

生薬単味製剤の指標成分の検討 ーオンジ，ケイヒを中心にー

奈良県薬事研究センター
検査・精度管理係 西原

はじめに・・・

**今回、お話す内容は、一部検討中の内容も含まれます。
(分析方法を含む)**

**そのため、県外企業等への、情報提供はご遠慮ください。
(分析方法の迅速化で、
他の企業よりも一歩先に承認申請が可能となる点を
踏まえて、十分ご了解ください)**

生薬単味製剤とは・・・

単一の生薬のみを有効成分とした生薬製剤のうち、
ガイダンス等で示されたもの※¹

現在、以下の29種の生薬が、承認取得可能となっています。
(うち、末とエキス重複：4種)

生薬	効能効果（代表的なもの）
ウワウルシ	残尿感（尿がでしぶる），排尿時の不快感のあるもの
オウバク末	健胃・止瀉の目的／外用：うちみ，ねんざ，歯周疾患の緩和
オウレン（末も）	健胃・止瀉の目的
オンジ	中年期以降の物忘れの改善
カゴソウ	残尿感（尿がでしぶる），排尿時の不快感のあるもの
カンゾウ（末も）	激しいせき，咽喉痛（のどの痛み）の緩和
キキョウ末	たん，たんを伴うせき
キササゲ	尿量減少の改善
ケイヒ末	健胃の目的／口渇，のどの渇き，糖尿病
ケツメイシ	整腸（便通を整える），腹部膨満感，軟便，便秘
ゲンチアナ末	健胃の目的

※¹：平成27年12月25日付け薬生審査発1225第6号通知

生薬	効能効果（代表的なもの）
ゲンノショウコ（末も）	整腸・止瀉の目的
コウカ	冷え症，血色不良（皮膚の色つやの悪いもの）
コウジン	滋養強壮
コンズランゴ流エキス	健胃の目的
サフラン	冷え症，血色不良（皮膚の色つやの悪いもの），気分がふさいだ症状，月経前の諸症状，食欲異常の緩和
サンキライ	尿量減少の改善
サンシシ末	うちみ，ねんざ
シャゼンソウ	せき
ジュウヤク	便秘，尿量減少の改善，便秘に伴うふきでもの（にきび）
センブリ	健胃の目的
ソウハクヒ	尿量減少の改善
ニンジン	滋養強壮
ベラドンナエキス	胃痛，腹痛，胃酸過多，胸やけ
ボウイ	次の症状の緩和：筋肉痛，神経痛，関節痛，関節のはれや痛み，関節のこわばり

生薬	効能効果（代表的なもの）
モクツウ	尿量減少の改善
ユウタン	健胃の目的
ヨクイニン（末も）	いぼ，皮膚（肌）のあれ
リュウタン末	健胃の目的

※用法及び用量，効能又は効果等の詳細は，
平成27年12月25日付け薬生審査発1225第6号通知
「生薬のエキス製剤の製造販売承認申請に係るガイダンスについて」
を参照してください。

製造販売業者から注目される生薬・・・

今回のガイダンスは、
これまで「局方生薬のてびき」において、煎剤として認められていたもの
について、

- ①扱いやすい生薬エキスも対象としたこと
(ただし、ケイヒは除く。)
- ②ケイヒ末の効能を新たに追加したこと
- ③オンジを新たに追加したこと

ことによるものです。



ケイヒ末のうち、「口渇、のどの渇き、**糖尿病**」

オンジの「**中年期以降の物忘れの改善**」

が、新たな効能として着目を浴びている。

(オンジでは、各社から特許がとられているほどです)

一般消費者から見ると・・・

「オンジ」のみでできた製品が、中年期以降の物忘れの改善に効果があることを知っているのは、
わずか3.9%しかいない。

一方で

「オンジ」のみでできた製品を、飲んでみたいと思うのは、
66.2%と、過半数を超えている。



消費者のニーズに応えるためには、
オンジに係る**宣伝**も重要な要因になる。
(認知度の向上)

※平成29年度「県民Webアンケート」
第9回 国産生薬・単味生薬に関する意識調査より

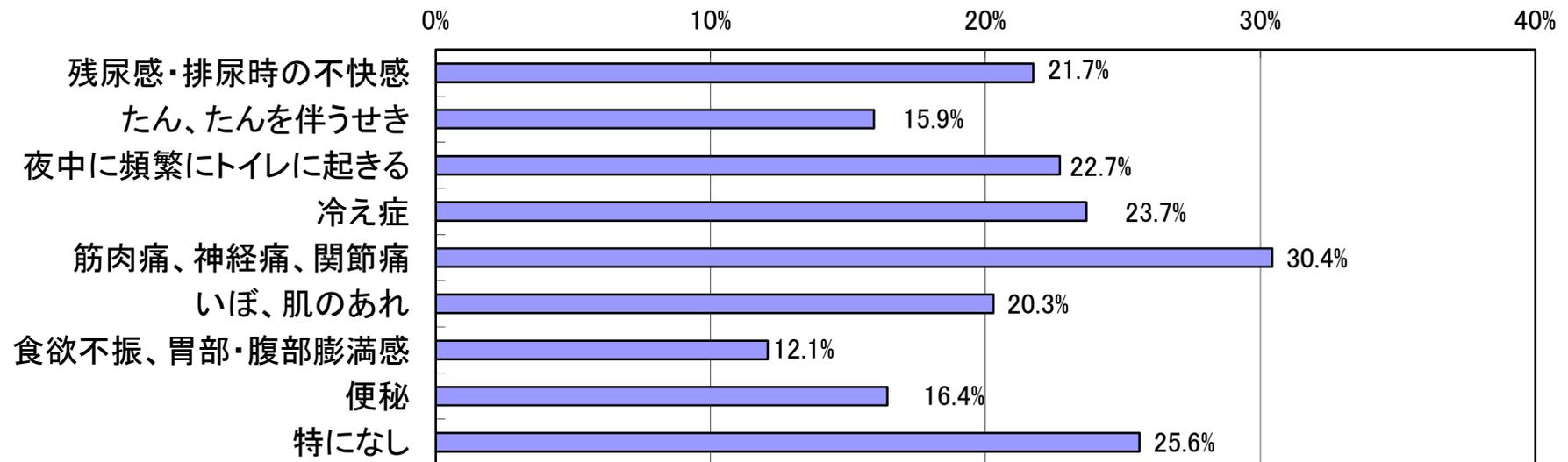
一般消費者の気になっている症状・・・

トップ5

- ① 筋肉痛，神経痛，関節痛
- ② 冷え症
- ③ 夜中に頻繁にトイレに起きる
- ④ 残尿感・排尿時の不快感
- ⑤ いぼ，肌のあれ

単味生薬に置き換えると

- ① ボウイ
- ② コウカ，サフラン
- ③ キササゲ，サンキライ，
ジュウヤク，ソウハクヒ，
モクツウ
- ④ ウワウルシ，カゴソウ
- ⑤ ヨクイニン



※平成29年度「県民Webアンケート」
第9回 国産生薬・単味生薬に関する意識調査より

単味生薬製剤の承認に必要な項目・・・

- 1. 標準煎剤と生薬エキスとの同等性を確認するための比較試験**
- 2. 標準煎剤に関する資料**
- 3. 生薬エキスに関する資料**
- 4. 製剤に関する資料**

1. 同等性を確認するための比較試験・・・

- ・ 「標準湯剤との比較試験に関する資料」に準ずる資料
- ・ 原料生薬に関する資料
 - 1) 標準的と考えられる生薬による
3ロット以上, 1ロット3回以上の
外観及び理化学試験 (試験成績書を提出)
 - 2) 指標成分について, **HPLC等の機器分析**を用いた**定量
複数の指標成分**について実施
(なるべく多くの成分について検討)
※定量できない場合でも, 定量的なパターン分析が必要
 - 3) 指標成分の下限値を設定
(生薬1日量中の指標成分の下限値: ○○以上)

2. 標準煎剤に関する資料・・・

- 1) 決められた調製法での標準煎剤について、
少なくとも3ロット以上、1ロット3回以上の
指標成分の定量**
- 2) 原料生薬から標準煎剤への指標成分の移行率
(1日量分中の定量値)
移行率と、1. 3) の下限値をもとに
標準煎剤における指標成分の下限値を設定**
- 3) 標準煎剤の調製法
①煎剤の場合、②末の場合
(ケイヒ末は、エキスは除外)**

3. 生薬エキスに関する資料・・・

生薬エキスについて、

3ロット以上，1ロット3回以上の指標成分の定量

**1日量分の生薬量から採れるエキス量を明記
(いわゆる原生薬換算量)**

**※ここで用いる生薬エキスは、
標準煎剤の原料生薬と**同一ロット**で製する必要がある。**

指標成分の検討 . . .

生薬の有効成分が明らかでない場合

→その成分を指標成分にして、同等性を担保

生薬の有効成分が明らかになっていない場合

→様々な方法で同等性を担保すべき

例) 生薬製剤の製造工程を管理し得る複数の成分を設定

※定量できない場合であっても、

定量的なパターン分析により同等性を担保する必要あり

指標成分について、

ロット毎に

- ・ 生薬 1 日量分中の指標成分の定量値**
 - ・ 1 日量分の標準煎剤中の定量値**
 - ・ 生薬エキスの 1 日量分中の定量値**
- を表にして提出。**

製剤の規格及び試験方法（定量法）・・・

日局収載の生薬，漢方エキス等の試験条件を参考に設定

各国の局方やそれらに準ずる基準（香港中薬材標準等）あるいは学術文献を参考に設定も可
（この場合は，設定根拠を明示）

定量用標準物質の順位

日局標準品＞日局収載試薬＞一般試薬又は自社精製品※

（※日局定量用試薬（例：サイコサポニンb2，定量用）に準じて規格を設定）

規格値の設定では，天然物の多様性を反映する必要がある。

単味生薬製剤の指標成分の検討・・・

**それでは、単味生薬製剤となる生薬について、
指標成分を検討した結果を
次から説明します。**

(なお、検討中の内容も含まれます)

オンジの規格（海外の薬局方等）・・・

定量規格は、
中華人民共和国薬典（中国薬典）、香港中薬材標準
に収載されています。
（韓国薬局方は、定量法の収載なし）

中国薬典：3成分

- ① tenuifolin, ② polygalaxanthone III,
- ③ 3,6'-disinapoyl sucrose

香港中薬材標準：1成分（パターン分析で+1成分）

tenuifolin

（パターン分析：3',6-di-*o*-sinapol-sucrose）

中国薬典の tenuifolin 定量法① . . .

【標準溶液の調製】

tenuifolin 標準品を 1mg/1mL となるようにメタノールに溶かす。

【試料溶液の調製】

オンジ末約 1g を精密に量り，70%メタノール溶液を 50mL 加え，質量を測定する。1時間超音波処理（400W，40kHz）した後，放冷し，再び質量を測定し，減量した分の 70%メタノール溶液を加えた後，振り混ぜ，ろ過を行う。この液について，25mL を正確に量り，ナスフラスコに加え，溶媒を留去する。残留物に 10%水酸化ナトリウム溶液 50mL を加え，2時間加熱還流した後，放冷し，塩酸を用いて pH4～5 に調製する。この液について，水飽和ブタノール溶液で 3回抽出する（1回 50mL）。ブタノール層を合わせ，減圧蒸留を行い溶媒を留去した後，残留物にメタノールを加えて溶かし，正確に 25mL とし，試料溶液とする。

中国薬典の tenuifolin 定量法② . . .

【HPLC測定方法】

充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

移動相：メタノール/0.05%リン酸溶液（70：30）

検出波長：210nm

システム適合性：

tenuifolinの理論段数が3000段以上

注入量：10 μ L

【含量規格】

換算した生薬の乾燥物に対し，2.0%以上

中国薬典のpolygalaxanthone IIIと 3,6'-disinapoyl sucroseの同時定量法① . . .

【標準溶液の調製】

polygalaxanthone III 0.15mg/1mL,

3,6'-disinapoyl sucrose 0.2mg/1mL

となるようにメタノールに溶かした混合溶液

【試料溶液の調製】

オンジ末約1gを精密に量り，70%メタノール溶液を25mL加え．質量を測定する．1.5時間加熱還流を行った後，放冷し，再び質量を測定する．減量した分の70%メタノール溶液を加えた後，振り混ぜ，ろ過を行い，ろ液を試料溶液とする．

中国薬典のpolygalaxanthone IIIと 3,6'-disinapoyl sucroseの同時定量法② . . .

【HPLC測定方法】

充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

移動相：アセトニトリル/0.05%リン酸溶液（18：82）

検出波長：320nm

システム適合性：

3,6'-disinapoyl sucroseの理論段数が3000段以上

注入量：10 μ L

【含量規格】

換算した生薬の乾燥物に対し、

polygalaxanthone III 0.15%以上

3,6'-disinapoyl sucrose 0.50%以上

香港中藥材標準のtenuifolin定量法①・・・

【標準溶液の調製】

*tenuifolin*標準品ストック溶液 (2000mg/L)

*tenuifolin*標準品を正確に10.0mgを量り，メタノール5mLに溶かす。

*tenuifolin*標準溶液 (定量用)

*tenuifolin*標準品ストック溶液を正確に量り，*tenuifolin*が200, 400, 600, 800, 1000mg/Lとなるようにメタノールで希釈する。

香港中藥材標準のtenuifolin定量法②・・・

【試料溶液の調製】

オンジ末0.5gを正確に量り，遠沈管に入れ，70%メタノール溶液25mLを加える．30分間超音波処理（240W）を行った後，2000gで10分間遠心分離を行う．上澄液を250mLナスフラスコに移す．この抽出操作をもう1回繰り返す．得られた上澄液を合わせる．ロータリーエバポレーターで溶媒を留去する．残留物を10%水酸化ナトリウム溶液50mLで溶かし，2時間加熱還流を行う．室温まで冷却した後，37%塩酸溶液を約10mL加え，pHを4～5に調整する．この液を250mLの分液漏斗に移し，水飽和ブタノール溶液50mLを加え，1分間振り混ぜる．2層に分離するまで，20分間放置した後，1-ブタノール層を250mLナスフラスコに移す．この抽出操作を2回繰り返す．得られた1-ブタノール層を合わせる．ロータリーエバポレーターで約60℃，減圧下で溶媒を留去する．残留物をメタノールに溶かし，25mLメスフラスコに移し，標線までメタノールを加える．0.45 μ mのPTFEフィルターに通し，試料溶液とする．

香港中藥材標準のtenuifolin定量法③ . . .

【HPLCシステム】

検出器：DAD 202nm

カラム：4.6mm×250mmカラムにODSシリカゲルを充填したもの（粒子径5 μ m）

流速：1.0mL/分

移動相：0.05%リン酸溶液/メタノール混液（35：65）

保持時間：約30分

【システム要求事項】

tenuifolin標準溶液（定量用）800mg/Lについて、10 μ Lを注入する。この操作を少なくとも5回行う。

システム要求事項は、次のとおり。

tenuifolinのピーク面積の相対標準偏差：5.0%以下

tenuifolinの保持時間の相対標準偏差：2.0%以下

tenuifolinのピークの理論段数：2500段以上

試料溶液中のtenuifolinと近接ピークとの分離度：1.5以上

香港中藥材標準のtenuifolin定量法④ . . .

【直線性】

tenuifolin標準溶液（定量用）全ての濃度溶液を10 μ L注入し，HPLC法によりクロマトグラムを得る。

tenuifolin標準溶液（定量用）の濃度に対応するピーク面積をプロットする。

直線の傾き， y 切片，5点の直線性の相関係数 r^2 を求める。

【測定法】

試料溶液10 μ Lを注入し，クロマトグラムを得る。

tenuifolin標準溶液（定量用）のクロマトグラムの保持時間と比較し，試料溶液中のtenuifolinを識別する。標準溶液中・試料溶液中のtenuifolinピークの保持時間が，2.0%以上異ならないこと。ピーク面積を測定し，試料溶液中のtenuifolin濃度（mg/L）を計算し，一般試験法IV (B) の計算法を用いて，tenuifolinの含量%を計算する。

香港中藥材標準のtenuifolin定量法⑤ . . .

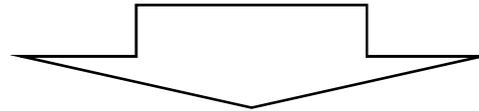
【含量規格】

乾燥物に換算して、2.5%以上のtenuifolinを含有すること

中国薬典の定量法の問題点① . . .

【成分共通】

- ・ HPLC条件について，中国薬典どおり行った場合，
夾雑物ピークと重なり，分離できなかった。
(ただし，カラムの長さ等の規定がないため，
tenuifolinは，Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 15cm
2成分同時定量は， Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 25cm
を用いた)



tenuifolinは，
移動相の比率を，
メタノール/0.05%リン酸溶液 (7 : 3) \rightarrow (6 : 4) へ
変更することで，夾雑物を除くことができた。
(カラムは，上記と同一)

中国薬典の定量法の問題点② . . .

【2成分同時定量】

移動相の比率調整，カラム長さの変更等を行っても同時定量では，夾雑物の分離は不可能であった。



同時定量を断念し，単独の分析法へと変更した。

なお，カラムの長さは，

Polygalaxanthone III : 25cm

3,6'-disinapoyl sucrose : 15cm

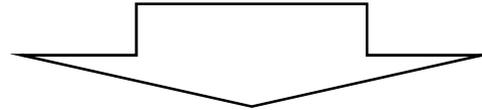
とした。

(夾雑物の分離と保持時間の関係から)

中国薬典の定量法の問題点③ . . .

【試料調製】

中国薬典の方法では、
試料溶液調製の際に、試料溶液の質量を測定したのち、
減量分の溶液を加える等、操作がしにくい面があった。
また、日局等での分析法に沿った内容に変更する必要があった。



試料調製法について、濃度は変更せずに、
日局等での分析法も踏まえ、
方法を改良した。

また、試料調製中の安全性も考慮し、一部変更を行った。

オンジの定量法 (tenuifolin) ① . . .

【試料溶液の調製】

オンジ末約1gを精密に量り，薄めたメタノール（7→10）を40mL加え，1時間超音波処理した後，放冷し，ろ過する．ろ液に薄めたメタノール（7→10）を加え，正確に50mLとする．この液について，25mLを正確に量り，減圧下で溶媒を留去した後，残留物に10%水酸化ナトリウム溶液50mLを加え，2時間加熱還流した後，放冷し，10%塩酸溶液を用いてpH4～5に調製する．この液について，ブタノール溶液で3回抽出する（1回50mL）．ブタノール層を合わせ，減圧下で溶媒を留去した後，残留物にメタノールを加えて溶かし，メタノールで正確に25mLとする．孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し，ろ液を試料溶液とする．

※青字：安全性の考慮

オンジの定量法 (tenuifolin) ② . . .

【標準溶液の調製】

定量用tenuifolin 約 10mgを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に10mLとし，標準溶液とする。

【HPLC条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム：Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 15cm

（内径4.6mm，長さ15cm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する）

移動相：メタノール/薄めたリン酸（1 \rightarrow 2000）混液
（3:2）

流量：1.0mL/分

（tenuifolinの保持時間：約13分）

注入量：10 μ L

オンジの定量法 (tenuifolin) ③ . . .

【HPLC条件（続き）】

システムの適合性

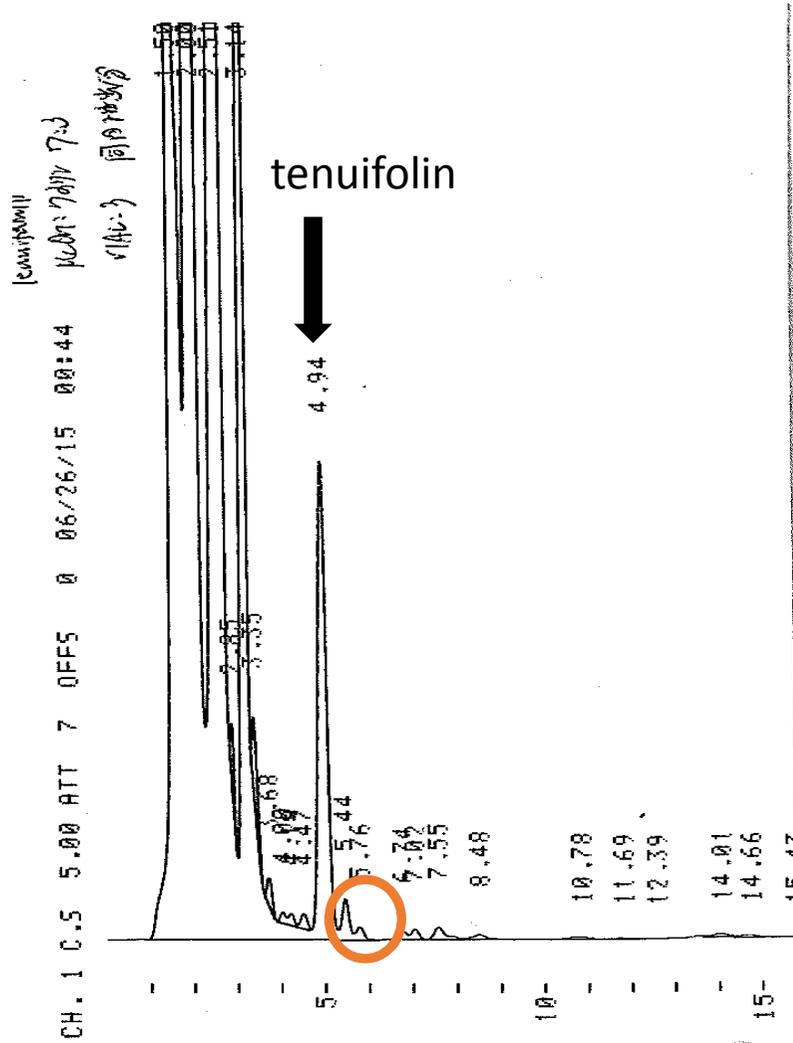
システムの性能：

標準溶液10 μ Lにつき，上記の条件で操作するとき，
tenuifolinの理論段数3000段以上，シンメトリー係数1.5
以下

システムの再現性：

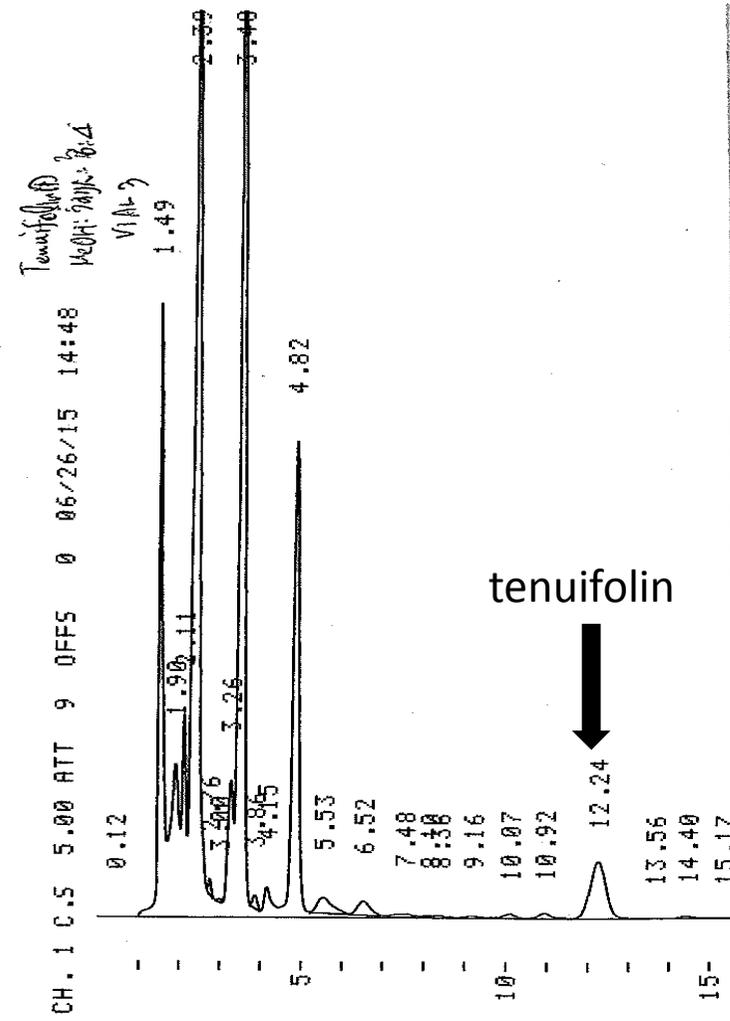
標準溶液10 μ Lにつき，上記の条件で試験を6回繰り返す
とき，tenuifoinのピーク面積の相対標準偏差は，1.5%以
下である。

オンジの定量法 (tenuifolin) のクロマト比較 . . .



**中国薬典の移動相比率
(7:3)**

使用カラム : Inertsil ODS-3 5 μm 4.6mm×15cm



**改善後の移動相比率
(6:4)**

オンジの定量法 (3, 6' -disinapoyl sucrose) ① . . .

【試料溶液の調製】

オンジ末約1gを精密に量り，薄めたメタノール（7→10）20mLを加え，1時間加熱還流を行う．冷後，ろ過し，薄めたメタノール（7→10）で正確に25mLとし，孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し，ろ液を試料溶液とする．

【標準溶液の調製】

定量用3, 6' -disinapoyl sucrose 約15mgを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に10mLとし，標準溶液とする．

オンジの定量法 (3, 6' -disinapoyl sucrose) ② . . .

【HPLC条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：320nm）

カラム：Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 25cm

（内径4.6mm，長さ25cm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する）

移動相：薄めたリン酸（1 \rightarrow 2000）/アセトニトリル混液
（21:4）

流量：1.0mL/分

（3, 6' -disinapoyl sucroseの保持時間：約55分）

注入量：10 μ L

オンジの定量法 (3, 6' -disinapoyl sucrose) ③ . . .

【HPLC条件（続き）】

システムの適合性

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，
3, 6' -disinapoyl sucroseの理論段数3000段以上，シン
メトリー係数1.5以下

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，3, 6' -disinapoyl sucroseのピーク面積の相対標
準偏差は，1.5%以下である。

オンジの定量法 (polygalaxanthone III) ① . . .

【試料溶液の調製】 (3,6'-disinapoyl sucroseと同じ)

オンジ末約1gを精密に量り，薄めたメタノール (7→10) 20mLを加え，1時間加熱還流を行う．冷後，ろ過し，薄めたメタノール (7→10) で正確に25mLとし，孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し，ろ液を試料溶液とする．

【標準溶液の調製】

定量用polygalaxanthone III約20mgを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に10mLとし，標準溶液とする．

オンジの定量法 (polygalaxanthone III) ② . . .

【HPLC条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：320nm）

カラム：Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 15cm

（内径4.6mm，長さ15cm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する）

移動相：薄めたリン酸（1 \rightarrow 2000）/アセトニトリル混液
（22:3）

流量：1.0mL/分

（polygalaxanthone IIIの保持時間：約32分）

注入量：10 μ L

オンジの定量法 (polygalaxanthone III) ③ . . .

【HPLC条件（続き）】

システムの適合性

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，polygalaxanthone IIIの理論段数3000段以上，シンメトリー係数1.5以下

システムの再現性：

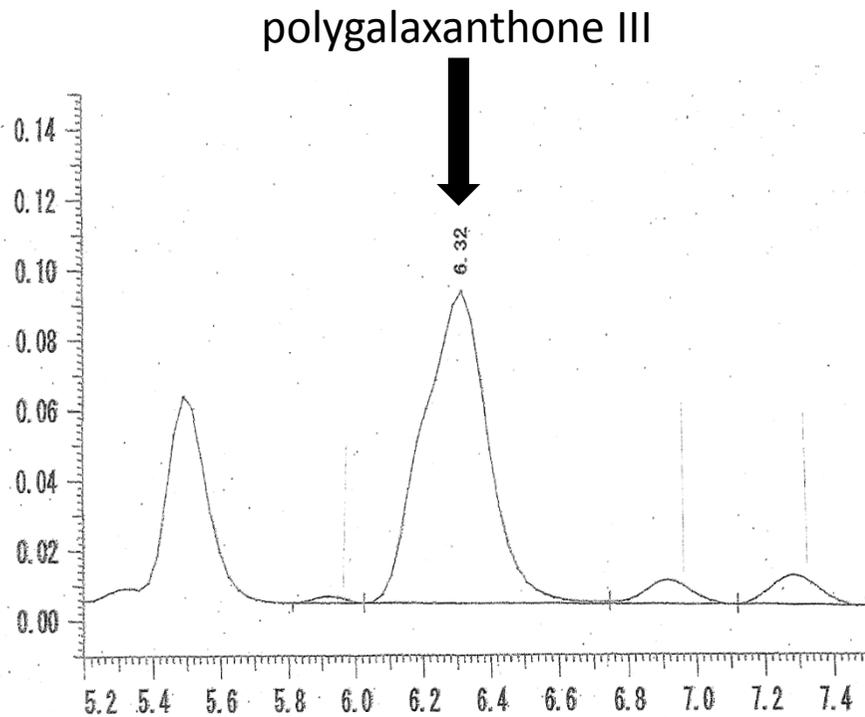
標準溶液10 μ Lにつき，上記の条件で試験を6回繰り返すとき，polygalaxanthone IIIのピーク面積の相対標準偏差は，1.5%以下である。

オンジの定量法 (polygalaxanthone III)

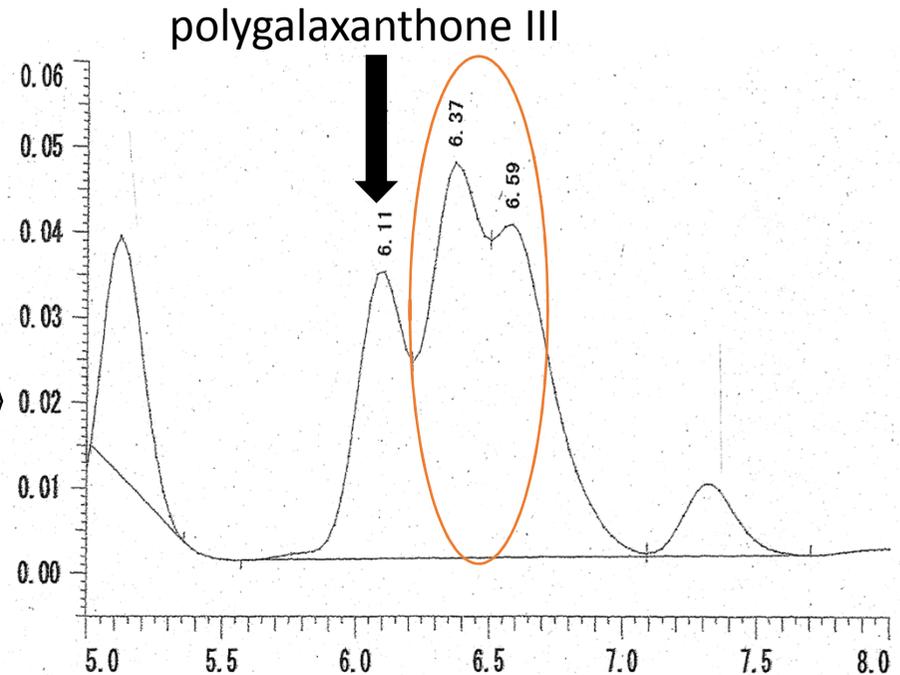
のクロマト比較① . . .

【カラムによる差】

いずれも、中国薬典の分析条件を適用



Kromasil 5C18 5 μ m 4.6mm \times 250cm
(中国薬典を利用した分析の
文献のカラムを使用)



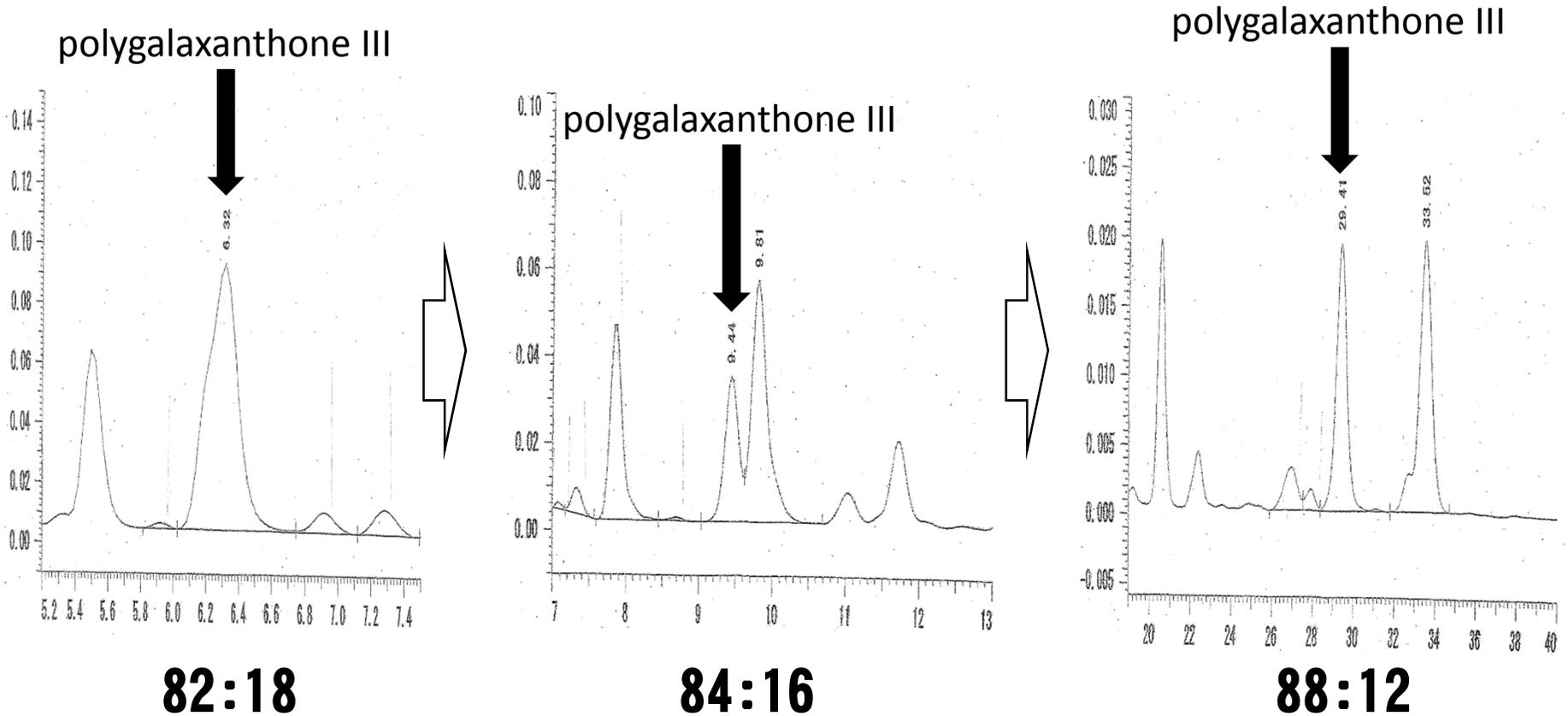
Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 150cm

分離ができていない

オンジの定量法 (polygalaxanthone III)

のクロマト比較② . . .

【移動相の比率】 Kromasil 5C18 5 μ m 4.6mm \times 250cm



※比率は, 薄めたリン酸 (1 \rightarrow 2000) : アセトニトリル

オンジの定量法 (polygalaxanthone III) の 分析法バリデーション結果 . . .

【分析法バリデーション】

直線性 : y切片のピーク面積に対する割合 : 2.23%

y切片の95%信頼区間 : -29516~4215

相関係数 : $r = 0.9999$

検出限界・定量限界 :

検出限界 : $0.70 \mu\text{g/mL}$

定量限界 : $2.12 \mu\text{g/mL}$

真度 : 平均 : 100.6%, 個々 : 97.4%~102.3%

相対標準偏差 : 1.54%

精度 : 併行精度 : 2.27%

範囲 : $9.375 \mu\text{g/mL} \sim 0.15\text{mg/mL}$

※直線性の濃度 :

0.009375, 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.195, 0.3mg/mL

オンジの定量法（標準品の入手）・・・

【tenuifolin】

国内業者：あり

海外業者：あり（国内仲介業者：あり）

【3,6'-disinapoyl sucrose】

国内業者：あり

海外業者：あり（国内仲介業者：あり）

【polygalaxanthone III】

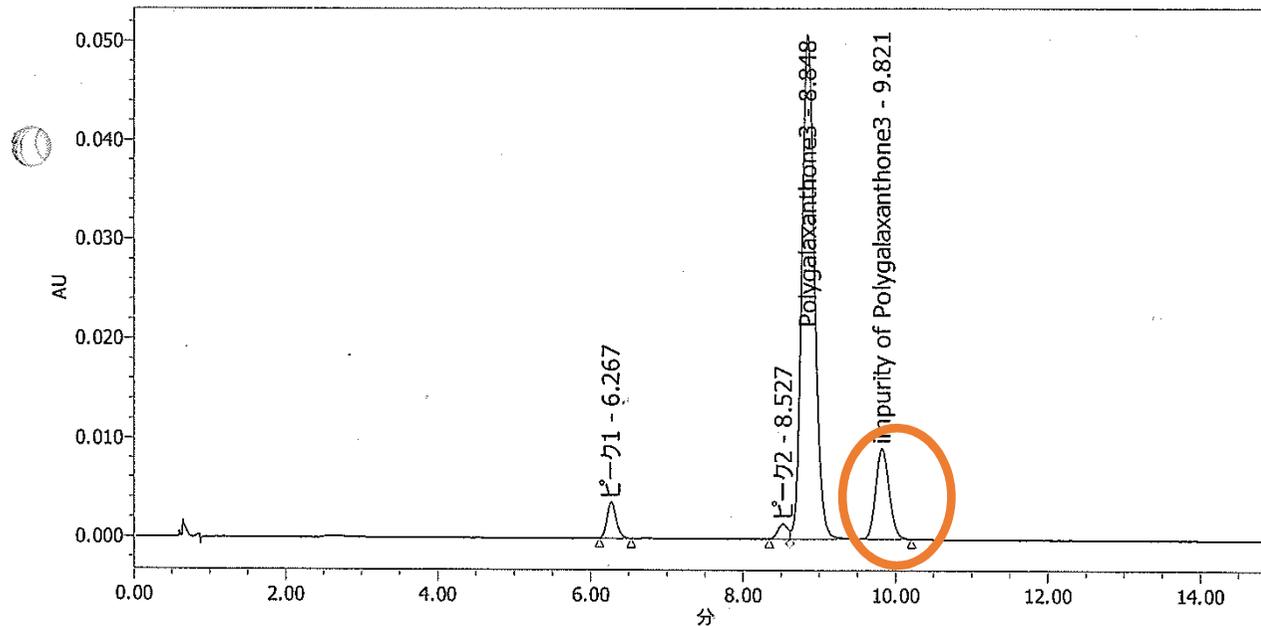
国内業者：なし

海外業者：あり（国内仲介業者：あり）

オンジの定量法 (polygalaxanthone III) の 標準品の問題点 . . .

【標準品の純度】

入手先のメーカーでは、純度99.0%以上としていたが . . .



	成分名	保持時間 (分)	面積 (μ V秒)	%面積	高さ (μ V)
1	ピーク1	6.267	31015	4.17	3627
2	ピーク2	8.527	14004	1.88	1569
3	Polygalaxanthone3	8.848	585961	78.82	50819
4	impurity of Polygalaxanthone3	9.821	112482	15.13	9219

かなりの量の夾雑物が混入していた。
→標準品の購入先の再検討

<分析条件>

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：210nm)

カラム：InertSustain AQ-C18 1.9 μ m 2.1mm \times 10cm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：薄めたリン酸 (1 \rightarrow 2000) /アセトニトリル混液 (65:35)

流量：0.4mL/分

注入量：1 μ L

ケイヒの指標成分の検討①・・・

【指標成分】

(*E*)-ケイ皮酸：桂枝茯苓丸エキス
桃核承気湯エキス
苓桂朮甘湯エキス
で含量規格，定量法の設定あり



単味生薬製剤では，複数の成分検討が必要なため，さらに候補となる成分を割り出すと・・・



【候補成分】

- ・ (*E*)-シンナムアルデヒド
- ・ クマリン
- ・ (*E*)-2-メトキシシンナムアルデヒド

など

ケイヒの指標成分の検討② . . .

【候補成分】

- ・ (E)-シンナムアルデヒド
- ・ クマリン
- ・ (E)-2-メトキシシンナムアルデヒド

など



このうち、

・ (E)-2-メトキシシンナムアルデヒド
は、ケイヒの種類によって検出できない場合があることが、
報告されている。 ※局方技術情報JPTI2016 1254ページ



よって、当初の検討では、

クマリン、(E)-ケイ皮酸、(E)-シンナムアルデヒド
の3成分同時定量法を検討し
た。

ケイヒの定量法条件の検討① . . .

【定量法のベース】

日局の苓桂朮甘湯エキスにおける、
(*E*)-ケイ皮酸の定量法をベースに、
3成分同時定量法ができないか、検討した。

その他、試料の抽出条件

- ・ 抽出方法
- ・ 抽出試料量
- ・ 抽出溶媒量

は、新たに検討した。

ケイヒの定量法（3成分同時）①・・・

【試料溶液】

ケイヒ末約0.5gを精密に量り，薄めたメタノール（7→10）25mLを正確に加え，30分間振とうした後，遠心分離を行い，上澄液について，孔径0.45 μ mのメンブランフィルターを通し，初めの1mLを捨て，次の1mLを試料溶液とした。

（ケイヒ末製剤は，原生薬換算量と合わせて同一条件）

【標準溶液】

- ①（E）-シンナムアルデヒド1mL＋メタノール→100mL
この液6mL＋メタノール→100mL（原液①）
- ②（E）-ケイ皮酸3mg＋メタノール→10mL（原液②）
- ③クマリン2mg＋メタノール→20mL（原液③）

原液①2.5mL＋原液②2.5mL＋原液③10mL＋メタノール→20mL

ケイヒの定量法（3成分同時）②・・・

【HPLC測定条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：280nm）

カラム：Inertsil ODS-3 5 μ m 4.6mm \times 150cm

Cosmosil 5C18-AR-II 4.6mm \times 150cm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液（750:250:1）

流量：1.0mL/分

（クマリンの保持時間：約11分

（*E*）-ケイ皮酸の保持時間：約16分

（*E*）-シンナムアルデヒドの保持時間：約23分）

注入量：10 μ L

ケイヒの定量法（3成分同時）③・・・

【HPLC測定条件（つづき）】

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、クマリン、(E)-ケイ皮酸、(E)-シンナムアルデヒドの順に溶出し、その分離度は、それぞれ4以上、3以上である。

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、クマリン、(E)-ケイ皮酸、(E)-シンナムアルデヒドの相対標準偏差はいずれも1.5%以下である。

ケイヒの定量法（3成分同時）のクロマトグラム・・・

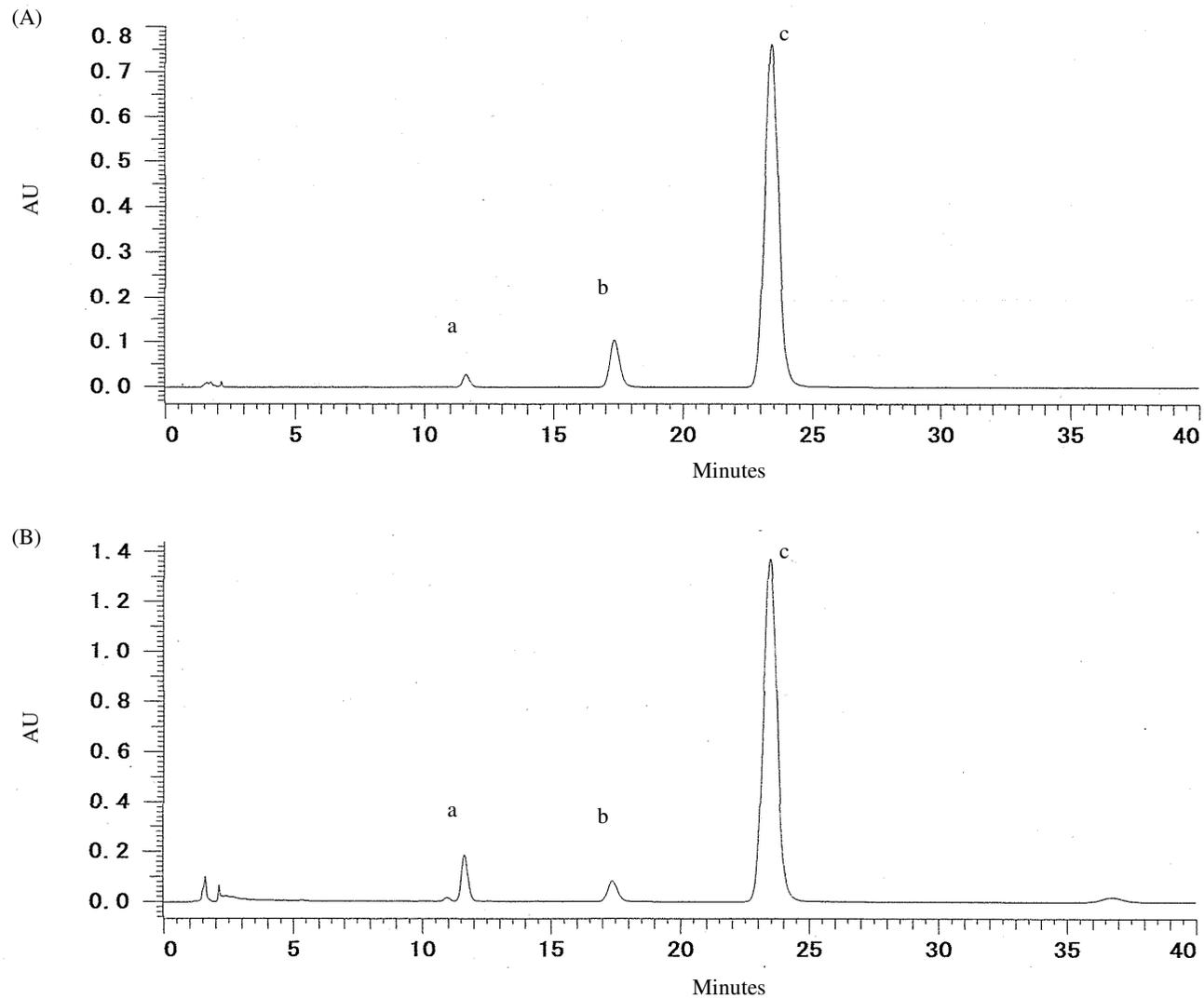


Fig 1. HPLC chromatograms of (A) standard solution and (B) 70% methanol extract of *cinnamommi cortex pulveratus*.

(a) coumarin, (b) (E)-cinnamic acid, and (c) (E)-cinnamaldehyde

ケイヒの定量法（3成分同時）

分析法バリデーション① . . .

【分析法バリデーション】 ※ここから，便宜上（E）記載を抜いています

特異性：標準溶液とのピークの相関度

いずれも0.9994以上

直線性：y切片の濃度におけるピーク面積に対する割合

クマリン：1.84%，ケイ皮酸：1.86%，

シンナムアルデヒド：2.36%

y切片の95%信頼区間

クマリン：-10853～15880，ケイ皮酸：-7942～22039

シンナムアルデヒド：-311297～954943

相関係数

クマリン： $r = 0.9987$

ケイ皮酸： $r = 0.9999$

シンナムアルデヒド： $r = 0.9997$

※濃度：クマリン0.394～630 $\mu\text{g/mL}$ ，ケイ皮酸：0.375～

600 $\mu\text{g/mL}$ ，シンナムアルデヒド0.625～200 $\mu\text{g/mL}$ の7点

ケイヒの定量法（3成分同時）

分析法バリデーション② . . .

【分析法バリデーション（つづき）】

検出限界：

クマリン：44ng/mL， ケイ皮酸：47ng/mL

シンナムアルデヒド：99ng/mL

定量限界：

クマリン：132ng/mL， ケイ皮酸：141ng/mL

シンナムアルデヒド：298ng/mL

真度：

平均回収率：クマリン99.2%， ケイ皮酸100.1%

シンナムアルデヒド99.6%

個々回収率：クマリン97.1～102.9%

ケイ皮酸98.2～102.4%

シンナムアルデヒド97.9～103.0%

回収率の相対標準偏差：クマリン2.12%， ケイ皮酸1.13%

シンナムアルデヒド1.65%

ケイヒの定量法（3成分同時）

分析法バリデーション③ . . .

【分析法バリデーション（つづき）】

精度：

併行精度：クマリン1.29%，ケイ皮酸0.71%
 シンナムアルデヒド0.71%

室内再現精度：クマリン1.97%
 ケイ皮酸1.68%
 シンナムアルデヒド1.23%

範囲：

クマリン：0.625～200 $\mu\text{g/mL}$
ケイ皮酸：0.375～600 $\mu\text{g/mL}$
シンナムアルデヒド：0.394～630 $\mu\text{g/mL}$

ケイヒの定量法（3成分同時）標準品・・・

【標準品】

- ・ ケイ皮酸

日局：定量用（*E*）-ケイ皮酸

- ・ シンナムアルデヒド

日局：薄層クロマトグラフィー用（*E*）-シンナムアルデヒド

- ・ クマリン

和光純薬 試薬 クマリン

いずれも国内入手が可能

ケイヒの定量法（3成分同時）の欠点・・・

【シナムアルデヒドの標準溶液の安定性の問題】

シナムアルデヒドは，ケイ皮酸に分解します。

そのため，標準溶液の管理が重要になります。

（同時定量とすると，ケイ皮酸の標準濃度が上がる可能性がある）

【製剤中の安定性の問題】

上記と同様に，製剤中のシナムアルデヒドも分解します。

そのため，加速試験で大幅に低下し，定量に適さない場合があります。

【クマリン】

クマリンは，海外では肝障害に起因する成分とされていることから，定量試験よりも純度試験のような限度値として規定する方が現実的です。

ケイヒの定量法（3成分同時）の今後・・・

【2-メトキシシンナムアルデヒドの可能性】

ケイヒは、2-メトキシシンナムアルデヒドの有無があるとの報告から、これまでは検討成分の対象外としていました。

が、

- ・ 一体、どれくらいのケイヒに含有されていないのか
- ・ 含有されている時は、定量に活かすことはできないのか（成分が安定なのか）

を含めて、現在解析中です。

（おまけ）ボウフウの定量について・・・

【ボウフウの定量】

**単味生薬製剤には含まれませんが、
ボウフウの定量についても実施し、報告しています。
（3成分）**

**防風通聖散など、ボウフウを配合する製剤では、
使える場合があるかもしれませんので、
ご興味があれば、ご確認ください。**

**※インターネットで「薬学雑誌」を検索し、
早期公開を選択すると、出てきます。
（料金は発生しません）**

今後の分析実施生薬（予定）・・・

来年度，予算が認められれば，次の単味生薬に関する分析を行う予定としています。

- ・ ウワウルシ**
- ・ キキョウ**
- ・ （オンジ，ケイヒは追加データ）**

が，ご希望の生薬等がありましたら，対応が可能な場合がありますので，ぜひご相談ください。

今後の生薬製剤に関する開発支援（予定）・・・

さらに，来年度の予算が認められれば，生薬製剤に関する開発支援を実施します。

本事業は，単味生薬製剤を中心に，定量法の設定，分析法バリデーションを含め，企業様と共同で開発，支援させていただく事業です。

（主に，オンジ，ケイヒを予定していますが，それ以外も応相談）

なお，本事業に係る薬事研究センター分の費用は**不要**です。
このチャンスをぜひご活用ください。

（本日本日お配りしたアンケートもご説明します）

最後に・・・

**これまで、報告させていただいた内容には、
以下の多くの企業様のご協力のもと、達成できましたこと、
ここに謝意を示します。**

**株式会社 前忠 様
三星製薬株式会社 様
至誠堂製薬株式会社 様
大峰堂薬品工業株式会社 様**

ご清聴，ありがとうございます。

**生薬に関するご相談等がありましたら，
ぜひお寄せください。**