

【原 書】

HPLCによる製剤中の塩化リゾチームの定量[※]

Determination of Lysozyme Chloride in Preparation by HPLC

竹 岸 雅 人
Masato TAKEGISHI

※※
テイカ製薬株式会社 品質管理部
Department of Quality Control Teika Seiyaku Co., LTD.

塩化リゾチームは医薬品として喀痰、慢性副鼻腔炎等に用いられ鎮咳去痰薬、かぜ薬等に配合されている有効成分である。局外規¹⁾に記載の定量法は、微生物(Micrococcus Lysodeikticus)の乾燥菌体を基質とした濁度法(Bacteriolytic Method; 以下図表中BMと略す)であり、この方法は感度は良いが、測定条件を厳密にしないとバラツキが大きく、定量精度を上げるためには操作に熟練を要する。

近年、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いた塩化リゾチームの定量が報告^{2)~5)}されているが、多成分配合の製剤への応用には分離が困難な場合があった。

今回、定量精度の向上及び操作の簡素化を目的として、汎用性の高いオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したカラムを用い逆相HPLC法による塩化リゾチームの定量を行い、溶液中の加速条件における安定性を濁度法と比較した結果、良好な相関が得られることを確認した。更に塩化リゾチームを含有する製剤について多成分の同時定量をHPLC法により行い、回収率及び再現性に満足すべき結果を得たので報告する。

実験の部

1. 標準品及び試料

1) 標準品

- 塩化リゾチーム(国立衛生試験所 標準品)
- 塩酸フェニルプロパノールアミン(アルプス薬品); 乾燥後定量するとき、塩化フェニルプロパノールアミン(C₉H₁₃NO·HCl) 99.0%以上含有する。
- 定量用カフェイン(日局)
- 定量用マイレン酸クロルフェニラミン(日局)

2) 試料

- 塩化リゾチーム(エーザイ製); 乾燥後定量する時、1mg当たりリゾチーム0.90mg(力価)以上含有する。
- 製剤(鼻炎剤); 塩化リゾチーム60mg(力価)、塩酸フェニルプロパノールアミン90mg、無水カフェイン90mg、マイレン酸クロルフェニラミン7.2mg及び賦形剤を加え全量780mgとしカプセル3個に充填する。

2. 試薬及び試液

※ 第7回家庭薬開発研究シンポジウム発表会 (富山, 1987年11月4日)

※※ 〒930 富山市荒川250番地 TEL 0764 (31) 8881

- ・アセトニトリルは和光純薬製液体クロマトグラフ用，エタノール，メタノール，クロロホルム及びトリフルオロ酢酸は和光純薬製試薬特級を用いた。
- ・リン酸塩緩衝液（pH1.8～12.0）；リン酸二水素カリウム9.08gに水を加えて溶かし1000mlとした液と，無水リン酸一水素ナトリウム9.46gに水を加えて溶かし1000mlとした液を混和して調製し，必要に応じ薄めたリン酸溶液（1→100）又は薄めた水酸化ナトリウム溶液（1→100）を用い調製する。
- ・内標準溶液（I S）；パラオキシ安息香酸メチル（日局）約25mgを量り水を加えて溶かし2000mlとする。

3. 測定方法

- 1) 濁度法：局外規，塩化リゾチームの項を準用する。
- 2) HPLC法：塩化リゾチーム0.125mg/mlになるよう調製した標準溶液及び試料溶液につきTable. 1に示す条件で試験を行い，内標準物質のピーク高さに対する塩化リゾチームのピーク高さ比 Q_s 及び Q_T を求め，次式により塩化リゾチームの残存率（%）を算出する。

$$\text{塩化リゾチーム残存率（\%）} = \frac{\text{塩化リゾチーム標準品の量 [mg (力価)]} \times \frac{Q_T}{Q_s} \times 100}{100}$$

Table.1 HPLC Condition

塩化リゾチームの量 [mg (力価)]

System: HITACHI 655 Liquid Chromatograph
Detector: UV280nm, 256nm
Column : Radialpack μ -Bondapack C18
Column Temp.: Room Temp.
Mobile Phase: A → B 10min line gradient
A; 0.1%TFA-Acetonitrile (90:10)
B; 0.1%TFA-Acetonitrile (40:60)
Flow Rate: 1.5ml/min
Injection Volume: 15 μ l

結果及び考察

1. HPLC法によるクロマトグラム及び検量線

Fig. 1の吸収曲線より塩化リゾチームは280nmに吸収の極大を認めたので，測定波長280nmを選んだ。クロマトグラムはFig. 2の示したとおり約11分に内標準物質，約12分に塩化リゾチームのピークを認めた。合わせて加熱分解品 [90° 30分，2-3) 項に準ずる] のクロマトグラムを示した。検量線を作成するとき塩化リゾチーム0.02～0.5mg (力価) / mlで原点を通る直線が得られた (Fig. 3)。

2. 安定性試験によるHPLC法と濁度法との比較

標準溶液及び試料溶液の調製方法をFig. 4に示す。次の1)～4)の条件に従って試験を行ないHPLC法及び濁度法により塩化リゾチームの残存率を求めた。

- 1) 溶媒安定性：各種有機溶媒及び移動相に用いる0.1%トリフルオロ酢酸溶液について，40° 2時間の接触で，失活はあまり認められなかった (Table. 2)。
- 2) pH安定性：各pHのリン酸塩緩衝液中の安定性は31° 24時間放置で，pH1.8～11まで安定であるが，pH12になると著しい失活が認められた (Fig. 5)。
- 3) 温度安定性：リン酸塩緩衝液 (pH6.2) 中50° 4時間で安定であったが90° では数分で失活が認められ，20分で約50%に低下した (Fig. 6)。

4) 蛋白分解酵素による分解：リン酸塩緩衝液 (pH6.2) に塩化リゾチームとピオジアスターゼ 1000 (天野製薬製) を 1 : 2 の配合比に加え、50° で保存した塩化リゾチームの経時変化を測定した結果、両方法による残存率は一致した (Fig. 7)。

以上 HPLC 法及び濁度法により得られた塩化リゾチームの残存率をまとめると Table. 3 に示すとおりで、両方法の相関係数は $r = 0.9919$ と良好な相関が得られ (Fig. 8), HPLC 法は、塩化リゾチームの安定性試験の検討に有効と考えられた。

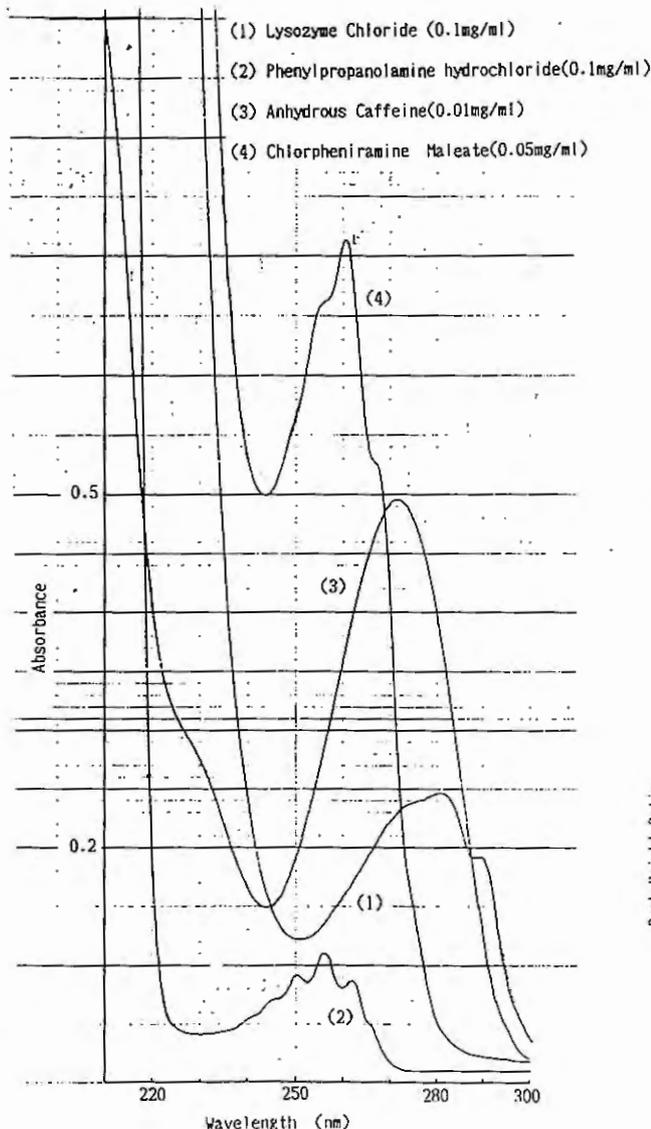


Fig. 1 Absorption Spectrum

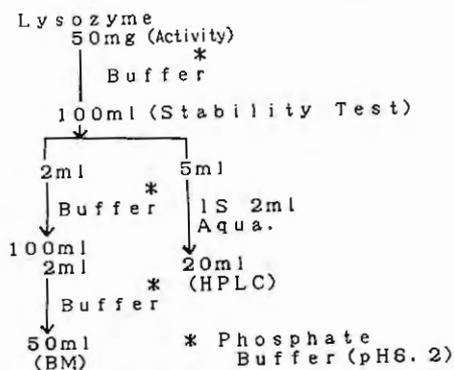


Fig. 4 Analytical Method

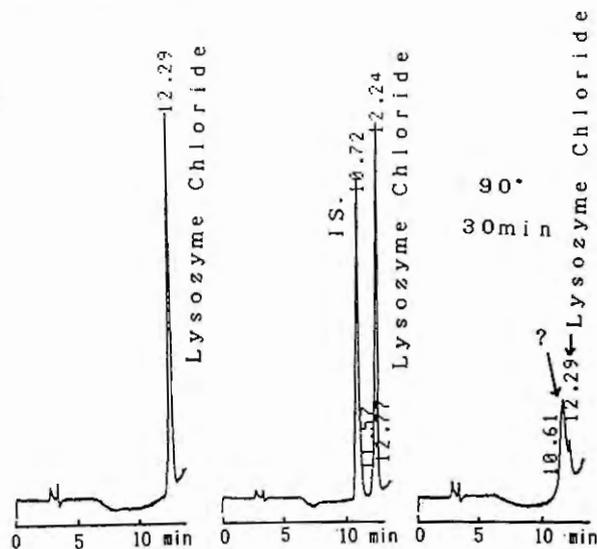


Fig. 2 Chromatogram of Lysozyme

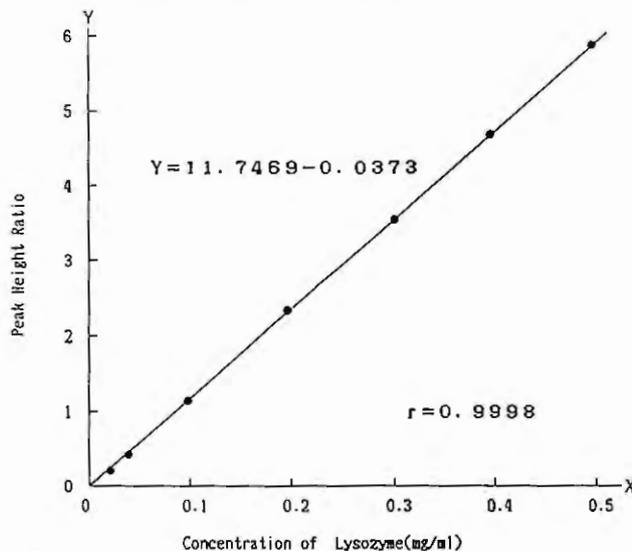


Fig. 3 Calibration Curve of Lysozyme

Table. 2 Stability of Lysozyme(0.5mg/ml) in Various Solvents(50° × 2hr)

Solvent	Result (%)	
	HPLC	BM
Ethanol	102.4	105.3
Methanol	98.5	95.8
Acetonitrile	99.5	98.5
Chloroform	101.5	103.5
0.1%TFA	100.4	105.1

TFA: Trifluoro Acetic Acid

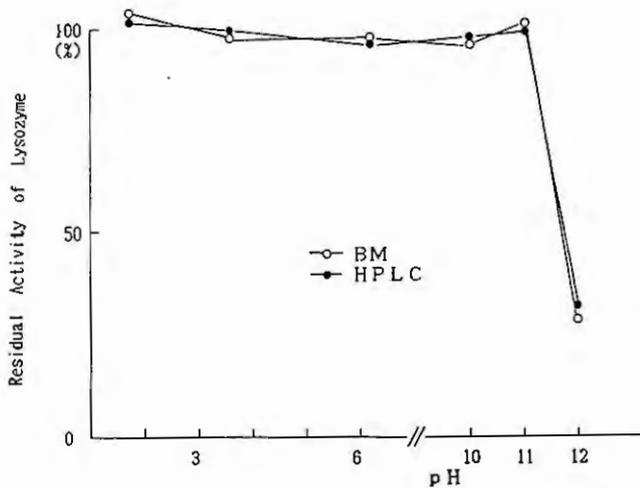


Fig. 5 Stability of Lysozyme(0.5mg/ml) in Phosphate Buffers at Various pH(31° × 24hr)

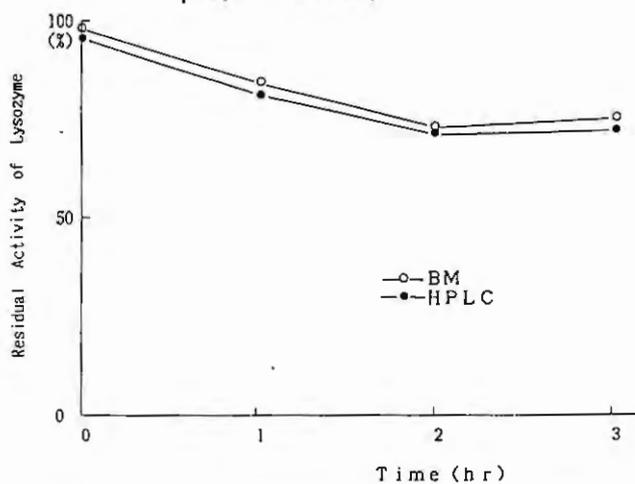


Fig. 7 Stability of Lysozyme(0.5mg/ml) with Protease(1.0mg/ml)(50°)

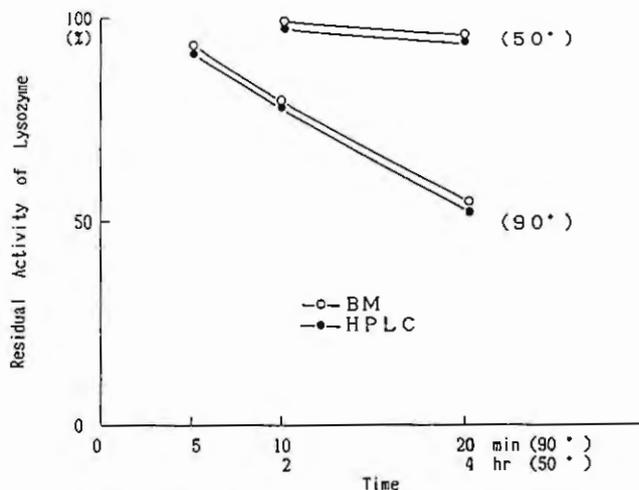


Fig. 6 Stability of Lysozyme(0.5mg/ml) in Phosphate Buffer(pH6.2)

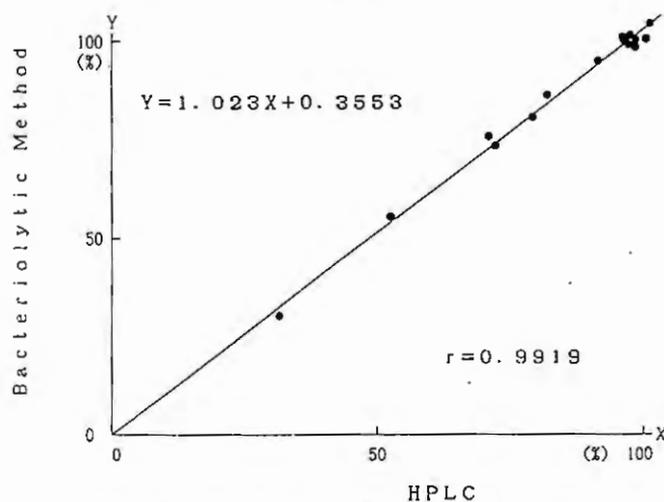


Fig. 8 Relation of Residual Activity between HPLC and Bacteriolytic Method

Table. 3 Comparison of Assay Results with HPLC and BM (%) n=3

Condition	HPLC	BM	
pH	1.8	101.2	104.2
	3.6	99.2	98.3
	6.2	96.5	98.5
	10.0	98.6	96.8
	11.0	97.4	102.1
	12.0	32.3	28.9
50°	2hr	97.5	100.4
	4hr	96.4	96.7
90°	5min	91.0	94.8
	10min	78.6	80.4
	20min	51.7	55.5
	Prot.	0hr	95.6
	1hr	81.3	86.1
	2hr	71.0	73.6
	3hr	69.6	75.8

3. 塩化リゾチームを含有する製剤の多成分同時定量
標準溶液及び試料溶液の調製方法をFig. 9に示す。

1) クロマトグラム及び検量線

吸収曲線 (Fig.1) より塩酸フェニルプロパノールアミンは280nmの吸収が小さいので、測定波長に256nmを選び、Table. 1に示す条件で操作した結果Fig.10に示すとおり各成分とも分離の良好なクロマトグラムが得られ、ピーク高さ法による内標準法により定量を行い検量線を作成するとき、Fig.11に示すとおり、4成分ともに良好な直線性が認められた。

2) 添加回収率

4成分抜き製の製剤に各成分を処方量に対して80~160%含有するように添加した試料についてHPLC法により測定した結果Table. 4に示すとおり良好な回収率が得られた。

3) 測定精度

製剤について定量操作におけるバラツキを検討するため、HPLC法及び濁度法に準じて6回繰り返し定量を行った結果Table. 5に示すとおり、HPLC法による塩化リゾチームの定量値は、濁度法に比べ平均値は一致し標準偏差がより小さい結果が得られた。また、他の成分に関しても、バラツキは小さく精度良く定量することができた。

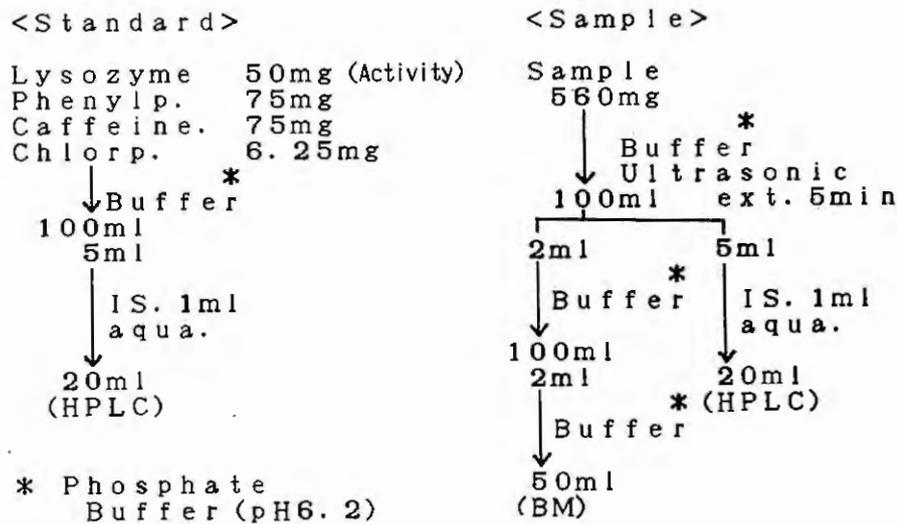


Fig. 9 Analytical Method

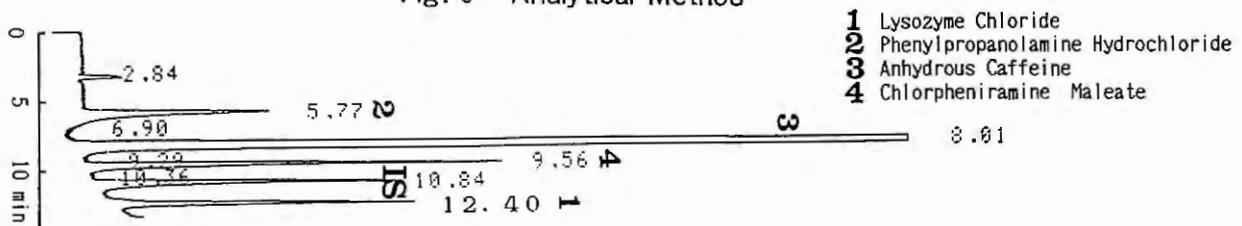


Fig.10 Chromatogram of Sample ; Detector : UV256nm

Added	Result (%)			
	80%	120%	140%	160%
Lysozyme Chloride	101.5	104.0	102.1	99.9
Phenylpropanolamine Hydrochloride	99.8	98.5	99.2	98.7
Anhydrous Caffeine	100.9	100.8	99.6	98.9
Chlorpheniramine Maleate	101.9	100.3	102.8	102.8

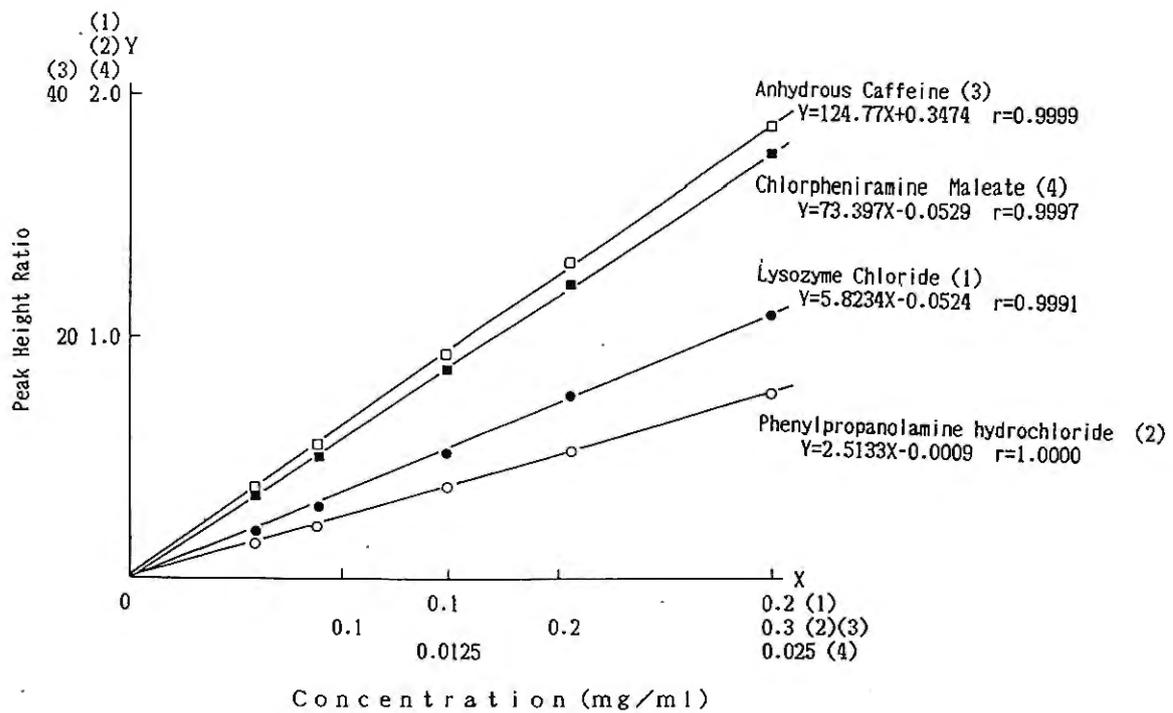


Fig.11 Calibration Curve

Table. 5 Reproducibility

	Result (%)				
	BM	HPLC			
		Lysozyme Chloride	Lysozyme Chloride	Phenylpropanol amine Hydrochloride	Anhydrous Caffeine
1	101.2	101.8	100.7	102.3	101.2
2	102.9	101.1	99.0	99.5	99.3
3	98.3	100.2	99.3	99.8	100.3
4	97.5	99.1	98.7	100.5	99.7
5	102.5	101.4	100.2	100.4	99.6
6	98.3	101.1	101.5	100.3	98.6
X	100.1	100.8	99.9	100.5	99.8
S. D	2.37	0.98	1.09	0.98	0.89

まとめ

塩化リゾチームの定量法について、HPLC法を濁度法と比較検討した結果、溶液中の加速条件による安定性及び塩化リゾチーム含有製剤（鼻炎剤）の定量において両方法に良好な相関性が認められた。更にHPLC法は濁度法と比較して、操作が簡便でかつ精度の高いことが認められた。

今後、更に塩化リゾチームの品質評価、安定性試験及び他の塩化リゾチーム含有製剤への応用など、品質管理及び製剤開発にHPLC法を検討したいと考える。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導くださいました富山県薬事研究所上田雅子氏、並びに有沢みさを氏に感謝致します。また、ご協力頂いたテイカ製薬(株)品質管理部の諸氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査第二課監修 “日本薬局法外医薬品成分規格1986”, 薬業時報社, 東京, 115-116 (1986)
- 2) 有沢みさを, 富山県薬事研究所所報, 昭和58・59合併号 145 (1985)
- 3) 足立 茂 他, 日本薬学会第105年会講演要旨集, 3 Q 3-28, 416 (1985)
- 4) 能田静穂 他, 日本薬学会第106年会講演要旨集, 3 C 1-2, 118 (1986)
- 5) 能田静穂 他, 日本薬学会第107年会講演要旨集, 4 Ai 2-2, 409 (1987)
- 6) 浅川直樹 他, 薬誌, **101**, 148 (1981)
- 7) 上田雅子, 富山県薬事研究所所報, 昭和60・61合併号 35 (1987)

【原 著】

内服液剤中の塩化カルニチンの定量[※]
Determination of Carnitine Chloride in Internalsolution

藤 田 章 夫 山 本 隆 二
Akio FUJITA Ryuji YAMAMOTO

第一薬品工業株式会社 研究開発部^{※※}
Daiichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd.

塩化カルニチンは、消化液中の消化酵素、酸の濃度を増加し、更に胃液の分泌を促進する為、胃腸薬や滋養強壯薬に配合される。また、近年ミトコンドリア内の脂肪酸代謝に関与するカルニチンの働きが注目され、各種の有機酸代謝異常症にカルニチン投与が試みられている。

カルニチンの定量法としては、生物検定法¹⁾、比色定量法²⁾、GC法³⁾、HPLC法⁴⁾、RI法⁵⁾などが報告されている。この他にいくつかの分析例も見受けられるが、内服液剤中の簡易定量法については報告がないので、HPLC法及びGC法について検討し、良好な結果を得たので報告する。

実験の部

標準品の塩化カルニチン ($C_7H_{16}ClNO_3$: 197.66) は金剛化学製、セップパックシリカはウォーターズ社製、その他の試薬は、和光純薬製試薬特級を用いた。塩化カルニチンの一定量を量り、水に溶かして定容とし標準溶液を調製した。市販の内服液剤はそのまま分析に用いた。

HPLC装置は島津製LC-6A型、検出器は紫外分光光度計検出器SPD-2Aを用い210nmを検出波長とした。移動相は、0.01Mリン酸一水素ナトリウム500mlにラウリル硫酸ナトリウム1.5gを溶かした液に、トリエチルアミン3mlを加え、リン酸でpH2.6調製した。分離カラムには、メルク社製Lichrosorb RP-18 (7 μ m, 4 mm i.d. \times 250mm) 及びSuperspher RP-18 (3 μ m, 4 mm i.d. \times 250mm) を用いた。

GC装置は、日立製663-30型を用い、分離カラムは、Chromosorb W60/80 (AW DMCS) にポリエチレングリコール20M及びリン酸をそれぞれ20%及び3%の割合で均一にコーティングしたものを内径3mm、長さ1mのガラスカラムに充てんし用いた。検出は、水素炎イオン化検出器を用いた。

データ処理装置は島津CR-3A及び横川ヒューレット・パカード3390Aを用いた。定量は、ピーク高さを基にした絶対検量線法により行った。

実験結果

1. HPLC法(1)

逆相系カラムを用いて、内服液剤中のカルニチンの定量を検討した。Fig. 1に示す条件で、カルニチンは約7分で検出された。また塩化カルニチン0.5~5 mg/mlの範囲で作成した検量線は原点を通る良好な直線性を示した (Fig. 2)。そこで、ビタミン製剤のモデル処方としてTable. 1に示した成分により成る処方を設定した。この処方1をFig. 1に示した条件で分析したところ、

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

※※ 〒930 富山県富山市奥田町6-10 TEL 0764 (32) 8571

カルニチンは他のビタミンに妨害され検出されなかった (Fig. 3) 溶離液, 分析条件等を何通りか検討したが, 共存成分と完全に分離した良好なクロマトチャートは得られなかった。

そこで, セップパックシリカを用い Fig. 4 に示す前処理を行った。カルニチンは, 0.5~2.5mg/ml の範囲で良好な回収率を示した (Table. 2)。この前処理により, 妨害ピークは完全に除かれ, 良好なクロマトチャートが得られた (Fig. 5)

OPERATING CONDITIONS

Instrument : Shimadzu LC-6A liquid chromatograph

Column : LiChrosorb RP-18 (7 μ m), 250 \times 4mm

Mobile Phase : 0.01M Na₂HPO₄+0.3%SDS+0.6%Triethylamine (pH 2.6 with H₃PO₄)

Column Temperature : 50°

Flow Rate : 1 ml/min

Detector : UV Photometer at 210 nm



Fig. 1 Chromatogram of Carnitine Chloride.

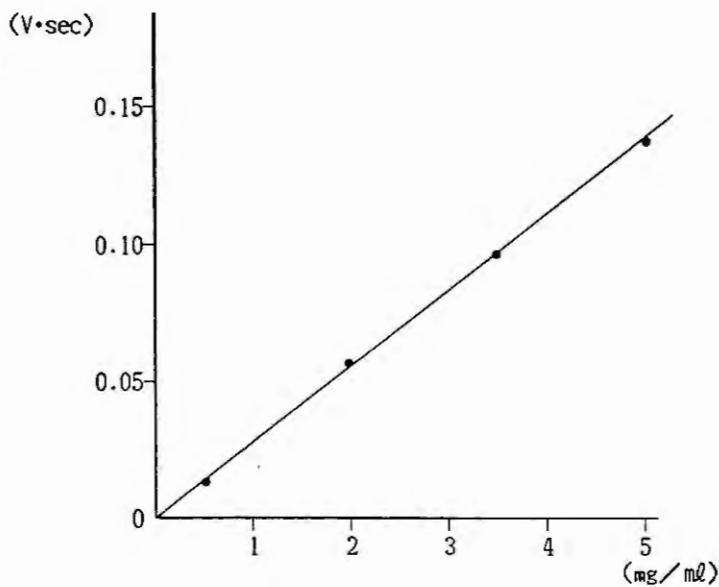


Fig. 2 Calibration curve of carnitine chloride.

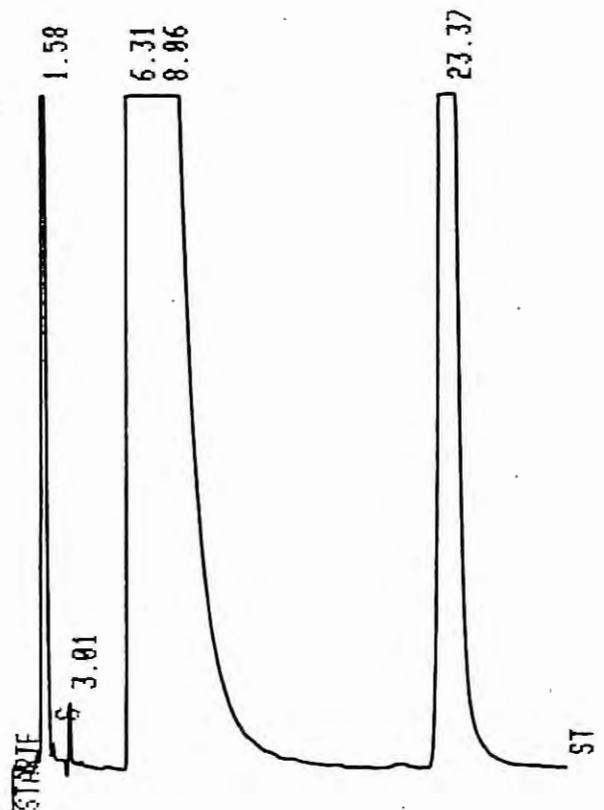


Fig. 3 Chromatogram of Rp.1.

Table. 1

Rp. 1

Thiamine nitrate	10 mg
Riboflavin sodium phosphate	6 mg
Pyridoxine hydrochloride	10 mg
Nicotinamide	20 mg
Inositol	100 mg
Taurine	500 mg
Caffeine	50 mg
Carnitine chloride	50 mg
Purified water	
sufficient to produce	30ml

Table. 2 Recovery of Carnitine chloride.

added (mg/ml)	Recovery (%)
0.5	98.7
1.0	98.0
1.5	98.3
2.0	98.1
2.5	97.6

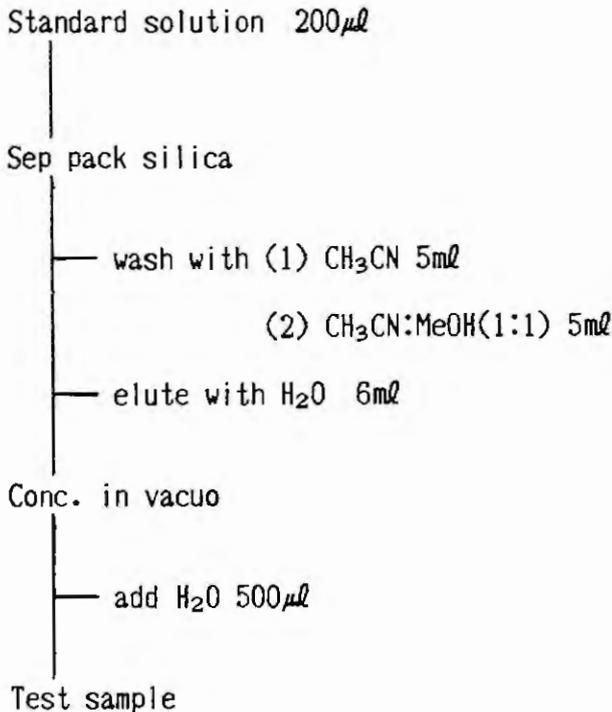


Fig. 4 Pretreatment Method.

2. HPLC法(2)

次に、前処理なしで処方1中のカルニチンを定量する方法を検討した。カラムは、平均粒子径が3 μ mの超微粒子球状充填剤で10万以上の高い理論段数が得られ、高い分解能が期待できるSuperspher R P-18を用い、カラム温度40 $^{\circ}$ 、流速0.8ml/minで測定した。

Fig. 6に示すように、カルニチン0.5~5 mg/mlの範囲で作成した検量線は良好な直線性を示した。この件で処方1を分析したところ、

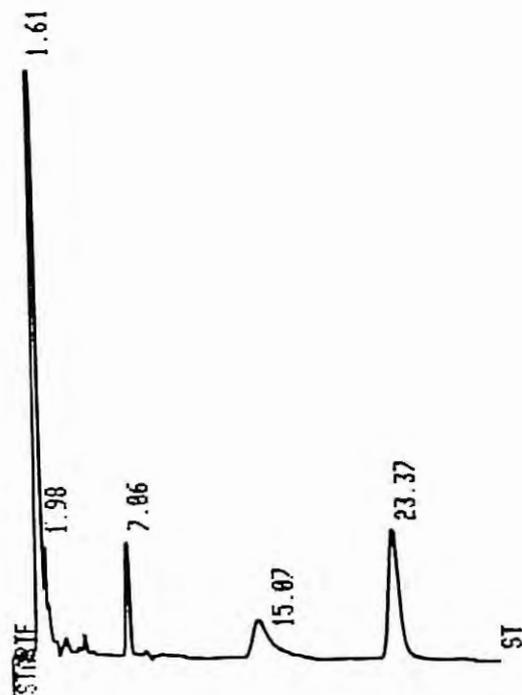


Fig.5 Chromatogram of Rp.1 after pretreatment.

Fig. 7 に示すように、約 9 分でカルニチンが妨害ピークより完全に離されて検出した。

OPERATING CONDITIONS

Column : Superspher RP-18 (3 μ m), 250 \times ϕ 4mm

Mobile Phase : 0.01M Na₂HPO₄+0.3%SDS+0.6%Triethylamine (pH 2.6 with H₃PO₄)

Column Temperature : 40°

Flow Rate : 0.8 ml/min

Detector : UV Photometer at 210 nm

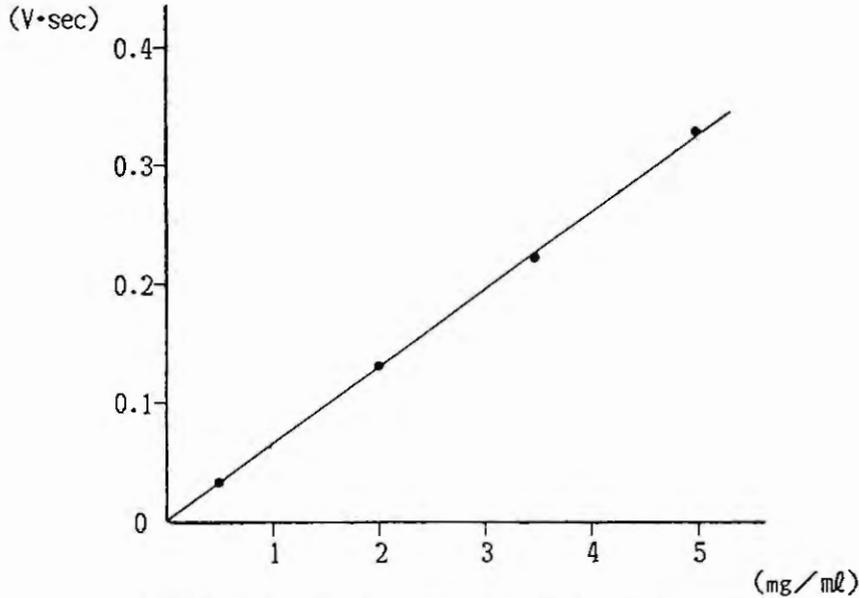


Fig. 6 Calibration curve of Carnitine chloride.

そこで、この条件下、市販滋養強壯内服液、胃腸薬内服液中のカルニチンの定量を行ってみた。A社製剤は、ビタミン類のみの製剤、B社製剤はビタミン類に生薬エキスが配合されたものだが、共に良好な分析チャートが得られた (Fig. 8)。同様にC社の滋養強壯製剤、またD社の生薬が主成分の胃腸薬製剤においても良好な分析チャートが得られた (Fig. 9)。

ところが、Table. 3 に示すように塩化カルニチンと生薬成分として、蒼朮、トウヒ、センタリウム草、黄連、延胡索、人參、ホップで構成された胃腸薬製剤では、共存成分との分離が困難であり、良好な分析結果が得られなかった (Fig. 10)。また、セップパックシリカによる前処理を行ってみたが、妨害成分を完全に除去することは難しく思われた。

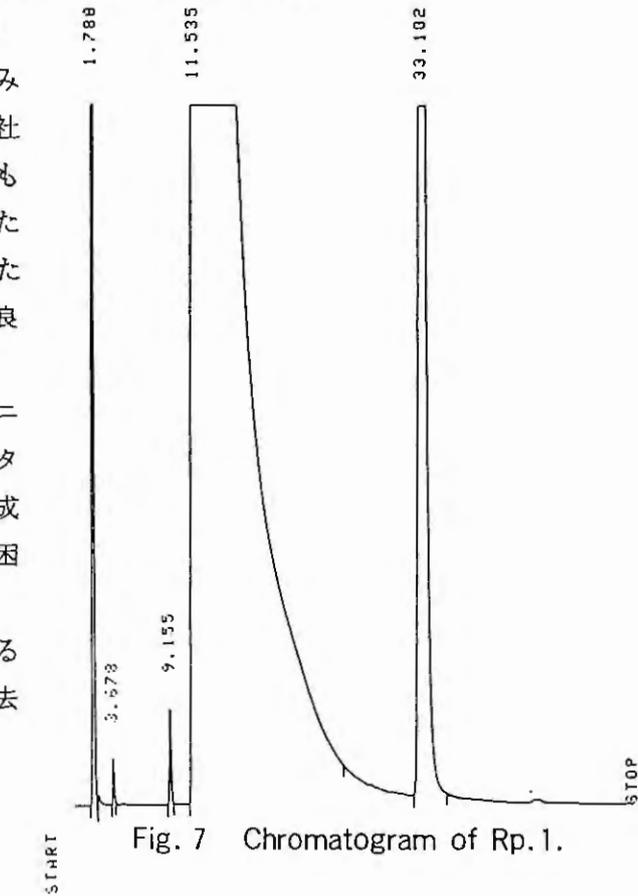
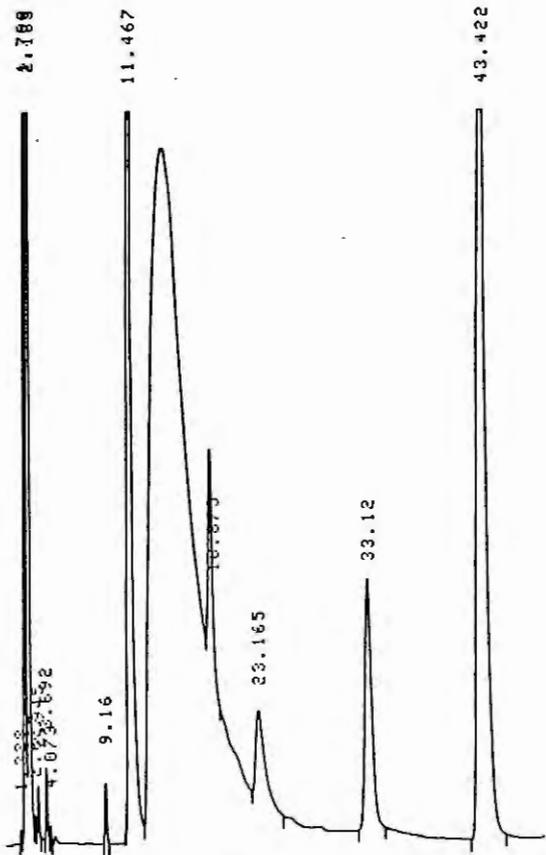
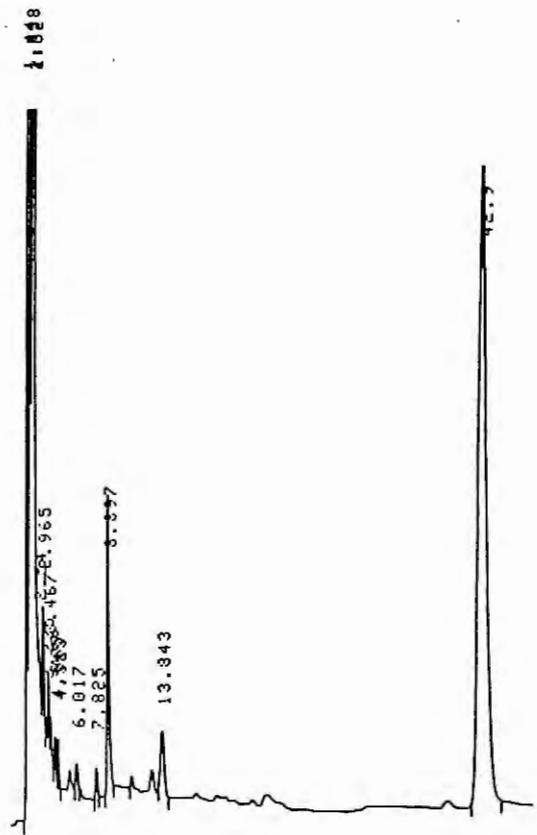


Fig. 7 Chromatogram of Rp. 1.

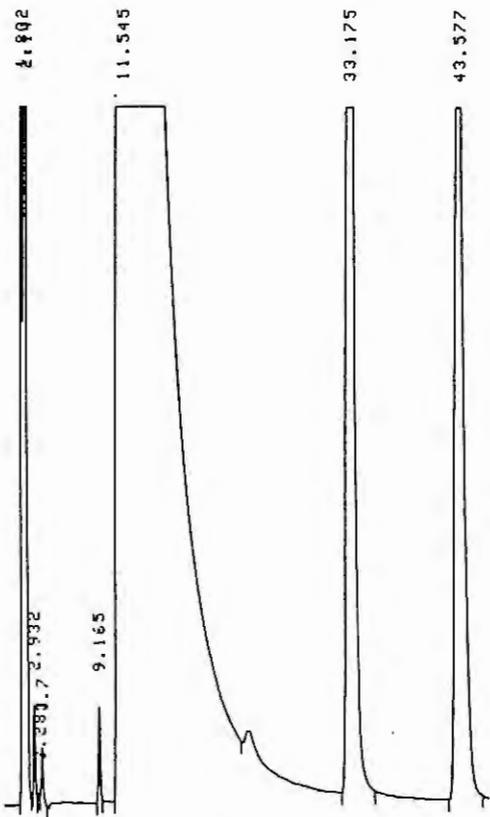


C社

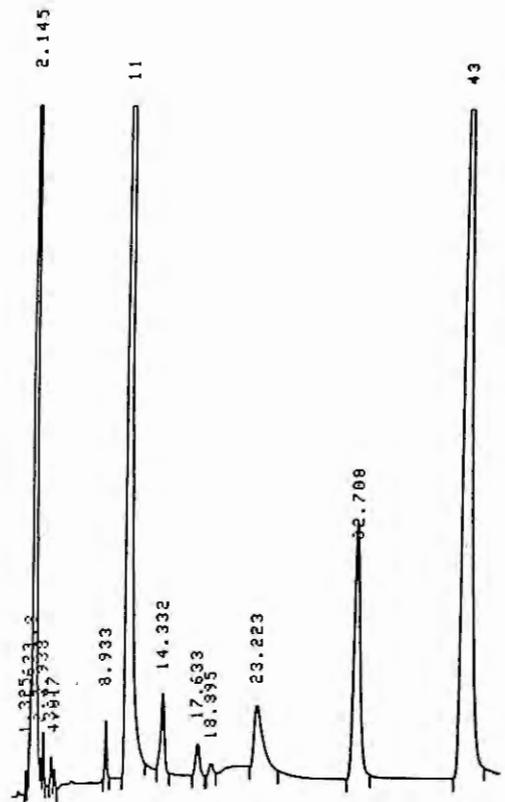


D社

Fig. 8 Chromatogram of pharmaceuticals



A社



B社

Fig. 9 Chromatogram of pharmaceuticals

Table. 3

Rp. 2

1 bottle (30ml) contains:

Atractyl. Lanc. Rhiz. (fl)	400 ml
Aurant. Peric. (tc)	30 ml
Centaur. Herb. (ex)	200 mg
Copt. Rhiz. (fl)	150 ml
Corydal. Tub. (ex)	400 mg
Gins. Rad. (ex)	350 mg
Humu. Stro. (ex)	400 mg
Carnitin chloride	60 mg

3. GC法

処方2について、LEWINらのGC法³⁾に準じて定量を検討した。試料200 μ lを正確に量り、セップバックシリカによる前処理後、減圧乾固し、水酸化ナトリウム溶液に溶かし、水素化ほう素ナトリウムを加え160°で30分間反応させた。これを、室温にもどしてから、過剰の水素化ほう素ナトリウムを5.5 M塩酸にて分解後、クロロホルムにて抽出し分析に用いた。この操作により、カルニチンは4-butylolactoneとして検出される事が報告されている (Fig.11)。

カラムは、ChromosordWにポリエチレングリコール20%、リン酸3%を添加したものをを用い、Fig. 12に示す条件で分析したところ約5.5分にカルニチン由来のピークが定量的に検出された。

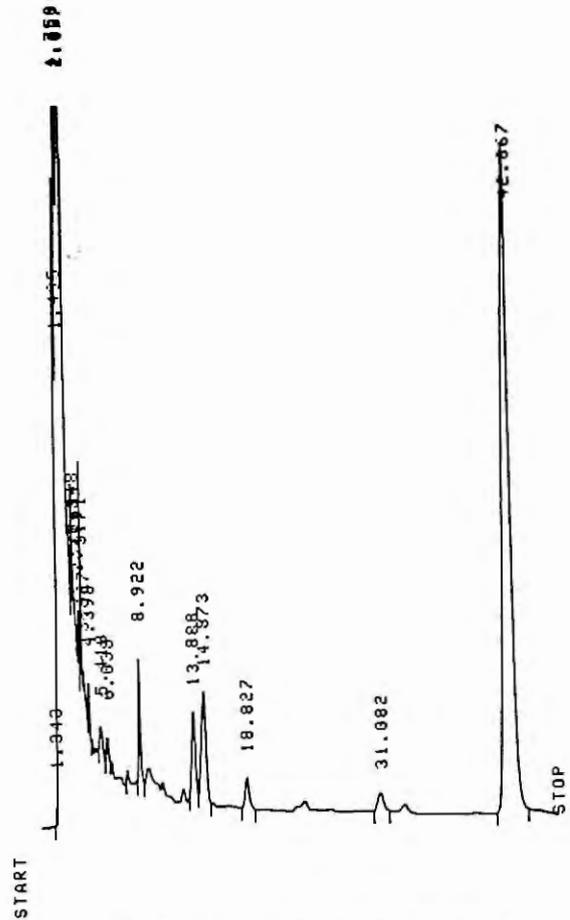


Fig.10 Chromatogram of Rp.2

Standard solution 200 μ l

Sep pack silica

wash with (1) CH_3CN 5ml

(2) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}(1:1)$ 5ml

elute with H_2O 6ml

Conc. in vacuo

add 0.5M NaOH 0.5ml + NaBH_4 4mg

heat at 160 $^\circ$ for 30min

add 5.5M HCl 0.5ml

extract. with CHCl_3 0.5ml

Test sample

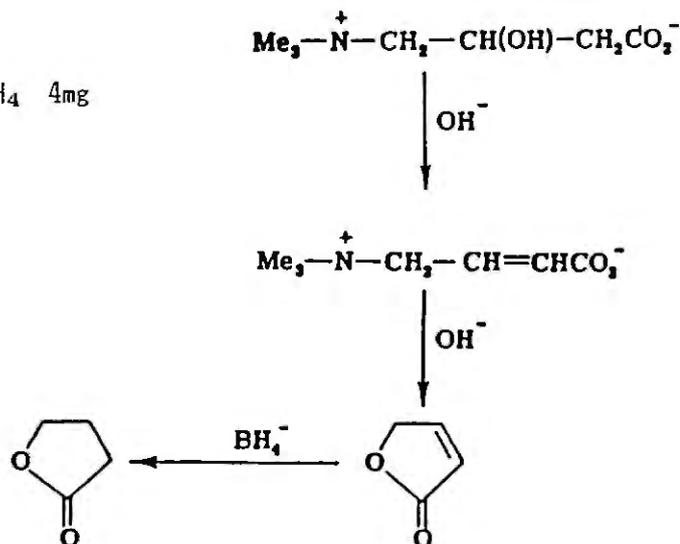


Fig.11 Pretreatment for GC.

OPERATING CONDITIONS

Column : Chromosorb W 60/80 (AW DMCS)+20%PEG+3% H_3PO_4 (3mm I.D. \times 1m)

Carrier : N_2

Flow Rate : 25 ml/min

Detection : FID

Column Temperature : 150 $^\circ$

Injection Temperature : 170 $^\circ$

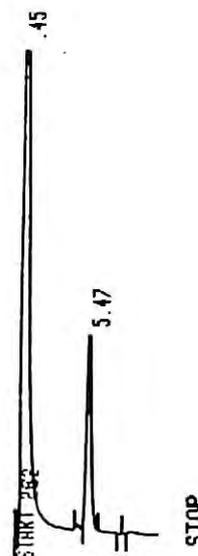


Fig.12 Gas Chromatogram of Rp.2.

考 察

処方に応じて、HPLC法、GC法を使いわけることにより、内服液剤の塩化カルニチンを比較的短時間に精度よく定量する条件を確立することができた。また市販製剤中のカルニチンの定量値は処方量とはほぼ一致が認められた。処方中に多量の糖類や生薬エキスなどを含み、かつ塩化カルニチンの含有量が少ない場合には、本法で採用したセップパックシリカによる前処理法が有用であると考えられる。

文 献

- 1) G.Fraenkel, *Arch.Biochem.Biophys.*, **50**, 486 (1954)
- 2) M.A.Mehlman, *Arch.Biochem.Biophys.*, **98**, 146 (1962)
- 3) L.M.Lewin, A.Peshin and B.Sklarz: A Gas Chromatographic Assay for Carnitine, *Anal.Biochem.*, **68**, 531 (1975)
- 4) P.Minkler, S.T.Ingalls, L.S.Kormos, D.E.Weir and C.L.Hoppel: Determination of Carnitine, Butyrobetaine and Betaine as 4'-Bromophenacyl Ester Derivatives by HPLC, *J.Chromatogr.*, **336**, 271 (1984)
- 5) A.Daveluy, R.Parvin and S.V.Pande, *Anal.Biochem.*, **119**, 286 (1982)

【原 著】

ジメチルポリシロキサン定量法の検討[※]

The Quantitative Analysis of Dimethylpolysiloxane by mean of A Gaschromatography

前 古 豊 能 登 満 田 中 良 一
Yutaka ZENKO Mitsuru NOTO Ryoichi TANAKA

東亜薬品株式会社 試験開発部^{※※}

Research Laboratories, Toa Medicine Co., Ltd.

要 旨

ジメチルポリシロキサン(DMPS, シリコン)を消泡剤として医薬品に応用するにあたり, その定量法が問題となり, これをガスクロマトグラム(GC)法で検討した結果, 従来のDiasolid ZF(ϕ 2.6mm \times 2m)のカラムをSE-30(15%, ϕ 2.6mm \times 2m)のカラムに変えることで, 分離の良いクロマトグラムが得られ, 定量の精度の高い分析結果が得られた。

この方法の優れている点は, 得られたクロマトグラムの分離が良くピークが高く鋭いこと, また胃腸薬に処方した場合, 他成分に強く吸着されていて, 他の抽出を要する分析方法において分析できなくとも, 高温での分解反応による定量方法であるため, ほぼ100%定量することができる。

序 論

DMPSが消泡剤として医薬品に応用されているもののなかに胃腸薬, 整腸剤, 消泡シロップ剤などがあるが, その効能, 効果は, 胃内視鏡検査時の胃内有泡性粘液の除去, 胃腸管内のガスに起因する腹部症状の改善, 腹部X線検査時における腸内ガスの駆除などである。

DMPSの定量法には大別して, 重量法, IR法, 原子吸光法, GC法, NMR法及び, 分光光度法がある¹⁾が, いずれもその定量の精度は良いとは言えず, セミマイクロあるいは, ミクロの分析技術が必要とする。

DMPSを応用した製剤の開発を行う上で精度の高い定量法の開発が必要となる。

今回, DMPSの定量分析をGC法で検討したところ, 良好な分析結果が得られたのでその条件及び操作について報告する。

実験方法

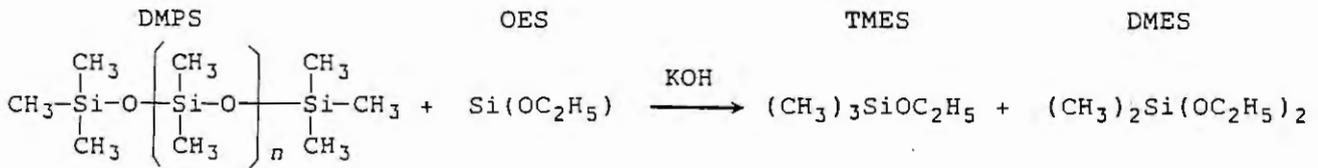
方法は1986年の金子²⁾らの方法に従い検討した。この方法は1972年のVoronkov^{3,4)}らの報告をもとにしており, Fig. 1に示すように, DMPSとオルト珪酸エチル(OES)をアルカリ存在下で反応させ, 生成したトリメチルエトキシシラン(TMES)及び, ジメチルジエトキシシラン(DMES)のうち, DMESをガスクロマトグラフィーによって測定する方法である。

この反応により, 10mgのDMPS(100cs)から理論上19.33mgのDMESが生成する。

※ 第7回家庭薬開発研究シンポジウム発表会 (富山, 1987年11月4日)

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

Fig. 1



(反応操作)

DMPS (信越化学製, KF-96, 100cs) 約10mgを精秤し, OESを8 mlとKOHを0.4 gを加え, 還流冷却器で170°付近で約30分間反応させた。冷却後, 190°以上で蒸留を行い, その留液約7 mlにOESを加えて10mlに調製したものを試料溶液とした。これをガスクロマトグラフに注入し, ピーク高さを絶対検量線法により定量した (Fig.2)。

1. カラムの選定

OES (和光純薬工業製) にDMES (関東化学製) を添加した試料溶液を, 金子¹⁾らの報告しているDiasolid ZFの他に, SE-30(15%), PEG-20M(10%)及び, XE-60(3%)の各々φ2.6m×2 mのものを作製し検討に用いた。

2. 試薬の検討

市販のDESには不純物が含まれており, GC分析に影響を及ぼす可能性があるため, 和光純薬工業製とメルク製のOESの比較検討を, DMES (関東化学製) を添加したものと添加しないものを試薬溶液として検討した。

3. 分析装置及び分析操作による精度の検討

カラム及び, 分析装置に依存した定量の精度を, OES (和光純薬工業製) にDMES (関東化学製) を種々の濃度に溶解して検量線および, 定量値のバラツキにより求めた。

4. 試料量及び, 反応条件による定量の精度の検討

反応時の試料の量及び反応操作に依存した定量の精度を, DMPSの添加量を変えて反応を行い, 検量線及びバラツキにより求めた。また, 同時に反応温度及び, 蒸留温度などの反応操作条件による, 定量値のバラツキ及び生成率を求めた。

なお, これら以外の反応条件は文献²⁾を参考にした。

5. 添加回収実験

胃腸薬にDMPSを配合した場合, 胃腸薬構成成分が定量に影響を及ぼすかどうかについて, 添加回収実験により検討した。

胃腸薬としては, Table. 1に示す胃腸薬を用い, DMPSを次の3つの条件で添加した。

添加方法の1は反応溶媒に10mgのDMPSを溶解し, 胃腸薬を加え反応させたもの, 2はあらかじめ200gの胃腸薬に4gのDMPSをそのまま加え, DMPSとして10mg相当量を反応させたもの, 3は200gの胃腸薬に4gのDMPSを溶媒で溶解し, 添加後, 乾燥したのち, DMPSとして10mg相当量を反応させたもので行った。

Fig. 2

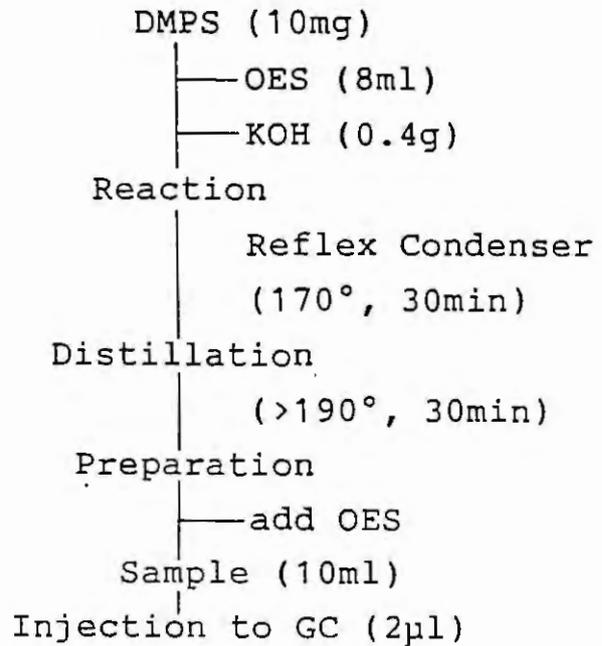


Table. 1 胃腸薬 (3600mg中) の配合量

メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	1200mg	ケイヒ末	300mg
重質炭酸マグネシウム	300mg	センブリ末	5mg
沈降炭酸カルシウム	750mg	シユクシャ末	100mg
ロートエキス3倍散	90mg	カンゾウ末	150mg
タカジアスターゼT	150mg	チョウジ末	30mg
ウイキョウ末	30mg		

結 果

1. カラムの選定

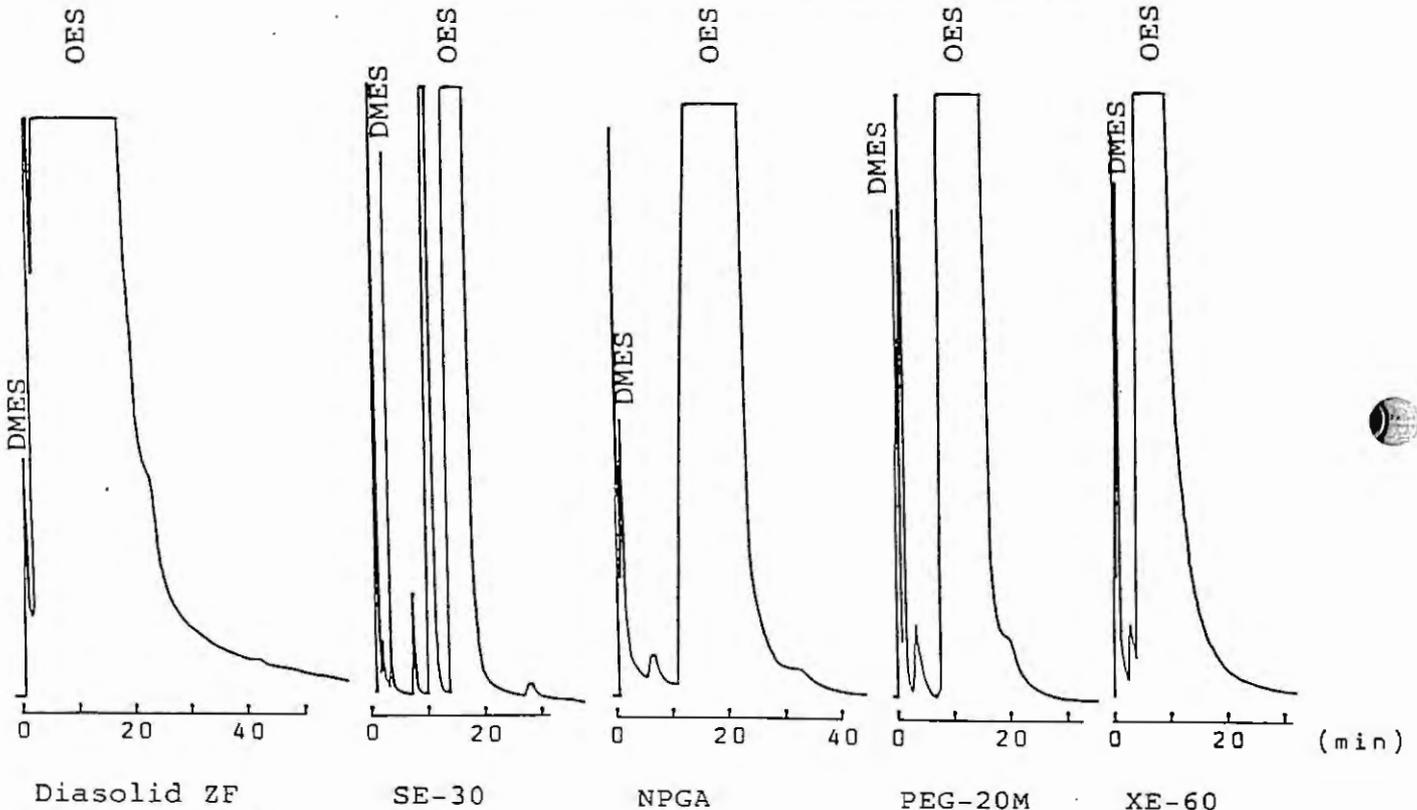
Diasolid ZF(φ2.6mm×2m)を用い、種々の条件で検討したところ、クロマトグラム上のDMPSのピーク分離が不十分であり、金子らの報告²⁾と一致しなかった。

そこで、別に、4種類の充填剤でカラムを作成し、これを用いて分析を行ったところ、これら4種類のカラムの内、SE-30(15%)においてDMESとOESに含有される不純物のピーク分離の最も良いクロマトグラムが得られた (Fig.3)。

更に、SE-30とDiasolid ZFのカラムと比較すると、SE-30はDiasolid ZFより分離が良く、同じ分析感度で高く鋭いピークが得られた。

このことから、以後の検討にはSE-30を用い、Table. 2の条件で分析を行った。

Fig.3 種々のカラムにおけるDMESとOESのクロマトグラム



2. 試薬の検討

Fig. 3のクロマトグラム上でDMESおよび、OES以外の不純物ピークが認められるので、これらの不純物が少ないものか、または不純物が定量に影響を与えないものを、メルク製および、和光純薬工業製のOESで調べた

その結果、メルク製のOESには、不純物は少ないがクロマトグラム上のDMESのリテンションタ

イム付近に定量を妨害する不純物が認められた。

しかし、和光純薬工業製のOESには、不純物が多いものの、DMESのリテンションタイム付近に定量を妨害する不純物は認められなかった (Fig.4)。

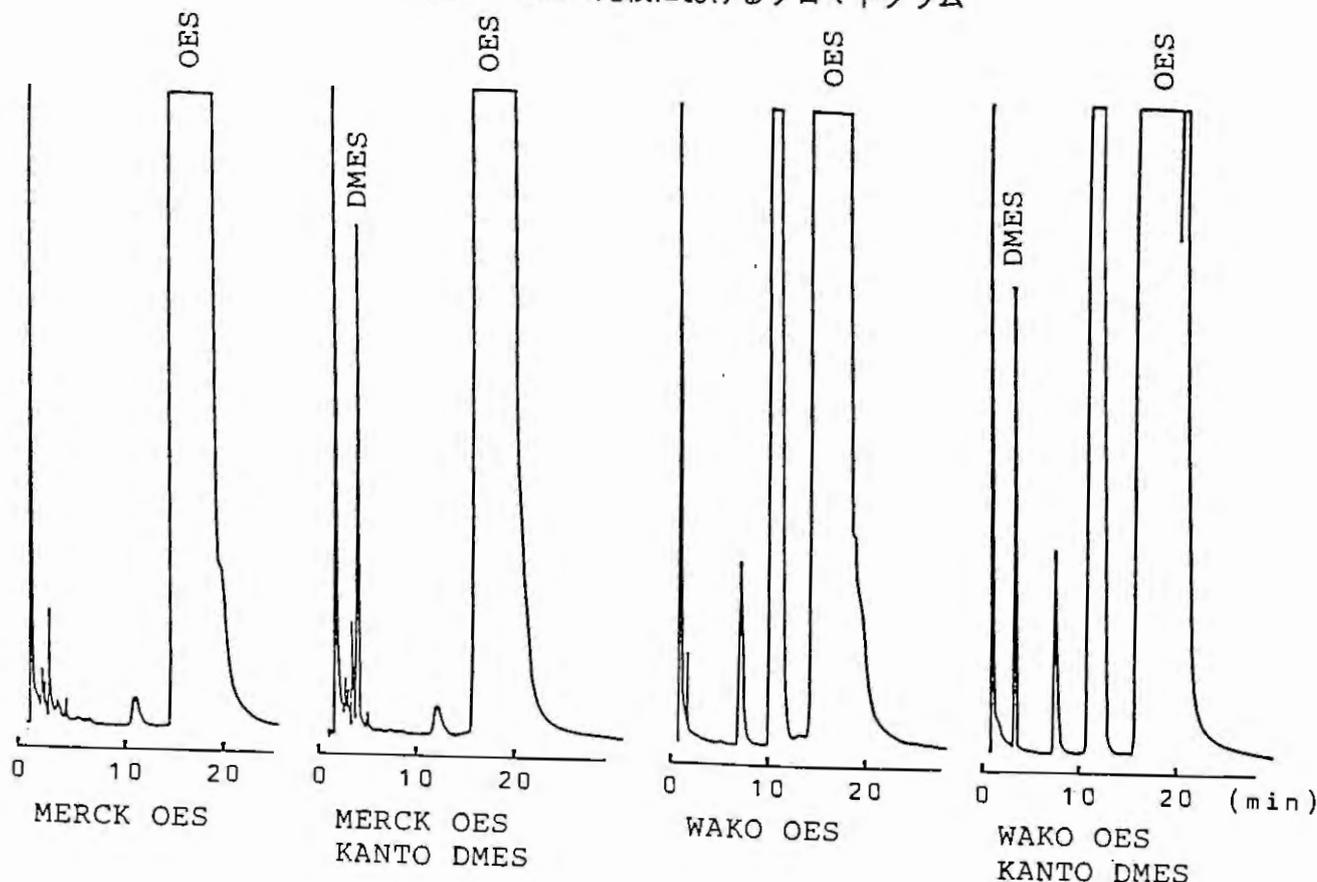
このことから、以後の検討には和光純薬工業製のOESを使用することにした。

Table. 2 分析条件

Condition of Gas Chromatograph

GC :	Simazu GC-8A
Detector :	FID
Column :	Silicon SE-30 15% φ2.6mmX2m (GASUKURO KOGYO)
Carrier Gas :	N ₂
Pressure of Carrier Gas :	2.0 kg/cm ²
Pressure of Hydrogen :	1.0 kg/cm ²
Pressure of Air :	0.5 kg/cm ²
Oven Temp. :	100°C
Column Temp. :	70°C
Attenuation :	32 × 10 ²
Injection Volume :	2μl

Fig. 4 OESの比較におけるクロマトグラム



3. 分析操作による定量の精度の検討

今回用いたカラム及び、分析装置による定量的精度をDMESの検量線を求めることにより検討した結果、10~50mgのDMESの濃度範囲でFig. 5で示すように、直線性の良い検量線が得られた。また、バラツキもC.V.値で1%以内と定量の精度も良く (Table.3)、カラム及び分析装置は本条件においてDMESの定量に十分満足する精度であることが確認された。

Fig. 5 DMESの検量線

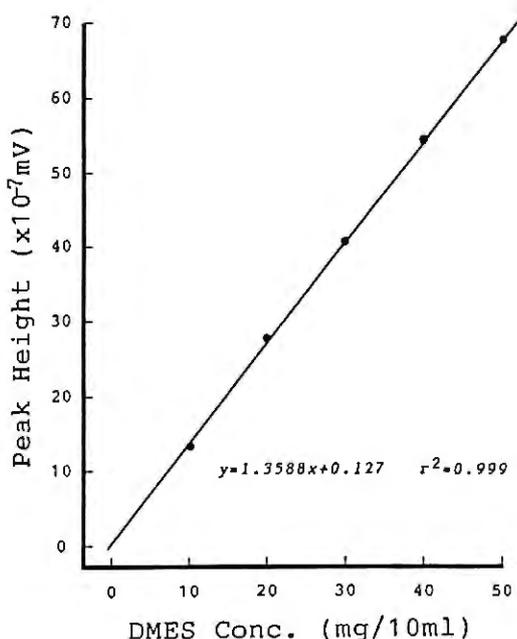


Table.3 DMESの定量値とバラツキ

DMES Conc. (mg/10ml)	Peak height (x10 ⁻⁷ mV)	Average (x10 ⁻⁷ mV)	C.V. (%)
10	13.728	13.628	0.967
	13.444		
	13.514		
	13.656		
	13.799		
20	27.598	27.283	0.676
	27.384		
	27.100		
	27.170		
	27.163		
30	40.614	40.855	0.675
	41.183		
	41.111		
	40.471		
	40.898		
40	54.910	54.967	0.620
	54.413		
	55.480		
	55.053		
	54.981		
50	68.140	67.728	0.545
	68.069		
	67.145		
	67.500		
	67.784		

4. 試料量及び反応条件による定量の精度の検討

反応時の試料の量及び反応操作に依存した検査線は1~20mgのDMPSの濃度範囲で、直線性の良い検量線が得られた (Fig.6)。さらに、定量値のバラツキにおいてもC.V.値で1%以内と定量の精度も良く (Table.4)、試料の量及び反応操作に依存した定量精度は分析した条件において、DMESの定量に十分満足する精度であることが確認された。

また、同時に反応温度を160~220°、蒸留温度を190~300°の範囲で行い、操作中の温度依存性についても検討したが、行った温度範囲では反応温度及び蒸留温度に影響されなかった。

Fig. 6 DMPSの検量線

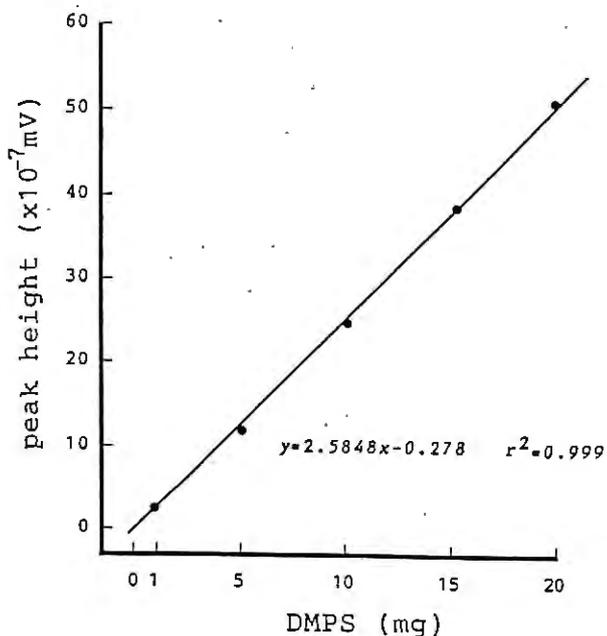


Table. 4 DMPSの定量値とバラツキ

DMPS (mg)	peak height (x10 ⁻⁷ mV)	average (x10 ⁻⁷ mV)	C. V. (%)
1	2.516	2.4976	0.763
	2.466		
	2.516		
	2.503		
	2.487		
5	11.896	11.8833	0.408
	11.796		
	11.945		
	11.895		
	11.887		
10	26.309	26.1704	0.669
	25.864		
	26.358		
	26.112		
	26.209		
15	39.043	38.8554	0.848
	39.339		
	38.401		
	38.599		
	38.895		
20	50.791	51.0276	0.634
	50.544		
	51.284		
	51.432		
	51.087		

Tadle. 5 添加方法の違いによる回収率とバラツキ

Recovery of DMPS from stomachic powder (%)

Sample No.	1	2	3
1	99.2	90.2	98.8
2	100.5	100.1	101.1
3	98.8	87.5	100.4
4	100.3	92.0	100.2
5	100.8	106.5	99.5
6	99.2	94.1	98.7
7	99.7	109.3	100.8
average	99.79	97.1	99.9
C.V.	0.71	8.00	0.88

5. 添加回収実験

DMPSを胃腸薬に処方した場合、抽出による定量法の場合、制酸剤やその他の成分に吸着され、抽出時に100%抽出されない場合が多い。そこで、本定量法においても他成分がDMPS定量に影響を及ぼすかどうかを添加回収実験により検討した。

その結果、Table. 5 で示したように、添加方法1及び3においてほぼ100%の回収率で、バラツキにおいてもC.V.値1%以内の値を示し他の成分に影響されないことが確認された。しかし、添加方法2においては回収率が一定せず、バラツキも著しく大きく、定量的でないことが確認された。

考察とまとめ

金子ら²⁾はGC法でのDMPSの定量分析に、Diasolid ZF(ϕ 3.0mm×2 m) カラムを用いている。これは反応により生成したDMESの沸点が70° 付近であるため低温で分離の良いカラムを選択したと思われるが、それでもDMESのピークがOESの不純物ピークと重なりやすく、定量の精度に問題があった。

今回、採用したSE-30のカラムは従来のDiasolid ZFよりもクロマトグラム上の各ピークが高く鋭いことや分離が良好であることに優れている (Fig.3)。

試薬のOESについては和光純薬工業製の方がメルク製に比べ、クロマトグラム上に数種の不純物による大きいピークが確認されたが、DMESのリテンションタイム付近にこれらのピークが確認されず、今回の定量分析に適していた。

今回用いたカラム及び分析装置による定量の精度をDMESの検量線を求めることにより検討し、カラム及び装置に関してはDMESの定量に十分に適しているという結果が得られた。また、反応時の試料の量及び反応操作に依存した定量の精度もDMPSの検量線に示されるように、分析した条件においてDMESの定量に十分満足できる精度であるという結果が得られた。

DMESの検量線でのバラツキは、おもにGCへの試料注入の際の注入量に依存しているのではないかと考えられる。これは、OESの不純物を内部標準と考え、内部標準法で解析した場合、定量値のバラツキが少なくなることから、DMESの検量線でのバラツキの原因は試料の注入量、注入スピードなどによるものと推測される。更に、DMPSの検量線でのバラツキがDMESの検量線でのバラツキとほぼ等しいことから、DMPSの検量線でのバラツキに関しても反応操作によるものではなく、分析操作の注入量や注入スピードのよるものと推測される。よって、バラツキを少なくするため注入量や注入

スピードをできるだけ一定に保つことに注意しなければならない。しかしこれには精度に限界がある。そこで、OESの不純物を内部標準と考え、内部標準法で解析しようとして検討したが、反応操作により不純ピークが低くなったので、この方法では定量できなかった。今後、内部標準法が可能になれば、さらに精度が良くなると思われる。

更に、DMES及びDMPSの両検量線 (Fig.5, Fig.6)により、10mgのDMPSから約19.3mgのDMESが生成されることが判り、この生成量はほぼ理論値と等しく、今回の反応条件においてはほぼ100%の反応が起こっていると推測される。

また、反応温度及び、蒸留温度については、行った温度範囲で温度依存性が認められなかったので、今回の温度条件の範囲であれば反応はほぼ100%起こると思われる。

添加回収実験において、胃腸薬構成成分による定量値への影響はないと結論した。しかし、DMPSを胃腸薬に直接練り合わせる添加方法2ではバラツキが大きく、また回収率も悪かった。この理由として、溶媒に溶解してDMPSを胃腸薬に添加した添加方法3において回収率がほぼ100%であったことから他成分への吸着による抽出不足とは考えられず、試料調製時に直接添加するため、一部の制酸剤などの胃腸薬構成成分に、DMPSが大量に吸着し試料の胃腸薬中でのDMPSの分布に偏りが生じ、バラツキとして表れたのではないかと予想される。

参考文献

1. 信越化学工業株式会社資料, 微量シリコーンの分析方法
2. 金子彰治, 対島勇禧, 吉田豊, 栢野正則: 分析化学, **35**, 189-192 (1986).
3. M.G.Voronkov: *J.Gen.Chem.USSR*, **29**, 890 (1959).
4. M.G.Voronkov, Z.I.Shabareva: *J.Gen.Chem.USSR*, **29**, 1501 (1959).

【原著】

植物タンニンの抗腫瘍活性について^{*}
Antitumor Activities of Tannins(Ellagitannin)in Mice

元山 貢 磯野 良子^{a)} 森 いずみ
Mitsugu MOTOYAMA Yoshiko ISONO Izumi MORI

松井 英一 横井 秀輔
Eiichi MATSUI Hideharu YOKOI

リードケミカル株式会社 研究開発部^{**}
Research Laboratory, Lead Chemical Co., Ltd.

宮本 謙一 越浦 良三
Kenichi MIYAMOTO Ryozo KOSHIURA

北陸大学 薬学部^{***}
School of Pharmacy, Hokuriku University

^{a)}(現リード株式会社)

タンニンとは植物中に含まれるポリフェノールで、加水分解型タンニンと縮合型タンニンに大別される。Ellagitanninはこのうち加水分解型タンニンに属し、その構造により単量体、二量体および三量体に分類される。宮本ら¹⁾はキンミズヒキ(*Agrimonia pilosa Ledeb*)根からEllagitanninの二量体構造を有するAgrimoniinを単離し、実験腫瘍を用いて抗腫瘍活性およびその宿主介在性の抗腫瘍機序について報告した。

著者らは更に二量体Ellagitanninに属するOenothlein BとCoriariin Aについて抽出・分離し、その抗腫瘍活性について検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 被験材料および対照物質

Oenothlein Bはオオマツヨイグサ(*Oenothera erythrosepala Borbas*)の葉から、Coriariin Aはドクウツギ(*Coriaria Japonica A, Grey*)の葉から下記の方法でそれぞれ抽出・分離したものを使用した。対照物質として、ピシパニール(OK-432, 中外製薬), E.Coli LPS(和光純薬)を用いた。

Ellagitanninの抽出・分離

原料植物を70%アセトンでホモジナイズし、その濃縮液をクロロホルムで抽出、可溶性分画を除去した後、水層を酢酸エチルで抽出、濃縮したものをダイアイオンHP-20(20%メタノール, 三菱化成)さらにトヨパールHW-40(70%エタノール, 東ソー)を充填剤とするカラムクロマトグラフィーにより、それぞれを単離精製した。また、TLCおよびHPLCにより標準品と比

* 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

** 〒930 富山市日俣77-3 TEL 0764 (25) 1978

*** 〒920-11 石川県金沢市金川町ホ3 TEL 0762 (29) 1161

較同定した。Oenothain BおよびCoriariin Aの分子構造をFig.に示す。

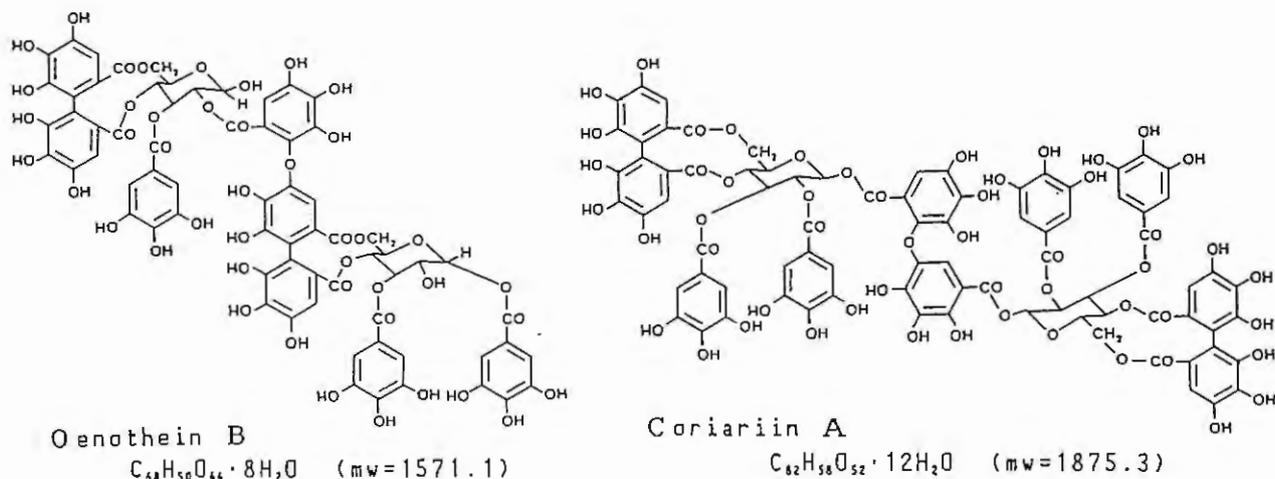


Fig.

2) 使用動物

生後5～6週令の雌性C3H/He系マウスおよび雌性BALB/c系マウス（静岡実験動物）を室温 $22 \pm 1^\circ$ ，湿度 $55 \pm 5\%$ の飼育室でマウス用固形飼料（MM3，船橋農場）と水を自由に与えて1週間予備飼育した後実験に供した。

3) 腫瘍細胞

マウス乳癌由来MM2細胞およびマウス繊維肉腫由来Meth A細胞をそれぞれ雌性C3H/He系マウスおよび雌性BALB/c系マウスの腹腔内に1週間毎に継代維持し，細胞を腹腔内より採取しダルベッコPBS（日水製薬）で洗浄を行った後実験に供した。

2. 実験方法

1) MM2腹水癌に対する作用

雌性C3H/He系マウスにMM2細胞を 1×10^6 個腹腔内に移植し，移植後の生存日数を観察した。被験物質の投与量はOenothain BおよびCoriariin Aについて1，3，10mg/kg，OK-432について100KE/kgとし，それぞれ腹腔内投与を行った。また被験物質の投与スケジュールは腫瘍細胞の移植4日前に投与する群（前投与）と移植1，4および7日後に投与する群（後投与）を設けた。抗腫瘍活性は細胞移植後の60日間の生存率および次式から求められる延命率により判定した。

$$\text{延命率 (\% ILS)} = \frac{L - C}{C} \times 100$$

L；被験物質投与群の平均生存日数

C；対照群の平均生存日数

（60日以上生存は生存日数を60日として計算した。）

2) Meth A固型型癌に対する作用

雌性BALB/c系マウスの鼠径部皮下にMeth A細胞を 1×10^6 個移植し、移植後8日から被験物質を7日間連続腹腔内投与した。投与量はCoriariin AおよびOenothain Bについては10mg/kg, OK-432は100KE/kg, LPSは1mg/kgとした。効果の判定は腫瘍細胞移植後21日目に増殖した細胞結節を摘出し、その湿重量を対照群のそれと比較した。また腫瘍増殖抑制率は次式から求めた。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

T; 被験物質投与群の平均腫瘍湿重量

C; 対照群の平均腫瘍湿重量

3) 統計処理

本実験のデータの統計処理はStudentのt検定により行った。

4) 被験物質の調製および投与方法

被験物質は用時PBSに溶解して調製し、投与方法はマウスの体重10g当り0.1ml腹腔内に投与した。

実験結果

1) MM2腹水腫瘍に対する効果

MM2細胞に対する各被験物質の前投与試験でCoriariin AおよびOenothain Bは10mg/kg投与群で最も強い延命効果(Coriariin A; ILS 192%, Oenothain B; ILS 192%)を示し、いずれの被験物質とも6例中5例が60日以上生存した。一方OK-432 100KE/kgの前投与では、ほとんど延命効果が認められなかった。またOenothain Bの効果は用量依存的であった。

後投与試験ではCoriariin Aはほとんど延命効果は認められなかったが、Oenothain Bには強い延命効果(ILS 197%)が認められた。またOK-432 100KE/kgの後投与はILS 164%であった。

Table 1 Coriariin A, Oenothain BのMM2腹水腫瘍に対する効果

被 験 薬	投 与 スケジュール	投与量	生存日数	延命率 (%)	生存率
Coriariin A	-4day	10	53.5±15.9 ^{b)}	192.3	5/6
	"	3	20.0± 3.6	9.3	0/6
	"	1	19.2± 1.9	4.9	0/6
	1,4,7days	10	18.3± 1.2	0.0	0/6
	"	3	16.6± 0.8	-9.3	0/6
	"	1	17.7± 0.8	-3.2	0/6
Oenothain B	-4day	10	53.5±15.9	192.3	5/6
	"	3	25.8±16.8	41.0	1/6
	"	1	19.2± 1.9	4.9	0/6
	1,4,7days	10	54.5± 8.5	197.8	4/6
	"	3	25.7±16.9	40.4	1/6
	"	1	26.1±17.0	42.6	0/6
OK-432	-4day	100 ^{a)}	20.5± 7.2	12.0	0/6
	1,4,7days	"	48.3±18.1	163.9	4/6
Control	-	-	18.3± 2.4	-	0/6

^{a)} KE/kg

^{b)} mean±S.D.

2) Meth A固型腫瘍に対する効果

Meth A固型腫瘍に対して、Oenothain Bの10mg/kg投与群では36%、LPSの1mg/kg投与群では42%の強い腫瘍増殖抑制作用を示した。一方Coriariin AおよびOK-432は共に約15%の弱い抑制作用を示したに過ぎなかった。

Table 2 Coriariin A, Oenothain B, OK-432およびLPSのMethA固型腫瘍に対する効果

被 験 薬	Dose(mg/kg)	湿重量 (g)	抑制率 (%)
Control		8.12±0.39 ^{b)}	
Coriariin A	10	6.84±0.42*	15.8
Oenothain B	10	5.15±0.40***	36.6
OK-432	100 ^{a)}	6.90±0.24*	15.0
L P S	1	4.73±0.86**	41.7

^{a)} KE/kg ^{b)} mean±S.D.

*,**,***p<0.05, 0.01, 0.001 Controlに対する有意差

考 察

オオマツヨイグサおよびドクウツギより抽出した植物タンニンであるOenothain BおよびCoriariin AはMM2腹水腫瘍細胞移植4日前の1回投与で強い抗腫瘍活性を示し、Oenothain Bは治療実験においてもOK-432より強い抗腫瘍活性を示した。またMeth A固型腫瘍に対してもOenothain B 10mg/kgで強い抗腫瘍活性を示した。Oenothain BおよびCoriariin Aの抗腫瘍活性の作用機序については、Agrimoniinにおいて腫瘍細胞に対する直接的な細胞障害作用によるものではなく宿主の非特異的免疫賦活作用、すなわちマクロファージ、リンパ球、NK細胞等の活性化によることが明らかにされていることから、Oenothain BおよびCoriariin Aにおいても、その構造の類似性から同様の作用機序によるものと推察される。この作用機序については今後さらに検討する予定である。

謝 辞

植物中からのタンニンの抽出、その他についてご指導を戴いた岡山大学・薬学部 奥田拓男教授に謝辞を表します。

文 献

- 1) K.Miyamoto, N.Kishi, R.Koshiura, *Japan.J.Pharmacol.*, **43**, 187-195 (1987)

【原著】

※

ブラジル産センソの薬理的検討

Pharmacological Investigation for Ch' an Su originated in Brazil

上野美穂 川筋透 横田洋一
Miho UENO Toru KAWASUJI Yoichi YOKOTA

斎藤晴夫
Haruo SAITO

富山県薬事研究所^{※※}

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

漢薬センソ（蟾酥，Ch' an Su）はシナヒキガエル（*Bufo bufo gargarizans* Cantor）又はその近縁種（Bufonidae）の毒腺の分泌物を集め、円盤状あるいは板状に固化したものである。センソは中国では古くから重用され、既に神農本草経にも記載され、種々の効能があげられている。疔などの悪性のできものに外用あるいは内用し、歯痛、痔疾などに外用して著効があるといわれている。

わが国でも古くから強心薬として用いられ、11局にも収載されている。当研究所はブラジル産ガマガエルの毒腺分泌物を入手し、横田ら¹⁾により既に理化学的な検討がおこなわれ、日局センソと成分的に異なることが明らかにされた。今回、医薬資源としての有用性を探るため薬理作用を中心に日局センソとの比較検討をおこなった。

実験の部

1. 実験材料

1) 試料

ブラジル産ガマガエル（パラ州産）毒腺分泌物，黄褐色不定形小片（以下ブラジル産センソと仮称し，CSBZと略記する）

日局センソ（粉末）（以下CSJPと略記）

(Table. 1)

一部の実験には六神丸（A；4 mg，B；3.75mg，C；2.5mg，D；2.6mg，E；5 mgのセンソをそれぞれ4粒中に含む）を使用した。

2) 実験動物

Wistar系雄性ラット（体重300～350g），日本白色種雄性ウサギ（体重3～3.5kg），Hartley系雄性モルモット（体重350～400g）および食用ガエル（体重350～450g）を使用した。

Table. 1 Contents of bufosteroids in CSJP and CSBZ

	CSBZ	CSJP	
Total bufosteroids	10.2	20.9	U.V
Bufalin	0.65	2.0	
Cinobufagin	N.0	4.4	
Resibufogenin	0.12	4.6	
Marinobufagin	9.4	N.0	
Total	10.17	11.0	HPLC

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表（富山，1987年11月4日）

※※ 〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山17-1 TEL 0766(56)6026

3) 試薬

セロトニン・クレアチニン硫酸塩 (和光純薬), アセチルコリンクロリド (関東化学), 硫酸アトロピン (和光純薬), 酒石酸水素L-アドレナリン (東京化成), ダイベナミン塩酸塩 (半井化学), 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, 塩化カルシウム (2水塩), リン酸一カリウム, 塩化マグネシウム, 炭酸水素ナトリウム, ブドウ糖 (無水), リン酸二水素ナトリウム二水和物, リドカイン, CMCおよびヘパリンナトリウム (以上, 和光純薬) を実験に供した。

2. 実験方法

1) 平滑筋に対する作用

(1) 胃に及ぼす影響

約18hr絶食したラットを瀉血致死させ, 直ちに胃を摘出してVaneら²⁾の方法に準じてfundus標本を作成した。32°のTyrode液を満たした20mlのマグヌス管内に標本を固定し, airを導入した。収縮はアイソトニックトランスジューサー (日本光電TD-112S) を介してレコーダーに記録した。標本をセロトニン (5-HT) 1.76×10^{-6} g/ml (1×10^{-5} M) の作用濃度で収縮高を一定にした後CSJP, CSBZ 1×10^{-6} g/ml, アドレナリン (Adr.) 2×10^{-6} g/ml, CSJP 1×10^{-6} g/ml対応量の六神丸 (A~E) を作用させた。

(2) 小腸に及ぼす影響

約18hr絶食したラットおよびモルモットの摘出小腸標本を用いた。標本は液温28°のTyrode液中でマグヌス法の常法に従って, アセチルコリン (ACh.) 1×10^{-6} g/mlおよびヒスタミン 1×10^{-7} g/mlの作用濃度により収縮高を一定にした。抗アセチルコリン作用には対照antagonistとして, ラットではアトロピン (Atr.) 1×10^{-7} g/ml, モルモットではAtr. 1×10^{-9} g/mlを3 min前処理した。

(3) 血管に及ぼす影響

瀉血致死したウサギ肺動脈のラセン状標本を用い, マグヌス法に従って血管に対する作用を調べた。Krebs Ringer bicarbonate液を20mlのマグヌス管に満たし, 液温を32°に保ちairを導入した反応槽を用いた。標本はあらかじめアドレナリン (Adr.) 2.86×10^{-6} g/mlの作用濃度を数回適用して収縮高を一定にした後使用した。抗Adr.作用にはダイベナミン 3.09×10^{-6} g/mlを5 min前処理した。反応の記録は(1)と同様である。

2) 心臓に対する作用

(1) カエル摘出心運動に及ぼす影響

八木法により摘出灌流標本を用いて調べた。心運動はアイソメトリックトランスジューサー (日本光電TB-652T) を介してレコーダーに記録した。薬物はRinger液に溶解し0.2~0.4mlを灌流液中に適用した。

(2) 乳頭筋に対する作用

ウレタン麻酔 (1.75 g/kg s.c.) したウサギの心臓を摘出して右心室の乳頭筋を取り出し, 空気を導入した37°のKrebs-Ringer液を満たした30mlの反応槽内に心筋側を固定し, 三尖弁側をアイソメトリックトランスジューサー (日本光電TB-652T) に接続した。筋標本に0.5gの張力を負荷し, 電気刺激は白金電極にて5 V, 5 msecの矩形波を1 cpsの頻度条件で加え, 生じた筋収縮をレコーダーに記録した。

3) 血圧に対する作用

ウレタン麻酔 (1.75 g/kg s.c.) したラットの頸動脈にカニューレを挿入し圧トランスジューサー (Gould H.B., U.S.A. P231D) を介して頸動脈圧を観血的にポリグラフ (日本光電 R

MP-6018) に記録した。血液凝固防止にはヘパリンナトリウムを1000U/kg i.v.投与した。また、薬物は股静脈に装着したカニューレを介してi.v.投与した。

4) 表面麻酔作用

Hartley系雄性モルモットを7匹用いた。モルモットの角膜をマンドリン線で刺激して正常な角膜反射(瞬目反射)のあることを確認した後、片眼に0.5%CMC生理食塩液に懸濁した1%の被験薬を25 μ l点眼し、1min作用させた。脱脂綿で薬液をふきとり、直後(0min)、2、5、10、15、20、25、30min後に、角膜中心部に一定刺激を5回与え、角膜反射の程度を以下の基準で評点した。

- 0 : 正常
- 0.5 : わずかに(ゆっくり)眼瞼を動かす
- 1 : 角膜反射の消失

5) 水溶液の安定性

センソを粉末化し、1.0mgを10mlのRinger液に溶かし、超音波処理を施して更に溶液を高めた。溶液は一部を室温(23~28 $^{\circ}$)に放置し残りは冷所に保存した。センソ水溶液の安定性はラット胃底標本に対する生物学的反応を指標として調べた。

結 果

1 平滑筋に対する作用

1) 胃に及ぼす影響

セロトニン 1.76×10^{-6} g/ml (1×10^{-5} M) で収縮高を一定したラット胃底標本に対してCSBZは 1×10^{-6} g/mlの作用濃度でCSJPより強い弛緩作用を示した。しかし、これらは経時的変化し、水溶液を5 $^{\circ}$ で保存した場合、CSJPは5日後には弛緩作用から収縮作用に転じた。CSBZは比較的安定で16日後にこのような変化が認められた(Fig. 1)。CSJP対応量の六神丸は、溶解直後ではCSJPに相当する弛緩作用を示した。製造後7年の六神丸も同程度の作用が認められた(Fig. 2)。

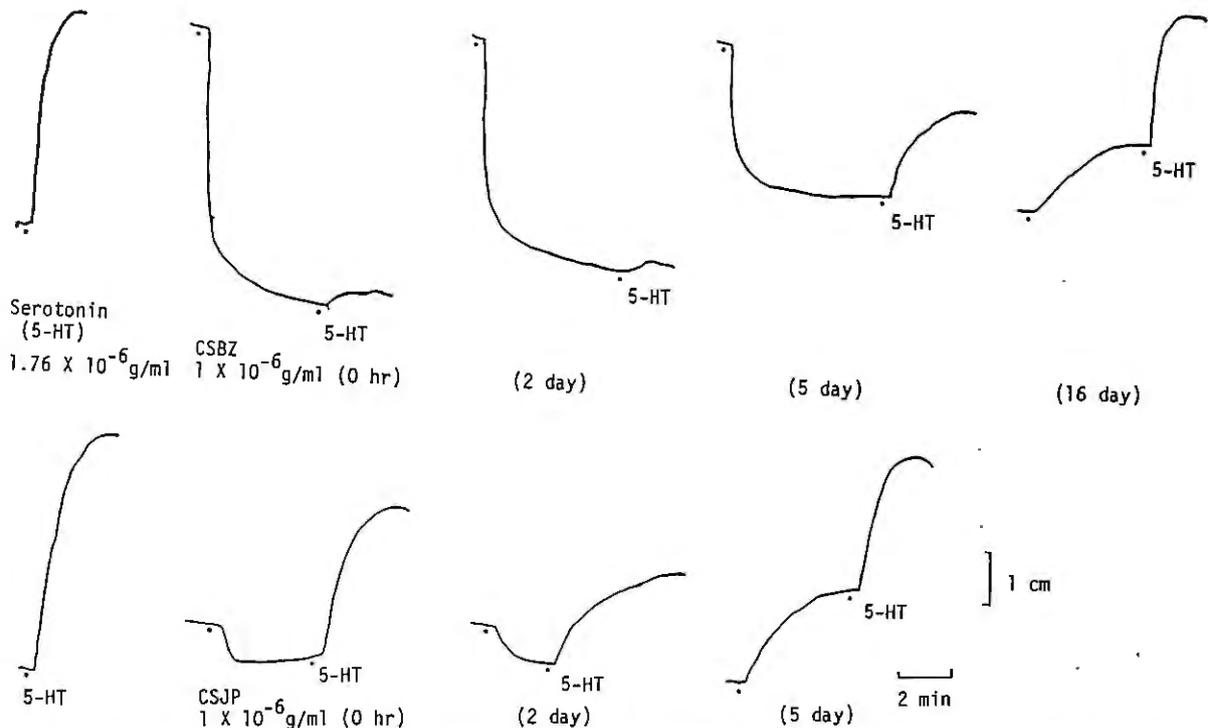


Fig. 1 Effect of CSJP and CSBZ on the isolated fundus preparation of rats

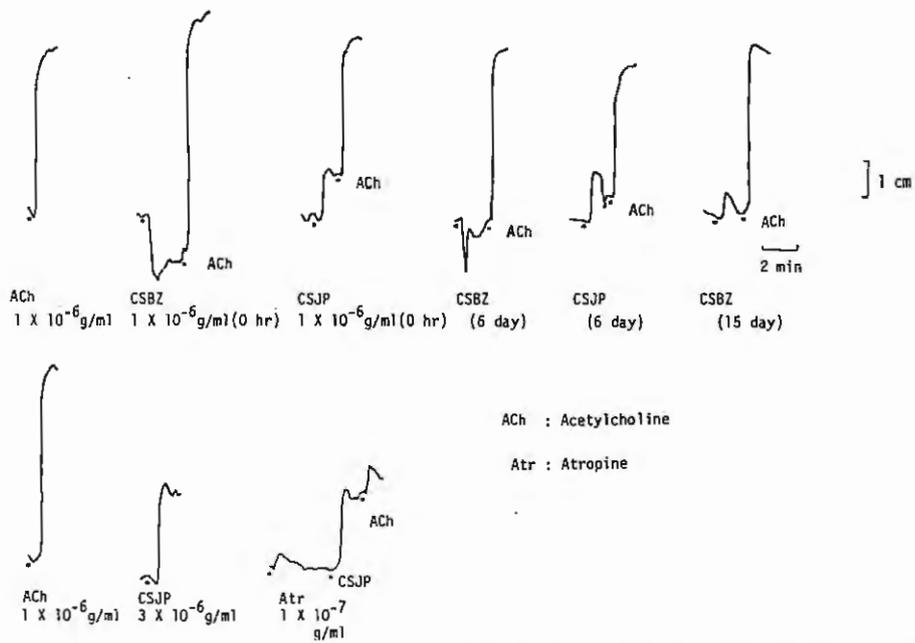


Fig. 2 Effect of CSJP and Rokusingan on the isolated fundus preparation of rats

2) 小腸に及ぼす影響

摘出ラット小腸に対してはCSBZは 1×10^{-6} g/ml の作用濃度で弛緩作用を示したが、CSJPは逆に収縮作用を示した。CSBZの水溶液は溶解後15日目で弛緩作用が消失し、弱い収縮作用に変化した、CSJP 3×10^{-6} g/ml によって生ずる収縮は、アセチルコリン 1×10^{-6} g/ml の収縮を抑制するアトロピン 1×10^{-7} g/ml の前処理により影響されなかった (Fig. 3)。

センソの摘出モルモット小腸に及ぼす影響は、Fig. 4 に例示した。アセチルコリン 1×10^{-6} g/ml で一定にした標本に対して 1×10^{-6} g/ml のCSBZは顕著な作用を示さなかったが、CSJP 1×10^{-6} g/ml で収縮作用が認められた。この収縮作用は試料調製後の日数の増加にともない増大した。CSJP 3×10^{-6} g/ml によって生ずる収縮は、アセチルコリン 1×10^{-6} g/ml の収縮を抑制しない濃度のアトロピン 1×10^{-9} g/ml の前処理により抑制された。

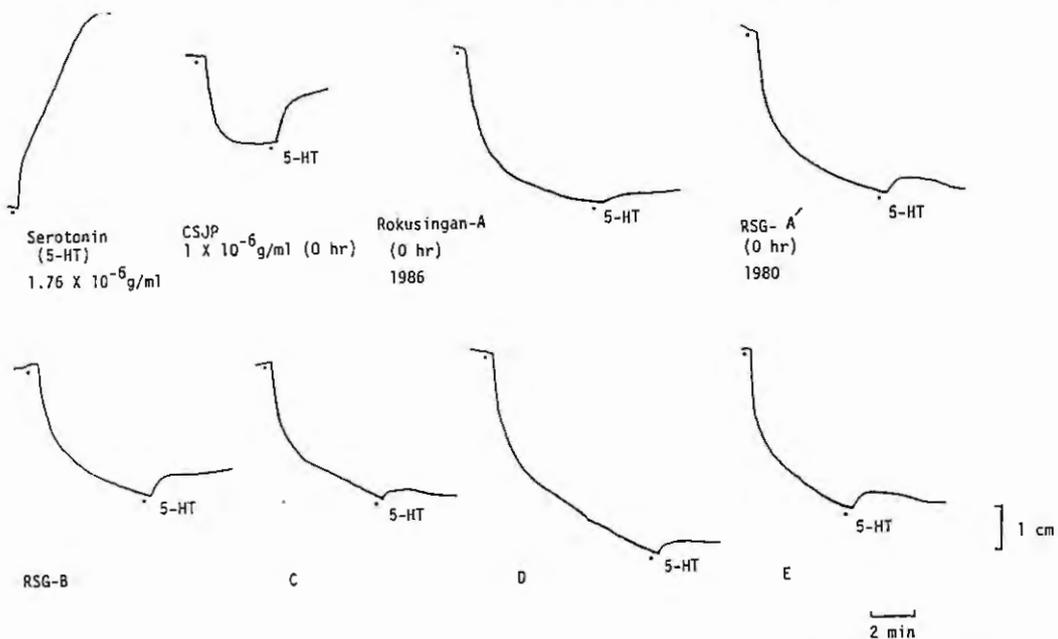


Fig. 3 Effect of CSJP and CSBZ on the isolated small intestine of rats

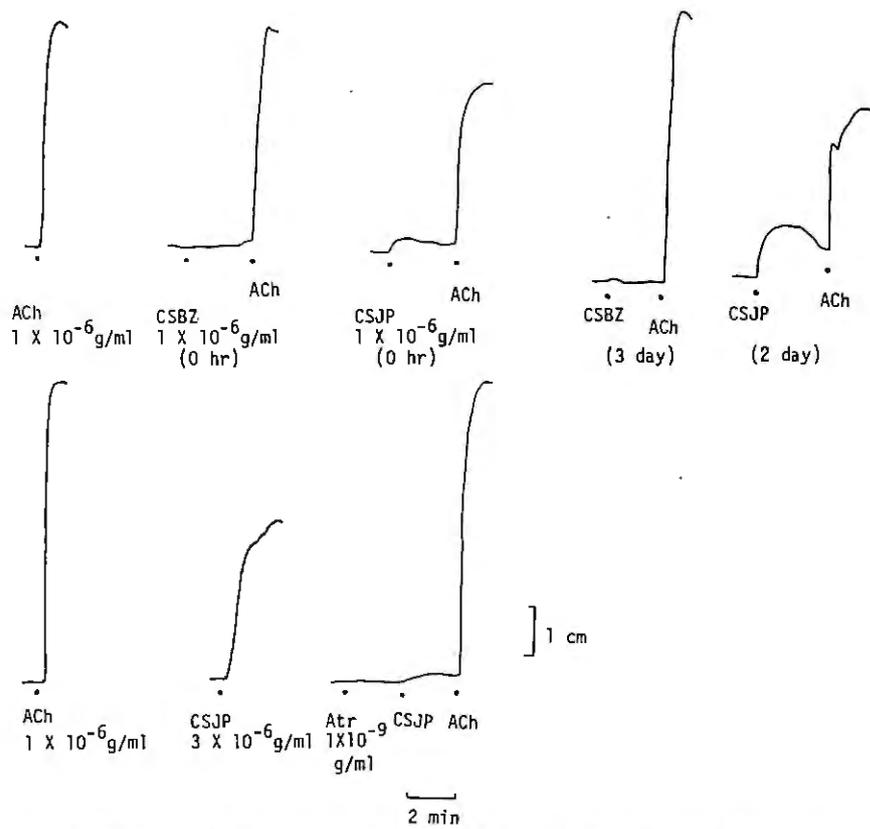


Fig. 4 Effect of CSJP and CSBZ on the isolated small intestine of guinea pigs

3) 血管に及ぼす影響

アドレナリン 2.86×10^{-6} g/ml で収縮高を一定にした摘出ウサギ肺動脈標本に対する作用は Fig. 5 に例示したように CSBZ および CSJP とも 1×10^{-6} g/ml で収縮を示した。この収縮作用は経日的に減少する傾向を示し、アドレナリン 2.86×10^{-6} g/ml による収縮を完全に消失するダイベナミン 3.09×10^{-6} g/ml の前処理により抑制された。

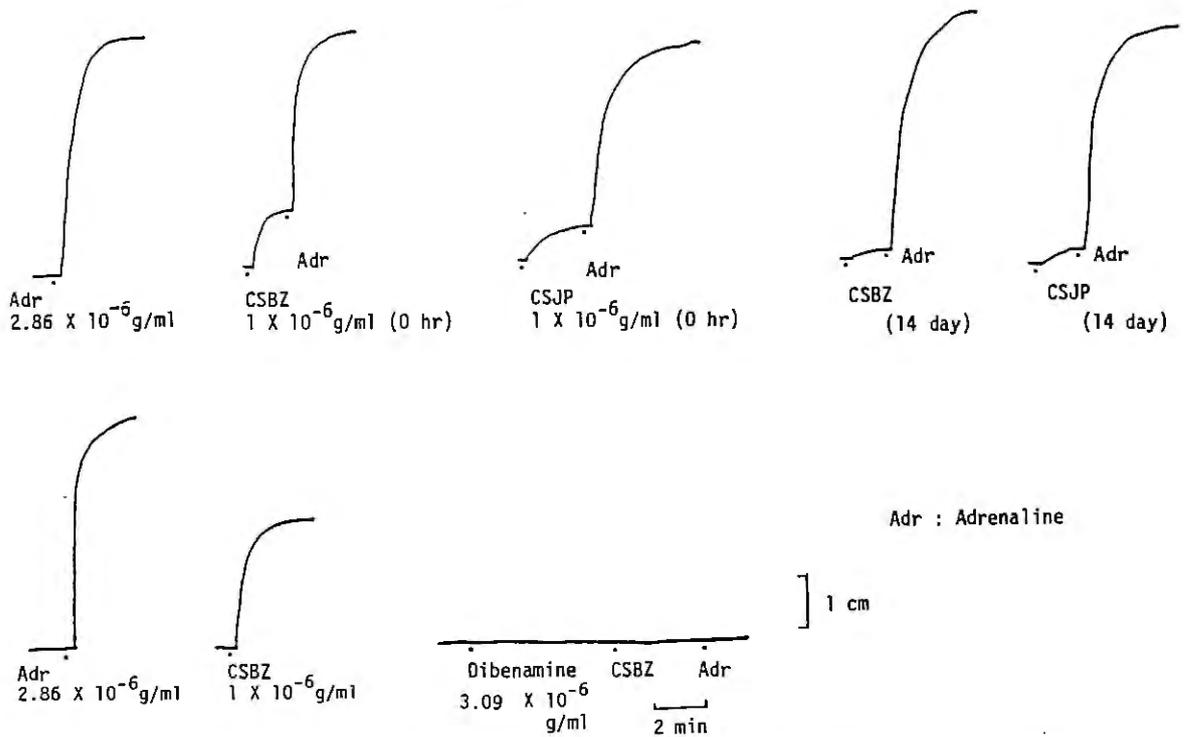


Fig. 5 Effect of CSJP and CSBZ on the isolated vascular strips of rabbits

4) アドレナリンの作用

アドレナリンの各種平滑筋に対する作用をFig. 6に示した。ラット胃底標本, ラットおよびモルモット小腸摘出標本に対してアドレナリンは 2×10^{-6} g/mlの濃度でいずれもCSBZと類似した弛緩作用を示した。

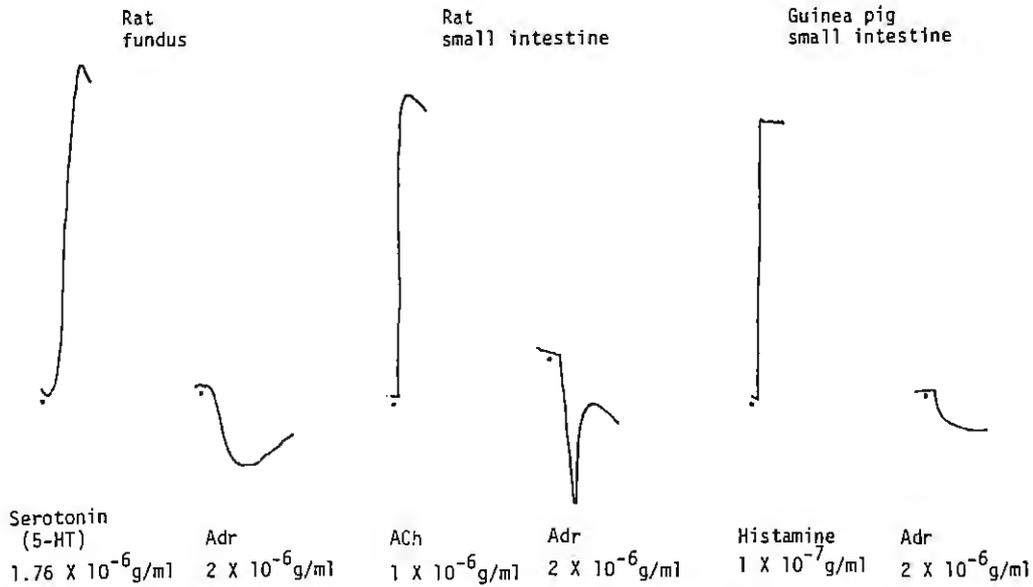


Fig. 6 Effect of Adrenalin on the isolated smooth muscle of rat and guinea pig

2. 心臓に対する作用

1) カエル摘出心運動に及ぼす影響

カエル摘出心に対する作用はFig. 7に例示したようにCSBZ0.2~0.4mlの灌流液(12~16 ml)内への適用により, 注入後直ちに心収縮力の増加が認められた。この収縮増大は約2倍に達し, 持続的であった。一方, CSJP0.2~0.4mlの適用では注入30~60sec後から徐々に収縮が増加し, 増大は約2倍に達した。

2) 乳頭筋に対する作用

ウサギ乳頭筋標本に対するセソンの作用はFig. 8に示した。CSBZ 1×10^{-6} , 2×10^{-6} g/mlの濃度で収縮力の増大が認められた。この収縮増大はアドレナリン 2×10^{-6} g/mlとほぼ同等であった。CSJPは 1×10^{-6} g/ml濃度で収縮増大が認められたが, CSBZに比べて発現が遅かった。CSJP対応量の六神丸も同様な収縮力の増大を示した。

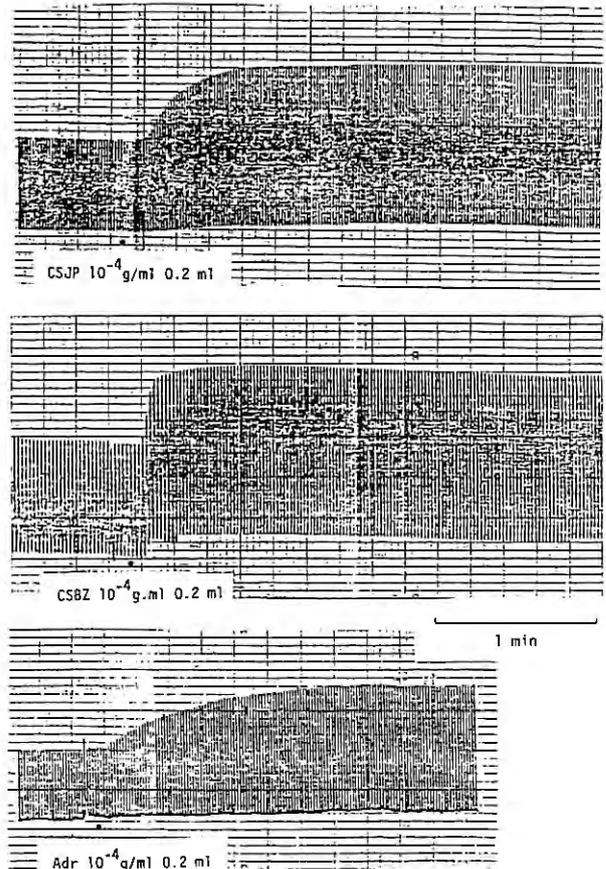


Fig. 7 Effect of CSJP, CSBZ and Adrenalin on frog heart in Yagi preparation

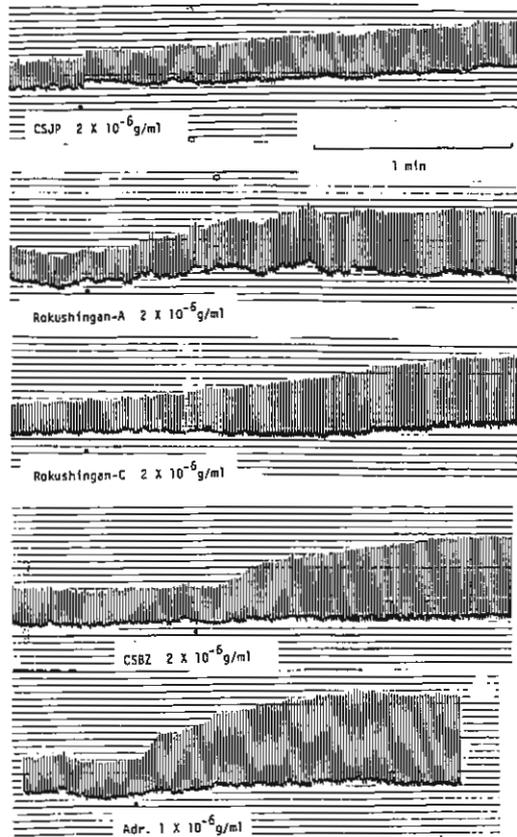
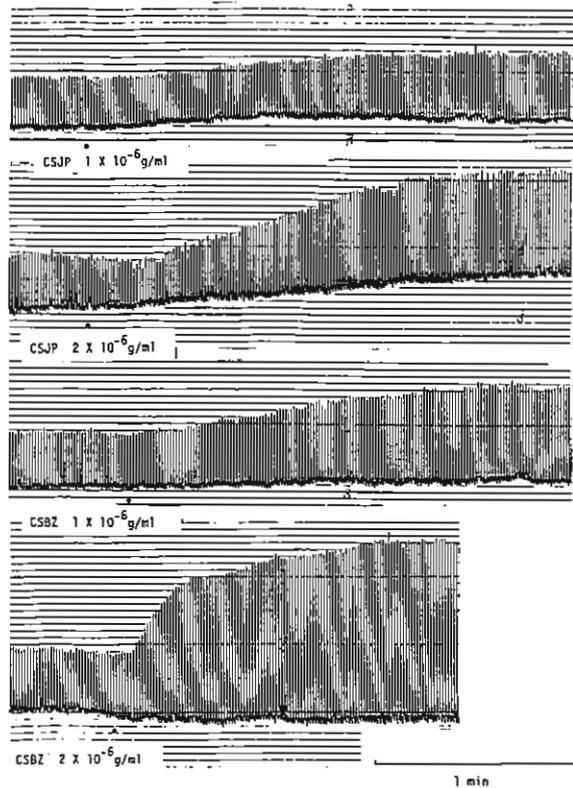


Fig. 8a Effect of CSJP, CSBZ, Rokusingan and Adrenalin on rabbit papillary muscle

Fig. 8b Effect of CSJP, CSBZ, Rokusingan and Adrenalin on rabbit papillary muscle

3. 血圧に対する作用

ラットの血圧反応に対する作用はFig. 9, 10, 11に示した。CSJPは一過性の血圧上昇の後、持続的な血圧上昇作用を示した。これに対してCSBZはアドレナリンと同様な一過性の強い血圧上昇作用を示した。

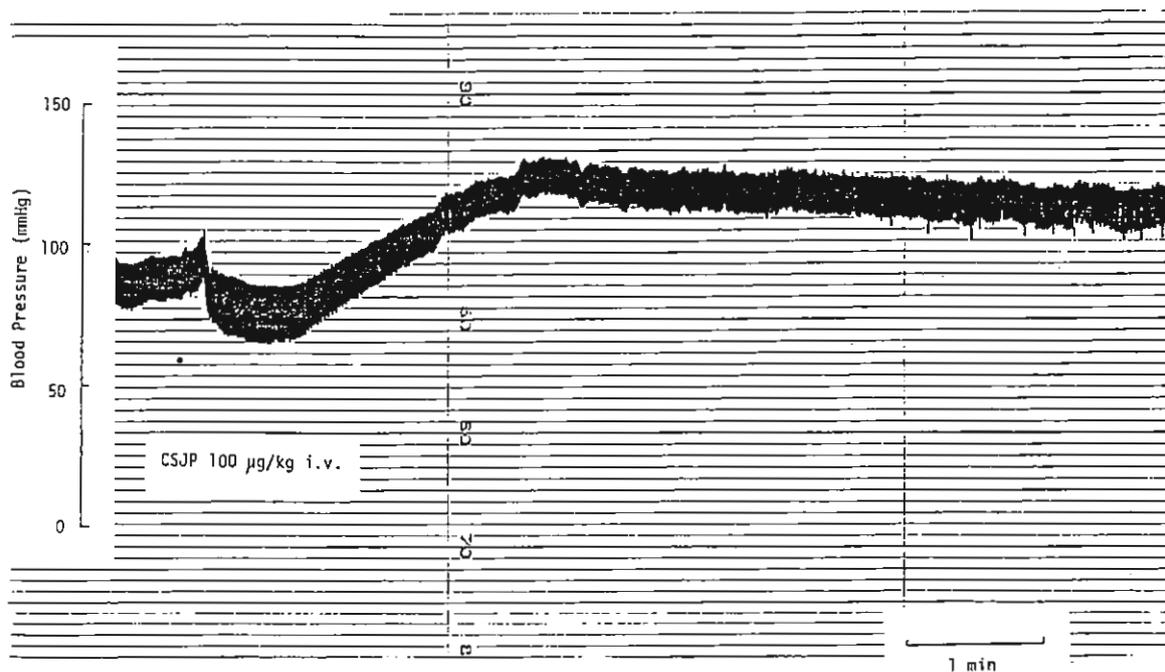


Fig. 9 Effect of CSJP on blood pressure in rat anesthetized with urethan(1.75 g/kg s.c.)

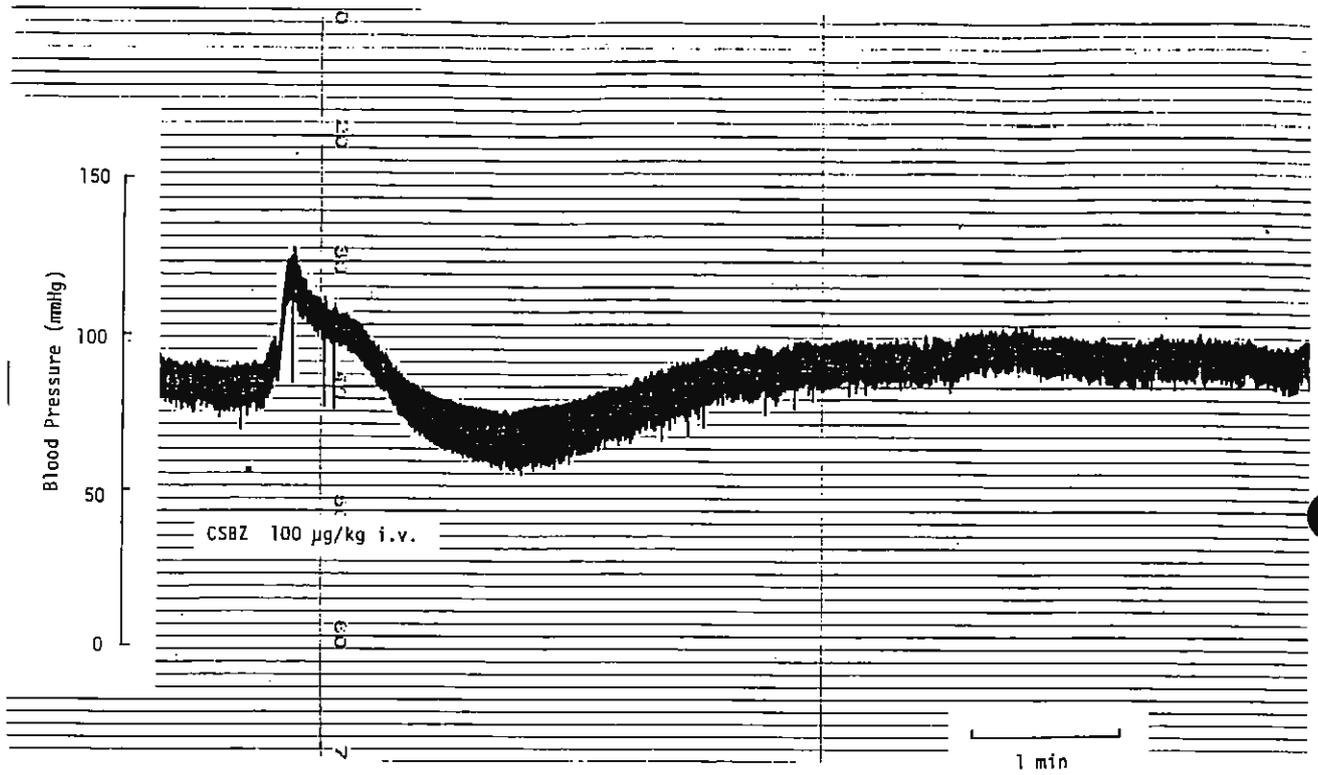


Fig.10 Effect of CSBZ on blood pressure in rat anesthetized with urethan(1.75 g/kg s.c.)

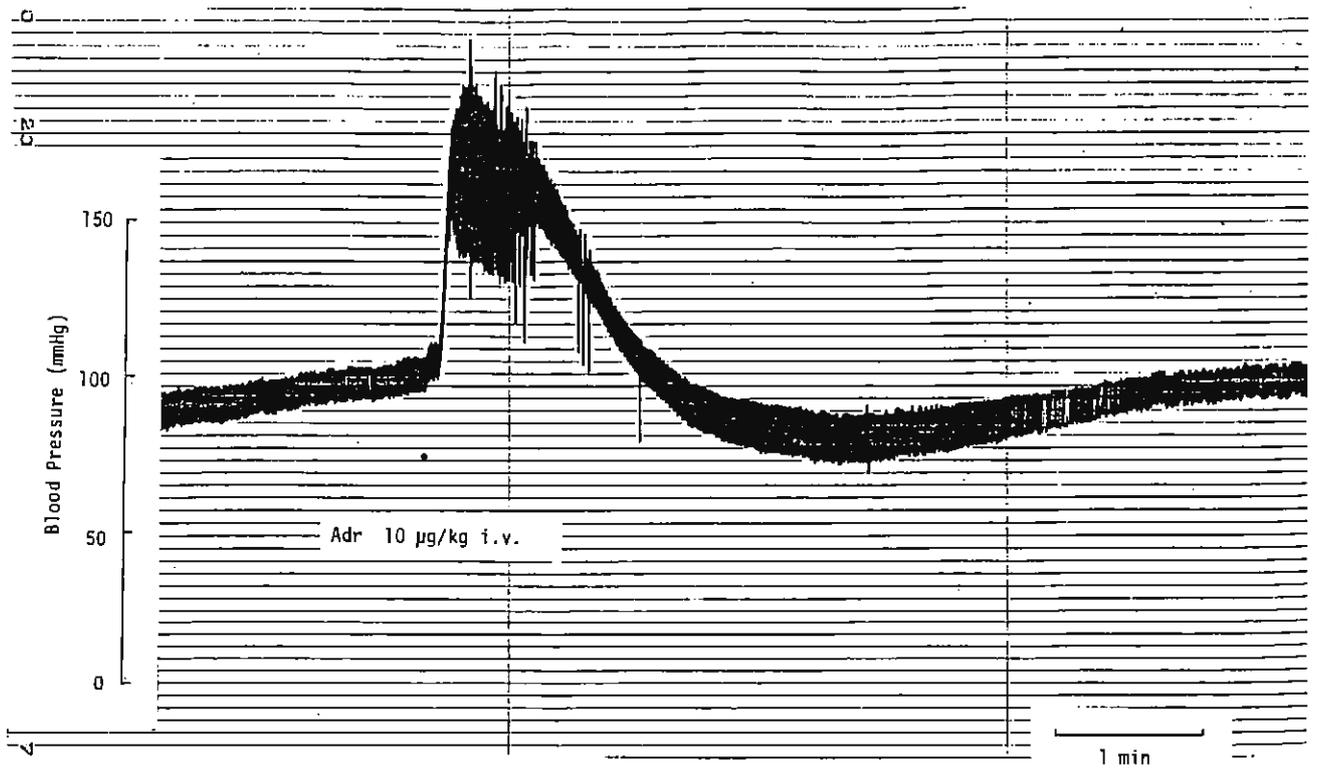


Fig.11 Effect of Adrenalin on blood pressure in rat anesthetized with urethan(1.75 g/kg s.c.)

4. 表面麻酔作用

CSBZ (1%) は適用後 2 min から角膜反射の消失および減弱作用が認められ、20、25 min 後には表面麻酔作用が最大となった。CSJP (1%) は適用直後から角膜反射の消失および減弱作用が認められ、20 min 後に表面麻酔作用が最大となった。リドカイン (1%) は適用後 2 min から 10 min までに全例に表面麻酔作用が認められた (Fig. 12)。

5. 水溶液の安定性

CSBZ および CSJP をそれぞれ Ringer 液に溶解した。水溶液は Fig. 13 に例示したように、溶解直後は胃底標本を弛緩させたが、経時的に変化して逆に収縮を示し、二相性の反応が認められた。室温 (23~28°) に 5 hr 放置した場合に CSBZ は変化しなかった。CSJP は溶解後 2 hr では著しい変化はみられなかったが 3 hr で弛緩作用は有意に減少し、4 hr で消失、5 hr 後には収縮作用が認められた。冷所 (5°) に保管した場合は、CSBZ および CSJP はいずれも経時的に変化して、CSJP は溶解 3 日後に弛緩作用が消失した。一方、CSBZ は溶解 5 日後では弛緩を示したが、14 日後では反応が逆転し収縮作用を発現した (Fig. 14)。

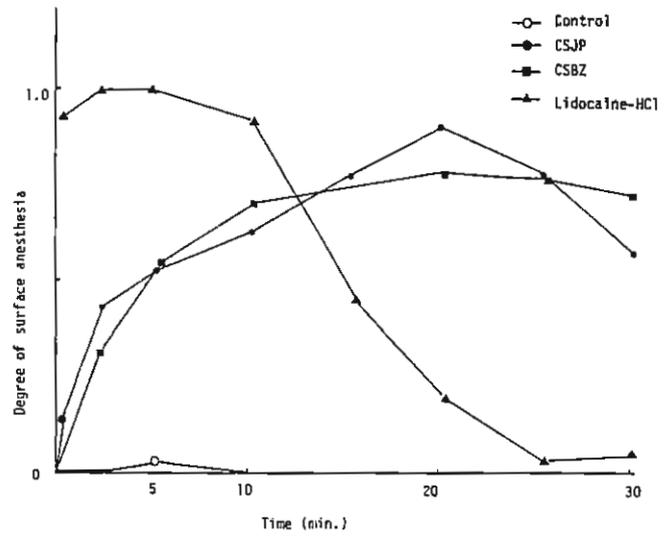


Fig. 12 Surface anesthesia of CSJP and CSBZ estimated by corneal reflex of guinea pigs

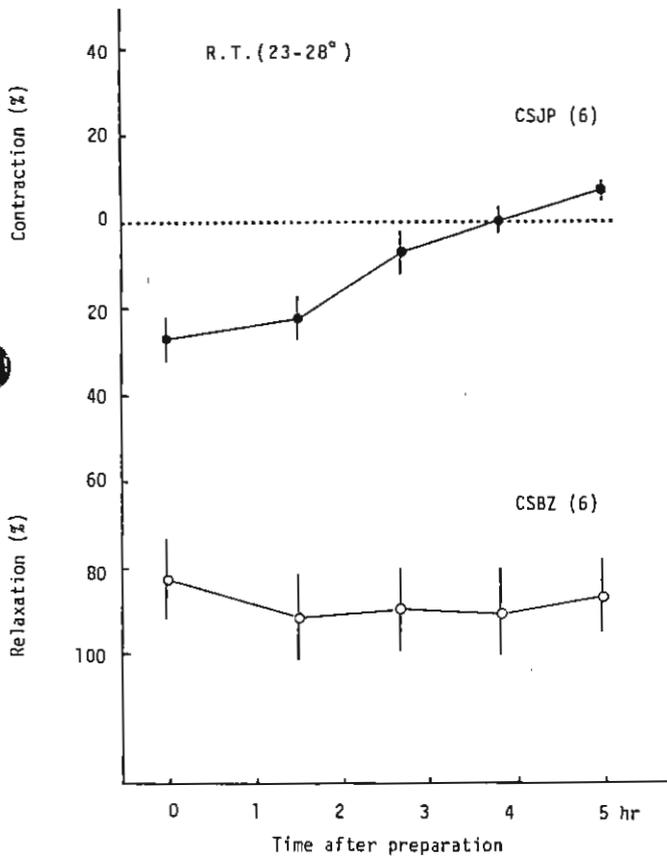


Fig. 13 Change in effect of CSJP and CSBZ on the isolated fundus strips of rats

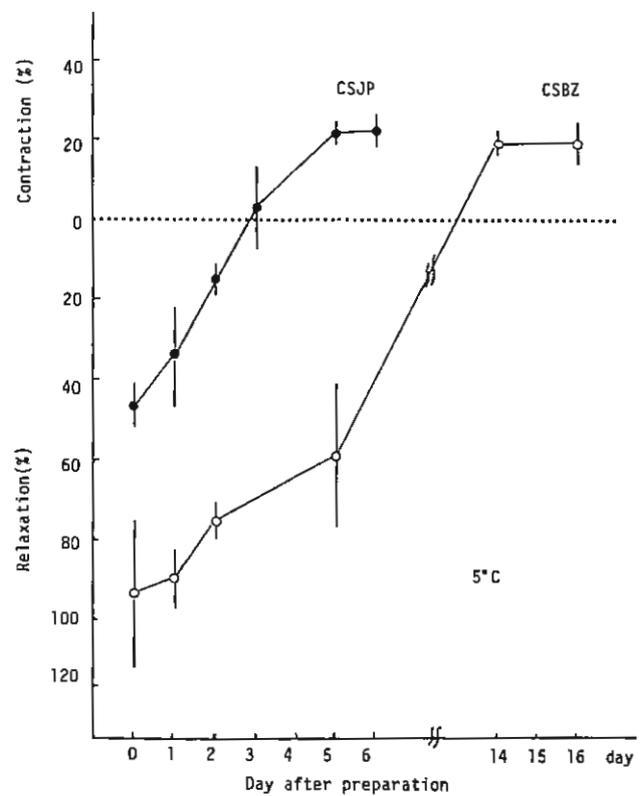


Fig. 14 Change in effect of CSJP and CSBZ on the isolated fundus strips of rats

考 察

CSBZおよびCSJPの平滑筋に対する作用は、弛緩および収縮の二相性を示した。その発現は平滑筋標本により、またセンソ水溶液調製後の経時変化により異なった。ラット胃底標本に対してはCSBZおよびCSJPは基本的には弛緩を示した。その弛緩作用はCSJPに比べてCSBZが強かった。ラット小腸平滑筋に対してはCSJPは 1×10^{-6} g/mlの濃度で収縮作用を現したが、逆にCSBZは弛緩を示した。またモルモット小腸平滑筋に対してCSBZの 1×10^{-6} g/ml濃度では未変化あるいはわずかな弛緩を示した。CSJPはラット同様に 1×10^{-6} g/mlで収縮作用のみを示した。一方、ウサギ肺動脈標本に対しては、CSBZおよびCSJPともに収縮を示したが、その作用は、CSBZが強かった。これらの平滑筋に対する作用は試料の経時変化にともなって変化し、ラット胃底標本に対しては弛緩作用を現す成分の失活に伴って収縮作用に転じるものと考えられる。このことは木村ら³⁾の報告すなわちセンソ水溶液を調製後3時間放置した場合、心収縮の亢進性が減弱することと一致している。須賀ら⁴⁾は摘出モルモット回腸に対してセンソ成分のレジブホゲニンが 5×10^{-8} g/ml以上で収縮を示し、この収縮は抗コリン薬アトロピン 1×10^{-8} g/mlにより抑制され、コリンエステラーゼ阻害薬エゼリンで増強されることからアセチルコリン遊離が関与することを示唆した。今回のセンソによる小腸収縮はアトロピンによりモルモットでは抑制されたがラットでは抑制されなかった。これは動物種の違いによる標本の差によるものと考えられる。また、胃底標本においてagonistの5-HTを抑制したが、これは強い弛緩による機能的な抑制と考えられる。

ラット頸動脈圧に対しての 100μ g/kgi.v.投与は同量のCSJPに比べて強い一過性の約40mgHgの上昇を示した。この昇圧はアドレナリン 10μ g/kgのほぼ1/2であったが、血圧パターンが類似していた。

一方、摘出心臓収縮に対してはCSBZはCSJPとはほぼ同様の心臓収縮亢進作用を示した。CSBZの乳頭筋に対する作用はCSJPに比べて作用の発現が速く筋収縮の増強はより強かった。乳頭筋に対するCSBZの反応はCSJPよりもむしろアドレナリンの反応に極めて類似していた。

表面麻酔作用については、CSBZおよびCSJPとも効果は徐々に現れ20minをピークとする比較的持続した作用を示した。センソ成分のうち局所麻酔作用が最も強い⁵⁾ Bufalin含量がCSBZは少ない¹⁾にもかかわらず、CSJPと同等の作用を示したが、他の成分の総和として効果が現れていると考えられる。

なお、一部の実験にCSJPを含む六神丸製剤を用いたが、胃平滑筋、乳頭筋、摘出心標本に対する作用で比較する限り、製造後7年の製剤はCSJPと変わらない活性を有していたが、水溶液に調製するとCSJPと同様の变化を示した。六神丸の薬理活性はセンソに強く依存していると思われるが、丸剤が極めて安定な活性を維持していることは興味深い。

文 献

- 1) 横田洋一 配置四県薬事指導所会議資料 富山 (1987)
- 2) J.R.Vane, Br.J.Pharmacol.Chemother. **14**, 87 (1959)
- 3) 木村正康, 長田永三郎, 脇 功巳, 薬誌, **88**, 125, (1968)
- 4) 須賀俊郎, 代永 宝, 弘中哲治, 岡田正弘, 日薬理, **62**, 72 (1966)
- 5) 須賀俊郎, 代謝, **10**, 762 (1973)

【原 著】

和漢薬による抗アレルギー製剤開発の基礎研究 (第2報)^{*}

Studies on Anti-allergic Agents from Tradional Orient Medicines Part-II

鶴居 恂輔 沢 和子
Jyunsuke TSURUI Kazuko SAWA

鶴居薬品工業株式会社^{**}
Tsurui Pharmaceuticai Co., Ltd.

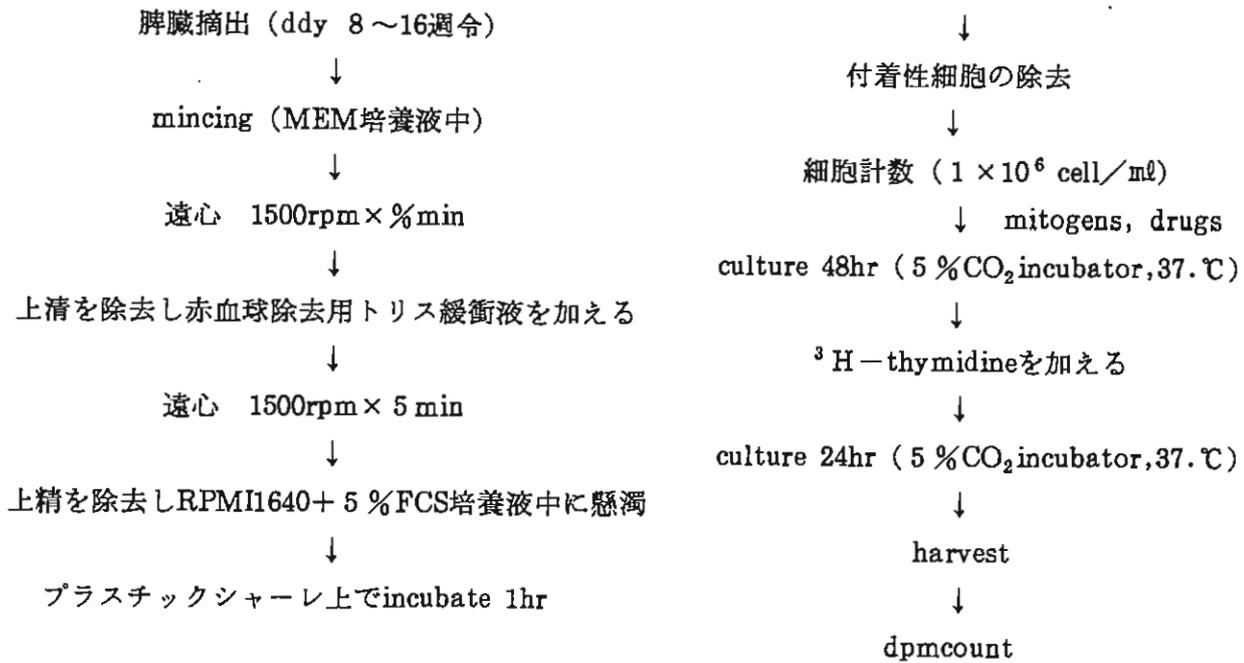
アレルギーとは、本来、外界からの異物の侵入より生体を防衛するための免疫機能がバランスをくずし、逆に生体を障害することである。これは主に抗体産生刺激の過剰亢進に起因しているものと考えられている。従って、抗体産生能を制御している免疫担当細胞に作用する薬剤を開発することは、数々のアレルギー疾患の治療にとって、重要な意味を持っている。そこで、我々は免疫担当細胞の調節物資を生薬中に求めるため、先にヒト末梢血リンパ球を用いてスクリーニングを行った。今回は、この方法より簡便で均一な実験システム開発のため、マウス脾臓リンパ球を用いた実験方法を検討した。すなわち、ヒト末梢血リンパ球による実験で、リンパ球の刺激又は抑制作用の認められた生薬エキスについてマウス脾臓リンパ球での効果と比較検討し、若干の成績を得たのでここに報告する。

実 験

Chart 1 に示す様に、マウス(ddY 8-16週令)の脾臓を無菌的に摘出し、これをミンチング後、細胞塊を除去し、赤血球除去用トリス緩衝液(Tris-NH₄Cl緩衝液pH7.2)を用いて赤血球を溶血した。これを培地にて洗浄後5% FCS加RPMI 1640培地に浮遊させ、プラスチックシャーレ上で1時間培養した。そして、シャーレに非付着性の細胞を10% FCS加RPMI 1640培地に1×10⁶cell/mlの濃度に調製し、以下の実験に供した。マイクロプレート上の細胞に生薬および、Table. 1 に示すmitogen(リンパ球刺激作用物資; PHA, LPS, ConA, PMA, PWMの5種類)を加え48時間培養後、³H-thymidineを加え最終濃度0.2μCi/wellとし、さらに24時間培養しCell-harvesterにより細胞をグラスファイバーフィルター上に回収し、5% TCA(Trichloroacetic acid)溶液で洗浄、乾燥後、0.6% t-butyl-PBD toluene溶液を加えて、液体シンチレーションカウンターで測定した。このカウントを、コントロールに対する³H-Thymidineの取り込み増加率として算出し、(Stimulation Index; S.I.)これをリンパ球の幼若化度の指標とした。

* 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

** 〒939-15 富山県東砺波郡福野町野尻457-1



$$S. I = \frac{\text{Sample dpm}}{\text{Control dpm}}$$

Chart 1 Method of screening

Table. 1 Target cell of mitogens

mitogens	反応する細胞
phytohemagglutinin (PHA)	T cell
lipopolysaccharide (LPS)	B cell
concanavalin A (Con A)	T _s cell
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	T _H cell
pokeweed mitogen (PWM)	T, B cell

結 果

ヒト末梢血リンパ球を用いた測定において、生薬のみで刺激効果の認められた5種のメタノールエキス中、刺激作用を有する(S.I.が1以上の場合)赤芍, *Coleus amboinicus*はマウス脾臓細胞のリンパ球でも同様に刺激作用が認められ、ヒト末梢血リンパ球で抑制作用を有する(S.I.が1以下の場合)和厚朴, 麻黄, 桃仁についても同様にマウス脾臓細胞リンパ球で抑制作用が認められた。*Coleus*はスリランカ生薬で、スリランカでは喘息の薬として用いられている。なお、*Coleus*は*amboinicus*から*aromaticus*に学名が変更になっている。またヒト末梢血リンパ球でmitogenと生薬を併用した場合に、PMAとの併用時において、特異的に刺激作用を有した赤芍についてもマウス脾臓細胞リンパ球ではPMA併用時に刺激作用が認められた。さらに入手可能な赤芍単離成分についてのマウス脾臓細胞リンパ球での結果もヒト末梢血リンパ球の場合と同様な作用を示した。

考 察

ヒト末梢血リンパ球とマウス脾臓細胞リンパ球において同様の結果を得たことで、今後、マウス脾臓細胞を用いた実験システムでのスクリーニングが有用であると考えられる。更に、生薬エキスの作

用が動物種を越えて共通していることは、これらの生薬中の免疫調節作用物質の存在がより強く示唆される。また、mitogenと併用して実験を行った赤芍はPMA併用時に刺激作用を示しており、ヘルパーTcell関与であることを示唆している。

謝 辞

本実験に当り、御指導下さいました、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 鏡森定信教授、成瀬優知助教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 鶴居 他, 家庭薬研究 No.3, 63 (1984)

【原 著】

延胡索成分の分画とその作用について[※]

Fractionation of *Corydalis Tuber* Extract and Its Effect on Acetylcholinesterase Activity

上 川 浩 久 保 喜 一
Hiroshi KAMIKAWA Kiichi KUBO

株式会社広貫堂 研究開発部^{※※}
Research Laboratory, Kokando Co.,Ltd.

延胡索は、ケシ科Corydalis属植物の塊茎を乾燥したもので、唐代の「本草拾遺」に玄胡索の名で収録され、宋代の「開宝本草」で正式な薬物として収載されている。また現在でも、鎮痛、鎮痙、浄血などの目的で、「安中散」などの漢方処方や、胃腸薬配合剤の原料として用いられている重要な生薬である。

著者らは、この延胡索成分の分画と、そのアセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性に及ぼす影響について検討した。

実験方法

延胡索は、(有)松原粉末薬品より購入したものをを用いた。動物は三協ラボサービス(株)より購入した。また、acetylthiocholine iodideおよび5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acidは関東化学(株)製のものを、その他の試薬は市販の特級品を用いた。

1. 延胡索成分の分画

延胡索1kgを粉碎、メタノール2ℓずつで3回、各4時間加熱還流抽出した。抽出液は冷後ろ紙ろ過し、減圧下で溶媒を留去してメタノールエキスとした。このメタノールエキスを、5%酢酸100mlずつで5回振とう抽出し、その残渣をFr-1とした。酢酸抽出液はアンモニア水を加えてアルカリ性とし、これをエーテル500mlずつで10回抽出する。エーテル層は溶媒を留去し、これをFr-2とし、水層をFr-3とした。この水層を塩酸で酸性とし、ここに25%ヨウ化カリウム溶液を、沈殿を生じなくなるまで加えた。この沈殿をろ取り、メタノールに溶かして不溶物を除去、減圧下で溶媒を留去してFr-3aとした。また沈殿を除いたろ液をFr-3bとした。(Fig. 1)

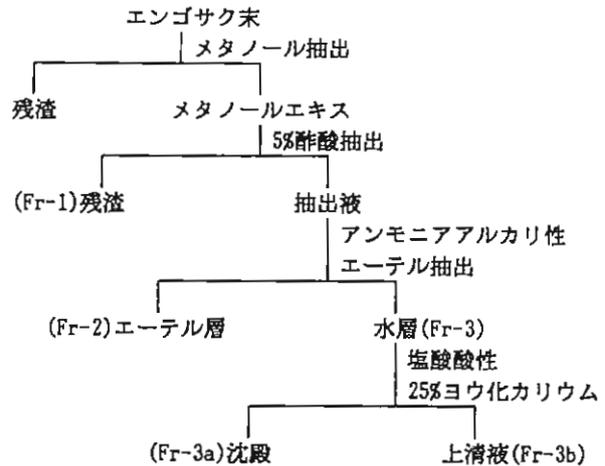


Fig. 1 延胡索成分の抽出及び分画

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

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

2. AChE活性測定法

人工的基質であるacetylthiocholineを用いて、AChEにより分解、生成されたthiocholineを、5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) と反応させる。その反応生成物である5-thio-2-nitrobenzoic acidの単位時間あたりの増加を測定してAChE活性を算出する。(Fig. 2)

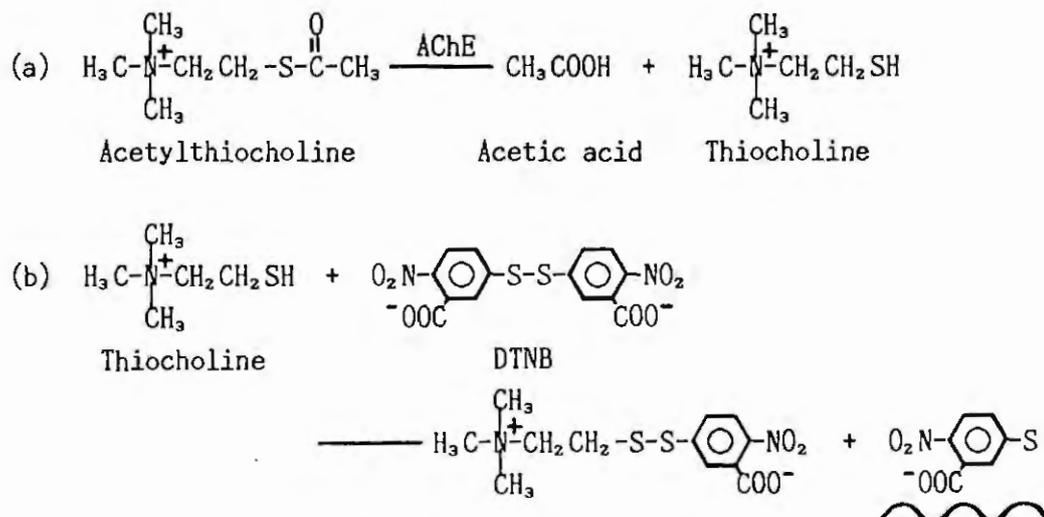


Fig. 2 AChE活性測定の原理

酵素溶液0.25mlに試料溶液0.5ml, 2 mM DTNB溶液0.5ml及び0.1Mリン酸緩衝液 (pH8.0) 1.25 mlを混合, 更に3 mM acetylthiocholine iodide溶液0.5mlを加え, 25℃でインキュベーションし, この反応溶液の412nmにおける吸光度の増加を経時的に測定した。(Fig. 3) 酵素溶液の代わりにリン酸緩衝液を加えたものをブランクとし, AChE活性は, 25℃において1分間に1 μmolの基質を分解するときを1単位として算出した。

リン酸緩衝液(0.1M pH8.0)	1.25ml
DTNB溶液	0.5ml (終濃度 0.33mM)
酵素溶液	0.25ml
試料溶液	0.5ml
25℃ 5min	
アセチルチオコリン溶液	0.5ml (終濃度 0.5mM)
25℃	
O.D.測定(412nm)	

Fig. 3 AChE活性測定の操作

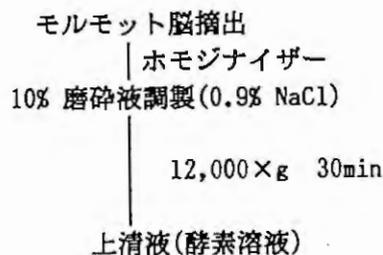


Fig. 4 AChE酵素溶液の調製

3. AChE酵素溶液の調製

Hartley系モルモット (雄性, 7週令) を屠殺して脳を摘出, 生理食塩水で数回洗浄する。これに生理食塩水を加えてホモジナイザーにかけ, 10% (W/V) 磨砕液を調製した。この磨砕液を12,000 × gで30分間遠心して, その上清をとり酵素溶液とした。(Fig. 4)

結 果

各フラクションの収率は, メタノールエキスが約5%, Fr-1, Fr-2, Fr-3がそれぞれ約0.7%, 0.3%, 4%, またFr-3aが約0.3%であった。

延胡索成分のAChE活性に及ぼす影響について検討した結果、まずメタノールエキスにAChE活性に対する阻害作用が認められた。そしてこのメタノールエキス中の、どの分画が阻害作用を有するの
 かを知るために、各分画の作用の強さを比較したところ、三級アルカロイド分画であるFr-2より
 も、水溶性四級アルカロイドを含むFr-3に最も強い阻害作用が認められた。(Fig. 5)

更に、このFr-3について、ヨウ化カリウムによりアルカロイドを沈殿させ、その沈殿と上清に
 ついて比較したところ、沈殿であるFr-3aに阻害作用が強く見られた。(Fig. 6)

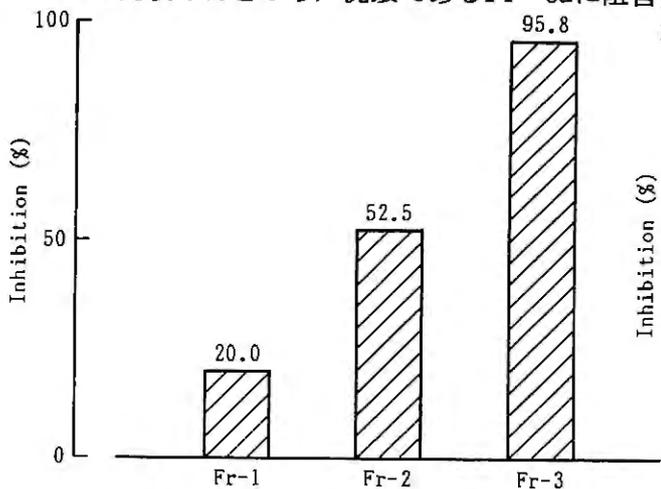


Fig. 5 Inhibitory effect of Corydalis fraction on AChE activity (Fr-1, Fr-2, Fr-3: 1.67 mg/ml finally)

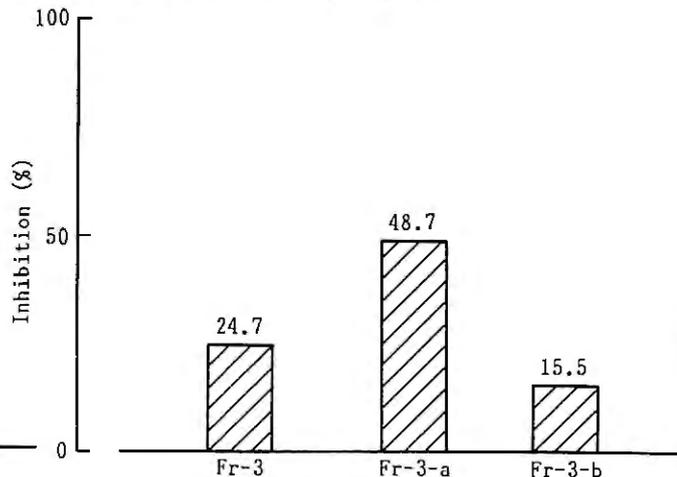


Fig. 6 Inhibitory effect of Corydalis fraction on AChE activity (Fr-3, Fr-3a, Fr-3b: 0.2 mg/ml finally)

次に延胡索成分の、AChE活性に対する阻害作用とその用量との関係について検討した。その結果、延胡索成分のAChE活性阻害作用には用量依存性が認められ、メタノールエキスとFr-3a (四級アルカロイドヨウ化物) の50%阻害濃度は、本条件下では、最終濃度でそれぞれ290 μ g/ml及び30 μ /mlであった。(Fig. 7)

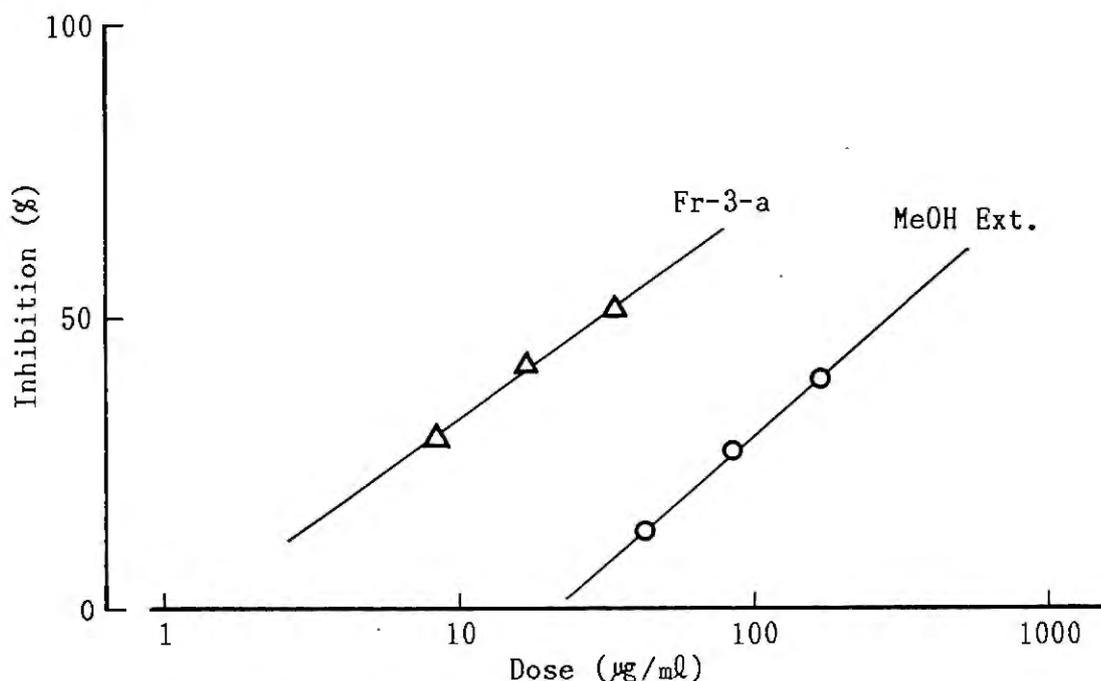


Fig. 7 Inhibitory effect of Corydalis fraction AChE activity (MeOH Ext. : -O-, Fr-3a: - Δ -)

考 察

延胡索は、中国産、朝鮮産、日本産などその産地により起源植物が異なっている。²⁾ また、その成分としては、corydaline, dehydrocorydaline, berberineなど多数のプロトベルベリン型三級及び四級アルカロイドが知られているが、起源植物によりその組成はやはり異なる。³⁾ そこで今回の延胡索のAChE活性に及ぼす影響については、個々の成分ではなく、分画成分について検討した。

一般に、四級アンモニウムをもつ物質には、AChEに対する活性阻害作用がみられるが、今回見出された延胡索成分のAChE活性阻害作用も、アルカロイド分画のうちでも、四級アルカロイド分画に最も強く認められた。

延胡索成分の薬理作用としては、鎮痙作用や子宮収縮作用、抗潰瘍作用、中枢抑制作用などが報告されているが、それによれば、このうち子宮収縮作用や抗潰瘍作用は四級アルカロイドによるものである。⁴⁾⁵⁾ 今回のAChE活性に対する阻害作用と、これら薬理作用との関連については未検討であるが、延胡索のもつ薬効のなんらかの指標となりうることを期待させる。そこで著者らは、この阻害作用について、延胡索の新しい薬効の研究に発展する可能性について検討中である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、ご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 萩田善一教授、並びに同生物試験部門 渡辺裕司教授に深謝致します。

参考文献

- 1) Whittaker, M, "Methods of Enzymatic Analysis, vol. III", Verlag Chemie, Weinheim 1983 p.52.
- 2) 難波恒雄 ら, 延胡索の生薬学的研究 I 本草文献学的考察(1), 生薬, **23**, 8-14 (1969)
- 3) 江蘇新医学院 編 "中薬大辞典 上冊", 上海科学技術出版社, 上海 1978 , p.919.
- 4) 今関和泉 ら, ベルベリン系アルカロイドのハツカネズミ腸管および子宮におよぼす作用について, 薬誌, **81**, 1281-1284 (1961)
- 5) 荘司行伸 ら, 延胡索成分アルカロイドの実験動物における胃液分泌抑制作用ならびに抗潰瘍作用, 日薬理 **65**, 196-209 (1969)

【原著】

漢方製剤の品質に関する研究 (第2報)[※]

— 安中散 —

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine II

— “Anchu-Sun” —

成川一郎 西本初博 吉井美矢子
Ichiro NARIKAWA Hatsuhiro NISHIMOTO Miyako YOSHII

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^{※※}

Research Institute, Toa Pharmaceutical Co., Ltd.

安中散は桂枝4g, 延胡索3g, 牡蠣3g, 茴香1.5g, 縮砂1g, 甘草1g, 良姜0.5g, 茯苓5gからなり, その原典「太平惠民和劑局方」¹⁾には「散剤を熱爛の酒で服用せよ。婦人はうすい酢で服用し, 酒が飲めない人は塩を一つまみ入れた湯で服用せよ。」と記述されており, 基本的には散剤としての服用が指示されている。

ところが現在安中散は, 湯液又はエキス製剤として服用されている場合が多い。

しかし, 本処方中には桂枝, 茴香, 縮砂, 良姜等の揮発性成分の多い生薬が配合され, また, 水に溶けにくい牡蠣が制酸剤として含まれている。従って製剤化の際の調製方法によっては安中散の品質, ひいてはその薬効に影響を及ぼすことも懸念される。

今回, 安中散製剤の調製方法と有効成分の動向との関連性について検討し, 若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 被験材料

- (1) 安中散処方中の揮発性成分を含む生薬(桂枝, 茴香, 縮砂, 良姜)の末
- (2) 安中散末の乾式造粒製剤: 安中散末に賦形剤(乳糖)を加え, 乾式造粒法により製した製剤
- (3) 安中散末の湿式造粒製剤: 安中散末に賦形剤(乳糖)を加え, 湿式造粒法により製した製剤
- (4) 安中散エキス: 安中散(桂枝4g, 延胡索3g, 牡蠣3g, 茴香1.5g, 縮砂1g, 甘草1g, 良姜0.5g, 茯苓5g)19g(1日量)に水190mlを加え, 1時間還流後布ごしろ過し, 抽出液を日局製剤総則. エキス剤の製法を準用して40~50°で減圧濃縮後, 真空乾燥して製したエキス
- (5) 牡蠣末
- (6) 市販の安中散末乾式造粒製剤A, B

2. 試験方法

1) 精油成分のGCパターン比較

(1) 被験材料

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

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

桂枝, 茴香, 縮砂, 良姜の各生薬末
安中散末の湿式造粒製剤

安中散末の乾式造粒製剤
安中散エキス

(2) 試験方法

① 日局精油定量法による抽出後GC分析

被験材料→日局精油定量法により3時間抽出→抽出液をエーテル抽出→水浴上エーテル留去→クロロホルムに溶解→GC分析

② エーテル還流抽出後GC分析

被験材料→エーテルで40° 30分抽出→水浴上エーテル留去→クロロホルムに溶解→GC分析

③ ①, ②におけるGC分析の条件

カラム: OV 17 2mガラスカラム

検出器: FID

温度: 120° 10分保持後毎分5°で220°まで昇温後10分間保持

2) 制酸力試験

(1) 被験材料

牡蠣末

市販の安中散末の乾式造粒製剤A, B

(2) 試験方法

胃腸薬統一試験法に準じて測定

3. 結果

1) 精油成分のGCパターン比較

安中散構成生薬中精油成分の多い桂枝, 茴香, 縮砂及び良姜それぞれのエーテル還流抽出液についてのGCパターン分析結果をFig. 1に示した。

桂枝のチャートにはCinnamic Aldehydeが保持時間約7分に, 茴香の場合はAnetholeが約5分に, 縮砂では保持時間約2分にBorneolが, また, 良姜のチャートには約1分にCineoleのピークがそれぞれ認められた。

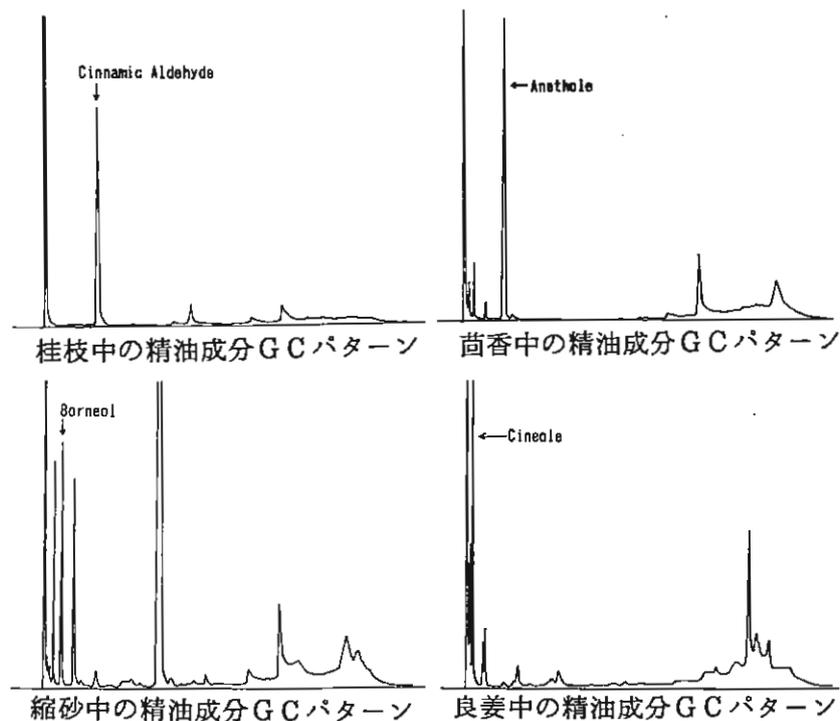


Fig. 1 安中散生薬の精油成分GCパターン

次に、安中散末の乾式造粒製剤及び湿式造粒製剤並びに安中散エキスそれぞれのエーテル還流抽出液によるGCパターン比較をFig. 2に示した。

乾式造粒製剤のチャートにおいては、Fig. 1に示す配合生薬固有のピーク中、沸点の最も低いCineoleを除き、Borneol, Anethole及びCinnamic Aldehydeのかなりの量の残存が確認されたのに対して、湿式造粒製剤の場合は低沸点部分の損失が著しく、生薬固有のピークとしてはCinnamic Aldehydeのみが確認された。また、安中散エキスのチャートには生薬固有のピークの残存は認められず、その他のピークも痕跡が認められるのみであった。

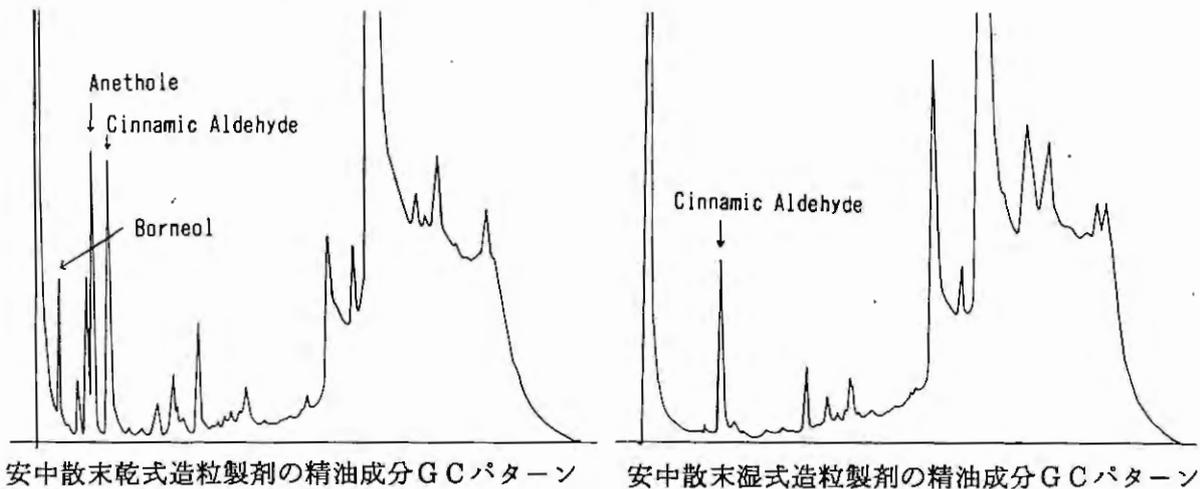


Fig. 2 安中散製剤の精油成分GCパターン

更に、精油成分のみのピークについて比較するため、精油定量法により抽出した液につき乾式造粒製剤と湿式造粒製剤のGCパターンを比較した結果、エーテル還流抽出液の場合と同様、乾式造粒製剤ではBorneol, AnetholeおよびCinnamic Aldehydeのピークが確認され、湿式造粒製剤のチャートにおいては生薬固有のピークとしてCinnamic Aldehydeのピークのみが認められ、乾式造粒製剤のそれよりもかなり低かった。(Fig. 3)

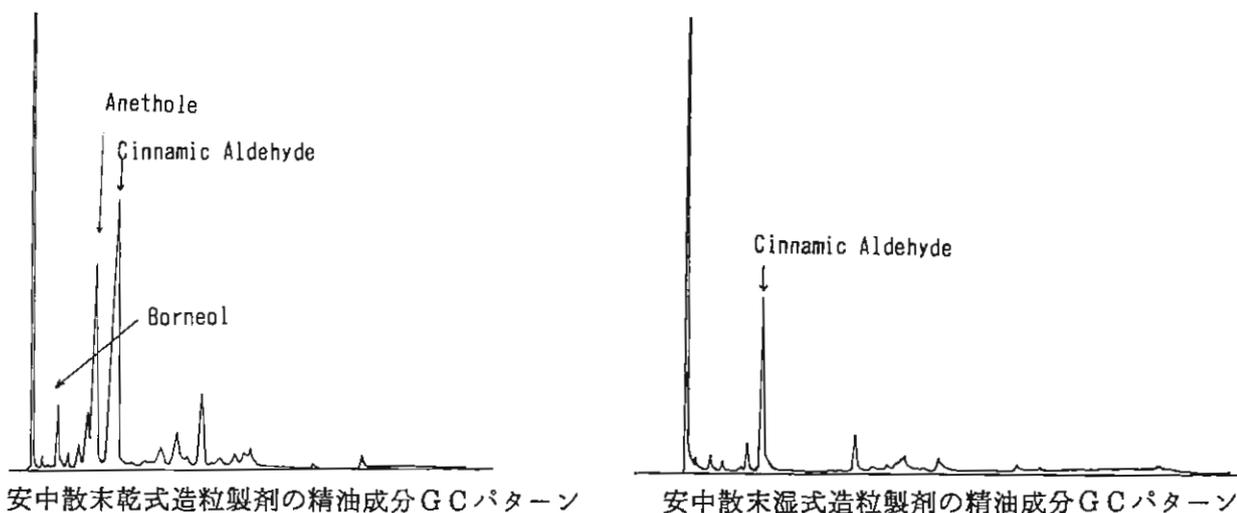


Fig. 3 安中散製剤の精油成分GCパターン（精油定量法による抽出）

2) 制酸力試験

安中散エキス並びに市販の乾式造粒製剤A及びBの制酸力を安中散構成生薬中の牡蠣の制酸力と比較した結果をTable. 1 に示した。

A及びBの制酸力は牡蠣のそれに一致したが、安中散エキスの制酸力はゼロであった。

Table. 1 安中散製剤の制酸力

		牡蠣 100mg当り換算の 0.1N 塩酸消費量 (ml)				
		0	5	10	15	20
牡蠣 (標準)		[Bar from 0 to 20]				
安中散末の	A	[Bar from 0 to 20]				
乾式造粒製剤						
(市販品)	B	[Bar from 0 to 20]				
安中散エキス	C	[Bar from 0 to 0]				

考 察

古典にも示されているように、安中散は本来「散」として用いるべきものである。

今回の実験で明らかのように、特に生薬の場合は、製剤化の技術次第でその機能効果に関わる有効成分の著しい損失を招く結果となる。揮発性有効成分を含むいわゆる芳香性健胃生薬の有効性を期待するならば、生薬は粉末のまま、水や溶媒なしで造粒（乾式造粒）することで煮沸、乾燥等の工程を避けるべきである。また牡蠣の配合目的が制酸作用にあることを意識すれば、安中散の水抽出エキスをもって製剤化を行うことがまったくのナンセンスであることは容易に理解できるはずである。しかし、現在市場にある製剤を調べてみた結果では、残念ながらこの種の困った製剤が現実に存在しており、安中散のエキスによる製剤も市場に流通しているのである。このような製剤の効果については動物実験や臨床試験を待つまでもなく結果は明らかである。

医薬品の製剤化研究にかかわる技術者は、漢方製剤や生薬製剤に限らず、製剤化に対する基本姿勢とは何かということを忘れてはならないと思う次第である。

参考文献

1) 太平惠民和剂局方 宋太平惠民和剂局編 人民衛生出版社

【原 著】

グリチルリチン酸及びその塩類の品質評価法に関する考察[※]

Evaluating Studies on the Glycyrrhizic Acid and Its Salts

横 田 洋 一 有 沢 み さ を 江 尻 千 鶴 子
Yoichi YOKOTA Misao ARISAWA Chizuko EZIRI

富山県薬事研究所^{※※}

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

グリチルリチン酸の定量にHPLC法が繁用されるようになり、標準品の純度が問題となってきている。¹⁾ グリチルリチン酸及びその塩類は純度の高いものが得難く、また、その水分含有は比較的多いにも関わらず、良い乾燥法が見あたらない。²⁾ また生薬試験用標準品と称するものが市販されているが、高価であるにも関わらず、含量規格は98%以上(HPLC法による面積百分率)程度の規格がついているのみで、水分含量については明らかでない。

そこで、グリチルリチン標準品の乾燥法について、若干の検討を加え、さらに、市販の生薬試験用標準品、再結晶品、分取品、製剤原料及び試薬についてHPLC法等を用い、品質評価を行った。

実験の部

1. 乾燥方法

1) 試料

食品添加物試験用標準品	1品目
再結晶品	3品目
製剤原料	4品目
試薬	3品目

2) 方法

(1) カールフィッシャー法(KF法)

機 器：微量水分測定装置(三菱化成工業製, VA-05)

方 法：直接法

試料量：0.05~0.1g

(2) 真空凍結乾燥法(FD法)

機 器：真空凍結乾燥器(ラプコンコ社製, FD-10)

品 温：40°

時 間：16時間

トラップ温度：-40°

真空度：80μHg

試料量：0.5g

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表 (富山, 1987年11月4日)

※※ 〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山17-1 TEL 0766 (56) 6026

2. 含量試験法

1) 試料

Table. 1 に示す。

名 称	本 質	試 料 名	備 考
生薬試験用標準品	グリチルリチン酸 グリチルリチン酸モノアンモニウム	A, B, C, D E	市販品 供与品
HPLC分取品	グリチルリチン酸	F※1	当所製
再結晶品	グリチルリチン酸モノアンモニウム グリチルリチン酸ジナトリウム	G※2, H J	当所製, 供与品 供与品
食品添加物試験用標準品	グリチルリチン酸モノアンモニウム	I	市販品
製剤原料	グリチルリチン酸ジカリウム グリチルリチン酸モノアンモニウム	K, L, M N	市販品 市販品
試薬	グリチルリチン酸モノアンモニウム	O, P, Q	市販品 (国産品1, 外国品2)

※1 分取方法：試料Jについて、以下のHPLC条件で分取を行った。

機 器 : M 600 (Waters社製)
検 出 器 : 紫外吸光度計 (測定波長: 254 nm)
カ ラ ム : μ -BONDASPHERE 5 μ C18-100A
19mm \times 15cm (Waters社製)
カラム温度 : 室温
移 動 相 : ギ酸溶液 (pH3.0)・アセトニトリル混液 (66:34)
流 量 : 1.2ml/min
注 入 量 : 0.25ml (40mg/ml)

※2 再結晶方法：試料Oを85%エタノール及び活性炭で再結晶、脱色を3回行った。

Table. 1 試 料

2) 方法

(1) 面積百分率

次の2種類のHPLC条件で行い、総ピーク面積に対するグリチルリチン酸のピーク面積の比率(%)を求めた。

イオン抑制法 (IS法)

機 器 : CCPM高速液体クロマトグラフ (東ソー製)
データ処理器 : CP-8000 (東ソー製)
検 出 器 : 紫外線吸光度計 (測定波長: 254nm)
カ ラ ム : A-312 (ODS) 6mm \times 15cm (山村化学研究所製)
カラム温度 : 40° 付近の一定温度
移 動 相 : 薄めた氷酢酸 (2 \rightarrow 100)・アセトニトリル混液 (3:2)
流 量 : 0.9ml/min
検 出 感 度 : 30mVFS
測 定 時 間 : グリチルリチン酸の保持時間の約2倍
試 料 溶 液 : 試料約10mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし正確に10mlとしたもの
注 入 量 : 5 μ l

イオンペア法 (IP法)²⁾³⁾

移 動 相 : 0.02Mリン酸一水素アンモニウム液 (東京化成製10%テトラブチルアンモニウム水溶液20mlを加え1 ℓ とし、リン酸でpH6.0に調製したもの)・アセトニトリル混液 (2:1)

流 量 : 1.2ml/min

その他の条件は I S 法と同じ

(2) 相対含量

A社製グリチルリチン酸を標準品として他の試料を I S 法及び I P 法で定量した。試料溶液及び標準溶液は I S 法の移動相でそれぞれ約100 μg/mlの濃度に溶解したもので、その10 μlを正確に注入し、絶対検量線法により求めた。

(3) 比吸光度 (E_{1%^{1cm}})

I S 法の移動相で各試料を約40 μg/mlの濃度に溶解したものを日立557 二波長自記分光光度計で波長252nmの吸光度を測定し求めた。グリチルリチン酸の塩類の場合はグリチルリチン酸に換算して、値を求めた。

結果及び考察

1. 乾燥方法

Table. 2 に K F 法及び F D 法の値を示す。製剤原料及び試薬については、2 法間で若干差を認めしたが、再結晶及び食添試験用標準品については、K F 法と F D 法で、ほぼ同じ値を示した。したがって、K F 法を用いる事のできない微量の標準品の乾燥に F D 法が有効と思われる。

試 料	水分含量 (K F 法)	乾燥減量 (F D 法)	K F 法-F D 法
再 結 晶 品	6.40	6.17	0.23
	6.14	6.05	0.09
	11.56	10.66	0.90
食品添加物試験用標準品	2.01	1.76	0.25
製 剤 原 料	10.01	8.47	1.54
	5.46	4.02	1.44
	5.39	6.33	-0.94
	7.94	8.11	-0.17
試 薬	5.13	7.73	-2.60
	4.29	2.09	2.20
	6.37	5.85	0.52

Table. 2 水分含量及び乾燥減量 (%)

2. 含量試験及び比吸光度

Table. 3 に面積百分率, 相対含量, および比吸光度を示す。また Fig. 1 ~ 4 にクロマトグラムを示す。

試 料 名	面積百分率		相対含量		比吸光度 (E _{1%^{1cm}})
	イオン抑制法	イオンペア法	イオン抑制法	イオンペア法	
A	99.7	98.7	100	100	145.5
B	99.7	98.6	103.2	101.7	146.0
C	98.3	94.7	101.4	96.3	147.0
D	97.2	94.6	98.6	95.8	147.0
E	99.4	99.0	98.1	98.2	142.0
F	99.6	97.0	98.4	95.8	138.5
G	87.9	84.3	85.8	80.5	148.0
H	88.1	86.0	84.6	79.7	144.3
I	89.1	86.7	87.8	83.6	147.2
J	92.2	91.7	90.5	86.0	142.8
K	83.1	82.2	70.8(78.2)	60.9(67.7)	142.3
L	79.4	77.1	70.0(74.0)	65.7(69.5)	138.8
M	79.8	77.0	67.5(71.3)	57.2(60.5)	136.8
N	79.8	77.7	71.1(77.2)	67.2(73.1)	144.5
O	79.4	76.9	68.8(74.6)	57.7(60.8)	137.3
P	81.1	83.3	68.6(71.1)	65.2(68.1)	131.5
Q	80.7	79.6	67.3(71.9)	64.3(68.7)	136.5

() は水分含量 (K F 法による) を補正した値

Table. 3 試料の面積百分率 (%), 相対含量 (%) 及び比吸光度

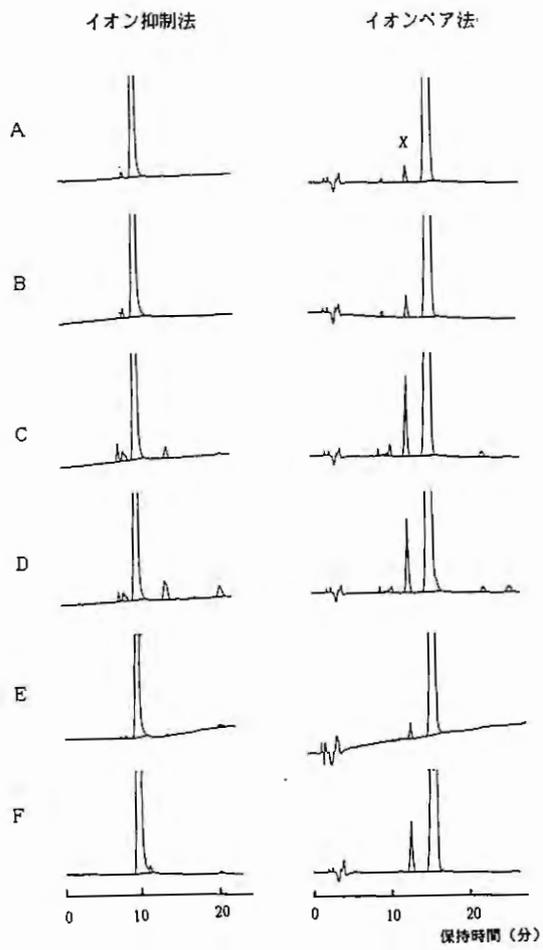


Fig. 1 生薬試験用標準品等のクロマトグラム

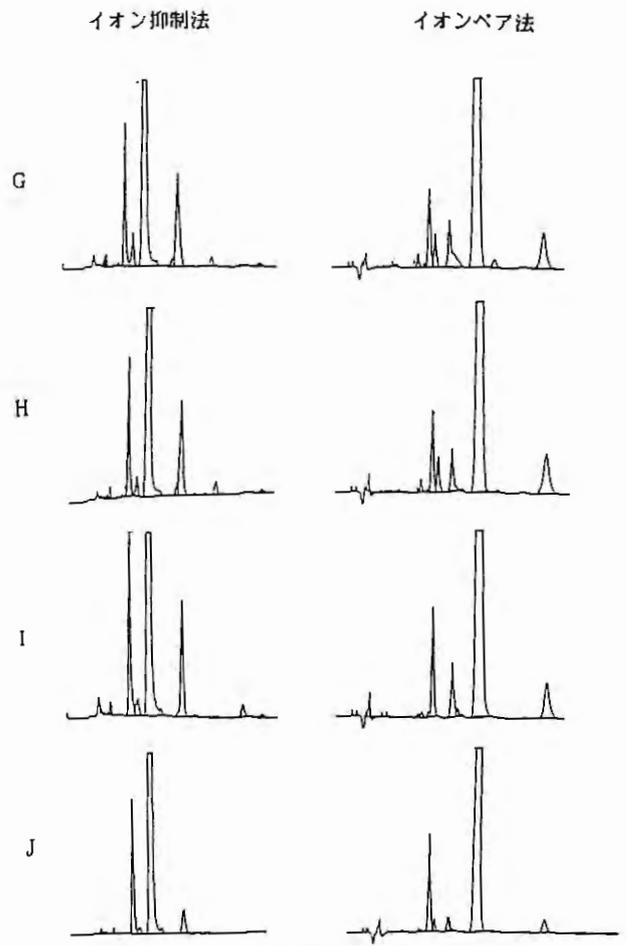


Fig. 2 再結晶品等のクロマトグラム

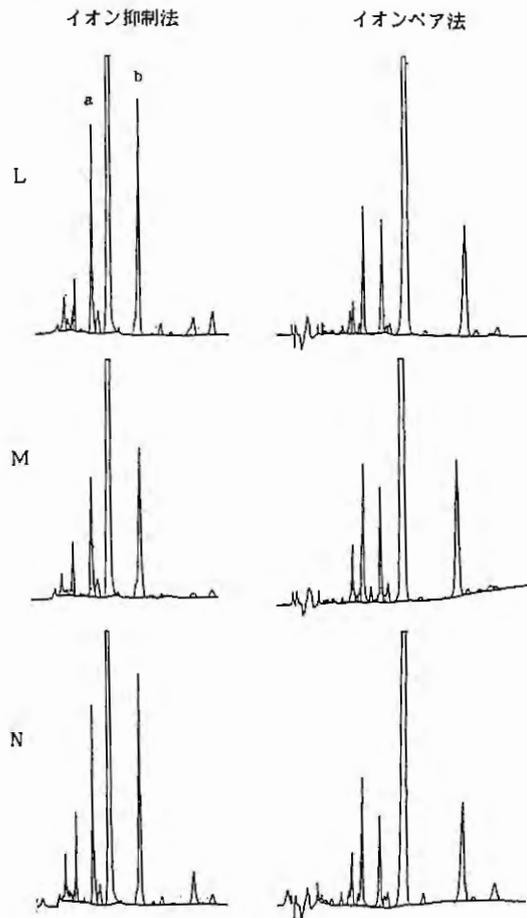


Fig. 3 製剤原料のクロマトグラム

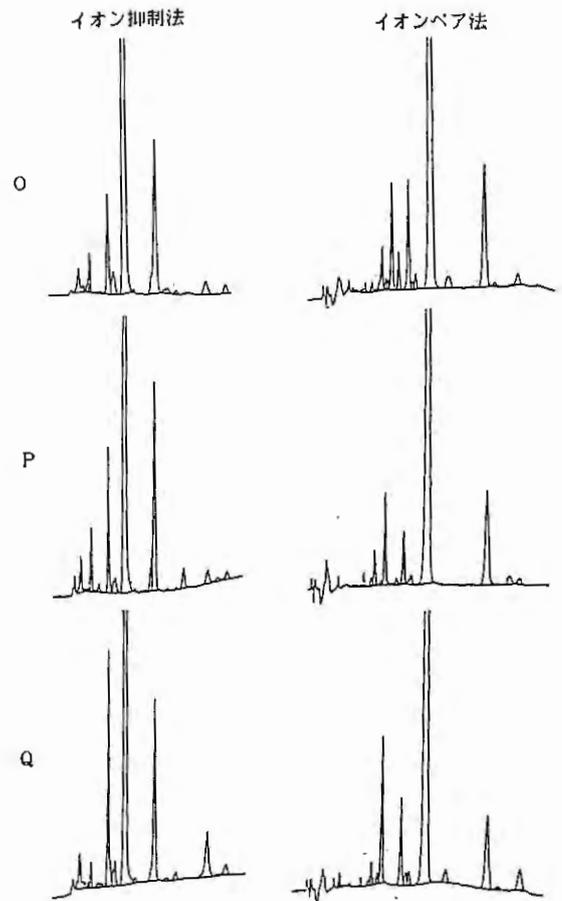


Fig. 4 試薬のクロマトグラム

- 1) 市販生薬試験用標準品の、面積百分率は I S 法では、ほぼ98%以上を示したが、I P 法では、C、Dは95%程度の値を示し、品質にばらつきを認めた。これは、I S 法では分離しないグリチルリチン酸の不純ピーク (X) が I P 法で分離し、しかもその面積が C、Dではかなり大きいためである。したがって、グリチルリチン標準品の純度を調べるときは、I S 法ばかりでなく I P 法によっても調べる必要がある。
- 2) 再結晶品及び食添試験用標準品の、面積百分率は I S 法、I P 法とも90%前後であった。これより、食添試験用標準品は再結晶品と思われる。したがって、このような再び結晶品を標準品として使用した場合、相対含量が示すように生薬試験用標準品を使用した場合より15%前後高い定量値を示すので、標準品として用いるには問題があると思われる。
- 3) 分取品の面積百分率は、I S 法では99%以上の値を示したが、I P 法では、若干低い値を示した。これは、分取条件がイオン抑制法であり分取に用いた原料が食品添加試験用標準品であるので、イオン抑制法の未分離ピーク (X) までグリチルリチンのピークとして分取した為である。したがって、より高い純度の標準品を得るためには、未分離ピーク (X) を含まない原料を選択するか、イオンペア法で分取する必要がある。
- 4) 製剤原料及び試薬の面積百分率は、I S 法、I P 法とも80%前後であった。Fig. 3 に示すように、I S 法ではグリチルリチン酸のピークの前後に大きな2本のピーク a、bが見られるが、特に後のピーク b は、再結晶標準品と比較して大きい。これは、再結晶等の精製を加えることで、グリチルリチン酸より極性の小さな不純物が主に除かれるためと思われた。そこで、相対含量 (I S 法) と b の a に対するピーク面積比の関係を調べたところ、Fig. 5 に示すように相関がみられたので、このピーク面積比は精製の度合いを示す指標となると思われる。
- 5) 面積百分率は I S 法、I P 法とも相対含量と良い相関を示した。(Fig. 6, 7)
しかし、回帰式が原点を通らず、一般に相対含量が面積百分率より低い値を示すのは、試料中にこれらの HPLC 条件では検出できないもの、例えば254nmに吸収を待たないものや溶出しないものが存在すると考えられる。よって、そのような不純物を多く含む製剤原料や試薬の純度決定に面積百分率を用いることはできないが、ここで求めた回帰式より相対含量を推定することは可能である。
- 6) 面積百分率の I S 法と I P 法の関係を調べたところ、Fig. 8 に示すように良い相関がみられ、その回帰式はほぼ原点を通った。その傾きが若干1より小さいのは、I P 法でピーク X がグリチルリチンよりを分離したためであり、また、その比率は試料全てにおいて、あまり変わらないためと考えられる。
- 7) 比吸光度と相対含量 (I S 法) の関係を Fig. 9 に示す。相関はみられたが、ばらつきが大きいので、吸光光度法を用いる定量法には問題があると思われる。

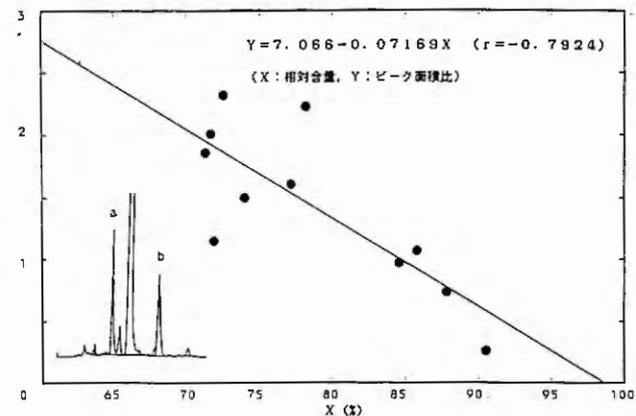


Fig. 5 相対含量 (イオン抑制法) と
ピーク面積比 (b/a) の相関

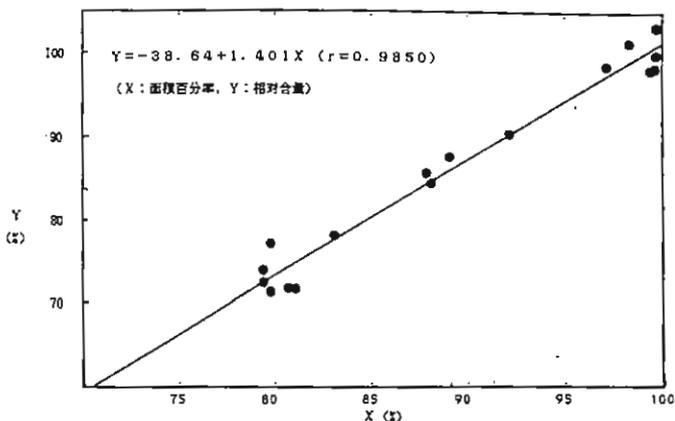


Fig. 6 面積百分率と相対含量の相関
 (イオン抑制法)

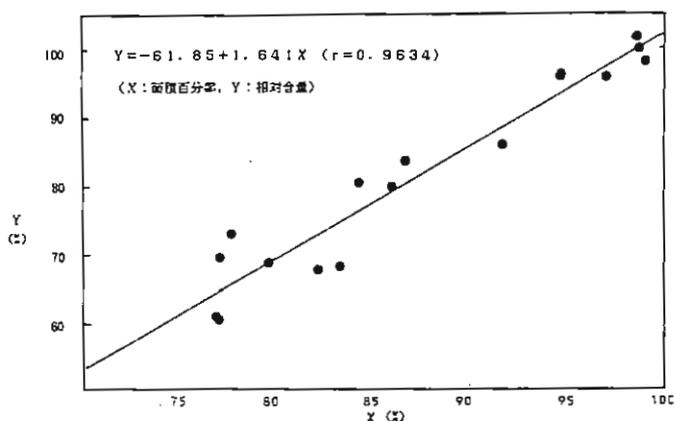


Fig. 7 面積百分率と相対含量の相関
 (イオンペア法)

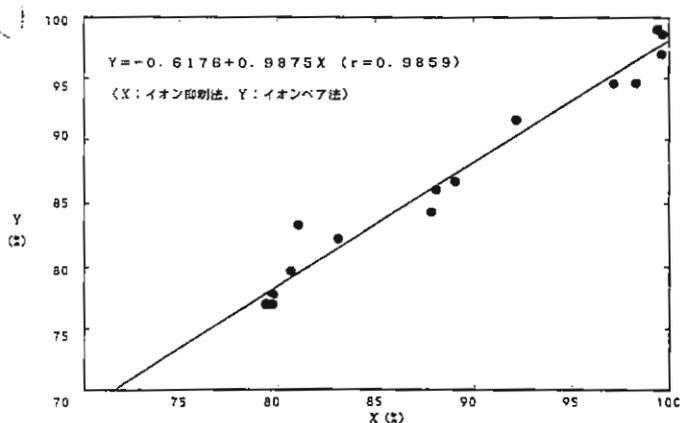


Fig. 8 イオン抑制法とイオンペア法の相関
 (面積百分率)

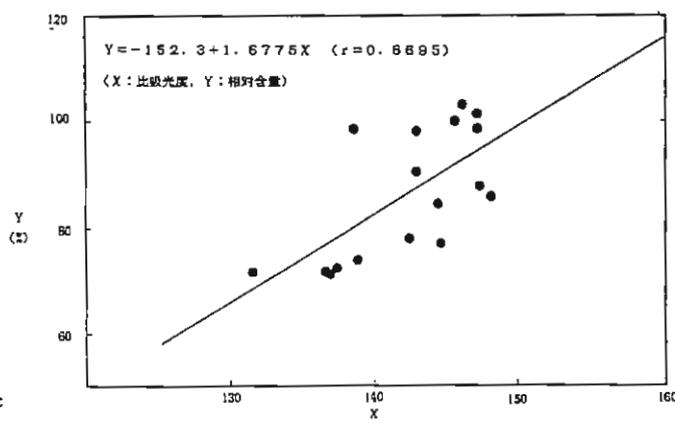


Fig. 9 比吸光度と相対含量 (イオン抑制法)
 の相関

まとめ

今回、種々の標準品や製剤原料等について、主にHPLC法で品質評価を行い、考察を加え、問題点を明らかにした。しかし、このHPLC法では検出波長が254nmという紫外外部吸収のみに頼っている等の制限もあり、必ずしも品質の全てを把握しているとは言い難い。したがって、例えば、示差屈折計や細管式電気泳動装置等、全く異なった方法を併用すれば、更に品質に関するより多くの情報が得られると考えられる。

最後に試料の一部を供与された日眼製薬(株)に深謝します。

文献

- 1) 岡田憲三, 田中 順, 宮下 晶, 井本勝恵, 薬誌, **101**, 822 (1981)
- 2) 山本恵一, 堀場聖子, 人見信之, 第14回生薬分析討論会要旨, 1985, P.50.
- 3) 相楽和彦, 伊東裕二, 大島俊幸, 村山 晋, 糸川秀治, 生薬, **40**, 77 (1986)

【原 著】

シコン及びトウキ配合 plaster 剤の薬理試験について[※]

Studies on Anti-inflammatory Effect of Sicon and Touki Plaster

木 澤 元 之 田 中 智 香 子 石 黒 文 子
Motoyuki KIZAWA Chikako TANAKA Fumiko ISHIGURO

大協薬品工業株式会社 研究開発部^{※※}

Research and Development Division, Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.

緒 言

サリチル酸メチルがラット Carrageenin 浮腫の局所適用に有意な抑制を示すことは、北川らが報告しており¹⁾、サリチル酸メチルを含有する硬膏剤が抗炎症・鎮痛効果を示すことは周知の事実²⁾³⁾である。又、シコン及びトウキについてはラット Carrageenin 浮腫及び紫外線刺激に対して軽度ではあるが抑制効果を示すことが、林らによって報告されている⁴⁾。そこで今回シコン及びトウキをサリチル酸メチル含有硬膏剤に配合する事により、この硬膏剤本来の抗炎症・鎮痛効果が相加的に増強されるのではないかと考え、このシコン及びトウキ配合硬膏剤について小動物を用い薬理実験を行ったので、その一部について報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 使用動物

本試験には、Hartley 系雄性モルモット（静岡県実験動物）及びWister/KY系雄性ラットを用いた。これらの動物は室温 $23 \pm 1^{\circ}$ 、湿度50~60%の飼育室にて1週間以上の予備飼育の後、健常な動物のみを用いた。これらの動物には固形飼料（モルモット：GM-1、ラット：MM-3、船橋農場）及び水道水を摂取させた。

2) 被験試料

本試験には、生ゴム、エステルガムに1-メントール（鈴木薄荷）、dl-カンフル（日本精華）等を含む基剤にシコン軟エキス（小城製薬）、トウキ軟エキス（小城製薬）、サリチル酸メチル（吉富製薬）を加えた。これをカレンダーロールにてスフ平織り布に 1 m^2 当り140gの厚さで均一に展延し、シリコン紙で被い plaster 剤としてこれを用いた。

3) 使用薬物

起炎薬として、 λ -Carrageenin（Picnin-A、逗子化学）、イースト（オリエンタル酵母）を用いた。

※ 第7回家庭薬開発研究会シンポジウム発表（富山、1987年11月4日）

※※ 〒939-05 富山市水橋島等字花の井173-3 TEL 0764 (78) 1122

Table. 1 配合成分表

(W/W%)

成分名	被験試料群					
	i 群	ii 群	iii 群	iv 群	v 群	vi 群
サリチル酸メチル	6.35	—	—	—	6.35	—
トウキ軟エキス	0.04	0.04	—	0.04	—	—
シコン軟エキス	0.15	0.15	0.15	—	—	—

2. 実験方法

1) 抗炎症作用¹⁾⁵⁾

(1) ラット後肢足蹠Carrageenin浮腫抑制作用

体重約120gのWister/KY系雄性ラットを1群8匹とし、右側後肢足蹠皮下に1% Carrageenin生理食塩水懸濁液0.05mlを、ウォーキングパッドの1つを通して注入し、直接薬剤を貼付した。起炎後1時間にPlethysmometer (Unicom社製, TK-101)を用いて足蹠容積を測定し、あらかじめ測定しておいた起炎前の足蹠容積に対する増加率を浮腫率として捉えた。なお、被験試料はあらかじめ足の大きさに合わせて1cm×2cmの大きさに裁断しておき、1時間毎の足蹠容積測定の直前に剝がし、測定直後に新しいものと貼り替える事とした。浮腫抑制効果については、Carrageeninの浮腫のピークであった3時間値の浮腫率で算出し、判定した。なお、実験中ラットには自製舐防止用フードをかぶせておいた。

浮腫抑制率の計算

$$\text{浮腫抑制率} = \frac{\text{無処置群の浮腫率} - \text{被験試料の浮腫率}}{\text{無処置群の浮腫率}} \times 100$$

(2) モルモット紫外線紅斑抑制作用⁶⁾⁷⁾

体重約300~350gのHartley系雄性モルモットで各群6匹、計18(3×6)部位にて実験を行った。実験前日に電気バリカンで除毛し、更に実験当日にはシェイバー(ブラウンミクロン、ブラウン社)で皮膚に傷をつけないように注意しながら完全に除毛した。この除毛部位に1cm間隔で直径8mmの3つの小穴を有するフェルトをあて、UVランプ(100V, 270W)にて16cmの距離から60秒間照射した。照射には、Unicom社製(TK-151)を使用した。被験試料(1.5cm×1.5cm)の貼付は照射1時間後とし、照射3時間及び5時間に照射部位を肉眼的に観察し、3時間目の観察終了後新たに被験試料を貼付した。紅斑の強度は下記の基準に従って判定した。その判定方法は、各時間の1匹当りの3照射部位のスコアの総和から算出した平均スコアで評価した。又、各被験試料の紅斑抑制率は、無処置群と比較して行った。なお、実験中モルモット

トは無拘束とした。

判定基準

- 0 : 全く変化が見られない
- 1 : 僅かに紅斑が見られる
- 2 : 明らかに紅斑が見られるが境界が不明瞭
- 3 : 強い紅斑で境界も明瞭

紫外線紅斑抑制率の計算

$$\text{抑制率} = \frac{\text{無処置群のスコア} - \text{被験試料群のスコア}}{\text{無処置群のスコア}} \times 100$$

2) 鎮痛作用

体重約120gのWister/KY系雄性ラットを1群9匹とし、各匹の右側後肢足蹠皮下に20%イースト生理食塩水懸濁液0.10mlをウォーキングパットの1つを通して注入した。注入後1時間してあらかじめ裁断しておいた1cm×2cmの被験試料を貼付し、3時間目の測定直後に新しいものと貼り替えることとした。起炎3及び5時間後にanalgecy-meter (Unicom社, MK-30)で炎症足の鎮痛閾値を測定し、各群の各時間後における閾値の和を注射前の閾値と比較した値を鎮痛係数とした。

鎮痛率については無処置群と比較して算出した。なお、閾値の測定についてはもがき反応もしくは足を引っ込める反応を疼痛反応とみなし、この反応を惹起するのに要した圧力をg単位で示した。

鎮痛係数の計算

$$\text{鎮痛係数} = \frac{\text{起炎後3及び5時間の刺激圧の和}}{\text{起炎前の刺激圧} \times 2}$$

鎮痛率の計算

$$\text{鎮痛率} = \frac{\text{被験試料群の鎮痛係数} - \text{無処置群の鎮痛係数}}{\text{無処置群の鎮痛係数}} \times 100$$

結 果

1) 抗炎症作用

(1) ラット足蹠Carrageenin浮腫抑制作用

Carrageeninによって惹起したラット足蹠浮腫の推移をFig. 1-1及びFig. 1-2に示した。又、この浮腫に対する3時間後の抑制率はTable. 2に示した。無処置群に比べて各被験試料適用群は、いずれも浮腫抑制傾向がみられたが、統計的に有意な浮腫の抑制がみられたのはi, v, iv, ii群の各群であった(P<0.01)。

(2) モルモット紫外線紅斑抑制作用

モルモットの3時間、5時間での紅斑強度と紅斑抑制率をTable. 4-1及びTable. 4-2に示した。紅斑の抑制はvi群を除いた各群とも無処置群に対して有意な抑制を示し(P<0.05)、なかでもi群が50.6%と強い抑制効果を示した。他の4群については約30%の抑制と同程度であった。

2) 鎮痛作用

ラット後肢炎症足を対照とした、Randall-Selitto法に基づき鎮痛効果を評価した。Fig. 2-1及びFig. 2-2に鎮痛閾値の変化を示した。又、3時間、5時間の鎮痛係数と鎮痛率をTable. 3

に示した。各群とも無処置群に対して有意な抑制効果 ($P < 0.001$) を示し、なかでも i 群が 96.78% と最も強い鎮痛効果を示した。ついでサリチル酸メチル単独配合の v 群が 78.87%，トウキ及びシコンそれぞれ単独配合は両群ともほぼ同程度の鎮痛効果であった。

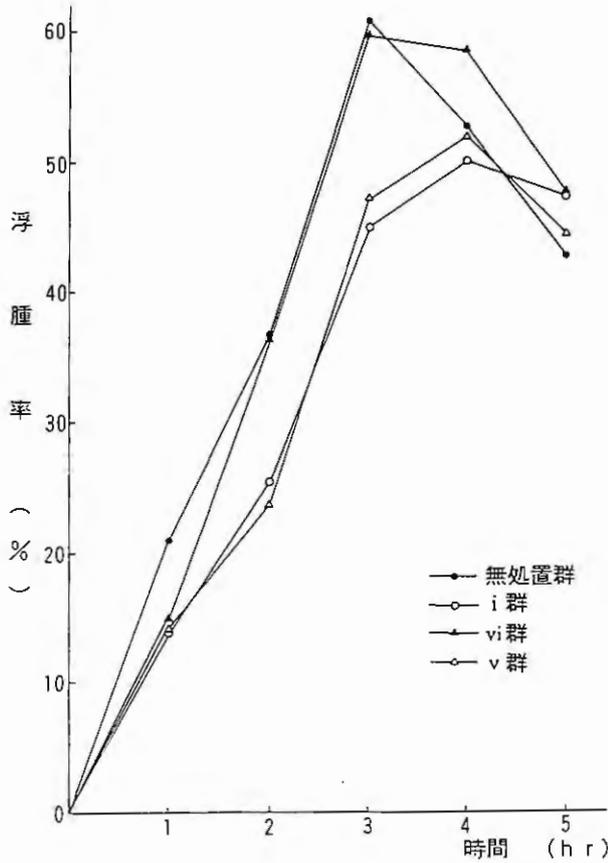


Fig. 1-1 ラット足蹠カラゲニン浮腫の変化

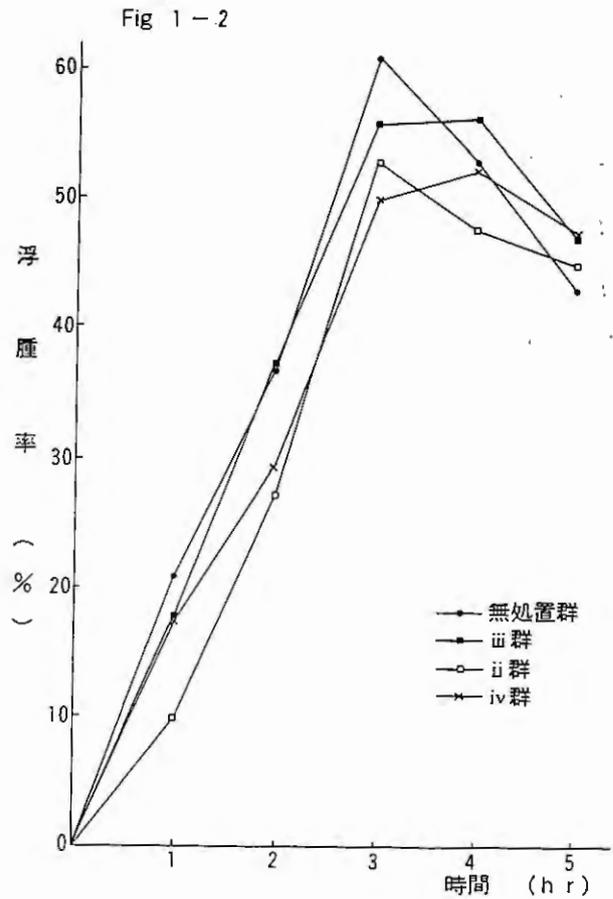


Fig. 1-2

Table. 2 ラット足蹠カラゲニン浮腫に対する浮腫率及び浮腫抑制率

群	浮腫率 (%)	浮腫抑制率 (%)
無処置群	60.82 ± 1.22	—
i 群	45.01 ± 3.63	25.99
ii 群	52.80 ± 0.92	13.19
iii 群	55.49 ± 2.29	8.76
iv 群	49.65 ± 3.65	18.37
v 群	47.28 ± 3.06	22.26
vi 群	59.66 ± 3.43	1.91

MEAN ± S. E. (n=8)

Table. 3 ラット足蹠イースト浮腫に対する鎮痛効果

群	鎮痛係数	鎮痛率 (%)
無処置群	0.497 ± 0.029	—
i 群	0.978 ± 0.031	96.78
ii 群	0.801 ± 0.020	61.17
iii 群	0.707 ± 0.028	42.25
iv 群	0.741 ± 0.024	49.09
v 群	0.889 ± 0.034	78.87
vi 群	0.583 ± 0.011	17.30

MEAN ± S. E. (n=9)

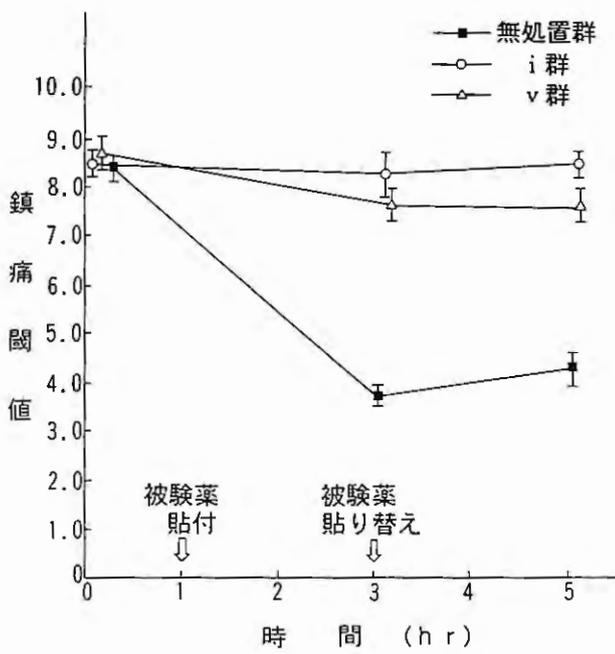


Fig. 2 - 1 鎮痛閾値の変化

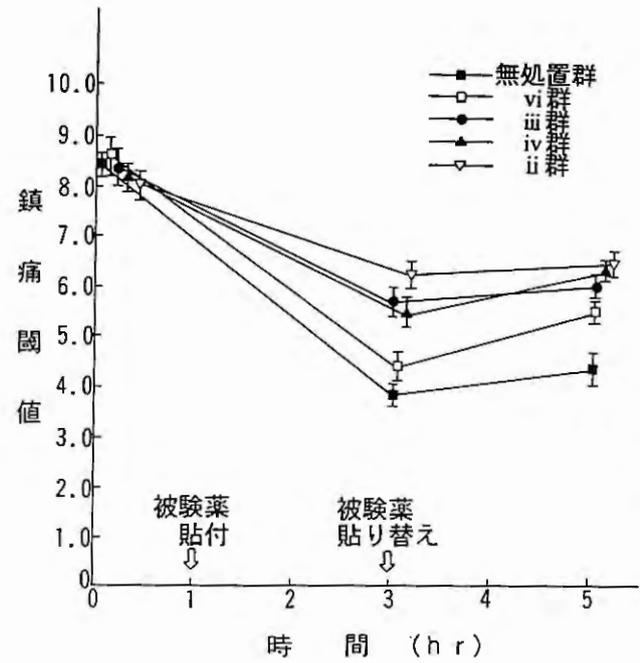


Fig. 2 - 2

Table. 4-1 モルモット紫外線紅斑に対する抑制率
3hr

	紅斑強度	紅斑抑制率
無処置群	6.00 ± 0.93	—
i 群	2.50 ± 0.56	58.33
ii 群	3.83 ± 0.83	36.17
iii 群	4.00 ± 0.37	33.33
iv 群	4.00 ± 0.45	33.33
v 群	3.67 ± 0.33	38.83
vi 群	4.50 ± 0.34	25.00

MEAN ± S. E. (n=6)

Table. 4-2 モルモット紫外線紅斑に対する抑制率
5hr

	紅斑強度	紅斑抑制率
無処置群	7.83 ± 0.48	—
i 群	4.33 ± 0.33	44.70
ii 群	5.67 ± 0.42	27.59
iii 群	5.67 ± 0.49	27.59
iv 群	6.17 ± 0.17	21.20
v 群	5.50 ± 0.22	29.76
vi 群	7.67 ± 0.49	2.04

MEAN ± S. E. (n=6)

考 察

今回、サリチル酸メチルを主剤とするプラスター剤にシコン及びトウキを加えたものについて小動物実験レベルで比較検討を行った。その結果シコン、トウキとサリチル酸メチルを全て配合したプラスター剤はラット足蹠Carrageenin浮腫及びモルモット紫外線紅斑において有意な抑制を示し、又、炎症足の鎮痛作用においては痛みの閾値の上昇がみられた。当初のねらいであったサリチル酸メチルとシコン及びトウキの相加効果は得ることができなかったものの、シコン及びトウキを配合することの意義は十分確認できた。

文 献

- 1) 北川晴雄, 斎藤晴夫, 森政雄, 田添竜一 硬膏剤の抗炎症および鎮痛作用, 応用薬理, **18**, 647-651 (1979)
- 2) Brown, Ernest W. and Scott, W.O. The absorption of methyl salicylate by the human skin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **50**, 32-48 (1934)
- 3) Birren, James, E., Schapiro, Harold B. and Miller, John H. The effect of salicylate upon pain sensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **100**, 67-71 (1950)
- 4) 林 元英 紫根および当帰の薬理学的研究 (第1報), 日薬理, **73**, 177-191 (1977)
- 5) 斎藤晴夫, 北川晴雄 成型パップ剤の薬効評価, 応用薬理, **28**, 879-884 (1984)
- 6) Tadashi Kurachi, Eiji Maki, Tomohiro Naruse, Ryuhei Iwase and Kenzaburo Tanabe Agent (2) Effect on Ultraviolet Erythema in Guinea-pigs., *Oyo Yakuri*, **17**, 233-239 (1979)
- 7) Takashi Nose, Kohei Kyuki, Kaito Tsurumi, Kenji Kawada, Hitoshi Kimure, and Akitsugu Ojima Study on the ultraviolet erythema in guinea-pigs (1)., 昭和61年度日本薬理学会発表要旨集, 1986, p.193.
- 8) 大田克美, 中尾恵哉, 北川敏一, 西村英明, 森田将義 Flufenamic acidの鎮痛・抗炎症および下熱作用, 応用薬理, **9**, 421-428 (1975)
- 9) 鈴木良雄, 伊藤幹雄, 佐野純子 パップ剤の抗炎症・鎮痛作用に関する研究, 応用薬理, **19**, 239-246 (1980)