

年10月31日、平成20年1月15日、平成20年2月26日の6回開催された。WG会議では、漢方処方エキスとして、牛車腎気丸エキス、真武湯エキス、八味地黄丸エキス、六君子湯エキス、当帰芍薬散エキス、釣藤散エキス、大建中湯エキス、麦門冬湯エキス、十全大補湯エキス、柴朴湯エキス、柴胡桂枝湯エキスの11エキス及び、これらの処方エキスに使用されるが局方規格のない、コウイ、コウベイ等の生薬並びにこれらの処方エキスの確認試験等に使用する薄層クロマトグラフィー用試薬ゴシツ、アトラクチロジン、ブシモノエステルアルカロイド、4'-グルコシル-5-O-メチルピサミノール、フラエルプトリン、ノダケニン等の規格について具体的な実験結果を基に、試験方法、規格値等の検討が行われた。本研究の成果を元にして、日本薬局方原案審議委員会生薬等（A及びB）委員会で議論が行われ、最終的に、第15改正日本薬局方第二追補では、牛車腎気丸エキス、真武湯エキス、八味地黄丸エキスの3エキスについて原案が完成し、収載予定となった。さらに、残りのエキスについても第16改正日本薬局方収載を目指し、引き続き検討が行われている。なお、本研究は、当研究課題「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」の中の別な分担研究課題「理化学試験用標準生薬に関する研究」と密接に関連しており、牛車腎気丸エキスの確認試験で使用する薄層クロマトグラフィー用試薬ゴシツは、「理化学試験用標準生薬に関する研究」で検討されたものを使用することになっている。

D. 結論

第15改正日本薬局方第二追補では、本研究課題での報告を元にして、牛車腎気丸エキス、真武湯エキス、八味地黄丸エキスの3エキスにつ

いて原案が完成し、収載予定となった。

健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

E. 研究発表

日本薬局方フォーラム17(1)に、牛車腎気丸エキス、真武湯エキス、八味地黄丸エキスの原案が提示されることになっている。

分担研究報告書

分担研究課題 漢方処方の使用実態調査研究，生薬の品質確保に関する研究，

漢方処方の同等性並びに品質確保に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

タンジン及びトウジンの確認試験法に関する研究

研究要旨 生薬の品質確保に関する研究の一環として，日本薬局方未収載のタンジン及びトウジンについて，有効な確認試験法の確立を目的に検討を行った。確認試験には，指標成分を分析することで簡便に品質判断が可能な薄層クロマトグラフ（TLC）法を選択し，クリーンアナリシスを考慮した分析条件を検討した。タンジンについて，振とう抽出により調製した試料溶液をシリカゲルプレートにスポットし，ヘキサン/酢酸エチル混液及びヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸混液の溶媒系でそれぞれ展開後，判別可能な2スポット（指標成分）を検出することができた。次にその指標成分の単離，精製を試み，単離した化合物を各種機器分析データに基づき構造解析した。その結果，カフェ酸4量体 lithospermic acid B 及びアピエタン型ジテルペン類 tanshinone II_A とそれぞれ同定した。本標品を指標にした試験法をタンジン市場品3検体で試験した結果，全ての試料で再現性よくスポットを検出し，確認試験としての有効性が示唆された。一方，トウジンの振とう抽出物について，同様にTLCによる確認試験を検討した結果，酢酸エチル/メタノール/水混液で展開し，希硫酸試液噴霧後，加熱することで鮮明なスポットを検出することができた。本スポットの単離，構造解析を試みた結果，単糖類 fructose であると同定した。振とう抽出物のみでさらに有効な指標成分の探索を，種々の検出法を適用して試みたが，顕著なスポットは確認できなかった。そこで，酸分解により得られた分画物についても評価した結果，紫外線検出により判別可能なスポットを検出することができ，構造解析の結果，5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde と同定した。

研究協力者

天倉 吉章 松山大学薬学部 准教授
好村 守生 松山大学薬学部 助教
吉田 隆志 松山大学薬学部 教授
川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部 室長

A. 研究目的

タンジン（丹参）は，中国の山野に広く自生するシソ科の多年草 *Salvia miltiorrhiza* BUNGE の根を基原とする生薬である。「神農本草経」の上品に収載されており，中国では古くから血をめぐらす効能があるとされ，去痰，排膿，止痛薬として婦人病などに用いられる^{1, 2)}。一方，ト

ウジン（党参）はキキョウ科ヒカゲノツルニンジン *Codonopsis pilosula* NANNF. やトウジン *C. tangshen* OLIV. の根を乾燥したもので、強壯、健胃、鎮咳去痰作用などを有する。また漢方で人參の代用とされる^{1,2)}。いずれも日本薬局方に未収載の生薬であり、生薬の品質確保のためにも確認試験法の設定が望まれる。

生薬の基準化の一つとして、指標成分を定義し、それに基づき品質評価する方法が国際的にも標準となりつつある。指標成分を信頼性及び簡便性の観点から分析評価する方法としては、高価な機器を必要とせず、簡便に品質判断が可能な薄層クロマトグラフィー（TLC）を用いた方法が有効である。タンジンについては、香港の試験法で TLC 法を用いた確認試験が採用されている³⁾。その方法では、2つの指標成分（tanshinone II_A及び salvianolic acid B）についてそれぞれ試料溶液を調製する必要があり、一方の調製は振とう抽出に1時間を要し、他方は沸騰水浴中で抽出する必要がある。加えて、操作途中に pH 調整が必要など、前処理に時間を要し、作業が煩雑に感じる。また展開溶媒にクロロホルムを使用しており、クリーンアナリシスの観点からも改良法の提案が望まれる。中華人民共和国（中国）薬典においても TLC 試験法が採用され⁴⁾、同様に抽出時間、操作性、クリーンアナリシス（ベンゼン、クロロホルムを展開溶媒として使用）の観点からも改良法の提案が望まれる。

トウジンについては、中国薬典に TLC 試験法が採用されている⁵⁾。本法では、抽出時間に30分を要し、カートリッジ処理を有するなど、前処理に煩雑性が感じられる。また指標物質が明確にされていない。

そこで本研究では、タンジン及びトウジンの TLC 指標成分を明らかにし、より簡便な TLC による確認試験法の提案を目的に検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料、試薬及び装置

試料として、タンジン、トウジンの市場品それぞれ各3品目（A：ウチダ和漢薬、B：栃本天海堂、C：松浦薬業）を用いた（図1）。分離、精製に使用したカラム充填剤は、Diaion HP-20、MCI-GEL CHP20P（いずれも三菱化学）で、分取 TLC には、Silica gel 60F₂₅₄（PLC プレート、1.0 mm、20×20 cm、メルク）を使用した。その他の試薬は全て特級または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

NMR 測定は Brucker AVANCE500（ブルカー・バイオスピン社）を使用し、測定溶媒として CDCl₃、CD₃OD 及び acetone-*d*₆ を用いた（内部標準として TMS）。MS 測定は micrOTOF-Q 質量分析装置（ブルカー・ダルトニクス社）でアセトニトリルまたはメタノールを溶媒として測定した。逆相 HPLC は Shimadzu Prominence システム（島津製作所）を使用した。HPLC 条件を以下に記す。カラム：L-column ODS（2.1 I.D. × 150 mm）（化学物質評価研究機構）、カラム温度：40° C、流速：0.2 mL/min、測定波長：200-400 nm、移動相：(A) 5%酢酸水溶液及び (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A)：0→30 min (0→50%)、30→35 min (50→85%)、35→40 min (85%)、40→50 min (85→90%)、50→55 min (90→100%)、55→60 min (100%)]. TLC は Silica gel 60F₂₅₄ プレート（メルク）を使用し、検出は紫外線（UV）照射（254、365 nm）、塩化鉄（III）・メタノール試液、希硫酸試液及びバニリン・硫酸試液（噴霧後加熱）

(いずれも日本薬局方に準拠して調製)により行った。

2. 試料の抽出、分画及び指標成分の単離

含有成分の分画、精製用の抽出には、極性の大小を含む広い範囲の化合物に適用させるため、50%含水アルコールにより抽出を行った。

(2-1) タンジン：タンジン試料 A (500 g) を 50%含水メタノール (2.5 L×2) 中でホモジナイズ抽出し、ろ過後、ろ液を濃縮し、50%含水メタノール抽出物を得た。これに酢酸エチル (2 L) を加えて分配抽出後、酢酸エチル分画物 (1.29 g) 及び水分画物 (467.6 g) を得た。水分画物 (450 g) の Diaion HP-20 (三菱化学) カラムクロマトによる 40%メタノール溶出画分について、さらに MCI-gel CHP20P カラムクロマトにより精製を行い、水溶出部から化合物 1 (lithospermic acid B) [1.8 g (Na 塩として), (=スポット①)] を単離した。一方、酢酸エチル分画物 (1 g) について、分取 TLC [シリカゲル, *n*-ヘキサン/アセトン (8:2), UV 検出 (254 nm)] を繰り返し、化合物 2 (tanshinone II_A) [32 mg, (=スポット②)] を単離した。

TLC 用の試料抽出には、メタノール、50%含水メタノール、アセトン、酢酸エチル、エタノールを用い、同一試料 1 g を各溶媒 5 mL 中、室温条件下で 5 分間それぞれ振とうし、自然ろ過後、得られた各ろ液を試料溶液とし、試料抽出溶媒を検討した。また抽出温度の比較検討には、還流抽出 (10 分間) して得られた試料溶液を用いた。

(2-2) トウジン：トウジン試料 A (300 g) を

50%含水メタノール (1.5 L×2) 中でホモジナイズ抽出し、ろ過後、ろ液を濃縮し、50%含水メタノール抽出物を得た。これに酢酸エチル (1 L) を加えて分配抽出後、酢酸エチル分画物 (1 g) 及び水分画物 (105 g) を得た。水分画物 (1 g) について、分取 TLC [シリカゲル, 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1), 希硫酸試液噴霧後、加熱] を行い、化合物 3 (fructose) [20 mg, (=スポット③)] を単離した。

TLC 用の試料抽出には、ヘキサン、アセトン、50%含水アセトン、メタノール、50%含水メタノール、エタノール、水、酢酸エチルを用い、同一試料 1 g を各溶媒 5 mL 中、室温条件下で 5 分間それぞれ振とうし、自然ろ過後、得られた各ろ液を試料溶液とし、試料抽出溶媒を検討した。また抽出温度の比較検討には、還流抽出 (10 分間) して得られた試料溶液を用いた。

3. TLC 条件

(3-1) タンジン：TLC 分析条件を以下に示す。

[化合物 1 (lithospermic acid B) (=スポット①)]

担体：Silica gel 60 F₂₅₄ (TLC アルミニウムシート)

展開溶媒：*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸混液 (5:15:1:2)

検出：UV 照射 (254 nm)

塩化鉄(III)・メタノール試液噴霧

[化合物 2 (tanshinone II_A) (=スポット②)]

担体：Silica gel 60 F₂₅₄ (TLC アルミニウムシート)

展開溶媒：*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液 (3:1)

検出：UV 照射 (254 nm)

希硫酸試液噴霧後、加熱

(3-2) トウジン: TLC 分析条件を以下に示す.

[化合物 3 (fructose) (=スポットC)]

担体: Silica gel 60 F₂₅₄ (TLC アルミニウムシート)

展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液 (7:3:1)

検出: 希硫酸試液噴霧

4. トウジンの酸分解画分の調製

トウジン試料 A (1 g) に 1 mol/L 塩酸 (5 mL) 及び水 (5 mL) を加えて 10 分間還流し、冷後、吸引ろ過した。ろ液に酢酸エチル (10 mL×3) を加え、分液ロートで分配後、酢酸エチル層を減圧濃縮したものをトウジンの酸分解画分とした。

5. トウジンの酸加水分解物の単離

トウジンの酸分解画分 (500 mg) を MCI-gel CHP20P カラムクロマトにより精製を行い、水溶出部から酸分解物 [化合物 4 (5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde)] (55 mg) を単離した。

<倫理面への配慮>本研究は、ヒト、動物を使用しない研究であり、倫理面での配慮は必要ないものとする。

C. 研究結果

1. TLC 条件の検討

(1) タンジン

(1-1) 予備試験及び抽出条件の検討: まず含有成分について文献調査を行った結果、特有成分としてカフェ酸誘導体及びアビエタン型ジテル

ペン類の含有が示唆された⁶⁻¹⁰⁾。そこで、それら成分の検出のため、まず UV 照射 (254, 365 nm) による検出を評価した。試料 A から C の 3 試料について TLC を展開し、UV 検出したところ、指標となり得るスポット (スポットA, B) が示された。また逆相 HPLC による分析を行った結果、スポットA, B に相当する主ピークが認められた。逆相 HPLC の結果を図 2 に示す。

これらを指標に、TLC 用の試料抽出溶媒について検討した結果、スポットA はメタノールまたは 50%メタノール抽出で効果的に検出された。一方、スポットB は、含水メタノール以外で検出可であった。それゆえ、メタノールで抽出することで、スポットA 及びB をいずれも検出することができ、抽出溶媒として適当であることが示唆された。また加熱による抽出効率の検討では、加熱処理を加えても検出に差は認められなかった。図 3-1 に抽出溶媒を検討した TLC の結果を示す。

以上の結果から、より簡便な室温下で振とうする方法により抽出可能であることが示された。また抽出溶媒は、汎用性、コスト面を考慮してもメタノールが適当と考える。

(1-2) 展開溶媒: クリーンアナリシスの観点から、クロロホルムなどの塩素系溶媒やベンゼンの使用を避けた溶媒系を検討した。まず 2 スポットのうち、スポットA を有効に検出できる溶媒系を検討した。その結果、*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸混液 (5:15:1:2) で展開後、UV 検出により、R_f 値 0.5 付近にスポットを検出することができた。本スポットについてはさらに塩化鉄 (III)・メタノール試液を噴霧すると青緑色に呈色した。

次にスポット⑥について最適な TLC 展開溶媒を検討した。その結果、*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液 (3:1) で展開後、UV 検出により、*R_f* 値 0.5 付近にスポットを検出することができた。本スポットについては、さらに希硫酸試液を噴霧し、加熱後、紫色に呈色した。図 3-2 に本方法による試料 A~C の TLC の結果を示す。

(2) トウジン

(2-1) 予備試験及び抽出条件の検討：タンジンと比較して含有成分に関する報告は少ないが、フェノール性配糖体、ポリアセチレン配糖体、セスキテルペン類、アルカロイドなどがこれまで報告されている¹²⁻¹⁶⁾。そのため、まず UV 検出 (254, 365 nm) 及び希硫酸試液 (噴霧後、加熱) による呈色を検討した。試料 A から C の 3 試料について TLC を展開し、各検出法により評価したところ、UV 検出では指標となり得る明確なスポットが観察されなかった。一方、希硫酸試液噴霧後、加熱した場合、判別可能な 1 スポット (スポット③) が示された。逆相 HPLC による分析を行った結果、UV 吸収領域に若干のピークが認められたが、その強度は弱く、含有量が少ないことが示唆された。逆相 HPLC の結果を図 4 に示す。

これらを指標に、TLC 用の試料抽出溶媒について検討した結果、*n*-ヘキサン、酢酸エチル以外はスポット③を検出した (溶媒検討についてはバニリン・硫酸試液で検出)。また還流抽出及び室温振とう抽出のいずれにおいても、目的のスポット③は明確に観察できた。図 5-1 にそれら TLC の結果を示す。一方で、還流抽出物においても UV 検出で明瞭なスポットは認められなかった。

以上の結果から、より簡便な室温中で振とう

する方法でスポット③が検出可能であることが示された。また抽出溶媒は、含水になるとスポットが大きくなりすぎる傾向があるため、操作性、汎用性、処理面なども考慮してメタノールが適当と考える。

(2-2) 展開溶媒：タンジンと同様に、クリーンアナリシスを考慮した溶媒系を検討した。スポット③を有効に検出する TLC 展開溶媒について条件検討した結果、酢酸エチル/メタノール/水混液 (7:3:1) で展開後、希硫酸試液を噴霧し、加熱後、*R_f* 値 0.5 付近に判別可能な濃緑色のスポットを検出することができた。図 5-2 に本方法による試料 A~C の TLC の結果を示す。

2. 指標物質の同定

TLC 分析で検出できた指標スポットについて、単離、同定を目的に、各種カラムクロマトによる分離精製を行い、タンジンから指標成分となり得る 2 スポット (スポット④, ⑤)、トウジンから 1 スポット (スポット③) を単離することができた。

スポット④について、MS 及び NMR スペクトルを測定し、諸データを詳細に解析したところ、カフェ酸 4 量体 lithospermic acid B の文献データ¹⁷⁾とよく一致したが、高分解能 MS の結果から、その Na 塩であることが示された。本化合物については、過去に Mg 塩、アンモニウムカリウム塩として単離された報告がある¹⁷⁾。そこで本化合物の水溶液を脱塩処理したところ、lithospermic acid B を得ることができた。また立体構造について確認するため、CD スペクトルを測定した。その結果、文献値^{17), 18)}とよく一致したため、スポット④は lithospermic acid B

(化合物 1) であると同定した。

次にスポット⑧について、MS 及び NMR スペクトルを測定し、諸データを詳細に解析したところ、アビエタン形ジテルペン tanshinone II_A の文献データ⁶⁾とよく一致した。また市販の標品と分析データを直接比較したところよく一致した。従って、スポット⑧は tanshinone II_A (化合物 2) であると同定した。

これら 2 化合物は、タンジンの主要成分として多くの報告があり、また中国薬典及び香港の試験法にもタンジンの確認試験における指標物質として掲載されている。以下に単離、同定した化合物 1, 2 の分析データを示す。

Lithospermic acid B (化合物 1) :

NMR データ: ¹H-NMR (500 MHz, acetone-*d*₆) d: 2.90 (2H, dd, *J*=9.5, 14.5 Hz, H-α', α''), 3.15 (2H, dd, *J*=4.5, 14.5 Hz, H-α', α''), 4.47 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-β), 5.20 (2H, m, H-β'', β'''), 5.88 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-α), 6.28 (1H, d, *J*=18 Hz, H-β'), 6.44 (1H, dd, *J*=2, 8 Hz, H-6), 6.64-6.84 (m, overlap), 6.90 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 7.25 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6'), 7.64 (1H, d, *J*=16 Hz, H-α').
¹³C-NMR (126 MHz, acetone-*d*₆) d: 37.4, 37.0 (α'', α'''), 57.0 (β), 74.8, 73.7, (β'', β'''), 87.5 (α), 113.2, 116.1 (×3), 117.2, 117.3, 118.2, 118.3, 121.6, 121.7, 124.5, 126.0, 128.6, 129.0, 133.3, 142.8, 144.4, 147.7 (×2), 145.5 (×2), 146.0, 146.2, 148.5 (C=C), 166.5, 170.6, 171.1, 171.5 (COO).

MS データ: HR-ESI-MS *m/z* 717.1449 ([M-H]⁻, Calcd for C₃₆H₂₉O₁₆-H: 717.1456).

CD データ (MeOH) [θ] (nm): -27565 (207),

+9580 (234), +18405 (252), -458 (278), +5902 (295).

Sodium lithospermate B :

NMR データ: ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) d: 2.83 (1H, dd, *J*=11, 14.5 Hz), 2.93 (1H, dd, *J*=9.5, 14.5 Hz) [H-α'', α'''], 3.14 (2H, brd, *J*=14.5, H-α'', α'''), 4.31 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-β), 5.04 (2H, m, H-β'', β'''), 5.68 (1H, brs, H-α), 6.19 (1H, d, *J*=16 Hz, H-β'), 6.42 (1H, brd, *J*=8 Hz), 6.59-6.78 (m, overlap), 7.08 (1H, d, *J*=8), 7.46 (1H, d, *J*=16, H-α').
¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) d: 38.3, 38.4 (C-α'', α'''), 57.8 (C-β), 77.6, 78.3 (C-β'', β'''), 88.2 (C-α), 113.3, 116.3, 116.4, 116.5, 117.3, 117.5 (C-β'), 117.6, 118.2, 118.4, 121.6, 121.9, 122.0, 125.1, 126.5, 130.4, 130.9, 134.0, 143.2 (C-α'), 144.8, 144.9, 146.0, 146.1, 146.5, 146.6, 149.0 (C=C), 168.9, 172.7, 177.6, 178.1 (COO).

MS データ: HR-ESI-MS 1Na 塩 *m/z* 739.1272 ([M-H]⁻, Calcd for C₃₆H₂₉O₁₆Na-H: 739.1275), 2Na 塩 761.1074 ([M-H]⁻, Calcd for C₃₆H₃₀O₁₆Na₂-H: 761.1095).

Tanshinone II_A (化合物 2) :

NMR データ: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) d: 1.31 (6H, s, H-18, 19), 1.66 (2H, m, H-3), 1.80 (2H, m, H-2), 2.26 (3H, d, *J*=1.5 Hz, H-17), 3.18 (2H, t, *J*=6, H-1), 7.22 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H-16), 7.55 (1H, d, *J*=8 Hz, H-7), 7.63 (1H, d, *J*=8 Hz, H-6). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) d: 30.0 (C-1), 19.3 (C-2), 38.0 (C-3), 34.8 (C-4), 150.3 (C-5), 133.6 (C-6), 120.4 (C-7), 127.6

(C-8), 126.7 (C-9), 144.6 (C-10), 183.8 (C-11), 175.9 (C-12), 120.1 (C-13), 161.9 (C-14), 121.3 (C-15), 141.4 (C-16), 8.9 (C-17), 32.0 (2C, C-18, 19).

MS データ: HR-ESI-MS m/z 317.1150 ($[M+Na]^+$, Calcd for $C_{19}H_{18}O_3Na$: 317.1154).

トウジンから得たスポット©について, MS 及び NMR スペクトルを測定し, 諸データを詳細に解析したところ, 単糖の fructose の分析データ¹⁹⁾とよく一致した. 市販の試薬を標品とし, 直接比較したところよく対応したため, スポット©は fructose (化合物 3) であると同定した. 以下に単離, 同定した化合物 3 の分析データを示す.

Fructose (β -D-Fructopyranose) (化合物 3):

NMR データ: 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 3.47, 3.65 (each 1H, d, $J=11$ Hz, H-1), 3.61, 4.01 (each 1H, dd, $J=1.5, 12.5$ Hz, H-6), 3.77 (2H, m, H-3, 4), 3.83 (1H, m, H-5). ^{13}C -NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 65.9 (C-1), 99.2 (C-2), 69.4 (C-3), 71.8 (C-4), 71.3 (C-5), 64.5 (C-6).

MS データ: HR-ESI-MS m/z 179.0544 ($[M-H]^-$, Calcd for $C_6H_{11}O_6-H$: 179.0557).

化合物 1~3 の構造式を図 6 に示す.

3. トウジンと他生薬類の TLC 比較

トウジンの TLC 分析において, 明瞭なスポットとして fructose が認められた. 糖類であるが, 一指標成分としての可能性を確認するため, 同一抽出条件で調製した他生薬抽出物の TLC 分析を行った. その結果, 特に同じキキョウ科のキ

キョウ, シヤジンやキキョウ目 (キク科) のソウジュツ, ビヤクジュツに R_f 値が一致したスポットが明瞭に確認された. 図 7 にその結果を示す.

4. トウジン酸分解画分の TLC と分解物の同定

トウジンについては, 各種溶媒における室温抽出, 還流抽出物において, UV 検出により指標となり得る明確なスポットを確認できなかった. また希硫酸試液噴霧で顕著なスポット©は単糖の fructose であった. 図 8 に試料 A~C のメタノール振とう抽出物の TLC 結果 (UV 検出と希硫酸試験噴霧検出の比較) を示す. そこで, さらに指標となり得る成分を明らかにする目的で, 酸処理を行い, その分解物について検討を行った. 1 mol/L 塩酸中で還流して調製した酸分解画分について TLC を行った結果, UV 照射下, 明瞭な 1 スポットを検出することができた. これは希硫酸試液を噴霧後, 加熱することにより青紫色に呈色した. 図 8 にその結果を示す.

このスポットの化合物について, カラムクロマトによる分離精製を行い, 単離した化合物について構造解析した結果, fructose の分解物と見なされる 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (化合物 4) と同定した¹⁹⁾. 以下に単離, 同定した化合物 4 の分析データを示す.

5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde (化合物 4):

NMR データ: 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.38 (1H, brs, OH), 4.57 (2H, s, H-6), 6.40 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-4), 7.13 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), 9.40 (1H, s, H-1). ^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ :

177.9 (C-1), 151.9 (C-2), 123.7 (C-3), 109.9 (C-4), 161.3 (C-5), 57.1 (C-6).

MS データ: HR-ESI-MS m/z 149.0200 ($[M+Na]^+$),
Calcd for $C_6H_6O_3+Na$: 149.0215).

化合物 4 の構造式を図 6 に示す。

D. 考察

タンジンについては、中国薬典収載の確認試験や香港の試験法においても、本研究結果と同様、tanshinone II_A 及び lithospermic acid B (別名: salvianolic acid B) の 2 化合物が TLC 標準品として採用されている。しかし前述のように、試料抽出に還流を伴い、操作に 1 時間を要する。また化合物ごとに異なった抽出が必要で、試料溶液 (抽出物) を 2 種類調製する必要がある。さらに抽出溶媒にはエーテル、展開溶媒にはベンゼン、クロロホルムが採用され、簡便性、クリーンアナリシスの観点からも改良法の提案が望まれる。今回検討した試験法は、室温下で数分間の振とう抽出のみで得られた試料溶液を用い、また同一試料溶液を 2 化合物の試験に使用することができる。いずれも UV 検出で判別可能であるが、それぞれの化合物の特性から、lithospermic acid B については塩化鉄 (III) 試液、tanshinone II_A については希硫酸試液をそれぞれ噴霧することによる呈色から、スポットをさらに確認することができる。Lithospermic acid B はタンジンに高含有であることが報告されており^{6,7)}、今回の結果においても特有成分として同様の結果であった。一方でシソ科 *Salvia* 属の他の植物にも広く含有していることが報告されており^{6,7)}、これのみを指標とした分析では信頼性が確保されない。それゆえ、もう一方の tanshinone II_A も確認することで本

確認試験の信頼性確保に繋がることを示唆される。また、これら 2 化合物を同一プレート上で一度に評価する方法が理想ではあり、それについても追求したが、類似構成成分の重複が観察されたこともあり、本研究ではそれぞれの条件下で展開することとした。

一方、トウジンについてはタンジンと比較し含有成分の報告は少ない、中国薬典では、トウジンの TLC 確認試験法も収載されているが、抽出に 30 分間を要し、また指標成分について明確な記載がない。本研究では、簡便法の提案を目指しており、まず各種溶媒で単なる振とう抽出のみの方法を検討した。その結果、UV 検出では顕著なスポットは認められなかったが、希硫酸試液を噴霧後、加熱すると鮮明なスポットを確認でき、これを fructose と同定した。糖類であることから、その分布の広さが考えられる。そこで本化合物の指標成分としての可能性を追求するため、同一条件で他生薬抽出物における検出行った。その結果、同じキキョウ科のキキョウ、シャジンなどにもスポットが確認されたが、トウジンにおける fructose のスポットは際立って顕著であり、その含有が多いことが示唆された。実際、トウジン末を舐めてみると非常に甘く、その含有の多さが感じられる。このことから、今後、トウジンの漢方における矯味剤としての用途も示唆された。一方で、トウジンはニンジンの代用とされるが、ニンジンにはこのスポットは認められなかった。それゆえ、ニンジンとの判別に使用できることが示された。

トウジンの単なるメタノール振とう抽出物の TLC では、UV 照射でスポットが検出されなかったことから、酸分解物について指標成分の可能性を模索した。その結果、再現性のある 1 スポ

ットをUV検出により確認することができ、これを解析したところ、5-(hydroxymethyl)-2-furaldehydeであった。この化合物はfructoseの酸分解物とみなされる。今回、明らかとなった指標成分は、糖あるいは糖由来の化合物であった。今後の課題として、分析法の信頼性向上のため、さらに二次代謝物を中心にトウジン特有成分を明らかにし、それを簡便に評価できる前処理法及び検出法についての検討が必要とされる。

E. 結論

生薬タンジンのTLCを用いた確認試験法について検討した結果、指標成分としてlithospermic acid B及びtanshinone II_Aを同定した。その分析条件は、メタノールで振とう抽出した試料溶液をスポットしたシリカゲルシートを*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液(3:1)で展開し、UV検出(254 nm)により、*R_f*値0.5付近に明瞭なスポットとして指標成分(tanshinone II_A)を検出し、さらに希硫酸試液噴霧後、加熱により、スポットを確認できることが明らかとなった。また同じ試料溶液をスポットしたシリカゲルシートを*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸(5:15:1:2)で展開し、UV検出(254 nm)により、*R_f*値0.5付近に明瞭なスポットとして指標成分(lithospermic acid B)を検出し、さらに塩化鉄(III)試液噴霧により、スポットを確認できることが明らかとなった。これら結果に基づき、タンジンの確認試験法案を以下のように提案する。

「本品の粉末1.0 gにメタノール5 mLを加え、5分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフ法

により試験を行う。試料溶液5 μLを薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液(3:1)を展開溶液として約10 cm展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長254 nm)を照射するとき、*R_f*値0.5付近に紫色のスポットを認める。このスポットは、希硫酸試液を均等に噴霧後、加熱するとき、紫色を呈する(tanshinone II_A)。

また同じ試料溶液について、同様に薄層板にスポットする。次に*n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸(5:15:1:2)を展開溶媒として約10 cm展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長254 nm)を照射するとき、*R_f*値0.5付近に紫色のスポットを認める。このスポットは、塩化鉄(III)試液を均等に噴霧するとき、青緑色を呈する(lithospermic acid B)。

一方、生薬トウジンのTLCを用いた確認試験法について検討した結果、指標成分としてfructoseが同定された。Fructoseの分析条件は、メタノールで振とう抽出した試料溶液をスポットしたシリカゲルシートを酢酸エチル/メタノール/水混液(7:2:1)で展開し、希硫酸試液を噴霧後、加熱による呈色で、*R_f*値0.5付近に明瞭なスポットとして検出することができた。本研究ではさらに別法を模索するため、トウジンの酸分解画分について検討した。得られた画分をTLC分析したところ、UV検出による1スポットを確認することができ、構造解析した結果、5-(hydroxymethyl)-2-furaldehydeと同定した。今回の結果では、fructoseの検出を指標としたトウジンの確認試験法案を以下のように示す。

「本品の粉末1.0 gにメタノール5 mLを加え、

5 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液 5 μL を薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/メタノール/水混液 (7:2:1) を展開溶液として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸試液を噴霧後、加熱したとき、R_F 値 0.5 付近に濃緑色のスポットを認める。

【参考文献】

- (1) 難波恒雄著「原色和漢薬図鑑 (上)」, 保育社, 大阪, 1980.
- (2) 奥田拓男編「天然薬物事典」, 廣川書店, 東京, 1981.
- (3) Department of Health Government of the Hong Kong Special Administrative Region ed., "Hong Kong Chinese Materia Medica Standards", Volume 1, Hong Kong, 2005, pp. 89- 101.
- (4) 中華人民共和国薬典 2005 年度版, pp. 52- 53.
- (5) 中華人民共和国薬典 2005 年度版, p. 199.
- (6) Tezuka Y., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1306- 1311 (1997).
- (7) Li MH., et al., *J. Ethnopharmacol.*, **120**, 419- 426 (2008).
- (8) Liu AH., et al., *J. Chromatogr. B*, **846**, 32- 41 (2007).
- (9) Hu P., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 677- 683 (2005).
- (10) Hu P., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 481- 486 (2005).
- (11) Yuan D., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 508- 514 (2005).
- (12) Wang, ZT., et al., *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 339-342 (1998).
- (13) Mizutani K., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2689- 2690 (1988).
- (14) Mizutani K., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2726- 2729 (1988).
- (15) Yuda M., et al., *Phytochemistry*, **29**, 1989- 1993 (1990).
- (16) Tsai TH., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1546- 1550 (2008).
- (17) Tanaka T., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 340- 344 (1989).
- (18) Koukoulitsa C., et al., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5388- 5392 (2006).
- (19) SDBSWeb. <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology).

F. 研究発表

論文発表

- 1) Amakura, Y., Yoshimura, M., Mouri, C., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y., Yoshida, T., Convenient TLC-based identification test for the crude drug "Pogostemoni Herba", *Yakugaku Zasshi*, **128** (12), 1833- 1837 (2008).

学会発表

- 1) 天倉吉章, 好村守生, 川原信夫, 合田幸広, 吉田隆志: タンジンの確認試験に関する検討. 日本薬学会 2009 年 3 月 (京都) 発表予定.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



図 1. タンジン及びトウジンの市場品 (各試料 A~C)

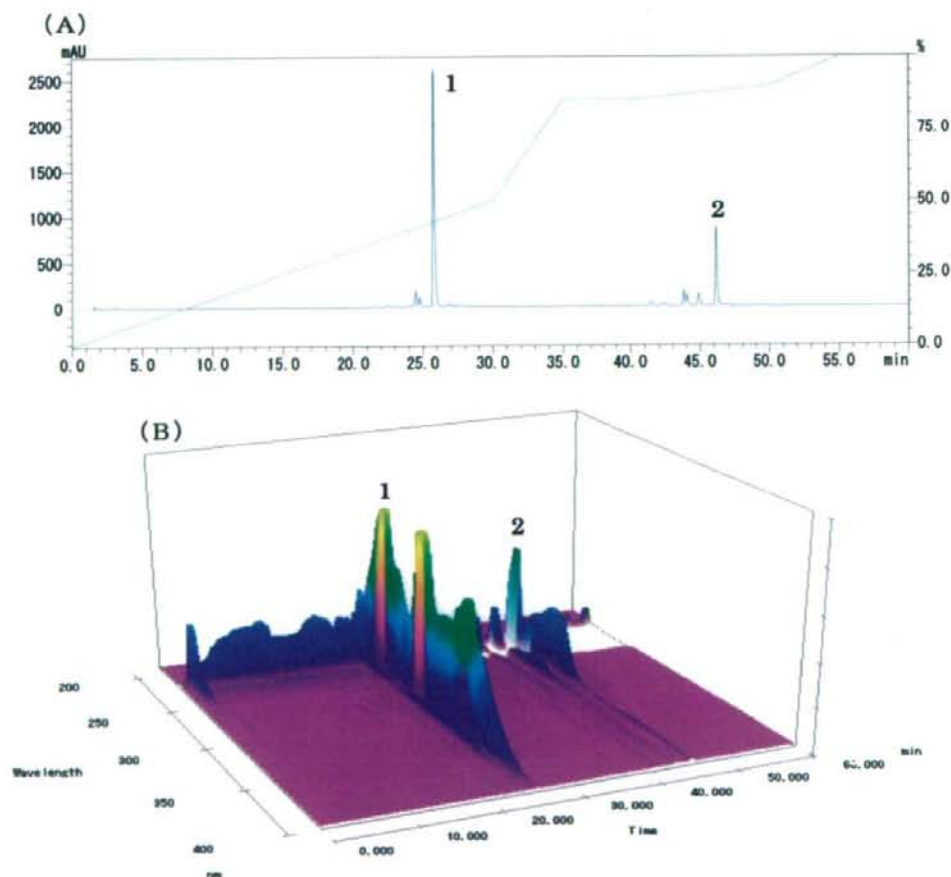


図 2. タンジン試料溶液の逆相 HPLC クロマトグラム

(A) 測定波長：280 nm, (B) 三次元クロマト

1. Lithospermic acid B (スポットⒶ), 2. Tanshinone II_A (スポットⒷ)

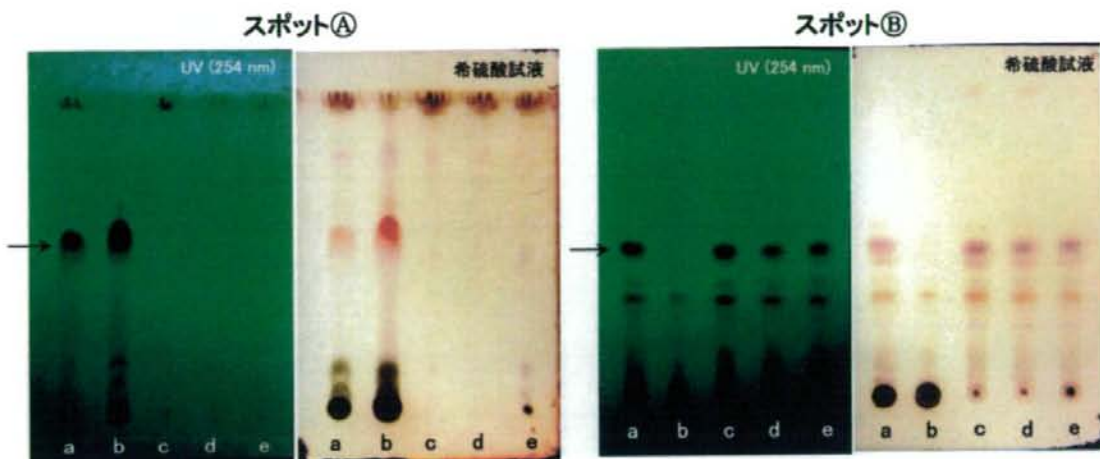


図 3-1. タンジンの TLC 分析 (抽出溶媒の検討)

a. メタノール, b. 50%含水メタノール, c. アセトン, d. 酢酸エチル, e. エタノール

展開溶媒: [スポット①] 酢酸エチル/酢酸/水 (9:2:1), [スポット②] *n*-ヘキサン/アセトン/ (8:2)
(いずれも室温下で振とう抽出, 3 μ L スポット)

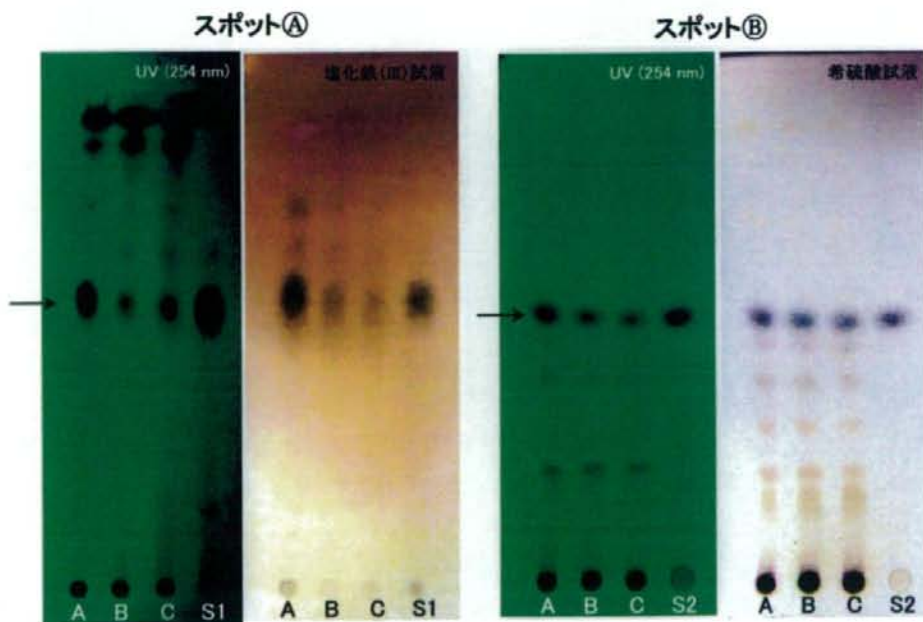


図 3-2. タンジンの TLC 分析 (試料 A~C)

展開溶媒: [スポット①] *n*-ヘキサン/酢酸エチル/メタノール/ギ酸 (5:15:1:2)

[スポット②] *n*-ヘキサン/酢酸エチル (3:1)

A~C: 試料名, S: 標準品 (S1: Lithospermic acid B, S2: Tanshinone II_A)

(いずれも室温下でメタノール振とう抽出, 5 μ L スポット)

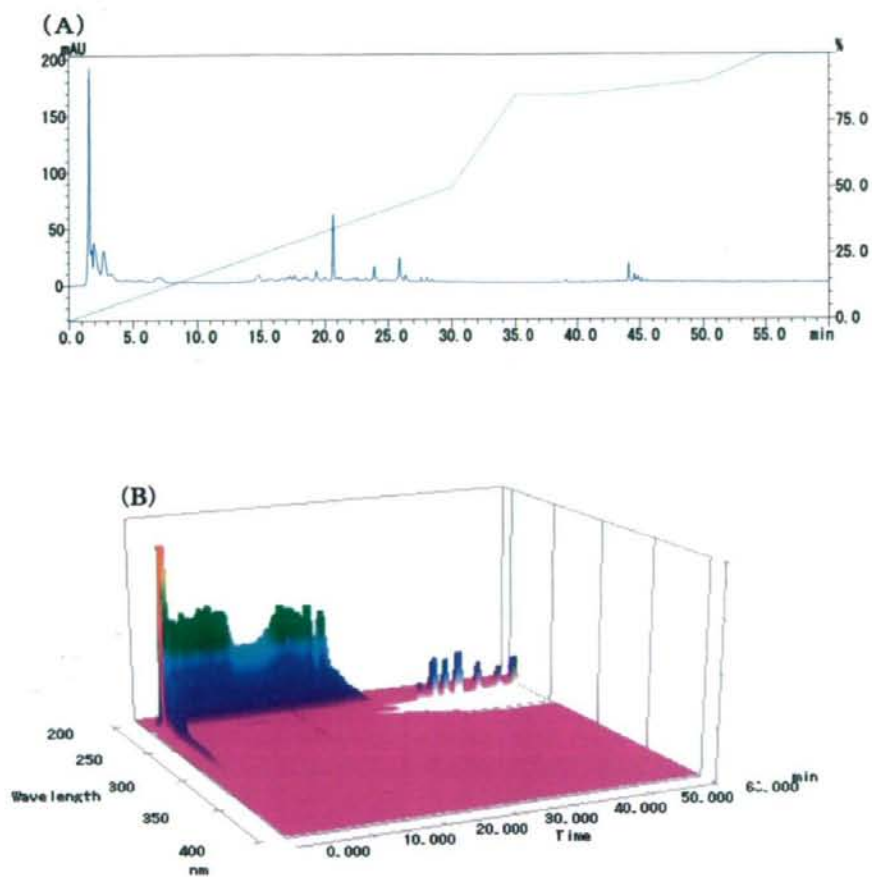


図 4. トウジン試料溶液の逆相 HPLC クロマトグラム
 (A) 測定波長：280 nm, (B) 三次元クロマト

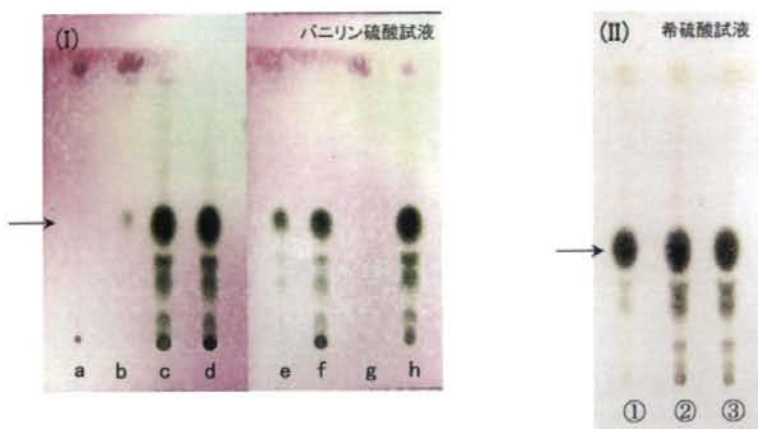


図 5-1. トウジンの TLC 分析 (抽出条件の検討)

- (I)抽出溶媒の検討: a. *n*-ヘキサン, b. アセトン, c. 50%含水アセトン, d. 50%含水メタノール, e. エタノール, f. 水, g. 酢酸エチル, h. メタノール
 (II)抽出温度の検討: ①. 室温下, メタノール振とう抽出, ②. メタノール還流抽出 (10 分間), ③. メタノール 50°C加温抽出 (10 分間)
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1) (全て 3 μ L スポット)

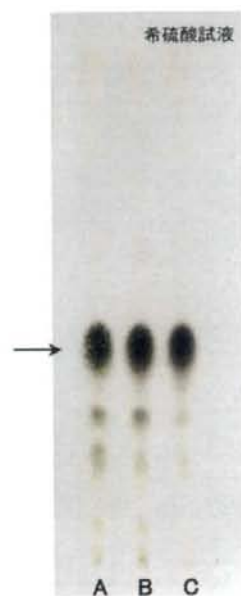


図 5-2. トウジンの TLC 分析 (試料 A~C)

- 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1)
 (全て室温下メタノール振とう抽出物を 3 μ L スポット)

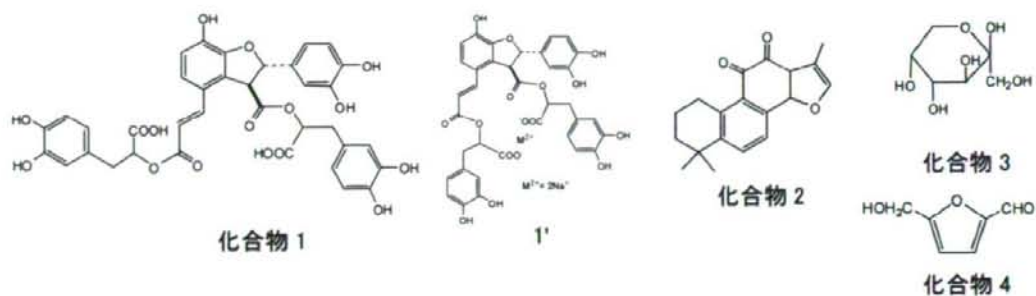


図 6. 同定した化合物の構造式

化合物 1 : Lithospermic acid B [タンジン] (1'. Sodium lithospermate B)

化合物 2 : Tanshinone II_A [タンジン]

化合物 3 : Fructose [トウジン]

化合物 4 : 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde [トウジン酸分解物]

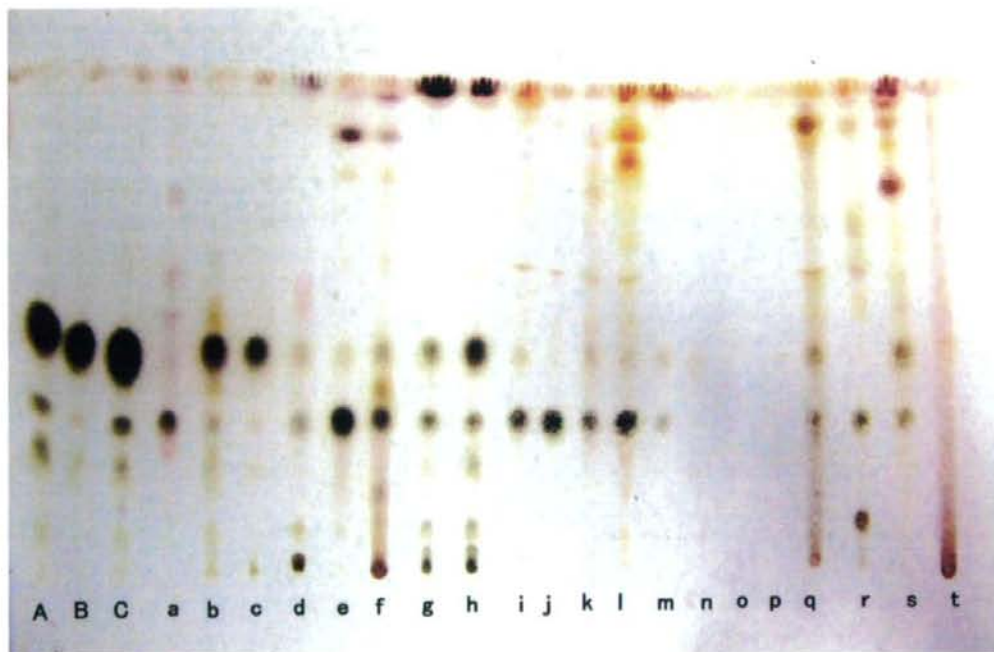


図 7. TLC 分析 (他生薬との同時分析)

A~C : トウジン試料

a. ニンジン, b. キキョウ, c. シャジン, d. タンジン, e. シャクヤク, f. ボタンビ,
g. ソウジュツ, h. ビヤクジュツ, i. クジン, j. オウギ, k. カッコン, l. カンソウ,
m. ショウキョウ, n. ブクリョウ, o. チョレイ, p. ハンゲ, q. ダイオウ,
r. ケツメイシ, s. センブリ, t. ケイヒ

展開溶媒 : 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1)

(全て室温下メタノール振とう抽出物を 3 μ L スポット)

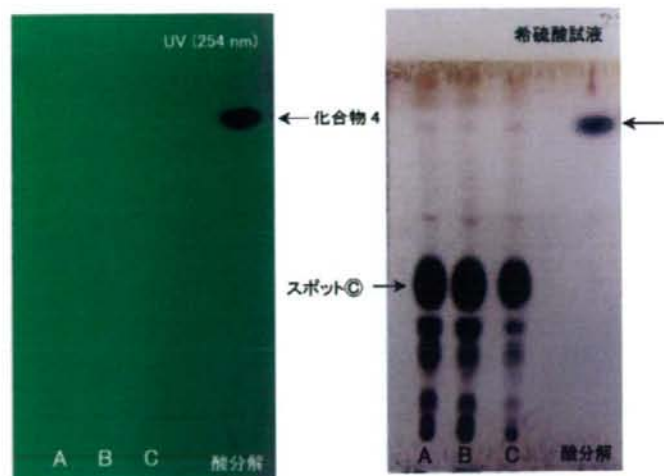


図 8. TLC 分析 (トウジン酸分解画分)

A~C: トウジン試料, 酸分解: トウジン酸分解画分
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水 (7:3:1)
 (全て 3 μ L スポット)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 漢方処方の使用実態調査研究，生薬の品質確保に関する研究，漢方処方の
同等性並びに品質確保に関する研究

分担研究者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

漢方製剤・生薬製剤・生薬用語に関する英語表記

要旨 日本人が漢方製剤・生薬製剤・生薬用語について英語表記を行う際，参照すべき用語集として，合計 126 語からなる「漢方製剤・生薬製剤・生薬用語の英語表記」第 1, 2 集を完成させた。

研究協力者

竹田忠紘 慶應義塾大学 薬学部 教授
木内文之（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源
研究センター センター長
仲井由宣 千葉大学 名誉教授，製剤機械技術研
究会 名誉会長
柴田敏郎（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源
研究センター 北海道研究部リーダー
佐々木博美 日本漢方生薬製剤協会 国際委員会
委員長
塩本秀己 日本漢方生薬製剤協会 国際委員会委
員
佐々木博 日本漢方生薬製剤協会 技術委員会委
員長
加藤照和 日本漢方生薬製剤協会 広報委員会委
員長
新井一郎 日本漢方生薬製剤協会 医療用製剤委
員会委員
秋葉秀一郎 日本漢方生薬製剤協会 生薬委員会
委員

A. 研究目的

漢方製剤・生薬製剤・生薬用語の英語表記に
関する研究は，以下に示した背景から開始され
た。第一に，第十五改正日本薬局方（2006年4
月施行）に初めて6種の漢方処方エキスが収載
されたが，収載にあたって日本生薬学会・日本
東洋医学会・和漢医薬学会の三学会合同で行
われた「漢字処方名のローマ字表記法」プロジ
ェクト（厚生労働科学研究，津谷喜一部分担研
究者）によりまず漢方処方のローマ字表記が
明確にされたことがあげられる。その際，漢方
薬や生薬などの英語表記について議論があっ
たが，公表するまでには至っていない。また同
時期に，WHO西太平洋地区事務局（WHO/WPRO）
を中心に伝統医学に関する用語集の編纂作業
が進められていたことがある。第二に，日本漢
方生薬製剤協会（日漢協）では，漢方製剤・生
薬製剤・生薬の残留農薬に関し，これまでの研
究や調査結果をまとめ，本内容は『医薬品研究』
39巻（2008年）に論文掲載されたが，本内容に
ついて相談を受けた際「漢方・生薬製剤関係の
英語表記が業界の中でも統一されていない」こ
とを実感し，各人，各社がそれぞれ固有の用語

についてばらばらな英語表記を行うと、それぞれの論文を読んだ外国人からはどの製剤を指すのかとも理解しがたいと感じたためである。情報の国際化が進む現代で、日本の漢方製剤や生薬製剤について国際的に誤解なく理解されるようにするためには、漢方製剤・生薬製剤・生薬関係用語に関して、それぞれの英語表記が、調整され整備されることが望ましい。この様な観点から、本研究は、平成19年度中途よりスタートしたものである。

B. 研究方法

日本薬局方生薬等委員会のメンバー、日本生薬学会会長、製剤技術研究会名誉会長等、日本漢方生薬製剤協会の関連委員会のメンバーが集まり、平成19年より予備会議を含めて計18回の会合を持ち、議論を重ねた。なお、用語の検討に当たっては、以下の文献を参考にした。また、最終的に出来た原案について、日本生薬学会の役員会の諸先生方、日本東洋医学会辞書編纂委員会の諸先生方からご意見を頂き、結果に反映させた。

- 1) 厚生労働省, 第15改正日本薬局方, 2006, available from (<http://jpd.b.nihs.go.jp/jp15/>).
- 2) The Ministry of Health, Labour and Welfare, "The Japanese Pharmacopoeia, Fifteenth Edition, English Version", 2006, available from (<http://jpd.b.nihs.go.jp/jp15e/>).
- 3) "The Japanese Standards for Herbal Medicines", Yakuji Nippo, Tokyo, 1993.
- 4) World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific, "WHO International Standard Terminologies in Traditional Medicine in the Western Pacific Region", World Health Organization, Western

Pacific Region, Manila, 2007, available from (http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/14B298C6-518D-4C00-BE02-FC31EADE3791/0/WHOIST_26JUNE_FINAL.pdf).

- 5) World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific, "Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines", World Health Organization, Western Pacific Region, Manila, 1998, available from (http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/24BF6429-201E-47E3-AD28-0461EDCEA193/0/Guidelines_Appropriate_Use_of_Herbal_Medicines.pdf).

- 6) World Health Organization, "WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants", World Health Organization, Geneva, 2003, available from (<http://libdoc.who.int/publications/2003/9241546271.pdf>).

- 7) World Health Organization, "WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues", World Health Organization, Geneva, 2007, available from (<http://www.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14878e/s14878e.pdf>).

- 8) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). "Guidance for Industry, Botanical Drug Products", 2004, available from (<http://www.fda.gov/cder/guidance/4592fnl.htm>).

- 9) European Medicines Agency, "Guidelines on Specifications: Test Procedures and