

Fig. 4 SIMCA cooman's plot of the Pinellia and Arisaema tubers

Plot name means the sample no.-population no.

Table 1 Details of the samples used in this study.

Sample no.	Voucher ID	Name	Source plant*	Locality
1	Han-U-1	Pinellia tuber	<i>Pinellia ternata</i>	unknown
2	Ten-Toc-2	Arisaema tuber	<i>Arisaema erubescens</i>	Sichuan, China
3	Ten-Toc-3	Arisaema tuber	<i>Pinellia pedatisecta</i>	Hebei, China
8	Ten-Toc-8	Arisaema tuber	<i>Arisaema erubescens</i>	Sichuan, China

*speculated from their *trnL-F* IGS sequence of chloroplast DNA

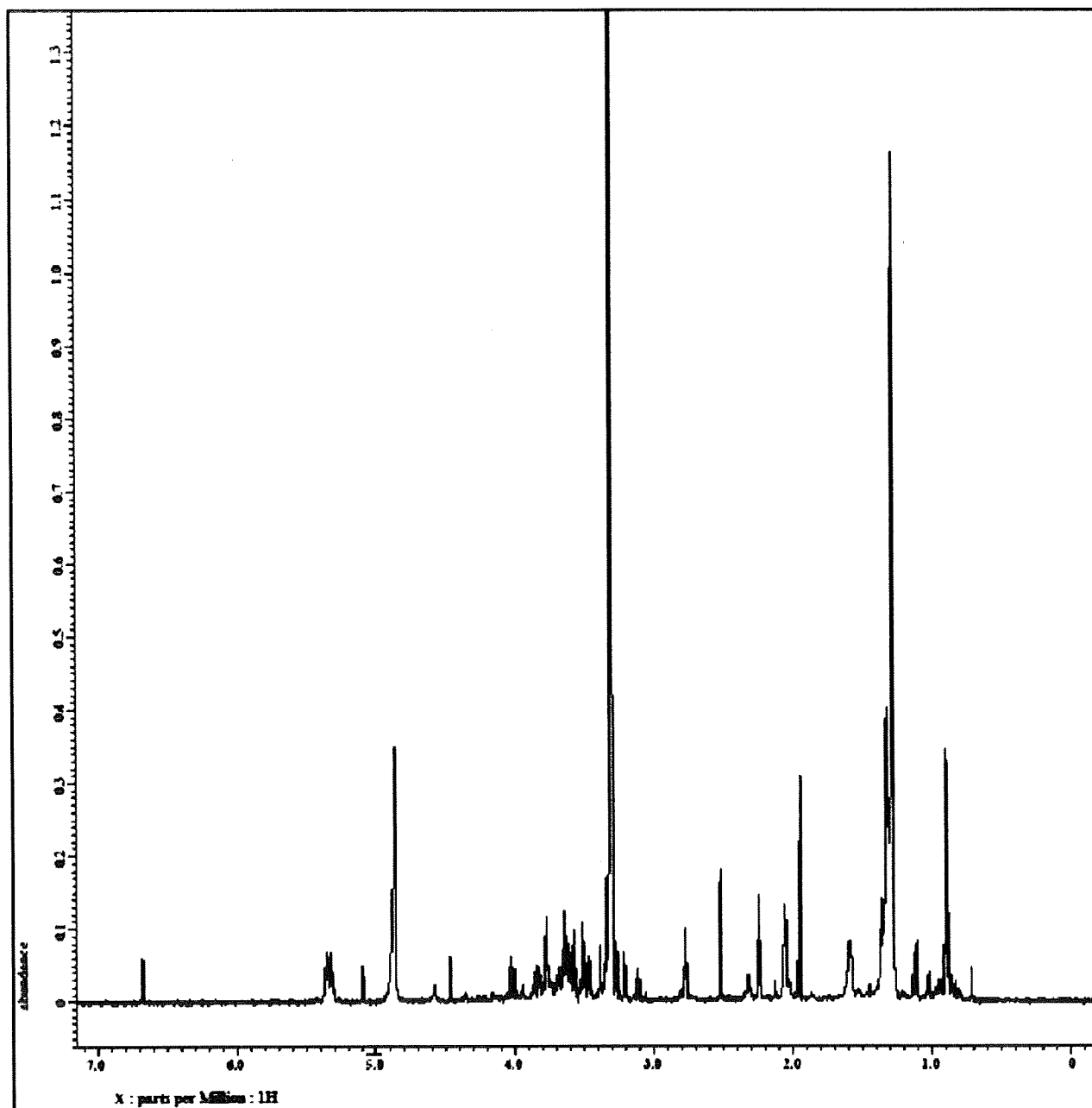


Fig. 1 NMR spectrum of *Pinellia* tuber CD₃OD extract

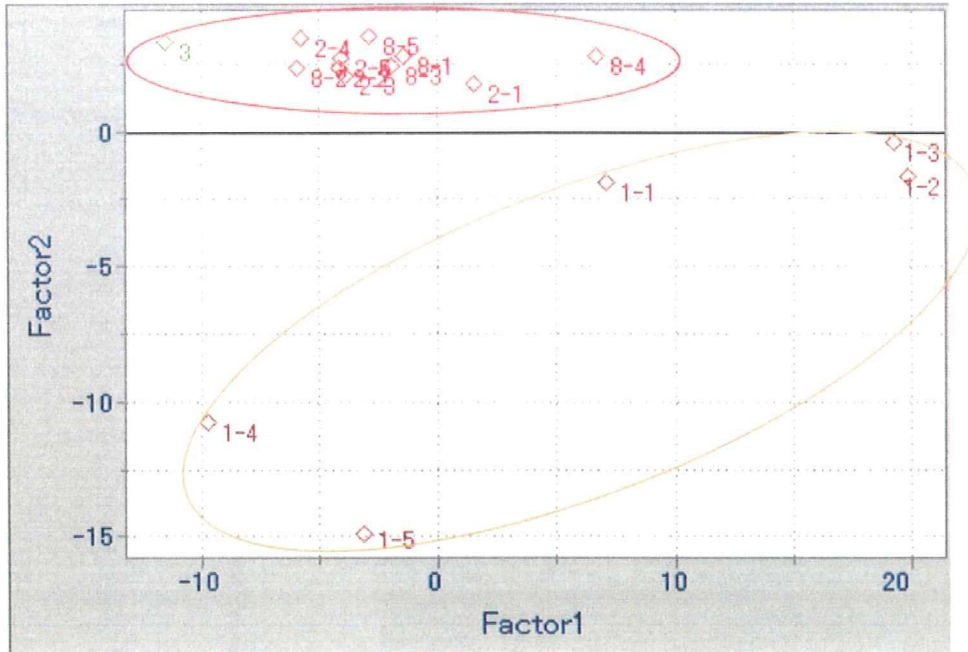


Fig. 2 PCA score plot of the Pinellia and Arisaema tubers
 Plot name means the sample no.-individual no.

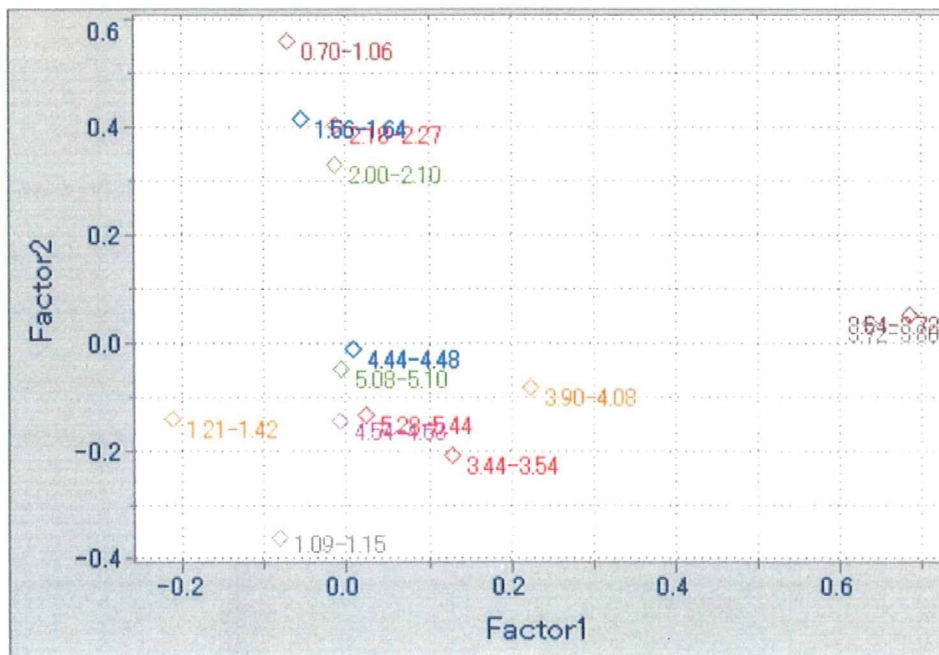


Fig. 3 PCA loading plot of the Pinellia and Arisaema tubers
 Plot name means the chemical shift range

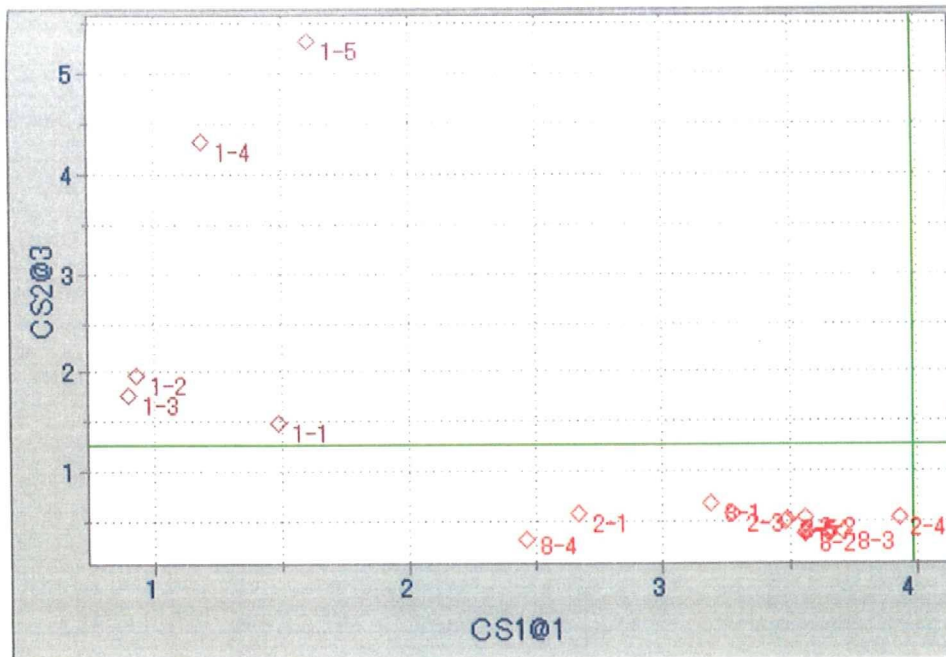


Fig. 4 SIMCA cooman's plot of the Pinellia and Arisaema tubers
 Plot name means the sample no.-population no.

分担研究課題 生薬及び漢方処方剤の安全性と有効性に関する研究
研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官
研究協力者 堀井周文 クラシエ製薬分析・評価センター

桂枝茯苓丸中のボタンピ成分ペオノールの血中濃度測定条件の検討

研究要旨 医薬品の同等性は、有効性や安全性に関する面での品質を担保するもののひとつである。漢方処方剤の場合、同等性に関する試験を成分について網羅的に行うことは不可能であることから、それに準ずる科学的評価法の開発が望まれる。そこで後発用医薬品の生物学的同等性試験に準ずる方法で試験を行い、漢方処方剤の同等性についての検討を行うこととした。今回は、桂枝茯苓丸構成生薬のひとつであるボタンピの成分ペオノールについて血中濃度測定条件の検討を行った。その結果、検出器に質量分析計（MS）を使用し、0.02%トリフルオロ酢酸（TFA）添加50%アセトニトリル溶液を移動相とするこ
とで、絶対注入量として30.45 pg / 10 μ Lまで分析可能であった。また、除タンパク操作に炭酸ナトリウムを用いることにより、ペオノールを効率良く回収することが出来た。この実験をもとに、ペオノールの血中濃度推移の評価が可能となった。

A. 研究目的

医薬品の同等性は、有効性や安全性に関する面での品質を担保するもののひとつである。主原料は天然物であり様々な成分が含まれる漢方処方剤の場合、同等性に関する試験を成分について網羅的に行うことは不可能であることから、それに準ずる科学的評価法の開発が望まれる。そこで後発用医薬品の生物学的同等性試験に準ずる方法で試験を行い、漢方処方剤の同等性についての検討を行うこととした。処方として桂枝茯苓丸を選び、服薬後の構成生薬の指標成分の血中濃度推移を把握することにした。今回は、構成生薬であるボタンピの成分であるペオノールの血中濃度測定条件の検討を行った。

B. 研究方法

ペオノールの分析方法¹⁾の検討及び抽出条件の検討を行った。さらに、内標準として合成したペオノールd₃を用いて検量線の直線性、定量限界の測定及び血漿を用いた添加回収試験を行なった。

試薬・試液

ペオノールはaldrich製を用いた。ヨウ化メチルd₃はCambridge Isotope Laboratories製（銅線入アンブル仕様）を、ヘキサン、ジエチルエーテル及びアセトンは関東化学製5,000倍濃縮検定品を、アセトニトリルは純正化学製高速液体クロマト用を、水はMilli-Q（日本ミリポア製）により精製された

ものを使用した。血漿はコージンバイオ製ヒト血漿(プール, 抗凝固剤ヘパリン, 抗 HIV-1, 2 抗体, 抗 HBsAg 抗体, 抗 HCV 抗体等陰性)を使用した。そのほかの試薬は全て試薬特級品を用いた。

装置

質量分析装置 (MS) は LCMS-2010A (島津製作所) を使用した。ソフトは LCMS Solution Ver.2.04 Su3H3 (島津製作所) を使用した。

1. 定量条件の予備検討

ペオノール 1 mg を採取し, 薄めたメタノール (1→2) を加えて正確に 100 mL とした溶液を段階希釈し, 下記の条件で測定した。

<方法 1>

HPLC 条件

移動相: 0.1% 酢酸添加 40 % アセトニトリル溶液

カラム: YMC-Pack Pro C18 (φ 2.0×150 mm)

流速: 0.2 mL/min

カラム温度: 20 °C

測定波長: 274 nm

分析時間: 20 min

MS 条件

プローブ: ESI

分析モード: SIM(ポジティブ)

測定質量数: m/z 167

ガス流量: 1.5 L/min

CDL 温度: 300 °C

ブロック温度: 300 °C

検出器電圧: 1.5 kV

プローブ電圧: 5 kV

CDL 電圧: -10 V

Q-array 電圧 (DC 1, 2, 3): 10 V

Q-array 電圧 (RF): 150 V

半値幅: 0.8 u

<方法 2>

HPLC 条件

移動相: 0.02% TFA 添加 50 % アセトニトリル溶液

他は, 方法 1 と同じ

MS 条件

プローブ, 分析モード, 測定質量数及びガス流量は, 方法 1 と同じ

CDL 温度: 250 °C

ブロック温度: 200 °C

検出器電圧: 2 kV

プローブ電圧: 4.5 kV

CDL 電圧: 5 V

Q-array 電圧 (DC 1, 2, 3): 15 V

Q-array 電圧 (RF): 85-95 V

半値幅: 0.8 u

2. 試料調製法の検討

使用溶媒の種類とその溶媒の留去方法及び分配方法の検討を行った。

<溶媒留去方法の検討>

i) 窒素気流下での溶媒留去

ペオノールのメタノール溶液 (1 mg/100 mL) 1 mL を採り窒素気流下で溶媒を留去し, 残留物にメタノール 1 mL を加えた。この溶液と処理前のメタノール溶液を比較し回収率を求めた。

ii) エバポレーターによる溶媒留去

各 1 mg/100 mL の濃度のペオノールのメタノール溶液, ヘキサン溶液またはジエチルエーテル溶液を 1 mL 採り, それぞれエバポレーターで溶媒を留去し, 残留物にメタノール 1 mL を加えた。この溶液と先のメタノール溶液を比較し回収率を求めた。

<分配方法の検討>

i) 抽出溶媒の検討

ペオノールのヘキサン溶液及びジエチルエーテル溶液 2 mL に水 1 mL を加えて振り混ぜた後、有機層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、減圧で溶媒を留去し、残留物にメタノール 1 mL を加えた。この溶液と先のメタノール溶液を比較し回収率を求めた。

ii) 強酸及び強塩基を利用した分配の検討

水 0.5 mL に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 0.5 mL 加えた後、内標準ペオノール d_3 を含むペオノールのジエチルエーテル溶液（ペオノール 500 pg/mL, ペオノール d_3 5,000 pg/mL）を 2 mL 加えて振り混ぜて水層に転溶後、遠心分離（3,000 rpm, 10 min）し、有機層を除いた。残った水層に 1 mol/L 塩酸溶液 1 mL を加え、ジエチルエーテル 3 mL で振盪抽出した後、遠心分離（3,000 rpm, 10 min）し、有機層を分取した。これに 5 % 炭酸ナトリウム溶液 1 mL を加えて洗浄後、遠心分離（3,000 rpm, 10 min）を行った。有機層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、減圧で溶媒を留去し、残留物に移動相（0.02 % TFA 添加 50 % アセトニトリル溶液）を 0.2 mL 加えて試料溶液とした。別にペオノール 5 ng 及びペオノール d_3 50 ng を量り移動相 1 mL を加えて標準溶液とし、これとの比較により回収率を求めた。

iii) 炭酸ナトリウムを利用した分配の検討

水 0.5 mL と 20 % 炭酸ナトリウム溶液 0.5 mL をとり、よく振り混ぜた後、内標準ペオノール d_3 を 40 ng/mL 含むペオノール 4 ng/mL のジエチルエーテル溶液 0.5 mL とジエチルエーテル 0.5 mL を加えて振り混ぜた後、遠心分離（3,000 rpm, 10 min）し有機層を分取した。再度、水層にジエチルエーテル 1 mL を加えて振り混ぜた後、有機層を遠心分

離（3,000 rpm, 10 min）し、先の有機層と合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、減圧で溶媒を留去し（30 °C, 400 mmHg）、移動相（0.02 % TFA 添加 50 % アセトニトリル溶液）0.2 mL に溶かしたものを試料溶液とした。別にペオノール 10 ng 及び内標準ペオノール d_3 100 ng を量り、移動相 1 mL を加えて溶かしたものを標準溶液とし、これとの比較により回収率を求めた。

3. ペオノール d_3 の合成²⁾

2, 4-ジヒドロキシアセトフェノン 3 g (19.7 mmol) をアセトン 36 mL に溶解し、炭酸カリウム 3.26 g (23.6 mmol) を加えた後、ヨウ化メチル d_3 5.67 g (39.4 mmol) を加え 3 時間加熱還流を行った。

反応液を減圧で溶媒を留去し、残渣にジエチルエーテル 50 mL 及び 10 % 炭酸ナトリウム 25 mL を加えて分配し、水層を除いた。再度、有機層に 10 % 炭酸ナトリウム 25 mL を加えて分配した。残った有機層に 5 % 水酸化ナトリウム 30 mL を加えて転溶した後、有機層を除去し、水層に塩酸を加え酸性とし、ジエチルエーテル 40 mL で 2 回抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム 30 mL 及び飽和塩化ナトリウム 30 mL で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧で溶媒を濃縮留去した（30 °C, 400 mmHg）。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン/ジエチルエーテル）により分離精製し、ペオノール d_3 を得た（収率 87%）。得られたペオノール d_3 をエタノールから再結晶した。

4. 検量線の直線性及び定量限界の測定

ペオノール 1 mg を採取し、移動相を加えて正確に 100 mL とした。別に、内標準ペオノール d_3 1 mg を採取し、移動相を加えて正確に 100 mL とした。これらの溶液をペオノール：ペオノール d_3 を 1：

10 または 1 : 100 で混合した後、段階希釈し、下記の条件で測定した。

HPLC 条件

「1. 定量条件の予備検討」の方法 2 に同じ

MS 条件

測定質量数: m/z 167 及び 170

それ以外は「1. 定量条件の予備検討」の方法 2 に同じ

5. 血漿からの添加回収試験

血漿 0.5 mL と 20 % 炭酸ナトリウム溶液 0.5 mL をとり、よく振り混ぜた後、内標準ペオノール d₃ を 40 ng/mL 含むペオノール 4 ng/mL のジエチルエーテル溶液 0.5 mL とジエチルエーテル 0.5 mL を加えて振り混ぜた後、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し有機層を分取した。再度、水層にエーテル 1 mL を加えて振り混ぜた後、有機層を遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) し、先の有機層と合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥した後、減圧で溶媒を留去し (30 °C, 400 mmHg), 移動相 (0.02 % TFA 添加 50 % アセトニトリル溶液) 0.2 mL に溶かしたものを試料溶液とした。別にペオノール 10 ng, 内標準ペオノール d₃ 100 ng/mL を移動相にかしたものを標準溶液とし、これとの比較から回収率を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. 定量条件の予備検討

ペオノールの検出には感度及び選択性の点から MS で行うこととした。移動相を 0.1 % ギ酸添加アセトニトリル溶液及び 0.02 % TFA 添加アセトニトリル溶液の 2 条件を設定し、MS 条件をそれぞれ最適化し検討を行った。その結果、TFA を用いた移動相では 30 pg / 10µL まで直線性を示し、ギ酸を用いた系よりも高感度に分析が可能であ

ると考えられた。またこれは UV での検出より 10 倍高感度であった。Fig. 1, 2 及び Table 1 に結果を示した。

2. 試料調製法の検討

窒素気流下でペオノールのメタノール溶液を留去したところ、ペオノールは残存していなかった。開放系であるため留去する際に、気化熱で水分が入り、メタノール及び水分とともにペオノールが揮発したものと考えられた。したがってエバポレーターを使用し、閉鎖的に溶媒を留去することとした。

次にエバポレーターによる溶媒留去の条件検討を行った。ペオノールのメタノール溶液について水浴温度や留去圧力を種々検討したが、ペオノールの回収率は 53-63 % であった。メタノールとペオノールが共沸により回収率が低下したものと考えられたことから、溶媒を変えて検討を行った。その結果、ヘキサンまたはジエチルエーテルを用いた場合、ペオノールの回収率は 90-100 % であった。この結果を受けて、ペオノールのヘキサン溶液及びジエチルエーテル溶液にそれぞれ水を加えて振盪後、有機層をエバポレーターで留去し、それぞれ回収率を求めた。その結果、エーテル溶液では、水浴温度 30°C, 留去圧力 400 mmHg の条件で 99.5% の回収率が得られたため、抽出溶媒としてジエチルエーテルを用いることとした。

最後に、ペオノールを抽出する際のマトリクスの影響を抑えるために分配条件の検討を行った。ペオノールは酸性では有機層、塩基性では水層に溶解することを利用することとした。その結果、ペオノールの最終絶対注入量が 500 pg/10 µL では回収率が 99 % と充分であったが、50 pg/10 µL では 60 % まで低下してしまった。加えて、プラスチック器具 (プラスチックチューブやピペッターのチップ等) を用いて抽出操作を行うとペオノールの

ピーク (m/z 167 のピーク) が大きくなる傾向が認められた。ガラスピペットやガラスチューブ等のガラス器具のみを用いた場合には m/z 167 の夾雑ピークは見られなかったことからプラスチックから夾雑物 (可塑剤) が溶出していると推測した。

一方、20%炭酸ナトリウム溶液で処理した場合は、回収率は 88-110%であった。 m/z 167 の夾雑物のピークも見られなかったことから、ペオノールの抽出方法として炭酸ナトリウム処理を行なうこととした。

3. ペオノール d_3 の合成

まず、ペオノール (4-メトキシ 2-ヒドロキシアセトフェノン) の合成を行った。構造の確認は NMR スペクトルの測定により行った。反応母液の分配処理により化合物を分離した (Fig. 4)。反応生成物はペオノール (4-メトキシ体) 及び 2,4-ジメトキシ体のみで、2-メトキシ体と思われる反応生成物は検出されなかった。理由として、原料が環状構造をとり 4 位のヒドロキシル基に選択的に反応が起こり、次いで過剰なヨウ化メチルによりジメトキシ体が生成するため、2-メトキシ体は生成しないと推察した。同様に、ヨウ化メチル d_3 を用いてペオノール d_3 の合成を行ない 87%の収率でこれを得た。

4. 検量線の直線性及び定量限界の測定

ペオノールと内標準ペオノール d_3 の比率が 1 : 10 または 1 : 100 で各濃度で測定を行った。その結果、1015 pg / 10 μ L から 30.45 pg / 10 μ L まで良好な直線性を示した (Table2, 3)。10.15 pg/10 μ L 以下では測定値のばらつきが大きく定量は困難と判断した。

5. 血漿からの添加回収試験

血漿にペオノール及びペオノール d_3 を添加し、回収率を求めた (Fig. 8)。ペオノール 96.3% 及びペオノール d_3 98.7% といずれも良好な値が得られた。また血漿ブランクでは夾雑するピークは認められなかった。

E. 結論

ペオノール血中濃度の測定は、MS 検出器を使用し、0.02%TFA 添加 50%アセトニトリルを移動相とすることで、絶対注入量として 30.45 pg / 10 μ L まで分析可能であった。また、血漿サンプルの除タンパク操作を考慮して炭酸ナトリウム処理を行なうことにより、ブランク血漿からペオノールを効率良く回収することが出来た。この実験をもとに、今後服用後のペオノールの血中濃度推移を評価できると思われた。

参考文献

- 1) 第 15 改正日本薬局方
- 2) K. Mimura and S. Baba: Studies on the biotransformation of paeonol by means of isotope tracer techniques – Synthesis and physicochemical properties of carbon-13 and deuterium labeled compounds-, *Radioisotopes.*, 28(12),739-744(1979)

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 各ペオノール濃度におけるピーク面積及びピーク高さ

移動相0.02%TFA水:0.02%TFAアセトニトリル=1:1

カラムYMGODS

	ペオノール面積			
	濃度	面積	高さ	S/N
ペオノール	1.015ng/10 μL	593251	29078	128
	507.5ng/10 μL	303738	14797	91
	101.5pg/10 μL	55109	2932	22
	71.05pg/10 μL	36505	2363	22
	50.75pg/10 μL	25684	1766	17
	30.45pg/10 μL	14080	972	6
	10.15pg/10 μL	6797	604	4
	7.105pg/10 μL	9101	655	5
	5.075pg/10 μL	7033	559	4
	3.045pg/10 μL	9352	766	7
	1.015pg/10 μL			

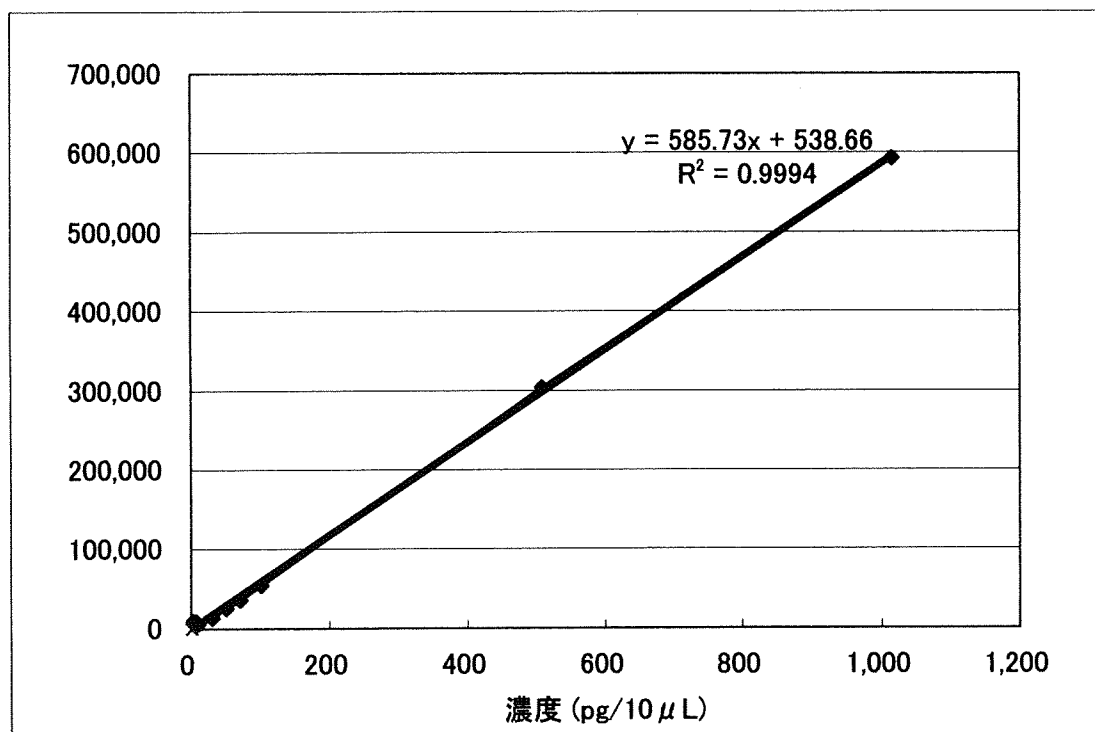


Fig. 1 ペオノールの濃度ーピーク面積曲線

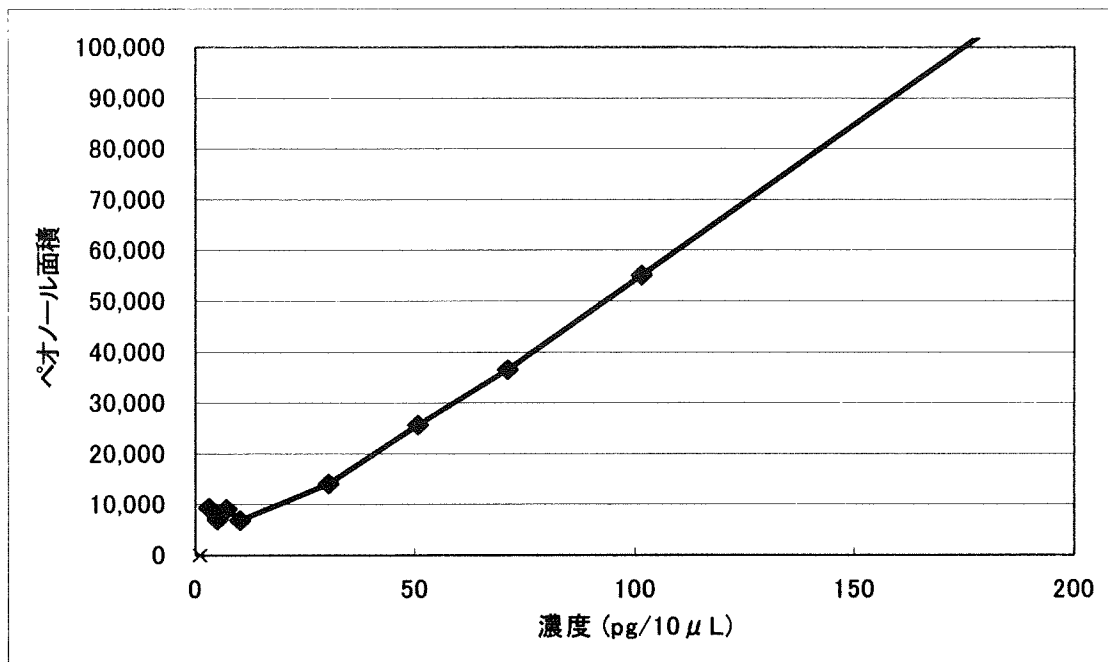


Fig. 2 ペオノールの濃度ーピーク面積曲線 (ペオノール濃度 100 pg/μL 以下の拡大)

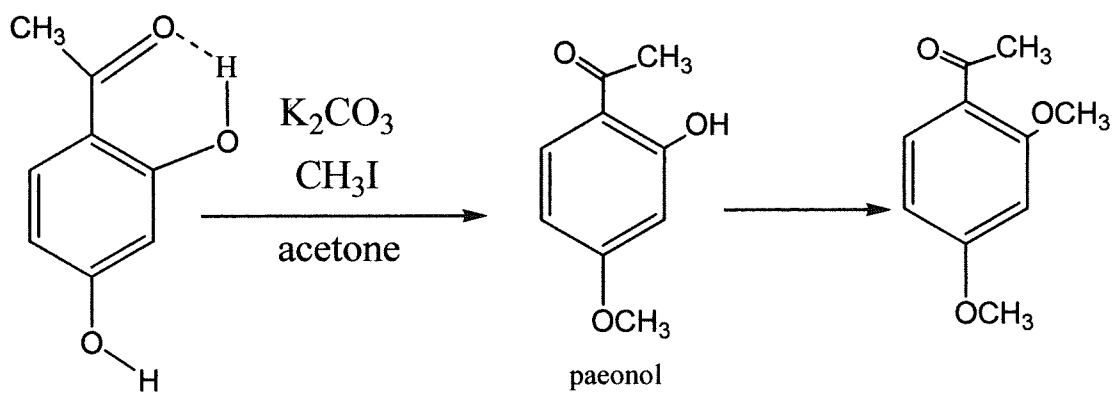


Fig. 3 ペオノールの合成

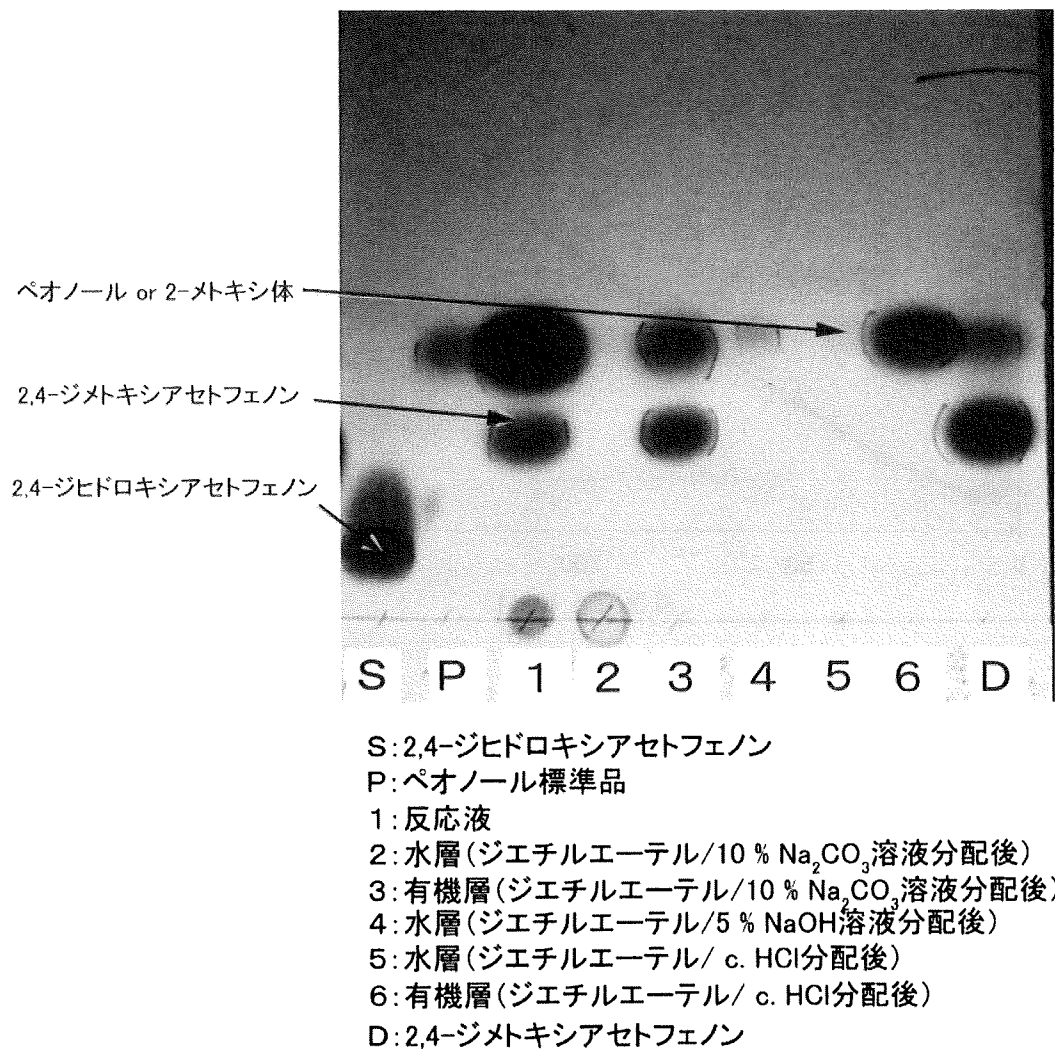


Fig. 4 ペオノール合成における分配精製時の各フラクションの薄層クロマトグラム

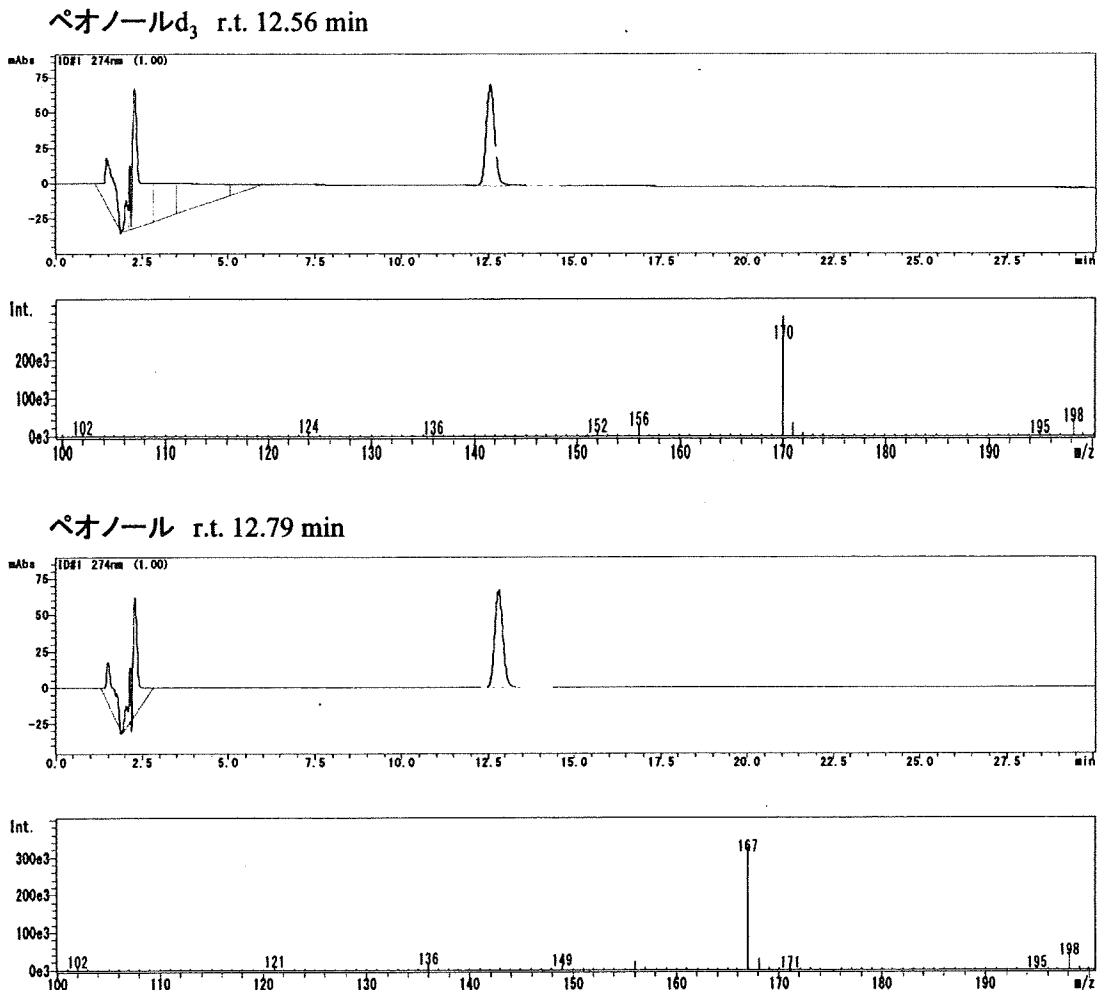


Fig. 5 ペオノール d₃及びペオノールのクロマトグラム (UV 274nm) とマスペクトル

Table 2 ペオノール : ペオノール d₃ = 1 : 10 の濃度比率での各濃度におけるピーク面積

ペオノール:ペオノールD3=1:10

ペオノール				ペオノールD3				面積比ペオノール/ペオノールD3
濃度 (pg/10 μL)	ペオノール面積	RSD	S/N比	濃度 (pg/10 μL)	ペオノールD3面積	RSD	S/N比	
1015	667250	0.1	753	10140	6671184	0.3	3641	0.10
507.5	333607	0.3	310	5070	3346140	0.5	1843	0.10
101.5	66429	0.7	67	1014	664359	0.5	403	0.10
71.05	46611	0.3	48	709.8	465196	0.3	285	0.10
50.75	33538	0.6	36	507	333998	0.2	189	0.10
30.45	19867	1.4	21	304.2	198650	1.3	108	0.10
10.15	6739	3.5	8	101.4	66005	1.8	30	0.10
7.105	4913	9.6	8	70.98	45390	6.0	28	0.11
5.075	3374	2.4	5	50.7	31983	3.5	13	0.11
3.045	2131	21	4	30.42	20059	4.5	10	0.11
1.015	790	35	2	10.14	5925	7.2	4	0.13

各濃度の面積値, RSD, S/N比は7回注入した平均値

定量可能な範囲

Table 3 ペオノール：ペオノール d3 = 1 : 100 の濃度比率での各濃度におけるピーク面積

ペオノール：ペオノールD3=1:100

濃度 (pg/10 μL)	ペオノール			ペオノールD3				面積比ペオノール/ペオノールD3
	ペオノール面積	RSD	S/N比	濃度 (pg/10 μL)	ペオノールD3面積	RSD	S/N比	
507.5	334361	0.4	377	50700	33354143	0.2	16594	0.01
101.5	66678	0.3	79	10140	6661907	0.1	4692	0.01
71.05	46609	0.7	55	7098	4648209	0.4	3304	0.01
50.75	33269	1.1	42	5070	3346152	0.8	2229	0.01
30.45	20498	1.0	22	3042	2027796	0.7	1295	0.01
10.15	7233	9.0	12	1014	662135	0.5	340	0.01
7.105	5014	12	8	709.8	464240	0.4	251	0.01
5.075	4155	17	6	507	334964	1.7	243	0.01
3.045	2648	15	4	304.2	200423	1.3	122	0.01
1.015	1244	33	4	101.4	62489	2.2	38	0.02

各濃度の面積値、RSD、S/N比は7回注入した平均値

定量可能な範囲

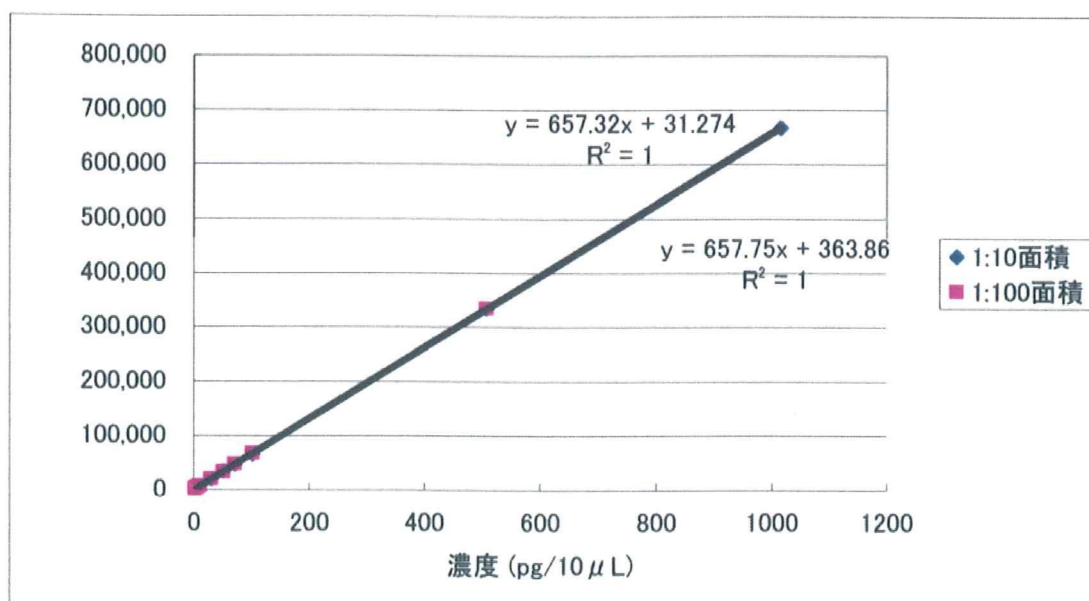


Fig. 6 ペオノール：ペオノール d3 = 1 : 10 及び 1 : 100 で作成した濃度ーピーク面積曲線

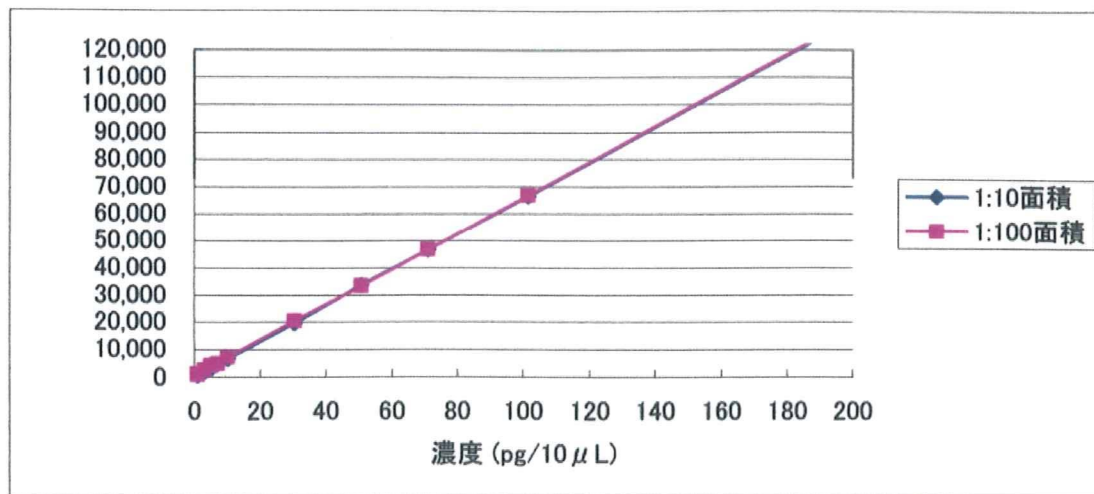


Fig. 7 ペオノール：ペオノール d3 = 1 : 10 及び 1 : 100 で作成した濃度ーピーク面積曲線 (ペオノール濃度 100 pg/10 μL 以下の拡大)

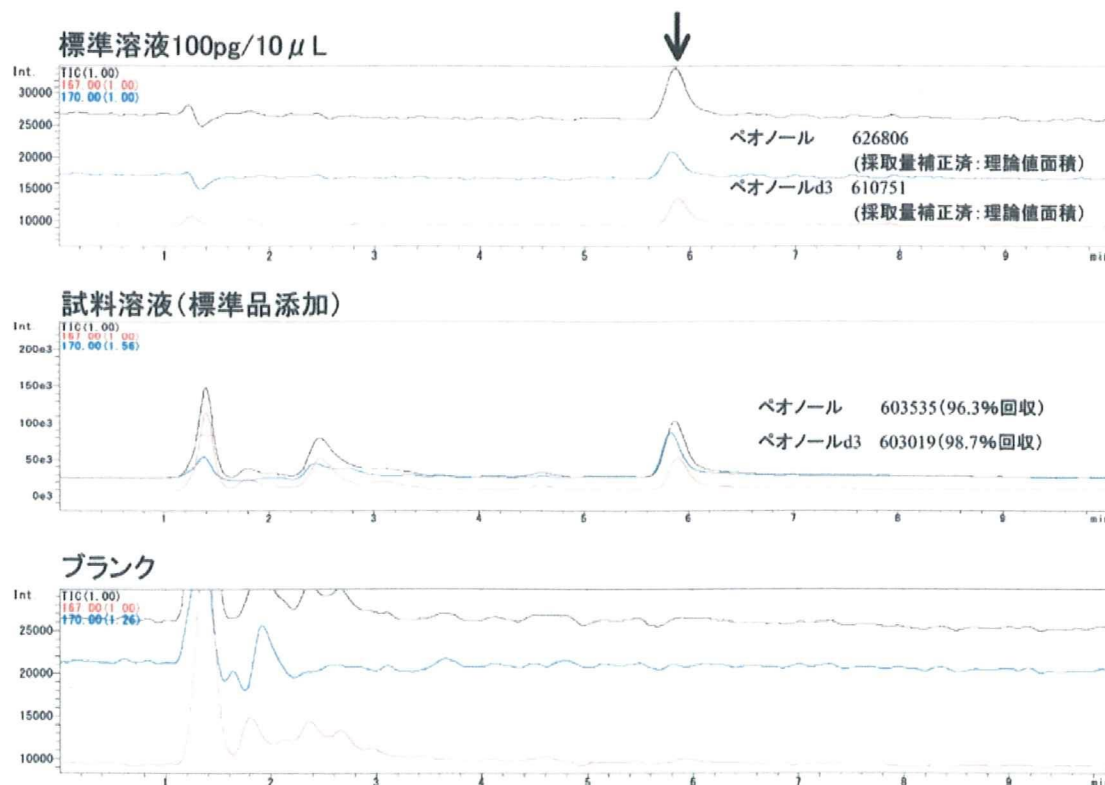


Fig. 8 ペオノールの血漿添加回収試験のクロマトグラム

分担研究課題 漢方処方製剤の同等性の評価に関するおよび漢方処方の安全性と
有効性に関する研究

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

当帰芍薬散加附子の品質評価に関する研究

当帰芍薬散加附子は、婦人薬として汎用される当帰芍薬散の類方であり、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」において一般用漢方処方「210 処方」への追加収載を提案されている。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。そして、7 種類の当帰芍薬散構成生薬のうち、芍薬、白朮、沢瀉及び加工ブシについて TLC を用いた確認試験案を考案した。また、paeoniflorin 及び atractylenolide III を指標成分とした逆相 HPLC による成分定量法案を考案した。

A. 研究目的

平成 21 年 6 月に改正薬事法が施行され、一般用医薬品を利用するセルフメディケーションに改めて国民の注目が集まっている。改正薬事法により、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った。一般用漢方製剤は第 2 類に分類され、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、その有効性や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「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」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 of 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、類聚方広義を原典とし、婦人薬として汎用される当帰芍薬散に附子を加え、「体力虚弱で、冷えが強く、貧血の傾向があり疲労しやすく、ときに下腹部痛、頭重、めまい、肩こり、耳鳴り、動悸などがあるもの」に対して、「月経不順、月経異常、月経痛、更年期障害、産前産後あるいは流産による障害（貧血、疲労倦怠、めまい、むくみ）、めまい・立ちくらみ、頭重、肩こり、腰痛、足腰の冷え症、しもやけ、むくみ、しみ、耳鳴り」に効果があるとされる当帰芍薬散加附子を取り上げ、構成生薬の TLC による確認試験及び HPLC による成分定量法について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

生薬及び試薬

当帰芍薬散加附子構成生薬（芍薬、白朮、沢瀉、加工ブシ、当帰、川芎、茯苓）はウチダ和漢薬より日本薬局方規格のものを購入した。生薬確認試験の検討における標準化合物として、paeoniflorin、atractylenolide III、alisol A 及び benzoylmesaconine hydrochloride を和光純薬より購入して用いた。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 HPTLC を用いた。陽イオン交換樹脂は Varian の Bond Elute Certify (50 mg/3 mL) 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 (東京理化器械) 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

当帰芍薬散加附子完全処方エキス : 7 種類の当帰芍薬散加附子構成生薬 (芍薬 4 g、白朮 4 g、沢瀉 4 g、加工ブシ 0.4 g、当帰 4 g、川芎 3 g、茯苓 4 g) をポット (らくらく煎) に取り、450 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。

当帰芍薬散加附子一味去エキス : 任意の生薬一つを除いた 6 種類の生薬を用いて、当帰芍薬散加附子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 : 当帰芍薬散加附子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) 芍薬 (葛根湯確認試験を準用) : 完全処方エキス 40 mg あるいは去芍薬処方エキス 40 mg あるいは芍薬単味エキス 20 mg をマイクロチューブに取り、水 $200\ \mu\text{L}$ を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール $200\ \mu\text{L}$ 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) 白朮 (補中益気湯確認試験を準用) : 完全処方エキスあるいは去白朮処方エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、水 $600\ \mu\text{L}$ を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル $600\ \mu\text{L}$ 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。残留物をメタノール $60\ \mu\text{L}$ に溶かして試料溶液とした。白朮単味エキスは、20 mg をマイクロチューブに取り、水 $200\ \mu\text{L}$ を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル $200\ \mu\text{L}$ 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。残留物をメタノール $20\ \mu\text{L}$ に溶かして試料溶液とした。

3) 沢瀉 (柴苓湯確認試験を改良) : 完全処方エキスあるいは去沢瀉処方エキス 60 mg をマイクロチューブに取り、炭酸ナトリウム試液 $300\ \mu\text{L}$ を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル $300\ \mu\text{L}$ 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試料溶液とした。沢瀉単味エキスは、20 mg をマイクロチューブに取り、炭酸ナトリウム試液 $200\ \mu\text{L}$ を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル $200\ \mu\text{L}$ 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試料溶液とした。

4) 加工ブシ : 完全処方エキスあるいは去加工ブシ処方エキス 100 mg をマイクロチューブに取り、pH6.0 リン酸緩衝液 1 mL を加えて振り混ぜた後、遠心分離した。この上澄液を、メタノール 1 mL 及び pH6.0 リン酸緩衝液 1 mL でコンディショニングした陽イオン交換樹脂に添加し、水 1 mL、酢酸 (31) (1 \rightarrow 50) 1 mL 及びメタノール 1 mL で洗浄した後、2% NH_4OH / メタノールで溶出させた。溶出液を遠心エバポレータで濃縮乾固させ、残留物をメタノール $20\ \mu\text{L}$ に溶かして試料溶液とした。加工ブシ単味エキス 100 mg をマイクロチューブに取り、pH6.0 リン酸緩衝液 1 mL を加えて振り混ぜた後、

遠心分離した。この上澄液を、メタノール 1 mL 及び pH6.0 リン酸緩衝液 1 mL でコンディショニングした陽イオン交換樹脂に添加し、水 1 mL、酢酸 (31) (1→50) 1 mL 及びメタノール 1 mL で洗浄した後、2%NH₄OH/メタノールで溶出させた。溶出液を遠心エバポレータで濃縮乾固させ、残留物をメタノール 50 μL に溶かして試料溶液とした。

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-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液、1-ナフトール・硫酸試液、バニリン・硫酸試液、噴霧用ドラッグンドルフ試液及び亜硝酸ナトリウム試液については、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) Paeoniflorin 定量分析法の条件検討：当帰芍薬散加附子完全処方エキス及び去芍薬エキスの各 5 mg、芍薬単味エキスの 1 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 μm 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、paeoniflorin のメタノール溶液 (1 mg/mL) の 1 mL を取り、薄めたメタノール (1→2) で 10 mL に希釈したものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 10 μL を HPLC 分析に供し、定量分析法の条件を検討した。

II) Atractylenolide III 定量分析法の条件検討：当帰芍薬散加附子完全処方エキス及び去白朮エキスの各 8 mg、白朮単味エキスの 1.6 mg に薄めたメタノール (1→2) 0.8 mL を加え、15 分間振とうし、0.22 μm 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、atractylenolide III のメタノール溶液 (1 mg/mL) の 1 mL を取り、薄めたメタノール (1→2) で 10 mL に希

釈したものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 50 μL を HPLC 分析に供し、定量分析法の条件を検討した。

III) Alisol A 定量分析法の条件検討：当帰芍薬散加附子完全処方エキス及び去沢瀉エキスの各 8 mg、沢瀉単味エキスの 1.6 mg に薄めたメタノール (1→2) 0.8 mL を加え、15 分間振とうし、0.22 μm 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、alisol A のメタノール溶液 (1 mg/mL) の 1 mL を取り、薄めたメタノール (1→2) で 10 mL に希釈したものを標準溶液とした。それぞれの溶液の 50 μL 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

当帰芍薬散加附子構成生薬の確認試験

当帰芍薬散加附子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。当帰芍薬散加附子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ものについて、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・第二追補あるいは 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、当帰芍薬散加附子処方中での確認試験について検討した。

1) 芍薬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：Paeoniflorin のメタノール溶液
(1mg/mL)

試料添加量：完全処方、去芍薬処方及び芍薬
単味は 5 μ L、paeoniflorin は 1 μ L

固定相：シリカゲル HPTLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水
(20:3:2)

検出方法：4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸
試液を噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱

備考：第 15 改正局方収載の葛根湯エキスにお
ける芍薬確認試験を準用した。

4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を噴
霧後に加熱した TLC プレートにおいて、完全処
方及び芍薬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、paeoniflorin 標
準溶液から得た青紫色のスポットと色調及び Rf
値 (0.38) が等しく、去芍薬処方の試料溶液か
らは検出されず、本分析条件が芍薬確認試験と
して適用し得ることが分かった (図 1C)。また、
このスポットは紫外線照射 (主波長 254 nm) (図
1A) でも検出することは可能であったが、感度
は 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液/加熱
(図 1C) に及ばなかった。

2) 白朮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：Atractylenolide III のメタノール
溶液 (1 mg/mL)

試料添加量：各試料 1 μ L ずつ

固定相：シリカゲル HPTLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル (1:1)

検出方法：1-ナフトール・硫酸試液を噴霧し、
105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱

備考：第 15 改正局方収載の補中益気湯エキス
における白朮確認試験を参考にした。

1-ナフトール・硫酸試液を噴霧後に加熱した
TLC プレートにおいて、完全処方及び白朮単味の
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、atractylenolide III 標準溶液から

得た赤紫色のスポットと色調及び Rf 値 (0.64)
が等しく、去白朮処方の試料溶液からは検出さ
れず、本分析条件が白朮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) の照射だ
けでは検出できなかった (図 2A 及び B)。

3) 沢瀉確認試験の条件検討

試料溶液：炭酸ナトリウム試液で抽出後のジ
エチルエーテル分配画分

標準溶液：Alisol A のメタノール溶液 (1
mg/mL)

試料添加量：完全処方及び去沢瀉処方 10 μ L、
沢瀉単味は 5 μ L、alisol A は 1 μ L

固定相：シリカゲル HPTLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸
(10:10:3)

検出方法：バニリン・硫酸試液を噴霧し、
105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、放冷後、紫外線照射
(365 nm)

備考：第 15 改正局方収載の柴芩湯エキスにお
ける沢瀉確認試験を参考にした。

バニリン・硫酸試液を噴霧後に加熱した TLC
プレートにおいて、完全処方及び沢瀉単味の試
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、alisol A 標準溶液から得た赤紫色の
スポットと色調及び Rf 値 (0.32) が等しく、去
沢瀉処方の試料溶液からは検出されず、本分析
条件が沢瀉確認試験として適用し得ることが分
かった (図 3C)。

4) 附子確認試験の条件検討

試料溶液：pH6.0 リン酸緩衝液で抽出後に陽イ
オン交換樹脂カートリッジにより精製した画
分

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

試料添加量：完全処方、去附子処方及び附子
単味は 10 μ L、benzoylmesaconine