

たと思われる。継続してヘパリン製剤の品質の一層の向上を目指し、現在も各局でさらなる改正に向けた検討が行われている。

昨年までのワークショップと比較した今回の特徴は、ヘパリンの品質試験のみでなく、製法に関する演題や、製法と品質の関連を明らかにした演題が複数あったことである。古典的な生物薬品であるヘパリンの品質確保においても、製造工程の理解と管理により品質確保を図る Quality by Design の考え方を取り入れることの有用性が述べられる等、近年の医薬品品質管理の潮流が波及していることが伺われた。本ワークショップの講演スライドは、

<http://www.hpa-events.org.uk/hpa/frontend/reg/tOtherPage.csp?pageID=50747&eventID=111&eventID=111>で公開されている。

日局方ヘパリン各条改正の現状と今後の予定、国際調査から明らかになった日局の課題とその後取り組みの成果について以下に示す。

3.1. 日局ヘパリン各条改正の現状と今後の予定

Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, NIHS; Revision of heparin sodium and heparin calcium monographs in Japanese Pharmacopoeia

日局では、2008年7月31日の第15局一部改正においてヘパリンナトリウム各条に¹H-NMRを用いたOSCS純度試験が追加された。また2009年9月30日の第15局第二追補において、ヘパリンナトリウム各条の基原が変更され、ヘパリンカルシウム各条が新規掲載された。2010年7月30日の一部改正では、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム各条に確認試験（弱塩基性陰イオン交換 HPLC; WAX-HPLC）と類縁物質試験（WAX-HPLC）、並びにヘパリンナトリウム各条にガラクトサミン純度試験が追加された。さらに、OSCS純度試験が改定され、試験法の高感度化も図られた。新たに開発した WAX-HPLC に関しては、論文としても公表している (Hashii N. Kawasaki N. et al. *Biologicals*, 38, 539, 2010)。2012年9月27日の第16局第一追補においては、ヘパリンナトリウム各条の基原が変更され、タンパク質純度試験が改定された。また新たに核酸純度試験が追加された。ヘパリンカルシウム各条については、タンパク質純度試験が改定され、新たに核酸純度試験が追加された。

今後は、定量法の改定、並びにエンドトキシン試験及び抗第 Xa 因子活性・抗第 IIa 因子活性比試験の追加を予定している。また、含量規格値は、

USP 及び EP との整合性を図るために、130 単位/mg 以上から 180 以上に改定される予定である。

3.2. 国際調査から明らかになった日局の課題

3.2.1. ヘパリンナトリウム各条改正の現状

日米欧薬局方ヘパリンナトリウム改正の現状を表1に示した。各局とも OSCS を検出可能な試験を設定しており、USP では¹H-NMR を用いた確認試験、¹H-NMR あるいは SAX-HPLC を用いた OSCS 純度試験、及び、高性能陰イオン交換クロマトグラフィー/パルスドアンペロメトリー検出器 (HPAEC/PAD) を用いたガラクトサミン純度試験により OSCS の混入が検出される。EP では、¹H-NMR を用いた確認試験、及び、亜硝酸分解と SAX-HPLC を用いた類縁物質純度試験により OSCS の混入が検出される。日局では、¹H-NMR を用いた OSCS 純度試験、WAX-HPLC を用いた類縁物質純度試験、及び HPLC/FD を用いたガラクトサミン純度試験により OSCS が検出される。日局の OSCS 純度試験における OSCS 限度値は 0.1% である。

OSCS はコンドロイチン硫酸 (CS) の誘導体であるが、DS や CS 等のガラクトサミノグリカン製造工程由来不純物としてヘパリン原薬中に残存している。そのため、各局ともにガラクトサミノグリカンの純度試験を設定しており、USP では HPAEC/PAD、EP では亜硝酸分解 SAX-HPLC、日局では HPLC/FD を採用している。日局法では、試料を酸加水分解した後に、4-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE) で蛍光標識し、標識されたガラクトサミンを HPLC/FD で分離定量する。この方法の特徴は、DS や CS 等のガラクトサミノグリカンの標準物質が不要であること、HPAEC/PAD のような特殊な装置を必要としないことである。日局におけるガラクトサミン含有多糖の限度値は 1% であり、USP と同じであるが、EP では 2% である。

理化学試験法を用いた確認試験および純度試験の拡充に加えて、EP では含量規格値の改正、USP では力価試験法と含量規格値の改正が行われている。EP では、力価試験法はヒツジ血漿を用いた抗凝固活性試験のまま変更されていないが、含量規格値が 150 IU/mg から 180 IU/mg に厳格化された。USP では、力価試験法を抗凝固活性試験から発色性合成基質を用いた抗 IIa 活性試験に変更すると共に、含量規格値を 140 U/mg から 180 IU/mg に厳格化した。さらに、確認試験として設定されている抗 Xa/抗 IIa 活性比を 0.9~1.1 に厳

格化した。USP では USP 単位、日局では日局単位を用いているが、いずれも標準品は国際標準品を参照して値付けされており、EP では国際単位が用いられている。日局では力価試験法として抗 Xa 活性試験を用いており、力価試験法が各局により異なっていることは考慮する必要があるが、180 U/mg と設定されている欧米の含量規格値に比べ、日局の規格値は 130 U/mg と低い値となっている。日局の規格値は、1971 年に告示された第 8 改正から変更されておらず、現在の国際的水準を参考に見直す必要があると考えられた。また、抗 Xa/抗 IIa 活性比がヘパリンの品質特性の指標として有用であると考えられるため、日局でも抗 IIa 活性の設定が必要と考えられた。力価試験および含量規格値の見直しの他、タンパク質や核酸の限度試験についても、見直す必要があると考えられた。その後の取り組みにより、① 2012 年 9 月 27 日の第 16 局第一追補において、ヘパリンナトリウム各条タンパク質純度試験が改定され、核酸純度試験が追加された。また、ヘパリンカルシウム各条については、タンパク質純度試験が改定され、新たに核酸純度試験が追加された。② 2013 年 3 月 11 日の日局改正意見公募において、定量法（抗 IIa 活性）の改定、抗 Xa/抗 IIa 活性比の設定、含量規格値の改訂（180 単位/mg）が提案されている。

3.2.2. ヘパリン製剤の品質確保

ヘパリンは不均一性の高い多糖類であり、抗凝固因子アンチトロンビンとの結合部位である 5 糖構造の含量などを人工的に制御することは困難である。したがって、ヘパリン製剤の品質の一定性確保のためには、原料や製造工程の管理と品質試験の双方を適切に実施する必要がある。

我が国で市販されているヘパリン製剤は、製造販売業者が海外から原薬を輸入し、製剤化しているものが少なくない。製造販売業者は原薬の製造工程管理や品質確保においても責任を負うが、自らが原薬の製造を行う場合と比較して、その製造工程や品質に関する理解が限定的になるのはやむを得ないと考えられる。また、製造工程と品質の関連解析に基づき、原薬の品質管理手法を自ら構築していくことは不可能である。このようなケースでは、第一に、原薬の品質試験により品質確保を図ることが重要であり、局方収載品であるヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムでは日本薬局方各条が果たす役割が大きい。今後も、国際的動向を見極めながら、我が国に流通するヘパリン製剤の品質確保のために、日本薬局方ヘパ

リン各条試験法の改正を進めていく必要があると考えられる。EP のように Definition に続き、Production の項を設けて、原材料や製造工程の管理に関する留意事項を書くことも一案かと思われる。

品質試験が最重要である一方で、ヘパリン製剤の製造に関わる製造販売業者が、原材料や製造工程の管理に関する最新の情報を原薬製造業者等から適切に入手し、知識管理や品質リスクマネジメントを含む品質システムを適切に実践していくことも、製品の品質確保に重要であることは言うまでもない。ヘパリン製剤では、原材料の調達や品質に国際的な情勢が大きく影響し、粗精製品の調製までにも多くのステップがある。また、原薬輸入及び製剤の製造販売を行っている会社が多数ある。このようなケースでは、最新の国際動向に基づく知識管理を効率よく行い、各社が品質システムを確実に実践していくために、規制側からの情報提供も有用であると考えられる。

4. 日局バソプレシン注射剤試験法改訂のための予備検討

4. 1. USP 法による日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01) 及びバソプレシン原薬 A の純度試験

バソプレシンは、視床下部で合成されて下垂体後葉に貯蔵され、種々の刺激により血中に分泌される 9 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、1 番目と 6 番目のシステイン間で S-S 結合を形成している (図 8)。同じく下垂体後葉から分泌されるオキシトシンとは、2 番目及び 8 番目の 2 カ所のアミノ酸が異なっている。バソプレシンは、抗利尿作用、血管収縮などの作用を示し、下垂体性尿崩症、下垂体性または腎性尿崩症の鑑別診断、腸内ガスの除去、食道静脈瘤出血の緊急処置に用いられる。バソプレシンの純度試験は、脳下垂体由来バソプレシンを用いた場合に混入が想定されるオキシトシンを想定して設定されている。しかしながら、現在バソプレシン原薬はペプチド合成により製造されているので、オキシトシンの混入はないことから、より適切な純度試験を設定すべきである。そこで、日局バソプレシン標準品とバソプレシン原薬 A について、USP 法に準じて HPLC を行い、不純物のプロファイルを求めた。図 9A 及び B に、日局バソプレシン標準品及びバソプレシン原薬 A のクロマトグラムを示す。含まれる不純物は微量であった。いくつかのピークは共通して存在したが、そうでないものもあり、そのプロファイルは異なっていた。最も多い不純物も異なっており、それぞれ、1.6%及び 1.5%含まれていた。

4. 2. バソプレシン (ピトレシン) の LC/UV

次に、合成バソプレシンに含まれる不純物のプロファイルの詳細に明らかにすることを目的に、市販バソプレシン注射剤を用いて HPLC/UV 分析条件の検討を行った。ペプチドの HPLC において、溶離液の添加物として、一般にトリフルオロ酢酸、ギ酸及びリン酸などが用いられている。しかしながら、トリフルオロ酢酸やギ酸などのカルボン酸を含む化合物は紫外部に吸収を持つことから、これらを添加物として用いた場合、微量の不純物を検出することができず不適切であった (データ非表示)。そこで、UPS 法と同様にリン酸緩衝液を用いることとし、より分離を向上させるため、担体の粒子径が $2\mu\text{m}$ 以下のカラムを用いて分析を行った (図 10)。不純物は非常に少なく、バソプレシンのピーク高さの 0.3 %以下であるが、多数の不純物のピークが認められ、いくつかのピークはバソプレシンのピークに非常に近接していた (図 10B)。グラジエント条件を用いることにより、より分離を向上できる可能性はある。しかしながら、HPLC にてこれらのピークを十分に分離可能な純度試験条件を構築するのは難しいと思われた。

4. 3. バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/MS

混入する不純物の特性を明らかにする目的で、LC/MS 分析を行った (図 11)。LC/MS においては、不揮発性のリン酸緩衝液は使用できないことから、ギ酸を用いたグラジエント条件を用いて分析を行った。図 11A に、ベースピーククロマトグラムを示す。11~18 分を積算したマススペクトルを 0 価の質量に変換した質量スペクトルを図 11B に示す。バソプレシン (1083.4 Da) のピーク以外に、質量 1066.4 (-17 Da)、1099.4 (+16 Da) 及び 2165.7 (+1082 Da) Da のピークが観測された。それぞれ、アミノ基の脱離、酸化ならびにペプチド分子間の S-S 結合の形成が推測された。酸化体については、図 11A に示すように、複数の溶出時間で溶出しており、酸化部位の違いにより溶出時間が異なることが推測される。以上のことから、現在市販されている合成バソプレシンには、不純物は非常に少なく、主要な不純物は酸化体及び分子間 S-S 結合形成物であることが分かった。そこで、ペプチド合成で製造されたバソプレシンの純度試験においては、これらの物質の含量を評価できる方法であることの必要性が示唆された。

4. 3. バソプレシンの試験法に関する考察

1) USP 法による日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01) の純度試験

日局バソプレシン標準品の不純物プロファイル

では、微量ではあるが多数のピークが観測された。バソプレシン原薬 A のプロファイルと比較したところ、最も多い不純物は異なっていた。含まれる不純物がどの程度生物活性を示すのかにより、バイオアッセイにより求めた生物活性と理化学的試験により求めた生物活性に乖離が生じる可能性がある。従って、定量法をバイオアッセイから理化学試験に置き換えるには、合成バソプレシンに含まれる不純物のパターンの範囲を明らかにすること、また、純度の高いバソプレシンを用いて代替を検討することが重要であろうと思われた。

2) バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/UV 及び LC/MS

担体の粒子径が $2\mu\text{m}$ 以下のカラムを用いた HPLC/UV においてバソプレシンのピークの直前に溶出するピークは、粒子径 $3\mu\text{m}$ 以上の通常のカラムを用いた場合には分離できていないと推察される。この近接したピークは LC/MS による不純物の検討結果から、恐らくバソプレシンの酸化体の一つであると思われる。バソプレシンの純度試験として、その含量を評価できる方法が期待される。また、USP においては、バソプレシンの確認試験に質量分析が用いられている。そこで、バイオアッセイを理化学試験に置き換える場合には、特異性の高い同一性の確認法として質量分析の設定を検討すべきと思われた。

D. 結論

1. イデュルスルファアーゼをモデルとして用いて遺伝子組換え糖タンパク質の糖鎖試験法として LC/MS を採用する場合の要件を明らかにすることを試みた。糖鎖試験法要件として、試料調製、システムの最適化、データ解析 (質量の求め方、フラグメントの解釈) が挙げられることを示し、それを踏まえ、糖鎖の LC/MS の要件をまとめた。
2. LC/MS を用いたグライコフォーム分析の糖鎖不均一性の類似性評価法としての有用性を評価するため、日本及び欧州にて販売されているエポエチン先行品及び後続品のグライコフォームの比較を行った。エポエチン先行品と後続品のグライコフォームの特徴 (シアル酸付加数とその分布、NueGc の存在量並びに O-アセチル化の程度並びに O-結合型糖鎖付加状況) を明らかにし、各エポエチン製剤は、それぞれ特有の特徴を持つことを確認した。LC/MS を用いたグライコフォーム分析は、糖鎖不均一性の類似性評価法として有用であることが示された。
3. 米国薬局方や欧州薬局方の改正動向などを調査することによって、日局医薬品各条多糖類の試験

見直し及び新規収載における課題を抽出した。その結果を踏まえて、含量規格値、抗 IIa 活性の設定、抗 Xa/抗 IIa 活性比、タンパク質や核酸の限度試験の検討を実施し、改訂を行うこととなった。

4. 日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01) の不純物プロファイルは、バソプレシン原薬のものとは異なっていることを確認した。合成バソプレシンに含まれる不純物のプロファイルを明らかにし、バソプレシンの純度試験においては、アミノ酸配列の異なるペプチドだけでなく、酸化体及び分子間 S-S 結合形成物の評価が可能な分析法を採用すべきであることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) Ryosuke Kuribayashi, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki: Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/ mass spectrometry with a column-switching system. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 67-68, 1-9 (2012)
- 2) S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 420, 61-67(2012)

総説など

- 1) 石井 明子, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ後続品/バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価, *ファームテックジャパン*, 29(1), 23-42, (2013)
- 2) R. Kuribayashi, S. Nakazawa, N. Kawasaki: N-glycan profiling by LC/MS. *Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD)*. <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>
- 3) 川崎ナナ: 抗体医薬品における品質評価の視点. *新機能抗体開発ハンドブック ~次世代抗体創製から産業への展開まで~* 監修 濱窪隆雄. 双文社 東京 2012
- 4) 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第6回) バイオ医薬品の生産用基材, *ファームテックジャパン*, 28(7), 1291-1300 (2012)
- 5) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第4回) バイオ医薬品の不純物の評価(2), *ファームテックジャパン*, 28(4), 113- 119 (2012)

- 6) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第3回) バイオ医薬品の不純物の評価(1), *ファームテックジャパン*, 28(3), 43- 48 (2012)
- 7) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第1回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテックジャパン*, 27(13), 2633-2638 (2011)
- 8) 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ: 再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, *薬学雑誌* 132(4), 489-497 (2012)
- 9) 中澤志織, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題—特性解析の新しい位置づけと重要性, *レギュトリーサイエンス学会誌*, 2(1), 21-30 (2012)
- 10) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ: ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, *医薬品医療機器レギュトリーサイエンス*, 42(5), 444-447 (2011)
- 11) 川崎ナナ: 『臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理』, 技術情報協会, PHARMSTAGE(東京), 11(10), 4-8 (2012)
- 12) 橋井則貴, 石井明子, 新見伸吾, 川崎ナナ共著: 「第1章申請に必要な品質評価試験項目設定でのポイント 第1節申請をふまえた構造・特性解析での押さえ所」「第1章 第2節申請で求められる不純物分析のポイント」, 『バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集』, 技術情報協会(東京), 3-18, 19-35 (2011)
- 13) 川崎ナナ: 参考情報 ペプチド及びたん白質の質量分析, 『日本薬局方技術情報 2011 (JPTI 2011)』(財)日本公定書協会編, じほう(東京), 307-311 (2011)
- 14) 石井明子, 川崎ナナ: バイオシミラー医薬品の各国ガイドラインについて -日本におけるバイオ後続品の位置付け及び海外との比較, 『透析療法ネクスト XI 新しい腎性貧血治療薬-EPO バイオシミラー』, 秋葉隆, 秋澤忠男編集, 医学図書出版, 22-36 (2011)
- 15) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ: 遊離糖鎖の LC/MS. 試料分析講座.
- 16) 川崎ナナ: 医薬品各条へパリンカルシウム. *日本薬局方技術情報(2011)* (財)日本公定書協会編. じほう(東京)
- 17) 川崎ナナ: 医薬品各条へパリンナトリウム. *日本薬局方技術情報(2011)* (財)日本公定書協会編. じほう(東京)
- 18) 石井明子, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 川崎ナナ:

へパリン製剤の品質確保に関する国際的動向－第4回へパリン製剤の品質評価に関するワークショップ報告－医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42(5), 448-464, (2011)

2. 学会発表

- 1) A. Harazono, N. Hashii, R. Kuribayashi, N. Kawasaki: Comparison of glycoforms of innovator and biosimilar epoetins using LC/ESI/MS of intact proteins. 26th International Carbohydrate Symposium, (July 22-27, 2012) Madrid, Spain
- 2) R. Kuribayashi, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Assessment of the glycan heterogeneity of monoclonal antibodies by LC/MS with a column-switching system: Application for process analytical technology., 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, (Mar. 19-22, 2012), Istanbul, Turkey
- 3) A. Harazono, N. Hashii, N. Kawasaki: Comparison of mass spectrometric glycoform profiles of innovator and biosimilar erythropoietin product, USP Science & Standards Symposium on Biologics & Biotechnology, (Oct. 3-6, 2011), Seattle, USA
- 4) 川崎ナナ: バイオ医薬品開発動向と課題. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム(2012, 3,28-31) 札幌
- 5) 橋井則貴, 原園 景, 栗林亮佑, 中澤志織, 川崎ナナ: 液体クロマトグラフィー/質量分析及び主成分分析によるエリスロポエチン製剤先行品及び後続品の糖鎖プロファイル類似性評価. 日本薬学会第 132 年会 (2012, 3,28-31) 札幌
- 6) 栗林亮佑, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ:

カラムスイッチング法を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析法による抗体医薬品の糖鎖不均一性解析技術の開発, プロセス解析工学の開発. 日本薬学会第 132 年会 (2012, 3,28-31) 札幌

- 7) 原園 景, 橋井則貴, 栗林亮佑, 川崎ナナ: 質量分析によるエポエチン先行品と後続品のグライコフォームプロファイルの比較. 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術集会 (2011, 9, 2-3) 東京
- 8) 栗林亮佑, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: カラムスイッチング法を用いた LC/MS によるバイオ医薬品の糖鎖不均一性解析技術の開発. 第 1 回レギュラトリーサイエンス学会学術集会(2011, 9, 2-3) 東京
- 9) Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)
- 10) Noritaka Hashii, Akiko Ishii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia: heparin identification test and purity tests for OSCS, related substances and galactosamine, 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

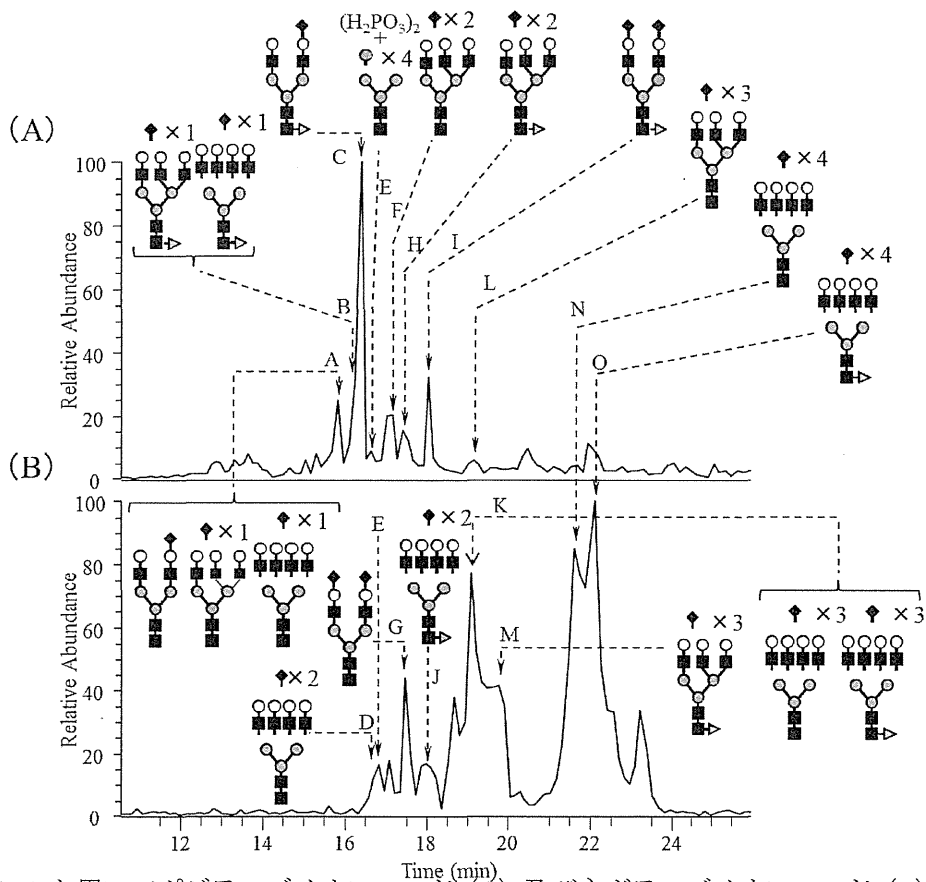


図1. LC/MSを用いてポジティブイオンモード(A)及びネガティブイオンモード(B)で取得されたイデュルスルファーゼ由来*N*-結合型糖鎖のTIC,並びに各ピークの糖鎖の推定構造. 略号:●, マンノース;○, ガラクトース;■, *N*-アセチルグルコサミン;▲, フコース;◆, *N*-アセチルノイラミン酸; H_2PO_3 , リン酸エステル基.

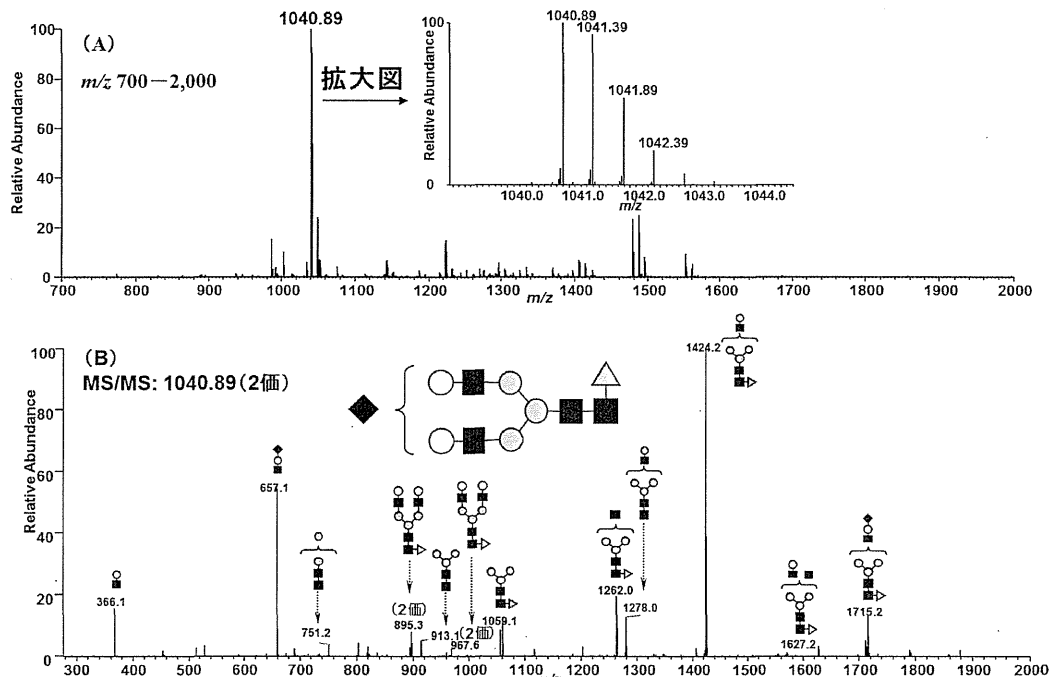
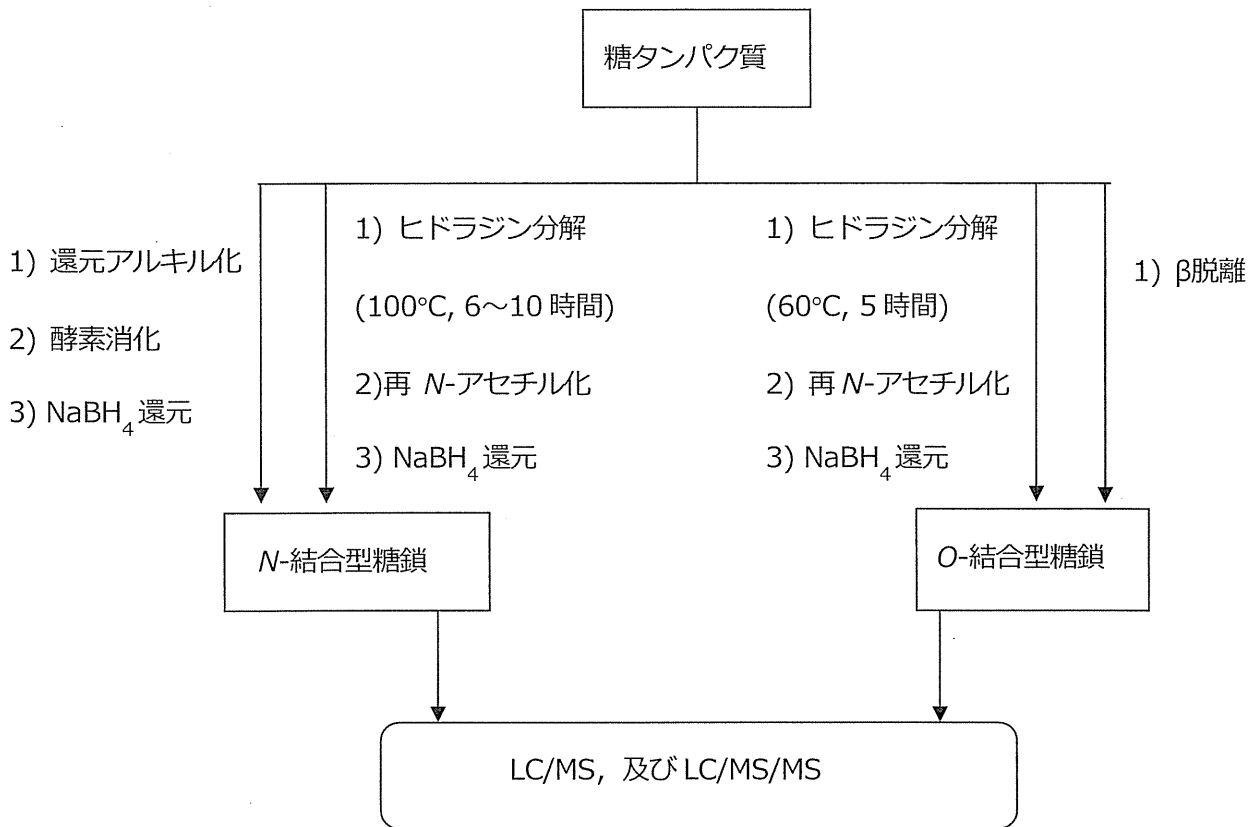


図2. ピークCの糖鎖 (m/z 1040.89, $[M+2H]^{2+}$) のマススペクトル(A),並びにプロダクトイオンスペクトル及びフラグメントの推定糖鎖構造(B). 略号:●, マンノース;○, ガラクトース;■, *N*-アセチルグルコサミン;▲, フコース;◆, *N*-アセチルノイラミン酸.



LCにより得られたクロマトグラムから糖鎖の分布を, また, MSにより求めた質量及びMS/MSにより得られた配列情報から糖鎖構造を推定する

図3. グラファイトカーボンを接続したLC/MSを用いて糖タンパク質の糖鎖を解析するときの操作の概略

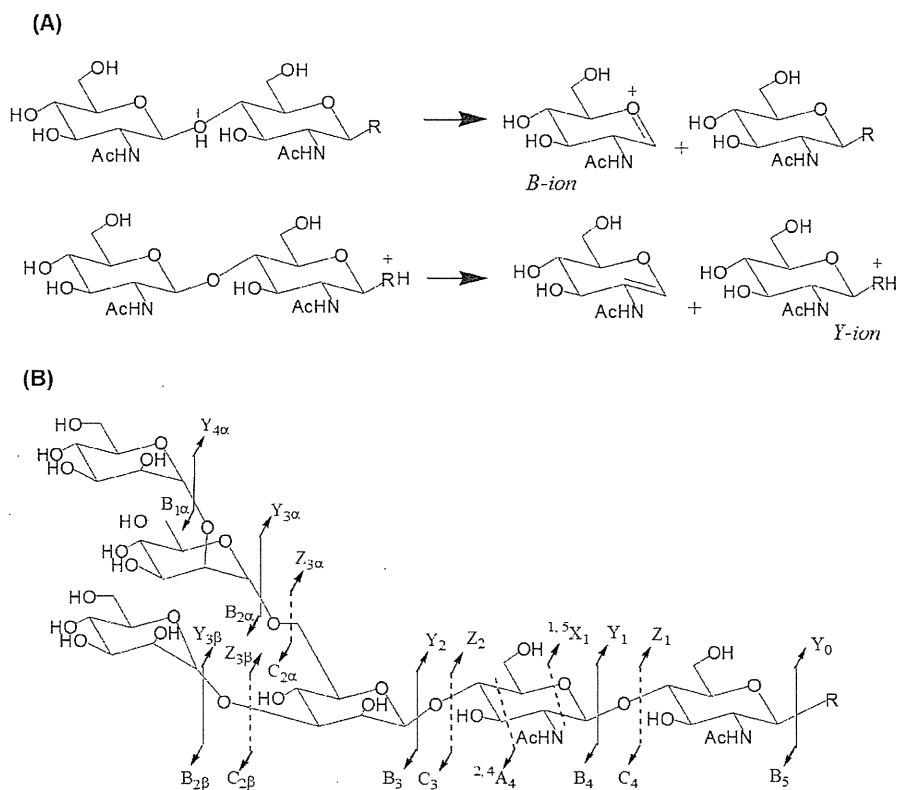
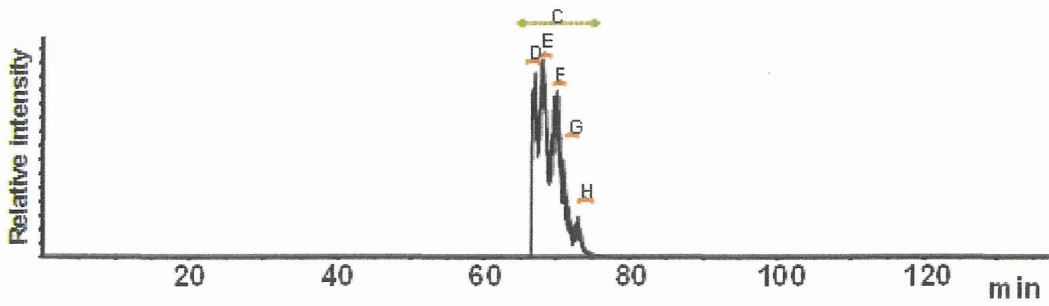
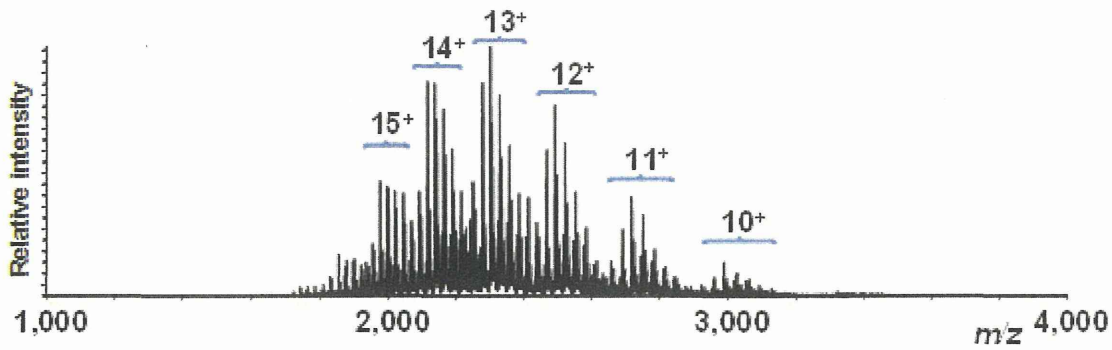


図4. ポジティブイオンモードにおけるB-及びY-イオンの産生(A), 並びに糖鎖の特徴的な開裂様式(B)

(A) Extract ion chromatogram of m/z 1,700-3,600



(B) Integrated mass spectra at 65.6-74.5 min



(C) Deconvoluted spectrum

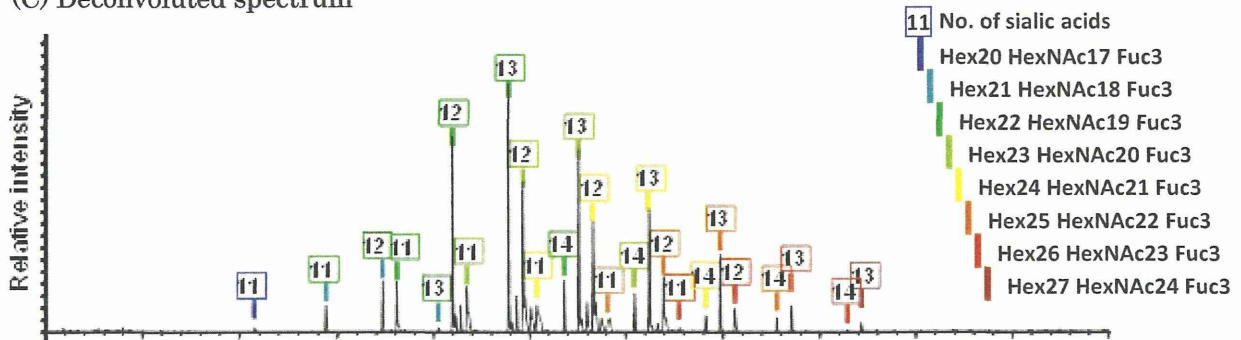


図 5. 次が続く

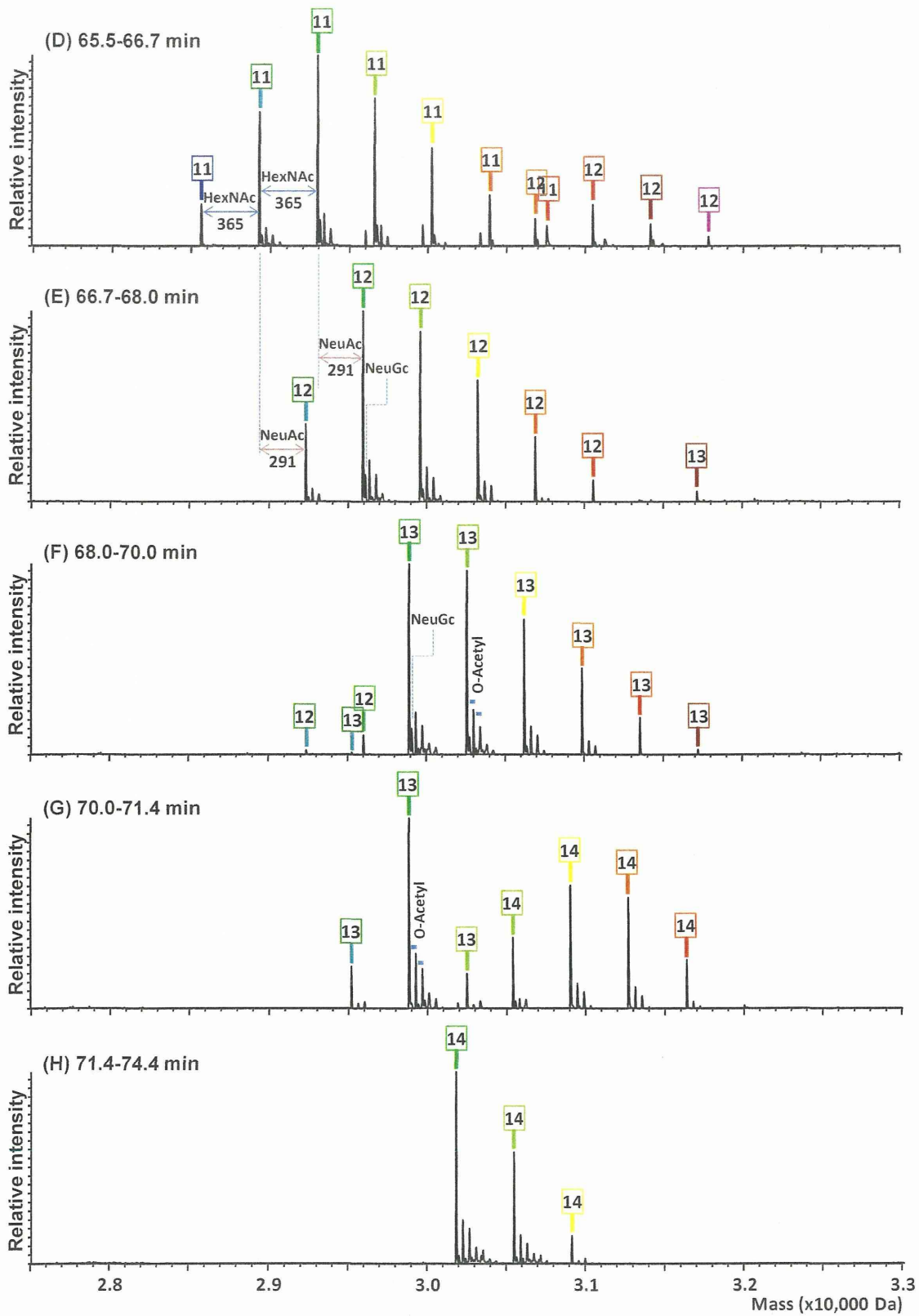


図 5. LC/MS によるエポエチンのグリコフォーム分析の例

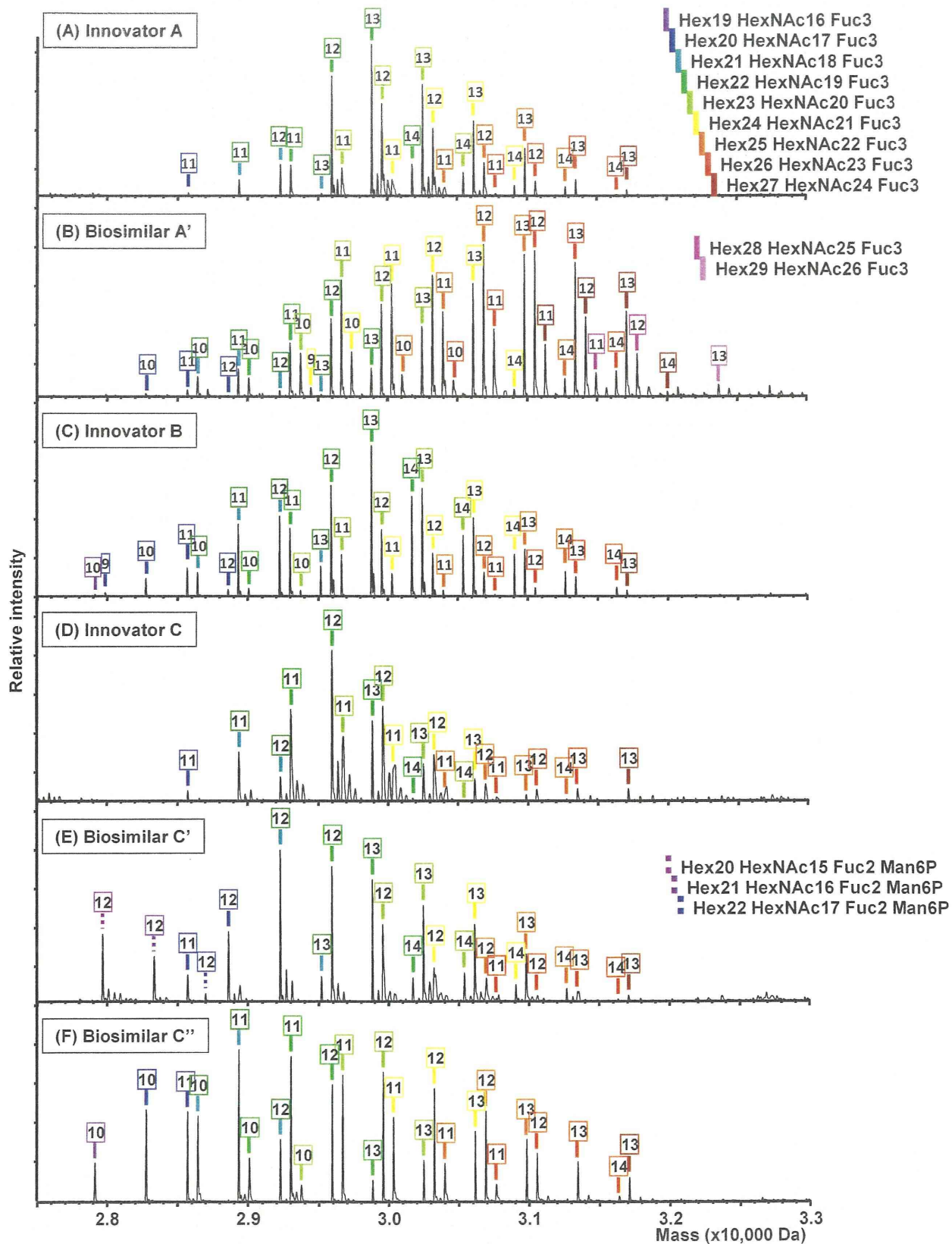
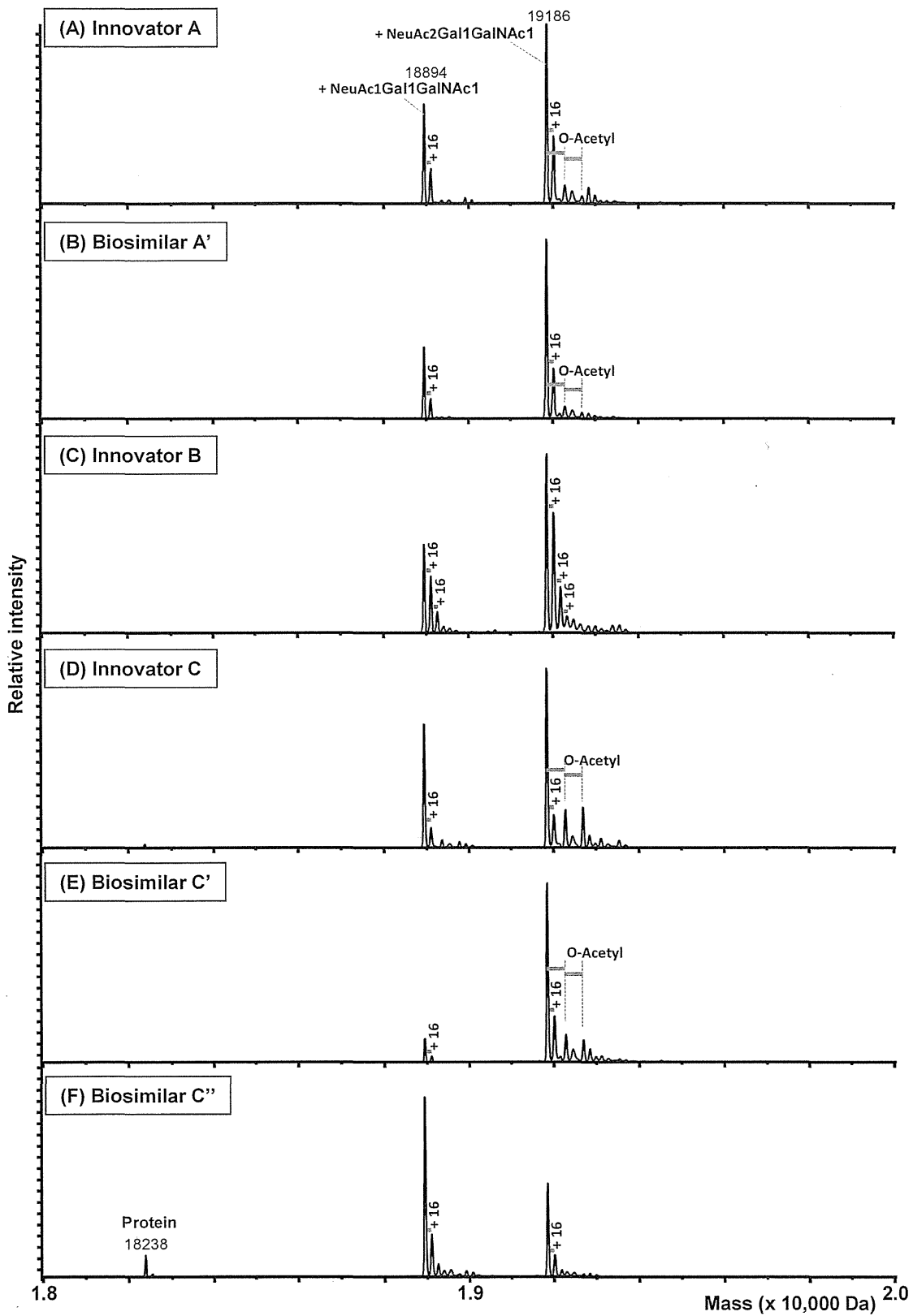


図 6. 各エポエチン製剤のグリコフォームの比較



*, +16 の質量の増加は、酵素消化処理中のタンパク質の酸化によると考えられる。

図7. 各エポエチン製剤のグリコフォーム（O結合型糖鎖のみ）の比較

バソプレシン: CYFQNCPRG-NH₂ (C₄₆H₆₅N₁₅O₁₂S₂: Mav 1084.23; Mm 1083.44)

オキシトシン: ^{*}CYI^{*}QNCPLG-NH₂ (C₄₃H₆₆N₁₂O₁₂S₂: Mav 1007.19; Mm 1006.44)

図 8. バソプレシン及びオキシトシン

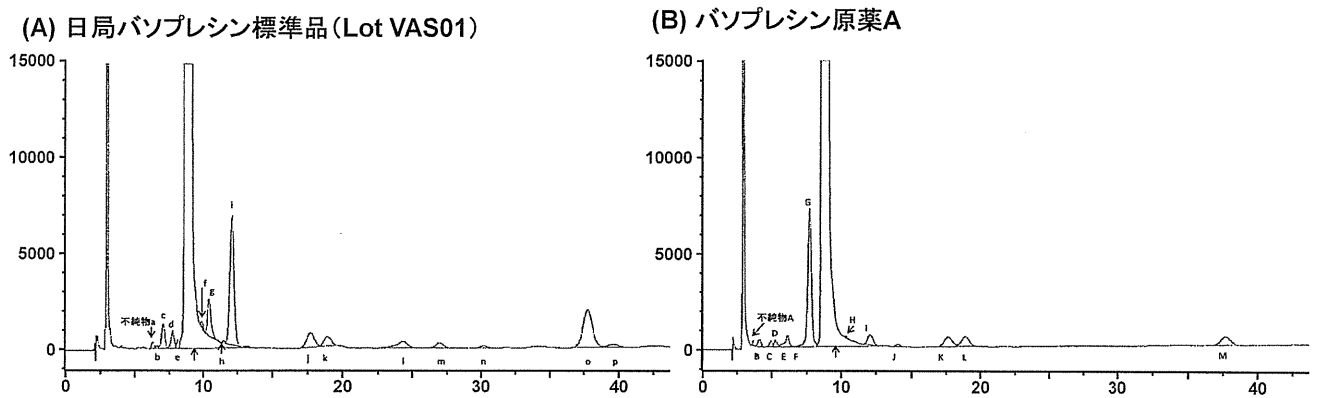


図 9. バソプレシンの不純物プロファイル (逆相クロマトグラフィー)

(A) 日局バソプレシン, (B) バソプレシン原薬 A

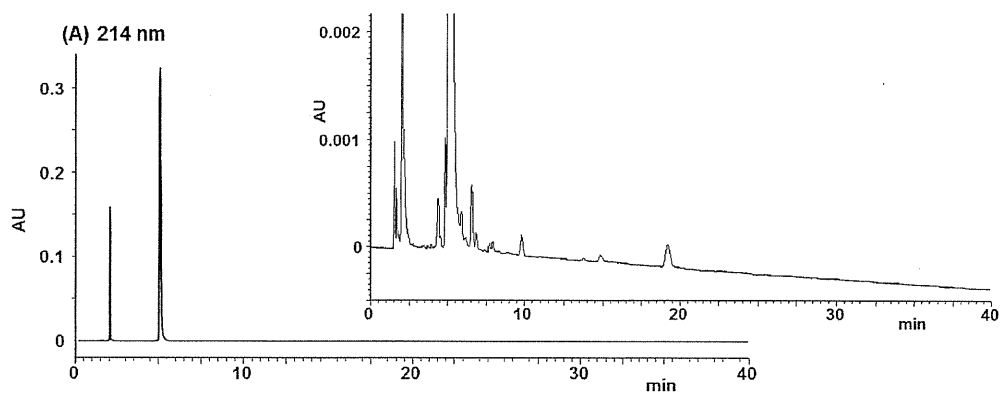


図 10. バソプレシン (ピトレシン) の不純物プロファイル (超高性能逆相クロマトグラフィー)

(A) ピトレシンのクロマトグラム及び拡大図

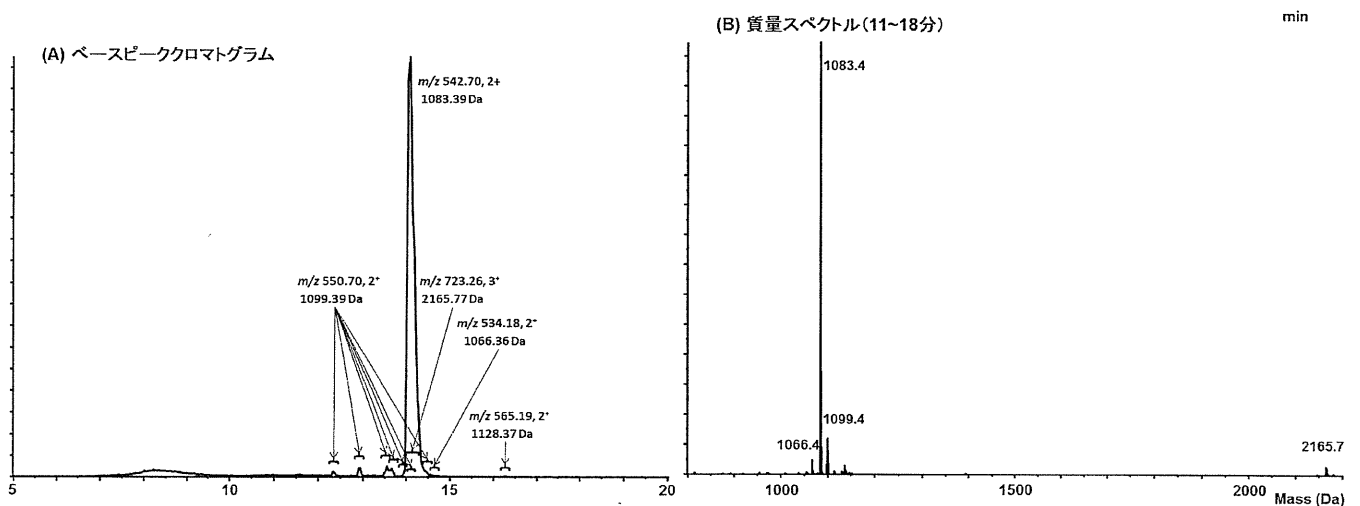


図 11. バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/MS

(A) ベースピーククロマトグラム, (B) 11~18 分の質量スペクトル

表 1. 日米欧薬局方ヘパリンナトリウム各条の比較

		USP	EP	JP
確認試験	ヘパリン	NMR	NMR	
		SAX-HPLC	SAX-HPLC	WAX-HPLC
		抗Xa/抗IIa活性	抗凝固活性	
	Na	炎色試験	原子吸光	
純度試験	GaIN含有多量	HPLC/PAD	亜硫酸分解 SAX-HPLC	HPLC/FD
	OSCS			NMR
				SAX-HPLC
	その他の遊離物質			WAX-HPLC
	タンパク質	ローリー法(1%以下)	ローリー法(0.5%以下)	TGA
	核酸	260 nm	260 nm	
	重金属	○ (30 ppm)	○ (30 ppm)	
	N	○ (1.3-2.5%)	○ (1.5-2.5%)	○ (3%)
Ba			BaSO ₄	
カ 価	抗IIa活性 (180 IU/mg)	抗凝固活性 (180 IU/mg)	抗Xa活性 (130 IU/mg)	
エンドトキシン	○	○	(発熱性物質)	
乾燥減量	○ (5%)	○ (8.0%)	○ (10%)	

表 2. 各条バソプレシン注射液の問題点

項目	第十六改正	問題点	方策
基原	<p>本品は健康なウシ又はブタなどの脳下垂体後葉から大部分の子宮収縮成分のオキシトシンを除いて得た血圧上昇成分のバソプレシン又は合成によって得たバソプレシンを含む。</p>	<p>現在は合成のみ。</p>	<p>市場調査後、脳下垂体部分を削除し、合成のみとする。</p>
製法	<p>本品は脳下垂体後葉から得たバソプレシン部分又は合成によって得たバソプレシンをとり、注射剤の製法により製する。</p>	<p>同上</p>	<p>同上</p>
純度試験	<p>次の方法により試験を行うとき、子宮収縮成分の量は、定量された 10 バソプレシン単位につき 0.6 オキシトシン単位以下である。</p> <p>標準溶液は、オキシトシン標準品に薄めた酢酸を加えた標準原液に生食液を加え 0.020 オキシトシン単位/mL 含むように調製し、試料溶液は、本品の定量されたバソプレシン単位の 6/100 の単位を求めオキシトシン単位と仮定し、注射液に生食液を加え仮定した 0.020 オキシトシン単位/mL を含むよう調整する。摘出子宮収縮実験装置を用い、マグナス容器を用いて子宮を懸垂する。幼時から雄を見ないように、更に雄の体臭をも感じさせないように分けて飼育した 175~350g の発情期でない健康な処女モルモットの頭を打って殺し、直ちに子宮を摘出・懸垂し、子宮が十分伸びきったとき、子宮収縮試験を始める。</p> <p>標準溶液による子宮収縮の高さの平均は、試料溶液による子宮収縮の高さの平均に等しいか、又はそれより大きい。また、25%増量した標準溶液による子宮の収縮の高さは定量の標準溶液による子宮収縮の高さより明らかに高い。</p>	<p>オキシトシンは、下垂体由来バソプレシンの場合に想定される製造工程由来不純物であるが、合成バソプレシンの場合は不要である。</p> <p>合成過程で生じる目的物質関連物質、目的物質由来不純物に対応していない。</p> <p>動物愛護の観点から無用な試験は実施すべきではない。</p>	<p>全文削除。</p> <p>合成バソプレシンに混在している不純物等を同定し、理化学的試験法を策定する。</p>
定量法	<p>標準溶液は、バソプレシン標準品に薄めた酢酸を加えた標準原液に生食液を加え薄め、薄めた液 0.2mL を試験動物に注射したとき血圧が 35~60mmHg 上昇するように調節し、これを高用量標準溶液 SH とする。更にこの液を生食液で 1.5~2.0 倍容量に薄めたものを低用量標準溶液 SL とする。試料溶液は、SH と等しい単位数を等容量中に含むように本品に生食液を加えて薄め、これを高用量試料溶液 TH とする。更にこの液を生食液で 1.5~2.0 倍容量に薄め、低用量標準溶液 TL とする。ただし、SH と SL との濃度比は TH と TL との濃度比に等しくする。</p> <p>体重 200~300g の健康な雄のシロネズミに麻酔をし、気管にカニューレを挿入して人工呼吸を行い、第二頸椎骨の一部を除き、脊髄を切断し、大後頭孔を経て脳髄を破壊する。股静脈には生食液を満たしたカニューレを挿入し、ヘパリンナトリウムに生食液を加えて溶かした液をこのカニューレを経て注射し、直ちに生食液で流し込む。次に頸動脈にカニューレを挿入し、ビニール管を用いて血圧マンローメーターに連結する。あらかじめ、カニューレとビニール管には生食液を満たしておく。一定の時間を置いて標準溶液及び試料溶液をカニューレを経て静脈に注射し、キモグラムの血圧の上昇値を 1mmHg まで測定する。注射順位は SH, SL, TH および TL を用いて 4 対（第 1 対 SH, TL, 第 2 対 SL, TH, 第 3 対 TH, SL, 第 4 対 TL, SH）を作り、各対中では示された順序とし、各対の順位は無作為とする。この試験は同じ試験動物を用いて 4 対をもって 1 組の試験とし、通例、2 組で行う。ただし、各組については異なった試験動物を使用してもよい。</p> <p>各組の各対における高用量及び低用量の起こした血圧上昇の差をもとに計算し、本品 1mL 中の単位数を求める。</p>	<p>オキシトシンは HPLC に変更されている。</p> <p>USP も HPLC である。</p> <p>動物愛護の観点から理化学的手法に変更すべきである。</p>	<p>HPLC に変更する。そのためには、強制劣化サンプル等を用いた、現行のバイオアッセイ法と HPLC 法の相関性の確認が必要である。</p>

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）
分担研究総合報告書

分担研究課題 生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

研究要旨 日本薬局方の改正に関する研究の一環として、生薬アキョウ及びベラドンナ総アルカロイドの規格基準について、検討を行った。アキョウについては、基原動物の調達状況、製造工程、品質管理など、多くの部分が不明確であったため、主産地である中国、山東省の製造業者を訪問し、原料であるロバの供給体制などについて視察するとともに、cytochrome b 領域の塩基配列の違いに基づく ARMS-PCR 法を利用した基原動物鑑別法の開発を行った。本方法は、0.1% の偽品の混入を検出可能な優れた方法である。今後の課題として、混入物の定量が可能な実験条件を確立する必要がある。一方、ベラドンナ総アルカロイドについては、原料である日局「ベラドンナコン」、同種のアルカロイドを含有する日局「ロートコン」及びそれらのエキスの規格を参考に検討を行い、性状、確認試験法、純度試験法（重金属及びヒ素）、定量法及び含量規格値について、収載案をまとめた。確認試験法及び定量法については、上記の品目を参考とすることで特に問題は認められなかったが、新たに検討を行った純度試験法では、重金属試験において、予め中和処理を設定するなど、一般試験法に記載の操作に、若干の変更を加えた。また、含量規格値については、天然物由来品目であることなどを考慮し、総アルカロイドの上限値を 102.0% とした。

協力研究者

蔡少青 北京大学 教授

桑田幸恵 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
研究員

浅野年紀 大正製薬株式会社

山田修嗣 アルプス薬品工業株式会社

びアキョウが局方未収載であるため、最終製品であるエキス製剤の規格化が困難であることに起因している。このため、上記 2 種の局方収載が検討され、ボウショウについては、第十七改正までの収載が見込まれているが、アキョウについては、需要のほぼ全てを海外、特に中国に依存しており、原料であるロバの調達状況、製造工程、品質管理法について、不明な点が多い等の理由により、収載の目処が立っていない。そこで本研究では、アキョウの主産地である中国、山東省の製造業者を訪問し、ロバの調達状況等について調査するとともに、遺伝子情報を利用したアキョウの基原動物鑑別法を開発し、国内市場に流通するアキョウの基原動物を調べた。

一方、ベラドンナ総アルカロイドは、ナス科植

A. 研究目的

2006 年 4 月に公布された第十五改正日本薬局方より、漢方処方エキスが収載され、第十六改正日本薬局方第一追補までに、24 処方が収載されている。漢方処方エキス製剤の生産量の 70% を占める上位 20 処方内、局方未収載のものは、防己黄耆湯と猪苓湯の 2 処方である。これらが、未収載であるのは、構成生薬であるボウショウ及

物, *Atropa belladonna* Linné (ベラドンナ, セイヨウハシリドコロ) の根のエキスからアルカロイド画分を精製したものであり, アレルギー性鼻炎や感冒を標的とした多数の一般用医薬品に配合されている. しかしながら, 現行の日本薬局方では, *Atropa belladonna* の根として, 「ベラドンナコン」, その含水エタノールエキスとして, 「ベラドンナエキス」が規定されているものの, 「ベラドンナ総アルカロイド」の規格は無い. トロパンアルカロイド類は, その薬理作用とともに, 毒性も強いため, 同品の有効かつ安全な使用のためには, 局方収載による品質の規格化が望まれる. このため, 「ベラドンナ総アルカロイド」の局方収載を目指し, 各条規格の検討を行った.

B. 研究方法

1. 実験材料

1-1. アキョウ

アキョウ及びオウメイキョウ (牛皮を原料にアキョウと同様の製法で製造したもの) の標準試料 (Eq-1 及び Bt-1) は, 現地調査時に, 東阿阿膠社で購入した物を用いた. アキョウ市場品については, 国内の 3 社が取り扱う 8 検体を用いた. ロバ毛は, 羽村市動物公園よりご恵与いただいたもの, ウマ, ウシ, ブタ肉はインターネット又はスーパーマーケットで購入した物を用いた.

1-2. ベラドンナ総アルカロイド

国内の市場に流通するベラドンナ総アルカロイド, 3 検体を使用した.

2. 実験方法

2-1. アキョウ

2-1-1. アキョウの前処理と DNA 抽出

アキョウ (板状) は, 適当な大きさのブロックにした後, 外部付着 DNA の処理を行う目的で, 各面を UV で 2 時間ずつ照射し, MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎したものを DNA 抽出に用いた.

アキョウからの DNA 抽出は, イオン交換樹脂 (QIAGEN Genomic tip 20/G または 100/G) を用いて, 組換え DNA 技術応用食品の検査方法を参考に操作した.

毛や肉サンプルからの DNA 抽出は, QIAGEN Genomic tip 20/G を用いてプロトコール通りに行った.

2-1-2. 動物種特異的検出 PCR

2-1-1. で調製した DNA を鋳型とし, cytochrome b 遺伝子領域のうち, ロバ, ウマ, ウシ, ブタに特異的な領域に設計したプライマーを用いてそれぞれ PCR を行い, 目的とする遺伝子領域を増幅させた. PCR は, Ampdirect Plus (Shimadzu)-Ex Taq Hot Start Version (Takara) の系により, 鋳型 DNA として, 5 ng (毛・肉サンプル) 又は 50 ng (アキョウサンプル) の DNA 溶液を用い, 以下の温度プログラムに従って行った: 94°C 4 min; 94°C 30 sec, 60°C (ロバ, ウマ, ウシ) 又は 64°C (ブタ) 30 sec, 72°C 10 sec, 35 cycles; 72°C 2 min. 得られた PCR 産物は, MinElute PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し, pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen/Life technologies) にサブクローニング後, 塩基配列を決定した. Plasmid の蛍光ラベル化は, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life technologies) を用いて行い, 解析は, ABI Prism 3130-genetic analyzer (Applied Biosystems/Life technologies) により行った.

2-1-3. ウシ DNA 検出限界の検討

Eq-1 に、Bt-1 を 0.1% 混合した試料から、上記と同様に DNA を抽出した。この DNA を鋳型として、ウシを特異的に検出する PCR を行うことにより、検出限界を調べた。

2-2. ベラドンナ総アルカロイド

2-2-1. 性状

各検体の外観を観察するとともに、第 17 改正日本薬局方原案作成要領に従い、水、エタノール (99.5) 及び定量法に使用するメタノールの溶解性を試験した。

2-2-2. 確認試験

日局「ベラドンナコン」の確認試験を参考に、下記の条件で検討を行った。

試料 2 mg をとり、エタノール (95) 1 mL を加えて溶かし、試料溶液とする。別にアトロピン硫酸塩標準品 2 mg をエタノール (95) 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液について、各 5 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルにスポットし、アセトン/水/アンモニア水 (28) 混液 (90:7:3) で、7 cm 展開した後、薄層板を 80°C、10 min 加熱乾燥し、冷後、噴霧用ドラッグンドルフ試液を噴霧し、発色するスポットの色調及び R_f 値を観察した。

2-2-3. 純度試験

2-2-3-1. 重金属

試料 1.0 g を磁製るつぼにとり、希塩酸 1.2 mL を加え混和後、硝酸マグネシウム六水和物のエタノール (95) 溶液 (1 \rightarrow 10) 10 mL を加えて混和し、沸騰水浴上で溶媒を蒸発させた後、徐々に加熱して炭化させた。以下、日本薬局方、一般

試験法、重金属 <1.07> の項が規定する第 4 法に従い、操作した。

2-2-3-2. ヒ素

試料 2.0 g をとり、日本薬局方、一般試験法、ヒ素 <1.11> の項が規定する第 4 法に従い、操作した。

2-2-4. 定量法及び含量規格

日局「ベラドンナコン」、「ベラドンナエキス」、「ロートコン」及び「ロートエキス」の定量法を参考に、下記の条件で検討を行った。

試料 25 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 25 mL とした。この液、5 mL を正確に量り、内標準物質（ブルシン二水和物の移動相溶液；1 \rightarrow 2500）3 mL を正確に加え、更に移動相を加えて 25 mL とし、試料溶液とした。別に、アトロピン硫酸塩標準品、約 25 mg を精密に量り、移動相に溶かして正確に 25 mL とし、標準原液 A とした。また、スコポラミン臭化水素塩標準品、約 25 mg を精密に量り、移動相に溶かして正確に 25 mL とした。この液 3 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 25 mL とし、標準原液 B とした。標準原液 A 5 mL 及び標準原液 B 2 mL をそれぞれ正確に量り、内標準液 3 mL を正確に加え、移動相を加えて 25 mL とし、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液 10 μ L につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行った。それぞれの液の内標準物質のピーク面積に対するヒオスチアミン（アトロピン）のピーク面積の比 Q_{TA} 及び Q_{SA} 並びにスコポラミンのピーク面積の比 Q_{TS} 及び Q_{SS} を求め、次式によりヒオスチアミン及びスコポラミンの量を計算した。

ヒヨスチアミンの量 (mg)

$$= M_{SA} \times Q_{TA} / Q_{SA} \times 0.8551$$

M_{SA} : 乾燥物に換算したアトロピン硫酸塩標準品の秤取量 (mg)

スコポラミンの量 (mg)

$$= M_{SS} \times Q_{TS} / Q_{SS} \times 6/125 \times 0.7894$$

M_{SS} : 乾燥物に換算したスコポラミン臭化水素酸塩標準品の秤取量 (mg)

HPLC 条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 210 nm)

カラム: 内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィーオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度: 20°C

移動相: リン酸化二水素カリウム 6.8 g を水 900 mL に溶かし, トリエチルアミン 10 mL を加え, リン酸で pH 3.5 に調製した後, 水を加えて 1000 mL とした液/アセトニトリル混液 (9:1)

C. 研究結果

1. アキョウ

1-1. 動物種特異的検出 PCR 条件の確立

アキョウの基原動物種はロバとされているが, ウマやウシ, ブタなどを由来とした偽物・粗悪品が流通していることから, ロバに加え, ウマ, ウシ, ブタを特異的に検出する PCR 条件についても確立を試みた。

Cytochrome b 領域中で各動物種特異的な配列に設計した各動物種特異的プライマーを用い, ロバ, ウマ, ウシ, ブタ各組織から抽出した DNA を鋳型として PCR を行い, 条件を検討した結果, 各

動物種特異的な増幅産物が得られた (ロバ, 64 bp; ウマ, 71 bp; ウシ, 68 bp; ブタ, 76 bp). 得られた増幅産物は, サブクローニング後の塩基配列解析により, 各動物種から予想される塩基配列と一致することが確認された。

次に, これらの動物種を特異的に検出する PCR 条件を, Eq-1 から抽出した DNA に適用したところ, ロバを特異的に検出する PCR 条件でのみ増幅産物が得られた。以上の結果により, 本研究で確立した種特異的検出 PCR は, アキョウの簡便な基原動物種鑑別法として有用であることが示された。

2-2. ウシ DNA 検出限界の検討

次に, アキョウにロバ以外の動物種由来 DNA が混入している場合に, 今回開発した PCR 法がどの程度の検出感度を有するかを調べるため, アキョウと同様の製法で作られている Bt-1 を用いて, ウシ DNA の検出限界の確認を行った。

Eq-1 に Bt-1 を 0.1% 混入させた試料から抽出した DNA を鋳型に, ウシ特異的検出 PCR を行ったところ, 0.1% 混入試料からも増幅産物が確認された。本実験に使用した Bt-1 は, ロバ特異的検出 PCR を行った際にも増幅産物が確認されており, 製造の過程でロバ由来サンプルが混入している恐れもあるが, 本実験結果から, 今回開発した PCR 法は, 少なくとも 0.1% のウシ由来製品の混入を検知できると考えられた。しかし, Bt-1 を 0.1%混入させた試料と Bt-1 100% 試料とにおいて, 増幅産物の量に違いがみられなかったことから, 本方法では, 意図的な材料の混入と, 製造過程での非意図的なコンタミネーションを区別するのは困難であると考えられた。

2-3. アキョウ市場品への適用

アキョウ市場品 8 試料について、ロバ、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR を行った。ロバ特異的検出 PCR において、山東省産以外の製品は増幅産物量が少なかったものの、いずれの製品からも増幅産物が得られた。さらに、ウシ特異的検出 PCR においてもすべての製品から増幅産物が得られ、その内の 1 検体からはウマ特異的検出 PCR においても増幅産物が得られた。一方、すべての製品からブタ特異的増幅産物は得られなかった。前述のように、ウシ由来試料についてはわずかな混入でも検知されることから、これらのアキョウ製品は、原料にウシが混入している、もしくはウシ由来製品と同じ工場内で作られている等、非意図的なコンタミネーションが起きているという二つの可能性が示唆された。

2. ベラドンナ総アルカロイド

2-1. 性状

各検体の外観は、いずれも白色であり、結晶性の粉末であった。また、各溶媒に対する溶解性は、水に溶けにくく、エタノール (99.5) に溶けやすく、メタノールに極めて溶けやすかった。

2-2. 確認試験

実験方法に記載の条件で試験を行った結果、いずれの検体においても、アトロピン標準品と色調及び R_f 値の一致するスポットを明瞭に観察可能であった。

2-3. 純度試験

本品の原料は、植物の地下部であることから、純度試験として、重金属及びヒ素の規格設定を検討した。

2-3-1. 重金属

各試料の重金属含量は、2.38-5.07 ppm であった。また、添加回収試験の結果は、84.8-119.4% と、いずれの試験区においても回収率 70% を上回っており、原案作成要領が定める基準を満たしていた。

2-3-2. ヒ素

各試料のヒ素含量は、0.01-0.04 ppm であった。また、添加回収試験の結果は、71.6-93.5% と、いずれの試験区においても回収率 70% 以上を満たしていた。

2-4. 定量法及び含量規格

実験方法に記載の条件で試験を行い、システム適合性について確認するとともに、定量値から含量規格値を検討した。各化合物は、スコポラミン、アトロピン、内標準物質の順に溶出され、試験に用いた各試料の分離度は、スコポラミンとアトロピンの間が、20.4-21.0、アトロピンと内標準物質の間が、7.6-8.8 であり、参考としたロートコン等の定量法に規定されている 11 及び 4 以上を満たしていた。

システムの再現性については、6 回繰り返し分析における相対標準偏差を算出した結果、0.16-0.39% だった。

各検体におけるヒヨスチアミン及びスコポラミンの含量は、それぞれ 97.06-98.19% 及び 1.94-2.19% であり、両者の和として算出した総アルカロイド量は、99.0-100.38% であった。

D. 考察

1. アキョウ

本研究では、PCR 法による、ロバ由来生薬ア

キョウの基原動物種鑑別法の検討を行った。まず、cytochrome b 領域をターゲット領域とした、ロバ、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR 条件を確立し、確立した PCR 法が、アキョウの基原動物種鑑別法として利用可能であることを示した。SINE 領域をターゲットとした既報の方法と異なり、本方法はロバとウマの鑑別が直接的に可能であり、新たなアキョウの簡便な基原動物種鑑別法として優れている。

また、本方法のウシ DNA の検出限界を確認したところ、0.1% のウシ由来製品の混入を検知できる結果となった。これは SINE 領域をターゲットとした方法と同等の感度である。しかし、SINE 領域をターゲットとした PCR 法と同様、本方法でもウシ由来試料の混入量について定量性が無く、意図的な材料の混入と、製造過程での非意図的なコンタミネーションを区別するのは困難であると考えられた。この点については、定量 PCR 法を利用し、0.1% 及び 100% Bt-1 試料における、PCR 産物の立ち上がりサイクル数の違いを比較する等、今後更なる検討が必要であると思われる。

アキョウ市場品 8 試料について、本研究で確立した PCR 法を適用したところ、全ての製品から、ロバ及びウシ特異的検出 PCR において増幅産物が得られた。このことから、市場に流通するアキョウ製品の多くは、原料にウシが混入している、もしくはウシ由来製品と同じ工場内で作られている等、非意図的なコンタミネーションが起きている可能性が示唆された。

2. ベラドンナ総アルカロイド

ベラドンナ総アルカロイドの局方収載に向け、各条規格の内、性状、確認試験法、純度試験法、

定量法及び含量規格値に関する検討を行った。

性状の項においては、試料の観察結果から、「白色の結晶又は結晶性の粉末」と規定することが妥当であると考えられた。また、各溶媒に対する溶解性は、「水に極めて溶けにくく、エタノール(99.5)に溶けやすく、メタノールに極めて溶けやすい」とすることが望ましい。

純度試験法の設定においては、当初、重金属については、第 2 法、ヒ素については、第 3 法による試験を検討したが、いずれも添加回収試験において、十分な結果が得られなかったため、第 4 法を適用した。その際、重金属試験については、試料が塩基性を有することを考慮し、中和の操作を加えた。

確認試験法及び定量法は、原料であるベラドンナコン及び同種のアルカロイドを含有するロートコンなどが既に局方収載されていることから、それらの方法を参考に検討を行った。原料植物エキスを精製した物であるため、確認試験法、定量法共に、夾雑物や妨害ピークが現れることも無く、特に問題は無かった。

各アルカロイドの含量規格値については、今回の測定結果から、ヒヨスチアミンを 95.0-99.0%、スコポラミンを 1.3-3.9% 含有することとし、また、両者の和を、総アルカロイドとして、99.0-102.0% 含むとする案をまとめた。このものに関しては、当初、99.0% 以上とする意見があった。この場合、通則上、その含有値の範囲は、99.0-101.0% となる。しかし、本品及び分析用標準品は、高度に精製されているとはいえ、天然物由来であることから、極微量の不純物の含有の可能性が否定出来ないこと、総アルカロイドが、2 化合物の和により算出されることに起因する数値上の誤差を勘案すると、上限値を 102.0% までと