

15. 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた漢方エキス剤 の一斉確認試験法の開発

○小林 俊也、服部 靖子、冨田 浩嗣、棚橋 高志 (愛知県衛生研究所)

【研究目的】

日本薬局方収載の漢方エキス剤の確認試験は、有効成分等（指標成分）を薄層クロマトグラフィー（TLC）で同定する方法が主流だが、分析機器を用いないため分析操作が適切に実施されたか確認できず、不正な試験への対策も難しい。また、指標成分の数だけ試験が必要なため多くの労力を要する。これらの課題を解決するため、液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いた漢方エキス剤の一斉確認試験法の開発を目指す。

【研究の必要性】

医薬品の製造において、国内メーカーによる医薬品出荷試験の不正を始め、近年試験データの改竄等が相次いでおり¹⁾、患者の不利益を防ぐため、試験データ等の改竄対策が強く求められている。機器分析による試験であれば機器の設定変更や対策用ソフトウェアの導入により対策が可能だが、TLC等の非機器分析では対策が困難である。また、非機器分析による試験は、試験毎に分析操作が適切に実施されたか確認できず、分析結果の信頼性が不十分であることから、国も積極的な機器分析の導入を求めている²⁾。第十八改正日本薬局方（以下、局方）収載の漢方エキス剤の確認試験は、含有する生薬の有効成分等（指標成分）を薄層クロマトグラフィー（以下、TLC）で同定する方法が主流であり、分析機器を用いないため不正な試験への対策が難しく、分析結果の信頼性も不十分であると考えられる。加えて、漢方エキス剤は構成生薬が増えるほど確認試験を多く実施する必要がある、労力を要する。

これらの課題を解決するため、TLC法に代わる信頼性の高い一斉分析法の開発を進める必要がある。

【研究計画】

天然物である生薬を原料とする漢方エキス剤は不純物が非常に多く、主に成分の分離時間（保持時間）で指標成分を特定するTLCや液体クロマトグラフィーでは複数成分の一斉検出は難しい。そのため、保持時間に加えて成分の質量を指標とした高度な分離同定が可能であるLC-MS/MSを分析に用いることにした(図1)。対象とする漢方エキス剤には、処方頻度が高く一般用医薬品としても広く流通する小柴胡湯及び半夏瀉心湯エキス剤を選定し

た。指標成分は局方を参照し、オーゴニン、リクイリチン、6-ギンゲロール、サイコサポニン_{b2}、ギンセノシドRb₁、ギンセノシドRg₁、コプチシン及び6-ショーガオールの8成分とした。確認試験法は、製剤中に共存すると考えられる物質の存在下で確実に指標成分を同定することが求められていることから、試験法開発のために以下のとおり実験を計画した。

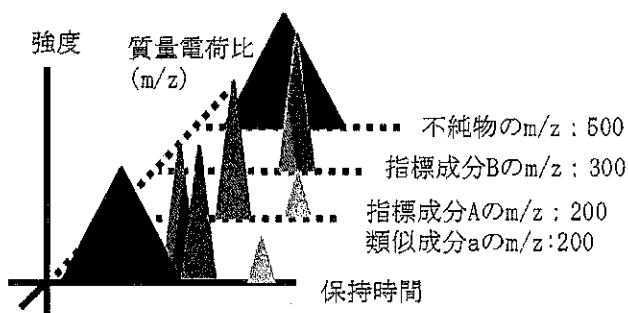


図1 LC-MS/MSによる一斉分離のイメージ

①標準品を用いて、各エキス剤の全指標成分及び各エキス剤に含まれる可能性があり、かつ指標成分と同じ質量をもつ成分（類似成分）を一斉に分離検出できる LC-MS/MS 分析条件を検討する。

②分析の精度条件を設定する。

③各ブランク製剤から指標成分を検出せず、各模擬製剤から全ての指標成分を検出できることを確認する(図2)。

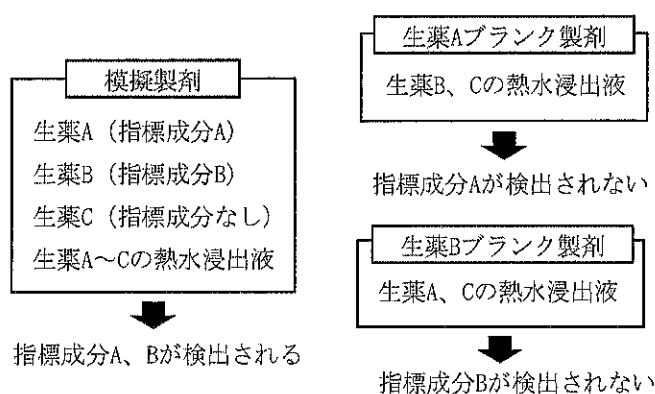


図2 ブランク製剤のイメージ

【実施内容・結果】

＜実施内容＞

1. 混合標準溶液及び試料溶液の調製

混合標準溶液：局方に設定されている小柴胡湯及び半夏瀉心湯の指標成分8成分とその類似成分2成分の標準品を用いて各成分2 μg/mLの混合標準溶液を調製した。ブランク製剤：小柴胡湯の構成生薬からタイソウ、ハンゲ以外の生薬を1つ除いて混合し、熱水で抽出した。半夏瀉心湯についても同様に調製した。模擬製剤：局方小柴胡湯及び半夏瀉心湯の製法どおりに生薬を混合し、熱水で抽出した。市販製剤：医療用の小柴胡湯エキス12製剤及び半夏瀉心湯エキス6製剤を試験に供した。試料溶液：ブランク製剤、模擬製剤及び市販製剤をそれぞれ水/メタノール混液(1:3)で抽出し、10分間超音波処理後に遠心分離し、0.20 μmのフィルターでろ過した。

2. LC-MS/MS 測定条件

装置;Ultimate3000 UHPLC/Orbitrap Q-exactive Forcus、カラム;ACQUITY UPLC HSS T3 (C18, 2.1 mm, i. d×150 mm×1.8 μm)、移動相;0.1%ギ酸-0.1%ギ酸アセトニトリル溶液

=75:25(0 min)→62:38(5 min)→62:38(12 min)→15:85(17 min)→95:5(17.01 min)→95:5(20 min)リニアグラジエント、流速;0.3 mL/min、カラム温度;40°C、イオン化法;ESI法 (+/- switching)、スキャンタイプ;Full MSを用いた。各指標成分及び類似成分の検出イオン等を表1に示す。

表1 指標成分及び類似成分の検出イオン

対象	生薬	指標成分	分子式	検出イオン	m/z
小柴胡湯、半夏瀉心湯	オウゴン	オーゴニン	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	285. 0757
小柴胡湯、半夏瀉心湯	カンゾウ	リクイリチン	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417. 1191
小柴胡湯、半夏瀉心湯	ショウキョウ	6-ギンゲロール	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M] ⁺	294. 1826
小柴胡湯	サイコ	サイコサポニンb ₂	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779. 4587
小柴胡湯	ニンジン	ギンセノシドRb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	[M+H] ⁺	1109. 6102
半夏瀉心湯	ニンジン	ギンセノシドRg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	799. 4849
半夏瀉心湯	オウレン	コブチシン	C ₁₈ H ₁₄ NO ₄	[M] ⁺	320. 0917
半夏瀉心湯	カンキョウ	6-シヨウガオール	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	277. 1798
サイコサポニンb ₂ 類似成分		サイコサポニン a, b ₁ , d	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779. 4587
ギンセノシドRg ₁ の類似成分		ギンセノシドRf, F11	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	799. 4849

<結果>

1. 混合標準溶液を用いた分析条件の検討

上記の条件で混合標準溶液を測定して得られたTIC（トータルイオンカレント）クロマトグラフから表の各m/z値でレスポンスを抽出した（以下、MSクロマトグラム）。各指標成分及び類似成分の標準溶液を用いて本MSクロマトグラム上の各ピークを帰属した結果（図3）、上記分析条件によりギンセノシドRg₁以外の成分を一斉に分離検出可能であると考えられた。不検出であったギンセノシドRg₁の代替となる指標成分を探索するため、半夏瀉心湯の模擬製剤及びニンジンブランク製剤を調製し分析したところ、ギンセノ

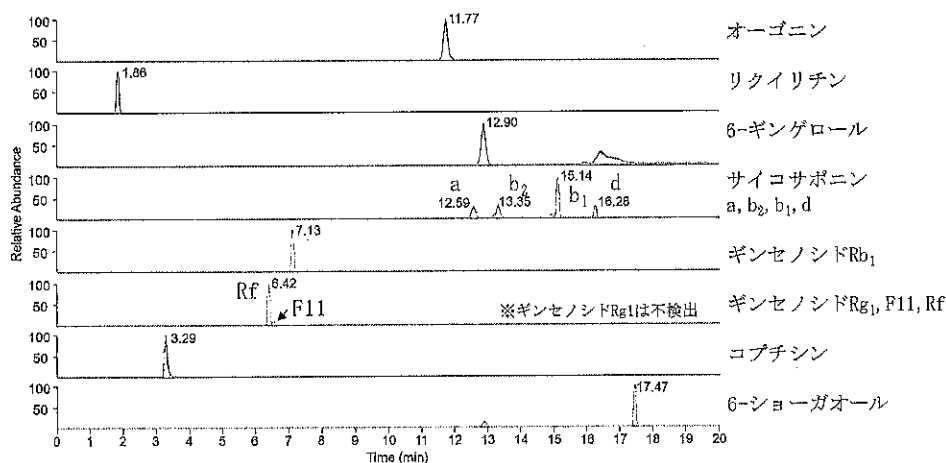


図3 混合標準溶液中の指標成分及び類似成分のMSクロマトグラム

シド Rb₁ が模擬製剤からのみ検出された。このことから、ギンセノシド Rb₁ は半夏瀉心湯中のニンジンに特異的な成分であると考えられたため、ギンセノシド Rg₁ の代わりにギンセノシド Rb₁ を指標成分に設定した。

2. ブランク製剤と模擬製剤を用いた試験法の妥当性の確認

局方に従い試験法の妥当性を確認するため、ブランク製剤及び模擬製剤の試料溶液を分析したところ、ブランク製剤からは除去された生薬の指標成分は検出されず、模擬製剤からは設定した全ての指標成分が検出された。この結果から、設定した全ての指標成分は各生薬に特異的な成分であり、本試験法により一斉に分離検出可能であると考えられた。

3. 分析精度条件の設定

本分析法の分析精度に最も大きな影響を与えるのは、 m/z の誤差であることから、混合標準溶液を測定し、各指標成分の m/z の実測値と理論値の誤差を確認した。その結果、いずれも ± 2.5 ppm 以内 ($n=6$) であったことから、少し余裕を持たせ、本試験法のシステム性能は「混合標準溶液を測定した際の各指標成分の m/z の実測値と理論値の誤差は ± 5 ppm 以内であること」とすることが適当と考えられた。

4. 市販製剤への試験法の適用

開発した試験法を用いて市販製剤 18 製剤を測定し、得られた MS クロマトグラムと標準溶液の MS クロマトグラムの保持時間を比較した(市販製剤の MS クロマトグラム例: 図 4)。全ての市販製剤から設定した全ての指標成分の検出を確認でき、本試験法は小柴胡湯及び半夏瀉心湯の確認試験法として適用可能であると考えられた。

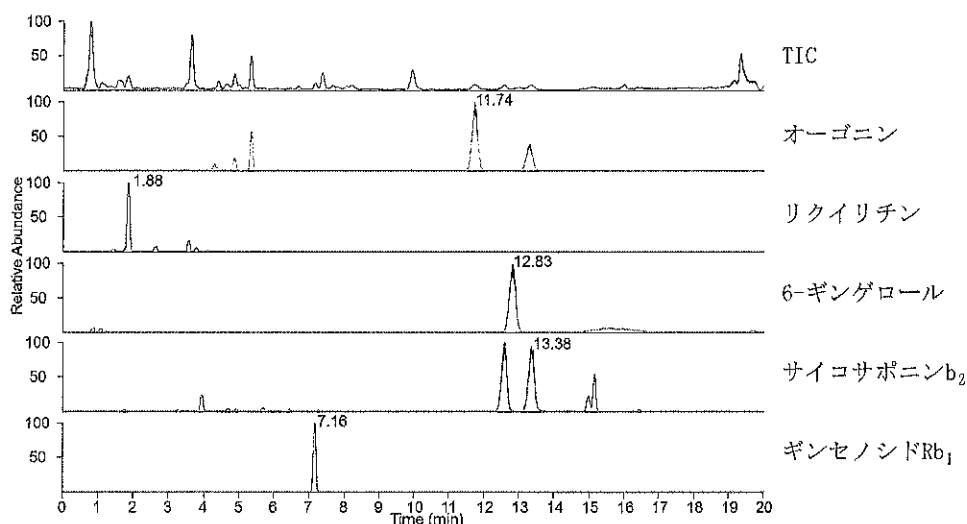


図 4 A 社小柴胡湯の TIC クロマトグラム及び MS クロマトグラム

【考察と今後の課題】

本研究により LC-MS/MS を用いた小柴胡湯及び半夏瀉心湯エキス剤の一斉確認試験法を開発することができた。医薬品製造販売メーカーが本試験法を導入することで、確認試験の省力化だけでなく不正な試験の防止を期待でき、消費者がより確実に品質を担保された医薬品を使用できると考えられる。

小柴胡湯及び半夏瀉心湯の構成生薬のうち、ハンゲ及びタイソウについては局方に指標成分が設定されていないことから、本研究ではこれらの生薬に指標成分を設定しなかった。しかし、これらの生薬についても指標成分を設定し、確認試験を実施して品質管理することが望ましいため、今後はハンゲとタイソウの指標成分の探索を行う予定である。

【参考文献】

- 1) 飛田勇輝, 山本剛, 工藤俊明, 湯本貴文, 近年の医薬品製造所における不正事案と再発防止策 保健医療科学, 2022 Vol.71 No.2 p.140-146
- 2) 第十九改正日本薬局方原案作成要領 第一部 第十九改正日本薬局方原案の作成に関する細則 1.1.3 試験方法の設定

【経費使途明細】

使 途	金 額
標準品購入費	
サイコサポニン a	28,050 円
サイコサポニン b ₁	25,432 円
サイコサポニン b ₂	33,385 円
サイコサポニン d	49,093 円
6-ギンゲロール	24,684 円
6-ショーガオール	52,459 円
ギンセノシド Rb ₁	65,164 円
試薬購入費	
アセトニトリル (LC/MS 用)	7,301 円
メタノール (LC/MS 用)	1,210 円
エタノール (LC/MS 用)	13,002 円
支払い時の振込手数料 (110 円×2 回)	220 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

