

## 参考資料

## ペプチドマップ法

## 目的と範囲

ペプチドマップ法はたん白質医薬品、特にバイオテクノロジー応用医薬品の確認試験の一方法である。本法はたん白質を化学的又は酵素的に処理してペプチド断片とし、その断片を再現性よく分離確認するもので、相補的 DNA 配列の読み違いあるいは点変異などによって生じる一個のアミノ酸の変化をも確認できる試験法である。標準品/標準物質について同様に処理したものと比較することで、たん白質の一次構造の確認、構造上の変化の有無の検出、製造工程の恒常性及び遺伝子安定性の評価を行うことが可能である。たん白質はそれぞれ固有の特性を有しており、化学的、分析学的アプローチによって十分に特異性のあるペプチドマップが可能になるように、当該たん白質の特性についてよく理解しておかなければならない。

ここでは、目的たん白質の特性解析、組換えたん白質生産のための遺伝子発現構成体の安定性および製造工程全体の恒常性の評価、たん白質の同一性や安定性の評価、あるいはたん白質の変異の検出を目的として、本法を適用する際の手引きを記す。

## ペプチドマップ

ペプチドマップ法にはどのようなたん白質にも適用可能な一般的な操作法はない。しかし、個々のたん白質に応じた特異的なマップの設定は可能である。ペプチドマップに関する解析技術は現在でも急速に進歩しつつあるが、広く認められている常法がいくつか存在する。各条においては、目的に応じてこれらの方法の変法が規定されることもある。

ペプチドマップはたん白質の指紋（フィンガープリント）とみなすことができ、酵素的あるいは化学的処理を受けた結果生成した最終分解産物であり、当該たん白質に関する包括的な情報を与える。本法は以下の主な4段階の操作からなる：たん白質が製剤成分の一部である場合には分離精製；ペプチド結合の選択的切断；得られたペプチドのクロマトグラフ法による分離；各ペプチドの分析と確認。試料は標準品/標準物質と同様に消化、分析する。化学的な切断剤に比べてエンドプロテアーゼ（例えばトリプシン）のような酵素を用いればより完全な切断が可能である。ペプチドマップはたん白質を識別するのに十分な種類のペプチド断片を得るべきである。断片の数が多すぎると多くのたん白質が類似したプロフィールを示してしまい、かえってその特異性が失われる場合もある。

たん白質の分離及び精製は、試験を妨害する添加剤やたん白質賦形剤を含む原薬及び製剤を分析する場合に必要であり、必要に応じて各条で規定する。製剤からたん白質を分離・生成した場合は回収率の定量性を検証しておく必要がある。

## ペプチド結合の選択的切断

ペプチド結合を切断する手段はたん白質試料の種類により異なる。用いる切断剤は切断のタイプ—酵素的あるいは化学的—、およびそれぞれのタイプに存在する切断剤の種類に応じて選択される。いくつかの切断剤とその特異性を表1に示す。この表は、切断剤すべてを網羅しているということではなく、他の切断剤が適切と認められた時には追加される。

**試料の前処理**—たん白質の大きさや形状によっては特別な前処理を行う必要がある。モノクローナル抗体についてはあらかじめH鎖とL鎖に分離する必要がある。分子量が100,000ダルトン以上のたん白質の切断剤としてトリプシンを用いる場合には、リジン残基をあらかじめシトラコニル化あるいはマレイル化しておかないと多種類のペプチド断片が生成してしまう。

**切断剤の前処理**—特に酵素系の切断剤については、マップの再現性を維持するために精製を目的とした前処理を行う必要がある場合がある。例えばトリプシンを用いる際には、混在するキモトリプシンを不活化するためにトシル-L-フェニルアラニクロロメチルケトンで処理する必要がある。HPLCによるトリプシンの精製、あるいはゲル支持体上への酵素の固定化などの方法も、たん白質試料が少量の場合に効果的である。

**たん白質の前処理**—試料濃度が低い場合など試料の濃縮が必要な場合があり、また製剤の処方用いる添加剤や安定化剤がマッピングの操作を妨害する場合、妨害物質をたん白質から分離する操作が必要な場合がある。前処理に用いる物理的方法として限外ろ過、カラムクロマトグラフ法、凍結乾燥があげられる。また、酵素がたん白質の切断部位に接近できるようにするため、たん白質の折りたたみ構造を解きほぐす目的で、例えば変性剤（例えば尿素）を添加したり、あらかじめジスルフィド結合を還元し、アルキル化することがしばしば必要となる。

トリプシンを用いる場合に、非特異的切断、脱アミド化、ジスルフィド結合の異性化、メチオニン残基の酸化、ペプチドのN末端グルタミンの脱アミド化によるピログルタミル基の生成、などの酵素反応中に起こる副反応によりマップが不明瞭になることがある。更に、トリプシンの自己消化によりピークが生じることもあるが、自己消化に起因するピークのピーク強度（ピーク面積またはピーク高さ）

は用いるトリプシンと試料たん白質の比率に依存する。酵素の自己加水分解を避けるには、酵素が活性を示さないように、至適 pH とは異なる pH (例えばトリプシンでは pH 5) で酵素溶液を調製し、使用時に切断反応に用いる緩衝液で更に希釈調製するとよい。

**至適消化条件の設定**—たん白質の消化の程度と効率に影響を及ぼす因子は、化学的あるいは酵素的切断に影響する因子そのものである。

**pH**—消化反応液の pH は用いる切断剤が働くのに最適と考えられる値に調整する。例えば、臭化シアンを切断剤に用いる場合は、強酸性条件 (pH 2, ギ酸) が必要であるが、トリプシンを用いる場合は弱アルカリ条件 (pH 8) が最適である。一般に、反応液の pH は、反応中に試料たん白質の化学的特性を変化させるものであってはならないし、切断反応の過程で変動してはならない。

**温度**—ほとんどの切断反応は 25~37℃が適当であるが、副化学反応が最も少ない反応温度を選択する。反応温度が上昇するとたん白質によっては変性を受けやすいものもあるので、反応液の温度はたん白質の種類によって決定する必要がある。例えば、組換えウシソマトロピンは高温では消化反応中に沈殿するため、消化は 4℃で行う。

**反応時間**—充分量の試料たん白質が入手可能な場合には、再現性のあるマップを得るため、かつ不完全な消化を避けるため、至適反応時間を検討する。消化の時間を 2~30 時間の間で変化させ、例えばトリプシン処理の場合は、生じたマップを妨害しない酸の添加か凍結により反応を止める。

**切断剤の量**—反応時間を適度に短く (すなわち 6~20 時間) するために、通常は過剰量の切断剤を用いるが、マップのクロマトグラフパターンへの影響を避けるために、切断剤の使用は最少量に留める。たん白質とプロテアーゼの比率は 20 : 1 から 200 : 1 が一般的である。切断剤は最適な切断を得るため 2 回あるいはそれ以上の回数に分けて加えることもある。ただし、最終反応液量はペプチドマップ法におけるその後の操作 (分離操作) を容易にするため、できるだけ小さくする。後の分析に障害となる分解生成物を区別するために、試料たん白質以外のすべての使用試薬を用いて空試験を行う。

## クロマトグラフ法による分離

多くの方法がマッピングにおけるペプチド分離に利用される。分離法は試験するたん白質に応じて選択する。ペプチドの分離に利用される効果的な方法を表 2 に示す。ここでは最も広く用いられている逆相分配型高速液体クロマトグラフ (RP-HPLC) 法をクロマトグラフ法による分離手法の例として示す。

溶媒や移動相の純度は HPLC による分離において極めて重要な因子である。RP-HPLC では入手可能な市販の HPLC 用溶媒や水が推奨される。グラジエント法を用いて分離す

る場合、単一溶媒より混合溶媒において溶存ガスの溶解性が低いと、ガスが気化し問題を生じる場合がある。このような場合は、減圧や超音波による攪拌が溶存ガスを除去する有効な操作法として汎用される。溶媒中の固形物が HPLC 系に入ると、ポンプのバルブシールの損傷、分離用カラムの先端の詰まりの原因になる。ポンプの前及び後のろ過も推奨される。

**分離用カラム**—分離用カラムは個々のたん白質に応じて経験に基づき選択する。孔径 100 Å あるいは 300 Å のシリカ担体のカラムが分離に適している。小さなペプチドの分離には、直径 3~10 μm の全多孔性シリカ粒子にオクチルシランが化学的に結合した充填剤又は直径 3~10 μm の多孔性シリカ粒子あるいはセラミックの微粒子にオクタデシルシランが化学的に結合した充填剤は、直径 5~10 μm の全多孔性シリカ粒子にブチルシランが化学的に結合した充填剤より有効である。

**溶媒**—最も一般的に用いられる溶媒は水とアセトニトリルの混液に 0.1%未満のトリフルオロ酢酸を加えた溶液である。粘度が過度に上昇しない限り、必要に応じてペプチドの溶解性を高めるためにイソプロピルアルコール又は *n*-プロピルアルコールを加えてもよい。

**移動相**—pH を 3.0~5.0 の範囲で変えることにより、酸性アミノ酸残基 (例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸) を含むペプチドの分離を改善できるので、pH の選択において適応範囲の広いリン酸塩緩衝液が移動相によく用いられる。リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸の pH 2~7 (ポリマー担体のカラム充填剤ではそれ以上の pH でも使用できる) の溶液もアセトニトリルによるグラジエント法と組み合わせて用いられる。トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルも非常によく使用される。

**グラジエント法の選択**—直線、非直線あるいは段階的グラジエントを用いることができる。複雑な混合物を分離するには濃度勾配の緩やかなグラジエントが推奨される。マーカピークとなる 1~2 個のピークを明確に分離するのに最適なグラジエントを選択する。

**アイソクラティック法の選択**—単一の移動相を用いるアイソクラティック HPLC システムは、簡便でありかつ検出器の感度の向上が期待できるためによく用いられる。ピーク一つ一つについて明瞭な分離を得るよう移動相の組成を決めることは、時として困難なことがある。移動相の組成比や pH のわずかな変化がペプチドマップのピークの保持時間に大きく影響するような移動相は、アイソクラティック HPLC システムでは用いてはならない。

**その他のパラメーター**—良好な再現性を得るためには、通常カラムの温度を制御する必要がある。移動相の流速は毎分 0.1~2.0 mL、ペプチドの検出は UV 検出器を用いて 200~230 nm の測定波長で行う。その他の検出法も利用されている (例えば、ポストカラム誘導体化法) が、UV 検出法より頑健性の点で劣り、また適用範囲も狭い。

**システム適合性**—この項には試験法の全体にわたる性

能を評価する方法を記述する。システム適合性の判定基準は、得られるデータの解釈と適否の決定に影響を及ぼす重要な試験パラメータの特定に基づく。これらの重要なパラメータはペプチドの消化とペプチド断片の分析をモニターする基準でもある。試料と全く同一に処理した標準品/標準物質との比較は、消化反応の終了を知る指標になる。システム適合性の判定基準を設定するために、試料と併行して標準品/標準物質を使用することが重要である。更に、比較のために標準品/標準物質から得たクロマトグラムの実例を付けるべきである。その他の指標として、目視によるたん白質あるいはペプチドの溶解性の検査、未切断たん白質が存在しないことの確認、消化の程度に依存して生成するペプチド断片の測定などがある。ペプチド分析のシステム適合性として重要なパラメータは、ペプチドの分離方法及び検出方法並びにデータ解析に関する要求に依存する。

ペプチドマップ法を確認試験として用いる場合、システム適合性として選択性及び精度が重要である。たん白質の同一性の確認試験においては、変異たん白質の存在の確認の場合と同様に、試料たん白質のペプチドマップのペプチド断片を標準品/標準物質のペプチドマップのそれと比較することにより、既知の一次構造との一致を証明したり、変異たん白質の存在を確認する。ペプチドの分離度を測定するためには、試料たん白質の代わりに標準品/標準物質の消化物を利用することができる。変異たん白質の検討には、変異を生じたペプチド部分が特にマップ上で分離が不十分な領域に存在する場合、変異たん白質と標準品/標準物質との一定混合物の比較分析が有効である。パターン的一致度の指標としては、検出される主要ペプチド断片の数が用いられる。各ペプチド断片のパターン的一致度はペプチド断片のピークの分離度から最もよく判定できる。クロマトグラフ法で使用される各種のパラメータ（例えばピーク間の分離度、ピークの最大幅、ピーク面積、テーリングファクター、カラム効率）がペプチドの分離度の決定に利用できる。試験するたん白質及び用いる分離法によっては、一つあるいは複数のペプチドの分離を適合性の条件としてもよい。

標準品/標準物質の消化物について試料と同一の条件で繰り返し分析することによって、試験精度の基準値が得られると共にペプチドの回収率を求めることができる。一般に試料たん白質のペプチド断片の回収率は、内標準物質又は外標準物質として添加したペプチドを用いて得られる。精度は相対標準偏差（RSD）で表される。回収率や精度は常に一定ではないので、システム適合性ではその両者についての限度を設定しなければならない。これらの限度値は、試料たん白質に特有なものであり、各条毎に規定されることになる。

**判定方法**—まず、相対保持時間、ピーク強度、ピークの数、全体の溶出パターンなどを視覚的に比較する。次に、ピーク強度比の数学的分析、さらに試料の消化物及び標準品/標準物質の消化物の 1:1 (v/v) 混合液のクロマトグラ

ムのプロフィールを比較して、一致することを確認する。試料と標準品/標準物質のそれぞれの消化物のすべてのピークが同じ相対保持時間及び同じピーク強度比を示すことにより、試料と標準品/標準物質との同一性が確認される。

試料と標準品/標準物質との間で明らかに異なる相対保持時間を示したピークが、上記の 1:1 混合液では単一ピークとしてみられた場合は、システムの変動性を示している。1:1 混合液でピークが分離する時は、それぞれのピークのペプチド断片が同一ではないことの証拠となる。1:1 混合液中のあるピークが、試料及び標準品/標準物質消化液中のそれに相当するピークに比べ明らかにブロードならば、異なるペプチドの存在を示している可能性がある。ペプチドマップ分析のためのコンピューター用パターン認識ソフトウェアの利用が提案され、適用されているが、ソフトウェアの検証に問題があり、当面は公定法として採用することはできない。その他、計算式、数学的モデル、又はパターン認識による自動化の試みがすでに行われている。例えば、赤外吸収スペクトルやダイオードアレイ UV スペクトルによるペプチドの確認の自動化が挙げられる。しかしこれらの方法には、分解能が不十分な場合、ペプチド断片間の分離が不完全な場合、あるいは標準品/標準物質と試料の消化断片間にピーク強度に差がある場合において、限界が存在する。

ペプチドマップにおいて正確に同定された特定のピークについては、ピークの保持時間とピーク面積あるいはピーク高さに関して数値を比較することができる。ピーク面積は、ピーク面積積分法がベースラインの変動の影響を受けやすく誤差を生じやすいことさえ考慮すれば、変動の比較的小さいピークを内標準として利用して計算することができる。代わりに、試料の全てのペプチド断片のピーク高さの合計に対する各ピーク高さの比率を算出し、標準品/標準物質で得られる該当ピークの比率と比較することもできる。トリプシンの自己消化の可能性はブランクのペプチドマップ、即ちブランクの溶液をトリプシン処理した際得られるペプチドマップから確認できる。

ペプチドマッピング法の適格性を示すために最低限必要な要件は、試験条件の管理のためのシステム適合性試験を含む試験法が設定され、その適格性が証明されていることである。一般的には開発の初期段階においては、たん白質のペプチドマッピングの適格性を示すことのみで十分である。しかしたん白質性医薬品の開発を進め、規制当局へ承認申請するためには、当該たん白質について意図したとおりにペプチドマップを得ることができることを保証するような、試験操作に関する検証を含めた方法の妥当性に関する追加的資料が必要な場合もある。

## ペプチドの分析と確認

この項は、規制当局へ承認申請を行うために医薬品の開発途上においてペプチドマッピングを用いる上での手引きである。

ペプチドマップを定性試験の手段として利用する場合には、個々のペプチドピークを完全に解析する必要はない。しかし、規制当局に承認申請する場合に必要なペプチドマップ法の検証には、個々のペプチドピークについて厳密な確認が必要である。ピークについての確認方法には、各ピークの N 末端アミノ酸配列分析とアミノ酸組成分析の組み合わせによる方法から質量分析法 (MS) までさまざまである。

N 末端アミノ酸配列分析法とアミノ酸組成分析法の組み合わせを解析に利用する場合には、ペプチドの分離スケールを上げる。スケールアップは時としてペプチドピークの分離能に影響を及ぼすので、その際分離度が低下しないことを実験的に確かめておく必要がある。特定のペプチドのピークに相当する画分を分取し、減圧濃縮し、必要ならば再度クロマトグラフ法で分離する。ペプチド断片のアミノ酸分析はペプチドの大きさによって制限を受ける。N 末端がブロックされている場合にはアミノ酸配列分析を始める前にその除去が必要となる。カルボキシペプチダーゼ処理と MALDITOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight)・MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法) による検出を組み合わせた C 末端アミノ酸配列分析法も各ピークの解析のために利用できる。

質量分析法によるアミノ酸配列分析では、分離したペプチドを直接測定装置に導入するか、又はオンライン液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC-MS) を利用して構造を分析する。一般にエレクトロスプレー質量分析法、MALDITOF 質量分析法や FAB (Fast Atom Bombardment) イオン化質量分析法が利用される。修飾たん白質のアミノ酸配列や修飾アミノ酸の決定には、タンデム質量分析法 (MS/MS) も利用されている。

たん白質試料の還元前後における消化物のマススペクトルを比較することにより、ジスルフィド結合の形成にあずかるチオール基を含むペプチドのジスルフィド結合を同定することができる。

ペプチドマップで一次構造が明確に証明できない部分がある場合には、さらに詳細なペプチドマップが必要な場合もある。ペプチドマップ法によってたん白質の一次構造を解析する場合、理論たん白質構造と少なくとも 95% が一致することを目標とする。

表 1. 切断剤の例

種類	試薬	特異性
酵素法	トリプシン (EC 3.4.21.4)	アルギニン, リジンの C 末端側
	キモトリプシン (EC3.4.21.1)	疎水性アミノ酸 (ロイシン, メチオニン, アラニン, 芳香族アミノ酸) の C 末端側
	ペプシン (EC 3.4.23.1 & 2)	非特異的消化
	リジルエンドペプチダーゼ (Lys-C エンドペプチダーゼ) (EC3.4.21.50)	リジンの C 末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ ( <i>S. aureus</i> 株 V8 由来) (EC3.4.21.19)	グルタミン酸, アスパラギン酸の C 末端側
	ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ (エンドプロテアーゼ Asp-N) (EC3.4.24.33)	アスパラギン酸の N 末端側
	クロストリパイン (EC3.4.22.8)	アルギニンの C 末端側
化学法	臭化シアン	メチオニンの C 末端側
	2-ニトロ-5 チオシアノ安息香酸	システインの N 末端側
	O-ヨードソ安息香酸	トリプトファン, チロシンの C 末端側
	希酸	アスパラギン酸, プロリン
	BNPS-スカトール	トリプトファン

表 2. ペプチドの分離方法

逆相分配型高速液体クロマトグラフ法 (RP-HPLC)
イオン交換クロマトグラフ法 (IEC)
疎水的相互作用クロマトグラフ法 (HIC)
ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE), 非変性
ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)
キャピラリー電気泳動 (CE)
高圧ろ紙クロマトグラフ法(PCHV)
高電圧ろ紙電気泳動 (HVPE)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

生薬に関する試験方法ならびに各条の

改正と国際調和に関する研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所  
筑波薬用植物栽培試験場長

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

生薬に関する試験法及び各条規格の改正と国際調和に関する研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場長

**研究要旨** 中国との薬局方生薬の調和に向けた研究活動は、日・中・韓・ベトナム・シンガポール・オーストラリア・香港に拡大し薬局方調和の組織の結成（FHH）へと発展した。調和の実効をあげるために科学的な生薬の評価を共通認識する作業を進めているが、検討項目の一つとしてブシの規格法設定を試みた。また、生薬の原料である薬用植物の栽培法の基準策定が世界的な重要課題となったため、Good Agriculture Practiceの日本案原案を作成した。FHH会議で本案と中国案の討議を進める一方、これらを基にWHOのGAPガイドライン作成準備委員会に出席し原案の創出を行った。

#### A. 研究目的

医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）や薬局方検討会議（PDG）等、日・米・欧三国間での調和会議が進められていて、PDGの進捗状況は日本薬局方フォーラムに逐次報告されている。生薬に関しては、共通生薬が圧倒的に多い中国の薬典との調和に関する研究を優先させてきた。しかし、自国の薬局法を持つ韓国、ベトナムの2カ国と中国生薬製剤を利用しているシンガポール、香港及びオブザーバーとしてオーストラリアの研究者が日中生薬規格調和会議に参加を希望してきた。そこで中国との2カ国間研究を拡大し、Forum for Harmonization of Herbal Medicines（FHH）を発足させ新たな研究を開始している。本年度はFHH参加国が共通して使用しているながら試験法が未整備であったブシについて検討を開始した。

一方、これまで生薬の原料である薬用植物は大部分を野生植物の採取に依存してきたが、環境の大きな変化により資源の枯渇が現実化している。そこで、これらの薬用

植物の栽培化と望ましい採取方法についての国際基準の作成がWHOにより計画された。既に、日本は10年前から厚生省により栽培と品質に関するガイドラインを作成している。WHOはこれを各論部分に相当するものと評価し原案作成準備会への参加を要請してきたので新たに総論部分を作成し、これらを英語版に翻訳し準備会の討議資料とした。

#### B. 研究方法

##### 1. ブシの規格—確認試験法—の検討

材料および方法：基原植物として *Aconitum carmichaeli* Debx. *A. japonicum* Thunb. であることから、2種を規定した。栽培地域の違いとして筑波、北海道、中国（加工処理）の試料を用いた。ブシには毒性の強いジエステルアルカロイドであるアコニチン、メサコニチン、エサコニチン、ヒパコニチンを含み、修治を行うことにより低毒性のモノエステル体に変わる。HPLCでの定量試験においてジエステル体とモノエステル体8成分の同時定量は困難であることから、定量試験ではジエステル体で

安全性を証明し、有効性は比色定量法による総アルカロイド量を規定しさらに TLC による確認試験でモノエステル体を検出することとして検討を進めており、先ず初めに確認試験法の作成を行った。

試料調整方法： 試料を粉碎後、1 g を量り取り、エーテル 7ml、強アンモニア水 0.7ml を加え、室温で 10 分間振とうする。その後、遠心分離を行い、エーテル層を約 10 分の 1 まで濃縮し、試料溶液とする。TLC プレート上に 10  $\mu$ l をスポットする。検出にはドラージェンドルフ試液を用いる。

## 2. GAP各論の英語版作成

総論部分は日本の状況を踏まえて新たに原案を作成した。特に農薬については薬用植物の栽培に必要な品目の指定に関して農林水産省と協力し法整備に向けて相互にデータの交換を行っている。各論は「薬用植物 栽培と品質評価」NO. 1-10 を参考に、植物名、利用部位、植物の性状、生薬の特徴および産地、栽培種の特性、栽培法、生薬の品質評価、特性分類表、栽培暦、資料を取り入れている。実施の際の記録事項や教育・広報に関しては栽培者の意見を反映すべく情報を収集している。これらを英語版とした後、WHOガイドライン作成準備会でFHH・GAP Working Groupでは日・中のGAP原案の紹介と韓国・ベトナム・シンガポール・香港を加えて意見交換を行った。

## C. 研究結果

### 1. ブシの規格—確認試験法—の検討

薄層板の種類および展開溶媒の検討：NH-シリカゲル、順層シリカゲル、ODSを各種展開溶媒を用いて検討した。検出にはUV (254nm)、ドラージェンドルフ試液を検討した。

NH-シリカゲルを用いると、ジエステル、モノエステルともによく分離するため、修治の有無、安全性の評価に有効。しかし順層シリカゲルプレートに比べ感度が劣る。順

層シリカゲルプレートは感度が良いが、いかなる展開溶媒を用いてもジエステル類とモノエステル類の判別が不明瞭であり、修治有無の評価に不適である。ベンゾイルメサコニンが指標物質となりうることがわかった。順層シリカゲルにおいて同一条件ですべてのアルカロイドを分離するのは困難である。さらに条件等を現在検討している。

## 2. GAP各論の英語版作成

当初 GAP と GFCP に分かれていた原案は 2002 年 10 月の Geneva 会議で GACP (Good Agriculture and Field Collection Practices) に統一された。国内の Field Collection については今後検討を深める予定である。

## D. 考察

ブシは猛毒性であるため医薬品として使用するには減毒加工が必須である。永い歴史の上で加工調製法は伝統的な秘法となっているため、中国における技術は推測の域を脱しえない。しかし、定性、定量機器の進歩により品質の試験法は格段と向上してブシにおいても規格設定が可能となってきた。性質の異なる多数のアルカロイド成分について試験法を規格化することは容易なことではないので更なる検討が必要である。GACPについては15年7月に原案検討会が開催される予定である。WHO参加国から各国の実情に合った意見が交換され実効あるガイドラインの作成が希望される。

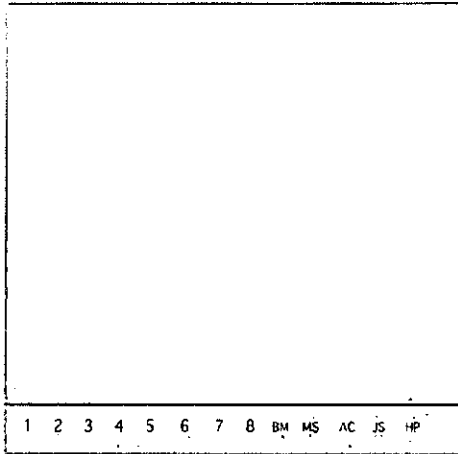
## E. 研究発表

佐竹元吉, 瀧野裕之, 飯田 修, 川原信夫, 合田幸広, 関田節子: 日本の GACP と WHO 及び FHH における国際調和, 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 2003

## F. 知的所有権の取得状況

なし





シリカゲルプレート (Merck)

展開溶媒 : 1-PrOH:H<sub>2</sub>O:AcOH=7:2:1

検出 : ドラーゲンドルフ試液

試料1-2 : ハナトリカブト, (筑波栽培  
試験場)、試料3 : ハナトリカブト (北  
海道産)、試料4 : 炮附子 (U社、中国  
産)、試料5 : 炮附子 (U社)、  
試料6 : 附子 (U社)、  
試料7 : 修治ブシ末N (T社)、  
試料8 : 加工ブシ末 (X社)



厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

理化学試験法の改正と国際調和に関する研究

近赤外分光法の応用研究を中心として

分担研究者 中村 洋 東京理科大学薬学部教授

厚生労働科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)  
分担研究報告書

理化学試験法の改正と国際調和に関する研究  
—近赤外分光法の応用研究を中心として—

分担研究者 東京理科大学薬学部薬教授 中村 洋

**研究要旨** 第十四改正日本薬局方(日局 14)施行後に発足した日本薬局方部会において、来るべき第十五改正日本薬局方の作成方針が策定され、国際調和の推進、最新分析法の積極的導入などを含む 5 本の柱が設定された。今年度は、米国製薬業界で最近インラインプロセス分析に使われ始めた近赤外分光法(near infrared spectrometry, NIRS)に着目し、日局 15 における一般試験法への導入をも睨んで、NIRSによる薬品鑑別の可能性について検討した。その結果、構造が比較的簡単な医薬品については、ろ紙上に置かれた粉末状の医薬品の 1 次微分スペクトルを測定することにより、それらの定性・定量が可能であることが示された。

**A. 研究目的**

本研究は、ICH(医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議)や PDG(薬局方検討会議)を軸とした国際調和の流れの中で鮮明になってきた課題や日本薬局方自身が抱える課題のうち、一般試験法(理化学試験法)の充実と国際化を目的とする研究の一環をなすものである。本年度は、日局に採り入れるべき最新分析法のうち近赤外分光法に着目し、その応用研究についての検討を行う。

現在、近赤外分光法(NIRS)は化学、生物学などの分野から農業・食品分野、医学・薬学分野、化学工業などの広い範

囲に及んで利用されている<sup>1)~3)</sup>。特に、農業、食品及び医療などの分野や石油化学分野では比較的新しい品質評価法としての期待が大きい<sup>4)~6)</sup>。一方、大家ら<sup>7)</sup>は近赤外光度法を応用した医薬品の定量として混合末中のセファクロルの迅速定量を行った。本研究は、このように広い範囲で利用されている近赤外分光法を鑑識科学分野へ応用することを目的とする。今回は、医薬品分析への NIRS の展開を図る目的で、アセトアミノフェン、フェナセチン、フェノール、アセトアニリドを用いた基礎的な検討結果について報告する。

## B. 研究方法

### 1. 試薬類, 装置

**試薬:** 日本薬局方アセトアミノフェン (丸石製薬)、日本薬局方フェナセチン (岩城製薬)、試薬特級フェノール (和光純薬)、元素分析用アセトアニリド (MERCK) を購入し、精製することなくそのまま使用した。それらの構造式を Fig.1 に示す。各試薬のメタノール溶液を Table 1 に従って調製した。ろ紙(No.2, ADVANTEC)を使用した。

**NIRS 装置:** InfraAlyzer500 (BRAN+LUEBBE)

**ソフトウェア:** SESAME (BRAN+LUEBBE)

### 2. サンプル調製

Table 1 に従って調製した試料溶液 0.3mL をサンプルセルの測定部 (直径 1.9cm) に合わせて切りぬいたろ紙上に滴下し、自然乾燥させた (Fig.2)。乾燥確認後、測定を行った。なお、ブランクには同様のろ紙に、メタノールを滴下し自然乾燥したサンプルを用い、各濃度では 5 サンプルずつ作製した。

### 3. 評価用サンプル (未知サンプル) 中のアセトアミノフェンの定量

評価用サンプル (ここでは未知サンプル, Sample X と表示する) として、武田薬品工業のタイレノール錠を用いた。タイレ

ノール 1 錠はアセトアミノフェン 300mg を含有するが、これを乳鉢・乳棒で粉末化し、そこにメタノール 6mL を加えて 1 時間静置し評価用の試料溶液とした。測定時には、その上清 0.3mL を滴下量とし、他の操作は 2-2 と同様としたが、サンプル数は 3 とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1. NIRS スペクトルの測定結果

構造の似ている化合物について、共通する吸収帯・固有の吸収帯を確認する意味で、上記 4 種の芳香族化合物を選択した。

#### 1-1. 各試薬の 1 次微分スペクトル

得られた各試薬のスペクトルを比較したが明確な差が認められなかった。そこで、1 次微分を施したスペクトルでの検討を試みた (Fig.3, Fig.4)。いずれについても、ブランク、1、5、10、20、30mg の計 6 種類のスペクトルを同時に示してあり、各濃度とも 5 サンプルを平均したスペクトルである。なお、Fig.3 上段はアセトアミノフェン、下段がフェナセチン、Fig.4 では順にフェノール、アセトアニリドのスペクトルである。

#### 1-2. 吸収帯の確認及び比較

文献<sup>4)</sup>をもとに各吸収帯の帰属を考察した。

① 吸収帯 (1112~1160 nm)

水酸基によると考えていたが、 $\text{-OH}$ を有しないアセトアニリドにも見られた。フェノールにも見られたことから、フェニル基に起因すると考えられる。実際、フェニル基は 1130~1140 nm に吸収を持つが、この吸収帯がフェナセチンに見られない理由は不明である。

② 吸収帯 (1400~1430、1630~1710 nm)

4つ全ての化合物で見られたので、フェニル基に起因すると考えられる。

③ 吸収帯 (1620~1630、2000~2020、2130~2160 nm)

フェノールのみで見られないので、第2級アミドによると考えられる。

④ 吸収帯 (1710~1800 nm)

フェノールのみで見られないので、メチル基によると考えられる。

⑤ 吸収帯 (2160~2170 nm)

全ての化合物で見られるので、フェニル基によると考えられるが、同時にアミドによる吸収帯も現れる<sup>4) 5)</sup>ので容易に帰属を行うことはできないと考えられる。

⑥ 吸収帯 (2310~2330、2420~2460 nm)

ピークの形から、アセトアミノフェンとフェノール、フェナセチンとアセトアニリドの2つに分けられる。この2つのグループの違いは水酸基の有無であることから、 $\text{-OH}$ による吸収帯と考えられる。またこの波長域に  $\text{CH}$  の吸収帯も現れる<sup>4) 5)</sup>ので、帰属は困難である。

## 2. 錠剤中アセトアミノフェンの定量

### 2-1. データ処理及び検量線作成

2-2 で得られたスペクトルに対し2次微分を施したスペクトルを Fig.5と Fig.6に示す。このうちアセトアミノフェン (Fig.5 の上段) において、1136、1568、1640、2152nm の4つの波長における2次微分値をもとに、検量線を作成した。それらを Fig.7 に示す。この結果、1136nm における値を用いた場合に検量線の相関係数が 1 に最も近くなり、精度よく定量できることが分かった。

### 2-2. 評価用サンプルのスペクトル測定

Fig.8 にサンプル X の2次微分スペクトルを示す。上段はサンプル X のスペクトルとブランク、下段はさらにアセトアミノフェン 10、20、30mg のスペクトルを付け加えたものである。ピーク的位置を見ても、アセトアミノフェン単独のときと非常に似ていることがわかる。

### 2-3. 定量結果

ろ紙上の Sample X に含まれるアセトアミノフェンの定量結果を Table 2 に示す。4つの測定波長のうち、1136nm が正確な結果を与えた。

## D. 結 言

2-2 より共通の構造に起因する吸収帯でも、化合物ごとに差があることが分かった。

文献<sup>4) 5)</sup>に記載されていない波長域での吸収帯は、ろ紙を構成する成分であるセルロースとの水素結合が考えられる。差スペクトルをとることが最善の策であると考えられるが、現在用いているソフトウェアではその処理を行うことが不可能である。また、今回作成したサンプルのろ紙上の薬物量は 1mg が最小量であったが、さらなる微量分析及び高感度の分析を行うには実験方法の改善が必須であると考えられる。具体的には、サンプルセルに直接試薬溶液を滴下・自然乾燥させるという方法、試薬を粉末のまま測定する方法を検討中である。まずは、ろ紙を用いた場合との吸収帯の比較を行うべきと考えている。

一方で、NIRS の特徴である非破壊分析を考慮するならば、固体試薬を溶液にすることは適当でなく、少量のサンプルが高感度に測定を行えるように改善する必要がある。今回は、サンプルセルへの充填の不均一性を消去することを目的にろ紙を用いた方法を取り上げたが、微分処理を施すことでその影響を軽減できるという報告<sup>6)</sup>があるので、今後の検討がまたれる。

定量結果については、理論上、ろ紙

上には 15mg のアセトアミノフェンが存在するはずであり、1136nm における検量線を用いたときに最も正確に定量することができたが、微量分析の観点において 1136nm が最も分析感度が良いかどうかは不明である。一方で、4 波長について言えることであるがメタノールに溶解する錠剤中の物質(賦形剤など)による影響も考えられるので、今後は混合物についても検討する必要がある。

大家ら<sup>7)</sup>は 2 次微分スペクトルを用いて混合末中セファクロルの定量を行ったが、我々は 4 種の類似化合物のついて 1 次微分スペクトルにより官能基の帰属の考察を、2 次微分スペクトルにより錠剤中アセトアミノフェンの定量を行った。固体試薬を溶液にし、ろ紙上に滴下・乾燥させたものをサンプルとすることにより、微量の固体試薬でも測定が可能でありサンプルセルへの充填がより均一に近いと言えることを見出した。本研究は近赤外分光法を鑑識科学に応用することを目的として錠剤中に含まれる主剤の定性・定量を試み、高用量の薬物量(10-30mg)であれば異同識別が可能であることを見出した。しかし、「微量分析および異同識別」の観点から考察すると、ろ紙上の薬物量が 1mg でも不十分であり、現状では感度不足の感は否めない。今後は、本法の一層の高感度化が課題である。

#### E. 参考文献

- 1) 尾崎幸洋:ぶんせき、1997, 56.
- 2) 河野澄夫:ぶんせき、1994, 75.
- 3) 田辺和俊、上坂博亨、南 幸男、三井利幸、大崎一男:第 57 回分析化学討論会講演要旨集、p.98(1996).
- 4) 岩元睦夫、河野澄夫、魚住 純:近赤外分光法入門、幸書房(1994).
- 5) 尾崎幸洋、河田 聡:近赤外分光法、学会出版センター(1996).
- 6) 相島鉄郎:ケモメトリックスー新しい分析化学ー、丸善(1992).
- 7) 大家 洋、永井真澄、澤田 実、金谷充清:分析化学、1988, 128.

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

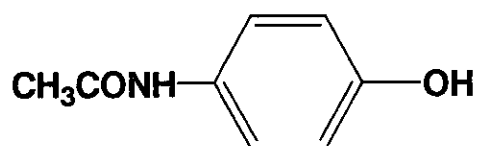


Table 1 Preparation of Samples for NIRS

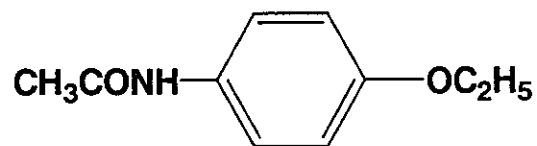
Compound	Concentration	Applied vol. (mL)	Applied amount (mg)
Acetaminophen	10.3mg/3mL	0.3	1.03
	50.2mg/3mL	0.3	5.02
	98.9mg/3mL	0.3	9.89
	207.5mg/4mL	0.4	20.75
	301.0mg/4mL	0.4	30.10
Phenacetin	9.7mg/3mL	0.3	0.97
	50.7mg/3mL	0.3	5.07
	103.6mg/3mL	0.3	10.36
	202.1mg/4mL	0.4	20.21
	304.1mg/4mL	0.4	30.41
Phenol	9.3mg/3mL	0.3	0.93
	49.1mg/3mL	0.3	4.91
	103.2mg/3mL	0.3	10.32
	215.8mg/4mL	0.4	21.58
	294.0mg/4mL	0.4	29.40
Acetanilide	9.9mg/3mL	0.3	0.99
	51.7mg/3mL	0.3	5.17
	105.2mg/3mL	0.3	10.52
	196.1mg/4mL	0.4	19.61
	309.2mg/4mL	0.4	30.92

Table 2 Determination of acetaminophen in Sample X by second derivative NIRS

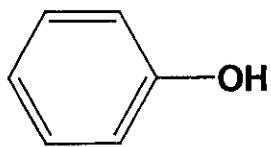
Wavelength (nm)	No.	Value of second derivative		Amount of acetaminophen (mg)	Mean (mg)
		Sample X	Filter paper		
1136	1	0.00002		15.36	15.36
	2	0.00002	-0.00001	15.36	
	3	0.00002		15.36	
1568	1	0.00001		13.72	13.72
	2	0.00001	-0.000004	13.72	
	3	0.00001		13.72	
1640	1	0.00009		14.05	16.69
	2	0.00011	-0.000006	16.69	
	3	0.00013		19.33	
2152	1	0.00009		16.92	18.79
	2	0.00010	0.000002	18.79	
	3	0.00011		20.65	



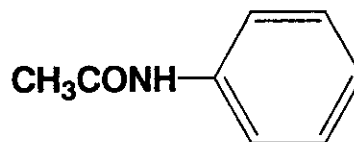
**Acetaminophen**



**Phenacetin**

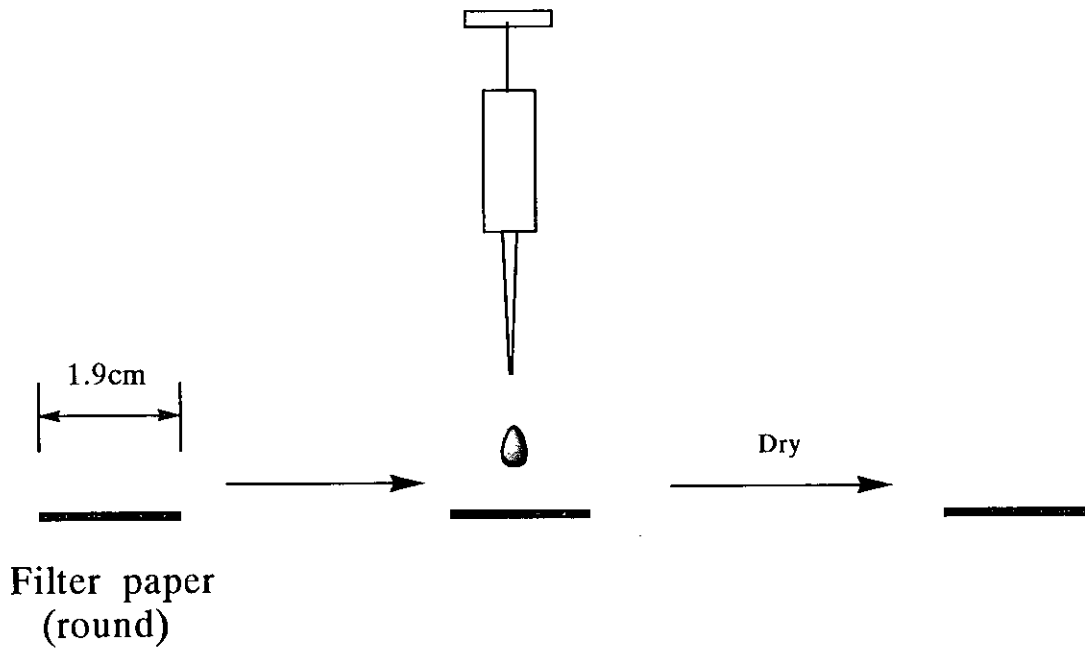


**Phenol**



**Acetanilide**

**Fig.1 Structures of acetaminophen, phenacetin, phenol and acetanilide**



**Fig.2 Sample preparation for NIRS**