

【原 著】

医薬品規格試験のパーソナルコンピュータ

によるデータ処理システム

Computerized Data Processing System on

Pharmaceuticals Standard Tests

江野本 加寿雄 竹内 二三雄

Kazuo ENOMOTO Fumio TAKEUCHI

株式会社広貫堂 品質管理部

Quality Control Department, Kokando Co., Ltd

正川 康明

Yasuaki MASAKAWA

研究開発部

Research Laboratory

近年、パーソナルコンピュータの普及が目覚しく、これらを利用した医薬品関連の試験に関するデータ処理システムも一部<sup>1)~3)</sup>報告されている。しかし、当社の既存の処理システムに適合するものは見当たらなかった。そこで、市販のパッケージソフトによりデータ処理システムを構築し、若干の知見が得られたので報告する。

実験の部

1. 装 置

本システムのハード構成の概要を Fig. 1 に、また、使用した機器名を Table. 1 に示した。

2. 接続方法

天秤とハンドヘルドコンピュータ HC-40 の接続はシリアルインターフェイスを用いて接続した。また、HC-40 と PC-9801 との接続は RS-232C インターフェイスを用いて接続した。

データの転送速

度は天秤と HC-40 間が 2400 bps であり、HC-40 と PC-9801 間は 1200 bps である。

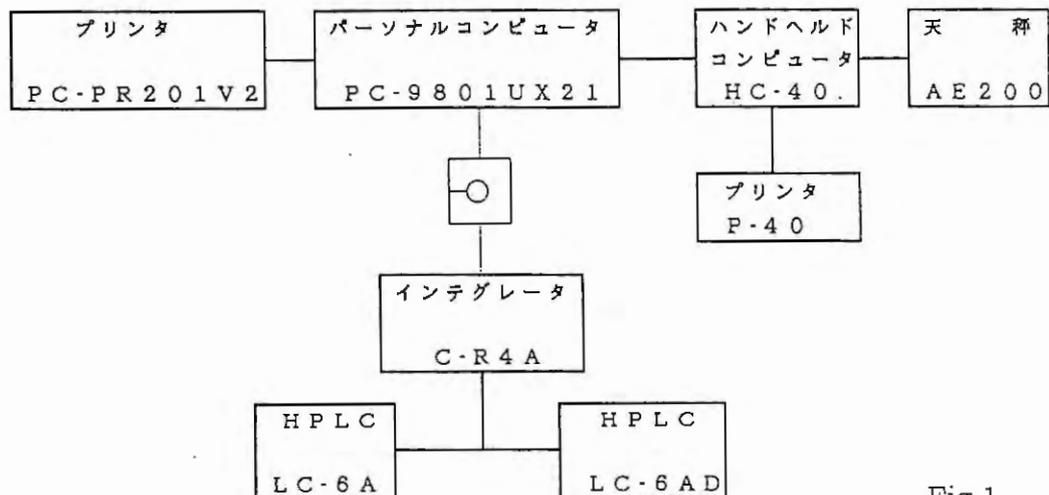


Fig.1

### 3. 使用ソフトとプログラムの作成

本システムのフローチャートをFig. 2に示した。システムの基本となるデータベースソフトは、リレーショナルデータベースソフトであるTIMS II TURBO<sup>4)</sup>を用い、また、試験成績書の印刷を行なうためのワープロソフトは一太郎<sup>5)</sup>を用いた。HPLCからのデータの授受には、C-R4A MS-DOSファイルコンバータプログラム<sup>6)</sup>を用いた。

装 置	メーカー	モデル	備 考
パーソナルコンピュータ	日本電気	PC-9801UX21	メインメモリ 640KB フロッピーディスク 2HDX2 ハードディスク 20MB RAMディスク 1.5MB
ハンドヘルドコンピュータ	エプソン	HC-40	メインメモリ 64KB (RAMディスク 26KB)
プリンタ	日本電気 エプソン	PC-PR201V2 P-40	シートフィーダ
高速液体クロマトグラフィー	島津製作所	LC-6AD	
高速液体クロマトグラフィー	島津製作所	LC-6A	
インテグレータ	島津製作所	C-R4A	フロッピーディスク 2DDX2
電子天秤	メトラ	AE-200	RS232C 脱着インターフェイス

Table.1

インテグレータC-R4A、HC-40及びPC-9801からのデータの転送用の簡単なプログラムは、それぞれBASIC<sup>7)~9)</sup>を用いて作成した。

### 4. システムの機能と運用について

システムの機能と運用についての説明図をFig 3に示した。

#### 1) 試験情報の入力

PC-9801のデータベースソフトを起動し、キー項目である製品コード<sup>1)</sup>を入力し、次にロット<sup>2)</sup>、製造量などの情報を順

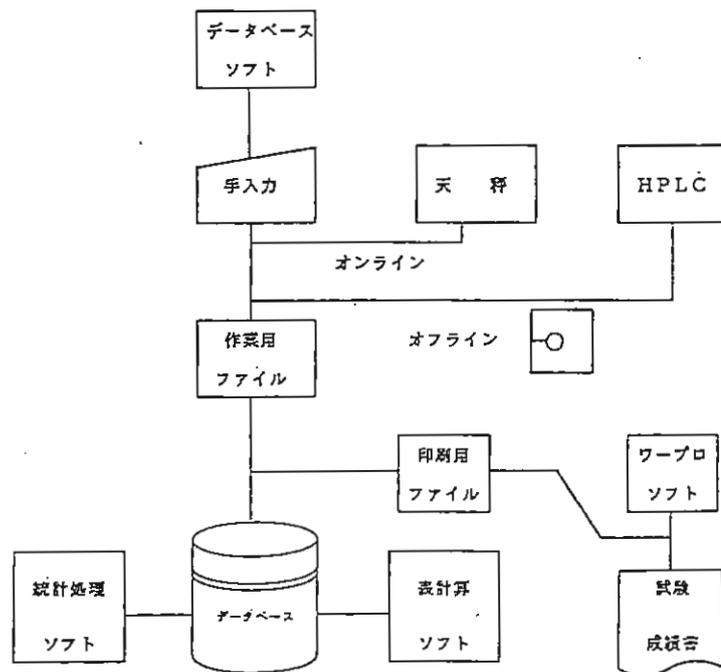


Fig.2

次入力した。入力終了後、採取量情報がHC-40に転送されるオンラインシステムとした。以後、キー項目の入力はロット<sup>2)</sup>のみで行なった。

#### 2) 天秤による標準品及び試料の秤量

電子天秤に接続したHC-40のプログラムを起動し、ロット<sup>2)</sup>を入力し、次に担務者コードを入力すると、採取すべき標準品の品名、規定採取量及び試料の規定採取量が液晶ディスプレイに表示されるので、その表示に従って採取を行なった。天秤での秤量データはHC-40のRAMディスク中のファイルに一時的に記録した。

格試験のバー

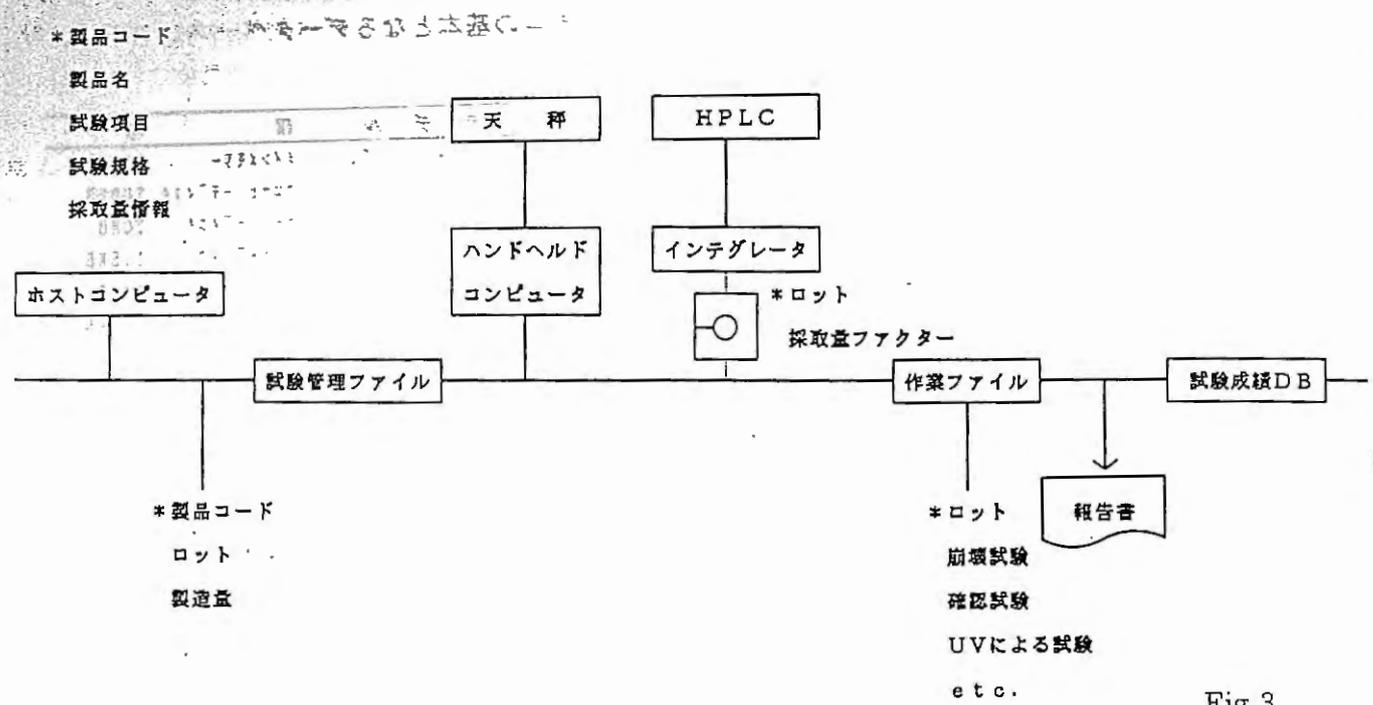


Fig.3

3) 天秤による重量偏差試験

2)と同様にロット毎、担務者コードを入力し、次にサンプル数を入力し、積み重ね方式によりサンプルの数だけ秤量を繰り返した。秤量値及び偏差等は、液晶ディスプレイに表示されるのと同時に、印字されるようにした。天秤での重量偏差データはHC-40のRAMディスク中のファイルに一時的に記録した。

4) HC-40からのデータの転送

HC-40は、2)及び3)の操作終了後、PC-9801からの命令待ち状態で待機しており、PC-9801からの指示によりHC-40のRAMディスク内に記録してある秤量データが、PC-9801の作業ファイルに転送されるシステムとした。

2)及び3)の操作を行なうときは、HC-40のストップキーを押す事によりプログラムが起動するようにした。

5) HPLCによる測定

PC-9801の作業ファイルに記録された秤量データより算出した採取量ファクターは、フロッピーディスクを介してC-R4Aに転送され、HPLC試験はその情報を基に行なった。データはフロッピーディスクを介して、PC-9801の作業ファイルに転送、記録されるようにした。

6) データの処理

PC-9801の作業ファイルに転送した各種データは、自動的に編集・統合されるようにした。

7) 自動入力化されていないデータの入力

自動入力化が困難な性状、確認試験、融点などのデータや、今回、自動入力化しなかった分光光度計等からのデータは、作業ファイル上で手入力を行なうようにした。

8) 試験結果の記録及び印刷

以上の操作により、作業ファイルに入力されたデータを、データベースファイルに記録・保管し、同時に試験項目、規格及び試験データがASCII形式で印刷用ファイルに書き込まれるようにした。

印刷は、ワードプロセッサである一太郎により、印刷用ファイルを読み込み、試験成績書を印刷するシステムとした。

## 結果及び考察

### 1. 試験情報の入力

製品コード $10$ を入力した後の試験情報の入力画面を Fig. 4 に示した。製品コードにより製品名、報告先等が自動入力され、後は、破線の部分に必要な事項を入力すれば良い事になる。

製品コード 10

製品名	かぜ薬				
報告先	製薬部	包装	課		
ロット	1	-----	報告	1	包装
ロット	2	-----	報告	2	配合
依頼年月日	-----				
製造年月日	-----				
製造量	-----				
備考	-----				

Fig.4

### 2. 標準品及び試料の秤量値

各標準品、試料の秤量値及び情報については、秤量時に HC-40 に接続しているプリンタにより印字した。その例を Fig. 5 に示した。

### 3. 重量偏差試験の測定値

Fig. 6 に重量偏差試験のデータの印字例を示した。

01771111111111111111 129\*217\*11

かせつこうすり

ロット No.	32-0100
オペレーター	INMET
-----	
アセトアミノフェン	0.0825
サリチル酸	0.0827 g
アスコルビン	0.0300
サリチル酸	0.0299 g
エテンアミン	0.2000
サリチル酸	0.2000 g
-----	
サリチル酸	1.0000
サリチル酸	1.0010 g
-----	

Fig.5

01771111111111111111 149\*307\*11

かせつこうすり

ロット No.	32-0100
オペレーター	TRIM
マシン	20
( 1 )	0.9991 g
( 2 )	0.9967 g
( 3 )	1.0017 g
( 4 )	1.0047 g
( 5 )	0.9993 g
( 6 )	0.9941 g
( 7 )	1.0003 g
( 8 )	0.9970 g
( 9 )	0.9924 g
( 10 )	0.9989 g
( 11 )	0.9909 g
( 12 )	0.9967 g
( 13 )	0.9948 g
( 14 )	0.9973 g
( 15 )	1.0011 g
( 16 )	1.0053 g
( 17 )	0.9996 g
( 18 )	0.9843 g
( 19 )	0.9959 g
( 20 )	1.0059 g
-----	
ゴウカイ	19.9560 g
* ハイキ	* 0.9979 g
アミン	0.0000 g
ヒョウジュンハン	0.0051 g
ヒョウジュンコ	0.0012 g
ハンクワイ	0.0051 g
* サイ	*(20) 1.0059 g
* サイ	*(18) 0.9843 g
レン	0.0216 g
* サイハン	*(+0.8118%)
* サイハン	*(-1.3530%)
-----	

Fig.6

4. HPLC法

Fig. 7及び8に内標準法を用いて標準品及び試料の測定を行なった例を示した。標準品の測定結果の例として、秤量値より算出されたファクターに基づき、直ちにキャリブレーションが完了する場合をFig. 7に示した。一方、試料の結果では標準品の測定で得た定量係数を用いて計算させた含量(%)が印字される場合をFig. 8に例示した。

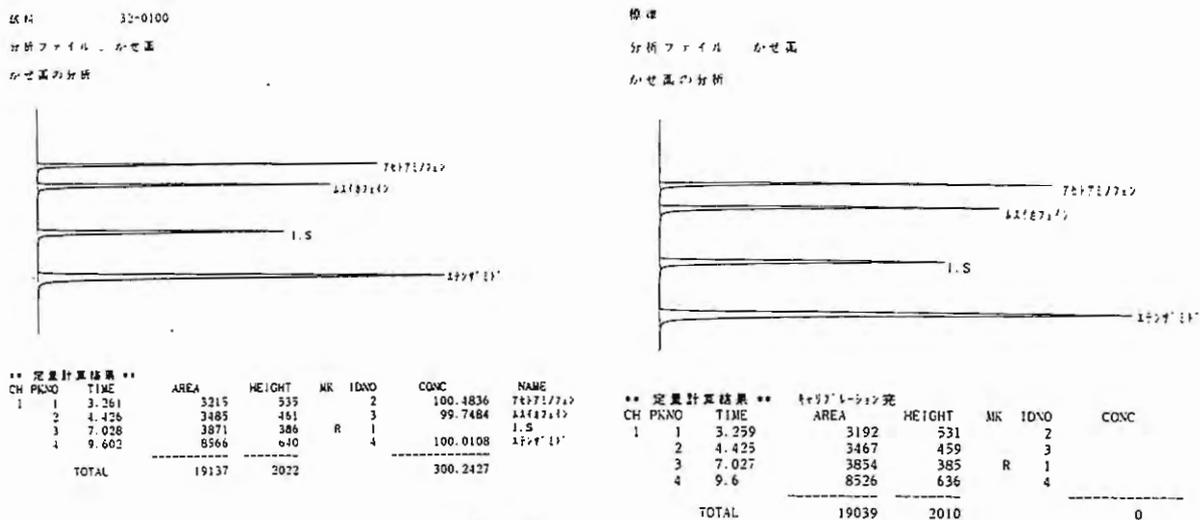


Fig.7

\*\*\* 分析用ファイル \*\*\* かぜ薬

IDNO	Name	Time	Band	Conc	Factor(1)	Factor(2)
1	1.5	7.02		1	1	
2	767717710	3.25		1.002	1.20993	
3	1.5	4.42		0.9967	1.10805	
4	1999111	9.6		1	0.451996	

Fig.8

5. 自動入力化していないデータの入力

Fig. 9に作業ファイルでの入力画面を示した。これは、ロット№. 入力後の画面であり、オンライン及びオフラインシステムにより、PC-9801に入力された重量偏差試験データ及びHPLCデータが自動入力されている。ここで、自動入力化していない試験データを入力することになるが、この例では、性状、確認試験、粒度試験のデータを入力することになる。また、データが間違っていたときは、ここで訂正ができるようにした。破線内のデータが、訂正可能な入力範囲である。

ロットNo	32-0100	コードNo	10
品名	かぜ薬	試験番号	A-11-157
報告先	製薬部 包装課	報告年月日	01年11月02日
ロット番号	包装No.32-0100	依頼年月日	01年11月02日
試験規格	承認書に依る	製造年月日	01年11月02日
担当者	江野本 八十島	製造量	100kg

試験項目	規格	試験成績
性状		適
確認試験	±8%以内	適
重量偏差		又 0.9978g
		max 1.0559g (+0.81%)
		min 0.9843g (-1.35%)
粒度試験		適
アセトアミノフェン	90~110%	100.5%
エテンザミド	"	100.0%
無水カフェイン	"	99.7%

Fig.9



【原 著】

一般用インドメタシン外用剤の製剤検討

Preparative Examination of Proprietary Indometacin Transdermal Preparations

水 上 輝 夫  
Teruo MIZUKAMI

荒 木 ゆかり  
Yukari ARAKI

藤 縄 知 昭  
Tomoeaki FUJINAWA

(株)池田模範堂 開発部  
Development Division, IKEDAMOHANDO Co., LTD

中 橋 孝  
Takashi NAKAHASHI

八十島 満 枝  
Mitsue YASOSHIMA

山 本 律 子  
Ritsuko YAMAMOTO

稲 垣 甚一郎  
Jin-ichiro INAGAKI

研究部  
Research Division

近年、強力な消炎鎮痛剤であるインドメタシンを皮膚から直接吸収させることが可能になり、医療用外用剤として開発され、昭和60年には、一般用としてスイッチされ、ゲル等が発売されている。

しかし、ゲルでは皮膚塗擦時のべたつきや、アルコールによる皮膚刺激が生じる場合がある。特に一般用の場合には、使用感が悪いと使用しなくなり、十分な治療効果が得られない場合が考えられる。

我々は、一般用の外用製剤の開発にあたり、薬理効果に優れたインドメタシンの特徴を一般薬として十分に生かすべく、使用感などにも配慮し検討を進めた。

実 験 の 部

1. 実 験 材 料

(1) 試 験 検 体

一般用インドメタシン外用剤として、当社で試作調製したクリーム、ゲル及び液を使用した。調製したクリームは、インドメタシンの微細結晶を油性成分に分散し、カルボキシビニルポリマー(ゲル化剤)を含んだ水溶性成分に配合し調製した。溶剤や界面活性剤の量を通常のクリームより減らすことで、さっぱりとして延びがよく、使用感に優れたクリームが調製できた。

また、ゲルについては、インドメタシン及び $\beta$ -メントールをエタノールと油性成分の混合液に溶解し、ゲル化して調製した。液についても、インドメタシン及び $\beta$ -メントールをエタノールと油性成分の混合液に溶解し調製した。いずれ

Table 1. 製品の有効成分(1g中の量)及びクリームの特徴

製 品	有 効 成 分	ク リー ム の 特 徴
当 社	いずれも	結晶分散型ゲルクリーム
A 社	インドメタシン 7.5 mg $\beta$ -メントール 30 mg	結晶分散型通常クリーム
B 社		結晶溶解型ゲルクリーム
C 社	インドメタシン 7.5 mg	結晶分散型ゲルクリーム
D 社	サリチル酸メチル 120 mg $\beta$ -メントール 60 mg ユーカリ油 20 mg テレピン油 15 mg	結晶溶解型通常クリーム

\* 芳香剤として、 $\beta$ -メントール 2mg を含む

の場合も、アルコールが揮散してもインドメタシンの結晶が析出しないように溶解剤を選択した。

比較対照として、一般用インドメタシン外用剤であるA社製ゲル、クリーム及び液、B社製クリーム、C社製クリーム及び液、一般用のサリチル酸メチルを主体とした外用剤であるD社製クリームを用いた。それぞれの有効成分及びクリームの特徴をTable. 1に示す。

## (2) 実験材料

起炎剤として、Carrageenin (PICNIN-A; 逗子化学研究所) 及びアジュバント〔結核死菌(青山B株)を流動パラフィンで10 mg/mlの濃度に懸濁し、オートクレーブで滅菌したもの〕(以下FCAと略す)を使用した。

## 2. 使用動物

実験に使用したラットは、室温22~24°、湿度50~65%の飼育室にて1週間以上の予備飼育の後、健全な動物のみを用いた。

## 3. 実験方法

### 1) 薬理効果

急性炎症のモデルとして、ラット打撲足浮腫試験を、慢性炎症モデルとして、ラットアジュバント関節炎試験を、また炎症部位が比較的深部である炎症モデルとして、ラットカラゲニン胸膜炎試験により薬理効果を評価した。

外用剤の経皮吸収の評価においては、皮膚表面の角質の状態が大きな影響を及ぼすため、アジュバント関節炎及び打撲足浮腫試験では検体塗擦部の除毛処理は行わず、また、カラゲニン胸膜炎においては皮膚をできるだけ損傷しないように注意を払って実施した。

#### (1) アジュバント関節炎試験

Winterらの方法<sup>1)</sup>に従って実施した。すなわち、Jcl-SD系雌性ラット(体重:172~233 g、日本クレア)を用い、FCA 0.05 mlを尾部皮内に接種し、その後13日目に右足容積が0.8 ml以上大きくなったラットを1群8匹に群分けして、実験を行なった。

クリーム、ゲルは、50 mgをガラスのへらで30 s間塗擦し、液はマイクロピペットで、0.058 ml滴下し、30 s間同様に塗擦した。検体適用後は、ラットが検体をなめるのを防止するため、プレスネット<sup>2)</sup>で被覆した。3 h後、再度検体を同様に塗擦し、プレスネット<sup>2)</sup>で被覆した。3 h後、プレスネット<sup>2)</sup>を除去し、検体を微温湯で拭取った。この操作を5日間繰返し、検体適用前及び検体適用後、1、3、5日目に足容積を測定し、(1)式より足浮腫率を求めた。

$$\text{式(1) 浮腫率(\%)} = \frac{\text{検体適用後の足容積} - \text{検体適用前(0日目)の足容積}}{\text{検体適用前の足容積(0日目)}} \times 100$$

#### (2) ラット打撲足浮腫試験

鈴木らの方法<sup>2)3)</sup>に従って実施した。すなわち、打撲浮腫惹起開始18 h前から絶食し、水のみを与えたStd Wistar/ST系雄性ラット(体重:100~126 g、静動協)を用い、右後肢に70 cmの高さから、100 gの上皿天秤用の分銅を自然落下させ、打撲足浮腫を惹起させた。

検体の適用は、

a) 50 mg 2回塗擦の場合、打撲の2 h前に右後肢の表裏に50 mg塗擦し、さらに打撲直後に同量を塗擦し、打撲2 h後に検体を微温湯で拭取った。

b) 当社クリームの塗擦量と鎮痛及び抗浮腫効果の関係を調べる場合は、12.5 mg、25 mg及び50 mg塗擦群を設定し、a)と同様に実験を行なった。

検体のなめを防止するため、打撲前はプレスネット<sup>2)</sup>で被覆し、打撲後は金網拘束を行なった。試験は、1群8匹で実施した。

打撲後、3、4及び5 h後の足容積及び平均疼痛閾値を測定し、(2)~(4)式より浮腫抑制率及び疼痛閾値上昇率を求めた。

$$\text{式(2) 浮腫率(\%)} = \frac{\text{打撲後の足容積} - \text{打撲前の足容積}}{\text{打撲前の足容積}} \times 100$$

$$\text{式(3) 浮腫抑制率(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{試験検体群の平均浮腫率}}{\text{コントロール群の平均浮腫率}} \right) \times 100$$

$$\text{式(4) 疼痛閾値上昇率(\%)} = \left( \frac{\text{試験検体群の平均疼痛閾値}}{\text{コントロール群の平均疼痛閾値}} - 1 \right) \times 100$$

### (3) ラットカラゲニン胸膜炎

鹿取<sup>4)</sup>の方法に従って実施した。すなわち、Std-Wistar/ST系雄性ラット(体重:195~225 g:静動協)の胸部を電気バリカンで除毛し、さらに電気カミソリ(ブラウン)で剃毛して用いた。1% Carrageenin 0.3 mlの右胸腔内投与の3 h前と直後に、10 cm<sup>2</sup>当り100 mgの検体を30 s間塗擦した。実験中は金網拘束下、絶食絶水とした。Carrageenin投与3 h後に開胸し、胸水量を測定し、コントロール群と比較した。

### 2) 清涼感

試験の主旨を説明し、本試験に承諾を得た成人男女ボランティア32名を対象とし、盲検法による官能試験を実施した。

試験は、各群16名で実施し、男性はこめかみ、女性は手首の左右の一方に当社クリーム、他方にA社又はC社のクリームを塗擦し、30 s、5 min、10 min後の清涼感の強さを比較した。

### 3) 安定性

それぞれの製剤3ロットについて、室温、35°、40°・75%相対湿度の条件下に保存し、経時的に、性状観察及び有効成分の含有量測定を実施した。

有効成分の定量方法は、クリーム、ゲルの場合、酢酸エチルにより有効成分を3回抽出し、液の場合は、メタノールに溶解し、それぞれについて、インドメタシンは液体クロマトグラフ法(HPLC)で、 $\beta$ -メントールはガスクロマトグラフ法(GC)によって定量した。

#### インドメタシンのHPLC条件

カラム: リクロソルブRP-18

移動相: メタノール・水・氷酢酸混液(75:25:1)

流量: インドメタシンの保持時間が約8 minになるように調整

測定波長: 270 nm

#### $\beta$ -メントールのGC条件

カラム: 20%PEG6000 クロモソルブW

キャリアガス: 窒素

流量:  $\beta$ -メントールの保持時間が約6 minになるように調整

検出器: 水素炎イオン化検出器

カラム温度: 160° 付近の一定温度

### 4) 安全性(皮膚刺激性)

試験の主旨を説明し、本試験のボランティアとなることに承諾を得た成人男子ボランティア18名を対象とし、ヒトパッチテスト試験を実施した。

試験は、クリームの場合、フィンチャンパー(大正製薬)に検体を適用し、ボランティアの背部に、

48h貼布した。対照として、白色ワセリン(ウイトコケミカル)を使用した。

ゲル、液については、検体にアルコール等を含有しているため、密封条件でのパッチテストでは、刺激性が強いと予想され、準開放条件で実施した。すなわち、アルミ皿を除去し、一文字の切れ目をつけたフィンチャンパーに口紙をのせ、それぞれの検体を適用し、ボランティアの背部に、48h貼布した。

検体除去後30min、24h及び48h後、本邦基準(Table. 2)に従って皮膚刺激反応について判定した。皮膚刺激指数は、須貝<sup>5)</sup>の提唱する(5)式の方法で算定した。

$$\text{式(5) 皮膚刺激指数} = \frac{\text{除去後の各判定時間での判定の強い方の評点の総和}}{\text{対象例数}} \times 100$$

## 結 果

### 1. 薬理効果

#### 1) ラットアジュバント関節炎

アジュバント接種19日目において、当社、A社及びC社の各製剤は、コントロール群の浮腫に対して有意な抑制効果を示した。一方、サリチル酸メチル製剤であるD社のクリームには有意な抑制効果はみられなかった。(Table. 3)

#### 2) ラット打撲足浮腫試験

##### (1) 50mg 2回塗擦

##### a) 鎮痛効果(疼痛閾値上昇率)

鎮痛効果において、試験開始後3~5hで、コントロール群の疼痛閾値は55~57gと安定した低下を示した。これに対して、当社、A社、B社及びC社の各製剤は20~30%程度の有意な疼痛閾値の上昇が認められた。一方、D社のクリームの鎮痛効果は弱く、有意な効果はみられなかった。(Table. 4)

Table 2. パッチテスト本邦基準

皮膚反応の程度	評点
反応なし	0点
軽い紅斑	0.5点
紅斑	1.0点
紅斑+浮腫	2.0点
紅斑+浮腫+丘疹~小水疱	3.0点
大水疱	4.0点

Table 3. ラットアジュバント関節炎抑制効果  
(アジュバント接種19日目のコントロールに対する抑制率)

製品	当社	A社	C社	D社
クリーム	36.1%	20.9%	30.5%	11.5%
液	23.3	29.1	-	-
ゲル	24.5	24.0	-	-

Table 4. ラット打撲足浮腫試験における鎮痛効果  
(疼痛閾値上昇率、3~5時間の平均値)

製品	当社	A社	B社	C社	D社
クリーム	30.1%	29.9%	28.1%	23.6%	7.4%
液	30.8	30.1	-	-	-
ゲル	25.0	32.6	-	-	-

##### b) 抗浮腫効果(浮腫抑制率)

抗浮腫効果においては、コントロール群では浮腫率で60~70%の安定した浮腫がみられ、これに対して、当社、A社、B社及びC社のクリーム及び液は17~28%程度の有意な抑制効果を示した。

一方、当社及びA社のゲルとD社のクリームの抗浮腫効果は弱く、有意な効果はみられなかつ

た。(Table. 5)

(2) 当社クリーム<sup>①</sup>の塗擦量と鎮痛及び抗浮腫効果

当社クリーム50mgの2回塗擦では、鎮痛及び抗浮腫効果がみられたが、25mg2回塗擦では鎮痛効果のみで、抗浮腫効果は認められず、12.5mgの2回塗擦では、両効果ともみられなかった。(Table. 6及びFig. 1)

Table 5. ラット打撲足浮腫試験における浮腫抑制率(3~5時間の平均値)

製品 製剤	当社	A社	B社	C社	D社
クリーム	28.3%	20.7%	26.1%	26.8%	8.3%
液	22.0	17.6	-	-	-
ゲル	6.0	7.8	-	-	-

Table 6. ラット打撲足浮腫試験における当社クリーム<sup>①</sup>の塗擦量と鎮痛及び抗浮腫効果

効果	クリーム塗擦量 (mg × 2回)		
	12.5	25.0	50.0
鎮痛効果 (疼痛閾値上昇率)	5.6%	19.2	29.6
抗浮腫効果 (浮腫抑制率)	-0.8	8.7	28.8

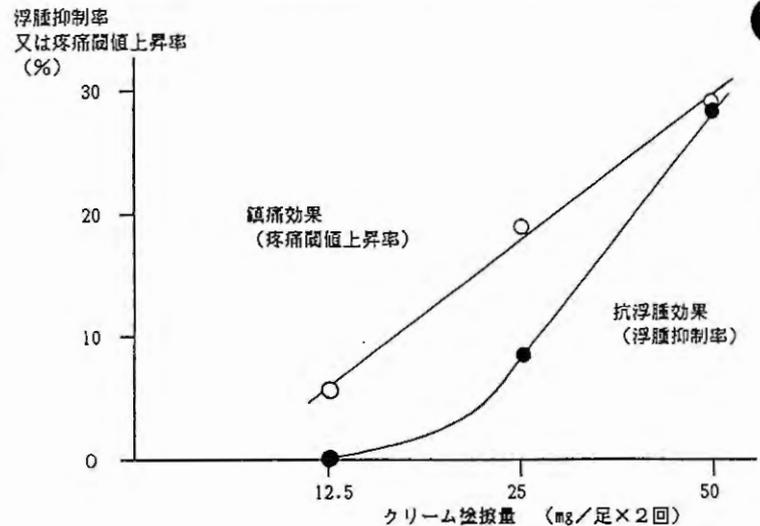
(3) ラットカラゲニン胸膜炎

当社及びA社のクリームに明らかな抗炎症作用が認められた。(Table. 7)

Table 7. ラットカラゲニン胸膜炎に対する抑制効果

検体	抑制率
当社クリーム	33.0%
A社クリーム	37.5%

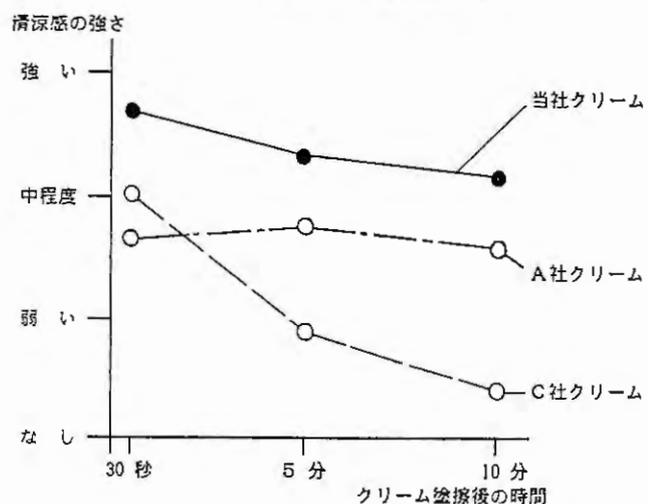
Fig. 1. ラット打撲足浮腫試験における当社クリーム<sup>①</sup>の用量反応曲線



2. 清涼感

当社のクリーム<sup>①</sup>の清涼感は、同じ処方<sup>②</sup>のインドメタシン製剤であるA社クリームに比較して強く、しかも比較的長く持続することが確認された。また、<sup>③</sup>薄荷<sup>④</sup>の含有量が少ないC社クリームは、塗擦直後の清涼感はあるが、5min、10min後の清涼感は弱いものであった。(Fig. 2)

Fig. 2. 清涼感の比較



### 3. 安定性

Table. 8 に、当社試作製剤のインドメタシンの含有量の経時変化を示した。なお、性状及びモノメントールの含有量については、変化がみられなかった。

クリームは室温保存では、ほとんどインドメタシンの含量低下がみられないが、加温条件での含量低下が比較的大きく、結晶の溶解など性状の変化の影響が考えられた。また、ゲル、液の場合は、室温及び加温条件でも含量低下がみられ、液がゲルより安定な傾向であった。

Table 8. インドメタシンの定量値 (保存開始時に対する%、3ロットの平均)

保存条件 製剤	室温 2年	35°C 8ヶ月	40°C 6ヶ月
クリーム	99.3%	95.1%	94.5%
ゲル	95.5%	-	92.5%
液	97.2%	-	94.4%

### 4. 安全性 (皮膚刺激性)

ヒトパッチテスト試験 (密封条件) では、当社クリームと A 社クリームとの刺激指数は同じで、C 社クリームの刺激指数は小さかった。(Table. 9)

ヒトパッチテスト試験 (準開放条件) では、いずれも刺激指数は低く、対照とした白色ワセリンと同程度であった。(Table. 10)

Table 9. 皮膚刺激指数 (密封条件)

	当社	A社	C社
クリーム	26.7	26.7	3.3

白色ワセリン (対照) 3.3

Table 10. 皮膚刺激指数 (準開放条件)

	当社	A社	C社
クリーム	0.0	0.0	0.0
液	0.0	6.3	3.1
ゲル	3.3	0.0	-

白色ワセリン (対照) 6.6

## 考 察

一般に、薬物の経皮吸収速度  $J$  は、角質中の薬物拡散が律速の場合、次の式で表わされる<sup>6)</sup>。

ここで、 $C_{ba}$  と  $K$  は基剤により変化し、経皮吸収を高めるよう工夫することが可能である。

$C_{ba}$  は経時的に減少するが、基剤中の薬物を懸濁型にすれば、結晶がなくなるまで、一定 (薬物の基剤中飽和濃度) に保たれる。また、薬物の基剤中での溶解度を増せば、皮膚への分配係数  $K$  は一般に減少し、逆に分配係数  $K$  を高めれば溶解度が下がる点に注意すべきである。

$$J = A \cdot C_{ba} \cdot K \cdot D_{sc} / \delta_{sc}$$

- A : 適用面積  
 $D_{sc}$  : 皮膚角質層の薬物拡散係数  
 $C_{ba}$  : 基剤中の薬物濃度  
 $\delta_{sc}$  : 角質層の厚み  
K : 分配係数 (薬物の皮膚角質層 / 基剤)

製剤検討したクリームは、基剤へのインドメタシンの過度の溶解を抑え、皮膚への分配 (係数) を大きくするため、適度な溶解性の溶解剤を配合し、溶解剤や界面活性剤の量は極力減らした<sup>7)</sup>。

また、溶解したインドメタシンとその微細結晶を共存させ、クリーム中のインドメタシン濃度が常に飽和濃度となるようにした。

結晶分散型製剤の例としては、結晶レジポアシステムで長時間にわたり安定した血中濃度を維持するという硝酸イソソルビドのテープ剤<sup>8)</sup>、ステロイドのクリームで血管収縮作用が優れるという例<sup>9)</sup>などが知

られている。

さらに、水溶性成分の含量を多くし、皮膚塗擦時の組成の変化（水溶性成分の揮散や吸収による結晶状態のインドメタシンの油相への溶解・濃縮効果）を利用し、皮膚からの吸収がより高まるよう設計した。加えて、高分子ゲル化剤を配合したゲルクリームとし、被膜形成による吸収促進効果と性状の安定性に配慮した。

以上の結果、さっぱりとして伸びがよく、使用感に優れたクリームが調製できた。

一方、ゲル、液については、アルコールが揮散してもインドメタシンの結晶が析出せず、またべとつきなど使用感にも配慮し、適度な溶解剤を選択し調製した。

これらの製剤検討より、当社のインドメタシン外用剤は、各種炎症モデルにおいて、市販の一般用インドメタシン製剤と同等かまたはそれ以上の抗炎症効果を示すことが確認され、ヒトにおいても十分な効果を示すと考えられる。

クリームの経皮吸収については、油相の量などの基剤の違いによりインドメタシンの吸収量が異なる事が報告されているが<sup>10)</sup>、今回の実験では、各社の製剤において、薬理効果に有意な差はみられなかった。しかし、ラット打撲足浮腫試験の浮腫に対する抑制効果では、クリームは著明な効果を示したのに対し、当社及び市販A社のゲルはともに、この試験条件で効果は確認できなかった。今回の試験条件でゲルの抗浮腫効果がとらえられなかった理由として、クリームに比較して、ゲルではインドメタシンを十分に溶かしすぎているため、基剤からのインドメタシンの皮膚への放出が悪く、炎症部位への吸収が不十分であったためではないかと考えられた。

清涼感の比較では、当社のクリームの清涼感は、同じ処方方のインドメタシン他剤に比較して強く、しかも比較的長く持続することが確認された。我々は先に、清涼感剤を水溶性成分の多いクリームに配合することによって、清涼感、その持続性及び使用感に優れたクリームとなることを見出しているが<sup>11)</sup>、清涼感に優れる理由として、*l*-メントールと水溶性成分の多いゲルクリームの組合せによって、*l*-メントールの経皮吸収が良くなったことと、水分の熱方散により、清涼感に対する皮膚の感受性が高まったのではないかと考えられた。

一般に、インドメタシン製剤の安定性については、ベンゾイル基の加水分解などによる含量低下が知られており、特にイオン性のゲル化剤の配合によってその分解が促進される傾向にある。当社のクリームは、ゲル化剤を配合しているが、インドメタシンの結晶分散型製剤であり、結晶が溶解しているゲル及び液に比較してインドメタシンの安定性に優れることが確認された。なお、比較的温度の高い保存状態では、組成の変化があり（結晶の一部が溶解する）、インドメタシンの分解が促進される。加速試験で、このような製剤の安定性を短期間に判断する時は、注意が必要であると考えられる。

皮膚刺激性の点では、密封条件のパッチテスト試験で、当社及びA社のクリームで比較的高い刺激指数がみられたが、C社のクリームの刺激指数が低いことを考慮すると、基剤やインドメタシンの刺激ではなく、メントールの影響と考えられた。また、準開放条件では、刺激指数は低く、この製剤が通常は密封状態で使用されることがないこと、主として健常皮膚に使用されること、皮膚刺激指数が市販品と同程度であることを考慮すると、皮膚刺激性に関して特に問題はないと考えられる。特にクリームは、アルコールを含まず、ゲル、液に比較して、より安全性が高いと考えられる。

なお、インドメタシン外用剤の副作用としては、医療外用剤の例が報告されているが<sup>12)</sup>、発現頻度は、ゲルで1.2%、液で0.9%、クリームで0.28%となっており、いずれも塗擦部の皮膚症状で、投与中止または継続中に消失すると報告されている。

以上のように、一般用インドメタシン外用剤について検討した。特にクリームは、水溶性成分の多い結晶分散型のゲルクリームとすることで、効果、安全性、品質（性状、安定性等）だけでなく、使用感の点でも満足のいく製剤となり、一般用の製剤として有用性が高いと考えられる。

## 文 献

- 1) Winter, C. A. et al: Treatment of Adjuvant arthritis rats with anti-inflammatory drugs *Arthr. and Rheum.* 9394(1966)
- 2) 鈴木良雄ほか: IM軟膏(lndomethacin  $\ell$ -menthol 軟膏)の抗炎症・鎮痛効果、応用薬理、24(4)、585(1982)
- 3) 鈴木良雄ほか: Salicylic acid ester 含有パップ剤の薬理学的研究、応用薬理、31(3)、567(1986)
- 4) M. KATORI et al: A Possible Role of Prostaglandins and Bradykinin as a Trigger of Exudation in Carrageenin-Induced Rat Pleurisy, *Agents Actions*, 8, 108(1978)
- 5) 須貝哲郎: 接触皮膚炎とパッチテスト、皮膚、19(2)、210(1977)
- 6) 中野真汎ほか: ドラッグデリバリーシステム -現状と将来- 南山堂(1986) p. 78
- 7) 消炎鎮痛クリーム剤: 公開技法 88-4305号公報(発明協会)
- 8) フランドル<sup>®</sup>テープS Drug Information、トーアエイヨー株式会社
- 9) ステロイドクリーム剤: 公開特許公報 昭62-238216号公報
- 10) 上出良一ほか: インドメタシンクリームの経皮吸収について、*Therapeutic Research*, 7(10)、363(1989)
- 11) 清涼感持続クリーム剤: 公開技法 88-5305号公報(発明協会)
- 12) 医療薬 日本医薬品集: 薬業時報社 (1989) p. 149

【原 著】

六神丸の強心作用とその評価法に関する研究

文

—ラット摘出心房筋に対する作用—

Evaluation of Cardiotoxic Action of Rokusingan

— Effects of Rokusingan on isolated atrial preparation of rat —

富山県薬事研究会 生物部会

Division of Pharmacology, Toyama Pharmaceutical Research Association

上川 浩 ( 広貫堂 )

Hiroshi KAMIKAWA

寺崎正之 ( 中新薬業 )

Masayuki TERASAKI

篠原達雄 ( 大東交易 )

Tatsuo SHINOHARA

森田次郎 ( 養命製薬 )

Jiro MORITA

山本隆二 ( 第一薬品工業 )

Ryuji YAMAMOTO

松原利行 ( 薬事研究所 )

Toshiyuki MATSUBARA

緒 言

薬事研究会生物部会では、初年度の研究課題として富山県の代表的家庭薬である生薬強心剤の六神丸を取り上げ、六神丸製剤としての薬効薬理試験を行なった。すなわち、効能効果である動悸・息切れ・気付けが強心作用に関連すると考えられるので、その薬理学的裏付けをとることを目的に、常道に従い、まずラット摘出心房筋標本を用いて収縮力および拍動数に対する影響を調べる *in vitro* の実験から着手した。

また、本実験を行うにあたり、最近センソの薬理実験を種々行いにつけて *adrenaline* の存在を十分考慮にいれなければ実験結果を評価できないことが明らかとなったことから、六神丸の強心作用について *adrenaline* と *bufosteroid* の量的関係を十分見極めることも目的とした。

実験材料

1. 被 験 薬

六神丸は養命製薬において製剤化 ( 練合・製丸 ) をしたものをを用いた。使用した六神丸の組成および製剤量は表1に示す通りであった。また、六神丸の製剤に用いたそれぞれの生薬も別個に用意した。

2. 実 験 動 物

Wistar系雄性ラット ( 8週齢 ) を三協ラボサービス ( 株 ) より購入し、一週間以上予備飼育した後実験に使用した。

3. 使用 試 薬

上記生薬以外に、L-*adrenaline bitartrate* ( 東京化成 )、*bufalin* ( シグマ )、*cinobufagin* ( シグマ )、*carboxymethyl cellulose sodium salt* ( 以下CMCと略す )、*dimethyl sulfoxide* ( 以下DMSOと略す )、*sodium chloride*、*potassium chloride*、*calcium chloride · 2H<sub>2</sub>O*、*potassium dihydrogen-phosphate*、*magnesium sulfate · 7H<sub>2</sub>O*、*sodium bicarbonate*、*dextrose*、

表1 試験に用いた六神丸 ( 標準 ) の組成

生 薬 名	4 種中の組成	製剤量
センソ	5 mg	25 g
ユウタン	3 mg	15 g
ゴオウ	2 mg	10 g
ジンコウ	2 mg	10 g
ニンジン	3 mg	15 g
ジャコウ	1 mg	5 g
寒梅粉	3.05 mg	15.25 g
合計	19.05 mg	95.25 g

六神丸1粒の重量 4.76 mg

anhydrous (以上和光純薬) の各試薬を購入し実験に用いた。

#### 4. 被験薬液の調製

六神丸および構成生薬は 0.1% CMC に懸濁し、超音波処理により均一な懸濁液を調製した。また、bufalin および cinobufagin に関しては DMSO に溶解した。

### 実験方法

#### 1. 六神丸に含有される各成分の定量

##### 1) センソおよび六神丸に含まれる adrenaline の定量

センソ約 10 mg を蒸留水に懸濁し、超音波処理 (ヤマト、Branson 321) を 10 分間したのち全量を 50 ml とした。遠心分離により得られた上澄液を、0.5  $\mu$  のフィルターを過し試料溶液とした。六神丸は、8 粒を秤量し同様に操作し試料溶液を調製した。酒石酸水素 L-adrenaline は水に溶解し標準溶液とした。標準溶液および試料溶液について、以下に示す HPLC 条件で蛍光吸収を用いて adrenaline 量を測定した。

カラム: AQ-312 (山村化学研究所)  $\phi 6 \times 150$  mm

移動相: リン酸緩衝液、pH 3.0 (0.1 M sodium dihydrogenphosphate, 0.1 M EDTA-2Na)

流量: 1 ml/min

カラム温度: 40 °C

検出器: FL (Ex 285 nm, Em 305 nm)

サンプル量: 20  $\mu$ l

##### 2) センソ中の bufosteroids の定量

センソを粉末 (約 100 メッシュ) とし、その約 120 mg を精秤した。これに 60 ml の水・アセトニトリル混液 (1:1) を加えるとともに、内部標準溶液 20 ml も正確に加えた。この懸濁液を超音波で 10 分間処理したのち、水・アセトニトリル混液 (1:1) を加えて正確に 100 ml とし、遠心分離後、上澄液を試料溶液とした。標準溶液および試料溶液の 20  $\mu$ l ずつをマイクロシリンジを用いて量り、日局一般試験法の液体クロマトグラフ法の内部標準法により bufosteroids の定量を行った。また、内部標準溶液は、フラボン (和光純薬、特級) の 30 mg を正確に秤量し、水・アセトニトリル混液 (1:1) を加えて正確に 1.000 ml としたものをを用いた。なお、HPLC 条件は以下の通りである。

移動相: 希釈リン酸 (1→1000) ・アセトニトリル混液 (60:40) で 1.000 ml とした溶液

流量: resibufogenin の保持時間が約 8 分になるように調整した

カラム温度: 約 40 °C

検出器: 紫外線吸収光度計 (300 nm)

カラム: 内径 4~6 mm、長さ 15~25 cm のステンレス管に 3~10  $\mu$ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填した。但し、標準溶液 20  $\mu$ l につき、上記の条件で操作するとき、bufalin、cinobufagin、resibufogenin およびフラボンの順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離するものを用いた。

##### 3) ジャコウ中の muscone および C<sub>19</sub> ステロイド類の定量

muscone および C<sub>19</sub> ステロイド類の定量は、TLC 展開後にガスクロマトグラフ法を用いる久保らの方法<sup>1)</sup>により行った。

4) ユウタン中のコール酸類の定量

ユウタンおよび標準コール酸を精秤し、メタノール10mlを加え10分間攪拌し遠心分離した。得られた上層の1mlを分取し溶媒を留去した。残留物に水0.2ml、水酸化カリウム0.8gおよびエチレングリコール1mlを加え、200℃で30分間加熱した。冷後、水1mlおよび6N塩酸試液2mlを加え、さらにエーテル・クロロホルム混液(2:1)4mlを加え10分間振り混ぜた。遠心分離後、上層2mlを分取し、溶媒を留去した。残留物に、トリエチルアミン・アセトニトリル溶液1mlを加えて80℃で1時間加熱した。冷後、内部標準(アセナフテン)溶液1mlを加えて試料溶液とした。上記の操作により得られた試料溶液10μlについてHPLC法によりユウタン中の各コール酸量を定量した。

2. 摘出心房筋に対する各種薬物の作用

ラットの頭部を強打失神させ、素早く心臓を摘出したのち、左右の心房を心筋から分離し、95%酸素+5%炭酸ガスを通気したKrebs-Henseleit液(37±0.5℃、組成 NaCl 118mM、KCl 4.7mM、CaCl<sub>2</sub> 2.55mM、MgSO<sub>4</sub> 1.18mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18mM、NaHCO<sub>3</sub> 24.88mM、グルコース 1.1mM)の30mlを満たしたorgan bath中に懸垂した。心房筋の両端にセルフインをつけ、一方を固定し、他方をisometric transducer(日本光電、TB-652T)に接続し、収縮張力を歪み圧力用アンプ(日本光電、EF-601G)を介してisometricに熱書ペンレコーダーに描記した。さらに、歪み圧力用アンプの出力を瞬時心拍計(日本光電、AT-601G)に入力し拍動数も同時に記録した。標本には約0.5gの負荷をかけ安定した後実験に供した。薬物は、溶媒投与後累積的に投与した。

実験結果

1. 六神丸に含有される各成分量(表2)

1) 六神丸およびセンソ中のadrenaline含量

adrenalineの含量は、六神丸では0.34%、センソでは1.28%であった。

2) センソ中のbufosteroidsの含量

センソ中のbufosteroidsは、bufalin 1.87%、cinobufagin 4.69%、resibufogenin 2.91%であり、合計9.47%であった。

3) ジャコウ中のmusconeおよびC<sub>19</sub>ステロイド類の含量

ジャコウ中のmusconeは3.24%、5α-androstane-3,17-dione(α体)が0.259%、5β-androstane-3,17-dione(β体)が0.141%、androst-4-ene-3,17-dione(エノン体)が0.283%含まれていた。

4) ユウタン中のコール酸類の含量

ursodesoxycholic acidが57.35%、chenodeoxycholic acidが3.65%であった。

表2 六神丸および構成生薬の成分含量

被験体	六神丸1粒中 (4.76mg)含量	成分	含量(%)
六神丸	-	アドレナリン	0.34
センソ	1.25mg	アドレナリン	1.28
センソ	1.25mg	ブファリン	1.87
センソ	1.25mg	シノブファギン	4.69
センソ	1.25mg	レジブフォゲニン	2.91
ジャコウ	0.25mg	ムスコン	3.24
ジャコウ	0.25mg	α体 <sup>a)</sup>	0.259
ジャコウ	0.25mg	β体 <sup>b)</sup>	0.141
ジャコウ	0.25mg	エノン体 <sup>c)</sup>	0.283
ユウタン	0.75mg	ウルソデオキシコール酸	57.35
ユウタン	0.75mg	ケノデオキシコール酸	3.65

a) 5α-androstane-3,17-dione

b) 5β-androstane-3,17-dione

c) androst-4-ene-3,17-dione

2. 摘出心房筋の収縮張力および拍動数に対する各種薬物の作用

1) 六神丸

六神丸は  $1 \times 10^{-5}$  粒/ml の濃度から用量依存的に収縮力の増加が認められ、 $1 \times 10^{-2}$  粒/ml で最大反応を示した (図1)。また、 $3 \times 10^{-5}$  粒/ml の濃度から拍動数の増加が用量依存的に認められ、 $3 \times 10^{-2}$  粒/ml で最大反応が得られた (図1)。陽性変時作用の発現濃度は変力作用より高濃度であった。六神丸の陽性変力作用および陽性変時作用を図2に例示した。

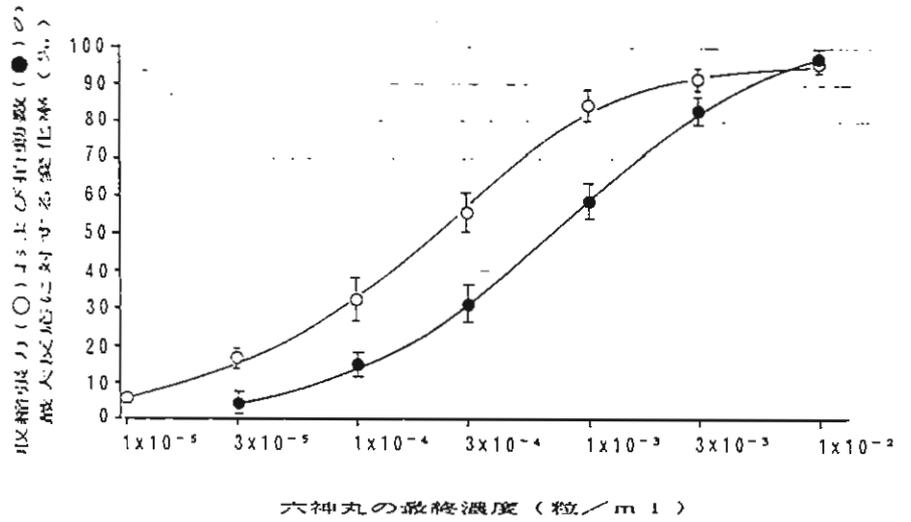


図1 ラット摘出心房筋における六神丸の陽性変力作用および陽性変時作用の用量反応曲線  
 図中の各点は15例の平均値±SEを示す。

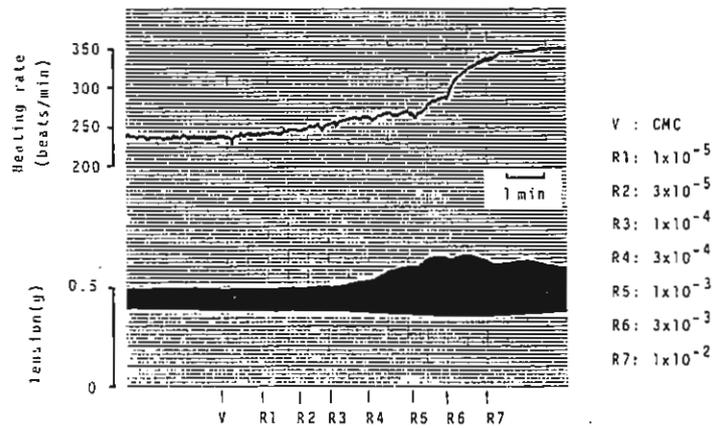


図2 六神丸のラット摘出心房筋標本に対する影響  
 六神丸のマグナス管内最終濃度は [粒/ml] で示した。

2) センソ

センソは六神丸に対応する量として  $1 \times 10^{-5}$  粒/ml の濃度から用量依存的に収縮力の増加が認められ、 $1 \times 10^{-2}$  粒/ml で最大反応を示した (図3)。また、 $3 \times 10^{-5}$  粒/ml の濃度から拍動数の増加が用量依存的に認められ、 $3 \times 10^{-2}$  粒/ml で最大反応が得られた (図3)。センソの陽性変力作用の用量反応曲線は六神丸のものとはほぼ一致した。

収縮力(○)および拍動数(●)の最大反応に対する変化率(%)

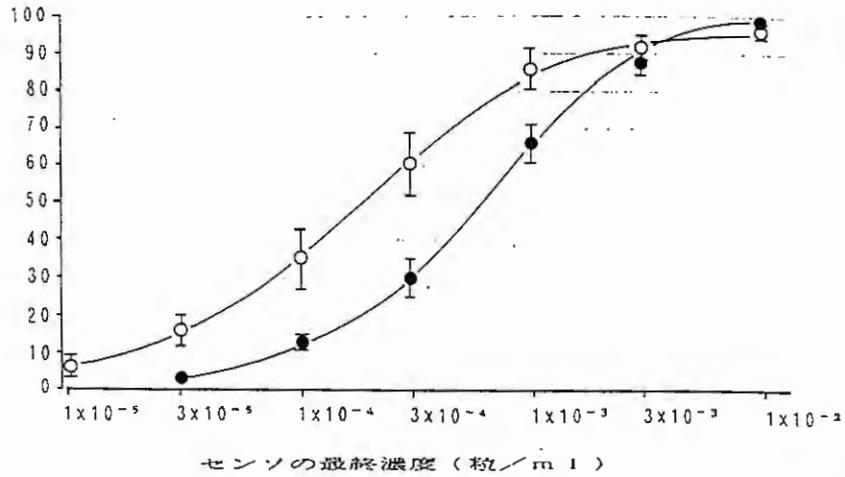


図3 ラット摘出心房筋におけるセンソの陽性変力作用および陽性変時作用の用量反応曲線  
 図中の各点は13例の平均値±SEを示す。  
 センソのマグネス管内最終濃度は相当する六神丸の粒/mlで示した。

3) センソを除く5種類の六神丸構成生薬混合物(五神丸と呼称する)

五神丸は、六神丸に対応する量として  $1 \times 10^{-1}$  粒/ml の濃度においても収縮力および拍動数にほとんど影響を及ぼさなかった (図4)。

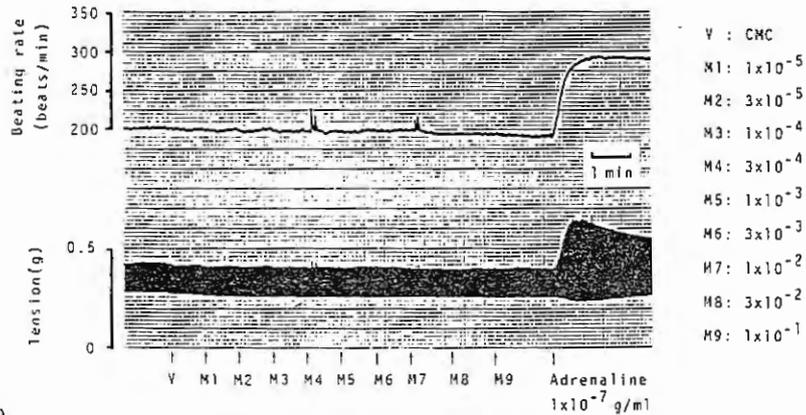


図4 センソを除く五種類の六神丸構成生薬混合物(ゴオウ、ジャコウ、ユウタン、ニンジン、ジンコウ)のラット摘出心房筋標本に対する影響  
 生薬混合物のマグネス管内最終濃度は相当する六神丸の[粒/ml]で示した。

4) adrenaline

adrenalineは  $3 \times 10^{-10}$  g/ml (六神丸換算量  $1.87 \times 10^{-5}$  粒/ml) の濃度から用量依存的に収縮力の増加が認められ、 $1 \times 10^{-7}$  g/ml (六神丸換算量  $6.17 \times 10^{-3}$  粒/ml) で最大反応を示した。また、 $3 \times 10^{-9}$  g/ml (六神丸換算量  $1.87 \times 10^{-4}$  粒/ml) の濃度から拍動数の増加が用量依存的に認められ、 $3 \times 10^{-7}$  g/ml (六神丸換算量  $1.87 \times 10^{-2}$  粒/ml) で最大反応が得られた。

adrenalineの陽性変力作用および陽性変時作用の1例を図5に示すと共に、六神

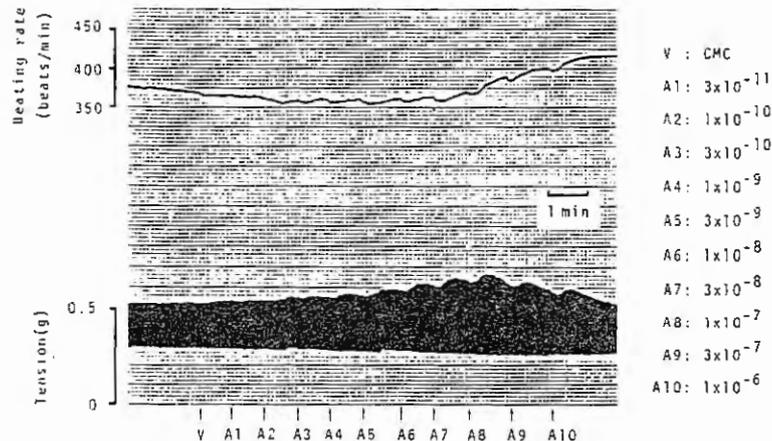


図5 adrenalineのラット摘出心房筋標本に対する影響  
 adrenalineのマグネス管内最終濃度は[g/ml]で示した。

丸相当量に換算した陽性変力作用および陽性変時作用の用量反応曲線を六神丸およびセンソと併せて図6および図7にそれぞれ示した。adrenalineの陽性変力作用の用量反応曲線は六神丸のものとはほぼ一致したが、変時作用については六神丸より若干右にシフトする傾向があったが有意差はなかった。

5) bufalin

bufalinは  $1 \times 10^{-5}$  g/ml (六神丸換算量  $4.27 \times 10^{-1}$  粒/ml) の濃度から用量依存的に収縮力の増加が認められ、栄養液が著明に白濁する  $1 \times 10^{-4}$  g/ml (六神丸換算量 4.27 粒/ml) で最大反応を示したのち停止した(図8)。また、 $1 \times 10^{-6}$  g/ml (六神丸換算量  $4.27 \times 10^{-2}$  粒/ml) の濃度から拍動数の減少が用量依存的に認められた。

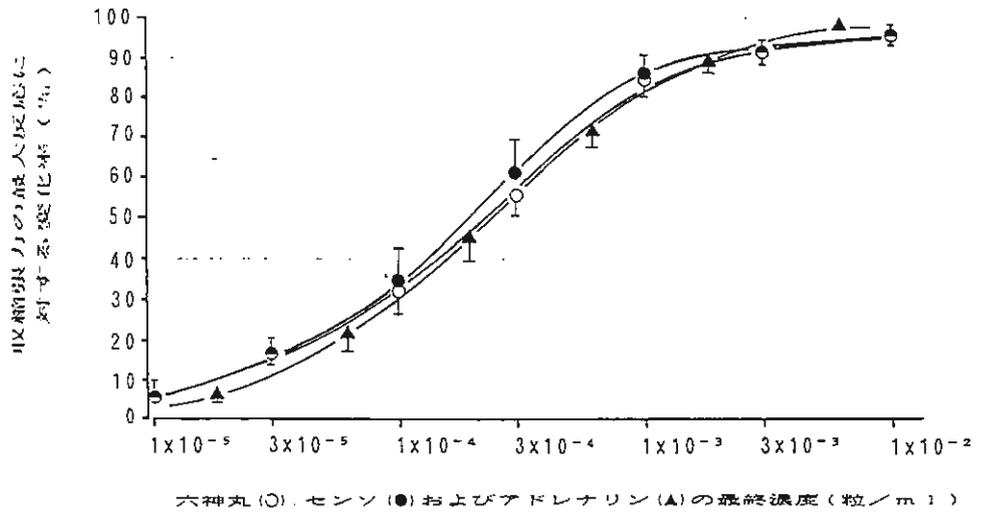


図6 ラット摘出心房筋におけるadrenalineの陽性変力作用の用量反応曲線および六神丸、センソとの比較  
 図中の各点は、アドレナリン12例、六神丸15例、センソ13例の平均値±SEを示す。

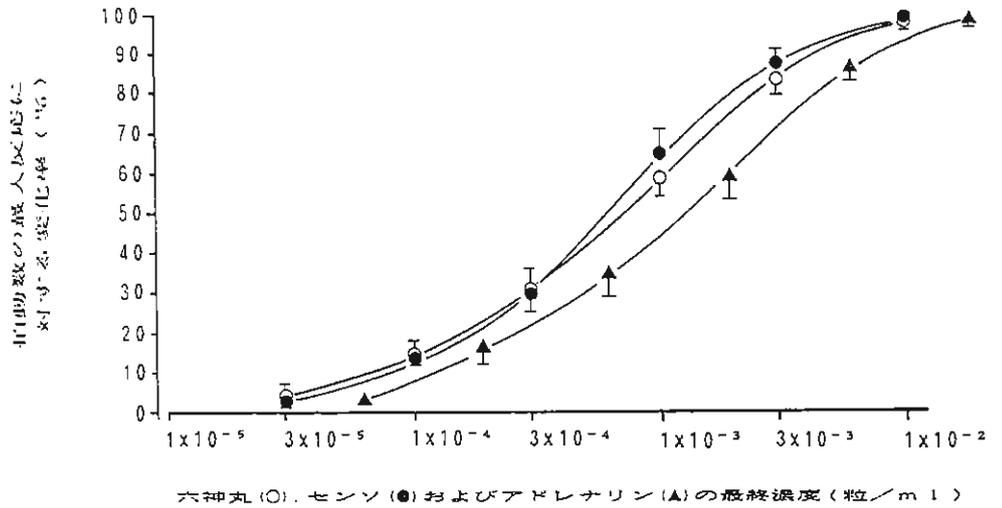


図7 ラット摘出心房筋におけるadrenalineの陽性変時作用の用量反応曲線および六神丸、センソとの比較  
 図中の各点は、アドレナリン12例、六神丸15例、センソ13例の平均値±SEを示す。

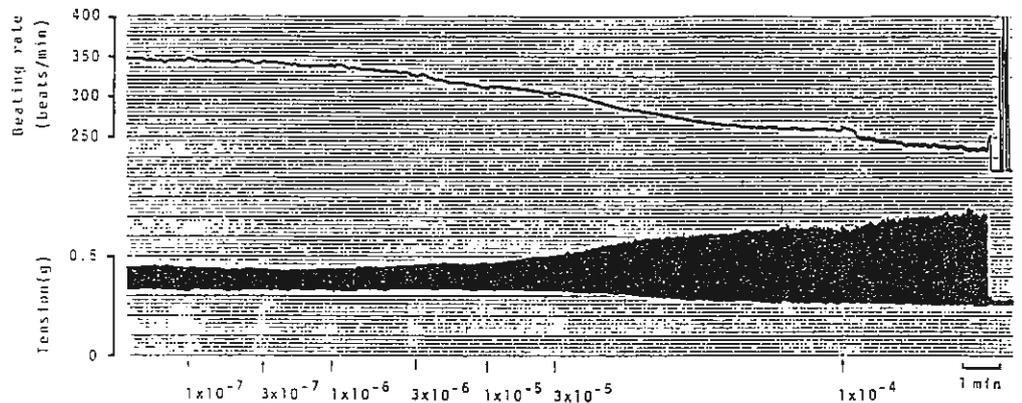


図8 bufalinのラット摘出心房筋標本に対する影響  
 bufalinのマグナス管内最終濃度は [g/ml] で示した。

6) cinobufagin  
 cinobufagin  
 は  $3 \times 10^{-6}$  g/ml  
 (六神丸換算量  
 $5.12 \times 10^{-2}$  粒/ml)  
 の濃度から用量依存的  
 に収縮力の増加が認め  
 られ、 $3 \times 10^{-5}$  g/  
 ml (六神丸換算量  
 $5.12 \times 10^{-1}$  粒/ml)  
 で最大反応を示したの  
 ち停止した(図9)。  
 また、 $3 \times 10^{-7}$  g/  
 ml (六神丸換算量  
 $5.12 \times 10^{-3}$  粒/ml)

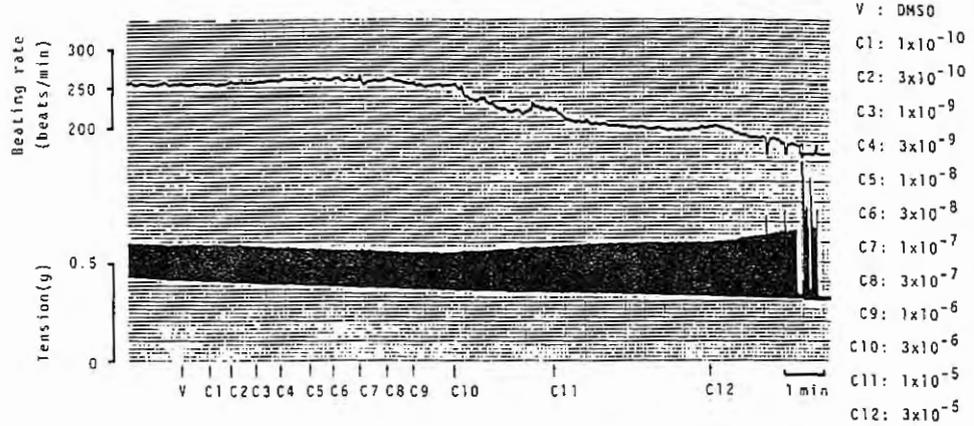


図9 cinobufaginのラット摘出心房筋標本に対する影響  
 cinobufaginのマグネシウム管内最終濃度は [g/ml] で示した。

の濃度から拍動数の減少が用量依存的に認められた。

3. 六神丸および構成生薬・成分のラット摘出心房筋における陽性変力作用と陽性変時作用のED<sub>50</sub>  
 Litchfield and

Wilcoxonの方法<sup>2)</sup>によりED<sub>50</sub>を求め、それぞれの値を六神丸に換算して表3に示した。陽性変力作用において、六神丸が  $2.21 \times 10^{-4}$  粒/ml (95%信頼限界: 1.05-4.64)、センソが  $1.70 \times 10^{-4}$  粒/ml (95%信頼限界: 0.81-3.57)、adrenalineが  $2.35 \times 10^{-4}$  粒/ml (95%信頼限界: 1.12-4.94)であり、センソおよびadrenalineのいずれも六神丸と有意差はなかった (P < 0.05)。また、陽

表3 六神丸および構成生薬・成分のラット摘出心房筋標本における陽性変力作用および陽性変時作用のED<sub>50</sub><sup>a)</sup>

被験体	陽性変力作用のED <sub>50</sub> (95%信頼限界)	六神丸との 有意差の有無 <sup>b)</sup>	陽性変時作用のED <sub>50</sub> (95%信頼限界)	六神丸との 有意差の有無 <sup>b)</sup>
六神丸	$2.21 \times 10^{-4}$ 粒/ml (1.05-4.64)		$6.25 \times 10^{-4}$ 粒/ml (3.21-12.2)	
センソ <sup>c)</sup>	$1.70 \times 10^{-4}$ 粒/ml (0.81-3.57)	有意差なし	$5.70 \times 10^{-4}$ 粒/ml (2.65-12.2)	有意差なし
センソを除く五種類の 構成生薬 <sup>c,d)</sup>	作用なし [ $\leq 1 \times 10^{-1}$ 粒/ml]		作用なし [ $\leq 1 \times 10^{-1}$ 粒/ml]	
アドレナリン <sup>c)</sup>	$2.35 \times 10^{-4}$ 粒/ml (1.12-4.94)	有意差なし	$1.15 \times 10^{-3}$ 粒/ml (0.44-2.99)	有意差なし
ブファリン <sup>c)</sup>	$> 1 \times 10^{-1}$ 粒/ml		陰性変時作用 [ $> 1 \times 10^{-2}$ 粒/ml]	
シノブファギン <sup>c)</sup>	$> 1 \times 10^{-2}$ 粒/ml		陰性変時作用 [ $> 1 \times 10^{-3}$ 粒/ml]	

a) ED<sub>50</sub>の算出および有意差検定はLitchfield and Wilcoxon(1949)の方法を用いた。

b) 六神丸群と有意差なし (P < 0.05)。

c) 六神丸に含有される量から六神丸の濃度に換算した。

六神丸1粒中に含有される量: センソ 1.25mg, アドレナリン  $1.62 \times 10^{-5}$ g, ブファリン  $2.34 \times 10^{-5}$ g, シノブファギン  $5.86 \times 10^{-5}$ g。

d) ゴオウ、ジャコウ、ユウタン、ニンジン、ジンゴウの混合物。

参考文献 Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F.: J. Pharmacol. Exp. Therap., 96, 99, 1949.

性変時作用においては、六神丸が  $6.25 \times 10^{-4}$  粒/ml (95%信頼限界: 3.21-12.2)、センソが  $5.70 \times 10^{-4}$  粒/ml (95%信頼限界: 2.65-12.2)、adrenalineが  $1.15 \times 10^{-3}$  粒/ml (95%信頼限界: 0.44-2.99)であり、adrenalineのED<sub>50</sub>値が若干大きかったがセンソと同様に六神丸と有意差はなかった (P < 0.05)。また、2種類のbufosteroidでは著明な収縮力の増加が認められたが、その発現濃度は極めて高く、ED<sub>50</sub>はbufalinで  $1 \times 10^{-1}$  粒/ml以上、cinobufaginで  $1 \times 10^{-2}$  粒/ml以上であり、in vitroでの実験ではbufosteroidが六神丸の陽性変力作用に関与しているとは考えにくい。また、拍動数に関してもbufosteroidは六神丸とは逆の減少作用を示し、六神丸の陽性変時作用には関与していないと考えられる。

## 考 察

六神丸の強心作用をラット摘出心房筋を用いて検討した結果、著明な陽性変力作用および陽性変時作用を認めた。これらの作用は構成生薬のセンソ中に含まれるadrenalineに由来することも明らかとなった。センソの循環器系に対する作用は、佐藤らによっても麻酔ラット、麻酔開胸犬、モルモットのLangendorff標本および心房筋標本で検討されており、センソ中のadrenalineに起因すると思われる作用が報告されている。<sup>3)</sup> また、森下らのセンソの一般薬理試験の報告でも、adrenaline様作用を示す物質が含まれていることを示唆する結果が得られている。<sup>4)</sup> この様にセンソおよび六神丸の研究においては、adrenalineの存在を十分に考慮したうえで、薬効薬理作用を検討しなければ判断を誤る危険性があることを十分認識しなければならない。一方、センソの強心作用はbufosteroidに因ることは広く知られており、山原ら<sup>5)</sup>および森下ら<sup>6)</sup>はモルモットの摘出心臓または摘出心房においてcinobufaginの $10^{-7}$  Mで強心作用を確認している。この点において我々の実験結果と相違があり、今後種差を含めて検討を要すると思われるが、六神丸は本来経口投与の剤形であることから、adrenalineが吸収されても速やかに不活性化され、生理活性を発現するとは考えられない。したがって、六神丸の薬効評価には経口投与による強心作用を検討する必要をあらためて強く認識し、今回のin vitroの結果を十分参考にしながら今後in vivoでの検討を進めるつもりである。

## 結 論

六神丸はラット摘出心房筋において、 $1 \times 10^{-5}$  粒/mlの濃度から用量依存的に収縮力の増加が認められ、 $1 \times 10^{-2}$  粒/mlで最大反応を示した。また、拍動数は $3 \times 10^{-5}$  粒/mlの濃度から用量依存的に増加が認められ、 $3 \times 10^{-2}$  粒/mlで最大反応が得られた。この六神丸の作用はセンソに由来するものであり、他の5種類の生薬はほとんど関与していないと考えられる。また、センソにはbufosteroidおよびadrenalineが含まれているが、bufosteroidは栄養液が白濁するほどの高濃度で初めて著明な収縮力の増強が認められ、拍動数も六神丸とは逆に減少し、in vitroで認められた六神丸の作用にはadrenalineの関与が極めて大きいと考えられる。

## 文 献

- 1) 久保喜一、高桑徳太郎、吉井栄一、北辻栄太郎、森腰正弘：動物性生薬の品質評価に関する研究（第2報） ジャコウの品質評価に関する研究、薬誌、98、483-488（1978）
- 2) 中村悦郎、木村 都：生物検定法と応用推計学、広川書店、東京、1977、183-195
- 3) 佐藤 博、大鳥居 健、豊口義夫、菅原和信：蟾酥、麝香および牛黄の循環器系に対する作用、応用薬理、33、817-824（1987）
- 4) 森下信一、斎藤 隆、三島泰宏、水谷 睦、平井康晴、川上万里：センソ含有製剤KY-1、KY-2の一般薬理作用、日薬理誌、87、361-378（1986）
- 5) 山原條二、田中慎二、松田久司、澤田徳之助、藤村 一：センソ強心ステロイドの灌流心臓に対強心作用特性と実験的虚血性心不全に対するcinobufaginの作用、日薬理誌、88、413-423（1986）
- 6) 森下信一、斎藤 隆、三島泰宏、水谷 睦、平井康晴、川上万里：cinobufaginの一般薬理作用、日薬理誌、86、269-292（1985）

【原 著】

塩化リゾチーム配合かぜ薬の安定性

Stability of Cold Remedies mixed Lysozyme Chloride

富山県薬事研究会 製剤部会

Division of Pharmaceutics,  
Toyama Pharmaceutical Research Association

朝日製薬(株)

Asahi Pharmaceutical Co., Ltd

(株) 広 貫 堂

Kokando Co., Ltd

(株) 広 昌 堂

Koshodo Co., Ltd

源平製薬(株)

Genpei Pharmaceutical Co., Ltd

(株) 島伊兵衛薬品

Shima Ihei Medicine Co., Ltd

大協薬品工業(株)

Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd

大東交易(株)

Daito Koeki Co., Ltd

東亜製薬(株)

Toa Pharmaceutical Co., Ltd

東亜薬品(株)

Toa Medicine Co., Ltd

(株) 内外薬品商会

Naigai Medicine Co., Ltd

(株) 富士薬品

Fuji Medicine Co., Ltd

松井製薬(株)

Matsui Pharmaceutcal Co., Ltd

明治製薬(株)

Meiji Medicine Co., Ltd

薬事研究所

Toyama Prefectural Institute  
for Pharmaceutical Research

石 倉 英 子

Eiko ISHIKURA

江野本 加寿雄

Kozuo ENOMOTO

山 岡 みどり

Midori YAMAOKA

平 野 正 夫

Masao HIRANO

島 欣 也

Kinya SHIMA

日 水 裕 子

Yuko HIMIZU

石 黒 文 子

Fumiko ISHIGURO

山 田 明 彦

Akihiko YAMADA

西 本 初 博

Hatsuhiko NISHIMOTO

立 本 純 子

Jyunko TATSUMOTO

前 田 淑 恵

Yoshie MAEDA

横 内 志 津 子

Shizuko YOKOUCHI

萩 原 彰 人

Akito HAGIHARA

平 井 道 子

Michiko HIRAI

北 野 喜 文

Yoshihumi KITANO

上 田 雅 子

Masako UEDA

## 諸 言

近年「塩化リゾチーム」は、鼻炎薬や鎮咳薬に消炎成分として配合される例が多い。

今回「塩化リゾチーム」を配合したかぜ薬の経時安定性について、モデル処方を作成して検討した。得られた結果が、今後「塩化リゾチーム」配合かぜ薬の製剤化に際しての参考資料となり、また、「塩化リゾチーム」のかぜ薬承認基準収載への一助となれればと考え、報告する。

## 試料の剤形及び処方

### 1) 剤 形

一般向けかぜ薬としてよく用いられ、また錠剤・カプセル剤の基本となる顆粒剤で試験を行うことにした。

### 2) 処 方

主成分は、一般向けかぜ薬において配合率の高い成分 (Table 1. A~F) を採用し、1日用量は承認基準の最大量を設定し、1包重量は1,000 mgとした。従って添加剤の用量が多く、成形性の問題はないと考えられたので、添加剤は一般に用いられる成分 (Table 1. G~J) を配合した。

Table 1

塩化リゾチーム配合かぜ薬1日量(3包)の成分分量

成 分 名	分 量(mg)
A. 塩化リゾチーム	60.0
B. アセトアミノフェン	600.0
C. エテンザミド	500.0
D. マレイン酸クロルフェニラミン	7.5
E. dl-塩酸メチルエフェドリン	60.0
F. 無水カフェイン	75.0
G. 結晶セルロース	120.0
H. 乳 糖	適 量
I. コーンスターチ	494.5
J. ヒドロキシプロピルセルロース	
計	3,000.0

## 実 験 の 部

### 1. 小規模試作による湿潤剤の検討

造粒性ならびに造粒に伴う物性やリゾチーム含量の変動を検討し、湿潤剤の種類と添加量を決定するために小規模試作を行った。

試作によって得られた製剤について、崩壊試験及びリゾチーム含量の定量を行った。

#### 1) 小規模試作

Table 2の成分分量に対して5%のヒドロキシプロピルセルロース(以下HPC-Lとする)のエタノール溶液1,350 g、5%HPC-Lの水・エタノール(1:1)溶液1,080 g、5%HPC-Lの水溶液1,080 gをそれぞれ用いて、円筒式造粒機により径0.8 mmのスクリーンで造粒した。

#### 2) 結 果

湿潤剤と造粒性の関係をTable 3に、崩壊性及び安定性についてはTable 4に示した。

Table 3及び4より、水では造粒不可能であり、水・エタノール(1:1)溶液では崩壊性及び安定性に問題が認められる。従ってエタノールが適当である。

Table 2

処方

成 分 名	仕 込 量	備 考
塩化リゾチーム	216.0 g	20%増*1
アセトアミノフェン	1,800.0 g	
エテンザミド	1,500.0 g	
マレイン酸クロルフェニラミン	22.5 g	
dl-塩酸メチルエフェドリン	180.0 g	
無水カフェイン	225.0 g	
結晶セルロース	360.0 g	
乳 糖	3,249.0 g	
コーンスターチ	1,529.0 g	3%増*2
合 計	9,081.5 g	

\*1: 経時的に力価の低下が予想されるため20%増の配合を行った。

\*2: コーンスターチの水分(約3%)を3%として3%増の配合を行った。

## 2. 本試作による安定性の検討

小規模試作の結果に従って本試作を行い、得られた製剤について安定性試験を実施した。

### 1) 本試作

Table 5.の仕込量について、エタノールを湿潤剤として円筒式造粒機により0.8 mmのスクリーンを用いて造粒した。40°で3時間乾燥後整粒し、顆粒剤24.5 kgを得た。

Table 5

処方

成分名	仕込量	備考
塩化リゾチーム	720 g	20%増
アセトアミノフェン	6,000 g	
エテンザミド	5,000 g	
マレイン酸クロルフェニラミン	75 g	
DL-塩酸メチルエフェドリン	600 g	
無水カフェイン	750 g	
結晶セルロース	1,200 g	
乳糖	10,565 g	
コーンスターチ	4,945 g	
ヒドロキシプロピルセルロース	145 g	
合計	30,000 g	

### 2) 安定性試験

(1) 1)で得られた顆粒剤は、セロニウム(ポリエチレンとアルミニウム箔をラミネートした包材)で分包する。アルミニウム層の厚さ9 μ、15 μの2種類を使用した。

分包した試料を、40±1°、75±5% R.H.(製造指針の保存条件)に6ヶ月間保存し、外観・乾燥減量・崩壊試験・塩化リゾチーム及びその他の成分の定量を行った。

(2) 1)で得られた顆粒剤に、ステアリン酸マグネシウム0.5%を加えて1錠250 mgの錠剤を製し、打錠圧による塩化リゾチーム及びその他の成分の力価変動を検討した。

### 3. 塩化リゾチームの定量

塩化リゾチームの力価を測定する溶菌法は、酵素反応であるため、試験操作の差異からバラツキを生じることが予想される。そこで、試験法の統一化を図り、また留意点を設定した。

[留意点]

- ① 標準品の溶解と試料の抽出は、同時点で実施し、20 mg/100 mlの濃度で保存して定量時に希釈する。<sup>1)</sup>
- ② 基質液は、使用前に氷水中で1時間以上攪拌し、使用時も氷水中で攪拌しながら採取する。
- ③ 基質液に試料溶液を加えるときは、正確に1分間隔で行う。
- ④ 基質液及び試料溶液の採取量及び反応時間は、特に厳守する。
- ⑤ 測定時は、よく振り混ぜて測定する。

Table 3

湿潤剤と造粒性

湿潤剤	使用量**	造粒性
5% HPC-L エタノール溶液	450.0 g	問題なし
5% HPC-L 水・エタノール(1:1)溶液	360.0 g	後半造粒不可
5% HPC-L 水溶液	360.0 g	造粒不可 24号篩により 押出造粒

\*\* : 粉末仕込量3 kgに対する使用量

Table 4

崩壊時間と塩化リゾチーム含量

湿潤剤	崩壊時間(分)	リゾチーム含量(%)
エタノール	2, 2, 2, 2, 3, 1	107.5
水・エタノール(1:1)	10, 11, 11, 12, 13, 9	103.4
水	造粒不可能	108.6

## 塩化リゾチーム試験法

### 1. 試薬及び試液

#### リン酸塩緩衝液 A

リン酸二水素カリウム 9.08 g に水を加えて溶かし、1,000 ml とした液 800 ml に、無水リン酸一水素ナトリウム 9.46 g に水を加えて溶かし 1,000 ml とした液 200 ml を加える。必要ならば、更にいずれかの液を加えて PH 6.2 に調整する。

#### リン酸塩緩衝液 B

塩化ナトリウム 17.53 g にリン酸塩緩衝液 A を加えて溶かし 1,000 ml とする。

#### リゾチーム標準品

国立衛生試験所標準品で検定した原料を使用する。

#### 基質液

*Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体（生化学工業製）適量にリン酸塩緩衝液 A を加えて振り混ぜ、懸濁した後、波長 640nm における透過率が 10% となるよう、更に基質又はリン酸塩緩衝液 A を加える。氷水中で攪拌しておく。

### 2. リゾチーム標準溶液

リゾチーム標準品（約 0.1 g を精密に量り、105° で 2 時間乾燥し、減量を測定しておく。）約 20 mg を精密に量り、リン酸塩緩衝液 B を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。この液 5 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 100 ml とする。更にこの液 2 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 50 ml としリゾチーム標準溶液(S)とする。

### 3. 定 量

塩化リゾチーム約 20 mg（力価）に対応する量（試料約 1,000 mg）を精密に量り、リン酸塩緩衝液 B を加えて正確に 100 ml とする。室温で 30 分間攪拌（スターラー）した後、遠心分離する。この上澄液 5 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 100 ml とする。更にこの液 2 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 50 ml とし、試料溶液(T)とする。

別にリン酸塩緩衝液 B 5 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 100 ml とする。この液 2 ml を正確に量り、リン酸塩緩衝液 A を加えて正確に 50 ml とし、空試験溶液(B)とする。

基質液 3 ml ずつを正確に量り、3 本の試験管に入れ、35° で 3 分間加温する。別に(S)(T)及び(B)を 35° で 3 分間加温し、その 3 ml ずつを正確に量り、それぞれを先の試験管に加え、35° で 10 ± 0.1 分間放置した後、直ちに水を対照として波長 640nm におけるそれぞれの吸光度  $A_S$ 、 $A_T$  及び  $A_0$  を測定する。

試験を 3 回繰り返し、その平均値について次の式により計算する。

試料採取量中のリゾチームの量 [mg (力価)] = 乾燥物に換算したリゾチーム標準品の量 [mg (力価)]

$$\times \frac{A_0 - A_T}{A_0 - A_S}$$

## 結果及び考察

### 1. 安定性試験

#### ① 外観・乾燥減量・崩壊試験

外観、乾燥減量及び崩壊試験の結果を

Table 6 に示した。

加速条件下で 6 ヶ月間保存したところ、

Table 6 外観・乾燥減量・崩壊試験

		0 日	1 ヶ月	3 ヶ月	6 ヶ月	9 ヶ月*
外 観		異常なし	異常なし	異常なし	異常なし	-
乾燥減量 (%)	9 μ	1.34 ± 0.18	1.16 ± 0.25	1.34 ± 0.36	1.10	1.06
	15 μ	1.53 ± 0.45	1.56 ± 0.48	1.55 ± 0.30	1.48 ± 0.46	1.47
崩壊試験		1 分以内	1 分以内	1 分以内	1 分以内	-

\*: 推定値

変化は認められなかった。最小二乗法で求めた乾燥減量の9ヶ月後の値にも、変化はなかった。

② 塩化リゾチームの安定性

塩化リゾチームの安定性試験の結果を、Table 7、Fig 1に示す。

厚さ9μのアルミニウム包材を用いた場合、加速条件下で6ヶ月間保存後では、約10%の低下がみられ、これらの値から最小二乗法によって求めた推定値は約14%の低下がみられた。また、15μの包材の場合、6ヶ月後の測定値は約6%、9ヶ月後の推定値は約8%の低下だった。

③ その他の成分の安定性

塩化リゾチーム以外の有効成分の安定性試験の結果を Table 8、Fig 2に示す。

試験法は、各社それぞれの方法で実施した。加速条件下で6ヶ月間の測定値及び9ヶ月後の推定値は、ほとんど変化がなかった。

Table 7 塩化リゾチームの安定性試験結果

包材	全社	0日	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月 (推定値)
9μ	A	116.2%	113.8%	113.7%	103.3%	
	B	109.4%	112.3%	110.1%	102.3%	
	C	117.9%	108.0%	101.6%	101.6%	
	D	113.6%	107.0%	109.6%	107.0%	
	E	116.1%	109.2%	112.3%	-	
	F	112.2%	104.8%	104.7%	105.7%	
	G	107.9%	102.3%	102.1%	101.7%	
平均		113.3±3.72%	108.2±4.02%	107.7±4.90%	103.6±2.25%	99.2%
15μ	H	118.8%	113.4%	106.2%	99.8%	
	I	108.1%	106.6%	108.4%	106.7%	
	J	111.7%	110.1%	113.0%	113.7%	
	K	116.3%	103.5%	107.7%	104.5%	
	L	116.2%	101.2%	105.9%	106.1%	
	M	111.9%	109.7%	113.3%	111.8%	
	平均		113.8±3.94%	107.3±4.28%	109.1±3.28%	107.9±6.54%

Fig. 1 塩化リゾチームの安定性試験結果

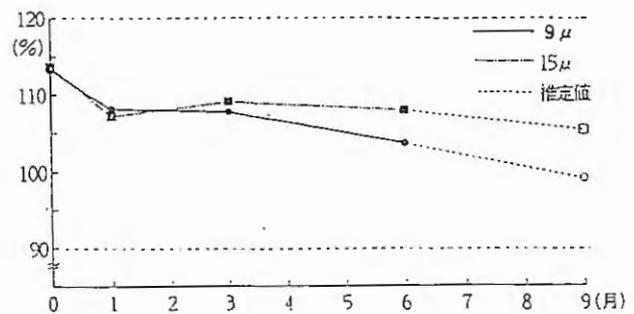
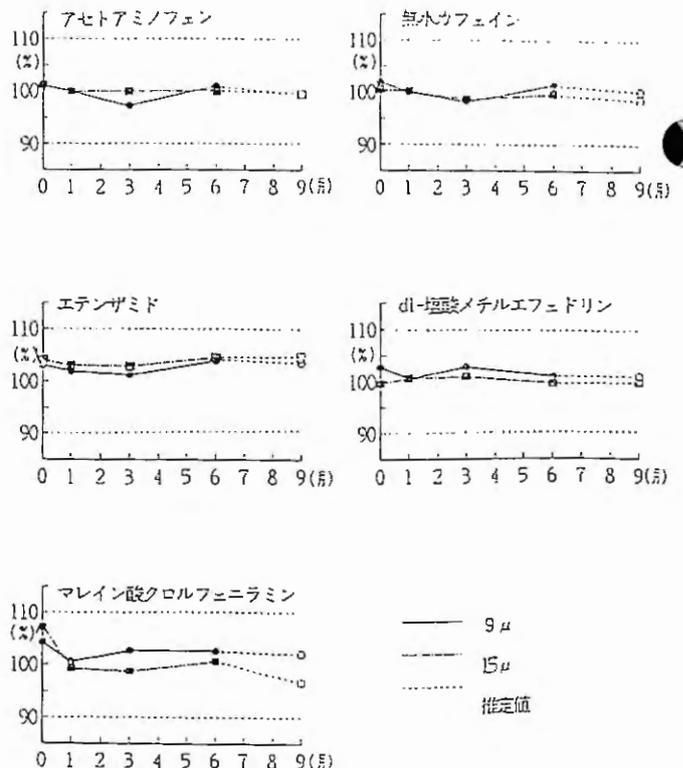


Fig. 2 他成分の安定性試験結果

Table 8 他成分の安定性試験結果

包材	成分名	0日 (%)	1ヶ月 (%)	3ヶ月 (%)	6ヶ月 (%)	9ヶ月 推定%
9μ	7-β-D-グルコピラノシド	101.3±0.91	100.0±1.65	97.4±2.78	101.0±1.13	99.6
	無水カフェイン	102.0±1.89	100.1±4.41	98.4±3.38	101.5±1.84	100.3
	エテンザミド	103.2±4.77	102.0±4.40	101.4±3.46	104.0±1.98	103.8
	dl-α-トウモロコシデキストリン	102.8±4.21	100.7±5.47	102.8±3.91	101.1±0.78	101.0
	α-D-グルコピラノシド	107.4±3.46	99.4±1.91	98.8±1.65	100.8±0.92	96.8
15μ	7-β-D-グルコピラノシド	101.0±2.73	100.1±1.38	100.0±1.33	100.1±1.92	99.6
	無水カフェイン	100.7±1.39	100.3±3.27	98.9±1.64	99.8±2.85	98.9
	エテンザミド	104.3±1.63	103.3±1.14	103.2±1.30	104.8±0.72	104.7
	dl-α-トウモロコシデキストリン	99.6±2.21	100.6±2.98	101.0±2.14	99.7±2.10	100.1
	α-D-グルコピラノシド	104.3±3.02	100.8±3.30	102.8±1.61	102.7±2.58	102.3



## 2. 打錠による含量変化

打錠前の定量値に対する打錠後の定量値を残存率としてTable 9、Table 10に示す。塩化リゾチーム及びその他の成分の残存率は高く、打錠前後ではほとんど変化がなかった。

Table 9 打錠時の塩化リゾチームの力価の変化

顆粒(0日)	錠剤(0日)	残存率(%)
116.2%	115.0%	99.0%
109.4%	110.7%	101.2%
117.9%	121.1%	102.7%
113.6%	103.6%	91.2%
116.1%	106.9%	92.1%
112.2%	106.1%	94.6%
107.9%	101.7%	94.2%
118.8%	111.3%	94.1%
108.1%	103.0%	95.3%
111.7%	108.3%	97.0%
116.3%	113.1%	101.5%
116.2%	112.1%	96.5%
111.9%	107.2%	95.8%
113.6±3.67%	109.7±5.86%	96.6±3.61%

Table 10 打錠時の他成分の含量の変化

成分名	顆粒(0日)	錠剤(0日)	残存率
アミノアミノアミン	101.1±2.12%	101.3±4.37%	100.2%
無水カフェイン	101.2±1.62%	99.9±0.65%	98.7%
エテンガミド	103.9±2.89%	103.7±2.01%	99.8%
d1-アミノアミノアミン	100.8±3.25%	101.2±2.23%	100.4%
アミノアミノアミン	103.0±3.46%	103.3±1.81%	100.3%

## ま と め

加速条件下で6ヶ月間の安定性試験及びその結果から求めた9ヶ月後の推定値について、

- ① 外観、乾燥減量及び崩壊性には、変化が認められなかった。
- ② 塩化リゾチーム以外の有効成分の含量には、ほとんど変化がなかった。
- ③ 塩化リゾチームの含量については、アルミニウム包材9 $\mu$ 、15 $\mu$ について6ヶ月後の測定値はそれぞれ約10%、6%、9ヶ月後の推定値は約15%、8%の低下がみられたが、いずれも規格値(90~120%)に充分包含される値であり、通常の保存条件下では少なくとも3年以上安定である。
- ④ 打錠前後の含量比較では、ほとんど変化がみられず、打錠による力価低下は少ないと判断した。

以上より、塩化リゾチームをかぜ薬に配合した場合の安定性に問題がないと判断した。

なお、塩化リゾチームの試験法は、操作のわずかな差異によって影響を受け易いので、操作の細部についてもあらかじめ設定した方法に従って注意深く実施する必要がある、更に安定な試験法の開発が望まれる。

## 文 献

- 1) 谷本剛ら、酵素製剤の定量試験(その1)リゾチーム製剤、国立衛生試験所報告、98、87~91、(1980)

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討 (第一報)

— グリチルリチン酸について —

Studies on Standardization of Crude Drug Components (I)

— Glycyrrhizic Acid —

富山県薬事研究会分析部会 (グリチルリチン酸分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical  
Research Association

新木 康子 (朝日製薬株)	Yasuko ARAKI (Asahi Seiyaku Co., LTD.)
上田紀代美 (明治薬品株)	Kiyomi UEDA (Meiji Yakuhin Co., LTD.)
金子 弘子 (仁生薬品株)	Hiroko KANEKO (Jinsei Yakuhin Co., LTD.)
河西 秀子 (株)ケロリン屋本店)	Hideko KAWANISHI (Kerorinya Honten Co., LTD.)
小鍛治まち子 (大和製薬株)	Machiko KOKAJI (Taiwa Pharmaceutical Co., LTD.)
小中宏子 (株)内山薬品商会)	Hiroko KONAKA (Uchiyama Medicine Co., LTD.)
島谷隆夫 (救急薬品工業株)	Takao SHIMATANI (Kyukyu Pharmaceutical Co., LTD.)
田中博子 (晴寿堂薬品株)	Hiroko TANAKA (Seijudo Yakuhin Co., LTD.)
○寺西昌明 (テイカ製薬株)	Masaaki TERANISHI (Teika Seiyaku Co., LTD.)
長島美由紀 (第一薬品株)	Miyuki NAGASHIMA (Daiichi Yakuhin Co., LTD.)
明官紳一 (テイカ製薬株)	Shin'ichi MYOKAN (Teika Seiyaku Co., LTD.)
森井一仁 (大東交易株)	Kazuhito MORII (Daito Koeki KK.)
吉田直樹 (中央薬品株)	Naoki YOSHIDA (Chuo Yakuhin Co., LTD.)
横田洋一 (富山県薬事研究所)	Youichi YOKOTA (Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research)

(○論文執筆者)

緒 言

近年、生薬分析等の急速な発展に伴い、医薬品の品質管理の一環として生薬中の有効成分の定量が広く実施されることとなったが、その基準となるべき標準品の製法、規格及び試験方法については、各社各様に対応しているのが現状であり、同一の尺度もしくは規格に従った品質の確保、保証が強く望まれている。

今回、本部会では甘草の有効成分グリチルリチン酸及びその塩類の標準品について検討し、各社共有が可能で、かつ実用に供することのできる標準品の製法、規格及び試験方法の設定を目的として共同研究を行った。以下その詳細について報告する。

1. グリチルリチン酸標準品の現状

グリチルリチン酸及びその塩類は、純度の高い標準品を得ることが難しく、また生薬試験用標準品が市販されているものの、製法、純度等が異なるなどの問題点が指摘されている<sup>1)~4)</sup>。そこで、本部会会員の各社で現在使用中の標準品規格について調査した。その結果を Table 1 に示す。

精製法に関する記載内容は、グリチルリチン酸モノアンモニウムをメタノール又はエタノールで数回、再結晶するものが多く、乾燥温度は 50~105°、乾燥時間は 1 時間から 24 時間とかなりの幅が認められ、含量規格値は精製法が近似しているにもかかわらず定量法により異なり、また HPLC による面積百分率法で測定した場合、その純度は 90% 以下であった。

生薬試験用標準品を用いた規格では、乾燥法を規定しているものが少なく、純度にも一部低いものが認められた。

## 2. 実験方法

1) 本標準品の製法をイオン抑制法による分取クロマトグラフ法で設定する目的で、高圧分取カラム及び中圧分取カラムを用い比較検討した。その操作条件をTable 2に示す。

2) 標準品の規格及び試験方法については文献に基づく評価を行い、評価項目を性状、純度試験(類縁物質)、 $E \frac{1}{1} \%$ 値及び定量法とし、その内容について比較検討した。

3) 設定した製法に基づき、6ロットを分取して試料とし、設定された試験方法に従い、各社で試験を行い、その実測値に基づいて規格値の設定を試みた。

## 3. 結果及び考察

### 1) 製法

Table 2 から得たクロマトグラムをFig.1に示す。グリチルリチン酸の溶出は、中圧分取カラムで45~75分、高圧分取カラムで35~40分となり、分離溶出時間ならびに類縁物質の分離状態から、高圧分取カラムが優れている事が判った。また原料は分取に長時間を要したことから、再結晶が比較的容易なグリチルリチン酸モノアンモニウムを用いた。また分取後再結晶が困難なので濃縮液を真空凍結乾燥<sup>4)</sup>し、移動相にギ酸を用いた。精製方法を以下に示す。

### 〔製造方法〕

グリチルリチン酸モノアンモニウム\*  
1gに薄めた氷酢酸(1→50)・アセトニトリル混液(2:1)2.5mlを加え、加温して溶かし、下記の条件で液体クロ

Table 1 標準品の現状

出発原料	精製法及び再結晶溶媒	乾燥条件	定量法(含量規格%)
グリチルリチン酸モノアンモニウム	メタノール(85→100) 4回再結晶(活性炭脱色)	105° 1時間	吸光度法(99.0~101.0) $E \frac{1}{1} \%$ 134
グリチルリチン酸モノアンモニウム	メタノール(85→100) 4回再結晶(活性炭脱色)	50° 24時間 五酸化リン	吸光度法(99.0~101.0) $E \frac{1}{1} \%$ 134
グリチルリチン酸アンモニウム	エタノール(80→100) 5回再結晶	80° 5時間 五酸化リン(減圧5mmHg)	滴定法(98.0~102.0) 70μmフロン7μm-試薬
グリチルリチン酸モノアンモニウム	エタノール(80→100) 3回再結晶	80° 5時間 (減圧)	HPLC法(99.0以上) 【標準法(ヒートアップ)】
グリチルリチン酸モノアンモニウム	アルコール 4回再結晶(活性炭脱色)	80° 15時間 五酸化リン(減圧1mmHg)	(98.0%以上)
グリチルリチン酸アンモニウム	中圧分取法(C <sub>18</sub> カラム) モノアンモニウム塩として再結晶	設定なし	HPLC法(99.0以上) 面積百分率
生薬試験用標準品 グリチルリチン	不明	設定なし	HPLC法(98.0以上)
生薬試験用標準品 グリチルリチン	不明	設定なし	(99.0以上) TLCにより他成分を認めない
生薬試験用標準品 グリチルリチン酸	不明	60° 3時間 五酸化リン(減圧)	HPLC法 (95.0以上)

Table 2 製法の検討(分取条件)

項目	高圧分取法	中圧分取法
検出器	紫外吸光度計(測定波長:254nm)	紫外吸光度計(測定波長:254nm)
カラム	μ-BONDASPHERE C <sub>18</sub> -100Å [19mmID×15cm] 粒径:5μm, Waters社	ローバーカラム RP-18 sizeB(LiChroprep RP-18), MERCK社
カラム温度	40°	40°
カラム圧力	1450 psi	400 psi
移動相	2%氷酢酸・アセトニトリル混液 (65:35)	2%氷酢酸・アセトニトリル混液 (60:40)
流量	10ml/min	3.5ml/min
試料注入量	250μl, 500μl [試料濃度:40mg/ml] [溶媒:50%アセトニトリル]	1000μl [試料濃度:50mg/ml] [溶媒:50%アセトニトリル]

使用したHPLC装置  
ポンプ : M600 (Waters社)  
検出器 : UV-Mode I-481 (Waters社)  
カラム恒温槽 : スガイ U-620 TYPE 30  
記録計 : SIC インテグレーター Model 7000A  
全自動サンプリング装置 : TOYO-フラクションコレクター SF-139

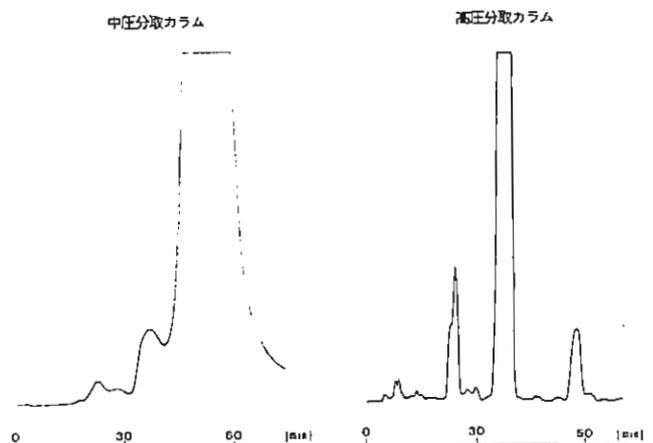


Fig.1 分取クロマトグラムの条件設定

マトグラフで分取する。分取されたグリチルリチン酸画分からアセトニトリルを留去後、真空凍結乾燥し、グリチルリチン酸標準品とした。

<操作条件>

- 検出器 : 紫外吸光光度計(測定波長254nm)
- カラム : 内径約20mm、長さ15~30cmのステンレス管に5 $\mu$ mのオクタデシルシリル化シリカゲルを充てん
- カラム温度 : 40 $^{\circ}$ 付近の一定温度
- 移動相 : ギ酸溶液\*\*・アセトニトリル混液(33:17)
- 流量 : グリチルリチン酸の保持時間が約35分になるように調整
- 注入量 : 2.0ml
- \* 食品添加物試験用(和光純薬工業株)
- \*\* ギ酸溶液(水にギ酸を加えてpH3.0に調整する)

2) 規格及び試験方法

(1) 純度試験(類縁物質)

試験は、昭和59~61年度厚生科学研究報告<sup>5)</sup>を参考とし、純度99.0%以上を確保するよう試料溶液及び標準溶液の濃度調整を行った。以下にその概要を示す。

[設定した薄層クロマトグラフ法の測定条件]

- 薄層板 : KIESELGEL 60 F<sub>254</sub> Pre-Coated TLC Plate、厚さ0.25mm (Merck社)
- 展開溶媒 : n-ブタノール・水・氷酢酸混液(7:2:1)
- 展開距離 : 約12cm
- 試料溶液 : 10mg/ml(希エタノール)
- 標準溶液 : 試料溶液1mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100mlとする
- スポット量 : 4 $\mu$ l
- 検出方法 : (i)紫外線(主波長254nm) (ii)薄めた硫酸(1→2)を噴霧後、105 $^{\circ}$ で10分間加熱

グリチルリチン酸のRf値は約0.2であり、原料で確認されていた他のスポットが、分取後では消失し、紫外吸収及び硫酸発色のいづれも標準溶液のスポットに比較して、試料溶液から得られたグリチルリチン酸以外のスポットが濃くないことが認められた(Fig. 2)。

(2) E<sub>1</sub><sup>1%</sup><sub>1cm</sub>値

本標準品の乾燥条件をE<sub>1</sub><sup>1%</sup><sub>1cm</sub>値を指標として検討した。その結果をFig. 3に示す。

乾燥条件を50 $^{\circ}$ 減圧、五酸化リン、4→16時間、また減圧の程度を23mmHg→4.5mmHg→1.5mmHgと厳しくすることより、本標準品のE<sub>1</sub><sup>1%</sup><sub>1cm</sub>値の上昇が認められた。これらの結果E<sub>1</sub><sup>1%</sup><sub>1cm</sub>値の条件範囲を減圧(5mmHg以下)、五酸化リン、16時間乾燥後、139~147と設定した。

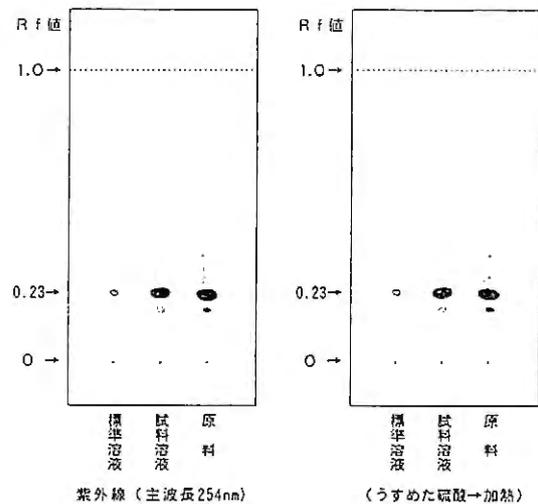


Fig.2 薄層クロマトグラフ法による純度試験

さらに本標準品の吸湿性について検討した。標準品を減圧下(1.5 mmHg)、乾燥後ただちに秤量し、室温23°、湿度54%の部屋に開放し、時間の経過に伴い試料の重量増加を測定した(Fig. 4)。

標準品は秤量後ただちに重量が増加し、10分間で約3%に達したことから、本品は極めて吸湿性が強く、取扱いに注意が必要である。

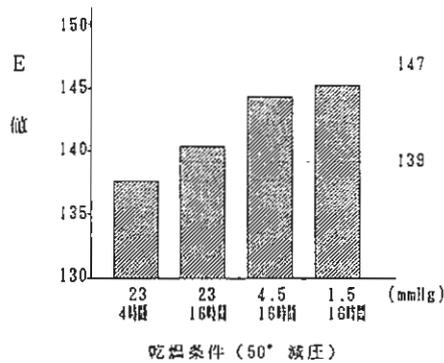


Fig. 3 乾燥条件によるE1%値の変化

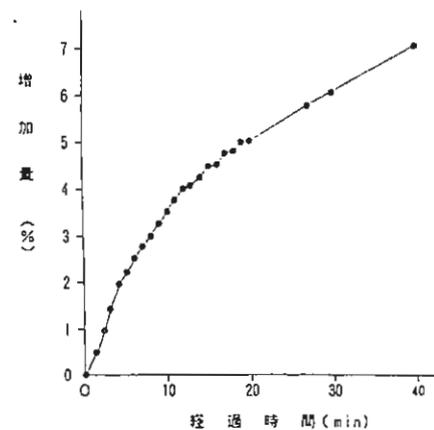


Fig. 4 グリチルリチン酸標準品の吸湿・時間曲線

### (3) 定量法

標準品の定量方法に、HPLCによる面積百分率法を採用した。移動相は、イオン抑制法が医薬品の定量で繁用されており、アメリカ公定書(AOAC)にもこれが収載されていることを考慮し2%氷酢酸・アセトニトリル混液を採用した。設定したHPLC法の操作条件を以下に示す。

[設定したHPLC操作条件]

- 試料溶液 : 0.1 mg/ml (希エタノール)
- 検出器 : 紫外吸光光度計(測定波長 254 nm)
- カラム : 内径4~6 mm、長さ10~30 cmのステンレス管に5~10 μmのオクタデシルシリル化シリカゲルを充てん
- カラム温度 : 40° 付近の一定温度
- 移動相 : 薄めた氷酢酸(1→50)・アセトニトリル混液(13:7)
- 流量 : グリチルリチン酸の保持時間が約15分になるように調整
- カラムの選定 : グリチルリチン酸1 mg、パラオキシ安息香酸ブチル0.2 mgを希エタノール100 mlに溶かし、この液20 μlにつき上記の条件で操作するとき、グリチルリチン酸、パラオキシ安息香酸ブチルの順に溶出し、その分離度が3以上のもの
- 検出感度 : 感度標準溶液\* 20 μlから得たグリチルリチン酸のピーク高さが記録計のフルスケールの約10%になるように調整
- 面積測定範囲 : 溶媒のピークの後からグリチルリチン酸の保持時間の約3倍の範囲
- 自動積分装置の Analytical Parameter : 感度標準溶液\* 5 mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100 mlとし、この液20 μlから得たグリチルリチン酸のピーク面積をカウントするように設定

\*感度標準溶液: 試料溶液1 mlを正確に量り、希エタノールを加えて正確に100 mlとする。

本標準品のクロマトグラムの一例を Fig. 5 に、定量値の集計結果を Table. 3 に示す。分取後の標準品は、平均  $99.6 \pm 0.09\%$  (S. E.) と高い値を示し、この結果から本標準品の規格を  $99.0\%$  以上と設定した。

カラムの選定における分離度は最低値が 3.2、最高値が 11.7 であったが、分離度による定量値の差は認められなかったことから 3 以上と設定した。

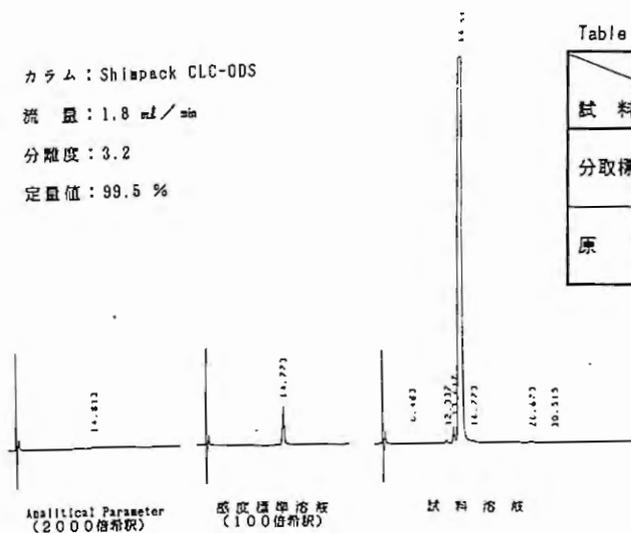


Table 3 試験成績

試料	試験結果				分離度(n=12)			
	定量値(n=12)				分離度(n=12)			
	Max.	Min.	Av.	S.E.	Max.	Min.	Av.	S.E.
分取標準品	99.9	98.8	99.6	0.09	11.7	3.2	6.1	0.82
原料 (注)	91.7	76.2	86.0	1.02				

(注) 食品添加物試験用 (和光純薬工業株)

Fig. 5 グリチルリチン酸標準品の定量クロマトグラム

#### 4. ま と め

- 1) イオン抑制法による高圧分取法 (HPLC) により、純度  $99.0\%$  以上の標準品が得られることを確認した。
- 2) 本標準品の一般的な規格及び試験方法 (純度  $99.0\%$  以上) を確立した。
- 3) 本標準品は極めて吸湿性が強く、市販標準品を含めて水分の除去を問題視する必要を認めた。

#### 謝 辞

最後に資料を御提供いただきました丸善製薬(株)、岡田憲三様に、またこの稿をまとめるにあたり貴重なご意見を賜りました国立衛生試験所、鈴木英世先生に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 岡田憲三、田中 順、宮下 晶、井元勝恵: 高速液体クロマトグラフ法による甘草成分の分析、薬学雑誌 101 (9)、p. 822 (1981)
- 2) 山本恵一、堀場聖子、人見信之: 生薬成分定量用標品の品質について (グリチルリチン酸モノアンモニウム)、第14回生薬分析討論会講演要旨集、p. 50、July 23、(1985)
- 3) 鈴木英世: 生薬成分の定量用標品について、第17回生薬分析討論会講演要旨集、p. 1、June 23、(1988)
- 4) 横田洋一、有沢みさを、江尻千鶴子: 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、家庭薬研究No.7、p. 80 (1988)
- 5) 鈴木英世: 定量用生薬成分について、第16回生薬分析討論会講演要旨集、p. 27 July 22、(1987)

【原 著】

生薬試験用標準品の規格設定に関する検討(第二報)

— 塩化ベルベリンについて —

Studies on Standardization of Crude Drug Components(II)

— Berberine Chloride —

富山県薬事研究会分析部会(ベルベリン分科会)

Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

秋元駿一(大同製薬(株))	Syunichi AKIMOTO(Daido Seiyaku Co., LTD)
○島谷隆夫(救急薬品工業(株))	Takao SHIMATANI(Kyukyu Pharmaceutical Co., LTD)
堀地 茂(東亜薬品(株))	Shigeru HORICHI(Toa Medical Co., LTD)
中村明美((株)池田模範堂)	Akemi NAKAMURA(Ikeda Mohando Co., LTD)
松下久男((株)池田模範堂)	Hisao MATSUSHITA(Ikeda Mohando Co., LTD)
横田洋一(富山県薬事研究所)	Youichi YOKOTA(Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research)

(○論文執筆者)

緒 言

漢方・生薬製剤の品質管理を目的として、生薬成分の定量が一般に実施されている。しかし、その指標成分定量に必要な標準品については、調製法や規格が統一されておらず、各社の責任で実施されているのが現状である。本部会では、この点に着目し、オウバクやオウレンなどの生薬の指標成分であるベルベリンの試験用標準品としての塩化ベルベリンの調製法及び規格設定について共同研究を実施した。また、市販生薬試験用標準品についても品質評価を行った。その結果を報告する。

1. 塩化ベルベリン標準品の現状

本分析部会を構成する各社において、現在使用中の標準品の規格について先づ調査した。その結果をTable. 1に示す。一般に、出発物質として日局塩化ベルベリンを用い、これを再結晶したものが多く、乾燥条件は各社異なっていた。また、規格の設定は、日局の定量法に準拠しており、液体クロマトグラフ法による純度試験は設定されていなかった。

標準品の出発原料	精製条件	乾燥条件	規 格
① 日局塩化ベルベリン	メタノールで3回再結晶	五酸化リン(減圧)3時間	日局塩化ベルベリンの定量法を準用
② "	希エタノールで3回再結晶	デシケーター(シリカゲル)室温, 10日間	"
③ "	—	—	"
④ "	希エタノールで3回再結晶	デシケーター(シリカゲル)室温, 10日間	" 薄層クロマトグラフにて単一のスポットを示す。
⑤ "	メタノールに加熱溶解し、ろ過後、水及び希塩酸を加え、室温で一晩放置する。結晶→メタノールで再結晶	室温で減圧乾燥	日局塩化ベルベリンの定量法を準用

Table.1 各社の塩化ベルベリン標準品規格

市販生薬試験用標準品のメーカー	乾燥条件	規格及び試験方法
1 K 社	設定はない。	(1)TLC法:異種スポット認めない。 (2)HPLC法:98%以上
2 N 社	"	HPLC法:98%以上
3 W 社	"	(1)TLC法:異種スポット認めない。 (2)HPLC法:98%以上
4 Y 社	"	"

Table.2 市販生薬試験用標準品の規格及び試験方法

次に、市販されている4社の生薬試験用標準品について調査した。結果をTable. 2に示す。規定されている規格としては、TLC法並びにHPLC法による純度試験のみで、乾燥条件並びに日局の定量試験などは、設定されてはいなかった。参考までにTable. 3にTLC法並びにHPLC法の操作条件を示すが、規格の統一はなされていない。

2. 実験方法

1) 標準品の調製方法の比較検討

本部会による標準品の調製方法並びに文献(1)(2)(3)を参考に規格試験法を設定し、再結晶による調製条件を種々検討した。標準品として調製したものは、純度試験、①TLC法、②HPLC法、及び定量法の各項目について実施し、再結晶に伴う残留溶媒量の検出も行った。下記にその方法を示す。

(1) TLC法

○ 試料溶液の調製

試料0.01gを量り、メタノールに溶かし、10mlとする〔試料溶液〕。この液1mlを正確に量り、メタノールを加えて、正確に100mlとする〔標準溶液〕。

○ TLC条件

薄層板：Kieselgel 60F<sub>254</sub> precoated plate (メルク社製、厚さ0.25mm)

展開溶媒：n-ブタノール・水・氷酢酸混液(7:2:1)

展開距離：約10cm

スポット量：2μl

検出方法：紫外線(主波長：365nm)照射

(2) HPLC法

○ 試料溶液の調製

(1)で得た試料溶液及び標準溶液を用いる。

○ HPLC条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：345nm)

カラム：Inertsil ODS(粒径：5μm)[4.6mm ID×15cm、ガスクロ工業(株)製]

カラム温度：40°

移動相：6mM酒石酸・アセトニトリル混液(1:1)1000mlにラウリル硫酸ナトリウム2.15gを加えて溶かしたもの

流量：ベルベリンの保持時間が約12~15分になるように調整する

カラムの選定：塩化ベルベリン1mg及び塩化パルマチン1mgをメタノール100mlに溶かす。この液20μlにつき、上記の条件で操作するとき、パルマチン、ベルベリンの順に溶出し、その分離度が1.5以上のものを用いる

検出感度：標準溶液20μlから得たベルベリンのピーク高さが記録計のフルスケールの約10%になるように調整する

面積測定時間：溶媒のピークの後からベルベリンの保持時間の約2倍の範囲

3-1 薄層クロマトグラフ法

項目	設 定 内 容			
	K 社	N 社	W 社	Y 社
1 薄層板	Silica gel 60 F <sub>254</sub> (Merck)	—	Silica gel 70 PR 7レ-193-	Silica gel 60 F <sub>254</sub> (Merck)
2 展開溶媒	n-ブタノール・水・氷酢酸混液(7:2:1)	—	n-ブタノール・水・氷酢酸混液(7:2:1)	n-ブタノール・水・氷酢酸混液(7:2:1)
3 展開距離	約10cm	—	約10cm	約10cm
4 スポット量	5μl [1.0mg/ml]	—	5μl [1.0mg/ml]	—
5 検出方法	365nm	—	345nm及び目視	345nm 10分間

3-2 液体クロマトグラフ法

項目	設 定 内 容			
	K 社	N 社	W 社	Y 社
1 検出器	紫外吸光光度計 測定波長:345nm	紫外吸光光度計 測定波長:254nm	紫外吸光光度計 測定波長:345nm	紫外吸光光度計 測定波長:254nm
2 カラム	μ-BONDAPAK C <sub>18</sub> [3.9mm×30cm]	μ-BONDAPAK C <sub>18</sub> [4.6mm×15cm]	Wakosil 5C <sub>18</sub> [4.6mm×15cm]	C-18
3 カラム温度	45°	17°	RT	RT
4 移動相	3mM SDS・7% トリメチルアミン・氷酢酸混液(55:50:1)	40% トリメチルアミン・氷酢酸混液(100:0.05)	0.1% 酒石酸・4mM SDS・7% トリメチルアミン混液(3:2)	水・7% トリメチルアミン混液(3:2)
5 流量	1.5ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min
6 試料注入量	1.05μg	4μg/4μl	2.5μg/5μl	—

Table.3 市販生薬試験用標準品の純度試験方法

(3) 定量法

試料約 0.05 g を精密に量り、水 200 ml を加えて加温して溶かし、冷後、水を加えて正確に 250 ml とする。この液 10 ml を正確に量り水を加えて、正確に 100 ml として試料溶液とし、以下日局塩化ベルベリンの定量法を準用する。別に、本品約 0.05 g を精密に量り、日局一般試験法水分測定法（カールフィッシャー法）に準じて、水分を測定し、水分量換算を行う。

(4) 残留有機溶媒の測定法

○ 試料溶液の調製

試料約 0.05 g に内標準溶液 2 ml を加えて、5 分間振り混ぜ、遠心分離し、その上澄液を試料溶液とする。

内標準溶液：n-プロパノールの n-ブタノール溶液（1→2500）

○ GC 条件

カラム：10% SBS-100 [3mm ID × 3m]

カラム温度：100°

試料気化室温度及び検出器温度：180°

キャリアーガス：窒素

流量：60 ml/min

注入量：2 μl

2) 市販生薬試験用標準品の品質評価の検討

市販されている生薬試験用標準品（K社、N社、W社、Y社）について、1) に準じて(1) TLC法 (2) HPLC法 (3) 定量法の各項目について検討した。なお、(3) における定量値は検体が微量で高価なために水分測定ができず、脱水物換算せずに求めた。

3. 結果及び考察

1) 標準品の調製方法の比較検討

標準品の調製方法を Table. 4 に示し、それに伴うクロマトグラムを Fig. 1 に示す。また、標準品の残留有機溶媒量のクロマトグラムは、Fig. 2 に示す。

標準品の調製方法としては、日局塩化ベルベリンをメタノールで2回再結晶して、HPLC法で99%以上の高純度が得られた。しかし、メタノールの残存が認められたので、更に希エタノールで再結晶することで除去された。したがって、標準品の調製法としては、メタノールで2回及び希エタノールで1回再結晶することとした。また、塩化ベルベリン分科会に参加した4社がそれぞれ上記の方法により、標準品を調製し、品質管理を実施した。Table. 5 に示すとおり高純度な標準品が得られ、各社間の測定値にもバラツキは認められなかった。

2) 市販生薬試験用標準品の品質評価の検討

各市販生薬試験標準品の品質評価の検討一欄表を Table. 6 に示し、それに伴う HPLC 法のクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示す。

今回、評価した生薬試験用標準品の純度は、HPLC法で98.0%以上であり、TLC法でも単一スポットであった。しかし、含量の定量値は、90%程度であり、水分の影響が示唆された。

精製条件	乾燥条件	残留溶媒 (メタノール)	純度試験		水分 (%)	定量(%) [水分換算]
			(1)TLC法	(2)HPLC法		
使用原料	-	-	3 SPOT	97.2	12.3	100.4
1.メタノール1回	ヒキエタノール 減圧(46~47°)24時間	-	-	98.9	-	-
2.メタノール2回	同上	3.48%	1 SPOT	99.3	9.48	96.4
3.希エタノール1回	同上	-	-	97.2	-	-
4.希エタノール2回	同上	-	-	98.2	-	-
5.メタノール2回+ 希エタノール1回	同上	0%	1 SPOT	99.5	9.45	100.0
6.メタノール2回+ 希エタノール2回	同上	0%	1 SPOT	99.7	7.97	99.4

Table.4 標準品の調製条件

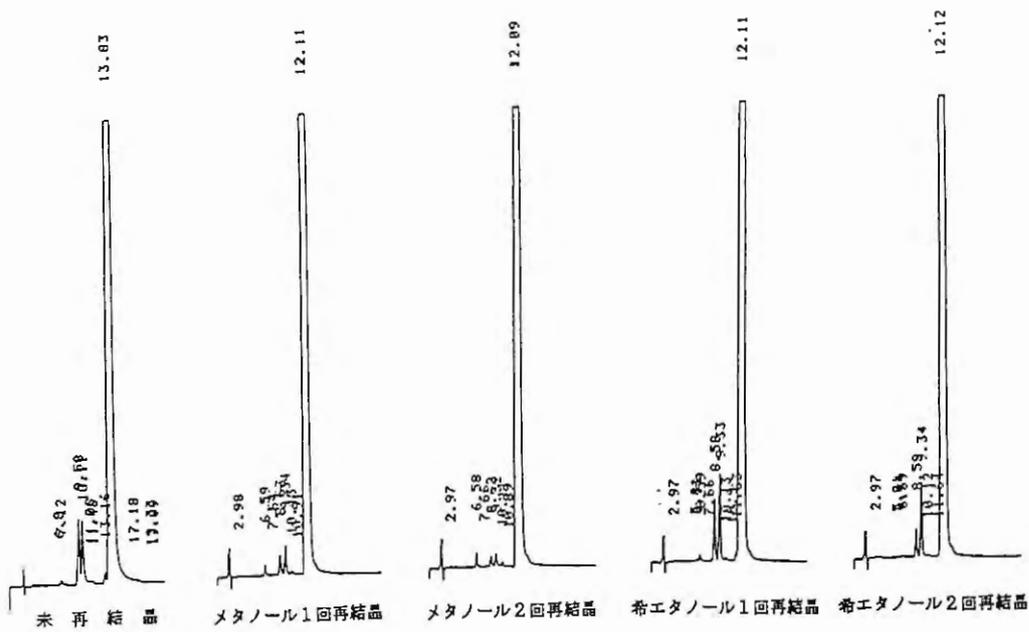


Fig.1-1 精製法の違いによるクロマトグラム(1)

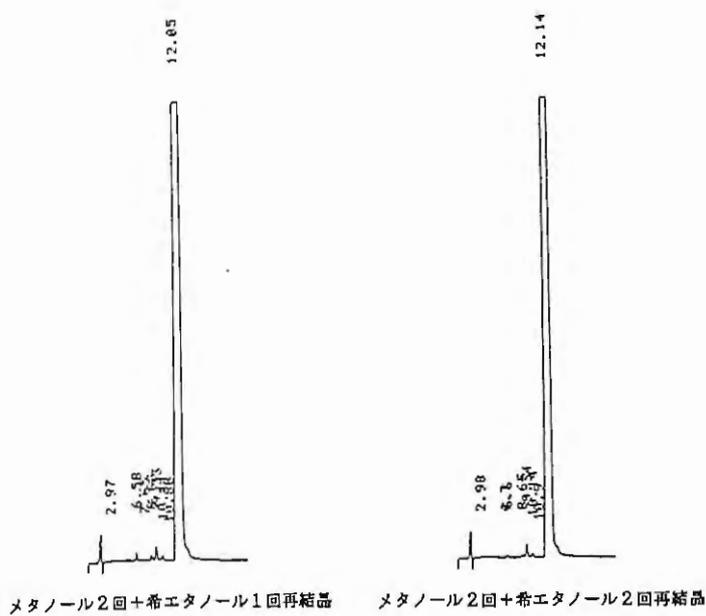
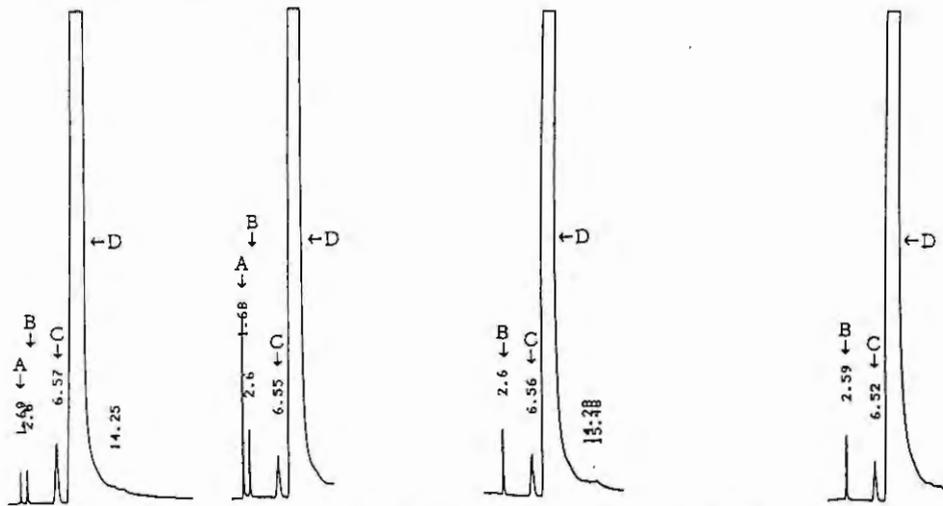


Fig.1-2 精製法の違いによるクロマトグラム(2)

- A: メタノール
- B: 内標 (n-ブタノール)
- C: 抽出溶媒 (n-ブタノール) 中の不純物
- D: 抽出溶媒 (n-ブタノール)



標準溶液    メタノール2回再結晶    メタノール2回+希エタノール1回再結晶    メタノール2回+希エタノール2回再結晶

Fig.2 精製品の残存有機溶媒のクロマトグラム

実施会社名	純度試験		定量(%) [水分換算]
	(1)TLC法	(2)HPLC法(%)	
A社	1 SPOT	99.5	99.9
B社	1 SPOT	99.7	100.1
C社	1 SPOT	99.4	99.9
D社	1 SPOT	99.3	100.7

Table.5 各社で調製した試験用標準品の品質評価

メーカー名	純度試験		定量(%)
	(1)TLC法	(2)HPLC法(%)	
K社	1 SPOT	99.2	85.1
N社	1 SPOT	99.4	92.0
W社	1 SPOT	98.2	86.7
Y社	1 SPOT	99.4	89.5

Table.6 市販生薬試験用標準品の品質評価

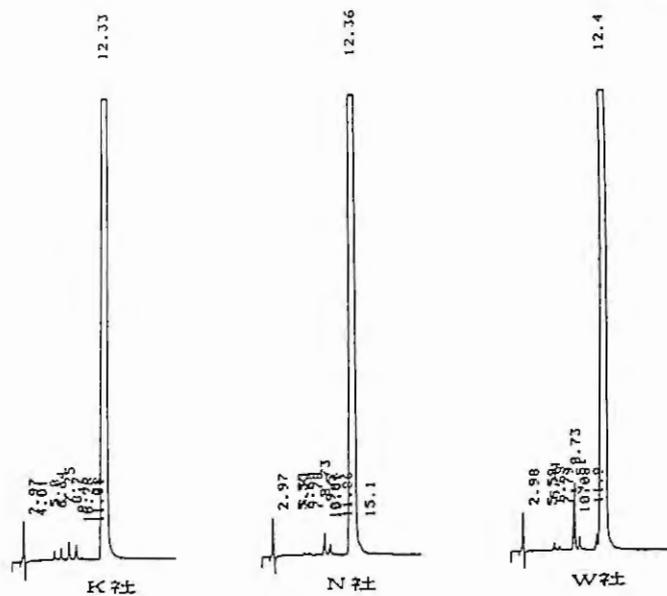


Fig.3 市販生薬試験用標準品のクロマトグラム

#### 4. ま と め

- 1) 標準品の調製は、日局塩化ベルベリンの再結晶で充分であることが、確認され、比較的多量を安価で得られるため、カールフィッシャー法による水分量測定が実施可能であることが示唆された。
- 2) 市販されている生薬試験用標準品は高純度ではあるが、検体が微量で高価なため、水分測定が困難であり、標準品として用いるには問題があると思われた。

#### 謝 辞

最後に、本研究にあたり、貴重なお意見を賜りましたアルプス薬品工業株式会社並びに国立衛生試験所鈴木英世先生に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) 安田一郎、浜野朋子、高野伊知郎、瀬戸隆子、秋山和幸、直井家壽太：塩化ベルベリン及びタンニン酸ベルベリン中のベルベリンの定量、医薬品研究 18(1)、146～151、(1987)
- 2) 鈴木英世：定量用生薬成分について、第16回生薬分析討論会講演要旨集、27、(1987)
- 3) 日本公定書協会編：第11改正日本薬局方解説書、広川書店、C-315～319、(1986)

# 漢方製剤の品質に関する研究(第4報)

## — 桂枝茯苓丸 —

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine IV

### — Keishibukuryo-gan —

舟 川 昌 代  
Masayo FUNAKAWA  
吉 井 美 矢 子  
Miyako YOSHII

石 田 裕 子  
Yuko ISHIDA  
西 本 初 博  
Hatsuhiko NISHIMOTO

中 田 る り 子  
Ruriko NAKADA  
成 川 一 郎  
Ichiro NARIKAWA

東亜製薬株式会社 試験研究室

Research Institute, Toa Pharmaceutical Co., Ltd.

桂枝茯苓丸は駆瘀血剤として最もしばしば用いられている漢方処方の一つである。その原典「金匱要略」<sup>1)</sup>に「桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、芍薬各等分、以上五味、細末となし、煉蜜で煉り、兔糞大の丸とする」とあるように、もともとは丸剤として用いられてきた。しかし、江戸時代<sup>2)</sup>より煎剤(丸料)の形で適用されるようになり、現在市場ではエキス製剤が多く、一般にこれらは丸剤と同一視される傾向にある。ところが、原典に従って丸剤としたものは、煎剤よりも優れているという結果が臨床<sup>3)</sup>、分析<sup>4)</sup>の両面から確かめられ、既に報告されている。

また、桃仁中の成分 amygdalin は共存する加水分解酵素 emulsin の作用によって容易に分解し、prunasin を経て、最終的に benzaldehyde を生ずることが知られているが、原典に従って調製した丸剤は amygdalin 等の指標成分の経時的安定性に懸念があるとの報告もある。<sup>5)</sup>

そこで、我々は原典の桂枝茯苓丸に近似した品質を有し、かつ、長期にわたって安定な「桂枝茯苓丸錠」の開発を試みた。本開発過程において安定性等につき検討した結果を報告する。

## 実験の部

### 1. 被験材料

生薬：桃仁、桂皮末、茯苓末、芍薬末、牡丹皮末及び蜂蜜はいずれも市販の局方品を用いた。桃仁及び蜂蜜以外はいずれも粉末を購入し、桃仁は自社で粉末とした。各生薬末は等量ずつ混合し、桂枝茯苓丸の生薬混合末(以下生薬混合末)とした。

桂枝茯苓丸：金匱要略に従い、生薬混合末と煉蜜(1~2 min 沸騰した蜂蜜)各等量を充分練合し、手で丸めて製丸した。丸剤1日量(3丸)中に含まれる生薬混合末の量は3,000 mgとした。

桂枝茯苓丸錠：生薬混合末に水分を除いた蜂蜜、賦形剤、滑沢剤を加えて打錠した。錠剤1日量(18錠)中に含まれる生薬混合末の量は3,000 mgとした。

市販桂枝茯苓丸製剤：A、B —— 桂枝茯苓丸(生薬末による丸剤)

C —— 桂枝茯苓丸(生薬末とエキスによる丸剤)

D、E —— 桂枝茯苓丸料エキス顆粒(エキスによる顆粒剤)

## 2. 実験方法

### 1) 抽出方法

被験材料から指標成分を抽出する方法は Fig. 1 に示した。

### 2) 定量方法

定量は UV 検出による HPLC 法で行った。指標成分及び HPLC 条件は Table. 1 に示した。

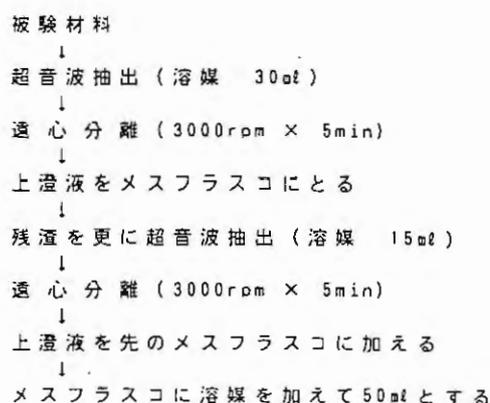


Fig. 1 抽出方法

Table. 1 HPLC 条件

指標成分	検出波長	移動相
amygdalin prunasin	210nm	H <sub>2</sub> O-MeOH(10:1)
benzaldehyde	210nm	H <sub>2</sub> O-MeOH(3:1)
paeoniflorin	240nm	H <sub>2</sub> O-MeOH(3:1)
cinnamic aldehyde paeonol	274nm	H <sub>2</sub> O-MeOH(1:1)

カラム : MERCK リコカート LiChrosorb RP-select B (250 × φ 4mm)

カラム温度 : 40°

流速 : 1.0 ml/min

## 結果

### 1. 抽出条件の検討

桃仁末 1g をメタノール及び 50%メタノールで抽出した場合の amygdalin、prunasin 及び benzaldehyde の量を Fig. 2 に示した。なお、横軸は 1 回の超音波抽出に要した時間である。

メタノールで抽出した場合は amygdalin がほとんど加水分解せず、抽出時間 20 min 以上では定量値が一定であった。50%メタノールの場合は 10 min で既に amygdalin が分解し、多くの prunasin 及び benzaldehyde が認められ、抽出時間の延長により分解の程度が著しく進行した。

別途、エタノールにより実施した結果によれば amygdalin の抽出率が非常に低く、50%エタノールでは 50%メタノールの場合と同様に amygdalin の分解が生じた。

よって、本実験では抽出溶媒としてメタノールを採用し、1 回の抽出時間を 30 min とした。

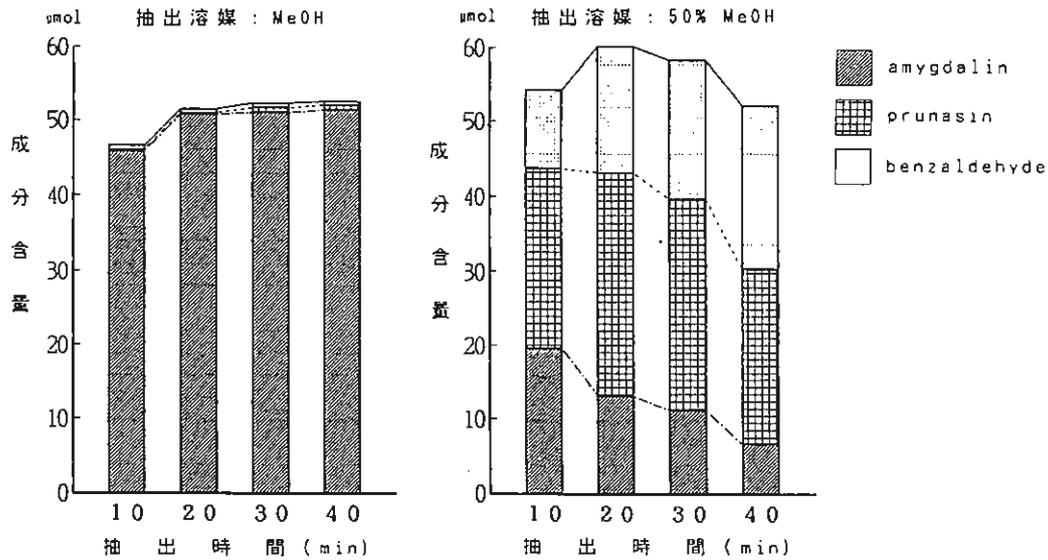


Fig. 2 桃仁 1 g あたりの amygdalin, prunasin, benzaldehyde の量 (μmol)

## 2. 桂枝茯苓丸及び桂枝茯苓丸錠中の指標成分の経時変化

丸剤及び錠剤は、服用 1 回分を厚さ 1.2 μm のアルミニウム包剤で包装し、冷蔵 (5~6°)、室温 (15~30°)、医薬品の製造指針の加速条件 (40°、75%) でそれぞれ 1 箇月、3 箇月、6 箇月間保存した。これらにつき指標成分の安定性を比較し、その結果を Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。

Fig. 3 によると、40°、75% 保存の丸剤においてのみ、amygdalin が加水分解して経時的に著しく減少している一方で分解生成物の prunasin 及び benzaldehyde が経時的に増加した。また、室温保存の丸剤においても 6 箇月目で prunasin 及び benzaldehyde が認められた。丸剤のその他の保存条件並びに錠剤においては amygdalin の変化は認められなかった。

cinnamic aldehyde は 40°、75% 保存の丸剤においてのみ著しい減少がみられ、それ以外ではいずれもほとんど変化がなかった。

また、Fig. 4 に示したように、paeonol 及び paeoniflorin についてはいずれの保存検体にもほとんど変化が認められなかった。

## 3. 市販製剤中の成分比較

各市販桂枝茯苓丸製剤に使用された原料生薬量について Table. 2 に示した。また、各製剤 1 日量中の指標成分量については Fig. 5 に示し、各製剤に使用された各原料生薬つまり桃仁、桂皮、牡丹皮、芍薬それぞれ 1 g あたりに換算した指標成分量については Fig. 6 に示した。

各製剤中 A 及び B は生薬末を丸剤としたもので、C は生薬末と抽出エキスを合わせて丸剤としたものである。D 及び E は抽出エキスを顆粒剤としたもので、「東亜」は東亜製薬(株)製の桂枝茯苓丸錠である。

Fig. 5 に示したように、各社製剤 1 日量中の amygdalin 量はいずれも「東亜」に比較して著しく低値か、もしくは全く認められなかった。その分解生成物 prunasin はいずれにおいても認められず、benzaldehyde は A、B 及び C において認められた。また、cinnamic aldehyde は、「東亜」並びに A、B においては比較的高い値を示したが、C、D 及び E においてはほとんど認められなかった。paeonol についても cinnamic aldehyde と同様の傾向がみられた。paeoniflorin については比較的高い含有率を示した。

一方、これらを各生薬1gあたりに換算してFig. 6に示したが、いずれも「東亜」に比較して指標成分が低く、特にエキス製剤において著しかった。

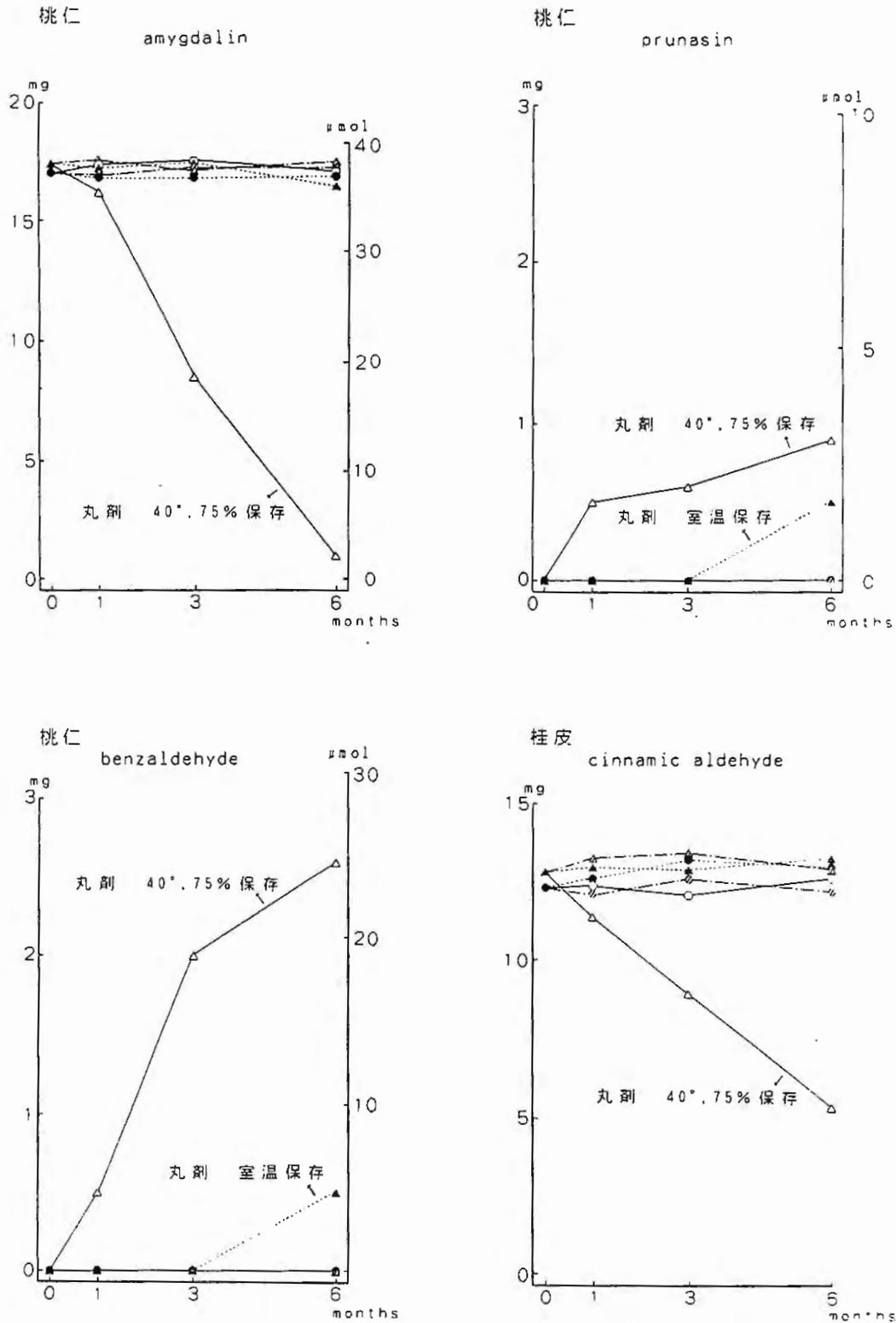
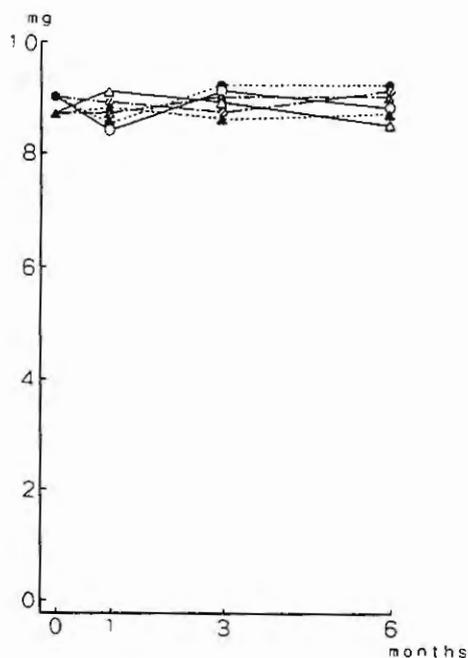


Fig. 3 桂枝茯苓丸及び桂枝茯苓丸錠中の指標成分の経時変化—I (mg/1日量)

丸剤      --△--: 冷蔵保存      ---▲---: 室温保存      —□—: 40°C, 75% 保存  
錠剤      --◇--: 冷蔵保存      ---●---: 室温保存      —○—: 40°C, 75% 保存

牡丹皮 paeonol



芍薬・牡丹皮 paeoniflorin

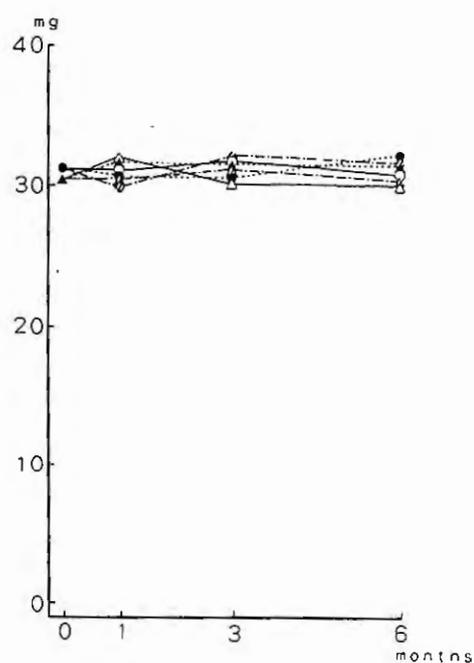


Fig. 4 桂枝茯苓丸及び桂枝茯苓丸錠中の指標成分の経時変化—II (mg/1日量)

Table. 2 各社製剤1日量中の各生薬量 (mg)

	東 亜	A	B	C	D	E
	生薬末	生薬末	生薬末	生薬末	エキスの 原料生薬	エキスの 原料生薬
桂 枝	600	1617	1200	360	800	4000
茯 苓	600	1617	1200	360	800	4000
牡丹皮	600	1617	1200	360	800	4000
桃 仁	600	1617	1200	360	800	4000
芍 薬	600	1617	1200	360	800	4000
小合計	—	—	—	1800	4000	—
合 計	3000	8083	6000	5800	20000	10050
備 考	丸 劑	丸 劑	丸 劑	丸 劑	エキス顆粒	エキス顆粒
				エキス量 400mg	エキス量 1000mg	エキス量 1150mg

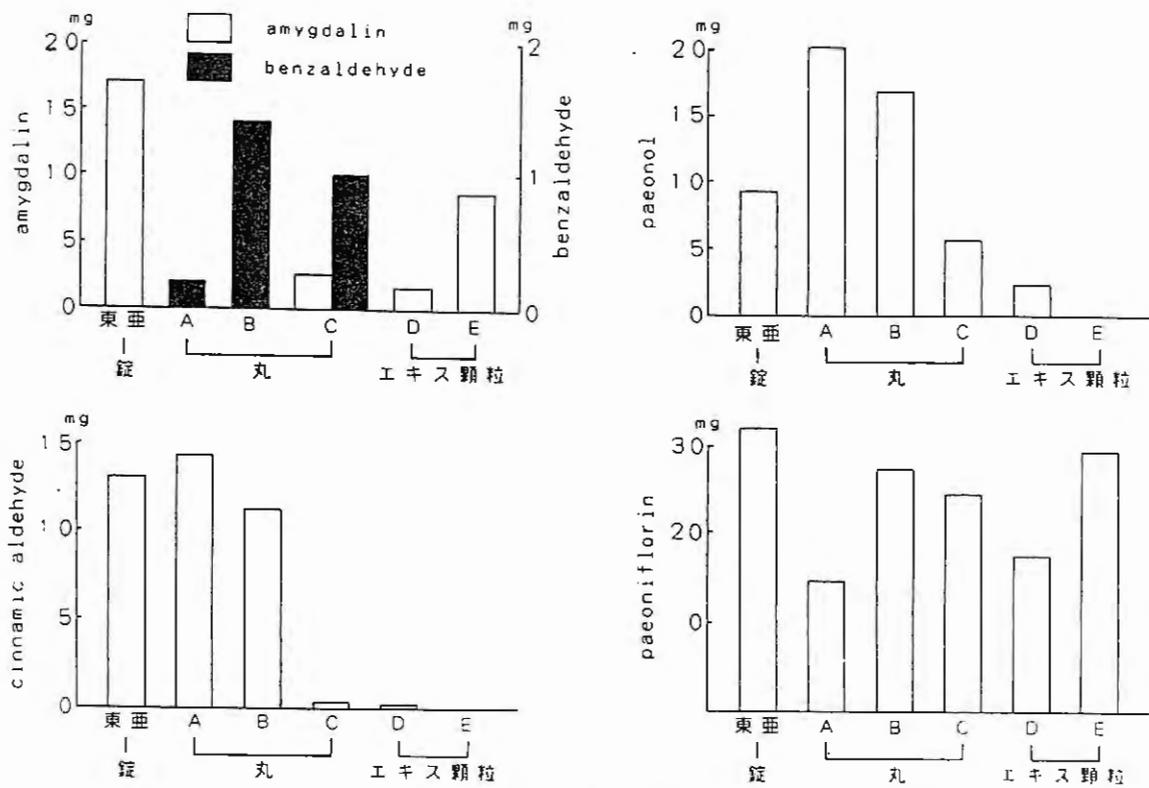


Fig. 5 市販製剤中の指標成分比較 (1日量)

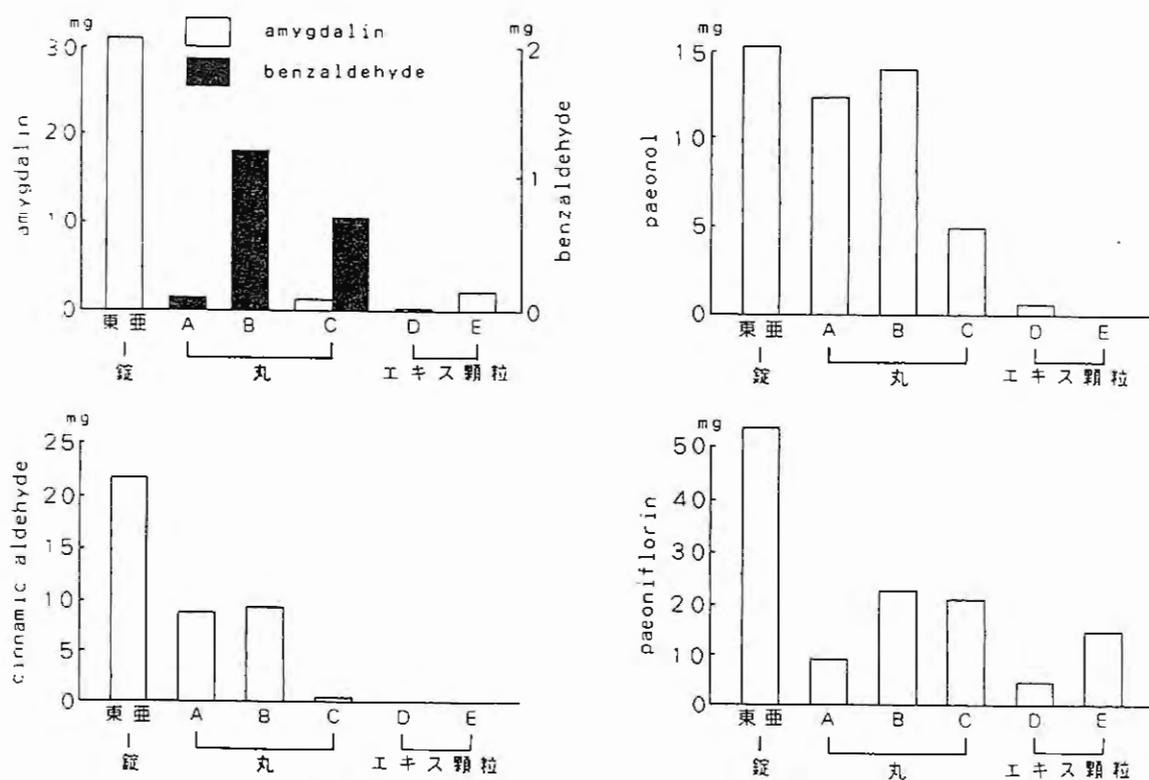


Fig. 6 市販製剤中の指標成分比較 (各生薬1gあたりに換算)

## 考 察

原典の製法に従って調製した桂枝茯苓丸と水分を除いた蜂蜜を用いて調製した桂枝茯苓丸錠についてその安定性を比較した。その結果、丸剤においては煉蜜中の水分等の影響により桃仁中の amygdalin 及び桂皮中の cinnamic aldehyde の経時的安定性に懸念があることが明らかとなった。一方、錠剤においては指標成分のいずれもほとんど変化がなく安定性に優れていることが確認された。

amygdalin は水の存在下、桃仁中に共存する加水分解酵素 emulsin によって比較的容易に分解することが知られており、また、cinnamic aldehyde は乾燥工程等での揮散を免れ難い。以上により桂枝茯苓丸製剤の品質は、製剤の製造工程によって左右されやすいものと考えられる。このことは現在の市販桂枝茯苓丸製剤の品質に反映しており、今回の実験結果から明らかのように、いずれの製剤も原料生薬量として最少の「東亜」の品質を大きく下廻った。

即ち、現在我国では、桂枝茯苓丸の原料生薬量の満量は 1 日 20 g で、粉末として用いる場合は 1 日 6 ~ 9 g と規定されており、一般向けの製剤としては更にこの 1/2 量まで減量することが認められている。「東亜」は原料生薬末量として最低値 (1 日 6 g) の 1/2 量の 1 日 3 g を使用しており、いわば最低規格の製剤である。しかしながら、「東亜」の指標成分は、「東亜」の 2 倍以上の生薬を使用している他の製剤に比べて明らかに高値を示した。

指標成分のそれぞれが桂枝茯苓丸を適用すべき「証」に対して、いかなる役割を果たすかについて、今後近代的見地から検討を進めるためには、その品質規格及び安定性が基盤となることはいうまでもない。また、我々は医薬品を製造する立場として、桂枝茯苓丸に限らず、品質の優れた製剤を市場に供給する義務があることを認識すべきであると考えらる。

## 文 献

- 1) 張中景、金匱要略、明刊兪子木本影印本、燎原、東京、1977
- 2) 多紀元簡、金匱要略輯義、復刻版、出版科学総合研究所、東京、1979
- 3) 寺澤捷年他、自家製・桂枝茯苓丸の臨床効果に関する研究—煎剤および丸剤の成分比較—、日本東洋医学雑誌、35、131 (1984)
- 4) 鳥居塚和生他、桂枝茯苓丸の製剤学的検討、日本東洋医学雑誌、35、185 (1985)
- 5) K. Toriizuka, Pharmaceutical Studies on the Medicinal Prescription Used in Traditional Sino-Japanese Medicine — Change of the Components in Keishibukuryo-gan Prepared in the Hospital Pharmacy —、生薬学雑誌、42(1)、89 (1988)

【原 著】

HPLCによるパップ剤中の精油類の分析

High performance liquid chromatographic analysis of essential oils in cataplasms

明 官 紳 一  
Shin'ichi MYOKAN

田 中 恣  
Tsutomu TANAKA

井 沢 香 里  
Kaori IZAWA

深 井 伸 恵  
Nobue FUKAI

テ イ カ 製 薬 株 式 会 社 品 質 管 理 部  
Quality Control Division, Teika Seiyaku Co., Ltd.

パップ剤中の精油成分の分析は、一般に蒸留法が用いられ、その代表的なものとして、日局生薬試験法、精油定量法により総精油量を求め、更にGC法により各成分の含量を定量する方法がある。<sup>1),2)</sup>しかし、精油定量法では抽出に非常に時間がかかり、また、精油定量器の精度はパップ剤の精油分析として必ずしも十分であるとはいえない。更に蒸留の加熱条件及び冷却方式にて誤差を生じることもある。そこでパップ剤中の *l*-メントール及び *dl*-カンフル等の分析精度を高める目的でメタノール溶媒振とうによる直接抽出法と検出方法として示差屈折計を用いたHPLCによる分析条件を検討し、比較的短時間に、かつ、高精度で定量することができる分析法を確立した。

実験の部

1. 標準品及び試料

1) 標準品

*l*-メントール標準品：日局 *l*-メントールをエタノールで2回再結晶した。含量99.0%以上。

*dl*-カンフル標準品：日局 *dl*-カンフルをエタノールで3回再結晶した。含量99.0%以上。

2) 試料

消炎鎮痛パップ剤A。有効成分として膏体

100g中 *l*-メントール0.3g、ハッカ油

1.0g及び *dl*-カンフル0.5gを含有する

製剤を用いた (Table. 1)。

Table 1 Composition of Cataplasma A

<i>l</i> -menthol	0.3g
mentha oil	1.0g
<i>dl</i> -camphor	0.5g
additive	q. s.
Total	100g (640cm <sup>2</sup> )

2. HPLC条件

検出器：示差屈折計

カラム：Shimpack CLC ODS (島津製作所、6mm×15cm、5µm)

カラム温度：40°付近の一定温度

移動相：アセトニトリル・水混液 (52:48)

流量：1.2ml/min

3. 内標準溶液の調製

アセナフチレン (和光純薬) 350mgを量り、メタノールを加えて100mlとした。

4. 標準溶液の調製

*l*-メントール標準品約300mg及び *dl*-カンフル標準品約240mgを精密に量り、メタノールを加えて正確に100mlとした。この液10mlを正確に量り、内標準溶液5mlを正確に加え、更にメタノールを加えて25mlとし標準溶液とした。

## 5. 試料溶液の調製

試料 30 cm<sup>2</sup> (5 cm × 6 cm) を正確に切りとり、幅約 5 mm に細切し、その重量を量り、50 ml のガラス製の共せん遠心沈殿管に入れ、これに内標準溶液 5 ml を正確に加え、更にメタノール 20 ml を加えて、90 分間激しく振とうし、これを 0.45 μm のフィルターでろ過し、ろ液を試料溶液とした。

## 6. 定量法

標準溶液及び試料溶液 30 μl ずつを HPLC に注入し、得られたクロマトグラムより内標準物質のピーク高さに対する *l*-メントール及び *d,l*-カンフルのピーク高さの比を求め、含量を算出した。

## 結果

### 1. HPLC 条件の設定

試料溶液を直接 GC に注入し定量することも可能であった。しかし、メタノールに抽出されたバップ基剤成分の流出時間は GC 条件下で非常に長く、また、カラムに強く保持され流出しない場合もあり、数十回の連続注入でクロマトグラムのベースラインが乱れ、測定が不可能であった。そこで測定方法を HPLC 法にすることにより、バップ基剤成分の影響を受けることなく連続注入が可能となった。HPLC の条件は、*l*-メントールが紫外部に吸収を持たないことより検出器に示差屈折計を用いた。<sup>3)</sup> カラムは長時間使用できるものとして島津製作所製の ODS 系カラム、Shimpack CLC を用い、移動相は調製が容易な条件ということで、アセトニトリル・水混液 (52:48) を採用した。

標準溶液及び試料溶液のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

### 2. 検量線

*l*-メントール及び *d,l*-カンフルにつき、それぞれ 0.2 ~ 2.0 mg/ml の濃度範囲で作成した検量線はいずれも原点を通る良好な直線性を示し、相関係数はいずれも 0.999 以上であった (Fig. 2)。

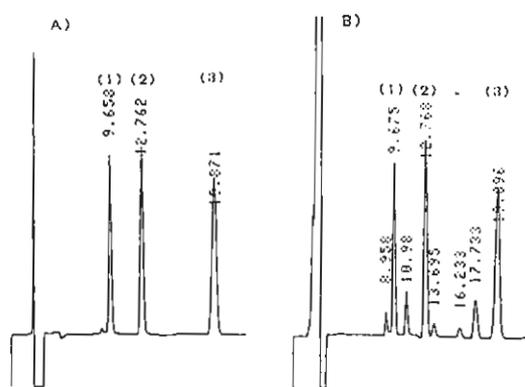


Fig. 1 Chromatogram of *l*-menthol, *d*-camphor and acenaphthylene

A) standard B) sample  
 (1) *d*-camphor  
 (2) *l*-menthol  
 (3) I. S. (acenaphthylene)

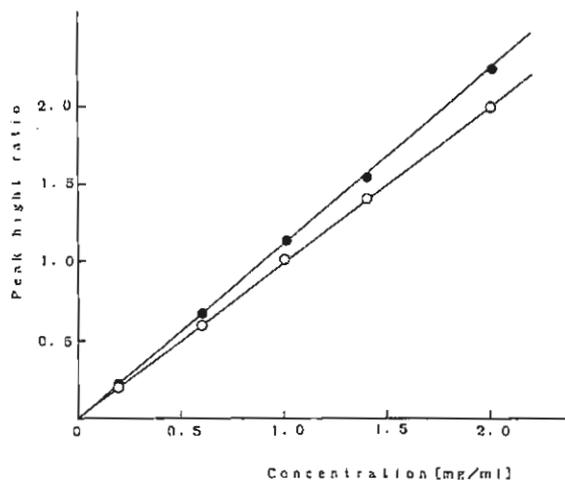


Fig. 2 Standard calibration curves of *l*-menthol and *d*-camphor

○ *l*-menthol  
 ● *d*-camphor

### 3. ハッカ油中の *l*-メントールの定量

*l*-メントール及び *d,l*-カンフルの定量分析の検討にあたり、原料のハッカ油中の *l*-メントール含量を測定し、GC による定量値と比較した。GC の条件を Table. 2 に示した。ハッカ油 3 ロット中の *l*-メントール含量は HPLC 法と GC 法ではほぼ同一の相関する結果を得た (Table. 3)。また HPLC 法でハッカ油の同一試料溶液を 5 回繰り返して注入したときの C. V. 値は 0.83% で、繰り返し精度も高いことを確認した (Table. 4)。

Table 2 Analytical conditions of GC

Detector : Flame ionization detector
Column : PEG-20M 10% on AW. ChromosorbW 60/80 (3mmφ×2m)
Column temperature : 130→170° 4' /min
Injection temperature : 200°
Carrier gas flow rate : Nitrogen, 50ml/min

Table 4 Influence of repeated injection to HPLC on analysis of mentha oil

No.	mentha oil
1	36.2
2	36.0
3	36.3
4	36.2
5	36.8
mean	36.3
c. v.	0.83

(%)

Table 3 Determination of *l*-menthol in mentha oil by HPLC and GC

Sample No.	HPLC	G C
A	1	37.1
	2	36.7
	3	36.7
mean	36.8	37.1
B	1	36.5
	2	36.2
	3	36.6
mean	36.4	37.1
C	1	35.5
	2	35.9
	3	36.2
mean	35.9	35.4

(%)

4. バップ剤 A 中の *l*-メントール及び *dl*-カンフルの定量

バップ剤 A 中の *l*-メントール及び *dl*-カンフルの定量分析を行った。抽出溶媒はメタノール、エタノール及びアセトニトリルの各溶媒につき比較した。60 min の振とう抽出で、メタノールでは *l*-メントール、*dl*-カンフル共にほぼ 100% の回収率を得た (Table. 5)。そこで抽出溶媒をメタノールと設定した。

次に抽出時間について検討した。*l*-メントール及び *dl*-カンフルは、共にメタノール溶媒振とう抽出 60 min 付近でほぼ 100% 回収された (Fig. 3)。そこで充分な抽出時間として 90 min と設定した。

Table 5 Influence of solvent on analysis of *l*-menthol and *d*-camphor

solvent	<i>l</i> -menthol	<i>d</i> -camphor
methanol	100.0	100.5
ethanol	91.0	93.5
acetonitrile	66.2	69.5

Shake 60min. Each value is the mean of three determinations (%)

5. 基剤の影響

バップ剤 A より、有効成分を除いた基剤試料を調製し、定量法と同様に操作したところ、*l*-メントール、*dl*-カンフル及び内標準物質の部位にピークを認めなかった (Fig. 4)。また、この製剤ブランクに *l*-メントール及び *dl*-カンフル標準溶液を添加し、定量法と同様に操作したところ、両成分共にほぼ 100% の回収率が得られた。このことより有効成分の基剤への吸

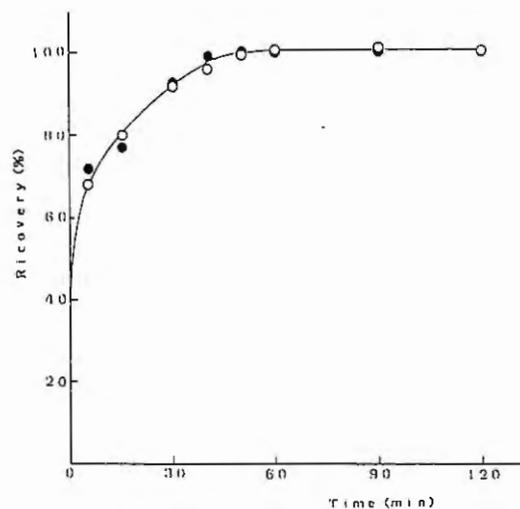


Fig. 3 Recovery of *l*-menthol and *d*-camphor from methanol solutions

○ *l*-menthol  
● *d*-camphor

着はないといえる。

#### 6. 製剤への適用

バップ剤A 3ロットにつき定量を行った (Table. 6)。HPLC法による *l*-メントール及び *dl*-カンフルの定量値は精度もよく、蒸留法を用いたGC法の定量値とほぼ等しいものであった。

#### 7. 本法による他成分の分析

バップ剤に一般に配合される成分及び他の精油類をHPLC条件下で注入した時の保持時間と保持比 ( $K'$ ) をTable. 7に示した。本定量法により、バップ剤Aの防腐剤であるチモールも精度良く定量することができた。

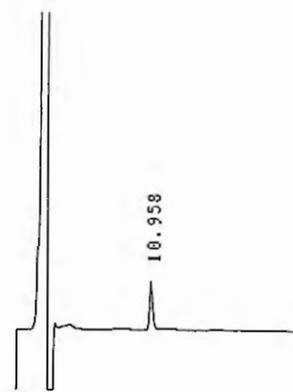


Fig.4 Chromatogram of preparation blank

Table 6 Determination of *l*-menthol and *d*-camphor in preparation by HPLC and GC

Sample No.	H P L C		G C	
	<i>l</i> -menthol	<i>d</i> -camphor	<i>l</i> -menthol	<i>d</i> -camphor
A	1	99.8	103.4	102.8
	2	102.2	102.7	102.3
	3	100.1	101.0	102.4
	mean	100.7	102.4	102.5
B	1	101.8	98.3	101.9
	2	103.5	100.1	101.7
	3	102.1	98.9	100.4
	mean	102.5	99.1	101.3
C	1	101.0	100.7	102.6
	2	103.4	102.8	102.4
	3	99.1	100.7	103.1
	mean	101.2	101.4	102.7

(%)

Table 7 Retention time and capacity factor

Material	Rt (min)	$K'$
glycyrrhizic acid	3.36	0.56
glycol salicylate	3.98	0.84
methyl salicylate	8.22	2.81
borneol	8.84	3.09
capsaicine	9.43	3.37
nonylic acide vanillylamide	9.44	3.37
<i>d</i> -camphor	9.62	3.45
thymol	10.83	4.01
isomenthol	11.65	4.39
<i>l</i> -menthol	12.78	4.92
cineole	12.85	4.95
menthone	17.48	7.09
anethole	17.86	7.27
acenaphthylene	19.53	8.04

## 考 察

バップ剤中の *l*-メントール及び *dl*-カンフルの分析は、従来の日局生薬試験法、精油定量法に準じた方法では、精油定量器の精度、正確性の点から、ときに定量値に大きなばらつきを生じることがあり、新しい試験法の開発が必要であった。今回、メタノール溶媒振とうによる直接抽出が、揮散の少ない精度の高い方法と考えられたので、定量法の確立を目的に検討した。測定方法としては示差屈折検出器を用いたHPLC法を採用した。これは、前処理が簡便な上にカラムも一般的なODS系カラムを使用し、基剤成分の影響の少ない、再現性の高い方法であり、ルーチン分析に適している。

今後は、ハッカ油中のテルペン類やユーカリ油中のシネオール等への応用を考えている。

## 結 論

パップ剤中の *l*-メントール及び *dl*-カンフルの HPLC による定量法を確立した。この方法は試験時間の短縮、分析コストの削減など品質管理面に有用であると考えられる。

## 謝 辞

この研究を行うにあたり、御指導いただきました(株)島津製作所、応用技術部、京都分析センターに深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) 中島慶子、安田敏子：消炎鎮痛貼布剤からのメントール、カンフル、サリチル酸メチルの揮散について、薬剤学、47(3)、168、(1987)
- 2) 原田裕文、風間成孔、寺島潔、高橋利恵子：第十改正日本薬局方収載製剤「複方サリチル酸メチル精」の安定性、定量について、医薬品研究、14(3)、411、(1983)
- 3) S. A. Hant and M. T. Core: J. Liq. Chromatogr., 4(10)、1869、(1981)

## 【原 著】

## 牛黄の品質評価について

Evaluation of the Quality of Oriental Bezoar

有 沢 みさを  
Misao ARISAWA石 田 美 鈴  
Misuzu ISHIDA横 田 洋 一  
Youichi YOKOTA江 尻 千 鶴子  
Chizuko EJIRI斉 藤 晴 夫  
Haruo SAITO

富 山 県 薬 事 研 究 所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

牛黄は牛 (*Bos taurus* Linne var. *domesticus* Gmelin (*Bovidae*)) の胆のうに生じた結石で、強心、利胆、鎮静、鎮けい、解毒、解熱などの目的で六神丸及び救命丸に配合されている。また民間では高血圧の治療薬としても使用されている<sup>1)</sup>。

牛黄は高価にもかかわらず、その品質評価には産地、色調、形態、味覚、臭いなどを指標とした経験的、主観的要素の多い手段が取り入れられている。

そこで今回、理化学的品質評価の導入の一環として、市販牛黄中の胆汁酸及びビリルビンの含量をHPLC法で測定し、産地間の差異について検討した。更にインド産牛黄より異物と推定される成分が検出され、それについても若干検討したので併せて報告する。

## 実験の部

## 1. 試 料

オーストラリア産7検体、北米産3検体、アルゼンチン産2検体、ウルグアイ産1検体、ブラジル産6検体、コスタリカ産1検体及びインド産6検体を用いた。

## 2. 標 準 品

ビリルビン：牛胆石より得られた結晶(シグマ製)、コール酸：東京化成試薬特級を70%エタノールより再結晶、デオキシコール酸：東京化成試薬特級を希エタノールより再結晶、ケノデオキシコール酸：シグマ製

## 3. 試薬及び試液

トリエチルアミン：和光純薬工業製(試薬特級)、フェナシルプロマイド：東京化成製(HPLCラベル用)、メタニールエロー：和光純薬工業製(試薬特級)、オーラミン：和光純薬工業製(試薬特級)

## 4. 装 置

島津LC-6A型高速液体クロマトグラフ及び日本分光FT/IR-3を使用した。

## 5. ビリルビンのHPLC

牛黄を粉末とし、その20mgを精密に量り、氷酢酸・クロロホルム混液(1:4)50mlを加え還流冷却器を付け75°の水浴中で1時間抽出した。冷後クロロホルムを加え正確に100mlとした。更にこの6mlを正確にとりクロロホルムを加え正確に100mlとし試料溶液とした。この試料溶液20μlにつき下記のHPLC条件で試験を行った。(以上の実験は遮光下で行った。)<sup>2), 3)</sup>

## HPLC条件

カラム : Shim-pack CLC-ODS (株島津)  $\phi 6 \times 150 \text{ mm}$   
 カラム温度 : 40° 付近の一定温度  
 移動相 : メタノール・薄めた氷酢酸(2→100)混液(89:11)

流 量 : 1.0 ml/min

検 出 器 : 紫外吸光光度計 (450 nm)

#### 6. 胆汁酸の HPLC

第18回生薬分析討論会講演要旨、横田らの「HPLC法による市販熊胆及び牛黄中の胆汁酸の分析」の方法に準拠した。<sup>4)</sup>

#### 7. 胆汁酸の TLC

牛黄を粉末とし、その100mgを精密に量り、メタノール50mlを加え水浴上で1時間抽出し、ろ過した。残留物を同様に2回抽出し、ろ液を合わせ溶媒を留去した後メタノールを加え正確に10mlとし試料溶液とした。この試料溶液20μlにつき下記のTLC条件で試験を行った。

TLC条件

薄層板 : HPTLC Kieselgel 60 (Merck)

展開溶媒 : トルエン・氷酢酸・水混液 (10:10:1)

検出法 : バニリン0.8gを硫酸・エタノール混液 (4:1) 10mlに溶かし噴霧し、105°で5分間加熱する。

#### 8. ショ糖(異物)の TLC、HPLC及びIRによる検索<sup>5)、6)</sup>

1) インド産牛黄100mgを精密に量り、以下7項と同様操作し下記のTLC及びHPLC条件で試験を行った。

TLC条件

薄層板 : HPTLC Kieselgel 60 (Merck)

展開溶媒 : (1)n-ブタノール・アセトン・水混液 (4:5:1) (2)メチルエチルケトン・氷酢酸・水混液 (3:1:1)

検出法 : バニリン0.8gを硫酸・エタノール混液 (4:1) 10mlに溶かし噴霧し、105°で5分間加熱する。

HPLC条件

カラム : TSKgel Amide 80 東ソ(株)  $\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$

移動相 : 薄めたエタノール (8→10)

検出器 : 示差屈折計

2) インド産牛黄を粉末にし、その100mgを精密に量り水10mlを加え超音波抽出器で30分間抽出した。これをろ過し、ろ液をクロマトグラフ柱(強塩基性イオン交換樹脂Dowe X50w $\times$ 4  $\phi 1.5 \times 10 \text{ cm}$ )に通した。次に水20mlを用いてクロマトグラフ柱を洗い、流出液及び洗液を合わせ、水浴上で濃縮した。得られた残留物をエタノールより再結晶させ、IRで測定した。

#### 9. タール色素(異物)の TLC及びHPLCによる検索

インド産牛黄(ビリルビン及び胆汁酸を含まない偽品)100mgを精密に量り、以下7項と同様操作し下記のTLC及びHPLC条件で試験を行った。

TLC条件

薄層板 : HPTLC Kieselgel 60 (Merck)

展開溶媒 : (1)n-ブタノール・氷酢酸・水混液 (10:10:1) (2)アミルアルコール・エタノール・強アンモニア水混液 (10:10:1)

検出法 : 肉眼で観察する。

HPLC条件

カラム : Shim-pack CLC-ODS (株)島津  $\phi 6 \times 150 \text{ mm}$

カラム温度 : 40° 付近の一定温度

移動相 : (1)メタノール・薄めた氷酢酸(2→100)混液(6:4) (2)メタノール・水混液(97:3)

流量 : 1.0 ml/min

検出器 : 紫外吸光光度計(410 nm)

### 1.0. テンブ(異物)の検索

9項で得られた残留物の一部についてヨウ素反応を行った。更に一部の残留物につき鏡検を行った。

## 結果及び考察

### 1. ビリルビン及び胆汁酸含量について

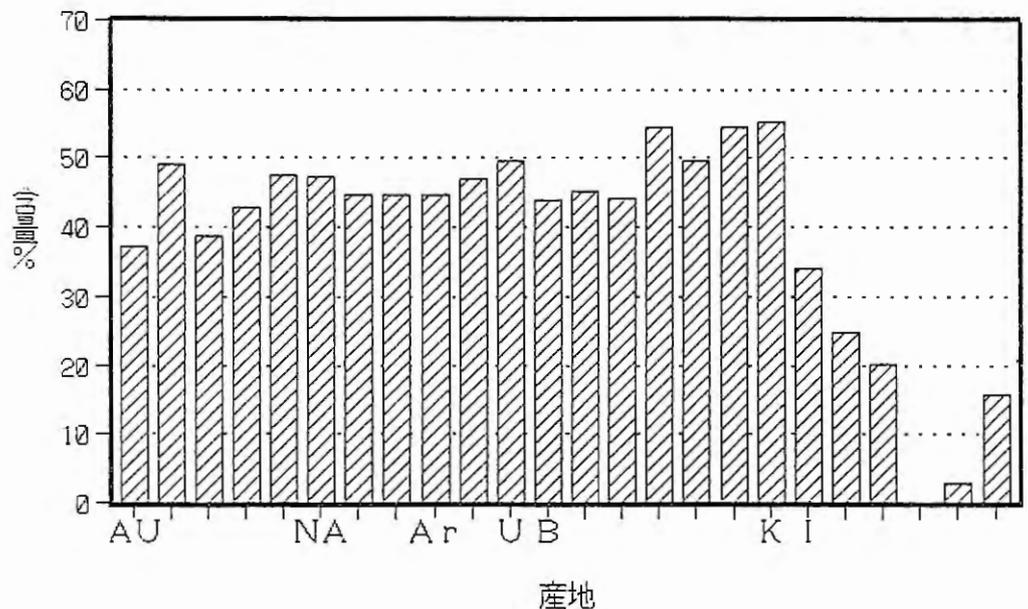
牛黄は市場では産地別にランク付され、オーストラリア産は上品、北米産及び中南米産は中品、インド産は下品として流通している。<sup>7)</sup>

そこで、今回我々は各産地の牛黄を3~4gずつ収集し、ビリルビン含量及び胆汁酸含量を求め、それらと市場における評価との相関について検討を行った。

Fig. 1は各産地の牛黄のビリルビン含量を示したものである。Fig. 2は胆汁酸含量を示したものである。今回の牛黄のビリルビン含量は0~55%であり、胆汁酸含量は0~13%であった。産地別では、下品といわれているインド産牛黄のビリルビン含量は0~34%、胆汁酸含量は0~5%であり、他の産地の値に比べ著しく低く、更にビリルビン及び胆汁酸が認められない偽品も1検体検出され、インド産の低い評価を裏づける結果であった。次に上品といわれるオーストラリア産と中品といわれる北米産、アルゼンチン産、ウルグアイ産、ブラジル産、コスタリカ産を比較したところ、これらの産地間

ではビリルビン及び胆汁酸含量においては差は認められず、ビリルビン含量40~55%胆汁酸含量6~13%の比較的高い値が得られた。ビリルビン及び胆汁酸含量で評価するならば、これらの産地の牛黄は同一の品質ものと考えられた。

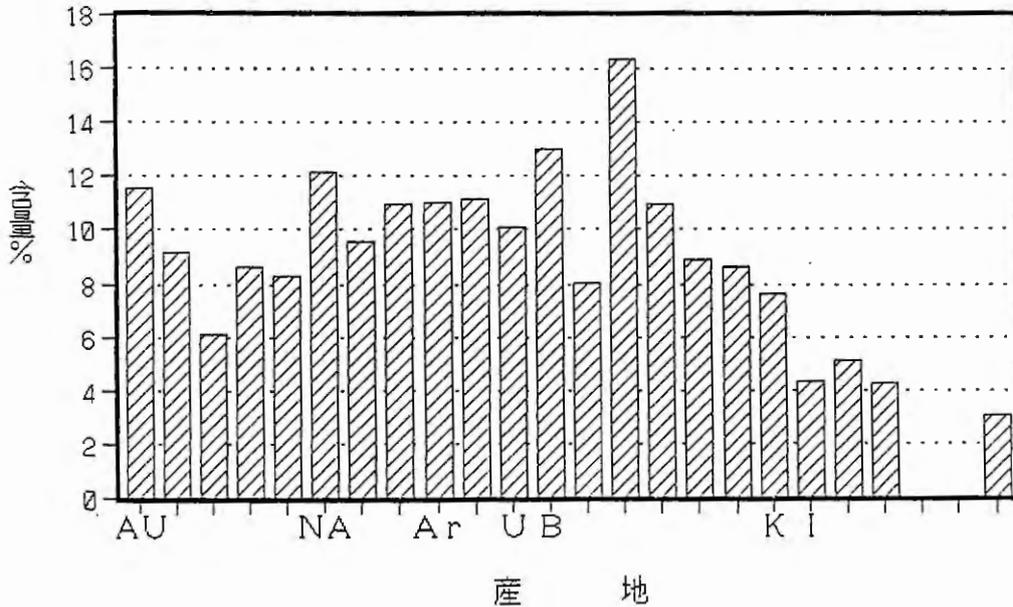
Fig.1 牛黄中のビリルビン含量



Au:オーストラリア NA:北米 Ar:アルゼンチン U:ウルグアイ

B:ブラジル K:コスタリカ I:インド

Fig.2 牛黄中の胆汁酸含量



Au:オーストラリア NA:北米 Ar:アルゼンチン U:ウルグアイ  
 B:ブラジル K:コスタリカ I:インド

2. 胆汁酸のTLCについて

つきに各産地の牛黄について、胆汁酸のTLCパターンで比較を行い、その結果をFig. 3に示した。オーストラリア産、北米産、アルゼンチン産、ウルグアイ産、ブラジル産、コスタリカ産のTLCパターンは類似しており、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、グリココール酸、グリコデオキシコール酸の抱合胆汁酸及びコール酸、デオキシコール酸の遊離胆汁酸が認められた。

インド産は他の産地に比べ若干異なったTLCパターンを示した。コール酸、デオキシコール酸の遊離胆汁酸は認められたが、抱合胆汁酸は殆ど認められなかった。また原点近くに他の産地の牛黄に認められない未知スポットも検出された。

3. インド産牛黄の異物のTLC、HPLC及びIRによる検索

前項で検出されたインド産牛黄の未知スポットについて、インド産牛黄特有の成分であるかまたは異物の混入によるものであるかについて検討を行い、その結果をFig. 4~8に示した。未知スポットのRf値、形状、色調が糖類に類似していたので、TLCでは対照として各種糖類を同時に展開した。Fig. 4~5のTLCよりインド産牛黄の未知スポットはショ糖とRf値、形状、色調が一

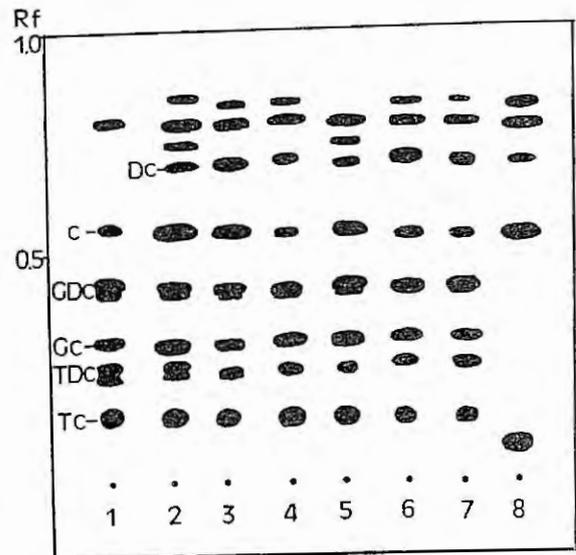


Fig.3 牛黄の薄層クロマトグラム

1:牛胆汁 2:オーストラリア 3:北米 4:アルゼンチン 5:ウルグアイ  
 6:ブラジル 7:コスタリカ 8:インド TC:タウロコール酸 TDC:タウロ  
 デオキシコール酸 GC:グリココール酸 GDC:グリコデオキシコール酸  
 C:コール酸 DC:デオキシコール酸

致した。Fig. 6のHPLCよりインド産牛黄のピークはショ糖と保持時間が一致し、その含量はほぼ35%であった。インド産牛黄より結晶を析出させIRスペクトルを測定したところ、Fig. 7~8に示すようにショ糖標準品と同一の波数(—OH 3370  $\text{cm}^{-1}$ 、—CH<sub>2</sub> 1460  $\text{cm}^{-1}$ 、—C—O—C— 1125  $\text{cm}^{-1}$ 、1104  $\text{cm}^{-1}$ 、1000  $\text{cm}^{-1}$ )に吸収が認められた。<sup>8)</sup> 以上の結果、インド産牛黄にはショ糖が含有することが明らかになり、ショ糖は植物由来のものであること及び多量に含むことより、故意的に増量剤としてインド産牛黄の中に混入されたものと推察された。<sup>9)</sup>

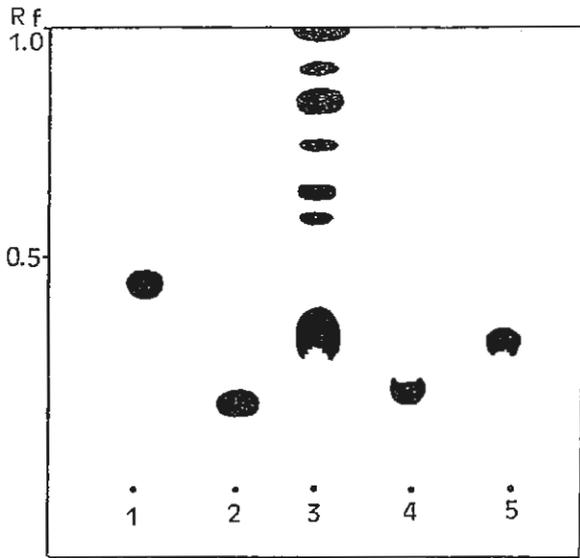


Fig. 4 インド産牛黄及び糖類の薄層クロマトグラム

1:ブドウ糖 2:乳糖 3:インド産牛黄 4:麦芽糖 5:ショ糖  
展開溶媒: n-ブタノール・アセトン・水混液(4:5:1)

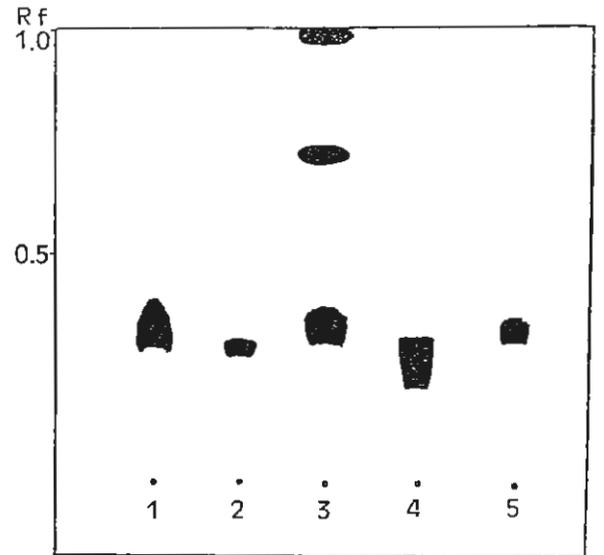


Fig. 5 インド産牛黄及び糖類の薄層クロマトグラム

1:ブドウ糖 2:乳糖 3:インド産牛黄 4:麦芽糖 5:ショ糖  
展開溶媒: メチルエチルケトン・水酢酸・水混液(3:1:1)

カラム: TSKgel Amide 80  
移動相: 薄めたエタノール(8→10)  
検出器: 示差屈折計

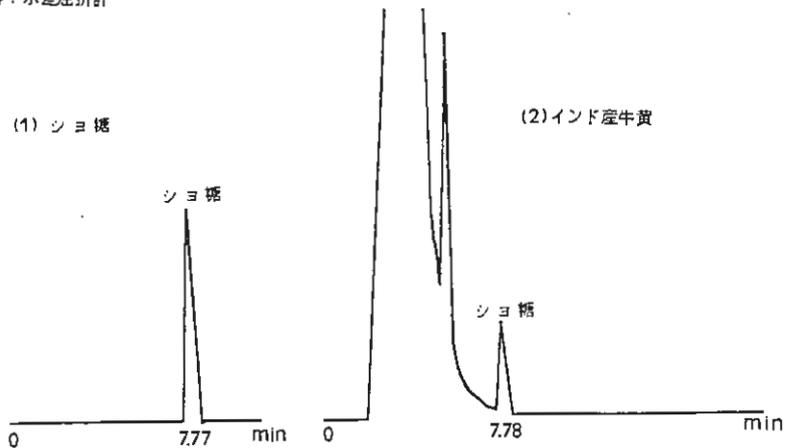


Fig. 6 インド産牛黄及びショ糖の液体クロマトグラム

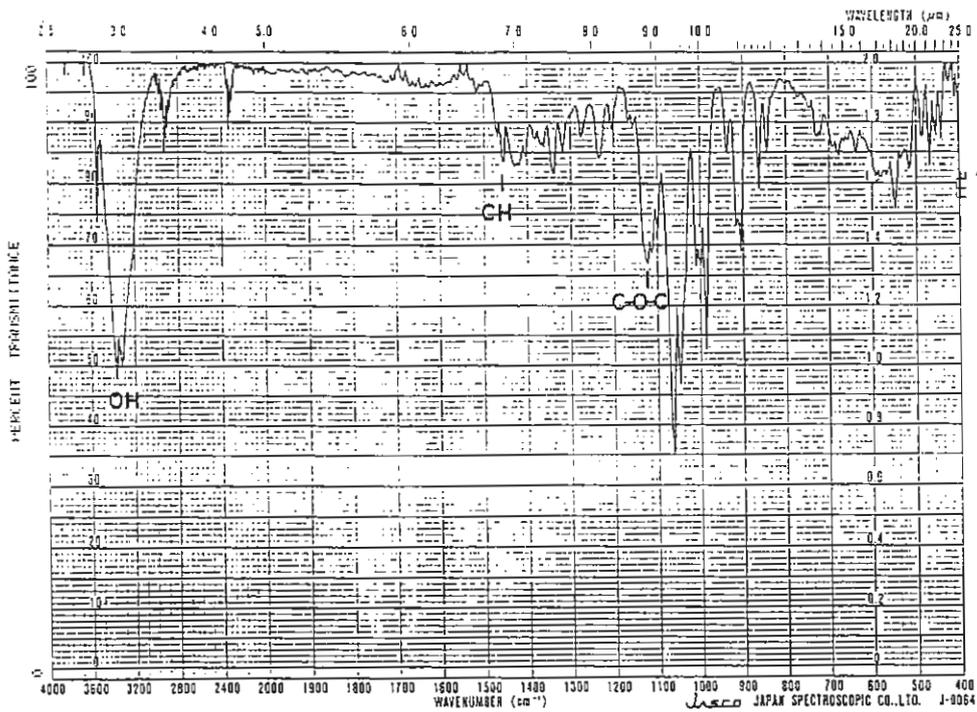


Fig.7 ショ糖のIRスペクトル

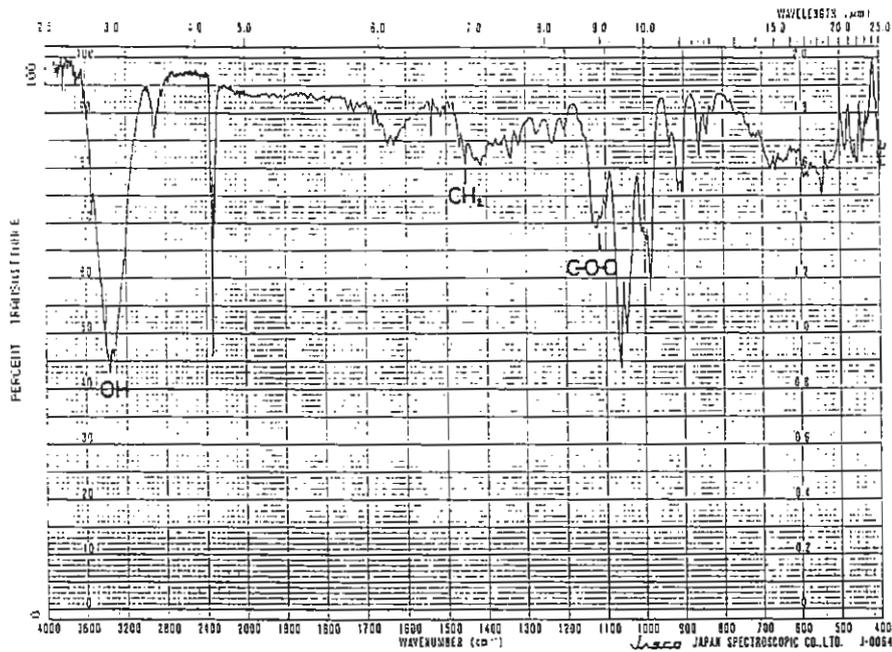


Fig.8 インド産牛黄より得られた結晶の  
IRスペクトル

#### 4. インド産牛黄(偽品)の成分の検索

インド産牛黄よりビリルビン及び胆汁酸を含まない偽品が検出されたので、成分の検索を行い、その結果を Fig. 9～12 に示した。Fig. 9 の TLC よりインド産(偽品)の各スポットはメタニールエロー及びオーラミンと R<sub>f</sub> 値、形状、色調が一致した。Fig. 10～11 の HPLC よりインド産牛黄(偽品)のピークはメタニールエロー及びオーラミンと保持時間が一致した。以上の結果、インド産牛黄(偽品)にメタニールエロー及びオーラミンが含有することが判明した。

またヨウ素反応陽性物質も確認され、鏡検を行ったところ、大きさ、形状がコメデンブんに類似していた。(Fig. 12)

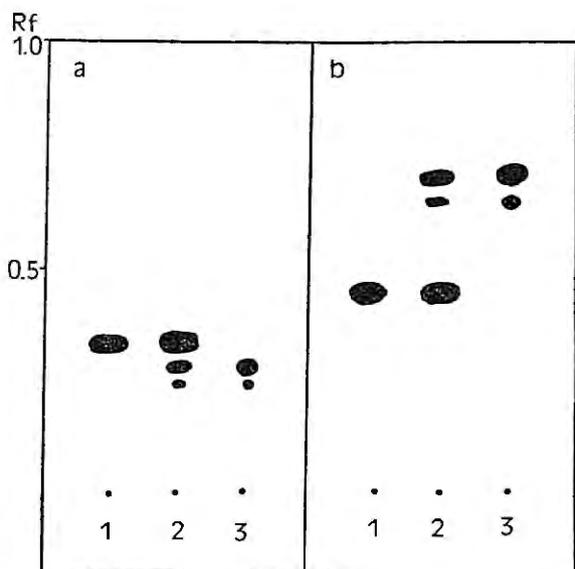


Fig.9 インド産牛黄(偽品)及び  
タール色素の薄層クロマトグラム

1. メタニールエロー 2. インド産牛黄(偽品) 3. オーラミン  
 a. 展開溶媒: n-ブタノール・氷酢酸・水混液(10:10:1)  
 b. 展開溶媒: アミルアルコール・エタノール・強アンモニア水  
 混液(10:10:1)

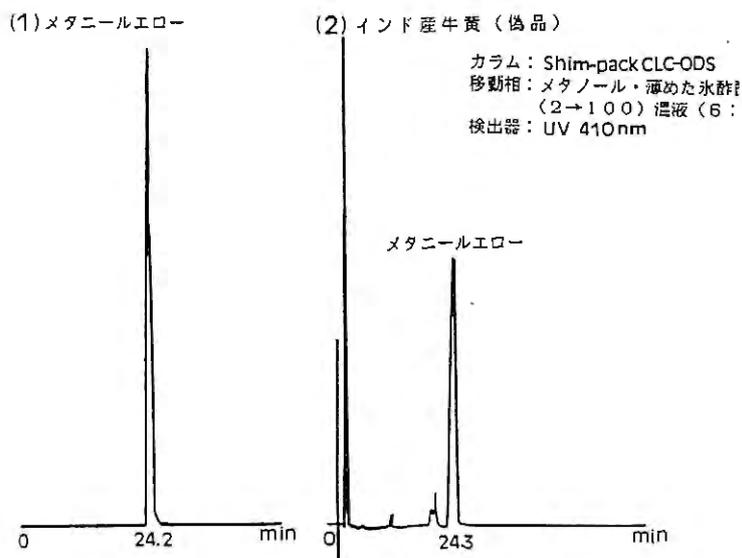


Fig.10 インド産牛黄(偽品)及びメタニールエローの  
液体クロマトグラム

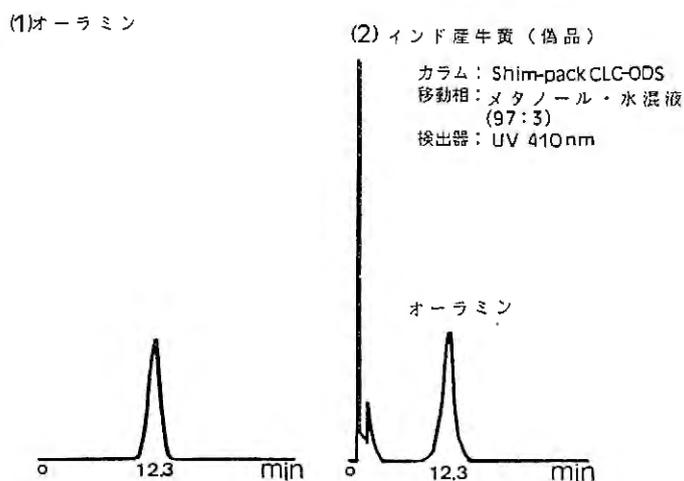
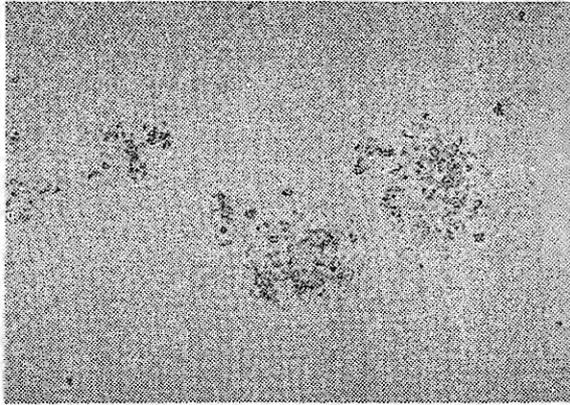
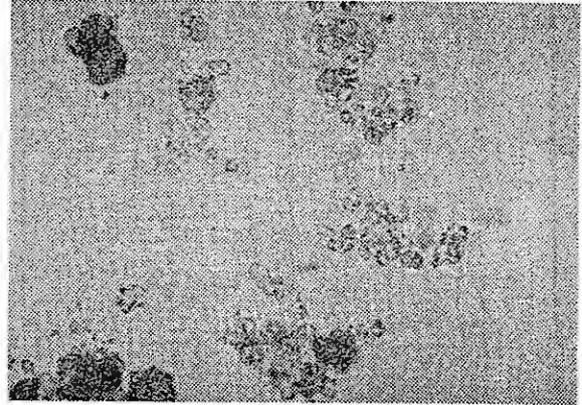


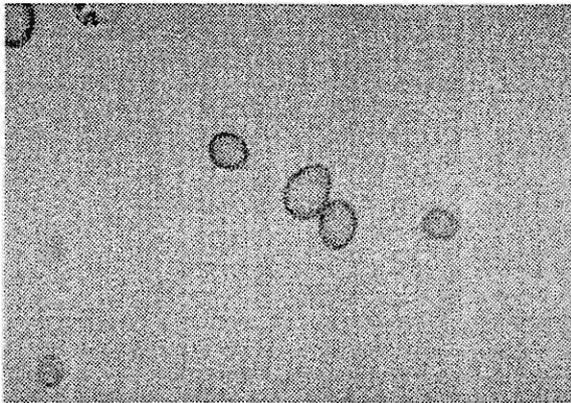
Fig.11 インド産牛黄(偽品)及びオーラミンの  
液体クロマトグラム



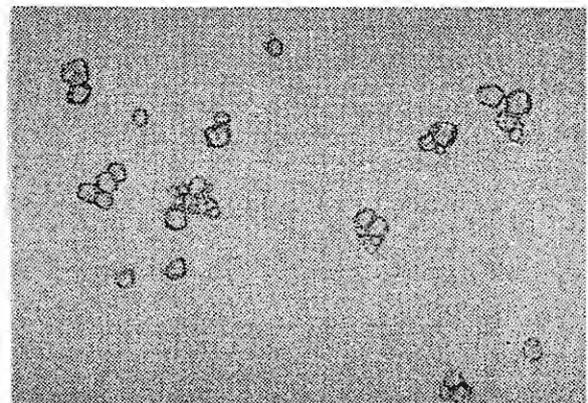
インド産牛黄(偽品)



コメデンポン



バレイショデンポン



トウモロコシデンポン

Fig.12 インド産牛黄(偽品)及び各種デンポンの顕微鏡写真(×400)

## ま と め

今回各産地の牛黄のビリルビン及び胆汁酸含量を求め、市場の評価との相関について検討を行ったが、オーストラリア産、北米産、アルゼンチン産、ウルグアイ産、ブラジル産及びコスタリカ産とも比較的高い値が得られ、市場における評価とは一致しなかった。しかしインド産についてはビリルビン及び胆汁酸含量は他の産地に比べ著しく低く更に多量のショ糖(異物)の混入が認められ、市場における低い評価を裏付ける結果であった。またタール色素及びコメデンポンからなる偽品も1検体検出され、インド産牛黄を使用する際は十分試験を行う必要があると考えられた。

今回はビリルビン及び胆汁酸を指標として牛黄の品質評価を検討したが、牛黄は胆石であるということとを考慮すると無機成分の検索を無視することができない。そこで予試験的に蛍光X線分析装置で牛黄中の金属を分析したところ、Ca、Zn、Mn、Cu等が懸著に認められたので<sup>10)</sup>、今後はCa、Zn等の金属を指標として、各産地の牛黄の含量を求め、更に市場の評価との相関についても検討を行いたい。

## 謝 辞

試料の一部を供与された第一薬品工業(株)及び松井製薬(株)に深謝致します。シヨ糖のHPLCによる定量及びIRスペクトルの測定に御協力頂いた富山県衛生研究所化学部及び食品研究所の諸氏に深謝致します。

## 文 献

- 1) 日本公定書協会、第11改正日本薬局方解説書、p 313~315、広川書店(1986)
- 2) 菰田康夫、山口登喜夫、中島 熙、化学の領域増刊号、133、139~149(1986)
- 3) 志甫伝逸、高林 昇、東 宏俊、和漢薬成分の分析化学的研究(第1報)牛黄中のビリルビン複合体の定量について、薬誌83、882~885(1963)
- 4) 横田洋一、石田美鈴、有沢みさを、村上守一、江尻千鶴子、斉藤晴夫、HPLCによる市販熊胆及び牛黄中の胆汁酸の分析、第18回生薬分析討論会講演要旨、p 30~36(1989)
- 5) 石川正幸、古谷 力、原 昭二、中澤康夫、薄層クロマトグラフィー 基礎と応用、p 168~171 南山堂(1963)
- 6) 北岡正三郎、糖類の分析、p 10~15、講談社サイエンティフィック(1971)
- 7) 高桑徳太郎、半田和敬、久保喜一、作村治子、牛黄の品質評価法、昭和50年度厚生科学研究報告 p 344~355(1975)
- 8) 日本公定書協会、第7改正日本薬局方解説書、p 966~967、南江堂(1965)
- 9) 化学大辞典編集委員会、化学大辞典4、p 847~848、共立出版(1971)
- 10) 有沢みさを、石田美鈴、横田洋一、江尻千鶴子、斉藤晴夫、牛黄の品質評価について(第2報)、富山県薬事研究所年報、16、p 98~102(1989)

【原 著】

*Cassia angustifolia* (セナ) の小葉・  
花・果実及び葉軸における成分の比較

Comparative Study of Components of Various Parts  
of *Cassia angustifolia* (Senna)

石 田 美 鈴      横 田 洋 一      有 沢 み さ を  
Misuzu ISHIDA    Youichi YOKOTA    Misao ARISAWA

江 尻 千 鶴 子      齊 藤 晴 夫  
Chizuko EZIRI      Haruo SAITO

富 山 県 薬 事 研 究 所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

セナは古くから欧米諸国で繁用されている緩下薬で、日本薬局方には第一版から収載されている。日本の市場品の大部分は、*Cassia angustifolia* VAHL (Leguminosae) を基原とするもので、チンネベリセナと呼ばれている<sup>1)</sup>。日局では薬用部位は小葉のみであるが、欧米ではその果実も同様に緩下薬として局方に記載されており<sup>2, 3)</sup>、また日本でも、1989年改訂版日本薬局方外生薬規格に収載された。

市販日局セナの中には、葉軸・果実・花など小葉以外の部位が混入することがある。日局セナの純度試験では

- (1) 葉軸及び果実：本品は葉軸及び果実5.0%以上を含まない。
- (2) 異 物：本品は葉軸及び果実以外の異物1.0%以上を含まない。

とあり、葉軸及び果実の混入限度を規定しているが花については記載がない。最近、市販日局セナに花が混入するため不適品となった例があったことから、局方適否試験を行う機会を得、純度試験を検討したところ、花が土砂やわらくずと同様に扱われている「異物」の範囲に疑問が生じた。

小葉以外の部位は、できる限り取り除かれるべきであるが、花は葉軸・果実と区別する必要があるかどうか明らかでない。そこで、小葉も含めて各部位の成分に差異があるか否かを検討した。

## 実 験 方 法

### 1. 試 料

日局セナ(2ロット)・花・果実・葉軸の各試料(鶴居薬品工業株式会社より提供されたもの)を粉末とし(300  $\mu$ m程度)、それぞれの試験に用いた。

### 2. 確認試験・灰分及び酸不溶性灰分

日局セナのそれぞれの項目に従って行った。また、酸不溶性灰分の定性は蛍光X線分析装置(理学電機製3064M型)を用いた。

### 3. 結合型アントラキノン類の定量

1,8-ジヒドロキシアントラキノン を標準としてセノサイドBに換算する方法で行った<sup>4), 5)</sup>。

#### 1) 標準溶液

1,8-ジヒドロキシアントラキノン〔和光純薬製(ただし、エタノールで3回再結晶したもの<sup>6)</sup>)をデッケーター(シリカゲル)で4時間乾燥したもの〕を、エーテルで0.01 mg/mlに調製し、標準溶液とした。

## 2) 試料溶液

試料約 0.15 g を精密に量り、水 30 ml を正確に加えて 40° の超音波浴で 30 分間抽出した。これを遠心分離し、上澄液を正確に 20 ml とり塩酸 1 滴を加えて混ぜたのち 15 ml のクロロホルムで 3 回洗浄した。水層を正確に 10 ml とり、5% 炭酸ナトリウム溶液で pH を 7~8 に調整し、10.5% 塩化第二鉄溶液 20 ml を加えて沸とう水浴中で 20 分間還流した。さらに塩酸 2 ml を加えて再び沈殿が消えるまで還流した。冷後エーテル 25 ml で 3 回抽出し、全エーテル層を合し 15 ml の水で 2 回洗浄したのち、エーテルで正確に 100 ml としたものを試料溶液とした。

## 3) 操作法

試料溶液及び標準溶液の 10 ml を正確にとり、エーテルを留去したのち、残渣に 1 N 水酸化カリウム試液を正確に 10 ml 加えて溶解したのちについて、1 N 水酸化カリウム試液を対照として 500 nm における吸光度を測定した。数値は、1 mg の 1,8-ジヒドロキシアントラキノンが 1.797 mg のセンノサイド B に対応するものとして計算した。

## 4. センノサイド A 及び B の定量

相楽らの大黄の分析法<sup>7)</sup>を参考にしてみた。

### 1) 標準溶液

センノサイド A (エキストラシンセス製標準品) は 0.03 mg/ml、センノサイド B (エキストラシンセス製標準品) は 0.045 mg/ml に調製し、標準溶液とした。

### 2) 試料溶液

試料約 0.1 g を精密に量り、水 25 ml を正確に加えて 40° の超音波浴で 30 分間抽出した。これを遠心分離し、上澄液を 0.5 μm のフィルターでろ過し試料溶液とした。

### 3) 操作法

試料溶液及び標準溶液の 1 ml を正確にとり、水 1 ml を正確に加え、これらの 10 μl につき次の条件で液体クロマトグラフ法の絶対検量線法(ピーク高さ法)を行った。

#### HPLC 条件

- 装置 : LC-6A 型液体クロマトグラフ及びクロマトパック C-R 3A (島津製作所製)  
カラム : YMC A-312 (ODS) 内径 6 mm、長さ 15 cm (山村化学研究所製)  
カラム温度 : 40° 付近の一定温度  
移動相 : 5 mM 臭化テトラ-*n*-ヘプチルアンモニウム (ナカライテスク製) を含む、酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) ・アセトニトリル混液 (68 : 32)  
流量 : 0.8 ml/min 付近の一定流量 (センノサイド B の保持時間が約 11 分になるように調整する)  
検出器 : 紫外吸光光度計 (波長 340 nm)

## 結 果

### 1. 確認試験

小葉・花・果実及び葉軸の各部位における確認試験(1)の結果、どの部位にも遊離及び結合型アントラキノン類の確認ができた。すなわち、各部位の試料粉末をエーテルで冷浸した後、ろ過したろ液にアンモニア試液を加えたところ黄赤色を呈した(遊離型)。また、エーテル抽出後の残留物を水で冷浸した後、ろ過したろ液にアンモニア試液を加えたところ黄赤色を呈した(結合型)。

確認試験(2)の結果、センノサイド A の赤い蛍光はどの部位でも確認できた (Fig. 1)。

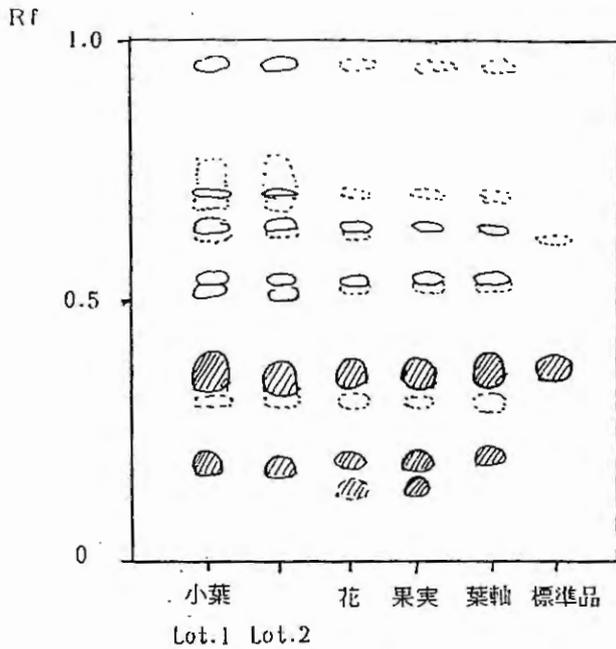


Fig.1 確認試験(2)のTLC

薄層板：HPTLC キーエーケール 60 (メルク社製)  
 展開溶媒：酢酸エチル・n-プロパノール・  
 水・氷酢酸混液 (40:40:30:1)  
 検出：紫外線 (主波長 365nm)

## 2. 灰分及び酸不溶性灰分

日局センナでは灰分 12.0%以下、酸不溶性灰分 2.0%以下と規定している。センナの小葉以下各部位について灰分及び酸不溶性灰分を測定したところ、Fig. 2 に示すとおりであった。灰分が最も多かったのは小葉で、最も少なかったのは果実であり、花は小葉に次いで多かった。一方酸不溶性灰分は、花が 1.3%と高い値だったのに対して、他の部位は 0.2~0.3%であった。

花は他の部位よりも、灰分に対する酸不溶性灰分の割合が大きかったので詳しく分析した。花の酸不溶性灰分を、蛍光X線分析装置を用いて含まれている元素を調べたところ、大部分がケイ素であった。

## 3. 結合型アントラキノン類の定量

各部位の結合型アントラキノン類の定量結果を Fig. 3 に示した。最も含量の高い部位は花で、次いで果実であり、小葉は 2 ロット間に 0.5%の差が認められた。

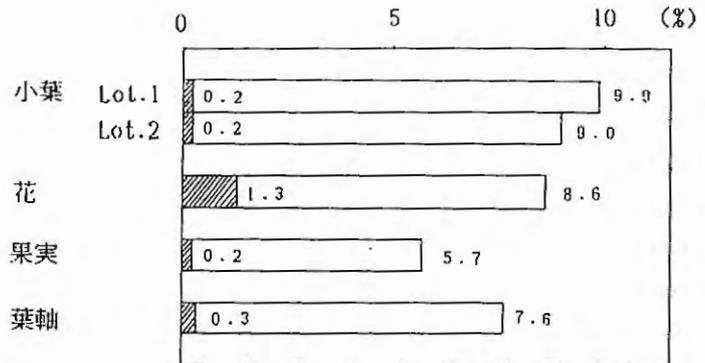


Fig.2 灰分及び酸不溶性灰分(%)  
 (斜線部は酸不溶性灰分)

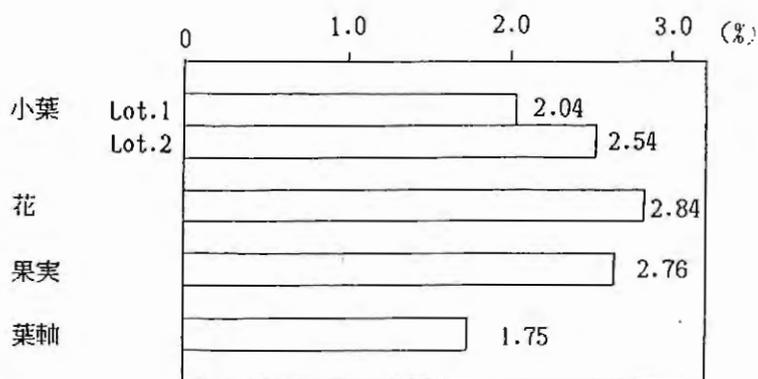


Fig.3 結合型アントラキノン類含量 (%)  
(センノサイドBに換算)

#### 4. センノサイドA及びBの定量

各部位のHPLCクロマトグラムをFig. 4に、定量結果をFig. 5に示した。センノサイドAの含量は花が最も高く、センノサイドBは果実が最も高かった。小葉は花や果実に比べて、センノサイドA及びBの含量とも低かった。また、どの部位もセンノサイドAよりセンノサイドBの含量の方が高かった。

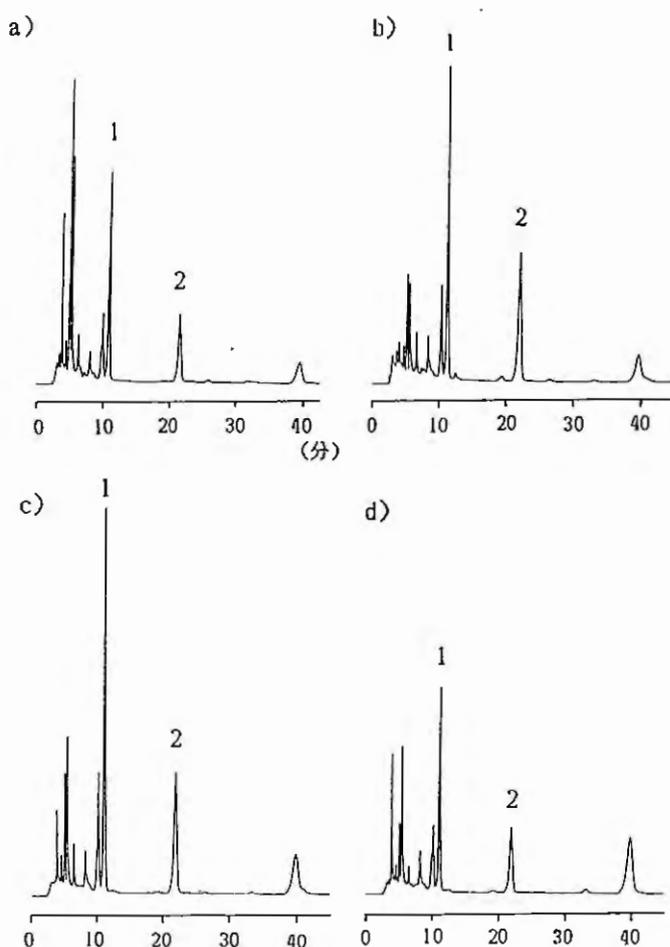


Fig.4 各部位の高速液体クロマトグラム

a)小葉 (Lot.1), b)花, c)果実, d)葉軸  
1:センノサイドB, 2:センノサイドA

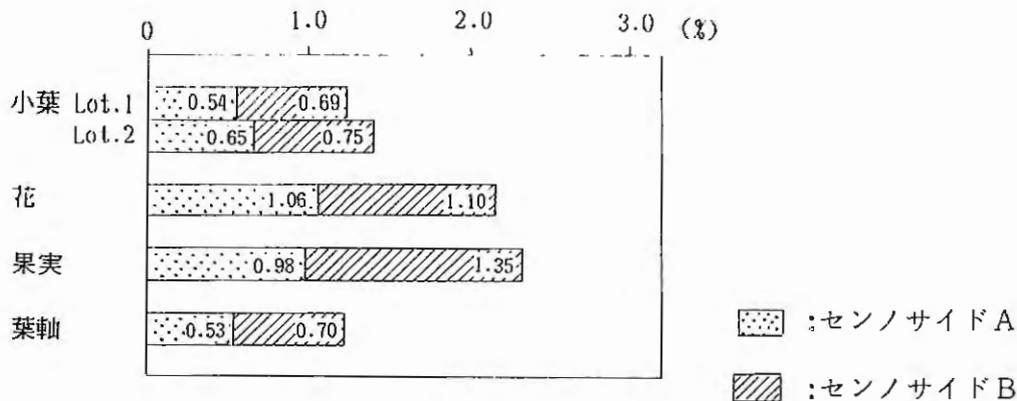


Fig.5 センノサイドA及びセンノサイドBの含量 (%)

## 考 察

センナの小葉とその他の部位(花・果実・葉軸)を理化学的な面において比較するために、日局センナの確認試験・灰分及び酸不溶性灰分の各項目の試験を検討し、更に詳細に成分の定量も行った。

センナの小葉には、アントラキノン類(アントラキノン誘導体、ジアントロン誘導体など)や結合型のアントラキノン類(アントラキノン類の配糖体)が種々含まれているが<sup>8,9)</sup>、主寫下作用を発揮するのはセンノサイドA及びBであり、その他の結合型アントラキノン類が作用を増強するといわれている<sup>10-12)</sup>。センナの薬効を考えると、結合型アントラキノン類とセンノサイドA及びBの定量は重要な意味をもつと思われる。小葉と果実については、これらの成分の定量例が報告されている<sup>10, 13-17)</sup>。

今回の確認試験の結果、各部位に大きな差はみられなかった。しかし、灰分及び酸不溶性灰分の試験結果をみると、花の酸不溶性灰分が非常に多かった。酸不溶性灰分には本質的に多く含まれるもの(組織中のケイ酸塩など)に由来するものと、土砂に由来するものとが考えられる<sup>18)</sup>。花の酸不溶性灰分を、蛍光X線分析装置を用いて含まれている元素を定性したところ、大部分がケイ素であった。土砂由来のものとは考えにくく、花には本質的にケイ素の化合物が多く含まれていると思われる。

各部位の結合型アントラキノン類含量を比較した結果、花が最も高い値を示した。また、センノサイドAも同様であったが、センノサイドBの含量は、わずかに果実の方が高い値を示した。このことは、センノサイドBの含量は花が最も高いというAtzornら<sup>18)</sup>や北中ら<sup>15)</sup>の報告と多少異なるが、この違いは各部位の試料が同じセンナの木(あるいは種)由来であるか否かによるものと推察される。

小葉のロット1とロット2を比較すると、灰分の多いロット1は、ロット2よりも結合型アントラキノン類・センノサイドA及びBの含量がいずれも低かった。センナの場合、灰分と品質に関係があるかは明らかでない。小葉に関しては灰分の多いものは成分含量が低い傾向にあると思われるが、検討が必要である。

センノサイドA及びBの定量時のHPLCクロマトグラム上、各部位に若干の相違が認められた。特に、溶出時間約40分にみられるピークは、葉軸に多く含まれている成分と考えられるが、同定はできなかった。移動相を変化させるなど、さらに詳細な分析を行うことによって、各部位に特有の成分が何であるか、また、特定の成分がセンナの各部位にどのように分布しているかなど検討の余地がある。これらのことは、センノサイドA及びBが結合型のアントロンから生薬の乾燥過程で生成するという説があり<sup>19)</sup>センナの品質を研究する上で重要な意味があると思われる。

以上のような検討を行う動機となったのは、日局センナの純度試験について疑問が生じたからである。日局センナの純度試験が現在の規定になったのは、第九改正からである(それ以前は、「異物：本品は葉

柄・果実及びその他の異物 5.0 %以上を含まない」となっていた)。生薬総則第 4 項が改正され、これに伴い各条の純度試験においても、本来の生薬に関係のある混入物(例えば根茎類生薬に付着する地上基部や、果実類生薬に付着したり混入する余剰の果柄など)を、全く関係のない「その他の異物」とできるだけ区別して規定することになり、センナなど 13 品目が改正になった<sup>20)</sup>。センナに混入する花は「本来の生薬に関係のある混入物」であり、果実及び葉軸と同じ扱いをすることができないのではないかと考えたのである。そこで、日局センナの純度試験の結果を調査したところ、試験を行った 23 ロットすべてに花が混入しており、その含量は少ないもので 0.1%、多いもので 1.0% で

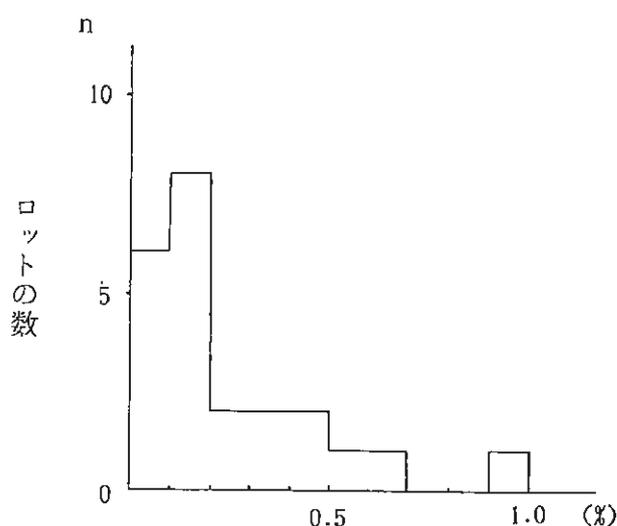


Fig.6 日局センナに混入する花の含量 (%) (n=23)

あった (Fig. 6)。なかには、花の含量が影響して純度試験(2)で不適となったものもあった。この調査の結果判明したことは、花も果実や葉軸と同じように混入しやすいものであるということ、やはり花を「(2)異物」として「1.0%以下」(「1.0%の表現は実際上0%に近いものを意味する」とある<sup>20)</sup>)に規定するのは、意味のあることなのか確かめる必要があると考えた。今回の各部位における成分の比較において、花を含めてそれぞれの部位間に大きな違いはみられなかったことから、花は果実及び葉軸と同様に扱い得ることが示唆された。

たとえ、花・果実・葉軸に寫下成分が多く含まれているとしても、局方品として非薬用部位であることに変わりはなく、混入しないように努力されるべきである。本研究はセンナの品質をより良いものにするための資料になると考える。

## 謝 辞

この研究を進めるにあたり、試料の提供など御協力いただいた鶴居薬品工業株式会社に深謝いたします。また、蛍光X線分析に御協力いただいた富山県工業技術センター・材料技術課の皆様に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書、D-551~556、廣川書店(1986)
- 2) USP XXI、p958~959、USPC, Inc., Rockville(1985)
- 3) BP 1988、p501~504、Her Majestys Stationery Office, London(1988)
- 4) BP 1980、p398~400、Her Majestys Stationery Office, London(1980)
- 5) 鈴木信夫、栗木武男、辻山 毅、加藤良司：大黄含有製剤の試験法、昭和49年度厚生科学研究報告、267~284(1975)
- 6) 飛田忠嗣、田中彰雄、江尻千鶴子、水上英一：ダイオウ及びその製剤中の結合型レインようアントラキノン類の定量法について、富山県薬事研究所所報、昭和54・55年度合併号、13~29(1981)
- 7) Sagara, K., Oshima, T. and Yoshida, T.: Rapid and simple determi-

- nation of sennoside A and B in Rhei Rhizoma by ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **403**, 253~261 (1987)
- 8) Hayashi, S., Yoshida, A., Tanaka, H., Mitani, Y. and Yoshizawa, K. : Analytical studies on the active constituents in crude drugs. IV. Determination of sennosides in senna and formulations by high-performance liquid chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 406~412(1980)
  - 9) Tanaka, H., Murata, R., Yoshida, A. and Hayashi, S. : Analytical studies on the active constituents in crude drugs. V. The structure of sennoside G, a new glucoside from Senna, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1550~1556 (1982)
  - 10) Oshio, H., Naruse, Y. and Tsukui, M. : Quantitative analysis of the purgative components of Rhubarb and Senna, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2458~2464(1978)
  - 11) Sasaki, K., Yamauch, K. and Kuwano, S. : Metabolic activation of sennoside A in mice, *Planta medica*, **37**, 370~378(1979)
  - 12) Kisa, K., Sasaki, K., Yamauchi, K. and Kuwano, S. : Potentiating effect of sennoside C on purgative activity of sennoside A in mice, *Planta medica*, **42**, 302~312(1981)
  - 13) Atzorn, R., Weiler, E. W. and Zenk, M. H. : Formation and distribution of sennosides in *Cassia angustifolia*, as determined by a sensitive and specific radioimmunoassay, *Planta medica*, **41**, 1~14(1981)
  - 14) Duez, P., Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., Hanocq, M. and Molle, L. : Comparison between high-performance thin-layer chromatography fluorometry and high-performance liquid chromatography for the determination of sennoside A and B in Senna (*Cassia* spp.) pods and leaves, *J. Chromatogr.*, **303**, 391~395(1984)
  - 15) 北中進、松浦晃、滝戸道夫、白井英夫、影井健吾：日本産センナ中のセンノシドA、Bの薄層デンストメトリー法による定量、*生薬誌*、**39**、106~110(1985)
  - 16) 瀬戸隆子、安田一郎、浜野朋子、秋山和幸：生薬製剤の品質に関する研究(第2報)高速液体クロマトグラフィーによる寫下薬中のセンノシドAおよびセンノシドBの定量、*東京衛研年報*、**36**、87~92(1985)
  - 17) 熊野真佐代、半田佐由利、平山文俊：瘦身効果が表示された茶中のセンナ分析、*長崎県衛生公害研究所報*、**30**、129~132(1987)
  - 18) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書、B-168~174、廣川書店(1986)
  - 19) Lemli, J. and Cuveele, J. : Transformation of anthroneglycosides by drying of the leaves of *Cassia senna* and *Rhamnus frangula* Investigation on anthraquinone drugs, **XXXI**, *Planta medica*, **34**, 311~318(1978)
  - 20) 木島正夫：第九改正薬局方と生薬、*薬局*、**27**、597~601(1976)