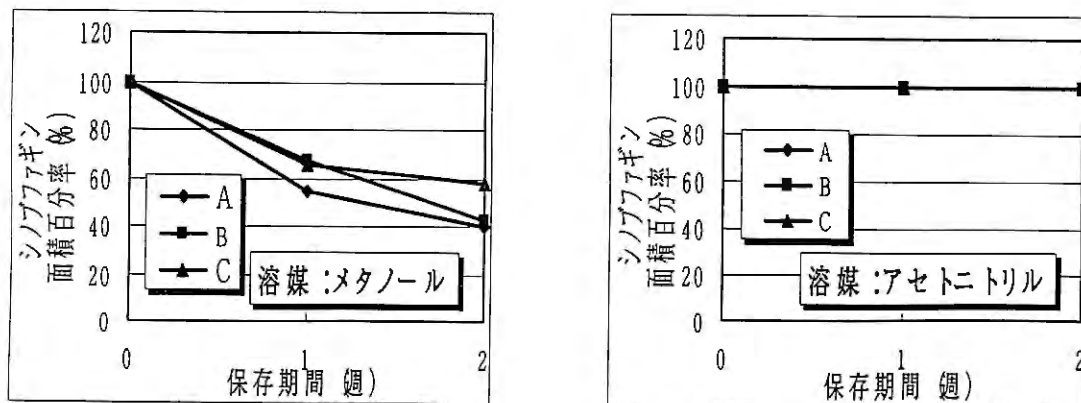


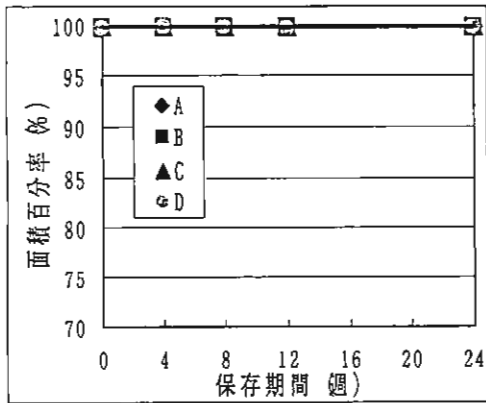
Fig.3 シノブファギンの予試験結果

2. 長期安定性試験

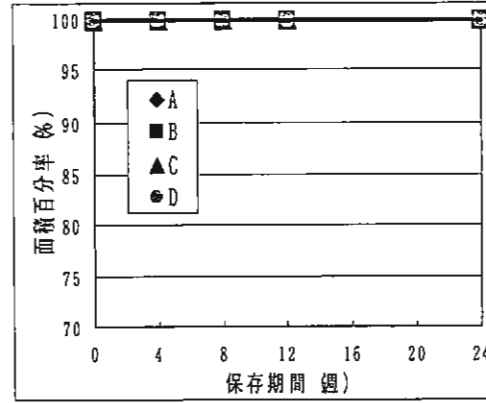
長期安定性試験の結果をFig.4、Fig.5、Fig.6に示す。

Fig中のAは、TSK-gel ODS-120A、Bは、YMC-Pack ODS-AL、Cは、Develosil ODS-ADは、Wakosil 5C18Nでの定量結果である。

保存温度は、 -15°C が冷凍庫での保存を、 5°C が冷蔵庫中での保存を、 25°C が室温中でのHPLC分析の環境を想定して設定されている。



5°C保存 溶媒:メタノール

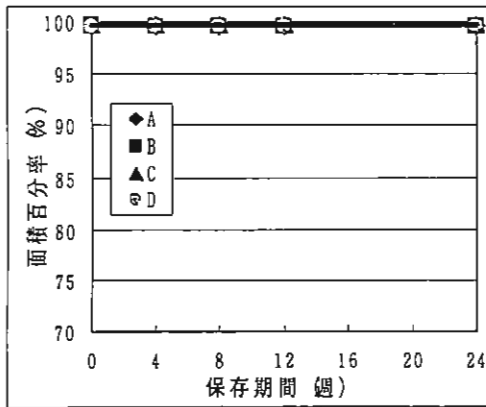


5°C保存 溶媒:アセトニトリル

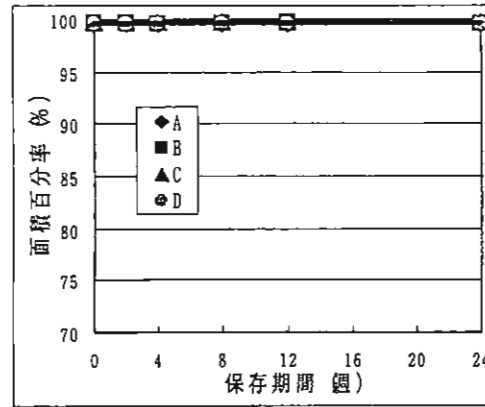
Fig.4 ブファリンの長期安定性試験結果

《ブファリン》

メタノール、アセトニトリル溶媒ともに 5°C 保存で24週間、100%の面積百分率の維持が確認できた。



-15°C 保存 溶媒:メタノール

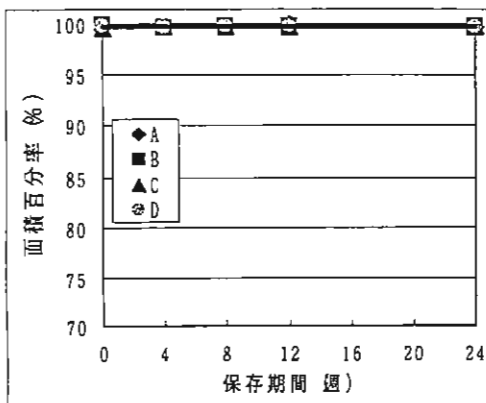


5°C保存 溶媒:メタノール

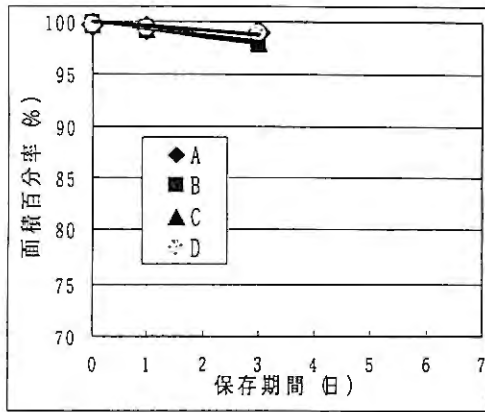
Fig.5 レジブフォゲニンの長期安定性試験結果

《レジブフォゲニン》

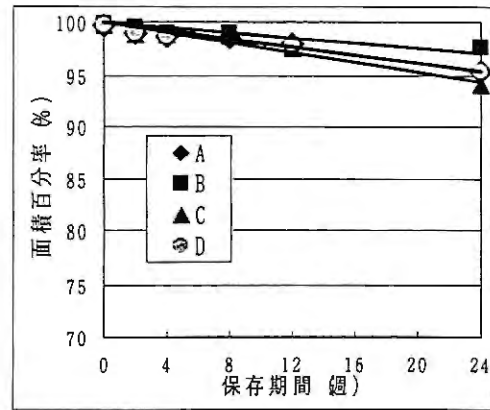
溶媒をメタノールとした場合、 -15°C 、 5°C 保存ともに24週間、99%以上の面積百分率の維持が確認できた。また、アセトニトリルを溶媒に使用するとブファリンと同様に100%の面積百分率の維持が確認できた。



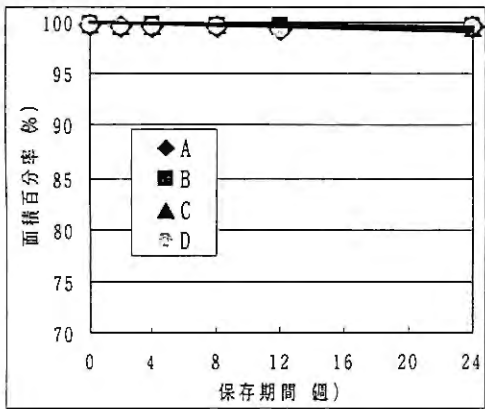
5°C保存 溶媒:アセトニトリル



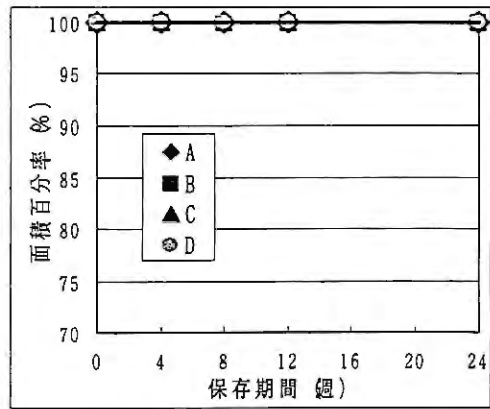
25°C保存 溶媒:メタノール



5°C保存 溶媒:メタノール



-15°C保存 溶媒:メタノール



5°C保存 溶媒:アセトニトリル

Fig.6 シノブファギンの長期安定性試験結果

《シノブファギン》

溶媒をメタノールとした場合、25°C保存では3日後に面積百分率が99%以下に低下した。5°C保存では、2週間後に面積百分率が99%以下になった。その経時変化の様子を示したHPLCチャートがFig. 7である。時間が経過するにつれ、分解物のピークが増加していくのが確認できる。しかし-15°C保存では、ほとんど面積百分率に変化が認められず、24週間後でも99%以上を維持した。

このことから、シノブファギンのメタノール溶液中での安定性は温度に依存していることが確認できたため、日常での長時間にわたるHPLC分析ではサンプルクーラー等でサンプルをできるだけ低温に保つことが必要になると考えられる。

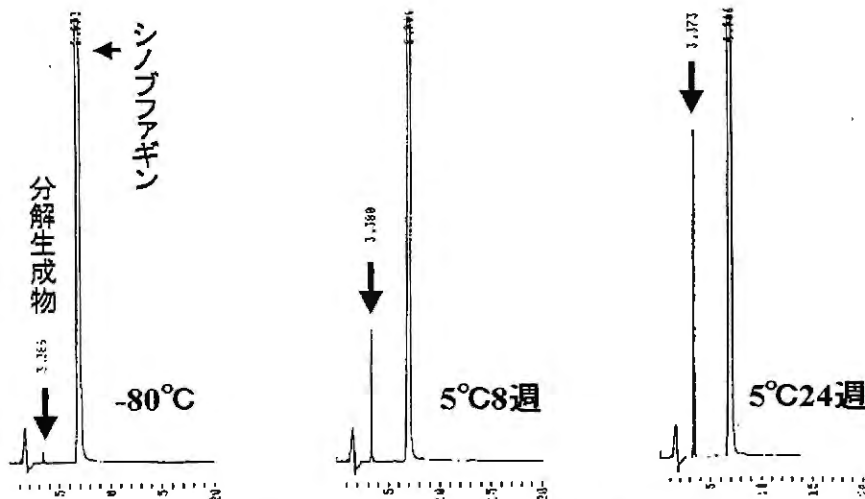


Fig.7 シノブファギン分解物の経時変化

また、溶媒をアセトニトリルとした場合、ブファリン・レジブフォゲニンと同様に、5℃での保存で24週間安定であることが確認できた。

まとめ

《ブファリン・レジブフォゲニンについて》

- ・ ブファリン・レジブフォゲニンは、溶媒にメタノール・アセトニトリルのいずれを用いても5℃すなわち冷蔵庫を想定した保存環境であれば、ほとんど含量の変化は認められず24週間は安定である。

《シノブファギンについて》

- ・ シノブファギンは、溶媒をメタノールとした場合、-15℃すなわち冷凍庫を想定した保存環境であれば、ほとんど含量の変化が認められず24週間は安定である。
- ・ 溶媒をアセトニトリルとした場合、5℃すなわち冷蔵庫を想定した保存環境であれば24週間は安定である。
- ・ 室温中での日常のHPLC分析において、標準・試料溶液の溶媒にメタノールを使用する場合、1日間で連続分析の限度であると考えられる。しかし、サンプルクーラー等によりサンプルをできるだけ一定の低温に保つことで標準・試料溶液の劣化が抑えることができるため、より長時間の連続分析が可能となる。

参考文献

- 1) 富山県薬事研究会分析部会：生薬試験用標準品の規格設定に関する検討(第三報)ーブフォステロイドについてー,家庭薬研究,10,34-40(1991)

各種結合剤の特性と使用法に関する研究

Effect of Several Binders and Method of Their Addition on the Properties of Granules
Prepared in a Fluidized Bed

富山県薬事研究会製剤部会

Division of Pharmaceutics, Toyama Pharmaceutical Research Association

石原 珠 貴	キョクトウ(株)
Tamaki ISHIHARA	Kyokuto Co., Ltd.
杉 浦 充 佳	
Mitsuyoshi SUGIURA	
焼 田 茂 樹	第一薬品(株)
Shigeki Yakita	Daiichi Medicine Co., Ltd.
南 真 琴	大協薬品工業(株)
Makoto MINAMI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
南 桂 子	
Keiko MINAMI	
佐々木 千 恵	大光製薬(株)
Chie SASAKI	Taikou Pharmaceutical Co., Ltd.
嶋 田 仁 義	ダイト(株)
Kimiyoshi SHIMADA	Daito Co., Ltd.
辻 井 賢	
Ken TSUJII	
塩 田 聡	テイカ製薬(株)
Satoshi SHIOTA	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
森 田 泰 弘	
Yasuhiro MORITA	
津 幡 泰 三	東亜薬品(株)
Taizo TSUBATA	Toa Medicine Co., Ltd.
河 合 自 立	東洋ファルマー(株)
Yoritatsu KAWAI	Toyo Pharmar Co., Ltd.
川 腰 利 之	日本医薬品工業(株)
Toshiyuki KAWAGOSHI	Nichiiko Pharmaceutical Co., Ltd.
池 内 裕 一 郎	
Yuichiro IKEUCHI	
保 田 和 子	日本ファルマー(株)
Kazuko YASUDA	Nihon Pharmar Co., Ltd.
桜 井 利 之	富士製薬工業(株)
Toshiyuki SAKURAI	Fuji Pharmaceutical Co., Ltd.
正 川 仁	(株)富士薬品
Hisashi SHOGAWA	Fuji Medicine Co., Ltd.
西 井 健 一	
Ken-ichi NISHII	

小山 春樹	前田薬品工業(株)
Haruki KOYAMA	Maeda Pharmaceutical Industry Co., Ltd.
市川 哲大	明治薬科(株)
Tetsuhiro ICHIKAWA	Meiji Yakka Co., Ltd.
宮村 博昭	明治薬品(株)
Hiroaki MIYAMURA	Meiji Yakuhin Co., Ltd.
嶋 智子	富山県薬事研究所
Tomoko SHIMA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research
渡会 三千代	
Michiyo WATARAI	
津野 敏紀	
Toshinori TSUNO	

結 言

一般に固形製剤の製造においては、単に粉末の混合のみを行う散剤や直接打錠により製する錠剤などを除けば、打錠用顆粒、カプセル充填用顆粒の製造など、何らかの形で造粒操作が行われる。造粒方法は粒剤の用途に応じて選択されるが、流動層造粒は現在、攪拌造粒や転動流動造粒と並び、汎用されている造粒法である。流動層造粒にて粉体を付着凝集させ造粒物にするには、結合剤の選定が重要であり、またその使用条件は、造粒性に大きく影響する。

そこで、処方は乳糖とコーンスターチを7：3の比で混合した標準処方とし、6品種の結合剤を使用し、流動層造粒の造粒過程における結合剤の使用法が、造粒物の物性に与える影響について調査したので報告する。

実 験

1. 実験材料

1) 賦形剤

乳糖 (Pharmatose 200, DMV)

コーンスターチ (日澱化学)

標準処方¹⁾をもとに、乳糖：コーンスターチ(7：3)をポリ袋内でよく混合したものを使用した。

結合剤を含めた総仕込量を600gとした。

2) 結合剤

ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-L、

HPC-SL、HPC-SSL、日本曹達)

ポリビニルピロリドン

(PLASDONE K-29/32、ISP

TECHNOLOGIES, INC.)

ヒドロキシプロピルメチルセルロース2910

(TC-5E、信越化学工業)

メチルセルロース

(メトロース SM-4、信越化学工業)

アルファー化デンプン

(アミコールC、日澱化学)

ゼラチン(G-1642P、新田ゼラチン)

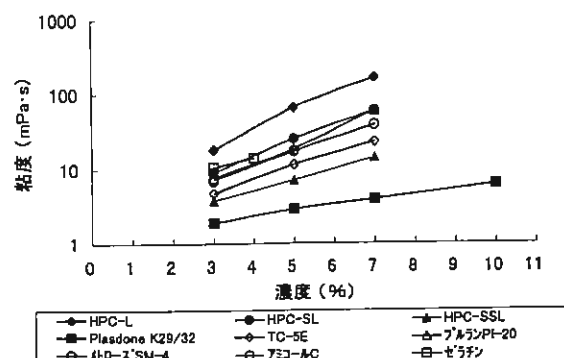


Fig. 1 各種結合剤の水溶液粘度

Fig. 1に、使用した結合剤水溶液の粘度を示した。HPCのみ粘度の異なる3タイプについて検討を行った。

3) 主薬

アセトアミノフェン 微粉(山本化学工業)

4) 滑沢剤

ステアリン酸マグネシウム(太平化学産業)

2. 造粒方法

流動層造粒機(Flow coater FLO-1、フロイント産業)を用いて造粒した。結合液添加終了後、品温が40℃に達するまで乾燥し、12号ふるいにより整粒したものを試料とした。操作条件をTable1に示した。

Table1 流動層造粒機の操作条件

使用装置: フローコーター(FLO-1)、フロイント産業製	
項目	
吸気温度(°C)	65-85
粉体表面からノズルまでの高さ(cm)	25.5
噴霧空気圧(kg/cm ²)	1.0
噴霧液速度(g/min)	7.0
シェーキングインターバル(sec)	6/30

3. 造粒物の物性評価方法

粒度分布は、直径20cmの標準ふるいを組み合わせ、試料50gをふるい振とう機(VSS-50、筒井理化学機器)にて5分間振とうし、各ふるい上の質量を測定して求めた。その累積分布より平均粒子径を算出した。また、積算ふるい上分布質量%をR(Dp)として、x軸とy軸にlogDpとlog{|log(100/R(Dp))|}をとり、ロジン・ラムラー線図(R.R.S線図: Rosin-Rammler-Sperling)を作図した²⁾。

水分は、外径約40mmの秤量瓶に約2gの試料を入れ、105℃のオープン中で2時間乾燥し、デシケーター内で放冷後の乾燥減量を測定した(n=3)。

見かけ比容積減少度は、見かけ比容積減少度測定器(KC-RHK タッピング、コニシ)を用い、試料約10cm³をタッピング高さ2cmで100回タッピングし、容積を測定し、算出した(n=3)。

顆粒強度は、ふるい分け法のふるい振とう時間を5分から20分に変化させたときの60号ふるい上率の減少率として評価した。

安息角は、安息角測定器(コニシFK型)を用い、試料を高さ約6cmから直径4cmの円盤上に積層し、測定した(n=3)。

4. 打錠方法

造粒物に0.5%(w/w)のステアリン酸マグネシウムをよく混合し、単発打錠機(P-16、理研精機)により、直径9mm、R12の杵を用いて、重量250mgの錠剤を打錠圧1271kg/cm²の打錠圧にて作製した。

5. 錠剤の物性評価方法

硬度計(三力製作所)を用いて錠剤硬度を測定した(n=10)。

結 果

1. 結合剤添加率一定のとき結合液濃度が造粒物に及ぼす影響

結合剤添加率は総仕込量に対して3%に固定し、添加する結合液濃度を3%、5%及び7%と変化させて造粒を行った。

1) ヒドロキシプロピルセルロース(以下HPC)

HPC-L及びHPC-SLでは、添加する結合液濃度を高くすることにより、造粒物の平均粒子径が大きくなる傾向がみられた。しかし、HPC-SSLでは、結合液濃度は、測定した範囲では造粒物の平均粒子径に影響しなかった(Fig. 2)。粘度の低いグレードを使用したほうが造粒物の粒度分布はシャープになった(SSL>SL>L)。

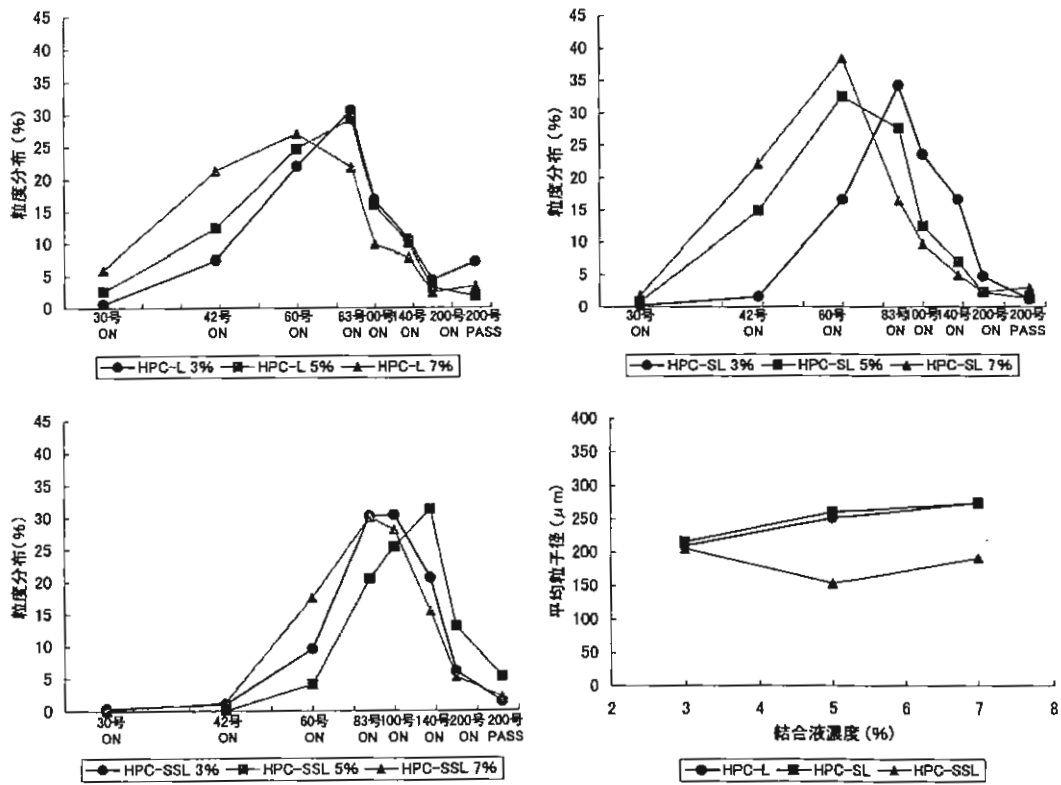


Fig. 2 結合液濃度と造粒物の粒度分布(HPC)

2) ポリビニルピロリドン(以下PVP)

結合液濃度7%のときの平均粒子径がわずかに大きくなってはいるが、HPCのような結合液濃度を高くすることによる平均粒子径の顕著な増加は認められなかった(Fig. 3)。

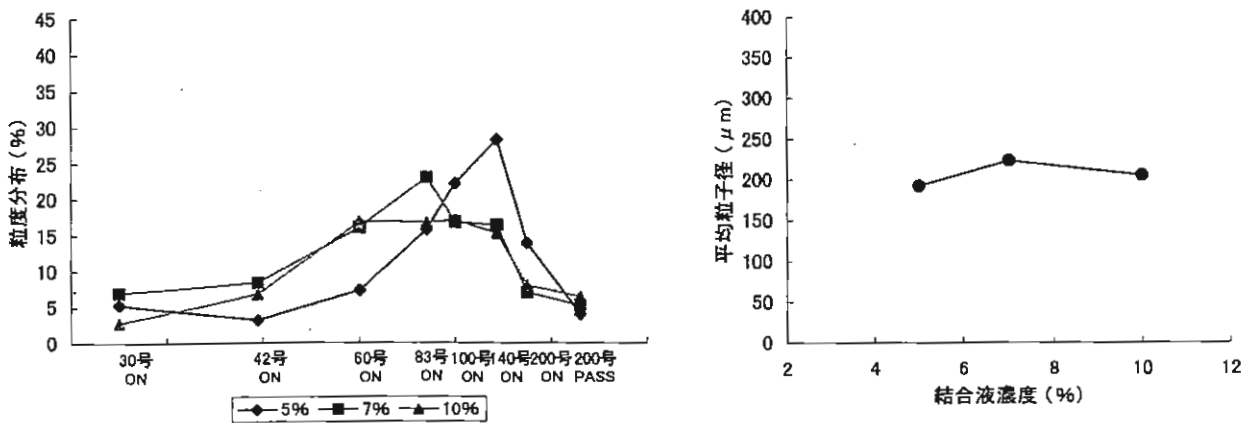


Fig. 3 結合液濃度と造粒物の粒度分布(PVP)

2. 結合液濃度一定のときの結合剤添加率が造粒物に及ぼす影響

結合液濃度を7%に固定し、総仕込量に対する結合剤の添加率を2%、3%及び4%と変化させて造粒を行った。

1) HPC

L、SL及びSSLのすべてのグレードで、添加率を増加させることにより、造粒物の平均粒子径は大きくなった。また、粘度の高いグレードを使用したほうが造粒物の平均粒子径は大きくなった(L>SL>SSL) (Fig. 4)。

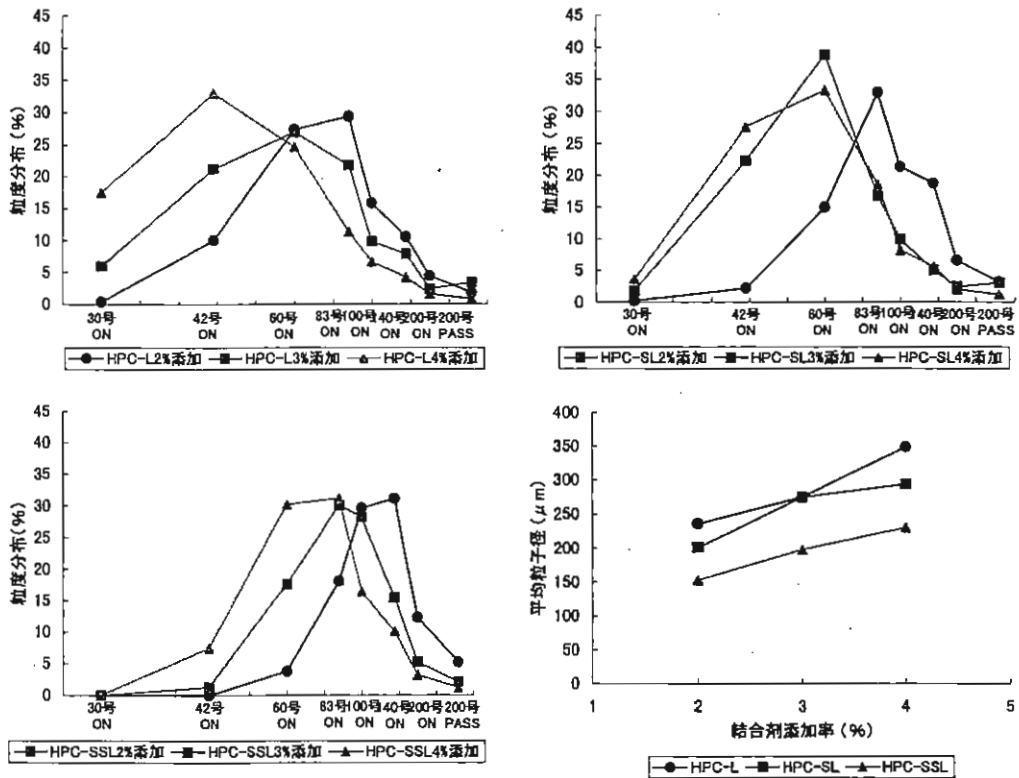


Fig. 4 結合剤添加率と造粒物の粒度分布(HPC)

2) PVP

HPCと同様、添加率の増加により、造粒物の平均粒子径は大きくなった (Fig. 5)。

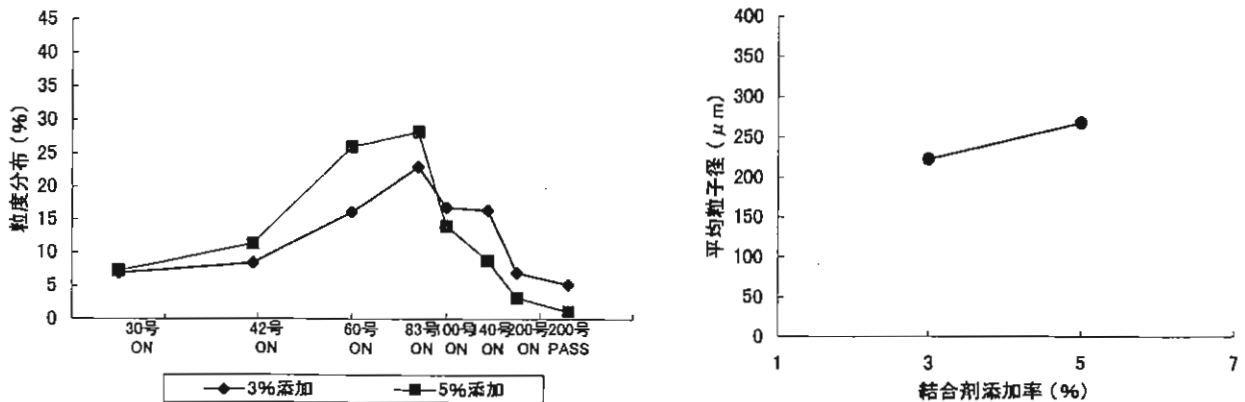


Fig. 5 結合剤添加率と造粒物の粒度分布(PVP)

3. その他の造粒物物性(HPC、PVP)

HPC及びPVP使用時の、粒度分布以外の物性について、それぞれTable2、3に示した。

Table2 造粒物の物性測定結果(HPC)

HPCグレード	HPC-L			HPC-SL			HPC-SSL		
結合液濃度 (%)	3	5	7	3	5	7	3	5	7
結合剤添加率 (%)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
顆粒強度 (60号 ONの減少率)	27.9	18.4	13.4	45.7	26.9	22.7	49.1	65.9	50.3
水分 (%)	2.53	2.64	2.27	2.36	2.13	2.38	2.11	2.98	2.01
見掛け比容積減少度	0.26	0.21	0.27	0.19	0.22	0.23	0.22	0.25	0.24
嵩密度 (Loose) (g/cm ³)	0.32	0.29	0.27	0.28	0.25	0.26	0.25	0.31	0.28
(Tap)	0.43	0.37	0.38	0.34	0.32	0.34	0.32	0.41	0.37
安息角 (°)	44.0	44.5	44.0	47.5	47.7	44.0	45.0	43.5	45.0

HPCグレード	HPC-L			HPC-SL			HPC-SSL		
結合液濃度 (%)	7	7	7	7	7	7	7	7	7
結合剤添加率 (%)	2	3	4	2	3	4	2	3	4
顆粒強度 (60号 ONの減少率)	32.5	13.4	9.8	63.4	22.7	20.8	52.6	50.3	33.2
水分 (%)	2.02	2.27	2.08	2.18	2.38	2.34	2.06	2.01	2.42
見掛け比容積減少度	0.24	0.27	0.25	0.19	0.23	0.19	0.27	0.24	0.22
嵩密度 (Loose) (g/cm ³)	0.28	0.27	0.24	0.30	0.26	0.26	0.30	0.28	0.25
(Tap)	0.37	0.38	0.32	0.37	0.34	0.32	0.41	0.37	0.33
安息角 (°)	45.0	44.0	44.0	47.9	44.0	49.2	43.0	45.0	47.9

Table3 造粒物の物性測定結果(PVP)

結合液濃度 (%)	5	7	10	7	7
結合剤添加率 (%)	3	3	3	3	5
顆粒強度 (60号 ONの減少率)	16.7	19.5	23.1	19.5	13.4
水分 (%)	3.39	3.03	3.10	3.03	3.15
見掛け比容積減少度	0.22	0.19	0.29	0.19	0.20
嵩密度 (Loose) (g/cm ³)	0.40	0.35	0.32	0.35	0.32
(Tap)	0.51	0.43	0.45	0.43	0.40
安息角 (°)	45.2	44.5	44.7	44.5	45.5

造粒物の顆粒強度は、HPC-L及びHPC-SLでは、結合液濃度が高くなるにつれて増加した。PVPの場合、結合液濃度が5%、7%及び10%と高くなるほど、顆粒強度は小さくなるという結果であった。PVPは粘度が低いいため、液濃度ではそれほど粘度に差がみられず、結合力(強度)も同様に差が小さく、バラツキの範囲内の減少と思われる。結合剤添加率を増加した場合は、HPC、PVPともに顆粒強度が増加した。顆粒強度以外の物性値は、結合剤品種、結合液濃度及び結合剤添加率などによる差は特に認められなかった。

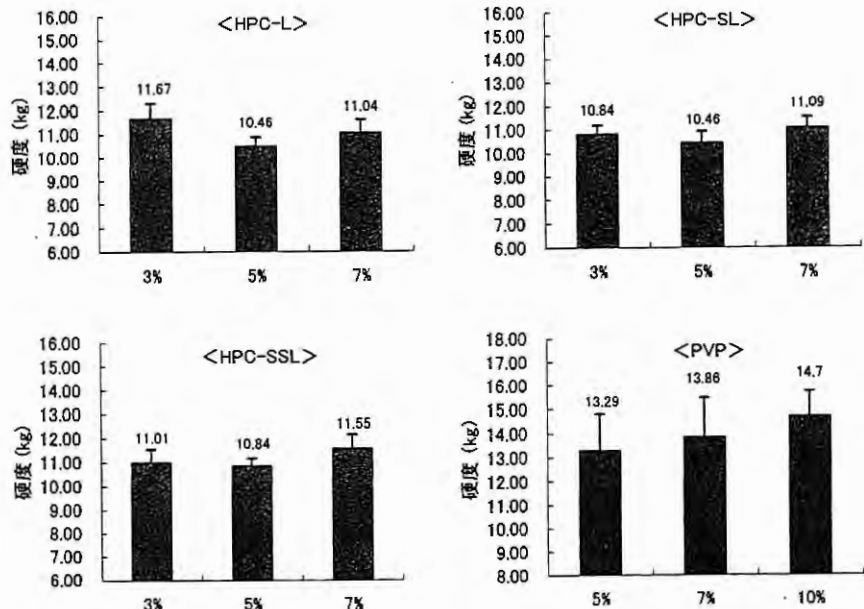


Fig. 6 結合液濃度と錠剤硬度(HPC、PVP)

4. 結合液濃度及び結合剤添加率が成型性へ及ぼす影響

結合液濃度及び結合剤の添加率を変化させて造粒した造粒物を打錠し、錠剤硬度を測定した (Fig. 6、7)。

1) HPC

結合液濃度を変化させても錠剤硬度に顕著な差は認められなかったが、結合剤添加率の増加により錠剤硬度は大きくなった。

2) PVP

結合液濃度及び結合剤添加率どちらも、増加させることにより錠剤硬度は大きくなった。また、今回の設定濃度及び添加率条件では、結合剤にHPCよりPVPを使用したほうが大きな錠剤硬度が得られる傾向がみられた。

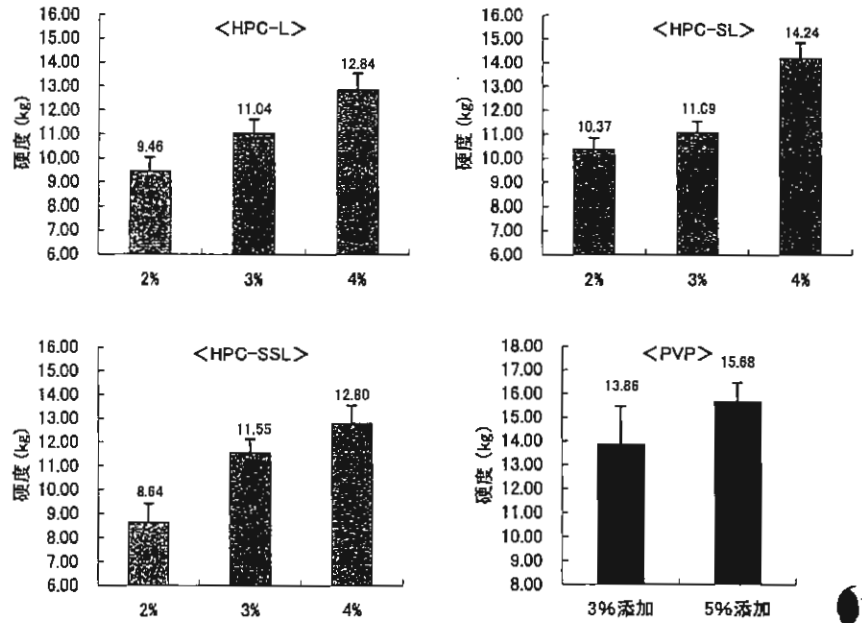


Fig. 7 結合剤添加率と錠剤硬度(HPC、PVP)

5. その他各種結合剤による造粒性

TC-5E、メトロース SM-4、アミコールC及びゼラチンについて、HPC及びPVPと比較のため、それぞれHPCと同程度の粘度となるように液濃度を設定し、造粒を試みた。粒度分布は、ほとんど83号ONにピークがあり、HPCやPVPとほぼ同様の分布を示した (Fig. 8)。その他の物性についても、同様であった。

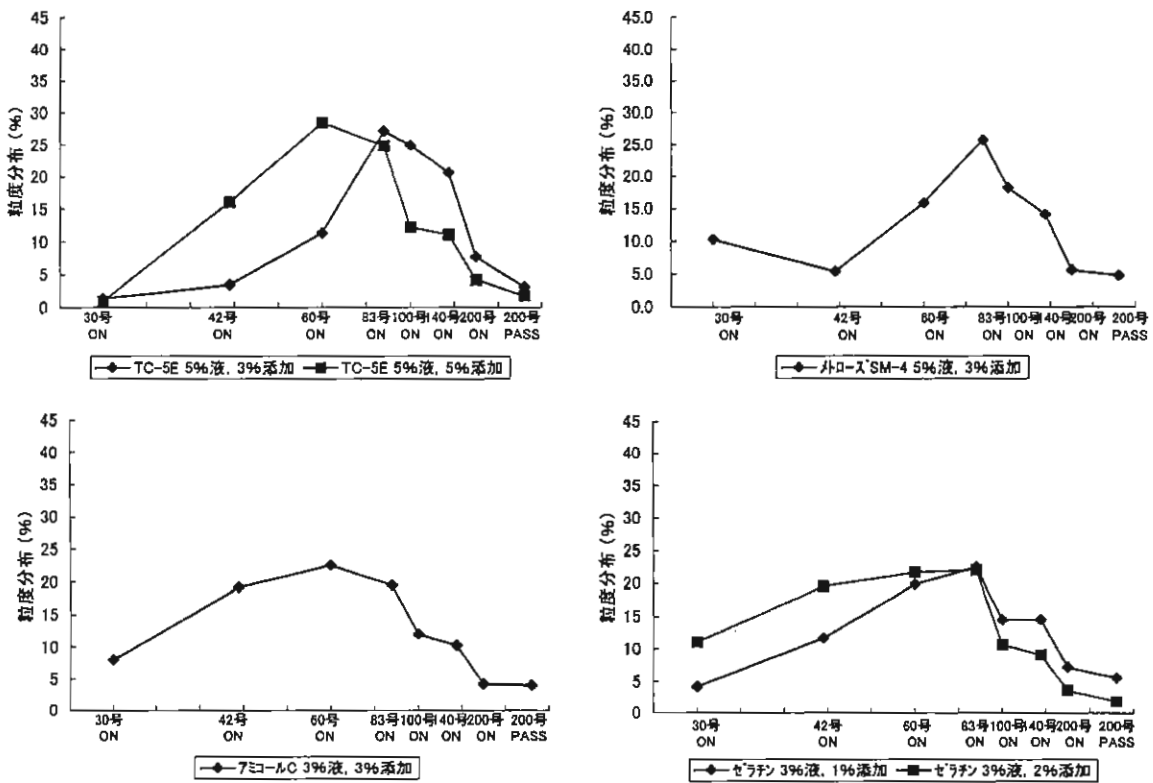


Fig. 8 その他結合剤使用時の造粒物の粒度分布

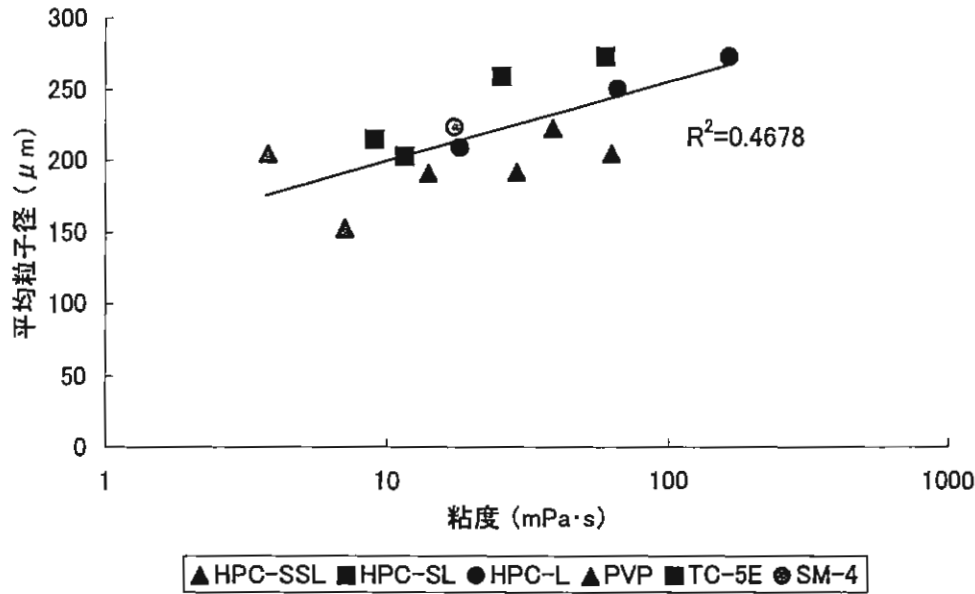


Fig. 9 結合液粘度と造粒物の平均粒子径

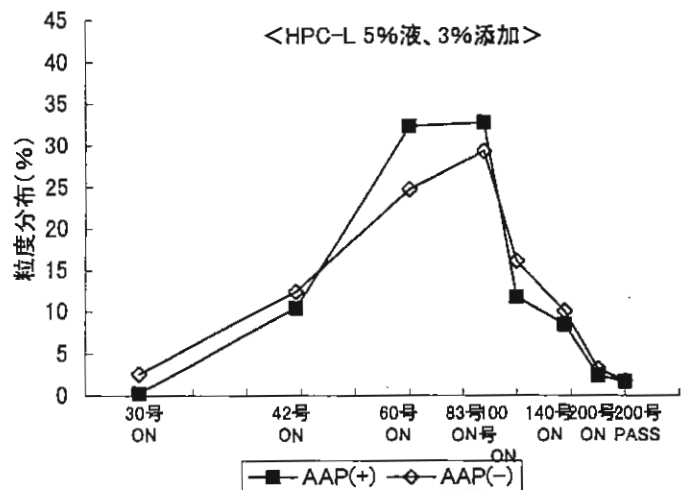


Fig. 10 アセトアミノフェン20%を含有する系の造粒物の粒度分布(HPC-L)

6. 結合液粘度と造粒物の平均粒子径

20℃下での結合液粘度と結合剤3%添加時の平均粒子径の関係をグラフに示した(Fig. 9)。今回の測定範囲では、結合液粘度と平均粒子径の関係は直線性があった。つまり、今回使用した結合剤では、結合剤の種類やグレードに関わらず、使用する結合液の粘度により造粒性が左右され、すなわち、粘度が同程度の結合剤を使用して造粒を行えば、同程度の粒度をもった造粒物が得られうることが示された。

7. アセトアミノフェンを含有する系の検討

実製剤として、参考にアセトアミノフェン20%含有する場合について行ったところ、結合剤にHPC-L及びPVPを使用したときの造粒性を検討した。粒度分布をはじめ、測定した物性値は、主薬を含まないときと比較するとHPC-Lではほぼ同様の結果を示した(Fig. 10)。

まとめ

HPC及びPVPを使用した検討により、添加する結合液濃度を増加すると、造粒物の平均粒子径が大きくなったが、低粘度域では大差がなかった。これは、液濃度の粒子径に及ぼす影響は、液濃度の増加で粘度が高くなることにより、ミスト径が増大し、ミスト1個あたりの瞬間的な結合力が増大しているためと考えられる。結合剤添加率を増加すると、造粒物の平均粒子径は大きくなり、また、顆粒強度も増加した。

錠剤硬度に及ぼす影響では、HPCとPVPには差がみられ、結合剤添加率を増加させた場合はどちらも錠剤硬度が増加したが、結合液濃度を増加させた場合は、HPCの場合錠剤硬度に顕著な差は認められなかったが、PVPでは増加した。

結合液粘度と造粒物の平均粒子径の関係をみると、今回4種の結合剤を3%添加した場合、結合剤の種類やグレード(HPC)によらず、結合液粘度により大きく影響を受け、粘度との直線性がみられた。

薬物として、アセトアミノフェンを20%含有させて造粒を行った結果、造粒物は含有しない場合と同様の粒度分布を示した。含有する薬物や結合剤の組合せにもよるが、今回の条件では乳糖・コーンスターチ系の結果が薬物含有系に応用できるといえるだろう。

今回の研究を通し、標準処方を用いて、造粒時に使用する結合剤の液濃度、添加率が造粒物物性ならびに打錠した際の錠剤硬度に及ぼす影響について、各種結合剤の基礎的なデータを得ることができた。

最後にこれらの結果が、流動層造粒法により造粒を行う際の結合剤選択の参考になればと考える。

文 献

- 1) 砂田久一, 長谷川正樹, 打錠用顆粒に関する研究, PHARM TECH JAPAN, 9(10), 1139-1149(1993).
- 2) 小石真純, 製剤の物理学的性質, 医薬品の開発15巻, 宮島孝一郎編, 廣川書店, 東京, 233-235(1989).