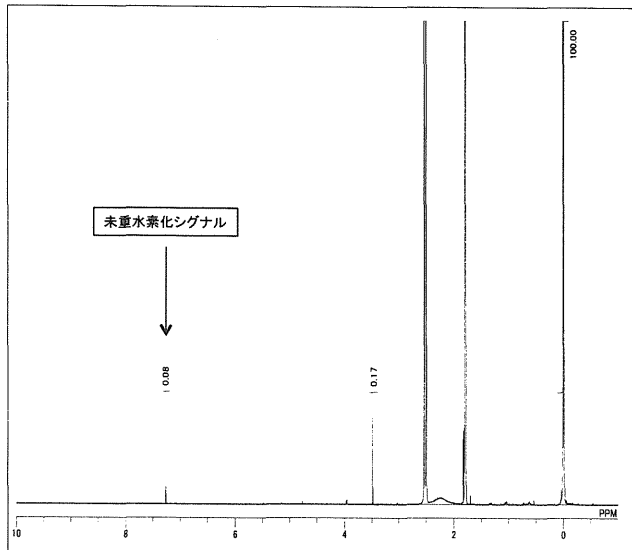
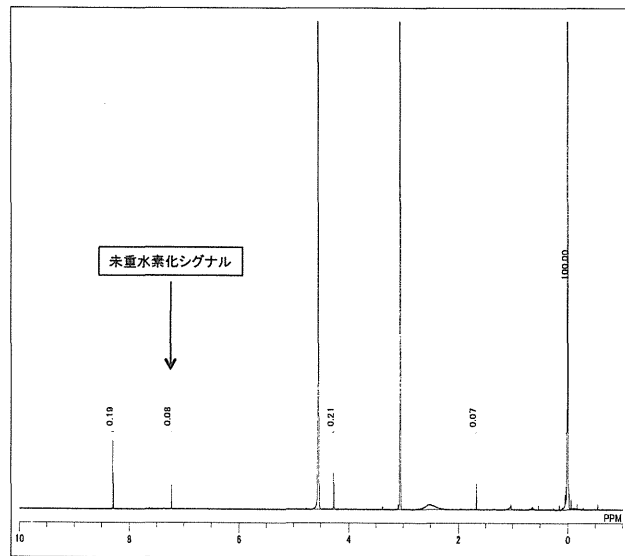


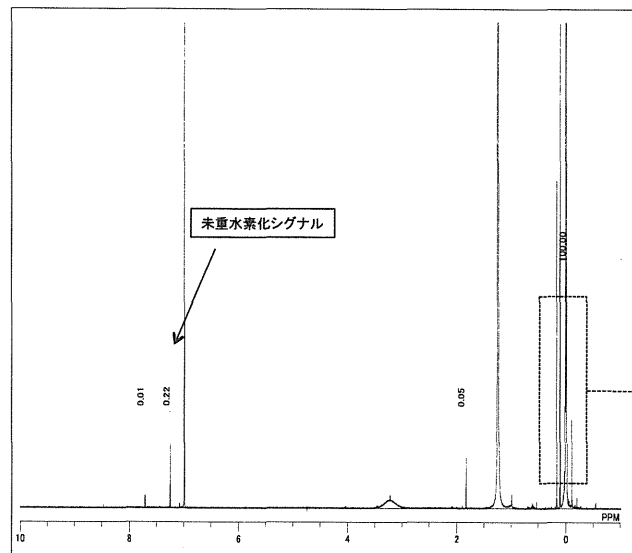
a) 重アセトン



b) 重メタノール



c) 重クロロホルム



d) 1ppm付近拡大 (BTMSB分解シグナル)

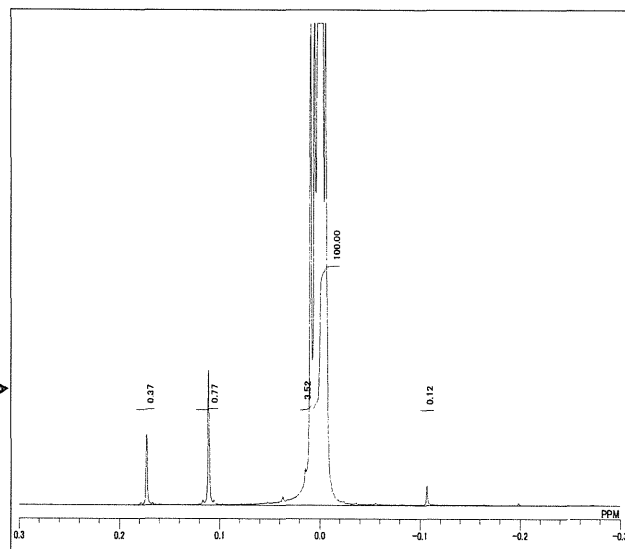


図1 各溶媒におけるBTMSB-d4の不純物シグナル

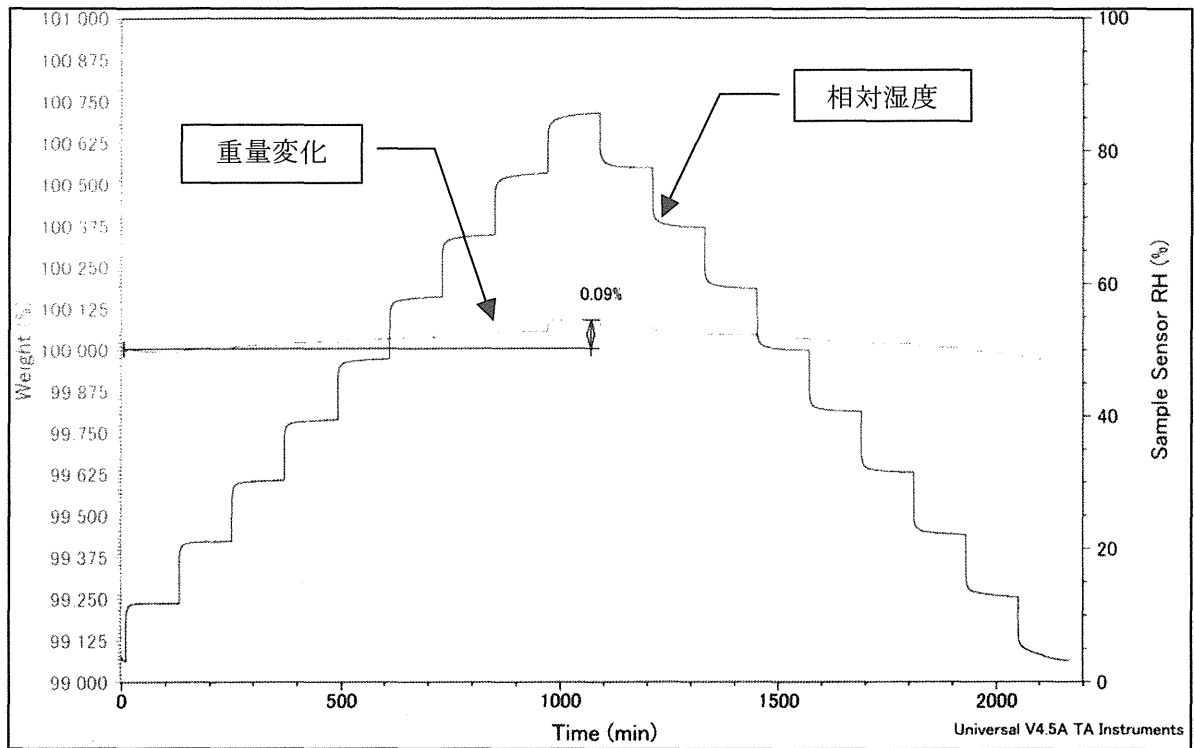


図2 マグネシウムフッ化物の TGA 分析

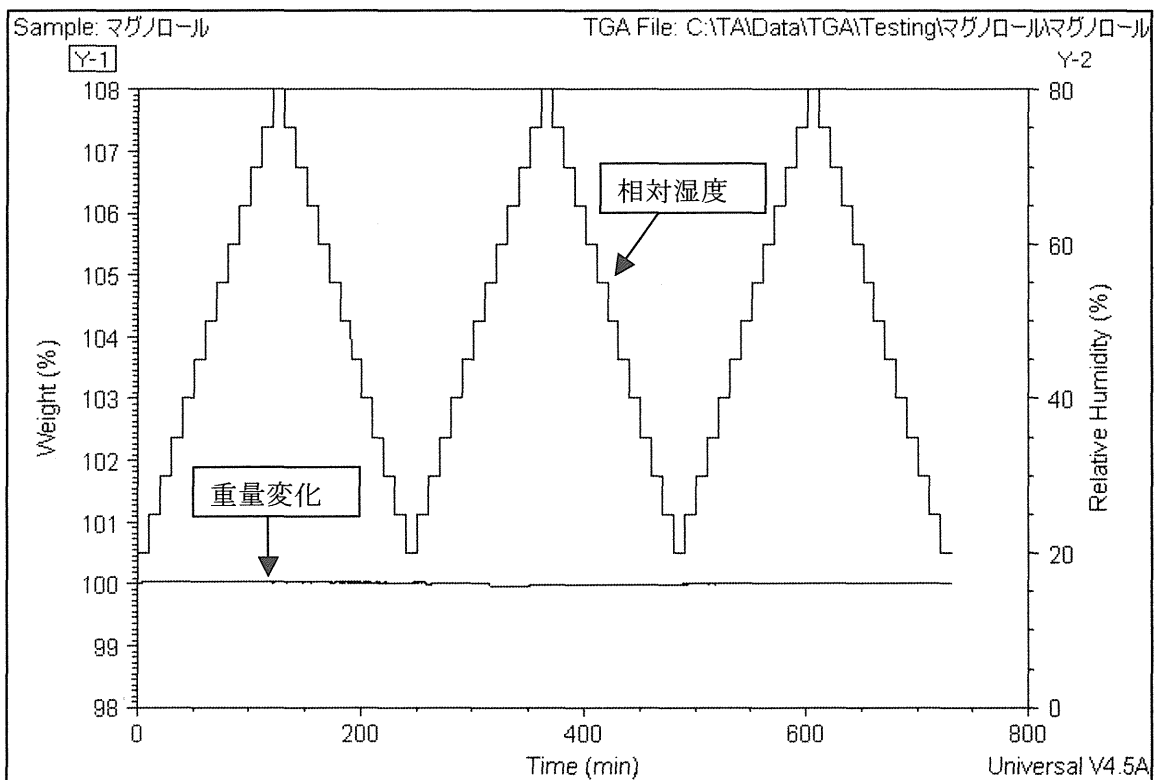


図3 マグネシウム (Lot.TLJ4901) の TGA 分析

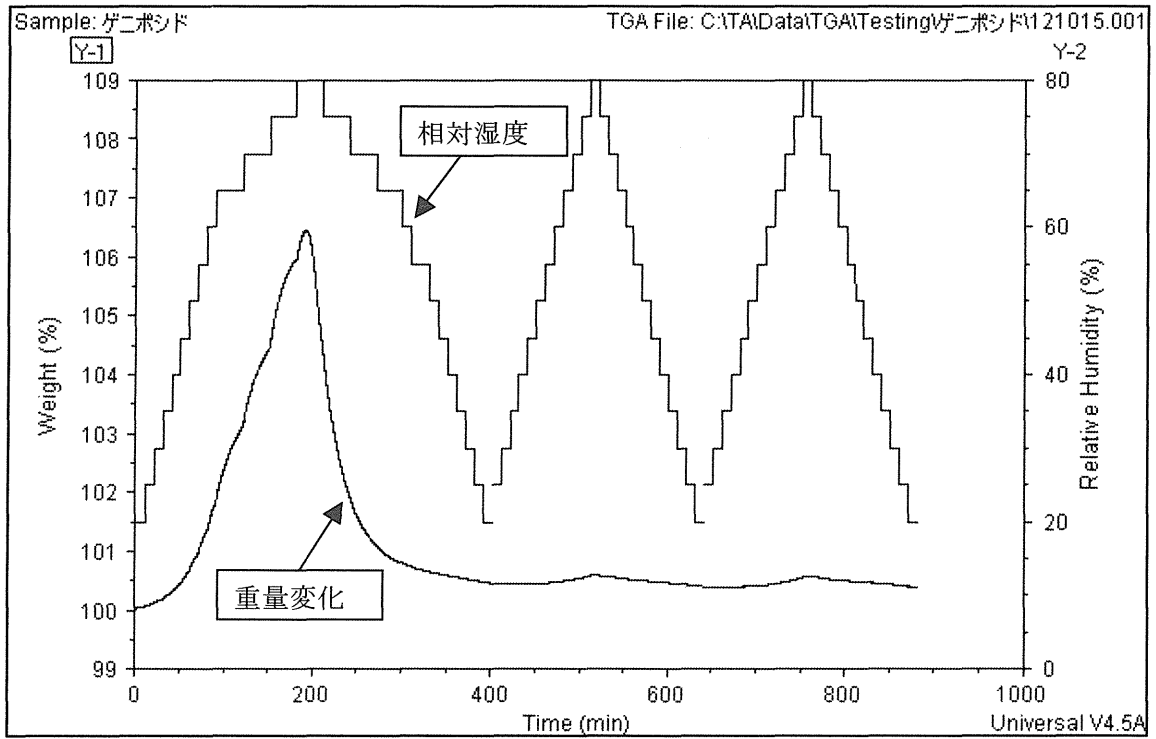


図4 ゲニポシド(Lot.TLN6531)の TGA 分析

分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究
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（株）漢方研究所

小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究

研究要旨 生物学的同等性は、医薬品の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。本研究において、日本薬局方にエキスとして収載される漢方処方の一つである小青竜湯について、同等性の評価について検討を行ってきている。今回、小青竜湯構成生薬のうち、小青竜湯の指標成分でカンゾウに含まれているグリチルリチン酸及びシャクヤクに含まれているペオニフロリンについて、製剤または湯剤投与後のそれらの血漿中濃度推移をもとに、同等性の評価について検討を行うこととした。その結果、小青竜湯の指標成分であるグリチルリチン酸及びペオニフロリンの血漿中濃度推移に関しては、吸収や代謝のメカニズムの個体差によるものと考えられるばらつきが大きく、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。しかしながらグリチルリチン酸及びペオニフロリンはそれぞれ甘草及び芍薬の代表的な成分であり、これらの生薬は多くの処方に配合されているため、他の成分とともに、その可能性について今後も検討を行う必要があると考えられる。

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の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。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」²⁾等の通知に基づき製造管理、品質管理の充実が図られてきた。しかし漢方処方製剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。

漢方処方製剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。従って、より現実的に、どのよう

に同等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方製剤において、指標となる成分を選択し、漢方処方製剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。

本研究において、日本薬局方にエキスとして収載される漢方処方の一つである小青竜湯（構成生薬はマオウ、シャクヤク、カンキョウ、カンゾウ、ケイヒ、サイシン、ゴミシ及びハンゲの8種類）について、同等性の評価について検討を行ってきている。今回は、小青竜湯の指標成分でマオウに含まれているエフェドリン及びプソイドエフェドリン³⁾について、製剤または湯剤を投与した後、それらの血漿中濃度推

移をもとに、同等性の評価について検討を行った。今回、小青竜湯構成生薬のうち、小青竜湯の指標成分でカンゾウに含まれているグリチルリチン酸及びシャクヤクに含まれているペオニフロリンについて、製剤または湯剤投与後のそれらの血漿中濃度推移をもとに、同等性の評価について検討を行うこととした。

B. 研究方法

被験者総数は 6 とし、無作為に 2 グループとした。これらについて、小青竜湯の湯剤及びエキス製剤のクロスオーバー試験を行った。すなわち、各グループに小青竜湯の湯剤またはエキス製剤を投与後、2 週間おいて湯剤をそれぞれ投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤のグループは湯剤をそれぞれ投与した。いずれの場合においても投与後、経時的に採血を行い、それを分析に供した。

倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省の「臨床試験に関する倫理方針」⁴⁾ に従い、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会での審査を受けて実施した。

湯剤の調製法

土瓶にマオウ 3 g、シャクヤク 3 g、カンキョウ 3 g、カンゾウ 3 g、ケイヒ 3 g、サイシン 3 g、ゴミシ 3 g 及びハンゲ 6 g と水 540 mL を加え、加熱抽出し、ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過し、湯剤を得た。

試薬・試液

グリチルリチン酸及びペオニフロリンは和光純薬工業株式会社製を、ヒト血漿はコージンバイオ社製を、メタノールは純正化学株式会社製の高速液体クロマト用を、アセトニトリルは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィ―/マススペクトロメトリー用を、ギ酸は和

光純薬工業株式会社製の高速液体クロマトグラフィ―/マススペクトロメトリー用を、水は Milli - Q (日本ミリポア社製) により精製されたものをそれぞれ用いた。フィルターはジーエルサイエンス株式会社製の GL クロマトディスク水系 / 非水系 (直径 13 mm, 孔径 0.45 μm) を、シリンジはテルモ株式会社製の 1 mL 容をそれぞれ使用した。

分析方法

検量線の作成

グリチルリチン酸及びペオニフロリン各 1 mg 精密に秤取し、移動相組成溶媒 (0.1% ギ酸添加 50% アセトニトリル溶液) に溶解し、精確に 100 mL とした。これを標準原液とし、段階希釈し、検量線を作成した。

添加回収実験

標準原液を 1000 倍希釈 (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) し標準溶液とした。別にグリチルリチン酸及びペオニフロリン各 1 mg を精密に秤取し、50% メタノール溶液に溶解し、精確に 100 mL とした。これを 1000 倍希釈 (10 ng / mL) したものを添加溶液とした。

ブランク血漿 0.5 mL に添加溶液 0.5 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、試料調製に従い試験溶液とし、標準溶液及び試験溶液の測定値を比較することにより添加回収率を求めた。

試料調製⁵⁾

血漿 0.5 mL にメタノール 5 mL を加え、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、遠心分離 (トミー精工製 LC 122 型遠心分離機, 3000 rpm, 10 min) し、上澄液を採取した。残渣にメタノール 5 mL を加え、同様に操作し、これらの上澄液をあわせ、エバポレーターで濃縮した。残留物に移動相組成溶媒 0.5 mL を加え、フィルターろ過をし、試料溶液とした。

分析条件

装置は、LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム (Waters 社製) を配した Waters Xevo TQ MS システム (Waters 社製) を用いた。

<HPLC 条件>

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm (Waters 社製)

移動相: A (0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液), B (0.1 % ギ酸溶液), リニアグラジエント

グリチルリチン酸: % A = 30 (init.), 80 (15 min)

ペオニフロリン: % A = 5 (init.), 70 (15 min)

流速: 0.4 mL / min

カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$

<MS 条件>

プローブ: ESI

キャピラリー電圧: 3 kV

脱溶媒温度: 500 $^{\circ}\text{C}$

脱溶媒ガス流量: 1000L / h

グリチルリチン酸

分析モード: MRM (ポジティブ)

測定質量荷電比: Precursor ion (m/z 823.63),

Product ion (m/z 453.47)

コーン電圧: 20 V

コリジョン電圧: 26 V

ペオニフロリン

分析モード: SIR (ネガティブ)

測定質量荷電比: Monitor ion (m/z 525.10)

コーン電圧: 26 V

C. 研究結果⁶⁾⁻¹⁰⁾

C.1 検量線の直線性と添加回収試験

グリチルリチン酸は 2 – 2000 ng / mL の範囲で、ペオニフロリンは 2 – 20000 ng / mL の範囲で相関係数がいずれも $R^2 = 1.000$ と良好な直線性を示した。グリチルリチン酸及びペオニフロリンの回収率はそれぞれ 88% 及び 98% で、いずれも良好な回収率が得られた。

C.2 グリチルリチン酸及びペオニフロリンの血漿中濃度推移

グリチルリチン酸及びペオニフロリンの血漿中濃度は、エキス製剤中含量を湯剤中含量に等しいものとして補正をかけた値で示した。また最高血漿中濃度 (C_{max}) や血漿中濃度曲線下面積 (AUC) はそれらの値を用いて算出した。

図 1 に小青竜湯エキス製剤または湯剤投与後のグリチルリチン酸の血漿中濃度推移を、図 2 にペオニフロリンの血漿中濃度推移をそれぞれ示した。各成分とも採血点によっては、血漿中濃度にばらつきが認められた。また、薬剤間での有意な差は認められなかった。これらの血漿中濃度推移から求めたそれぞれの最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}), C_{max} 及び AUC を表 1 に示した。グリチルリチン酸の C_{max} はエキス製剤で 22.5 ± 36.7 ng / mL, 湯剤で 30.6 ± 46.4 ng / mL であった。また AUC はエキス製剤で 62.5 ± 76.2 ng \cdot h / mL, 湯剤で 90.5 ± 116 ng \cdot h / mL であった。ペオニフロリンの C_{max} はエキス製剤で 6.00 ± 6.30 ng / mL, 湯剤で 4.0 ± 4.20 ng / mL であった。AUC はエキス製剤で 25.9 ± 28.0 ng \cdot h / mL, 湯剤で 17.0 ± 21.0 ng \cdot h / mL であった。被験者の間で C_{max} , AUC とともにばらつきが大きい傾向が認められた。表 2 にグリチルリチン酸の、表 3 にグリチルリチン酸の C_{max} 及び AUC の分散分析表をそれぞれ示した。

D. 考察

小青竜湯のエキス製剤及び湯剤を投与後、血漿中のグリチルリチン酸及びペオニフロリンの濃度を経時的に測定し、生物学的同等性の指標である T_{max} , C_{max} 及び AUC を算出した。分散分析の結果、グリチルリチン酸の AUC 及び C_{max} に関しては、薬剤、時期及び被験者のいずれの項においても有意差は認められなかった。一方、ペオニフロリンの AUC 及び C_{max}

に関しては、被験者の項で有意であり、個体差が認められた。しかしながら、グリチルリチン酸、ペオニフロリンともにエキス製剤と湯剤の間で有意差は認められなかったことから検出力 $1-\beta$ の算出を行った。その結果、グリチルリチン酸では C_{max} 、AUC ともに 10% 以下、ペオニフロリンでは C_{max} は 10% 以下、AUC は 11% 程度であり、十分な検出力が得られていないことが判明した。そこで、得られた結果をもとに、十分な検出力を得るための被験者数を推定することとした。被験者を増やしても同様のデータが得られると仮定して被験者数の計算を行ったところ、1 群 61 人に増やしてもグリチルリチン酸は C_{max} 、AUC ともに 10% 以下、ペオニフロリンの C_{max} は 13% 程度、AUC は 15% 程度であり十分な検出力が得られないことが判明した。

今回、分析対象としたグリチルリチン酸やペオニフロリンは、腸内細菌による消化管内での代謝や、グルコーストランスポーターを介する吸収機構などが認められており¹¹⁾、また、腸内細菌叢には個体差のあることが知られており、そのため、血漿中濃度推移が影響を及ぼすことが推測される。グリチルリチン酸に関しては、甘草エキス⁵⁾、甘草配合漢方エキス^{12, 13)}あるいはグリチルリチン酸製剤¹⁴⁾を投与した場合、グリチルリチン酸は検出されるものの血液中の濃度は低く、その代謝物としてグリチルレチン酸が検出されることが報告されている。今回の結果でもグリチルリチン酸の血漿中濃度は低く、また、個体差が認められた。ペオニフロリンに関しては、芍薬や芍薬配合処方投与後の薬物動態試験^{15~17)}において、単味と処方とでは血液中の濃度に違いが認められ、また個体間変動が大きい結果が示されている。今回の結果では、ペオニフロリンの血漿中濃度は低く、また、個体差が認められた。

今回の結果から、小青竜湯の指標成分であるグリチルリチン酸及びペオニフロリンの血漿

中濃度推移に関しては、吸収や代謝のメカニズムの個体差によるものと考えられるばらつきが大きく、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。しかしながらグリチルリチン酸及びペオニフロリンはそれぞれ甘草及び芍薬の代表的な成分であり、これらの生薬は多くの処方に配合されているため、他の成分とともに、その可能性について今後も検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

小青竜湯構成生薬のうち、甘草のグリチルリチン酸、芍薬のペオニフロリンについて血漿中濃度推移の比較をし、製剤と湯剤の同等性の評価について基礎的検討を行った。その結果、グリチルリチン酸、ペオニフロリンは同等性を評価する指標成分とするには現段階では困難と考えられた。

参考文献

- 1) 医療用漢方製剤の取り扱いについて、昭和55年6月25日、薬審第804号(1980).
- 2) 医療用漢方エキスの取り扱いについて、昭和60年5月31日、薬審二第120号(1985).
- 3) 堀井周文, 小此木明, 大窪敏樹, 鎌倉浩之, 合田幸広: 小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究, 日本薬学会第132年会要旨集化学系薬学, p.195 (2012).
- 4) 臨床研究に関する倫理方針, 平成16年12月28日, 医政第128001号(2004).
- 5) Ozaki, Y., Noguchi, M., Kamakura, H., Harada, M.: Studies on Concentration of Glycyrrhizin in Plasma and Its Absorption after Oral Administration of Licorice Extract and Glycyrrhizin., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 77 - 81 (1990).
- 6) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について, 平成18年11月24日, 薬食審第1124004号(2006).

- 7) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1106 - 1119 (1982).
- 8) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説 - 統計解析 その 2 -, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1267 - 1271 (1982).
- 9) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説 - 統計解析 その 3 -, *IYAKUHIN KENKYU*, **15**, 123 - 133 (1984).
- 10) 統計数値表編集委員会編: 簡約統計数値表, 日本規格協会, 東京 (1977).
- 11) 第 4 章ポリフェノールの体内吸収と動態, pp 38 - 48, 植物ポリフェノール含有素材の開発, 吉田隆志・有井雅幸監修, シーエムシー出版, 東京 (2007).
- 12) Miyamura, M., Ono, M., Kyotani, A., Nishioka, Y.: Properties of Glycyrrhizin in Kampo Extracts Including Licorice Root and Changes in the Blood Concentration of Glycyrrhetic Acid after Oral Administration of Kampo Extracts., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 209 - 216 (1996).
- 13) Nishioka, Y., Kyotani, S., Miyamura, M., Kusunose, M.: Influence of Time of Administration of a Shosaiko-to Extract Granule on Blood Concentration of Its Active Constituents., *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1335 - 1337 (1992).
- 14) 島田文恵, 陳明豊, 加藤弘巳, 矢野三郎, 金岡又尾: グリチルリチン製剤及び甘草投与におけるグリチルリチン, グリチルレチン酸の血中動態について(第2報), *J. Trad. Med.* **6**, 402 - 403 (1989).
- 15) Sheng, Y., Li, L., Wang, C., Li, Y., Guo, D.: Solid-phase extraction-liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of albiflorin and paeoniflorin in rat serum after oral administration of Si-Wu decoction., *J. Chromatogr. B*, **806**, 127-132 (2004).
- 16) Heikal, O. A., Akao, T., Takeda, S., Hattori, M.: Pharmacokinetic study of paeonimetabolin I, a major metabolite of paeoniflorin from paeony roots., *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 517-521 (1997).
- 17) Bando, M., Shibahara, N., Shimada, Y., Meselhy, M. R., Akao, T., Itoh, T., Terasawa, K.: Pharmacokinetic study of Paeoniflorin, Paeonimetabolin - I and Glycyrrhetic acid in humans after oral administration of Paeony Root, Glycyrrhiza and Shakuyaku - kanzo - to (Shao - Yao - Gan - Cao - Tang). *J. Trad. Med.* **17**, 26 - 33, (2000).
- F. 健康危機情報
なし.
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし.
2. 学会発表等
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

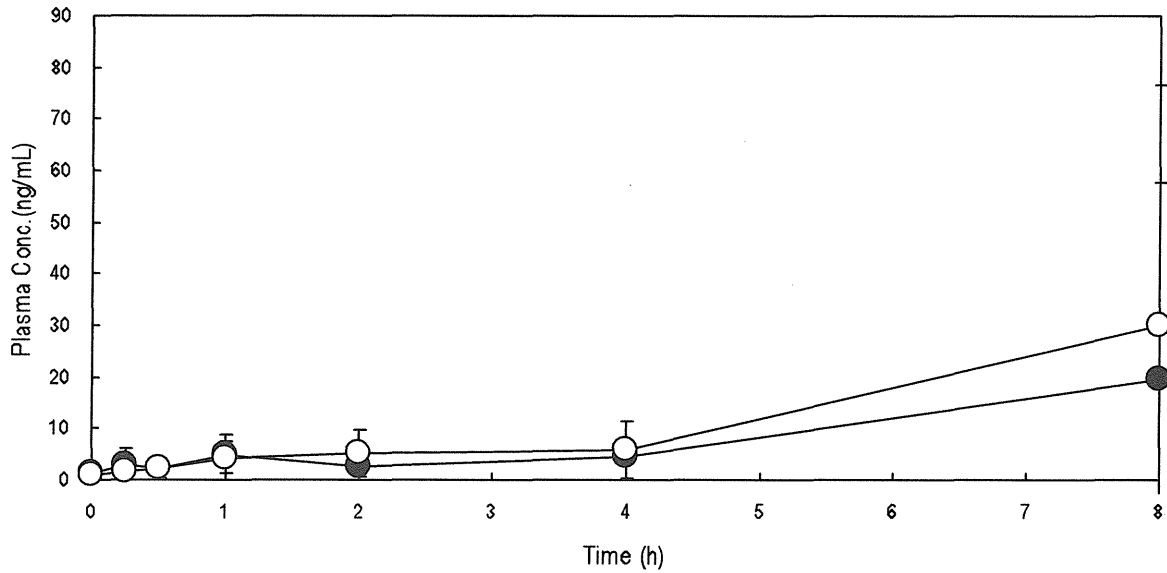


図 1 グリチルリチン酸の血漿中濃度推移 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)
 Values are the means \pm S.D., n = 6

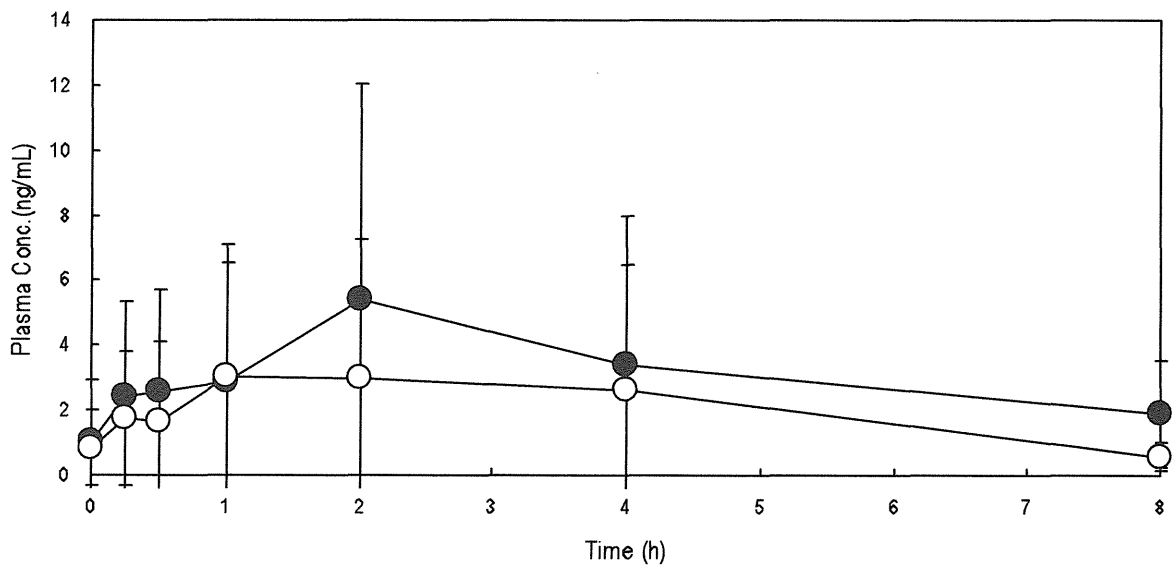


図 2 ペオニフロリンの血漿中濃度推移 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)
 Values are the means \pm S.D., n = 6

表 1 湯剤またはエキス製剤投与時のグリチルリチン酸及びペオニフロリンの T_{max} , C_{max} 及び AUC

小青竜湯		T_{max} (h)	C_{max} (ng / mL)	AUC (ng · h / mL)
グリチルリチン酸	湯剤	5.83	30.6 ± 46.4	90.5 ± 116
	製剤	1.83	22.5 ± 36.7	62.5 ± 76.2
ペオニフロリン	湯剤	2.21	4.00 ± 4.20	17.0 ± 21.0
	製剤	4.33	6.00 ± 6.30	25.9 ± 28.0

表 2 グリチルリチン酸の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
AUC	薬剤	5298	1	5298	0.69	7.71
	時期	25063	1	25063	3.28	7.71
	被験者	40956	5	8191	1.07	6.26
	合計	101840	11	9258		
	残差	30523	4	7631		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
C_{max}	薬剤	194	1	194	0.13	7.71
	時期	4377	1	4377	3.03	7.71
	被験者	7355	5	1471	1.02	6.26
	合計	17705	11	1610		
	残差	5780	4	1445		

表 3 ペオニフロリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
AUC	薬剤	241	1	241	5.33	7.71
	時期	32	1	32	0.72	7.71
	被験者	5922	5	1184	26.25	6.26
	合計	6375	11	580		
	残差	180	4	45		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
C _{max}	薬剤	11	1	11	3.51	7.71
	時期	1	1	1	0.27	7.71
	被験者	275	5	55	17.18	6.26
	合計	300	11	27		
	残差	13	4	3		

分担研究課題 生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究
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（株）漢方研究所

葛根湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究

研究要旨 生物学的同等性は、医薬品の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。本研究において、日本薬局方にエキスとして収載される漢方処方の一つである葛根湯について、同等性の評価について検討を行ってきている。今回、葛根湯構成生薬のうち、葛根湯の指標成分でカンゾウに含まれているグリチルリチン酸について、製剤または湯剤投与後のそれらの血漿中濃度推移をもとに、同等性の評価について検討を行うこととした。その結果、葛根湯の指標成分であるグリチルリチン酸の血漿中濃度推移に関しては、吸収や代謝のメカニズムの個体差によるものと考えられるばらつきが大きく、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。しかしながらグリチルリチン酸は甘草の代表的な成分であり、本生薬は多くの処方に配合されているため、他の成分とともに、その可能性については今後も検討を行う必要があると考えられる。

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の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。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」²⁾等の通知に基づき製造管理、品質管理の充実が図られてきた。しかし漢方処方製剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。漢方処方製剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。従って、より現実的に、どのように同等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方製剤において、指標となる成分を選択し、

漢方処方製剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。

本研究において、日本薬局方にエキスとして収載された漢方処方の一つである葛根湯（構成生薬はカクコン、タイソウ、マオウ、カンゾウ、ケイヒ、シャクヤク及びショウキョウの7種類）について、マオウに含まれているエフェドリン及びプソイドエフェドリ³⁾、カクコンのプエラリン、ダイゼイン、カンゾウのリクイリチン、シャクヤク⁴⁾のペオニフロリンの血漿中濃度推移を、製剤と湯剤で比較し、同等性の評価について検討を行ってきた。今回、葛根湯構成生薬のうち、指標成分であるカンゾウのグリチルリチン酸について血漿中濃度推移を比較し、製剤と湯剤の同等性の評価について検討を行うこととした。

B. 研究方法

被験者総数は 6 とし、無作為に 2 グループとした。これらについて、葛根湯の湯剤及びエキス製剤のクロスオーバー試験を行った。すなわち、各グループに葛根湯の湯剤またはエキス製剤を投与後、2 週間おいて湯剤をそれぞれ投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤のグループは湯剤をそれぞれ投与した。いずれの場合においても投与後、経時的に採血を行い、それを分析に供した。

湯剤の調製法

土瓶にカッコン 8 g, マオウ 4 g, タイソウ 4 g, ケイヒ 3 g, シャクヤク 3 g, カンゾウ 2 g 及びショウキョウ 1 g と水 500 mL を加え、加熱抽出し。ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過し、湯剤を得た。

試薬・試液

グリチルリチン酸は和光純薬工業株式会社製を、ヒト血漿はコージンバイオ社製を、メタノールは純正化学株式会社製の高速液体クロマト用を、アセトニトリルは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、ギ酸は和光純薬工業株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、水は Milli-Q (日本ミリポア社製) により精製されたものをそれぞれ用いた。フィルターはジーエルサイエンス株式会社製の GL クロマトディスク水系 / 非水系 (直径 13 mm, 孔径 0.45 μm) を、シリンジはテルモ株式会社製の 1 mL 容をそれぞれ使用した。

分析方法

検量線の作成

グリチルリチン酸 1 mg を精密に秤取し、移動相組成溶媒 (0.1% ギ酸添加 50% アセトニ

トリル)に溶解し、精確に 100 mL とした。これを標準原液とし、段階希釈し、検量線を作成した。

添加回収実験

標準原液を 1000 倍希釈 (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) し標準溶液とした。別にグリチルリチン酸及びペオニフロリン各 1 mg を精確に秤取し、50% メタノール溶液に溶解し、精確に 100 mL とした。これを 1000 倍希釈 (10 ng / mL) したものを添加溶液とした。

ブランク血漿 0.5 mL に添加溶液 0.5 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、試料調製に従い試験溶液とし、標準溶液及び試験溶液の測定値を比較することにより添加回収率を求めた。

試料調製⁶⁾

血漿 0.5 mL にメタノール 5 mL を加え、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、遠心分離 (トミー精工製 LC122 型遠心分離機, 3000 rpm, 10 min) し、上澄液を採取した。残渣にメタノール 5 mL を加え、同様に操作し、これらの上澄液をあわせ、エバポレーターで濃縮した。残留物に移動相組成溶媒 0.5 mL を加え、フィルターろ過をし、試料溶液とした。

分析条件

装置は、LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム (Waters 社製) を配した Waters Xevo TQ MS システム (Waters 社製) を用いた。

<HPLC 条件>

移動相 : A (0.1% ギ酸アセトニトリル溶液),
B (0.1% ギ酸溶液), リニアグラジエント
%A = 30 (init.), 80 (15 min)

カラム : ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm (Waters 社製)

流速 : 0.4 mL / min

カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

<MS 条件>

プローブ：ESI

分析モード：MRM (ポジティブ)

測定質量荷電比：Precursor ion (m/z 823.63),

Product ion (m/z 453.47)

イオン電圧：20 V

コリジョン電圧：26 V

キャピラリー電圧：3 kV

脱溶媒温度：500 °C

脱溶媒ガス流量 1000 L/h

<倫理面への配慮>

本研究は、厚生労働省の「臨床試験に関する倫理方針」⁵⁾に従い、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会での審査を受けて実施した。

C. 研究結果⁷⁻¹¹⁾

C.1 検量線の直線性と添加回収試験

グリチルリチン酸は 2–2000 ng/mL の範囲で相関係数が $R^2=1.000$ と良好な直線性を示した。また、回収率は 88% で、良好な回収率が得られた。

C.2 グリチルリチン酸の血漿中濃度推移

グリチルリチン酸の血漿中濃度はエキス製剤中含量を湯剤中含量に等しいものとして補正をかけた値で示した。また最高血漿中濃度 (C_{max}) や血漿中濃度曲線下面積 (AUC) は、それらの値を用いて算出した。

図 1 に葛根湯エキス製剤及び湯剤投与後のグリチルリチン酸の血漿中濃度推移を示した。採血点によっては血漿中濃度にばらつきが認められ、薬剤間で有意な差が認められなかった。これらの血漿濃度推移から求めた最高血漿中濃度到達時間 (T_{max})、 C_{max} 、AUC を表 1 に示した。 C_{max} はエキス製剤で 25.9 ± 17.7 ng/mL、湯剤で 13.1 ± 2.20 ng/mL であった。また

AUC はエキス製剤では 63.8 ± 32.6 ng·hr/mL、湯剤で 33.6 ± 3.42 ng·hr/mL であり、ばらつきが大きかった。表 2 に C_{max} の、表 3 に AUC の分散分析表をそれぞれ示した。

D. 考察

葛根湯のエキス製剤及び湯剤を投与後、血漿中のグリチルリチン酸の濃度を経時的に測定し、生物学的同等性の指標である T_{max} 、 C_{max} 及び AUC を算出した。分散分析の結果、グリチルリチン酸の AUC 及び C_{max} に関しては、薬剤、時期及び被験者のいずれの項においても有意差は認められなかった。そこで検出力 $1 - \beta$ の算出を行った結果、 C_{max} 、AUC とともに 10% 以下で、十分な検出力が得られていないことが判明した。そこで、得られた結果をもとに、十分な検出力を得るための被験者数を推定することとした。被験者を増やしても同様のデータが得られると仮定して被験者数の計算を行ったところ、一群 61 人でも十分な検出力が得られないことが判明した。

今回、分析対象としたグリチルリチン酸は、腸内細菌による消化管内での代謝や、グルコーストランスポーターを解する吸収機構などが認められており¹²⁾、また、腸内細菌叢には個体差があることが知られており、そのため、血漿中濃度推移が影響を及ぼすことが推測される。グリチルリチン酸に関しては、甘草エキス⁶⁾、甘草配合漢方エキス^{13, 14)}あるいはグリチルリチン酸製剤¹⁵⁾を投与した場合、グリチルリチン酸は検出されるものの血液中の濃度は低く、その代謝物としてグリチルレチン酸が検出されることが報告されている。今回の結果でもグリチルリチン酸の血漿中濃度は低く、また、個体差が認められた。また、投与後 1 時間、2 時間及び 4 時間におけるの血漿中濃度にあまり変化がないことから、採血時間の延長などの検討も必要と考えられた。

今回の結果から、葛根湯の指標成分であるグリチルリチン酸の血漿中濃度推移に関しては、

吸収や代謝のメカニズムの個体差によるものと考えられるばらつきが大きく、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。しかしながらグリチルリチン酸は甘草の代表的な成分であり、本生薬は多くの処方に配合されているため、他の成分とともに、その可能性について今後も検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

葛根湯構成生薬のうち、甘草のグリチルリチン酸について血漿中濃度推移の比較をし、製剤と湯剤の同等性の評価について基礎的検討を行った。その結果、グリチルリチン酸は同等性を評価する指標成分とするには、現段階では困難と考えられた。

参考文献

- 1) 医療用漢方製剤の取り扱いについて、昭和55年6月25日、薬審第804号(1980).
- 2) 医療用漢方エキスの取り扱いについて、昭和60年5月31日、薬審二第120号(1985).
- 3) 堀井周文, 小此木明, 大窪敏樹, 鎌倉浩之, 合田幸広: 葛根湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究, 第28回和漢医薬学会学術大会要旨集, p 60 (2011).
- 4) 堀井周文, 小此木明, 大窪敏樹, 鎌倉浩之, 合田幸広: 葛根湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 (第2報), 第29回和漢医薬学会学術大会要旨集, p 89 (2012).
- 5) 臨床研究に関する倫理方針, 平成16年12月28日, 医政第128001号(2004)
- 6) Ozaki, Y., Noguchi, M., Kamakura, H., Harada, M.: Studies on Concentration of Glycyrrhizin in Plasma and Its Absorption after Oral Administration of Licorice Extract and Glycyrrhizin., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 77 - 81 (1990).
- 7) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラ

イン等の一部改正について、平成18年11月24日、薬食審第1124004号(2006).

- 8) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1106 - 1119 (1982).
- 9) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説 -統計解析 その2-, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1267 - 1271 (1982).
- 10) 江島昭他:生物学的同等性の試験方法についての解説 -統計解析 その3-, *IYAKUHIN KENKYU*, **15**, 123 - 133 (1984).
- 11) 統計数値表編集委員会編: 簡約統計数値表, 日本規格協会, 東京 (1977).
- 12) 第4章ポリフェノールの体内吸収と動態, pp 38 - 48, 植物ポリフェノール含有素材の開発, 吉田隆志・有井雅幸監修, シーエムシー出版, 東京 (2007).
- 13) Miyamura, M., Ono, M., Kyotani, A., Nishioka, Y.: Properties of Glycyrrhizin in Kampo Extracts Including Licorice Root and Changes in the Blood Concentration of Glycyrrhetic Acid after Oral Administration of Kampo Extracts., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 209 - 216 (1996).
- 14) Nishioka, Y., Kyotani, S., Miyamura, M., Kusunose, M.: Influence of Time of Administration of a Shosaiko-to Extract Granule on Blood Concentration of Its Active Constituents., *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1335 - 1337 (1992).
- 15) 島田文恵, 陳明豊, 加藤弘巳, 矢野三郎, 金岡又尾: グリチルリチン製剤及び甘草投与におけるグリチルリチン, グリチルレチン酸の血中動態について (第2報) ., *J. Traditional Medicines.* **6**, 402 - 403 (1989).

F. 健康危機情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし.

2. 学会発表等

なし.

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

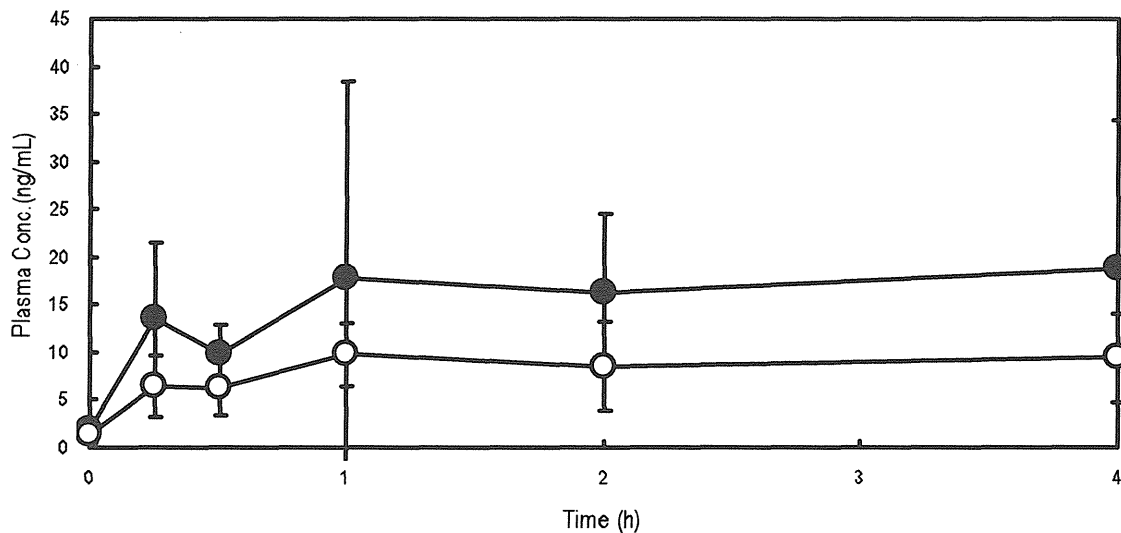


図1 グリチルリチン酸の血漿中濃度推移 (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)
 Values are the means \pm S.D., n = 6

表1 湯剤, エキス製剤投与時のグリチルリチン酸の T_{max} , C_{max} と AUC

葛根湯		T_{max} (h)	C_{max} (ng / mL)	AUC (ng · h / mL)
グリチルリチン酸	湯剤	1.71	13.1 \pm 2.20	33.6 \pm 3.42
	製剤	2.33	25.9 \pm 17.7	63.8 \pm 32.6

表2 グリチルリチン酸の分散分析表 (AUC)

AUC	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
	薬剤	2735	1	2735	6.20	7.71
時期	1300	1	1300	2.95	7.71	
被験者	2314	5	463	1.05	6.26	
合計	8114	11	738			
残差	1766	4	441			

表3 グリチルリチン酸の分散分析表 (C_{max})

C _{max}	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
	薬剤	497	1	497	3.90	7.71
時期	332	1	332	2.60	7.71	
被験者	753	5	151	1.18	6.26	
合計	2091	11	190			
残差	510	4	127			

分担研究課題

生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究

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

イオンモビリティ分離技術を利用した生薬中の異性体成分の構造推定法に関する研究

協力研究者 渥美さやか 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

研究要旨 LC/MSによるメタボローム分析による多様性確認を指向し、LC-IMS-MSを用いた生薬中の異性体成分の構造推定法の有用性を検討するため、大黄中のアントラキノン配糖体の位置異性体について、衝突断面積を測定し、分子シミュレーションによって得られた候補化合物の衝突断面積の理論値と比較することによって、構造推定を行った。その結果、文献情報を基にLCの保持時間やMSスペクトルから予測した構造と、衝突断面積の比較から推定された構造は良く一致した。さらに、衝突断面積の理論値と実測値の誤差は十分低い値であったことから、LC-IMS-MS分析により、高い精度で生薬中の異性体成分の構造推定が可能であることが示唆された。

研究協力者

川原信夫 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科

寺坂和祥 名古屋市立大学大学院薬学研究科

高橋 豊 エムエス・ソリューションズ株式会社

川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

使用される漢方薬は動植物を原料とする生薬から構成されるが、これらは天然由来であるため、基原種や産地、栽培条件、加工・調製法などの違いにより品質に差が生じやすく、品質確保のためには化学薬品とは異なった視点からのアプローチが求められる。そこで本研究では、イオンモビリティ分離技術を生薬の成分分析に取り入れることにより、従来とは異なる視点から生薬の多様性を評価し、新しい品質評価法の礎を築くことを目指した。

従来、生薬の成分分析はLC-MSを中心に進められてきたが、化合物の構造決定のためには単離とNMR測定が必要な場合が多く、微量・不安定成分の同定は困難であった。一方、Ion Mobility Mass Spectrometry (IMS) は、比較的高圧のガスセル内をイオンが移動する際の移動度に応じて分離を行う技術であり、測定された移動度から化合物の衝突断面積 (Collision Cross Section; CCS) を算出し、分子シミュレーションによる候補化合物の衝突断面積の理論

A. 研究目的

近年、総人口に占める高齢者の割合が急速に増加し、国民の健康ニーズも多様化する中、代替医療やセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を集めている。漢方医学で

値と比較することで、構造推定が可能である。従来の LC-MS 分析に加え、イオンの高高さの違いによっても化合物を分離できる LC-IMS-MS は、生体高分子の分析を中心に利用が広がってきたが、低分子化合物の分析報告は極めて少なく、研究開始当時は、フラボノイド配糖体¹⁾と医薬品のグルタチオン抱合体²⁾の分析報告が確認されるのみであった。そこで本研究では、まず、フラボノイド配糖体と同程度の分子量と高高さを持つ生薬中の配糖体成分を対象として分析を行うこととした。

生薬単体として、また、漢方薬の構成生薬としても需要の高い大黄は、漢方医学において最も重要な生薬のひとつであり、大黄の成分研究は 1960 年代まで遡ることができる。大黄の基原植物である *Rheum palmatum*, *R. tanguticum*, *R. officinale*, *R. coreanum* や近縁植物からは、rhein 配糖体, emodin 配糖体, aloe-emodin 配糖体, chrysophanol 配糖体などの位置異性体が多数、単離されている (図 1) ことから、本研究では、LC/MS によるメタボローム分析による生薬の多様性確認を指向し、生薬中の異性体成分の構造推定法の有用性を評価するため、大黄中のアントラキノン配糖体の位置異性体の識別を試みることにした。

B. 研究方法

材料

本研究に用いたダイオウの熱水抽出エキスは、国内市場に流通する大黄を 2 時間加熱還流して凍結乾燥したものを、医薬基盤研究所薬用資源研究センターより譲り受けた。試料の詳細を表 1 に示す。Emodin 6-*O*-glucoside は、センナ由来の配糖化酵素 UGT73B11 を用いて emodin と UDP-glucose から酵素化学的に合成したものを、名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野より譲り受けた。

LC-MS/MS 測定

ダイオウ熱水抽出エキスの凍結乾燥試料を

50%メタノールに溶解し、終濃度 1 mg/mL に調製した後、1 分間超音波照射し、遠心分離して得た上清を n = 2 として LC-MS/MS 分析に供した。測定条件は以下の通りである。

LC 部: Shimadzu Prominence UFLC (島津製作所)

- ▶ カラム Thermo Scientific
Hypersil-GOLD, 2.1 x 100 mm, 1.9 μm
- ▶ 移動相 A = 0.1 % 酢酸水溶液,
B = 0.1 % 酢酸/アセトニトリル
- ▶ グラジエント B = 20 – 70% (30 min) –
100% (35 min)
- ▶ 流速 0.2 mL/min
- ▶ 注入量 10 μL
- ▶ 検出器 PDA

MS 部: LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific)

- ▶ ESIスプレー電圧 4,000 V, -3,000 V
- ▶ キャピラリー温度 300°C
- ▶ スキャン *m/z* 範囲 100 ~ 2,000
- ▶ 質量分解能 30,000
- ▶ CID電圧 35V
- ▶ プリカーサー *m/z* 範囲 3.5

測定データを Xcalibur (ThermoFisher Scientific) を用いて分析し、ピークの検出と組成推定を行った。

LC-IMS-MS 測定

ダイオウ水抽出エキスの凍結乾燥試料を超純水に溶解し、終濃度 1 mg/mL に調製した後、遠心分離して得た上清を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して LC-IMS-MS 分析に供した。デモ分析、本分析共に測定条件は以下の通りである。

LC 部: ACQUITY UPLC (Waters)

- ▶ カラム ACQUITY UPLC BEH C18,
2.1×100, 1.7 μm
- ▶ 移動相 A = 0.1 % 酢酸水溶液,
B = 0.1 % 酢酸/アセトニトリル