

Table 4 Recoveries of 28 Organophosphorus Pesticides from *Angelicae Radix* Using DB-1 Column

Pesticide	Recovery (%), Mean (CV ^{*)}			
	Hokkai		Yamato	
	Test solution 1 ^{**}	Test solution 2 ^{**}	Test solution 1	Test solution 2
<i>n</i> =3				
Group A				
(<i>E</i>)-Chlorfenvinphos	136 (7.5)	106 (2.2)	135 (2.3)	97 (10.2)
(<i>Z</i>)-Chlorfenvinphos	173 (2.0)	114 (2.3)	142 (4.9)	103 (10.6)
Chlorpyrifos	105 (3.7)	99 (2.2)	108 (2.1)	86 (8.1)
Chlorpyrifos-methyl	136 (1.3)	95 (4.5)	139 (3.7)	88 (6.4)
Diazinon	91 (2.0)	94 (2.5)	91 (3.0)	90 (7.7)
Dichlorvos	120 (3.6)	70 (8.7)	152 (3.6)	76 (5.1)
Ethoprophos	103 (0.8)	100 (2.6)	105 (2.0)	93 (4.2)
Fenitrothion	150 (0.9)	97 (0.6)	147 (4.2)	92 (6.9)
Malathion	174 (1.5)	101 (1.9)	167 (1.9)	82 (7.3)
Methidathion	270 (7.3)	110 (5.9)	270 (2.5)	105 (9.7)
Group B				
Ethion	111 (5.5)	88 (3.5)	114 (1.0)	85 (3.1)
Parathion	108 (3.3)	89 (2.0)	103 (3.7)	84 (3.4)
Parathion-methyl	161 (1.0)	94 (2.4)	152 (1.0)	89 (4.7)
Phosmet	415 (6.5)	117 (1.6)	370 (21.0)	111 (7.1)
Pirimiphos-methyl	98 (3.3)	87 (1.7)	98 (0.0)	87 (3.6)
Quinalphos	127 (2.3)	91 (2.8)	122 (1.8)	91 (6.7)
Group C				
Edifenphos	242 (7.1)	108 (3.5)	240 (22.0)	113 (8.8)
EPN	111 (2.3)	86 (3.7)	124 (10.6)	96 (5.7)
Fenthion	101 (1.1)	85 (1.6)	113 (5.9)	81 (9.3)
Phenthoate	82 (3.1)	86 (3.2)	74 (8.0)	82 (11.7)
Phosalone	228 (2.8)	101 (4.6)	249 (5.3)	106 (5.6)
Tolclophos-methyl	98 (2.3)	82 (2.6)	102 (8.5)	88 (9.1)
Group D				
Cyanofenphos (CYP)	103 (6.0)	103 (8.0)	105 (1.2)	100 (4.6)
Cyanofos (CYAP)	122 (4.4)	108 (6.7)	104 (0.8)	101 (2.8)
Iprobenfos (IBP)	101 (4.1)	99 (3.8)	97 (3.0)	96 (3.3)
Isocarbofos	112 (2.5)	107 (3.8)	104 (1.7)	107 (1.7)
Leptophos (MBCP)	101 (13.8)	103 (10.1)	103 (1.6)	101 (4.7)
Pyridaphenthion	131 (3.1)	119 (5.5)	120 (0.5)	115 (8.2)

*1 not cleaned up on a Silica gel mini-column, *2 cleaned up on a Silica gel mini-column using 13 mL of acetone/*n*-hexane (15 : 85)

Table 5 Detection Limit and Quantitation Limit of Investigated Organophosphorus Pesticides

Pesticide	DB-1 column		CBP-10 column	
	Detection limit ^{*1} (ppm)	Quantitation limit ^{*2} (ppm)	Detection limit (ppm)	Quantitation limit (ppm)
Group D				
Cyanofenphos (CYP)	0.01	0.04	0.03	0.08
Cyanofos (CYAP)	0.01	0.04	0.03	0.1
Iprobenfos (IBP)	0.01	0.03	0.02	0.05
Isocarbofos	0.02	0.05	0.03	0.1
Leptophos (MBCP)	0.02	0.06	— ^{*3}	—
Pyridaphenthion	0.03	0.09	0.3	0.8

*1 Concentration of pesticide at S/N ratio 3,

*2 Concentration of pesticide at S/N ratio 10,

*3 more than 0.4 ppm

ジョンが発生したので、少量のメタノールを添加し2層に分離することにした。GCに試験溶液Iを注入後、標準溶液Aを注入したところ、メチダチオンのピーク感度（面積、高さ）の低下が認められた。GC分析において、注入ロライナーやカラムの先端に保持された抽出物と反応し、農薬が分解する可能性があることが報告²¹⁾されている。DB-1カラムの先端を50 cm 切除しても感度は回復しなかったが、注入ロライナーを新しいものに交換したところ、ほぼ元の感度に回復した（Fig. 1）。

感度の低下は、注入ロライナーに保持された夾雑物が原因と考えられたので、シリカゲルミニカラムによる精製法について更に検討した。サイコ抽出液におけるシリカゲルミニカラムからの農薬の溶出パターンを Table 6 に示した。ヘキササン 13 mL では農薬は溶出されなかったが、アセトン/ヘキササン（10：90）10 mL では大部分の農薬が溶出された。しかし、ピリダフェンチオンについては同液 10 mL では 54% しか溶出されず、全量を溶出するためには同液 20 mL を要した。また、最初にヘキサ

ン 20 mL を注入した場合には、レプトホスが 56%（S.D. 4.3%, $n=3$ ）溶出された。そこで、シリカゲルミニカラムに試料溶液を注入後、ヘキササン 3 mL で洗い込み、ヘキササン 10 mL で洗浄、アセトン/ヘキササン（10：90）20 mL で溶出することにした。

ソウジュツについては、試験溶液IをGC分析したところ、エトプロホス付近に妨害ピークが出現した（Fig. 2）。また、GC分析において、試験溶液Iを注入後、標準溶液を注入したところ、パラチオンメチル、ホスメット等のピーク感度（面積、高さ）の低下が認められた（Fig. 3）。注入ロライナーを新しいものに交換しても感度は回復しなかったが、DB-1カラムの先端を40 cm 切除したところ、ほぼ元の感度に回復した（Fig. 3）。感度の低下は、カラムの先端に保持された夾雑物が原因と考えられた。

そこで、妨害ピーク及び夾雑物を除去するため、ミニカラムにより精製することにした。シリカゲルミニカラム、LC-NH₂ミニカラム、PSAミニカラム、ENVI-Carb/LC-NH₂ミニカラム及びENVI-

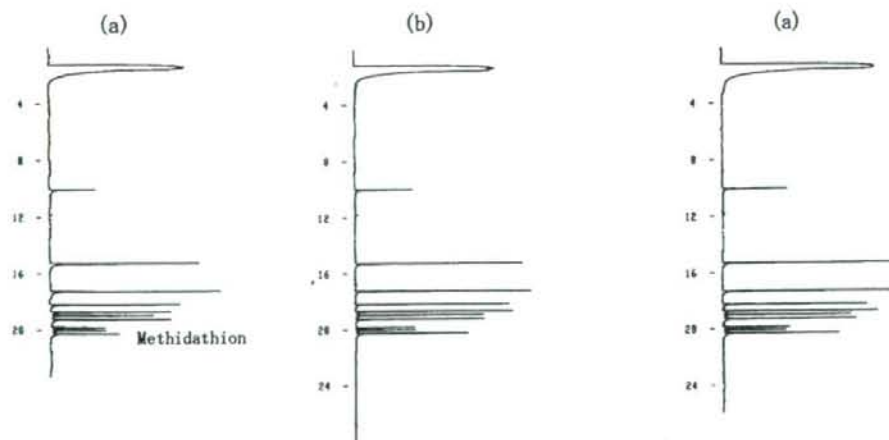
After the injection of test solution I^{*1}After the injection of test solution II^{*2}

Fig. 1 Gas Chromatograms of Standard Mixture A^{*3} after Injection of Bupleuri Radix Test Solution by GC-FPD with DB-1 Column

(a): before replacement of the GC injector liner; (b): after replacement of the GC injector liner, ^{*1} The extract was cleaned up on a Silica gel mini-column using 13 mL of acetone/*n*-hexane (15:85), ^{*2} The extract was cleaned up on a Silica gel mini-column using 20 mL of acetone/*n*-hexane (10:90) after washing with 13 mL of *n*-hexane, ^{*3} 0.1 µg/mL of each pesticide

Table 6 Elution Profiles of 28 Organophosphorus Pesticides from Mini-column

Pesticide	Elution volume (mL) [Recovery (%)]	
	Silica gel	Diol
Group A		
(<i>E</i>)-Chlorfenvinphos	0-10 ^{*1} [92± 7.3] ^{*2}	0-5 ^{*3} [98±15.3]
(<i>Z</i>)-Chlorfenvinphos	0-10 [88± 6.9]	0-10 [100±13.0]
Chlorpyrifos	0-10 [106± 1.4]	0-5 [101± 2.0]
Chlorpyrifos-methyl	0-10 [103± 3.5]	0-5 [99± 5.6]
Diazinon	0-10 [101± 5.5]	0-5 [102± 3.4]
Dichlorvos	0-10 [76± 9.3]	0-5 [71± 4.1]
Ethoprophos	0-10 [89± 7.1]	0-5 [87±11.8]
Fenitrothion	0-10 [85± 6.0]	0-5 [83± 3.4]
Malathion	0-10 [89± 5.1]	0-5 [88± 3.7]
Methidathion	0-10 [87± 5.8]	0-5 [93± 6.2]
Group B		
Ethion	0-10 [104± 2.9]	0-5 [102± 3.2]
Parathion	0-10 [96± 2.4]	0-5 [87± 4.5]
Parathion-methyl	0-10 [83± 3.2]	0-5 [72± 4.3]
Phosmet	0-10 [103±10.6]	0-5 [101± 3.5]
Pirimiphos-methyl	0-10 [108± 3.6]	0-5 [97± 0.9]
Quinalphos	0-10 [97± 1.9]	0-5 [92± 2.2]
Group C		
Edifenphos	0-10 [103±10.1]	0-10 [104±15.3]
EPN	0-10 [98± 0.9]	0-5 [93± 6.7]
Fenthion	0-10 [88± 6.7]	0-5 [94± 6.4]
Phenthoate	0-10 [93± 5.8]	0-5 [96±10.1]
Phosalone	0-10 [100± 2.0]	0-5 [99± 8.0]
Tolclophos-methyl	0-10 [104± 2.4]	0-5 [100± 8.3]
Group D		
Cyanofenphos (CYP)	0-10 [90± 8.1]	0-5 [94± 5.7]
Cyanophos (CYAP)	0-10 [78± 2.6]	0-5 [73± 4.8]
Iprobenfos (IBP)	0-10 [103±16.0]	0-10 [68± 7.9]
Isocarbofos	0-10 [87± 1.0]	0-10 [79± 4.1]
Leptophos (MBCP)	0-10 [99± 1.0]	0-5 [98± 0.9]
Pyridaphenthion	0-20 ^{**} [120± 9.4]	0-15 [44± 4.7]

^{*1} elution range of pesticides in Bupleuri Radix sample solution with acetone/*n*-hexane (10:90) after washing with 13 mL of *n*-hexane, ^{*2} Values represent mean ± S.D. (*n*=3), ^{*3} elution range of pesticides in standard mixture solution with *n*-hexane, ^{**} In the case of 0-10 mL, the recoveries of Pyridaphenthion were 54% (S.D. 7.3%).

Carb/PSA ミニカラムによる精製法を検討したが、良好な結果は得られなかった。しかし、シリカゲルミニカラムを後に連結したジオールミニカラムにより精製したところ（試験溶液Ⅲ）、妨害ピークは消失し、エトプロホスの定量が可能となった（Fig. 2）。標準溶液におけるジオールミニカラムからの農薬の溶出パターンを Table 6 に示した。ヘキサン 15 mL では全量回収されない農薬があったが、ヘキサン 15-20 mL の面分には農薬は溶出されなかったことから、ヘキサン 15 mL でジオールミニカラムから農薬を溶出し、更にサイコの精製法に準じ、シリカゲルミニカラムにより精製することにした。なお、ソウジュツ抽出液中のレプトホスは、ヘキサン 15 mL ではシリカゲルミニカラムから溶出され

なかった。

ソウジュツ試験溶液Ⅲを GC に注入後、標準溶液を注入したところ、試験溶液Ⅰ程ではなかったが、パラチオンメチル、ホスメット等のピーク高の低下が認められた（Fig. 4）。ピーク高の低下は夾雑物による影響と考えられた。ソウジュツには β -eudesmol, hinesol 等の精油が 3.5-7% 含まれる²¹⁾。試験溶液Ⅲは試験溶液Ⅰより精油含量が少なかったが、ピーク高を低下させる夾雑物は農薬と類似した極性を有すると考えられることから、ミニカラムによる夾雑物の除去は困難であると考えられた。

ビャクジュツについては、試験溶液Ⅰを GC 分析したところ、エトプロホスのピークが 2 本に分離したため、高さ計算による定量は困難であると考えら

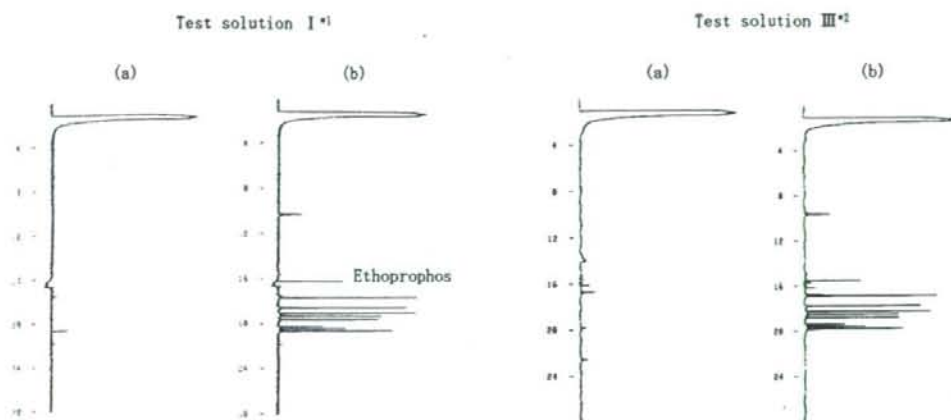


Fig. 2 Gas Chromatograms of Atractylodis Lanceae Rhizoma by GC-FPD with DB-1 Column

(a): blank sample; (b): sample spiked at 0.1 µg/mL of each pesticide, *¹ The extract was cleaned up on a Silica gel mini-column using 13 mL of acetone/*n*-hexane (15 : 85), **² The extract was cleaned up on a Diol mini-column and a Silica gel mini-column using 20 mL of acetone/*n*-hexane (10 : 90) after washing with 15 mL of *n*-hexane.

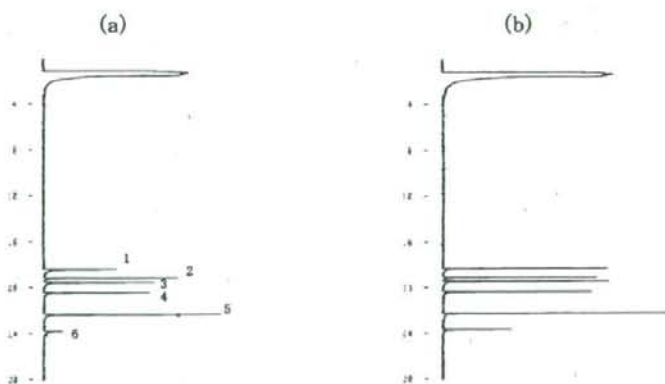


Fig. 3 Gas Chromatograms of Standard Mixture B*¹ after Injection of Atractylodis Lanceae Rhizoma Test Solution I*² by GC-FPD with DB-1 Column

(a): before removal of the first 40 centimeters of the GC column; (b): after removal of the first 40 centimeters of the GC column, 1: Parathion-methyl; 2: Pirimiphos-methyl; 3: Parathion; 4: Quinalphos; 5: Ethion; 6: Phosmet, *¹ 0.1 µg/mL of each pesticide, **² The extract was cleaned up on a Silica gel mini-column using 13 mL of acetone/*n*-hexane (15 : 85).

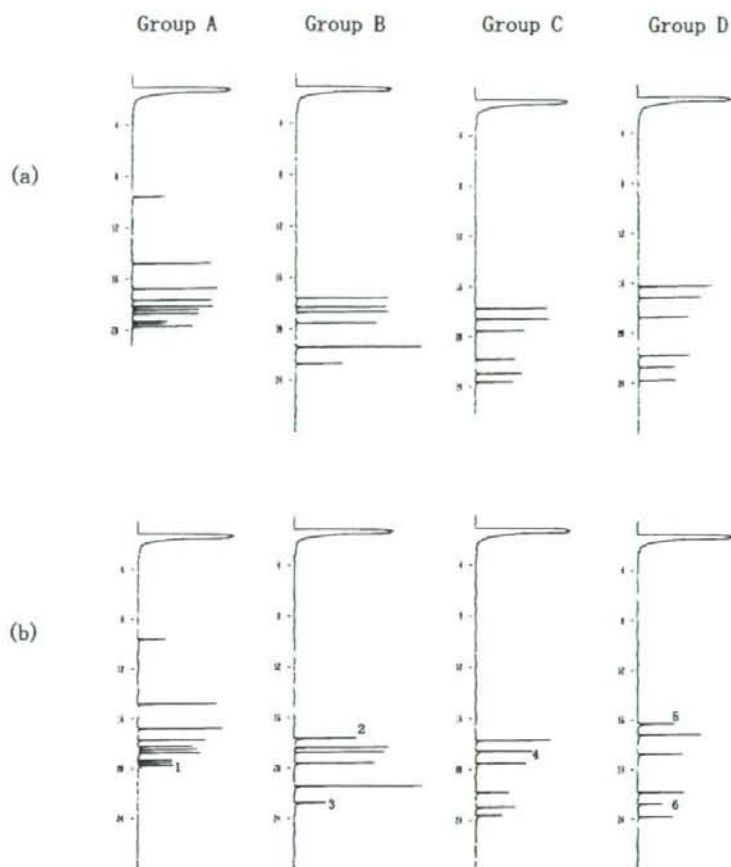


Fig. 4 Gas Chromatograms of Standard Mixture^{*1} after Injection of Atractylodis Lanceae Rhizoma Test Solution III^{**} by GC-FPD with DB-1 Column

(a): before injection of test solution; (b): after injection of test solution, 1: Methidathion; 2: Parathion-methyl; 3: Phosmet; 4: Fenthion; 5: Cyanophos; 6: Pyridaphenthion; ^{*1} 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each pesticide, ^{**} The extract was cleaned up on a Diol mini-column and a Silica gel mini-column using 20 mL of acetone/*n*-hexane (10 : 90) after washing with 15 mL of *n*-hexane.

れた (Fig. 5), 有機リン系農薬の GC 分析において、マトリックスの影響により農薬のピークが 2 本に分離する場合がある²³⁻²⁵。そこで、ソウジュツと同様にシリカゲルミニカラムを後に連結したジオールミニカラムにより精製したところ (試験溶液 III), エトプロホスのピークはシャープなシングルピークとなり定量可能となった。

2. 添加回収試験

食品中の残留農薬迅速分析法¹⁰⁾では、回収率及び変動係数 (相対標準偏差) についてガイドライン (回収率は 70~120%, 変動係数は 20% 以内) を定めている。そこで、このガイドラインに従って本法の結果を考察した。

サイコ, ショウキョウ, シンイ, トウキ (北海当

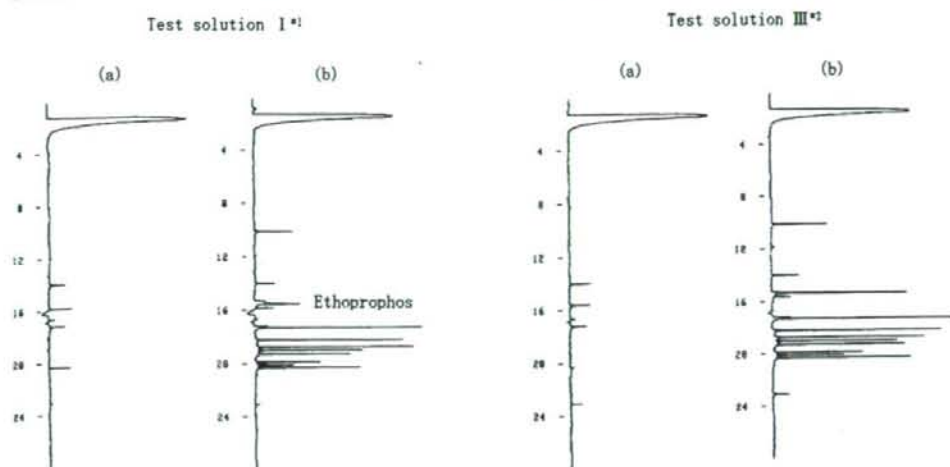


Fig. 5 Gas Chromatograms of Atractylodis Rhizoma by GC-FPD with DB-1 Column

(a): blank sample; (b): sample spiked at 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each pesticide, *¹ The extract was cleaned up on a Silica gel mini-column using 13 mL of acetone/*n*-hexane (15 : 85), **² The extract was cleaned up on a Diol mini-column and a Silica gel mini-column using 20 mL of acetone/*n*-hexane (10 : 90) after washing with 15 mL of *n*-hexane.

掃及び大和当掃), ハッカ, ビャクジュツ及びヨクイニンについては70~119% (DB-1, 面積) と概ね良好な結果が得られた。

ウイキョウ, カッコン及びマオウ中のジクロロボスについては70%を下回ったが, ジクロロボスは揮発性が高い農薬であることから, 濃縮時における損失によるものと考えられた。

ショウマ中のクロルピリボス, エチオン及びレプトホスの回収率 (DB-1, 面積) はそれぞれ51%, 35%及び22%と70%を大きく下回った。今回, 試験溶液を調製する際, 農薬の抽出効率を上げるため, 試料に水を加え1時間膨潤後, 抽出操作を開始した。しかし, 乾物試料の場合, 長時間水を加えて膨潤することにより農薬の分析値が低くなることが報告されている²⁰⁾。そこで, 試料5.0gに水20mL及びアセトニトリル80mLを加え, 直ちに抽出操作を開始した。その結果, クロルピリボス, エチオン及びレプトホスの回収率はそれぞれ72%, 68%及び63%と, 膨潤時よりも高い回収率を示した。他の生薬においては1時間膨潤した場合でも良好な結果が得られていることから, 回収率低下の原因は膨潤時における生薬成分との反応によるものと考えられた。

生薬と農薬の組み合わせにより, 回収率が120%を上回る農薬があった。中でもシャクヤク中のホスメットは面積計算値, 高さ計算値共に400%を上回った。120%を上回る農薬については, マトリックスによる影響と考えられる。

また, 回収率が面積計算値と高さ計算値で大きく異なる農薬があった。DB-1カラムにおいて, ウイキョウ中のジクロロボス, ショウキョウ中のエトプロボス, ソウジュツ中のジクロロボス及びフェンチオンの面積計算値はそれぞれ60%, 92%, 79%及び72%であったが, 高さ計算値はそれぞれ19%, 63%, 63%及び58%と高さ計算値の方が低い値となった。

一方, シャクヤク, ソウジュツ, ビャクジュツ, トウキ (北海当掃及び大和当掃) については, 高さ計算値が面積計算値を大きく上回る農薬があった。中でも, DB-1カラムにおけるソウジュツ及びビャクジュツ中のシアノボス, CBP-10カラムにおけるビャクジュツ中のジクロロボスについては, 高さ計算値は面積計算値のそれぞれ2.0倍, 2.9倍, 2.1倍の値となった。

有機リン系農薬をGC分析する場合, マトリック

の影響により試験溶液と標準溶液のピーク形状が異なり、面積計算値と高さ計算値が異なる場合がある^{23,25)}。DB-1カラムにおいて、ウイキョウ中のジクロロボスのピーク半値幅は広がり、ビャクジュツ中のシアノホスのピーク半値幅は狭くなる傾向が認められた。ピーク半値幅が広がる場合、高さ計算値が低くなり、ピーク半値幅が狭くなる場合、高さ計算値が高くなる傾向がある²⁵⁾。これらのピーク形状の違いが回収率にも影響したものと考えられた。

シャクヤク、ソウジュツ及びビャクジュツについて、試験溶液注入前後の標準溶液のピーク感度を比較したところ、面積値はほとんど変わらないが、試験溶液注入後の高さが低下する農薬があった。高さ計算値が面積計算値より高くなる農薬については、マトリックスによる影響の他に、試験溶液注入後の標準溶液のピーク高が低下していることも原因の一つとして考えられた。

また、CBP-10カラムを用いた場合、面積計算でガイドラインをはずれていた農薬が高さ計算では範囲内となる農薬があったが、両カラムにおいて逆の傾向が多数認められたことから、定量するには面積計算が有効と考えられた。

生薬との組み合わせにより、ガスクロマトグラム上の保持時間が0.1分以上遅れる農薬があった。実試料では見落としの原因になると考えられることから、定量するには、あらかじめ農薬を添加した試験溶液（試料抽出液標準溶液）により保持時間を確認する必要がある。

回収率がガイドラインをはずれる農薬、面積計算値と高さ計算値が大きく異なる農薬、標準溶液と比較しガスクロマトグラム上の保持時間に0.1分以上の差が認められる農薬については、マトリックスの影響が考えられるので、更に精製が必要と思われた。試験溶液中の夾雑物は、試験溶液I、II、IIIの順に減少すると考えられることから、試験溶液Iにおいてマトリックスの影響を受けたと考えられる農薬が確認された場合には、より精製効果の高い試験溶液II、あるいは最も精製効果の高い試験溶液IIIの方法が有効と考えられる。

有機リン系農薬をGCで分析する際、起爆注入をせずに標準溶液を注入した場合、ピーク面積は試料抽出液標準溶液のピーク面積よりも小さくなる傾向がある。しかし、試験溶液を起爆注入すると標準溶

液のピーク面積が増加し、試料抽出液標準溶液よりもピーク面積は小さいものより近くなる場合がある²⁰⁾ことから、絶対検量線法により定量する場合には、通常起爆注入が行われる。今回、試験溶液を多数GCに注入したところ、起爆注入を行っても標準溶液のピーク感度（面積、高さ）が十分には増加せず、トウキ（北海当帰及び大和当帰）において回収率が120%を上回る農薬（メチダチオン、ホスメット、エディフェンホス、ホサロン）があった。そこで、カラムを新しいものに交換したところ、120%を上回った農薬の標準溶液におけるピーク感度が増加し、良好な回収率が得られた。カラムが著しく劣化した場合には、起爆注入を行っても標準溶液のピーク感度の増加は不十分であると考えられた。カラムが劣化した場合には、標準溶液のピーク感度が低下する農薬があることから、GC分析するには、あらかじめ標準溶液により感度を確認する必要がある。感度を確認するには、Aグループではメチダチオン、Bグループではパラチオンメチル及びホスメット、Cグループではフェンチオン、エディフェンホス及びホサロン、Dグループではシアノホス及びピリダフェンチオンのピークが最適と思われた。感度が低下した場合、カラムの先端を約50cm切除、又は注入ロライナーを新しいものに交換することにより感度が回復する場合があるが、カラムが著しく劣化した場合には回復不能となることから、新しいカラムに交換する必要がある。

3. 生薬中の残留農薬

今回分析対象とした生薬を部位別に分類すると、根部10種（カッコン、サイコ、シャクヤク、ショウキョウ、ショウマ、ソウジュツ、トウキ（北海当帰）、トウキ（大和当帰）、ニンジン及びビャクジュツ）、果実・種子2種（ウイキョウ及びヨクイニン）、地上部3種（シンイ、ハッカ及びマオウ）であった。これらのうち、カッコンはクズの周皮を除いた根を乾燥したもの²²⁾で、根から得られる葛澱粉は和菓子の材料としても用いられる²⁰⁾。ショウキョウは野菜としても流通しているショウガの根茎を乾燥したもの^{22,29)}で、ウイキョウ及びハッカは食品としても流通²⁹⁾している。

ウイキョウからはイソカルボホス及びパラチオンメチル、ハッカからはクロルピリホス、パラチオン

及びパラチオンメチルが検出された。これらの農薬はいずれも殺虫剤である。食品については食品衛生法により農薬の残留基準値が設定されているが、医薬品に該当するものは、同じ植物であっても、食品衛生法に規定される残留基準の対象とはならない²⁰⁾。

農薬の検出率を部位別に見ると、地上部（27%）、果実・種子（20%）、根部（8%）の順に高く、主に栽培時に使用されていた農薬が検出されたと推察された。前報²¹⁾においても、農薬の検出率は果皮を含む果実及び葉部（共に91%）、根皮を含む根部（11%）の順に高く、今回と同様の結果が得られている。

今回ニンジン1検体からクロルピリホス及びトルクロホスメチル（殺菌剤）、サイコ1検体からパラチオンが検出された。前回の調査²¹⁾では、チンピからキナルホス、クロルピリホス、パラチオンメチル、フェントロチオン、マラチオン及びメチダグチオンが検出されている。これらの生薬は補中益気湯エキス²²⁾などの漢方処方エキスに配合されている。エキス製剤において、抽出する際には水が用いられる。しかし、農薬の多くは脂溶性であることから、水への移行率は低いと考えられる。著者らは農薬が検出されたソウ及びチンピを用い、煎液への農薬移行について調べた結果、煎液に農薬はほとんど移行しないことを報告している²³⁾。したがって、農薬が検出された生薬をエキス製剤に用いたとしても、エキス製剤中の農薬含量は極めて低いものと推察される。生薬の85～90%は漢方処方エキスの形で流通していることから、今後、農薬が検出された生薬をエキス製剤に用いた場合の煎液への農薬の移行について検討する予定である。

結 論

1. 生薬15品目51検体について、28種類の有機リン系農薬の残留調査を行った結果、4品目8検体から5種類の有機リン系農薬が検出された。
2. 農薬の検出率を部位別に見ると、地上部（27%）、果実・種子（20%）、根部（8%）の順に高く、主に栽培時に使用されていた農薬が検出されたと推察された。
3. サイコ、ショウキョウ、シンイ、トウキ（北海道産及び大和当帰）、ハッカ、ビャクジュツ、ヨクイニンについては70～119%（DB-1、面積）と概ね良好な回収率が得られた。

4. サイコについては、シリカゲルミニカラムによる精製の際、ヘキサソルボン洗浄後、アセトン/ヘキサソルボン（10：90）で溶出することにより、妨害物質の除去が可能であった。

5. ソウジュツ及びビャクジュツについては、シリカゲルミニカラムを後に連結したジオールミニカラムで精製することにより、妨害物質の除去が可能であった。

6. 生薬と農薬の組み合わせにより、回収率がガイドライン（回収率は70～120%、変動係数は20%以内）をはずれる農薬、面積計算値と高さ計算値が大きく異なる農薬、標準溶液と比較しガスクロマトグラム上の保持時間に0.1分以上の差が認められる農薬については、マトリックスによる影響が考えられるため、更に精製が必要と思われた。

7. GC分析において、試験溶液注入によりカラムが劣化し、標準溶液のピーク感度が低下する場合があることから、分析する際にはあらかじめ標準溶液により感度を確認する必要がある。

8. 今回生薬から検出された農薬はいずれも脂溶性が高いことから、水への移行率は低いと考えられる。今後、農薬が検出された生薬をエキス製剤に用いた場合の煎液への農薬の移行について検討する予定である。

謝 辞

有益な御助言をいただいた北海道立衛生研究所食品薬品部主任研究員長南隆夫氏、青柳光敏研究職員に深謝いたします。

本研究は平成18年度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）による「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」の一部として行われたことを付記し、合わせて関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働科学特別研究事業「生薬中の農薬分析に関する研究」平成15年度 総括・分担研究報告書（H15-特別-041）（主任研究者 合田幸広）。
- 2) 佐藤正幸，姉帯正樹，合田幸広：医薬品研究，36(2)，83-97（2005）。
- 3) 中嶋順一，浜野朋子，塩田寛子，安田一郎，鎌倉

- 浩之, 合田幸広: 東京健安研七報, 55, 49-53 (2004).
- 4) 野口 衛, 金田吉男, 持田研秀, 吉村 淳: 生薬学雑誌, 25(1), 33-39 (1971).
 - 5) 野口 衛, 金田吉男, 持田研秀, 吉村 淳: 生薬学雑誌, 25(1), 40-46 (1971).
 - 6) 山田從憲, 中村寿夫, 合路忠明: 広島県衛研・公害研・研究報告, 23, 45-49 (1976).
 - 7) 大西孝司, 勝田幸恵, 小坂菊枝: 石川衛公研年報, 15, 156-160 (1978).
 - 8) 中島慶子, 安田敏子: 衛生化学, 29(6), 427-432 (1983).
 - 9) 佐竹元吉, 鈴木英世, 永井吉澄, 岡田 稔, 相楽和彦, 壇浦國夫, 倉重満雄: 医薬品研究, 27(7), 467-480 (1996).
 - 10) 中里光男, 牛山博文, 永山敏廣, 観 公子, 田端節子, 上村 尚, 田村行弘, 友松俊夫: 東京衛研年報, 48, 61-66 (1997).
 - 11) 塩田寛子, 高野伊知郎, 瀬戸隆子, 安田一郎, 浜野朋子, 佐藤かな子, 永山敏廣, 大西和夫, 藤田祥二, 大野孝義, 鯉澤照夫: 東京衛研年報, 48, 67-70 (1997).
 - 12) 中里光男, 田端節子, 永山敏廣, 観 公子, 立石恭也, 安田和男: 東京衛研年報, 49, 65-70 (1998).
 - 13) 中里光男, 永山敏廣, 観 公子, 田端節子, 立石恭也, 安田和男: 東京衛研年報, 51, 34-39 (2000).
 - 14) 吉岡直樹, 秋山由美, 三橋隆夫, 畑中久勝, 辻正彦, 松下純雄: 医薬品研究, 31(4), 225-231 (2000).
 - 15) 中里光男, 観 公子, 永山敏廣, 田端節子, 山嶋裕季子, 安田和男: 東京衛研年報, 52, 48-52 (2001).
 - 16) 梶村計志, 田上貴臣, 早月由香, 中村晚彦, 山本文雄, 岩上正蔵: 大阪府立公衛研所報, 44, 61-65 (2006).
 - 17) 塩田寛子, 浜野朋子, 中嶋順一, 下村壽一, 末次大作, 安田一郎: 東京衛研年報, 55, 43-47 (2004).
 - 18) 厚生省生活衛生局長: 残留農薬迅速分析法の利用について (通知, 衛化第43号, 平成9年4月8日).
 - 19) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究, 45(9), 31-49 (1995).
 - 20) 根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武: 第35回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 56-57 (1998).
 - 21) Liao, W., Joe, T., Cusick, W. G.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74(3), 554-565 (1991).
 - 22) 日本薬局方解説書編集委員会編: 第十五改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2006, p.D-406-D-410.
 - 23) 藤原 修, 佐藤正幸, 新山和人: 道衛研所報, 49, 123-126 (1999).
 - 24) 佐藤正幸, 藤原 修, 武内伸治, 内山康裕, 新山和人: 道衛研所報, 50, 32-40 (2000).
 - 25) 佐藤正幸, 内山康裕, 宇野豊子, 新山和人: 道衛研所報, 52, 1-11 (2002).
 - 26) 坂真智子, 飯島和昭, 狛由紀子, 藤田眞弘, 小田中芳次, 加藤保博: 第24回農薬残留分析研究会講演要旨集, 131-137 (2001).
 - 27) 厚生労働省: 第十五改正日本薬局方, 2006, p.1190-1191, 1226-1227, 1266-1269.
 - 28) 成瀬宇平: 食材図典II, 東京, 小学館, 2001, p.226.
 - 29) 菅原龍幸, 井上四郎編: 新訂原色食品図鑑, 東京, 建帛社, 2001, p.220, 224.
 - 30) 厚生労働省食品安全部: 農産物等の食品分類表 [2007.5版] (<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu2/dl/070516-1.pdf>).
 - 31) 佐藤正幸, 柿帯正樹, 合田幸広: 医薬品研究, 37(4), 245-250 (2006).

西太平洋地区 4 カ国 (日本, 中国, 韓国, ベトナム) の薬局方収載生薬の
各種試験法並びに規格値の比較に関する研究 (第 4 報)
クリーンアナリシスと国際調和を指向した TLC 条件の比較

川原信夫*¹, 井戸淑恵*², 中島育美*², 川崎武志*², 酒井英二*³, 合田幸広*¹

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所, *² 株式会社ウチダ和漢薬, *³ 岐阜薬科大学

Comparative Study on Testing Methods and Specification Values for Crude Drugs
in Pharmacopoeias among Four Western Pacific Regional Countries
(Japan, China, Korea and Vietnam) (IV)

Comparative Study on TLC Identification for Crude Drugs Considering
Harmonization and Clean Analysis

Nobuo Kawahara*¹, Yoshie Ido*², Ikumi Nakajima*², Takeshi Kawasaki*²,
Eiji Sakai*³ and Yukihiro Goda*¹

*¹ National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

*² Uchida Wakanyaku Co., Ltd, 4-4-10 Higashi-nippori, Arakawa-ku, Tokyo 116-8571, Japan

*³ Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu-shi, Gifu 502-8585, Japan

(Received March 26, 2008)

Recently, from the viewpoint of prevention of environmental pollution and the health protection of researcher, clean analysis removing harmful chemical reagents such as benzene and chloroform is recommended worldwide. At the fourth Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH) Standing Committee in Tokyo 2006, we proposed the collaborative study of the developing solvent for TLC identification in Pharmacopoeia, considering clean analysis. The proposed collaboration study is as follows: each member state tests the TLC analysis using non-toxic solvent systems which are described in other members' Pharmacopoeia with regard to the designated crude drugs in the comparative table. In this paper, we show the results of the task work.

From our comparative study, it is suggested that for almost all TLC identification of crude drugs using chloroform (or benzene) as a developing solvent, non-toxic solvent systems will be able to replace the toxic solvents.

Keywords: FHH, Crude drug, Comparative study, TLC identification, Clean analysis

はじめに

「生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会」(FHH: Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines) は、西太平洋地区の 6 カ国 7 地域 (日本, 中国, 韓国, ベトナム, シンガポール, オーストラリア, 香港) における生薬・薬用植物の安全性, 有効性及び品質に関する技術的な記録とコンセンサスを提供することを目的としている。日本はその下

部組織である Sub-Committee I 会議 (Nomenclature and Standardization) を主催し, 5 つの専門部会 (Expert working group, EWG 1-5) を設立した。これらの EWG では, それぞれの分野における各国薬局方の比較表を作成することが課題事項として議決された。著者の一人である川原は EWG 2 (Testing Methods used in Monographs) の責任者であり, 著者らは第一報及び第二報において日本, 中国, 韓国, ベトナム 4 カ国の薬局方に収載された生薬の試験

法及び規格値に関する比較表を作成するとともに、確認試験法における TLC 条件並びに定量法（成分含量測定法）における分析条件の詳細な比較表を作成し、それらの共通点、相違点について報告した^{1) 2)}。さらに第三報において EWG 5 (Information on General Tests) の課題事項である日本、中国、韓国、ベトナム 4 カ国の薬局方に記載された生薬関連一般試験法の詳細について比較表を作成し、その検討結果について報告を行った³⁾。

一方、近年、環境汚染防止並びに実験者の健康保護を目的として、各種試験における有害試薬の使用を極力排除する“クリーンアナリシス”が世界的に浸透しつつある。日本においても 2002 年に公示された第十五改正日本薬局方原案作成要領、第一部、第十五改正日本薬局方原案の作成に関する細則において、有害な試薬の扱いと題して、人及び環境への影響を配慮した試験方法となるよう努めるとの記載がなされている⁴⁾。本項目には、ベンゼン、四塩化炭素、水銀化合物等の試薬は原則使用せず、またクロロホルム、ジクロロメタン（塩化メチレン）等のハロゲン化合物は使用について慎重に検討すると記載されている。有害試薬の扱いについては、2007 年に公示された第十六改正日本薬局方原案作成要領においても継承され、特にクロロホルム等のハロゲン化合物は代替溶媒がない場合についてのみその使用を認めると記載され、より厳密な表記に変更されている⁵⁾。

このような背景の下、2006 年の FHH 会議において、クリーンアナリシスを指向した国際調和の観点から、TLC の展開溶媒として有害試薬を使用している国は、他国の有害試薬を使用しない試験法を参考にして自国の試験法を変更する努力を行うことが重要であるとの提案がなされ、自国内で流通する生薬を用い、有害試薬を使用しない他局の試験法について検討することが承認された。本報では、FHH 諸国の局方に記載された共通生薬の TLC を用いた確認試験法について、各種試験条件の詳細な検討を行い、比較実験を行ったので報告する。

方法

本研究では FHH 参加国及び地域のうち、独自の薬局方を保有している日本、中国、韓国、ベトナムの 4 カ国の生薬に関して検討を行っている。対象となる生薬は著者の一人で EWG1 (Nomenclature) の責任者でもある酒井が作成した共通生薬リストに記載された 106 種である³⁾。これらの生薬をもとに TLC を用いた確認試験における

有害試薬の使用実態を調査し、比較表を作成した。次いで、日本薬局方 (JP) に記載された試料調製法により検液を調製し、TLC の比較検討を行った。本比較表の作成に使用した各国薬局方を Table 1 に示す。

Table 1 Pharmacopoeias Used in Preparation of Comparative Table

日本薬局方 (JP)	第 15 改正日本語版、英語版 日本薬局方外生薬規格 1989 年日本語版
中華人民共和国薬典 (CP)	2005 年版中国語版、英語版
大韓民国薬局方 (KP)	2002 年 第 8 版韓国語版、英語版
ベトナム薬局方 (VP)	2005 年 第 3 版英語版

結果

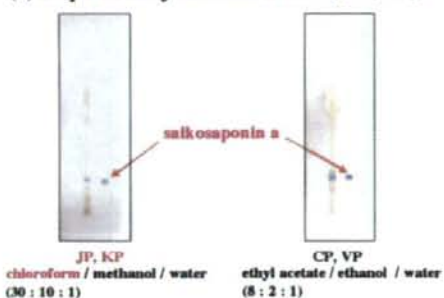
作成した比較表を Table 2 に示す。この結果、サイコ、ケイヒ、サンシュユ、ウコン、マオウ、カンゾウ、コウボク、シャクヤク、キョウニン、オウゴン、キクカ、ジャショウシ、リュウタン、カッコン及びカイカの 15 生薬において、いずれかの薬局方の確認試験に有害試薬が使用されていることが明らかとなった。そこでこれら 15 種の生薬について、各国局方の試験条件により TLC 検討を行った。結果を Fig. 1 に示す。15 種の生薬のうち、サンシュユ (Fig. 1-3) では JP 及び大韓民国薬局方 (KP) は、loganin を指標としているのに対し、中華人民共和国薬典 (CP) 及びベトナム薬局方 (VP) では ursolic acid を指標としていた。また、コウボク (Fig. 1-7) では JP 及び KP は magnocurarine 等のアルカロイド成分を指標としているのに対し、CP 及び VP は magnolol 及び honokiol を指標としていた。さらにキクカ (Fig. 1-11) では CP は buddeleoside を指標としているのに対し、JP 及び VP は luteolin を指標としていた。従ってこれら 3 生薬では対象とする指標成分が異なるため、直接比較は不可能であった。

一方、サイコ (Fig. 1-1)、ケイヒ (Fig. 1-2)、ウコン (Fig. 1-4)、マオウ (Fig. 1-5)、カンゾウ (Fig. 1-6)、シャクヤク (Fig. 1-8)、キョウニン (Fig. 1-9)、オウゴン (Fig. 1-10)、ジャショウシ (Fig. 1-12)、リュウタン (Fig. 1-13)、カッ

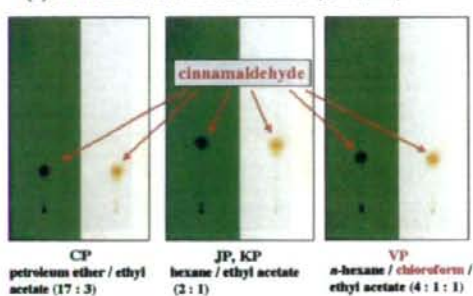
Table 2 Comparative Table on TLC Solvent of Identification for Crude Drugs in CP, JP, KP and VP

No.	Latin name	TLC condition (developing solvent)
1	<i>Bupleurum falcatum</i> Linné (サイコ)	
	CP RADIX BUPLIURI	ethyl acetate / ethanol / water (8 : 2 : 1)
	JP BUPLIURI RADIX	chloroform / methanol / water (30 : 10 : 1)
	KP BUPLIURI RADIX	chloroform / methanol / water (30 : 10 : 1)
	VP RADIX BUPLIURI	ethyl acetate / ethanol / water (8 : 2 : 1)
2	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume (ケイヒ)	
	CP CORTEX CINNAMOMI	petroleum ether / ethyl acetate (17 : 3)
	JP CINNAMOMI CORTEX	hexane / ethyl acetate (2 : 1)
	KP CINNAMOMI CORTEX	hexane / ethyl acetate (2 : 1)
	VP CORTEX CINNAMOMI	n-hexane / chloroform / ethyl acetate (4 : 1 : 1)
3	<i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini (サンシュユ)	
	CP FRUCTUS CORNI	toluene / ethyl acetate / formic acid (20 : 4 : 0.5)
	JP CORNI FRUCTUS	ethyl acetate / water / formic acid (6 : 1 : 1)
	KP CORNI FRUCTUS	ethyl acetate / water / formic acid (6 : 1 : 1)
	VP FRUCTUS CORNI OFFICINALIS	cyclohexane / chloroform / ethyl acetate (20 : 5 : 8)
4	<i>Curcuma longa</i> Linné (ウコン)	
	CP RHIZOMA CURCUMAE LONGAE	chloroform / methanol / formic acid (96 : 4 : 0.7)
	JP CURCUMAE RHIZOMA	ethyl acetate / hexane / acetic acid (100) (70 : 30 : 1)
	KP CURCUMAE LONGAE RHIZOMA	chloroform / methanol / formic acid (96 : 4 : 0.7)
	VP RHIZOMA CURCUMAE LONGAE	chloroform / acetic acid (9 : 1)
5	<i>Ephedra sinica</i> Stapf (マオウ)	
	CP HERBA EPHEDRAE	chloroform / methanol / concentrated ammonia (20 : 5 : 0.5)
	JP EPHEDRAE HERBA	1-butanol / water / acetic acid (100) (7 : 2 : 1)
	KP EPHEDRAE HERBA	n-butanol / water / acetic acid (7 : 2 : 1)
	VP HERBA EPHEDRAE	chloroform / methanol / ammonia (20 : 5 : 0.5)
6	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer, <i>G. glabra</i> Linné (カンゾウ)	
	CP RADIX ET RHIZOMA GLYCYRRHIZAE	ethyl acetate / formic acid / glacial acetic acid / water (15 : 1 : 1 : 2)
	JP GLYCYRRHIZAE RADIX	1-butanol / water / acetic acid (100) (7 : 2 : 1)
	KP GLYCYRRHIZAE RADIX	n-butanol / water / acetic acid (7 : 2 : 1)
	VP RADIX GLYCYRRHIZAE	petroleum ether / benzene / ethyl acetate / glacial acetic acid (10 : 20 : 7 : 0.5)
7	<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wilson var. <i>biloba</i> Rehd. et Wilson (コウボク)	
	CP CORTEX MAGNOLIAE OFFICINALIS	benzene / methanol (27 : 1)
	JP MAGNOLIAE CORTEX	1-butanol / water / acetic acid (100) (4 : 2 : 1)
	KP MAGNOLIAE CORTEX	n-butanol / water / acetic acid (4 : 2 : 1)
	VP CORTEX MAGNOLIAE OFFICINALIS	benzene / methanol (27 : 1)
8	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallus (シャクヤク)	
	CP RADIX PAEONIAE ALBA	chloroform / ethyl acetate / methanol / formic acid (40 : 5 : 10 : 0.2)
	JP PAEONIAE RADIX	acetone / ethyl acetate / acetic acid (100) (10 : 10 : 1)
	KP PAEONIAE RADIX	acetone / ethyl acetate / glacial acetic acid (26 : 14 : 5)
	VP RADIX PAEONIAE	chloroform / ethyl acetate / methanol / formic acid (40 : 5 : 10 : 0.2)
9	<i>Prunus armeniaca</i> Linné, <i>P. armeniaca</i> Linné var. <i>ansu</i> Maximowicz (キウニン)	
	CP SEMEN ARMENIACAE AMARUM	chloroform / ethyl acetate / methanol / water (15 : 40 : 22 : 10)
	JP ARMENIACAE SEMEN	ethyl acetate / methanol / water (7 : 3 : 1)
	KP ARMENIACAE SEMEN	ethyl acetate / methanol / water (7 : 3 : 1)
	VP SEMEN ARMENIACAE AMARUM	chloroform / ethyl acetate / methanol / water (15 : 40 : 22 : 10)
10	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi (オウゴン)	
	CP RADIX SCUTELLARIAE	toluene / ethyl acetate / methanol / formic acid (10 : 3 : 1 : 2)
	JP SCUTELLARIAE RADIX	1-butanol / water / acetic acid (4 : 2 : 1)
	KP SCUTELLARIAE RADIX	chloroform / methanol / glacial acetic acid (20 : 10 : 3)
11	<i>Chrysanthemum indicum</i> Linné (キクカ)	
	CP FLOS CHRYSANTHEMI INDICI	ethyl acetate / butanone / chloroform / formic acid / water (15 : 15 : 6 : 4 : 1)
	JP CHRYSANTHEMI FLOS	ethyl acetate / 2-butanone / water / formic acid (25 : 3 : 1 : 1)
	VP FLOS CHRYSANTHEMI INDICI	ethyl acetate / formic acid / water (8 : 1 : 1)
12	<i>Cnidium monnieri</i> Casson (ジャシウシ)	
	CP FRUCTUS CNIDII	toluene / ethyl acetate / n-hexane (3 : 3 : 2)
	JP CNIDII MONNIERIS FRUCTUS	hexane / ethyl acetate (2 : 1)
	VP FRUCTUS CNIDII	benzene / ethyl acetate (30 : 1)
13	<i>Gentiana scabra</i> Bunge (ジユウタン)	
	CP RADIX ET RHIZOMA GENTIANAE	ethyl acetate / methanol / water (20 : 2 : 1)
	JP GENTIANAE SCABRAE RADIX	ethyl acetate / ethanol (99.5) / water (8 : 2 : 1)
	KP GENTIANAE SCABRAE RADIX	chloroform / methanol / water (30 : 10 : 1)
14	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi (カッコン)	
	CP RADIX PUERARIAE LOBATAE	chloroform / methanol / water (7 : 2.5 : 0.25)
	JP PUERARIAE RADIX	ethyl acetate / methanol / water (12 : 2 : 1)
	KP PUERARIAE RADIX	chloroform / methanol / water (6 : 4 : 1)
15	<i>Sophora japonica</i> Linné (カイカ、局外)	
	CP FLOS SOPHORAE	ethyl acetate / formic acid / water (8 : 1 : 1)
	JP SOPHORAE FLOS	chloroform / methanol / water (6 : 4 : 1)
	KP SOPHORAE FLOS	ethyl acetate / formic acid / water (8 : 1 : 1)

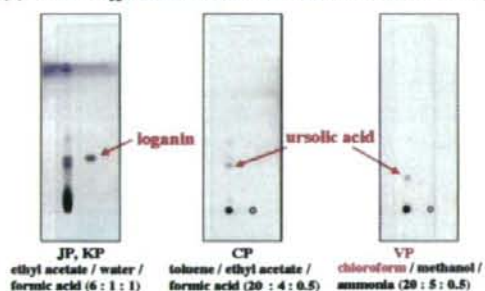
(1) *Bupleurum falcatum* Linné (サイコ)



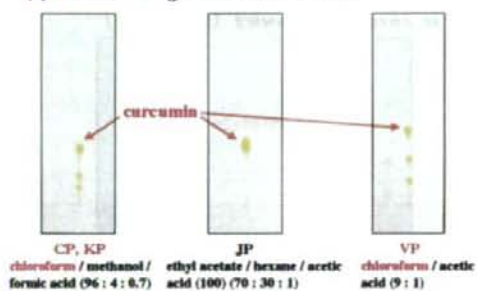
(2) *Cinnamomum cassia* Blume (ケイヒ)



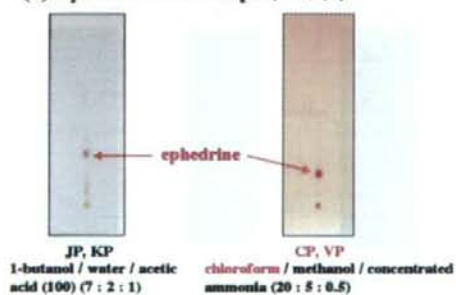
(3) *Cornus officinalis* Siebold et Zuccarini (サンシユユ)



(4) *Curcuma longa* Linné (ウコン)



(5) *Ephedra sinica* Stapf (マオウ)



(6) *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, *G. glabra* Linné (カンゾウ)

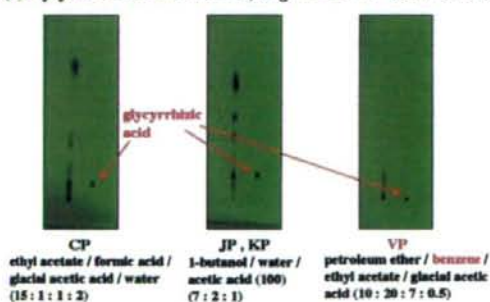
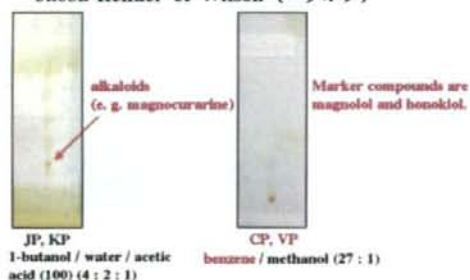
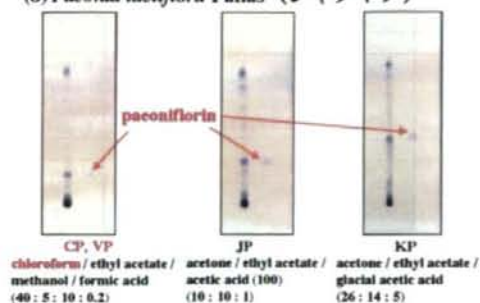


Fig. 1 Comparative Study on TLC Identification for Crude Drugs in CP, JP, KP and VP

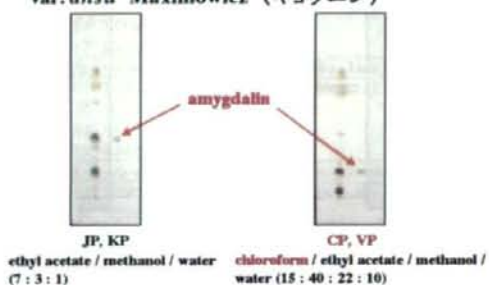
(7) *Magnolia officinalis* Rehder et Wilson var. *biloba* Rehder et Wilson (コウボク)



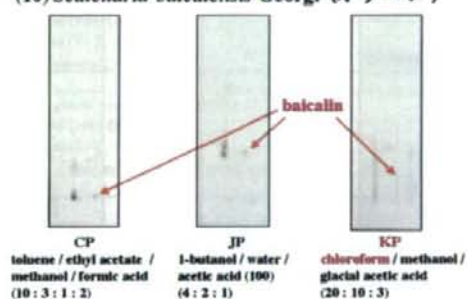
(8) *Paeonia lactiflora* Pallas (シヤクヤク)



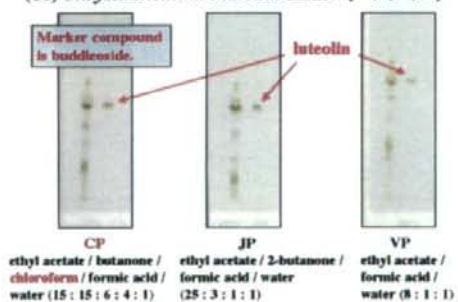
(9) *Prunus armeniaca* Linné, *P. armeniaca* Linné
var. *ansu* Maximowicz (キョウニン)



(10) *Scutellaria baicalensis* Georgi (オウゴン)



(11) *Chrysanthemum indicum* Linné (キクカ)



(12) *Cnidium monnieri* Cusson (ジャシヨウシ)

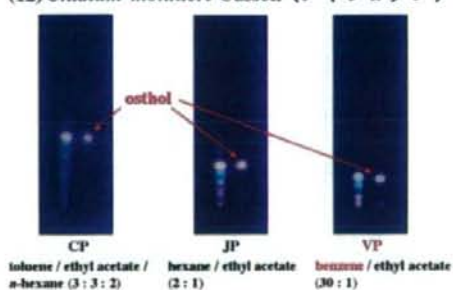
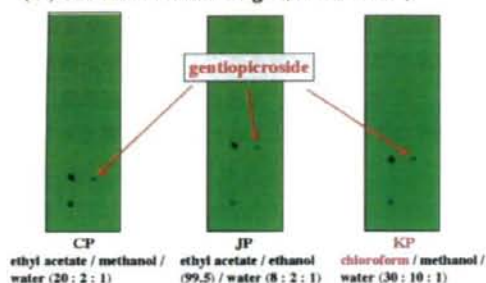
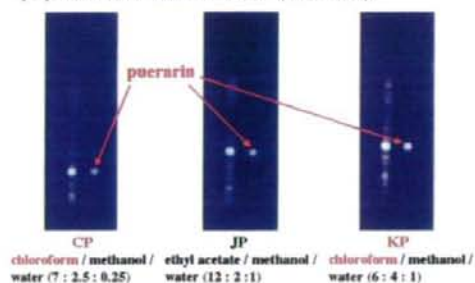


Fig. 1 Comparative Study on TLC Identification for Crude Drugs in CP, JP, KP and VP

(13) *Gentiana scabra* Bunge (リュウタン)



(14) *Pueraria lobata* Ohwi (カッコン)



(15) *Sophora japonica* Linné (カイカ)

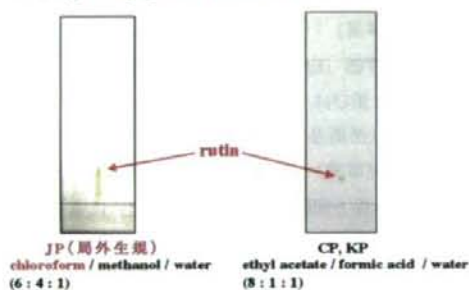


Fig. 1 Comparative Study on TLC Identification for Crude Drugs in CP, JP, KP and VP

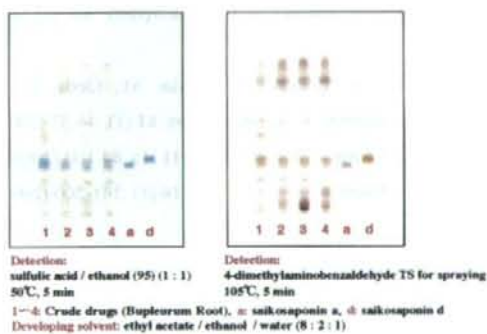


Fig. 2 Comparative Study on TLC Identification of Bupleurum Root and Saikosaponins a and d in Different Detection

コン (Fig. 1-14) 及びカイカ (Fig. 1-15) の 12 生薬では、すべて有害試薬を使用しない方法でも同一の指標成分が確認可能であることが示された。特にサイコでは、JP 及び KP でクロロホルムを使用しているのに対し、CP 及び VP では有害溶媒を使用しておらず、CP 及び VP 法を用いても国内流通生薬の確認が可能であることが明らかとなった。さらにサイコに関して、検出試薬の違いによる呈色の比較検討を行った (Fig. 2)。この結果、噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液では、saikosaponin a 及び d の呈色が異なることが確認され、本噴霧試液を用いることにより、saikosaponin a 及び d を同時に分別検出することが可能となった。

考察及び結論

今回の比較表作成並びに比較試験により、東アジア地区 4 カ国の薬局方に記載された生薬の確認試験法で使用される有害試薬の設定状況が明らかとなった。特に CP 及び VP については有害溶媒の使用頻度が高かった。重要生薬であるサイコに関しては、有害試薬を用いないこと並びに明瞭な検出の二点において CP 及び VP 法が優れていることが明らかとなり、JP 法を変更する必要があると考えられた。一方、ケイヒ、ウコン、マオウ、カンゾウ、シャクヤク、キョウニン、オウゴン、ジャショウシ、リュウタン及びカクコンの 10 生薬における確認試験では、クリーンアナリシスであることのみならず指標成分の値、スポットの形状等、様々な面において JP 法が最も適していると考えられた。

本報では、クリーンアナリシスを指向した国際調和の観点から、日本、中国、韓国、ベトナム 4 カ国の薬局方に記載される共通生薬について、TLC を用いた確認試験法で使用される各種有害試薬の比較表を作成し、比較試験を行った。この結果、15 種の生薬のうち、同一の指標成分を有する 12 生薬において、すべて有害試薬を使用しない方法においても指標成分が確認可能であることが

示された。特にサイコでは、現行の日本薬局方において展開溶媒にクロロホルムを用いているが、CP 及び VP の有害試薬を用いない試験条件でも指標成分が検出可能であることが確認された。今後は JP の確認試験における試験条件の変更を視野に入れた対応が必要であると考えられた。

謝辞

本研究は平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 (特別研究事業)「生薬規格の国際調和に関する研究」、平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (医薬品等医療技術リスク評価研究事業)「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価 (EBM 確保) 手法及び安全性確保等に関する研究」、平成 16 及び 17 年度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)「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価 (EBM 確保) 手法及び安全性確保等に関する研究」並びに平成 18 及び 19 年度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)「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」による。

引用文献

- 1) Kawahara, N., Sakai, E., Itokazu, N., Satake, M., Goda, Y., *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **60** (1), 39-50 (2006).
- 2) Kawahara, N., Sakai, E., Itokazu, N., Satake, M., Goda, Y., *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **60** (2), 80-90 (2006).
- 3) Kawahara, N., Itokazu, N., Satake, M., Goda, Y., *The Japanese Journal of Pharmacognosy*, **61** (1), 44-57 (2007).
- 4) *Japanese Pharmacopoeial Forum*, **11** (1), 84-100 (2002).
- 5) *Japanese Pharmacopoeial Forum*, **16** (1), 161-200 (2007).

Convenient TLC-based Identification Test for the Crude Drug “Pogostemoni Herba”

Yoshiaki AMAKURA,^{a,*} Morio YOSHIMURA,^a Chika MOURI,^b Masayuki MIKAGE,^b
Nobuo KAWAHARA,^c Yukihiko GODA,^c and Takashi YOSHIDA^a^aCollege of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, 4-2 Bunkyo-cho, Matsuyama City 790-8578, Japan, and ^bGraduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa City 920-1192, Japan, and ^cDivision of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received May 30, 2008; Accepted August 29, 2008)

TLC and HPLC were used to identify possible chemical markers for evaluating the quality of the crude drug “Pogostemoni herba” (aerial part of *Pogostemon cablin*), which is a component of Kampo medicines. In addition to the reported patchouli alcohol and 2-hydroxy-6-methyl-3-(4-methylpentanoyl)-4-pyrone, three phenylethanoids were isolated from this plant material for the first time: acteoside, isoacteoside, and crenatoside. The usefulness of these compounds as indicators of the crude commercial drug under various TLC conditions was examined, and patchouli alcohol was found to give a definite spot with a reproducible *R_f* value. Therefore, we propose TLC of the methanol (MeOH) extract using patchouli alcohol as a marker as a convenient method for identifying the crude drug Pogostemoni herba.

Key words—*Pogostemon cablin*; Pogostemoni herba; thin-layer chromatography; patchouli alcohol

INTRODUCTION

Pogostemon cablin Benth (Labiatae) grows in Southeast Asia, China, and India, and its dried aerial part (Pogostemoni herba) is used as a crude drug called “Kakko” in Japan¹⁾ for gastrointestinal disorders such as indigestion, vomiting, and diarrhea. “Kakko” is also an important component of Kampo formulas such as “Kakkoshokisan.” The crude drug is reported to contain terpenes,²⁻⁴⁾ flavones,^{5,6)} chalcones,⁷⁾ and alkaloids,⁸⁾ and is rich in volatile patchouli oil,⁹⁻¹⁴⁾ which is used widely in the perfume industry.

In traditional Chinese medicine, “Kakko” (or *Dokakko* or *Senkakko*) is derived from the leaves and stems of *Agastache rugosa* O. Kuntze (Kawamidori and Haikousou in Japan), which belongs to the same family, and the aerial part of *P. cablin* is called “Kokakko.”^{15,16)} Although the Chinese *Kakko* derived from *A. rugosa* is currently rare in Japanese markets, a reliable quality standard for the crude drug Pogostemoni herba is necessary to avoid confusing its origin.

A method of identifying the crude drug Pogostemoni herba has already been described,¹⁾ but it is a qualitative method that uses visualization with 2,4-dinitrophenylhydrazine reagent for carbonyl com-

pounds in the distillate after steam distillation. Therefore, a simple, rapid method to detect marker compounds, such as a TLC method, is required. We describe a TLC-based method for identifying Pogostemoni herba as part of our studies on evaluating the quality of crude drugs.

MATERIALS AND METHODS

General UV spectra were recorded on a Shimadzu UVmini-1240. Electrospray ionization (ESI) MS and high-resolution (HR) ESI-MS were performed using a micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, USA) mass spectrometer with acetonitrile as the solvent. HR-EI-MS was performed on a JEOL JMS-700 instrument (JEOL, Tokyo, Japan). ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Varian INOVA AS600 (600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C; Varian, USA), and the chemical shifts are given in parts per million relative to that of the solvent [chloroform-*d* (δ_{H} 7.26; δ_{C} 77.0) or methanol-*d*₄ (δ_{H} 3.30; δ_{C} 49.0)] on a tetramethylsilane scale. The standard pulse sequences programmed for the INOVA AS600 were used for each two-dimensional (2D) measurement (COSY, HSQC, and HMBC). *J_{CH}* was set at 8 Hz for the HMBC measurement. Reverse-phase HPLC conditions were: column, L-column ODS (5 μm , 150 \times 2.1 mm i.d.; Chemicals Evaluation and Research Institute, Tokyo, Japan); mobile phase, solvent A 3% acetic acid and solvent B acetonitrile (0

*e-mail: amakura@cc.matsuyama-u.ac.jp

-30 min, 0-50% B in A; 30-35 min, 50-85% B in A; 35-40 min, 85-85% B in A); injection volume, 10 μ l; column temperature, 40°C; flow rate, 0.3 ml/min; and detection, 200-400 nm. Preparative HPLC conditions were: column, L-column ODS (5 μ m, 250 \times 10 mm i.d.; Chemicals Evaluation and Research Institute); mobile phase, solvent A 3% acetic acid and solvent B acetonitrile (0-30 min, 0-50% B in A; 30-35 min, 50-85% B in A; 35-40 min, 85-85% B in A); column temperature, 40°C; flow rate, 2.0 ml/min; and detection, 200-400 nm. Column chromatography was conducted on a Diaion HP-20, MCI GEL CHP-20P (75-150 μ m; Mitsubishi Chemical Industries, Tokyo, Japan), Toyopearl HW-40 (fine grade; Tosoh, Tokyo, Japan), and silica gel 60 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). TLC was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Germany). About 5 μ l of the solution was injected, and the spots were visualized by heating the plates after spraying them with vanillin-sulfuric acid test solution¹⁷⁾ or by placing them under a UV lamp.

Materials Commercial Pogostemoni herba (*Kakko*) samples (A-E) were obtained from Uchida Wakanyaku (lot nos. 262314 and 263111, Tokyo, Japan), Tochimoto Tenkaido (lot nos. 025206001 and 025206002, Osaka, Japan), and Matsuura Yakugyo (lot no. 826084, Aichi, Japan) in 2006. The aerial parts of *A. rugosa* O. Kuntze were collected in September 1995 in Okayama, Japan, and in March 2008 in the medicinal plant garden of Kanazawa University, Ishikawa, Japan. A voucher specimen (MU-L-51) was deposited in the Herbarium of the College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, Ehime, Japan. All other chemicals were of analytical reagent grade.

Isolation Pogostemoni herba (400 g) was soaked in methanol (MeOH; 9 l) for 24 h at ambient temperature. The filtrate was concentrated to give an MeOH extract (40 g). The residue was further homogenized in 70% aqueous acetone (6 l), and the concentrated solution (1 l) was extracted with ethyl acetate (EtOAc; 6 l) to give EtOAc (6.0 g) and water (13.8 g) extracts. The MeOH extract was partitioned between *n*-hexane and water to give an *n*-hexane extract (11.9 g). A portion (1 g) of the *n*-hexane extract was dissolved in acetone and subjected to preparative TLC to give patchouli alcohol (1) (30 mg). Another portion (1 g) of the *n*-hexane extract was purified on column chromatography over silica

gel 60 (50 \times 2.0 cm i.d.) with *n*-hexane/acetone (9 : 1 \rightarrow 8 : 2) to give fraction A. Fraction A was purified using preparative TLC [*n*-hexane/acetone (9 : 1)] to give 2-hydroxy-6-methyl-3-(4-methylpentanoyl)-4-pyrone (2) (15 mg). A portion (1.0 g) of the EtOAc extract was subjected to column chromatography on MCI GEL CHP-20P (30 \times 1.1 cm i.d.) with aqueous MeOH and then purified using preparative HPLC to yield acteoside (3) (30 mg), isoacteoside (4) (3.0 mg), and crenatoside (5) (2.0 mg).

RESULTS AND DISCUSSION

To characterize marker compounds for a TLC-based identification test of Pogostemoni herba, the optimal TLC conditions, including solvent and detection method, were examined for a sample solution prepared by shaking the crude drug in MeOH at ambient temperature. The TLC (SiO₂) chromatogram developed with *n*-hexane/acetone (9 : 1) was found to give two clear, well-separated spots with *R_f* values of approximately 0.7 (spot 1) and 0.4 (spot 2). Spot 1 was visualized as purplish red by spraying with vanillin-sulfuric acid test solution followed by heating on a hot plate, and spot 2 was observed under UV light (254 nm). The constituent giving spot 1 was identified as patchouli alcohol (1)^{2,3,18)} based on its isolation using preparative TLC under the same conditions. The UV-sensitive compound (spot 2) was identified as 2-hydroxy-6-methyl-3-(4-methylpentanoyl)-4-pyrone (2).¹⁹⁾ On chromatographic separation of 2 over silica gel with HPLC monitoring, three phenylethanoid derivatives were also obtained: acteoside (3), isoacteoside (4),^{20,21)} and crenatoside (5).²²⁾ (Fig. 1). All of the compounds were identified by spectral comparisons with reported data. Compounds 3, 4, and 5 were isolated from this plant material for the first time.

To determine the best marker among the constituents, TLC was performed for MeOH extracts obtained from five commercial samples of Pogostemoni herba (samples A-E) from Japanese markets. Compound 1 was detected as a clear spot with reproducible *R_f* values in all samples (Fig. 2), whereas 2 was barely observed in some of the samples, probably because of low content (Fig. 3a). To confirm this, the MeOH extracts of samples A-E were analyzed using HPLC with a photodiode-array detector. Although all of the samples indicated the presence of 2 and 3, the content of the former was clearly low in samples

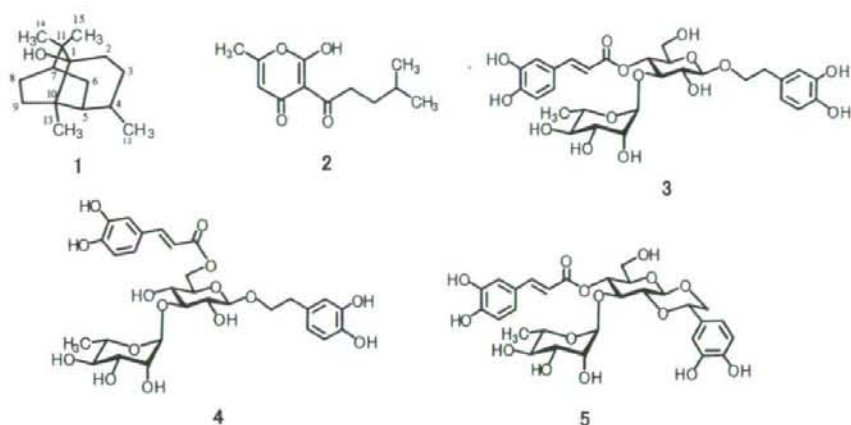


Fig. 1. Structures of Compounds 1-5 Isolated from *Pogostemoni Herba*

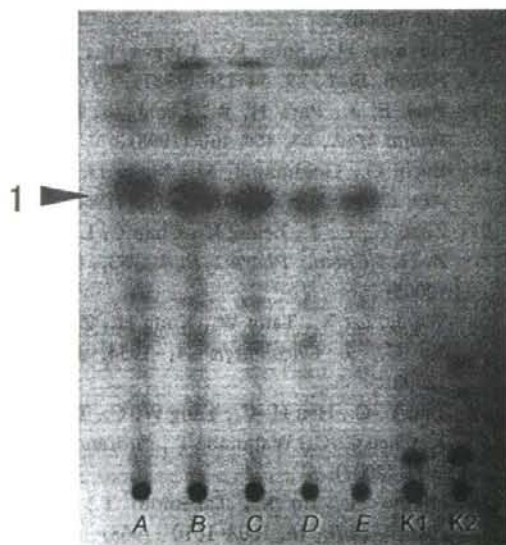


Fig. 2. TLC Profiles of MeOH Extracts (Samples A-E) of Commercial *Pogostemoni Herba* and MeOH Extracts of *A. rugosa* (K1 and K2)

1: Patchouli alcohol, Solvent: *n*-hexane-acetone (9 : 1), Detection: spraying the plate with vanillin-sulfuric acid test solution and heating.

C, D, and E (Fig. 4). Therefore compound 2 is not suitable as a marker for TLC, although it has potential as a diagnostic marker because it is a rare characteristic constituent of this plant and is easily detected under UV light without any reagent. Likewise, compound 3 is also not adequate as a TLC marker because its spot was not detected clearly in all samples prepared using simple MeOH extraction and UV ir-

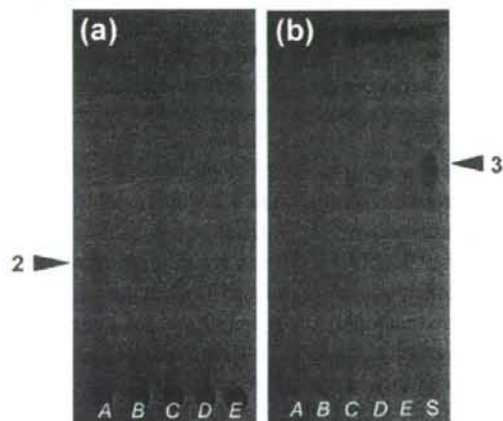


Fig. 3. TLC Profiles of MeOH Extracts (Samples A-E) of Commercial *Pogostemoni Herba*

(a) Solvent: *n*-hexane-acetone (9 : 1), Detection: UV lamp at 254 nm.
(b) S: acteoside (3), Solvent: ethyl acetate : acetic acid : water (7 : 2 : 1), Detection: UV lamp at 254 nm.

radiation (Fig. 3b) or spraying with the detection reagent, iron (III) chloride or 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid.²³ These results were similar to those for drug extracts prepared under heat (60°C, 10 min). Therefore we deemed compound 1 the best marker for a TLC-based method for authenticating the crude drug.

To distinguish Japanese "Kakko" from the Chinese "Kakko" derived from *A. rugosa*, the MeOH extract of *A. rugosa* was subjected to TLC. Compared with the TLC profiles of samples A-E, the spot of 1 was not detected on the TLC plates of two

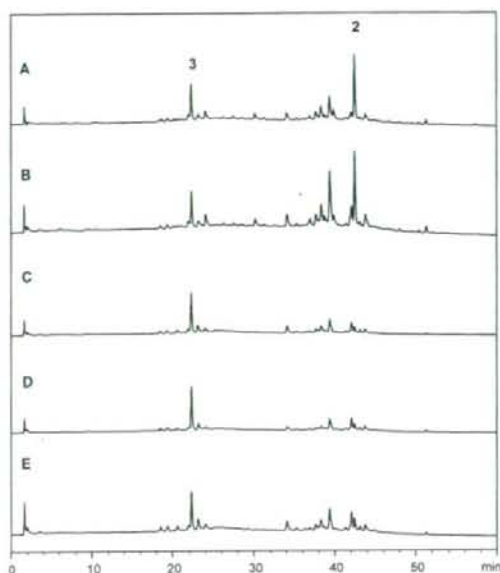


Fig. 4. Reversed-phase HPLC Profiles at 254 nm of MeOH Extracts (Samples A-E) of Commercial Pogostemoni Herba

A. rugosa extracts (K1 and K2; Fig. 2), allowing the differentiation of these crude drugs, although the Chinese “*Kakko*” itself was not examined in detail.

In conclusion, our proposed TLC identification test for Pogostemoni herba is as follows: the sample (0.5 g) is extracted by shaking with MeOH (5 ml) for 3 min at ambient temperature and then filtered. An aliquot (5 μ l) of the filtrate is applied to a TLC plate and developed with a mixture of *n*-hexane/acetone (9 : 1) to a distance of 10 cm, and the plate is air-dried. The plate is sprayed thoroughly with vanillin-sulfuric acid test solution and heated to detect the purplish red spot of **I** with an *R_f* value of approximately 0.6–0.7. This method consists of a simple MeOH extraction procedure and TLC using safe reagents [*n*-hexane/acetone (9 : 1)] without harmful benzene or halogenated solvents such as chloroform and dichloromethane and is comparable to the identification tests used for many crude drugs in the *Japanese Pharmacopoeia*, 15th edition.¹⁷⁾

Acknowledgments We thank Dr. Hideyuki Ito (Okayama University) and Dr. Naoki Sugimoto (National Institute of Health Sciences) for performing the NMR and MS measurements. This work was supported by a Health Sciences Research Grant from the

Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, “The Japanese herbal medicine codex” (non-JP crude drug standard), Yakujiinipposha, 2005, p. 9.
- 2) Ichikawa K., Kinoshita T., Sankawa U., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 345–348 (1989).
- 3) Kiuchi F., Matsuo K., Ito M., Qui T. K., Honda G., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1495–1496 (2004).
- 4) Yang Y., Kinoshita K., Koyama K., Takahashi K., Tai T., Nunoura Y., Watanabe K., *Phytomedicine*, **6**, 89–93 (1999).
- 5) Miyazawa M., Okubo Y., Nakamura S., Kosaka H., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 642–647 (2000).
- 6) Itokawa H., Suto K., Takeya K., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 54–256 (1981).
- 7) Park E. J., Park H. R., Lee J. S., Kim J., *Planta Med.*, **64**, 464–466 (1998).
- 8) Büchi G., Goldman I. M., Mayo D. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3109–3113 (1966).
- 9) Zhao Z., Lu J., Leung K., Chan C. L., Jiang Z.-H., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 856–860 (2005).
- 10) Wu J., Lu X., Tang W., Kong H., Zhou S., Xu G., *J. Chromatogr. A*, **1034**, 199–205 (2004).
- 11) Tsai Y.-C., Hsu H.-C., Yang W.-C., Tsai W.-J., Chen C.-C., Watanabe T., *Fitoterapia*, **78**, 7–11 (2007).
- 12) Hikino H., Ito K., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1608–1610 (1968).
- 13) Hu L. F., Li S. P., Cao H., Liu J. J., Gao J. L., Yang F. Q., Wang Y. T., *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **42**, 200–206 (2006).
- 14) Tsubaki N., Nishimura K., Hirose Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 597–600 (1967).
- 15) Shanghai Scientific Technologic Publisher, “Dictionary of Chinese Medicines”, Shogakukan, Japan, 1998, pp. 293–295.
- 16) Namba T., “Coloured Illustrations of Wakan-Yaku” (Crude Drugs in Japan, China, and Neighbouring Countries), Vol. II, Hoikusha, Japan, 1980, pp. 58–59.
- 17) Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, “The Japanese Pharmacopoeia”, 15th