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）
分担研究報告書

医薬部外品原料規格の整備に関する試験法の開発研究

分担課題名
天然由来品目における試験法開発

研究分担者
大嶋　直浩　国立医薬品食品衛生研究所　生活衛生化学部　主任研究官

研究要旨

本研究では、医薬部外品原料規格のうち旧来の測定法や有害試薬の使用が規定されている「ヒノキチオール」に焦点を当て、HPLC を用いた改正定量法の提案を目的とした。市販試薬ヒノキチオール 3 種のうち 1 種を標品として、EDTA およびクエン酸を移動相とする HPLC 分析を行った結果、0.25–10 μg/mL の濃度範囲で良好な直線性（R^2 0.9996）を示し、各濃度の試料の回収率は 98.75%–101.67%、システム再現性は 1.16 %であった。そのうち、5 μg/mL の濃度ではシンメトリー係数が 1.4 以下、理論段数が 10,000 以上であった。そこで 5 μg/mL の 1 点検量線法で 2 種の市販試薬ヒノキチオールを定量した結果、それぞれの回収率が 101.1%、99.4%であった。用いた試薬の絶対純度は ^{1}H-NMR 法により 99.5%以上であった。また、室温下 2 ヶ月の保存安定性も認められた。そこで、5 つの試験室における室間再現性試験を実施した結果、ヒノキチオール 2 種類の回収率は現行規格値の範囲内であった。各試験室内のシステム再現性は 1.5%RSD であり、室間再現性精度（RSD_R）は 1.72%、1.43%であった。以上より、ヒノキチオールの改正定量法として、EDTA 及びクエン酸緩衝液を移動相とし、1 点検量線を用いる HPLC 法を提案する。

研究協力者
吉冨太一　神奈川県衛生研究所　理化学部

A．研究目的

医薬部外品原料規格（外原規）は、医薬部外品や化粧品の原料として使われる成分のうち、日本薬局方、食品添加物公定書および日本産業規格には収載されていない成分について、原料の段階で品質や安全性を保証するための公定規格である[1)]。外原規は1991年に制定された規格を端緒としており、その後「化粧品原料基準」及び「化粧品種別配合成分規格」が統合され、最新の外原規2021の制定に至っている[1-3)]。

外原規には合成品や天然物を含め2,600以上の品目が収載されている。しかし、様々な規格を統合して作成された背景から、個々の規格で差が大きく、必要な項目が設定されていない品目もある。また、有害試薬の使用や煩雑な操作なども規定されており依然として課題がある。

公的な試験法は、一般的に科学的知見および分析技術の進展に応じて随時見直されるものであり、これは国際的にも共有された規制科学上の基本原則である[4–6)]。他方、外原規には吸光度測定などの旧来の試験法が多く設定されている。吸光度測定は操作が簡便だが、測定結果が単一の数値として記録されるため、後日の再解析や第三者による客観的な検証が難しい。また、共存成分の影響を受けやすく、測定値が目的以外の成分に由来する可能性も否定できない。

外原規の対象は医薬品ではなく医薬部外品や化粧品であることから、日本薬局方と同等の高度かつ厳格な規制を一律に求めることは必ずしも適切ではない。しかしながら、外原規においても、分離・同定能を有する機器分析を用い、第三者による客観的な検証が可能な試験法

を位置付けることは、制度全体の信頼性や原料の付加価値を高める上で最低限必要な要件であると考えられる。

HPLC は、目的成分を分離した上で定量を行い、分離情報を含むクロマトグラムを一次データとして自動的に記録できる分析手法である。そのため、共存成分の影響を低減できるとともに、測定結果の保存性およびトレーサビリティの確保が可能である。また、HPLC は 日本薬局方や 食品添加物公定書等の公的規格において広く採用されており、目的に応じて1点検量線による定量が用いられるなど、実務的観点からも確立された分析手法である。

HPLCを用いた試験法の改定を検討するにあたっては、試験法の科学的妥当性および第三者による客観的検証可能性を裏付けるデータの整備が重要となる。その一環として、クロマトグラムおよびUVスペクトルによる成分の分離・同定能、真度や室内精度に代表される分析性能に加え、装置およびカラムの違いを考慮した汎用性や、多機関における検証可能性が求められる。さらに、規格値を十分に包含する定量範囲および条件変動に対する頑健性が確認されていることが望ましい。

「ヒノキチオール」は、外原規に記載されている成分であり[2)]、防腐、抗炎症作用などにより、薬用石けん・シャンプー・リンス、除毛剤、育毛剤などに幅広く使用されている[7–8)]。ヒノキチオールは7員環のトロポロン環骨格を有し、金属イオンと結合しやすい構造を有する[9)]。現行のヒノキチオールの試験法は、有害試薬クロロホルムの使用や酢酸鉄(III)水溶液を用いた煩雑な分液操作、並びに旧来の吸光度法（波長 425 nm）が規定されている。

本研究では、医薬部外品原料規格収載「ヒノキチオール」に焦点を当て、より安全かつ簡易的で、信頼性の高いHPLCを用いて1点検量線法による定量法の可能性を検証した。

B．研究方法

試薬

ヒノキチオールでは、検量線用標準試薬（試料S）として東京化成工業製を、定量対象試薬（試料A，B）として富士フィルム和光純薬製、メルク社製の計3試料を用いた。1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene-d_4 (1,4-BTMSB-d_4)は富士フィルム和光純薬製を使用した。

前処理方法

本品及びヒノキチオール標準品を乾燥し、その20 mgを精密に量り、メタノールを加えて溶解し、100 mLとした。この液2.5 mLを正確にとりメタノールを加えて100 mLとし、試料溶液及び標準溶液とした。

分析方法　HPLCによるヒノキチオールの測定にはLC-30Aシリーズ（島津製作所）を使用した。HPLCの分析条件は以下の通りである。

HPLC条件

既報[10)]に準じた方法で定量した。即ち、10 µLのサンプルをInertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. x 250 mm, 5 µm; GL Sciences社製)カラムを用いてメタノール及び0.2 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）含有5 mMクエン酸緩衝液の混液(*v/v* 6/4)を1 mL/minでアイソクラティックに送液し紫外可視吸光度 (λ 240 nm)で測定した。なお、0.2 mM EDTA含有5 mMクエン酸緩衝液は、クエン酸一水和物3.5 g、クエン酸三ナトリウム二水和物3.0 g、EDTA二ナトリウム0.32 gを水500 mLに溶かし、室温で保管し、分析時に当該溶液を水で10倍に希釈した。

保存安定性評価

LED照明下、25℃、50%RHの実験室において、ヒノキチオールメタノール溶液（10 µg/mL）を室温・冷蔵・冷凍下で透明及び褐色バイアルでそれぞれ保管し、時間推移と共に計7点を継続的に分析し、初日のピーク面積に対する変動率で表した。測定精度を考慮して、変動率が90–110%の範囲内を、保存安定性が「良好」と評価した。

純度測定

絶対純度の測定には、ヒノキチオール (5.0 mg)及び基準物質1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene-d_4 (1,4-BTMSB-d_4 (99.9%, 5.0 mg))を正確に秤量し、重メタノール（1 mL）に溶解した試料を、SCプローブを搭載した日本電子製ECZ600の定量NMR（核磁気共鳴装置）で非連続的に3回分析しその平均値を算出した。絶対純度は以

下のEq.(1) を用いて計算した。

(1)

$$P_{analyte} = \frac{S_{analyte}}{S_{std}} \times \frac{H_{std}}{H_{analyte}} \times \frac{M_{analyte}}{M_{std}} \times \frac{W_{std}}{W_{analyte}} \times P_{std}$$

ただし，*S*, シグナル面積; *H*, *S*に由来するプロトン数; *M*, 分子量; *W*, 秤量値（g）; *P*, 純度（wt%）; std, qNMR用基準物質; analyte, 測定対象物質

室内分析バリデーション

3種類の試料（試料S, 試料A, 試料B）のうち、試料Sを標準試料として用い，残り2試料を同一実験室で6回繰り返して分析し、回収率、システム再現性(RSD %)、シンメトリー係数、および理論段数を評価した。回収率は、5 μg/mL のヒノキチオール標準メタノール溶液を測定し、5 μg/mL の一点検量線から算出した定量値を、標準溶液の濃度（5 μg/mL）で除して百分率として算出した。システム再現性は、同一バイアルの6回繰り返し測定により得られたピーク面積の標準偏差を平均値で除して、百分率として算出した。シンメトリー係数および理論段数は、取得したクロマトグラムから解析ソフトウェアにより自動算出した値を用いた。

室間分析バリデーション

異なる5つの試験室（Labs. 1–5）において、室内分析バリデーションと同様に実施した。すなわち、試料Sを標準試料として用い，残り2試料（A, B）を同一実験室で6回繰り返して測定し、回収率、シンメトリー係数および理論段数を算出した。検出波長，カラム温度および注入量は，全実験室で統一した条件とした。分離カラムには一般的なODS（C18）カラムを用い，内径4.6 mmは固定とした。一方，カラム長については各試験室が保有するカラムの使用を許容した。各試験室よりピーク面積、保持時間、クロマトグラム、シンメトリー係数、理論段数及び濃度値として報告された。システム再現性は、各試験室で同一バイアルを6回繰り返し測定し、得られたピーク面積から相対標準偏差（RSD, %）を算出した。室間再現性は各試験室で得られた測定値の一元配置分散分析（one-way ANOVA）を行い、試験室間平均平方および試験室内平均平方から室間再現標準偏差（S_R）を算出し、全体平均値で除して室間再現性相対標準偏差（RSD_R %）を算出した。得られた値の妥当性は、Horwitzの経験式に基づくHorRat値[11]（観測RSD_R／Horwitz式由来RSD_R）により評価した。HorRatが0.5–2.0の範囲内を許容と判定した。

C．研究結果および考察

ヒノキチオールのメタノール溶液を HPLC で分析した結果、9.8 分の保持時間に明瞭なピークが認められ、極大吸収波長は 240 nm であった（**図 1**）。標準品の絶対純度においては、ヒノキチオールのイソプロピル基のメチン水素シグナル（e）を定量シグナルとして、^{1}H-NMR 法で測定した結果、99.7%であった（**図 2**）。また、約 2 ヶ月の保存安定性を、透明バイアルおよび褐色バイアルを用いて室温・冷蔵・冷凍の各条件で保存安定性試験を実施した結果、いずれの条件においても初日との比較において変動差は 10%以内であり、保存安定性は良好であった（**図 3**）。

標品を段階希釈して定量したところ 0.25–10 μg/mL の濃度範囲で良好な直線性（R^2 0.9996）を得た。各濃度の回収率、併行精度、シンメトリー係数および理論段数を**表 1** に示す。高濃度域である 5, 10 μg/mL では、回収率は現行規格値 98.0~105.0%の範囲内であり、併行精度は RSD_r 1.2 %以下、シンメトリー係数は 1.4 以下、理論段数は 10,000 以上であった。本結果より、1 点検量線に資する濃度は直線性を加味して 5 μg/mL に設定した。

さらに、当該濃度を 1 点検量線として 2 種の市販試薬ヒノキチオール（試料 A、B）を用いて室内分析バリデーションを実施した結果、それぞれの回収率が 101.1%、99.4%であり、現行規格値の範囲内であった（**Table 2**）。RSD_r は 0.5%以下であり、良好な結果であった。

そこで、5 つの試験室の室間分析バリデーションを実施した。いずれの試験室においても，試料 A および B のクロマトグラムは明瞭なピーク形状を示し（**Fig. 4**），定性および定量に支障となる妨害ピークは認められなかった。カラム長を委ねた条件下においても，流量を調節す

ることで保持時間 10 分付近にピークが認められた。

理論段数は, 室内分析バリデーション時にはすべての測定で 10,000 を超えていたのに対し、室間再現性試験では 3 機関において 10,000 未満となった（**Table 5**）。特にラボ 5 では 7,899 および 7,898 と低い値を示した。シンメトリー係数においては、室内分析では 1.4 以下であったのに対し、ラボ 2 において 1.54 および 1.53 とやや高い値が認められた（**Table 6**）。これらの結果は、カラム長の違い、あるいは配管・デッドボリューム等の装置要因がピーク形状および理論段数に影響した可能性が示唆された。しかしながら、定量値への影響は限定的であった。

試料 A および B の回収率は 98.8%–104%であり、いずれも現行規格値の範囲内であった（**Fig. 5**）。各試験室のシステム再現性は 0.11–1.03 (RSD %)であり（**Table 7**）、室間再現性においては、試料 A、B の RSD_R はそれぞれ 1.72%、1.43%であった（**Table 8**）。室間精度の指標として算出した HorRat 値は、試料 A および B のいずれにおいても 0.14、0.11 であった。HorRat 値は一般に 0.5‐2.0 の範囲が妥当とされているため、試験条件を緩和するなど、運用面での拡張性を高める余地があるものと考えられる。

ヒノキチオールの HPLC 分析は、既報の条件で外原規の定量法として規格化できることが確認された。本実験で使用した試料の純度は極めて高く、長期間の保存安定性も認められ、室間再現性も良好であった。以上のことから、外原規における「ヒノキチオール」の定量法として、5 μg/mL を 1 点検量線とした HPLC 法を提案する。

D．結論

ヒノキチオールの改正定量法として、EDTA 及びクエン酸緩衝液を移動相とし、1点検量線を用いるHPLC法を提案する。

E. 研究発表

１．論文発表

なし

2. 学会発表

1) 大嶋直浩, 細江潤子, 内山奈穂子. 医薬部外品原料規格「ヒノキチオール」の定量法開発. 日本香粧品学会第 50 年会 (2025.7.4) 東京

F. 知的所有権の取得状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

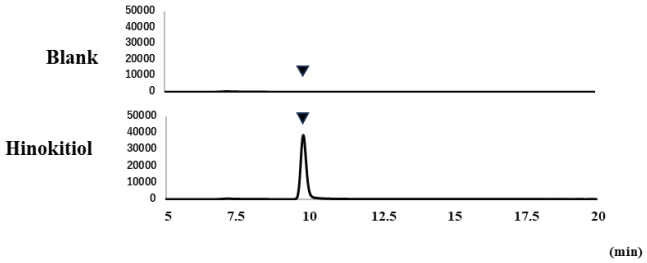
なし

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」（薬生発0325第1号．厚生労働省医薬・生活衛生局長通知。令和3年3月25日）
2) 厚生労働省「医薬部外品原料規格2021の一部改正について」（医薬発0321第1号．厚生労働省医薬局局長通知。令和7年3月21日）
3) 大原 拓, 日本香粧品学会誌 43(4), 322-327 (2019)
4) OECD. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34 (2005).
5) ISO/IEC. ISO/IEC Directives, Part 1: Procedures for the technical work. International Organization for Standardization.
6) ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
7) 大原 拓, 日本香粧品学会誌 43(4), 322‐327 (2019).
8) Inamori Y., et al. Antimicrobial activity of hinokitiol. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 22, 990–993 (1999).
9) Okabe T., Saito K. Metal chelation properties of tropolone derivatives. Journal of Inorganic Biochemistry, 36, 131–139 (1989).
10) 萩野賀世ほか : 台所用品からのヒノキチオールの分析．東京健安研セ年誌，54: 247-250, 2003.

11) Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W. *Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents*. **Pure Appl. Chem.**, 1980, **52**, 397–407.

(a)



(b)

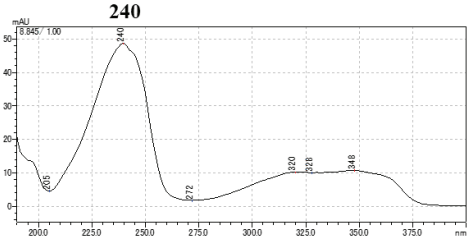


図1. ヒノキチオールのクロマトグラム(A)とUVスペクトル(B)

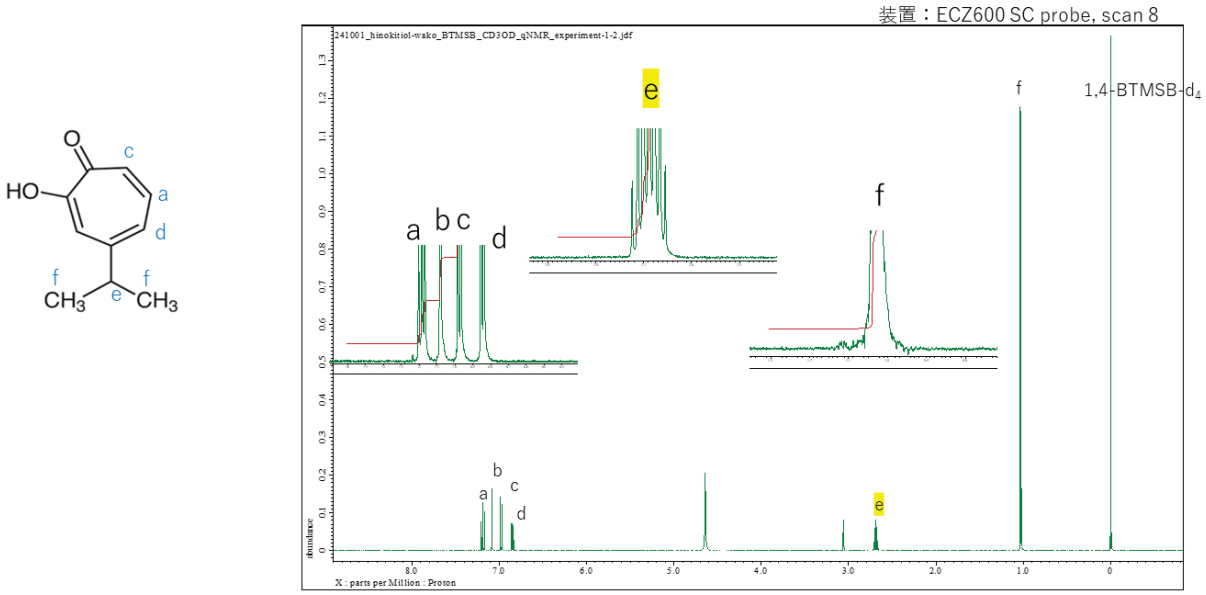


図2. ヒノキチオールの^{1}H-NMRスペクトル(e: 測定対象プロトン)

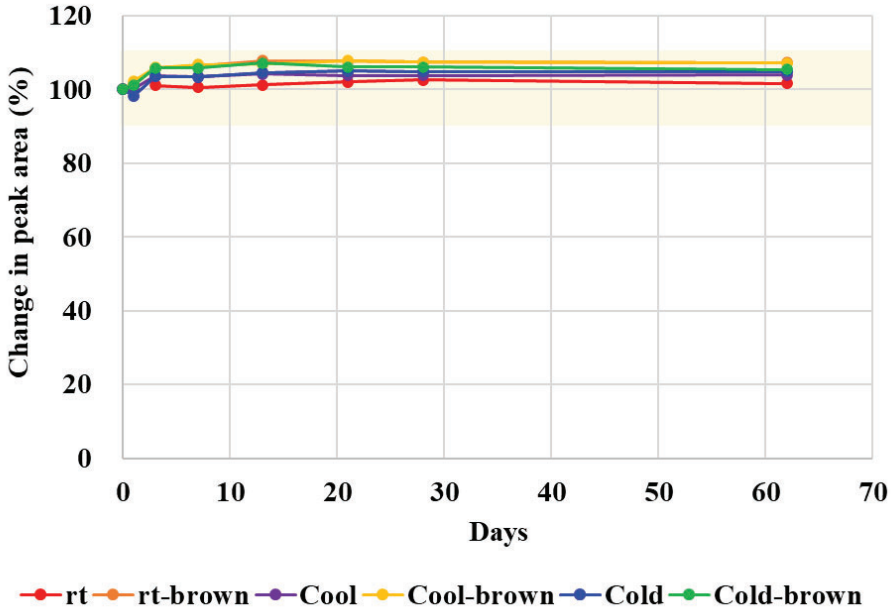


図3. ヒノキチオールの初日のピーク面積を100としたときの経時推移. rt: 室温・透明バイアル、rt-brown：室温・褐色バイアル、Cool:冷蔵・透明バイアル、Cool-brown:冷蔵・褐色バイアル、Cold:冷凍・透明バイアル、Cold-brown:冷凍・褐色バイアル

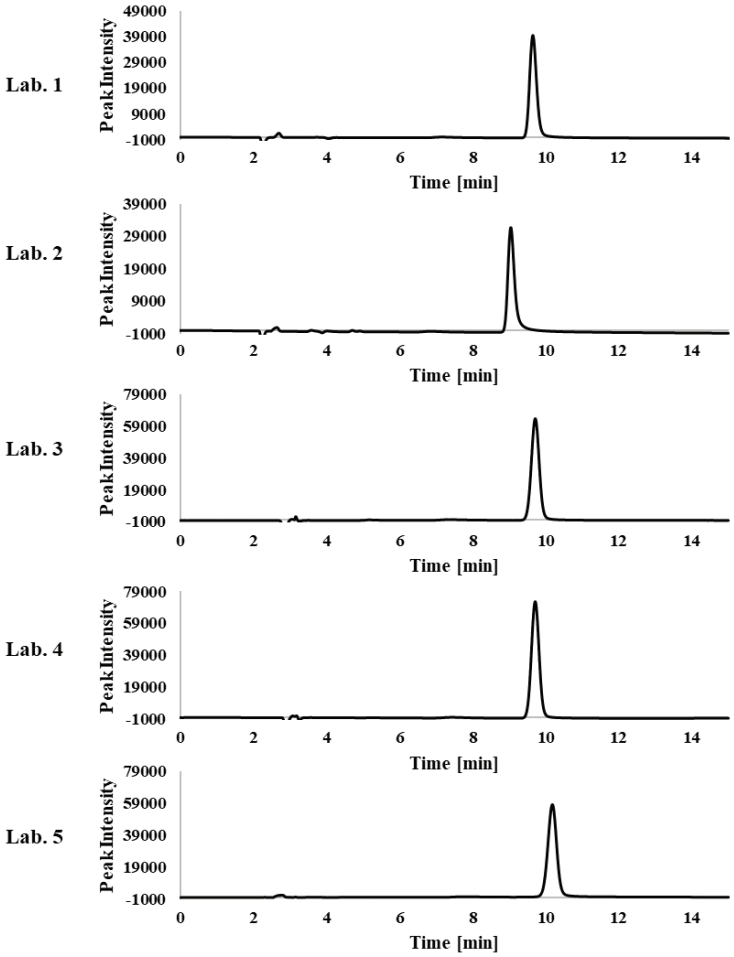
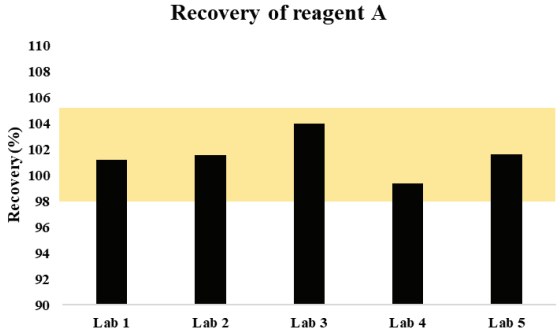


図4. 各ラボにおける**hinokitiol**のクロマトグラム

(a)



(b)

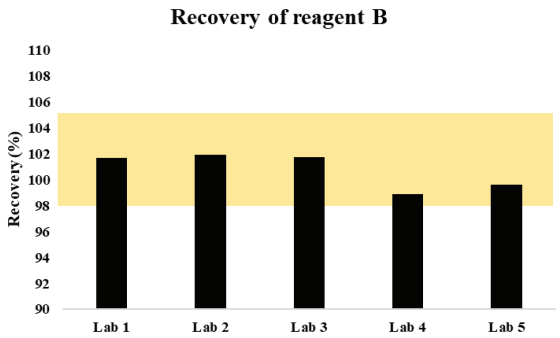


図5. 各ラボのhinokitiolの回収率(%). (a) reagent A, (b) reagent B

表1. ヒノキチオールの各濃度のシンメトリー係数、理論段数、回収率およびシステム再現性

Sample	No.	Peak area	Symmetry factor	Number of theoretical plates	Recovery (%)	System repeatability (% RSD)
0.25 μg/mL	1	12,107	1.648	6,258	140.3	0.87
	2	12,523	1.824	5,876		
	3	11,914	1.700	6,355		
	4	12,483	1.434	7,084		
	5	12,414	1.764	5,948		
	6	12,778	1.844	5,812		
0.5 μg/mL	1	32,989	1.808	7,780	112.3	1.15
	2	33,931	1.890	7,822		
	3	34,891	2.040	7,597		
	4	33,709	1.865	7,791		
	5	34,281	1.996	7,649		
	6	33,459	1.902	7,815		
1 μg/mL	1	76,135	1.986	8,680	98.8	1.16
	2	78,021	1.988	8,762		
	3	76,166	1.921	8,695		
	4	76,846	1.898	8,803		
	5	78,901	1.981	8,699		
	6	78,265	1.941	8,761		
2.5 μg/mL	1	225,698	1.597	9,784	98.8	0.55
	2	228,395	1.577	9,794		
	3	229,172	1.575	9,779		
	4	229,341	1.570	9,804		
	5	228,649	1.557	9,787		
	6	229,213	1.563	9,848		
5 μg/mL	1	482,795	1.389	10,260	100.7	1.09
	2	487,562	1.386	10,224		
	3	488,087	1.383	10,255		
	4	495,426	1.385	10,245		
	5	488,606	1.374	10,209		
	6	497,957	1.376	10,257		
10 μg/mL	1	997,489	1.325	10,456	101.7	0.81
	2	1,012,299	1.317	10,448		
	3	1,019,262	1.316	10,458		
	4	1,015,533	1.315	10,400		
	5	1,018,265	1.311	10,450		
	6	1,019,122	1.310	10,440		

表2. 標品および試料の純度

Samples	絶対純度(%)	表記純度（%）
Hinokitiol (S)	99.7%	>99.0%(GC)
Hinokitiol (A)	100.1%	>99.0%(GC)
Hinokitiol (B)	99.5%	100.0%(GC)

表3. 1点検量線（5 μg/mL）を用いたヒノキチオール試料の回収率

Hinokitiol	5 μg/mL	
	Recovery (%)	System repeatability (% RSD)
A	101.4	0.28
B	99.4	0.31

Current specification limit ：98.0~105.0%

表4. 多機関バリデーションにおける測定条件一覧

Item	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
Manufacturer	Shimadzu	Shimadzu	Shimadzu	Shimadzu	Waters
Instrument model	HPLC 20A	LC-2030	Nexera-i	Nexera X2	ACQUITY UPLC H-Class
Column temperature	40 ℃	40 ℃	40 ℃	40 ℃	40 ℃
Detection wavelength	240 nm	240 nm	240 nm	240 nm	240 nm
Flow rate	1 mL/min	1 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.55 mL/min
Injection volume	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
Column manufacturer	GL Sciences	GL Sciences	Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI)	Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI)	GL Sciences
Column specification	Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)	Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm)	L-column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm)	L-column ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm)	Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm)

表5. 各ラボのhinokitiolの理論段数

Number of theoretical plates	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
Reagent A	11,294	11,661	9,517	9,547	7,899
Reagent B	11,300	11,658	9,438	9,560	7,898

表6. 各ラボのhinokitiolのシンメトリー係数

Symmetry factor	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
Reagent A	1.21	1.54	1.06	1.04	1.17
Reagent B	1.21	1.53	1.05	1.04	1.17

表7. 各試験室における試薬A、Bのシステム再現性

Reagent	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5
A	0.68	1.03	0.16	0.16	0.59
B	0.28	0.49	0.36	0.11	0.29

表8. 試薬A、Bの室間再現性、Horwitz式による予測室間精度、HorRat値

Reagent	**A**	**B**
Reproducibility (RSD_R, %)	1.72	1.43
Predicted RSD_R by the Horwitz equation (%)	12.6	12.6
Horwitz ratio (HorRat)	0.14	0.11