

## HPLC法の分析時間短縮化に関する検討（第5報） -生薬成分について-

Study on shortening of analysis time in high performance liquid Chromatography.V.

- Crude drugs -

前田 典子	第一薬品工業株式会社	野原 江里子	株式会社廣貫堂
Noriko MAEDA	Daiichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd.	Eriko NOHARA	Kokando Co., Ltd.
永井 喜美	株式会社延寿堂	古寺 篤子	小太郎漢方製薬株式会社
Kimi NAGAI	Enjudo Co., Ltd.	Atsuko KODERA	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
堀井 周文	クラシエ製薬株式会社	福田 大輔	株式会社三九製薬
Chikafumi HORII	Kracie Pharma, Ltd.	Daisuke FUKUTA	Sankyu Pharmaceutical Co., Ltd.
田中 啓介	クラシエ製薬株式会社	西村 真一	東亜薬品株式会社
Keisuke TANAKA	Kracie Pharma, Ltd.	Shinichi NISHIMURA	Toa Pharmaceuticals Co., Ltd.
橋本 明佳	株式会社廣貫堂	中村 直子	株式会社パナケイア製薬
Sayaka HASHIMOTO	Kokando Co., Ltd.	Naoko NAKAMURA	Panakeia Pharmaceutical Co., Ltd.
南谷 洋平	株式会社廣貫堂	横田 洋一	富山県薬事研究所
Youhei MINAMIDANI	Kokando Co., Ltd.	Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

### 緒 言

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要性から、1 検体当たりの分析時間の短縮化が求められている。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。

これまでに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に使用する ODS カラムを日本薬局方等の公定書で汎用される粒径 5 $\mu$ m(内径 4.6mm、長さ 150mm)から粒径 3 $\mu$ m(内径 4.6mm、長さ 75mm)に変更する事で、分析時間の短縮化と移動相溶媒の削減を検討してきた<sup>1~4)</sup>。

今回の検討対象成分は、昨年度研究対象としたブシ末を含有するブシ製剤(湯剤)である八味地黄丸エキス中のブシアルカロイド、さらに、昨年度のセンナ中の総センノシドに引き続き、漢方製剤である防風通聖散料エキス中のセンノシドAの計二種類の生薬成分を選択した。

### 実験方法

#### 1. 八味地黄丸エキス中の総アルカロイドについて

##### 1) 試料

八味地黄丸エキス粉末：JP16 に記載されている製法 2)の処方に従い生薬をとり、エキス剤の製法により乾燥エキスとした。

##### 2) 試薬

ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質は和光純薬工業株式会社製(Lot.No. DCR3164)を、生薬は日本薬局方の生薬総則及び生薬試験法に適用する生薬を使用した。

##### 3) 標準溶液及び試料溶液

標準溶液：ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質約 0.25 mgにブシ用リン酸塩緩衝液/トラヒドロフラン混液(183:17)5mL を正確に加えて溶かし、標準溶液とした。

試料は JP16 記載の八味地黄丸エキスの定量法(3)総アルカロイドの項に準じて調製した。

試料溶液：試料約 1g を精密に量り、ジエチルエーテル 20mL を加えて振り混ぜた後、0.1mol/L 塩酸試液 3.0mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上層を取り除いた後、ジエチルエーテル 20mL を加えて同様に操作し、上層を取り除いた。水層にアンモニア試液 1.0mL 及びジエチルエーテル 20mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。水層は、アンモニア試液 1.0mL 及びジエチルエーテル 20mL を用いて、更にこの操作を 2 回行った。全上澄液を合わせ、減圧で溶媒を留去した後、残留物にブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液(1:1)を加えて溶かし、正確に 10mL とし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。

#### 4) 試験条件

本研究に携わる 4 名が所属する製薬企業が所有する HPLC を用いて、試料溶液中のベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン及び 14-アニソイルアコニンの分析を次の条件で行い、粒径 5 $\mu$ m カラムと粒径 3 $\mu$ m カラムとの性能比較を行った。

検出器は紫外吸光度計(測定波長：231nm…ベンゾイルメサコニン及びベンゾイルヒパコニン、254nm…14-アニソイルアコニン)、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、移動相はブシ用リン酸塩緩衝液/テトラヒドロフラン混液(183:17)を用いた。流量は毎分 1.0mL、注入量は 10 $\mu$ L とした。

使用カラムを Table1 に示した。

Table1. 使用カラム

カラム名	粒子径( $\mu$ m)	内径×長さ(mm)	メーカー
TSK gel ODS-80T <sub>M</sub> (対照カラム)	5	4.6×150	東ソー
YMC-Pack ODS-A A-302	3	4.6×75	YMC
Unison UK	3	4.6×75	Intakt
Nucleosil 3C18	3	4.6×75	Chemco

※対照カラムは、「財団法人日本公定書協会編, JPTI 日本薬局方技術情報 2010<sup>5)</sup>」に例として記載されているカラムを使用した。

各社で使用した分析機器は以下の通りである。

A 社…L-2000(日立ハイテクノロジーズ製)、B 社…Agilent1260(アジレント・テクノロジー製)、C 社…prominenceLC-20AD(島津製作所製)、D 社…LC-2010(島津製作所製)

## 2. 防風通聖散料エキス中のセンノシドA

### 1) 試料

防風通聖散料エキス(乾燥エキス)(天津泰達有限公司製、Lot. No. Z1108010B)

### 2) 試薬

センノシドA標準品

センノシドB標準品

(ともに医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団(旧 日本公定書協会)製)

### 3) 標準溶液及び試料溶液

試料約 1.5g を精密に量り、水 10mL 及び酢酸エチル 20mL を加えて 1 分間振り混ぜた。その後、遠心分離し、酢酸エチル層を除去した。残った水層に酢酸エチル 20mL を加え同様に操作した。残った水層にメタノール 10mL を加えて 20 分間超音波抽出した。次に遠心分離し、上澄液を 50mL メスフラスコに移した。残留物に薄めたメタノール (1→2) を 20mL 加え、20 分間超音波抽出後、同様に操作した。得られた上澄液を合わせ、薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 50mL とした。この液を 0.45  $\mu$ m メンブランフィルターによりろ過し、試料溶液とした。別にセンノシド A 標準品約 5mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液 (1→100) に溶かして正確に 20mL とした。この液 5mL を正確に量り、薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 20mL とし、0.45  $\mu$ m メンブランフィルターによりろ過し、標準溶液とした。

### 4) 試験条件

検出器は紫外吸光度計 (測定波長: 360nm)、カラム温度は 40°C、移動相は pH 5.0 0.04mol/L 酢酸緩衝液 (2.5mM の臭化テトラ-*n*-デシルアンモニウムを含む) / アセトニトリル/2-プロパノール (10:10:1) を用いた。流量は毎分 1.5mL、注入量は 10  $\mu$ L とした。システム適合性におけるシステム性能は、センノシド A 及びセンノシド B を 1mg ずつ量り薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 25mL とした液を正確に 5mL 量り、薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 20mL とした試験溶液 10  $\mu$ L につき、上記条件で操作するとき、センノシド B、センノシド A の順に溶出し、その分離度は 8 以上であるとした。システムの再現性は標準溶液 10  $\mu$ L につき、上記条件で試験を 6 回繰り返すとき、センノシド A のピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下であるとした。

但し、粒子径 1.7  $\mu$ m カラム AQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> の分析は Waters UPLC H-class を使用し、流量は毎分 0.6mL、注入量は 0.7  $\mu$ L の条件で行った。

使用カラムを Table2 に示した。

Table2. 使用カラム

カラム名	粒子径 ( $\mu$ m)	内径×長さ (mm)	メーカー
TSK gel ODS-80Ts (対照カラム)	5	4.6×150	東ソー
YMC-Pack Pro C18	3	4.6×75	YMC
CAPCELL PAK C <sub>18</sub> SG120	3	4.6×75	資生堂
UnisonUK C18 (Imtakt)	3	4.6×75	Imtakt
AQUITY UPLC <sup>®</sup> BEH C <sub>18</sub>	1.7	2.1×50	Waters

※対照カラムは、「財団法人日本公定書協会編, JPTI 日本薬局方技術情報 2006<sup>6)</sup>」に例として記載されているカラムを使用した。

各社で使用した分析機器は以下の通りである。

E 社…LC10AS (島津製作所製)、F 社…LC-2010CHT (島津製作所製)、G 社…Waters Alliance2695 (ウォーターズ製)、H 社…LC-10AVP-a (島津製作所製)

## 実験結果

### 1. 八味地黄丸エキスにおけるプシアルカロイドの分析

(Table3、4、Fig.1~3)

定量の結果、各社で対照カラムに比べばらつきはあるものの、YMC-Pack ODS-A A-302 及び Unison UK で100%近い値がみられた(Table3)。このばらつきは、分析機器及びデータ処理条件の差によるものであると考えられる。なお、Nucleosil 3C18 では、ベンゾイルヒパコニンと前出成分不明ピークとの分離が悪く、対照カラムに比べてベンゾイルヒパコニンの定量値が高い傾向がみられ、このカラムはプシモノエステルアルカロイドの定量には適切ではないことが示唆された。Table4に各カラムによるベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン及び14-アニソイルアコニンのピーク成績を示した。また、分析時間においては、対照カラムである TSK gel ODS-80TM の14-アニソイルアコニンの溶出時間は約32分であり、YMC-Pack ODS-A A-302 では約14分、Unison UK では約17分と、分析時間を約半分に短縮することができた。Fig.1に標準溶液の対照カラムのクロマトグラムを、Fig.2、3に対照カラム及びYMC-Pack ODS-A A-302、Unison UKのクロマトグラムを示した。

また、同じくプシ含有製剤である真武湯エキスの定量も行った。YMC-Pack ODS-A をA社及びC社で使用した場合には良好な結果が得られた。それ以外で、今回検討した各カラムを使用して各社で真武湯エキスやブランクエキスを分析した結果、ベンゾイルメサコニンまたはベンゾイルヒパコニンと重なるピークが検出された。なお、同一のYMC-Pack ODS-A を使用しても各社で分離状況が異なった原因としては、使用機器を含めた分析条件の相違が示唆された。

Table3. 八味地黄丸エキスの定量結果 (各社平均値)

(対照カラム: TSK gel ODS-80T<sub>M</sub> (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150mm, 東ソー) の値を100とした)

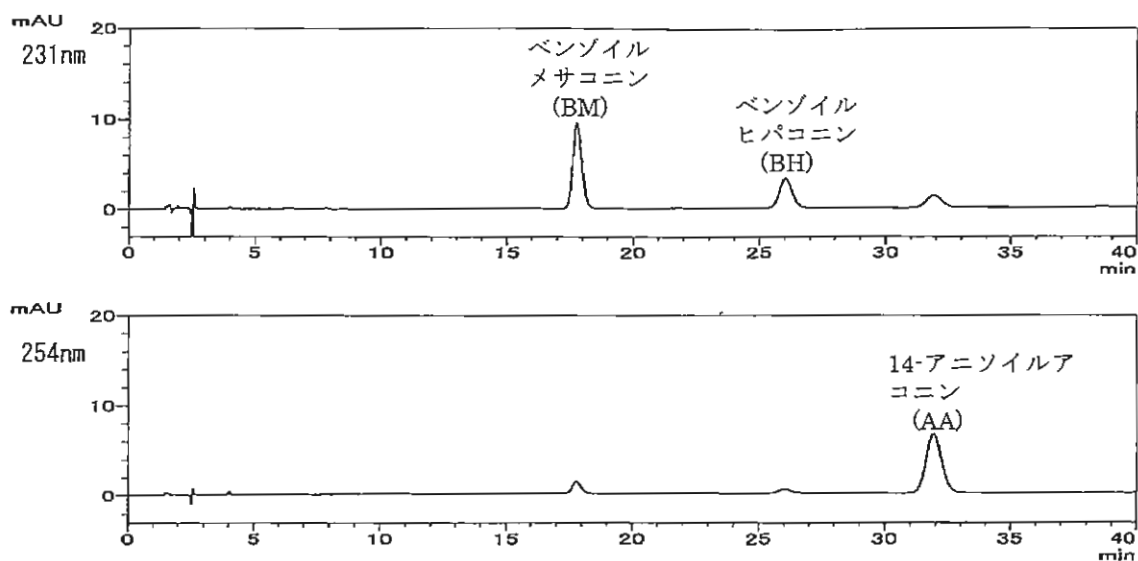
カラム名 (粒子径, カラムサイズ)	ベンゾイル メサコニン(%)	ベンゾイル ヒパコニン(%)	14-アニソイル アコニン(%)
YMC-Pack ODS-A A-302 (3 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 75mm)	98.8	96.9	107.6
Unison UK (3 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 75mm)	99.7	98.0	102.8
Nucleosil 3C18 (3 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 75mm)	94.8	160.8	107.7

Table4. 八味地黄丸エキスの定量におけるベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン、14-アニソイルアコニンのピーク情報 (◎:対照カラム)

カラム	ベンゾイルメサコニン			ベンゾイルヒパコニン			14-アニソイルアコニン		
	分離度	理論段数	シンメトリー係数	分離度	理論段数	シンメトリー係数	分離度	理論段数	シンメトリー係数
◎TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	3.2	8827	1.15	1.6	6161	0.99	10.9	10793	1.10
YMC-Pack ODS-A A-302	2.8	6274	1.08	2.3	5217	0.86	4.5	7468	1.05
Unison UK	3.8	6511	0.95	2.4	6443	0.98	6.2	8133	0.98

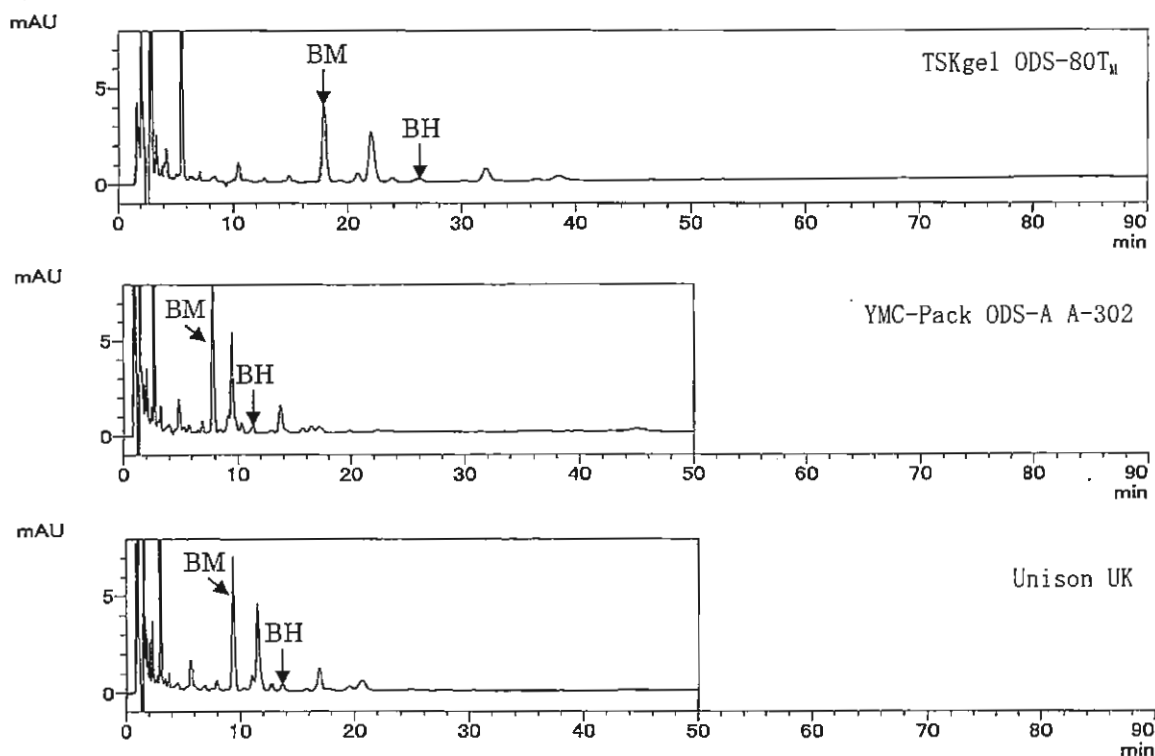
※分離度は定量対象成分の前に溶出する成分名不明ピークとの分離度

Fig. 1 TSK gel ODS-80T<sub>M</sub> (対照カラム) を用いて分析した時の標準溶液のクロマトグラム



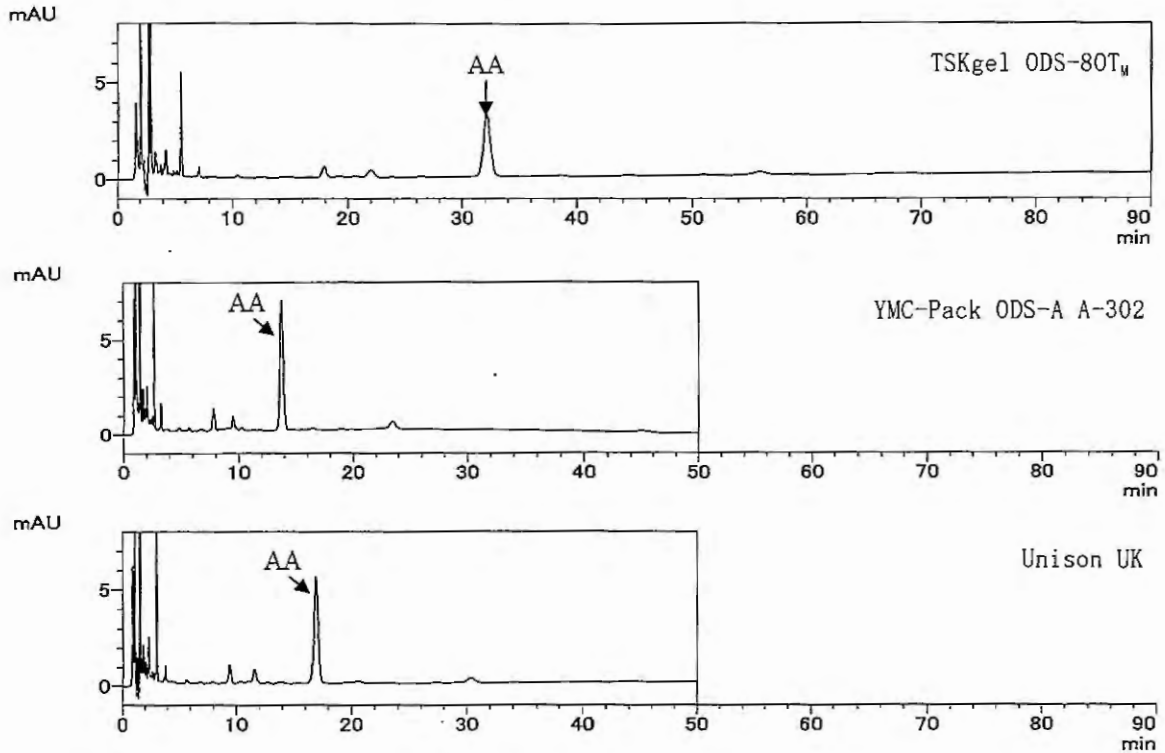
※分析機器 : prominenceLC-20AD

Fig. 2 八味地黄丸エキスの分析における各カラムのクロマトグラム  
(231nm : ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン)



BM: ベンゾイルメサコニン、BH: ベンゾイルヒパコニン、※分析機器 : prominenceLC-20AD

Fig. 3 八味地黄丸エキスの分析における各カラムのクロマトグラム  
(254nm : 14-アニソイルアコニン)



AA:14-アニソイルアコニン、※分析機器 : prominencLC-20AD

2. 防風通聖散料エキス中のセンノシドAの分析 (Table5、Fig. 4~8)

センノシドAの定量結果を Table.5 に示す。粒径 3 $\mu$ m カラムでの各社のセンノシドAの定量値は、それぞれのカラムでほぼ同じであり、分離度、再現性にも問題はなく良好な結果が得られ、3本すべてでそれぞれ同等の有用性がみとめられた。また、粒径 1.7 $\mu$ m カラムでもセンノシドAを定量した結果、粒径 3 $\mu$ m カラムと同じ定量値が得られた。

Table5. センノシドA (SA) 及びセンノシドB (SB) のピーク成績及び定量結果 (各社平均値)  
(◎:対照カラム)

カラム	粒子径	SA 及び SB のピーク成績						分離度 (カラム の選定)	SA 含量 (%)
		SB 保持時間 (min)		SA 保持時間 (min)		SA 理論段数			
		標準	試料	標準	試料	標準	試料		
◎TSK gel ODS-80Ts	5 $\mu$ m	26.15	24.59	41.76	40.53	11039	5089	12.98	0.19
YMC-Pack Pro C18	3 $\mu$ m	14.33	13.24	22.34	21.86	7935	4649	9.88	0.21
APCELL PAK C <sub>18</sub> SG120		9.30	8.49	13.83	13.50	7440	2525	8.38	0.21
UnisonUK C18		11.66	11.09	18.16	17.81	8549	3962	10.15	0.21
AQUITY UPLC® BEH C <sub>18</sub>	1.7 $\mu$ m	3.52	3.28	5.17	5.06	10230	7623	9.6	0.23

Fig. 4 TSK-gel ODS-80Ts(対照カラム)のクロマトグラム

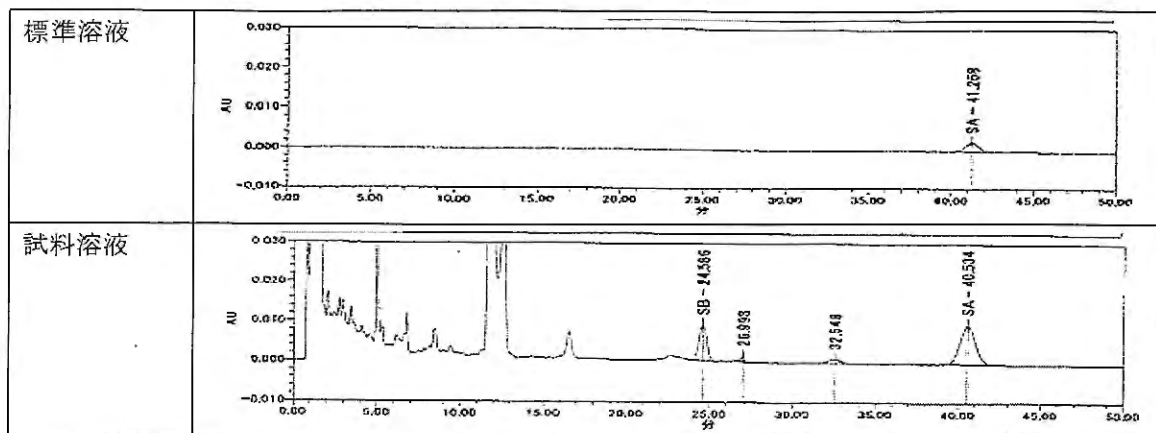


Fig. 5 YMC-pack pro C18(3 $\mu$ m)のクロマトグラム

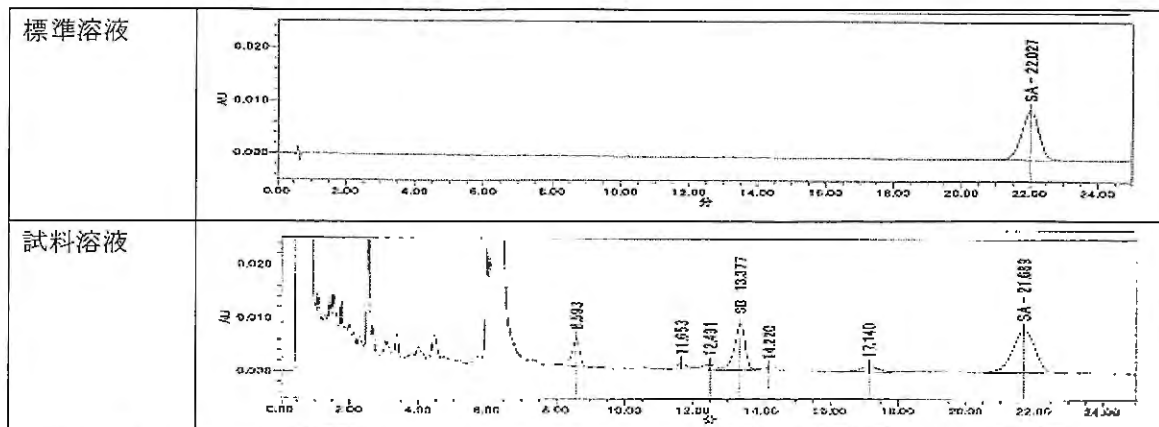


Fig. 6 CAPCELLPAK C18 SG120(3 $\mu$ m)のクロマトグラム

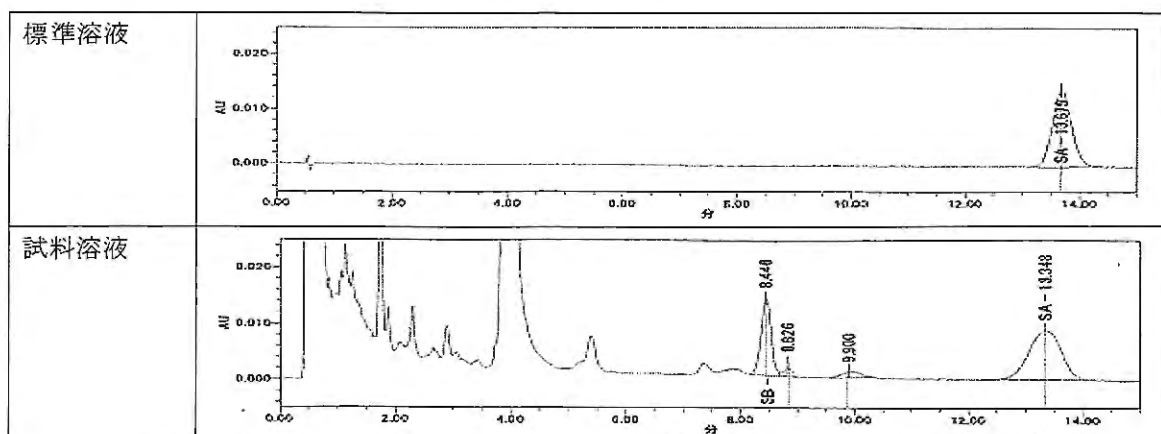
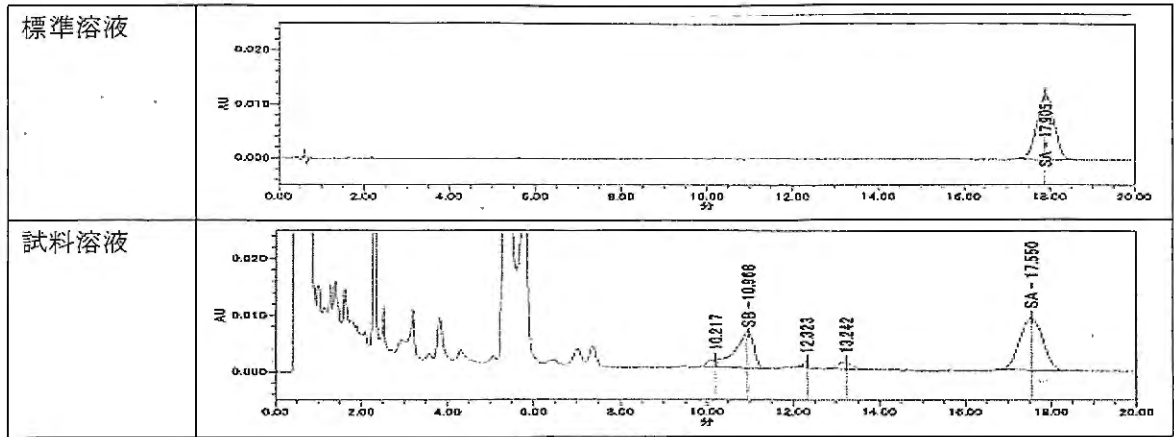
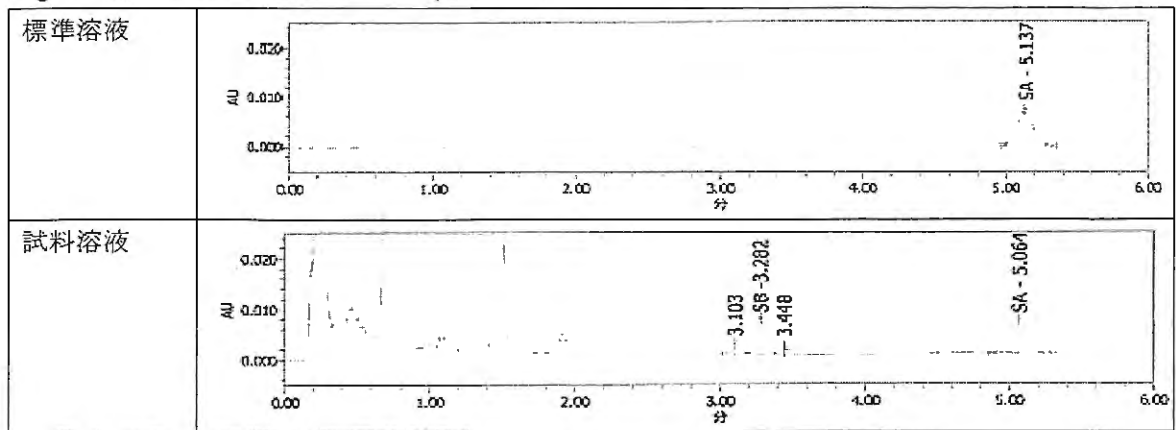


Fig.7 UnisonUK C18(3 $\mu$ m)のクロマトグラム



SA:センノシドA、SB:センノシドB、※分析機器:Waters Alliance2695

Fig.8 AQUITY UPLC® BEH C18(1.7 $\mu$ m)のクロマトグラム



SA:センノシドA、SB:センノシドB、※分析機器:Waters Alliance2695

### 考 察

本研究で使用した 75mm カラムでの真武湯エキスのプシモノエステルアルカロイド定量には、カラムの充填剤の影響ばかりでなく、使用機器を含めた分析条件が定量の可否に影響することがわかった。

八味地黄丸エキスの分析においては検討した 75mm カラム 3 本中 2 本で分析時間を約半分に短縮することができた。3 本中残りの 1 本のカラムでは、定量した全社でベンゾイルヒパコニンと成分不明ピークの分離が悪く、そのため対照カラムに比べてベンゾイルヒパコニンの定量値が高く、このカラムは八味地黄丸の定量に適切ではないことが示唆された。このことより、プシ剤の定量を行う場合は、分析する製剤にあらかじめ適するカラムを見極めてから分析する必要があることがわかった。

防風通聖散料エキス中のセンノシドAについて、粒径 3 $\mu$ m カラム及び粒径 1.7 $\mu$ m カラムを用いて定量の検討を行った結果、ピーク形状、定量値、分離度及び再現性に問題なく、良好な結果が得られた。また、分析時間の短縮化により、1 試料あたりに使用する移動相の量は粒径 5 $\mu$ m カ



ラムに比べ、粒径 3  $\mu$ m カラムでは 60~70%の削減に、粒径 1.7  $\mu$ m カラムでは 90%の削減に成功した。

なお、今回検討したすべてのカラムに共通して、標準溶液と試料溶液のセンノシドの保持時間にわずかな差が認められた。これは、防風通聖散料エキス中に多様な共雑物があること及び試料濃度とカラムの容量との関係などにより、試料溶液のピーク保持時間が標準溶液のピーク保持時間よりもわずかに短くなったためと考えられる。

## 文 献

- 1) 永井喜美ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討－生薬成分について－  
家庭薬研究 No. 28、28-34(2009)
- 2) 安藤英広ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 2 報)－生薬成分について－  
家庭薬研究 No. 29、23-30(2010)
- 3) 堀井周文ら：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－  
家庭薬研究 No. 30、31-43(2011)
- 4) 中林佐知栄ら：HPLC 法の分析時間短縮化に関する検討(第 4 報)－生薬成分について－  
家庭薬研究 No. 31、61-69(2012)
- 5) 財団法人日本公定書協会編，JPTI 追補 日本薬局方技術情報 2010  
八味地黄丸 p176-181
- 6) 財団法人日本公定書協会編，JPTI 追補 日本薬局方技術情報 2006  
センナ p1497-1498

## HPLC 法の新規充填剤及びアセトニトリル代替溶媒を用いた省力化・低コスト化

### の検討

Study on low-cost and labor-saving method using acetonitrile alternative solvents and new packing materials in HPLC

上野英志 Eiji UENO	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.	小山裕樹 Yuki KOYAMA	株式会社池田模範堂 Ikeda Mohando Co.,Ltd.
野坂宜宏 Nobuhiro NOSAKA	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd.	大上成菜 Sena OOKAMI	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co.,Ltd.
関 友香里 Yukari SEKI	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co.,Ltd.	島田佳子 Yoshiko SHIMADA	日医工株式会社 Nichiiko Co.,Ltd.
老松 聡 Satoru OIMATSU	株式会社富士薬品 Fujiyakuhin Co.,Ltd.	飯田貴子 Takako IIDA	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Industry Co.,Ltd.
嶋田宮子 Miyako SHIMADA	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.	横田洋一 Yoichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

### 緒 言

品質管理業務等を代表とするルーチン分析を円滑に行うため、省力化・低コスト化は重要である。HPLC 分析の場合、分析時間の短縮や移動相溶媒の削減が考えられる。その具体的な方法として、今回はコアシェル型充填剤を用いたカラムサイズの短縮化による分析方法と、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分析方法の二つの方法に着目した。

#### 1 コアシェル型充填剤を用いた分離分析法の検討

##### 目 的

コアシェル型充填剤 ODS カラムは、粒子が非多孔性の核とその周りを覆う多孔質層から形成されているシリカゲル粒子を充填したカラムであり、多孔質層が薄いため圧力上昇を抑えることができる。粒子径サブ 3 $\mu\text{m}$  のコアシェルカラムは、最適条件下で、HPLC では使用が難しい粒子径サブ 2 $\mu\text{m}$  の全多孔性型充填剤 ODS カラムに準じる理論段数を比較的低压で引き出すことができるとされている<sup>1)</sup>。

HPLC におけるコアシェルカラムの実用性を確認するために、前報<sup>2)</sup>で検討し設定した鼻炎用点鼻薬成分の分析条件を使用し、同じカラムサイズ (内径 4.6mm、長さ 75mm) の 4 社のコアシェルカラムを用いて、各カラムの性能比較、定量性及び再現性の確認を行った。

## 実験方法

市販鼻炎用点鼻薬のフェニレフリン塩酸塩約 10mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 10mg 及びリドカイン約 2mg に対応する量を正確に量り、内標準溶液 5mL を正確に加え、さらに移動相を加えて 30mL とし、孔径 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液 3mL を除き、次のろ液を試料溶液とした。「リドカイン」約 50mg を精密に量り、移動相に溶かし、正確に 50mL とし、リドカイン標準原液とする。別に「フェニレフリン塩酸塩」約 50mg 及び「クロルフェニラミンマレイン酸塩」約 50mg をそれぞれ精密に量り、これにリドカイン標準原液 10mL を正確に加え、移動相を加えて溶かし、正確に 50mL とする。この液 10mL と内標準溶液 5mL を正確に加え、さらに移動相を加えて 30mL 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、下記の条件で HPLC により試験を行った。試料溶液及び標準溶液の内標準物質のピーク面積に対する有効成分のピーク面積の比を求め、希釈係数と各採取量を用いて含有率を算出した。内標準溶液は、パラオキシ安息香酸エチルの移動相溶液 (3 $\rightarrow$ 5000) とした。

### 実験条件

検出器：紫外吸光光度計（検出波長：230nm）、

カラム：表 1 に記載

移動相：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1 $\rightarrow$ 275) /メタノール/テトラヒドロフラン/リン酸混液 (550 : 400 : 50 : 1)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

流量：1.3mL/min

使用機器：島津製作所製の LC-10AT、SPD-10A 及び SIL-10AD(A 社所有)を使用

表 1 使用カラム

①	L-column ODS 3 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm (財団法人化学物質評価研究機構 *昨年度使用カラム (参考用))
②	Ascentis Express 2.7 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm (SIGMA-ALDRICH製)
③	KINETEX 2.6 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm (phenomenex製)
④	Poroshell 2.7 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm (Agilent Technologies製)
⑤	SunShell 2.6 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm (ChromaNik Technologies製)

※カラム①は全多孔性カラム カラム②～⑤はコアシェルカラム

## 結果と考察

### 1) カラムの比較

一昨年度使用した全多孔性カラム①を比較対照とし、4社のコアシェルカラム②～⑤を用いて上記試験方法にて試料溶液の分析を行い、分析結果の各パラメーターを比較した(表2)。図1に全多孔性カラムを、図2にコアシェルカラムを用いて分析し得られたクロマトグラムを示す。

コアシェルカラム間の比較では、カラム④(Poroshell)で最も保持時間、理論段数及び分離度が高い値を示した。Poroshellでは各成分の保持時間も他の3本と比較し若干長く、またカラム背圧も他の3本より高いことから、他のコアシェルカラムと比較しコアシェル粒子の粒度分布や充填量が異なるためと考えられる。一方、全多孔性カラム①と比較すると、いずれのコアシェルカラムも保持時間、理論段数及び分離度は低い値を示した。一般にコアシェル型充填剤は、非多孔性の核を有するため全多孔性型充填剤と比較し炭素含有率が低く、保持が弱かったと推察される。全多孔性カラムからコア

シェルカラムへ切り替えた際の理論段数と分離度の低下に関しては、この保持時間の低下の影響に加え、汎用型 HPLC のデッドボリュームの影響が示唆された。

コアシェル型充填剤は、粒度の分布が一定のため、多流路拡散を抑制でき、非多孔性の核が存在するため粒子内拡散も抑制できる。これらの要因によりカラム内拡散を減少させ、理論段数及び分離度の増加が期待できる。しかし、それゆえに全多孔性カラム以上にデッドボリュームに起因するカラム外拡散がバンド幅に影響を与える。そのため、今回の汎用型 HPLC における比較では、全多孔性カラムと比較し、コアシェルカラムでの理論段数と分離度が低い値を示していると考えられた。

表 2 分析結果の各パラメーター：試料溶液（A 社 SHIMADZU 製 LC-10A シリーズ）

カラム	①	②	③	④	⑤	
	(L-column)	(Ascentis)	(KINETEX)	(Poroshell)	(SunShell)	
粒子径 (μm)	3	2.7	2.6	2.7	2.6	
圧力 (MPa)	16.3	19.4	21.1	24.2	18.3	
フェニレフリン	保持時間	1.156	0.847	0.88	0.976	0.87
	理論段数	1147	700	787	936	712
	分離度	3.5	2.1	2.2	2.8	2.2
	シンメトリー係数	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
リドカイン	保持時間	2.213	1.57	1.526	1.812	1.643
	理論段数	2771	1942	1990	2502	2025
	分離度	6.9	5.4	4.9	6.2	5.6
	シンメトリー係数	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
パラオキシ安息香酸エチル (内標準物質)	保持時間	3.175	2.04	2.049	2.364	2.211
	理論段数	5325	3511	3568	4273	3743
	分離度	5.6	3.4	3.8	3.8	3.9
	シンメトリー係数	1.2	1.4	1.4	1.3	1.4
クロルフェニラミン	保持時間	4.7	3.302	2.96	3.792	3.487
	理論段数	6698	4949	4868	6213	5105
	分離度	7.6	7.8	5.9	8.5	7.5
	シンメトリー係数	1.3	1.5	1.5	1.4	1.5

図 1 カラム① (L-column, 全多孔性カラム) のクロマトグラム

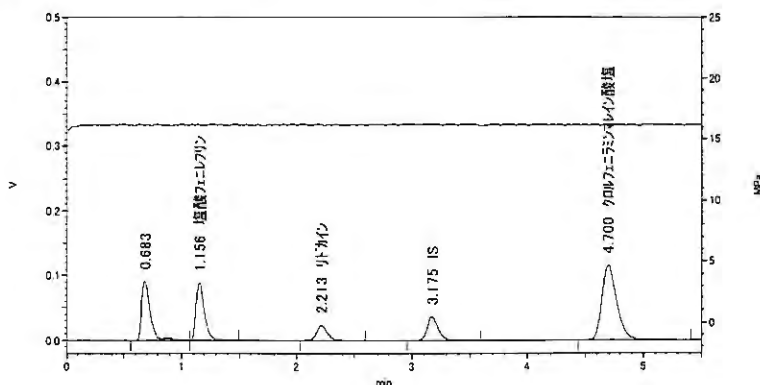
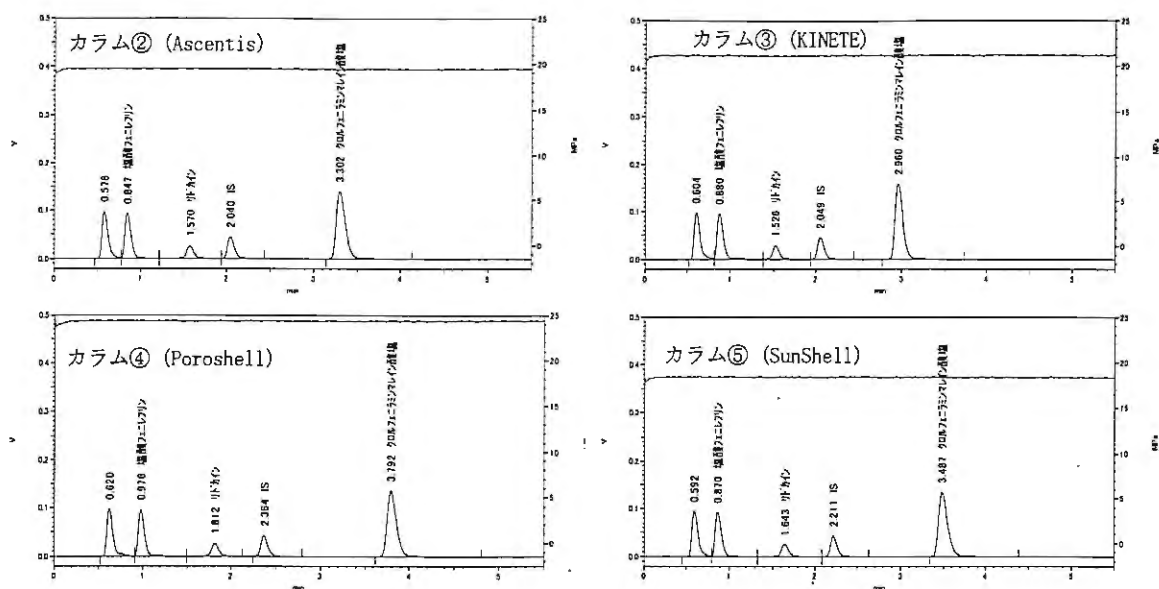


図2 コアシェルカラムのクロマトグラム



## 2) 定量性及び再現性

1) の結果から、コアシェルカラム 4 本のうち理論段数及び分離度の値が最も高い値を示した Poroshell を用いて、参加企業 4 社で定量性及び再現性の確認を行った。

本分析法により得られた、各社で行ったシステムの再現性 (標準溶液 6 回注入) の相対標準偏差 (%) を表 3 に示す。各社ともシステム再現性は 1.0% 未満と、低い値を示した。また、定量性の再現性 (表 4) も、各社ともバラツキが少なく安定した定量値が得られ、HPLC におけるコアシェルカラムの使用は今回の分析に問題が無いことが確認された。

表 3 システムの再現性(n=6)

相対標準偏差 (%)	A社	B社	C社	D社	4社平均値
フェニレフリン塩酸塩	0.14	0.35	0.13	0.21	0.21
リドカイン	0.34	0.14	0.19	0.24	0.23
クロルフェニラミンマレイン酸塩	0.05	0.16	0.12	0.25	0.15

表 4 定量値 (各社 n=3 の平均値)

定量値 (%)	A社	B社	C社	D社	4社平均値
フェニレフリン塩酸塩	99.2	99	99.3	99.5	99.3
リドカイン	99.7	99.2	99.7	99.8	99.6
クロルフェニラミンマレイン酸塩	99.3	99.5	99.3	99.4	99.4

## 3) デッドボリュームの影響

1) の仮説を検証するために、デッドボリューム影響を確認した。分析カラムは Poroshell を用いた。使用 HPLC は低デッドボリュームの機器として Waters H class (デッドボリューム約 9 $\mu$ L) を用い、1) で使用した機器 (LC-10A 型、デッドボリューム約 90 $\mu$ L) で測定して得られた結果 (表 2 及び図 2 の④) を比較対象として、Waters H-class を用いて得られた分析結果とを比較した。Waters H-class を用いて得られた分析結果 (クロマトグラム及び各ピークパラメーター) を図 3 に示す。いずれのビ

ークも形状が良好となっており、特に理論段数においては著しい改善が認められた。このことから、コアシェルカラムはデッドボリウムの影響を受けやすいことが示された。

図3 Waters H-class による分析結果  
(クロマトグラム)

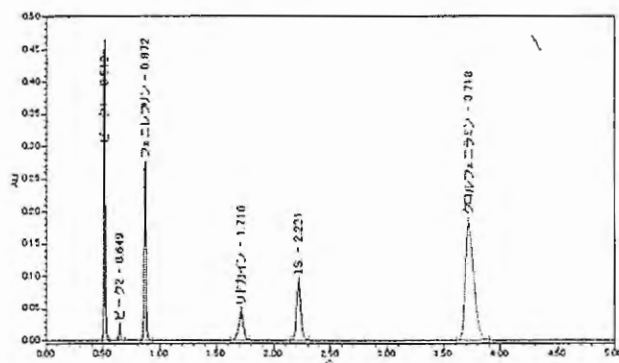


表5 H class による分析結果 (パラメーター)

HPLC機種		② (Waters H class)
粒子径 ( $\mu\text{m}$ )		2.7
圧力 (MPa)		40
フェニレフリン	保持時間	0.872
	理論段数	13193
	分離度	8.2
	シンメトリー係数	1.1
リドカイン	保持時間	1.716
	理論段数	8726
	分離度	16.3
	シンメトリー係数	0.9
パラオキシ安息香酸 エチル (内標準物質)	保持時間	2.221
	理論段数	15725
	分離度	7.0
	シンメトリー係数	1.1
クロルフェニラミン	保持時間	3.718
	理論段数	12270
	分離度	14.6
	シンメトリー係数	1.4

以上の結果より、コアシェル型充填剤は $3\mu\text{m}$ の全多孔性型充填剤と比較し機器のデッドボリウムの影響を受けやすいが、汎用 HPLC 条件下でも、カラムサイズの短縮化は可能であり、分析時間の短縮や移動相溶媒の削減に寄与できた。また、デッドボリウムを低減することで、更なる高分離分析が可能であることも示された。

## 2 アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による試験法の開発 目 的

ラウリル硫酸ナトリウム等に代表されるイオンペア試薬を用いた分離分析 (イオンペア法) は、塩基性イオン性化合物を再現性良く分析できる手法として、広く利用されている。しかしその性質上、通常の分析と比べてカラムの安定化及び洗浄に多くの移動相溶媒が必要である。さらにイオンペア試薬の完全な除去が困難であることから、カラムの専有化が推奨されている。近年、アルカリ性移動相に対して耐久性を持たせたカラムが次々と登場しており、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分離分析を実現させる技術として注目されている。そこで本検討では、塩基性医薬品についてイオンペア試薬を用いた分析である文献「一般用医薬品の試験法 上巻 (じほう)」に記載されているイオンペア試薬を用いたフェニレフリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩及びリドカインの同時定量法 (文献収載法) を参考に、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分離分析を試みた。

### 実験方法

試料溶液、標準溶液及び内標準溶液は、コアシェル型充填剤を用いた分離分析法と同様の方法で調製した。試料溶液及び標準溶液  $10\mu\text{L}$  にて、移動相、カラム温度、流量以外は下記の条件で試験を行った。

## 実験条件

検出器：紫外吸光度計（検出波長：230nm）

カラム：Triart C18 3 $\mu$ m 4.6mmID $\times$ 75mm（株式会社ワイエムシィ製）

移動相：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1 $\rightarrow$ 375）／アセトニトリル／リン酸混液（750：250：1）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

流量：1.3mL/min

## 結果と考察

### 1) イオンペア抜き移動相条件による分離検討

イオン抑制法における分析条件の検討のため、文献記載移動相よりイオンペア試薬を抜いた移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液(750:250:1)用い、移動相流量・カラム温度をそれぞれ1.3mL/min、40 $^{\circ}$ Cで分析を行った。図4に文献記載条件を用いた分析結果及びイオンペア試薬を抜いた移動相のクロマトグラムを示す。内標準物質であるパラオキシ安息香酸エチル以外の成分はイオンペア法での分析に比べて著しく保持が低下しており、ほとんど保持されていなかった。これはフェニレフリン塩酸塩、リドカイン、クロルフェニラミンマレイン酸塩のpKaが9.2、7.9、9.3であることから、酸性条件下でイオンの解離しており、ODSカラムでは保持されなかったためと思われる。文献記載の分析法では、解離した3成分とイオンペア試薬がイオン対を作り、疎水性を向上させ、カラムに保持させていると推測される。

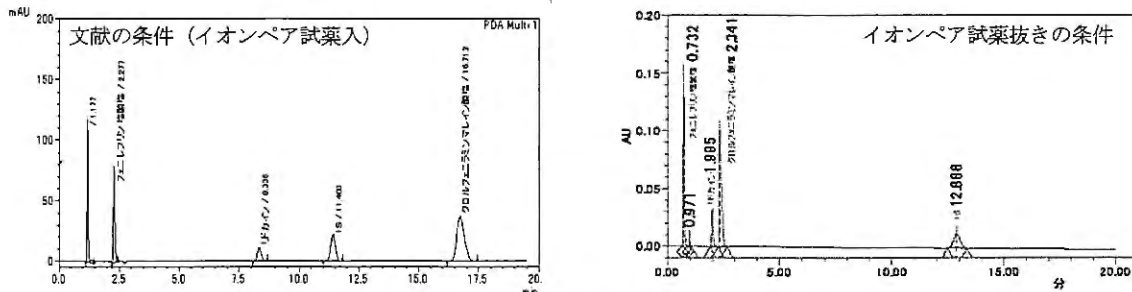
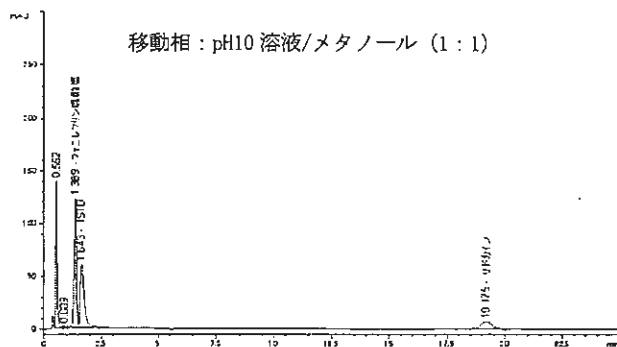


図4 文献記載の移動相及びイオンペア試薬を除いた移動相により得られたクロマトグラム

### 2) アルカリ性移動相を用いた検討について

1)の結果から、イオン抑制法にて各成分を保持させるためアルカリ性移動相の検討を行った。移動相の組成・HPLC機器の主な使用条件は、使用したカラム（Triart C18）の説明書条件を参考に、pH調節剤としてトリエチルアミンを用い、pH12以下、カラム温度30 $^{\circ}$ C、また背圧を考慮し、移動相流量を1.3ml/minから1.0ml/minに落として設定した。その結果、pHを10まで上げることによって、酸性側では保持がなかったリドカイン、クロルフェニラミンが大きく保持された。しかしピーク形状が悪く、内標準物質の保持時間も不安定なケースも観られ、分析に適したクロマトグラムが得られなかった。これは移動相に添加されたpH調節剤がトリエチルアミンのみであったことから、緩衝能が不十分であり、移動相のpHが不安定だったためと推測される。使用した移動相及び分析結果の一部を図5に示す。なお、本条件ではクロルフェニラミンは溶出しなかった。

図5 アルカリ性移動相のクロマトグラム



### 3) pH 緩衝液を添加した移動相を用いた結果について

2) で得られた検討結果から、緩衝能を持たせたアルカリ性緩衝液 (0.05% トリエチルアミン溶液にリン酸を加えて pH を調整) を用いた分離検討を行った。なお、アルカリ性緩衝液の pH を 7~11、メタノール濃度を 50~60% とした。検討を行った結果、有効成分及び内標準のピーク形状、保持時間は安定となった。しかしフェニレフリンについては、ピークの分離は可能であるものの、保持が十分ではなく、またピーク形状も期待した値が得られなかった。pH11 の移動相においても、フェニレフリンの保持に劇的な変化は見られなかった。イオンペア法であれば、イオンペア試薬を変更することで保持そのものの調整が可能であるが、イオン抑制法ではそういった調整は不可能である。このことから、イオン抑制法はもともとの疎水性がある程度強い化合物に適した方法と考えられ、今後の課題として挙げられた。フェニレフリン自体の分離は可能であったことから、各ピークの分離度、理論段数、分析時間及びピーク形状を考慮し、メタノール/pH10 緩衝液混液 (3 : 2) が適切であると考え、定量性検討の移動相として採用した。

### 4) 定量精度及び再現性

これまでの検討結果から分析条件を下記のように定め、富山県薬事研究会分析部会参加企業 4 社にて定量操作を行い、定量精度及び再現性の確認を行った。なお文献収載法より変更した箇所を波線で示す (試料溶液及び標準溶液調製方法及びに内標準溶液の調製方法に変更なし)。

#### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (検出波長：230nm)

カラム：Triart C18 3µm 4.6mmID×75mm (株式会社ワイエムシー製)

移動相：メタノール/0.05% トリエチルアミン溶液にリン酸を加えて pH10.0 に調整した液混液 (3 : 2)

カラム温度：30°C 付近の一定温度

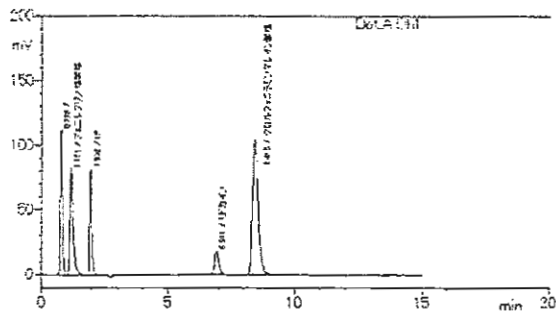
流量：1.0mL/min

本分析法により得られた標準溶液及びの測定結果を図 6 に示す。また、本分析法により得られたシステムの再現性 (標準溶液 6 回注入) を表 6 に示す。各ピークのシステム再現性 (4 社平均) は良好で、一般的な基準である 1.0% を上回るバラツキは見られず、本分析法はバラツキの少ない分析法であることが確認された。更に、本分析法の有効成分が配合されている市販鼻炎点鼻薬を用いて、各有効成分の含有率を算出した (表 7)。4 社の平均定量値は 100% 付近の定量値であり、かつそのバラツキは



非常に小さかった。以上の事から、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による本分析法は、室間再現性、機種間再現性に問題のない分析方法であり、製剤の定量が可能であることが示された。

図6 標準溶液の測定結果



	保持時間	理論段数	分離度
フェニレフリン	1.157	477	-
パラオキシ安息香酸 (内標準物質)	1.937	2208	4.16
リドカイン	6.916	7703	20.8
クロルフェニラミン	8.41	6970	4.17

表6 システムの再現性 (n=6)

システムの再現性(n=6) (%)	E社	F社	G社	H社	平均
フェニレフリン	0.31	0.26	0.43	0.24	0.31
リドカイン	0.51	0.14	0.19	0.53	0.34
クロルフェニラミン	0.53	0.06	0.2	0.11	0.23

表7 定量値 (各社 n=3 の平均値)

定量値 (%)	E社	F社	G社	H社	平均
フェニレフリン	99.6	99.5	99.8	100.2	99.8
リドカイン	99.2	99.5	99.6	98.6	99.2
クロルフェニラミン	100.4	99.5	99.6	100.6	100

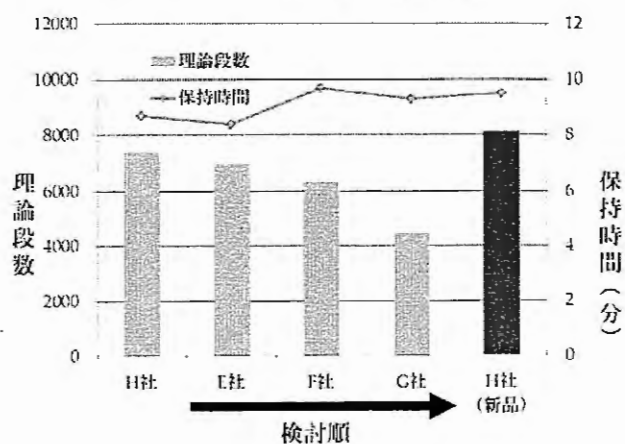
### 5) カラム耐久性

上述した定量精度及び再現性の確認を行った際、ピーク形状、分離度は4社とも良好な結果であったが、H社からG社に分析を重ねたため、理論段数が低下していく傾向が認められた。この低下傾向は、各社間の保持時間に大きな違いが認められていないものの無視できない結果である(図7)。

そこで、検討時からのカラムの劣化を確認するために、新品カラムを用いて精度及び再現性の確認・比較を行った。その結果、新品カラムの理論段数が検討時のカラムの理論段数を上回り、注入回数を重ねる毎にカラムの性能が低下する傾向があることが確認された(図7)。

このことから、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分析は、定量性には問題がないものの、その条件によってはカラムの劣化が懸念される。カラム耐久性は日々のルーチンワークにとって非常に重要なパラメーターであり、それぞれの分析条件によるカラム耐久性の確認は必須であると思われる。

図7 クロルフェニラミンの理論段数の推移



以上の結果より、アルカリ性移動相を用いたイオン抑制法による分析条件には、上述したような化合物特性による適性やカラム耐久性等の問題点が挙げられるものの、定量性及び再現性ともに問題のない結果を得ることができた。イオン抑制法はイオンペア法に比べ、省コスト化、省力化といった面で優れた手法である。塩基性化合物の分離分析手法の一つとして、さらには業務効率化を実現する方法として、今後のさらなる検討・分析法構築が期待される。

#### 参考文献

- 1) ChromaNik Technologies 技術資料
- 2) 小山祐樹ら, 家庭薬研究, Vol.31, 76-83(2012)

## 刻印錠の不鮮明化を防ぐフィルムコーティング条件の検討

Research of Suitable Operating Conditions to Film-coating for Punch Marked Tablets

富山県薬事研究会製剤部会

Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association

杉窪 克哉 Katsuya SUGIKUBO	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.	志手 真人 Masato SHITE	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
前田 将孝 Masataka MAEDA	キョーリンリメディオ株式会社 Kyorin Rimedio Co., Ltd.	山森 英樹 Hideki YAMAMORI	株式会社広貫堂 KOKANDO Co., Ltd.
無江 邦充 Kunimitsu MUE	小林化工株式会社 Kobayashi Kako Co., Ltd.	福田 大輔 Daisuke FUKUTA	三九製薬株式会社 Sankyu Pharmaceutical Co., Ltd.
村上 拓磨 Takuma MURAKAMI	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kougyou Co., Ltd.	岡本 守 Mamoru OKAMOTO	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co., Ltd.
中村 敏也 Toshiya NAKAMURA	東亜薬品株式会社 TOA Pharmaceutical Co., Ltd.	宅見 信哉 Nobuya TAKUMI	富山小林製薬株式会社 Toyama Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.
井澤 祥 Sho IZAWA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.	柏原 裕樹 Hiroki KASHIWABARA	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.	渡邊 大輝 Daiki WATANABE	バイホロン株式会社 Biholon Co., Ltd.
川上 拓郎 Takuro KAWAKAMI	株式会社富士薬品 Fujiyakuhin Co., Ltd.	南 敬照 Noriteru MINAMI	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Industry Co., Ltd.
大西 高洋 Takahiro OHNISHI	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Industry Co., Ltd.	五十嵐 健太 Kenta IGARASHI	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.
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

一般に錠剤間の識別性を上げ、調剤ミスを減らすための方法の一つとして、錠剤には刻印の施された枠で錠剤を圧縮成形し、錠剤表面を打刻している。刻印錠のフィルムコーティングでは、刻印の埋まりやフィルムの浮き上がりしがしばしば起こり、製造現場で問題となっている。

そこで、このようなトラブルを防ぐコーティング条件を検討するため、刻印入りの実験枠を用いて錠剤を製錠し、錠剤硬度やフィルム液のスプレー速度及びフィルム液濃度を変化させることで、最適なコーティング条件の検討を実施したので、その結果を報告する。

## 実験方法

実験では、①錠剤硬度と②スプレー速度及び③コーティング溶液濃度の違いによる刻印錠のフィルムコーティングへの影響を検討するため、刻印錠を製錠し、コーティング実験を行った。

### 1. 打錠

コーティング実験用の錠剤として、Table 1 に示した処方を秤量し、Table 2 の条件で製錠した。錠剤硬度は 55N 及び 85N の 2 種類の錠剤を製錠した。打錠用の金型には、富山県章刻印入りの直径 10 mm の標準 R 杵を用いた。また、打錠後の錠剤について、硬度 (錠剤硬度計、三力製作所) 及び摩損度 (摩損度試験器、Pharma Test) を測定した。

Table 1. 錠剤処方

クロルフェニラミンマレイン酸塩	4 mg (1%)
乳糖 (ダイラクトーズ R)	272.5 mg (78%)
結晶セルロース (PH-101)	52.5 mg (15%)
L-HPC (LH-21)	17.5 mg (5%)
ステアリン酸マグネシウム	2.45 mg (0.7%)
軽質無水ケイ酸 (アソリダー 101)	1.05 mg (0.3%)
	350 mg / Tab

Table 2. 打錠条件

打錠機	ロータリー式打錠機 (VELA5, 榊水製作所)
錠剤粉取機	ルミナーV
金型	直径 10 mm, 14R (県章刻印)
仕込量	1.4 kg
回転数	20 rpm
打錠圧	6~10 kN
重量	350 mg

### 2. フィルムコーティング

実験装置として、錠剤フィルムコーティング装置 (HC-LABO 型、フロイント産業株) を用いた。

1 で製錠した錠剤 1.3 kg を投入し、パンの回転を間欠運転にした状態で暖気運転を行い、排気温度が 40℃ に達した時点でコーティング溶液のスプレーを開始した。コーティング溶液には水系の胃溶性基剤ヒプロメロースを 5, 7 及び 10% 配合した処方 (Table 3~5) を用い、コーティング量は錠剤重量に対して 3% を噴霧した。①錠剤硬度の違いを比較する実験では、硬度 55N と 85N の 2 種類の錠剤を用いて、給気温度を一定 (65℃) にし、スプレー速度を変化 (5~8 g/min) させて排気温度を調整した (Table 6)。また、②スプレー速度の違いを比較する実験では、硬度 85N の錠剤を用い、スプレー速度を一定 (5 g/min 又は 8 g/min) にし、給気温度を変化 (55~65℃) させて排気温度を調整した (Table 7)。

Table 3. ヒプロメロース 5% 溶液処方

ヒプロメロース (TC-5 R)	5%
ポリエチレングリコール 6000	0.5%
色素 (黄色 5 号)	0.003%
水	94.5%
	100 %

Table 4. ヒプロメロース 7% 溶液処方

ヒプロメロース (TC-5 R)	7%
ポリエチレングリコール 6000	0.7%
色素 (黄色 5 号)	0.003%
水	92.3%
	100 %

Table 5. ヒプロメロース 10% 溶液処方

ヒプロメロース (TC-5 R)	10%
ポリエチレングリコール 6000	1%
色素 (黄色 5 号)	0.003%
水	89%
	100 %

Table 6. コーティング条件①

仕込量	1.3 kg
パンサイズ	30 型パン (直径 30cm)
パン回転数	15 rpm
スプレー速度	5~8 g/min
スプレー圧	0.1 MPa
スプレーガン	STA-5 ガン
ノズル口径	直径 1.3 mm
エアキャップ径	直径 2.0 mm
給気温度	65°C (一定)
排気温度	40~45°C
風量	1.0 m <sup>3</sup> /min

Table 7. コーティング条件②

仕込量	1.3 kg
パンサイズ	30 型パン (直径 30cm)
パン回転数	15 rpm
スプレー速度	5 又は 8 g/min
スプレー圧	0.1 MPa
スプレーガン	STA-5 ガン
ノズル口径	直径 1.3 mm
エアキャップ径	直径 2.0 mm
給気温度	55~65°C
排気温度	40~45°C
風量	1.0 m <sup>3</sup> /min

### 3. 物性評価

フィルムコーティング錠について、マイクロスコープ (DS-400C、マイクロ・スクエア株) による表面形態の観察を行い、刻印埋まり等の評価を行った。また、フィルムコーティング前後での錠剤 50 錠あたりの重量を測定し、次式よりコーティング効率を算出した。

$$\text{コーティング効率 (\%)} = \frac{\text{実際のコーティング量}}{\text{理論上のコーティング量}} \times 100$$

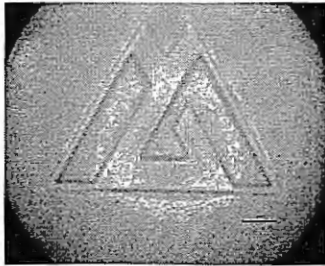
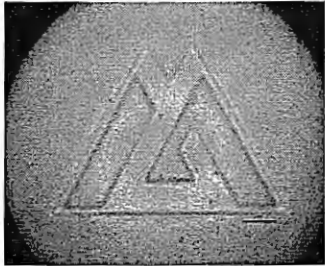
$$\left( \begin{array}{l} \cdot \text{実際のコーティング量} = \text{コーティング後の錠剤 50 錠の重量} - \text{コーティング前の錠剤 50 錠の重量} \\ \cdot \text{理論上のコーティング量} = \text{コーティング溶液の使用量} \times \text{コーティング溶液中のヒドロロース等の重量\%} \\ \quad \times \text{素錠 50 錠の重量} \div \text{仕込量} \end{array} \right)$$

### 実験結果

#### 1. 錠剤硬度の違いによるフィルムコーティングへの影響


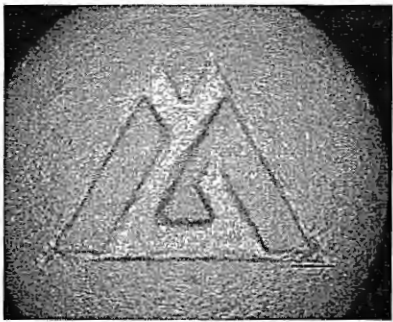
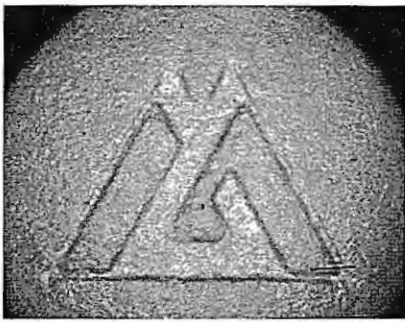


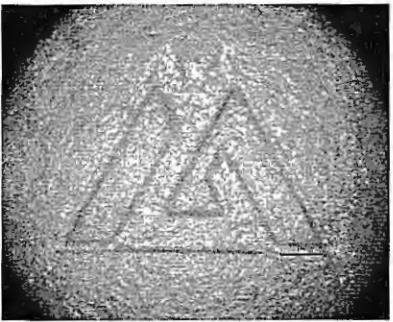
フィルムコーティング実験を行うにあたり、2 種類の錠剤硬度の刻印錠を製錠した。打錠後に錠剤の物性測定を行った結果、摩損度は 55N の錠剤で 0.3%、85N の錠剤で 0.0% であり、85N の錠剤の方が摩損性は小さかった (Table 8)。

Table 8. 刻印錠表面写真 (素錠)

錠剤硬度	55N	85N
表面写真		
摩損度	0.3%	0.0%

これらの2種類の硬度の異なる刻印錠を用い、フィルムコーティングを行った結果、55Nの錠剤では刻印中央部に欠けが見られ、コーティング効率の低下も認められたが、85Nの錠剤では刻印の欠けが少なく、鮮明な刻印のまま、高いコーティング効率でフィルムコーティングが可能であった (Table 9)。また、同じ硬度 85N の錠剤では、ヒプロメロースの溶液濃度として7%を使用した条件が刻印の埋まりや肌荒れが少なく、最も鮮明な刻印錠が得られた。




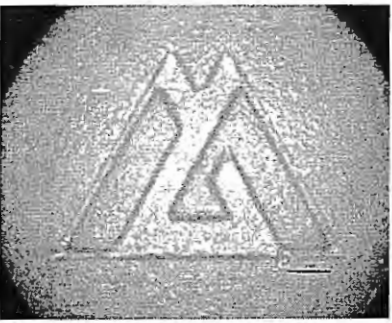
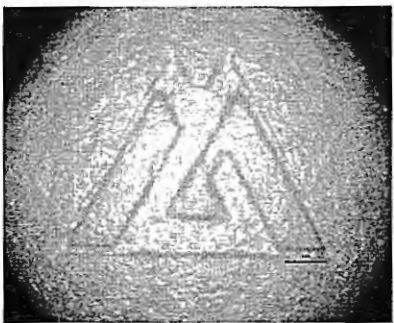
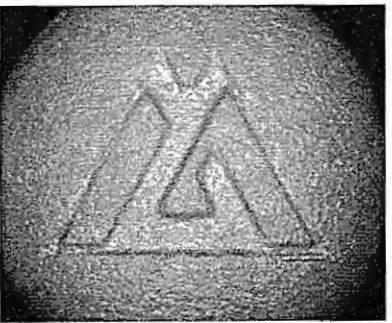
Table 9. 錠剤硬度の違いによるフィルムコーティング錠の表面写真

ヒプロメロース 溶液濃度		錠剤硬度 55N	錠剤硬度 85N
5%	表面写真		
	コーティング 効率	57.1%	80.8%
7%	表面写真		
	コーティング 効率	72.7%	86.6%
10%	表面写真		
	コーティング 効率	84.1%	83.2%

## 2. スプレー速度の違いによるフィルムコーティングへの影響

スプレー速度の違いによる比較では、スプレー速度 5 g/min と比較して、8 g/min の方が刻印の埋まりや錠剤表面の肌荒れが少なく、鮮明な刻印が確認できた (Table 10)。さらに、同じ 8 g/min のスプレー速度で比較すると、ヒプロメロースの溶液濃度として、7% を使用した条件が最もコーティング効率が高く、鮮明な刻印錠が得られた。

Table 10. スプレー速度の違いによるフィルムコーティング錠の表面写真

ヒプロメロース 溶液濃度	スプレー速度 5 g/min		8 g/min	
5%	表面写真			
	コーティング効率	80.3%	83.2%	
7%	表面写真			
	コーティング効率	83.5%	88.2%	
10%	表面写真			
	コーティング効率	73.7%	76.6%	

## 攪拌造粒による新規口腔内崩壊錠に関する研究

Study on New Orally Disintegrating Tablets by the Agitating Granulation

川岸貴博 深井伸恵 松葉裕子 伊東宏子  
Takahiro KAWAGISHI Nobue FUKAI Hiroko MATSUBA Hiroko ITO  
島谷隆夫 木村隆仁  
Takao SHIMATANI Takahito KIMURA  
テイカ製薬株式会社 研究所

Research Laboratory, Teika Pharmaceutical Co.,Ltd

竹内淑子 竹内洋文

Yoshiko TAKEUCHI, Ph.D. Hirofumi TAKEUCHI, Ph.D. Professor  
岐阜薬科大学 薬物送達学大講座 製剤学研究室

Gifu Pharmaceutical University Department of Drug Delivery Technology and Science  
Laboratory of Pharmaceutical Engineering

### 結 言

医薬品の分野における経口固形製剤の剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等が一般的に知られている。しかしながら、いずれも服用時に水を必要とするため、高齢者、幼児、小児、嚥下困難な患者、寝たきりの患者などにとっては服用しづらいといった、服用コンプライアンスの面で大きな問題があった。

近年では、水なしで服用できる剤形として、口腔内の唾液で崩壊して服用でき、咀嚼を必要としない口腔内崩壊錠が相次いで開発されている<sup>1) 2)</sup>。しかしながら、これらは成形性及び崩壊性の機能を向上させるために、特殊な製造方法を用いることが必要であった。

本研究では、汎用的な製造方法である攪拌造粒を用いることにより、優れた成形性及び崩壊性を有する口腔内崩壊錠が得られたので、その研究内容について報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

医薬有効成分として、ケトチフェンフマル酸塩、ロペラミド塩酸塩及びファモチジンを含むし、基剤として、D-マンニトール、ポビドン(PVP)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、タンニン酸、クロスポビドン、L-メントール、アスパルテーム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、クエン酸水和物及びステアリン酸マグネシウムを添加した。

#### 2. 製剤処方及びその調製方法

##### 1) 医薬有効成分を含有しない製剤での処方検討

本製剤の調製は、表1の処方に示す組成に基づき、ポビドン又はヒドロキシプロピルセルロース、D-マンニトールを攪拌混合造粒機(岡田精工製)で混合した後、造粒溶媒であるエタノールの適量にタンニン酸を溶解した液を徐々に加えて造粒した。次に、この造粒品を棚式乾燥機(木村科学器械製)で乾燥した後、この乾燥品を整粒した。更に、この整粒品にD-マンニトール以外の添加剤を加えて混合した後(打錠末)、ロータリー式打錠機(菊水製作所製)を用い、約8kNの打錠圧で打錠し、1錠の直径が8.5mmで、その質量が240mgの錠剤を得た。また、タンニン酸を除いた処方、ポビドン及びヒドロキシプロピルセルロースを除いた処方、並びにポビドン、ヒドロキシプロピルセルロース及びタンニン酸を除いた処方においても、同様な調製条件で実施した。



表1 医薬有効成分を含有しない製剤の処方

		処方1	処方2	処方3	処方4	処方5	処方6
水溶性 結合剤	PVP	12.0	12.0	—	—	—	—
	HPC	—	—	12.0	12.0	—	—
タンニン酸		6.0	—	6.0	—	6.0	—
D-マンニトール		510.6	516.6	510.6	516.6	522.6	528.6
メタケイ酸アルミン酸マグネシウム		9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
クロスポビドン		30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
アスパルテーム		1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
L-メントール		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
クエン酸水和物		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
ステアリン酸マグネシウム		3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
総量 (g)		576.0	576.0	576.0	576.0	576.0	576.0

2) 医薬有効成分を含有する製剤での処方検討

(1) ケトチフェンフマル酸塩含有製剤の処方検討

本製剤の調製は、表2の処方に示す組成に基づき、ケトチフェンフマル酸塩、ポビドン又はヒドロキシプロピルセルロース、D-マンニトールを攪拌混合造粒機(岡田精工製)で混合した後、造粒溶媒であるエタノールの適量にタンニン酸を溶解した液を徐々に加えて造粒した。次に、この造粒品を棚式乾燥機(木村科学器械製)で乾燥した後、この乾燥品を整粒した。更に、この整粒品にD-マンニトール以外の添加剤を加えて混合した後(打錠末)、ロータリー式打錠機(菊水製作所製)を用い、約8kNの打錠圧で打錠し、1錠の直径が8.5mmで、その質量が240mgの錠剤を得た。また、タンニン酸を除いた処方においても、同様な調製条件で実施した。

表2 ケトチフェンフマル酸塩含有製剤の処方

		処方7	処方8	処方9	処方10
ケトチフェンフマル酸塩		3.312	3.312	3.312	3.312
水溶性 結合剤	PVP	12.0	12.0	—	—
	HPC	—	—	12.0	12.0
タンニン酸		6.0	—	6.0	—
D-マンニトール		507.288	513.288	507.288	513.288
メタケイ酸アルミン酸マグネシウム		9.0	9.0	9.0	9.0
クロスポビドン		30.0	30.0	30.0	30.0
アスパルテーム		1.8	1.8	1.8	1.8
L-メントール		0.6	0.6	0.6	0.6
クエン酸水和物		3.0	3.0	3.0	3.0
ステアリン酸マグネシウム		3.0	3.0	3.0	3.0
総量 (g)		576.0	576.0	576.0	576.0

(2) ロペラミド塩酸塩含有製剤の処方検討

本製剤の調製は、表3の処方に示す組成に基づき、ポビドン又はヒドロキシプロピルセルロース、D-マンニトールを攪拌混合造粒機(岡田精工製)で混合した後、造粒溶媒であるエタノールの適量にロペラミド塩酸塩とタンニン酸を溶解した液を徐々に加えて造粒した。次に、この造粒品を棚式乾燥機(木村科学器械製)で乾燥した後、この乾燥品

を整粒した。更に、この整粒品にD-マンニトール以外の添加剤を加えて混合した後（打錠末）、ロータリー式打錠機（菊水製作所製）を用い、約8kNの打錠圧で打錠し、1錠の直径が8.5mmで、その質量が240mgの錠剤を得た。また、タンニン酸を除いた処方においても、同様な調製条件で実施した。

表3 ロペラミド塩酸塩含有製剤の処方

	処方11	処方12	処方13	処方14
ロペラミド塩酸塩	1.2	1.2	1.2	1.2
水溶性 結合剤	PVP	12.0	—	—
	HPC	—	—	12.0
タンニン酸	6.0	—	6.0	—
D-マンニトール	509.4	515.4	509.4	515.4
メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	9.0	9.0	9.0	9.0
クロスポビドン	30.0	30.0	30.0	30.0
アスパルテーム	1.8	1.8	1.8	1.8
L-メントール	0.6	0.6	0.6	0.6
クエン酸水和物	3.0	3.0	3.0	3.0
ステアリン酸マグネシウム	3.0	3.0	3.0	3.0
総量 (g)	576.0	576.0	576.0	576.0

(3) ファモチジン含有製剤の処方検討

本製剤の調製は、表4の処方に示す組成に基づき、ファモチジン、ポビドン又はヒドロキシプロピルセルロース、D-マンニトールを攪拌混合造粒機（岡田精工製）で混合した後、造粒溶媒であるエタノールの適量にタンニン酸を溶解した液を徐々に加えて造粒した。次に、この造粒品を棚式乾燥機（木村科学器械製）で乾燥した後、この乾燥品を整粒した。更に、この整粒品にD-マンニトール以外の添加剤を加えて混合した後（打錠末）、ロータリー式打錠機（菊水製作所製）を用い、約8kNの打錠圧で打錠し、1錠の直径が8.5mmで、その質量が240mgの錠剤を得た。また、タンニン酸を除いた処方においても、同様な調製条件で実施した。

表4 ファモチジン含有製剤の処方

	処方15	処方16	処方17	処方18
ファモチジン	24.0	24.0	24.0	24.0
水溶性 結合剤	PVP	12.0	—	—
	HPC	—	—	12.0
タンニン酸	6.0	—	6.0	—
D-マンニトール	486.6	492.6	486.6	492.6
メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	9.0	9.0	9.0	9.0
クロスポビドン	30.0	30.0	30.0	30.0
アスパルテーム	1.8	1.8	1.8	1.8
L-メントール	0.6	0.6	0.6	0.6
クエン酸水和物	3.0	3.0	3.0	3.0
ステアリン酸マグネシウム	3.0	3.0	3.0	3.0
総量 (g)	576.0	576.0	576.0	576.0

### 3. 評価方法

#### 1) 硬度試験

試験は、錠剤硬度計（富山産業製）を用いて実施し、錠剤の硬度を測定した（N=10）。

#### 2) 摩損度試験

試験は、日本薬局方参考情報の「錠剤の摩損度試験法」に準じて、摩損度試験器（富山産業製）を用いて実施した。また、錠数を30錠として、錠剤の摩損度を測定した（N=1）。

#### 3) 崩壊試験

試験は、日本薬局方一般試験法の「崩壊試験法」に準じて、崩壊試験器（富山産業製）を用いて実施した。また、試験液には水を用い、補助板なしの条件で錠剤の崩壊時間を測定した（N=6）。

## 実験結果

### 1. 医薬有効成分を含有しない製剤処方による比較検討

表5、並びに図1及び図2から明らかなように、処方1及び処方3の製剤は、崩壊時間がいずれも8秒、更に硬度がそれぞれ52.66N及び51.09Nであり、優れた崩壊性と成形性を示した。これに対し、タンニン酸を含まない処方2及び処方4の製剤は、崩壊時間がそれぞれ40秒及び19秒であり、崩壊性が悪かった。また、ポビドン又はヒドロキシプロピルセルロースを含まない処方5の製剤は、硬度が42.76Nであり、処方1及び処方3に比べて成形性が悪かった。また、タンニン酸、並びにポビドン又はヒドロキシプロピルセルロースを含まない処方6の製剤は、硬度が15.20Nであり、成形性が一層悪かった。別に、処方1から処方6における打錠末の電子顕微鏡写真を図3に示す。

表5. 医薬有効成分を含有しない製剤の処方における物性評価

		処方1	処方2	処方3	処方4	処方5	処方6
水溶性 結合剤	PVP	○	○	—	—	—	—
	HPC	—	—	○	○	—	—
タンニン酸		○	—	○	—	○	—
硬度 (N) (平均値)		52.66	63.35	51.09	63.84	42.76	15.20
崩壊時間(秒) (平均値)		8	40	8	19	9	8

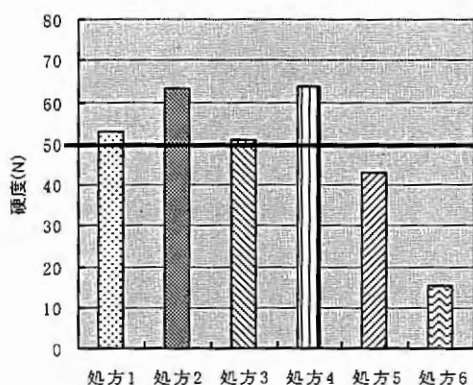


図1. 硬度試験

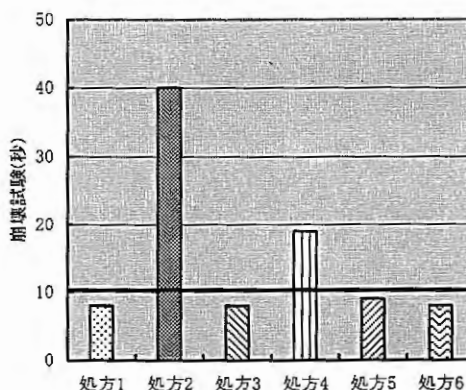


図2. 崩壊試験

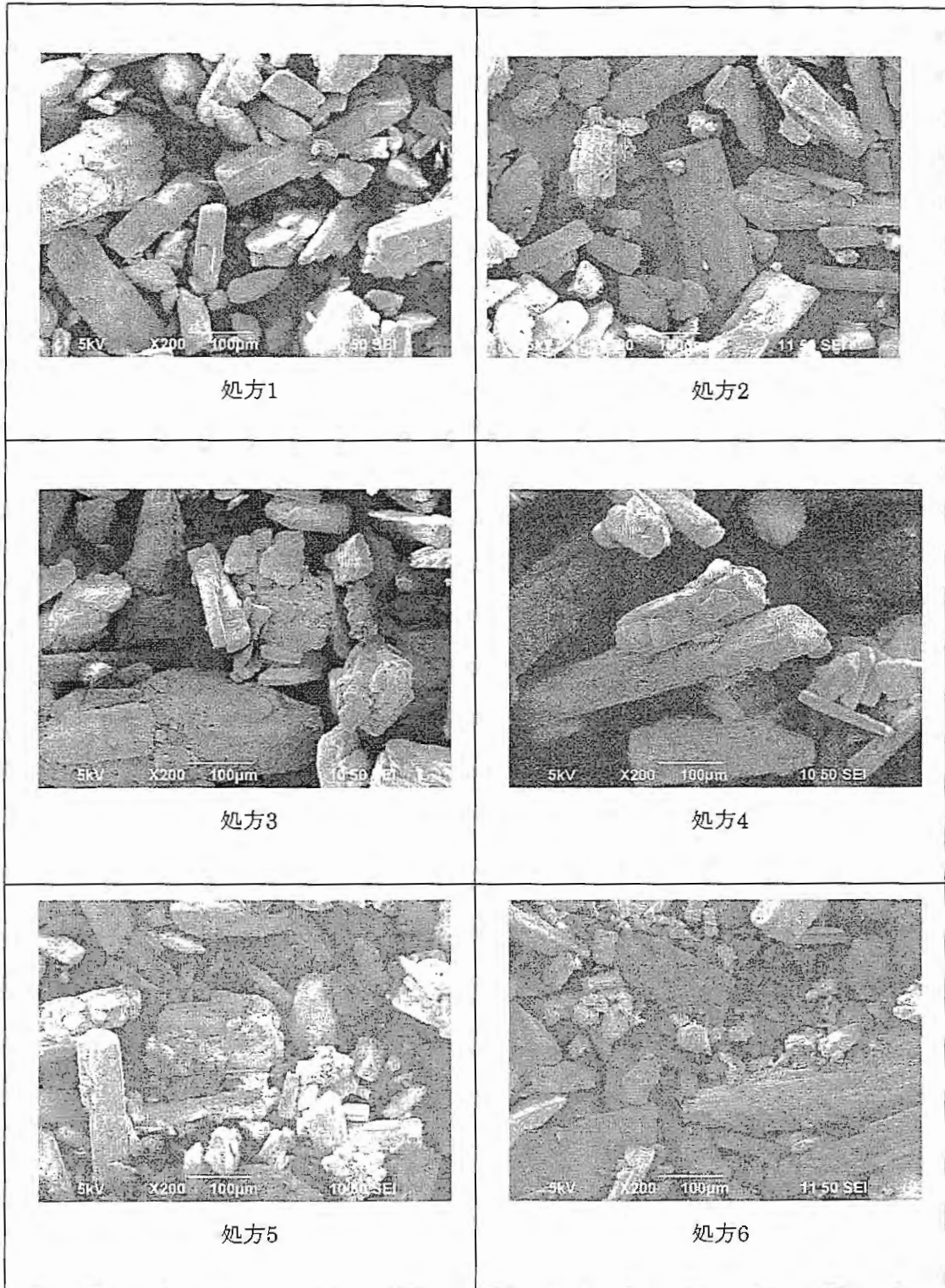


図3. 各処方の打錠末の電子顕微鏡写真

## 2. 医薬有効成分を含有する製剤処方による比較検討

表6、並びに図4及び図5から明らかなように、処方7及び処方9の製剤は、崩壊時間がそれぞれ9秒及び8秒、更に硬度がそれぞれ62.17N及び63.65Nであり、優れた崩壊性と成形性を示した。これに対し、タンニン酸を含まない処方8及び処方10の製剤は、崩壊時間がそれぞれ43秒及び15秒であり、処方7及び処方9の製剤と比較して崩壊性が悪かった。また、処方7から処方10の製剤における摩損度の著しい差は、特に認められず、0.3~0.4%以内であった。

表6. ケトチフェンフマル酸塩含有製剤の処方における物性評価

		処方7	処方8	処方9	処方10
水溶性 結合剤	PVP	○	○	—	—
	HPC	—	—	○	○
タンニン酸		○	—	○	—
硬度(N) (平均値)		62.17	68.84	63.65	59.04
摩損度 (%)		0.37	0.30	0.35	0.33
崩壊時間(秒) (平均値)		9	43	7	15

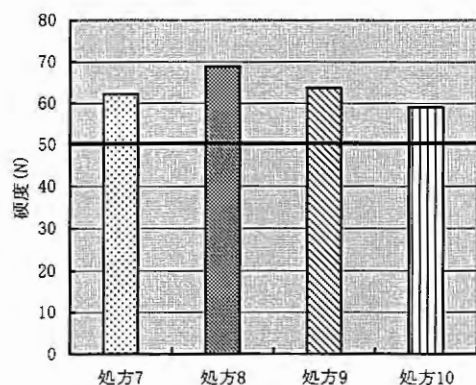


図4. 硬度試験

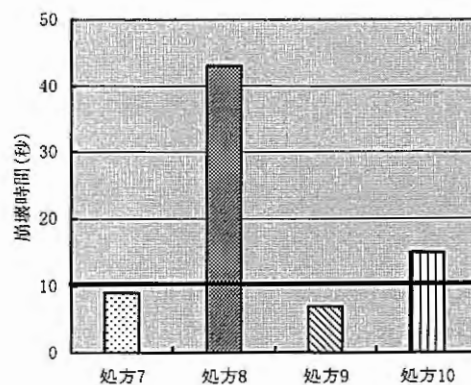


図5. 崩壊試験

表7、並びに図6及び図7から明らかなように、処方11及び処方13の製剤は、崩壊時間がいずれも9秒、更に硬度がそれぞれ57.07N及び64.23Nであり、優れた崩壊性と成形性を示した。これに対し、タンニン酸を含まない処方12及び処方14の製剤は、崩壊時間がそれぞれ35秒及び19秒であり、処方11及び処方13の製剤と比較して崩壊性が悪かった。また、処方11から処方14の製剤における摩損度の著しい差は、特に認められず、0.3~0.4%以内であった。

表7. ロペラミド塩酸塩含有製剤の処方における物性評価

		処方11	処方12	処方13	処方14
水溶性 結合剤	PVP	○	○	—	—
	HPC	—	—	○	○
タンニン酸		○	—	○	—
硬度(N) (平均値)		57.07	65.41	64.23	68.35
摩損度 (%)		0.44	0.33	0.33	0.32
崩壊時間(秒) (平均値)		9	35	9	19

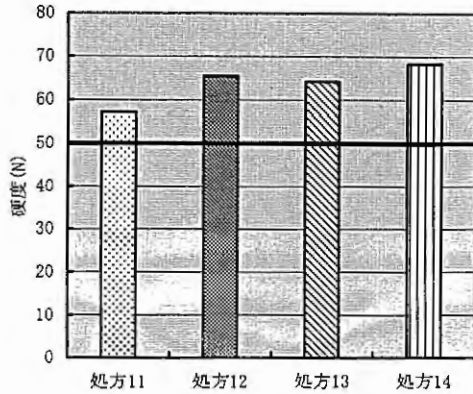


図 6. 硬度試験

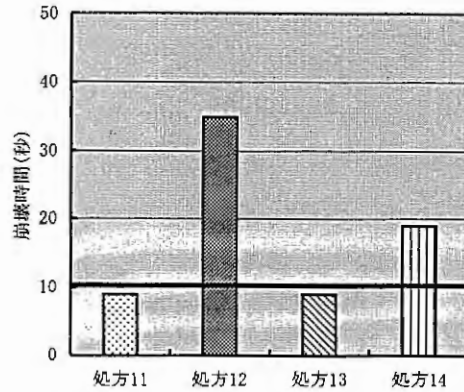


図 7. 崩壊試験

表8、並びに図8及び図9から明らかなように、処方15及び処方17の製剤は、崩壊時間がそれぞれ12秒及び8秒、更に硬度がそれぞれ60.31N及び69.82Nであり、優れた崩壊性と成形性を示した。これに対し、タンニン酸を含まない処方16及び処方18の製剤は、崩壊時間がそれぞれ36秒及び15秒であり、処方15及び処方17の製剤と比較して崩壊性が悪かった。また、処方15から処方18の製剤における摩損度の差は特に認められず、0.2~0.4%以内であった。

表8. ファモチジン含有製剤の処方における物性評価

		処方15	処方16	処方17	処方18
水溶性 結合剤	PVP	○	○	—	—
	HPC	—	—	○	○
タンニン酸		○	—	○	—
硬度 (N) (平均値)		60.31	63.65	69.82	67.27
摩損度 (%)		0.32	0.37	0.23	0.22
崩壊時間(秒) (平均値)		12	36	8	15

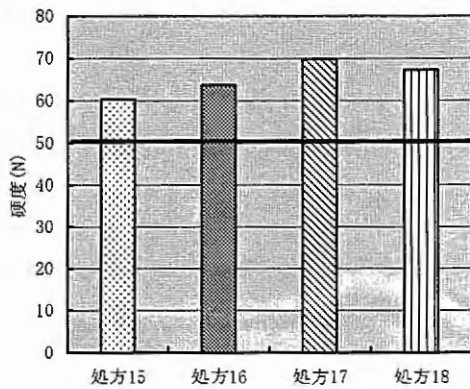


図 8. 硬度試験

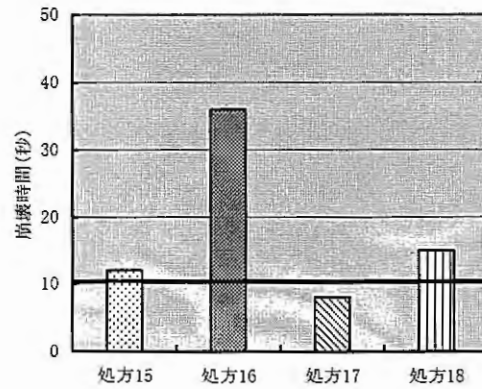


図 9. 崩壊試験

## 考 察

今回我々は、特殊な製造方法を用いない口腔内崩壊錠の製剤化を目指し、プラセボ製剤及び3種類のモデル薬物含有製剤を用いて、種々検討を行った。その結果、ポビドン (PVP) 又はヒドロキシプロピルセルロース (HPC) と、タンニン酸とを併用し、汎用的な製造方法

である攪拌造粒で製造した口腔内崩壊錠が、成形性及び崩壊性に優れていることを実証できた。

本研究により、従来の口腔内崩壊錠の製剤化技術とは異なる、新たな口腔内崩壊錠の製剤化技術を見出すことができ、今後は、あらゆる医薬有効成分に対して応用可能な、プラットフォーム技術としての確立を目指し、医薬品分野において貢献できることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) 増田義典：調剤と情報、11 (11) : 1499-1506、2005
- 2) 緒方賢次、他：医療薬学、27 (6) : 553-558、2001

## 北陸地域に自生する海藻の生物活性及びその製品化について

The bioactivities and development of alga growing in Hokuriku area.

太田裕子

Yuko OHTA

平野信哉

Sinya HIRANO

株式会社 廣貫堂

Kokando Co. Ltd.,

林京子

Kyoko HAYASHI

李貞範

Jung-Bum LEE

富山大学大学院医学薬学研究部 薬用生物資源学研究室

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama.

### 緒言

厚生労働省の人口動態統計によると、近年、日本では、生活環境の向上や医療技術の進歩に伴い平均寿命が伸び、高齢者の割合が高まると共に、出生率が低下したため少子高齢化が急速に進行している。これら的高齢者や小児は免疫機能が低いためウイルス感染症等の疾患に罹患しやすい。このことは医療費増加の原因の一つであり、社会問題になっている。それゆえに、生体の感染防御能である「免疫力」を調節してウイルス感染症を予防することは、医療費増加の抑制に繋がり、社会保障の点からも重要であると考えられている。

現在の医療保険制度では、疾病を早期に発見し治療することに重点を置く「治療医学」が主流となっているが、日本では、高騰する国民医療費の抑制を目標に、国策として、セルフメディケーションが推奨されている。それゆえに、国民の間では、健康に関する意識も高まりつつある。その中において、生体の感染防御能である「免疫力」を調節して疾病を予防する「予防医学」の重要性が認識され始めてきた。

廣貫堂では“未病・予防”を念頭に、生薬を使用した薬膳シリーズや機能性食品の開発を行っている。そして、医薬品の製造・販売だけではなく、薬食同源をキーワードに食を通した健康づくりを推進している。その一環として、免疫賦活化を介してウイルス感染症等の疾患に対抗できる健康な体を作る機能性食品の開発・商品化を進めている。

今回、免疫賦活化効果を介した抗インフルエンザウイルス (IFV) 活性を有する食用海藻である褐藻アカモク (*Sargassum horneri*) の生物活性とその製品化について紹介する。

### 実験方法

1. インフルエンザウイルス感染実験による有効性の評価: BALB/c マウス (♀, n=10) に、A型インフルエンザウイルス (IFV-A, A/NWS/33株, H1N1亜型:  $2 \times 10^4$  PFU/マウス) を麻酔下で経鼻接種した。各マウスには、サンプルを感染 3日前から 7日後まで 1日2回、経口投与した。サンプルの投与量は、コントロール (蒸留水), タミフル (0.2 mg/day), HWE (エタノールで脱脂後のアカモクを熱水抽出したエキス, 5 mg/day (フコイダン含有量 約 20-45 質量%)、アカモクから精製したフコイダン (5 mg/day) とした。感染後 14 日間にわたって各群の体重及び死亡数を記録した。



感染 3 日後に、各群半数のマウスから気道洗浄液 (BALF) 及び肺を採取し、そのウイルス量をプラークアッセイ法によって測定した。残りの半数のマウスについては、感染 14 日後に血清及び BALF を採取し、その中和抗体価 (血清と一定量のウイルス液を混和した後、この混液中の生残ウイルス量をプラークアッセイ法によって測定する) を求めた。

2. 免疫担当細胞に対する効果 (NO 産生量の測定): BALB/c マウスの腹水由来マクロファージ細胞株 RAW246.7 細胞に、HWE またはアカモクフコイダン含有培地 (最終濃度 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加し、24 時間培養した。この際、ポジティブコントロールとして LPS (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた。培養上清中の NO 産生量はグリース法<sup>2)</sup>によって測定した。

3. アカモクの製品化: 石川県産のアカモクを用いて、本海藻エキス抽出のラインテストを行った。具体的には、石川県産のアカモクを熱水抽出し、得られた熱水エキスを遠心した。遠心後、上清を濾過、濃縮、スプレードライ、殺菌し、アカモクエキスを得た。

## 実験結果

### 1. アカモクについて

アカモクは、褐藻類綱ヒバマタ目ホンダワラ科の海藻である。本海藻は、北陸では石川県や富山県の氷見などに自生しており、その他にも北海道を除く日本沿岸各地に生育している<sup>2)</sup>。本海藻については、中和抗体産生促進作用、癌細胞増殖阻害作用、骨吸収抑制作用、抗血液凝固作用など様々な生物活性がこれまでに報告されている。林らの研究室では、以前からアカモクのウイルス感染症に対する効果を評価していた<sup>3)</sup>。そして、アカモク由来エキスには、培養細胞を用いた免疫担当細胞の増殖刺激作用及び抗ウイルス作用が認められたため、本研究を推進した。その結果、アカモクには分子量の異なる数種類以上のフコイダンが含有されていると示唆された。次に HWE およびアカモクフコイダンの抗ウイルス効果を確認するために以下の実験を行った。

### 2. インフルエンザウイルス感染実験における有効性の評価

IFV は、ウイルス粒子の内部に存在するタンパク質の抗原性により A、B 及び C 型に分けられる。この中で広い宿主域を持ち、伝播力が強く、大流行の原因になりやすい型は A 型であるため、最も問題視されている<sup>4)</sup>。そこで、マウスへの感染発症が可能な IFV-A 株を用いてマウス感染実験を行った。この際、比較対照として抗インフルエンザ薬であるタミフルを経口投与した (Fig. 1)。

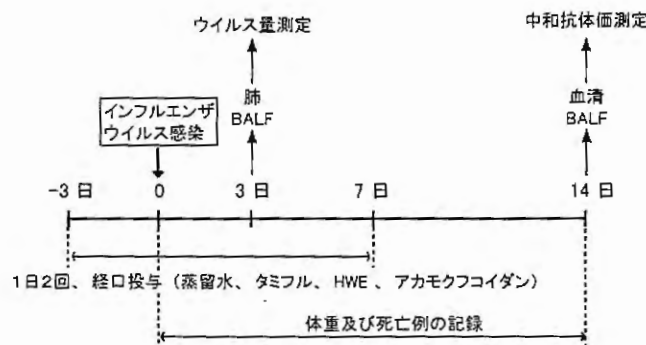


Fig. 1. インフルエンザウイルス感染実験の実験デザイン

感染 3 日後に採取した肺及び BALF 中のウイルス量を測定したところ、コントロール群と比較して HWE 及びアカモクフコイダン投与により有意に減少した (Fig. 2)。

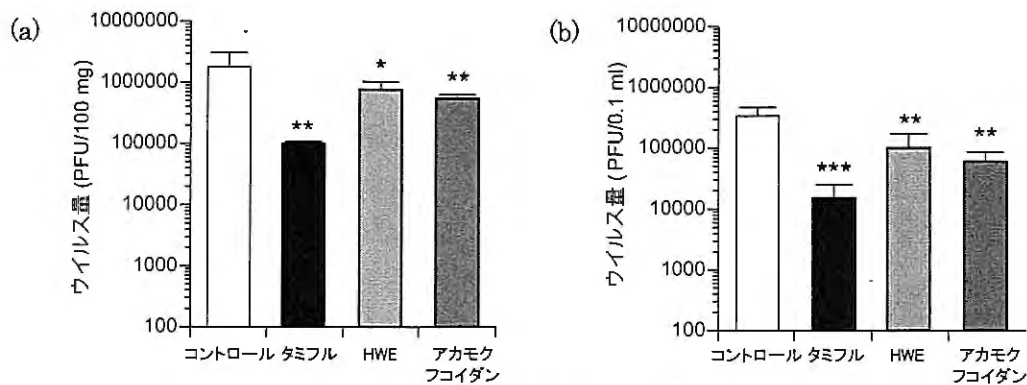


Fig. 2. A 型インフルエンザ感染マウスの肺 (a) 及び BALF (b) 中のウイルス量  
ウイルス量は、感染 3 日後に評価した。有意差検定には、Student's の *t* test を用いた。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

次に、感染 2 週間後の血清及び BALF 中の中和抗体価を測定した。タミフル投与群ではコントロール群と比較して中和抗体価の上昇が有意に抑制されていたのに対して、HWE 投与群では、中和抗体価が高い傾向が見られ、アカモクフコイダン投与群では、有意に中和抗体価が上昇した (Fig. 3)。

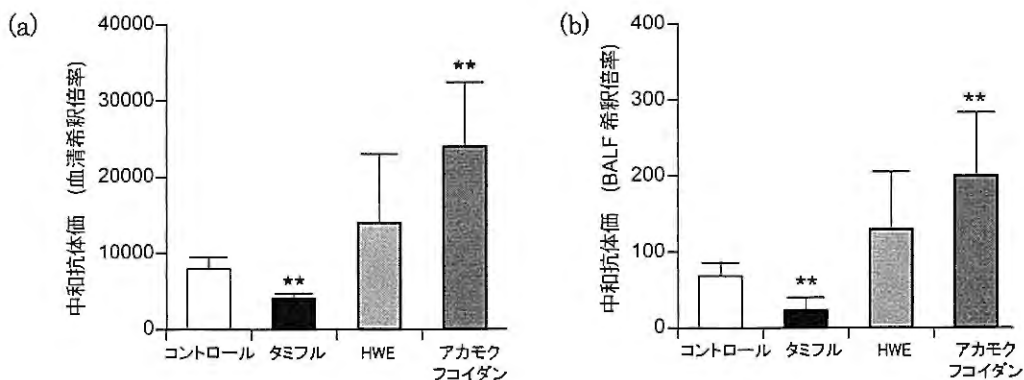


Fig. 3. A 型インフルエンザ感染マウスの血清 (a) 及び BALF (b) 中の中和抗体価  
中和抗体価は、感染 2 週間後に評価した。Y 軸は血清及び BALF 無添加時のプラーク数を 100% とした時に、希釈血清及び BALF がプラーク数を 50% まで減少させる希釈倍率を示している。有意差検定には、Student's の *t* test を用いた。\*\* $p < 0.01$

### 3. 免疫担当細胞に対する効果

動物実験で確認したアカモクの免疫機能に対する効果をさらに詳細に検討するために、免疫担当細胞の 1 つであるマクロファージを用いて *in vitro* の実験系で確認した。一酸化窒素 (NO) は抗原提示細胞であるマクロファージを活性化し、インターロイキン等のサイトカインの産生し、種々の炎症を引き起こす。その一方で食細胞の動員をかけるるとともに補体成分等の血管滲出を促し局所での異

物の排除等を行い、T 細胞を活性化することなどが知られている。そこで、NO 産生能の亢進が免疫活性化の指標の 1 つになると考え、HWE 及びアカモクフコイダンの NO 産生能に対する効果を確認した。NO 量をグリース法により測定したところ、いずれもコントロールと比較して、HWE 及びアカモクフコイダンは濃度依存的に NO 産生を有意に促進した。これらの結果から、これらの試料は、マクロファージの活性化を促すことで、その免疫賦活化効果に少なくとも部分的に寄与する可能性が示唆された (Fig. 4)。

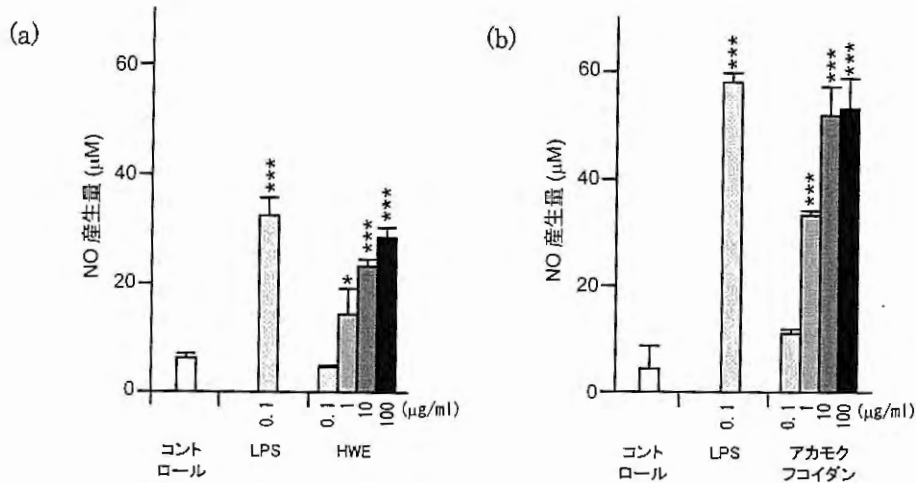


Fig. 4. マクロファージ由来細胞におけるアカモクエキスとフコイダンの NO 産生促進効果  
有意差検定は、Dunnett test で行なった。 \*\*\*p<0.001, \*p<0.01.

#### 4. アカモクの製品化

前述の「2. インフルエンザウイルス感染実験における有効性の評価」および「3. 免疫担当細胞に対する効果」の結果から、アカモクの免疫賦活化を介した抗ウイルス活性は、アカモクフコイダンに依拠するものであり、その活性は熱水抽出エキスでも十分に保持されていることが明らかになった。そこで、工業的にアカモクを抽出する方法を確立する目的で、石川県産のアカモクを用いて、本海藻エキス抽出のラインテストを行った。すなわち、石川県産アカモクを熱水抽出し、得られた熱水エキスを遠心した。遠心後、上清を濾過し、濃縮、スプレードライ、殺菌し、アカモクエキスを得た (Fig.5)。



Fig. 5. アカモクエキス

アカモクエキスは、淡褐色の粉体であり、ほとんど海藻臭を有しない。口に含むとわずかに海藻特有の味を感じる程度であった。これらの結果から、アカモクエキスは海藻特有の臭いや味がほとんどないため加工しやすい粉体であると考えられた。

## 考 察

感染実験及び *in vitro* の結果から、アカモクは、免疫賦活化を介した抗ウイルス活性を有する海藻であり“ウイルス感染症等の疾患に対抗できる健康な体を作る機能性食品の素材”として有用であると示唆された。この効果は、本海藻に含有されるフコイダンに起因するものであり、その活性は熱水抽出エキスでも十分に保持されていることが明らかになった。また、工業的なアカモクエキスの抽出法の見当がついたので、さらに商品化を進めて行く。本研究報告の内容は、特願 2012-046351 より抜粋したものである。

## 謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました林 京子先生及び李 貞範先生に心から感謝しております。また、共同研究開始当初から御尽力賜りました林 利光名誉教授に深く感謝いたします。なお、本研究に関してご支援頂いております北陸産業活性化センター R&D推進・研究助成事業に御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Griess J.P., On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen., *Phil. Trans. R. Soc. (Lond.)*, 154, p 667-731 (1964)
- 2) 田中次郎、日本の海藻、平凡社、2004、p 120-121
- 3) Hoshino T., Hayashi T., Hayashi K., Hamada J., Lee J.-B., Sankawa U., An Antivirally Active Sulfated Polysaccharide from *Sargassum horneri* (Turner) C. AGARDH, *Biol. Pharm. Bull.*, 28, p 730-734 (1998)
- 4) 吉田玲子、高田礼人、粘膜免疫からの感染と免疫応答機構、実験医学増刊、第 25 巻、清野宏編、羊土社、2007、p 98-104

## 富山県薬用植物指導センター産シャクヤクの成分分析について

Study on the constituents in the root of *Paeonia lactiflora* Pallas cultivated in Toyama prefectural center for medicinal plant guidance

横田 洋一 松永 孝之 高橋 敏\* 田村 隆幸  
Yoichi YOKOTA Takayuki MATSUNAGA Satoshi TAKAHASHI Takayuki TAMURA  
富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

(\* 現富山県高岡厚生センター)

### 緒言

シャクヤクは、日本薬局方では *Paeonia lactiflora* Pallas の根と規定され、鎮痛、鎮痙、婦人病及び瘀血の改善などを目的に数多くの漢方処方に配合されている重要な生薬である。平成 20 年度の国内生産量は年間約 40 トン<sup>1)</sup>、輸入量は約 1100 トンであり<sup>2)</sup>、大部分は中国からの輸入に依存している。これまでシャクヤクの薬理効果としては、消化管に対する作用（胃運動亢進、腸管運動抑制、ストレス潰瘍の抑制）、鎮痛作用、抗炎症作用、鎮静作用、抗痙攣作用、血液凝固・線溶系に対する作用などが報告されている<sup>3)</sup>。成分としては、モノテルペンであるペオニフロリン、アルビフロリンやそれらの関連化合物及びガロタンニン類（ペンタガロイルグルコースを含む）などが知られている<sup>3)</sup>。なお、日本薬局方では、ペオニフロリン含量が乾燥物換算で 2.0%以上と規定されている。

当所の付設機関である富山県薬用植物指導センター（以下、センター）では、これまでにセンターで栽培している約 230 品種のシャクヤクについてペオニフロリン、アルビフロリンを調べ、これらの成分含量が品種間で大きく異なっていることを明らかにしており<sup>4)</sup>、品種間で薬効に差異があることが予想された。

そこで、センターで栽培している切花用シャクヤクの中から代表的な薬用種である「梵天」に比べ、より高い薬効を有するものを見出し、当該品種を「富山シャクヤク」として栽培普及し、ブランド化を図るとともに、富山シャクヤクを配合した「富山オリジナルブランド医薬品」の開発へとつなげることを目的に、平成 22 年度から切花用シャクヤク 60 品種について、当所で成分試験及び薬理試験を実施している。今回、これまで行ったセンター産シャクヤクの成分分析結果について報告する。

### 実験方法

#### 1. 検体

平成 21 年秋にセンターで掘り取った切花用シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas) 60 品種 (Table 1) 並びに比較対照として薬用種の「梵天」(4 年物) 及び「北宰相」(8 年物) の根を皮付きのまま水洗、約 3 ヶ月日陰で風乾した後、真空凍結乾燥して用いた。ただし「春の粧」は 3 年物、「やまびこ」は 7 年物、それ以外は 8 年物を用いた。さらに、市販品として中国産（ウチダ和漢薬）及び日本産（ツムラ）を用いた。

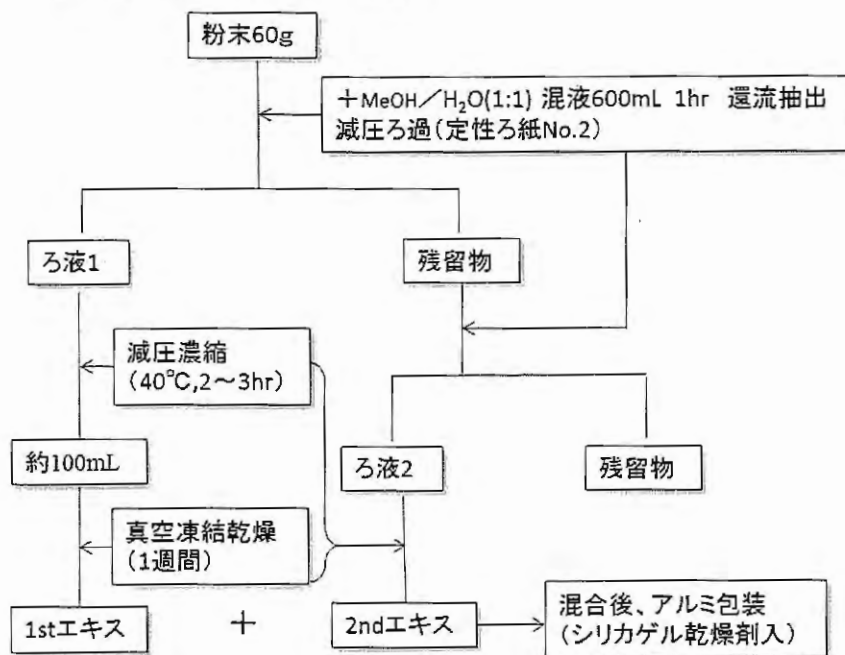
#### 2. エキス調製法

シャクヤクの根の粉末を日局シャクヤクの定量法の抽出法に準じ、Fig. 1 に従って乾燥エキスを作製した。なお、エキス収率(%)はエキス量(g)/シャクヤク量(g)×100とした。

Table.1 切り花用シャクヤクの品種

信濃の雪	ピンクドクター	ひなまつり	ピーターブランド	春の粧	信濃の春
ミスクレーム	夕映	フェスティバルマキシマ	マダムパープル	ルーズベルト	ラテンドル
ビーナス	ブライダルアイシング	春の里	ダッチスネムール	かげろう	春の虹
アルプス	桃山	レッドバロン	エジェリスパーパー	カンサス	ブライダルシャワー
リチャード	絵姿	カールローゼンフィールド	フローラ	氷点	管平30号
ヤトリス	マーサリード	サラベルナール	駒澤	信濃3号	ミスアメリカ
深山の雪	滝の粧	セバスチャンマース	ハニーゴールド	エクリップス	祇園
火祭	ミスエクハルト	・新珠	晴姿	アバランチェ	バンカーヒル
蜂の雪	華燭の典	滝沢赤	エルサセス	輪舞	白雪
ミスターハーメリック	新雪	行春	藤娘	ソルベット	やまびこ

Fig.1 シャクヤク乾燥エキスの調製法



### 3. 試験方法

#### 1) 試薬

没食子酸 (GA) (ナカライテスク試薬特級)、オキシペオニフロリン (OP) (PhytoLab)、カテキン (CA) : (+)-カテキン水和物 (東京化成試薬)、没食子酸メチル (MG) (和光純薬試薬特級)、アルビフロリン (AL) (和光純薬生薬試験用)、ペオニフロリン (PA) (日本薬局方標準品)、ペンタガロイルグルコース (PG) : 1, 2, 3, 4, 6-ペンタガロイル-β-D-グルコピラノース (Toronto research chemicals)、安息香酸 (BA) (和光純薬試薬特級)、ベンゾイルペオニフロリン (BP) (PhytoLab)、ペオノール (PE) (和光純薬局方生薬試験用)、ケルセチン (QE) (東京化成試薬特級)

## 2) 試験条件

機器は Waters 社製の UPLC H-class、検出器はフォトダイオードアレイ検出器(PDA)、検出波長は 232、280 及び 257nm。カラムは Waters 社製の ACQUITY UPLC HSS C18 (粒径 1.8  $\mu$ m、2.1 $\times$ 50mm)、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C、移動相は薄めたリン酸 (1 $\rightarrow$ 1000) (A) 及びアセトニトリル(B)を用いて、Table 2 に示すグラジエント溶出を行った。なお、曲線は Waters 社が設定したグラジエント曲線を示す。

Table 2 グラジエント条件

時間min	流量mL/min	%A	%B	曲線
0	0.5	98	2	
1.1	0.5	75	25	4
2.5	0.5	10	90	4
3.0	0.5	0	100	6
3.2	0.5	0	100	6
3.4	0.5	98	2	6

## 3) 定量法

乾燥エキス約 0.1g を精密に量り、メタノール/水混液(1:1)を加えて溶かし、正確に 50mL とした。この液 5mL を正確にとり、内標準溶液 (QE 60.0mg をメタノール溶かし 500mL としたもの) 2mL を正確に加え、水 2mL 及びメタノール/水混液(1:1)1mL を加え、孔径 0.2  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。別に試薬の項の GA、OP、CA、MG、AL、PA、PG、BA、BP 及び PE をメタノールに溶かし、適宜希釈したものに試料溶液と同濃度になるよう内標準溶液を加え標準溶液とした。注入量は 0.5  $\mu$ L とした。上記の試験条件により試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するそれぞれの成分のピーク面積の比を求めた。センター産シャクヤク根 (真空凍結品) 及び市販品 (未乾燥物) の各成分含量 (%) は、得られた乾燥エキス中の各成分含量 (%) にエキス収率 (%) / 100 を乗じて求めた。

## 結果及び考察

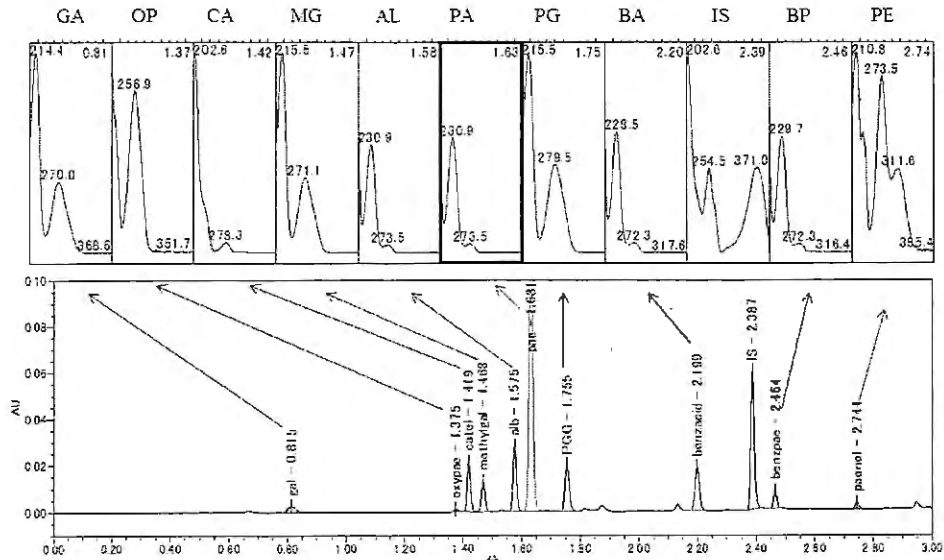
### 1. 定量法

センター産切花用シャクヤク60種 (*Paeonia lactiflora* Pallas) の中から優良品種を見出し、当該品種を「富山シャクヤク」としてブランド化を図ることを目的に成分分析を行った。シャクヤクは多彩な薬理作用を有することが知られており、それを裏付けるには、日局で規定のあるPEの他にもなるべく多くの成分を測定することが望ましい。今回、多検体の多成分分析を行うため、迅速定量を試みた。UPLC H-class (Waters) を用い、試験条件を種々検討したところシャクヤク10成分 (GA、OP、CA、MG、AL、PA、PG、BA、BP、PE) 及び内標準物質 (QE) を3分間以内で分離する条件を見出し、迅速分析が可能となった。232nmにおける標準溶液のクロマトグラム及び各成分の紫外吸収スペクトルをFig. 2に示す。

試料溶液のピークの同定には、標準溶液の保持時間及びPDAによる紫外吸収スペクトルを用いた。また、GA、CA及びMGは280nm、OPは257nm、それ以外の成分は232nmの波長で検出を行った。これらの4成分については、検出波長を各ピークの極大波長付近とすることで、近接するピークの影響を軽減した。Fig. 3に日本産シャクヤクの各波長のクロマトグラム例を示す。また、内標準物質を使用する

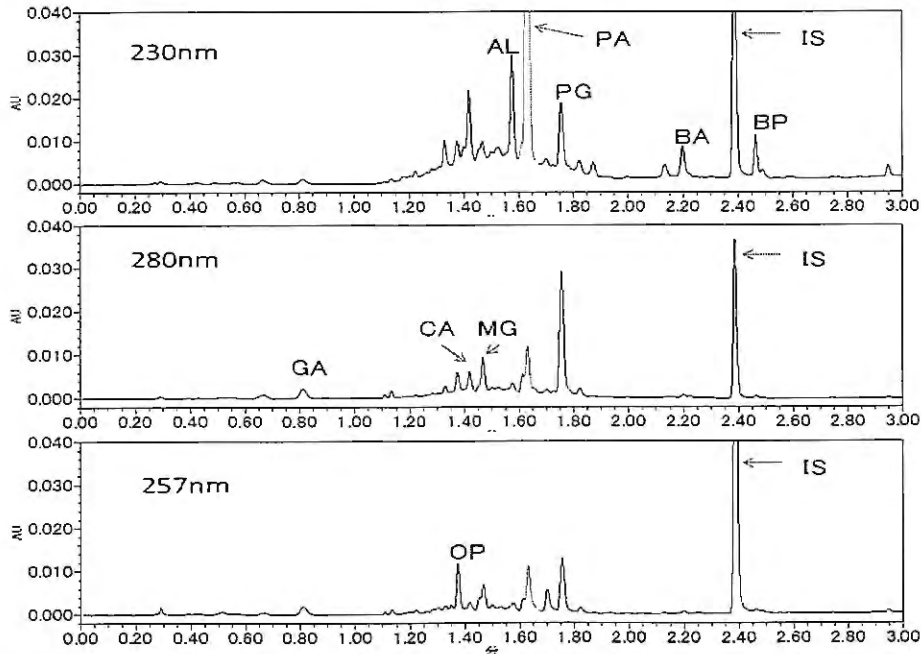
ことで、各成分の直線性やシステムの再現性など定量に必要なパラメータも良好となった。

Fig.2 シャクヤク標準溶液のクロマトグラム及び紫外吸収スペクトル



GA:没食子酸, OP:オキシペオニフロリン, CA:カテキン, MG:没食子酸メチル, AL:アルビフロリン, PA:ペオニフロリン, PG:ペンタガロイルグルコース, BA:安息香酸, IS:ケルセチン, BP:ベンゾイルペオニフロリン, PE:ペオノール

Fig.3 日本産シャクヤクの3波長におけるクロマトグラム



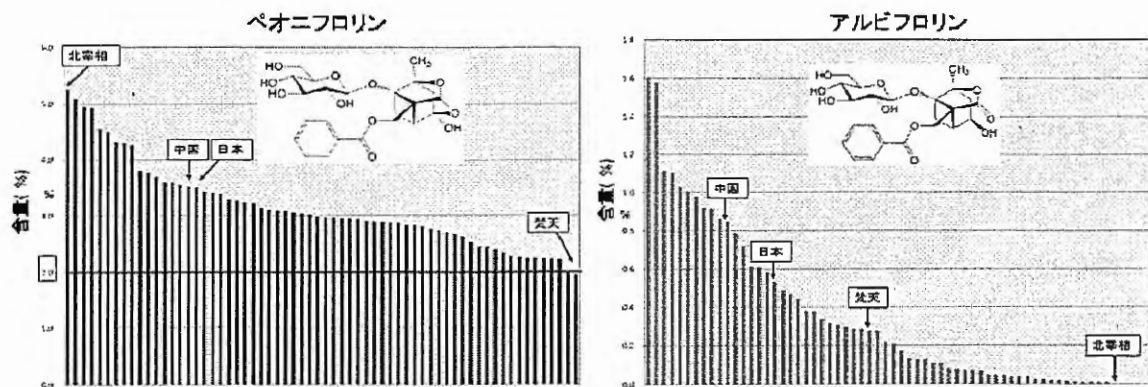
GA:没食子酸, OP:オキシペオニフロリン, CA:カテキン, MG:没食子酸メチル, AL:アルビフロリン, PA:ペオニフロリン, PG:ペンタガロイルグルコース, BA:安息香酸, BP, IS:ケルセチン, BP:ベンゾイルペオニフロリン



## 2. 成分含量

- 1) 主成分とされるPAについては、使用したセンター産切り花用品種（以下、切り花用品種）の根の含量はすべて2.0%以上であった。薬用種の梵天、北宰相はそれぞれ、最小、最大の含量を示した（Fig. 4）。北宰相は、国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）により、PA含量が高い品種として登録されたものであり<sup>9)</sup>、今回の結果からもこのことが裏付けられた。
- 2) PAの類縁体であるALについては、PAに比べ品種による含量ばらつきが大きく、検出されないものもあった。薬用種では、PAが最大の含量を示した北宰相では不検出であった。市販品は比較的高い含量を示したが、切り花用品種の中には最大含量を示したのものもあった（Fig. 4）。

Fig.4 各シャクヤクの成分含量分布（1）



- 3) PGについては、切り花用品種では薬用品種及び市販品より含量の多いものが多数見られ、MGについても同様の傾向が見られた（Fig. 5）。そこで、センターで栽培されたシャクヤク（n=62）について、これらの関係を調べたところ正の相関が見られた（Fig. 6）。MGは没食子酸のメチルエステルであり、ガロタンニンであるPGの構成成分であることから、これらについて生合成の関連性が示唆された。

Fig.5 各シャクヤクの成分含量分布（2）

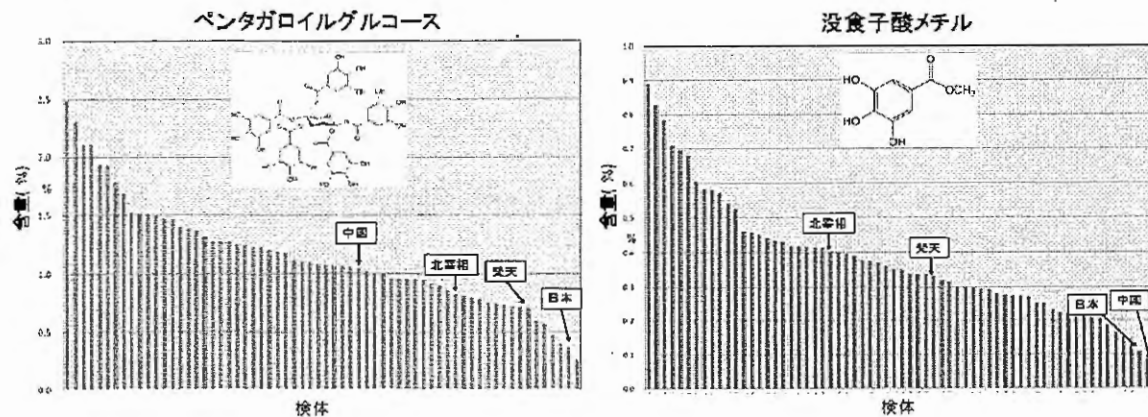
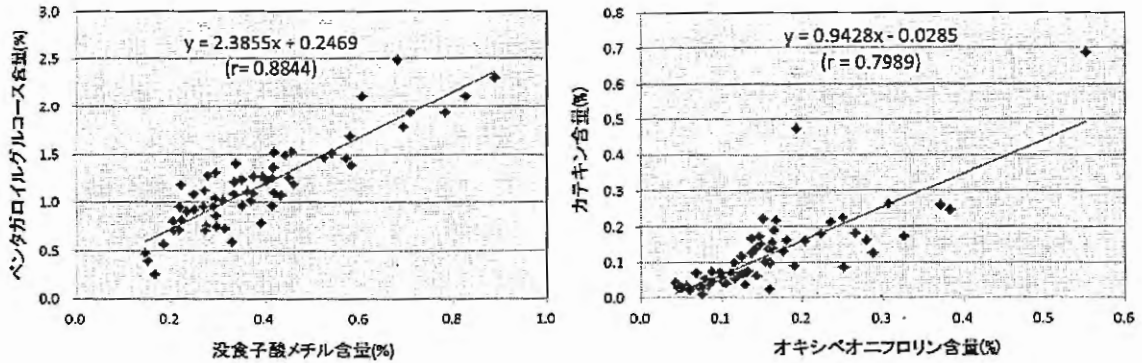
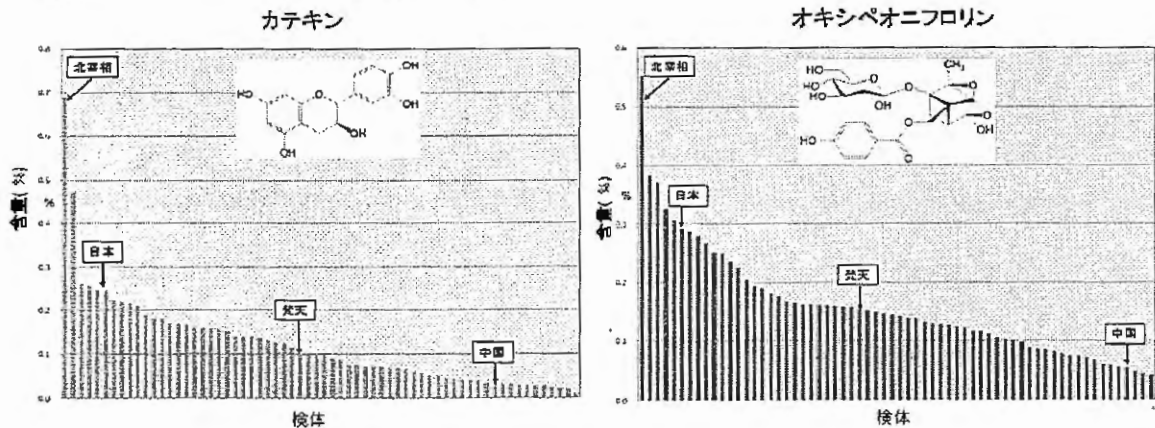


Fig.6 シャクヤク成分間の相関



4) CA及びOPについては、いずれもPAと同様、北宰相が高い含量を示した (Fig. 7)。これら2成分の含量の関係についても正の相関が見られたが (Fig. 6)、それぞれに構造上の直接の関連性は見られなかった。

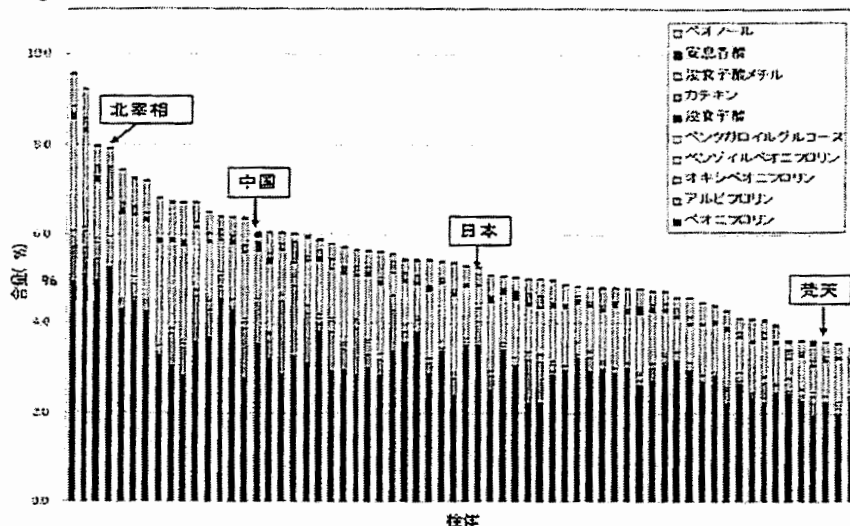
Fig.7 各シャクヤクの成分含量分布 (3)



5) その他の比較的低含量の成分については、GAは中国産が最大値を示し、日本産及び薬用種は比較的低含量であった。BAは中国産及び梵天が最大値付近を示し、北宰相は最低含量であった。BPでは北宰相が最大含量で市販品、梵天とも比較的高含量であったが、切り花用品種にも高含量の品種が見受けられた。PEは市販品、薬用種はじめ、ほとんどの品種で不検出であったが、切り花用品種の少量の品種にのみ含有されていた。なお、PEは揮発性であるため、エキス調製過程で損失があった可能性がある。

6) 10成分の総含量においては、梵天は比較的低含量であり、北宰相は比較的高い含量を示した。切り花用品種の大部分は梵天の含量以上であり、北宰相より含量の高い品種も見受けられた (Fig. 8)。

Fig.8 各シャクヤクの10成分含量分布



まとめ

1. シャクヤク 10 成分 (GA、OP、CA、MG、AL、PA、PG、BA、BP、PE) について内標準物質を用いた同時分析法の開発を目指したところ、UPLC H-class 及び PDA (Waters) を用いることで、3 分以内の迅速分析が可能であった。
2. 薬用種の北宰相は PA、CA、OP 及び 10 成分などの含量が高いが、AL 及び BA 含量が少ない等、特徴的な性質を保持していた<sup>5)</sup>。一方、優良種とされる梵天の PA 含量は低く<sup>4,6)</sup>、10 成分総含量も比較的低い等、北宰相と対照的な成分組成を示した。このことについては今後、糖など紫外部吸収を持たない他成分についても分析を行う必要があると考えられた。
3. 今回用いた市販のシャクヤク (中国産及び日本産) の PA 及び 10 成分総含量は栽培品種のほぼ平均的な値に近い値を示したが、両者とも MG は低い値を示した。なお、BA 及び GA は中国産が最大値を示した。これらについては、今後、他の市販品についても検討する必要がある。
4. ほとんどのセンター産切り花用の 60 品種の PA 及び 10 成分含量は、優良品種とされる薬用種梵天を上回り、また北宰相に匹敵する含量を示す品種も存在した。また、PG 及び MG 含量では薬用種及び市販品より高い値を示すものも多く見られた。このことは今のところセンター産切り花用品種の特徴ともいえる。これらの結果については今後、より詳細な解析の必要がある。

文 献

- 1) (財) 日本特産農産物協会、「薬用作物 (生薬) に関する資料」
- 2) 日本漢方生薬製剤協会「原料生薬使用量等調査報告書—平成 20 年度の使用量」(2011)
- 3) 第十六改正日本薬局方解説書、広川書店 (2011)、D-378
- 4) 田村隆幸、田中彰雄、内 正人、村上守一：シャクヤクの栽培研究—8 年間栽培したシャクヤクの品質について—、富山県薬事研究所年報、37、57-64 (2010)
- 5) 島山好雄、熊谷健夫、香月茂樹、本間尚治郎、石崎昌吾、三浦忠一、沢井清道、山岸 喬、西澤信、林 隆章、姉帯正樹：シャクヤクの栽培・育種に関する研究 (1) 薬用品種「北宰相」の特性について、Natural Medicines、52(2)、103-108(1998)
- 6) 姉帯正樹、佐藤正幸、南取、シャクヤクの試作栽培、道衛研所報、57、61-64 (2007)