

別紙 A 加味温胆湯の記載修正版 2/2

9A. 加味温胆湯

参考文献名		半夏	茯苓	陳皮	竹茹	乾生姜	生姜	枳実	枳殼	甘草	遠志	玄参	人参	地黄	熟地黄	酸棗仁	大棗	黄連	五味子
処方分量集	注1	3.5	3.5	—	3	1	—	3	—	2	—	—	3	2	—	3.5	—	2	—
診療の実際		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
診療医典		6	6	2.5	2	—	3	1.5	—	1	—	—	—	—	—	2-5	—	1.5	—
症候別治療	注2	4	4	2	2	—	3	1.5	—	1	—	—	—	—	—	5	—	1.5	—
処方解説		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
後世要方解説		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
漢方百話	注3	6	6	3	2	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—	1	—	1	—
応用の実際	注4	5	4	3	3	2	—	2	—	2	2	2	2	2	—	2	2	2*1	—
明解処方		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
漢方医学		5	3	3	3	—	2	3	—	2	2	2	2	2	—	2	2	—	—
現代入門		5	3	3	3	—	2	3	—	2	2	2	2	2	—	2	2	—	—
漢方精撰百八方		5	4	3	3	—	2	2	—	2	2	2	2	2	—	2	2	—	—
図説東洋医学		5	4	3	3	1	—	2	—	2	2	2	2	2	—	3	2	2*2	—
黙堂柴田良治処方集		4	2	2	2	—	1	2	—	1	3	—	3	—	3	3	2	—	3
漢方処方大成		5.2	1.5	1.8	2.2	—	○	2.2	—	1.5	1.5	—	1.5	—	1.5	1.5	○	—	1.5

*1 更に加えてよいことがある *2 加える場合もある

注1 上記の生薬に麦門冬 3.0、当帰・山梔子各 2.0、辰砂 1.0 が加味された万病回春の処方が記載されている。

注2 不眠。

注3 胃障害による不眠症。

注4 神経症、不眠症、胃下垂症、胃アトニー症、大病後の衰弱による虚煩。

参考：類似の加味方として、万病回春に竹茹温胆湯*（柴胡 5.0、桔梗、陳皮、半夏、竹茹、茯苓各 3.0、香附子、人参、黄連各 2.0、枳実、甘草、乾生姜各 1.0）

千金方に千金温胆湯*（半夏 5.0、陳皮 3.0、甘草、竹茹各 2.0、乾生姜各 1.0）。

古今医鑑に清心温胆湯*（半夏、茯苓、陳皮、白朮各 3.0、当帰、川芎、芍薬、麦門、遠志、人参、竹茹各 2.0、黄連、枳実、香附、菖蒲、甘草各 1.0）などがある。

* 矢数道明「処方解説」

別紙 B 生姜の扱いについて

状況説明

「現行 210 手引き」は全編に渡り原典・出典の記載に忠実である。

- ・「現行 210 手引き」の生姜 ⇒ ヒネショウガに相当
- ・「現行 210 手引き」の乾生姜 ⇒ 現行の日局ショウキョウに相当

「新 210 手引き案」の右ページ（参考文献表及びその注釈）は、原典・出典の記載に忠実である。すなわち「現行 210 手引き」の記載を踏襲している。

- ・「新 210 手引き案」の右ページの生姜 ⇒ ヒネショウガに相当
- ・「新 210 手引き案」の右ページの乾生姜 ⇒ 現行の日局ショウキョウに相当

「新 210 手引き案」の左ページ（主に処方構成）は、現行日本薬局方に準じている。

- ・「新 210 手引き案」の左ページの生姜 ⇒ 現行の日局ショウキョウに相当

提案

「現行 210 手引き」から「新 210 手引き案」への移行に際して、公的規格を優先した表現を使用するため、以下の式に従って生姜の換算を行った。

「現行 210 手引き」		「新 210 手引き案」
生姜 ○g	⇒	生姜 ○/3～○/4g（ヒネショウガを使用する場合 ○g） [ただし、○/2g の場合もあり]
乾生姜 △g	⇒	生姜 △g

（「現行 210 手引き」あるいは原典において、乾生姜の使用が指定されている処方、ヒネショウガの用量を記さない。）

別紙 C 白朮、蒼朮の問題

状況説明

傷寒雑病論などの古典では白朮と蒼朮の区別はせずに「朮」として利用。

「現行 210 手引き」では朮、白朮、蒼朮が混在。

ただし、蒼朮が処方構成に記されているのは 3 処方のみ。

3 胃苓湯、57 香砂養胃湯、160 二朮湯（いずれも蒼朮・白朮併用）

「新 210 手引き案」の作成に際して、処方構成に「朮」という表現は使用しなかった。
参考文献の処方構成と臨床での使用状況を勘案し、原則的に次の移行を行った。

「現行 210 手引き」		「新 210 手引き案」
白朮	⇒	白朮
蒼朮	⇒	蒼朮
朮	⇒	白朮
	⇒	白朮（蒼朮も可）
	⇒	蒼朮
	⇒	蒼朮（白朮も可）

また、「新規 85 処方」においても、参考文献の処方構成に従い、上記の表の右列のいずれかの構成で表現した。

別紙 D 「改訂版新 210 手引き案」の電子文書化における留意点

1) 文字使用の基本方針

原則的に、JIS 第 1 水準、JIS 第2水準及び WindowsXP—Word2003 で対応しているユニコード文字(以下、XP 対応文字と呼ぶ)を用いる。

2) 旧字体で記された書物からの引用部分の扱い

- XP 対応文字であるかぎり、原文で使用されている文字を用いる。
- 現行 210 処方の記載については、原則的に「現行 210 手引き(仮想改訂版)」の記載(原文で使用されている文字を使用している)を踏襲する。
- 原文あるいは「現行210手引き(仮想改訂版)」で使用されている文字が XP 対応文字ではない場合は、対応する当て字・新字体が XP 対応文字として存在する場合はそれを用いる。ただし、対応する当て字・新字体が存在しても、それが適切でないと判断される場合は、じほう社に作字を依頼する。
- 原文あるいは「現行210手引き(仮想改訂版)」で使用されている文字が XP 対応文字ではない場合、かつ、対応する当て字・新字体が XP 対応文字として存在しない場合は、じほう社に作字を依頼する。

3) (引用部分以外の)現代文の扱い

- 現行 210 処方の記載については、原則的に、XP 対応文字であるかぎり「現行210手引き(仮想改訂版)」で使用されている文字を踏襲するが、明らかに現代文として適切でない旧字体の場合は、対応する当て字・新字体を用いる。
- 新規 85 処方の記載については、引用部分以外は、現在の時代を反映させた表現を積極的に用いる。

別紙E 現行210手引きにおける正字と改訂新210手引き案の略字・当て字の対照表

正字 (旧字体)	略字・当て字 (新字体)	正字 (旧字体)	略字・当て字 (新字体)	正字 (旧字体)	略字・当て字 (新字体)
倦	倦	瀉	瀉	宰	宰
屑	屑	虎	虎	瘥	瘥
屺	屺	孟	孟	羸	羸
愈	愈	熨	熱	泡	泡
貌	貌	輓	輓	兔	兔
榔	榔	虚	虚	囊	囊
樽	樽	搜	搜	莧	莧
溢	溢	钱	钱	函	函
灼	灼	窩	窩	葱	葱
煉	煉	竅	竅	芩	芩
煎	煎	魔	魔	苡	苡
瘦	瘦	變	變	喝	喝
蝕	蝕	寧	寧	褐	褐
飴	飴	苒	苒	眩	眩

別紙F 安中散加茯苓の参考文献表(案)

1A. 安中散加茯苓

参考文献名	桂枝	延胡索	牡蛎	茴香	縮砂	甘草	良姜	茯苓	用法・用量
処方解説	5	4	4	2	1.5	1.5	0.7	5.0	(多く茯苓を加える) *1
漢方治療百話	5	4	4	2	1.5	1.5	0.7	5.0	
漢方処方大成	3~5	3~4	3~4	1.5~2	1~2	1~2	0.5~1	5.0	(茯苓のない場合も可)
実用処方便覧	3~5	3~4	3~4	1.5~2	1~2	1~2	0.5~1	5.0	(茯苓のない場合も可)
図説・漢方処方方の八網分類	3~5	3~4	3~4	1.5~2	1~2	1~2	0.5~1	5.0	
図解・常用漢方処方	3~5	3~4	3~4	1.5~2	1~2	1~2	0.5~1	(5)	

*1 七味を末となし、毎回1.0~2.0ずつ温めた酒で服用する。(婦人は薄めた酢でもよい)。通常1日2~3回、酒のきらいなもの塩湯を用いるが、一般には微温湯で服用している。煎用することも多く、そのときは上記分量を一日量とする。

注1 脾胃(おもに胃のこと)の虚寒と気鬱血滯による胃痛、腹痛というのが主目標で、次のような諸徴候を参考とする。痩せ型で皮膚筋肉の弛緩傾向、脈は虚、軟、腹も軟弱(とくに臍傍)で、動悸(とくに臍傍)、胃内停水などを認めることもある。その他、心下痛、心下痞満、腹満(軽度)、下腹部より腰部に及ぶ牽引性疼痛、過酸(または低酸)症、食欲不振、嘔吐(軽度)などである。
方輿輓には「婦人、血氣刺痛、小腹(下腹)ヨリ腰ニ連リ、功疰重痛(牽引痛)スルヲ治ス」とあり、勿誤方函口訣には「此方世上ニハ癖囊(胃拡張)ノ主薬トスレドモ、吐水甚シキ者ニハ効ナシ。痛ミ甚シキ者ヲ主トス。反胃(胃拡張、胃癌の類)ニ用ユルニモ腹痛ヲ目的トスベシ。又婦人血氣刺痛ニハ癖囊ヨリ反テ効アリ」といつている。

分担研究課題 漢方処方 の 同等性並びに品質確保等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

黄芩煎出液における沈殿物の生成と Baicalin の加水分解に関する研究

甘露飲処方 の品質評価について検討する中で、構成生薬の一つである黄芩の水煎出液に黄芩含有フラボノイドの沈殿が大量に生じることを見出した。また、黄芩粉末の水懸濁液においても沈殿は生成し、溶液中ではフラボノイド配糖体の加水分解が進行していることも明らかとなった。日本薬局方第 15 改正における黄芩の Baicalin 定量法では、薄めたリン酸（1→46）/アセトニトリル混液（18:7）が抽出溶媒として規定されており、この溶媒で黄芩粉末を懸濁させた場合、2 時間までは沈殿生成、加水分解共に起こらなかったが、15℃で 1 日放置すると沈殿が生じた。水-メタノール混液を用いる場合、メタノールの含量が増えるほど沈殿生成と加水分解が起こり難くなり、50%以上メタノールを含むと沈殿は生成せず、70%以上メタノールを含むと加水分解も進行しなくなることが分かった。日本薬局方第 15 改正第一追補において、黄芩の Baicalin 定量法の抽出溶媒は薄めたメタノール（7→10）へ変更されたが、本研究の結果はその妥当性を支持するものとなった。

A. 研究目的

現代の日本では、生活様式の欧米化に伴う疾病構造の変化と人口分布の高齢化という社会構造の変化が起きている。そして、ある程度の経済的余裕と高度情報化により多くの国民が自らの健康に強い関心を持つようになり、しかもそのニーズは多様化している。このような状況において、軽度な疾病の予防や生活の質の改善・向上などを目標とした、一般用医薬品によるセルフメディケーションの考え方が浸透しつつある。これに呼応するようにして厚生労働省では、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、平成 14 年に一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を発表している。そして、その具体的な方策の一つとして、一般用漢

方処方の見直しとその積極的な活用が提言されている。

一般用漢方処方については、昭和 40 年代末に当時の厚生省より 210 の処方について承認審査の内規が公表され、「一般用漢方処方の手引き」としてまとめられている。この手引きは、古くより伝わる数千種の処方のうち一般用医薬品として必要と判断された 210 処方について、成分・分量、用法・用量、効能・効果等が記載されたものであり、この記載に従って一般用医薬品としての承認申請を行う限りにおいては、その有効性及び安全性が長年の臨床使用経験によって担保される。ただし、この内規は昭和 40 年代末に公開されて以来、ほとんど変更が加えられていないため、現代の社会構造及び疾病構造の変化に対応できない面も指摘されている。このような時代の要請と、一般用医薬品承認審査合理化等検討会の提言を

受ける形で、厚生労働科学研究費補助金による医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価（EBM 確保）手法及び安全性確保等に関する研究」において「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究班」が組織され、従来の一般用漢方処方「210 処方」の見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規処方の追加が検討され、平成 17 年度末に「新一般用漢方処方の手引き案」として報告された。そして、平成 19 年度末には本手引き案の改訂版が報告される予定である。

当研究部では、この「新一般用漢方処方の手引き案」の新規処方について、実際に一般用医薬品として流通させるため、どのように有効性や安全性を担保し、どのように品質を保証するか検討を進めている。そして、新規処方の規格設定において生じる問題点を個別に解明する目的で、昨年度の本研究事業では、新規追加候補処方の一つである甘露飲を取り上げ、構成生薬の確認試験及び含有成分の定量法について検討した。この一環として、黄芩主要成分の Baicalin を指標成分とした成分定量法の条件設定を行ったが、その中で、黄芩の水煎出液において 1 時間もしないうちに大量の沈殿物が生じることに気付いた。また、粉末の黄芩を用いて水による煎出を行った際、煎出開始までに手間取ると煎出液中のフラボノイドの組成が大きく変化することに気付いた。文献検索の結果、生薬黄芩には主要成分のフラボノイド配糖体 Baicalin 及び Wogonoside をアグリコンの Baicalein 及び Wogonin へ変換する加水分解酵素が活性を有したまま残存し¹⁾、また、これらのフラボノイドは水に対する溶解度が低いため、水煎出液では容易に析出してしまうことが分かった²⁾。この現象は甘露飲及びその他の黄芩含有処方の有効性に影響を及ぼし、また品質評価の精度にも影響を及ぼし得るものである。そこで、本研究では黄芩煎出液における沈殿物の生成と Baicalin の加水分解について、さらに詳細に検討を加える

ことにした。

B. 研究方法

生薬及び試薬

生薬黄芩はウチダ和漢薬より購入した。定量法における標準化合物として、Baicalin、Baicalein 及び Wogonin は和光純薬より購入した。煎出あるいは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）において用いる水は、Milli-Q Synthesis (Milipore) により調製した超純水を用いた。HPLC に用いる有機溶媒は、関東化学の高速液体クロマトグラフィー用溶媒を用いた。その他の試薬は、いずれも各試薬メーカーの特級品を用いた。

機器

HPLC 分析は、島津高速液体クロマトグラフ Prominence システムを用いて行った。

[システム構成]：

ポンプ (LC-20AB)、PDA 検出器 (SPD-M20A)、
デガッサー (DGV-20AB)、オートサンプラー
(SIL-20AC)、カラムオープン (CTO-20AC)

生薬の粉碎は、VIBRTIN SAMPLE MILL TI-200 (HEIKO) によって行った。生薬の振とう抽出及び遠心分離は、RECIPRO SHAKER SR-2W (TAITEC) 及び高速冷凍遠心機 6900 あるいは 6500 (KUBOTA) を用いて行った。

HPLC の分析条件

試料は 0.22 μ m メンブレンフィルター (Millipore, Millex-GV) でろ過した後、その 10 μ L を HPLC 分析に供した。分析条件は以下の通りである。

装置: Shimadzu Prominence System

検出器: PDA

カラム: Luna C18 (4.6x250mm, 5 μ m, Phenomenex)

カラム温度: 40°C

移動相: (A) 水/酢酸 (1000:5) (B) メタノール/酢酸 (1000:5)

溶出条件: (A)/(B)

100/0(0min)-94/6(9min)-70/30(15min)-55/45(23min)-40/60(50min)-30/70(55min)-0/100(55.1min)-0/100(65min)-100/0(65.1min)-100/0(80min)

流速: 1.0 mL/min

検出波長: 277nm

サンプル注入量: 10 μ L

水及び熱水による黄芩粉末懸濁液の成分定量

水懸濁液の分析: Mill で粉末化した黄芩 0.125 mg を 100 mL 三角フラスコに取り、室温の水 30 mL を入れて素早く振り混ぜ、すぐにろ紙によりろ過した。この溶液を 500 μ L 取り、0.22 μ m メンブレンフィルター (Millipore、Millex-GV) でろ過した後、すぐにその 10 μ L を HPLC 分析に供した。また、残りの溶液を 15 $^{\circ}$ C で 24 時間放置した後、同様に 500 μ L 取り、フィルターろ過して、その 10 μ L を HPLC 分析に供した。

熱水懸濁液の分析: 100 mL 三角フラスコにあらかじめ 80 $^{\circ}$ C に熱した水を入れ、そこに Mill で粉末化した黄芩 0.125 mg を加えて素早く振り混ぜ、すぐにろ紙によりろ過した。この溶液を 500 μ L 取り、フィルターろ過した後、すぐにその 10 μ L を HPLC 分析に供した。また、残りの溶液を放冷してから 15 $^{\circ}$ C で 24 時間放置した後、同様に 500 μ L 取り、フィルターろ過して、その 10 μ L を HPLC 分析に供した。

日本薬局方黄芩定量法の抽出溶媒による黄芩粉末懸濁液の成分定量

前項の水懸濁液の分析と同じ操作を、日本薬局方第 15 改正の黄芩定量法における抽出溶媒 (薄めたリン酸 (1 \rightarrow 46) /アセトニトリル混液 (18:7)) 及び日本薬局方第 15 改正第一追補の黄芩定量法における抽出溶媒 (メタノール (7 \rightarrow 10)、すなわち 70%メタノール) を用いて行い、同様にして HPLC 分析に供した。

溶媒添加後放置時間の検討

日本薬局方黄芩定量法に準じた還流抽出による成分分析において、溶媒の種類と溶媒を添加後の室温放置時間を変化させた。抽出溶媒としては水、30%メタノール、50%メタノール、70%メタノール及び薄めたリン酸 (1 \rightarrow 46) /アセトニトリル混液 (18:7) を用いた。溶媒添加後の室温での放置時間は 0 分、30 分、60 分及び 120 分について検討した。100 mL ナスフラスコに黄芩粉末 0.5g を入れ、抽出溶媒 30 mL を加え、一定時間室温で放置した後、還流冷却器をつけて、あらかじめ沸騰させておいた水浴上で 30 分間加熱した。その後、50 mL 共栓遠心沈殿管に移し、栓をして 5000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液を分取した。還流抽出に用いたナスフラスコを溶媒 30mL で洗い、洗液を先の共栓遠心沈殿管に入れ、栓をして 5 分間振とうした。これを 5000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を分取して先の上澄液と合わせた。共栓遠心沈殿管の残留物はさらに溶媒 30mL を加え、5 分間振とうし、遠心分離の後に上澄液を分取した。全抽出液を合わせ、溶媒を用いて 100mL に定容した。この溶液を 500 μ L 取り、フィルターろ過して、その 10 μ L を HPLC 分析に供した。

倫理面への配慮

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

C. 研究結果

黄芩水煎出液における沈殿物生成とフラボノイド配糖体の加水分解

黄芩粉末を水に懸濁してすぐに HPLC で分析すると主要なフラボノイド類 (Baicalin、Wogonoside、Baicalein 及び Wogonin) がほとんど溶出されていることが観察された (図 1A)。この溶液を室温で放置すると 1 時間もしないうちに濁り始めた。また、15 $^{\circ}$ C で 24 時間放置した後に HPLC で分析すると、配糖体である Baicalin 及び Wogonoside のピークが著しく低くなり、代わって

これらのアグリコンである Baicalein 及び Wogonin のピークが増大していた。これは、文献情報等から総合的に判断して配糖体の加水分解が起こったものと予想した。そこで、80℃の熱水に直接黄芩粉末を加え、加水分解酵素を熱により失活させた状態で同様に 24 時間放置したものを分析したところ、予測通り配糖体からアグリコンへの変換は起きず、生薬黄芩の中には加水分解酵素が活性を失わないままで残存しているものと推測された。

日本薬局方黄芩定量法の抽出溶媒による黄芩粉末懸濁液における沈殿生成と加水分解

黄芩粉末を水で懸濁させた場合に沈殿の生成と加水分解が観察され、配糖体の Baicalin を指標として品質評価を行う際には注意を要することが分かった。そこで、日本薬局方黄芩定量法で指定されている抽出溶媒における黄芩フラボノイドの挙動を HPLC により定量的に分析することにした。水で懸濁させた場合、図 3 に示すように懸濁直後には Baicalin 及び Baicalein の総量に対する Baicalein の比が 0.02 であったものが、15℃で 24 時間置くことにより 0.92 に変化し、激しく加水分解が進行していることが分かり、また、図中の Baicalin 及び Baicalein のバーが著しく小さくなり、溶液からこれらの化合物が大量に析出していることが分かった。懸濁直後と比較した 24 時間後の Baicalin 及び Baicalein の溶液中への残存率はわずかに 7.9%であった。これに対して、日本薬局方第 15 改正の黄芩定量法における抽出溶媒（薄めたリン酸 (1→46) /アセトニトリル混液(18:7))を用いた場合、Baicalin 及び Baicalein の総量に対する Baicalein の比は 0.04 のまま 24 時間後も変化せず、加水分解は進行しないことが分かったが、図中の Baicalin 及び Baicalein のバーが 24 時間後にはわずかに小さくなっており、数字にして 9.9%が沈殿して溶液の系外に排出されていることが分かった。次に、日本薬局方第 15 改正第一追補の黄芩定量法における抽出溶媒

(70%メタノール)を用いた場合は、Baicalin 及び Baicalein の総量に対する Baicalein の比は 0.04 のまま 24 時間後も変化せず、また、図中の Baicalin 及び Baicalein のバーは 24 時間後にも同じ高さであり、加水分解も沈殿の生成も起こっていないことが分かった。

抽出溶媒及び還流抽出前タイムラグの影響

実際に日本薬局方黄芩定量法を適用する場合、粉末黄芩を懸濁で抽出するわけではなく、研究方法の項目に記述した通り、還流及び洗い込みによる注意深い抽出方法が設定されている。図 4 にこの抽出法を模式的に示したが、沈殿精製及び加水分解の進行がどのような条件で起こるか明らかにするため、抽出溶媒及び還流前タイムラグを変化させて検討を行った。

水を抽出溶媒とした場合、図 5 に示した通り、溶媒を粉末黄芩に加えて 30 分後には Baicalin 及び Baicalein の総量に対する Baicalein の比は 0.19 から 0.34 へ変化し、加水分解が進行していることが分かり、また Baicalin 及び Baicalein のバーも 2/3 程度に小さくなり、沈殿として析出したことが分かる。そして 120 分後には Baicalein の占有率が 0.74 に上昇し、溶液への Baicalin 及び Baicalein の残存率は 8.2%まで落ち込んでおり（表 1）、著しい加水分解の進行と大量の沈殿の生成が観察された。

30%メタノールを抽出溶媒とした場合、120 分後に 95.2%の残存率が観察され、沈殿生成は起こりづらくなっていることが分かるが、Baicalein の占有率は 120 分で 0.62 まで上昇し、加水分解は著しく進んでいた（図 6 及び表 1）。

50%メタノールを抽出溶媒とした場合、120 分後にも 99.9%の残存率が観察され、沈殿生成は起こらないことが分かった。加水分解も抑制され、Baicalein の占有率は 120 分で 0.08 から 0.18 までしか上昇しなかった（図 7 及び表 1）。

70%メタノールを抽出溶媒とした場合、図 8 及び表 1 に示す通り、沈殿の生成も加水分解の進行

もまったく観察されなかった。

最後に、薄めたリン酸 (1→46) /アセトニトリル混液 (18:7) を抽出溶媒とした場合、図 9 及び表 1 に示した通り、120 分後までのタイムラグであれば沈殿の生成も加水分解の進行も起こらないことが観察された。

D. 考察

前年度、新規処方である甘露飲の品質評価の一環として、各構成生薬の水煎出液の成分分析を行ったが、オートサンプラーを用いて甘露飲構成生薬 10 種類の試料を HPLC 分析に供すると、HPLC の gradient program が 1 試料あたり 80 分であるため全試料の処理には半日以上掛かり、さらに同じ試料で二回り目の分析を行った場合、黄芩については成分ピークが全体的に低くなり、またピークの組成が大きく変化していることに気付いた。文献調査の結果、これがフラボノイドの析出と配糖体の加水分解によるものであることを知り、事実、HPLC のサンプルバイアルに沈殿物が多量に発生していることを確認した。これらの沈殿物をメタノールに再溶解し、HPLC 分析したところ、主に Baicalin 及び Baicalein から構成されていることが分かった。そこで、甘露飲の規格設定においてどのようなことに気を付けるべきか、あるいは、甘露飲の有効性を確保するために煎出液の調製等においてどのようなことに気を付けるべきか知るために、抽出溶媒の検討と還流抽出前のタイムラグ等の検討を行った。

まず、黄芩中に生きた加水分解酵素が残存していることを確認してみることにした。驚いたことに、VIBRTIN SAMPLE MILL TI-200 (HEIKO) によって粉末化した黄芩は細胞構造が破壊されているらしく、水に懸濁させただけで主要な成分は溶出し、その濃度はアルコールで還流抽出した場合と同等であった。このため、水に懸濁させた時点で水溶性の加水分解酵素と接触することになり、配糖体からアグリコンへの加水分解が速やかに進行した。これが酵素反応であることは、熱水に

直接黄芩粉末を投入した際に加水分解が全く進行しないことをもって証明した。生薬は、原植物が収穫されてから乾燥、保存、輸送、選品、包装等の様々な工程を経て市場に流通するが、この期間、一般には不安定と言われる酵素タンパクが活性を完全には失わずに残存していたことは驚くべきことである。同時にこれは黄芩含有処方の有効性に影響を及ぼし、また品質評価の精度にも影響を及ぼし得るものである。

そこで、抽出溶媒の種類と還流抽出前のタイムラグの影響について検討したが、結論から言って、日本薬局方に定められた適切な溶媒を用いる限り、品質評価の精度に大きな影響は及ぼさないことが分かった。日本薬局方第 15 改正において指定された薄めたリン酸 (1→46) /アセトニトリル混液 (18:7) を用いる限り加水分解は起こらず、少なくとも 120 分までは放置しても沈殿は生じない。また、日本薬局方第 15 改正第一追補において改訂された 70%メタノールを用いれば、1 日置いても加水分解と沈殿物生成は起こらず、図らずも第一追補による抽出溶媒の変更の妥当性を支持する結果となった。

ところで、Baicalin を加水分解する酵素の頑強さは一般の常識を超えた特別なものである。市場に出るまでの長い工程で活性を失わずに残存しているだけでも特別だが、メタノールが 30%も含まれる溶媒中でも十分に活性を示し、50%含まれてもわずかながら活性を示すことは、生化学の常識ではあり得ないことである。この酵素のアルコール耐性のメカニズムにも興味を持たれる。

さて、今回は粉末の生薬を用いて検討したが、処方煎出液を調製する場合は刻み生薬のままで行われるため、酵素反応の基質である Baicalin 等や酵素反応の主体である酵素が細胞外に溶出する可能性は低いものと思われる。ただし、水に長く浸した場合、あるいは昇温速度が緩やか過ぎる場合等は、酵素と Baicalin の接触が可能となることも考えられ、ここで配糖体とアグリコンの組成比が変化する可能性が存在する。配糖体とア

グリコンでは活性の強さ及び特質が異なる場合もあり、製剤の有効性の観点からも無視はできない問題である。また、煎出後の生薬残渣の分離を速やかに行わない限り、黄芩フラボノイドが大量に析出し、残渣との見分けが付かず、煎出液より除外されてしまう可能性も十分に考えられる。すなわち、黄芩含有処方品質を一定に保つためには、エキス製造工程における昇温速度、ろ過方式、濃縮温度、濃縮時間などを厳密に設定し、GMP などを通して適正に規定されることが必要であると思われる。

E. 結論

- 市場に流通する生薬黄芩には、その主要成分であるフラボノイド配糖体をアグリコンへ加水分解する酵素が活性を保ったままで残存し、その加水分解反応は黄芩の粉末を水に懸濁させるだけで速やかに進行することが分かった。
 - 日本薬局方第 15 改正において黄芩定量法の溶媒として指定された薄めたリン酸 (1→46) /アセトニトリル混液 (18:7) を用いる限り、黄芩粉末を懸濁させても加水分解は起こらず、少なくとも 120 分までは放置しても沈殿は生じなかった。ただし、1 日 15℃で放置すると約 10%のフラボノイドが沈殿することが分かった。
 - 日本薬局方第 15 改正第一追補において黄芩定量法の溶媒として改訂された 70%メタノールを用いれば、黄芩粉末を懸濁させて 1 日置いても加水分解と沈殿物生成は起こらなかった。
 - 水-メタノール混液を黄芩粉末を懸濁する溶液として用いた場合、メタノールの含量が増えるほど沈殿生成と加水分解が起こり難くなり、少なくとも 120 分間において、50%以上メタノールを含むと沈殿は生成せず、70%以上メタノールを含むと加水分解も進行しなくなることが分かった。
- 黄芩粉末における主要フラボノイドの沈殿形成と加水分解の進行を回避するという観点から、日本薬局方第 15 改正第一追補において黄芩定量法の溶媒として導入された 70%メタノールは優れた溶媒であると評価できる。

F. 参考文献

- 1) 相楽和彦ら、生薬学雑誌、40、72-76 (1986).
- 2) 鈴木英世ら、富山薬事研究所年報、40-44 (2005).

G. 研究発表

1. 学会発表

石崎祥子、袴塚高志、合田幸広、小林進、新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討 (4) 生薬煎出におけるオウゴン含有成分の加水分解及び沈殿生成、日本生薬学会第 54 回年会、2007 年 9 月 (名古屋)

2. 誌上発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

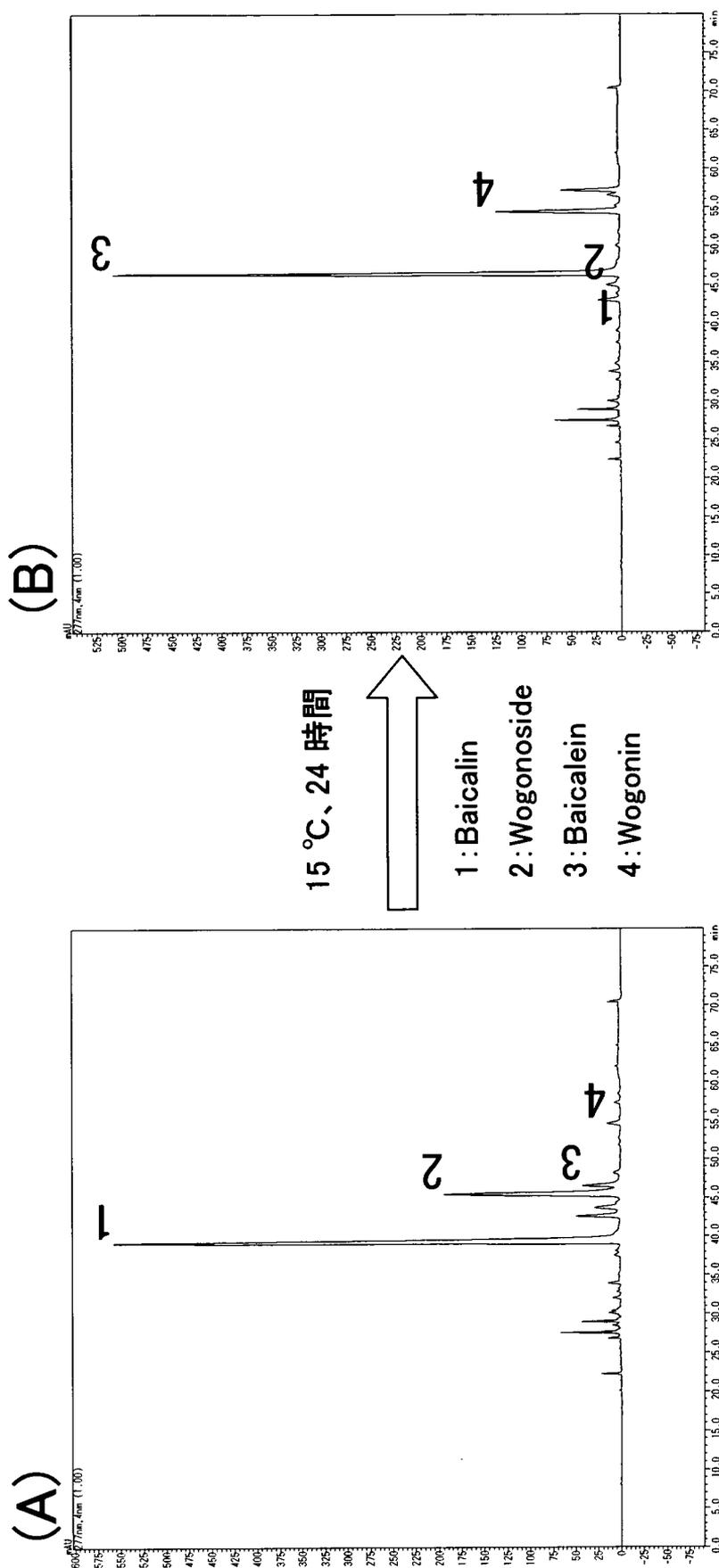


図1 黄芩粉末を水に懸濁させた溶液のHPLC分析

(A) 黄芩粉末を水に懸濁させた直後に収穫したもの

(B) 黄芩粉末を水に懸濁させて15°Cで24時間置いた後に収穫したもの

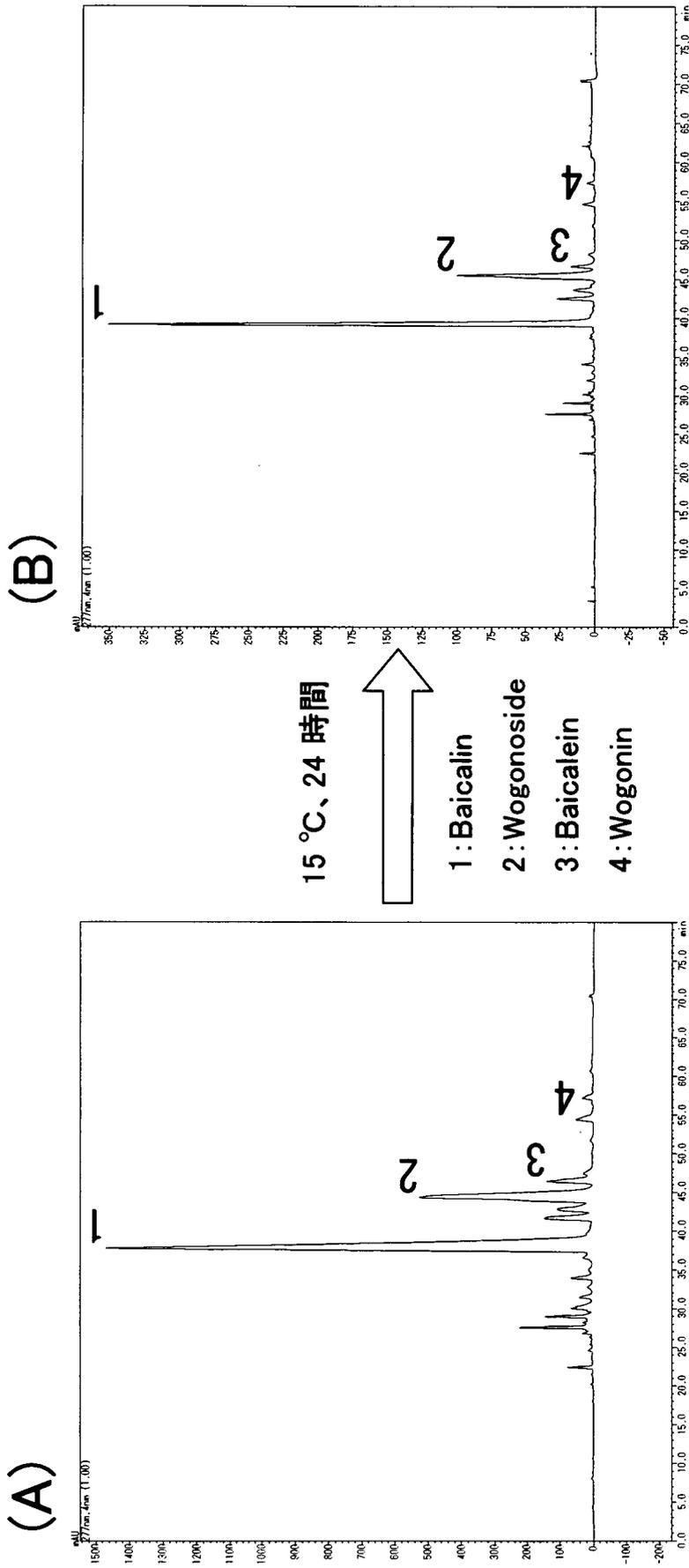
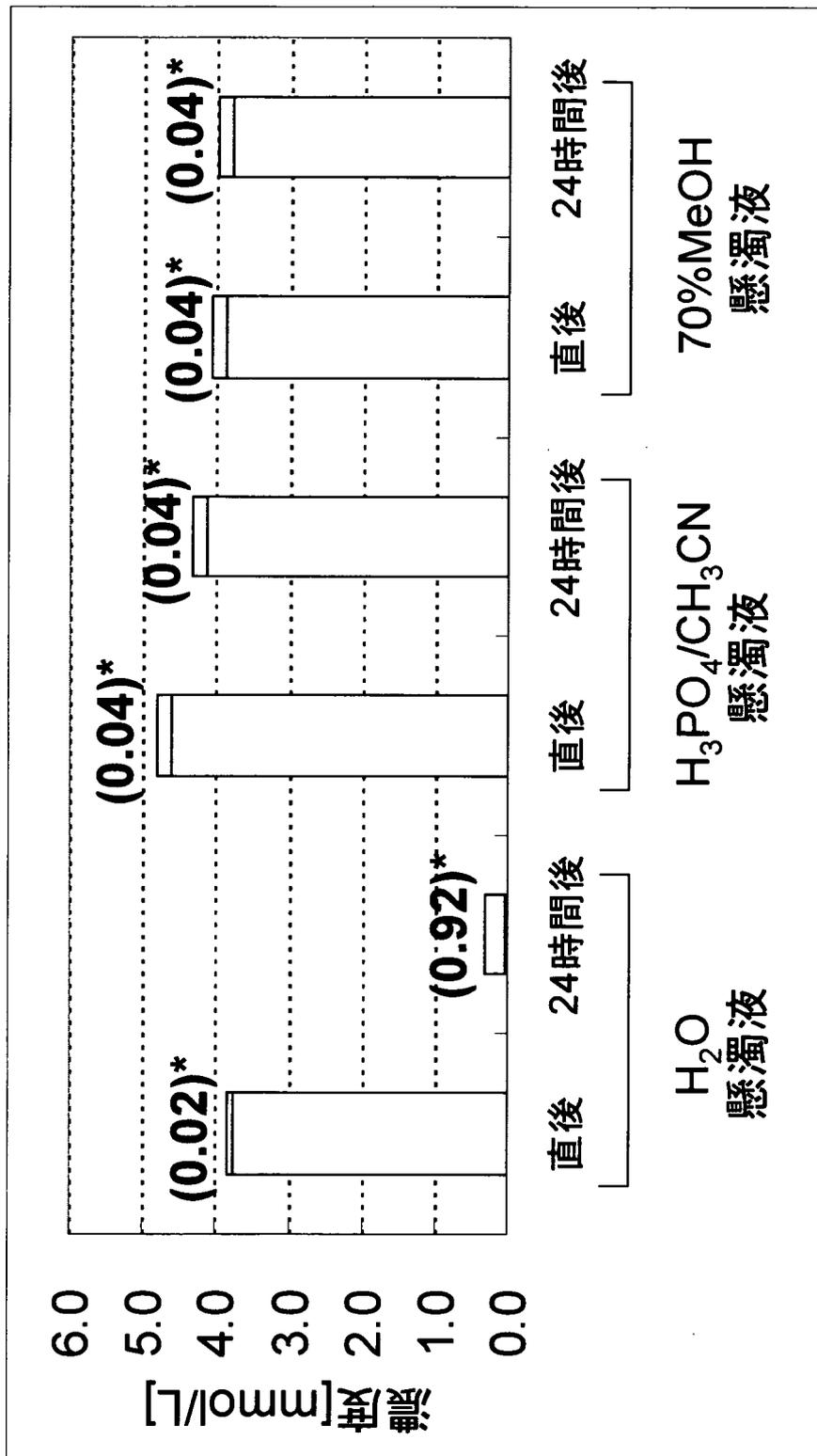


図2 黄芩粉末を80°Cの熱水に懸濁させた溶液のHPLC分析

- (A) 黄芩粉末を80°Cの熱水に懸濁させた直後に収穫したもの
- (B) 黄芩粉末を80°Cの熱水に懸濁させて放冷し、15°Cで24時間置いた後に収穫したもの



: Baicalin
 : Baicalein
* = $\frac{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}{\text{Baicalein}}$ 総量

図3 粉末黄芩懸濁液における沈殿物生成とフラボノイド配糖体の加水分解

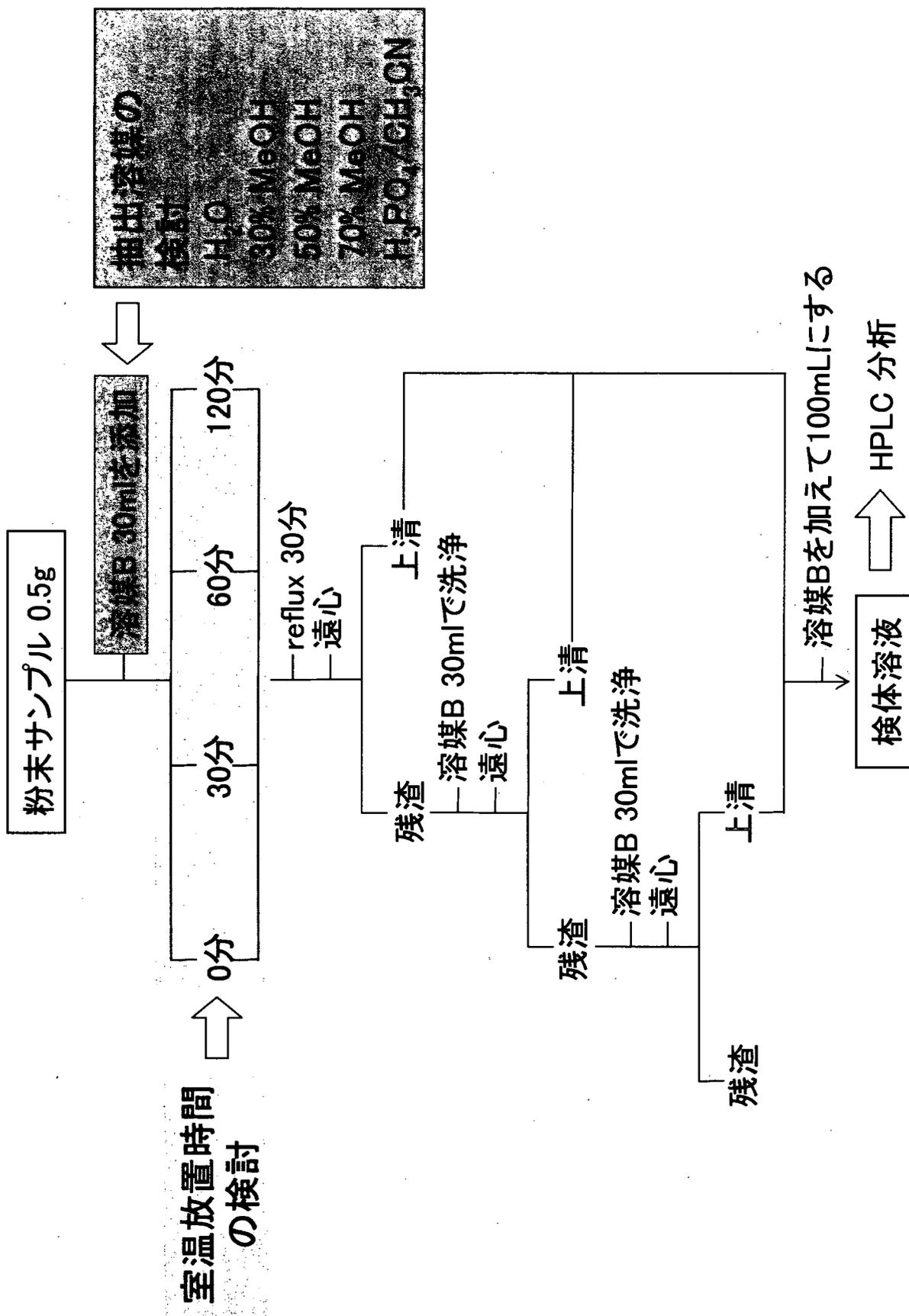
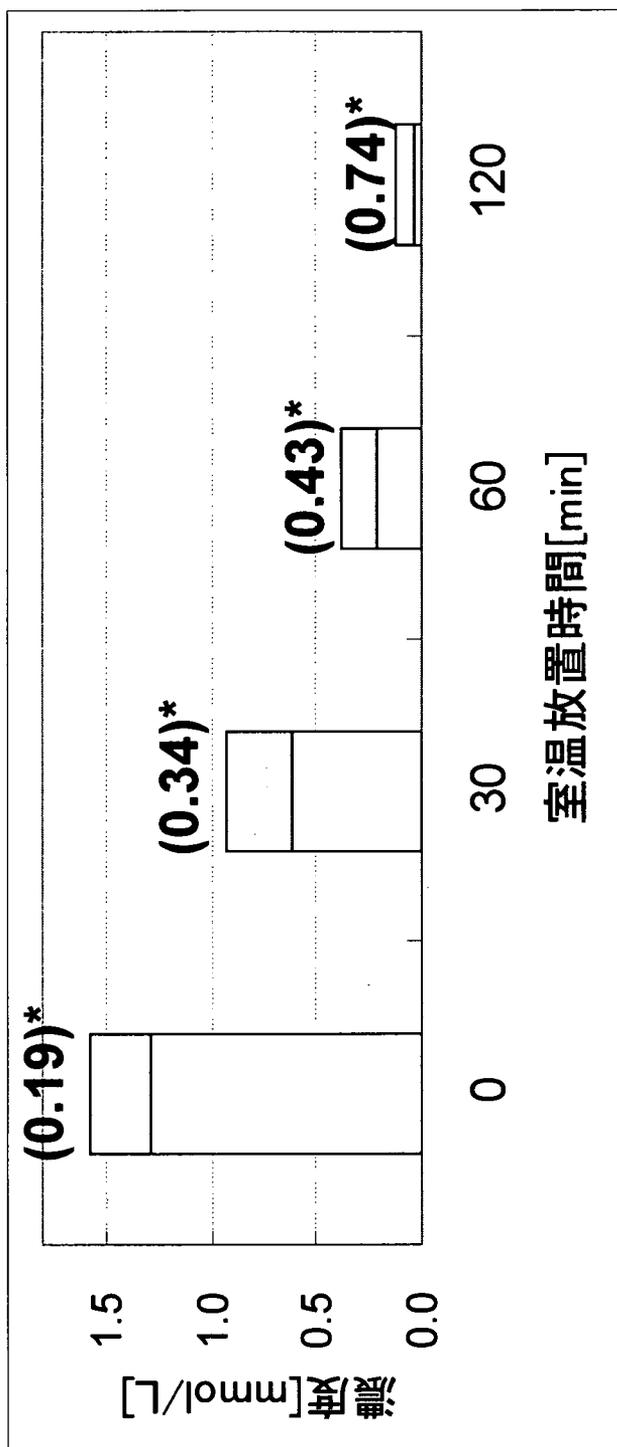


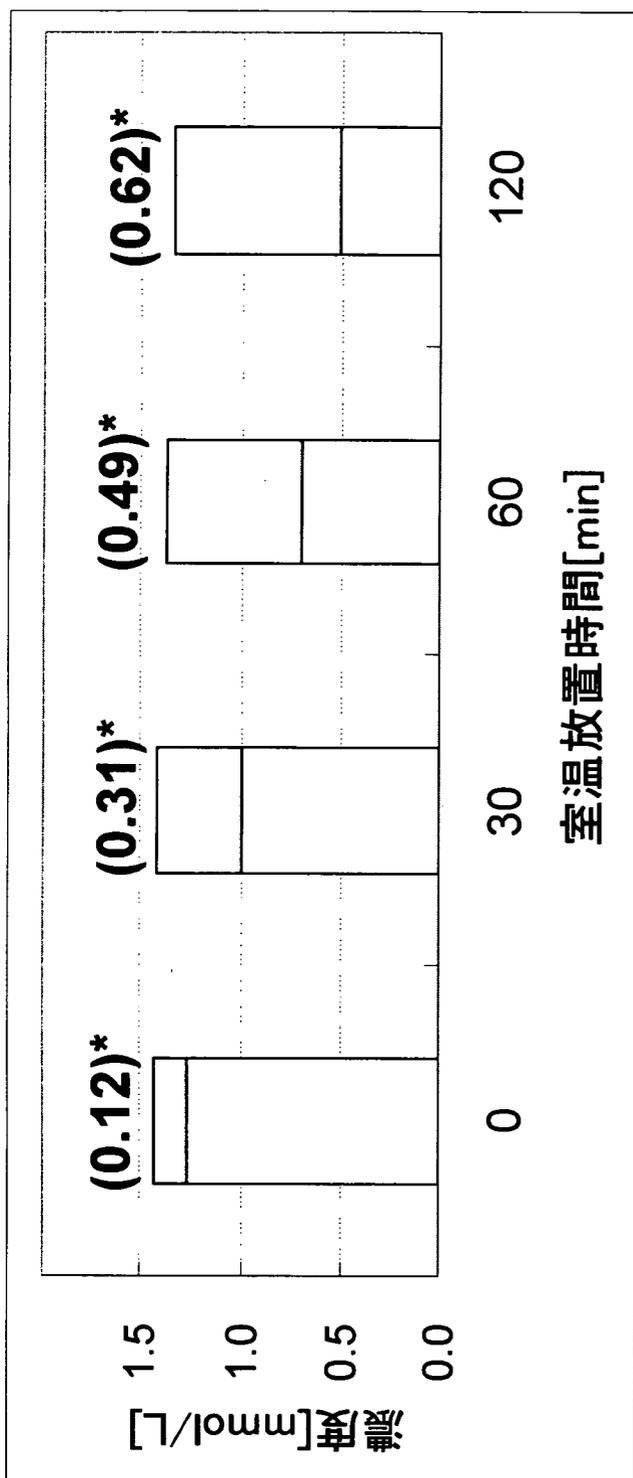
図4 第15改正日本薬局方の黄芩定量法を基本とした抽出溶媒及び抽出前タイムラゲの検証



: Baicalin : Baicalein
 ()* = $\frac{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}{\text{Baicalin} + \text{Baicalein 総量}}$

- 大量の沈殿が生成
- 著しい加水分解の進行

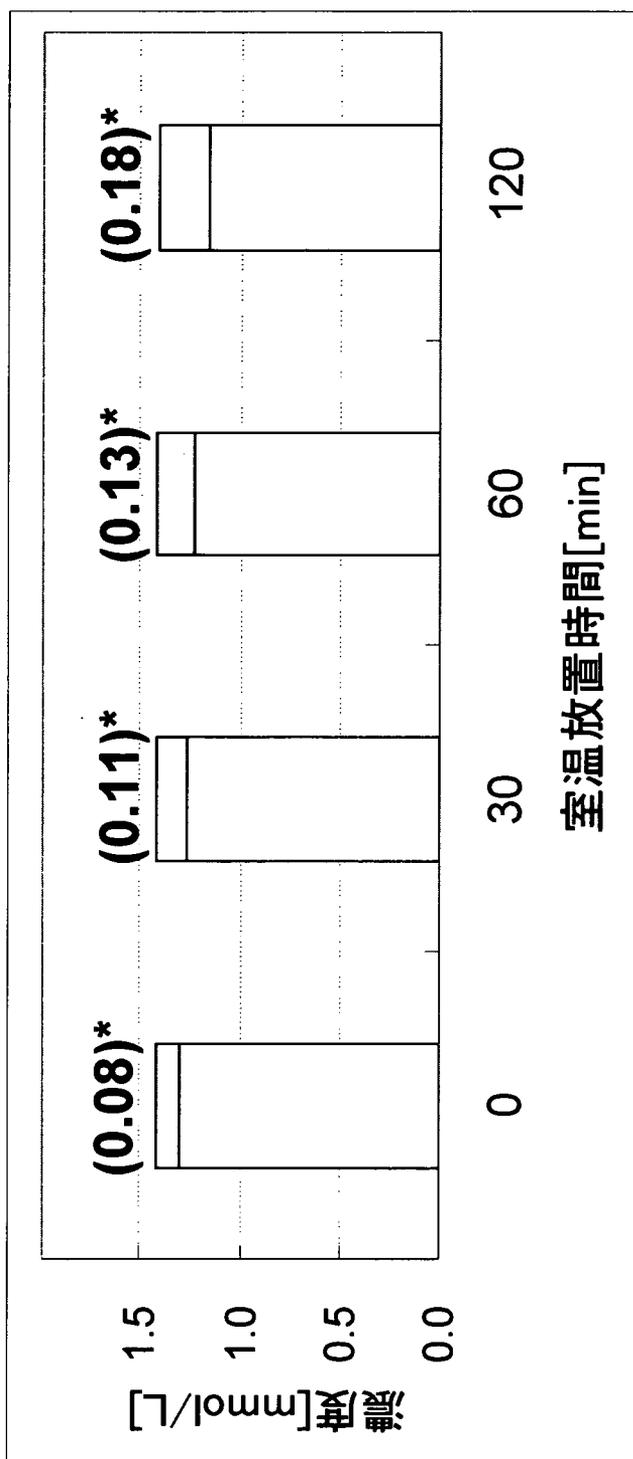
図5 黄芩粉末の抽出工程における抽出前放置時間と Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及び加水分解の関係 [H₂Oで抽出した場合]



: Baicalin : Baicalein
 ()* = $\frac{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}{\text{Baicalin} + \text{Baicalein 総量}}$

- 少量の沈殿が生成
- 著しい加水分解の進行

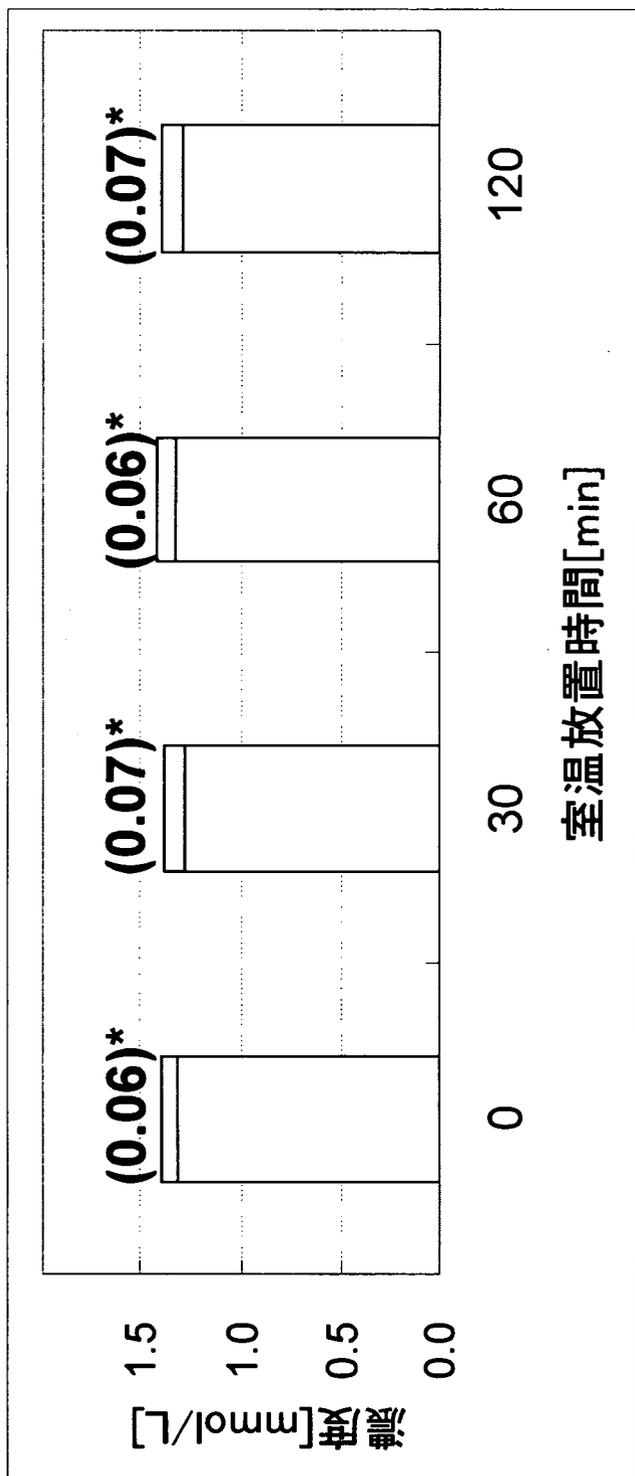
図6 黄芩粉末の抽出工程における抽出前放置時間と Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及び加水分解の関係 [30%MeOHで抽出した場合]



: Baicalin : Baicalein
 ()* = $\frac{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}{\text{Baicalin} + \text{Baicalein 総量}}$

●沈殿は生成しない
 ●わずかな加水分解の進行

図7 黄芩粉末の抽出工程における抽出前放置時間と Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及び加水分解の関係 [50%MeOHで抽出した場合]



: Baicalin : Baicalein
 ()* = $\frac{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}{\text{Baicalin} + \text{Baicalein 総量}}$

● 沈殿は生成しない
 ● 加水分解は進行しない

図8 黄芩粉末の抽出工程における抽出前放置時間と Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及び加水分解の関係 [70%MeOHで抽出した場合]