

1. 緒言

我々は、日本薬局方における天然物の定量に関する問題を解決するため、定量 NMR (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純度規格化していくか検討を行っている¹⁾。前報では、実際に日本薬局方試薬及び研究者が天然素材よりクロマトグラフィーにより精製した化合物について qNMR の測定を行い、同法を純度規格化に利用する場合における課題について報告した。本研究では、日本薬局方において生薬等の成分の定量測定用の分析用標品として用いられる 2 化合物（「コウボク」に使用されるマグノロール、「サンシシ」に使用されるゲニポシド）を用い、qNMR 法を利用して複数機関の測定者間で独立に両化合物について定量を行い、同法を、日本薬局方試薬の純度規格化に利用するためのバリデーション実験を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 期間及び参加者

平成 22 年 10 月下旬より 11 月下旬までの期間中、機器間誤差を確認するため同一参加者による同一機器による測定実験を除き、5 機関（国立衛研生薬部、国立衛研生活衛生化学部、ツムラ、日本電子、和光純薬工業）の参加者 5 名が、全ての操作について独立して実験を行った。

2.2 NMR 溶媒と実験材料

NMR 測定の溶媒として ISOTEC 製又は和光純薬製の重水素化率 99.9%以上の重クロロホルム（マグノロール用、Isotec 製 Cat. No. 151858, Lot. 08414LE, Lot. ST0581 又は和光純薬製 Cat. No. 036-19011, Lot. EPR3096）及び重水素化率 99.9%以上の重メタノール（ゲニポシド用、Isotec 製、Cat. No. 194166, Lot. EW1886, EQ0675 又は、和光純薬製 Cat. No. 130-10402, Lot. KWP4978）を用いた。内部標準物質としては、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、取り扱いの容易な固体化合物で、¹H-NMR で δ 0.23 ppm に鋭い 1 本のピークを示す 1,4-BTMSB-d₄ (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-d₄, Mw=226.50) を、和光純薬より購入して使用した。なお、本品は ASNITE (Guide 34) を取得した認証標準物質と同一である。測定対象物としては、同一ロットのものを一定量（数 100 mg）用意できる生薬成分として、マグノロールとゲニポシドを選択した。マグノロール (Mw=266.34) 及びゲニ

ポシド (Mw=388.37) は、株式会社ツムラで分析用標品として単離精製されたものを使用した。なお、両化合物は、日本薬局方の「コウボク」及び「サンシシ」の定量法で使用される定量用マグノロール²⁾ 及びゲニポシド³⁾ の規格を満たしている。

2.3 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 XP2U あるいは UMX2) を使用した。NMR は日本電子製 ECA800, ECA600, ECA500, ECS 400 (2 台) を使用した。このうち、ECA600 及び、両 ECS400 にはオートサンプラー (AS) が設置されており、AS が設置されている場合には、AS を使用した。NMR 試料管は Wilmad 製 528-pp を使用した。

2.4 試料溶液の調製

各天秤にて、25 mg 程度の風袋を使用し USP 基準⁴⁾ に則り各測定者について最小計量値を計算した結果、最大値は 0.6782 mg であることを確認した。

試料溶液の調製は以下のように実施した。(1)測定物質を 5.0000 mg \pm 10%の範囲で、可能な限り精密に秤量する（風袋と風袋込みの試料を別計量）。(2)試料を風袋ごと希釈用容器に入れて密栓する。(3)別に、内標準物質を 1 mg 以上 1.1 mg 以下になるように精密に秤量し、希釈容器に加えて密栓する。(4)次に NMR 測定溶媒を 1.0 mL 量り希釈容器に加えて密栓し、試料と内標準物質を溶解させる（試料濃度：マグノロール約 19 mmol/L, ゲニポシド約 13 mmol/L）。次いで測定物質について(1)~(4)までの操作を 2 回繰り返す。1 測定物質あたり 3 本の試料溶液を用意する。これらの試料溶液について振とう器あるいはソニケーターを用いて良く攪拌し、不溶物がないことを確認する。全ての段階で試料容器の持ち運びには汚れのないピンセットを使用した。なお、使用した風袋の質量は 25~30 mg 程度であった。

次いで、試料溶液をピペットで採り試料液高 40 mm となるように NMR 試料管に移し、キャップを閉めテフロンシールで密栓し、直ちに NMR の測定を行った。

2.5 qNMR の測定

観測核 ¹H, 測定周波数は機器に対応して 400~800 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 ¹³C デカップル実施, 積算回数 8 回, ダミ

ースキャン2回とし、各試料について、非連続に3回測定を行った。NMR データの処理には、日本電子製 Alice 2 for qNMR を使用、内部標準物質ピーク (1,4-BTMSB-d₄) 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、測定者の判断に基づき、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⁹⁾。

3. 結果と考察

3.1 測定対象シグナル

測定対象シグナルとしては、前報¹⁾ で示した考え方に従い、マグノロールの場合には、6.81 ppm (b) と 6.70 ppm (c) のダブルットシグナル (各々1,2,4 置換ベンゼンの6位, 3位)、ゲニボシドの場合には、7.26 ppm (a) のシングレットシグナルと 4.92 ppm (c) のダブルットシグナル (各々シクロペンタ (c) ピラン環の3位, 1位) 4.06 ppm (e1) 及び 3.93 ppm (e2) の各ダブルットシグナル (ヒドロキシメチル基のジェミナルプロトン) を選択した。得られた積分値について、マグノロールの場合には、シグナル b と c の値の平均値を、ゲニボシドの場合には、シグナル a, c, e1, e2 の値の平均値を算出した。

3.2 積分選択シグナルの検証

3.2.1 マグノロール

NMR 測定より得られた、シグナル b, c の典型的なスペクトル拡大図と積分範囲を Fig. 1 に示す。参加者が測定した全ての 1,4-BTMSB-d₄ 及び b, c シグナルについて形状を確認したところ、異常は観測されなかった。更に 5 名の参加者のシグナル b に関する各積分値 (n=3×3=9) の平均±標準偏差 (SD) は、それぞれ 98.66±0.07, 99.05±0.19, 98.80±0.11, 98.95±0.07, 98.74±0.42 でこれらの総平均±標準偏差 (SD) は 98.84±0.16 であった (Table 1)。一方シグナル c に関する積分値の平均±SD は、それぞれ 98.79±0.05, 99.30±0.03, 99.06±0.04, 99.18±0.12, 98.70±0.30 でこれらの総平均±SD は 99.01±0.26 であった (Table 1)。このようにシグナル c 及び b の積分値は、非常に近い値を示し (Fig. 2)、それぞれの積分範囲に不純物等が入っている可能性は非常に低く、マグノロールの純度は、両ピークの平均値で示すことで問題ないものと考えられた。

3.2.2 ゲニボシド

NMR 測定より得られた、シグナル a, c, e1, e2 の典型的なスペクトル拡大図と積分範囲を Fig. 3 に示す。参加者が測定した全ての 1,4-BTMSB-d₄ 及び a, c, e1, e2 シグナルについて形状を確認した。その結果、参加者 S のシグナル a のデータにおいて、チャートの対称性と分解能がやや悪いため、微少な不純物ピークも含めて積分

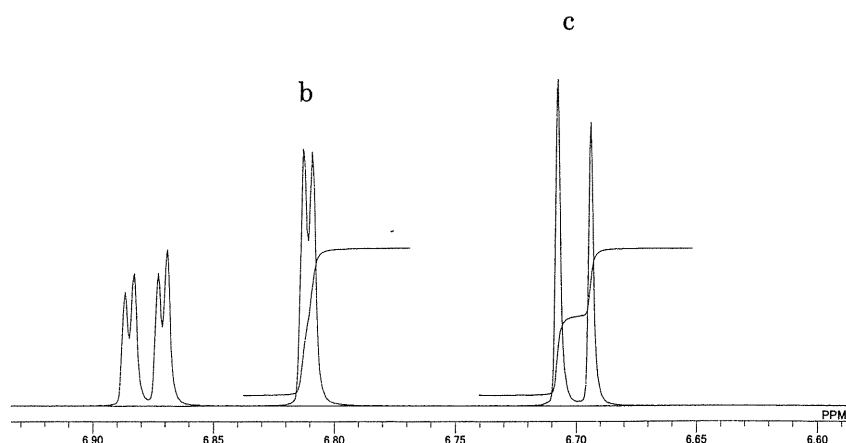


Fig. 1 Enlarged View with Integration Range of Signals b and c from Magnolol

Table 1 Purity (%) Data of Magnolol by Using Target Signal b or c and Their Average with SD.

Target signal	Participant					Average (%)	SD (%)
	O	U	E	A	S		
b	98.66±0.07	99.05±0.19	98.80±0.11	98.95±0.07	98.74±0.42	98.84	0.16
c	98.79±0.05	99.30±0.03	99.06±0.04	99.18±0.12	98.70±0.30	99.01	0.26

SD: Standard deviation

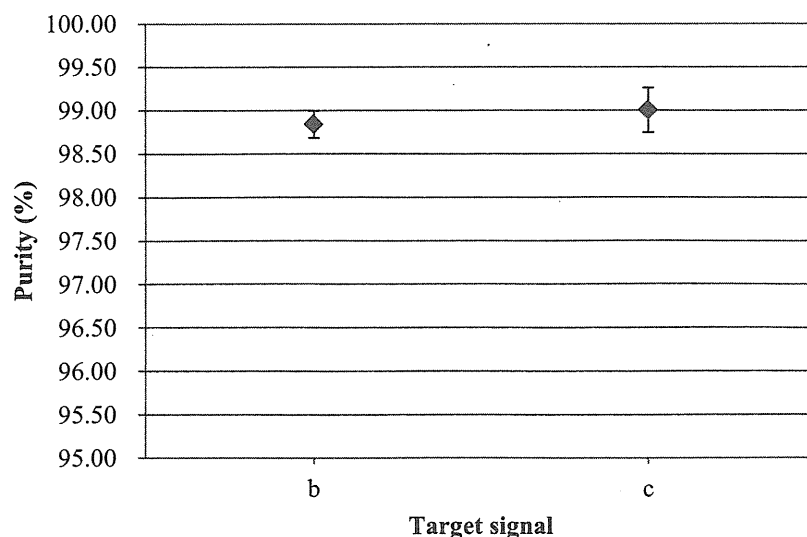


Fig. 2 Average of Magnolol Purity (%) by Using Target Signal b or c

していることが判明した。そこで、参加者 S のデータでは、a の積分値（実測値：97.28±0.29）を使用しないこととした。S を除く参加者のシグナル a に関する積分値の平均±SD は、それぞれ 95.74±0.15, 95.82±0.23, 96.27±0.09, 96.46±0.20 であり、これらの総平均±SD は、96.07±0.35 であった（Table 2, Fig. 4）。

シグナル c に関する個々の参加者の各積分値の平均±SD は、それぞれ 95.92±0.14, 96.37±0.27, 95.59±0.10, 96.38±0.30, 96.21±0.37 であり、これらの総平均±SD は、96.09±0.34 であった（Table 2）。同様にシグナル e1 に関する個々の参加者の各積分値の平均±SD は、それぞれ 95.75±0.04, 96.15±0.19, 95.59±0.04, 96.20±0.10, 96.77±0.46 であり、これらの総平均±SD は、96.09±0.46 であった（Table 2）。また、シグナル e2 に関する個々の参加者の各積分値の平均±SD は、それぞれ 95.81±0.34, 96.33±0.51, 96.32±0.06, 96.72±0.22, 96.98±0.48 であり、これらの総平均±SD は、96.43±0.45 であった（Table 2）。以上シグナル a, c, e1, e2 の積分値は、それぞれ非常に近い値を示し（Fig. 4）、それぞれの積分範囲に不純物等が入っている可能性は非常に低く（参加者 S の a のデータを除く）、ゲニポシドの純度は、これら 4 ピークの平均値（参加者 S の場合には a を除く 3 ピーク）で示すことで問題ないものと考えられた。

3.3 NMR の機器内誤差の検討

3.3.1 個別積分によって得られた結果に基づく検討

今回の報告では、個々の参加者が、それぞれ独立した別の NMR を使用して測定を行っている。個々の機器内誤差を検討するため、同一サンプルについて個々の測定者が非連続に 3 回ずつ測定し、マグノロールの定量対象

ピークについて積分した結果を Table 3-1 に、ゲニポシドの定量対象ピークについて積分した結果を Table 4-1 示す。

参加者 O において、マグノロールの試料 1 の個々の測定におけるシグナル b, c の積分値の平均は、それぞれ、98.75, 98.82, 98.57 であり、これらの総平均±SD は、98.71±0.13 であった。同様に試料 2 の総平均±SD は 98.70±0.10, 試料 3 の総平均±SD は、98.77±0.06 であった。それぞれの参加者の各試料ごとの平均の標準偏差は、参加者 O で 0.06~0.13, 参加者 U で 0.09~0.20, 参加者 E で 0.05~0.09, 参加者 A で 0.04~0.16, 参加者 S で 0.24~0.49 であった。

ゲニポシドを測定試料とした場合でもマグノロールと同様の傾向が得られた。すなわち、それぞれの参加者の各試料ごとの平均の標準偏差は、参加者 O で 0.05~0.28, 参加者 U で 0.09~0.57, 参加者 E で 0.07~0.19, 参加者 A で 0.09~0.19, 参加者 S で 0.44~0.49 であった。

両化合物を使用した同一試料の繰り返し測定において、ばらつきの大きさは、機器の測定磁場の大きさとは関係しなかった。これは、両化合物の純度が高く、十分に分離したシグナルを積分対象として選択し、積分範囲に不純物が入っていないか、不純物の可能性があったシグナルを事前に積分値の計算から除いたことによるものと考えられる。更に、ばらつきが小さい結果を示した参加者 O, E, A は AS を使用していることが判明した。したがって、AS の使用により、スピナーへのサンプル管の抜き差しによる影響等の人為的な誤差がなくなるため、機器内誤差は小さくなるものと考えられた。また、参加者 S のばらつきは、同じく AS を使用しない参加者 U の結果と比較しても、明らかに大きいものと考えられた。そ

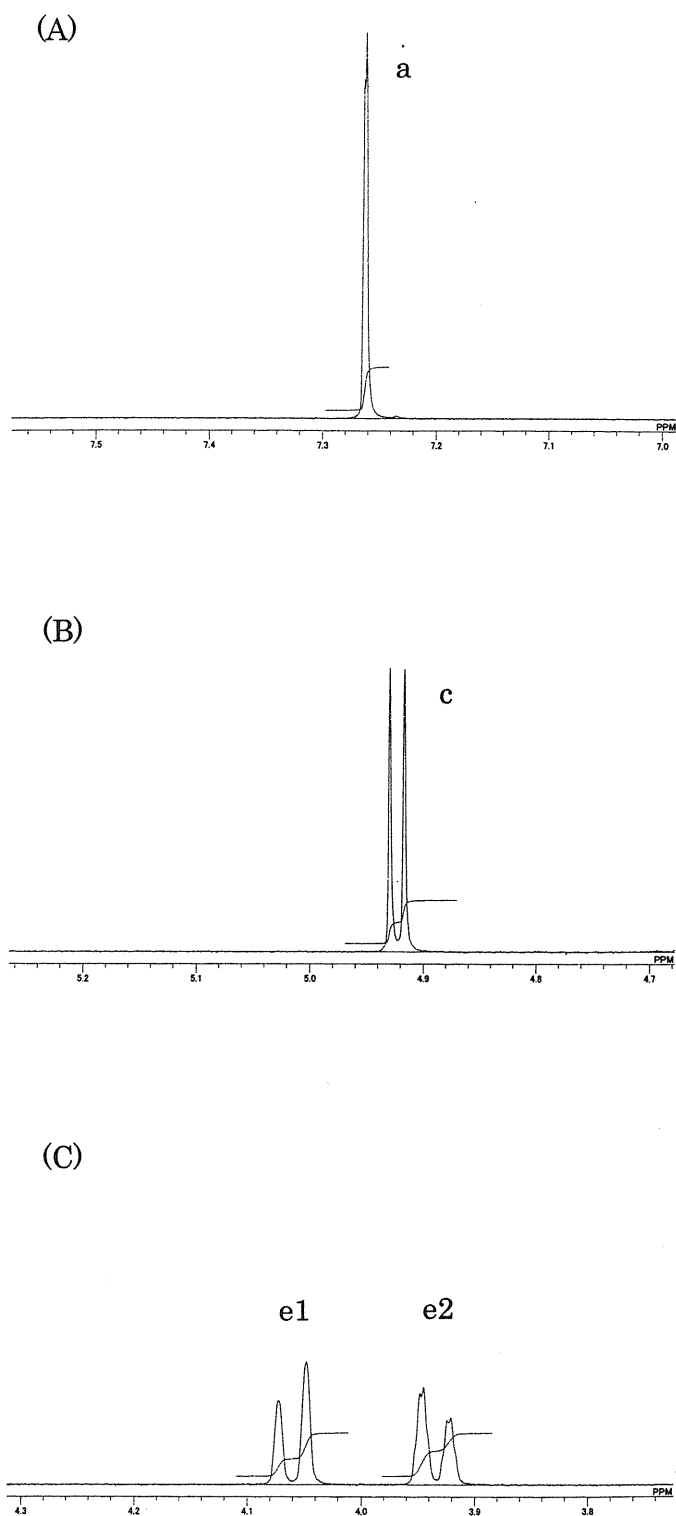


Fig. 3 Enlarged View with Integration Range of Signals a (A), c (B), e1 and e2 (C) from Geniposide

ここで、その原因を突き止めるため、全てのNMRチャートを確認したところ、NMRのシムの調整が適切ではない可能性が示唆された。そこで使用したNMRを再点検したところ、測定条件として設定したオートFGシムだ

けでは調整できないZ3軸、Z4軸のシムのずれ⁹⁾が明らかになった。

3.3.2 積分範囲を固定した手法（固定積分）での検討
Table 3-1 及び Table 4-1 の積分値の算出には、個々

Table 2 Purity (%) Data of Geniposide by Using Target Signal a, c, e1 or e2 and Their Average with SD.

Target signal	Participant					Average (%)	SD (%)
	O	U	E	A	S		
a	95.74±0.15	95.82±0.23	96.27±0.09	96.46±0.20	—	96.07	0.35
c	95.92±0.14	96.37±0.27	95.59±0.10	96.38±0.30	96.21±0.37	96.09	0.34
e1	95.75±0.04	96.15±0.19	95.59±0.04	96.20±0.10	96.77±0.46	96.09	0.46
e2	95.81±0.34	96.33±0.51	96.32±0.06	96.72±0.22	96.98±0.48	96.43	0.45

— : The data were omitted from the average calculation because of contamination of a impurity peak.

SD: Standard deviation

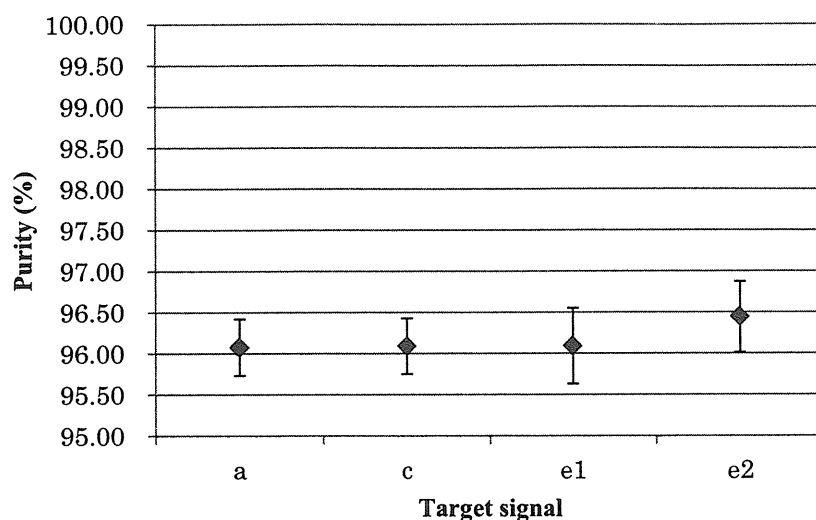


Fig. 4 Average of Geniposide Purity (%) by Using Target Signal a, c, e1 or e2

の測定者が化合物ごとに、最適と判断した積分範囲を（マニュアルで）決定する（個別積分）という行為が含まれており、この部分の影響で個々のNMRの機器内誤差以外の誤差が生じる可能性も考えられた。そこで、各シグナルにつき、5人の測定者のうち任意で選んだ1名の積分範囲を固定した積分範囲（データポイント範囲）として設定し、その条件で積分値を再計算し、各試料ごとに平均±SDを算出した。その結果を Table 3-2（マグノロール）、Table 4-2（ゲニポシド）に示す。なお、参加者Sの結果については、前述した原因で測定結果の信頼性がやや低いものと考えられたため、本表からは除外した。

固定積分におけるそれぞれの参加者の各試料ごとの平均の標準偏差は、マグノロールにおいて参加者Oで0.06~0.13、参加者Uで0.08~0.16、参加者Eで0.05~0.06、参加者Aで0.02~0.12、ゲニポシドにおいて、参加者Oで0.05~0.28、参加者Uで0.11~0.49、参加者Eで0.05~0.20、参加者Aで0.03~0.19であった。更に、これら各試料ごとの全SDの平均は、マグノロールで0.08、ゲニポシドで0.17となった。

これより、固定積分の場合でも、個別積分で得られた結果とほぼ同様のばらつきを示すことが判明した。

3.3.3 誤差と S/N に関する考察

今回のマグノロールに関するqNMRの測定チャートにおいて、最もピーク高さが高いシグナルは、18個分のHに由来する1,4-BTMSB-d₄の基準ピークである。今回の試験では、天秤の最小計量値を考慮して、1,4-BTMSB-d₄の秤量値を1mg以上1.1mg以下とする一方、基本的に高価な天然物の定量を考慮して、定量対象物の秤量値を5mg±10%とした。その結果、シグナルの多重度、モル比も考慮した場合、1,4-BTMSB-d₄の基準ピークの高さを1とすると、マグノロールの測定シグナルのピーク高さは1/4程度、ゲニポシドの測定シグナルのピーク高さは1/12程度となる。よって、S/N比を考慮すれば、ピーク高さが3倍あるマグノロールのシグナルの方がゲニポシドのシグナルよりノイズの影響が少なくなり、1/√3≒1/2倍程度測定の際のばらつき（SD）が減少すると説明することが可能となる。当然ではあるが、試料をより高濃度で測定すれば、SDは減少することになる。

今回の測定では、最もピークが低いゲニポシドのe2

Table 3-1 Calculated Purity of Magnolol by Standard Manual Method

Sample	Set	Target signal	Participant					Total average (%)	SD (%)	
			O	U	E	A	S			
No.1	1	b	98.74	99.06	98.96	98.82	98.64			
		c	98.76	99.02	99.16	99.18	98.88			
		AV	98.75	99.04	99.06	99.00	98.76			
	2	b	98.72	99.33	98.85	98.92	98.78			
		c	98.92	99.33	99.11	99.16	98.68			
		AV	98.82	99.33	98.98	99.04	98.73			
	3	b	98.53	98.84	98.69	98.83	99.29			
		c	98.62	99.06	99.10	98.82	99.02			
		AV	98.57	98.95	98.90	98.82	99.16			
Sample 1 average(%)			98.71	99.11	98.98	98.96	98.88			
SD(%)			0.13	0.20	0.08	0.12	0.24			
No.2	1	b	98.67	98.75	98.93	98.89	98.26			
		c	98.66	99.55	99.02	99.12	98.55			
		AV	98.67	99.15	98.98	99.00	98.40			
	2	b	98.74	99.17	98.81	98.92	98.48			
		c	98.87	99.28	98.97	99.26	98.34			
		AV	98.80	99.23	98.89	99.09	98.41			
	3	b	98.48	99.40	98.63	98.87	99.37			
		c	98.76	99.60	98.97	99.21	99.13			
		AV	98.62	99.50	98.80	99.04	99.25			
	Sample 2 average(%)			98.70	99.29	98.89	99.04	98.69		
	SD(%)			0.10	0.18	0.09	0.04	0.49		
	No.3	1	b	98.65	98.75	98.83	99.02	98.65		
c			98.98	99.44	99.12	99.15	98.56			
AV			98.82	99.09	98.98	99.08	98.61			
2		b	98.68	99.16	98.77	99.24	98.15			
		c	98.74	99.30	99.02	99.51	98.22			
		AV	98.71	99.23	98.90	99.38	98.19			
3		b	98.74	98.98	98.72	99.05	99.01			
		c	98.82	99.15	99.05	99.22	98.89			
		AV	98.78	99.07	98.89	99.14	98.95			
Sample 3 average(%)			98.77	99.13	98.92	99.20	98.58			
SD(%)			0.06	0.09	0.05	0.16	0.38			
Participant average(%)			98.73	99.18	98.93	99.07	98.72	98.92	0.20	
SD(%)			0.04	0.10	0.05	0.12	0.15	98.97*	0.19*	
								0.09		
								0.08*		

* Values were calculated excluding the participant average of the participant S.

AV: Average of calculated purity (%) of target signals

SD: Standard deviation

シグナルに対して、ノイズのRMSに対するS/N比は、120から257に分布している。もし、機械的な精度が上がり、このS/N比が1000程度になれば、今回のゲニポシド程度のモル濃度(13 mmol/L)であっても、機器内誤差はSDで0.1以下になるものと考えられる。この場合、qNMRの純度の決定に機器内誤差がほとんど影響しなくなるものと推定される。

3.4 参加者の調液誤差の検討

Table 3-1, 3-2, 4-1, 4-2のParticipant averageの値

は、各参加者について、各3試料ごとの測定平均値(each sample average)の平均値を示す。したがって、ここで示されるSDは、試料ごとの各参加者の調液のばらつきを示すことになる。マグノロールに関しマニュアル法による個別積分を使用した場合の参加者O, U, E, Aに関するこの値は、0.04, 0.10, 0.05, 0.12となり、SDの平均は0.08となる。一方、固定積分を行った場合には、0.04, 0.11, 0.05, 0.09となりSDの平均は0.07となる。また、ゲニポシドの場合には、個別積分で、各参加者のSDは0.12, 0.11, 0.18, 0.14となりSDの平均は0.14,

Table 3-2 Calculated Purity of Magnolol by Fixed Integration Area Method

Sample	Set	Target signal	Participant				Total average (%)	SD (%)	
			O	U	E	A			
No.1	1	b	98.74	99.23	99.11	99.12			
		c	98.76	99.02	98.98	99.18			
		AV	98.75	99.12	99.04	99.15			
	2	b	98.72	99.55	99.16	99.26			
		c	98.92	99.33	99.12	99.17			
		AV	98.82	99.44	99.14	99.21			
	3	b	98.53	99.46	98.95	99.13			
		c	98.62	99.07	99.11	98.84			
		AV	98.57	99.27	99.03	98.98			
	Sample 1 average(%)			98.71	99.28	99.07			99.11
	SD(%)			0.13	0.16	0.06			0.12
	No.2	1	b	98.67	99.34	98.99			99.24
c			98.66	99.56	98.84	99.11			
AV			98.67	99.45	98.92	99.17			
2		b	98.74	99.48	99.07	99.19			
		c	98.87	99.29	98.99	99.26			
		AV	98.80	99.38	99.03	99.22			
3		b	98.48	99.55	98.98	99.19			
		c	98.76	99.59	98.97	99.21			
		AV	98.62	99.57	98.98	99.20			
Sample 2 average(%)			98.70	99.47	98.97	99.20			
SD(%)			0.10	0.09	0.06	0.02			
No.3		1	b	98.65	99.26	99.01	99.46		
	c		98.98	99.43	98.92	99.13			
	AV		98.82	99.34	98.97	99.30			
	2	b	98.68	99.25	99.01	99.43			
		c	98.74	99.33	99.04	99.25			
		AV	98.71	99.29	99.02	99.34			
	3	b	98.74	99.21	99.08	99.30			
		c	98.82	99.15	99.06	99.23			
		AV	98.78	99.18	99.07	99.26			
	Sample 3 average(%)			98.77	99.27	99.02	99.30		
	SD(%)			0.06	0.08	0.05	0.04		
	Participant average(%)			98.73	99.34	99.02	99.20	99.07	0.26
SD (%)			0.04	0.11	0.05	0.09	0.07		

AV: Average of calculated purity (%) of target signals

SD: Standard deviation

固定積分で各参加者の SD は 0.12, 0.12, 0.15, 0.14 となり SD の平均は 0.13 となる。したがって、この様な条件下での調液誤差は SD でマグノロールの場合 0.08 以下、ゲニポシドの場合 0.14 以下と考えられる。

一般に、NMR のチャートは、使用するプローブの特性とシムの状態により、そのシグナルの形状が微妙に変化するため（機器間差）、より再現性の良い積分値を得るためには、積分の開始点と終了点を得られたシグナルごとに変更することが望ましい。この点を考慮して、今回の測定手順では、積分範囲をマニュアルで指定する手

法（個別積分）としている。今回の実験で、Participant average の段階では、個別積分と固定積分のどちらでも、積分値は、前述したように、ほぼ同様のばらつきを示すことが判明した。したがって、今回使用した機器においては、特に、個別に積分範囲を規定しても、あらかじめ積分するデータポイント範囲を規定しても、特に差はないことが明らかとなった。なお、同一の機器で連続的に試料を測定する場合には、異なった調液の試料であっても、ほぼ同一のシグナル形状が現れるものと考えられることから、この場合には、機器内誤差を抑えるため、同

Table 4-1 Calculated Purity of Geniposide by Standard Manual Method

Sample	Set	Target signal	Participant					Total average (%)	SD (%)	
			O	U	E	A	S			
No.1	1	a	95.22	96.13	96.25	96.52	96.96**			
		c	95.56	97.15	95.97	96.31	96.13			
		e1	95.53	96.13	95.69	96.04	96.37			
		e2	95.35	96.94	96.18	96.70	96.37			
		AV	95.41	96.59	96.02	96.39	96.29			
	2	a	95.78	95.69	96.08	95.90	97.24**			
		c	95.68	95.48	95.93	96.66	96.68			
		e1	95.76	95.74	95.78	95.75	97.36			
		e2	95.86	95.41	96.43	96.77	97.46			
		AV	95.77	95.58	96.06	96.27	97.17			
	3	a	95.85	95.90	96.64	96.39	97.36**			
		c	95.70	96.86	96.34	95.92	96.08			
		e1	95.99	96.74	95.84	96.09	96.73			
		e2	96.35	96.64	96.48	96.48	97.13			
		AV	95.97	96.53	96.33	96.22	96.65			
	Sample 1 average(%)			95.72	96.23	96.13	96.30	96.70		
	SD(%)			0.28	0.57	0.17	0.09	0.44		
	No.2	1	a	95.94	96.07	96.31	96.53	97.01**		
			c	96.58	95.91	95.52	95.94	95.72		
			e1	95.96	95.85	95.40	96.23	96.25		
			e2	95.51	96.64	96.31	96.59	96.53		
			AV	96.00	96.12	95.89	96.33	96.16		
		2	a	95.86	95.44	96.40	96.50	97.70**		
			c	95.99	95.98	95.85	96.54	96.85		
			e1	95.70	96.36	95.54	96.40	97.21		
			e2	96.03	96.01	96.23	97.20	97.35		
			AV	95.89	95.95	96.01	96.66	97.14		
		3	a	95.99	95.70	96.25	96.83	97.20**		
			c	95.98	96.17	95.30	96.07	96.32		
			e1	96.04	96.37	95.33	96.64	96.90		
			e2	95.74	96.03	96.62	96.84	97.09		
			AV	95.94	96.07	95.88	96.66	96.77		
		Sample 2 average(%)			95.94	96.05	95.92	96.55	96.69	
SD(%)			0.05	0.09	0.07	0.19	0.49			
No.3		1	a	93.12*	96.00	96.22	96.48	96.86**		
			c	95.97*	96.75	95.24	96.48	95.51		
			e1	94.95*	96.12	95.66	96.50	96.22		
			e2	94.80*	96.83	96.59	96.54	96.40		
			AV	94.71*	96.42	95.93	96.50	96.04		
		2	a	95.58	95.73	96.08	96.32	97.43**		
			c	95.99	96.74	94.72	96.98	95.93		
			e1	95.67	96.06	95.32	96.11	97.01		
			e2	96.40	95.94	96.09	96.97	97.24		
			AV	95.91	96.12	95.55	96.59	96.73		
		3	a	95.82	95.72	96.18	96.68	97.76**		
			c	95.73	96.28	95.48	96.50	96.63		
			e1	95.36	95.99	95.72	96.06	96.88		
			e2	95.60	96.52	95.95	96.43	97.26		
			AV	95.63	96.13	95.83	96.42	96.92		
		Sample 3 average(%)			95.77	96.22	95.77	96.50	96.56	
	SD(%)			—	0.17	0.19	0.09	0.46		
	Participant average(%)			95.81	96.17	95.94	96.45	96.65	96.20	0.35
	SD(%)								96.09***	0.28***
									0.12	
									0.14***	

* The data were omitted from the sample 3 average calculation because of lower spectrum resolution for unknown reasons.

** The data were omitted from the average calculation because of contamination of a impurity peak.

*** Values were calculated excluding the participant average of the participant S.

AV: Average of calculated purity (%) of target signals

SD: Standard deviation

Table 4-2 Calculated Purity of Geniposide by Fixed Integration Area Method

Sample	Set	Target signal	Participant				Total average (%)	SD (%)
			O	U	E	A		
No.1	1	a	95.22	96.18	96.13	96.45		
		c	95.56	96.65	95.78	96.23		
		e1	95.53	96.77	95.55	95.97		
		e2	95.35	97.03	95.76	96.30		
		AV	95.41	96.66	95.80	96.24		
	2	a	95.78	96.00	96.10	96.03		
		c	95.68	95.21	95.86	96.60		
		e1	95.76	96.46	95.72	95.78		
		e2	95.86	95.77	96.08	96.55		
		AV	95.77	95.86	95.94	96.24		
	3	a	95.85	95.89	96.61	96.51		
		c	95.70	96.93	96.28	95.92		
		e1	95.99	97.42	95.78	96.04		
		e2	96.35	96.77	96.10	96.24		
		AV	95.97	96.75	96.19	96.18		
Sample 1 average(%)			95.72	96.42	95.98	96.22		
SD(%)			0.28	0.49	0.20	0.03		
No.2	1	a	95.94	96.12	96.32	96.59		
		c	96.58	96.02	95.51	95.88		
		e1	95.96	96.38	95.38	96.14		
		e2	95.51	96.90	95.94	96.24		
		AV	96.00	96.36	95.78	96.21		
	2	a	95.86	95.64	96.28	96.82		
		c	95.99	95.71	95.83	96.25		
		e1	95.70	96.94	95.49	96.33		
		e2	96.03	96.23	95.92	96.94		
		AV	95.89	96.13	95.88	96.58		
	3	a	95.99	95.65	96.38	96.87		
		c	95.98	96.96	95.49	96.02		
		e1	96.04	96.52	95.20	96.43		
		e2	95.74	95.90	96.18	96.51		
		AV	95.94	96.26	95.81	96.46		
Sample 2 average(%)			95.94	96.25	95.83	96.42		
SD(%)			0.05	0.11	0.05	0.19		
No.3	1	a	93.12*	96.19	96.22	96.71		
		c	95.97*	97.25	95.33	96.52		
		e1	94.95*	96.47	95.49	96.44		
		e2	94.80*	96.82	96.29	96.39		
		AV	94.71*	96.68	95.83	96.52		
	2	a	95.58	95.65	96.06	96.57		
		c	95.99	97.44	94.86	96.84		
		e1	95.67	96.32	95.29	96.10		
		e2	96.40	95.90	95.78	96.74		
		AV	95.91	96.33	95.50	96.56		
	3	a	95.82	95.75	96.15	96.82		
		c	95.73	96.55	95.44	96.39		
		e1	95.36	96.57	95.59	96.02		
		e2	95.60	96.83	95.55	96.25		
		AV	95.63	96.42	95.68	96.37		
Sample 3 average(%)			95.77	96.48	95.67	96.48		
SD(%)			—	0.18	0.17	0.10		
Participant average(%)			95.81	96.38	95.83	96.37	96.10	0.32
SD (%)			0.12	0.12	0.15	0.14	0.13	

* The data were omitted from the sample 3 average calculation because of lower spectrum resolution for unknown reasons.

AV: Average of calculated purity (%) of target signals

SD: Standard deviation

一の積分範囲で積分することが重要であるし、今回の測定もそのように実施している。

3.5 NMR の機器間誤差の検討

Table 3-1, 4-1 の参加者ごとの Participant average を比較すると、各参加者が使用した機器ごとの定量値の特徴と参加者ごとの調液、個別積分の特徴が現れることになる。前述した理由でデータがばらついた参加者 S のデータを除くと、マグノロールとゲニポシドの両化合物での Participant average の値は、参加者 O, U, E, A で、それぞれ 98.73, 99.18, 98.93, 99.07 (以上マグノロール)、95.81, 96.17, 95.94, 96.45 (以上ゲニポシド) となり、両化合物とも参加者 O, E で低く、参加者 U, A で高くなっている。そこで、このような傾向が、機器の違いによるもの(機器間誤差)であるのか、参加者の調液等の違いによるものであるのかを確認する目的で、同一の機器(ECA600)を使用し、同一測定者(参加者 O)により、参加者 O, U, E, S が調液したゲニポシド試料を用いて NMR の測定を行った(参加者 A が調液した試料は、保存中のトラブルで再測定できなかった)。その結果、参加者 U が調液した試料で得られた結果(Participant average) が最も低く (95.93 ± 0.19)、参加者 O の試料 (95.94 ± 0.05) がほとんど同じ値を示す一方、参加者 S の試料の値がやや高く (96.08, サンプル No. 3 の測定ができなかったため SD は求められない)、参加者 E の試料の値が最も高い (96.19 ± 0.13) ことが判明した。ゲニポシドについて別々の試料を別々の NMR で測定した場合と、別々の試料を同一の NMR で測定した場合を、比較可能な参加者 O, U, E の試料の値で比較してみると、前者は $U > E > O$ であり、後者は $E > O \approx U$ となり、得られる積分値の傾向は、異なることが判明した。

そこで、異なった 3 人の調製者 (O, U, E) が 3 回ずつ調製した 9 試料を同一の NMR で測定した結果 (Table 5) をもとに一元配置の分散分析を実施した。その結果、P 値は 0.101, F 境界値は 5.14, 観測された分散比は 3.44

Table 5 Calculated Purity of Geniposide by Using JEOL ECA600

Sample	Preparator		
	O	U	E
No.1	95.89	95.81	96.25
No.2	95.99	95.84	96.28
No.3	95.95	96.15	96.04
Average (%)	95.94	95.93	96.19
SD (%)	0.05	0.19	0.13

SD: Standard deviation

となった。したがって、5%の棄却域 (95%の有意水準) では試料の調製者間で得られる測定値に差はないという結果となった。以上の結果を考え合わせると、別々の試料を別々の NMR で測定した場合に得られた差は、試料の調製者間差というより、機器間誤差である可能性が高いことが判明した。

3.6 積分値の誤差の総合検討

Table 3-1, Table 4-1 の参加者ごとの Participant average の平均値 \pm SD の値は、今回のバリデーション実験で検討を行った全ての積分値の誤差要因 (機器内誤差, 調液誤差, 機器間誤差等) を全て含んで得られた値である。参加者 S のデータを除くと、その値はマグノロールでは、 98.97 ± 0.19 となり、得られた最大値と最小値の差は 0.45, ゲニポシドでは、 96.09 ± 0.28 となり、最大値と最小値の差は 0.64 となる。生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり、規制値も 0.1% が最小単位であることから、天然物である生薬ごとのばらつきを考慮すれば、定量用の標準物質の含量精度は、有効数字 2 桁を保証すれば十二分と考えられる。今回の検討では、なるべく測定差が大きくなるように、異なった NMR を使用して行った。この場合、マグノロールの指標プロトン濃度 (マグノロールの場合 2H 分の縮重したシグナルを積分しているため、38 mmol/L/1H, 1H 分のダブルレットを指標シグナルとして、分子量 300 で 10 mg 程度) で定量試料を調製すれば、機器間誤差を含めても得られた定量値の標準偏差が 0.2 程度、ほぼ 95% 信頼区間となる平均値 ± 2 SD が平均値 ± 0.4 程度となり、有効数字 2 桁を保証しながら十分に値付けが可能となる。

現在、独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター (IA Japan) の認定プログラム (ASNITE) において、校正された NMR 装置を用いて試薬等の値付けを行う機関に対する認定を行う準備が進められている。したがって、近い将来、試薬会社はこの認定を受けて試薬の値付けを行うことが可能となり、それによって、結果の同等性が確保できるものと考えられる。この場合、機関間誤差 (機器間誤差を含む) は無視できることになる。したがって、機器内の測定ばらつき 0.08 (マグノロールにおける各参加者の全ての Sample average の標準偏差の平均) に、調液によるばらつき 0.07 程度 (マグノロールにおける参加者の Participant average の標準偏差の平均、秤量値が今回の 5 mg より大きい 10 mg であれば、実際には秤量誤差がより小さくなり、今回得られたこの値より小さくなる可能性が高い) を考慮すれば良いことになり、計量学的により正確な値付けが可能となる。

4. まとめ

本研究では、qNMR により、日本薬局方で使用する試薬の SI トレサブルな値付けが現実的に可能であるかどうか検討するため、日本薬局方の定量法で使用される定量用試薬規格を満たす化合物を利用して、5 機関によるバリデーション実験を行った。その結果、有効数字 2 桁程度の精度を持つ値付けが、現実的に可能であることが示された。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費及び財団法人日本公定書協会の平成 22 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究事業の

支援を受けたので深謝する。

文 献

- 1) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41(12), 960-970 (2010).
- 2) 厚生労働省: 第 16 改正日本薬局方, 2011, p. 262.
- 3) 厚生労働省: 第 16 改正日本薬局方, 2011, p. 181.
- 4) USP34-NF29: "Weights and Balances", Vol. 1, 2011, p. 47-48.
- 5) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: FFI ジャーナル, 215(2), 129-136 (2010).
- 6) T. D. W. クラリッジ著, 竹内敬人, 西川実希訳: 有機化学のための高分解能 NMR テクニック, 東京, 講談社, 2008, p. 92-93.

味認識装置を用いた精油類の化学的品質評価

(2011年11月11日受付)

(2012年1月25日受理)

安食菜穂子^{a, b)}、細江潤子^{c)}、瀧野裕之^{d)}、池崎秀和^{a)}、御影雅幸^{b)}、川原信夫^{d)}、合田幸広^{c)}

a) 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー

b) 金沢大学大学院自然科学研究科

c) 国立医薬品食品衛生研究所

d) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター

Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing system

(Received November 11, 2011)

(Accepted January 25, 2012)

Naoko Anjiki^{a, b)}, Junko Hosoe^{c)}, Hiroyuki Fuchino^{d)}, Hidekazu Ikezaki^{a)},
Masayuki Mikage^{b)}, Nobuo Kawahara^{d)}, Yukihiro Goda^{c)}

a) Intelligent Sensor Technology, Inc.

b) Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

c) National Institute of Health Sciences

d) Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation

Abstract

Recently, it has been recognized effectiveness and functionality of aromatherapy, a natural holistic approach to therapy using essential oils and other plant extracts. Many common essential oils have been used for such as perfume materials, flavor ingredients and antiseptic purposes since ancient times and are still widely used today. Essential oils are registered in "The Japan's Specifications and Standards for Food Additives" mainly used as bitter substances and anti-oxidants, and also seven essential oils are registered in "The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition".

In this study for development of a new method for the quality evaluation of essential oils, we investigated the profile analysis of 16 kinds of essential oils by a taste-sensing system. As the results, 16 kinds of essential oils were classified mainly into 5 types by the taste distributions. Furthermore, we purchased commercial clove and thyme oils, both of which showed high taste intensities in "anionic bitterness" and investigated the relationship between their anionic bitterness intensity and the amounts of the main constituents, namely eugenol and thymol for clove and thyme oils, respectively. In consequence, as clove oils, the "anionic bitterness" intensities of eight samples were approximately the same as those of the corresponding standard samples of eugenol. As for the remaining three samples, more than 70% of the "anionic bitterness" intensity was attributed to eugenol content. These data strongly suggest that the "anionic bitterness" taste of clove oil is mostly derived from eugenol. Meanwhile, as thyme oils, no correlation was observed between the "anionic bitterness" intensity and thymol content. This finding suggests that constituents other than thymol may have a larger effect on the anionic bitterness intensity of thyme oil.

Keywords: 精油、味認識装置、味分類、チヨウジ油、タイム油

essential oils, a taste-sensing system, taste classification, clove oil, thyme oil

I 緒言

近年、植物由来の精油成分の香りを利用して心身のトラブルを穏やかに回復させるアロマセラピーの有用性・機能性が

認識され始めている。精油とは水蒸気蒸留法や圧搾法により得られる植物に含有する揮発性有機化合物であり、主に香料として使用されている。現在、我が国で使用が認められている食品添加物の天然香料の基原物質リストには 600 種

連絡先: 〒 305-0843 茨城県つくば市八幡台 1-2 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 川原信夫

Corresponding author: Nobuo Kawahara, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

類を超えるハーブ類、生薬等が記載されており、それらの約半数には天然香料の製法に精油としての製法が記載されており¹⁾、既存添加物の中にも苦味料等²⁾や酸化防止剤³⁾等の用途で数種類の精油が記載されている。また、精油には抗菌作用もあるため⁴⁻⁸⁾、食品の品質変化の抑制を目的としても多く使用されている。これらのうち、クローブ(チョウジ)やシナモン(ケイヒ)などの精油は医薬品として日本薬局方にも記載されているが⁹⁾、食品添加物として用いられる場合、これらについて成分含量等の規定は無い。そこで今回、様々な用途で用いられている精油について、新たな品質評価法の可能性を探るため、味認識装置を用いて各精油が示す味分布の調査を試みた。更に、チョウジ油及びタイム油を例に、味認識装置を用いた精油中の主要成分(eugenol及びthymol)の定量を試み、これら成分が精油の味への程度寄与しているのか検討し、得られた知見について報告する。

II 実験方法

1. 16種の精油の味のパターン分析

1) 研究試料

厚生省生活衛生局長通知「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」別添2の「天然香料基原物質リスト」^{*1)}に記載されており、かつ、試薬として製薬メーカーより入手可能な精油を試料とした。入手したのは下記16種である。ウイキョウ油(fennel oil)、オレンジ油(orange oil)、チョウジ油(clove oil)(以上、和光純薬工業株式会社、大阪)、ウィンターグリーン油(wintergreen oil)、グレープフルーツ油(grapefruit oil)、シトロネラ油(citronella oil)、ゼラニウム油(geranium oil)、タイム油(thyme oil)、ローズマリー油(rosemary oil)(以上、フナコシ株式会社、東京)、ケイヒ油(cinnamon oil)(小川香料株式会社、東京)、シソ油(perilla oil)、ハッカ油(mentha oil)、芳油(Ho oil)(以上、小城製薬株式会社、大阪)、テレピン油(turpentine oil)(日本テルベン化学、神戸)、ベルガモット油(bergamot oil)及びラベンダー油(lavender oil)(以上、関東化学株式会社、東京)。尚、芳油とは、クスノキ科のホウショウ(芳樟)の樹、幹、枝、根の水蒸気蒸留により得た精油である。

2) 測定機器

味測定は、味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー、厚木)を用いて行った。各味要素を検出するための脂質膜センサは、AAE、CT0、CA0、C00、AE1及びAN0の6種類のセンサを用いた¹⁰⁻¹¹⁾。

3) 試薬・試液

塩化カリウム(30 mM)と酒石酸(0.3 mM)を溶解した水溶液を味測定時の安定液とした。塩化カリウム及び酒石酸は和光純薬工業株式会社より入手した。水はEQS-10Lシステム

(日本ミリポア株式会社、東京)により精製した超純水を使用した。

4) 試料の調製

各精油試料を濃度5%になるように塩化カリウム(10 mM)と酒石酸(0.1 mM)の混合溶液に添加して超音波処理を行った。その後、3,000 rpmで10分間遠心分離し、分離した油層を除去し、試料溶液とした。また、塩化カリウム(10 mM)と酒石酸(0.1 mM)の混合溶液をブランクコントロールとした。

5) 測定方法

味認識装置を用いて、既報¹⁰⁻¹¹⁾と同様に各試料溶液について、6種のセンサ(AAE、CT0、CA0、C00、AE1及びAN0)を用いて味測定を行い、ウェーバーの法則に基づいてヒトが感じる味強度の違いを推定し、得られた推定値を各味要素の数値とした。ブランクと比較して1以上の数値が得られた時、味要素が検出されたとし、本論文での味の評価対象とした。本実験で評価した味要素は、酸味、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、旨味、塩味及び塩基性苦味後味である。

2. チョウジ油及びタイム油の酸性苦味値に寄与する各精油の主要成分 eugenol 及び thymol 含量の関係の検討

1) 研究試料

日本市場に流通しているチョウジ油11種類(マダガスカル産5種、スリランカ産1種及び産地不明5種)並びに、タイム油12種類(フランス産6種、スペイン産2種、モロッコ産1種、イギリス産1種及び産地不明2種)を試料とした。尚、タイム油は12種類すべてthymolを主要成分とするものを用いた。

2) 測定機器

酸性苦味強度は、脂質膜センサC00を用いて、味認識装置SA402Bにて測定した。チョウジ油及びタイム油の主要成分含量測定は、高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズHPLCシステム:707plus Autosampler, 2487 DUALλAbsorbance Detector, 1525 Binary HPLC Pump)にて行った。

3) 試薬・試液

塩化カリウム(30 mM)と酒石酸(0.3 mM)を溶解した水溶液を味測定時の安定液とした。塩化カリウム及び酒石酸は和光純薬工業株式会社より入手した。水はEQS-10Lシステム(日本ミリポア株式会社)により精製した超純水を使用した。HPLC用の水及びアセトニトリル、標準溶液に用いたeugenol及びthymol並びにこれらの希釈に用いたメタノールは関東化学株式会社より入手した。尚、eugenol及びthymolの表示純度は、それぞれ99.5%、98%であった。

*1 <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/48b1f48352378e7e492565a1002ecd5e/b949aef970492f0b4925684600083647?OpenDocument>

4) 試料の調製

味認識装置による測定：チョウジ油及びタイム油はそれぞれ濃度 0.1 及び 0.04% になるように塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) の混合溶液に添加し、上記 1 の 4) と同様に処理した。別に、eugenol は濃度がそれぞれ 0.05, 0.1, 0.15%、また、thymol は濃度がそれぞれ 0.01, 0.02, 0.04% になるように塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) の混合溶液に添加し、1 の 4) と同様に処理し、標準溶液とした。

HPLC による測定：チョウジ油及びタイム油試料は約 10 mg を精密に秤量し、メタノールで正確に 50 mL にして測定用液とした。別に、eugenol 及び thymol をメタノールでそれぞれ 188.1 及び 197.96 µg/mL に希釈し、各標準溶液とした。

5) 測定方法

味認識装置による測定：チョウジ油については、各濃度に調製した eugenol 標準溶液を、濃度 0.1% に調製した各市場品チョウジ油試料液と共に測定し、それぞれの酸性苦味値を算出した。その後、eugenol 標準溶液の酸性苦味値より、各市場品チョウジ油中の eugenol 推定含量を算出した。タイム油についても同様に、各濃度に調製した thymol 標準溶液を、濃度 0.04% に調製した各市場品タイム油試料液と共に測定し、それぞれの酸性苦味値を算出した。その後、thymol 標準溶液の酸性苦味値より、各市場品タイム油中の thymol 推定含量を算出した。

HPLC による測定：チョウジ油については、eugenol 標準溶液を 20, 10 及び 5 µL 注入し、3 点検量にて検量線を作成し、各社チョウジ油中の eugenol を定量した。タイム油中については、thymol の 1 点検量で各社タイム油中の thymol を定量した。HPLC 測定条件は以下の通りである。カラム：TSK-gel ODS 80TM, 4.6 mm × 150 mm (TOSOH)、カラム温度：40°C、移動層：アセトニトリル/水混液 (30 : 70)、流速：

1.0 mL/min、注入量：10 µL (チョウジ油) 及び 20 µL (タイム油)、検出波長：230 nm。尚、eugenol 及び thymol のピークの同定に関しては、数種類の溶出溶媒を用いて単一のピークであることを確認すると共に、GC-MS 測定において質量数及びフラグメントパターンが一致していることを確認した。

III 結果および考察

1. 16 種の精油の味のパターン

各種精油中における各味要素 (酸味、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、旨味、塩味及び塩基性苦味後味) の味強度を Table 1 に示す。この結果、次に示す i) から iv) の傾向が認められた。i) 酸味を示す精油類が多く、特にゼラニウム油、ローズマリー油及びケイヒ油の値が高い。ii) 次に酸性苦味を示す精油が多く、タイム油、ウインターグリーン油及びチョウジ油で値が高い。iii) 塩基性苦味後味を示した精油はグレープフルーツ油、ゼラニウム油及びオレンジ油の 3 種類があり、いずれも 1 から 2 の間の値を示す。また、iv) ウイキョウ油など、どの味要素も数値が 1 未満であり、本法では味が検出されない精油類も存在した。

更に 16 種の精油類は、それらの味分布から Fig. 1 に示すような A から E の 5 つのタイプに分類されることが明らかとなった。すなわち、酸味に特徴的な味分布を示すタイプ (タイプ A: ゼラニウム油、ローズマリー油、ケイヒ油、ベルガモット油、シソ油、シトロネラ油、芳油、ラベンダー油) (Fig. 1 (A-1 ~ A-3))、酸性苦味に特徴的な味分布を示すタイプ (タイプ B: ウインターグリーン油) (Fig. 1 (B))、塩基性苦味後味に特徴的な味分布を示すタイプ (タイプ C: グレープフルーツ油、オレンジ油) (Fig. 1 (C))、酸味と塩基性苦味後味以外の様々な味要素に分布を示すタイプ (タイプ D: タイム油、チョ

Table 1. Taste intensities of essential oils

Essential oils	Taste factors								Type ^a
	Sourness	Anionic bitterness	Aftertaste of anionic bitterness	Astringency	Aftertaste of astringency	Umami	Saltiness	Aftertaste of cationic bitterness	
Rosemary oil	7.81	0.66	0.27	-0.23	-0.15	-1.76	0.15	0.10	A-1
Bergamot oil	2.84	0.27	0.15	0.22	0.14	-0.92	0.10	0.11	
Perilla oil	2.77	0.50	0.35	-0.02	-0.14	-0.63	0.08	0.20	
Citronella oil	2.07	0.52	0.39	0.04	-0.03	-0.29	0.40	0.65	
Ho oil	2.20	0.62	0.55	0.49	0.41	-0.03	0.65	-1.14	
Lavender oil	1.14	0.31	0.19	0.22	0.17	-0.22	0.18	0.02	
Cinnamon oil	4.32	1.38	0.33	-0.50	-0.60	-0.73	0.33	-0.64	A-2
Geranium oil	15.95	0.68	0.51	0.01	-0.36	-5.12	0.02	1.18	A-3
Wintergreen oil	-0.56	3.85	0.05	0.14	0.09	0.25	0.41	0.28	B
Grapefruit oil	0.30	0.37	-0.13	0.11	0.10	-0.05	0.19	1.58	C
Orange oil	0.31	0.34	0.12	0.07	0.03	-0.01	0.01	1.01	
Thyme oil	-1.57	8.38	8.57	2.54	2.09	1.53	1.56	-2.89	D
Clove oil	-0.77	3.48	3.77	4.02	3.71	2.07	1.38	-1.11	
Fennel oil	0.01	0.34	0.04	0.04	-0.03	0.11	0.31	0.37	E
Turpentine oil	-0.31	0.06	0.01	-0.09	-0.05	0.10	0.05	0.26	
Mentha oil	0.40	0.28	0.22	0.08	-0.02	0.14	0.19	0.05	

^a Classified by the characteristics of detected taste factors. Types A, B and C are characterized by the taste factor of sourness, anionic bitterness, and aftertaste of cationic bitterness, respectively. Type D is characterized by the detection of tastes factors except for sourness and aftertaste of cationic bitterness. Type E is characterized by the none detection of any taste factors.

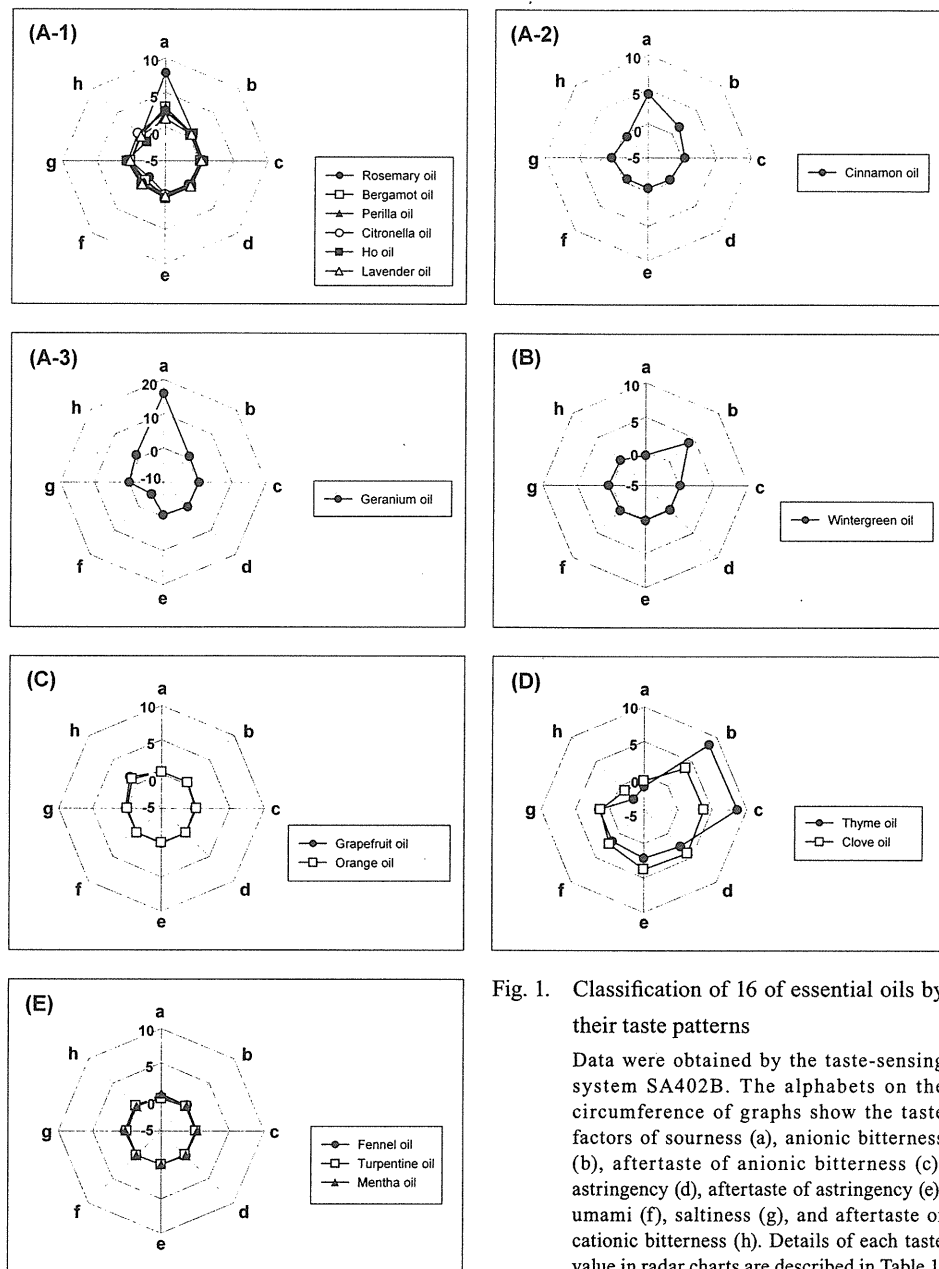


Fig. 1. Classification of 16 of essential oils by their taste patterns

Data were obtained by the taste-sensing system SA402B. The alphabets on the circumference of graphs show the taste factors of sourness (a), anionic bitterness (b), aftertaste of anionic bitterness (c), astringency (d), aftertaste of astringency (e), umami (f), saltiness (g), and aftertaste of cationic bitterness (h). Details of each taste value in radar charts are described in Table 1.

ウジ油) (Fig. 1 (D)) 及びどの味要素も検出されないタイプ (タイプ E: ウイキョウ油、テレピン油、ハッカ油) (Fig. 1 (E)) である。タイプ A は更に、酸味のみを示すタイプ (タイプ A-1: ローズマリー油、ベルガモット油、シソ油、シトロネラ油、芳油、ラベンダー油) (Fig. 1 (A-1))、酸味及び酸性苦味を示すタイプ (タイプ A-2: ケイヒ油) (Fig. 1 (A-2)) 及び酸味及び塩基性苦味後味を示すタイプ (タイプ A-3: ゼラニウム油) (Fig. 1 (A-3)) に細分され得る。

2. チョウジ油及びタイム油の酸性苦味値に寄与する各精油の主要成分 eugenol 及び thymol 含量の関係の検討

次に、上記味のパターン分析を行った精油類の中で、多くの味要素の存在が認められたタイプ D のチョウジ油とタイム

油について、それぞれの主要成分が精油の味にどの程度寄与しているか検討した。尚、本研究で用いた味測定用のセンサ部分は人工脂質膜で構成されているため、油分の高い試料溶液を測定することにより、センサの劣化が生じる。そのため本検討においては、抽出時の精油濃度をなるべく低くすることにし、チョウジ油及びその主要成分である eugenol は 0.1% で、また、タイム油及びその主要成分である thymol は 0.04% で、それぞれ酸味及び塩基性苦味後味を除いたすべての味要素について味パターンの比較を行った。その結果、チョウジ油と eugenol、タイム油と thymol はそれぞれ似た味パターンを示したため (Fig. 2)、これらの精油の味にはそれぞれの主要成分が寄与していると考えられた。

そこで、チョウジ油とタイム油共に、味パターンを検討した各味要素の中で一番高い値が得られた酸性苦味値に着目

し、市場品のチョウジ油 11 検体とタイム油 12 検体について、酸性苦味の値からチョウジ油中の eugenol 及びタイム油中の thymol 推定含量を算出し、これらの HPLC による定量値と比較して、これら主要成分が精油の酸性苦味の値にどの程度寄与しているのか検討した。

その結果、チョウジ油については、11 検体中 8 検体 (C-1 ~ C-4, C-7, C-9 ~ C-11) が HPLC による定量値と酸性苦味の値から算出した eugenol 推定含量が 10% 未満の差ではほぼ一致し、残りの 3 検体の酸性苦味についても、70% を超える同等性を示したことから、チョウジ油の酸性苦味はほとんどが eugenol に由来すると考えられた (Table 2)。一方、タイム油については、HPLC による定量値と酸性苦味の値から算出した thymol 推定含量が同等であったのは 12 検体中 2 検体 (T-4, T-12) のみで、その他の 10 検体では大きくずれているものもあった (Table 3)。これらのうち 7 検体 (T-1, T-3, T-5, T-8 ~ T11) は酸性苦味の値から算出した thymol 推定含量が HPLC による定量値と比較して高く、これらの検体には thymol とは別にタイム油の酸性苦味に寄与する成分の存在が示唆された。また、これらと反対の傾向を示した T-2, T-6 及び T-7 の 3 検体にはタイム油の酸性苦味を抑制する物質が含まれている可能性が考えられた。タイム油は、本研究で検討した thymol を主要成分とするものの他にも linalool を主成分

とするものなど、原植物の種が同じでも生育環境によってその性質が大きく異なるものが多種類存在する精油である。そのため、thymol を主要成分とするものの中にも他の成分が様々に含まれ、酸性苦味の値に影響を与えていると考えられる。現在、食品添加物としての苦味マスキング剤にベネコート BMI (花王株式会社) があり、医薬品の苦味軽減などに有効であるとの報告があるが¹²⁾、タイム油にも同様の効果を期待できる可能性も考えられる。

IV まとめ

本研究では、様々な用途で用いられている精油について、新たな品質評価法の可能性を探るため、味認識装置を用いて 16 種の精油が示す味分布の調査を試みた。この結果、各味要素並びに味強度による分布のパターンから、主として 5 つのタイプに分類されることが明らかとなった。このことは、味のパターンによる精油の分類評価の可能性を示唆するものと考えられる。精油は、主に香料として使用されるが、酸化防止剤や苦味料として用いられるものもある。今回、種々の精油がそれぞれ特徴的な味のパターンを有していることが示されたことから、精油の味のパターンを調査することは、精油を食品に添加した際にその味に与える影響を予測、評価することなどに応用可能と考えられる。

また、チョウジ油とタイム油についてこれらの主成分である eugenol 及び thymol が精油の酸性苦味に対してどの程度寄与しているか検討した結果、チョウジ油が示す酸性苦味はほぼ 100% eugenol に由来すると考えられる結果が得られた。一方、タイム油では、thymol とは別にタイム油の酸性苦味に寄与する物質の存在や、また逆にタイム油の酸性苦味を抑制する物質の存在の可能性が示唆された。本研究では市場品をランダムに調査したが、それぞれの精油に特徴的な主要成分を一定量含有していることが確認された精油を標準とした品質比較の検討が今後の課題である。

V 謝辞

本研究は平成 20 及び 21 年度財団法人日本食品化学研究振興財団の研究助成により行われたものであり、関係各位に感謝致します。

VI 引用文献

- 1) 日本食品化学学会編 “日本食品化学学会編 - 食品添加物活用ハンドブック - II 食品添加物実用必須データ編”, 東京, 産業調査会事典出版センター, 2009, p.475-523. (ISBN 978-4-88282-576-0 C3058)
- 2) 日本食品化学学会編, “日本食品化学学会編 - 食品添加物活用ハンドブック - II 食品添加物実用必須デー

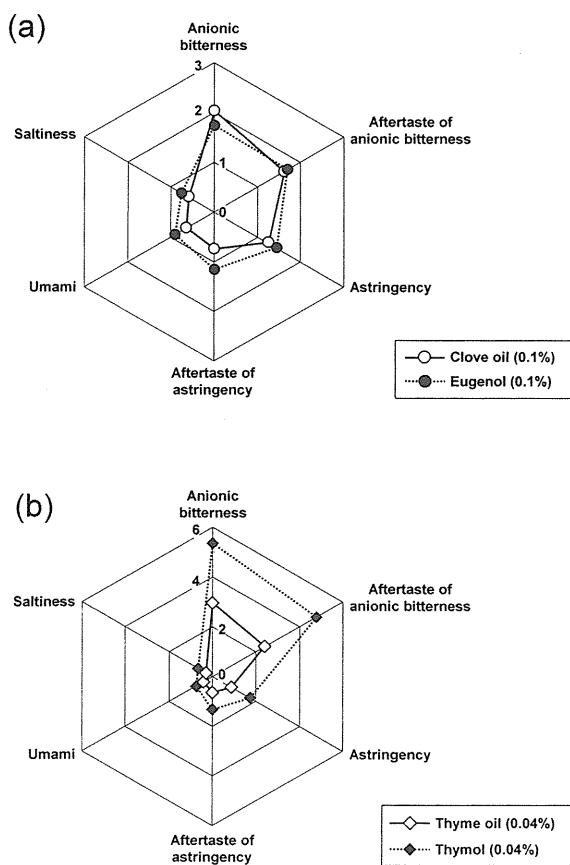


Fig. 2. Taste patterns of clove oil (a), thyme oil (b) and their main constituents (a or b)
Data were obtained by the taste-sensing system SA402B.

Table 2. Comparison between the amount of eugenol quantified by HPLC with its estimated one by taste-sensing system

Sample No.	Origin	Taste intensity of anionic bitterness	Estimated amount of eugenol calculated from the intensity of anionic bitterness (%) (A)	Amount of eugenol determined by HPLC (%) (B)	Ratio of A to B (%)
C-1	Madagascar	1.87	76.47	78.65	97.22
C-2	unknown	1.92	80.11	76.09	105.28
C-3	Madagascar	1.10	74.13	75.14	98.66
C-4	Madagascar	1.69	78.10	79.29	98.49
C-5	unknown	2.03	92.40	75.87	121.79
C-6	unknown	2.04	93.25	75.86	122.92
C-7	unknown	1.19	74.47	74.80	99.56
C-8	unknown	1.05	70.97	80.58	88.07
C-9	Madagascar	1.98	80.56	76.74	104.98
C-10	Sri Lanka	1.96	79.13	75.39	104.97
C-11	Madagascar	1.92	83.90	77.19	108.70

Table 3. Comparison between the amount of thymol quantified by HPLC with its estimated one by taste-sensing system

Sample No.	Origin	Taste intensity of anionic bitterness	Estimated amount of thymol calculated from the intensity of anionic bitterness (%) (A)	Amount of thymol determined by HPLC (%) (B)	Ratio of A to B (%)
T-1	France	1.61	21.01	6.48	324.54
T-2	unknown	3.09	40.72	57.35	70.99
T-3	France	3.47	51.83	37.53	138.10
T-4	Britain	2.91	37.75	37.86	99.72
T-5	France	3.72	47.54	41.22	115.33
T-6	Spain	2.07	25.35	48.73	52.02
T-7	France	2.88	39.05	56.41	69.23
T-8	Morocco	1.95	26.02	10.65	244.29
T-9	France	3.63	48.47	43.31	111.91
T-10	France	3.34	40.03	35.78	111.88
T-11	Spain	4.21	68.67	52.99	129.59
T-12	unknown	2.89	38.82	41.20	94.21

- タ編”, 東京, 産業調査会事典出版センター, 2009, p.259-300. (ISBN 978-4-88282-576-0 C3058)
- 3) 日本食品化学学会編, “日本食品化学学会編 - 食品添加物活用ハンドブック - II 食品添加物実用必須データ編”, 東京, 産業調査会事典出版センター, 2009, p.213-233. (ISBN 978-4-88282-576-0 C3058)
 - 4) Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. : The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157: H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159-166 (2008).
 - 5) Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.-Y., Mohammed, H., Hamdi, M. : Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 242-251 (2008).
 - 6) Busatta, C., Vidal, R. S., Popiolski, A. S., Mossi, A. J., Dariva, C., Rodrigues, M. R. A., Corazza, F. C., Corazza, M. L., Vladimir, O. J., Cansian, R. L. : Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food microbiology*, 25, 207-211 (2008).
 - 7) Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. : The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food microbiology*, 25, 120-127 (2008).
 - 8) Valero, M., Salmeron, M. C. : Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 73-81 (2003).
 - 9) The Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011.
 - 10) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y. : Studies on the taste profile analysis of Setsucha by a taste-sensing system. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 14, 121-127 (2007).
 - 11) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Kiuchi, F., Sekita, S., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y. : Evaluation of the taste of crude drug and Kampo formula by a taste-sensing system (4): Taste of Processed Aconite Root. *J. Nat. Med.*, 65, 293-300 (2011).
 - 12) Saito, M., Watanabe, M., Igarashi, A., Ogata, H., Edo, K. : Comparison between masking effect of Benecort BMI-40 and BMI-60 to bitterness. *Byoin Yakugaku (Journal of the Nippon Hospital Pharmacists Association)*, 26, 577-583 (2000).

月刊薬事
The Pharmaceuticals Monthly

別 刷

じ ほう

一般用漢方処方を見直し

合田 幸広*, 袴塚 高志**

GODA Yukihiko, HAKAMATSUKA Takashi

▶ はじめに

2008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）（以下、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（以下、旧基準）は、多くの見直しとともに内規から通知へと格上げされた。旧基準は、一般用医薬品として承認される210処方の成分および分量、用法および用量、効能または効果を具体的に示したものであるが、旧基準の公表から間もない昭和50年に、その趣旨の徹底および安全な治療の推進を目的として、旧基準の内容に処方解説および参考文献情報などを加えた「一般用漢方処方の手引き」（以下、旧210処方）がじほうより出版されている。2008年の通知発出は、旧基準の公開より30年以上の時を経た改正であり、漢方に関連する分野においてエポックメイキングなものと考えられる。本稿では、新基準の通知に至るまでの経過と、新基準に組み込まれた内容の特徴について概説する。

▶ 通知までの経過

1. 新210処方原案がまとまるまで

厚生労働省は2002年に一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、近年の生活環境の変化や急激な人口の高齢化に伴う疾病構造の変化などに対応しうる一般用医薬品の必要性とその適正使用などについて検討した。そ

の結果、中間報告書として「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」を公表し、さまざまな分野における対応について「提言－具体的な方策」として提案した。旧基準発出より約30年が経過していた当時、漢方を取り巻く環境も大きく変化しており、本中間報告において、時代にあ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。

この漢方処方に関する提言を受けて、2003年度から3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」（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。本調査研究班は国立医薬品食品衛生研究所生薬部を中心に、医師、薬剤師および日本漢方生薬製剤協会関係者などを班員として組織され、日本漢方生薬製剤協会一般用製剤委員会の報告書「一般用漢方210処方 処方小委員会検討レポート」を基礎資料として、疾病構造の変化などに対応した追加・削除処方の選定とともに、新規追加候補処方をあわせた全298処方の処方構成、用法用量、効能効果、処方解説、参考文献情報などの検討が行われた^{1),2)}。その検討結果は、旧210処方を改訂するかたちでまとめられ、2006年3月におよそ700頁のボリュームをもつ「新一般用漢方処方の手引き案」（以下、新210処方原案）として報告された。

* 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 ** 同 生薬部室長

2. 新210処方原案の特徴

新210処方原案は、基本処方210と、基本となる処方に一部の生薬を加減して構成するいわゆる「類方」88に分類して作成され、以下のような特徴をもつものであった。

- ①疾病構造の変化に対応した新規処方の収載
- ②基本処方と類方（加減法など）を組み合わせた処方記載
- ③「証」の概念に対応した「しぼり」の導入
- ④現代に即した効能効果の見直し
- ⑤第15改正日本薬局方に対応した構成生薬の表記
- ⑥成書に基づいた処方構成（成分および分量）の記載の妥当性の再確認
- ⑦解説と参考資料の充実
- ⑧原典と出典の区別

このうち、①は中間報告書の趣旨に従ったもので、生活環境の変化や急激な人口の高齢化に伴う疾病構造の変化に対応する85処方を選択したものである。特に、附子製剤については現行の「210処方」（旧210処方）の設定時、配合される加工ブシの毒性に対する安全性が十分確保されないおそれがあったことより、医療現場では多くの処方が用いられているにもかかわらず、その多くが採択されなかった経緯による。他方、加工ブシは2004年12月に日本薬局方第14局第二追補に収載され、品質が規格化され安全性確保が容易となった。したがって、加工ブシの安全性が確保されたものと考え、加工ブシ含有処方を一般用として選択することに問題がないと判断している。

②は、漢方処方に関する提言に即し、より漢方的な考え方を新処方案に盛り込むため行われた。

③は、一般用の処方でも、その有効性および安全性を確保するため、陰陽、虚実、気血水、五臓などの漢方の病態認識の考え方に即した処方の選択がなされるように行われたものである。なお、「しぼり」の記述にあたっては、この種の専門用語を用いることを極力回避し、一般的に理解しやすい言葉に置き換えられている（この部分は、後項で若干解説を加える）。

④は、文献に基づき、アレルギー性鼻炎、五十肩など、一般用処方としての有用性が認められる効能効果を新規

に記載するとともに、胃アトニー、胃腸カタルを胃腸虚弱と書き換えるなど、わかりにくい効能効果の書き直しが行われている。

⑤は、主に生姜（処方構成での生姜はヒネショウガではなく、日局ショウキョウを指す）と朮（白朮と蒼朮の区別）について対応したものである。また、附子もすべて局方収載名の加工ブシとして記述されている。

⑥は、既収載、新規収載のすべての処方について、成書に基づいた処方構成（成分および分量）の記載の妥当性の再確認を行ったものである。

⑦は、追加処方だけでなく現行処方についても、①～⑥の考えに従って行ったもので、特にこれまで解説がなかった処方についても、すべて解説が記述されている。

⑧旧210処方では「解説」の欄に記載があったものがあるが、原典であるか出典であるか不明であった。新210処方原案では、原典は当該処方に関する記述が初めて行われた文献、出典は当該処方の具体的な使用法が記された文献とし、新たにそれぞれの欄が設けられている。

3. 新210処方案の完成まで

この新210処方原案は、あくまでも研究報告書として提出されたものであり、旧210処方に収載されている処方の参考文献の注をそのままコピーして使用するなど、原稿は完全に電子ファイル化されたものではない。また、旧210処方はいくつかの明らかな誤りを含むが、それらは訂正されずに踏襲されている。さらに、新210処方原案は3年間にわたって検討されたため、研究班の初期に検討されたものと後期に検討されたもので表現上の不統一がみられ、処方構成と「参考文献」の表中の処方の分量が一致しない部分もあり、一部に一般用としてふさわしい効能効果であるかどうか再検討を要する部分があるなど、行政的に利用される資料としては若干の問題があることがわかった。

そこで、行政レベルでの検討に資するため、2006年度に開始された新しい厚生労働科学研究「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）において組織された研究班「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究」