

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。

## 2.2 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、測定溶媒ごとに異なるため、特に断らない限り、その値は補正しなかった。

## 2.3 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。

## 2.4 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  $^{13}C$  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。

## 3. 結果と考察

### 3.1 内部基準物質の不純物シグナル

重水素溶媒には, それぞれの製品に未重水素化溶媒や水等の不純物が含まれており, これらの不純物シグナルが存在する領域は, qNMR の積分対象シグナルとしてはならないことは自明である。今回, 内部基準物質として使用している 1,4-BTMSB- $d_4$  と DSS- $d_6$  についても, 3800 回程度の積算 (約 3 日の積算) を実施し, 微量の有機不純物が含まれていることを明らかにし, これらの領域も, qNMR の積分対象シグナルに含めてはいけないことが判明した。

すなわち, 1,4-BTMSB- $d_4$  の場合には 7.3ppm 付近 (重アセトン: 7.27ppm, 重メタノール: 7.24ppm, 重クロロホルム: 7.26ppm) に, 1,4-( $Me_3Si$ ) $_2$ - $C_6D_3H$  に由来する未重水素化シグナルが出現した (Fig. 1a, 1b, 1c)。その面積値は, 重メタノール, 重アセトン中では内部基準シグナルの 0.1% 以下であったが, 重クロロホルム中では, 0.22% となり, クロロホルム中では, 内部標準物質の脱 d 化が促進されていることが判明した。また, クロロホルム中では, 7.3ppm 付近の未重水素化シグナルだけでなく, 他の溶媒中の測定では観測されない -0.11ppm, 0.009ppm, 0.11ppm, 0.17ppm に 4 本の新規シグナルが観測され (Fig. 1d), これらのシグナルは, 長時間の測定において, 内部基準物質 (1,4-( $Me_3Si$ ) $_2$ - $C_6D_3$ ) そのものが分解あるいは化学変化したことに由来するものと推定された。また, 同様の事実は, 重メチレンクロリド中の測定でも観測された (図を示さない)。

また, 重クロロホルム中に 1,4-BTMSB- $d_4$  を溶かし, サンプル管を密封後, 冷蔵庫保存し, 不純物である  $CHCl_3$  シグナル強度を基準として, 5 日後より経時的 (10 日後, 14 日後, 19 日後) に qNMR を測定すると, 水由来シグナルの定量値に変化がない一方, 7.3ppm 付近の未重水素化シグナル, -0.11ppm, 0.009ppm, 0.17ppm のシグナル強度は, 経時的に増加し, 更に 10 日後以降では, 新たに, -0.20ppm のシグナルが観測され, このシグナルも以後経時的に強度が増加した。したがって, 重クロロホルム中では, 経時的に 1,4-BTMSB- $d_4$  が分解することは, 確実な事実と考えられる。従来より, 安定剤の加えられていない高純度のクロロホルムでは, ラジカル反応が生じることが知られており, その結果, 1,4-BTMSB- $d_4$  が分解されたとすると, 上記の事実は, 合理的に説明可能となる。また, 5 日後以降, 0.11ppm のシグナル強度には変化が現れなかったが, このシグナルの由来する化合物が更に変化して, 他のシグナルが生じたとすると, 変化が観測されないことは, 説明可能となる。

原則として, qNMR の場合, 積算回数を増やすと, S/N

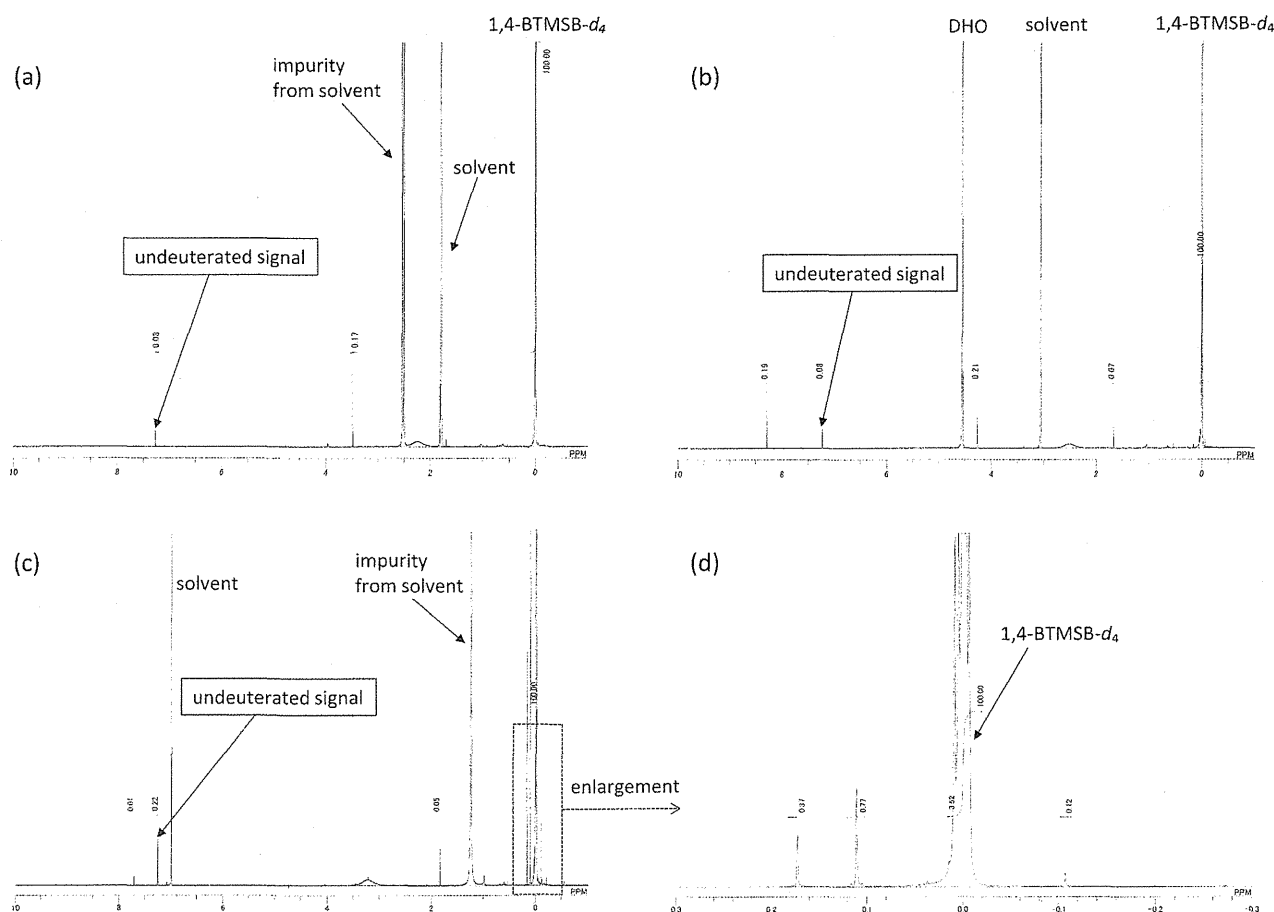


Fig.1 Impurity Signals from “1, 4-BTMSB- $d_4$ ” in Each Solvent

(a) Acetone- $d_6$ , (b) Methanol- $d_4$ , (c) Chloroform- $d$ , (d) Enlarged view around 0 ppm in chloroform- $d$

比が改善されることで、測定精度が上がることになる。しかし、上記の事実は、重クロロホルムや重メチレンクロリドといった溶媒を使用する際には、積算回数の増加にはメリットだけでなく、デメリットもあるということを示している。したがって、溶解度の関係で、qNMRの使用溶媒として、重クロロホルムや重メチレンクロリドを使用する際には、試料溶液を調製してから、素早く測定することが、試料の正確な定量値を得るために、非常に重要であるものと考えられた。

なお、1,4-BTMSB- $d_4$ の7.3ppm付近の、1,4-( $\text{Me}_3\text{Si}$ ) $_2$ - $\text{C}_6\text{D}_3\text{H}$ に由来するシグナルは、測定磁場の大きさが400MHzクラスでは、重メタノール中、ゲニポシドでqNMRの対象シグナルの一つであった7.26ppm付近のシグナルとベースライン分離しないことが確認され、同シグナルは、日本薬局方でqNMRの測定対象シグナルと規定しないこととなった (Fig. 2).

一方、DSS- $d_6$ の場合には、 $\text{D}_2\text{O}$ 中で0.59ppm ( $\text{Me}_3\text{SiCHDCD}_2\text{CD}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ), 1.72ppm ( $\text{Me}_3\text{SiCD}_2\text{CHDCD}_2\text{SO}_3\text{Na}$ ), 2.88ppm ( $\text{Me}_3\text{SiCD}_2\text{CD}_2\text{CHDSO}_3\text{Na}$ )にDSS- $d_6$ の未重水

素化シグナルが観測され、これらのシグナルは、DMSO- $d_6$ 中では、それぞれ、0.48ppm, 1.54ppm, 2.37ppmに観測されることが判明した。これらのシグナルが観測される領域は、当然ながらqNMRの測定対象領域とすべきではないが、化合物の性質上、全て高磁場領域に出現するため、測定対象領域になりやすく、1,4-BTMSB- $d_4$ の7.3ppm付近の不純物シグナルよりは、問題になりにくいものと考えられた。

### 3.2 測定対象物の不純物シグナル

これまでの研究で、測定対象物由来の不純物シグナルが測定対象物のシグナルとベースライン分離しない場合には、そのシグナルは、qNMRの対象としないことが基本原則として確認されている。一方で、qNMRの測定条件に $\text{S/N}=100$ 以上という規定があるが、 $\text{S/N}=100$ 程度の条件では、測定対象物の含量に対して1%以下の不純物由来シグナルは明瞭にならないことが指摘された。更に、前述の内部基準物質の測定より、積算回数を3800回程度行うと、ノイズがほぼ見えなくなり、不純物シグナルが明確

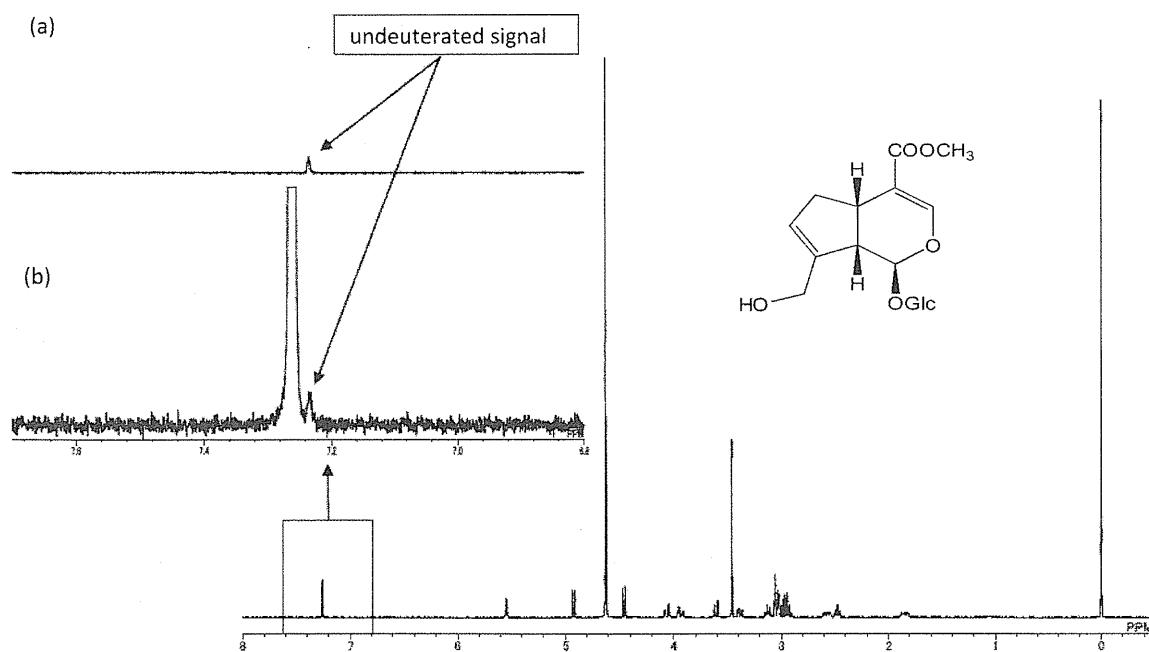


Fig.2 QNMR Spectra of Geniposide

(a) Impurity signal from "1,4-BTMSB- $d_4$ " in MeOH- $d_4$ , (b) Enlarged view of the 6.8-7.7ppm region

になることが確認されたことから、試薬の qNMR 測定の際にも、実際の qNMR での定量とは別に、事前になるべく多くの積算回数で NMR 測定を実施し、対象となる可能性のシグナルのショルダー等に不純物シグナルが含まれないことを確認する必要性が判明した。実際に、日本薬局方で定量規格が定められており、シグナル間で定量値に差が見られたロスマリン酸、サイコサポニン類 (a, b<sub>2</sub>, d)<sup>9)</sup> について、積算を 3800 回程度に増やして測定すると、これまで定量対象シグナルと考えていたシグナル中に、不純物由来と考えられるシグナルが確認された (ロスマリン酸では、5', 6' 位, サイコサポニン a, d の 11 位, サイコサポニン b<sub>2</sub> の 12 位) (Fig. 3, Fig. 4)。また、ロスマリン酸で、複数の試薬メーカーの異なるロットを測定すると、それぞれのロットで、不純物シグナルが異なることが確認された (Fig. 3)。したがって、実際に qNMR で値付けする際には、それぞれのロットごとに、事前に十分な積算で NMR 測定を行い、不純物シグナルの位置を確認することが重要であることが明らかとなった。特に対象化合物の純度が 95% 以下であるときは、不純物由来のシグナルの出現頻度が高く、この作業は、非常に重要であるものと考えられる。

### 3.3 内部基準物質の化学シフト

実験方法の項で前述したように、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。本研究では、IUPAC のルールに基づき<sup>9)</sup>、25°C で測定した際の各溶媒中の内部基準物質の

真の化学シフトを決定した。以下にその結果を示す。

1,4-BTMSB- $d_4$ : 0.219ppm (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>), 0.251ppm (CDCl<sub>3</sub>), 0.238ppm (DMSO- $d_6$ ), 0.223ppm (CD<sub>3</sub>OD), 0.228ppm (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

DSS- $d_6$ : 0.102ppm (D<sub>2</sub>O), 0.069ppm (DMSO- $d_6$ ), 0.089ppm (CD<sub>3</sub>OD).

### 3.4 ピークの単一性の問題

日本薬局方上では、qNMR は、試薬の規格に組み込まれ、qNMR で値付けされた定量値が、試薬の純度に換算される。その試薬の純度を基準として、HPLC 定量分析を行い、試薬のピーク面積と生薬中の対象物のピーク面積の比較から、生薬中の対象物含量が明らかにされる。この場合、試薬の純度そのものは、qNMR で明確に規定されるが、qNMR のみの実施で、試薬の純度を規定し HPLC に応用すると、HPLC のクロマトグラム上、不純物のピークが試薬の対象ピークの下に隠れていたとしても、問題にされず、その結果、誤った対象物の定量値が得られることになる。

一般に、HPLC の定量用標品として使用される試薬の規格の場合、確認試験に規定された UV や IR 等の規定や TLC 等の純度試験の規定により、試薬の純度が、かなりのレベルで保証され、更に、事前の HPLC の検討段階で、様々なカラムを使用して、試験がバリデートされる。その結果、使用される試薬の HPLC 上のピークの単一性について言及されることはない。

一方、qNMR では、比較的純度の低い試薬でも、純度

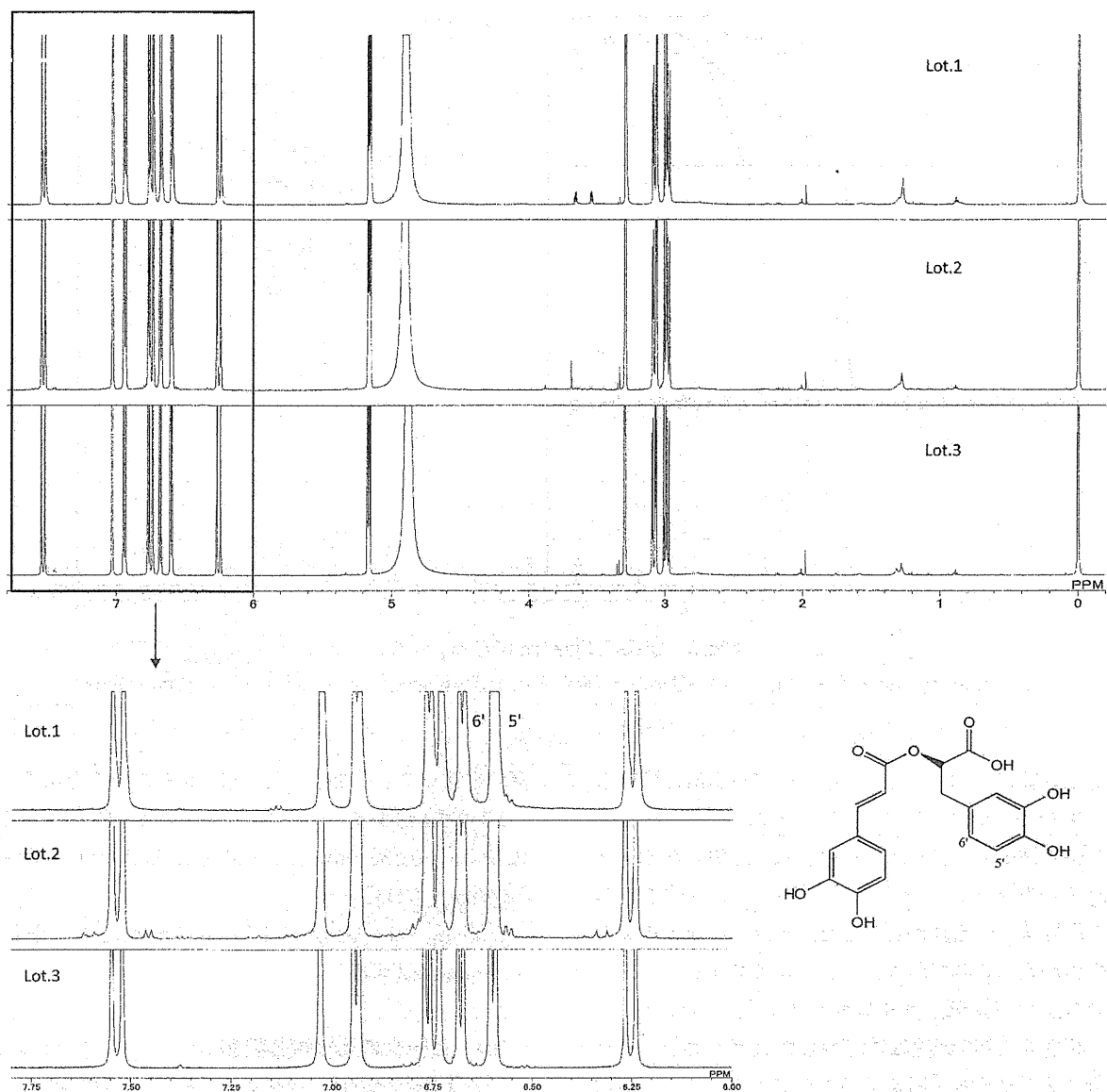


Fig.3 QNMR Spectra of Rosmarinic Acid Lots 1-3 and Their Enlarged View of the 6.0-7.8ppm Region

の値付けが正確にできることが多い。この場合、その試薬が、HPLCの定量用標品として使用されることを意識せずに、定量値付けを行うことが可能となり、HPLCのクロマトグラム上、不純物のピークが試薬の対象ピークの下に隠れることも充分にありうることになる。したがって、qNMRで値付けする試薬の規格には、HPLCで使用される条件でのピークの単一性試験が必須であるものと考えられた。

ただし、日本薬局方では、一般試験法の液体クロマトグラフィー<2.01>の項に、「9.注意」として、標準被検試料、内標準物質、試験に用いる試薬及び試液は、測定の妨げとなる物質を含まないものを用いるとされており、この文章から、ピークの単一性試験は不要であると読み込むことができるとの指摘もあった。しかし、このような文章で規定

されているとするならば、全ての標準被検試料や、試薬等で規定されている純度試験は不要ではないかという反論があり、<2.01>「9.注意」で規定されている内容は、「個々の試験において、用途にあわせて試験に影響を与えると考えられる試薬等は使わない。すなわち、HPLCにおいて、試験を妨害する普通のアセトニトリルは使用すべきでなく、HPLC用アセトニトリルを使用すべきである。」という一般原則を規定したものと解釈すべきであるとの考えが出された。よって、qNMRで定量値を規定する試薬には、実際にはHPLCで使用されるという事実の注意喚起も含めて、ピークの単一性試験が、規格として必要であるとの結論となった<sup>10)</sup>。

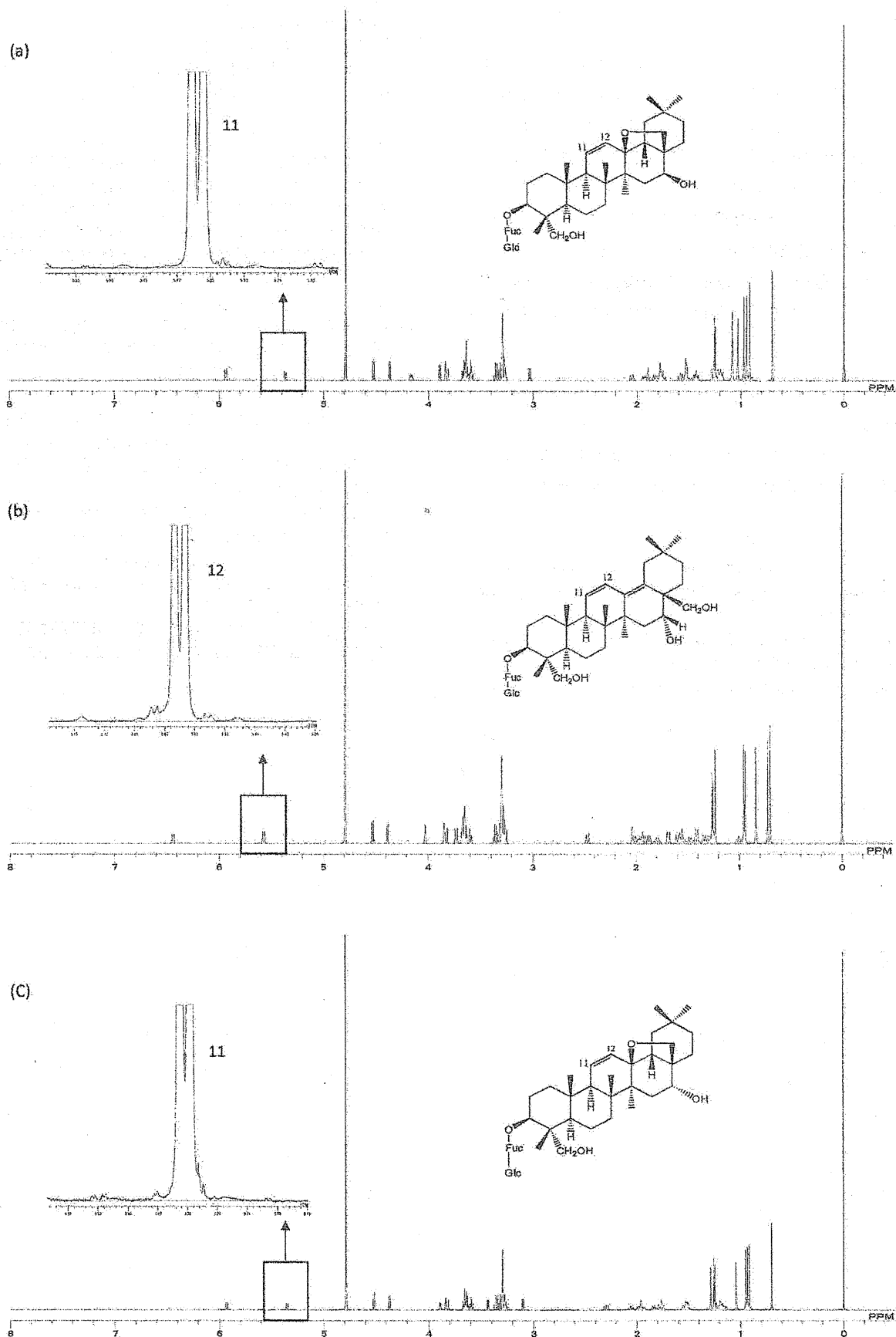


Fig.4 QNMR Spectra of Saikosaponin a (a) , Saikosaponin b<sub>2</sub> (b) and Saikosaponin d (c) and their Enlarged View in the Olefinic Regions

#### 4. まとめ

本研究では、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として、内部基準物質の不純物シグナルの問題、測定対象物の不純物シグナルの問題、内部基準物質の化学シフトの問題、ピークの単一性の問題について検討し、生薬試験法に記載すべき qNMR 測定上の注意点や、qNMR の試薬各条での記載案をどうすべきか、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、個々の試薬で、どのようなことを注意すべきであるか等、考察した。

#### 謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費及び(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の平成 24 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究事業の支援を受けたので深謝する。

#### 文 献

- 1) Goda, Y. QNMR and its application to reagents in the Japanese Pharmacopoeia. *Pharm Tech Japan*, 2012, 28, p.2795-2799.
- 2) Tahara, M.; Suematsu, T.; Hayakawa, M.; Goda, Y.; Sugita-Konishi, Y.; Sugimoto, N. Application of quantitative NMR to determine absolute purities of trichothecenes.

*Mycotoxins*. 2012, 62, p.111-119.

- 3) 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*. 2013, 61 (6), p.300-305.
- 4) 合田幸広. 定量 NMR と日本薬局方試薬への定量 NMR の適用. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*. 2013, 44 (9), p.753-767.
- 5) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広. 定量 NMR (qNMR) による日本薬局方試薬の純度規格化の検討. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*. 2010, 41 (12), p.960-970.
- 6) 細江潤子, 杉本直樹, 末松孝子, 山田裕子, 早川昌子, 勝原孝雄, 西村浩昭, 合田幸広. 日本薬局方における生薬等の成分定量用試薬を利用した定量 NMR (qNMR) のバリデーション試験. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*. 2012, 43 (2), p.182-193.
- 7) 厚生労働省. 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. 2012, p.213-214.
- 8) 合田幸広. 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. 漢方処方製剤の安全性及び同等性の評価並びに生薬の品質確保と国際調和に関する研究. 平成 23 年度総括・分担研究報告書 (H21 - 医薬 - 一般 - 004). 平成 24 年 3 月, p.31-38.
- 9) Harris, R.K.; Becker, E.D.; Cabral De Menezes, S.M.; Goodfellow, R.; Granger, P. NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.* 2001, 73 (11), p.1795-1818.
- 10) 日本薬局方フォーラム. 第十六改正日本薬局方第二追補に記載予定の改正案(意見募集). 2013, 22 (1), p.6-7.

## 葛根湯エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究 (I)

堀井 周文<sup>a,\*</sup>, 小此木 明<sup>a</sup>, 大窪 敏樹<sup>a</sup>, 鎌倉 浩之<sup>b</sup>, 合田 幸広<sup>b</sup><sup>a</sup>クラシエ製薬株式会社漢方研究所, <sup>b</sup>国立医薬品食品衛生研究所

## Studies on Bioequivalence of Kakkonto Decoction and Its Extract Preparation (I)

Chikafumi Horii<sup>a,\*</sup>, Akira Okonogi<sup>a</sup>, Toshiki Okubo<sup>a</sup>, Hiroyuki Kamakura<sup>b</sup>  
and Yukihiro Goda<sup>b</sup><sup>a</sup>Kracie Pharma, Ltd., Kambo Research Laboratories, 3-1 Kanebo-machi, Takaoka, Toyama 933-0856, Japan<sup>b</sup>National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received April 15, 2013)

In order to obtain basic information of the bio-equivalence between the Kakkonto decoction and its extract product, a crossover study was performed involving 6 healthy adult males as study participants randomly divided into 2 groups. The change of concentrations of the two marker compounds, ephedrine (E) and pseudoephedrine (PE), in human blood plasma was observed after their oral administration. As the results, no significant differences in the plasma levels between the decoction and the product were noted at any sampling times. Variance analysis of the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the area under the plasma concentration-time curve (AUC) on both E and PE revealed no significant differences between the decoction and the product or between the administration days. The statistical power ( $1-\beta$ ) was determined to be sufficient (more than 80%) for both  $C_{max}$  and AUC on PE, but not on E. However, assuming that the standard deviation was the same as our result for E, when the number of the study participants is increased to 14 it is revealed that its statistical power become sufficient (more than 80%) for both  $C_{max}$  and AUC on E. Since E and PE are known to be important biologically active components in Kakkonto formula, these results suggest that E and PE may be used as the marker compounds for the bio-equivalence judgment between preparations, although further study is needed to clarify this issue.

**Keywords:** bio-equivalence; Kakkonto; ephedrine; pseudoephedrine; blood plasma level

## 緒 言

生物学的同等性は、医薬品の有効性及安全性を確保する品質保証のための概念の一つである。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方製剤の取扱いについて」<sup>1)</sup>、「医療用漢方エキス製剤 GMP」<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。したがって、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。

本研究では、第十六改正日本薬局方にエキスとして収載され、最も著名な漢方処方の一つと考えられる葛根湯<sup>3)</sup>を対象に検討を行った。葛根湯の処方構成生薬はカッコン、タイソウ、マオウ、カンゾウ、ケイヒ、シャクヤク及びシヨ

ウキョウの7種類である。今回は処方構成生薬の一つであるマオウの指標成分であるエフェドリン(E)及びブソイドエフェドリン(PE)を分析対象として、葛根湯湯剤と医療用葛根湯エキス製剤について、それぞれをヒトに投与したときの血漿中濃度推移を明らかとし、両者の同等性について基礎的な検討を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬・試液

E塩酸塩は第一ファインケミカル製を、PE塩酸塩はアルプス薬品工業製をそれぞれ用いた。また、E- $d_3$ 塩酸塩及びPE- $d_3$ 塩酸塩は合成<sup>4,5)</sup>したものを用いた。ヒト血漿コージンバイオ製を、N-ヘプタフルオロイミダゾール(HFBI)はサーモフィッシュサイエンティフィック社製または東京化成製品を、ヘキサン及び酢酸エチルは関東化学製5,000倍濃縮検定品をそれぞれ用いた。水はMilli-Q(日本ミリポア製)により精製されたものを用いた。そのほかの試薬は全て試薬特級品を用いた。

### 2. 製剤の調製<sup>2)</sup>

湯剤は、土瓶にカッコン8g、マオウ4g、タイソウ4g、ケイヒ3g、シャクヤク3g、カンゾウ2g、ショウキョウ1g及び水500mlを加え、加熱抽出し、ガーゼ4枚を重ね、熱時ろ過を行い、半量に調製したものを葛根湯湯剤とした。本品中にEは16.7mg、PEは9.1mg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葛根湯エキス細粒7.5gを使用した。本品中にEは14.0mg、PEは8.1mgを含有する。

### 3. 投与方法

被験者数は6とし、無作為に2グループとした。これらについて、湯剤、エキス製剤のクロスオーバー試験を行った。各グループに湯剤、エキス製剤を投与後、2週間おいて湯剤を投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤を投与したグループは湯剤を投与した。投与後、15分、30分、60分、120分、240分に採血を行い、それらを分析に供した。

被験者の募集は大学病院医療情報ネットワーク研究センター臨床試験登録(UMIN-CTR)において公募し、実施施設では口頭で募集を行った。食事は日頃の食生活を維持するようにし、試験前日の21時以降は絶食した。本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理方針」<sup>6)</sup>に従い、社団法人石川県医師会の治験審査倫理委員会、及び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。

### 4. 分析方法<sup>4,5)</sup>

ヒト血漿1mlにE- $d_3$ 塩酸塩(0.3  $\mu$ g/ml)、PE- $d_3$ 塩酸塩(0.3  $\mu$ g/ml)混液1mlと5mol/l水酸化ナトリウム溶液50  $\mu$ lを加え、ヘキサン/酢酸エチル(9/1)5mlで2回抽出した。有機層をあわせ、HFBI 100  $\mu$ lを加え50℃で15分間加温した後、0.1mol/l塩酸を4ml加え、振とう、遠心分離後、有機層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、減圧下で濃縮した。これにヘキサン/酢酸エチル(9/1)200  $\mu$ lを

加え、そのうち1  $\mu$ lをGC-MSに注入した。

### 5. 装置及び分析条件

GC-MSは島津製作所QP-2010を用いた。

カラムはDB-1701(0.32mm i.d.×30m, J&Wサイエンティフィック社製)を用い、注入口温度、イオン源温度はそれぞれ200, 230℃とした。カラムオープンの温度設定は初期値が70℃とし、2分間保持後40℃/minの昇温率で200℃まで昇温し、9.75分間保持した。キャリアガスにはヘリウムを用い、カラム流量を3.0ml/minに設定し、スプリットレス注入(パージ開始2分)を行った。イオン化は電子衝突イオン化とし、イオン化エネルギーは70eVとした。E、PE及びE( $d_3$ )、PE( $d_3$ )のモニタリングイオンとして254, 257を設定し、selected ion monitoring(SIM)法により測定した。

## 結果及び考察

湯剤及びエキス製剤投与後のE及びPEの血漿中濃度推移をそれぞれFig. 1及びFig. 2に示した。投与した湯剤とエキス製剤のE及びPEの含量が若干(Eは16%, PEは10%)異なるため、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。製剤間での各時間におけるE及びPEの血漿中濃度に有意な差は認められず、同様の濃度推移を示した。Table 1にE及びPEの $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 、AUC、及びMRTを示した。Eに関して、 $C_{max}$ は、湯剤は58.0ng/ml、エキス製剤は61.4ng/mlであった。AUCは、湯剤は188ng·h/ml、エキス製剤は195ng·h/mlであった。またMRTは、湯剤は2.05h、エキス製剤は2.01hであった。PEに関して、 $C_{max}$ は、湯剤は36.2ng/ml、エキス製剤は38.0ng/mlであった。AUCは、湯剤は120ng·h/ml、エキス製剤は121ng·h/mlであった。製剤間でE及びPEの $C_{max}$ とAUCに有意な差は認められなかった。また、MRTは、湯剤は1.98h、エキス剤は2.04hであった。MRTは消失速度が同じと仮定すると吸収速度に依存することから、E及びPEの吸収速度に製剤間で差が認められないものと考えられた。

Table 2にEの、Table 3にPEの $C_{max}$ 及びAUCについての分散分析の結果をそれぞれ示した。投与製剤及び投与時期の変動要因についても有意差は認められず、被験者によるばらつきが見られたものの、血漿中濃度推移は同等であった。そこで、本試験の検出力 $1-\beta^{7-10)}$ を求め、十分な検出力があるかを検討した。その結果、Eに関しては、AUCで43%、 $C_{max}$ で38%であり、十分な検出力が得られていないことが判明した。一方、PEに関しては、AUCで90%、 $C_{max}$ で80%であり、十分な検出力が得られていることが判明した。Eに関して測定値のばらつきが被験者数を増やしても変わらないと仮定して検出力を計算したところ、一群の人数が7、即ち被験者数が14の場合にAUC及び $C_{max}$ の検出力が80%を超えたことから、被験者数を増やせばEに関しても十分な検出力が得られるものと考え



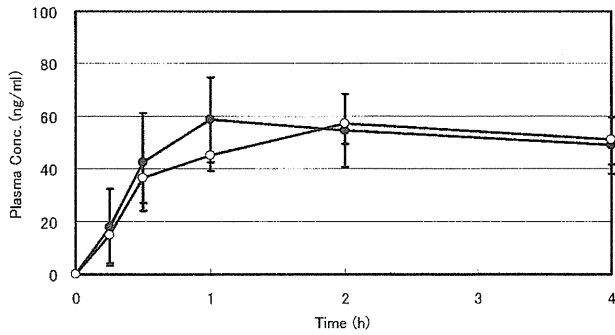


Fig. 1. Ephedrine の血漿中濃度推移 (mean ± SD, n=6) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

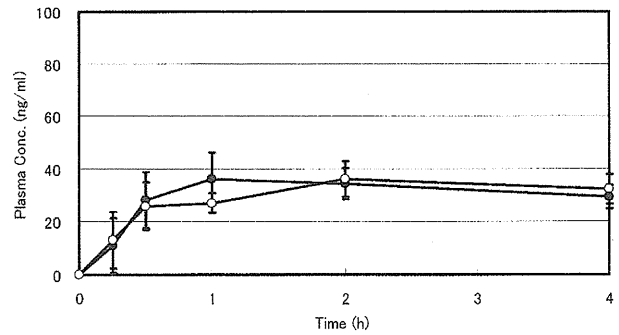


Fig. 2. Pseudoephedrine の血漿中濃度推移 (mean ± SD, n=6) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

Table 1. 湯剤またはエキス製剤投与時の Ephedrine (E) 及び Pseudoephedrine (PE) の  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC, 及び MRT\*

		$T_{max}$	$C_{max}$	AUC	MRT
		(h)	(ng/ml)	(ng/ml · h)	(h)
E	湯剤	2	58.0 ± 7.0	188 ± 22	2.05 ± 0.08
	エキス製剤	1	61.4 ± 15.0	195 ± 49	2.01 ± 0.10
PE	湯剤	2	36.2 ± 6.9	120 ± 19	1.98 ± 0.09
	エキス製剤	1	38.0 ± 8.7	121 ± 24	2.04 ± 0.06

\* $T_{max}$ : 最高血漿中濃度時間,  $C_{max}$ : 最高血漿中濃度, AUC: 血漿中濃度曲線下面積, MRT: 平均滞留時間. 値は平均値 ± 標準偏差 (n=6).

Table 2. E の分散分析表

		変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
AUC	薬剤		129.9	1	129.9	0.169	7.71
	時期		5.405	1	5.405	0.007	7.71
	被験者		11,349	5	2,270	2.946	6.26
	合計		14,567	11	1,324		
	残差		3,082	4	770.5		
		変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
$C_{max}$	薬剤		35.34	1	35.34	0.407	7.71
	時期		56.18	1	56.18	0.647	7.71
	被験者		968.8	5	193.8	2.232	6.26
	合計		1,408	11	128.0		
	残差		347.2	4	86.81		

えられた。

今回、局方で規定された指標成分である E 及び PE の血漿中濃度を測定し、漢方処方同等性についての基礎的検討を行った。その結果、E について被験者数を増やすこと

が必要となるが、これら局方の指標成分を利用して、葛根湯煎剤と医療用葛根湯エキス製剤の同等性の一部を確認出来る可能性が示唆された。したがって、これらの化合物は漢方処方剤の同等性の判断の指標化合物のひとつになる

Table 3. PE の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
AUC	薬剤	2.248	1	2.248	0.025	7.71
	時期	65.14	1	65.14	0.717	7.71
	被験者	4,439	5	887.8	9.771	6.26
	合計	4,870	11	442.7		
	残差	363.4	4	90.86		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
C <sub>max</sub>	薬剤	10.20	1	10.20	0.887	7.71
	時期	39.79	1	39.79	3.463	7.71
	被験者	528.8	5	105.8	9.203	6.26
	合計	624.7	11	56.79		
	残差	45.97	4	11.49		

可能性が示唆され、異なった製剤間の同等性評価にも応用可能と考えられた。

漢方処方製剤の主原料である生薬は天然物であり、処方製剤には多種多様な成分が含まれる。したがって、今回試験を行った E 及び PE だけで製剤間の同等性の評価を行うことができないことは明らかである。葛根湯については、日本薬局方<sup>3)</sup>において定量法として E 及び PE 以外に、シャクヤクに含まれるペオニフロリン及びカンゾウに含まれるグリチルリチン酸が規定されている。これらの成分も指標成分となりうる可能性が考えられるが、今後、吸収・代謝の影響や分析方法等を総合的に考慮し、検討していく必要があると思われる。

本研究の一部は、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」「漢方処方製剤の安全性及び同等性の評価並びに生薬の品質確保と国際調和に関する研究」、及びその継続研究によるものでありここに深謝する。

## 文 献

- 1) Notification No. 804 (Jun. 25, 1980), "Iryouyou Kampo Seizai No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of Evaluation and Registration Division, Director of Biologics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.
- 2) Notification No. 120 (May 31, 1985), "Iryoyo Kampo Ekiisu No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of the 2nd Division of Evaluation and Registration, Director of the 1st Division of

Evaluation and Registration, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.

- 3) The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 4) Nakano M., Morimoto Y., Tajima S., Kosaka N., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 583-586 (2000).
- 5) Yamamoto K., *Med. Biol.*, **111**, 157-160 (1985).
- 6) Notification No. 128001 (Dec. 28, 2004), "Rinsho Kenkyu Ni Kansuru Rinri Hoshin", Director-General of Health Policy Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare.
- 7) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., *Iyaku hin Kenkyu*, **13**, 1106-1119 (1982).
- 8) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., *Iyaku hin Kenkyu*, **13**, 1267-1271 (1982).
- 9) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., *Iyaku hin Kenkyu*, **15**, 123-133 (1984).
- 10) Tokei Suchihyo Henshu Inkai, ed., "Kanyaku Tokei Suchi Hyo", Nihon Kikaku Kyokai, Tokyo (1977).

## 小青竜湯エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究 ( I )

堀井 周文<sup>a,\*</sup>, 小此木 明<sup>a</sup>, 大窪 敏樹<sup>a</sup>, 鎌倉 浩之<sup>b</sup>, 合田 幸広<sup>b</sup>

<sup>a</sup> クラシエ製薬株式会社漢方研究所

<sup>b</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

## Studies on Bioequivalence of Shoseiryuto Decoction and Its Extract Preparation (I)

Chikafumi Horii<sup>a,\*</sup>, Akira Okonogi<sup>a</sup>, Toshiki Okubo<sup>a</sup>, Hiroyuki Kamakura<sup>b</sup>  
and Yukihiro Goda<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Kampo Research Laboratories, Kracie Pharma, Ltd., 3-1 Kanebo-machi, Takaoka, Toyama 933-0856, Japan

<sup>b</sup>National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received October 15, 2013)

In a previous report (Horii, C., *et al.*, *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (1), 9-12, 2014), we studied the bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation and the result suggested that ephedrine (E) and pseudoephedrine (PE) from *Ephedrae Herba* might be used as marker compounds for a bio-equivalence judgment between preparations. In this study, we deal with Shoseiryuto, the formulation of which also involves *Ephedrae Herba*.

A crossover study was performed involving 6 healthy adult males as study participants randomly divided into 2 groups. A change in concentrations of the two marker compounds, E and PE, in human blood plasma was observed after their oral administration. As the results, no significant differences in the plasma levels between the decoction and the product were noted at any sampling times. Variance analysis of the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the area under the plasma concentration-time curve (AUC) on both E and PE revealed no significant differences between the decoction and the product or between the administration days. The statistical power ( $1-\beta$ ) is determined to be insufficient (less than 80%) for both  $C_{max}$  and AUC on E and PE. However, assuming that the standard deviation is the same as our result for E, when the number of the study participants is 10 it is revealed that its statistical power becomes sufficient (more than 80%) for both  $C_{max}$  and AUC on E.

Since E and PE are known to be important biologically active components in Shoseiryuto preparations as well as Kakkonto ones, these results also suggest that E and PE may be used as the marker compounds for their bio-equivalence judgment, although further studies on bio-marker compounds derived from other crude drugs than *Ephedrae Herba* are needed to discuss this issue.

**Keywords:** bio-equivalence; Shoseiryuto; ephedrine; pseudoephedrine; blood plasma level

### 緒 言

生物学的同等性は、医薬品の有効性及安全性を確保する品質保証のための概念の一つである。漢方処方製剤に関し

ては、製造管理や品質管理についての充実を図るため、1980年<sup>1)</sup>及び1985年<sup>2)</sup>に厚生省(当時)から通知が出されており、今日まで医療の現場等で使用されてきている。しかしながら、これらの漢方処方製剤について、生物学的

同等性に関する研究は殆ど行われていない。天然物である生薬を主原料とする漢方処方製剤には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。したがって、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。

我々はこれまでに、エキスが日本薬局方収載品目である葛根湯について、煎剤及びエキス製剤を対象にヒト投与試験を行い、局方の指標成分のエフェドリン (E) 及びプソイドエフェドリン (PE) について、漢方処方製剤において、同等性を判断する指標化合物となりうるかどうか検討を行い、良好な結果を得た<sup>3)</sup>。本研究では、第十六改正日本薬局方にエキスとして収載されており、かつ日本漢方生薬製剤協会が2012年11月16日発刊した「漢方製剤等の生産動態」において、漢方製剤の特掲医薬品に関する生産及び輸入金額が91品目中9位と、汎用漢方処方である小青竜湯<sup>4)</sup>を対象とした。小青竜湯の処方構成生薬はマオウ、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種類である。今回も処方構成生薬の一つであるマオウの指標成分であるE及びPEを分析対象として、小青竜湯湯剤と医療用小青竜湯エキス製剤について、それぞれをヒトに投与したときの血漿中濃度推移を明らかとし、両者の同等性について基礎的な検討を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬・試液

E 塩酸塩は第一ファインケミカル製を、PE 塩酸塩はアルプス薬品工業製をそれぞれ用いた。また、E- $d_3$  塩酸塩及びPE- $d_3$  塩酸塩は合成<sup>5,6)</sup>したものをを用いた。ヒト血漿はコージンバイオ製を、N-ヘプタフルオロイミダゾール (HFBI) はサーモフィッシュャーサイエンティフィック社製または東京化成製品を、ヘキサン及び酢酸エチルは関東化学製5000倍濃縮検定品をそれぞれ用いた。水はMilli-Q (日本ミリポア製) により精製されたものをを用いた。そのほかの試薬は全て試薬特級品を用いた。

### 2. 製剤の調製<sup>1)</sup>

湯剤は、土瓶にマオウ3g、シャクヤク3g、カンキョウ3g、カンゾウ3g、ケイヒ3g、サイシン3g、ゴミシ3g、ハンゲ6g及び水540mLを加え、加熱抽出し、ガーゼ4枚を重ね、熱時ろ過を行い、半量に調製したものを小青竜湯湯剤とした。本品中にEは11.6mg、PEは5.1mg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6.0gを使用した。本品中にEは11.1mg、PEは5.2mgを含有する。

### 3. 投与方法

被験者数は6とし、無作為に2グループとした。これら

について、湯剤、エキス製剤のクロスオーバー試験を行った。各グループに湯剤、エキス製剤を投与後、2週間おいて湯剤を投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤を投与したグループは湯剤を投与した。投与後、15分、30分、60分、120分、240分、480分に採血を行い、それらを分析に供した。

被験者の募集は大学病院医療情報ネットワーク研究センター臨床試験登録 (UMIN-CTR) において公募し、実施施設では口頭で募集を行った。食事は日頃の食生活を維持するようにし、試験前日の21時以降は絶食した。本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理方針」<sup>7)</sup>に従い、社団法人石川県医師会の治験審査倫理委員会及び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。

### 4. 分析方法<sup>5,6)</sup>

ヒト血漿1mLにE- $d_3$  塩酸塩 (0.3 $\mu$ g/mL)、PE- $d_3$  塩酸塩 (0.3 $\mu$ g/mL) 混液1mLと5mol/L水酸化ナトリウム溶液50 $\mu$ Lを加え、ヘキサン/酢酸エチル (9/1) 5mLで2回抽出した。有機層をあわせ、HFBI 100 $\mu$ Lを加え50 $^{\circ}$ Cで15分間加温した後、0.1mol/L塩酸を4mL加え、振とう、遠心分離後、有機層に無水硫酸ナトリウムを少量加え、減圧下で濃縮した。これにヘキサン/酢酸エチル (9/1) 200 $\mu$ Lを加え、そのうち1 $\mu$ LをGC-MSに注入した。

### 5. 装置及び分析条件

GC-MSは島津製作所GCMS-QP 2010を用いた。

カラムはDB-1701 (0.32mm i.d.  $\times$  30m, J&Wサイエンティフィック社製)を用い、注入口温度、イオン源温度はそれぞれ200、230 $^{\circ}$ Cとした。カラムオープンの温度設定は初期値を70 $^{\circ}$ Cとし、3.5分間保持後40 $^{\circ}$ C/minの昇温率で200 $^{\circ}$ Cまで昇温し、9.75分間保持した。キャリアガスにはヘリウムを用い、カラム流量を3.0mL/minに設定し、スプリットレス注入 (パージ開始2分)を行った。イオン化は電子衝突イオン化とし、イオン化エネルギーは70eVとした。E、PE及びE ( $d_3$ )、PE ( $d_3$ ) のモニタリングイオンとして254、257を設定し、selected ion monitoring (SIM) 法により測定した。

## 結果及び考察

湯剤及びエキス製剤投与後のE及びPEの血漿中濃度推移をそれぞれFig. 1及びFig. 2に示した。投与した湯剤とエキス製剤のE及びPEの含量が若干 (Eは4.5%、PEは1.9%)異なるため、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。C<sub>max</sub>は各採取時間における血漿中濃度の最高値の平均値として算出した。また、T<sub>max</sub>は各採取時間における血漿中濃度の平均値の最高値を示した時間として算出した。AUCは投与後8時間までの血漿中濃度の平均値をもとに台形法より面積値として算出した。

製剤間での各時間におけるE及びPEの血漿中濃度に有意な差は認められず、同様の濃度推移を示した。Table 1

にE及びPEの $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC, 及びMRTを示した。Eに関して, $C_{max}$ は、湯剤は41.6ng/mL, エキス製剤は42.9ng/mLであった。AUCは、湯剤は256ng/mL・h, エキス製剤は252ng/mL・hであった。またMRTは、湯

剤は1.86h, エキス製剤は1.81hであった。PEに関して, $C_{max}$ は、湯剤は18.7ng/mL, エキス製剤は19.8ng/mLであった。AUCは、湯剤は110ng/mL・h, エキス製剤は115ng/mL・hであった。製剤間でE及びPEの $C_{max}$ と

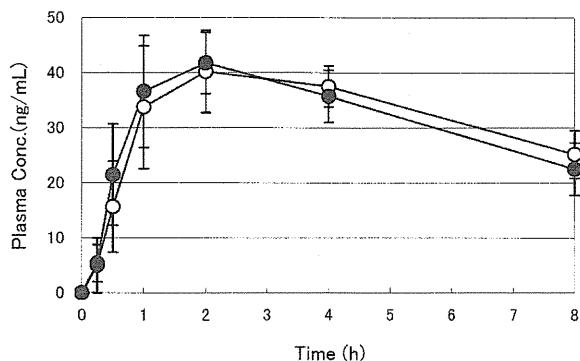


Fig. 1. Ephedrine の血漿中濃度推移 (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

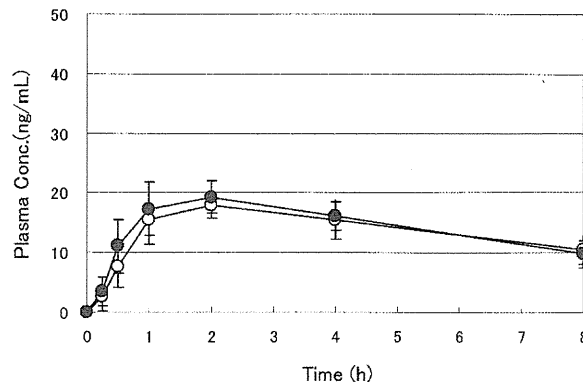


Fig. 2. Pseudoephedrine の血漿中濃度推移 (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ ) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

Table 1. 湯剤またはエキス製剤投与時の Ephedrine (E) 及び Pseudoephedrine (PE) の  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC, 及び MRT\*

		$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	AUC (ng/mL・h)	MRT (h)
E	湯剤	2	41.6 $\pm$ 6.1	256 $\pm$ 34.9	1.86 $\pm$ 0.05
	エキス製剤	2	42.9 $\pm$ 5.9	252 $\pm$ 33.4	1.81 $\pm$ 0.07
PE	湯剤	2	18.7 $\pm$ 2.2	110 $\pm$ 15.5	1.84 $\pm$ 0.06
	エキス製剤	2	19.8 $\pm$ 3.1	115 $\pm$ 16.4	1.78 $\pm$ 0.07

\*  $T_{max}$ : 最高血漿中濃度時間,  $C_{max}$ : 最高血漿中濃度, AUC: 血漿中濃度曲線下面積, MRT: 平均滞留時間, 値は平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 6$ ).

Table 2. E の分散分析表

変動要因		平方和	自由度	不偏分散	分散比	5%限界値
AUC	製剤	48.75	1	48.75	0.0992	7.71
	時期	54.24	1	54.24	0.1104	7.71
	被験者	9,640	5	1,928	3.923	6.26
	合計	11,709	11	1,064		
	残差	1,966	4	492		
$C_{max}$	製剤	4.94	1	4.94	0.2161	7.71
	時期	35.71	1	35.71	1.562	7.71
	被験者	233.3	5	46.66	2.041	6.26
	合計	365.4	11	33.22		
	残差	91.44	4	22.86		

Table 3. PE の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5%限界値
AUC	薬剤	86.27	1	86.27	0.6351	7.71
	時期	111.0	1	111.0	0.8173	7.71
	被験者	1,895	5	379.1	2.791	6.26
	合計	2,636	11	239.6		
	残差	543.3	4	135.8		
C <sub>max</sub>	薬剤	3.52	1	3.52	0.541	7.71
	時期	8.50	1	8.50	1.31	7.71
	被験者	35.7	5	7.14	1.10	6.26
	合計	73.7	11	6.70		
	残差	26.0	4	6.51		

AUC に有意な差は認められなかった。また、MRT は、湯剤は 1.84h、エキス剤は 1.78h であった。MRT は消失速度が同じと仮定すると吸収速度に依存することから、E 及び PE の吸収速度に製剤間で差が認められないものと考えられた。

Table 2 に E の、Table 3 に PE の C<sub>max</sub> 及び AUC についての分散分析の結果をそれぞれ示した。投与製剤及び投与時期の変動要因についても有意差は認められず、被験者によるばらつきが見られたものの、血漿中濃度推移は同等であった。そこで、本試験の検出力  $1-\beta^{8-11}$  を求め、十分な検出力があるかを検討した。その結果、E に関しては、AUC で 88%、C<sub>max</sub> で 62%、PE に関しては、AUC で 68%、C<sub>max</sub> で 48% であり、E の AUC で 80% を超えるものの、検出力はやや不十分であることが判明した。測定値のばらつきが被験者数を増やしても変わらないと仮定して検出力を計算したところ、一群の人数が 5、即ち被験者数が 10 の場合に AUC 及び C<sub>max</sub> の検出力が 80% を超えたことから、被験者数を増やせば十分な検出力が得られるものと考えられた。

前報<sup>3)</sup>において、葛根湯の湯剤とエキス剤の同等性に関する検討を、E 及び PE の血漿中濃度推移を指標として行っている。処方間でマオウの配合量が異なる（小青竜湯 3g、葛根湯 4g）ため、E 及び PE の投与量 1mg あたりに換算して今回の C<sub>max</sub> 及び AUC の結果と、葛根湯で得られたものと比較を行った。その結果、C<sub>max</sub> は小青竜湯に関して、E が湯剤で 3.59ng/mL、エキス剤で 3.69ng/mL、PE が湯剤で 3.67ng/mL、エキス剤で 3.88ng/mL であるのに対し、葛根湯では、E が湯剤で 3.47ng/mL、エキス剤で 3.68ng/mL、PE が湯剤で 3.98ng/mL、エキス剤で 4.18ng/mL となった。また、AUC に関しては、葛根湯の場合に合わせて 4 時間までの値を用いて比較を行ったところ、小青竜湯では、E が湯剤で 11.2 ng/mL・h、エキ

ス剤で 11.6 ng/mL・h、PE が湯剤で 11.3 ng/mL・h、エキス剤で 12.3ng/mL・h であるのに対し、葛根湯では、E が湯剤で 11.3ng/mL・h、エキス剤で 11.7 ng/mL・h、PE が湯剤で 13.2 ng/mL・h、エキス剤で 13.3 ng/mL・h となった。やや、PE での値が、C<sub>max</sub> 及び AUC とも、小青竜湯より葛根湯の方が大きい傾向が見られるが有意ではなく、どのデータにおいても、僅かにエキス剤の方が大きな値を示すことを含めて、小青竜湯での結果と葛根湯での結果に大きな違いはないものと考えられた。

以上、局方で規定された指標成分である E 及び PE の血漿中濃度を基に、小青竜湯の同等性についての基礎的検討を行った。その結果、E 及び PE については、被験者数を増やすことが必要となるが、煎剤及びエキス剤に関し、本処方の同等性の一部を確認出来る可能性が示唆された。また前報の葛根湯の結果と合わせると、E 及び PE は、マオウを含む漢方処方の同等性の判断の指標化合物になる可能性があると考えられた。

漢方処方製剤の主原料である生薬は天然物であり、処方製剤には多種多様な成分が含まれる。したがって、今回試験を行った E 及び PE だけで製剤間の同等性の評価を行うことできないことは明らかである。小青竜湯については、日本薬局方<sup>4)</sup>において定量法として E 及び PE 以外に、シャクヤクに含まれるペオニフロリン及びカンゾウに含まれるグリチルリチン酸が規定されている。これらの成分も指標成分となりうる可能性が考えられるが、今後、吸収・代謝の影響や分析方法等を総合的に考慮し、検討していく必要性があると考えられる。

本研究の一部は、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」「漢方処方製剤の安全性及び同等性の評価並びに生薬の品質確保と国際調和に関する研究」及びその継続研究によるもの

でありここに深謝する。

## 文 献

- 1) Notification No. 804 (Jun. 25, 1980), "Iryouyou Kampo Seizai No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of Evaluation and Registration Division, Director of Biologics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.
- 2) Notification No. 120 (May 31, 1985), "Iryoyo Kampo Ekisu No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of the 2nd Division of Evaluation and Registration, Director of the 1st Division of Evaluation and Registration, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.
- 3) Horii C., Okonogi A., Okubo T., Kamakura H., Goda Y., Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I), *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (1), 9-12 (2014).
- 4) The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 5) Nakano M., Morimoto Y., Tajima S., Kosaka N., GC-MS determination of *l*-ephedrine and *d*-pseudoephedrine in human plasma, *Yakugaku Zasshi*, **120**, 583-586 (2000).
- 6) Yamamoto K., GC/MS determination of ephedrine related compounds in the human plasma after oral administration of the traditional Chinese drug containing mahuang, *Medicine and Biology*, **111**, 157-160 (1985).
- 7) Notification No. 128001 (Dec. 28, 2004), "Rinsho Kenkyu Ni Kansuru Rinri Hoshin", Director-General of Health Policy Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare.
- 8) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., "Seibutsugakutekidotosei No Shikhenho Ni Tsuite No Kaisetsu", *Iyakuhin Kenkyu*, **13**, 1106-1119 (1982).
- 9) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., "Seibutsugakutekidotosei No Shikhenho Ni Tsuite No Kaisetsu—Tokei Kaiseki Part 2—", *Iyakuhin Kenkyu*, **13**, 1267-1271 (1982).
- 10) Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., "Seibutsugakutekidotosei No Shikhenho Ni Tsuite No Kaisetsu—Tokei Kaiseki Part 3—", *Iyakuhin Kenkyu*, **15**, 123-133 (1984).
- 11) Tokei Suchihyo Henshu Iinkai, ed., "Kanyaku Tokei Suchi Hyo", Nihon Kikaku Kyokai, Tokyo (1977).

## TLC による炙甘草と甘草の化学的識別

神本敏弘<sup>\*a,b</sup>, 余村かおり<sup>b</sup>, 菊地祐一<sup>b</sup>, 平倉一弘<sup>b</sup>,  
 牧野文昌<sup>b</sup>, 橋本和則<sup>b</sup>, 西村浩昭<sup>b</sup>, 碓井公利<sup>b</sup>,  
 袴塚高志<sup>c</sup>, 合田幸広<sup>c</sup>, 川原信夫<sup>d</sup>, 木内文之<sup>a</sup>

a 慶應義塾大学大学院薬学研究科, b 株式会社ツムラ, c 国立医薬品食品衛生研究所,  
 d 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

## Discrimination between Prepared Glycyrrhiza and Glycyrrhiza by TLC

Toshihiro Kammoto<sup>\*a,b</sup>, Kaori Yomura<sup>b</sup>, Yuichi Kikuchi<sup>b</sup>, Kazuhiro Hirakura<sup>b</sup>,  
 Bunsho Makino<sup>b</sup>, Kazunori Hashimoto<sup>b</sup>, Hiroaki Nishimura<sup>b</sup>, Kimitoshi Usui<sup>b</sup>,  
 Takashi Hakamatsuka<sup>c</sup>, Yukihiro Goda<sup>c</sup>, Nobuo Kawahara<sup>d</sup> and Fumiyuki Kiuchi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

<sup>b</sup>Tsumura & Co., 3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan

<sup>c</sup>National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>d</sup>Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation,  
 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

(Received October 22, 2013)

Prepared Glycyrrhiza is an important crude drug used in Kampo products and formulae such as Shakanzoto. However, no identification test evaluating a characteristic marker constituent for quality control of this crude drug has been established. In this paper, we compared the constituents of Prepared Glycyrrhiza and those of Glycyrrhiza by TLC and found three spots which exist in Prepared Glycyrrhiza but not in Glycyrrhiza. These spots were formed when Glycyrrhiza was heated above 130°C for more than 30 min. Among these three spots, two originated from sugars and were also found in heat-treated Astragalus Root. However, the other spot was characteristic for Prepared Glycyrrhiza and suitable as an indicator spot for an identification test of Prepared Glycyrrhiza. We developed a method to detect this spot by TLC which can be used as an identification test of this crude drug in the Japanese Pharmacopoeia.

**Keywords:** Prepared Glycyrrhiza, Identification test, TLC, Leguminosae

## 緒 言

炙甘草(シャカンゾウ)は、改訂一般用漢方処方の手引き<sup>1)</sup>に記載されている「炙甘草湯」に配合される重要な生薬である。日本の漢方で用いられる炙甘草(Prepared Glycyrrhiza)は、「日本薬局方カンゾウを煎ったものである」<sup>2)</sup>とされており、中華人民共和国薬典<sup>3)</sup>に記載されて

いる炙甘草(Prepared Licorice Root, 蜂蜜とともに煎ったもの:蜜炙甘草)とは異なる生薬である。炙甘草の製法は固定されたものではなく、一般的には、切断した日本薬局方(日局)「カンゾウ」を、褐色～淡褐色に色調が変化するまで焙煎(120～160°C, 15～30分間)して製されているが、炙甘草を特徴付ける化学的指標は報告されていない。また、その確認試験についても規定はなく、日局「カンゾ



ウ」の確認試験を準用し、グリチルリチン酸を確認するのが一般的である。このことから、炙甘草の日局収載を視野に入れ、炙甘草に特異的に確認される成分で、とりわけ甘草との差異が認められる成分探索を、簡便な分析方法である薄層クロマトグラフィーを用いて行った。その結果、炙甘草のクロマトグラムにおいて、甘草には認められない3つのスポットが確認され、このうちの1つがTLCによる炙甘草の確認試験の指標成分として利用できることを明らかにしたので報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 生薬材料

シャカンゾウ (1b~10b) 並びにそれを製するのに用いたカンゾウ (1a~10a, *Glycyrrhiza uralensis* 由来) の市場流通品は、公益社団法人東京生薬協会、日本生薬連合会、ならびに日本漢方生薬製剤協会の協力により収集した。*G. glabra* 由来のカンゾウ (11a~13a)、カクコン並びにオウギは、市場流通品を用いた。

### 2. 装置

以下の装置を用いた。

粉砕ミル：New Power Mill (大阪ケミカル), Vibration Sample Mill TI-100 (HEIKO)

シェイカー：Recipro Shaker SR-1 (TAITEC)

薄層板：シリカゲル 60F<sub>254</sub> (Merck)

展開槽：100-7D (矢沢科学)

噴霧瓶：ガラス製噴霧器 M 型 (SANSYO)

プレートヒーター：TLC Plate Heater III (CAMAG)

撮影装置：TLC Visualizer (CAMAG)

データ処理：winCATS Planar Chromatography Manager, Ver. 1.4.4.6337 (CAMAG)

キャピラリ：MICROCAPS (Drummond Scientific)

天秤：化学天秤 ED224S (SARTORIUS), ミクロ天秤 QB6 (Mettler-Toledo International), ME36S (SARTORIUS)

### 3. 試薬

以下の試薬等を用いた。

溶媒・試薬：メタノール, 酢酸エチル, エタノール(99.5), ジエチルエーテル (国産化学, 試薬特級), エタノール(95) (和光純薬, 日本薬局方), リン酸, 硫酸, 希硫酸, 酢酸(100), 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド

ド (和光純薬, 試薬特級), 1,3-ナフタレンジオール (和光純薬, 和光一級), 0.1mol/L 塩酸 (和光純薬, 容量分析用), 4-メトキシベンズアルデヒド (東京化成, 試薬特級), 2-プロパノール (和光純薬, 高速液体クロマトグラフ用)。

標準物質：ショ糖, D-(+)-グルコース (和光純薬, 試薬特級), D-(-)-フルクトース (和光純薬, 和光特級), アミノ酸 (L-Amino acid and glycine, kit containing 22 standards, Aldrich), グリチルリチン酸 (日本薬局方標準品), リクイリチン (和光純薬, 局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)), リクイリチンアピオシドは、甘草から単離し、スペクトルデータの文献値との比較によりその構造を確認した。

### 4. 試料調製方法

#### 4-1. 分析条件 I~III

シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

#### 4-2. 分析条件 IV

シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g に酢酸エチル 5 mL を加えて、15 分間振り混ぜた後、遠心分離して上澄液を取り除き、その残渣に酢酸エチル 5 mL 及び 0.1 mol/L 塩酸 5 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、その酢酸エチル層を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

### 5. 薄層クロマトグラフィー分析条件

#### 5-1. 分析条件 I

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(20 : 3 : 2)  
展開距離：約10 cm  
スポット量：20  $\mu$ L  
検出方法：4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

#### 5-2. 分析条件 II

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(7 : 2 : 1)  
展開距離：約10 cm  
スポット量：20  $\mu$ L  
検出方法：1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後、

105°Cで5分間加熱

#### 5-3. 分析条件 III

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(20 : 3 : 2)  
展開距離：約10 cm

スポット量：20  $\mu$ L

検出方法：噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧した後、風乾

#### 5-4. 分析条件 IV

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(7:2:1)

展開距離：約10 cm

スポット量：20  $\mu$ L

検出方法：4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

## 結 果

カンゾウ (*G. uralensis* 由来, 1a~10a) 及びこれらのカンゾウから製したシャカンゾウ (1b~10b) を用いて、薄層クロマトグラフィーの各種条件を検討した結果、実験の部に示した分析条件 I~III で、シャカンゾウにのみ見られるスポット A~C を見出した。すなわち、分析条件 I では  $R_f$  値 0.6 付近に赤橙色のスポット A (Fig. 1) を、分析条件 II では  $R_f$  値 0.3 付近に赤紫色のスポット B (Fig. 2) を、分析条件 III では  $R_f$  値 0.5 付近に桃色のスポット C (Fig. 3) を認めた。但し、シャカンゾウ (6b~8b) では、これらのスポットがほとんど認められなかった。

そこで、今回用いたシャカンゾウとその原料であるカンゾウについて、サンプルの色調、味、においの比較を行った。その結果、いずれの項目でもスポットが認められなかったシャカンゾウ (6b~8b) は、他のシャカンゾウに比べ対応する原料のカンゾウ (6a~8a) との性状 (色、におい) の差があまり感じられなかった。従って、これらのシャカンゾウについては、調製時の加熱不足が考えられた。

そこで、加熱不足と考えられたシャカンゾウ (6b~8b) のサンプルをプレートヒーター (約 130°C) で 30 分間加熱した後、再び分析を実施した。その結果、いずれのサンプルについても全ての条件で特異的なスポットが確認できた (Fig. 4)。以上のことより、これらのスポットは加熱による生成物に由来することが明らかとなった。

以上の結果から、加熱によって生成するこれらのスポットを確認することにより、カンゾウとシャカンゾウを識別することが可能であると考えられた。次に、それぞれの分析条件で検出されるスポットについて更に検討を行うことにした。

#### 1) 分析条件 I

シャカンゾウにのみ見られる  $R_f$  値 0.6 付近のスポット A

は、ロットにより、明瞭ではないものがあつたことから、展開溶媒及び抽出方法を種々検討した。その結果、展開溶媒を酢酸エチル/メタノール/水混液(7:2:1)に変更することでスポットのまとまりが改善された。抽出方法に関しては、シャカンゾウの粉末 1.0 g に酢酸エチル 5 mL を加えて、15 分間振り混ぜた後、遠心分離して上澄液を取り除き、その残渣に酢酸エチル 5 mL 及び 0.1 mol/L 塩酸 5 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、その酢酸エチル層を試料溶液とすることにより、 $R_f$  値 0.6 付近の赤橙色のスポット A がより明瞭となった (Fig. 5)。このスポット A は酸性条件で効率よく抽出されたことから、酸性物質であると推定した。後述するように、このスポット A はシャカンゾウに特徴的であり、上述の条件 (以降、この条件を分析条件 IV とする) を TLC によるシャカンゾウの確認試験として用いることが可能である。なお、この抽出条件では、カンゾウ及びシャカンゾウの両方で、スポット A と同様な色調を示すスポット X が  $R_f$  値 0.3 付近にも認められた。

#### 2) 分析条件 II

シャカンゾウにのみ見られる  $R_f$  値 0.3 付近の赤紫色のスポット B は、糖類の発色試液である 1,3-ナフタレンジオール試液で発色していることから、糖類が熱変化したものと推定した。そこでまず、カンゾウに含まれる糖類について TLC 分析を行った。カンゾウのメタノール抽出溶液を、薄層板にスポットし、2-プロパノール/酢酸(100)/ジエチルエーテル/水混液(4:3:2:1)を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧し、105°C で 5 分間加熱した。その結果、主としてフルクトースとショ糖を含むことが明らかとなった (Fig. 6)。そこで、ショ糖及びその構成糖のフルクトース、グルコースを 150°C で 30 分加熱したものについて、TLC 分析を行ったところ、フルクトース及びショ糖を加熱したもので、シャカンゾウの  $R_f$  値 0.3 付近の赤紫色のスポット B と一致するスポットが確認できた (Fig. 7) ことから、スポット B は糖類の熱変化体であることが判明した。

#### 3) 分析条件 III

シャカンゾウにのみ見られる  $R_f$  値 0.5 付近の桃色のスポット C は、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液により桃色に発色することから、ピロール環を有することが推測された。ピロール化合物はメイラード反応によって生じることが知られていることから<sup>4)</sup>、カンゾウに含まれる糖類

(フルクトース) と各種アミノ酸を用いて検討を行った。

薄層板にアミノ酸とフルクトースを混合スポットし、展開前に薄層板をプレートヒーター上で加熱 (130°C, 30 分間) し、冷後、酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 2) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧したところ、シャカンゾウに特徴的な  $R_f$  値 0.5 付近のスポット C は、アスパラギンとフルクトースから得られるスポットと一致した

(Fig. 8)。よって、スポット C はアスパラギンとフルクトースの加熱によって生成するものと推測される。

次に、上述のスポット A, B および C に対するカンゾウの加熱温度及び加熱時間の影響を検討した。カンゾウの細切品をプレートヒーターを用いて、110°C, 130°C 及び 150°C で、それぞれ 10 分、30 分及び 60 分加熱したものを、3 種の分析条件で比較した。その結果、加熱温度 110°C では 60 分間加熱したもので、いずれのスポットも確認できなかった。一方、130°C および 150°C では 30 分以上の加熱で、いずれのスポットも確認できた (Fig. 9)。また、これら検体を用いて日局「カンゾウ」の確認試験並びに日局「葛根湯エキス」の確認試験(5)の条件を用いて、グリチルリチン酸並びにリクイリチンの確認を行ったところ、いずれの加熱条件においても、両者ともに確認試験の結果に明確な変化は認められなかった (Fig. 10)。

上述の 3 つのスポットは、カンゾウを加熱することによって新たに生成するものであるが、これらがカンゾウを加熱することによって特異的に生成するスポット、すなわちシャカンゾウに特異的なスポットであるかを検証するために、日局収載生薬でカンゾウと同じマメ科の地下部を使用する生薬であるカッコン及びオウギについて比較検討を行った。これら生薬は本来加熱処理することはない生薬であるが、シャカンゾウを製する条件 (130°C, 30 分間) で加熱処理を行い、3 つの分析条件でのクロマトグラムを比較した。分析条件 IV (Fig. 11-A) では、 $R_f$  値 0.6 付近のスポット A はシャカンゾウ (1~3) のみで検出され、加熱処理したカッコン (4~6) 及びオウギ (7~9) では検出されなかった。一方、分析条件 II では、いずれの検体にも  $R_f$  値 0.3 付近の赤紫色のスポット B が認められ (Fig. 11-B)、分析条件 III では、加熱処理したオウギにも、 $R_f$  値 0.5 付近の桃色のスポット C が認められた (Fig. 11-C)。以上の結果から、分析条件 IV の  $R_f$  値 0.6 付近のスポット A が、他の条件から得られるスポット B および C より、シャカンゾウの指標成分としての特異性が高いと判断さ

れた。

日本薬局方にはカンゾウの基原種として *G. uralensis* の他に *G. glabra* も収載されている。そこで、もう 1 つの基原種である *G. glabra* についても、上記の分析条件 IV を用いて検討を行った。*G. glabra* 由来のカンゾウ (11a~13a) を、プレートヒーター (130°C, 30 分間) で加熱し、シャカンゾウ (11b~13b) を調製した。これらのカンゾウ及びシャカンゾウを、前述の分析条件 IV で比較した結果、いずれのロットにおいてもシャカンゾウに特異的な  $R_f$  値 0.6 付近のスポット A が検出可能であった (Fig. 12)。

#### 考察及び結論

*G. uralensis* 由来のカンゾウとこれと同一のロットを用いて製した市場流通品のシャカンゾウ 10 ロットについて、TLC を用いた化学的な識別が可能であるかを検討し、3 つの分析条件でシャカンゾウに特徴的なスポット A~C を見いだした。これらのスポットに対する加熱温度と加熱時間の影響を調べた結果、これらのスポットは 110°C の加熱では生成せず、カンゾウを 130°C 以上で 30 分以上加熱処理することで、生成が確認できることが明らかとなった。今回検討したシャカンゾウ 10 ロットのうちの 3 つのサンプル (6b~8b) については、シャカンゾウに特徴的なスポット A~C の確認が困難であった。しかし、これらのロットについて、再加熱処理を行ったところ、スポットが確認できるようになったことから、これらのロットについては、加熱温度が低かった或は加熱時間が短かった可能性が考えられた。

カンゾウと同じマメ科の地下部を用いる生薬であるカッコン及びオウギについて、130°C で 30 分間の加熱処理を行い、3 種の分析条件で検討した結果、分析条件 IV で検出される  $R_f$  値 0.6 付近のスポット A のみが加熱処理したカッコン並びにオウギでは検出されず、シャカンゾウに特有の成分であることが明らかとなった。また、スポット A は、日本薬局方収載のカンゾウの基原種である *G. uralensis* 及び *G. glabra* のいずれに由来する生薬においても検出可能であった。

以上の結果から、スポット A を確認することにより、シャカンゾウの TLC による化学的判別が可能となると考えられ、今回見出したサンプル調製法並びに TLC の条件を、シャカンゾウの確認試験として用いることができるものと考えられる。なお、今回得られたスポットの単離・構造決定については、別途報告する。

## 謝 辞

本研究にあたり、試料の収集にご協力いただいた公益社団法人東京生薬協会、日本生薬連合会、ならびに日本漢方生薬製剤協会の方々に感謝いたします。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金の補助を受けて実施した。

## References and Notes

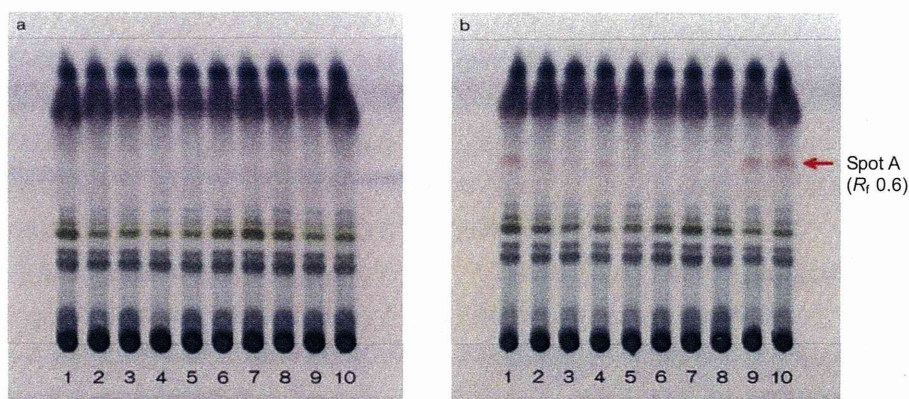
1) Goda Y., Hakamatsuka T., “Establishment of the approval standards for OTC Kampo products” ed. by Japan Kampo Medicines Manufacturers Association, Jiho Inc., Tokyo,

2009.

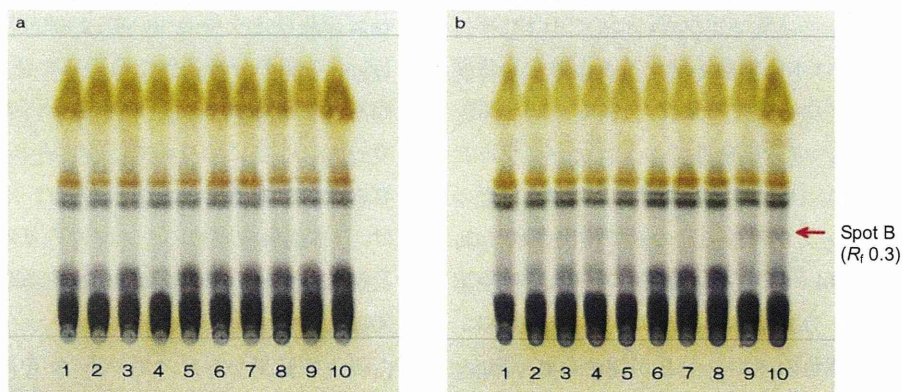
2) Japan Kampo Medicines Manufacturers Association, Japan Medicinal Plant Federation, “Crude drug self-imposed standards not listed on JP16 and non-JP crude drug standards 2012”, Ministry Notification No.1030001.

3) Chines Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010, China Medical Science Press, Beijing, 2010, p. 215.

4) Okumura J., *Denpun Kagaku*, 38, 81-92(1991).



**Fig. 1 TLC Comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b) (Condition I)**  
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (20:3:2), Detection; Spraying 4-methoxybenzaldehyde Test Solution then heated at 105°C.  
Red arrow indicates the spot specific for Prepared Glycyrrhiza (Spot A,  $R_f$  0.6).



**Fig. 2 TLC Comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b) (Condition II)**  
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (7:2:1), Detection; Spraying 1,3-naphthalenediol Test Solution then heated at 105°C.  
Red arrow indicates the spot specific for Prepared Glycyrrhiza (Spot B,  $R_f$  0.3).