

# HPLC法の分析時間短縮化に関する検討 (第3報)

## —生薬成分について—

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

—crude drugs—

堀井 周文 Chikafumi HORII	クラシエ製薬株式会社 Kracie Pharmaceutical Co., Ltd	安藤 英広 Hidehiro ANDO	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd
宇於崎 智佳 Chika UOZAKI	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd	市井 満美子 Mamiko ICHII	救急薬品工業株式会社 KyuKyu Pharmaceutical Co., Ltd
金本 美幸 Miyuki KANAMOTO	㈱富士薬品 Fuji Medicine Co., Ltd	小此木 明 Akira OKONOGI	クラシエ製薬株式会社 Kracie Pharmaceutical Co., Ltd
佐賀 早苗 Sanae SAGA	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Co., Ltd	崎久保 由正 Yoshimasa SAKIKUBO	キョクトウ株式会社 kyokuto Co., Ltd
士林 智美 Tomomi TSUCHIBAYASHI	㈱広昌堂 Koshodo Co., Ltd	永井 喜美 Kimi NAGAI	㈱延寿堂 Enjudo Co., Ltd
中林 佐知栄 Sachie NAKABAYASHI	㈱廣貫堂 Kokando Co., Ltd	中村 直子 Naoko NAKAMURA	共栄製薬工業株式会社 Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd
宮田 尚美 Naomi MIYATA	㈱廣貫堂 Kokando 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から、1検体当たりの分析時間の短縮が求められる。また、近年では、経済状況の悪化に起因するアセトニトリルの供給不足や価格高騰といった事象から、使用溶媒の削減にも注力する必要がある。今回我々は、液体クロマトグラフィー (HPLC : High Performance Liquid Chromatography) において、日本薬局方等の公定書で主流とされる粒径  $5\mu\text{m}$  内径  $4.6\text{mm}$  長さ  $150\text{mm}$  の ODS カラムを粒径  $3\mu\text{m}$  内径  $4.6\text{mm}$  長さ  $75\text{mm}$  の ODS カラムに変更することにより、分析時間の短縮に伴う移動相溶媒削減について検討を行った。

なお、検討対象成分として、マオウについては類似成分が複数存在し分離度が要求される総アルカロイド含量 (エフェドリン、プソイドエフェドリンの和) と、カンゾウについては日本薬局方 (日局) の定量法で使用するカラムによってピーク形状が変化すると報告されている<sup>1)</sup> グリチルリチン酸を選択した。

## 実験方法

### 1. 標準品及び試料

マオウの総アルカロイドの定量では、標準品として定量用塩酸エフェドリンは各社保有品を、硫酸アトロピンは和光純薬工業製を、二次標準品として日局マオウを用いた。試料は、総アルカロイド含量が未知の別の日局マオウを用いた。また分離度測定用標準品として塩酸フェニルプロパノールアミン、塩酸プソイドエフェドリン、塩酸プソイドエフェドリン、塩酸メチルエフェドリンは各社保有品のものを使用した。

カンゾウ末のグリチルリチン酸の分析では、グリチルリチン酸標準品は和光純薬工業製を、パラオキシ安息香酸プロピルは和光純薬工業製を用いた。試料は日局カンゾウ末を用いた。

### 2. 装置

マオウの総アルカロイドの定量では、HPLC システムにおいて、A 社は Prominence LC20AB (島津製作所製)、B 社は L-2000 (日立ハイテクノロジーズ製)、C 社は Prominence LC20AB (島津製作所製)、D 社は LC-10AT (島津製作所製)、E 社は M600 (ウォーターズ製) を使用した。

カンゾウ末のグリチルリチン酸の分析では、HPLC システムにおいて、Prominence (島津製作所製)、LC-2010A/CHT (島津製作所製)、LC10Avp (島津製作所製)、LC-2010CHT (島津製作所製)、Alliance 2695 (ウォーターズ製) を使用した。

### 3. 試験方法

#### (1) マオウの総アルカロイドの定量

エフェドリンは法律上取り扱いが難しいため、あらかじめ、日本薬局方マオウの定量法により、総アルカロイド (エフェドリン、プソイドエフェドリン) 含量を測定したマオウ末を、標準品日局マオウ (二次標準品) とし、これを用いて、未知試料である試料日局マオウを次の方法で分析した。すなわち、試料日局マオウ及び標準品日局マオウの粉末を各約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、薄めたメタノール (1→2) 20 mL を加え、30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物は薄めたメタノール (1→2) 20 mL ずつを用いて、更にこの操作を 2 回行った。全抽出液を合わせ、薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 100 mL とし、試料溶液及び標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液につき HPLC 法により下記分析条件を用いて、標準品日局マオウのエフェドリン含量から試料溶液中のエフェドリン及びプソイドエフェドリンを測定した。なお、調製した試料溶液及び標準溶液は、分割して各社で使用した。

HPLC 条件は次のとおり。検出器は紫外吸光光度計 (測定波長: 210 nm)。カラムは Table1 に示す。カラム温度は 45°C 付近の一定温度、移動相はラウリル硫酸ナトリウム溶液 (1→128) / アセトニトリル / リン酸混液 (640 : 360 : 1)、流量は 1.7 mL/min (TSKgel ODS-80Ts を使用し、日局の記載に従い、エフェドリンの保持時間が 14 分になるように調整した。)、注入量は 10  $\mu$ L とした。

システム適合性のシステムの性能は、①標準溶液 10  $\mu$ L につき上記の条件で操作したとき、フェニルプロパノールアミン、プソイドエフェドリン、エフェドリン、メチルエフェドリンの順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である。②標準溶液 20 mL 中にアトロピン含量が 0.8mg になるように調製し、この液 10  $\mu$ L につき上記の条件で操作したとき、エフェドリン、アトロピンの順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である（日局）とした。

システムの再現性は標準溶液 10  $\mu$ L につき上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、エフェドリンのピーク面積の相対標準偏差（RSD）は 1.5% 以下であるとした。

Table1. 本試験で使用したカラム

カラム	粒径 ( $\mu$ m)	内径×長さ	メーカー
TSKgel ODS-80Ts	5	4.6mm×150mm	東ソー
YMC-Pack Pro C18	3	4.6mm×75mm	YMC
Unison UK-C18	3	4.6mm×75mm	Imtakt
Cadenza CD-C18	3	4.6mm×75mm	Imtakt

## (2) カンゾウ末のグリチルリチン酸の定量

### 1) 粒径 5 $\mu$ m 対照カラムの選定

カンゾウ末約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、希エタノール 35mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物は希エタノール 35mL を加え、同様に操作した。残留物は更に希エタノール 25mL を加え、同様に操作した。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に 100mL とし、試料溶液とした。別にグリチルリチン酸標準品約 25mg を精密に量り、希エタノールに溶かして正確に 100mL とし、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液 20  $\mu$ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液についてシステムの性能を測定した。

HPLC 条件は次のとおり。検出器は紫外吸光光度計（測定波長：254 nm）。カラムは Table2 に示す。カラム温度は 25°C 付近の一定温度、移動相は薄めた酢酸（1→15）/アセトニトリル混液（3：2）、注入量は 20  $\mu$ L、流量は日局の記載に従い、グリチルリチン酸の保持時間が 10 分になるように調整した。

システム適合性のシステムの性能は、①グリチルリチン酸標準品 5mg 及びパラオキシ安息香酸プロピル 1mg を希エタノールに溶かして 20mL とし、この液 20  $\mu$ L につき、上記の条件で操作するとき、グリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸プロピルの分離度を求めた。②グリチルリチン酸標準溶液及び試料溶液 10  $\mu$ L につき、上記条件で操作するときのグリチルリチン酸のピークの理論段数とシンメトリー係数を求めた。

システムの再現性は、標準溶液 10  $\mu\text{L}$  につき上記の条件で試験を 5 回繰り返すとき、グリチルリチン酸のピーク面積の相対標準偏差 (RSD) は 1.5% 以下であるとした。

Table2. 対照カラム選定で使用したカラム

カラム	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	内径×長さ	メーカー
Inertsil ODS-3	5	4.6mm×150mm	GL Sciences
Inertsil ODS-P	5	4.6mm×150mm	GL Sciences
Inertsil ODS-SP	5	4.6mm×150mm	GL Sciences
COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II	5	4.6mm×150mm	ナカライテスク
YMC-Pack ODS-A	5	4.6mm×150mm	YMC
CHEMCOSORB 5-ODS-H	5	4.6mm×150mm	Chemco
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	5	4.6mm×150mm	資生堂
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> AG	5	4.6mm×150mm	資生堂
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> UG120	5	4.6mm×150mm	資生堂
L-column ODS	5	4.6mm×150mm	CERI
Symmetry C <sub>18</sub>	5	4.6mm×150mm	Waters
Puresil C <sub>18</sub>	5	4.6mm×150mm	Waters
Atlantis T3	5	4.6mm×150mm	Waters
XBridge C <sub>18</sub>	5	4.6mm×150mm	Waters
Mightysil RP-18(L)GP	5	4.6mm×150mm	関東化学

## 2) 粒径 3 $\mu\text{m}$ カラムの検討

1) で調製した試料溶液及び標準溶液 20  $\mu\text{L}$  ずつを正確にとり、次のカラム (Table3) を用いて、1) と同じ条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のグリチルリチン酸のピーク面積を測定し、システム性能を測定し、さらに試料溶液の定量を行った。

Table3. 対照カラム及び検討で使用した 3  $\mu\text{m}$  カラム

カラム	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	内径×長さ	メーカー
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120 (対照カラム)	5	4.6mm×150mm	資生堂
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	3	4.6mm×75mm	資生堂
L-column ODS	3	4.6mm×75mm	CERI
Atlantis T3	3	4.6mm×75mm	Waters
Hydrosphere C18	3	4.6mm×75mm	YMC

## 実験結果

### (1) マオウの総アルカロイドの定量

#### 1) 標準品日局マオウの定量

定量用塩酸エフェドリンを使用し、分析カラムとして TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (以下、TSKgel) を用いて定量した場合、標準品日局マオウ、試料日局マオウの総アルカロイド含量は、原料メーカー定量値(標準品日局マオウ 0.97%、試料日局マオウ 1.30%) とほぼ同じ値であった (Table 4)。エフェドリンは覚せい剤原料のため、各社において標準品の取り扱いに注意が必要となる。従って、今回は標準品日局マオウを二次標準品と設定した。

## 2) 試料日局マオウの定量

使用したカラムは、勝部ら<sup>2)</sup>の報告で検討実績のあるカラムのうち YMC-Pack Pro C18、Cadenza、Unison を選択して検討を行なった。

エフェドリンの保持時間は内径 4.6 mm 長さ 150 mm 粒径 5 $\mu$ m カラムの TSKgel を用いた場合のエフェドリンの保持時間は 14 分であり、同流量で内径 4.6 mm 長さ 75mm 粒径 3 $\mu$ m カラム YMC-PACK PRO C18、Unison、Cadenza の場合、エフェドリンの保持時間は約半分の時間 (7 分前後) になった。これは A 社から E 社までの各社で同じ傾向であった (Table 5)。

システムの性能では、フェニルプロパノールアミン、プソイドエフェドリン、エフェドリン、メチルエフェドリンに対する各成分の分離度は TSKgel が最も良かった。内径 4.6 mm 長さ 75mm 粒径 3 $\mu$ m カラムでは C 社の Cadenza でエフェドリン-メチルエフェドリン間の分離度を除き、Unison と Cadenza は TSKgel に劣るものの分離度は 1.5 以上であった (Table 6)。

また、日局規定のエフェドリンとアトロピンの分離度については、ピークが完全に分離するものを用いるとされている。Unison は良好な分離度であったが、Cadenza はアトロピンとメチルエフェドリンの保持時間が重なり、分離が悪かった。なお、YMC-Pack Pro C18 の分離度は 0.48 と悪かったため、A 社のみの測定とした。

各社それぞれで、試料日局マオウの総アルカロイド含量を定量した結果、各社とも TSKgel で測定した定量値は同じ値を示した (Table 7)。またカラム間における定量値も TSKgel で得た値を 100%とした場合、Unison、Cadenza も 99.5 から 102.1%の範囲に収まり、カラム間の RSD も 1.5%未満であり良好であった (Table 8)。

システムの再現性もエフェドリンの RSD は 1.5%未満であり、良好であった (Table 9)。なお、A 社の装置を用いた各カラムにおけるクロマトグラムを Figure 1 に示した。

Table 4. 塩酸エフェドリン標準品を用いた各種マオウのエフェドリン含量及び総アルカロイド含量 (%)

	A社	B社	C社	総アルカロイド含量 (各社平均値)	総アルカロイド含量 (原料メーカー 定量値)	エフェドリン含量 (各社平均値)
標準品日局マオウ	1.06	1.15	1.07	1.09	0.97	0.78
試料日局マオウ	1.41	1.53	1.42	1.45	1.30	1.03

Table 5. エフェドリンの保持時間 (min)

カラム	A社	B社	C社	D社	E社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5μm (東ソー)	14.64	14.39	13.98	14.38	14.61	14.40
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC)	7.82	/	/	/	/	7.82
Unison UK-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	7.16	6.67	6.79	6.76	6.65	6.81
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	7.75	7.84	7.90	7.46	7.50	7.69

YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC) はA社のみ測定した。

Table 6. エフェドリン及びその他成分の分離度

	A社	B社	C社	D社	E社	会社間
	フェニルプロパノールアミン-ブソイドエフェドリン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5μm (東ソー)	2.52	2.25	2.48	2.04	2.42	2.34
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC)	1.35	/	/	/	/	1.35
Unison UK-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	2.08	2.03	2.10	1.90	2.16	2.05
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	2.11	1.61	1.53	1.77	2.11	1.83
	ブソイドエフェドリン-エフェドリン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5μm (東ソー)	2.32	2.28	2.28	1.94	2.17	2.20
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC)	1.74	/	/	/	/	1.74
Unison UK-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	1.51	1.83	1.73	1.59	1.96	1.72
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	2.06	1.94	1.55	1.78	2.01	1.87
	エフェドリン-メチルエフェドリン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5μm (東ソー)	2.40	2.17	2.32	1.94	2.22	2.21
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC)	1.30	/	/	/	/	1.30
Unison UK-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	1.75	1.94	1.89	1.74	1.99	1.86
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	1.92	1.55	1.36	1.70	1.91	1.69
	エフェドリン-アトロピン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5μm (東ソー)	2.02					
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3μm (YMC)	0.48					
Unison UK-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	1.72					
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3μm (Imtakt)	1.01					

Table 7. 標準品日局マオウを用いた試料日局マオウの総アルカロイド含量 (%)

	総アルカロイド含量 (エフェドリン+プソイドエフェドリン)					会社間
	A社	B社	C社	D社	E社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (東ソー)	1.44	1.45	1.45	1.45	1.44	1.45
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (YMC)	1.44	/	/	/	/	1.44
Unison UK-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	1.46	1.44	1.45	1.45	1.45	1.45
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	1.47	1.44	1.45	1.46	1.44	1.45
カラム間の RSD (%)	0.92	0.07	0.11	0.24	0.14	0.32

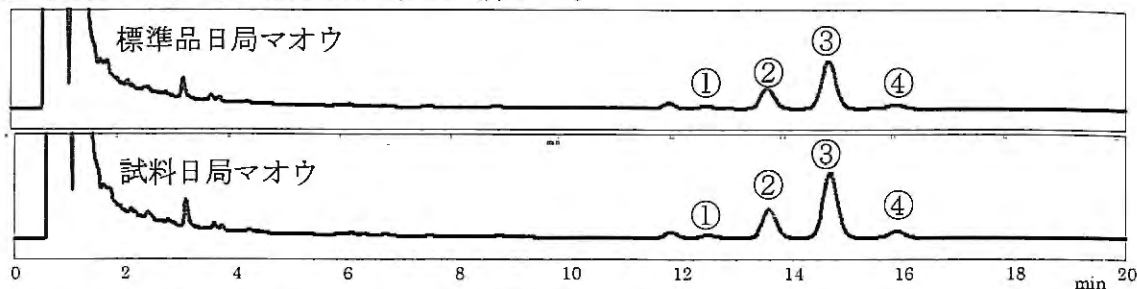
Table 8. TSKgel の測定値を 100%とした各カラムの総アルカロイド含量 (%)

	総アルカロイド含量 (エフェドリン+プソイドエフェドリン)					会社間
	A社	B社	C社	D社	E社	Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (東ソー)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (YMC)	100.2	/	/	/	/	100.2
Unison UK-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	101.8	99.9	99.7	99.5	100.3	100.2
Cadenza CD-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	102.1	99.9	99.9	100.0	100.1	100.4
カラム間の RSD (%)	0.92	0.07	0.11	0.24	0.14	0.14

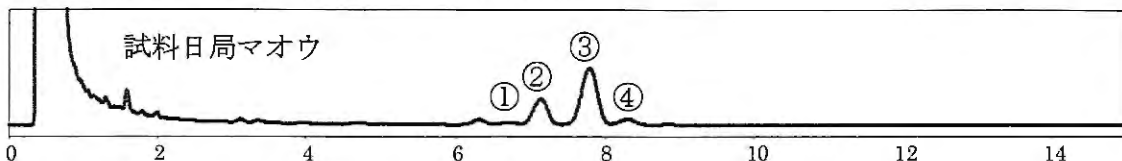
Table 9. システムの再現性 (%)

	A社	B社	C社	D社	E社	会社間
	エフェドリン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (東ソー)	0.11	0.17	0.45	0.15	0.69	0.31
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (YMC)	0.17	/	/	/	/	0.17
Unison UK-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	0.71	0.15	0.11	0.12	0.22	0.26
CadenzaCD-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	0.18	0.11	0.24	0.05	0.24	0.16
	プソイドエフェドリン					Ave.
TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (東ソー)	0.15	0.14	0.17	0.21	0.55	0.24
YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (YMC)	0.17	/	/	/	/	0.17
Unison UK-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	0.71	0.13	0.08	0.13	0.18	0.25
CadenzaCD-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)	0.33	0.11	0.23	0.07	0.21	0.19

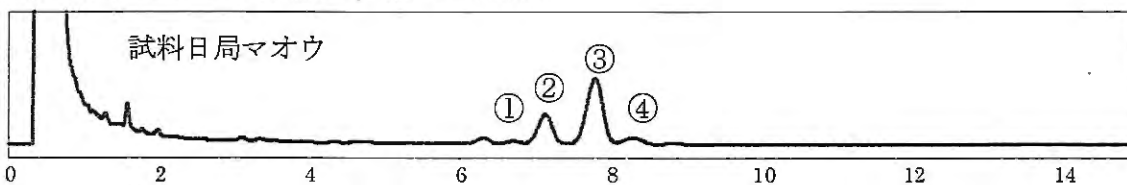
・ TSKgel ODS-80Ts 4.6×150mm 5 $\mu$ m (東ソー)



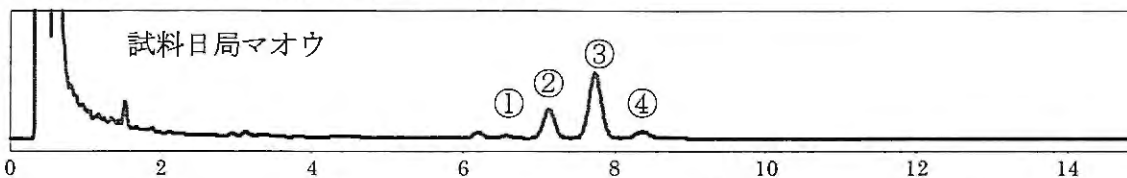
・ YMC-Pack Pro C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (YMC)



・ UnisonUK-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)



・ CadenzaCD-C18 4.6×75mm 3 $\mu$ m (Imtakt)



① : フェニルプロパノールアミン・② : プソイドエフェドリン・③ : エフェドリン・④ : メチルエフェドリン

Figure 1. A社の装置を用いた各カラムによるマオウのクロマトグラム

## (2) カンゾウ末のグリチルリチン酸の定量

### 1) 対照カラムの選定

分析結果を Table10 に示した。

選定に用いた全てのカラムにおいて、グリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸プロピルの順に溶出し、分離度も良好であった。標準溶液における COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II、Symmetry C<sub>18</sub>、Mightysil RP-18(L)GP のシンメトリー係数は 1.5 以上であった。試料溶液では、CAPCELL PAK C<sub>18</sub> UG120, Symmetry C<sub>18</sub> 及び Mightysil RP-18(L)GP において、グリチルリチン酸のピークと他成分の分離が悪く、シンメトリー係数を測定できなかった。

上記結果より、標準溶液及び試料溶液のシンメトリー係数が類似しており、他成分との分離も良好であった CAPCELL PAK C<sub>18</sub> SG120 を対照カラムとした。



Table10. 対照カラム選択におけるグリチルリチン酸の分析結果

カラム	標準溶液			試料溶液	
	理論段数	シンメトリー係数	分離度 <sup>※1</sup>	理論段数	シンメトリー係数
Inertsil ODS-3	3845	1.35	6.00	3277	1.00
Inertsil ODS-P	2714	1.28	18.5	2558	1.28
Inertsil ODS-SP	8967	1.12	15.58	7352	1.47
COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II	6473	1.52	9.33	4342	1.27
YMC-Pack ODS-A <sup>※2</sup>	13028	1.32	9.01	12132	1.89
CHEMCOSORB 5-ODS-H <sup>※2</sup>	5494	1.26	5.95	4808	1.55
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	7264	1.27	11.9	6624	1.39
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> AG	4684	1.08	3.81	4535	1.10
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> UG120	8371	1.27	1.48	7895	- <sup>※3</sup>
L-column ODS	8384	1.34	4.12	7928	1.35
Symmetry C <sub>18</sub>	6479	1.87	5.96	5703	- <sup>※3</sup>
Puresil C <sub>18</sub>	9921	1.47	8.60	9169	1.57
Atlantis T3	10502	1.19	6.52	10194	1.25
XBridge C <sub>18</sub>	12976	1.20	12.81	12185	1.39
Mightysil RP-18(L)GP	5758	2.13	4.45	5065	- <sup>※3</sup>

※1 分離度はグリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸プロピル間を示す。

※2 カラム温度は40℃とした。

※3 他成分との分離が悪く、計測できなかった。

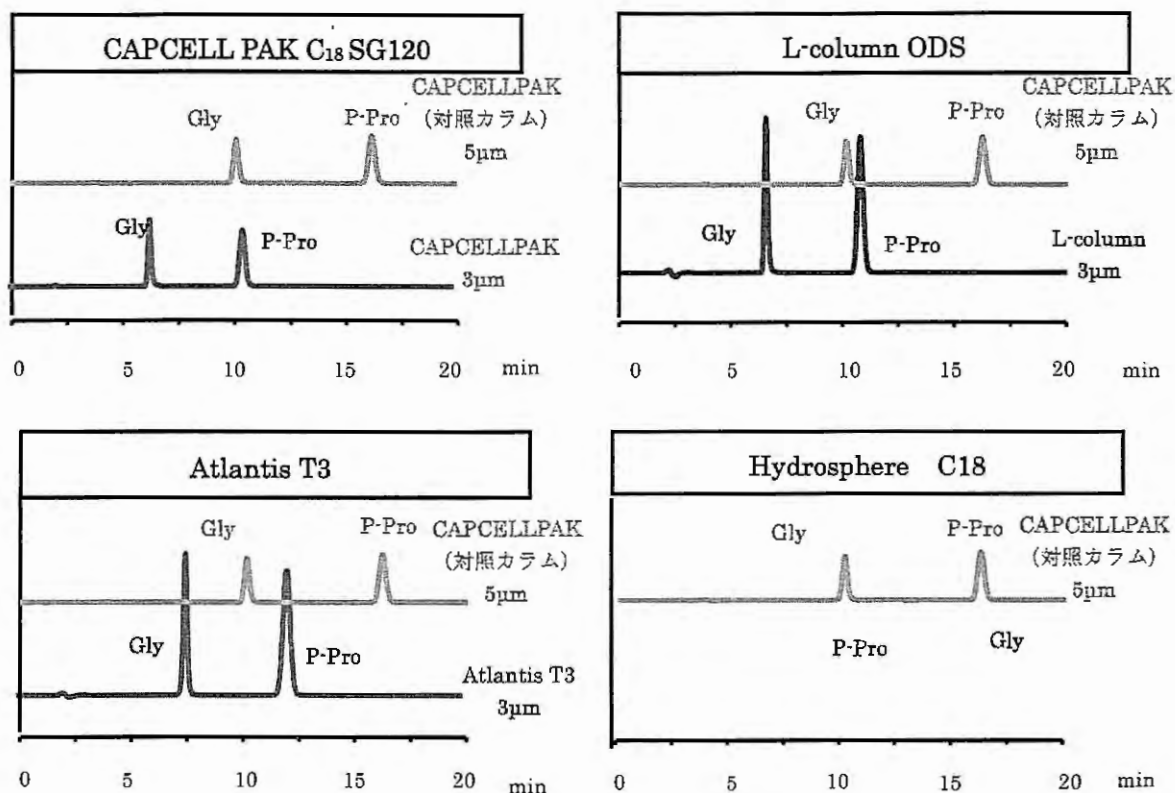
2) 粒径 3 $\mu$ m カラムの検討

選択した 3 $\mu$ m カラムにおけるシステムの性能を比較した。

CAPCELL PAK、L-column 及び Atlantis ではグリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸プロピルの順に溶出し、良好な分離を示した。

なお、Hydrosphere についてはグリチルリチン酸とパラオキシ安息香酸プロピルのピークの溶出順序が逆となったため、この操作条件には当てはまらないと判断し、検討から外すこととした。

分析結果を Figure2 及び Table11 に示した。



Gly:グリチルリチン酸 P-Pro:パラオキシ安息香酸プロピル

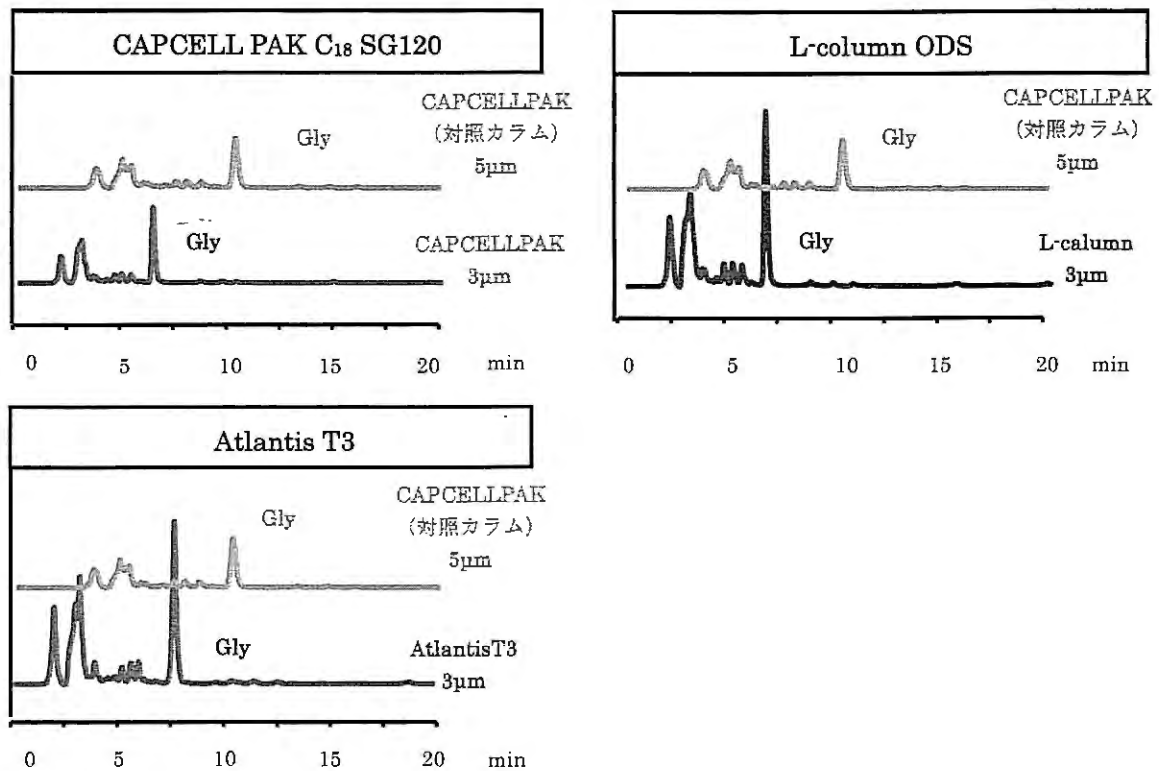
Figure2. システムの性能測定におけるクロマトグラム

Table11. システムの性能における各パラメーター

カラム	粒径 ( $\mu$ m)	パラオキシ安息香酸プロピル		分離度	試験の 再現性
		理論段数	シンメトリー係数		
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	5	12320	1.09	11.10	0.09
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	3	5944	1.27	8.82	0.05
L-column ODS	3	7350	1.13	10.56	0.06
Atlantis T3	3	6345	1.03	9.96	0.07
Hydrosphere C18	3	7415	1.07	3.35	0.10

試料溶液における定量を行ったところ、L-columnODS 及び Atlantis T3 については、グリチルリチン酸のピークのシンメトリー係数が、標準溶液及び試料溶液で類似しており、また、定量値が粒径  $5\mu\text{m}$  のカラムとほぼ同等であり、良好な結果を得た。分析時間はL-columnODS で約  $2/3$  に、Atlantis T3 で約  $3/4$  に短縮できた (Figure3、Table12)。

CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  SG120 については、従来の粒径  $5\mu\text{m}$  内径  $4.6\text{mm}$  長さ  $150\text{mm}$  の ODS カラムの場合と比較し、分析時間が約半分に短縮されたが、他成分との分離が悪く、定量値は低くなった (Figure4、Table12)。



Gly: グリチルリチン酸

Figure3. 各カラムにおけるカンゾウ末のグリチルリチン酸のクロマトグラム

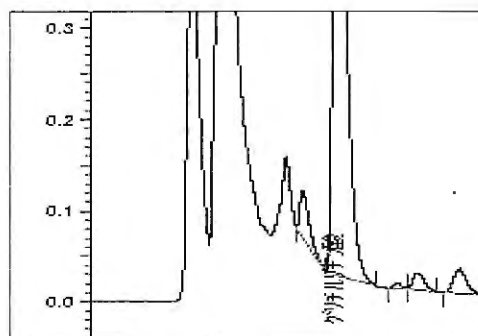


Figure4. CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  SG120 ( $3\mu\text{m}$ ) のカンゾウ末のグリチルリチン酸のクロマトグラム

Table12. カンゾウ末中のグリチルリチン酸分析結果

カラム	粒径 ( $\mu\text{m}$ )	保持時間	理論段数		シンメトリー係数		Gly 含量 (%)
			標準溶液	試料溶液	標準溶液	試料溶液	
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	5	10.3	8324	7368	1.17	1.25	6.00
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	3	4.8	3829	3285	1.63	1.62	5.81
L-column ODS	3	6.5	7742	6694	1.42	1.48	5.93
Atlantis T3	3	7.9	8755	7830	1.09	1.19	6.01

Gly: グリチルリチン酸

## 考 察

### 1. マオウの総アルカロイドの定量

マオウ中の総アルカロイドについて、長さ 75mm 粒径  $3\mu\text{m}$  のカラムでは、日局使用のカラムの長さ 150mm 粒径  $5\mu\text{m}$  (保持時間 14分) と比較し、分析時間が 1/2 に短縮された。最も分離等が良かったカラムは Unison UK-C18 であり、Cadenza CD-C18 も使えろと考えられるが、YMC-Pack Pro C18 についてはエフェドリン類の分析には使用できなかった。エフェドリン類の分析に関しては Unison、Cadenza を代替カラムとして用いることで分析時間の短縮化が可能であるといえる。なお、YMC-Pack Pro C18、Unison、Cadenza CD-C18 は勝部ら<sup>2)</sup>が報告して検討されているように YMC-Pack Pro C18 は疎水性相互作用が高く、Cadenza CD-C18 は平面認識能が高く、Unison は水素結合性が高いという特性を持っている。今回のエフェドリン類の分離には Unison が最も良かったことから、カラムの特性から考慮すると充填剤の極性に関するパラメーターがエフェドリン類の分離に寄与したと推定された。従って粒径  $3\mu\text{m}$  の Unison UK-C18 を用いることで、定量値、分離度及び再現性に問題なく、分析時間の短縮化により移動相溶媒を削減することができた。

### 2. カンゾウ末のグリチルリチン酸の分析

カンゾウ末中のグリチルリチン酸の分析についてもマオウと同様に、長さ 75mm 粒径  $3\mu\text{m}$  の L-column ODS 及び Atlantis T3 を用いることで、ピーク形状、定量値、分離度及び再現性に問題なく、分析時間の短縮化により移動相溶媒を削減することができた。グリチルリチン酸のピーク形状の良否はカラム充填剤の性質(疎水性相互作用、極性等)に影響されると推測された。しかし、Atlantis T3 と Hydrosphere C18 のように、いずれも極性の大きな物質用とされるカラムであっても溶出挙動に差異を認めことから、一般的に言われている充填剤の性質以外にも要因があると推定された。

### 3. まとめ

マオウのアルカロイド含量及びカンゾウ中のグリチルリチン酸含量の測定において、日局に記載されている粒径  $5\mu\text{m}$  内径 4.6mm 長さ 150mm の ODS カラムに替え、粒

径 3  $\mu$ m 内径 4.6mm 長さ 75mm の ODS カラムを用いて、分析時間短縮の検討を行った。

その結果、マオウのアルカロイド含量の測定では、Unison UK-C18 において、分析時間が約 1/2 に短縮化された。またカンゾウのグリチルリチン酸含量の測定では、L-column ODS で約 2/3 に短縮された。いずれも定量値、分離度及び再現性に問題はないため、今回検討した、粒径 3  $\mu$ m 内径 4.6mm 長さ 75mm の ODS カラムの局方試験への使用の可能性が示唆された。なお、充填剤の性質が類似したカラムであっても溶出挙動に差異を認めたことから、分析に使用するカラムの選定には注意が必要と考えられた。

## 文 献

- 1) 勝部祐至ら：HPLC における移動相溶媒削減について（第 3 報）—ODS カラムの使用実例（その 2）—，家庭薬研究，No 26，p. 25-30（2007）
- 2) 勝部祐至ら：HPLC における移動相溶媒削減について（第 2 報）—ODS カラムの使用実例—，家庭薬研究，No25，p. 43-53（2006）

# HPLCの移動相の代替溶媒に関する基礎的検討

## —かぜ薬成分について—

Basic Research on Alternative Solvent at Mobile Phase in HPLC

—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

西川直志 Tadashi NISHIKAWA	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.	出口真裕子 Mayuko DEGUCHI	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co.,Ltd.
高嶋真由美 Mayumi TAKASHIMA	新新薬品工業株式会社 Shinshin Pharmaceutical Co.,Ltd.	澤西恵理 Eri SAWANISHI	大協薬品工業株式会社 Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd.
堀田大介 Daisuke HORITA	株式会社池田模範堂 Ikeda Mohando Co.,Ltd.	有川千佳子 Chikako ARIKAWA	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co.,Ltd.
佐藤 仁 Hitoshi SATO	富士薬品工業株式会社 Fuji Phama Co.,Ltd.	石黒理恵子 Rieko ISHIGURO	ファーマパック株式会社 Phamapack Co.,Ltd.
		横田洋一 Yoichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research

## 結 言

近年、アセトニトリルの供給が不足し価格が高騰していることから、アセトニトリルに替えメタノールを用いた移動相で、粒径  $3\mu\text{m}$  のODSカラムを用いてかぜ薬の成分であるアセトアミノフェン、カフェイン、エテンザミド、クロルフェニラミンマレイン酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピンについて分析条件の検討を行い、通常の高速液体クロマトグラフシステムにおいて分析可能か否かを検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

市販かぜ薬で1日量が、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 のものを用いた。

### 2. アセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミドの試験方法

かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法収載の一般用医薬品試験法Ⅱ<sup>1)</sup>及び昨年度の検討結果<sup>2)</sup>を参考に、次の試験法で実験を行った。すなわち、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) /メタノール混液 (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った。この液 5mL を正確にとり、薄めたリン酸 (1→1000) /メタノール混液 (1:1) を加え 50mL とし、遠心分離後、上澄液を 0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過し、試料溶液とした。別に「アセトアミノフェン」約 87mg、「エテンザミド」約 53mg 及び「カフェイン」約 10mg を精密に量り、薄めたリン酸 (1→1000) /メタノール混液 (1:1) 20mL 及び内標準溶液 5mL を正確に加えた。この液 5mL を正確にとり、薄めたリン酸 (1→1000) /メタノール混液 (1:1) を加え 50mL とし、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液 3 $\mu$ L につき、以下の条件で試験した。内標準溶液は、安息香酸の薄めたリン酸 (1→1000) /メタノール混液 (1:1) 溶液 (1→100) とした。

試験条件の検出器は紫外吸光光度計 (検出波長: 280 nm)、カラムは Table1 に示した性能を有する粒径 3 $\mu$ m の ODS カラム (内径 4.6mm、長さ 75mm) 3 種類を用いた。移動相は薄めたリン酸 (1→1000) /メタノール混液 (75:25)、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度、流量は 1.0mL/min、システムの性能は標準溶液 3 $\mu$ 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とした。

使用機器は Table2 に示した分析機器を使用し、各社で各成分の保持時間、分離度、システム再現性、定量値を求めた。

Table1 分析に使用したカラム (粒径 3 $\mu$ m、内径 4.6mm、長さ 75mm) の性能

カラム名	メーカー	疎水性相互作用 $\alpha$ (T/B)	水素結合 $\alpha$ (Cf/Ph)	平面認識能	
				$\alpha$ (Tp/0t)	$\alpha$ (Ts/Cs)
YMC-Pack ProC18	YMC	2.14	0.33	1.29	1.07
Hydrosphere C18	YMC	2.11	0.37	1.20	1.06
Inertsil ODS-SP	GL サイエンス	1.93	0.40	1.15	1.01

Table2 各社の使用機器

会社	A 社	B 社	C 社	D 社
分析機器: ポンプ	LC-20AT (島津製作所)	Agilent 1200 シリーズ	LC-2010CHT (島津製作 所)	Agilent 1100 シリーズ
検出器	SPD-20AV (島津製作所)			
オートサンプラー	SIL-20ACHT (島津製作所)			

### 3. ノスカピン、デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びクロルフェニラミンマレイン酸塩の試験方法

武田寧ら<sup>3)</sup>の月刊薬事 27 収載の医薬品迅速分析法 8 を参考に、注入量、流量、測定波長及び移動相組成について、今回用いた製剤組成及びカラムに対応するように変更し、次の試験法で実験を行った。すなわち、「クロルフェニラミンマレイン酸塩」約 75mg に薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (3:7) を加え正確に 50mL とし、その 2mL を正確にとり、薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (3:7) を加え正確に 20mL とし、標準原液 1 とした。また「デキストロメトトルファン臭化水素酸塩」約 32.5mg、「ノスカピン」約 47.5mg を精密に量り、薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (3:7) を加えて溶かし、正確に 50mL とし標準原液 2 とした。標準原液 1 及び標準原液 2 それぞれ 4mL を正確にとり、内標準溶液 10mL を正確に加え、薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (3:7) を加え 50mL とし、標準溶液とした。標準溶液 3 $\mu$ L につき以下の条件で試験した。内標準溶液はフェナントレンの薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (3:7) 溶液 (1→2500) とした。

試験条件の検出器は紫外吸光光度計 (検出波長: 226 nm)、カラムは Table3 に示した性能を有する粒径 3 $\mu$ m の ODS カラム (内径 4.6mm、長さ 75mm) 2 種類、移動相は Table4 に示した。カラム温度は 50°C 付近の一定温度、流量は 1.0mL/min とした。

使用機器は島津製作所製 CLASS-V P を使用し、保持時間及び分離能を確認した。

Table3 分析に使用したカラム (粒径 3 $\mu$ m、内径 4.6mm、長さ 75mm) の性能

カラム名	メーカー	疎水性相互作用 用 $\alpha$ (T/B)	水素結合 $\alpha$ (Gf/Ph)	平面認識能	
				$\alpha$ (Tp/0t)	$\alpha$ (Ts/Cs)
YMC-Pack ProC18	YMC	2.14	0.33	1.29	1.07
Hydrosphere C18	YMC	2.11	0.37	1.20	1.06

Table4 検討した移動相

1	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)
2	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) / メタノール混液 (13:12)
3	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) / メタノール混液 (19:31)
4	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) / メタノール/2-プロパノール (又はテトラヒドロフラン) 混液 (38:53:9)・・・添加溶媒約 15%
5	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) / メタノール/2-プロパノール (又はテトラヒドロフラン) 混液 (38:50:12)・・・添加溶媒約 20%
6	ラウリル硫酸ナトリウムの薄めたリン酸 (1→1000) 溶液 (1→200) / メタノール/2-プロパノール (又はテトラヒドロフラン) 混液 (38:46:16)・・・添加溶媒約 25%

## 実験結果

### 1. アセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミドの試験結果

まずは、分析時間や各成分の保持時間、分離度及び理論段数等を確認するため、A社にて各カラムでメタノールの配合率を変化させて予備試験を行った。流量は 1.0mL/min 固定とし、メタノールの配合率を変化させ 3 種類のカラムにおける保持時間、分離度、理論段数、カラム圧のデータ及び各成分のピーク形状の確認を行った。Fig.1 に移動相



として薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (17:3) で分析したクロマトグラム例、Fig. 2 に移動相として薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (75:25) (メタノール配合率 25%と略す。) で分析したクロマトグラム例を示す。

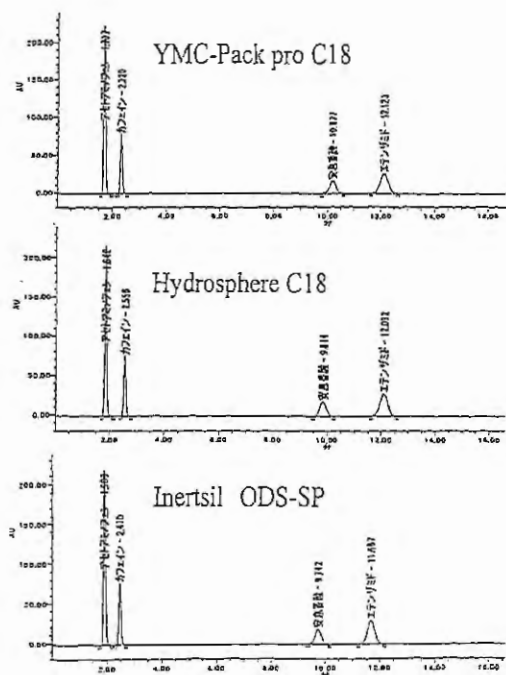


Fig. 1 薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル混液 (17:3) によるクロマトグラム

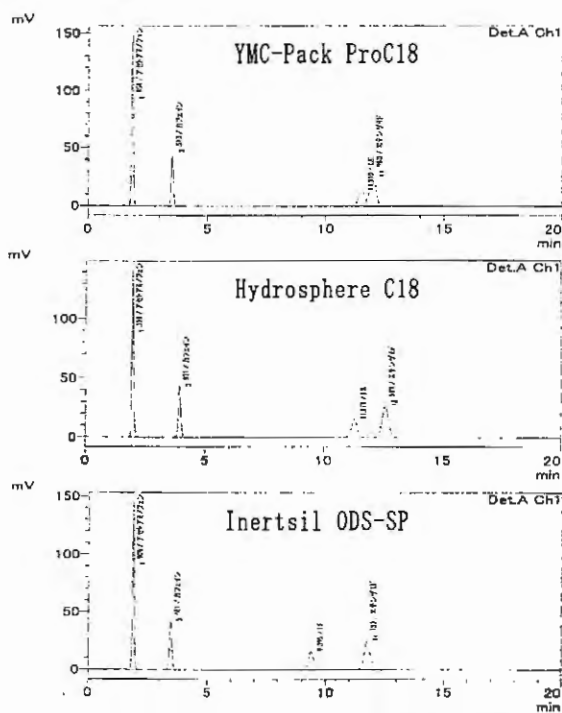
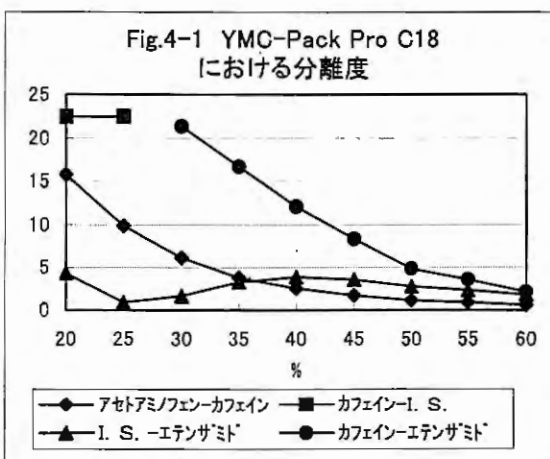
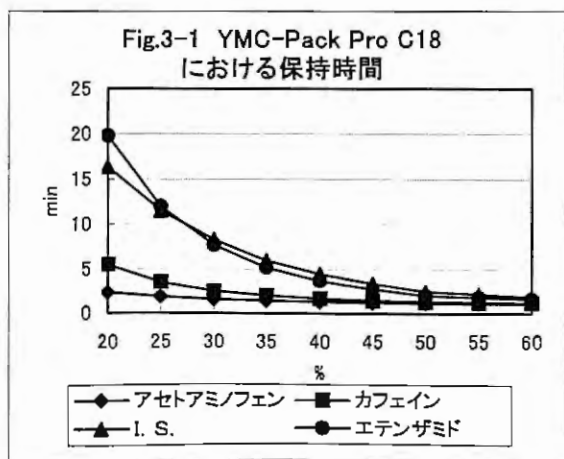


Fig. 2 薄めたリン酸 (1→1000) / メタノール混液 (75:25) によるクロマトグラム

各カラムについてメタノール配合率を変化させた場合の保持時間 (Fig. 3-1~3-3)、分離度 (Fig. 4-1~4-3) 及び理論段数 (Fig. 5-1~5-3) の推移をグラフに示した。

YMC-Pack Pro C18 ではメタノール配合率約 27%付近で、YMC-Hydrosphere C18 ではメタノール配合率約 30%付近で、Inertsil ODS-SP ではメタノール配合率約 40%付近で内標準物質とエテンザミドの溶出順位が逆転した。分離度 (Fig. 4-1~4-3) 及び理論段数 (Fig. 5-1~5-3) に関しては、いずれのカラムにおいてもメタノール配合率が増加するにつれ、分離度及び理論段数が低下する傾向が見られた。



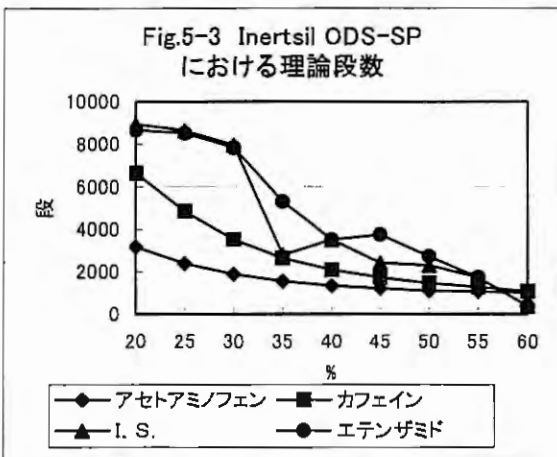
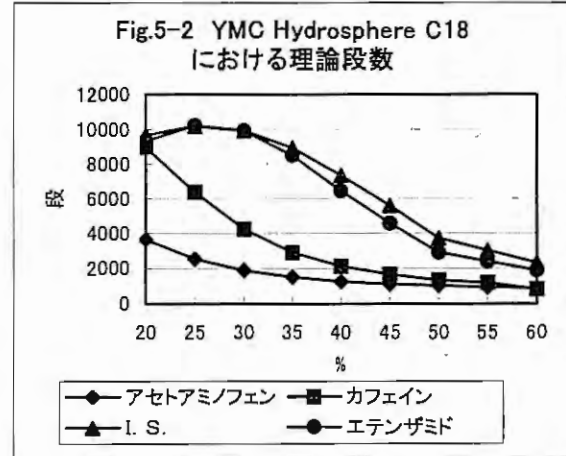
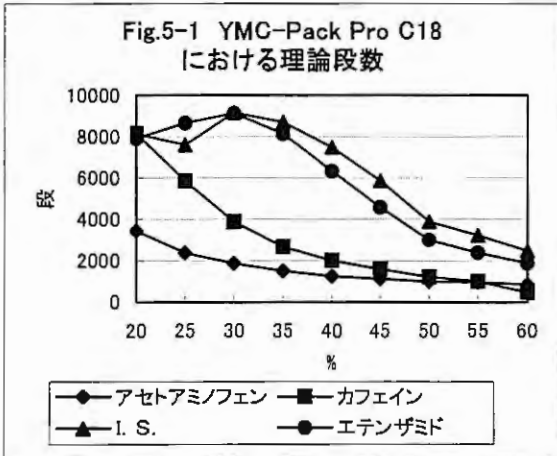
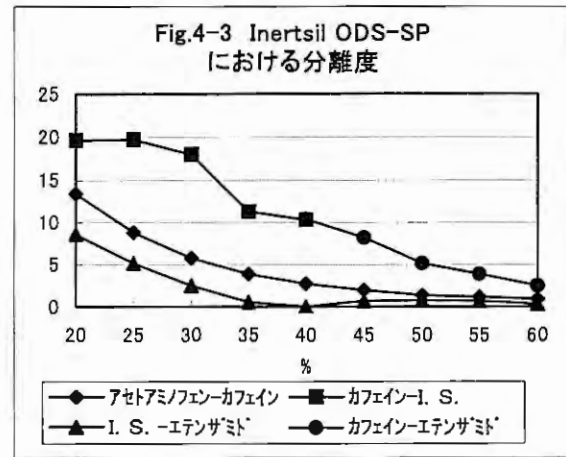
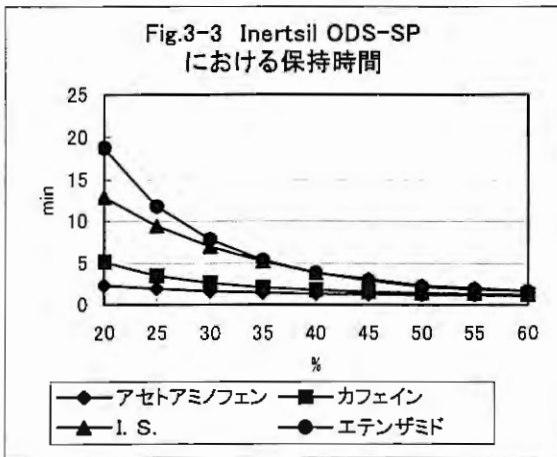
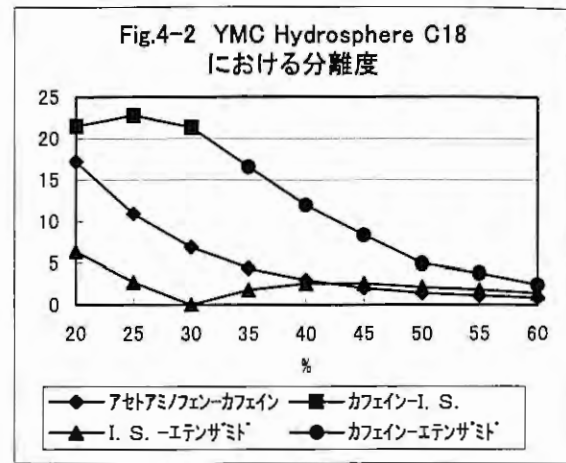
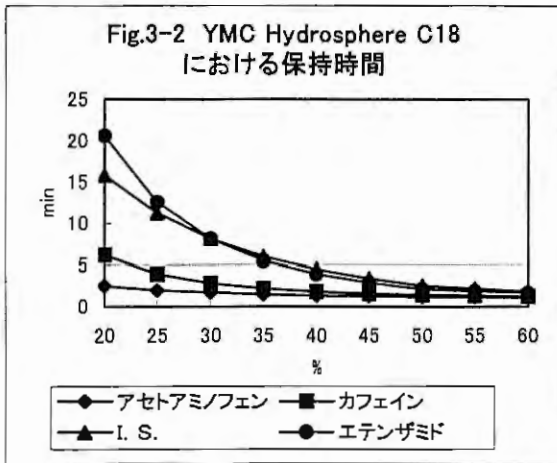


Fig. 3~5  
メタノール配合率を変化させた場合の各カラムにおける保持時間、分離度及び理論段数

予備試験結果から、3種類のカラムで違いが顕著に現れているメタノール配合率 25%

を移動相として各社で試験を行った。その結果を Table 5~9 に示す。再現性、理論段数及び定量値に関しては、YMC-Pack Pro C18 以外のカラムにおいて良好な結果が得られることが確認された。YMC-Pack Pro C18 において、内標準物質とエテンザミドの分離が不十分であった。これはこのカラムが他の 2 種類のカラムに比べ充填剤であるシリカゲルの疎水性相互作用の高いこと、加えて移動相であるメタノールの極性が影響している可能性が高いと考えられた。また、カラム圧はいずれのカラムでも各メタノール配合率において約 8~10Mpa の範囲内であったため、通常の液体クロマトグラフシステムでの分析に問題は無く、メタノール系移動相での分析は十分可能であることが示唆された。

Table5 アセトアミノフェンの保持時間、理論段数、再現性及び定量値

	保持時間 (4社 Ave)	理論段数 (4社 Ave)	再現性 (4社 Ave)	定量値 (4社 Ave)
YMC-Pack ProC18	1.740	3305.8	0.16	99.25
Hydrosphere C18	1.854	3443.0	0.09	98.00
Inertsil ODS-SP	1.778	3158.5	0.10	99.80

Table6 カフェインの保持時間、理論段数、再現性及び定量値

	保持時間 (4社 Ave)	理論段数 (4社 Ave)	再現性 (4社 Ave)	定量値 (4社 Ave)
YMC-Pack ProC18	3.211	6849.5	0.15	98.90
Hydrosphere C18	3.565	7286.8	0.12	97.92
Inertsil ODS-SP	3.145	5478.0	0.09	99.71

Table7 内標準物質 (安息香酸) の保持時間及び理論段数

	保持時間 (4社 Ave)	理論段数 (4社 Ave)
YMC-Pack ProC18	10.793	5591.0
Hydrosphere C18	10.336	10141.8
Inertsil ODS-SP	8.509	8520.5

Table8 エテンザミドの保持時間、理論段数、再現性及び定量値

	保持時間 (4社 Ave)	理論段数 (4社 Ave)	再現性 (4社 Ave)	定量値 (4社 Ave)
YMC-Pack ProC18	10.901	—	—	—
Hydrosphere C18	11.346	10115.8	0.09	98.07
Inertsil ODS-SP	10.455	8290.0	0.08	98.69

(内標準物質と分離が不十分であったため YMC-Pack ProC18 は結果なし)

Table9 アセトアミノフェン、カフェイン、内標準物質及びエテンザミドの分離度

	アセトアミノフェン/カ フェイン (4社 Ave.)	カフェイン/ I.S. (4社 Ave.)	I.S./エテンザ ミド (4社 Ave.)
YMC-Pack ProC18	10.544	20.565	0.201
Hydrosphere C18	11.571	23.418	2.325
Inertsil ODS-SP	9.139	19.869	4.674

I.S. : 内標準物質

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

先ず、Hydrophere C18 の粒径  $3\mu\text{m}$  内径  $4.6\text{mm}$  長さ  $75\text{mm}$  のカラムを用いて、アセトニトリルの代替溶媒として、メタノールが利用可能か検討し分析を行った。その結果、Table4の移動相のうち、移動相3で良好な分離を得ることができた。しかし、溶出順序はアセトニトリルに比べ、クロルフェニラミン及びデキストロメトルファンは内標準物質の後に溶出した。アセトニトリルからメタノールへ変更することにより、各物質の溶出順が入れ替わるという現象 (Fig.6、7) についてイオン性物質であるクロルフェニラミン及びデキストロメトルファンへ与える影響が大きかったと考えられる。更に分析時間が従来のアセトニトリル使用の移動相の2倍近くなることから、メタノールに第二の有機溶媒を添加し、分離度の改善や分析時間の短縮が可能か検討した。

添加溶媒には、エタノール、2-プロパノール、テトラヒドロフラン及び酢酸エチルを用いた。その結果、2-プロパノール及びテトラヒドロフランについて、良好な結果が得られたため、添加濃度の検討を行った。2-プロパノール25%のクロマトグラムをFig.8に、2-プロパノール及びテトラヒドロフランの保持時間をグラフ化したものをFig.9及びFig.10に示す。

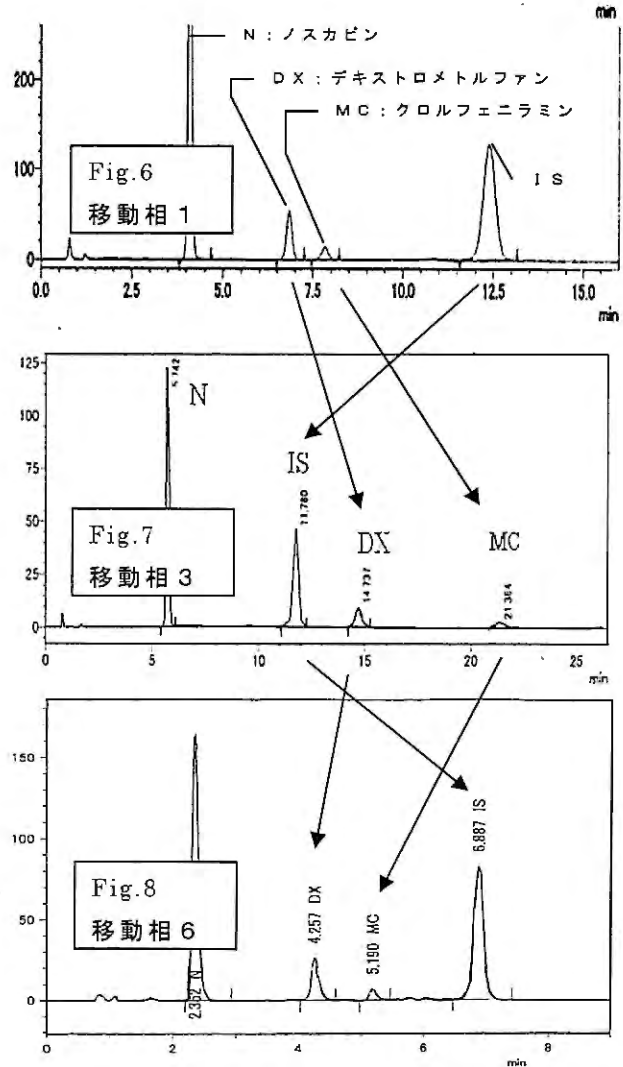
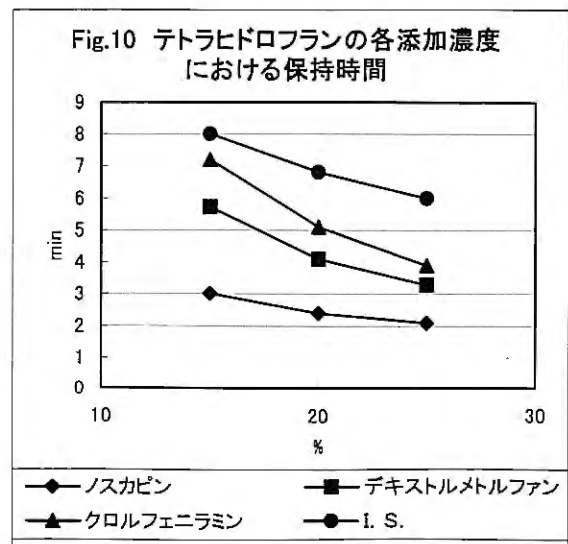
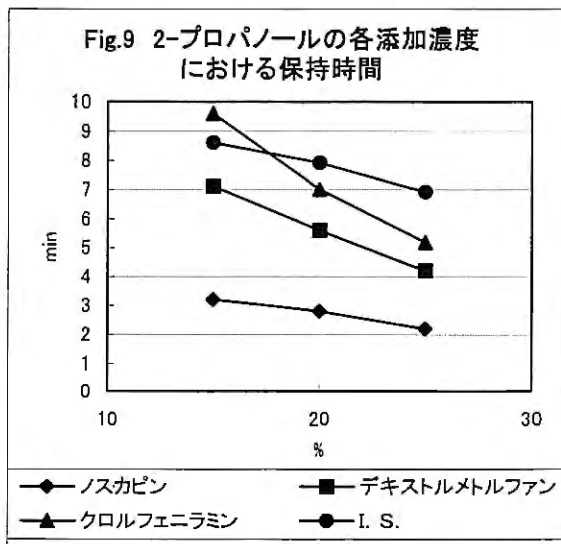


Fig.6~8 移動相 1、3 及び 6 におけるクロマトグラム



2-プロパノールの添加濃度（有機溶媒中の添加濃度）15%では、I.S.とクロルフェニラミンの分離が不十分であったのに対し、20%及び25%は溶出順が入れ替わり、分離度の改善が見られた。テトラヒドロフランの添加濃度15%、20%及び25%では、分離はすべて良好であり、濃度に比例して分析時間の短縮が見られた。その結果、第二の有機溶媒を添加することにより、メタノール単独の時より分析時間の短縮及び分離度の改善が可能であることが示唆された。同様の条件で、内径4.6mm長さ75mm粒径 $3\mu\text{m}$ のYMC-Pack Pro C18カラムでも測定を行ったところ、Hydrosphere C18とほぼ同様な改善が見られた。

## 考 察

アセトアミノフェン、カフェイン及びエテンザミドの分析においては、従来用いていた薄めたリン酸（1→1000）／アセトニトリル混液（17:3）を薄めたリン酸（1→1000）／メタノール混液に替えて、メタノールの配合率を変化させて検討を行った結果、メタノール配合率25%で比較的良好な結果が得られた。また、カラム圧は約8~10Mpaの範囲内であったため、通常の液体クロマトグラフシステムでの分析に問題は無いものと考えられた。

クロルフェニラミンマレイン酸塩、デキストロメトルファン臭化水素酸塩及びノスカピンの分析においては、従来用いていた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）のアセトニトリルをメタノールに変えたところ（19:31）の比率で良好な分離を得た。しかし、溶出順序の変化や分析時間の増大といった問題が生じた。そこで2-プロパノール及びテトラヒドロフランを添加したところ、分析時間の短縮が可能となりその分離も良好であった。

これらの結果から、移動相のアセトニトリルからメタノールへの変換においては、溶出順序の変化を引き起こす場合があることがわかった。また、その他溶媒の添加が分離度や分析時間の改善に有用である可能性が示唆されたので、他の分析に応用できるものと考えられる。

## 文 献

- 1) 日本大衆薬工業協会編：一般用医薬品の試験法Ⅱ、57-58(2000)
- 2) 堀田大介ら：HPLC法の分析時間短縮化における粒径 $2\mu\text{m}$ カラムの特性について、家庭薬研究、No.29、31-38(2010)
- 3) 武田寧ら：医薬品迅速分析法8、月刊薬事27、589-593(1985)

## 錠剤物性に及ぼす滑沢剤混合と打錠操作の影響

Effects of lubricant mixing and tableting operation on tablet properties

富山県薬事研究会製剤部会

Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association

熊田 俊吾 Shungo KUMADA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.	成瀬 真弓 Mayumi NARUSE	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
斉藤 充広 Mitsuhiro SAITO	共栄製薬工業株式会社 Kyohei Pharmaceutical Co., Ltd.	松平 直久 Naohisa MATSUHIRA	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
山口 裕隆 Hirota YAMAGUCHI	小林化工株式会社 Kobayashi Kako Co., Ltd.	福田 大輔 Daisuke FUKUDA	三九製薬株式会社 Sankyu Pharmaceutical 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.	岩田 皓生 Kouki IWATA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
横山 慎一 Shinichi YOKOYAMA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.	霜鳥 武司 Takeshi SHIMOTORI	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 Fujiyakuhin 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.

### 緒言

錠剤は、内服固形製剤の中でも、取り扱いの簡便性、服用性、腸溶性等の機能付与性、生産性の点で優れており、現在もっとも生産割合の高い剤形である<sup>1)</sup>。錠剤の一般的な製造工程は、秤量→混合→造粒→乾燥→整粒→滑沢剤混合→打錠(→コーティング)と進むが、製錠の良否は打錠以前の工程に依存し、適切な打錠用顆粒あるいは打錠末が得られなければキャッピング、スティッキング、バインディングに代表される打錠障害が起こる<sup>2)</sup>。

特に、製錠の良否を左右する工程として、造粒工程および滑沢剤の混合工程が挙げられる。滑沢剤とは、製錠の際に①臼と杵の間に発生する摩擦を減らす、②粉末の流動性を良くする、③成形圧の伝達を良くするための添加剤であり、代表的なものにはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カル

シウム、タルク等が挙げられる。一方で、滑沢剤の特性から、混合過多、添加量過多になると、錠剤の硬度減少、崩壊遅延といった悪影響を及ぼすことが知られている<sup>3)</sup>。また、造粒法には、大別して攪拌造粒法、流動層造粒法があるが、これら造粒法の選択も錠剤物性に影響を及ぼす。一般的に攪拌造粒で造粒した造粒物は、重質で丸みを帯びており、打錠時に変形が起こりにくく硬度が低くなる傾向があるが、重質であるため臼への吸い込み深さが少なく高速回転の打錠に適している。一方で、流動層造粒で造粒した造粒物は、不定形で軽質であるため、打錠時には塑性変形が起こりやすく、硬度の高い錠剤が得られるが、軽質であるため高速回転の打錠には不向きである<sup>4)</sup>。したがって、高品質な錠剤を安定的に生産するには、これらの各単位操作が錠剤物性に及ぼす影響について正しく理解することが重要である。

本研究では、富山県薬事研究所製剤部会の共同研究の一環として、特に①滑沢剤の混合操作、②打錠速度および③造粒方法の違いが錠剤物性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした基礎的実験を実施した。

## 実験方法

### 1. 処方

実験には下記の処方を用いて攪拌造粒（処方 1）と流動層造粒（処方 2）により、打錠用顆粒を製した。なお、処方 1 の添加水分量は処方の塑性限界（Plastic Limit: PL）から下記のとおり計算した。処方 1 の PL は  $(400 \times 0.18 \times 0.8) + (50 \times 1.23 \times 0.1) + (35 \times 0.63 \times 0.07) = 65.3 \text{ mL}$  である。精製水 65.3 mL を PL100% とし、PL に対して 130%（精製水 85 mL）を添加量とした。

処方 1	カフェイン水和物	15 g (3%)	塑性限界(PL)
	乳糖	400 g (80%)	0.18 mL/g
	結晶セルロース	50 g (10%)	1.23 mL/g
	コーンスターチ	35 g (7%)	0.63 mL/g
	合計	500 g (100%)	
	結合剤(HPC-L)粉末添加 (精製水 85 mL を滴下)	15 g (3%)	

処方 2	カフェイン水和物	15 g (3%)
	乳糖	400 g (80%)
	結晶セルロース	50 g (10%)
	コーンスターチ	35 g (7%)
	合計	500 g (100%)
	結合剤(HPC-L) 8%水溶液	187.5 g (3%)

### 2. 操作および操作条件

#### (1) 攪拌造粒による造粒

攪拌造粒では攪拌造粒機（ハイスピードミキサー、FS-GS-5 型、深江パウテック社製）を用いた。処方 1 の粉末 500 g をアジテーター回転数 400 rpm、チョッパー回転数 1500 rpm で 1 分混合した後、精製水 85 mL を滴下し 10 分間造粒した。造粒後は流動層造粒機（FLO-1 型、

フロイント産業社製)にて乾燥した。

### (2)流動層造粒機による造粒

流動層造粒では流動層造粒装置 (FL-LABO 型、フロイント産業社製) を用いた。

処方 2 の粉末 500 g に HPC-L 8% 水溶液を 187.5 g スプレーし、造粒した。造粒後、同装置にて乾燥した。

### (3)滑沢剤等の混合と打錠

造粒物と滑沢剤等の混合にはマイクロ型 V 型混合機 (S-3 型仕込み 1L タイプ、筒井理化学器械製) を用いた。各造粒物の 18 メッシュ (850  $\mu\text{m}$ ) パス品に滑沢剤 (ステアリン酸マグネシウム) 及びカルメロースカルシウム (崩壊剤) を 5% 添加したものを混合し、打錠用顆粒とした。攪拌造粒物については、滑沢剤の添加割合を、0.5、1、2、3、4、5% とし、混合時間は 3 分間とした。また、滑沢剤の添加割合 1% のものについては、混合時間を 1、3、5、15、30 分間と変化させた。打錠実験には、ロータリー式打錠機 (VELA5 型、菊水製作所製) を用い、各混合操作を施した造粒物について、錠剤サイズ直径 9 mm、目標質量 300 mg、目標本圧 10 kN、打錠回転数 20 rpm で製錠した。混合時間 3 分、滑沢剤添加割合 1% の打錠末については、打錠回転数を 10、20、30、40 rpm に変化させ打錠した。なお、流動層造粒物については、混合時間 3 分、滑沢剤添加割合 0.5%、打錠回転数 20 rpm で製錠した。

## 3. 物性評価

乾燥後の各造粒物の整粒品について、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。平均粒子径は正規確率紙 (対数正規分布) を用いて算出した。また、各条件で打錠した錠剤は硬度 (錠剤硬度試験器、三力製作所製) と崩壊度 (崩壊試験器、富山産業製) を測定した。

## 実験結果

### ①滑沢剤混合操作と錠剤硬度および崩壊時間の関係 (攪拌造粒物)

Fig. 1 に攪拌造粒物における滑沢剤混合時間と平均錠剤硬度および崩壊時間の関係を示す。Fig. 1 より、錠剤硬度は滑沢剤混合時間が長くなるほど低下した。滑沢剤混合時間 1 分では平均錠剤硬度が 44.2 N であったが、混合時間 30 分では 28.9 N と、混合時間が 29 分長くなるにともない硬度が混合時間 1 分の約 2/3 まで低下した。また、混合時間に対する錠剤硬度低下は混合初期の変化が最も大きく、混合時間 1 分から 5 分で錠剤硬度が 8.6 N 低下し、それ以降の硬度は混合時間とともにある一定値に漸近していく傾向にあった。また、崩壊時間は滑沢剤混合時間が長くなるほど遅延した (Fig. 1)。滑沢剤混合時間 1 分の崩壊時間は 4 分であったが、混合時間 30 分では 10 分と崩壊時間は混合時間 1 分の場合と比較して 2.5 倍長くなった。また、混合時間に対する崩壊時間の遅延も混合初期にかけての変化が最も大きく、混合時間 1 分から 5 分で崩壊時間が約 5 分遅延した。それ以降の崩壊時間の変化は、硬度の変化と同様に、混合時間とともにある一定値に漸近する傾向にあった。Fig. 2 に攪拌造粒物における滑沢剤添加量と平均錠剤硬度及び崩壊時間の関係を示す。Fig. 2 より、錠剤硬度は滑沢剤添加量が多くなるほど低下した。平均錠剤硬度は滑沢剤添加量 0.5% では 44.6 N であるのに対し、添加量 5% では 17.8 N と硬度が添加量 0.5% の約 2/5 まで低下した。また、崩壊時間は滑沢剤添加量が多くなるほど長くなった。滑沢剤添加量 0.5% では崩壊時



間が約3分であるのに対し、添加量5%では約18分と添加量0.5%の場合に比較して6倍長くなった。また、錠剤硬度、崩壊時間ともに滑沢剤添加量3%を境に、添加量に対する錠剤硬度、崩壊時間の変化が緩やかになり、ある一定値に漸近していく傾向にあった。

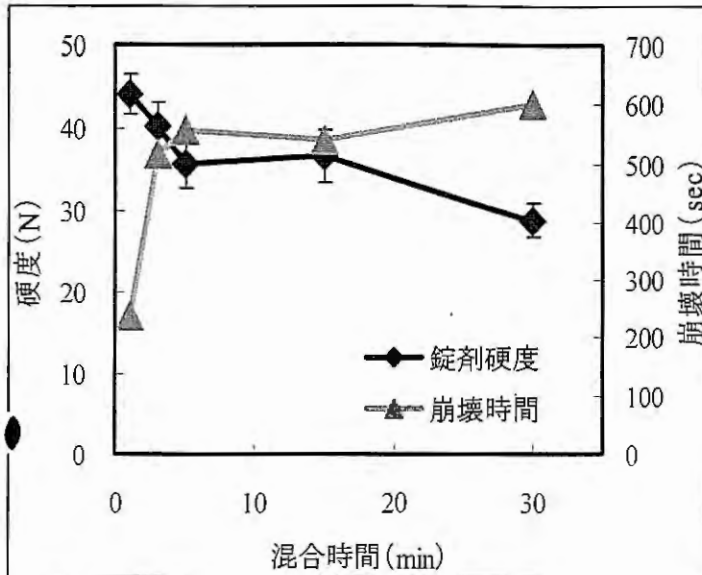


Fig. 1 滑沢剤混合時間と錠剤物性の関係

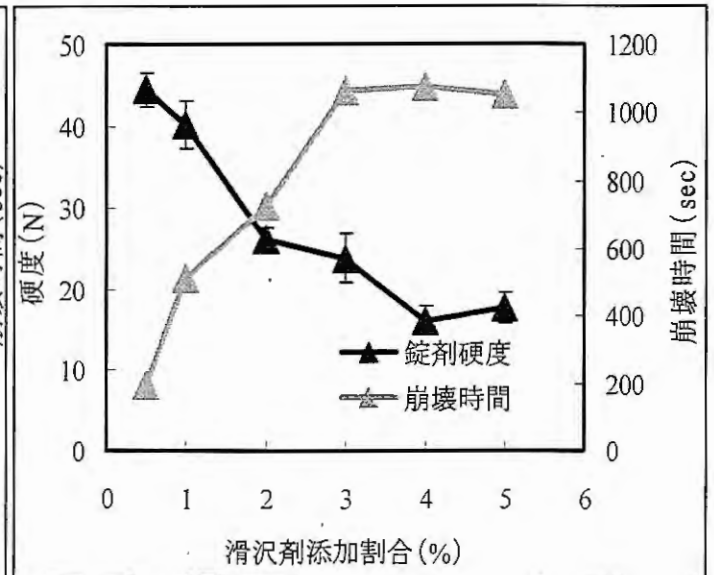


Fig. 2 滑沢剤添加量と錠剤物性の関係

②ターンテーブル回転数に与える影響 (攪拌造粒物)

Fig. 3 に、ターンテーブルの回転数と錠剤硬度との関係を示す。今回のラボ機 (杵臼 12 本立) では、ターンテーブル回転数と錠剤硬度との間に明確な関係性は得られなかったが、若干の硬度低下が見受けられた。

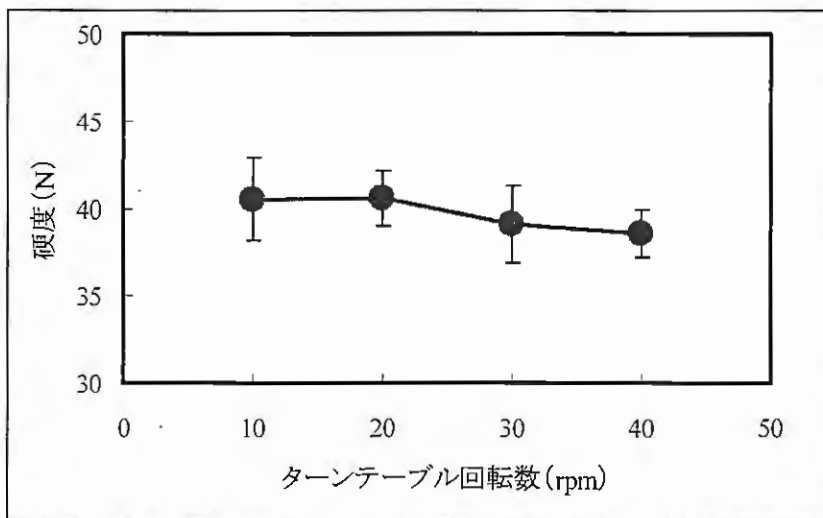


Fig. 3 ターンテーブル回転数と錠剤硬度との関係

③攪拌造粒と流動層造粒の違いによる錠剤物性への影響

各造粒法における錠剤物性の違いについてまとめたものを Fig. 4 および Table 1 に示す。造粒物性について流動層造粒物と攪拌造粒物を比較した場合、平均粒子径や安息角に大きな差異はなかつ

たが、見かけ密度は攪拌造粒の方が流動層造粒物に比べて約2倍大きくなっていた。また、錠剤物性については流動層造粒物の硬度が攪拌造粒物に比べて高く、崩壊時間も遅延した (Fig. 4)。

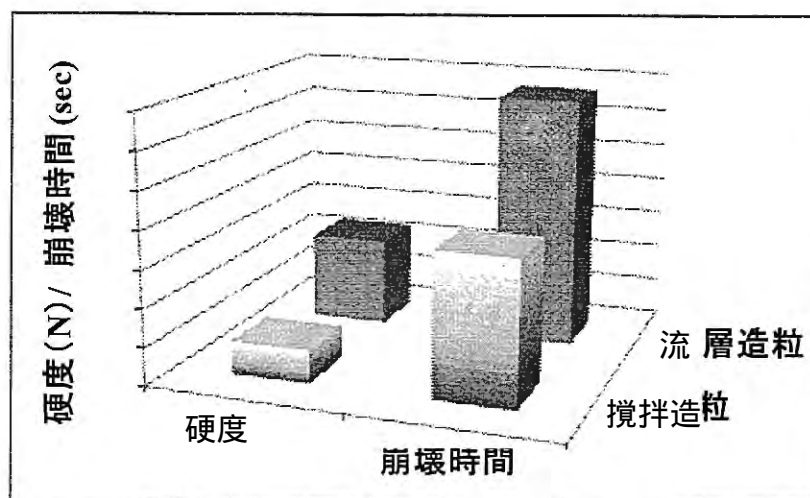
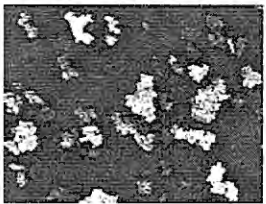
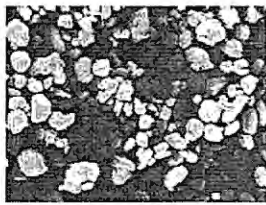


Fig. 4 造粒装置の違いと錠剤物性との関係

Table 1 造粒装置の違いによる造粒物性と錠剤物性

物性		装置	流動層造粒機	攪拌造粒機
造粒	見かけ密度 (g/ml)		0.34	0.65
	平均粒子径(D <sub>50</sub> )( $\mu$ m)		219	229
	安息角 (°)		37.0	33.4
錠剤	錠剤重量 (mg)		300	300
	錠剤厚み (mm)		4.18	4.21
	錠剤硬度 (N)		118	45
	崩壊時間 (min)		5" 35'	3" 11'
表面写真				

## 考 察

滑沢剤混合操作と錠剤物性の関係について実験を行った結果、滑沢剤の混合過多また過剰添加の状態になると、錠剤硬度が低下し、崩壊速度も遅延することが確認された。これは、粒子同士の結合性劣化、撥水性 (疎水性) を発現する滑沢剤が、混合過多、添加量過多では粒子表面に広く付着したためであると考えられた。また、滑沢剤混合時間に対する錠剤物性の変化は混合初期の変化が著しく、したがって、滑沢剤混合操作では、特に混合初期における錠剤物性の変化について注意する必要がある。

ると考えられた。加えて、滑沢剤添加量も著しく錠剤物性を変化させるため、滑沢剤の過剰添加には十分注意する必要があることが確認された。

次に、打錠機のターンテーブル回転数と錠剤物性の関係について実験を行った結果、ターンテーブル回転数と錠剤硬度との間に明確な関係性は得られなかったが、若干の硬度低下が認められた。一般的に打錠速度が速くなると、圧縮停滞時間が短くなり、空隙が増えるため錠剤硬度が低下することが知られている<sup>5)</sup>。実生産機スケールでは、ラボ機に比較して周速が速いため、錠剤硬度に対するターンテーブル回転数の影響について考慮する必要があると考えられた。

造粒法の違いと錠剤物性の関係について実験を行った結果、造粒物の平均粒子径や安息角はほぼ同じであったが、みかけ密度は攪拌造粒物が流動層造粒物に比べて約2倍大きくなった。これは、流動層造粒は液体架橋によって造粒されるため造粒物が軽質で不定形（ポーラス）となるのに対し、攪拌造粒は剪断・転動・圧密作用で造粒されるため造粒物が重質で球形となるためであると考えられた（Table 1 表面写真）。また、錠剤物性を比較すると、流動層造粒物の方が攪拌造粒物に比べて硬度が高く、崩壊時間も遅延した。これは、造粒物が球形の攪拌造粒と比べて、造粒物が不定形の流動層造粒では圧縮時に塑性変形が起りやすいため、錠剤硬度が大きくなると考えられた。一方で、崩壊時間については、硬度の影響が現れているために攪拌造粒の錠剤が短くなったと考えられた。

以上、今回の実験結果より、滑沢剤の混合時間と添加量、造粒法の違いが錠剤物性に大きく影響を与えることを確認した。また、実生産機スケールでは、ターンテーブル回転数も考慮する必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) 粉体工学会 製剤と粒子設計部会編：すぐに役立つ粒子設計・加工技術, 307, じほう(2003)
- 2) 粉体工学会 製剤と粒子設計部会編：粉体の圧縮成形技術, 142, 日刊工業新聞社(1998)
- 3) 津田 恭介, 野上 寿：医薬品開発基礎講座 18 製剤工学, 198, 地人書館(1971)
- 4) 粉体工学会 製剤と粒子設計部会編：粉体の圧縮成形技術, 165, 日刊工業新聞社(1998)
- 5) 粉体工学会 製剤と粒子設計部会編：ibid, 56, 日刊工業新聞社(1998)

# カンゾウの自然免疫抑制機構の解析

Analyses of suppressing effect of Glycyrrhizae Radix for innate immunity

本田 裕恵 Hiroe HONDA	富山県薬事研究所 Toyama Pref. Inst. Pharmaceut. Res.
長井 良憲 Yoshinori NAGAI	富山大学大学院医学薬学研究部 免疫バイオ・創薬研究探索講座 Dept. Immunobiol. Pharmacol. Genetics., Grad. Sch. Med. Pharmaceut. Sci., Univ. Toyama
高津 聖志 Kiyoshi TAKATSU	富山県薬事研究所 Toyama Pref. Inst. Pharmaceut. Res. 富山大学大学院医学薬学研究部 免疫バイオ・創薬研究探索講座 Dept. Immunobiol. Pharmacol. Genetics., Grad. Sch. Med. Pharmaceut. Sci., Univ. Toyama

## 緒 言

近年、獲得免疫系よりも原始的な免疫系である自然免疫系が注目され、研究が進んでいる。自然免疫系には病原体を認識する病原体センサーが存在する。その中で最も重要なセンサーが Toll-like-receptor (TLR) である。TLR は病原体に共通の構成成分を認識する<sup>1-7)</sup>。例えば TLR4 は MD-2 と呼ばれるタンパクと会合してグラム陰性菌の LPS (エンドトキシン) を、TLR7 や TLR9 は細菌やウイルスの RNA や DNA などの核酸成分を認識し<sup>8-10)</sup>、炎症性サイトカインの産生を促し、防御反応を惹起する。一方、病原体センサーのシグナルは獲得免疫系の発動にも重要な役割を果たしている。すなわち自然免疫系は感染防御の初期だけではなく、それ以降の特異的な免疫応答を誘導する司令塔の役割もある。したがって、TLR のシグナルを抑制するものは、免疫反応全体を抑制することで炎症性疾患の治療に役立つ可能性が期待される。また TLR4/TLR6 には、酸化 LDL 及びβ-アミロイドなど、病態に関わる自己成分が反応することが報告されている<sup>11)</sup>。この病原体センサーと内在性リガンドとの相互作用やその破綻が、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病やアルツハイマー病、炎症性腸疾患などの慢性炎症性疾患の病態に関わっていることが明らかになりつつある。したがって TLR を制御する物質は、非感染性の慢性炎症性疾患に対しても効果を示すことが十分期待される。

漢方薬・和漢薬は、生体のホメオスタシスの維持に重きをおく薬物治療体系であり、自然免疫系もその重要な標的の一つである可能性が高い。そこで今回、漢方処方に多く含有されており免疫系への作用が大きいと思われる13種の生薬エキスについて、自然免疫系への効果を検討した。比較的強く抑制作用の認められたカンゾウエキスにつき、さらに分子・細胞学的手法を用いて検討した。

## 実験方法

### 1. 実験試薬

本実験で用いた生薬の熱水抽出エキスは、日本薬局方ニンジン、日本薬局方カンゾウ、日本薬局方サイコ、日本薬局方タイソウ、日本薬局方シャクヤク、日本薬局方ハンゲ、日本薬局方ショウキョウ、日本薬局方オウギ、日本薬局方ソウジュツ、日本薬局方トウキ、日本薬局方オウゴン、日本薬局方ケイヒ、日本薬局方ブクリョウ（いずれも延寿堂）を蒸留水で加熱し、不溶物を取り除き、上清を凍結乾燥後サンプルとして実験に用いた。また、ツムラ株式会社より購入した熱水抽出カンゾウエキスも使用した。

また、グリチルリチン（ミノファーゲン製薬株式会社より供与）、イソリクイリチゲニン（Sigma）、lipid A（Sigma）、LPS（Sigma）を実験に使用した。

### 2. 細胞及び細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は 10 % の非働化ウシ胎児血清（FBS）、100 U/mL のペニシリン、0.1 mg/mL のストレプトマイシン及び 292 µg/mL の L-グルタミンを含む DMEM 培地中にて継代、維持した。

マウス骨髄由来マクロファージは、7 週令から 9 週令のメスの C57/BL6 マウスの大腿骨及び頸骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/mL の M-CSF 存在下で 7 日間、10 % の非働化ウシ胎児血清（FBS）、100 µM の 2-メルカプトエタノール、100 U/mL のペニシリン、0.1 mg/mL のストレプトマイシン及び 292 µg/mL の L-グルタミンを含む RPMI 培地中で培養及び分化誘導し、実験に使用した。

### 3. サイトカイン量の測定

RAW264.7 を 96 穴プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well となるよう播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータにおいて 37 °C で 2 時間培養した。その後、生薬エキス、グリチルリチン又はイソリクイリチゲニンと lipid A（TLR4 リガンド）の存在下及び非存在下で 24 時間培養し、その培養上清を回収した。TNF-α は、R&D SYSTEMS 社のマウス TNF-α 定量用 ELISA キットを用いて測定した。

### 4. ウェスタンブロッティング

マウス骨髄由来マクロファージを lipid A とカンゾウエキス、グリチルリチン又はイソリクイリチゲニンの存在下、37 °C で 30 分培養し、細胞を溶解して SDS-PAGE を行った。これを PVDF 膜に転写した後、抗 IκBα 抗体（Cell Signaling）及び抗 β-actin 抗体（sigma）を用いて免疫ブロットを行った。

### 5. マウス血漿中のサイトカイン量の測定

マウス（BALB/C, 8 週令, メス）を 1 群 5 匹ずつ使用し、LPS 腹腔内投与 24 時間前と 1 時間前にグリチルリチンは腹腔内投与を、イソリクイリチゲニン及びデキサメタゾンについては胃ゾンデを用いて経口投与を行った。LPS 投与後、1 時間後の血漿を採取し、R&D SYSTEMS 社のマウス TNF-α 定量用 ELISA キットを用いて測定した。

### 6. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で表し、測定値の有意差検定は、スチューデントの *t* 検定により行い、有意水準（*P*）が 5 % 未満の場合に有意であるとした。

## 実験結果

### 1. カンゾウエキスの *in vitro* における TNF- $\alpha$ の産生抑制効果

免疫系と関連の深いと思われる漢方処方に重複して含まれている 13 種の生薬（ニンジン、サイコ、ケイヒ、シャクヤク、オウギ、ハンゲ、カンゾウ、タイソウ、トウキ、オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、ブクリョウ）を選択し、これらの熱水抽出エキスを調整した。RAW264.7 をこれら各々のエキスと lipid A (TLR4 リガンドである LPS の活性部位) と共に培養し、エキスの培養上清中の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の産生量に与える影響を検討したところ、カンゾウエキスが有意にその産生を抑制した (Fig.1)。他のカンゾウエキスでも同様な効果があるか否かを確認するため、別に熱水抽出されたカンゾウエキスを購入し、その効果を確認したところ、lipid A 刺激による RAW264.7 からの炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の産生を用量依存的に抑制した (Fig.2)。従ってこの効果はカンゾウエキスにある程度普遍的な効果と考えられ、以降の実験は購入したカンゾウエキスを使用した。なおデータには示さないが、カンゾウエキス 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  という濃度は、RAW264.7 細胞の生存率には影響を示さなかった。

### 2. カンゾウエキス中の成分であるグリチルリチン、イソクイリチゲニンの *in vitro* における TNF- $\alpha$ の産生抑制効果

カンゾウエキス中に含まれる主要な成分であるグリチルリチン及びイソクイリチゲニン (Fig.3) について検討を行った。これら 2 つの化合物は、lipid A による RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  の産生を用量依存的に抑制した (Fig.4)。なおデータには示さないが、RAW264.7 細胞の生存率はグリチルリチン 300  $\mu\text{M}$  及び 1000  $\mu\text{M}$  並びにイソクイリチゲニン 10  $\mu\text{M}$  及び 30  $\mu\text{M}$  という濃度では影響を受けなかった。

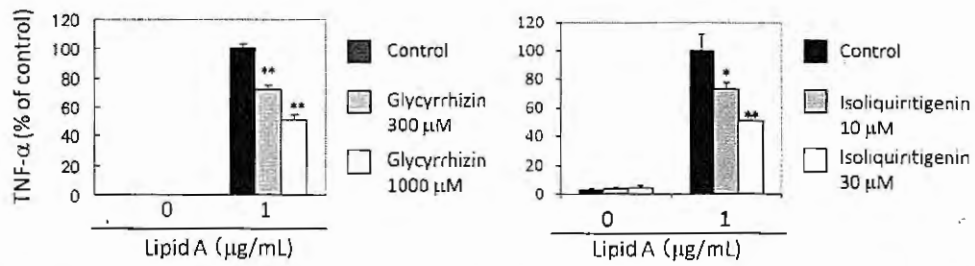
### 3. グリチルリチン及びイソクイリチゲニンの *in vivo* における TNF- $\alpha$ の産生抑制効果

グリチルリチン及びイソクイリチゲニンの *in vivo* における効果を検討するため、あらかじめこれらの薬剤を投与しておいたマウスに LPS を 10 mg/kg で腹腔内投与し、投与 1 時間後及び 4 時間後の血漿を採取した。投与 1 時間後の血漿中の TNF- $\alpha$  を ELISA にて定量したところ、ポジティブコントロールのデキサメタゾンと比較するとその抑制の程度は低いものの、グリチルリチン及びイソクイリチゲニン投与群においてコントロール群に比べ有意に産生量が抑制されていた (Fig.5)。このことから、グリチルリチン及びイソクイリチゲニンは、*in vivo* においても TLR4 シグナルによって誘導される TNF- $\alpha$  の産生を抑制することが示された。

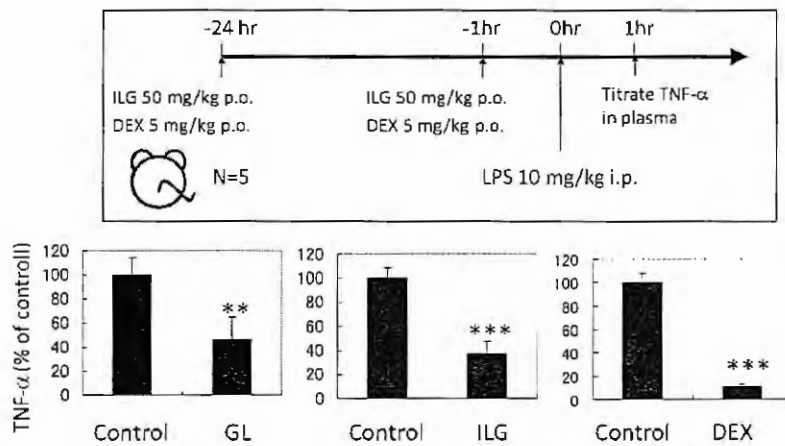
### 4. グリチルリチン及びイソクイリチゲニンの転写因子 NF- $\kappa\text{B}$ の活性化に与える影響

マウス骨髄由来マクロファージをカンゾウエキス、グリチルリチンまたはイソクイリチゲニンの存在下で lipid A とともに培養し、その細胞溶解液について抗 I $\kappa\text{B}\alpha$  抗体及び抗  $\beta$ -actin 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。lipid A によって I $\kappa\text{B}\alpha$  の分解を認めたが、カンゾウエキス、グリチルリチン若しくはイソクイリチゲニンによってその分解が一部抑制された (Fig.6)。一方、 $\beta$ -actin のタンパク量に変化はなかった (Fig.6)。NF- $\kappa\text{B}$  は通常細胞質内で I $\kappa\text{B}\alpha$  と複合体を形成し、核移行する前に I $\kappa\text{B}\alpha$  が外れ、I $\kappa\text{B}\alpha$  のリン酸化及び分解が起こるとされている。これらの結果からカンゾウエキス、またその成分であるグリチルリチン及びイソクイリチゲニンがこれらの過程を抑制することで、NF- $\kappa\text{B}$  の核移行を抑制していることが示唆された。

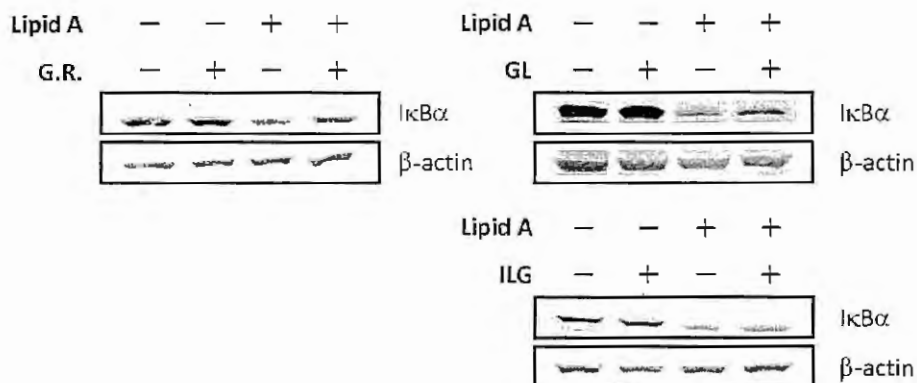




**Fig. 3** Glycyrrhizin or isoliquiritigenin suppresses the TLR4-induced TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were stimulated with glycyrrhizin or isoliquiritigenin in the presence of 1  $\mu$ g/mL of lipid A for 24hr. TNF- $\alpha$  production in the culture supernatants was measured by ELISA. The data are shown as mean  $\pm$  S.D. of triplicate wells. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. each of control.



**Fig. 4** Glycyrrhizin or isoliquiritigenin suppresses LPS-induced inflammatory cytokine production *in vivo*. Glycyrrhizin (GL), isoliquiritigenin (ILG) and dexamethasone (DEX) were administered to female BALB/C mice 24 hours and 1 hour before LPS intraperitoneal administration. GL was administered intraperitoneally (i.p.) and ILG and DEX were orally (p.o.) administered. The level of TNF- $\alpha$  in the plasma was measured by ELISA. The data are shown as mean  $\pm$  S.D. of 5 mice. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. each of control.



**Fig. 5** Extracts from *Glycyrrhizae Radix*, glycyrrhizin or isoliquiritigenin suppresses I- $\kappa$ B degradation in mouse bone marrow-derived macrophages. Mouse bone marrow-derived macrophages were stimulated with or without extracts from *Glycyrrhizae Radix* (G.R.) (1 mg/mL), glycyrrhizin (GL) (1 mM) or isoliquiritigenin (ILG) (30  $\mu$ M) for 30min in the presence of lipid A (1  $\mu$ g/mL). I- $\kappa$ B degradation was analyzed by western blotting.



## 考 察

カンゾウは、欧州でも古くより結核や膀胱炎等に対して伝承薬として使用されてきた<sup>12)</sup>。『葯典 (90年)』によれば、カンゾウの薬能として「清熱解毒」の記載があり、これは各種の抗炎症作用、抗アレルギー作用と解釈され<sup>13,14)</sup>、古くから広い意味での炎症を治療する目的で使用されてきたと考えられる。本研究の結果から、カンゾウエキスは自然免疫系への抑制作用を有することが明らかとなった。そこで、カンゾウの成分であるグリチルリチン及びイソリクイリチゲニンについて着目し、解析を行ったところ、これら2つの成分はいずれもLipid A刺激によるマウスマクロファージ細胞株からのTNF- $\alpha$ 及びIL-6の産生を抑制した。さらにTLR4のシグナル伝達に対する影響について検討を行ったところ、グリチルリチンとイソリクイリチゲニンは両者ともNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することが明らかとなった。従って、今回認められたカンゾウエキスの効果は、少なくともこれら2つの成分による総合的な炎症抑制効果であると考えられた。

本研究は、東西において伝統的に使用されてきたカンゾウが、自然免疫系を標的にして抗炎症作用を示すことを分子生物学的な手法を用いて明らかにしたものであり、カンゾウの効能に対して科学的なエビデンスを与えるものである。

## 謝 辞

本研究は、文部科学省 地域イノベーションクラスタープログラム 富山・石川地域「ほくりく健康創造クラスター」の一環として実施された。

また、グリチルリチンを提供下さったミノファージェン製薬株式会社に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) O'Neill, L.A., Dinarello, C.A.: The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense, *Immunol. Today*, **21**, 206–209 (2000)
- 2) Brightbill, H.D., Modlin, R.L.: Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response, *Immunology*, **101**, 1–10 (2000)
- 3) Daun, J.M., Fenton, M.J.: Interleukin-1/toll receptor family members: receptor structure and signal transduction pathways, *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**, 843–855 (2000)
- 4) Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T.: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nat. Immunol.*, **2**, 675–680 (2001)
- 5) Medzhitov, R.: Toll-like receptors and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **1**, 135–145 (2001)
- 6) Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M.: *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective, *Nat. Immunol.*, **3**, 121–126 (2002)
- 7) Barton, G.M., Medzhitov, R.: Toll-like receptors and their ligands, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **270**, 81–92 (2002)
- 8) Fearon, D.T.: Seeking wisdom in innate immunity, *Nature*, **388**, 323–324 (1997)
- 9) Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 4–9 (1997)

- 10) Imler, J.L., and Hoffmann, J.A. : Toll receptors in innate immunity, *Trends Cell Biol.*, **11**, 304-311 (2001)
- 11) Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D.T., Moore, K.J.: CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.*, **2**, 155-161(2010)
- 12) Fiore, C., Eisenhut, M., Ragazzi, E., Zanchin, G., Armanini, D.: A history of the therapeutic use of liquorice in Europe, *J Ethnopharmacol.* , **99**(3), 317-24 (2005)
- 13) 谿 忠人 : 漢方用薬の伝承と科学(5) 甘藷 (上) : 漢方調剤研究, **1**, 28-31 (1993)
- 14) 谿 忠人 : 漢方用薬の伝承と科学(6) 甘藷 (下) : 漢方調剤研究, **1**, 32-35 (1993)