

単味生薬・生薬の指標成分の探索 その1

奈良県薬事研究センター
検査・精度管理係
西原 正和

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、
ガイド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（尿がでしづる）、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（尿がでしづる）、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／口渴、のどの渇き、糖尿病
ケツメイシ	整腸（便秘を整える）、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
ペラドンナエキス	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ドンスについて」
を参照してください。

今回ターゲットにした単味生薬と生薬・・・

①ケイヒ（続報）

新たな成分として、
Z-メトキシシンナムアルデヒドを指標成分とした分析法
の検討

②オウバク

日本薬局方に規定されたベルベリン塩化物以外に
Z成分を追加した分析法の検討

③エンメイソウ（カゴソウまでが目標）

シソ科に特有の成分であるZ成分の分析法の検討

④その他

①ケイヒ（続報）・・・

これまでの報告で、クマリン、ケイ皮酸、シンナムアルデヒド
の同時定量法は確立した。

【試料抽出条件】

ケイヒ末約0.5gに対応する量を精密に量り、薄めた
メタノール（7→10）25mLを正確に加え、
30分間振り混ぜた後、遠心分離を行い、上澄液について
孔径0.45μmのメンブランフィルターでろ過し、
初めの1mLを捨て、次の1mLを試料溶液とした。

【標準溶液】

定量用ケイ皮酸約15mgを精密に量り、メタノールに溶かして
正確に25mLとし、標準原液とする。

別に定量用シンナムアルデヒド約30mgを精密に量り、標準
原液2mLを正確に加え、メタノールを加えて正確に25mL
とする。

この液1mLを正確に量り、メタノールを加えて正確に10mL
としたもの。

【HPLC条件】

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：280nm）

カラム：Inertsil ODS-3
4.6×150mm 5μm

カラム温度：40℃

移動相：水／アセトニトリル／リン酸混液
（750：250：1）

流量：1.0mL／分

注入量：10μL

標準溶液調製時の注意点・・・

①

シンナムアルデヒドは、非常に不安定であることから、
一度、溶液のバイアルを開封すると、その後、日がたつに
つれて、**結晶が析出**する場合があります。

（おそらく、ケイ皮酸が生成??）

そのため、結晶が析出している場合には、
たとえシンナムアルデヒド溶液が残っている場合にも
使うことが困難になります。

標準溶液調製時の注意点・・・

②

シナムアルデヒドの標準溶液を調製する際、
水を含有する溶媒で、溶解すると分解する恐れがあります。
(溶解の際、溶媒が白濁します)

そのため、
シナムアルデヒドを溶かす際には、
まず、メタノール、もしくはアセトニトリルの有機溶媒
で溶かしたのち、水を含有する溶媒で希釈してください。
(例：薄めたメタノール (7→10) など)

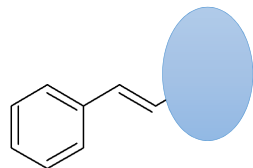
指標成分として・・・

クマリンは、欧州食品安全機関やドイツ連邦リスクアセスメント研究所では肝毒性がある成分とされており、
定量法よりは、純度試験の限度値として設定する方が、
より実態に沿うのではないかと考えられる。

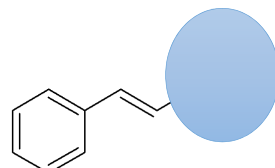
一方、ケイ皮酸、シナムアルデヒドは、
定量法として、十分に対応可能な指標成分であった。

ケイヒ指標成分の問題点・・・

しかし、シナムアルデヒドは、酸化することなどにより、
ケイ皮酸に変化することが想定される。



シナムアルデヒド



ケイ皮酸

そのため、安定性において、残存率が極端に悪くなり、
含量規格が設定できない場合がある

安定性結果・・・

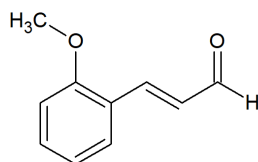
シナムアルデヒドの加速試験結果 (%)

	0M	2M	4M	6M
Lot. 1	1.503 (100.0)	1.210 (80.5)	1.087 (72.3)	0.978 (65.1)
Lot. 2	1.519 (100.0)	1.252 (82.4)	1.024 (67.4)	0.947 (62.3)
Lot. 3	1.424 (100.0)	1.094 (76.8)	0.898 (63.1)	0.874 (61.4)

2M時点で、20%程度顕著に減少し、
それ以降も減少し続けている。

新たな指標として・・・

2-メトキシシナムアルデヒドに着目し、新たに定量法を検討した。



2-メトキシシナムアルデヒド

本成分は、**ケイヒによっては、含有していないものもあり、**注意が必要であるが、ケイヒの指標成分を増やす上では有益であると考え、検討を行った。

新たな指標として・・・

ケイヒ末に、2-メトキシシナムアルデヒドがあるかは、TLCを用いて確認することが可能。

【試料溶液】

試料**2g** + ジエチルエーテル**10mL** → 振り混ぜ**5分**
→ 遠心分離 → 上澄液

【標準溶液】

2-メトキシシナムアルデヒド**1mg** + メタノール**10mL**

【TLC条件】

薄層板：Silicagel 60F₂₅₄

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル混液（**2 : 1**）

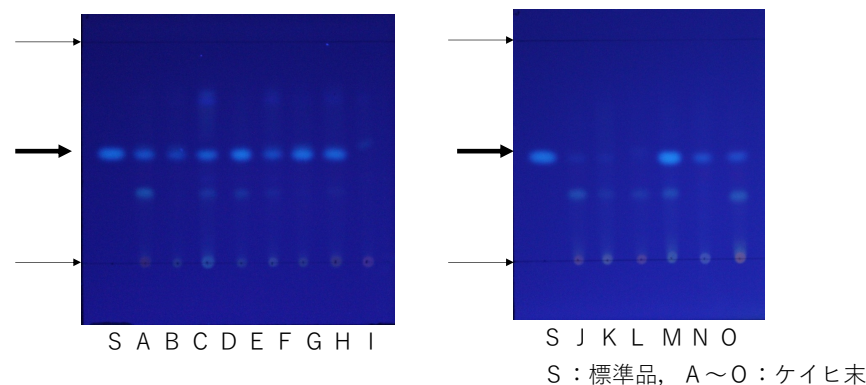
展開距離：**7cm**

検出方法：紫外線（**365nm**）

スポット量：**10μL**

新たな指標として・・・

【TLC結果】



Iは、確認できない。

J~Lは、確認できるがスポットが非常に薄い。

検討結果（検討中）の内容・・・

【HPLC条件】

前報の条件でも対応可能であったが、さらなる分析時間の短縮を求め、移動相の比率を変更した。

移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液

(**750 : 250 : 1**) → (**730 : 270 : 1**)

(その他は前報と同等の条件)

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：**280nm**）

カラム：**Cosmosil 5C₁₈-AR-II**

4.6 × 150mm 5μm

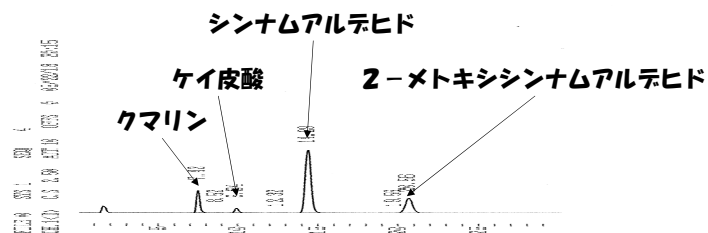
カラム温度：**40℃**

流量：**1.0mL/分**

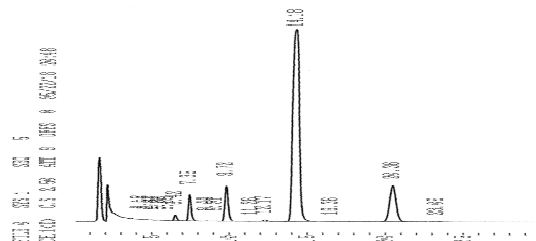
注入量：**20μL**

クロマトグラム・・・

標準溶液



試料溶液



検討中の内容・・・

分析法バリテーションについて、データ取得中

ただし、現在判明しているのは、以下の試料抽出条件では、これまでの成分を含んだ4成分同時定量とする上では、**シナムアルデヒドの含量が高いため、当該成分の直線性を立証することが難しい**可能性がある。

【試料溶液の調製】

ケイヒ末約**0.1g**を精密に量り、**70%メタノール25mL**を正確に加え、**30分間**振り混ぜたのち、遠心分離を行い、上澄み液を、孔径**0.45μm**のメンブランフィルターでろ過したもの

0.1gまで減らしても、上限付近が頭打ちになる。

検討結果（検討中）の内容・・・

UHPLCを用いた場合であれば、これまでと同一試料量（**0.5g**）でも対応することが可能。

【UHPLC条件】

検出器：紫外吸光度計（測定波長：**280nm**）

カラム：J-Pak UPX AQ C18
2.1×100mm 1.9μm

カラム温度：**40℃**

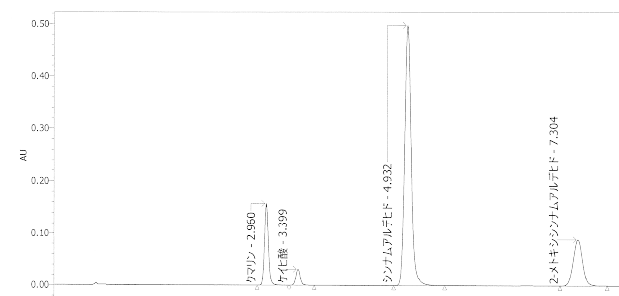
移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液
(**730:270:1**)

流量：**0.4mL/分**

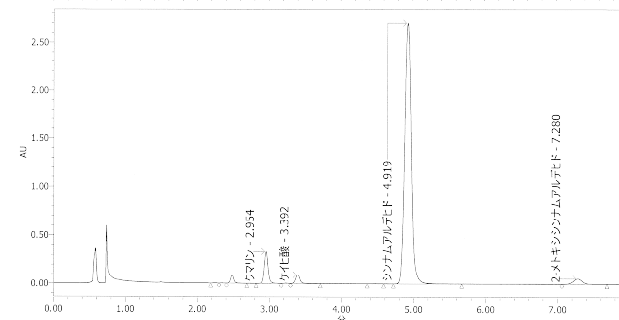
注入量：**1μL**

クロマトグラム・・・

標準溶液

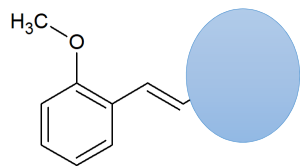


試料溶液

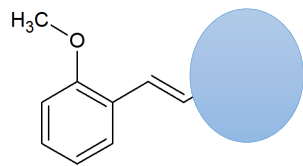


検討中の内容・・・

2-メトキシシナムアルデヒドは、シナムアルデヒドと同様にアルデヒド構造を持つため、安定性において、同様の問題が生じる可能性がある。
(今後、安定性試料を用いて検証予定)



2-メトキシシナムアルデヒド



2-メトキシケイ皮酸?

②オウバク・・・

日本薬局方で、すでにベルベリンを指標成分とした定量法は確立されている。
しかし、単味生薬製剤の申請では、複数成分の定量法の検討が求められることから、他の成分との同時定量法を検討。

1. パルマチン塩化物
(JPでは、システム適合性のシステム性能での評価成分)
2. フェロテンドリン
3. マグノフロリン
4. ジャトロリジン

検討結果（検討中）の内容・・・

日局「オウバク末」試験条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：345 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する。

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液（1：1）1000 mLにリン酸二水素カリウム3.4 g及びラウリル硫酸ナトリウム1.7 gを加えて溶かす。

流量：ベルベリンの保持時間が約10分になるように調整する。

カラムの選定：ベルベリン塩化物標準品及びパルマチン塩化物1 mgずつをメタノールに溶かして10 mLとする。この液20 μLにつき、上記の条件で操作するとき、**パルマチン、ベルベリンの順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離**するものを用いる。

検討結果（検討中）の内容・・・

日局既定の条件では、測定に用いたカラムでは、完全分離（分離度：1.5以上）を満たすことができない場合があったため、移動相の比率を再検討。

注）日局に基づく原料試験では、日局に規定の移動相で試験を実施する必要がある。

下記条件であれば、分離度が**1.93**となり、完全分離を満たすことが可能となった。

移動相：水/アセトニトリル混液（1：1）→ **（11：9）**
1000 mLに
リン酸二水素カリウム3.4 g、
ラウリル硫酸ナトリウム1.7 gを溶かした液

検討結果（検討中）の内容・・・

その他のHPLC条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：345 nm）

カラム：Inertsil ODS-3
4.6×150mm, 5μm

カラム温度：40℃

流量：1.0mL/分

注入量：20μL

検討結果（検討中）の内容・・・

【試料溶液】

（条件検討用のため、JPの条件とは異なります）

オウバク末0.5g+メタノール25mL

→振り混ぜ30分→遠心分離→上澄液

→孔径0.45μmのメンブランフィルターろ過→ろ液

【標準溶液】

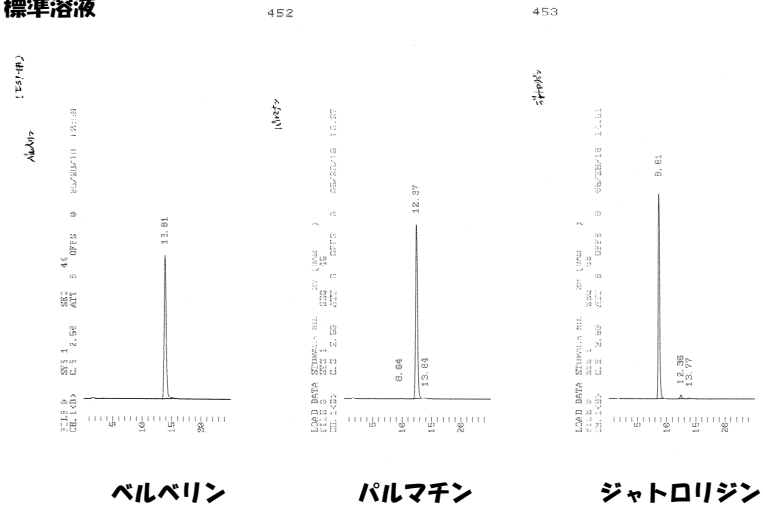
ベルベリン塩化物標準品 1mg+メタノール→10mL

定量用パルマチン塩化物 1mg+メタノール→10mL

定量用ジャトロリジン 1mg+メタノール→10mL

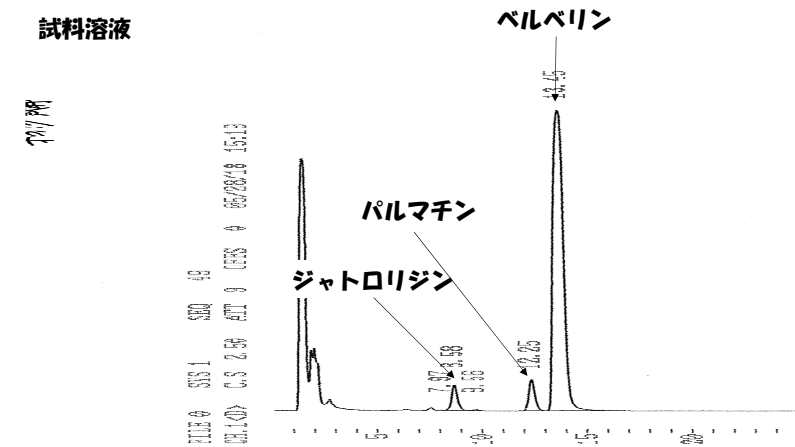
クロマトグラム・・・

標準溶液



クロマトグラム・・・

試料溶液



検討中の内容・・・

検討成分のうち、
マグノフロリン、**フェロテンドリン**については、
 測定波長、保持力の問題があり、**同時定量が困難**
 (フェロテンドリンは、波長変更で対応できる可能性あり)

<フェロテンドリン検討条件>

測定波長：**210 nm**

移動相：水/アセトニトリル混液 (1 : 1) → **(13 : 12)**

1000mLに

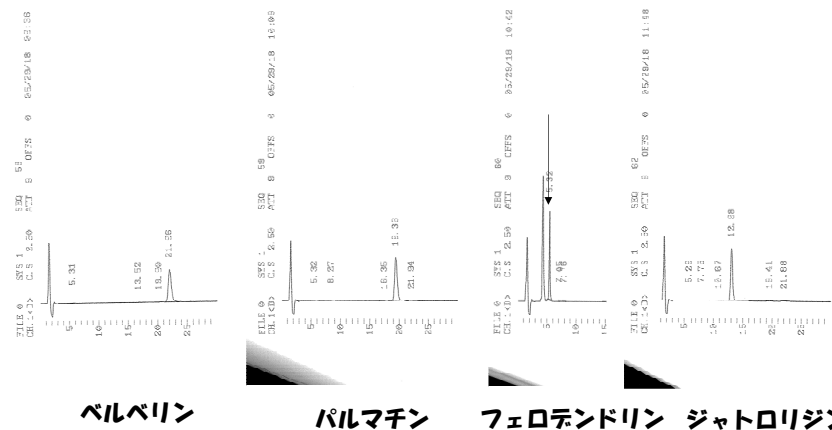
リン酸二水素カリウム**3.4 g**、

ラウリル硫酸ナトリウム**1.7 g**を溶かした液

(他は、前述と同様)

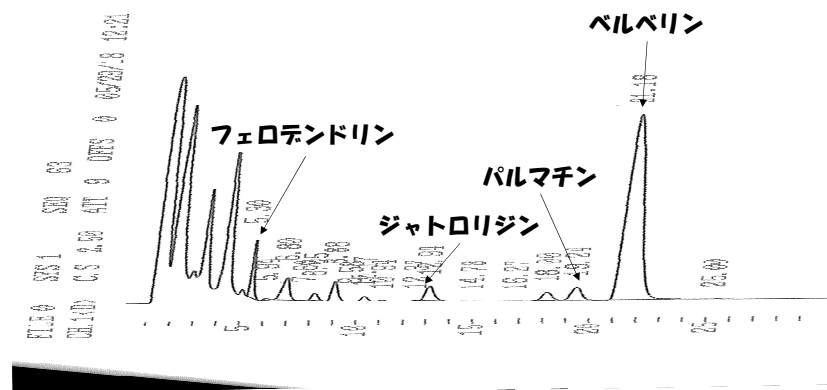
クロマトグラム・・・

標準溶液



クロマトグラム・・・

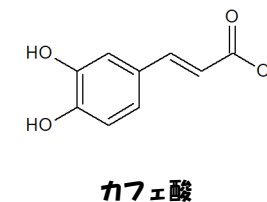
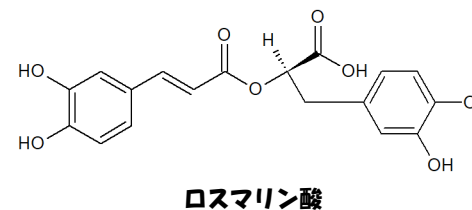
試料溶液



③エンメイソウ (カゴソウ)・・・

シソ科植物には、**ロスマリン酸**が含まれている。
 (特にソヨウ)

そこで、シソ科植物に対する**ロスマリン酸**及び**カフェ酸**についての同時定量法を検討した。



検討結果（検討中）の内容・・・

日局「半夏厚朴湯エキス」試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：330nm）

カラム：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。

カラム温度：30℃付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル／リン酸混液
（800：200：1）

流量：毎分1.0mL（ロスマリン酸の保持時間約11分）

システム適合性は省略

検討結果（検討中）の内容・・・

HPLC条件は、日局「半夏厚朴湯エキス」をベースとして検討。

ただし、測定に用いたカラムでは、カフェ酸に夾雑物ピークが
重なり、定量が困難

そのため、カラムを変更し、炭素含有量の多いカラムで
再検討したところ、分離が可能となった。

カラム：Inertsil ODS-3
5 μ m 4.6 \times 150mm
（炭素含有率：15%）
→Inertsil ODS-HL
5 μ m 4.6 \times 250mm
（炭素含有率：23%）

検討結果（検討中）の内容・・・

その他のHPLC条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：330nm）

カラム温度：40℃

移動相：水／アセトニトリル／リン酸混液
（800：200：1）

流量：1.0mL／分

注入量：10 μ L

検討結果（検討中）の内容・・・

【試料溶液】

エンメイソウ0.3g + 70%メタノール15mL

→超音波10分→遠心分離→上澄液①

残渣 + 30%メタノール10mL

→超音波10分→遠心分離→上澄液②

上澄液①+②+70%メタノール→50mL

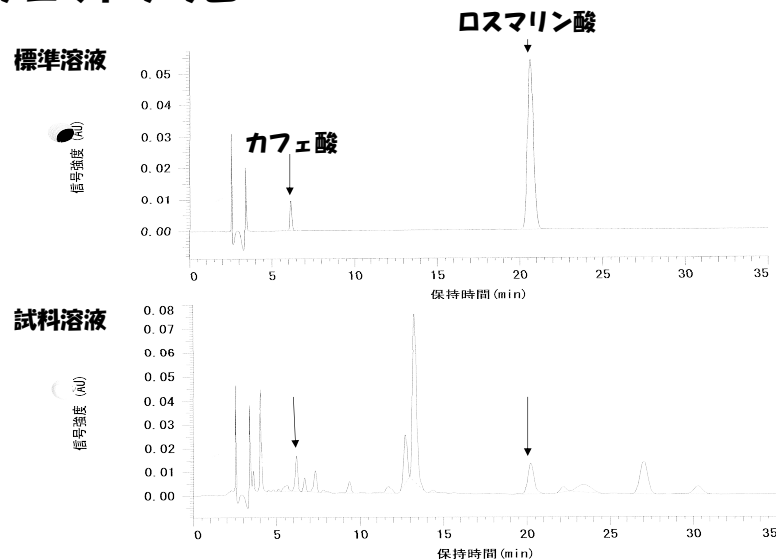
→孔径0.45 μ mのメンブランフィルターろ過→ろ液

【標準溶液】

カフェ酸4mg + 70%メタノール→25mL（標準原液）

ロスマリン酸5mg + 標準原液1mL→100mL

クロマトグラム・・・

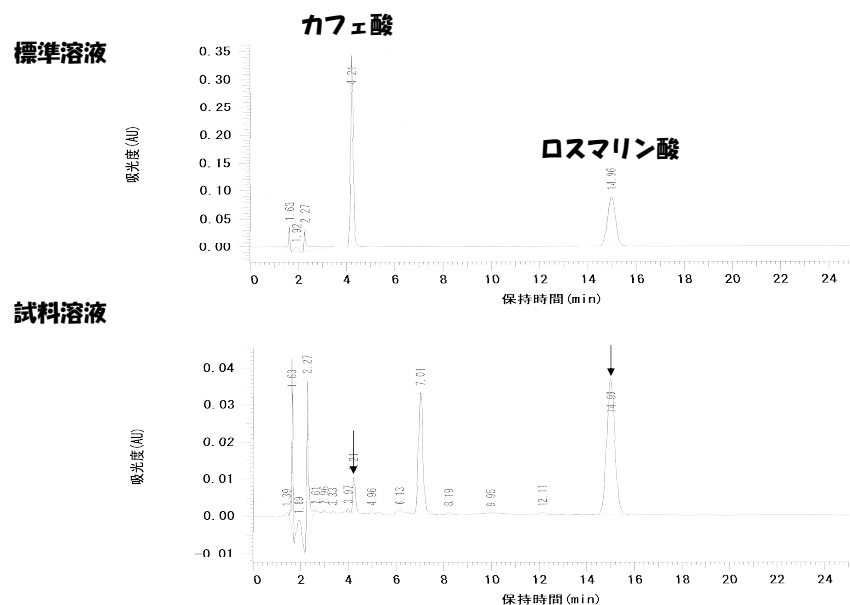


カゴソウの場合・・・

カゴソウの場合、エンメイソウとは異なり、**カフェインの保持時間付近の夾雑物ピークが少ない**ことから、HPLC条件は、日局「半夏厚朴湯」を用いることができる可能性がある。

カラム：Inertsil ODS-3
 5 μ m 4.6 \times 150mm
 (炭素含有率：15%)

クロマトグラム・・・



カフェイン、ロスマリン酸同時定量の注意点・・・

カフェイン、ロスマリン酸の同時定量を行う場合、試料からの抽出において、同一溶媒での抽出が困難（抽出効率が異なる！）

カフェイン：**水比率の多い**方が抽出される。
 ロスマリン酸：**メタノール比率の多い**方が抽出される。

そのため、試料溶液の調製法を検討する必要がある。

④その他・・・

【失敗した内容】

ヨクイニン：ヨクイニンに含まれるとされている
「Coixol」の分析を検討したが、
検出できなかった。
→よく調べると、ヨクイニンの「根」に特異的
な成分！

主な含有成分：脂肪酸のため、紫外吸光度法
では検出できない。
別の成分等で検討中。

ご清聴ありがとうございました。