

分担研究課題

生薬及び漢方処方安全性と有効性に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長 合田 幸広
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 研究員 鄭 美和

防風通聖散製剤を用いた使用実態調査研究

平成 15 年度より一般用漢方製剤の有用性評価法確立を目的として、市販一般用漢方製剤「葛根湯」、「加味逍遙散」、「猪苓湯」を用い、それぞれ、長期・中期・短期服用モデルとして、漢方処方の使用実態調査の手法確立を行ってきた。その結果、この調査デザインは、再現性があり、漢方薬の有用性評価の手法として有効な手段であることが示された。この確立された調査手法を用い、昨年度は日本漢方生薬製剤協会、大学関係者の協力を得て「防風通聖散」の使用実態調査を行った。本年度は終了した調査で得られたデータのまとめ・解析を行った。

研究協力者

柴原直利 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学部門教授

花輪壽彦 北里大学東洋医学総合研究所所長

中田敬吾 聖光園細野診療所院長

雨谷栄 日本薬科大学漢方薬学科教授

糸数七重 日本薬科大学漢方薬学科講師（国立医薬品食品衛生研究所生薬部協力研究員）

伏見 環 細菌製剤協会常務理事

大窪敏樹 日本漢方生薬製剤協会一般用漢方製剤委員会委員長（クラシエ薬品(株)漢方研究所）

西山隆 日本漢方生薬製剤協会（クラシエ薬品(株)ヘルスケア学術グループ）

松本良三 日本漢方生薬製剤協会（小太郎漢方製薬株式会社信頼性保証部）

若林健一 日本漢方生薬製剤協会（小林製薬中央研究所薬事部管理薬事グループ）

平雅代 日本漢方生薬製剤協会（ジェーピーエス製薬(株)開発部）

平野泰雅 日本漢方生薬製剤協会（(株)ツムラヘ

ルスケア部商品企画課）

村田康治 日本漢方生薬製剤協会（ロート製薬(株)マーケティング本部製品情報部）

袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

大屋のぞみ 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

近年、急速な高齢化の進展や生活習慣病の増加など疾病構造の変化、生活の質（QOL）の追求等に伴い、自分の健康に強い関心を持つ国民が増えるとともに、薬局や薬店の薬剤師等による適切なアドバイスの下で、身近にある一般用医薬品を利用するセルフメディケーションの考え方が広がりつつある。一般用医薬品のあり方等に関しては、これまでも様々な場で検討されてきた。しかしながら、以前に比べて高齢者の全人口に占める割合がさらに増加し、国民の健康ニーズも多様化している中で、今後、保健・医療資源としての一般用医薬品の有効活用

を進めていくためには、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品を育成していく必要がある。この様な背景から、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、平成 14 年 6 月から一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、11 月に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-」を公表した。本中間報告では、時代に合わせた具体的な方策としての「漢方薬・生薬の活用，一般用漢方処方の見直し」

（「漢方処方に関する提言」）が提言されている。

この中間報告を受け、平成 15 年度から 6 年間、厚生労働科学研究「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」及び「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」（主任研究者：合田幸広）において研究班が組織され、「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究」が行われた。この研究の成果を反映させる形で、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）（「新基準」）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。この新基準では、漢方の「証」の概念に対応し、内服するすべての処方に「しぼり」として、効能・効果等の項に使用されるべき体質傾向や症状が記載されたことが特徴のひとつとして挙げられている。

一方で、前述した研究班では、漢方処方の有用性評価の手法としての使用実態調査 (AUR) の確立に取り組み、これまでに、加味逍遙散、葛根湯、猪苓湯について関東・関西両地区でそれぞれ調査を行ってきた。異なった年度、異なった場所で行った AUR は、全体として良い再現性を示し、AUR が、一般用医薬品としての漢方処方（製剤）の有用性評価手法として、実行可能

かつ有効な方法であるものとの結論を得た。

今回発出された新基準は、発出までに薬事・食品衛生審議会一般用医薬品部会での審議を得るが、同部会では、新基準における一般用処方方の体力の「しぼり」と「防風通聖散」等の効能・効果として挙げられている肥満症について議論があり、さらに漢方処方と安全性の関係についても議論がなされた。しかし、一般用漢方製剤において漢方の証と使用される処方の安全性との関係について、具体的に調査された例はない。

そこで本研究では、部会での議論を背景として、既に一般用医薬品としての漢方処方（製剤）の有用性評価手法として、実行可能かつ有効な方法として確立したと考えられる使用実態調査研究 (AUR) を用い、現在、一般用として販売が拡大している漢方処方である「防風通聖散」製剤について、「しぼり」（使用されるべき体質傾向や症状）と、効能効果（有用性）との関係を明らかにし、同時に使用者の体調変化についても調査する目的で、AUR を実施した。

B. 研究方法

昨年度に得られた総エントリー数 199 例のうち、回収数（有効エントリー数）は 188 例であった。本年度はデータを取りまとめ、得られたデータ間の相関等、データ解析を引き続き実施するとともに、医師である研究班員との討議に基づき、昨年度行ったデータ解析の修正、解釈の変更を行った。Spearman の相関係数は、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) を使用して解析した。

C. 研究結果と考察

調査に参加した薬局は 35 店舗、調査責任薬剤師は 35 名であった。199 例のエントリーがあり、188 例 (94.5%) を有効エントリーとし、解析の対象とした。また、調査脱落者を非有効エントリーとし、11 例 (5.5%) が該当した。有効エントリーの内訳として、調査完了者は 178 例、

副作用による中断は5例、治癒による中断2例、その他は3例であった。非有効エントリーの内訳として、音信不通による書類回収不可が8例、調査終了時の書類紛失が2例、年齢制限（20歳以上参加可）による対象外が1例であった。調査協力者の男女比は、男性60名（32%）、女性128名（68%）となった。

調査開始日と開始数の推移を表1に示した。調査開始直後の1か月にピークがあり、過去に行った調査と同様の傾向が見られた。

同意取得に要した時間は、5分以内が77名（41%）、5～10分が101名（54%）、10分以上が8名（4%）、記入なしが2名（1%）となった。

調査協力者の年齢内訳を表2に示した。平均年齢は、男性が46歳、女性が43歳となった。また、最高年齢は男性が80歳、女性が85歳であった。

防風通聖散の服用経験とその他（主訴以外）の病気について調査した結果、服用経験ありと回答した人は62名（33%）、なしと回答した人は120名（64%）、不明・無回答が6名（3%）となった。その他（主訴以外）の病気がありと回答した人は18名（10%）、なしと回答した人は162名（86%）、不明・無回答が8名（4%）となった。

調査協力者のプロフィールを表3に示した。体力の程度は、スコアを1から5までにふり、1は虚弱、5は体力がある、とした。防風通聖散は体力の程度が3以上の人が服用対象となり、エントリー確認票にて体力がないと自己回答した人は除かれる。したがって、スコア2と回答した人は調査の対象ではないはずだが、1例のみスコア2と回答した結果が確認された。また、身体の冷えに関する質問に対し、手足の冷えがある、と回答した人の87.5%は女性であった（data not shown）。

服用後の体調変化について調査した結果、体調変化ありと回答した人が19名（10%）、なしと回答した人が163名（88%）、無回答が4名（2%）となった。体調変化ありと回答した19名のう

ち、男性は5名、女性は14名であった。体調変化なしと回答した163名のうち、男性は57名、女性は106名であった。無回答4名は全員女性であった。なお、他社の同効薬を服用していた人（1名）、抗うつ薬を服用していた人（1名）は医師の判断により解析から外した。体調変化あり、と回答した19名の内訳を表4に示した。

調査薬剤師による有用性評価を表5に示した。きわめて有用、有用、やや有用の合計が150名（80%）となり、過去に行った猪苓湯、葛根湯、加味逍遥散の調査（生薬学雑誌より引用）に比べて低い結果となった。

有効エントリーのうち、副作用による中断が5例あった。この5例の副作用状況について解析した結果、調査薬剤による副作用は5例中2例と判断され、服用後、早い段階で副作用が出る傾向が認められた。ただし2例とも重篤ではなかった。この結果は、使用者の「証」を確認することで、調査薬剤の適正使用を推進できることを示したと考えられた。

調査協力者による評価を表6に示した。9つある症状のうち、便秘に対する評価が一番高いことが明らかとなった。たいへん良くなった、良くなった、少し良くなった、と改善を表す回答をした人は59%に上った。また、1人当たりの平均症状は4つあることも分かった。調査開始時・終了時の症状変化についても解析を行った結果、9つある症状のうち、排便回数の改善に対して一番良いことが分かった（図1）。調査終了後の調査協力者による総合判定において、便秘に対する回答と満足度の度合いの関係をSpearmanの相関係数を用いて解析した結果、Spearman r（相関係数）=0.327、 $p < 0.0001$ となった。Spearman rの値は $0 < r < 1$ の範囲で算出され、1に近いほど相関関係が強いことを表す。そしてp値より、相関関係に有意差が認められた。すなわち、便秘が「良くなった」と判断した人ほど、満足度の度合いが「高い」と評価する傾向が認められた。

調査協力者による全体評価を表 7 に示した。たいへん良くなった, 良くなった, 少し良くなった, と回答した人は合わせて 126 名 (68%) となった。これに対し, 調査薬剤師が有用と回答した割合は 80%であった (表 5)。すなわち, 調査薬剤師と調査協力者の間で, 有用性に対する意識の違いがあることが明らかとなった。おそらく, 調査薬剤師より調査協力者の方が, 調査薬剤に対する効果の期待を高くもって服用した反面, 調査終了後に有用と感じにくかったことがこれらの数字に表れたのではないかと考えられる。さらに, 調査協力者の満足度もまた, この結果を裏付けていると思われる (表 8)。過去に行った調査で, 不満足と回答した例は 1~2 例 (1~2%) であったことに対し, 本調査では 12 例 (7%) と多い結果となった。

今回の調査において, 調査協力者に服用前後の体重と腹囲を任意で測定してもらった。その結果を表 9, 10 に示す。体重変化の平均は, 男女差がなく -1kg であった。腹囲変化の平均も, 男女差がなく -1.4cm であった。さらに調査協力者の BMI 値 (任意回答) を算出した結果, 普通体重に該当する人数が一番多いことが明らかとなった (表 11)。BMI による肥満区分と調査協力者による満足度の度合いの相関性を調べてみた結果, BMI 値が 30 以上 (肥満度 2) の協力者で高い満足度が得られる結果となった (図 2)。

さらに, 体重, または腹囲変化と調査協力者による満足度について解析を行った結果を図 3 に示した。体重変化と満足度について, 調査前後の体重変化を -6~-2kg, -1kg, $\pm 0 \sim +4$ kg の 3 グループに分けた。きわめて満足 (満足度 1), 満足 (満足度 2), やや満足 (満足度 3) と回答した割合は, -6~-2kg のグループが 81.8%, -1kg のグループが 66.7%, $\pm 0 \sim +4$ kg のグループが 44.7%, と体重変化の減少度高いほど満足度も高いことが明らかとなった。同様に, 調査前後の腹囲変化を -8~2cm, -1cm, $\pm 0 \sim 7$ cm の 3 グループに分けた。きわめて満足

(満足度 1), 満足 (満足度 2), やや満足 (満足度 3) と回答した割合は, -8~2cm のグループが 82.4%, -1cm のグループが 58.3%, $\pm 0 \sim 7$ cm のグループが 45.0%, と腹囲変化の減少度が高いほど満足度も高いことが明らかとなった。

D. 結論

これまでのパイロット調査を経て, 本格的な一般用漢方処方の使用実態調査を, 防風通聖散を用いて行った。

①肥満症との関係について: BMI 値が 30 以上 (肥満度 2) の協力者で高い満足度が得られる結果となった。体重では平均値で男女とも 1kg, 腹囲では平均値で男女とも 1.4cm の現象が見られた。

②安全性について: 調査期間中に医師の診断が必要な有害事象等, 重大なトラブルは生じず, エントリー時の体力調査が有用であるものと考えられた。

すなわち, 使用者の「証」を確認することで, 防風通聖散製剤の適正使用を推進できることを示したのと考えられた。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

- 1) 鄭美和, 柴原直利, 花輪壽彦, 中田敬吾, 雨谷栄, 糸数七重, 伏見環, 一般用漢方製剤委員会, 袴塚高志, 合田幸広, 一般用漢方製剤「防風通聖散」の使用実態調査 - 漢方処方の安全性と有効性に関する研究 1 -, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 富山, (2011.8)
- 2) 鄭美和, 柴原直利, 花輪壽彦, 中田敬吾, 雨谷栄, 糸数七重, 伏見環, 一般用漢方製剤委員会, 袴塚高志, 合田幸広, 一般用漢方製剤「防風通聖散」の使用実態調査 - 漢方処方の安全性と有効性に関する研究 2 -. 日本生薬学会第 58 年会, 東京, (2011.9)

- 3) 合田幸広，一般用漢方処方を用いた使用実態調査 AUR について，日本薬局製剤研究会全国大会，東京（2011. 10）.

	5/16-6/15	6/16-7/15	7/16-8/15	8/16-9/15	9/16-10/15	10/16-11/15	11/16-12/15	12/16-12/31
全体	55	52	24	25	17	11	4	0
男性	21	16	3	11	5	5	1	0
女性	34	36	21	14	12	6	3	0

表 1. 調査開始日と開始数の推移

	20-29 歳	30-39 歳	40-49 歳	50-59 歳	60-69 歳	70-79 歳	80-89 歳
全体	35	40	39	55	13	3	3
男性	7	14	12	20	5	1	1
女性	28	26	27	35	8	2	2

表 2. 調査協力者の年齢

	健康食品/一般薬の服用	高血圧ぎみ	身体の冷え
はい	64 名(34%)	26 名(14%)	56 名(30%)※
いいえ	123 名(65%)	160 名(85%)	123 名(65%)
無回答	1 名(1%)	2 名(1%)	9 名(5%)

体力の程度	2	3	4	5	無回答
	1 名(1%)	77 名(41%)	77 名(41%)	31 名(16%)	2 名(1%)

表 3. 調査協力者のプロフィール ※手足の冷えに限る

	4	3	2	1
下痢	4(3)	2	9	0
腹痛	3(2)	1	1	0
発疹・発赤	0	0	1	0
胃部不快感	0	1	4(1)	0
倦怠感		0	1	0
動悸・息切れ		0	2	0
手足のむくみ		1	2	0
その他	0	1(1)	2※(1)	0
人数	4	5	15	0

4. 明らかな症状があり日常生活に支障がある
3. 軽い症状があり症状を意識する
2. わずかに症状があるが気にならない
1. 症状なし

※その他の 1 名は、良くなったという意味の体調変化でチェックをつけた。

回答人数 19 名 複数回答あり カッコ内は服用を中断した人

表 4. 「体調変化あり」と回答した人の内訳

	きわめて有用	有用	やや有用	有用とは思えない	好ましくない	無回答
全体	4名(2%)	38名(20%)	108名(58%)	31名(17%)	4名(2%)	2名(1%)
男性	2名	13名	33名	13名	1名	0名
女性	2名	25名	75名	18名	3名	2名

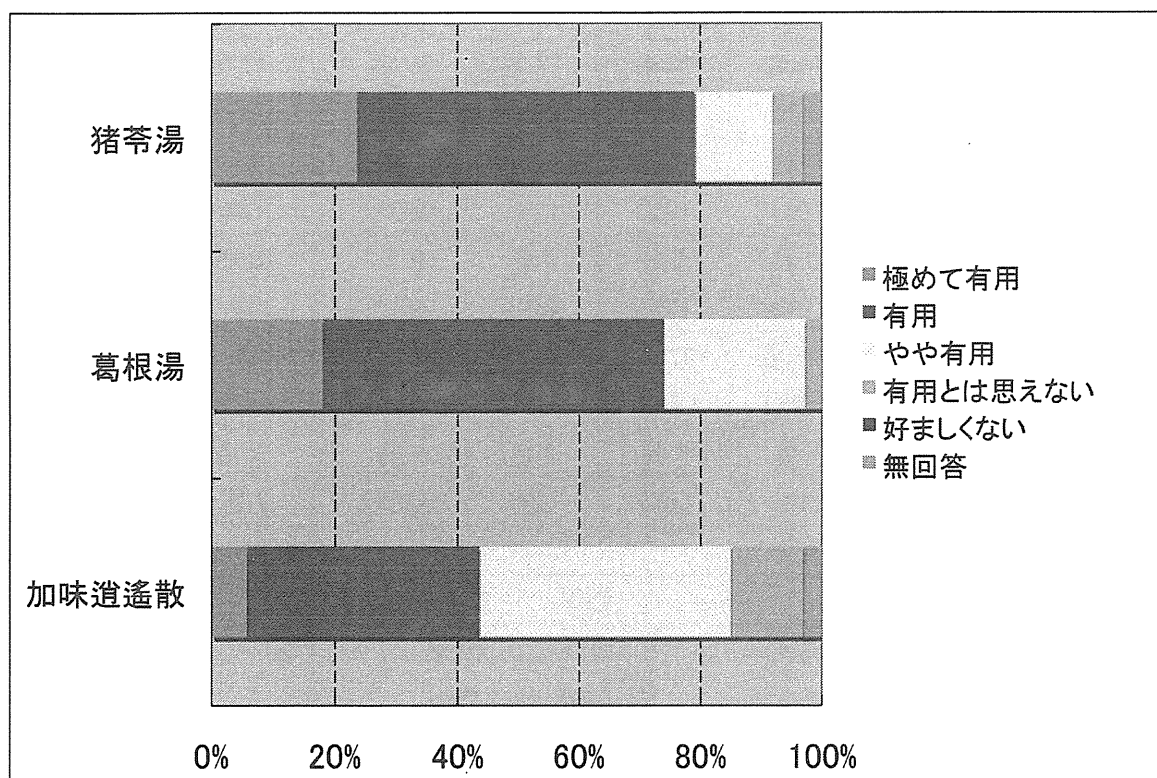


表 5. 調査薬剤師による有用性評価 図は生薬学雑誌 62(1), 1-7 (2008) より引用

	のぼせ	肩こり	便秘	湿疹	ふきでもの	皮膚炎
たいへん良くなった (きわめてよく効いた)	11名 (6%)	11名 (6%)	32名 (17%)	12名 (6%)	11名 (6%)	11名 (6%)
良くなった (効いた)	8名 (4%)	9名 (5%)	41名 (22%)	4名 (2%)	6名 (3%)	4名 (2%)
少し良くなった (やや効いた)	5名 (3%)	33名 (18%)	37名 (20%)	5名 (3%)	7名 (4%)	2名 (1%)
どちらともいえない (効かなかった)	38名 (20%)	74名 (40%)	17名 (9%)	37名 (20%)	47名 (25%)	36名 (19%)
少し悪くなった	0名 (0%)	0名 (0%)	3名 (2%)	1名 (0.5%)	5名 (3%)	2名 (1%)
悪くなった	0名 (0%)	1名 (0%)	0名 (0%)	0名 (0%)	0名 (0%)	0名 (0%)
症状が初めからなかった	123名 (66%)	57名 (31%)	54名 (29%)	126名 (68%)	109名 (59%)	130名 (70%)
無回答	1名 (1%)	1名 (0%)	2名 (1%)	1名 (0.5%)	1名 (0%)	1名 (1%)

	動悸	むくみ	鼻づまり
たいへん良くなった (きわめてよく効いた)	12名 (6%)	10名 (5%)	14名 (7%)
良くなった (効いた)	5名 (3%)	9名 (5%)	5名 (3%)
少し良くなった (やや効いた)	10名 (5%)	20名 (11%)	5名 (3%)
どちらともいえない (効かなかった)	35名 (19%)	54名 (29%)	41名 (22%)
少し悪くなった	0名 (0%)	1名 (0%)	1名 (0.5%)
悪くなった	0名 (0%)	0名 (0%)	0名 (0%)
症状が初めからなかった	123名 (66%)	91名 (49%)	119名 (64%)
無回答	1名 (1%)	1名 (0%)	1名 (0.5%)

表6. 調査協力者による評価 平均症状数は4であった。

調査開始時・終了時の症状変化

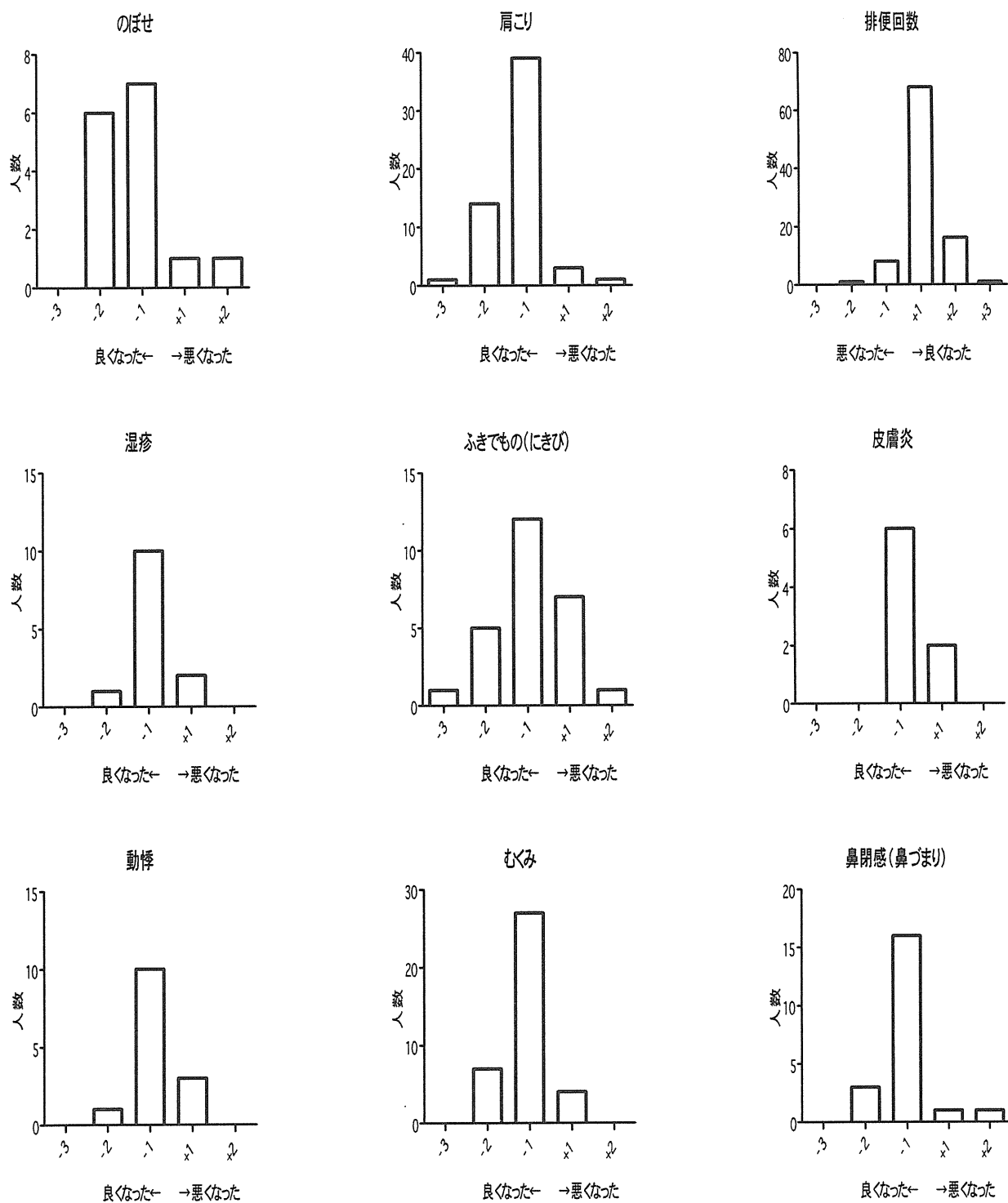


図 1. 調査開始時・終了時の症状変化

たいへん良くなった(きわめてよく効いた)	5名(3%)
良くなった(効いた)	30名(16%)
少し良くなった(やや効いた)	91名(49%)
どちらともいえない(効かなかった)	56名(30%)
少し悪くなった	0名(0%)
悪くなった(好ましくない)	1名(0.5%)
薬剤師・医師に相談するような症状があった	1名(0.5%)
無回答	2名(1%)

表 7. 調査協力者による全体評価

きわめて満足	満足	やや満足	どちらとも いえない	不満足	無回答
2名(1%)	44名(24%)	73名(39%)	53名(28%)	12名(7%)	2名(1%)

表 8. 調査協力者による満足の度合い

	-6kg	-4kg	-3kg	-2kg	-1kg	±0kg	+1kg	+4kg	合計
全体	1名 (1%)	2名 (1%)	8名 (6%)	22名 (17%)	60名 (45%)	30名 (23%)	8名 (6%)	1名 (1%)	132名
男性	1名	0名	4名	8名	24名	14名	1名	1名	53名
女性	0名	2名	4名	14名	36名	16名	7名	0名	79名

表 9. 調査協力者（任意回答）の体重変化

	-8cm	-7cm	-6cm	-5cm	-4cm	-3cm	-2cm	-1cm	±0cm	+1cm	+2cm	+6cm	合計
全体	1名 (1%)	1名 (1%)	3名 (3%)	4名 (3%)	1名 (1%)	8名 (7%)	33名 (29%)	24名 (21%)	34名 (29%)	4名 (3%)	1名 (1%)	1名 (1%)	115名
男性	0名	0名	1名	2名	0名	3名	15名	12名	12名	2名	0名	0名	47名
女性	1名	1名	2名	2名	1名	5名	18名	12名	22名	2名	1名	1名	68名

表 10. 調査協力者（任意回答）の腹囲変化

肥満度区分 BMI 値	低体重(やせ) ~18.5 未満	普通体重 18.5~25.0 未満	肥満(1度) 25.0~30.0 未満	肥満(2度) 30.0~35.0 未満	合計
全体	8名	113名	47名	8名	176名
男性	1名	27名	27名	4名	59名
女性	7名	86名	20名	4名	117名

表 11. 調査協力者（任意回答）の BMI 値

図2. 「BMIによる肥満区分」—「調査協力者による満足度の度合い」

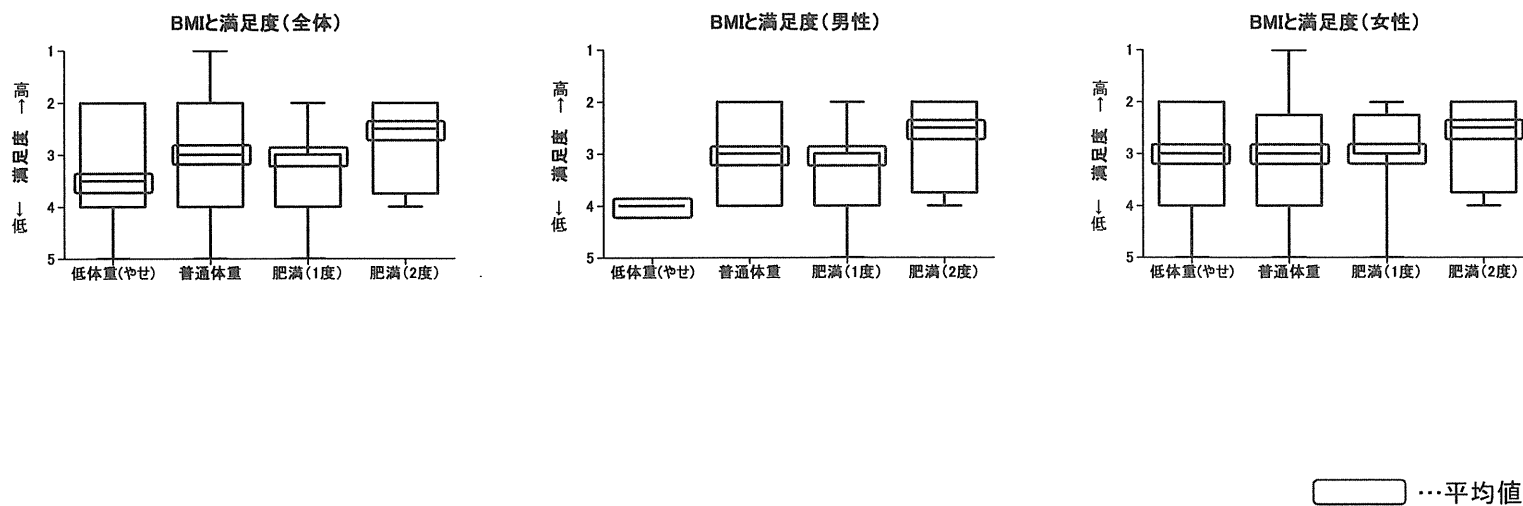
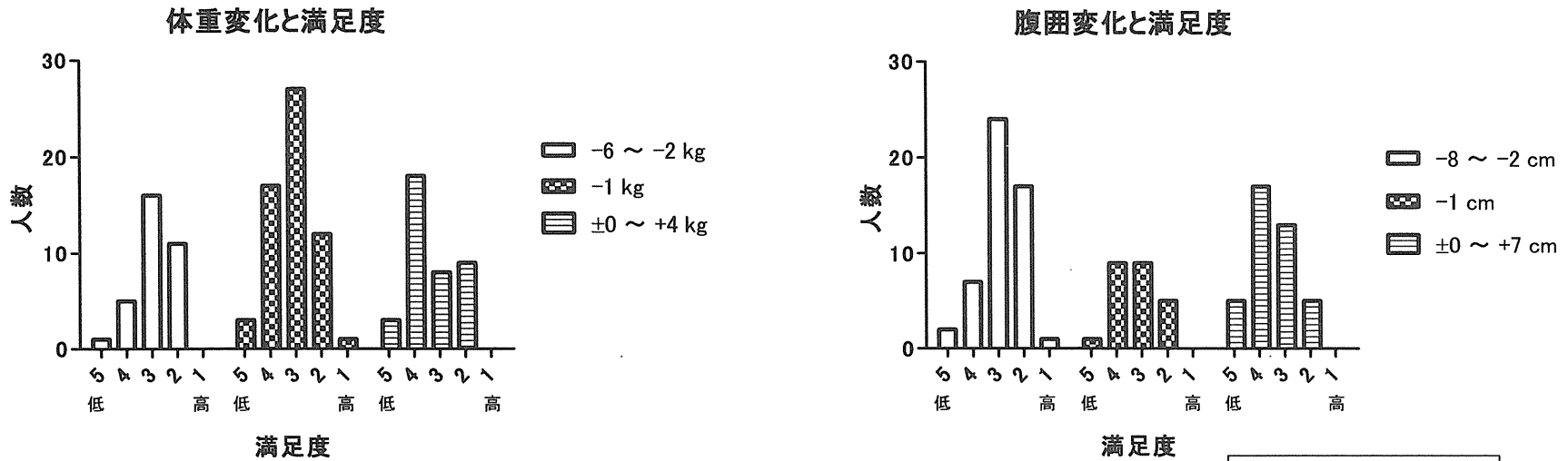


図3. 「体重/腹囲変化（任意回答）」 — 「調査協力者による満足度の度合い」



満足度

- 1 : きわめて満足
- 2 : 満足
- 3 : やや満足
- 4 : どちらともいえない
- 5 : 不満足

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

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 細江潤子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

定量 NMR (qNMR) による日本薬局方試薬の定量規格化の検討

定量 NMR (qNMR) を利用して、日本薬局方で使用する生薬成分含量測定用試薬を定量規格化するための検討を行っている。本年度は、日本薬局方において生薬等の成分含量測定用に用いられる試薬 14 化合物について、qNMR を測定し、定量の指標とすべき、シグナルについて検討した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生
化学部室長
末松孝子 日本電子株式会社NM事業ユニット
NMアプリケーショングループ
栗原正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学
部部長

A. 目的

日本薬局方では、生薬及び漢方処方エキスについて、医薬品としての安全性と有効性を担保するため定量法（成分含量測定法）が設定されている。生薬、漢方処方エキスの場合、定量指標成分は、天然物であるため、公的な標準品（日本薬局方標準品）の設定には以下のような問題がある。化学合成医薬品と異なり、医薬品（生薬、漢方処方エキス）中、数%以下～0.1%程度の含量の化合物が指標とされている。多くの場合このような化合物の簡易合成は困難で、純度の高い化合物を得るためには、天然物より単離

することになる。この場合、多大な労力が必要で、指標成分を準備する経済的コストが多くなる。また、原料の差、抽出、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間変動が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい、また天然物の場合、最大の不純物は、水である場合が多いが、定量用途を目的として、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な指標成分を多量に消費することになる。このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキス各条規格では、多くの場合、便宜上その時点で市販されている試薬、あるいは市販可能な試薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品として、定量法（成分含量測定法）と定量規格を規定している。ところが、このような試薬を分析用標品とした場合、クロマトグラム上の純度等は規定可能であるが、成分を大量に消費する

関係でカールフィッシャー法による水分含量測定を規定することはなされていない。また、事前検討に一定量の指標成分を準備する必要性があるため、コスト面の難点から、乾燥減量も規定されていない。さらに、局方においてクロマトグラムで規定される純度は、国際単位系 (SI) へのトレーサビリティを確保した絶対分析法ではないため、その値は、計量学 (Metrology) 的に値付けが行われているとはいえ、分析値の信頼性を損なう可能性を完全に否定できない。従って、法的な拘束力のある公的規格で、標準品としての公的な保証を行っていないこのような試薬に頼り、生薬及び漢方処方エキスについて規格値を設定することは、厳密には問題があるものと考えられる。

近年、このような天然物の定量問題を解決する手法として、国際単位系 (SI) へのトレーサビリティを確保した絶対分析法として、定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) が、国立衛研の杉本らを中心として実用化されつつある。qNMR は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上に観察される化合物のシグナル面積比が分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例することを利用して、2つの化合物が同時に存在する場合、シグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、もう一方の化合物の純度あるいは含量を観察されるシグナル面積比と調製値の関係から求める事が出来る。従って、qNMR は、測定対象と同一化合物の定量用標準品を必要とせず、別の標準物質を基準として定量分析が可能な絶対定量法であり、SI にトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する分析

法である。従って、本法を用いた場合、上位の標準物質「ものさし」を用いて、NMR で測定可能な、あらゆる化合物の絶対量が計量学的に正確に求めることが可能となる。

本研究では、前述した天然物の定量問題を解決するため、日本薬局方において qNMR 法を利用することを前提とし、これまでに天然物由来の試薬をどのように定量規格化していくか検討を行ってきた。昨年度は、日本薬局方において生薬等の成分含量測定用に用いられる化合物を利用し、これまでに確立した qNMR 法を用いて、同一の試料を使用し、複数機関の測定者間で独立に定量実験を行い、同法についてバリデーション実験を行った。本年度は、日本薬局方において生薬等の成分含量測定用に用いられる試薬 14 化合物について、qNMR を測定し、定量の指標とすべきシグナルについて検討したので報告する。

B. 研究方法

B.1. 試薬及び試液

測定した日本薬局方生薬試験用試薬は、(E)-カプサイシン、(E)-ケイ皮酸、[6]-ショールガオール、10-ヒドロキシ-2-(E)-デセン酸、1-メントール、アミグダリン、アルブチン、クルクミン、サイコサポニン d、硝酸デヒドロコリダリン、ヒルスチン、ヘスペリジン、ペリラルデヒド、ロスマリン酸の 14 品目で、全て和光純薬工業(株)製を用いた。有機溶媒可溶の内標準物質としては、認証標準物質 (NMIJ CRM) である 1,4-ジクロロベンゼンから SI トレーサブルな値付けをされた 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4 , $M_w=226.50$) を、水溶性の内標準物質としては、DSS- d_6 (Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- d_6 -sulfonate, $M_w=$

224.36) を和光純薬工業(株)より購入して使用した。なお、これらは ASNITE (Guide34) を取得した認証標準物質と同一である。qNMR 測定用重溶媒としては、重水素化率 99.9% 以上の重水 (D_2O) (Acros 社製), 重アセトン ($acetone-d_6$) (Aldrich 社製), ジメチルスルホキシド- d_6 ($DMSO-d_6$) (Aldrich 社製), 重メタノール ($methanol-d_4$) (Isotec 社製) 及び重クロロホルム ($CDCl_3$) (Isotec 社製) を用いた。

B. 2. 器具及び装置

天秤は、最小表示値が 0.0001 mg のウルトラマイクロ天秤 (Mettler Toledo UMX2) を使用した。NMR はオートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製) を使用し、ケミカルシフト値は、内標準物質を基準シグナル (0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。NMR 試料管は Wilmad 製 528-pp を使用した。

B. 3. 試料溶液の調製

ペリルアルデヒドを除き、各試薬約 5 mg, 内標準物質約 1 mg をそれぞれ精密に量り採り、風袋ごと同一の容器に入れ NMR 測定溶媒 1 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試料管に封入したものを試料溶液とした。ペリルアルデヒドについては、ペリルアルデヒド約 10 mg, 内標準物質約 2 mg を精密に量り採り、NMR 溶媒 2 mL に溶解させた。

B. 4. qNMR 測定条件

観測核 1H , 測定周波数は 600 MHz, 観測スペクトル幅は 20 ppm, デジタルフィルタを使用し、スペクトル中心は 5 ppm の位置に設定, パルス幅は, 90 度パルスとなる時間に設定し, 取り込み時間 4 秒, デジタル分解能 (Resolution) 0.25 Hz, 遅延時間 60 秒, オート FG シムによるシム調整, 測定温度は室温とし, MPF8 による ^{13}C デカップル実施, 積算回数 8 回, ダミーキャン 2 回とし, 各試料について 3 回測定を行った。

NMR データの処理には, 日本電子(株)製 Alice 2 for qNMR を使用, 内部標準物質のトリメチルシリルピークを 0 ppm とし, マニュアル法で位相補正, オートベースライン補正を行い, マニュアル法で各ピークの積分範囲を決定した。また, 本報告では積分値は, 全て純度換算 (%) により表示した。

C. 結果と考察

これまでの検討結果に従って, 以下の原則に従い分析対象シグナルを決定した。結果を表 1 に示す。

(A) 不純物ピークの混入の可能性がスペクトル上観測されず, (B) なるべく単純なスピン系のシグナルを優先し, それらのシグナルの純度値の平均を値とする。この場合シグナルの選択には, (C) 交換性のプロトンであるかどうか, 及び (D) 複数のコンフォーメーションによる積分値の変化も考慮する。(E) さらに純度が低くなった場合には, 単純に有効シグナルの純度値の平均化を行わず, 最も確からしい純度値あるいは, 最も低い純度値を示すシグナルの値を優先的に利用する。この場合, 通常, 不純物のシグナルは高磁場領域で混入し易いと考えられるため, なるべく低磁場のシグナルを優先する。

C. 1. (E)-Capsaicin

フェニル基の 2 位に由来する δ 6.85 ppm のダブルットシグナルが, 原則 A, B に対応するため, 選択した。その結果, 純度は, 99.5% と算出された。

C. 2. (E)-Cinnamic acid

側鎖の 2 位 (d 位), 3 位 (a 位) に由来するダブルットシグナルが原則 A, B に対応し, 両者のシグナルの積分値により純度を算出した結果, 99.3% の値が得られた。

C. 3. 6-Shogaol

フェニル基の 2' 位, 5' 位に由来する両ダブルレットシグナルが原則 A, B に対応し, これらの積分値より純度を算出した結果, 98.82%の値が得られた。

C.4. 10-Hydroxy-2-(E)-decenoic acid

原則 A, B に準拠し, 低磁場のシグナルである 2 位のプロトンシグナルを選択し, 純度を算出した結果, 98.5%の値が得られた。

C.5. (1)-Menthol

最も低磁場の 1 位のシグナルと比較的分離の良い 6 位及び環外メチン (8 位) のシグナルを選択し, これらの平均値より純度を算出したところ, 100%の値が得られた。なお, 磁場の大きさによっては, 6 位及び 8 位の分離が完全でない場合が考えられるため, この場合は, 両者を 2H 分として, 定量する必要がある。

C.6. Amygdalin

本物質は, 吸湿性のため, 通常の実験室条件では秤量が難しく, この段階で qNMR による絶対定量に対して困難さが存在し, 現段階では, 最終的な純度は算出しない。

本化合物のシグナルにおいて最も低磁場にあるフェニル基のシグナルは, 縮退しているため 5H 分として定量せざるを得ない。この定量値と, 糖の 1' 位, 1'' 位のシグナルの定量値を比較すると, 糖の 1' 位, 1'' 位の定量値が 1%程度低い値を示している。通常, グルコース 2 糖の場合, 両糖とも安定な 6 員環 all eq 配座しかとらないものと考えられ, また, 1 位には, 溶媒由来の D 原子の影響もないものと考え, フェニル基の下に若干の不純物が入っている可能性が考えられる。従って, この場合, 糖の 1' 位, 1'' 位のシグナルの定量値の平均で純度を算出すべきと考えられる。なお, 環外メチンプロトンの強度は, フェニル基のものより 3%低い値を示しているが, これは, $-\text{CH}(\text{Ph})-\text{CN}$ に対

し, $-\text{C}(\text{Ph})=\text{C}=\text{NH}$ の平衡があるとする, うまく説明可能となるが, 今後の検討が必要である。

C.7. Arbutin

ベンゼン環の 2, 6 位由来のシグナル及び, 3, 5 位由来の 2H 分のシグナルを選択した結果, 両積分値の平均より, 純度 96.4%が得られた。なお, 糖の 1' 位のシグナルについても, 検討の余地が残されている。

C.8. Curcumin

溶液中においてケト, エノール異性体が通常状態で存在するため, 両異性体由来のシグナルを合わせて定量値を算出せざるを得ない化合物である。原則 A, B を考慮して, 6, 6' 位の 2H 分のシグナルと, 9, 9' 位の 2H 分のシグナルを選択して, 両者の平均値より, 純度を 98.0%と算出した。なお, 今後, DMSO-d₆ 中で, 異性体間の平衡速度が速くなる高温条件で, qNMR を実施する予定である。

C.9. Saikosaponin d

糖のアノマー炭素に結合するプロトンのシグナルを除き, 最も単純なスペクトルは, 12 位のダブルレットシグナルであるが, このシグナルの積分値は, 11 位のシグナルより 3%ほど積分値が小さく, 11 位のシグナルの下に不純物ピークが存在するの, 12 位のシグナル強度に影響を与える化学的環境が存在しているの, 引き続き検討が必要と考えられる。コンピューターによる計算によれば, この部分の安定なコンフォメーションはほぼ固定されており, 13 位に結合したエーテル酸素のローンペア-が比較的 12 位に近いことが示されている。しかし, 12 位の水素とローンペア-との水素結合は無理があり, 水素結合により, 12 位のの水素の積分値が小さくなるとの説明は出来ないものと考えられる。一方, これまでの測定では, 16 位の水酸基の立体が逆である Saikosaponin a では,

12位のシグナルは、11位のシグナルより1.5%ほど面積値が小さいものの、13位に結合したエーテル酸素を持たないSaikosaponin b2では12位、11位のシグナルの面積値はほぼ等しいことが判明している。Saikosaponin類の純度は90%程度であり、不純物の存在は比較的多いものと考えられるので、常識的には、原則Eを適用し、最も積分値の値の小さい(12位の)シグナルの積分値を利用すべきものとするが、Saikosaponin類については、他のロットでの測定を増やし、引き続きどのシグナルを対象とすべきか、検討を行う予定である。

C.10. Dehydrocorydalin Nitrate

11位、12位のシグナルは重なり合っているため、シグナルの形状を完全には確認出来ないため、それ以外で原則A,Bを充たすシグナルとして、8位、1位、4位を選択し、これらのシグナルより純度を算出したところ、98.2%の値が得られた。

C.11. Hirsutin

600 MHzでの測定では、最も単純なシグナルと考えられる17位が9位と分離していないことが判明した。一方、10-12位のシグナルはそれぞれ独立したシグナルとして観測されたので、これらのシグナルを選択した結果、純度95.5%と算出された。今後、800 MHzでの測定を実施し、9位と17位のシグナルの分離が可能かどうか、検討する予定である。

C.12. Hesperidin

フラバノンのA環、B環由来のシグナルは、それぞれまとまって縮退していたため、A環のものを2H分、B環のものを3H分として選択し、両者の平均より、純度92.6%を算出した。

C.13. Perillaldehyde

アルデヒドであり、酸化を受けやすく不安定な化合物である。最も単純なスピン系と考えら

れるのは9位であるが、明らかにショルダーピークが観測され、不純物の混入が予想される。従って、次に単純なピークと考えられる2位を選択し、純度を算出したところ、86.0%の値が得られた。本化合物は、ヘキセン環においてコンフォーメーション的に安定な配座が一つしかないかどうか、引き続き検討が必要なものとする。また、純度が低いため、より純度の高い試料での検討も重要である。

C.14. Rosmarinic acid

ケイヒ酸ユニットとフェニルプロパン酸ユニット部の低磁場領域(2,6,7,8位と5',6'位)で面積値に2%程度差が存在する。この原因が明らかではないが、単純なピークでシグナルの面積値がより低いものを選択するとベンゼン環の2位と、環外の二重結合由来の7,8位となる。これらの3つのシグナルの面積値の平均より、純度93.7%が算出された。今後、ユニット間での面積値の違いの原因を解明する必要があるが、7,8位のシス体が存在する可能性もあり、この点については、シグナルを確認するため積算回数をふやし測定を行う必要性があるものと考えられる。また、異なるロットで同様のことが観測されるか、この点も検討が必要である。

D. まとめ

本研究では、14試料についてqNMRの測定を行ったが、これらの試料のうち、(E)-Capsaicin, (E)-Cinnamic acid, 6-Shogaol, 10-Hydroxy-2-(E)-decenoic acid, (1)-Menthol, Arbutin, Dehydrocorydalin Nitrate, Hesperidinの8化合物については、qNMR測定の際の指標となるべきシグナルが選択されたものとする。残りの化合物については、引き続き行う予定の実験結果と考え合わせて指標シグナルを選択していく予定である。

E. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

F. 研究発表

論文等

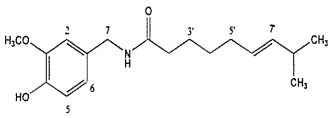
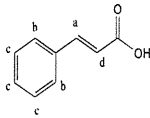
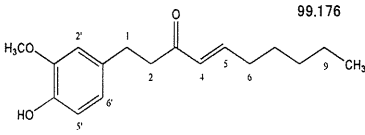
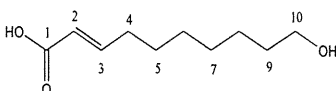
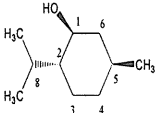
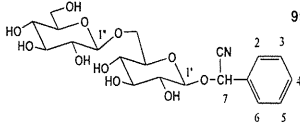
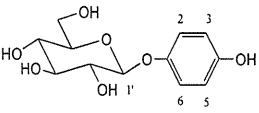
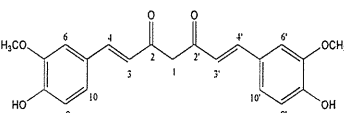
- 1) Hosoe, J., Sugimoto, N., Suematsu, T., Yamada, Y., Hayakawa, M., Katsuhara, T., Nishimura, H., Goda, Y., "Validation studies of qNMR for chemical reagents used as reference standards for quantitative analyses of crude drugs in the Japanese Pharmacopoeia." *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science* **43**, 182-193(2012).
- 2) Tahara, M., Sugimoto, N., Ohtsuki, T., Tada, A., Akiyama, H., Goda, Y., Nishimura, T., "Determination of the purities of commercial reagent products using qNMR for the ensuring the reliability of quantitative analysis." *Journal of Environmental Chemistry* **22**, 33-41 (2012).
- 3) 日本薬局方フォーラム 20 (4) pp648-649 に、「核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用」の原案が提示された。

学会等

- 1) 合田幸広, 生薬の定量規格と日本薬局方試薬, 第 40 回生薬分析シンポジウム, 大阪 (2011.12) .
- 2) 合田幸広, 生薬の定量規格と日本薬局方試薬への定量 NMR の適用, 平成 23 年度日本薬剤師会試験検査センター技術研修会, 東京 (2011.12) .
- 3) 合田幸広, 定量 NMR と日本薬局方試薬への定量 NMR の適用, 第 8 回日本薬局方に関する説明会, 東京 (2012.2) .

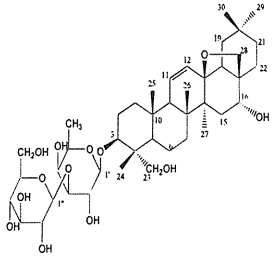
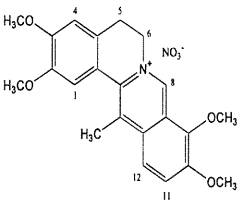
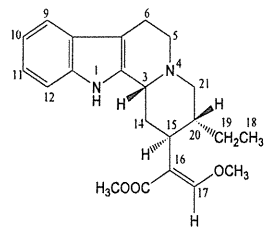
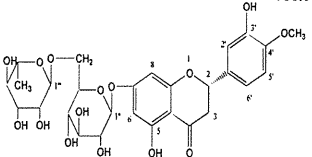
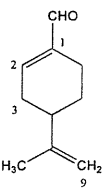
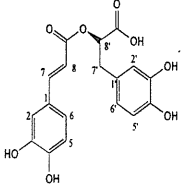
- 4) 合田幸広, 定量 NMR と日本薬局方試薬への定量 NMR の適用, 第 8 回日本薬局方に関する説明会, 大阪 (2012.3) .

表1 日本薬局方生薬定量用指標成分のqNMRによる定量値一覧(1/2)

Reference sample	試験成績書記 載純度 (%)	Position	Chemical shift* (ppm)	Purity (%)	RSD(%) n=3	Solvent	Standard
(E)-Capsaicin							
Lot. LAN1767	100.0000	2-H	6.85	99.52	0.13	MeOH-d4	DSS-d6
							
(E)-Cinnamic acid							
Lot. PEG5666	100.0000	a-H d-H	7.54 6.20	99.10 99.58	0.59 0.08	CDCl3	1,4-BTMSB-d4
			Average	99.34	0.42		
6-Shogaol							
Lot. LAE4354	99.176	2'-H 5'-H	6.76 6.67	99.01 98.62	0.29 0.06	MeOH-d4	DSS-d6
			Average	98.82	0.18		
10-Hydroxy-2-(E)-decanoic acid							
Lot. DCN0416	-	2-H	5.78	98.51	0.05	MeOH-d4	DSS-d6
							
l-menthol							
Lot. EPF1122	-	1-H 8-H 6-H	3.23-3.07 1.99-1.83 1.76-1.65	100.48 99.87 99.93	0.14 0.14 0.15	CDCl3	1,4-BTMSB-d4
			Average	100.09	0.15		
Amygdalin							
Lot. PEL5321	99.936	2,3,4,5,6-H	7.67-7.50	92.62	0.14	D2O	DSS-d6
							
Arbutin							
Lot. CDJ4270	99.9084	2,6-H 3,5-H	7.10-7.01 6.91-6.82	96.34 96.53	0.09 0.18	D2O	DSS-d6
			Average	96.44	0.14		
Curcumin							
Lot. EPJ4012	-	6,6'-H 9,9'-H	7.08 6.63	97.48 98.53	0.33 0.39	acetone-d6	1,4-BTMSB-d4
			Average	98.01	0.36		

* ケミカルシフト値は、スタンダードを基準シグナル 0 ppm とし表した
- 純度の記載なし

表1 日本薬局方生薬試験用標準品のqNMRによる定量値一覧(2/2)

Reference sample	試験成績書記 載純度 (%)	Position	Chemical shift* (ppm)	Purity (%)	RSD(% n=3)	Solvent	Standard
Saikosaponin d							
Lot. LAR0939							
	99.4351	12-H	5.93	92.45	0.34	MeOH-d4	DSS-d6
Dehydrocorydalin Nitrate							
Lot. PEH5139							
	99.780	8-H	9.92	98.11	0.07	DMSO-d6	DSS-d6
		1-H	7.42	98.03	0.23		
		4-H	7.21	98.51	0.13		
		Average		98.22	0.14		
Hirsutin							
Lot. CDE2282							
	100.0000	12-H	7.30	95.37	0.35	MeOH-d4	DSS-d6
		10-H	7.04	95.64	0.08		
		11-H	6.97	95.36	0.45		
		Average		95.46	0.29		
Hesperizin							
Lot. WKF0958							
	100.0000	2', 5', 6'-H	7.04-6.86	92.67	0.12	DMSO-d6	DSS-d6
		8, 6-H	6.17, 6.15	92.56	0.26		
		Average		92.62	0.19		
Perillaldehyde							
Lot. DCM1370							
	-	2-H	6.61-6.53	86.03	0.06	CDCI3	1,4-BTMSB-d4
Rosmarinic acid							
Lot. DCJ4692							
	-	7-H	7.54	93.97	0.10	MeOH-d4	DSS-d6
		2-H	7.03	93.66	0.07		
		8-H	6.25	93.31	0.21		
		Average		93.65	0.12		

* ケミカルシフト値は、スタンダードを基準シグナル 0 ppm とし表した
- 純度の記載なし