

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

麗沢通気湯の品質評価に関する研究

麗沢通気湯は、平成 17 年度末に報告された「新一般用漢方処方の手引き案」において追加収載を提案された処方である。本研究では、新規処方の規格設定において生じる問題点を明らかにする目的で、構成生薬の確認試験について検討した。その結果、14 種類の麗沢通気湯構成生薬のうち、平成 19 年度の本研究事業において報告した 3 種類の生薬（葛根、生姜、黄耆）に加えて、大棗を除く 10 種類（甘草、麻黄、山椒、蒼朮、羌活、白芷、防風、升麻、葱白及び独活）について TLC を用いた確認試験案を提示することができた。また、glycyrrhizin、puerarin 及び ephedrine を指標成分として、逆相 HPLC による成分定量法案を提示することができた。

A. 研究目的

平成 21 年 6 月の改正薬事法施行を目前に控え、一般用医薬品を利用したセルフメディケーションの重要性に改めて国民の注目が集まっている。改正薬事法施行後に、一般用医薬品はリスクの程度に応じて第 1 類より第 3 類に分類され、薬剤師や登録販売者による適切な情報提供のもとに販売されることになる。一般用漢方製剤は第 2 類に分類される予定であるが、このクラスは「副作用・相互作用などの項目で安全性上、注意を要するもの」、すなわち、「副作用等により日常生活に支障を来す程度の健康被害が生ずるおそれがある医薬品」が属するものである。今回の薬事法の改正は、購入者の視点に立ち、適切な一般用医薬品を選択する環境を整えることに資するものであるが、それに伴い、一般用医薬品の製造販売に際し、その有効性及び安全性をいかに担保し、品質をいかに確保していくか、という問題が今後益々重要になるものと思われる。

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（85 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。これを引き継いだ本研究事業では、平成 19 年度末に、「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」を報告している。そして、この手引き案（改訂版）を基礎として、厚生労働省一般用医薬品部会において一般用漢方処方の見直しが審議され、平成 20 年 9 月 30 日に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として、「一般用漢方製剤承認基準の制定について」（薬食審査発第 0930001 号）が発出され、昭和 40 年代末に公表された一般用漢方処方 210 処方の承認審査内規は、多くの見直しと共に、内規から通知へと格上げされた。

今回の通知は、従来の 210 処方に関して見直したものであるが、新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）において新規追加が提案された 85 処方についても、今後順次検討されていくものと期待されている。そして、これらの新規処方が実際に一般用医薬品として流通するためには、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することが重要である。

日本薬局方は、5 年ごとに改訂される。従って、局方収載生薬については、ある程度現代の科学水準が反映された規格が担保されていると言える。中間製品あるいは最終製品において該当する生薬の含有が確認されれば、製剤の品質は定性的に確保され得る。また、品質の保証された生薬が、製造規格における処方構成通りの分量で使用されている限り、数種の指標成分について中間製品あるいは最終製品中の含量を定量し、一定の規格内に収まることを確認できれば、煎出を含む製造工程における生薬成分の移行率及び収率を確認することができ、製剤の品質は定量的に確保され得る。従って、漢方製剤の適切な品質評価においては、各構成生薬の確認試験及び含有成分の定量法の確立が最重要事項と言える。

本研究では、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、新規追加

候補処方の一つであり、万病回春を原典とし、においがわかりにくい嗅覚異常に効果があるとされ、一般用医薬品として理想的な効能・効果を有す麗沢通気湯を取り上げ、構成生薬の TLC による確認試験について基礎的な検討を行った。既に平成 19 年度の本研究事業の分担研究報告書「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究 麗沢通気湯の品質評価に関する研究」において 3 種類の生薬（葛根、生姜、黄耆）の確認試験案を提案したが、今年度は、黄耆について改良法を提案すると共に、10 種類の生薬（甘草、麻黄、山椒、蒼朮、羌活、白芷、防風、升麻、葱白及び独活）について TLC を用いた確認試験案を提示する。

B. 研究方法

生薬及び試薬

麗沢通気湯構成生薬（黄耆、山椒、蒼朮、麻黄、羌活、白芷、独活、生姜、防風、大棗、升麻、葱白、葛根、甘草）のうち、葱白以外はウチダ和漢薬より日本薬局方規格のものを購入した。葱白は八百屋でネギを購入し、白い偽茎の部分を用いた。生薬確認試験の検討における標準化合物として、liquiritin、astragaloside IV、3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(E)-propenoic acid (= 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid)、(E)-ferulic acid (= 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) 及び [6]-gingerol を和光純薬より購入して用いた。Imperatorin は Toronto Research Chemicals より購入した。煎出、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 及び TLC 溶媒調製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。順相シリカゲル TLC プレートは、MERCK 社のシリカゲル 60F₂₅₄ を用いた。逆相 ODS TLC プレートは、MERCK 社の RP-18 F_{254S} 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

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830 (東京理化工機) を用いて行った。1.5 mL マイクロチューブ等の小さいスケールでの溶媒留去には佐久間製作所の遠心エバポレータ EC-57CS を用いた。HPLC による分析及び分取は、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)

凍結乾燥エキスの調製

麗沢通気湯完全処方エキス : 14 種類の麗沢通気湯構成生薬 (黄耆 4 g、山椒 1 g、蒼朮 3 g、麻黄 1 g、羌活 3 g、白芷 4 g、独活 3 g、生姜 1 g、防風 3 g、大棗 1 g、升麻 1 g、葱白 3 g、葛根 3 g、甘草 1 g) をポット (らくらく煎) に取り、600 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液をナス型フラスコに入れ、-45°C で予備凍結させた後、凍結乾燥させて完全エキスを調製した。

麗沢通気湯一味去エキス : 任意の生薬一つを除いた 13 種類の生薬を用いて、麗沢通気湯完全エキスと同様の操作により調製した。

生薬単味エキス : 麗沢通気湯構成生薬をそれぞれ 20 g ずつポット (らくらく煎) に取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液から凍結乾燥により生薬単味エキスを調製した。

生薬確認試験検討のための試料溶液調製

1) 甘草 (葛根湯確認試験を準用) : 完全処方エキス 40 mg あるいは去甘草処方エキス 40 mg あるいは甘草単味エキス 20 mg をマイクロチュー

ブに取り、水 200 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 200 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して試料溶液とした。

2) 麻黄 (葛根湯確認試験を準用) : 完全処方エキスあるいは去麻黄処方エキス 50 mg をマイクロチューブに取り、水 500 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 500 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物をメタノール 50 μ L に溶かして試料溶液とした。麻黄単味エキスは、20 mg をマイクロチューブに取り、水 200 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 200 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して試料溶液とした。

3) 黄耆 (補中益気湯確認試験を改良) : 完全処方エキス、去黄耆処方エキスあるいは黄耆単味エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水酸化カリウム・メタノール溶液 (1→50) 800 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 500 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取し、遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 60 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。

4) 升麻 (補中益気湯確認試験を改良) : 完全処方エキスあるいは去升麻処方エキス 300 mg をチューブに取り、水 3 mL を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 3 mL を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 100 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。升麻単味エキスは、20 mg をマイクロチューブに取り、水 200 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 200 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 20 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。

- 5) 蒼朮 (補中益気湯確認試験を改良) : 完全処方エキスあるいは去蒼朮処方エキス 300 mg をチューブに取り、水 3 mL を加えて振り混ぜた後、ヘキサン 3 mL を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ヘキサン層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 100 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。蒼朮単味エキスは、60 mg をチューブに取り、水 600 μ L を加えて振り混ぜた後、ヘキサン 600 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ヘキサン層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 60 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。
- 6) 羌活 : 完全処方エキスあるいは去羌活処方エキス 50 mg をマイクロチューブに取り、水 500 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 500 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 50 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。羌活単味エキスは、20 mg をマイクロチューブに取り、水 200 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 200 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して試料溶液とした。
- 7) 防風 : 完全処方エキス、去防風処方エキスあるいは防風単味エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水 600 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 600 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 60 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。
- 8) 独活 : 完全処方エキスあるいは去独活処方エキス 300 mg をチューブに取り、水 3 mL を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 3 mL を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 100 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。独活単味エキスは、30 mg をマイクロチューブに取り、水 300 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 300 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 30 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。
- 9) 山椒 : 完全処方エキスあるいは去山椒処方エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水 600 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 600 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 20 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。山椒単味エキスは、30 mg をマイクロチューブに取り、水 300 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 300 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 30 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。
- 10) 白芷 : 完全処方エキスあるいは去白芷処方エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水 600 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 600 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 20 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。白芷単味エキスは、30 mg をマイクロチューブに取り、水 300 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 300 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 30 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。
- 11) 葱白 : 完全処方エキス、去葱白処方エキスあるいは葱白単味エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水 600 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 600 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取して遠心エバポレータで濃縮乾固させた。残留物にメタノール 60 μ L を加えて溶かし、試料溶液とした。

呈色試薬の調製

展開後のTLCプレートに噴霧する希硫酸、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液、ニンヒドリン試液及びバニリン・硫酸試液については、日本薬局方一般試験法の試薬・試液の項(9.41)に従って調製した。

定量法あるいは成分含量測定法の条件検討

- I) Glycyrrhizin 定量分析法の条件検討：麗沢通気湯完全処方エキス、去甘草エキス、甘草単味エキスの各 5 mg に薄めたメタノール (1→2) 0.5 mL を加え、15 分間振とうし、0.22 μ m メンブレンフィルター (Millipore, Millex-GV) でろ過したものを試料溶液とした。また、glycyrrhizin 1mg を薄めたメタノール (1→2) 10mL に溶かしたものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 10 μ L を HPLC 分析に供し、定量分析法の条件を検討した。
- II) Puerarin 定量分析法の条件検討：麗沢通気湯完全処方エキス、去葛根エキスの各 5 mg、及び葛根単味エキスの 1.5 mg に薄めたメタノール (1→2) 0.5 mL を加え、15 分間振とうし、0.22 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを試料溶液とした。また、puerarin の 1mg/mL メタノール溶液を調製し、これを薄めたメタノール (1→2) で 10 倍に希釈したものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 10 μ L を HPLC 分析に供し、定量分析法の条件を検討した。
- III) Ephedrine 定量分析法の条件検討：麗沢通気湯完全処方エキス、去麻黄エキスの各 5 mg、及び麻黄単味エキスの 0.5 mg に薄めたメタノール (1→2) 0.5 mL を加え、15 分間振とうし、0.22 μ m メンブレンフィルターでろ過したものを試料溶液とした。また、ephedrine chloride の 1mg/mL メタノール溶液を調製し、これを薄めたメタノール (1→2) で 10 倍に希釈したものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 10 μ L を HPLC 分析に供し、定量分析法

の条件を検討した。

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

麗沢通気湯構成生薬の確認試験

麗沢通気湯における生薬確認試験は、局方等に示される定法と同様に、操作が簡便な TLC を用いた分析法の確立を目標とした。麗沢通気湯の完全処方煎出エキス、一味去処方煎出エキス及び単味生薬煎出エキスを水に溶解させ、1-ブタノール、ジエチルエーテル、あるいはヘキサンで分配したのについて、特異的な指標成分を検出できるような条件を模索した。第 15 改正日本薬局方及び第一追補あるいは JP Forum に、漢方処方の構成生薬として、あるいは生薬単味として確認試験法の記載があるものについては、その分析法の準用を念頭に置きつつ、麗沢通気湯処方中での確認試験について検討した。葛根及び生姜については、平成 19 年度の本研究事業分担研究報告書「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究 麗沢通気湯の品質評価に関する研究」に最終案を提示できたので、ここでは大棗を除くその他の 11 種類の生薬について検討した結果を記述する。

1) 甘草確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

標準溶液：Liquiritin のメタノール溶液 (1mg/mL)

試料添加量：完全処方及び去甘草処方は 5 μ L、甘草単味は 1 μ L、liquiritin は 5 μ L

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (20:3:2)

検出方法：希硫酸を噴霧し、105°C で 5 分間加熱

備考：第 15 改正局方収載の葛根湯エキスにおける甘草確認試験を準用した。

完全処方及び甘草単味の試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、liquiritin 標準溶液から得た黄褐色のスポットと色調及び R_f 値 (0.32) が等しく、去甘草処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が甘草確認試験として適用し得ることが分かった (図 1C)。また、このスポットは硫酸噴霧及び加熱の後に紫外線 (主波長 254 nm) (図 1D) あるいは紫外線 (主波長 365nm) (図 1E) の紫外線を照射することにより黄緑色を呈し、より観察が容易となることを見出した。

2) 麻黄確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

標準溶液：Ephedrine chloride のメタノール溶液 (1mg/mL)

試料添加量：各試料 1 μ L ずつ

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (4:2:1)

検出方法：ニンヒドリン試液に 2 秒浸した後、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱

備考：第 15 改正局方収載の葛根湯エキスにおける麻黄確認試験を参考にした。

完全処方及び麻黄単味の試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、ephedrine chloride 標準溶液から得た赤紫色のスポットと色調及び R_f 値 (0.38) が等しく、去麻黄処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が麻黄確認試験として適用し得ることが分かった (図 2C)。このスポットは紫外線 (主波長 254 nm あるいは 365 nm) の照射では検出できなかった (図 2A 及び B)。第 15 改正局方収載の葛根湯エキスにおける麻黄確認試験では、TLC の展開溶媒を 1-ブタノール/水/酢酸 (7:2:1) と規定しているが、ephedrine chloride の R_f 値を上げて見易くするため、1-ブタノール/水/酢酸 (4:2:1) に変更した。

3) 黄耆確認試験の条件検討

試料溶液：アルカリ性メタノール抽出後、1-ブタノール分配画分

標準溶液：astragaloside IV のメタノール溶液 (1mg/mL)

試料添加量：完全処方及び去黄耆処方 10 μ L、黄耆単味は 1 μ L、liquiritin は 5 μ L

固定相：逆相 ODS TLC

展開溶媒：メタノール/水/1-ブタノール/水 (60:30:10:1)

検出方法：メタノールに 2 秒間浸した後、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱

備考：第 15 改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける黄耆確認試験を参考にした。

完全処方及び黄耆単味の試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、astragaloside IV 標準溶液から得た赤褐色のスポットと色調及び R_f 値 (0.44) が等しく、去黄耆処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が黄耆確認試験として適用し得ることが分かった (図 3C)。このスポットは紫外線 (主波長 254 nm あるいは 365 nm) の照射では検出できなかった (図 3A 及び B)。第 15 改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける黄耆確認試験では、アルカリ性メタノール抽出の後にジエチルエーテルで夾雑物を振り取っているが、麗沢通気湯エキスの場合は、このステップを除いても指標成分の検出に支障がないことが分かった。

4) 升麻確認試験の条件検討

試料溶液：ジエチルエーテル分配画分

試料添加量：完全処方及び去升麻処方 5 μ L、升麻単味は 1 μ L、3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(*E*)-propenoic acid 及び (*E*)-ferulic acid の混液は 2 μ L

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/アセトン/水

(20:12:3)

検出方法：希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱

備考：第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける升麻確認試験を参考にした。

第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける升麻確認試験では、1-ブタノールで分配した画分について、3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(*E*)-propenoic acid及び(*E*)-ferulic acidの混液を指標成分とするTLC分析を規定しているが、麗沢通気湯エキスの場合は、様々な溶媒系を検討しても去升麻処方試料溶液において指標成分と同様のR_F値を有する成分が観察された。そこで、3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(*E*)-propenoic acid及び(*E*)-ferulic acidの混液を指標成分とすることを諦め、また、分配する溶媒も1-ブタノールからジエチルエーテルに変更して再検討したところ、希硫酸噴霧後に加熱した条件において(図4C)、完全処方及び升麻単味の試料溶液から得られたR_F値0.45の赤紫色のスポット(図4Cの矢印)は去升麻処方試料溶液からは検出されず、この成分を指標とする本分析条件を升麻確認試験として適用し得ることが分かった。また、このスポットは希硫酸噴霧・加熱後に紫外線(主波長365nm)を照射することにより、さらに観察が容易となることが分かった(図4D)。

5) 蒼朮確認試験の条件検討

試料溶液：ヘキサン分配画分

試料添加量：完全処方及び去蒼朮処方は5μL、蒼朮単味は1μL

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(30:10:1)

検出方法：4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱

備考：第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける蒼朮確認試験を参考にした。

完全処方及び蒼朮単味の試料溶液から得られたR_F値0.23の帯緑褐色のスポット(図5Cの矢印の先)は、去蒼朮処方の試料溶液からは検出されず、この成分を指標とする本分析条件が蒼朮確認試験として適用し得ることが分かった。また、第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける蒼朮確認試験では、シリカゲルTLCの展開溶媒としてヘキサン/アセトン(7:1)を規定しているが、平成19年度の本研究事業分担研究報告書に記載したように、この溶媒ではシャープなスポットを形成しないため、上に示した溶媒に変更した。

6) 羌活確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

試料添加量：各試料1μLずつ

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：酢酸エチル/エタノール/水(8:2:1)

検出方法：紫外線(主波長365nm)の照射

備考：第15改正局方収載の羌活単味生薬の確認試験を参考にした。

紫外線(主波長365nm)を照射した条件において完全処方及び羌活単味の試料溶液から得られたR_F値0.44あるいは0.36の青白色のスポットは去羌活処方試料溶液からは検出されず(図6B)、この成分を指標とする本分析条件が羌活確認試験として適用し得ることが分かった。第15改正局収載の単味生薬羌活の確認試験は逆相TLCによる分析を規定しており、これに従った分析結果は平成19年度の本研究事業分担研究報告書に記載したが、逆相TLCは感度が低いため、羌活が麗沢通気湯エキスの構成生薬として処方中に含まれる場合は、羌活単味の確認試験で指定されている指標成分を検出することは困難であった。

7) 防風確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

試料添加量：各試料1 μ Lずつ

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水
(10:2:1)

検出方法：紫外線（主波長 365 nm）の照射

備考：JP Forum Vol.16 No.3 (2007) 掲載の防風単味生薬の確認試験を参考にした。

紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において完全処方及び防風単味の試料溶液から得られた Rf 値 0.5 の青白色のスポットは去羌活処方の試料溶液からは検出されず（図 7B）、この成分を指標とする本分析条件が防風確認試験として適用し得ることが分かった。JP Forum Vol.16 No.3 (2007) 掲載の防風単味生薬の確認試験では、紫外線（主波長 254 nm）を照射した条件において観察される Rf 値 0.43 のスポットを指標成分に指定しているが、防風が麗沢通気湯エキス構成生薬として処方中に含まれる場合は、このスポットを検出することが困難であった。

8) 独活確認試験の条件検討

試料溶液：ジエチルエーテル分配画分

試料添加量：完全処方及び去独活処方は 5 μ L、
独活単味は 1 μ L

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸
(30:10:1)

検出方法：バニリン・硫酸試液を噴霧し、
105 $^{\circ}$ Cで5分間加熱

備考：第 15 改正局方第一追補掲載の独活単味
生薬の確認試験を準用した。

完全処方及び独活単味の試料溶液から得られた Rf 値 0.49 の赤紫色のスポットは去独活処方の試料溶液からは検出されず、この成分を指標とする本分析条件が独活確認試験として適用し得ることが分かった（図 8C）。平成 19 年度の本
研究事業分担研究報告書には 1-ブタノールで分配した試料溶液についても検討したが、上記の
指標成分の検出感度はジエチルエーテル分配の

方が優れていた。

9) 山椒確認試験の条件検討

試料溶液：ジエチルエーテル分配画分

試料添加量：各試料1 μ Lずつ

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：ヘキサン/アセトン (1:1)

検出方法：紫外線（主波長 254 nm）の照射

備考：第 15 改正局方掲載の山椒単味生薬の確
認試験を準用した。

紫外線（主波長 254 nm）を照射した条件において完全処方及び山椒単味の試料溶液から得られた Rf 値 0.29 のスポットは去山椒処方の試料溶液からは検出されず（図 9A）、この成分を指標とする本分析条件が山椒確認試験として適用し得ることが分かった。また、希硫酸噴霧及び加熱によって、同スポットは暗紫色を呈し、こちらの分析条件も十分に適用可能と考えられる。第 15 改正局方掲載の山椒単味生薬の確認試験では、粉末生薬の含水エタノール抽出画分に対して酢酸エチル/エタノール/水 (8:2:1) を展開溶媒とする TLC 分析を規定しているが、平成 19 年度の本
研究事業分担研究報告書に記載した通り、この条件では多くの成分が抽出され、しかも分離が不良であった。

10) 白芷確認試験の条件検討

試料溶液：ジエチルエーテル分配画分

標準溶液：Imperatorin のメタノール溶液
(1mg/mL)

試料添加量：各試料5 μ Lずつ

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸
(20:10:1)

検出方法：紫外線（主波長 254 nm）の照射

紫外線（主波長 254 nm）を照射した条件において、完全処方及び白芷単味の試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、
imperatorin 標準溶液から得たスポットと Rf 値

(0.4) が等しく、去白芷処方試料溶液からは検出されず、本分析条件を白芷確認試験として適用し得る可能性が示された (図 10A)。ただし、処方あるいは生薬の抽出画分中の該当するスポットが imperatorin であるかどうかの確認は取れていない。

11) 葱白確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

試料添加量：各試料 1 μ L ずつ

固定相：逆相 ODS TLC

展開溶媒：メタノール/水/酢酸 (90:10:1)

検出方法：紫外線 (主波長 365 nm) の照射

紫外線 (主波長 365 nm) を照射した条件において完全処方及び葱白単味の試料溶液から得られた Rf 値 0.43 あるいは 0.31 の黄緑色のスポットは去葱白処方の試料溶液からは検出されず (図 11B)、この成分を指標とする本分析条件が葱白確認試験として適用し得る可能性が示された。また、希硫酸噴霧後に加熱した上で紫外線 (主波長 365 nm) を照射すると、さらに上記 2 つのスポットの色は鮮やかとなるが (図 11D)、希硫酸噴霧及び加熱は必ずしも必要ではないように思われる。

麗沢通気湯の定量法あるいは成分含量測定法

麗沢通気湯における定量法あるいは成分含量測定法は、HPLC を利用して行うものとし、その指標成分候補として、甘草含有の glycyrrhizin、葛根含有の puerarin、及び麻黄含有の ephedrine を選択した。I)~III) に、甘露飲における上記 3 つの指標成分の定量法として適用し得る条件を示す。

I) Glycyrrhizin 定量法の条件検討

第 15 改正日本薬局方収載の葛根湯エキスにおける glycyrrhizin 定量法を参考にして、麗沢通気湯エキスにおける glycyrrhizin の HPLC 分析条件を検討した。麗沢通気湯完全処方エキス由

来の試料は、ODS カラム C-18 を用いた以下の HPLC 分析条件において良好な分離を示し、glycyrrhizin は保持時間約 23 分のピークとして観察され (図 12A)、これに相当する保持時間には、去甘草処方エキス由来の試料においてピークが検出されず (図 12B)、本分析条件が glycyrrhizin 定量法として適用し得ることが分かった。局方収載の葛根湯エキスにおける glycyrrhizin 定量法では 4.6 x 150 mm のカラムを用いているが、この長さのカラムを用いると、去甘草処方エキスの溶出プロファイルにおいて、glycyrrhizin の保持時間 (約 12 分) に相当する位置に他の成分由来のピークが重なった (図 13B)。カラム長を 250 mm に変更したところ、良好な分離が得られた。

検出器：UV 検出器 254 nm

カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 250 mm)

カラム温度：40°C

移動相：酢酸 (31) (1 \rightarrow 15)/アセトニトリル (13:7)

流速：1.0 mL/min

II) Puerarin 定量法の条件検討

第 15 改正日本薬局方収載の葛根における puerarin 定量法を参考にして、麗沢通気湯エキスにおける puerarin の HPLC 分析条件を検討した。麗沢通気湯完全処方エキス由来の試料は、ODS カラム C-18 を用いた以下の HPLC 分析条件において良好な分離を示し、puerarin は保持時間約 11 分のピークとして観察され (図 14A)、これに相当する保持時間には、去葛根処方エキス由来の試料においてピークが検出されず (図 14B)、本分析条件が puerarin 定量法として適用し得ることが分かった。

検出器：UV 検出器 250 nm

カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ

4.6 mm x 150 mm)

カラム温度：40°C

移動相：0.05M リン酸二水素ナトリウム/アセトニトリル (9:1)

流速：1.0 mL/min

III) Ephedrine 定量法の条件検討

第 15 改正日本薬局方収載の葛根湯エキスにおける総アルカロイド定量法を参考にして、麗沢通気湯エキスにおける ephedrine の HPLC 分析条件を検討した。麗沢通気湯完全処方エキス由来の試料は、ODS カラム C-18 を用いた以下の HPLC 分析条件において良好な分離を示し、ephedrine は保持時間約 30 分のピークとして観察され (図 15A)、これに相当する保持時間には、去麻黄処方エキス由来の試料においてピークが検出されず (図 15B)、本分析条件が ephedrine 定量法として適用し得ることが分かった。

検出器：UV 検出器 210 nm

カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μm (φ 4.6 mm x 150 mm)

カラム温度：40°C

移動相：ラウリル硫酸 Na 溶液(1→130)/アセトニトリル/リン酸混液 (650:350:1)

流速：1.0 mL/min

D. 考察

麗沢通気湯は 14 種類もの生薬から構成され、数ある漢方処方の中でも特に構成生薬が多い処方であり、シリカゲル TLC プレート上で多くのスポットを与えるが、大棗を除く 13 種類の生薬について確認試験法となり得る分析条件を見出すことができた。このうち、葛根、生姜、甘草、麻黄及び黄耆については、指標成分をそれぞれ puerarin、[6]-gingerol、liquiritin、ephedrine 及び astragaloside IV と特定することが可能であり、また、白芷についても、今回の実験で指標成分として想定したスポットが、

imperatorin に相当することはほぼ確実と思われる。升麻、蒼朮、羌活、防風、独活、山椒及び葱白については、完全処方エキスと単味生薬エキスに検出され、一味去処方エキスで検出されないという判定基準において指標成分として設定し得るスポットを見出すことができた。今後は、これらの成分を同定することが必要である。指標成分の特定は不十分であるが、日本薬局方あるいは JP Forum において、特定の漢方処方の構成生薬としての確認試験が記載されていない生薬の中で、白芷、羌活、防風、独活、山椒及び葱白について確認試験案を提出できたことは大きな成果である。一方、大棗については目立ったスポットが検出されず、特定成分の濃縮や呈色試薬の工夫等により含有成分を TLC 上で検出することがまず優先事項であると思われる。

今回の確認試験の条件検討では、日本薬局方あるいは JP Forum に確認試験法の記載がある生薬については、その分析法を積極的に参考にするスタンスで臨み、多くの場合において、これらの情報は非常に有用であった。葛根、甘草及び生姜については、局方収載の葛根湯エキスにおける確認試験法をほぼそのまま準用することができた。また、麻黄及び蒼朮については、それぞれ葛根湯エキス及び補中益気湯エキスにおける確認試験法の TLC 展開溶媒を若干変更することで対応可能であった。黄耆及び独活については、それぞれ補中益気湯エキス及び独活単味生薬における確認試験法の試料溶液調製法を若干変更することで対応可能であった。一方、升麻については、補中益気湯エキスの確認試験法で規定されている指標成分を準用することはできず、別に指標成分候補を提案することになった。さらに、羌活、防風及び山椒についても、局方あるいは JP Forum に記載される単味生薬の確認試験の条件とは全く異なる分析法を提案することになった。白芷は局方に収載されているものの確認試験は規定されておらず、葱白は局方あるいは JP Forum に未収載であるため、全く

新規の分析法を提案することになった。

ところで、一般用漢方製剤の製造方法、規格及び試験方法等は医療用漢方製剤の取扱いに準じることとされており、これは、昭和55年6月25日付薬審第804号別添「医療用漢方製剤の取扱いについて」及び昭和60年5月31日付薬審二第120号通知の別紙1「標準湯剤との比較試験に関する資料について」に規定されている。ここでは、2指標成分以上の定量を実施することが義務付けられている。ただし、この規定が適用されてから20年以上が経過した現在、現代の科学水準に基づく品質評価法という観点からすれば指標成分の数は物足りない。また、第15改正日本薬局方において、初めて漢方処方エキスが収載され、ここでは3つの成分を指標とした定量法が規定されている。そこで、本研究においても3つの成分について定量法の条件設定を行った。指標成分として glycyrrhizin、puerarin、及び ephedrine を設定したが、glycyrrhizin と ephedrine は局方収載の葛根湯エキスにおける定量法を、そして puerarin については局方収載の葛根単味生薬の定量法をほぼそのまま準用することができた。ただし、glycyrrhizin については、夾雑ピークの重ならない良好な溶出プロファイルを得るため、カラムの長さを15 cm から25 cm に変更する必要があった。

漢方処方の成分組成は構成生薬が一つ増えただけでも大きく変化する場合があるため、基本的に新規収載候補処方の品質評価法は個別に検討せざるを得ないが、本研究で局方等に既収載の処方あるいは生薬の確認試験法や成分定量法を取り入れたように、麗沢通気湯において見出した分析条件が、麗沢通気湯以外の新規処方の確認試験検討の参考情報として貢献することを期待している。

E. 結論

・麗沢通気湯エキス中の生薬確認試験として、

平成19年度の本研究事業分担研究報告書「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究 麗沢通気湯の品質評価に関する研究」に報告した葛根及び生姜に加え、甘草、麻黄、黄耆、白芷、升麻、蒼朮、羌活、防風、独活、山椒及び葱白について、シリカゲル TLC あるいは逆相 ODS TLC を用いた条件設定案を提示することができた。

・麗沢通気湯エキス中の定量法あるいは成分含量測定法として、glycyrrhizin、puerarin 及び ephedrine を指標成分とする HPLC による分析条件案を提示することができた。

F. 研究発表

1. 学会発表

「新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討(9) 麗沢通気湯の品質評価について」袴塚高志、合田幸広、日本薬学会第129年会(京都)、平成21年3月28日

2. 誌上发表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当

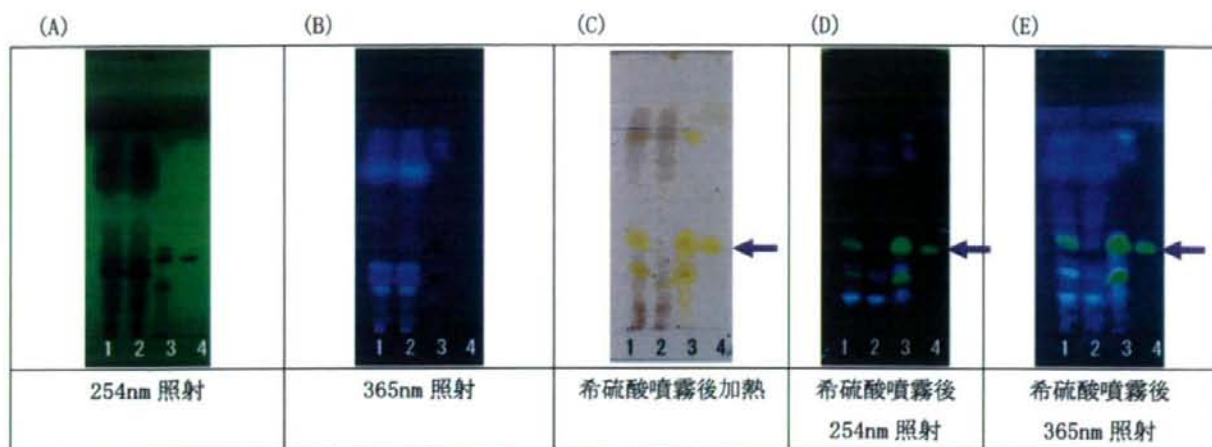


図1 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による甘草確認試験の条件検討
 分析試料: 1…完全処方 2…去甘草処方 3…甘草単味 4…liquiritin
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水 (20:3:2)

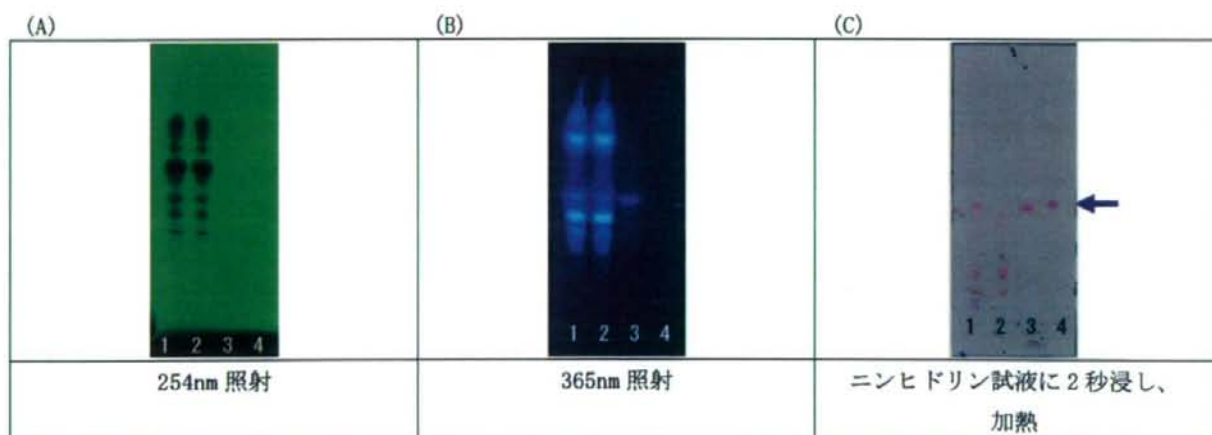


図2 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による麻黄確認試験の条件検討
 分析試料: 1…完全処方 2…去麻黄処方 3…麻黄単味 4…ephedrine chloride
 展開溶媒: 1-ブタノール/水/酢酸 (4:2:1)

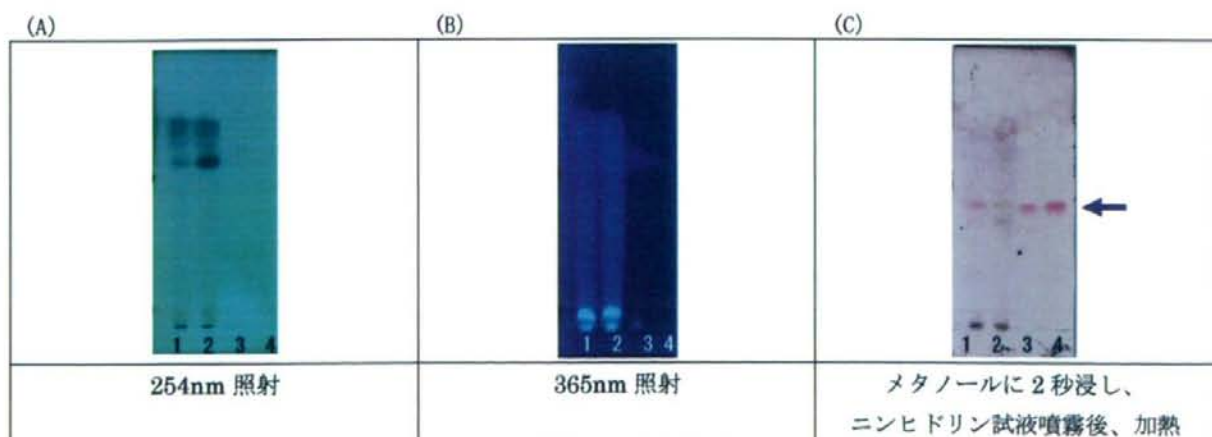


図3 麗沢通気湯エキスにおける ODS TLC による黄耆確認試験の条件検討
 分析試料: 1…完全処方 2…去黄耆処方 3…黄耆単味 4…astragaloside IV
 展開溶媒: メタノール/水/1-ブタノール/水 (60:30:10:1)

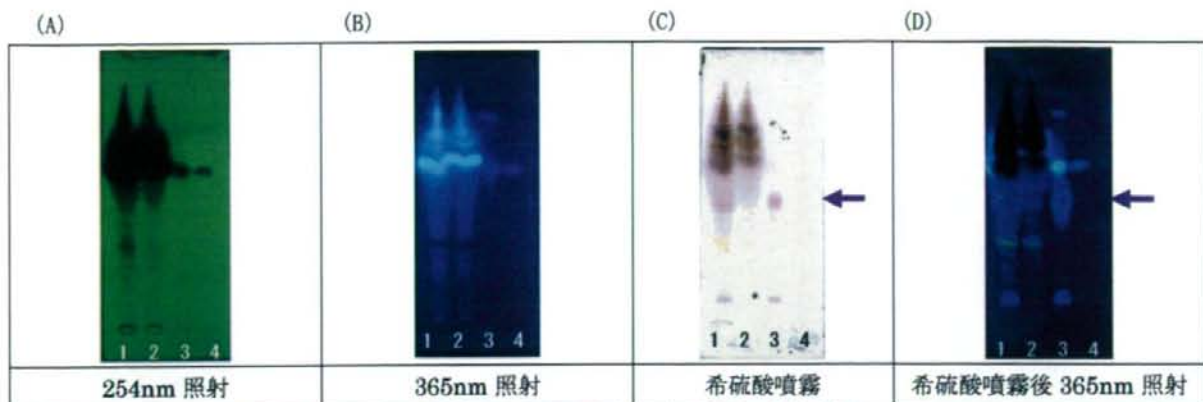


図4 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による升麻確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去升麻処方 3…升麻単味 4…3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(E)-propenoic acid 及び (E)-ferulic acid の混液
 展開溶媒：酢酸エチル/アセトン/水 (20:12:3)

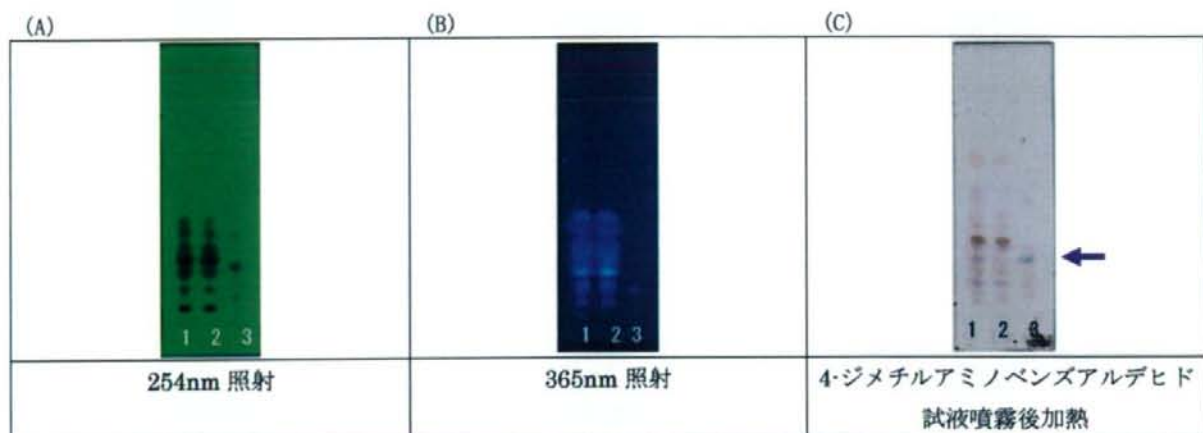


図5 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による蒼朮確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去蒼朮処方 3…蒼朮単味
 展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (30:10:1)

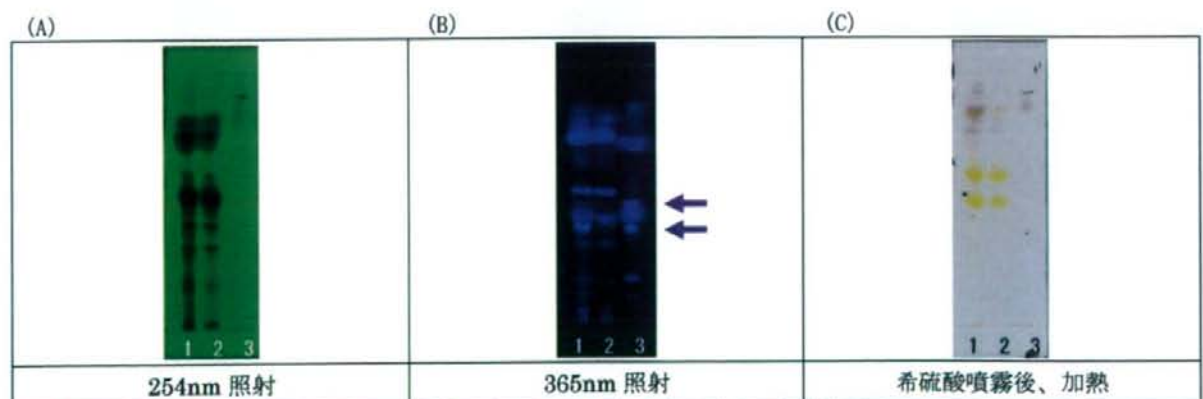


図6 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による羌活確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去羌活処方 3…羌活単味
 展開溶媒：酢酸エチル/エタノール/水 (8:2:1)

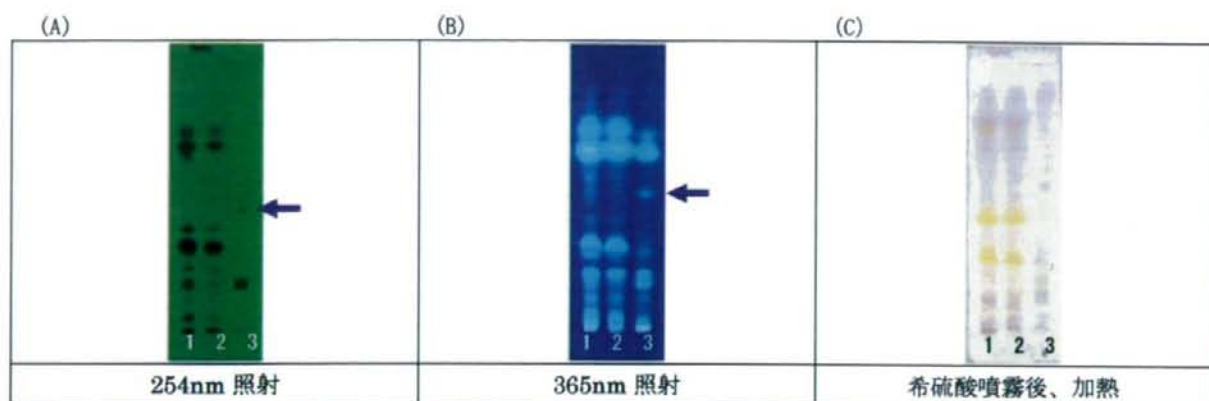


図7 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による防風確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去防風処方 3…防風単味
 展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (10:2:1)

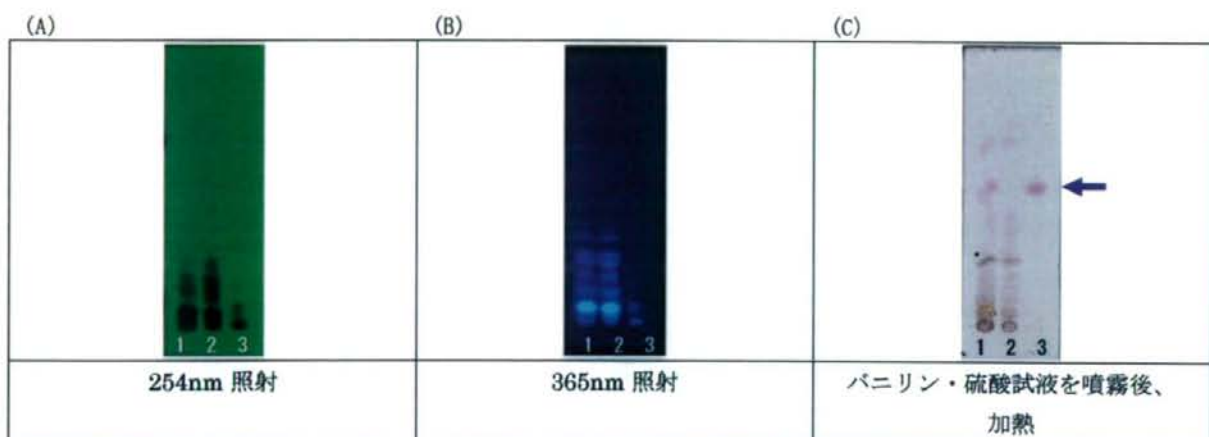


図8 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による独活確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去独活処方 3…独活単味
 展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (30:10:1)

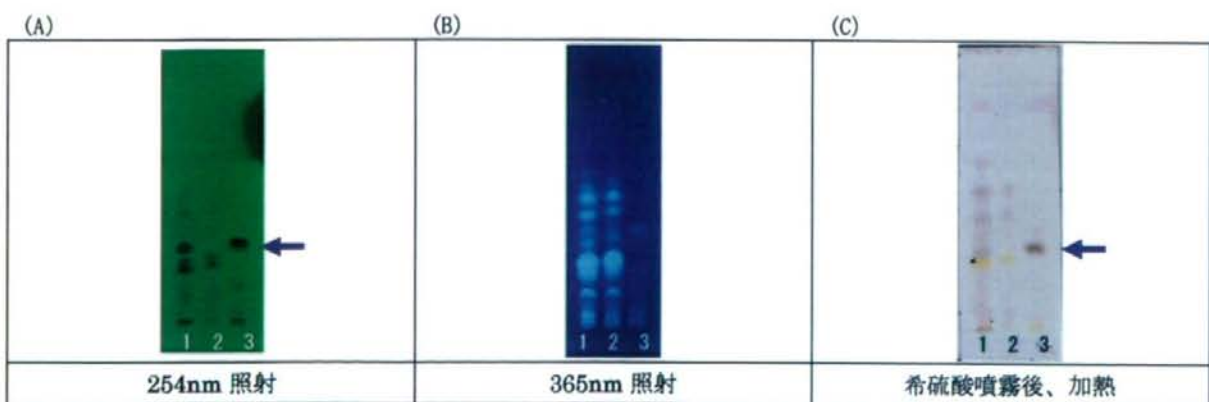


図9 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による山椒確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去山椒処方 3…山椒単味
 展開溶媒：ヘキサン/アセトン (1:1)

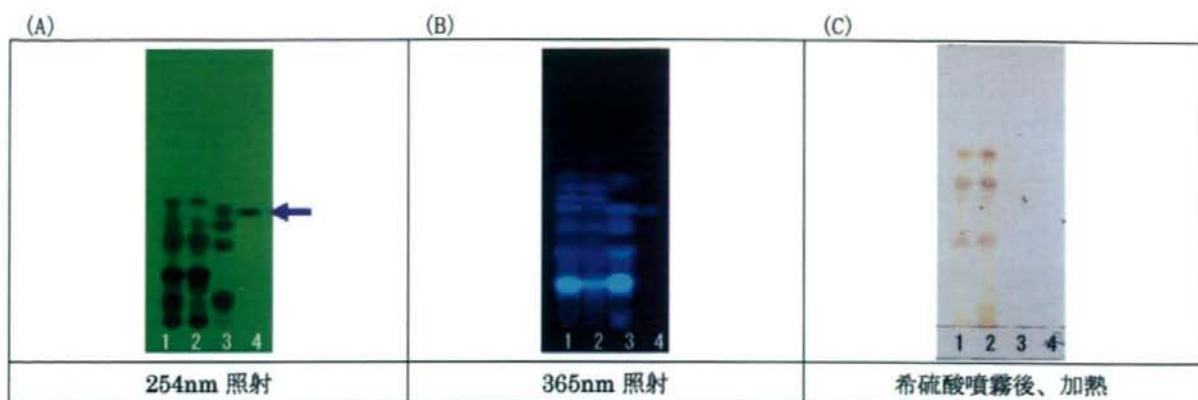


図 10 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による白芷確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去白芷処方 3…白芷単味 4…imperatorin
 展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(20:10:1)

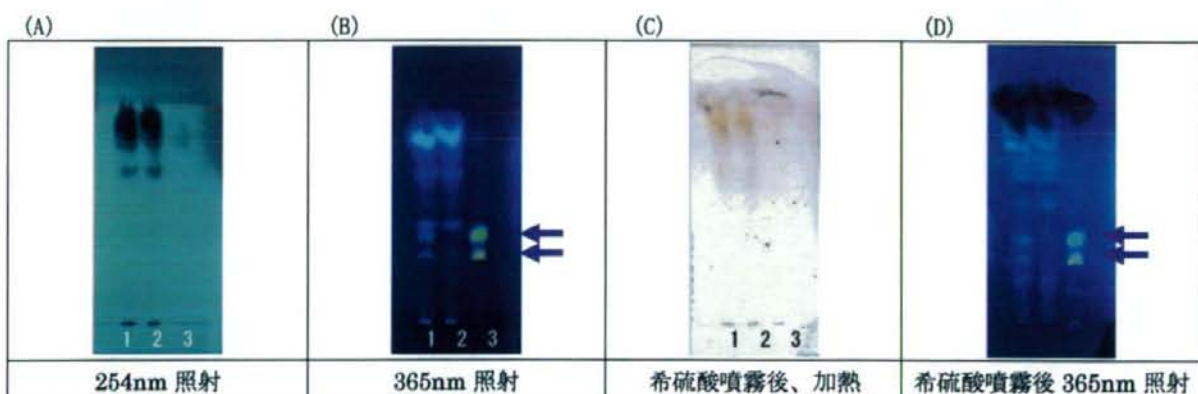


図 11 麗沢通気湯エキスにおける ODS TLC による葱白確認試験の条件検討
 分析試料：1…完全処方 2…去葱白処方 3…葱白単味
 展開溶媒：メタノール/水/酢酸 (90:10:1)

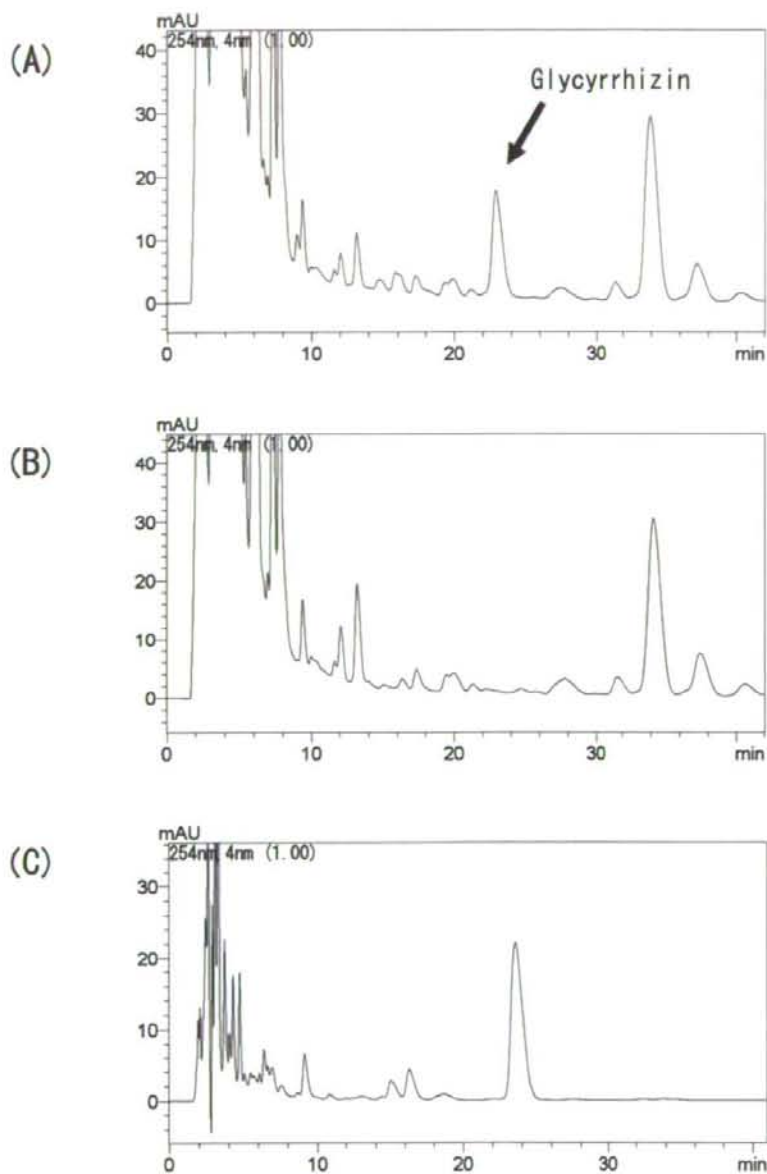


図 12 麗沢通気湯エキスにおける逆相 HPLC による glycyrrhizin の定量分析 (その 1)
 分析試料: (A) 麗沢通気湯エキス、(B) 麗沢通気湯去甘草エキス、(C) 甘草単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 250 mm)
 移動相: 酢酸(31) (1 \rightarrow 15)/アセトニトリル (13:7)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 254 nm、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

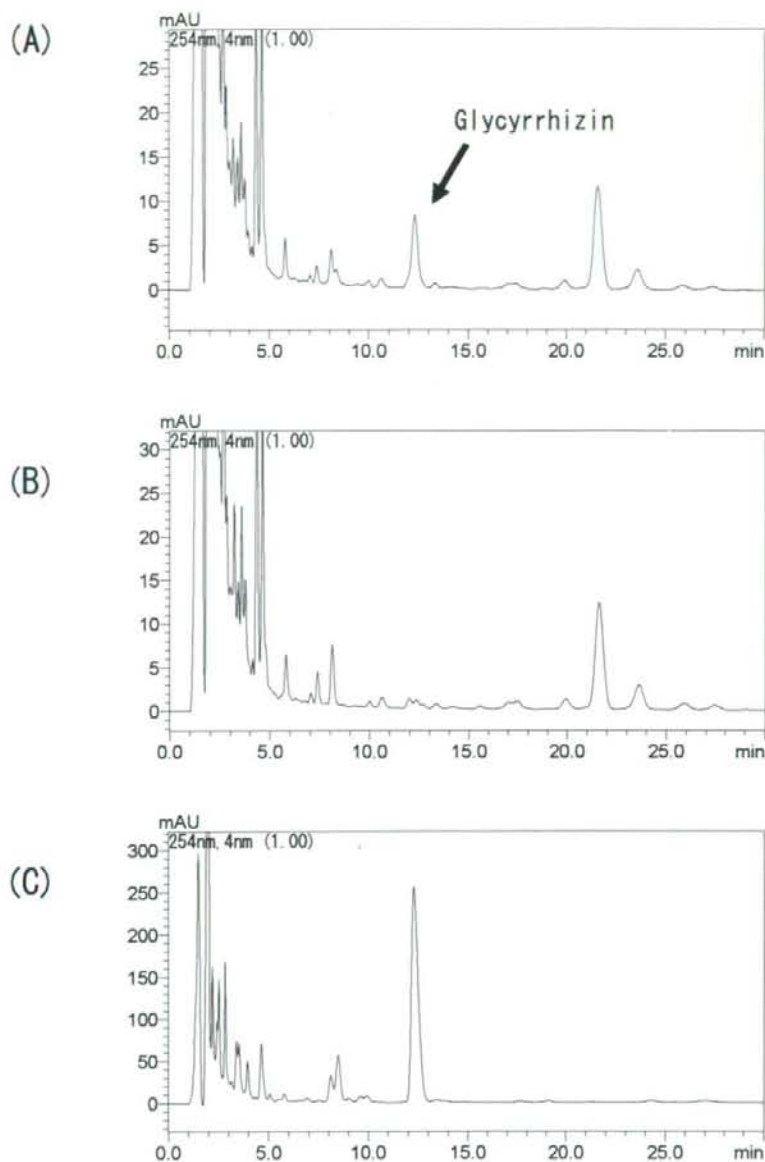


図 13 麗沢通気湯エキスにおける逆相 HPLC による glycyrrhizin の定量分析 (その 2)
 分析試料: (A) 麗沢通気湯エキス、(B) 麗沢通気湯去甘草エキス、(C) 甘草単味エキス
 カラム: Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相: 酢酸(31)(1 \rightarrow 15)/アセトニトリル (13:7)
 流速: 1.0 mL/min、検出波長: 254 nm、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

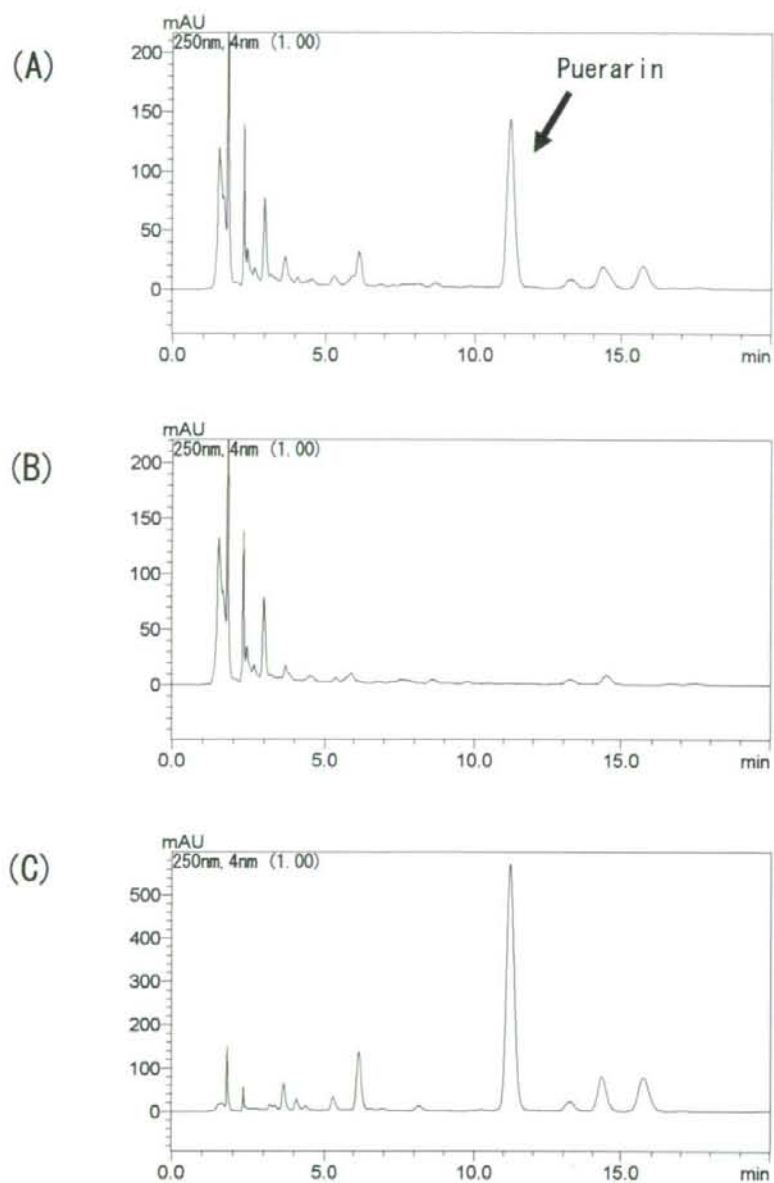


図 14 麗沢通気湯エキスにおける逆相 HPLC による puerarin の定量分析
 分析試料：(A) 麗沢通気湯エキス、(B) 麗沢通気湯去葛根エキス、(C) 葛根単味エキス
 カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相：0.05M リン酸二水素ナトリウム/アセトニトリル (9:1)
 流速：1.0 mL/min、検出波長：250 nm、カラム温度：40 $^{\circ}$ C

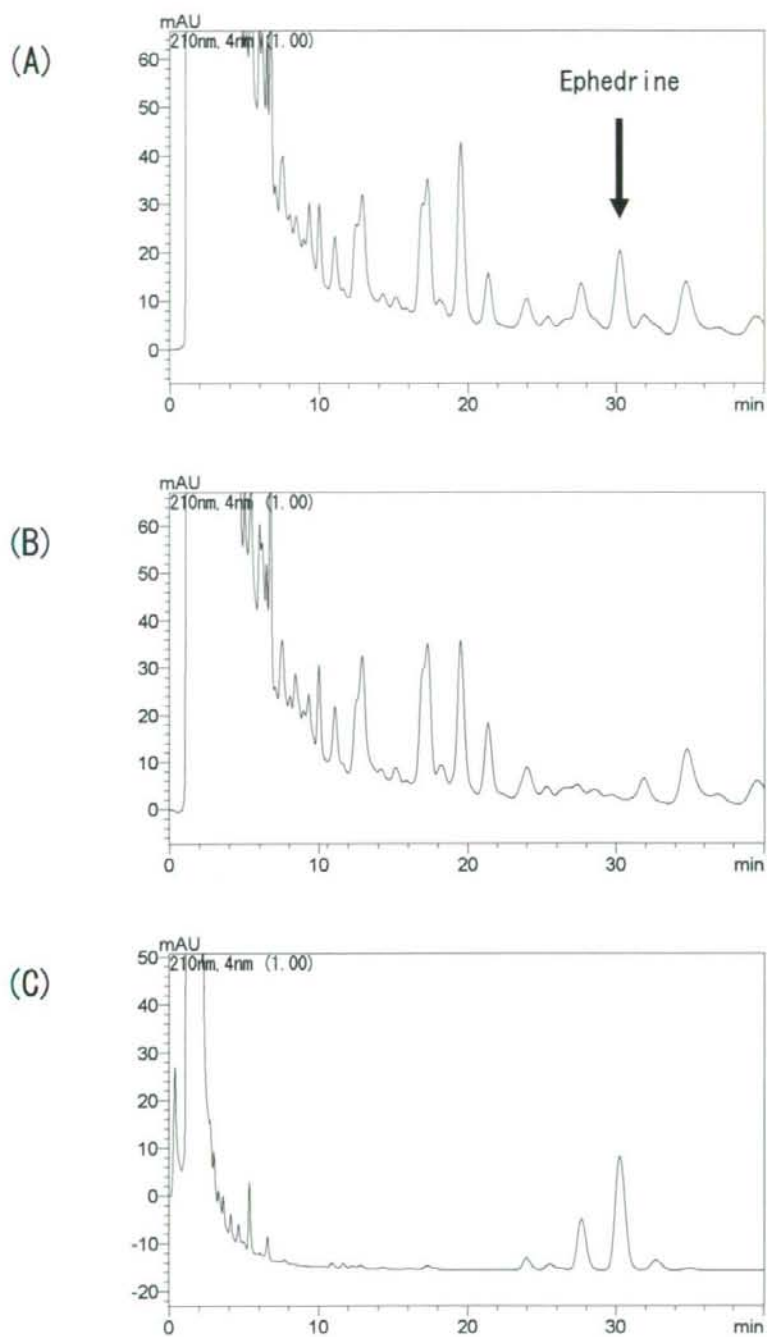


図 15 麗沢通気湯エキスにおける逆相 HPLC による ephedrine の定量分析
 分析試料：(A) 麗沢通気湯エキス、(B) 麗沢通気湯去麻黄エキス、(C) 麻黄単味エキス
 カラム：Phenomenex Luna C18(2) 5 μ m (ϕ 4.6 mm x 150 mm)
 移動相：ラウリル硫酸 Na 溶液(1 \rightarrow 130)/アセトニトリル/リン酸混液 (650:350:1)
 流速：1.0 mL/min、検出波長：210 nm、カラム温度：40 $^{\circ}$ C

分担研究課題 漢方処方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

新一般用漢方処方の腸内細菌の生育に与える影響に関する研究

漢方処方及び生薬エキスの腸内細菌の生育及び有機酸生成に対する影響を検討するため、*in vitro*培養した腸内細菌 *L. reuteri* を用い、顕微鏡観察画像における細菌占有面積より細菌数を自動計測するアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用い、効能・効果として下部消化管への作用が謳われている処方を中心にスクリーニングを行なったところ、*L. reuteri* の増殖を強力に抑制する処方として、大黃甘草湯、麻子仁丸、小承氣湯及び桃核承氣湯を、また、増殖を促進する処方として中建中湯、參苓白朮散、滋血潤腸湯及び大柴胡湯を見出した。

研究協力者

勢ノ康代 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

腸内細菌叢の適切なバランスは、宿主の健康を維持する上で極めて重要である。腸内細菌の多くは生育と共に酢酸、乳酸、酪酸等の有機酸を産生し、腸内の pH を下げて腸内環境を整える。また、生産された有機酸は宿主の腸管細胞よりエネルギー源として利用される。このため、腸内細菌叢の組成解明に関する研究やプロバイオティクス、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢や短鎖脂肪酸含量をコントロールする試み等が、ヒトを含む多くの動物を対象として盛んに行われている。漢方処方の作用発現における腸内細菌の関与も古くから論じられ、腸内細菌に代謝されることにより漢方処方成分の有効性に変化が生じる例はよく調べられている。一方、漢方処方の服用が腸内細菌叢のバランス、腸内細菌の増殖及び短鎖脂肪酸の生産に与える影響に関しては、十分に検討されているとは言い難い。

さて、社会構造及び疾病構造の変化に加えて、

自らの健康に強い関心を持つ国民が増え、軽度な疾病の予防や生活の質の改善、向上等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普及しつつあることを受けて、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、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-」を平成 14 年に発表している。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。

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（85 処方）の追加が検討され、平