

定量NMRと日本薬局方試薬への 定量NMRの応用

QNMR and its application to reagents in the Japanese Pharmacopoeia

国立医薬品食品衛生研究所生薬部

合田幸広

YUKIHIRO GODA

Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics

National Institute of Health Sciences

はじめに

第16改正日本薬局方第一追補では参考情報として、「核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用」が収載された。本稿では、定量NMRの基本的原理とSIトレーサビリティについて概説したのち、日本薬局方試薬への応用の現状と今後の予定について記載する。

1. 定量NMR

物質を溶液に溶解し、水素核検出核磁気共鳴(^1H NMR)を測定して得られるスペクトルは、測定した物質の化学構造によって異なる化学シフトに共鳴ピークを与えること、化学結合を通して隣接する炭素に結合する ^1H の数などに応じてピークが分裂を示すこと、信号強度(面積)が共鳴する ^1H の数に比例することなどから、物質の化学構造の決定に強力な分析法として多く利用されてきた。

^1H NMRスペクトルでは、同一分子内の異なる環境にある水素核が、共鳴周波数に応じて異なる化学シフトを持つ分離したピークとして観測されるため、化学シフトが異なる2つのピーク強度を比較することが可能となり、それぞれのピーク面積 S_i は、共鳴する ^1H 核の数 N_i 、溶液体積 V 、試料の質量 m 、分子量 M と純度 p 、励起パルス角 β 、信号を与える核の縦緩和時間 T_{1i} 、繰り返り積

算を行う際の遅延時間 T_r と平衡磁化 M_0 から、

$$S_i \propto N_i \frac{m}{VM} p \sin \beta \frac{1 - e^{-T_r/T_{1i}}}{1 - e^{-T_r/T_{1i}} \cos \beta} M_0$$

で示されることになる。ここで添え字の i は異なるピークを示し、緩和時間は ^1H の環境によって異なる。

NMRは一般に測定感度がよくないことから、スペクトルを取得する際に積算して信号雑音比(SN比)を向上させる。このとき、測定対象物質のプロトン中で最も長い T_1 より十分長い遅延時間 T_r で積算すると、測定対象となる化合物のすべてのピークに対して $1 - e^{-T_r/T_1} \approx 1$ の条件を満たすことが可能である。構造解析に利用する場合には、遅延時間を十分長くとらず、SN比を向上するために積算回数を多くする条件、すなわち、検出感度優先の測定が行われているため、分子内のピーク面積と ^1H の数の比は精密に求められていない。したがって、通常の構造決定で使用される条件では、定量値はおおまかな値でしかない。しかしながら、定量性が確保される条件、すなわち、測定対象物質のプロトンのなかで最も長い T_1 より十分に長い遅延時間 T_r (通常 $7T_1$ 以上)で測定を行い、この関係を分子間に対して応用すれば、それぞれの分子数に応じた面積比が得られることになる。

この定量性を確保できる条件下で、分子内の異なる化学シフトを示す共鳴ピーク(i, j)の面積を比較すると、

$$\frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j}$$

③ 定量NMRと日本薬局方試薬への定量NMRの応用

となり、ピーク面積が共鳴する¹Hの数に比例することが示される。

このようなピーク面積と¹Hの数の比例関係は、異なる2分子間に由来するピークにも適用することができる。この場合、試料溶液を測定する際の励起パルス角や溶液の体積は化合物によらず一定と考えられるので、得られる面積 S が測定対象の分子の純度、分子量、質量など測定する化合物のみに依存する値に比例した次式が得られることになる(a , s はそれぞれ測定対象物質と内部標準物質を示す)。

$$p_a = \frac{S_a N_s M_a m_s}{S_s N_a M_s m_a} P_s$$

それぞれの分子が溶液中で反応などの相互作用を起こさないこと、異なる化学シフトに分離したピークを有することなど必要な条件はあるものの、この条件下で¹H NMR測定を行うことで純度既知の標準物質があれば、測定対象物質の純度も計算できることになる。言い換えれば、正確な純度が付与された、分子量が既知の基準物質が上位標準として用意されれば、溶液¹H NMRを用いることで、同時に測定された同一溶液内の他の化合物の純度が決定できることを示している。

2. SIトレーサビリティ

世界には以下の7つの基本となる単位(国際単位系, International System of Units: SI)がある。Time (s), Length (m), Mass (kg), Electric Current (A), Thermodynamic Temperature (K), Amount of Substance (mol), Luminous Intensity (cd)。常識的なことであるが、日本の1 kgと米国の1 kgが等しいのは、国際キログラム原器を頂点とする切れ目のない比較の連鎖があるからといえる。トレーサビリティ(traceability)とは不確かさがすべて表記された、切れ目のない比較の連鎖を通じて、通常は国家標準または国際標準である決められた標準に関連づけられ得る測定結果または標準の値の性質と定義されている。定量NMRの場合には、国際標準である決められた標準に関連づけられる基準物質を内部標準として測定すると、測定対象物の物質質量(mol)が測定結果から計算上得られる手法であるため、SIへの計量トレーサブルな測定が可能となる。

SIトレーサビリティに関し、HPLC定量法と定量NMR

法との最大の違いは、HPLCでは測定対象物質と同じ化合物がSIトレーサビリティを持ち、このSIトレーサビリティを持つ物質を標準物質として検量線を作成しない限り、測定対象物質の物質質量はSIトレーサビリティを有することができないのに対し、定量NMRでは異なる化合物を内部標準物質として、測定対象物についてSIトレーサビリティを有する結果が得られることである。言い換えれば、定量NMRは1つのSIトレーサブルな物質があれば、異なった物質に対して、次々とSIトレーサブルな値をつけていくことができる拡大的な分析手法であることに特徴がある。

3. 定量NMR用基準物質と定量用ソフトの供給

定量NMRに使用する内部標準物質としては、図1に示したような化合物がこれまで使われている。近年、日本の国家計量機関である独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)より供給される認証標準物質(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、取り扱いの容易な固体化合物として、¹H NMRで特異的な化学シフトに鋭い1本のピークを示す有機溶媒用の1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- d_4 (BTMSB- d_4)、メタノールおよび水系用の3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸- d_6 -ナトリウム塩(DSS- d_6)が、内部標準物質として容易に入手可能となった。

これらのSIトレーサブルな値付けをされた内部標準物質と測定対象物質の質量をそれぞれ精密に量り取り、同一のNMR測定溶媒に溶解させ、定量NMRを測定すれば、測定対象物質の純度はSIトレーサブルな値として得られることになる。実際の定量NMRの測定には、前述した十分な T_1 値の設定以外に以下のような注意点がある。¹³Cサテライトシグナルのデカップリング、十分なデジタル分解能の設定、適切なパルス励起範囲とオーディオフィルタの設定などであった。しかしながら、NMRメーカーよりこのような注意点を考慮した測定ソフトが供給されるようになっており、現実的には誰でも容易に定量NMRを実施できることになっている。なお、機器のパルス発信の精度も直接的に定量精度に影響するため、精度の高い測定を行うためには、より新しい機器の利用が推奨される。

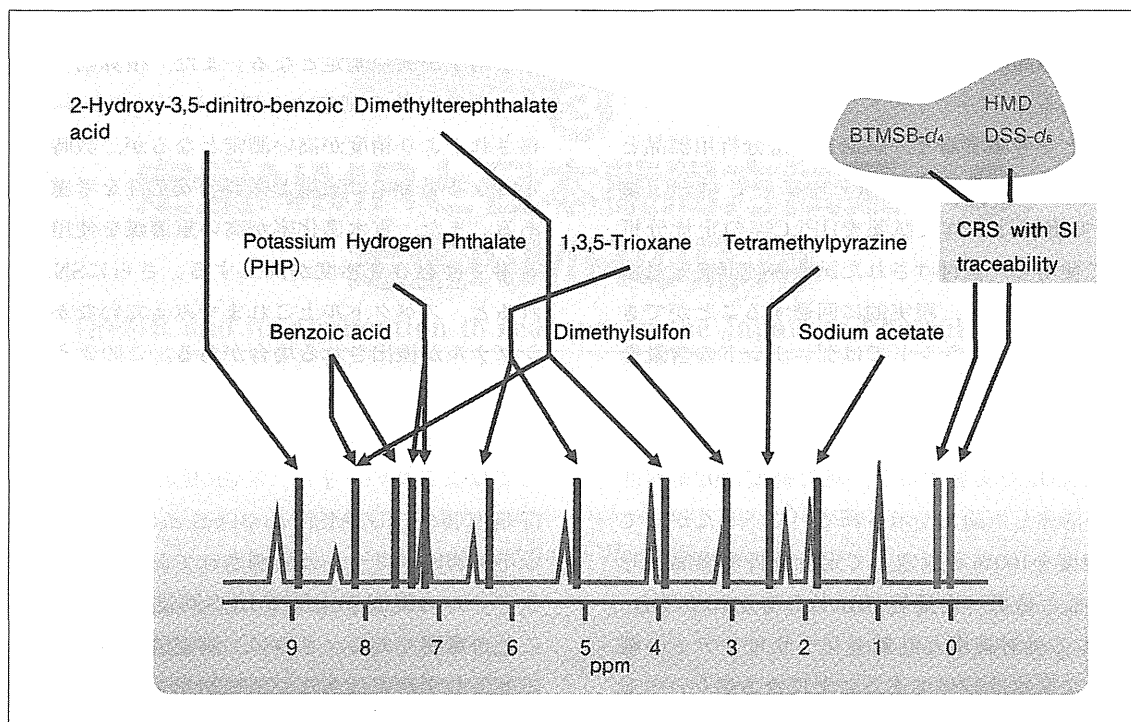


図1 定量NMRで使用される内部標準物質の例
(CRS : Certified Reference Standard)

4. 日本薬局方における生薬・漢方 処方エキス中の定量指標成分と 定量分析用標品の設定

日本薬局方における生薬、漢方処方エキスにおいて、定量値を規定する場合、定量指標成分が天然物であるため、多くの化学医薬品と同様に日本薬局方標準品を設定し用意するには、以下のような課題がある。

化学医薬品と異なり、生薬・漢方処方エキスは非常に多くの化合物の混合物であり、医薬品(生薬・漢方処方エキス)中の0.1～数%程度の含量の化合物を定量指標成分として設定する必要があるが、多くの場合、これらの化合物の合成は容易ではない。したがって、天然物より十分な純度を持つ化合物を精製、単離することになる。この場合、多大な労力が必要となり、標準品を準備する経済的コストが多くなる。また、原料の差、抽出、精製、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間格差が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい。また、天然物の場合、最大の不純物は水であることが多いが、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な化

合物を別途消費することになる。

このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキス各条規格では、多くの場合、日本薬局方標準品の設定が難しく、便宜上その時点で市販されている試薬、あるいは市販可能な試薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品と規定し、定量法と定量規格を規定している。ところが、このような試薬を定量分析用標品とした場合、得られた定量値は計量学的に値付けが行われていないものであるため、厳密に議論すると、その信頼性が問題となる。

このような天然物に由来する試薬の純度の問題は、定量NMRを用いることで解決することが可能である。すなわち、前述した原理に基づき、生薬中の定量指標成分として使用される試薬に対して定量NMRを用いて正しい含量を値付けすることができれば、試薬を計量トレーサビリティが保証された分析用標品として利用することが可能となる。バリデーション実験によれば、分子量300程度の測定対象化合物で、測定に10mg程度使用すれば、使用機器間誤差を含めても通常の実験室レベルで、有効数字2桁を保証しながら値付けが可能であることが示されている¹⁾。通常、生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり、規制値も0.1%が最小単位であることから、天然物である生薬ごとのばらつきを考慮すれば

⑤ 定量NMRと日本薬局方試薬への定量NMRの応用

ば、定量分析用標品の含量精度は有効数字2桁の保証で十分と考えられる。

これらのことを考慮すると、試薬を定量分析用標品として使用して得られた分析値のあいまいさは、定量NMRによって値付けされた試薬をHPLC等の定量分析用標品として使用し、値付けされた試薬の純度を定量値の算出に組み込むことで、現実的に回避することができる。例えば、局方「サンシシ」ではゲニポシドの含量をHPLC分析に基づき3.0%以上と規定しているが、定量分析用標品となる定量用ゲニポシドとして使用可能な試薬について定量NMRを実施すると、絶対純度は92%程度であることが前述した論文で示されている。したがって、この試薬の純度を100%と仮定して定量分析用標品としHPLCを実施した結果、定量値が3.0%と導かれる場合、定量NMRによる絶対純度と計量トレーサビリティの確保を考慮した定量値は2.8%であることになる。

現在、このような試薬に対する定量NMRは順次実施されており、定量NMRでSIトレーサブルな定量値(純度)が値付けされ、試薬・試液の項に規定されたものは、定量分析用日本薬局方試薬として利用可能である。さらに、定量NMRによって値付けされた試薬をHPLC等の定量分析用標品として利用し、値付けされた試薬の純度を対象化合物の定量値の算出に組み込んだ場合には、定量値はSIトレーサブルな値として扱うことが可能となる。

5. 定量NMR実施の際の現実的な注意事項

定量NMRを研究室レベルで実施するには、不純物のピークとの分離に要する分解能、さらには検出感度を考慮して、少なくとも ^1H 核で400MHz以上の共鳴周波数を持つ磁場で、 ^{13}C 核について精度よくゲート付きデカップリングできる機器で実施する必要がある。また、当然ではあるが、プローブのチューニングとシムが最適に調整され、受信機の受信感度が適正な条件で測定する必要がある。

前述したように、定量NMR実施の際のクリティカルポイントとして、内部標準物質と測定対象物質の秤量がある。両者の秤量には高い精度が求められることから、天秤の最小計量値を加味しウルトラマイクロ天秤を用い、かつ採取量は天秤の最小計量値以上でなければならない。また、溶解度を考慮しながら、なるべく増量して測定し

たほうがスペクトルのSN比が改善され、ほとんどの場合、より精度が高い測定となる。また、積算回数もなるべく多い積算回数で測定するほうがスペクトルのSN比が改善され、より精度が高い測定となるが、数時間以上の測定となる場合には磁場と機器の安定性を考慮する必要がある。また、重水素化率が高い重溶媒を使用するほうが、若干ではあるが感度が向上する。さらにSN比が改善されると、スペクトル上これまでみていなかった不純物シグナルが検出される場合がある。このような不純物に由来するシグナルの存在が明確になったときは、そのシグナルが存在する化学シフトの範囲は絶対に積分対象としてはならない。また、NMR測定用重水素化溶媒や内部標準物質のBTMSB- d_4 やDSS- d_6 においても、わずかな不純物のシグナルは観測されており、これらの不純物シグナルの範囲を定量NMRの測定の前に把握しておくことが重要である。さらに、測定溶媒中に長時間保存すると、わずかではあるが不純物シグナルが増えることが確認されており、定量NMRの測定は試料調製後、直ちに実施すべきである。なお、不純物シグナルの確認には定量NMR条件でNMRを測定する必要はないが、スピニングを行わず、 ^{13}C 核のデカップリング条件下で測定したほうが、サテライトシグナルとの区別が容易である。

6. 日本薬局方試薬における定量NMRの現状と今後の予定

日本薬局方生薬等で定量分析に使用される試薬は16局第一追補現在で、以下の化合物である。Aconite monoester alkaloids, Amygdalin, Arbutin, Barbaloin, Bufalin, (E)-capsaicin, (E)-cinnamic acid, Cinobugain, Curcumin, Dehydrocorydaline nitrate, Emetine hydrochloride, Geniposide*, [6]-Gingerol, Hesperidin, 10-Hydroxy-2-(E)-decenoic acid, Loganin, Magnolol*, Paeonol*, Perillaldehyde, Resibufogenin, Rhynchophylline, Rosmaric acid, Saikosaponin a, Saikosaponin b2, Saikosaponin d, [6]-Shogaol

これらの試薬のうち、*をつけた化合物について、本年度中に定量NMRで純度が値付けされたものが市販されることになっている。さらに、16局第二追補では新規な試薬として、Magnoflorineが収載予定であるが、本化合物も本年度中に値付けされたものが市販される予定である。16局第二追補では、生薬試験法に定量NMR法が収載されるとともに、試薬・試液の項に、これらの試薬

を使用する(定量NMRによる試薬純度を考慮した)HPLC定量法が各条に収載となる。なお、17局までは定量NMRで値付けされていない試薬を利用した従来法との併用が決まっている。したがって、16局第二追補の段階で具体的に定量NMRの影響を受ける各条は、サンシシ、サンシシ末、ボタンピ、ボタンピ末、コウボク、コウボク末、加味逍遙散エキス、黄連解毒湯エキス、半夏厚朴湯エキス、葛根湯加川芎辛夷(新規収載)などになると考えられる。

■参考文献

- 1) 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: *Pharm. & Med. Dev.Sciences*, 43, 182-193(2012)

定量 NMR とレギュラトリーサイエンス分野への応用

GODA Yukihiko

合田 幸広

国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

SI (国際単位系, The International System of Units) トレーサブルな定量分析法として, 定量 NMR (quantitative NMR, qNMR) が注目され, 公的な分析法として取り入れられつつある。本稿では, 同法の原理について概説の後, SI トレーサビリティとの関係を, クロマトグラフ法と比較して説明する。さらに, 食品や薬品, 環境化学物質等を, 国民にとって真の利益につながるように, 科学的に規制し, 調整するための科学であるレギュラトリーサイエンス分野での応用例について紹介する。

1 はじめに

物質を溶液に溶解し, 水素核検出核磁気共鳴 (^1H NMR) を測定して得られるスペクトルは, 測定した物質の化学構造によって異なる化学シフトに共鳴ピークを与えること, 化学結合を通して隣接する炭素に結合する ^1H の数などに応じてピークが分裂を示すこと, 信号強度 (面積) が共鳴する ^1H の数に比例すること等から, 物質の化学構造の決定に強力な分析法として多く利用されてきた。現代化学では, 物質の構造決定や状態推定には, NMR は欠くことのできない分析法であり, 多くの場合, 定性的な研究ツールとして捉えられている。しかし, 近年, NMR を物質の定量に応用するという考え方が広まりつつあり, 医薬品や食品といった生活関連物質について品質を確保し, 真の国民の利益にかなうように調整するためのサイエンス (レギュラトリーサイエンス) 分野においてさまざまな応用が図られるようになってきた。本稿では, 定量 NMR (quantitative NMR, qNMR) について概説した後, レギュラトリーサイエンス分野での応用について紹介する。

2 qNMR とは

^1H NMR スペクトルでは, 同一分子内の異なる環境にある水素核が, 共鳴周波数に応じて異なる化学シフトを持つ分離したピークとして観測されるため, 化学シフトが異なる 2 つのピーク強度を比較することが可能となり, それぞれのピーク面積 S_i は, 共鳴する ^1H 核の数 N_i , 溶液体積 V , 試料の質量 m , 分子量 M と純度 p , 励起パルス角 β , 信号を与える核の縦緩和時間 T_{1i} , 繰り返し積算を行う際の遅延時間 T_r と平衡磁化 M_0 から,

$$S_i \propto N_i \frac{m}{VM} p \sin \beta \frac{1 - e^{-T_r/T_{1i}}}{1 - e^{-T_r/T_{1i}} \cos \beta} M_0$$

で示されることになる。ここで, 添え字の i は異なるピー

クを示し, 緩和時間は ^1H の環境によって異なる。

NMR は一般に測定感度が良くないことからスペクトルを取得する際に積算して信号雑音比 (SN 比) を向上させる。このとき, 測定対象物質のプロトン中で最も長い T_{1i} より十分長い遅延時間 T_r で積算すると, 測定対象となる化合物のすべてのピークに対して $1 - e^{-T_r/T_{1i}} \approx 1$ の条件を満たすことが可能である。構造解析に利用する場合には, 遅延時間を十分長く取らず, SN 比を向上するために積算回数を多くする条件, すなわち, 検出感度優先の測定が行われているため, 分子内のピーク面積と ^1H の数の比は精密に求められていない。したがって, 通常の構造決定で使用される条件では, 定量値は, おおまかな値でしかない。しかしながら, 定量性が確保される条件すなわち, 測定対象物質のプロトンの中で最も長い T_{1i} より十分に長い遅延時間 T_r (通常 $7T_{1i}$ 以上) で測定を行い, この関係を分子間に対して応用すれば, それぞれの分子数に応答した面積比が得られることになる。

この定量性を確保できる条件下で分子内の異なる化学シフトを示す共鳴ピーク (i, j) の面積を比較すると,

$$\frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j}$$

となり, ピーク面積が共鳴する ^1H の数に比例することが示される。

図 1 に, クロトン酸エチルエステルについて, 構造決定で利用される。通常条件 (検出感度優先) と定量 NMR 条件 (定量精度優先) で測定した際の ^1H シグナルの積分値の違いを示す。このように通常条件では, 十分な遅延時間 (繰り返し時間) をとっていないため, 緩和時間が長いメチンシグナルは, 末端のメチルシグナルと比較して, 積分値は数% 小さく, 正確には ^1H の数に比例しないが, 定量 NMR 条件で測定すると, 積分値は ^1H の数に比例した値となる。

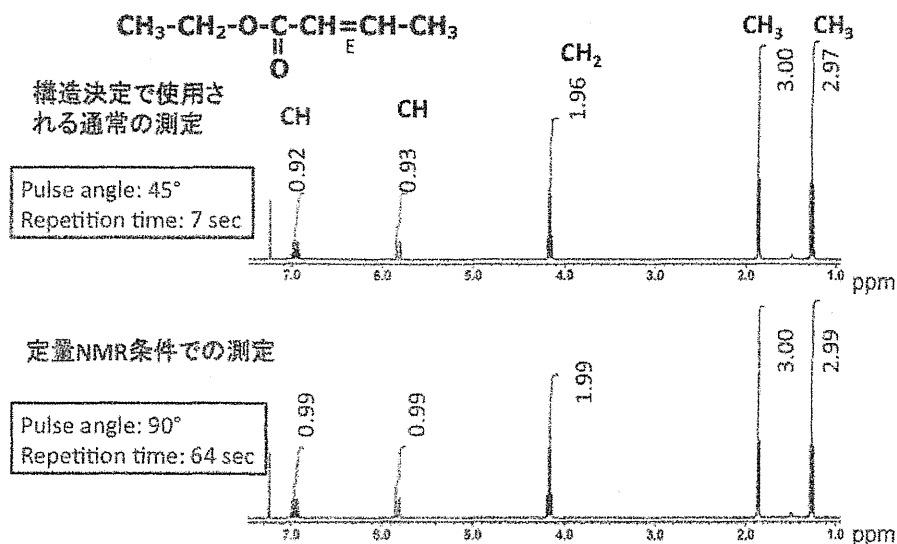


図1 通常条件と定量条件でNMRを測定した際のプロトンシグナル積分値の比較(試料はクロトン酸エチルエステル)。

このようなピーク面積と¹Hの数の比例関係は、異なる2分子間に由来するピークにも適用することができる。この場合、試料溶液を測定する際の励起パルス角や溶液の体積は化合物によらず一定と考えられるので、得られる面積Sが測定対象の分子の純度、分子量、質量など測定する化合物のみに依存する値に比例した次式が得られることになる(a, sは、それぞれ測定対象物質と内標準物質を示す)。

$$p_a = \frac{S_a N_a M_a m_s}{S_s N_s M_s m_a} p_s$$

それぞれの分子が溶液中で反応などの相互作用を起こさないこと、異なる化学シフトに分離したピークを有することなど必要な条件はあるものの、この条件下で¹H NMR測定を行うことで、純度既知の標準物質があれば、測定対象物質の純度も計算できることになる。言い換えれば、正確な純度が付与された、分子量が既知の基準物質が上位標準として用意されれば、溶液¹H NMRを用いることで、同時に測定された同一溶液内の他の化合物の純度が決定できることを示している。

3 SIトレーサビリティとqNMR用基準物質

世界には、以下の7つの基本となる単位(国際単位系、仏語: Le Système International d'Unités、英語: The International System of Units, SI)がある。Time (s), Length (m), Mass (kg), Electric Current (A), Thermodynamic Temperature (K), Amount of Substance (mol), Luminous Intensity (cd)。常識的なことであるが、日本の1kgと米国の1kgが等しいのは、国際キログラム原器を頂点とする切れ目のない比較の連鎖があるから

といえる。トレーサビリティ(traceability)とは、不確かさがすべて表記された、切れ目のない比較の連鎖を通じて、国際標準である決められた標準(上記の基本単位系)あるいは国家標準に関連づけられ得る測定結果または標準の値の性質と定義されている。qNMRの場合、国際標準である決められた標準に紐づけられる基準物質を内部標準として測定すると、測定対象物の物質質量(mol)が測定結果から計算上得られる手法(一次比率法)であるため、SIへの計量トレーサブル測定と考えることができる。

qNMRに使用する内標準物質として、これまでさまざまな物質が使われてきたが、近年、日本の国家計量機関である独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)より供給される認証標準物質(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、取り扱いの容易な固体化合物として、¹H NMRで特異的な化学シフトに鋭い1本のピークを示す有機溶媒用の1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン-d₄(BTMSB-d₄)、メタノール及び水系用の3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸-d₆=ナトリウム塩(DSS-d₆)が、内部標準物質として容易に入手可能となっ

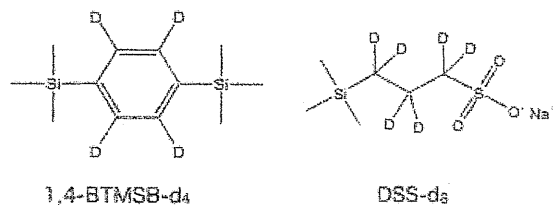


図2 定量NMRに使用されるSIトレーサブルな値付けをされた内部標準物質の構造式。



た(図2)。したがって、これらのSIトレーサブルな値付けをされた内部標準物質と測定対象物質の質量をそれぞれ精密にはかり取り、同一のNMR測定溶媒に溶解させ、qNMRを測定すれば、測定対象物質の純度は、SIトレーサブルな値として得られることになる。

4 クロマトグラフ定量法とqNMR法の違い

有機化合物はその分子構造に起因した固有の物性値を持っている。物性値とは、紫外可視吸収スペクトル、旋光度、屈折率などであり、HPLCやGCといったクロマトグラフ法は、これらの化合物ごとの物性値の違いを利用し、カラムによる分離と検出器による分子認識に頼った分析法である。検出器の応答性は化合物の分子構造に由来し、化合物ごとに異なるため、測定対象の化合物が異なれば、定量を行うため、それぞれの化合物に対して一つずつの標準物質を用意し、検量線を作成する必要がある。この標準物質が、SIにトレーサブルであれば、クロマトグラフ法で定量した結果は、SIトレーサブルな結果となるが、実際に市販されているSIトレーサブルな化合物は、クロマトグラフ法で定量される可能性のある物質数と比較して、僅かしかない(有機化合物の標準物質の整備・供給体制の強化は継続的に行われている。しかし、測定対象となり得る化合物は、ケミカルアブストラクト^{*)}に登録されている化合物だけでも7,000万以上である一方、世界中の公的な基準物質は、最大限多く見積もっても10,000以下と考えられる)。

一方、qNMRでは、測定対象物とは異なる化合物を内部標準物質として、測定対象物についてSIトレーサビリティを有する定量結果が得られる手法である。言い換えれば、qNMRとは、一つのSIトレーサブルな基準物質を用いることで、異なった物質に対して、次々と、SIトレーサブルな値をつけていくことができる分析法であり、qNMRは、SIトレーサビリティに関して、対象物拡大的な分析手法であることに特徴がある。

5 レギュラトリーサイエンス分野での応用

食品や薬品、環境化学物質等を、国民にとって真の利益につながるように、科学的に規制し、調整するための科学をレギュラトリーサイエンスと呼ぶ。このレギュラトリーサイエンスの分野で、最近qNMRが注目を浴びている¹⁻³⁾。

現在、食品分野の分析では、クロマトグラフ法が一般的に用いられており、さまざまな物質の分析値が報告されている。しかし、SIトレーサブルな標準物質の存否から、今日においても得られた分析値の信頼性が厳密に確保されているとは言えないものも存在することは事実である。例えば、食品中の農薬については、残留基準や、暫定基準が

設定されているが、これらの定量は、クロマトグラフ法で実施される。この場合、定量用標品として、通常市販の試薬が用いられるが、従前、これらの試薬の純度は、クロマトグラフ法のみで保証され、絶対的な純度を示すものではなかった。したがって、規定されたクロマトグラフ上に現れない標品の不純物量は全く無視されるようになっていた。最近になり、qNMRの考えが広まるにつれ、試薬メーカーもqNMRを使用して、絶対的な純度に不確かさをつけて標準品を販売するようになった。このような標準品を使用して、ユーザーがクロマトグラフ法で食品中の残留農薬を測定し、試薬の純度を計算式に入れて、残留量を定量すれば、この値は、SIトレーサブルな値として、使用できることになり、定量値の信頼性が圧倒的に向上することになる。

また、クロマトグラフ法を介さずに、qNMRを直接食品分析に応用する例も、多く報告されるようになってきた。例えば、ソバ中のルチンおよびクエルセチンの含量測定は、天然物化学あるいは食品分析学の実習課題として採用している大学も多く、その実習の手引き書には、「高速液体クロマトグラフ(HPLC)により市販試薬を標品とした絶対検量線法で定量すること」と記載されている。しかし、市販試薬の純度は、農薬分析に用いられる定量用標品の場合と同じくクロマトグラフ法でしか保証されていないため、得られた値は、計量学的に保証されたもの(SIトレーサブルなもの)とは言えない。他方、ソバの抽出エキスについて、SIトレーサブルな内部標準物質を使用しながらqNMRスペクトルを測定し、得られたルチンおよびクエルセチン由来の分離したピークのシグナル面積から、直接これらのエキス中の両化合物量を定量すれば、得られた値はSIトレーサブルな値となる。

図3に、市販の韃靼そば抽出物について、直接qNMRを測定したチャートを示す。この時点では、まだBT-MSB-*d*₄が市販されておらず、HMD(ヘキサメチルジシラン)を定量基準物質として使用している。図で明らかのように6 ppmより低磁場領域には、フラボノイドであるクエルセチン由来のシグナルが、他のシグナルと明瞭に分離し出現しており、このシグナルを利用して試料中のクエルセチンの含量を直接定量すると、その含量は1.58±0.14 mgとなる。一方、あらかじめ市販試薬クエルセチンの純度決定をqNMRで行った後にHPLCによる絶対検量線を作成し、HPLCで定量すると、その値は1.54±0.12 mg/gとなり、この値は(当然ながら)、直接qNMRで定量したものと、非常に良く一致している⁴⁾。

このような結果は、qNMRを直接的に、食品中の化合物の絶対量分析に使用できることを示している。したがって、qNMRによる直接分析は、クロマトグラフィーによる分離操作を必要としない点、測定対象化合物ごとに検量

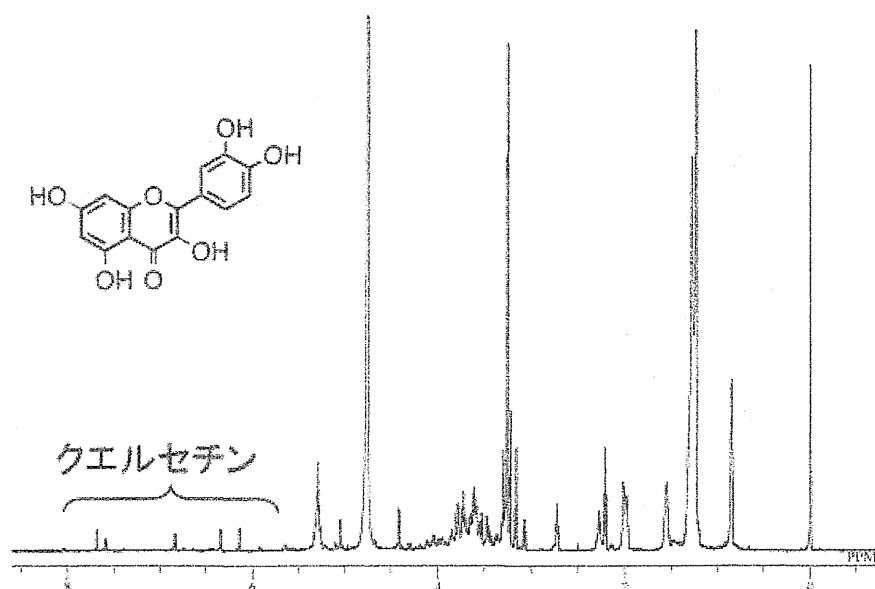


図3 クエルセチンの構造式と韃靼そば抽出物の定量NMRチャート。

線の作成を必要としない点において、ハイスループット (high-throughput, 短時間での大量処理可能) な手法と言え、多検体を処理していく必要のある食品分野の定量分析において、非常に有効であるものと考えられる。

平成23年8月31日、食品添加物(防かび剤)であるフルジオキソニル(fludioxonil; 図4)^{*2}の定量用標準物質の規格において、DSS-d₆を内部標準とした、qNMR法が公定法として採用された(食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品に関する省令の一部を改正する命令、府令・省令: 内閣府・厚生労働5号; 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件、告示: 厚生労働307号)。このように、qNMR法を積極的に、公的な定量分析法において利用しようという動きは、薬品分野でも明らかになっている。

日本薬局方^{*3}は、日本の医薬品の規範書であるが、直近の改正である第16改正日本薬局方第一追補¹⁾において、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。日本薬局方では、化学的合成品である医薬品の定量の際、ほとんどの場合、純度を公的に保証した日本薬局方標準品が供給されることを前提として、医薬品の定量規格を規定してきた。一方、天然物由来の医薬品である、生薬、漢方処方エキスで指標成分の定量値を規定する場合、指標成分が天然物であるため、多くの化学医薬品と同様に日本薬局方標準品を設定し用意するには、以下のような課題があることが指摘されてきた。

化学医薬品と異なり、生薬・漢方処方エキスは非常に多くの化合物の混合物であり、医薬品(生薬・漢方処方エキス)中の0.1%~数%程度の含量の化合物を定量指標成分

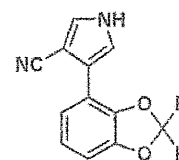


図4 防かび剤フルジオキソニルの構造式。

として設定する必要があるが、多くの場合これらの化合物の合成は容易ではない。したがって、天然物より、十分な純度を持つ化合物を精製、単離することになる。この場合、多大な労力が必要となり、標準品を準備する経済的コストが多くなる。また、原料の差、抽出、精製、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット^{*4}間格差が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい。また天然物の場合、最大の不純物は水である場合が多いが、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法^{*5}を利用することになり、水分含量規定のために貴重な化合物を別途消費することになる。

このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキス各条規格では、多くの場合、日本薬局方標準品の設定が難しく、便宜上その時点で市販されている試薬、あるいは市販可能な試薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品と規定し、定量法と定量規格が規定されている。ところが、このような試薬を定量分析用標品とした場合、標品の純度規格は、計量学的な値付けが行われていないため、前述の食品分析の場合と同様、信頼性の問題が生じることになる。

例えば、局方サンシシ^{*6}では、指標成分ゲニボシド(図5)の含量をHPLC分析に基づき3.0%以上と規定しているが、定量分析用標品となる「定量用ゲニボシド」として使用可能な試薬についてqNMRを実施すると、絶対純度は92%程度であることが論文³⁾で示されている(図5のNMRのチャートでわかるように、この場合、ほとんどの不純物は水である)。したがって、この試薬を定量分析用標品(試薬純度を100%と見なすことになる)としてHPLCを実施した結果、定量値が3.0%と導かれる場合、qNMRによる絶対純度と計量トレーサビリティの確保を考慮した定量値は、2.8%であることになる。また、このような分析用標品のひとつであるバルバロインについて、qNMRでその絶対純度を測定すると、2つのロットで異なる値が得られることが報告されている。この場合、分析用標品のロットが変わると、同一分析対象物でも、定量結果が変わることが、容易に予想される。上記の第16改正日本薬局方(第16局)第一追補での「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」の取載は、このような問題を根本的に解決する手法として、qNMRを、天然物医薬品の定量分析の分析用標品の純度決定に今後、使用していく方針を示したものである。また、平成26年3月の第16局第二追補の公布までに、前述したゲニボシドに加えて、ペオノール^{*7}、マグノロール^{*8}、マグノフロリン^{*9}(図6)について、qNMRで値付けされた分析用標品が、試薬会社から供給されることになっている。したがって、これらの試薬を利用して、日本薬局方における、サンシシ、サンシシ末、ボタンピ、ボタンピ末、コウボク、コウボク末と、加味逍遙散エキス、半夏厚朴湯エキス等複数の漢方処方エキスにおいて、qNMRの定量結果に基づいた指標成分の定量が可能とな

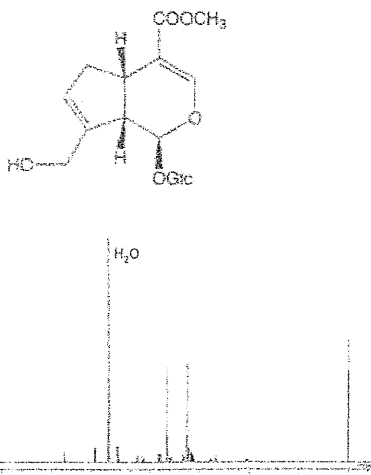


図5 生薬「サンシシ」の指標成分ゲニボシドの構造式と「定量用ゲニボシド」の定量NMR例。

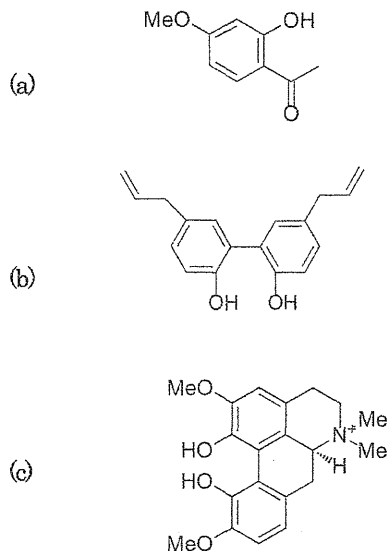


図6 ペオノール(a)、マグノロール(b)、マグノフロリン(c)の構造式。

る予定である。

6 おわりに

NMRは、化学分析機器の中では、飛び抜けて高価な機器(400 MHzクラスで数千万円、600 MHzクラスで1億円、800 MHzクラスで3億円、900 MHz以上のクラスだと10億円程度)のひとつである。したがって、qNMRによる直接的な定量分析は、NMRを自由に使用できる環境にある人しか行うことができない。一方、qNMRを利用した、試薬の絶対純度の値付けは、日本の試薬会社だけでなく、海外の会社が供給する試薬でも行われつつある。このように、試薬会社がqNMRを自社の試薬について実施し、この試薬を用いて分析者が定量クロマトグラフィーを実施すれば、広い範囲の分野でqNMRの恩恵を直接的に受けたSIトレーサブルな分析が可能となる。このような利点があるため、今後、qNMRは、レギュラトリーサイエンスの分野で積極的に利用されていくものと考えられる。また、化合物の絶対純度は、化合物の比活性等を正確に測定するために非常に重要であり、今後、幅広い分野で、利用されていくことは、確実なものと考ええる。

参考文献

- 1) 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。
- 2) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀. FFIジャーナル 2010, 215, 129.
- 3) 合田幸広. *Pharm. Tech. Japan* 2012, 25, 2795.
- 4) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 田原麻衣子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治. 日本食品化学会誌 2010, 17, 179.

- 5) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010, 41, 960.

用語解説

- *1 ケミカルアブストラクト: アメリカの化学会の下部組織 CAS (Chemical Abstracts Service, キャス) が発行している化学および関連分野の文献抄録誌。1907年に創刊され, 世界最大の化学のデータベースである。以前は, 冊子体のみの発刊であったが, 1996年以降, CD-ROM版も発刊, オンラインでの利用も可能である。ケミカルアブストラクトに採録された化合物には, 化学物質を特定するための CAS 登録番号が付加される。現在1日あたり14,000の物質が登録されている。
- *2 フルジオキノニル: フェニルピロール系の非浸透移行性の防かび剤で, ブドウ及び野菜類の灰色かび病に対する茎葉散布剤, 麦類の種子消毒剤として使用され, 国内では, 食品添加物としての規格基準が定められている。
- *3 日本薬局方: 医薬品の性状および品質の適正を図るため, 薬事法第41条に基づき, 厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて定めた医薬品の公的な規範書。初版は明治19年6月に公布された。医薬品の開発と試験技術の向上, 医療需要の変化等に伴い, 改訂が重ねられ, 直近では, 第十六改正日本薬局方(第16局)が平成23年3月に告示。現在は, 5年ごとに改訂されている。また, 5年間の大改訂間に2回の追加が告示され, 最新版は, 平成24年9月に告示された第16局第一追補。
- *4 ロット: 生産管理上の製品の単位のこと。同じ原材料から, 同一の製造工程で同時期に生産された製品が同一ロットの製品となる。薬事法で定められた省令「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」によれば, ロットとは, 一の製造期間内に一連の製造工程により均質性を有するように製造された製品及び原料の一群とされている。合成物であれば, 同様の原材料で, 同一の製造工程で別時期に生産しても, 製品間のばらつき(ロット間格差)は少な

い, 他方, 天然物由来製品の場合, 医薬品であったとしても, 原材料の構成成分のばらつきが大きく, ロット間格差は大きいといえる。本文で述べている化合物名で販売される天然物由来の試薬の場合, 数%程度対象物を含む原材料から, 抽出, 精製, 単離工程を経て, 90~99%程度の純度の対象物を得ることになり, ロットが異なれば対象物の純度と不純物構成も異なることになる。実際に, 試薬で販売されている天然物の純度をみると, ロット間で数%程度のばらつきは, 日常的に観察される。

- *5 カールフィッシャー法: 電量あるいは容量滴定により, 対象物中の微量の水分を絶対定量する方法。全体の反応は, I_2 による SO_2 の酸化反応であり, 1モルの I_2 が反応する際, 1モルの水が消費されるという原理に基づく。水分含量測定法としては, 正確な方法であるが, 反応セルの中に対象物を加えるため, 水分含量を測定した対象物は, 実質的に回収できない。
- *6 サンシシ: アカネ科クちなシ (*Gardenia jasminoides* Ellis) の果実を基原とする生薬。漢字で書くと山梔子。解熱, 消炎, 止血等の薬効が知られている。正月料理キントンの着色に用いられるが, この着色成分の一つがゲニポシドである。
- *7 ペオニール: ボタン科ボタン (*Paeonia suffruticosa* Andrews) の根に含まれるフェノール成分。アセトフェノン骨格を持ち, 鎮静, 運動量抑制, 解熱, 抗痙攣作用等を持つ。
- *8 マグノロール: モクレン科ホオノキ (*Magnolia obovata* Thunberg) 等 *Magnolia* 属植物に含まれるフェニルプロパノイド二量体。中枢神経抑制作用や, 抗ストレス潰瘍作用等が知られている。生薬コウボク(厚朴)は, ホオノキの樹皮を基原とする。
- *9 マグノフロリン: チロシンから生合成されるベンジルイソキノリンアルカロイドの一種。生薬では, 前述したコウボクの他に, シンイ(辛夷), オウレン(黄連)などに含まれる。抗 HIV 作用等が知られている。

【連絡先】158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (勤務先)。



生薬規格の国際標準化と国際調和の動向
(ISO/TC249 と FHH)

川原信夫

特集

国際標準化と漢方：ISO/TC249 を中心に

生薬規格の国際標準化と国際調和の動向
(ISO/TC249 と FHH)

川原信夫

Key words ISO/TC249, FHH, pharmacopoeia, crude drug, medicinal plant

はじめに

現在、ISO/TC249 における国際標準化作業では、5つの作業グループ (WG1～5) が設置され、各種作業が遂行されているが、筆者はそれらのWGのうち、原料生薬及び伝統的加工法を担当するWG1の主査を拝命している。そこで本特集では、筆者が担当するWG1の現状を報告すると共に、2002年に設立された「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 (The Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines)」における日本の取り組みについて、主として筆者がFHHの専門部会において担当してきた西太平洋地区4ヵ国 (日本、中国、韓国、ベトナム) 薬局方の各種比較表作成に関する内容並びに作成の際に得られた知見の概要を中心に解説する。

1. WG1 の設置から ISO/TC249 WG1
北京会議までの動向について

WG1は、2011年5月のオランダ・ハーグにおける2nd ISO/TC249 plenary meeting において原料生薬及び伝統的加工法を取り扱う作業グループとして設置された。その直後、中国よりニンジンの種子及び種苗に関するNWIP (new work item proposal) “Standardization on seed and seedling standards of ginseng” が提出された。参加各国による投票の結果、NWIPは承認され、中国は引き続きWD (working draft) を作成し、審議を継続することとなった。

そこでWG1幹事国である中国は、上記WDの審議も兼ねた第1回ISO/TC249 WG1会議を2011年12月、北京において主催した。その際、中国から提出されたニンジンの種子及び種苗に関するWD “Ginseng Seeds and Seedlings - Part 1: *Panax ginseng* C.A. Meyer” は特に大きな反対はなく承認され、韓国・大田における plenary

2013年1月28日受理

KAWAHARA Nobuo: Recent progress of international standardization and harmonization of crude drugs and medicinal plants - Activity of ISO/TC249 and FHH (The Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines) -

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：〒305-0843 茨城県つくば市八幡台1-2

meetingに付議されることとなった。また、日本はWG1と2の切り分けに関して、WG1では2011年5月のハーグにおけるresolutionに基づき、採取直後の乾燥や洗浄など(basic processing)のみを扱うとの提案を行ったが、最終的にprocessingとdecoction piecesをWG1のスコープに含むことが承認された。また、韓国からニンジン及びニンジン製剤の微生物限度試験、重金属限度試験等に関する3種類のNWIPが提出されたが、2012年2月末までに内容を整理して再提出することとなり、再提出されたNWIPに対して日本は、ニンジンに限らず生薬全般に対応できる内容が良いのではないかと、またWG1と2の切り分けについて再検討すべきとのコメントを提出し、これらの内容に関して韓国・大田で開催予定のWG1 meetingで議論されることとなった。

2. ISO/TC249 WG1

大田会議の動向について

3rd ISO/TC249 plenary meetingの会期中、第2回ISO TC249 WG1会議が5月22日、韓国・大田のKIOM (Korea Institute of Oriental Medicine)において開催された。今回のWG1会議では、まずWG1と2の切り分けについて、WG2幹事国であるドイツより提案がなされた。すなわちWG1では、採取直後の洗浄、切細、乾燥などのbasic processingまでを対象とし、dried raw materialの品質及び安全性評価は行わないとすること、さらにindividual standards for traditional processing (中国における炮製)に関しては本来、WG2の範疇であるが、今回はその部分においてのみWG1の飛び地として扱い、品質及び安全性評価は行わないこととされた。審議の結果、本提案は了承され、翌日のWG2に付議されることとされた。

続いてカナダよりアメリカニンジンに関する提案“The standard development of standardization

on seed and seedling standards of ginseng - *P. quinquefolius*”が行われた。審議の結果、PWI (preliminary working item)として承認されたが、まだ不完全な部分が多いので、次のステップに進ませず、さらなる情報を付加した上で、NWIPに進むことに関して再度審議することとされた。さらに中国よりニンジンの種子及び種苗に関するWD “Ginseng Seeds and Seedlings - Part 1: *Panax ginseng* C.A. Meyer”の修正案についての説明が行われた。本案件は、特に大きな反対はなく承認され、CD (committee draft)として提出されることが承認された。また、中国より生薬の重金属限度値に関するNWIP提案“Limited Value Standard of Heavy Metal in Traditional Medicine Material”が行われ、審議の結果、投票にかけられることとされた。日本より、本提案に関してInternational Standardは相応しくなく、Technical SpecificationあるいはPublicly Available Specificationにするべきとの意見が出されたが、受け入れられなかった。

一方、韓国よりニンジン及びニンジン製剤の重金属限度試験 (Determination of arsenic, cadmium and lead in Ginseng and Ginseng products by inductively coupled plasma spectrometry)、微生物限度試験 (Microbiological quality control of ginseng and ginseng products) 及び農薬限度試験 (Ginseng and ginseng products - Determination for pesticide multi-residues - Method by GC/MS/MS and LC/MS/MS)に関するNWIP提案が行われた。審議の結果、3件とも投票にけることに関して承認はされなかったが、PWIとして今後も引き続き考慮されることとされた。さらに韓国より韓当帰 (*Angelica gigas*)の種子と種苗の国際標準化に関するPWI提案“Standards for seeds and seedlings of Cham Dang Gui (*Angelica gigas*)”がなされた。審議の結果、本案件は国際性が低いことからNWIPに進

むことに関して承認はされず、他国の栽培状況等に関する情報を収集する旨、示唆がなされた。

3. 大田会議以降の動向

大田会議で承認されたニンジンの種子と、種苗に関するCD案の投票用最終原案が、2012年7月25日に中国より提出され、10月25日締め切りで投票がなされた。WG1では、CD案に賛成として投票を行ったが、コメントとして、オタネニンジンは食品や化粧品にも広く使用されている現状であるため、今回の標準案の対象は医薬品に限ることと理解している旨申し添えた。本CD案は可決され、次のステージであるDIS (Draft International Standard) へステップアップし、WG1の手を離れた。さらに11月15日には中国より天然物由来のTCM (Traditional Chinese Medicine) の重金属に関するNWIP “Heavy metals in natural materials of Traditional Chinese Medicine (TCM)” 投票用原案が提出され、本年2月16日の投票締め切りを見据え、現在国内審議を行っているところである。

4. FHHの概要と 日本の取り組みについて

近年、漢方薬あるいは生薬への関心が高まる中で、名称の類似、同名異物等の問題が表面化してきている。生薬の安全性を確保し、有効利用を考える上で、生薬の正しい認識と理解が必須であり、各国で使用されている生薬に関する情報を収集、整理し、共通認識を得ることは生薬、薬用植物の国際調和の観点からも非常に重要と考えられる。このような背景から2002年3月に北京において「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)」設立のための国際会議が開催された。本フォーラムでは、西太平洋地区の6ヵ国7地域 (日本、中国、韓国、ベトナム、シンガポール、オーストラリア、香港) の生薬・

薬用植物の規制に関する関係者が一堂に会し、生薬・薬用植物の安全性、有効性及び品質に関する技術的な記録とコンセンサスを提供することが目的に掲げられた。日本はその下部組織である Nomenclature and Standardization に関する Sub-Committee 会議を主催することを受諾し、2002年5月、FHH 東京会議が開催された。本会議において以下の5つの専門部会 (Expert working group, EWG) が設立された。

EWG 1: Nomenclature

EWG 2: Testing Method in Monographs

EWG 3: List of Chemical Reference Standards (CRS) and Reference of Medicinal Plant Materials (RMPM)

EWG 4: List of Analytically Validated Method

EWG 5: Information on General Test

これらの専門部会では、それぞれの分野における各国薬局方の比較表を作成することが課題事項として議決され、EWG 2の責任者となった筆者は、試験法及び規格値に関する比較表の作成について担当することとなった。本編では、主として著者がFHHの専門部会において取り組んできた各種比較表の作成並びに比較検討により得られた知見の概要について説明する。

5. 西太平洋地区4ヵ国 (日本、中国、韓国、ベトナム)の 薬局方収載生薬の比較検討について

1) 各種試験法並びに規格値の比較¹⁾

EWG 2では将来的な国際調和を踏まえ、各国の薬局方収載生薬について共通点と相違点を認識すること目的として、日本、中国、韓国、ベトナム4ヵ国の薬局方に収載された生薬の試験法並びに規格値について比較表を作成し、比較検討を行った。比較表は、EWG 1 (Nomenclature) の責任者である酒井博士が作成した共通生薬 (103種) の比較表をもとに各国の確認試験、純度試験、

乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量及び定量法の各項目について試験法の設定の有無, 試験方法, 規格値について作成した。

この結果, 4カ国局方すべてにおいて共通の基原植物に由来する生薬は57種であった。4カ国共通生薬57種に関して比較を行った場合, 確認試験, 純度試験, 灰分の3項目についてはすべての局方においてほぼ設定がなされており, 特にTLC法を用いた確認試験が普及していることが明らかとなった。一方, 乾燥減量, 酸不溶性灰分, エキス含量等は設定されていない国が多かった。また, 定量法に関してはカンゾウ, ボタンピ, ホミカにおいて共通の指標成分が各局方に設定されていたが, 試験法や規格値に相違点が認められた。

本比較表より, 東アジア地区4カ国の薬局方の共通点, 相違点が明らかとなった。特にベトナム薬局方(VP)と中華人民共和国薬典(CP), また日本薬局方(JP)と大韓民国薬局方(KP)との間にはそれぞれ共通点が多かった。これは局方作成に当り, VPはCPをKPはJPをそれぞれ参考にして作成されているため, このような結果が得られたものと推測された。

2) 確認試験におけるTLC条件及び

定量法における分析条件の比較²⁾

本検討では前述の比較研究において対象とした共通生薬103種に, CP 2005年版において基原植物の変更, 追加等が確認されたモクツウ, ケイガイ, ソボクの3生薬を加えた106種を対象生薬とした。これらの生薬をもとに各国の確認試験におけるTLC条件(展開溶媒, 検出方法, 呈色, 指標成分)並びに各種試験法を用いた定量法における分析条件(試験方法, 溶出溶媒, 検出方法)の詳細について比較表を作成した。

この結果, TLC法を用いた確認試験が設定されている生薬は106種の共通生薬のうち89種で, これらのうち4カ国局方すべてにおいて設定され

ている生薬は15種であった。また, TLCの指標成分に関しては, 72生薬に何らかの指標成分が設定されており, 特にインヨウカク, サンシシ, シャクヤク, ボタンピの4生薬は4カ国局方すべてにおいて同一の指標成分が設定されていた。

一方, 定量法が設定されている生薬は106種の共通生薬のうち69種で, これらのうちマオウ, カンゾウ, ボタンピ, オウゴン, ホミカの5生薬は, 4カ国すべての局方に定量法が設定されていた。確認試験におけるTLC条件に関してCP及びVPではTLC法に使用する溶媒の種類が非常に多く, かつ多成分系の条件が設定されているのが特徴であると考えられた。定量法に関しては, VPでは未だにHPLCによる分析法が確立されておらず, また定量法が設定されている生薬も少なかった。一方, CP 2005年版では2000年版と比較してHPLC法を設定した生薬が飛躍的に増加しており, さらにELSD法等, 新たな検出機器の導入も認められた。

3) 生薬関連一般試験法の比較³⁾

我々はさらにEWG 5 (Information on General Tests) の課題事項である4カ国の薬局方に収載された生薬関連一般試験法を精査し, 各国の生薬試験法(試料の採取, 異物, 分析用試料の作成, 乾燥減量, 灰分, 酸不溶性灰分, エキス含量, 精油含量, 鏡検, 重金属, ヒ素等)の各項目について試験法の設定の有無, 試験方法について比較表を作成した。

この結果, JPとKPの試験項目, 記載内容はほぼ同一であった。他方, CPとVPの試験項目, 記載内容はほぼ同一であった。また, 鏡検に関してJP及びKPでは装置, 鏡検用プレパラートの作成及び性状の項の各要素の観察の各小項目で比較的簡単に記載されているのに対し, CP及びVPでは崩壊した組織のスライド作成法, 花粉や胞子のスライド作成法, 細胞壁及び細胞内容物の観察方

法等、詳細な記載が認められた。このようにCP及びVPでは、鏡検による生薬の鑑別が現在においても重要視されていることが示唆された。さらに生薬の品質評価法、生薬の調製・加工等の項目も新規収載されており、興味深い。

4) クリーンアナリシスと国際調和を指向したTLC条件の比較⁴⁾

近年、環境汚染防止並びに実験者の健康保護を目的として、各種試験における有害試薬の使用を極力排除する“クリーンアナリシス”が世界的に浸透しつつある。日本においても2002年に公示された第十五改正日本薬局方原案作成要領、第一部、第十五改正日本薬局方原案の作成に関する細則において、有害な試薬の扱いと題して、人及び環境への影響を配慮した試験方法となるよう努めるとの記載がなされている⁵⁾。本項目には、ベンゼン、四塩化炭素、水銀化合物等の試薬は原則使用せず、またクロロホルム、ジクロロメタン（塩化メチレン）等のハロゲン化合物は使用について慎重に検討すると記載されている。有害試薬の扱いについては、2007年に公示された第十六改正日本薬局方原案作成要領においても継承され、特にクロロホルム等のハロゲン化合物は代替溶媒がない場合についてのみその使用を認めると記載され、より厳密な表記に変更されている⁶⁾。

このような背景の下、2006年のFHH会議において、クリーンアナリシスを指向した国際調和の観点から、TLCの展開溶媒として有害試薬を使用している国は、他国の有害試薬を使用しない試験法を参考にして自国の試験法を変更する努力を行うことが重要であるとの提案がなされ、自国内で流通する生薬を用い、有害試薬を使用しない他局の試験法について検討することが承認された。そこで我々は、FHH諸国の局方に収載された共通生薬のTLCを用いた確認試験法について、各種試験条件の詳細な検討を行い、比較実験を行っ

た。

この結果、サイコ、ケイヒ、サンシュユ、ウコン、マオウ、カンゾウ、コウボク、シャクヤク、キョウニン、オウゴン、キクカ、ジャシヨウシ、リュウタン、カクコン及びカイカの15生薬において、いずれかの薬局方の確認試験に有害試薬が使用されていることが明らかとなった。そこでこれら15種の生薬について、各国局方の試験条件によりTLC検討を行った結果、サンシュユ、コウボク及びキクカを除く12生薬では、すべて有害試薬を使用しない方法でも同一の指標成分が確認可能であることが示された。特にサイコでは、JP及びKPでクロロホルムを使用しているのに対し、CP及びVPでは有害溶媒を使用しておらず、CP及びVP法を用いても国内流通生薬の確認が可能であることが明らかとなった。そこでサイコに関して、日本薬局方生薬等委員会では、確認試験法における試験条件の再検討を行い、検出試薬の違いによる呈色の比較検討を行った。この結果、噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液では、saikosaponin a及びdの呈色が異なることが確認され、本噴霧試液を用いることにより、両化合物を同時に分別、検出することが可能となった。本検討により第15改正日本薬局方第二追補では、サイコの確認試験について、有害試薬を用いず、かつ検出の容易な試験法に変更するに至った。

第6回FHH会議（2008年）以降、クリーンアナリシスにおける国際調和の観点から、我が国も含め有害試薬を使用している国は、他国の有害試薬を使用しない試験法を参考として自国の試験法を変更する検討が継続的になされている。

おわりに

今回、ISO/TC249における国際標準化とFHHにおける国際調和の動向について報告したが、FHHでは、生薬及び生薬関連製剤の規制と国際調和に関して、参加各国の状況を互いに理解、尊

重する姿勢が認められ、全般的に和やかな雰囲気
で会議が進行しているのに対し、ISO/TC249では、
中国の権益主張を中心として議論が進行する場面
が多く認められ、それに反発する日本及び韓国と
のせめぎ合いが継続的に繰り返されている。こ
のように、中国を中心とした生薬及び生薬関連製
剤の国際標準化の潮流は、今後さらに加速してい
くものと考えられる。我が国固有の伝統医療であ
る漢方医学を守り、世界にその存在感をアピール
するためには、産官学が一体となった積極的かつ継
続的な活動を展開していくことが必須と考えられ

る。

文献

- 1) Kawahara, N., Sakai, E., Itokazu, N., et al.: The Japanese Journal of Pharmacognosy, 60, (1), 39-50, 2006.
- 2) Kawahara, N., Sakai, E., Itokazu, N., et al.: The Japanese Journal of Pharmacognosy, 60, (2), 73-85, 2006.
- 3) Kawahara, N., Itokazu, N., Satake, M., et al.: The Japanese Journal of Pharmacognosy, 61, (1), 44-57, 2007.
- 4) Kawahara, N., Ido, Y., Nakajima, I., et al.: The Japanese Journal of Pharmacognosy, 62, (2), 72-78, 2008.
- 5) Japanese Pharmacopoeial Forum, 11 (1), 84-100, 2002.
- 6) Japanese Pharmacopoeial Forum, 16 (1), 161-200, 2007.

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

(独) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 川原 信夫

1. はじめに

近年、漢方薬あるいは生薬への関心が高まる中で、名称の類似、同名異物等の問題が表面化してきている。生薬の安全性を確保し、有効利用を考える上で、生薬の正しい認識と理解が必須であり、各国で使用されている生薬に関する情報を収集、整理し、共通認識を得ることは生薬、薬用植物の国際調和の観点からも非常に重要と考えられる。このような背景から2002年3月に北京において「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)」設立のための国際会議が開催された。本フォーラムでは、西太平洋地区の6カ国7地域 (日本、中国、韓国、ベトナム、シンガポール、オーストラリア、香港) の生薬・薬用植物の規制に関する関係者が一堂に会し、生薬・薬用植物の安全性、有効性及び品質に関する技術的な記録とコンセンサスを提供することが目的に掲げられた。日本はその下部組織である Nomenclature and Standardization に関する Sub-Committee 会議を主催することを受諾し、2002年5月、FHH 東京会議が開催された。本会議において以下の5つの専門部会 (Expert working group, EWG) が設立された。

EWG1: Nomenclature

EWG2: Testing Method in Monographs

EWG3: List of Chemical Reference Standards (CRS) and Reference of Medicinal Plant Materials (RMPM)

EWG4: List of Analytically Validated Method

EWG5: Information on General Test

これらの専門部会では、それぞれの分野における各国薬局方の比較表を作成することが課題事項として議決され、EWG 2の責任者となった著者は、試験法及び規格値に関する比較表の作成につ

いて担当することとなった。本稿では、主として著者が FHH の専門部会において取り組んできた各種比較表の作成並びに比較検討により得られた知見の概要について説明する。

2. 西太平洋地区4カ国 (日本、中国、韓国、ベトナム) の薬局方収載生薬の比較検討について

1) 各種試験法並びに規格値の比較¹⁾

EWG 2では将来的な国際調和を踏まえ、各国の薬局方収載生薬について共通点と相違点を認識すること目的として、日本、中国、韓国、ベトナム4カ国の薬局方に収載された生薬の試験法並びに規格値について比較表を作成し、比較検討を行った。比較表は、EWG 1 (Nomenclature) の責任者である酒井博士が作成した共通生薬 (103種) の比較表をもとに各国の確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量及び定量法の各項目について試験法の設定の有無、試験方法、規格値について作成した。

各国の各種試験法の比較に関して作成した表の一例を表1に示す。この結果、4カ国局方すべてにおいて共通の基原植物に由来する生薬は57種であった。4カ国共通生薬57種に関して比較を行った場合、確認試験、純度試験、灰分の3項目についてはすべての局方においてほぼ設定がなされており、特に TLC 法を用いた確認試験が普及していることが明らかとなった。一方、乾燥減量、酸不溶性灰分、エキス含量等は設定されていない国が多かった。また、定量法に関してはカンゾウ、ボタンビ、ホミカにおいて共通の指標成分が各局方に設定されていたが、試験法や規格値に相違点が認められた。

本比較表より、東アジア地区4カ国の薬局方の

表1 各国薬局方における生薬関連試験法及び規格値の比較 (部分抜粋)

No.	Latin name	Identification	Purification	Loss on drying	Total ash	Acid-insoluble ash	Extract content	Assay (Essential oil content)
1	<i>Acyranthea bidentata</i> Blume							
	CP RADIX ACYRANTHIS BIDENTATAE	O (TLC)	X	O (1.10%, Water)	O (1.87%)	O (1.17%)	1.02% (1-Oxolanone-ester extract)	X
	JP ACYRANTHIS RADIX	O	X	O (Steam, Foreign matter)	O (1.15.0%)	O (1.1.4%)	X	X
	VP RADIX ACYRANTHIS BIDENTATAE	O (TLC)	X	O (Steam, Foreign matter)	O (1.12.0%)	O (1.1.5%)	X	X
2	<i>Alisma orientalis</i> Zuccarini							
	CP RHIZOMA ALISMATIS	O	X	X	O (1.8.5%)	O (1.0.5%)	X	X
	JP ALISMATIS RHIZOMA	X	X	X	O (1.8.5%)	O (1.0.5%)	X	X
	VP RHIZOMA ALISMATIS	O (Powder)	X	O (1.10.0%)	O (1.8.5%)	X	X	X
3	<i>Alisma oxyphylla</i> Blume							
	CP RHIZOMA ALISMATIS OXYPHYLLAE	O (TLC)	X	X	X	X	X	1.5% (Essential oil content)
	JP ALPHEA FRUCTUS	X	X	X	O (1.10.0%)	O (1.2.0%)	X	1.0 mL/50g (Essential oil content)
	VP RHIZOMA ALISMATIS OXYPHYLLAE	O (TLC)	X	X	O (1.10.0%)	O (1.2.0%)	X	1.0 mL/50g (Essential oil content)
4	<i>Amentheneta asphodeloides</i> Bunge							
	CP RHIZOMA ANEMARHENAE	O (TLC)	X	O (1.10.0%, Water)	O (1.8.0%)	O (1.4.0%)	X	Diosgenin 1.10% (TLC)
	JP ANEMARHENAE RHIZOMA	O	X	O (Foreign matter)	O (1.7.0%)	O (1.5.0%)	X	X
	VP RHIZOMA ANEMARHENAE	O (TLC)	X	O (Foreign matter)	O (1.7.0%)	O (1.5.0%)	X	X
5	<i>Angelica dahurica</i> Desfont. et Hooker fil.							
	CP RADIX ANGELICAE DAHURICAE	O (TLC)	X	O (1.14.0%, Water)	O (1.8.5%)	O (1.1.5%)	15.0% (Dilute ethanol-soluble extract)	Hydrocortisone 1.005% (HPLC)
	JP ANGELICAE DAHURICAE RADIX	O	X	O (Leaf ash, Foreign matter)	O (1.7.0%)	O (1.2.0%)	X	X
	VP RADIX ANGELICAE DAHURICAE	O (TLC)	X	O (Leaf ash, Foreign matter)	O (1.7.0%)	O (1.2.0%)	15.0% (Dilute ethanol-soluble extract)	X
6	<i>Atractylodes lancea</i> Thunberg							
	CP RADIX ATRACTYLIDIS	O (TLC)	X	O (1.15.0%, Water)	O (1.1.0%)	O (1.2.0%)	X	X
	JP ATRACTYLIDIS RADIX	X	X	O (Root of <i>Hesperium apiculata</i> and others)	O (1.10.0%)	O (1.1.0%)	X	X
	VP RADIX ATRACTYLIDIS MEMBRANAE	O (TLC)	X	O (1.12.0%)	O (1.6.0%)	X	X	X
7	<i>Atractylodes lancea</i> var. <i>chinensis</i> , A. <i>chinensis</i> (Kobusch)							
	CP RHIZOMA ATRACTYLIDIS	O (TLC)	X	X	O (1.7.0%)	X	X	X
	JP ATRACTYLIDIS LAINGIAE CHINENSIS	X	X	O (Atractylodes rhizome)	O (1.7.0%)	O (1.1.5%)	X	1.7 mL/50g (Essential oil content)
	VP RHIZOMA ATRACTYLIDIS	O (TLC)	X	O (Atractylodes rhizome)	O (1.7.0%)	O (1.1.5%)	X	1.7 mL/50g (Essential oil content)
8	<i>Bupleurum falcatum</i> Linné							
	CP RADIX BUPLEURI	O (TLC)	X	X	O (1.8.5%)	O (1.1.0%)	X	X
	JP BUPLEURI RADIX	O (TLC)	X	O (Steam and leaf, Foreign matter)	O (1.8.5%)	O (1.1.0%)	X	1.5 mL/50g (Essential oil content)
	VP RADIX BUPLEURI	O (TLC)	X	O (Steam and leaf, Foreign matter)	O (1.8.5%)	O (1.1.0%)	X	1.5 mL/50g (Essential oil content)
9	<i>Carthamus tinctorius</i> Linné							
	CP FLOS CARTHAMI	O (TLC)	X	X	O (1.10.0%, Water)	O (1.5.0%)	50.0% (Water-soluble extract)	Hydrocortisone A 1.2% (HPLC), Kamptulide 1.05% (HPLC)
	JP FLOS CARTHAMI	O	X	O (Foreign matter)	O (1.10.0%)	X	X	X
	VP FLOS CARTHAMI TINCTORII	O (TLC)	X	O (Change of coloration, Foreign matter)	O (1.10.0%, Water)	O (1.10.0%)	X	X

共通点、相違点が明らかとなった。特にベトナム薬局方 (VP) と中華人民共和国薬典 (CP)、また日本薬局方 (JP) と大韓民国薬局方 (KP) との間にはそれぞれ共通点が多かった。これは局方作成に当り、VPはCPをKPはJPをそれぞれ参考にして作成されているため、このような結果が得られたものと推測された。

2) 確認試験における TLC 条件及び定量法における分析条件の比較²⁾

本検討では前述の比較研究において対象とした共通生薬103種に、CP 2005年版において基原植物の変更、追加等が確認されたモクツウ、ケイガイ、ソボクの3生薬を加えた106種を対象生薬とした。これらの生薬をもとに各国の確認試験における TLC 条件 (展開溶媒、検出方法、呈色、指標成分)

表2 各国薬局方の確認試験法における TLC 条件の比較 (部分抜粋)

No.	Latin name	TLC condition	(2) detection	(3) color tone on TLC	(4) marker compounds
1	<i>Acyranthea bidentata</i> Blume				
	CP RADIX ACYRANTHIS BIDENTATAE	chloroform / methanol (40 : 1)	phosphomolybdic acid TS, 110		oleanic acid
	JP ACYRANTHIS RADIX	chloroform / methanol / water (8 : 2 : 0.5)	UV 254 nm 2) sulfuric acid TS		20-hydroxyecdysen
2	<i>Aconitum camptochloa</i> Daboesz				
	VP RADIX ACONITIS	ethyl acetate / ethanol (90:6) saturated water (20) (4:1:3:3)	phosphomolybdic acid in ethanol, 110°, 10 min	yellow-brown	benzylmagnecisone hydrobenzide
	JP FROEDSII ACONITIS RADIX				
3	<i>Alisma oxyphylla</i> Blume				
	CP RHIZOMA ALISMATIS OXYPHYLLAE	n-hexane / ethyl acetate (8 : 1)	1) UV 254 nm 2) dinitrophenylhydrazine chloride TS	1) dark spot 2) orange-red	
	VP RHIZOMA ALISMATIS OXYPHYLLAE	n-hexane / ethyl acetate (8 : 1)			
4	<i>Amentheneta asphodeloides</i> Bunge				
	CP RHIZOMA ANEMARHENAE	benzene / acetone (8 : 1)	5% vanillin in ethanol / sulfuric acid (0.5 : 0), 100°		carosapogenin
	JP ANEMARHENAE RHIZOMA	chloroform / methanol / water (8 : 2 : 0.5)	sulfuric acid TS		anemarsaponin B
	VP RHIZOMA ANEMARHENAE	benzene / acetone (8 : 1)	5% vanillin in ethanol / sulfuric acid (0.5 : 0), 100°, 5 min		carosapogenin
5	<i>Angelica dahurica</i> Desfont. et Hooker fil.				
	CP RADIX ANGELICAE DAHURICAE	petroleum ether / ether (1 : 2)	UV 365 nm		imperatorin, iclimperatorin
	VP RADIX ANGELICAE DAHURICAE	benzene / ethyl acetate (8 : 1)	UV 265 nm	blue fluorescent	
6	<i>Atractylodes lancea</i> Thunberg				
	CP RADIX ATRACTYLIDIS	chloroform / methanol / water (18 : 7 : 2)	1) 10% sulfuric acid in ethanol, 100° 2) UV 254 nm	1) brown 2) orange-yellow	atractygenin IV
	VP RADIX ATRACTYLIDIS	chloroform / methanol / water (50 : 15 : 10)	10% sulfuric acid in ethanol, 100°, 5 min		atractygenin IV
7	<i>Atractylodes lancea</i> var. <i>chinensis</i> , A. <i>chinensis</i> (Kobusch)				
	CP RHIZOMA ATRACTYLIDIS	petroleum ether / ethyl acetate (20 : 1)	p-dimethylaminobenzaldehyde in 10% sulfuric acid	muddy green	atractygenin
	VP RHIZOMA ATRACTYLIDIS	petroleum ether / ethyl acetate (20 : 1)	p-dimethylaminobenzaldehyde in 10% sulfuric acid		
8	<i>Bupleurum falcatum</i> Linné				
	CP RADIX BUPLEURI	ethyl acetate / ethanol / water (8 : 2 : 1)	5% p-dimethylaminobenzaldehyde in 50% sulfuric acid 60°, 365 nm	yellow	saikosaponin a, d
	JP BUPLEURI RADIX	chloroform / methanol / water (30 : 10 : 3)	sulfuric acid / ethanol (50 : 1), 60°, 5 min	blue to blue-purple	saikosaponin a
9	<i>Carthamus tinctorius</i> Linné				
	CP FLOS CARTHAMI	ethyl acetate / formic acid / water / methanol (7 : 2 : 3 : 0.4)	pet. In a desiccator pre-saturated with the vapour of ammonia	1) 4 brownish-yellow spots	
	VP FLOS CARTHAMI TINCTORII	ethyl acetate / formic acid / water (8 : 1 : 1)		2) 2 brownish-yellow spots	
11	<i>Cimicifuga racemosa</i> Komarov				
	CP RHIZOMA CIMICIFUGAE	benzene / ethyl acetate / formic acid (8 : 1 : 0.5)	UV 365 nm		isoflavanic acid
	JP CIMICIFUGAE RHIZOMA				
12	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume				
	CP CORTEX CINNAMOMI	petroleum ether / ethyl acetate (17 : 3)	ethanolic 2,4-dinitrophenylhydrazine TS		cinnamaldehyde
	JP CINNAMOMI CORTEX	benzene / ethyl acetate (2 : 1)	1) UV 254 nm 2) 2,4-dinitrophenylhydrazine TS	1) purple 2) yellow orange	
	VP CORTEX CINNAMOMI	benzene / ethyl acetate (2 : 1)	1) UV 254 nm 2) 2,4-dinitrophenylhydrazine TS	1) purple 2) yellow orange	
13	<i>Coronilla officinalis</i> Desfont. et Zuccarini				
	CP FLORES CORONILLAE	n-hexane / chloroform / ethyl acetate (4 : 1 : 1)	2,4-dinitrophenylhydrazine	5 orange spots	chamaecitridic acid
	JP FLORES CORONILLAE				
14	<i>Cuscuta japonica</i> Siebold et Zuccarini				
	CP FLORES CUSCUTAE	toluene / ethyl acetate / formic acid (20 : 4 : 0.5)	1) 10% sulfuric acid in ethanol, 110° 2) UV 365 nm	1) pinkish-red	crocin acid
	JP FLORES CUSCUTAE	ethyl acetate / water / formic acid (8 : 1 : 1)	4-methylbenzaldehyde-sulfuric acid TS, 90°, 5 min	2) yellow orange fluorescent	
	VP FLORES CUSCUTAE OFFICINALIS	ethyl acetate / water / formic acid (8 : 1 : 1)	p-nitrobenzaldehyde-sulfuric acid TS, 90°, 5 min	red-purple	loganin
15	<i>Cuscuta japonica</i> Siebold et Zuccarini				
	CP FLORES CUSCUTAE JAPONICAE	cyclohexane / chloroform / ethyl acetate (20 : 5 : 0)	10% sulfuric acid in ethanol, 110°, 5-7 min	3) pinkish-red	crocin acid
	JP FLORES CUSCUTAE JAPONICAE	chloroform / methanol / formic acid (30 : 4 : 0.7)			
	VP FLORES CUSCUTAE JAPONICAE	ethyl acetate / benzene / acetic acid (100 : 70 : 30 : 1)			