

表3 各国薬局方の定量法における試験条件の比較 (部分抜粋)

No.	Latin name	Assay (†: Not less than)	(1) method	(2) developing solvent	(3) detection
1	<i>Asarum canadense</i> Sibthorpe JP PROCESSU ACONITI RADIX	Total Alkaloids 0.7~1.2% (Type 1), 0.1~0.6% (Type 2), 0.5~1.0% (Type 3)	Titration		
2	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge CP RHIZOMA ANEMARRHENAE	Diogenin † 1.0%	HPLC (ODS column)	methanol / water (85 : 15)	Evaporative Light Scattering method
3	<i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hook. et Thunb. CP RADIX ANGELICAE DAHURICAE	Imperatorin † 0.050%	HPLC (ODS column)	methanol / water (65 : 35)	UV 300 nm
4	<i>Xanthoxylum membranaceum</i> Gumpert CP RADIX ASTRAGALI	Astragaloside IV † 0.04%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / water (20 : 80)	Evaporative Light Scattering method
5	<i>Bupleurum scorzonoides</i> Willd. JP BUPLEURI RADIX KP BUPLEURI RADIX	Saikosaponin a + d † 0.35% Saikosaponin a † 0.2%	HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm)	1) acetonitrile / water (2 : 5) 2) 50 : 50 3) adjust flow rate to elute Saikosaponin d at ca. 8 min 1) acetonitrile / water (35 : 65) 2) 20' 3) 0.8 mL/min	UV 208 nm UV 203 nm
6	<i>Carthamus tinctorius</i> Linne CP FLORES CARTHAMI	Hydroxytyrosin A † 1.0%, Koempferide † 0.05%	HPLC (ODS column)	Hydroxytyrosin A (methanol / acetonitrile / 0.7% phosphoric acid (25 : 2 : 72)), Koempferide (methanol / 0.4% phosphoric acid (82 : 18))	Hydroxytyrosin A (UV 405 nm), Koempferide (UV 347 nm)
7	<i>Cnidifolium hensekei</i> Komarov CP RHIZOMA Cnidifoliae	Ferulic acid † 0.1%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / 0.1% phosphoric acid solution (13 : 87)	UV 316 nm
8	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume CP CORTEX CINNAMOMI KP CINNAMOMI CORTEX	Cinnamic acid † 1.5% Cinnamic acid † 0.03%	HPLC (ODS column) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm)	acetonitrile / water (33 : 67) 1) methanol / water / glacial acetic acid (12 : 88 : 1) 2) 20' 3) 2.0 mL/min	UV 294 nm UV 299 nm
9	<i>Conium maculatum</i> Steud. et Zuccarini CP FRUCTUS CONII KP CONII FRUCTUS	Loganin † 0.50% Loganin † 0.5%	HPLC (ODS column) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm)	acetonitrile / water (16 : 84) 1) methanol / water (30 : 70) 2) 20' 3) 1.0 mL/min	UV 240 nm UV 240 nm
10	<i>Curcuma longa</i> Linn. CP RHIZOMA CURCUMAE LONGAE	Curcumin † 1.0%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / 4% glacial acetic acid solution (48 : 52)	UV 430 nm
11	<i>Ephedra sinensis</i> Stapf CP HERBA EPHEDRAE JP EPHEDRAE HERBA KP EPHEDRAE HERBA VP HERBA EPHEDRAE	Ephedrine hydrochloride † 1.0% Total alkaloids † 0.7% Total alkaloids (ephedrine + pseudoephedrine) † 0.7% Total alkaloids † 0.5%	HPLC (ODS column) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm) Titration	acetonitrile / 0.1% phosphoric acid solution (9 : 91) 1) sodium lauryl sulfate (1 in 125) / acetonitrile / phosphoric acid (540 : 350 : 1) 2) 45' 3) adjust flow rate to elute ephedrine at ca. 14 min 1) sodium lauryl sulfate (1 in 125) / acetonitrile / phosphoric acid (540 : 350 : 1) 2) 45' 3) adjust flow rate to elute ephedrine at ca. 14 min	UV 207 nm UV 210 nm UV 210 nm
12	<i>Epimedium koreanum</i> Nakai CP HERBA EPIMEDII	Total flavonoids † 8.0%, Icaritin † 0.50%	Total flavonoids (Absorption) Icaritin (HPLC (ODS column))	Total flavonoids (methanol), Icaritin (acetonitrile / water (30 : 70))	UV 270 nm
13	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver CP CORTEX EUCCOMIAE	Flavonoid-di-glucosylsaccharide † 0.1%	HPLC (ODS column)	methanol / water (25 : 75)	UV 277 nm
14	<i>Evodia rutaecarpa</i> Benth. et Hook. et Thunb. CP FRUCTUS EVODIAE	Evodiamine/pseudoevodiamine † 0.15%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / 0.04% octanesulfonic acid sodium salt (48 : 52)	UV 225 nm
15	<i>Fenugreek</i> (Fenugreek) CP FRUCTUS FENUGRAECI KP FRUCTUS FENUGRAECI	Fenugreek † 0.15%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / water (20 : 80)	UV 277 nm
16	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq. CP BULBUS FRITILLARIAE THUNBERGII KP BULBUS FRITILLARIAE THUNBERGII	Peimlans + Peimlans † 0.050%	HPLC (ODS column)	acetonitrile / water/ethylacetate/methanol (70 : 30 : 0.3)	Evaporative Light Scattering method
17	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis CP FRUCTUS GARDENIAE JP GARDENIAE FRUCTUS	Gardenoside † 1.5% Gardenoside † 0.2%	HPLC (ODS column) HPLC (ODS column, I.D. 8 mm x 16 cm, 9 mm)	acetonitrile / water (15 : 85) 1) water / acetonitrile (22 : 3) 2) 20' 3) adjust flow rate to elute Gardenoside at ca. 16 min	UV 258 nm UV 240 nm
18	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisher, G. glabra Linne CP RADIX GLYCYRRHIZAE JP GLYCYRRHIZAE RADIX KP GLYCYRRHIZAE RADIX VP RADIX GLYCYRRHIZAE	Glycyrrhizic acid † 2.0%, Licquiritin † 1.0% Glycyrrhizic acid † 2.2% Glycyrrhizic acid † 2.5% Glycyrrhetic acid † 8.0%	HPLC (ODS column) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm) HPLC (ODS column, I.D. 4.6 mm x 15-25 cm, 5-10 mm) Weight	Glycyrrhizic acid (methanol / 0.2 mol/L ammonium acetate / glacial acetic acid (87 : 13 : 1)), Licquiritin (acetonitrile / 0.5% glacial acetic acid (1 : 4)) 1) dilute acetic acid / acetonitrile (3 : 2) 2) 20' 3) adjust flow rate to elute glycyrrhizic acid at ca. 10 min 1) dilute acetic acid / acetonitrile (3 : 2) 2) 20' 3) adjust flow rate to elute glycyrrhizic acid at ca. 10 min	Glycyrrhizic acid (UV 250 nm), Licquiritin (UV 276 nm) UV 254 nm

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。

確認試験の比較に関して作成した表の一例を表2に示す。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、定量法の比較に関して作成した表の一例を表3に示す。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<sup>3)</sup>

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。

生薬関連一般試験法の比較に関して作成した表の一例を表4に示す。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

表4 各国薬局方における生薬関連一般試験法の比較 (部分抜粋)

JP	KP	CP	VP
<p><b>Sampling</b></p> <p>Unless otherwise specified, sample should be taken by the following methods. If necessary, preserve the samples in light containers.</p> <p>(1) When crude drugs to be sampled are small-sized, cut or powdered, 50 to 250 g of sample should be taken after mixing thoroughly.</p> <p>(2) When crude drugs to be sampled are large-sized, 250 to 500 g of sample should be taken after cutting to a suitable size and mixing thoroughly.</p> <p>(3) When the mass of each single piece of the crude drugs is not less than 100 g, not less than 5 pieces should be taken for a sample, or not less than 500 g of the sample should be taken after cutting to a suitable size and mixing thoroughly.</p>	<p><b>Sampling</b></p> <p>Unless otherwise specified, sample should be taken by the following methods. If necessary, preserve the samples in light containers.</p> <p>(1) When crude drugs to be sampled are small-sized, cut or powdered, 50 to 250 g of sample should be taken after mixing thoroughly.</p> <p>(2) When crude drugs to be sampled are large-sized, 250 to 500 g of sample should be taken after cutting to a suitable size and mixing thoroughly.</p> <p>(3) When the mass of each single piece of the crude drugs is not less than 100 g, not less than 5 pieces should be taken for a sample, or not less than 500 g of the sample should be taken after cutting to a suitable size and mixing thoroughly.</p>	<p><b>Sampling of Crude Drugs</b></p> <p>Sampling of crude drugs refers to the method used to sort the crude drugs for examination. The validity of sampling affects directly the precision and accuracy of the examination. The procedure for sampling should be followed in detail.</p> <p>1. Examine the confirmation of the name, source of material, specification and package form of the cargo before sampling. Examine the fit between cleanliness of packages and contamination of moulds and foreign matter, make notes in detail. The abnormal packages should be examined separately.</p> <p>2. The general requirements for sampling of crude drugs in a consignment are as follows: when the total number of packages less than 5, the packages are sampled one by one. 5-99 packages, 5 packages are sampled at random; 100-1000 packages, 5% are sampled; more than 1000 packages, 1% of the part in excess of 1000 packages are sampled; Precious crude drugs are sampled one by one, regardless of the number of packages.</p> <p>3. If the material is in crushed or powdered form or in pieces of less than 1 cm in size, at least 2-3 portions of sample are taken by suitable means from different parts in each package. If volume of package is large, samples taken should be 10 cm in depth below the surface from different parts. The quantity of samples taken is defined as follows: Common drugs: 100-500 g Powdered drugs: 25 g Precious drugs: 5-10 g</p> <p>As for the drugs of large size or large number, representative samples can be taken on the basis of real situation.</p> <p>4. Mix the samples thoroughly, i. e. the total quantity of samples taken. If the total quantity of samples taken is several times that required for the testing, take an average sample by quartering, until sufficient quantity of sample is obtained for testing and retention.</p> <p>5. The quantity or average sample taken should be not less than 3 times that required for the testing, using one third for analysis, another one third for verification and the remaining as retention which should be kept.</p>	<p><b>SAMPLING OF CRUDE DRUGS</b></p> <p>Sampling of crude drugs refers to the method used to sort the crude drugs for examination. The representativeness of samples affects directly the precision and accuracy of the examination. Attention should be paid to the following points while sampling:</p> <p>(a) Verify the name, source of the material, specifications and forms of packages before sampling. Examine the fit between cleanliness of the packages and the contamination of moulds and foreign matter, make notes in detail. Abnormal packages should be examined more carefully.</p> <p>(b) The general requirements for sampling of crude drugs are as follows: For a number of packages: less than 5, every package is sampled; less than 100, 5 packages are sampled; from 100 to 1000, 5% of packages are sampled; over 1000, 50 packages and 1% of the number in excess of 1000 packages are sampled. For precious crude drugs every package is sampled, regardless of the number of packages.</p> <p>(c) If the material is in crushed or powdered form or in pieces of less than 1 cm in size, at least 2-3 portions of sample are taken by suitable means from different parts in each package. If the number of packages is small, the amount of sample taken should be not less than 3 times the quantity required for testing. If the number of packages is large, the amount of sample taken is as follows: Common drugs: 100-500 g Powdered drugs: 25 g Precious drugs: 5-10 g (unless otherwise specified)</p> <p>(d) For the drugs in large size, a representative sample can be taken from different pieces of a package (at 10 cm in depth below the surface for large package).</p> <p>(e) Mix the samples taken as required for the test sample. If the sample size of drug is small, take an average sample by quartering method as follows: Spread the samples (after mixing thoroughly) in a square, then divide the sample into 4 equal parts by diagonal; take two opposite parts and mix them. With the mixture obtained, repeat the quartering in the same way until a sufficient amount of sample is obtained for testing and retention. In the case of large size drugs, the average samples can be obtained with any appropriate methods. The amount of an average sample should not less than 3 times of that required for testing, using one third for analysis, another for verification and the remaining as retained sample which should be kept at least for one year.</p>
<p><b>Foreign matter</b></p> <p>Unless otherwise specified, weigh 25 to 500 g of the sample, spread out in a thin layer, and separate the foreign matter by inspecting with the naked eye or with the use of a magnifying glass of 10 magnifications. Weigh, and determine the percentage of foreign matter.</p>	<p><b>Foreign matter</b></p> <p>Unless otherwise specified, weigh 25 to 500 g of the sample, spread out in a thin layer, and separate the foreign matter by inspecting with the naked eye or with the use of a magnifying glass of 10 magnifications. Weigh, and determine the percentage of foreign matter.</p>	<p><b>Determination of Foreign Matter</b></p> <p>Foreign matter consists of any or all of the following:</p> <p>1. The biological origin of which differs from that specified in the monograph concerned but the appearance or botanical parts is different.</p> <p>2. The biological origin of which differs from that specified in the monograph concerned.</p> <p>3. Foreign mineral matters such as stones, sand, lumps of soil.</p> <p>Method</p> <p>(1) Weigh a quantity of the drug as specified in the monograph and spread out in a thin layer. Detect the foreign matter by inspection with naked eye or with a lens (5-10 ×), or by the use of a suitable sieve, if necessary, to separate the foreign matter.</p> <p>(2) Weigh separately each kind of foreign matter and calculate the percentage content.</p>	<p><b>DETERMINATION OF FOREIGN MATTER IN CRUDE DRUGS</b></p> <p>Foreign matter in herbal drugs consists of any or all of the following:</p> <p>1. Foreign mineral matters such as stones, lumps of soil. Other herbs and other parts of the plant that are not specified as crude drugs.</p> <p>2. Remains of insects.</p> <p>Method: Weigh a quantity of the crude drug as specified in the monograph and spread out in a thin layer. Detect the foreign matter by inspection with naked eye or with a lens or by use of a suitable sieve, if necessary, to separate the foreign matter. Weigh the foreign matter and calculate the percentage, using the expression: <math>\% = \frac{a}{b} \times 100</math> where: a: mass of foreign matter (g) b: mass of test sample being examined (g)</p>
<p><b>Preparation of the test sample for analysis</b></p> <p>Preparations are to be made by mixing the sample well. Powdered drugs should be used as they are, and in the case of unpowdered drugs, unless otherwise specified, grind the sample into powder. If the sample cannot be ground into powder, reduce it as finely as possible, spread it out in a thin layer, and withdraw a typical portion for analysis. If necessary, preserve the test sample in a light container.</p>	<p><b>Preparation of the test sample for analysis</b></p> <p>Preparations are to be made by mixing the sample well. Powdered drugs should be used as they are, and in the case of unpowdered drugs, unless otherwise specified, grind the sample into powder. If the sample cannot be ground into powder, reduce it as finely as possible, spread it out in a thin layer, and withdraw a typical portion for analysis. If necessary, preserve the test sample in a light container.</p>	<p><b>Determination of Loss on Drying</b></p> <p>Loss on drying is the loss of mass, expressed as percentage (from), of the substance being examined thoroughly, if it is in the form of large particles, reduce them to a size of about 2 mm by crushing. Place 1 g or the amount specified under individual monographs of the substance being examined in a tared, shallow weighing bottle, previously dried to constant weight under the conditions specified in individual monographs, unless otherwise directed. The substance being</p>	<p><b>DETERMINATION OF LOSS ON DRYING</b></p> <p>Loss on drying is the loss of mass, expressed as percentage (from), of the substance being examined under conditions specified in the individual monograph. The loss of mass after drying represents the loss of the absorbed water, one part or the whole water of crystallisation and other volatile substances present in the sample being examined. The determination of loss of drying should not affect basic physico-</p>

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記載されており、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<sup>4)</sup>

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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。

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 諸国の局方に記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。

各国薬局方における TLC を用いた確認試験法に使用される有害試薬の比較表を表5に示す。また、比較検討を行った TLC の写真の一例を図1

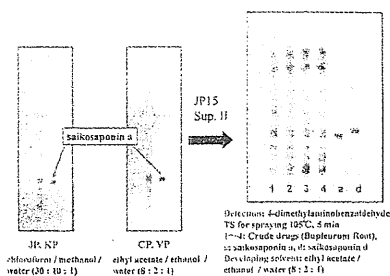


図1-1 *Bupleurum falcatum* Linné (サイコ)

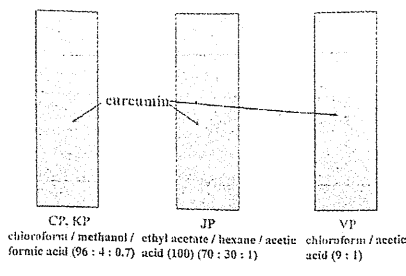


図1-2 *Curcuma longa* Linné (ウコン)

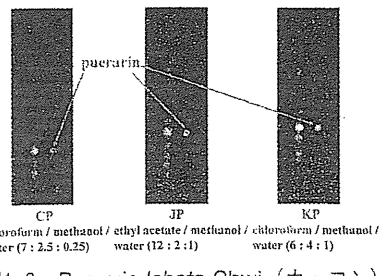


図1-3 *Pueraria lobata* Ohwi (カッコン)

に示す。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、ジャショウシ、リュウタン、カッコン及びカイカの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。

### 3. おわりに

2010年に中華人民共和国薬典2010年版が刊行さ

れ、2011年4月には第16改正日本薬局方が施行されている。また韓国、ベトナムにおいても順次薬局方の改正が予定されており、引き続きFHH会議では、各種比較表の更新、クリーンアナリシスに関する調和、副作用情報の共有等、新たな課題に積極的に取り組んでいく方針である。

一方、WHOが主催するIRCH(International Regulatory Cooperation for Herbal Medicines)の活動も進捗しており、生薬・薬用植物の規制等に関わる国際調和の潮流は、今後さらに加速していくものと考えられる。我が国がアジア諸国の代表として国際調和に貢献し、世界にその存在感を十分に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である。本研究を通じて作成した各種比較表が今後の活動の一助となれば幸いである。

### References

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

# 多成分系としての 生薬・漢方製剤の特性と課題

## Key Points

合田 幸広

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 部長

- ① 医薬品としての生薬・漢方製剤の最大の特徴は、多成分系であることである。
- ② 成分多様性の要因は、遺伝的多様性に加え、環境要因、採取・栽培方法、加工法の違い、原処方などで生じる。
- ③ 漢方製剤の標準化は、原則、3成分の含量を3倍幅に落とし込むことでなされる。
- ④ 漢方製剤の生物学的同等性確認は、煎剤との比較で行われるが、指標成分の選択が重要な課題である。
- ⑤ 同等性確認を困難とする要因に、分析感度、ヒト腸内細菌叢、製剤内での関連成分の存在などがある。

## はじめに

世界各地で伝統医学への関心が高まり、医療への積極的利用が進められつつある。日本の伝統医学「漢方医学」で使用される生薬・漢方製剤は、正規の医薬品として流通しており、公的保険の適用を受けることができる。西洋医学と伝統医学を統合したいわゆる「統合医療」の実践が世界的に求められつつあるが、日本では、漢方エキス製剤が保険適用となった1970年代から「統合医療」が正規医療の一環として進められているといえる。

医薬品の有効性・安全性確保のために、医薬品には高い品質が求められる。品質確保がなされた製品を利用できてこそ、医療の再現性が実現することになる。このような観点から、化学薬品や生物薬品の新薬の場合、医薬

品の有効性および安全性は、各種非臨床試験を経た後、最終的に二重盲検の臨床試験を経て承認される。一方、生薬・漢方製剤の医薬品としての承認は、原則として伝統的な医療経験(成書での記述)に基づいて行われている。本稿では、このような背景のもと、生薬・漢方製剤が持つ特性と課題について述べる。

## 生薬・漢方製剤の特徴

医薬品としての生薬・漢方製剤の最大の特徴は、非常に多くの成分からなる多成分系であることである。漢方で最も重要な生薬である甘草を例にとると、これまでに同植物での存在が確認された二次代謝成分は少なくとも100以上存在する。例えば、甘草の成分の一つに5,7-ジヒドロキシフラバノンがあるが、

この構造を基本として、3位のジメチルアリル基、6位のジメチルアリル基、7位のジメチルアリル基、8位のジメチルアリル基あるいは水酸化ジメチルアリル基、3'位の水酸基、4'位の水酸基の有無が異なる誘導体が確認されている<sup>1)</sup>。したがって、生合成的に考えると図1に示すように $2 \times 2 \times 2 \times 3 \times 2 \times 2 = 96$ 種類の化合物が存在する可能性があり、さらに、熱抽出の過程で2位の立体が変化することを考えれば、エキス中には5,7-ジヒドロキシフラバノンの誘導体だけで、192化合物が存在する可能性があることになる。甘草中には、フラボノイド誘導体だけでなく、トリテルペン類をはじめとして多数の成分が存在することから、それらの生合成経路を考えると、低分子だけで1,000以上の物質が含まれていると考えてもおかしくない。したがって、甘草の薬効は、これらの成分全体が複合的に作用して生み出されているものと推定される。

植物を原材料とする医薬品の構成成分の多様性は、基本的に植物の二次代謝の多様性に由来するが、それだけではない。医薬品の原材料である植物は、その承認書において種が規定されるが、同一種でもさまざまな遺伝的多様性があるために、遺伝的な要因に伴って成分多様性が生じる。さらに、天候や降水量、気温、湿度といった環境要因に従って二次代謝産物の種類と量は変化し、さらに、採取・

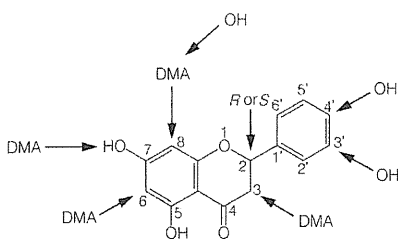


図1 甘草中で確認されている5,7-ジヒドロキシフラバノン誘導体  
DMA: ジメチルアリル基

栽培方法とその時期が異なれば成分組成は変化することになる。また、生薬の場合には、最終的に、皮をむく、蒸す、焦がすなど、さまざまな加工方法があることから、この加工方法の差によっても、構成成分は異なることになる。事実、筆者らの研究では、<sup>1</sup>H-NMRと多変量解析を利用して種や産地の違い、加工法の違いにより、甘草エキスや、芍薬エキスの構成成分全体がそれぞれグループ分けできることを見いだしている。

一方で、医薬品としての甘草の指標成分は、日本薬局方においてグリチルリチン酸(2.5%以上の含量規定あり)とリクイリチン(漢方処方における定性確認成分)の2成分のみとなっている。医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部を中心とした栽培研究では、北海道研究部の同一の圃場で収穫された種子より同一の圃場で同時期に栽培され、同時期に収穫されたカンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*) 100検体において、グリチルリチン酸とリクイリチンの含量を測定している。その結果、グリチルリチン酸では、最も含量が高いものと低いもの間に、10.2倍の差があり、リクイリチンの場合では24.1倍の差があることが確認されている。

生薬の標準化の最初の段階は、生薬の栽培をGood Agricultural Practice (GAP)管理の下で行うことであるが、医薬基盤研究所での甘草の栽培は、GAP管理の下で行われたとあってよく、このような管理の下での栽培であったとしても、遺伝的多様性は、このように大きいことを、生薬・漢方製剤を取り扱う人間は、よく認識しておく必要がある。

一方、近年、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターのグループは、単一クローンから水耕で*G. uralensis*を400～740日栽培した際の試料間のグリチルリチン酸含量について報告しているが、*n*数は少ないものの、同条

件で栽培した試料間での含量比は最大1.5倍程度であり、ここまで条件がそろえば、成分の多様性はかなり標準化されることが分かってきている。

## 漢方製剤の多様性

これまで述べてきた成分構成と含量の両面での多様性は、天然物医薬品の宿命といえる。このような多様性のある植物由来エキスを少しでも標準化するために、有効成分がある程度判明しているヨーロッパの植物薬は、エキスの濃縮率を変化させて指標成分の含量を一定にすることで対応している。一方、漢方処方製剤の場合、単味生薬エキスと異なり、最大20程度の生薬を組み合わせた処方を同時に抽出する究極の複合製剤であるため、1つの有効成分を指標にして標準化することは不可能と考えられる。

また、漢方にはさまざまな流派があり、同一処方名であったとしても、医師が異なれば使用する処方の構成生薬とその使用量が異なる。例えば、大塚敬節先生、矢数道明先生監修の『経験漢方処方分量集』では、葛根湯の構成生薬である葛根の量は1日量で8gであるが、山田光胤先生が書かれた『漢方処方応用の実際』では4gである。したがって、医薬品である葛根湯剤では、葛根の量を8g使用する場合も4g使用する場合も当然あり得ることになる。前述したように、漢方処方製剤の処方構成は、成書に記載されている生薬の含量に基づいており、その値に基づき承認を受けているため、当然葛根湯エキス製剤であっても、さまざまなパターンの生薬構成に基づいたエキス製剤が存在することになる。したがって、日本薬局方の葛根湯エキスでは、4通りの生薬構成パターンが記載されている。昭和60年5月31日に発出された薬審二第

120号通知(いわゆる「マル漢」通知)では、承認申請書に、標準湯剤との同等性を確保する条件として、指標成分を含有する生薬については、当該指標成分の定量を行い下限値を設定し、さらにエキスまたは最終製品では、少なくとも2指標成分について3ロットの標準湯剤での含量を基準とした含量規格を設定することになっている。また、申請書の記載の1日分の生薬量からとれるエキス量について明記することが求められている。言い換えれば、エキス製剤の標準化は、承認書に記載された製法に加えて、わずか2成分の含量と、全体のエキス量で基本的にコントロールされているといえる。

第15改正日本薬局方から、順次漢方処方エキスが局方取載されるようになったが、その際には、前述したマル漢通知を上回る標準化として、原則、指標成分を3成分以上とした含量規格が規定されるようになった。また、成分含量の幅は、標準湯剤含量を100としたときの $\pm 50\%$ を考慮して、3倍幅の規格となっている。なお、生薬に含量規格がない場合では、一部の漢方処方において、指標成分含量が4倍幅、あるいは下限規格となっている場合があるが、これらの規格は、今後の標準化が進めば、3倍幅に収束させていく予定となっている。

このような規格は、前述した成分多様性を一定レベルの幅に落とし込むためのものであるが、わずか3成分3倍幅であっても、数十倍の含量幅を持つ生薬を使用してエキス製剤を調製するには、生薬/漢方製剤メーカーの広い経験が必要となる規格である。今後、生薬の栽培化がより進めば、野菜の味が均一化してきたように、将来的には、より狭い幅規格が可能と考えられるが、栽培化には、薬効研究と組み合わせた有用品種の確保が不可欠であり、中・長期的な検討が必要となる。

## 漢方製剤の生物学的同等性

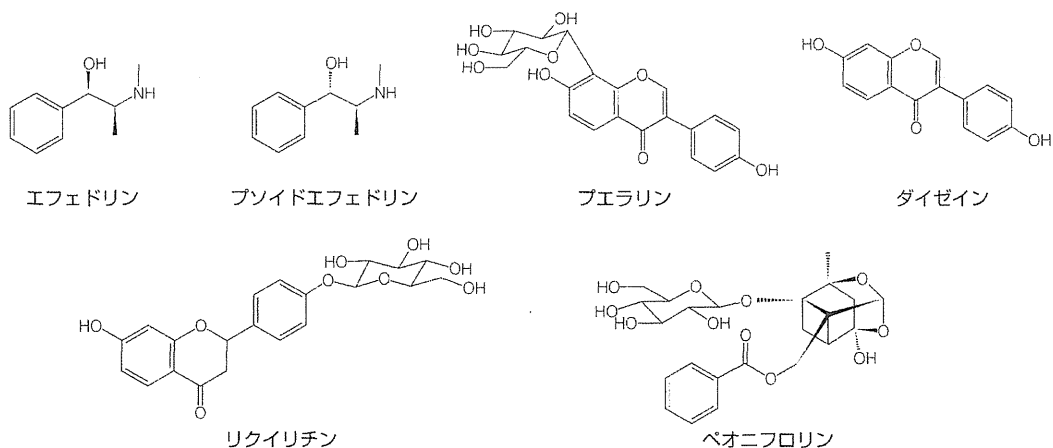
薬剂的に見て、製剤間の生物学的同等性は重要な課題である。一方、多成分系である漢方製剤の場合、生物学的同等性を現実的にどのように考えるべきであるか、学会レベルでの議論すら行われていないのが現状と考える。漢方製剤の承認が伝統医療での経験に基づいて行われている以上、伝統医療で使用されてきた煎剤を前提に生物学的同等性を考えるのが基本であり、「マル漢」といわれた前述の規制も、この考えに基づき標準湯剤との比較により実施されている。

乱暴な議論であるが、煎剤(漢方処方熱水抽出エキス)の場合、多くの成分が何らかの形で水に(擬似的な場合も含めて)溶けていることを考えると、水溶性製剤と同様に考えることも可能かもしれない。一方、成分レベルで考えると、上記の指標成分であっても、含量の低さ(単味生薬エキスから換算しても2~0.1%程度。したがって、漢方処方エキスから換算すると0.2~0.01%程度)、腸内での代謝、生体内での代謝が未解明などの理由による、血液からの検出の難しさが大きな

壁として立ちはだかる。

筆者らは、いくつかの漢方処方について、煎剤とエキス製剤を生物学的同等性の比較対象として、その処方を構成する生薬の指標成分となる化合物を選び、実際に検討を行ってきた。例えば、葛根湯では、葛根以下7つの生薬が、処方構成生薬となるが、そのうち麻黄についてはエフェドリンとプソイドエフェドリン、葛根ではプエラリンとダイゼイン、甘草についてはリクイリチン、芍薬についてはペオニフロリンについて、煎剤投与とエキス剤投与間での血漿中濃度推移について予備的な検討を行った(図2)。

その結果、アルカロイドであるエフェドリンとプソイドエフェドリンについては、*n*数をとることで、両製剤間で同等性評価を得られる可能性が高いことが判明した<sup>2)</sup>。一方、プエラリンやリクイリチン、ペオニフロリンといった配糖体では、同一製剤内でも、被験者間のばらつきが大きいことが判明した。これは、腸内細菌叢の違いなどにより、配糖体の分解速度に違いが出るためと推定している。さらに、単純なイソフラボンであるダイゼインの場合には、2相性のピークが出現し



葛根湯の生物学的同等性について予備的検討を行った指標化合物の構造式

た。これは、葛根湯内のダイゼイン配糖体が一定時間経過後に、腸内細菌などにより、ダイゼインに分解されて吸収されたことに由来すると推定している。

近年、LC-MS/MSは非常に高感度になってきており、高価な同機器を使用すれば、血漿中の漢方処方エキス由来生薬指標成分の検出は、多くの場合可能になりつつある。しかし、合成医薬品と比較すれば、含量的に1,000倍程度の高感度条件で検出せざるを得ず、分析それ自体が隘路となる場合が多い。さらに、腸内細菌叢に起因するヒト間のばらつき、類似・関連した成分の同一エキス内での存在など、指標成分を選択するだけでもさまざまな点を考慮する必要がある。何より先に、処方の活性を代表する成分をどう考えるか。麻黄の由来のエフェドリンとプソイドエフェドリンは、確かに麻黄を代表するアルカロイド成分であり、麻黄湯や麻黄が持つ生理活性のいくらかは説明する成分である。しかし、近年、筆者らは、別な成分が麻黄湯や麻黄の持つ重要な活性を担っていることを明らかにしており<sup>3)</sup>、生薬・漢方製剤が多成分

系の医薬品であることを実感している。

## おわりに

生薬・漢方製剤は多成分系の医薬品であり、医療の再現性の基本となる標準化は困難を極める。化学薬品の関係者から見ると、想像を絶する世界であるのではないか。しかし、医薬品の有効性と安全性を保証するには、多成分系であったとしても、可能な手段をとりつつ標準化を推し進める必要がある。生薬・漢方製剤関係者は、常にこの点を意識して医薬品研究を実施していくべきであろう。

## 引用文献

- 1) Hayashi H, et al: Characterization of phenolics and their variation in the leaves of *Glycyrrhiza* plants collected in Kazakhstan. *Chem Pharm Bull*, 51: 1147-1152, 2003.
- 2) Horii C, et al: Studies on bioequivalence of kakkonto decoction and its extract preparation (I). *Shoyakugaku Zasshi*, submitted.
- 3) Amakura Y, et al: Characterization of phenolic constituents from ephedra herb extract. *Molecules*, 18: 5326-5334, 2013.



## 定量NMR と日本薬局方試薬への定量NMR の適用<sup>\*2</sup>

合田 幸広<sup>\*1</sup>

### 1. 定量 NMR : quantitative NMR (qNMR) とは

定量 NMR は、<sup>1</sup>H-NMR を利用した SI トレーサブルな内部標準定量法であり、主に低分子を利用した定量分析(純度や濃度)に利用できます。一般的な定量分析として、例えば医薬品、農薬、天然物、食品関連物などの分野で活用が可能な試験法です。

トレーサビリティ (Traceability) とは JIS Z 8103-2000 の計測用語において「不確かさが全て表記された切れ目のない比較の連鎖によって、決められた基準に結びつけられ得る測定結果又は標準の値の性質」と定められています。また、校正(較正) (Calibration) とは、計器又は測定系の示す値、若しくは実量器又は標準物質の表す値と、標準によって実現される値との間の関係を確定する一連の作業です。

通常は校正の連鎖により、得られた値は上位標準(国家標準又は国際標準)に紐付いていることが求められます。これをフィッシュボーンダイアグラムといいます (Fig. 1)。一つひとつの分析の過程が繋がって、最後に逆算すると国際標準に繋がります。つまり、実際に定量すると、最後にどこかで国際標準に繋がることがトレーサビリティと考えて下さい。

国際標準には国際単位系 (The International System of Units : SI) があります。本部はフランスにありますのでフランス語では SI となります。

SI は十進法を原則とした最も普遍的な単位系で、七つの基本単位があります。時間 (s)、長さ (m)、質量 (kg)、電流 (A)、熱力学温度 (K)、物質質量 (mol)、光度 (cd) です。実際に測定したデータは、国際的な同一性を持たなければ意味がありませんので、全ての数値データは SI にトレーサブルであるべきです。

実際に化学分析によって得られた値は前述の七つの基本単位の組み合わせで表されます。

通常の化学分析は、基本的には物質質量 (mol) を基にします。mol とは 0.012kg の炭素 12 に含まれる原子と等しい数の構成要素を含む系の物質質量ですが、物質質量を通じて SI にトレーサブルであるべきです。

#### 1.1 物質質量の SI トレーサブルな測定法とは

SI トレーサブルな測定法を Table 1 に示します。

一つは一次標準測定法、もう一つは相対測定法(二次測定法)です。一次標準測定法の中で最も多いものは一次直接法です。よく知られている電量分析法や重量分析法、凝固点降下法などは、物質の基準となる他の化学物質を用いずに、自分自身で目的の化学物質の物質質量を測れる方法(絶対測定法)です。

このような方法に基づいて絶対的な定量ができますが、これらは、試料によっては正確な定量が困難で、不純物の影響の評価が難しい測定法です。更に操作が煩雑で分析が長時間となる欠点があります。

一方、二次測定法は、多くの場合はクロマトグラフ法で、一次標準測定法で得られた目的の化学物質の標準品を用いることによって、相対値として目的の物質質量を測ります。したがって標準品があれば、計量学的にトレーサブルになりますが、標準品自体が非常に乏しいことが最大の欠点です。

一次標準測定法の中に一次比率法があり、その中に qNMR 法があります。これは、物質質量の基準となる化学物質を用いて、それとの比較において目的物質の化学物質を測る方法の一つです。

<sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

<sup>\*2</sup> 当財団主催の第 8 回日本薬局方に関する説明会(平成 24 年 2 月 21 日:東京, 3 月 1 日:大阪)における講演による。

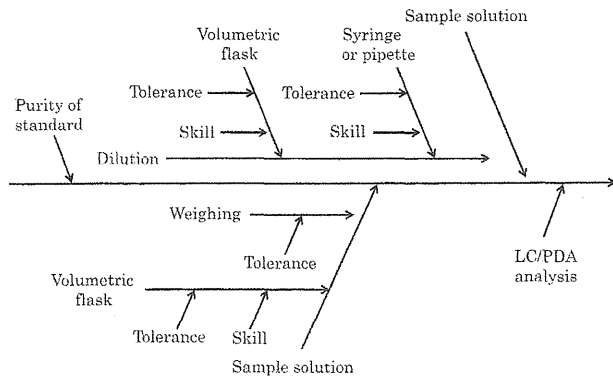


Fig.1 フィッシュボーンダイアグラム

## 1.2 クロマトグラフ法による有機化合物の定量値の信頼性

日常の分析、特に局方の中で分析を行う場合には、多くはクロマトグラフ法によって有機化合物を定量します。定量の信頼性は、標準となる物質(ここでは標品)の質に依存していることとなります。

実際に認証標準物質(CRM)があり、これと比較して行う場合には、SIトレーサブルな値になりますが、例えば標準品のようなものを自ら合成したり、単離生成したり、あるいは一般の市販試薬等を使用して分析した場合には、純度自体がSIトレーサブルでなく、国際単位系に繋がらないといった問題が出てきます。

標準物質がどのくらいあるかを Fig. 2 に示します。化

Table 1 物質量の SI トレーサブルな測定法

定量分析法の分類	説明	操作性	問題点
一次標準測定法	国際単位系(SI)にトレーサブルな測定(絶対量の測定)		
一次直接法	物質量の基準となる他の化学物質を用いず、自分自身で目的の化学物質の物質量を測れる方法(絶対測定法) (電量分析法, 重量分析法, 凝固点降下法)	×	試料によっては正確な定量が困難。不純物の影響評価が困難、操作が煩雑で分析が長時間となる。
一次比率法	物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法 (滴定法, 同位体希釈質量分析法)	×	
	定量 NMR (quantitative NMR: qNMR)法	◎	
相対測定法(二次測定法)	一次標準測定法で値付けた目的の化学物質の標準品を用いて、相対値として目的の物質量を測る (クロマトグラフ法)	◎	計量学的に妥当な手順によって純度が算出された標準品に乏しい。

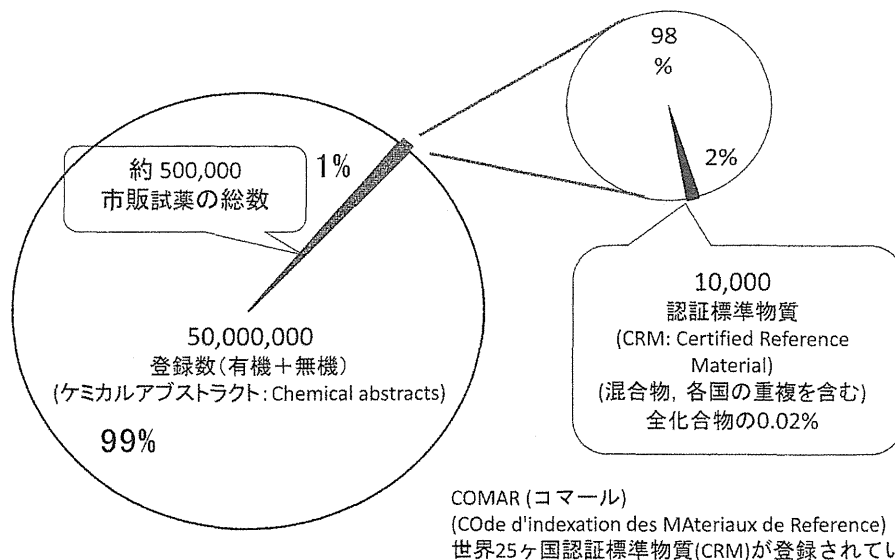


Fig.2 標準物質の数は？

学物質全体が世界でどのくらいあるかを調べてみますと、ケミカルアブストラクトに登録されている化学物質は 5000 万で、そのうちの 1% の 50 万が市販の試薬として売られています。この市販の試薬に対応して認証標準物質のあるものは、最大限見積もって 1 万です。これは混合物や各国の重複も全てを含めた場合です。つまり全化合物の 0.02% しか認証標準物質はありません。クロマトグラフ法で分析しようと思うと、認証標準物質を入手しなければ実際にはトレーサブルになりませんので、残りの化合物は全て SI トレーサブルな分析ができないことになります。

### 1.3 qNMR とクロマトグラフ法の違い

qNMR とクロマトグラフ法の違いを Fig. 3 に示します。qNMR 法は、化合物一つひとつを「ものさし」にするのではなく、化合物の中に含まれている原子核を「ものさし」

にします。化合物には、多くの場合水素が含まれていますので、水素原子核を標準とすることによって、物質の量を比較することが可能になります。

クロマトグラフ法は相対的な分析法ですので、同じ形のものでなければ比較ができません。標準物質がなければ SI トレーサブルな分析ができないことになります。

### 1.4 qNMR の原理

Fig. 4 に qNMR の簡単な原理を示します。例えばメタノールのメチル基、トルエンのメチル基には水素が存在しています。同じメチル基について NMR を測定すると、メチル基の数、つまり CH<sub>3</sub> の数に比例して NMR 現象が観測されます。

NMR のシグナルの強度を観測することによって、最終的にはこの化合物の濃度に対して直接的な比例関係が得ら

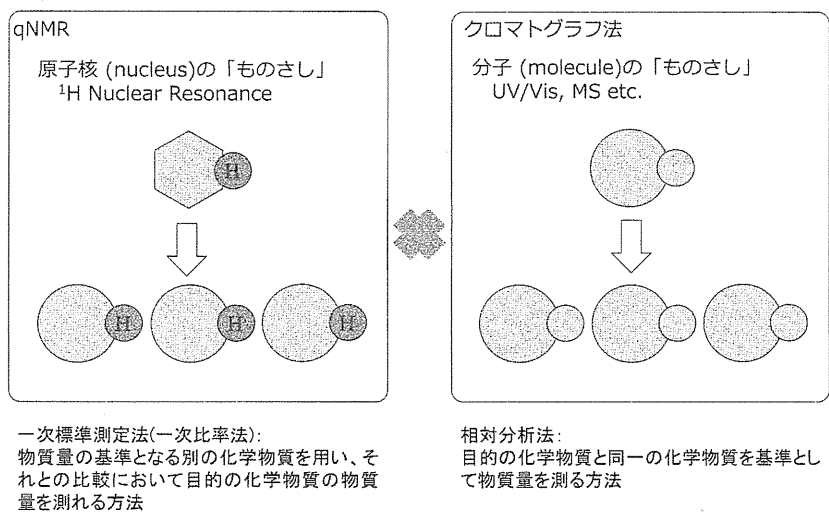


Fig.3 qNMR とクロマトグラフ法の違い

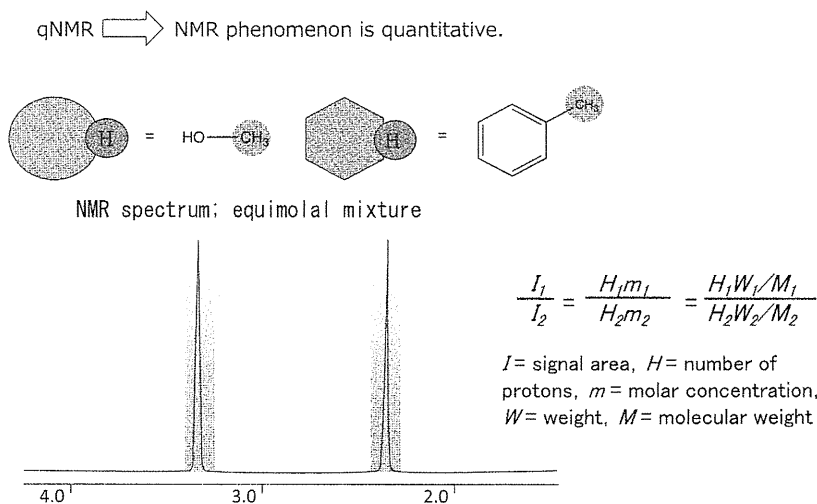


Fig.4 定量 NMR (quantitative NMR: qNMR) の簡単な原理

れることとなります。Fig. 4のように違う物質であったとしても、同じ濃度であれば同じようなシグナルの強度が現れます。

実際のアセトアミノフェン、ヒドロキシ安息香酸メチルの混合溶液のスペクトルを Fig. 5 に示します。分子量はほぼ同じで、どちらも 30mM 濃度が入っていて、似たようなシグナルが出てきます。

このシグナルについて qNMR の条件で測定し、積分値を比較してみると、どちらも同じ値が出てきます。違う物質であっても、同じ濃度であれば同じ強度のシグナルが出てきます。これが NMR 現象の基本です。

NMR で測定し、積分値を比較することによって、プロトンの数×モル濃度の比が同じような値が出てきます。例えば Fig. 6 に示したように、化合物 (A) の面積値は 3 で、

(B) は 1.02 です。面積値に比例して計算が容易にできますので、(A) のアセトアミノフェンの濃度が 27.16 mM と事前にわかっていた場合には、関係式①に代入すると (B) の濃度 9.24 mM を出すことができます。

つまり NMR で定量する場合、一つの標準物質があれば、別な化合物であったとしても、直接的に他の物質の濃度を測ることができることとなります。

### 1.5 qNMR の特徴 (Table 2)

第一に、非常に汎用性の高い定量法であり、標準物質があれば有機化合物のほとんど全てが対象となります。

第二に、測定対象物と同一の標準物質は必要としないので、非常に効率性の高い試験法です。

第三に、定量のための検量線を必要としない。直接の

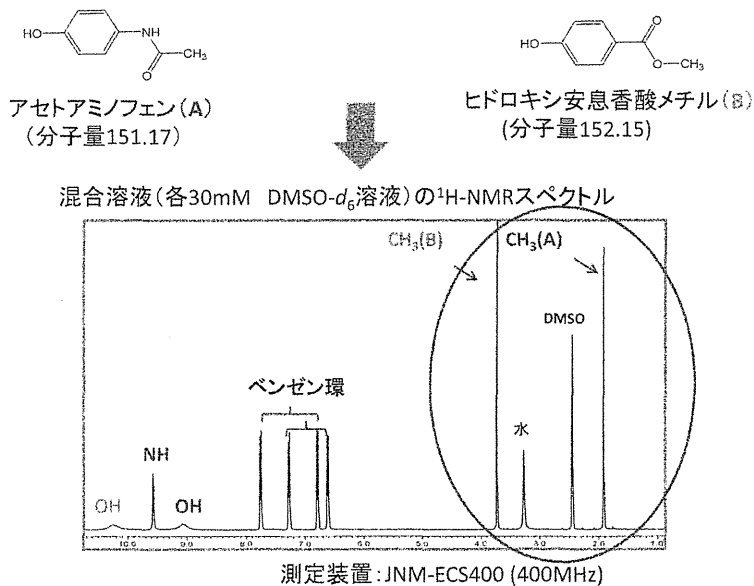


Fig.5 混合溶液の<sup>1</sup>H-NMR スペクトル

スペクトル上の分子間の関係式: ①

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{H_A c_A}{H_B c_B}$$

I : 積分値  
H : プロトン数  
(官能基の水素の数)  
c : モル濃度

アセトアミノフェン(A) 27.16mM    ヒドロキシ安息香酸メチル(B) ?mM

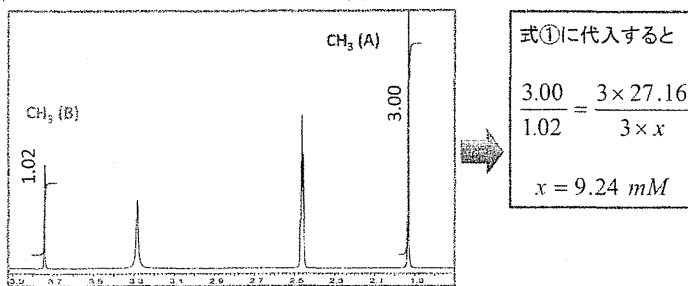


Fig.6 NMR で定量するという事

Table 2 qNMR(quantitative NMR)の特徴

<ul style="list-style-type: none"> <li>● 特徴 1：汎用性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 有機化合物ほとんどすべてが対象</li> <li>  応用報告例（農薬・医薬品・食品添加物・各種標準物質）</li> </ul> </li> <li>● 特徴 2：効率性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 測定対象物と同一の標準物質は必要としない                             <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ qNMR 用基準物質を使用しますが、一つの基準物質で様々な測定対象物の定量分析が可能です。</li> <li>➢ 標準物質が手に入らない測定対象物の定量分析が可能です。</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● 特徴 3：迅速性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 定量のための検量線は必要としない。</li> <li>  10～15分程度で測定が終了                             <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 数 mg 程度のサンプル量が必要です。</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● 特徴 4：信頼性                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 国際単位系 (SI) にトレーサブルな純度評価が可能                             <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 計量トレーサビリティが確保された qNMR 用基準物質を使用し、適確な分析操作手順を行った場合。</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
---

面積を比較しますので、測定そのものは 10～15 分で完了しますが、正確な値を出すためには、10mg 程度のサンプル量が必要です。

第四に、国際単位系 (SI) にトレーサブルな純度評価が可能な分析法です。

### 1.6 NMR で定量を行うための注意点

このような特徴があるのに、なぜこれまで qNMR がそれほど行われていなかったのかとといいますと、基本的に NMR は他の分析機器による方法に比べて非常に感度が悪い方法だからです。通常有機化学の構造決定に使用する場合には、感度は非常に重要ですので、S/N を重視した測定条件になっていました。したがって、通常の NMR の測

定条件は定量分析には向かない条件でした。

例えば Fig. 7 に通常条件での <sup>1</sup>H-NMR のスペクトルを示します。実際の積分値は、ほぼプロトンの数に比例しますが、しかし、経験上完全には正確ではないと思っている場合が多いと思います。

事実そのとおりで、一つの化合物の中では、当然積分比は整数比になるべきですが、メチル基の面積値 3.00 で取ると、メチン基は 0.92 になります。大まかには比例していますが、このままでは計算で面積値を出すことに対しては使えないことになります。

これは NMR 測定では、感度を稼ぐために、緩和時間を考慮し、完全にスピン系がもとの平衡に戻るのを待って測定をするよりも、短時間に繰り返し測定をしたほうが相対的な感度は上がるという実状に由来するものです。したがって十分な待ち時間を置かず次の繰り返しがあり、そのために、通常の測定では緩和時間に反比例して、積分値が小さくなります。これが通常の NMR の場合です。したがって qNMR を測定しようとした場合、qNMR に適した条件を作らなければなりません。

NMR で定量を行うための注意点は、まずパルスの繰り返し時間を十分に持つことです。

2 番目に <sup>13</sup>C サテライトをデカップリングして行わないとノイズになってしまいます。これはよく知られていることと思いますが、天然には炭素核の中に 1.1% NMR 現象を持つ <sup>13</sup>C の核があります。その <sup>13</sup>C の核と、<sup>1</sup>H (プロトン) がカップリングしていますので、そのカップリングをデカップリングして <sup>1</sup>H-NMR を測定する方が、より精度の高い測定ができます。

3 番目にデジタル測定ですから、デジタル分解能を十分に取らなければ正確な値が出ません。したがってポイント数も十分に持たせる必要があります。

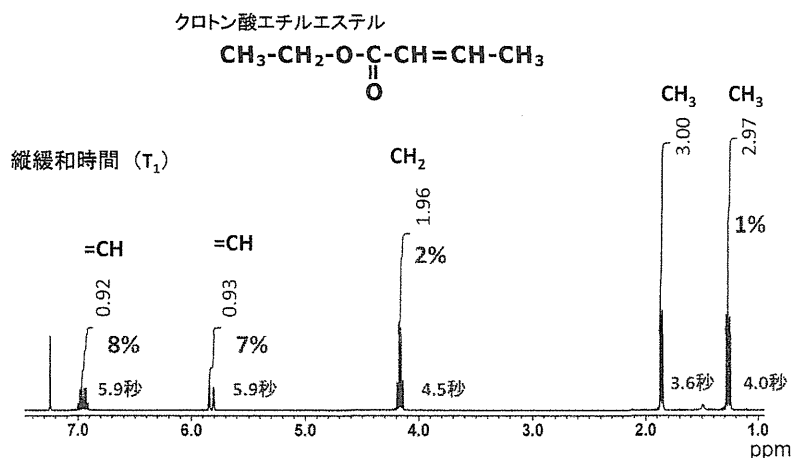


Fig.7 通常条件での <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

4番目にパルスの励起範囲は、完全に全領域を励起できなければ定量性はありません。

5番目にオーディオフィルタの問題もあります。

これらの注意点は装置が持つ要因です。NMRは非常に高価ですが、かなり昔の機械、例えば20年前の機械では、機械そのものが出せるパルスの間隔の精度や、一つひとつのパルスの再現性の問題で、容易にqNMRを実施できるというレベルの機械ではありませんでした。

しかし、現在の機械は十分にそのような精度を持っています。少なくとも有効数字2桁目までは正しい値が出せるレベルまで上がっていますので、装置が持つ要因は、現在使われている機械であれば、ほぼどの機械でも解消していることになります。

後述しますが、我々は2005年頃から、qNMRを実際に天然物の標準品に応用し、それによって測定に応用できると考えて研究を開始し、国立医薬品食品衛生研究所、産業技術総合研究所(産総研)、和光純薬工業株式会社、日本電子株式会社(JEOL)と共同で、具体的な問題を一つひとつ解決してきました。

### 1.7 qNMR 技術構築のための要素技術の開発と実用化 (Fig. 8)

実際にqNMR技術構築のためには、個々の技術的な問題も解決しなければいけません。前述した遅延時間の最適化、オーディオフィルタの最適化などについて、JEOLと共同で検討し、非常に容易に測定できるプログラムを作り

上げました。

更にもう一つ大事なものは標準物質で、SIトレーサブルな標準物質がない限りは具体的な数値づけができませんので、それを産総研と共同研究で検討しました。

これらの技術的な要素と化合物的な要素を組み合わせ、qNMRが日常的に測定できるようなレベルになりました。

### 1.8 qNMR のインフラの整備

我々は、Speed, Simple, Smartの三つの用語に基づいて、誰にでもqNMRが測定できるようなシステムを作り上げてきました。NMRをよく知らない場合でも、ソフトを購入し、サンプルチューブを実際に入れて測定すればデータが出てきて、それに対応した定量値が出せるような状況になっています。

最も重要な点は、標準品と測定するものの秤量です。非常に精度の高いマイクロ天秤を使って測り取ることが重要で、秤量が最も定量値に影響を与えます。この秤量以降は、具体的にNMR装置で測りさえすれば、容易に値が出せるレベルにまで来ています。

### 1.9 qNMR の SI トレーサビリティの確保 (Fig. 9)

SIトレーサビリティの確保には標準品が非常に重要です。有機化合物的には、現在1,4-ビス(トリメチルシリル)ベンゼン- $d_4$  (BTMSB- $d_4$ )を産総研において値付けて和光純薬で販売しています。水系の化合物は、同じように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

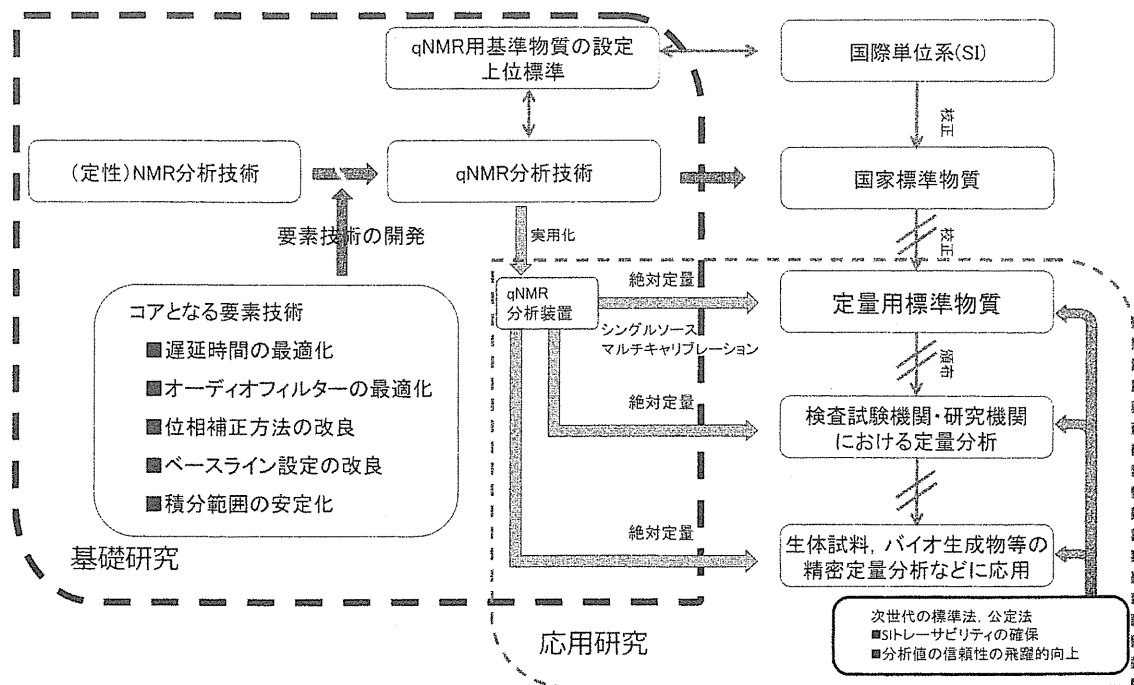


Fig. 8 qNMR 技術構築のための要素技術の開発と実用化：SI トレーサビリティの実現

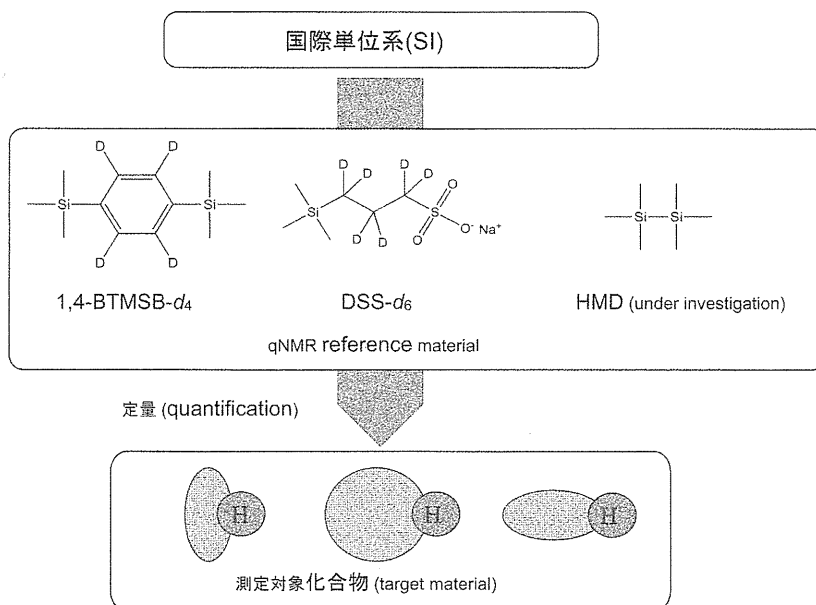


Fig.9 qNMRのSIトレーサビリティの確保

塩 (DSS-*d*<sub>6</sub>) を販売していますので、これをテトラメチルシラン (TMS) の代わりにサンプルチューブに測り取り、NMRを測定すると、どのような化合物でも容易に定量の値付けができます。

なお、qNMR用の標準物質は、50mgで3万円程度で市販されています。

## 2. qNMRを天然物の試薬の定量値の値付けに なぜ利用するようになったか

### 2.1 生薬・漢方製剤の品質保証

医薬品の3大要素は有効性、安全性及びそれらを担保するための品質保証です。生薬や漢方製剤は、栽培指針、GMP等でその品質を保証していますが、一方で物質レベルでは多くの場合は日本薬局方(日局)で品質を保証しています。また、日局に入っていない生薬を対象として日本薬局方外生薬規格(局外生規)があります。このようなものを全て組み合わせることによって、医薬品としての生薬及び漢方製剤の品質を保証しています。

物質レベルで最も重要な品質保証の規格書は日局で、成分管理の規定があり、定量法又は成分の含量の規格値が設定されています。この定量法などでSIトレーサブルな分析を実施するためには非常に問題がありました。

まず第一に標準物質の問題です。標準物質は『医薬品研究』に書かれた報告書<sup>1)</sup>に「化学分析、生物活性や物理量などの測定、あるいは試験法や測定装置の正確さを確かめるための標準として用いる物質の総称」と定義されています。更に「公的に供給される、医薬品の試験用途に相応し

い品質であることが保証された標準物質」のことを標準品と呼ぶとされています。ここでは「公的に保証」という言葉が使われています。

日局は国の法令ですので、「公的に保証」されたものが供給される限りにおいては、SIトレーサブルであってもなくても、法的にはそこで完結します。したがって、現実的に標準品が供給されている限りにおいては、日局上、特に定量に対して問題はありません。

日局標準品は現在353品目あります(Table 3)。このうち生薬関係の標準品は10品目で、この中の2品目(glycyrrhizic acid, berberine chloride)は生薬以外にも使用されています。この10品目以外、生薬及び漢方製剤に関しては、標準品は供給されていません。

標準品の使用目的は、基本的には相互比較により物質量を決定することで、多くの場合はクロマトグラフ法等によって定量値を得るために使用します。したがって、生薬及び漢方製剤ではこの10品目以外のものについて定量値を設定することが難しい状況でした。

### 2.2 日本薬局方の標準品の供給体制

日局11(1986年)までは国立衛生試験所(現：国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研))が供給をしていましたが、日局12(1991年)公布直後に厚生省(現：厚生労働省)が日本公定書協会(現：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団)に一部供給を依頼するようになりました。その後日本公定書協会において製造・供給するための体制が整備され、2004年以降、抗生物質標準品以外は全て日本公定書協会に完全に移管されました。

Table 3 日本薬局方標準品の分類

<ul style="list-style-type: none"> <li>● 日本薬局方標準品（日局標準品）：353 品目             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 化学薬品用標準品 183 品目                 <ul style="list-style-type: none"> <li>生物薬品用 21 品目</li> <li>抗生物質用標準品 130 品目</li> </ul> </li> <li>- 生薬標準品 9 品目 + 1 品目（glycyrrhizic acid, baicalin, paeoniflorin, swertiamarin, sennoside A, sennoside B, berberine chlorohydrate*, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg1, puerarin）</li> <li>- 一般試験法用（機器校正用も含む）標準品 9 品目</li> </ul> </li> <li>● 使用目的（主に定量用）</li> <li>● 化学物質：HPLC 法や吸光度法は、測定対象物質の物理的特性を基本としており、質量とは直接結びつかないため、基準となる物質を基に物理量の相互比較により相対的に物質量を決定</li> <li>● 生物薬品、抗生物質医薬品量：力価又は単位で表され、生物検定法、微生物検定法、酵素活性測定法等、基準となる物質との応答能の相互比較により相対的に物質量を決定</li> <li>● 確認試験用（定性試験）5 品目、純度試験用 4 品目も規定</li> </ul>
---

\*：化学薬品用に分類

日局 15 (2006 年) になると、供給機関は登録制になり、日本公定書協会が登録第 1 号になりました。現在は国立感染症研究所が製造・供給している抗生物質標準品以外は、全て医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団で入手が可能になっています。

一方、標準品の製造先については、日本薬局方技術情報 (JPTI) 2011<sup>2)</sup> に試験法を設定しようとする実質的な当事者が供給をしないと生産できないと書かれています。つまり、医薬品の先発企業が、標準品を供給することを念頭に、その試験法が設定されています。更に標準品評価委員会 (第三者機関) が標準品の含量規格を評価し、最終的に標準品が供給されることになっています。

生薬については先発企業があるわけではないため、この原則は当てはまりません。過去に国立衛研が製造していましたが、現状では先発企業がない限りは、誰も作れないこととなります。

### 2.3 生薬の定量規格に関する従来体制 (Table 4)

生薬は日局 12 より、標準品の供給されているものは標準品を使用して HPLC を利用した定量規格を設定するようになりました。例えばオウバク等は、直接的に電位差滴定でベルベリンを定量できますので、従来から定量法が設定されていました。ベルベリンの場合この標準品を用い、HPLC による定量法に改訂されましたが、それ以外のものについては、国立衛研で標準品そのものを製造せざるを得ませんでした。

それより以前はその当時市販されている試薬を使用し

Table 4 生薬の定量規格に関する従来体制

<ul style="list-style-type: none"> <li>● JP12 (1991 年) より、標準品のあるものは、標準品を使用した HPLC を利用した定量規格 (オウバク等) の設定、標準品のないものは、成分含量測定用試薬を試薬で規定し、HPLC による定量規格の設定 (シヤクヤク、ボタンビ等) → HPLC を利用した定量法の拡大</li> <li>● 国立医薬品食品衛生研究所 (大阪支所 or 生薬部) で厚生労働省試験研究費試験製造費 (庁費) で製造：最終品目 ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg (平成 13 年度), sennoside A, sennoside B (平成 14 年度), 平成 15 年度で大阪支所閉所 標準品製造業務の終了</li> <li>● 純度試験用アリストロキア酸の供給の必要性 (JP15:2006 年 4 月, 平成 14 年)</li> <li>● 厚生労働科学研究費で対応 → 純度の高いアリストロキア酸を試薬として供給             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 純度が高い? と考えられる標準物質が試薬として販売されていないものは、定量規格の設定ができない</li> <li>- 試薬の純度はだれが保証する? 標準物質の純度が違えば定量値も異なる</li> </ul> </li> </ul>
--

て定量規格を設定していました。試薬であっても定量規格を入れる方が、入っていないよりも規格としてはよいと考えたからです。

このような状況で設定された規格は順次、国立衛研が生産する標準品に基づくものに移し替え予定でしたが、国立衛研での標準品業務が前述のように日本公定書協会に移管されることとなり、平成 15 年度でその業務を実施していた大阪支所が閉所になりました。したがって天然物についての標準品を供給する体制がまったくない状態で、局方が運営されるようになりました。

それ以降でアリストロキア酸の標準品を供給をしなければならなくなった際には、非常に緊急事態でしたので、厚生労働科学研究費で純度の高いアリストロキア酸を調製し、標準品ではなく試薬として試薬会社から販売しました。しかしこのようなことは非常にまれで、誰かが具体的に何らかの標品になるものを提供しない限り、クロマトグラフ法での定量規格は設定できない状態となっていました。

このような状況ですので、生薬の規格は最も純度が高いと考えられる市販の試薬を局内での試薬・試液で規格化して、成分含量測定法として設定してきました。

しかし、試薬の純度は実際には誰も保証していません。毎回ロットが違って純度が変わった場合に、その値の変化を誰が保証するのかはブラックボックスのままです。

### 2.4 天然物の定量分析における問題 (Table 5)

天然物は、単離精製が非常に困難です。例えば 100mg の一つの天然物を入手しようと思うと、含量が 1% として、数十キロの生薬から調製しなければなりません。また単離



Table 5 定量指標成分(天然物標品)の問題点

単離精製が困難	多大なコストと労力？
水分含量の測定が困難	相当量が必要？
原料，単離工程により不純物構成が異なる	原料と単離工程の統一？
ロット間差が大きく純度コントロールが難しい	品質管理の厳格化？
クロマトグラム上の面積百分率による純度規定	面積百分率では絶対量が不明？

に非常にコストと労力がかかります。更にせっかく単離した化合物が100mgあったとしても、水分含量をカールフィッシャーで測定する場合、最低でも約20mgは必要ですので、水分含量を測定するだけで貴重な化合物を消費してしまいます。

その上単離すると、1回ごとに原料や単離工程が異なるため、含まれる不純物構成が異なります。つまりロット間格差が大きいため、標準品そのものの品質管理が非常に難しいことがわかります。

このような問題がある上に、最終的に純度の測定をどのように実施するかが、難しい問題です。最も問題のある不純物は水かもしれませんが、それ以外にも、クロマトグラム上に現われてこない不純物はわかりません。天然物の標準品を作ることそのものが非常に難しいことです。

## 2.5 薬局方の生薬成分定量試薬規格の抜本的な解決策としての qNMR の検討

日局 15 では、漢方処方エキスについては原則として 3 成分の定量規格を入れることになっていましたので、定量は非常に重要な課題でした。このような状況の中で、qNMR の研究を検討しました。

qNMR そのものは、2005 年頃、国衛研食品添加物部の杉本<sup>3)</sup>により研究がスタートしました。生薬も天然添加物と同じような問題を持っていますので、同じような視点から、qNMR を具体的に応用すべきと考え、平成 20 年に国立衛研と産総研との間で共同研究契約を結び、標準品の開発等を行うことになりました。

更に厚生労働科学研究費で平成 21 年から研究を実施し、現在は qNMR を生薬規格にどのように応用するかの研究を行っています。2010 年、2012 年に発表した論文について後述します。以上の研究に基づいて、日局 16 第一追補に参考情報として、「NMR 法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用」が記載されることになりました。

## 3. 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 (Table 6)

日局 16 第一追補の本参考情報では、最初に定量技術の原理について書いてあります。まず、測定対象物のピーク面積値とプロトン核の数に比例関係があることを示しています。実際には十分に緩和時間を考慮した待ち時間を取れば、基本的に標準品と測定対象物との面積値を測ることによって、測定対象物の濃度あるいは純度がわかります。

更に NMR 用の基準物質の定量ソフトの供給、日本薬局方における生薬中の定量指標成分と定量分析用標品の設定、及び qNMR の具体的な応用について説明してあります。

先ほど取り上げた論文では、どのピーク、シグナルに対して qNMR で値付けをするかが非常に大きな問題になることを明らかにしています。実際には指標とするシグナルの決定のルール作りが必要であり、試薬ごとにどのシグナルに基づけば最も確実かについて、日本薬局方原案審議委員会の中で議論をして決めることが重要と考えています。原則としては、低磁場のシングレットピークが優先で、カップリング系が複雑にならないものがよいと述べています。

また、最低の定量値がよいとも述べています。つまり、qNMR の定量値が最も不正確になる原因は、実はその下に隠れている不純物です。シグナルの下に不純物が隠れていると、その定量値についての信頼性はないことになりませんが、qNMR の測定結果だけでは、本当に不純物が隠れているかどうかわかりません。この問題については、直接的にシグナルを見て、品目ごとにどの値を優先してつけるかについて慎重に考える必要があります。

更に、ここに示した条件で、具体的に成分含量測定用に使用される試薬を用いて、5 機関でバリデーション実験を実施し、どのぐらいの精度があるか分析を行いました。5 機関は国立衛研の中の 2 か所と、JEOL、和光純薬及びツムラです。

この結果、分子量 300 の試料で 10mg 程度調製できれば、この場合に少なくともダブルレット程度のピークで qNMR を実施した場合には、機器間誤差を含めても、得られた定量値の標準偏差は 0.2 程度になることが明らかになりました。

標準偏差 0.2 は、 $\pm 2SD$  では 0.4 になりますので、ほぼ 95% 信頼区間となります。有効数字 2 桁を保証しながら十分に値付けが可能であることが、具体的な測定結果に基づいて実証されました。

これらの実験結果は 2 つの論文に発表しています<sup>4,5)</sup>。

ある程度不純物の混入が多いことが、qNMR で天然物を測定する際の一つの大きな問題です。市販試薬で測定し

Table 6 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 (参考情報)

## 1. 核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した定量技術の原理

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

ピーク面積  $S_i$ , 共鳴する  $^1\text{H}$  核の数  $N_i$ , 溶液体積  $V$ , 試料の質量  $m$ , 分子量  $M$ , 純度  $p$ , 励起パルス角  $\beta$ , 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  $T_i$ , 平衡磁化  $M_0$

定量 NMR 条件下では

$$1 - e^{-T_i/T_{1i}} \approx 1 \quad \frac{S_i}{S_j} = \frac{N_i}{N_j}$$

したがって a, s を, それぞれ測定対象物質と内標準物質とすると

$$p_a = \frac{S_{ai} N_{sj} M_a m_s}{S_{sj} N_{ai} M_s m_a} p_s$$

## 2. NMR 用基準物質と定量ソフトの供給

- 日本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,  $^1\text{H}$  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- $d_4$ ), 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- $d_6$ ) が容易に入手可能
- NMR メーカーより, 前述した原理に基づく定量 (定量 NMR, qNMR) が容易に実施できるような測定ソフトも供給

- 日本薬局方で使用される試薬に関し, 容易に定量 NMR を実施可能

## 3. 日本薬局方における生薬中の定量指標成分と定量分析用標品の設定 (現行の説明)

## 4. 生薬・漢方処方エキスの分析に用いる定量分析用標品への定量 NMR の応用

- 定量値付けの際考慮すべき点: 指標とするシグナル決定のルール作りが必要 (低磁場シングレットピーク優先, 最低定量値優先等) → 局方生薬等委員会にて試薬毎に決定 Hosoe J. *et al.*, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, 960-970 (2010).
- 平成 22 年度厚生労働科学研究費等 成分含量測定用試薬を用い 5 機関で, バリデーション実施 → 分子量 300 で 10 mg 程度使用し, 定量試料を調製すれば, 機器間誤差を含めても得られた定量値の標準偏差が 0.2 程度, ほぼ 95%信頼区間となる平均値  $\pm 2SD$  が平均値  $\pm 0.4$  程度で, 有効数字 2 桁を保証しながら十分に値付けが可能 Hosoe J. *et al.*, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 43, 184-195 (2012).

## ● 実際例

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。

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%。

## 5. 定量 NMR で値付けされた試薬の供給

現在, 独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター(IA Japan)の認定プログラム(ASNITE)において, 校正された NMR 装置を用いて試薬の値付けを行う機関に対する認定をどのように行うか検討が開始されている。さらに IA Japan では, 試験方法区分への「定量 NMR 分析」の追加を予定している。

したがって, 近い将来, 試薬会社はこの認定を受けて試薬の値付けを行うことが可能となる。この場合, SI トレーサブルな値を得るために, 試薬ユーザーが個々に定量 NMR を実施する必要がない (現行の標準品と同じ状態)。

非常に純度が高い場合で水分が入っていない場合には 99%以上の純度となります。一般的には, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団が販売している標準品の多くはこのような純度です。

また別に水分含量が測定されていれば, その含量について対応すればよいので, ほぼ SI トレーサブルなものといえます。

一方で, 通常カラムクロマトグラフィーで分けて, 非常に大変な工程で精製し, 試薬として売られているものの場合, 95%程度しか純度がありません。少し悪くなると 90%を割ります。例えば Fig. 10 に挙げたクルビタシン

B は, 普通の人が普通にカラムクロマトグラフィーで単離し, 構造決定に使用したのですが, これを我々が実際に qNMR で測定すると, 純度は 50%ぐらいになります。

つまり十分に構造決定ができて, 見た目はきれいであったとしても, 天然物の場合はそのくらいの純度であることが往々にしてあります。したがって各化合物の純度によって, qNMR の場合の定量対象とするシグナルの決め方も大きく異なっていることがあります。その問題をこの論文で議論しています。

更に Fig. 11 に挙げたような条件でバリデーション実験を実施しました<sup>3)</sup>が, 有効数字 2 桁程度の精度を持つ値付

天然物の定量問題を解決するため、日本薬局方においてqNMRを利用することを前提とし、成分含量測定用試薬の純度について、どのように規格していくか具体的な方策を検討。

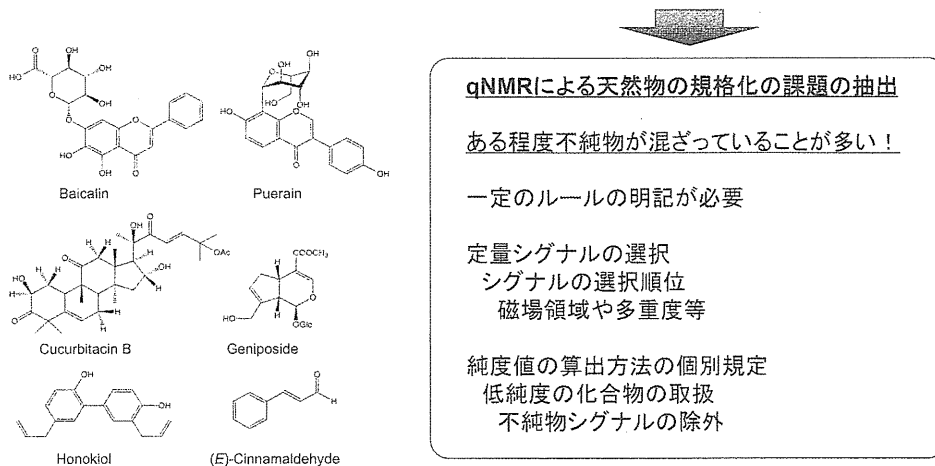
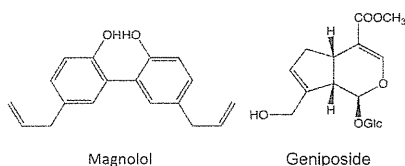
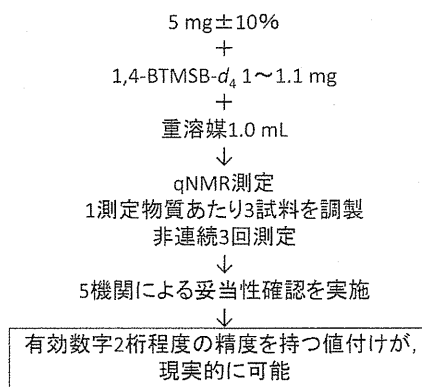


Fig.10 定量 NMR (qNMR) による日本薬局方試薬の純度規格化の検討<sup>4)</sup>



定量NMR (qNMR)による純度試験法の設定

生薬等の成分の定量測定用の分析用標品の2化合物  
「コウボク」に使用されるマグノロール(magnolol)  
「サンシシ」に使用されるゲニポシド(geniposide)



測定条件  
NMR: 400-800 MHz  
観測スペクトル幅: 20 ppm  
スペクトル中心: 5 ppmの位置に設定  
パルス角: 90°  
取り込み時間: 4 s  
取り込み点数: 0.25 Hz  
遅延時間: 60 s  
測定温度: 室温  
<sup>13</sup>Cデカップリング: MPF8  
積算回数: 8 回

Fig.11 日本薬局方における生薬等の成分定量用試薬  
定量 NMR (qNMR) のバリデーション試験<sup>5)</sup>

けが具体的に可能であることが明らかになりました。局方のサンシシでは、ゲニポシドの含量を HPLC 分析法に基づき 3.0% 以上として規定していますが、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を購入し、qNMR を実施すると、絶対純度は 92% 程度しかありません。

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て HPLC を実施した場合、定量値は 3.0% として導かれたとしても、qNMR による絶対純度は、即ち、計量トレーサビリティを確保した値として出てくるのは実

は 2.8% となります。真実の値は 2.8% であっても、このような試薬を使ってしまえば定量値は 3.0% と出るという矛盾点が生じるのが現状です。

qNMR で値付けされた試薬の供給については新規参考情報の最後に書かれています。現在、独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター (IA Japan) の認定プログラム (ASNITE) において、校正された NMR 装置を用いて試薬の値付けを行う機関に対する認定をどのように行うかが検討されています。

更に IA Japan では、試験方法区分への「qNMR 分析」

の追加を予定しています。現実的に自社のラボでこのような試験を行った場合、試験法的には正しいとしても、実際にプログラム上測定が正しいかどうかは誰も保証してられません。しかしこの認定を受ければ、前述したフィッシュボーンダイアグラムに繋がることとなります。近い将来、試薬会社がこの認定を受けることになっていますので、その試薬会社で値付けされた試薬そのものは、全て完全に SI トレーサブルになります。

この場合 SI トレーサブルの値を得るために、試薬ユーザーが個々に qNMR を実施する必要はなく、値付けされた試薬を購入して使用すれば良いことになり、これは現行の標準品を使用する場合とまったく同じ状態になるということです。

Table 7 は、局方生薬成分定量試薬の qNMR を国衛研生薬部で実験的に測ったデータです。バルバロインはロットを二つについて測っています。見た目の純度、つまり表示純度は 99% ですが、測定の純度は 89% や 92% といった数字が出ています。

サイコサポニンの純度は 99% となっていますが、これはクロマトグラム上の純度で、実際に測定した純度は 90%、あるいは 86% といった値が出ています。先ほど述べたように、普通に精製したものでは、SI トレーサブルの値としては、実はこのくらいの定量値が普通であることがわかります。

今後の問題点としては、多くの場合生薬成分は、市販試薬に基づいて定量することが当たり前でしたので、現在作られた規格は、そのような値に基づいて規格値が定められています。しかし、qNMR に基づいた試薬の純度をその規格の中に組み込むことになると、得られた定量値が小さくなり、規格値そのものについても何らかの考慮をする必要と考えます。

例えばアロエのバルバロイン 4% 以上を含むという規格ですが、先ほど示しましたように試薬に二つのロットがあり、90% と 92% の異なる純度が出ています。もともとはどちらも 100% として計算して適合でしたが、92% のロットを使用すると 3.9% の含量で不適、90% のロットを使っても 3.6% で不適になるという問題が出てきます。今後、具体的に qNMR の値付けをされた試薬が販売されるようになるタイミングと合わせて、生薬等委員会で議論して、定量規格値をどうするかを考える必要があります。

### 3.1 公定書の中の NMR

食品添加物公定書では、フルジオキソニル(標準品)が平成 23 年 8 月 31 日の官報公布において、qNMR を使って純度そのものを直接測定することが規格化されています。一般試験法にも、「確認又は定量を行うことができる

との記載が既につけ加えられています。

食品添加物公定書は大臣告示ですので、局方と同じ格の公定書です。既に公定書の中に qNMR の実施が組み込まれていますので、今後、局方上に qNMR を組み込むことも基本的には問題ないと考えています。

局方には、NMR そのものが一般試験法の中にあり、確認試験として抗生物質 46 品目に利用されています。更にヘパリン中の過硫酸化コンドロイチン硫酸の限度試験として、2008 年に USP、EP と調和をして試験法が組み込まれました。今後、qNMR で値付けをされた生薬の定量用試薬について第一追補の参考情報で示し、qNMR は第二追補で組み込むことを考えています。また、qNMR の試験法そのものについては、一般試験法 5.01 生薬試験法に入れる方がよいと考えています。

米国薬局方では、一般試験法の NMR の項に、「NMR による定量の理論」が記載されており、いくつかの異性体比等を測る試験法として入っています。しかし、qNMR そのものが組み込まれているわけではありません。ただし、定量を行うことが操作上に入っているものもあります。

## 4. 質疑応答

**質問 1** 薬局方の中で NMR 試験が定義されているものの事例として、ヘパリンナトリウムの中の OSCS がありませんが第二追補で入れるということでしょうか。

**回答** これはもう入っている試験法です。第二追補で入れるのは、純度試験法で、ピークは観測しないような試験法です。したがって定量試験法とはいえません。第二追補で入れることを考えているのは、qNMR 法を使った試薬が、その段階では既に販売されておりますので、その試薬に例えば 94% という定量値の値付けがされたものが販売され、定量値の計算、例えば生薬中のある成分の値が 3.0% 以上との規格があった場合、その 3.0% を算出する際に、試薬に qNMR で値付けをされた定量値の値を組み込んで計算するという形式を考えています。これで試薬のロットごとによる定量値の差が出ないこととなります。

**質問 2** あまり NMR に詳しくありませんが、直感的に qNMR の測定結果が本当に正しいという証明が難しいような気がしますが、測定条件などからバリデーションのようなことはできるのでしょうか。

**回答** A の化合物と B の化合物は、どちらも国際標準で、SI トレーサブルなもの同士を測定して、両方の値が同じであれば正しいです。そのようなことは事前に産総研で全