

- 学会第60 回年会，日本生薬学会第60回年会，当別 (2013.9).
- 7) 桑田幸恵，勢<sup>メ</sup>康代，袴塚高志，合田幸広，新規漢方処方<sup>の</sup>品質規格に関する基礎的検討 (15) 腸内細菌 *Clostridium difficile* の増殖を抑制する漢方処方について，日本生薬学会第60回年会，当別 (2013.9).
  - 8) 伏見直子，伏見裕利，安食菜穂子，御影雅幸，川原信夫，合田幸広，生薬「滑石」の基原について(3)：日本薬局方および中国薬典収載品の分光測色計による鑑別，日本生薬学会第60回年会，当別 (2013.9).
  - 9) 杉本直樹，日本薬局方の第17改正に向けた最近の動き -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-。日本薬局方セミナー，JASIS2013，幕張 (2013.9).
  - 10) Hakamatsuka, T., “Japanese pharmacopoeia and relevant monographs, and practical use of natural medicines in healthcare systems in Japan”, International Pharmaceutical Federation (FIP) 2013, Ireland, Dublin (2013.9).
  - 11) Goda, Y., “Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines”, 61<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Munster, German (2013.9).
  - 12) Goda, Y., “Current Status and Future Plans of Standardization for Herbal Medicines in Japan”, Follow up meeting to GA2013 at the Univ. of Applied Sciences, Northwestern Switzerland, Basel, Switzerland (2013.9).
  - 13) 合田幸広，多成分系としての生薬・漢方製剤の特性と課題，富山大学・和漢医薬学総合研究所創立50周年記念講演会，富山 (2013.10).
  - 14) 合田幸広，生薬・生薬製剤に関する12年3ヶ月，生薬学会関西支部平成25年度秋期講演会，大阪(2013.11).
  - 15) Goda, Y., Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines, The 11th Standing Committee Meeting of the Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines, Singapore, (2013.10).
  - 16) 杉本直樹，田原麻衣子，大槻 崇，多田敦子，伊藤裕才，佐藤恭子，五十嵐良明，合田幸広，穂山 浩，qNMR スペクトルライブラリの構築. 第50回全国衛生化学技術協議会年会，富山(2013.11).
  - 17) 合田幸広，医薬品としての生薬・漢方薬研究，日本薬学会東海支部講演会，名古屋 (2014.2).
  - 18) 袴塚 高志，漢方・生薬製剤の現状と伝統医学国際標準化の動向について，奈良県医薬品製造販売業等管理者講習会，奈良 (2014.2).
  - 19) 坂上祐香，湯浅宗光，合田幸広，袴塚高志，新規漢方処方<sup>の</sup>品質規格に関する基礎的検討(16) 半夏が有する抗炎症性サイトカ

インの発現増強活性, 日本薬学会第134年会, 熊本 (2013. 3).

3. その他, 単行本等

- 1) Goda, Y., Anjiki, N., Kawahara, N., *Biochemical Sensors: Mimicking Olfactory and Gustatory Senses, Chapter 11: Herbal Medicines.* pp205-230 Pan Stanford Publishing (2013). ISBN 978-981-4267-07-6
- 2) 第16改正日本薬局方第二追補参考情報「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」(第一追補の改訂版)
- 3) 第16改正日本薬局方第二追補5.01生薬試験法10.「磁気共鳴(NMR)法を利用した生薬及び漢方処方エキスの定量指標成分の定量

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

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 薬品部長

漢方処方日本薬局方原案作成に関する研究

要旨 日本薬局方に漢方処方エキスを収載する目的で、漢方処方の原案作成WG会議を平成25年度5回開催し、日本漢方生薬製剤協会、日本生薬連合、東京生薬協会、薬剤師会、日本試薬協会、生薬等委員会等からの参加者の意見を取りまとめて、随時日本薬局方原案審議委員会生薬等（A）委員会に漢方処方WGからの報告を行った。

研究協力者

川原信夫（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）

木内文之（慶應義塾大学薬学部）

袴塚高志（国立医薬品食品衛生研究所）

以上生薬等委員会。

塚田正論（医薬品医療機器総合機構）

三上正利（日本薬剤師会薬局製剤・漢方委員会）

小此木明，堀井周文，近藤誠三，高尾正樹，田村 真，川崎武志，玉木智生，石崎昌洋，山本藤輔，岩嶋 浄，山田修嗣（日本漢方生薬製剤協会）

有本恵子（日本生薬連合会）

菊地祐一，神本敏弘（東京生薬協会）

佐藤陽子，高谷和広（日本試薬協会）

山下忠俊（常磐植物科学）

渥美さやか（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

漢方処方製剤の品質確保を目指し、日本薬局方に漢方処方エキスを収載する目的で、事前どのような規格が可能か、実際に漢方処方製剤

を販売している業界団体の関係者と日本薬局方生薬等委員会の委員、エキス製剤の原料を供給する生薬団体、分析試薬を準備する試薬業界団体の関係者及び日本薬剤師会の関係者が定期的に集まり意見交換を行う。また、漢方処方エキスの原料である一部の生薬の規格及び、漢方処方エキスの規格で使用する試薬・試液の規格についても意見交換を行う。

B. 研究方法

ほぼ2ヶ月に1回、国立医薬品食品衛生研究所内の会議室に、漢方処方の原案作成WGとして研究協力者が集まり、日本漢方生薬製剤協会技術部会、東京生薬協会、日本試薬協会等が行った実験結果を元にして、お互いに忌憚ない意見を交換し、日本薬局方原案審議委員会生薬等A委員会に漢方処方WGからの報告書を提出する。

C. 研究結果・考察

本WG会議は、平成25年5月28日、同年8月27日、同年11月5日、同年12月26日、平成26年3月6日の5回開催された。WG会議では、特に16局第二追補以降に収載する漢方処方エキスの候補品目として、防已黄耆湯、麻黄湯、桃核承気湯、

葛根湯加川芎辛夷，加味帰脾湯，防風通聖散，五苓散，半夏瀉心湯，大柴胡湯，抑肝散及び乙字湯の各エキス11品目について，規格化を検討するとともに，これらの漢方処方エキスの規格化の際使用する試薬類の規格かについて検討し，各WG会議後，生薬等A委員会に検討内容について報告した。

前年度終了の段階で，すでに，上記11処方のうち，半夏瀉心湯エキス，葛根湯加川芎辛夷エキス，麻黄湯エキス，大柴胡湯エキス，乙字湯エキスの5エキスについては，本WGでの規格化を経て，生薬等A委員会，生薬等B委員会での議論が終了しており，16局第一追補（半夏瀉心湯エキス），及び第二追補への収載が可能となっていた。桃核承気湯についても，審議はほぼ終了していたが，処方構成生薬であるボウショウが審議未了であった関係で，17局収載となっていた。本年度は，さらに，防已黄耆湯，加味帰脾湯，防風通聖散，五苓散，抑肝散の5エキスについて検討した。その結果，防已黄耆湯，加味帰脾湯，防風通聖散，抑肝散の4エキスについては，17局での収載にほぼ目処がたった。個別の処方では，防已黄耆湯において，3番目の定量指標成分として，適切な化合物が選択できないことから，黄耆そのもので，カリコシン-7-0-グリコシドを対象として，定量規格を設定する方針で対応することになった。また，同エキスでは，シノメニンにおいて，一部のカラムでグリチルリチン酸と分離出来ないことが確認されており，システムの適合性を設定することで解決することになった。また，防風通聖散エキスでは，ショウキョウのTLC確認試験で，6-ギンゲロールだけでなく，6-ショウガオール両者のどちらかを確認する手法とされた。また，ペオニフロリンの定量試験において，ブランクに若干の重なりが観測される場合があったが，黄連解毒湯エキスのバイカリン定量時に定めた規格下限の判定値に影響の与えない量について検討した結果，5%までは許容値であることが明かとなり，既収載の条件と同じ定量

試験条件を設定した。

従来からの課題であった，乾燥エキスと軟エキスの性状の色調について，17局の際，書き分けることを念頭に，これまで未検討であった半夏瀉心湯エキス，葛根湯加川芎辛夷エキス，防已黄耆湯エキス，麻黄湯エキス，加味帰脾湯エキスについて，実際に市販品の原材料となるエキスを集め，色についてWGであらためて検討した。その結果，乾燥エキスでは，半夏瀉心湯は淡黄色～黄褐色，葛根湯加川芎辛夷は淡褐色～褐色，防已黄耆湯は淡黄褐色～帯赤褐色，麻黄湯は淡褐色，加味帰脾湯は淡黄褐色～褐色，軟エキスでは，5処方ともに黒褐色とすることとされた。

#### D. 結論

第16改正日本薬局方第二追補では，本研究課題で実施された漢方処方の原案作成WGの報告を元にして，葛根湯加川芎辛夷エキス，麻黄湯エキス，大柴胡湯エキス，乙字湯エキスの4エキスの原案が完成し，16局第二追補収載となった。さらに，残り6漢方処方エキス及び処方構成生薬の局方収載を目標として，技術的検討が進んでおり，桃核承気湯，防已黄耆湯，加味帰脾湯，防風通聖散，抑肝散の5エキスについては，17局での収載にほぼ目処がたった。

#### 健康危機情報

本研究において健康に危機を及ぼすような情報は無い。

#### E. 研究発表

##### 論文等報告

- 1) 合田幸広，多成分系としての生薬・漢方製剤の特性と課題，薬局 **64**: 2777-2781 (2013)。

##### 学会発表等

- 1) 合田幸広，多成分系としての生薬・漢方製剤の特性と課題，日本薬剤学会第28年会，

名古屋(2013. 5)

- 2) 合田幸広, 生薬及び漢方製剤の品質確保, 保健医療科学院薬事衛生管理研修, 和光(2013. 6).
- 3) Hakamatsuka, T., Japanese pharmacopoeia and relevant monographs, and practical use of natural medicines in healthcare systems in Japan, International Pharmaceutical Federation (FIP) 2013, Ireland, Dublin (2013. 9) .
- 4) Goda, Y., Current Status and Future Plans of Standardization for Herbal Medicines in Japan, Follow up meeting to GA2013 at the Univ. of Applied Sciences, Northwestern Switzerland, Basel, Switzerland (2013. 9).
- 5) 合田幸広, 多成分系としての生薬・漢方製剤の特性と課題, 富山大学・和漢医薬学総合研究所創立50周年記念講演会, 富山(2013. 10).
- 6) 合田幸広, 生薬・生薬製剤に関する12年3ヶ月, 生薬学会関西支部平成25年度秋期講演会, 大阪(2013. 11)
- 7) 合田幸広, 医薬品としての生薬・漢方薬研究, 日本薬学会東海支部講演会, 名古屋(2014. 2).

### 3. その他

- 1) 日本薬局方フォーラム 22(1)pp39-46, に, 乙字湯, 大柴胡湯, 麻黄湯エキスの原案が, 同 22(2)pp276-280 に葛根湯加川芎辛夷の原案が, 同 22(3) pp483-484 に麻黄湯エキスの一部改定案が提示された.

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 薬品部長

研究協力者 細江潤子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

日本薬局方における定量 NMR (qNMR) の利用に関する研究

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、サイコサポニン類及びチョウトウコウアルカロイド類、(-)-epigallocatechin 3-O-gallate 及び、(E)-ケイヒ酸について、バリデーション試験等を実施し、測定溶媒と内部標準物質、定量対象シグナルを決定した。また、ロスマリン酸について、使用溶媒等について予備的検討を行った。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長

西村浩昭，菊地祐一，勝原孝雄 株式会社ツムラ生産本部製剤・品質部品質設計 1 グループ  
末松孝子 株式会社 JEOL RESONANCE ソリューション・マーケティング部

早川昌子，鈴木裕樹 和光純薬工業株式会社試薬事業部試薬開発本部試薬開発部

三浦 亨 和光純薬工業株式会社試薬事業部 試薬開発本部試薬研究所

山田裕子 和光純薬工業株式会社試薬事業部試薬開発本部試薬研究所主席研究員

山下忠俊 株式会社常磐植物化学研究所研究開発部

A. 目的

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きた。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、さらに、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が独立に定量実験を行うことにより、同法についてバリデーション実験を行い良好な結果を得た。ついで、日本薬局方の生薬等で使用する個々の試薬について、実際に qNMR を測定し、個々の試薬について、どのシグナルを純度規格化に利用するか順次、検討してきた。これらの研究に基づき、第 16 改正日本薬局方第一追補では、参考情報として「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」が収載された。さらに、第二追

補の段階では、qNMR を利用して定量値付けされた試薬が試薬の項に収載されるとともに、生薬試験法で qNMR が収載され、生薬や漢方処方エキス各条の成分定量において、qNMR で値づけされた試薬が実際に使用されることを目指している。

これまでの研究の結果より、qNMR 法そのものは、日本薬局方のような公的規格の中で十分に利用できることは明確にされた。しかし、qNMR 法は、これまで日本薬局方の中になかった概念であり、生薬試験法に記載すべき qNMR 測定上の注意点は、どのようなものであるべきか、測定機器についてシステムの適合性等をどのように設定すべきか、qNMR を実際に日本薬局方で採用した後、試薬会社で値付けの際にどのようなことを注意すべきで、販売の際にはどのような注意書きを書くべきであるか等、qNMR が日本薬局方に収載されて、生薬成分の含量規格に公的に利用されるまでに解決すべき現実的な問題が浮上してきた。

本研究は、このような背景の下、国立医薬品食品衛生研究所の研究者と、試薬会社（和光純薬、常磐植物化学）、機器会社（日本電子）、製薬会社（ツムラ）の研究者が共同で、前述したような諸問題について継続的に対応しているものである。

## B. 研究方法

### B. 1. 班会議の開催

研究班会議を 4 回（4 月 24 日、7 月 22 日、10 月 31 日、1 月 22 日）開催し、研究班員が具体的にそれぞれの分野で抱えている問題点を持ち寄り議論を行い、検討課題を整理し、それぞれの分野で実証的な対応を行った。

### B. 2. 試料

ツムラで天然物より直接調製した化合物、和

光純薬で、現在販売中及び、以後販売予定の化合物を実験対象とした。

有機溶媒可溶の内部基準物質としては、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- $d_4$ , Mw= 226.50, Code No. 021-16441, Lot. KWH5334, Code No. 024-17031, Lot. DCL1923, 純度 99.8%±0.2%）、及び水系用の内部基準物質として、DSS- $d_6$ （Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- $d_6$ -sulfonate, Mw= 224.36, Code No. 048-31071, Lot. EPL1095, 純度 92.2%±0.5%）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, Cat. No. 166310100, Lot. A0280880)、重アセトン (acetone- $d_6$ ) (Aldrich 社製, Cat. No. 423114, Lot. 15827JH)、ジメチルスルホキシド- $d_6$  (DMSO- $d_6$ ) (Isotec 社製, Cat. No. 156914, Lot. MKBB9086)、重メタノール (methanol- $d_4$ ) (Isotec 社製, Cat. No. 194166, Lot. EW1886) 及び重クロロホルム ( $CDCl_3$ ) (Isotec 社製, Cat. No. 151858, Lot. MKBG4655V) を用いた。また、内部基準物質の化学シフト測定用重溶媒としては、和光純薬工業(株)製の重水 (Code. No. 040-26842, Lot. TLL2274)、重アセトン (Code. No. 018-11933, Lot. No. DCR3477)、ジメチルスルホキシド- $d_6$  (Code. No. 048-29062, Lot. TLL1344)、重メタノール (Code. No. 134-13641, Lot. DCM1080)、重クロロホルム (Cat. No. 036-18011, Lot. TLP6263)、及び CIL 社製の重メチレンクロリド ( $CD_2Cl_2$ ) (Code. No. 533-74452, Lot. 12B-082) を用いた。

### B. 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 UMX2) を使用した。NMR はオートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) 及び JNM-ECS400 (400 MHz) (日本電子(株)製) を使用し、ケミカルシフト値は、内部標準物質を基準シグナル (0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。NMR 試料管は Wilmad 製 528-pp を使用した。なお、内部基準物質は、実際には、0.1ppm (DSS- $d_6$ ) から 0.2ppm (1,4-BTMSB- $d_4$ ) 程度の化学シフトを持つが、測定溶媒毎に異なるため、特に断らない限り、その値は補正しなかった。

#### B.4. 試料溶液の調製

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。また、内標準物質約 1 mg を精密に量り採り、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内標準溶液とした。

#### B.5. qNMR 測定条件

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  $^{13}\text{C}$  デカップル実施, ダミースキャン 2 回とし, 内部標準法 (AQARI: Accurate quantitative NMR with internal reference substance) により, 原則として各試料について 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

#### C.1 サイコサポニン類

サイコサポニン a, サイコサポニン b2, サイコサポニン d について, 重メタノールを溶媒とし, 1,4-BTMSB- $d_4$  を内部標準物質として, 複数の機関で定量 NMR を実施した。その結果, それぞれ, 12-H (5.94ppm 付近), 11-H (6.44 ppm 付近), 12-H (5.93ppm 付近) を積分対象シグナルとすると, 妨害ピークがなく良好な結果が得られることが判明した。ただし, これらの化合物は吸湿性が高く, 実際に販売する際, どのタイミングでどのように値付けして, どのような注意書きを書き, 開封後, どのような条件で量りにとって HPLC の分析用標品として溶解させるか, 引き続き検討が必要とされた。また, 現在の条件では S/N が低いため, 実際に試薬として値付けする際には, S/N=100 以上になるように, 濃度 (例えば 10mg/mL) と, 積算回数 (scan 32 など) について, 使用する機器の感度を考慮して, 検討することとされた。

#### C-2. チョウトウコウアルカロイド類

ヒルスチンとリンコフィリンについては, 重 acetone, 重 DMSO, 重メタノールを溶媒とし, 異なる内部標準物質を使用してそれぞれ複数の機関で定量 NMR を測定した結果, 前者では, 重メタノールを溶媒, DSS- $d_6$  を内部標準とし, 後者では, アセトン- $d_6$  溶媒とし, 1,4-BTMSB- $d_4$  を内部標準とするのが適切と判断された。さらに, 前者では 17, 9, 12, 10, 11-H, 後者では, 17, 9, 11, 10, 12-H のうち, 分離度良好な部分を定量用シグナルとすることが適切と判断されたが, 少量で高価なため, これ以上の検討

保留とされた。

### C-3. カテキン類

茶葉は漢方処方構成生薬であり、日本薬局方に新規採用される可能性があるため、新規の qNMR ターゲット試薬として、カテキン類について、バリデーション試験を実施することとした。茶葉の指標成分としては、(-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) が最も適切と考えられるため、和光純薬販売の本物質について、まず、重メタノールを溶媒、1,4-BTMSB-d4 を内部標準として検討を行った。その結果、溶媒中で、EGCG が徐々に分解することが確認された。そこで、溶媒として重アセトンを選択したところ、良好な結果が得られたため、5 機関でバリデーション試験を実施した。その結果、6.36ppm 付近のシグナルが定量用として適切であることが判明した。

### C-4. (E)-ケイヒ酸

(E)-ケイヒ酸は、複数の漢方処方エキスで定量用指標成分とされている化合物である。溶解度の関係から、溶媒として重クロロホルムを選択し、1,4-BTMSB-d4 を内部標準物質として、5 機関でバリデーション試験を行ったところ、良好な結果が得られ、最終的に定量シグナルを 6.20ppm 付近のシグナルと決定した。

### C-5. ロスマリン酸

ロスマリン酸は、半夏厚朴湯の定量指標成分として利用されている。本研究では、まず予備実験として、適切な溶媒を選択するため、重アセトン、重メタノール、重 DMSO 中におけるロスマリン酸のシグナルの経時変化について確認した。その結果、重 DMSO を溶媒として選択した場合、最も安定であることが明らかとなった。溶媒を重 DMSO とした場合、内部標準物質は、DSS-d6 が溶解度の関係から適切と考えられた。さらに、従前の実験から、定量シグナル

7, 8, 8' -H が適切と判断されたため、これらのシグナルを対象として、今後、バリデーション試験を行うことが決定された。なお、ロスマリン酸は吸湿性があることから、乾燥条件を規定した上で、ツムラおよび和光純薬 2 社が提供する試薬について測定を行うこととされた。

### D. まとめ

本研究では、qNMR が局方収載されて、生薬成分の含量規格に公的に利用されるまでに解決すべき現実的な問題を順次検討している。本年度は、サイコサポニン類及びショウトウコウアルカロイド類について、対象試薬の測定溶媒と内部標準物質、定量対象シグナルについて決定した。さらに、(-)-epigallocatechin 3-O-gallate 及び(E)-ケイヒ酸について、測定溶媒と内部標準物質を決定、バリデーション試験を実施し、定量対象シグナルを決定した。

なお、サイコサポニン類については、吸湿性の問題があり、実際に販売する際、どのタイミングでどのように値付けして、どのような注意書きを書き、開封後、どのような条件で量りとして HPLC の分析用標品として溶解させるか、引き続き検討が必要とされている。ただし、この問題は、局方の標準品でも、同じであり、開封後の問題は、別次元で議論すべきかもしれない。

### 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) Goda, Y.: Introduction of quantitative NMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds

- Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science, **44**: 753-767 (2013).
- 2) 合田幸広: 定量 NMR とレギュラトリーサイエンス分野への応用, 化学と教育, 61(6), 300-305 (2013).
  - 3) Hosoe, J., Sugimoto, N., Suematsu, T., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki, H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T. and Goda, Y.: Preliminary studies for application of quantitative NMR (qNMR) in the Japanese Pharmacopoeia (I). Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science, **45**(3): in press (2014).
  - 4) 第 16 改正日本薬局方第二追補参考情報「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」
  - 5) 第 16 改正日本薬局方第二追補生薬試験法「核磁気共鳴(NMR)法を利用した生薬及び漢方処方エキスの定量指標成分の定量」
- る添加物定量用試薬の規格試験法について. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013. 11. 7-8) (富山)
- 4) 杉本直樹, 田原麻衣子, 大槻 崇, 多田敦子, 伊藤裕才, 佐藤恭子, 五十嵐良明, 合田幸広, 穂山 浩: qNMR スペクトルライブラリの構築. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013. 11) (富山)

#### 学会等

- 1) 杉本直樹: 日本薬局方の第 17 改正に向けた最近の動き -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-. 日本薬局方セミナー, JASIS2013 (2013. 9. 6, 幕張メッセ) .
- 2) GODA, Yukihiro “Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines”, 61<sup>st</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Sep. 1-5 (2013) Münster, Germany.
- 3) 大槻 崇, 佐藤恭子, 杉本直樹, 多田敦子, 合田幸広, 河村葉子, 穂山 浩: qNMR によ

分担研究課題 生薬及び漢方処方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 薬品部長

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  
協力研究者 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。本研究では、日本薬局方にエキスとして収載されている漢方処方の一つである小青竜湯の同等性の評価について検討を行ってきた。これまでに、マオウ成分のエフェドリン及びプソイドエフェドリン、カンゾウ成分のグリチルリチン酸、シャクヤク成分のペオニフロリンの血漿中濃度推移をもとに、同等性の評価を行った。本研究では、引き続き、小青竜湯構成生薬のうち、ゴミシのゴミシン A 及びシザンドリン、カンゾウのリクイリチン及びリクイリチゲニン、サイシンのアサリニンについて血漿中濃度推移を比較し、製剤と湯剤の同等性について検討を行った。その結果、今回の試験ではリクイリチゲニン、アサリニンはばらつきが大きく、これらを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ものの、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチンは同等性を評価する指標成分となりうる可能性が示唆された。

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」<sup>1)</sup>、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」<sup>2)</sup>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。しかしながら、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、前回までにその指標成分で、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<sup>3)</sup>、カンゾウに含まれているグリチルリチン酸、シャクヤクに含まれているペオニフロリン<sup>4)</sup>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、小青竜湯構成生薬のうち、指標成分であるゴミシのゴミシン A 及びシザンドリン、カンゾウのリクイリチン及びリクイリチゲニン、サイシンのアサリニン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、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」<sup>5)</sup>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, 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、湯剤とした。本品中にゴミシン A は 1.24 mg, シザンドリンは 4.38 mg, リクイリチゲニンは 0.89 mg, アサリニンは 2.12 mg, リクイリチンは 303 mg を含有する。エキス製剤は湯剤と同じ構成生薬、配合割合により製したクラシエ小青竜湯エキス細粒 6.0 g を使用した。本品中にゴミシン A は 0.64 mg, シザンドリンは 2.21 mg, リクイリチゲニン 0.81 mg, アサリニンは 2.56 mg, リクイリチンは 248 mg を含有する。

### 試薬・試液

ゴミシン A, シザンドリン, リクイリチン, アサリニンは和光純薬工業株式会社製を、リクイリチゲニンはクロマデックス社製を、ヒト血漿はコージンバイオ社製を、メタノー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 5 mL 容を使用した。

### 分析方法

#### 検量線の作成

ゴミシン A, シザンドリン, リクイリチゲニン, リクイリチン及びアサリニン各 1 mg を精密に取り、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 ng/mL) したものを標準溶液とした。別にゴミシン A, シザンドリン及びリクイリチゲニン各 1 mg を精密に取り、50% メタノール溶液に溶解し、精確に 100 mL とし、これを 1000 倍希釈 (10 ng/mL) したものの 0.5 mL をブランク血漿 0.5 mL に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、試験溶液とした。また、リクイリチン及びアサリニン各 1 mg を精密に取り、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、これを 1000 倍希釈 (10 ng/mL) したものの 0.5 mL を同様にブランク血漿 0.5 mL に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、試験溶液とした。標準溶液及び試験溶液の各成分の測定値より回収率を求めた。

### 試料調製<sup>6)</sup>

ゴミシン A, シザンドリン及びリクイリチゲニンの試料溶液調製方法

血漿 0.5 mL にメタノール 5 mL を加え、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）し上澄み液を採取した。残渣にメタノール 5 mL を加え同様に操作した。上澄み液をあわせ減圧下で濃縮した後，0.1% ギ酸添加 50% アセトニトリル溶液 0.5 mL を加え，試料溶液とした。

リクイリチン及びアサリニンの試料溶液調製方法

血漿 0.5 mL に 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液 2.5 mL を加えボルテックスミキサーにて攪拌した後，0.1% ギ酸溶液を加え，精確に 5 mL とし，遠心分離（トミー精工製 LC 122 型遠心分離機，3000 rpm，10 min）後，上澄み液をフィルターろ過し，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  $\mu$ m 2.1 mm 100 mm (Waters 社製)

移動相：A 液 (0.1% ギ酸アセトニトリル溶液)，

B 液 (0.1% ギ酸溶液)

グラジエント条件

ゴミシン A 及びシザンドリン：%A = 40 (init.)，85 (15min.)

リクイリチゲニン及びリクイリチン：%A = 5 (init.)，70 (15min.)

アサリニン：%A = 50 (init.)，90 (15 min.)

流速：0.4 mL/min

カラム温度：40°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°C

脱溶媒ガス流量：1000 L/h

ゴミシン A

MRM ポジティブで Precursor ion を  $m/z$  417.09，Product ion を  $m/z$  368.28 とし，コーン電圧 8 V，コリジョン電圧 22 V で行った。

シザンドリン

MRM ポジティブで Precursor ion を  $m/z$  433.12，Product ion を  $m/z$  384.25 とし，コーン電圧 12 V，コリジョン電圧 20 V で行った。

リクイリチゲニン

MRM ポジティブで Precursor ion を  $m/z$  257.04，Product ion を  $m/z$  137.04 とし，コーン電圧 30 V，コリジョン電圧 22 V で行った。

アサリニン

MRM ポジティブで Precursor ion を  $m/z$  355.14，Product ion を  $m/z$  135.08 とし，コーン電圧 8 V，コリジョン電圧 22 V で行った。

リクイリチン

MRM ネガティブで Precursor ion を  $m/z$  417.03，Product ion を  $m/z$  135.02 とし，コーン電圧 30 V，コリジョン電圧 34 V で行った。

C. 研究結果<sup>7-11)</sup>

検量線の直線性と添加回収試験

ゴミシン A は 100 - 1000 ng/mL の範囲で，シザンドリンは 5 - 1000 ng/mL の範囲で，リクイリチゲニンは 5 - 10000 ng/mL の範囲で，アサリニンは 5 - 10000 ng/mL の範囲で，リクイリチンは 1 - 10000 ng / mL の範囲で相関係数がいずれも  $R^2 = 0.999$  と良好な直線性を示した。ゴミシン A，シザンドリン，リクイリチゲニン，アサリニン及びリクイリチンの回収率は，それぞれ 80%，98%，101%，109% 及び 91% であり，それぞれ良好な回収率が得られた。

## 各成分の血漿中濃度推移

湯剤及びエキス製剤投与後の各成分の血漿中濃度推移をそれぞれ図 1~5 に示した。投与した湯剤とエキス製剤のそれぞれの成分の含量が異なるため（湯剤を 100%としたときの製剤の割合はゴミシン A は 51.6%, シザンドリンは 50.5%, リクイリチゲニンは 91.0%, アサリニンは 121%, リクイリチンは 81.9%である。), それぞれの血漿中濃度は, 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。

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 ( $T_{max}$ ),  $C_{max}$ , AUC 及び平均滞留時間 (MRT) を表 1 に示した。ゴミシン A の  $C_{max}$  は湯剤で  $72.1 \pm 33.4$  ng/mL, エキス製剤で  $65.9 \pm 20.2$  ng/mL, AUC は湯剤で  $166 \pm 96.2$  ng·h/mL, エキス製剤で  $146 \pm 51.3$  ng·h/mL であった。また, MRT は湯剤で  $1.47 \pm 0.10$  h, エキス製剤で  $1.47 \pm 0.07$  h であった。シザンドリンの  $C_{max}$  は湯剤で  $93.3 \pm 42.9$  ng/mL, エキス製剤で  $96.8 \pm 31.8$  ng/mL, AUC は湯剤で  $172 \pm 73.6$  ng·h/mL, エキス製剤で  $182 \pm 63.4$  ng·h/mL であった。MRT は湯剤で  $1.42 \pm 0.08$  h, エキス製剤で  $1.38 \pm 0.02$  h であった。リクイリチゲニンの  $C_{max}$  は湯剤で  $3.19 \pm 2.60$  ng/mL, エキス製剤で  $2.02 \pm 2.02$  ng/mL, AUC は湯剤で  $11.6 \pm 4.69$  ng·h/mL, エキス製剤で  $8.66 \pm 6.86$  ng·h/mL であった。MRT は湯剤で  $1.83 \pm 0.35$  h, エキス製剤で  $1.78 \pm 0.23$  h であった。アサリニンの  $C_{max}$  は湯剤で  $2.98 \pm 1.31$  ng/mL, エキス製剤で  $1.73 \pm 0.46$  ng/mL, AUC は湯剤で  $8.60 \pm 2.52$  ng·h/mL, エキス製剤で  $6.88 \pm 1.25$  ng·h/mL であった。MRT は湯剤で  $1.81 \pm 0.54$  h, エキス製剤で  $1.72 \pm 0.25$  h であった。リクイリチンの  $C_{max}$  は湯剤で  $8.65 \pm 1.24$  ng/mL, エキス製剤で  $10.1 \pm 2.19$  ng/mL, AUC は

湯剤で  $28.8 \pm 4.14$  ng·h/mL, エキス製剤で  $32.7 \pm 6.97$  ng·h/mL であった。MRT は湯剤で  $1.57 \pm 0.17$  h, エキス製剤で  $1.72 \pm 0.21$  h であった。 $C_{max}$  及び AUC に関しては, リクイリチン及びアサリニン以外は被験者によるばらつきが大きい傾向が認められた。表 2~6 に各成分の  $C_{max}$  及び AUC の分散分析表を示した。

## D. 考察

小青竜湯のエキス製剤及び湯剤を投与後, 血漿中の各成分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, ゴミシン A 及びシザンドリンの  $C_{max}$  では被験者の項が有意であり, 個体差が認められた。また, アサリニンの AUC では時期の項が有意であった。一方, リクイリチゲニン及びリクイリチンは薬剤, 時期及び被験者のいずれの項においても有意差は見られなかった。 $C_{max}$  及び AUC に関して, 一部の成分で個体差は認められるものの, 薬剤間に有意差は検出さ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, ゴミシン A では  $C_{max}$  は 38%, AUC は 16%, シザンドリンでは  $C_{max}$  は 28%, AUC は 17%, リクイリチゲニンは  $C_{max}$ , AUC とともに 10% 以下, アサリニンでは  $C_{max}$  は 12%, AUC は 44%, リクイリチンでは  $C_{max}$  は 47%, AUC は 29% 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が得られる被験者数の推定をすることとした。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計算を行ったところ, 十分な検出力を得るためには, ゴミシン A では 1 群 18 人以上, シザンドリンは 1 群 15 人以上, リクイリチゲニンは 1 群 61 人以上, アサリニンは 1 群 29 人以上, リクイリチンは 1 群 9 人以上の被験者数が必要となることが判明した。

今回検討を行った 5 成分のうち, リクイリチゲニン及びアサリニンの血漿中濃度推移には個体間でのばらつきが認められた。リクイリチゲニンに関しては, 本間ら<sup>12)</sup>が, 柴朴湯投与後のフ

フェノール性化合物の血中濃度測定を行い、リクイリチゲニンの AUC 及び  $C_{max}$  に被験者間で 2 倍以上の違いが観察されたことを報告している。また、Zuo ら<sup>13)</sup> は、黄芩湯のフラボノイド配糖体が腸内細菌とのインキュベーションによりアグリコンへ代謝されるとして、リクイリチンからリクイリチゲニンへの腸内細菌による代謝の報告をしている。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、血漿中濃度推移に影響を及ぼすことが推測される。アサリニンに関しては、検出はされたものの血漿中濃度が低く、十分な検出感度が得られなかった。

今回の結果から、リクイリチンは、同等性の指標成分となる可能性が示唆された。また、ゴミシン A 及びシザンドリンに関しても、検討の余地があるものと考えられた。一方、リクイリチゲニン及びアサリニンに関しては、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。

これまで小青竜湯構成生薬 8 種類のうちマオウ、シャクヤク、カンゾウ、サイシン及びゴミシンの 5 種類の生薬の成分について検討を行ってきた。今後、その他の生薬についての可能性について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、ゴミシンのゴミシン A 及びシザンドリン、カンゾウのリクイリチン及びリクイリチゲニン、サイシンのアサリニンについて血漿中濃度推移の比較を行い、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、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチンは同等性を評価する指標成分となる可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 医療用漢方製剤の取り扱いについて、薬審第 804 号、昭和 55 年 6 月 25 日。
- 2) 医療用漢方エキス剤の取り扱いについて、薬審二第 120 号、昭和 60 年 5 月 31 日。

- 3) 日本薬学会第 132 年会要旨集化学系薬学, p. 195 (2012).
- 4) 第 30 回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 85 (2013).
- 5) 臨床研究に関する倫理方針, 医政発第 128001 号, 平成 16 年 12 月 28 日。
- 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) 平成 18 年 11 月 24 日薬食審査発第 1124004 号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。
- 8) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUJIN 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 -, *IYAKUJIN 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 -, *IYAKUJIN 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) Homma, M., Ishihara, K., Satake, A., Oka, K., Niitsuma, T., Hayashi, T.: Discovery of biologically active compounds from human administered Kampo-medicine. XX. Determination of blood concentration of phenolic compounds in healthy subjects after single dose of Saiboku-to. , *J Tradit Med*. **13**, 412 - 413 (1996).
- 13) Zuo, F., Zhou, Z - M., Yan, M - Z., Liu, M - L., Xiong, Y - L., Zhang, Q., Song, H - Y., Ye, W - H.: Metabolism of Constituents in Huangqin - Tang, a Prescription in Traditional Chinese Medicine, by Human Intestinal Flora., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 558 - 563 (2002).

## F. 健康危機情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H.,  
Goda, Y.: Studies on Bioequivalence of Kakkonto  
Decoction and Its Extract Preparation ( I ) .,  
*Shoyakugaku Zasshi*, **68**, 9 - 14 (2014).

2. 学会発表等

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 (第 2 報), 第 30 回和漢医薬学会学術  
大会 (金沢), 2013. 8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

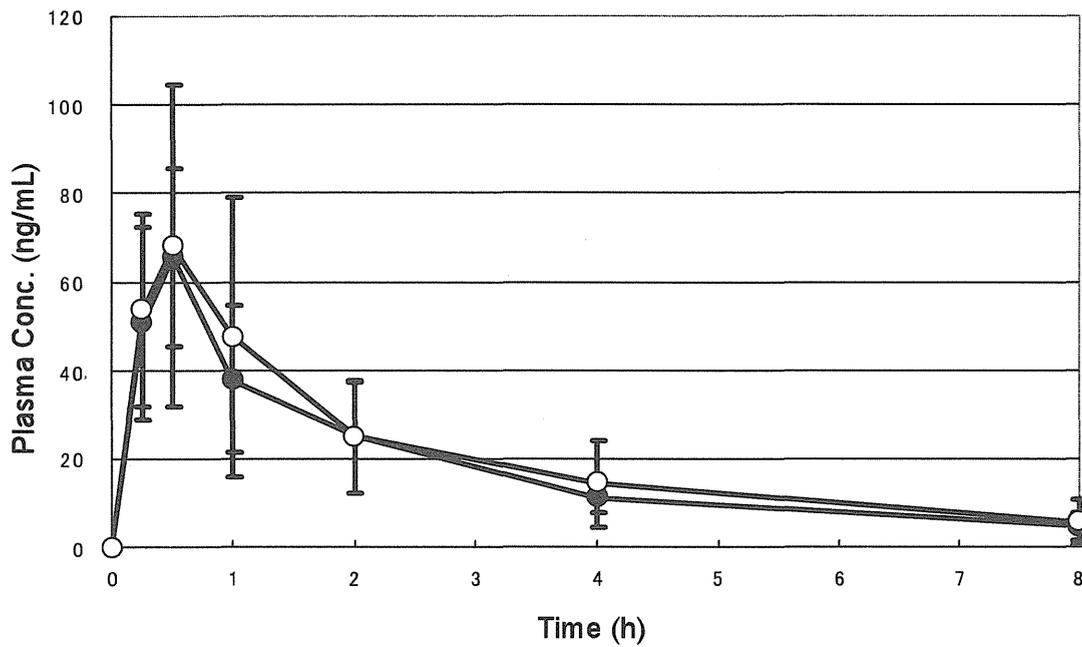


図 1 ゴミシン A の血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

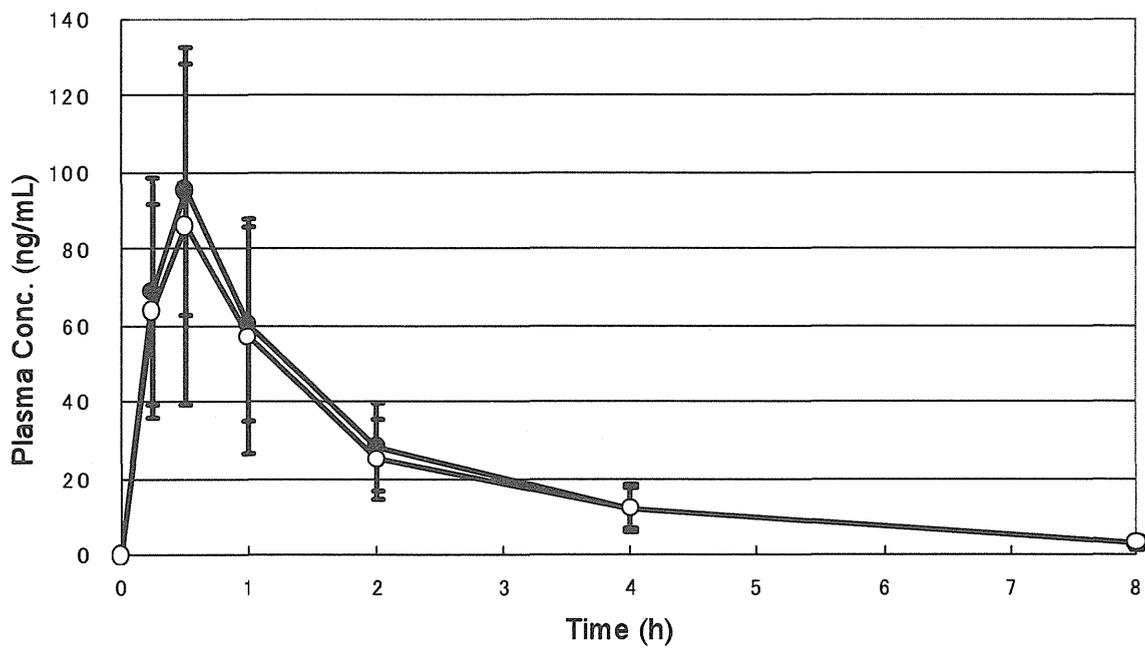


図 2 シザンドリンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

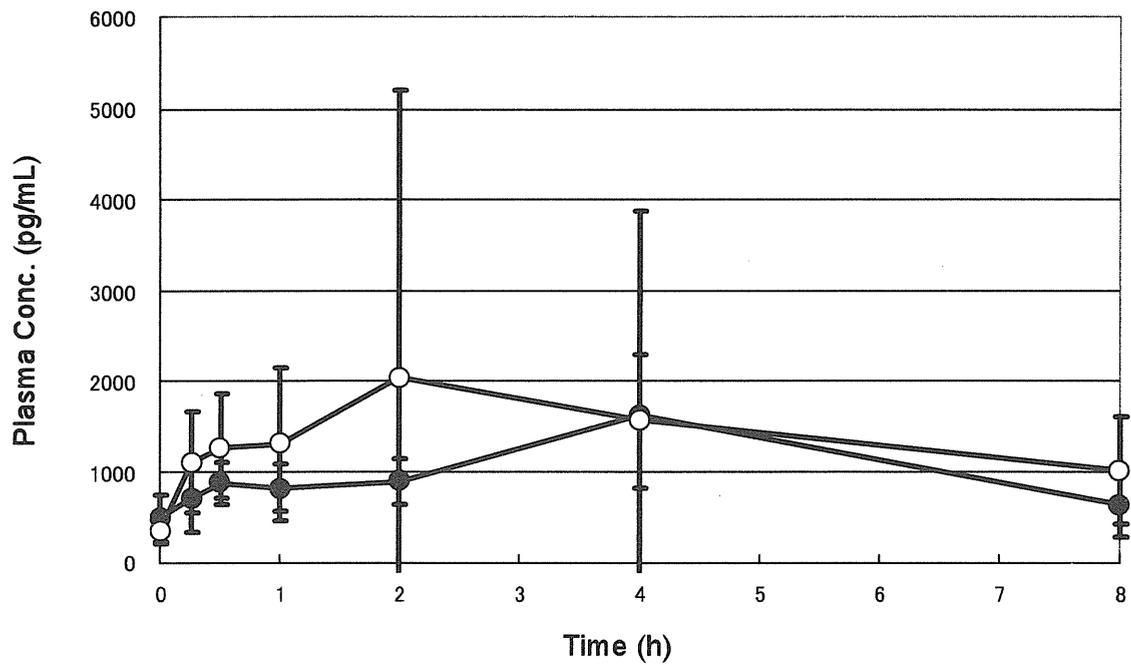


図 3 リクイリチゲニンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

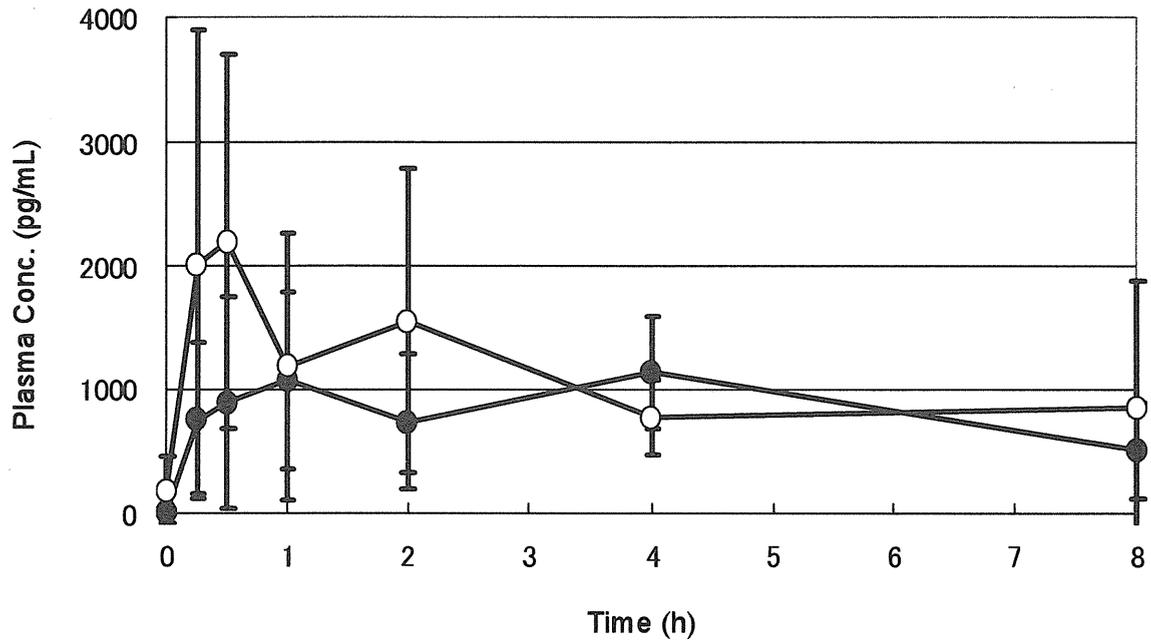


図 4 アサリニンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

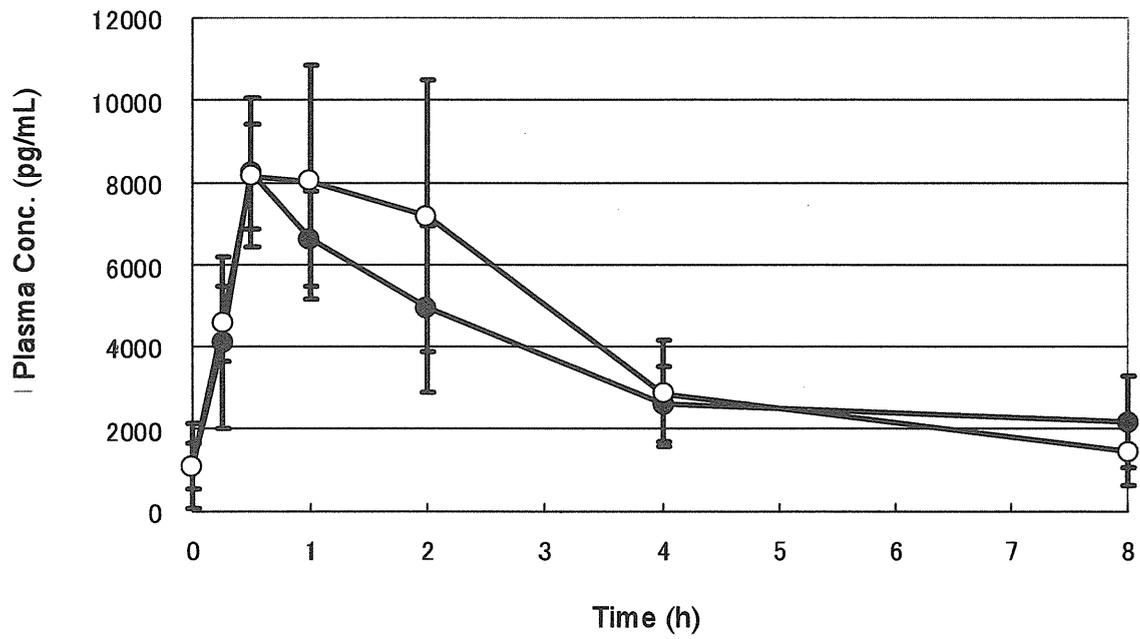


図 5 リクイリチンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)

表 1 湯剤, エキス製剤投与時の各成分の  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC と MRT

成分	剤形	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng / mL)	AUC (ng · h / mL)	MRT (h)
ゴモシン A	湯剤	0.42	72.1 ± 33.4	166 ± 96.2	1.47 ± 0.10
	製剤	0.42	65.9 ± 20.2	146 ± 51.3	1.47 ± 0.07
シザンドリン	湯剤	0.42	93.3 ± 42.9	172 ± 73.6	1.42 ± 0.08
	製剤	0.42	96.8 ± 31.8	182 ± 63.4	1.38 ± 0.02
リクイリチゲニン	湯剤	2.08	3.19 ± 2.60	11.6 ± 4.96	1.83 ± 0.35
	製剤	3.33	2.02 ± 2.02	8.66 ± 6.86	1.78 ± 0.23
アサリニン	湯剤	3.01	2.98 ± 1.31	8.60 ± 2.52	1.81 ± 0.54
	製剤	1.38	1.73 ± 0.46	6.88 ± 1.25	1.72 ± 0.25
リクイリチン	湯剤	0.79	8.65 ± 1.24	28.8 ± 4.14	1.57 ± 0.17
	製剤	1.08	10.1 ± 2.19	32.7 ± 6.97	1.72 ± 0.21

表 2 ゴモシン A 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	1228	1	1228	0.51	7.71
	時期	4829	1	4829	2.02	7.71
	被験者	44955	5	8991	3.75	6.26
	合計	60591	11	5508		
	残差	9579	4	2395		

	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	115	1	115	0.84	7.71
	時期	320	1	320	2.35	7.71
	被験者	6741	5	1348	9.91	6.26
	合計	7719	11	702		
	残差	544	4	136		