

## 甘草中のグリチルリチンの湯液への移行率 (第一報)<sup>\*</sup>

—— 葛根湯・小青竜湯 ——

成川 一郎 西本 初博 吉井 美矢子  
Ichiro NARIKAWA Hatsuhiro NISHIMOTO Miyako YOSHI

中田 るり子 石田 裕子  
Ruriko NAKADA Yuko ISHIDA

東亜製薬株式会社 試験研究室<sup>\*\*</sup>

甘草は、現在我が国で公的に認められている漢方処方 210 処方中 147 処方に配合され、その配合率は 70% に達し、また、その使用総量も他の漢方生薬に比べて圧倒的に多い。したがって、その主成分グリチルリチンについての物性や薬理効果等については多数報告されている。しかし、市場品についての実状や、実際に漢方湯液として服用される場合のグリチルリチン利用率等についてはほとんど報告がない。

我々は主産地、東北・西北並びに新疆産の甘草について TLC 及び HPLC のパターンを比較し、更にこれらを単独もしくは漢方処方として煎出した場合の各湯液中へのグリチルリチン移行率 (利用率) を経時的に求め、若干の知見を得たので報告する。

### 実験の部

#### I 甘草の産地別 TLC 並びに HPLC パターンについて

1. 試料 : 東北甘草, 西北甘草, 新疆甘草の各細切品  
その他の生薬は、市場一般品の各細切品

#### 2. 試験方法

##### 1) TLC<sup>1)</sup>

各甘草を酢酸エチルで抽出した液を検液とする。

展開液 : ベンゼン・酢酸エチル・酢酸混液 (25 : 25 : 1)

発色法 : ① UV (365 nm) 照射

② 希硫酸噴霧後 105° 3~5 分間加熱

##### 2) HPLC

各甘草については、水・メタノール混液 (1 : 1) で抽出した液を遠心分離して検液とする。  
漢方処方については熱水抽出後、遠心分離した液を検液とする。

HPLC 条件 カラム : Waters 社製 Z 型加圧モジュール

Radial-PAK NOVA-PAK C<sub>18</sub> (8 mm ID × 10 cm)

カラム温度 : 室温

検出波長 : 254 nm

移動相 : 水・アセトニトリル・酢酸混液 (65 : 32 : 3)

流量 : 2.0 ml/min

\* 第 5 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1985 年 11 月 6 日)

\*\* 〒 930-03 富山県中新川郡上市町若杉 55 TEL 0764 (72) 1010

### 3. 試験結果

#### 1) TLC

各産地の甘草につきTLCを行った結果については、photo 1及び2に、また、これらを用いた漢方処方については、photo 3及び4に示した。これによれば新疆産甘草及びこれを用いた漢方処方にもRf約0.5に特有の黄緑色のけい光スポットを検出し、このけい光スポットは希硫酸噴霧後、105°で3～5分間の加熱により濃赤色を呈した。

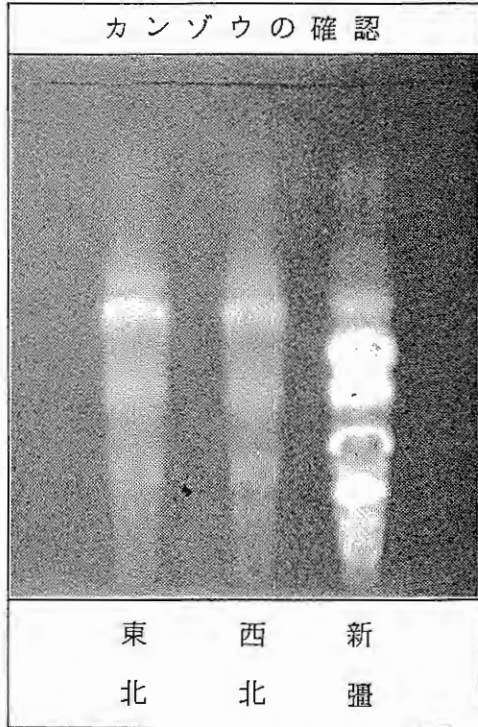


photo 1. TLC, 甘草 UV時

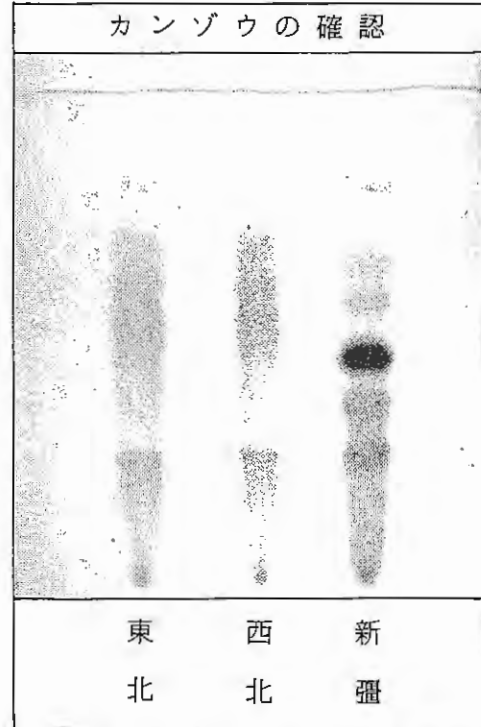


photo 2. TLC, 甘草, 希硫酸噴霧時

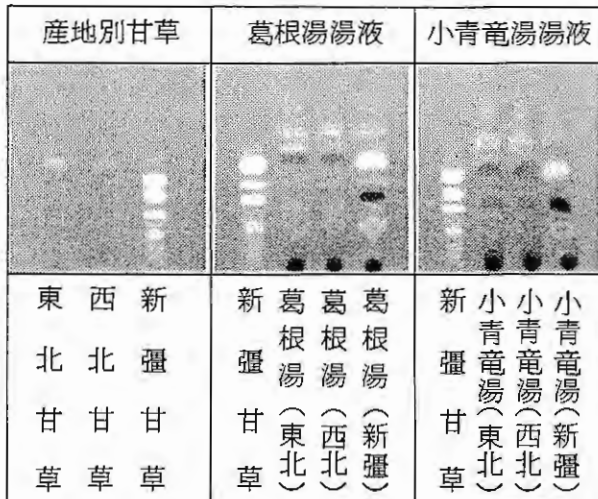


photo 3. TLC, 甘草, 葛根湯, 小青竜湯 UV時

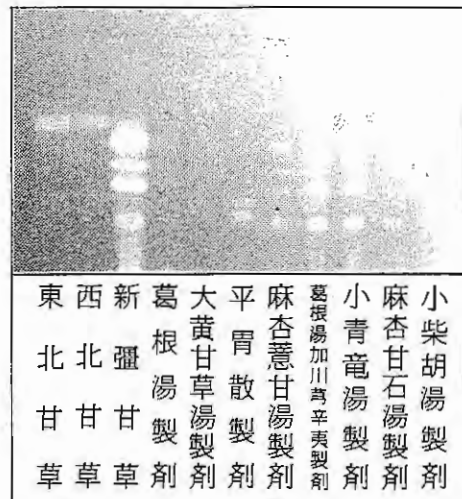


photo 4. TLC, 漢方エキス製剤 UV時

#### 2) HPLC

各産地の甘草及びこれを用いた漢方処方につき、HPLCを行った結果についてはFig.1に示した。これによれば新疆産甘草及びこれを用いた漢方処方にも、R.T.約15分に特有のピークが認められたが、このピークは先にTLCにおいて認められた新疆産甘草特有のスポット部分の抽出液についてのHPLCのピークとは一致しなかった。

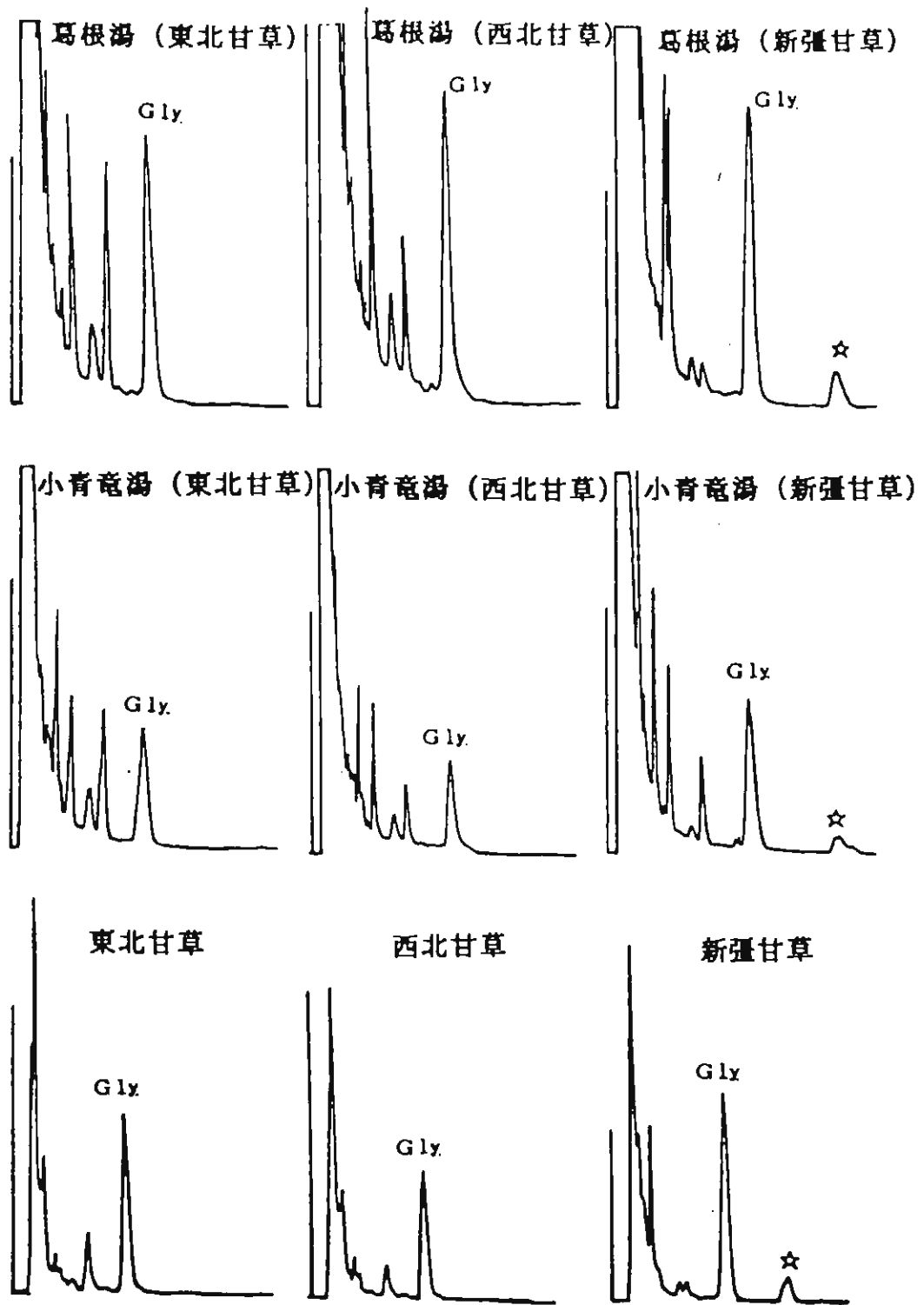


Fig. 1. 甘草及び湯液のHPLCパターン

## II 甘草中グリチルリチンの湯液中への移行率について

1. 試料：実験 I と同じ。

2. 試験方法

1) 甘草中グリチルリチンの定量

水・メタノール混液 (1:1) を用いて 3 回各 1 時間還流抽出後、抽出液を合わせて一定量とした液につき HPLC により定量する。

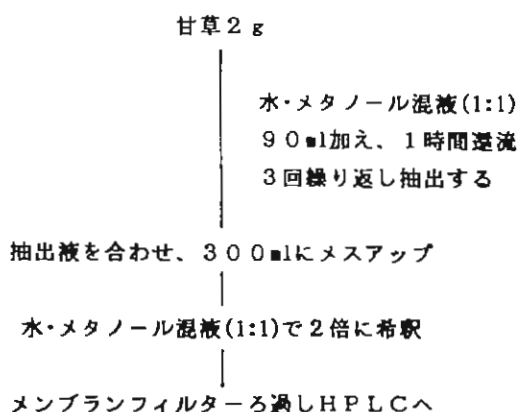
2) 漢方処方還流抽出液中のグリチルリチン定量

漢方処方の原生薬にその 20 倍量の水を加え、沸騰後 2 時間攪拌還流抽出を行う。沸騰開始後 30 分毎に抽出液の一定量を採取し、遠心分離した上澄液につき HPLC により定量する。

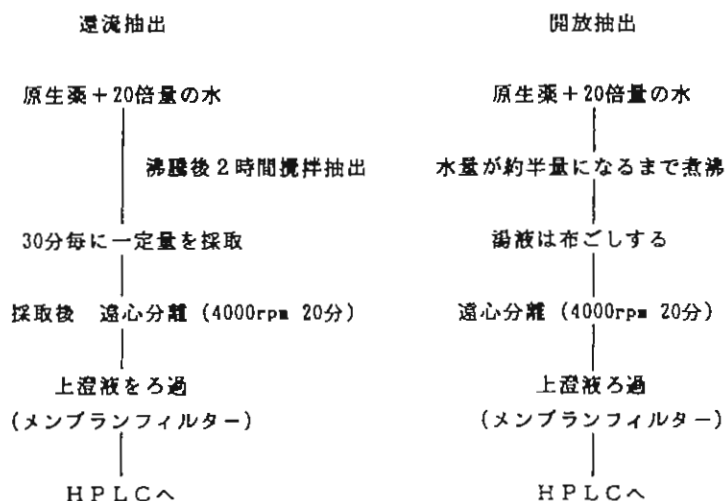
3) 漢方処方開放抽出液中のグリチルリチン定量

漢方処方の原生薬にその 20 倍量の水を加え、抽出水量が約半量になるまで煮沸、後布ごしし、更に遠心分離した上澄液につき HPLC により定量する。

### 抽出方法



### 抽出方法及び前処理



3. 試験結果

1) 甘草中のグリチルリチン量

各産地の甘草につき定量を行った結果について Table 1 に示した。この値からは甘草の産地別にグリチルリチン含有量の差は認められなかった。

Table 1. 産地別甘草のグリチルリチン含有率 (%)

東北甘草 (1)	東北甘草 (2)	西北甘草	新疆甘草
4.16	4.34	3.46	4.53

2) 甘草中グリチルリチンの湯液への移行率

各産地の甘草に含まれるグリチルリチンの湯液中への移行率を経時的に求めてFig. 2に示した。これによれば、移行率は65~75%で、甘草によって移行率に約10%の差が認められた。

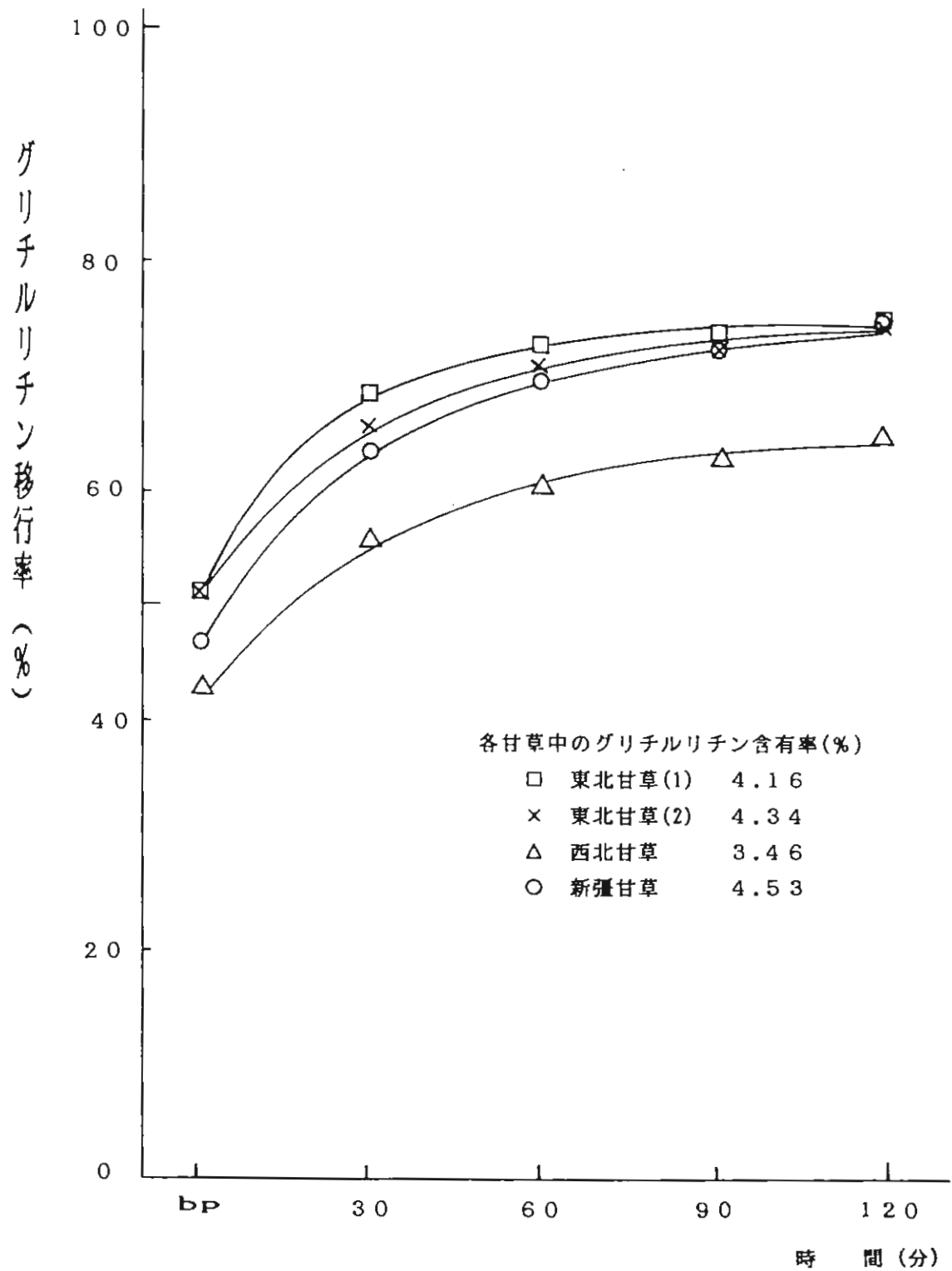


Fig. 2. 産地別甘草の熱水中へのグリチルリチン移行率  
(還流抽出)

3) 漢方処方中グリチルリチンの湯液への移行率

各産地別甘草を用いた葛根湯並びに小青竜湯につき、グリチルリチンの湯液中への移行率を経時的に求めてFig.3に示した。

これによれば、グリチルリチンの溶出量は、いずれも沸騰後60~90分で最大となり、これは、先に報告したマオウ中エフェドリンの湯液中溶出の経過に一致する。

一方、溶出率について葛根湯においては65~75%、小青竜湯においては25~40%と両処方に格差が認められた。

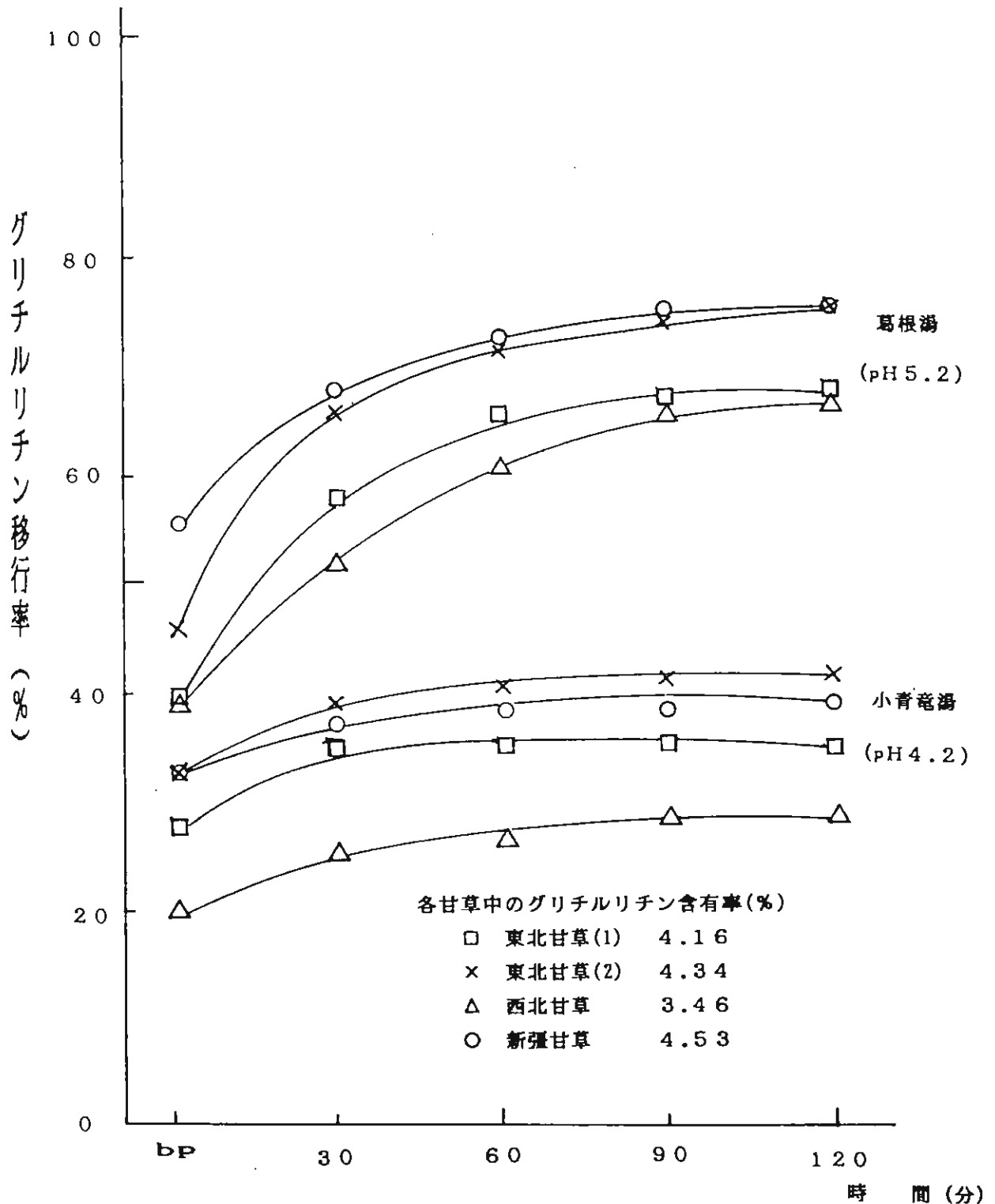


Fig. 3. 葛根湯・小青竜湯の湯液中へのグリチルリチン移行率  
(還流抽出)

4) 還流抽出と開放抽出におけるグリチルリチンの移行率

葛根湯，小青竜湯についてそれぞれに還流抽出と開放抽出を行いグリチルリチンの移行率を求めてTable 2で比較した。これによれば還流抽出の方が開放抽出の場合よりも，いずれも定量値が高く，その差は7～25%とばらついた。

Table 2. 還流抽出と開放抽出のグリチルリチン移行率の比較

	甘草の産地	東北甘草(1)	東北甘草(2)	西北甘草	新疆甘草
葛根湯	還流抽出	67.3%	76.1%	66.4%	75.3%
	開放抽出	52.9%	52.1%	54.9%	52.5%
小青竜湯	還流抽出	34.6%	42.2%	28.1%	38.4%
	開放抽出	26.8%	17.7%	21.2%	25.7%

5) pHの変化とグリチルリチンの移行率

小青竜湯湯液のグリチルリチン移行率が葛根湯のそれに比べて著しく低い原因につき検討した。Table 3は葛根湯と小青竜湯の構成生薬を比較したものである。小青竜湯のグリチルリチン移行率を低下させる原因が，小青竜湯中のいずれかの配合生薬にあると考え，半夏抜き，細辛抜き，五味子抜きでそれぞれ小青竜湯湯液を作り，各湯液中へのグリチルリチン移行率を求めて，その結果をFig.4に示した。五味子抜きの小青竜湯が約50%のグリチルリチン移行率を示したのに対して，半夏抜き，細辛抜きの場合は小青竜湯そのものと大差はなかった。そこで五味子抽出液にグリチルリチンの水溶液を加え，加熱してみたところ photo 5に見られるような綿状の沈殿を生じた。

一方葛根湯湯液のpHは5.2，小青竜湯湯液のpHは4.2と両湯液のpHに差があるのは，小青竜湯中に配合されている五味子中の有機酸によるものと判断される。そこで小青竜湯湯液のpHを0.1N KOH添加により順次変化させて定量した。その結果，五味子抜き小青竜湯とほぼ同じpH値において定量値はほぼ一致し，移行率は約50%に達した。

Table3. 構成生薬の比較

葛根湯 pH: 5.2	小青竜湯 pH: 4.2
麻黄	麻黄
桂枝	桂枝
芍薬	芍薬
甘草	甘草
生姜	乾姜
葛根	×半夏
大棗	×細辛
	◎五味子 pH: 3.1



photo.5

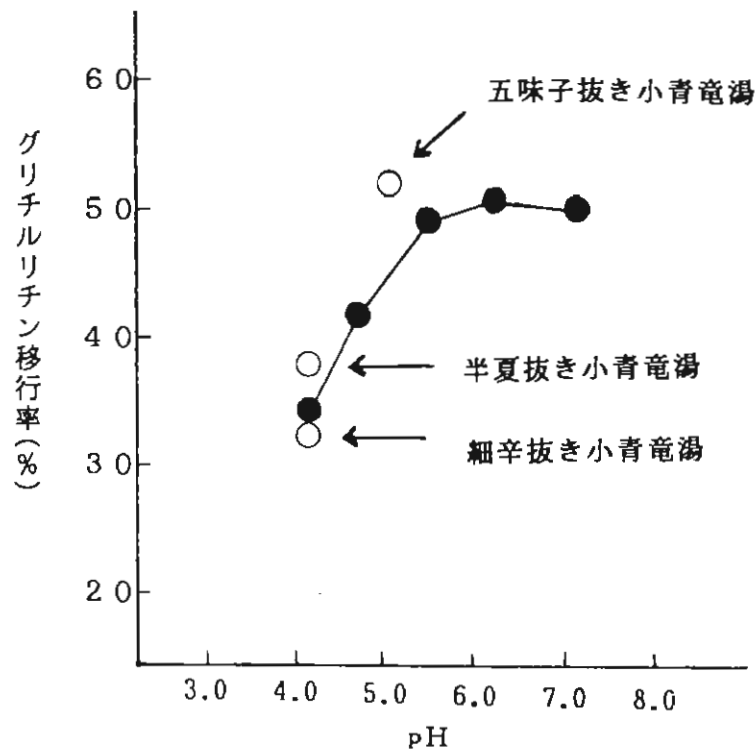


Fig. 4. 小青竜湯湯液+0.1N-KOHでpH調整した場合のグリチルリチン移行率(%)

## 考 察

現在市場に出廻っている東北産並びに西北産甘草に比べて、新疆産甘草は、グリチルリチンの含量としては大差がなく、その他の含有成分の種類が異なることを改めて確認した。漢方薬市場においては、甘草の使用に関し産地を云々する傾向があるが、新疆産甘草には少なくとも2種類の特有な成分が認められた。

一方、漢方処方湯液中のグリチルリチンの動向が、他の生薬成分によって影響を受けることは十分に考えられる。国立衛生試験所の野口<sup>2)</sup>はpHの低下で甘草中グリチルリチンと黄連中ベルベリンが結合して沈殿を生じると報告している。今回の我々の実験において小青竜湯中に配合されている五味子抽出液にグリチルリチンの水溶液を加えると綿状の沈殿を生じたが、これと同じことが小青竜湯の湯液中でも起こっているものと判断され、その沈殿物が遠心分離やろ過の過程でろ別されて定量値の減少をひき起こしたと考えられる。したがって小青竜湯湯液の場合、古典で指示されているように、煎出後、沈殿が浮遊状態にある熱い内に目の粗い布でろ過して服用することがより効果的であることが判明した。

また、開放抽出の場合に定量値が低下したのは、開放抽出の場合抽出液が約半量に濃縮され、湯液中グリチルリチン濃度も高まり、生薬残渣中に包含残存して定量にあずからない分の湯液に含まれるグリチルリチン量も多いためのばらつきと考えられる。

以上、漢方湯液においては、その調製方法によって格差が生じることが多く、湯液の調製のみならず、エキス製剤の製造工程においても、各漢方処方の特性を十分に検討した上で、より効果的な抽出処理方法を採用すべきである。



## 参考文献

- 1) 西本 和光：甘草の品質，現代東洋医学，vol 2 No.1 ( 1981 )
- 2) 野口 衛：Studies on the Pharmaceutical Quality Evaluation of Crude Drug Preparations Used in Oriental Medicine "Kampo" VI.  $^{13}\text{C}$  NMR Studies on Diberberine-mnoglycyrrhizinate and Related Compounds, 生薬学雑誌, 39 (2) 101~105 ( 1985 )

## 直打錠の成分 C<sub>p</sub> 値による均一性の改善<sup>\*</sup>

小西良宜 河内敏夫  
Yoshinobu KONISHI Toshio KAWAUCHI

田中 恣  
Tsutomu TANAKA

テイカ製薬株式会社<sup>\*\*</sup>

製薬企業は、有効でかつ安全性の高い優良な医薬品を供給するため、製造工程全般にわたる品質管理を組織的に進めている。

今回、直打錠のA製品について均一性の向上を目差し、製造部門と品質管理部門が協力して成分含量についての工程能力指数 C<sub>p</sub>、C<sub>pk</sub> 値を算出した。工程能力が低い成分については、その原因を調査・改良することにより、製品均一性が改善されたので報告する。

### 製品及び工程の概要

A製品の処方は、アセトアミノフェンが50%、アリルイソプロピルアセチル尿素が10%及び無水カフェインが8.3%である (Table 1)。その製造工程は主薬及び賦形薬を混合し、20メッシュのふるいを通過させ、再度混合し直接打錠している (Fig.1)。

Table 1. A製品の処方内容

アセトアミノフェン	300	50.0%
アリルイソプロピルアセチル尿素	60	10.0%
無水カフェイン	50	8.3%
賦形薬等	190	31.7%
合計	600	100.0%

(単位 mg)

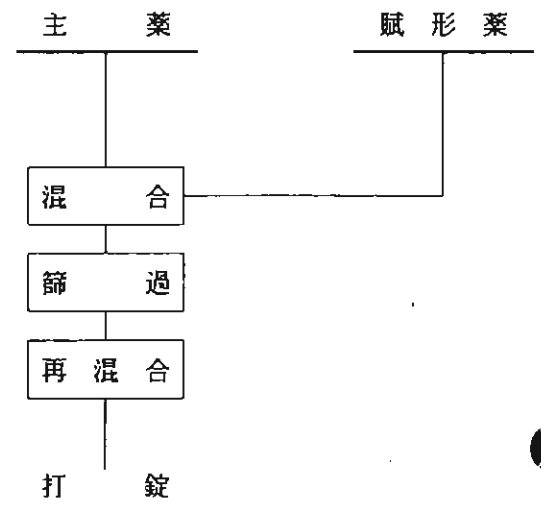


Fig. 1. A製品の製造工程

### 実験の部

#### 1. 現状把握

A製品に配合されているアリルイソプロピルアセチル尿素は、社内品質管理部のデータによると、定量値が規格幅中でばらついており (Fig.2)、ロット間のばらつきを小さくするため、成分含量の工程能力指数 C<sub>p</sub>、C<sub>pk</sub> 値を算出し、工程能力が低い要因を検討した。

\* 第5回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1985年11月6日)

\*\* 〒930 富山市荒川250 TEL 0764 (31) 8881

## 2. Cp, Cpk 値の算出方法

Fig.3 に示すように、Cp 値は規格幅分の 6σ (標準偏差) であり、その意味するところはロット間において、標準どおりの作業が行われたときに、どの程度の品質、つまり一定の製品が製造できるかを示すものである。すなわち分布のピークが高く、ピーク幅の狭いほど大きい値となる。

Cpk 値は、この Cp 値にカタヨリ度、つまり平均値と中心値を加味したものであり、分布のピークが高く、幅が狭くても平均値が中心値からずれるほど値は小さくなる。

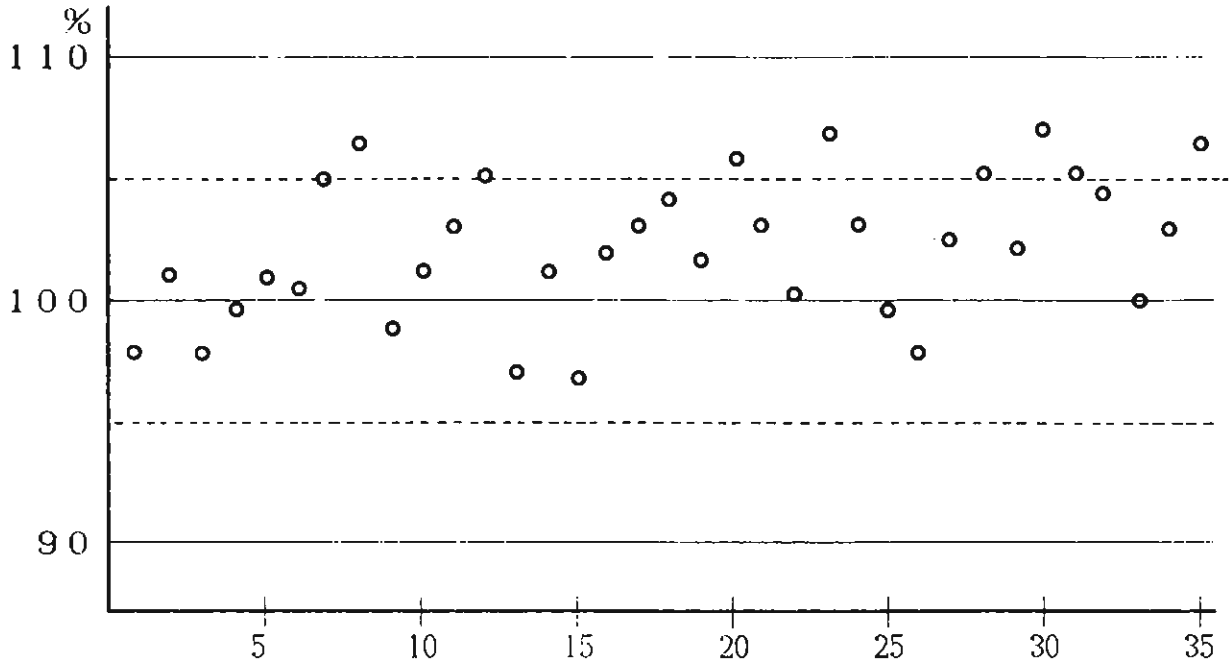


Fig. 2. アリルイソプロピルアセチル尿素の定量値

$$C_p = \frac{S_u - S_L}{6\sigma} = \frac{(\text{上限規格}) - (\text{下限規格})}{6 \times (\text{標準偏差})}$$

$$C_{pk} = (1 - K) \frac{S_u - S_L}{6\sigma} = (1 - \text{カタヨリ度}) \times \frac{(\text{上限規格}) - (\text{下限規格})}{6 \times (\text{標準偏差})}$$

$$K = \frac{|(S_u + S_L) / 2 - \bar{x}|}{(S_u - S_L) / 2}$$

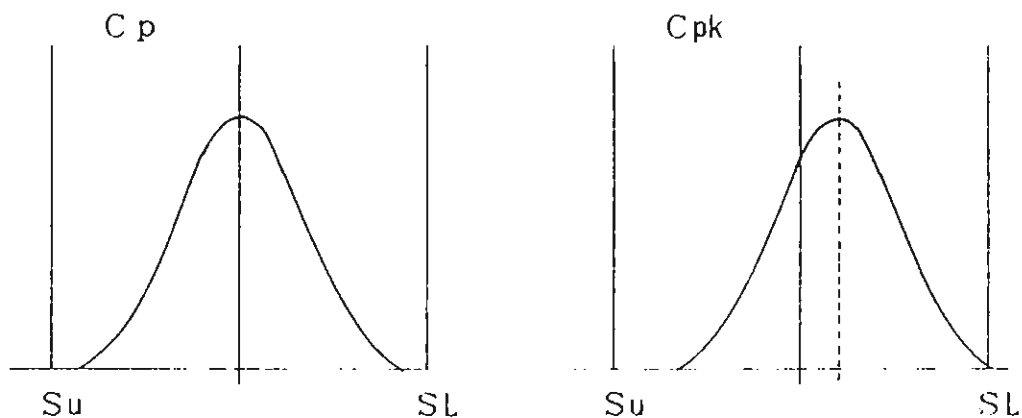


Fig. 3. Cp, Cpk 値の算出方法

### 3. Cp, Cpk 値の工程能力有無の判断

Cp, Cpk 値から工程能力を判断すると, Cp (又はCpk) 値が 1.67 以上であれば工程能力は十分過ぎ, 管理の簡素化, コスト低減などを行うことができる。1.67 未満 1.33 以上であれば工程能力は十分であり, その状態を維持することが必要である。また, 1.33 未満 1.0 以上であれば工程能力は十分とはいえないまでもまずまずであり, 管理体制を整え管理を十分行う必要がある。1.0 未満であれば工程能力が不足しているので改善が必要となる (Table 2)。

Table 2. 工程能力の有無の判断

No	Cp(又はCpk)値	工程能力有無の判断	処 置
1	$Cp \geq 1.67$	工程能力は十分すぎる	
2	$1.67 > Cp \geq 1.33$	工程能力は十分である	理想的な状態なので維持する
3	$1.33 > Cp \geq 1.0$	工程能力は十分とはいえないがまずまずである	工程能力をしっかりと行き、管理状態に保つ
4	$1.0 > Cp \geq 0.67$	工程能力は不足している	全数選別、工程の管理・改善を必要とする
5	$0.67 > Cp$	工程能力は非常に不足している	品質の改善、原因の追求を行い、緊急な対策を必要とする

Table 3. 各成分の Cp, Cpk 値

	アセトアミノフェン	アリルイソプロピルアセチル尿素	無水カフェイン
含量最大値	104.5%	106.9%	102.2%
含量最小値	95.1%	96.6%	94.7%
平均値	99.73%	102.16%	97.18%
標準偏差	1.888	2.984	1.478
Cp 値	1.766	1.117	2.255
Cpk 値	1.719	0.875	1.619

n = 35

### 4. 現状分析

A 製品について 35 ロット, 各ロット 30 錠の定量値から各成分の工程能力指数 Cp, Cpk 値を求めた。

この結果を Table 2 に基づき判断すれば, アセトアミノフェン及び無水カフェインでは工程能力は十分であったが, アリルイソプロピルアセチル尿素においては Cpk 値 0.875 で工程能力は不十分であった (Table 3)。

## 5. 要因分析

アリルイソプロピルアセチル尿素の工程能力指数Cp, Cpk 値を 1.33 以上に改善するため, その要因を分析した。

- (1) 定量の精度の不足。
- (2) 原料の定量値がばらついている。
- (3) アリルイソプロピルアセチル尿素が均一になっていない。その要因として,
  - 粒度がばらついている。
  - 混合時間及び割合が少ない。

以上の要因について, それぞれ検討を試みた。

## 結果及び考察

### 1. 定量の精度

A製品のアリルイソプロピル尿素を液体クロマトグラフ法<sup>1)</sup>で定量したところ, 変動係数CV値 1%であり, 精度が高いこの定量法に問題はなかった。

Table 4.

アリルイソプロピルアセチル尿素の定量値(%)

1	100.7	11	99.5
2	99.3	12	100.6
3	98.6	13	99.1
4	100.9	14	99.2
5	99.2	15	100.5
6	100.9	16	99.4
7	100.7	17	99.8
8	99.4	18	99.0
9	100.8	19	98.6
10	99.1	20	99.7

### 2. 原料の定量値

原料20ロットを定量したところ, 平均値は99.75, CV値は0.797であり, 原料の定量値には問題はなかった(Table 4)。

### 3. 粒度分布

各原料10ロットについて粒度分布を調べたところ, それぞれの粒度分布は, Table 5に示すとおりであった。

$$\bar{x} = 99.75$$

$$\sigma = 0.795$$

$$cv = 0.797$$

Table 5. 各成分の粒度

粒 度	アセトアミノフェン	アリルイソプロピルアセチル尿素	無水カフェイン
~32mesh	0	40.0%	0
32~48mesh	0	32.5%	0
48~80mesh	0	8.5%	0
80mesh pass	100%	19.0%	100%
合 計	100%	100.0%	100%

そこで、アリルイソプロピルアセチル尿素の粒度分布が広いことにより、定量値に影響を及ぼすことが考えられ、検討するため次の3タイプの原料を用いて検討を行った (Fig. 4)。

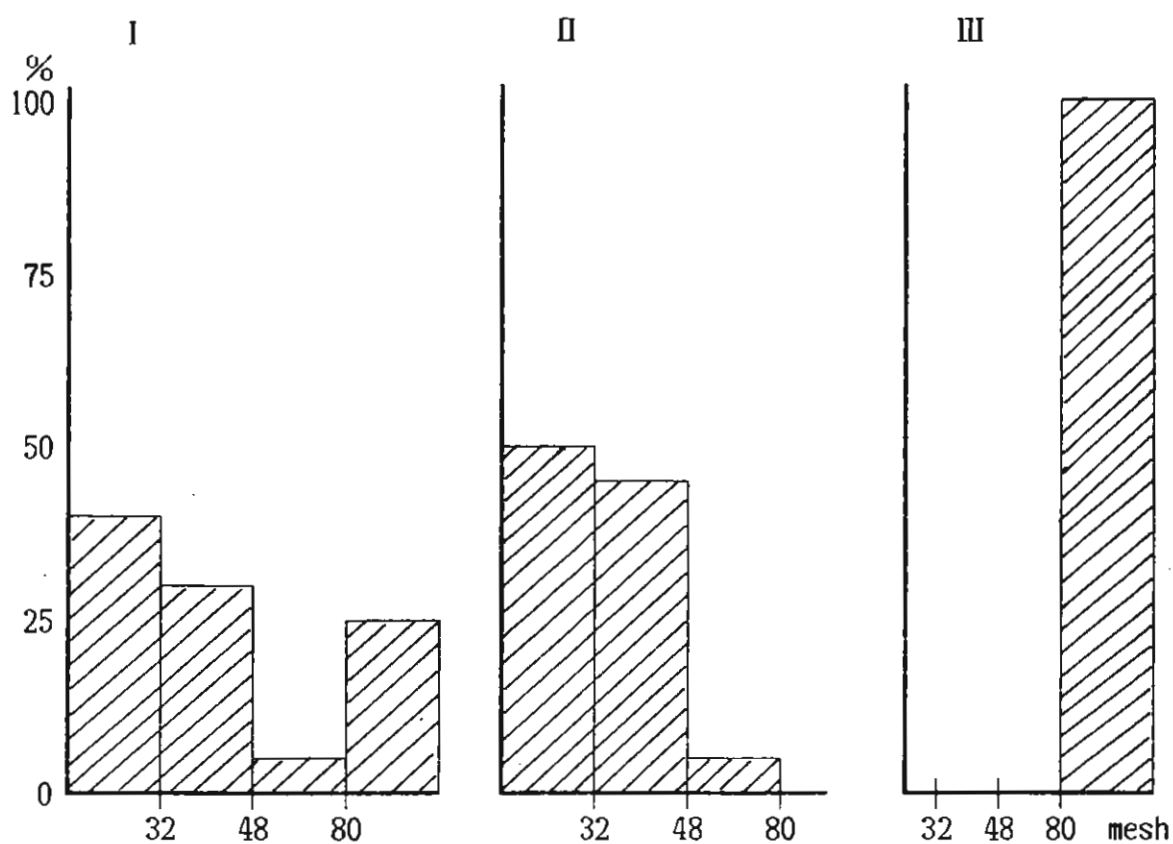


Fig. 4. 粒度が異なるタイプの原料

- I 粒度分布の平均値に近いもの
- II 32メッシュ及び48メッシュ残留ほぼ半々のもの
- III 80メッシュパス 100%のもの

3タイプの定量値から工程能力指数  $C_p$ ,  $C_{pk}$  値を求めた (Table 6)。その結果から粒度のばらつきが大きいほど定量値のばらつきも大きいことがわかった。

Table 6. 3タイプの原料の  $C_p$ ,  $C_{pk}$  値

	成分名	$\bar{x}$	$\sigma$	$C_p$ 値	$C_{pk}$ 値
I を使用	アリルイソプロピルアセチル尿素	103.23%	3.04	1.096	0.741
II を使用	〃	99.28%	5.27	0.632	0.586
III を使用	〃	102.09%	1.33	2.506	1.982
	アセトアミノフェン	100.99%	0.96	3.472	3.128
	無水カフェイン	98.73%	1.40	2.489	2.172

I, II ( $n=8$ ), III ( $n=10$ )

#### 4. 混合時間及び配合割合

混合時間の多少の増減では、定量値のバラツキの程度は従来と変らなかった。

Table 7 に示す A 製品及び B 製品を用いて配合割合の関係について検討した。B 製品は造粒後、打錠と条件は異なるが、配合割合の非常に少ないものとして、0.15% 配合のマレイン酸クロルフェニラミンを選んだ。A 製品及び B 製品 100 ロットにおける各成分の Cp, Cpk 値を求めた (Table 8)。無水カフェインでは Cp, Cpk 値が共に低く、マレイン酸クロルフェニラミンでは Cpk 値 0.994 であり、工程能力が不足していることが分かった。

Table 7. A・B 製品の成分配合割合

	A 製品	B 製品
アセトアミノフェン	50.0%	13.7%
アリルイソプロピルアセチル尿素	10.0%	—
無水カフェイン	8.3%	1.59%
マレイン酸クロルフェニラミン	—	0.15%

Table 8. A・B 製品の Cp, Cpk 値

成分	A 製品		B 製品	
	Cp 値	Cpk 値	Cp 値	Cpk 値
アセトアミノフェン	1.766	1.719	2.435	2.323
アリルイソプロピルアセチル尿素	1.117	0.875	—	—
無水カフェイン	2.255	1.619	1.464	1.153
マレイン酸クロルフェニラミン	—	—	1.157	0.994

#### まとめ

以上の結果から、工程能力指数 Cp, Cpk 値の改善には、アリルイソプロピルアセチル尿素の粒度を、アセトアミノフェン及び無水カフェインと同じ 80 メッシュを通過するものとする必要があると考えられたので、以後の製造には、80 メッシュを 100% 通過する原料を用いた。

80 メッシュを 100% 通過する原料を用いて製造した 21 ロットにおいて、アリルイソプロピルアセチル尿素の定量値のばらつきは小さくなっており (Fig. 5), Cp, Cpk 値を求めたところ、Cp 1.715, Cpk 1.560 と明らかに工程能力が向上した (Table 9)。

このことより混合時間の短縮や、仕込量の増大など管理の簡素化が期待される。

なお、配合割合の非常に少ない成分の工程能力の改善には、今後、さらには検討の必要がある。

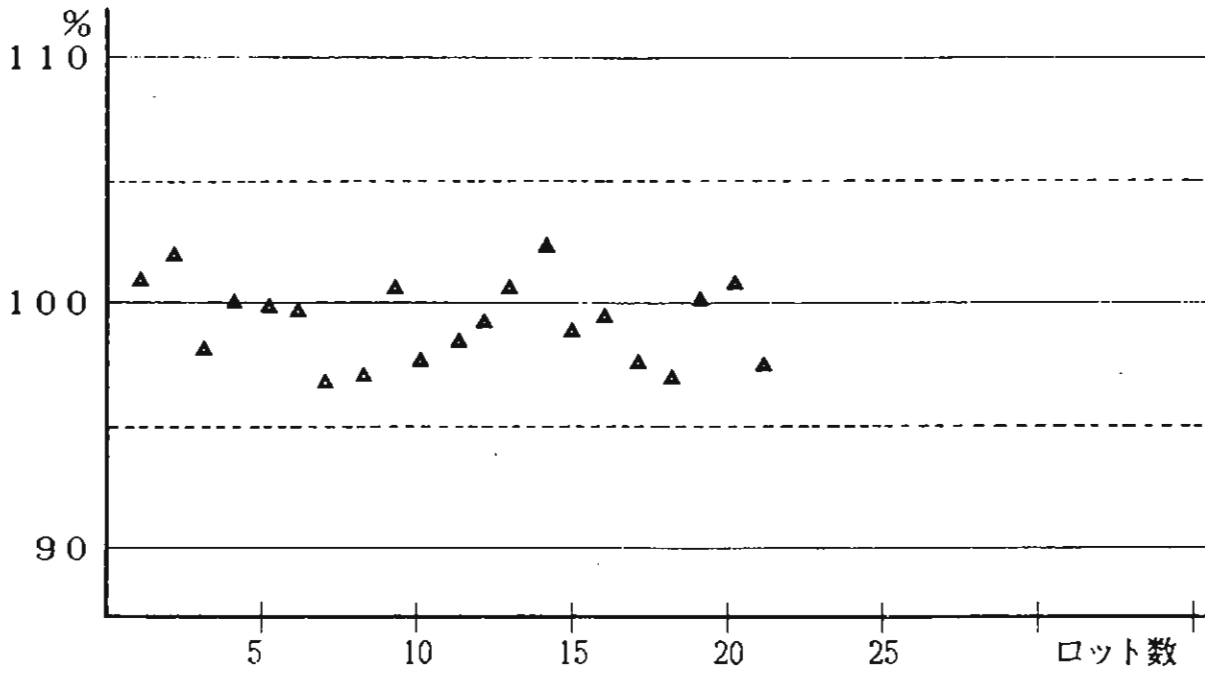


Fig. 5. アリルイソプロピルアセチル尿素の定量値

		アセトアミノフェン	アリルイソプロピルアセチル尿素	無水カフェイン
改善後	含量平均値	99.18%	99.10%	98.30%
	標準偏差	1.798	1.992	1.760
	Cp値	1.900	1.715	1.941
	Cpk値	1.744	1.560	1.610
改善前	含量平均値	99.73%	102.16%	97.18%
	標準偏差	1.888	2.984	1.478
	Cp値	1.766	1.117	2.255
	Cpk値	1.719	0.875	1.619

Table 9. 工程能力

文献

- 1) 小鍛治まち子：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，家庭薬研究 3 45 (1984)
- 2) 木暮 正夫：工程能力の理論とその応用，日科技連 (1975)



## 糖衣錠の結合剤について\*

吉岡 毅 正川 康明  
Takeshi YOSHIOKA Yasuaki MASAKAWA

清水 正彦  
Masahiko SHIMIZU

株式会社 廣貫堂\*\*

糖衣錠とは製錠した錠剤を白糖等の物質で剤皮を施したもので、服用時の苦味・刺激性の防止、剤皮の防湿効果による錠剤の変質防止、外観上の美しさによる商品価値の向上、着色による錠剤の識別等の目的で一般に用いられている剤形である。従来、この糖衣錠を製造する際に使用する剤皮には、糖衣層の強度を高めたり、裸錠と糖衣層間または糖衣層間同士の結合力を高めるために、ゼラチンやアラビアゴム等の結合剤が使用されている。しかしながら、これらの結合剤にも問題がある。例えば、ゼラチンを用いると経日的に褐変現象を起したり、糖衣層の不溶化をきたして崩壊時間が遅延することがある。また、アラビアゴムを用いた場合には結合力が不十分で衝撃等によるひび割れ等が発生することがある。

そこで、今回ひとつの試みとして、食品加工分野において実績のあるプルランを結合剤として検討してみた。

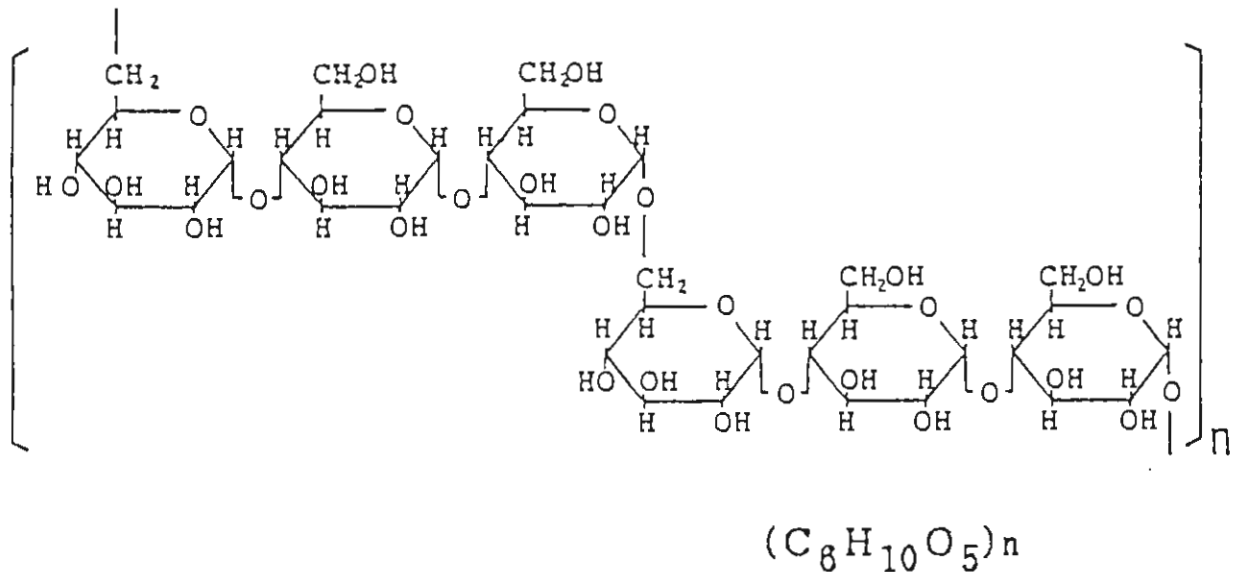


Fig. 1. プルラン ( Pullulan )

プルランは、プルラリア・プルランスの培養により得られる菌体外粘質物で、その構造は、Fig. 1 のとおり  $\alpha - 1 \cdot 4$  結合による 3 個のグルコースから成るマルトトリオースが、 $\alpha - 1 \cdot 6$  結合で繰り返し鎖状に結合した天然高分子重合体である。

\* 第 5 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 ( 富山, 1985 年 11 月 6 日 )

\*\* 〒 930 富山市梅沢町 2 - 9 - 1 TEL 0764 ( 24 ) 2271

## 糖衣錠の試製方法

### 1) 下掛け

装置 菊水製作所製 No.16-D

パン直径 25 cm

回転数 30 rpm

条件 裸錠仕込量 500 g

結合液1回注加量 8~14 cc

散布剤1回散布量 35 g

温風温度 50~60 ℃

温風送風時間 15~20 min

方法 裸錠を糖衣パンに入れ回転させながら調製した結合液を注加し、かき回しながら液を錠剤表面に行きわたらせた後、散布剤を振りかけて更にかき回し温風を送り乾燥し、これを繰り返す。

裸錠1錠重量 210 mg/tab

下掛け終了1錠重量 320 mg/tab

### 2) 上掛け

装置 菊水製作所製 No.16-D

パン直径 25 cm

回転数 30 rpm

条件 仕込量 500 g

被覆液1回注加量 4~6 cc

温風温度 50~60 ℃

温風送風時間 10~15 min

方法 下掛け終了錠を糖衣パンに入れ回転させながら調製した被覆液を注加し、かき回しながら錠剤表面に均等に行きわたらせた後、温風を送り乾燥し、これを繰り返す。

上掛け開始1錠重量 320 mg/tab

上掛け終了1錠重量 360 mg/tab

## 試験方法

### 1) 崩壊試験

日局「一般試験法 36 崩壊試験法」の被覆錠の項目に従った。但し、ディスクは使用せずに行った。

### 2) 落下衝撃試験

2.5 cm φ × 150 cm のガラス管を垂直に立てピーカを受け皿として1錠ずつ1回落下させ糖衣錠の状態を観察した。

### 3) 接着強度試験

\*試験用チップ

1 cm φ × 2 cm の塩化ビニール製円柱の一方の面にフックを取り付け他の面を平らに切削したもので、切削面からフックの荷重部までの距離を34mmとした。

試験用チップの切削面を接着面とし、この表面に結合液を塗布し、チップ同士を接着し乾燥（70℃ 6時間）してから更に減圧乾燥（70℃ 20 mmHg 4時間）した後シリカゲルデシケータ中で放冷したものを試料とする。

試料はFig.2の様に固定し、400 g/minの速度で荷重していき、接着面が離れた時の重量を測定する。

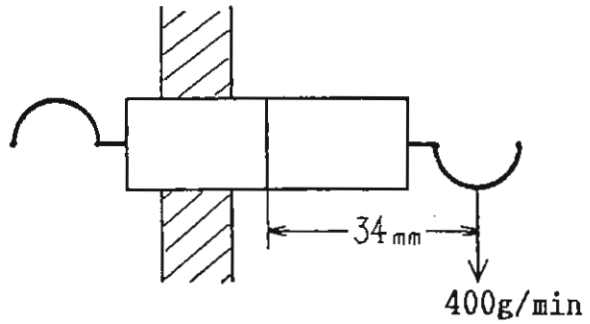


Fig. 2. 接着強度試験方法

### 実験 1.

Table 1の1, 2, 3の処方による結合液を調整し、散布剤は沈降炭酸カルシウム・タルク=2:1の混合物を用いて各々試製方法1)により下掛けを行い、できあがった下掛け錠を各々瓶詰めし、40℃で保存し、1ヶ月ごとに試験方法1)崩壊試験を実施した。この崩壊試験は、一錠ずつ個々に剤皮だけが完全に崩壊するまでの時間を秒単位で読み取った（以後の崩壊試験も全て同様に行った。）その結果はTable 2に示す。

Table 1. 下掛け結合液処方

	1	2	3
Acacia	16%	—	—
PULLULAN	—	6%	—
PVP	—	—	4%
精製白糖	50%	50%	50%
精製水	34%	44%	46%
合計	100%	100%	100%

Table 2. 経日崩壊試験結果

n=12	Acacia	PULLULAN	PVP
初期	1017	2270	1199
1カ月	805	2870	1720
2カ月	941	2941	1805
3カ月	949	3572	2783

（単位：sec）

\* 数値は試料12個の合計崩壊時間

ここで得られたデータから経日による要因をA、結合剤の違いによる要因をBとしてくり返し数12の二元配置の分散分析を行った結果はTable 3となり、要因A、Bには高度に有意差が認められた。

Table 3. 分散分析表

要因	S	$\phi$	V	F <sub>0</sub>
A	1148333	3	38277.77	29.703**
B	658444.5	2	329222.25	25.5470**
A×B	67183.7	6	11197.28	8.689
e	17139.6	133	1288.69	
T	1011857.5	144		

次に各結合剤間の有意差を調べると

結合剤間の有意差

$$| B_1 - B_2 | = 510.62 > 6.85$$

$$| B_1 - B_3 | = 116.41 > 6.85$$

$$| B_2 - B_3 | = 139.41 > 6.85$$

$$F(1, 120, 0.01) = 6.85$$

となり、各原料間には崩壊速度に差があるといえる。そこで各原料間の母平均を推定しグラフ化するとFig.3となった。

このようにアラビアゴム、プルラン、PVPを用いることにより、それぞれ崩壊時間に差があり、その順序はアラビアゴム、PVP、プルランの順に短いといえる。また、初期の崩壊時間に対する経日後の崩壊時間の割合をみると、Fig.4となり、アラビアゴムは全く崩壊の遅延が認められなかったがPVPはかなり遅延し、プルランも遅延することが解った。

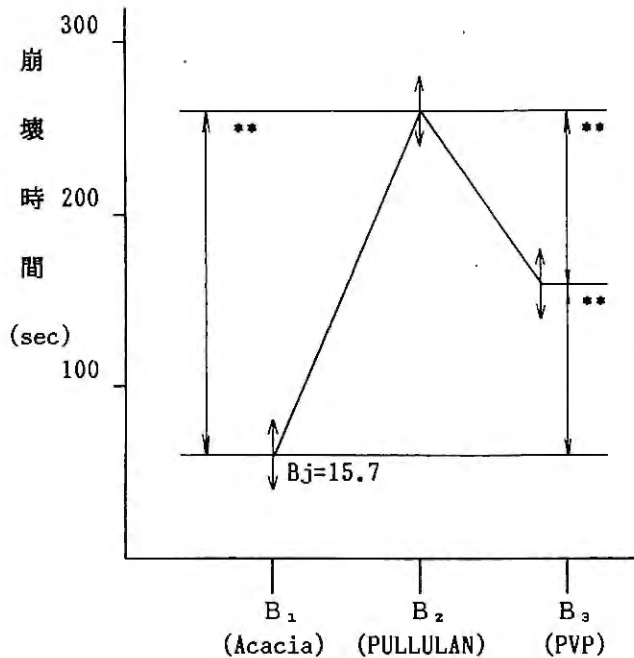


Fig. 3. グラフ化

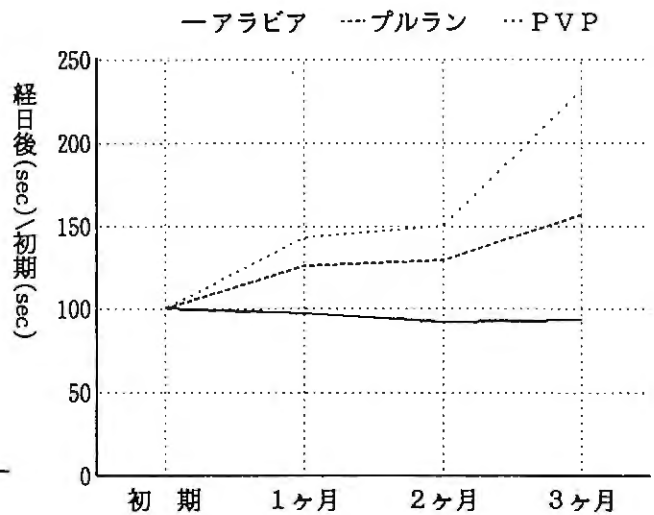


Fig. 4. 崩壊時間の経日変化

## 実験 2.

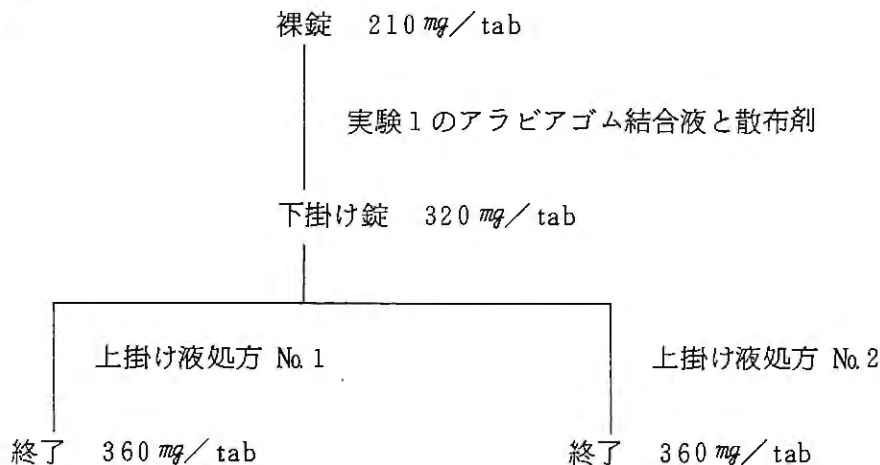


Table 4. 上掛け液処方

	1	2
糖製白糖	65 %	65 %
PULLULAN	—	1.5 %
精製水	35 %	33.5 %
合計	100 %	100 %

Table 5. 糖衣錠硬度

	1	2
N	20	20
$\bar{x}$	9.935	9.505
S	2.49255	1.77695
V	1.3119	0.8885

(モンサント硬度計による測定)

実験1で用いたアラビアゴム結合液と散布剤で320mg/tabまで下掛けし、更にTable 4の上掛け液1, 2で各々360mg/tabまで上掛けする。このできあがり糖衣錠の硬度を測定した結果Table 5.に示すとおりとなった。この結果から等分散と平均値の差の検定を常法に従い行くと

$$F_0 = 1.48 < F(20, 20, 0.05/2) = 2.46$$

分散に差があるとはいえない( $\alpha = 5\%$ )

$$t_0 = 1.28 < t(38, 0.05) = 2.21$$

糖衣錠の硬度には差があるとはいえない( $\alpha = 5\%$ )

となり、上掛け層にプルランを1.5%添加しても硬度に影響を与えない。しかし試験方法2)落下衝撃試験を行うとTable 6.のとおりプルランを添加することにより、落下衝撃に対し糖衣錠が強くなると思われる。次に、糖衣錠を瓶詰めし40℃で保存し、1ヶ月ごとに崩壊試験を実施した。その結果はTable 7.となり、経日による要因をA、上掛け液処方の違いによる要因をBとして、くり返し数12の二元配置の分散分析を行った結果Table 8.のとおりとなり、要因A, Bには有意差が認められなかった。更にグラフ化するとFig.5.となる。

Table 6. 落下衝撃試験結果

	1	2
欠け	25	4
ヒビ	25	46
合計	50	50

Table 7. 上掛け錠崩壊試験 (単位: sec)

n=12	1	2
初期	12030	13838
1ヶ月	11541	10991
2ヶ月	16329	13233
3ヶ月	13910	12524

\*数値は試料12個の合計崩壊時間

Table 8. 分散分析表

要因	S	$\phi$	V	$F_0$
A	1036910	3	345636.66	0.2302
B	108370	1	108370	0.0722
A×B	519550	3	173183.33	0.1153
e	$1.32126 \times 10^8$	88	1501431.8	
T	$1.33791 \times 10^8$	95		

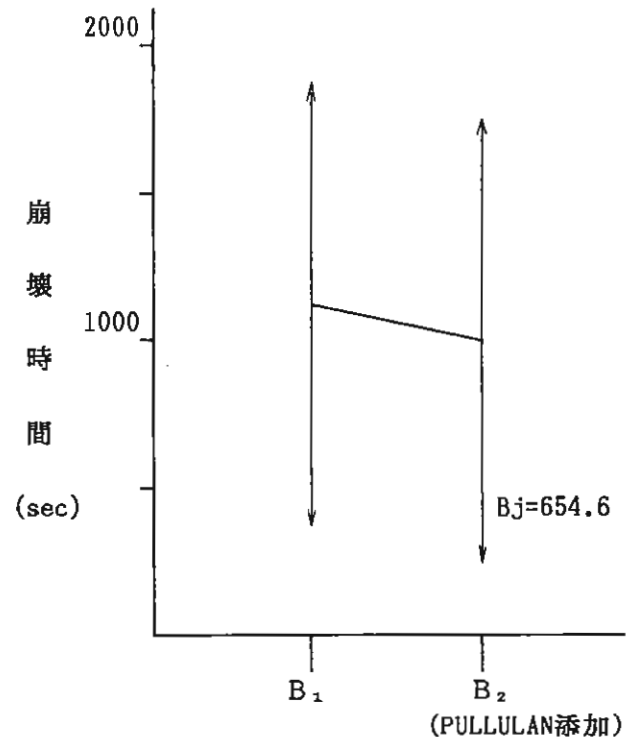


Fig. 5. グラフ化

このように、上掛け層にプルランを添加することによって、崩壊時間に影響を与えずに耐衝撃性を向上させることができるものと思われる。

### 実験 3.

実験 1 で用いた下掛け用結合液 1, 2 (Table 9.) について、試験方法 3), 接着強度試験を行ったところ Table 10. に示す結果となった。

Table 9. 接着強度試験結合液処方

	1	2
Acacia	16 %	—
PULLULAN	—	6 %
精製白糖	50 %	50 %
精製水	34 %	44 %
合計	100 %	100 %

Table 10. 接着強度試験結果

	1	2
N	10	10
$\bar{x}$	339	449.5
S	245190	514122.5
V	27243.3	57124.7

これから等分散と平均値の差の検定を常法に従い行おうと

$$F_0 = 1.582 < F(9, 9, 0.05/2) = 4.03$$

分散に差があるとはいえない ( $\alpha = 5\%$ )

$$t_0 = 1.203 < t(18, 0.05) = 2.101$$

下掛け結合液の接着強度に差があるとはいえない ( $\alpha = 5\%$ )

となり、下掛け結合液として用いたアラビアゴム液とプルラン液は、今回の接着強度試験では、統計的に差が認められないといえる。しかしながら実験データの平均値が示すように、プルランを使用した方が接着力が強い傾向にあるように思われる。

### 結 論

今回の実験においては、16%アラビアゴム下掛け結合液と6%プルラン下掛け結合液の接着強度は、プルランを用いた方が強い傾向にあるように思われる。しかし、初期の崩壊時間はアラビアゴムを用いた方が崩壊時間が短かく、崩壊遅延も認められなかった。一方、上掛け液にプルランを添加したところ糖衣錠の耐衝撃性を向上させることが解った。

〔原 著〕

## サリチル酸グリコールとノニル酸ワニルアミド含有 ペレット貼付剤 K T の作用について\*

北 本 祐 子      野 村      明  
Yuko KITAMOTO      Akira NOMURA  
横 井 秀 輔  
Hideharu YOKOI

リードケミカル株式会社 研究開発部\*\*

ペレット貼付剤 K T は主成分としてサリチル酸グリコールと局所刺激作用を有するノニル酸ワニルアミド (以下 N A と略) を含有し、ペレット状に成形した新しい製剤であり、患部のポイントをおさえて温感刺激を与え、皮膚に密着して薬物が吸収される。これらの特徴に加えて、K T 貼付により貼付部位の皮膚血流量の増加と皮膚温度の上昇のあることが実験動物レベル (ウサギ) において認められている。<sup>1)</sup> 今回成人男女のボランティアにより K T 貼付部位の皮膚血流量と皮膚温度の変化について検討したので報告する。

### 実 験 の 部

#### 1) 被験材料

##### (1) ペレット貼付剤 K T (以下 K T と略)

薬剤を直径 6 mm のペレット状に成形し、直径 22 mm の絆創膏で固定した貼付剤で、有効成分として 1 粒中、*dl*-カンフル 0.8 mg, *l*-メントール 3.2 mg, ジフェンヒドラミン 0.32 mg, サリチル酸グリコール 6.4 mg, ノニル酸ワニルアミド 1.6 mg を含有する。

##### (2) 比較対照試料 1

K T の膏体から N A を除いた成分を K T と同一のペレット状に成形して絆創膏に固定した。

##### (3) 比較対照試料 2

K T と同一の形状を有するコルクを絆創膏に固定した。

#### (4) 被 験 者

年令 22~35 才の健康成人男女ボランティアを対象とした。

#### 2) 実験方法

##### (1) 皮膚血流量の測定

室温 23~26 ° の室内で被験者は椅子に腰かけ手はほぼ心臓の高さで机の上に静置し、中指中節骨上部の皮膚にセンサーを取りつけ、熱勾配式組織血流計<sup>2)3)</sup> (バイオメディカルサイエンス K.K. B T G-1) により、試料貼付後 60 分間の皮膚血流量変化を測定した。試料は第三中手骨と第四中手骨間上部の皮膚に貼付した。また、血流量は電解式組織血流計<sup>4)5)</sup> (バイオメディカルサイエンス K.K. R B F-1) によりあらかじめウサギ耳介を用いて測定し、絶対値を算出してこれを外挿した。結果は、試料貼付前の血流量に対する貼付後の変化を百分率で表わした。

\* 第 5 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1985 年 11 月 6 日)

\*\* 〒 930 富山市日俣 77-3 TEL 0764 (25) 1978

## (2) 皮膚温度の測定

室温23~26°の室内で被験者をベット上に横臥させ毛布をかけて環境に順応させた後、腰椎部の皮膚温度を測定した。測定は皮膚表面と試料の間に温度センサー（宝工業K.K. XK67）を固定し、表面温度計（宝工業K.K. D641）により貼付前後の皮膚温度の変化を測定した。皮膚温度の測定値はチャート上で2分間隔で数値を読み取り、60分毎の平均皮膚温度を求めた。

## 実験結果

### 1) 皮膚血流量

測定した5例のうち22才女性の例をFig.1に示した。KT貼付後20分~60分に持続的な血流量の増加が認められた。また比較対照試料1の貼付により20分~60分後の血流量は貼付前に比較しほとんど変化が認められなかった。比較対照試料2の場合、KTのような上昇はみられず逆に減少の傾向が認められた。Fig.2には24才男性の例を示した。KT貼付によってこの例でも、持続的な血流量の増加が認められた。比較対照試料1では20分後の減少に続いて40~60分後に増加が認められたが、KT貼付時にみられた著しい変化はみられなかった。比較対照試料2の貼付では20分後に若干の増加が認められた以外は貼付前と比較して全く変化が認められなかった。測定例全例の60分後の血流量変化の平均は、KTで1.085%の増加、比較対照試料1で0.54%の増加、比較対照試料2で2.9%の減少であった。

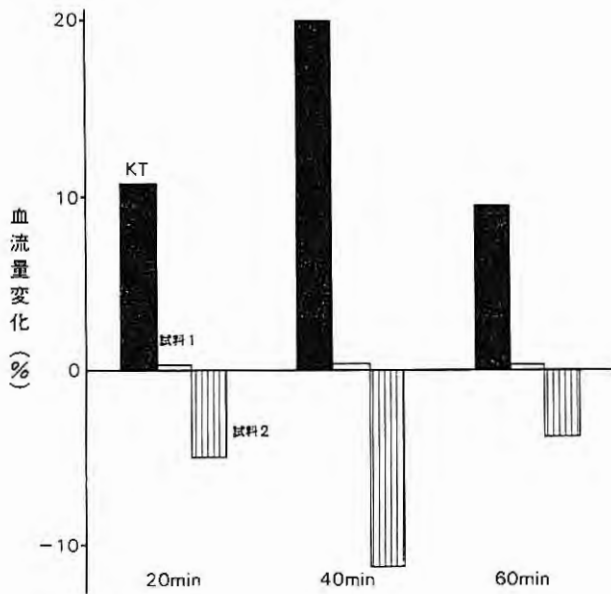


Fig. 1. 試料貼付による血流量変化（22才，女性）

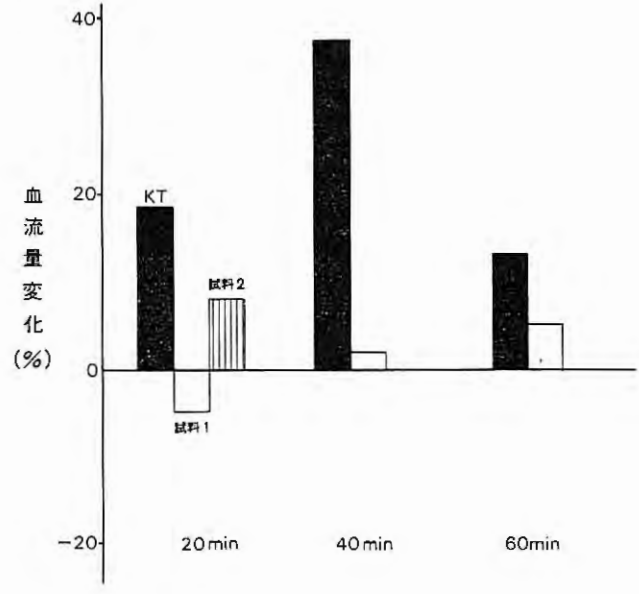


Fig. 2. 試料貼付による血流量変化（24才，男性）

### 2) 皮膚温度

測定例をFig. 3, 4に示した。3-1は28才男性の例で、KT貼付前の腰椎部の皮膚温は、35.4°~36.2°，平均35.9°，KT貼付10~20分後より徐々に皮膚温度は上昇し最高1.2°の皮膚温度の上昇を示した。また貼付後60分間の皮膚温度の変化は平均0.9°の上昇を示し、以後0.5°前後の上昇が約3時間持続した。3-2は31才男性の例で、貼付前の皮膚温度は平均35.8°，貼付後60分間の皮膚温度の上昇は0.8°，3-3は27才男性の例で、この場合が測定例中最も低く0.3°の上昇にとどまった。皮膚温度の上昇は測定例（12例）全例に認められ、最高1.2°，最低0.3°で平均0.54°の上昇を示した。比較対照試料1では貼付前の皮膚温度が35.6°~36.2°に対して貼付後の皮膚温度は35.7°



～36.4°であり差は認められなかった(4-1)。また、比較対照試料2では貼付前の皮膚温度が35.7°～36.1°に対して、貼付後では35.7°～36.3°であり皮膚温度の変化は認められなかった。

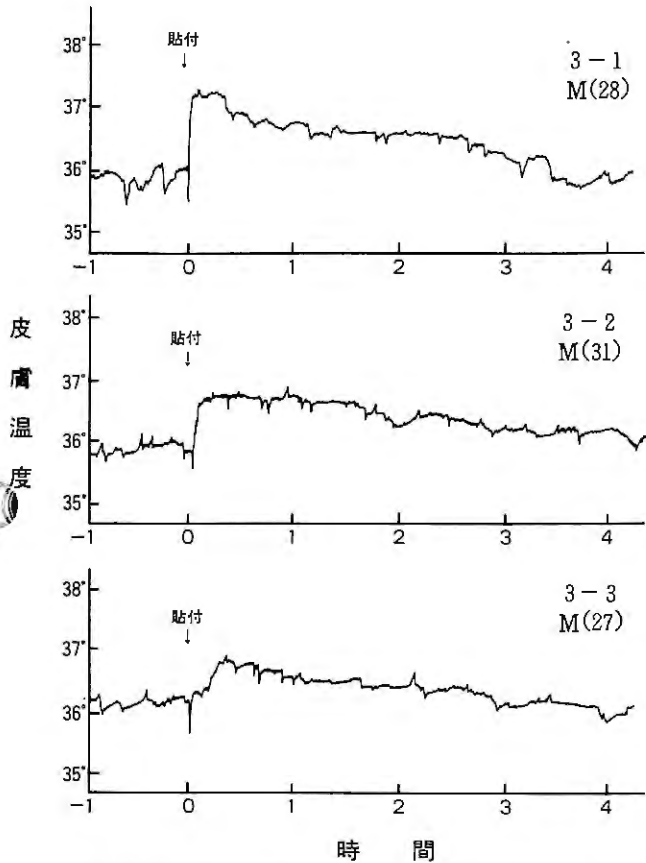


Fig. 3. K T貼付による皮膚表面温度変化

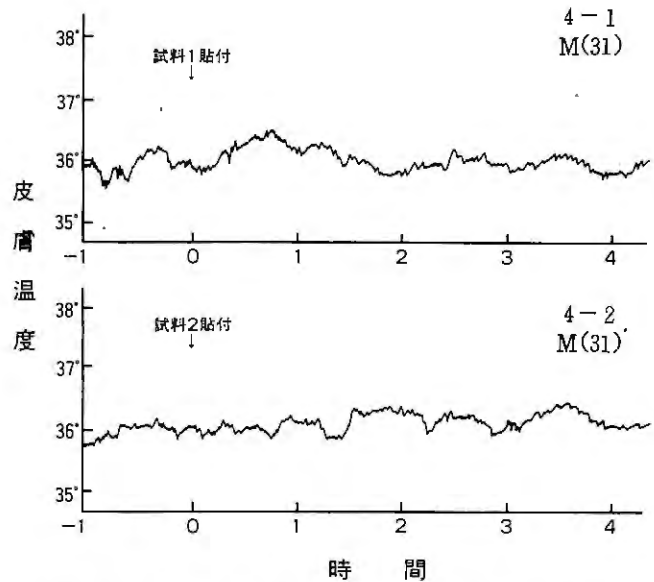


Fig. 4. 対照試料貼付による皮膚表面温度変化

## 考 察

K Tをヒト皮膚に適用した場合、貼付部位の末梢血流の増加と、皮膚表面温度の上昇が認められ、NAを含まない比較対照試料1、2ではこれらの変化が認められなかったことから、温度上昇と血流量増加は温感成分であるNAによるものと判断された。また、この作用はNAにより知覚神経が刺激され末梢血管の拡張に伴って血流量が増加し、その結果、皮膚温度が上昇するものと考えられる。温感成分の作用については、ラットにおいてカプサイシンの静注により皮膚温度が2.3～4.5°上昇することが報告<sup>6)</sup>されているが、外用貼付剤K Tの貼付によって表面血流量の増加と皮膚温度の上昇が認められたことは極めて興味ある作用である。一方、薬物の経皮吸収は皮膚表面温度によって変化することが知られており、例えばサリチル酸の吸収量と温度は正の相関を示すことが報告されている。<sup>7)</sup>このことは、皮膚温上昇によって皮脂粘度が低下し、その結果、角質層中への薬物の拡散を高め、更に血流量の増加によって薬物の吸収量が増大するものと考えられる。本研究の結果、K Tの貼付において薬物吸収にノニル酸ワニルアミドの皮膚刺激作用が関与していることが考えられる。

## 文 献

- 1) リードケミカルKK研究報告：未発表（1985）
- 2) L.P. Carter, R. Erspamer, W.J. Bro ; Cortical Blood Flow : Thermal Diffusion vs Isotope Clearance, *Stroke*, **12**, 513(1981)
- 3) 甲州啓二, 遠藤俊郎, 高久 晃, 斉藤建夫 ; Peltier Stack を利用した電極による連続的局所脳血流測定を試み, 第25回日本神経学会総会講演要旨集, 138 (1984)
- 4) K. Koshu, T. Endo, A. Takaku, T. Saito ; Measurement of regional blood flow using hydrogen gas generated by electrolysis, *Stroke*, **13**, 483 (1982)
- 5) J. Donnerer, F. Lembeck ; Heat loss reaction to capsaicin through a peripheral site of action, *Br. J. Pharmacol.*, **79**, 719 (1983)
- 6) T. Arita, R. Hori, T. Anmo, M. Washitake, M. Akatsu, T. Yajima ; Studies on Percutaneous Absorption of Drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1045(1970)

## Zymogen 活性化機構におよぼすオウバク成分の影響\*

上 川 浩  
Hiroshi KAMIKAWA

株式会社廣貫堂 研究開発部\*\*

消化性酵素プロテアーゼは、生体内において膵臓中で不活性な酵素前駆体、つまり Zymogen として合成される。この前駆体が小腸に分泌され、小腸に存在する活性化因子の作用を受けて、初めて活性型の酵素に変換される。

この活性化機構の例として、膵臓中の不活性なトリプシノーゲンが、小腸中の活性化因子であるエンテロキナーゼの作用を受けて活性型のトリプシンに変換され、このトリプシンが残りのトリプシノーゲンはもちろんのこと、他の Zymogen をも活性化させるといふ、段階的な機構が考えられている。<sup>1)</sup> (Fig. 1)

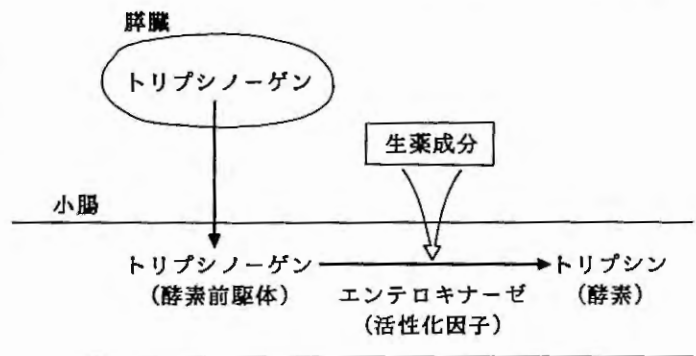


Fig. 1. プロテアーゼ活性化機構の例

前報において、この Zymogen 活性化機構

におよぼす生薬成分の影響の、試験管内解析方法について検討した。これにより、センブリやゲンチアナ等のいわゆる苦味健胃薬がこの活性化機構を増強させ、また、共にベルベリンを主成分とするオウレンとオウバクについては、オウレンやベルベリンがやはり増強的に働くのに対し、オウバクでは逆にこれを抑制することを見出し、報告した。<sup>2)</sup>

今回、オウバクのもつプロテアーゼ活性化機構に対する抑制作用に注目し、その作用機構や化学成分との関係について検討した結果について報告する。

### 実験方法

1. 臓器抽出液：C3H/He系雄性マウスより膵臓および小腸を摘出し、洗浄後それぞれ精製水を加え、ガラス製ホモジナイザーで20% (W/V) 磨砕液を調製した。これを 12,000 × g で30分間遠心した後、その上清を各臓器抽出液とした。<sup>3)</sup> これらを凍結保存し、用時溶解してプロテアーゼ活性測定に用いた。
2. 薄層クロマトグラフィーによる分画法：シリカゲル60 F<sub>254</sub> プレート (Merck 社) を用い、*n*-ブタノール・酢酸・水 (3 : 1 : 1) 混液を展開溶媒として展開後、紫外線照射によって検出されるバンドごとに薄層をかきとり、精製水で抽出した。
3. 電気泳動法による分画法：支持体に0.7%アガロースゲル (0.5 cm × 10 cm × 30 cm) を用い、定電流20 mA で1時間泳動した。その後1 cm間隔でゲルを切断し、液体窒素を用いて凍結、融解を繰り返してゲルマトリックスを破壊し、精製水で抽出した。

\* 第5回家庭薬開発研究会発表 (富山, 1985年11月6日)

\*\* 〒930 富山市梅沢町2-9-1 TEL 0764 (24) 2271

4. カラムクロマトグラフィーによる分画法：DEAE-セルロースおよびCM-セルロース（Whatman DE-52, CM-52）カラムを用いて、それぞれ0.1M Glycine-NaOH 緩衝液（pH 9.0）および0.1M AcOH-AcONa 緩衝液（pH 4.0）でイオン交換クロマトグラフィーを、また、Sephadex G-25（Pharmacia）を用いてゲルろ過を行い、各分画ごとに分取した。
5. プロテアーゼ活性測定法：酵素前駆体として膵臓抽出液、また活性化因子として小腸抽出液または精製トリプシン（DIFCO）溶液を用い、これらを希釈、混合し、さらに生薬抽出液または分画液を原生薬に換算して10~20mg相当量およびリン酸緩衝液（pH 7.4）を加える。これを37℃で60分間インキュベーションしてプロテアーゼを活性化させた後に、基質として1%カゼイン溶液（Hammarsten 氏法カゼイン1gを1/15Mリン酸ナトリウム溶液75mlに加熱溶解した後精製水で100mlとする。）1mlを加え、さらに30分間インキュベーションとして蛋白を分解させた後、0.8Mトリクロル酢酸溶液を1ml加えて未分解の蛋白を沈殿させる。これを室温で20分間放置後遠心し、その上清液を1mlとる。ここに0.4M炭酸水素ナトリウム5mlと1Nフェノール試薬1mlを加え、37℃で20分間インキュベーションして呈色させ、その660nmにおける吸光度を測定してプロテアーゼ活性とする。<sup>4)</sup>

## 実験結果

このプロテアーゼ活性化機構におよぼす生薬成分の影響の作用機構を知るために、精製トリプシンのみに対する生薬抽出液の作用について検討した。

その結果、すでに活性を持ったトリプシンに対しては、オウレン等の増強作用はみられず、オウバクによる抑制作用がわずかに認められたのみであった（Fig. 2）。

次に、小腸抽出液のかわりに精製トリプシンを活性化因子として用いた場合は、オウレンの増強作用はやはり認められなかったが、オウバクでは、小腸抽出液の場合と同様な強い抑制作用が認められた（Fig. 3）。

このことより、活性化の増強成分は、トリプシンに対しては直接には働かないが、抑制成分はトリプシンに直接作用してその効果を発現するものと考えられる。

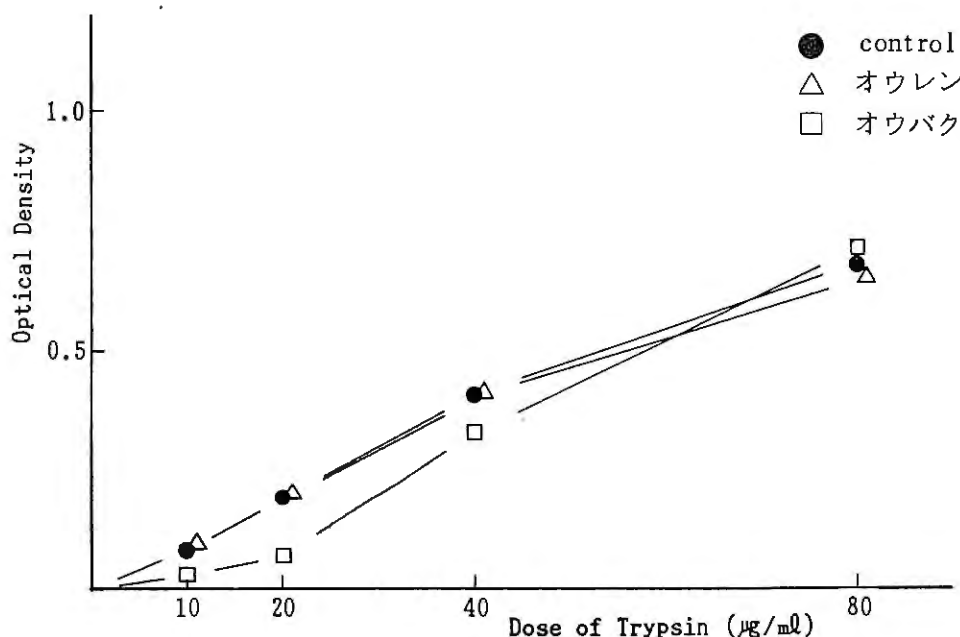


Fig. 2. 精製トリプシンに対するオウレン、オウバクの効果

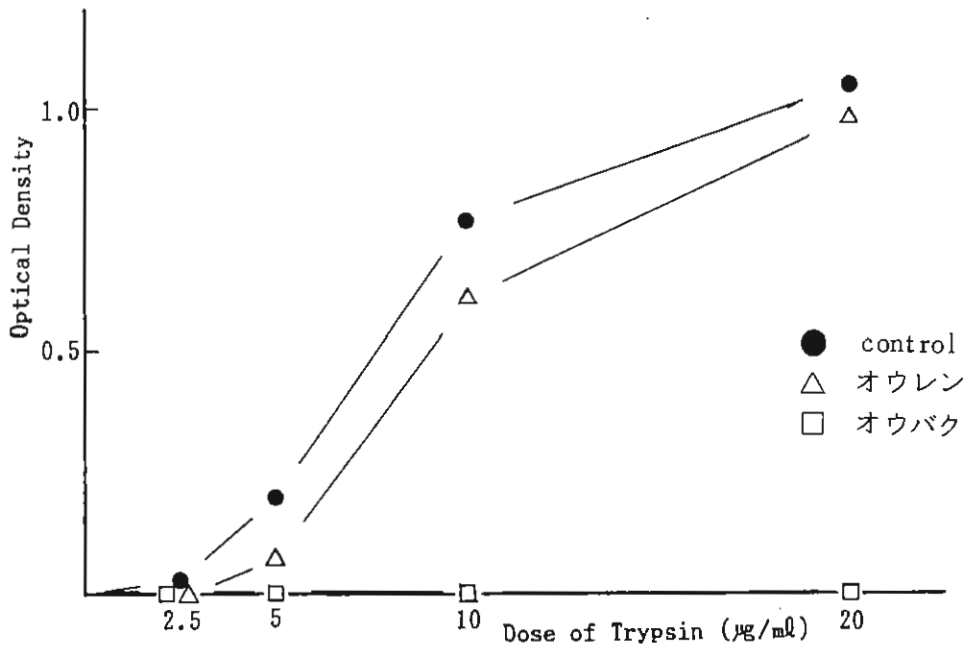


Fig. 3. 精製トリプシンを活性化物質としたときのオウレン，オウバクのプロテアーゼ活性化機構に対する効果

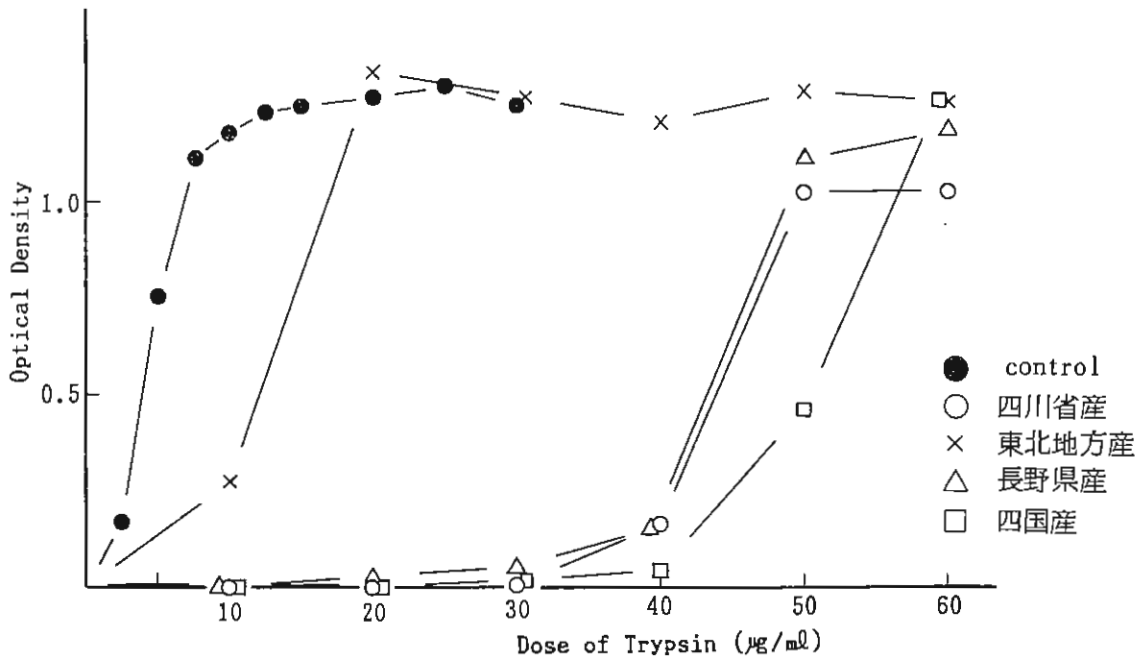


Fig. 4. 産地によるオウバクのプロテアーゼ活性化機構に対する効果

次に、産地の異なる各種のオウバクについて、そのプロテアーゼ活性化の抑制作用について比較検討した。その結果、国内産、中国産共に産地にかかわらず抑制作用を示すが、その強さには、産地によって大きな差が認められた (Fig. 4)。

次に、このオウバクの抑制作用と化学的成分との関連性を明らかにしたいと考え、オウバク抽出液を種々の方法により分画し、そのプロテアーゼ活性化機構に対する抑制作用について検討した。

まず、シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる分画成分について検討した。しかし、その結果、どのフラクションにも抑制作用が認められなかった (Fig. 5)。その理由としては、抑制成分の Rf 値が、ベルベリン等の増強成分のそれと近く、抑制成分の効果が阻害されているか、または、シリカ

ゲルの酸性により抑制成分の活性が失われてしまった可能性等が考えられる。

そこで、電気泳動法による分画を試みた。この分画成分について抑制作用を検討したところ、原点付近に活性がみられた (Fig. 6)。このことにより、抑制成分は電氣的に中性もしくは弱い負の電荷をもつか、または非常に高分子の物質であると予想された。

ここで、オウバクには粘性物質が多く含まれ、水で抽出するとかなり粘度が高くなり、濃縮等後の処理が困難になるため、他の溶媒による抽出を試みた。

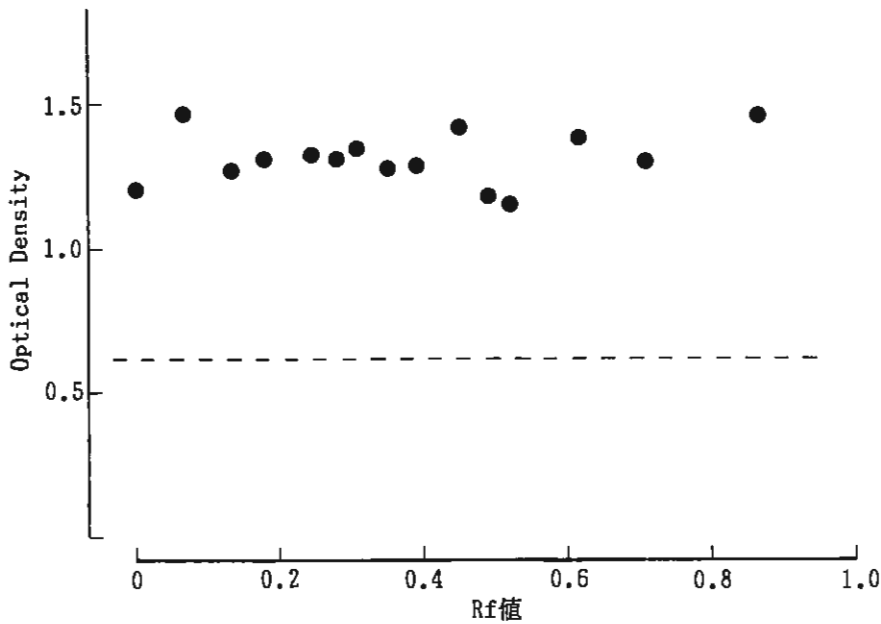


Fig. 5. 薄層クロマトグラフィー法によるオウバク分画成分の効果

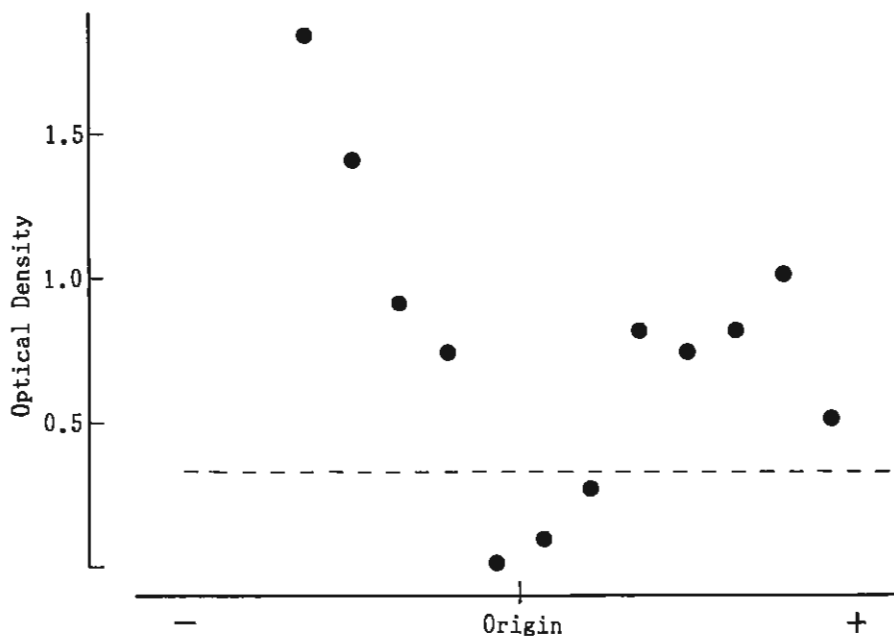


Fig. 6. 電気泳動法によるオウバク分画成分の効果

まず、メタノール抽出エキスについて、プロテアーゼ活性化に対する作用について検討した。しかし、メタノール抽出エキスには抑制作用は認められず (Fig. 7)、その他アセトンやアセトニトリルでも同様であった。

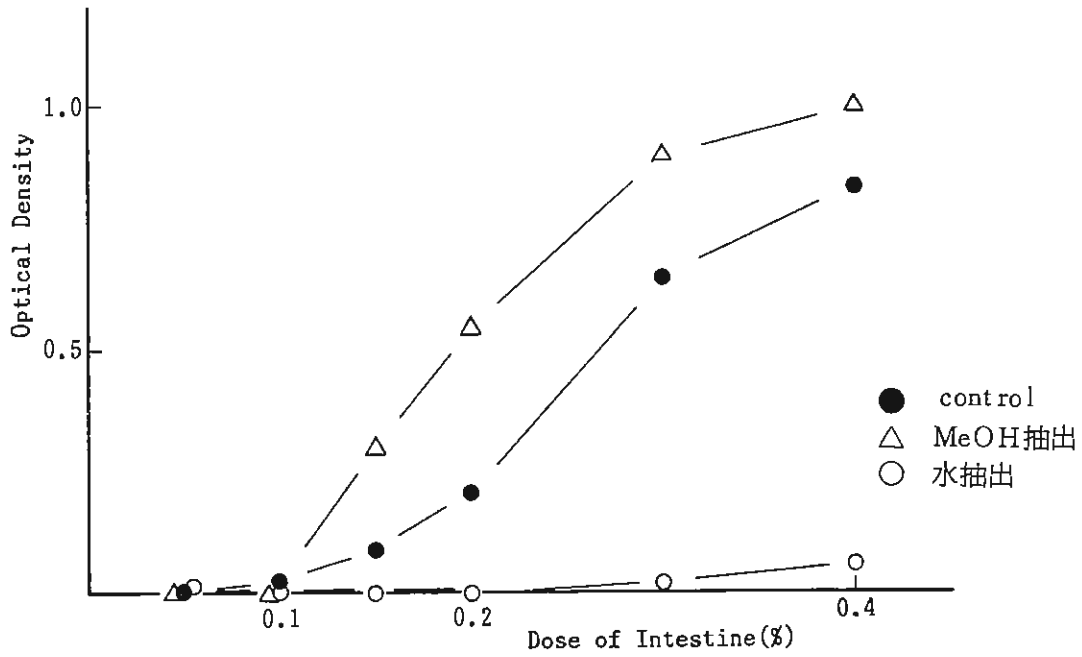


Fig. 7. オウバクのマタノール抽出成分の効果

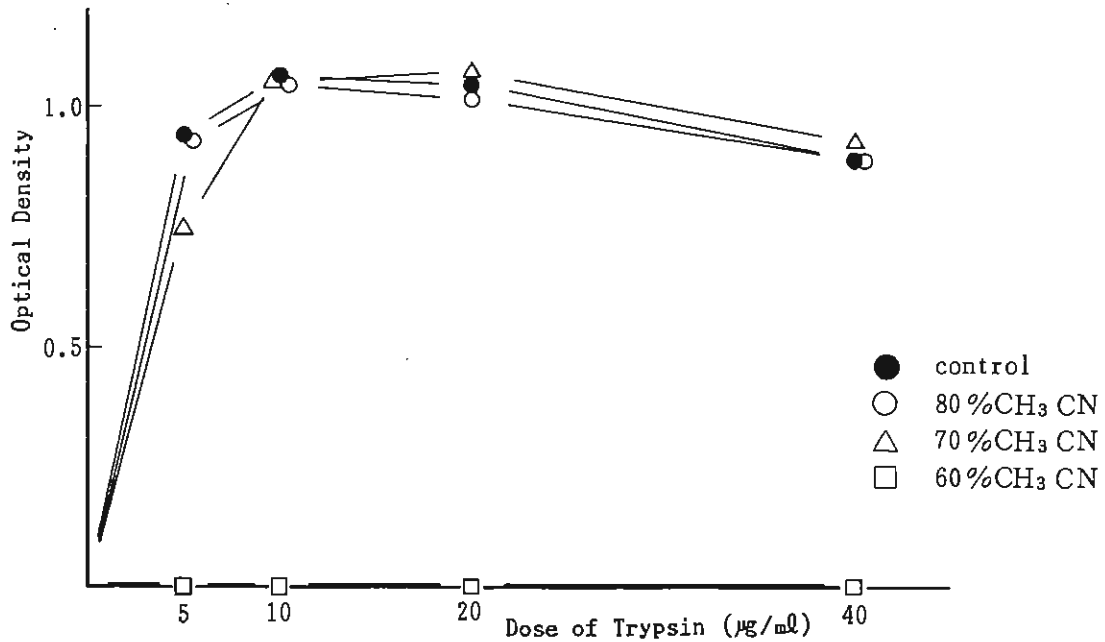


Fig. 8. オウバクのアセトニトリル・水混液による抽出成分の効果

そこで、アセトニトリルと水の混液を抽出溶媒に用い、その比率を変えて検討した (Fig. 8)。その結果、アセトニトリル60%以下で抑制成分が抽出されると共に、粘性物質は50%程度でも抽出されないことが分かった。そこで、以下の分画法は、オウバクをメタノールで抽出した残渣をさらに50%アセトニトリルで抽出、濃縮したものについて行うことにした。

次に、陰イオン交換体である DEAE-セルロースを用いてカラムクロマトグラフィーを行った結果、非吸着部分に抑制作用が認められた (Fig. 9)。さらに、この非吸着部分を陽イオン交換体である CM-セルロースカラムで分画したところ、やはり非吸着部分に活性のあることがわかった (Fig. 10)。この結果からも抑制成分は中性物質であると推定され、これは先の電気泳動法による分画の結果と一致する。

さらに DEAE - セルロースにも CM - セルロースにも吸着されないフラクションを Sephadex G - 25 を用いてゲルろ過を行った結果, 最初に溶出されるフラクションに活性が認められた (Fig. 11)。従ってこの抑制成分は比較的分子量の大きな物質であると推定される。

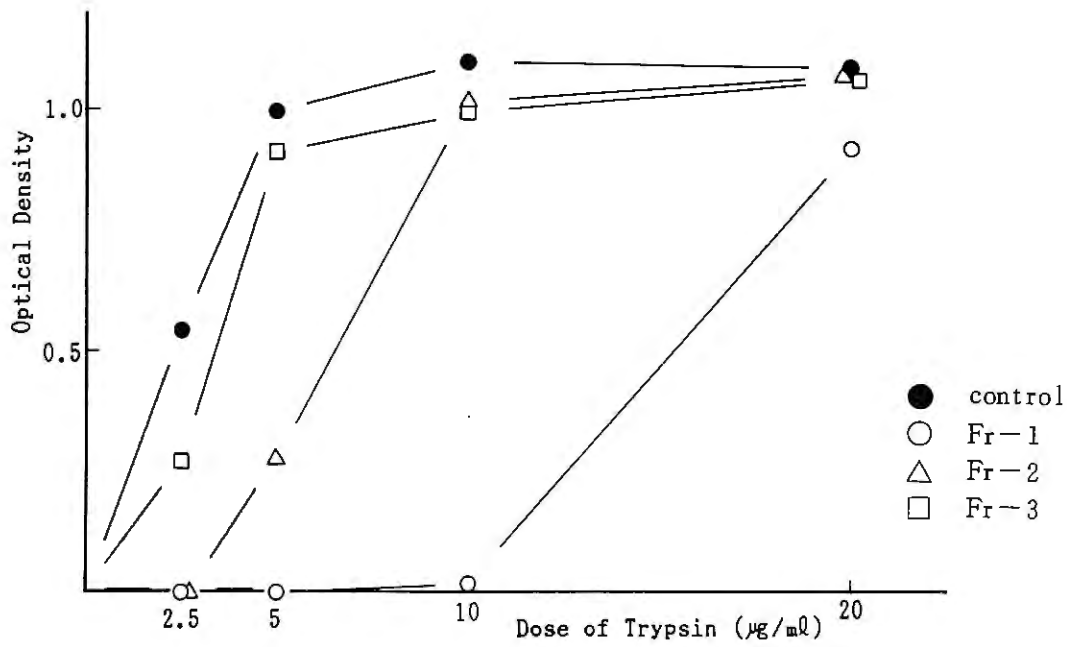


Fig. 9. DEAE-セルロースによるオウバク分画成分の効果

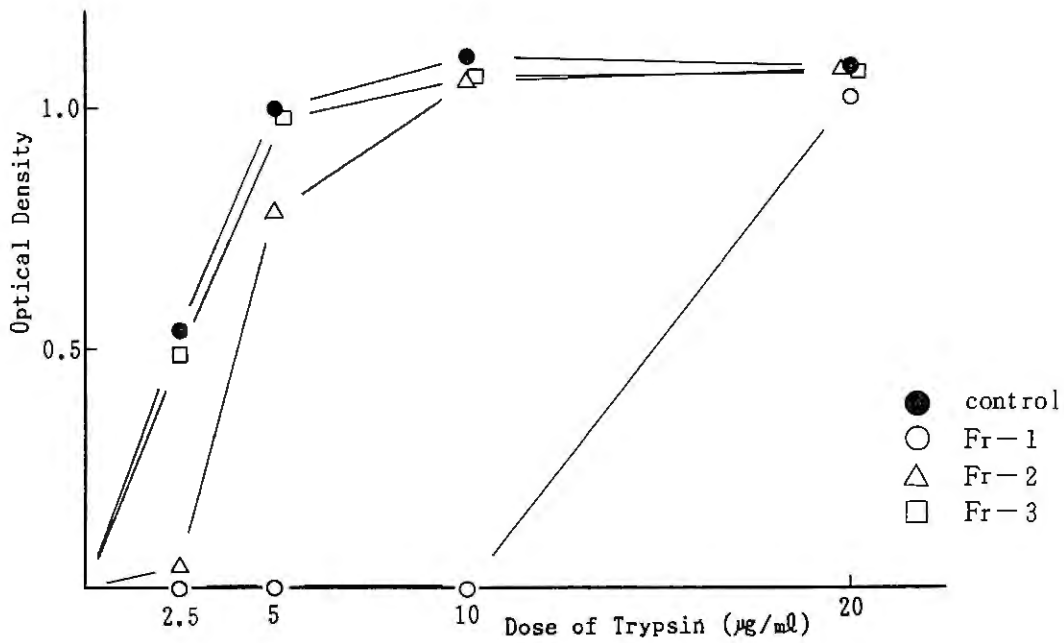


Fig. 10. CM-セルロースによるオウバク分画成分の効果



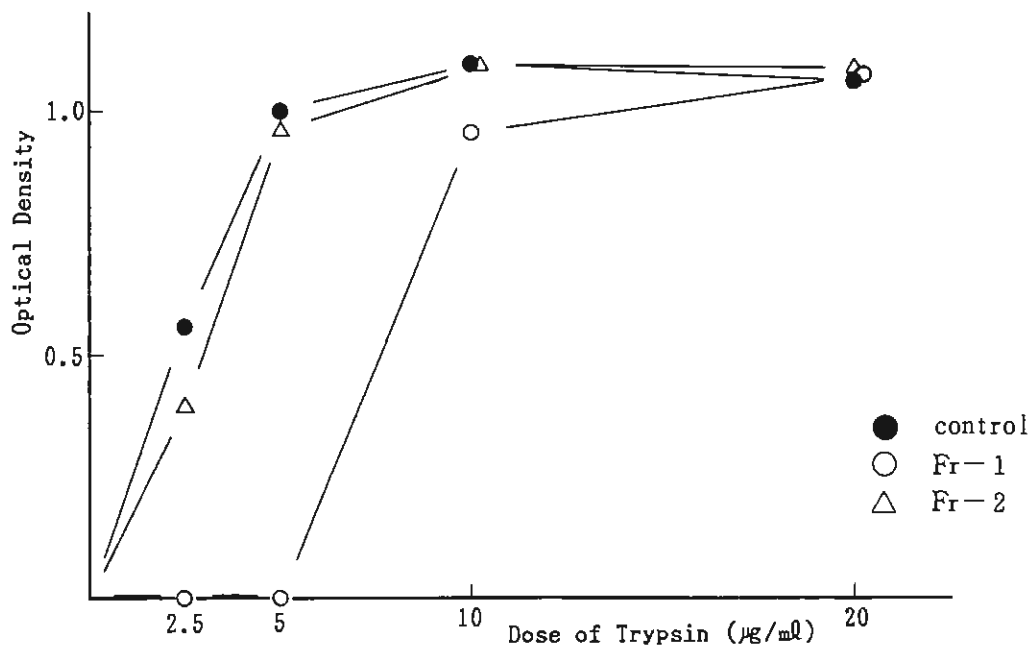


Fig. 11. Sephadex G-25 によるオウバク分画成分の効果

### 結論および考察

以上の研究結果から、オウバクのもつプロテアーゼ活性化機構に対する抑制作用は、オウバク中のある成分がトリプシンに直接作用し、その一種の蛋白分解作用である活性化因子としての作用を阻害することによって発現され、また、その抑制成分は中性かつ水溶性であり、比較的大きな分子量をもった熱安定性の高い物質であることが示唆された。

今後さらに研究を継続し、この抑制成分の更に詳しい化学的性質や、また、ベルベリン等他の成分との関連性、オウバクのもつ消炎作用との関連性等についても明らかにしたいと考えている。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導いただきました富山医科薬科大学 和漢薬研究所 病態生化学部門 荻田善一教授に、また生薬試料を恵与いただきました春陽堂薬房社長 安倍政利氏に深謝致します。

### 参考文献

- 1) Kunitz, M.: Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 429-446 (1939)
- 2) 上川浩: Zymogen 活性化刺激物質の解析方法, 家庭薬研究No.4, 23 (1985)
- 3) 磯部正治, 荻田善一: 二次元電気泳動法によるマウス膵由来プロテアーゼ・サイモーゲンの等電点決定法 *生物物理化学*, **27**, 341-345 (1983)
- 4) Lowry, O. H., N. J. Rosenbraugh, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)

〔原著〕

## B群ビタミンと共存するパントテン酸カルシウムの分解について\*

高崎 慎一 吉田 浩昭  
Shinichi TAKASAKI Hiroaki YOSHIDA  
第一薬品工業株式会社\*\*

パントテン酸は生体内で補酵素 C<sub>o</sub>A を構成する重要な物質として良く知られており、市販の総合ビタミン剤には、パントテン酸カルシウムなどの比較的安定な形で多くの配合例が見られる。一方、種々のビタミンと同時に配合された際の不安定性についても多くの報告がある。<sup>1)~3)</sup>

パントテン酸カルシウムの定量法としては、微生物定量法<sup>4)</sup>をはじめ多くの方法が知られているが、今回、高速液体クロマトグラフ<sup>5)</sup>を用いて定量を行い、B群ビタミンと共存する際の分解の要因について若干の知見を得たので報告する。

### 実験の部

#### 1. 実験その1

##### 1) 試験方法

パントテン酸カルシウムを中心に、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、チアミンジスルフィド及びニコチン酸アミドを各々組合せ、均一混合した16の検体を作成した (Table 1)。

検体をそれぞれ径25mm、高さ25mmの秤量ビンに入れ、室温密閉、50°・密閉及び室温・75%RHの各条件下で3週間の経時変化試験を行い、高速液体クロマトグラフを用いてパントテン酸カルシウムの定量を行った。

#### HPLCの条件

紫外分光光度計

(検出波長: 210 nm)

カラム: メルク社製, リクロカート

NH<sub>2</sub>タイプ (5 μm)

カラム温度: 40°

Table 1. 検体の構成

パントテン酸カルシウム : P-Ca  
塩酸ピリドキシン : B<sub>6</sub>  
リボフラビン : B<sub>2</sub>  
チアミンジスルフィド : TDS  
ニコチン酸アミド : N·A

検体No	構成ビタミン
1	P-Ca
2	P-Ca + B <sub>6</sub>
3	P-Ca + B <sub>2</sub>
4	P-Ca + N·A
5	P-Ca + TDS
6	P-Ca + B <sub>6</sub> + B <sub>2</sub>
7	P-Ca + B <sub>6</sub> + N·A
8	P-Ca + B <sub>6</sub> + TDS
9	P-Ca + B <sub>6</sub> + B <sub>2</sub> + N·A
10	P-Ca + B <sub>6</sub> + B <sub>2</sub> + TDS
11	P-Ca + B <sub>6</sub> + B <sub>2</sub> + TDS + N·A
12	P-Ca + B <sub>2</sub> + N·A
13	P-Ca + B <sub>2</sub> + TDS
14	P-Ca + B <sub>2</sub> + N·A + TDS
15	P-Ca + B <sub>6</sub> + N·A + TDS
16	P-Ca + N·A + TDS

P-Ca は約50mg, B<sub>6</sub> は約100mg, B<sub>2</sub> は約50mg, N·A は約100mg, TDS は約50mgを精密に量る。

\* 第5回家庭薬開発研究会シンポジウム (富山, 1985年11月6日)

\*\* 〒930 富山市奥田町6-10 TEL 0764 (32) 8571

移動相：アセトニトリル：5 mMリン酸緩衝液（8：2）

内部標準物質：アスコルビン酸

2) 試験結果

16の検体のパントテン酸カルシウムの経時変化試験では、室温密閉、50°・密閉及び室温・75% RHのいずれの条件でも変化がほとんど認められなかった。

2. 実験その2

1) 試験方法

実験1と同様に16検体を40°・75%RHの条件下で5週間の経時変化試験を行った。

2) 試験結果

パントテン酸カルシウムの分解は、パントテン酸カルシウムに塩酸ピリドキシンを含む検体（No. 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15）に著しく、5週間目のパントテン酸カルシウム残存率が90%未満であった。

Table 3.を5週間目のパントテン酸カルシウム残存率が90%以上（Fig.1），70%以上90%未満（Fig.2）及び70%未満（Fig.3）に分類し、比較した。

その結果、Fig.1, Fig.2のとおり、塩酸ピリドキシンがパントテン酸カルシウムの分解に影響を与えており、さらにFig.3のとおりニコチン酸アミドの共存が、その分解を促進していた。

Table 2. パントテン酸カルシウムの経時変化（実験その1）

Table 3. パントテン酸カルシウムの経時変化（実験その2）

(%)

検体No	室温-密閉		50°-密閉		室温-75%RH	
	7日後	21日後	7日後	21日後	7日後	21日後
1	101.1	101.7	100.1	100.3	99.3	100.9
2	102.4	100.3	99.1	103.0	100.1	99.9
3	100.6	99.3	101.9	102.0	99.4	99.8
4	101.9	102.0	99.8	100.3	100.3	99.7
5	102.7	101.7	101.9	100.1	101.3	101.2
6	100.3	99.6	102.8	99.4	100.5	101.1
7	101.8	102.1	102.6	99.4	98.9	98.7
8	97.8	99.9	101.3	100.3	98.6	101.6
9	98.9	100.9	100.6	100.5	99.5	99.2
10	101.3	101.1	101.7	101.8	101.6	99.7
11	98.2	99.8	103.0	101.6	101.3	100.5
12	102.1	102.2	102.4	103.3	102.1	99.9
13	98.5	99.6	101.8	102.1	99.1	100.4
14	99.1	101.8	99.5	99.1	99.1	99.2
15	99.6	101.1	99.1	99.1	98.5	100.1
16	100.6	99.0	99.2	98.6	98.6	99.0

(40°-75%RH条件)  
(%)

検体No	1週後	2週後	3週後	4週後	5週後
1	101.4	100.5	100.3	98.6	96.1
2	95.1	90.3	85.7	81.2	79.3
3	100.4	99.6	98.9	97.7	93.7
4	99.7	100.2	99.2	95.5	92.1
5	100.7	100.2	99.7	97.1	94.6
6	97.4	92.3	86.5	83.5	80.3
7	91.2	84.4	77.5	70.2	64.9
8	95.1	92.5	88.3	83.0	77.7
9	91.7	84.5	74.6	65.6	49.8
10	95.8	91.1	86.0	79.6	75.0
11	90.7	85.2	79.7	71.0	60.5
12	100.8	100.3	98.2	97.0	94.4
13	99.2	99.6	98.6	96.7	95.6
14	99.4	100.1	98.0	95.0	92.3
15	91.9	83.8	75.5	70.0	62.5
16	100.2	99.5	98.3	97.6	94.8

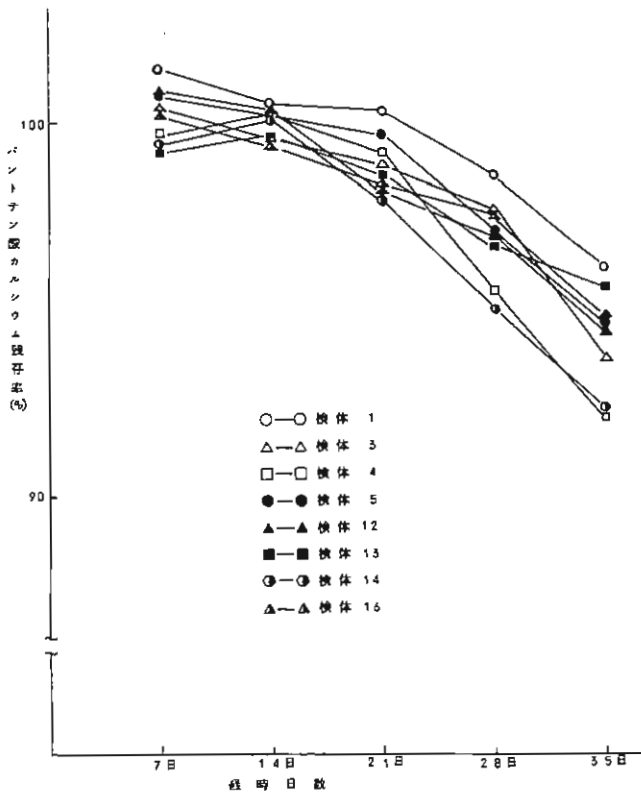


Fig. 1. パントテン酸カルシウム残存率  
(90%以上100%未満)

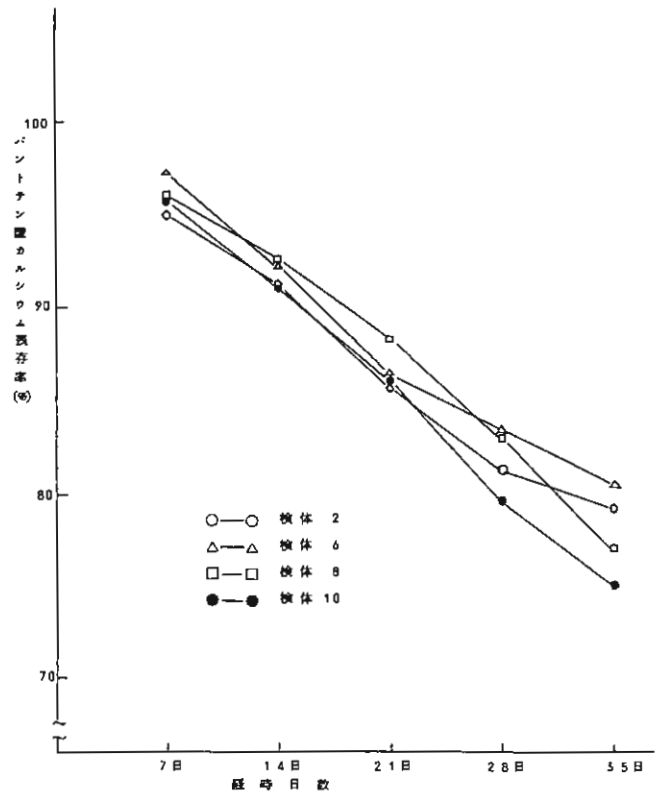


Fig. 2. パントテン酸カルシウム残存率  
(70%以上90%未満)

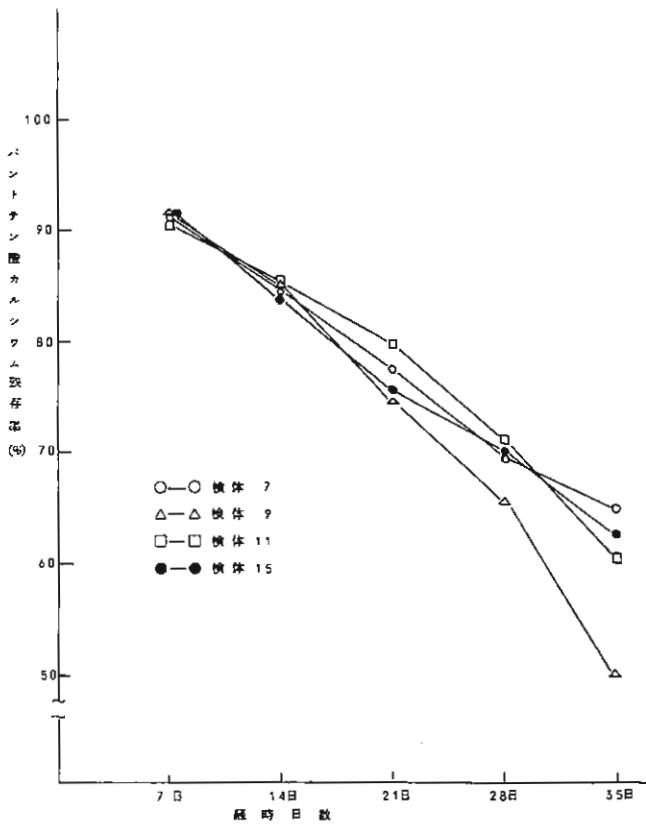


Fig. 3. パントテン酸カルシウム残存率  
(70%未満)

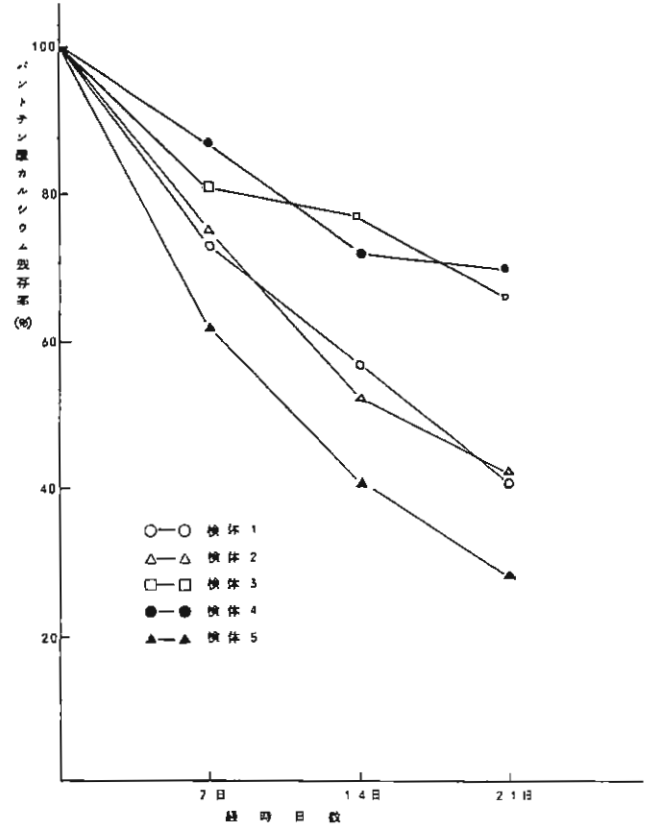


Fig. 4. パントテン酸カルシウムの経時変化  
(実験その3)

### 3. 実験その3

#### 1) 試験方法

製剤上の観点から、次の5つの検体を作成し、 $50^{\circ}$ ・75%RHの苛酷条件下で、3週間の経時変化試験を行った。

検体1：パントテン酸カルシウム及び賦形薬からなる顆粒を作り、これをマルメライザーで球形化した後、AEAを3%コーティングした顆粒とする。別に塩酸ピリドキシン、チアミンジスルフィド、ニコチン酸アミド、リボフラビン及び賦形薬から成る別顆粒を作り、以上の2種の顆粒を混合し、さらに滑沢剤を加えて再度混合し、径9mmφ、重量約250mgの錠剤とし、これにHPCを5%コーティングしたものの。

検体2：検体1中AEAコーティングを行っていないもの。

検体3：塩酸ピリドキシン及び賦形薬からなる顆粒を作り、これをマルメライザーで球形化した後、AEAを3%コーティングし顆粒とする。別にパントテン酸カルシウム、チアミンジスルフィド、ニコチン酸アミド、リボフラビン及び賦形薬からなる顆粒を作る。以上2種の顆粒を混合し、滑沢剤を加えて再度混合し、径9mmφ、重量約250mgの錠剤とし、HPCを5%コーティングしたものの。

検体4：検体3中AEAコーティングを行っていないもの。

検体5：パントテン酸カルシウム、塩酸ピリドキシン、チアミンジスルフィド、ニコチン酸アミド、リボフラビンに賦形薬を加え造粒し、滑沢剤を加えて混合し、径9mmφ、重量約250mgの錠剤とし、HPCを5%コーティングしたものの。

(注) 賦形薬はバレイショデンプン、乳糖、結晶セルロースを2：1：1の割合で混合したものを使用。

検体1錠中パントテン酸カルシウムは10mg、塩酸ピリドキシンは20mg、リボフラビンは10mg、ニコチン酸アミドは10mg、チアミンジスルフィドは10mgを含有する。

#### 2) 試験結果

いずれの検体もパントテン酸カルシウムにかなりの経時変化を認めたが、検体№5が他の4検体に比して変化が著しかった。

塩酸ピリドキシンを別顆粒として造粒したのち錠剤とする方が、パントテン酸カルシウムを別顆粒としたり、又5種のビタミン全部を同一顆粒として錠剤とする場合より経時変化が少なかった。

なお、検体№3と№4のAEAコーティングの有無による差異はなかった(Fig.4)。

### 考 察

パントテン酸カルシウムは比較的安定な物質であるにもかかわらず、高温・高湿という条件とB群ビタミン中でも塩酸ピリドキシンが共存する場合にはパントテン酸カルシウムの分解が進行し、製剤化を検討する際には、B群ビタミンからパントテン酸カルシウムを分離するよりも、この分解要因である塩酸ピリドキシンを分離するほうがより良い効果を期待することができるものと考えられる。

今回の実験は、各ビタミンの検討や賦形薬等製剤上の検討は不十分であるが、一つの問題提起として報告した。

## 文 献

- 1) 前川秀幸ら：薬剂学 26, 120 (1966)
- 2) A. Bojarski : Diss. Pharm. Pharmacol. 19, 297 (1967)
- 3) 山本隆一：薬誌 79, 419 (1959)
- 4) 衛生試験法・註解 P 225 (日本薬学会編 1980, 金原出版)
- 5) T. J. Hudson et al : J. Pharm, Sci. 73, 113 (1984)

〔原 著〕

## HPLCによるビタミンB<sub>2</sub>誘導体定量法の検討<sup>\*</sup>

田 中 良 一 Ryoichi TANAKA	堀 地 茂 Shigeru HORICHI	能 登 満 Mitsuru NOTO
才 木 良 則 Yoshinori SAIKI	黒 瀬 映 子 Eiko KUROSE	高 尾 美 代 子 Miyoko TAKAO

東亜薬品株式会社 試験開発部<sup>\*\*</sup>

医薬品として使用されるビタミン B<sub>2</sub> 類には、リボフラビン（以下FRと略）、リン酸リボフラビン（以下FMNと略）、フラビンアデニンジヌクレオチド（以下FADと略）等、数種の誘導体があり、それぞれの特徴、生体内活性を利用した製品が開発されている。

これらビタミン B<sub>2</sub> 誘導体の定量法は種々検討されているが、基本的にはフラビン核の光特性を利用し、吸光度、蛍光強度を測定するのが一般的である。しかし、これらの方法では操作が簡便ではなく、また変質した際に含量の低下を正確に察知することが困難である場合がある等の問題もある。

今回、FR及びFADの定量法について検討を行い若干の知見を得たので報告する。

### 1. 実験の部

#### 1) 標準品及び検体

FR標準品は国立衛生試験所標準品（日局標準品）を、FAD標準品は局外規FADをエタノールから再結晶をくり返し、乾燥後定量するとき、換算した脱水物に対し含量98%以上のものを用いた。検体として弊社製FR配合内服固型製剤3種、FAD配合液剤1種を用いた。

#### 2) 蛍光強度測定装置

日立139型分光光度計、蛍光強度測定用付属装置（139-0480, 139-0500）を用いた。

#### 3) 吸光度測定装置

日立100-30型分光光度計を用いた。

#### 4) HPLC装置

送液ユニット：島津LC-3A及びLC-6A、検出器：島津SPD-2A（紫外部）及びSPD-6AV（可視部、紫外部）、データ処理装置：島津CR-1B及びCR-3Aを用いた。

### 2. FRの検討

#### 1) ルミフラビン蛍光法

常法<sup>1)</sup>に従って行った。

#### 2) HPLC法（紫外部検出、可視部検出）

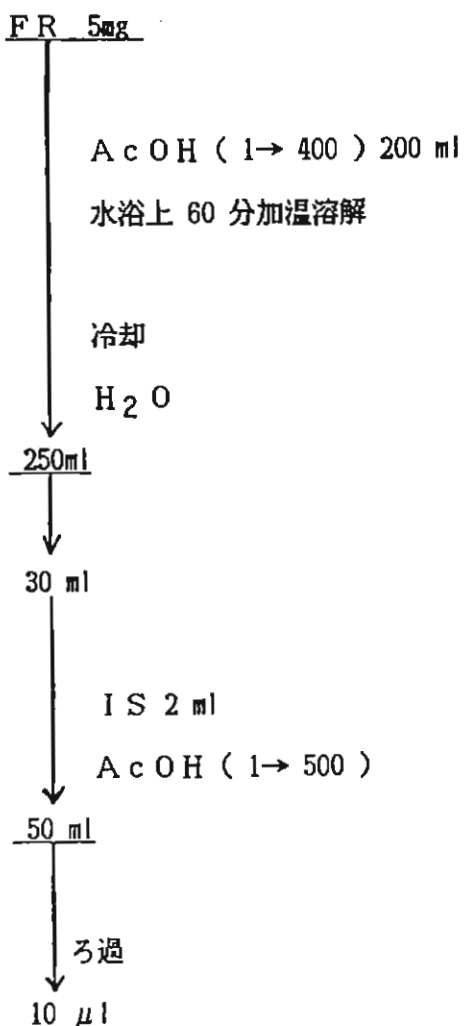
定量操作をChart.1に示した。

測定波長270 nmでは試料溶液と標準溶液のFRの内部標準物質に対するピーク高さ比を測定し、内部標準法で表示量に対する含有率を算出する。

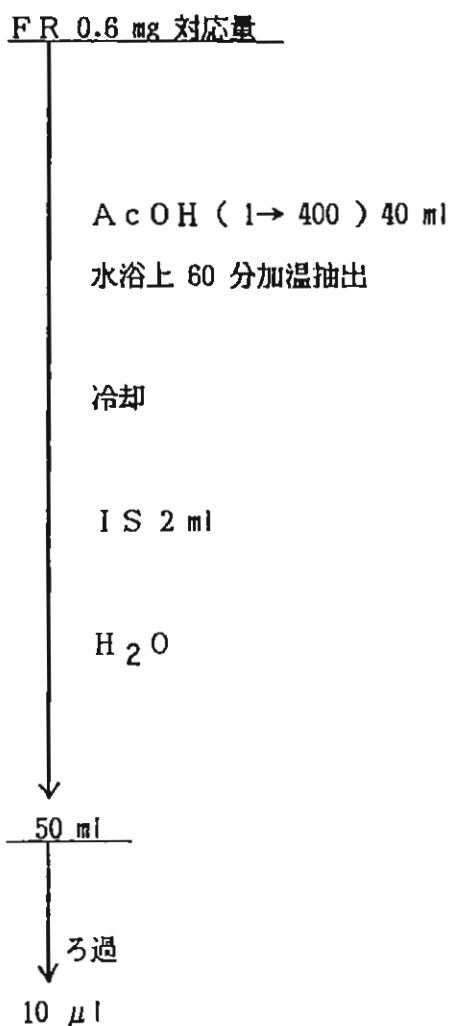
\* 第5回家庭薬開発研究会シンポジウム（富山、1985年11月6日）

\*\* 〒939-05 富山市三郷26番地 TEL 0764(78)5100

標準溶液



試料溶液



IS : 0.7 %安息香酸・メタノール溶液

1 FR  
2 安息香酸

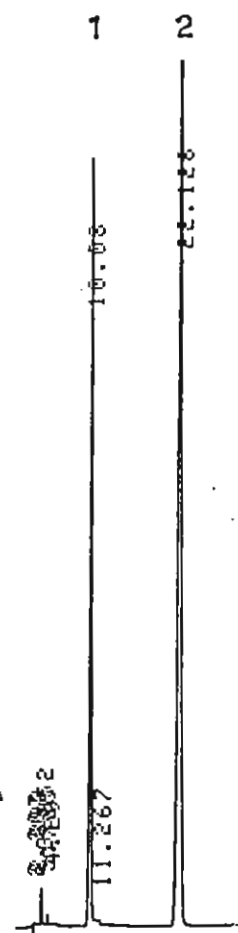


Fig. 1.  
FR 及び安息香酸  
のクロマトグラム

Column : Chemcopak 7-ODS-H (Φ4mm × 25 cm )  
 Carrier : AcOH(1→100)・CH<sub>3</sub>CN ( 3 : 1 )-0.07%ヘキシルジカルボン酸ナトリウム  
 Flow rate : 1.0 ml/min  
 Detection : 270nm ( 0.04A U F S ), 445nm ( 0.02A U F S )  
 Column temp: 35°

Chart 1. FRのHPLC法

測定波長 445 nm では試料溶液と標準溶液のFRのピーク高さを測定し絶対検量線法で表示量に対する含有率を算出する。

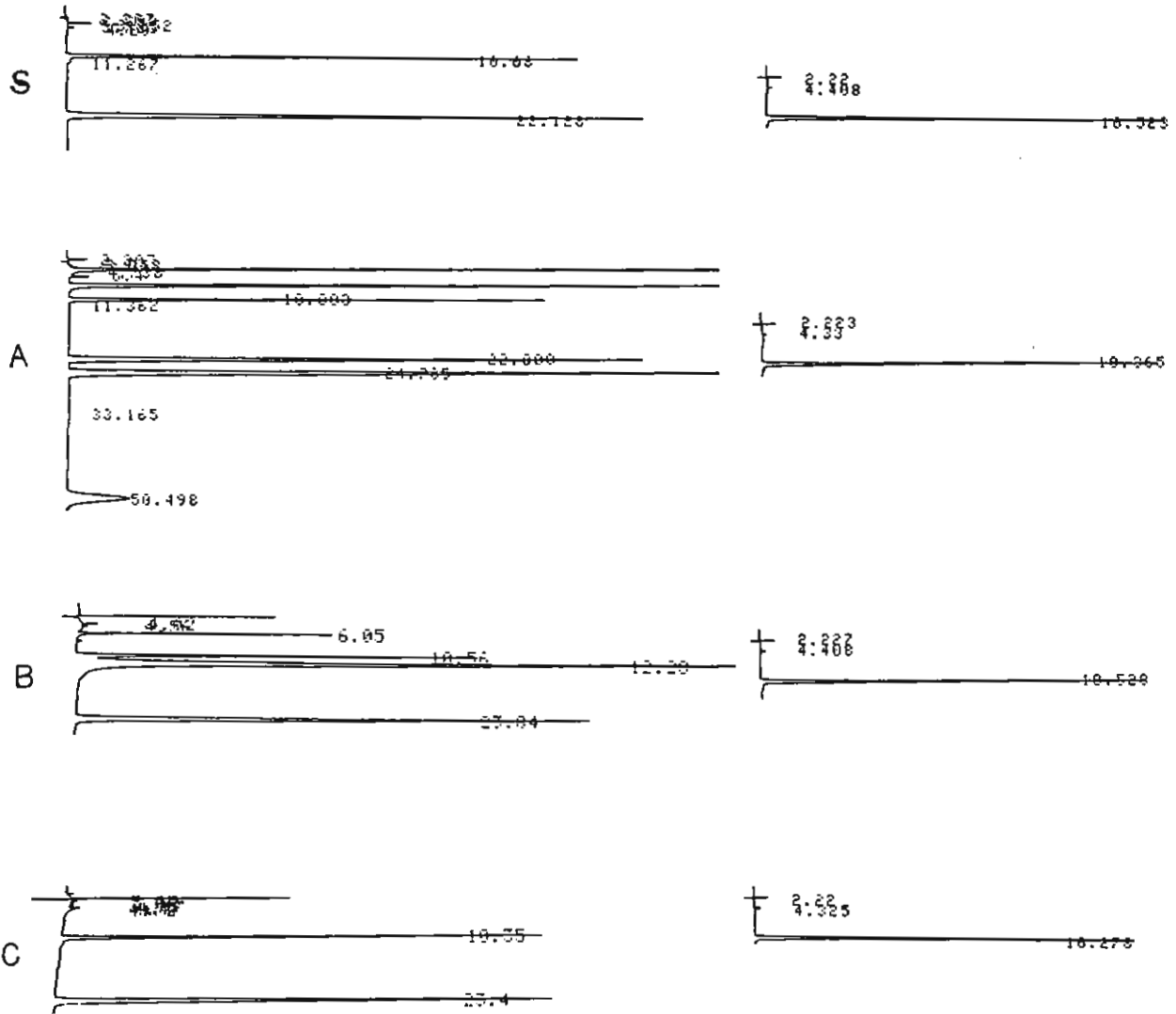
標準溶液のクロマトグラム Fig.1 に示す。FRと内部標準物質（安息香酸）は良好に分離されている。

検量線はいずれも原点を通る良好な直線性を示した。（紫外部： $r = 0.9997$ ，可視部： $r = 0.9999$ ）

添加回収実験を検体 3 種（A，B，C）について行った。270 nm ではいずれの検体でも分離は



良好で妨害は認められず, 445 nm ではFR以外のピークは認められなかった (Fig. 2)。結果は Table 1 に示したとおり良好な値を示した。



紫外部におけるクロマトグラム

可視部におけるクロマトグラム

Fig. 2. FR配合製剤のクロマトグラフ

Table 1. FR配合製剤の添加回収実験 (HPLC法)

検体	配合主成分	回収率 (%)		n
		紫外部	可視部	
A	アセトアミノフェン エテンザミド マレイン酸クロルフェニラン dl-塩酸メチルエフェドリン 無水カフェイン リボフラビン (FR) ヘスペリジン	99.3	98.8	6
B	ビオタミン リボフラビン (FR) 塩酸ピリドキシン パントテン酸カルシウム シアノコバラシン	98.9	99.5	6
C	リボフラビン (FR) ゴオウ ニンジン末	101.1	100.8	6

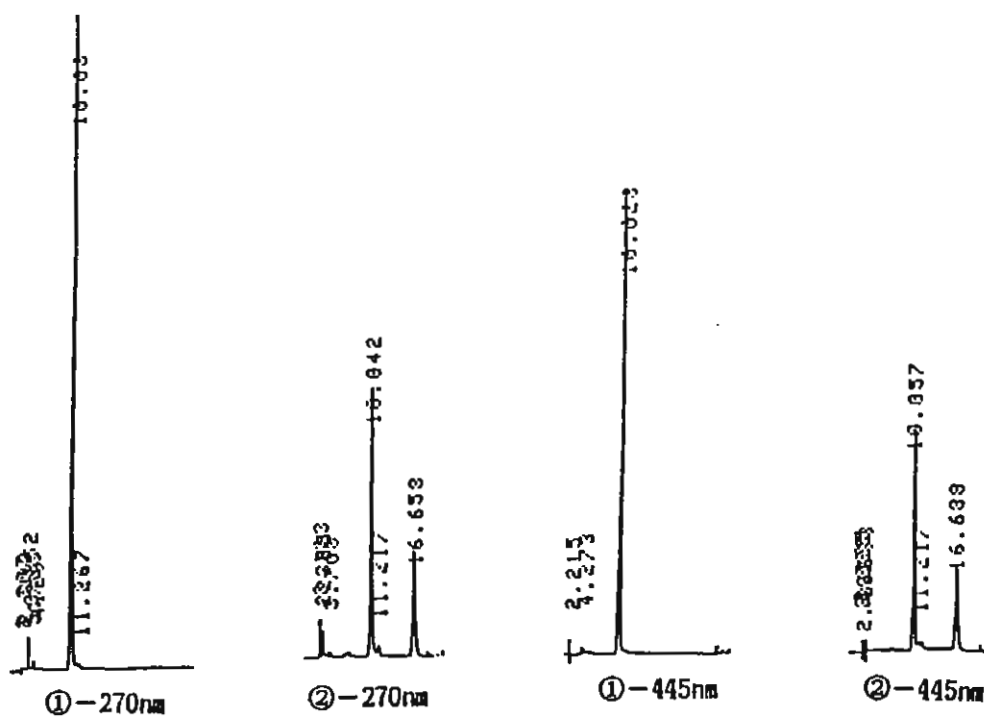
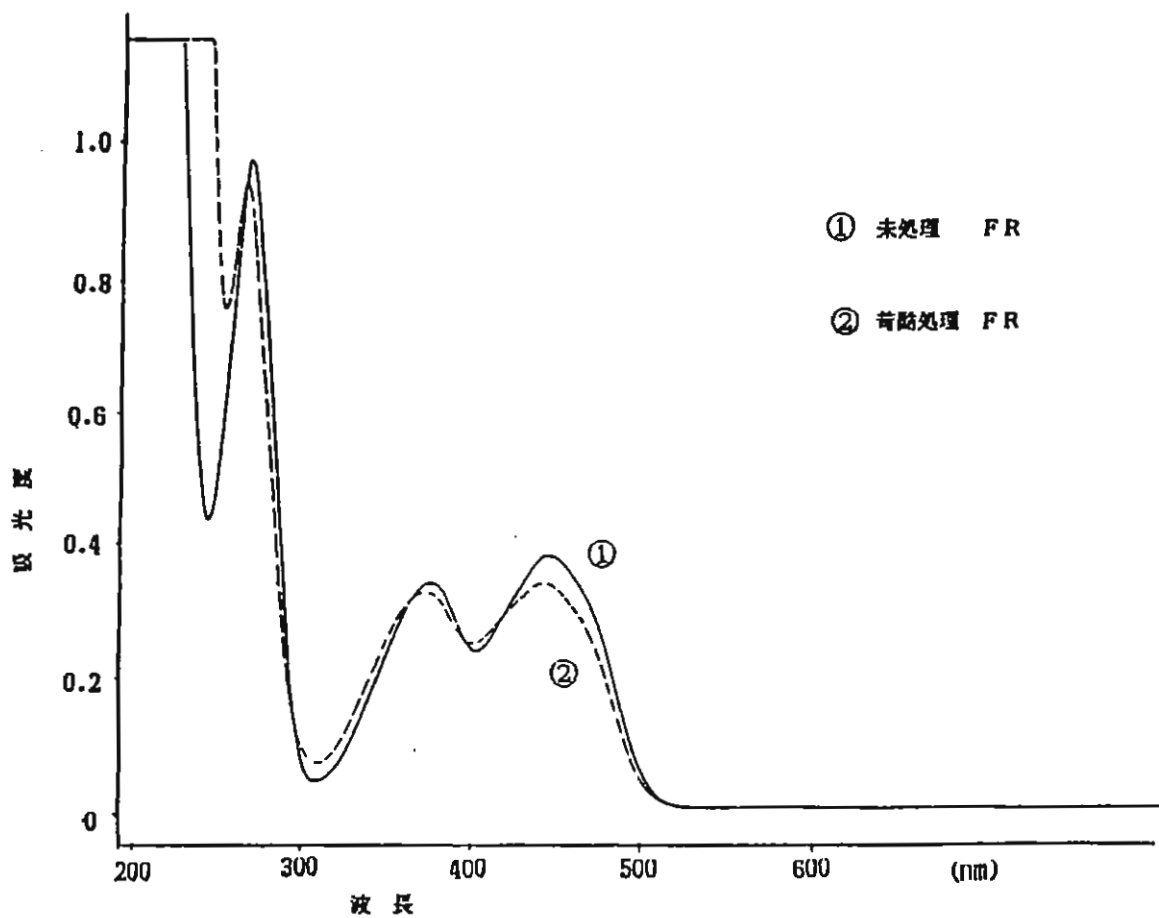


Fig. 3. FRの吸収曲線とHPLCクロマトグラム

### 3) 苛酷処理品の定量比較

上記検体 A, B, C を粉碎し, 紫外線照射の苛酷処理を行い各定量法によって FR の残存率を未処理品の定量値を 100.0 % として求めた (Table 2)。検体 A では 3 法ともほぼ同一の値を示したが, 検体 B, C では蛍光法が他の 2 法に比べて高い値を示した。

### 4) FR 標準品の苛酷処理品

FR 標準品の氷酢酸 (1 → 500) 溶液に 500W 白色光を照射し, その前後の吸収曲線と HPLC クロマトグラムを Fig. 3 に示した。苛酷処理品には FR の分解物と思われるピークが認められる。

Table 2. 各定量法による定量結果比較

定量法	検体	残存率 (%)	
		未処理品	苛酷処理品
けい光法	A	100.0	98.7
	B	100.0	97.8
	C	100.0	100.0
HPLC法紫外部	A	100.0	97.4
	B	100.0	90.0
	C	100.0	94.5
HPLC法可視部	A	100.0	98.4
	B	100.0	93.2
	C	100.0	94.7

## 3. FAD の検討

### 1) 吸光度法

Chart. 2 に示した操作で調製した試料溶液及び標準溶液について 450 nm における吸光度を測定し表示量に対する含有率を算出する。

検量線はほぼ原点を通る良好な直線性を示した ( $r = 1000$ )。又添加回収率も良好であった。

### 2) HPLC 法 (紫外部検出)

定量操作を Chart. 3 に示した。

試料溶液及び標準溶液の FAD の内部標準物質に対するピーク高さ比を測定し表示量に対する含有率を算出する。

検量線はほぼ原点を通る良好な直線性を示した ( $r = 1000$ )。又添加回収率も良好であった。

### 3) 金属塩分解法

局外規に収載された定量法<sup>2)</sup>を準用した (Chart. 4)。

### 4) 苛酷処理品の定量比較

試料に 500W 白色光照射の苛酷処理を行い, 各定量法によって残存率を未処理品の定量値を 100.0 % として求めた (Table. 3)。吸光度法は他の 2 法に比べ高い値を示している。

上記苛酷処理を行う前後の試料の HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示した。苛酷処理品には FAD の分解物と思われるピークが認められる。又 FAD 標準品水溶液に同様の苛酷処理を行う前後の吸収曲線を Fig. 5 に示す。

Table 3. 各定量法による定量結果比較

定量法	残存率 (%)	
	未処理品	苛酷処理品
吸光度法	100.0	86.6
HPLC法 (紫外部)	100.0	69.3
金属塩分解法 (局外規法)	100.0	71.9

## 4. 他のビタミン B<sub>2</sub> 誘導體

Fig. 6 及び Fig. 7 に FMN 水溶液及び酪酸リボフラビン (FR-B) エタノール溶液について 500W 白色光照射の苛酷処理を行う前後の吸収曲線を示す。

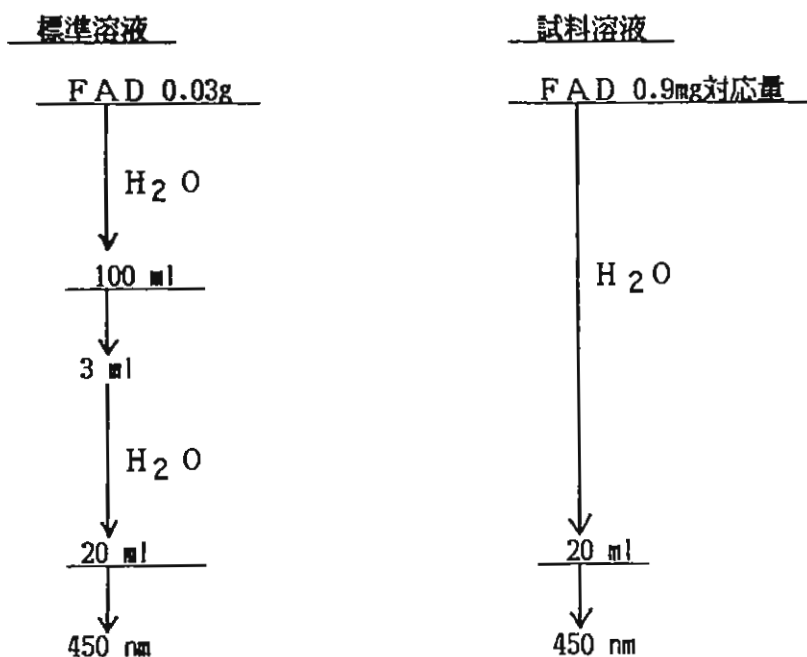


Chart. 2. FADの吸光度法

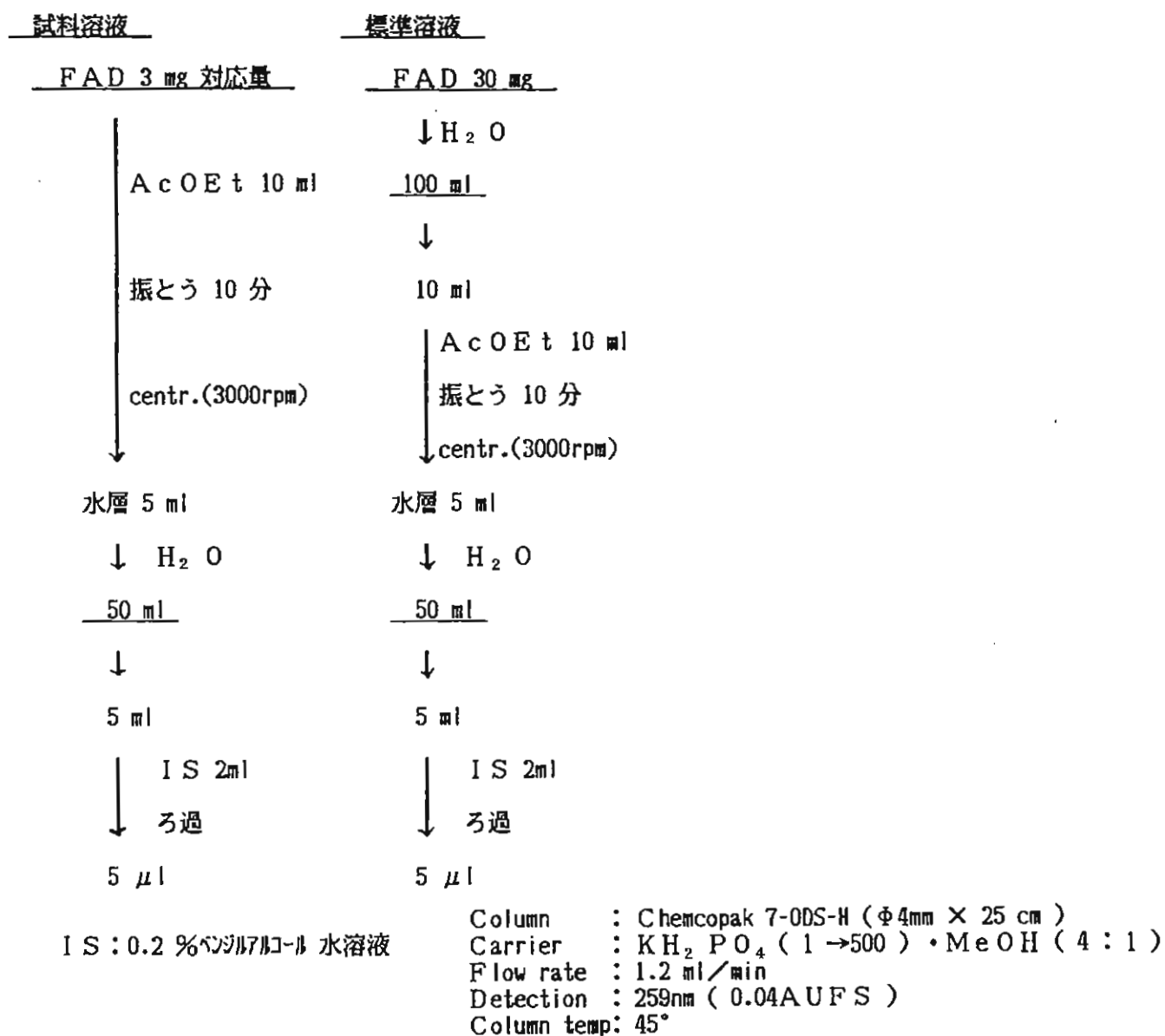
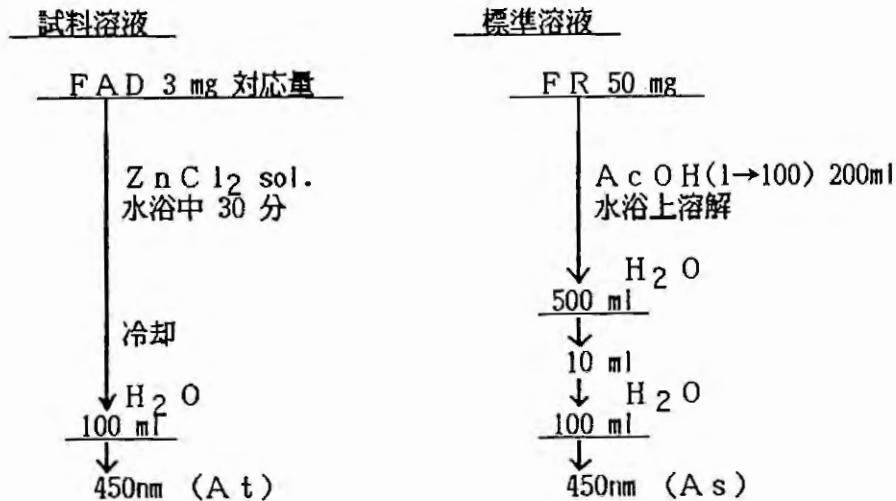


Chart. 3. FADのHPLC法

(1) 総フラビン量



$$\text{総フラビン量 (mg/ml)} = \text{FR 標準品 (mg)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{500}$$

(2) FADのピーク面積比

HPLC操作条件

Column : Chemcopak 7-ODS-H (φ4mm × 25 cm)  
 Carrier : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1→500) · MeOH (4:1)  
 Flow rate : 0.7 ml/min  
 Detection : 450nm (0.16A UFS)  
 Column temp: 45°  
 Injection : 5 μl

$$\text{FADのピーク面積比} = \frac{1.08 \times T_1}{1.08 \times T_1 + T_2}$$

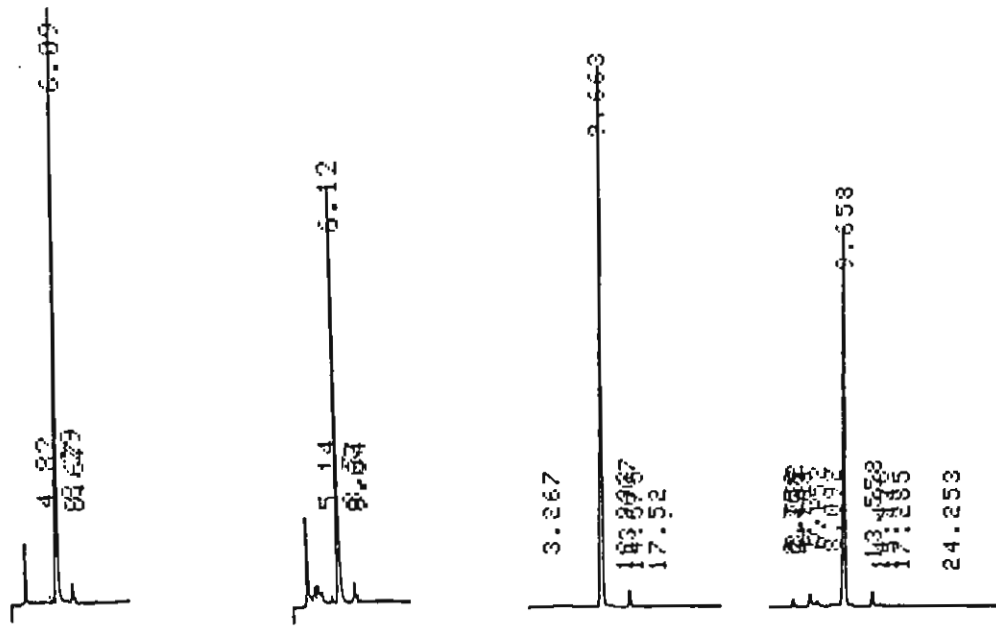
T<sub>1</sub> : FADピーク面積  
 T<sub>2</sub> : 類縁物質ピーク面積総和

(3)

$$\text{FAD量 (mg/ml)} = F_t \times F_r \times \frac{829.52}{376.37}$$

F<sub>t</sub> : 総フラビン量 (1)  
 F<sub>r</sub> : FADのピーク面積比 (2)

Chart. 4. FADの金属塩分解法 (局外規法)



①-未処理試料 259nm ②-苛酷処理試料 259nm ①-未処理試料 450nm ②-苛酷処理試料 450nm

Fig. 4. 試料のクロマトグラム

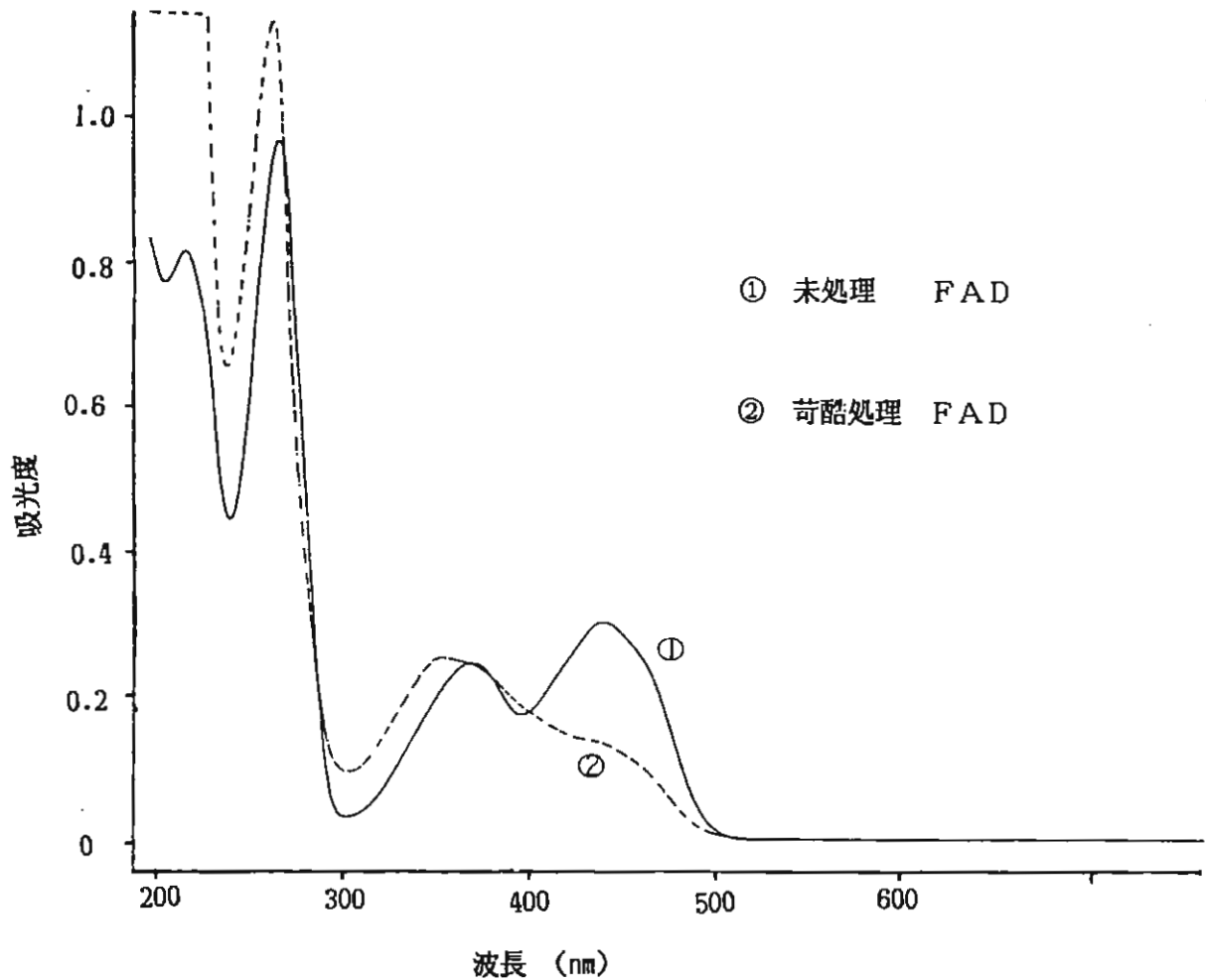


Fig. 5. FADの吸収曲線

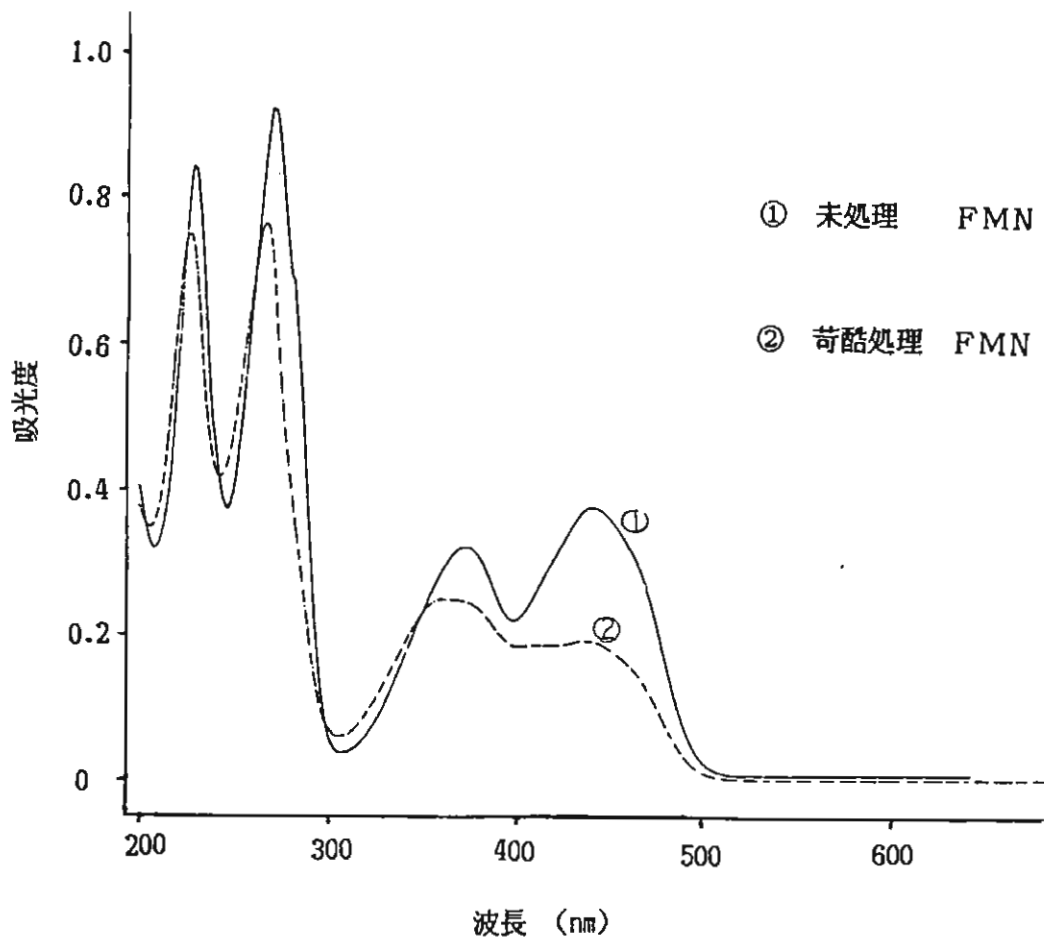


Fig. 6. FMNの吸収曲線

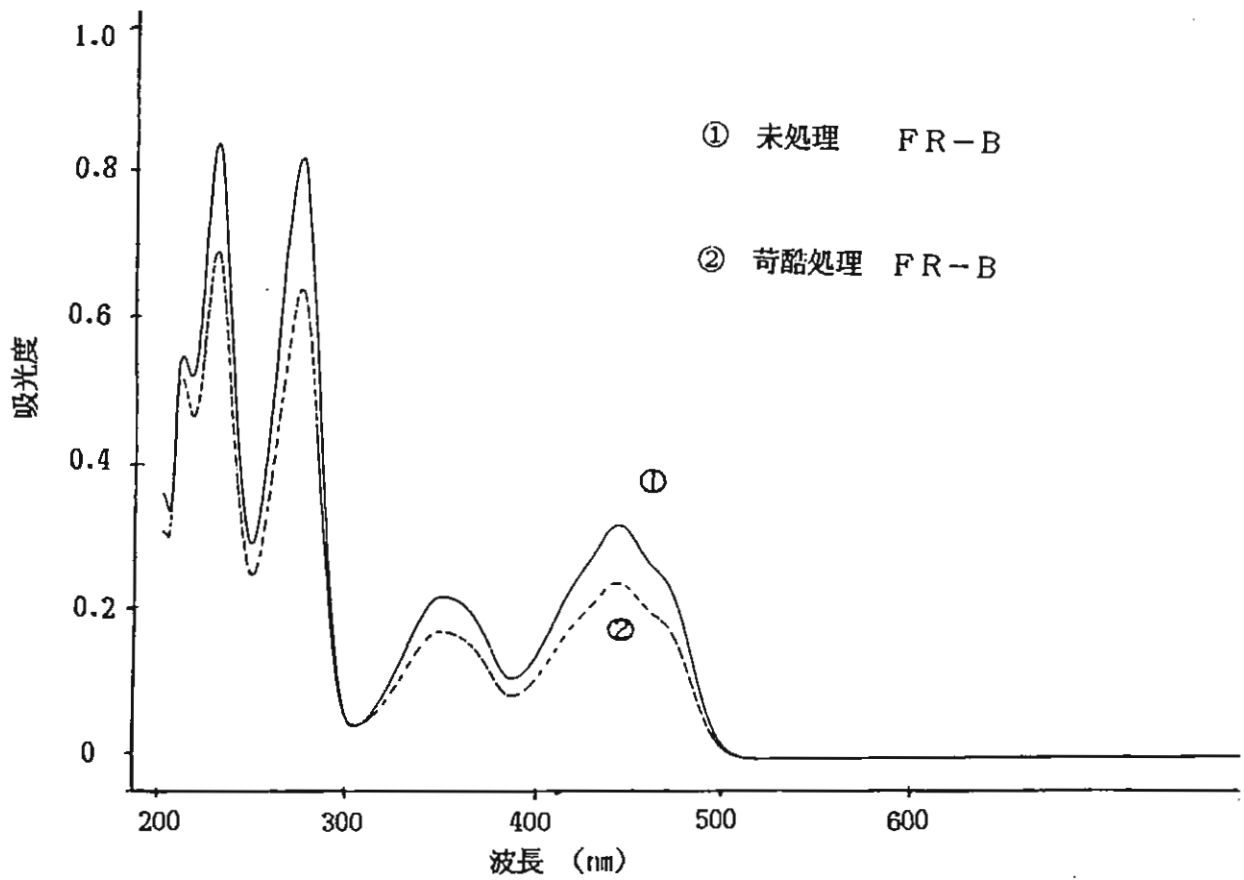


Fig. 7. FR-Bの吸収曲線

## 5. 結果, 考察

FR, FAD等のビタミン B<sub>2</sub> 誘導体は必ずしも安定ではなく, その分解生成物は多様で測定波長付近に吸光度, 蛍光度をもつものも多い。そのため定量法によってはそれら分解生成物を含めた値を示すことになる。(FRのルミフラビン蛍光法では, FRをルミフラビンに分解しその蛍光強度を測定するので, FRが光等により一部ルミフラビンに分解していた場合にはより高い定量値を示すであろうし, FADの吸光度法では, FADの分解物には可視部(450 nm 付近)に吸光度をもつものも多く, これらの存在下ではより高い定量値を示すことになる。)HPLCを用いる方法ではこれらの分解生成物をより良く分離し, 定量が行えるのでより正確な定量値を示していると考えられる。特に変質している可能性のある検体についてよりすぐれた方法であると思われる。

しかし今回は分解生成物や, 苛酷条件と分解経路等については確認しておらず, これらについては今後さらに検討が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) 岩尾裕之, 高尾百合子: ビタミンの分析, 76, 講談社(1972)
- 2) 厚生省薬務局審査課監修: 日本薬局方外医薬品成分規格 1983 追補, 209, 薬業時報社(1984)



## 動物胆中の胆汁酸のHPLC定量法<sup>※</sup>

日 水 裕 子      能 村      修  
Yuko HIMIZU      Osamu NOMURA

松 原 良 充  
Yosimitu MATSUBARA

大協薬品工業株式会社 試験研究室<sup>※※</sup>

家庭薬中に苦味健胃剤として配合される動物胆中の胆汁酸は、従来、比色法<sup>1)</sup>、TLC法<sup>2)</sup>、GC法<sup>3)</sup>などの定量法が多く報告されている。

今回、動物胆の加水分解生成物から、セップパックC<sub>18</sub>カートリッジを用いて遊離胆汁酸を分離し、得られた遊離胆汁酸をF. Stellaard等の方法<sup>4)5)</sup>にしたがってフェナシルエステル誘導体とした後、HPLCで定量する方法について検討し、回収率、再現性とも良好な結果が得られたので報告する。

### 実験の部

#### 1. 標準品、試薬及び試料

##### 1) 標準品

コール酸(以下C):和光純薬製のものを70%エタノールで2回再結晶する。(m.p. 202~205℃), デオキシコール酸(以下DC):東京化成製のものを無水エタノールで2回再結晶する。(m.p.175~179℃), ケノデオキシコール酸(以下CDC):Aldrich社製, 含量98%, ウルソデオキシコール酸(以下UDC):Sigma社製, 含量99%。

##### 2) 試 薬

$\alpha$ -Bromoacetophenone(以下BAP):東京化成製。Triethylamine(以下TEA):和光純薬製。

セップパックC<sub>18</sub>カートリッジ(Waters社製):あらかじめメタノール2ml, 水2mlで順次洗浄しておく。

##### 3) 試 料

牛胆(国産), 熊胆(インド産), 牛黄

#### 2. 試料の前処理

##### 1) メタノール抽出液の調製

試料1gにメタノール50mlを加え, 1時間ずつ3回還流抽出する。抽出液をあわせて, メタノールで正確に200mlとする。

##### 2) 抱合胆汁酸の加水分解<sup>3)</sup>

メタノール抽出液の10mlを大型試験管にとり, 溶媒を留去後3N-NaOH液5mlを加えて,オートクレーブ中120℃で4時間加熱分解する。

※ 第5回家庭薬開発研究会シンポジウム発表(富山, 1985年11月6日)

※※ 〒939-05 富山市水橋島等字花井173-3 TEL 0764(78)1121

### 3) 遊離胆汁酸の分離

加水分解後、内容物をビーカーにとりだし、希塩酸及び0.1N-塩酸でpH7.3とし、更に水を加えて正確に50mlとする。その4mlをセップパックC<sub>18</sub>カートリッジに流し、水2mlで洗浄した後メタノール3mlで溶出する。溶出液を減圧で留去し、残留物にエタノール2mlを加えて溶かす。

### 3. 遊離胆汁酸のフェナシルエステル化

遊離胆汁酸のエタノール溶液(C 1mg, DC 0.5mgを含む)に10%TEA-アセトニトリル溶液, 15%BAP-アセトニトリル溶液各1mlを加え, 50℃の水浴中で2時間加熱還流する。冷後, メタノールを加えて25mlとする。

### 4. HPLC条件

装置: 島津高速液体クロマトグラフLC-3A, 検出器: 紫外分光光度計検出器SPD-2A, カラム: Zorbax ODS (Du-Pont社製, 4.6mm×25cm), 移動相: 80%メタノール-水, 流速0.8ml/min, 温度: 60℃, 測定波長: 240nm。

## 実験結果

### 1. HPLC条件の設定

逆相系カラムを用いて, C, DC, CDC, UDC の4成分を同時に分離定量できる条件について検討した。メタノール-水系で各成分の保持比  $K'$  を調べた結果は, Fig.1 に示すとおりである。最も良好な分離を示す条件でのクロマトグラムをChart 1 に示す。

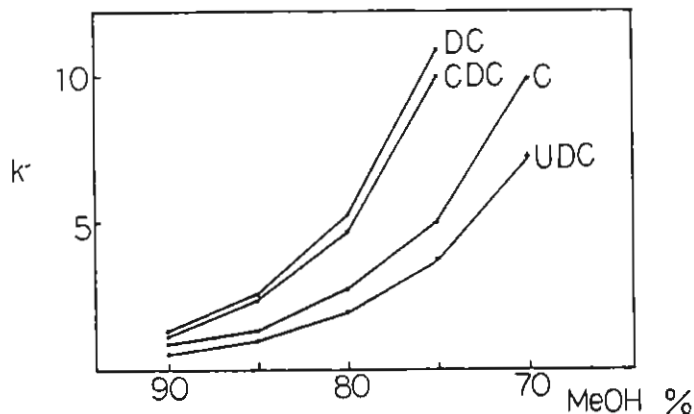


Chart 1.

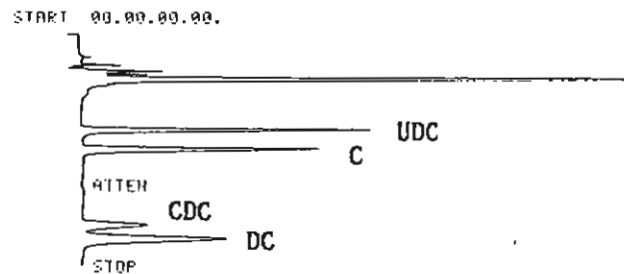


Fig 1. Relationships of capacity factor( $k'$ ) vs. mobile phase composition

### 2. フェナシルエステル化の条件

C1.0mg, DC0.5mgについて, 反応温度及び時間, 試薬量について検討を行った。

#### 1) 反応温度及び時間

C及びDCに過剰のTEA及びBAPを加え, 反応温度30°, 50°, 80°の場合について時間ごとくフェナシルエステルのピーク高さを調べた(Fig. 2)。以後50°で2時間加熱することにした。

#### 2) 試薬量

TEA 5mg, 10mg, 15mgの場合について, BAPを2.5~25mg迄変化させて50°の水浴で2時間加熱し, ピーク高さの変化を調べた。Fig.3のように, BAP10mg以上でTEAに関係なく, ピーク高さはほぼ一定である。試料中の共存物質による試薬の消費と過剰の試薬によるカラムへの

影響を考慮して, TEA 10mg, BAP 15mgを加えることにする。

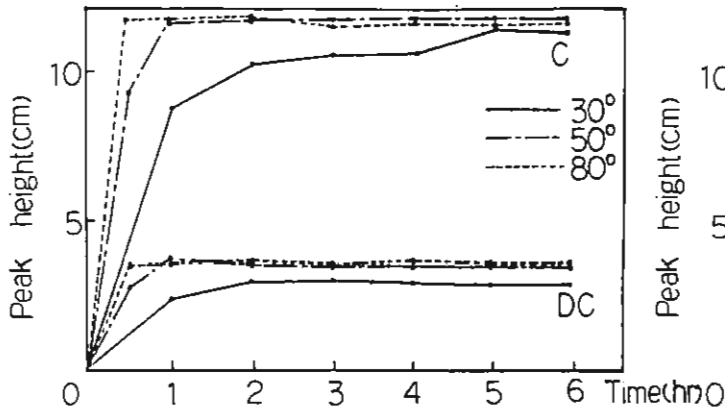


Fig 2. Conditions of Labeling Reaction  
Reaction Temp. 30°, 50°, 80°

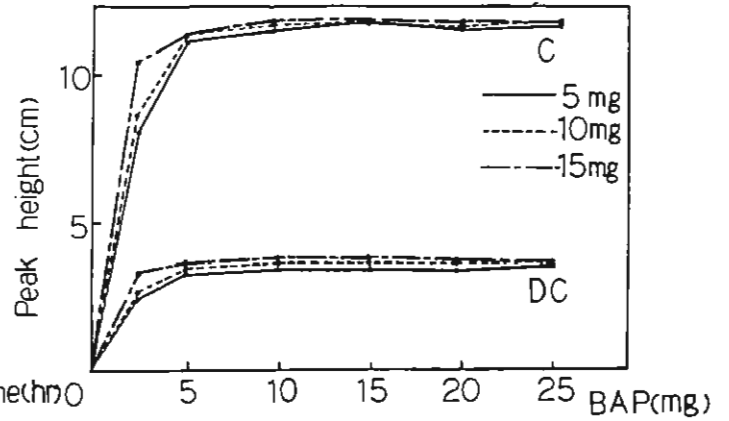


Fig 3. Comparison of Labeling Reagents amount (TEA and BAP)  
TEA amount 5, 10, 15 mg

3. フェナシルエステルの安定性

生成された胆汁酸のフェナシルエステルは, Fig. 4 のとおり時間的に安定である。

4. 検量線の作成

C, UDC (0.33 ~ 1.67 mg/25ml), CDC, DC (0.16 ~ 0.83 mg/25ml) の範囲内で絶対検量線 Fig. 5 を作成した。4成分とも原点を通り直線性を示す。

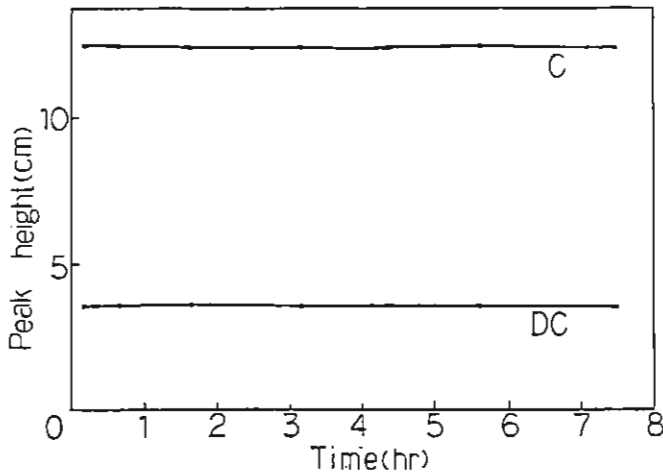
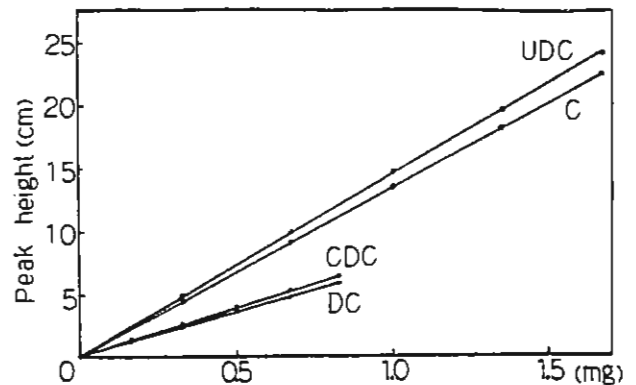


Fig 4. Stability of Phenacyl ester



UDC	r = 0.9997
C	1.0000
CDC	1.0007
DC	0.9957

Fig 5. Calibration Curve of Bile acids

5. 加水分解生成物の分離

加水分解後, 遊離胆汁酸を中性でセップパック C<sub>18</sub>カートリッジ内に吸着させた後, 水洗しメタノールで溶出させる。溶出に必要なメタノールの量を調べた結果を Fig. 6 に示す。また Table 1 のようにカートリッジによる遊離胆汁酸の回収率は, 標準品, 動物胆に既知量の標準品を添加した場合とも良好であった。

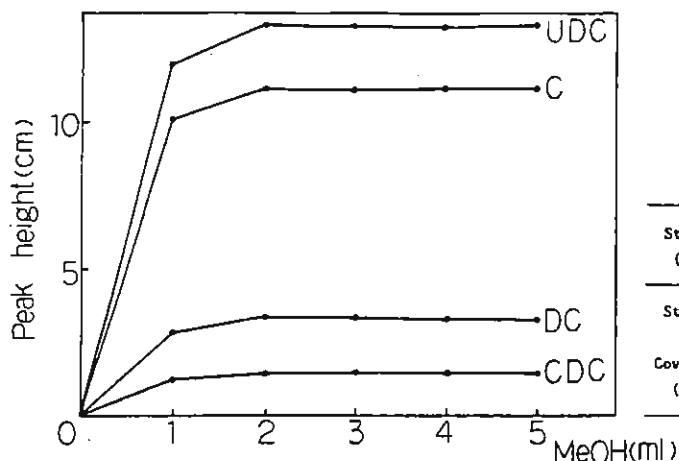


Fig 6. Eluted MeOH amount of Sep-Pak C18 cartridge

Table 1. Recovery Tests for Bile Acids (Treated by Sep-Pak C18 cartridge)

		Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid	Ursodeoxy cholic acid
Standard (n=5)	av. CV	97.6% 1.01%	97.7 0.62	100.5 0.80	99.1 0.66
Standard +	av. CV	98.4% 2.25%	101.0 1.28	100.4 0.94	101.3 1.21
Cov Gallie (n=5)					

### 6. 動物胆の定量結果

牛胆 (chart 2), 熊胆 (chart 3), 牛黄 (chart 4) について胆汁酸を定量し, その結果を Table 2 に示す。

また, 牛胆についてはGC法(メチル化法)でも定量を行ないHPLC法と比較した (Table 3)。

Chart 2.

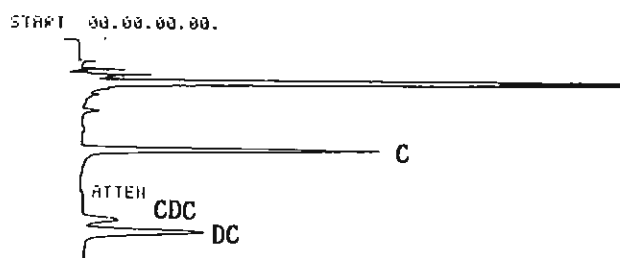


Table 2. Results of Determination of Bile Acids (Treated by Sep-Pak C18 cartridge)

		Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid	Ursodeoxy cholic acid
Cov Gallie (n=5)	av. CV	29.2% 0.85%	2.6 1.72	10.1 1.13	
Bear Gallie (n=5)	av. CV		2.7% 2.06%		50.3 1.68
Cov Bezoar (n=5)	av. CV	6.0% 1.39%	0.3 0.00	2.9 1.54	

Chart 3.

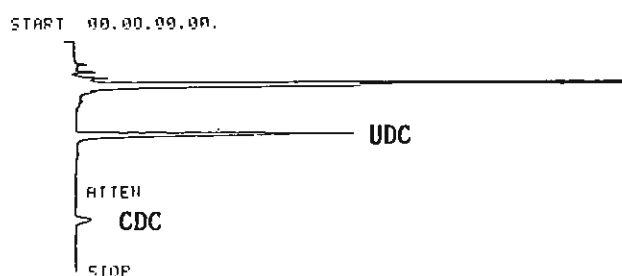
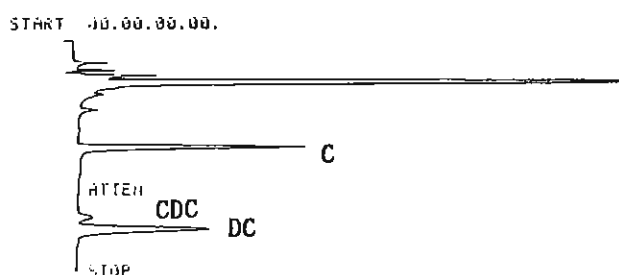


Table 3. Results of Determination of Bile Acids in Cov Gallie Comparison of HPLC & GC (Treated by CHCl3 Extraction)

		Cholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Deoxycholic acid
H P L C (n=3)	av. CV	25.3% 0.89%	2.5 2.34	8.6 1.04
G C (n=5)	av. CV	25.3% 1.07%	2.2 5.08	8.0 0.83

Chart 4.



## ま と め

HPLCによる胆汁酸の定量は、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸の4成分同時定量が可能であり、特にデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸について十分な分離が得られた。また、GC法に比べて検出感度が良く微量の試料について定量が可能であり、セップパックC<sub>18</sub>カートリッジの使用により回収率が改善された。今後、製剤分析に応用するために内部標準法での検討が必要である。

● 胆汁酸の定量法について

● 胆汁酸の定量法について

## 文 献

- (1) 飛田忠嗣, 江尻千鶴子: 牛胆中のコール酸類の定量法について (第3報), 富山県薬事研究所所報 (1979. 1 1981.3)
- (2) 江尻千鶴子, 田中彰雄, 大久保睦子: 牛胆中のコール酸類の定量法について (第1報), 富山県薬事研究所所報 (1977.4~1979.3)
- (3) 宇治昭, 滝浦潔: 熊胆に関する研究 (第一報) ガスクロマトグラフィーによる熊胆中の胆汁酸の定量
- (4) 江尻千鶴子, 飛田忠嗣: 牛胆中のコール酸類の定量法について (第2報), 富山県薬事研究所所報 (1979.4~1981.3)
- (5) Stellaard F., Hachey D. L., and Klein P. D. : Separation of Bile Acids as Their Phenacyl Esters by High-Pressure Liquid Chromatography, Anal. Biochem 87, 359 (1978)