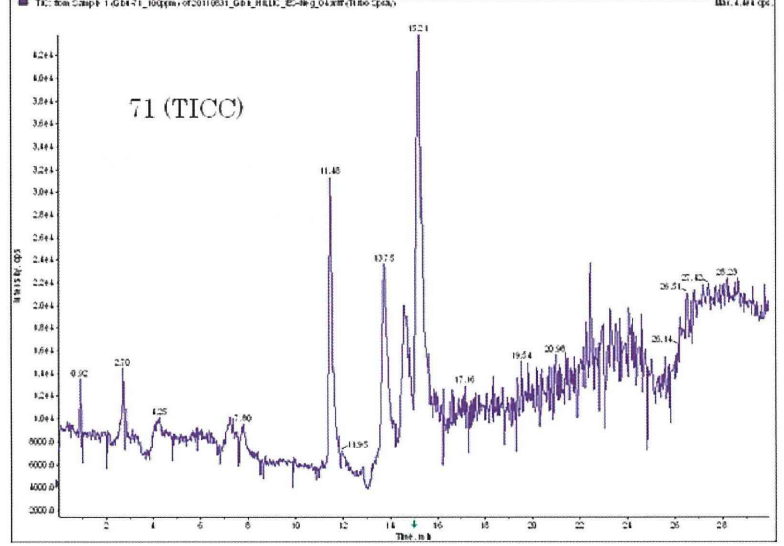
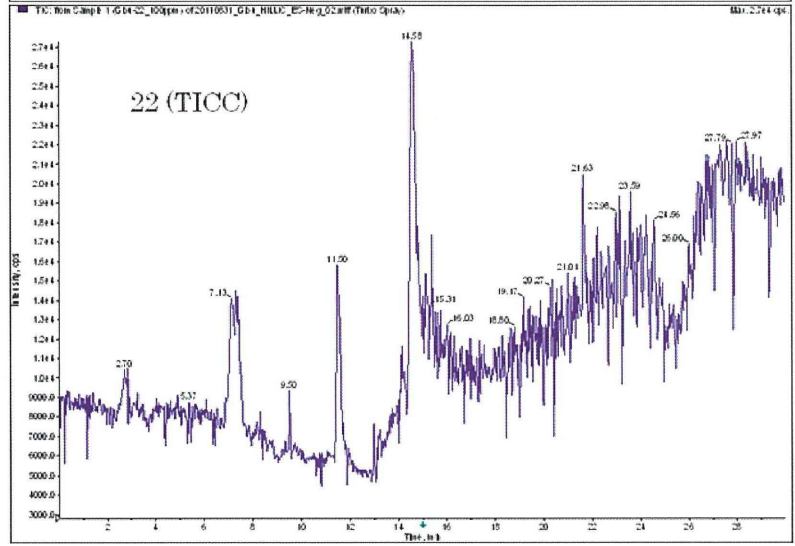
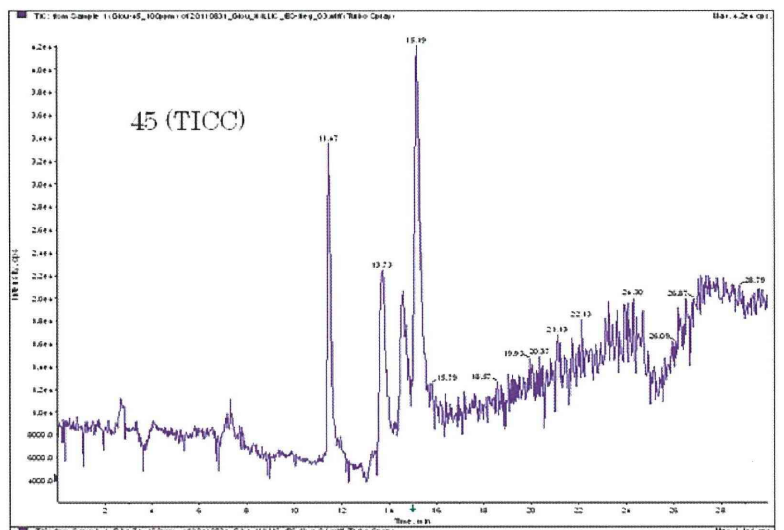
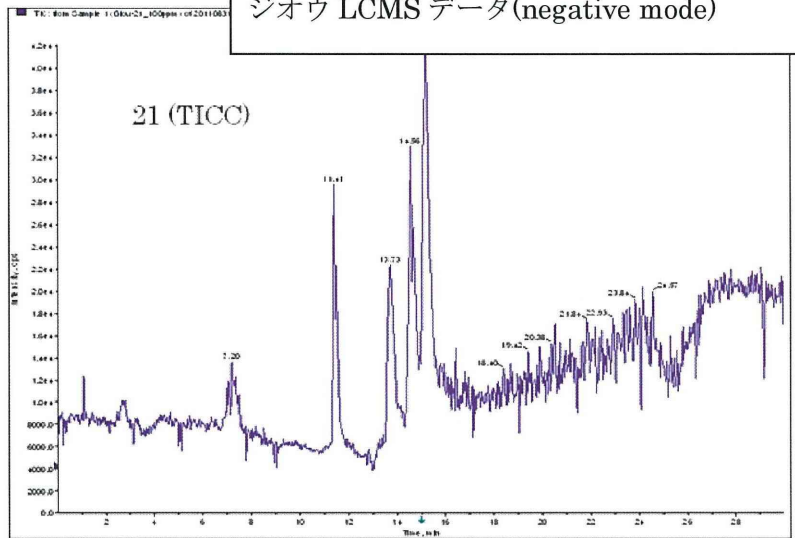
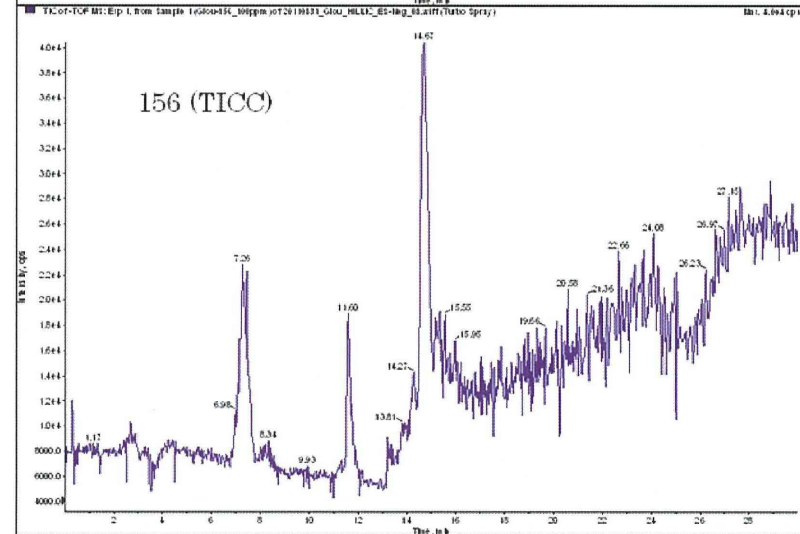
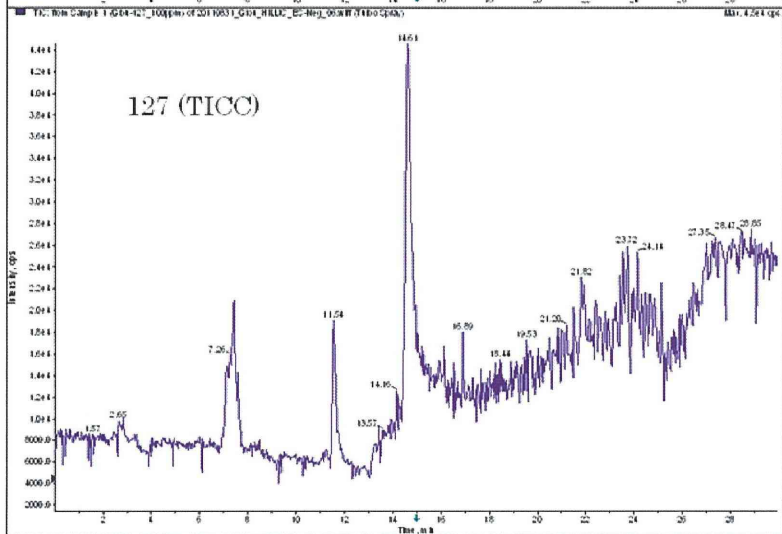
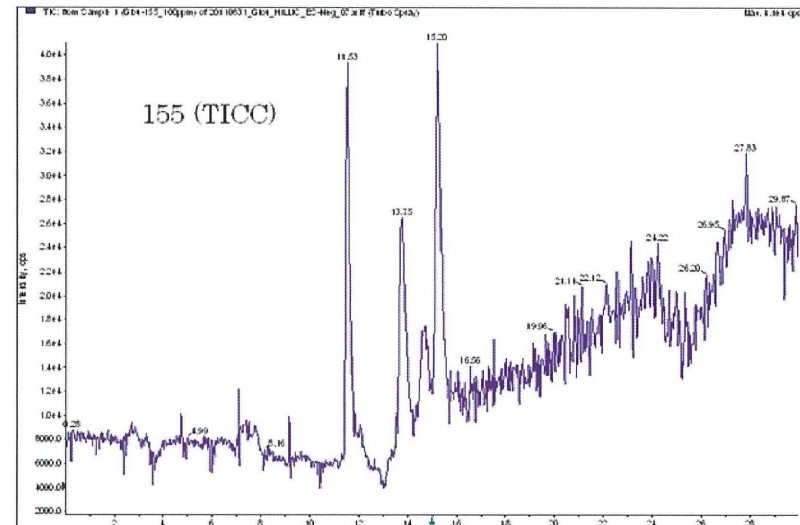
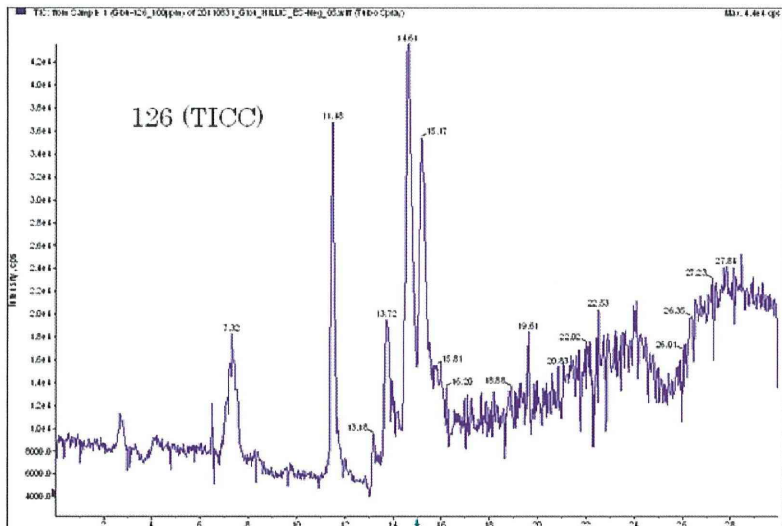
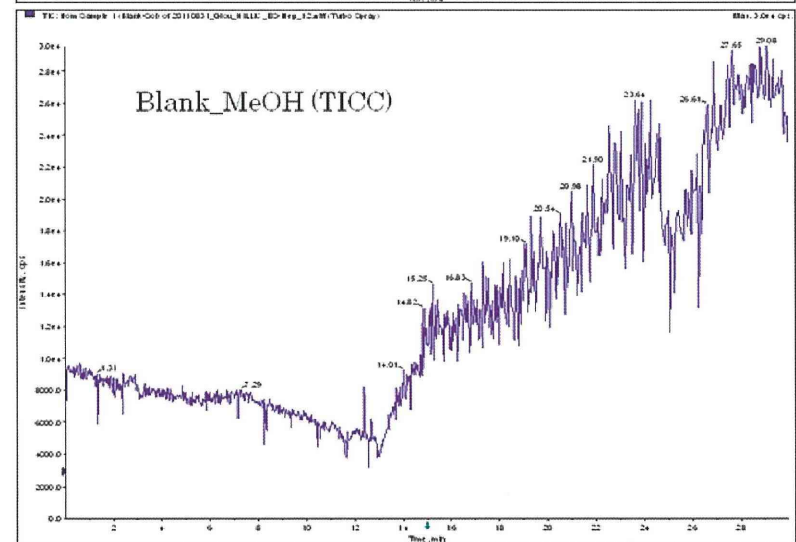
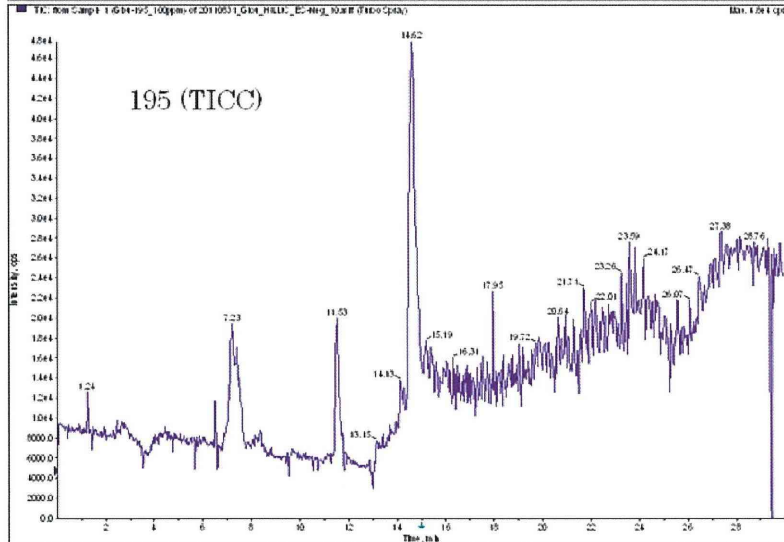
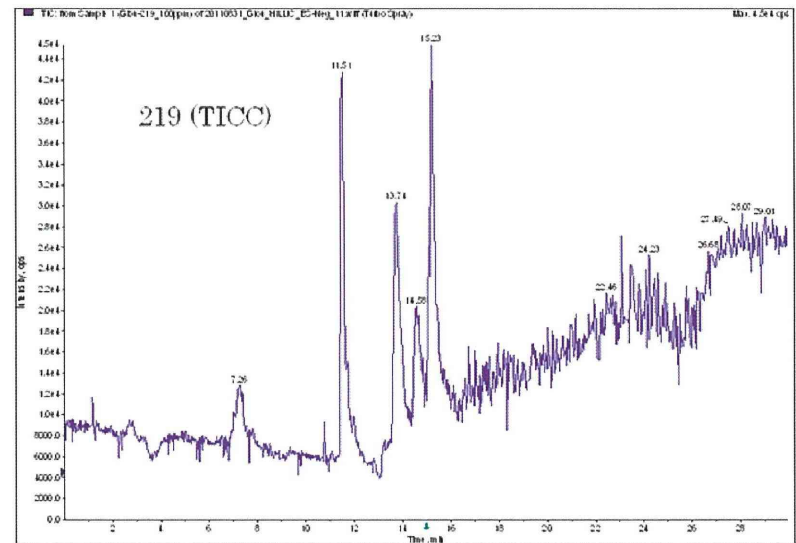
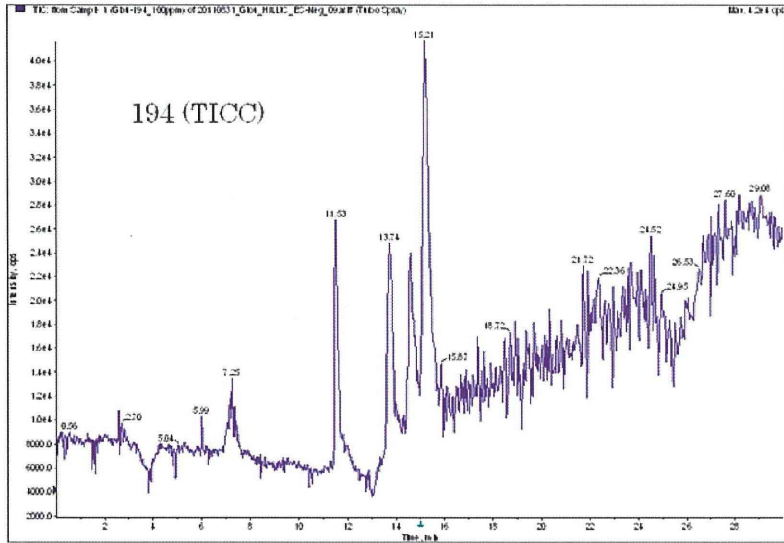
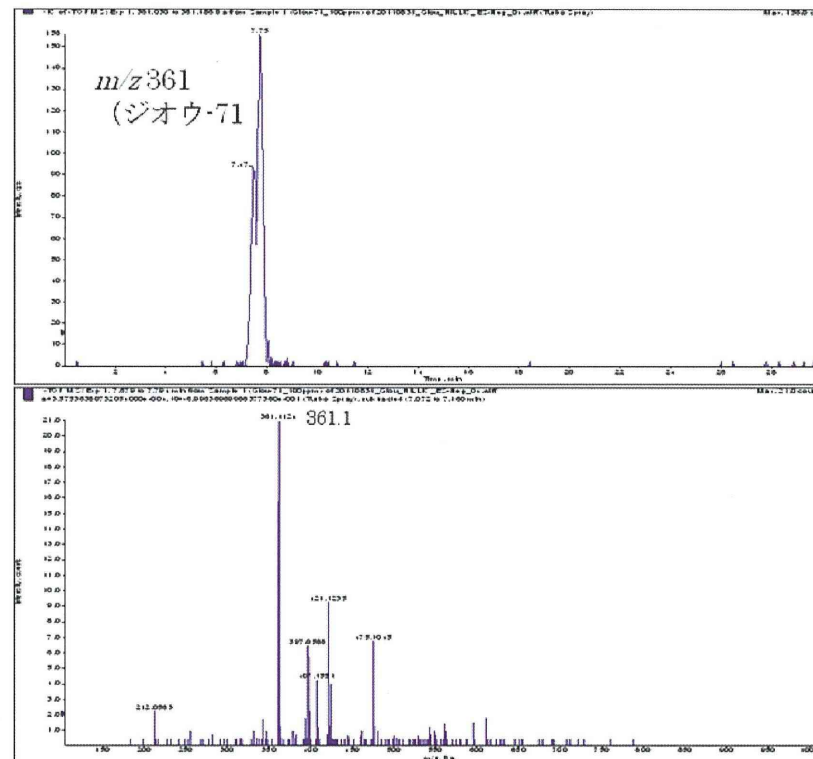
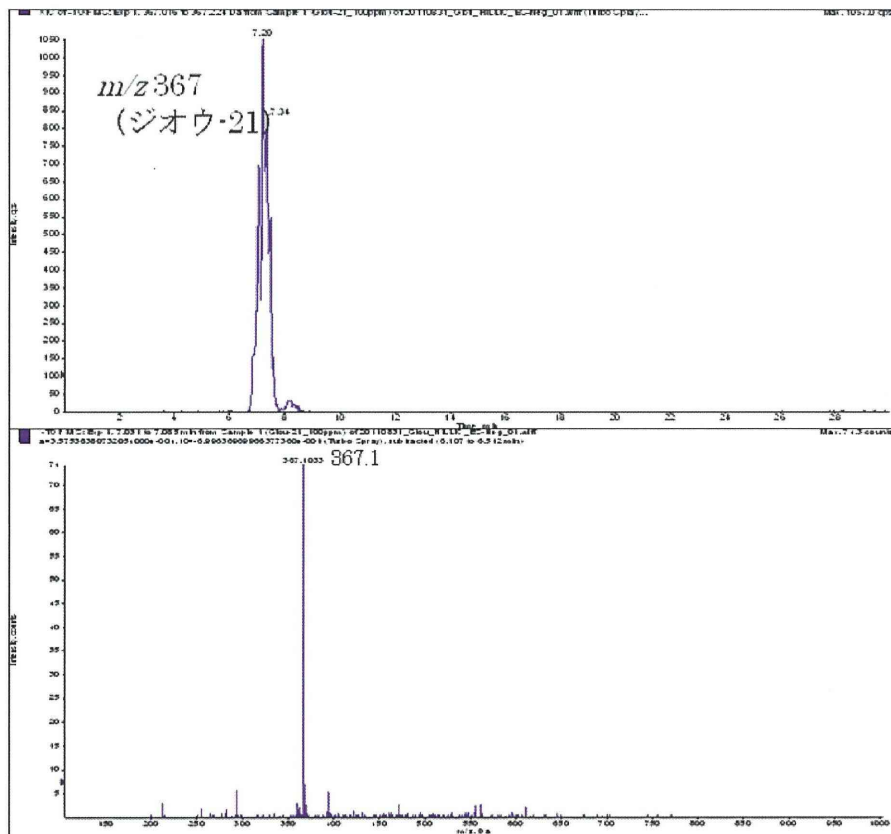


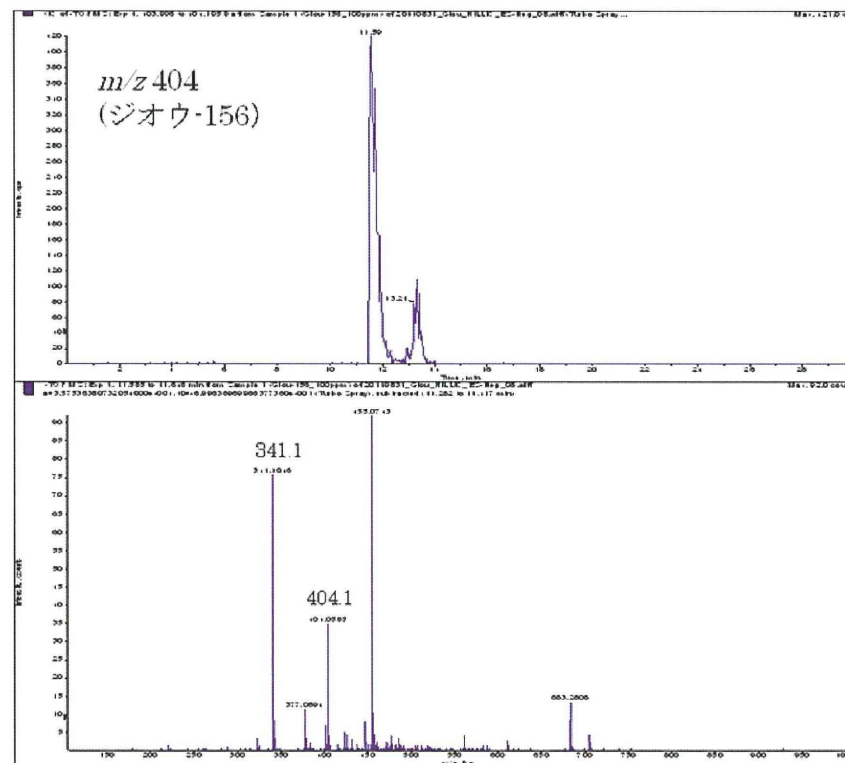
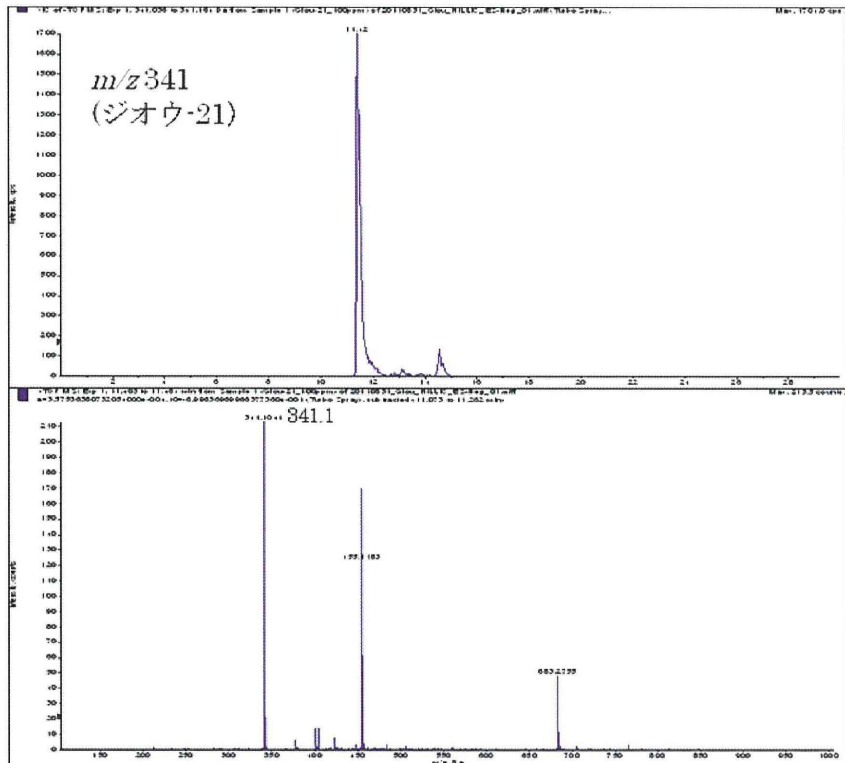
ジオウ LCMS データ(negative mode)

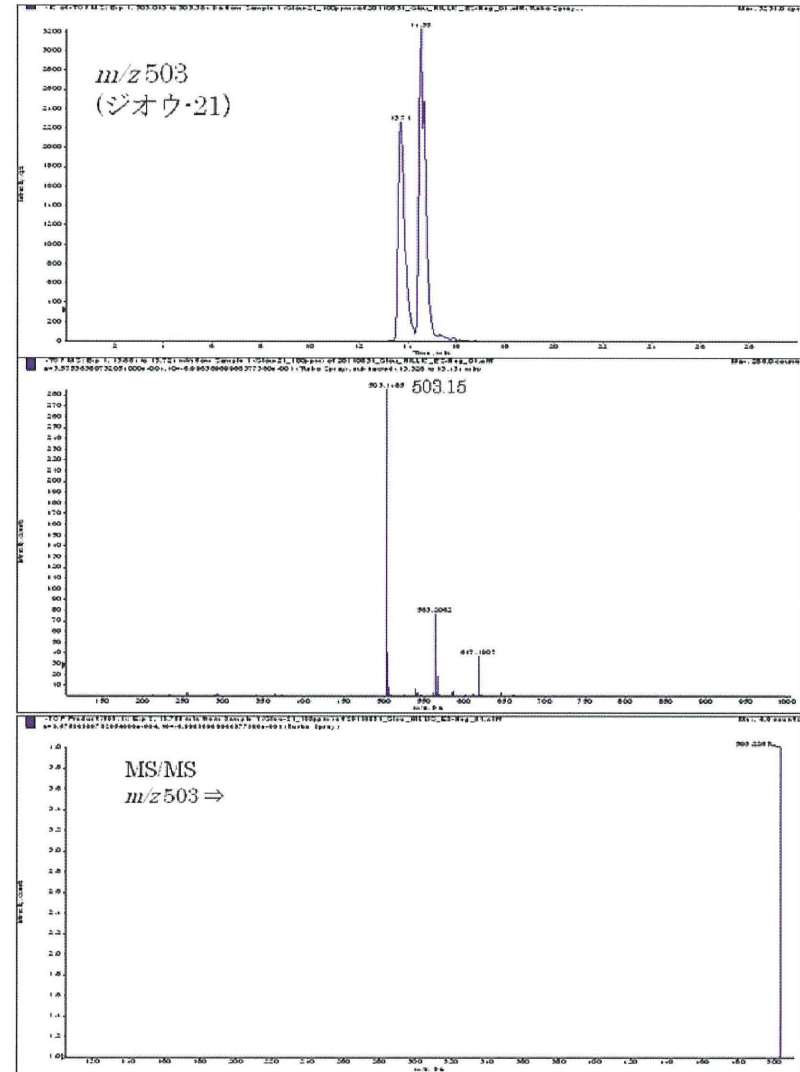
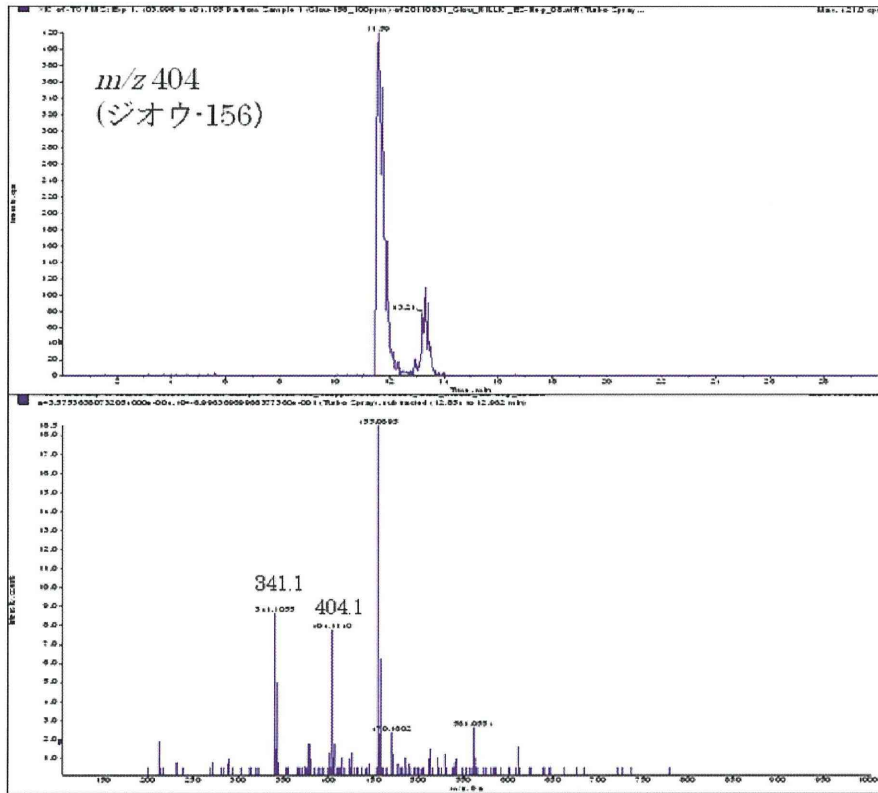


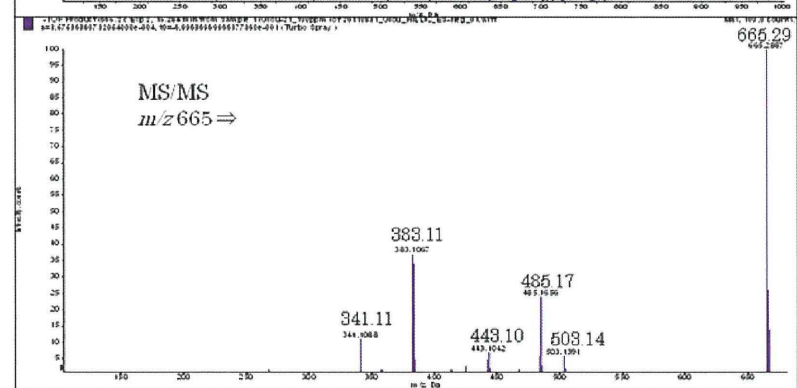
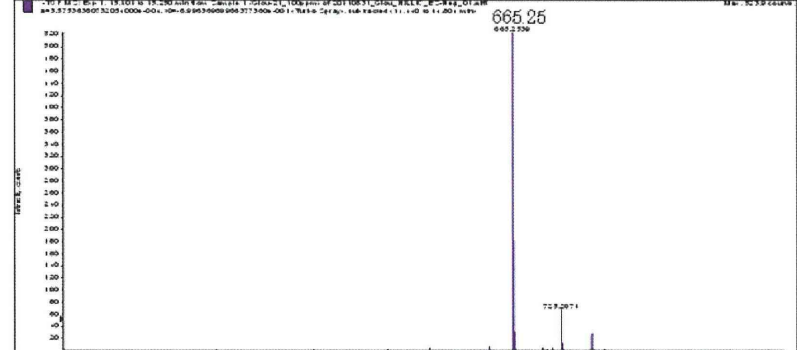
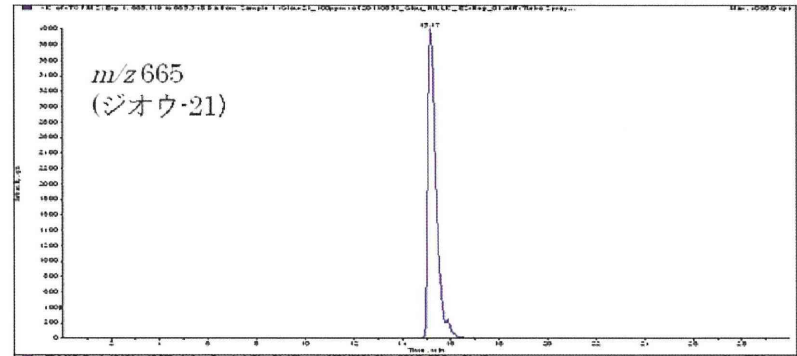
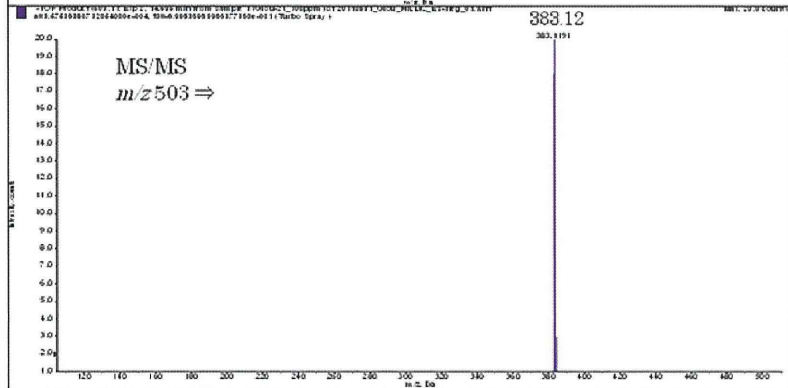
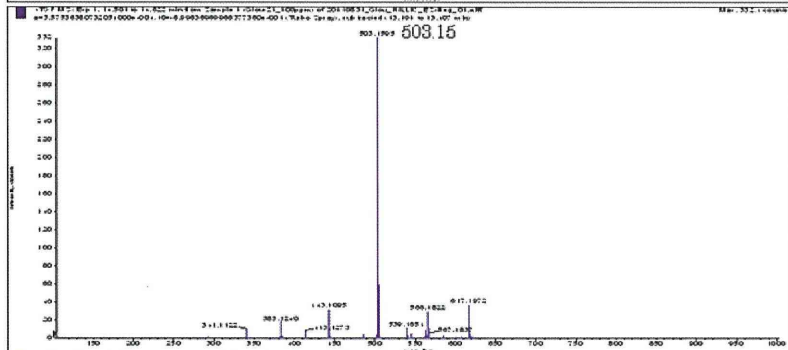
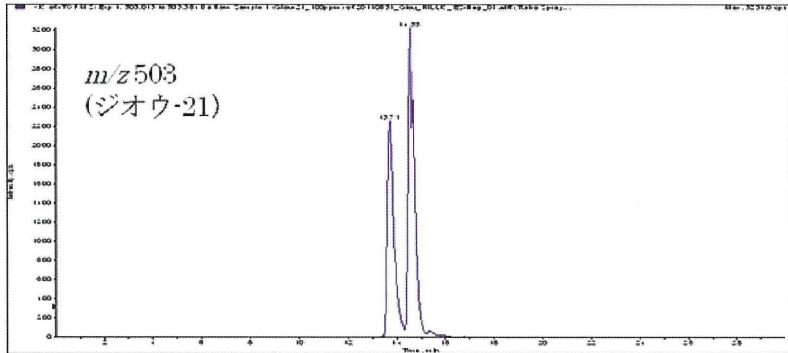


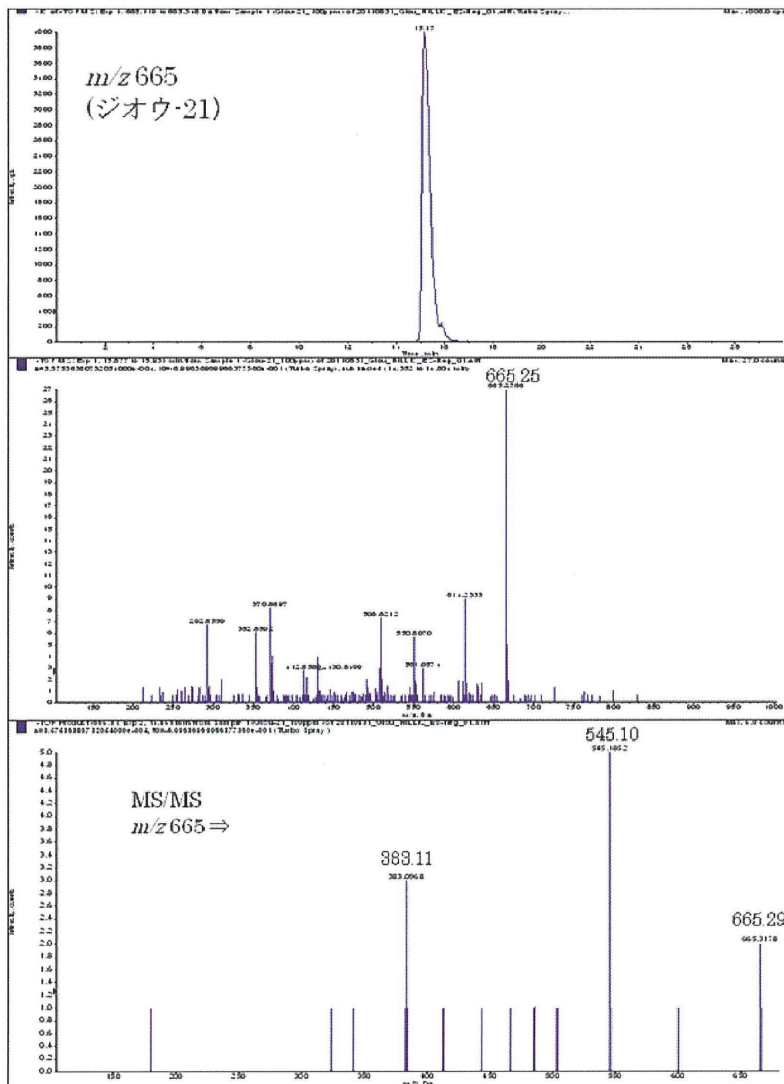












厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進事業）
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）
分担研究報告書

分担研究課題 成分分析データ情報およびさく葉標本に関する研究

研究分担者 瀧野 裕之 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター

HPTLC による国内流通生薬の成分比較

研究協力者 天倉 吉章 松山大学薬学部 准教授

薬用植物総合データベース構築のための基盤整備に関する研究の一環として、薬用植物（生薬）の化学成分分析データの集積を目的に、日本薬局方（局方）収載の6生薬（ソウジュツ、カンゾウ、ショウキョウ、ニンジン、オウレン、ケイヒ）について高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）による含有成分の成分比較を行った。各生薬は国内市場流通品を使用し、局方記載の確認試験に準じて試料調製、分析を行った。ソウジュツは8試料を分析し、attractylodin、hinesol および β -eudesmol が主スポットとして観察された。カンゾウは16試料を分析し、glycyrrhizic acid、liquiritin のスポットがすべての試料に認められた。ニンジンは16試料を分析し、10種近くのスポットが認められ、指標成分である ginsenoside Rg₁ および Rb₁ のスポットがすべての試料に観察された。ケイヒは17試料を分析し、いずれも cinnamaldehyde のスポットが顕著に認められた。ショウキョウでは10試料を分析し、数種のスポットとともに指標成分である[6]-gingerol のスポットがすべての試料に確認され、またオウレン11試料からは、指標成分 berberine を含む数個のスポットが観察された。さらに昨年度実施したオウゴンについて、HPTLCで観察された主要成分 baicalin 以外のスポットについて精査し、wogonoside、chrysin 6-C-arabinoside-8-C-glucoside および wogonin を同定した。今回の生薬市場品の幅広い HPTLC データから、同じ生薬間においても検出する成分パターンに差がある生薬が流通している実態を確認することができた。

研究協力者

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 独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター長
合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所
生薬部長

の有効性・安全性を確保するためには、原料の生薬の品質確保が必須であり、その判断が簡便にできる日本薬局方（局方）収載の確認試験は、それら品質評価に大きな役割を果たす。局方記載の方法に従い、確認試験は実施することができるが、データの信頼性を確認するにはこれまで報告されている文献を検索するなど、手段は限定されている。本プロジェクトでは、生薬の確認試験などの科学データを総合的にデータベース化し、正確なデータを提供することを目的としている。一方で、生の研究データ

A. 研究目的

近年、高齢化社会を迎える中、国民の生薬・漢方薬への関心は高まる一方であり、その役割に大きな期待が寄せられる。漢方

を基盤としたデータベースの構築には、国内に流通しているより多くの市場品に関する科学データを幅広く揃える必要がある。

本研究では、その一環として、まだデータの少ない高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) による国内流通生薬の成分比較を行い、データベースとして相応しい、明瞭な TLC 画像の集積を目的とする。昨年度はオウゴンについて検討し、その分析条件などについて報告した。今年度はオウゴンの未同定スポットの検討とともに、他の局方生薬 [6 生薬 (ソウジュツ 8 試料、カンゾウ (16 試料)、ショウキョウ (10 試料)、ニンジン (16 試料)、オウレン (10 試料)、ケイヒ (17 試料)] の HPTLC による成分比較および主要成分の同定、さらに一部生薬について主要成分の定量分析を実施した。

B. 研究方法

1. 試料、試薬および装置

試料とした国内流通品 [ソウジュツ (8 試料)、カンゾウ (16 試料)、ショウキョウ (10 試料)、ニンジン (16 試料)、オウレン (10 試料)、ケイヒ (17 試料)、オウゴン (15 試料)] は、日本漢方製剤協会、日本生薬連合および東京生薬協会を通じて入手した (表 1)。HPTLC は、HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ Glass plate (20×10 cm) (Merck 社製) を用いた。試料溶液注入には、TLC サンプルアプリケーションター リノマート V、TLC 画像の撮影には、TLC 撮影システム TLC ビジューライザー (いずれも CAMAG 社製) を使用した。

各生薬の標準品は、以下のものを使用した。ソウジュツ : *atractylodin* 標準溶液 (生薬試験用)、 β -*eudesmol* 標準品 (生薬試験用) (いずれも和光純薬製)、オウゴン : *baicalin* (局方生薬試験用)、*wogonin* (局方生薬試験用)、*baicalein* 標準品 (生薬試験用) (いずれも和光純薬製)、カンゾウ : *glycyrrhizin* (生薬試験用) (ナカライテスク製)、*liquiritin* 標準品 (生薬試験用) (和光純薬)、ニンジン : *ginsenoside Rg₁* (生薬試験用) (ナカライテスク製)、*ginsenoside Rb₁* 標準品 (生

薬試験用) (和光純薬製)、ケイヒ : *trans-cinnamaldehyde* (一般試薬) (東京化成製)、ショウキョウ : [6]-*gingerol* (局方生薬試験用)、[6]-*shogaol* (局方生薬試験用) (いずれも和光純薬製)、オウレン : *berberine chloride* 標準品 (生薬試験用)、*palmatine chloride* (局方一般試験法用) (いずれも和光純薬製)、*coptisine hydrochloride* (研究用) (コスモ・バイオ製)、オウゴン : *baicalin* (局方生薬試験用)、*baicalein* 標準品 (生薬試験用) (いずれも和光純薬製)。Glycerol trioleate (*triolein*) は東京化成製を、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。

検出は紫外線 (UV) 照射 (254, 366 nm)、塩化鉄 (III)・メタノール試液噴霧、希硫酸試液後加熱、バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後加熱、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧 (いずれも局方に準拠して調製) のいずれかにより行った。

HPLC は、Shimadzu Prominence システム (島津製作所製) を使用した。HPLC 条件を以下 (1~3) に記す。(1) カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm) (化学物質評価研究機構製)、カラム温度 : 40°C、流速 : 0.3 mL/min、測定波長 : 360 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%)]。(2) カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm) (化学物質評価研究機構製)、カラム温度 : 30°C、流速 : 0.3 mL/min、測定波長 : 254 nm、移動相 : 薄めた酢酸 (31) (1→15) /アセトニトリル (3:2)。(3) カラム : L-column ODS (2.1 I.D. × 150 mm) (化学物質評価研究機構製)、カラム温度 : 30°C、流速 : 0.3 mL/min、測定波長 : 203 nm、移動相 : 水/アセトニトリル (4:1)。

2. 試料溶液の調製

各生薬の試料溶液の調製は、以下のよう

に行った。

(ソウジュツ)各試料の粉末 0.2 g に *n*-ヘキサン 1.0 mL を加え、3 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(カンゾウ)各試料の粉末 0.1 g にエタノール/水混液 (7:3) 1.0 mL に加え、約 40°C 下、5 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(ニンジン)各試料の粉末 0.1 g に *n*-ブタノール/水 (1:1) 1.0 mL を加え、5 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(ケイヒ)各試料の粉末 0.1 g にメタノール 1.0 mL を加え、1 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(ショウキョウ)各試料の粉末 0.1 g にジエチルエーテル 1.0 mL を加え、3 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(オウレン)各試料の粉末 0.1 g にメタノール 4.0 mL を加え、1 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

(オウゴン)各試料の粉末 0.1 g にメタノール 1.0 mL を加え、10 分間超音波処理を行った。遠心分離 (3000 rpm) を 3 分間行い、得られた上清を試料溶液とした。

3. TLC 条件

すべての試料溶液および標準溶液は HPTLC ガラスプレートにスポットし、約 7 cm 展開した。各スポットのバンド幅は 8 mm、バンド間隔 2 mm とした。各生薬の条件については、下記に記す。

(ソウジュツ) 注入量: 各 3 μ L、展開溶媒: *n*-ヘキサン/アセトン混液 (6:1)、検出: 希硫酸試液噴霧後加熱。

(カンゾウ) 注入量: 各 2 μ L、展開溶媒: *n*-ブタノール/水/酢酸混液 (7:2:1)、検出: UV 照射 (254 nm) および希硫酸試液噴霧後加熱。

(ニンジン) 注入量: 各 5 μ L、展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液 (14:5:4)、検出: バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後加熱。

(ケイヒ) 注入量: 各 5 μ L、展開溶媒: *n*-ヘキサン/酢酸エチル混液 (2:1)、UV 照射 (254 nm) および 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧。

(ショウキョウ) 注入量: 各 5 μ L、展開溶媒: *n*-ヘキサン/酢酸エチル混液 (1:1)、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧後加熱。

(オウレン) 注入量: 各 5 μ L、展開溶媒: *n*-ブタノール/水/酢酸混液 (7:2:1)、検出: UV 照射 (254 および 366 nm)。

(オウゴン) 注入量: 各 5 μ L、展開溶媒: *n*-ブタノール/水/酢酸混液 (4:2:1)、検出: UV 照射 (254 および 366 nm) および塩化鉄 (III)・メタノール試液噴霧。

4. 定量条件

(ソウジュツ) 1 の「試料、試薬および装置」に示した HPLC 条件 (1) で、atractyrodin について、ピーク面積法によりそれぞれの含有量を求めた。

(カンゾウ) 1 の「試料、試薬および装置」に示した HPLC 条件 (2) で、glycyrrhizin について、ピーク面積法により各試料中の含有率を求めた。

(ニンジン) 1 の「試料、試薬および装置」に示した HPLC 条件 (3) で、ginsenoside Rg₁ および Rb₁ について、ピーク面積法により各試料中の含有率を求めた。

(オウゴン) 1 の「試料、試薬および装置」に示した HPLC 条件 (1) で、baicalin、wogonoside、chrysin 6-C-arabinoside-8-C-glucoside、wogonin、baicalein について、ピーク面積法により各試料中の含有率を求めた。

5. ソウジュツ成分の単離精製

粉碎した局方ソウジュツ (10 g) をアセトン (50 mL) 中で 10 分間超音波処理し、ろ過後、ろ液を濃縮して抽出液を得た。このアセトン抽出液について、分取 TLC [担

体 Silica gel 60_{F254} (メルク)、展開溶媒 *n*-ヘキサン/アセトン (5:1)] による分離精製を繰り返し、hinesol (101 mg)、 β -eudesmol (20.3 mg)、atractylodin (14.5 mg)、triolein (7.2 mg)、2-[(2*E*)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl]-6-methyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione (5.2 mg)、atractylodinol (6.2 mg) を単離、同定した。標準品として供給されていない化合物については単離したものを標品として使用した。

Hinesol¹⁾: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5.31 (1H, brs), 1.90-2.00 (3H, m), 1.25-1.80 (13H, m), 1.21, 1.20 (each 3H, s), 0.92 (3H, d, $J=7$ Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 16.3, 20.0, 24.3, 27.8, 28.0, 28.1, 28.5, 33.4, 35.8, 36.8, 48.9, 51.5, 72.1, 121.8, 140.2. ESI-MS: m/z 245 [M+Na]⁺.

β -Eudesmol²⁾: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.71 (1H, brd, $J=1.5$ Hz), 4.44 (1H, brd, $J=1.5$ Hz), 1.10-2.40 (15H, m), 1.20 (6H, s), 0.70 (3H, s). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 16.5, 22.5, 23.7, 25.2, 27.3, 27.4, 36.1, 37.1, 41.3, 42.0, 49.6, 50.0, 73.0, 105.5, 151.3. ESI-MS: m/z 245 [M+Na]⁺.

Atractylodin³⁾: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 6.79 (1H, d, $J=16$ Hz), 6.30-6.42 (3H, m), 6.11 (1H, d, $J=16$ Hz), 5.62 (1H, dt, $J=2, 13$ Hz), 1.83 (3H, dd, $J=1.5, 6.5$ Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 19.1, 72.7, 80.4, 82.1, 105.1, 111.2, 112.1, 130.9, 143.7, 143.8, 152.1. ESI-MS: m/z 205 [M+Na]⁺.

Atractylodinol⁴⁾: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (1H, d, $J=1.5$ Hz), 6.80 (1H, d, $J=16$ Hz), 6.39-6.44 (3H, m), 6.11 (1H, d, $J=16$ Hz), 5.89 (1H, d, $J=7$ Hz), 4.27 (2H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 62.8, 74.9, 76.2, 80.8, 81.1, 104.7, 109.1, 111.2, 112.1, 131.1, 143.6, 145.2, 151.9. ESI-MS: m/z 221 [M+Na]⁺.

2-[(2*E*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl]-6-methyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione⁵⁾: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.55 (1H, m), 6.47 (1H, m), 5.15 (1H, m), 5.08 (1H, m), 3.13 (2H, brd, $J=7.5$ Hz), 2.08 (1H, m), 2.06 (4H, m), 1.70

(3H, brs), 1.62 (3H, brs), 1.60 (3H, brs). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 16.1, 16.2, 17.9, 25.8, 26.6, 27.7, 39.8, 118.2, 124.1, 132.0, 132.4, 133.3, 140.0, 146.1, 148.7, 188.1, 188.2. ESI-MS: m/z 281 [M+Na]⁺.

6. オウゴン成分の単離精製

粉碎した局方オウゴン (350 g) を 50% 含水メタノール (3 L) でホモジナイズし、ろ過後、ろ液を濃縮し、*n*-ヘキサン (3 L)、酢酸エチル (3 L)、*n*-ブタノールで順次抽出し、各エキス (*n*-ヘキサンエキス (0.5 g)、酢酸エチルエキス (24.8 g)、*n*-ブタノールエキス (12.0 g)、水エキス (83.6 g) を得た。*n*-ブタノールエキス (10 g) について、Diaion HP-20、次いで YMC-GEL ODS-AQ による分離精製を繰り返し、wogonoside (85 mg) および chrysin 6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside (125 mg) を単離した。これら 2 化合物は標準品として供給されていないため、単離したものを標品として使用した。

Wogonoside⁶⁾: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.09 (2H, m, H-2', 6'), 7.62 (3H, m, H-3'-5'), 7.06 (1H, s, H-3), 6.72 (1H, s, H-6), 5.29 (1H, d, $J=7$ Hz, glcr H-1), 4.03 (1H, d, $J=9.5$ Hz, glcr H-5), 3.42 (1H, t, $J=9$ Hz, glcr H-4), 3.30-3.40 (2H, m, glcr H-2, 3), 3.90 (3H, s, -OMe). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.6 (C-2), 105.3 (C-3), 182.4 (C-4), 149.2 (C-5), 98.7 (C-6), 156.0 (C-7), 129.3 (C-8), 156.0 (C-9), 105.3 (C-10), 130.7 (C-1'), 126.4 (2C, C-2', 6'), 129.3 (2C, C-3', 5'), 132.2 (C-4'), 99.6 (glcr C-1), 72.9 (glcr C-2), 75.3 (glcr C-3), 71.2 (glcr C-4), 75.8 (glcr C-5), 170.0 (glcr C-6), 61.4 (-OMe). ESI-MS: m/z 495 [M-H]⁻.

Chrysin 6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside⁷⁾: ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.19 (2H, m, H-2', 6'), 7.60 (3H, m, H-3'-5'), 7.01 (1H, s, H-3), 4.80 (1H, d, $J=9$ Hz, glc H-1), 4.75 (1H, d, $J=9$ Hz, ara H-1), 3.92 (1H, dd, $J=9, 10$ Hz, glc H-2), 3.25-3.80 (10H, m, glc H-3-6, ara H-2-5). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.6 (C-2), 104.9 (C-3), 182.5 (C-4), 155.3

(C-5), 108.4 (C-6), 161.3 (C-7), 105.3 (C-8), 158.3 (C-9), 104.1 (C-10), 131.0 (C-1'), 127.0 (2C, C-2', 6'), 129.1 (2C, C-3', 5'), 132.1 (C-4'), 74.2 (ara C-1), 68.5, 70.6 (ara C-2, 3), 73.9 (ara C-4), 69.7 (ara C-5), 73.3 (glc C-1), 71.0 (glc C-2), 78.9 (glc C-3), 70.2 (glc C-4), 82.0 (glc C-5), 61.3 (glc C-6). ESI-MS m/z 547 [M-H].

(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. 各生薬の HPTLC 分析

表 1 に示した各生薬国内流通サンプルについて、それぞれ試料溶液を調製し、研究方法に記した方法で HPTLC 分析を行った。試料溶液のスポットには、ばらつきをなくす目的で TLC サンプルアプリケーション (リノマート V) を用い、TLC 画像の撮影には専用機である TLC ビジュアルライザーを用いた。各生薬の結果を以下に記す。

(ソウジュツ) ソウジュツについては、局方に確認試験が記載されていないため、まず TLC 分析条件を検討した。その結果、*n*-ヘキサン抽出物を *n*-ヘキサン/アセトン系溶媒で展開し、希硫酸噴霧後加熱することで、数個のスポットを確認することができた。各スポットについて分取 TLC による分離精製を行い、構造解析した結果、atractylodin、hinesol、 β -eudesmol、triolein、2-[(2*E*)-3,7-dimethyl-2,6-octadienyl]-6-methyl-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione、atractylodinol を同定した (図 1)。Atractylodin はソウジュツの主要成分として知られていることから、これを指標成分として 8 市場品を検討した。その結果、すべての試料に atractylodin のスポットが確認されたが、一部の市場品のスポットは非常に薄く、試料間でのばらつきが認められた (図 2)。その他のスポットとして、hinesol、 β -eudesmol が明瞭な共通スポットとして観察されたが、これらも試料

間でばらつきが認められた。そこで含有量を確認するため、HPLC により atractylodin の定量を行った。全ての試料に atractylodin のピークを検出することが出来たが、スポットの特に薄かった 2 市場品は 0.08、0.25 mg/g と含有量が他 (0.99~2.74 mg/g) と比べると少なく、試料間で 30 倍以上の含有量差が確認された (図 3)。一方、ビャクジュツからは atractylodin は検出されなかった (図 2)。

(カンゾウ) カンゾウは、局方に TLC による確認試験が記載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。カンゾウの国内市場品 16 試料について、glycyrrhizic acid および liquiritin を標準品として、HPTLC 分析した結果、すべての試料において 2 化合物の鮮明なスポットを観察した (図 4)。加えて、各試料中の glycyrrhizic acid 含有率についても検討した結果、2.9~8.9%とすべて局方の規格内 (2.5%以上) であった (図 5)。

(ニンジン) ニンジンは、局方に TLC による確認試験が記載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。ニンジンの国内市場品 16 試料について、ginsenoside Rg₁ および ginsenoside Rb₁ を標準品として、HPTLC 分析した。その結果、標準品 2 化合物とともに、他の ginsenoside 類のものと考えられるスポットが 10 個近く観察された (図 6)。標準品とした 2 化合物について、各試料中の含有率についても検討した結果、ginsenoside Rg₁ が 0.22~0.86%、ginsenoside Rb₁ が 0.31~1.54%といずれも局方の規格内 (ginsenoside Rg₁: 0.1%以上、ginsenoside Rb₁: 0.2%以上) であった (図 7)。

(ケイヒ) ケイヒは、局方に TLC による確認試験法が記載されており、本法に準じて HPTLC 分析を行った。ケイヒの国内市場品 17 試料の HPTLC 結果は、紫外線 (254 nm) 照射、次いで 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧による検出により、すべてに共通で明瞭な 1 スポットが確認された (図 8)。特に、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液による検出では、ほぼ 1 スポットで観察された。このスポットは、標品との比較

により *trans*-cinnamaldehyde と同定した。

(ショウキョウ) ショウキョウは、局方の TLC による確認試験に準じて HPTLC 分析を行った。国内市場品 10 試料の HPTLC 結果では、すべての試料において標準品である [6]-gingerol のスポットが確認された (図 9)。その他、[6]-shogaol を含む数個のスポットが観察された。

(オウレン) オウレンは、局方の TLC による確認試験に準じて HPTLC 分析を行った。国内市場品 10 試料の HPTLC 結果では、すべての試料において標準品である berberine のスポットが観察された (図 10)。その他、berberine 関連化合物のスポットが観察された。

(オウゴン) オウゴン 15 試料について、局方の TLC 確認試験に準じて HPTLC 分析を行った。その結果、大きく 3 つの領域に明瞭なスポットが観察された (図 11)。それら成分を明らかにするため、標準品のスポットと直接比較したところ、 R_f 0.50 付近にある暗緑色のスポットが baicalin と一致し、本化合物であると同定した。その他、溶媒フロントに近い R_f 1.0 付近に観察された褐色のスポットは wogonin と一致した。また、baicalin のすぐ上にあるスポット (R_f 0.58 付近の褐色スポット) については、別途分取 TLC を行い、2 成分 (wogonoside および chrysin 6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside) を単離、同定することが出来た。HPTLC 分析したオウゴン 15 検体の試料溶液について、併せて逆相 HPLC を行った (図 12)。HPTLC の結果と同様、全ての試料において、標準品 baicalin が主ピークとして検出された。そこで、HPTLC により検出された成分を中心に、主要成分 baicalin の他、baicalein、wogonin、wogonoside、chrysin 6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside の計 5 フラボン類について、HPLC によるピーク面積法で定量分析を行い、原料に対する各成分の含有率を求めた。その結果、baicalin は試料乾燥重量当り 7.9~17.1% で最も多く、次いで wogonoside (2.3~5.1%) であった。その他の成分は、baicalein (0.1~2.2%)、chrysin

6-*C*-arabinoside-8-*C*-glucoside (0.6~1.0%)、wogonin (0.1~0.6%) の含有率であった (表 2)。

D. 考察

今回、6 生薬の国内市場品における HPTLC 分析を行い、各標準品のスポットを中心に、分離良好な画像データを得ることが出来た。標準品以外のスポットにおいては、各生薬間で分布に違いもあり、今後それらスポットの化合物を特定することで、品質への影響を考察するためのデータになり得るかどうか、さらに検討を進める予定である。

定量分析については、ソウジュツ (局方に定量法未記載) においては HPLC により atractylodin の含有量について検討し、0.08~2.74 mg/g の含有量が確認された。Atractylodin については、ビャクジュツからは検出されておらず、これまでもソウジュツの主要成分としてあげられている。今回の結果においても、含有量の大小はあったが共通成分として検出された。本化合物を指標成分とする場合、市場品において 30 倍近くの濃度差があったことから、すべてを検出させるための試料濃度検討、または含有量について一定の基準を設ける必要性が示唆された。

カンゾウ、ニンジン、オウゴンについては、局方に定量法および指標成分の含有率が設定されている。カンゾウおよびニンジンは、市場品における標準品の含有率がすべて局方の規格内であった。一方、オウゴンについては、HPLC による定量分析の結果、baicalin が乾燥重量当り 7.9~17.1% の含有率で認められた。検討した試料のうち 1 検体のみ 7.9% で、他はすべて 10% 以上であった。局方でオウゴンは、「乾燥物に対し、バイカリン 10.0% 以上を含む」ことが規定されておりその範囲外ということになるが、本研究で用いた試料はすべて品質管理試験を経た市場流通品である。今回、試料調製には限定したごく少量の一部を粉砕した試料を用いており、「試料 50~250 g を採取

する」という局方の生薬試験法に沿ったものではない。そのことを考えると、サンプリング方法が原因の一つと考えられ、ロットから抜き取るサンプル量については、局方の生薬試験法に従って実施する必要性が示された。また、今回の定量分析では乾燥減量換算を行っておらず、局方でオウゴン乾燥減量が最大 12%まで認められていることを考慮すると、この含有率は約 9%となり、これによる影響も大きいことが考察される。一方で、オウゴン中には加水分解酵素 (baicalinase) が存在し、一定の温度と湿度条件下で baicalin から baicalein に分解することが知られているが、この分解反応は、熱湯中や 80%エタノール中においてはほとんど起こらないことが報告されており⁸⁾、その影響は少ないものと考察される。

E. 結論

本研究では、6 生薬の国内市場品における HPTLC 分析を行い、各標準品のスポットを中心に、分離良好な HPTLC 画像データを得ることが出来た。これらは視覚判断可能な一斉分析データとして、有用な資料になると考えられる。今回のような広範囲な国内市場品生薬の同等性を化学的に評価した例は少なく、本結果はデータベース構築のための一科学データとして期待される。今後、引き続き、コア局方生薬を中心に HPTLC 画像データの集積を実施する。

【参考文献】

- 1) Nakazaki A., Era T., Numada Y., Kobayashi S. Stereoselective total synthesis of (±)- α -vetispiroene, (±)-hinesol, and (±)- β -vetivone based on a claisen rearrangement, *Tetrahedron* 2006: 62, 6264-6271.
- 2) Mash EA., Fryling JA. Homochiral ketals in organic synthesis. Enantioselective synthesis of (+)- β -eudesmol, *J. Org. Chem.* 1987: 52, 3000-3003.
- 3) Sakurai T., Yamada H., Saito K., Kano Y. する研究—ソウジュツについて。日本生薬

Enzyme inhibitory activities of acetylene ad sesquiterpene compounds in *Atractylodes Rhizome*, *Biol. Pharm. Bull.* 1993: 16, 142-145.

- 4) Resch M., Heilmann J., Steigel A., Bauer R. Further phenols and polyacetylenes from the rhizomes of *Atractylodes lancea* and their anti-inflammatory activity, *Planta Med.* 2001: 67, 437-442.
- 5) Resch M., Steigel A., Chen ZL., Bauer R. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*, *J. Nat. Prod.* 1998: 61, 347-350.
- 6) Kang J., Choi MY., Kang S., Kwon HN., Wen H., Lee CH., Park M., Wiklund S., Kim HJ., Kwon SW., Park S. Application of a ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines, *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11589-11595.
- 7) Takagi S., Yamaki M., Inoue K. Flavone di-C-glycosides from *Scutellaria baicalensis*, *Phytochemistry* 1981, 20, 2443-2444.
- 8) Ikegami F., Matsunae K., Hisamitsu M., Kurihara T., Yamamoto T., Murakoshi I. Purification and properties of a plant β -D-glucuronidase from *Scutellaria* root, *Biol. Pharm. Bull.* 1995: 18, 1531-1534.

F. 研究発表

論文発表

現在のところなし

学会発表

- 1) 天倉吉章、瀧野裕之、好村守生、合田幸広、吉田隆志、川原信夫：薬用植物総合データベース構築のための基盤整備に関する学会第 58 回年会、2011 年 9 月（東京）。

2) 天倉吉章、瀧野裕之、好村守生、合田幸
広、吉田隆志、川原信夫：HPTLCによる
国内流通生薬の成分比較。日本薬学会第
132 年会、2012 年 3 月(札幌) (発表予定)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 試験した生薬国内流通品のサンプルリスト

番号	生薬名	産地	形態	入手年
NIB-009	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2008年
NIB-010	ソウジュツ	内蒙古	原形	2010年
NIB-058	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2010年
NIB-092	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2008年
NIB-111	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2009年
NIB-148	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2009年
NIB-181	ソウジュツ	中国湖北省	原形	2010年
NIB-182	ソウジュツ	中国陝西省	原形	2010年

NIB-003	カンゾウ	内蒙古	原形	2009年
NIB-004	カンゾウ	寧夏	原形	2008年
NIB-005	カンゾウ	内蒙古	原形	2008年
NIB-006	カンゾウ	内蒙古	原形	2008年
NIB-007	カンゾウ	内蒙古	原形	2008年
NIB-037	カンゾウ	中国内蒙古自治区	原形	2010年
NIB-038	カンゾウ	中国甘肅省	原形	2010年
NIB-054	カンゾウ	吉林省産	原形	2010年
NIB-074	カンゾウ	中国甘肅省	刻み	2008年
NIB-090	カンゾウ	中国 寧夏	刻み	2008年
NIB-107	カンゾウ	中国寧夏省	刻み	2010年
NIB-108	カンゾウ	中国寧夏省	刻み	2009年
NIB-109	カンゾウ	中国内蒙古自治区	刻み	2010年
NIB-146	カンゾウ	中国甘肅省	刻み	2006年
NIB-168	カンゾウ	中国内蒙古自治区	原形	2009年
NIB-176	カンゾウ	中国内蒙古自治区	原形	2010年

NIB-011	ニンジン	吉林	原形	2009年
NIB-012	ニンジン	吉林	原形	2008年
NIB-040	ニンジン	中国吉林省	原形	2007年
NIB-056	ニンジン	吉林省産	原形	2009年
NIB-061	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年
NIB-067	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年
NIB-076	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年
NIB-077	ニンジン	中国吉林省	刻み	2009年
NIB-093	ニンジン	中国 遼寧省	原形	2009年
NIB-112	ニンジン	中国吉林省	原形	2010年
NIB-113	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年
NIB-114	ニンジン	中国吉林省	刻	2007年
NIB-149	ニンジン	中国吉林省	原形	2008年
NIB-170	ニンジン	中国吉林省	原形	2009年
NIB-183	ニンジン	中国吉林省	原形	2010年
NIB-184	ニンジン	日本福島県	原形	2009年

表 1. (続き)

番号	生薬名	産地	形態	入手年
NIB-222	ケイヒ	中国広西省	原形	
NIB-014	ケイヒ	ベトナム	原形	2009年
NIB-015	ケイヒ	中国広西省	原形	2010年
NIB-043	ケイヒ	中国広西壮族自治区	刻み	2010年
NIB-062	ケイヒ	中国広西壮族自治区	刻み	2009年
NIB-068	ケイヒ	中国広東省	刻み	2007年
NIB-069	ケイヒ	中国広西省	刻み	2009年
NIB-070	ケイヒ	ベトナム	刻み	2009年
NIB-078	ケイヒ	中国広西自治区	刻み	2008年
NIB-095	ケイヒ	ベトナム	刻み	2009年
NIB-117	ケイヒ	中国広東省	砕	2009年
NIB-118	ケイヒ	ベトナム	刻み	2010年
NIB-119	ケイヒ	中国広西自治区	砕	2009年
NIB-151	ケイヒ	中国広西壮族自治区	刻み	2010年
NIB-171	ケイヒ	中国広西壮族自治区	原形	2009年
NIB-187	ケイヒ	中国広西壮族自治区	刻	2009年
NIB-188	ケイヒ	ベトナム	原形	2010年

NIB-008	ショウキョウ	雲南	原形	2010年
NIB-039	ショウキョウ	中国雲南省	原形	2009年
NIB-055	ショウキョウ	雲南省産	原形	2010年
NIB-060	ショウキョウ	中国雲南省	刻み	2008年
NIB-075	ショウキョウ	中国雲南省	刻み	2006年
NIB-091	ショウキョウ	中国 雲南省	スライス	2009年
NIB-110	ショウキョウ	中国雲南省	刻み	2010年
NIB-147	ショウキョウ	中国雲南省	原形	2010年
NIB-169	ショウキョウ	中国雲南省	原形	2009年
NIB-179	ショウキョウ	中国雲南省	原形	2010年

NIB-215	オウレン	中国四川省	原形	
NIB-013	オウレン	中国四川省	原形	2010年
NIB-041	オウレン	中国雲南省	原形	2009年
NIB-042	オウレン	中国重慶	原形	2008年
NIB-094	オウレン	中国四川省	原形	2008年
NIB-115	オウレン	日本岐阜県	原形	2010年
NIB-116	オウレン	中国重慶	刻み	2010年
NIB-150	オウレン	中国四川省	原形	2009年
NIB-185	オウレン	日本福井県	原形	2010年
NIB-186	オウレン	中国四川省	原形	2010年

表 1. (続き)

番号	生薬名	産地	形態	入手年
NIB-001	オウゴン	中国河北省	原形	2010年
NIB-002	オウゴン	中国河北省	原形	2009年
NIB-035	オウゴン	中国河北省	原形	2010年
NIB-036	オウゴン	中国河北省	原形	2009年
NIB-057	オウゴン	中国山東省	原形	2009年
NIB-059	オウゴン	中国河北省	刻み	2010年
NIB-073	オウゴン	中国河北省	刻み	2008年
NIB-089	オウゴン	中国河北省	原形	2009年
NIB-105	オウゴン	中国河北省	刻み	2009年
NIB-106	オウゴン	中国内蒙古自治区	刻み	2008年
NIB-142	オウゴン	中国 河北省	原形	2001年
NIB-145	オウゴン	中国河北省	原形	2010年
NIB-167	オウゴン	中国陝西省	原形	2009年
NIB-174	オウゴン	中国河北省	小刻	2010年
NIB-175	オウゴン	中国陝西省	原形	2009年