

漢方薬抽出自動包装機を用いた湯液品質の経時変化 (2) —葛根湯について—

太田 (堂井) 美里^{a,c}, 藤田 和成^b, 平澤沙恵香^b, 安食菜穂子^a, 川崎 武志^c,
垣内 信子^d, 御影 雅幸^{a,*}

^a 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科資源生薬学研究室, ^b 金沢大学医薬保健学域薬学類創薬科学類,

^c 株式会社ウチダ和漢薬, ^d 九州保健福祉大学薬学部生薬学講座

Temporal Change in Quality of the Kampo Decoction Packed by a Decocting Machine (2) —On Kakkonto—

Misato Doui-Ota^{a,c}, Kazunari Fujita^b, Saeka Hirasawa^b, Naoko Anjiki^a, Takeshi Kawasaki^c,
Nobuko Kakiuchi^d and Masayuki Mikage^{a,*}

^a *Herbal Medicine and Natural Resources, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medical Science,
Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan*

^b *School of Pharmacy, College of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University,
Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan*

^c *Uchida Wakanyaku Co., Ltd., 4-4-10 Higashi-nippori, Arakawa-ku, Tokyo 116-8571, Japan*

^d *Department of Pharmacognosy, School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University of Health and Welfare,
1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka, Miyazaki 882-8508, Japan*

(Received April 30, 2013)

In recent years, decoctions that are stored for 1 month after production by decocting machines, which can package in a single operation, have been used in clinical practice. However, changes in the quality of decoctions stored on a long-term basis have not been fully elucidated. Though we have previously reported that significant changes were not observed in the color or principal compounds of packed decoctions of Daiokanzoto produced by a decocting machine within 1 month at room temperature, the safety of such decoctions in terms of microorganisms has not been verified. Therefore, in this study, we stored Kakkonto produced by a decocting machine for 1 month at 4, 25, and 40°C, and analyzed microbial levels, as established by the Japanese Pharmacopoeia, as well as the color, taste, and principal compounds of the decoctions.

The results showed that microbial levels (aerobic bacterium, fungus, *Escherichia coli*, and *salmonella*) fulfilled the criteria of the Japanese Pharmacopoeia, and the color of Kakkonto was maintained for 5 weeks at 4°C and 25°C, and 2 weeks at 40°C. Discernible changes in taste were not detected for 1 week at 4°C or for 2 weeks at 25°C. In addition, principal compounds (ephedrine, pseudoephedrine, glycyrrhizin, and puerarin) hardly showed any change. Therefore, we concluded that the packed decoctions of Kakkonto produced by a decocting machine could be stored for a maximum of 2 weeks at 25°C and 1 week at 4°C without significant changes in quality.

Keywords: Kakkonto; decocting machine; microorganism; color; taste

緒 言

近年、漢方湯液約1ヶ月分を一度に煎じて、1服分ずつアルミパック包装できる漢方薬抽出自動包装機が開発され、中国や韓国では病院の薬剤部や市中の薬局で日常的に使用されている。日本でも薬局で導入され始め、実用化が進められている。しかし、湯液の長期保存による品質変化については十分な検討がされていない。我々¹⁾はこれまでに本装置で製してアルミパック包装した大黃甘草湯は室温保存で1ヶ月間は色彩、味、含有成分量に大きな変化がないことを報告したが、適切な保存条件は処方別に異なる可能性が考えられた。加えて、湯液の保存に伴う微生物学的品質特性についても検討がされていない。そこで今回は常用処方である葛根湯を本装置で調製し、保存による品質の変化を検討した。評価は第16改正日本薬局方²⁾(以下、日局)の「非無菌製剤」の項目で許容基準値が規定される好気性細菌、真菌及び大腸菌、「生薬及び生薬を配合した製剤」の項目で許容基準値が規定されるサルモネラの数測定に加えて、色彩、味及び含有成分量の分析を行った。

実験材料及び方法

1. 生薬材料

日本薬局方カッコン(ウチダ和漢薬 Lot. 9341053 及び ABK0108)、マオウ(同 Lot. US262114 及び B1B0601)、タイソウ(同 Lot. 8751152 及び 99J1164)、ケイヒ(同 Lot. 70M1065 及び 04D1089)、シャクヤク(同 Lot. 83B1136 及び 05C1136)、カンゾウ(同 Lot. 88T1057 及び SU452905)、ショウキョウ(同 Lot. 8A61112)を用いた。

2. 試薬

グリチルリチン、プエラリン、日局試験用の各種培地及びクロラムフェニコール、亜セレン酸ナトリウムは和光純薬工業株式会社、エフェドリン塩酸塩及びプソイドエフェドリン塩酸塩はアルプス薬品工業株式会社から入手した。HPLCにはHPLC用試薬を、その他は試薬特級を用いた。

3. 微生物学的品質評価研究

3.1 葛根湯煎液の調製方法

漢方薬抽出自動包装機(ハニルパートナー EXT-500S, 株式会社ウチダ和漢薬)の配管内を消毒するために、食品や医療分野などで頻用される弱酸性次亜塩素酸水³⁾(200ppm)を12時間充填した。次に、配管内を水道水で洗浄した後、30分間水道水で煮沸した。その後、本装置の抽出タンクに葛根湯の構成生薬をそれぞれ14日分(カッコン112g, マオウ56g, タイソウ56g, ケイヒ42g, シャクヤク42g, カンゾウ28g, ショウキョウ14g)と蒸留水【14日分(100ml×3回/日×14日)+1.5l(蒸発量)】を加え、30分間煎じて、アルミパック包装42包を得た。

3.2 試料の保存方法

アルミパック包装した葛根湯煎液を4℃、25℃、40℃の恒温器内で4、7、14、28日間保存した。なお、前報¹⁾における大黃甘草湯の適切保存期間が1ヶ月であったことを

考慮し、葛根湯でも同一期間保存可能かを検討するために本研究の最大保存期間を28日とした。

3.3 微生物試験

全試験は日局に準じて以下の通り行った。

(1) 好気性細菌及び真菌

好気性細菌はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地、真菌は抗生物質添加(クロラムフェニコール50mg/l)サブローブドウ糖カンテン培地を用いてカンテン平板表面塗抹法で行った。固化後に表面を乾燥したカンテン培地上に試料0.2mlを塗抹し、好気性細菌は32℃、真菌は25℃で5日間培養した後に集落数を計測した。各検体にそれぞれ寒天培地を2枚ずつ使用した。基準値は、日局に規定される「非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値」(好気性細菌:100cfu/ml以下、真菌:10cfu/ml以下)に従った。なお、cfuはcolony forming unitの略称で、コロニー数を示す。

(2) 大腸菌

試料10mlを乳糖ブイヨン90mlに加え、振り混ぜた液1mlをEC培地(9~10ml)を入れた発酵試験管にとり44.5±0.2℃の恒温水槽中で24時間培養し、ガス発生が認められない場合は大腸菌陰性と判定した。なお、日局の「非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値」には大腸菌は非検出とある。

(3) サルモネラ

試料10mlを乳糖ブイヨン90mlに加え約32℃で48時間培養した。増殖が見られた場合、試料1mlをセレナイト・シスチン液体培地及びテトラチオネート液体培地10mlずつに接種し、24時間培養した。次に、それぞれの液体培地からブリリアントグリーンカンテン培地及び亜硫酸ビスマスカンテン培地に塗抹し、30~35℃で48時間培養し、サルモネラの集落の判定を行った。なお、日局の「生薬及び生薬を配合した製剤の微生物学的品質に対する許容基準値」にはサルモネラは非検出とある。

4. 化学的品質評価研究

4.1 葛根湯煎液の調製方法

漢方薬抽出自動包装機の抽出タンクに葛根湯構成生薬をそれぞれ45日分と蒸留水【45日分(100ml×3回/日×45日)+1.5l(蒸発量)】を加え、30分間煎じて、アルミパック包装135包を得た。

4.2 試料の保存方法

アルミパック包装した葛根湯を4℃、25℃、40℃の恒温器内で、1、2、4、7、14、21、28、35日間保存した。

4.3 色彩の測定方法

前報¹⁾に従い、遠心分離(3,000rpm, 10分間)した煎液の上清を光路長10mmのガラスセルに入れ、標準D65の透過光を分光測色計CM-3500d(コニカミノルタホールディングス株式会社)で測定した。 L^* 値(明度)、 a^* 値【赤(+方向)、緑(-方向)】、 b^* 値【黄(+方向)、青(-方向)】及び ΔE^*ab 値(色差)により評価した。なお、 L^* は0から100の値で示され、100に近い程明るいことを意味し、

また、 a^* 及び b^* は色の方向を表しており、これらは共に単位はない。更に、 ΔE^*ab 値は L^* 値、 a^* 値、 b^* 値の色差を元に算出され $\{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}\}$ 、値が 12 以上の時、別の色系統に変わると評価される。

4.4 味の測定方法

前報¹⁾ 及び安食ら⁴⁾ の報告に従い、遠心分離 (3,000rpm, 10 分間) 後の煎液の上清を蒸留水で 10 倍に希釈し、塩化カリウムと酒石酸をそれぞれ 10mM 及び 0.1mM となるように添加した液を試料溶液とした。各試料溶液について、味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー) にて 6 種類のセンサ (AC0, C00, AE1, AAE, CT0, CA0) を用いて測定し、得られた各センサの出力値から、ウェーバーの法則に基づいてヒトが感じる味強度の違いを推定した。本法則において、ヒトは味の強さが 20% 変化するとその味の違いを認識すると言われているため^{5,6)}、20% の変化をその味の強さの 1 単位としている⁷⁾。今回は、酸性苦味、渋味、旨味、酸性苦味後味、渋味後味及び旨味後味の強度を推定した。

4.5 成分含量の測定方法

検出器: L-2400, ポンプ: L-2130, クロマトグラフ: D-2500, オートサンプラー: L-2200 (株式会社日立ハイテクトロジーズ), カラム: YMC-Pack ODS (6.0×150mm, 株式会社ワイエムシィ) を用いて HPLC 法で測定した。

4.6 試料溶液の調製

遠心分離 (3,000rpm, 10 分間) 後の煎液の上清を 2 倍に希釈し、メンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試料溶液とした。なお、成分含量は 1 日分 (100ml × 3 包) に含まれる量として換算した。また、別に同一煎

液のアルミパック間 ($n=6$) の誤差を求め、同様に 1 日分として換算した。

4.7 HPLC 分析条件

全条件で、流量: 1.0ml/min, カラム温度: 室温, 注入量: 10 μ l とし、移動相、検出波長は以下の通りである。

(1) エフェドリン及びプソイドエフェドリン

移動相: アセトニトリル: 水: リン酸: ラウリル硫酸ナトリウム (190ml: 310ml: 0.8ml: 2.4g), 検出波長: 210nm.

(2) グリチルリチン

移動相: アセトニトリル: 0.05 % リン酸 (35: 65), 検出波長: 254nm.

(3) プエラリン

移動相: アセトニトリル: 0.05 % リン酸: メタノール (9: 90: 1), 検出波長: 250nm.

実験結果

同様の実験を 2 回行い、平均値をグラフまたは表に示した。

1. 微生物数の経時変化

煎じた日の好気性細菌は 4.2cfu/ml であり、日局での許容基準値 (100cfu/ml) に比して非常に少なかった。また、このコロニー数は保存に伴い減少した。一方、全保存条件において真菌は 0cfu/ml, 大腸菌, サルモネラは非検出であり、いずれも日局の基準を満たしていた (Table 1)。

2. 色彩の経時変化

漢方薬抽出自動包装機で作製し、アルミパック保存した葛根湯煎液を 40℃ で保存した時、保存期間の長さに伴って L^* 値 (明度) の減少及び a^* 値 (赤み) の増加が認めら

Table 1. Temporal changes of microbial levels in Kakkonto.

Storage temperature	Microorganism	Storage period (days)				
		0	4	7	14	28
4℃	aerobic bacterium	4.2	1.25	1.25	0	1.25
	fungus	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>salmonella</i>	ND	ND	ND	ND	ND
25℃	aerobic bacterium	4.2	1.25	2.5	1.25	0
	fungus	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>salmonella</i>	ND	ND	ND	ND	ND
40℃	aerobic bacterium	4.2	0	0	0	0
	fungus	0	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND
	<i>salmonella</i>	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

れた (Fig. 1-A, B). また, 同温度の b^* 値 (黄み) は 4 日後に一度増加するが, その後減少した (Fig. 1-C). 一方, 4℃及び 25℃では, 顕著な色の変化は認められなかった. 以上の ΔE^*ab (色差) は保存温度 40℃で 21 日後に値が 12 以上となり, 別の色系に変わった (Fig. 1-D).

3. 味の経時変化

作製当日の葛根湯煎液を 10 倍希釈した溶液の味のパターンを Fig. 2-A に示した. 本試料液は酸性苦味及び旨味を強く有していた. 各味要素における経時変化の特徴として, 酸性苦味については, 保存温度 40℃では 1 日後に, 4℃では 7 日後に煎液作製当日の値から 1 以上減少したが, 両保存温度とも 21 日後には顕著に増加し, 煎液作製当日との違いを感じられない値になった. 一方, 保存温度 25℃では, 保存開始から 14 日目までは酸性苦味の値が一旦減少するものの味強度 1 以上の変化はなく, 21 日後には他の保存温度の試料と同様に値が顕著に増加し, 35 日目ではヒトが違いを感じられる程度にまで値が大きくなった (Fig. 2-B). また, 渋味については, 保存温度 40℃では保

存開始 1 日目に渋味強度が減少し, その後安定した値を示した (Fig. 2-C). なお, その他の味要素 (旨味, 酸性苦味後味, 渋味後味及び旨味後味) に経時変化は認められなかった (データ省略).

4. 成分の経時変化

エフェドリンとプソイドエフェドリンの総量 (Fig. 3-A), グリチルリチン含量 (Fig. 3-B), プエラリン含量 (Fig. 3-C) の変化を Fig. 3 に示した. また, グラフには同一煎液中のアルミパック間 ($n=6$) の誤差範囲 (エフェドリンとプソイドエフェドリンの総量: $\pm 7.9\text{mg}/300\text{ml}$, グリチルリチン: $\pm 86\text{mg}/300\text{ml}$, プエラリン: $\pm 172\text{mg}/300\text{ml}$) を線で示した.

全成分量の変化は, 全て誤差範囲内であった. すなわち, 葛根湯煎液のエフェドリン, プソイドエフェドリン, グリチルリチン, プエラリン含量には保存温度の差異による経時変化は認められなかった.

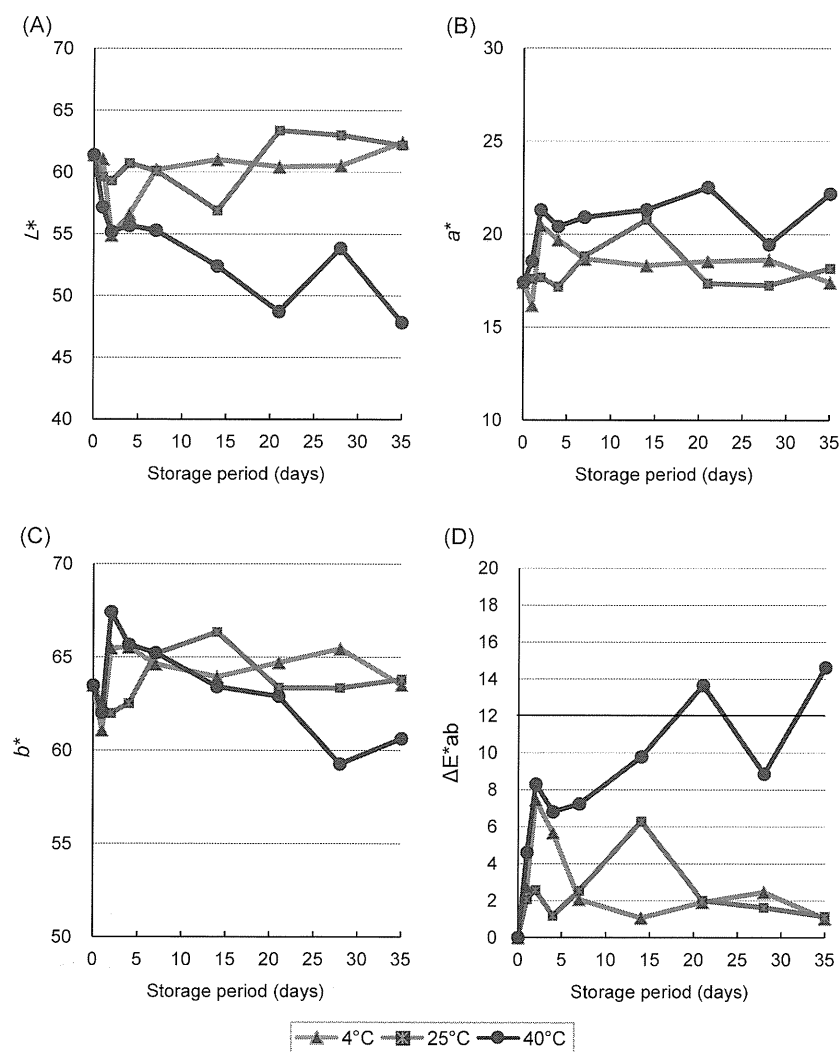


Fig. 1. Temporal changes of color values in Kakkonto.
(A) L^* , (B) a^* , (C) b^* , (D) ΔE^*ab .

考 察

1. 本研究は、微生物数並びに色彩、味及び化学成分を指標に、漢方薬抽出自動包装機で製した葛根湯の最適保存条件と品質保持期間の検討を目的として行った。その結果、全条件で4週間は微生物数の日局基準を満たしていた。一方、色彩は保存温度4℃及び25℃で5週間、40℃で2週間は同系統の色を維持した。また、保存温度4℃では1週間、25℃では2週間はヒトが感じる味の変化はないが、40℃では保存後1日で味が変わった。一方、エフェドリンとプソイドエフェドリンの総量、グリチルリチン含量、プエラリン含量には経時変化が認められなかった。以上から、本装置で製した葛根湯は25℃すなわち室温保存で2週間、4℃すなわち冷蔵保存で1週間は大きな変化なく維持できると判断した。

2. これまで煎液の保存による微生物数の変化について検討されてこなかったが、葛根湯を4、25及び40℃のいずれの温度で保存した場合でも、4週間は保存期間の長さ、

保存温度の違いに伴い好気性細菌が増加することはない、また、真菌、大腸菌及びサルモネラが検出されることはないことが明らかになった。加えて、化学的評価では冷蔵保存において味が変わることが明らかになったことから、微生物数が増加しないのであれば室温で保管するのが良いと判断できる。

3. 生薬そのものに細菌や真菌が付着しているが⁸⁾、漢方薬抽出自動包装機を用いて調製した葛根湯には好気性細菌が4.2cfu/mlしか認められず、真菌は非検出であった。このことから100℃で30分煎じることにより、生薬に付着したほとんどの菌は死滅することが明らかになった。また、好気性細菌数は湯液の保存に伴い減少したが⁸⁾、これは葛根湯を構成する葛根⁹⁾、桂皮¹⁰⁾、甘草¹¹⁾、生姜¹²⁾などの抗菌作用によるものと推察できる。

4. 葛根湯の煎液を4℃で保存した時、2日後から酸性苦味が減少し、7日後にはヒトが認識できる程度の味の変化を来した。すなわち、湯液は通常、冷蔵庫で保存するように指示されるが、葛根湯の場合、味を一定に保つためには

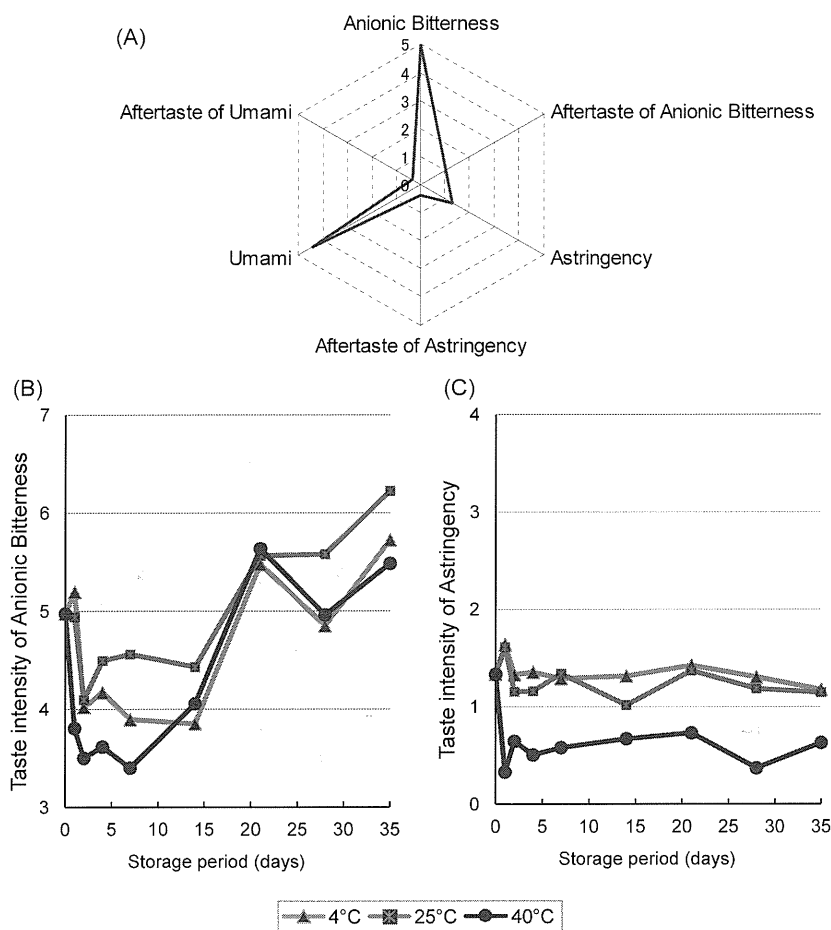


Fig. 2. Taste intensity values of the ten-fold diluted Kakkonto decoction. (A) Taste pattern on the day of decoction. (B) Changes in taste intensity values of Anionic Bitterness during storage period. (C) Changes in taste intensity values of Astringency during storage period. The 20% taste change in measured values, which humans can clearly recognize, is defined as 1.

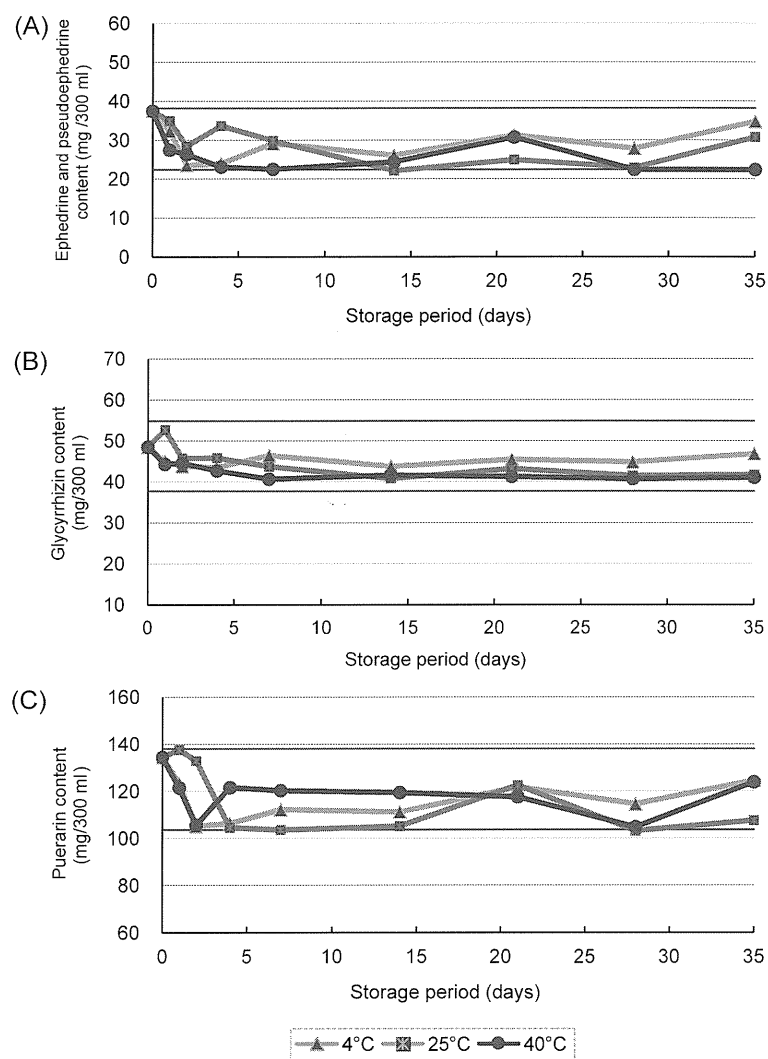


Fig. 3. Temporal changes of principal compounds in Kakkonto.
(A) Ephedrine and pseudoephedrine, (B) Glycyrrhizin,
(C) Puerarin. Each error range is indicated by two lines.

室温保存の方が適していることが明らかになった。前報¹⁾で検討した大黃甘草湯は色の変化から室温保存が適していると報告したが、今回の結果と合わせると、煎液の味や色を一定に保つためには必ずしも冷蔵保存が良いとは言えないと判断できる。

5. 酢酸性苦味値には経時変化が認められたが、この変化はエフェドリン含量のわずかな変化と似ている。安食ら⁴⁾はこれまで葛根湯の味はマオウに大きく起因していると報告しているが、今回、エフェドリン含量の微妙な変化も葛根湯の味に影響する可能性が示唆された。

6. 40℃で保存した時、保存期間に伴い、明度を表す L^* 値及び黄色を表す b^* 値が減少し、赤色を表す a^* 値が増加したことから、赤みを帯びた暗い色に変化した。同温度では保存後1日で酸性苦味及び渋味の減少が認められ、味の変化が生じることが明らかになった。このことから、夏の高温時に葛根湯を室温で保存した場合、味及び色に変化する可能性があることを患者に適切に説明することが重要で

ある。

一方、40℃で4週間保存した葛根湯煎液の色差は12以下であり、3週間保存したものよりも値が小さかった。すなわち、高温保存により色は変化するが、変色速度が遅い場合もあり得ると考えられる。

7. 今回、葛根湯を用いて微生物試験を行ったが、漢方処方の中には糖分を多く含み、微生物が生育する可能性が高い処方も存在する。今後、他の処方についても同様の検討を行う必要がある。

文 献

- 1) Doui M., Anjiki N., Ina S., Yoshimitsu M., Kawahara N., Goda Y., Kakiuchi N., Mikage M., *Jpn. J. Pharmacog.*, **65** (2), 103-107 (2011).
- 2) The Ministry of Health, Labour and Welfare, The Japanese Pharmacopoeia 16th Edition (2011).
- 3) Ono T., Yamashita K., Sato T., *Bokin Bobai*, **38** (8), 509-514 (2010).

- 4) Anjiki N., Suzuki A., Kawahara N., Goda Y., *Jpn. J. Pharmacog.*, **60** (1), 21-27 (2006).
- 5) Pfaffmann C., Neurophysiology, Field J. (eds.), Handbook of physiology, vol. 1, American Physiological Society, Washington, DC, 507-534 (1959).
- 6) Schutz H. G., Pilgrim E. S., *J. Exp. Psychol.*, **54**, 41-48 (1957).
- 7) Habara M., Toko K., Biomimetic membrane for taste sensing. Chapter 6, Ariga K., Nalwa H.S. (eds), Bottom-up nanofabrication, vol. 6, American Scientific Publishers, Los Angeles, 91-109 (2009).
- 8) Okonogi A., Higuchi H., Uno T., Ogino H., Mikage M., *Bokin Bobai*, **32** (5), 235-242 (2004).
- 9) Kim S., Fung D. Y. C., *Lett. Appl. Microbiol.*, **39** (4), 319-325 (2004).
- 10) Bae K. H., Ji J. M., Park K. L., *Arch. Pharm. Res.*, **15** (3), 239-241 (1992).
- 11) Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nomura T., *Fitoterapia*, **73** (6), 536-539 (2002).
- 12) Mascolo N., Jain R., Jain S. C., Capasso F., *J. Ethnopharmacol.*, **27** (1-2), 129-140 (1989).