

## 1 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用

### 3 以下を次のように改める。

#### 1. 日本薬局方における生薬中の定量指標成分と定量分析用標品の設定

日本薬局方における生薬、漢方処方エキスにおいて、定量値を規定する場合、定量指標成分が天然物であるため、多くの化学医薬品と同様に日本薬局方標準品を設定し用意するには、以下のような課題がある。

化学医薬品と異なり、生薬・漢方処方エキスは非常に多くの化合物の混合物であり、医薬品(生薬・漢方処方エキス)中の0.1～数%程度の含量の化合物を定量指標成分として設定する必要があるが、多くの場合これらの化合物の合成は容易ではない。したがって、天然物より、十分な純度を持つ化合物を精製、単離することになる。この場合、多大な労力が必要となり、標準品を準備する経済的コストが多くなる。また、原料の差、抽出、精製、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間格差が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい。また天然物の場合、最大の不純物は水である場合が多いが、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な化合物を多量に消費することになる。

このような隘路があるため、日局の生薬、漢方処方エキス各条規格では、多くの場合、日本薬局方標準品の設定が難しく、便宜上その時点で市販されている試薬、又は市販可能な試薬について規格を日局の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品と規定し、定量法と定量規格を規定している。ところが、このような試薬を定量分析用標品とした場合、得られた定量値は計量学的に値付けが行われていないものであるため、厳密に議論すると、使用した場合の分析値の信頼性が問題となる。

#### 2. 生薬・漢方処方エキスの分析に用いる定量分析用標品への定量NMRの応用

このような天然物に由来する試薬の純度の問題は、定量NMRを用いることで解決することが可能である。日本薬局方生薬試験法10.1.核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術の原理で示された考え方にに基づき、これらの試薬に対して定量NMRを用いて正しい含量を値付けすることができれば、試薬を計量トレーサビリティが保証された分析用標品として利用することが可能となる。

現在、このような試薬に対する定量NMRは、順次実施されており、試薬の定量値付けの際、考慮すべき点を考察した論文が公表<sup>1)</sup>されている。また、HPLCによる定量分析用標品として使用される可能性の高い物質を使用して、定量NMRのパラメーション実験も行われており、分子量300程度の測定対象化合物の場合、測定に10 mg程度使用すれば、使用機器間誤差を含めても通常の実験室レベルで、有効数字2桁を保証しながら値付けが可能であることが示されている<sup>2)</sup>。通常、生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり、規制値も0.1%が最小単位であることから、天然物である生薬ごとのばらつきを考慮すれば、定量分析用標品の含量精度は有効数字2桁の保証で十分と考えられる。

これらのことを考慮すると、試薬を定量分析用標品として使

用して得られた分析値の曖昧さは、定量NMRによって値付けされた試薬をHPLC等の定量分析用標品として使用し、値付けされた試薬の純度を定量値の算出に組み込むことで、現実的に回避することができる。例えば、日局「サンシシ」では、ゲンポシドの含量をHPLC分析に基づき3.0%以上と規定しているが、定量分析用標品となる定量用ゲンポシドとして使用可能な試薬について定量NMRを実施すると、絶対純度は92%程度であることが前述した論文で示されている。したがって、この試薬の純度を100%と仮定して定量分析用標品としHPLCを実施した結果、定量値が3.0%と導かれる場合、定量NMRによる絶対純度と計量トレーサビリティの確保を考慮した定量値は、2.8%であることになる。

#### 3. 定量NMRで値付けされた試薬の供給

現在、独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター(IA Japan)の認定プログラム(ASNITE)において、校正されたNMR装置を用いて試薬の値付けを行う機関に対する認定をどのように行うか検討が開始されている。さらにIA Japanでは、試験方法区分への「定量NMR分析」の追加を予定している。したがって、近い将来、試薬会社はこの認定を受けて試薬の値付けを行うことが可能となる。この場合、SIトレーサブルな値を得るために、試薬ユーザーが個々に定量NMRを実施する必要がなくなる。さらに、機関間誤差(機器間誤差を含む)は無視できることになり、試薬に表示された値を指標成分の定量値の算出の際に組み込むことで、より精度の高い値付けを行えることになる。

なお、内部基準物質のSIトレーサブルな値付けに用いる認証標準物質(NMIJ CRM)は、独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)より供給されている。

#### 4. 定量NMRに使用する機器の性能の管理

日本薬局方試薬の純度決定に使用される定量NMRは、SIトレーサブルな内標準物質を基準として同一試料管内の測定対象物を同時に測定する内標準法である<sup>3)</sup>。この方法は、NMR現象を利用して原子核の数を観測していることから、試料溶液中の測定対象物のモル数を標準物質で直接的に校正している状態といえる。

このような定量NMR条件における測定機器の性能の管理では、測定対象シグナルの積分値が、シグナルが観測されるスペクトル幅内(通常0～10 ppmの範囲)において正確に定量できることを確認する。その際、定量積分では、不純物に由来するシグナルを定量範囲に含めないことが最も重要である。したがって、機器の性能の管理を行う際には、純度が高い純度既知の化合物(定量NMRで規定された純度が99.0%以上のものが望ましい)を用いる。このとき、なるべく単純なスピン系由来の複数のシグナルについて定量積分を行い、複数のシグナルから得られる理論上の原子核数の比が正確(どちらも<sup>1</sup>H分のシグナルであれば、0.995～1.005)であることを確認する。

なお、NMRの励起波長を考えると、800 MHzの共鳴周波数の機器を使用した時、観測中心が5 ppm付近、観測スペクトル幅20 ppm(定量NMR純度規定のある試薬の項で規定された条件)とすると、通常、測定対象物のシグナルが観測される0～10 ppmにおける励起効率率は、90度パルス幅が10 μ秒であるとき99.95%以上であることから、プローブのチューニングとシムの調整が行われた機器であれば、通常の実験室レベルで有効数字2桁の精度が全く問題なく保証できる。さらに400MHzの共

107 鳴周波数の機器であれば、同様の励起効率は、90度パルス幅  
108 20  $\mu$ 秒まで得られるので、特に特別なプローブを使用しなく  
109 ても十分に定量NMRが測定可能である。

110 5. 参考資料

111 1) Hosoe J. *et al.*, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,  
112 **41**, 960-970 (2010)

113 2) Hosoe J. *et al.*, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,  
114 **43**, 182-193 (2012)

115 3) Hosoe J. *et al.*, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,  
116 **45**, 243-250 (2014)

117

118

119