

覚試験では、タイソウの試料液 b は、『はじめ甘味と弱い酸味があり、後に渋く旨味が残る』と表現され、ショウキョウの試料液 b は、『はじめわずかに甘く、後に非常に辛い』と表現された (Table 2). そこで、濃度が 10 倍高いタイソウの試料液 b とショウキョウの試料液 b について味認識装置を用いて測定を行ったところ、タイソウの試料液 b は、酸味、塩味、旨味、酸性苦味、塩基性苦味、塩基性苦味後味について、『味がある』と感知され、それぞれ 2.9, 1.8, 4.9, 2.5, 1.7, 2.3 の推定値を示した。また、ショウキョウの試料液 b は酸性苦味および酸性苦味後味について、『味がある』と感知され、それぞれ 1.5 および 4.9 の推定値を示した。

D. 考察

葛根湯の構成生薬のうち、マオウの試料液 b について、ヒトが『葛根湯のような味』と表現している (Table 2). また、味認識装置による測定においても、葛根湯の味はマオウの味のパターンと近似することが判明した (Fig. 1(B)). 特に、酸味および塩基性苦味については、葛根湯よりもマオウの方が大きな値を示し、なおかつマオウ以外の生薬ではほとんど感知されていないことから、これらの味は、マオウのみに由来するものであり、処方として煎出される際にはマオウ以外の生薬によって味を弱められるものと考えられた。一方、塩味および旨味はカクコン (Fig. 1(C)), また、渋味についてはカンゾウも葛根湯の味に寄与していることが認められた (Fig. 1(F)). 従って、葛根湯の味は主にマオウの味を基本として、さらにカクコンおよびカンゾウの味によって構成されていることが示された。

マオウの成分としては、**ephedrine** をはじめとするアルカロイド類がよく知られているが、その他、タンニンや多糖類も含まれている^{5,7)}。塩基性苦味は、アルカロイド類に由来しているものと考えられるが、これらマオウの含有成分と味の関係

については更なる検討が必要と考えられる。

葛根湯の各構成生薬について、マオウとタイソウに関してはヒトが酸味を表現しており、マオウに関しては味認識装置による測定結果とよく一致した。しかし、タイソウに関しては、タイソウの試料液 a では、酸味は検出されなかった。また、ヒトが『えぐい』と評価したマオウおよびシャクヤクについては、味認識装置による測定では酸性苦味が共通して検出された。『えぐい』とは、あくが強く、のどをいらいらと刺激する味がある、また、いがらっぽいということであり⁸⁾、収斂性のある苦味や渋味に近い味覚と考えると実験結果を合理的に説明できる。

本研究では、味認識装置による測定は、センサーの有効域と耐用度を考慮して、ヒトによる味覚試験用試料液の 10 分の 1 濃度の煎出液を用いて行っている。ヒトによる味覚試験と味認識装置による測定によって示された各試料液の味の評価は、センサーが味を検出しなかったタイソウおよびショウキョウを除いてほぼ一致していた。本装置で用いるセンサーは、ヒトと比較して有効域が狭く、更に、高濃度で測定した場合、以後測定不可能となる。従って、極端に味の薄い生薬や味の濃い生薬についての測定を行う場合には、事前に試料液の希釈範囲を検討する必要性が示唆された。

タイソウおよびショウキョウについて、味認識装置を用いて、試料液 b について測定した場合、タイソウの試料液 b については、旨味が強く感知された他、酸性および塩基性の苦味も感知された。他方、ヒトによる味覚試験では、旨味と渋味が感じられているが、苦味は表現されていない。昨年度の研究においても同様に、ヒトでは苦味を感じられないが、味認識装置による測定では苦味を感知した例があり、ヒトは苦味と渋味を味認識装置ほどはつきりと識別できないという傾向が今回も示された。

ショウキョウの試料液 b については、酸性苦味

が強く検出されたが、ヒトでは辛味が非常に強く感じられた。従ってヒトでは、強い辛味にマスクされ、苦味が表現されなかったと考えられる。尚、辛味は、味細胞で感じる味ではなく⁹⁾、本装置では測定できない味の要素である。従って、昨年度と同様、基本的な味の傾向は本装置による測定とヒトによる味覚試験で同じ結果が得られたものと考えられる。

味認識装置測定用試料液（試料液 a）を味認識装置によって測定した際、葛根湯、カッコンおよびマオウで旨味が強く検出された。一方、10倍濃い濃度である、試料液 b を用いたヒトによる味覚試験では、タイソウについてのみ旨味が表現された。味認識装置に用いられるセンサーのうち、旨味に応答するセンサーは、グルタミン酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウムなどの物質に反応する。カッコンおよびマオウは、味認識装置による測定によって、旨味成分が含まれていることが示唆されたにもかかわらず、ヒトによる味覚試験では旨味として表現されなかった。その理由として、苦味など他の味が旨味以上に強く感じられた可能性が考えられる。カッコンについては、グルタミン酸を含有しているとの報告があり¹⁰⁾、味認識装置による測定において旨味が検出されるのは合理的である。

昨年度の研究において、5種類の漢方処方についてのヒトによる味覚試験において旨味を表現した人はおらず、それについては、これまで生薬や漢方処方に関して旨味を考えるとという概念が無かったためと推定した。しかし今回、旨味という概念があるにもかかわらず、葛根湯の試料液 b について、旨味が表現されることは無かった。他方、葛根湯の煎出液とエキス剤の味を比較すると、ヒトによる味覚試験では『煎出液の方がまろやかでおいしい』と評価され、味認識装置による測定では、旨味に関してのみ、葛根湯の方がエキス剤より強い値を示した。従って、葛根湯に関してヒトが『まろやか』と表現したのは、味認識装置に

よる測定において旨味として検出された味の要素である可能性がある。

今回、センサーの安定性が得られず、甘味についての評価が出来なかった。生薬および漢方処方の味において甘味は非常に重要な要素であるとともに、ヒトでも容易に感知、表現できる味の要素である。また、甘味を持つ代表的な生薬カンゾウは漢方処方の構成生薬として使用されている頻度が最も高い。従って、各処方の味分布の特徴をより正確にとらえるためには甘味の測定は不可欠と考えられ、安定度の高いセンサーが開発されることを望む。

E. 結論

葛根湯独自の味に大きく寄与しているのはマオウであり、さらにカッコンの旨味とカンゾウの渋味が加わって、処方である葛根湯の味を構成していることが示された。従って、医薬品としての漢方処方を味認識装置により規格化する場合、生薬により、味への影響差があること認識して、規格化することが、重要であると考えられた。

F. 引用文献

- 1) Research Committee of Sensory Evaluation, Union of Japanese Scientists and Engineers ed., "Shinban Kanno Kensa Handobukku" (Sensory evaluation handbook), JUSE Press Ltd. (1973) (ISBN 4-8171-9002-7).
- 2) Mcleod S., *Jour Exp. Psychol.* 44, 316-323 (1952).
- 3) Shutz, H. G., Pilgrim, E. S., *Jour Exp. Psychol.* 54, 41-48 (1957).
- 4) <http://moldb.nihs.go.jp/jp/jp15.htm>
- 5) Konno C., Takashi T., Tamada M., Hikino H., *Phytochemistry*, 18, 697-698 (1979).
- 6) Nishioka, I., *Yakugaku Zasshi*, 103, 125-142 (1983).
- 7) Konno, C., Mizuno, T., Hikino, H., *Planta*

Medica, 162-163 (1985).

- 8) Shinmura, I. ed., "Kojien", Fifth edition, Iwanami Shoten (1998) (ISBN 4-00-080112-0).
- 9) Montell C., Birnbaumer L., and Flockerzi V., *Cell*, 108, 595-598 (2002).
- 10) Akamatsu, K., "Shintei Wakanyaku", Ishiyaku Publish.Inc. (1970) (ISBN 4-263-73701-6).

G. 健康危険情報

本研究においては、特になし。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 安食菜穂子, 川原信夫, 合田幸広: 味認識装置による漢方処方味の評価に関する研究 (第1報), *Natural Medicines*, 59, 164-170 (2005)
- 2) 安食菜穂子, 鈴木あゆみ, 川原信夫, 合田幸広: 味認識装置による漢方処方味の評価に関する研究 (第2報) 葛根湯に関する

検討, *生薬学雑誌*, 60, 21-27 (2006)

2. 学会発表

- 1) 安食菜穂子, 鈴木あゆみ, 川原信夫, 合田幸広: 漢方処方味の認識に関する研究 (第3報): 日本生薬学会第52年会 (2005年9月16-17日, 金沢)
- 2) 安食菜穂子, 川原信夫, 合田幸広: 漢方処方味の認識に関する研究 (第4報): 日本生薬学会第126年会 (2006年3月28-30日, 仙台)

I. 知的所有権の取得状況

1. 取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

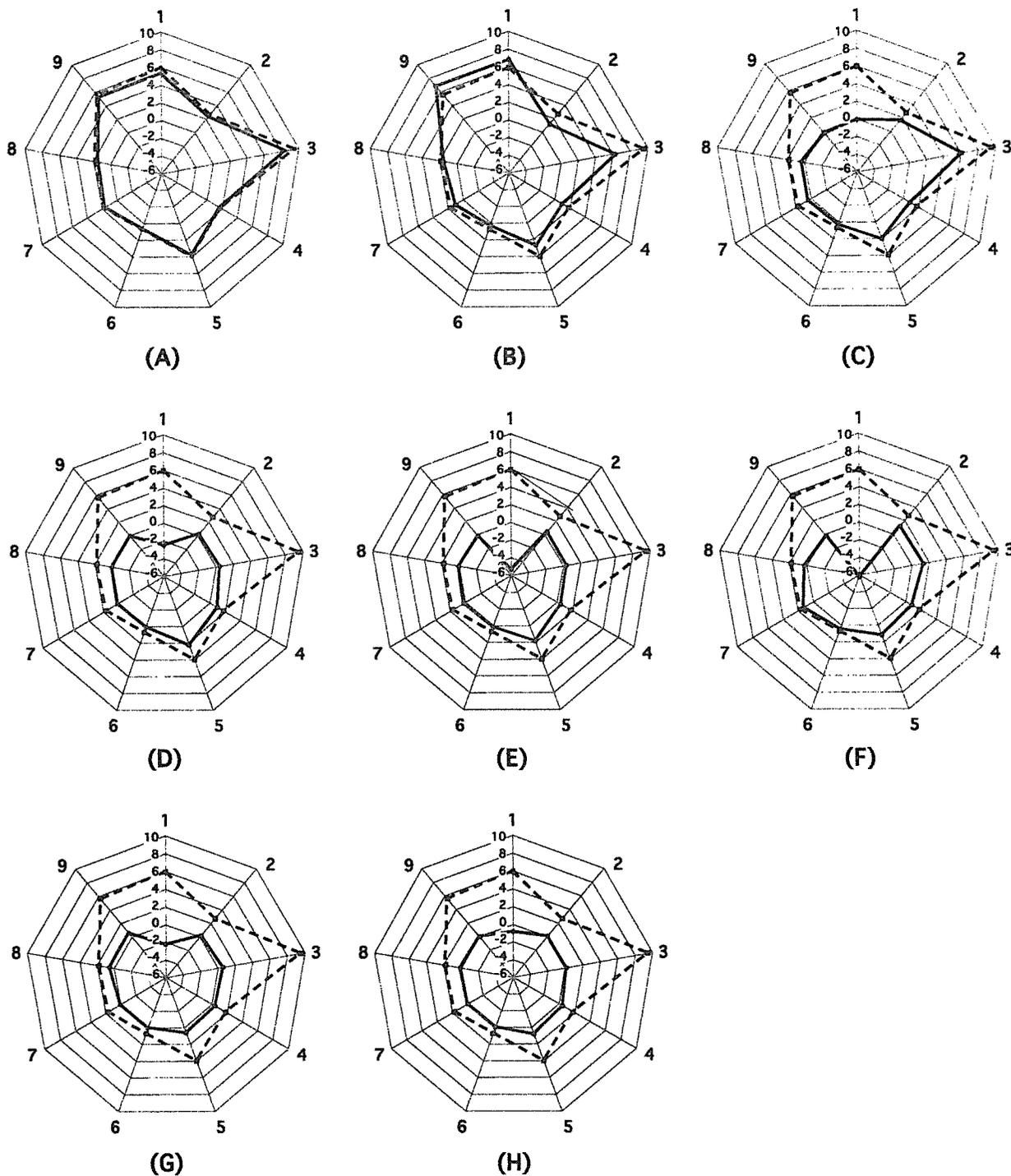


Fig. 1 Taste patterns of Kakkonto and the decoctions of the respective crude drugs which are the components of the Kakkonto formula.

The data were obtained by the taste-sensing system. The dashed line in all graphs shows the taste value of Kakkonto decoction (A~H). The solid line in each graphs shows the taste value of a commercial Kakkonto extract (A), and Ephedra Herb (B), Pueraria Root (C), Cinnamon Bark (D), Peony Root (E), Glycyrrhiza (F), Jujube (G), and Ginger (H) decoctions, respectively. The numbers on circumference of graphs show the taste factors of sourness (1), saltiness (2), umami (3), aftertaste of anionic bitterness (4), anionic bitterness (5), aftertaste of astringency (6), astringency (7), aftertaste of cationic bitterness (8), and cationic bitterness (9), respectively.

Table 1 Components of Basic Taste Solutions

Taste	Components
Reference solution	KCl (30 mM) + Tartaric acid (0.3 mM)
Sourness	KCl (30 mM) + Tartaric acid (3.0 mM)
Saltiness	KCl (300 mM) + Tartaric acid (0.3 mM)
Umami	KCl (30 mM) + Tartaric acid (0.3 mM) + Monosodium glutamate (10 mM)
Bitterness (cation)	KCl (30 mM) + Tartaric acid (0.3 mM) + Quinine-HCl (0.1 mM)
Bitterness (anion)	KCl (30 mM) + Tartaric acid (0.3 mM) + Humulone derivatives (0.01 vol%)
Astringency	KCl (30 mM) + Tartaric acid (0.3 mM) + Tannic acid (0.05 wt%)

Table 2 Taste of Kakkonto and the decoction of the respective crude drugs which are components of Kakkonto formula by Human Gustatory Sensation Test

Samples	Taste
Kakkonto decoction	Sweet at first then slightly bitter and astringent, later slightly pungent and sour
Commercial Kakkonto dry extract	Sweet at first, later pungent and fairly bitter*
Ephedra Herb	Sour and acrid, Kakkonto-like taste
Pueraria Root	Sweet and savory
Cinnamon Bark	Sweetish, pungent and astringent
Peony Root	Sweetish and slightly acrid
Glycyrrhiza	Sweet at first, then bitter
Jujube	Sweet and rather sour at first, then slightly astringent and tasty
Ginger	Slightly sweet at first, then extremely pungent

* Kakkonto decoction tastes milder than Kakkonto extract

分担研究課題 専ら医薬品の成分検索に関する研究

— 営実について —

分担研究者 大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科薬学専攻創薬学講座生薬学教室 教授

研究要旨 日本市場に流通している北朝鮮産営実について成分検討を行った。その結果、フラボノイド配糖体、フェノール配糖体、メガスティグマン配糖体等に加え、新規な含窒素化合物が単離された。

A. 研究目的

エイジツ（営実）は日本薬局方に収載されており、本品はノイバラ *Rosa multiflora* Thunb. (= *Rosa polyantha* Sieb. et Zucc.)

（写真 1.）の偽果又は果実と規定されている。神農本草経の上品には営實として収録され、その薬能は「瘍疽，悪瘡，結肉，跌筋，云々を主どる」とされている。



写真 1.

基原植物ノイバラ(バラ科)は日本全土および中国、朝鮮に分布しており、現在日本産と北朝鮮産が市場に出回っており、年間約20トンが輸入されている。薬効として強下剤として用いられ、利尿作用を有する

ため関節痛、筋肉痛、腎臓病また癰疽、悪瘡などに用いられている。ケンフェロール、クエルセチンをアグリコンとするフラボン類が薬効本体と考えられている。

類似生薬としてはヨーロッパでは *R. canina* Lの果実が腎結石の治療にまた利尿を目的として用いられている。

市販品の品質評価並びに検討班での評価 B（専ら医薬品）またはE（薬食区分見直しの対象）との評価をうけ、いずれに区分されるかを検討することとなり、継続して成分検索を行った。

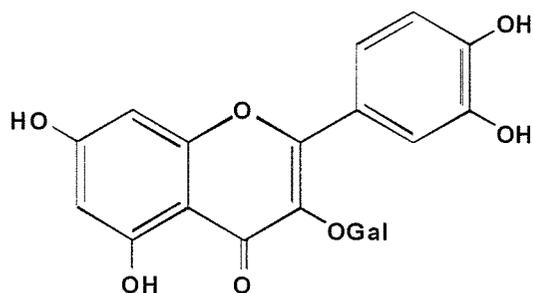
B. 研究方法

北朝鮮産営実の成分検索

北朝鮮産営実 5.0 kg を粉碎後、MeOH で抽出した。MeOH エキスは Chart 1 に示すように溶媒分配を行い、n-BuOH 可溶画分 105.5 g を得た。本画分をダイヤイオン HP-20、順層、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、液滴向流クロマトグラフィー（DCCC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等を用いて分離、精製を行った。

C. 研究結果

昨年度の報告ではフラボンの一種である hyperin の単離、同定を行った。



Hyperin (Cpd 3)

更に n-BuOH 可溶画分をダイヤイオン HP-20 カラムに付したて得たフラクションのうち Fr. 3, Fr. 4 を中心として分離精製を進め (Chart 2)、Fr. 3 より Cpd 1、Fr. 4 より Cpd 2 から Cpd 12 を単離した。そのうち Cpd 1 は β -シトステロールのグルコシド、Cpd 4 は 3,4,5-トリメトキシフェノールのグルコシド、Cpd 5, 10 および 11 はクエルセチンもしくはイソラムネチンの配糖体であり、Cpd 9 はタキシフォリンの 3-O グルコピラノシドであった。Cpd 6 はブタノールのフルクトピラノシド、Cpd 7 はメガスティグマンのグルコピラノシド、さらに Cpd 8 はシリンジンであった (図 1)。Cpd 6 は分配操作中にブタノールを用いているので天然物ではない可能性もあるが、他に多くの糖が存在するにもかかわらずフラクトースだけブタノールと縮合する点には興味を持たれる。

Cpd 2 は Cpd 12 のメチルエステルである。Cpd 2 には NMR スペクトルより芳香環の存在が示唆され (Table 1)、更に炭素 7 個からなる化合物であった。化学シフト、HH-COSY および HMBC スペクトル (図 2) を詳細に検討した結果、図 1

の 2 および 12 に示す構造を有すると推定している。特に δ_c 51.0 のシグナルがトリプレットで現れている点は窒素含有を強く示唆している。Cpd 2 は抽出、分離中に Cpd 12 がメチル化されてエステルとなった可能性は否定できない。現在までこれらの構造を有する化合物は報告されておらず、少なくとも Cpd 2 は新規天然物有機化合物である。

D. 考察

この度の研究ではこれまで當実より得られていないメガスティグマンの配糖体等が単離された。しかしながらその主成分とされる multiflorin 類の精査もおこなったが現在まで単離に至っていない。多くのフラボン類が得られているので、これは、単離技術に問題があるのではなく、北朝鮮産の當実、もしくはこのロットの當実にはそれらが含まれていないか、含まれていても極微量ではないかと推察される。

E. 結論

今回の成分検索で化合物 1 から 12 を単離して、その構造を決定、又は推定した。Multiflorin は得られなかったもの近縁化合物を単離した。今後、multiflorin が當実の主成分で寫下作用に関与する成分である言う記述は當実の産地による変異を含めて検討する必要があると思われる。また、含窒素化合物の単離はさらに成分検索を詳細に行う必要があると思われる。

F. 健康危険情報

本研究において含窒素化合物が単離され

たことより、今後この物質の生物活性の追及が必要であると考え。その他の化合物については特段の健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

<Extraction and isolation>

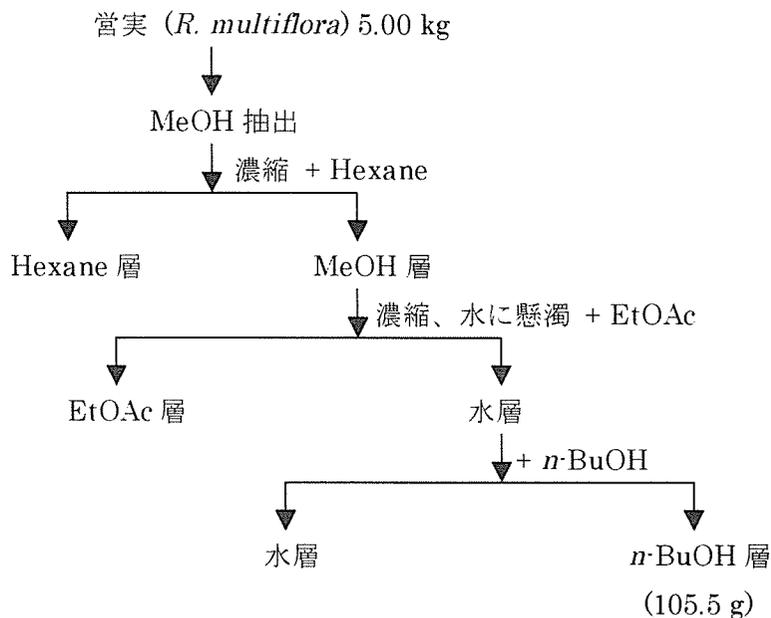
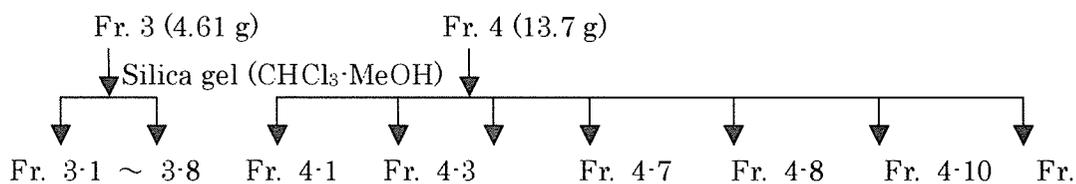
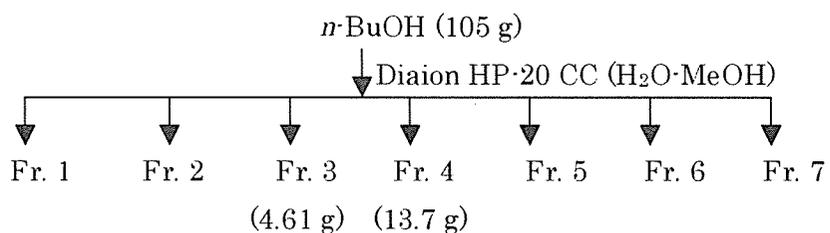
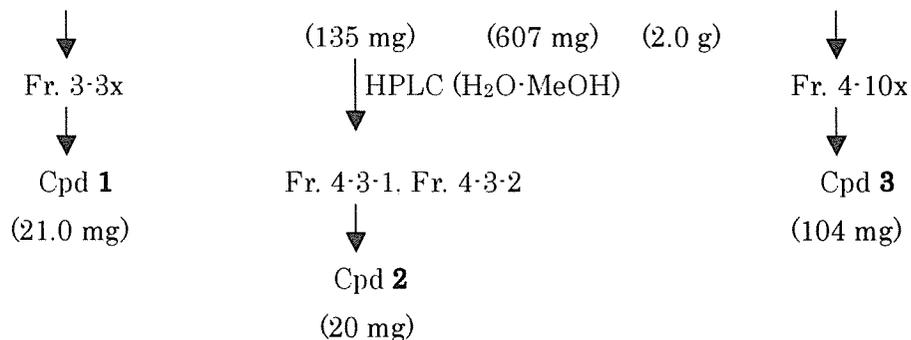


Chart 1



4-14



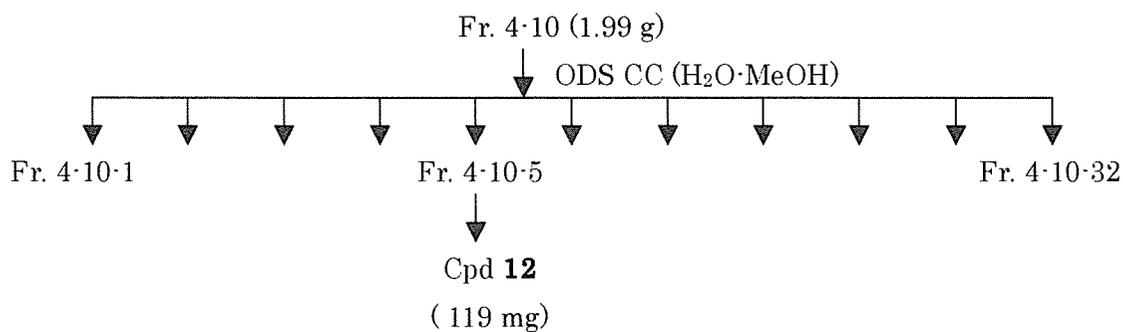
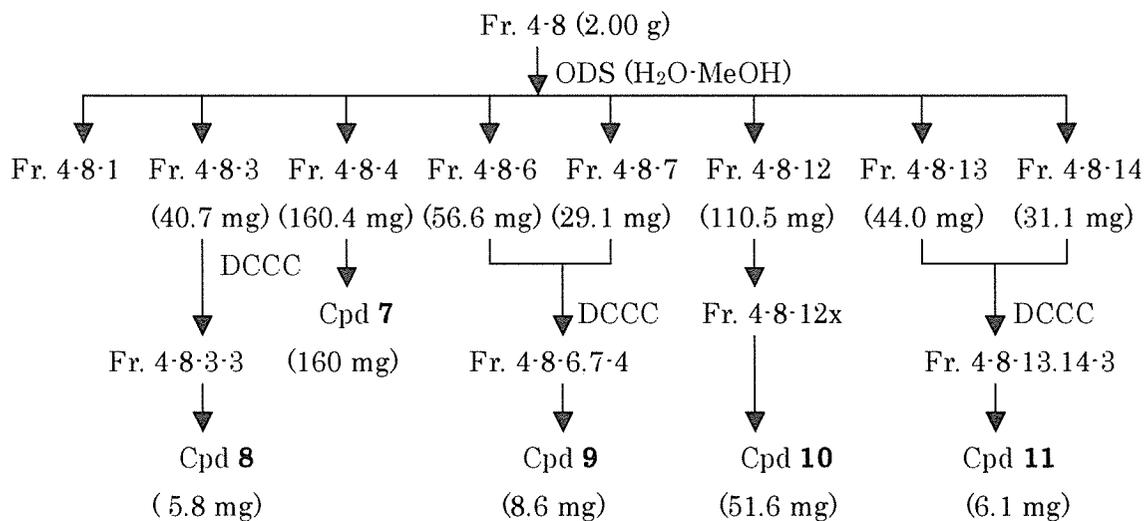
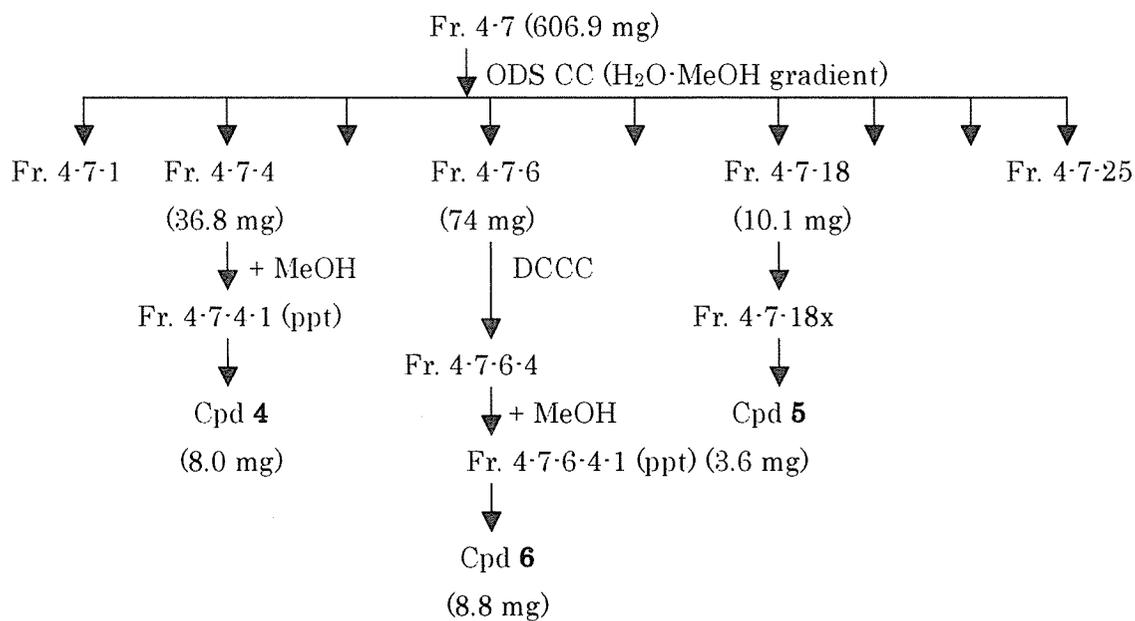
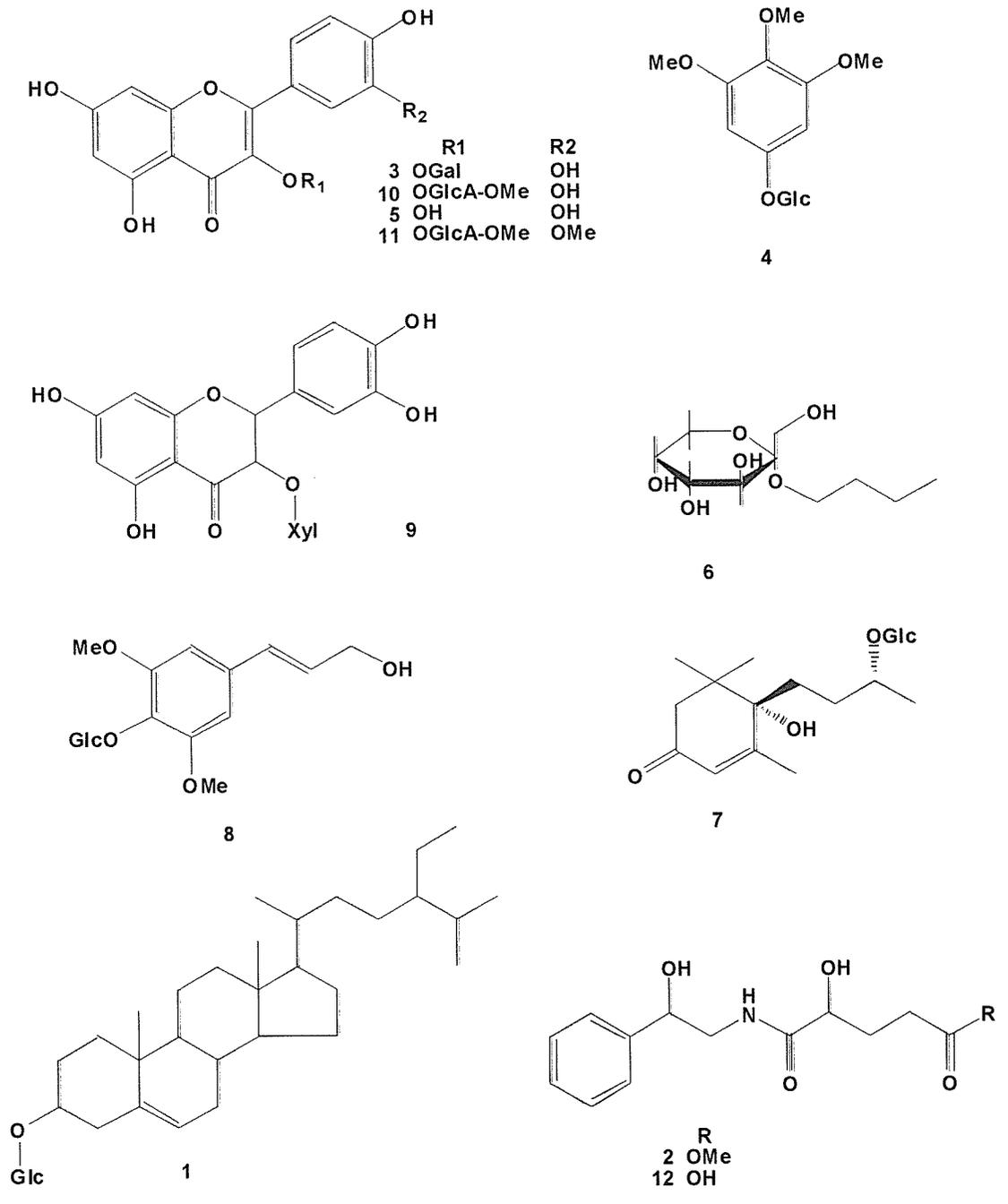


Chart 2



☒ 1

assign	Compound 2	
	¹³ C	¹ H
1	143.7	
2	126.9	7.37, <i>m</i>
3	129.5	7.33, <i>m</i>
4	128.7	7.23, <i>tt</i> , <i>J</i> =1.4, 6.9
5	129.5	7.33, <i>m</i>
6	126.9	7.37, <i>m</i>
7	73.8	4.88, <i>dd</i> , <i>J</i> =3.6, 8.8
8	51.0	3.85, <i>dd</i> , <i>J</i> =3.6, 14.4, 3.28, <i>dd</i> , <i>J</i> =9.2, 14.4
1'	178.4	
2'	63.0	4.60, <i>m</i>
3'	30.4	2.24, <i>m</i> , 2.39, <i>m</i>
4'	24.0	2.01, <i>m</i> , 2.24, <i>m</i>
5'	174.1	
OMe	53.0	3.76, <i>s</i>

recorded in CD₃OD

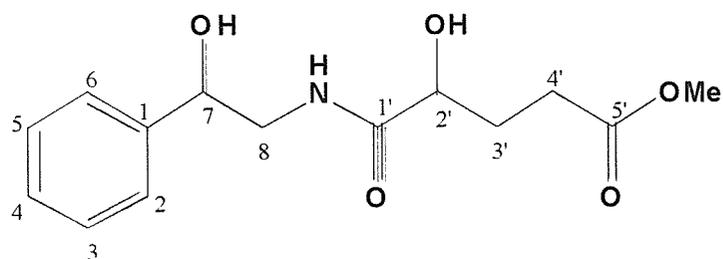
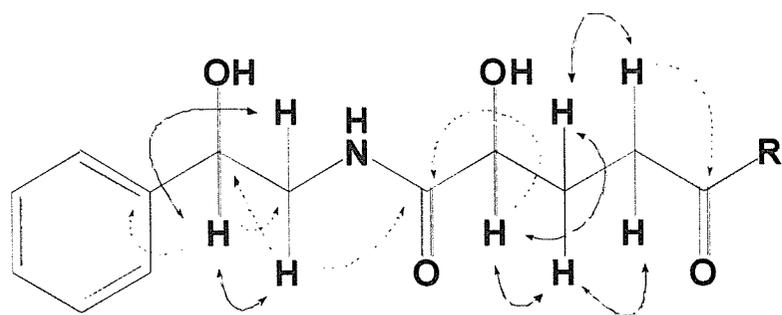


Table 1



COSY \longleftrightarrow
 HMBC $\cdots\cdots\cdots$

☒ 2

分担研究課題 「専ら医薬品」の分析に関する研究
ーコケモモヨウの成分分析ー

分担研究者 市瀬 浩志 武蔵野大学薬学研究所・薬学部 教授

研究要旨 専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リストに掲載されているコケモモヨウの使用を標榜する欧州市場品について、アルブチンを指標成分として HPLC による定量分析を行ったところ、アルブチン含量は 4.6% となり、類似植物を基原とする生薬ウワウルシの日本薬局方規定含有量（7.0% 以上）には満たないことが明らかとなった。

協力研究者

田口 貴章 武蔵野大学薬学研究所・薬学部
助手

A. 研究目的

コケモモ (*Vaccinium vitix-idaea* L.) はツツジ科スノキ属の常緑の小低木で、北半球の寒帯に広く分布する。1938 年、国際情勢が悪化し生薬ウワウルシの基原植物であるクマコケモモ (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel) が入手困難になった際、その代用としてコケモモが用いられた。

現在日本では、コケモモは日本薬局方に未収載であり、「コケモモヨウ」として専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リストに掲載されており、平成 15 年度の調査研究では、評価基準 D（安全性に関するデータが認められないため、現在のところ判断データがないと考えられる）となっている。本研究では、コケモモヨウの市場品に指標成分がどの程度含まれているのか検討することを目的とした。

B. 研究方法

試料及び試薬 コケモモヨウ市場品は、平成

15 年度本研究分担研究課題「諸外国における未承認医薬品等に関する研究ー欧州におけるボーターライン製品の取扱い状況に関する調査研究ー」の一環としてチェコ共和国にて買い上げ調査されたものを使用した。抽出成分の比較対照としてウワウルシ（ウチダ和漢薬製）を、指標品としてアルブチン（SIGMA 製）及び没食子酸（和光純薬製）を用いた。

分析試料の調製方法 コケモモヨウをミルサーで破碎し、得られた粉末のうち 0.522g をコーニング・チューブに移した。チューブに水 40 ml を加え室温で 30 分間転倒混和した後、10,000 rpm (11,900xg) で 5 分間遠心し、上清を別の容器に移した。遠心後残留物に水 40 ml を加え、再び室温で 30 分間転倒混和した。10,000 rpm (11,900xg) で 5 分間遠心し、上清を先の抽出液に加え、さらに水を加えて 100ml とした。ウワウルシについても、粉末 0.517g を用いて同様の操作を行い、抽出液 100ml を得た。2 種の抽出液をそれぞれ 200 μ l ずつコスモスピンフィルター H に移し、遠心ろ過したものを HPLC 分析用サンプルとした。また、指標品であるアルブチンおよび没食子酸は水に溶解し、最終濃度が

それぞれ 0.6 mg/ml、0.125 mg/ml になるように調製した。

TLC 分析方法 薄層板 Silica gel 60WF₂₅₄ (MERCK 製) を用い、クロロホルム/エタノール/ギ酸 = 5/4/1 で展開した。紫外線 254nm 及び 356nm を照射し観察した後、塩化鉄 (III) 試薬 (JP14 準拠) を噴霧した。

HPLC 分析方法 HPLC システム : Waters 600E マルチソルヴェントシステム (HPLC、Waters 2996 フォトダイオードディテクター設置)、解析ソフトウェア : Empower、カラム : ナカライテスク製 COSMOSIL 5C₁₈-PAQ 4.6 x 150 mm (4.6 x 10 mm ガードカラム付)、カラム温度 : 40 度、移動相 : A: 0.5% 酢酸水溶液、B: 0.5% 酢酸含有メタノール、溶離グラディエント(%B) : 0-7 min (5 %), 7-22 min (5-100 %), 22-27 min (100 %), 27-30 min (100-5 %)、流速 : 1.0 ml/min、データ収集波長 : 240-400 nm、クロマトグラムは 280 nm で描画。

C. 研究成果

抽出条件の検討 かつてウワウルシの代用にココモモが代用されたことがあることから、局方 (14JP) に記載されているウワウルシの成分含量測定法に準じて抽出を行った。抽出液の色は、ウワウルシが淡黄色、コケモモヨウが淡褐色であった。

TLC 分析 両サンプルともに、紫外線 254nm 照射下強い吸収スポットを与える成分が含まれ、塩化鉄 (III) 試薬試験陽性であった (図 1)。これらのスポットの下端はアルブチンのスポットと同程度の Rf 値になるので、アルブチンは主要成分としてウワウルシ、コケモモヨウの両方に含まれていることが示唆された。

HPLC 分析 HPLC 条件は、局方 (14JP) 記載の条件、すなわち、アルブチン、ヒドロキノン、没食子酸の順に溶出する ODS カラムを用い、水/メタノール/0.1mol/L 塩酸試液混液 (94 : 5 : 1) を移動相とするという条件を修正して利用した。この条件下、アルブチンは保持時間 3.9 分に、没食子酸は 6.4 分に検出されることを確認した (図 2)。

ウワウルシ抽出液を分析したところ、保持時間 3.9 分にアルブチンのピーク、6.4 分に没食子酸のピークが検出された。ピーク面積から、ウワウルシ抽出液中のアルブチンの濃度は 0.43 mg/ml (原生薬に対する含有率は 8.3% で、使用した材料は局方規定を満たしていることが確認された)、没食子酸の濃度は 25.9 µg/ml と算出された。両ピークの間には保持時間 5.5 分のピークが確認され、その吸収スペクトル (極大吸収波長 289nm) からヒドロキノンであることが示唆された。また、保持時間 14 分から 22 分にかけて多くのピークが検出された。TLC 分析結果を併せて考えると、ここにはポリフェノール成分が含まれていると推測される (図 3)。

一方コケモモヨウ抽出液からは、アルブチンのピークを検出できたものの、没食子酸は trace 量 (約 4 µg/ml) しか検出できなかった。抽出液中のアルブチン濃度は 0.24 mg/ml (原料に対する含有率は 4.6%) と算出された。またウワウルシ同様、保持時間 14 分から 22 分の間に多数のピークが検出され、これらにはポリフェノール成分が含まれていることが TLC 分析結果から予想されるが、その化合物のピークパターンはウワウルシのものとは異なり、複雑であった (図 4)。

D. 考察

ココモモヨウの市場品から、指標成分であるアルブチンを検出することができた。HPLC 分析で得られたクロマトグラムから、市場品のコケモモヨウは指標成分を十分に含む製品であ

る言える。

コケモモヨウは、一時ウワウルシの代用品として用いられた経緯があるが、コケモモヨウのアルブチン含有量はウワウルシに比べて少なく、また没食子酸やヒドロキノンも微量しか含まないことが判明した。

E. 結論

専ら医薬品として使用される成分本質（原料リスト）に掲載されるココモモヨウの使用を標榜する欧州市場製品について、アルブチンを指標成分として TLC 及び HPLC 分析を行い、指標成分が含まれていることを確認した。

F. 参考文献

1. 第十四改正日本薬局方一条文と解釈—日本薬局方解説書編集委員会編（廣川書店）平成 13 年
2. 日本薬草全書、水野瑞夫監修、田中俊弘編集（新日本法規出版）平成 7 年

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

I. 知的所有権の取得状況

なし

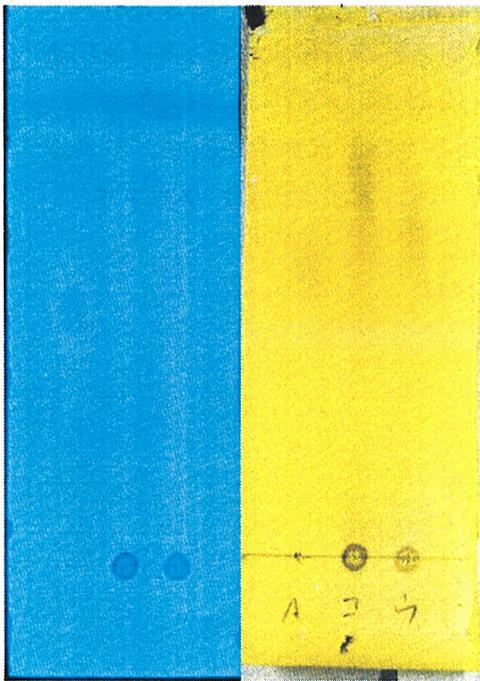


図1 TLC分析結果
 左：紫外線 254 nm 照射、右：塩化鉄試薬 (III) 噴霧。
 サンプルは、左からアルブチン、コケモモヨウ抽出液、
 ウワウルシ抽出液。

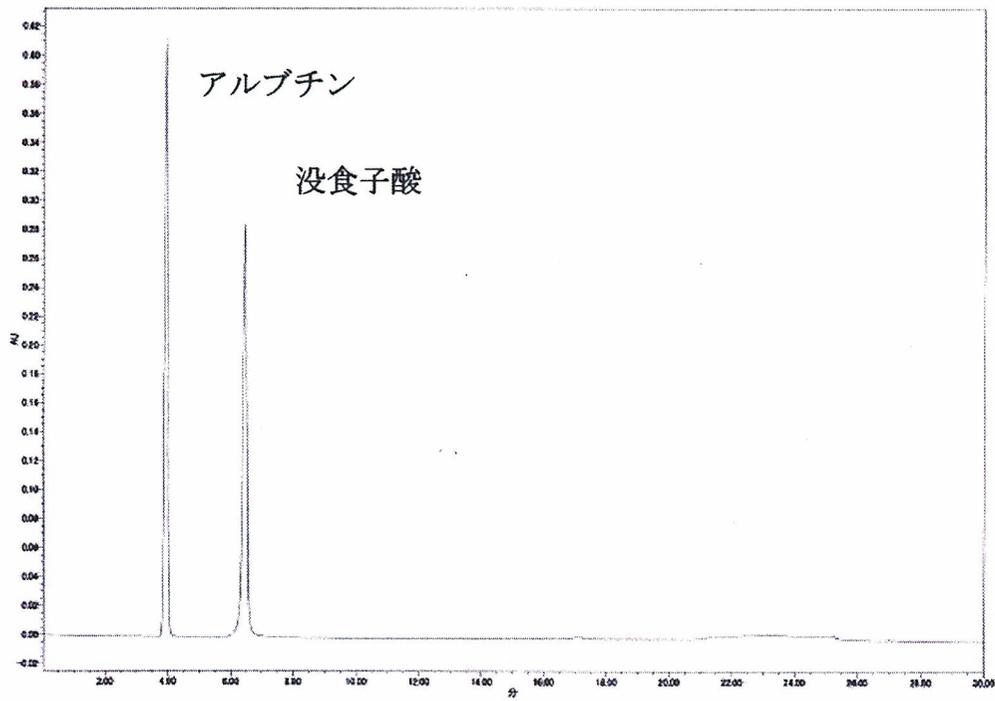


図2 指標成分（アルブチン及び没食子酸）の分析結果（284 nm のクロマトグラム）

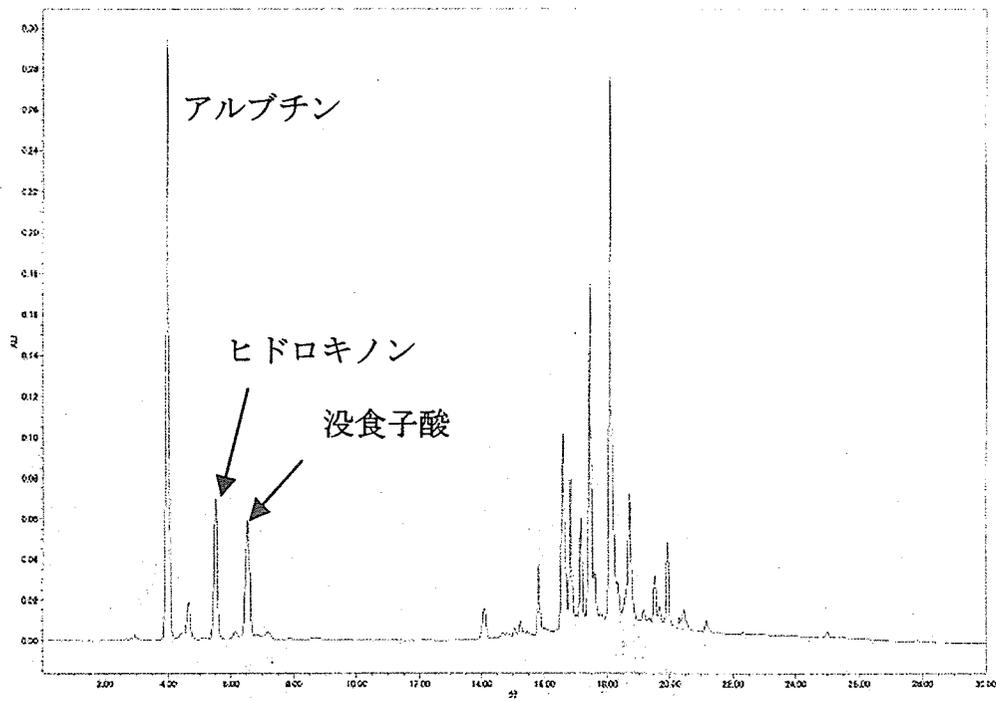


図3 ウラウルシ抽出液の分析結果 (284 nm のクロマトグラム)

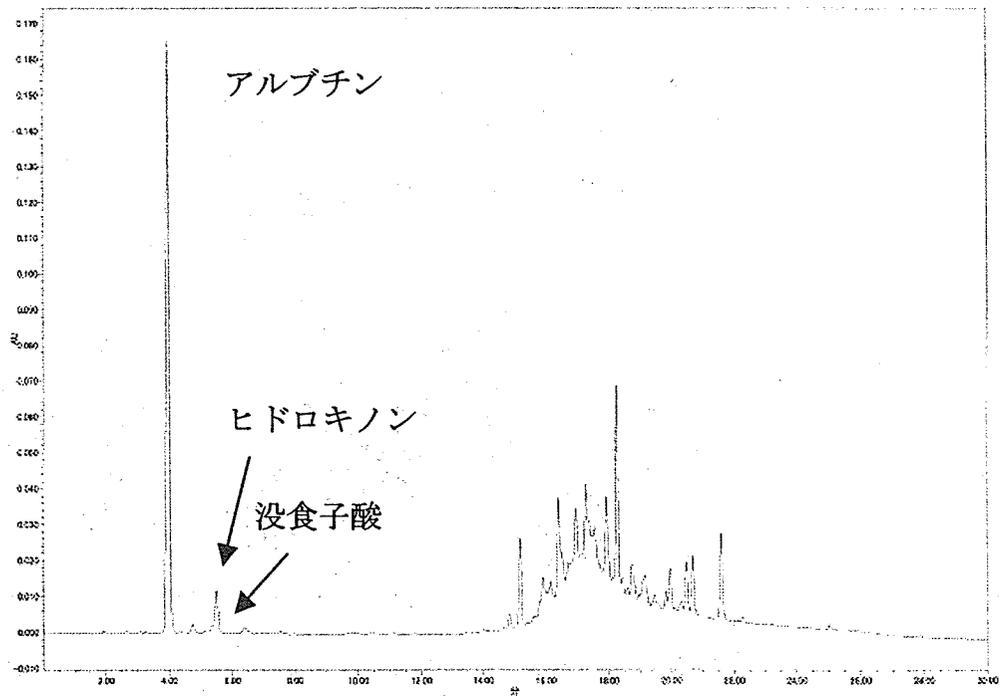


図4 コケモモヨウ抽出液の分析結果 (284 nm のクロマトグラム)

分担研究課題 「専ら医薬品」の分析に関する研究

－ハマメリスヨウのタンニン関連成分の分析－

分担研究者 市瀬 浩志 武蔵野大学薬学研究所・薬学部 教授

研究要旨 専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リストに掲載されているハマメリスヨウの使用を標榜する欧州市場品について、ハマメリタンニン及びその分解物である没食子酸を指標成分としてHPLC、LC/MSによる分析を行い、薬草茶および抽出液市場品に両指標成分を確認した。

協力研究者 田口貴章 武蔵野大学薬学研究所・薬学部 助手

A. 研究目的

アメリカマンサク (*Hamamelis verigniana* L., 英名 witch hazel) はマンサク科マンサク属の落葉小高木で、その葉にはハマメリタンニンが主要タンニンと含まれる。そのポリフェノール類としての抗酸化作用、抗菌作用、抗紫外線吸収作用が注目され、「ハマメリスヨウ」として薬用茶、化粧水等に欧米を中心に利用されてきた西洋ハーブである。

現在日本では、「ハマメリスヨウ」として「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に掲載されており、昨年度の調査研究では評価基準E（医薬品としての使用基準が乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となり得ると考えられる）となった。

昨年度は、ハマメリスヨウを含有する市場品について指標成分がどの程度配合されているのかを、TLC・HPLCにより分析した。本年度はさらにLC-MSによる分析を行い、指標成分の有無、含有量についても検討することを目的とした。

B. 研究方法

試料及び試薬 全て昨年度と同様、以下の品目（商品形態・購入国）を用いた：市場品#7（薬草茶、チェコ）；市場品#8（薬草茶、フランス）；市場品#9（丸剤5CH、スイス）；市場品#10（坐剤、スイス）；市場品#11（薬草粉末のカプセル剤、フランス）；市場品#12（抽出液、フランス）；市場品#13（ローション、スイス）。指標品として、市販の没食子酸（和光純薬製）とハマメリタンニン（EXTRASYNHESESE 製）を用いた。

分析試料の調製方法 昨年度の方法に準じて行った。

LC-MS 分析方法 HPLC システム：Waters 2795 セパレーションモジュール（HPLC、Waters 2996 フォトダイオードディテクター設置）、Waters LCT Premier（TOF-MS）、解析ソフトウェア：Mass Lynx、カラム：ナカライテスク製 COSMOSIL 5C₁₈-PAQ 4.6 x 150 mm（4.6 x 10 mm ガードカラム付）、カラム温度：40 度、移動相：A: 0.1% ギ酸水溶液、B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル、溶離グラディエント(%B)：0-8 min (5%), 8-16 min (5-90%), 16-19 min (90%), 19-22 min (90-5%)、流速：0.8 ml/min、データ収集波

長:240-500 nm、MS 検出条件:Polarity: ES- / ES+, Analyzer: V Mode, Capillary: 1800 V, Sample Cone: 40 V, Desolvation Temp: 200 °C, Source Temp: 100 °C, Cone Gas Flow: 50.0, Desolvation Gas Flow: 700.0, Lock Spray: Leucine Enkepharine。

C. 研究成果

昨年度の報告のとおり、HPLC 分析の結果、#7 (薬草茶)、#8 (薬草茶)、#11 (薬草粉末カプセル剤)、#12 (抽出液)において没食子酸とハマメリタンニンが検出された。一方#9 (丸剤)、#10 (坐剤)、#13 (ローション)には、両指標成分共に検出されなかった。

続いて、LC/TOF-MS により上記サンプルを分析した。指標成分である没食子酸(MW = 170.123)は、negative ion の total ion chromatogram (TIC)で 6.0 min に $m/z = 169.019$ ($[M-H]^-$)のピークを、ハマメリタンニン (MW = 484.085)は negative ion の TIC 上 12.9 min に $m/z = 483.099$ ($[M-H]^-$)のピーク、及び positive ion の TIC 上 12.9 min に $m/z = 467.067$ ($[M-H_2O+H]^+$)のピークを与えることが判明した。さらに、両指標成分の $[M-H]$ に相当する値でクロマトグラムを描画すると、それぞれ単一のピークを与えた(図1)。

続いて、各市場品から得た抽出液を同条件で分析した。HPLC で両指標成分を検出できた#7、#8、#11、#12 については、negative ion の TIC から両指標成分の $[M-H]$ に相当する m/z (没食子酸は 169.0、ハマメリタンニンは 483.1) を抽出しクロマトグラムを描画した結果、標準試料と同様の保持時間・MS スペクトルを示すピークを検出できた(図2~5)。このうち#7、#8、#11 については、UV254nm のクロマトグラム、negative・positive の TIC でハマメリタンニンのピークを確認することは困難であったことから、ハマメリタンニン含有量は低いと考えられる。以上、#7 (薬草茶)、#8 (薬草茶)、#11

(薬草粉末カプセル剤)、#12 (抽出液)が両指標成分を含んでいることを確認した。

HPLC で両指標成分を検出できなかった#9 (丸剤)、#10 (坐剤)、#13 (ローション)については、感度がよいとされる LC/TOF-MS 分析でも両成分を検出することはできなかった(図6)。しかしながら、市場品#10 からは未知の peak X、X'を、市場品#13 からは peak Y、Z を、両指標成分の代わりに検出した。このうち市場品#10 に含まれる peak X'の positive な MS スペクトルで $m/z = 341.092$ を、negative で $m/z = 339.095$ を検出したことから、その分子量は 340.1 と推測された(図7)。Peak X、Y、Z については、それぞれ positive、negative の MS スペクトルを得られたものの、分子量の推測には至らなかった(図7)。なお、昨年度の報告では市場品#9 から peak W を検出したが、今年度は検出できなかった。

D. 考察

昨年度の TLC 分析、HPLC 分析から両指標成分の含有が強く示唆された薬草茶(#7、#8)、薬草粉末カプセル剤(#11)、抽出液(#12)については、保持時間、MS スペクトルから両指標成分の存在を確認できた。ただし、抽出液(#12)以外の4品については、両指標成分とも主成分とは言いがたい程度の含有量であることが示唆された。商品流通過程や不適切な商品の保管による品質低下の可能性が考えられることから、製品化されて間もない市場品の指標成分含有量との比較が必要と思われる。

HPLC 分析で指標成分の含有を確かめられなかった丸剤(#9)、坐剤(#10)、ローション(#13)については、高感度の TOF-MS をもってしても指標成分を確認することができなかった。これらの市場品については、製剤化にあたり多量の基材が使用されるため没食子酸やハマメリタンニンの濃度が低下していること