

漢方エキス製剤に関する研究*¹

宮田一好, 梅田貴文, 二宮昌樹, 水口和生, 高杉益充

徳島大学医学部附属病院薬剤部*²A Study on Manufactured Kampo Extracted Herbal Drugs*¹

KAZUYOSHI MIYATA, TAKABUMI UMEDA, MASAKI NINOMIYA,

KAZUO MINAKUCHI, and MASUMITSU TAKASUGI

Department of Pharmacy, Tokushima University Hospital*²

(Received July 28, 1983)

Kampo-extracted herbal drugs are available today in pharmacies or drug stores. Among them are several commercial drugs containing the same composition of ingredients. It is reported that they might be even diversified in quality by the difference in the origin of herbal crude materials, the preservation techniques, the manufacturing process or other cases. And there may be a possible existence of microbes in crude herbs used for them. We made therefore fact-finding tests with 4 drugs of Shoseiryu-toh granule or aqueous extracts, which are available commercially. First, from Syakuyaku (Paeony root), Kanzo (Glycyrrhiza) and Mao (Ephedra herb), the analyses of major ingredients such as Paeoniflorin, Glycyrrhizin and Ephedrine were made to determine the quantity of each ingredient by a high-speed liquid chromatography. Secondly the observation and count of bacteria was examined by cultivating them with these drugs in agar medium. The comparison of products by the analysis showed that the quantity of each ingredient differed by products; furthermore, the count test of bacteria number proved that some products held a possibility of microbial contamination.

Keywords—kampo; herbal drugs; paeoniflorin; glycyrrhizin; ephedrine; high-speed liquid chromatography; microbial contamination; shoseiryu-toh

はじめに

従来、漢方薬は散剤、丸剤、あるいは煎剤として用いられていたが、製剤技術の発達に伴い服用の簡便さなどから現在では多数の漢方エキス製剤が市販されている。しかし、同一処方製剤であってもエキス製剤の原料となる生薬は、産地、採取時期、保存法などにより品質が異なる。また、エキス製剤の製造工程すなわち抽出工程、エキス化、粉末化工程などによってもその品質に差異が生じるといわれている。^{1,2)} 其上、原料生薬は土壌菌に汚染されたり、カビが生じやすく、さらには適切な滅菌操作を適用し難い点から微生物汚染を受けやすい。

微生物汚染度の測定は医薬品の品質管理と安全性確保

の観点から重要であり、注射剤、点眼剤については十局において無菌試験が規定されている。しかし、内用剤など非無菌製剤については、わずかに厚生省薬務局長通知(薬発第 297 号)³⁾ により内用液剤および X 線造影剤の微生物試験が示されているにすぎない。その他の剤形、ことに天然物を基原とする漢方製剤については何ら法的規定はないのが現状である。また生薬の微生物汚染に関する試験法についての報告は若干あるが、^{4,5)} いまだ確立された方法はない。

そこで今回著者らは、市場の小青竜湯エキス製剤 4 製品について、芍薬、甘草、麻黄の主要成分であるペオニフロリン (Pae)、グリチルリチン (Gly)、エフェドリン (Eph) を指標物質として、これらの含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定することにより、その品質について比較検討した。さらに薬発第 297 号を参考とし、各製品について一般生菌数を測定し、微生物

*¹ 日本薬学会中国四国支部年会 (1982年) で発表。

*² 徳島市蔵本町 2 丁目 50; 50, Kuramotocho, 2-cho-me, Tokushima-shi, 770 Japan

汚染の面からも検討を加えた。

実験の部

1. 試料

実験に使用した小青竜湯エキス製剤4製品のロット番号と1日用量を Table 1 に示した。A, C, D の3製品はエキス顆粒, B製品はエキス散である。

原生薬煎液の調製は, 小青竜湯の原料生薬 (マオウ 3 g, ショクヤク 3 g, カンゾウ 3 g, ケイヒ 3 g, ゴミン 3 g, カンキョウ 3 g, ハンゲ 6 g, サイシン 3 g) に水 600ml を加え, 直火で 300ml になるまで煎出し, ガーゼでろ過した。ついで市販エキス製剤の試料調整濃度と同濃度に調整するため, ろ液をエバポレーターを用いて 100ml まで濃縮し, この煎液を 300 回転で10分間遠心分離し, さらに 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試料とした。

2. 測定機器および試薬

1) 測定機器 高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-3 A 型, 検出器: 島津 SPD-1 型, インテグレーター: 島津クロマトパック E1A 型, カラム: エルマ光学 ERC-ODS 1272。

2) 試薬 トリプチケースソイ寒天培地(BBL), グルコースペプトン寒天培地(ダイゴ), 日局, l-塩酸エフェドリン(大日本製薬), ペオニフロリンおよびグリチルリチン標準品 (カネボウ薬品株式会社より提供を受けた)。その他の試薬はすべて和光純薬特級を用いた。

3. ペオニフロリンの定量

定量法については赤田⁶⁾の逆層系カラムを用いる方法を応用した。小青竜湯エキス製剤半日量に水 30ml を加え, 15分間振とうした後, 3,000 回転で10分間遠心分離し, 上清 25ml を採取した。残渣にさらに水 10ml を加え, 同様に処理して上清 10ml をとり, 上清を合せて 35ml とした。これに内部標準物質 (I.S.) として p-ヒ

ドロキシアセトフェノン (4mg/ml) を 5ml 加え, さらに水を加えて全量 50ml とし, 0.45 μ m のメンブランフィルター (マイレックス HA, ミリポア) でろ過したものを試料液とした。原生薬については半日量の煎液に I.S. を加えたものを用いた。測定条件はクロマトグラフとともに Fig. 1 に示した。移動相はメタノール:水 (35:65) を用い, 検出は波長 232nm で行った。

4. グリチルリチンの定量

定量法は岡田⁷⁾の方法を応用した。試料の調製は前述の Pae の場合と同様, 抽出溶媒に水を用いて行い, I.S. として n-プロピル p-ヒドロキシ安息香酸 (0.1mg/ml) を用いた。測定条件はクロマトグラフとともに Fig. 2 に示した。移動相は 2% 酢酸:アセトニトリル (6:4) を用い, 検出は波長 254nm で行った。

5. エフェドリンの定量

定量法は岬⁸⁾の方法を応用した。試料の調製には, 抽出溶媒として Fig. 3 に示した移動相すなわちアセトニトリル:0.02Mリン酸緩衝液 pH 2.3 (1:9) を用い, 前述と同様に行った。I.S. としてカフェイン (0.1 mg/ml) を用い, 検出は 210nm で行った。

6. 一般生菌数の測定

日局無菌試験法⁹⁾を準用した。生菌数の測定は, 各製品でアルミシートされた分包品から 1 g を無菌的に取り出し, 滅菌生理食塩水 9ml を加えた。均一な懸濁液を得るためにホモジナイザーを用いて懸濁した後, 滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈を行い, 各希釈液についてその 0.1ml を平板培地に塗布した。

細菌試験はトリプチケースソイ寒天培地を使用し 37°C で, 真菌試験ではグルコースペプトン寒天培地を使用し 30°C でそれぞれ培養した。72時間培養した後, 形成されたコロニーを計測し, 製剤 1 g 当りの生菌数を算出した。

結果および考察

1. 定量法

1) ペオニフロリンおよびグリチルリチンの定量

Pae および Gly の定量についてはすでに薄層クロマトグラフィー,¹⁰⁻¹²⁾ ガスクロマトグラフィー,^{13,14)} 高速液体クロマトグラフィー^{6,7,15,16)} を用いた方法が報告されている。しかしこれらは Pae および Gly 含有単一生薬に適用されたもので, 多数の生薬が配合された漢方処方に対する報告は数少ない。^{17,18)}

著者らは Pae については赤田⁶⁾の, Gly については岡田⁷⁾の逆層系カラムを用いた HPLC 法を応用し, さらに市販製剤を定量するという観点から抽出方法についても再検討を加えた。また, 分析精度をあげるため内

Table 1. Lot Number and Daily Dose of Commercial Drugs Used for This Study

| Sample | Lot No. | Daily dose (g) |
|--------|---------|----------------|
| A | 1DB1D | 6 |
| B | N392M | 6 |
| C | 989321 | 5 |
| D | 1877 | 6 |

部標準法を用いることにした。HPLCを用いた単一生薬からの Pae および Gly の抽出溶媒としては水,^{6,17)} 0.05 N アンモニア水,¹⁸⁾ メタノール,¹⁵⁾ 50%エタノール¹⁹⁾ などが使用されている。しかし、市販エキス製剤ではその大部分が顆粒状であること、Pae および Gly は水溶性成分であることから抽出溶媒には水を用い、15分間2回振とう抽出を行った。この方法では標準品の添加回収率でほぼ100%の値が得られた。

Pae のクロマトグラフを Fig. 1 に示した。左が製品 A, 右が原生薬煎液のものである。ピーク(1)は Pae であり、ピーク(2)は I.S. として用いた p-ヒドロキシアセトフェノンである。

Gly のクロマトグラフを Fig. 2 に示した。左が製品

A, 右が原生薬煎液である。ピーク(1)は Gly であり、ピーク(2)は I.S. として用いた n-プロピルp-ヒドロキシ安息香酸である。

2) エフェドリンの定量

麻黄中の主要アルカロイドは、*l*-エフェドリン (*l*-E) であるが、 α -*g*-エフェドリン (α -pE) のほか微量ではあるが *l*-N-メチルエフェドリン (ME), *l*-nor-エフェドリン (NE) などの類縁成分も共存する。^{8,20)}

HPLC を用いた麻黄中の Eph を定量した報告は若干あるが,⁸⁾ 野口らの方法²¹⁾ はエーテル抽出を行うことから前処理操作が煩雑となることおよび多量のサンプルを処理する場合に危険を伴うことから、エキス製剤の品質試験には不向きであると思われる。本報ではエキス製

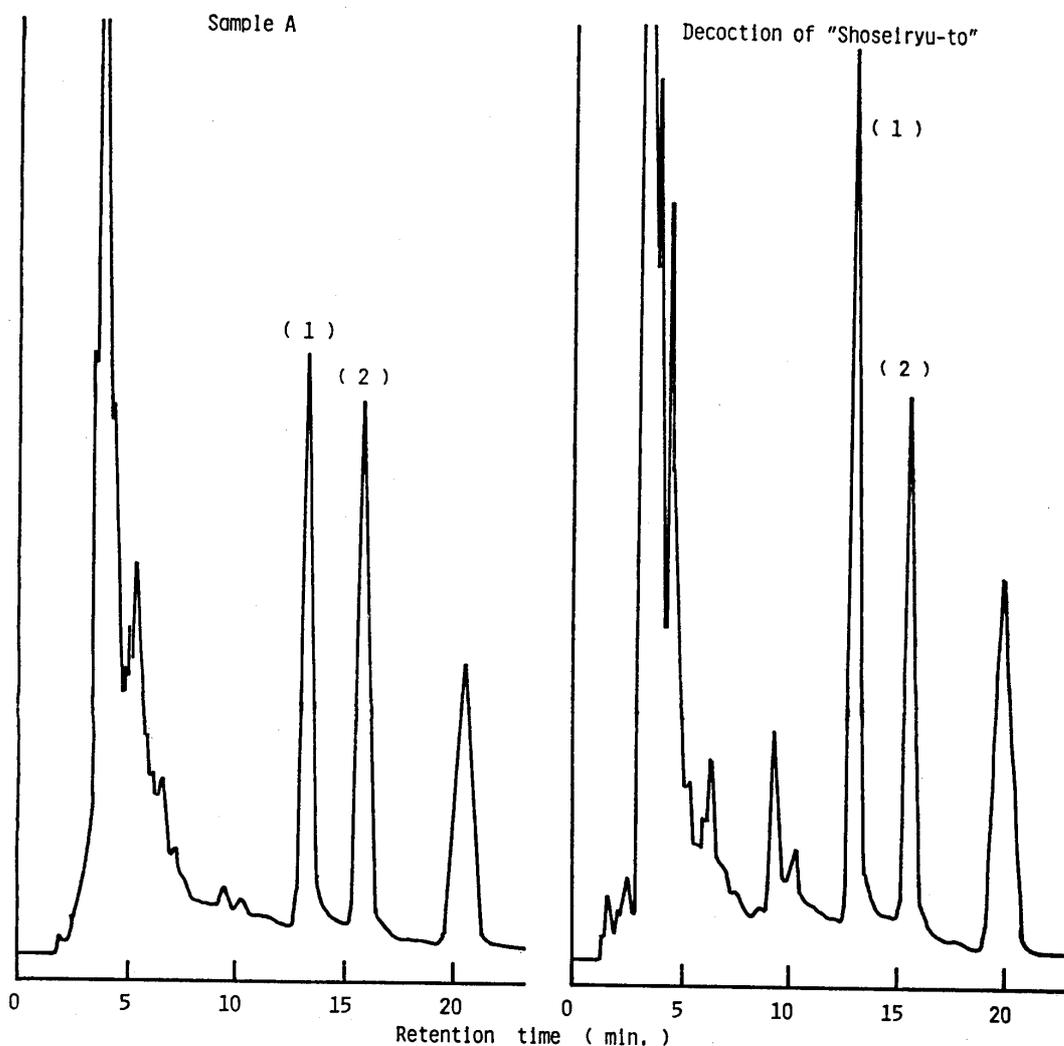


Fig. 1. Chromatogram of Paeoniflorin Extracted from Pharmaceutical Preparation (Sample A) and Decoction of "Shoseiryu-toh"

Conditions: column: ERC-ODS-1272, eluate: methanol-water (35 : 65), flow rate: 1.0 ml/min, detector: UV 232nm, column temp.: 40°C

(1) Paeoniflorin, (2) p-Hydroxyacetophenone (I.S.)

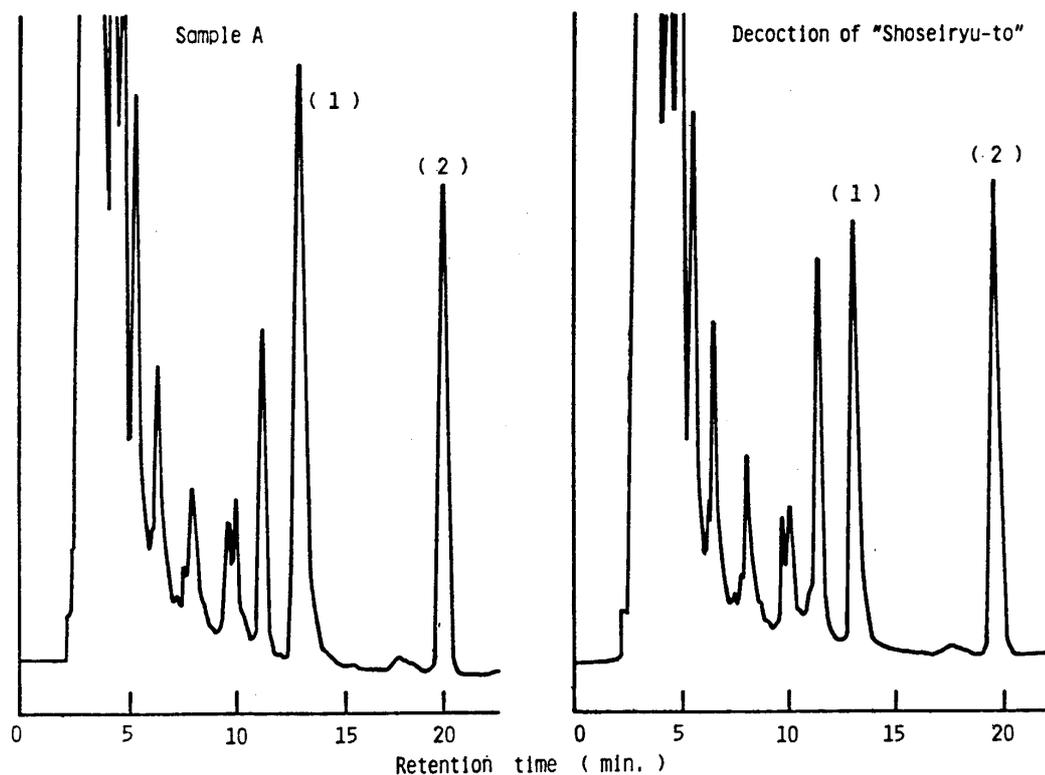


Fig. 2. Chromatogram of Glycyrrhizin Extracted from Pharmaceutical Preparation (Sample A) and Decoction of "Shoseiryu-toh"

Conditions: column: ERC-ODS-1272, eluate: 2% AcOH-CH₃CN (6:4), flow rate: 1.0ml/min, detector: UV 254nm, column temp.: 40°C
(1) Glycyrrhizin, (2) n-Propyl p-hydroxybenzoate (I.S.)

剤から Eph の抽出に pH 2.3 の移動相を用いたが、Eph は酸性水溶液中で安定であり、98% の回収率を得た。

クロマトグラフは Fig. 3 に示したとおり、14分前後に Eph、25分前後に I.S. であるカフェインのピークが認められた。しかし今回の条件では *l*-E と α -pE の分離に若干の問題があり、カラムの選択、移動相の検討を要すると考えている。

2. 各製品の Pae, Gly, Eph 含有量

Pae および Gly の測定結果を Table 2 に示した。単位は 1 日用量当りの mg 数で表わした。Pae については原生薬が 43.6mg、4 製品では 17.7~36.5mg の範囲であり、A 製品が原生薬煎液に最も近い値を示し、C 製品が最も低い値を示した。Gly については、原生薬の含量は 10.9mg であるが、4 製品では A のように 19.1mg と 2 倍近くの値を示すもの、また逆に D のように約半量しか含まれていないものなど製品間にかんがりの差異がみられた。

Eph の含量測定結果を Table 3 に示したが、標準品

として *l*-塩酸エフェドリンを用いており、定量値は塩酸エフェドリン量に換算して表わしている。定量値は 4 製品について 5.2~14.3mg の範囲の値を示し、これらの間に 2~3 倍のひらきがあり、Eph についても製品間にかんがりの差異が認められた。

3. 一般生菌数の測定

細菌試験の結果を Table 4 に示した。左側に 5 回試験を行ったうち、コロニーが形成されたサンプル数を、右側には製品 1 g 当りの生菌数の範囲を示した。A, C 製品では微生物汚染が認められたサンプルは 2~3 個、その生菌数も 67 個以下と少なく良好な結果を示した。B, D 製品については 5 回すべてに生菌がみられ、その数も A, C に比べて非常に多く、微生物汚染の可能性が予想される。²²⁾

生薬製剤については生菌数の規定はないが、薬発第 297 号では内用液剤および X 線造影剤の菌数の限度を 1 g 当り 1000 個以下としており、これを適用した場合は全製品とも規定には適合することになる。

真菌試験の結果を Table 5 に示した。真菌数からみ

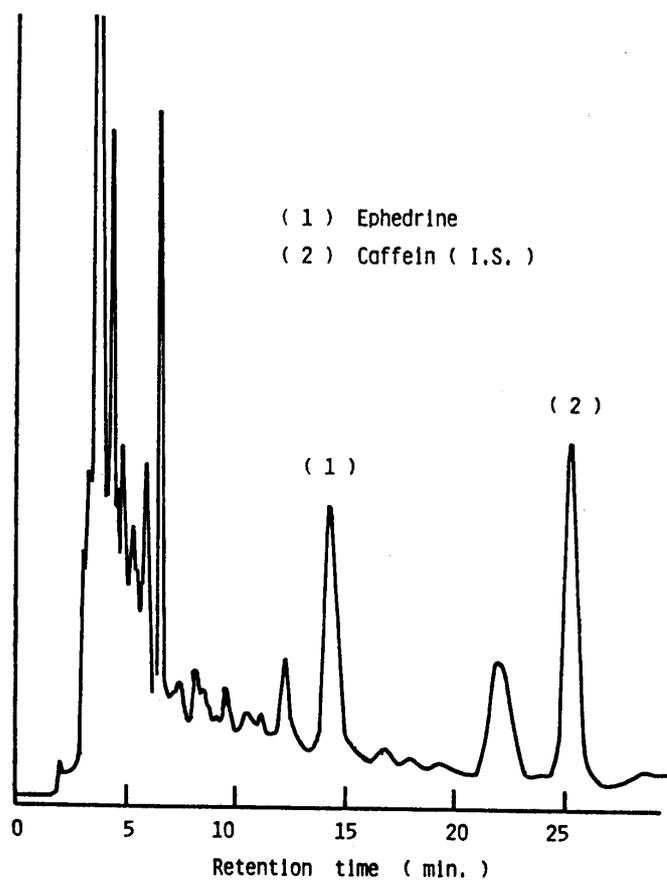


Fig. 3. Chromatogram of Ephedrine Extracted from Pharmaceutical Preparation (Sample A)

Conditions: column: ERC-ODS-1272, eluate: CH_3CN -Phosphate buffer (pH 2.3) (1 : 9), flow rate: 1.0ml/min, detector: UV 210nm, column temp.: 40°C

Table 2. Determination of Paeoniflorin and Glycyrrhizin Contents

| Sample | Paeoniflorin (mg / daily dose)* | Glycyrrhizin |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| decoction of "Shoseiryu-to" | 43.6 ± 2.6 | 10.9 ± 1.2 |
| A | 36.5 ± 2.4 | 19.1 ± 0.4 |
| B | 27.7 ± 0.3 | 11.3 ± 0.2 |
| C | 17.7 ± 1.7 | 7.1 ± 1.9 |
| D | 28.1 ± 0.5 | 6.7 ± 0.6 |

* mean ± S.D.

(n = 6)

Table 3. Determination of Ephedrine Content

| Sample | Ephedrine (mg/daily dose)* |
|--------|-------------------------------|
| A | 14.3 ± 0.6 |
| B | 10.4 ± 1.0 |
| C | 5.2 ± 1.2 |
| D | 7.4 ± 0.4 |

* mean ± S.D. (n = 6)

Table 4. Result of Sterility Test on Trypticase Soy Agar

| Sample | Trypticase Soy Agar | |
|--------|---|--|
| | number of positive samples / tested samples | range of microbial count (organisms / g) |
| A | 2 / 5 | 0 — 67 |
| B | 5 / 5 | 67 — 330 |
| C | 3 / 5 | 0 — 67 |
| D | 5 / 5 | 200 — 730 |

Table 5. Result of Sterility Test on Glucose Peptone Agar

| Sample | Glucose Peptone Agar | |
|--------|---|--|
| | number of positive samples / tested samples | range of microbial count (organisms / g) |
| A | 1 / 3 | 0 — 67 |
| B | 3 / 3 | 830 — 2700 |
| C | 3 / 3 | 33 — 100 |
| D | 3 / 3 | 230 — 600 |

でも細菌数と同様の傾向がみられる。すなわち、A、C製品は微生物汚染の可能性が比較的少なく、よく管理されていると思われる。

結 論

今回、小青竜湯エキス製剤4製品について、主要成分である Pae, Gly, Eph を定量することにより、その品質を比較検討したが、各成分の含量には製品間にかなりの差異のあることが認められた。現在、漢方エキス製剤の成分含量についてはその規定がなく、各製品の表示エキス量も1日当り1,500~2,000mgと統一されていない。したがって一般に煎液中の成分含量を基準としてそれに近づけていく方法がとられている。²⁾ 今回の実験で Pae と Gly について煎液と比較したところ、各製品で1/2~2倍の差異が認められた。

また生菌数測定の結果から微生物汚染の可能性のある製品がみられた。しかし漢方製剤の微生物汚染に関してその汚染度の規定はない。したがって成分含量の規定ならびに微生物試験法の確立を含め、漢方エキス製剤について品質確保の面から早急な解決が望まれる。

文 献

- 1) 成川一郎ほか：家庭薬研究，1，24 (1982)。
- 2) 野口衛：漢方製剤メーカー協議会8月例会講演要旨集，1982。
- 3) 厚生省薬務局長通知：薬発第297号，内用液剤及びX線造影剤の菌数の限度及び試験法について，1976年4月1日。
- 4) 西川洋一ほか：生薬学雑誌，32，153 (1978)。
- 5) 紀氏汎恵ほか：病院薬学，8，124 (1982)。
- 6) 赤田良信ほか：薬学雑誌，99，858 (1979)。
- 7) 岡田憲三ほか：薬学雑誌，101，822 (1981)。
- 8) 岬哲夫ほか：第10回生薬分析討論会要旨集，1981。
- 9) 第十改正日本薬局方解説書，一般試験法，無菌試験法，広川書店，1981。
- 10) 山岸喬ほか：道衛研所報第26集，32 (1976)。
- 11) 寺崎正之ほか：家庭薬研究，1，40 (1982)。
- 12) 吉崎正雄ほか：薬学雑誌，97，916 (1977)。
- 13) Th. Vondenhof, K. W. Glombitza, M. Steiner: Sci. Pharm., 41, 155 (1973)。
- 14) 金田宣ほか：日本生薬学会26年会要旨集，1979。
- 15) 清水岑夫ほか：薬学雑誌，99，432 (1979)。
- 16) 赤田良信ほか：薬学雑誌，96，1035 (1976)。
- 17) 赤田良信ほか：薬学雑誌，100，958 (1980)。
- 18) 小川俊太郎ほか：薬学雑誌，96，1488 (1976)。
- 19) 浅川直樹ほか：薬学雑誌，99，598 (1979)。
- 20) 山崎和男：第8回和漢薬シンポジウム要旨集，1974。
- 21) 野口衛ほか：薬学雑誌，98，923 (1978)。
- 22) 生薬漢方製剤の微生物及び異物汚染対策講演会要旨集，1982。