

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題

単味生薬製剤及び西洋ハーブの品質・安全性確保に資する評価手法に関する研究

研究分担者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

単味生薬製剤の品質確保に資する評価手法に関する研究

「局方医薬品承認申請の手引き」に収載されている生薬を単味エキス製剤として承認申請する際に必要となる資料等について、単味生薬製剤承認基準原案及び「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)としてまとめた。さらに、「局方医薬品承認申請の手引き」収載生薬のエキスに関して、各種公定書及び文献を調査したのち、単味生薬の煎剤および定量法の指標成分を選定し、その可用性を実証的に検討し、暫定案として示した。これらは、単味生薬エキスに由来するエキス製剤の開発における規格設定に有益な情報となり得るものと思われる。

研究協力者

合田幸広	国立医薬品食品衛生研究所
佐藤直子	国立医薬品食品衛生研究所
木内文之	慶應義塾大学薬学部
中村高敏	(独) 医薬品医療機器総合機構
須藤慶一	OTC 医薬品協会
小泉裕久	OTC 医薬品協会
岡崎洋行	OTC 医薬品協会
大黒宏樹	OTC 医薬品協会
北郡秀晃	OTC 医薬品協会
岡 秀樹	OTC 医薬品協会
佐々木隆宏	OTC 医薬品協会
森口展明	OTC 医薬品協会
塩本秀己	OTC 医薬品協会
奥野憲治	OTC 医薬品協会
二宮伸二	OTC 医薬品協会
秋田幸子	OTC 医薬品協会

力石正子	OTC 医薬品協会
山田 航	OTC 医薬品協会
中田孝之	日本漢方生薬製剤協会
大田慶隆	日本漢方生薬製剤協会
畑 恵美子	日本漢方生薬製剤協会
近藤誠三	日本漢方生薬製剤協会
山本 豊	日本漢方生薬製剤協会
岩嶋 淨	日本漢方生薬製剤協会

A. 目的

現行の日本薬局方（第十六改正）には 200 品目を超える生薬が収載されているが、その用途はほとんどが漢方製剤の製造原料であり、「刻み」または「末」として承認されている約 30 種を除き、単味の医薬品としてはほとんど承認されていない。一方、厚生労働省は一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、平成 14 年

11月に提出された中間報告『セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言－具体的な方策－』の中で、「国内で長期間医薬品として使用されてきた生薬に関する検討」の必要性に言及し、一般用医薬品の範囲拡大のためにも具備すべき特性を考慮した基準等（例えば、「単味生薬製剤承認基準（仮称）」）を策定するなど、今後とも積極的に維持存続を図るよう検討が必要と提言している。そこで本検討班では、単味生薬製剤承認基準の内規とも言える昭和55年出版の「局方医薬品承認申請の手引き」（以下、局方手引き）の内容整備及び行政文書としての発出するための原案作成、そして主に煎液または末での服用が規定されている局方手引きをエキス製剤（錠剤、顆粒剤等）の開発にも対応させるためのブリッジングガイドラインの策定に着手した。

このような状況において、平成25年度は単味生薬製剤承認基準原案及び「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」（案）（以下、同等性ガイドライン案）を作成した。同等性ガイドライン案におけるエキス製剤の品質確保は、単味生薬の標準煎剤と生薬エキスの指標成分を定量し、その比較を行うことで煎剤とエキスの同等性を担保する方法を採用している。これは、漢方における標準湯剤と処方エキスの同等性を担保することにより漢方処方の品質を確保する方法（昭和60年5月31日薬審2第120号別紙1「標準湯剤との比較試験に関する資料について」）を参考としたものである。なお、本検討班で作成した同等性ガイドライン案の大きな特徴は、単味ではあるが複数の指標成分の定量を求めているところにある。

そこで、本年度は、各生薬で複数の指標成分の定量法を設定できるよう検討を進めた。また

これと並行して、局方手引きのさらなる改訂を行うべく、生薬や効能効果の追加収載に向けた方針を議論したので報告する。

B. 研究方法

生薬製剤承認基準案検討班会議の開催

国立医薬品食品衛生研究所生薬部を拠点とし、OTC 医薬品協会の生薬製品委員会と薬制委員会、日本漢方生薬製剤協会の原薬エキス委員会と生薬製剤委員会及び慶応大学薬学部と綿密に連絡を取りつつ、3回にわたり、生薬関連メーカー、（独）医薬品医療機器総合機構、慶応大学薬学部及び国立医薬品食品衛生研究所生薬部の関係者から構成される検討班会議を開催した。会議の座長は本研究事業研究分担者の袴塚が務めた。

平成26年度第一回会議

日時：平成26年7月3日 13:00～15:00

場所：国立医薬品食品衛生研究所

第一第二会議室

参加者：20名

平成26年度第二回会議

日時：平成26年10月17日 13:30～17:00

場所：国立医薬品食品衛生研究所第二会議室

参加者：19名

平成26年度第三回会議

日時：平成27年1月8日 13:30～17:00

場所：国立医薬品食品衛生研究所講堂

参加者：19名

単味生薬の煎剤及びエキスの同等性確保に資する確認試験及び定量法に関する検討

局方手引き収載生薬に関して、各生薬エキスの指標成分及びその確認試験と定量法の具体

例を作成した。各生薬エキスの確認試験及び定量法の指標成分は、以下に挙げる各国薬局方及びそれに準ずる基準等を参考として選定した。

- ・第十六改正日本薬局方 (The Japanese Pharmacopoeia sixteenth edition; 以下、JP)
- ・中華人民共和国薬典 (Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010; 以下、CP)
- ・Herbal Medicines Compendium published by the U.S. Pharmacopoeial Convention; 以下、USP)
- ・ヨーロッパ薬局方 (European Pharmacopoeia 7th edition; 以下、EP)
- ・イギリス薬局方 (British Pharmacopoeia 2013; 以下、BP)
- ・香港中薬材標準 (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards; 以下、HKCMMS)

確認試験及び定量法の可能性の検証には、局方手引き及びガイドライン案の記載に従って調製した各生薬の煎出液である標準煎剤と、その水分を留去して作製したエキスとを用いた。

<倫理面への配慮>

ヒト由来サンプル及び実験動物を使用していないため、該当する事由はない。

C. 結果

第一回単味生薬班会議

昨年度までの班会議で、単味生薬製剤承認基準原案の作成がほぼ終了した。そこで、平成26年度第一回班会議では、今後の班会議の方針について確認した。将来的に新規単味生薬エキス製剤の承認が得られるようになることを目標とし、局方手引きに収載されていない生薬や効能効果を単味生薬製剤承認基準に追加收載するための活動を行うことで合意した。

第二回単味生薬班会議

単味生薬エキスと煎剤の同等性確保のためのブリッジングガイドラインにおいて、各生薬の標準煎剤とエキスの1日量分中の指標成分定量値の比較を行い、それらの同等性を担保することによりエキスの品質を確保することとしている。さらに、指標成分としては各生薬エキスにつき原則2つの成分について定量することが規定されている。本検討班では、エキス製剤の品質を担保する上で特に重要な項目である各生薬エキスの確認試験と定量法について、各国薬局方 (JP, CP, USP, EP, BP, HKCMMS) 及び学術文献を参考に暫定案を作成した。各国薬局方及び学術文献に記載されている確認試験・定量法は生薬粉末を試料とした場合がほとんどであるが、検討班ではこれをエキスに適用した。単味生薬製剤承認基準原案に収載されているもののうち11生薬については、昨年度すでに指標成分を選定しその確認試験と定量法を実証し例示している。本年度は、さらに14生薬 (ウワウルシ、カゴソウ、キキョウ、ケツメイシ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、サンキライ、シャゼンソウ、センナ、センブリ、ダイオウ、ニンジン、ボウイ、マクリ) について指標成分を選定したうえで確認試験と定量法について実証試験を行い、会議にてその妥当性を議論した。なお、14生薬の試験法例は、末尾に資料1として示した。

第三回単味生薬班会議

どのような生薬や効能効果を単味生薬製剤承認基準に追加すべきかを検討するため、一般用医薬品として承認された過去のある生薬とその効能効果のリストを作成し、追加收載すべきと思われる生薬について議論した。他の承認基準において単味で認められているものや承

認前例として現在でも認められているものを除き、承認前例がないあるいは承認された時期が昭和 42 年以前で前例になりえないもののうち、現代でも使用価値のある生薬や効能効果について検討していくことで合意した。

D. 結論

本年度は昨年度に引き続き、エキス製剤の品質を担保する上で特に重要な項目である、各生薬エキスの指標成分及びその確認試験法と定量法について実証し、局方手引きに収載されているほとんどの生薬における具体例（案）を提示した。特に定量法においては、多くの生薬エキスで少なくとも 2 成分を指標とできることを示した。しかし、本検討班における実証的検討は少数の試料を対象にしたものであり、バリデーションも行っていないため、あくまでも具体例を提示した暫定案との位置付けである。本提案を参考として、実用に耐える確認試験及び定量法を確立することが望まれる。

また、昨年度までの班会議で作成した単味生薬製剤承認基準原案及び同等性ガイドライン（案）を基にして、厚労省医薬食品局審査管理課より、平成 26 年 9 月 1 日～10 月 3 日に意見公募が掛けられた。資料 2 に公開されたファイルを示したが、本件に寄せられたパブリックコメントを参考に修正が行われ、現在、平成 26 年度中の通知発出に向けて作業が進められている。

今後、単味生薬製剤承認基準に新たな生薬や効能効果を追加収載することをめざし、必要なエビデンス情報を収集するほか、各生薬において指標成分とその確認試験と定量法を実証検討することを通じて単味生薬製剤承認基準を改訂していく予定である。

E. 健康危機情報

F. 研究発表等

論文発表等

該当無し

学会発表等

該当無し

報道発表等

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

各生薬エキス試験法の具体例（案）

- ・ ウワウルシエキス
- ・ カゴソウエキス
- ・ キキョウエキス
- ・ ケツメイシエキス
- ・ ゲンチアナエキス
- ・ ゲンノショウコエキス
- ・ サンキライエキス
- ・ シャゼンソウエキス
- ・ センナエキス
- ・ センブリエキス
- ・ ダイオウエキス
- ・ ニンジンエキス
- ・ ボウイエキス
- ・ マクリエキス

※資料中の略号は以下の通りである。

- JP : 第十六改正日本薬局方 (The Japanese Pharmacopeia sixteenth edition)
- CP : 中国薬典 2010 (Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010)
- USP : Herbal Medicines Compendium published by the U.S. Pharmacopeial Convention
- EP : ヨーロッパ薬局方 第 7 版 (European Pharmacopoeia 7th edition)
- BP : イギリス薬局方 2013 (British Pharmacopoeia 2013)
- HKCMMS : 香港中薬材標準 (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards)

ウワウルシエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：アルブチン (arbutin)、ヒドロキノン (hydroquinone)

日本薬局方 (JP)「ウワウルシ」を参考に、確認成分としてアルブチンを、定量成分としてアルブチンおよびパルマチンを選定した。

想定される含量

アルブチン：7.0%以上 (JP)

2. 確認試験

日本薬局方 (JP)「ウワウルシ」に準ずる。

原生薬 0.4 g 相当量の乾燥エキスをエタノール(95)/水混液 (7:3) 10 mL を加え、5 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別に薄相クロマトグラフィー用アルブチン 1 mg をエタノール(95)/水混液 (7:3) 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄相クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄相クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にギ酸エチル/水/ギ酸混液 (8:1:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧し、105°C で 10 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た黄褐色~黒褐色のスポットと色調及び Rf 値が等しい。

3. 定量法

日本薬局方 (JP)「ウワウルシ」を参考にする。

原生薬 1 g 相当量の標準煎剤及び乾燥エキスを精密に量り、水を加えて正確に 100 mL とし、振り混ぜた後、遠心分離し上澄液を試料溶液とする。別にヒドロキノンをデシケーター (減圧, シリカゲル) で 12 時間以上乾燥し、その約 10 mg を精密に量り、水に溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のアルブチンとパルマチンのピーク面積を測定し、含量を求める。

試験条件

検出器：紫外線吸光光度計 (測定波長：280 nm)

カラム：内径 4~6 mm, 長さ 15~25 cm のステンレス管に 5~10 mm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：20°C 付近の一定温度

移動相：水/メタノール/0.1 mol/L 塩酸試料混液 (94:5:1)

流量：アルブチンの保持時間が約 6 分になるように調製する。

カラムの選定：定量用アルブチン、ヒドロキノン及び没食子酸 0.05 g ずつを水に溶かして 100

(資料 1)

mL とする。この液 10 L につき、上記の条件で操作するとき、アルブチン、ヒドロキノン、没食子酸の順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき、試験を 5 回繰り返すとき、アルブチンのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

【参考資料】

・アルブチン

CAS Number: 497-76-7

JP に試薬（定量用）として収載

・ヒドロキノン

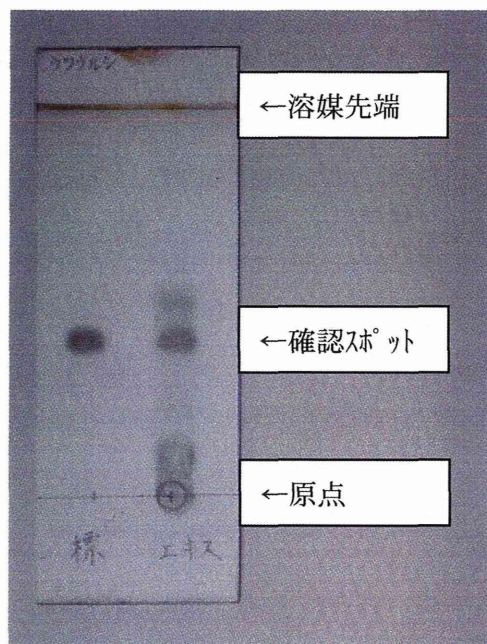
CAS Number: 123-31-9

・各国公定書での記載

JP	定性	確認成分：アルブチン 試験方法：TLC 展開溶媒：ギ酸エチル／水／ギ酸混液（8:1:1） 検出：薄めた硫酸（1→2），105℃10 分加熱（黄褐色～黒褐色）
	定量	定量成分：アルブチン（7.0%以上） 試験方法：HPLC 検出器：紫外線吸光光度計（測定波長：280 nm） カラム：内径 4～6 mm，長さ 15～25 cm のステンレス管に 5～10 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填。 移動相：水／メタノール／0.1 mol/L 塩酸試料混液（94:5:1）
CP	定性	未収載
	定量	未収載
EP/BP	定性	確認成分：アルブチン 試験方法：TLC 展開溶媒：酢酸エチル／水／ギ酸混液（88:6:6） 検出：10 g/L ジクロロキノンクロロイミド in メタノール →20 g/L 炭酸ナトリウム（青色）
	定量	定量成分：アルブチン（7.0%以上） 試験方法：LC 検出器：紫外線吸光光度計（測定波長：280 nm） カラム：内径 4 mm，長さ 25 cm のカラムに 5 μm のクロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填 移動相：水／メタノール混液（90:10）
USP	定性	未収載
	定量	未収載
HKCMMS	定性	未収載
	定量	未収載

【試験実施結果】

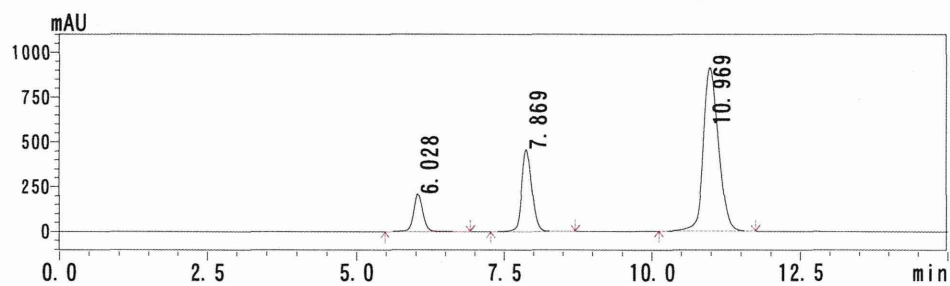
○確認試験



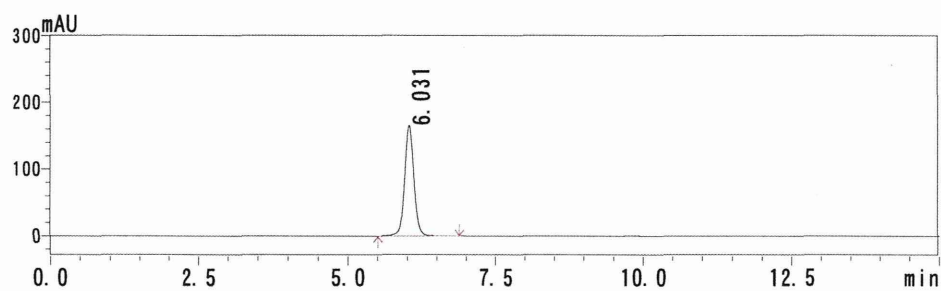
スポット左からアルブチン，エキスの順

○定量法

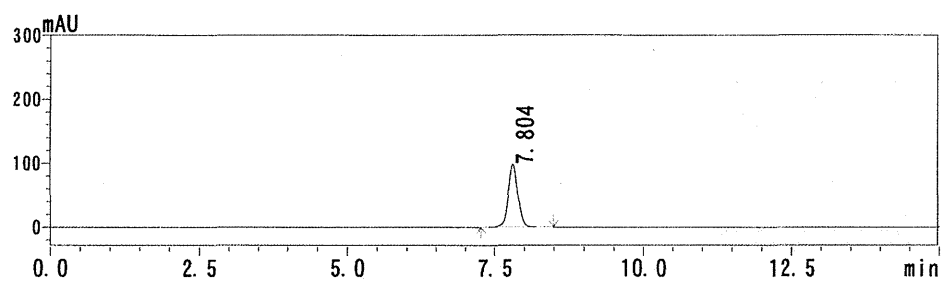
- ・分離度 (左からアルブチン，ヒドロキノン，没食子酸の順)



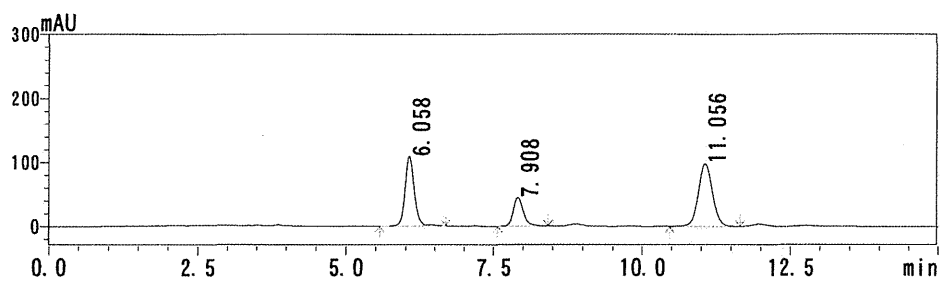
- ・標準溶液－アルブチン



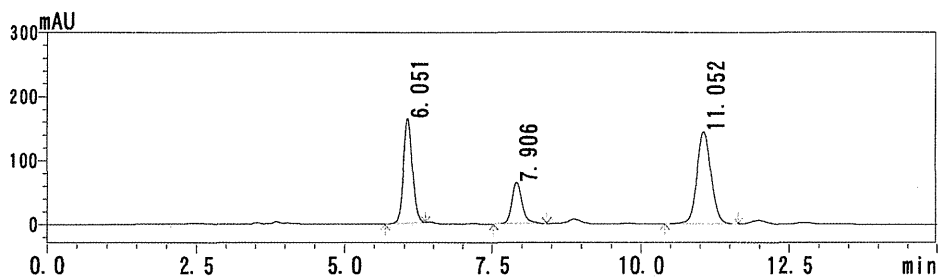
- 標準溶液－ヒドロキノン (0.1 mg/mL, in 水)



- 試料溶液－標準煎剤



- 試料溶液－エキス



- 原生薬 1 g あたりの各指標成分の定量値

	アルブチン (日局：7.0%以上)	ヒドロキノン
原生薬 (ウワウルシ)	82.1 mg	5.07 mg
標準煎剤	56.2 mg	5.21 mg
エキス	55.5 mg	5.96 mg

カゴソウエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：ロスマリン酸 (rosmarinic acid), カフェ酸 (caffeic acid)

CP 及び HKCMMS では、確認成分及び定量成分をロスマリン酸と規定していることから、本化合物を指標成分として選定した。また、エキスに含まれる化合物を同定し、定量成分としてカフェ酸を選定したほか、サルビアノール酸 A についても検討した。

想定される含量

ロスマリン酸：0.2%以上 (CP), 0.041%以上 (HKCMMS)

2. 確認試験

日本薬局方 (JP)「半夏厚朴湯エキス」を参考にする。

乾燥エキス 0.5 g を取り、メタノール 20 mL を加えて振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を分取し、減圧で溶媒を留去した後、残留物にメタノール 2 mL を加えて試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用ロスマリン酸 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 5 μ L, 標準溶液それぞれ 2 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲル (蛍光剤入り) を用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル／水／ギ酸混液 (60 : 1 : 1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットはロスマリン酸標準溶液から得た暗紫色のスポットと色調及び Rf 値が等しい。

3. 定量法

日本薬局方 (JP)「半夏厚朴湯エキス」に準ずる。

乾燥エキス約 0.5 g を精密に量り、薄めたメタノール (7→10) 50 mL を正確に加えて 15 分振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別に定量用ロスマリン酸、カフェ酸、サルビアノール酸 A 各約 5 mg を精密に量り、薄めたメタノール (7→10) に溶かして正確に 50 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のロスマリン酸、カフェ酸、サルビアノール酸のピーク面積を測定し、含量を求める。

(標準煎剤)

標準煎液を、そのままメンブランフィルターを用いてろ過し、試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 330 nm, 287 nm）

※サルビアノール酸Aは 287 nm 付近に極大吸収を認めた。

カラム：内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする (TSKgel ODS-80Ts)。

カラム温度：30°C 付近の一定温度

移動相：i) 水／アセトニトリル／リン酸混液 (800:200:1)

ii) 移動相 A：水／ギ酸混液 (1000:1)

移動相 B：アセトニトリル／ギ酸混液 (1000:1)

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～35	98→45	2→55
35～45	2	98
45～65	98	2

流量：毎分 1.0 mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 10 μ L につき，上記の条件で操作するとき，ロスマリン酸のピークの理論段数及びシンメトリー係数は，それぞれ 5000 段以上，1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，ロスマリン酸のピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

【参考資料】

・ ロスマリン酸

CAS Number: 20283-92-5

JP に試薬（定量用，薄層クロマトグラフィー用）として収載

・ カフェ酸

CAS Number: 331-39-5

・ 各国公定書での記載

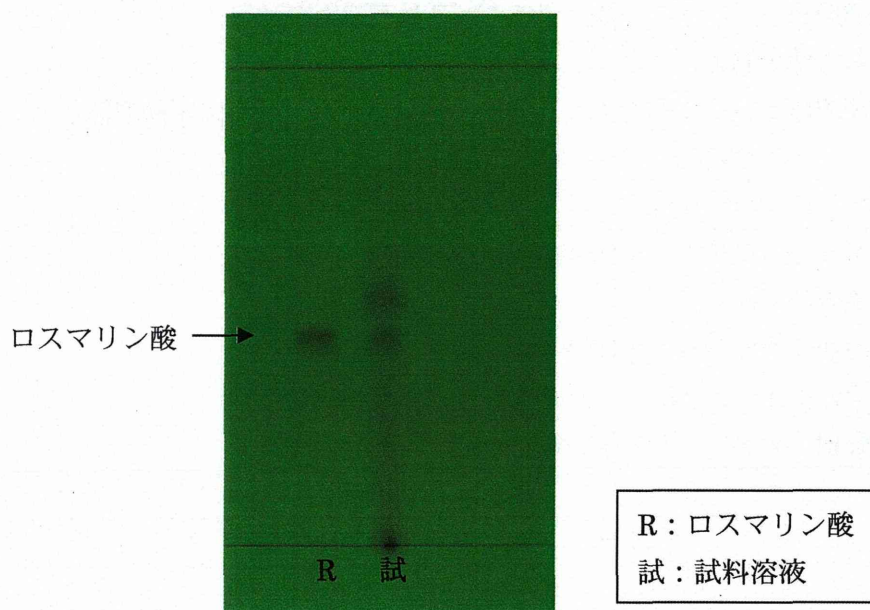
JP	定性	規定なし
	定量	規定なし
CP	定性	確認成分：ロスマリン酸 試験方法：TLC 展開溶媒：シクロヘキサン／酢酸／イソプロパノール／ギ酸混液 (15:3:3.5:0.5) 検出：UV (365 nm)
	定量	定量成分：ロスマリン酸 (0.2%以上) 試験方法：HPLC 検出器：紫外線吸光光度計（測定波長：330 nm） カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルを充填 移動相：メタノール／0.1%TFA 試料混液 (42:58)
EP/BP	定性	—
	定量	—
USP	定性	—
	定量	—
HKCMMS	定性	確認成分：ロスマリン酸 試験方法：TLC(HPTLC) 展開溶媒：シクロヘキサン／酢酸エチル／イソプロパノール／ギ酸混液 (7:3:2:0.3) 検出：10%硫酸 in MeOH→105°C→UV (366 nm)
	定量	定量成分：ロスマリン酸 (0.041%以上) 試験方法：HPLC 検出器：紫外線吸光光度計（測定波長：330 nm） カラム：4.6×250 mm のカラムに 5 μm のオクタデシルシリル化シリカ ゲルを充填 移動相：メタノール／0.1%TFA 試料混液 (37:63)

【試験実施結果】

○煎液及びエキスの作製方法

	作製方法	補足
煎液	1 日量 10 g を，水約 600 mL をもって煮て約 400 mL に煮つめ，滓をこして取り去った．	マイコン煎じ器 3（HARIO 製）にて作製した．
エキス	煎液を凍結乾燥した．	凍結乾燥機（FD-830，EYELA 製）にて作製した．また，エキスの収率は約 9%であった．

○確認試験



○定量法

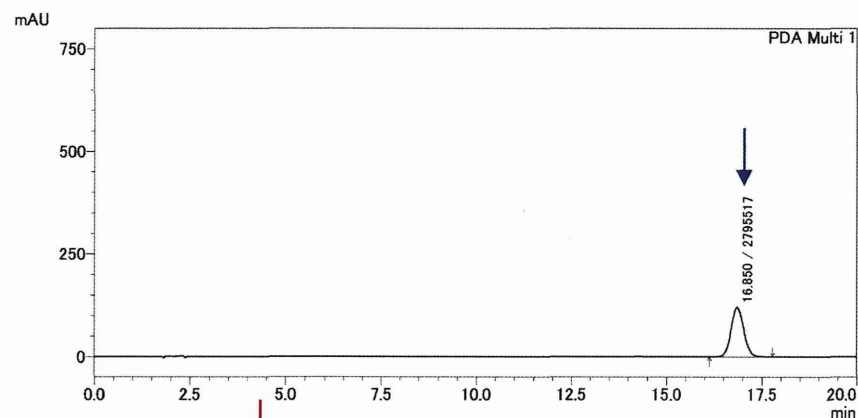
<結論>

ロスマリン酸，カフェ酸は 2 種類の移動相ともに分析可能であった．
サルビアノール酸 A については，移動相 i) では煎剤で検出されなかった．移動相 ii) ではエキスと煎剤ともに検出されたが，それぞれ微量であったため正確な値が出ず，同等性が取れなかった．

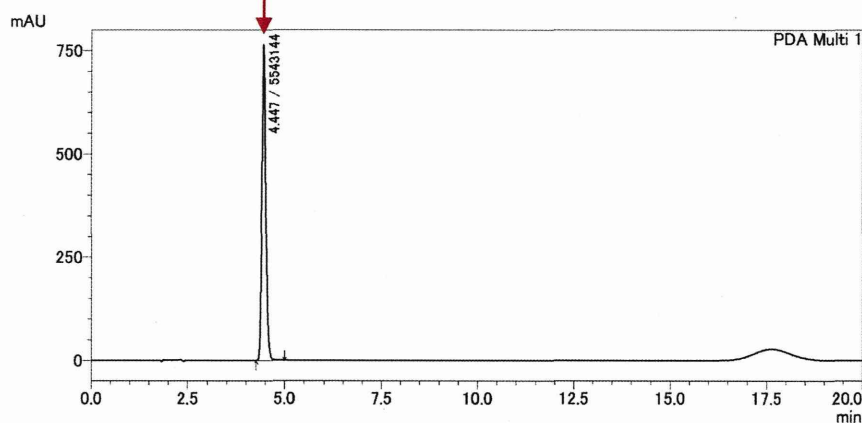
移動相 i)

① ロスマリン酸 / カフェ酸 測定波長：330 nm

クロマトグラム

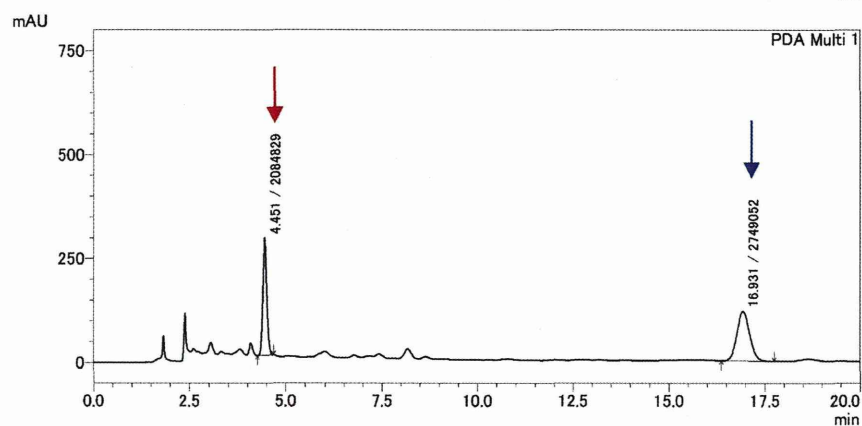


ロスマリン酸標準溶液

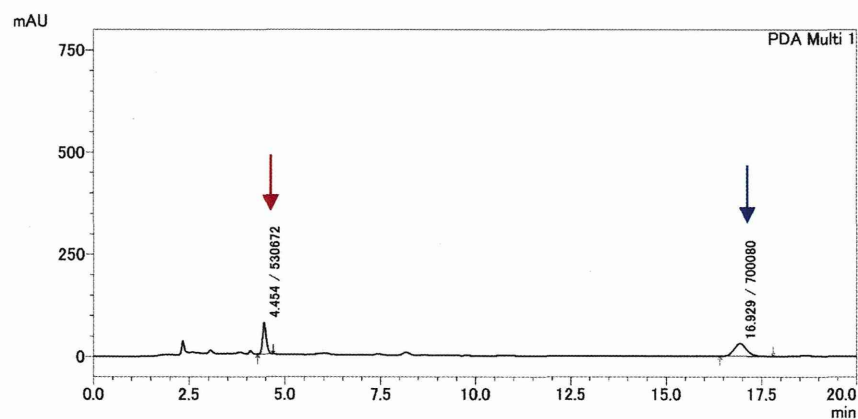


カフェ酸標準溶液

※17.5 分付近にブロードのピークが見られた(2 量体?)



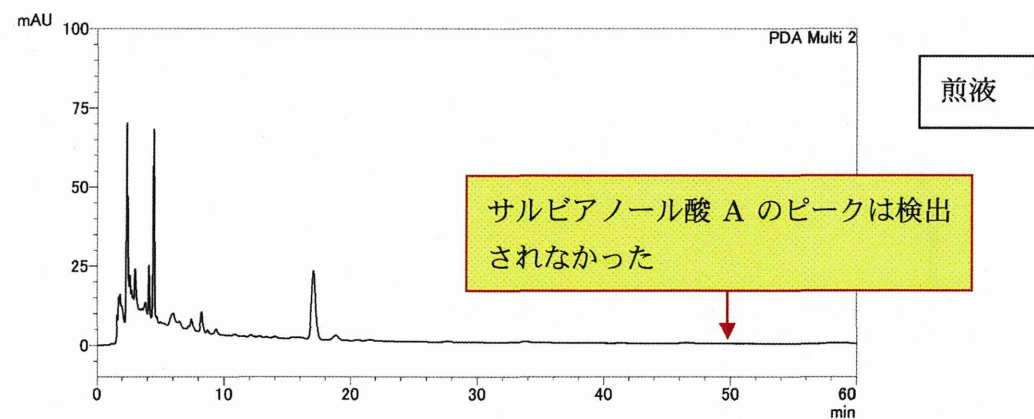
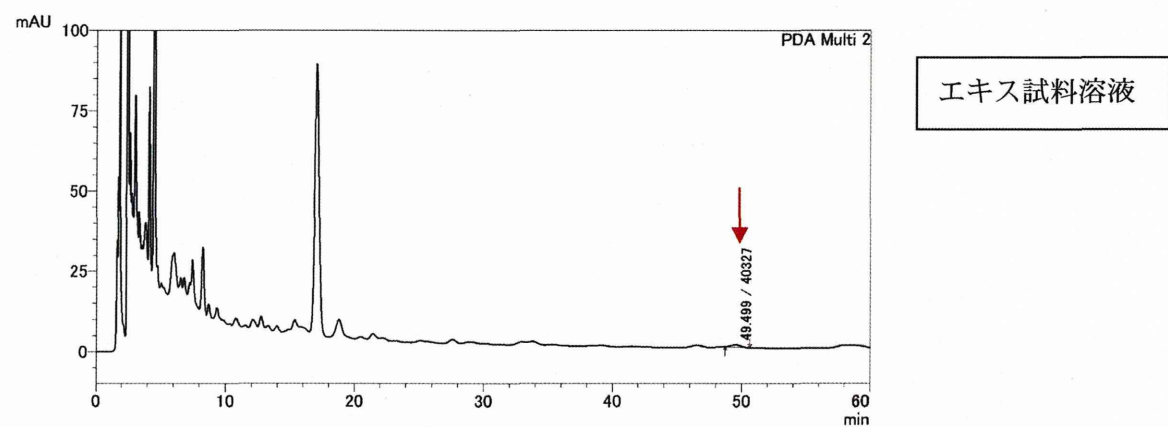
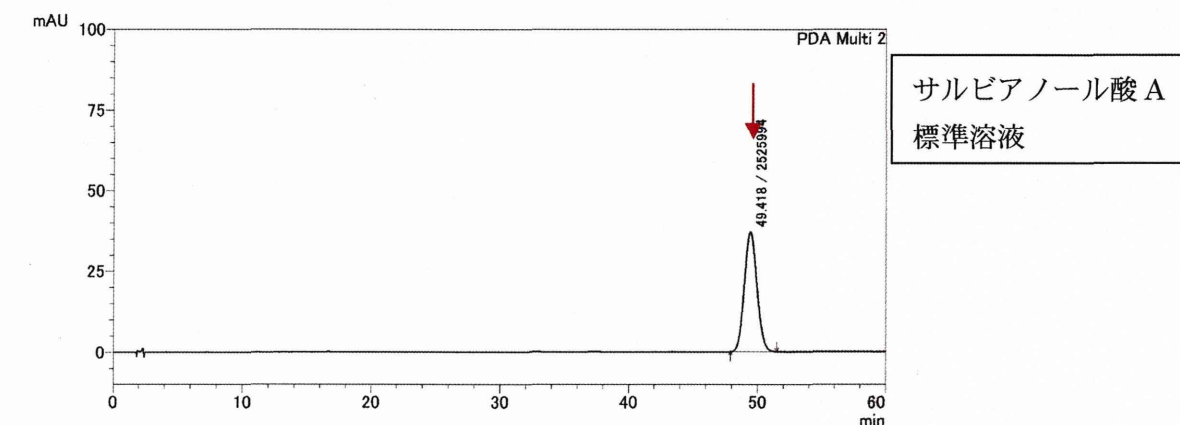
エキス試料溶液



煎液

②サルビアノール酸 A 測定波長：287 nm

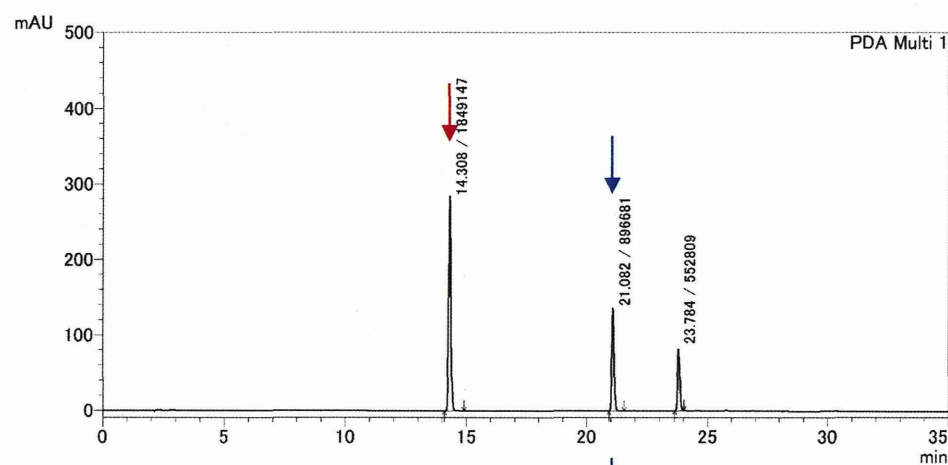
クロマトグラム



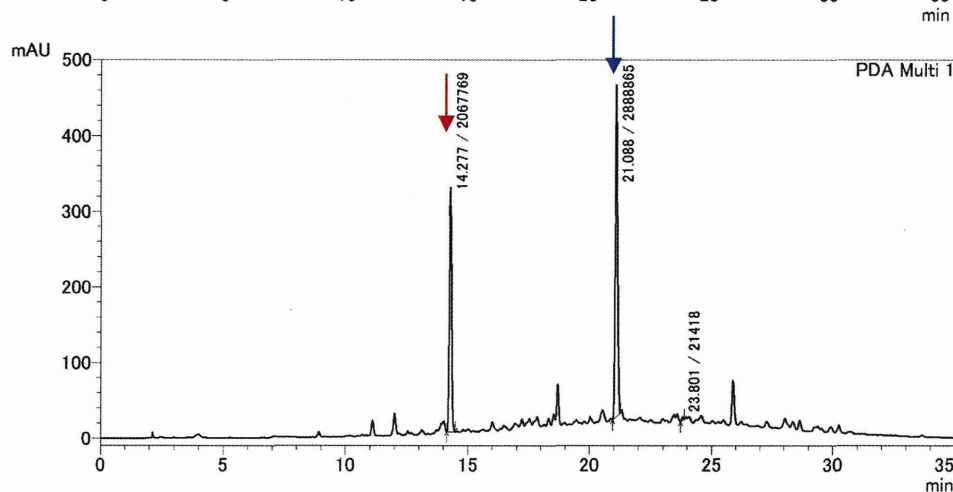
移動相 ii)

① ロスマリン酸 / カフェ酸 測定波長：330 nm

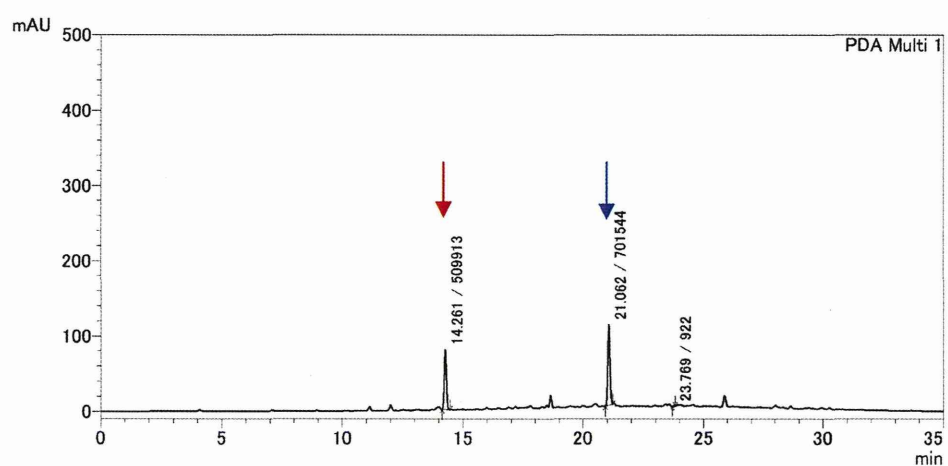
クロマトグラム



ロスマリン酸,
カフェ酸,
サルピアノール酸 A
等量混合標準溶液



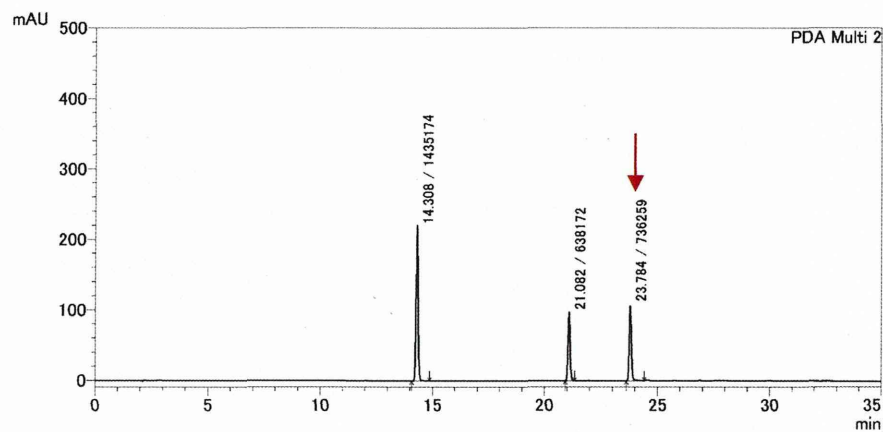
エキス試料溶液



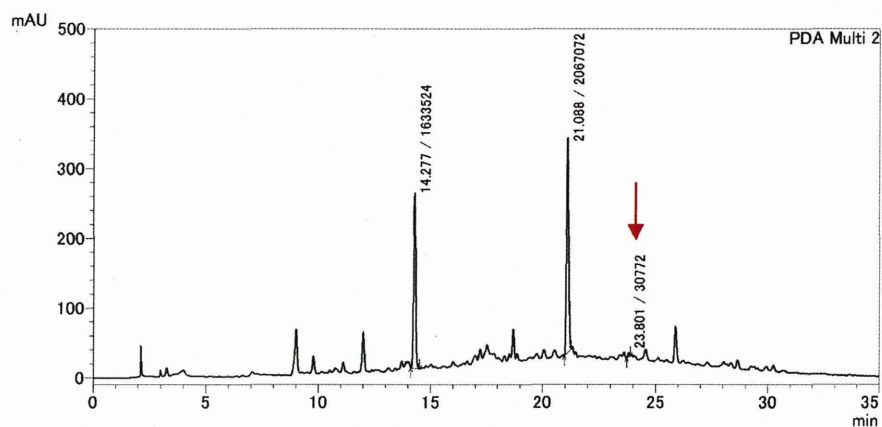
煎液

②サルビアノール酸 A 測定波長：287 nm

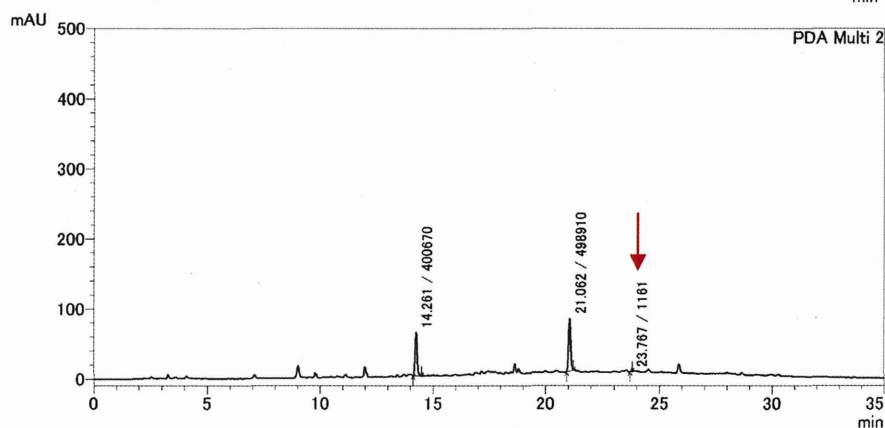
クロマトグラム



ロスマリン酸,
カフェ酸,
サルビアノール酸 A
等量混合標準溶液



エキス試料溶液



煎液

＜煎液とエキスの定量結果の同等性＞

試験結果から、生薬カゴソウ 1 g 中に換算した成分含量を求め、定量結果の同等性を求めた。

		煎液分析時の含量	エキス分析時の含量	同等性
移動相 i)	ロスマリン酸	0.97 mg	0.93 mg	95.9%
	カフェ酸	0.37 mg	0.35 mg	94.6%
移動相 ii)	ロスマリン酸	1.03 mg	1.02 mg	99.0%
	サルビアノール酸 A	0.002 mg	0.013 mg	15.4%
	カフェ酸	0.35 mg	0.35 mg	100.0%

キキョウエキスの指標成分とその確認試験・定量方法について

1. 指標成分となりえる化合物：プラチコジン D (platycodin D),
プラチコシド E (platycoside E)

香港中薬材標準 (HKCMMS) 及び文献¹⁾を参考に、確認成分としてプラチコジン D を、定量成分としてプラチコジン D 及びプラチコシド E を選定した。

文献 1) 佐伯剛ら「生薬・キキョウのサポニン成分の HPLC による品質評価」

YAKUGAKUZASSHI 123(6), 431-441(2003).

2. 確認試験

乾燥エキス 1.0 g (原生薬対応量 2.0 g※) をとり、炭酸ナトリウム試液 20 mL を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 5 mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別にプラチコジン D 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液 5 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/1-プロパノール/水/酢酸(100)混液 (7:5:4:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧し、105°C で 5 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た黄褐色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

※今回使用したエキスの収率による。

(標準煎剤)

標準煎剤の調製は昭和 60 年 5 月 31 日 薬審 2 第 120 号「標準湯剤との比較試験に関する資料について」別紙 1 の記載に準じて実施した。キキョウ 10.0 g に水 200 mL を加え、約 60 分間かけて半量になるまで加熱抽出した後、ろ過し、ろ液に水を加え正確に 100 mL とし標準煎剤とする。この液 20 mL をとり、無水炭酸ナトリウム 2.1 g を加えて振り混ぜて溶かした後、1-ブタノール 5 mL を加えて 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。

3. 定量法

香港中薬材標準 (HKCMMS) 「Radix Platycodi」及び文献¹⁾を参考にする。

乾燥エキス約 0.5 g (原生薬対応量 1.0 g※) を精密に量り、水 30 mL を少量ずつ静かに加え 10 分間超音波照射し分散させた後、更に水を加えて正確に 50 mL とする。この液 30 mL を正確にとり、あらかじめメタノール 20 mL 及び水 20 mL で順次洗浄した前処理カラムに添加し、水 20 mL 及び薄めたメタノール(3→10) 20 mL で順次洗浄した後、メタノール 20 mL で溶出する。溶出液は水浴上で溶媒を減圧留去し、残留物はメタノール 10 mL で溶かしながら 20 mL のメスフラスコに移し、水を加えて正確に 20 mL とした後、必要ならばメンブランフィルターろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にプラチコジン D 5 mg を正確に量り、

メタノールを加えて溶かし正確に 10 mL とし、標準原液 A とする。また別にプラチコシド E 5 mg を正確に量り、メタノールを加えて溶かし正確に 10 mL とし、標準原液 B とする。標準原液 A 2 mL 及び標準原液 B 5 mL をそれぞれ正確に量り、10 mL のメスフラスコに合わせ、水 5 mL を加えて振り混ぜた後、メタノールを加えて正確に 10 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μ L ずつを正確に量り、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のプラチコジン D 及びプラチコシド E のピーク面積を測定する。

※今回使用したエキスの収率による。

(標準煎剤)

標準煎剤の調製は昭和 60 年 5 月 31 日 薬審 2 第 120 号「標準湯剤との比較試験に関する資料について」別紙 1 の記載に準じて実施した。キキョウ 10.0 g に水 200 mL を加え、約 60 分間かけて半量になるまで加熱抽出した後、ろ過し、ろ液に水を加え正確に 100 mL とし標準煎剤とする。この液 5 mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 10 mL とした後、遠心分離し、上澄液をメンブランフィルターろ過し、ろ液を試料溶液とする。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：206 nm）

カラム：内径 4.6 mm，長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度：40°C 付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル混液（75:25）

流量：毎分 1.0 mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 20 μ L につき、上記の条件で操作するとき、プラチコシド E のピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ 5000 段以上、1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 20 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、プラチコシド E のピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。