

- b) Establish a common pharmacovigilance database for safety and quality issues related to herbal medicines (e.g. ADR, products with history of adulteration or contamination); and
- c) Promote sharing of relevant data (e.g. access to English version of herbal pharmacopoeias of member states, reference standards for quality of starting materials and finished products).

25. Dr Samdan also proposed that an action plan be drawn up to help FHH take stock of its progress and assess how to move forward. The plan should include key details on activities, objectives, timelines, lead member states and expected outcomes. She added that WHO wished to continue contributing to FHH's work.

26. The Co-chairperson, Mr Yee expressed appreciation to WHO WPRO's support to FHH and attendance at relevant meetings. Dr Vu agreed with Dr Samdan that FHH should progress from information sharing to working on more concrete deliverables.

27. Mr Yee then gave a presentation on "Other Matters Arising", to facilitate discussion on administrative matters related to FHH. With the changes in representatives from various member states over the years, he asked for the current team to relook at the Basic Operational Document of FHH which was confirmed in 2002, and that any suggestions on changes to the Document could be discussed at the 12th FHH Standing Committee Meeting.

28. Future hosts of the 2015 – 2016 and 2017 – 2018 Standing Committee Meetings were tentatively decided as China and Japan respectively. Prof Ma would bring the suggestion back for discussion. The Secretariat was also tasked to check with Australia whether they could host the 2017 – 2018 term. Separately, the Meeting agreed to maintain the frequency of Standing Committee Meetings on an annual basis.

29. Mr Yee also raised the topic on absenteeism for discussion, citing Australia as an example of not being able to attend the 10th and 11th Standing Committee Meetings, but still gave comments on Sub-committee II's RMPM guideline. The Meeting agreed for the Secretariat to check with Australia on their commitment to FHH, including whether they were able to host the Standing Committee Meetings for the 2017-2018 term, as well as to encourage their attendance. Dr Goda also suggested for Singapore to announce the meeting dates for the 12th Standing Committee Meeting earlier to facilitate Australia's preparations.

(Post-meeting note as of 5 Mar 2014: The Secretariat had clarified with Australia regarding FHH matters, and their official reply was that they would decline all face-to-face meetings, in view that they operated on a 100% cost-recovery basis and their capacity to participate in overseas events was hence limited. In addition, their international engagement strategy would end in 2015 and priorities for 2017-2018 were not confirmed yet and therefore, Australia would not be able to host the Standing Committee Meetings in 2017-2018. However, Australia had indicated their interest to continue contributing to the work of FHH, e.g. via review of technical documents and guidelines, as well as to be informed on outcomes of FHH Meetings.)

30. Mr Yee also informed that the Secretariat would follow up on Dr Samdan's proposal on reviewing FHH's achievements by circulating a template for member states to fill up, including

details for a 3-year workplan. The Secretariat would then compile the returns and member states could present their 3-year workplan at the 12th Standing Committee Meeting for discussion and adoption.

31. On the use of the WHO logo, the Secretariat was tasked to check on the guidelines for its use. Dr Samdan also added that WPRO could discuss with Korea and the Secretariat further on the use of the logo on the new FHH website before its launch, and that the logo on the current website could remain.

32. The Chairpersons for the Sub-committees and focal points for each member states were confirmed as follows:

Sub-committee I	Chairperson: Dr Kawahara
Sub-committee II	Chairperson: Prof Park
Sub-committee III	Chairperson: Prof Ma
Canada	Focal Point: Dr Vu
China	Focal Point: Prof Ma
Hong Kong	Focal Point: Mr Robert Law
Japan	Focal Point: Dr Goda
Korea	Focal Point: Dr Kim
Singapore	Focal Point: Mr Pang
Vietnam	Focal Point: Mrs Nguyen

33. The Meeting also discussed about the tentative dates for the 12th Standing Committee Meeting and 5th International Symposium, and agreed to hold them at the end of Nov 2014. The Secretariat would follow up with the member states via email to ask for suggestions on topics for the Symposium, as well as for proposed agenda items for the next Standing Committee Meeting.

(Post-meeting note as of 5 Mar 2014: China, Japan, Korea and Vietnam have agreed to the proposed dates of 25-27 Nov 2014 for the 12th FHH Standing Committee Meeting and 5th International Symposium to be held in Singapore.)

XII. Any Other Business

34. Dr Samdan proposed for the Secretariat to consider inviting other ASEAN countries, in particular, Malaysia, Philippines and Brunei, as observers at FHH Standing Committee Meetings, for them to share on their experience with traditional medicines. This was in consideration that ASEAN has 7 countries in the Western Pacific region, and hence would benefit from being in the loop of FHH proceedings. She also suggested for the Secretariat to invite representatives from Malaysia, Philippines and Brunei as speakers for the Symposium.

35. In response to Dr Samdan's proposal, Dr Goda commented that it was beneficial for information exchange since ASEAN countries have their own form of traditional medicines, and that they could attend as self-funded observers. He also raised the issue that while it was acceptable for other countries to attend FHH meetings as observers, the Meeting should consider having criteria for converting observers to official members. Dr Goda shared that Japan had accepted the attendance of Malaysia for the 4th FHH Meeting as an observer in Japan previously, but they did not attend in the end. The Meeting agreed that the Secretariat could have the discretion to invite Malaysia, Philippines and Brunei as observers for the FHH Standing Committee Meetings and Symposium.

XIII. Closing Remarks

36. Asst Prof Raymond Chua, Group Director of the Health Products Regulation Group of the Health Sciences Authority of Singapore, delivered closing remarks to thank the members and observers for their commitment and contribution to make the meeting a success.

37. There being no other business, the meeting was adjourned at 1300 hours on 23 Oct 2013.

Finalized List of Co-chairpersons for Standing Committee Meeting Sessions

Session	Co-chairperson(s)
Session 1 – Presentation of Regional/Country Reports Related to Latest Developments in Herbal Medicines	Mr Yee Shen Kuan and Mrs Cao Thi Mai Phuong
Session 2 – Presentation of Regional/Country Reports Related to Latest Developments in Herbal Medicines	Prof Fumiyuki Kiuchi and Ms Polly Chan
Session 3 – Report of Sub-committee I: Nomenclature and Standardization	Dr Yukihiro Goda
Session 4 – Report of Sub-committee II: Quality Assurance and Information	Dr Seong Rackseon
Session 5 – Report of Sub-committee III: Adverse Drug Reactions	Prof Ma Shuangcheng
Session 6 – Discussion under Sub-committee II: Quality Assurance and Information	Mr Yee Shen Kuan
Session 7 – Discussion on Joint Action Plans on WHO Regional Strategy and the Way Forward for FHH	Mr Yee Shen Kuan

生薬の薄層クロマトグラフィー試験法に関する研究

研究分担者 木内 文之 慶應義塾大学薬学部・教授

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者の協力を得て、日本薬局方に薄層クロマトグラフィーによる確認試験が規定されていない生薬について、TLCによる確認試験法を検討し、適切な条件が設定できた生薬については、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に新たな生薬の確認試験法として提案することを目的として研究を実施した。今年度は、日本薬局方に既に記載されているTLCによる確認試験のうち、センソとトウガラシについてデータを収集した。また、アマチャ、キキョウ、サイシン、サンヤク、シュクシャ、タクシャ、チモ、ハッカ等14品目について新たなTLCによる確認試験を検討し、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカについてTLCによる確認試験法を設定するとともに、TLCクロマトグラムの写真を画像データの収集を行った。本研究の成果は、日本薬局方の信頼性の向上と日本で用いられる生薬の品質の確保に貢献することが期待される。

研究協力者

石崎昌洋 三和生薬株式会社
川崎武志 株式会社ウチダ和漢薬研究開発部
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
神本敏弘 株式会社ツムラ生産本部
菊地祐一 株式会社ツムラ生産本部
合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所薬品部
近藤誠三 小太郎漢方製薬株式会社研究所
佐藤陽子 和光純薬株式会社試薬事業部
杉本智潮 救心製薬株式会社山梨工場技術研究部
玉木智生 日本粉末薬品株式会社研究開発部
成川佑次 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生薬部
日向野太郎 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所
平川尚子 和光純薬株式会社品質保証部

山田裕子 和光純薬株式会社試薬開発本部

山本 豊 株式会社栃本天海堂品質管理部

A. 研究目的

本格的な高齢化社会を迎えつつある現在、国民の健康に対する漢方の役割に大きな期待が寄せられている。漢方薬の有効性・安全性を担保するためには、そこで用いられる原料薬物である生薬の品質の確保が必須であるが、生薬は天産品であるため、その品質の確保のための様々な努力が必要である。

日本薬局方では、生薬の含有成分に関する規定として、確認試験、定量法、精油含量等を定めている。これらのうち確認試験には、その生薬に特徴的な成分（群）或は類似生薬との判別に有効な成分（群）を検出する方法が主として採用されており、第16改正日本薬局方では指標成分をTLCで検出する方法が多く採用されている。TLCは、特別な装置を必要とせず、簡便に行える分析法であるが、厳密に条件を揃えないとR_f値の再現性

が確保できないため、分析に際してはサンプルと標準物質とを同時に展開するのが一般的である。

日本薬局方の生薬の確認試験に於いても、多くの生薬でこの方法が採用されている。しかし、生薬の確認試験の中には、指標となる成分の標準物質が利用できない等の理由で、サンプルのみを TLC で分析し、発色試薬等による発色の色調並びに R_f 値で指標成分を確認するものもあることから、成分の含量等の影響で、指標成分を見誤る可能性もある。これまで我々は日本薬局方に記載されている TLC を用いた生薬の確認試験について典型的な TLC クロマトグラムを集積し、その際に明らかとなった問題点について改良法を設定し、日本薬局方の確認試験の改正案として日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案してきた。昨年度までの研究で、日本薬局方に記載されている TLC を用いたほぼ総ての確認試験並びに純度試験についての検討が終了したことから、本研究では、TLC による確認試験が設定されていない生薬 (Table 1) について、新たな TLC による確認試験法を検討し、適切な条件が設定できた生薬については、新たな確認試験法として提案するとともに、その TLC クロマトグラムを画像として収集した。

B. 研究方法

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、TLC による確認試験が設定されていない生薬について、TLC による新たな確認試験を設定するために、設定品目の検討、指標成分の選定、試験法の構築をを行い、試験法が確立できた品目については、そのクロマトグラムを画像データとして収集した。実験には、Merck 社と和光純薬工業から市販されている TLC プレートを用い、日本薬局方の生薬各条の規定に従って確認試験を実施した。なお、TLC による確認試験を迅速化するために、TLC の展開距離については 7 cm とした。また、クロマトグラムの色の再現性を確保するために、発色を伴う TLC 画像については日本色研の新配色カード 129a の vivid (Lot No. 00706) から 9 色 (3:yR, 8:Y, 12:G, 16:gB, 19:pB, 24:RP, W, Gy5.5, Bk) を選んで順番に並べた色見本を作成

し、これを同一画面に入れて画像データを取り込んだ。

今年度検討した生薬のうち、確認試験法の改正案並びに新たな確認試験法が設定できた生薬の TLC クロマトグラムを Fig. 1~5 に示す。また、研究に参加した機関の各確認試験の指標スポットの R_f 値の平均値を Table 2 に示す。

C. 研究結果

1. 既記載試験法の TLC 画像データの集積

日局既記載の試験で検討を継続していた トウガラシの確認試験並びにセンソの確認試験における加熱時間とスポットの色の変化について画像データを集積した。

(1) トウガラシ (Fig. 1)

辛味成分であるカプサイシンを検出する現行の試験法は、12 cm 展開で R_f 値が大きく、スポット形状が悪いことから、試料量を減らし (2.0 g → 1.0 g)、展開溶媒をジエチルエーテル/メタノール混液 (19 : 1) からヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (10 : 9 : 1) に変更するとともに、展開距離を 7 cm として検討した。

一方、日局では定量法においてカプサイシンを指標としており、別の指標成分を確認試験で用いた方がよいと考えられることから、トウガラシの主要色素成分であるカプサンチンを指標成分とした確認試験法案についても検討した。食品添加物公定書トウガラシ色素の確認試験をもとに酢酸エチルで抽出し、エタノール (95) / シクロヘキサン混液 (1 : 1) およびヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (40 : 10 : 1) を展開溶媒として用いた条件で検討を行ったが、ロットによってカプサンチン脂肪酸エステルとそれ以外の成分の含量 (比) が異なるため、検出感度やスポット形状が悪くなるなど条件の設定が困難であった。また、カプサンチン脂肪酸エステルを加水分解し、カプサンチンとして確認出来るかどうかをヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (10 : 9 : 1) を展開溶媒として検討したところ、 R_f 値 0.35 付近にカプサンチンのスポットを認め、濃縮操作を加えることによって赤色が薄いトウガラシでも確認できたが、赤色の濃いトウガラシ由来カプサンチンのス

ポット形状が悪化した。

以上の検討結果から、現行法を改良した方法が適切と判断した。検出法についても4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液、希硫酸を噴霧後加熱および紫外線（主波長 365 nm）照射等を検討したが、現行の2,6-ジブロモ-N-クロロ-1,4-ベンゾキノノンモノイミン試液でカプサイシンを特異的に検出できることからこの試薬を用いることとした。但し、長時間アンモニアガス中に放置するとTLCが暗褐色になってしまい適切ではないことから発色操作を「アンモニア蒸気に接触させるとき」という表現とし、以下の改正案を生薬等（B）委員会に提案した（下線が改正点）。

確認試験案：本品の粉末（本品）1.0 gにエタノール(95) 5 mLを加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用(E)-カプサイシン 1 mgをエタノール(95) 1 mLに溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー〈2.03〉により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液(10:9:1)を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに2,6-ジブロモ-N-クロロ-1,4-ベンゾキノノンモノイミン試液を均等に噴霧し、アンモニア蒸気に接触させるとき、試料溶液から得たスポットは、標準溶液から得た青色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

（2）センソ

日局確認試験法に基づいて確認試験を行い、指標物質であるレジブフォゲニンのスポットの色調の経時変化を観察した。加熱初めは鮮やかな色調を示すが、次第にくすんできて焦げて色味が失われる。日局試験法では変化の落ち着いた5分後の色調を比較することになっているが、色の変化の途中である。色調の鮮やかさや分離はWako社製プレートの方が良好であった。

2. TLCによる新たな確認試験の検討

日局（16局第1追補）収載の生薬について、

TLCによる確認試験の設定状況をTable 1に示す。日局収載の生薬のうち、23品目（末を除く、以下同様）に確認試験が設定されていない他、確認試験が設定されている生薬のうち52品目では呈色反応等の比較的特異性の低い試験法が設定されている。なお、日局収載の漢方処方エキスにおいてTLCによる確認試験が設定されている生薬については、備考欄に指標成分を示した。生薬自体と処方エキスでは、確認試験の意味合いや対象とする成分の制約等がかなり異なっているが、TLCによる新たな確認試験を設定するにあたっては、処方エキスで用いられている方法を、まず参考にすることとした。また、各社で品質管理のために用いている試験法で適切なものがあれば提案してもらい、それをもとに検討することとした。以下に本年度の検討結果を述べる。

（1）サイシン（Fig. 2）

日局小青竜湯エキスの試験法を参考にし、ヘキサン/酢酸エチル混液（2:1）で展開する確認試験法案について各社で検討を行った。スポットの検出の際、加熱時間2分ではスポットが確認出来ないことが報告されたため、加熱時間を5分に変更することとした。標準物質としてアサリニンが設定されているが価格が高い（和光純薬 10 mg/4万円）ことが問題となり、和光純薬で純度の低いものを低価格で販売できるかどうか検討することになった。また、アサリニンを標準品として使用せず、スポットパターンや発色で確認することが可能かどうかについても協議したが、標準品を用いないと判断しにくいと判断した。改正案を生薬等(B)委員会へ提案した。

確認試験案：本品の粉末 1 g にジエチルエーテル 10 mL を加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用アサリニン 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー〈2.03〉により試験を行う。試料溶液 10 μ L 及び標準溶液 5 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/酢酸エチル混液（2:1）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を

均等に噴霧し、105℃で2分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち1個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び R_f 値が等しい。

(2) サンヤク (Fig. 3)

アラントインをメタノール/水混液で抽出し、4-ジメチルアミノシンナムアルデヒド試液で検出する試験法が提案され、これに基づいた検討を行った。抽出溶媒に水が入っていることから、展開する前に十分乾燥させないとスポットの形状が悪くなる。試料 1.0 g をメタノール/水混液 (4 : 1) 4 mL で抽出し、標準溶液は薄層クロマトグラフィー用アラントイン 1 mg をメタノール/水混液 (4 : 1) 2 mL に溶解し、各々2 mL をスポットし、酢酸エチル/メタノール/水混液 (7 : 3 : 1) で展開後、4-ジメチルアミノシンナムアルデヒド・塩酸・エタノール試液で検出することで良好な結果が得られた。なお、Wako 社製プレートでは全体が赤くなりスポットの検出が困難である。

試験法の文中にスポットを十分乾燥させる旨を記載することとし、以下の試験法案を改正案を生薬等(B)委員会へ提案した。

確認試験案：本品の粉末(本品) 1g にメタノール/水混液 (4 : 1) 4 mL を加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用アラントイン 1 mg をメタノール/水混液 (4 : 1) 2 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー〈2.03〉により試験を行う。試料溶液 5 μ L 及び標準溶液 2 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/メタノール/水混液 (7 : 3 : 1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-ジメチルアミノシンナムアルデヒド・塩酸・エタノール試液を均等に噴霧し、105℃で2分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち1個のスポットは、標準溶液から得た淡赤色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

(3) チモ (Fig. 4)

サルササポゲニンを指標成分として検出する方法が提案され、サポニンの加水分解の方法やサンプルのスポット量について検討を行った結果、試料 1 g に 1 mol/L 塩酸試液 10 mL を加えて還流冷却器をつけ水浴上で 30 分間加熱する方法で加水分解することとした。標準物質としてサルササポゲニンを用い、試料溶液及び標準溶液を 5 mL スポットして、酢酸エチル/水/ギ酸 (10 : 3 : 2) で展開する。なお、チモの特徴的な成分であるマンギフェリンを指標とした確認試験法案についても提案があったが、将来的に定量法の指標物質として用いられる可能性があることから、確認試験ではサルササポゲニンを用いることとなった。以下の改正案を生薬等(B)委員会へ提案した。

確認試験案：本品の粉末 1g に 1 mol/L 塩酸試液 10 mL を加え、還流冷却器を付けて水浴上で 30 分間加熱する。冷後、遠心分離し、上澄液を取り除く。残留物にジエチルエーテル 10 mL を加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用サルササポゲニン 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー〈2.03〉により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン混液 (7 : 3) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を均等に噴霧し、105℃で2分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち1個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び R_f 値が等しい。

(4) ハッカ (Fig. 5)

日局加味逍遙散エキスの確認試験では、日局ハッカを標品とした TLC による確認試験が設定されているが、指標成分としては揮発性のないジヒドロナフタレン化合物が用いられている。しかし、生薬ハッカの代表的成分はメントールであることから、粉末をジエチルエーテルで抽出し、ヘキサン/アセトン (7 : 3) を展開溶媒としてメントールを確認する方法を検討した。検出試薬である4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧後、

5 分間加熱すると背景が赤色を帯びるが、放冷すると退色する。また、メントールのスポットの 2 つ下に認められるスポットはオレオノール酸とウルソール酸の混合物である。似たような TLC パターンを示すペパーミントとは灰分によって区別可能である。試験法としてはメントールの標品を使用せずに「 R_f 値 0.5 付近 (0.6 付近から訂正) に青色のスポットを認める」とすることとし、改正案を生薬等 (B) 委員会へ提案した。

確認試験案：本品の粉末 1 g に ジエチルエーテル 10 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。試料溶液につき、薄層クラマトグラフィー

〈2.03〉により試験を行う。試料溶液 2 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン混液 (7:3) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱するとき、 R_f 値 0.5 付近に青色のスポットを認める。

(5) アマチャ

アマチャには代表的な甘味成分であるフィロズルチンとこれと構造が類似したヒドラングノールが含まれている。これらは紫外線 (主波長 254 nm および 365 nm) で検出可能であり、UV 254 nm で検出することとした。TLC でこの 2 つの成分が分離する展開溶媒を検討した結果、ジエチルエーテル/ヘキサン/ギ酸混液 (5:5:1) が比較的良好な分離を示した。抽出溶媒についてはメタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテルのいずれも指標成分の検出が可能であった。検討した試料の中にはヒドラングノールのスポットが薄いものがあり、指標成分をフィロズルチンのみにしてはどうかとの意見が出され、2 つのスポットを分離せずに 1 つのスポットとして検出する方法も検討したが、確認試験の特異性を考えて 2 つのスポットを検出することとした。ヒドラングノールが薄い試料について、抽出溶媒およびスポット量を再度検討することとした。

(6) キキョウ

アシル基を加水分解で除いたサポニンを 1,3-ナフタレンジオールによって検出する方法が提案され、これに基づいて検討を行った。当初展開溶媒として 1-プロパノール/酢酸エチル/水/酢酸 (40:40:30:1) を用いて 10 cm 展開する案が提案されたが、溶媒を酢酸エチル/1-プロパノール/水/酢酸 (7:5:4:1) に変更することにより、展開距離 7 cm で試験が可能であった。加水分解に用いる塩基を炭酸水素ナトリウムから塩基性の高い炭酸ナトリウムに変更するとともに、1,3-ナフタレンジオールによる検出ではプラチコジン D と同じ位置に夾雑成分が認められるため希硫酸噴霧後、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱する方法に変更することとした。プラチコジン D の標品は高価となることが予測されることから標品を用いないこととし、試験の特異性を考えてプラチコジン D とその下のスポットの 2 つを検出対象とすることとした。下のスポットが何であるかは不明であることから、その同定を慶應大で行うこととした。試料調製は、粉末 2 g に炭酸ナトリウム試液 20 mL を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 5 mL を加えて 10 分間振り混ぜることとし、追試を行うこととした。なお、確認試験には採用しないが、追試の際には標品としてプラチコジン D を同時にスポットし、画像データとすることとした。

(7) シュクシャ

粉末をヘキサンで抽出し、ヘキサン/ジエチルエーテル/メタノール (15:5:1) を展開溶媒として酢酸ボルニルを検出する確認試験法案について検討を行った。生薬の産地によってスポットパターンが異なり、同じ基原種であっても栽培地によって成分パターンが変わる可能性がある。酢酸ボルニル直下の青色スポットは不明、その下の青色スポットがカンファー、その下の緑色スポットがボルネオール、その下の青色スポットがリナロールである。スポットの色調は加熱後の時間によって変化し、酢酸ボルニルのスポットは放冷すると鮮やかな緑色となる。酢酸ボルニルはシグマ-アルドリッチより市販されており、ボルネオールは安価で各社から市販されている。ベトナム産

などボルネオールスポットが薄いものもあるが、確認試験の特異性を考慮し、 R_f 値 0.6 付近(酢酸ボルニル) および 0.3 付近(ボルネオール) の 2 つのスポットを指標とすることとした。TLC のパターンが複数あり、酢酸ボルニルのスポットは安定して認められることから酢酸ボルニルを標品として使用し、酢酸ボルニルと同様の色調のスポットとしてボルネオールのスポットを表現することとした。酢酸ボルニルが液体であるので容量で調製できるように確認試験の文章を考慮することとした。また、標品である酢酸ボルニルの規格は和光純薬で設定することとした。

(8) サンソウニン (純度試験)

メタノール抽出物について、酢酸エチル/水/ギ酸混液 (5 : 1 : 1) で TLC を行い、希硫酸を噴霧後 105°C で 5 分間加熱してから紫外線 (365 nm) でミャンマー産の類似生薬 (インドナツメ) にのみ見られるスポット (R_f 値 0.3 付近) を検出する純度試験法が提案され、これに基づいて検討した。Merck のプレートでは 10% 程度の混入で検出できるが、Wako 社製プレートではスポット自体が不明瞭である。中国産のサンソウニンであっても指標となるスポットの位置にバックグラウンドがあり、ミャンマー産との判別が難しい。また、サンソウニンに認められてミャンマー産の類似生薬では認められないスポット (R_f 値 0.15 付近) が検出されるものがある。ミャンマー産は外観が異なる (色が明るい) が、最近中国産でも類似した外観のものがある。現在、国立衛研にて成分の分析が行われており、その結果を見て再検討することとした。

(9) タクシャ

現在、五苓散エキス中のタクシャ成分の定量が検討されているが、HPLC では困難なことから TLC で定量的要素を含んだ確認試験法を検討中である。TLC の条件は、八味地黄丸エキスの確認試験を参考にして検討した。高含量成分であるアリソール B モノアセテートをアルカリ加水分解することによりアリソール B へ変換し、総アリソール B 含量を測定する試験法案を検討した。アリソール B モノアセテートのスポットは消失したが、ア

リソール A のスポットも大きくなり、アリソール B が加水分解あるいは中和の過程でアリソール A に変化した可能性がある。アリソール A は不安定 (どのように変化するかは不明) であることから、更なる検討が必要である。タクシャは産地によって川沢と建沢に分けられるが、川沢はアリソール類の含量が多いのに対し、建沢では少なく、アリソール B が薄いスポットとしてしか確認できない。アリソール類とそのアセテートでは発色の色調が異なる。五苓散エキスではアリソール A を指標成分としているが、建沢ではほとんど認められない。確認試験法についてはアリソール A に収束させて確認する方法や主トリテルペノイド 3 種のうち、2 種を確認する方法、川沢と建沢で規格を分けてつくるなどの意見があった。中国薬典 (CP) では川沢、建沢分けておらず、アリソール B モノアセテートを指標成分としている。川沢は比較的パターンが一定しているが、建沢には色々なパターンがあり、市場品を集めて検討する必要がある。医薬基盤研で集めたタクシャ 28 検体 (10 g 程度)、並びに栃本、小太郎で今回分析した建沢と考えられる試料をツムラへ送付して、一斉に検討することとした。建沢は栽培地が変化しており、栽培品種の特定等も必要かも知れない。

(10) チョウトウコウ

日局釣藤散エキスの確認試験をもとに検討を行った。チョウトウコウについては定量法でリンコフィリンとヒルスチンを HPLC で定量しており、同じ物質で TLC の確認試験を行っても意味がないのではないかと意見があった。過去に基原植物を網羅した形で確認試験を検討したことがあり、成分の含量が低く TLC での確認試験は無理であると判断をした経緯があることが報告された。

(11) バクモンドウ

日局麦門冬湯エキスの確認試験法をもとに検討を行った。Wako 社プレートでは指標物質としているイヌリン様物質が検出出来なかった。もっといい展開溶媒をあれば検討する。バクモンドウには多くの成分パターンがある。純度試験で *Liriope* 属由来のものと区別出来るように検討すべきとの意見があった。香港生薬標準では

ophiopogonin B の検出をしているが、含量が少ないため難しいと考えられる。中国薬典 (CP) なども参考にして引き続き検討することとした。

(12) ハマボウフウ

栽培品と市場品に明確な差はなく、含有成分として報告のある psoralen, xanthotoxin, bergapten, imperatorin, isoimperatorin, bergamottin を分離する条件としてはヘキサノール/酢酸エチル混液 (1 : 1) が最適であった。多くの試料で UV (主波長 366 nm) 照射下において isoimperatorin, bergamottin と考えられるスポットが認められたが一部の試料で検出の困難なものもある。光過敏症の原因となりうるフラノクマリンを標準品とすることが適切か、また原点に強い蛍光が認められることからクマリン配糖体が多く含まれているのではないかと意見があり、クマリン以外の成分の検討も含めて今後検討が必要である。

(13) モクツウ

日局ニンジンの確認試験法を参考にした方法で検討を行った。産地や部位によってサポニン含量、組成が違うことから TLC による確認試験は難しい。モクツウに関しては純度試験を検討した方が良いとの意見があった。

(14) モッコウ

加味帰脾湯エキスの局方収載に向けて、日本漢方生薬製剤協会・技術委員会・試験法部会が作成した確認試験法案を検討した。デヒドロコスツスラク톤を指標成分とし、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液で検出する試験法案について検討した。加熱時間、放冷時間によって2つあるスポット色調が変化する。上のスポット (デヒドロコスツスラク톤) は加熱直後、青色を呈し、放置により紫色に変化するのに対し、下のスポットは加熱直後に紫色を呈し、次第に青色を呈する。噴霧試薬を 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液にすると安定した発色が得られる。また、希硫酸噴霧後、加熱すると赤色と灰色のスポットに呈色する。標品を同時に展開しない場合にはスポットの色調を記載する必要があることから色

調が変化するの望ましくない。希硫酸および 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液で安定した色調が得られるかを確かめるために追試することとなった。なお、抽出溶媒は揮発性が高いジエチルエーテル (試料調製法 1) ではなく取り扱いやすいメタノール (試料調製法 2) とすることとした。

3. FHH の場での情報収集

Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH) の第 11 回 Standing Committee Meeting が、2013 年 10 月 22-23 日に、シンガポールで開催された。この会議には、中国、香港、日本、韓国、シンガポール、カナダ、ベトナム並びに WHO の代表が参加し、西太平洋地域内での生薬に関する国際調和をテーマに討議が行われた。セッションの概略を Table 3 に示す。会議では、各国/地域での生薬に関連する規制等の最新情報が発表され、質疑討論が行われた。この会議は、日本と共通した多くの生薬を使用している中国、韓国、香港などの状況を把握し、これらの国々と協調して生薬を有効に利用して行く上で、非常に重要なものである。

D. 考察

薄層クロマトグラフィーは、特別な装置を必要とせず、簡便に行えることから、日本薬局方の生薬の確認試験として多用されている。本研究では、昨年度に引き続き生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社で行われた TLC による生薬の確認試験のクロマトグラムを基にして、現行の確認試験法の問題点を整理し、これを解決するための試験法の検討を行った。

今年度、日局に TLC による確認試験が設定されていない 14 の生薬について、TLC による確認試験法の検討を行い、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカについて新たに TLC による確認試験を設定した。細辛については、小青竜湯エキスの試験法を参考にして試験法を設定したが、他の生薬については新たに検討したものである。これらの生薬は、これまで確認試験が設定されていないか呈色反応のような特異性が低い方法が設定されていたものであり、今回設定した TLC による確認試

験は、日局生薬の品質の担保に貢献することが期待される。特にハッカについては、加味逍遙散エキスの確認試験で日局ハッカが標品として使用されることから、その確認試験に TLC が用いられるようになることの意義は大きいと思われる。今年度検討した生薬の中には、TLC による確認試験の設定が困難と思われるものもあるが、適切な条件がほぼ見出せているものもあることから、新たな品目も含めて TLC による確認試験を設定する努力を継続することが重要である。

E. 結論

日本薬局方に記載されている生薬のうち、TLC による確認試験が設定されていないものについて、あらたな TLC による確認試験を設定するために、生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、試験法の設定のための検討を行った。今年度検討した 14 品目の生薬のうち、適切な試験法が設定できたサイシン、サンヤク、チモ、ハッカについては、試験法案を作成して、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案した。また、昨年度から検討を続けていたトウガラシの確認試験についても改正案を提案した。これらの試験法案は、日本薬局方の信頼性の向上と日本で用いられる生薬の品質の確保に貢献することが期待される。

(参考文献)

1. 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, pp. 41-42.
2. 木内文之, 成川佑次, 合田幸広, 石崎昌洋, 糸博之, 川崎武志, 川原信夫, 神本敏弘, 菊地祐一, 近藤誠三, 杉本智潮, 日向野太郎, 山本豊, 日本薬局方収載の TLC による生薬の確認試験(1) 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液を展開溶媒とする確認試験について, 生薬学雑誌, 65 (1), 25-32 (2011).

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 TLCによる確認試験が設定されていない生薬（日局 16 第 1 追補）

確認試験なし

	生薬	備考
1	カゴソウ	
2	ガジュツ	
3	カノコソウ	
4	カロコン	
5	ケンゴシ	
6	コウブシ	
7	サイシン	処方:アサリニン
8	サンキライ	
9	シュクシャ	
10	ショウズク	
11	ショウマ	処方:フェルラ酸・イソフェルラ酸
12	センキュウ	処方:::(Z)-リグスチリド
13	ソウジュツ	処方:TLC Rf 0.4 の UV スポット
14	タイソウ	
15	タクシャ	処方:アリソール A
16	トウキ	処方:::(Z)-リグスチリド
17	ニガキ	
18	バクモンドウ	処方:生薬バクモンドウ
19	ハチミツ	
20	ハマボウフウ	
21	ハンゲ	
22	ヤクチ	
23	ロジン	

	生薬	備考
14	ゲンノショウコ	
15	ゴオウ	
16	ゴシツ	処方:理化学試験用ゴシツ
17	ゴシュユ	
18	コメデンブ	
19	コロロボ	
20	コンズランゴ	
21	サフラン	
22	サンヤク	
23	シャゼンシ	処方:理化学試験用シャゼンシ
24	ジュウヤク	
25	セッコウ	
26	セネガ	
27	センコツ	
28	ソウハクヒ	
29	ソボク	
30	チモ	
31	チョウジ	
32	チョウトウコウ	処方:リンコフィリン・ヒルスチン
33	チョレイ	
34	チンピ	処方:ヘスペリジン
35	トコン	
36	トチュウ	
37	トラガント	
38	ハッカ	処方:生薬ハッカ
39	ビヤクシ	
40	ビヤクジュツ	処方:アトラクチレノイド III
41	ブクリヨウ	
42	ボウイ	
43	ボウコン	
44	ホミカ	
45	ボレイ	
46	モクツウ	
47	モッコウ	
48	ヨクイニン	
49	リュウガンニク	
50	リュウコツ	
51	レンギョウ	
52	レンニク	

呈色等の確認試験あり

	生薬	備考
1	アセンヤク	
2	アマチャ	
3	アンソッコウ	
4	イレイセン	
5	エイジツ	
6	オウセイ	
7	オンジ	
8	カッセキ	
9	カンテン	
10	キキョウ	
11	キジツ	
12	クジン	
13	ケツメイシ	

Table 2 展開溶媒と Rf 値

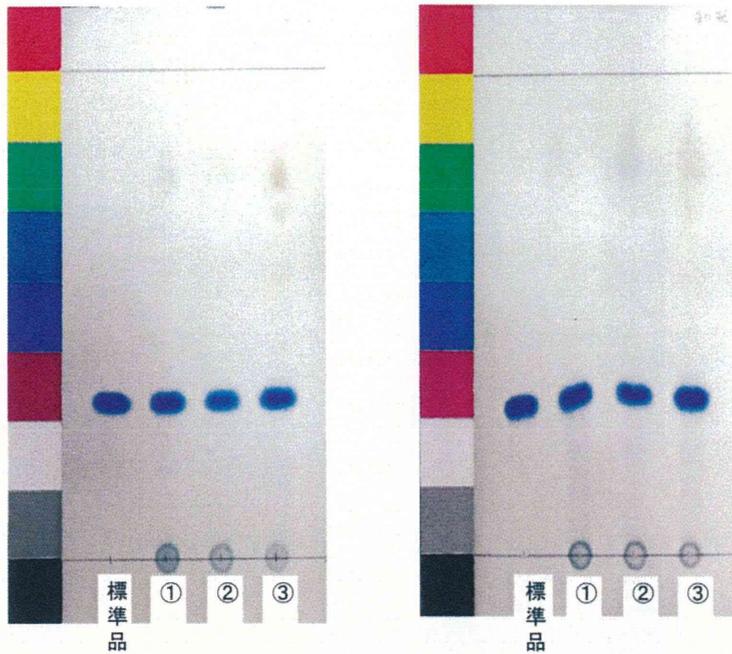
生薬名	溶媒系	実測値平均		指標成分
		M7	W7	Rf 値
トウガラシ	ヘキサン/酢酸エチル/ギ酸(10:9:1)	0.36	0.36	(E)-カプサイシン
サイシン	ヘキサン/酢酸エチル(2:1)	0.40	0.37	アサリニン
サンヤク	酢酸エチル/メタノール/水(7:3:1)	0.48	不明瞭	アラントイン
チモ	ヘキサン/アセトン(7:3)	0.45	0.48	サルササポゲニン
ハッカ	ヘキサン/アセトン(7:3)	0.51	0.51	トメントール

Table 3 11th FHH Standing Committee Meeting

Presentation of country/region report related to the latest development on herbal medicines	
WHO	WHO Strategies on Traditional Medicine
Canada	Health Canada's Vigilance Activities of Natural Health Products
China	Introduction of Traditional Chinese Medicine Supervision
Hong Kong	Development of Regulatory Regime for Chinese Medicines in Hong Kong - the Latest Update
Japan	Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for Specification of Marker Compounds Used for Standardization of Herbal Medicines
Korea	Recent Progress on Regulations of Herbal Medicines in Korea
Singapore	Overview of Complementary Health Products Regulation in Singapore
Vietnam	Development of Monographs of Materia Medica in VP From 2010-2013
Vietnam	Quality of Herbal Materials in Vietnamese Market
ASEAN	ASEAN Traditional Medicines & Health Supplements Product Working Group
Report of Sub-committee I: Nomenclature and standardization	
Japan	Comparative Studies on Japanese Pharmacopoeia and Hong Kong Chinese Materia Medica Standards
Japan	Standardization of Traditional East Asian Medicine in ISO/TC249
Report of Sub-committee II: Quality assurance and information	
Korea	Report of Sub-Committee II - Draft Guideline on International RMPM Establishment and Feedback
Korea	Collaborative Study Plan for International RMPM and Discussion
Report of Sub-committee III: Adverse drug reaction	
China	ADR Monitoring and TCM Administration in China (2012-2013)
Japan	A Preliminary Assessment of Reported Adverse Drug Reaction Associated with Ethical Kampo Medicines in Japan
China	ADR Monitoring and Administration in China
Vietnam	Pharmacovigilance Practice of Traditional Medicine Drugs: Challenges and Perspectives for VietNam
Discussion on Joint Action Plans on WHO Regional Strategy and the Way Forward for FHH	
WHO	Discussion on Joint Action Plans on WHO Regional Strategies on Traditional Medicine

カプサイシンの検出

ヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液 (10:9:1)



Merck製(7cm展開)

Rf値:0.33

展開時間:10分

検出:2,6-ジブromo-N-クロロ-1,4-ベンゾキノモノイミン試液/アンモニア蒸気

Wako製(7cm展開)

Rf値:0.33

展開時間:7分

標準品:(E)-カプサイシン

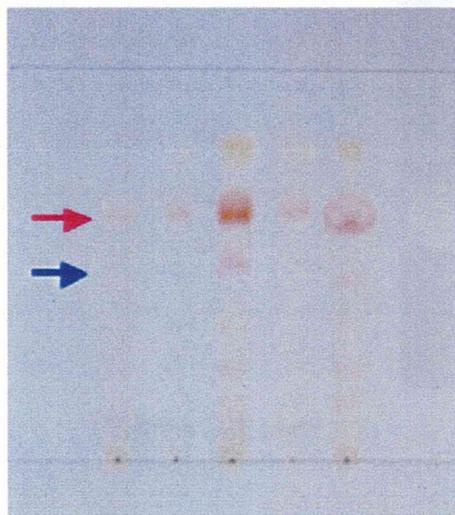
① 中国(2010年10月入手)

② 中国(2010年9月入手)

③ 中国(2012年8月入手)

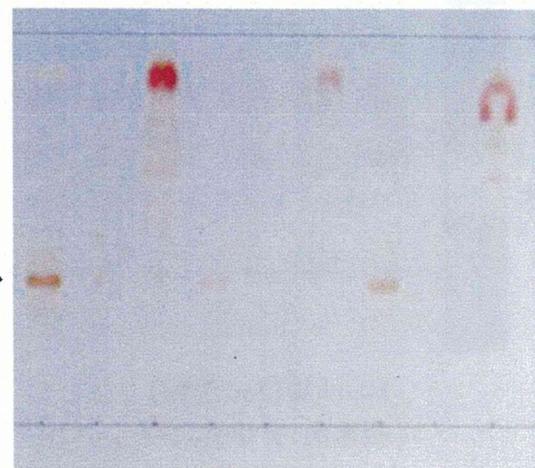
トウガラシ色素の検出

ヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液(40:10:1)



酢酸エチル抽出物

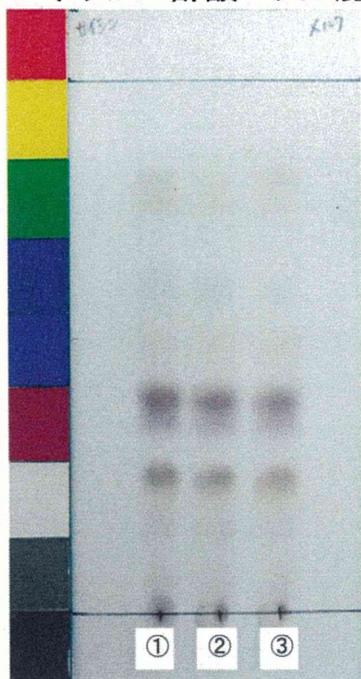
ヘキサン/酢酸エチル/ギ酸混液(10:9:1)



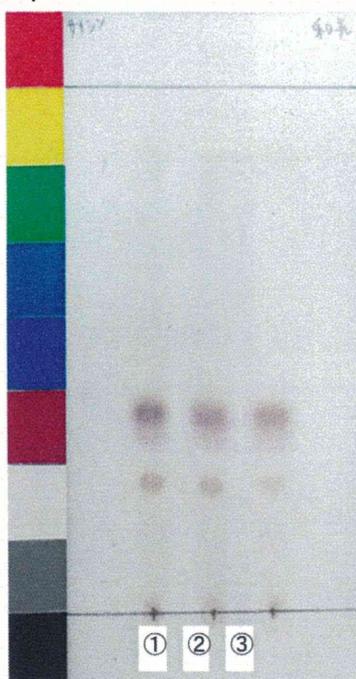
加水分解物と酢酸エチル抽出物との比較

Fig. 1 トウガラシの確認試験

ヘキサン/酢酸エチル混液(2:1)

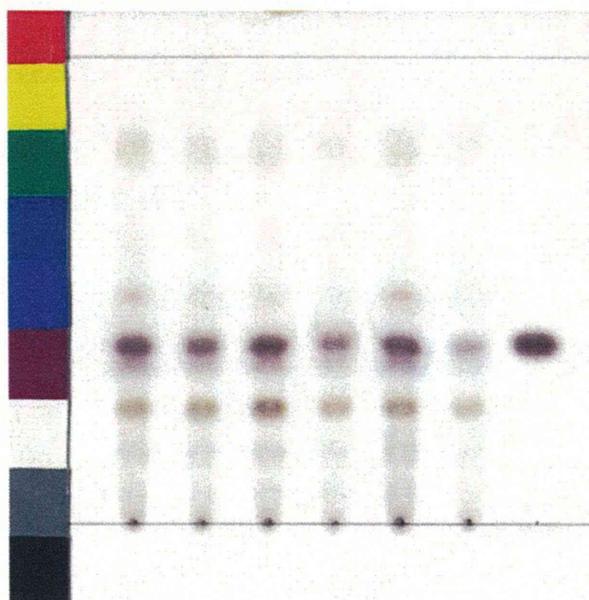


Merck製(7cm展開)
Rf値:0.40
展開時間:8分

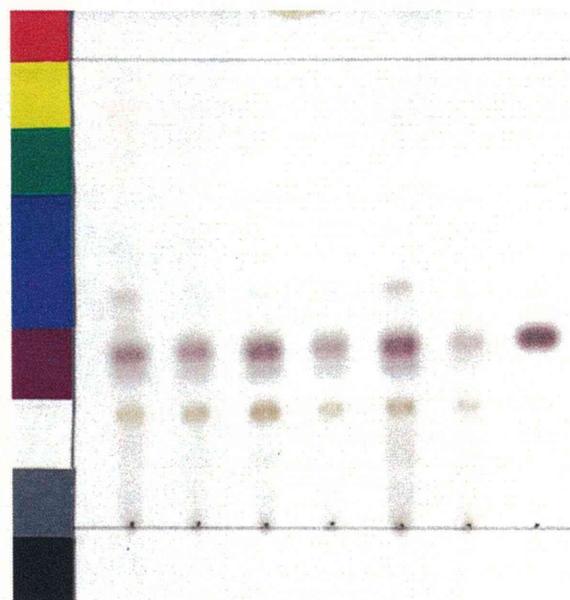


Wako製(7cm展開)
Rf値:0.38
展開時間:6分

- ① 中国(2013年4月入手)
- ② 中国(2012年5月入手)
- ③ 中国(2010年5月入手)



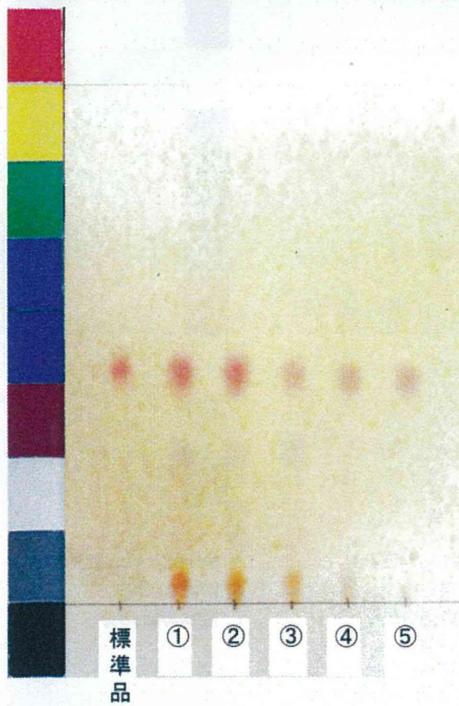
Merck製(7cm展開)
標準品:アサリニン



Wako製(7cm展開)

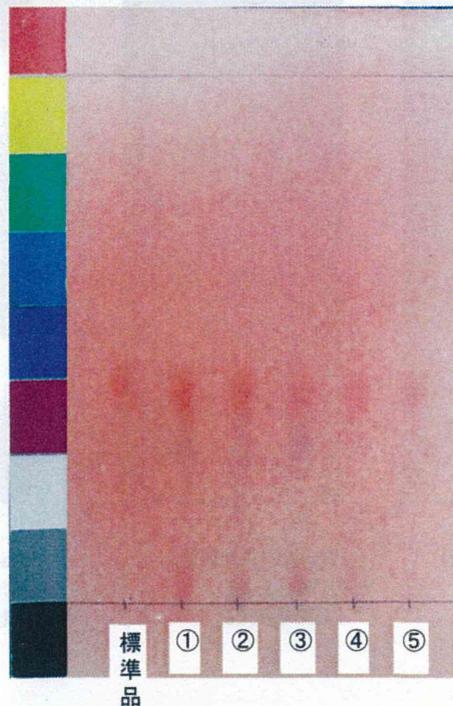
Fig. 2 サイシンの確認試験

酢酸エチル/メタノール/水混液(7:3:1)



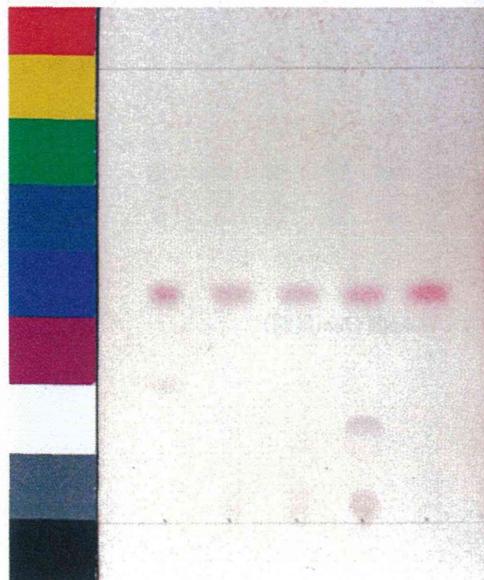
Merck製(7cm展開)
Rf値:0.44
展開時間:14分

標準品:アラントイン
① 中国(2013年4月入手)
② 中国(2012年3月入手)



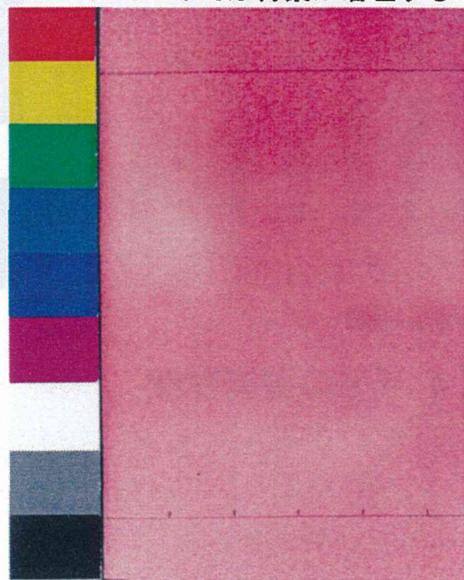
Wako製(7cm展開)
Rf値:不明瞭
展開時間:10分

③ 日本(2010年1月入手)
④ 中国(2008年10月入手)
⑤ 中国(1998年4月入手)



Merck製(7cm展開)

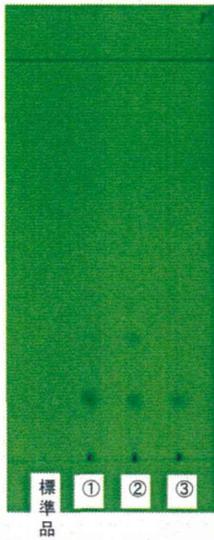
Wakoのプレートでは背景が着色する



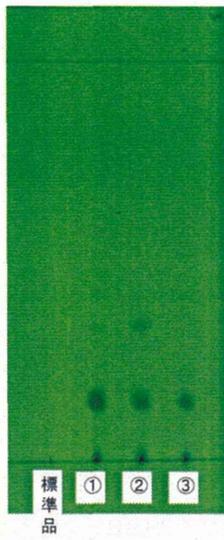
Wako製(7cm展開)

Fig. 3 サンヤクの確認試験

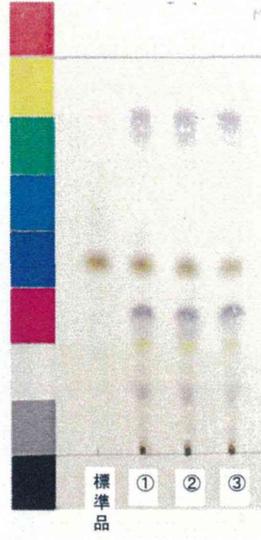
ヘキサン/アセトン(7:3)



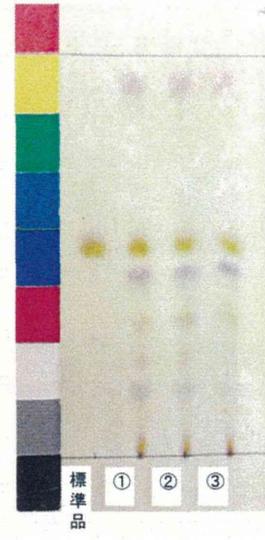
Merck製(7cm展開)
Rf値:0.47
展開時間:8分



Wako製(7cm展開)
Rf値:0.52
展開時間:6分



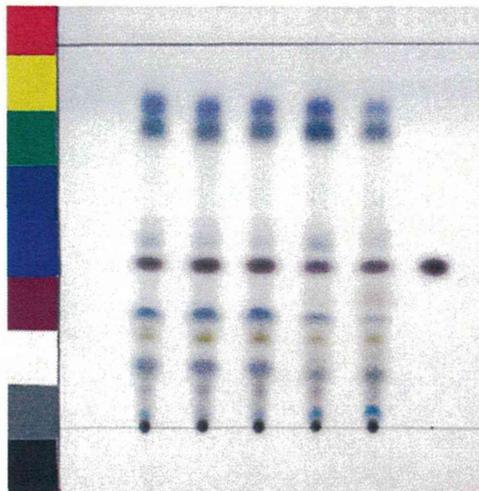
Merck製(7cm展開)
Rf値:0.47
展開時間:8分



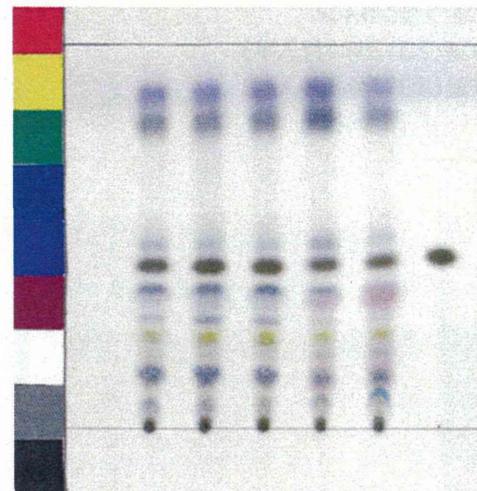
Wako製(7cm展開)
Rf値:0.52
展開時間:6分

標準品:サルササボゲニン
① 中国(2013年2月入手)

② 中国(2012年10月入手)
③ 中国(2011年8月入手)



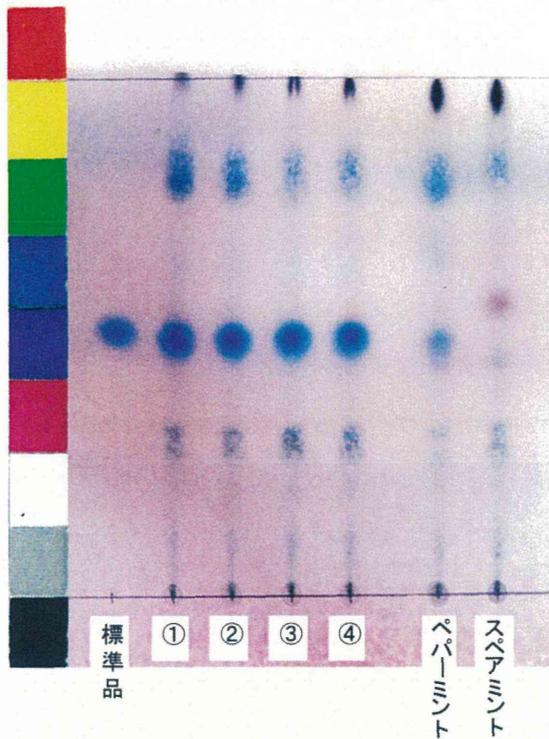
Merck製(7cm展開)



Wako製(7cm展開)

Fig. 4 チモの確認試験

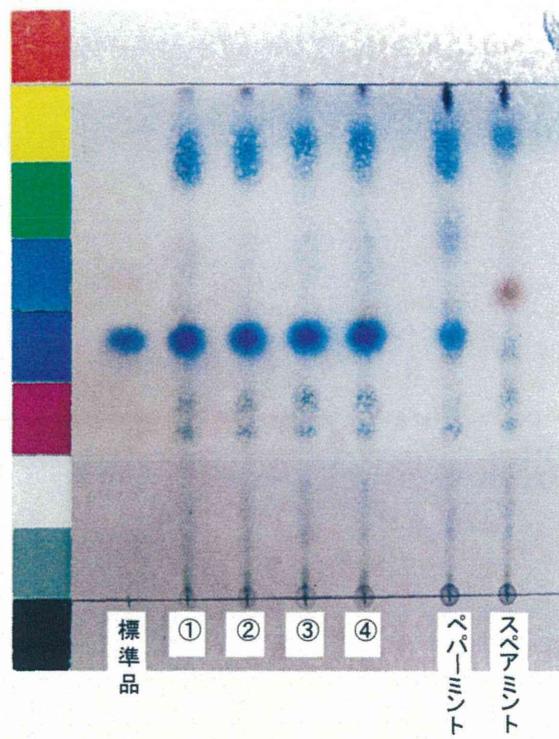
ヘキサン/アセトン(7:3)



Merck製(7cm展開)
Rf値:0.50
展開時間:9分

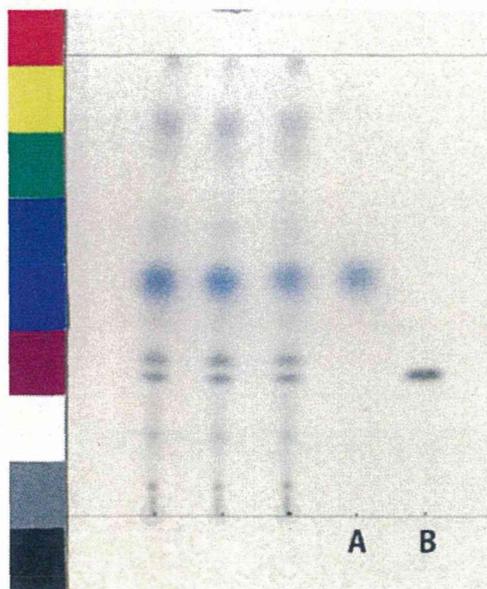
標準品:トメントール

- ① 中国・安徽(2008年11月入手)
- ② 中国・江蘇(2009年6月入手)

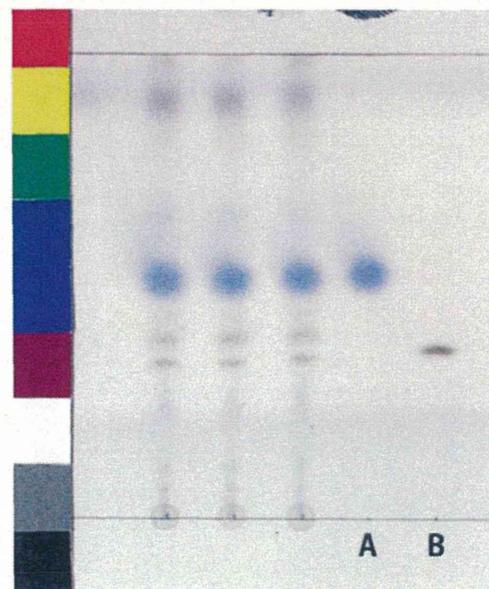


Wako製(7cm展開)
Rf値:0.51
展開時間:6分

- ③ 中国・上海(2010年9月入手)
- ④ 中国・上海(2011年3月入手)



Merck製(7cm展開)
A:メントール; B:ウルソール酸



Wako製(7cm展開)

Fig. 5 ハッカの確認試験

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Horii, C.他	Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I)	Shoyakugaku Zasshi	68	accepted	2014
Hosoe, J. 他	Preliminary studies for application of quantitative NMR (qNMR) in the Japanese Pharmacopoeia (I)	Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science	45	243-250	2014
Horii, C.他	Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I)	Shoyakugaku Zasshi	68	9-12	2014
Hoshino, T. 他	Two new sulfated oleanan saponins from Achyranthes root	J. Nat. Med.	67	386-389	2013

総説

Goda, Y.	Characteristic features and challenges of crude drug and Kampo products as multicomponent mixtures.	The Journal of Practical Pharmacy	64	2777-2781	2013
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
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
川原 信夫	FHHIにおける東アジア地域の生薬・薬用植物の国際調和の現状	特産種苗	16	103-108	2013
川原 信夫	生薬規格の国際標準化と国際調和の動向 (ISO/TC249 とFHH)	漢方と最新治療	22	15-20	2013
袴塚 高志	一般用漢方製剤承認基準の制定及び改正について	日本薬剤師会雑誌	65(4)	371-375	2013

その他、単行本等

発表者氏名	タイトル名	書名	ページ	出版年
Goda, Y.他	Chapter 11 Herbal Medicines	<i>Biochemical Sensors: Mimicking Olfactory and Gustatory Senses</i> , Pan Stanford Publishing (ISBN 978-981-4267-07-6)	205-230	2013
	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16改正日本薬局方第二追補参考情報(第一追補の改訂版)		2014
	磁気共鳴(NMR)法を利用した生薬及び漢方処方エキス等の定量指標成分の定量	第16改正日本薬局方第二追補5.01 生薬試験法10		2014