

活性本体であることを明らかにした。そこで陳皮の他、同じ柑橘類生薬である枳実、青皮について同化合物含量を測定したところ、陳皮>青皮>枳実の順であり、陳皮は青皮より3~6倍も糖含量が高いことが確認された。また、これらの生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性は、sucrose 含量に対応した。

次に、乙字湯が7種の腸内細菌 (*Clostridium* 属2種, *Lactobacillus* 属2種, *Bifidobacterium* 属3種) の増殖に与える影響を調べた結果、乙字湯は、*Clostridium* 属、特に *C. difficile* (抗生物質投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属及び *Bifidobacterium* 属の一部に対しては増殖促進活性を示すことを示した。また、*Clostridium* 属の中でも *C. difficile* に対して特に強い増殖抑制活性がみられたことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。また、*C. difficile* に対する増殖抑制活性を担う構成生薬は、大黄、黄芩、甘草であり、これらは大黄を中心として協調して活性を示すことを明らかにした。

また別に、漢方処方が腸内環境へ与える影響について検討するため、小腸上皮細胞様培養細胞におけるサイトカインの発現に着目した *in vitro* アッセイ系の構築を試みた。その結果、ヒト小腸上皮細胞株 Caco-2 における炎症性サイトカインの発現を惹起する刺激として TNF- α 処理について検討し、Interleukin-6 及び 8 の発現が誘導されることを見出した。また、漢方処方スクリーニングの予備実験として、Caco-2 細胞における漢方処方凍結乾燥エキスの細胞毒性について検討した。さらに、抗炎症

性サイトカイン Interleukin-10 の誘導活性を持つ六君子湯の活性生薬として半夏を見出し、半夏に含有される活性成分は、特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは糖以外的高分子化合物 (タンパク質等) であることを明らかにした。さらに、活性本体の特定のため、効率的に目的の活性成分を得る抽出法の検討を行い、従前の抽出法より簡潔に得られる可能性を見出した。

D-7 新一般用漢方処方の手引きに関する研究

従前より継続していた研究成果を元に、平成24年8月30日、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「一般用漢方製剤承認基準の改正について」(薬食審査発第0830第1号)が発出された。本研究では、通知発出のために、最終的な処方名称、処方構成、効能効果等の検討を行い、一部の処方について名称の変更、効能効果の言い換え等を行った。さらに、「一般用漢方製剤承認基準の改正について」の解説について検討し、平成25年9月に「新一般用漢方処方の手引き」を上梓した。社会構造及び疾病構造が変化した現代において、一般用漢方製剤の承認基準が30数年ぶりに見直されたことは、国民のセルフメディケーションの選択肢を広げ、適切な健康管理に貢献するものと期待する。

D-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

生薬製剤承認審査基準原案策定の第一段階として、単味生薬について「局方医薬品承認申請の手引き」(局方手引き)の効能効果を分かり易く読み替えるとともに、エビデンスのある効能効果を一部追加した改訂案を作成した。さらに局方手引きでは、収載生薬について主に煎剤あるいは末での服用が規定されているため、局方手引き収載生薬をエキス製剤として承認申請する際のガイドラインである「単味生薬と

生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)を作成した。また、各生薬エキスの確認試験法と指標成分の定量法については具体例(案)も提示し、これらに基づき「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」を策定し、パブリックコメントを経て、通知発出へ向けた記載整備を行った。

D-9 生薬の品質確保に関する研究

重金属含量が高い可能性のある9処方(柴朴湯、半夏厚朴湯、牛車腎気丸、柴苓湯、十全大補湯、小柴胡湯、無コウイ大健中湯、麦門冬湯、苓桂朮甘湯)エキスの計131検体、8処方(桂枝茯苓丸、柴胡桂枝湯、芍薬甘草湯、真武湯、大黃甘草湯、釣藤散、補中益気湯、六君子湯)エキスの170検体を集め、4大金属含量を調査した。その結果、半夏厚朴湯1検体においてヒ素値が2.20ppmと局方の基準値(3ppm)を満たしていたものの香港生薬標準での基準値2.0ppmを超え、それ以外は、いずれも香港の基準値を下回っていた。また、試験対象とした元素が比較的高値で検出された検体は、これまで、4大金属含量が高い可能性のある生薬(ハンゲ、ショウキョウ、ジオウ、サンヤク、ケイヒ、サイコ等)を、処方構成に持ち、その原因は原料とした生薬に由来するものと考えられた。そこでさらに、これらの処方のうち、鉛含量が1.5ppmをこえていた半夏厚朴湯(11検体)、小柴胡湯(3検体)及び苓桂朮甘湯(1検体)について、その構成生薬9種(コウボク、ソヨウ、ショウキョウ、ハンゲ、サイコ、オウゴン、ニンジン、ケイヒ及びビャクジュツ)62検体を対象に、同様のヒ素、重金属分析を実施した。その結果、鉛が検出された要因は原料とした一部の生薬(コウボク、ソヨウ、サイコ、ビャクジュツ)に由来するものと考えられた。

分光測色計を用いた生薬滑石の識別に関する検討も行った。これまでの結果より、中国で流通する滑石には、6タイプあることを明らかとしている。今回の検討から、粉末色の測定では、6タイプすべてのタイプ間での識別は困難であるが、JPカッセキとCP滑石では、 L^* 、 a^* 、 b^* すべての値で有意な差が認められ($p < 0.01$)、特にJPカッセキはCP滑石に比べて、 L^* 値は小さく、 b^* 値は大きい傾向にあり、両者は、分光測色計による識別が可能であることが明らかとなった。

D-10 TLC試験法に関する研究

これまでに、日本薬局方収載生薬で確認試験・純度試験にTLCが設定されているものについては、全ての試験法について広く実施データを集積し、問題点がある試験法について、改良法を局方原案として提案している。その結果、検討した26品目の生薬のTLCによる試験のうち、アラビアゴム、コウイ、ゴマ、ゴミシ、サンシシ、ゼンコ、センブリ、ソヨウ、ダイオウ、ニクズク、ニンドウ、ブシ、ボタンピについて展開距離を7cmとするとともに、何らかの問題点が明らかになったものに関して試験法の改正案を作成した。また、ソウジュツ並びにビャクジュツの新たなTLCによる確認試験法案を作成するとともに、サンシュユについても試験法の改正案を作成した。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た。その結果、アマチャ、サイシン、サンヤク、シュクシャ、チモ、ハッカ、シャゼンシ、モッコウ、レンギョウについてTLCによる新規試験法を作成、TLC画像データの収集を行った。更に、これらの試験法案を日本薬局方原案審議委員会生薬等委

員会に提案した。

D-11 生薬の国際調和に関する研究

FHHに関連した研究では、JP16(局外生規 2012 も含む)と CP2010 との生薬の比較を実施し、日本の公的規格収載生薬のおよそ 2/3 の 137 の生薬で、CP と同じ基原と部位の動植物を、その生薬の基原種として認めていることを示した(この場合、多くの生薬で、基原として複数の種を認めているため、日本と中国において一部の基原種が同じであった場合は同一の基原と見なしている)。さらに、香港中薬材標準(Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, HKCMMS)について、JP(局外生規も含む)との収載生薬品目及び TLC 確認試験法、定量法について比較表の作成を行った。また、ベトナム(2012)、シンガポール(2013, 2014)で行われた FHH の Standing Committee に出席して、日本の生薬の公的規格の現状と Sub-Committee I の活動等について報告した。さらに Sub-Committee II の活動として、韓国より提案された International Reference of Medicinal Plant Material(国際 RMPM)の構築に向けた FHH における共同研究案が提示され、日本も協力中である。また 5th FHH 国際シンポジウムに出席し我が国のショウマ類を含む製品の現状について発表を行った。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表等

1) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N. and Goda, Y.: Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing

system. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **19**, 32-37 (2012).

- 2) Chung, M. H., Tokishakuyakusan as a treatment for women's diseases, *J. Trad. Med.* **29**, 89-92 (2012).
- 3) Goda, Y., QNMR and its application to reagents in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharm Tech Japan*, **28**, 2795-2799 (2012).
- 4) Tahara, M., Suematsu, T., Hayakawa, M., Goda, Y., Sugita-Konishi, Y. and Sugimoto, N.: Application of quantitative NMR to determine absolute purities of trichothecenes. *Mycotoxins*, **62**, 111-119 (2012).
- 5) Anjiki, N., Fushimi, H., Hosoe, J., Fushimi, N., Komatsu, K., Cai, S.-Q., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y., Use of a taste-sensing system to discriminate Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide) in The Japanese Pharmacopoeia and Huashi (Talc) in Pharmacopoeia of The People's Republic of China *J. Trad. Med.*, **30**, 34-40 (2013).
- 6) 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**, 300-305 (2013).
- 7) 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).
- 8) 川原信夫: FHH 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).
- 9) Hoshino, T., Narukawa, Y., Haishima, Y., Goda, Y. and Kiuchi, F.: Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med.*, **67**, 386-389 (2013).

- 10) Goda, Y. : Characteristic features and challenges of crude drug and Kampo products as multicomponent mixtures. The Journal of Practical Pharmacy, **64**, 2777-2781 (2013).
- 11) 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).
- 12) 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**, 243-250 (2014).
- 13) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H. and Goda, Y. : Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I). Shoyakugaku Zasshi, **68**, 9-12 (2014).
- 14) Kammoto, T., Yomura, K., Kikuchi, Y., Hirakura, K., Makino, B., Hashimoto, K., Nishimura, H., Usui, K., Hakamatsuka, T., Goda, Y., Kawahara, N. and Kiuchi, F. : Discrimination between Prepared Glycyrrhiza and Glycyrrhiza by TLC. Shoyakugaku Zasshi, **68**, 70-77 (2014).
- 15) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H. and Goda, Y. : Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I). Shoyakugaku Zasshi, **68**, 65-69 (2014).
- 16) Goda, Y., Kiuchi, F. : Current situation and challenge of "Crude Drugs" in the Japanese Pharmacopoeia". Regulatory Science of Medicinal Products, **4**, 155-160 (2014).
- 17) Hanaoka, N., Ishizuka, Y., Hayashi, K., Tu, P., Kammoto, T., Hakamatsuka, T. and Goda, Y. : Comparison of the constituents of the original plants of crude drugs Cistanchis Herba and Boschniakia Herba. Shoyakugaku Zasshi, **60**: 1-9 (2015).
- 18) Oshima, N., Zaima, K., Kamakura, H., Hamato, A., Yamamoto, Y., Kang, D. H., Yokokura, T., Goda, Y., Hakamatsuka, T. and Maruyama, T. : Identification of marker compounds for Japanese Pharmacopoeia non-conforming jujube seeds from Myanmar. J. Nat. Med., **69**: 58-75 (2015).

2. 学会発表等

- 1) 袴塚 高志, 医療用漢方製剤の特徴, 局方及び一般用漢方製剤承認基準について, 漢方沖繩シンポジウム, 沖繩 (2012. 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 (2012. 6).
- 3) 袴塚高志, 一般用漢方製剤承認基準の制定及び改正を振り返って, 日本漢方生薬製剤協会生薬製剤委員会平成24年度講演会, 東京 (2012. 8).
- 4) 鄭美和, 当帰芍薬散とエストロゲンの共通点と相違点, 日本東洋医学会関東甲信

- 越支部 栃木県部会第19 回学術集会, 宇都宮 (2012. 8).
- 5) 堀井周文, 小此木明*, 大窪俊樹, 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, 東京 (2012. 9).
- 6) 袴塚高志, ISO/TC249 における東洋伝統医学の国際標準化と生薬・漢方製剤分野への影響について, 日本生薬学会第59 回年会, 木更津 (2012. 9).
- 7) 伏見直子, 伏見裕利, 安食菜穂子, 池崎秀和, 御影雅幸, 川原信夫, 合田幸広, 生薬「滑石」の基原について(2): 分光測色計による識別, 日本生薬学会第59 回年会, 木更津 (2012. 9).
- 8) 合田幸広, 生薬・漢方製剤分野で使用する生薬の英語表記について, 日本生薬学会第59回年会ワークショップ:生薬・漢方製剤の国際化, 木更津 (2012. 9) .
- 9) GODA, Yukihiro “qNMR, a new method for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines”, FIP 2012, INTERNATIONAL WORLD OF PHARMACOPOEIAS. NOW AND IN FUTURE, Workshop: Challenges in developing Herbal medicines monographs and applying them in practice, Amsterdam (2012. 10).
- 10) 合田幸広, 最近の生薬の話題, 大阪生薬協会技術部会特別研修会, 大阪 (2012. 10) .
- 11) 合田幸広, 局方及び局外生規に関する最近の話題, 生薬学会関西支部平成24年度秋期講演会, 大阪 (2012. 11) .
- 12) Goda, Y., Pharamacopoeial Topics in Japan from 2011 to 2012, The 10th Standing Committee Meeting of the Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines, Hanoi (2012. 11).
- 13) 鎌倉浩之, 合田幸広, 漢方製剤における放射性物質の移行についての検討, 第49 回全国衛生化学技術協議会年会, 高松 (2012. 11) .
- 14) Goda, Y., Current Status of Herbal Medicines in Japan and Their Quality Assurance, JICA 東南アジア行政官GMP研修, 東京 (2012. 11).
- 15) 合田幸広, 生薬資源の確保に向けて, シンポジウム:「生薬等医薬資源の科学の構築」に向けて ファンクショナルゲノミクスと化学から医薬資源の確保・国産化と医療の展開まで, 東京 (2013. 2) .
- 16) 合田幸広, 日本の漢方薬における伝統的知識の利用の現状, 名古屋議定書に係る国内措置のあり方検討会第6回, 東京 (2013. 2).
- 17) 渥美さやか, 高橋 豊, 渕野裕之, 寺坂和祥, 水上 元, 橋井則貴, 川崎ナナ, 袴塚高志, 川原信夫, 合田幸広, 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: 大黄中のアントラキノン配糖体について, 日本薬学会第133年会, 横浜 (2013. 3) .
- 18) 桑田幸恵, 勢ノ康代, 若菜大悟, 袴塚高志, 合田幸広, 新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討(14) 腸内細菌 *Lactobacillus reuteri*の増殖を促進させ

- る漢方処方エキスの成分について，日本薬学会第133年会，横浜（2013. 3）.
- 19) 坂上祐香，湯浅宗光，袴塚高志，合田幸広，新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討(13) 六君子湯エキスによる抗炎症性サイトカインの発現増強，日本薬学会第133年会，横浜（2013. 3）.
- 20) 袴塚高志，生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会（FHH）における国際調和について，日本薬学会第133年会シンポジウム伝統医薬の国際化について考える，横浜，（2013. 3）.
- 21) 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).
- 22) 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）.
- 23) 堀井周文，小此木明，大窪俊樹，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）.
- 24) 袴塚高志，ISO/TC249 における生薬製剤分野の動向，第30回和漢医薬学会学術大会，金沢（2013. 9）.
- 25) 川原信夫，伝統医学の国際標準化：薬物分野を中心にWHO/FHHの話題．第30回和漢医薬学会学術大会，金沢（2013. 9）.
- 26) 袴塚高志，ISO/TC249 における生薬及び関連製剤の国際標準化の動向，日本生薬学会第60 回年会，日本生薬学会第60回年会，当別（2013. 9）.
- 27) 桑田幸恵，勢ノ康代，袴塚高志，合田幸広，新規漢方処方の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）.
- 28) 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）.
- 29) 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）.
- 30) 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） .
- 31) Goda, Y., “Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines” , 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Munster, German (2013. 9).
- 32) 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).

- 33) 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).
- 34) 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).
- 35) 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).
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 坂上祐香, 湯浅宗光, 合田幸広, 袴塚高志, 新規漢方処方の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).
- 40) 合田幸広, 生薬・生薬製剤に関する 12 年 3 ヶ月, 日本漢方製剤協会講演会, 東京 (2014. 5).
- 41) 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 (2014. 5).
- 42) 合田幸広, 医薬品としての生薬・薬用植物薬学的視点からの共創的連携, 大阪大学総合学術博物館学術シンポジウム, 大阪 (2014. 6).
- 43) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 三浦亨, 山田裕子, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊地祐一, 山下忠俊, 合田幸広, NMRによる定量分析技術“AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)”の日本薬局方試薬への応用, プロセス化学会 2014 サマーシンポジウム, 東京 (2014. 7).
- 44) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 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3報), 第31回和漢医薬学会学術大会, 千葉 (2014. 8).
- 45) Suematsu, T., Hosoe, J., Sugimoto, N., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T., Goda, Y. Application of AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance) to the reagents in the crude drug section of the Japanese Pharmacopoeia, The 8th JSP-CCTCN-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, Fukuoka (2014. 9).
- 46) 木内文之: 生薬の品質評価と有効成分. 日本生薬学会第61回年会, 福岡 (2014. 9).
- 47) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 山田裕子, 三浦亨, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩

- 昭, 菊池祐一, 山下忠俊, 合田幸広, AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)による天然由来成分の純度評価のための基礎研究, 天然有機化合物討論会, 高知 (204.10) .
- 48) Goda, Y., Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines, 2014 International Summit on Innovative Drug Discovery, Charting the Course of Standardization of Chinese Materia Medica, Hong Kong (2014.11) .
- 49) 杉本直樹, 石附京子, 田原麻衣子, 細江潤子, 多田敦子, 大槻 崇, 河崎裕美, 佐藤恭子, 合田幸広, 穂山 浩: 食品添加物等のNMR スペクトル検索システムの検討. 第51回全国衛生化学技術協議会年会, 別府 (2014.11) .
- 50) 合田幸広, 一般用漢方処方について行って来たこと, 第47回社団法人日本漢方交流会全国学術集会, 京都 (2014.11) .
- 51) Goda, Y., Pharmacopoeial topics on herbal medicines in Japan from 2013 to 2014, The 12th Standing Committee Meeting of FHH, Singapore (2014.11) .
- 52) 合田幸広, 医薬品としての生薬の品質評価, 北里WHO・COIシンポジウム(兼漢方診療標準化プロジェクト第2回シンポジウム), 横浜 (2014.12) .
- 53) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広: 八味地黄丸エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 (第1報), 日本薬学会第135年会, 神戸 (2015.3) .
- 54) 鎌倉浩之, 細江潤子, 袴塚高志, 合田幸広: 漢方エキス中の水銀, ヒ素, 鉛及びカドミウムについて, 日本薬学会第135年会, 神戸 (2015.3) .
3. 単行本
- 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) Goda, Y., Standardization of crude drugs and Kampo medicines in Japanese Pharmacopoeia, pp166-172, CMC Publishing (2014). ISBN978-4-7813-1003-9
4. その他
- 1) 第十六改正日本薬局方医薬品各条生薬等の確認試験及び純度試験に規定されている薄層クロマトグラフィーの試験条件及びRF値, (財)日本公定書協会編集, 第16改正日本薬局方, 資料2, pp. 11-16, じほう (2012) .
- 2) 第16改正日本薬局方第一追補参考情報「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」
- 3) 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)
- 4) 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

- 5) 第17改正日本薬局方原案, 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 (改訂), 定量NMRに使用する機器の性能の管理, 日本薬局方フォーラム, 23(4), 727-728 (2014).
- 6) 第17改正日本薬局方原案, 試薬・試液, (E)-ケイヒ酸, 定量用; サイコサポニン b2, 定量用; ロスマリン酸, 定量用; サイコサポニン b2 標準試液, 定量用; レイン, 定量用; 日本薬局方フォーラム, 23(4), 607-610, 690, 694 (2014).
- 7) 第17改正日本薬局方原案, 加味帰脾湯, 桃核承気湯, 防己黄耆湯, 防風通聖散, 抑肝散エキス, 日本薬局方フォーラム 23 (4) pp687-690, 691-694, 695-704.
- 8) 第17改正日本薬局方原案, 各種漢方処方一部改正案, 日本薬局方フォーラム 23 (4) pp 704-707, 707-709, 711, 712, 713, 714, 715, 716.
- 9) 東京生薬協会, 日本薬局方「タクシャ」の新規確認試験 (原案) の設定経緯, 生薬学雑誌, 69(1) 39 (2015).

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
Anjiki, N. 他	Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing system	Jpn. J. Food Chem. Safety	19(1)	32-37	2012
Chung, M.H.	Tokishakuyakusan as a treatment for women's diseases	J. Trad. Med.	29(2)	89-92	2012
Tahara, M. 他	Quantitative NMR determination of purity of trichothecene mycotoxins in commercial reagents	Mycotoxins	62(2)	111-119	2012
Anjiki, N. 他	Use of a taste-sensing system to discriminate Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide) in The Japanese Pharmacopoeia and Huashi (Talc) in Pharmacopoeia of The People's	J. Trad. Med.	30(1)	34-40	2013
Hoshino, T. 他	Two new sulfated oleanan saponins from Achyranthes root	J. Nat. Med.	67(2)	386-389	2013
Hosoe, J. 他	Preliminary studies for application of quantitative NMR (qNMR) in the Japanese Pharmacopoeia (I)	Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science	45(3)	243-250	2014
Horii, C. 他	Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I)	Shoyakugaku Zasshi	68(1)	9-12	2014
Horii, C. 他	Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I)	Shoyakugaku Zasshi	68(2)	65-69	2014
Kammoto, T. 他	Discrimination between Prepared Glycyrrhiza and Glycyrrhiza by TLC.	Shoyakugaku Zasshi	68(2)	70-77	2014
Oshima, N. 他	Identification of marker compounds for Japanese Pharmacopoeia non-conforming jujube seeds from Myanmar.	J. Nat. Med.	69(1)	68-75	2015
Hanaoka, N. 他	Comparison of the constituents of the original plants of crude drugs Cistanchis Herba and Boschniakia Herba	Shoyakugaku Zasshi	69(1)	1-9	2015

総説

発表者氏名	タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Goda, Y.	QNMR and its application to reagents in the Japanese Pharmacopoeia	Pharm Tech Japan	28(14)	2795-2799	2012
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	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(1)	15-20	2013
川原 信夫	FHH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	130-108	2013

Goda, Y.	Characteristic features and challenges of crude drug and Kampo products as multicomponent mixtures	The Journal of Practical Pharmacy	64(11)	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(9)	753-767	2013
Goda, Y. & Kiuchi, F.	Current situation and challenge of "Crude Drugs" in the Japanese Pharmacopoeia".	Regulatory Science of Medicinal Products	4(2)	155-160	2014

単行本

著者名	タイトル名	出版社	ページ	出版年
Goda, Y. 他	Biochemical Sensors: Mimicking Olfactory and Gustatory Senses, Chapter 11: Herbal Medicines.	Pan Stanford Publishing ISBN 978-981-4267-07-6	205-230	2013
Goda, Y.	Standardization of crude drugs and Kampo medicines in Japanese Pharmacopoeia,	CMC Publishing ISBN 978-4-7813-1003-9	166-172	2014

その他

発表者氏名	タイトル名	出版社	ページ	出版年	
	第十六改正日本薬局方医薬品各条生薬等の確認試験及び純度試験に規定されている薄層クロマトグラフィーの試験条件及びRf値	(財)日本公定書協会編集 第16改正日本薬局方資料2 じほう	11-16	2012	
	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改正日本薬局方第一追補参考情報		2012	
	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	
	第17改正日本薬局方原案, 試薬・試液, (E)-ケイヒ酸, 定量用; サイコサポニンb2, 定量用; ロスマリン酸, 定量用; サイコサポニンb2標準試液, 定量用; レイン, 定量用	日本薬局方フォーラム	23(4)	607-610, 690,694	2014
	第17改正日本薬局方原案, 加味帰脾湯, 桃核承気湯, 防己黄耆湯, 防風通聖散, 抑肝散エキス	日本薬局方フォーラム	23(4)	687-690, 691-694, 695-704	2014
	第17改正日本薬局方原案, 各種漢方処方一部改正案	日本薬局方フォーラム	23(4)	704-707, 707-709, 711,712, 713,714, 715,716	2014
	第17改正日本薬局方原案, 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(改訂), 定量NMRに使用する機器の性能の管理	日本薬局方フォーラム	23(4)	727-728	2014
東京生薬協会	日本薬局方「タクシャ」の新規確認試験(原案)の設定経緯	生薬学雑誌	69(1)	39	2015

Use of a taste-sensing system to discriminate Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide) in The Japanese Pharmacopoeia from Huashi (Talc) in Pharmacopoeia of The People's Republic of China

Naoko Anjiki,^{a,b)} Hirotoshi Fushimi,^{c)} Junko Hosoe,^{d)} Naoko Fushimi,^{b,e)} Katsuko Komatsu,^{c)} Shao-Qing Cai,^{f)} Hidekazu Ikezaki,^{a)} Masayuki Mikage,^{b)} Nobuo Kawahara^{g)} and Yukihiro Goda^{*d)}

^{a)}Intelligent Sensor Technology, Inc., 5-1-1 Onna, Atsugi-shi, Kanagawa, 243-0032, Japan. ^{b)}Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, 920-1192, Japan. ^{c)}Institute of Natural Medicine, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama, 930-0194, Japan. ^{d)}National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan. ^{e)}Uchida Wakanyaku Ltd., 4-4-10 Higashi-Nippori, Arakawa-ku, Tokyo, 116-8571, Japan. ^{f)}School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, 38 Xue-yuan Road, Haidian District, Beijing, 100191, China. ^{g)}Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0843, Japan. (Received September 21, 2012. Accepted November 26, 2012.)

Abstract

'Kasseki' in Japanese or 'Huashi' in Chinese are highly similar crude mineral drugs. Though almost the same Chinese characters are used for both, the definition of the former in The Japanese Pharmacopoeia (JP) is different from that of the latter in Pharmacopoeia of The People's Republic of China (CP). Namely, Kasseki is defined as "a mineral substance, mainly composed of aluminum silicate hydrate and silicon dioxide" in JP, while Huashi is defined as "mainly hydrated magnesium silicate" in CP. Since the Kasseki used in Japan is imported from China, discrimination of these two is important from the viewpoint of regulatory science. In this report we applied a taste-sensing system having artificial lipid membrane sensors to discriminate between Kasseki and Huashi.

First, seven types of sensors were tested on serial concentrations of water extracts of Kasseki and Huashi. The results suggested that the AC0 and AAE sensors were appropriate for our purpose when 1% (w/w) water extracts of samples were used. Next, we tested ten each of Kasseki and Huashi samples in this condition. For the Kasseki samples, both sensors showed specifically localized output values ranging from 0 to -5 mV. By contrast, for the Huashi samples, AC0 characteristically showed output values deviating from the range within ± 5 mV and AAE showed a wide range of output values, from -22 to 1 mV. These data suggest that the taste-sensing system can discriminate Kasseki from Huashi when their 1% (w/w) water extracts are measured by AC0 and AAE sensors.

Key words Kasseki, Huashi, Pharmacopoeia, Discrimination, Taste-sensing system, Artificial lipid membrane sensors.

Introduction

'Kasseki' and 'Huashi' are crude mineral drugs. The former has been used as a component of some

Kampo formulae such as bofutsushosan and choreito, and recently its consumption increases. Though almost the same Chinese characters are used for both, they have different definitions. In Japan, in 2011, Kasseki was newly adapted to The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (JP16) with its English name of Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide and defined as

*To whom correspondence should be addressed.
e-mail : goda@nihs.go.jp

“a mineral substance, mainly composed of aluminum silicate hydrate and silicon dioxide; it is not the same substance as mineralogical talc”.¹⁾ Although the Kasseki used in today’s Japanese markets is almost completely imported from China, it has been never found as Huashi in Chinese markets.²⁾ Huashi, in the Pharmacopoeia of The People’s Republic of China (CP), is defined as “mainly hydrated magnesium silicate” with the Latin name of ‘TALCUM’ and the English name of ‘Talc’.³⁾ Thus, Huashi as defined in CP is thought to be equivalent to the “mineralogical talc”, or magnesium salt, distinguished from Kasseki in JP16. In fact, JP16 describes a confirmation test which distinguishes Kasseki from talc by the identification of aluminum in Kasseki.²⁾ It should be noted that this confirmation test focuses only on aluminum, but not on the whole of Kasseki, which consists of aluminum silicate hydrate and silicon dioxide. X-ray fluorescence analysis and X-ray diffraction are available in order to strictly analyze Kasseki.⁴⁻⁶⁾ They are particularly effective methods for the analysis of minerals, but they utilize somewhat expensive instruments.

Meanwhile, we have used a taste-sensing system as one of the comprehensive and objective methods for quality evaluation of Kampo formulae, crude drugs and foods.⁷⁻¹³⁾ The taste-sensing system is a tool for objective taste measurement, which is based on the concept of modeling the mechanism of human taste recognition. This system is composed of a sensor unit, consisting of various artificial lipid membrane sensor probes, and a personal computer. The taste data are obtained from the change of the electric potential of the artificial lipid membranes when the taste substances interact electrically with, or are adsorbed to, the membrane.¹⁴⁾ In this study, we report the possibility of this system as a new method to discriminate Kasseki from Huashi.

Materials and Methods

Materials

Samples: Ten Kasseki samples were kindly supplied from Japan Medicinal Plant Federation (Osaka, Japan). Ten Huashi samples were obtained from eight drug stores, a pharmaceutical factory and a drug market in China. The main component of Huashi samples was

preliminarily identified as hydrated magnesium silicate by the X-ray diffraction method. In addition, a talc which is sold as a commercial reagent (average particle size 7 ~ 12 μm) and an equivalent to Huashi was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Information about the sources of Kasseki and Huashi samples is summarized in Table 1. Every sample was investigated the X-ray diffraction method in order to identify the origin of minerals (data not shown). The brick-type samples were pulverized using an electric mill and passed through a No. 100 sieve (150 μm). All samples are stored at Museum of Materia Medica, Research Center for Ethnomedicine, Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Japan.

Chemicals and reagents: A solution consisting of 30 mM potassium chloride in 0.3 mM tartaric acid was employed as the reference solution in the measurement by the taste-sensing system. As the washing solution for negatively charged artificial lipid membrane sensor probes, 30% ethanol aqueous solution containing 100 mM hydrochloric acid was used. As the washing solution for positively charged artificial lipid membrane sensor probes, 30% ethanol aqueous solution containing 100 mM potassium chloride and 10 mM potassium hydroxide was used. Potassium chloride, tartaric acid, ethanol (99.5 v/v%) and potassium hydroxide were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Hydrochloric acid (35 ~ 37%) was purchased from Nakalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Ultra pure water was obtained by an EQS-10L system (Nihon Millipore K.K., Tokyo, Japan). The internal solution for the artificial lipid membrane sensor probes containing 3.3 M potassium chloride in saturated silver chloride aqueous solution was obtained from Intelligent Sensor Technology, Inc. (Atsugi, Japan).

Sample preparation

A pulverized and sieved Kasseki (TMPW 25309 in Table 1) and the reagent talc were weighed and suspended in ultra pure water at serial concentrations (Kasseki: 0.01 ~ 10% (w/w), reagent talc: 0.01 ~ 1% (w/w)), and then extracted by sonication for 10 minutes at 25°C. After centrifuging at 1,710 $\times g$ for 10 minutes at 25°C, the supernatant was filtered with No. 2 filter paper (JIS P3801). Potassium chloride and tartaric acid

Table 1 Collection data of Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide) in Japanese markets and Huashi (Talc) in Chinese markets

Drug Name in Pharmacopoeia	No.	TMPW No.	Market	Origin	Date
Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide (KASSEKI, 消石, 軟滑石) in The Japanese Pharmacopoeia	J-1	25309	Japan Medicinal Plant Federation, Osaka, Japan (日本生薬連合会, 大阪)	Fujian Prov.	Oct., 2006
	J-2	25304	"	Unknown	"
	J-3	25305	"	Fujian Prov.	"
	J-4	25306	"	"	"
	J-5	25307	"	"	"
	J-6	25310	"	"	"
	J-7	25311	"	"	"
	J-8	25313	"	"	"
	J-9	25314	"	"	"
	J-10	25867	"	Unknown	Jan., 2007
Talc (消石, Huashi) in Pharmacopoeia of The People's Republic of China	C-1	26071	Zhangzhou biochemical pharmaceutical factory, Zhangzhou, Fujian, China (漳州市生物化学制药厂, 福建省漳州)	Guangxi Prov.	Aug., 2007
	C-2	26072	Zhangzhou libin drug store, Zhangzhou, Fujian, China (漳州利宾大药房, 福建省漳州)	Unknown	"
	C-3	26073	Jiankang yiyao market, Zhangzhou, Fujian, China (健康医药商场, 福建省漳州)	Fujian and Shandong Prov.	"
	C-4	26075	Jining drug store, Zhangzhou, Fujian, China (济宁药店, 福建省漳州)	Guangxi Prov.	"
	C-5	26077	Gucheng shenrong drug store, Xiamen, Fujian, China (古城参茸药行, 福建省厦门)	"	"
	C-6	26079	Zhuqiang drug store, Xiamen, Fujian, China (祝强大药房, 福建省厦门)	"	"
	C-7	26080	Taian yiliaobaoxian dingdian drug store, Taian, Shandong, China (泰安市医疗保险定点药店, 山东省泰安)	Shandong Prov.	"
	C-8	26084	Jianlian chinese drug store, Jinan, Shandong, China (建联中药店, 山东省济南)	"	"
	C-9	26088	Beijing tongrentang laizhou drug store, Laizhou, Shandong, China (北京同仁堂莱州药店, 山东省莱州)	"	"
	C-10	26092	Zhirentang drug store, Penglai, Shandong, China (芝仁堂大药房, 山东省蓬莱)	"	"

TMPW No.: The specimen reference number of the Museum of Materia Medica, Research Center for Ethnomedicine, Institute of Natural Medicine, University of Toyama

were added to the filtrate at concentrations of 10 mM and 0.1 mM, respectively.

The test solutions were initially applied to the taste-sensing system to determine the optimal concentration and sensor types. Next, ten Kasseki and ten Huashi samples were extracted to the optimal concentration in the same way as described above, and measured by the taste-sensing system. Aqueous solution containing 10 mM potassium chloride and 0.1 mM tartaric acid was used as a blank control.

Measurement

We measured sensor outputs of water extracts of Kasseki and Huashi samples under the following conditions, which were chosen as described in our previous report.¹²⁾

Instrument: Taste-sensing system SA402B (Intelligent Sensor Technology, Inc.). Artificial lipid membrane sensor probes: AAE, CT0, CA0, C00, AE1, AC0 and AN0 (Intelligent Sensor Technology, Inc.). In this study, we used only the sensor output values called relative

potentials, that is, the electrical potential changes between the sample solution and the reference solution.

Results

First, graduated concentration solutions of Kasseki and reagent talc were measured by the Taste-sensing system SA402B with seven types of artificial lipid membrane sensor probes. As the result, the AC0 and AAE sensors showed slightly negative output values for Kasseki water extracts, with little concentration-dependent sensor output changes. For the reagent talc, by contrast, two sensors' output values changed depending on sample concentrations. The output values of the AC0 sensor to 1% (w/w) of Kasseki and the reagent talc solutions were -3.5 mV and -15.7 mV (Fig. 1-a), while those of the AAE sensor were -1.5 mV and -9.3 mV (Fig. 1-b), respectively. These two sensors' output values were stable and their measurement deviations were small. Thus, we judged that the AC0 and AAE sensors

were sufficient to discriminate Kasseki from Huashi at the extract condition of 1% (w/w). There were several reasons that the other five sensors were considered inappropriate. The CT0 and AE1 sensors did not respond to any of the sample solutions and the C00 sensor showed no constant concentration-dependent sensor output changes for either sample type (data not shown). The AN0 and CA0 sensors showed similar output tendencies to those of AC0 and AAE sensors, respectively; however, these two sensors were less durable.

Then, each of the ten samples of both Kasseki and Huashi were extracted at the condition of 1% (w/w) and their sensor output values were measured by the AC0 and AAE sensors. As a result, both sensors showed specifically localized output values ranging from 0 to -5 mV for all ten Kasseki sample solutions (Fig. 2) while, for the Huashi samples, AC0 characteristically showed output values deviating from the range within ± 5 mV (actual figure ranges were from -21 to -9 mV and from +9 to +15 mV) and AAE showed a wide range of output values, from -22 to 1 mV (Fig. 2).

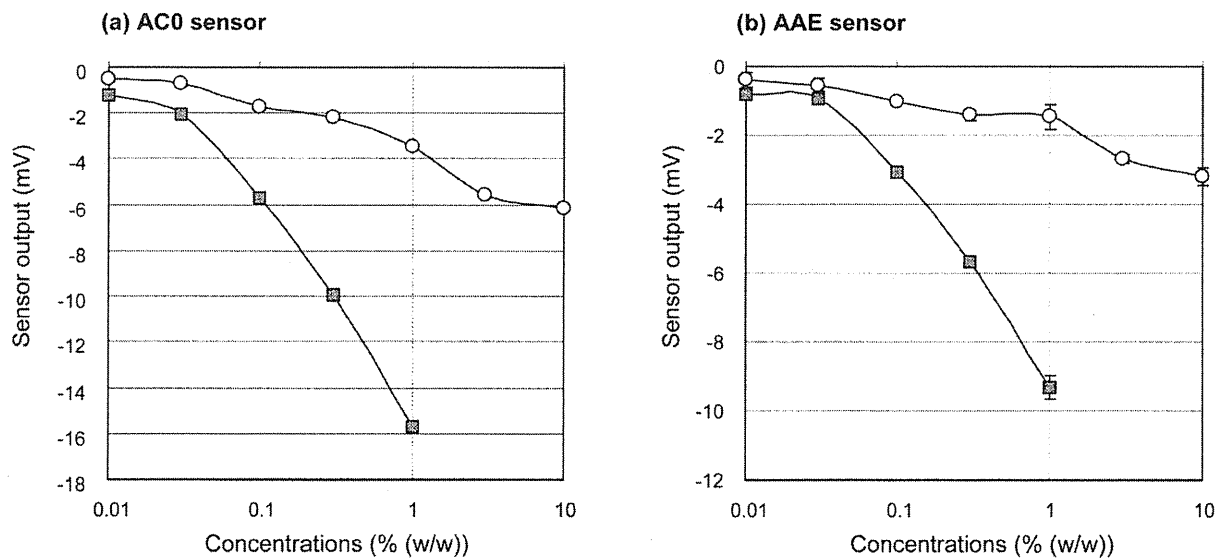
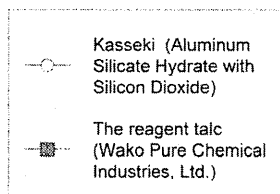


Fig. 1 Concentration dependences of electrical output changes on artificial lipid membrane sensors (AC0 and AAE) to Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide) and reagent talc (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). AC0 (a) and AAE (b). To avoid damage to the sensor, higher concentrations than 1% (w/w) were not tested for the reagent talc. Each value represents the mean \pm standard deviation of three measurements.



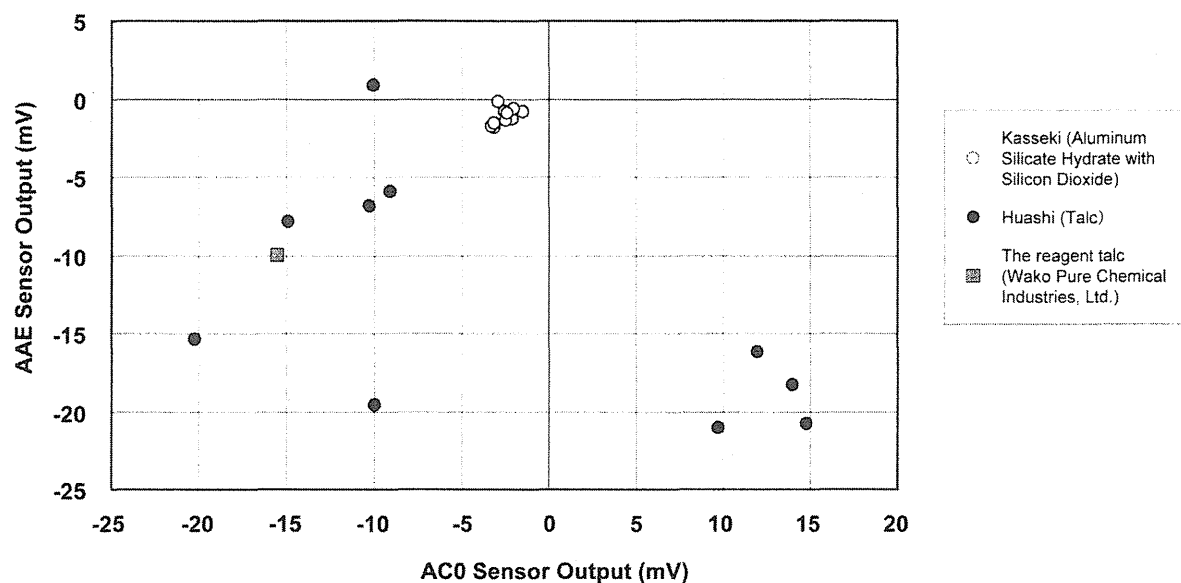


Fig. 2 Distribution of AC0 and AAE sensor outputs for Kasseki (Aluminum Silicate Hydrate with Silicon Dioxide, used in Japan) and Huashi (Talc, used in China). Sensor output values were obtained at the sample concentration of 1% (w/w). As reference, reagent talc (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) solution (1% (w/w)) was used.

Discussion

In this study, we tried to discriminate Kasseki from Huashi by a taste-sensing system. In the measurements, both AC0 and AAE sensors showed slight responsiveness to Kasseki samples, ranging from 0 to -5 mV, whereas, for the Huashi samples, a wide variety responsiveness deviating from the output value range from 0 to -5 mV. These data clearly suggest that the taste-sensing system can discriminate Kasseki from Huashi when their 1% (w/w) water extracts are measured by AC0 and AAE sensors. In other words, under the conditions of this study, when the tested sample showed an output value deviating from the range from 0 mV to -5mV, the sample is not referable to Kasseki and may be to Huashi.

Although AC0 and AAE sensors used in this study are normally utilized for detecting the taste factors of cationic bitterness and umami respectively, none of the human subjects in the gustatory test noted a specific taste for either Kasseki or Huashi water extracts. Thus, it is unlikely that sensor output values to these extracts result from the sensor responsiveness to taste substances of cationic bitterness and umami. The Kasseki and Huashi samples tested in this study originate mainly

from “aluminum silicate hydrate and silicon dioxide” and “hydrated magnesium silicate”, respectively. It is assumed that the differences in the sensor output values obtained by the taste-sensing system with AC0 and AAE sensors reflect the differences of kinds and amounts of minerals eluted from Kasseki or Huashi to water. Therefore, the data in this study may offer a new application of the taste-sensing system in the field of mineralogy in addition to drug regulatory science. In this study, we employed not ANO sensor but AC0 sensor for discriminating Kasseki from Huashi because of the difference in their endurance. Both sensors are usually applied to evaluate a taste value of cationic bitterness and the difference of their endurance is likely to be due to the compositional differences of the corresponding artificial lipid membranes.

All of the Kasseki samples showed similar sensor output values. In contrast, Huashi showed wide-ranging values (Fig. 2). This result seems to denote a rich diversity of the Huashi in Chinese markets. It is of interest that the AC0 sensor showed both positive and negative values for Huashi samples. These phenomena may be due to compositional differences of the Huashi samples. Huashi as defined in CP is thought to be equivalent to the JP Talc. According to the JP16, Talc may contain

related mineral substances consisting chiefly of chlorite, magnesite, calcite and dolomite.¹⁵⁾ The existence of these related substances may affect sensor responses, although detailed analyses of Huashi samples by other analytical instruments would be needed to clarify such variations.

Since ancient times, most of the Kasseki used in Japan has been imported from China. Masutomi mentioned that the origin of Kasseki housed at Shosoin as early as the eight century was mainly hydrated halloysite, namely aluminum silicate hydrate.¹⁶⁾ In addition, it is known that all of Kasseki products in the Japanese market at the present day are imports from Fujian Province, China. On the basis of the survey analyses of Kasseki used in Japan, JP16 defined Kasseki as “a mineral substance, mainly composed of aluminum silicate hydrate and silicon dioxide”. While in China, Huashi has been defined as “mainly hydrated magnesium silicate” in CP. Several papers have reported that Huashi having different combinations of minerals from that defined in CP are sometimes sold in Chinese markets.^{5,6)} These facts suggest that mineral crude drugs other than Kasseki may be mistakenly imported as Kasseki from the Chinese market to Japan in the future. Thus, it is important to continually monitor the mineral crude drugs imported from China. Since the measurement of mineral extracts by the taste-sensing system is not time-consuming and does not require expertise in pharmacognosy, this method may be suitable for the monitoring analysis.

Conclusion

This study showed that some artificial lipid membrane sensors of Taste-sensing system SA402B were able to discern the difference between Kasseki and Huashi. When a 1% (w/w) water extract of tested samples is measured by AC0 and AAE sensors and these sensors show their output values from 0 to -5 mV, the tested sample is identifiable as Kasseki.

Acknowledgements

The authors are grateful to members of Japan

Medicinal Plant Federation for kindly providing the Kasseki samples. This work was supported in part by a Health and Labour Sciences Research Grant.

References

- 1) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011: “The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition”, English version, pp. 1598-1599, 2011.
- 2) “The Japanese Pharmacopoeia Technical Information 2011” (Ed. by Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan), Jiho, Inc., Tokyo, pp. 819-820, 2011.
- 3) The State Pharmacopoeia Commission of P. R. China: “Pharmacopoeia of The People’s Republic of China, 2010 Volume I”, China Medical Science Press, Beijing, English version, p. 433, 2010.
- 4) Ota, N., Inoue, M., Mino, Y.: Physicochemical studies on crude drugs (IV) on the constituents of the Chinese crude drug “Kasseki”. *Shoyakugaku Zasshi*, **34**, 13-18, 1980.
- 5) Fushimi, H., Namba, T., Komatsu, K.: Fundamental study on the quality evaluation of Chinese crude drug, “Huashi”. *Natural Medicines*, **55**, 193-200, 2001.
- 6) Fushimi, H., Sakai, E., Kawahara, N.: Review of description for crude drugs registered in JP and studies on quality evaluation of a new candidate mineral crude drug “Talcum Crystallinum” for JP 16. *Pharm. Regul. Sci.*, **40**, 402-417, 2009.
- 7) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the Taste of Kampo Formulae by Taste-Sensing System (1). *Natural Medicines* **59**, 164-170, 2005.
- 8) Anjiki, N., Suzuki, A., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the Taste of Kampo Formula by Taste-Sensing System (2), Taste of Kakkonto. *Jpn. J. Pharmacog.*, **60**, 21-27, 2006.
- 9) Anjiki, N., Yoshino, C., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the Taste of a Kampo Formula by a Taste-Sensing System (3): the Taste of Ryoikeijutsukanto. *Jpn. J. Pharmacog.*, **61**, 6-13, 2007.
- 10) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y.: Studies on the Taste Profile Analysis of Setsucha Products by a Taste-Sensing System. *Jpn. J. Food Chem.*, **14**, 121-127, 2007.
- 11) Kawahara, N., Anjiki, N., Hosoe, J., Kim, IH., Ikezaki,

- H., Mikage, M., Goda, Y.: Studies on Relationship between Taste and Content of Sulfur Dioxide in Crude Drugs Obtained from the Japanese Market. *Pharm. Regul. Sci.*, **40**, 129-135, 2009.
- 12) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Kiuchi, F., Sekita, S., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y.: Evaluation of the Taste of Crude Drug and Kampo Formula by a Taste-Sensing System (4): Taste of Processed Aconite Root. *J. Nat. Med.*, **65**, 293-300, 2011.
- 13) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y.: Quality evaluation of essential oils by a taste-sensing system. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **19**, 32-37, 2012.
- 14) Toko, K.: "Biomimetic Sensor Technology", The Press Syndicate of The University of Cambridge, Cambridge, pp. 113-148, 2000.
- 15) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011: "The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition", English version, pp. 1451-1452, 2011.
- 16) Masutomi, K.: "Shosoin Yakubutsu Wo Chushin To Suru Kodai Sekiyaku No Kenkyu - Shosoin No Kobutsu I", Nihon Chigakukenkkyu Kaikan, Kyoto, pp. 85-88, 159-165, 1973.

日本薬局方における定量 NMR (qNMR) の利用に関する 準備研究 (第 1 報)

細江 潤子^{*1}, 杉本 直樹^{*1}, 末松 孝子^{*2}, 山田 裕子^{*3}, 三浦 亨^{*3}, 早川 昌子^{*4}, 鈴木 裕樹^{*4},
勝原 孝雄^{*5}, 西村 浩昭^{*5}, 菊地 祐一^{*5}, 山下 忠俊^{*6}, 合田 幸広^{*1, #}

(受付:平成 25 年 8 月 6 日, 受理:平成 25 年 12 月 26 日)

Preliminary Studies for Application of Quantitative NMR (qNMR) in the Japanese Pharmacopoeia (I)

Junko HOSOE^{*1}, Naoki SUGIMOTO^{*1}, Takako SUEMATSU^{*2}, Yuko YAMADA^{*3}, Toru MIURA^{*3},
Masako HAYAKAWA^{*4}, Hiroki SUZUKI^{*4}, Takao KATSUHARA^{*5}, Hiroaki NISHIMURA^{*5},
Yuuichi KIKUCHI^{*5}, Tadatoshi YAMASHITA^{*6} and Yukihiro GODA^{*1, #}

Summary

Preliminary studies were performed to establish the quantitative nuclear magnetic resonance (“qNMR”) test” in the crude drug test section of the Japanese Pharmacopoeia (JP). In this report, we examined impurity signals from internal reference substances and targeted marker compounds, chemical shifts of internal reference substances, and the suitability of signal peaks of targeted marker compounds for qNMR.

For example, the internal reference substance 1,4-BTMSB-*d*₄ showed an impurity signal at about 7.3ppm derived from 1,4-(Me₃Si)₂-C₆D₃H in the highly accumulated NMR spectrum at 400 MHz. The impurity signal increased time-dependently in CDCl₃, but not in CD₃OD or CD₃COCD₃. This impurity signal interfered with integration of the signal of geniposide at 7.26ppm. Therefore, we consider that this signal of geniposide is unsuitable for quantification. Our data also suggest that it is important to measure qNMR immediately after sample preparation when CDCl₃ is used as the solvent. Similarly, the highly accumulated NMR spectrum of another internal reference substance, DSS-*d*₆, showed impurity signals at 0.59, 1.72 and 2.88ppm in D₂O and at 0.48, 1.54 and 2.37ppm in DMSO-*d*₆, which are derived from Me₃SiCHDCD₂CD₂SO₃Na, Me₃SiCD₂CHDCD₂SO₃Na, and Me₃SiCD₂CD₂CHDSO₃Na, respectively. Therefore, it is considered essential that the spectral regions around these impurity signals be avoided in selecting suitable signals of targeted compounds for integration. Very small, but distinct, impurity signals also appeared in the spectra of several targeted marker compounds when the data were obtained under highly accumulated (about 3800 times) conditions.

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒 158-8501)
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*2} 株式会社 JEOL RESONANCE 東京都昭島市武蔵野 3-1-2 (〒 196-8558)
JEOL RESONANCE Inc., 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, Japan

^{*3} 和光純薬工業株式会社 埼玉県川越市大字の場 1633 (〒 350-1101)
Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 1633 Matoba, Kawagoe, Saitama 350-1101, Japan

^{*4} 和光純薬工業株式会社 東京都中央区日本橋本町 4-5-13 (〒 103-0023)
Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 4-5-13 Nihonbashi-Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan

^{*5} 株式会社ツムラ 茨城県稲敷郡阿見町吉原 3586 (〒 300-1192)
TSUMURA & CO., 3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan

^{*6} 株式会社常磐植物化学研究所 千葉県佐倉市木野子 158 (〒 285-0801)
Tokiwa Phytochemical Co., Ltd., 158 Kinoko, Sakura, Chiba 285-0801, Japan

責任著者 Corresponding author

These observations suggest that prior determination of impurity signals arising from the internal reference substances and the targeted samples would be essential to assure the validity of qNMR.

The present results are expected to be helpful in the process of establishing “ the qNMR test” in the JP.

Key words

Quantitative NMR, Impurity signals, Japanese Pharmacopoeia, 1,4-BTMSB- d_4 , DSS- d_6 , Marker compounds

1. 緒言

我々は、日本薬局方における天然物の定量に関する問題を解決するため、定量 NMR (qNMR) 法を利用することを前提とし、これまでに天然物由来の試薬をどのように純度規格化していくか検討を行ってきた¹⁻⁴⁾。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⁵⁾、更に、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ンド)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⁶⁾。次いで、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、第十六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」が記載された⁷⁾。更に、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記載されるとともに、生薬試験法で qNMR が記載され、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 が日本薬局方に記載されて、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。本論文では、その第 1 報として、値付けされた試薬の販売と日本薬局方での規制について、トラブルを未然に防ぎながら実施できるように準備することを目的とし、内部基準物質の不純物シグナル、測定対象物の不純物シグナル、内部基準物質の化学シフト、ピークの単一性に関する諸問題について検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

和光純薬工業(株)製のサイコサポニン a (Lot. TLP 6646)、サイコサポニン b_2 (Lot. TLJ5221)、サイコサポニン d (Lot. TLL2003)、ロスマリン酸 (Lot. CDJ4692, Lot. CDJ4362)、SIGMA 製のロスマリン酸 (Lot. SLBB0144V)、株式会社ツムラで分析用標品として単離精製されたゲニポンドを実験対象とした。

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. 15827 JH)、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.