グリチルリチン注射剤市販品の物性および 成分含量の比較検討

古閑健二郎^{*1}, 李 帥¹, 大柳賀津夫¹, 高田寛治²

北陸大学薬学部臨床薬剤学¹, 京都薬科大学薬物動態学²

Comparative Study of Physicochemical Properties and Constituent Contents of Glycyrrhizin Injectable Solutions

Kenjiro Koga^{*1}, Sui Ri¹, Kazuo Ohyanagi¹ and Kanji Takada²

Department of Clinical Pharmaceutics,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University¹

Department of Pharmacokinetics, Kyoto Pharmaceutical University²

[Received December 27, 2007]
[Accepted March 7, 2008]

We evaluated the quality of parenteral injections (22 products) containing monoammonium glycyrrhizinate, the main extract from the *Glycyrrhizae radix*. The pH and osmolarity ratio of each product were within the range stated in the package insert.

The glycyrrhizic acid, glycine, and L-cysteine concentrations in the injection products were 2.07–2.51 mg/mL, 16.0–21.4 mg/mL, and 1.04–1.30 mg/mL, respectively. The concentrations of glycyrrhetinic acid and glycyrrhetic acid-3-O-glucuronide, impurities that cause pseudo-aldosteronism, were 0.173–2.24 µg/mL and 0.777–8.29 µg/mL, respectively, showing that there was a wide variation in the concentrations of these 2 substances among the products. Further, the results of discriminant analysis on impurity proportions suggested that it is possible to distinguish bulk powders from each other based on impurity contents. In conclusion, it is important to determine the proportions of impurities in glycyrrhizic acid products and their bulk powders in order to assess their quality.

Key words glycyrrhizin, glycine, L-cysteine, quality, generic

緒 言

今日、甘草抽出成分であるグリチルリチン酸を含有するグリチルリチン酸モノアンモニウム塩・日局グリシン・L システイン塩酸塩配合剤(以下、グリチルリチン注射剤と略す)は17社の製造元、23社の発売元から41品目が上市されている。1管中の容量は5, 10, 20, 40および100 mLと異なるが、成分濃度はすべて先発品と同じである。医療用医薬品のグリチルリチン酸モノアンモニウム塩原末の純度あるいは精製度に関する資料はないが、グリチルリチン酸の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析における検出ピーク¹⁾ならびに不純物質として存在が明らかであるグリチルレチン酸(グリチルリチン酸からグルクロン酸2分子が外れたもの)およびグリ

チルレチン酸モノグルクロニド体(グルクロン酸1分子が外れたもの)の含有率²⁾からグリチルリチン酸モノアンモニウム塩原末における純度は80~90%程度であろうと推定される。このグリチルリチン酸モノアンモニウム塩の純度に関して、医薬部外品中のグリチルリチン酸塩の定量が検討されている³⁾。その純度は、高純度グリチルリチン酸塩の内標準法によるHPLC定量分析において80%弱であることが示された。また、混在している類縁化合物のHPLC分析時における保持時間ならびに化学構造式も示された³⁾。本医薬品成分のグリチルリチン酸は構造式の18位炭素に結合する水素の位置がシス型(18型)のみをさす。しかし、その光学異性体であるトランス型(18型)がわずかながら含有することわかって⁴⁾いる。

今回、入手できたグリチルリチン注射剤22製品を用

* 石川県金沢市金川町ホ3; Ho-3, Kanagawa-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa, 920 1181 Japan

いて、物性値として pH および浸透圧比、有効成分であるグリチルリチン酸、グリシンおよび L システインの濃度、グリチルリチン酸の主要加水分解産物であるグリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体の濃度、ならびに化学構造式は不明であるが HPLC において検出されたピーク面積から捉えた不純物含有率により市販品を比較検討した。

方 法

1. 製品の入手

2006 年 4 月に購入できたグリチルリチン注射剤を表 1 の左カラムの製造番号に、再度、2006 年 10 月に購入できた同一品目の注射剤を右カラムの製造番号に示した。17 社の製造元のうち 5 社の製品を購入できなかったことで、12 社からの 22 製品を実験の対象とした。全製品の有効期限は 2008 年 1 月から 2009 年 5 月の範囲であった。ただし、強力ネオミノファーゲンシー P およびノイファーゲン注は異なる製造番号の製品を購入できなかったことで、各々 1 製品のみとなった。

2. 物性値の測定

各注射剤を開封後、ただちに pH 値を pH メーター (SevenEasy, メトラー・トレード(株))を用いて測定した。また、浸透圧比は各注射剤の浸透圧を浸透圧計 (Semi-micro Osmometer K 7400, Knauer GmbH)を用いて測定し、生理食塩水 (0.9 w/v% NaCl 溶液)の浸透圧に対する比として算出した。いずれの製品も 3 回測定した。

3. グリチルリチン酸濃度の測定

各注射剤を 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4)を用いて 200 倍に希釈し、HPLC 用分析試料とした。標準溶液はグリチルリチン標準品 (和光純薬工業(株), 純度 99.8%)

を 50% メタノールで溶解して 1 mg/mL とし、次に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4)を用いて 10 µg/mL に調製した。

HPLC の条件は、ODS カラム (CapcellPak C 18, MG タイプ, 内径 4.6 mm × 直径 150 mm, (株)資生堂), カラム温度 40 °C, 測定波長 254 nm, 試料注入量 50 µL, メタノール/0.6% 過塩素酸水 (55 : 45) 溶液を 25% アンモニア水で pH 8 に調整して移動相とし、流速 0.8 mL/min とした。いずれの製品も 3 回測定し、その平均値と標準偏差で示した。

4. グリシン濃度の測定

各注射剤を 200 mM 水酸化ナトリウム溶液を用いて 2000 倍に希釈した。標準溶液はグリシン (和光純薬工業(株), 純度 99.0%) を 200 mM 水酸化ナトリウム溶液を用いて 10 µg/mL に調製した。希釈した試料溶液あるいは標準溶液の 0.4 mL と 3% イソチオシアン酸フェニル 1 プロパノール水溶液 0.3 mL を混和し、50 °C, 30 分間の条件で加温した。常温に戻した後、ベンゼン 0.1 mL を正確に加えて 500 rpm, 5 分間の条件で振盪 (Vortex Shaker VR 36, タイテック(株)) し、16,000 g, 15 分間遠心分離した。上層液を除き、下層液 200 µL および 8 M 塩酸 200 µL を混和し、水浴 50 °C で 1 時間加温した。常温に戻した後、酢酸エチル 400 µL で 3 回抽出し、70 °C で蒸発乾固した。残留物に移動相 0.4 mL を正確に加えて溶解させ、HPLC 用の試料溶液とした。

HPLC の条件は、ODS カラム, カラム温度 35 °C, 測定波長 254 nm, 試料注入量 50 µL, 20 mM 酢酸ナトリウム液/メタノール (80 : 20) を移動相とし、流速 0.8 mL/min とした。いずれの製品も 3 回測定し、その平均値と標準偏差で示した。

5. L システイン濃度の測定

各注射剤を開封後、ただちに 0.2 mL を量り、2 M 水

表 1. 実験に用いたグリチルリチン注射剤

製品名	製造番号	
アスファーゲン注	AS 2 L 05 G 1	6 C 3004
キョウミノチン	12155	12165
強力ネオミノファーゲンシー P 20 mL	P 0215	-
グリファーゲン C	5 PL 32	6 PL 04
グリベルチン静注液 20 mL	471911	503605
グルコリン S 注射液	60110 C	60503 C
ケベラ S 注	0015 LC	0017 M 6
ニチファーゲン注	702062	126062
ネオファーゲン注	M 6 A 74	M 6 E 95
ノイファーゲン注 20 mL	01 DA	-
ヒシファーゲン C 注	06 F 01	06 H 08
ミノフィット注 20 mL シリンジ	060307 AA	060525 AA

酸化ナトリウム溶液 0.1 mL および 0.4% 塩化ベンジルエタノール溶液 0.2 mL を加えよく混和した。標準溶液は L シス테인(和光純薬工業(株), 純度 99.0%)を精製水を用いて 1 mg/mL に調製し, ただちに 2 M 水酸化ナトリウム溶液 0.1 mL および 0.4% 塩化ベンジルエタノール溶液 0.2 mL を混和した。調製した両試料を常温で 30 分間放置した後, クロロホルム 0.1 mL を正確に添加した。500 rpm, 5 分間振盪し, 15 分間放置した後, 2,800 g, 15 分間遠心分離を行った。上清層の 0.2 mL を HPLC 用試料溶液とした。

HPLC の条件は, ODS カラム, カラム温度 40 , 測定波長 254 nm, 試料注入量 50 μ L, 20 mM リン酸二水素カリウム液/メタノール(55:45)を移動相とし, 流速 0.7 mL/min とした。いずれの製品も 3 回測定し, その平均値と標準偏差で示した。

6. グリチルレチン酸濃度の測定

各注射剤を 50 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)を用いて 2 倍に希釈し, HPLC 用分析試料とした。標準溶液はグリチルレチン酸(和光純薬工業(株), 純度 100%)を 50% エタノールで溶解して 0.2 mg/mL とし, 次に 50 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)を用いて 2.0 μ g/mL に調製した。

HPLC の条件は, ODS カラム, カラム温度 40 , 測定波長 254 nm, 試料注入量 50 μ L, メタノール/0.6% 過塩素酸水(80:20)溶液を 25% アンモニア水で pH 8 に調整して移動相とし, 流速 1.0 mL/min とした。いずれの製品も 3 回測定し, その平均値と標準偏差で示した。

7. グリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度の測定

各注射剤を 50 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)を用いて 2 倍に希釈し, HPLC 用分析試料とした。標準溶液はグリチルレチン酸モノグルクロニド体(和光純薬工業(株), 純度 96.6%)を 50% メタノールで溶解して 0.2 mg/mL とし, 次に 50 mM リン酸塩緩衝液(pH 7.4)を用いて 2.0 μ g/mL に調製した。

HPLC の条件は, ODS カラム, カラム温度 40 , 測定波長 251 nm, 試料注入量 50 μ L, メタノール/0.6% 過塩素酸水(78:22)溶液を 25% アンモニア水で pH 2.5 に調整して移動相とし, 流速 0.8 mL/min とした。いずれの製品も 3 回測定し, その平均値と標準偏差で示した。

8. HPLC 分析のピークエリアから捉えた不純物比率の算出

HPLC 測定において, 不純物と思われるピークを検出したグリチルリチン酸(図 1 A)およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体(図 1 B)の二種類について, 不純物のピーク面積の比率を算出した。グリチルリチン酸濃度の HPLC 測定において, 試料を注入後, 12 分までに検

出されたピークのなかで, 保持時間が 6 分付近および 8 分付近の二種のピークを不純物ピークとみなした。不純物ピーク面積および 9 分付近のグリチルリチン酸のピーク面積の和に対する不純物ピーク面積の比率を不純物比率として算出した。グリチルレチン酸モノグルクロニド体の HPLC 測定において, 試料を注入後, 保持時間が 5.7 分付近から 19 分付近までのピークのなかで 9.3 分付近に検出されたグリチルレチン酸モノグルクロニド体のピーク以外を未知不純物によるピークとみなした。未知不純物ピーク面積およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体のピーク面積の和に対する未知不純物ピーク面積の比率を不純物比率として算出した。いずれの製品においても各々の不純物ピークをほぼ同じ保持時間に観察できたことで, ピーク面積の比率での評価は妥当であると判断した。

9. 統計処理

測定値の統計処理は, 一元配置分散分析後, 群間の比較は Tukey 検定を用い, 危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

グリチルリチン酸モノアンモニウム塩原末を提供するメーカー名を把握できたグリチルリチン注射剤に対する判別分析を行った。原末メーカーであるアルプス薬品工業株式会社, 宏輝株式会社, 常盤薬品工業株式会社および丸善製薬株式会社の 4 社を群とした。判別分析における変量は, グリチルリチン酸濃度に対するグリチルレチン酸濃度あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体の比率, ならびにグリチルリチン酸のピーク面積に対する不純物ピーク面積あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体のピーク面積に対する不純物ピーク面積の比率とした。判別の有意性は Wilks のラムダ統計量を用い, ラムダ統計量の分布が F 分布に近似できると仮定し, 統計処理ソフト Mulcel および Microsoft Excel 2003 を用いて解析した。

結 果

1. pH 値と浸透圧比

グリチルリチン注射剤の pH 値および浸透圧比を表 2 に示す。いずれのグリチルリチン注射剤も添付文書に記載された範囲内の値を示した。

2. グリチルリチン酸濃度

グリチルリチン注射剤中のグリチルリチン酸濃度を図 2 に示す。グリチルリチン酸濃度は 2.07~2.51 mg/mL の範囲にあった。Tukey の検定において, 先発品である強力ネオミノファーゲンシー P 20 mL と対比して, 製品 O のみ危険率 5% 未満の有意差を認めた。

図1. グリチルリチン注射剤市販品の HPLC 分析におけるグリチルリチン酸(A)およびグリチルリチン酸モノグルクロニド体(B)のチャート
A; 約6分付近に出現したピークの成分は24-ヒドロキシグリチルリチン酸, 8分付近の成分は有効成分であるグリチルリチン酸(18型)の光学異性体18型である.
B; 9.3分付近に出現したグリチルリチン酸モノグルクロニド体以外のピーク成分については不明である.

表2. 各グリチルリチン注射剤の pH 値と浸透圧比

製品	pH 値		浸透圧比	
	測定値	(添付文書記載値)	測定値	(添付文書記載値)
A	6.34	(6.0-7.0)	1.56	(1.5-1.7)
B	6.80	(6.5-7.5)	1.64	(1.5-1.8)
C	6.86	(6.0-7.5)	1.92	(1.8-2.2)
D	6.86	(6.0-7.5)	1.97	(1.8-2.2)
E	7.26	(約7.3)	0.95	(約1)
F	7.28	(約7.3)	1.01	(約1)
G	6.82	(6.7-7.4)	0.98	(0.9-1.3)
H	6.82	(6.7-7.4)	1.04	(0.9-1.3)
I	6.48	(6.0-7.4)	1.00	(約1)
J	6.49	(6.0-7.4)	1.08	(約1)
K	6.83	(6.0-8.5)	0.98	(約1)
L	6.85	(6.0-8.5)	1.05	(約1)
M	6.76	(6.5-7.5)	1.91	(1.9-2.3)
N	6.78	(6.5-7.5)	1.95	(1.9-2.3)
O	6.60	(6.0-7.4)	1.10	(0.9-1.2)
P	6.61	(6.0-7.4)	1.06	(0.9-1.2)
Q	6.54	(5.5-7.5)	2.04	(1.5-2.4)
R	6.54	(5.5-7.5)	2.00	(1.5-2.4)
S	7.08	(6.0-8.0)	1.04	(0.9-1.1)
T	7.07	(6.0-8.0)	0.98	(0.9-1.1)
U	6.51	(6.0-7.4)	1.00	(約1)
V	6.52	(6.0-7.4)	1.07	(約1)

同じ製品名称でも製造番号が異なるものは分けて表示した.
表1の製品名の順序とは異なる. 実験回数は3回とし, その平均値で示した.
変動係数が2%以内であったことで標準偏差値は示していない.

図2. グリチルリチン注射剤市販品中におけるグリチルリチン酸濃度
同じ製品名称でも製造番号が異なるものは分けて表示した. 各データは平均値±標準偏差(3回分析)で示した. Tukey 検定の結果, 先発品である強力ネオミノファーゲンシー P 20 mL と対比して製品 O のみ P<0.05 であった.

3. グリシン濃度および L システイン濃度

グリチルリチン注射剤中のグリシンおよび L システインの濃度を図3に示す. グリシンおよび L システイン濃度はそれぞれ 16.0~21.4 mg/mL および 1.04~1.30

mg/mL の範囲にあり, 14 製品のグリシン濃度は添付文書に記載された値, すなわち 20 ± 1 mg/mL (添付文書記載値の $\pm 5\%$) の範囲外であった。先発品と比較したとき, グリシン濃度では 6 製品において, L システイン濃度においては 18 製品において統計学的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。

4. グリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度

不純物として化学構造が明確にされているグリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体の製品中に含有される濃度を図 4 に示す。製品中のグリチルレチン酸濃度の最低値および最大値は $0.173 \pm 0.001 \mu\text{g/mL}$ および $2.24 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ であり, その差は 13 倍にも上がった。一方, 製品中のグリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度の最低値および最大値は $0.777 \pm 0.015 \mu\text{g/mL}$ および $8.29 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$ であり, その差は 12 倍を示した。先発品と比較したとき, グリチルレチン酸濃度では 12 製品において, グリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度では 18 製品において, 統計学的に有意差が生じた ($P < 0.05$)。

5. 不純物のピークエリア

グリチルリチン酸測定時における不純物比率は, 最小値の製品では $5.86 \pm 0.13\%$, 最大値の製品では $20.3 \pm 0.8\%$ であった。一方, グリチルレチン酸モノグルクロニド体測定時における不純物比率は, 最小値の製品では $56.4 \pm 0.8\%$, 最大値の製品では $97.2 \pm 0.2\%$ であった。

6. 判別分析

グリチルリチン酸濃度に対するグリチルレチン酸あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体の濃度の比率を変量として判別統計処理を行ったところ, 分散共分散行列の等分散性の検定では, χ^2 値は 21.9, P 値は 0.00932 となった。この結果は 4 群の分散共分散行列が異なることを反映する。また, 判別の有意性の検定では P 値 = 0.00355 となり, 1% 未満で有意差ありとなった。

グリチルリチン酸のピーク面積に対する不純物ピーク面積あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体のピーク面積に対する不純物ピーク面積の比率を変量として判別統計処理を行ったところ, 分散共分散行列の等分散性の検定では, χ^2 値 = 24.5, P 値 = 0.00355 となった。また, 判別の有意性の検定では P 値 = 0.000011 となり, 0.1% 未満で有意差ありと判定された。

考 察

添付文書に記載されている組成・性状には, 成分, 添加物, 性状, pH, 浸透圧比の各項目が記載されている。成分はすべてのグリチルリチン注射剤において同じ濃度であるが, 添加物には酸化防止剤として日局亜硫酸ナトリウム, 亜硫酸水素ナトリウム, ピロ亜硫酸ナトリウム等が使用され, 製造メーカーごとに相違が認められる。pH 調整剤として日局アンモニア水が主として使用されているが, ただ単に pH 調整剤と記載してある場合もある。その他の添加物として, 目的は浸透圧調整, 溶解液等と推察されるが, 日局塩化ナトリウム, 生理食塩水,

図 3. グリチルリチン注射剤市販品におけるグリシン(A)および L システイン(B)濃度
同じ製品名称でも製造番号が異なるものは分けて表示した。各データは平均値
±標準偏差(3 回分析)で示した。Tukey 検定の結果, 先発品である強力ネオミノ
ファージェンシー P 20 mL と対比して, グリシン濃度では 6 製品が, L システイ
ン濃度では 18 製品が $P < 0.05$ であった。

図4. グリチルリチン注射剤市販品におけるグリチルレチン酸(A)およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体(B)濃度
 同じ製品名称でも製造番号が異なるものは分けて表示した。各データは平均値 ± 標準偏差(3回分析)で示した。Tukey 検定の結果、先発品である強力ネオミノファーゲンシー P 20 mL と対比して、グリシン濃度では 12 製品が、L システイン濃度では 18 製品が $P < 0.05$ であった。

D ソルビトール、クエン酸、炭酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、ブドウ糖などが使用されている。添加物の違いにより pH 値および浸透圧比は異なるが、これら注射剤が主に点滴に混注することで使用されることから、医薬品としての治療効果に影響を及ぼす要因には該当しないと考えられる。不純物を含めた成分の安定性において、有効成分の安定性は市販のメーカーが有効期限内において保証していること、本研究において指摘する不純物に関して明記された安定性の報告例を見つけることができなかったが、製造メーカーの担当者の意見として、グリチルレチン酸は広範囲の pH 領域の水溶液中で安定であること、また、グリチルレチン酸モノグルクロニド体は強酸でない限りグルクロン酸分子が外れることがないことから、添付文書の pH 値に示された範囲(最小値 pH 5.5, 最大値 pH 8.5)では、不純物を含めた成分の安定性および存在比が変動することはないと思われる。

有効成分であるグリチルリチン酸、グリシンおよび L システインの各濃度をそれぞれ製品ごとに比較したとき、先発品に対して統計学的有意差を認める後発品を確認した。しかしながら、この統計学的解析結果は、1 製品あたりの測定値の変動(標準偏差値)が非常に小さかった。すなわち、実測値の分散が小さくなったことでわずかの平均値の差から有意差が生じたと推察する。以前、グリチルリチン注射剤において、先発品と後発品との間で治療効果に差があることが報告され⁵⁾、グリチルリチン酸の成分含量の相違が指摘された。その後、このグリチルリチン酸含量の違いはおおむね解決されたと考え、

22 製品の成分含量の平均値と標準偏差値より、95% 信頼区間内に全製品が分布するかどうかについて調べた。その結果、グリシン濃度の平均値とその標準偏差は 18.6 mg/mL および 1.4 mg/mL、L システイン濃度の平均値とその標準偏差は 1.17 mg/mL および 0.07 mg/mL であり、95% 信頼区間内に全製品が包含された。グリチルリチン酸濃度の平均値および標準偏差は 2.36 mg/mL および 0.09 mg/mL であり、製品 O のみ 95% 信頼区間から外れた。以上のことから、3 成分の濃度とも先発品との比較では統計学的に 5% 未満の有意差を認めたものの、顕著な相違があるとは考えられない。

グリシン含量が添付文書記載値(20 mg/mL)に達していない製品が数多く検出された要因として、分析法の相違が考えられる。日局グリシンの定量法である電位差滴定法が通常用いられるが、今回、HPLC 法を用いたことにより、その測定値を低く見積もった可能性を否定できない。

商品名を表示していないことから、図 2 および図 3 においては、同一製品名で製造番号が異なる製品間の比較はできないが、成分濃度の違いに顕著な差はなく、品質管理が行き届いていたと考えられる。

グリチルリチン酸の主要加水分解産物として、グリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体が存在する。グリチルレチン酸はグリチルリチン酸と同様に、副腎皮質の電解質あるいは糖質コルチコイド様作用⁶⁾、抗炎症作用^{7,8)}、肝細胞の酸化ストレス障害抑制作用⁹⁾などを有している。一方で、本注射剤の安全性上の

問題となっている偽アルドステロン症については、これまでその原因物質がグリチルレチン酸とする報告^{10,11)}とグリチルレチン酸モノグルクロニド体とする報告^{12,13)}があり、明確に一種の物質であると断定できない。しかし、これら両薬物のどちらかあるいは両者ともに偽アルドステロン症に関係している可能性が非常に高いことから、製剤中に含まれる両薬物の含量には注意を必要とする。グリチルリチン酸の添付文書記載の用法・用量欄には「慢性肝疾患に対しては1日1回40～60 mLを静脈内に注射または点滴静注する。年齢、症状により適宜増減する。なお、増量する場合は1日100 mLを限度とする」と記されており、製剤中グリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度が最も高い製剤での分析結果から算出すると、100 mLあたりそれぞれ224 µg および829 µg が患者に投与されることになる。通常、慢性肝疾患患者は週に2,3回の本製剤の投与を受けている。ここで、長期間にわたりグリチルリチン注射剤が投与された後、そのグリチルリチン酸が体内でグリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体に代謝され、偽アルドステロン症が惹起されるとき、グリチルレチン酸およびグリチルレチン酸モノグルクロニド体が、どの程度体内に存在することでこの副作用が発現するかが重要な問題である。この点に関して、興味深い報告がある。ヒトにおけるグリチルリチン酸の経口投与による副作用検討において、血漿中カリウム濃度などの臨床値より算出された無毒性レベルから、副作用の発現する血漿中グリチルレチン酸濃度は800 ng/mL以上であることが報告された¹⁴⁾。また、グリチルレチン酸モノグルクロニド体(30, 100 mg/kg)を5日間連続でモルモットの静脈内に投与したとき、100 mg/kgの投与群のみ偽アルドステロン発症の指標の一つである血漿中カリウム値が有意に低下した報告¹³⁾があるが、この実験における血液中グリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度は測定されていなかったことで、血液中あるいは組織中におけるグリチルレチン酸モノグルクロニド体濃度がどのレベルで偽アルドステロン症を引き起こすかという議論はできない。しかしながら、この著者ら¹³⁾はグリチルリチン製剤を長期間投与することで、グリチルレチン酸モノグルクロニド体の蓄積量が徐々に増え、最終的に偽アルドステロン症を惹起しているだろうと結論している。したがって、一般に薬物を排泄する力が衰えた高齢者やこれらの薬物に対する感受性の高い患者においては、低カリウム血症などの副作用発現頻度を抑えるためにも、投与量あるいは投与間隔の設定が重要な事項と位置づけられよう。

製品中に不純物として含まれる両薬物の含量が、偽アルドステロン症の発現率を高めるかどうかは最も関心が持たれるであろう。これに対する解決の糸口となる報告

がある。まず、グリチルリチン注射剤(40 mL)を健常ヒト被験者の静脈内に投与したとき、グリチルレチン酸は投与後約6時間くらいから血中に出現し、24時間後にピーク(約100 ng/mL)を示したことで、ならびに慢性肝疾患患者に同量を静脈内に投与したとき、グリチルレチン酸は投与後約10時間後に検出された¹⁵⁾。この報告は、われわれの疑問に対して、グリチルリチン酸の代謝に伴い生じたグリチルレチン酸が血中濃度に反映していることを裏付けている。しかし、その一方で、グリチルリチン注射剤(40 mL)を慢性肝疾患患者の静脈内に30分かけて持続的に投与した臨床試験において、血中グリチルレチン酸濃度が投与開始30分後に 89.9 ± 5.5 ng/mL、6時間後に 114 ± 13.9 ng/mL、24時間後に 126 ± 10.7 ng/mLであった報告¹⁶⁾から考えると、注入終了時にただちにはグリチルレチン酸が血中に検出されないという矢野らの報告¹⁵⁾と矛盾する。この注入終了時にグリチルレチン酸が検出された結果に対して、注射剤中に不純物として含有されていた量が血液中に存在し、測定に反映した可能性がある。投与開始後6時間から24時間まで、血中グリチルレチン酸濃度が低下しなかった要因として、不純物として体内に投与されたグリチルレチン酸の消失過程とグリチルリチン酸の代謝に伴うグリチルレチン酸が増大してきた過程が複合されたことで、みかけ上、血中のグリチルレチン酸濃度がほぼ一定値を保持した可能性が考えられる。上述した二つの臨床報告における被験者が異なるため、単純に血中グリチルレチン酸濃度を比較することはできないが、24時間での血中グリチルレチン酸濃度が後者の報告において2割程度高い原因として、製品中に含有されていたグリチルレチン酸による影響のある可能性も否定できない。ただし、ヒトにおける偽アルドステロン症として低カリウム血症などの副作用を惹起するグリチルレチン酸の血中レベルが800 ng/mL以上であるとする報告¹⁴⁾から捉えた場合、注射剤中に含有されるグリチルレチン酸単独での血中動態の把握が必要になる。ラットにおけるグリチルレチン酸の静脈内投与後の体内動態パラメータ¹⁷⁾をもとに、今回の実験で得られたグリチルリチン注射剤100 mL中に含まれるグリチルレチン酸の最大含有量224 µgをあてはめるとき、投与後12時間での血漿中グリチルレチン酸濃度は14 ng/mLと算出された。このレベルは副作用を惹起するレベル800 ng/mLからみて十分に低く、混在している不純物単独での副作用発現の可能性はないであろう。しかしながら、グリチルリチン注射剤の反復投与が長期間にわたって継続される場合、特に投与量が多い処方の場合では、製剤中に含有される不純物がグリチルリチン酸の代謝により生じた成分により惹起されるであろう偽アルドステロン発症の時期を早めたり、副作用の程度に影響を及ぼす可能性も考えられる。

製剤ごとに比較した不純物比率の検討において、グリチルリチン酸の HPLC チャートに出現した約 6 分付近の成分は 24 ヒドロキシグリチルリチン酸³⁾、8 分付近の成分はグリチルリチン酸(18 型)の光学異性体 18 型⁴⁾であることが報告されている。両成分がグリチルリチン酸の治療にどのような影響を及ぼすかについての報告は見あたらないが、その含有比率が最大で約 20% を示したことから品質管理において注意を払う必要がある。グリチルレチン酸モノグルクロニド体の HPLC チャート上に出現したピークについて、それらの成分についてはなんら報告がなかった。非常に高い不純物の比率を示したことで、グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の原末中に含まれる種々の成分がグリチルレチン酸モノグルクロニド体含量よりも多く含まれている可能性がある。

判別分析の結果、グリチルリチン酸濃度に対するグリチルレチン酸あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体の濃度の比率を変量とした場合も、グリチルリチン酸のピーク面積に対する不純物ピーク面積あるいはグリチルレチン酸モノグルクロニド体のピーク面積に対する不純物ピーク面積の比率を変量とした場合も、危険率 1% 未満で有意差ありと判定されたことは、グリチルリチン酸モノアンモニウム塩の原末の種類によって製品の品質が影響を受けたことを反映する。また、逆に製品の不純物含量をもとに原末の種類あるいは品質を判別できることを意味する。

以上の検討より、生薬抽出成分であるグリチルリチン酸を含有するグリチルリチン注射剤が、慢性肝疾患患者に対して長期にわたり静脈内に投与されることから、原末における不純物含有率は品質管理の 1 項目として測定されることが望まれる。

引用文献

- 1) 福島悦子, 矢崎廣久, 久門勝利, 高速液体クロマトグラフィーによる甘草含有製剤中のグリチルリチン酸の定量, 千葉衛研報告, **18**, 39 42 (1994).
- 2) 名徳倫明, 今井康陽, 福田和人, 中西晶子, 塩石知子, 乾とし子, 宮本絵美, 末村奈津子, 小来田幸代, 澤井良之, 黒川正典, 川口進一, グリチルリチン注射剤「ミノフィット」(プレフィルドシリンジ製剤)の有用性について, 医療薬学, **33**, 463 468 (2007).
- 3) 林正人, 門脇英二, 高松翼, 松岡昌弘, 高速液体クロマトグラフィーによる医薬部外品中のグリチルリチン酸塩の定量における異常挙動の解明, 薬学雑誌, **112**, 496 502 (1992).
- 4) K. Koga, K. Ohmachi, S. Kawashima, K. Takada, M. Murakami, Determination of 18 β -glycyrrhizin and 18 α -glycyrrhizin in dog plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, **738**, 165 168 (2000).
- 5) 古庄憲浩, 中嶋寿, 有山巖, 久保徳彦, 柏木謙一郎, 鍋島茂樹, 柏木征三郎, 林純, C 型慢性肝炎に対する静注グリチルリチン治療における強力ネオミノファーゲン C(SNMC)とその後発品投与による効果の比較, 臨床と治療, **80**, 179 184 (2003).
- 6) L.H. Louis, J.W. Conn, Preparation of glycyrrhizinic acid, the electrolyte-active principle of licorice: its effects upon metabolism and upon pituitary-adrenal function in man, *J. Lab. Clin. Med.*, **47**, 20 28 (1956).
- 7) R.S. Finney, G.F. Somers, The antiinflammatory activity of glycyrrhetinic acid and derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.*, **10**, 613 620 (1958).
- 8) K.K. Tangri, P.K. Seth, S.S. Parmar, K.P. Bhargava, Biochemical study of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of glycyrrhetic acid, *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1277 1281 (1965).
- 9) E. Gumprich, R. Dahl, M.W. Devereaux, R.J. Sokol, Licorice compounds glycyrrhizin and 18 α -glycyrrhetinic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10556 10563 (2005).
- 10) J.W. Conn, D.R. Rovner, E.L. Cohen, Licorice-induced pseudoaldosteronism. hypertension, hypokalemia, aldosteronopenia, and suppressed plasma renin activity, *JAMA*, **205**, 492 496 (1968).
- 11) P.M. Stewart, A.M. Wallace, R. Valentino, D. Burt, C. H.L. Shackleton, C.R.W. Edwards, Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age, *Lancet*, **2**, 821 824 (1987).
- 12) H. Kato, M. Kanaoka, S. Yano, M. Kobayashi, 3-Monoglucuronyl- glycyrrhetinic acid is a major metabolite that causes licorice-induced pseudoaldosteronism, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **80**, 1929 1933 (1995).
- 13) N. Ohtake, A. Kido, K. Kubota, N. Tsuchiya, T. Morita, Y. Kase, S. Takeda, A possible involvement of 3-monoglucuronyl-glycyrrhetinic acid, a metabolite of glycyrrhizin (GL), in GL-induced pseudoaldosteronism, *Life Sci.*, **80**, 1545 1552 (2007).
- 14) C.E. van Gelderen, J.A. Bijlsma, W. van Dokkum, T.J. Savelkoul, Glycyrrhizic acid: the assessment of a no effect level, *Human Exp. Toxicol.*, **19**, 434 439 (2000).
- 15) 矢野三郎, 中野直子, カンゾウ(甘草), 治療学, **7**, 703 708 (1981).
- 16) 高橋美香子, 中野哲, 武田功, 熊田卓, 杉山恵一, 長田敏正, 桐山勢生, 豊田秀徳, 島田真, 佐守友実, C 型慢性肝炎および肝硬変に対するグリチルリチン製剤投与時のグリチルリチンおよびグリチルレチン酸の血中動態について, 日本消化器病学会雑誌, **92**, 1929 1936 (1995).
- 17) T.H. Tsai, C.F. Chen, High-performance liquid chromatographic determination of 18 β -glycyrrhetinic acid and 18 α -glycyrrhetinic acid in rat plasma: application to pharmacokinetic study, *J. Chromatogr.*, **567**, 405 414 (1991).