

地膚子と蛇床子を含む高水分含有率油中水型クリーム剤の調製

郡 修徳,^{*,a} 山下美妃,^a 金澤 勉,^b 小寺 一^bPreparation of Water in Oil Type Cream with High Content of Water Containing *Kochia scoparia* Fruit and *Cnidium monnieri* FruitNaonori KOHRI,^{*,a} Miki YAMASHITA,^a Tsutomu KANAZAWA,^b and Hajime KODERA^b^aHokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan, and ^bHarunire Bio Laboratory Co., Ltd., Cooperative Research Center, Kitami Institute of Technology, 603-2 Hakuyo-cho, Kitami, Hokkaido 090-0013, Japan

(Received May 27, 2011; Accepted September 5, 2011; Published online September 9, 2011)

Kikisui[®] is a herbal lotion containing *Kochia scoparia* Fruit and *Cnidium monnieri* Fruit that is clinically used as an antipruritic for itchy dry skin. However, this formulation is unsuitable for inducing a prolonged effect. Here, we attempted to change the formulation from a lotion to a cream. The cream we chose was a water-in-oil (W/O) type emulsion for enhancing skin compatibility. In addition, the high water content imparts a sensation of coolness. However, it is difficult to prepare a stable W/O type cream with high water content using a mechanical mixing method. Instead, we prepared the W/O type emulsion using liquid crystals. Water containing cocamidopropyl betaine was added to a dispersed phase comprising an oil phase of oleic acid and liquid paraffin that was constantly stirred. Addition of an aqueous solution containing *Kochia scoparia* Fruit and *Cnidium monnieri* Fruit decreased the stability of the cream. However, addition of glycerin as a humectant, and ethyl *p*-hydroxybenzoate/*n*-butyl *p*-hydroxybenzoate as preservatives enhanced the stability of the cream. The stability of the emulsion was correlated with the apparent viscosity of the cream. The final W/O type cream had a water content of 83% and was stable for more than 6 months at 4°C. Furthermore, ostol, which is one of the main biologically active herbal compounds, was also stable for more than 6 months.

Key words—water-in-oil type; emulsion; liquid crystal; cream; *Kochia scoparia* Fruit; *Cnidium monnieri* Fruit

緒 言

漢方ローションである『貴肌水[®]』(株式会社はるにれバイオ研究所, 北海道)¹⁾の主原料は, 地膚子と蛇床子の2種類の生薬であり, これらの主成分はそれぞれモルデイン Ic とオストールである。『貴肌水[®]』は Compound 48/80 誘発搔痒モデルにおいて, 抗搔痒作用が認められている。²⁾ さらに, アトピー性皮膚炎, 老人性皮膚瘙癢症, 主婦湿疹, 慢性湿疹などの皮膚の乾燥による痒みを主訴とする患者における症状に対して高い有効率が報告されている。²⁾ しかし, 剤形が液状のため効果が持続しない, 携帯が不便という問題点がある。本研究では, これらの問題点を解決するために, ローション剤からクリーム剤への剤形変更を試み, 水中油型(以下, O/W 型と略す)より皮膚親和性に優れている油中

水型(以下, W/O 型と略す)を選択し, さらに清涼感を高めるために, 水分含有率の高い W/O 型クリーム剤を試作した。今回は, 化粧品には利用されているが, 医薬品には利用されていない液晶乳化法を用いて調製を試み, 基剤の安定性を向上させる要因について検討した。

実 験 方 法

1. 使用医薬品及び試薬 クリーム基剤として, 日本薬局方流動パラフィン(ヤクハン製薬, 北海道), ヤシ油脂肪酸アミドプロピルバタイン液(30%水溶液, ニッサンアノン BDF-SF[®], 日本油脂, 東京), 日本薬局方グリセリン(ヤクハン製薬, 北海道), L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物(鹿特級, 関東化学, 東京), *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル(鹿特級, 関東化学, 東京), *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチル(鹿特級, 関東化学, 東京), L(+)-アスコルビン酸(特級, 関東化学, 東京),

^a北海道薬科大学, ^b株式会社はるにれバイオ研究所

*e-mail: kohri@hokuyakudai.ac.jp

dl- α -トコフェロール (鹿特級, 関東化学, 東京), 超純水 (Milli-Q®を用いて調製) を用いた. その他, オレイン酸として EXTRA OLEIN99® (純度 $\geq 99\%$, 日本油脂, 東京) とルナック O-LL-V® (純度 $\geq 86.4\%$, 花王, 和歌山) を使用した. 地膚子と蛇床子含有原液 (以下, 原液と略す) は, 株式会社はるにれバイオ研究所から供与された水性の懸濁液を使用した.

2. 液晶乳化法によるクリーム剤の調製 流動パラフィン (以下, LP と略す) とオレイン酸 (以下, OA と略す) を混合し油相とし, 両性界面活性剤であるヤシ油脂肪酸アミドプロピルベタイン (以下, CAPB と略す) 液と超純水を混合し水相とした. 添加物の効果の検討については, 抗酸化剤として用いた *dl*- α -トコフェロールは油相に, L(+)-アスコルビン酸は水相に添加した. 保存剤として用いた *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルと *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチルは水相に添加した. 保湿剤として用いたグリセリンと L-グルタミン酸水素ナトリウム水和物は水相に添加した. 室温下, 油相をケミスターラー (東京理化工機, B-100 型) で攪拌 (512 rpm) しながら, その中に水相を徐々に加えた. 攪拌後, 軟膏板で練合し, プラスチック製軟膏容器 (村中医療器, 50 g 用) に充填した. なお, 今回調製したクリーム剤の処方 Table 1-3 に示す.

3. 乳化型の確認 デジタルマルチメーター (株式会社カスタム, CDM-2000D) で抵抗値を測定し, 確認した. 抵抗値が振り切れる場合は W/O 型, 抵抗値が数値として読み取れる場合は O/W 型と判断した.³⁾

4. 見かけの粘度の測定 スパイラル粘度計 (株式会社マルコム, PC-1TL) を用い, 25°C, ローターの回転数 10 rpm (ずり速度 6 s^{-1}) 条件下で測定を開始し 3 分後の値を見かけの粘度値とした.

5. 統計解析 遮光の効果では *t*-検定法を用い, それ以外は一元配置分散分析法で解析し, 統計的有意性の有無を危険率 (*p*) 5% によって検定した.

6. 原液含有及び非含有時のクリーム剤の外観変化 調製品をプラスチック製軟膏容器に入れ, 室温・非遮光, 室温・遮光, 4°C・遮光, 20°C・遮光又は 30°C・遮光にて保存した. 外観変化は常に蓋への水分の付着, 基剤表面のひび割れ, 基剤の液相

Table 1. Formula of W/O Emulsion Prepared with Liquid Crystals

Formula No.	Content, % (w/w)				Water
	Liquid paraffin	Lunac O-LL-V®*	30% Cocamidepropyl betaine solution		
			Active ingredient	Water	
A1	1	8	3.2	7.5	80.3
A2	1	8	2.7	6.3	82
A3	1	8	2.4	5.6	83
A4	1	8	2.2	5.2	83.6
A5	1	8	2	4.7	84.3
A6	1	8	1.6	3.7	85.7
A7	1	8	1.3	3	86.7
A8	1	4	1.3	3.1	90.6
A9	1	12	3.6	8.4	75
A10	1	15	4.5	10.5	69
A11	1	18	5.5	12.8	62.7
A12	1	22	6.7	15.7	54.6
A13	1	30	9.1	21.3	38.6

* Purity of oleic acid $\geq 86.4\%$.

分離の順に観察されたので, 最も早く観察された蓋への水分の付着を外観変化の判断基準とした.

7. 原液含有クリーム剤中のオストールの安定性 調製した各クリーム剤中のオストール量は, 調製日及び調製後 1 ヶ月毎に, Li ら⁴⁾の方法に準拠した HPLC 法で測定した.

クリーム剤 0.5 g にジエチルエーテル 4 ml, 超純水 1 ml を共栓付き試験管に入れ, 振とう機で振とう (30 min) 後, 遠心分離 (3000 rpm, 30 min) した. その後, エーテル相 1 ml を別の試験管に移し, 室温で減圧乾固させた. 残渣に内標準物質溶液 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ フルオシノニドメタノール溶液) 1 ml を加え, ボルテックス後, 遠心分離 (3000 rpm, 30 min) した上清を HPLC に注入した. ポンプは LC-10AD vp (島津製作所), カラムは Mightysil RP-18 GP (4.6 \times 250 mm, 関東化学) を用いた. 検出器は SPD-10AV vp (島津製作所) を用い検出波長 322 nm でモニターした. 移動相として水-アセトニトリル (10 : 13) を用い, 流速は 0.7 ml/min, 注入量は 20 μl , 分析温度は 40°C とした.

Table 2. Formula of W/O Emulsion Prepared with Liquid Crystals Containing Additives

Formula No.	Content, % (w/w)											
	Liquid paraffin	Lunac O-LL-V®**	30% Cocamidepropyl betaine solution		Water	Glycerine JP**		Sodium glutamate	<i>p</i> -hydroxybenzoate Ethyl	<i>n</i> -Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	Ascorbic acid	<i>dl</i> - α -tocopherol
			Active ingredient	Water		Glycerine	Water					
B1	1	8	2.4	5.6	82.95	—	—	—	—	—	0.05	—
B2	1	8	2.4	5.6	82.9	—	—	—	—	—	0.1	—
B3	1	8	2.4	5.6	82.5	—	—	—	—	—	0.5	—
B4	1	8	2.4	5.6	82	—	—	—	—	—	1	—
B5	1	8	2.4	5.6	82.9	—	—	—	—	—	—	0.1
B6	1	8	2.4	5.6	82.5	—	—	—	—	—	—	0.5
B7	1	8	2.4	5.6	82	—	—	—	—	—	—	1
B8	1	8	2.4	5.6	82.8	—	—	—	0.1	0.1	—	—
B9	1	8	2.4	5.6	77.0	5	0.8	—	0.1	0.1	—	—
B10	1	8	2.4	5.6	77.8	—	—	5	0.1	0.1	—	—

* Purity of oleic acid \geq 86.4%. ** the Japanese Pharmacopoeia.

Table 3. Formula of W/O Emulsion Prepared with Liquid Crystals Containing Drug Solution and Additives

Formula No.	Content, % (w/w)											
	Liquid paraffin	Lunac O-LL-V®**	Extra Olein99®***	30% Cocamidepropyl betaine solution		Water	Drug solution***	Glycerine JP		Sodium glutamate	<i>p</i> -hydroxybenzoate Ethyl	<i>n</i> -Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
				Active ingredient	Water			Glycerine	Water			
C1	1	8	—	2.4	5.6	80.6	2.4	—	—	—	0.1	0.1
C2	1	8	—	2.4	5.6	75.4	2.4	—	—	5	0.1	0.1
C3	1	8	—	2.4	5.6	74.6	2.4	5	0.8	—	0.1	0.1
C4	1	—	8	2.4	5.6	74.6	2.4	5	0.8	—	0.1	0.1

* purity of oleic acid \geq 86.4%. ** purity of oleic acid \geq 99.0%. *** containing *Kochia scoparia* Fruit and *Cnidium monnieri* Fruit.

結 果

1. 液晶乳化法による調製

1-1. 基剤の乳化型 乳化型に及ぼす油相 (LP + OA) 含有率 (% (w/w)) とモル比 OA/CAPB の影響について検討した (Fig. 1). モル比 OA/CAPB の低い領域では O/W 型, 高い領域では W/O 型のクリーム剤が得られた.

1-2. 原液非含有の基剤の外観変化に及ぼす要因

Figure 2 には, OA の含有率を一定にし, CAPB 液の含有率を変化させることで, モル比 OA/CAPB を変化させた処方 A1-A7 の 30°C・遮光保存における外観変化が認められるまでの日数と調製直後の見かけの粘度を示す. モル比が 3.5 の処方 A3 の基剤が外観変化が認められるまでに最も長い日数を示した. またモル比が低いほど見かけの粘度が上昇した.

次にモル比を 3.5 として, OA と CAPB の合計量

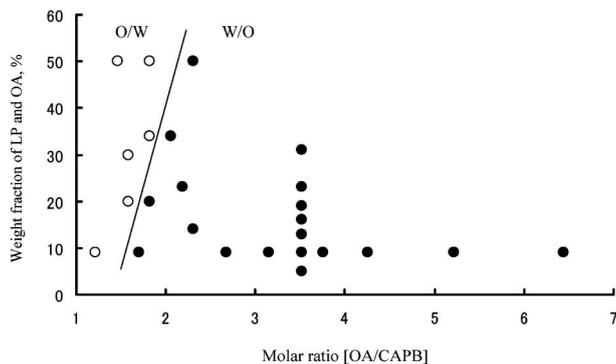


Fig. 1. Diagram of Emulsion Type for the Four-Component System Consisting of OA, CAPB, LP and Water
○; O/W Type, ●; W/O Type.

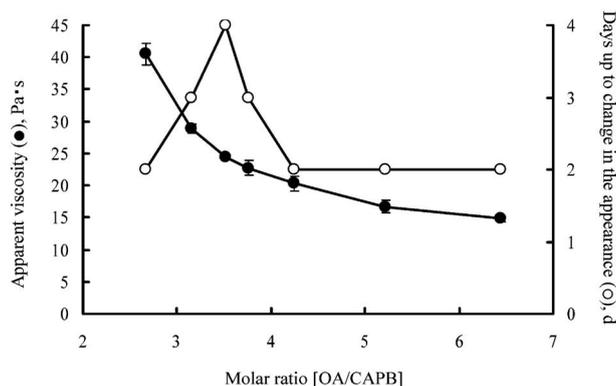


Fig. 2. Effect of OA/ CAPB on the Appearance of Water Droplet on the Inside of Container Evaporated from W/O Type Cream and Apparent Viscosity of W/O Type Cream under Shading at 30°C
Each closed circle represents the mean \pm S.D. of three measurements.

を変化させることで水分含有率を 59.9–93.7% に変化した処方 A3 及び A8–A13 の 30°C・遮光保存における外観変化が認められるまでの日数とそれぞれの基剤の調製直後の見かけの粘度を Fig. 3 に示す。この場合も処方 A3 の基剤が外観変化が認められるまでに最も長い日数を示した。また見かけの粘度は水分含有率の増加に伴い上昇した。

基剤として最も安定であった処方 A3 を用いて、基剤の外観変化に及ぼす光の影響を室温下で検討した。基剤の外観変化が認められるまでの日数は、遮光条件下で 2.5 倍に増加 ($p < 0.01$) した [Fig. 4(a)].

基剤として最も安定であった処方 A3 を基に、種々の添加剤を加えた処方 B1–B10 の 30°C・遮光保存における外観変化が認められるまでの日数を Fig. 4(b) に示す。抗酸化剤としてアスコルビン酸とト

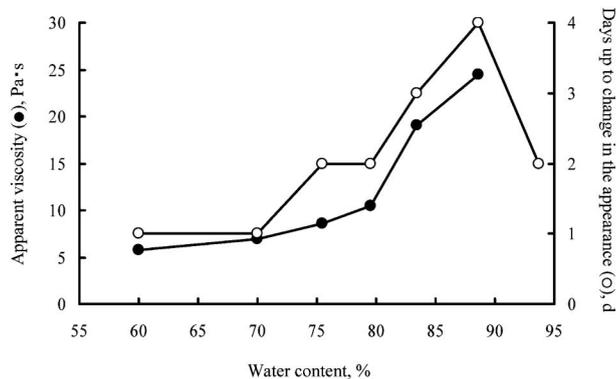


Fig. 3. Effect of Water Content on the Appearance of Water Droplet on the Inside of Container Evaporated from W/O Type Cream and the Apparent Viscosity of W/O Type Cream under Shading at 30°C
Each closed circle represents the mean \pm S.D. of three measurements.

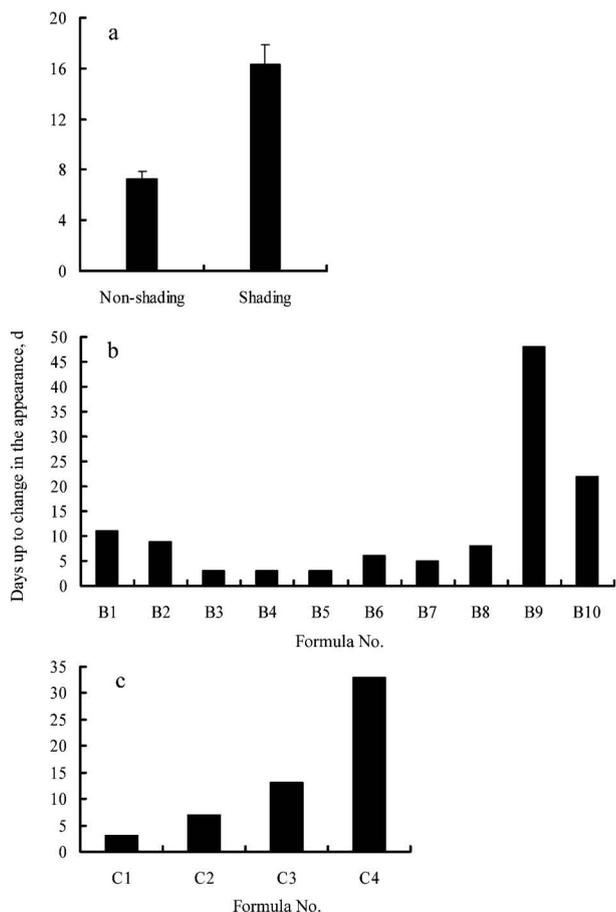


Fig. 4. Effect of Other Factors on the Appearance of Water Droplet on the Inside of Container Evaporated from W/O Type Cream

a, Light at room temperature. Each value represents the mean \pm S.D. of three measurements. b, Additives under shading at 30°C. c, Drug solution and purity of oleic acid under shading at 30°C.

コフェロールを加えた処方 B1, B2, B6 及び B7 では、外観変化が認められるまでの日数は増加したが、すべての処方において変色が認められた。保存剤として *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルと *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチルのみの添加した処方 B8 において、処方 A3 に比べ外観変化が認められるまでの日数は増加した。処方 B8 に保湿剤としてグリセリン又はグルタミン酸ナトリウムを添加した処方 B9 及び B10 の基剤の外観変化が認められるまでの日数はさらに増加し、グリセリンの方がその効果は強かった。

1-3. クリーム剤の外観変化に及ぼす原液添加の影響 Figure 4(c)には、基剤に原液を添加したクリーム剤の 30°C・遮光保存における外観変化が認められるまでの日数を示した。処方 B8 に原液を添加した処方 C1 の外観変化が認められるまでの日数は処方 B8 に比べ減少した。そこで処方 C1 にさらに保湿剤としてのグリセリン又はグルタミン酸ナトリウムを添加したそれぞれの処方 C2 又は C3 の場合、外観変化が認められるまでの日数は処方 C1 に比べ増加したが、その効果はグリセリンのほうが高かった。

次に処方 C3 中のオレイン酸をルナック O-LL-V® からさらに純度の高い EXTRA OLEIN99®へ変更した処方 C4 の場合、外観変化が認められるまでの日数はさらに約 2.5 倍増加した。

Figure 5 には、処方 B10 と C2 を用いてクリーム剤の外観変化が認められるまでの日数に及ぼす原液の影響について検討した、経日的な見かけの粘度変化を示す。原液添加製剤は原液無添加製剤に比べて、経日的見かけの粘度の低下が認められ、8 日目以降、原液添加製剤は原液無添加製剤に比べ統計的に有意に低下した。

Figure 6 には、外観変化が認められるまでの日数が最も長かったクリーム剤である処方 C4 を用い、外観変化が認められるまでの日数に及ぼす遮光条件下での保存温度の影響について検討した。外観変化は 30°C・遮光保存で 33 日間まで、20°C・遮光保存で 153 日間まで認められなかったが、4°C・遮光保存では 180 日以上認められず、現在も経過観察中である。保存温度の低下に伴い、外観変化が認められるまでの日数が増加した。

1-4. 原液クリーム剤中の主成分であるオス

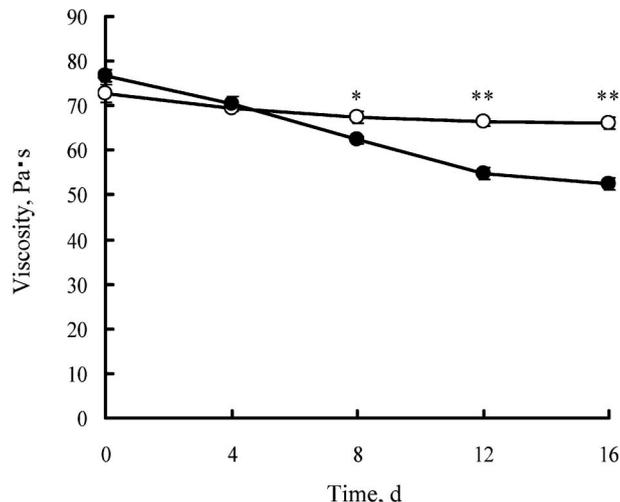


Fig. 5. Effect of Drug Solution on the Apparent Viscosity of W/O Type Cream

○; without drug solution, ●; with drug solution. Each value represents the mean \pm S.D. of three measurements. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

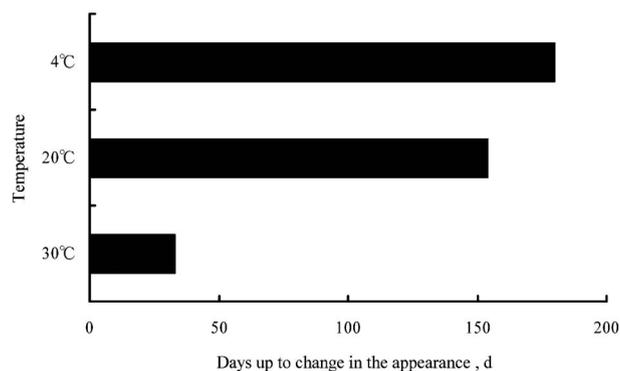


Fig. 6. Effect of Preservation Temperature on the Appearance of Water Droplet on the Inside of Container Evaporated from W/O Type Cream

ルの安定性 Figure 7 に処方 C4 の 4°C・遮光保存におけるクリーム剤中のオストール残存率の経日的変化を示す。6 ヶ月目までにおいて、オストールの残存率に統計的に有意な差は認められず、分解はほとんど生じていなかった。

考 察

『貴肌水®』は、地膚子と蛇床子を主成分とする漢方ローションであり、アトピー性皮膚炎、老人性皮膚掻痒症、主婦湿疹、慢性湿疹などの皮膚の乾燥による痒みに対して有効性が報告されている。²⁾ 今回は本製剤の持続性、携帯性を向上させるために、クリーム剤への剤形変更を試み、皮膚親和性に優れ、

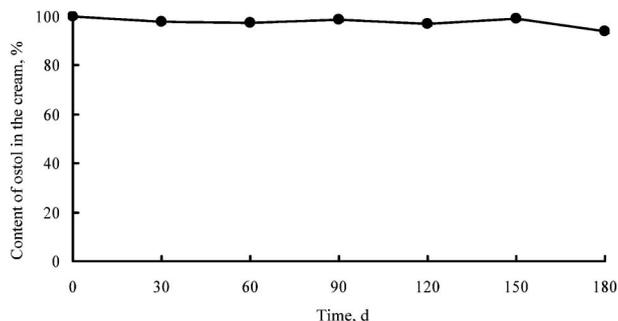


Fig. 7. Stability of Ostol in W/O Type Cream under Shading at 4°C

Each value represents the mean \pm S.D. of three measurements.

さらに掻痒感を向上させる目的で清涼感を高めた水分含有率の高い W/O 型乳剤性クリーム剤の調製について検討した。

一般的に機械的乳化法で調製した W/O 型クリーム剤の水分含有率は基剤の安定性の観点から低く処方されており、例えば日本薬局方の吸水クリームの場合 39.3% である。今回、さらに水分を高率で包含させることを目的として、液晶乳化法を用いて W/O 型クリーム剤の調製について検討した。

液晶とは、分子の占める位置及び分子軸の方向が固体結晶にみられるような完全な規則性を持つ状態と、通常の等方性液体にみられるような不規則な状態との中間状態を示す物質をいう。⁵⁾ また、液晶は一般的に流動性が乏しく、エマルジョン調製の効率が悪いことから、多価アルコールなどを併用し、系の界面張力を低下させてエマルジョン調製を行う方法が知られている。^{6,7)} しかしながら、今回用いた方法では、両性界面活性剤を溶解した水相と、高級脂肪酸を溶解した油相を用いた乳化プロセスの過程で両性界面活性剤のカチオン部分と高級脂肪酸のアニオン部分で静電的な相互作用による結合により油/水界面に連続的に液晶が形成されるので、多価アルコールを用いることなく、効率よく液晶を用いたエマルジョンが調製できると報告されている。^{8,9)} またこのとき逆ヘキサゴナル型液晶が形成されており、水は液晶の円柱内に保持された構造をとっていることが報告されている。^{8,9)}

クリーム剤は、OA を含んだ LP 溶液を攪拌しながら、その中に CAPB 水溶液を徐々に添加する方法で調製し、電導度法により乳化型を決定した。

Figure 1 に示すように、モル比 OA/CAPB の違い

により異なる乳化型が得られ、モル比の低い領域では O/W 型、高い領域では W/O 型のエマルジョンが得られた。モル比の低い O/W 型エマルジョンの領域では、OA と CAPB によって形成されたラメラ液晶が乳化粒子の回りに付着した O/W 型エマルジョンが形成されていると考えられる。⁹⁾ 一方、モル比の高い領域の W/O 型エマルジョンでは、内水相比が高まり、逆ヘキサゴナル液晶が形成されていると考えられる。^{8,9)}

今回、高級脂肪酸として OA、両性界面活性剤として CAPB を用い、安定な液晶を得るためのモル比 OA/CAPB について 2.2-5.3 の範囲で検討したが、この比が小さくなるにしたがい粘性が高くなったが、3.5 でエマルジョンの合一やクリーミングに対して最も乳化状態の安定な基剤が調製できた (Fig. 2)。しかし、その比が 3.5 より小さくなると逆に低下し、至適なモル比が存在することが示唆された。高級脂肪酸としては、リノール酸でも検討したが、酸化によると考えられる液晶乳化の構造破壊が OA を用いたときよりもより早急に生じたことより、高級脂肪酸としては不飽和度の最も小さい OA を用いた。また高級脂肪酸として飽和脂肪酸であるステアリン酸を用いて検討したが、LP に溶解しないためクリーム剤の調製は不可能であった。

さらに両性界面活性剤と高級脂肪酸以外の油性成分を添加しなければクリーム剤の形成には至らなかったため、高級脂肪酸以外の油性成分の添加が必要であった。中間には流動パラフィンの有用性を報告している⁸⁻¹⁰⁾ が、クリーム基剤として汎用される白色ワセリンやサラシミツロウについても検討した。これらの物質を用いる場合、融点以上で乳化を行わなければならないので、70°C で行った。しかしながら、流動パラフィンを用いた場合に、外観変化が認められるまでの日数が最も長い基剤を調製できた。その効果は含有率 1% と 10% で同等であったため、すべての処方で流動パラフィン含有率を 1% に設定した。

さらに、水分含有率の上限について 59.9-93.7% の範囲で検討したが、88.6% のとき最も安定な基剤の調製が可能であった。これは水分含有率の上昇に伴いクリーム剤の粘度が上昇し乳化状態が安定になったためと考えられる (Fig. 3)。水分含有率 93.7% の場合、稠度が硬く流動性がほとんどなくなり、

粘度測定ができなかった。このとき基剤の安定性が低下したが、今回の処方において水分含有率に最適な値が存在することが示唆された。

遮光により基剤の安定性が向上したが、これは光によりオレイン酸の酸化が促進し乳化状態が不安定になったためと考えられる [Fig. 4(a)].

次に基剤の安定性に及ぼす添加剤の影響について検討した。保存剤である *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルと *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチルの添加により基剤の外観変化が認められるまでの日数が増加したが、その理由については現在検討中である。この保存剤のほかにさらに保湿剤であるグリセリンやグルタミン酸ナトリウムの添加により基剤の外観変化が認められるまでの日数がより増加した。保湿剤が水の蒸発を抑制したためと考えられるが、その効果はグリセリンの方が優れていた [Fig. 4(b)].

続いて、クリーム剤の安定性に及ぼす原液の影響について処方 B10 と C2 を用いて検討した。原液添加により基剤の外観変化が認められるまでの日数が減少した。原液無添加の場合、基剤の見かけの粘度の減少は 16 日間でわずかであった。一方、原液添加の場合、見かけの粘度は経日的に減少し、調製後 8 日目以降では両者間に明らかに差が認められ、外観変化の結果とほぼ一致した [Figs. 4(b), (c) and 5].

次に、オレイン酸の純度を高めて検討したが、その純度が高くなるにしたがい、クリーム剤に外観変化が認められるまでの日数も増加した [Fig. 4(c)]. 不純物が乳化状態に影響にしていると考えられる。

クリーム剤に外観変化が認められるまでの日数を増加させる試みとして保存温度について検討した。Figure 6 に示すように、保存温度の低下に伴い、外観変化が認められるまでの日数が増加した。これはオレイン酸の融点が 4°C で、低温では酸化され難くなるため基剤の構造的安定性が得られたと考えられる。

基剤中のオストールは、Fig. 7 に示すように 6 カ

月間安定であり、現在も観察中である。原液中の他の主成分であるモモルディン Ic については、標準品が市販されておらず、入手困難なため、今回検討しなかったが、化学構造的にも水難溶性であり、今回用いた基剤中では安定な化合物であることが予想される。

今回、液晶乳化法により最終的に水分を約 83% 含む清涼感の高い W/O 型クリーム剤を調製することができた。主成分であるオストールとモモルディン Ic は脂溶性が高いので連続層である油相部分に分布し、塗布後、薬効が速やかにあらわれ、かつローション剤よりも持続すると考えられる。今後、室温保存でもより安定なクリーム剤を得るための添加剤の選択について検討するとともに、医薬品添加により基剤の安定性が低下したことより、液晶乳化法に適した医薬品の選択についても検討する予定である。

REFERENCES

- 1) Kodera H., Japan Patent 3994226 (2007).
- 2) Harunire Bio Laboratory, “Kikisui,”: (<http://www.harunirebio.com/item/kikisui>), cited 26 May, 2011.
- 3) Roehl E.-L., *Soap Perfum. Cosmet.*, **45**, 343–350 (1972).
- 4) Li Y., Meng F., Xiong Z., Liu H., Li F., *J. Chromatogr. Sci.*, **43**, 426–429 (2005).
- 5) Sasaki A., “Ekishou Electronics no Kiso to Ouyou,” Ohmusha, Ltd., Tokyo, 1979, p. 11.
- 6) Suzuki T., Tsutsumi H., *Yukagaku*, **36**, 588–593 (1987).
- 7) Suzuki T., Takei H., Yamazaki S., *J. Colloid Interface Sci.*, **129**, 491–500 (1989).
- 8) Nakama Y., Shiojima Y., Takeshita Y., Yamaguchi M., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **74**, 803–808 (1997).
- 9) Nakama Y., Shiojima Y., Harusawa F., *J. Oleo. Sci.*, **47**, 1331–1336 (1998).
- 10) Nakama Y., Shiojima Y., Harusawa F., *J. Oleo. Sci.*, **47**, 585–590 (1998).