は市販可能な試薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め，その物質を分析用標品として，定量法（成分含量測定法）と定量規格を規定している．ところが，このような試薬を分析用標品とした場合，クロマトグラム上の純度等は規定可能であるが，その値は，計量学的に値付けが行われていないものであるため，分析値の信頼性を大きく損なう可能性を完全には否定できない．従って，法的な拘束力のある公的規格で，標準品としての公的な保証を行っていないこのような試薬に頼り，規格値を設定することは，厳密には問題があるものと考えられる．

近年，このような天然物の定量問題を解決する手法として，国際単位系（SI）へのトレーサビリティを確保した絶対分析法として，定量NMR（quantitative NMR: qNMR）が，国立衛研の杉本らを中心として実用化されつつある．qNMRは，^{1}H-NMRスペクトル上に観察される化合物のシグナル面積比が分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例することを利用している．2つの化合物が同時に存在する場合，シグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから，一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば，もう一方の化合物の純度あるいは含量を観察されるシグナル面積比と調製値の関係から求める事が出来る．従って，qNMRは，測定対象と同一化合物の定量用標準品を必要とせず，別の標準物質を基準として定量分析が可能な絶対定量法であり，SIにトレーサブルな一次標準測定法のうち，一次標準比率法，すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い，それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する分析法である（杉本ら，食品衛生学雑誌投稿中）．従って，本法を用いた場合，上位の標準物質「ものさし」を用いて，NMRで測定可能な，あらゆる化合物の絶対量が計量学的に正確に求めることが可能となる．

本研究では，前述した問題を解決し，成分含量測定用試薬を定量規格化し，生薬や漢方処方エキスにおいて信頼性のある定量規格を設定するため，日本薬局方においてqNMR法が利用可能か検討を行う．さらに利用可能な場合，局方において，同法を利用して成分含量測定用試薬をどのように定量規格化していくか具体的な方策を検討する．初年度である平成21年度では，日本薬局方用試薬を用い，実際にqNMRの測定を行い，qNMR法を日本薬局方で利用可能であるかどうか検討を行うとともに，利用する場合における課題の抽出を行った．

B. 研究方法

実験方法は，以下の変更点を除き，既報（杉本ら，日食化誌16(1)，28-33，2009）に準拠した．日本薬局方用試薬としては，和光純薬製，honokiol（**1**，Lot WKL0604），geniposide（**2**，Lot CDF1230），baicalin（**3**，Lot CDF1316），puerarin（**4**，Lot CDR4423），(*E*)-cinnamaldehyde（**5**，Lot ALL5888）を用いた．cucurbitacin B（**6**）は，沖縄県衛生環境研究所が単離したものを使用した．天秤は，METLER TOLEDを使用した．ヘキサメチルジシラン（hexamethyldisilane: HMD）は，東京化成製のものを用いた．重水素化溶媒（重溶媒）は，全てISOTEC製のものを使用した．HMDの濃度校正は，HMD約100 mgを精密に量り，DMSO-d6を除き，重溶媒50 mLに定容した．DMSO-d6では，25 mLに定容した．これら溶液をMeOHを除く重溶媒では10倍，MeOH-d4では5倍，同じ重溶媒でさらに希釈しqNMR用標準液とした．日本薬局方用試薬の純度測定は，各試薬約5 mgを精

密に量り取り，予め調製した標準液 1.0 mL に溶解し，この溶液 0.6 mL を NMR 試料管（Wilmad 928）に封入し，上記既報に従い qNMR を各化合物につき 3 回測定することで行った．なお個々の積分は，1 個以上のプロトンに由来するシグナルについて分離可能な範囲で行った．

C. 研究結果と考察

C.1. honokiol（**1**）

化合物 **1** の NMR チャートとその部分拡大図（構造式）及び，qNMR の結果を，Fig. 1a，Fig. 1b，Table 1 に示す．**1** は，芳香族化合物であり，シグナルは，3.3ppm 付近に存在するベンジルメチレン（h, i）から，8ppm 付近に存在する 2 個の水酸基に由来するピーク（OH1, OH2）にかけて分布する（Fig. 1a 上，高磁場に存在するシグナルは，溶媒であるアセトンと水に由来する）．このうち，交換性の水酸基由来のピークを除いた各シグナル（a-i）の純度値は，最小で 95.4%（f），最大で 97.3%（b）となり，のこりのシグナルは，2 件（i, c, 97.0%）を除き，6 シグナルが 96%台の値を示した．全てのシグナルの n=3 での相対標準偏差（RSD%）は，最大で 1.6%（e），最小で 0.8%（a）であった．

1 の場合，添付文書に記載された HPLC による純度表示が 100%であり，非常に精製された試薬であった．このような試薬においても，NMR では，明らかに水（及び HDO）由来と考えられるシグナルが高磁場に存在しており，この存在が，qNMR 上の純度を 96%程度に押し下げたものと考えられる．（なお，添付書類には x・H_2O の表記があり，水分を含んでいることが，試薬会社も意識しているものと考えられる．）

一般に，NMR においては，シグナルが単スピン系の場合シングレットとなり，二スピン系となるとダブレットに分裂し，さらに多スピン系になると，より複雑なカップリングパターンを示すことになる．多スピン系の場合，それぞれの化学シフトと *J* 値との関係から 1 次近似出来ないシグナル系となる場合が多くあり，その場合，主観的に決定した積分範囲の外に，実際には残ったシグナルが存在することがあり得る．また，より積分範囲が狭いほど，正しいシグナルに隠れた不純物のシグナルを同時に積分する可能性が減ることになる．従って，積分値の信頼性を考えると，より単純なスピン系を持つシグナルでより積分範囲が狭いシグナルがより正確で信頼のおける純度値を示すものと考えられる．

今回測定したシグナルのうち，最もこの条件に当てはまるのは，ほぼ 2 スピン系と考えられるシグナル a と c である．これらのシグナルの純度値は，96.5%（RSD：0.79%），97.0%（RSD：1.17%）となる．一方，水酸基由来のシグナルを除き今回測定を行った全てのシグナル（10 シグナル）の純度値の平均は 96.59%である．この数値は，シグナルの測定数が多くなるという意味で，純度値としてより精度が高くなっているが，一方で，不純物のシグナルを含む可能性がより多くなり，また，多スピン系のシグナルも含む点で積分範囲の決定により曖昧さを持ったシグナルのデータを含めたものとなる．シグナル a，c の平均値は 96.73%であり，どちらにせよ，本化合物の純度は 96.6−96.7%付近にあるものと考えられるが，日本薬局方に使用する試薬として最終的な値付けを行うとすると，qNMR 測定後，どのようなルールで値付けを行い純度表示を実施するか，議論に基づいたコンセンサスが必要となると考えられる．但し，天然物の定量として，局方上求められる精度は，有効数字が最大で 2 桁であり，その点を考えると，本品のように純度が高い（95%以上の値が示さ

れるもの）場合には，どちらのルール（最も単純なシグナルの平均 vs 全有効シグナルの純度値の平均）を使用しても，得られる結果に差は生じない可能性が高い．

C.2. geniposide（**2**）

化合物**2**のNMRチャート(構造式)及び,qNMRの結果を，Fig. 2, Table 2に示す．**2**は，イリドイド配糖体であり，そのシグナルは，高磁場領域に比較的多く，2ppmから，7.5ppmの範囲に分布している．不純物のシグナルでは，4.8 ppm付近に存在する水（HDOも含む）のシグナルが最も大きい．**2**由来と考えられるシグナルのうち，最もスピン系が単純なシグナルはシングレットのa（91.9%）及び3H分のカルボキシメチルシグナルであるf（93.8%）で，次いで2スピン系のグルコースのアノメリックプロトンd（92.6%）のシグナル，配糖体の付け根のc（91.7%）及び，お互いにカップリングしているe1（92.1%），e2（91.9%）のシグナルで，これらの純度値の平均は，92.3%となる．これらのシグナルのうち純度値が最も大きいのが，カルボキシメチルシグナルでこのシグナルだけが，他のシグナルより1%以上純度値が高く，このシグナルを外した場合には，平均値は92.0%となる．NMRのデータを良く観察すると，若干fシグナルの下部のベースラインが盛り上がっているようにも観察される．また，この領域は，天然物に多い糖及び配糖体の不純物由来のシグナルが出現する領域である．事実，積分を行っていないこの付近の領域でも，明らかな不純物ピークが観察されている．また，3.7ppmより高磁場に出現するグルコース由来の領域は，4カ所に区分（最も高磁場の部分にg由来のシグナルを含む）されるが，どの領域でも純度値が92.6%以上と先ほどの平均値を上回っており，このような不純物が容易に入り込んでいることが示唆される．

次に，糖領域より，さらに高磁場の領域には，シグナルhとメチレン由来の2つのシグナルi1, i2が観測される．これらのシグナルは，bからスタートしてシグナルcに至る連続した多スピン系のシグナルであり，主観的に決定した積分範囲の外に，実際には残ったシグナルが存在する可能性があり，それぞれ簡単にはどのシグナルがどの水素由来であるとの近似を行うことが厳密には難しい．事実，b, h, i1, i2のシグナルの純度値は，91.8%, 94.2%, 94.2%, 90.5%と単純なスピン系のシグナルの平均値から得られた値92.0%に対して，大小があり，この予想を支持しているものと考えられる．

以上，化合物**2**の結果を考えると，純度が92%程度の化合物で，各シグナルの平均値を純度値として用いる場合，どのシグナルを平均値算定の対象シグナルとするか，試料毎に慎重な検討が必要であるものと考えられた．

C.3. puerain（**3**）

化合物**3**は，フラボノイド配糖体であり，そのシグナルは，大きく芳香族部分と糖部分に分かれている．本化合物は，測定溶媒による差についても観測するためMeOH-d4と，acetone-d6の二種類の溶媒で測定した．化合物**3**のそれぞれの溶媒によりNMRチャート（構造式）及び，qNMRの結果を，Fig. 3a及び3b, Table 3a及び3bに示す．

本化合物の場合，不純物シグナルが混入しにくい芳香族領域の5カ所シグナル(a-e)では，MeOH-d4中で測定した場合,89.2%(b)から91.1%（e）の間に純度値が分布しその平均は90.1%, acetone-d4中では，88.3%（b）から90.3%（e）の間に純度値が分布しその平均値は89.6%と平

均値で0.5%の差が生じた．また，これらのシグナルの内，特にスピン系が単純なa，b，dのシグナルでは，MeOH-d4 中での平均が 89.6%，acetone-d6 中では，89.1%となりここでも平均値で 0.5%の差が生じた．試薬 5 mg 程度を測定する天秤での秤量誤差を考えると，有効数字は2 桁であるものと考えられ，また，今回の測定で全てのシグナルでRSDは0.5%程度あることから，この 0.5%の誤差は，測定溶媒による差ではなく，秤量段階での誤差である可能性が高いものと思われる．次に，糖部でのシグナルの積分値を観察すると，スピン系が単純なアノメリックプロトンのシグナルである f において，acetone-d6 中では純度値が 89.4%であるのにかかわらず，MeOH-d4 中での値が 86.6%であり，上記の芳香族領域のシグナルと比較して 3.5%程度小さな純度値となっていることが目を引く．このアノメリックプロトンの緩和時間が異常に長いとは考えにくい．従って，常識的には，この化合物には本溶媒中では確率分的に 3.5%程度の別なコンフォーマーがあり，そのシグナルが別な位置に観測されるため，このシグナルの積分値が小さくなったものと考えると説明可能となる．事実，MeOH-d4 中では，acetone-d6 中ではない小さいピークが 4.6ppm 付近に存在すること，グルコースのピークである g2 のピークの純度値が 86%程度であることも，この可能性を支持するものである．一方，acetone-d6 中では，アノメリックプロトンを除いては，グルコースのピークの分離が悪く正確な積分が難しいことが明らかとなった．以上考えると，本化合物の場合には，少なくとも，芳香族ピークを対象として純度値を算出する場合には，どちらの溶媒を用いても，秤量誤差のレベルに見合った純度値が得られることが明らかとなった．

C.4. baicalin（**4**）

次に，**3** と同様フラボノイド配糖体ではあるが，メタノール，アセトンに溶けにくい baicalin について，溶媒を DMSO-d6 として qNMR を測定した．化合物 **4** の NMR チャート（構造式）及び，qNMR の結果を，Fig. 4，Table 4 に示す．なお，本試薬は 1 水和物として添付文書上記載されている．

DMSO 中で NMR を測定すると，水酸基由来のプロトンのシグナルが観察される事が知られている．実際，化合物 **4** のスペクトルには，10ppm 以上のキレート水酸基領域に a のシグナルが，芳香族領域にフェノール性水酸基由来の b のシグナルが観測される．また，a のシグナルのベースは，やや盛り上がっており，この付近に水由来のブロードシグナルが存在しているものと推定される．5-5.5ppm 付近には，糖由来の水酸基のダブレットシグナル g,h が観測される．糖由来水酸基で自由度の高い水酸基の場合，ブロードなシグナルとなるものと予想されるが，確かに，5.5ppm 付近には，チャート上盛り上がりが観測され，これがそのシグナルであるものと予想される．以上を考えるとて，a 及び g，h のシグナルの積分値には，それぞれ水由来のシグナル及びシャープなピークとして観測されないグルクロン酸水酸基由来のシグナルをそれぞれ若干含んでいるものと予想される．事実，これらのシグナルは，他の純度値と比較して高く，この予想は正しいものと考えられる．一方，b のピークは，水と交換可能であるので，その純度値が他のシグナルと比較して小さいことも容易に説明可能である．従って，定量用に利用可能なシグナルは，芳香族領域にある c，d，e+f のシグナル及びグルクロン酸のメチン水素由来のシグナルであることになる．このうちア

ノメリックプロトン由来のシグナルはｉであり，このシグナルの下部には前述したように水酸基由来のブロードシグナルが存在しているため定量用途には用いることはできない．一方，4.0ppmのシグナルｊは，カルボン酸の付け根の6位のプロトンのシグナルであり，ダブレットであることから，ある程度定量用途に適するものと考えられる．他方，グルクロン酸の2位から5位までのメチン基のシグナルは，3.4ppm付近の水由来と考えられるシグナルの近傍に存在する上，多スピン系のシグナルのため分離が難しく，正確な定量を行うことを断念した．従って，定量用途に使用可能なシグナルは，c, d, e+f 及びｊのシグナルとなる．これらのシグナルの純度値は，それぞれ92.8%, 93.8%, 93.2%, 91.9%であり，この平均は，92.9%となる．一方c, dは多スピン系であるため，純度値の算出から除くと平均は92.6%となる．なお，今回の測定は600MHz NMRで行っているが，800MHzのNMRを利用すれば，e，fは明瞭に分離するものと考えられ，この場合には，シングルスピン系のe, fを分けて積分することが可能となり，より精度の高い純度値が得られるものと考えられる．

前述したように，本化合物は1水和物として添付文書上説明されている．今回の上記結果は，分子量を**4**のみのものとして計算して得られたものである．一方1水和物として分子量を計算すると，今回の純度値は96.5%程度となる．NMRのチャート上には，2ppm付近に明らかな不純物が存在するが，この不純物は，他のロットのものを測定した場合でも出現するため，明らかに試料由来のものである．従って，残り3.5%の多くは，この不純物由来である可能性がある．

C.5. (*E*)-cinnamaldehyde（**5**）

化合物**5**は，芳香族化合物であり，添付文書にあるHPLC分析結果ではまったく不純物のピークが存在していない．本化合物のNMRチャート（構造式）及び，qNMRの結果を，Fig. 5, Table 5に示す．Fig 5上，明らかに不純物と考えられる明瞭なピークが6.5ppm，8.1ppm付近に，水由来と推定されるブロードなシグナルが2.7ppm付近に観察され，本試薬の純度が100%でない事は容易に予想される．本化合物由来のシグナルは，9.7ppm付近のアルデヒド性のダブレットシグナルa，芳香族領域のb，dのシグナル及び，側鎖のオレフィニックプロトンシグナルc，eとなる．これらのシグナルのうち，非交換性でスピン系が単純かつ，他のピークと多重化されていないシグナルは，a, eのみであり，それぞれの純度値は，73.6%，74.1%で，両シグナルの平均値は，73.9%となった．この値は，dのシグナルの純度値（74.9%）と比較すると若干小さいが，dのシグナルの下部には，小さい不純物ピークが観測され，1%程度の過積分は，このピーク由来すると考えると，説明が可能となる．

qNMRから推定した本化合物の純度は，これまで測定した化合物の中で，飛び抜けて低いものである．一方，チャート上で最も明瞭に観測される6.5ppm付近の不純物由来のダブレットの積分値は，eのシグナル強度の15%程度あり，この試料に含まれている不純物は主に，本シグナルを生じさせる化合物と，水であるものと推定される．なお，6.5ppm付近の不純物シグナルは，本化合物が酸化された（*E*）-桂皮酸のものと考えられ，本化合物が試薬として供給される間に生じた不純物である可能性が高い．

C.6. cucurbitacin B（**6**）

化合物**6**は，試薬でなく，天然物より研究者がクロマトグラフィーにより単離した典型的

な化合物として選択した．本化合物のNMRチャート（構造式）及び，qNMRの結果を，Fig. 6, Table 6に示す．**6**は，HPLC的には98%の純度であると報告されているが，NMR上のチャートでは，明らかに水以外の不純物が多く存在する．本化合物は4環性のトリテルペンであり，分子量が558とこれまでの化合物と比較して大きく，2 ppm以下の高磁場領域のシグナルは個々に積分するには分離が十分ではない．従って，主に低磁場領域にある分離の良好なシグナルa, b, c, d+e+f, g, h, iについてqNMRとしての純度値の計算を行った．その結果，純度値は，47.6%から，74.4%までばらついた．これらのシグナルの内，スピン系の単純なa, bのシグナルでは，その下部に不純物由来と推定されるピークが被っている．またd+e+f及びh, iも積分範囲が広く，不純物シグナルを含んで積分している可能性が高い．従って，スピン系が単純で積分範囲が狭いcおよびgのシグナルが最も正しい純度値を示しているものと推定される．両者の純度値はそれぞれ47.6%, 50.5%であり，この平均は，49.1%である．このレベルの純度であると，どのピークでも不純物ピークが被っている可能性が高くなる．この点を考えると，複数のシグナルの純度値の平均で純度を計算する事が適切であるかどうか若干の疑問が残る．むしろ，最も低い純度値を示した，プロトン交換のない単純スピン系シグナルの純度値1点を値とする方がより正確な値に近い可能性がでると考えることも可能であり，この様な化合物における純度値の取扱には，今後の議論が必要である．

D. まとめ

本研究では，日本薬局方試薬及び研究者が天然素材よりクロマトグラフィーにより精製した化合物を用い，qNMRが成分含量測定用試薬を定量規格化するため利用可能であるか検討を行うとともに，利用する場合における課題の抽出を行った．様々な純度の試薬について複数の溶媒系でqNMRを測定した結果，一定のルールの下，qNMRにより成分含量測定用試薬を定量規格化できることが確認された．但し，日本薬局方に使用する試薬として最終的な値付けを行う場合，qNMR測定後，どのようなルールでどのシグナルに基づき，値付けを行い，純度表示を実施するか，議論に基づいたコンセンサスが必要であるものと考えられた．

その際，qNMRの測定により判明した純度のレベルにより適用すべきルールは異なる方が，より正確な純度値を提示出来る可能性が高いものと考えられる．即ち，純度が高い場合には，全有効シグナルの純度値の平均で値を算出することが可能であるが，純度が低くなるに従い，個々のシグナルに不純物が入る可能性が高くなる．従って，ある程度の純度であるものであっても，基本的に不純物ピークの混入の可能性がスペクトル上観測されず，なるべく単純なスピン系のシグナルを優先し，それらのシグナルの純度値の平均を値とする．この場合シグナルの選択には，交換性のプロトンであるかどうか，及び複数のコンフォーメーションによる積分値の変化も考慮する．さらに純度が低くなった場合には，単純に有効シグナルの純度値の平均化を行わず，最も確からしい純度値あるいは，最も低い純度値を示すシグナルの値を優先的に利用することも考える．この場合，通常，不純物のシグナルは高磁場領域で混入し易いと考えられるため，なるべく低磁場のシグナルを優先する．おおまかではあるが，少なくとも，このようなルールを最低限規定し，そのルールに基づき，さらに個々のシグナル毎に，科学的

により正しい純度値が示されている可能性が高いか判断し，正しい純度値が示されている可能性が高いと考えられたシグナルに基づき値付けをすることが重要であるものと考えられた．

さらに，値の再現性確認のため，局方で試薬を規定する場合には，その試薬の純度がどのシグナルに基づき規定されているのか，添付文書上に明記することが重要であると考えられる．また，純度が低い化合物の場合には，qNMR に利用するシグナルの n 数を増やして，測定精度を上げることを優先するか，最も値が小さいシグナル 1 点を利用することで不純物混入のリスクを下げるべきか，混乱を避けるため，明確な判断基準を公的に示す必要があるものと考えられた．

測定機器について考えると，不純物シグナルの混入は，基本的になるべく少ない範囲を積分することで避けやすくなることから，qNMR の測定には，シグナルの分解能が高い，なるべく高磁場の NMR を用いることが重要であることは明らかである．また，今回の測定でも，化合物**4**の e，f のシグナルは，800MHz クラスの NMR では，シグナルがベースライン分離するものと考えられ，e，f それぞれ独立した値を得ることができる．この点でも，より高磁場の NMR を利用することは，測定精度を上げる為に重要であるものと考えられた．

以上，qNMR を日本薬局方上で試薬の純度規定に利用するための考察を行った．今後，引き続き局方上で成分含量測定用に利用されている各試薬について qNMR を測定し，個々の試薬毎に，純度算出のために利用するシグナルについて検討する予定である．

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ない。

E. 研究発表

現段階ではない

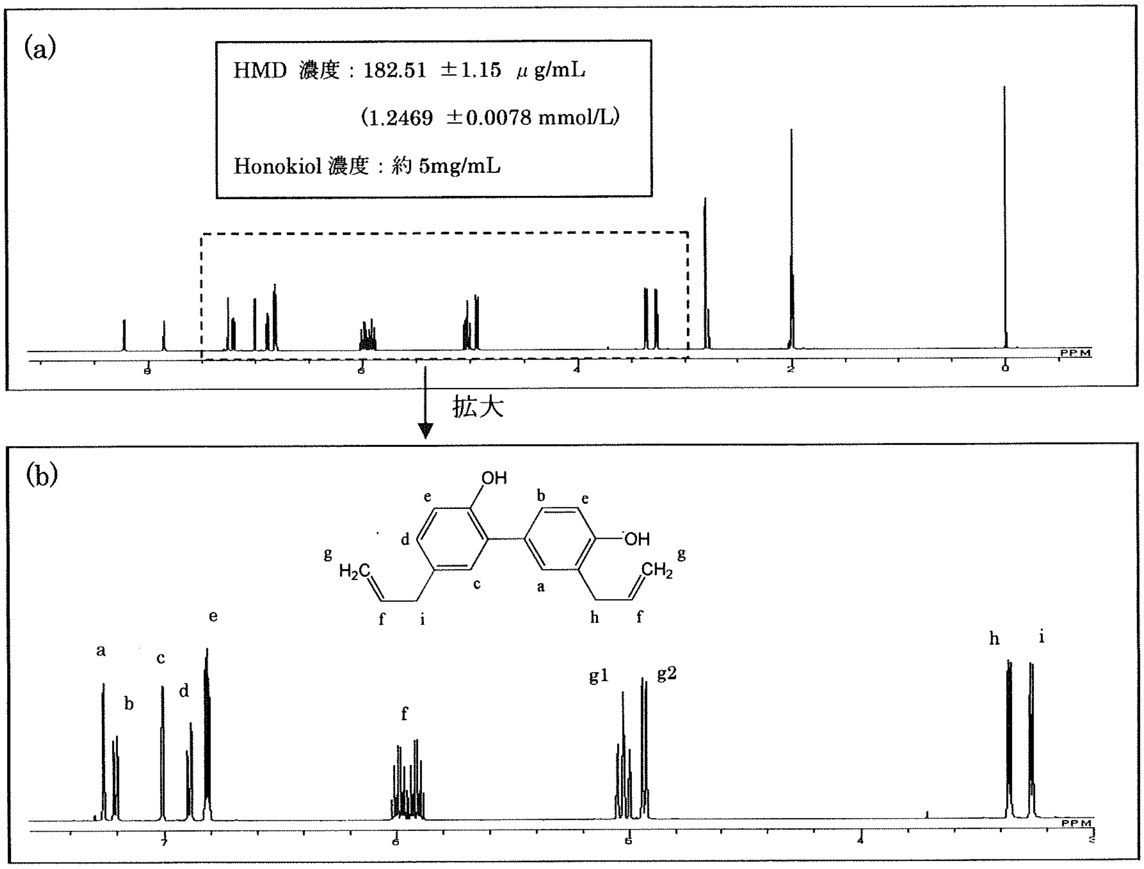

Fig. 1 NMR chart of honokiol (1) in acetone-d_6 (a) and its enlarged view with the chemical structure (b)

Table 1 Quantitative NMR results of honokiol (1) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)	RSD (%)
OH1	8.23	1	62.58	0.69
OH2	7.86	1	63.44	1.05
a	7.26	1	96.49	0.79
b	7.21	1	97.28	1.47
c	7.01	1	96.96	1.17
d	6.89	1	96.92	1.00
e	6.81	2	96.16	1.64
f	5.84-6.06	2	95.36	1.12
g1	4.98-5.07	2	96.46	1.46
g2	4.90-4.97	2	96.38	1.28
h	3.36	2	96.86	1.54
i	3.27	2	97.02	1.17

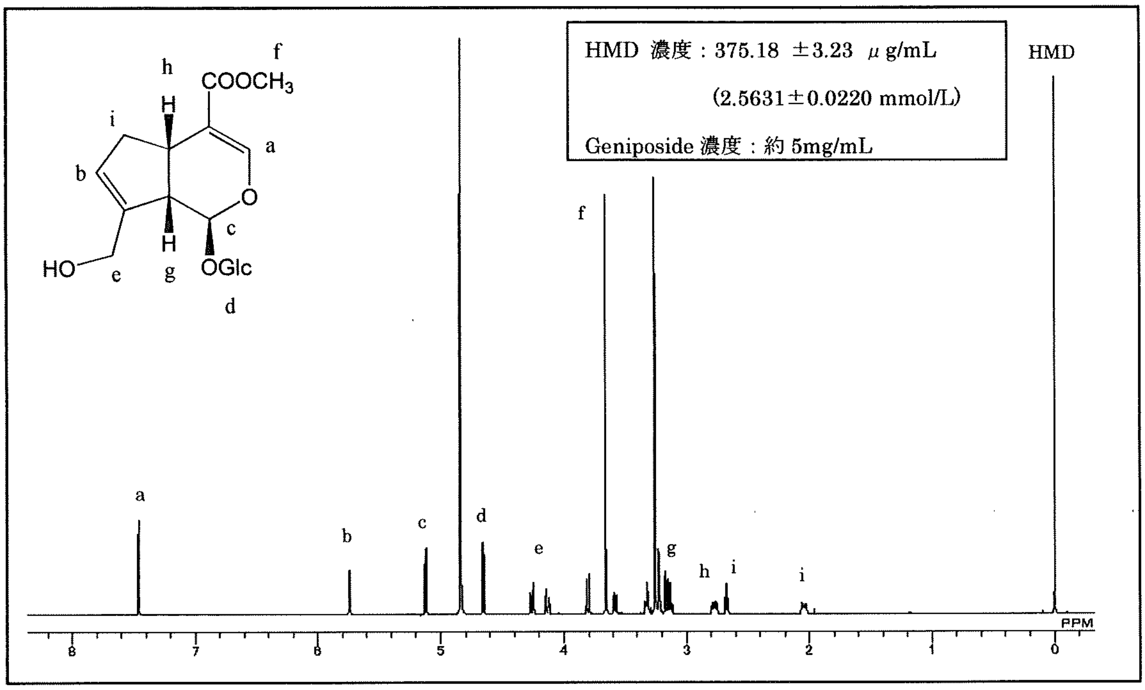

Fig. 2 NMR chart of geniposide (2) in MeOH-d_4 with the chemical structure

Table 2 Quantitative NMR results of geniposide (2) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)	RSD (%)
a	7.46	1	91.86	0.95
b	5.75	1	91.79	0.66
c	5.12	1	91.66	1.27
d	4.66	1	92.57	0.88
e1	4.26	1	92.06	1.15
e2	4.13	1	91.91	1.05
glc	3.81	1	91.55	1.15
f	3.66	3	93.77	1.40
glc	3.59	1	92.58	1.07
glc	3.30-3.35	1	98.95	1.68
glc	3.21-3.23	2	93.21	0.58
glc+g	3.11-3.17	2	95.68	0.98
h	2.77	1	94.22	0.85
i1	2.67	1	94.18	1.01
i2	2.05	1	90.47	0.89

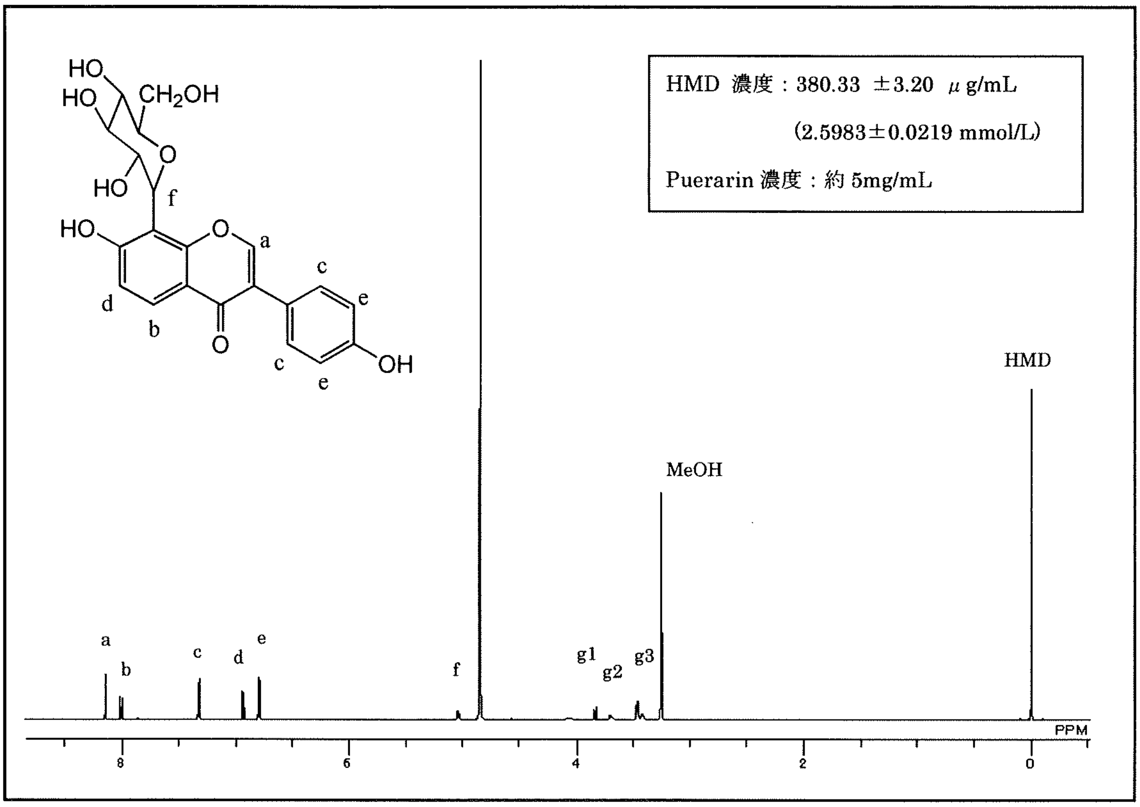

Fig. 3a NMR chart of puerarin (3) in MeOH-d_4 with the chemical structure

Table 3a Quantitative NMR results of puerarin (3) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)	RSD (%)
a	8.15	1	89.32	0.33
b	8.01	1	89.23	0.43
c	7.33	2	90.73	0.50
d	6.94	1	90.20	0.50
e	6.80	2	91.06	0.51
f	5.05	1	86.61	1.69
g1	3.84	1	91.44	0.53
g2	3.63-3.76	1	86.02	0.31
g3	3.38-3.52	3	90.45	0.26

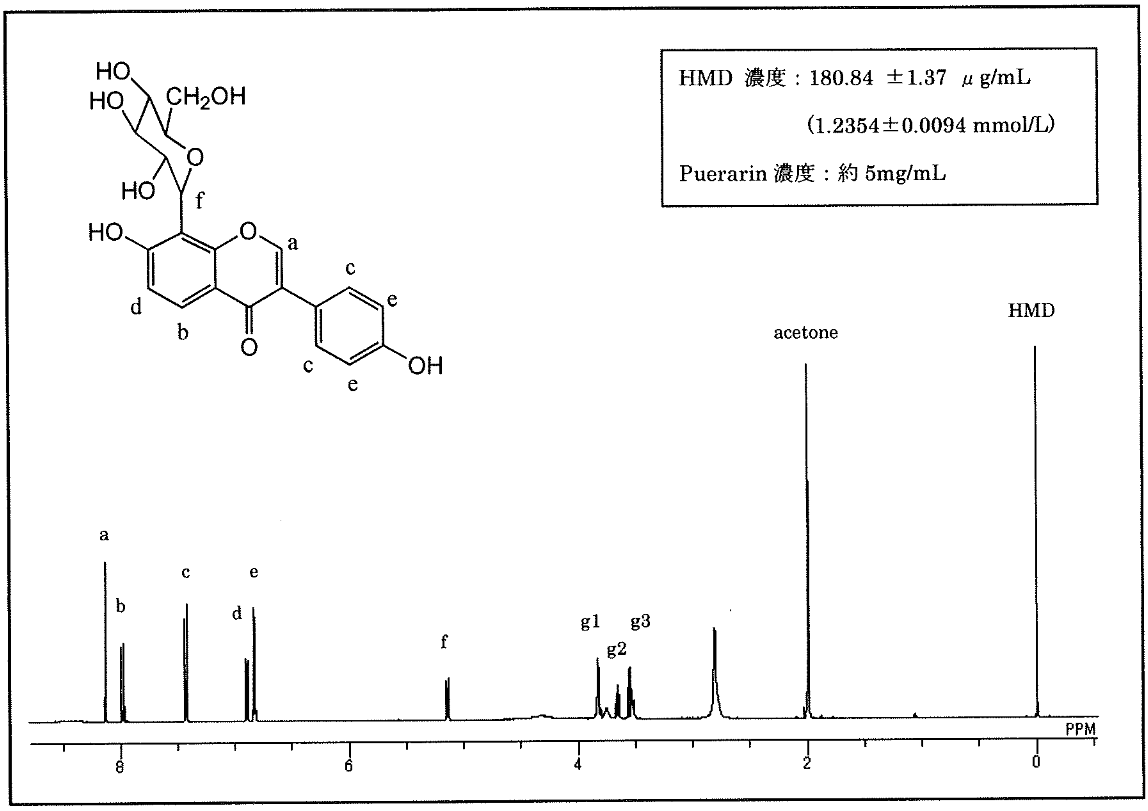

Fig. 3b NMR chart of puerarin (3) in acetone-d_6 with the chemical structure

Table 3b Quantitative NMR results of puerarin (3) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)	RSD (%)
a	8.13	1	89.92	0.51
b	7.98	1	88.29	0.08
c	7.43	2	90.18	0.45
d	6.90	1	89.09	0.64
e	6.84	2	90.32	0.62
f	5.15	1	89.39	0.61
g1	3.70-3.88	3	94.76	0.66
g2	3.66	1	96.28	0.46
g3	3.49-3.60	2	94.09	0.83

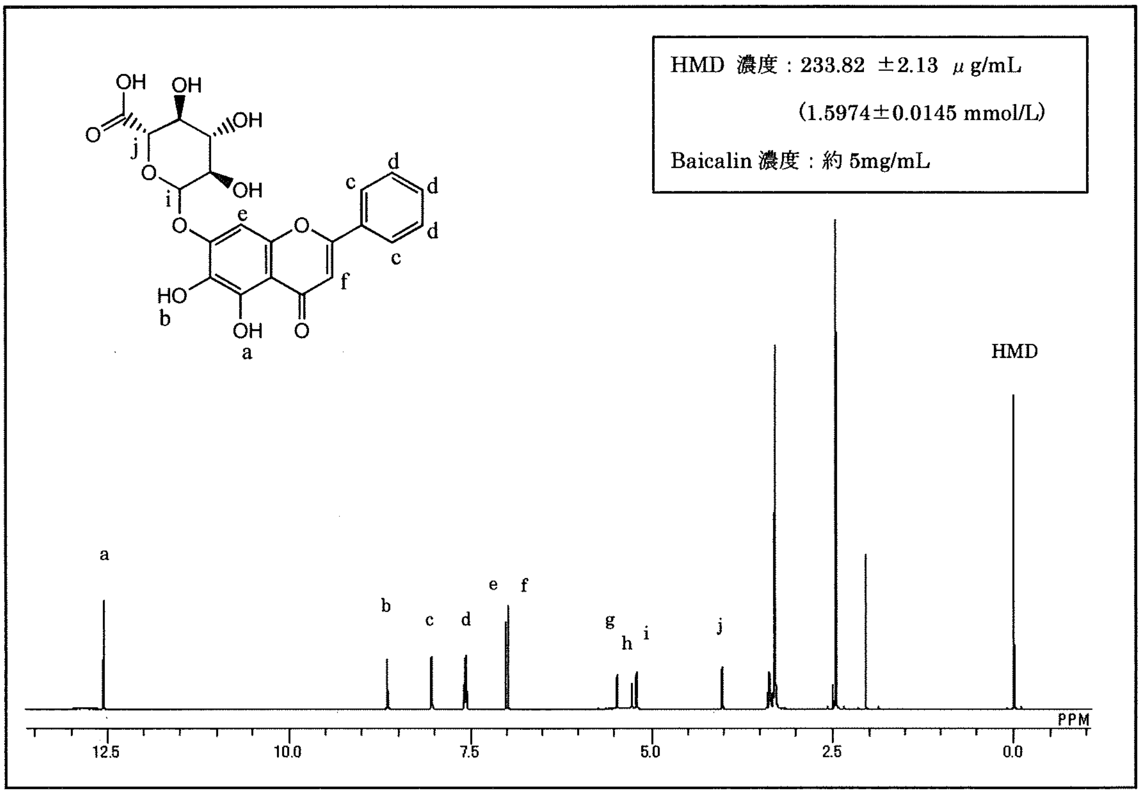

Fig. 4 NMR chart of baicalin (4) in DMSO-d_6 with the chemical structure

Table 4 Quantitative NMR results of baicalin (4) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Baicalin		Baicalin·H_2O
			Calculated purity (%)	RSD (%)	Calculated * purity (%)
a	12.56	1	95.44	0.46	99.29
b	8.65	1	88.85	0.79	92.43
c	8.05	2	92.84	0.47	96.59
d	7.53-7.62	3	93.80	0.54	97.59
e+f	7.02	2	93.20	0.45	96.96
g(OH)	5.48	1	107.09	0.72	111.41
h(OH)	5.28	1	100.04	0.50	104.07
i	5.21	1	97.13	0.36	101.06
j	4.03	1	91.93	0.53	95.64

* Data was calculated as Baicalin·H_2O

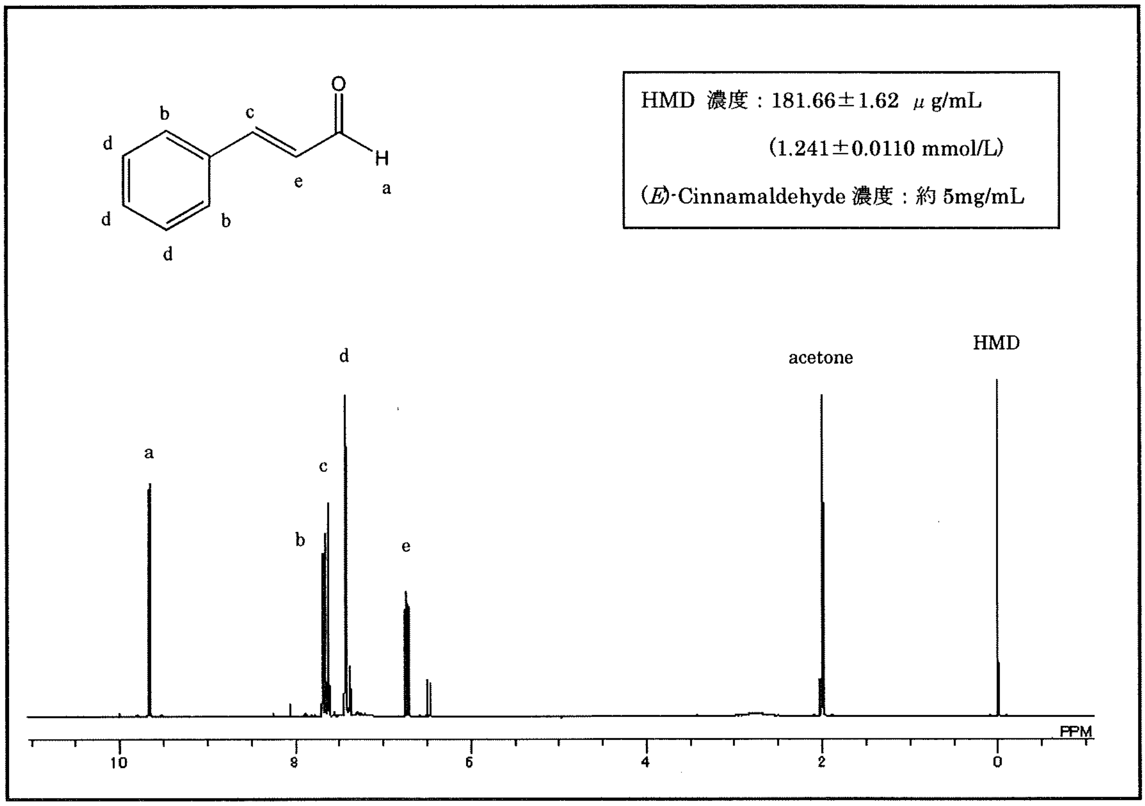

Fig. 5 NMR chart of (*E*)-cinnamaldehyde (5) in acetone-d_6 with the chemical structure

Table 5 Quantitative NMR results of (E)-cinnamaldehyde (5) n=3

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)	RSD (%)
a	9.67	1	73.60	0.95
b	7.67-7.72	2	74.05	1.19
c	7.65	1	109.06	1.38
d	7.41-7.46	3	74.90	0.87
e	6.73	1	74.14	0.52

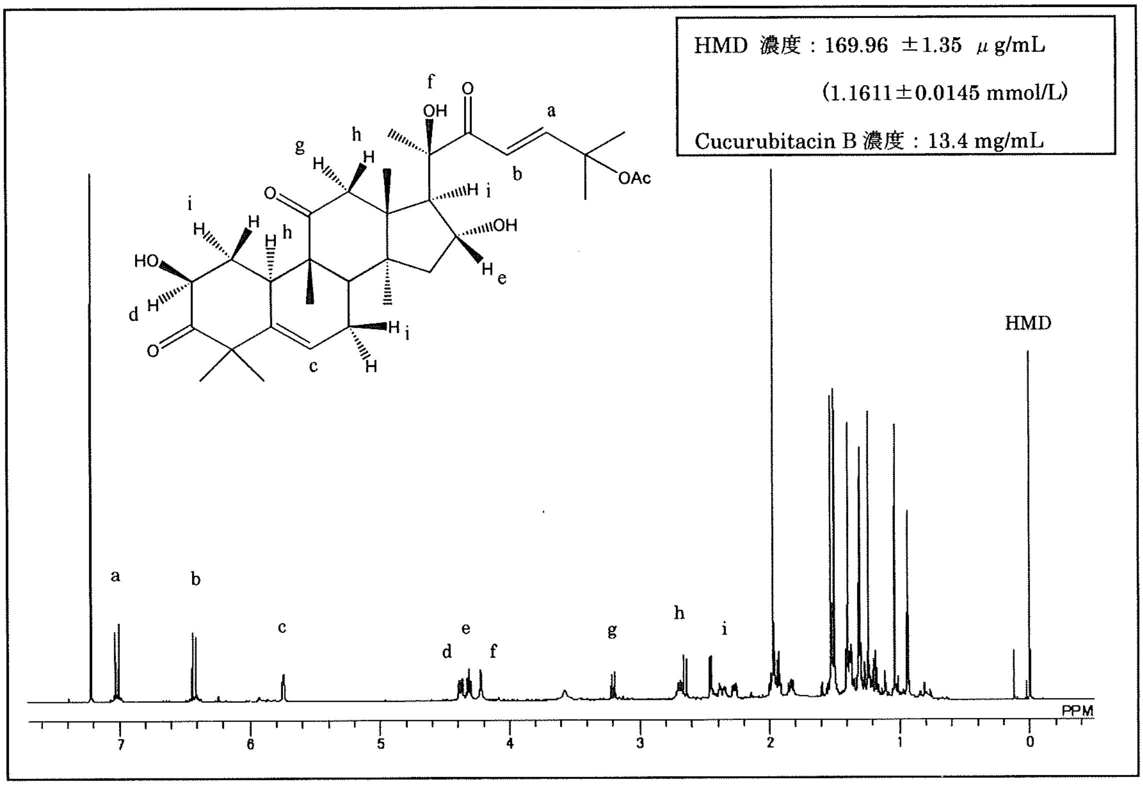

Fig. 6 NMR chart of cucurubitacin B (6) in $CDCl_3$ with the chemical structure

Table 6 Quantitative NMR results of cucurubitacin B (6)

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Calculated purity (%)
a	7.03	1	66.60
b	6.43	1	61.88
c	5.75	1	47.58
d+e+f	4.13-4.50	3	68.32
g	3.21	1	50.47
h	2.60-2.79	2	68.44
i	2.23-2.48	3	74.37

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　生薬及び漢方処方の安全性と有効性に関する研究
研究分担者　合田幸広　国立医薬品食品衛生研究所　生薬部長

NMR スペクトルを用いた多変量解析による生薬の品質評価の検討

研究要旨　NMR スペクトルデータの多変量解析が，生薬の品質評価に有用であるかを検討するため，予試験として，半夏と天南星の CD_3OD 抽出エキスの NMR スペクトルデータの多変量解析を行った．その結果，両者は本手法により，明瞭に区別可能であった．今回は，予試験のため，検体数が絶対的に不足していることから，今後，検体数を増やし，今回の結果の普遍性を慎重に確認する必要がある．

研究協力者
丸山卓郎　国立医薬品食品衛生研究所　生薬部室長
若菜大悟　国立医薬品食品衛生研究所　派遣研究員

A. 研究目的

近年，国民の生活様式の変化から，アレルギーを初めとする自己免疫疾患や高血圧，糖尿病といった生活習慣病など，難治性の慢性疾患が増加している．これまでの西洋医学では治療が困難なこれらの疾病に対する代替医療として，伝統医学，とりわけ，体質改善による身体の恒常性の回復を治療の基礎とする漢方医学への期待が高まっている．この漢方医学の担い手は，数百種類に及ぶ生薬を組み合わせた漢方処方である．生薬は，主に薬用植物の根，葉，種子などを加工調製したものであり，天然物であるため，その品質を一定に揃える事が一般の医薬品に比べ困難を伴う．しかしながら，漢方医学の普遍性を担保するための一条件は，漢方処方を構成する個々の生薬について，薬用価値の高い品質のものを安定的に供給することであることに疑いの余地はない．

現在，生薬・漢方製剤の品質管理は，日本薬局方及び旧厚生省通知（薬審二第 120 号など）に従い，五感による官能試験及び数種の指標成分の定量あるいは定性をもって行われているが，近年の科学技術の水準を考慮すると，多成分系である生薬及び漢方製剤の品質管理として充分とは言い難いものもある．

一方，近年，タンパク発現や代謝物情報などを網羅的に解析するオミクス研究が急速な発展を見せている．生薬分野においても，LC/MS^n データを多変量解析することにより，品質評価に生かす試みがなされている [1-4]．しかし，植物成分は，非常に骨格多様性に富むため，LC/MS^n では，常にピーク同定に困難が伴い，ユニバーサルな手法の確立が難しい．

そこで本研究では，含有成分の構造情報を直接得る事が出来る NMR スペクトルデータを利用した多変量解析による生薬の品質評価法を

検討することとした.

今年度は，予試験材料として，形態及び理化学試験による鑑別が困難な半夏及び天南星を選択し，NMR スペクトルデータの多変量解析により，両者の区別が可能かどうかを検討した.

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用した試料を Table 1 に示した. 各試料の基原植物は，2 個体（試料 **3** は，1 個体）を無作為に選び，葉緑体 DNA，*trn*L (UAA)-*trn*F (GAA) intergenic spacer (IGS) 領域の塩基配列を解析することにより推定した. NMR スペクトル解析には，各試料より無作為抽出された 5 個体（試料 **3** は，1 個体）を使用した.

2. 実験方法

2-1. DNA 配列解析

各試料 20 mg を 2 mL 容のサンプルチューブに入れ，液体窒素により凍結させた後，震盪粉砕器 MM-300 (Qiagen) により粉末とした. このものより，DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて，genomic DNA を抽出，精製した. このものを鋳型とし，葉緑体 DNA，*trn*L (UAA) 3'-exon 及び *trn*F (GAA) 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマー[5] を用いた PCR を行うことにより，目的の *trn*L-F IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した. Montage-PCR (Millipore) により，PCR 産物を精製した後，ダイレクトシークエンスにより，塩基配列を決定した.

2-2. NMR スペクトル測定及び多変量解析

各試料をステンレス製の粉砕ジャー（25 mL 容）に入れ，震盪粉砕器 MM-300 (Qiagen) により粉末とした. 各粉末 50 mg に CD_3OD 1 mL を加え，10 分間震盪抽出し，Ultra free-MC (0.45 mm; Millipore) により遠心ろ過（2000 x g，30 sec）したものを NMR スペクトル測定用試料液とした.

^{1}H-NMR の測定は，JNM-ECA800 (Jeol) を用い，以下の条件で行った: non-spin; temp., 25°C; scans, 32; x-offset, 5 ppm; x-sweep, 30 ppm; relaxation delay, 5 sec.

得られたスペクトルは，machine phase により phase 合わせをした後，目視により微調整を行った. 重メタノールに由来するピークを除いた 0-6 ppm の範囲から水及び重溶媒ピークを除いた積分値を 100 とした時の各積分値を以下の範囲について計測した: (δ 0.70 - 1.06, δ 1.09 - 1.15, δ 1.21 - 1.42, δ 1.56 - 1.64, δ 1.91 - 1.96, δ 2.00 - 2.10, δ 2.18 - 2.27, δ 2.28 - 2.37, δ 2.50 - 2.53, δ 2.74 - 2.83, δ 3.09 - 3.13, δ 3.19 - 3.23, δ 3.37 - 3.40, δ 3.44 - 3.54, δ 3.54 - 3.72, δ 3.72 - 3.88, δ 3.90 - 4.08, δ 4.44 - 4.48, δ 4.54 - 4.63, δ 5.08 - 5.10, δ 5.28 - 5.44 ppm).

主成分分析 (principal component analysis; PCA) 及び Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA 法) は，Pirouette (Infometrix) を用いて行った. ただし，検体数不足のため，Ten-Toc-3 は，SIMCA 法から除外された.

C. 結果

各試料の基原植物の推定は，標準植物試料及びデータベース中の配列との比較により行った. その結果，試料 **1** は，カラスビシャク，*Pinellia ternata*，試料 **2**，**8** は，*Arisaema erubescens* 又はその近縁種，試料 **3** は，

Pinellia pedatisecta と推定され，薬局方及び薬局方外生薬規格が規定する半夏及び天南星の基原植物と大きな齟齬はなかった．

各試料の NMR スペクトルの一例として，半夏の CD_3OD 抽出液の NMR スペクトルの一つを Fig. 1 に示した．芳香族に由来する低磁場側のピークは，ほとんど見られず，脂肪鎖及び糖類に由来すると思われるピークが主に観測された．この傾向は，天南星においても同様であった．

別に，$CDCl_3$ による抽出も検討したが，脂肪酸に由来するピークがわずかに認められる程度であり，少なくとも，半夏，天南星の多変量解析には $CDCl_3$ による抽出は，今回の研究目的に不向きであると思われた．

各試料の CD_3OD エキスの NMR スペクトルデータを用いて PCA 解析を行った後，第一及び第二主成分に対する寄与の少なかった範囲（δ 1.91 - 1.96，δ 2.28 - 2.37，δ 2.50 - 2.53，δ 2.74 - 2.83，δ 3.09 - 3.13，δ 3.19 - 3.23，δ 3.37 - 3.40 ppm）をデータから除き，再計算を行った，その第一，第二主成分のスコアプロットを Fig. 2 に，ローディングプロットを Fig. 3 に示した．図において，プロット名は，Fig. 2 が，サンプル番号とその個体番号を，Fig. 3 は，化学シフトの範囲を示している．PCA 解析の結果，factor 1（第一主成分），factor 2（第二主成分）共に，天南星 3 試料 11 個体に比べ，半夏 1 試料 5 個体の方が，スコアのバラツキが大きかった（Fig. 2）．また，半夏，天南星共に，factor 1 の方が，factor 2 のスコアよりバラツキが大きく，その傾向は，特に半夏において顕著だった．Factor 1 のローディングプロットから，この factor 1 のスコアのバラツキは，主に糖類の含量に起因していると思われた（Fig. 3）．

一方，factor 2 のスコアの正負により，半夏と天南星が区別された（Fig. 2）．Factor 2 のローディングプロットから，両者の区別には，脂肪族領域の寄与が大きいと予想された（Fig. 3）．

また，判別解析手法である SIMCA 法を用いることにより，両者は，より明瞭に区別可能であった（Fig. 4）．

D. 考察

今回，少数の検体を用いた予試験では，NMR スペクトルデータの多変量解析により，半夏と天南星の判別が可能であった．今後，検体数を増やし，今回の結果の普遍性を確認すると共に，より明瞭な判別が可能な解析条件を検討する必要がある．また，普遍性が確認出来た場合には，両者の区別に寄与する成分を同定し，TLC や HPLC などの汎用機器を利用したより平易な判別法の確立が望まれる．

E. 結論

今回，予試験として少数の半夏及び天南星を用いて，NMR スペクトルデータの多変量解析を行った結果，本手法が生薬の品質評価に有用である可能性を示す結果を得た．

参考文献

1) Tanaka K., Tamura T., Fukuda S., Batkhuu J., Sanchir C., Komatsu K., Quality evaluation of Astragali Radix using a multivariate statistical approach, *Phytochem.*, **69**, 2081-2087 (2008).

2) Tanaka K., Kuba Y., Ina A., Watanabe H., Komatsu K., Prediction of cyclooxygenase

inhibitory activity of Curcuma Rhizome from chromatograms by multivariate analysis, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 936-940 (2008).
3) 千田ら, 漢方処方のメタボロミクス, 第 55 回日本生薬学会講演要旨集 p154 (2008).
4) Okada T., Nakamura Y., Kanaya S., Takano A., Malla K. J., Nakane T., Kitayama M., Sekita S., Metabolome analysis of Ephedra plants with different contents of ephedrine alkaloids by using UPLC-Q-TOF-MS, *Planta Med.*, **75**, 1356-1362 (2009).
5) Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J., Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA, *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1105-1109 (1991).

Table 1 Details of the samples used in this study.

Sample no.	Vouchor ID	Name	Source plant*	Locality
1	Han-U-1	Pinellia tuber	*Pinellia ternata*	unknown
2	Ten-Toc-2	Arisaema tuber	*Arisaema erubescens*	Sichuan, China
3	Ten-Toc-3	Arisaema tuber	*Pinellia pedatisecta*	Hebei, China
8	Ten-Toc-8	Arisaema tuber	*Arisaema erubescens*	Sichuan, China

*speculated from their *trn*L-F IGS sequence of chloroplast DNA

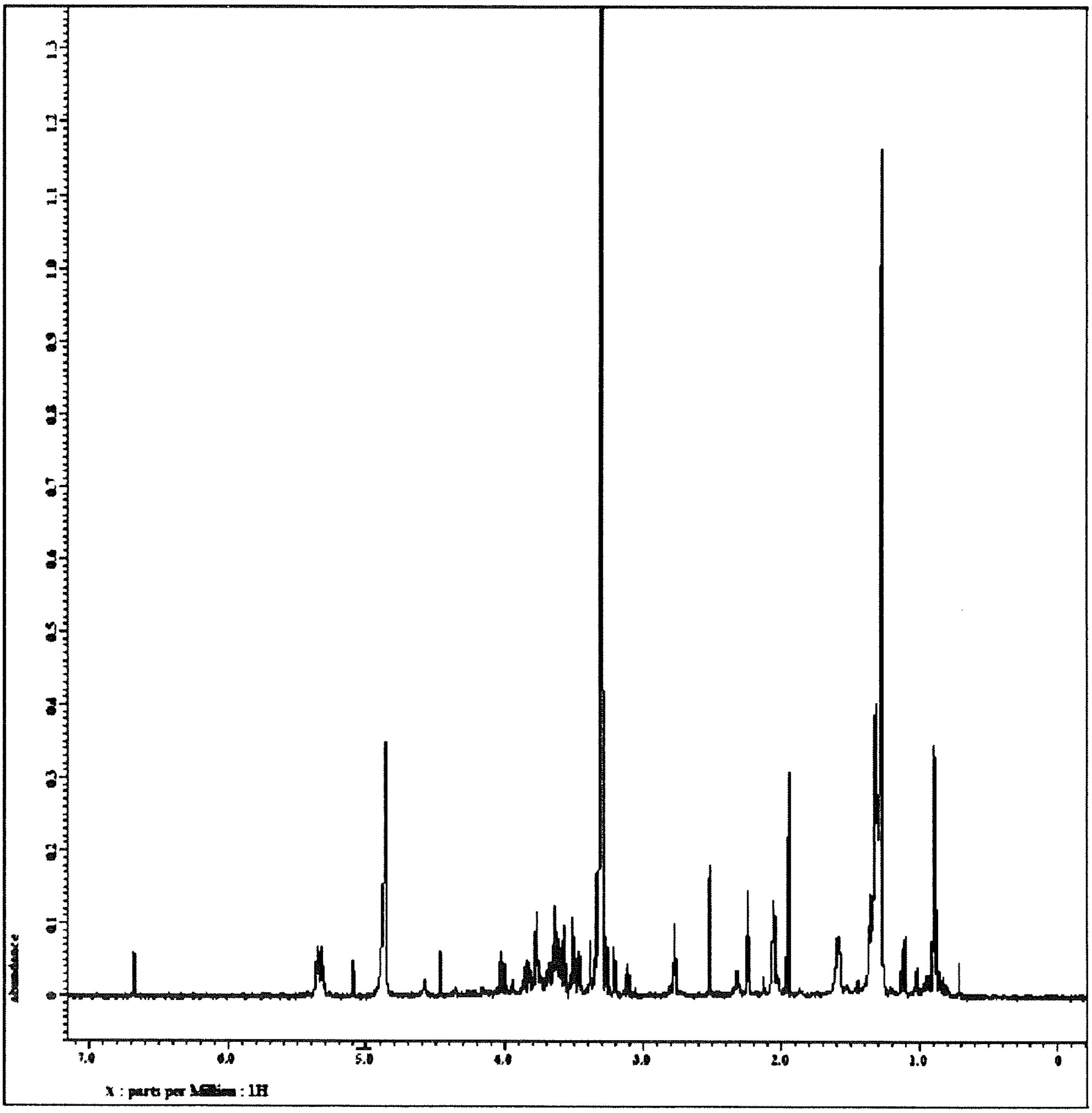

Fig. 1 NMR spectrum of Pinellia tuber CD_3OD extract

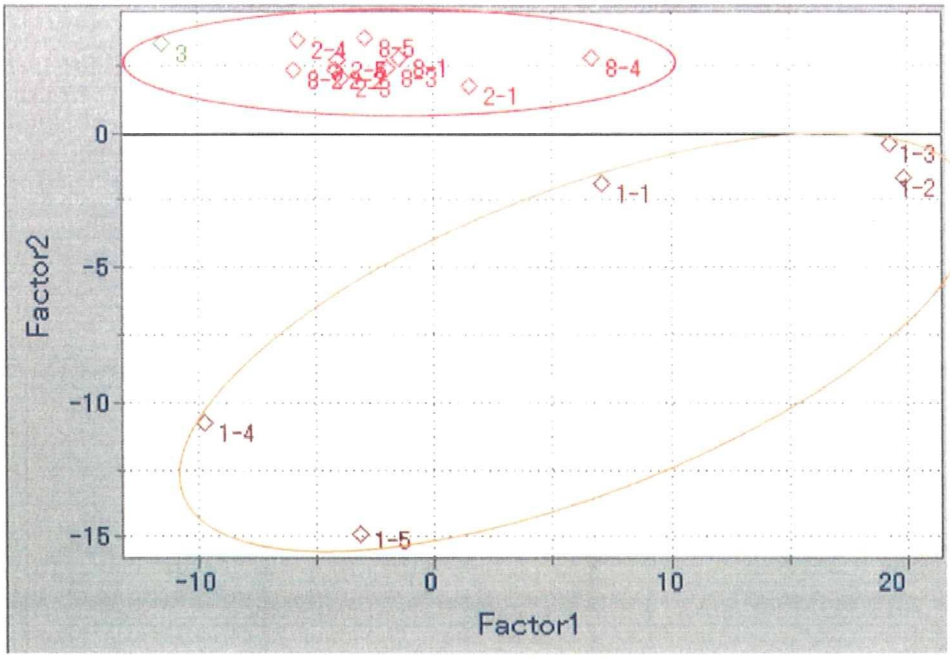

Fig. 2 PCA score plot of the Pinellia and Arisaema tubers

Plot name means the sample no.-individual no.

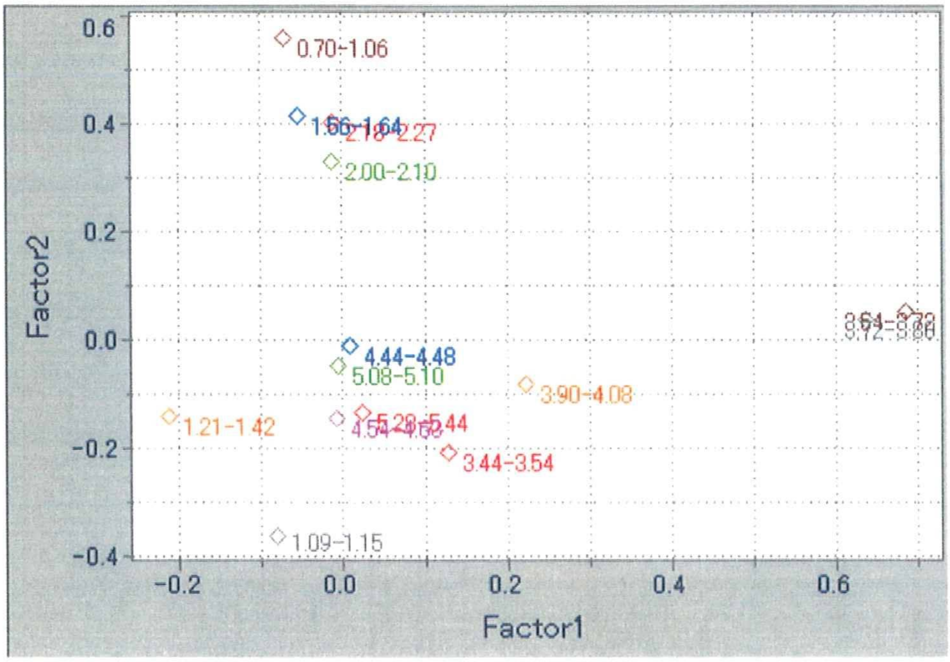

Fig. 3 PCA loading plot of the Pinellia and Arisaema tubers

Plot name means the chemical shift range