

マオウ中の総アルカロイド定量法の検討 (第1報)

成川 一郎 西本 初博
西村 裕子 中田 りり子
東亜製薬株式会社・試験研究室*

マオウ中の総アルカロイド量を求める方法として、一般には日本薬局方の定量法（以下JP法と略称する）が採用されている。

我々がJP法を準用して、マオウやマオウの湯液並びにマオウの入った漢方処方湯液の中の総アルカロイドを定量したところ、原生薬マオウの定量値よりも、同一ロットのマオウの湯液あるいは漢方処方湯液の定量値の方がいずれの場合も高い値を示した。即ちJP法において抽出される総アルカロイド量よりも、沸騰水中へ溶出する総アルカロイド量の方が多^{1) 2) 3)}いことが判明した。

そこでマオウを定量する際の抽出操作につきあらためて検討した結果、迅速でかつ再現性のよい方法を見出したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) マオウ

ロットC ₁	中国産	鈴粉末薬品(株)扱
ロットC ₂	中国産	鈴粉末薬品(株)扱
ロットC ₃	中国産	日本粉末薬品(株)扱
ロットS ₁	ソ連産	アルプス薬品工業(株)扱

2) 実験材料の前処理

実験に先立ち細切品のマオウをふるいを用いて5回反復混合した後小西式粉砕器で粗粉末とし、更に繊維部分は薬研ですりつぶして粉末とし、全体を十分に混合した。

2. 方法及び結果

1) 実験に使用したマオウのJP法による定量

ロットC₁, C₂, C₃, S₁のマオウについてJP法で定量した結果をTable 1に示した。なお、ロットC₁のマオウについては富山県薬事研究所に試験依頼したが、当社

Table 1. JP法によるマオウ中の総アルカロイド定量結果(%)

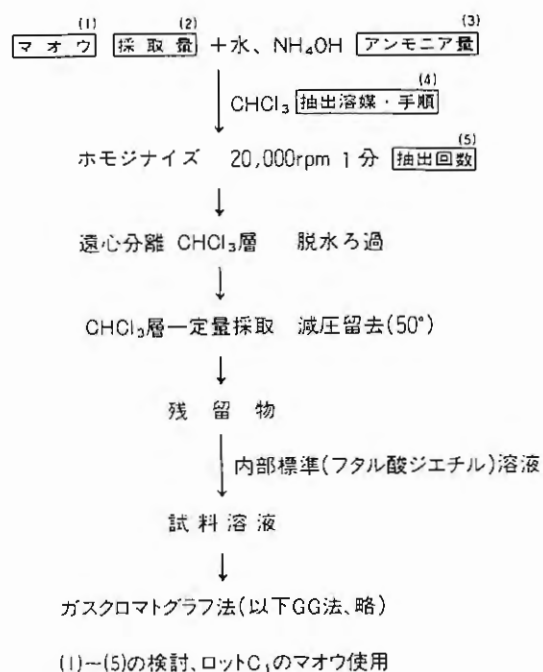
ロット 実施者 回	C ₁ (中国産)		C ₂ (中国産)	C ₃ (中国産)	S ₁ (ソ連産)
	富山県薬事研究所	東亜製薬KK	東亜製薬KK	東亜製薬KK	東亜製薬KK
1	1.10	1.10	0.94	2.01	1.73
2	1.03	0.94	1.21	2.07	1.63
3	1.00	0.97	0.91	1.97	1.73
4	—	0.95	1.10	—	1.68
5	—	1.02	1.25	—	1.60
\bar{x}	1.04	1.00	1.08	2.02	1.67

の結果とほぼ一致した。

2) ホモジナイザー抽出法の設定と細部の検討

マオウ中の総アルカロイド定量法としてホモジナイザーを用いる方法（以下HZ法と略称する）を設定し、ロットC₁のマオウを用い以下に示すごとく(1)~(5)の細目について順次検討した。

ホモジナイザー抽出法 (HZ) の設定と細部の検討



(1) 試料の前処理の検討

マオウを前処理によって粉末にしたものと前処理なしの細切品について定量し比較した結果, Table2に示すごとく定量値に差はみられなかった。

Table.2. 粉末品と細切品の定量結果 (%)

回	粉末品	細切品
1	2.43	2.36
2	2.39	2.46
3	2.44	2.42
\bar{x}	2.42	2.41

(2) 試料採取量の検討

マオウは外皮部や内芯部等部分的にアルカロイド含有量が異なることが予想され, 従って試料採取量による定量値の変動も考えられる。そこで試料採取量0.33~2.00gで試験した結果, Table3に示すごとく定量値に差はみられなかった。以下の試験は試料採取量1gで行った。

Table.3. 試料採取量と定量結果 (%)

回	採取量 ^g	0.33	0.50	0.70	1.00	1.50	2.00
1		2.32	2.34	2.32	2.43	2.46	2.38
2		2.34	2.36	2.46	2.39	2.41	2.40
3		2.46	2.47	2.42	2.44	2.53	2.43
\bar{x}		2.37	2.39	2.40	2.42	2.47	2.40

(3) アンモニア量の定量

抽出時に加えるアンモニア量につき検討した結果, Table4に示すごとく, マオウ1gに対しアンモニア試液5ml以上で定量値はほぼ一定になった。

(4) 抽出溶媒及び抽出手順の検討

マオウをアルカリ性でクロロホルム抽出する場合, アルカロイド以外の物質も溶出してガスクロ

Table.4. アンモニア量と定量結果 (%)

ml	アンモニア試液	強アンモニア水
3	2.30	2.48
5	2.48	2.47
8	2.51	2.47

マトグラムのエフェドリン類のピークに重なることが懸念される。そこで前操作として酸性でヘキサン抽出し懸念される妨害物質の存在の有無を確かめた。実験操作の概略及び各抽出溶液のガスクロマトグラムについてはFig1に示した。

実験の結果、Aのヘキサン層から調製した試料溶液には標準溶液Eのエフェドリンと同一の相対保持時間のピークもその他のピークもみられなかった。またヘキサン抽出後の水層をアルカリ性でクロロホルム抽出した液から調製した試料溶液B、ヘキサン処理を行わない試料溶液C及びD（HZ法）に現れたピークの各相対保持時間は、標準溶液Eのエフェドリンのピークのそれに一致した。

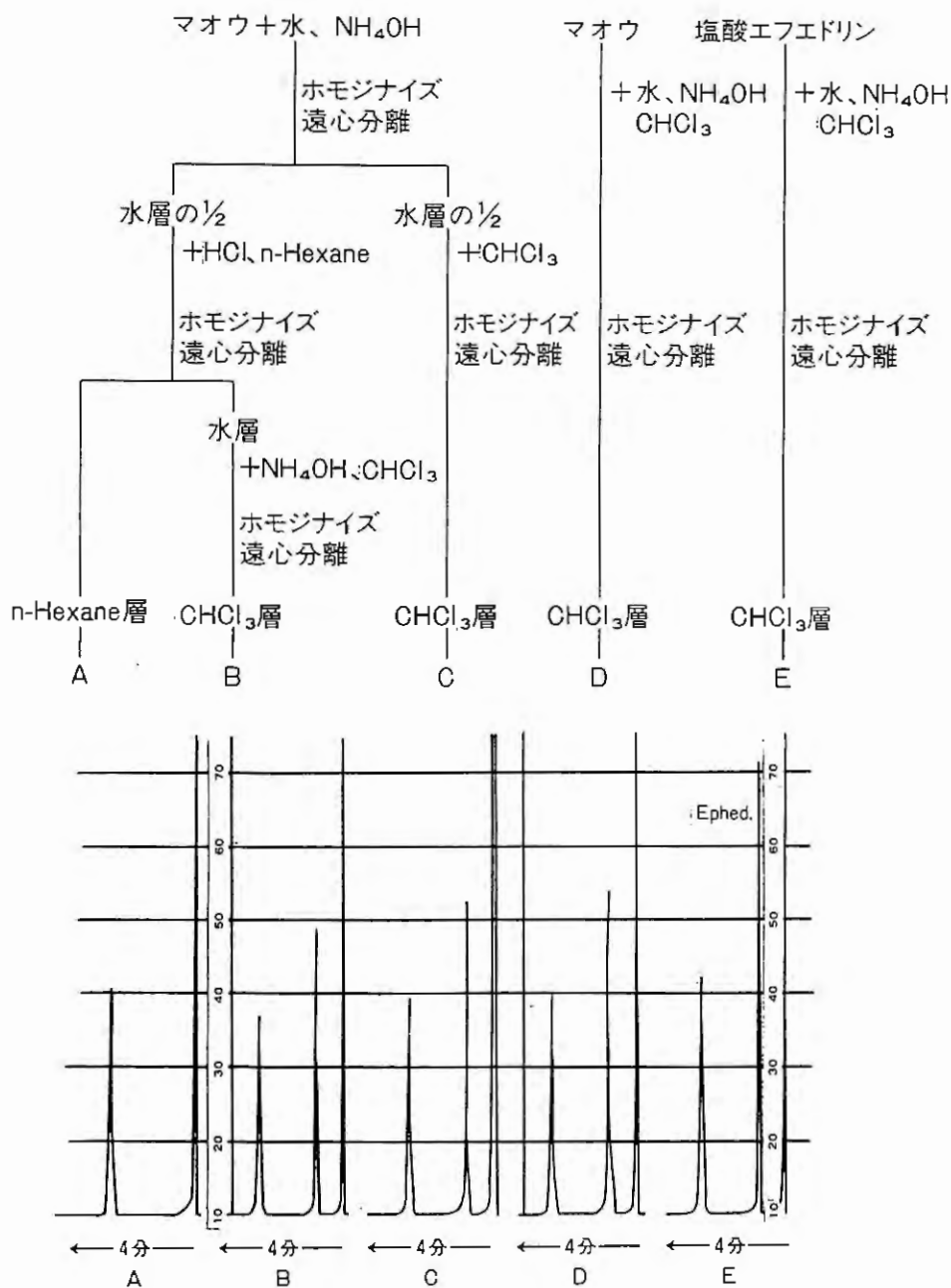


Fig.1. 実験操作の概略並びに各抽出溶液のガスクロマトグラム

(5) 抽出回数 の 検 討

ホモジナイザーで抽出する回数について抽出回数1~3回で検討した結果、Table5に示すごとく定量値に差はみられなかった。

2) 以上(1)~(5)の検討の結果、試料1gの抽出に対するアンモニアの必要分量はアンモニア試液として5ml、ホモジナイザー抽出の必要回数は1回で、抽出溶媒、抽出手順ともに適切であり、この方法によれば再現性のよい定量値が得られることを確認した。

3) その他の検討資料

前項で述べたH Z法の設定に至る過程において各種抽出方法並びに検討を試みたので報告する。

(1) エタノール、メタノール抽出法

ロットC₁のマオウ1gに50%エタノール又はメタノール40mlを加えて2時間還流抽出を反復して2回行い、抽出溶媒を減圧下で留去し、残留物にエーテル20mlを加えて溶かし、以下J P法の操作を準用し定量した結果をTable6に示した。その値はJ P法による定量の約2倍であった。

(2) J P法の定量操作の検討並びにJ P法抽出残渣の再定量

ロットC₁のマオウをJ P法で定量したあとの滴定終了溶液をアンモニアアルカリ性でクロロホルム抽出してGC法で定量した値はJ P法の値と一致し、J P法滴定操作には問題がないことを確認した。

次にJ P法で抽出した後の抽出残渣についてH Z法で定量した値とJ P法の値の和は、H Z法の値とほぼ一致し、J P法の抽出操作が不十分であることを確認した(Table7)。

更にTable7における②の滴定終了溶液から調製した液並びに③の抽出残渣から調製した液について薄層クロマトグラフにより比較した結果をFig2に示した。両液ともエフェドリンと同一の赤紫色スポット(Rf約0.56)とそれ以外に赤紫色スポット(Rf約0.62)が認められた。

展開溶媒 : n-ブタノール・酢酸・水混液(4:2:1)

発色試薬 : ニンヒドリン試液

(3) 熱水抽出法、H Z法並びにJ P法の定量値の比較

ロットC₁, C₂, C₃及びS₁の各細切品100gに水2ℓずつを加えて還流煮沸し、溶出した総アルカロイドを経時的にGC法で定量した結果を各マオウのH Z法並びにJ P法の定量値と比較してFig3に示した。いずれもH Z法の定量値が最も高くJ P法の定量値が最も低かった。熱水抽出においては、いずれも沸騰開始後90分ではほぼ最大値を示しその値はH Z法の80~95%であった。

Table.5. 抽出回数と定量結果(%)

抽出回数	1	2	3
1	2.43	2.41	2.37
2	2.43	2.40	2.40
3	2.40	2.40	2.38
\bar{x}	2.42	2.40	2.38

Table.6. エタノール、メタノール抽出法の定量結果(%)

溶媒	50%エタノール	メタノール
1	1.89	1.93
2	1.96	1.97
3	1.87	1.96
\bar{x}	1.91	1.95

Table.7. 定量方法の比較並びに抽出残渣の定量結果 (%)

試料 定量法 回	マオウC ₁ (中国産)		抽出残渣	② + ③ 合計値
	① J P 法	② ①の滴定終了液 G C 法	③ H Z 法 G C 法	
1	0.78	0.71	1.84	2.55
2	0.96	1.02	1.28	2.30
3	1.09	1.07	1.29	2.36
\bar{x}	0.94	0.93	1.47	2.40

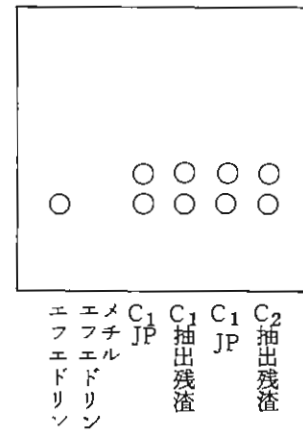


Fig.2. 薄層クロマトグラム

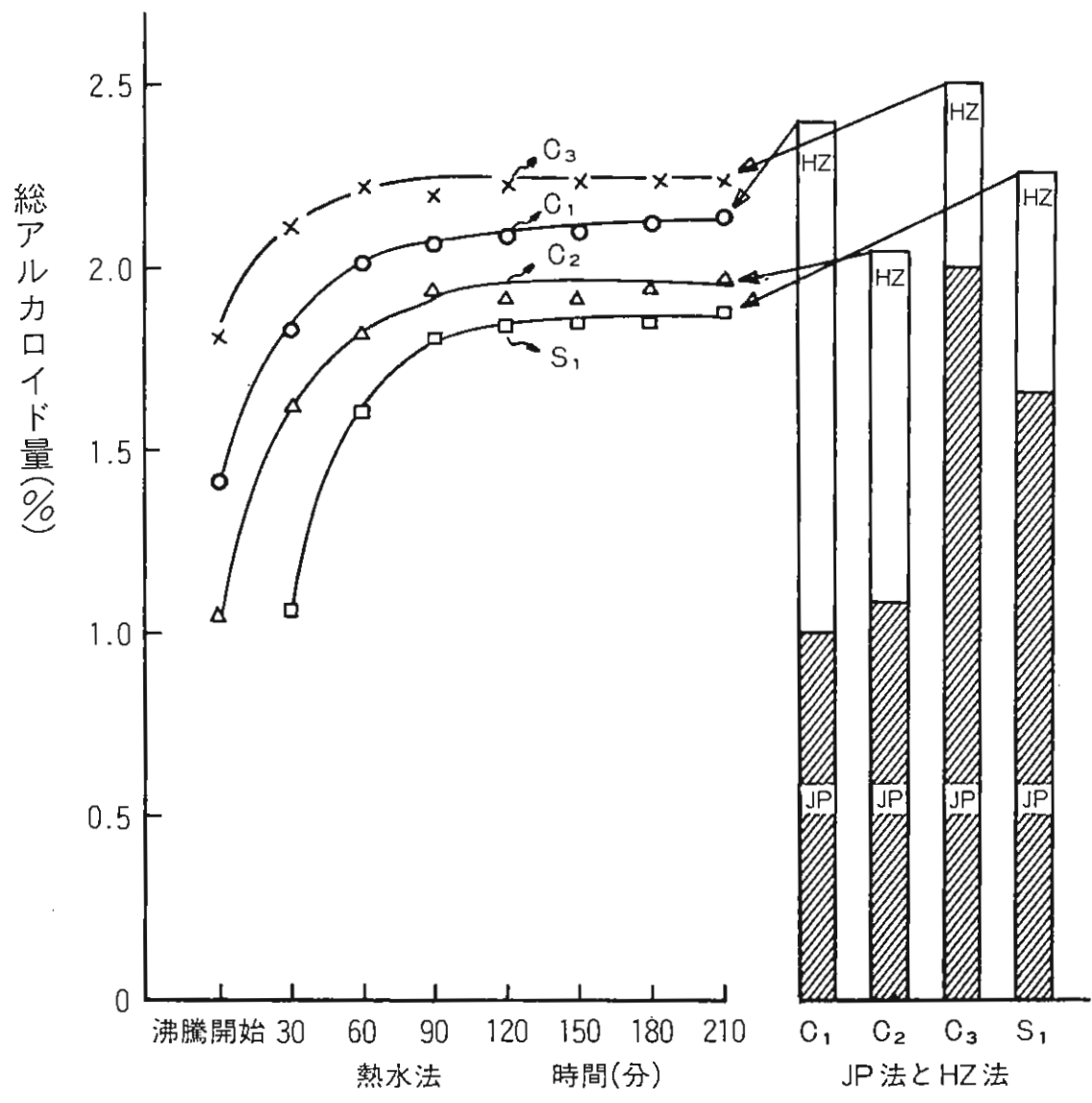


Fig.3. 熱水法 H Z 法並びに J P 法の定量値の比較

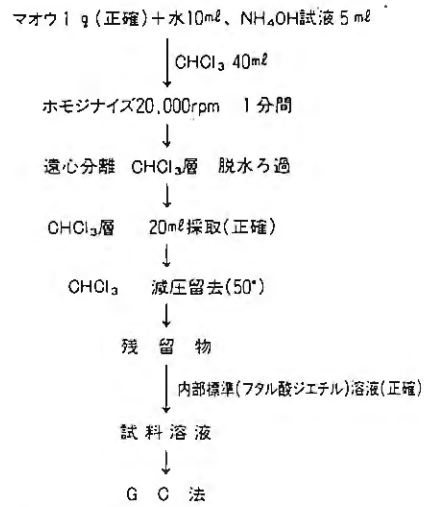
ま と め

1. HZ法の設定

ここであらためてHZ法の操作法について略記する。

2. 各種抽出法による定量値の比較

ロットC₁, C₂, C₃及びS₁についての各種抽出法による定量値を Table 8 及び Fig 4 に示した。いずれも HZ法の定量値が最も高くJP法の定量値が最も低かった。またメタノール法の定量値は熱水法の定量値にほぼ一致し、HZ法の80~95%であった。



条件 検出器: FID
 カラム: OV-17 3% 2 m
 カラム温度: 180°
 検出器温度: 220°

Table. 8. 各種の抽出方法による定量値 (%)

ロット	試験法	回					\bar{x}	σ
		1	2	3	4	5		
C ₁	JP法	1.10	0.94	0.97	0.95	1.02	1.00 ± 0.06	
	HZ法	2.43	2.39	2.44	2.41	2.40	2.41 ± 0.02	
	メタノール法	1.93	1.97	1.96	—	—	1.95 ± 0.02	
	熱水法	2.08	—	—	—	—	2.08	
	エタノール法	1.89	1.96	1.87	—	—	1.91 ± 0.04	
	JP法 + HZ法	2.55	2.30	2.36	—	—	2.40 ± 0.11	
C ₂	JP法	0.94	1.21	0.91	1.10	1.25	1.08 ± 0.14	
	HZ法	2.00	2.13	2.08	1.97	2.06	2.05 ± 0.06	
	メタノール法	1.98	1.96	2.00	—	—	1.98 ± 0.02	
	熱水法	1.95	—	—	—	—	1.95	
C ₃	JP法	2.01	2.07	1.97	—	—	2.02 ± 0.04	
	HZ法	2.55	2.52	2.43	—	—	2.50 ± 0.05	
	メタノール法	2.27	2.33	2.37	—	—	2.32 ± 0.04	
	熱水法	2.23	—	—	—	—	2.23	
S ₁	JP法	1.73	1.63	1.73	1.68	1.60	1.67 ± 0.05	
	HZ法	2.30	2.23	2.25	2.29	2.24	2.26 ± 0.03	
	メタノール法	1.99	2.07	1.90	—	—	1.99 ± 0.07	
	熱水法	1.88	—	—	—	—	1.88	

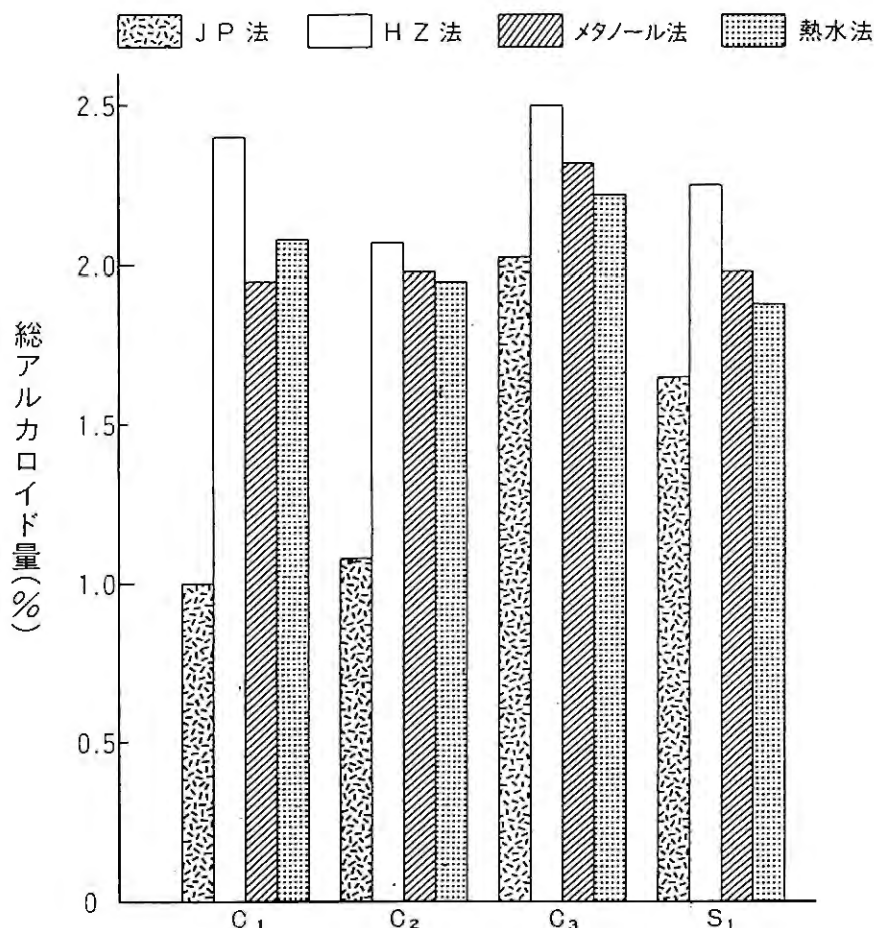


Fig.4. 各種抽出法による定量値の比較

考 察

以上の結果によれば、4ロットのマオウについて検討した各抽出法中、JP法はいずれも最も低い値を示した。従って、JP法による原生薬マオウの定量値を基準として、湯液中への総アルカロイド溶出量や総アルカロイド溶出に対する他の生薬の影響等について判断することは困難である。またJP法ではマオウやマオウの入った漢方処方乾燥エキス、更にこれらの製剤についての正確な品質評価も期し難い。即ちJP法は被験マオウが日局のマオウの規格値に適合するかどうかの判定のためのものであり、我々が上述のような一連の比較研究や品質評価を実施するためには適さないと判断される。

現在の分析技術は各種高度な検出機器が開発され、研究応用されているが、抽出法については超音波等を使用する方法が研究されているものの一般にはあまり進歩がないように思われる。生物の細胞中に含まれる成分の定量等についてはその抽出方法について十分検討する必要があると考える。

今回我々が設定したHZ法は試料のマオウが粉末でも細切品でも定量値にほとんど差がなく、ロット毎にはほぼ一定しており、操作が簡便で時間がかからない利点があり、マオウの一連の研究により適切な方法であると思われる。

なお、本実験においてはホモジナイザー抽出後GC法で検出定量を行ったので、エフドリンと類縁化合物とはピークが分離されず、同一ピークとして検出されるので、いずれもその結果は「総アルカロイド」として表現した。今後エフドリン及びその類縁化合物を液体クロマトグラフその他の検出法によって分離定量すれば、更に興味深い結果が得られるものと考えられる。

提 案

マオウ及びマオウを含む製剤中の総アルカロイドに関する品質評価については、ホモジナイザー抽出を行うか、少なくともメタノール抽出又は熱水抽出を行うことを提案致します。

謝 辞

本研究にあたりご指導いただいた富山医薬大吉崎正雄助教授，金岡又雄助教授，国立衛生試験所生薬部野口衛先生，富山県薬事研究所の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) 野口衛他：漢方製剤の薬剤学的品質評価に関する研究 麻黄中のアルカロイドの漢方湯液調製時の挙動について，薬学雑誌，98，923（1978）
- 2) 西本和光：麻黄の品質，東洋現代医学，1，52（1980）
- 3) ヒキノヒロシ他：和漢薬の品質に関する研究 第2報麻黄，日本東洋医学会誌，31，167（1981）
- 4) 橋本庸平：“麻黄の研究—ガスクロマトグラフィーによるエフェドリン類の分離定量について，”生薬分析，広川書店，東京（1977）
- 5) 高石清和他：ガスクロマトグラフ法による ℓ -および d - ϕ -エフェドリンの定量，日本生薬学会第29回年回講演要旨集，4（1982）

漢方処方¹⁾の抽出条件とエキス量 (第2報)

—麻杏薏甘湯, 麻杏甘石湯—

成川 一 郎 西本 初 博
西村 裕 子 中田 りり子
東亜製薬株式会社・試験研究室[※]

今回は麻黄湯型漢方¹⁾処方を用いて、各種抽出条件によるエキス収率とその乾燥エキス中の総アルカロイド量の関係を明らかにするため実験を行った。ここで次の2つの問題点が生じた。即ち日本薬局方の定量法 (以下J P法と略称する) による原生薬マオウの定量値よりも湯液あるいは乾燥エキス^{2) 3)}の定量値の方が高い値を示した^{2) 3)}こと、次いで麻杏薏甘湯に比べて麻杏甘石湯の定量値の方がかなり高い値を示した⁴⁾ことの2点である。第1点はさきに我々が報告した⁴⁾“ホモジナイザー抽出法 (以下H Z法と略称する)”⁴⁾を採用することによって解決した。第2点についてもこの方法を用いて検討した。即ち、⁵⁾両処方の構成生薬中、各処方⁵⁾を特徴づけている麻杏薏甘湯中のヨクイニン、麻杏甘石湯中のセッコウがそれぞれ湯液中への総アルカロイド溶出にどのような影響を及ぼしているかについて検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

実験に使用した生薬は、すべて中国産 (鈴粉末薬品扱) の細切品である。

なお、マオウの総アルカロイド含有率はH Z法で2.4%, J P法で1.0%である。

2. 試験方法

1) 乾燥エキスの製造方法

抽出、ろ過、濃縮及び乾燥方法については第1報¹⁾に準じて次の工程で製造する。

各抽出条件にて抽出→布ごし→遠心分離→エバポレーターで濃縮 (55°) →真空乾燥 (60°)

抽出の種類

Op: 開放抽出, Rx: 還流抽出, 土: 土びん煎出

抽出水量

原生薬量の倍数で表す。

2) 定 量 法

(1) 総アルカロイド: H Z 法

(2) 硫酸カルシウム: 食添第4版の硫酸カルシウム定量法を準用。

3. 試験結果

1) 麻黄湯型処方からのエキス収率

麻黄湯を基本骨格として考えた場合、麻杏薏甘湯は麻黄湯からケイヒを去りヨクイニンを加えたものであり、麻杏甘石湯は同様にケイヒを去ってセッコウを加えたものである。このように構成生薬中の1種類ずつ異なるが、これら麻黄湯型処方からのエキス収率は、原生薬量の20倍の抽出水量を用いた場合はTable 1に示すごとくいずれも原生薬量の13~14%であった。

Table.1. 麻黄湯型処方からのエキス収率

処方名	麻黄湯		麻杏薏甘湯	麻杏甘石湯		
	1	2	1	1	2	3
1日量(g)	15.5	12.5	19.0	20.0	20.0	20.0
抽出水量(倍数)	20	16	20	20	10	5
エキス量(g)	2.2	1.7	2.6	2.7	2.0	1.7
エキス収率(%)	14.2	13.6	13.7	13.5	10.0	8.5
生薬名	麻黄	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	杏仁	5.0	4.0	3.0	4.0	4.0
	甘草	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0
	桂皮	4.0	3.0	-	-	-
	薏苡仁	-	-	10.0	-	-
	石膏	-	-	-	10.0	10.0

抽出条件：開放 2時間煮沸

2) 麻杏薏甘湯の各抽出条件によるエキス収率と総アルカロイド

Fig.1に示すごとく麻杏薏甘湯のエキス収率は原生薬量の10~13%であった。20倍の抽出水量で1時間還流抽出した場合は土びん煎出とほぼ同じで原生薬量の約12%であった。

総アルカロイドはいずれも1回目の抽出でマオウのHZ法定量法の約60%が溶出し、1, 2回の抽出合計では約70%が溶出した。

3) 麻杏甘石湯の各抽出条件によるエキス収率と総アルカロイド

Fig.2に示すごとく麻杏甘石湯のエキス収率は原生薬量の11~14%であった。20倍の抽出水量で1時間還流抽出した場合は土びん煎出とほぼ同じで原生薬量の約13%であった。

総アルカロイドはいずれも1回目の抽出でマオウのHZ法定量値の約70%が溶出し、1, 2回の抽出合計では約80%が溶出した。

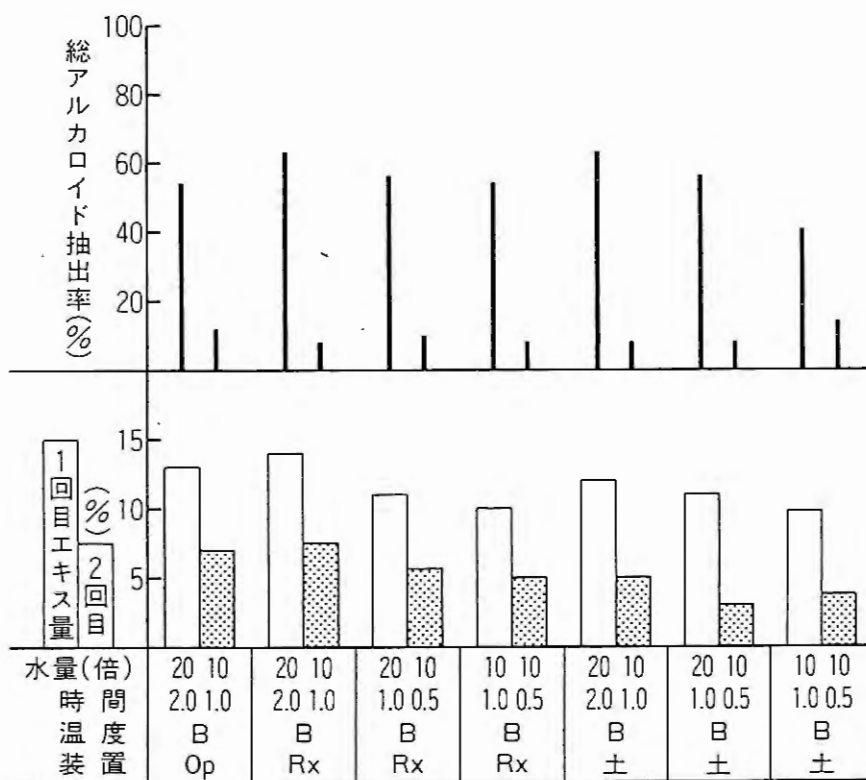


Fig.1. 麻杏薏甘湯の各抽出条件によるエキス収率と総アルカロイド量 PH: 5.2

マオウの総アルカロイド含有率：2.4%

Op：開放抽出 Rx：還流抽出 土：土びん煎出

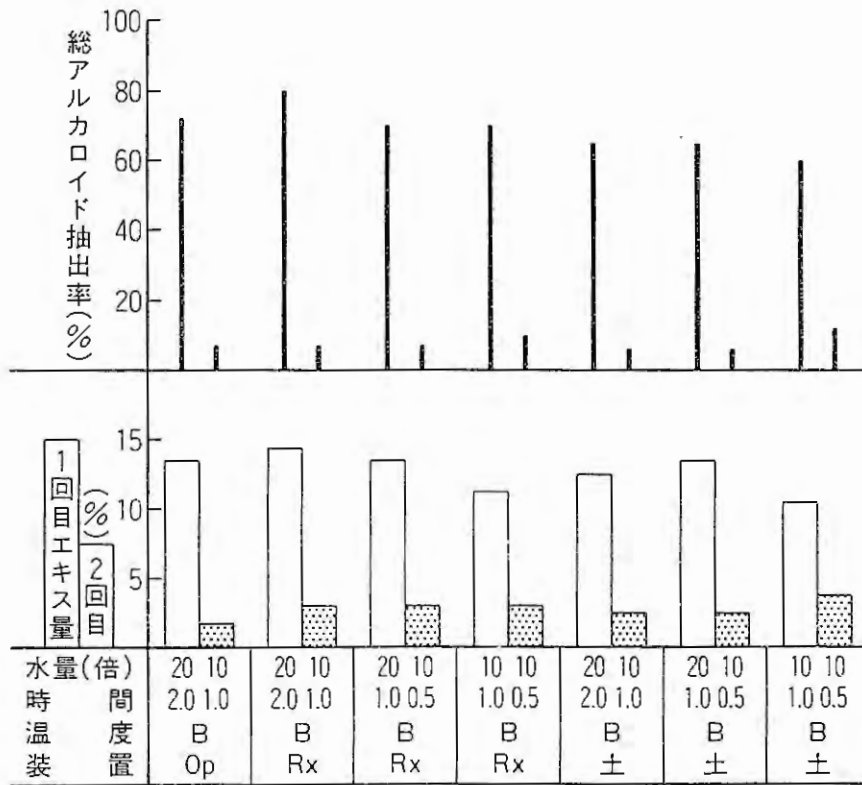


Fig.2. 麻杏甘石湯の各抽出条件によるエキス収率と総アルカロイド抽出率 PH: 4.9

マオウの総アルカロイド含有率: 2.4%

Op: 開放抽出 Rx: 還流抽出 土: 土びん煎出

4) 麻杏甘石湯の各抽出条件による $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の溶出

麻杏甘石湯の湯液中への総アルカロイド溶出に対するセッコウの影響を検討するに際して、本処方方のセッコウからの硫酸カルシウム溶出量を求めた。

実験に先立ち、セッコウにより試験して得た $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の溶出率は、化学定数表の溶解度の値「 $100^\circ 222\text{mg}/100\text{ml}$ 」にはほぼ一致した。

麻杏甘石湯を実験3)の各抽出条件で抽出し、湯液中の $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を定量した結果については Fig.3 に示した。開放抽出並びに20倍水量2時間土びん煎出及び10倍水量1時間土びん煎出の場合は煎出中の蒸発量が多く、最終的な湯液の収量は抽出開始時の50~60%とかなり濃縮された。この場合の $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 定量値は湯液収量に対する溶解度から算出した理論値の140~150%となった。

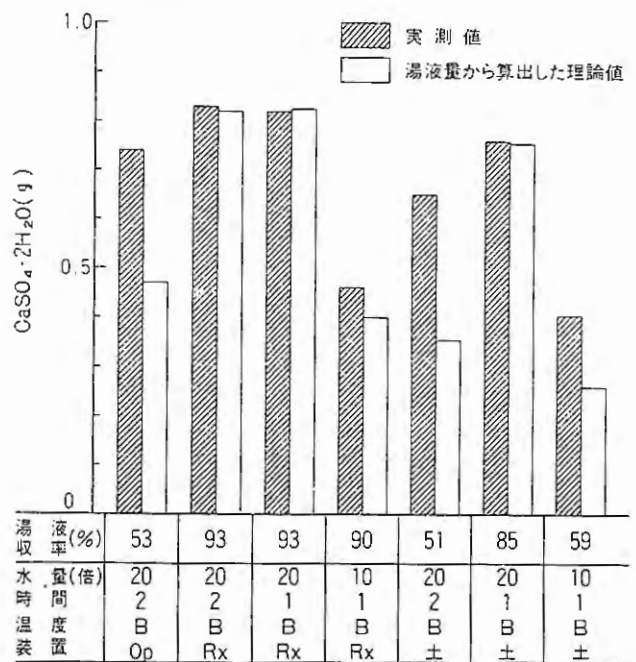


Fig.3. 麻杏甘石湯の抽出条件と $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の量

Op: 開放抽出 Rx: 還流抽出 土: 土びん煎出

還流抽出並びに20倍水量1時間土びん煎出の場合は抽出中の蒸発はほとんどなく、湯液の収量は85~90%で、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の定量値は理論値とはほぼ一致し、麻杏甘石湯1日量からの溶出量は0.7~0.8gであった。

即ち $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の溶出量は抽出水量に左右され、また、湯液が濃縮される場合は、最終的な湯液量から算出した理論値と一致しなかった。

5) マオウ及び麻杏薏甘湯、麻杏甘石湯並びにセッコウを去った麻杏甘石湯の各湯液中の総アルカロイド量の動向

麻杏薏甘湯と麻杏甘石湯は10倍、15倍及び20倍の抽出水量で、セッコウを去った麻杏甘石湯と原生薬マオウは20倍の抽出水量でそれぞれ還流抽出し、いずれも経時的に総アルカロイドを定量した結果をFig4に示した。各湯液とも沸騰開始後60~90分で総アルカロイド溶出量は最大となりその後の増加はなかった。総アルカロイドの最大値は原生薬マオウの湯液ではマオウ1gあたり20~21mg、麻杏甘石湯並びにセッコウを去った麻杏甘石湯はともに18~20mgでマオウの湯液に近い値を示した。これに対して麻杏薏甘湯は14~15mgで5~6mg低い値を示した。

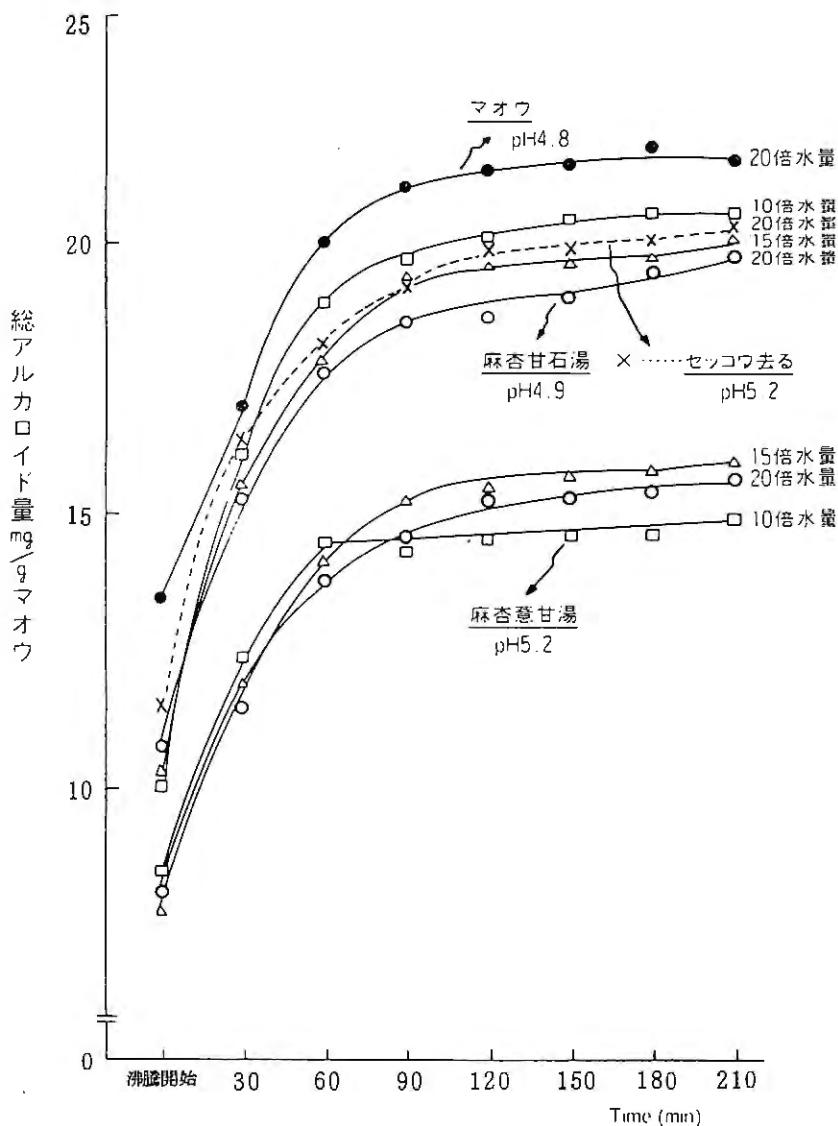


Fig.4. 各湯液の総アルカロイド量の動向

マオウの総アルカロイド含有率：2.4%

ま と め

1. 麻黄湯型漢方処方からのエキス収率は、20倍の抽出水量で2時間還流抽出した場合、原生薬量の13~14%で、前報の桂枝湯型漢方処方の場合の約25%に比べて低かった。
2. 麻杏薏甘湯、麻杏甘石湯ともに、エキス量及び総アルカロイド量がほぼ最大値を示すのは、桂枝湯型漢方処方と同じく、20倍の抽出水量を用いて1~1.5時間の還流抽出又は土びん煎出を行った場合であった。
3. 麻杏甘石湯1日分から湯液中へ溶出する硫酸カルシウム量は、20倍の抽出水量で1時間の還流抽出又は土びん煎出を行った場合約0.8gであったが、この値は抽出水量に左右される。また、湯液が蒸発によって濃縮された場合は湯液の減量に応じて過飽和となった硫酸カルシウムのかなりの量が沈殿せずに定量値に加わった。
4. マオウ、麻杏薏甘湯、麻杏甘石湯並びにセッコウを去った麻杏甘石湯の各湯液中への総アルカロイド溶出最大量をマオウ1gあたりに換算した値をTable2に示した。この結果からセッコウは総アルカロイド溶出に影響せず、麻杏薏甘湯中のヨクイニンが総アルカロイドの溶出を抑制していることが判明した。

Table.2. マオウ1gあたりに換算した総アルカロイド量

	総アルカロイド量 (mg)	含有率 (%)
マオウの熱水抽出液	20 ~ 21	2.0 ~ 2.1
麻杏薏甘湯の湯液	14 ~ 15	1.4 ~ 1.5
麻杏甘石湯の湯液	18 ~ 19	1.8 ~ 1.9
麻杏甘石湯より石膏去る湯液	18 ~ 20	1.8 ~ 2.0

考 察

マオウの日局の規格値は下限だけの規定で、「総アルカロイド量0.6%以上」となっている。0.6%という数値は一般に流通しているマオウの日局定量値からみても低い方である。その上我々がさきに報告した「マオウ中の総アルカロイド定量の検討(第1報)」によれば、JP法による定量値は、熱水抽出した場合の定量値よりも低い。従ってマオウの一般的総アルカロイド含有率を0.6~0.8%程度とみなしたり、JP法による定量値を基準として、湯液や乾燥エキスあるいはその製剤中の総アルカロイド量を想定するわけにはいかない。

この実験に使用したマオウはJP法定量値約1%、我々が設定したHZ法定量値約2.4%、熱水抽出による定量値約2%であった。JP法による定量値を基準として麻黄湯型漢方処方の湯液中へ溶出する総アルカロイド量を想定し、これを湯液の実測値並びに塩酸エフェドリンの常用量、極量と比較したのがTable3である。

即ち想定値では、例えば鎮咳作用を目的とした麻杏甘石湯においては、1日量中の総アルカロイド量は32mgであるが、実測値は塩酸エフェドリンの常用量と同じ75mgであった。以上のごとく麻黄湯型漢方処方では、一般に流通しているマオウの使用により、塩酸エフェドリンの常用量あるいはそれ以上のアルカロイドを服用していることが判明した。

従って湯液中の総アルカロイド量を求める場合は、湯液を定量するか、あるいは原生薬マオウをより適切な方法で定量した値を基準として想定すべきであると考え。

Table. 3. J P 法 1 % のマオウを用いた場合の想定値と実測値

()マオウの g 数	想 定 値(mg) ※		実 測 値(mg)	
	1 回 量	1 日 量	1 回 量	1 日 量
麻黄湯中の総アルカロイド量(5)	13	40	30	90
麻杏薏甘湯中の総アルカロイド量(4)	11	32	20	60
麻杏甘石湯中の総アルカロイド量(4)	11	32	25	75
塩酸エフェドリンの常用量	25	75	25	75
塩酸エフェドリンの極量	50	150	50	150

※総アルカロイドが湯液中へ80%溶出したとしての値

謝 辞

本研究にあたり終始ご指導いただいた東京理科大長沢元夫教授、富山医薬大吉崎正雄助教授、同大金岡又雄助教授、橋本竹二郎先生、国立衛生試験所生薬部野口衛先生、富山県薬事研究所の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) 成川一郎他：漢方処方抽出条件とエキス量（第1報），家庭薬研究，1，24（1982）
- 2) 野口 衛他：漢方製剤の薬剤学的品質評価 - 麻黄配合剤を中心として，医薬ジャーナル，15，No.11，41（1979）
- 3) 橋本 庸平：“麻黄を使用する漢方湯液中のエフェドリンの分離定量”，生薬分析，広川書店，東京（1977）
- 4) 成川一郎他：マオウ中の総アルカロイド定量法の検討（第1報），家庭薬研究，2，24（1982）
- 5) 伊藤忠信他：石膏の薬理学的研究，日本東洋医学会誌，29，161（1979）

パップ剤の抗炎症効果について

杉林毅宏 元山 貢
野村 明 森 政雄^{*}
リードケミカル株式会社・研究部

現在市販されているパップ剤は有効成分として主にサリチル酸メチル, *dl*-カンフル, *l*-メントール等を含み, 捻挫, 打撲, 筋肉痛, 関節痛等の鎮痛・消炎に広く用いられている。

パップ剤の薬効は*dl*-カンフル, *l*-メントール及び基剤中の水分による湿布効果と, サリチル酸メチル等のサリチル酸誘導体の経皮吸収による薬効があいまって抗炎症・鎮痛効果を発揮しているものと考えられる。

従来サリチル酸誘導体の経皮吸収に関する実験は種々行われてきたが, パップ剤成分としてのサリチル酸メチルの経皮吸収に関しては先に我々が報告した。この実験によればウサギ皮膚に適用した際, パップ剤中のサリチル酸メチルは経皮吸収により貼付投与後15分で血中に現れ, 投与後2時間で血中濃度は最高に達し, 24時間後にはほぼ血中から消失した。また, 投与したパップ剤中のサリチル酸メチルの約32%が経皮吸収され尿中へ排泄された。

今回我々は, 当社開発による含水性ゲル基剤からなるパップ剤を用いて, パップ剤中の各有効成分特にサリチル酸メチルの抗炎症効果につきラットカラゲニン浮腫により実験を行ったので報告する。

実 験 の 部

1. 使用動物

生後4~6週令のWistar系雄性ラットを使用した。ラットは温度 $22 \pm 1^\circ$; 湿度50~60%の飼育室で飼育し, 飼料としてラット用固形飼料(船橋農場製, MM-3)を用い, 飼料, 水ともに自由に摂取させた。なお, ラットは1週間予備飼育した後実験に供した。

2. 使用薬物

起炎剤: 1%カラゲニン水溶液

3. 被験パップ剤

1) 基剤(0% S-P)

含水性ゲル基剤。以下の被験パップ剤の基剤として用いた。

2) 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% S-P

基剤中に当該濃度のサリチル酸メチルを含有させたパップ剤。

3) 0% CMS-P

基剤中に*dl*-カンフル1.0%, *l*-メントール1.3%を含有させたパップ剤。

4) 0.5, 1.0, 2.0% CMS-P

0% CMS-Pに当該濃度のサリチル酸メチルを含有させたパップ剤。

上記の被験パップ剤はいずれも支持体700 cm^2 あたり100 g の割合で均一に展延してあり, 実験に際しては1枚3.5 $\text{cm} \times 4\text{cm}$ (膏体2 g)に裁断して用いた。

4. 実験方法

1) S-Pの抗炎症効果

ラットは実験前日左側後肢足蹠の被毛を電気カミソリで剪毛し1群10匹使用した。実験当日、剪毛足蹠に被験パップ剤として、0、0.5、1.0、2.0及び4.0% S-Pをそれぞれ貼付し、2時間後薬剤を取り除き、その足蹠皮下に起炎剤として1%カラゲニン水溶液0.05 mlをWalking-padの1つを通して注入し、同部位に再び新たな同種薬剤を貼付した。起炎剤注入3時間後に薬剤を取り除き足蹠容積を測定した。浮腫率は測定した足蹠容積の起炎前足蹠容積に対する増加率で、浮腫抑制率は次式により求めた。

$$\text{浮腫抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{被験パップ剤群の浮腫率 (\%)}}{\text{control 群あるいは基剤群の浮腫率 (\%)}} \right) \times 100$$

なお、control 群は無処置とし、実験中ラットはすべてボールマンケージ内に拘束し絶食絶水とした。

本実験のデータに関する統計処理はStudentのt検定で行った。

2) CMS-Pの抗炎症効果

被験パップ剤として、0、0.5、1.0及び2.0% CMS-Pを用い、実験1)と同様に実施した。

3) CMS-Pの経時的抗炎症効果

被験パップ剤として、0%並びに2.0% CMS-Pを用いて実験1)と同様に実施したが、測定は起炎剤注入後1時間毎に5時間後まで行った。また薬剤は測定時取り除き測定後新たな同種薬剤を貼付した。

4) S-P及びCMS-Pの抗炎症効果

被験パップ剤として、0、2.0% S-P並びに0、2.0% CMS-Pを用い、実験1)と同様に実施した。

5. 実験結果

1) S-Pの抗炎症効果

被験パップ剤として基剤中にサリチル酸メチルのみを、0、0.5、1.0、2.0及び4.0%の各濃度含有させた0、0.5、1.0、2.0及び4.0% S-Pを用い、起炎3時間後の浮腫抑制効果について試験した結果はTable 1及びFig 1に示した。これによれば0.5%以上のサリチル酸メチル濃度でcontrol に対し有意で用量依存的な浮腫抑制効果が認められ、2.0%以上で効果はほぼPlateauに達した。またサリチル酸メチル1.0%以上で基剤に対しても有意な浮腫抑制効果が認められた。

Table.1. S-Pの浮腫抑制率

群	浮腫率 (%)	浮腫抑制率 (%)	
		control に対して	基剤に対して
control	59.2 ± 4.6	—	—
基剤 (0% S-P)	53.8 ± 5.2	9.1	—
0.5% S-P	42.9 ± 3.7*	27.5	20.3
1.0% S-P	39.3 ± 3.9*†	33.6	27.0
2.0% S-P	36.1 ± 2.6**††	39.0	35.7
4.0% S-P	35.6 ± 4.0**†	39.9	36.0

n = 10

*P < 0.05 (control に対して)

†P < 0.05 (基剤に対して)

**P < 0.01 (control に対して)

††P < 0.01 (基剤に対して)

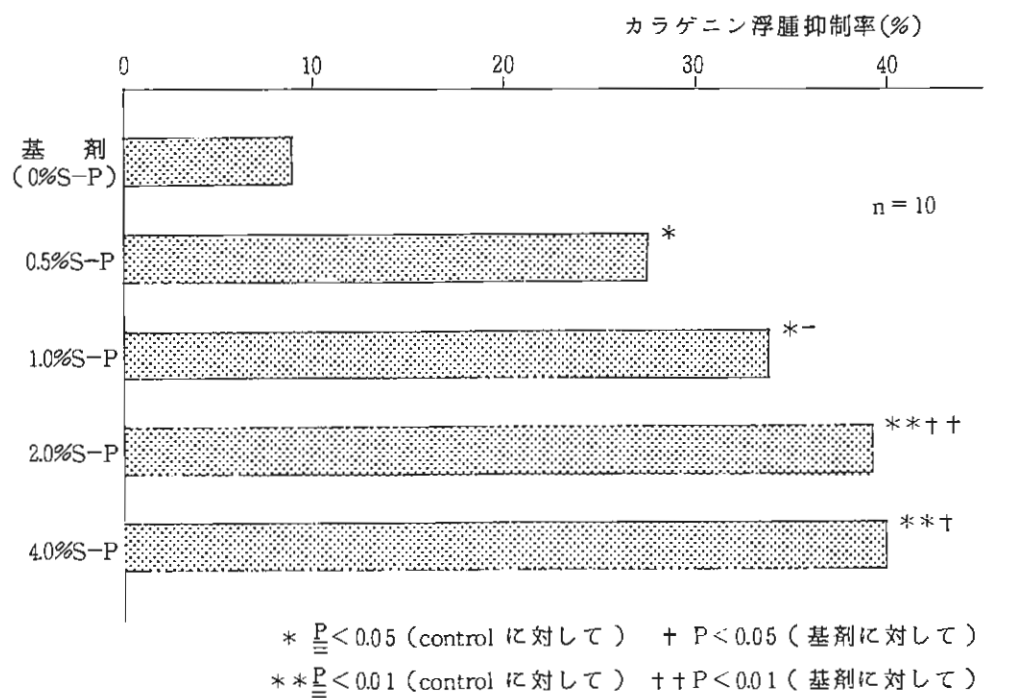


Fig.1. S-Pの抗炎症効果 3時間値

2) CMS-Pの抗炎症効果

被験パップ剤として基剤中に dl -カンフル1.0%及び l -メントール1.3%のほかサリチル酸メチルを、0、0.5、1.0及び2.0%の各濃度含有させた0、0.5、1.0及び2.0%CMS-Pを用い、起炎3時間後の浮腫抑制効果について試験した結果はTable2及びFig2に示した。これによれば dl -カンフル1.0%、 l -メントール1.3%を配合した場合、0.5%以上のサリチル酸メチル濃度でcontrolに対し有意で用量依存的な浮腫抑制効果が認められたが、サリチル酸メチルを含まない場合は有意な浮腫抑制効果が認められなかった。またサリチル酸メチルを2.0%含有する場合は dl -カンフル、 l -メントールのみのものに対しても有意な浮腫抑制効果が認められた。

Table.2. CMS-Pの浮腫抑制率

群	浮腫率 (%)	浮腫抑制率 (%)	
		control に対して	0%CMS-Pに対して
control	60.6 ± 5.1	—	—
0%CMS-P	52.6 ± 4.3	13.2	—
0.5%CMS-P	41.7 ± 2.6*	31.2	20.7
1.0%CMS-P	39.4 ± 4.7**	35.0	25.1
2.0%CMS-P	35.6 ± 4.4**+	41.3	32.3

n=10

* $P < 0.05$ (control に対して)
** $P < 0.01$ (control に対して)
+ $P < 0.05$ (0%CMS-Pに対して)

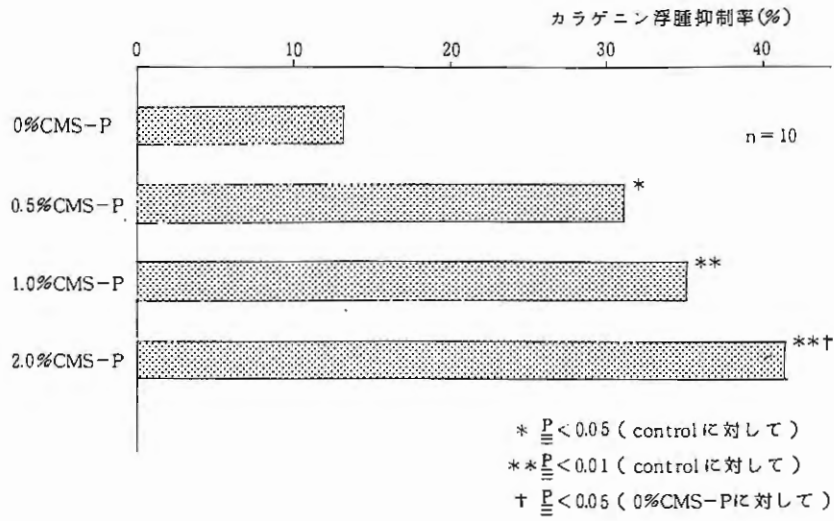


Fig. 2. CMS-P の抗炎症効果

3 時間値

3) CMS-P の抗炎症効果 (経時的推移)

被験パップ剤として基剤中にdl-カンフル 1.0%及びl-メントール 1.3%を含有させたもの(0% CMS-P)及びこれにサリチル酸メチル 2.0%を加えたもの(2.0% CMS-P)を用い、起炎5時間後まで1時間毎に浮腫抑制効果について試験した結果はTable 3, Table 4及びFig 3に示した。これによればdl-カンフル, l-メントールに加えてサリチル酸メチルを2.0%含有させたものはcontrol に対して起炎2時間後から5時間後まで有意な浮腫抑制効果が認められたが, dl-カンフル, l-メントールのみのもものでは全測定時を通じて有意な浮腫抑制効果は認められなかった。サリチル酸メチル 2.0%を加えたものは, dl-カンフル, l-メントールのみのもものに対しても起炎3時間後から5時間後まで有意な浮腫抑制効果が認められた。

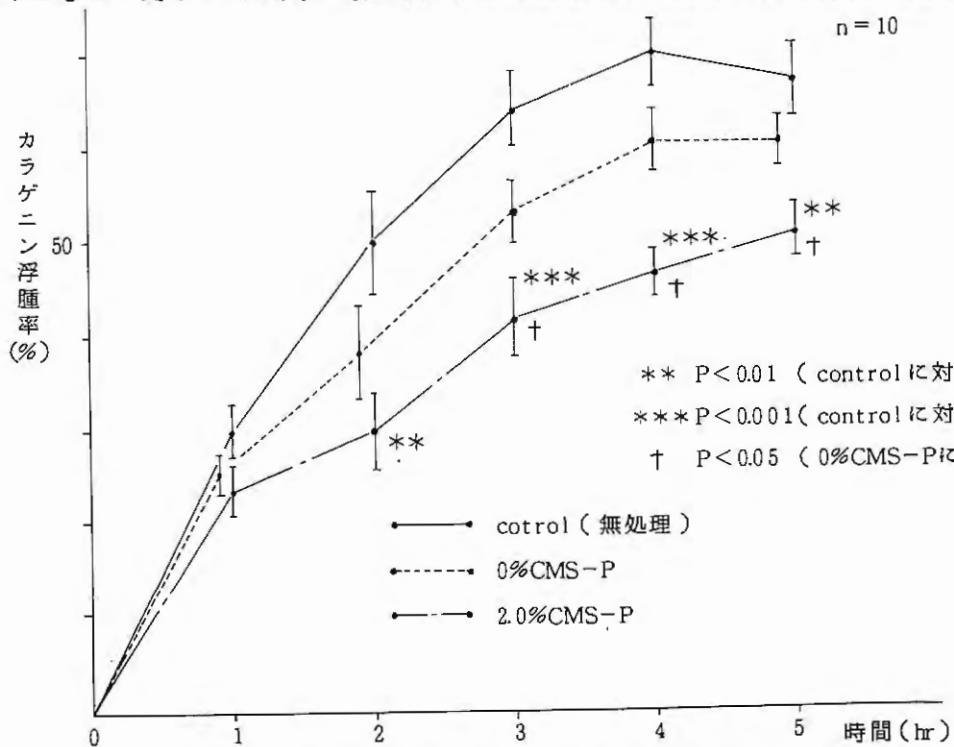


Fig. 3. CMS-P の抗炎症効果 (経時的推移)

Table.3. CMS-P適用時の浮腫率 (%)

群 \ 時間	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
control	29.7 ± 2.8	49.9 ± 5.4	63.7 ± 3.9	70.3 ± 3.7	67.1 ± 3.9
0% CMS-P	25.3 ± 2.2	38.1 ± 4.8	53.0 ± 3.4	60.9 ± 3.4	61.2 ± 3.0
2.0% CMS-P	23.3 ± 2.7	30.0 ± 4.3 **	41.6 ± 4.0 ***†	46.8 ± 2.8 ***†	50.8 ± 2.8 ***†

**P<0.01 (control に対して) n=10
***P<0.001 (control に対して) †P<0.05 (0% CMS-P に対して)

Table.4. CMS-Pの浮腫抑制率 (%)

群 \ 時間	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr
0% CMS-P	14.8	23.6	16.8	13.4	8.8
2.0% CMS-P	21.5	39.9	34.7	33.4	24.3

n=10

4) S-P及びCMS-Pの抗炎症効果

被験パップ剤として基剤 (0% S-P), 基剤中にサリチル酸メチル 2.0% を含んだもの (2.0% S-P), dl-カンフル 1.0% 及び ℓ -メントール 1.3% を含んだもの (0% CMS-P), dl-カンフル 1.0%, ℓ -メントール 1.3% に加えてサリチル酸メチル 2.0% を含んだもの (2.0% CMS-P) の 4 種類を用いて起炎 3 時間後の浮腫抑制効果について試験した結果は Table 5 及び Fig 4 に示した。これによればサリチル酸メチルを含まないものと 2.0% 含んだものとは浮腫抑制率に約 30% の差がみられ, サリチル酸メチルを 2.0% 含有したものはいずれも control に対して有意な浮腫抑制効果を示したが, サリチル酸メチルを含まない場合は有意な浮腫抑制効果を示さなかった。また dl-カンフル, ℓ -メントールを加えた場合はそれぞれ若干の浮腫抑制率増加が認められたがその差は有意な値ではなかった。

Table.5. S-P 及び CMS-P の浮腫抑制率

群	浮腫率 (%)	浮腫抑制率 (%)
control	72.3 ± 4.9	—
0% S-P (基剤)	65.8 ± 5.6	9.0
0% CMS-P	60.6 ± 5.3	16.2
2.0% S-P	44.4 ± 3.7**	38.6
2.0% CMS-P	41.7 ± 3.3**	43.2

n=10

**P<0.01 (control に対して)

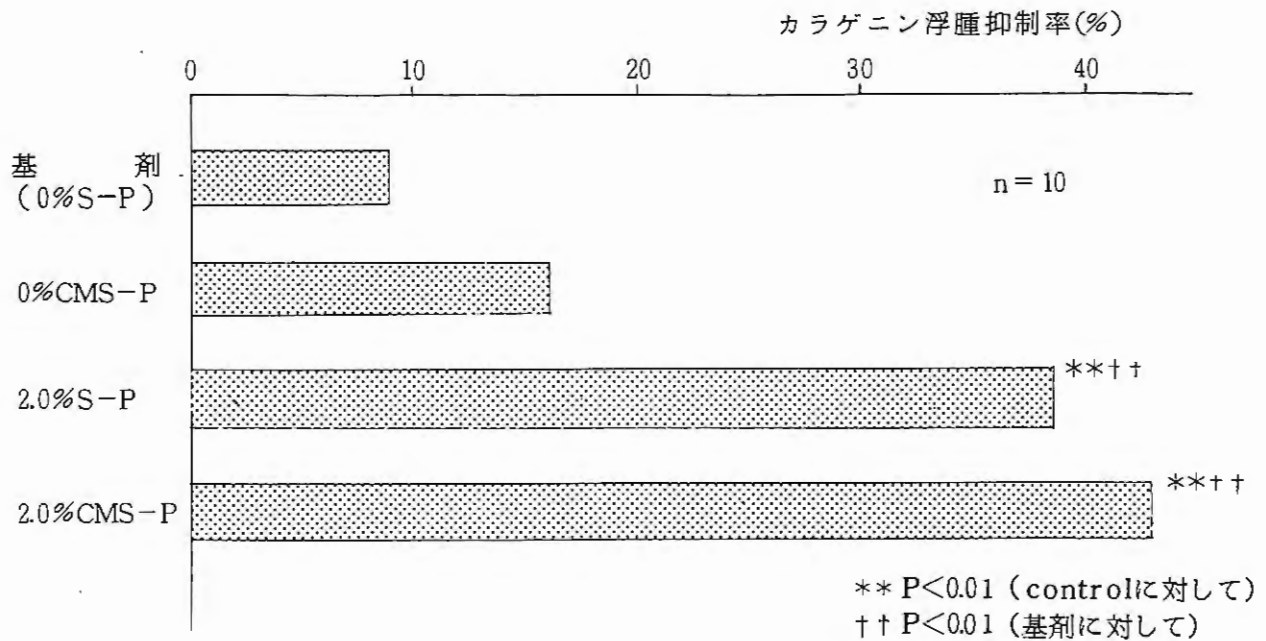


Fig. 4. S-P 及び CMS-P の抗炎症効果

考 察

今回のラットカラゲニン浮腫法による実験に用いた含水性ゲル基剤からなるパップ剤においてサリチル酸メチルの経皮吸収による抗炎症効果を期待するためには、サリチル酸メチルとして1.0%以上の配合が必要であり、またサリチル酸メチルの経皮吸収による効果は2.0%以上の配合でほぼ一定になることが判明した。一方、サリチル酸メチルに加えてdl-カンフル、*l*-メントールを配合することにより若干抗炎症効果の増大が認められたものの有意な値ではなく、またdl-カンフル1.0%、*l*-メントール1.2%のみのパップ剤ではcontrol並びに基剤に対して有意な抗炎症効果が認められなかったことから、今回の実験条件でのdl-カンフル並びに*l*-メントールはサリチル酸メチルの経皮吸収の補助及びパップ剤基剤中の水分による湿布効果の補助の役割を果しているものと考えられる。

即ち、含水性ゲル基剤のパップ剤においてラットカラゲニン浮腫法による抗炎症効果は、主としてサリチル酸メチルに代表されるサリチル酸誘導体の配合に負うものと判断した。

今後更に別の炎症モデルについても検討するとともに、抗炎症効果、炎症組織内濃度及び血中濃度相互の関連性についても明らかにして、パップ剤の治療薬としての裏付けを確立する必要があると考える。

文 献

北川晴雄他：ウサギ皮膚に適用したMethyl salicylateの吸収分布および排泄について、応用967(1979)

外用ステロイド剤フルオシノニドの血管収縮試験

佐貫大三郎 神田 章

前田薬品工業株式会社・開発部※

外用ステロイド剤の血管収縮試験はMekenzie¹⁾²⁾等によって開発され、血管収縮に伴う蒼白現象とステロイドの臨床効果との間に高い相関性があるとされている。この為血管収縮試験は外用ステロイド³⁾の作用機序の中で重視されるものの一つで、局所効果の生物学的検定法として高く評価されている⁴⁾。今回フルオシノニドクリーム⁴⁾の効力比較試験として、血管収縮試験を採用し、その検討を行った。

実験および方法

1. 実験材料

- 被験剤-クリーム1g中フルオシノニド0.5mgを含有するPG（プロピレングリコール）を主体とした親水性クリーム
- 基剤-被験剤中ステロイドの入らないもの
- 対照剤-トプシムクリーム（田辺製薬株式会社製）
- パッチテスト用絆創膏-鳥居薬品株式会社製

Table 1 基剤による蒼白現象

密封時間 (hrs)	被験者	判定時間 (hrs)							密封時間 (hrs)	被験者	判定時間 (hrs)						
		20分後	1	2	3	4	6	16			24	20分後	1	2	3	4	6
1	1	+	+	-	-	-	-	-	6	1	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	±	±	-	-	-	-		2	+	±	±	±	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-	-		3	±	±	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-		4	±	+	±	-	-	-	-
	5	±	-	-	-	-	-	-		5	+	±	-	-	-	-	-
	6	±	±	-	-	-	-	-		6	-	-	-	-	-	-	-
2	1	±	±	-	-	-	-	-	16	1	+	+	-	-	-	-	
	2	±	+	±	-	-	-	-		2	±	±	±	±	-	-	-
	3	+	±	-	-	-	-	-		3	+	±	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	-	-	-		4	±	±	-	-	-	-	-
	5	+	±	-	-	-	-	-		5	-	-	-	-	-	-	-
	6	±	-	-	-	-	-	-		6	+	±	-	-	-	-	-
3	1	+	+	-	-	-	-	-	24	1	+	+	-	-	-	-	
	2	+	+	±	-	-	-	-		2	+	+	±	±	-	-	-
	3	±	±	-	-	-	-	-		3	+	±	-	-	-	-	-
	4	±	±	-	-	-	-	-		4	±	±	-	-	-	-	-
	5	+	±	-	-	-	-	-		5	-	±	-	-	-	-	-
	6	±	-	-	-	-	-	-		6	±	±	-	-	-	-	-
4	1	±	+	-	-	-	-	-									
	2	+	+	±	±	-	-	-									
	3	+	±	-	-	-	-	-									
	4	±	±	±	-	-	-	-									
	5	-	-	-	-	-	-	-									
	6	±	±	-	-	-	-	-									

2. 実験方法

1) 予試験および実験条件の設定

(1) 基剤における影響

密封実験による蒼白現象はクリーム基剤のみでも発現する可能性が考えられる⁵⁾⁶⁾為、被験クリーム基剤の影響について検討した。

試験方法は後述の本試験の試験法に準じ行った。被験者6人の上腕屈側皮膚にステロイド剤の入れぬ基剤だけを0.1g塗布したパッチテスト用絆創膏を用いて1, 2, 3, 4, 6, 16および24時間密封し、各部位について絆創膏除去20分後, 1時間後, 2時間後, 3時間後, 4時間後, 16時間後, 24時間後の蒼白現象の判定を行った。Table 1に示すように密封時間と蒼白現象の間には相関性は認められず、いずれの場合も4時間後には蒼白現象は消失し、除去直後生じた蒼白は絆創膏密着による物理的影響に近いものと判断した。この結果判定時間は4時間以降が適当と考えられる。ただ主薬と基剤との間の影響を考慮し、20分後の測定もその対象とした。

Table 2. 密封時間と判定時間の関係

密封時間 (hrs)	被験者	判定時間 (hrs)			密封時間 (hrs)	被験者	判定時間 (hrs)		
		20分後	4時間後	24時間後			20分後	4時間後	24時間後
1	1	+	-	-	6	1	+	±	±
	2	+	-	-		2	+	+	+
	3	+	-	-		3	++	+	-
	4	±	-	-		4	±	+	-
	5	±	-	-		5	+	++	-
	6	+	-	-		6	±	++	+
2	1	+	-	-	16	1	++	++	-
	2	±	-	-		2	+	+	-
	3	±	-	-		3	++	+	-
	4	+	-	-		4	+	++	+
	5	±	-	-		5	++	+	-
	6	+	-	-		6	++	+	-
3	1	±	-	±	24	1	++	++	-
	2	+	+	±		2	+	+	-
	3	+	±	±		3	++	+	-
	4	+	±	-		4	+	++	+
	5	±	-	-		5	++	+	-
	6	±	±	+		6	++	+	-
4	1	+	±	+		1	+	±	±
	2	+	+	+		2	+	+	+
	3	+	+	±		3	+	+	±
	4	±	±	±		4	±	±	±
	5	±	+	-		5	±	+	-
	6	±	+	±		6	±	+	±

(2) 密封時間と判定時間の関係

密封時間と判定時間は主薬によりまた文献等により差があるため、被験者6人の上腕屈側皮膚に对照製剤0.1gを1, 2, 3, 4, 6, 16および24時間密封した後除去20分後, 4時間後, 24時間後の蒼白現象の判定を行った。Table 2はその結果で陽性率(出現率)は除去20分後で高く(Fig 1 a ~ c), Fig 2に示す後述の判定基準による作用力(スコア値)合計は除去20分後において4時間以上貼付で高くなっている。一方除去4時間後のものは3時間貼付から上がりトータルスコア値もかなり高くなり以後長時間貼るにつれ値が大きくなっている。除去24時間後の陽性率では4時間でピークで、それ以上の時間貼付は減退の傾向をたどった。以上の事から貼付時間を4時間, 16時間, 24時間と定め判定時間は除去20分後, 4時間後, 24時間後とした。

(3) 判定基準およびその施行に関して

判定の基準は蒼白斑を全く認めぬもの (-, 0), 軽度の蒼白斑のもの (±, 1), 明らかな蒼白斑のもの (+, 2), 顕著な蒼白斑のもの (++, 3) とした。本実験は二重盲検法に準じて行い, 判定者及び施行者 (コントローラー) は別人にし, 判定終了後初めてキイコードを

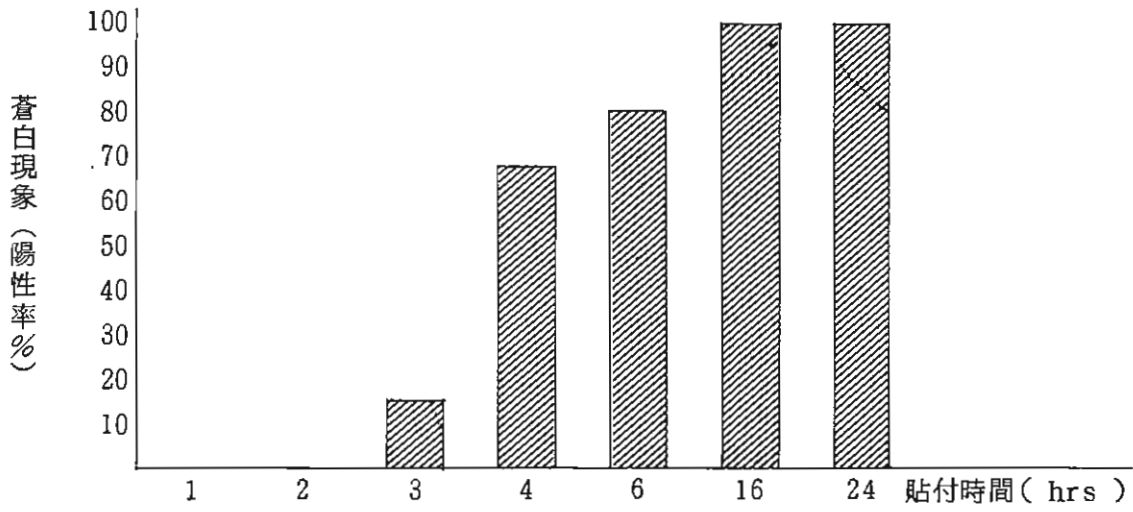


Fig.1 - a. 陽性率 (発現率%) 4時間後判定

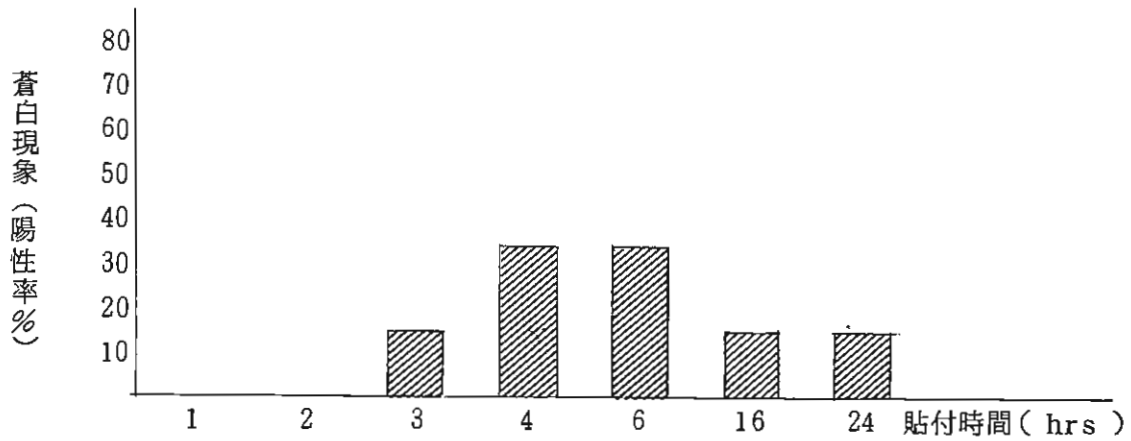


Fig.1 - b. 陽性率 (発現率%) 24時間後判定

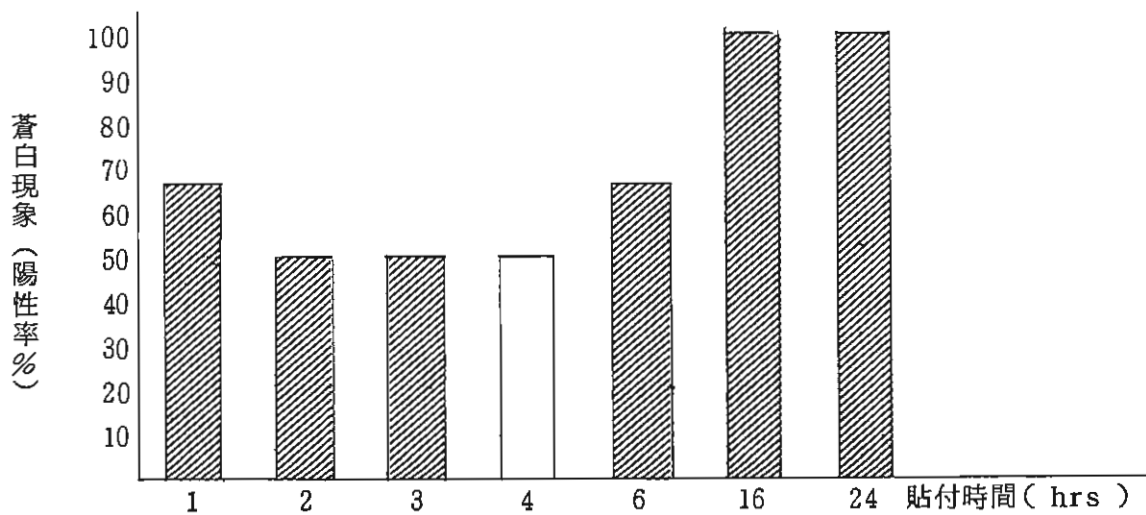


Fig.1 - c. 陽性率 (発現率%) 20分後判定

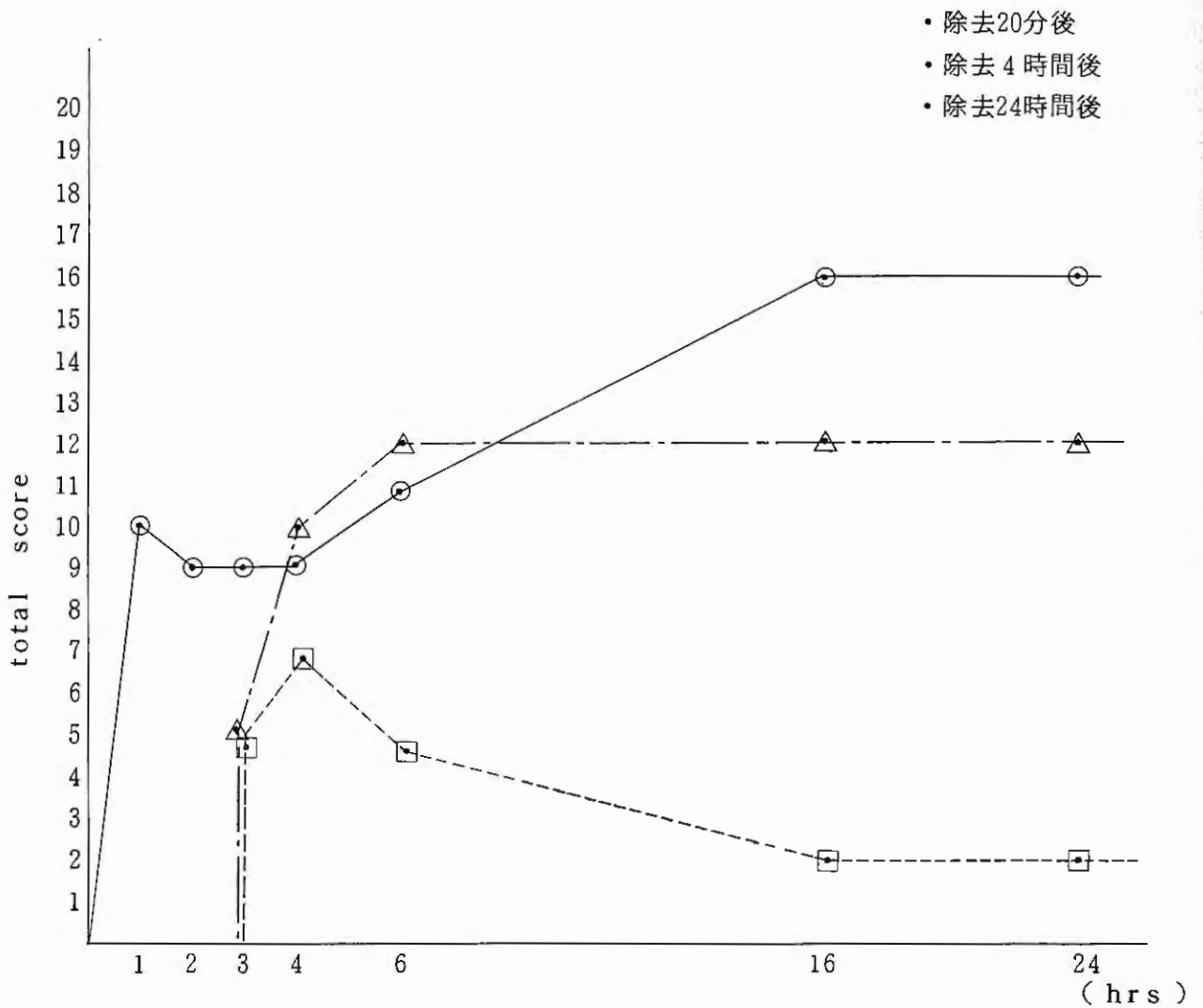


Fig.2.

開票して結果を解析した。被験者は当社員からボランティアを募り、健康診断で「適」と認められた男子20名で行った。老人皮膚は正常でも蒼白な事もあり、判定に難点があるとする文献もあり、49才以上の者は志願者から削除した。又女子は男子に比べ信頼度が低いとされる為同様に除外し、多量の汗をかく作業の者、腕をぬらす作業の者も除き、健康な男子20名で行った。判定は血圧計のマンシェットの代わりにゴム管で上腕部を15秒間しめつけ観察した。なお予め蒼白度の写真を吟味し判定に誤りのないよう心がけた(Photol, Fig4)。Fig3は貼付位置と貼付時間を示したが、検体試料は1人につき片腕5部位、他腕4部位とした。なお判定基準、判定方法に関し富山医科薬科大学医学部皮膚科学教室の指導を受けた。

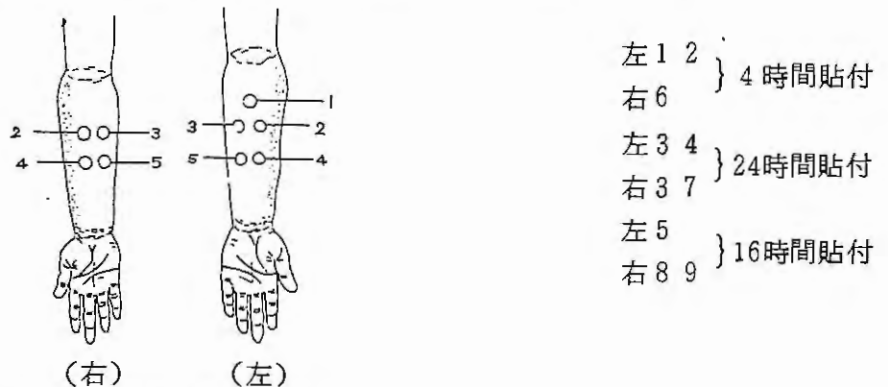


Fig.3. 貼付位置と貼付時間

(3) 判定規準は予試験 c に触れたが 4 ランクに分け、写真に示す割合をもって段階付けを行った。

Photo. 1.

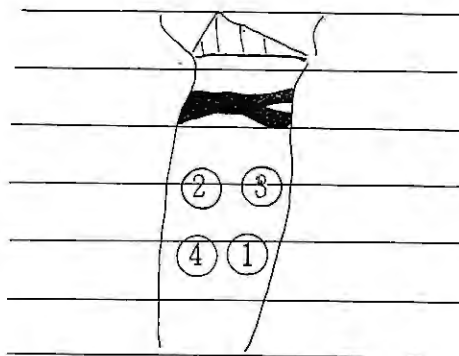
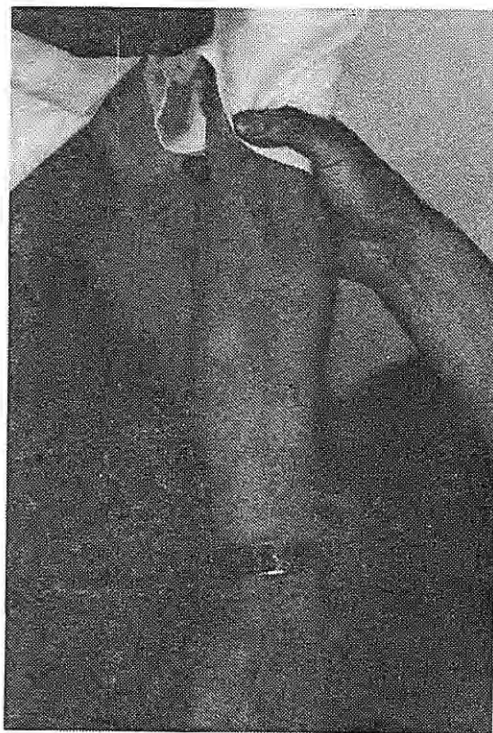


Fig.4. 写真の説明



- 1 ++ フルオシノイド 0.1 mg/EtOH ml を 0.04 ml
- 2 + フルオシノイド 0.01 mg/EtOH ml を 0.04 ml
- 3 ± フルオシノイド 0.001 mg/EtOH ml を 0.04 ml
- 4 - EtOH を 0.04 ml

2) 本試験

当社に勤務する 25~48 才の健康な男子の 20 名を被験者とし、被験前に医師による聴打診と問診、尿検査、血圧測定及び皮膚観察の健康診断を行い食事および勤務は通常の状態とした。投与方法としてパッチ用絆創膏の丸型布片（塗布面直径 16mm）にクリーム 0.1 g を塗布し、予じめ消毒用エタノールで清拭した被験者の上腕屈側の皮膚にクローズドパッチした。一定時間後に絆創膏を除去し、被験部位の残存クリームを消毒用エタノールで拭きとり、絆創膏除去 20 分後、4 時間後、24 時間後に試験部位の蒼白現象の有無ならびにその程度の判定を行った。即ち密封は午前 8 時 30 分に片腕 4 部位、他腕に 2 部位貼り、4 時間後および 24 時間後に拭きとりそれぞれについて除去 20 分後、4 時間後、24 時間後に密封部位の成績判定を行った。又午後 4 時 30 分に片腕に 1 部位、他腕に 2 部位貼り、16 時間後即ち翌日 8 時 30 分に拭きとり同様に 20 分後、4 時間後、24 時間後に判定した（Table 3 a~c）。検体試料は 1 人につき片腕 5 部位、他腕に 4 部位となり貼付時間および観察時間とのサイクルの関係ならびに剝がす位置にトラブルのないよう貼付部位を決定した（Fig 3）。又試験施行者（コントローラー）と判定者は時間的打合わせだけを行った。

3. 統計処理

Fig 5 でみられるヒストグラムからほぼ分布の形が等しいと考えられるので Wilcoxon の符号順位検定及び Mann-Whitney の U 検定さらに +, - だけの類別変数値で行なう Fisher の直接確率法で行った。但し観察値は 0~3 を順位変数とした。

Table.3-a. フルオシノニドクリームによる皮膚蒼白現象
3 (除去時間4時間後判定)

No	被験者名	年齢	被験製剤(密封時間hrs)			対照製剤(密封時間hrs)			基剤 (コントロール) (密封時間hrs)		
			4	16	24	4	16	24	4	16	24
1	中○×○	28	+	+	±	+	+	±	±	-	-
2	松○×○	33	+	±	±	+	±	+	-	±	±
3	畑○×○	36	±	+	±	±	+	+	-	-	-
4	大○×○	48	+	-	±	+	±	±	-	-	±
5	大○×	46	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	丸○×○	32	+	+	±	+	-	±	-	-	-
7	前○×○	43	+	+	±	±	±	±	-	±	-
8	高○×○	43	+	±	-	+	-	-	-	±	-
9	島○×	37	+	+	±	+	+	±	-	-	±
10	島○×○	26	+	+	±	±	+	±	-	-	±
11	渡○×○	31	+	+	-	+	±	-	-	±	-
12	宝○×	36	+	+	±	+	+	±	-	-	±
13	菅○×○	34	±	±	-	±	±	-	-	±	-
14	佐○×○	36	+	±	-	+	+	-	-	-	-
15	平○×○	28	+	+	-	+	±	±	-	-	-
16	池○×○	31	±	+	±	±	+	±	-	-	-
17	丸○×○	30	+	+	±	+	+	±	-	±	±
18	長○×○	25	±	+	±	±	+	±	-	±	±
19	中○×○	34	+	+	±	+	+	±	-	-	-
20	江○×○	39	+	+	±	+	+	-	-	-	-
計	+		11	6	0	13	5	0	0	0	0
	+		5	9	1	1	8	3	0	0	0
	±		4	4	14	6	6	12	1	7	7
	-		0	1	5	0	1	5	19	13	13

Table.3-b. フルオシノニドクリームによる皮膚蒼白現象
(除去24時間後判定)

No	被験者名	年齢	被験製剤(密封時間hrs)			対照製剤(密封時間hrs)			基剤 (コントロール) (密封時間hrs)		
			4	16	24	4	16	24	4	16	24
1	中○×○	28	-	-	±	±	±	±	-	-	-
2	松○×○	33	-	-	±	-	±	-	-	-	-
3	畑○×○	36	-	-	±	-	±	±	-	-	±
4	大○×○	48	+	-	±	±	-	±	-	-	-
5	大○×	46	-	±	±	±	±	±	-	-	-
6	丸○×○	32	±	-	-	-	-	-	-	-	-
7	前○×○	43	-	±	±	±	-	±	-	-	-
8	高○×○	43	±	±	-	-	+	-	-	±	±
9	島○×	37	±	±	±	±	-	±	-	±	±
10	島○×○	26	±	±	-	±	-	±	-	-	-
11	渡○×○	31	-	±	-	-	±	-	-	-	-
12	宝○×	36	±	-	±	-	±	±	-	±	±
13	菅○×○	34	±	±	-	-	±	-	-	-	-
14	佐○×○	36	-	±	-	±	±	-	-	-	-
15	平○×○	28	±	±	-	±	-	±	-	-	-
16	池○×○	31	±	±	±	±	±	±	-	-	-
17	丸○×○	30	±	±	±	+	±	±	-	-	-
18	長○×○	25	±	±	±	±	-	-	-	-	±
19	中○×○	24	-	±	±	±	±	±	-	-	-
20	江○×○	39	±	-	±	±	±	-	-	-	-
計	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+		1	0	0	1	1	0	0	0	0
	±		11	13	13	12	12	12	0	3	5
	-		8	7	7	7	7	8	20	17	15

Table.3-c. フルオシノニドクリームによる皮膚蒼白現象
(除去20分後判定)

No	被験者名	年齢	被験製剤(密封時間hrs)			対照製剤(密封時間hrs)			基剤(コントロール) (密封時間hrs)		
			4	16	24	4	16	24	4	16	24
1	中〇×〇	28	+	+	+	+	+	±	±	-	-
2	松〇×〇	33	+	+	±	+	+	±	±	±	±
3	畑〇×〇	36	+	+	+	+	+	+	±	-	±
4	大〇×〇	48	+	+	+	+	+	+	±	±	±
5	大〇×	46	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	丸〇×〇	32	±	±	±	-	±	+	±	-	-
7	前〇×〇	43	+	+	±	±	±	±	-	±	-
8	高〇×〇	43	-	±	±	±	+	±	-	-	±
9	島〇×	37	-	+	+	±	+	+	-	-	+
10	島〇×〇	26	+	+	+	+	+	+	±	-	±
11	渡〇×〇	31	+	+	+	±	±	+	-	+	-
12	宝〇×	36	+	+	+	+	+	+	-	-	±
13	菅〇×〇	34	±	+	+	±	+	+	-	-	-
14	佐〇×〇〇	36	+	+	±	+	+	+	±	-	±
15	平〇×〇	28	±	+	±	±	+	+	-	-	±
16	池〇×〇	31	+	+	+	±	±	+	±	±	-
17	丸〇×〇	30	+	+	+	±	+	+	-	+	-
18	長〇×〇	25	+	+	+	+	±	+	±	-	+
19	中〇×〇	34	+	+	+	+	+	+	±	±	±
20	江〇×〇	29	+	+	+	±	+	+	±	+	+
計	+		1	11	6	1	8	8	0	0	0
	±		14	7	8	9	7	8	0	3	3
	-		3	2	6	9	5	4	11	5	9
	-		2	0	0	1	0	0	9	12	8

結 果

Fig 5 a ~ cは蒼白現象陽性率（発現率）の各時間後判定のヒストグラムを示す。

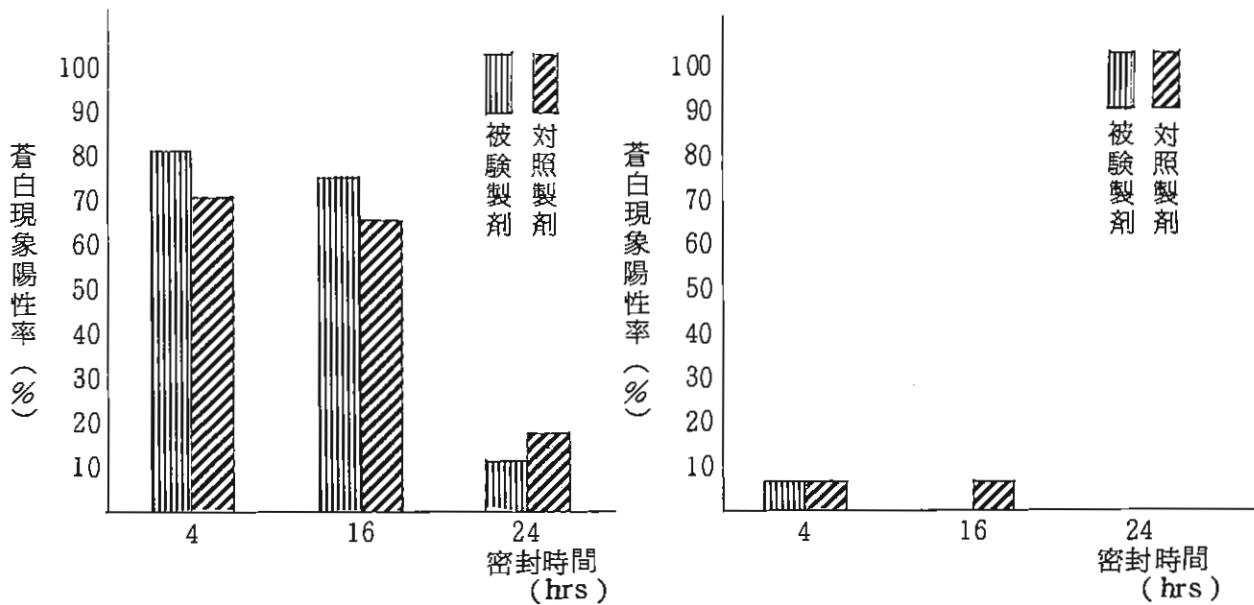


Fig.5-a. フルオシノニドクリームの
蒼白現象陽性率（発現率）
（4時間後判定）

Fig.5-b. フルオシノニドクリームの
蒼白現象陽性率（発現率）
（24時間後判定）

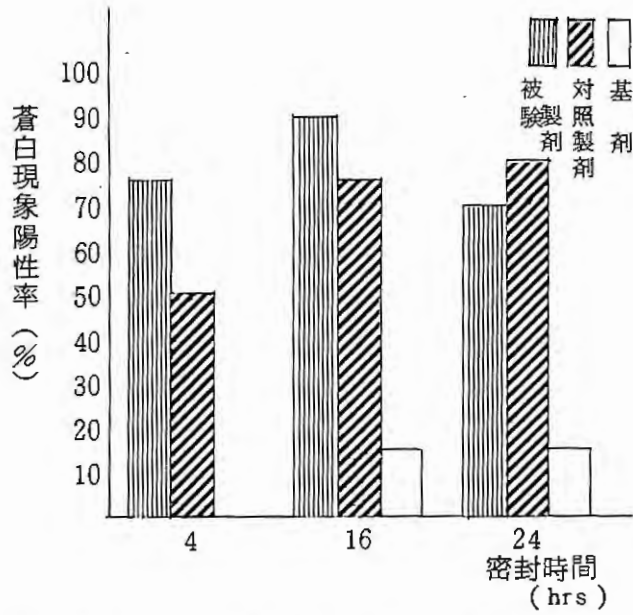


Fig. 5 - c. フルオシノニドクリームの
蒼白現象陽性率 (発現率)
(20分後判定)

各除去時間においても被験製剤, 対照製剤の
パターンは同じである。Fig 6 a ~ c は縦軸に
順位変数和をとり, 横軸に貼付時間をとった図
である。除去20分後, 4時間後判定の場合は特
に被験製剤群, 対照製剤群の同一パターンに比
べ, 基剤だけのブランク群は値が低く異ったパタ
ーンを示している。除去24時間後判定の場合
はほぼ同一なパターンとなるがブランクの値が
小さい。

以上の結果の統計処理を行ったのがTable 4
である。ノンパラメトリックな手法ではあるが
被験製剤, 対照製剤間に有意の差はなく, 基剤
群とは明らかな差が得られた。

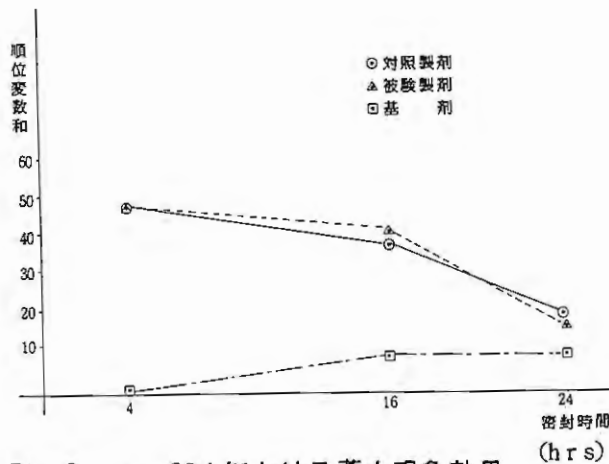


Fig. 6 - a. 20人における蒼白現象効果
(各密封時間での順位変数)
(4時間後判定)

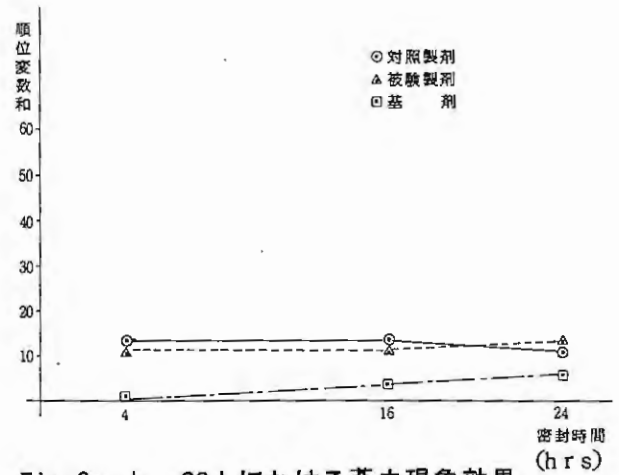
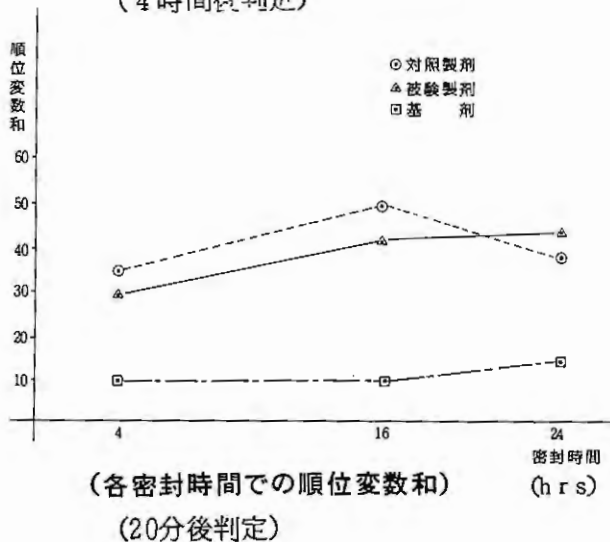


Fig. 6 - b. 20人における蒼白現象効果
(各密封時間での順位変数)
(24時間後判定)



① Wilcoxonの符号順位和検定

Table.4 ①-a. 4時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	薬効判定				順位和 (Wilcoxon)		
		++	+	±	-	被・対	被・コ	対・コ
4	被験製剤	11	5	4	0	(n=6) 10.5	(n=20) 210	(n=20)
	対照製剤	13	1	6	0	10.5		210
	コントロール	0	0	1	19		0	0
16	被験製剤	6	9	4	1	(n=10) 20	(n=16) 136	(n=15)
	対照製剤	5	8	6	1	35		120
	コントロール	0	0	7	13		0	0
24	被験製剤	0	1	14	5	(n=4) 不能	(n=8) 36	(n=9)
	対照製剤	0	3	12	5			45
	コントロール	0	0	7	13		0	0

密封時間 (hrs)	有意差		
	被・対	被・コ	対・コ
4	有意差なし	有意	有意
16	有意差なし	有意	有意
24	不能	有意	有意

数値表より
5% (両側)

n = 6	0
n = 8	4
n = 9	6
n = 10	8
n = 15	25
n = 16	30
n = 20	52

を用いる。

Table.4 ①-b. 24時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	薬効判定				順位和 (Wilcoxon)		
		++	+	±	-	被・対	被・コ	対・コ
4	被験製剤	0	1	11	8	(n=11) 30	(n=20) 210	(n=20)
	対照製剤	0	1	12	7	36		210
	コントロール	0	0	0	20		0	0

密封時間 (hrs)	有意差		
	被・対	被・コ	対・コ
4	有意差なし	有意	有意

数値表より
5% (両側)

n = 11	11
--------	----

を用いる。

Table. 4 ①-c. 20分後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	薬効判定				順位和 (Wilcoxon)		
		+	+	±	-	被・対	被・コ	対・コ
4	被験製剤	1	14	3	2	(n=10) 33	(n=17) 153	(n=19)
	対照製剤	1	9	9	1	22		8.5
	コントロール	0	0	11	9		0	181.5
16	被験製剤	11	7	2	0	(n=8) 29	(n=19) 190	(n=17)
	対照製剤	8	7	5	0	7		153
	コントロール	0	3	5	12		0	0
24	被験製剤	6	8	6	0	(n=9) 31.5	(n=13) 182	(n=16)
	対照製剤	8	8	4	0	13.5		136
	コントロール	0	3	9	8		0	0

密封時間 (hrs)	有意差			数値表より 5% (両側)		を用いる。
	被・対	被・コ	対・コ	n		
4	有意差なし	有意	有意	n = 8	4	
16	有意差なし	有意	有意	n = 9	6	
				n = 10	8	
24	有意差なし	有意	有意	n = 13	17	
				n = 16	30	
				n = 17	35	
				n = 19	40	

但し順位和 (Wilcoxon) において

被・対は被験クリームと対照クリーム間での順位和を表わす。

被・コは被験クリームとコントロール間での順位和を表わす。

対・コは対照クリームとコントロール間での順位和を表わす。

② Mann-Whitney のU検定

Table. 4 ②-a. 4時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂	密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
4	被験製剤	403	207	16	被験製剤	430.5	179.5
	対照製剤	417	197		対照製剤	389.5	220.5
	被験製剤	608	2		被験製剤	582.5	27.5
	コントロール	212	398		コントロール	237.5	372.5
	対照製剤	607	3	対照製剤	575.5	34.5	
	コントロール	213	397	コントロール	244.5	365.5	

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
24	被験製剤	406.5	203.5
	対照製剤	413.5	196.5
	被験製剤	530	80
	コントロール	290	320
	対照製剤	540	70
	コントロール	280	330

検定値は数表より

5% (両側)

n₁ = n₂ = 20 127 を用いる。

Table 4-②b 24時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
4	被験製剤	450	160
	対照製剤	370	240
	被験製剤	562.5	47.5
	コントロール	257.5	352.5
	対照製剤	545	65
	コントロール	275	335

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
16	被験製剤	450.5	159.5
	対照製剤	369.5	240.5
	被験製剤	588.5	21.5
	コントロール	231.5	378.5
	対照製剤	572	38
	コントロール	248	362

Table 4-②c 20分後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
4	被験製剤	450	160
	対照製剤	370	240
	被験製剤	562.5	47.5
	コントロール	257.5	352.5
	対照製剤	545	65
	コントロール	275	335

密封時間 (hrs)	クリーム	R ₁ , R ₂	U ₁ , U ₂
24	被験製剤	382	228
	対照製剤	438	172
	被験製剤	553	57
	コントロール	267	343
	対照製剤	568	42
	コントロール	252	358

Table 4-③a Fisher の直接確率法 4時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	++ +	± -
		(%)	(%)
4	被験製剤	16	4
	対照製剤	14	6
	コントロール	0	20
16	被験製剤	15	5
	対照製剤	13	7
	コントロール	0	20
24	被験製剤	1	19
	対照製剤	3	17
	コントロール	0	20

密封時間 (hrs)	クリーム	P (両側値)	判定
4	被験製剤 対照製剤	0.2215	有意差なし
	被験製剤 コントロール	7.708×10^{-6}	高度に有意
	対照製剤 コントロール	1.6702×10^{-6}	高度に有意
16	被験製剤 対照製剤	0.2151	有意差なし
	被験製剤 コントロール	3.854×10^{-5}	高度に有意
	対照製剤 コントロール	6.442×10^{-4}	高度に有意
24	被験製剤 対照製剤	0.2495	有意差なし
	被験製剤 コントロール	0.5	有意差なし
	対照製剤 コントロール	0.1154	有意差なし

Table.4 —③ b. 24時間後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	++ + (%)	± - (%)	密封時間 (hrs)	クリーム	P (両側値)	判定
4	被験製剤	1	19	4	被験製剤 対照製剤	0.5128	有意差なし
	対照製剤	1	19		被験製剤 コントロール	0.5	有意差なし
	コントロール	0	20		対照製剤 コントロール	0.5	有意差なし

Table.4 —③ c. 20分後判定

密封時間 (hrs)	クリーム	++ + (%)	± - (%)
4	被験製剤	15	5
	対照製剤	10	10
	コントロール	0	20
16	被験製剤	18	2
	対照製剤	15	5
	コントロール	3	17
24	被験製剤	14	6
	対照製剤	16	4
	コントロール	3	17

考 察

生物学的同位性試験において、血管収縮試験を採用し、その検討を行った。貼付時間に関し、予試験では4時間から陽性率が上がる傾向がみられるが、逆に24時間後の判定では4時間後の判定に比べ発現率が減少し、密封時間と発現率の間には相関性は認められなかった。従ってこの4時間後近くの観察は薬物の吸収速度に、また24時間後の観察は薬物の持続性（皮膚貯留性）に関係すると考えることも本来である。一方文献によれば各時間に対するレスポンスのAUC (Area under the curve) を求めパラメータとした方法もあるが、吸収速度と血管収縮力のファクターが混ったものであると考えられるので採用しなかった。

終りに血管収縮試験に関して述べれば、その血管収縮のメカニズムについて必ずしも明確にされていないが、血管壁の平滑筋に対する直接作用やカテコールアミンを介して間接的に血管収縮するという報告もある¹⁵⁾。又皮膚組織クリアランスの変化を調べ血流の低下を起すことが認められている。

文 献

- 1) Mckenzie, A, Stoughton, R. : Arch. Derm. 86. 608 (1962)
- 2) Mckenzie, A.W. : Arch. Derm, 86, 611 (1962)
- 3) 石原 勝：ホルモンと臨床 19. 96 (1971)
- 4) 石原 勝：診断と保険 13. 1348 (1971)
- 5) Tree, S. et al : Brit. J. Derm. 85. 171 (1971).
- 6) A. F. Pepler, R. Woodford. and J. C. Morrison Brit. J. Derm. 85. 171 (1971)
- 7) 東 萬彦：西日本皮膚科 41 966 (S. 54)

- 8) 石原 勝：薬理と治療 1037(1975)
- 9) Coldman, M. F. Lokerlie, L. and Laws, Brit. J. Derm. 85. 381(1971)
- 10) 田上八郎：皮膚科紀要 66 1 ~ 45 (1971)
- 11) 増山元三郎：“少数例のまとめ方 I” P 103. P 240.(竹内書店新社)
- 12) 石居 進：“生物統計学入門” P 127. 81. 109 (培風館)
- 13) ゴールドスタイン：“生物検定法入門” P 44. 49
- 14) A. L. Delaunoy, “Biostatistics in Pharmacology II” P 923. 907
- 15) Hild. R. Hille. H. et al. : Z. Kreis. Forsh. 49. 964 (1960)

[原 著]

ハッカゴム膏におけるサリチル酸メチルの放出挙動

南木 朗 石黒文子
大協薬品工業株式会社*

ハッカゴム膏からの薬物の放出を簡便な方法で測定することによりハッカゴム膏の性能を評価できれば多くの配合の中から合理的な選択ができる。また、基剤に要求される物理的特性に加えて、生物学的特性も考慮した製剤設計が可能ではないかと考え *in vitro* を主体に *in vivo* での試験法も検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 各種放出試験器

日本薬局方に採用されている溶出試験器（パドル法）の概略図をFig 1に示す。その他 1969 年に大正製薬の新海がステロイド軟膏の放出試験に用いた試験器¹⁾、1978 年に福岡大学の木田らがパップ剤からのサリチル酸メチルの放出が温度によりどのように変化するかを調べたパップ剤放出試験器²⁾、京都大学薬剤学教室で開発され現在市販されている坐剤放出試験器など各種剤形に合わせて工夫された装置が考案されている。

2. ハッカゴム膏放出試験器

日局溶出試験器を一部改造してFig 2に示すハッカゴム膏放出試験器を製作した。アクリル製の固定わくと固定板の間にシリコンシールをはさみ、セルローズ膜と硬膏をビスとナットで締めつける構造にした。この放出部全体をふたに装着できるようにした。

3. 試 薬

試薬はすべて市販の特級品を用いた。

pH5.0 クエン酸緩衝液：0.5Mクエン酸溶液に0.5 Mリン酸一水素カリウム溶液を加え pH5.0 に合わせた。

4. 実験動物

生育良好の雄性ラット（Wister 系，体重平均 200g）を用いた。

5. 試 験 品

dl-カンフル（日局）1.8g，サリチル酸メチル（同）9.0g，ジフェンヒドラミン（同）0.4g，*l*-メントール（同）4.5g，ハッカ油（同）1.125gおよびノニル酸ワニリルアミド0.075gを成分分量の異なる2種類の基剤（A基剤，B基剤）に配合し，全膏体として184.125g（塗工面積1m²）とした。6cm×2.6cm（サリチル酸メチル14mg対応量）に裁断し放出試験，ラット経皮吸収試験に用いた。

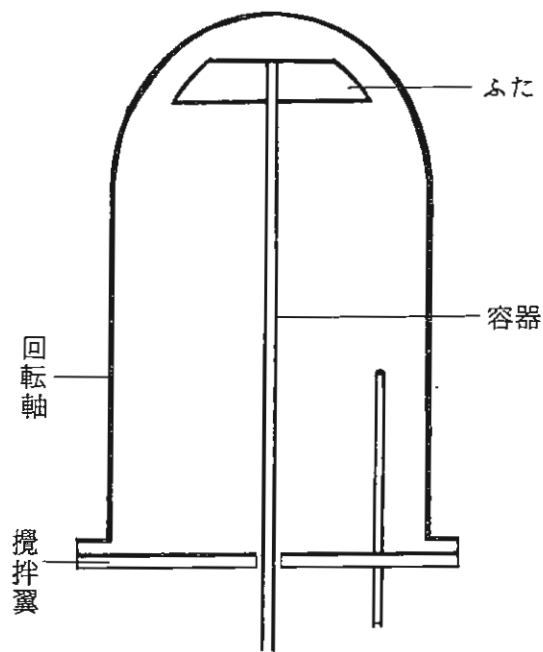


Fig.1. JP Dissolution Test Apparatus (Paddle Method)

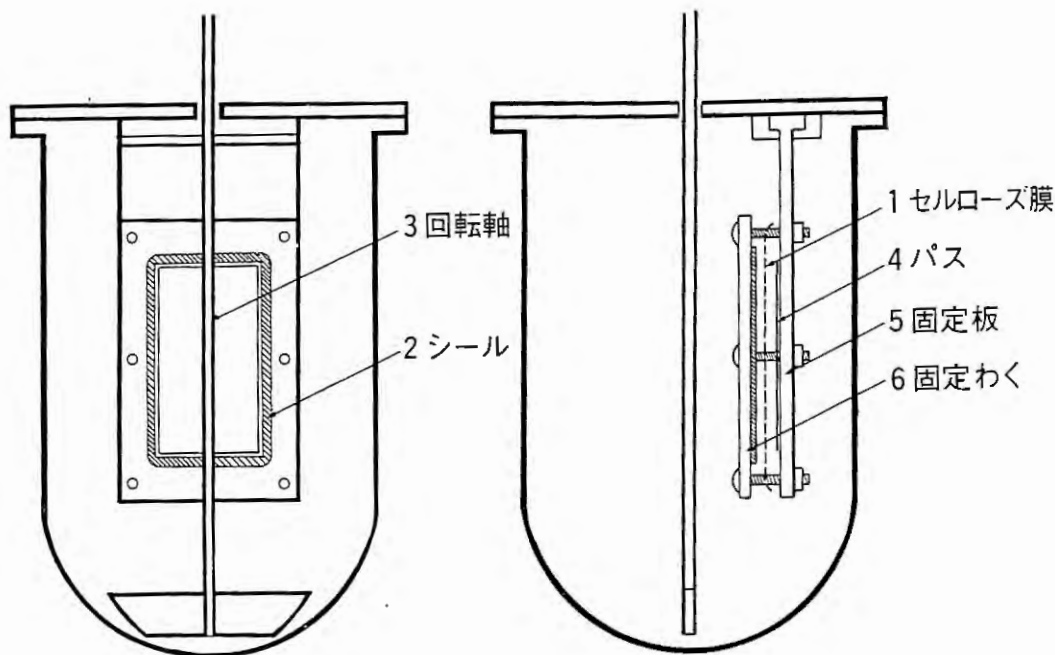


Fig.2. Release Test Apparatus for plaster

6. *in vitro* 放出試験

1) 放出液の検討

B基剤の試験品をセルローズ膜を用いずに放出部に固定し、放出液としてエタノール・水 (50 : 50), エタノール・水 (20・80) 混液 1 ℓ を用い 25°C で放出試験を行なった。また、生理食塩液 1 ℓ を用いて 37°C での放出試験も行なった。

放出液を満たした容器の中へ放出部を沈め、毎分 150 回転で攪拌し所定時間に 1 ml を採取し、そのつど同量の液を補充した。採取した放出液に 1 N 水酸化カリウム溶液 50 μl と N, N-ジメチルホルムアミド 5 ml を加え、励起波長 352 nm で 402 mm 付近の極大けい光強度を測定した。

標準液としてサリチル酸メチルの既知濃度の溶液を用い、上記と同様に操作して検量線を作成し、これより濃度を算出した。

けい光測定には島津けい光光度計 (RF 500 型) を用いた。

2) セルローズ膜を用いた放出試験

A, B 両基剤の試験品をそれぞれセルローズ膜でおおい、放出部に固定した。生理食塩液 1 ℓ を用い 37°C で放出試験を行ない、1) に準じて定量した。

セルローズ膜 (cellulose tubing 1-7/8 UCC 社製) は蒸留水中で約 5 時間煮沸後、生理食塩液中に 5°C で 24 時間以上浸漬して用いた。

3) セルローズ膜を用いない放出試験

セルローズ膜を用いず A, B 両基剤の試験品を放出部に固定し、以下 1) に準じて定量した。

7. *in vivo* 吸収試験

ラットの背部を剪毛処理し試験品を貼付し 1, 2, 3, 4 時間後に頸静脈より 0.5 ml を採血した。^{2) 3)} これを遠心分離して得られた血しょうについて以下 Fig 3 のように定量操作した。

対照血しょうに既知量のサリチル酸を加え、同様の処理で検量線を作成し、サリチル酸メチルとしての濃度を算出した。

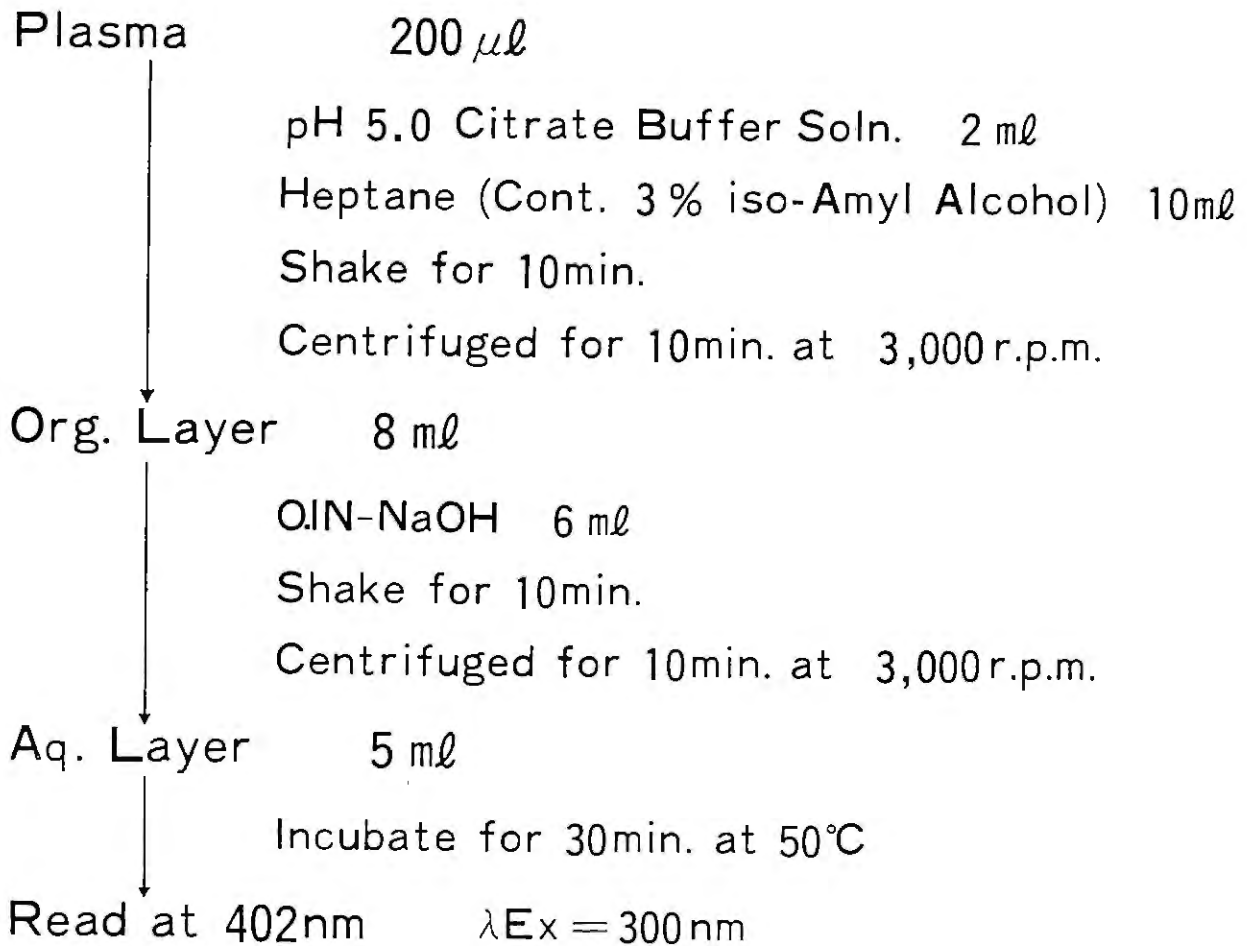


Fig.3. Determination of Methyl Salicylate *in vivo*

結果

1. 放出液の検討

エタノールを含まない生理食塩液だけの場合でも放出温度を37°Cに設定したところ Fig 4 のように適度の放出があった。

2. *in vitro* 放出試験

セルローズ膜を用いた場合は Fig 5 のように A 基剤, B 基剤とほぼ同じ推移を示した。放出量は 4 時間で約 4.1 mg/l となり, 投与量 14 mg に対して約 30% であった。

これに対して, セルローズ膜を用いない場合は Fig 6 のように A 基剤は約 1 時間半で放出が止まり, B 基剤は 3 時間まで放出が続いた。放出量は 4 時間で約 11.3 mg/l となり, 投与量 14 mg に対して約 80% となった。

3. *in vivo* 吸収実験

A, B 両基剤とも Fig 7 のようにほぼ同じ血中濃度の推移を示した。

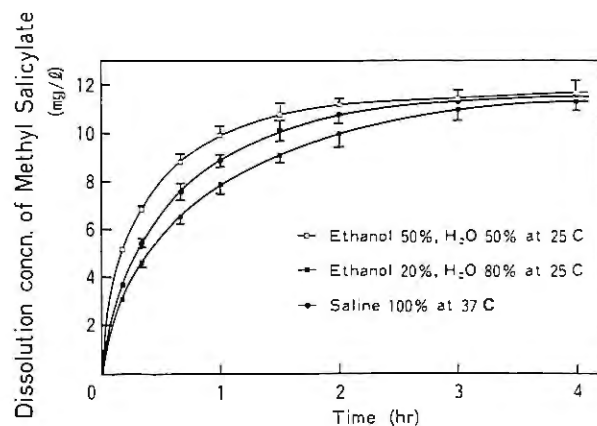


Fig.4. Effect of Dissolution Fluid on Release of Methyl Salicylate
Each symbol represents the mean value of 4 experiments. Vertical bars show S.E.

投与後4時間で血しょう1 ml当り約50 μ gの吸収がみられた。

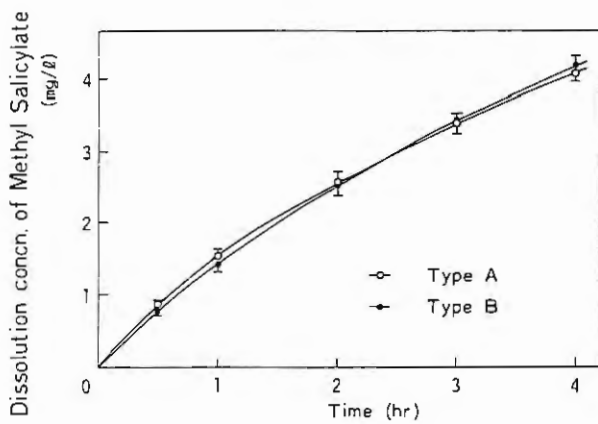


Fig. 5. Release of Methyl Salicylate from Plaster to Saline with Cellulose Film at 37°C
Each symbol represents the mean value of 4 experiments. Vertical bars show S.E.

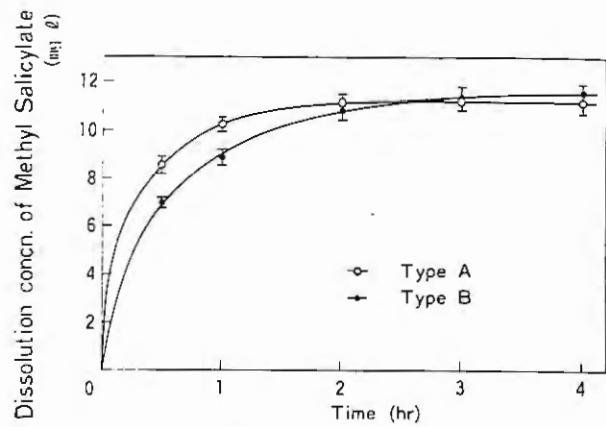


Fig. 6. Release of Methyl Salicylate from Plaster to Saline without Cellulose Film at 37°C
Each symbol represents the mean value of 4 experiments. Vertical bars show S.E.

考 察

セルローズ膜を用いない放出試験で基剤中の拡散速度を比較することができ、セルローズ膜を用いた放出試験で吸収性能を比較することができる。

今回行なったセルローズ膜を用いない放出試験によりA基剤は膏体中の拡散速度が速く保管中に薬物が表面に浮き出す等の現象が起こることも考えられる。また、セルローズ膜を用いた放出試験において、その放出曲線に明らかな違いがあれば生物学的利用能の差も当然予側されるが、⁴⁾差がみられなかったのでB基剤は皮膚の薬物透過速度へ影響しない程度にrelease controlされているといえるのではなかろうか。

セルローズ膜を用いた場合と用いない場合の放出曲線を比較することにより、ハッカゴム膏の製剤の安定性の評価が可能のように思われる。

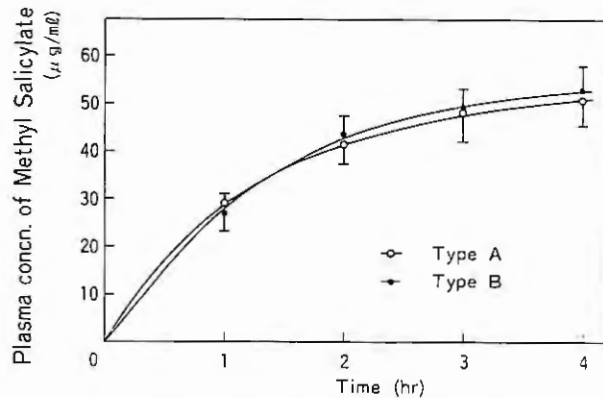


Fig. 7. Plasma Concentration of Methyl Salicylate after Topical Application to Rats
Each symbol represents the mean value of 4 experiments. Vertical bars show S.E.

文 献

- 1) 新海弘之：薬誌，89，365（1969）
- 2) 木田浩陸：福岡医師，69，208（1978）
- 3) Veresh S. A. Hom F. S. and Miskel, J. J. J. Pharm. Sci., 60, 1092, (1971).
- 4) Leeson, L. J. Carstensen, J. T. (eds.), 永井恒司他訳，“医薬品の溶出”，米国薬学会編，（地人書館，1977）。

動物胆中の総胆汁酸比色定量法について

松 田 久 司
株式会社廣貫堂・研究所

動物胆(熊胆, 牛胆, 豚胆)は古くから家庭薬原料として用いられている。

最近, 動物胆原料及びそれらを含む製剤について品質規格の設定と, これに伴う品質管理の重要性が増しつつある。それには動物胆中の成分の一つである胆汁酸類を定量するのが最も有力な方法であるが、これについては数多くの報告が見られる。^{1)~9)}

先に薬事研究会の動物胆部会¹⁾で, これらの定量法をとりあげ実用性について検討し, GLC法(HFIP-TFA化)⁷⁾及び比色法(DCC法)⁶⁾が該目的に適していることを明らかにしている。しかし, GLC法(HFIP-TFA化)は牛胆に適用できるが, 豚胆の場合ピークが重なり, 定量が不可能である(Fig1)。一方比色法では従来バラツキが大きいことなどにより, 幅広く品質管理に応用するには必ずしも満足できない。

そこで著者らは, 簡易且つ実用的な胆汁酸類の定量法の確立を目的として検討した。比色法が各種動物胆に適用可能なこと, 特別なテクニックや高価な分析機器を必要としないこと, DCC法(EDC法)⁵⁾そのものの再現性がすぐれていること等に着眼し, 特に比色法の改良を行った。その結果, 一応実用化への知見を得たので報告する。

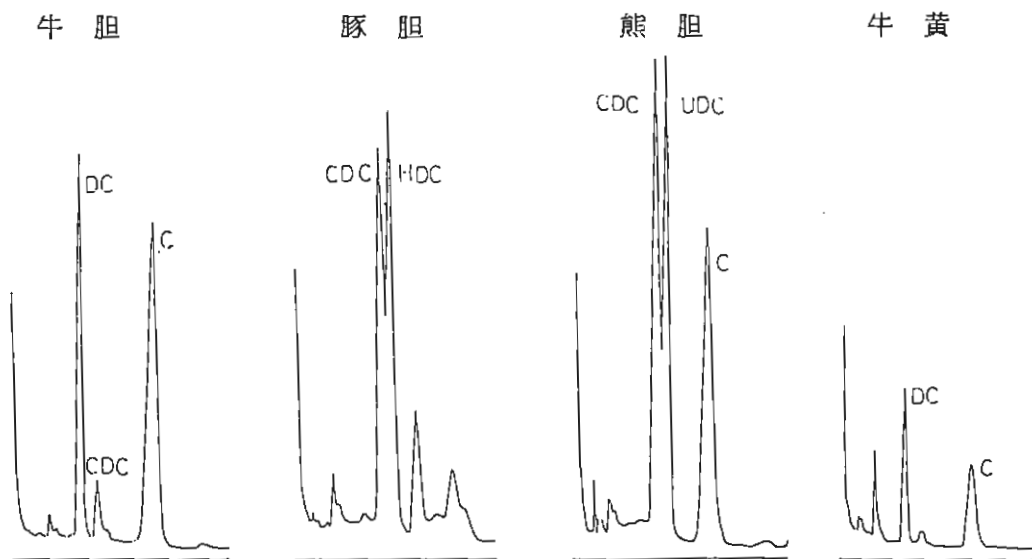


Fig.1. Gas chromatogram of hexafluoroisobutyl ester-trifluoroacetyl derivatives of bile acids
(薬事研究会, 動物胆部会報告(1980)より)

標準品および試薬

コール酸(P-L Biochemicals), デオキシコール酸(P-L Biochemical), ケノデオキシコール酸(東京化成), ウルソデオキシコール酸(日局品)いずれも 105°, 2時間乾燥後, デシ

※ 〒930 富山市梅沢町2-9-1 TEL 0764(24)2271

ケータ-中に保存したものを使用した。パルミチン酸(和光純薬), ジシクロヘキシルカルボジイミド(和光純薬), 過塩素酸第二鉄(関東化学), 1M過塩素酸ヒドロキシルアミン溶液(関東化学), シリカゲル(メルク社, シリカゲル60, 70~230mesh), メタノール, エタノール(99.5 V/V%), クロロホルム, ジクロルメタン, 水酸化ナトリウム, 塩酸。

定 量 法

原料動物胆及び製剤中の総胆汁酸定量法をそれぞれChart 1及びChart 2に示した。

比色法については, 動物胆部会の報告に従った。

また, 標準液は, コール酸をエタノールに溶かしたもの($4 \mu\text{mol}/\text{ml}$)をそのまま用いた。

結果および考察

1. DCC比色法について

Table 1に示したように, 各種遊離胆汁酸の検量線の傾きがほぼ同じであった。即ち遊離胆汁酸の種類による呈色の差が少なく, 互いに相加性があることを示す。一方, 他のカルボキシル基をもつもの(例 パルミチン酸)も同程度の呈色を示すことから, DCC比色法の最も重要な点は胆汁酸の分画方法にあると推察される。

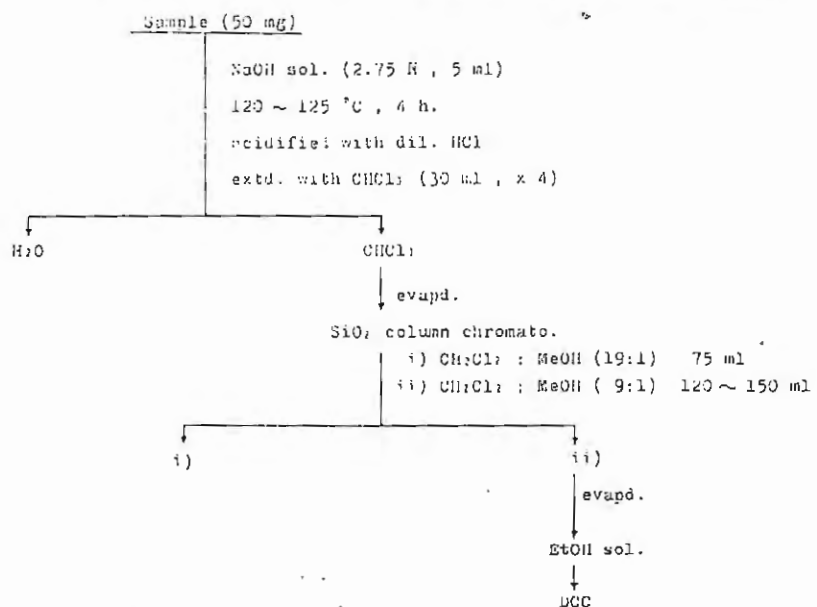
Table 1. 各種遊離胆汁酸の回帰係数

Compounds	$y = Ax + B$ (y : O.D. at 530 nm) (x : $\mu\text{mol.} / \text{ml}$)	
	A	B
Cholic Acid	8.68×10^{-2}	1.84×10^{-4}
Chenodeoxycholic Acid	8.45×10^{-2}	7.35×10^{-3}
Deoxycholic Acid	8.36×10^{-2}	4.84×10^{-3}
Hyodeoxycholic Acid	8.90×10^{-2}	7.33×10^{-3}
Ursodeoxycholic Acid	8.91×10^{-2}	8.97×10^{-3}
Palmitic Acid	8.59×10^{-2}	9.25×10^{-3}

2. 動物胆からの分画方法

Chart 1に分画方法を示す。尚, ジクロルメタン・メタノール混液はあらかじめ脱気したものを用いた。シリカゲルカラムによる胆汁酸の分離状態を調べるため1 fr 8 mlずつ集め, 濃縮後, TLCで成分を確認しながらDCC法で量的なものを求めた。Fig 2に豚胆, Fig 3に牛胆の分離結果を示す。リトコール酸は標品と比較した結果, 最初のフラクションで溶出されるが, 量的には殆んどネグレクトされる。

Chart 1. 原料動物胆中総胆汁酸の定量方法(原料動物胆)



このシリカゲルカラムを用いる方法以外にもXAD-2を用いる方法等が考えられるが, 他のカルボキシル基をもつ物質との分離が十分でないことや回収率に問題があることより, 今回はシリカゲルカラムを用いた。

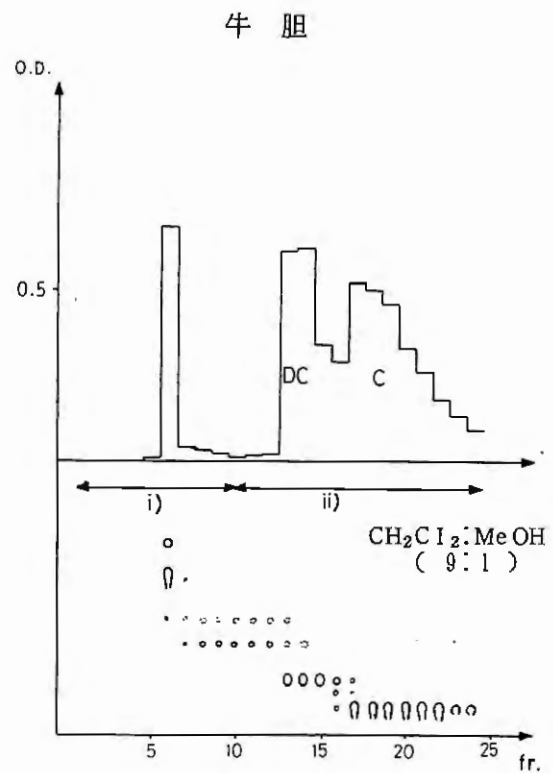
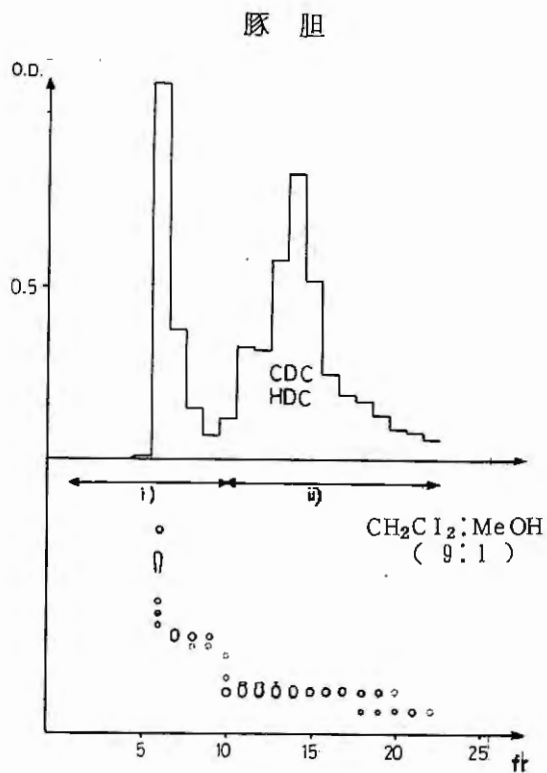


Fig. 2. シリカゲルカラムによる分離状態

Fig. 3. シリカゲルカラムによる分離状態

3. 動物胆の胆汁酸定量結果

Table 2に豚胆, 牛胆, 熊胆等各市販品の測定結果を示す。各3回ずつ測定し, 測定による変動係数を求めた。()内はコール酸に換算した値を含量(%)で示した)

各種動物胆とも 1 m mol/g 程度の胆汁酸を含み, 得られた値の再現性も良好であるといえる。また, 牛胆についてはGLC法(HFIP-TFA化)で別に定量し比較検討した。その結果, コール酸, デオキシコール酸の総和は 1.234 m mol/g であり, 比色法で得られた値 1.27 m mol/g に近似していることは, この比色法の正確さを裏付けていることを示す。

Table 2. 各種動物胆中総胆汁酸定量結果

	Total Cholic Acid (m mol./g)	mean C.V.	GLC (HFIP-TFA) (m mol./g)	Loss on Drying
豚胆	1.01 (41.3 %) 1.05 (42.9 %) 1.03 (42.0 %)	1.03(42.1 %) 1.9 %		2.0 %
牛胆	1.26 (51.5 %) 1.28 (52.3 %) 1.26 (51.5 %)	1.27 (51.8 %) 0.9 %	C 0.839 (34.3 %) DC 0.360 (14.1 %) CDC 0.035 (1.4 %)	3.9 %
熊胆	1.13 (46.2 %) 0.98 (40.0 %) 0.98 (40.0 %)	1.03 (42.1 %) 8.4 %		11.8 %

4. 製剤への応用

以上の如く確立した動物胆中の胆汁酸定量法を一步進めて、製剤中の定量の適用性について検討を行なった。

まず、Table 3の如くモデル処方を組み立て試みた結果、加水分解後の抽出溶媒は、クロロホルムのみでは不十分であり、クロロホルム・メタノール混液を用いると好結果を得ることが分った。以後この溶媒系で抽出することにした。また、遊離カルボン酸の分離に炭酸水素ナトリウムによる抽出操作を追加することが有効であった。

以上の改良を加えて製剤中の定量法をまとめたのがChart 2である。

また本定量法の精度を求めるため、牛胆・豚胆を原料とした製剤について定量値の変動係数を求めTable 4に示すが、一応満足すべきものである。

Table 3. モデル処方

成分及び分量		1日量	
	オウレンエキス	28mg	
	オウバクエキス	152mg	
	ゲンチアナエキス	80mg	
	ダイオウエキス	80mg	
日局	アロエ	150mg	
	動物胆	50mg	
	アカメガシワエキス	400mg	
賦形剤	日局	パレイショデンプン	適量
"	"	タルク	30mg
合計		1,680mg	

Chart 2. モデル処方中総胆汁酸の定量方法

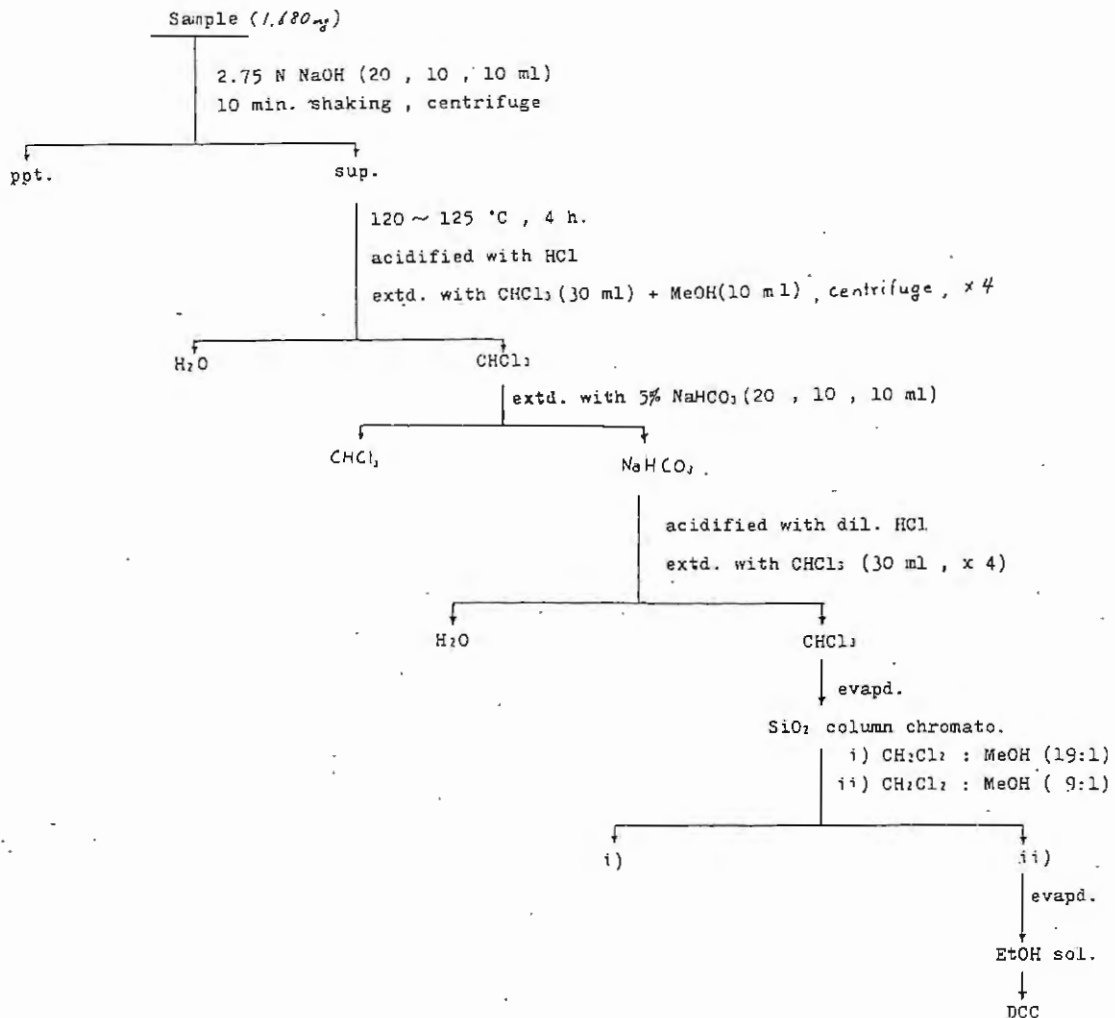


Table 4. モデル処方中総胆汁酸定量値

	Total Bile Acid [※] (mg / 1 day)	mean (mg) C.V.	Recovery
豚胆	18.6	18.4 1.4 %	87.6 %
	18.1		
	18.4		
牛胆	23.2	23.0 2.6 %	88.8 %
	23.4		
	22.3		

5. 総括

著者らの発展した総胆汁酸の定量は操作が簡易であること、定量精度が一応満足できること、特種な機器類を必要とせず一般的であること、動物胆の種類を問わず応用できること等により動物胆の品質管理、規格設定に役立つものと期待する。

しかし、製剤中の定量にみられる如く、操作の煩雑さや回収率が、処方中の配合生薬の種類や量によって影響を受けるという問題点がある。最近、臨床化学分野で 3α -hydroxysteroid dehydrogenase⁸⁾⁹⁾の応用が検討され、その利点が報告されており、著者らはこれを適用するなど、さらに改良法を研究中である。しかし本法は分離と呈色を別々に行わなければならない、それを同時に行う機器分析に及ばない。また、そこに本法の限界がある。

本来、生薬の品質評価という点から、その生薬の薬理効果を代表する有効成分を定量することが最も望ましい。その点、著者らが今回対象とした動物胆は成分と薬理効果との相関関係が必ずしも究明されているとはいえない。今後それが解明されるとともに、その有効成分を特異的に定量できる簡易且つ迅速な機器分析の開発が望まれる。

- 1) 薬事研究会：動物胆部会報告（1980）
- 2) 宇治ら：薬誌，95，114，214（1975）
- 3) 難波ら：第11回生薬分析討論会講演要旨集（1982）
- 4) 山原ら：第11回生薬分析討論会講演要旨集（1982）
- 5) 飛田ら：薬事研究所所報 昭和54，55年度合併号
- 6) 谷村ら：Analytical Chemistry 47，34（1975）
- 7) K・Imai: Journal of Chromatography 120，181（1976）
- 8) 武良ら：医学のあゆみ 115，331（1980）
- 9) 真重文子：臨床病理 29，433（1981）

センソの原料入荷時における品質評価について

渡 辺 悦 子
共栄製薬株式会社 品質管理部*

センソは、強心薬の原料として、配置家庭薬の中でも歴史ある薬である六神丸に古来より用いられている。その薬理作用を代表するものは、ブホステロイド類であるとされている。また、強心薬の承認規格には、センソのブホステロイドの含量規格を設定することになっている。しかし、日局の成分含量試験をそのまま用いることは、試験誤差が大きい等、ブホステロイド類の含量チェック方法としては、必ずしも適当とは考えられない。また、一般に従来より云われている品質評価(外観、官能、価格)と、日局の試験法による結果とは、必ずしも一致していない。従来、センソの含量試験に関しては、ガスクロマトグラフィー法等、数多く報告がなされている。ガスクロマトグラフィー法では、抽出→カラム分離→誘導体化(シリル化)等の煩雑な操作が必要でしかも実験所要時間が多い事より、原料入荷時の品質評価法としては満足出来るものではない。今回ステロイド骨格の α -ピロン環および高速液体クロマトグラフィーに基づくブホステロイドの特異吸収による吸光度法によって、ブホステロイド含量を高い精度で、迅速に定量する方法を検討したので報告する。

実 験 の 部

1. 吸光度法

試料溶液の調製：センソを注意して、粉末となし、デシケーター(シリカゲル)で、24時間乾燥し、その約200mgを精密に量り取り、クロロホルム30mlを加えて、沸騰水浴中で60分間還流抽出し、ろ過後クロロホルムを加えて正確に50mlとする。この5mlを正確に量り取り、水浴上で注意してクロロホルムを留去し、残留物にメタノール25mlを正確に加えて溶かし、この液を試料溶液とした。

測定条件

装置：島津デジタルダブルビーム分光光度計 uv-190型

レコーダー：島津 u-125Mu 型

結果 Fig.1. の如くのピークがあった。

2. 高速液体クロマトグラフィー法

試料溶液の調製

[第1法]

1. 吸光度法と同様の操作により試料溶液とした。

[第2法]

1. 吸光度法と同様に操作しクロロホルムで正確に50mlとした後、この5mlを正確に量り取り、水浴上で注意してクロロホルムを留去し、残留物にメタノール10mlを正確に加えて溶かし試料溶液とした。

[第3法]

1. 吸光度法と同様に操作しクロロホルムで正確に50mlとした後、この2mlを正確に量り取り、これにクロロホルム5mlを正確に加えて振り混ぜ試料溶液とした。

操作条件

装置：島津高速液体クロマトグラフィー LC-3A型

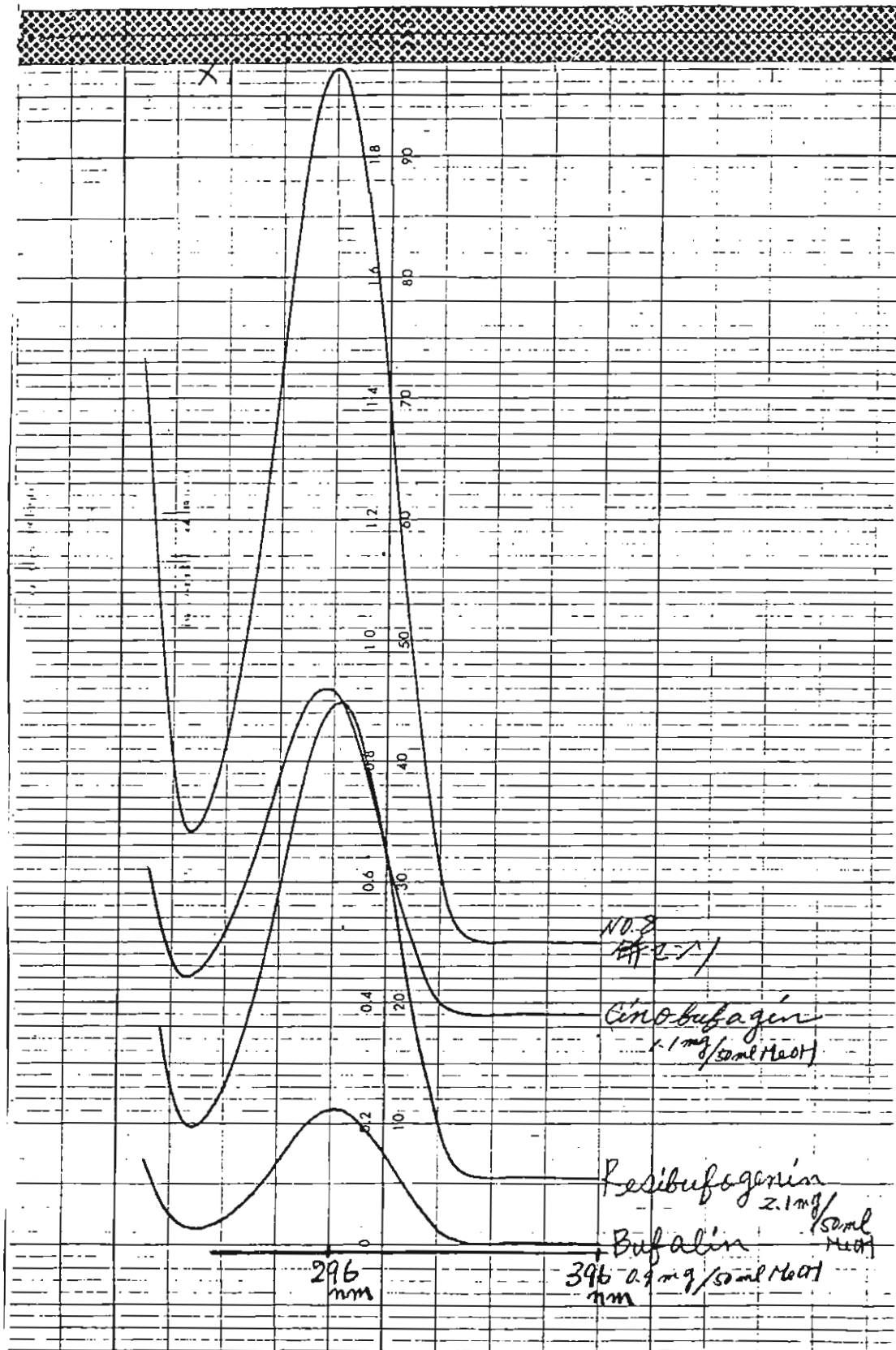


Fig.1. 吸光度曲線

検出器：島津紫外分光光度計 SPD-2A型 296 nmで検出

カラム：Zorbax CN

内径 4.6 mm 長さ15cmのステンレスカラム

移動相：〔第1法, 第2法〕

エタノール・*n*-ヘキサン混液(7.5:92.5)

〔第3法〕

n-ヘキサン・エタノール・イソプロパノール混液(279:21:50)

流量：〔第1法, 第2法〕

1.3ml/min

〔第3法〕

2.5ml/min

注入量：5 μ l

定量

ブファリン、シノブファギン、レジブホゲニンの一定量を精密に量り、クロロホルムを加えて溶かし、一定容とし標準溶液とした。試料溶液の面積値と標準溶液の面積値より含量を求めた。

結果および考察

1. 試料溶液および移動相

第1法と第2法の結果より第2法の濃度の方が良好と考えられ、また溶媒としては移動相との混合よりメタノールよりクロロホルムの方が良好であった。移動相に関しては、エタノール・*n*-ヘキサン混液(7.5:92.5)では分析に時間を多く要し、また、溶媒のわずかな混合比の変動(混合量、脱気時間等より生じる)により保持時間の変動が激しいという点があり、第3法によりイソプロパノールを加え、流量を2.5ml/minとし、移動相の安定化と分析時間の短縮をした。(Fig. 2. 3. 4)

- ##### 2. 標準品の検量線および再現性と変動係数各々の標準品は良好な直線が得られ、変動係数は0.5~1.3%と良好な結果を得た。(Fig.5, Table.1)また、カラムの状態等(理論段数の低下等)により、分離不十分となりシノブファギンとレジブホゲニンが同一のピークとなった場合も両者の1:1混合物により検討したところ検量線は直線となり、変動係数は0.9%と良好な結果を得た。(Fig. 6. 7. 8, Table.1)

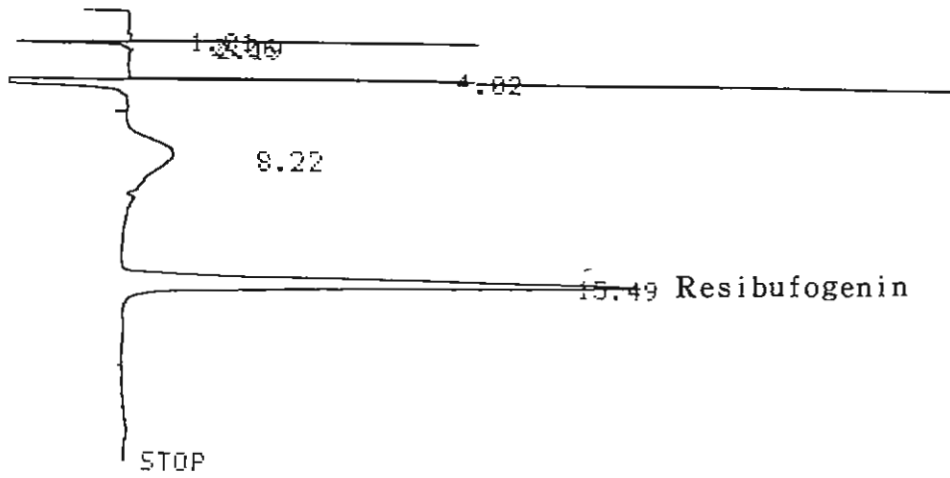
結論

吸光度法と高速液体クロマトグラフィー法により得られる成績は一致するが日局の成分含量試験成績とは一致しない事より(Table.2, 3), 日局の方法のみで品質評価を行うことは、製品のブホステロイド含量に変動をきたすことが予想されるので、日局に加えて、液クロ法、吸光度法による自社規格としての管理を充実し、今後、内部標準法の検討を加え、さらに製品の品質管理へと進みたいと考えています。

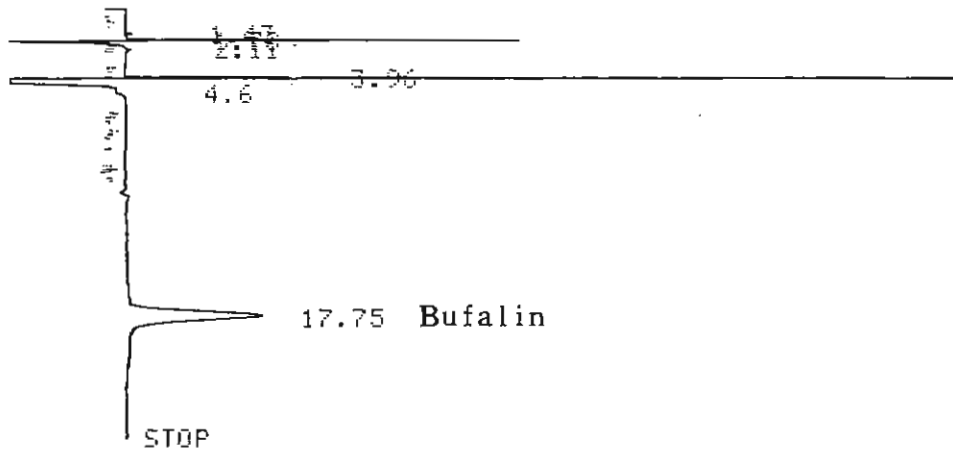
文献

日本公定書協会 第十改正日本薬局方

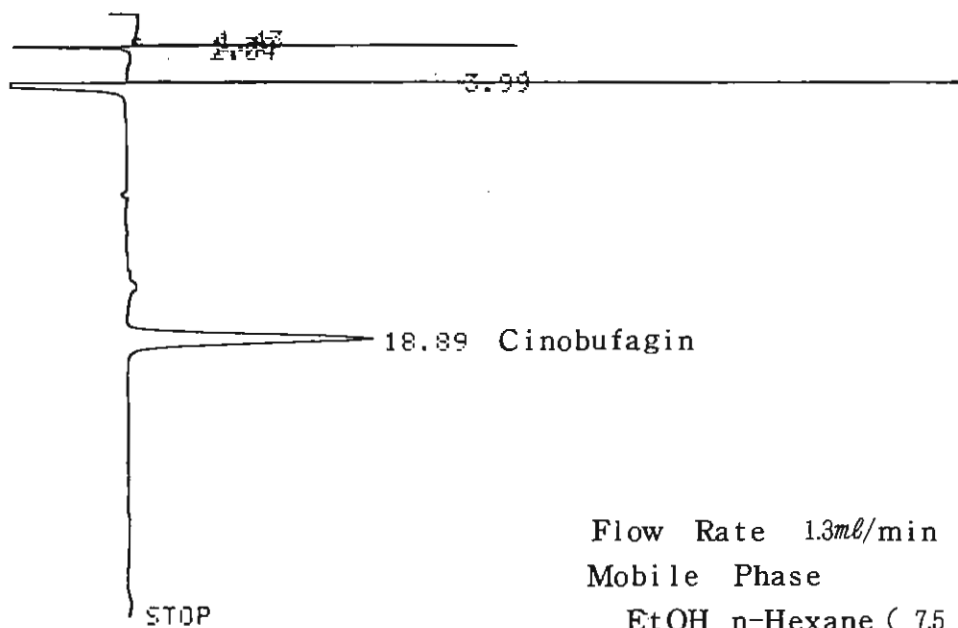
RESI 2.1MG-50ML 7UL
START 00.00.00.00.



BUFA 0.9MG050ML 7UL
START 00.00.00.00.



CINO 1.1MG050ML
7UL
START 00.00.00.00.

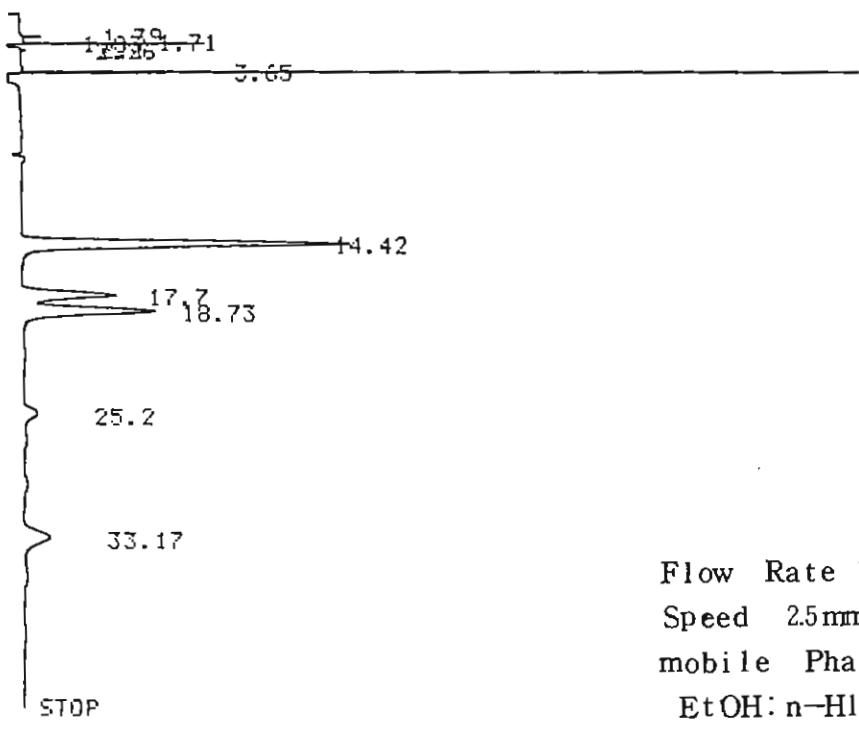


Flow Rate 1.3ml/min
Mobile Phase
EtOH n-Hexane (7.5 : 92.5)

Fig.2. Chromatogram of Standard

SENSO NO 4
SUL
START 00.00.00.00.

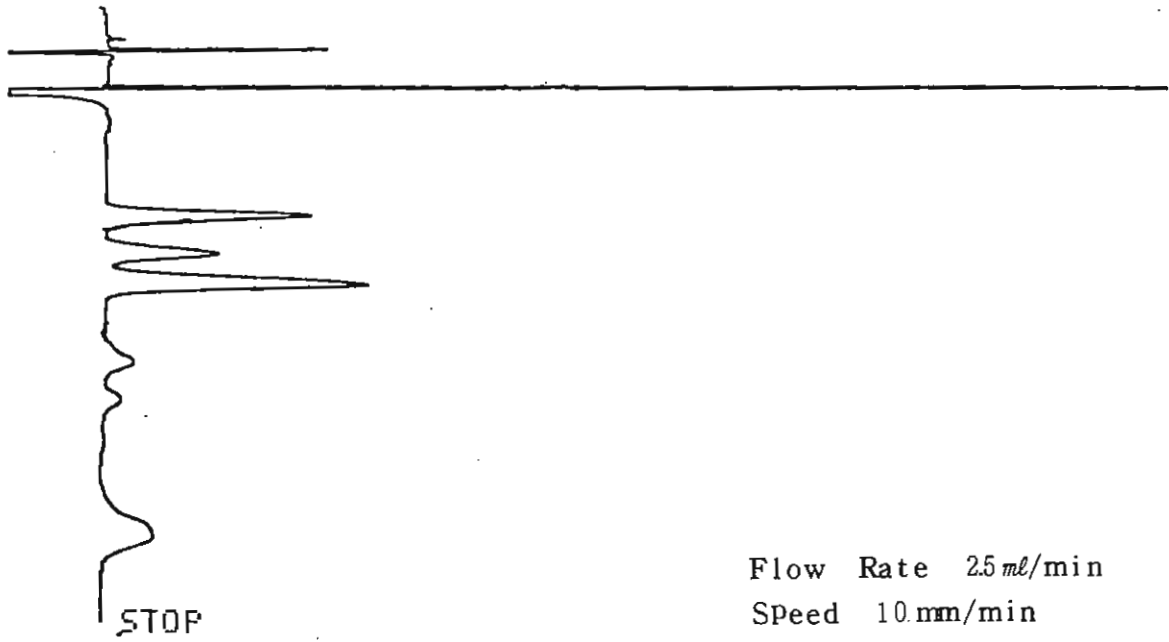
ATTEN 1



Flow Rate 1.3 ml/min
Speed 2.5 mm/min
mobile Phase
EtOH: n-Hlxane (7.5: 92.5)

Fig3. Chromatogram of Sample

LEVEL -89.6
ATTEN 4
START 00.00.00.00.



Flow Rate 2.5 ml/min
Speed 10 mm/min

Fig4. Chromatogram of Sample

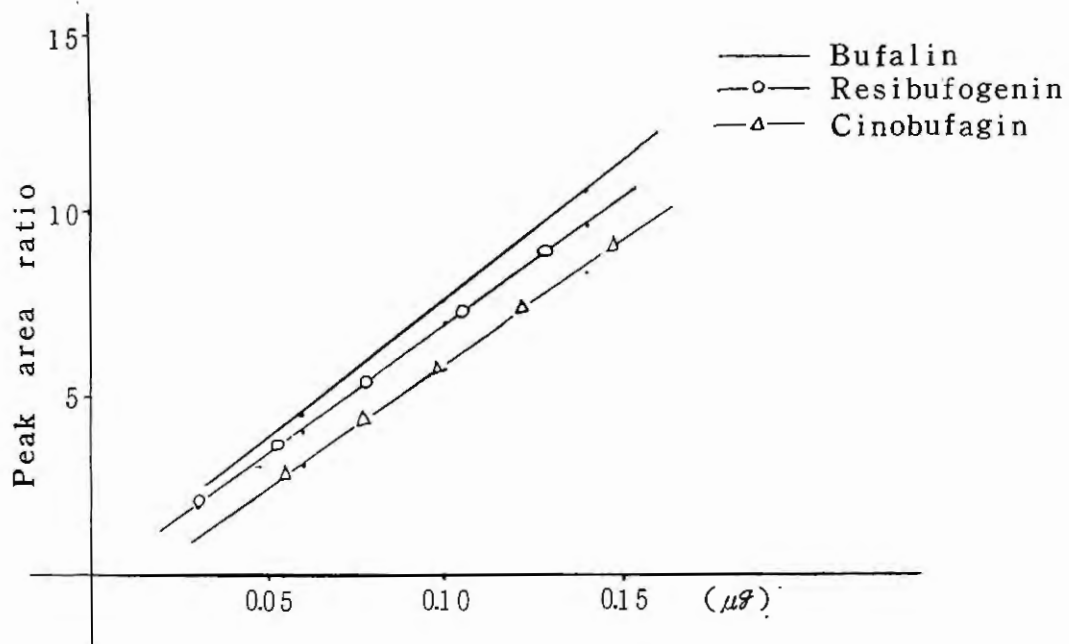


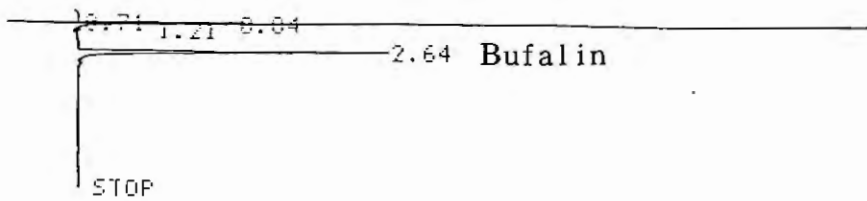
Fig.5. Calibration Curve

Table.1. 標準品の再現性と変動係数

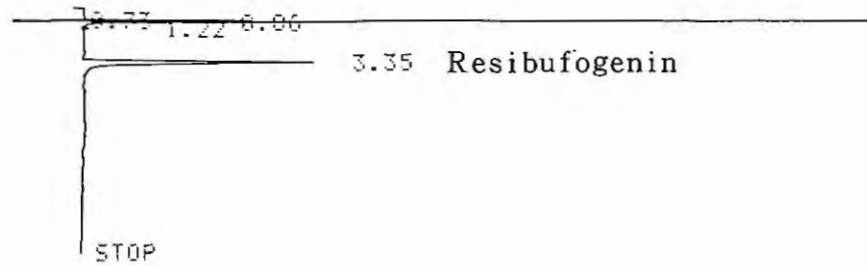
(Arerによる)

No	1	2	3	4	5	\bar{x}	CV
Bufalin (0.02mg/ml) 5 μl Inj	7,536	7,605	7,550	7,502	7,546	7,548	0.5
Cinobufagin (0.02mg/ml) 5 μl Inj	5,715	5,626	5,732	5,777	5,631	5,696	1.2
Resibufogenin (0.02mg/ml) 5 μl Inj	6,928	7,032	7,179	7,102	7,054	7,059	1.3
Cino:Resi (1:1)mixture (0.08mg/ml) 5 μl Inj	25,738	25,579	25,424	25,326	25,887	25,591	0.9

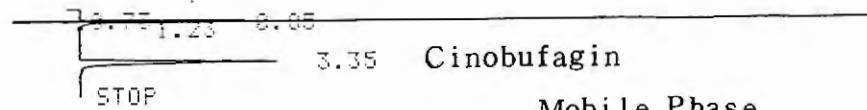
BUFA SUL
START 00.00.00.00.



RSI SUL
START 00.00.00.00.



CINO SUL
START 00.00.00.00.

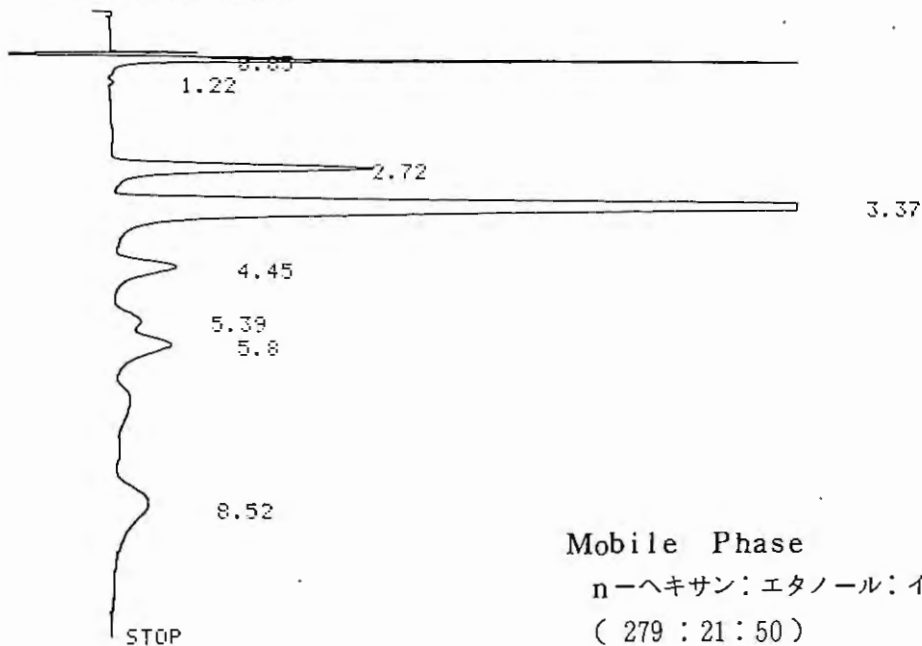


Mobile Phase

n-ヘキサン:エタノール:イソプロパノール
(279 : 21 : 50)

Fig.6. Chromatogram of Standard

SPEED 10
FLOW RATE 2.5ML
SUL
START 00.00.00.00.



Mobile Phase

n-ヘキサン:エタノール:イソプロパノール
(279 : 21 : 50)

Fig.7. Chromatogram of Sample

(CinobufaginとResibufogeninがかさなったもの)

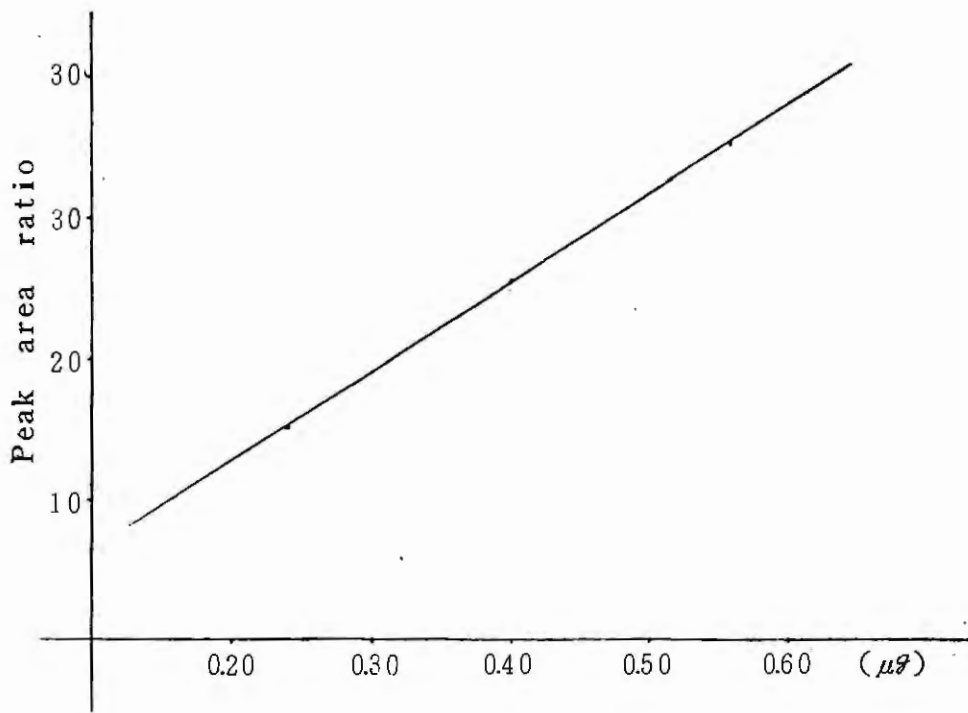


Fig.8. Calibration Curve of Cinobufagin :
Resibufogenin (1 : 1) mixture

Table.2. センソ中の成分試験結果

試料	成分含量 (%)	吸光度 (296nm)	方法	高速液クロ法		
				レジブホゲニン含量 (%)	ブファリン含量 (%)	シノブファギン含量 (%)
1	18.87	1.469	1	1.93	1.96	4.87
			2	2.09	2.19	4.95
2	11.89	1.403	1	1.97	2.03	3.37
			2	2.10	2.14	3.41
3	22.48	0.901	1	1.02	0.96	2.20
			2	1.09	1.00	2.36
4	22.83	1.358	1	3.50	1.69	2.53
			2	3.53	1.69	2.54
5	30.11	1.265	1	2.28	1.96	4.78
			2	2.42	2.19	4.84
6	19.76	0.502	1	0.58	0.51	0.95
			2	1.26	0.78	1.35
7 棋子	20.52	0.434	1	1.06	0.79	1.29
			2	1.02	0.68	1.27
8	18.98	1.308	1	2.67	1.73	4.14
			2	2.49	1.55	4.06

Table 3. センソ中の成分試験結果

試料	成分含量 (%)	吸光度 296nm	ブファリン 含量 (%)	ブファリン 含量 平均値	ブファリン 含量CV	シノブファギン レジブホゲニン 含量 (%)	シノブファギン レジブホゲニン 含量平均値	シノブファギン レジブホゲニン 含量CV
1	30.11	1.265	1.30	1.30	0.44	6.91	6.98	1.19
			1.30			6.95		
			1.31			7.07		
2	11.89	1.403	1.31	1.32	0.87	6.18	6.25	0.94
			1.33			6.27		
			1.33			6.29		
3	17.97	1.262	1.21	1.23	1.69	6.85	6.85	0.51
			1.25			6.88		
			1.22			6.81		
4	18.98	1.308	1.29	1.26	2.10	7.17	7.05	1.48
			1.24			6.98		
			1.25			7.00		
5 種子	20.52	0.434	0.47	0.47	0.00	2.37	2.37	0.24
			0.47			2.38		
			0.47			2.37		

(第3法による。シノブファギン：レジブホゲニン(1:1)として求めた)

[原 著]

製剤中のアクリノール及びベルペリンの HPLCによる分離定量

森井一仁 窪田 博 近藤弘之
大東交易株式会社 品質管理部*

アクリノール及びタンニン酸ベルペリンは、いずれも日本薬局方収載の医薬品であり整腸薬などに配合されている。

アクリノール及びベルペリンの定量法に関しては従来多くの報告があるが¹⁾、試料の前処理や定量操作の簡便さ、再現性及び分析時間などに問題がある。

著者らはこれらの点を考慮し、アクリノール及びベルペリンの迅速かつ簡便な定量法として²⁾、高速液体クロマトグラフィー(以下HPLCと略す)に着目し検討した結果、比較的短時間に同時定量する条件を確立したので報告する。

実験の部

1. 標準品及び試料

標準品：アクリノール(J. P. X収載品)、塩化ベルペリン(J. P. X収載品)

試料：整腸薬(錠剤)45錠(2,400mg)中、アクリノール60mg、タンニン酸ベルペリン200mg、
その他賦形剤及び結合剤等2,140mg

2. HPLC条件

カラム：NUCLEOSIL C18(粒径5 μm, φ4.0×150)

カラム温度：室温

移動相：アセトニトリル：水(65：35)に0.005Mになるようにオクタンスルホン酸ナトリウムを加えたもの

検出波長：254nm

流速：1.0ml/min

3. 内部標準溶液の調整

シンナリジン(局外医薬品)100mgをうすめた酢酸(1→5)を加えて溶かし100mlとする。

4. 標準溶液の調整

アクリノール100mg、塩化ベルペリン100mgをとり、うすめた酢酸(1→5)を加えて溶かし100mlとする。この液の20mlをとり内部標準溶液20mlを加え、うすめた酢酸(1→5)を加え100mlとし標準溶液とする。

5. 試料溶液の調整

試料(アクリノール20mg対応量)をとりうすめた酢酸(1→5)60mlを加え30分間振とうする。この液に内部標準溶液20mlを加え、うすめた酢酸(1→5)を加え100mlとし試料溶液とする。

6. 定量法

標準溶液及び試料溶液2μlずつをHPLCに注入し、得られたクロマトグラムの内部標準に対するアクリノール及びベルペリンのピーク面積比を求め次式より含量を算出する。

ベルペリン

$$\text{ベルペリン}(C_{20}H_{19}O_5N) \text{の量}(mg) = \text{標準品の量}(mg) \times \frac{AT}{AS} \times 0.95 \times \frac{1}{5}$$

$$\times \frac{\text{未乾燥塩化ベルベリンの含有率}(\%)}{100}$$

$$\frac{C_{20}H_{19}O_5N}{C_{20}H_{18}O_4NCI} = \frac{353.36}{371.81} = 0.95$$

アクリノール

$$\text{アクリノール}(C_{18}H_{21}O_4N_3 : H_2O) \text{の量}(\text{mg}) = \text{標準品の量}(\text{mg}) \times \frac{AT}{AS} \times \frac{1}{5}$$

$$\times \frac{\text{標準アクリノールの含量}(\%)}{100}$$

結果および考察

1. HPLC条件の検討

アクリノールはエタクリジンの乳酸塩で、ベルベリンもまた分子内に第4級アンモニウム塩を有する塩基性物質である。そこで、アルキルスルホン酸をカウンター物質として添加するペアードイオクロマトグラフィーの検討を行った。

充填剤には逆相用充填剤であるNUCLEOSIL C₁₈を用い、移動相には水/アセトニトリル混合溶媒にオクタンサルホン酸を添加し種々混合比を変えたものを移動相とした。(Fig.1 参照)

また、溶媒の混合比はアセトニトリル60%から70%まで検討し、各ピークのK'値を算出した(Fig.2.)。

以上より、各成分の分離が良好で溶出時間も適当であるアセトニトリル65%に0.005Mオクタンサルホン酸を添加した溶媒を移動相とした。

2. 検量線及び定量精度

前に述べた定量法に従い、アクリノール及び塩化ベルベリンの0.1 μ g-0.8 μ gの範囲における検量線を作成したところ、この範囲において良好な直線関係が成立した(Fig.3.)。

主剤を含まない試料にアクリノール及び塩化ベルベリンを添加し抽出後、その定量精度を求めたところ、Table 1に示すように良好な結果が得られた。

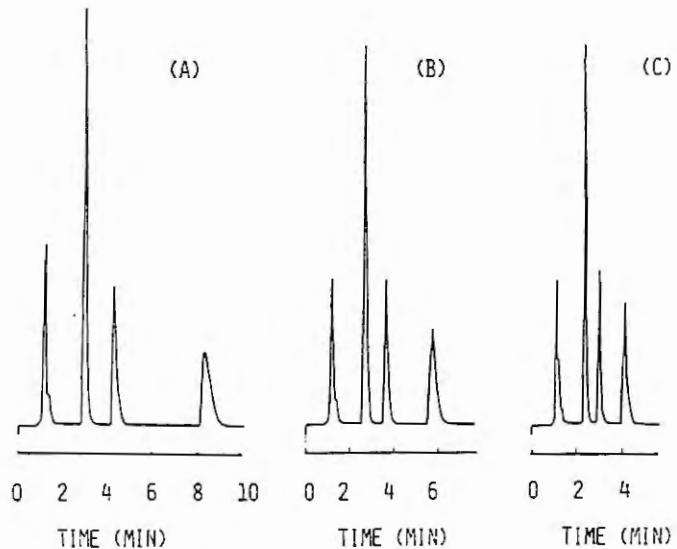


Fig.1. Effect of acetonitrile concentration on chromatogram of acrinol and berberine

- (A) AcCN:H₂O (60:40) with 0.005M octanesulphonic acid
 (B) AcCN:H₂O (65:35) //
 (C) AcCN:H₂O //

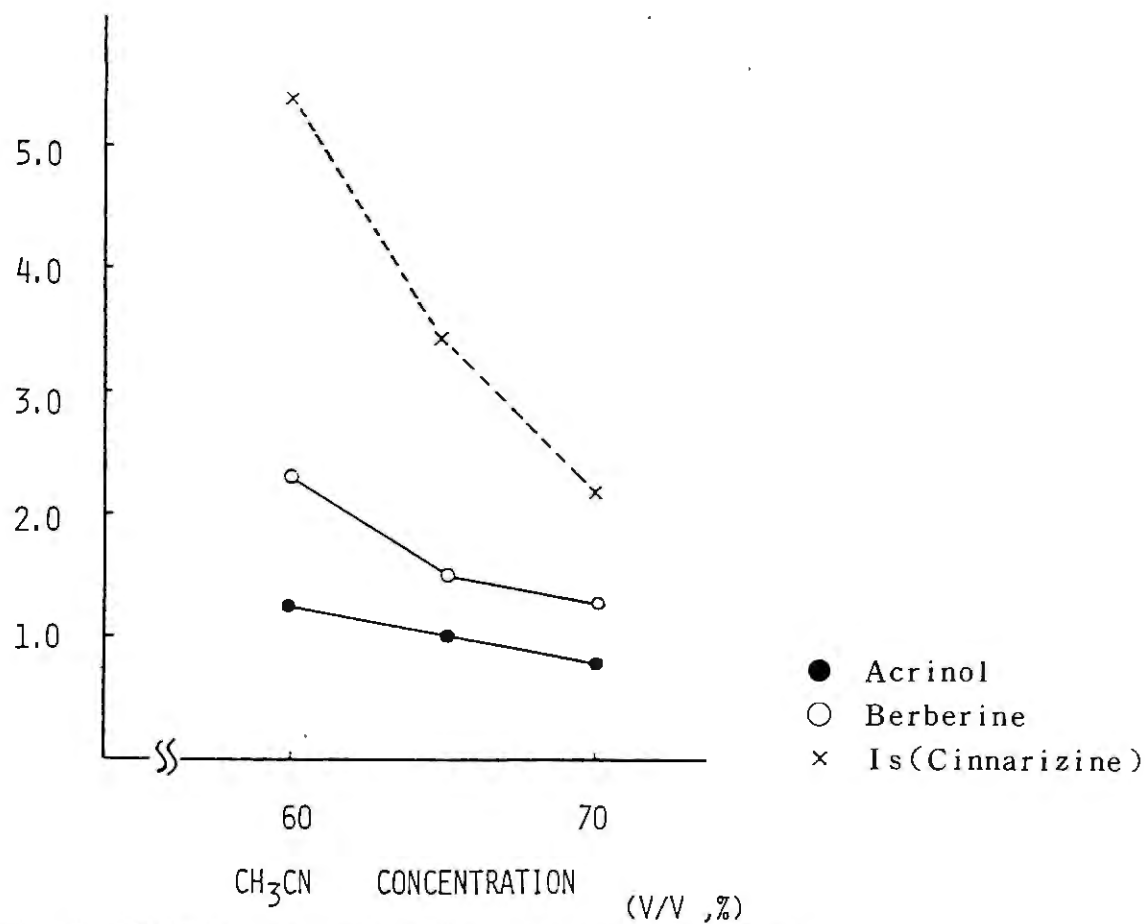


Fig.2. Effect of acetonitrile concentration on chromatogram of acrinol and berberine

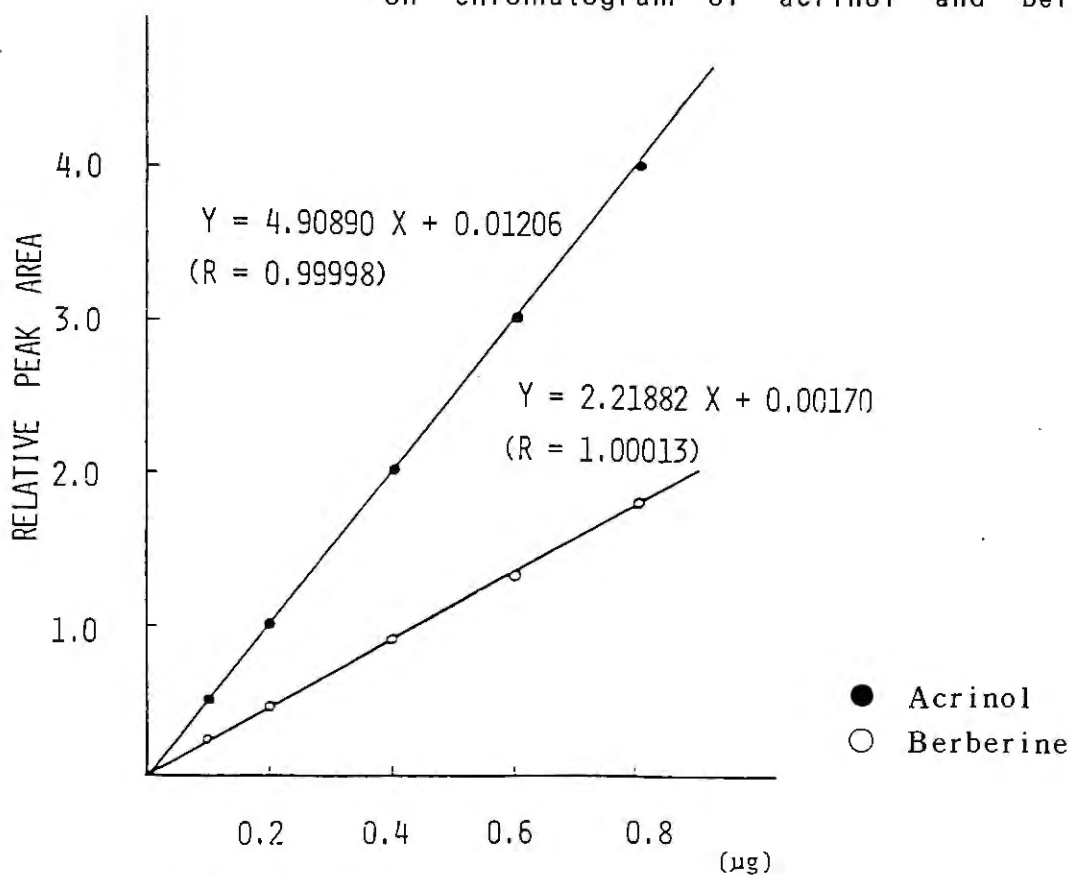


Fig.3. Calibration curve acrinol and berberine

3. 製剤中の妨害物質の影響

アクリノール, 塩化ベルベリン, タンニン酸ベルベリン, タンニン酸及び主剤を含まない試料について, 前に述べたHPLC条件で分析を行ったところ, アクリノール及び塩化ベルベリンはそれぞれ単一ピークを示し, 他の混在物は認められなかった。しかし, タンニン酸ベルベリンにおいては, ベルベリンのピークとは別にピークを認めた。これは, タンニン酸ベルベリン中のタンニン酸が酢酸塩となり溶出したものと思われる。また, 主剤を含まない試料についても同様に行ったところ, ほとんどピークは認められなかった (Fig.4.)。

4. タンニン酸ベルベリン中のベルベリンの定量

タンニン酸ベルベリンはベルベリンとタンニン酸との化合物で日本薬局方ではベルベリン含量 27.0~32.0%と規定している。そこで, タンニン酸ベルベリン中のベルベリンの分析をHPLC法に従って行った結果, Table 2に示すように良好な結果が得られた。HPLC法との比較の為, 日本薬局法の吸光度法により定量を行った。

Table 3に示す。

5. 製剤中のアクリノール及びベルベリンの定量

本法により製剤中のアクリノール及びベルベリンの同時定量が極めて精度よく, かつ迅速にできることがわか

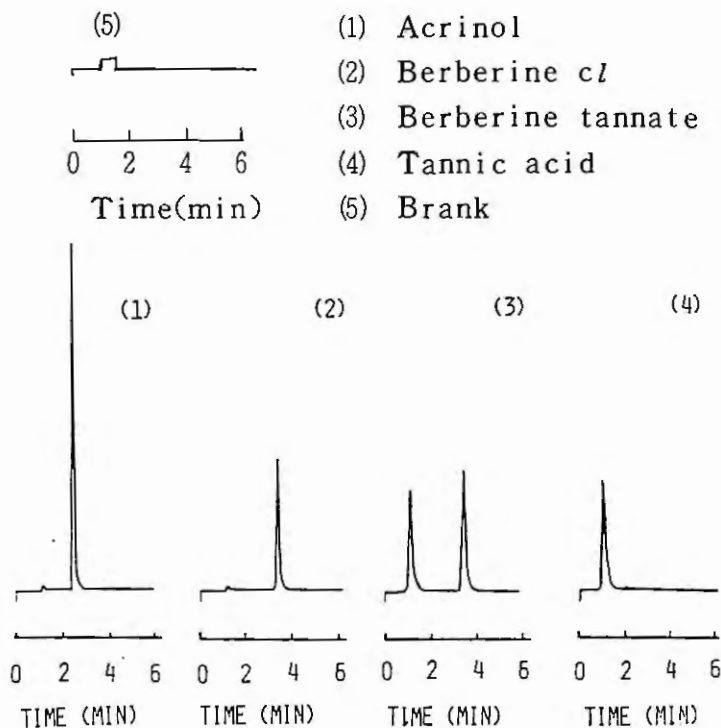


Fig.4. Chromatogram of Sample

Table.1. Precision of the Quantitative Determination

Amount of added (µg)		Amount of found (µg)		Error (%)	
Acrinol	Berberine Cl	Acrinol	Berberine Cl	Acrinol	Berberine Cl
0.198	0.201	0.197	0.202	-0.51%	+0.50%
0.200	0.236	0.202	0.236	+1.00%	0.00%
0.402	0.387	0.400	0.385	-0.99%	-0.52%
0.407	0.223	0.408	0.225	+0.25%	+0.90%
0.605	0.475	0.604	0.477	-0.17%	+0.42%
0.600	0.597	0.600	0.600	0.00%	+0.50%

Table.2. Determination of Berberine in Berberine Tannate by HPLC

Amount of Berberine Tannate taken (mg)	Berberine amount in Berberine Tannate (mg)	Berberine content in Berberine Tannate (%)
72.3	20.97	29.00
73.2	21.38	29.21
80.3	22.98	28.62
65.3	18.94	29.00
67.5	19.45	28.81
X		28.93
σ		0.223
CV		0.770

った。本法の分析精度を5回繰り返して定量値から変動係数を求めたところTable 4に示すように、すべての成分の変動係数は0.6%以上となり、極めて精度の高い結果を得ることができた。

Table.3. Determination of Berberine in Berberine Tannate by J. P. X

Amount of Berberine Tannate taken (mg)	Berberine amount in Berberine Tannate (mg)	Berberine content in Berberine Tannate (%)
50.0	14.45	28.90
50.2	14.48	28.84
50.0	14.35	28.70
50.1	14.51	28.96
50.0	14.42	28.84
X		28.85
σ		0.097
CV		0.336

Table.4. Determination of Acrinol and Berberine
in Pharmaceutical Preparations

Sample No.	Amount of sample taken (mg)	Amount in sample (mg)		Content in sample (%)		Average (%)	
		Acrinol	Berberine	Acrinol	Berberine	Acrinol	Berberine
1	800.3	19.92	19.62	99.87	100.04	99.87	100.05
		19.96	19.68	100.07	100.34		
		19.88	19.57	99.67	99.78		
2	805.6	20.18	19.88	100.51	100.70	100.23	100.49
		20.12	19.79	100.21	100.24		
		20.07	19.85	99.96	100.54		
3	801.2	20.01	19.72	100.21	100.43	100.31	100.47
		19.98	19.81	100.06	100.89		
		20.10	19.65	100.66	100.08		
4	811.7	20.28	19.80	100.25	99.54	100.00	99.39
		20.19	19.62	99.81	98.63		
		20.22	19.89	99.95	99.99		
5	795.1	20.00	19.50	100.93	100.07	100.39	100.39
		19.86	19.48	100.22	99.97		
		19.82	19.52	100.02	100.18		
	X					100.16	100.09
	σ					0.3328	0.5332
	CV					0.332	0.533

結 論

本法は、製剤中のアクリノール及びベルベリンを迅速かつ簡便な定量法としてHPLC法を用い定量したところ、煩雑な前処理を必要とせず、抽出液を直接カラムに注入するのみで、短時間で定量することができた。

謝辞、御指導、御助言を賜りました富山県薬事研究所、江尻千鶴子氏に深謝します。

文 献

- 1) 江尻千鶴子：富山県薬事研究所所報，昭和48年 49年合併号，64～72
江尻千鶴子：同 上 ，昭和52年 53年合併号，19～21
- 2) 赤田良信他：薬誌，100，766～770（1980）

アスピリン製剤の安定性に及ぼす包装材料の影響

吉川明茂, 高堂昭則
第一薬品工業株式会社 研究所※

解熱鎮痛薬であるアスピリンの安定性については、品質管理及び使用期限設定という点からも重要な問題である。

アスピリンは、湿った空气中で徐々に加水分解してサリチル酸になるが、この不安定であるアスピリンを配合する製剤について、各種包装材料を用い、アスピリンの加水分解生成物である遊離サリチル酸量を指標として各条件下で経時変化試験を実施した。

実験の部

1. 製 剤

試料P (淡かっ色の散剤)

成分及び分量 (2 包中)	
アスピリン ^{a)}	1,200mg
カフェイン	120mg
ケイヒ末	200mg
バレイショデンブ ^{b)}	280mg
合 計	1,800mg

a) 結晶性アスピリン (42メッシュ)

b) 水分含量 2%

試料T (白色の錠剤)

成分及び分量 (4 錠中)	
アスピリン ^{c)}	1,360mg
アリルイソプロピルアセチル尿素	120mg
無水カフェイン	100mg
結晶セルロース	270mg
乳 糖	適 量
ハイドロキシプロピルスターチ	130mg
軽質無水ケイ酸	0.5mg
タルク	20mg
合 計	2,200mg

c) 顆粒状アスピリン (32メッシュ)

2. 包装材料

試料Pは、ポリエチレンラミネートセロファン (厚さ80 μ m)、ポリエチレンラミネートグラシン紙 (厚さ50 μ m) 及びアルミニウム箔 (厚さ15 μ m) とポリエチレン (厚さはアルミニウム箔をはさんで15 μ mと30 μ m) をラミネートしたものの3種類で分包し、分包散剤とする。

試料Tは、アルミニウム箔 (厚さ20 μ m) でPTP包装したものと同じくアルミニウム箔 (厚さ20 μ m) に塩化ビニール・塩化ビニリデン (厚さ260 μ m) 複合シートでPTP包装したものの2種類を

作成した。

3. 定量法

遊離サリチル酸定量法として鉄塩法を採用した。

4. 試験条件

上述した検体について、室温放置及び加速試験(40°, RH75%および40°, RH90%)を行った。

結果および考察

各包製材料の各条件下におけるアスピリンの分解速度をFig.1, Fig.2及びFig.3に示した。

Fig.1, Fig.2及びFig.3より、遊離サリチル酸含有率は経時的に増加するが、アルミニウム箔とポリエチレンをラミネートしたものとアルミニウム箔に塩化ビニル・塩化ビニリデン複合シートでPTP包装したものは、他に比べてアスピリンの分解速度がかなり遅いことがわかる。また加速試験(40°, RH75%)では、ポリエチレンラミネートセロファンで3カ月目に、ポリエチレンラミネートグラシン紙で4カ月目にそれぞれ酢酸臭が認められ、加速試験(40°, RH90%)では、ポリエチレンラミネートセロファン及びポリエチレンラミネートグラシン紙で2カ月目に酢酸臭が認められた。Fig.2 Fig.3より、遊離サリチル酸含有率が4%以上に達すると酢酸臭が認め

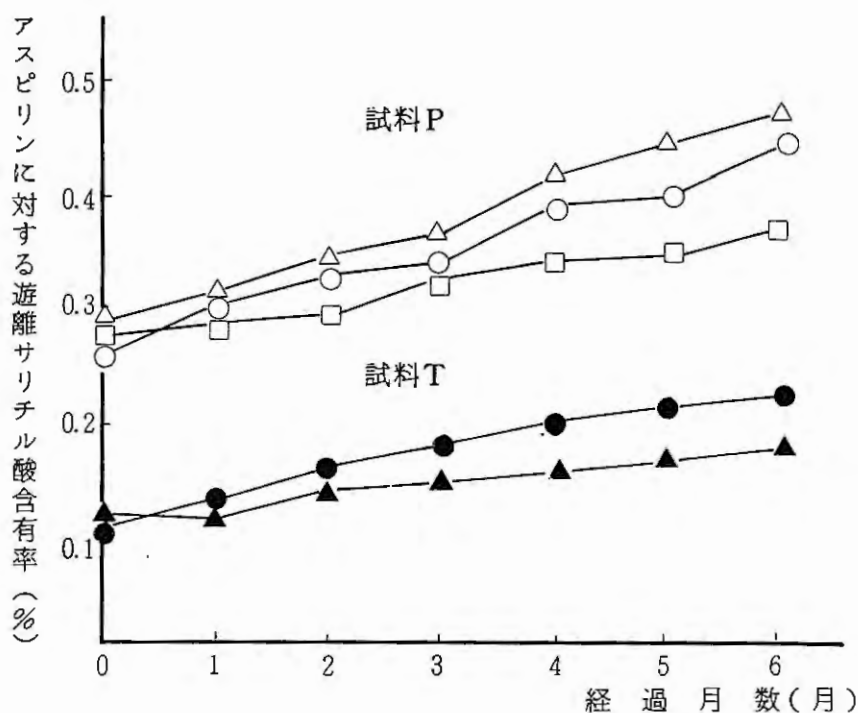


Fig. 1. アスピリンの分解速度(室温放置)

- ; ポリエチレンラミネートセロファン △; ポリエチレンラミネートグラシン紙
- ; アルミニウム箔・ポリエチレン ●; 塩化ビニル
- ▲; 塩化ビニル・塩化ビニリデン

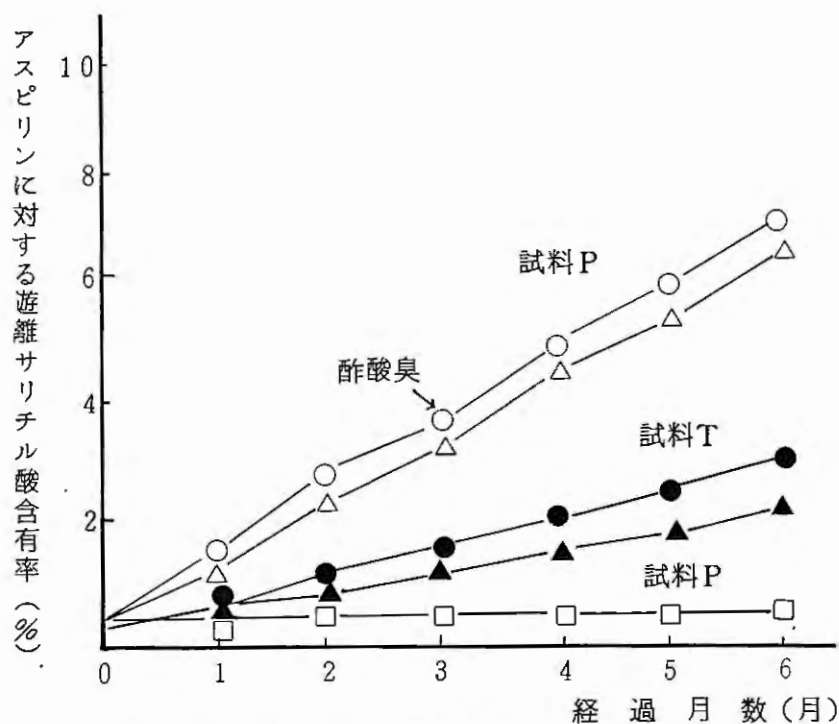


Fig. 2. アスピリンの分解速度(40°, RH75%)

- ; ポリエチレンラミネートセロファン △; ポリエチレンラミネートグラシン紙
- ; アルミニウム箔・ポリエチレン ●; 塩化ビニル
- ▲; 塩化ビニル・塩化ビニリデン

られることがわかる。

以上のことにより、試料Pについては、厚さ15 μm のアルミニウム箔とポリエチレンをラミネートしたものが包装材料として最適であり、試料Tについては、厚さ20 μm のアルミニウム箔に厚さ260 μm の塩化ビニル・塩化ビニリデン複合シートでPTP包装したものが最適であると考えられた。そこでこの2種類の包装材料(形態)を我社のアスピリン製剤に使用した。

試料P及び試料Tの保管検体のアスピリンの分解速度をFig. 4及びFig. 5に示した。Fig. 4からわかるように、厚さ15 μm のアルミニウム箔に切り替える前のポリエチレンラミネートグラシン紙分包装の5年目の遊離サリチル酸含有率は1.88%であり、15 μm のアルミニウムとポリエチレンをラミネートしたものの分包装は製造してから1年半経過したが、その時点での遊離サリチル酸含有率は0.39%であった。Fig. 5よりわかるように、厚さ20 μm のアルミニウム箔に塩化ビニル・塩化ビニリデン複合シートでPTP包装した製剤は製造してから約1年経過したが、その時点での遊離サリチル酸含有率は0.21%であった。

以上の様に今回試験し

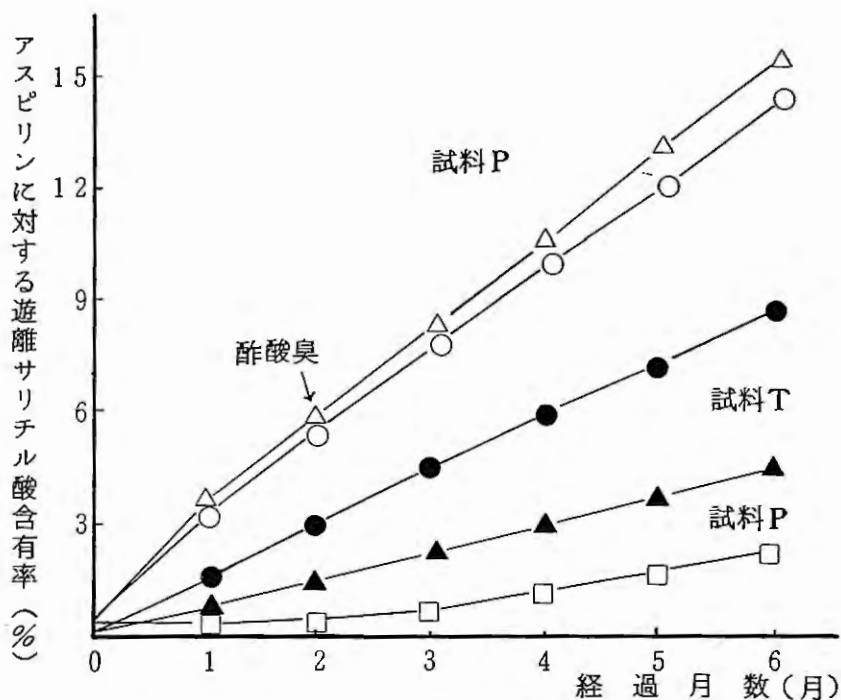


Fig. 3. アスピリンの分解速度 (40° RH90%)

- ; ポリエチレンラミネートセルロファン
- △; ポリエチレンラミネートグラシン紙
- ; アルミニウム箔・ポリエチレン
- ; 塩化ビニル
- ▲; 塩化ビニル・塩化ビニリデン

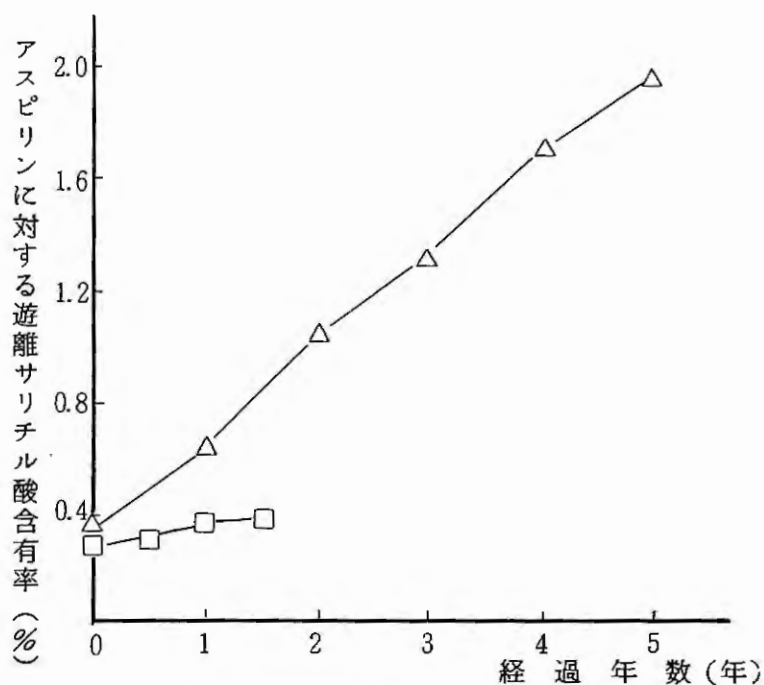


Fig. 4. 試料Pのアスピリンの分解速度

(保管検体, 室温)

- △; ポリエチレンラミネートグラシン紙
- ; アルミニウム箔・ポリエチレン

た包装材料のうち、散剤では厚さ15 μm のアルミニウム箔とポリエチレンをラミネートしたものが、錠剤では厚さ20 μm のアルミニウム箔に厚さ260 μm の塩化ビニル・塩化ビニリデン複合シートでPTP包装したものが最適であることがわかった。また加速試験の結果から、遊離サリチル酸含有率が約4%に達すると酢酸臭が認められたことより、遊離サリチル酸含有率の上限を3%と設定し、この場合少なくとも3年以上はアスピリンは安定であり、最長5年程度までは品質保証できると考える。

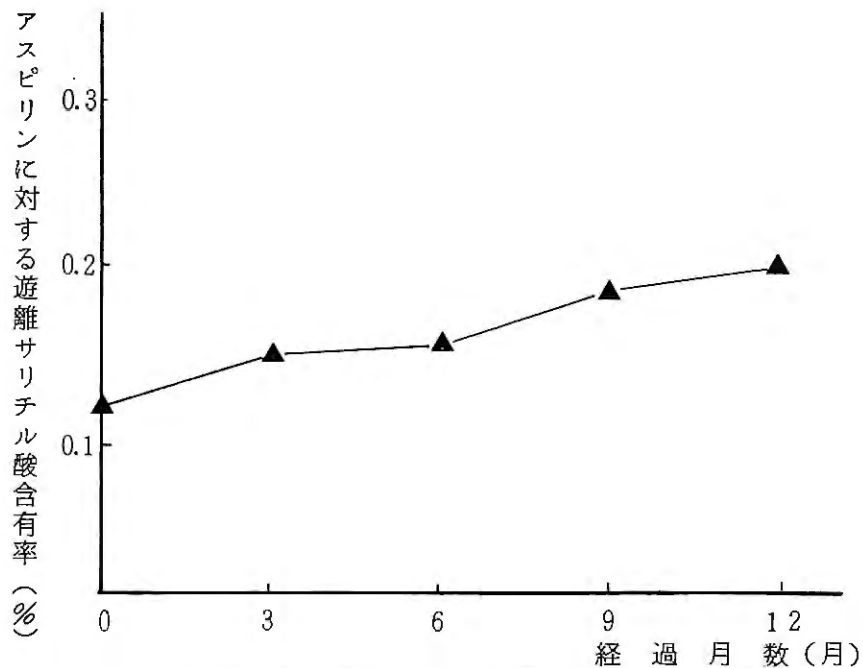


Fig.5. 試料Tのアスピリンの分解速度
(保管検体, 室温)

▲; 塩化ビニル・塩化ビニリデン

謝 辞

本実験に際し、適切な御助言を賜りました富山県薬事研究所製剤課長、杉本義則氏に深謝致します。

害虫忌避剤の開発について

効力評価法についての考察

押田 勝, 鹿熊 武, 森井 勇, 吉田裕一
株式会社 池田模範堂*

害虫忌避剤の開発にあたっては、製剤の有効性、安全性、さらに使用性が満足される必要がある。特に有効性については、有効成分の選定や配合量に影響されるところが大きい。

しかし、効力評価については統一された標準試験法といったものはなく、種々の方法で行われているのが現状である。

このため開発に際しての処方決定は、独自に設定した2, 3の効力評価法にもとづいて行ってきたが、忌避効果は試験方法、使用環境、使用時期等によっても異なっており、忌避効果を客観的に評価するためには、実際の使用時と相関性のある標準試験法の確立が望ましいと思われる。

2, 3の実験例を紹介し、これらの問題点について考察してみたい。

1. 効力評価法

開発に際して設定した評価は次の(1)~(3)式から求めた忌避率を指標にして行った。

$$\text{忌避率}(\%) = \frac{\text{一定時間までの未吸血蚊の数}}{\text{使用した蚊の数}} \times 100 \dots\dots(1)$$

$$\text{忌避率}(\%) = \frac{\text{一定時間までの未吸血被験者数}}{\text{被験者の総数}} \times 100 \dots\dots(2)$$

$$\text{忌避率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{一定時間までの塗布足群での吸血箇所の数}}{\text{無塗布足群での吸血箇所の数}} \right) \times 100 \dots\dots(3)$$

(1)および(2)式は、ケージ内で飼育した雌蚊を使って、マウスやヒトに吸血させてその忌避効果の実態を知る実験室の方法である。(1)式は主として処方の比較決定のためのものであり、(2)式はヒトに対する効果の持続性を知るためのものである。(3)式は実際に使用された場合の効果を確認するために野外実験の結果から求める方法である。

2. 実験例

実験1：飼育蚊を用いたマウスでの処方検討

害虫忌避剤の主な有効成分を配合目的別に分類するとTable 1の通りとなる²⁾³⁾。この中から有効成分を選定しTable 2に例示した組合せNo. 1~No. 6について効力評価を行った²⁾⁴⁾。

忌避剤が有効とされる害虫はFig 1に示す7種類が主なものである⁵⁾。実験は富山医科薬科大学医学部病理学教室上村清助教授から提供された富山県産アカイエカを飼育したものをを用いた。飼育方法として幼虫は乾燥酵母、成虫は5%砂糖水を餌とし、温度28℃、湿度60~70%の恒温恒湿室で行った。なお、⁵⁾幼虫の飼育は窒息させないため水槽中にエアレーションしながら1日1回浮遊する汚物を取り除いた。⁵⁾アカイエカの発育史はFig 2に、飼育風景はPhoto 1~3に示す通りである。

Table.1. 主な有効成分

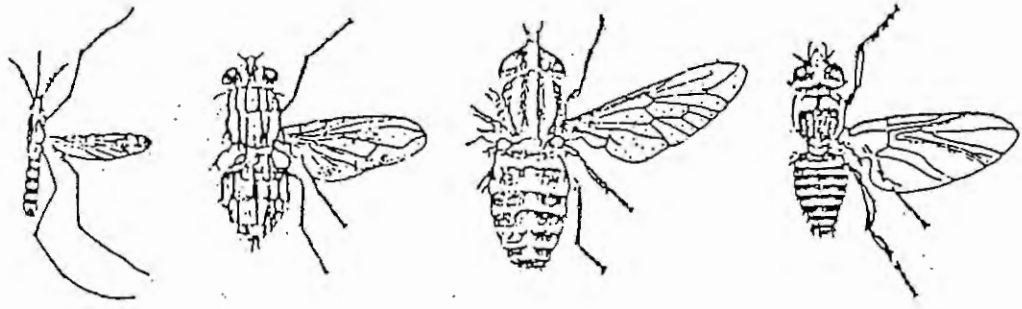
分類	化学名 (一般名)
忌避成分	<ul style="list-style-type: none"> ○ N,N-Diethyl-m-toluamide (Deet) ○ Di-n-propyl-isocinchomeronate (MGK-326*) ○ 2,3,4,5,-Bis(2-butylene)-tetrahydrofurfural (MGK-11*) <p>2-Ethyl-1,3 hexandiol</p>
効力増強成分	<ul style="list-style-type: none"> ○ N-(2-Ethylhexyl)-bicyclo[2,2,1]-hept-5-ene-2,3,-dicarboximide (Synepirin 222*) <p>N-(2-Ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2,2,2]oct-5-en-2,3-dicarboximide (Synepirin 500*)</p>
殺虫成分	<p>d1-2-Allyl-4-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentene-1-one-d1-cis-trans chrysanthemum monocarboxylate (Allethrin)</p> <p>N-(3,4,5,6-Tetraphthalimide)-methyl-d1-cis-trans chrysanthemum monocorboxylate (Phthalthrin)</p>

○医薬品製造指針収載

★商品名

Table.2. 検討した処方例

有効成分	Na 1	Na 2	Na 3	Na 4	Na 5	Na 6 (control)
Deet (忌避剤)	4%	4%	4%	4%	6%	0%
Synepirin 222 (効力増強剤)	0	2	0	2	0	0
Phthalthrin (殺虫剤)	0	0	0.1	0.1	0	0

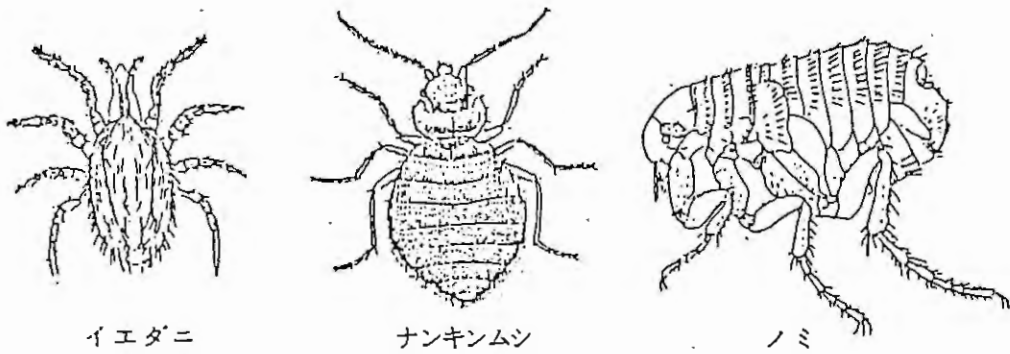


蚊

刺バエ

アブ

ブユ



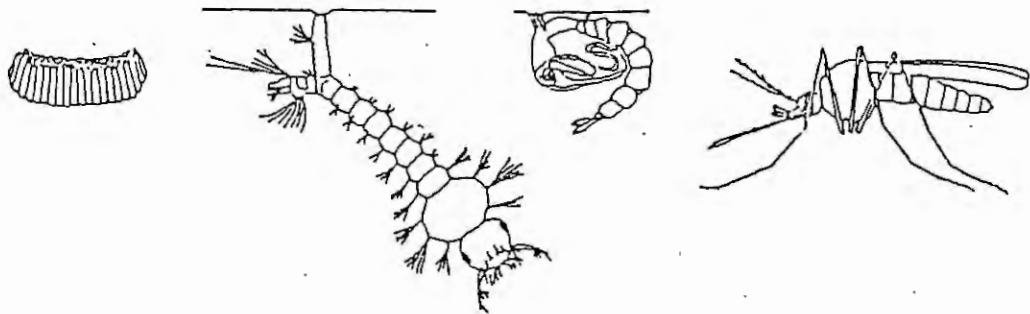
イエダニ

ナンキンムシ

ノミ

(鈴木, 緒方「日本の衛生害虫」による)

Fig. 1. 忌避剤が有効とされる害虫



(上村原図による)

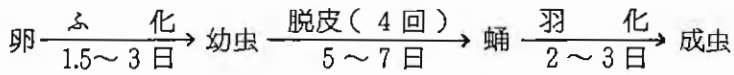


Fig. 2. 蚊の発育史



Photo.1. 蚊の飼育風景

(白色の水槽では乾燥酵母を餌としてエアレーションしながら幼虫を飼育する)

Photo.2. 蚊の飼育風景

(中段左のビーカーで羽化させた成虫を布網張りのケージに移し、飼育する)

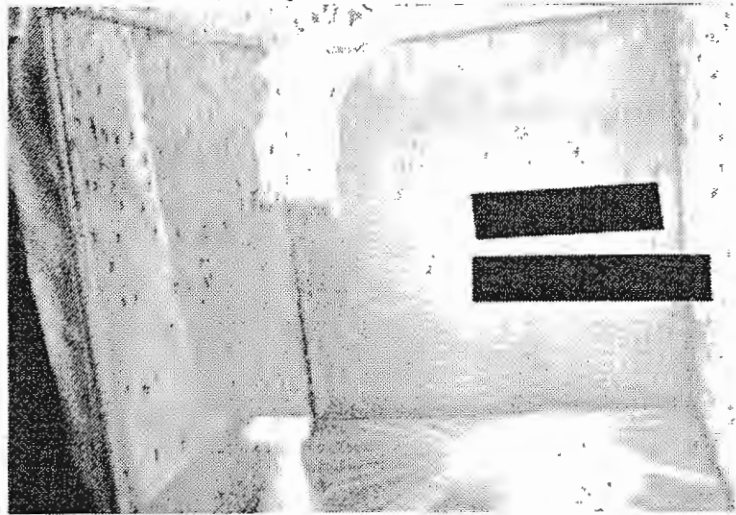


Photo.3. 蚊の飼育風景

(5%砂糖水を餌にして30cm×30cm×30cmケージ内にて飼育する。室温28℃、湿度60~70%)

〈方 法〉

同一世代の雌アカイエカに前日より餌(5%砂糖水)を断って十分に吸血意欲を高める。これを50匹ずつ布網張りのケージ(30cm×30cm×30cm)に入れる。

ついで雄マウス(ddY系23~27♂)を金網で固定する。Table 2に示したNa1~Na5及びNa6(control Na1~Na5の溶剤)をマウスの全面に0.3mlずつを均等に噴霧し、ケージ内に入れる。ケージをダンボール箱で覆い暗くして、室温28℃、湿度60~70%に保ちながら1~6時間吸血させた。

〈結 果〉

吸血した蚊は腹が充血して膨らむので識別出来るため、これを計数し(1)式から時間毎の忌避率を求めた。結果はFig 3に示す通りである。効力増強成分や殺虫成分を配合した場合の効果は一応認められるものの、特に効力増強成分の配合よりも主薬(忌避剤: Deet)を増量した方がより効果的であることが判明した。

実験 2: 飼育蚊によるヒトでの効果

忌避剤使用の有無によって、吸血されるまでの時間にどの程度の違いが生じるかを調べる目的で行った実験である。

〈方 法〉

被験者13名の左右いずれかの手首(ゴム手袋の内側部に直径3cmの穴があけてある)に忌避剤(Table 2 No 5 Deet 6%配合)を塗布し、一方は無塗布群として暗室中にて1時間毎(無塗布群は20分間毎)に10分間吸血させる。吸血されてかゆみを訴えるまでの時間を測定した。

実験に供した雌アカイエカ及び温度、湿度条件は、上記実験(1)の場合と同様とした。

この実験風景は、Photo 4に示す通りである。

〈結 果〉

吸血の有無の被験者数から(2)式に従って時間毎の忌避率を求め、まとめるとFig 4の通りとなった。

無塗布群では、直ちに吸血が始まり30分後には全ての被験者が吸血される。

これに対し、No 5 (Deet 6%配合)塗布群では3時間後までは吸血されな

いが、4時間目から吸血される被験者が出始め、全員が吸血されたのは9時間後であった。

持続効果を50%忌避率を示す時間で表わすと無塗布群では10分以内、塗布群では約6時間30分であった。

実験 3: 野性ブユによる人での効果

実際に近い評価をするため、野性ブユの生息地に於ける使用実験を試みた。

害虫の対象をブユにしたのは、蚊と異なり吸血したあとは必ず出血するので吸血数の計数が可能となるためである。

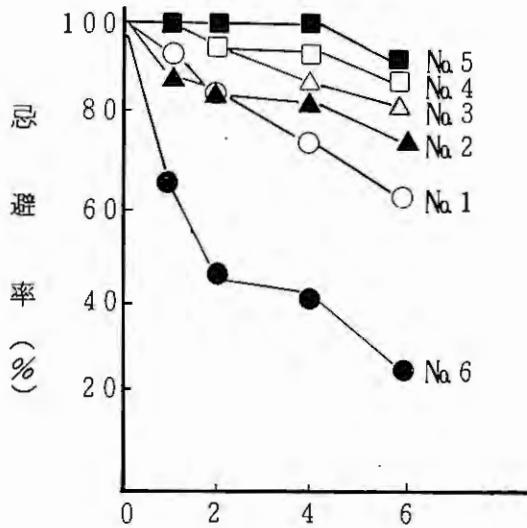


Fig. 3. 飼育雌アカイエカ (50匹) 中でマウスに吸血させたときの忌避率の比較



Photo. 4. 吸血実験風景 (50匹の雌蚊を入れ、暗くしたケージ内で吸血されるまでの時間を測定する)

予備調査の結果、ブユの吸血活動が最も活発になるのは夏期では夕方6～7時頃と朝の5～6時頃である。この時間帯以外はあまり吸血されない。従って、有効持続時間を知るにはこの吸血時間帯からどれくらい前に塗布したものがどの程度の忌避率を示すかを調べることが必要となった。

〈方法〉

富山県中新川郡上市町大岩のキャンプ場跡(山間の溪流の近くにあるブユの多発生息地)を実験場所として選び、2種類の検体(Deet 6%及び12%配合のもの)の効力比較を行った。ブユの吸血活動の最や盛んになる時間帯はFig 5に示すようにPM 6時から7時頃までであるので15名の被験者を3群に分け、2時間(PM 5時)、4時間前(PM 3時)、6時間前(PM 1時)にそれぞれFig 6及びPhoto 5に示す部位に検体の塗布を行った。各群とも3名は、左右いずれかの足にDeet 6%配合検体を、他の足にDeet 12%配合検体を塗布し、残り2名は左右いずれかの足にDeet 6%又は12%配合検体を塗布し、他の足は無塗布としてPM 7時まで吸血させた。

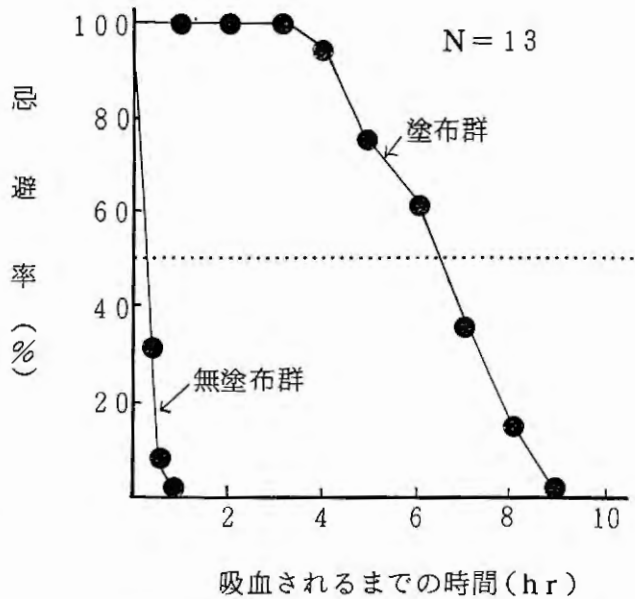


Fig. 4. 飼育雌アカイエカ(50匹)中でヒト手首に吸血させたときの忌避率の比較

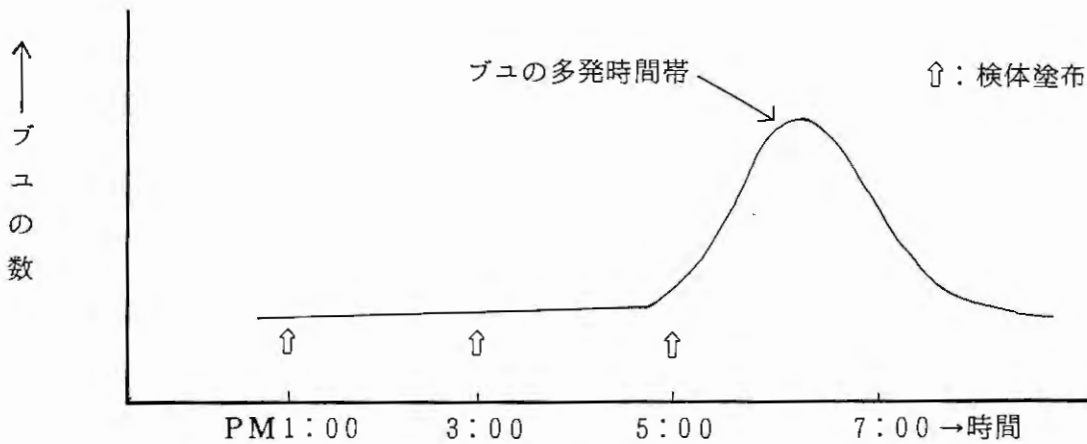


Fig. 5. 検体の塗布時間

〈結果〉

吸血終了後、各時間毎の無塗布、Deet 6%配合検体及びDeet 12%配合検体塗布足の吸血数を計算し、一人当りの吸血数に換算したのち(3)式から忌避率を求めた。吸血後の被験者の1例はPhoto 6に示す通りである。

これらをまとめた結果はFig 7に示す通りである。Deetの配合濃度が高いほど忌避率が高く持続時間も長くなる傾向を示した。

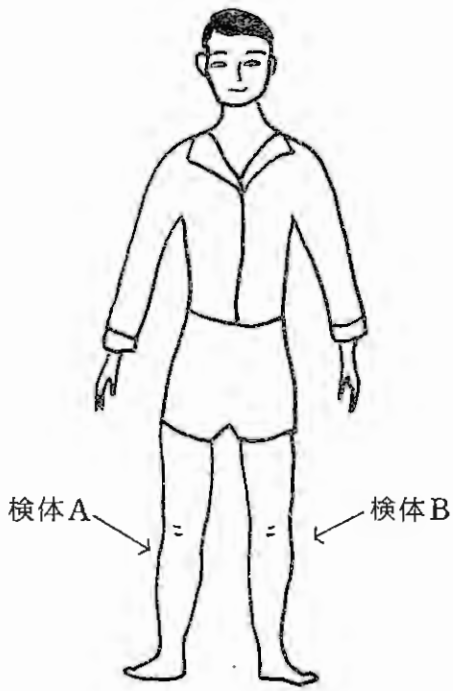


Fig. 6. 検体の塗布方法



Photo.5. 検体の塗布状況



Photo.6. 塗布6時間後の被験者の吸血状況
(右足は無塗布, 左足はDeet12%
配合検体塗布)

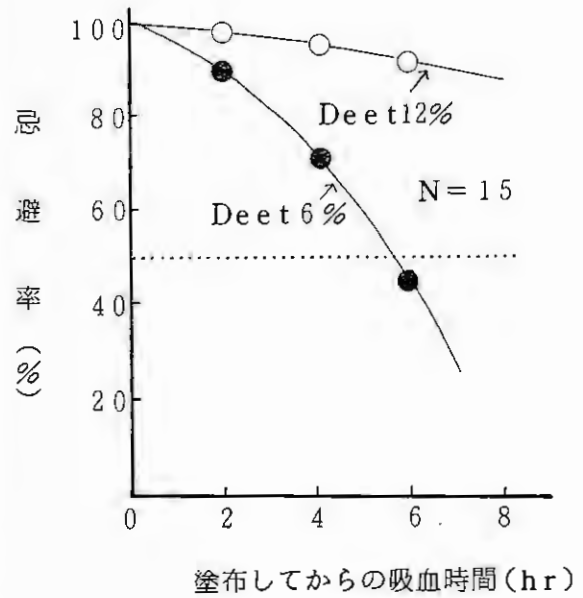


Fig. 7. 野性ブユによるヒト足での忌避率の比較

3. 考 察

実験(1)では、試験方法設定のための予備実験で前日からの断食の有無、室温、雌アカイエカの世代の違いや羽化後の生育日数の違い、また、検体の塗布量の違い等により忌避率が異なることを経験している。

実験(2)は、使用したアカイエカは飼育したもので野性の蚊ではないので、実際の使用時とは異なった結果が予想される。また、塗布群での吸血までの時間が4～9時間とバラツキが大きいのは主としてヒトの体質の差によるものと考えている。

実験(3)では、濃度差による忌避効果の違いは明らかとなった。Deet12%含有のものは、7～8時間程度効力が持続するものと思われる。しかし、同一検体をブユの吸血活動を始める直前に使用した場合と、その時間前に使用した場合とでは吸血される時間帯が同じであることから持続時間に差が生じることになる。

従って、その効果を持続時間で表現することは、適当でないと考えられる。

また、この実験でも人による効果の差は大きく、他の実験では重ね塗りをした場合には効果が増大することも経験している。

なお、実験(1)～(3)は、雌アカイエカ及びブユでの忌避効果であり、他の害虫や種類の差によって結果が異なってくることは充分予想される。

以上をまとめると忌避剤の効果は、目的とする試験方法によって違い、対象とする害虫、使用者の体調・体質、使用環境、使用時期等によっても異なってくる。

また、効果の表現方法も吸血されるまでの時間とするか、50%忌避率を示す時間とするか等によっても違ってくる。実験例(1)～(3)で示したように、忌避剤間の相対的効力比較は可能であるが、絶対的評価にはなっていないと考えられる。

最後に本実験に際し、アカイエカのご提供、飼育などのご指導を賜りました富山医科薬科大学医学部病理学教室、上村清助教授に対し、深謝致します。

文 献

- 1) 鹿熊 武：日皮協ジャーナル 5 (1), 20 (1982)
- 2) 日本公定書協会, 医薬品製造指針 '82, 薬業時報社
- 3) 山本 亮, 野口照久：新農薬剤製法, 南江堂
- 4) 鈴木 猛, 緒方一喜：日本の衛生害虫, 新思潮社
- 5) 佐々 学, 栗原 毅, 上村 清：蚊の科学
- 6) 梅谷献二, 安富和男：毒虫の話, 北隆館
- 7) 石井象二郎：昆虫の行動学, 培風館
- 8) R.H. Wright(池庄司敏明訳)：サイエンス, 5 (9), 94, (1979)