

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第2報）—生薬成分について—

Study on shortening of analysis time in high performance liquid chromatography. II.

— crude drugs —

安藤英広 Hidehiro ANDO	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	中村裕貴代 Yukiyo NAKAMURA	株式会社安全性研究センター Anzensei Kenkyu Center Co., Ltd.
永井喜美 Kimi NAGAI	株式会社延寿堂 Enjudo Co., Ltd.	市井満美子 Mamiko ICHII	救急薬品工業株式会社 KyuKyu Pharmaceutical Co., Ltd.
中村直子 Naoko NAKAMURA	共栄製薬工業株式会社 Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.	藤井 希 Nozomi FUJII	キョクトウ株式会社 Kyokuto Co., Ltd.
俣野 豊 Yutaka MATANO	クラシエ製薬株式会社 Kracie Pharma, Ltd.	疋田真穂 Maho HIKITA	クラシエ製薬株式会社 Kracie Pharma, Ltd.
山口優子 Yuko YAMAGUCHI	株式会社廣貫堂 Kokando Co., Ltd.	土林智美 Tomomi TUCHIBAYASHI	株式会社廣昌堂 Koshodo Co., Ltd.
堀田好美 Yoshimi HOTTA	大同製薬株式会社 Daido Pharmaceutical Co., Ltd.	中島恵子 Keiko NAKAJIMA	中央薬品株式会社 Chuo Pharmaceutical Co., Ltd.
晒 由香里 Yukari SARASHI	中央薬品株式会社 Chuo Pharmaceutical Co., Ltd.	横田洋一 Yoichi YOKOTA	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。これまでに当部会では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に使用する ODS カラムを日本薬局方などの公定書で汎用される粒径 5 μm (内径 4.6 mm、長さ 150 mm) から粒径 3 μm (内径 4.6 mm、長さ 75 mm) に変更することで分析時間の短縮化を図ってきた。昨年度は分析時間が長く、夾雑物との分離が困難とされる生薬ニンジン中のギンセノシド R_{g1} 定量試験、オウレン・オウバク中のベルベリン定量試験について達成している¹⁾。今回著者らは昨年度の研究成果をニンジン配合製剤、及びオウレン・オウバク配合製剤について応用したので報告する。また、新たに六神丸等の強心剤に使用される生薬センソに含まれるブフォステロイド類 3 種、ブファリン、シノブファギン及びレジブフォゲニンについて、日本薬局方の成分含量試験法に準じ、分析時間短縮化の検討を行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

- ギンセノシド R_{g1} (和光純薬工業)
- ギンセノシド R_e (和光純薬工業)
- ベルベリン標準品
- ブファリン (和光純薬工業)
- シノブファギン (和光純薬工業)
- レジブフォゲニン (和光純薬工業)
- ニンジン配合製剤 (Table 1)
- ニンジン配合製剤の
ニンジン乾燥エキス末ブランク試料

Table 1. ニンジン配合製剤のモデル製剤の

配合と1日量(mg)

配合	mg	配合	mg	
人參乾燥エキス末	450	オウギ末	200	
延胡索エキス	60	沈降炭酸 Ca	1253	
蛇床子エキス	30	馬鈴薯澱粉		
オキゾミチン末	100	寒梅粉		
牛黄	5	サリチル酸		
厚朴末	90	タルク		
当帰末	200	薬用炭		
芍薬末	200	アラビアゴム末		
川芎末	200	精製セラック		
桂皮末	200	合計		2988

市販品オウレン・オウバク配合製剤 8 種類
日局センソ

2. 試験方法

(1) ニンジン配合製剤の分析²⁾

本品の粉末約 1 g を精密に量り、薄めたメタノール (3→5) 30 mL を加えて 15 分間振り混ぜ、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 50 mL とし、遠心分離して上澄液を分取した。上澄液をろ過し、ろ液 25 mL を正確にとり、水を加えて正確に 50 mL とした。この液 5 mL を正確にとり、Bond Elut Jr. SAX (VARIAN) と Sep-pak plus C18 (Waters) を連結させたカラムに通した後、Bond Elut Jr. SAX を外し、Sep-pak plus C18 を薄めたメタノール (3 → 10) 5 mL で洗浄した後、薄めたメタノール (3→5) 5 mL で溶出した。この液を薄めたメタノール (3→5) で正確に 5 mL とし、試料溶液とした。

ギンセノシド R_{g1} 約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (3→5) を加えて正確に 100 mL とし、ギンセノシド R_{g1} 標準溶液とした。

〈HPLC 条件〉

検出器: 紫外吸光光度計(測定波長:203 nm)
カラム: ① TSK-GEL ODS-80Ts (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
② L-column ODS (粒径 3 μm、内径 4.6 mm、長さ 75 mm)
③ Unison UK-C18 (粒径 3 μm、内径 4.6 mm、長さ 75 mm)
カラム温度: 30°C 付近の一定温度
移動相: 0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム試液/アセトニトリル混液(4:1)
流量: 1 mL/min
注入量: 10 μL

〈システム適合性の評価〉

ギンセノシド R_{g1} 及びギンセノシド R_e 約 1 mg を精密に量り、薄めたメタノール(3→5)に溶かして 10 mL とする。この液 10 μL につき上記の条件で操作したとき、ギンセノシド R_{g1}、ギンセノシド R_e の順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である。

〈システム再現性の評価〉

標準溶液 10 μL につき上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ギンセノシド R_{g1} のピーク面積の相対標準偏差(RSD)は 1.5%以下である。

(2) オウレン・オウバク配合製剤の分析

4 社の社内試験方法に従って試料溶液、及びベルベリン標準溶液を調製し、4 種類の条件にて分析を行った。各条件ともに日常分析で使用しているカラムに加えて、粒径 3 μm のカラム Cadenza CD-C18 (内径 4.6 mm、長さ 75 mm)を使用した。

〈使用カラム〉

- 条件 1: CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm)
- 条件 2: CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
- 条件 3: CAPCELL PAK C₁₈ UG120 (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
- 条件 4: Mightysil RP-18 GPS (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)

〈システム再現性の評価〉

標準溶液 10 μL につき上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ベルベリンのピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は 1.5% 以下である。

(3) センソの分析

センソの粉末をデシケーター (シリカゲル) で 24 時間乾燥し、その約 0.5 g を精密に量り、メタノール 50 mL を加え、還流冷却器を付けて水浴上で 1 時間加熱し、冷後、ろ過する。残留物はメタノール 30 mL で洗い、洗液及びろ液を合わせる。この液にメタノールを加えて正確に 100 mL とする。この液 10 mL を正確に量り、内標準溶液 5 mL を正確に加えた後、メタノールを加えて正確に 25 mL とし、試料溶液とした。

ブファリン約 10 mg、シノブファギン約 20 mg、レジブフォゲニン約 20 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 100 mL とする。この液 10 mL を正確に量り、以下試料溶液と同様に操作し、ブフォステロイド混合標準溶液とした。

〈HPLC 条件〉

- 検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 300 nm)
- カラム:
- ① YMC-Pack ODS Pro C₁₈ (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
 - ② YMC-Pack ODS-AL (粒径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
 - ③ Cadenza CD-C₁₈ (粒径 3 μm、内径 4.6 mm、長さ 75 mm)
 - ④ Cadenza CL-C₁₈ (粒径 3 μm、内径 4.6 mm、長さ 75 mm)
- カラム温度: 40°C
- 移動相: 薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (11:9)
- 流量: 1 mL / min
- 注入量: 5 μL

〈システム適合性の評価〉

ブフォステロイド混合標準溶液 10 μL につき上記の条件で操作したとき、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンの順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である。

〈システム再現性の評価〉

標準溶液 10 μL につき上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ブファリン、シノブファギン、レジブフォゲニンのピーク面積の相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ 1.5% 以下である。

実験結果

(1) ニンジン配合製剤の分析

これまでに当部会ではニンジン含有製剤におけるギンセノシド R_{g_1} の定量法を報告しており、その際に TSK-GEL ODS-80Ts を使用した分析時間は 80 分であった²⁾。今回は前報のニンジン中のギンセノシド R_{g_1} の分析時間短縮化において成績が良好であった粒径 3 μm カラムの L-column ODS、及び Unison UK-C18 を用いて、分析時間の短縮が可能であるか検討した結果、粒径 3 μm カラムの保持時間は粒径 5 μm カラムの半分以下となった (Table 2)。また全てのカラムにおいてギンセノシド R_{g_1} とギンセノシド R_e との間の分離度は 1.5 以上であり (Table 3)、システム再現性は 1.5 % 以下 (Table 4) であったため、測定条件を満たしていることを確認した。ニンジン配合製剤、及びそのブランク製剤を用いてギンセノシド R_{g_1} の測定を行った結果、各社の各カラムにおける定量値の平均値はよく一致した (Table 5)。この室間再現性を評価すると TSK-GEL ODS-80Ts の RSD が 19.2% であるのに対し、L-column ODS は 11.7%、Unison UK-C18 は 3.1% となり、粒径 3 μm カラムが良好な再現性を示した。なお各カラムにおける分析時の特記事項は Table 6、クロマトグラムは Figure 1~3 に示した。

以上より、ニンジン配合製剤中のギンセノシド R_{g_1} 測定に関して粒径 3 μm カラム (内径 4.6 mm、長さ 75 mm) を用いることが可能と考えられる。

Table 2. ギンセノシド R_{g_1} の保持時間 (min)

カラム	A社	B社	C社	D社	E社	F社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts	27.4	26.9	30.4	27.9	29.2	26.1	28.0
L-column	10.7	10.8	12.0	10.4	12.2	9.5	10.9
Unison UK-C18	12.5	13.0	13.1	12.3	13.1	11.2	12.5

Table 3. ギンセノシド R_{g_1} とギンセノシド R_e の分離度

カラム	A社	B社	C社	D社	E社	F社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts	1.98	1.97	2.06	2.26	2.12	1.91	2.05
L-column	1.94	1.94	2.05	1.66	2.09	1.74	1.90
Unison UK-C18	1.94	1.99	2.01	1.96	2.08	1.83	1.97

Table 4. システム再現性 (RSD%)

カラム	A社	B社	C社	D社	E社	F社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts	0.32	0.13	0.43	1.06	0.91	0.73	0.60
L-column	0.04	0.15	0.20	0.06	0.24	1.42	0.35
Unison UK-C18	0.27	0.38	0.32	0.36	0.20	0.81	0.39

Table 5. ギンセノシド R_{g_1} の定量値 (%) と室間再現性 (RSD%)

カラム	A社	B社	C社	D社	E社	F社	Ave.	室間再現性
TSKgel ODS-80Ts	0.96	0.78	0.94	0.62	1.07	0.77	0.86	19.2
L-column	0.87	0.86	0.73	0.73	0.99	0.88	0.84	11.7
Unison UK-C18	0.83	0.82	0.82	0.83	0.85	0.88	0.84	3.1

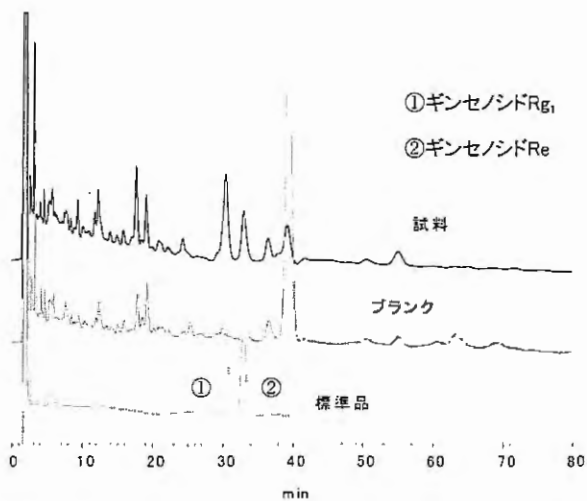


Figure 1. TSKgel ODS-80Ts

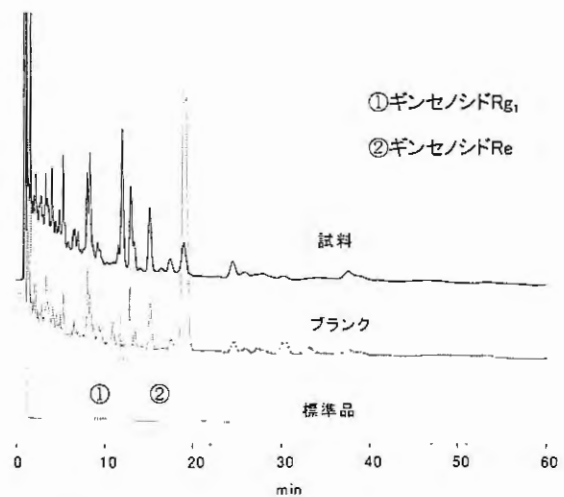


Figure 2. L-column ODS

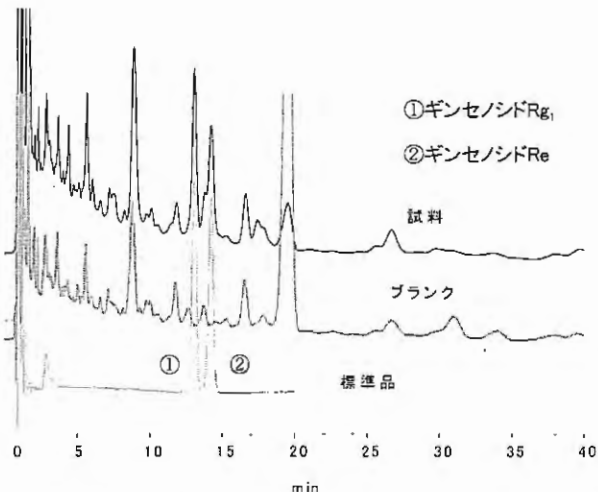


Figure 3. Unison UK-C18

Table 6. 各カラムに関する特記事項

カラム	特記事項
TSKgel ODS-80Ts	A社: R _{g1} に重なるピーク有 B社: 保持時間が安定し難い C社: R _{g1} に重なるピーク有
L-column	B社: Reに重なるピーク有 C社: R _{g1} とReに重なるピーク有 E社: Reに重なるピーク有
Unison UK-C18	C社: Reに重なるピーク有

(2) オウレン・オウバク配合剤の分析

各社内試験法の条件1~4において分析カラムを粒径3 μmカラムのCadenza CD-C18に変更することで、保持時間をそれぞれ51%、74%、83%、及び61%に短縮することができた (Table 7)。また8種類のオウレン・オウバク配合剤分析において粒径3 μmカラムから得られた定量値は従来の分析方法から得られた値とほぼ一致した。

各社内試験法によるオウレン・オウバク配合剤の分析において、分析カラムを粒径5 μmから粒径3 μmに移行することで、定量値および再現性を損なうことなく分析時間を短縮でき、分析業務の生産性を高め、分析コストを削減できることが考えられる。

Table 7. オウレン・オウバク配合製剤のベルベリン分析結果

分析	製剤	粒径 5 μm カラム			Cadenza CD-C18		
		保持時間 (分)	再現性 (cv%)	定量値 (mg/day)	保持時間 (分)	再現性 (cv%)	定量値 (mg/day)
A 社	1	17.05	0.86	2.11	8.66	0.73	2.08
B 社	2	8.60	1.21	1.05	6.39	1.44	1.05
	54.1			53.8			
C 社	4	14.96	0.58	3.84	12.41	1.15	3.84
	5.07			4.90			
D 社	6	7.88	0.57	466	4.80	0.43	456
	7			214			216
	8			111			112

(3) センソの分析

各カラムにおける混合標準溶液を分析したクロマトグラム (Figure 4~7) を比較すると、カラム②及び④の分析においてシノブファギンとレジブフォゲニン間(C/R)の分離が良く、両成分の分離度は各社平均で 4.80、3.05 と良好な分離度を示した。一方、カラム①は 0.90、カラム③は 1.52 と低い分離度を示した (Table 8)。レジブフォゲニンはシノブファギンの 16 位にアセチル基を有し、互いに類似した化合物である。カラム①及び③はオクタデシル化シリカゲル担体の未修飾シラノール基をエンドキャッピング処理しており、カラム②および④は担体のシラノール基をコントロールして残存させているカラムである。このことからシノブファギンとレジブフォゲニンの僅かな構造の差がカラム担体の残存シラノール基によって分離されたことが考えられる。カラム②及び④の分析結果を比較すると、各成分の定量値と再現性はほぼ同様であるが、カラム④の保持時間はカラム②の 53%となった (Table 8~11, Figure 8, 9)。今回センソの分析にはカラム④のように残存シラノール基をもつ粒径 3 μm のカラムを使用することで、ブフォステロイド類を良好な分離度で、分析時間を半減できることがわかった。今後はセンソを配合する製剤の分析についての応用を検討したい。

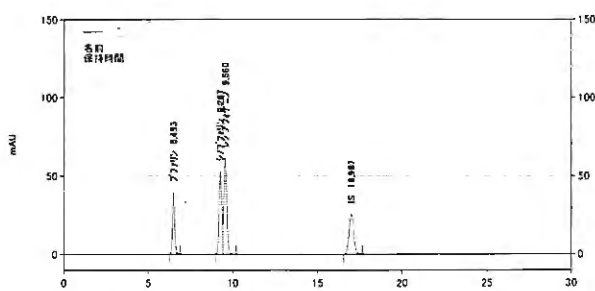
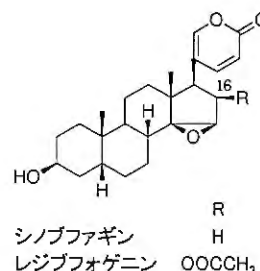


Figure 4. カラム① (YMC Pack Pro C18)

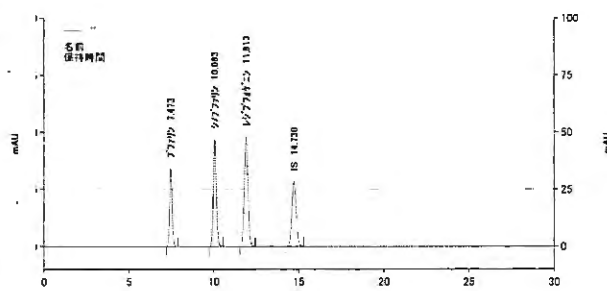


Figure 5. カラム② (YMC Pack ODS-AL)

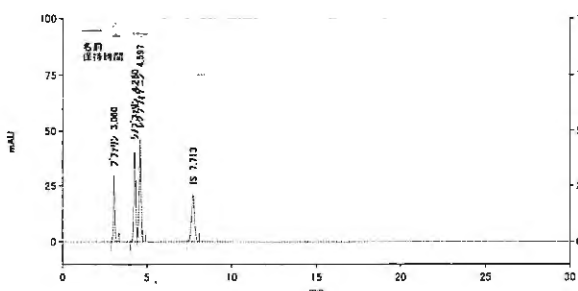


Figure 6. カラム③ (Cadenza CD-C18)

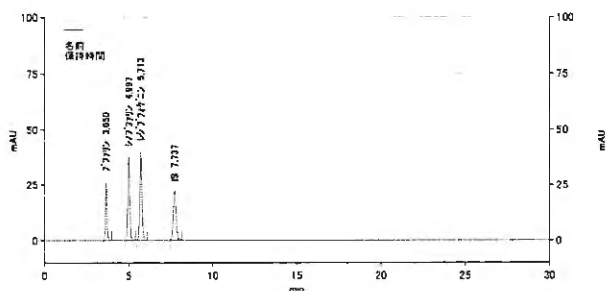


Figure 7. カラム④ (Cadenza CL-C18)

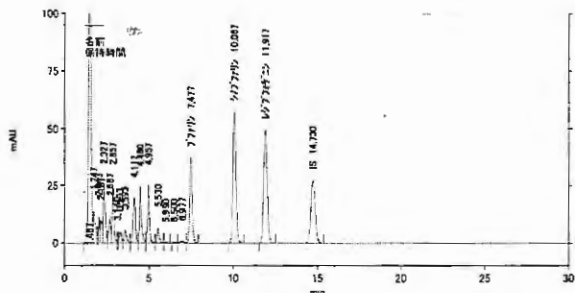


Figure 8. カラム②(YMC Pack ODS-AL)

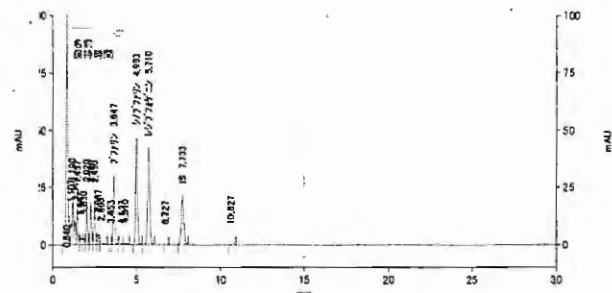


Figure 9. カラム④(Cadenza CL-C18)

Table 8. 各成分の分離度

カラム	B/C				C/R				R/Is			
	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社
1	9.92	9.19	11.05	10.58	0.95	0.69	1.04	0.92	16.35	16.01	17.90	17.53
2	7.90	7.69	8.80	8.73	4.65	4.33	5.14	5.08	6.21	6.50	6.43	6.52
3	6.65	5.38	7.98	7.20	1.52	1.16	1.76	1.64	10.95	10.06	12.40	11.84
4	6.65	5.30	7.90	7.24	3.10	2.36	3.50	3.22	7.07	6.27	7.76	7.49

B:ブファリン、C:シノプファギン、R:レジブフォゲニン、Is:インドメタシン

Table 9. 各成分の保持時間 (min)

カラム	ブファリン				シノプファギン				レジブフォゲニン			
	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社
1	6.56	7.12	6.54	6.49	9.91	10.31	9.19	9.27	11.67	10.58	9.49	9.56
2	7.43	8.20	7.45	7.47	9.23	11.22	9.93	10.06	9.53	13.23	11.71	11.91
3	3.10	3.05	3.05	3.06	4.28	4.82	4.23	4.28	4.59	5.15	4.53	4.60
4	3.66	4.05	3.65	3.65	4.95	5.61	4.95	5.00	5.64	6.39	5.63	5.71

Table 10. 各成分の再現性 (RSD%)

カラム	ブファリン				シノプファギン				レジブフォゲニン			
	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社
1	1.94	—	0.34	0.11	1.89	—	0.46	0.16	2.01	—	0.74	0.18
2	1.46	0.08	0.39	0.20	1.45	0.11	0.53	0.11	1.46	0.10	0.45	0.15
3	0.68	—	0.85	0.08	0.75	—	0.93	0.14	0.66	—	0.90	0.05
4	0.77	0.11	0.21	0.07	0.70	0.07	0.31	0.08	0.77	0.05	0.23	0.12

—:実施せず

Table 11. 各成分の定量値 (mg)

カラム	ブファリン				シノプファギン				レジブフォゲニン			
	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社	A社	B社	C社	D社
1	5.79	5.84	5.81	5.81	12.36	—	12.38	12.48	10.65	—	10.91	10.67
2	5.73	5.85	5.80	5.59	12.46	12.45	12.68	12.16	10.60	10.56	10.79	10.32
3	5.83	5.79	6.16	6.00	12.46	—	12.65	12.43	10.70	—	10.91	10.66
4	5.78	5.84	5.81	5.79	12.56	12.56	12.65	12.56	10.65	10.62	10.70	10.64

—:実施せず

考 察

昨年度に検討したニンジン中のギンセノイド R_g1 定量試験、及びオウレン・オウバク中のベルベリン定量試験の分析時間の短縮化について、ニンジン配合製剤、及びオウレン・オウバク製剤に応用した結果、定量値及び再現性を損なうことなく分析時間を短縮することができた。センソ中のブファリン、シノブファギン、及びレジブフォゲニンの分析では担体に残存シラノール基を有するカラムにて粒径 5 μm (内径 4.6 mm、長さ 150 mm) から粒径 3 μm (内径 4.6 mm、長さ 75 mm) に移行することでセンソ中のブフォステロイド類の分析時間を約半分に短縮することができた。

本方法を日常分析に利用することで分析業務の生産性を高め、アセトニトリル含有移動相を省溶媒化できることが考えられる。今後はさらなる分析業務の生産性向上とコスト削減に寄与するため、本方法による甘草や麻黄など繁用生薬の分析時間短縮化を検討したい。

文 献

- 1) 家庭薬研究第 28 巻 p28-34 (2009)
- 2) 家庭薬研究第 27 巻 p23-29 (2008)

HPLC 法の分析時間短縮化における粒径 2 μ m カラムの特性について

—かぜ薬製剤の分析—

Study on Shortening of Analysis Time in HPLC by Using Sub-2 μ m Particles Column
—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

堀田大介 Daisuke HORITA	株式会社池田模範堂 Ikeda Mohando Co.,Ltd.	福田大輔 Daisuke HUKUTA	株式会社三九製薬 Sankyu Pharmaceutical Co.,Ltd.
高嶋真由美 Mayumi TAKASHIMA	新新薬品工業株式会社 Shinshin Pharmaceutical Co.,Ltd.	関絵理子 Eriko SEKI	大協薬品工業株式会社 Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd.
赤井由紀 Yuki AKAI	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co.,Ltd.	有川千佳子 Chikako ARIKAWA	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co.,Ltd.
宮本加奈子 Kanakano MIYAMOTO	株式会社富士薬品 Fuji Medicine Co.,Ltd.	中嶋慶太 Keita NAKAJIMA	東亜薬品株式会社 Toa Pharmaceutical Co.,Ltd.
西川直志 Tadashi NISHIKAWA	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.	横田洋一 Yoichi YOKOTA	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。昨年度は粒径 3 μ m 内径 4.6mm 長さ 75mm の ODS カラムを、成書収載の粒径 5 μ m の充てん剤を用いた高速液体クロマトグラフィーによるかぜ薬製剤の分析に応用したところ、良好な結果を得た¹⁾。一方、近年では、より微細な 2 μ m 程度の充填剤が販売されるようになった。そこで今回我々は、昨年度と同様かぜ薬製剤の分析¹⁾において、粒径 2 μ m のカラムを用いて従来使用されている機器での分析時間の短縮化について、前回用いた粒径 3 μ m カラムと比較検討した。また最近使用されるようになった超高压用 HPLC (UPLC : Waters 社製) を用いて検討を行った。

実験方法

試料

市販かぜ薬（1日量）

アセトアミノフェン 650mg、エテンザミド 400mg、カフェイン 75mg、クロルフェニ
ラミンマレイン酸塩 7.5mg、デキストロメトルファン臭化水素酸塩 32mg、ノスカピ
ン 48mg

方法

1. アセトアミノフェン、カフェイン、エテンザミド

かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法収載の一般用医薬品試験法Ⅱ²⁾ に準じて、下記の試験法
で実験を行った。なお、注入量と流量については、今回用いたカラムに対応し変更した。

試料約 0.24g(アセトアミノフェン約 87mg、エテンザミド約 53mg、カフェイン約 10mg
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)
20mL 及び内標準溶液 5mL を正確に加え、15 分間超音波抽出を行う。この液 5mL 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 50mL とし、
遠心分離後、上澄液を 0.45 μ m のフィルターでろ過し、試料溶液とする。

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)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（検出波長：280 nm）

カラム：1) 内径 3.0mm 長さ 75 mm のステンレス管に粒径 3 μ m の液体クロマトグ
ラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。(YMC Pro C18)
2) 内径 3.0mm 長さ 50mm のステンレス管に粒径 2 μ m の液体クロマトグラ
フィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。(YMC-UltraHT Pro
C18、YMC-UltraHT Hydrosphere C18)。

移動相：薄めたリン酸(1→1000) / アセトニトリル混液(17:3)

カラム温度：40℃付近の一定温度

流量：0.4mL/min(各社機器)、0.4、0.8、1.0 及び 1.2mL/min(UPLC)

システムの性能：標準溶液 3 μ L につき上記の条件で試験するとき、アセトアミノフェ
ン、カフェイン、内標準物質、エテンザミドの順に溶出する。

使用機器

Table1 に示した機器を使用し、各社で各カラムの圧力、各成分の保持時間、分離度、
理論段数、システム再現性、定量値を求めた。

UPLC は Waters より貸与されたものを使用した。

Table1 各社の使用機器

	A 社	B 社	C 社	D 社	E 社 1	E 社 2
分析機器：ポンプ	LC-2010C	不明	Agilent	LC-20AT	LC-20AB	LC-20AB
検出器			1200	SPD-20AV	SPD-20AV	SPD-20AV
オートサンプラー			シリーズ	SIL-20AC	SIL-20A	SIL-20AHT
メーカー	島津製作所	不明	Agilent	島津製作所	島津製作所	島津製作所

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

武田寧らの医薬品迅速分析法³⁾に準じて、下記の試験法で実験を行った。なお、注入量、流量、測定波長及び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変更した。

試料約 0.146g (クロルフェニラミンマレイン酸塩約 0.6mg、デキストロメトルファン臭化水素酸塩約 2.6mg、ノスカピン約 3.8mg 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) 35mL を加え 15 分間超音波抽出を行う。内標準溶液 10mL 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 50mL とする。遠心分離後、上澄液を 0.45 μ m のフィルターでろ過し、試料溶液とする。

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)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (検出波長：226 nm)

カラム：1. と同じ

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)

カラム温度：50℃付近の一定温度

流量：0.4mL/min (各社機器)、0.4、0.8、1.0 及び 1.2mL/min (UPLC)

システムの性能：標準溶液 3 μ L につき上記の条件で試験するとき、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、内標準物質の順に溶出する。

使用機器

Table2 に示した機器を使用し、各社で各カラムの圧力、各成分の保持時間、分離度、理論段数、システム再現性、定量値を求めた。

UPLC は Waters より貸与されたものを使用した。

Table2 各社の使用機器

	A 社	B 社	C 社	D 社
分析機器：ポンプ	Waters2695			
検出器	Waters2487	LC-2010C	LC-2010C	LC-2010C
オートサンプラー	Waters2695			
メーカー	Waters	島津製作所	島津製作所	島津製作所

実験結果

1. アセトアミノフェン、カフェイン、エテンザミド

各社所有の機器を用いて、流量 0.4mL/min で分析を行った。粒径 2 μ m の ODS カラム (内径 3.0mm 長さ 50mm) は、粒径 3 μ m カラム (内径 3.0mm 長さ 75mm) と同様、いずれも良好な分離であった。カラム圧、保持時間、分離度、理論段数、システム再現性及び定量値について、5 社の平均値を Table3、Table4、Table5 に示す。

粒径 2 μm のカラム圧は粒径 3 μm の約 1.7 倍であった。分析時間の短縮については約 80% 程度であった。また各社同検体、同条件により施設間再現性を確認したところ、各社の再現性は良好であった。定量値は粒径 3 μm 及び 2 μm の両カラムともほぼ同じ値を示し、十分用いることができると考えられた。

Table3 カラム圧及び保持時間(値は 5 社の平均)

カラム	圧力 (MPa)	保持時間(分)			
		AC	CA	IS	ET
YMC ProC18(3 μm)	5.9	1.87	2.42	9.35	10.94
YMC ProC18(2 μm)	9.8	1.36	1.77	6.91	8.17
Hydrosphere(3 μm)	10.0	1.47	1.95	7.17	8.65

アセトアミノフェン(AC)、カフェイン(CA)、内標準物質(IS)、エテンザミド(ET)

Table4 分離度及び理論段数(値は 5 社の平均)

カラム	分離度			理論段数			
	AC/CA	CA/IS	IS/ET	AC	CA	IS	ET
YMC ProC18(3 μm)	3.0	22.0	3.4	1811	2795	7302	7592
YMC ProC18(2 μm)	2.4	17.1	2.8	1037	1634	4392	4537
Hydrosphere(3 μm)	2.8	17.6	3.3	1223	1976	4881	5048

アセトアミノフェン(AC)、カフェイン(CA)、内標準物質(IS)、エテンザミド(ET)

Table5 システム再現性及び定量値(値は 5 社の平均)

カラム	システム再現性(%) (n=6)			定量値(%)		
	AC	CA	ET	AC	CA	ET
YMC ProC18(3 μm)	0.12	0.25	0.10	98.3	99.5	98.9
YMC ProC18(2 μm)	0.14	0.18	0.11	99.4	100.0	100.9
Hydrosphere(3 μm)	0.15	0.19	0.11	97.9	100.2	98.5

アセトアミノフェン(AC)、カフェイン(CA)、内標準物質(IS)、エテンザミド(ET)

今回の分析方法では、粒径 2 μm のカラムを用いることにより圧力の上昇が考えられたため、従来の使用機器を用いることを考慮して流速は 0.4mL/min に設定した。しかし、粒径 2 μm のカラムが本来の性能を発揮するのは、より高流速領域であるとされている。そこで、高耐圧性である UPLC を用いて高流速領域におけるカラムの性能を検証した。

YMC-Pack ProC18 の粒径 2 μm のカラムでは 0.4、0.8、1.0 及び 1.2mL/min、粒径 3 μm では 0.4 及び 0.8mL/min の流速で分析を行った。この結果、粒径 2 μm のカラムで、流速 1.2mL/ml ではほぼ 3 分で分析が終了し、圧力は 37Mpa を示した。理論段数は早く溶出するアセトアミノフェン、カフェインで流速の増大により低下したが、分離度の低下はほとんどみられなかった (Fig.1)。

粒径 3 μm のカラムにおけるアセトアミノフェン及びカフェインの流速増大による理論段数の低下率は、粒径 2 μm カラムに比べ大きかったが、分離度は最低でも 2.8 に保たれていたため、0.8mL/min の流速においても、18Mpa の耐圧があれば通常の機器でも使用可能と思われた (Fig.2)。

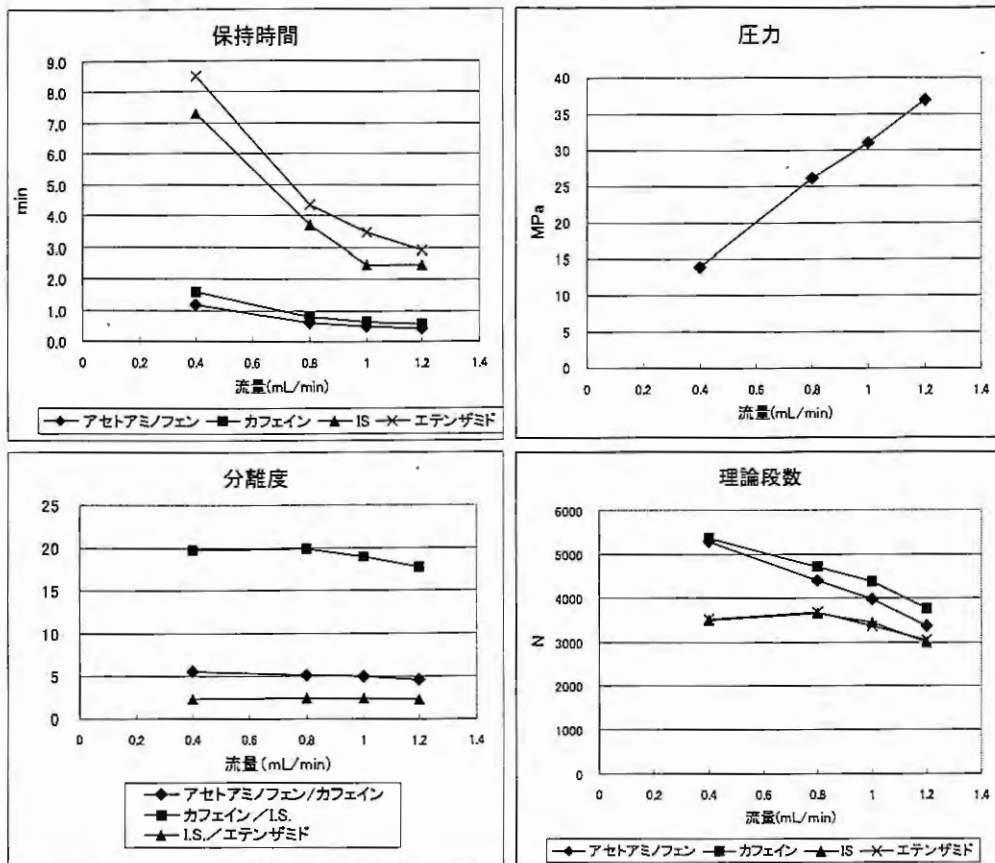


Fig.2 YMC-PackProC18(粒径 2 μ m)の流量と保持時間、圧力、分離度及び理論段数の関係

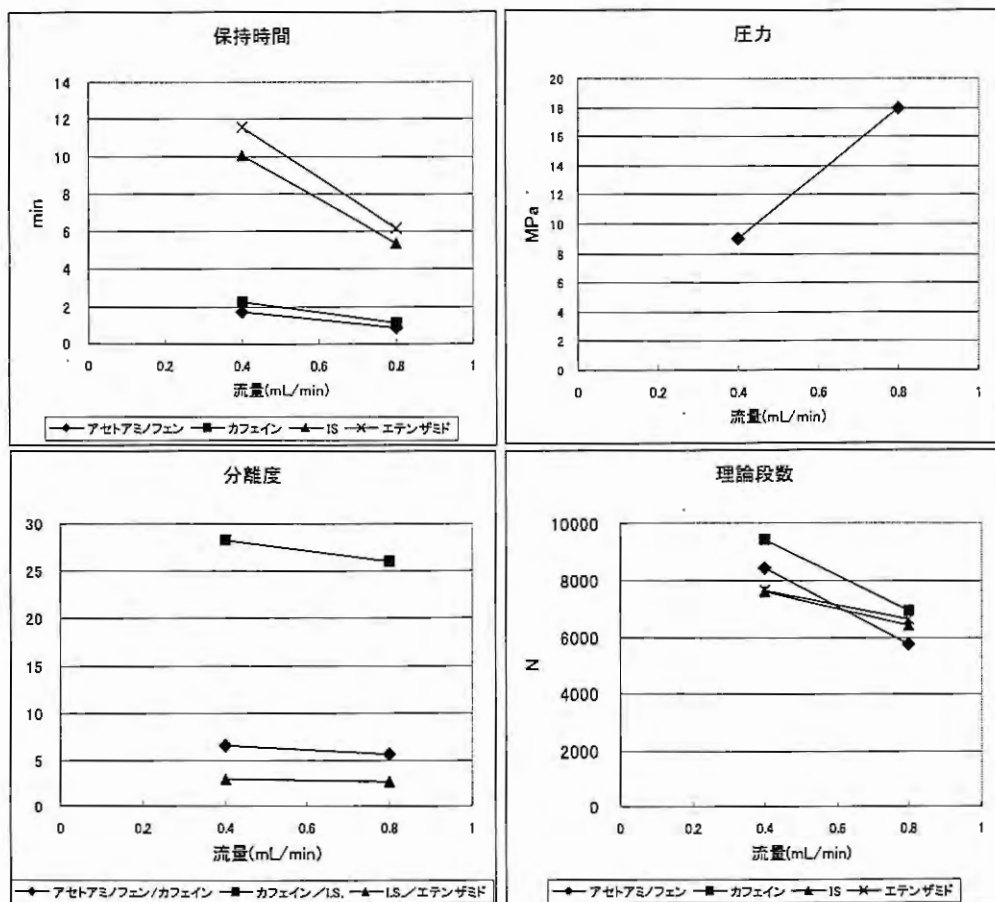


Fig.2 YMC-PackProC18(粒径 3 μ m)の流量と保持時間、圧力、分離度及び理論段数の関係

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

1. と同様、各社所有の機器を用いて検討した結果を Table6、Table7、Table8 に示す。いずれのカラムも分離度、理論段数、定量値、再現性に問題ないことが確認できた。粒径 2 μm のカラム圧は粒径 3 μm の約 1.7 倍であった。粒径 2 μm のカラムによる分析時間の短縮は 70%程度であり、分析時間の短縮が可能であった。粒径 2 μm の充てん剤では、疎水性相互作用が大きい Pro C18 が Hydrosphere C18 よりも保持時間は長かった。

Table6 カラム圧及び保持時間(値は 4 社の平均)

カラム	圧力 (MPa)	保持時間(分)			
		NO	DE	CH	IS
YMC ProC18(3 μm)	5.2	4.58	7.89	9.78	14.55
YMC ProC18(2 μm)	8.3	3.51	6.11	7.67	10.79
Hydrosphere(3 μm)	8.1	3.31	5.44	6.24	9.50

ノスカピン(NO)、デキストロメトルファン(DE)、クロルフェニラミン(CH)、内標準物質(IS)

Table7 分離度及び理論段数(値は 4 社の平均)

カラム	分離度			理論段数			
	NO/DE	DE/CH	CH/IS	NO	DE	CH	IS
YMC ProC18(3 μm)	10.99	4.70	8.01	5638	7635	7523	5871
YMC ProC18(2 μm)	8.95	3.95	5.38	3644	4853	4698	3566
Hydrosphere(3 μm)	7.83	2.33	6.62	3345	4684	4643	3648

ノスカピン(NO)、デキストロメトルファン(DE)、クロルフェニラミン(CH)、内標準物質(IS)

Table8 システム再現性及び定量値(値は 4 社の平均)

カラム	システム再現性(%) (n=6)			定量値(%)		
	NO	DE	CH	NO	DE	CH
YMC ProC18(3 μm)	0.32	0.34	0.46	101.1	99.5	100.8
YMC ProC18(2 μm)	0.35	0.32	0.48	101.4	99.9	100.1
Hydrosphere(3 μm)	0.48	0.51	0.72	100.6	100.0	100.3

ノスカピン(NO)、デキストロメトルファン(DE)、クロルフェニラミン(CH)、内標準物質(IS)

先と同様に高耐圧性である UPLC を用いて、高流速領域におけるカラムの性能を検証した。この結果、粒径 2 μm のカラムにおいて、流速 1.2mL/ml では約 5 分で分析は終了したが、圧力は 33Mpa を示した。

理論段数はいずれの成分も流速の増大により低下し、流速 0.8mL/min 以上ではピーク形状がテーリングするため定量分析には適していないと考えられた。これは今回用いた分析条件及び使用カラムの特性によるものと考えられた。今後、カラムや装置の変更により分析時間の短縮化を図る際には、使用する分析条件、カラム、装置の特性などを考慮して流速など最適な条件を設定することが必要であると考えられる。分離度についてはデキストロメトルファン、クロルフェニラミンの分離度の低下はみられなかった。その他成分間では流速の増大により低下したがいずれも 2 以上であった (Fig.3)。

粒径 3 μm カラムでは、流速 0.8mL/min においても分離度は 4 以上であった。圧力も 14Mpa であることから、通常の機器でも耐圧があれば使用可能と思われた (Fig.4)。

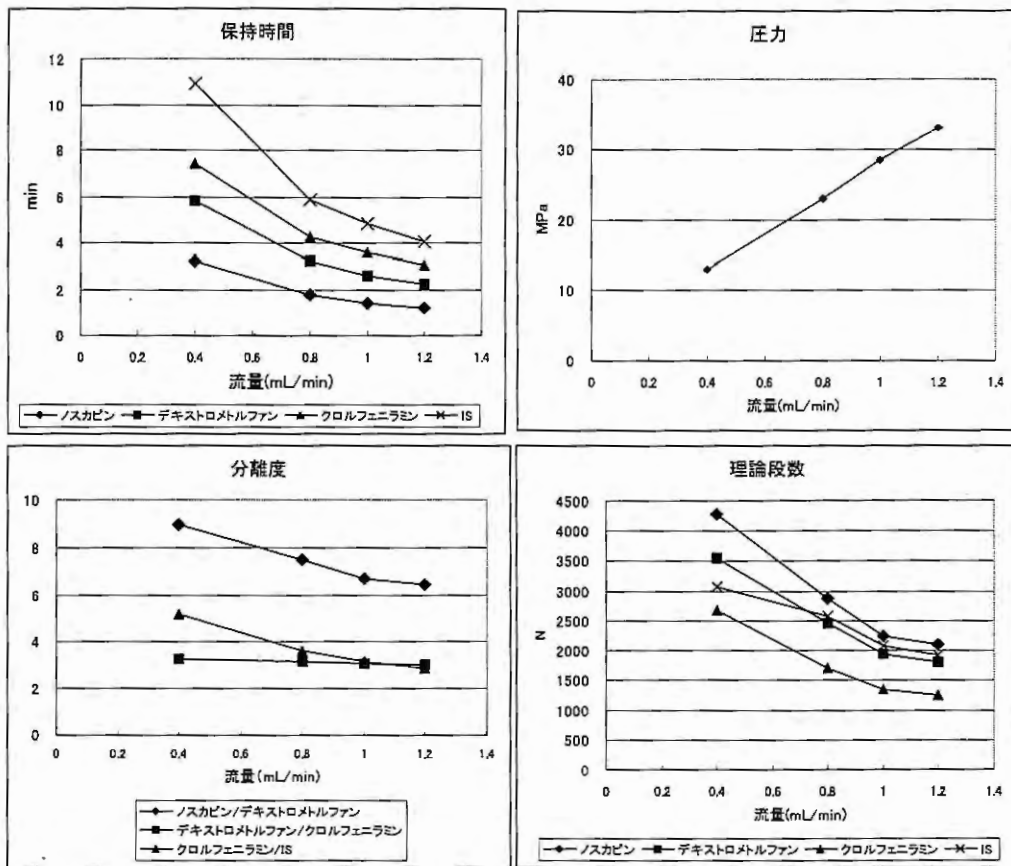


Fig.3 YMC-PackProC18(粒径 2 μ m)の流量と保持時間、圧力、分離度及び理論段数の関係

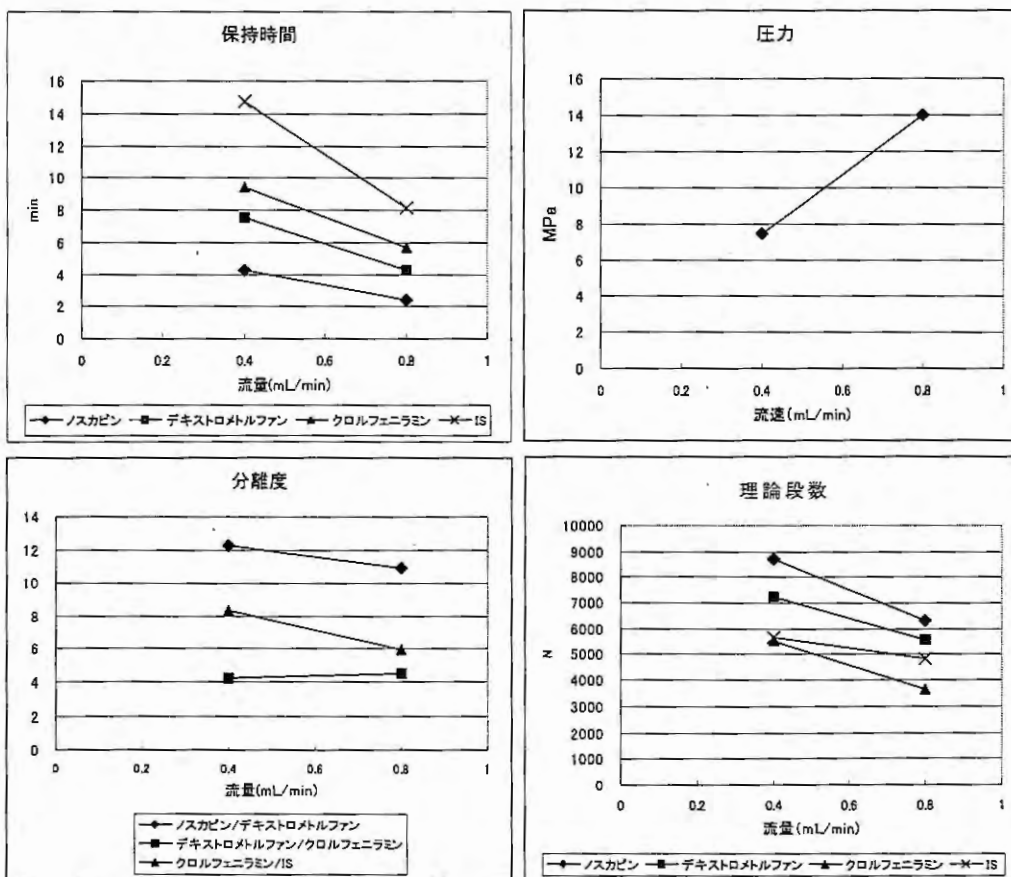


Fig.4 YMC-PackProC18(粒径 3 μ m)の流量と保持時間、圧力、分離度及び理論段数の関係

考 察

粒径 $2\mu\text{m}$ 内径 3.0mm 長さ 50mm カラムによる分析時間の短縮化について、かぜ薬成分の分析法を用いて検証した。通常使用している機器を使用するため $0.4\text{mL}/\text{min}$ の流量で分析を行ったところ、対照とした粒径 $3\mu\text{m}$ 内径 3.0mm 長さ 75mm カラムと比較し、何れの成分も分析時間を短縮できた。しかし、その時間差はわずかであり、圧力上昇や理論段数低下などのデメリットも見られた。従って、粒径 $2\mu\text{m}$ カラムを用いて更に分析時間の短縮化を図るには、高圧分析可能な機器を利用し流速を上げる必要があると考えられた。

イオンペア試薬を用いた分析ではピーク形状の悪化が観察された。高流速領域において、イオン性溶質の保持に問題があった可能性も示唆される。粒径が微細なカラムを用いて分析時間を短縮するには、分析成分の特性を考慮し、使用する分析条件、カラムの種類、装置などの条件を再設定する必要があると考えられる。

今回、粒径 $2\mu\text{m}$ カラムを用いて分析時間の短縮化を検討した。結果、通常の HPLC でも応用が可能であり、高耐圧仕様の機器を用いることで更に時間を短縮できることが示唆された。

文 献

- 1) 室智章ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討、家庭薬研究、No.28、35-41(2009)
- 2) 日本大衆薬工業協会編：一般用医薬品の試験法Ⅱ、57-58(2000)
- 3) 武田寧ら：医薬品迅速分析法 8、月間薬事 27、589-593(1985)

生活習慣病に対する動物胆の有用性評価研究

Study on Effect of Animal bile on Life-style related Diseases

金盛 俊介 Shunsuke KANAMORI	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kougyo Co., Ltd
松井 泰治 Taiji MATSUI	松井製薬株式会社 Matsui Seiyaku Co., Ltd
老田 一志 Kazushi OIDA	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
松野 加奈子 Kanakano MATSUNO	株式会社廣貫堂 Kokando Co., Ltd.
新屋 隆士 Takashi SHINYA	リードケミカル株式会社 Lead Chemical Co., Ltd.
松永 孝之 Takayuki MATSUNAGA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

近年、動物胆の主要成分である胆汁酸の核内受容体が明らかにされ、この受容体などを介して脂質代謝や糖代謝に影響を及ぼすことが報告されている。これらの代謝異常は、肥満、高脂血症あるいは高血糖など生活習慣病を来す要因になることから、代謝異常の改善により生活習慣病の予防あるいは治療への有用性が期待されている。

熊胆、牛胆及び豚胆は、種々の抱合型胆汁酸を含有し、利胆作用、鎮痙作用あるいは肝障害抑制作用を有することが報告されている。我々は、これらの作用や抗潰瘍作用などについて、熊胆を含む動物胆の効果を検討してきた。動物胆が肥満や糖尿病などの生活習慣病にも有用性が期待されることから、今回、高脂肪食給餌マウスにおける肥満に対する胆汁酸及び動物胆の効果を比較検討した。

動物胆の胆汁酸組成 (%)

	熊胆	牛胆	豚胆
タウリン抱合			
UDCA	47.9	0	0
DC	0	10.8	0
CA	7.1	30.2	0
CDCA	30	2.8	2.4
グリシン抱合			
UDCA	0	0	0
DC	0	8	0
HDCA	0	0	30.4
CA	0	18.9	0
CDCA	0	2.3	24.1

実験方法

1、試料の調製

本試験で用いた生薬は、熊胆、牛胆及び豚胆であり、乳鉢で粉碎して粉末にした後試料に混合した。また、胆汁酸類は、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、コール酸 (CA)、デオキシコール酸 (DCA)、ヒオデオキシコール酸 (HDCA)、リトコール酸 (LCA) 及びタウロコール酸 (TCA) を用い、同様に試料に混合した。

2、使用動物

マウス (C57BL/6J 系、5-6 週令、雄性) を三協ラボサービスより購入し、1 週間の予備飼育後に試験に供した。

3、マウスへの高脂肪食の給餌

高脂肪食 (DIO rodent purified diet with 60% energy from fat, test Diet 製) は、0.5 または 1% の濃度で被検物または対照にはカルボキシメチルセルロースを均一に混合した後、冷蔵庫で保存し、給餌は原則毎日行い、残った飼料は廃棄した。また、普通食 (AIN-76A purified diet, Test Diet 製) についても同様に給餌した。マウスへの給餌は、8 週間行った後解剖に付した。マウスをエーテル麻酔下で解剖し、腹大静脈から採血した後、肝臓及び副睾丸周囲の脂肪組織を摘出し、各々重量を測定した。血中のグルコース、トリグリセライド、AST 及び ALT などの測定は、生化学自動分析装置を用いて測定した。また、血液中のインスリン、レプチン及びアディポネクチンは、ELISA 測定キットを用いて測定した。さらに肝臓については、トリグリセライド、コレステロール及び過酸化脂質の定量に供した。

4、肝臓中の過酸化脂質の定量

肝臓に 9 倍量の 1.15% 塩化カリウム溶液を加えてテフロンホモジナイザーで破碎し、この破碎液 0.1ml に 8.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液 0.1ml、20% 酢酸 0.75ml に 0.8% チオバルビツール酸ナトリウム溶液 0.75ml 添加し、沸騰水浴中で 30 分間加熱した。これを氷水中で冷却した後蒸留水 0.5ml とブタノール：ピリジン混液 (15:1) 2.5ml 添加してよく混和した。これを遠心分離後上層の吸光度 (535nm) を測定した。標準試料としてテトラエトキシプロパン 10 μ M を用いて同様に測定し、過酸化脂質が分解して生成するマロンジアルデヒド量として換算した。

5、肝臓中の脂質抽出と定量

肝臓に等量の蒸留水を加えてホモジナイザーで破碎後 5 倍量の 0.13M NaCl 溶液を加えた。これにクロロホルム：メタノール (2:1) 混液 10 倍量を添加して超音波発生装置を用いて混和した。これを遠心分離して下層のクロロホルム層を分取した後再度クロロホルム：メタノール (2:1) 混液 10 倍量を添加して超音波発生装置を用いて混和した。これを遠心分離して下層のクロロホルム層を分取した後再度クロロホルム：メタノール (2:1) 混液 10 倍量を添加して超音波発生装置を用いて混和した。これを遠心分離して下層のクロロホルム層を分取した後再度クロロホルム：メタノール (2:1) 混液の 10 倍量で抽出し、クロロホルム層を採取して先の抽出液と合わせ、エバポレーターでクロロホルムを留去した。抽出した脂質は適量のアルコールで溶解後コレステロール及びトリグリセライドを測定キットを用いて定量した。

6、統計処理

測定値の有意差検定は、Student の t-検定を用いて行った。*、**、***:高脂肪食群に比較して 5%、1%、0.1% の危険率で有意差を認めることを示す。

実験結果

1、高脂肪食給餌マウスに対する胆汁酸の効果

0.5%胆汁酸配合の高脂肪食をマウスに給餌し、摂餌量の変化、体重の変化を観察した。摂餌量は、普通食群に比べて高脂肪食群では減少したが、摂取エネルギー量はほぼ同等であった。胆汁酸配合による摂餌量の変化は見られなかった。体重は、UDCA 群、CA 群及びLCA 群の胆汁酸群で抑制される傾向が見られ、特にDCA 群で顕著に抑制された(図1)。

8 週間給餌後に摘出した副睾丸周囲の脂肪組織重量では、高脂肪食による重量増加は、CDCA 群、CA 群、DCA 群及びHDCA 群で普通食群と同程度まで有意に減少した(図2)。

血中及び肝臓中の血液生化学の分析では、血中胆汁酸濃度は、胆汁酸群において上昇する傾向が見られた。特にDCA 群でALT 及びAST 値が有意に上昇し、肝障害を来していると考えられる(表1)。肝臓中のトリグリセライド含量は、胆汁酸群で減少する傾向が見られ、CDCA 群及びDCA 群では有意に減少した(表2)。

2、高脂肪食給餌マウスに対する動物胆の効果

1.0%動物胆配合の高脂肪食をマウスに給餌し、摂餌量の変化及び体重の変化を観察した。動物胆配合による摂餌量の変化は見られなかった。体重増加は、動物胆配合により抑制された。特に牛胆群ではTCA 群及びCA 群の胆汁酸群と同様に普通食以下の体重に抑制された(図3)。

8 週間給餌後に摘出した副睾丸周囲の脂肪組織重量では、高脂肪食による重量増加は熊胆群及び牛胆群で有意に抑制された(図4)。

血中及び肝臓中の血液生化学の分析では、胆汁酸と異なり、動物胆群で血中胆汁酸やALT 及びAST 値の上昇は見られなかった。血糖値は、動物胆群で有意に減少すると共に、血中レプチン濃度が熊胆及び牛胆配合群において有意に低下した(表3)。肝重量は、高脂肪食給餌による減少が動物胆配合により抑制され、牛胆では有意に増加した(表4)。また、肝臓中のトリグリセライド含量は、動物胆配合により減少する傾向が見られた(表4)。

図1 胆汁酸配合高脂肪食給餌マウスにおける体重変化

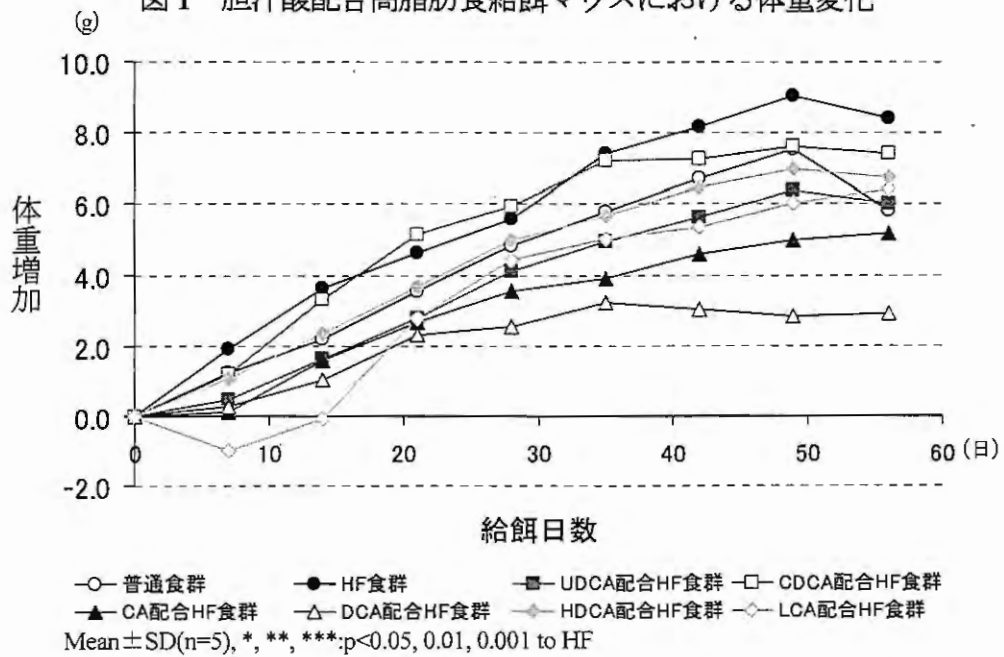


図2 胆汁酸配合高脂肪食給餌マウスにおける脂肪組織重量

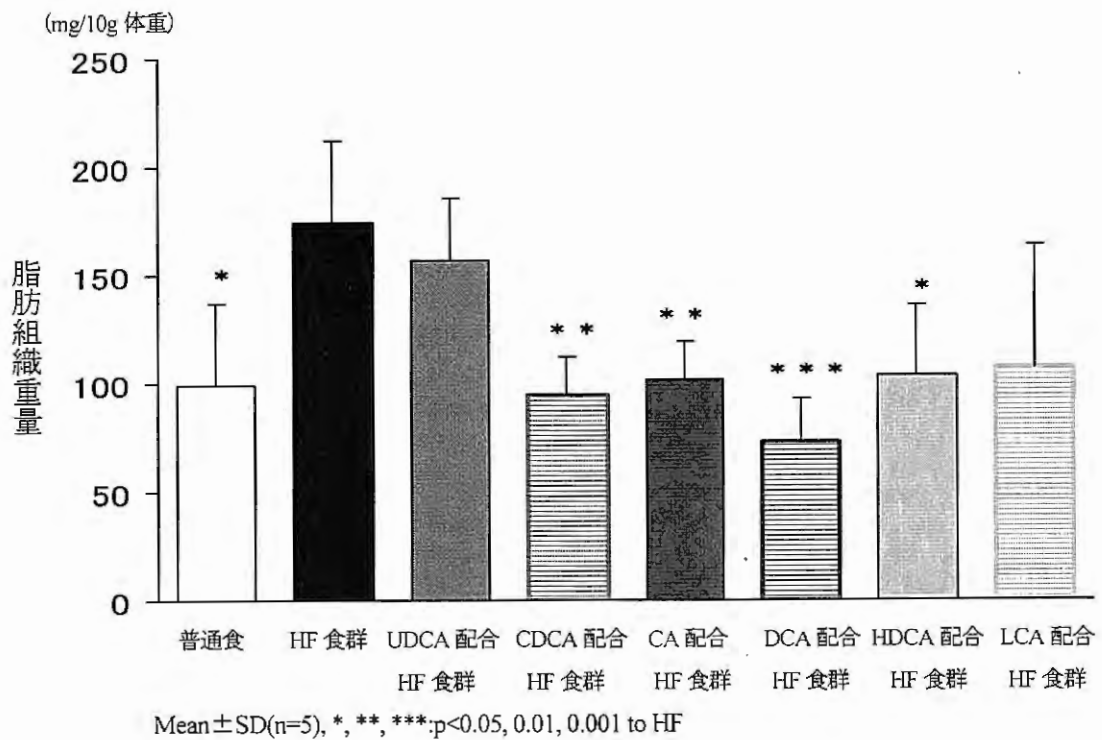


表1 胆汁酸配合高脂肪食給餌マウスにおける血液生化学分析値

	トリグリセライド (mg/dl)	コレステロール (mg/dl)	血糖値 (mg/dl)	胆汁酸 (μ M)	AST (U/l)	ALT (U/l)	レプチン (ng/ml)	インスリン (ng/ml)
普通食群	75.0 \pm 18.7	128 \pm 29.5	231 \pm 34.0	34.6 \pm 21.4	188 \pm 139	173 \pm 148	7.12 \pm 6.17	4.91 \pm 2.37
HF食群	90.8 \pm 25.0	134 \pm 14.0	219 \pm 57.3	32.1 \pm 9.81	75.8 \pm 52.8	55.0 \pm 34.8	5.96 \pm 4.90	2.15 \pm 1.96
UDCA配合HF食群	91.6 \pm 12.1	146 \pm 14.8	224 \pm 36.5	40.9 \pm 6.10	69.6 \pm 32.2	41.4 \pm 22.9	9.04 \pm 4.55	2.74 \pm 1.97
CDCA配合HF食群	73.6 \pm 18.4	123 \pm 6.43	231 \pm 38.0	49.5 \pm 10.7*	71.0 \pm 27.6	53.0 \pm 24.0	3.77 \pm 2.91	2.60 \pm 0.92
CA配合HF食群	69.5 \pm 17.7	134 \pm 14.7	230 \pm 29.7	64.3 \pm 28.2	153 \pm 90.0	138 \pm 57.8*	3.53 \pm 2.51	3.74 \pm 3.50
DCA配合HF食群	127 \pm 47.8	127 \pm 23.8	217 \pm 40.3	169 \pm 74.2**	202 \pm 55.8*	271 \pm 95.8**	2.65 \pm 1.86	1.30 \pm 1.01
HDCA配合HF食群	87.0 \pm 16.7	154 \pm 11.0	255 \pm 98.1	94.6 \pm 79.1	89.4 \pm 35.1	50.6 \pm 25.0	5.47 \pm 4.74	1.98 \pm 0.85
LCA配合HF食群	99.4 \pm 50.0	118 \pm 42.4	234 \pm 45.0	87.9 \pm 78.9	92.0 \pm 58.7	70.6 \pm 55.2	4.94 \pm 3.69	2.78 \pm 2.67

Mean \pm SD(n=5), *, **, Different from HF-diet group at p<0.05, 0.01

表2 胆汁酸配合高脂肪食給餌マウスにおける肝重量及び脂質含量

	重量 (mg/10g体重)	コレステロール (mg/g肝)	トリグリセライド (mg/g肝)	過酸化脂質 (nmole/g肝)
普通食群	496 \pm 52.5**	4.52 \pm 2.58	35.7 \pm 27.2	499 \pm 231
HF食群	380 \pm 35.9	5.08 \pm 2.48	52.4 \pm 37.6	743 \pm 301
UDCA配合HF食群	390 \pm 58.2	3.93 \pm 2.23	39.8 \pm 32.8	722 \pm 268
CDCA配合HF食群	392 \pm 20.1	4.74 \pm 2.93	11.3 \pm 6.59*	584 \pm 278
CA配合HF食群	449 \pm 65.8	7.67 \pm 9.77	18.9 \pm 18.8	617 \pm 223
DCA配合HF食群	513 \pm 38.1***	5.97 \pm 4.32	10.2 \pm 8.80*	517 \pm 200
HDCA配合HF食群	395 \pm 59.7	3.18 \pm 1.70	13.8 \pm 12.1	644 \pm 260
LCA配合HF食群	439 \pm 122	4.38 \pm 3.31	22.3 \pm 19.4	655 \pm 218

Mean \pm SD(n=5), *, **, ***: Different from HF-diet group at p<0.05, 0.01, 0.001

図3 動物胆配合高脂肪食給餌マウスにおける脂肪組織

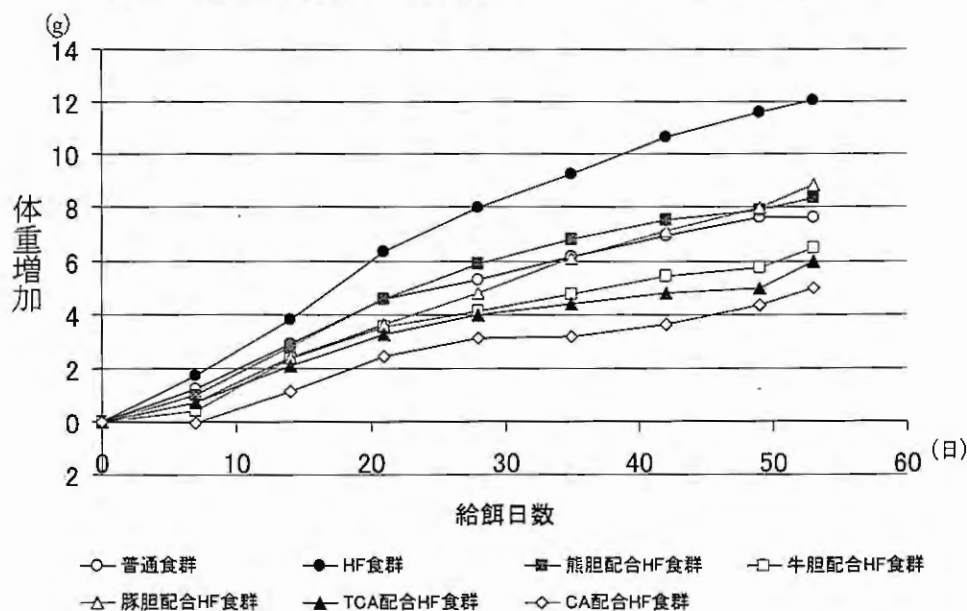


図4 動物胆配合高脂肪食給餌マウスにおける脂肪組織重量

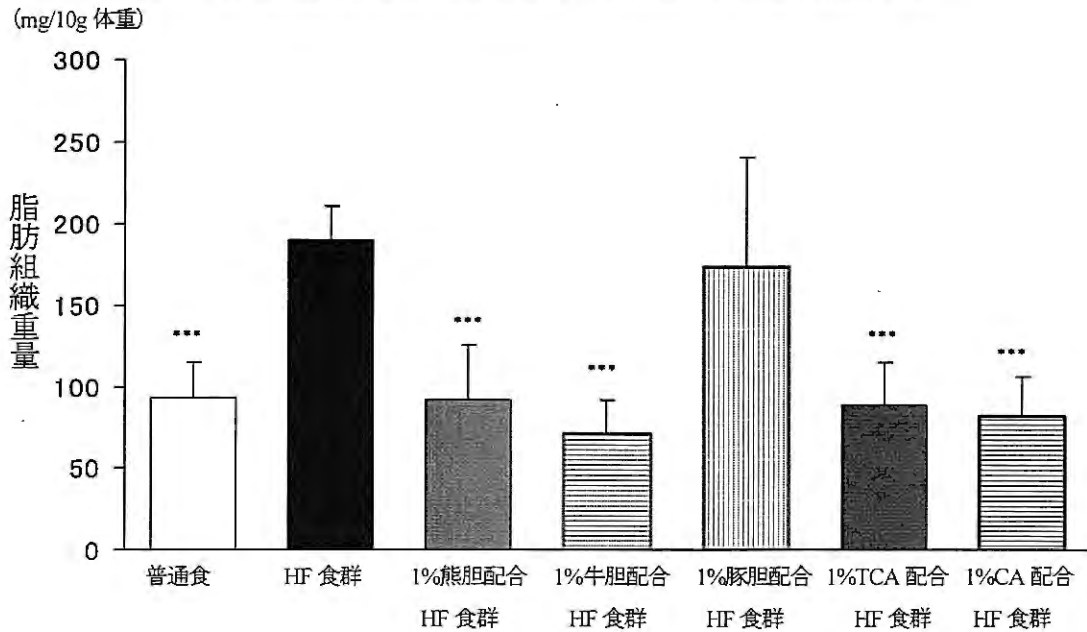


表3 動物胆配合高脂肪食給餌マウスにおける血液生化学分析値

	血糖値 (mg/dl)	トリグリセライド (mg/dl)	遊離脂肪酸 (mEq/l)	胆汁酸 (μ M)	AST (U/l)	ALT (U/l)	アディポネクチン (μ g/ml)	レプチン (ng/ml)
普通食群	239 \pm 28.8	66.6 \pm 14.9	0.48 \pm 0.25	25.7 \pm 14.3	125 \pm 80.2	59.6 \pm 31.3	23.8 \pm 6.60*	12.0 \pm 4.79
HF食群	263 \pm 24.1	71.6 \pm 17.5	0.55 \pm 0.16	26.6 \pm 25.3	96.8 \pm 70.6	58.0 \pm 39.0	39.9 \pm 13.9	16.2 \pm 2.00
1%熊胆配合HF食群	194 \pm 14.8***	49.0 \pm 23.6	0.37 \pm 0.30	8.84 \pm 4.22	56.8 \pm 29.9	22.0 \pm 6.78	29.5 \pm 2.79	7.40 \pm 4.50**
1%牛胆配合HF食群	219 \pm 24.7*	70.8 \pm 41.4	0.59 \pm 0.29	26.2 \pm 12.1	108 \pm 34.0	82.8 \pm 36.8	36.3 \pm 14.5	6.72 \pm 5.03**
1%豚胆配合HF食群	213 \pm 8.9**	66.0 \pm 13.7	0.58 \pm 0.16	22.5 \pm 19.0	83.8 \pm 67.8	44.0 \pm 36.1	42.1 \pm 8.80	15.0 \pm 3.88
1%TCA配合HF食群	196 \pm 51.2*	52.5 \pm 11.9	0.42 \pm 0.13	24.8 \pm 23.7	182 \pm 94.0	181 \pm 104*	32.6 \pm 6.47	7.23 \pm 2.28***
1%CA配合HF食群	230 \pm 17.9*	55.5 \pm 24.0	0.68 \pm 0.35	35.4 \pm 20.1	262 \pm 234	263 \pm 238	24.7 \pm 9.41	6.48 \pm 3.45***

Mean \pm SD (n=4-5), ***, ***, ***, * p < 0.05, 0.01, 0.001 to HF

表4 動物胆配合高脂肪食給餌マウスにおける肝重量及び脂質含量

	重量 (mg/10g 体重)	トリグリセライド (mg/g 肝)	コレステロール (mg/g 肝)	過酸化脂質 (nmole/g 肝)
普通食群	479 \pm 37.7***	11.0 \pm 3.04	2.61 \pm 0.72	424 \pm 85.2*
HF食群	347 \pm 17.6	13.5 \pm 10.1	3.03 \pm 1.73	551 \pm 62.1
1%熊胆配合HF食群	399 \pm 48.6	4.57 \pm 1.66	2.17 \pm 0.57	533 \pm 77.9
1%牛胆配合HF食群	444 \pm 25.8***	8.22 \pm 2.99	3.73 \pm 0.92	574 \pm 31.6
1%豚胆配合HF食群	354 \pm 31.9	7.94 \pm 1.03	3.42 \pm 1.56	664 \pm 82.3
1%TCA配合HF食群	415 \pm 29.3**	9.09 \pm 3.01	6.04 \pm 1.24*	621 \pm 163
1%CA配合HF食群	453 \pm 56.1**	10.7 \pm 3.00	5.32 \pm 1.68	489 \pm 93.5

Mean \pm SD (n=4-5), ***, ***, ***, * p < 0.05, 0.01, 0.001 to HF

考 察

1、高脂肪食給餌によるマウスの体重増加に対して、遊離型及び抱合型のコール酸は同程度の抑制効果を示した。この抗肥満作用に相関して、脂肪組織重量も減少すると共に、肝臓における脂肪蓄積を抑制した。一方、両タイプのコール酸は用量依存的に肝障害を来たすが、抱合型の方が障害性は低いことが推察された。

2、1%の動物胆配合により、高脂肪食による体重増加は有意に減少し、特に牛胆では普通食群以下の体重増加に留まった。この抗肥満効果に相関して、熊胆及び牛胆では脂肪組織重量の減少が見られた。一方、血中胆汁酸濃度、AST 及び ALT は、動物胆給餌によっても低値を示し、動物胆中の胆汁酸含量を考慮しても遊離型及び抱合型コール酸よりも動物胆の方が肝障害を生じにくいことは明らかである。さらに、動物胆により脂肪蓄積が抑制される傾向が認められている。

以上の結果より、抱合型の胆汁酸を含む動物胆は、肝障害を生じにくい抗肥満薬としての応用を可能にする生薬であることが示された。

文 献

- 1) Mitsuhiro Watanabe, Sander M. and Houten, et al.: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation, *Nature*, Vol. 439, 484-489 (26 January 2006)
- 2) Erkan Yilmaz, Lale Ozcan. and Masato Furuhashi, et al.: Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes, *Science*, Vol. 313, 1137-1140 (25 August 2006)
- 3) 大野 雅恵: “コレステロール代謝に関わる核内受容体 Farnesoid X Receptor の解析”、*薬学雑誌* 128(3), 343-355, (2008)

攪拌造粒における結合剤液量と造粒物性の関係

Study of the Relationship between Amount of Binder Solution and
Granulated Physical Property on High Shear Mixer

富山県薬事研究会製剤部会 —攪拌造粒グループ—

Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association
- High Shear Mixer Group -

斉藤 充広 Mitsuhiro SAITO	共栄製薬工業株式会社 Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.	三上 好美 Yoshimi MIKAMI	キョーリン Remedio 株式会社 Kyorin Rimedio Co., Ltd.
田中 基晴 Motoharu TANAKA	小林化工株式会社 Kobayashi Kako Co., Ltd.	吉田 健人 Takehito YOSHIDA	新新薬品工業株式会社 Shinshin Pharmaceutical Co., Ltd.
坂木 智昭 Tomoaki SAKAKI	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kougyou Co., Ltd.	成田 梓 Azusa NARITA	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co., Ltd.
斉藤 由紀絵 Yukie SAITO	東亜薬品株式会社 Toa Pharmaceuticals Co., Ltd.	小西 弘貢 Hirotsugu Konishi	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
加藤 隆 Takashi KATO	日本曹達株式会社 Nippon Soda Co., Ltd.	利波 真未子 Mamiko TONAMI	バイホロン株式会社 Bihoron Co., Ltd.
小泉 晴佳 Haruka KOIZUMI	富士化学工業株式会社 Fuji Chemical Industry Co., Ltd.	長谷川 雄一 Yuichi HASEGAWA	株式会社富士薬品 Fujiyaku Co., Ltd.
大谷 桂 Katsura Ohtani	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Industry 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.		

結 言

医薬品のうち、内服固形製剤を製造するための重要な工程の一つに「粉を大きくして粒をつくる」造粒があり、このなかでも攪拌造粒では流動性に優れ、丸みを帯びた重質の粒子が出来上がるのが特徴である。攪拌造粒機は造粒時間が短く、造粒羽根と解砕羽根を回すだけの操作のため、造粒機の中で、世界中で最も多く使用されている。問題として、終点制御と結合剤の使用量が難しいという点であり、バッチによって粒子形状が変化し、溶出や打錠に影響が出ることが多い。

今回は、結合剤の適当な使用量について検討するため、結合剤の固形分量を 3% に固定し、水の

分量のみを変化させることで、粒子形状がどのように変化するかを検討した。すなわち、塑性限界 (Plastic Limit: PL) に対する水分量を変化させることで、造粒物のでき方にどのような違いが出てくるかを評価した。塑性限界とは粉の空隙が、すべて水分で置換された状態であり、感触がぱさぱさからねばねばに変わる寸前で、消費電力が最も高くなる。この塑性限界の水分量を基準として、段階的に水分量を振り分けて造粒を行い、物性を比較したので報告する。

実験方法

1. 処方 (標準処方)

	(2型用, 300 g 仕込み)	(5型用, 1 kg 仕込み)
乳糖(200M)	210g(70%)	700g(70%)
コーンスターチ	90g(30%)	300g(30%)
HPC-L	9g(3%, 外側添加)	30g(3%, 外側添加)

※ 乳糖の PL は 0.18 mL/g、コーンスターチは 0.67 mL/g である。コーンスターチの平衡水分は 12%程度とされているが、当所測定で 6.54%であり、コーンスターチの PL を 0.63 mL/g とした。乳糖は水分をほとんど含まないので、0.18 mL/g とした。したがって、2型用処方の PL は $(210 \times 0.18 \times 0.7) + (90 \times 0.63 \times 0.3) \div 43.5$ mL/g であり、5型用処方の PL は $(700 \times 0.18 \times 0.7) + (300 \times 0.63 \times 0.3) \div 182.7$ mL/g と計算された。HPC-L については、添加量を統一するために粉末添加(3%)とした。

※ 2型用処方では 43.5 g を PL100%とし、34.8 mL(80%), 39.2 mL(90%), 43.5 mL(100%), 47.9 mL(110%), 52.2 mL(120%)の液量で造粒した。一方、5型用処方では 182.7 g を PL100%とし、109.6 mL(60%), 128 mL(70%), 146.1 mL(80%), 164.4 mL(90%), 182.7 mL(100%)の液量で造粒した。

2. 操作条件

実験装置：ハイスピードミキサー (LFS-GS-2型、FS-GS-5型、深江パウテック製)

操作法：2型のミキサーは、アジテーター回転数 420 rpm、チョッパー回転数 1500 rpm、で1分混合し、既定量の水を滴下後 10分間造粒した。一方、5型のミキサーは、アジテーター回転数 400 rpm、チョッパー回転数 1500 rpm、で1分混合し、既定量の水を滴下後 5分間造粒した。造粒後はそれぞれ流動層造粒機にて乾燥し、850 μm でふるった造粒物を物性評価に用いた。

3. 物性評価

乾燥後の造粒品について、見かけ密度 (かさ密度)、粒度分布、安息角、平均粒子径を測定した。平均粒子径は対数正規分布 (正規確率紙) を用いて算出した。

実験結果および考察

仕込み量の異なる 2 種の攪拌造粒機を用いて造粒した造粒物の物性を比較した結果、平均粒子径、微粉量、安息角のグラフとも、並行の線図を示していた (Fig. 1)。よって、塑性限界に対する水分添加量によっては、2 種の攪拌造粒機で類似の傾向が認められた。しかし、平均粒子径のグラフでは、 $200\mu\text{m}$ の粒子を得るのに、5 型 (1kg 仕込み) では塑性限界の 80%、2 型 (300g 仕込み) では 110% の水分添加量となっており、5 型のほうが「塑性限界に対して 0.5~0.85 程度の範囲に本格的な造粒現象が生じる¹⁾」との理論に対応していることが明かとなった。攪拌造粒ではバインダーの添加量のみが支配的なのではなく、全体の粒子に加わるせん断力、つまり、回転数と仕込み量の設定も重要であることが考察された。

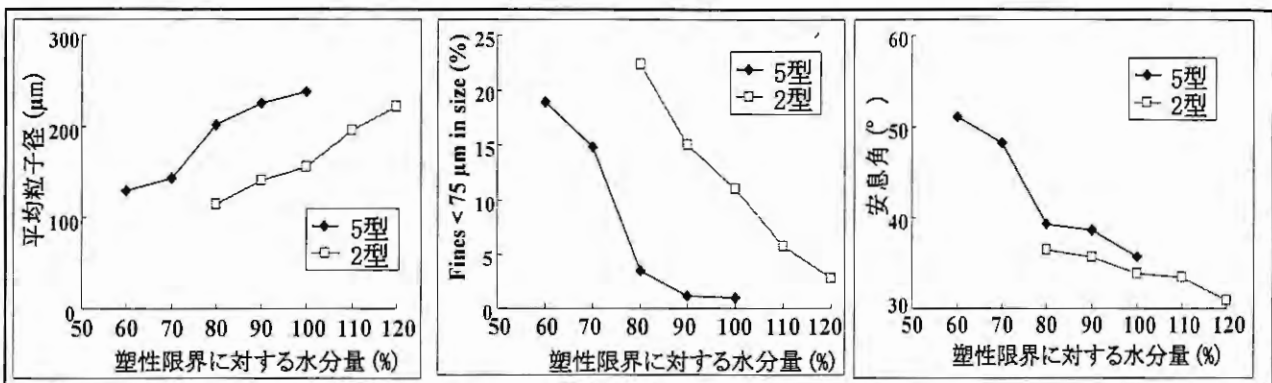


Fig. 1 塑性限界に対する水分量と各種物性の関係

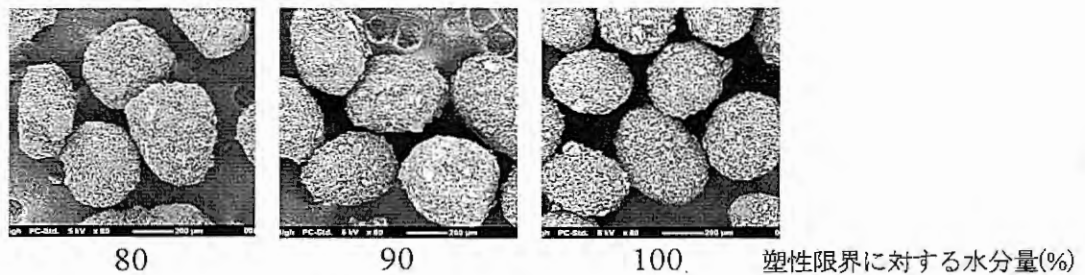


Fig. 2 水分量と粒子形状 (2型ミキサー)

文 献

- 1) 日本粉体工業技術協会編「造粒ハンドブック」 オーム社 (1991)

降圧剤短期間投与による脳卒中予防効果および発症マーカーの探索

Preventative Effects of Temporary Treatment of Antihypertensive on Cerebral Apoplexy and
Quest for Novel Stroke Biomarkers in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats
(SHRSP)

永井 秀昌

Hidemasa NAGAI

松原 利行

Toshiyuki MATSUBARA

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒 言

生活習慣病の中でも脳卒中は重篤な後遺症を伴うことから、その予防及び治療は高齢社会において大きな課題である。脳卒中の原因となる高血圧の治療としては、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB)、利尿剤、カルシウム拮抗薬 (CCB)、交感神経抑制剤 (β 遮断薬) などの降圧剤が临床上使用されている。近年これらの降圧剤のうち、ACE 阻害薬もしくは ARB を脳卒中易発性高血圧ラット (Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat、SHRSP) に一定期間投与することで、その後の高血圧の発症が持続的に抑制されるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) ブロックメモリー現象が報告された^{1), 2)}。

そこで本研究では、ACE 阻害薬を短期投与することによって、RAS ブロックメモリー効果による脳卒中発作の予防ができないかと考え、詳細な検討を行った。また、我々はこれまで行ってきた脳卒中発症診断マーカーの探索研究において、SHRSP と正常ラット血漿の電気泳動パターンを比較することにより、マーカー候補たんぱく質を同定している³⁾。今回は、この発症マーカー候補たんぱく質について脳卒中発作発症との関連性を調べ、マーカーとしての有用性を検討した。

実験方法

1. 実験動物

実験には脳卒中易発性高血圧ラットである SHRSP (5 週齢、♂) と正常ラットである WKY ラット (5 週齢、♂) を用い、それぞれ三協ラボサービス㈱から購入した。

2. 降圧剤の混餌投与

降圧剤としてカプトプリルおよびニフェジピンを使用した。降圧剤はトウモロコシデンプンを賦形剤として 10% 散を作製し、この予製散を粉末飼料に 100 g 当たり 1 g 添加し十分混和した。飼料はガラス製給餌器に入れて水道水とともに自由に与えた。また、降圧剤の摂餌投与は 8 週齢から開始した。

3. 動物の観察および血圧測定

実験開始後 1 週間は毎日摂餌量、飲水量および動物の体重を測定し、以後摂餌量と飲水量について、週 1 回最初に脳卒中発作が見られるまでの間測定し、動物の体重については実験期間中、週 1 回測定を続けた。また、動物の行動は毎日観察し、脳卒中発症日および死亡日を記録

した。脳卒中発症の指標は、一方の前肢の持ち上げ運動、歩行異常、過敏、自発運動の減少、立毛、体重減少などの発現とした。血圧は2週に1回の頻度で最初の脳卒中が発症するまでの間、小動物自動血圧測定装置を用いて tail cuff 法により測定した。

4. マーカー候補蛋白質の確認

WKY と SHRSP 雄性ラットから眼窩静脈採血により血漿を採取し(薬剤投与後 0-12 週)、サンプルバッファーで 100 倍に希釈した。希釈した血漿(5 μ l)を SDS-PAGE により分離した。泳動したゲルは銀染色を行い、バンドパターンを比較した。

実験結果

1. 血圧に対する影響

SHRSP ラットの対照群では血圧の上昇が著しく、実験開始時(8 週令)の血圧はいずれの群も約 180 mmHg であったが、5 週間後には 250 mmHg に達した。一方、SHRSP ラットのカプトプリル 5 週間投与群においては、投与期間中は血圧が一定に保たれており、投与終了後に血圧が一時急激に上昇するものの、それ以降の上昇は緩やかであった(Fig. 1)。また、カプトプリル 10 週間、20 週間およびニフェジピン投与群においても、同様の傾向を示した。これらの群においては、測定を続けた 40 週目まで 250 mmHg に達することはなかった。

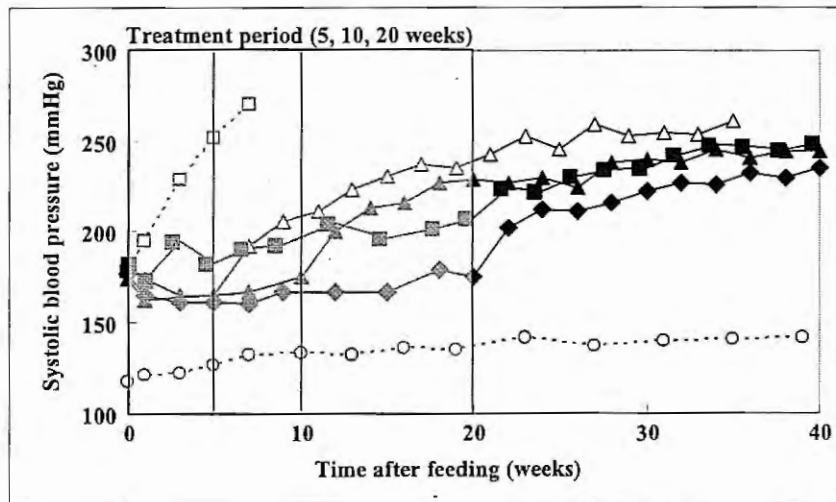


Fig. 1 Change of systolic blood pressure after treatment with Captopril or Nifedipine in SHRSP

○; WKY rats, □; SHRSP (control), △; captopril 5 weeks, ▲; captopril 10 weeks, ◆; captopril 20 weeks, ■; nifedipine 20 weeks

2. 脳卒中発作発症までの期間および生存日数に対する影響

SHRSP ラットのカプトプリル 5、10、20 週投与およびニフェジピン 20 週投与群において、脳卒中発作発症までの期間と生存日数が大幅に延長した。カプトプリル 5 週、20 週投与群における発作発症までの期間はそれぞれ 217 日、322 日延長し、生存日数も 267 日、404 日延長した(Fig. 2-3, Table 1)。また、カプトプリル 20 週投与群とニフェジピン 20 週投与群とを比較した結果、有意な差は認められなかったものの、いずれもニフェジピン投与群で日数が低下する傾向が認められた。

次に、カプトプリルを 1、2、3、5 週間投与し、比較した結果、1 週間の投与においても有意な脳卒中発作発症までの期間の延長 (51 日) と生存日数の延長 (105 日) が認められた (data not shown)。

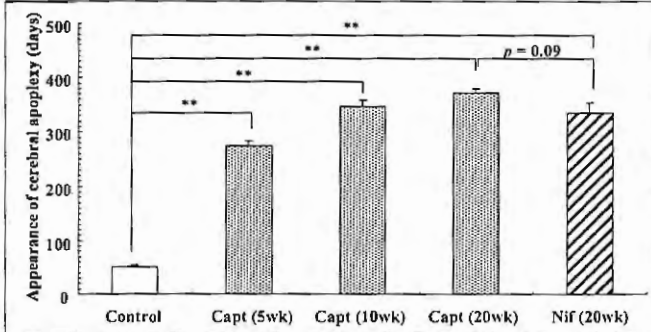


Fig. 2 Effect of Captopril and Nifedipine on appearance of apoplexy in SHRSP

Results are mean \pm S.E. (n = 4).
control; SHRSP control, Capt (5wk); captopril 5 weeks, Capt (10wk); captopril 10 weeks, Capt (20wk); captopril 20 weeks, Nif (20wk); nifedipine 20 weeks
** : $p < 0.01$ vs. control (Scheffe's test)

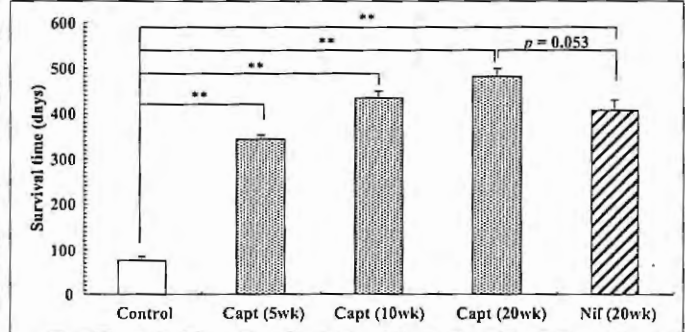


Fig. 3 Effect of Captopril and Nifedipine on survival time in SHRSP

Results are mean \pm S.E. (n = 4).
control; SHRSP control, Capt (5wk); captopril 5 weeks, Capt (10wk); captopril 10 weeks, Capt (20wk); captopril 20 weeks, Nif (20wk); nifedipine 20 weeks
** : $p < 0.01$ vs. control (Scheffe's test)

Table 1 Prolongation of life span by Captopril or Nifedipine in SHRSP

Group	Appearance of cerebral apoplexy (days)	Survival time (days)
Control (SHRSP)	51 \pm 3	76 \pm 11
0.1% Captopril (5wk)	268 \pm 8**	343 \pm 10**
0.1% Captopril (10wk)	346 \pm 12**	435 \pm 16**
0.1% Captopril (20wk)	373 \pm 8**	480 \pm 19**
0.1% Nifedipine (20wk)	328 \pm 17**	406 \pm 24**

mean \pm S.E. (n=4)

** : $p < 0.01$ vs. control (Sheffe's test)

3. 脳卒中発作発症診断マーカー候補蛋白の探索

SHRSP ラットの カプトプリル 5 週間投与群と対照群について、薬剤投与後 0 週から 12 週までの血漿中蛋白の電気泳動パターンを比較した。これまでに報告しているとおりに、対照群では脳卒中発作発症後に、haptoglobin (Hp) と apolipoprotein E (Apo E) のバンドが消失していることを確認した。一方、カプトプリル投与群においては、2 種のバンドの消失は見られなかったことから、脳卒中発作との相関性が確認された (Fig. 4)。

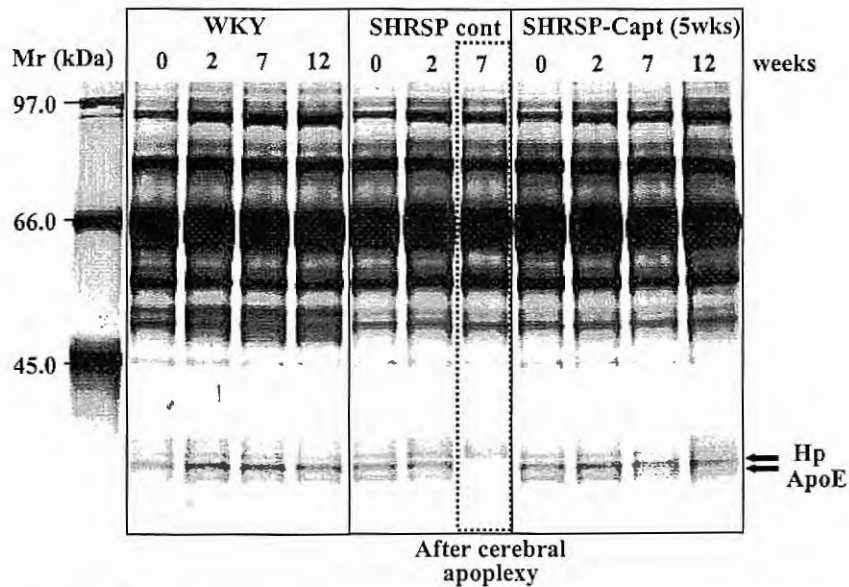


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of WKY and SHRSP plasma protein (silver staining)
 Five μ l of plasma from WKY(left), SHRSP control (middle) and SHRSP captopril 5 weeks (right) were separated as described materials and methods.
 Hp: haptoglobin, ApoE: apolipoprotein E

考 察

今回の実験では、SHRSP ラットの脳卒中発作発症までの時期と生存日数を指標とし、ACE 阻害薬の一つであるカプトプリルの投与期間を 5、10、20 週に変えて、脳卒中発作予防効果の認められる投与期間を検討した。この結果、カプトプリル投与群において、投与終了後も血圧の急激な上昇は認められず、RAS ブロックメモリー現象が確認された。また、脳卒中発作の発症までの期間は対照群よりも 5 週投与群で 217 日、20 週投与群で 322 日延長し、生存日数もそれぞれ 267 日、404 日延長するなど、脳卒中予防効果が認められた。さらに、投与期間を 1、2、3、5 週に設定して実験を行った結果、1 週間投与群においても脳卒中予防効果が認められた。今後は投与開始の時期を変更することにより、短期投与でも脳卒中予防効果が認められる原因を解明していく予定である。

今回の研究成果から、初期治療で ACE 阻害薬を投与し、その後は脳卒中発症マーカーを指標にしながら緩和的な治療を続けることで QOL の高い効果的な治療ができる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Nakaya, H., Sasamura, H., Hayashi, M., Saruta, T.: Temporary treatment of prepubescent rats with angiotensin inhibitors suppresses the development of hypertensive nephrosclerosis., *J Am Soc Nephrol.*, 12, 659-66 (2001).
- 2) Ishiguro, K., Sasamura, H., Sakamaki, Y., Itoh, H., Saruta, T.: Developmental activity of the renin-angiotensin system during the "critical period" modulates later L-NAME-induced hypertension and renal injury., *Hypertens Res.*, 30, 63-75 (2007).
- 3) 永井秀昌, 高橋敏, 松原利行: プロテオーム解析による脳卒中発症診断マーカーの探索, 富山県薬事研究所年報, 33, 13-17 (2006).