

HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討 — 生薬成分について —

Study on shortening of analysis time in high performance liquid chromatography

- Crude drugs -

富山県薬事研究会分析部会 — 生薬成分分科会 —

Division of Analytical Chemistry

Toyama Pharmaceutical Research Association

永井喜美	株式会社延寿堂
Kimi NAGAI	Enjudo Co.,Ltd.
市井満美子	救急薬品工業株式会社
Mamiko ICHII	Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
中村直子	共栄製薬株式会社
Naoko NAKAMURA	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
久志愛子	キョクトウ株式会社
Aiko HISASHI	Kyokuto Co., Ltd.
俣野 豊	クラシエ製薬株式会社
Yutaka MATANO	Kracie Pharma, Ltd.
疋田真穂	クラシエ製薬株式会社
Maho HIKITA	Kracie Pharma, Ltd.
秋元住江	株式会社廣貫堂
Sumie AKIMOTO	Kokando Co., Ltd.
牧村貴子	株式会社廣貫堂
Takako MAKIMURA	Kokando Co., Ltd.
士林智美	株式会社広昌堂
Tomomi TUCHIBAYASHI	Koshodo, Ltd.
本島多可美	小太郎漢方製薬株式会社
Takami MOTOSHIMA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
喜多村かおり	株式会社三九製薬
Kaori KITAMURA	Sankyu Pharmaceutical Co., Ltd.
関 絵理子	大協薬品工業株式会社
Eriko SEKI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
堀田好美	大同製薬株式会社
Yoshimi HOTTA	Daido Pharmaceutical Co., LTD.
中島恵子	中央薬品株式会社
Keiko NAKAJIMA	Chuoh 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

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要性から、1 検体あたりの分析時間の短縮が求められる。液体クロマトグラフィーにおいては、第 15 改正日本薬局方 (JP. XV) などの公定書では粒径 5 μm の ODS カラム(径 4.6 mm、長さ 150 mm)が主流であるが、最近、高分離分析が可能で分析時間の短縮化が期待できる粒径 3 μm 以下の充填剤が出回りつつある。そこで、今回演者らは、重要生薬であり夾雑物の影響により分析時間の長いニンジン中のギンセノイド R_{g1} と、オウレン、オウバク等に含まれ、分離の困難であるパルマチンとベルベリンについて、粒径 3 μm ODS カラム(径 4.6 mm、長さ 75 mm)を用い、分析時間の半減を図るとともに、公定書(JP. XV)記載の医薬品の液体クロマトグラフィーによる試験について、利用可能かどうか検討することとした。

実験

1. 試料

株延寿堂製 ニンジン、オウレン、オウバク

2. 標準品

和光純薬工業製 ギンセノイド R_{g1} 、 R_e 及びベルベリン塩化物、パルマチン塩化物

3. 方法

(1) ニンジン中ギンセノイド R_{g1}

本品の粉末約 1 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、薄めたメタノール (3 \rightarrow 5) 30 mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物は更に薄めたメタノール (3 \rightarrow 5) 15 mL を加え、同様に操作した。全上澄液を合わせ、薄めたメタノール (3 \rightarrow 5) を加えて正確に 50 mL とした。この液 10 mL を正確にとり、希水酸化ナトリウム試液 3 mL を加えて 30 分間放置した後、0.1 mol/L 塩酸試液 3 mL を加え、薄めたメタノール (3 \rightarrow 5) を加えて正確に 20 mL とし、試料溶液とした。

別にギンセノイド R_{g1} 及び R_e 標準品約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (3 \rightarrow 5) を加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とした。

試料溶液及び標準溶液につき、HPLC 法により Table 1. の分析条件を用いて溶液中のギンセノイド R_{g1} を測定した。また、使用したカラムを Table 2. に示した。

Table 1. HPLC 試験条件 (ニンジン中のギンセノイド R_{g1})

検出器	紫外吸光度計 (測定波長: 203 nm)
カラム	粒子径 3 μm 、内径 4.6 mm、長さ 75 mm の ODS カラム
カラム温度	30°C 付近の一定温度
移動相	水/アセトニトリル混液 (4:1)
流量	1 mL / min
注入量	10 μL

Table 2. 使用カラム (ニンジン中のギンセノイド R_{g1})

カラム	粒子径	内径 × 長さ	メーカー	備考
L-column ODS	3 μm	4.6 × 75 mm	CERI	
Unison UK-C18	3 μm	4.6 × 75 mm	Imtakt	
Develosil MG-3	3 μm	4.6 × 75 mm	野村化学	
Unison US-C18	5 μm	4.6 × 150 mm	Imtakt	参照用

(2) オウレン、オウバク中ベルベリン

本品の粉末約 0.5 g 精密に量り、メタノール/希塩酸混液 (100:1) 30 mL を加え、還流冷却器を付けて水浴上で 30 分間加熱し、冷後、ろ過した。残留物は、メタノール/希塩酸混液 (100:1) 30 mL 及び 20 mL を用いて、更にこの操作を 2 回行なう。最後の残留物にメタノール 10 mL を加え、よく振り混ぜた後、ろ過した。全ろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とした。

別にベルベリン塩化物及びパルマチン塩化物標準品約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とした。

試料溶液及び標準溶液につき、HPLC 法により Table 3. の分析条件を用いて溶液中のベルベリンを測定した。また、使用したカラムを Table 4. に示した。

Table 3. HPLC 試験条件 (オウレン、オウバク中のベルベリン)

検出器	紫外吸光光度計 (測定波長: 345 nm)
カラム	粒子径 3 μ m, 内径 4.6 mm, 長さ 75 mm の ODS カラム
カラム温度	40°C 付近の一定温度
移動相	水/アセトニトリル混液 (1:1) 1000 mL にリン酸二水素カリウム 3.4 g 及びラウリル硫酸ナトリウム 1.7 g を加えて溶かす。
流量	1 mL / min
注入量	5 μ L

Table 4. 使用カラム (オウレン、オウバク中のベルベリン)

カラム	粒子径	内径 × 長さ	メーカー	備考
Cadenza CD-C18	3 μ m	4.6 × 75 mm	Imtakt	
Unison UK-C18	3 μ m	4.6 × 75 mm	Imtakt	
Develosil HG-3	3 μ m	4.6 × 75 mm	野村化学	
CAPCELLPAK C18 UG120	5 μ m	4.6 × 150 mm	資生堂	参照用

結果及び考察

1. ギンセノシド R_{g1}

Table 5. に示すように、ギンセノシド R_{g1} の平均保持時間は短い順に Unison UK-C18、L-column ODS、Develosil MG-3 となったが、L-column ODS は室間再現性において最大 10.6 分の差が生じた。また、すべてのカラムについて、分離度は 1.5 以上であり、システム再現性は良好であった (Table 5 ~ 7.)。各社 HPLC 機種については Table 8. に示した。定量値に関して従来のカラムである粒径 5 μ m、内径 4.6 mm 長さ 150 mm とこれらのカラムを比較したところ、Table 9. に示したように差は認められなかった。実際に Unison US-C18 (粒径 5 μ m、内径 4.6 mm 長さ 150 mm) と Unison UK-C18 (粒径 3 μ m、内径 4.6 mm 長さ 75 mm) を用いてニンジン試料を測定したクロマトグラムを Figure 1. に示したが、Unison US-C18 と比較し Unison UK-C18 では保持時間が 1/2 程度に短縮され、分離度も良好であった。以上より、粒径 3 μ m、内径 4.6 mm 長さ 75 mm のカラムはギンセノシド R_{g1} の測定に関して、分析時間の短縮化に有効であると考えられた。

Table 5. ギンセノシド R_{g1} の保持時間

保持時間(分)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	会社間
		ギンセノシドR _{g1}							Ave.
L-column	3	16.3	11.3	21.5	10.9	11.0	20.9	11.3	14.7
Unison UK-C18	3	-	12.7	12.8	-	12.7	12.3	11.5	12.4
Develosil ODS-MG-3	3	-	-	-	-	17.8	16.9	16.3	17.0
Unison US-C18	5	-	24.2	24.0	-	-	24.9	-	24.4

-: 未検討

Table 6. ギンセノシド R_{g1} 及び R_e の分離度

分離度	粒径 (μm)	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	会社間
		ギンセノシドR _{g1} /ギンセノシドR _e							Ave.
L-column	3	1.86	1.74	1.80	1.89	1.87	2.16	1.52	1.83
Unison UK-C18	3	-	2.07	2.11	-	2.15	2.15	2.05	2.11
Develosil ODS-MG-3	3	-	-	-	-	1.91	1.82	1.75	1.83
Unison US-C18	5	-	2.15	2.03	-	-	2.23	-	2.14

-: 未検討

Table 7. ギンセノシド R_{g1} 定量におけるシステム再現性

再現性(%)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	会社間
		ギンセノシドR _{g1}							Ave.
L-column	3	0.14	0.09	0.27	0.15	0.12	0.07	1.58	0.35
Unison UK-C18	3	-	0.54	0.23	-	0.07	0.05	1.59	0.50
Develosil ODS-MG-3	3	-	-	-	-	0.15	0.68	0.47	0.43
Unison US-C18	5	-	0.53	0.23	-	-	0.39	-	0.38

-: 未検討

Table 8. 各社 HPLC 機種

	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社
使用機器	LC-10AT	HPLC2010A/CHT	LC-10ADVP	LC-10ADVP	HPLC2010A/CHT	Prominence	D-7000
メーカー	島津製作所	島津製作所	島津製作所	島津製作所	島津製作所	島津製作所	日立

Table 9. ニンジン中のギンセノシド R_{g1} 定量値

定量値(%)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	D社	E社	F社	G社	会社間
		ニンジン							Ave.
L-column	3	0.40	0.38	0.24	0.36	0.37	0.37	0.35	0.35
Unison UK-C18	3	-	0.37	0.35	-	0.35	0.37	0.38	0.36
Develosil ODS-MG-3	3	-	-	-	-	0.38	0.37	0.37	0.37
Unison US-C18	5	-	0.36	0.35	-	-	0.37	-	0.36

-: 未検討

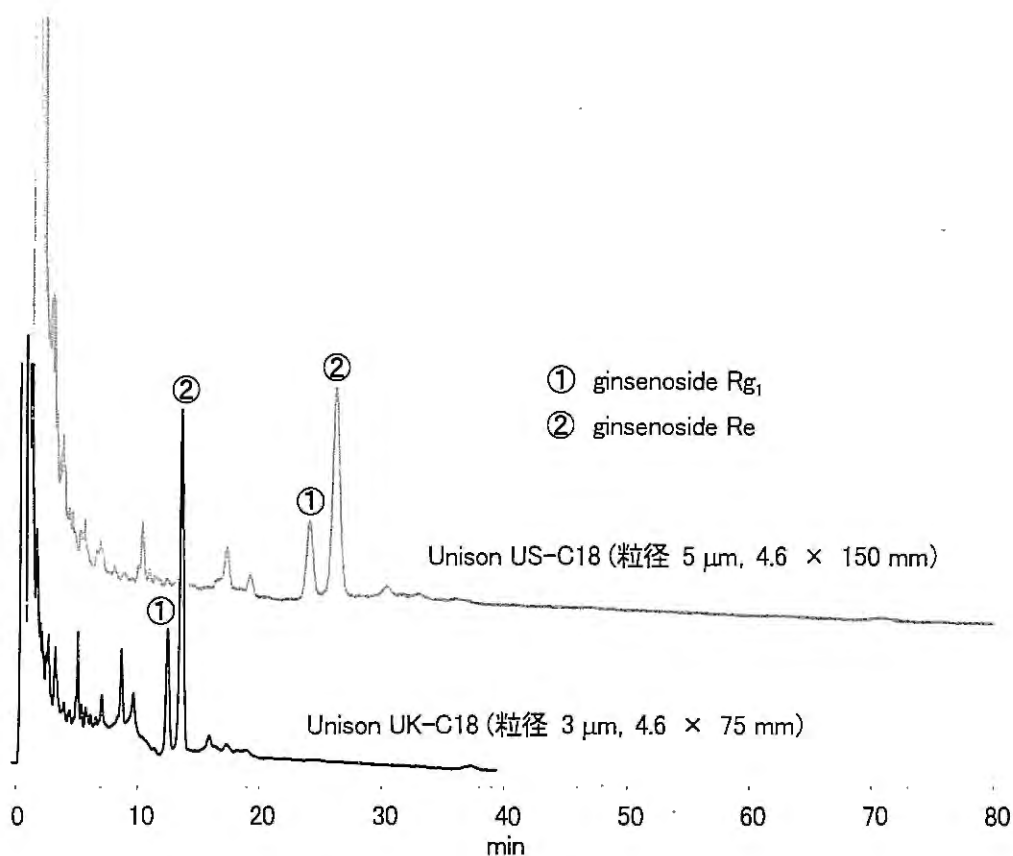


Figure 1. Unison UK-C18 と Unison US-C18 の比較

2. ベルベリン

JP. XV の定量法では、注入量は 20 μL となっているが、20 μL では良好なクロマトグラムが得られなかったため、5 μL に変更して試験を行なった (Figure 2.)。システム再現性は 1.5%以下であった (Table 10.)。パルマチンとベルベリンの分離度は分析機器の機種によって差が認められたが、最大となったのは Cadenza CD-C18 であり、室間再現性も良好であった (Table 11.)。Table 12. に示すように、試料の定量値はほぼ同様の値を示した。Figure 3. は実際にオウレン、オウバクを測定したクロマトグラムである。また Table 13. に示すように、ベルベリンは 3.3 ~ 3.9 分に溶出し、従来の粒径 5 μm 内径 4.6 mm 長さ 150 mm カラムの場合の 10 ~ 15 分と比較すると、約 1/3 に分析時間の短縮ができた。

次に、従来のカラムであり各社において通常使用している CAPCELLPAK C18 UG120 を用いて同一試料を局方の条件で測定し、Cadenza CD-C18 との比較を試みたが、CAPCELLPAK C18 UG120 は局方条件では分離度が 1.2 前後で、定量値にもバラつきがあり、定量に適さないことが判明した。そこで、各社において通常分析している条件で CAPCELLPAK C18 UG120 と Cadenza CD-C18 を比較したところ、Table 14. に示すように各社とも分離度は良好であり、保持時間も短縮されたことから、今回用いた粒径 3 μm 内径 4.6 mm 長さ 75 mm のカラムは各社の通常の分析に応用可能であると考えられた。Table 15. に各社使用 HPLC 機種を示した。

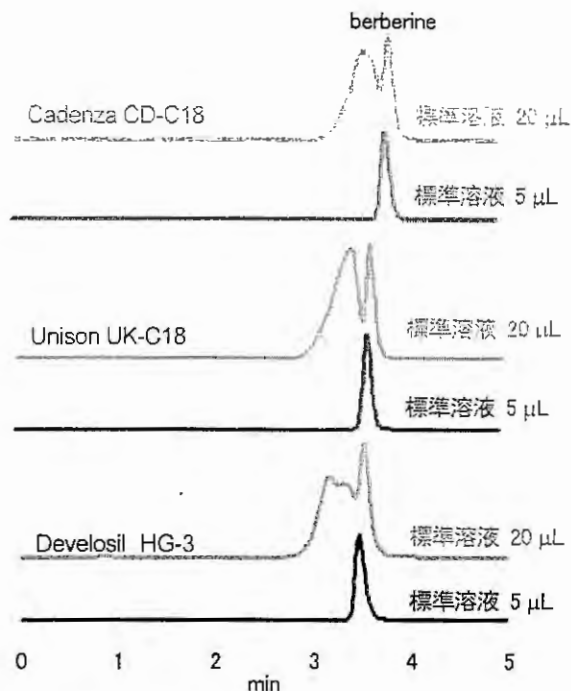


Figure 2. 注入量の比較

Table 10. ベルベリン定量におけるシステム再現性(CV)

再現性(%)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	会社間
		ベルベリン			Ave.
Cadenza CD-C18	3	0.66	0.26	1.57	0.83
Unison UK-C18	3	1.44	0.42	1.25	1.04
Deverosil HG-3	3	1.11	0.97	1.49	1.19

Table 11. ベルベリン及びパルマチンの分離度

分離度	粒径 (μm)	A社	B社	C社	会社間
		ベルベリン/パルマチン			Ave.
Cadenza CD-C18	3	1.80	1.45	1.45	1.57
Unison UK-C18	3	1.88	1.00	1.53	1.47
Deverosil HG-3	3	1.40	1.18	1.12	1.23

Table 12. オウレン、オウバク中のベルベリン定量値

定量値(%)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	会社間	A社	B社	C社	会社間
		オウレン			Ave.	オウバク			Ave.
Cadenza CD-C18	3	6.92	6.63	6.81	6.79	4.15	4.02	4.19	4.12
Unison UK-C18	3	6.77	6.75	6.72	6.75	4.09	4.11	3.90	4.03
Deverosil HG-3	3	7.29	6.8	6.73	6.94	4.12	4.08	4.21	4.14

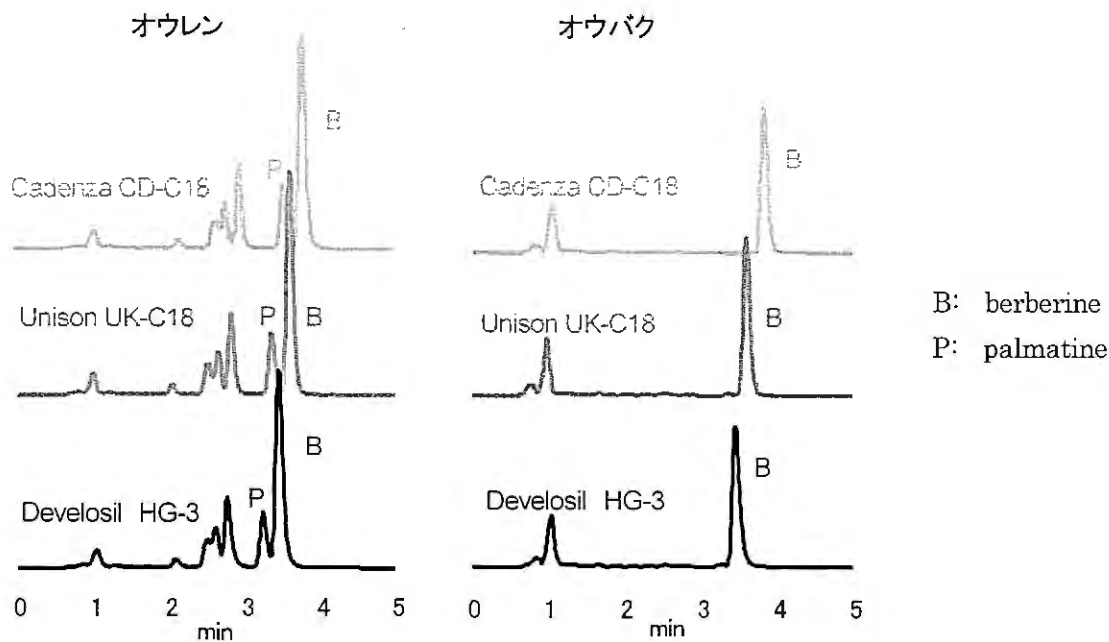


Figure 3. オウレン、オウバクのクロマトグラム

Table 13. ベルベリンの保持時間

保持時間(分)	粒径 (μm)	A社	B社	C社	会社間
		ベルベリン			Ave.
Cadenza CD-C18	3	3.45	3.55	3.62	3.54
Unison UK-C18	3	3.67	3.36	3.85	3.63
Deverosil HG-3	3	3.29	3.44	3.47	3.40

Table 14. 各社条件における CAPCELLPAK C18 UG120 (粒径 $5\mu\text{m}$) と Cadenza CD-C18 (粒径 $3\mu\text{m}$) の比較

	粒径 (μm)	保持時間 (分)			分離度		
		A社	B社	C社	A社	B社	C社
CAPCELLPAK C18 UG120	5	16.0	14.26	8.19	2.60	2.03	1.74
Cadenza CD-C18	3	7.50	6.73	6.03	2.40	2.07	1.56

Table 15. 各社 HPLC 機種

	A社	B社	C社
使用機器	2695	LC-10A	LC-20A
メーカー	WATERS	島津製作所	島津製作所

まとめ

今回、ニンジン中のギンセンノド R_{g1} 、オウレン、オウバク中のベルベリンについて、JP. XV などの公定書に用いられている粒径 $5\mu\text{m}$ の ODS カラム (径 4.6mm 、長さ 150mm) に替え、粒径 $3\mu\text{m}$ ODS カラム (径 4.6mm 、長さ 75mm) を用いた結果、各生薬とも、分析時間の短縮化を達成することができた。今後は他の医薬品成分(製剤)への応用を検討するとともに、更なる短縮化を目指し、最近発売された粒径 $2\mu\text{m}$ ODS カラムの利用も視野に入れ検討する必要がある。

HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討

—かぜ薬成分について—

Study on Shortening of Analysis Time in High Performance Liquid Chromatography
—Medicine for cold—

—富山県薬事研究会分析部会（かぜ薬分科会）—

Division of Analytical Chemistry Toyama Pharmaceutical Research Association

室 智章

Tomoaki MURO

坂野公紀

Kiminori BANNO

土屋和幸

Kazuyuki TUCHIYA

水橋 輝

Akira MIZUHASHI

上井義和

Yoshikazu KAMII

馬淵礼央奈

Reona MABUCHI

宮本加奈子

Kanako MIYAMOTO

安田美奈子

Misako YASUDA

関 絵理子

Eriko SEKI

有川千佳子

Chikako ARIKAWA

釣谷千尋

Chihiro TURITANI

田中 学

Manabu TANAKA

横田洋一

Yoichi YOKOTA

アステラス株式会社

Astellas Pharma Inc.

株式会社三和化学研究所

Sanwa Kagaku Kenkyusyo Co., Ltd.

株式会社三和化学研究所

Sanwa Kagaku Kenkyusyo Co., Ltd.

新新薬品工業株式会社

Shinshin Pharmaceutical Co., Ltd.

ダイト株式会社

Daito Corporation

東亜薬品株式会社

Toa Medicine Co., Ltd.

株式会社富士薬品

Fuji Medicine Co., Ltd.

株式会社池田模範堂

Ikeda Mohando Ltd.

大協薬品工業株式会社

Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.

テイカ製薬株式会社

Teika Pharmaceutical Co., Ltd.

日東メディック株式会社

Nitto Medic Co., Ltd.

株式会社陽進堂

Yoshindo Inc.

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical
Research

緒言

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要性から、1検体あたりの分析時間の短縮が求められる。液体クロマトグラフィーにおいては、日本薬局方 (JP. XV) などの公定書では粒径 5 μm の ODSカラム (径 4.6 mm, 長さ 150 mm) が主流であるが、最近、高分離分析が可能で分析時間の短縮化が期待できる粒径 3 μm 以下の充填剤が出回りつつある。そこで、今回我々は、粒径 3 μm の ODSカラム (径 4.6 mm, 長さ 75 mm) を用い、汎用されるかぜ薬成分のアセトアミノフェン、カフェイン、エテンザミド、クロルフェニラミンマレイン酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピンについて、成書¹⁾ 2) 記載の液体クロマトグラフィーによる分析法に応用し、分析時間の短縮化の可能性について検討した。

方法

1. アセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミド

かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法記載の一般用医薬品試験法 II¹⁾ に準じて、下記の試験法に従い、Table 1 の分析条件で行った。

試料約 0.24 g (アセトアミノフェン約 87mg, エテンザミド約 53 mg, カフェイン約 10 mg に応ずる量) を精密に量り、薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (1:1) 20 mL 及び内標準溶液 5 mL を正確に加え、15 分間超音波抽出を行った。この液 5 mL を正確にとり、薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (8:1) を加え 50 mL とし、遠心分離後、上澄液を 0.45 μm のフィルターでろ過し、試料溶液とした。

内標準溶液 安息香酸の薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (1:1) 溶液 (1→100)

Table 1 アセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミドの分析条件

検出器	紫外吸光光度計 (測定波長 280nm)
カラム	Table 3 に示したもの
カラム温度	40°C 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 (17:3)
流量	1 mL/min
注入量	20 μL
試料	市販かぜ薬 (1 日量) アセトアミノフェン 650 mg, エテンザミド 400 mg, カフェイン 75 mg, クロルフェニラミンマレイン酸塩 7.5 mg, デキストロメトルファン臭化水素酸塩 32 mg, ノスカピン 48 mg

2. クロルフェニラミンマレイン酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピン

武田寧らの月間薬事 27 記載の医薬品迅速分析法⁸⁾ に準じて、下記の試験法に従い、Table 2 の分析条件で試験を行った。なお、測定波長と移動相組成については、今回用いた製剤組成及びカラムに対応し若干変更した。

試料約 0.146 g (クロルフェニラミンマレイン酸塩約 0.6 mg, デキストロメトルファン臭化水素酸塩 2.6 mg, ノスカピン約 3.8 mg に対応する量) を精密に量り、薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (1:1) 35 mL を加え 15 分間超音波抽出を行った。内標準溶液 10 mL を正確に加え、薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (1:1) を加え 50 mL とした。遠心分離後、上澄液を 0.45 μm のフィルターでろ過し、試料溶液とした。

内標準溶液 フェナントレンの薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (1:1) 溶液 (1→2500)

Table 2 クロルフェニラミンマレイン酸塩, デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピンの分析条件

検出器	紫外吸光度計 (測定波長 226nm)
カラム	Table3 に示したもの
カラム温度	50°C付近の一定温度
移動相	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) /アセトニトリル混液 (13:12)
流量	1 mL/min
注入量	10 μ L
試料	Table1 に示した試料と同様

3. 使用カラム及び機器

Table 3 に示した性能³⁾を有する粒径 3 μ m の ODSカラム (径 4.6 mm, 長さ 75 mm) 3 本及び機器 (Table 4) を使用し, 各社で各成分の保持時間, 分離度, システム再現性, 定量値を求めた. なお,

A~D 社はアセトアミノフェン, カフェイン, エテンザミド, F~K 社はクロルフェニラミンマレイン酸塩, デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピンを分析した.

Table 3 カラム (粒径 3 μ m, 内径 4.6mm, 長さ 75mm)

カラム名	メーカー	疎水性相互作用 α (T/B)	水素結合性 α (Cf/Ph)	平面認識能	
				α (Tp/Ot)	α (Ts/Cs)
YMC-Pack Pro C18	YMC	2.14	0.33	1.29	1.07
Hydrosphere C18	YMC	2.11	0.37	1.20	1.06
Inertsul ODS-SP	GL Sciences	1.93	0.40	1.15	1.01

Table 4 各社の使用機器

	A 社	B 社	C, G, I, J 社	D 社	F 社	H, K 社
使用機器	2010C	L-7400	LC-20A	LC-10A	—	LC-2010
メーカー	島津製作所	HITACHI	島津製作所	島津製作所	WATERS	島津製作所

結果及び考察

1. アセトアミノフェン, カフェイン, エテンザミド

4 社において Table 1 の分析条件で, Table 3 の粒径 3 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 75 mm の 3 種類の ODS カラムを用いて試験したところ, いずれも良好な分離を示した. Fig. 1 にクロマトグラムの例を示す.

またエテンザミドの溶出が約 12 分であったことから, 文献の分析時間 25 分の半分以下に短縮される結果となった. また, 対照カラムとして, 従来の粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm の ODS カラム (Waters Puresil: 1 社のみ使用) を用いて比較したところ, 60%程度に短縮された. (Table 5)

充てん剤の品質 (疎水性相互作用, 極性等) の違い (Table 3) が分離条件に及ぼす影響を調べるため, 使用した YMC-Pro C18, Hydrosphere C18, Inertsil ODS-SP 各カラムの保持時間及び分離度を比較した (Table 5 及び Table 6). 疎水性相互作用が比較的小さく, 極性が大きい Inertsil ODS-SP にアセトアミノフェンの保持に若干増加が見られた以外は, 溶出パターンに大きな違いは見受けられなかった.

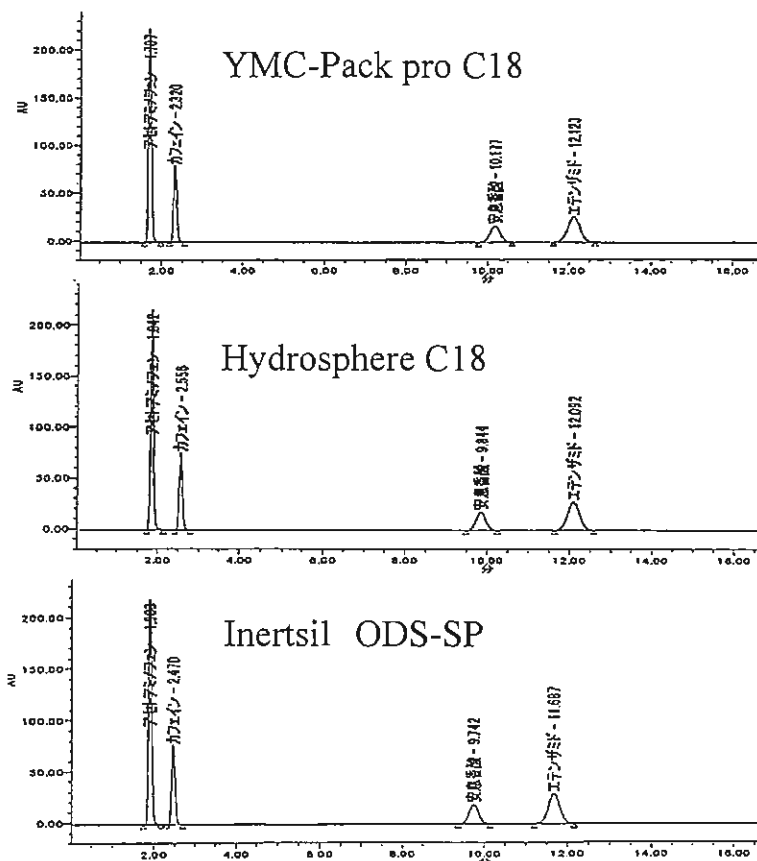


Fig.1 各カラム (粒径 3 μ m, 内径 4.6mm, 長さ 75mm) のクロマトグラム

Table 5 各カラムにおける保持時間 (分)

	アセトアミノフェン			カフェイン			エテンザミド		
	AVE (N=4)	SD	CV	AVE (N=4)	SD	CV (%)	AVE (N=4)	SD	CV (%)
YMC-Pack ProC18	1.73	0.03	1.9	2.33	0.06	2.6	11.63	0.61	5.2
Hydrosphere C18	1.86	0.03	1.5	2.55	0.05	2.1	11.61	0.53	4.6
Inertsil ODS-SP	1.93	0.04	2.1	2.49	0.06	2.6	11.40	0.61	5.3
Puresil (Waters) *	2.83	-	-	3.71	-	-	19.09	-	-

値は4社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), *: 粒径 5 μ m, 内径 4.6mm 長さ 150mm

Table 6 各カラムにおける分離度

	アセトアミノフェン / カフェイン			カフェイン / I.S.			I.S. / エテンザミド		
	AVE (N=4)	SD	CV (%)	AVE (N=4)	SD	CV (%)	AVE (N=4)	SD	CV (%)
YMC-Pack ProC18	4.39	0.57	13.0	24.82	1.32	5.3	3.78	0.35	9.2
Hydrosphere C18	4.82	0.59	12.2	24.47	1.47	6.0	4.77	0.29	6.1
Inertsil ODS-SP	3.87	0.49	12.6	23.91	1.76	7.4	4.11	0.23	5.7
Puresil (Waters) *	5.61	-	-	33.02	-	-	4.10	-	-

値は4社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), *: 粒径 5 μ m, 内径 4.6mm 長さ 150mm

また各社同検体, 同測定条件によりシステム再現性を確認したところ, 各社の再現性は良好であった (Table 7). 定量値においては粒径 3 μ mと5 μ mの対照カラムでほぼ同じ値を示し (Table 8), 十分用いることができると考えられた.

Table 7 各カラムにおけるシステム再現性

再現性 (%)	A社	B社	C社	D社		A社	B社	C社	D社		A社	B社	C社	D社	
	アセトアミノフェン				AVE	カフェイン				AVE	エテンザミド				AVE
YMC-Pack Pro C18	0.09	0.12	0.04	0.21	0.12	0.26	0.10	0.04	0.12	0.13	0.03	0.12	0.04	0.06	0.06
Hydrosphere C18	0.03	0.14	0.01	0.26	0.11	0.10	0.16	0.01	0.20	0.12	0.03	0.16	0.02	0.10	0.08
Inertsil ODS-SP	0.02	0.13	0.08	0.21	0.11	0.03	0.13	0.08	0.18	0.11	0.06	0.13	0.06	0.06	0.08
Puresil (Waters)*	0.12	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	0.10	-	-	-	-

* : 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm,

Table 8 各カラムにおける定量値 (%)

	アセトアミノフェン			カフェイン			エテンザミド		
	AVE (N=4)	SD	CV (%)	AVE (N=4)	SD	CV (%)	AVE (N=4)	SD	CV (%)
YMC-Pack ProC18	99.8	0.15	0.2	100.2	0.17	0.2	101.2	1.18	1.2
Hydrosphere C18	99.8	0.06	0.1	100.0	0.33	0.3	100.2	0.34	0.3
Inertsil ODS-SP	99.8	0.25	0.3	100.0	0.44	0.4	100.1	0.42	0.4
Puresil (Waters)*	99.9	-	-	99.8	-	-	100.3	-	-

値は4社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), * : 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm

2. ノスカピン, デキストロメトルファン臭化水素酸塩, クロルフェニラミンマレイン酸塩

6社においてTable 2の分析条件で, 粒径 3 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 75 mmのODSカラムを用いて試験したところ, いずれも良好な分離を示した. Fig. 2にクロマトグラムの例を示す. なお, 今回, 内径 4.6 mm 長さ 75 mm (粒径 3 μ m) のカラムが文献²⁾の方法に応用可能か検討したところ, 移動相組成を 60:40 から 52:48 (13:12) に変更したところ各成分が良好に分離した. このことは, 現在のODSカラムの品質が試験法の作成された当時のものとは若干異なるためと思われた.

また対照カラムとして, 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm の ODS カラム (Inertsil ODS-2, YMC-ODS AM302 : それぞれ 1 社のみ使用) を用いて比較したところ, 分析時間を約半分に短縮することができた (Table 9).

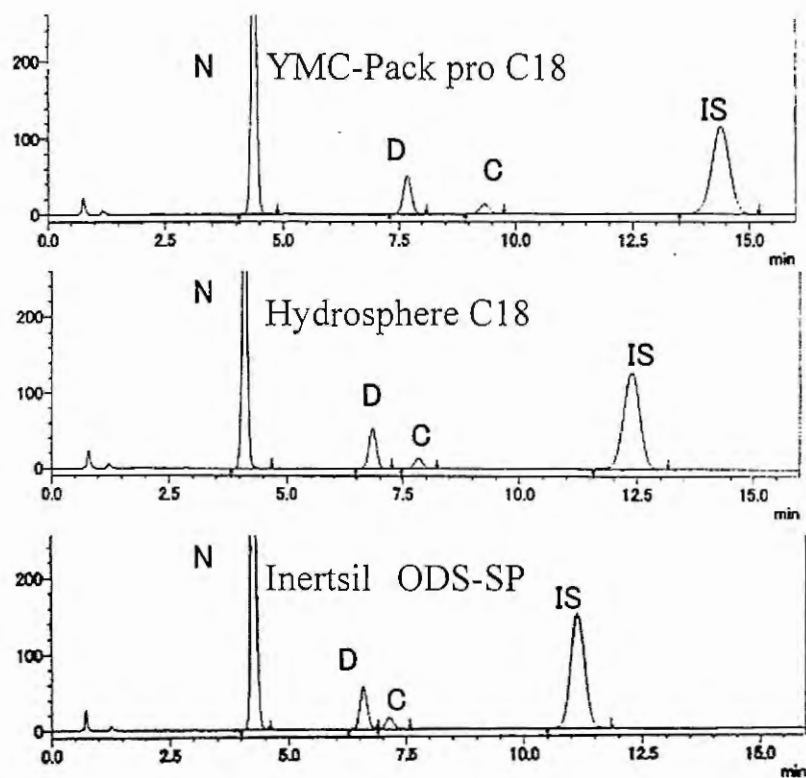


Fig. 2 各カラム (粒径 $3\mu\text{m}$, 内径 4.6mm , 長さ 75mm) のクロマトグラム
 N: ノスカピン, D: デキストロメトルファン, C: クロルフェニラミン

Table 9 各カラムにおける保持時間 (分)

	ノスカピン			デキストロ メトルファン			クロルフェニラ ミン			I. S.		
	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV
YMC-Pack ProC18	4.5	0.33	7.3	7.9	0.65	8.3	9.7	0.91	9.4	14.8	1.15	7.8
Hydrosphere C18	4.3	0.29	6.9	7.1	0.54	7.6	8.3	0.69	8.4	13.0	0.95	7.3
Inertsil ODS-SP	4.3	0.26	6.1	6.7	0.42	6.3	7.4	0.50	6.8	11.4	0.82	7.2
Inertsil ODS-2*	7.5	-	-	12.7	-	-	16.07	-	-	24.9	-	-
YMC-ODS-AM302*	7.9	-	-	13.8	-	-	17.27	-	-	23.8	-	-

値は6社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), *: 粒径 $5\mu\text{m}$, 内径 4.6mm 長さ 150mm

さらに, 今回用いた粒径 $3\mu\text{m}$ の充てん剤の品質の違いが分離条件に及ぼす影響を調べたところ, 各ピークの保持時間は, 疎水性相互作用が大きい充てん剤ほど長い傾向を示した. このことについては, ペアードイオンであるラウリル硫酸ナトリウムの影響が示唆された.

また, 各カラムの分離度については, Inertsil ODS-SP でのデキストロメトルファンとクロルフェニラミンが 2.1 と若干小さかった以外は, ほぼ良好な分離を得ることができ, 定量値においても, 対照カラムとほぼ同様の値を得ることができた (Table 10 及び Table 11).

Table 10 各カラムにおける分離度

	ノスカピン/デキストロ メトルファン			デキストロメトルファン /クロルフェニラミン			クロルフェニラミン/ I. S.		
	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV
YMC-Pack ProC18	13.1	0.70	5.4	5.0	0.37	7.3	9.0	0.56	6.2
Hydrosphere C18	11.4	0.67	5.9	3.4	0.30	9.0	9.1	0.62	6.8
Inertsil ODS-SP	9.4	0.50	5.3	2.1	0.27	13.0	9.0	0.26	2.9
Inertsil ODS-2*	15.0	-	-	6.8	-	-	11.9	-	-
YMC-ODS-AM302*	16.2	-	-	6.6	-	-	8.9	-	-

値は6社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), * : 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm

Table 11 各カラムにおける定量値 (%)

	ノスカピン			デキストロ メトルファン**			クロルフェニラミン		
	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV	AVE	SD	CV
YMC-Pack ProC18	100.2	1.16	1.2	96.0	0.91	1.0	101.0	1.52	1.5
Hydrosphere C18	100.7	0.97	1.0	96.7	0.49	0.5	101.1	1.13	1.1
Inertsil ODS-SP	100.6	0.63	0.6	96.6	0.47	0.5	100.8	0.89	0.9
Inertsil ODS-2*	101.9	-	-	95.3	-	-	100.1	-	-
YMC-ODS-AM302*	99.7			95.5			100.6		

値は5社の平均 (AVE), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (CV), * : 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm, ** : 無水物 ($C_{18}H_{25}NO \cdot HBr$) としての含量

さらに, Inertsil ODS-SP を用いて耐久性試験を行い, 連続 100 回注入を試したが, 定量値, 分離度とも影響は確認されなかったため, 日常ルーチン試験に使用可能であると考えられた.

まとめ

今回, かせ薬成分について, 成書に用いられている粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 150 mm の ODS カラムに替え, 粒径 3 μ m, 内径 4.6 mm 長さ 75 mm の ODS カラムを用いた結果, 分離度, 定量値, 再現性に問題なく, 分析時間の短縮化を達成することができた. また, Table 4 に示した通り, 汎用機器で精度良く分析可能であったことから, 広く適用されることが期待できると考えられた.

文献

- 1) 日本大衆薬工業協会編 一般用医薬品の試験法Ⅱ—かせ薬・解熱鎮痛薬の試験法— p57-58 (2000)
- 2) 武田 寧ら: 医薬品迅速分析法-8-, 月刊薬事 27, 589-593 (1985)
- 3) 勝部 祐至ら: 家庭薬研究, No. 27, p 36-40 (2008)

口腔内崩壊錠の崩壊速度に及ぼす空隙率と崩壊剤の影響

Effect of Porosity and Disintegrants on the Disintegration Rate of Orally Disintegrating Tablets

富山県薬事研究会製剤部会 一口腔内崩壊錠グループ

Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association

松平 直久 Naohisa MATSUHIRA	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	五十嵐 一彦 Kazuhiko IGARASHI	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
本田 陽彦 Haruhiko HONDA	小林化工株式会社 Kobayashi Kako Co., Ltd.	日水 裕子 Yuko HIMIZU	大協薬品工業株式会社 Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
川岸 貴博 Takahiro KAWAGISHI	第一薬品株式会社 Daiichiyakhin Co., Ltd.	慶伊 和明 Kazuaki KEII	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kougyou Co., Ltd.
松原 健 Takeshi MATSUHIRA	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co., Ltd.	麻生 健治 Kenji ASO	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
津幡 泰三 Taizo TSUBATA	東亜薬品株式会社 Toa Pharmaceutical Co., Ltd.	茶木 弘一 Kouichi CHAKI	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
宇野 正敏 Masatoshi UNO	富士製薬工業株式会社 Fuji Pharma Co., Ltd.	永井 秀昌 Hidemasa NAGAI	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research
明 長良 Nagayoshi MYO	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research		

緒 言

近年、小児や高齢の患者に対する服薬コンプライアンス改善のため、口腔内速崩壊錠が相次いで研究開発されている。口腔内速崩壊錠が目標とする崩壊時間は口腔内で30秒以内と非常に速く、各種添加剤の配合比率などを考慮して製剤設計を行う必要がある。添加剤の中でも、特に崩壊剤の種類や配合量が製剤設計において重要ではあるが、良好なテクスチャーを得るためには空隙率もまた重要な因子となってくる。しかしながら、製薬業界において錠剤の崩壊速度と空隙率に関する実験データは少ない。このため、本研究では空隙率が崩壊時間に及ぼす影響を測定した。また併せて、各種崩壊剤の違いが崩壊性に与える影響も検討した。

実験方法

1. 口腔内崩壊錠の崩壊速度に及ぼす空隙率の影響

1-1. 造粒処方とバインダー

主薬 (マーカー)	アセトアミノフェン	22.5 g	バインダー HPC-L
賦形剤	D・マンニトール	150.0 g	6.0 g (5%水溶液 ca. 120 g)
賦形剤	乳糖 (200M)	90.0 g	
崩壊剤	L-HPC (LH-32)	30.0 g	
合計		292.5 g	

1-2. 造粒

上記処方を流動層造粒機 (FL-LABO, フロイント産業(株)) に仕込み、設定したスプレー速度で造粒を行った。120 g のスプレー量に達したら、スプレーのみ停止し、造粒物を終点(43℃)まで乾燥した。ヒーターを切り、排気温度が 40℃になるまで流動させた後に排出した。造粒物は 1400 μm 篩過品を物性評価の試料とした。

1-3. 物性評価

単発打錠機 (SE WORK PRESS WPM-2, (株)東洋マテリアル, 臼杵; 直径 9 mm, R12, 打圧 7 kN) を用い打錠圧を変えて (1.0, 3.0, 5.0, 7.0 kN) 打錠し、崩壊度と硬度を測定した (n=5)。また、錠剤体積と真比重から以下の計算式に基づいて空隙率を計算した。

$$\text{空隙率(\%)} = \{ \text{錠剤の体積} - (\text{錠剤の重量} / \text{原料成分の真比重}) \} / \text{錠剤の体積} \times 100$$

2. 口腔内崩壊錠の崩壊速度に及ぼす崩壊剤の影響

2-1. 打錠処方

タブレットズ	298.5 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g (0.5%)
崩壊剤	①L-HPC (LH-21 低置換度ヒドロキシプロピルセルロース 信越化学(株)製) ②ECG-505 (カルボキシメチルセルロースカルシウム 五徳薬品(株)製) ③HPS (ヒドロキシプロピルスターチ フロイント産業(株)製) ④PCS (部分α-化でんぷん 旭化成ケミカルズ(株)製) ⑤エフメルト (口腔内崩壊錠に使用される崩壊性のある賦形剤 富士化学工業(株)製)

2-2. 物性測定

上記処方を単発打錠機 ((株)岩黒製作所, 臼杵; 直径 10 mm, 隅角 R) に仕込み、打錠圧および重量をほぼ一定 (340 mg) にして打錠し、錠剤の物性測定 (崩壊度および硬度) に用いた。崩壊度は崩壊試験器 (NT-2HS, 富山産業(株)) を用い、硬度は硬度計 ((株)三力製作所) を用いてそれぞれ 6 錠ずつ測定した。

実験結果および考察

1. 口腔内崩壊錠の崩壊速度に及ぼす空隙率の影響

実験 1 の結果より、錠剤の空隙率が大きくなるほど崩壊時間が早くなる傾向が認められ、特に空隙率を 20%以上にすることにより、崩壊性の改善が認められた(図 1)。空隙率が大きくなれば、毛細管現象によって錠剤内に浸潤してくる水の影響をより受けることになるため、崩壊性は向上すると予想される。今回の実験結果よりこのことが確認された。

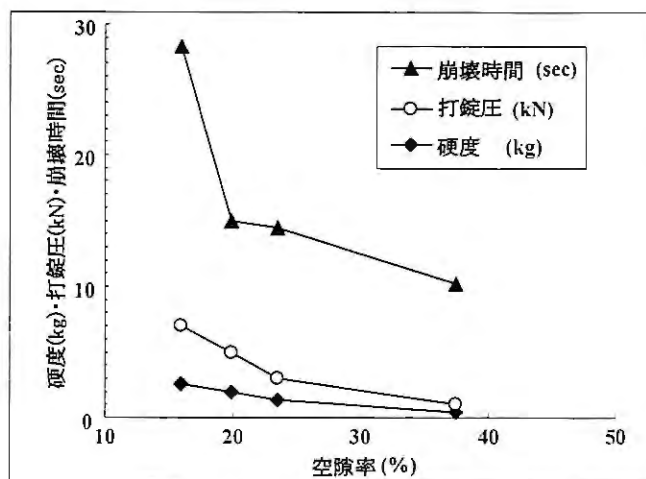


図 1 空隙率の違いによる崩壊時間の評価

2. 口腔内崩壊錠の崩壊速度に及ぼす崩壊剤の影響

また、実験2の結果より、各種崩壊剤の違いによって崩壊時間に差が認められた(図2)。中でも L-HPC は崩壊時間の顕著な短縮が認められ、硬度の低下も認められなかったことから、今回の処方に関しては L-HPC の崩壊性が優れていると言える。L-HPC はヒドロキシプロポキシル基含量が 10~12.9%のセルロース誘導体であり、水に不溶で膨潤する性質を持つ崩壊剤である。

今回の実験結果より、20%以上の空隙率を確保することと適切な崩壊剤を選択することが、口腔内崩壊錠の製剤設計において重要であることが結論付けられた。

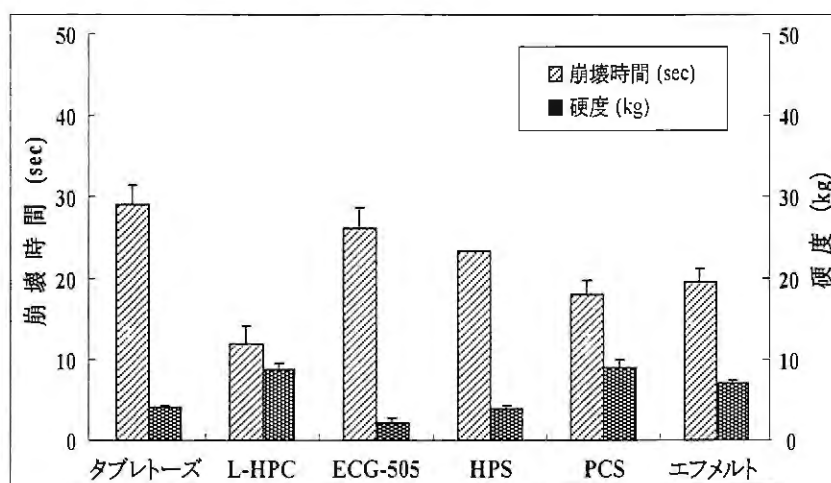


図2 各種崩壊剤による崩壊時間と硬度の評価

胆汁酸によるタンパク分解酵素活性の促進効果

Potentiating Effect of Bile Acids on the Proteolysis by Protease

松永 孝之、永井 秀昌

Takayuki MATSUNAGA Hidemasa NAGAI

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for

Pharmaceutical Research

緒言

胆汁酸はコレステロールの代謝産物であり、肝臓中で生成された後胆汁成分として十二指腸内に分泌される。これまで胆汁酸には、利胆作用、胆石溶解作用及び肝障害に対する保護作用などが知られているが¹⁾、近年、免疫調節作用やアポトーシス抑制作用など新たな薬理作用を有することが報告されている²⁾。また、胆汁酸の受容体が同定され、胆汁酸や脂質の代謝及び糖質の代謝制御に胆汁酸が関与することが明らかになってきている³⁾。

胆汁酸は、両親媒性で界面活性作用を有するため、消化液中の脂肪を乳化させ脂肪粒子の表面積を増大することによりリパーゼが作用しやすくなり、分解が促進される⁴⁾。一方、タンパク分解酵素活性については、ペプシン活性に対しては胆汁酸は阻害作用を示すが⁵⁾、トリプシン・キモトリプシン活性に対しては胆汁酸混液が促進作用を示すことが近年報告されている⁶⁾。そこで、トリプシン・キモトリプシンを用いて、遊離型及び抱合型胆汁酸、動物胆のタンパク分解酵素活性に対する効果を比較検討したので報告する。

実験方法

1. 使用試薬 本試験で用いた胆汁酸は、コール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、デオキシコール酸 (DCA) 及びそれらのグリシン (G) またはタウリン (T) 抱合体の Na 塩である (以上、カルビオケム)。また、動物胆は、熊胆 (産地不明)、牛胆及び豚胆 (国産) を用いた。酵素基質としては、ヘモグロビン (和光純薬)、 β -ラクトグロブリン、ミオグロビン、牛血清アルブミン (BSA)、オボアルミン (以上シグマ) 及びベンジルアルギニン-p-ニトロアニリド (バケム) を用いた。また、タンパク分解酵素としては、トリプシン (和光純薬) 及びキモトリプシン (シグマ) を各々反応緩衝液に溶解して用いた。また、電気泳動用のポリアクリルアミドゲルとして、SuperSep 15% (和光純薬) を、銀染色は Silver Staining Kit, Protein (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いた。
2. 胆汁酸混液の調製 本試験で用いた胆汁酸混液の組成は、12.8 mM GCA、12.8 mM GCDCA、6.4 mM GDCA、3.2 mM TCA、3.2 mM TCDCA 及び 1.6 mM TDCA であり、人胆汁中の胆汁酸組成を模したものである⁷⁾。これらを、蒸留水に溶解して総胆汁酸濃度 40mM 溶液を調製した。
3. タンパク分解酵素活性の測定 1%タンパク溶液 250 μ l に胆汁酸混液 125 μ l 及び 10 mM CaCl₂ 含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) 10

5 μ l 加えて 37°C、5 分間前処理した。その後、タンパク分解酵素溶液（1% トリプシン及びキモトリプシン溶液を各々 10 μ l）を添加して 37°C、15 分間反応させた。5% トリクロロ酢酸溶液 500 μ l 添加して反応停止し、5 分間の氷冷した後遠心分離（10,000 rpm、5 分間）して得られた上清の吸光度（280 nm）を測定した。

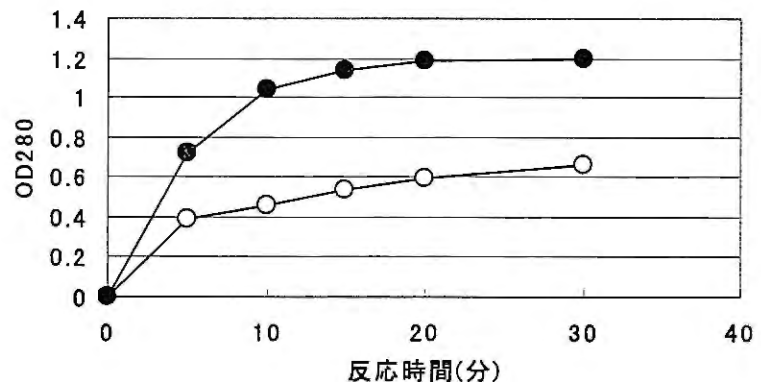
4. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によるタンパク分離 上記条件で酵素処理したタンパク反応液 100 μ l にサンプルバッファー「125 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)、20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、4% SDS、0.04% ブロモフェノールブルー」400 μ l 添加し、100°C、2 分間加熱して反応を停止した。この溶液をさらにサンプルバッファーで 10 倍に希釈した後、37°C で 30 分間加温した。その後、希釈した検体（5 μ l）を SDS-PAGE により分離した（泳動条件: 15 mA/ゲル、1.5 時間、泳動バッファー: 25 mM トリス、192 mM グリシン、0.1% SDS）。泳動後のゲルは Silver Staining Kit を用いて銀染色を行い、タンパクのバンドパターンを比較した。

結 果

1. タンパク分解酵素による各種タンパク分解に対する胆汁酸混液の効果

タンパク分解酵素の基質として汎用される BSA を用いて、タンパク分解に対する胆汁酸混液の効果を検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、BSA は酵素反応の時間に依存して分解が進行するが、胆汁酸混液が共存することにより反応は明らかに亢進し、反応 20 分後に定常状態に達した。

Fig. 1 トリプシン、キモトリプシンによる牛血清アルブミン分解に対する胆汁酸の効果



次に、BSA 含めて 5 種類

のタンパクを基質として用いた時の胆汁酸混液の効果を Table 1 に示した。その結果、ミオグロビンでは 2 mM 胆汁酸混液では 2.17 倍、10 mM では 9.55 倍と顕著な分解の亢進が認められた。また、BSA 及びオボアルブミンでも 10 mM で 2 倍前後の分解亢進が見られたが、ヘモグロビン及び β ラクトグロブリンでは明らかな亢進効果は見られなかった。そこで、以降の試験ではタンパク基質としてミオグロビンを用いた。

○—牛血清アルブミン ●—牛血清アルブミン+10mM胆汁酸混液

Table 1 5種タンパク分解に対する胆汁酸の効果

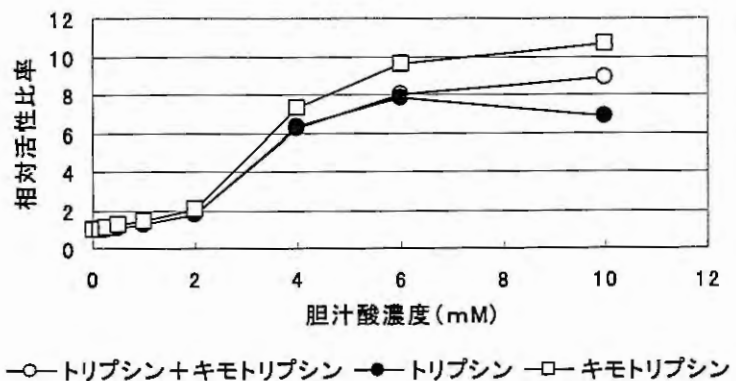
	胆汁酸混液	
	2mM	10mM
ミオグロビン	2.17	9.55
牛血清アルブミン	2.11	2.25
オボアルブミン	1.64	1.94
ヘモグロビン	1.45	0.98
β -ラクトグロブリン	1.04	0.79

各値は、コントロールに対する相対活性比率を示す

2. タンパク分解酵素によるミオグロビン分解に対する胆汁酸混液の効果

胆汁酸混液の濃度を変えてトリプシン、キモトリプシン単独または併用時の酵素活性に対する効果を検討した。その結果、Fig. 2に示すように、用量依存的に活性の亢進が見られ、2mM以上の濃度で急激に活性が亢進した後キモトリプシン単独及び両酵素併用時では10mMでほぼ最大に達した。一方、トリプシンでは5mM胆汁酸混液で酵素反応が最大に達した後低下した。

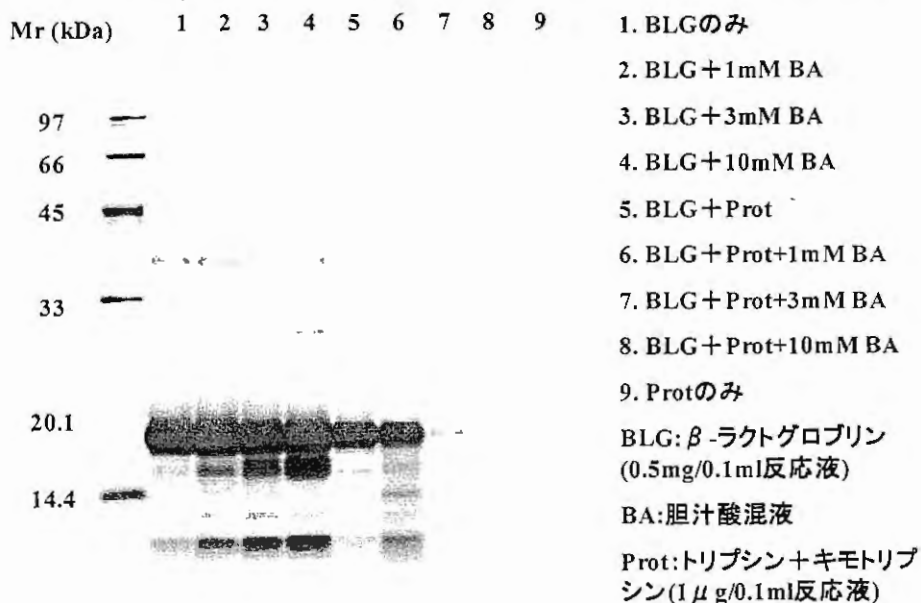
Fig. 2 胆汁酸によるタンパク分解酵素活性の亢進作用



○—トリプシン+キモトリプシン ●—トリプシン □—キモトリプシン

3. タンパク分解に対する胆汁酸混液の亢進効果の電気泳動分析による解析

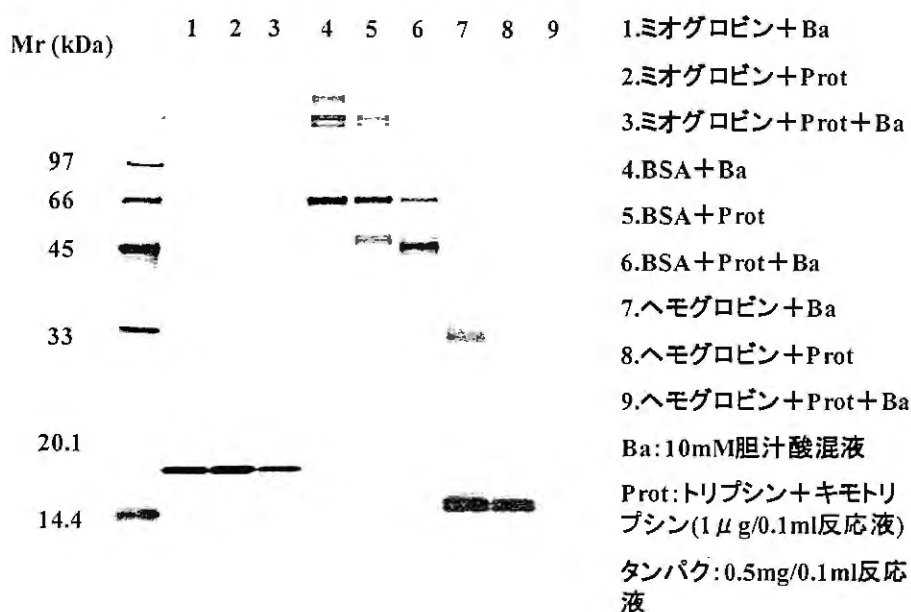
Fig.3 胆汁酸によるβ-ラクトグロブリン分解作用の亢進



最初に、基質としてβラクトグロブリンを用いて検討した。基質に胆汁酸混液を添加すると胆汁酸の濃度に依存して低分子側のバンドが増加する傾向が見られた (Fig. 3)。一方、基質にトリプシン及びキモトリプシン添加すると基質のバンドが若干減少した。これに胆汁酸混液を添加すると基質バンドの減少がさらに進行し、3mM及び10mM胆汁酸では基質及び低分子側バンド共に顕著に減少した。

次に、他のタンパクでも検討した。その結果、Fig. 4に示すように、ミオグロビンでは胆汁酸混液の添加によりタンパクバンドが減少した。また、BSAでもタンパクバンドの減少と共に分解物と思われる低分子側のタンパクバンドの増加が見られた。さらに、ヘモグロビンの場合も胆汁酸混液の添加でバンドがほぼ消失し、分解物と思われるスメアーが低分子側に見られた。

Fig. 4 胆汁酸によるたんぱく分解作用の亢進



4. タンパク分解酵素によるミオグロビン分解に対する胆汁酸及び動物胆の効果

4種の遊離型胆汁酸のタンパク分解酵素活性に対する効果を比較検討した (Table 2)。その結果、DCAとCDCAではタンパク分解の顕著な亢進が見られ、4 mMでは前者で約9倍、後者でも約6倍の活性亢進を示した。一方、UDCA及びCAでも活性亢進は認めるものの、前二者に比べて弱いものであった。さらに、タウリン抱合型でも検討したが、ケノデオキシコール酸で抱合型の方が若干活性の亢進作用が強い傾向を認めた以外は、遊離型と抱合型でほぼ同程度の作用を示した。

Table 2 遊離型及び抱合型胆汁酸によるタンパク分解酵素活性の亢進作用

	遊離型	タウリン抱合型
コール酸	1.88	1.67
ウルソデオキシコール酸	2.72	3.19
デオキシコール酸	8.98	8.98
ケノデオキシコール酸	5.93	7.14

各値は、コントロールに対する相対活性比率を示す

次に、3種動物胆の作用を比較検討した。その結果、Table 3に示すように、3種動物胆は用量依存的にタンパク分解酵素活性を亢進し、5 mg/ml作用時には熊胆で9.5倍、牛胆では10.9倍、豚胆では10.4倍の活性亢進が認められたが、他の作用濃度の効果を比較しても、熊胆が若干他2者に比べて弱い傾向が見られた。

Table 3 動物胆によるタンパク分解酵素活性の亢進作用

作用濃度(mg/ml)	0.5	2.0	5.0
熊胆	1.51	6.80	9.51
牛胆	2.85	9.27	10.86
豚胆	2.50	8.84	10.43

各値は、コントロールに対する相対活性比率を示す

5. タンパク分解酵素による合成基質の分解に対する胆汁酸混液の効果

次に、胆汁酸が酵素自身あるいは基質であるタンパクに作用して活性亢進を生じるのか検証するため、低分子の合成基質を用いてトリプシンによる分解に対する作用を検討した (Fig. 5)。その結果、胆汁酸の用量に依存して活性が阻害され、

10mM 胆汁酸では約 40% の基質分解に抑制された。

考 察

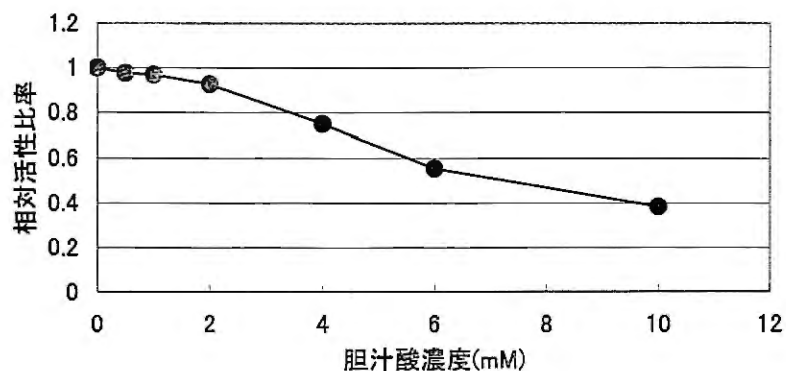
胆汁酸は両親媒性物質であり、水溶液中ではミセルを形成して脂溶性ビタミンなどの吸収促進や胆石溶解作用を有することが知られている⁸⁾。また、この性質により脂肪の溶解性を高めるため、リパーゼによる分解が亢進する

ことがよく知られている⁴⁾。一方、プロテアーゼによるタンパク分解に対する作用についてはあまり報告がない。唯一、胆汁酸がペプシン活性を阻害するとの報告とトリプシン及びキモトリプシン活性を亢進するとの報告があるのみである⁶⁾。そこで、プロテアーゼによるタンパク分解に対する遊離型、抱合型胆汁酸及び動物胆の効果を検討した。

G a s s ら⁶⁾ は、ヒト胆汁中の胆汁酸組成及び濃度に相当する 6 種の抱合型胆汁酸混液を用いている。そこで、我々もこの胆汁酸混液を用いて検討した結果、吸光度法によるタンパク分解の測定で、ミオグロビン、BSA 及びオボアルブミンで分解の亢進を認めた。前 2 者については、SDS-PAGE においても分解促進によるタンパクバンドの減少を認めた。一方、ヘモグロビンは 2 mM 胆汁酸混液で若干のタンパク分解の亢進を認めるが、10 mM では亢進作用は消失した。また、 β -ラクトグロブリンでは、2 及び 10 mM 胆汁酸混液では亢進作用は認められず、10 mM では阻害作用が見られた。しかし、SDS-PAGE では、両タンパク共に胆汁酸混液による分解亢進が認められた。この吸光度法と SDS-PAGE における結果の相違は、反応液中のトリプシン及びキモトリプシン濃度の差によるものと思われる。即ち、SDS-PAGE で分析したタンパク分解反応液中の酵素濃度は、吸光度法の 1/20 であり、ヘモグロビン及び β -ラクトグロブリンでは高濃度の酵素存在下では胆汁酸混液の促進効果は発現しにくかったものと思われる。逆に、オボアルブミンの分解では、SDS-PAGE 法では胆汁酸混液による促進効果は認めないとされているが、吸光度法では約 2 倍の促進が認められたのも酵素濃度によるものと考えられる。

プロテアーゼによるタンパク分解に対する胆汁酸の効果をトリプシン、キモトリプシンの単独時または併用時で検討した。その結果、両酵素併用時及びキモトリプシン単独時では胆汁酸の濃度依存的にタンパク分解は亢進し、10 mM でほぼ最大に達した。一方、トリプシンでは 6 mM 胆汁酸で最大に達した後 10 mM では減少した。胆汁酸は両親媒性の特性から、タンパクの立体構造に変化をもたらすものと考えられる。この特性から、胆汁酸がタンパクである基質またはプロテアーゼに作用してタンパク分解を促進しているものと推察される。そこで、基質を低分子の合成基質に代えてトリプシンによる分解に対する胆汁酸の効果を検討した結果、胆汁酸の濃度依存的に活性は低下した。このことは、胆汁酸は酵素自体には阻害的に作用するが、同時に基質であるタンパクの構造も変えて酵素が作用しやすくなるため、全体的には活性の亢進が見られたものと推察される。E t o ら⁵⁾ が、ペプシンに対して胆汁酸が阻害的に作用すると報告しているが、彼らは合成基質を用いて評価していることから、酵素に対

Fig. 5 トリプシン活性に対する胆汁酸の作用



する阻害作用のみ見られたのかもしれない。タンパクを用いての再評価が必要であると思われる。

個々の胆汁酸でプロテアーゼによるタンパク分解の亢進作用に差はあるのか検討した。その結果、CA及びUDCAに比べてDCA及びCDCAの方が亢進作用は強かった。これは、臨界ミセル濃度(CMC)の差によるものと思われる。また、タウリン抱合型でもCDCAを除いて遊離型と同程度の亢進作用を示した。さらに、抱合型胆汁酸を主要成分とする熊胆、牛胆及び豚胆の作用を検討したところ、熊胆に比べて牛胆及び豚胆の方がタンパク分解の亢進作用が強いことが明らかになった。今回用いた熊胆の胆汁酸組成は不明であるが、TUDCAが主要成分で、他にTCDC A及びTCAが含有されているものと思われる。一方、牛胆ではDCA、DCA及びCAのタウリン及びグリシン抱合体が、豚胆ではヒオデオキシコール酸のグリシン抱合体、CDCAのタウリン及びグリシン抱合体が含有されている。動物胆におけるタンパク分解の効力の差は、この胆汁酸組成及び濃度の差に起因しているものと思われる。

今回の結果では、食品中のタンパクとしてはオボアルブミンに対する作用しか見ていないが、Gassら⁶⁾は、食品タンパクサプリメントでも胆汁酸による分解の亢進が認められることを報告している。このことから、胆汁酸は脂肪消化だけでなく食品タンパクの消化においても促進作用を発揮しているものと推察される。そのため、胆汁分泌が低下している状態では、動物胆などの利胆作用は、消化機能の改善に有効であると思われる。

文 献

- 1) 梶山 梧郎、胆汁酸製剤、臨床と研究、73、2203-2210 (1996)
- 2) 藤原豊博、ウルソデオキシコール酸の新たな展開、Pharma Medica、16、147-158 (1998)
- 3) Pellicciari, R., Costantino, G. and Fiorucci, S.: Farnesoid X receptor: From structure to potential clinical application, J. Med. Chem., 48, 5383-5403(2005)
- 4) Hofmann, A.F. and Roda, A.: Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: An overview of the problem, J. Lipid Res., 25, 1477-1489(1984)
- 5) Eto, T. and Tompkins, R.K.: Inhibition of pepsin activity by ursodeoxycholic acids and chenodeoxycholic acids, Am. J. Surg., 150, 564-567(1985)
- 6) Gass, J., Vora, H., Hofmann, A.F., Gray, G.M. and Khosla, C.: Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids, Gastroenterol., 133, 16-23(2007)
- 7) Hoffman, A.: Intestinal absorption of bile acids and biliary constituents: The intestinal component of the enterohepatic circulation and the integrated system. In Jacobson, E.D. and Walsh, J.H. ed., Physiology of gastrointestinal tract, Vol.2, Raven, New York, 1994, 1845-1865
- 8) 大菅俊明、Urso therapyの現況、Tokyo Tanabe Quarterly、82-87 (1986)