

マオウ中の総アルカロイド定量法の検討(第2報)

成 川 一 郎 西 本 初 博
 石 田 裕 子 中 田 るり子
 東亜製薬株式会社 試験研究室*

マオウ中の総アルカロイド定量法¹⁾に関しては、すでに我々が開発した方法(以下 HZ 法と略)につき第1報で解説するとともに、本方法による結果を日本薬局方の定量法(以下 JP 法と略)の結果と比較した。HZ 法はマオウ中の総アルカロイドを定量する方法としてはより優れている。しかし HZ 法を準用して葛根湯の湯液中の総アルカロイドを定量したところ、原生薬マオウ中の総アルカロイド量に比して異常に低い値が得られた。この原因を検索するため、エフェドリンがアルデヒド類と結合しやすいとの報告²⁾に基づき、ケイヒ中のケイヒアルデヒドの影響を想定して実験を行い更に定量法についても再検討した。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

1) 使用生薬並びに漢方処方

Table1. 実験に用いた漢方処方

生薬名	産 地	葛 根 湯	麻 黄 湯
葛 根	中 国	4.0	—
麻 黄	中 国	3.0	5.0
桂 皮	中 国	2.0	4.0
芍 薬	日 本	2.0	—
甘 草	中 国	2.0	1.5
乾 生 姜	中 国	1.0	—
大 棗	中 国	3.0	—
杏 仁	中 国	—	5.0

麻黄中の総アルカロイド量：HZ法 2%、JP法 1.3%

2) 使用薬品

塩酸エフェドリン(日局品)

dl-塩酸メチルエフェドリン(日局品)

ケイヒアルデヒド(和光純薬工業KK製, 和光規格特級)

2. 試 験 方 法

1) 湯液の調製と検液の採取

Fig. 1 の装置を用い、漢方処方6日分の原生薬に20倍量の水を加えて沸騰水浴中で還流

抽出し、経時的に抽出溶液 20 ml^{*}ずつを正確に採取し検液とした。なお、沸騰開始から 240 分後に A 栓を取り除き、開放口に冷却管をつけて蒸発水分を採取した。A 栓の開放はケイヒアルデヒドの揮散による影響をみるためであり、蒸発水分測定は補正のためである。

* 2 回目以降の検液の定量では、さきの検液採取による抽出水量漸減に伴う誤差を計算時に補正した。

2) 湯液中の総アルカロイドの定量法 (HZ 法)¹⁾

検体 20 ml を正確にとり、アンモニアアルカリ性でホモジナイザーを用いてクロロホルム抽出した後クロロホルムを留去し、残留物を内部標準溶液に溶かしてガスクロマトグラフ法により標準溶液と比較定量した。

ガスクロマトグラフの条件

検出器：FID カラム：OV-17 3% 2m

カラム温度：180° 検出器温度：220°

内部標準：フタル酸ジエチル

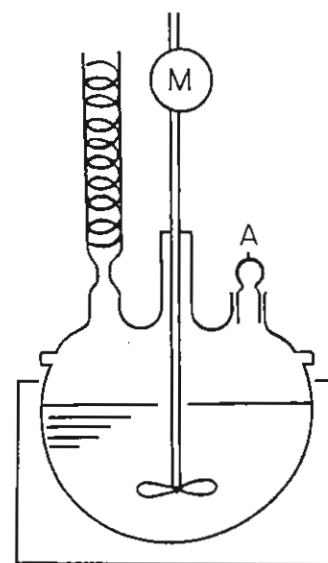


Fig.1, 装置

3. 試験結果

1) 葛根湯湯液のガスクロマトグラフ定量法に対するケイヒの影響

葛根湯に関して次に述べる各試料の湯液を調製し、その抽出過程においてそれぞれ経時的に総アルカロイドを定量した結果を Fig. 2 に示した。

(1) 葛根湯

葛根湯の湯液の総アルカロイド収率は、沸騰開始時約 45%，沸騰開始 180 分後約 80% で最大値となり、それ以後の増減はなかった。

(2) マオウ

マオウの湯液の総アルカロイド収率は、沸騰開始時 80 ~ 90%，沸騰開始 90 分後約 100% となり、それ以後の増減はなかった。

(3) マオウをさきに煎出した後、葛根湯のケイヒを除くその他の生薬を加えた場合

マオウの湯液の沸騰開始 120 分後、葛根湯のケイヒを除くその他の生薬を加えると総アルカロイド収率は 2 ~ 3% 減少し、それ以後の増減はなかった。

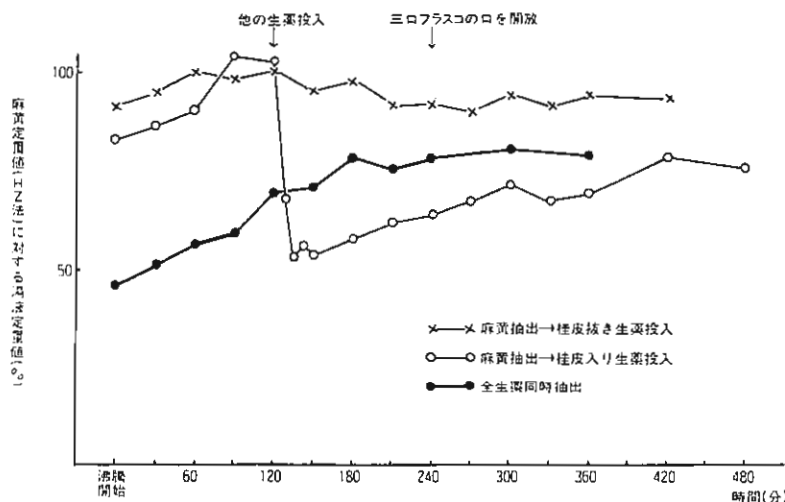


Fig.2, 葛根湯湯液のガスクロマトグラフによる経時的定量

(4) マオウをさきに煎出した後、葛根湯のその他の生薬を加えた場合（傷寒論の煎出方法）

マオウの湯液の沸騰開始 120 分後、葛根湯のその他の生薬を加えると総アルカロイド収率は約 50 % に激減し、その後徐々に増加して葛根湯と同様の値となった。

2) 麻黄湯湯液のガスクロマトグラフ定量値に対するケイヒの影響

麻黄湯に関して次に述べる各試料の湯液を調製し、その抽出過程においてそれぞれ経時的に総アルカロイドを定量した結果を Fig. 3 に示した。

(1) 麻黄湯

麻黄湯の湯液の総アルカロイド収率は、沸騰開始時が約 30 % でその後徐々に増加し、最大値は約 85 % であった。

(2) マオウ

マオウの湯液の総アルカロイド収率は、沸騰開始時 70 ~ 80 %、沸騰開始 90 分後約 97 % となり、それ以後の増減ははなかった。

(3) マオウをさきに煎出した後、麻黄湯のケイヒを除くその他の生薬を加えた場合

マオウの湯液の沸騰開始 120 分後、麻黄湯のケイヒを除くその他の生薬を加えても総アルカロイド収率に変化はみられなかった。

(4) マオウをさきに煎出した後、麻黄湯のその他の生薬を加えた場合（傷寒論の煎出方法）

マオウの湯液の沸騰開始 120 分後、麻黄のその他の生薬を加えると総アルカロイド定量値はほぼ瞬間的に零となりそのままピークは現れなかった。沸騰開始 240 分後に開放抽出に切り替えた後ようやくピークが現れたが、総アルカロイド収率として 4 ~ 5 % に過ぎなかった。

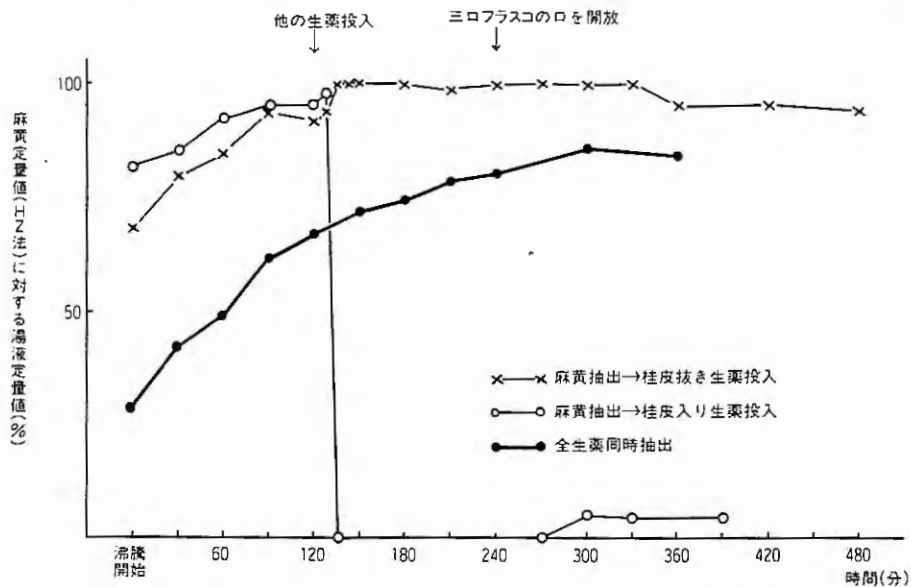


Fig.3. 麻黄湯湯液のガスクロマトグラフによる経時的定量

3) エフェドリン類のガスクロマトグラフ定量値に対するケイヒアルデヒドの影響

塩酸エフェドリン又は *dl*-塩酸メチルエフェドリンの水溶液にケイヒ又はケイヒアルデヒドを加えた場合の経時的定量値については Fig. 4 に示した。

(1) 塩酸エフェドリンにケイヒを加えた場合

0.03 % 塩酸エフェドリン溶液 2 l を煮沸し、これにケイヒ 24 g を加えると定量値はほぼ瞬間的に約 30 % に低下し、後しだいに増加して 60 分後には約 50 % になりそれ以後の増減はなかった。

(2) 塩酸エフェドリンにケイヒアルデヒドを加えた場合

0.03% 塩酸エフェドリン溶液 2 l を煮沸し、これにケイヒアルデヒド 0.6 ml を加えると定量値はほぼ瞬時的に約 15% に低下し、後しだいに増加して 60 分後には約 20% になりそれ以後の増減はなかった。

(3) dl-塩酸メチルエフェドリンにケイヒアルデヒドを加えた場合

0.03% dl-塩酸メチルエフェドリン溶液 2 l を煮沸し、これにケイヒアルデヒド 0.6 ml を加えても定量値に変化はなかった。

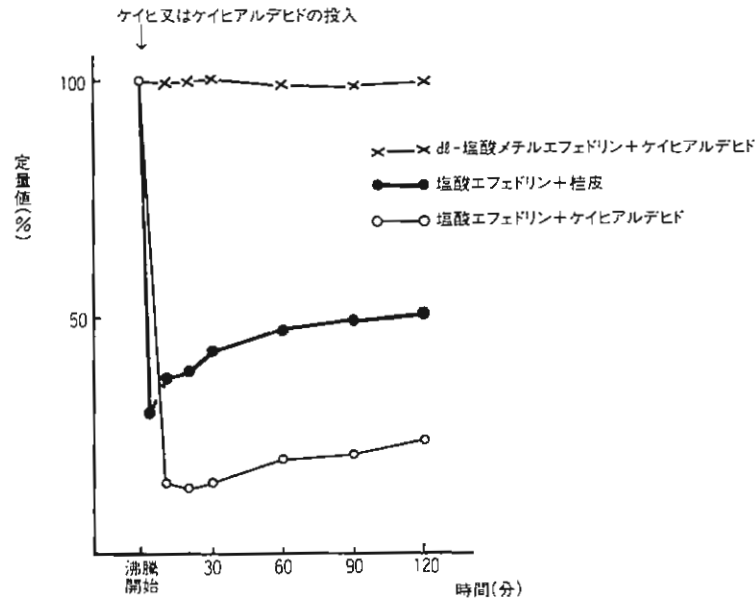


Fig.4, エフェドリン類のガスクロマトグラフ定量値に対するケイヒアルデヒドの影響

4) エフェドリンとケイヒアルデヒドの反応生成物の同定

塩酸エフェドリン溶液にケイヒアルデヒドを加えるとガスクロマトグラフのエフェドリン及びケイヒアルデヒドのピークが縮小又は消滅する一方、これらと別のピークが現れた。マオウの湯液にケイヒを加えた場合も同様のピークが現れ両者の保持時間は一致した。塩酸エフェドリンとケイヒアルデ

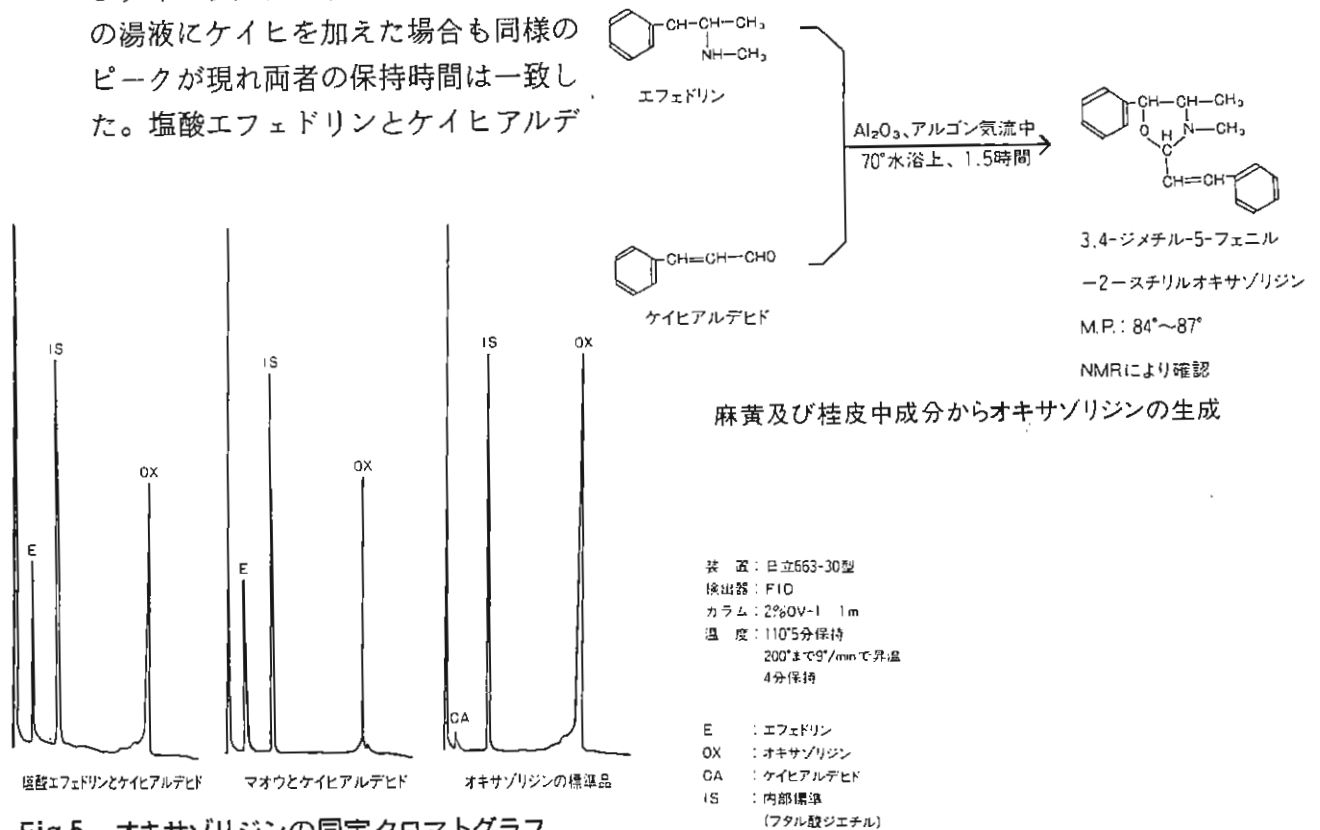


Fig.5, オキサソリジンの同定クロマトグラフ

ヒドを下記の方法で反応させて得た生成物を NMR により 3, 4-ジメチル-5-フェニル-2-スチリルオキサゾリジンと確認し、さきのピークと同定した (Fig. 5)。

5) 定量法の検討

(1) 高速液体クロマトグラフによる定量

マオウとケイヒを含む漢方処方湯液の総アルカロイドを定量する方法として高速液体クロマトグラフ法を採用し下記の条件で実施したところ、3, 4-ジメチル-5-フェニル-2-スチリルオキサゾリジンの生成はみられなかった (Fig. 6)。

高速液体クロマトグラフ法による定量

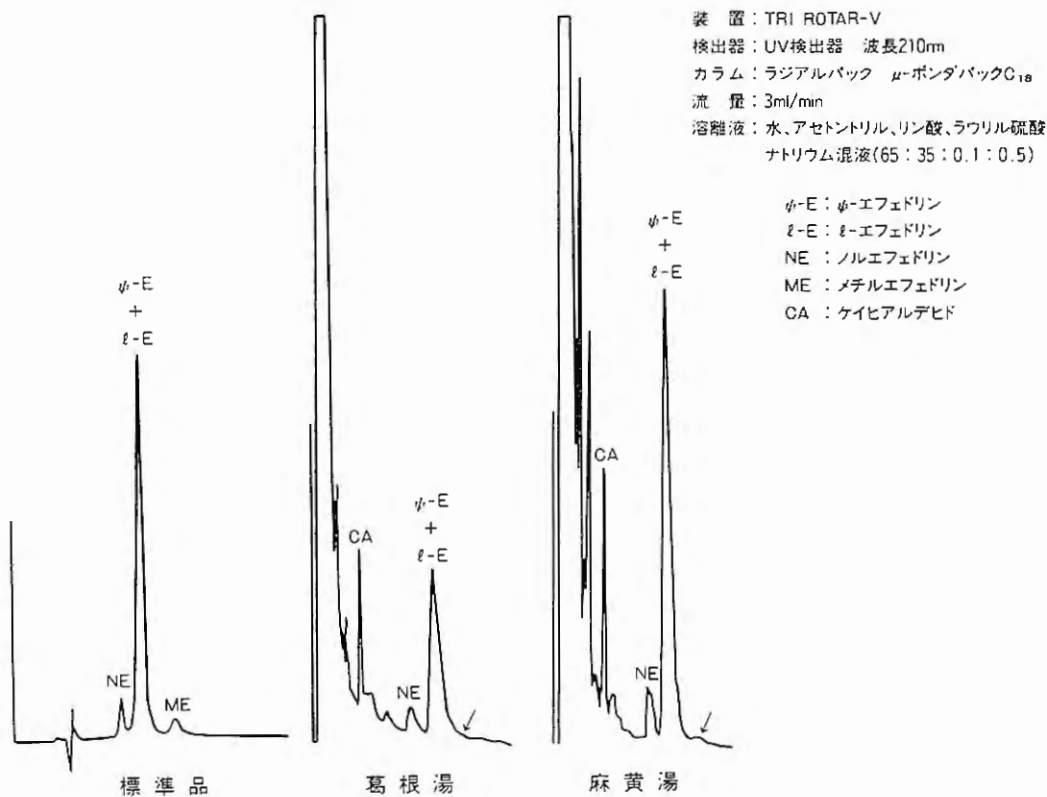
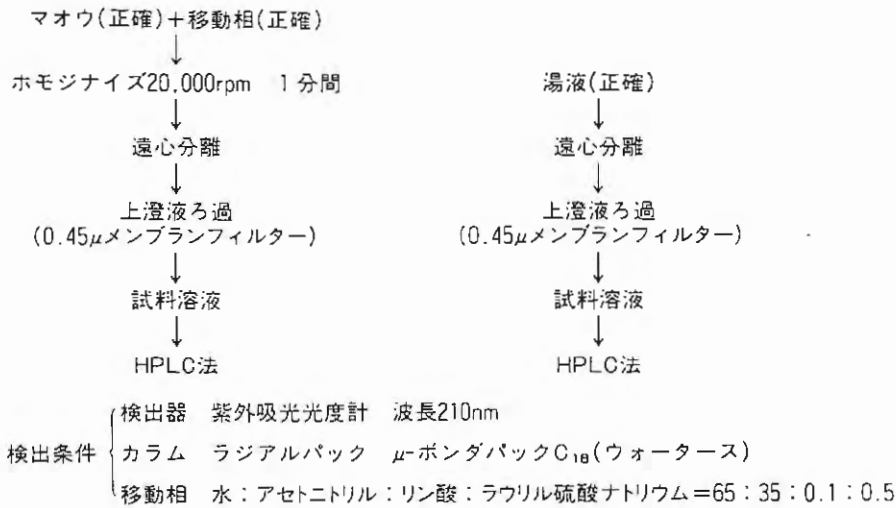


Fig.6, 高速液体クロマトグラフィーによるエフェドリンの分離

(2) 葛根湯湯液の高速液体クロマトグラフによる定量

葛根湯に関してさきにガスクロマトグラフにより実施した場合と同様に経時的に高速液体クロマトグラフにより定量した結果を Fig. 7 に示した。実験結果によればケイヒの影響は認められなかった。

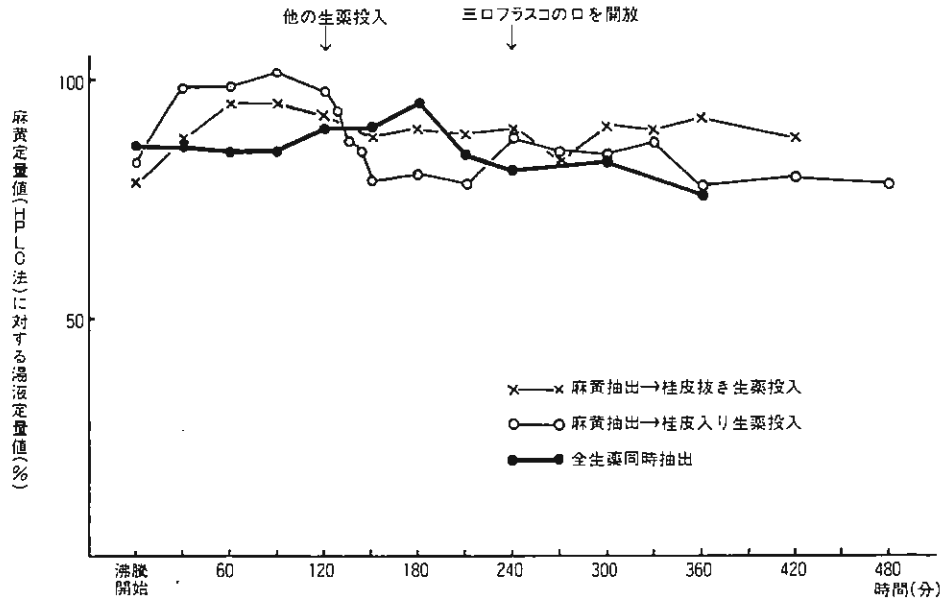


Fig.7, 葛根湯湯液の高速液体クロマトグラフによる経時的定量

(3) 麻黄湯湯液の高速液体クロマトグラフによる定量

麻黄湯に関してさきにガスクロマトグラフにより実施した場合と同様に経時的に高速液体クロマトグラフにより定量した結果を Fig. 8 に示した。実験結果によればケイヒの影響は認められなかった。

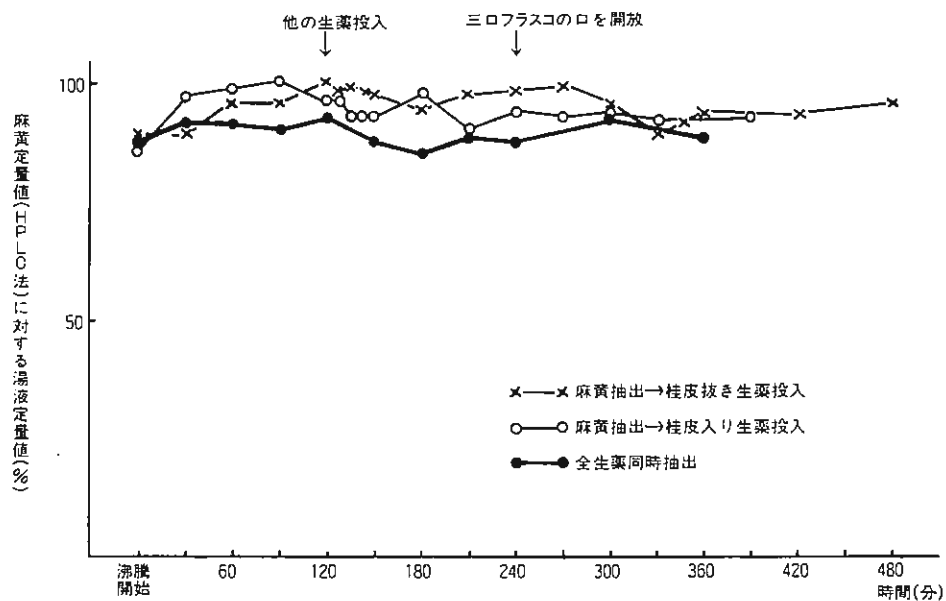


Fig.8, 麻黄湯湯液の高速液体クロマトグラフによる経時的定量

考 察

葛根湯又は麻黄湯の湯液をクロロホルム抽出後ガスクロマトグラフにより定量した場合、湯液から定量に至る過程でエフェドリンとケイヒアルデヒドの結合によるオキサゾリジンの生成が確認された。一方これら湯液につき高速液体クロマトグラフによる定量を行った場合オキサゾリジンの生成は認められず、従ってクロロホルムにより湯液中から同時に抽出されたエフェドリンとケイヒアルデヒドがクロロホルム溶液中で反応してオキサゾリジンになることが判明した。この結果からケイヒ配合の漢方処方並びにその湯液中のエフェドリン定量には前報のガスクロマトグラフによる定量でなく、本報の高速液体クロマトグラフによる方法を採用しなければならない。本報の結果では δ -エフェドリン、 ϕ -エフェドリンが分離していないがこれらの分別定量についてはすでに報告³⁾されている。しかし、高速液体クロマトグラフでは各エフェドリンの分別定量可能という利点がある一方、単に総アルカロイド値を求めたい場合は分別定量後合計しなければならぬという煩雑さがある。また実験によれば乾燥エキスの場合、乾燥工程中でケイヒアルデヒドはほとんど揮散して妨害因子にはならないとの結果を得ている。従って漢方処方の乾燥エキスやマオウの定量には前報のガスクロマトグラフによる方法がより適切である。

これらの実験により生薬中に含まれるその他のアルデヒド類にも同様の反応の可能性が示唆され漢方製剤や生薬製剤中の特定成分の定量においては様々の植物成分の混在条件下であることに留意してその抽出法や検出法を確立しなければならない。

また、傷寒論の煎出方法「先煮麻黄葛根減二升，去白沫，内諸薬，煮取三升」（まず麻黄葛根を煮て二升を減じ白沫を去り諸薬を入れ煮て三升をとり……）については総アルカロイドの煎出に関する限りでは無意味であると判断され、このことは傷寒論の書かれた時代マオウを現代のように細切して用いたとは考えにくく、従って麻黄の煎出に特に時間をかけたとも考えられる。以上の例からみて傷寒論に記述された内容についても現代にそのまま流用すべきかどうかにつき実験的裏付けによって再検討し、漢方を現代薬学の観点からも可能な限り根拠あるものとして確立すべきであると考えらる。

謝 辞

本研究にあたりご指導いただいた富山医科薬科大学金岡又雄助教授、富山県薬事研究所の皆様方に深謝致します。

文 献

- 1) 成川一郎他：マオウ中の総アルカロイド定量法の検討（第1報），家庭薬研究，2，26（1983）
- 2) 坂井進一郎他：麻黄，桂皮，杏仁の主成分間の結合と薬理作用との関連，薬誌，84，(2)，183（1964）
- 3) 岬哲夫他：ペアードイオンクロマトグラフィーによる麻黄及び麻黄配合製剤中のエフェドリンアルカロイドの定量，第10回生薬分析討論会講演要旨（1981）

漢方処方エキス収率と原生薬エキス収率

成 川 一 郎 西 本 初 博
石 田 裕 子 中 田 るり子
東亜製薬株式会社 試験研究室*

昨今、薬学会等において漢方エキス製剤中のエキス量に関する研究発表が行われ、各方面で漢方処方からのエキス収率について検討されている。

我々も第1回の本シンポジウムにおいては、葛根湯を中心に桂枝湯型漢方処方について¹⁾、第2回では、麻黄湯型漢方処方について²⁾、それぞれそのエキス収率及びアルカロイドの溶出量等に関する実験報告を行った。その結果、アルカロイド等の特定成分の研究もさることながら、それ以前の基本的な前提条件として、まず漢方処方や生薬のエキス量を把握することが必要であることを痛感した。即ち、エキス量の把握抜きで、漢方エキス製剤や生薬エキス製剤の品質評価も製剤設計もあり得ないのである。

そこで、今回は配置許可漢方処方、かぜ薬配合漢方処方及び将来配置向として要望の強い漢方処方の合計27処方を選出し、これら処方につき抽出水量10倍量、抽出時間1時間という抽出条件に限定してエキス量を求めた。更にこれら処方を構成する個々の生薬につきそれぞれ同様の条件でエキス量を求め、この値から漢方処方としてのエキス量を算出しさきの実験値と比較した。その結果、2、3の例を除いて実測値と計算値は一致し、その他、第1回及び第2回シンポジウムにおける報告を裏付ける値も得られたので、以下に報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

漢方処方構成生薬を中心に一般市場で入手した生薬の細切品

59品目92種類

上記生薬で構成された漢方処方 27処方

2. 装置及び実験方法

1) 乾 燥 減 量

日本薬局方に準じる。

2) エ キ ス 量

生薬の場合は20g、漢方処方の場合は1日量を基本にして約20gを採取し、10倍量の水を加え下図の装置で各1時間還流煮沸した後布ごしした。ろ液は遠心分離後上澄液をとりエバポレーター(55°)で濃縮後真空乾燥器(60°)で44時間乾燥して乾燥エキスとした。いずれも各2回実施し平均値をエキス量とした。

3. 実 験 結 果

各生薬のエキス収率についてはTable 1に示し、更に10%ごとに大別してTable 2に示した。これによれば概して生薬のロット間のばらつきは小さ



Table1. 和 漢 生 薬 の エ キ ス 収 率

生薬名	210処方 中使用例	産地	乾燥減量(%) ()内J P 値	エキス収率(%) ()内J P 値	生薬名	210処方 中使用例	産地	乾燥減量(%) ()内J P 値	エキス収率(%) ()内J P 値
茴 香	2	ラオス	10 (←)	17 (←)	川 芎	34	日本	9 (←)	21 (←)
延 胡 索	3	中国	12 (←)	14 (←)			日本	10	27
黄 耆	17	韓国	11 (13)	20 (←)			日本	11	22
黄 芩	37	中国	8 (←)	31 (←)			日本	11	30
		中国	11	33	川 骨	1	中国	12 (15)	22 (←)
		中国	11	31	蒼 朮	3	中国	13 (←)	49 (←)
中国	11	31	中国	12			33		
黄 柏	14	日本	12 (9)	20 (←)	大 茴 香	-	中国	12	18
黄 連	19	日本	9 (9)	17 (←)	大 黄	27	中国	10 (13)	34(希30)
葛 根	9	韓国	11 (13)	26 (←)			中国	13	32
滑 石	5	日本	2	0.2			中国	11	31
甘 草	149	新疆	8 (12)	25(希25)	大 棗	66	中国	15 (←)	64 (←)
		東北	10	20	沢 瀉	21	中国	12 (←)	20 (←)
		東北	10	20	熟 地 黄	28	中国	15 (←)	62 (←)
		西北	10	28	竹 節 人 参	-	日本	11 (←)	30(希30)
		西北	10	26	釣 藤 鈎	4	中国	10	14
桔 梗 根	21	中国	14 (←)	63(希25)	猪 苓	8	中国	11 (←)	2 (←)
吉 草 根	-	日本	12 (←)	15 (←)	連 皮	44	日本	13 (13)	38(希30)
杏 仁	12	中国	6 (←)	10 (←)			日本	14	36
前 芥	11	中国	1 (←)	18(希8)			中国	14	37
桂 皮	62	中国	14 (15)	7 (←)	当 帰	56	日本	18 (←)	43(希35)
		ベトナム	14	6			日本	11	46
香 附 子	15	日本	12 (←)	12 (←)			日本	15	48
		日本	12	13	桃 仁	13	中国	5 (←)	19 (←)
		韓国	12	17	人 参	52	韓国	14 (←)	32(希14)
厚 朴	25	日本	6 (←)	10(希12)	薄 荷 葉	12	日本	11 (13)	20 (←)
		中国	12	12	半 夏	47	中国	11 (14)	13 (←)
五 味 子	7	韓国	17 (←)	36 (←)	白 芷	8	中国	12 (←)	40(希25)
柴 胡	32	韓国	12 (←)	13 (←)	白 朮	61	韓国	12 (←)	31 (←)
細 辛	8	韓国	10 (←)	16 (←)	栝 楼 子	4	中国	11 (←)	7 (←)
		中国	16	14	茯 苓	73	韓国	10 (←)	1 (←)
中国	7 (←)	27 (←)	中国	16			3		
山 梔 子	16	台湾	11	32			中国	18	4
山 菜 蓂	3	韓国	22 (←)	44(希35)	芒 硝	5		46	52
		韓国	19	46	防 風	17	中国	13	21(希20)
山 薬	5	中国	12 (14)	9 (←)	杜 丹 皮	15	中国	8 (←)	22 (←)
蘇 葉	9	台湾	11 (13)	12 (←)			中国	10	24
芍 薬	67	中国	13 (←)	26 (←)			日本	11	24
		日本	11	33	杜 蛎	3	日本	1 (←)	1 (←)
		日本	13	25	麻 黄	17	中国	9 (←)	23 (←)
		日本	10	30	木 香	11	中国	14 (←)	58(希17)
縮 砂	12	ラオス	13 (←)	8 (←)	蒼 朮 仁	4	タイ	13 (14)	5 (←)
乾 生 姜	89	台湾	11 (←)	14 (←)	良 姜	2	中国	12	18
		韓国	11	11	連 翹	10	中国	9 (←)	17(希10)
		中国	13	11	升 麻	8	中国	7 (9)	15(希18)
中国	13	11	中国	12			14		
辛 夷	2	中国	6	21	石 膏	13	中国	18 (←)	2 (←)

希：希エタノールエキス

かった。ばらつきが比較的大きいものとしてはエキス量の少ない茯苓，次いで香附子及び蒼朮にもややばらつきがみられた。また東北甘草よりも西北甘草のエキス量はやや多いという傾向がみられたが著明な差ではなかった。エキス量の多いものとしては桔梗根，大棗及び熟地黄がエキス収率 60% を越え，芒硝及び木香は 50～60% であった。猪苓，茯苓等の菌核生薬のほか石膏や牡蛎，薏苡仁はエキス収率 5% 以下と低かった。

Table 2. 生薬のエキス収率集計

エキス収率(%)	生薬数	生薬名
60.1～70.0	3	桔梗根、大棗、熟地黄
50.1～60.0	2	芒硝、木香
40.1～50.0	3	山茱萸、蒼朮、当帰
30.1～40.0	7	黄芩、五味子、大黄、陳皮、人參、白朮、白芷
20.1～30.0	13	黄耆、黄柏、葛根、甘草、山梔子、芍薬、辛夷、川芎、川骨、竹節人參、防風、牡丹皮、麻黄
10.1～20.0	21	茴香、延胡索、黄連、吉草根、黄耆、荊芥、香附子、黄柏、柴胡、細辛、蘇葉、生姜、升麻、大茴香、釣藤鉤、桃仁、半夏、良姜、連翹、沢瀉、薄荷葉
0.1～10.0	12	桂皮、山藥、縮砂、石膏、猪苓、栝榔子、茯苓、牡蛎、薏苡仁、滑石、厚朴、杏仁

以上の生薬エキス収率から，これらで構成された漢方処方²⁾のエキス量を計算によって求め，実際の漢方処方²⁾のエキス収率と比較して Table 3 に示した。更に漢方処方 1 日量のエキス量を 1 g ごとに大別して Table 4 に示し，エキス収率については 5% ごとに大別して Table 5 に示した。これらによれば 1 日分の処方合計量の多い補中益気湯や防風通聖散等はエキス量も多く，処方中にエキス収率の高い生薬が多く含まれている場合はその処方のエキス収率も当然高かった。漢方処方エキス量の計算値と実測値の比較では，桂枝茯苓丸，三黄瀉心湯及び麻杏薏甘湯の 3 例を除きほぼ両者は一致した。

考 察

生薬の中で牡蛎及び鉱物生薬の石膏のエキス収率は抽出水量²⁾に関わるものであり，また山藥，半夏及び薏苡仁等は我々が実験したところによれば抽出時間の延長，抽出水量の増加に伴ってエキス量が増加する。これらの特殊な例を除き植物生薬においては成分的に澱粉，イヌリンあるいは糖分の多いものはエキス量が多いとの結果が得られた。また生薬のエキス収率は数例を除いてほとんどロット間のばらつきがみられないが，これは微量成分は別として澱粉，イヌリン，糖分などの主な溶出成分の含有率が生薬の品種ごとにほぼ一定しておりロット間に大差がないことを示唆している。

生薬のエキス収率から求めた漢方処方²⁾のエキス量の計算値と実験で求めた漢方処方²⁾のエキス量が，3 例を除いてほぼ一致したことにより，今回実測を行わなかった漢方処方や生薬製剤のエキス量も Table 1 に示した生薬のエキス収率から計算によって推計することが可能である。漢方処方や生薬製剤の製剤設計においてはそのエキス量を把握する必要があるからその際の参考値として採用することができる。例えば Table 6 に示したかぜ薬配合可能の漢方処方の中で柴胡桂枝湯については本

Table3. 漢方処方 の エキス量

処 方 名	処 方 量 (g)	1日量中のエキス(g)		実測値/計算値 × 100 (%)	エキスの収率%	
		実測値	計算値		実測値	計算値
安 中 散	14.0	1.5	1.4	107	10.5	9.8
黄 連 解 毒 湯	8.0	2.3	2.0	115	28.5	25.3
◎葛 根 湯	17.0	4.7	5.0	94	27.9	29.1
◎葛根湯加川芎辛夷	23.3	6.3	6.4	98	27.0	27.3
桂 枝 湯	15.0	4.5	4.5	100	30.1	30.0
桂枝加朮附湯	19.0	6.8	6.5	105	35.6	34.0
桂枝茯苓丸	20.0	2.0	2.9	69	9.8	14.7
香 蘇 散	9.5	2.1	1.9	111	22.2	20.1
香 蘇 散	11.0	2.4	2.2	109	21.8	20.2
五 苓 散	16.5	2.5	2.5	100	14.8	15.3
柴胡桂枝湯	22.5	5.4	5.2	104	24.0	23.0
三 黄 瀉 心 湯	3.0	0.6	0.8	75	20.0	27.3
小 建 中 湯	17.0	5.6	5.0	112	32.9	29.5
◎小 柴 胡 湯	24.0	6.3	6.0	105	26.2	25.1
◎小 青 竜 湯	27.0	5.2	5.2	100	19.3	19.2
◎大 黄 甘 草 湯	5.0	1.6	1.6	100	31.6	32.0
桃核承気湯	15.5	3.7	3.6	103	23.7	23.2
当 帰 芍 薬 散	22.0	5.5	5.8	95	24.9	26.1
八 味 地 黄 丸	21.0	6.1	6.0	102	29.1	28.8
◎平 胃 散	13.5	5.0	5.0	100	36.7	37.0
防 風 通 聖 散	27.1	7.5	6.9	109	27.7	25.5
補 中 益 気 湯	22.5	8.1	8.1	100	35.9	35.8
麻 黄 湯	15.5	2.0	2.3	87	13.1	14.7
◎麻 杏 甘 石 湯	20.0	2.4	2.1	114	11.9	10.3
◎麻 杏 薤 甘 湯	19.0	1.7	2.2	77	8.7	11.5
抑 肝 散	20.5	4.9	5.0	98	23.7	24.2
◎葱 豉 仁 湯	28.0	5.7	6.5	88	20.4	23.0

◎印 配置許可処方

Table4. 漢方処方 1日量から得られるエキス量

エキス量(g)	処方数	処 方 名 ()内は処方1日量(g)
8.1~9.0	1	補中益気湯(22.5)
7.1~8.0	1	防風通聖散(27.1)
6.1~7.0	4	葛根湯加川芎辛夷(23.3)、桂枝加朮附湯(19.0)、小柴胡湯(24.0)、 八味地黄丸(21.0)
5.1~6.0	5	柴胡桂枝湯(22.5)、小建中湯(17.0)、小青竜湯(27.0)、当帰芍薬散(22.0)、 葱豉仁湯(28.0)
4.1~5.0	4	葛根湯(17.0)、桂枝湯(15.0)、平胃散(13.5)、抑肝散(20.5)
3.1~4.0	1	桃核承気湯(15.5)
2.1~3.0	6	黄連解毒湯(8.0)、香蘇散(9.5)、香蘇散(11.0)、五苓散(16.5)、 麻黄湯(15.5)、麻杏甘石湯(20.0)
1.1~2.0	4	安中散(14.0)、桂枝茯苓丸(20.0)、大黄甘草湯(5.0)、麻杏薤甘湯(19.0)
0.1~1.0	1	三黄瀉心湯(3.0)

Table5. 漢方処方エキス収率集計

エキス収率 (%)	処方数	処 方 名
35.1~40.0	3	桂枝加朮附湯、平胃散、補中益気湯
30.1~35.0	3	桂枝湯、小建中湯、大黃甘草湯
25.1~30.0	6	黄連解毒湯、葛根湯、葛根湯加川芎辛夷、小柴胡湯、八味地黄丸、防風通聖散
20.1~25.0	6	香蘇散、柴胡桂枝湯、桃核承気湯、当帰芍薬散、抑肝散、薏苡仁湯
15.1~20.0	2	三黄瀉心湯、小青竜湯
10.1~15.0	4	安中散、五苓散、麻黄湯、麻杏甘石湯
5.1~10.0	2	桂枝茯苓丸、麻杏薏甘湯

報中の柴胡桂枝湯と処方量が異なるので実測値がない。そこで生薬のエキス収率から計算によってエキス量 5.28g を求め更にかぜ薬配合可能な量 1.06 ~ 2.64g を求めて、かぜ薬に配合する場合 1 日量中に少なくとも 1.06g 程度の柴胡桂枝湯乾燥エキスを加えねばならないことが推測できるのである。計算値と実測値が一致しなかった 3 例中桂枝茯苓丸は桃仁が原因と考えられる。即ち桃仁は多量の油分のため生薬の場合と漢方処方に配合された場合とでは乾燥度が異なる。麻杏薏甘湯には抽出水量や抽出時間によってエキス量が増減する薏苡仁が配合されており、三黄瀉心湯の場合は野口らの報告にもあるように大黃と黄連中の成分によって沈殿が生じた。我々は実験の正確さを期すために、湯液を熱時布でろ過しろ液を遠心分離して上澄液を採取したためこの沈殿物が除かれる結果となりそのためエキス量の実測値が減少した。

Table6. 製 剤 設 計 の 例

かぜ薬への漢方処方の配合分量は 1 日最大分量の $\frac{1}{5}$ 以上 $\frac{1}{2}$ 未満

処 方 名	1 日最大分量 (g)	収 率 (%)	乾燥エキス (g)	乾燥エキスの配合分量 (g) $\frac{1}{5} \sim \frac{1}{2}$
葛 根 湯	25	実 25	6.25	1.25 ~ 3.12
桂 枝 湯	15	実 30	4.50	0.90 ~ 2.25
香 蘇 散	11	実 22	2.42	0.48 ~ 1.21
柴 胡 桂 枝 湯	24	計 22	5.28	1.06 ~ 2.64
小 柴 胡 湯	24	実 26	6.24	1.25 ~ 3.12
小 青 龍 湯	24	計 19	4.56	0.91 ~ 2.28
麻 黄 湯	13	計 16	2.08	0.42 ~ 1.04
半 夏 厚 朴 湯	16	計 9	1.44	0.29 ~ 0.72

計：計算値 実：実測値

我々が第 1 回及び第 2 回の本シンポジウムにおいて報告した各抽出条件下における漢方処方のエキス収率を集計して Table 7 に示したが、今回の実験結果もほぼこの範囲内であった。このこともまた生薬のロット間にエキス収率の差が少ないことを示している。従ってこれらの生薬で構成された漢方処方のエキス収率にも、抽出条件による多少の増減はあるとしても、最大値が最小値の 2 倍

を越えるような大差はないことが裏付けられた。

Table7, 漢方処方エキス収率比較

処 方 名	前回までの実験結果			今回の実験結果		
	抽出水量 (倍数)	抽出時間 (時間)	収 率 (%)	抽出水量 (倍数)	抽出時間 (時間)	収 率 (%)
葛 根 湯	6~30	0.5~2	25~33	10	1	27.9
小 青 竜 湯	10~20	1~2	18~25	10	1	19.3
麻 杏 薏 甘 湯	10~20	1~2	10~14	10	1	8.7
麻 杏 甘 石 湯	10~20	1~2	10~15	10	1	11.9

各方面において発表されている漢方製剤や生薬製剤中のアルカロイド等微量成分に関する実験報告の中にも前提条件としての製剤中のエキスの量を見受けられる。これらの報告においては多くの場合生薬の産地等による差異のみで片付けられているが、製剤に使用されたエキスそのものの把握なしには製剤中の微量成分の含有量等について論じることは意味のないことと考える。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導いただいた富山医科薬科大学 吉崎正雄助教授、国立衛生試験所生薬部野口衛先生に深謝致します。

文 献

- 1) 成川一郎他：漢方処方の抽出条件とエキス量（第1報），家庭薬研究，1，24（1982）
- 2) 成川一郎他：漢方処方の抽出条件とエキス量（第2報），家庭薬研究，2，34（1983）
- 3) 野口 衛他：漢方湯液中における黄連と大連および甘草の反応に関する研究，昭和50年度厚生科学研究報告，1976，p. 1

動物胆中の総胆汁酸の簡易定量法について (第2報)

松田久司
 (株) 廣貫堂 研究所*

第1報¹⁾において、著者は dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 法を応用した動物胆中の総胆汁酸簡易定量法を確立し、一応の成果を報告した。しかし、製剤への応用については、前処理操作が煩雑なことや定量値が他の配合成分によって影響され易いなど問題点が残されていた。

近年、 3α -hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD) という酵素を利用した胆汁酸の定量法が種々報告され、血清中の胆汁酸分析や 3α -HSD 固定化酵素カラムを検出系とした高速液体クロマトグラフ法により、動物胆中の胆汁酸組成の分析に成果を上げている。そこで今回は該酵素反応の応用による検討の結果、真重の方法を適用することにより、動物の種類を問わず胆汁中の胆汁酸類について、従来法より簡易迅速に定量できた。さらに該動物胆を原料とした製剤への応用についても、前処理法を簡易化でき且つ配合成分の影響が少なく、回収率や再現性に満足すべき結果を得たので報告する。

測定原理

胆汁酸はステロイド骨格の3位に α 配位の水酸基をもつが、 3α -HSD はこの水酸基と特異的に反応する。さらにこの反応に diaphorase 反応を共役させ、生成した resorfin のけい光を測定することにより胆汁酸量を求める (Fig. 1)。

実験の部

1. 試薬及び試液

glycocholic acid [Sigma, Grad. 乾乾燥 (減圧, P_2O_5 , 24時間) 後使用], 3α -HSD (Nyegaard & Co. A/S, sterognost- 3α の酵素剤を使用), diaphorase (Sigma, type II-L), β -NAD (Baehringer mannheim, Grad. I, 100%), resazurin Na (半井化学), 1N NaOH (和光純薬), tris (hydroxymethyl) aminomethane (和光純薬), 塩酸 (局方),

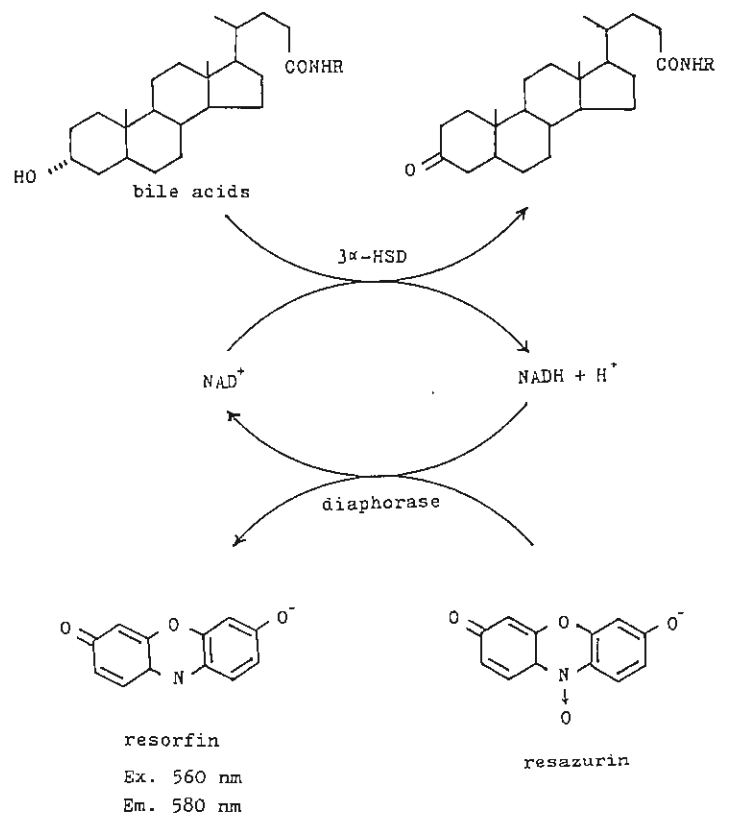


Fig.1, 測定原理

メチルセロソルブ (和光純薬)

酵素液及びブランク酵素液は文献に従い調製した (Table 1)。

Table1. 酵素及びブランク酵素液の調製法

試 液	調 製 方 法	酵 素 液	ブランク酵素液
3 α - HSD 溶液	0.1 M トリス緩衝液 (pH9.0) に用時溶解し, 0.05 U/mlとする。	3 ml	—
トリス緩衝液	pH9.0, 0.1M	—	3 ml
NAD 溶液	β - NAD を 0.1 M トリス緩衝液に用時溶解し, 5 μ m l/mlとする。	3 ml	3 ml
diaphorase 溶液	0.05 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し 2.5 U/mlとする。 凍結保存	3 ml	3 ml
resazurin 溶液	メチルセロソルブに溶解し, 200 μ m l/lとする。 冷蔵保存 (1 カ月)	3 ml	3 ml

2. 装 置

分光けい光々度計 (日立製作所, 204 - S 型)

3. 標準溶液

glycocholic acid (GC) を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 9.0) に溶かし, 20 ~ 100 μ mol/l の濃度とした。

4. 反応操作

文献に準じ, けい光強度 ΔF を求めた (Table 2)。

Table2. 反 応 操 作 (ml)

	A	B	C	D
試 料 溶 液	0.2	0.2	—	—
トリス緩衝液	—	—	0.2	0.2
“	5.0	5.0	5.0	5.0
酵 素 液	0.8	—	0.8	—
ブランク酵素液	—	0.8	—	0.8
	20°C, 40 min			
反 応 停 止 液 1 N NaOH	0.2	0.2	0.2	0.2
けい光測定 Ex. 560 nm Em. 580 nm	Fa	Fb	Fc	Fd

$$\Delta F = (Fa - Fc) - (Fb - Fd)$$

すなわち、試料溶液に酵素液を反応させて測定した F_a から、試料溶液自身がつけい光や diaphorase 系に反応する成分による正誤差を除くために F_b を求め、さらに試液自身がつけい光を除くため F_c 及び F_d を求める。

したがって胆汁酸由来のけい光強度 ΔF は次式により得られる。

$$\Delta F = (F_a - F_c) - (F_b - F_d)$$

5. 励起及びけい光スペクトル

標準溶液 (GC, $50 \mu\text{mol}/\ell$) の反応液 A 及び B の励起及びけい光スペクトルを Fig. 2 に示した。薬剤の多くは短波長にけい光を有するが、本法は長波長 (Ex. 560 nm, Em. 580 nm) で測定するため、ベルベリンなどによる影響は少ない。

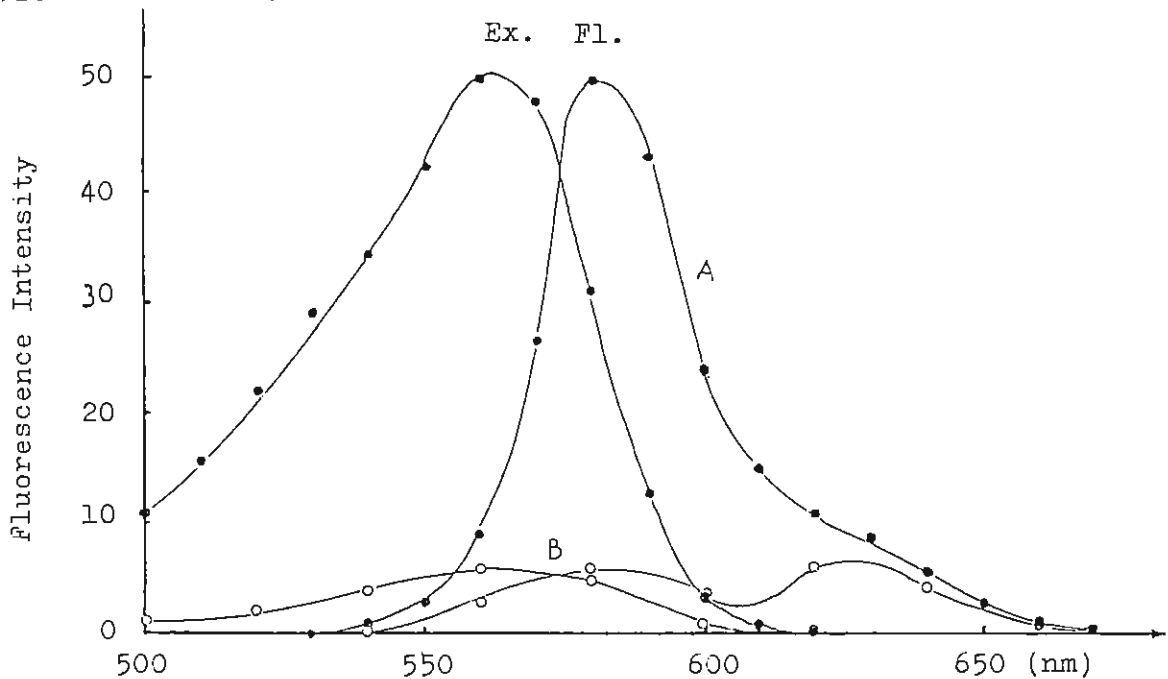


Fig. 2, 励起及びけい光スペクトル (試料: GC $50 \mu\text{mol}/\ell$)

6. 反応時間及び反応温度の設定

反応温度は低い程 ΔF は大きいが、反応終了までに時間を要することから (Fig. 3, Fig. 4),

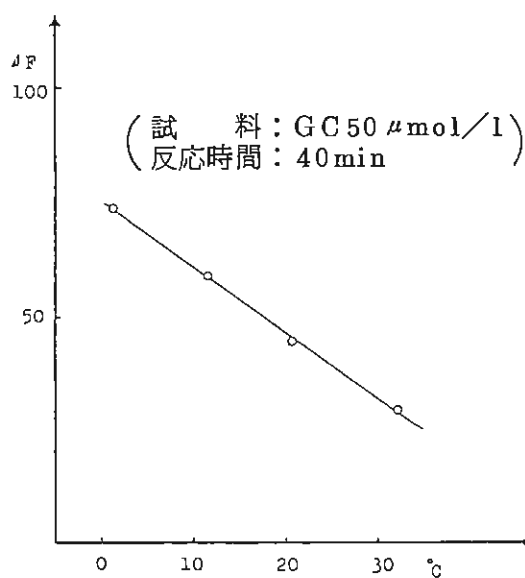


Fig. 3, 反応温度とけい光強度

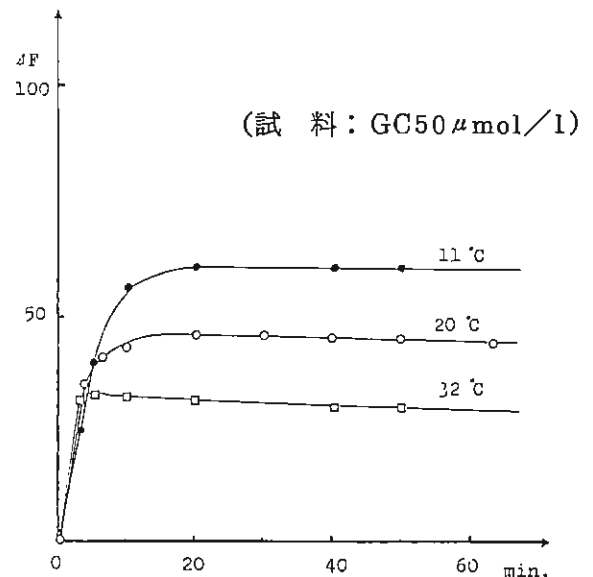


Fig. 4, 反応時間とけい光強度

3)
反応速度の遅い胆汁酸のことを考え、条件を 20°C, 40 min. に設定した。なお、反応中の温度変化は再現性に大きく影響するため、20° ± 0.5° の水浴中で反応させた。

7. 検量線

GC 80 $\mu\text{mol}/\text{l}$ まで直線性を示した (Fig. 5)。

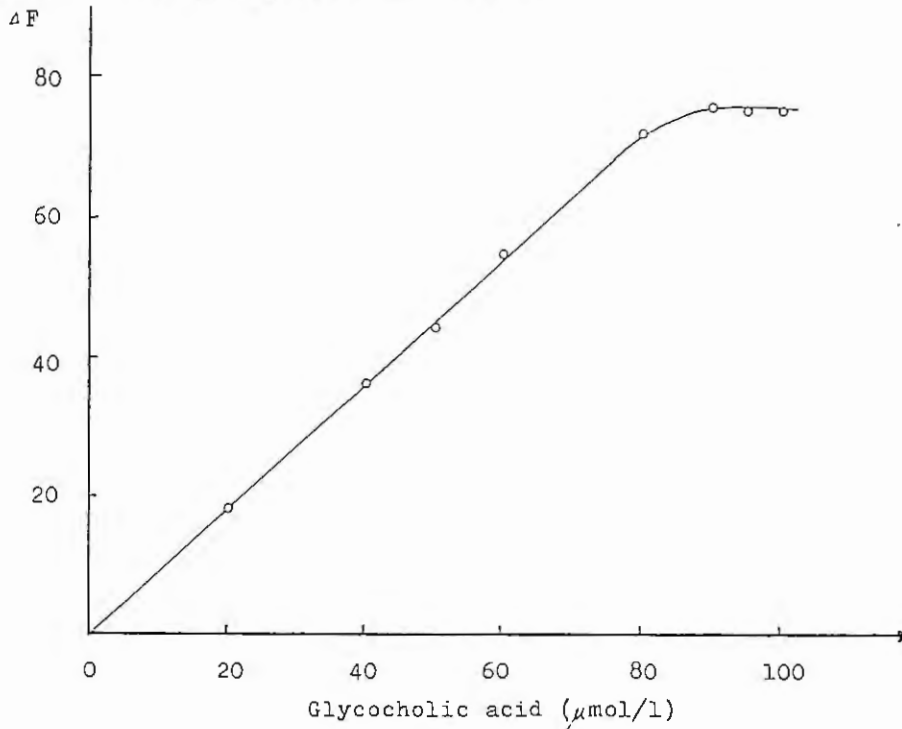


Fig.5. 検量線

8. 試料溶液の調製

動物胆及び牛黄は市販品を用いた。

動物胆 (60 ~ 80mg) を精密に量り、0.1 M トリス緩衝液 70 ml を加え、90 ~ 100° の水浴中で約 30 分間加熱することにより、残存酵素の失活及び胆汁酸の抽出を行う。冷後トリス緩衝液を加え、正確に 100 ml とする。次いで必要ならば遠心分離もしくはメンブランフィルターにてろ過後、20 倍に希釈し、試料溶液とする。ただし牛黄は 4 倍希釈とした。

9. 動物胆の総胆汁酸定量値及びその再現性

定量値は牛胆、豚胆及び熊胆で 1.5 mmol/g 程度、牛黄では 0.3 mmol/g 程度であり、ロット間で大きな変化は見られなかった。再現性については、同時測定の場合変動係数 (C.V.) は 1 % 以下であったが、隔日測定の場合 2 ~ 6 % とややバラツキがみられた (Table 3)。

10. 製剤への応用

モデル処方 (Table 4) として、各種生薬を配合した製剤 (test) を作成し、同時に動物胆を除いたブランク製剤 (blank) についても測定した。

試料溶液の調製は、先の動物胆と同様操作とした。ただし試料採取量は、動物胆として 3 ~ 4 mg 相当量を量り、希釈は行わなかった。

定量結果は、原料からの回収率約 95 %、隔日測定の変動係数 2.7 % と良好であった (Table 5)。

11. 妨害成分について

本定量法に正誤差もしくは反応阻害が認められる生薬を Table 6 に示した。各生薬と牛胆 (総胆汁酸量 1.62 mmol/g) をそれぞれの割合で配合し、定量を行い、原料の回収率を求めた。

ジャコウ及びニンジン配合した場合、正誤差を与えるが、ジャコウについては、反応前に試料溶液を 5 倍量の Hexane · Ether (1 : 1) 混液で洗浄することにより解決された。センソは、

本定量法に大きな妨害を与えるが、通常の配合量では、センソの量は1日数mg程度であり、実用上問題にならないと考えられる。

Table3. 動物胆の総胆汁酸定量値

動物胆	定量値 (mmol/g)	再現性 (C.V. (%))	
		同時測定	隔日測定
牛胆	1.62	0.2 (n = 3)	3.4 (n = 6)
	1.55		
	1.48		
	1.13*		
豚胆	1.48	0.5 (n = 3)	5.8 (n = 7)
	1.47		
	1.56		
	1.39		
熊胆	1.42	0.2 (n = 3)	1.9 (n = 4)
	1.65		
牛黄	0.26	0.6 (n = 3)	5.1 (n = 5)
	0.32		

* 稠厚牛胆, 乾燥減量 22.1% (1g, 105°, 5時間)

Table4. モデル処方

成分名	test	blank
ボレイ末	1,600	1,600
ゲンノショウコ末	400	400
ケイヒ末	250	250
センブリ末	25	25
ダイオウ末	50	50
トウヒ	500	500
リュウタン末	50	50
オウバク末	150	150
牛胆(稠厚)	200	—
乳糖	適量	適量
合計	3,300	3,300

(mg)

Table5. モデル製剤中の総胆汁酸定量値

	総胆汁酸量 (1日処方中)	原料の回収率	再現性
原料牛胆	236 μ mol (1.18 mmol/g)	—	
test	227 μ mol	96.2 %	同時測定 C.V.=0.1% (n=3) 隔日測定 C.V.=2.7% (n=3)
blank	1.6 μ mol		

Table6. 妨害成分について

成分	成分：牛胆	前処理	原料の回収率 (%)	備考
ジャコウ	50 : 1	Hexane.Et ₂ O (1:1) 抽出	152.1	
	50 : 1		96.4	
	50 : 1		124.4	
	10 : 1		103.6	
ニンジン末	5 : 1		103.4	
	2.5 : 1		102.6	
	50 : 1		46.2	反応阻害
センソ末	10 : 1		81.2	
	5 : 1		88.5	
	2.5 : 1		95.1	

結 論

本法は、ステロイド骨格の3位の α 配位の水酸基との特異的な反応をけい光測定 (Ex. 560nm, Em. 580 nm) するものである。種々の実験結果からも本法は従来法と比較して加水分解や分画操作などの煩雑な前処理が省略でき、その上高感度である利点があった。それからも胆汁配合製剤について一部ニンジンを除き、種々の生薬配合成分に影響されずに定量できることが分った。しかも本法は特別な機器類を必要としないことから、今後、各種動物胆の品質評価や、製剤の品質管理などに、実用価値の高い定量法として期待される。

なお、現在、ニンジンなど本法の妨害成分についてその除去法を検討中である。

謝 辞

本研究に際し、種々協力していただいた本社研究開発部及び品質管理部の諸氏に感謝します。

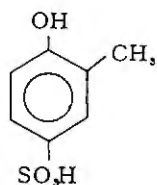
文 献

- 1) 松田久司：家庭薬研究, No. 2, 63 (1983)
- 2) 武良哲雄他：医学のあゆみ, 115, 331 (1980)
- 3) 真重文子：臨床病理, 29, 433 (1981)
- 4) 難波恒雄他：薬誌, 102, 760 (1982)
- 5) 江尻千鶴子他：薬事研究所所報 (1979. 4 ~ 1981. 3)

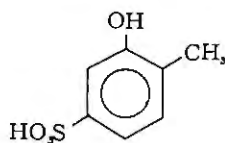
高速液体クロマトグラフ法によるグアヤ コールスルホン酸カリウムの定量

寺崎正之 松嶋町子
吉田由美子
中新薬業株式会社*

グアヤコールスルホン酸カリウム potassium guaiacol sulfonate (以下 PGS と略) は 1881 年にはじめて製造され、1898 年にその効力が試験されて以来、約 85 年間使用されており、第六改正日本薬局方にも収載されたことのある去痰薬である。その製法は一般にグアヤコールをスルホン化した後、硫酸バリウムで中和し、可溶性バリウム塩を炭酸カリウムにて交換分解し、アルコールで再結晶しているが、この方法ではグアヤコール-4 スルホン酸カリウム potassium guaiacol-4-sulfonate (PG4S) 及びグアヤコール-5 スルホン酸カリウム potassium guaiacol-5-sulfonate (PG5S) が生成し、両者の比率は反応条件によって変動する。¹⁾



(PG4S)



(PG5S)

目 的

PGS 配合剤の標準的定量法としては、従来より亜硝酸法による比色法が採用されているが、この方法では異性体の混合比を知ることができず、またイオン交換樹脂を用いる煩雑さもある。²⁾ 著者らはこれらの点を解決するため、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いて製剤中の PGS の定量操作を迅速簡便化し、定量精度の向上を図り、市販原料の PGS 及び PGS 製剤数品目の中の PG4S と PG5S の比を求め、PGS の製剤原料としての実態を追求し、受入原料としての品質規格を設定するために実験を行った。³⁾⁴⁾⁵⁾ その結果、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料及び試験方法

1) 試 料

原料 PGS については 3 社 8 検体 (A 社 5 検体, B 社 2 検体, C 社 1 検体), PGS 配合剤については自社製品 2 品目 (製品 A, B), 他社製品 5 社 9 品目 (O 社 3 品目, P 社 2 品目, Q 社 2 品目, R 社 S 社各 1 品目) を試料とした。

製品 A は 1 包量 1,200 mg 中 PGS 60 mg 含有,

製品 B は 1 包量 1,000 mg 中 PGS 90 mg 含有する。

2) HPLC の条件

装置— Waters 社製 204 型にデータモジュールを接続し、カラムは Waters 社製 Radial pak μ -Bondapak C₁₈ (ϕ 8 mm \times 10 cm) を使用した。移動相は検討の結果、アセトニトリル—0.3%テトラブチルアンモニウム (10 : 90), pH5.0 とし、流速は 3.0 ml/min, 検出波長は 280 nm, カラム温度は室温とした。

3) 検量線

2) の条件下でフェノールを内部標準として検量線を求めた結果、(Fig. 1) のごとき原点を通る良好な直線が得られた。また、同条件でアセトアミノフェン (PA), 無水カフェイン (Caf), リボフラビン (B₂) の検量線を求めた結果 PGS と同様に原点を通る直線 Fig. 2 が得られた。

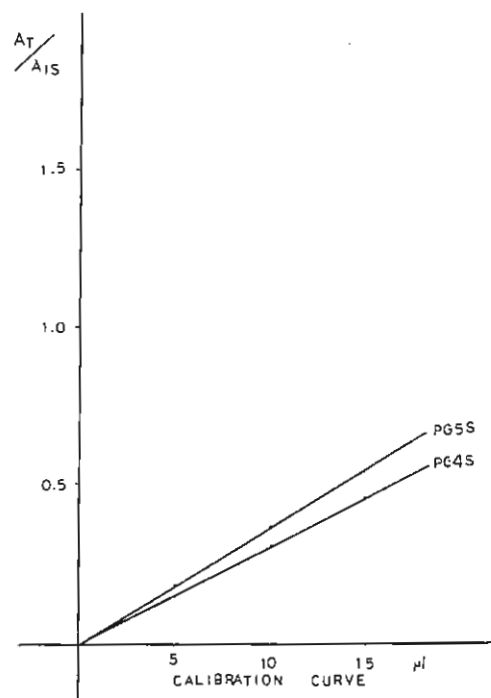


Fig.1,

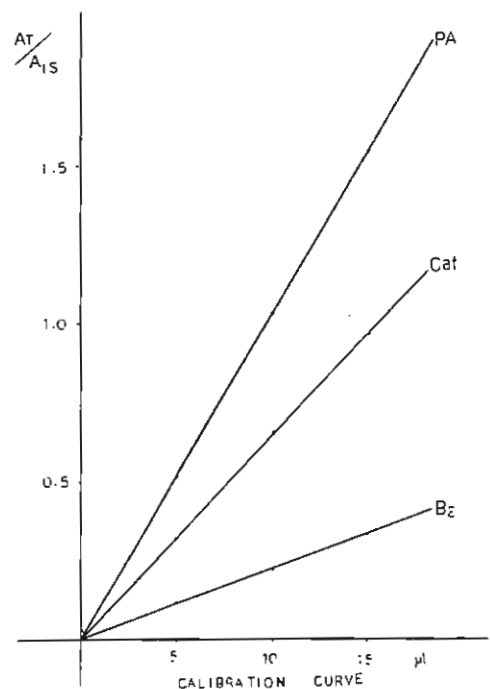


Fig.2,

4) 定量方法

PGS 60 mg に対応する試料を正確に量りとり、50%メタノールに溶かした後、内部標準溶液 (フェノール 1 g を 50%メタノールに溶かし 100 ml とする。) 10 ml を加え正確に 100 ml とするこの液をマイクロフィルターにてろ過し、ろ液を試料溶液 (T) とする。試料溶液 (T) の 5 μ l を HPLC に注入し、得られるピーク面積値より PG 4 S 及び PG 5 S の含有率を算出する。

2. 結果

1) 本試験法により、Fig. 3 に見られるごとく、PGS の両異性体及び他成分 (ビタミン B₁ B₂ アセトアミノフェン, 無水カフェイン, エテンザミド, プセチン) を同時に、迅速かつ簡便に分離することができた。

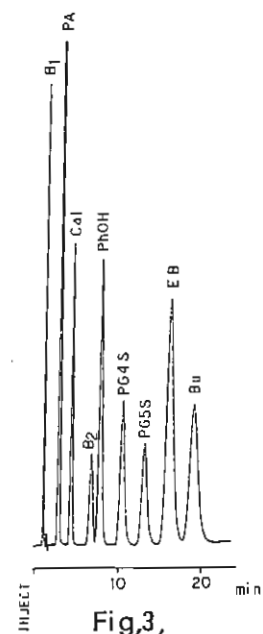


Fig.3,

- 2) 過去に市販されていた PGS は 4S 体と 5S 体の混合比が様々であったが、現在、市販されている PGS はほとんど 4S 体 100% であった。しかし、原料メーカーによっては僅かの 5S 体を含むものがある (Table 1)。
- 3) 他社の PGS 配合製品について同様に調べた結果、上記 2) を裏付ける値が得られた (Table 2)。

Table 1. (%)

Company	Lot	PG4S	PG5S
A	a	100.0	0.0
"	b	91.9	8.1
"	c	84.7	15.3
"	d	56.9	43.1
B	e	100.0	0.0
"	f	21.7	78.3
C	g	95.0	5.0

Table 2. (%)

Company	Preparation	PG4S	PG5S
O	a	96.4	3.6
"	b	98.6	1.4
"	c	96.1	3.9
P	d	100.0	0.0
"	e	98.8	1.2
Q	f	98.1	1.9
"	g	99.0	1.0
R	h	98.3	1.7
S	i	100.0	0.0

- 4) 従来、PGS は 2 種の異性体混合物とされていたが、自社製品の参考品 (保存サンプル) を定量試験した結果、昭和 55 年後半以降は 4S 体だけの供給がなされていたことが判明した (Fig. 4, 5)。

Preparation A

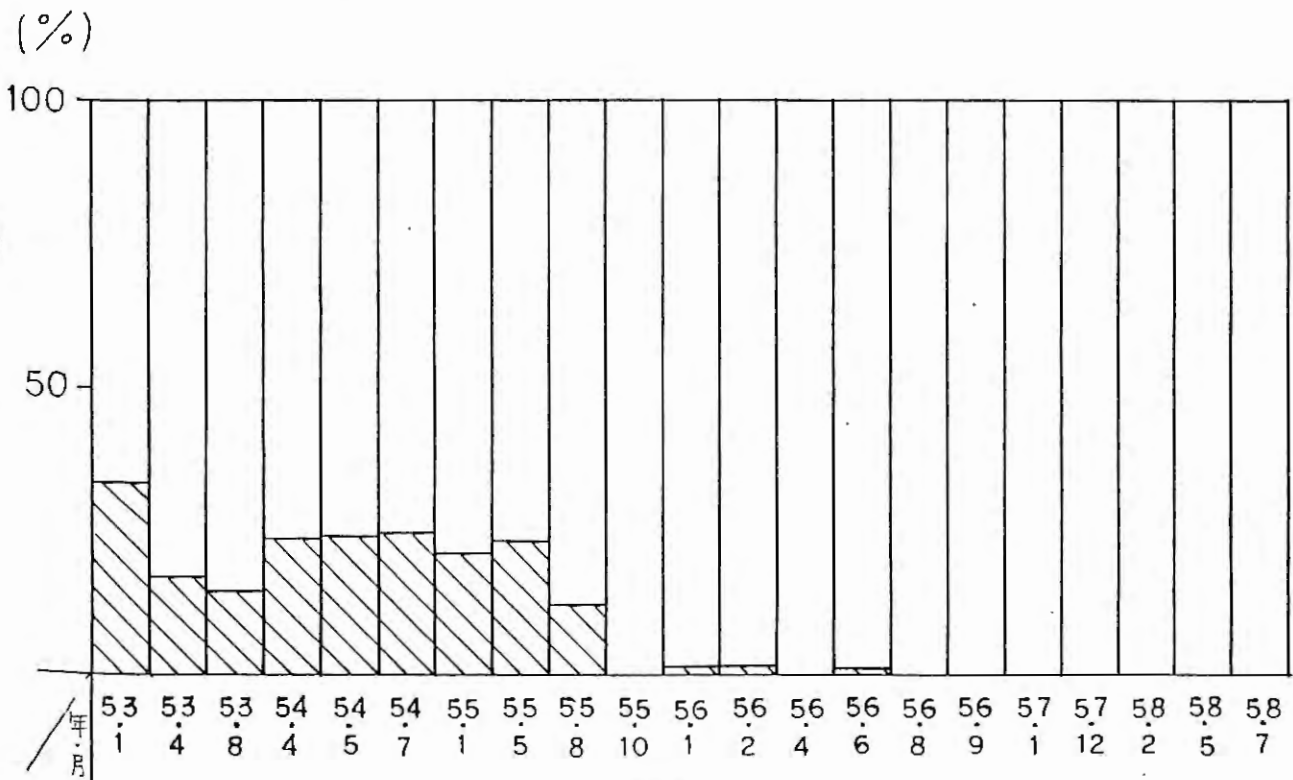


Fig. 4,

3. 考察及び結論

PGS のバルク GMP の観点からすれば、現在、4S 体 100 % 原料が供給されていることは望ましいことと思われるが、バイオアベラビリティーの観点からすれば、両異性体に薬効の差があるか否かは興味深いものがあり、今後、検討の余地があると考え

る。
なお、従来のグアヤコールスルホン酸カリウムの記述は、グアヤコール-4-スルホン酸カリウムに改められることを提言する。

文 献

- 1) “第六改正日本薬局方註解” 日本公定書協会編，南江堂，東京 1951 年
- 2) 井上哲男：医薬品研究：3 (4)，408 (1972)
- 3) V.D.Gupta：J. Phar. Sci. 68，118 (1979)
- 4) 立沢政義他：日本薬学会第 100 年会講演要旨集 556 (1980)
- 5) 半田光一他：日本薬学会第 102 年会講演要旨集 319 (1982)

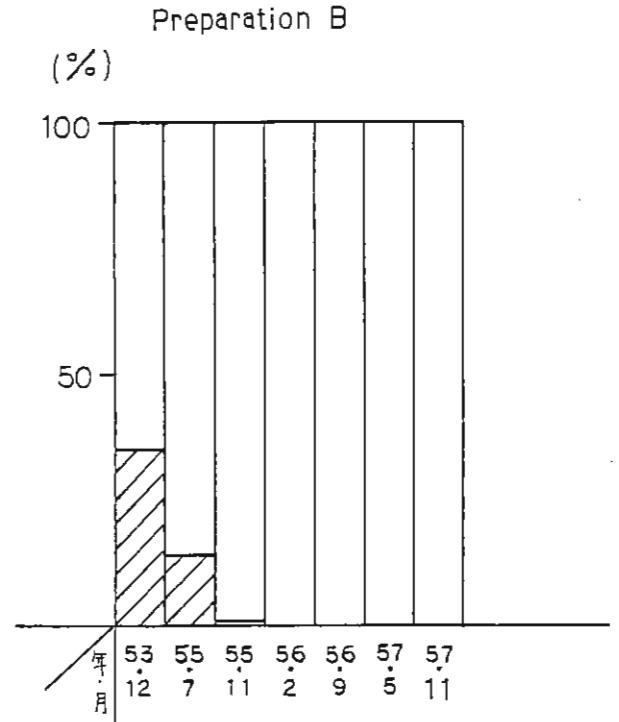


Fig. 5.

高速液体クロマトグラフ法による製剤中の アリルイソプロピルアセチル尿素の定量

小鍛治 まち子

テイカ製薬株式会社 品質管理部*

解熱鎮痛薬に配合されるアリルイソプロピルアセチル尿素（以下APと略す）は、現在、定量法としてジメチルグリオキシム・チオセミカルバジド法による比色定量が主に行われている。この定量を高速液体クロマト法で行えないかと検討したので結果を報告する。

実 験 の 部

1. 試料及び試薬

標準品；市販 AP ($C_9H_{16}N_2O_2$) をエタノールより2回再結晶しデシケーター（減圧，五酸化リン）で4時間乾燥。融点 $195 \sim 196^\circ$ のもの

試 料；解熱鎮痛薬（顆粒剤）2,500 mg 中アセトアミノフェン 600 mg，エテンザミド 1,000 mg，AP 120 mg，無水カフェイン 100 mg，ケイヒ末 20 mg，その他賦形剤及び結合剤等 660 mg

内部標準物質；定量用フェノール（JIS 特級）

2. 装置及び条件

HPLC 装置；日立高速液体クロマトグラフ 655 型及び波長可変 UV モニタ 638 - 41 型

HPLC カラム；ラジアルパック μ ボンダパック C₁₈ (8 mm ID × 10 cm 粒径 10 μ)

HPLC 条件；移動相：水：アセトニトリル（8：2）

検出波長：230 nm

流 量：3 ml/min

カラム温度：室温

3. 内部標準溶液の調製

定量用フェノール 100 mg をエタノールを加えて溶かし 100 ml とする。

4. 標準溶液

AP 標準品 50 mg をとり，エタノールを加えて 50 ml とする。この液 15 ml をとり，内部標準溶液 2 ml を加えエタノールにて 20 ml とし標準溶液とする。

5. 試料溶液の調製

試料（AP 50 mg 対応量）をとりエタノール 30 ml を加え，15 分間超音波振動にて抽出しエタノールを加えて 50 ml とする。これを 5,000 rpm にて 10 分間遠心分離し上清 15 ml をとり，内部標準溶液 2 ml を加えエタノールにて 20 ml とし試料溶液とする。

6. 定 量 法

標準溶液及び試料溶液 6 μ l ずつを高速液体クロマトグラフに注入し，得られたクロマトグラムの内部標準物質に対する AP のピーク面積比を求め定量する。

$$\text{AP の量 (mg)} = \text{AP 標準品の量 (mg)} \times \frac{\text{試料中の AP のピーク面積比}}{\text{AP 標準品のピーク面積比}}$$

結果及び考察

1. 波長の選択

Fig. 1 に AP エタノール溶液の UV 吸収曲線を示す。AP は短波長側にのみ吸収があるので測定波長として比較的溶媒の影響の少ない 230 nm を選んだ。

2. 移動相の検討

水-アセトニトリル系の逆相系について検討した。ここで AP は UV 吸収が AP よりも大きいエテンザミドと隣接しており、また AP 120 mg に対しエテンザミドが 1,000 mg も含まれ AP の定量値に与える影響が大きいため、両者の分離を完全にする移動相条件の検討を行った。

水-アセトニトリルの比率を (75 : 25) から (90 : 10) まで順次変化させて AP とエテンザミドの分離状態を調べた。Fig. 2 にアセトニトリルの含有率と t_R の関係を、また Fig. 3 にアセトニトリルの含有率とエテンザミドと AP の分離度の関係をそれぞれ示した。ここで分離時間が 12 分程度でエテンザミドと AP の分離度が 3.6 であるアセトニトリル濃度 20 % が最も適当と考え、これを移動相とした。

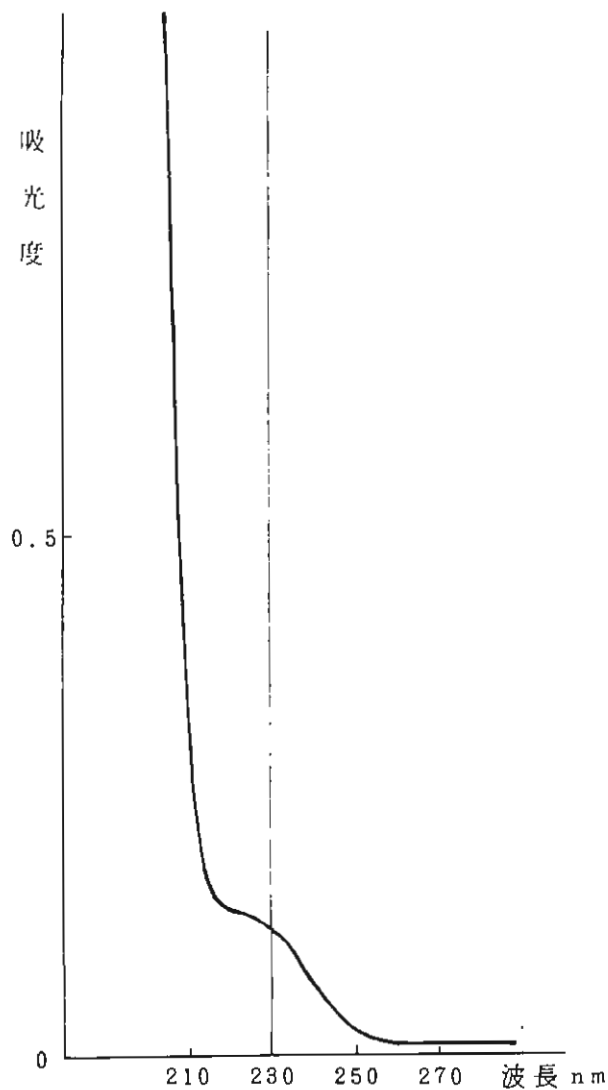


Fig.1, APのUV吸収曲線

3. 妨害物質の影響及び内部標準物質の選択

AP, 試料から AP を除いたもの及び試料の 3 種について, 前記の分離条件に従って得たクロマトグラムを Fig. 4 (a), (b), (c), (d) に示した。(a) では AP は単一ピークを示し, 他に溶媒ピーク以外のピークは認められなかった。また (b) の試料から AP を除いたものでは, AP の t_R 付近には妨害となるピークを認めなかった。また (c) の試料のクロマトグラムより妨害ピークのない t_R 5.0 分付近のフェノールを内部標準物質として選んだ。フェノールとエテンザミドの RS は 3.2 でありエテンザミドと AP の RS は 3.5 であった。

Fig. 4 (d) には試料に内部標準物質を加えたクロマトグラムを示した。アセトアミノフェン及び無水カフェインは 2.5 分, 内部標準物質のフェノールは 5.0 分, エテンザミドは 7.9 分, AP は 12.0 分にそれぞれ溶出した。

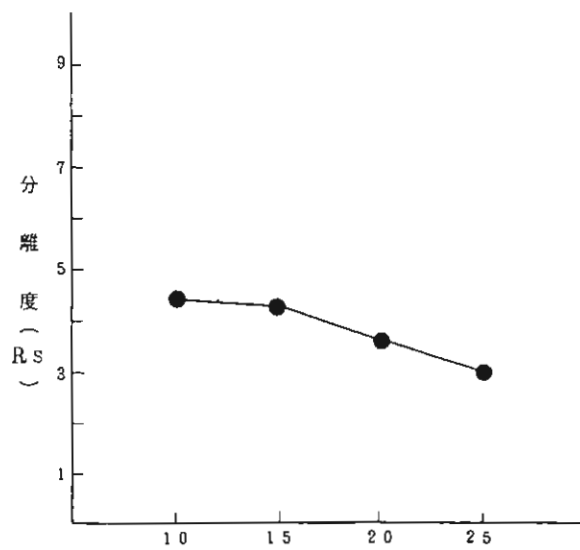
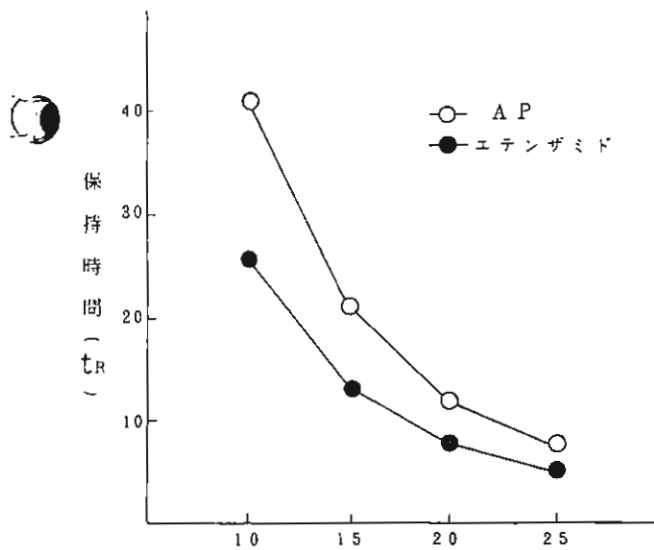


Fig. 2, アセトニトリルの濃度と保持時間 (t_R) の関係

Fig. 3, アセトニトリルの濃度と分離度 (RS) の関係

4. 検量線の作成

AP 標準品について 0.5, 1.0, 1.5 及び 2.0 (mg/ml) エタノール溶液を調製し, その各 15 ml をとり, これに前記の内部標準溶液 2 ml をそれぞれ加えエタノールにて 20 ml とし, 定量法に従い内部標準に対するピーク面積比を求め検量線を作成した。検量線は Fig. 5 に示すとおりほぼ原点を通る直線となった。

5. 再現性についての検討

試料 2.5 g 中 AP 120.8 mg を含むように調製し本法により 5 回測定した。その結果を Table 1 に示す。本表に見るとおり $CV = 0.99\%$ で再現性は良好なものと考えられる。

6. 添加回収実験

AP を除いた試料 2.5 g 中に AP 60 mg から 230 mg までを含むようにそれぞれ調製し, 本法に従って測定し回収率を求めたところ, Table 2 に示すとおり良好な回収率を得た。

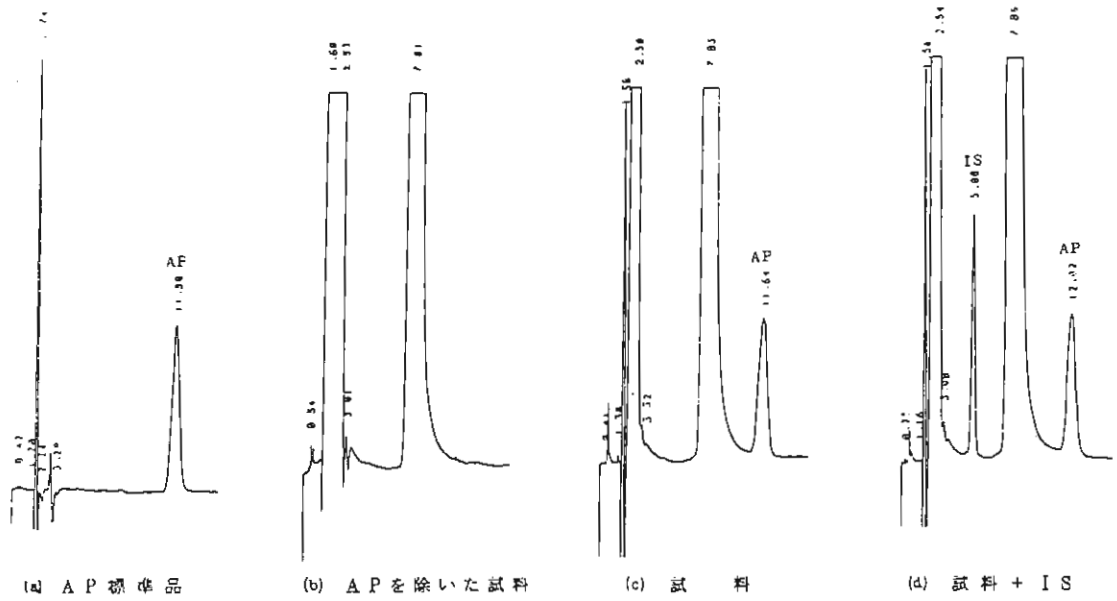


Fig.4, 各種試料のクロマトグラム

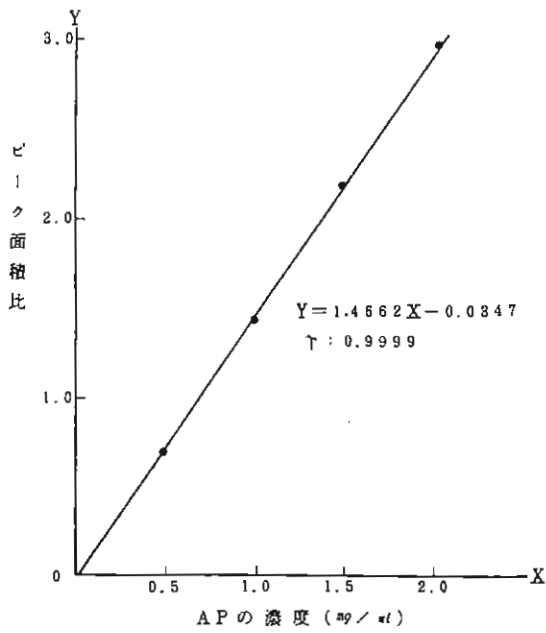


Fig.5, 検量線

Table1. 再現性

定量値 (mg)	(回収率%)	2.5 g 中
121.9	(100.9)	
121.9	(100.9)	
122.6	(101.5)	
120.6	(99.8)	
119.6	(99.0)	
平均	121.32	(100.36)
σ_{n-1}		0.989
CV		0.985%

Table2. 添加回収実験

AP添加量 2.5 g 中	定量値 (n=3) (mg)	回収率(%)
61.5	59.9 60.5 $\bar{X} = 60.5$ 61.0	98.3
120.3	121.3 121.2 $\bar{X} = 121.2$ 121.0	100.7
175.0	178.9 174.1 $\bar{X} = 176.9$ 177.6	100.5
229.6	234.6 242.2 $\bar{X} = 236.4$ 232.4	103.0

結 論

解熱鎮痛薬に配合されるアリルイソプロピルアセチル尿素は検出波長を低波長（230 nm）にし、また移動相を水-アセトニトリル（8：2）にすることにより逆相系カラムで分離定量することができた。検量線はほぼ原点を通る直線となり、CV値は1%以下であった。また添加回収実験も良好な結果を得た。1回の分析時間は約12分である。本法は他成分の影響を受けることなく、より信頼性の高いデータを得ることができ、実際の製剤における定量に有用であると思われる。

リパーゼの脂肪消化力試験法の検討及び脂肪消化力に影響を及ぼす2、3の配合物について

田 中 良 一 高 尾 美代子
東亜薬品株式会社 試験研究室*

Studies on fundamental procedures of determination of lipase activity and effects of some substances on lipase activity.

Ryoichi TANAKA Miyoko TAKAO
Laboratory TOA Medicine CO; LTD Summary

Summary

In the procedure of Toitsu-Testing-Method (issued No532, 1980. by Japanese Ministry of Health and Welfare) important factors are quality of substrate and stability of emulsion. For former a normal olive oil which gives a definite activity and for latter 3%PVA and 13000rpm revolving speed of homogenizing are desirable.

Ca^{2+} and water extraction of Ginseng and Glycyrrhiza increase the lipase activity.

Zn^{2+} decreases the activity and extract. of Coptis Rhizoma exhibits an effect. Effect of bile salts are not clear by this experiments.

胃腸薬に配合される各消化酵素の消化力を測定する試験法が、昭和55年薬審第523号で厚生省薬務局審査課長から通知されている（以後、統一試験法と略す）が、他の消化酵素の消化力測定法に比べ、脂肪消化力試験法はばらつきが大きい。リパーゼ配合胃腸薬の品質を管理するうえで、再現性の高い脂肪消化力試験法が必要であるので、統一試験法の基本的な重要事項について検討した。また、ある種の配合物がリパーゼの消化力に影響を及ぼすことが判ったので、併せて報告する。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

リパーゼ：天野製薬㈱製 リパーゼ AP₆（以下リパーゼと略す）

2. 試薬及び試液

リン酸塩緩衝液：0.1 Mリン酸ニナトリウム液に0.1 Mリン酸カリウム液を加え、pH 6.0に調整する。

ポリビニルアルコール：倉敷レイヨン㈱製 ポバール 117（以下P.V.A.と略す）

P.V.A. 試液：P.V.A. 30gに水を加え、75～80° に加熱して溶かす。冷後、ろ過し、水を加えて1,000 mlとする。

オリーブ油：「日局」

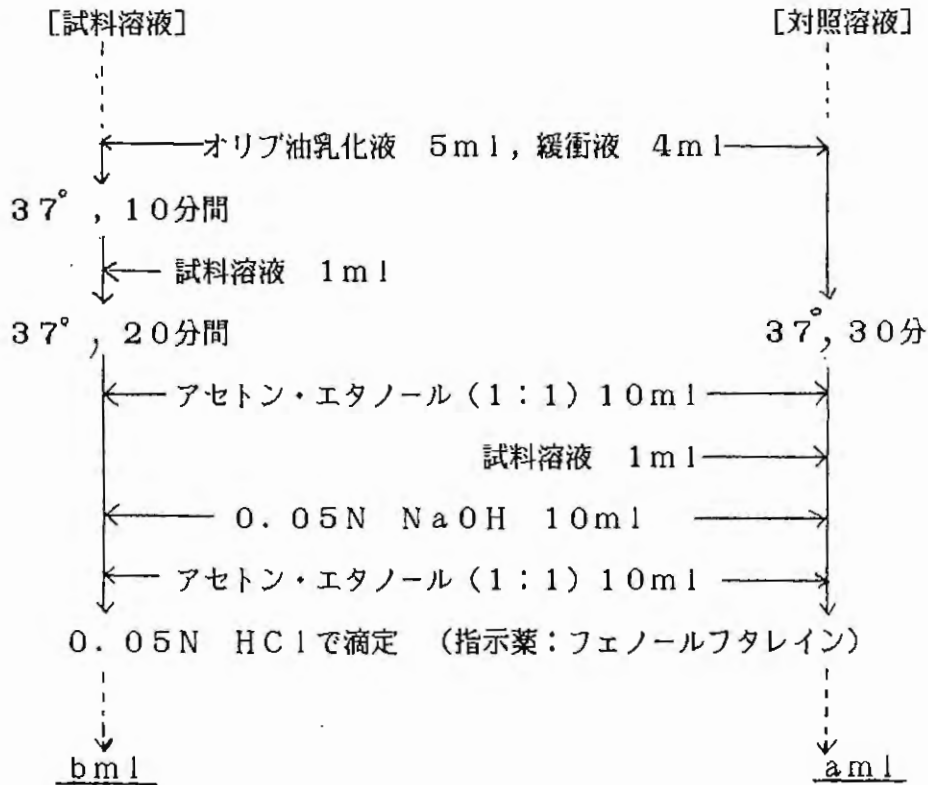
オリーブ油乳化液：P.V.A. 試液・オリーブ油混液（3：1）200～300 mlを500 mlの乳化機容器に入れ、10° 以下に冷却しながら12,000～16,000rpmで10分間乳化する。乳化後、1時間冷所に放置し、油層が分離しない事を確認した後、使用する。

3. 試料溶液

リパーゼを冷水または冷緩衝液に溶かし、約0.25 mg/mlの濃度とする。

4. リパーゼ試験法

昭和55年薬審第523号通知の脂肪消化力試験法に準ずる（Fig. 1）。



$$\text{脂肪消化力 (単位/g)} = (a - b) \times 50 \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{W} \times f$$

W：試料溶液1ml中の試料の量（g）

f：0.05N HClの規定度係数

Fig.1. 脂肪消化力統一試験法の概略

結果及び考察

1. 試験方法についての検討

(1) オリーブ油の品質

4種類のオリーブ油を使用して、同一リパーゼの脂肪消化力を測定した (Table 1)。製造会社及び製造ロットの異なるオリーブ油を使用した場合、消化力が異なる。また各オリーブ油の酸価の測定値はそれぞれ異なるが、酸価と消化力の関係は明らかでない。

更にオリーブ油の品質の影響を検討する目的で、オリーブ油に、(1)空気を吹き込む (2)直射日光を照射する (3) 80° に加温する、の条件で処理し、それぞれの脂肪消化力に及ぼす影響を調べた (Fig. 2)。この結果、加温処理したオリーブ油の消化力に及ぼす影響は比較的少ないが、日光照射及び空気により変質した場合、その影響は大きい。

オリーブ油は天然物であるので、その品質には十分注意を払う必要があり、一定の脂肪消化力を与えるオリーブ油を入手する事が、リパーゼの品質管理上重要である。Fig. 2 から、オリーブ油は遮光密栓して保存する必要のある事が理解される。

Table1. EFFECT OF OLIVE OILS ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP6.

OLIVE OILE		ACTIVITY	ACID VALUE
MAKER	LOT No.	Unit/ g \pm SD	
A	1	6015 \pm 137	0.17
B	1	6303 \pm 316	0.30
C	1	6525 \pm 294	0.34
C	2	5368 \pm 155	0.49

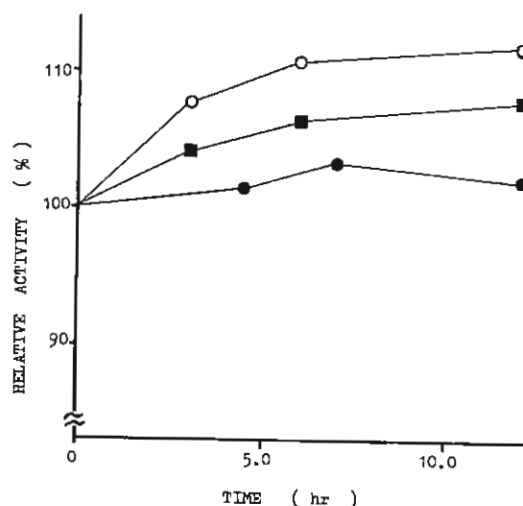


Fig.2. EFFECT OF OLIVE OILS TREATED WITH AIR, LIGHT AND HEAT ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP6.

100% IS THE ACTIVITY WITH NON-TREATED OLIVE OILE.

(-○-) AIR, (-■-) LIGHT, (-●-) HEAT.

(2) オリーブ油の乳化状態

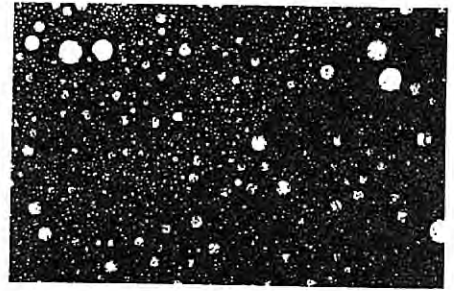
① P.V.A. 濃度

各濃度の P.V.A. 溶液とオリーブ油を 18,000 rpm で乳化し、それぞれの乳化液の粒子径を顕微鏡で観察した (Fig. 3)。2% 溶液使用の乳化液粒子径は $1.7 \sim 35 \mu$ 、3% では $1.5 \sim 25 \mu$ 、5% では $1.2 \sim 10 \mu$ と、P.V.A. 濃度が高くなると、粒子径が小さく均質になる。

また、各濃度の P.V.A. とオリーブ油で調製した乳化液を冷蔵庫に保存し、リパーゼの脂肪消化力を経時的に測定した (Fig. 4)。P.V.A. 濃度が高くなると、脂肪消化力は高くなるが、ばらつきが大きく、経時的にも不安定であることがわかる。

リパーゼの活性は基質の絶対量ではなく、乳化液粒子の界面積に依存する事が報告されており、従って粒子径を規定するなどの方法で均質な乳化液を調製し、保証する事が重要である。高濃度の P.V.A. 溶液を使用すると均質な乳化液が得られるが、粘度が高くな

2 % P.V.A.



3 % P.V.A.



5 % P.V.A.



Fig.3. MICROSCOPIC PHOTOGRAPHS OF SUBSTRATE WITH DIFFERENT CONCENTRATION OF P.V.A. (X300)

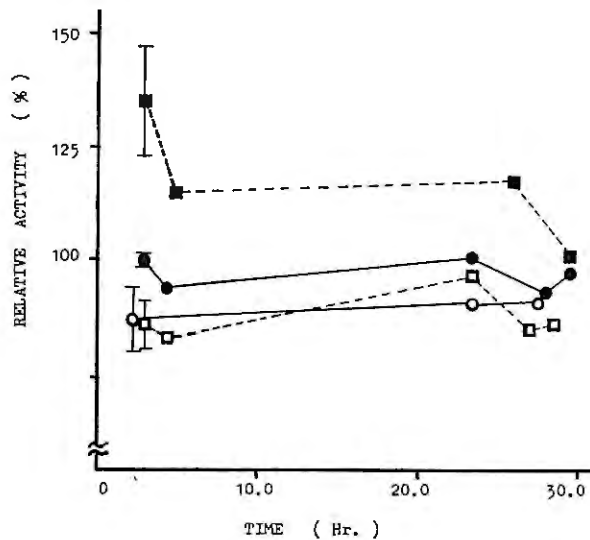


Fig.4. EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF P.V.A. ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP₆.

100% IS THE ACTIVITY WITH 3 HOURS AFTER
3 % P.V.A.
(—■—) 5 %, (—●—) 3 %, (—□—) 2 %, (—○—) 1 %.

りピペット操作に誤差が大きくなること及び、アセトン・エタノール混液を加える際、塊ができて滴定を妨害する事等から測定値がばらつき、実用的でない。低濃度の P.V.A. を使用すると、操作上の誤差は少なくなるが保存中に油層が分離しやすく、均質な乳化液が得られない。以上の結果より、3% P.V.A. を使用する事は、実用的かつ、再現性の高い事がわかった。

② 乳化機回転数

オリブ油を P.V.A. 溶液で乳化させる際、乳化機の回転数を変えて、それぞれの乳化液を調製し、乳化状態を顕微鏡で観察した (Fig. 5)。乳化機回転数が大きくなると、乳化液の粒子径は小さく、均質になる。

また、異なる回転数で調製した乳化液で、リパーゼの脂肪消化力を測定したところ、Fig. 6 に結果を示す様に、高回転数で乳化すると消化力が大きく、ばらつきも少なくなり、乳化機回転数は、13,000 rpm 以上必要である。

(3) 脂肪酸の定量

統一試験法では、生成した脂肪酸は中和滴定法で定量され、終点の判定はフェノールフタレインの変色点を肉眼でみる事になっている。しかし、反応液が乳白色であるために、測定誤差が大きくなる

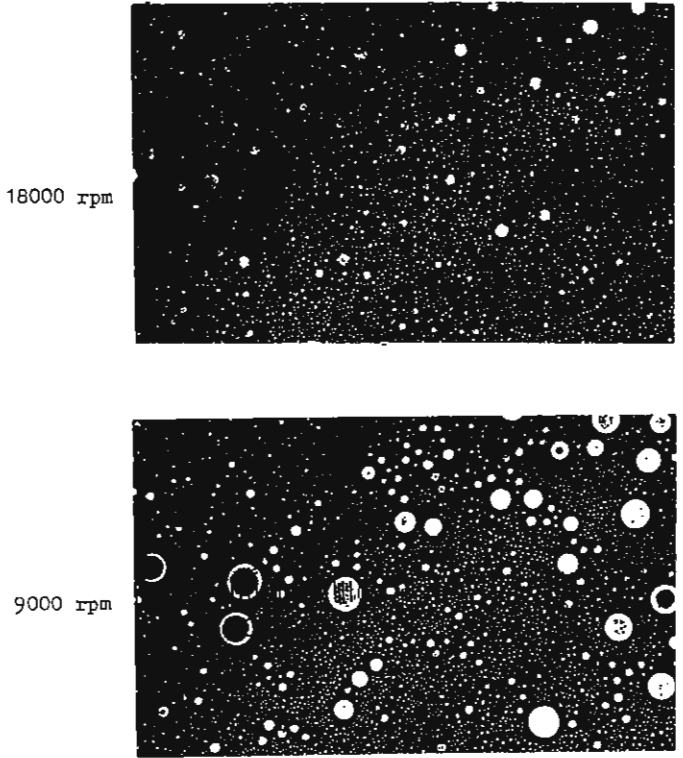


Fig.5. MICROSCOPIC PHOTOGRAPHS OF SUBSTRATE WITH 3% P.V.A. AT DIFFERENT REVOLVING SPEED. (X300)

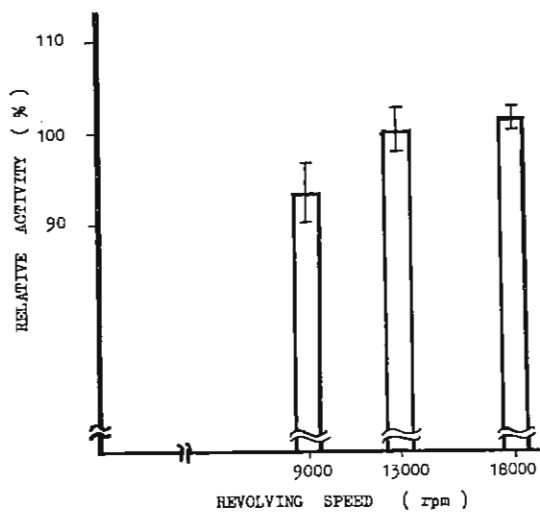


Fig.6. EFFECT OF REVOLVING SPEED AT HOMOGENIZING SUBSTRATE ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP6.
100% IS THE ACTIVITY WITH SUBSTRATE HOMOGENIZED AT 13000rpm.

ことがあるので、再現性の高い終点の判定法を検討した。

同一反応液につき、pH 滴定曲線を作成しながら、0.05 N 塩酸で滴定し、終点の判定は、(1) フェノールフタレインの変色点 (2) pH 変曲点 (3) pH 10.0 になる点の 3 通りの方法で行った。その結果、脂肪消化力を算出する (a - b) 値は、①が 0.548, ②が 0.540, ③が 0.541 と大差がなかった。

また終点の判定を(1)と(3)の方法で行い、リパーゼ濃度と (a - b) 値の関係を調べた結果、いずれもほぼ同一の直線性を示した (Fig. 7)。

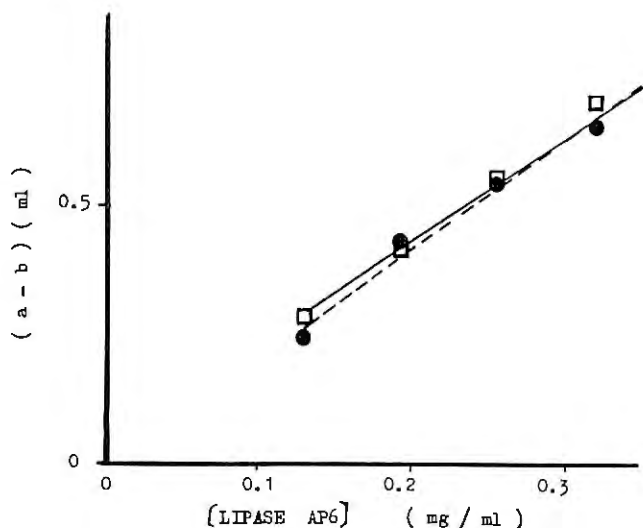


Fig.7. (a-b)VALUE AND CONCENTRATION OF LIPASE AP₆.

(—●—) TITRATION END POINT IS DETERMINED WITH PHENOLPHTHALEIN.

(—□—) TITRATION END POINT IS DETERMINED WITH pH METER (pH 10.0).

以上の結果より、終点は pH が 10.0 になる点とするが、個人差が少なく、実用的である。

2. 脂肪消化力に影響を及ぼす配合物について

以上、検討した試験法を用い、リパーゼの脂肪消化力に影響を及ぼす配合物について検討した。

(1) 胆汁酸塩の影響

オリブ油乳化液 5 ml と緩衝液 3 ml とを混合した液の中に各胆汁酸塩水溶液 1 ml を加え、よく混和し、以下統一試験法に準じて操作した (Fig. 8)。胆汁酸を加えず、初めから緩衝液 4 ml を加えたときの消化力を対照 (100%) として、各測定力価を Relative Activity (%) で示した。横軸の濃度は反応液中の胆汁酸塩濃度を示す。(Fig. 9 も同様)

ウルソデスオキシコール酸は、0.2 mM 以下で若干、脂肪消化力を増加させる傾向があり、デヒドロコール酸ナトリウム及びタウロコール酸ナトリウムは減少させる傾向がある。

胆汁酸塩の脂肪消化力促進作用は主にその界面活性作用による脂肪の乳化によるものと考えられているが、本実験では、胆汁酸塩の明確な脂肪消化力促進作用は認められなかった。これは、オリブ油が P.V.A. で乳化されているので、胆汁酸塩の乳化効果が顕著にならなかったと考えられる。又、胆汁酸塩の脂肪消化力に及ぼす影響は非常に複雑で、低濃度で活性化剤、高濃度で阻害剤としてはたらき、その濃度依存性は胆汁酸塩の種類や条件により大きく異なる事が報告されており、^{2) 3)} 本実験で採用した胆汁酸塩濃度は、脂肪消化力促進作用を示す適当な濃度

でなかった事も考えられる。

(2) 無機塩の影響

オリブ油乳化液 5 ml と緩衝液 3 ml とを混合した液の中に各無機塩水溶液 1 ml を加え、よく混和し、以下統一試験法に準じて操作した。無機塩水溶液を加えないものを対照 (100%) として各測定力価を百分率で示した (Fig. 9)。

塩化カルシウムは脂肪消化力を増加させ、硫酸亜鉛は減少させる傾向にある。又、各塩溶液に同濃度の EDTA を添加すると、塩類の配合効果はほとんどなくなることから、脂肪消化力に影響を及ぼすのは各陽イオンであると推測される。その機構については、リパーゼの作用により生成した脂肪酸がカルシウムイオンと結合し、水に不溶な塩をつくり次々に反応系外に運び去られるので、脂肪分解作用が促進されるとの報告がある²⁾。

(3) 生薬の影響

各生薬を緩衝液で抽出し、各冷抽出液 (3.2 ~ 7.5 mg/ml ニンジン末抽出液, 4.0 ~ 7.5 mg/ml カンゾウ末抽出液及び 1.0 ~ 7.5 mg/ml オウレン末抽出液) にリパーゼを溶かして試料溶液とし、統一試験法に準じて操作した。無添加のリパーゼの消化力を対照 (100%) として、各測定力価を百分率で示した (Fig. 10)。

カンゾウ及びニンジンはリパーゼの脂肪消化力を増加させるが、オウレンは影響を及ぼさない。カンゾウ及びニンジンが、リパーゼの脂肪消化力を増加させる原因について、生薬中の含有サポニンによる乳化作用が考えられるが、2-1) の胆汁酸塩の実験で、乳化作用を説明する結果が得られなかった事、又、カンゾウ末抽出液 4.0 mg/ml の代わりに、抽出液中の量に対応する量のグリチルリチン溶液 0.2 mg/ml での同様の実験では、102.1% となり、グリチルリチン配合の効果が明らかでないこと、更に 2-2) で記したような無機イオンの影響も推測されるので、これら生薬配合効果の原因は明確ではなく、かなり複雑な要因が絡んでいると考えられる。

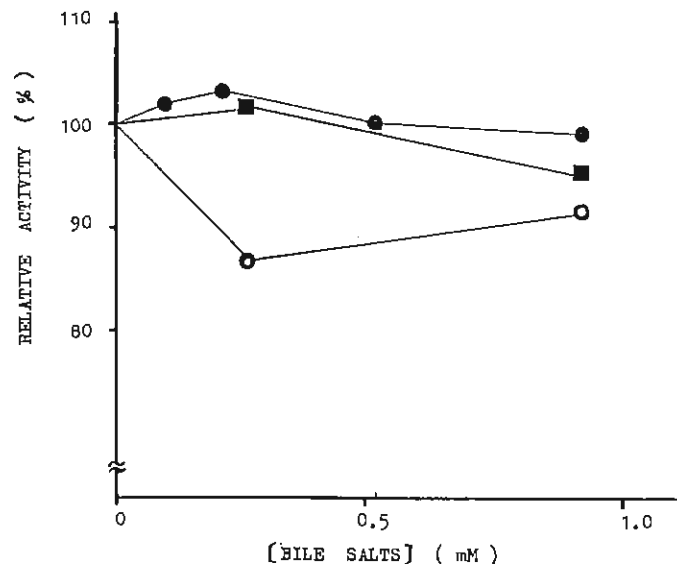


Fig.8. EFFECT OF SOME BILE SALTS ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP6.

100% IS THE ACTIVITY WITHOUT BILE SALT
(—●—) SODIUM URSEDESCHOLATE, (—■—)
SODIUM DEHYDROCHOLATE, (—○—) SODIUM TAURO-
CHOLATE.

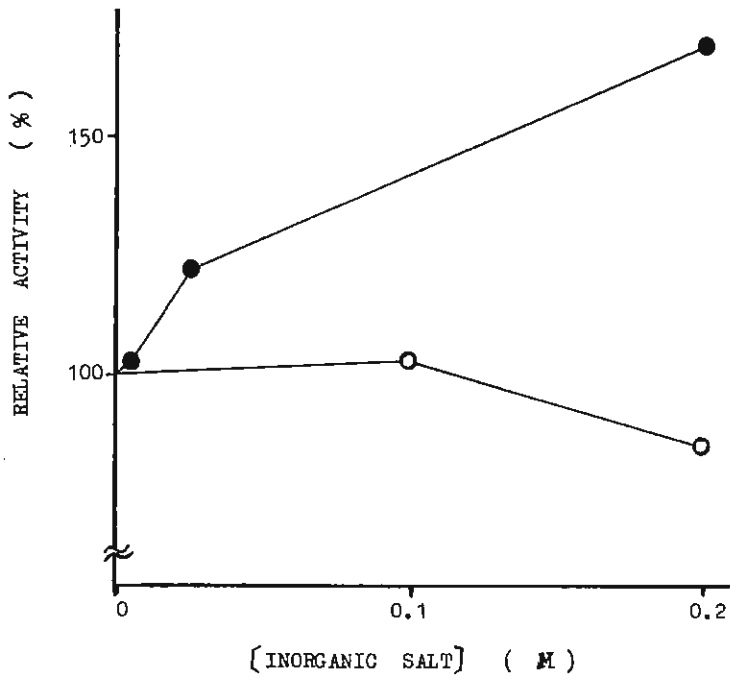


Fig.9. EFFECT OF CaCl₂ AND ZnSO₄ ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP₆.

100 % IS THE ACTIVITY WITHOUT INORGANIC SALT. (—●—) CaCl₂, (—○—) ZnSO₄.

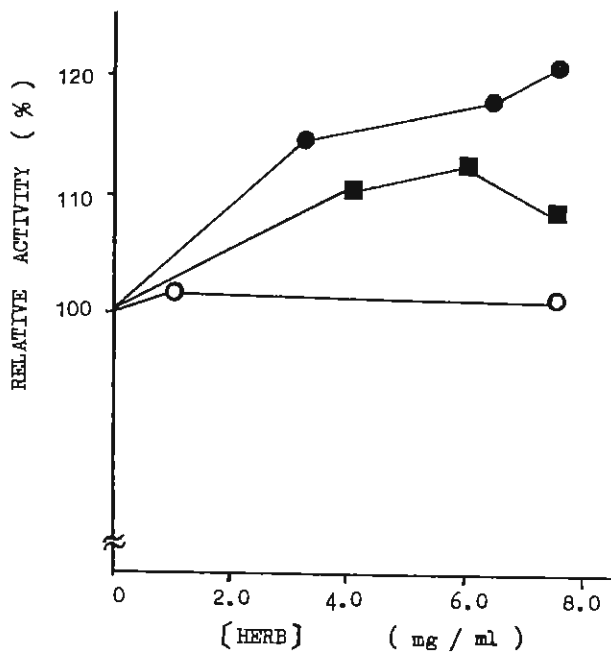


Fig.10. EFFECT OF SOME HERBS ON THE ACTIVITY OF LIPASE AP₆.

100 % IS THE ACTIVITY WITHOUT HERB.
 (—●—) GINSENG, (—■—) GLYCYRRHIZA,
 (—○—) COPTIS RHIZOMA.

ま と め

統一試験法でリパーゼの脂肪消化力を測定する際、測定値のばらつきを少なくすることを検討し、次の結果を得た。

1. 一定品質のオリブ油を基質に使用する事。そのためには、標準品としてのリパーゼ（力価測定済み）を保管し、新しいオリブ油を使用する際には、標準品リパーゼの力価を測定して、同じ力価を与えるオリブ油であることをチェックする必要があると思われる。
2. 均質・安定な乳化液を調製すること。そのためには、乳化機回転数（13,000 rpm 以上）、P. V.A. 濃度（3%）及び乳化温度（10°以下）に十分に注意すべきである。
3. 脂肪酸の定量の際、窒素ガスを通じながら十分に攪拌して滴定を行い、滴定の終点は pH メーターで pH 10.0 になる点とすること。

また、ある種の配合物はリパーゼの消化力に影響を及ぼし、カルシウムイオン、ニンジン及びカンゾウ抽出物は消化力を増加させることが明らかとなった。

謝 辞

本研究にあたり、適切な御助言を賜りました富山医科薬科大学 宮原龍郎助教授、富山県薬事研究所の皆様に深謝致します。

文 献

- 1) P. Desnuelle: "Enzymes", 3rd. ed., Vol. 7, ed. by P. D. Boyer Academic Press, New York. 1972
- 2) 中原 裕他, パンクレアチンの脂肪消化力試験法
医薬品研究 14 (3) 417 (1983)
- 3) B. Borgstom et al: Pancreatic Lipase and Colipase Eur. J. Biochem. 37, 60 (1973)

セイヨウトチノミエキス配合パップ剤の抗炎症効果

元 山 貢 野 村 明
杉 林 毅 宏 森 政 雄
リードケミカル株式会社 研究部*

セイヨウトチノミエキスは、マロニエの名で知られるセイヨウトチノキの種子から抽出したエキスで、ヨーロッパでは古くから民間薬として広く用いられている。有効成分とされているエスシンはトリテルペン系サポニンの混晶で、その他の成分としてはフラボノイドやクマリンが含まれている。我が国では手術後や外傷時の腫脹、静脈瘤、痔核等の症状の緩解に医療用経口剤あるいは軟膏剤として使用されており、第17次の医療用医薬品再評価でその有用性が確立されている。

現在市販されているパップ剤にはサリチル酸誘導体、カンフル、メントール等のほかにオウバク、サンシシ等の生薬を配合したのものも見受けられる。

今回我々はサリチル酸メチルを主成分としたパップ剤の効果を更に高める目的で、上述のセイヨウトチノミエキスの配合を試み、セイヨウトチノミエキス貼付剤並びにセイヨウトチノミエキス配合パップ剤について、カラゲニン誘発ラット浮腫により実験したので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 使用動物

生後5～6週令のWistar系雄性ラットを使用した。ラットは温度 $22 \pm 1^\circ$ 、湿度50～60%の飼育室で飼育し、飼料としてラット用固形飼料(船橋農場製、MM-3)を用い、飼料、水ともに自由に摂取させた。なお、ラットは1週間予備飼育した後実験に供した。

2) 使用薬物

1%カラゲニン生理食塩水、1%カラゲニン溶液、生理食塩水

3) 被験薬剤

① 基剤(0% A-P)

含水性基剤。以下の被験薬剤の基剤として用いた。

② 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0% A-P

基剤中に当該濃度セイヨウトチノミエキス^{*}を含有させた。

③ 0% AH-P

基剤中にサリチル酸メチル2.0%、*dl*-カンフル1.0%、*l*-メントール1.3%及びサリチル酸ジフェンヒドラミン0.1%を含有させた。

④ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0% AH-P

0% AH-Pに当該濃度のセイヨウトチノミエキスを含有させた。

*セイヨウトチノミエキス：トリテルペン系サポニン(エスシン)6.0～9.0%含有
上記の被験薬剤は、いずれも支持体 875 cm^2 あたり膏体100gの割合で均一に展延してあり、実験に際して1枚 $2.5 \times 5.6 \text{ cm}^2$ (膏体1.65g)又は1枚 $3.5 \times 4 \text{ cm}^2$ (膏体1.65g)に裁断した。

2. 実験方法

1) A-Pのラット背部カラゲニン浮腫抑制作用

山崎らの方法を一部変更して行った。

ラット（体重 180～200g）を1群5匹使用し、実験前日背部被毛を電気バリカン及び電気剃刀で剪毛した。実験当日背部正中線を挟んで左側に1%カラゲニン生理食塩水 0.05 ml, 右側に生理食塩水 0.05 mlをそれぞれ2箇所ずつ皮内注射した。直ちに起炎部位に 2.5 × 5.6 cm²に裁断した0, 0.5及び1.0% A-Pを貼付した。3時間後にラットを放血致死させ、背部皮膚を注意して剥ぎ取り、皮革用打ち抜きパンチで浮腫部位及びその対称の部位を直径 15 mmの円型に打ち抜き、直ちに湿重量を秤量した。浮腫重量は浮腫皮膚の重量から対照皮膚の重量を減じた湿重量で表し、浮腫抑制率は次の式から算出した。

$$\text{浮腫抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{A-P 貼付群の浮腫重量 (mg)}}{\text{control 群あるいは基剤貼付群の浮腫重量 (mg)}} \right) \times 100$$

なお、本実験のデータに関する統計処理はすべて Student の t 検定で行った。

2) A-Pのラット足蹠カラゲニン浮腫抑制作用

ラット（体重 190～210g）を1群10匹使用し、実験前日左側後肢足蹠の被毛を電気剃刀で剪毛した。実験当日、足蹠皮下に1%カラゲニン溶液 0.05 mlを walking pad の一つを通して注入し、直ちに同部位に 3.5 × 4 cm²に裁断した0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0% A-Pを貼付した。3時間後に炎症足蹠容積を測定し、起炎前容積に対する増加率から浮腫率を求め、次式により浮腫抑制率を算出した。

$$\text{浮腫抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{A-P 貼付群の浮腫率 (\%)}}{\text{control 群あるいは基剤貼付群の浮腫率 (\%)}} \right) \times 100$$

実験中ラットはすべてボールマニケージ内に拘束して絶食絶水とし、実験のデータに関する統計処理はすべて Student の t 検定で行った。

3) AH-Pのラット背部カラゲニン浮腫抑制作用

ラット（体重 180～200g）を1群5匹使用し、実験1)の方法に準じて 2.5 × 5.6 cm²に裁断した基剤並びに0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0% AH-Pの浮腫抑制効果を比較した。

$$\text{浮腫抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{AH-P 貼付群の浮腫重量 (mg)}}{\text{control 群あるいは基剤貼付群の浮腫重量 (mg)}} \right) \times 100$$

3. 実験結果

1) A-Pのラット背部カラゲニン浮腫抑制作用

基剤中にセイヨウトチノミエキスのみを0, 0.5及び1.0%の各濃度含有した0, 0.5及び1.0% A-Pのラット背部カラゲニン浮腫に対する効果を Fig. 1に示した。実験によればセイヨウトチノミエキス 0.5%以上で control 並びに基剤に対して有意な浮腫抑制効果が認められた。

2) A-Pのラット足蹠カラゲニン浮腫抑制作用

基剤中にセイヨウトチノミエキスのみを0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0%の各濃度含有した0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0% A-Pのラット足蹠カラゲニン浮腫に対する効果を Fig. 2に示した。実験によればエキス濃度 0.25%以上で control に対して有意な浮腫抑制効果が認められ、エキス濃度 0.5%以上で基剤に対しても有意な浮腫抑制効果が認められた。またエキス濃度 0.5%以上で効果はほぼ Plateau に達した。

3) AH-Pのラット背部カラゲニン浮腫抑制作用

基剤中に有効成分としてサリチル酸メチル 2.0%, dl-カンフル 1.0%, l-メントール

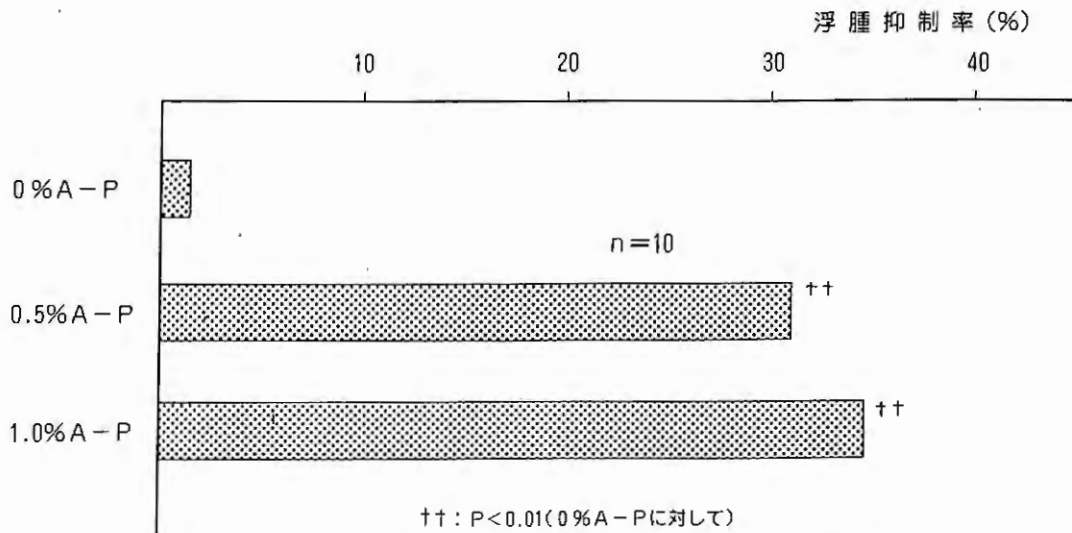


Fig.1, ラット背部カラゲニン浮腫抑制作用 (3時間値)

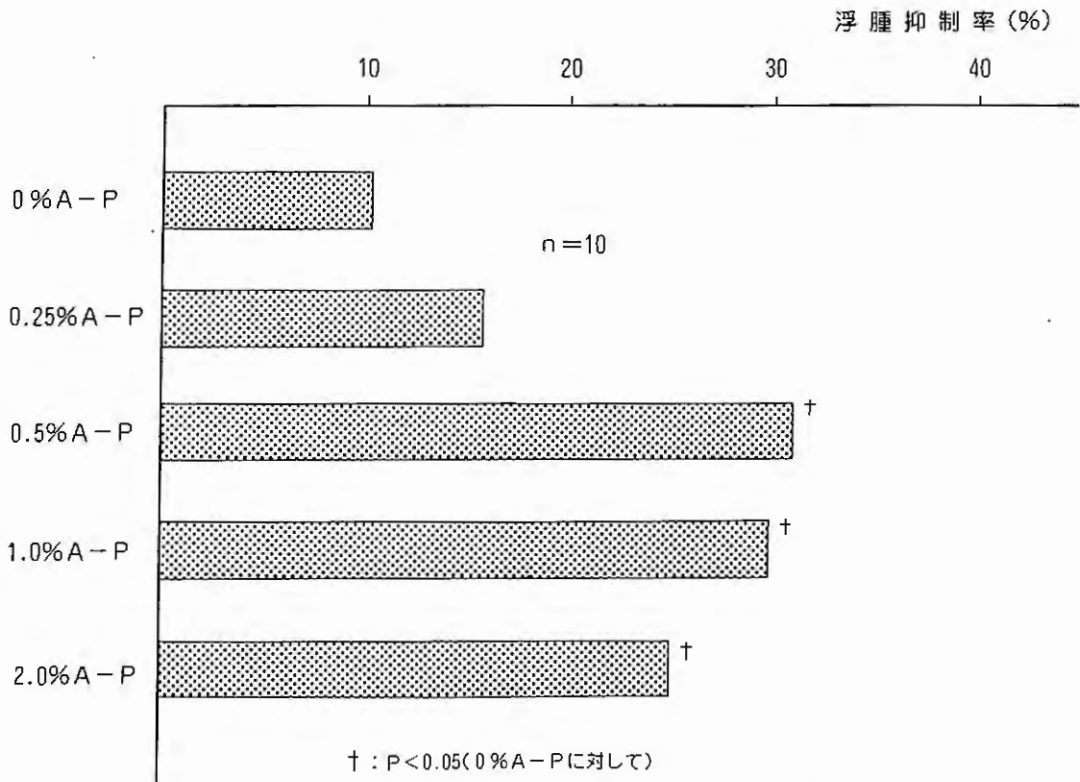


Fig.2, ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制作用 (3時間値)

1.3%並びにサリチル酸ジフェンヒドラミン0.1%を含有するパップ剤にセイヨウトチノミエキス0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0%の各濃度含有させた場合のラット背部カラゲニン浮腫に対する効果をFig.3に示した。実験によればいずれもcontrol並びに基剤に対して有意な浮腫抑制効果が認められ、この効果はセイヨウトチノミエキス0.5%以上でほぼplateauに達した。またエキス0.5%以上の配合で0%AH-P及び0.25%AH-Pに比較して14~17%の浮腫抑制率増加が認められた。

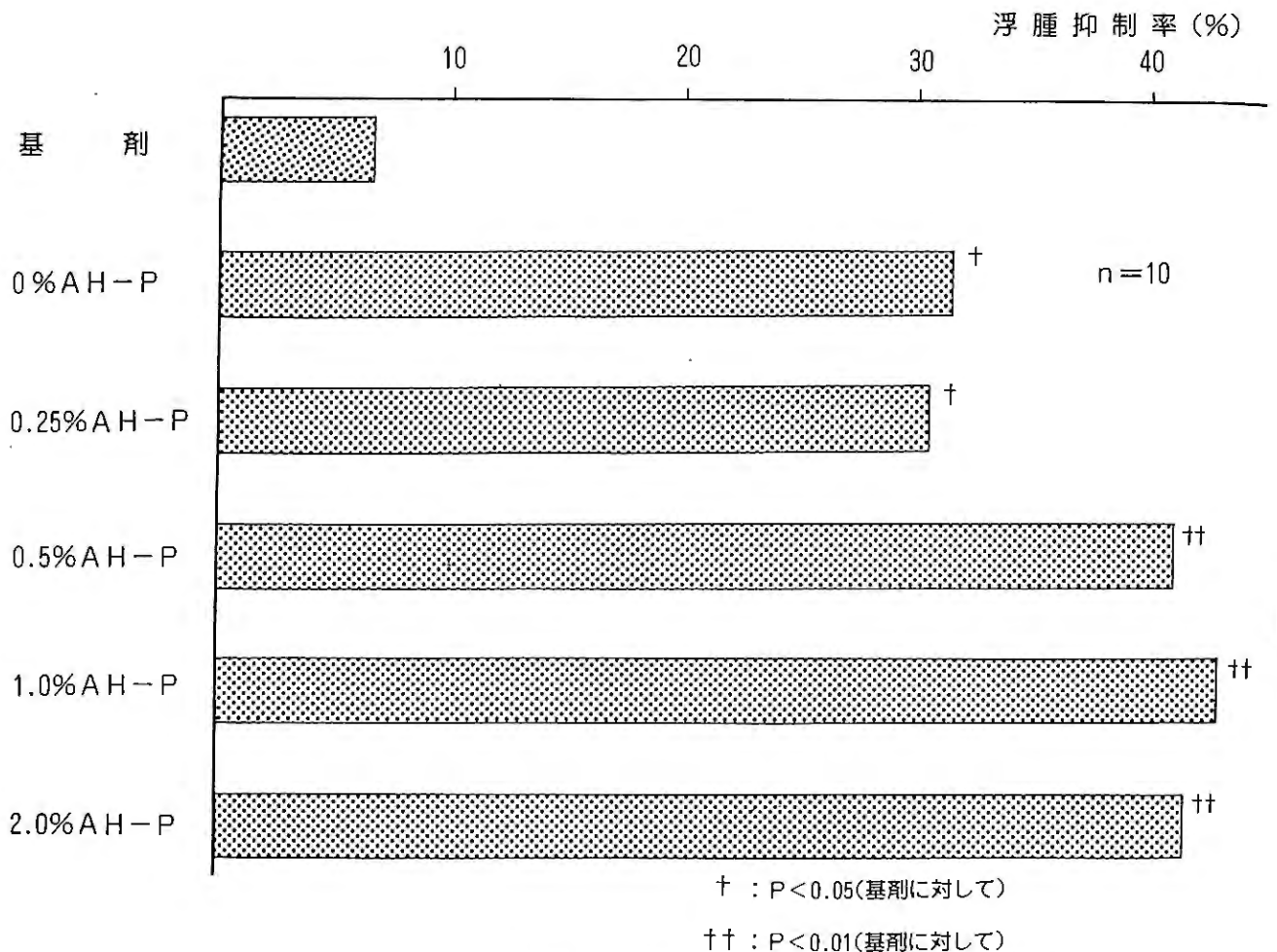


Fig.3, ラット背部カラゲニン浮腫抑制作用 (3 時間値)

考 察

今回実施した実験によればセイヨウトチノミエキスを貼付剤として皮膚適用した場合は 0.5% 以上の配合で有意な抗炎症効果が得られた。また従来のサリチル酸誘導体を主成分とするパップ剤にセイヨウトチノミエキスを 0.5% 以上加えることにより抗炎症効果は 14 ~ 17% 上昇しかつその効果は 0.5% でほぼ平衡に達することが判明した。

サリチル酸メチル等のサリチル酸誘導体の抗炎症効果はプロスタグランジンの生合成抑制に基づくものとされているが、これに対してセイヨウトチノミエキスは静脈壁の緊張度を常態に戻しうっ血を改善し毛細血管の透過性を抑制すると説明されている。このように作用機序の異なる抗炎症成分を配合することによってパップ剤の効果をより高めることができたものと判断した。

パップ剤が抗炎症鎮痛剤として有用な治療剤であることを実証する一端として、今後従来パップ剤中に配合されている生薬やその他の成分についても同様の実験を行い、それらの配合の意義について改めて検討する必要があると考える。

謝 辞

本実験にあたりご指導いただいた千葉大学薬学部 北川晴雄教授、北陸大学薬学部 斉藤晴夫助教授に深謝致します。

文 献

- 1) 山崎美正他：Punch 法による抗炎症薬の効力測定法の検討とその応用，日薬理誌，60，65 (1964)

和漢薬による抗アレルギー-製剤開発の基礎研究

鶴居 恂 輔 尾 崎 由紀子
鶴居薬品工業株式会社*

本来、生体の恒常状態を維持するための防御的反応であるべき免疫現象が、逆に生体を障害する場合に起こるのがアレルギーである。アトピー性疾患は、遺伝的素因の関与するアレルギーであるが、これは抗体産生に対する抑制作用が遺伝的に低下するために、抗体が過剰産生されることによって起こる疾患である。抑制する作用があって初めて、抗体の過剰産生が防がれるわけであるが、これをリンパ球におきかえると、B細胞の抗体産生機能を抑制するサプレッサーT細胞の機能が低下していることにより抗体が過剰産生されると考えられる。従って、低下したサプレッサーT細胞の機能を高めることが、このアレルギーの治療につながると思われる。そこで、サプレッサーT細胞の機能を高める物質のスクリーニングのための基礎研究を行なった。まず、リンパ球の核分裂刺激作用があるとされている重金属イオン（亜鉛など）添加によるリンパ球の機能への影響を検討した。さらにスリランカで喘息治療薬として使われている生薬についても検討した。

実 験 方 法

ヒト末梢血を用い、比重遠心法により、リンパ球を分離し、 $1 \times 10^6 / ml$ のリンパ球浮遊液を製する。これに10%の仔牛胎児血清、10%の適当濃度に調整した亜鉛を加え、3日間 37° でpreincubateする。その後、mitogen（リンパ球の核分裂刺激作用物質）を加え、さらに48hr培養後、 3H -thymidineを加え、24hr後Cell-harvesterにより細胞を回収し、液体シンチレーションカウンターにより、 3H -thymidineの取り込み量を測定し、リンパ球の活性化度を判定した。mitogenは、サプレッサーT細胞を刺激するConcanavalin A (Con A)、ヘルパーT細胞を刺激するPhorbol miristate acetate (PMA)を用い、これらによるリンパ球の反応の比較によりリンパ球の機能を調べた。サプレッサーSIおよびヘルパーSIの算出は次の計算式によった。

$$\text{Stimulation Index (SI) of Suppressor} = \frac{\text{dpm in ConA-stimulated culture}}{\text{dpm in unstimulated culture}}$$

$$\text{Stimulation Index (SI) of Helper} = \frac{\text{dpm in PMA-stimulated culture}}{\text{dpm in unstimulated culture}}$$

実 験 結 果

亜鉛 $6.5 \mu g / ml$ の濃度で、リンパ球を培養した場合、サプレッサー、ヘルパーいずれも亜鉛により刺激された。亜鉛は一般にT細胞を刺激するが、そのうちでも特に、ヘルパーT細胞を刺激する。

スリランカで喘息治療薬として使われている生薬については、従来、富山医科薬科大学和漢薬研究所で、このエキスをを用いた動物実験で、I型アレルギーを抑制するという結果が出ている。このエキスをを用いて、亜鉛の場合と同様の方法で検討した。濃度 $0.1 \sim 100 \mu g / ml$ の範囲で培養した場合、 $10 \mu g / ml$ 以上では、ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞共に、コントロールに比べ、有意に刺激度が大きくなっている。特に、サプレッサーT細胞は、培養中の生薬エキス濃度の増加に伴い、

* 〒 939 - 15 富山県東砺波郡福野町野尻 457 - 1 TEL 0763 (2) 2561

より刺激された。この場合のヘルパーT細胞とサプレッサーT細胞の刺激され具合をみると、エキシス濃度による有意な変化はみられないが、ヘルパーT細胞に比べ、サプレッサーT細胞の方がより強く刺激された。

以上、スリランカ産生薬によるサプレッサーT細胞及びヘルパーT細胞への影響は、亜鉛の作用とは逆で、サプレッサーT細胞をより強く刺激するのではないかと示唆される。今後さらに検討の必要がある。

これらのスクリーニング法は比較的簡便であり、将来、和漢薬を含めた生薬類の抗アレルギー製剤開発の有力な方法となり得るものと思われる。

謝 辞

本研究を行なうにあたり御指導くださいました富山医科薬科大学和漢薬研究所 難波恒雄教授 服部征雄助教授、保健医学教室 鏡森定信助教授に感謝します。

〔原 著〕

利胆剤 Dehydrocholic acid の体内動態と薬理効果に関する一考察

稲垣 健一 竹内 文和
中谷 篤

東洋ファルマー株式会社 薬理研究部*

Dehydrocholic acid (DHC と略) は、古くから利胆、解毒促進、脂溶性ビタミンの吸収促進などの薬理作用が知られ、胆石症をはじめ種々の疾患に広く用いられている薬物である。しかし、その体内挙動については十分に明らかとなっておらず、臨床投与計画とも関連して解明が期待されている。

DHC の代謝に関する研究は、イヌやイエウサギを用いて行なわれており、その尿中から得られた代謝物は、Fig. 1 に示すとおりである。

また DHC の 3 位のケトンが還元され、Reductodehydrocholic acid (RDHC と略) となることは、正常イエウサギの組織切片 (肝、小腸、腎、筋肉) を用いた *in vitro* の実験³⁾ で認められている。

今回、著者らは DHC の体内挙動と薬理効果の関係を薬動力学的解析により調べることを目的に研究を行ない、若干の知見を得たので報告する。

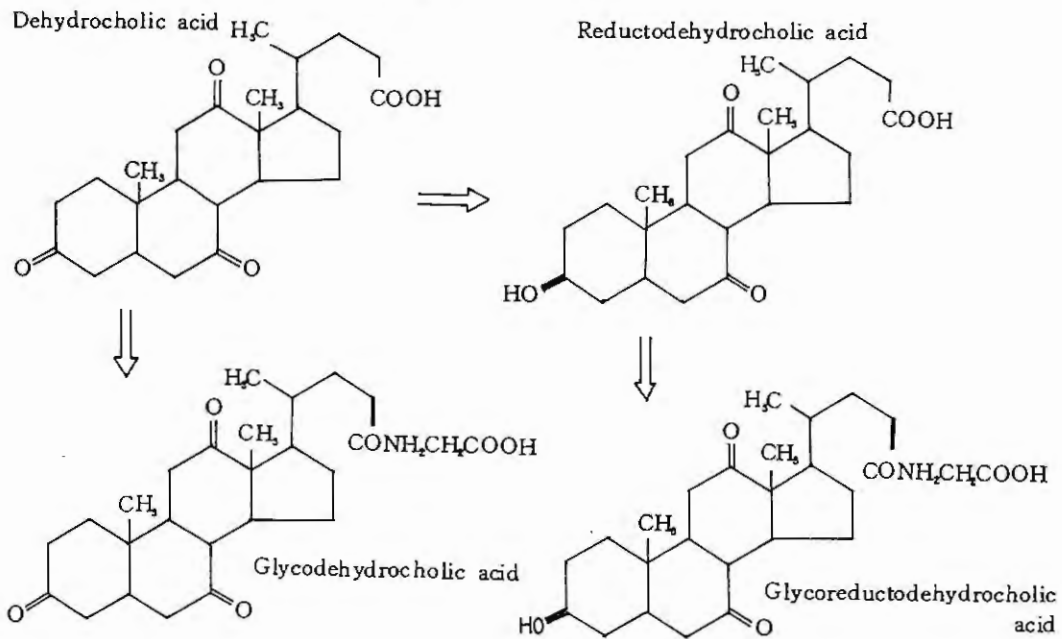


Fig.1. Metabolites of DHE in the urine

実験の部

試験薬の調製

Sodium Dehydrocholate (片山化学工業株式会社) を蒸留水に溶解し、1 回の投与あたり 1 ml になるように調製した。

使用動物

ウイスター系雄性ラット（静岡実験動物農業協同組合）体重 250 g ~ 270 g のものを血漿中濃度測定の実験に用い、280 g ~ 310 g のものを胆汁分泌量測定の実験に用いた。

実験方法

1. 血漿中 DHC 濃度測定

100 mg/kg 及び 300 mg/kg に調製した試験薬を左側の頸静脈から静脈内に投与し、その後経時的に左側頸より採血を行ない、遠心分離により得られた血漿を用いて DHC の定量を行なった。操作方法を Fig. 2 に示す。

なお、本測定法における検量線は、 $2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で良い直線性が得られた。

2. 胆汁分泌量の測定

ラットをエーテル麻酔下で開腹し、総胆管に内径 0.5 mm のビスキングチューブでカニレーションをほどこした。次に、胆汁の流出が一番多くなる角度にチューブを調整し、腹部を縫合した後単位時間に流出する胆汁の容量を測定した。

3. 胆汁中の胆汁酸量の測定

Imai et al⁴⁾の方法を基にして作成した操作方法（Fig. 3）に従がい、胆汁中の胆汁酸の定量を行なった。検出された各胆汁酸（Lithocholic acid, Deoxycholic acid, Chenodeoxycholic acid, Cholic acid）は、それぞれ本定量法において、直線性の良い検量線が得られた。

4. GC - Mass による代謝物の同定

血漿中 DHC の定量及び胆汁中の胆汁酸の定量の際得られた Gas Chromatogram（Fig. 4,5）中に出現した未知ピーク（X, Y）について、GC - Mass により同定を行なった。使用した GC - Mass は日本電子 D - 300 にコンピュータ JMA - 200 を接続したものである。

5. 薬動力学解析

マイクロコンピュータ PC - 9800（NEC）に、山岡等が開発したプログラムを導入して計算を行った。⁵⁾

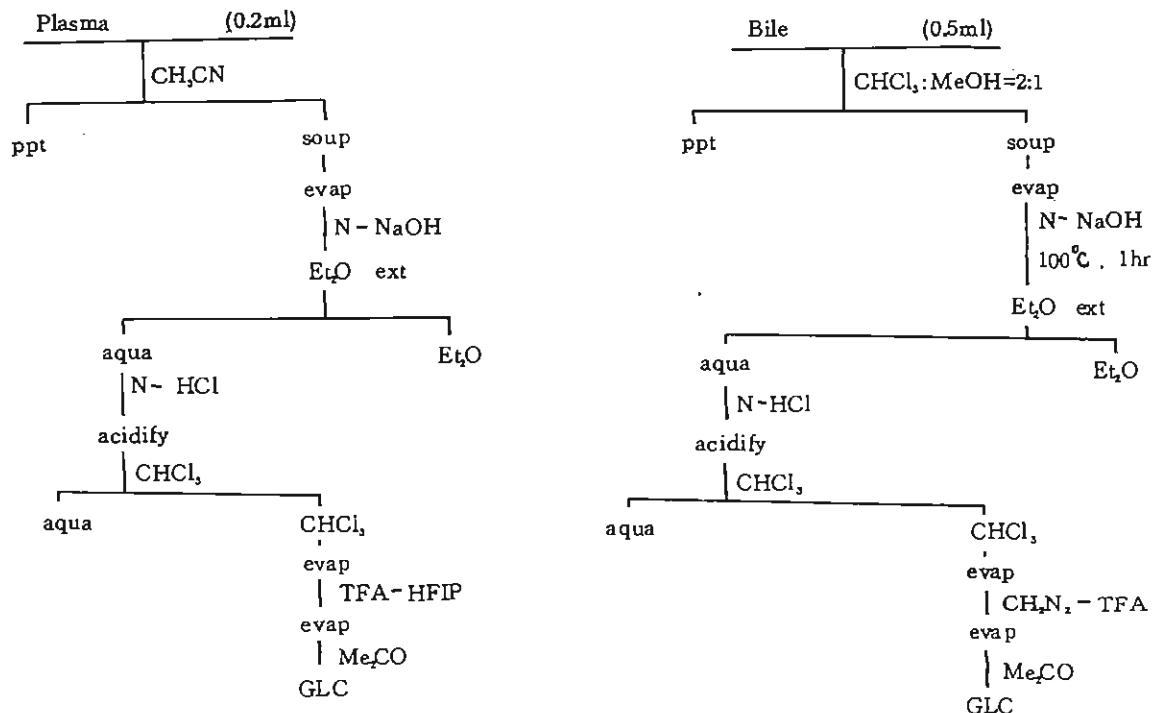


Fig.2, Analytical method of DHC in plasma

Fig.3, Analytical method of Bile acids in Bile

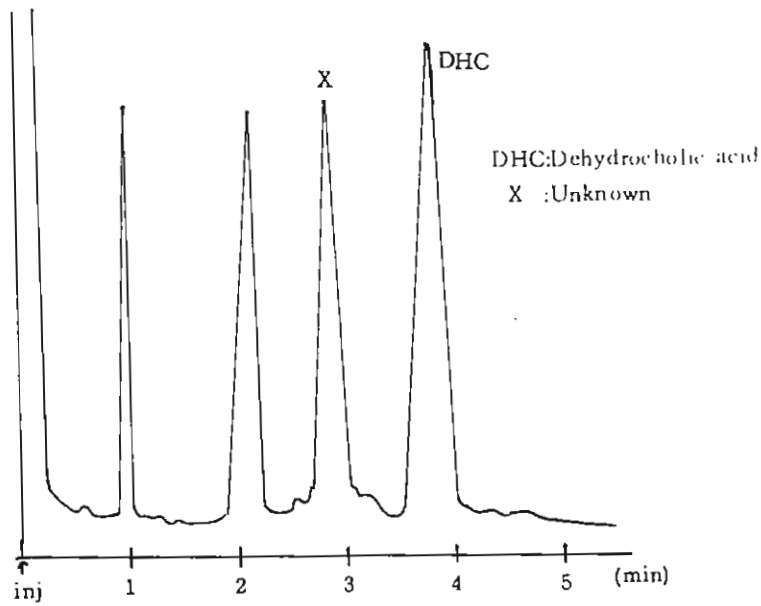


Fig.4. Gas-Chromatogram of plasma

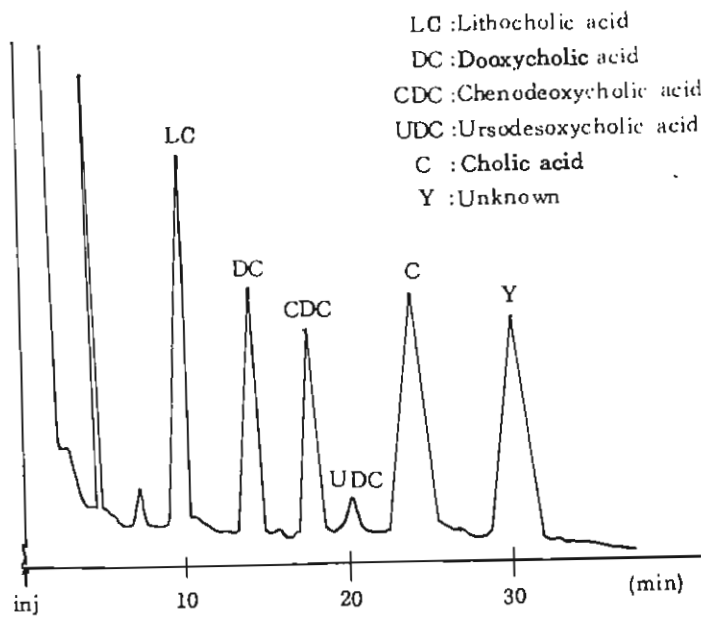


Fig.5. Gas-Chromatogram of bile

結果及び考察

血漿中 DHC の挙動 静脈内に投与された DHC - Na は Open Two Compartment Model 様の消失パターンを示し (Fig. 6) , 速かに血漿中より消失した。その生物学的半減期は, α - phase で約 3 min , β - phase で約 15 min であった。また血漿中 DHC Gas Chromatogram の未知ピーク X は, GC - Mass による Mass Spectorum から, RDHC の脱メチル化体と推定された。

次に DHC が胆汁中の胆汁酸に与える影響を調べる目的で胆汁中の胆汁酸定量を行なった結果 (Fig. 7 に Cholic acid , Deoxycholic acid の時間的推移を示したが, Chenodeoxycholic acid , Ursodeoxycholic acid , Lithocholic acid についても同様の結果が得られている。) ,

DHCは胆汁中の胆汁酸量を増加させず、分泌される水分量のみを増加させる hydrocholeretica であることが確認された。また胆汁分泌量の累積値を各投与量に対してプロットすると、Fig. 8に示す様な直線関係が得られ、DHCの胆汁分泌促進作用と血漿中薬物量との間には比例関係が成立すると推察された。

なお、今回の実験で胆汁中からは、投与したDHCの未変化体及び抱合体は検出されず、ただ代謝物と考えられるピークYが検出されただけであった。ピークYは、Mass Spectorum (Fig. 9)よりRDHCであると推定された。このことより、DHCによる腸肝循環は、ほとんどないものと推察された。

DHCの血漿中からの消失が速かである為、胆汁分泌量の測定の単位時間を10 minとし、Fig. 10に示す結果が得られた。

今迄述べた結果を考え併せ、著者らはDHCの胆汁分泌促進作用 (B. S Effect) と血漿中のDHC未変化体との関係について式-1, 2が成立すると仮定し、Fig. 11に示すCompartment Modelを作成した。

$$\text{B.S Effect} = r_1 \cdot X_2 \quad \dots\dots\dots (\text{式-1})$$

$$r_1 \int_0^{\infty} X_2 dt = r_2 \cdot \text{Dose} \quad \dots\dots\dots (\text{式-2})$$

r_1 : 胆汁分泌と作用部位における薬物量との比例定数

r_2 : Fig. 8の直線関係より得られた比例定数

X_2 : 作用部位における薬物量

血漿中DHCの測定により得られた経時的血漿中濃度をOpen Two Compartment Model (式-3)にあてはめて計算を行ない、Fig. 12を得た。

次に血漿中DHCのシュミレーションより得られた各パラメータ (α , β , A, B)を、Fig. 11に示したCompartment Modelに従った式-4に計算を行ない、Fig. 13を得た。

$$X_1 = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \dots\dots (\text{式-3})$$

$$X_2 = K_4 \cdot V_d \cdot A / (\alpha - K_5) \cdot (e^{-k_5 t} - e^{-\alpha t}) + K_4 \cdot V_d \cdot B / (\beta - K_5) \cdot (e^{-k_5 t} - e^{-\beta t}) \dots\dots (\text{式-4})$$

X_1 : Central Compartmentにおける薬物量

X_2 : 作用部位 Compartmentにおける薬物量

V_d : 分布容積

この結果、実測値と計算値が良く一致し、また推定されたパラメータの値 (Table 1)は、2つの投与量間で近い値が得られた。

今回DHCの生体内挙動と胆汁分泌速度の増加との関係については、DHCの未変化体についてのみ検討を加えたが、RDHCについて同様の検討を加えることにより、これらの関係がより明らかとなると考える。

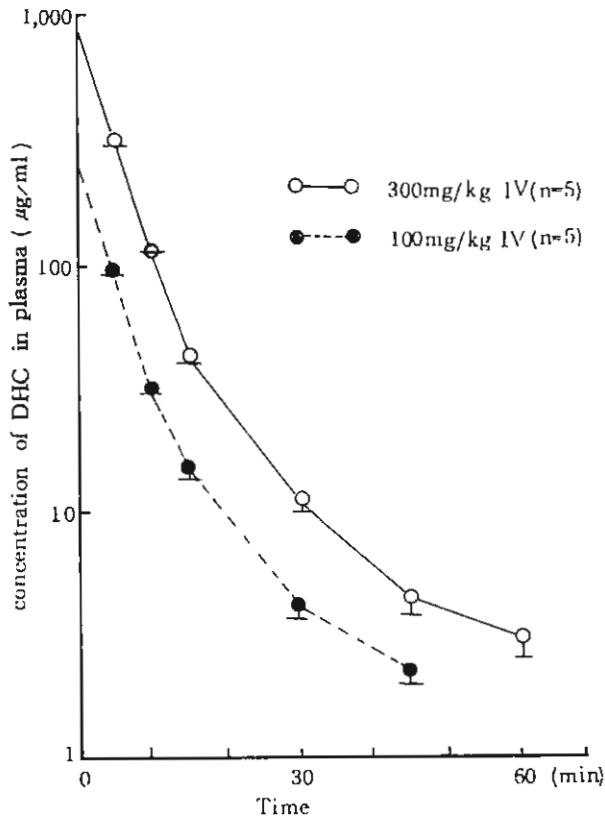


Fig. 6, plasma concentration of DHC after intravenous administration

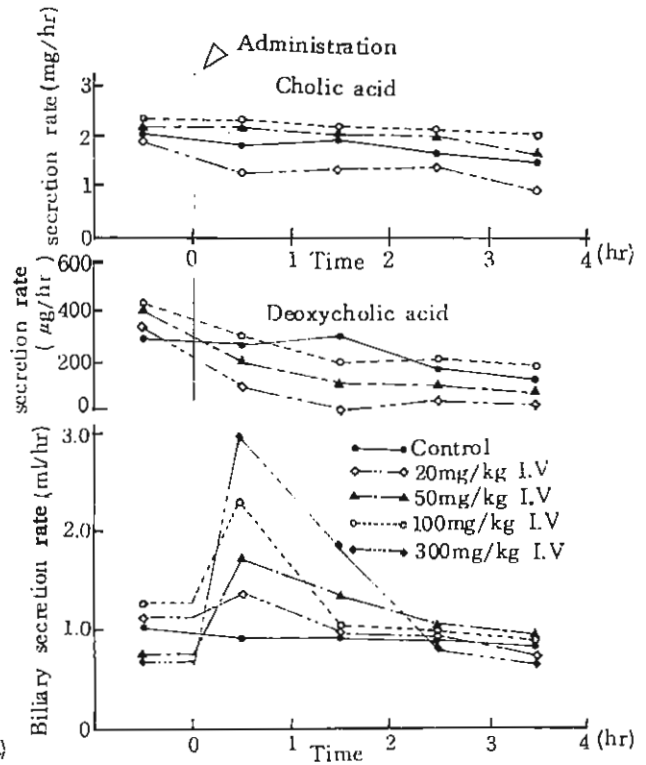


Fig. 7, Biliary secretion rate and biliary secretion rate of bile acids (cholic acid, Deoxycholic acid) after intravenous administration

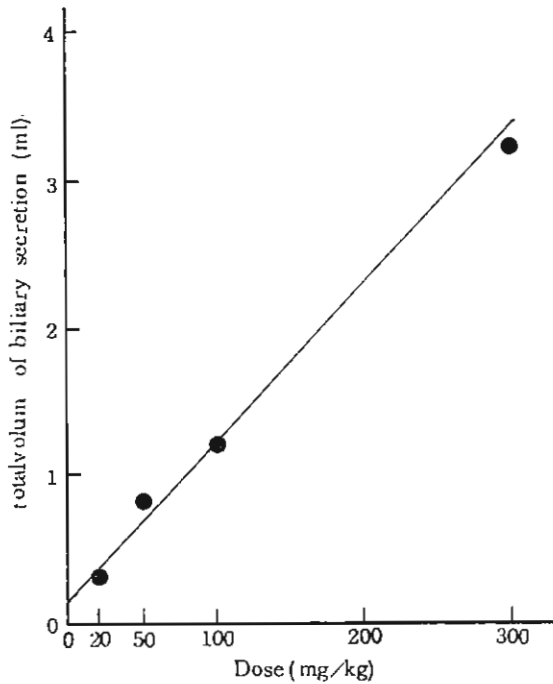


Fig. 8, Dose-response (total volume of biliary secretion) relationship after intravenous administration of DHC-Na

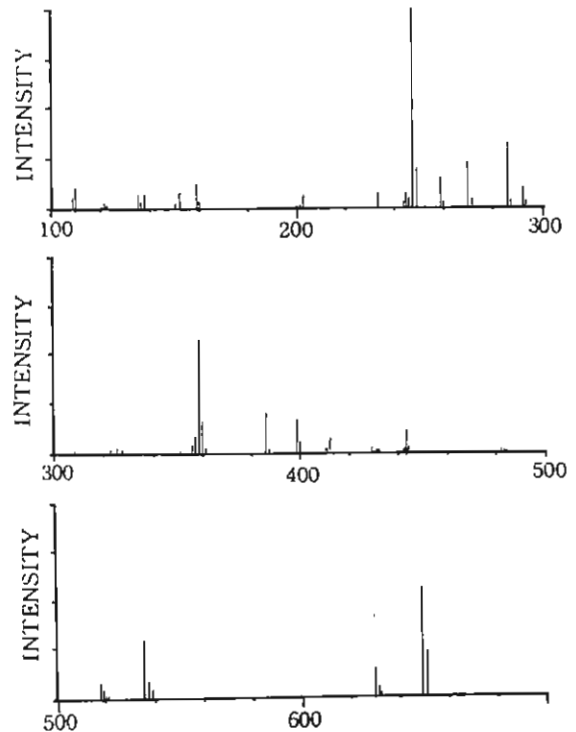


Fig. 9, Mass Spectrum of Unknown peak Y (Fig. 4) in bile

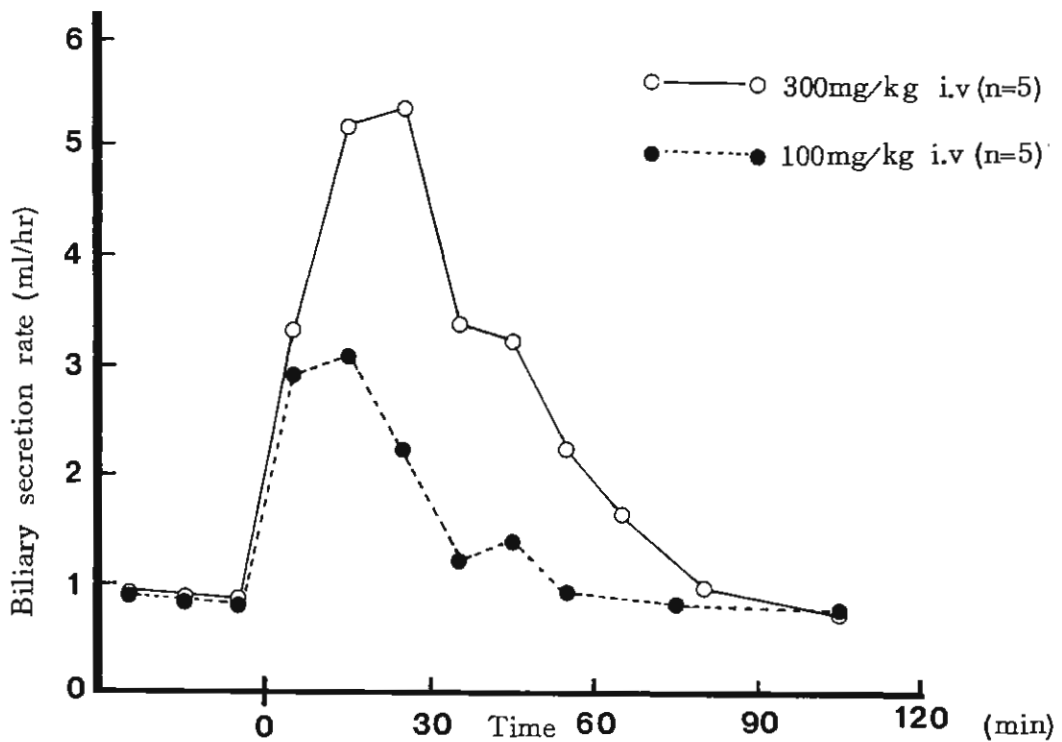


Fig.10. Time course of biliary secretion rate after intravenous administration of DHC Na

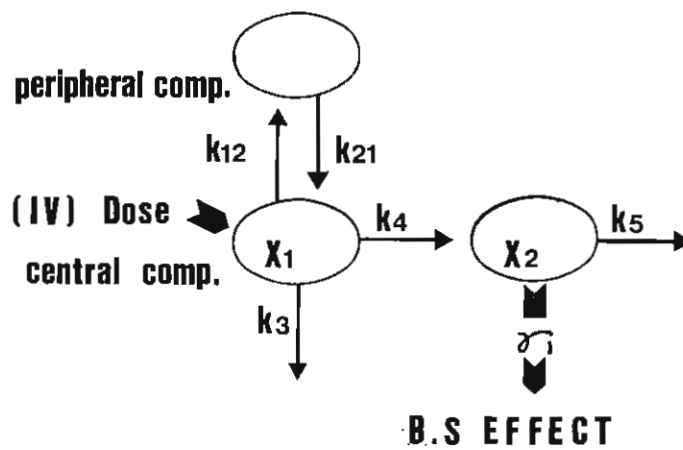


Fig.11. Compartment model describing the kinetics of DHC in plasma and B.S Effect after intravenous administration of DHC-Na

Table1. Computed parameters for the compartment model shown in Fig.-11

Parameter Dose	A	α	B	β	k_5	$k_4 \cdot \sigma_1 \cdot V_d$
300 mg/kg iv	897.65 [$\mu\text{g/ml}$]	0.2306 [min^{-1}]	37.02 [$\mu\text{g/ml}$]	0.0438 [min^{-1}]	0.1978 [min^{-1}]	0.0204 [ml/min]
100 mg/kg iv	305.44 [$\mu\text{g/ml}$]	0.2802 [min^{-1}]	23.64 [$\mu\text{g/ml}$]	0.0543 [min^{-1}]	0.8319 [min^{-1}]	0.0338 [ml/min]

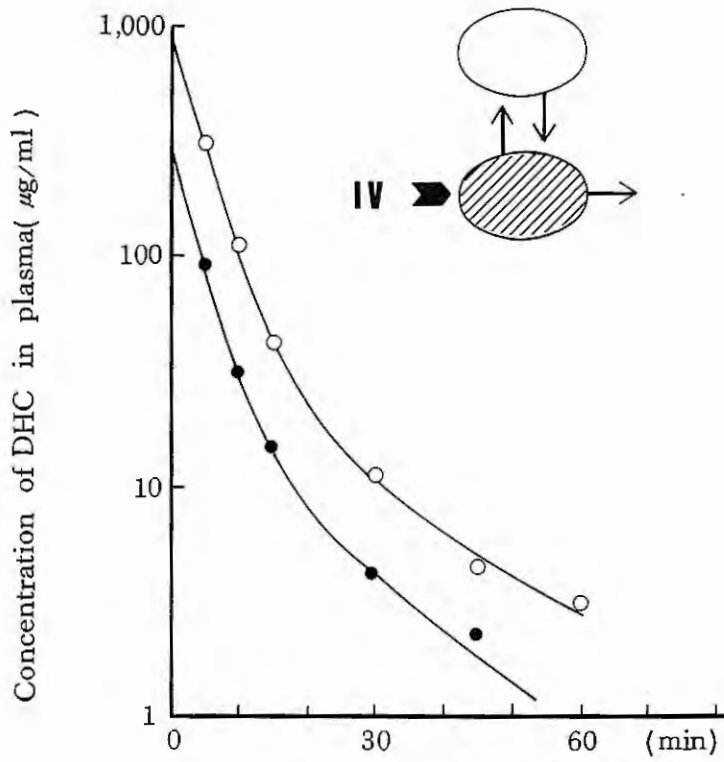


Fig.12. plasma concentrations of DHC after intravenous administration of DHC-Na
The continuous lines are the plasma levels of DHC

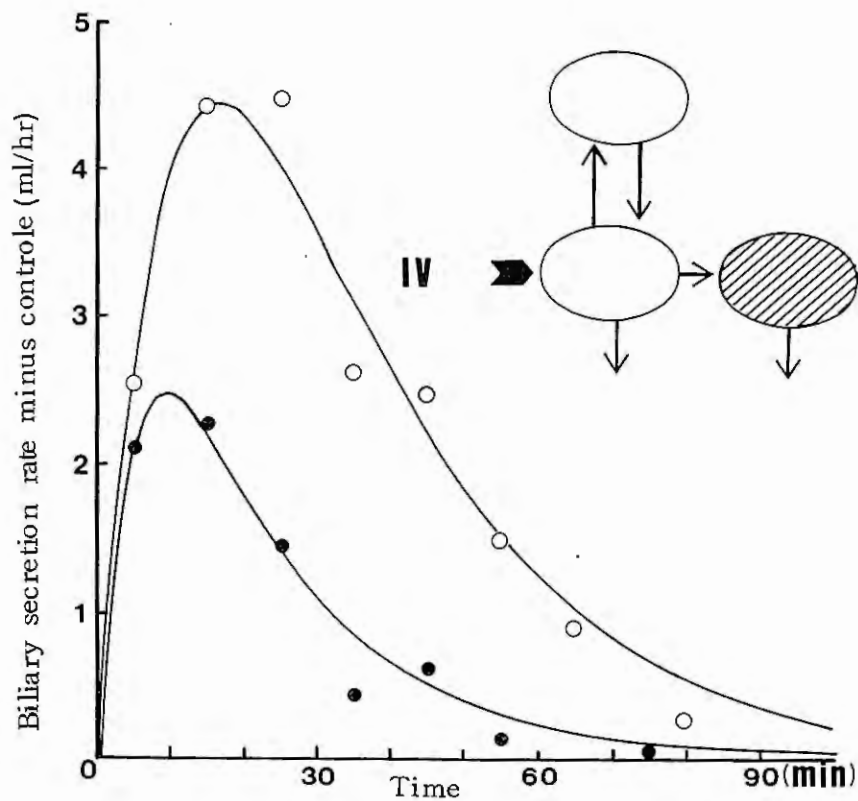


Fig.13. Biliary secretion rate after intervenous administration of DHC-Na
The continuous lines are the computed biliary secretion rate

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御指導、御協力を戴いた富山医科薬科大学 小泉教授 片山先生を始め生物薬剤学教室の諸学兄に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 中尾政和：米子医誌 11 (1), 78, 1960
- 2) 白井敏明他：米子医誌 11 (1), 154, 1960
藤岡 忠：米子医誌 11 (1), 111, 1960
- 3) 早瀬 啓：米子医誌 11 (1), 55, 1960
- 4) K. Imai et al : J. Chromatogr. 120, 181, 1960
- 5) K. Yamaoka et al : J. Pharm. Dyn., 4, 879, 1976
- 6) 山岡 清他 “マイコンによる薬物速度論入門”，南江堂，東京

インドメタシン・尿素・プロピレングリ コール混合系について

川 尻 昭 男 南 木 朗

石 黒 文 子

大協薬品工業株式会社 学術部*

現在、整形外科領域で、外用の非ステロイド消炎鎮痛剤として、インドメタシン軟膏がよく使用され、その効果が認められている。著者らはインドメタシンの経皮吸収を高めるために、インドメタシン・尿素・プロピレングリコール (PG) からなる系を研究し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 試料の調製

試料 I : インドメタシン・尿素・PG 重量比 1 : 0.5 : 1 からなる混合物を石川式混合らいかい機で 3 時間らいかいし、類白色の液状としたもの。

試料 II : I と同配合の混合物をセパラブルフラスコに入れマントルヒーターで 90° 付近まで加熱し溶融させた後 3 時間らいかいし、類白色で粘性のあるペースト状としたもの。

2. 顕微鏡—水への分散の観察

PG 中のインドメタシン、尿素および試料 I, II を顕微鏡により 600 倍で、また水を満たしたビーカーに試料を投下し水への分散状態を観察した。

3. 溶出試験

1) 溶出試験器

日局溶出試験器パドル法を一部改造したもので、石黒らのハッカゴム膏におけるサリチル酸メチルの放出挙動で使用された装置を用いて固定板上に試料を 12 mg/4.5 cm² 塗布しセルローズ膜を介して行なった。溶出液は 37 ± 1°, パドル回転数は 150 rpm とした。

2) 溶 出 液

pH 7.4 リン酸緩衝液 : 0.05 M リン酸水素二ナトリウム溶液に 0.05 M リン酸二水素カリウム溶液を加え pH 7.4 に合わせた。

3) 定 量

0.5, 1, 2, 3, 4 時間後に溶出液 1 ml を分取し、S. J. Soldin らの方法に従って液体クロマトグラフィーで測定した。

4. X線回折, DSC 測定

インドメタシン、尿素および試料 I, II について X 線回折 (Ni — filter, CuKα 線) DSC (試料約 8 mg, 昇温速度 2.5°/min) 測定を行なった。またインドメタシン・尿素の 2 成分系について DSC により状態図を作成し、回線回折測も行なった。

結果と考察

1. 水への分散, 溶出

インドメタシンの原末は微粉末で結晶は (Photo. 1) 1~5 μ であるが尿素の結晶は (Photo. 2) 50 μ 以上のものが見られた。3 時間らいかいした I は (Photo. 3) 大きいものでも 5~15 μ と粉砕されているが, II は (Photo. 4) は均一なペースト状で, この倍率では結晶は確認出来なかった。水への分散では, I は底に沈殿したままになっているのに対し, II は投下した瞬間

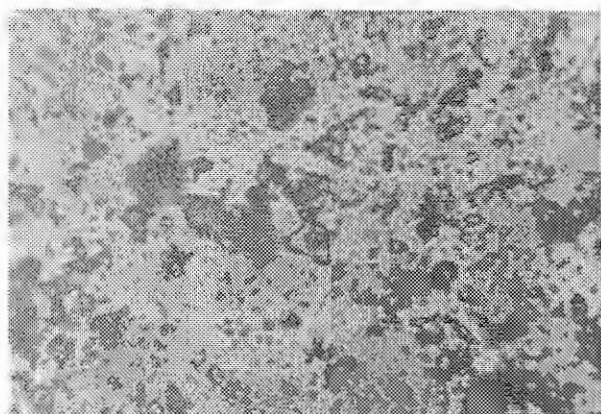


photo1.

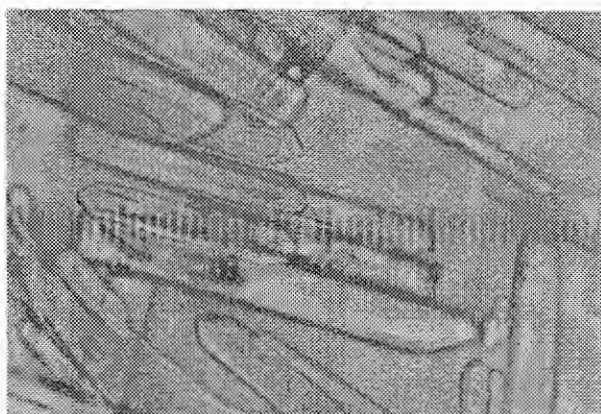


photo2.



photo3.

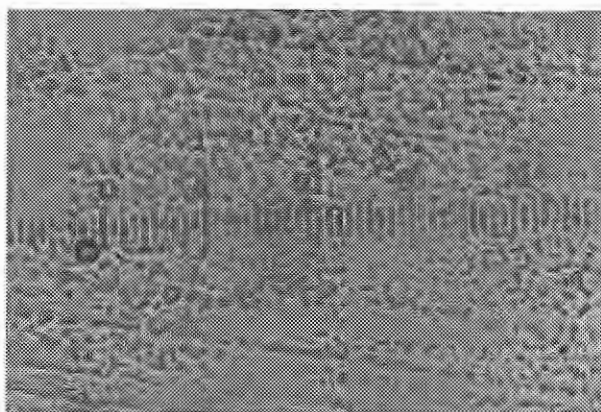


photo4.

水へすばやく分散し白濁した。次にセルローズ膜を介した溶出試験の結果を Fig. 1 に示した。これによると I は 4 時間で約 80 % の溶出であったのに対し, II は 3 時間ですでに 100 % の溶出を示

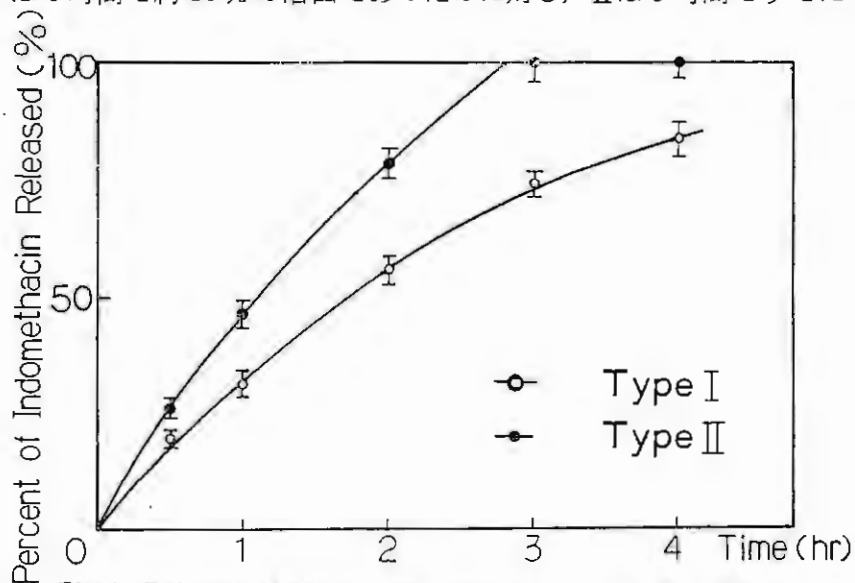


Fig.1. Release Patterns of Indomethacin from Type I and Type II

し, 水への分散が良かった II が溶出試験においても良い結果が得られた。

2. X線回折, DSC 測定

インドメタシンには3種の多形があることはすでに報告されて³⁾おり、本実験に用いたインドメタシンは γ 形であった (Fig. 2)。Fig. 4によるとIは γ 形インドメタシンと尿素のかさなったピークが見られたが、Fig. 5ではIIは α 形に転移しており尿素とかさなったピークが見られた。

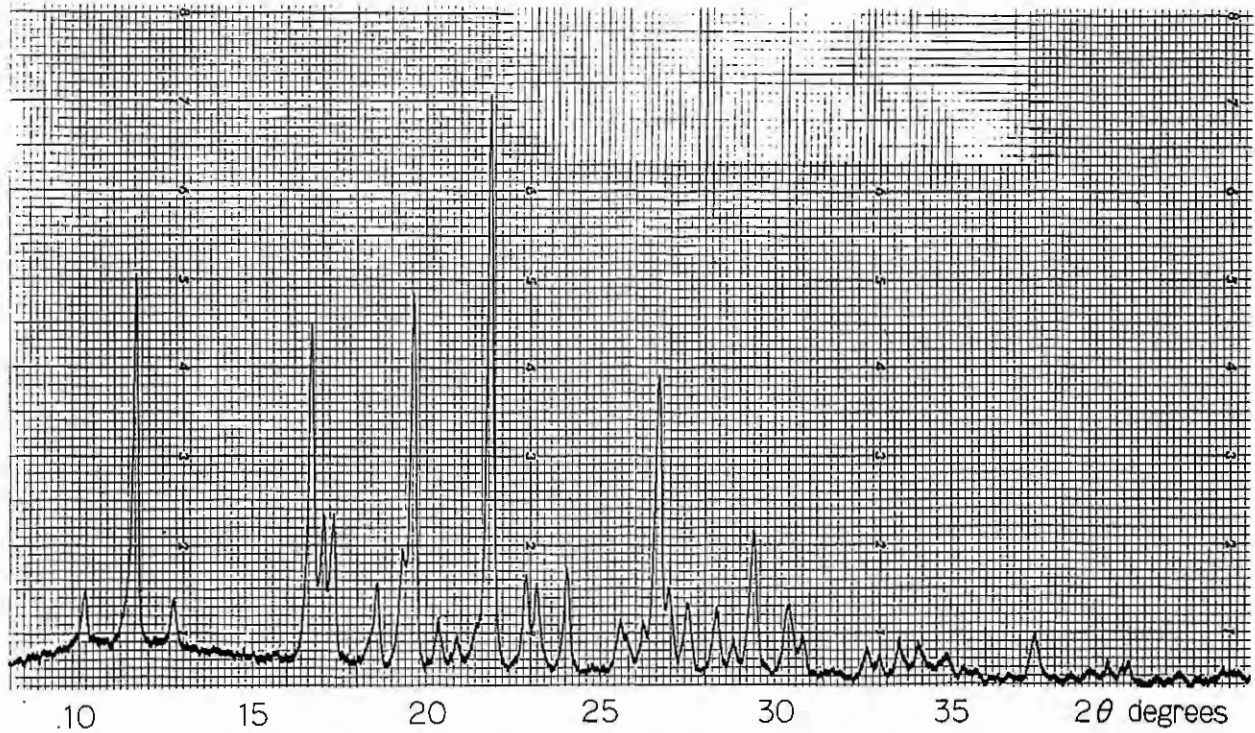


Fig.2. X-Ray Diffraction pattern of Indomethacin (γ form)

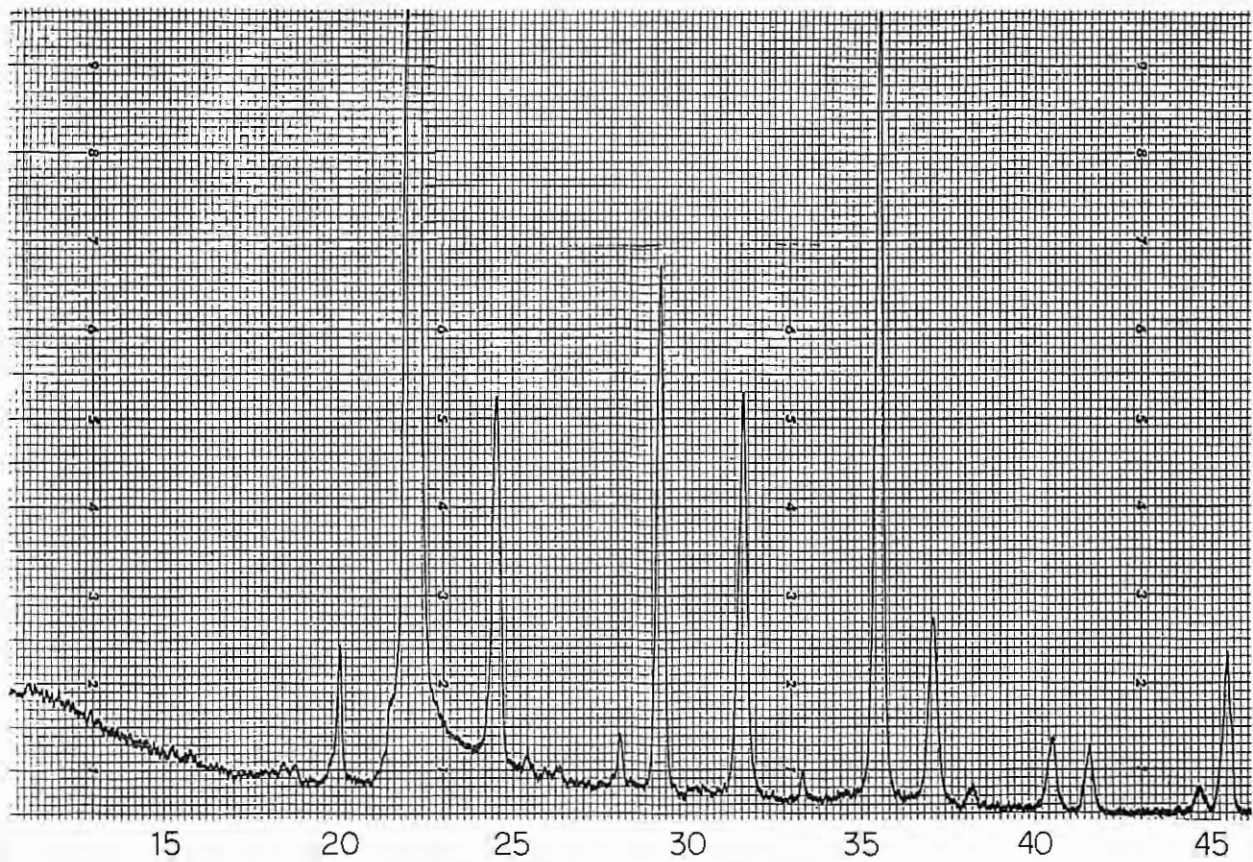


Fig.3. X-Ray Diffraction Pattern of Urea

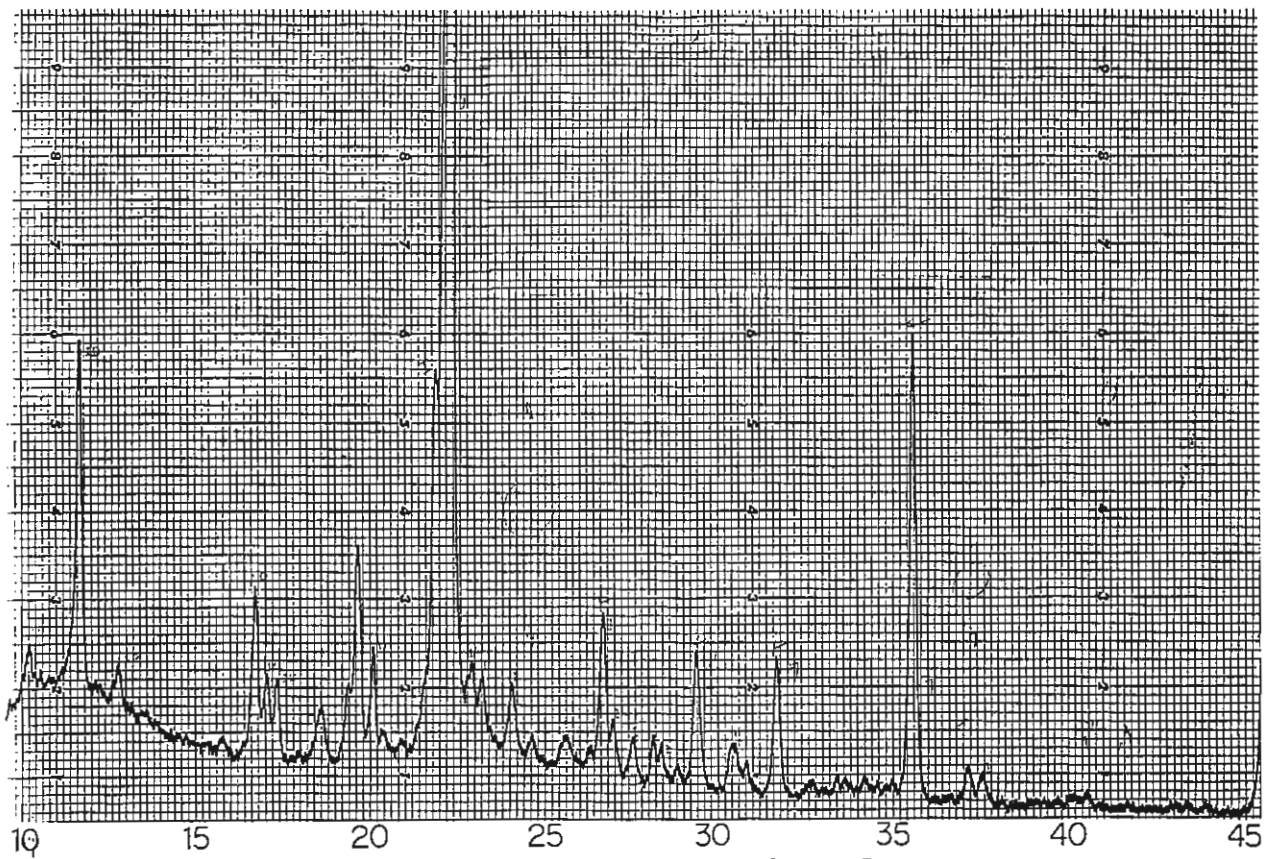


Fig.4. X-Ray Diffraction Pattern of Type I

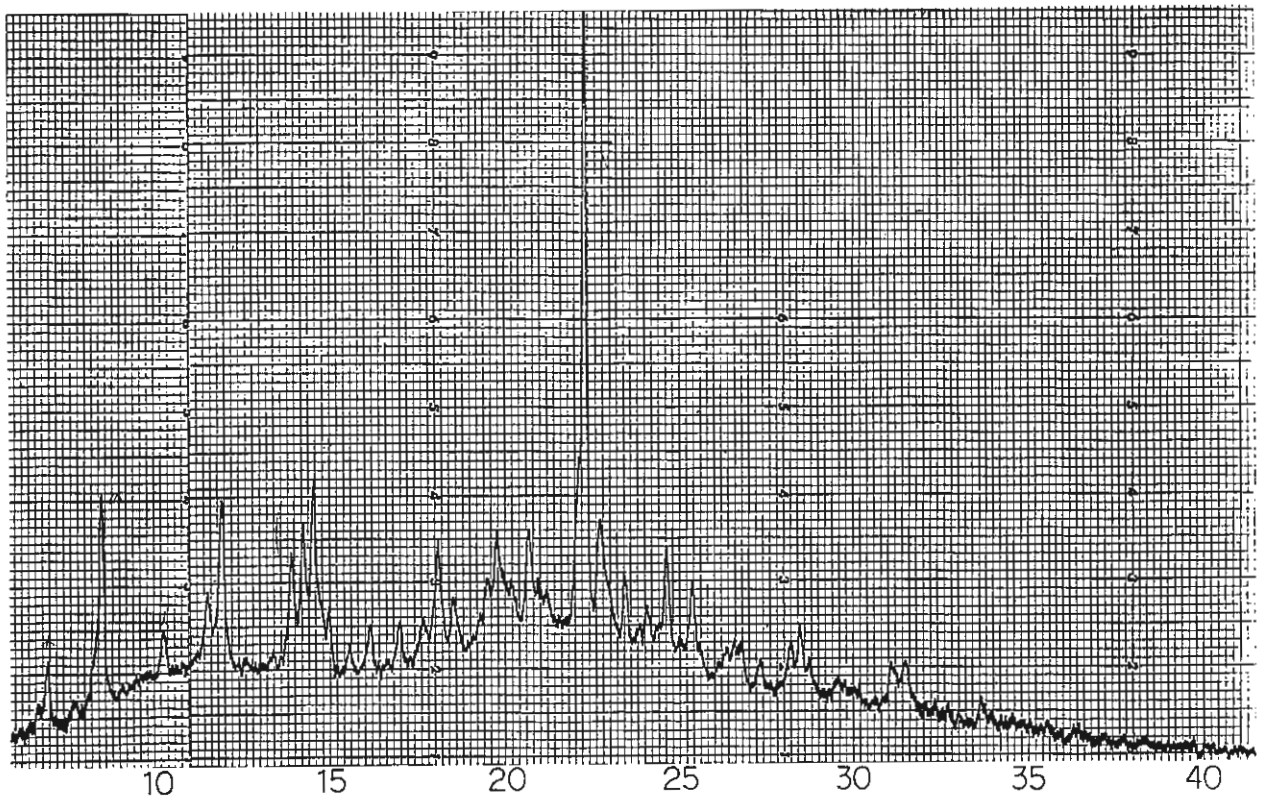


Fig.5. X-Ray Diffraction Pattern of Type II

次に DSC により Fig. 6 で示した吸熱曲線が得られた。I は 90 °C より、II は 84 °C よりそれぞれゆるやかな吸熱ピークを示し、これはインドメタシンの結晶形の相違によるものと思われた。また Fig. 5 においてピークが全体的に小さくベースラインもふくらんでおり、Fig. 6 では II の方がピーク面積が小さいことより、I より多く PG に溶解しているのか、それとも一部アモルファスの状態になっているのではないかと思われた。

以上より PG 中でのインドメタシンと尿素の Physical Mixture である I に比べ一度溶融した II は顕微鏡では結晶が観察出来なかったのに対し、X線回折 DSC 測定では結晶となって存在していることが示され、これは PG 中で両者が互いに微細な結晶粒子となって凝集している状態つまり共融化合物のような形になっていると考えられた。このように水に難溶性のインドメタシンを易溶性の尿素と共融化させることにより、水への分散、溶出の促進が見られたのではないかと。また γ 形よりも α 形が吸収が良いという報告¹⁾があり α 形への転移が見られた II が総合的に見ても実際の吸収において優れているものと考えられた。

次にインドメタシン・尿素 2 成分系について Complex 生成の有無を調べるため状態図を作成した (Fig. 7)。これによるとモル比 1 : 1 に共晶点をもつ単純共融系のパターンを示しており Complex は生成していなかった。また 1 : 1 のインドメタシン 85.6 % を溶融固化し粉碎したものについて X 線回折

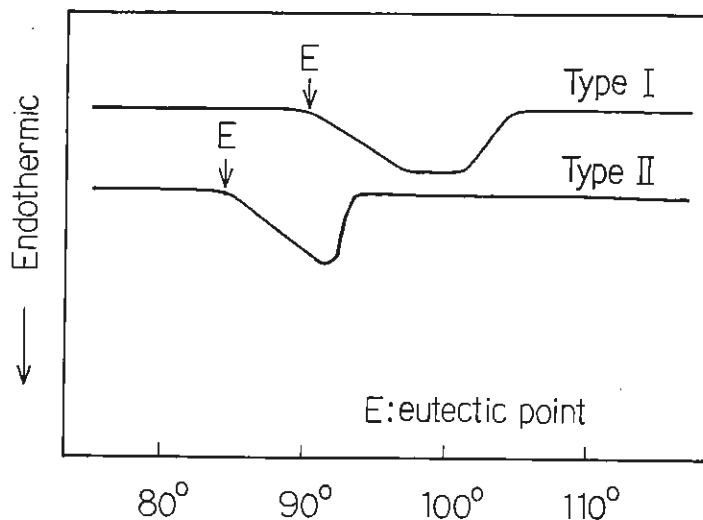


Fig.6. DSC Curves of Indomethacin and Urea

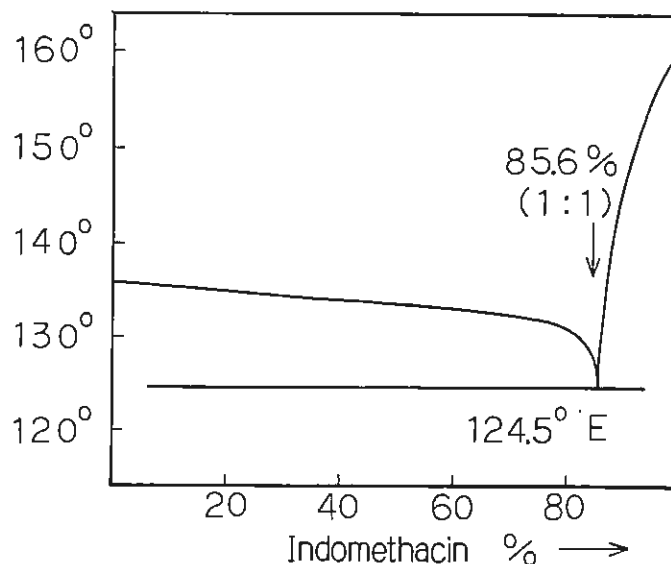


Fig.7. Phase Diagram of Indomethacin and Urea

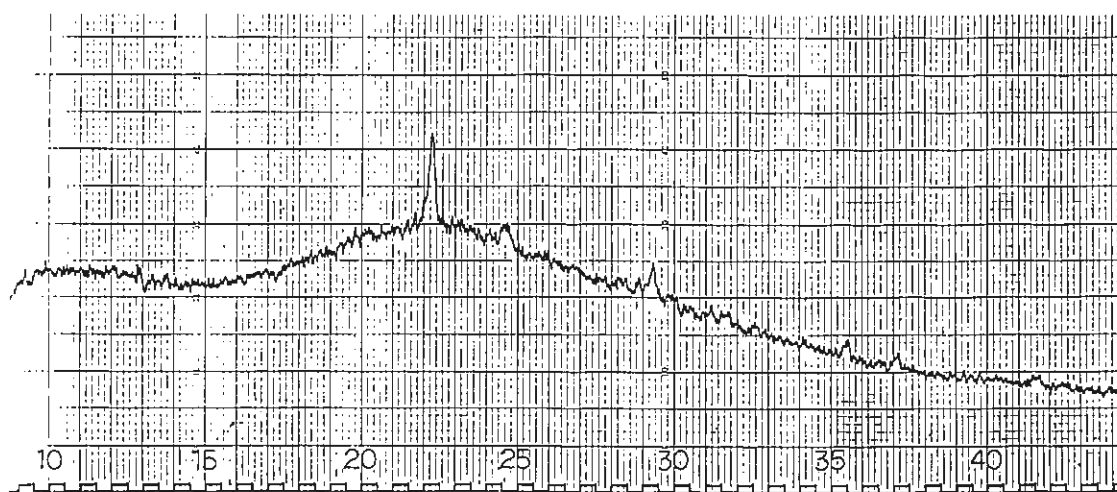


Fig.8. X-Ray Diffraction Pattern of Indomethacin 85.6 %

折を測定したところ (Fig. 8) 尿素のピークだけでインドメタシンはアモルファスになっていた。したがってIIの結晶形転移はPGによる再結晶でおこったものと推測された。

文 献

- 1) 石黒文子他：ハッカゴム膏におけるサリチル酸メチルの放出挙動, 家庭薬研究, 2, 59 (1983)
- 2) S. J. Soldin, T. Gero : *Clin. Chem*, 25, 589 (1979)
- 3) H. Yamamoto : *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 16, 17 (1968)
- 4) 黒田耕司他：薬誌, 99, 837 (1979)



カフェイン配合製剤の経時変化について

飯 倉 康 男 針 原 悦 子

下 田 美 津 子

第一薬品株式会社 研究部*

従来かぜ薬や解熱鎮痛薬等に配合されている無水カフェイン（以下 CF と略す）の経時変化についてはあまり問題とされていなかった。今回当社の品質管理上、製剤の種類により CF 含量に若干の低下が認められたので室温保存品と 40°、RH 75 % 保存品との比較及び剤型別による設定配置（使用）期限後の CF 含量について試験を行ったので報告する。

実 験 材 料

試料 K（散剤） 成分・分量（2 包中） アスピリン 1,200mg, プロムワレリル尿素 200 mg, CF 100 mg, ケイヒ末 60 mg, 賦形薬, 合計 2,000 mg

試料 Z（顆粒） エテンザミド, アセトアミノフェン, プロムワレリル尿素, CF

試料 M（素錠） アスピリン, エテンザミド, CF

試料 D（糖衣錠） ブセチン, エテンザミド, マレイン酸クロルフェニラミン, ノスカピン, CF

試料 R（液剤） チアミンチオシアン酸塩, 塩酸ピリドキシン, ニコチン酸アミド, アミノエチルスルホン酸, ゴオウチンキ, CF

試料 K は散剤を茶クラフトテープに分包したものを室温に保管してある保存試料と、別に新たに製造し、茶クラフトテープ及びメタルテープに分包した試料中の CF 含量の経時変化を調べ、製造時の CF 含量を 100.00 とした時の値を Table 1. に示す。

Table 1. 試料 K 中の CF 含量の経時変化

CF 含量（室温保存） 茶クラフトテープにて分包（比色法による）

1 箇 年	2 箇 年	3 箇 年	4 箇 年	5 箇 年
101.53	98.45	96.97	97.54	96.69

CF 含量（40°, RH 75 %） 茶クラフトテープにて分包（比色法による）

1 箇 月	2 箇 月	3 箇 月	4 箇 月	5 箇 月	6 箇 月
99.23	100.35	97.43	96.11	95.83	96.48

CF 含量（40°, RH 75 %） ^{*1}メタルテープにて分包（比色法による）

1 箇 月	2 箇 月	3 箇 月	4 箇 月	5 箇 月	6 箇 月
99.46	96.69	101.03	99.11	95.94	95.63

*1 ポリエチレン 15 μ アルミニウム 15 μ

茶クラフトテープにて分包室温保存 3 箇年目及び 40°, RH 75 % 6 箇月目で約 3 % 低下し, 従来から言われていた室温保存 3 箇年と 40°, RH 75 % 6 箇月保存試料の値がほぼ一致した

(Fig. 1)。室温保存 5 箇年では新たな低下は認められなかった。メタルテープに分包した試料についても茶クラフトテープに分包した試料とほぼ同様であった。又その他製剤で室温に保管

してある試料中の CF 含量を測定し, 製造時の CF 含量を 100.00 とした時の値を Table 2 に示す。

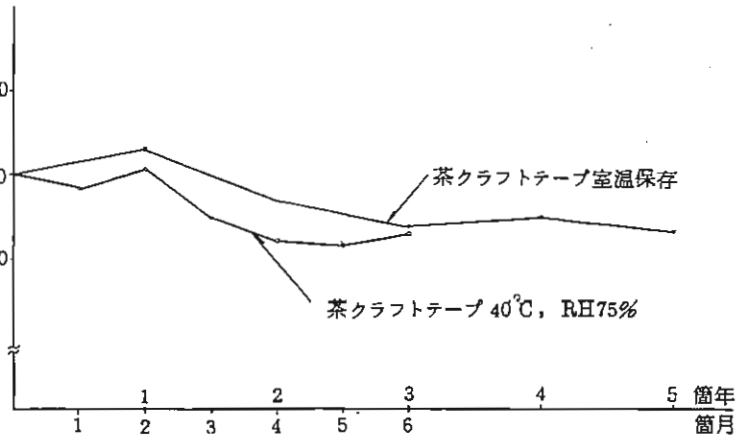


Fig.1. 試料K中のCF含量とその経時変化

Table 2. その他の試料中の CF 含量の経時変化

試料名	試料 Z	試料 M	試料 D	試料 R
経過年数	5 箇年	2.5 箇年*2	5 箇年	2 箇年
CF 含量	99.24	98.57	97.17	100.57

*2 使用期限で 3 箇年が設定してあるが, 製造開始して約 2.5 箇年である。

試料 Z は顆粒剤をグラシンポリエチレンテープで分包。試料 M は素錠を PTP 包装。試料 D は糖衣錠をセロファンポリエチレンテープで分包。試料 R はかっ色のガラスびんに充てんした液剤である。試料 Z, M, D 及び R の CF 含量については比色法, HPLC 法ともほぼ同様の結果が得られた。

試料 K について経時変化試験をメタノール抽出による HPLC 法で定量を行うと, CF が抽出不足となり, 見掛上 CF 含量のより大きな低下を示す, これが CF 含量の低下に起因するものか又は抽出溶媒に起因するものか, 或いは比色法と HPLC 法の相異に起因するものかの確認を行った (Fig. 2)。

A 希塩酸+水抽出	{	比色法で定量	96.40%
		HPLC 法で定量	97.67%
B メタノール 100 % 抽出	{	比色法で定量	81.32%
		HPLC 法で定量	82.68%

Fig. 2 試料 K (室温 4 箇年保存の同一ロット) 中 CF の抽出法 (希塩酸+水とメタノール 100 %) の比較及び比色法と HPLC 法の比較

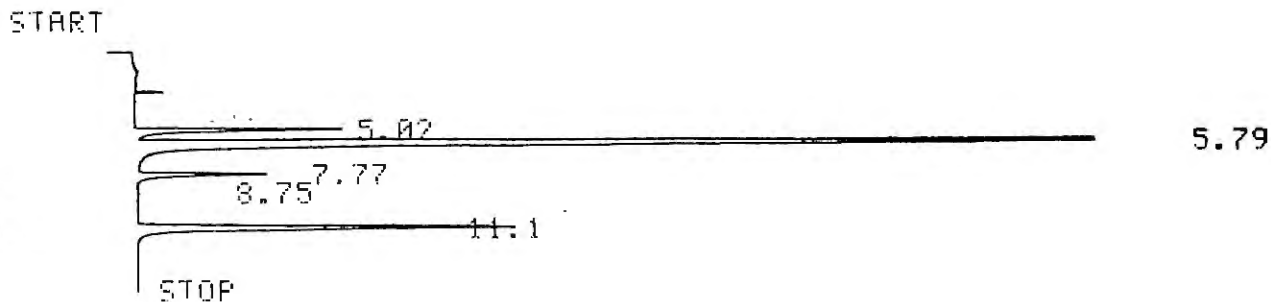
実験の部

試料 K 中の CF の定量法

1. 比色法 (次亜塩素酸・ピリジン法) ……常法とおり

2. HPLC 法

試料をよくすりつぶし CF として約 50 mg (試料 1,000 mg) を精密に量り, 100 ml のメスフラスコに入れメタノール約 60 ml を加え室温にて超音波発振器 (45 KHz) で 15 分間抽出を行い, メタノールを加えて 100 ml とする。遠心分離後上澄液をろ過し, そのろ液 2 ml を量り, 別に内部標準物質として, 日局パラオキシ安息香酸エチル 1 mg/ml メタノール溶液 4 ml を量り, 25 ml のメスフラスコ中に合わせて入れ, メタノールを加えて 25 ml とし HPLC を行う (Fig. 3)。



TIME	
2.52	MeOH
5.02	Caffeine
5.79	Aspirin
7.77	Bromovalerylurea
11.1	Ethyl Parahydroxybenzoate

Fig. 3. Chromatogram of Sample K

HPLC の条件

カラム	Zorbax ODS (4.6 mm ϕ × 15 cm, ステンレス製)
カラム温度	45° 付近の一定温度
移動相	メタノール:リン酸 (1 → 20,000) 混液 = 1 : 1
流量	0.4 ml/分付近の一定流量
測定波長	220 nm
感度	2 ⁵ mV/フルスケール
チャートスピード	2 mm/分
注入量	2 μ l

結果

CF 含量について

製造時の CF 含量を 100.00 とした時, 試料 K は茶クラフトテープにて分包した状態で室温保存 3 箇年目及び 40°, RH 75 % 6 箇月保存で約 3 % 低下する。又別にメタルテープにて分包し 40°, RH 75 % 6 箇月保存した場合も同様であった。茶クラフトテープにて分包した状態で室温保存 5 箇年経過するも新たな低下は認めない。

試料 Z 室温保存 5 箇年, 試料 R 室温保存 2 箇年経過するも低下は認めない。試料 M は室温保存 2.5 箇年で 1.4 % の低下, 試料 D は室温保存 5 箇年で約 3 % の低下を認めた。

試料K中のCFの抽出について

希塩酸+水による抽出を行い定量（比色法）を行う時は、製造時及び経時変化試験に於て抽出上の問題はない。しかしメタノールにて抽出を行い定量（HPLC法）を行うと、製造時及び40°、RH75%4箇月経過位まではCFが100%抽出されるが、それ以上期間が経過するとCFの抽出量が下がり、CF含量のより大きな低下を示す。又メタノール抽出時、温度を55-60°で行うも、抽出時間を室温で45分行うも抽出方法としては有効な手段ではなかった。メタノールとクロロホルムの混合溶媒による抽出方法も検討したがメタノール（100%）抽出よりも優位ではなかった。（測定波長254nm）

尚試料Mについても差は少ないものの試料Kと同じ様な傾向が見受けられた。

結 論

試料K、Z、M、D及びRについてCF含量の低下するものもあるが規格幅は満足する。又比色法とHPLC法による定量法自体には両者に有意な差はなく、抽出溶媒にメタノールを用いると製剤によっては経時変化試験に於て見掛上より大きな差を生じる。今後HPLC法等による試験法を設定する際には試料Kの様な挙動を示す場合もあるので、抽出等については十分な注意が必要と考え、更に検討を重ねたいと思う。

原料の粒度及び製法の違いによる顆粒剤の収率について

岡 崎 秀 寿

株式会社広貫堂 製剤第二課*

私ども医薬品製造工場では、製剤をいかに収率よく製造し、また工程の短縮化を計るかが必要な問題となっている。そこで今回A製品について、収率の向上を考えるべく製造現場の協力の基に取り組んだ結果、原料の粒度及び製法の違いによりA製品の収率に向上が見られたのでここに報告する。又、本文中のデータは現場より得られたものである。

製品及び工程の概要

A製品の製造工程を Fig. 1 に示す如く生薬原料を粉碎篩過したものと、洋薬原料および賦形薬の篩過したものを配合し、結合剤を溶媒に溶かし結合剤溶液として加えて練合、造粒、乾燥工程をへて分級し、次工程へ送る。

Table 1. A製品の処方

原料名	数量
洋薬類 A	209
生薬類 A	150
賦形薬	412
結合剤	29
合計	800

Table 1 にA製品の処方を示し、Fig. 2, Fig. 3 にA製品の収支を示す。Fig. 2 は、乾燥工程から分級した正粒の収支を示し、Fig. 3 は、Fig. 1 の製造工程で示したように、荒粒を破碎しさらに分級して得た正粒の収支である。このように、破碎工程を行なう以前では正粒の収率が62%であるのに対し破碎工程によって79.4%の収率を得た。しかし今回破碎工程を省略して効率よく正粒の収率を上げる方法はないか検討を行なった。

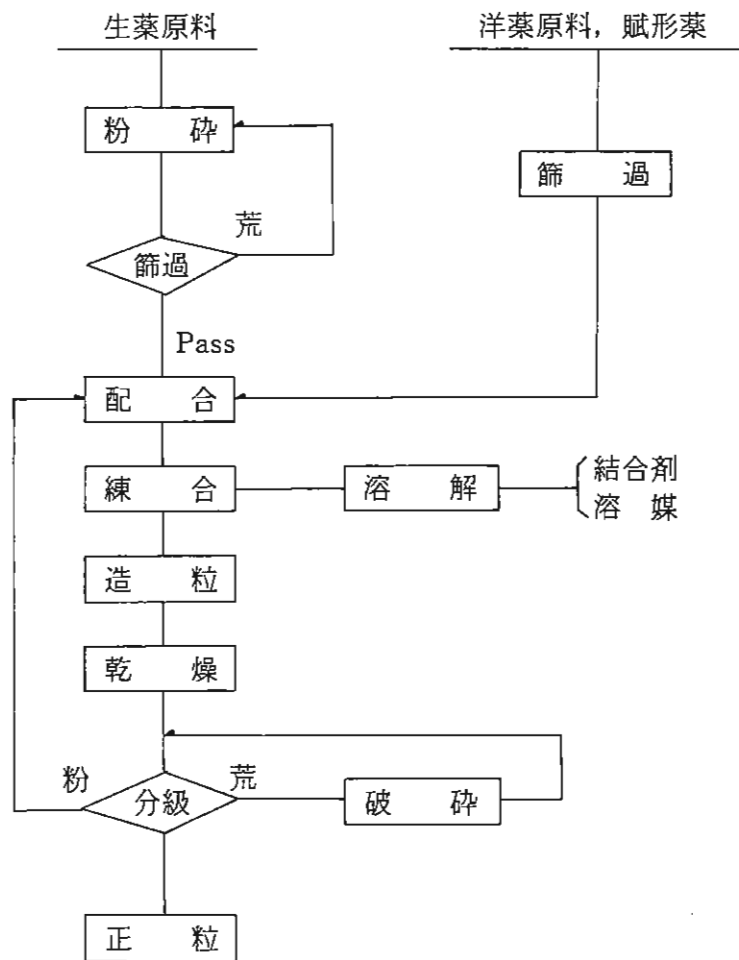


Fig. 1. A製品の製造工程

* 〒 930 富山市梅沢町 2-9-1

TEL 0764 (24) 2271

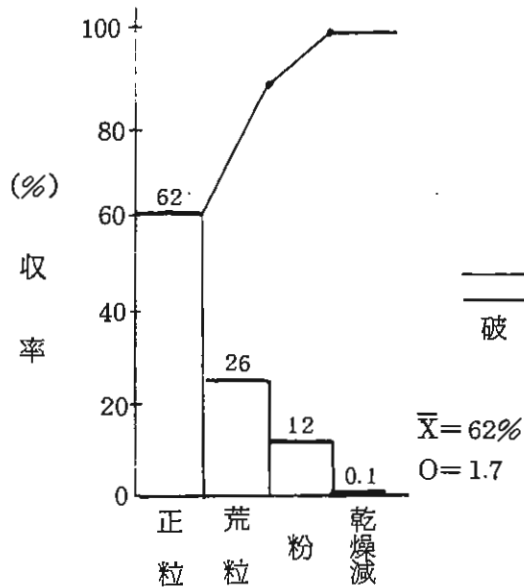


Fig. 2. 破碎前

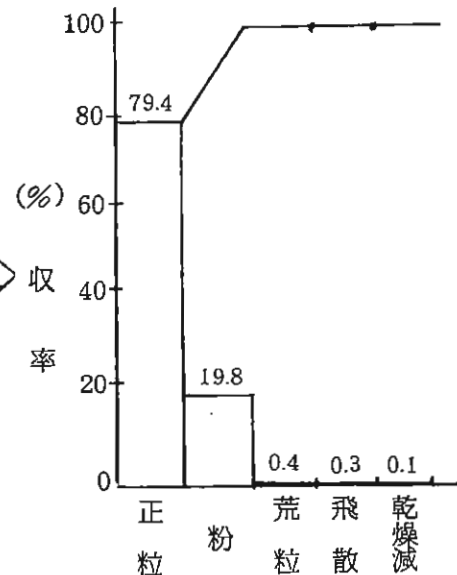


Fig. 3. 破碎後

実験の部

顆粒の収率に影響をおよぼす因子として、下記の3点が大きく影響してくると思われるので、以下この3点について実験を行なった。

- 1) 原料の粒度
- 2) 造粒時のスクリーンの目の大きさ
- 3) 結合剤液量

1. 原料の粒度とスクリーンの目の大きさの関係

ここで原料の粒度についてであるが、前に示した製造工程 (Fig. 1) から、生薬原料の粒度が収率に大きく影響をおよぼしているのではないかと考えられるので、ここでは生薬原料の粒度について実験を行なった。

まず生薬原料を粉碎し、80 ~ 150 mesh, 150 ~ 180 mesh, 180 mesh passのものに分け、造粒時のスクリーンの目の大きさを0.6 mmφ, 0.8 mmφ, 1.2 mmφとして、結合剤液量を一定とし、顆粒を製しその収率を見た。その結果を Table 2 に示す。80 ~ 150 mesh の生薬末を用いたものでは、0.6 mmφ,

Table 2. 各粒度における顆粒剤の収率 単位φ n=3

スクリーンの目	粒度	80~150mesh	150~180mesh	180mesh pass
0.6 mmφ		発熱	すこし発熱 91.3	92.6
0.8 mmφ		発熱 77.6	79.3	78.6
1.2 mmφ		63.5	60.3	62.7

0.8 mmφのスクリーンで発熱を起こし、1.2 mmφでは、63.5%の収率を得、また150~180 meshでは0.6 mmφですこし発熱を起こし、0.8 mmφでは79.3%, 1.2 mmφでは60.3%, 180 mesh passのものについて0.6 mmφ 92.6%, 0.8 mmφ 78.6%, 1.2 mmφ 62.7%の収率を得た。この結果からスクリーンの目の大きさが、小さくなればなる程、顆粒の収率が良くなっており、又80 meshよりも細かい生薬原料の粒度では、あまり顆粒の収率に粒度が影

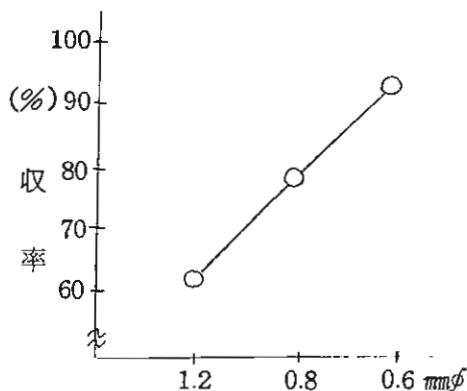


Fig. 4. 正粒の収量

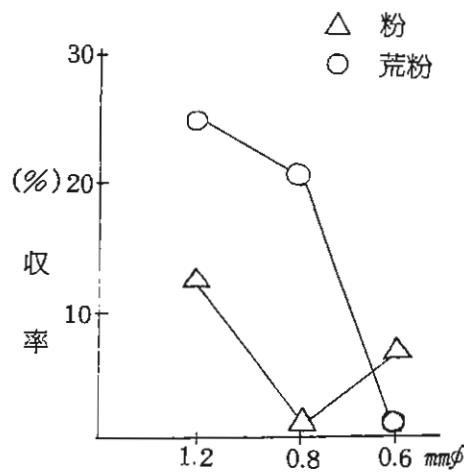


Fig. 5. 荒粒および粉の収量

響していないことがわかる。Fig. 4および Fig. 5は、生薬原料が180mesh passしたものについてグラフ化したものである。Fig. 4から、スクリーンの目が小さくなればなる程収率が向上していることが分かる。また、Fig. 5から、スクリーンの目が小さくなればなる程荒粒の割合が少なくなり、0.6 mm ϕ になると、粉の割合が増加していることが分かる。

2. スクリーンの目の大きさとしめり（結合剤溶媒量）の関係

前記実験の結果から、生薬原料の粒子の大きさは、安全域を考え180 mesh passとし、次にスクリーンの目の大きさと結合剤溶媒量との関係を調べた。なお、A製品は、処方上結合剤の量が決っているので、溶媒量を変化させ、濃度の異なる結合剤溶液として顆粒を製し、実験を行なった。

Table 3. 各々の水準

水準	溶媒量
C ₁	現行 100%
C ₂	95
C ₃	90
C ₄	85

n = 4

水準として現行の溶媒量を100として以下95、90、85%の溶媒量とし（Table 3）、この量の溶媒を用い結合剤を溶解させ、顆粒を製し収率を見た。Fig. 6及び Fig. 7に各水準で行なったスクリーンの目の大きさと溶媒量との関係を示す。Fig. 6は、各水準における正粒の収率、Fig. 7は、各水準における粉の収率を示す。グラフから溶媒量の減少とともに、0.6 mm ϕ 、1.2 mm ϕ のスクリーンにおいて、正粒の収率が減少しているのに対し、0.8 mm ϕ では90%の溶媒量で正粒の

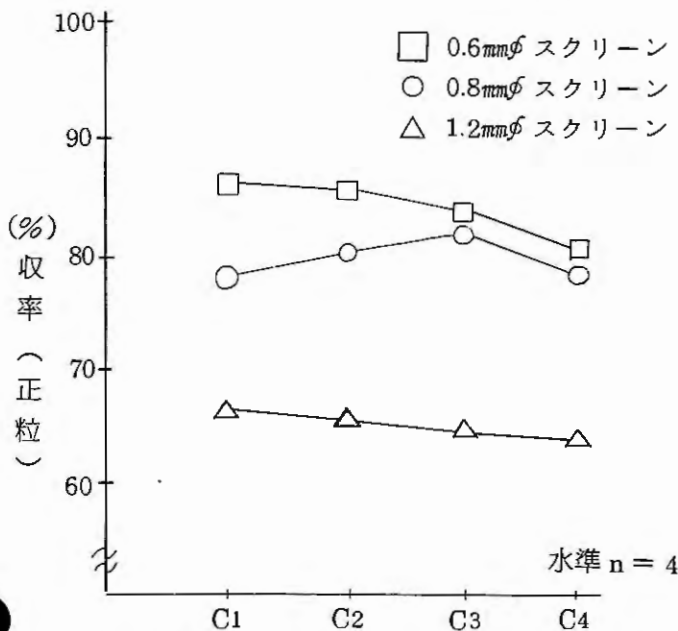


Fig. 6. 各水準における(12~48 mesh)の収率

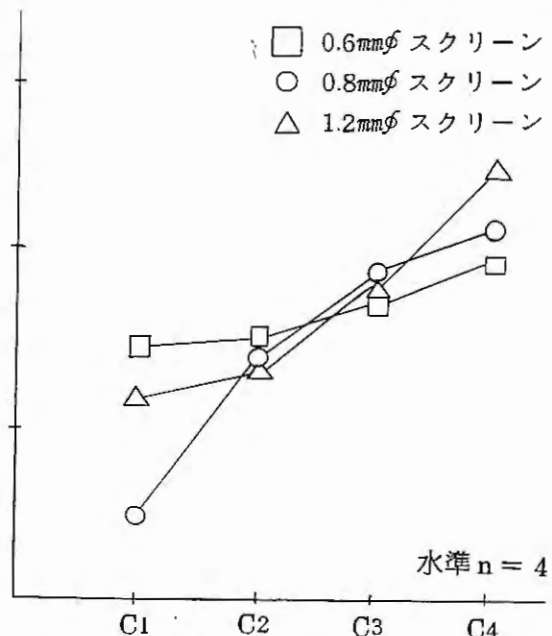


Fig. 7. 各水準での48mesh通過未の収率

収率がピークを示している。又、溶媒量の減少とともにそれぞれ粉の割合が増加している。なお溶媒量の変化によって収率に差があるか検定を行なった結果、危険率 (α) 1%で有意であったことをつけくわえておく。

結果及び考察

- 80 mesh よりも細かい生薬原料において、原料の粒度は顆粒の収率に影響せず、スクリーンの目の大きさが、収率に大きく影響をおよぼしていることが分かった。また、生薬原料の粒度が荒くなれば、スクリーンの目が小さくなればなる程、発熱を起こす。これは生薬原料の繊維質が、からみ合って造粒時に目づまりを起こす為、出にくくなり、発熱を起こすものでないかと考えられる。
- 溶媒量が減少すると正粒の減少以上に粉の増加が著しくなる。(特に1.2 mm ϕ のスクリーンにお

いて) 現行の溶媒量の 100% を越えると荒粒が増加するので、スクリーンの目の大きさによって溶媒量の最適値が異なっていると考えられる。なお、溶媒量の変化によって収率に差があるか検定を行ない、また、各々の溶媒量について収率の推定を行った結果を Fig. 8 に示す。各々の溶媒量において収率は危険率 ($\alpha = 1\%$) で有意であり、溶媒量 90% において 82.9% ~ 81.5% ($\alpha = 1\%$) の収率が得られると推定された。

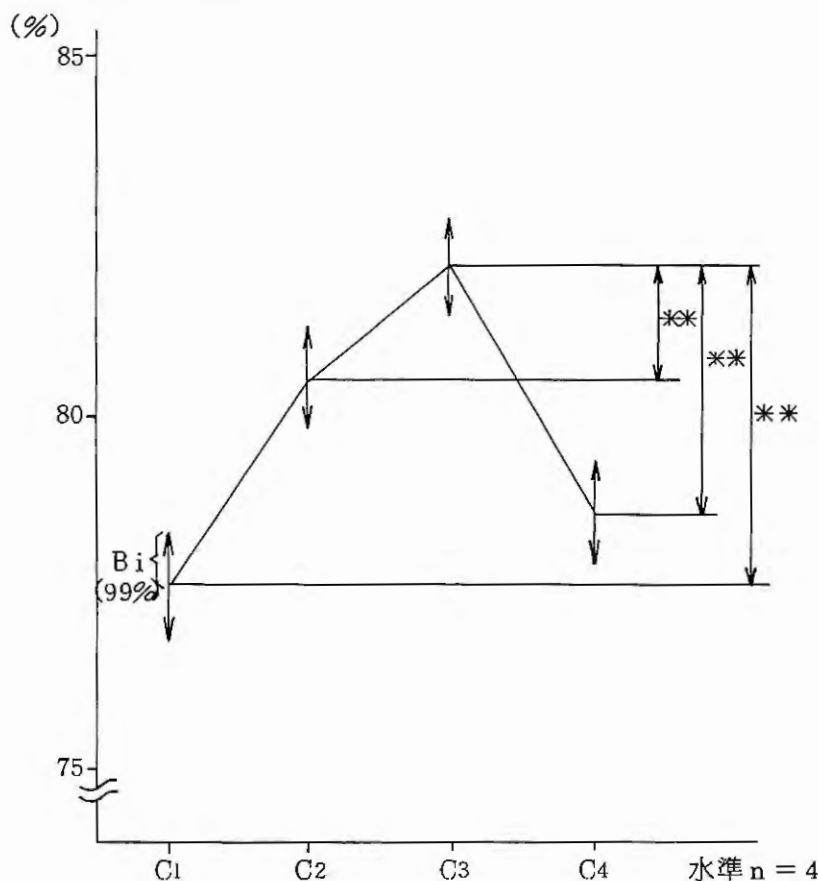


Fig.8. 各水準での正粒の収率の推定グラフ

結 論

A製品の製造条件の最適化を行なうに当り、造粒性、造粒速度、顆粒の形状などを考え合わせると、生薬粉末 180 mesh pass スクリーンの目の大きさ 0.8 mm ϕ 溶媒量現行の 90% とすることにより、最適条件を与えることが出来ると考えられる。この結果を基に実際の生産を行なったところ、破碎工程を通らず、平均 88.2% の収率を得た。

実験全体を通して

80 ~ 180 mesh の生薬末を使用すると、スクリーンの目が小さいと発熱をおこすことから、生薬末自体が繊維である為、篩過する繊維には相関があると考えられる。又、顆粒を作るに当り、スクリーンの目の大きさが異なれば、収率を最高とする為に要する溶媒量も異なることが分かった。なお、本研究は QC 研究論文に提出したものの一部であり、QC 手法および検定、推定に関するものは本発表に当り省いてある。

謝 辞

本研究に当り、御協力頂いた製剤第二課の方々に深く御礼を申し上げます。