厚生労働行政推進調査事業費
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）
総括研究報告書

医薬部外品原料規格の整備に関する試験法の開発研究

研究代表者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

分担研究課題　医薬部外品原料規格に収載されているカンゾウ抽出末の定量法の改善検討

研究協力者：
岩橋孝祐，桑原千雅子（神奈川県衛生研究所 理化学部薬事毒性・食品機能グループ）
田中優樹，細江潤子，大嶋直浩，東阪嘉子，久保田領志（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

医薬部外品原料規格（外原規）2021 において「カンゾウ抽出末（GEP：Glycyrrhiza Extracted Powder)」の指標成分であるグリチルリチン酸（GA：Glycyrrhizic acid）の定量法には，イオン抑制法の移動相を用いた液体クロマトグラフィー（LC）が設定されている．しかし，当該方法では GA の類縁物質の一つであるガラクツログリチルリチン酸（GGA：Galacturo glycyrrhizic acid）の分離が不十分であることから試験法の改善が望まれる．令和 6 年度，我々は GEP の LC 条件を緩衝液法に変更して検討を行った．その結果，緩衝液法では GA と GGA が完全分離すること，イオン抑制法では性能条件を満たさないカラムであっても，緩衝液法では性能条件を満たすことを確認した．令和 7 年度は (1) 試料調製法および定量用試薬の改良，ならびに (2) 相対モル感度（RMS：Relative molar sensitivity）を利用した定量法の適用可能性について検討した．その結果，(1) 希エタノールを用いた簡便な試料調製法とグリチルリチン酸標準品を用いることにより，良好な精度で GA を定量できることが確認された．(2) RMS 法では，パラオキシ安息香酸プロピル（PP：Propyl *p*-Hydroxybenzoate）を基準物質とすることで，GEP 中の GA を精度よく定量可能であった．以上より，改良定量法および RMS 定量法はいずれも外原規「カンゾウ抽出末」の試験法として適用可能であることが示された．今後はこれらの定量法について他機関バリデーションを実施し，さらなる妥当性の評価を行う予定である．

A. 目的

カンゾウ及びカンゾウ由来製品は医薬品，医薬部外品，食品など幅広く利用されている．これらの指標成分であるグリチルリチン酸（GA：Glycyrrhizic acid）の定量には，医薬部外品原料規格（外原規）及び日本薬局方（局方）において，液体クロマトグラフィー（LC）が設定されている[1,2]．設定当初以降の両規格においては，イオン抑制法，イオンペア法，緩衝液法の中から主にイオン抑制法が採択されてきた．しかしながら当該方法では，類縁物質の一つであるガラクツログリチルリチン酸（GGA：Galacturo glycyrrhizic acid）の分離性能にカラムによる差があることから，局方では第 17 改正以降緩衝液法へ変更された[3]．一方，現行の外原規 2021 においてもカラムサイズ等に違いはあるが，「カンゾウ抽出末（GEP：Glycyrrhiza Extracted Powder）」の定量法でイオン抑制法が設定されており，試験法の改善が望まれる．

令和 6 年度，我々は GEP の LC 条件を局方の「カンゾウ粗エキス」の分析条件に準拠した緩衝液法に変更し検討を行った．その結果，カラムの種類によらず外原規で規定される性能条件を満たし，GA と GGA も完全分離することを確認した．

本研究では，(1) 試料の調製方法，グリチルリチン酸標準品及び LC 条件を改良した定量法（改良定量法）について検討し，GEP を用いた分析バリデーションを実施した．(2) さらに，局方条件で定量用試薬として定められているグリチルリチン酸標準品より汎用的な試薬を定量用標品に用いた試験法として，現行の GEP の分析法でカラムの選定に用いるパラオキシ安息香酸プロピル（PP：Propyl *p*-Hydroxybenzoate）を基準物質とした相対モル感度（RMS：Relative molar sensitivity）による定量法（RMS 法）の適応可能性について検討した．

B. 方法

B-1. 改良定量法の検討

試薬及び装置

試料のカンゾウ抽出末は外原規適合品を用いた．標準品は，局方グリチルリチン酸標準品，外原規適合グリチルリチン酸モノアンモニウムを用いた．

試薬は，アセトニトリルは富士フイルム和光純薬製 HPLC 用，グリチルリチン酸ジカリウムは東京化成工業製の純度>75%(HPLC)のものを用いた．グリチルリチン酸モノアンモニウムは東京化成工業製の純度>70%(HPLC)のものを用い，局方の試薬である分離確認用グリチルリチン酸一アンモニウムに適合することを確認した．以後，この試薬をグリチルリチン酸モノアンモニウム（分離確認用）と記載する．エタノール（95），酢酸アンモニウム及び酢酸は富士フイルム和光純薬製の試薬特級品を用いた．希エタノールはエタノール(95) 1 容量に精製水を 1 容量加えて調製した．
分析条件は実験ごとに表に記載する．

試料調製

現行法との比較

（調製法 1）GEP 約 15 mg を精密に量り，希エタノールを加えて溶かし正確に 10 mL とした．（調製法 2）GEP 約 15 mg を測り取り，希エタノールを 2.5 mL 加えて時々振り混ぜながら，50℃で 30 分振とうした．冷後，遠心分離し上澄液を分取した．残留物に

希エタノール 2 mL を添加し，同様に操作し，全抽出液を合わせ希エタノールを加え，正確に 10 mL とした．（調製法 3）GEP 約 15 mg を精密に量り，薄めた酢酸（1→50）/アセトニトリル混液（20：11）を加えて溶かし，正確に 10 mL とした．各液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し，試料溶液とした．各試料溶液は，3 併行で調製した．（改良定量法標準溶液）グリチルリチン酸標準品約 15 mg を希エタノールに溶かし，正確に 10 mL とし，0.2 mg/mL となるよう希エタノールで希釈して標準溶液とした．(現行法標準溶液)現行法を準用し，「グリチルリチン酸モノアンモニウム」を 80℃，減圧下で 4 時間乾燥後，約 1.5 mg を精密に量り，イオン抑制法における移動相を加えて溶かし，正確に 5 mL とし，標準溶液とした．

改良定量法の妥当性評価

試料溶液は GA 含量が約 30%である GEP 及びグリチルリチン酸ジカリウムを用いて調製した．すなわち，GA 含量約 6%，18%及び 30%に相当する試料は，GEP を約 30 mg，90 mg 及び 150 mg 量り取り，希エタノールを加えて溶かし正確に 100 mL とした．この液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し，試料溶液とした．次に，グリチルリチン酸ジカリウムの希エタノール溶液を調製し，GA 含量をグリチルリチン酸標準品を用いて定量した．GA 含量約 40%，50%および 60%に相当する試料溶液は，GEP 150 mg に対してグリチルリチン酸ジカリウム溶液を GA 換算で約 15 mg，30 mg 及び 45 mg 添加した後，上記の方法により調製した．各濃度の試料溶液は，3 併行で調製した．標準溶液はグリチルリチン酸標準品約 20 mg を希エタノールに溶かし，正確に 100 mL とした．室内再現精度は GA 含量約30%に相当する試料につき，試験者，装置，カラムを割付し，各 2 併行で 6 日間分析することにより評価した．

定量

「グリチルリチン酸モノアンモニウム」を標準品とした GA の含量は式（1）に代入して求めた．現行の外原規 2021 では，グリチルリチン酸モノアンモニウムの採取量を乾燥減量により換算しているが，乾燥後，秤量することで代用した．

$$\mathrm{GA}(\%) = \frac{A_\mathrm{T}}{A_\mathrm{S}} \times \frac{W_\mathrm{S}}{W_\mathrm{T} \times \left(1 - \frac{L_T}{100}\right)} \times \frac{822.93}{839.96} \times 100 \quad (1)$$

A_T，A_S：試料溶液及び標準溶液中の GA のピーク面積

W_S，W_T：グリチルリチン酸モノアンモニウム及び試料の採取量

L_T：試料の乾燥減量（%）

グリチルリチン酸標準品を標準品とした GA の量(mg)は式（2）に代入して求め，各採取量からその含量(%)を求めた．

$$\mathrm{GA\ の量（mg）} = W_\mathrm{S} \times \frac{A_\mathrm{T}}{A_\mathrm{S}} \times \text{希釈係数} \quad (2)$$

W_S：脱水物換算したグリチルリチン酸標準品の採取量

A_T，A_S：試料溶液及び標準溶液中の GA のピーク面積

統計解析

真度及び95%信頼区間は6濃度の設定値に対する試料溶液の定量値の割合の総平均（$\bar{x}$）及び分散（Variance）から算出した．併行精度（repeatability relative standard deviation: RSD_r）及び室内再現精度（Intermediate Precision relative standard deviation: RSD_{IP}）を算出する際はMicrosoft社のExcel 365を用い，一元配置分散分析を行い，「グループ内分散」及び「グループ間分散」から，式(3)，(4)により併行標準偏差（σ_r）及び室内標準偏差（σ_{IP}）を算出した．また，各データの総平均（$\bar{x}$）から式(5)，(6)によりRSD_r及びRSD_{IP}を求めた．なお，併行精度ではCochran検定で各濃度の等分散性を確認したうえで，一元配置分散分析を実施した．

$$\sigma_r = \sqrt{\text{グループ内分散}} \tag{3}$$

$$\sigma_{IP} = \sqrt{\frac{\text{グループ間分散} - \text{グループ内分散}}{\text{併行回数}}} \tag{4}$$

$$RSD_r(\%) = \frac{\sigma_r}{\bar{x}} \times 100 \tag{5}$$

$$RSD_{IP}(\%) = \frac{\sqrt{{\sigma_{IP}}^2 + {\sigma_r}^2}}{\bar{x}} \times 100 \tag{6}$$

B-2. RMS定量法の検討

試薬及び装置

グリチルリチン酸標準品はレギュラトリーサイエンス財団から，カンゾウ抽出末（外原規適合品）はA社及びB社より，グリチルリチン酸モノアンモニウム（外原規適合品）はC社より入手した．

パラオキシ安息香酸プロピル（日局試薬，99.9%(LC)），DSS-d_6（3-(trimethylsilyl)propane-1,1,2,2,3,3-d6-sulfonic acid，純度92.4%），パラオキシ安息香酸メチル，パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸ブチル，パラオキシ安息香酸イソプロピル，パラオキシ安息香酸イソブチル，エタノール（95）（特級試薬），酢酸，酢酸アンモニウム，アセトニトリルは富士フイルム和光純薬株式会社から，グリチルリチン酸モノアンモニウム（分離確認用）は東京化成から，Methanol-d_4はEurisotopから購入した．希エタノールはエタノール(95) 1容量に精製水を1容量加えて調製した．

ウルトラミクロ天秤はメトラー・トレド製XPR2UV，核磁気共鳴装置（NMR）は日本電子製ECZ600（600 MHz）を用いた．装置条件は実験ごとに表に示す．

基準物質の選定

GEP及び各パラオキシ安息酸エステル類をそれぞれ希エタノールに溶解し，標準原液を調製した．これをGEP 1.5 mg/mL，パラオキシ安息香酸エステル類0.05 mg/mLとなるように希釈し，緩衝液法条件下におけるUV-Visスペクトルを測定した．また，標準原液をGEP 0.75 mg/mL，パラオキシ安息香酸エステル類0.025 mg/mLとなるよう混合し，HPLCによりUVクロマトグラムを測定した．

物質量比（Rn）の算出

グリチルリチン酸標準品20 mg，PP 5 mgおよび定量NMR（qNMR：quantitative NMR）

用標準物質 DSS-d_6 2 mg を精密に量り取り，Methanol-d_4 4 mL に溶解し，qNMR 用混合試料溶液を調製した．基準物質及び化合物の分子量，秤量値及びプロトン当たりの各シグナル強度を式（7）に代入し，Rn を算出した．試料は各 3 回測定し，得られたシグナルの平均値を算出した．

$$Rn = \frac{n_T}{n_S} = \frac{I_T}{I_S} \times \frac{H_S}{H_T} \qquad (7)$$

n_T，n_S：対象物質及び基準物質の物質量
H_T，H_S：対象物質及び基準物質の特定基のプロトン数
I_T，I_S：対象物質及び基準物質の特定基のシグナル強度

応答比（Rr）の算出

qNMR 用混合試料溶液を希エタノールを用いて, GA 濃度が 1.0 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.4 mg/mL，0.2 mg/mL，0.1 mg/mL になるよう希釈し, HPLC 用混合標準液とした．混合標準液の濃度は外原規における GEP 中の GA 含量の規格値範囲 12.0～50.0%における直線性を確認するため，GEP 中の GA 含量換算で 6.66%，13.3%，26.6%，53.3%及び 66.6%に相当するよう希釈した．測定波長 254 nm におけるクロマトグラムのピーク面積を式（8）に代入し，Rr を算出した（5 装置）．装置 1 及び 2 はそれぞれ溶液 1 及び 2 を希釈して測定した．装置 3，4 及び 5 は，装置間差を確認するため，同一の溶液 3 を希釈して測定した．

$$Rr = \frac{A_T}{A_S} \qquad (8)$$

A_T，A_S：対象物質及び基準物質のピーク面積

RMS の算出

GA の PP に対する RMS はそれぞれの測定条件における Rr 及び対応する溶液における Rn を式（9）に代入し，その平均により求めた．

$$\mathrm{RMS} = \frac{R_r}{R_n} \qquad (9)$$

試料及び標準液の調製

「グリチルリチン酸モノアンモニウム」及び GEP は必要量を秤量後, 希エタノールに溶かし，正確に 100 mL とした．「グリチルリチン酸モノアンモニウム」は 3 併行，GEP は 6 併行で調製した．必要に応じて 0.45 μm メンブランフィルターでろ過し，試料溶液とした．「グリチルリチン酸モノアンモニウム」の定量の際は PP 約 25 mg を希エタノールに溶かし，正確に 50 mL とした．この液約 5 mL を正確にとり，希エタノールを加えて正確に 50 mL とし，PP 標準溶液とした．GEP の定量の際は PP 約 50 mg を希エタノールに溶かし, 正確に 50 mL とした．この液約 2.5 mL を正確にとり，希エタノールを加えて正確に 50 mL とし，PP 標準溶液とした．グリチルリチン酸標準品は約 20 mg を希エタノールに溶かし，正確に 100 mL とし，GA 標準溶液とした．グリチルリチン酸モノアンモニウム（分離確認用）5 mg を希エタノール 10 mL に溶かし，システム性能確認用標準溶液とした．

定量

PP を標準品とした RMS 法による GA の含量は式（10）に代入して求めた.

$$\mathrm{GA}(\%) = \frac{W_{\mathrm{PP}}}{W_{\mathrm{T}}} \times \frac{A_{\mathrm{GA}}}{A_{\mathrm{PP}}} \times \text{希釈係数} \times \frac{M_{\mathrm{GA}}}{M_{\mathrm{PP}}} \div \text{RMS 係数} \times 100 \quad (10)$$

W_{PP}, W_{T}：基準物質及び試料の採取量（mg）

A_{GA}, A_{PP}：対象物質及び基準物質のピーク面積

M_{GA}, M_{PP}：対象物質及び基準物質の分子量

グリチルリチン酸標準品を標準品とした GA の含量は式（2）に代入して求めた.

統計解析

装置内 RSD 及び装置間 RSD は $\mathrm{RSD_r}$ 及び $\mathrm{RSD_{IP}}$ と同様に Microsoft 社の Excel 365 を用い，一元配置分散分析を行い式(3)，(4)，(5)，(6)により求めた.

C. 結果と考察

（1） 改良定量法の検討

現行法との比較

外原規における GEP の定量法（現行法）及び局方「カンゾウ粗エキス」の定量法の概要を表 1 に記載する [1,2]. 現行法では試料約 0.25 g をイオン抑制法の移動相（薄めた酢酸/アセトニトリル混液）で溶解し，フィルターろ過を行い測定試料としている．しかしながら，昨年度の検討により当該移動相を用いた LC 条件では GA とその類縁物質である GGA の分離が不十分であり，移動相の変更が必要であることが示された．そこで，GEP の前処理溶媒において，移動相に代えて局方「カンゾウ粗エキス」の定量法で用いられている希エタノールが適応できるか検討した. さらに, 同定量法に規定されている加温，遠心分離等の工程の必要性について検討した．測定試料は，GEP 約 15 mg を希エタノールで溶解し調製した試料溶液（調製法 1），希エタノールで溶解後，加温，遠心分離等の工程を経て調製した試料溶液（調製法 2），現行の外原規に準じた方法で調製した試料溶液（調製法 3）の 3 法を用意した（表 2）. 各調製法は各試料溶液中の GA 量で評価することとし，GA の定量法は局方「カンゾウ粗エキス」に準拠し，LC 条件には緩衝液法を, 定量用試薬にはグリチルリチン酸標準品を，分析用カラムサイズは 4.6×150 mm を用いた（表 3）.

GEP 中の GA の定量結果は，調製法 1～3 においてそれぞれ, Lot.A で 30.7%, 31.0% 及び 32.2%，Lot.B で 31.0%，31.0%及び 31.5%, Lot.C で 31.8%, 31.0%及び 32.3% であり，いずれのロットにおいても各調製法間で概ね一致し, 各 RSD も良好であった. 以上の結果から, 簡便な操作でありながら, 現行の外原規および局方「カンゾウ粗エキス」の前処理法と同等の抽出効率が得られる調製法 1 が，試料溶液調製法として適していると考えられた．以後，表 4 に示す定量法を，本研究における改良定量法と定義する.

上記試験と並行して，改良定量法による定量結果と現行法における定量結果を比較するために，改良定量法の分析に用いた試料溶液（調製法 3）を現行法に準拠した標準溶液及び条件で分析し，改良定量法と比較した．現行法では使用するカラムについてサイズが 4.0×300 mm であることを定めて

いるが, 保有するカラムは, カラムの選定において規定される PP 及び GA の混合溶液を測定した時, GA, PP の順に溶出し, それぞれのピークが完全に分離するという条件を満たしていなかった. そこで現行法による定量は, サイズ規定は満たすが, カラムの選定条件を満たさないカラム（現行法 1）及び, カラムの選定条件は満たすが, 外原規一般試験法に準じ, サイズを変更したカラム (現行法 2) の 2 条件で実施した (表 5). また, 現行法 1 ではカラムの耐圧による制限のため, 移動相の流量を現行法の条件より変更して測定した.

それぞれの条件において, LC 条件にイオン抑制法を用いる現行法 1 及び 2 では, GA 及び GGA の分離度が 1.5 を下回るか, あるいは分離していなかった. 一方で, 改良定量法では, 両ピークの分離度は 1.5 以上であった(図 1). このことから正確な定量値を得るために, 改良定量法においても, システム適合性として GA と GGA の分離度が 1.5 以上であることを設定することが適切であると考えられた.

GEP 3 ロットにおける各条件の GA 定量値は, 改良定量法で 30.7～31.8%であったのに対し, 現行法 1 及び 2 ではそれぞれ 47.5～49.4%, 及び 52.0～53.4%であり, 両者の間には約 20%の乖離が認められた. そこで, 現行法で定量用試薬として用いる「グリチルリチン酸モノアンモニウム」3 ロットを改良定量法により定量したところ, GA 含量は 67%～70%程度であった. グリチルリチン酸標準品を用いた標準溶液では GA のピークが明瞭に認められ, GGA 由来のピークは認められなかった一方で,「グリチルリチン酸モノアンモニウム」では GA 以外のピークが多数認められた（図 2). 現行法では GA と GGA の分離が不十分であること及び今回使用した定量用試薬「グリチルリチン酸モノアンモニウム」の GA 含量が低いことが改良定量法との値の乖離の原因であると考えられた.

改良定量法の妥当性評価

外原規「カンゾウ抽出末」では GA の含量規格が 12.0～50.0%と定められている. そこで, ICH Q2[4]を参考に規格範囲の約 80～120%の GA 含量の試料を用いて改良定量法の範囲, 特異性（選択性), 真度, 併行精度 (RSD_r) 及び室内再現精度 (RSD_{IP}) を評価した.

分析に先立ち, 参考とした局方「カンゾウ粗エキス」[2]の定量法におけるシステム適合性に適合することを確認した.

範囲は, グリチルリチン酸標準品より調製した規格値を含む 6 濃度（試料中含量に換算して 2.5%, 4.9%, 12.3%, 30.8%, 49.3%及び 61.6%）の GA 標準溶液を測定し, その定量結果について最小二乗法を用いた回帰分析を行うことで評価した. その結果, 2.5～61.6%の範囲において相関係数は r=0.9999 であり, 濃度 0 におけるレスポンスの 95%信頼区間は原点を含んでいたことから, 良好な直線性が認められた（図 3).

分析法の特異性（選択性), 真度, RSD_r 及び RSD_{IP} は GEP 及びグリチルリチン酸ジカリウムから調製した GA 含量約 6%, 18%, 30%, 40%, 50%及び 60%の試料溶液（試料 1～6）を用いて評価した（表 6).

特異性(選択性)の評価基準は試料溶液中の GA のピークが GGA と分離すること及び GA ピーク中の紫外吸収スペクトルが一

致することとした．各試料溶液について，GA と GGA のピークは分離度 1.5 以上であり，GA ピーク中の 3 点の紫外吸収スペクトルはいずれも一致した．このことから本法の特異性（選択性）が示された．

次に，改良定量法の真度を求めるために本法の定量値を，標準溶液の GA 含量と比較した．すなわち，改良定量法による試料 3（GEP 採取量 150 mg）の GA 定量値を基準とし，GEP の採取量，グリチルリチン酸ジカリウム溶液の濃度，添加量及び GA 定量値から真度を求めた．RSD_r は 3 併行の各試料から得られた値から求めた．RSD_{IP} は，試料 3 について試験者，装置，カラムを表 7 及び 8 のように割付け，各 2 併行で測定した値から求めた．真度，RSD_r 及び RSD_{IP} は 99.9%，0.24%，0.61%といずれも良好なものであった．改良定量法では試料採取量を現行法より少ない 150 mg に設定したが，特異性，範囲，真度及び精度において良好な結果が得られ，本法の妥当性が示された．

(2)　RMS 法の検討

RMS の決定

相対モル感度（RMS：relative molar sensitivity）とは，任意の検出器における単位物質量当たりの応答について，基準物質に対する分析対象物質の感度比として定義され，特定の分析条件下における応答比（Rr）と物質量比（Rn）から算出される．一般に，化合物間の RMS は物質固有の値であり，これを用いることで，ある化合物の応答量から他の化合物の応答量を算出することが可能である．したがって，HPLC 等の相対定量においては，RMS を用いることで分析対象物質の標準品に代わり，安定性や安全性等の観点で取り扱いに優れる物質を基準物質として，分析対象物質を定量することが可能となる．RMS 法は既にわが国の公定書において採用実績があり，第十八改正日本薬局方では生薬ソヨウ，第十八改正日本薬局方第二追補ではブシ配合処方エキスにおいて，RMS を利用した試験法が収載されている [5,6]．本研究では，定量用標品に日本薬局方標準品より汎用的な試薬を適応することを目的に，RMS 法を用いた GEP の定量法を検討した．

RMS 法での定量では適切な基準物質を選定する必要がある．基準物質の望ましい条件としては，安定，高純度，安価，安全であり，測定対象物質と近い吸収極大（λmax）を有していることがあげられる．また，GEP 中の GA の定量に用いることを考慮すると，緩衝液法の LC 条件で GA と明確に分離する必要がある．本研究では，現行の GEP の定量において，カラムの選定に用いられる物質である PP とその類縁化合物であるパラオキシ安息香酸メチル（MP：Methyl *p*-Hydroxybenzoate），パラオキシ安息香酸エチル（EP：Ethyl *p*-Hydroxybenzoate），パラオキシ安息香酸イソプロピル（iPP：Isopropyl *p*-Hydroxybenzoate），パラオキシ安息香酸ブチル（BP：Butyl *p*-Hydroxybenzoate）及びパラオキシ安息香酸イソブチル（iBP：Isobutyl *p*-Hydroxybenzoate）を基準物質の候補とした（図 4）．

まず，これらの化合物及び GA の極大吸収を確認するため，GEP 及び各パラオキシ安息酸エステル類の UV-Vis スペクトルを測定した（図 5）．その結果，GA の極大吸

収は 253 nm であり，パラベン類の極大吸収はいずれも 255 nm 付近であった．さらに，これらの混合標準溶液を緩衝液法の LC 条件で測定したところ，いずれのパラオキシ安息酸エステル類も良好に GA と分離した（図 6）．iBP 及び BP はピークがややブロード気味であること，保持時間が長く分析に時間がかかることから，基準物質として適当ではないと判断した．一方で，MP，EP，iPP 及び PP はピーク形状も良好であり，RMS の基準物質として使用可能であることが示唆された．本研究では，GEP の試験法で使用実績があることを考慮し，PP を基準物質に選定した．

GA の PP に対する RMS を算出するため，混合試料溶液を 3 調製し，^{1}H-qNMR 及び HPLC を用いて Rn 及び Rr を算出した．分析条件は表 9 及び表 10 に示す．^{1}H-qNMR による Rn の算出では，不純物由来のシグナルが認められず，他の化合物のシグナルと重ならないものを定量シグナルとして選定し（図 7），各化合物のプロトン当たりのシグナル強度比より GA の PP に対する Rn を算出した．次に，qNMR 用混合試料溶液を希エタノールで 5 濃度に希釈し，HPLC における Rr を求めた（図 8）．この操作を溶液 1 及び 2 では 1 回，溶液 3 では 3 回，試験者及び分析装置を別にして繰り返した．溶液濃度ごとの Rr は同一装置内でほぼ一致した値であり，装置内 RSD は 0.12～0.28%と良好な値であった．これは当該希釈範囲において GA 及び PP の濃度とピーク面積に比例関係が認められ，RMS 法が適応可能であることを示している．

最後に，得られた Rr を対応する溶液の Rn で除し GA の PP に対する RMS を算出した（表 11）．装置間 RSD は 1.79%であり，既報[7-10]と比較しても許容範囲のばらつきであることから，定量に用いる係数は 5 装置での測定結果の平均値である 0.7989 を採用することとした．

RMS 法による GA の定量

RMS 法の真度及び精度を評価するために，グリチルリチン酸モノアンモニウムを用いて GEP 採取量換算でそれぞれ約 6%，30%，60%に相当する GA を含む試料溶液を作成し，RMS 法及び改良定量法で GA 含量を定量した．分析に先立ち，単波長の UV-Vis 検出器及び多波長の PDA 検出器を含んだ 3 装置，4 検出器（表 12）において局方「カンゾウ粗エキス」を準用したシステム適合性を確認した．すなわち，システム性能確認用標準溶液を測定時に，GA 及び GGA の分離度が 1.5 以上であること及び，各 GA，PP 標準溶液を 6 回測定時に各ピーク面積の相対標準偏差が 1.5%以下であることを確認した（図 9，表 13）．

RMS 法により求めたそれぞれの試液に対する GA 濃度は 6.0%，30.1%及び 60.3%であった．改良定量法による定量値を基準とした真度は各装置において 95.7～99.5%となり，その平均値は 98.2%であった．このことから，RMS 法による定量値は改良定量法で求めた定量値と一致することが示された．また，装置内 RSD は 0.41～0.68%，同一の試料溶液及び標準溶液を測定することにより求められた装置間 RSD は 1.23～1.57%であり，高い再現性が示された．

次に，「カンゾウ抽出末」2 社各 3 ロットを用いて各 6 併行で RMS 法による定量を行った．分析には上記試験と同様に同一の

試料溶液及び標準溶液を 3 装置，4 検出器で分析した．RMS 法により算出した GA 含量の装置平均は A 社 3 ロットにおいて，29.4%，29.3%及び 29.8%，B 社 3 ロットにおいて 29.6%，30.0%及び 30.5%であった（表 14）．装置内 RSD は 0.33～0.58%，装置間 RSD は 1.38～1.68%であり，良好な再現性が示された．また，上記と同様に求めた真度は，各装置において 96.8～100.1%となり，その平均は 98.7%であった．RMS 法による定量結果は，改良定量法による定量結果より装置間差があり，その値もわずかに低かったが，「カンゾウ抽出末」中の GA 含量の規格である 12.0～50.0%の範囲において，ほとんど影響を及ぼさないものと考えられた．以上より，PP を基準物質として用いた RMS による定量法は，GEP 中の GA 定量法として，適応可能であることが示された．

D. 結論

本研究ではまず，GEP の試料調製法と定量法を検討した．調製法は試料採取量を減らし，希エタノールに溶解する簡便な方法が適応可能であった．これにグリチルリチン酸標準品を用いた定量法を組み合わせた改良定量法は，規格値を含む様々な GA を含む GEP 試料の測定において，優れた特異性，真度及び再現性を示した．

次に，PP を用いた RMS 法による定量法を検討した．^{1}H-qNMR 及び HPLC により算出した GA の PP に対する RMS は 0.7989 であった．この係数を用いてカンゾウ抽出末中の GA を定量したところ，その真度は 98.7%，装置内 RSD は 0.33～0.58%，装置間 RSD は 1.38～1.68%となり，良好な結果が得られた．以上より，PP を基準物質として用いた RMS による定量法は，GEP 中の GA 定量法として適応可能であると考えられた．

今後はこれらの定量法について他機関バリデーションを実施し，さらなる妥当性の評価を行う予定である．

E. 研究発表

1. 学会発表

1） 岩橋孝祐, 桑原千雅子, 内山奈穂子：医薬部外品原料規格「カンゾウ抽出末」の定量法の改良について，第 62 回全国衛生科学技術協議会年会（薬-10），（2025.11.7，群馬）．

2） 岩橋孝祐，桑原千雅子，細江潤子，田中優樹，内山奈穂子: 医薬部外品原料規格「カンゾウ抽出末」の定量法の検討（27-52-pm2-05），日本薬学会第 146 年会（2026.3.27，大阪）

3） 田中優樹，細江潤子，東阪嘉子，大嶋直浩，岩橋孝祐，桑原千雅子，久保田領志，内山奈穂子: 医薬部外品原料規格「カンゾウ抽出末」の相対モル感度を利用した定量法の開発（27-52-pm2-03），日本薬学会第 146 年会（2026.3.27，大阪）

2. 誌上発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 引用文献

1）厚生労働省,「医薬部外品原料規格 2021

について」(令和 3 年 3 月 25 日付薬生発第 0325 第 1 号．厚生労働省医薬・生活衛生局長通知）(2021).
2）厚生労働省，第十九改正日本薬局方（令和 8 年 4 月 10 日厚生労働省告示第 193 号）(2026)
3）厚生労働省，第十七改正日本薬局方（平成 28 年 3 月 7 日厚生労働省告示第 64 号）(2016)
4）厚生労働省，「分析法バリデーションに関するガイドラインについて」（令和 7 年 10 月 9 日付医薬薬審発 1009 第 1 号．厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知）
5）厚生労働省，第十八改正日本薬局方（令和 3 年 6 月 7 日厚生労働省告示第 220 号）(2021)
6）厚生労働省，第十八改正日本薬局方第二追補（令和 6 年 6 月 28 日厚生労働省告示第 238 号）(2024).
7）西崎ら，食品衛生科学雑誌，59，1-10 (2018).
8）Masumoto, N., et al.: J. Nat. Med., 73, 566–576 (2019).
9）内山ら，薬学雑誌，143, 951-962, (2023)
10）Masumoto, N., et al.: Chem. Pharm. Bull., 73, 650–657 (2025).

表 1 局方「カンゾウ粗エキス」及び外原規「カンゾウ抽出末」の定量法

	局方「カンゾウ粗エキス」	外原規「カンゾウ抽出末」
採取量	0.15 g	0.25 g
試料調製法	試料約0.15 gに希エタノール25 mLを加えて時々降り混ぜながら、50℃で30分振とう。冷後、遠心分離し上澄液を分取。残留物に希エタノール20 mLを添加し、同様に操作。全抽出物を合わせ希エタノールを加え、100 mLに定容し、試料溶液とする。	試料約0.25 gに移動相を加えて溶かし、100 mLに定容する。0.45 μmメンブランフィルターでろ過し試料溶液とする。
移動相	酢酸アンモニウム3.85 gを水720 mLに溶かし、酢酸（100）5 mL及びアセトニトリル280 mLを加える。	薄めた酢酸（100）（1→50）/アセトニトリル混液（20：11）
定量用試薬	局方グリチルリチン酸標準品	「グリチルリチン酸モノアンモニウム」
カラム	ODSカラム（4.6×150 mm, 5μm）	ODSカラム（4.0×300 mm, 5μm）
カラム温度	約40℃	約40℃
流量	GAの保持時間が約15分になるように調整する。	GAの保持時間が約10分になるように調整する。
注入量	10 μL	20 μL
システム適合性（カラムの選定）	GAとGGAの分離	GAとPPの分離と溶出順

表 2 試料調製法

	調製法1	調製法2	調製法3
試料重量	約15 mg	約15 mg	約15 mg
溶媒	希エタノール	希エタノール	薄めた酢酸（1→50）/アセトニトリル混液（20：11）
操作	希エタノールを加えて溶かし、10 mLに定容する。	希エタノール2.5 mLを加えて時々振り混ぜながら、50℃で30分振とう。冷後、遠心分離し上澄液を分取。残留物に希エタノール2 mLを添加し、同様に操作。全抽出物を合わせ希エタノールを加え、10 mLに定容しする。	薄めた酢酸（1→50）/アセトニトリル混液（20：11）を加えて溶かし、10 mLに定容する。
フィルターろ過	あり	あり	あり

表 3 試料調製法検討時の分析条件

移動相	緩衝液法
装置	Alliance e2695
検出器	PDA2998 Detector
カラム	A社ODSカラム (4.6×150 mm, 5 μm)
カラム温度	40℃
流量	1.23 mL/min
注入量	10 μL

表 4 改良定量法と局方及び外原規の定量法

	改良定量法	局方「カンゾウ粗エキス」	外原規「カンゾウ抽出末」
採取量	0.15 g	0.15 g	0.25 g
試料調製法	試料約0.15 gに希エタノールを加えて溶かし、100 mLに定容する。0.45 μmメンブランフィルターでろ過し試料溶液とする	試料約0.15 gに希エタノール25 mLを加えて時々降り混ぜながら、50℃で30分振とう。冷後、遠心分離し上澄液を分取。残留物に希エタノール20 mLを添加し、同様に操作。全抽出物を合わせ希エタノールを加え、100 mLに定容し、試料溶液とする。	試料約0.25 gに移動相を加えて溶かし、100 mLに定容する。0.45 μmメンブランフィルターでろ過し試料溶液とする。
移動相	酢酸アンモニウム3.85 gを水720 mLに溶かし、酢酸（100）5 mL及びアセトニトリル280 mLを加える。	酢酸アンモニウム3.85 gを水720 mLに溶かし、酢酸（100）5 mL及びアセトニトリル280 mLを加える。	薄めた酢酸（100）（1→50）/アセトニトリル混液（20：11）
定量用試薬	局方グリチルリチン酸標準品	局方グリチルリチン酸標準品	「グリチルリチン酸モノアンモニウム」
カラム	ODSカラム （4.6×150 mm, 5 μm）	ODSカラム （4.6×150 mm, 5μm）	ODSカラム （4.0×300 mm, 5μm）
カラム温度	約40℃	約40℃	約40℃
流量	GAの保持時間が約15分になるように調整する。	GAの保持時間が約15分になるように調整する。	GAの保持時間が約10分になるように調整する。
注入量	10 μL	10 μL	20 μL
システム適合性 （カラムの選定）	GAとGGAの分離	GAとGGAの分離	GAとPPの分離と溶出順

表 5 改良定量法及び現行法の分析条件

定量法	改良定量法	現行法1	現行法2
標準品	日局グリチルリチン酸標準品	「グリチルリチン酸 モノアンモニウム」	「グリチルリチン酸 モノアンモニウム」
溶媒	希エタノール	移動相	移動相
移動相	緩衝液法	イオン抑制法	イオン抑制法
装置	Alliance e2695	ACQUITY Arc	Prominence-i
検出器	2998 PDA Detector	2998 PDA Detector	LC-2030 UV Detector
カラム	A社ODSカラム （4.6×150 mm, 5 μm）	A社ODSカラム （4.0×300 mm, 5 μm）	B社ODSカラム （4.6×150 mm, 5 μm）
注入量	10 μL	20 μL	20 μL
流量	GAの保持時間が約15分となるように調整	カラムの耐圧に合わせて調整	GAの保持時間が約10分となるように調整

表 6 分析法バリデーションにおける試料条件

試料	1	2	3	4	5	6
GEP秤量値(mg)	30	90	150	150	150	150
GA添加量(mg)	-	-	-	15	30	45
GA含量(%)	約6%	約18%	約30%	約40%	約50%	約60%

表 7 分析法バリデーションにおける分析条件

	A	B
装置	Alliance e2695	Prominence-i
検出器	2998 PDA Detector	LC-2030 UV Detector
カラム	A社ODSカラム 4.6×150 mm, 5μm	C社ODSカラム 4.6×150 mm, 5μm

試料 1, 2, 3, 4, 5, 6 は条件 A，別途，試料 3 は室内再現精度として表 8 に示す条件で分析した.

表 8 室内再現精度評価時の装置割付け

実験日	割付		
	試験者	装置	カラム
1日目	1	A	A
2日目	1	B	A
3日目	1	A	B
4日目	2	B	B
5日目	2	A	B
6日目	2	B	A

表 9 qNMR 装置条件

装置名	ECZ600（600MHz）
プローブ	SCプローブ
溶媒	Methanol-d_4
基準物質	DSS-d_6
観測核	^{1}H
観測スペクトル幅	20 ppm
取り込み時間	4秒
積算回数	16～32回
取り込み点数	0.25 Hz
パルス幅と角度	90°
遅延時間	60 秒
スピン	OFF
温度	25 ℃
^{13}C デカップリング	MPF-8

表 10 RMS 算出時の HPLC 分析条件

	装置1	装置2	装置3	装置4	装置5
装置	UltiMate3000（Thermo Fisher Scientific）	UPLC H-Class（Waters）	LC-20A（Shimadzu）	LC-20AD（Shimadzu）	UPLC H-Class（Waters）
検出器	Diode Array Detector（Thermo Fisher Scientific）	PDA eλ detector（Waters）	Diode Array Detector（Shimadzu）	SPD-M20A（Shimadzu）	PDA eλ detector（Waters）
カラム	A社ODSカラム	A社ODSカラム	A社ODSカラム	A社ODSカラム	A社ODSカラム
サイズ	4.6×150 mm, 5 μm	4.6×150 mm, 5 μm	4.6×150 mm, 5 μm	4.6×150 mm, 5 μm	4.6×150 mm, 5 μm
流量	1.2 mL/min	1.2 mL/min	1.5 mL/min	1.1 mL/min	1.2 mL/min
カラム温度	40℃	40℃	40℃	40℃	40℃
移動相	酢酸アンモニウム3.85 gを水720 mLに溶かし，酢酸(100) 5 mL及びアセトニトリル280 mLを加えた				
試料	溶液1	溶液2	溶液3	溶液3	溶液3
注入量	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
測定波長	254 nm	254 nm	254 nm	254 nm	254 nm

表 11 GA の PP に対する RMS

試料 HPLC条件	溶液1 装置1	溶液2 装置2	溶液3 装置3	溶液3 装置4	溶液3 装置5	平均
Rr*	0.6402	0.6045	0.6477	0.6254	0.6287	
Rn	0.7848	0.7630	0.7968	0.7968	0.7968	
RMS	0.8157	0.7923	0.8129	0.7848	0.7890	0.7989

*5 濃度の平均より求めた

表 12 GA 定量時の分析条件

装置条件	A	B	C	D
装置	Alliance e2695 (Waters)	Alliance e2695 (Waters)	UPLC H-Class PLUS (Waters)	Prominence-i LC-2030C (Shimadzu)
検出器	2998 PDA Detector (Waters)	2489 UV/Vis Detector (Waters)	PDA eλ Detector (Waters)	LC-2030 UV Detector (Shimadzu)
カラム	A社ODSカラム (4.6×150 mm, 5 μm)	A社ODSカラム (4.6×150 mm, 5 μm)	A社ODSカラム (4.6×150 mm, 5 μm)	A社ODSカラム (4.6×150 mm, 5 μm)
カラム 温度	40℃	40℃	40℃	40℃
移動相	酢酸アンモニウム3.85 gを水720 mLに溶かし，酢酸(100) 5 mL及びアセトニトリル 280 mLを加える			
注入量	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
流量	1.15 mL/min	1.15 mL/min	1.12 mL/min	1.10 mL/min
測定波長	254 nm	254 nm	254 nm	254 nm

表 13 各分析条件におけるシステム適合性

分析条件	A	B	C	D
GGAとGAの分離度	1.9	1.9	2.1	2.0
GA測定時のRSD（%）	0.53	0.53	0.18	0.02
PP測定時のRSD（%）	0.43	0.45	0.15	0.03

表 14 分析条件 A-D における RMS 法及び改良定量法による「カンゾウ抽出末」中の GA 含量

分析条件	Lot.A-1		Lot.A-2		Lot.A-3		Lot.B-1		Lot.B-2		Lot.B-3		真度（%）
	RMS	改良定量法	RMS	改良定量法	RMS	改良定量法	RMS	改良定量法	RMS	改良定量法	RMS	改良定量法	
GA含量（%）	29.4	29.8	29.3	29.7	29.8	30.2	29.6	30.0	30.0	30.4	30.5	31.0	98.7
装置内RSD	0.58	0.57	0.45	0.44	0.39	0.38	0.34	0.33	0.52	0.51	0.33	0.33	
装置間RSD	1.68	0.57	1.55	0.45	1.51	0.38	1.42	0.36	1.43	0.63	1.38	0.55	

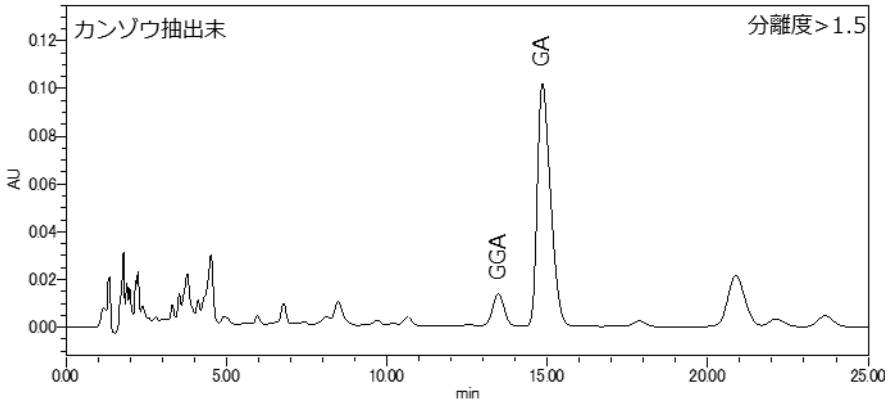


図 1 改良定量法による試料溶液の UV クロマトグラム

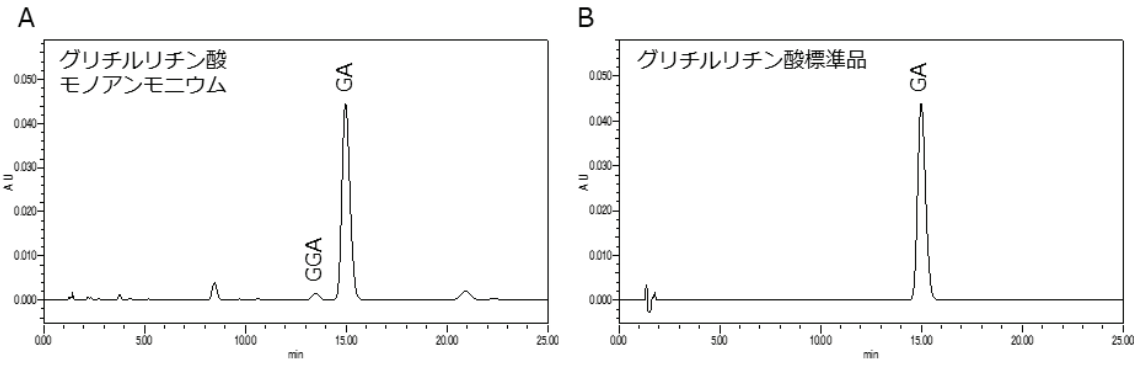


図 2 改良定量法の UV クロマトグラム
（A）グリチルリチン酸モノアンモニウム及び（B）局方グリチルリチン酸標準品の
改良定量法における UV クロマトグラム

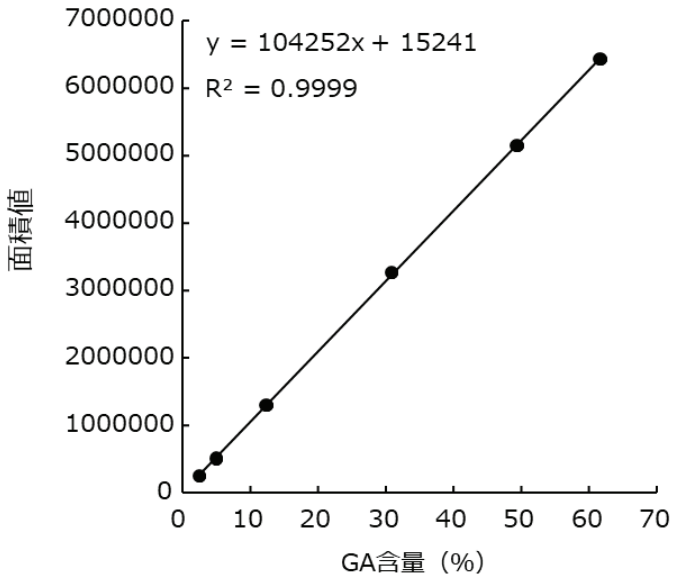

y = 104252x + 15241
R² = 0.9999
面積値
GA含量（%）
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
0
10
20
30
40
50
60
70

図 3 標準溶液の検量線

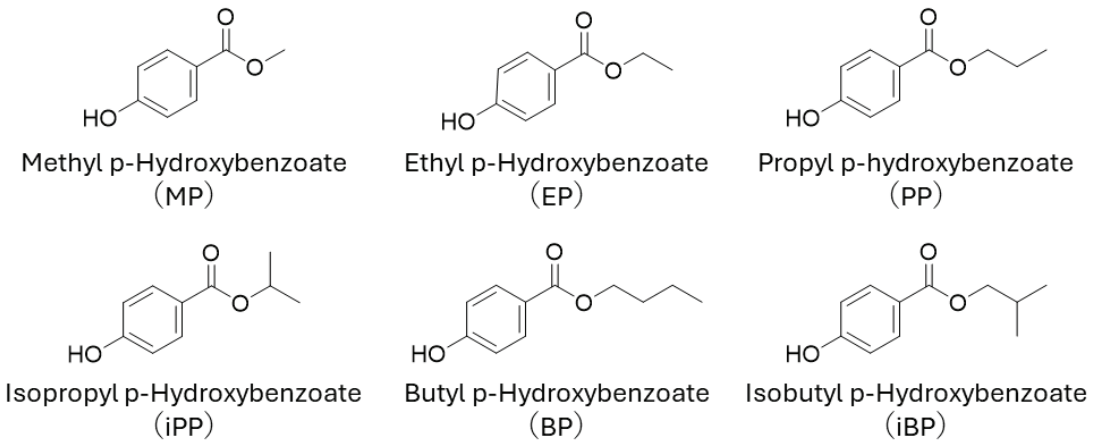


図 4　検討した基準物質の構造式

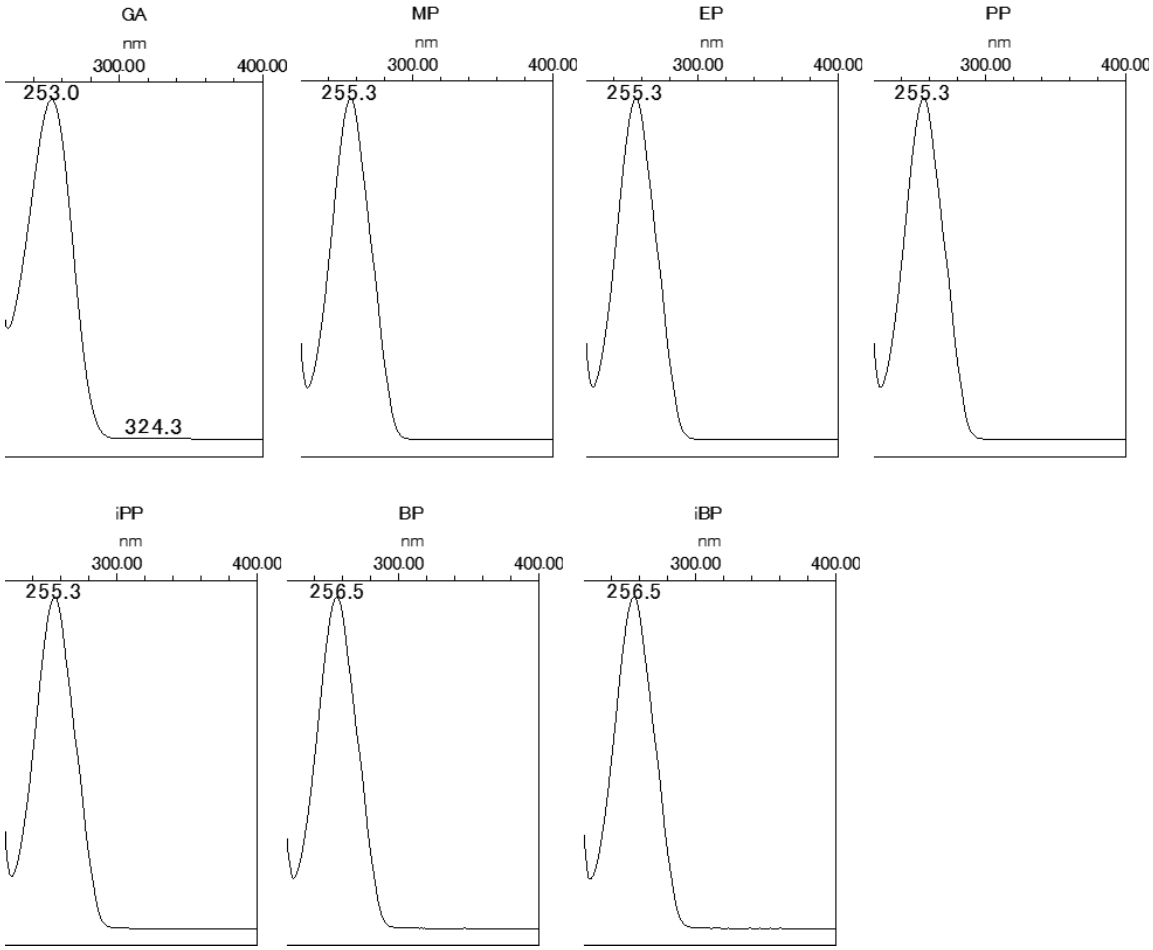


図 5　GA 及びパラオキシ安息香酸エステル類の UV-Vis スペクトル

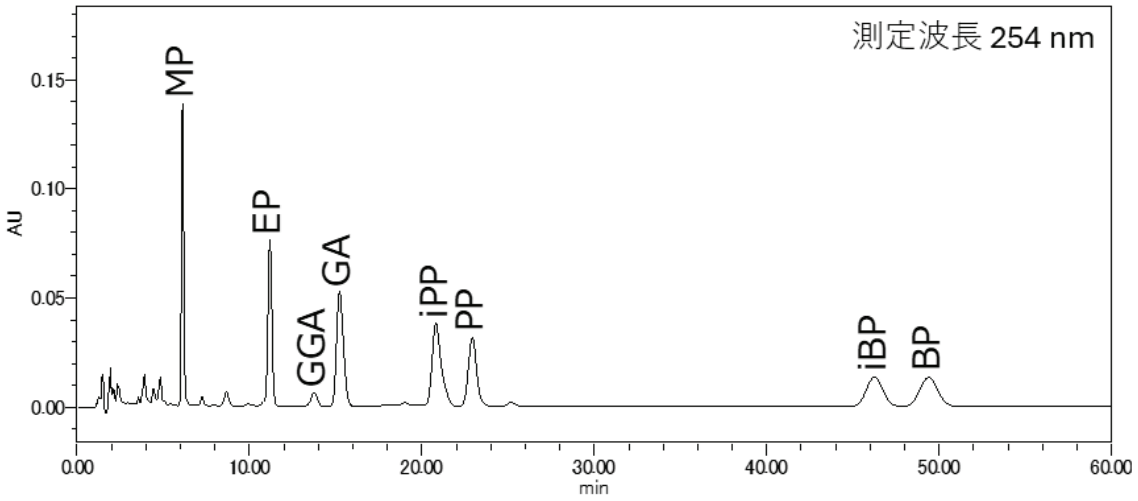


図 6　GA 及びパラオキシ安息香酸エステル類の UV クロマトグラム

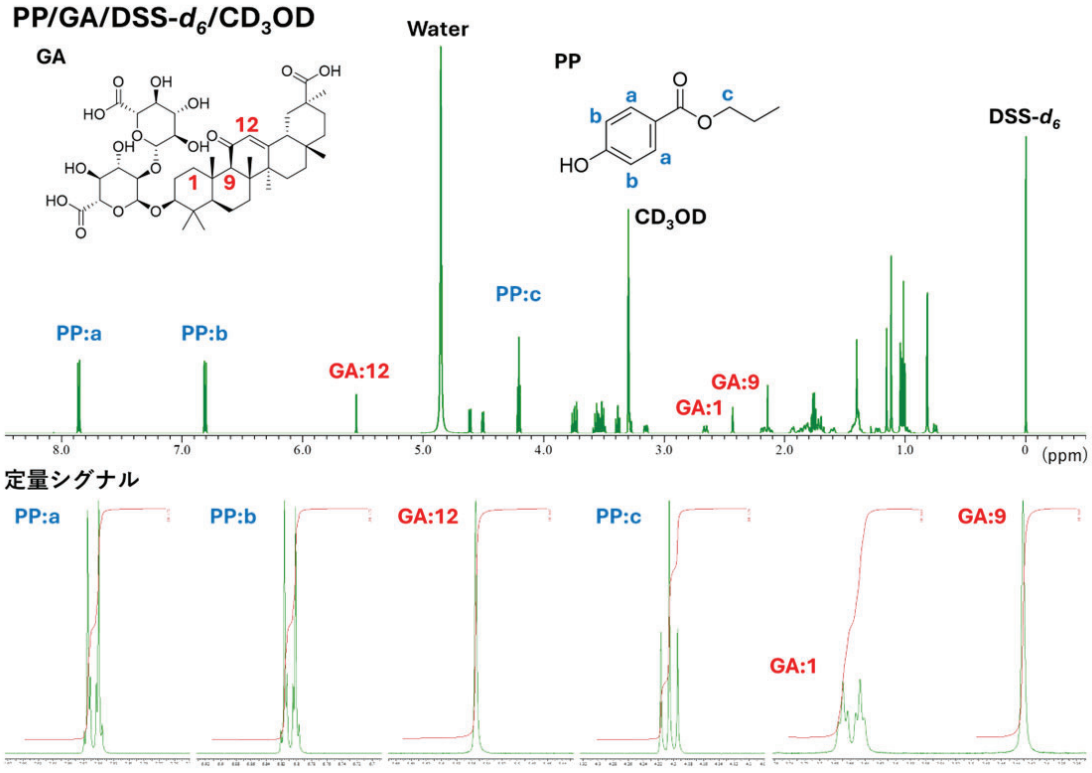


図 7 混合試料溶液の ^{1}H-qNMR スペクトル

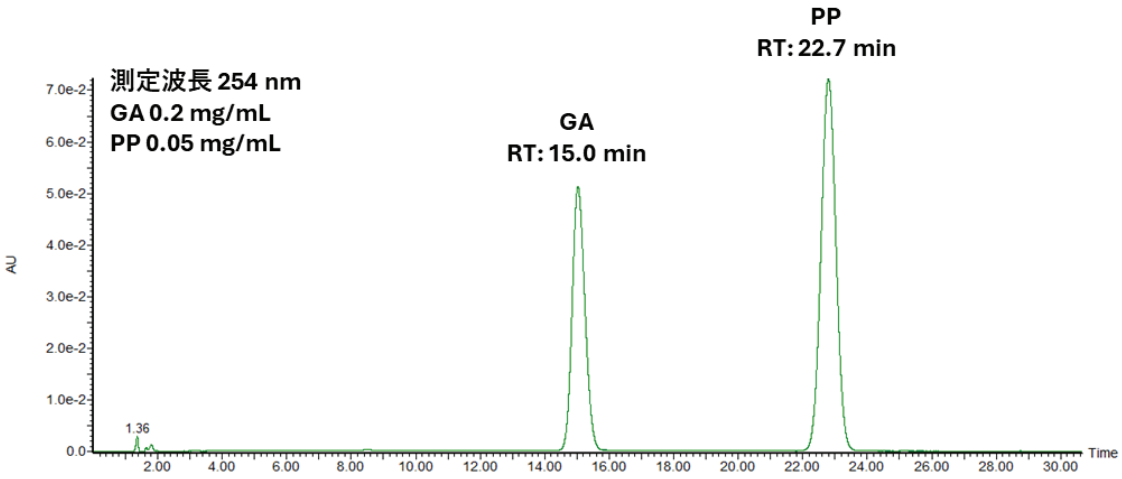


図 8 混合標準液の代表的な UV クロマトグラム

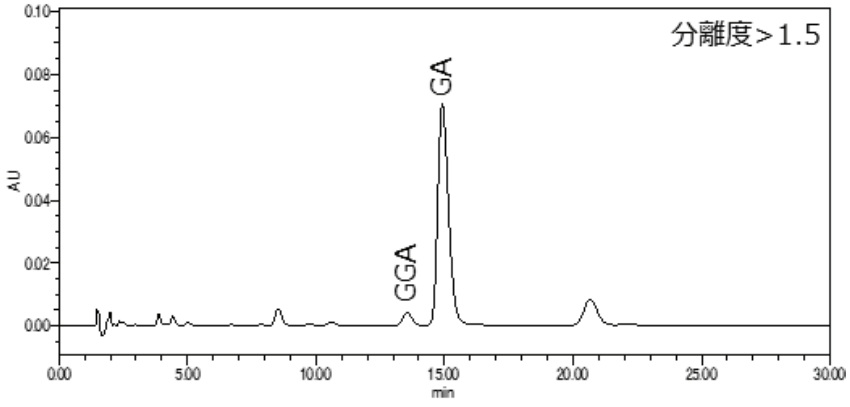


図 9 分析条件 A におけるシステム性能確認用標準溶液の UV クロマトグラム