

簡易合成は困難で、純度の高い化合物を得るためには、天然物より単離することになる。この場合、多大な労力が必要で、指標成分を準備する経済的コストが多くなる。また、原料の差、抽出、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間変動が成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい。また天然物の場合、最大の不純物は、水である場合が多いが、定量用途を目的として、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な指標成分を多量に消費することになる。このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキスの各条規格では、多くの場合、便宜上その時点で市販されている試薬、あるい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、成分を大量に消費する関係でカールフィッシャー法による水分含量測定を規定することはなされていない。また、事前検討に一定量の指標成分を準備する必要があるため、コスト面の難点から、乾燥減量も規定されていない。更に、局方においてクロマトグラムで規定される純度は、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ではないため、その値は、計量学（Metrology）的に値付けが行われているとはいえ、分析値の信頼性を損なう可能性を完全には否定できない。したがって、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、生薬及び漢方処方エキスについて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、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）が実用化されつつある¹⁻¹⁰⁾。qNMRは、¹H-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、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濃度調製値の関係から求めることができる。したがって、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。したがって、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。

本研究は、前述した天然物の定量問題を解決するため、日本薬局方においてqNMR法を利用することを前提とし、局方において、同法を利用して成分含量測定用試薬の純度について、どのように規格化していくか具体的な方策を検討する目的で、実際に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についてqNMRの測定を行い、利用する場合における課題の抽出を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬及び試液

日本薬局方用試薬としては、和光純薬(株)製、honokiol (1, Lot WKL 0604), geniposide (2, Lot CDF 1230), baicalin (3, Lot CDF 1316), puerarin (4, Lot CDR 4423), (*E*)-cinnamaldehyde (5, Lot ALL 5888)を用いた。cucurbitacin B (6)は、沖縄県衛生環境研究所で単離されたものを使用した。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(株)製のものを用いた。フタル酸ジエチル (diethyl phthalate: DEP)は、(独)産業技術総合研究所製の認証標準物質 (Certified Reference Material: CRM) (品番 NMIJ SRM 4022-b: 純度 99.74 ± 0.09 (mol/mol%))を用いた。重水素化溶媒 (重溶媒)は、すべて ISOTEC製のものを使用した。

2.2 装置

核磁気共鳴装置(NMR)：オートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz) (日本電子(株)製)。ケミカルシフト値は、HMDを基準シグナル (0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。データ解析には、自動定量解析ソフトウェア ALICE2 for qNMR (日本電子(株)製)を用いた。

2.3 qNMR用標準液の調製及びHMDの濃度校正

HMD 約 100 mg を精密に量り、DMSO-*d*₆を除き、重溶媒 50 mL に定容した。DMSO-*d*₆では、25 mL に定容した。これら溶液を MeOH-*d*₄を除く重溶媒では 10 倍、MeOH-*d*₄では 5 倍、同じ重溶媒で更に希釈し qNMR 用標準液とした。これら標準液中の HMD 濃度は、既報⁶⁾に従い、DEP により校正して求めた。

2.4 日本薬局方用試薬の純度測定

各試薬約5 mgを精密に量り取り、あらかじめ調製した標準液1.0 mLに溶解し、この溶液0.6 mLをNMR試料管(Wilmad 528)に封入したものを試料溶液とした。各試料につき3サンプル調製し、既報に従って測定、解析処理し純度を算出した。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。

3. 結果と考察

3.1 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, 1b, Table 1に示す。1は、芳香族化合物であり、シグナルは、3.3 ppm付近に存在するベンジルメチレン(h, i)から、8 ppm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、残りのシグナルは、2件(i, c, 97.0%)を除き、6シグナルが96%台の値を示した。すべてのシグナルの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、試薬メーカーによる試験成績書に記載され

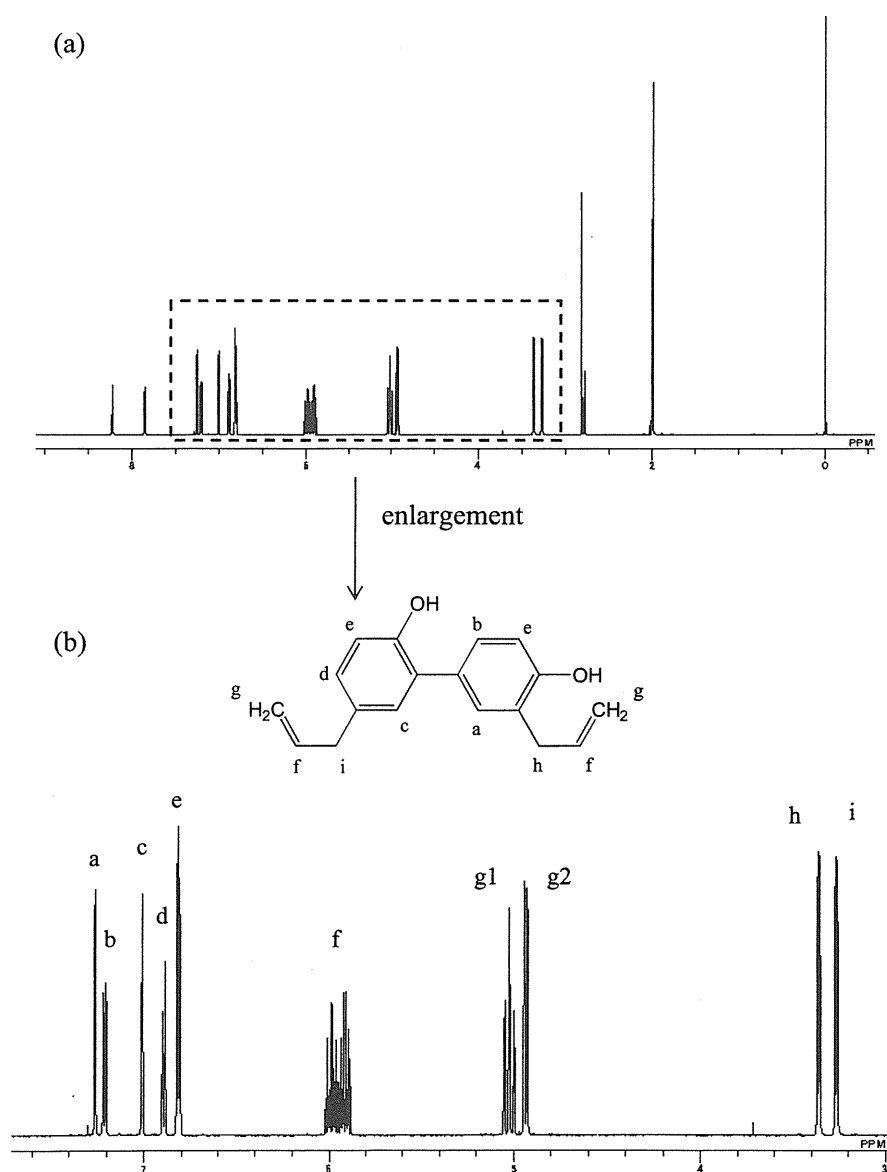


Fig.1 NMR Chart of Honokiol (1) in Acetone-d₆ (a) and its Enlarged View with the Chemical Structure (b)

Table 1 Quantitative NMR Results of Honokiol (1)

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

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 H₂O）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、本試薬の試験成績書には x · H₂O 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。

NMR においては、シグナルが単スピン系の場合シングルレットとなり、2 スピン系となるとダブルレットに分裂し、更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 次近似でき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。したがって、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すべてのシグナル（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ものと考えられる。ただし、生薬関連の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 桁であるものと考えられ、本品のように純度が高くどのシグナルにおいても 95% 以上の値が示されるものでは、最も単純なシグナルの平均を使用した場合あるいは全有効シグナルの純度値の平均を使用した場合のどちらでも、得られる結果に差は生じない可能性が高い。

3.2 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、2 ppm から、7.5 ppm 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（H₂O 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ルレットの 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

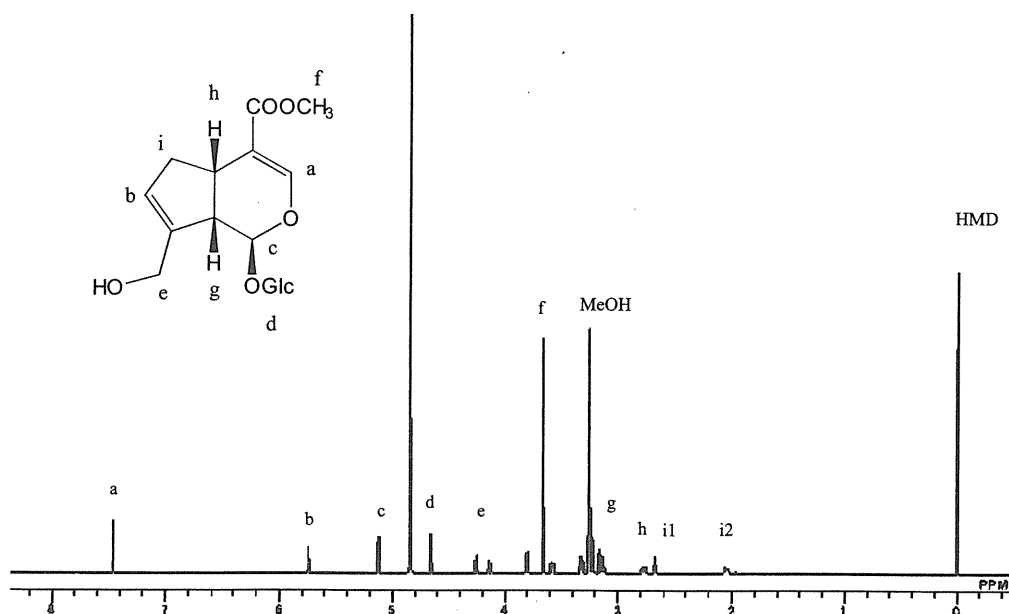
Fig. 2 NMR Chart of Geniposide (2) in MeOH- d_4 with the Chemical Structure

Table 2 Quantitative NMR Results of Geniposide (2)

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

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、3.7 ppmより高磁場に出現するグルコース由来の領域は、4か所に区分（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、更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、試料ごとに慎重な検討が必要であるものと考えられる。

3.3 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- d_4 と、acetone- d_6 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る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か所のシグナル(a~e)では、MeOH-*d*₄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-*d*₆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、特にスピ全系が単純なa, b, dのシグナルでは、MeOH-*d*₄中での平均が89.6%、acetone-*d*₆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、今回の測定ですべてのシグナルで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、スピ全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-*d*₆中では純度値が89.4%であるのかかわらず、MeOH-*d*₄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。したがって常識的には、この化合物には本溶媒中では確率的に3.5%程度

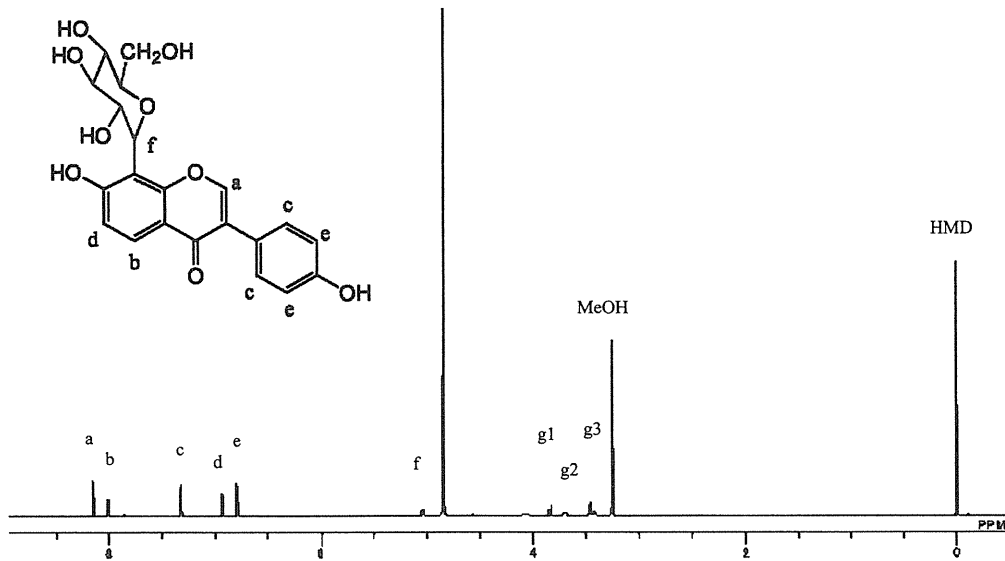


Fig. 3a NMR Chart of Puerarin (3) in MeOH-*d*₄ with the Chemical Structure

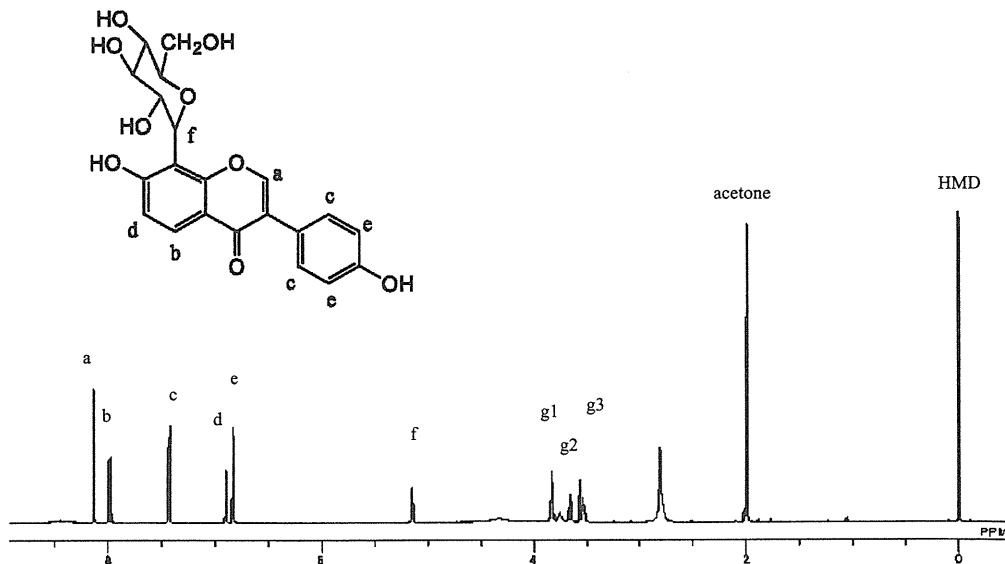


Fig. 3b NMR Chart of Puerarin (3) in Acetone-*d*₆ with the Chemical Structure

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	6.8	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

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	6.9	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

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たと説明可能となる。事実、MeOH- d_4 中では、acetone- d_6 中ではない小さいピークが4.6 ppm付近に存在すること、グルコース由来のg2のシグナルの純度値が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- d_6 中では、アノメリックプロトンを除いては、グルコースのシグナル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、芳香族シグナル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。

3.4 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- d_6 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、本試薬は一水和物、HPLC上の純度は99.6%と試薬メーカーによる試験成績書上記載されている。

DMSO- d_6 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測されることが知られている。実際、化合物4のスペクトルには、10 ppm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、やや盛り上がりしており、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。5~5.5 ppm付近には、糖由来の水酸基のダブルレットシグナル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、5.5 ppm付近には、チャート上盛り上がりが見られ、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、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

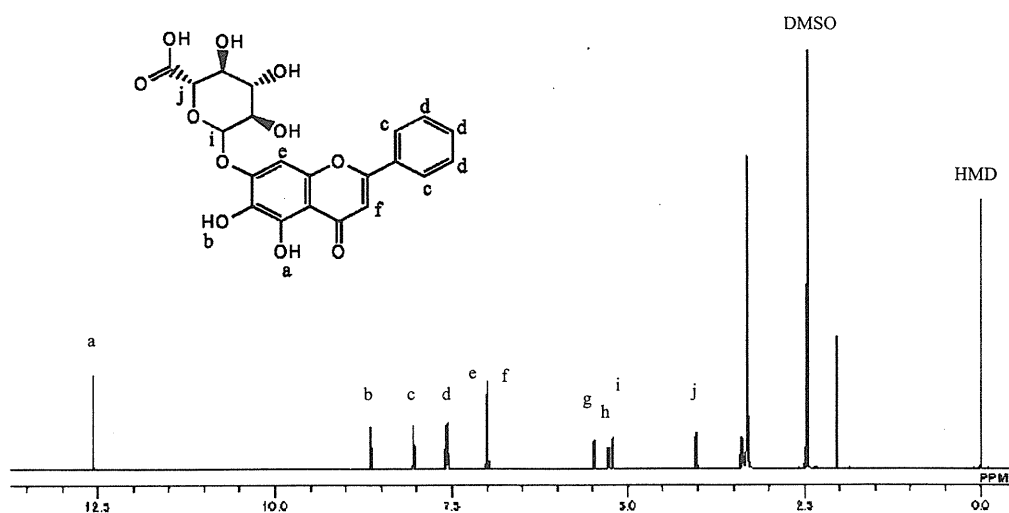
Fig. 4 NMR Chart of Baicalin (4) in DMSO- d_6 with the Chemical Structure

Table 4 Quantitative NMR Results of Baicalin (4)

Target signal	Chemical shift (ppm)	Number of H	Baicalin		Baicalin · H ₂ O
			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 · H₂O

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のシグナルは、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。したがって、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、4.0 ppm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、ダブル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、3.4 ppm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。したがって、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600 MHz NMRで行っているが、800 MHz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、本化合物は一水和物として試薬メー

カーによる試験成績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。一方一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、2 ppm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。したがって、残り3.5%の多くは、この不純物由来である可能性がある。

3.5 (*E*)-cinnamaldehyde (5)

化合物5は、芳香族化合物であり、試薬メーカーによる試験成績書にある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6.5 ppm, 8.1 ppm付近に、水由来と推定されるブロードなシグナルが2.7 ppm付近に観察され、本試薬の純度が100%でないことは容易に予想される。本化合物由来のシグナルは、9.7 ppm付近のアルデヒド性のダブルレットシグナル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、他のシグナル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、このピークに由来すると思われる。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、ずば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6.5 ppm付近の不純物由来のダブルレットの積分値は、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、6.5 ppm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。

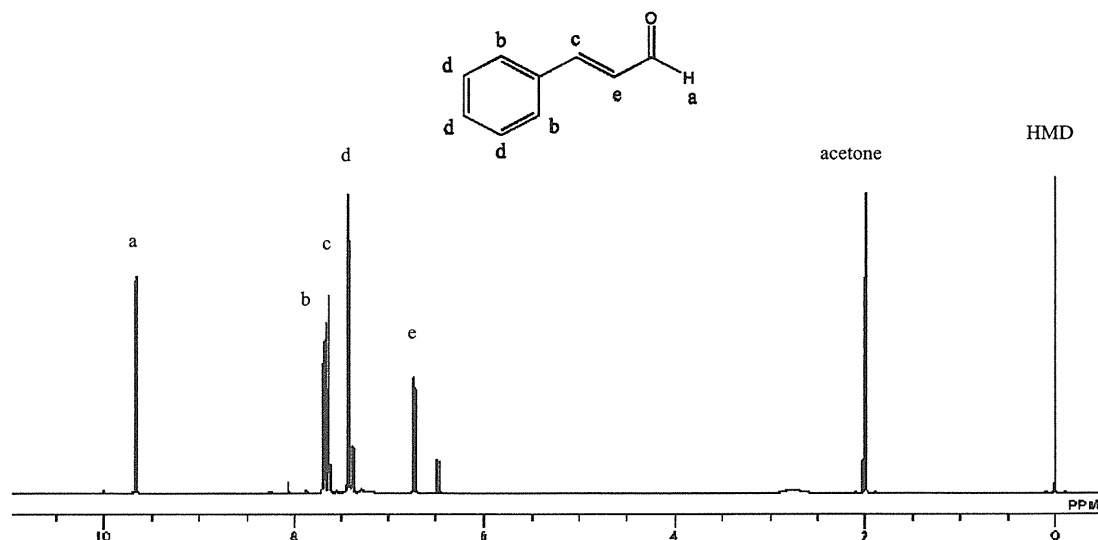
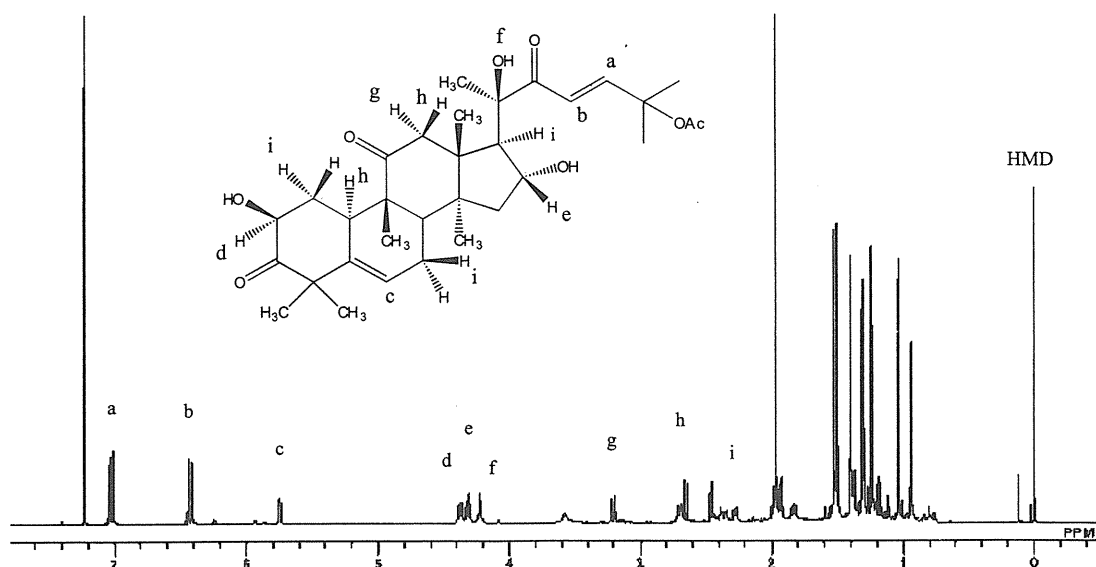


Fig. 5 NMR Chart of (*E*)-Cinnamaldehyde (5) in Acetone- d_6 with the Chemical Structure

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 Cucurbitacin B (6) in CDCl₃ with the Chemical Structure

3.6 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。したがって、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、その中に不純物由来と推定されるピークが重なって観測されている。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。したがって、スピン系が単純で積分範囲が狭い c及び 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、どのシグナルでも不純物ピークが重な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こと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のみを使用する方がより正確な値に近い可能性があると考えられることも可能である。したがって、このような化合物における純度値の

Table 6 Quantitative NMR Results of Cucurbitacin 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

取扱いをどうするか、今後の議論が必要である。

qNMRの特徴として、定量に利用するシグナルが他のシグナルと分離している限り、不純物を問わず直接的にSIへのトレーサビリティがある絶対定量値が得られることが挙げられる。不純物含量の高い化合物 **5**, **6**での結果は、このqNMRの特徴を明瞭に示したものと考えられる。

3.7 総括

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の測定を行い、qNMRにより成分含量測定用試薬について、その純度をほぼ絶対的に規格化するため課題の抽出を行った。様々な純度の化合物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の純度について、規格化できることが明らかとなった。ただし、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できる可能性が高いものと考えられる。すなわち、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。したがって、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メーションによる積分値の変化も考慮する。更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、更に個々のシグナルごとに、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。

更に、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、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、800 MHz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、測定精度を上げるために重要であるものと考えられた。

以上、qNMRを日本薬局方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、個々の試薬ごとに、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。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）により行われたものであり、ここに感謝の意を記す。

文 献

- 1) Saito, T., Nakaie, S., Kinoshita, M., Ihara, T., Kinugasa, S., Nomura, A., Maeda, T.: *Metrologia*, **41**, 213-218 (2004).
- 2) Sugimoto, N., Koike, R., Furusho, N., Tanno, M., Yomota, C., Sato, K., Yamazaki, T., Tanamoto, K.: *Food Add. Contam.*, **24**, 799-806 (2007).
- 3) Pauli, Guido F., Jaki Birgit U., Lankin, David C.: *J. Natural Prod.*, **70**, 589-595 (2007).
- 4) Ihara, T., Saito, T., Sugimoto, N.: *Synthesiology*, **2**, 12-22 (2009).
- 5) Saito, T., Ihara, T., Koike, M., Kinugasa, S., Fujimine, Y., Nose, K., Hirai, T.: *Accred. Qual. Assur.*, **14**, 79-86 (2009).
- 6) 田原麻衣子, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 多田敦子, 久保田領志, 清水久美子, 山崎 壮, 棚元憲一, 中澤裕之, 西村哲治: *日食化誌*, **16**, 28-33 (2009).
- 7) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: *FFIジャーナル*, **215**, 129-136 (2010).
- 8) Hasada, K., Yoshida, T., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Nishimura, T., Nagatsu, A., Mizukami, H.: *J. Nat. Med.*, **64**, 161-166 (2010).
- 9) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 伊藤澄夫, 山崎 壮, 河村葉子, 西村哲治: *食衛誌*, **51**, 19-27 (2010).
- 10) 多田敦子, 高橋加奈, 杉本直樹, 末松孝子, 有福和紀, 齋藤 剛, 井原俊英, 吉田雄一, 石附京子, 西村哲治, 山崎 壮, 河村葉子: *食衛誌* (submitted).

生薬「タンジン」及び「トウジン」の TLC 確認試験法の検討

天倉 吉章^a, 好村 守生^a, 川原 信夫^b, 合田 幸広^c, 吉田 隆志^a

^a 松山大学薬学部, ^b 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部,

^c 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

TLC-Based Identification Test for the Crude Drug *Salviae miltiorrhizae Radix* and *Codonopsis Radix*

Yoshiaki Amakura^a, Morio Yoshimura^a, Nobuo Kawahara^b, Yukihiro Goda^c and Takashi Yoshida^a

^a College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, 4-2 Bunkyo-cho, Matsuyama, Ehime 790-8578, Japan

^b Tsukuba Division, Research Center of Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

^c Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received April 12, 2010)

Rapid and simple methods for TLC-based identification of the crude drug *Salviae miltiorrhizae Radix* (*Salvia Miltiorrhiza* Root; root of *Salvia miltiorrhiza*) as well as *Codonopsis Radix* (*Codonopsis* Root; root of *Codonopsis pilosula* and *C. tangshen*) were developed. TLC and HPLC were preliminarily applied to characterization of possible chemical markers for evaluating their qualities, and two UV-sensitive compounds, lithospermic acid B and tanshinone II_A, were identified as TLC markers of danshen methanolic extracts prepared under set conditions. On the other hand, although no UV-sensitive TLC marker of tangshen extract was detected, a characteristic spot of D-fructose was definitely detected by spraying with diluted sulfuric acid test solution. The present data could be useful for development of convenient TLC tests for identifying the danshen and tangshen.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; *Salviae miltiorrhizae* Root; *Codonopsis pilosula*; *Codonopsis tangshen*; *Codonopsis* Root; thin-layer chromatography

タンジン〔丹参 (danshen) ; *Salviae Miltiorrhizae* Root〕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果があるとされ、去痰、排膿、止痛薬として婦人病などに用いられる。¹⁾ 一方、トウジン〔党参 (tangshen) ; *Codonopsis* Root〕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し、また漢方で人参の代用とされる。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。

指標成分を信頼性およ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、香港中薬材標準で 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 および salviolic acid B) についてそれぞれの分析用試料溶液を調製する必要があり、tanshinone II_A との比較用試料溶液の調製は振とう抽出に 1 時間を要し、salviolic acid B では沸騰水浴中で抽出する必要がある。加えて、操作途中で pH 調整が必要など前処理に時間を要し、作業が煩雑である。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。

一方、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 lobetyolin を指標物質とするが、抽出時間に 30 分を要し、カートリッジ処理を要するなど、前処理に煩雑性が感じられる。

そこで本研究では、タンジンおよびトウジンの TLC 指標成分についてそれぞれ再検討し、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。

実験方法

1. 試料、試薬および装置

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 [タンジン A: ウチダ和漢薬製 (lot.7901651), B: 栃本天海堂製 (lot. 029808001), C: 松浦薬業製 (lot. 8601), トウジン A: ウチダ和漢薬製 (lot. 7001653), B: 栃本天海堂製 (lot. 027107005), C: 松浦薬業製 (lot. 77K3)] を用いた。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、Slica 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 Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピ) を使用し、測定溶媒として chloroform-*d*, methanol-*d*₄ および 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) 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%酢酸水溶液および (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 (噴霧後加熱) (いずれも日本薬局方^{6,7)} に準拠して調製) により行った。

2. TLC 用の試料調製のための抽出溶媒の検討

タンジンの抽出溶媒としては、メタノール, 50%含水メタノール, アセトン, 酢酸エチル, エタノールを用いて比較検討した。一方、トウジンについては上記溶媒に加えてヘキサンおよび水抽出についても検討した。それぞれ粉末にした生薬 1 g を各溶媒 5 mL 中, 室温条件下で 5 分間振とうし, 自然ろ過後, 得られた各ろ液を試料溶液とした。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. 指標成分の単離

含有成分の分画, 精製のための抽出には, 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。

(3-1) タンジン: タンジン試料 A (500 g) を粉砕し, 50%含水メタノール (2.5 L×2) 中, ポリトロン (KINEMATICA) によりホモジナイズし, ろ過後, ろ液を濃縮し, 50%含水メタノール抽出物とした。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 (1.3 g) および水分画物 (167.6 g (固形分量)) を得た。水分画物 (150 g) の Diaion HP-20 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Ⓐ)] 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)] を繰り返して, 化合物 2 (tanshinone II_A) [32 mg, (=スポットⒷ)] を単離した。

Lithospermic acid B: ¹H-NMR (500 MHz, acetone-*d*₆) δ: 2.90 (2H, dd, *J*=9.5, 14.5 Hz), 3.15 (2H, dd, *J*=4.5, 14.5 Hz), 4.47 (1H, d, *J*=4.5 Hz), 5.20 (2H, m), 5.88 (1H, d, *J*=4.5 Hz), 6.28 (1H, d, *J*=16 Hz), 6.44 (1H, dd, *J*=2, 8 Hz), 6.64–6.84 (8H, m, overlap), 6.90 (1H, d, *J*=8.5 Hz), 7.25 (1H, d, *J*=8.5 Hz), 7.64 (1H, d, *J*=16 Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, acetone-*d*₆) δ: 37.0, 37.4, 57.0, 73.7, 74.8, 87.5, 113.2, 116.0, 116.1, 116.2, 116.7, 117.2, 117.3, 118.2, 118.3, 121.6, 121.7, 121.8, 124.5, 126.0, 128.6,

129.0, 133.3, 142.8, 144.4, 144.65, 144.70, 145.49, 145.54, 146.0, 146.2, 148.5, 166.5, 170.6, 171.1, 171.5. HR-ESI-MS m/z 717.1449 ([M-H]⁻, Calcd for C₃₆H₂₉O₁₆-H: 717.1456). CD (MeOH) [θ] (nm): -27565 (207), +9580 (234), +18405 (252), -458 (278), +5902 (295), +5482 (327).

Tanshinone II_A: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 1.31 (6H, s), 1.66 (2H, m), 1.80 (2H, m), 2.26 (3H, d, $J=1.5$ Hz), 3.18 (2H, t, $J=6$), 7.22 (1H, d, $J=1.5$ Hz), 7.55 (1H, d, $J=8$ Hz), 7.63 (1H, d, $J=8$ Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 8.9, 19.3, 30.0, 32.0 (2C), 34.8, 38.0, 120.1, 120.4, 121.3, 126.7, 127.6, 133.6, 141.4, 144.6, 150.3, 161.9, 175.9, 183.8. HR-ESI-MS m/z 317.1150 ([M+Na]⁺, Calcd for C₁₉H₁₈O₃Na: 317.1154).

(3-2) トウジン: トウジン試料 A (300 g) を粉碎し, 50% 含水メタノール (1.5 L×2) 中, ポリトロンによりホモジナイズし, 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) および水分画物 (105 g (固形分量)) 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 (D-fructose) [20 mg, (= スポット©)] を単離した.

Fructose: ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 3.47, 3.65 (each 1H, d, $J=11$ Hz), 3.61, 4.01 (each 1H, dd, $J=1.5, 12.5$ Hz), 3.77 (2H, m), 3.83 (1H, m). ¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD) δ: 64.5, 65.9, 69.4, 71.3, 71.8, 99.2. HR-ESI-MS m/z 179.0544 ([M-H]⁻, Calcd for C₁₆H₁₁O₆-H: 179.0557).

4. TLC 条件

(4-1) 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Ⓐ): 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Ⓑ): 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.

(4-2) トウジン: TLC 分析条件を以下に示す.

化合物 3 (D-fructose) (スポット©): 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: 希硫酸試液噴霧後, 加熱.

Lobetyolin: 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 (14:3:2), 検出: 希硫酸試液噴霧後, 加熱, UV 照射 (365 nm).

5. トウジンの酸分解画分の調製

トウジン試料 A (1 g) の粉末に 1 mol/L 塩酸 (5 mL) および水 (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.

6. 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) を得た.

5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 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). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 57.1, 109.9, 123.7, 151.9, 161.3, 177.9. HR-ESI-MS m/z 149.0200 ([M+Na]⁺, Calcd for C₆H₆O₃+Na: 149.0215).

結果

1. TLC 条件の検討

タンジン基原植物からは, 特有成分としてカフェ酸誘導体およびアビエタン型ジテルペン類の含有が報告されている.⁸⁻¹³⁾ そこで, それら成分の検出のため, まず TLC 上 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Ⓐ, Ⓑ) 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Ⓐ, Ⓑに相当する主ピークが認められた (Fig. 1A). それらを指標に, TLC 用の試料抽出溶媒について検討した結果, スポットⒶ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Ⓑ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Ⓐ およびⒷのいずれも検出できることから, 抽出溶媒としてはメタノールが適当であることが示唆された (Fig. 1B). 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ことから, 抽出は室温下で振とうする簡便な方法で十分であることが示された.

展開溶媒としては, 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種々検討した. 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) による展開において, 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 UV 照射下の検出に加えて, 塩化鉄 (III)・メタノール試液の噴霧による青緑色のスポットとしても確認でき

た (Fig.2). 次にスポット④について最適な TLC 展開溶媒として、*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液 (3:1) で展開後、UV

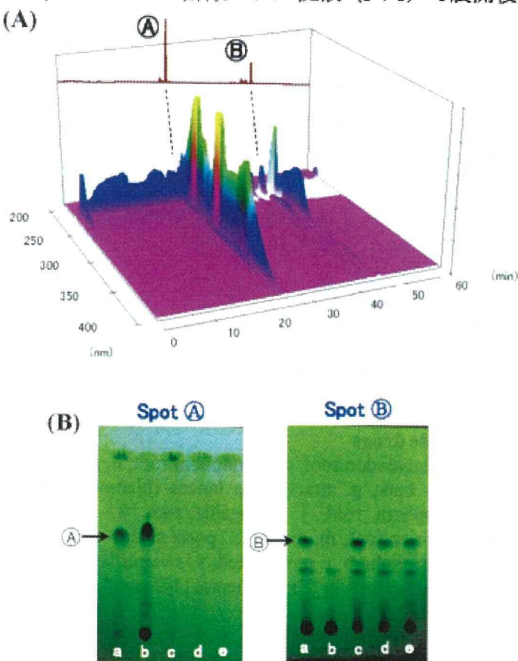


Fig. 1 (A) 3D HPLC chromatogram of MeOH extract of *Salvia miltiorrhiza* root, (B) TLC profiles of extracts of *Salvia miltiorrhiza* root prepared by different solvents
④; spot A, ⑤; spot B. a. MeOH, b. 50%aqueous MeOH, c. Acetone, d. Ethyl acetate, e. EtOH. Conditions are described in “Experimental (4-1)”.

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も希硫酸試液を噴霧し、加熱することにより紫色の呈色で確認できる (Fig. 2)。

トウジンは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。¹⁴⁻¹⁸⁾ そのため、まず UV 検出 (254, 365 nm) および希硫酸試液 (噴霧後、加熱) による呈色を検討した。

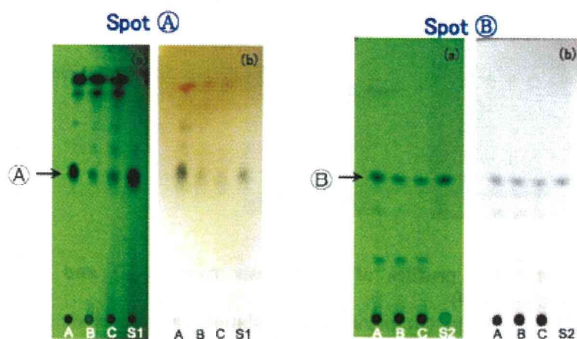


Fig. 2 TLC profiles of MeOH extracts of *Salvia miltiorrhiza* root (A-C)
S1; lithospermic acid B, S2; tanshinone II. Spot ④ (a) UV 254 nm, (b) FeCl₃ solution, Spot ⑤ (a) UV 254 nm, (b) diluted H₂SO₄ solution. Conditions are described in “Experimental (3-1 and 4-1)”.

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④) 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 (Fig. 3A)。

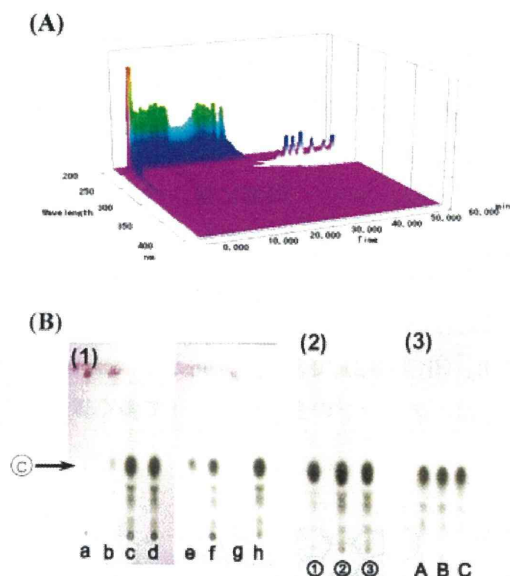


Fig. 3 (A) 3D HPLC chromatogram of MeOH extract of *Codonopsis* root, (B) TLC profiles of extracts prepared by some procedures
④; spot c. (1) shaking with a. *n*-Hexane, b. Acetone, c. 50% aqueous Acetone, d. 50%aqueous MeOH, e. EtOH, f. Water, g. Ethyl acetate, h. MeOH. (2) ①shaking with MeOH under room temperature, ②reflux with MeOH for 10 min, ③heating in MeOH at 50°C for 10 min. (3) *Codonopsis* root (A-C) prepared by (2)-①. Conditions are described in “Experimental (3-2 and 4-2)”.

これらを指標に、TLC 用の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④を検出した。また還流抽出および室温振とう抽出のいずれにおいても、目的のスポット④は明確に観察できた (Fig. 3B)。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④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。

次にスポット④を有効に検出する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 (Fig. 3B)。

2. 指標物質の同定

スポット④について、MS および 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¹⁹⁾とよく一致したが、高分解能 MS の結果から、そのナトリウム塩であることが示された。本化合物については、過去にマグネシウム塩、アンモニウムカリウム塩として単離された報告がある¹⁹⁾。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^{19,20)}と一致したため、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⑤について、同様に諸スペクトルデータを解析したところ、アビエタン形ジテルペン tanshinone II_A の文献データ⁸⁾と一致した。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⑤は tanshinone II_A (化合物 2) であると同定した。これら 2 化合物 (Fig. 4) は、タンジンの主要成分として多く報告されている。

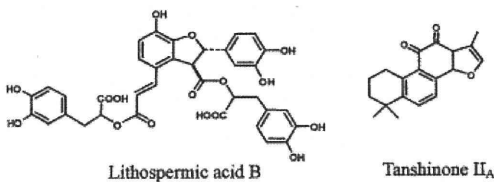


Fig. 4

一方、トウジンから得たスポット③についても同様に諸スペクトルデータを解析したところ、単糖の D-fructose の分析データ²¹⁾とよく一致した。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③は fructose (化合物 3) であると同定した。

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認められた fructose (化合物 3) は一般的な糖類であるため、確認試験の指標成分となり得るかどうかを確認する目的で、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やシャジン、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確認されたが、トウジンのスポットは際立って顕著で、その含有量が多いことが示唆された。一方でニンジンにはこのスポットは検出されなかった (Fig. 5)。

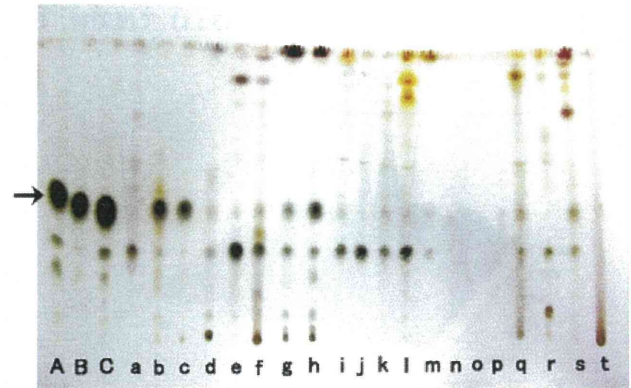


Fig. 5 TLC profiles of MeOH extracts of *Salvia miltiorrhiza* root (A-C) and crude drugs

a. ginseng, b. platycodon root, c. adenophora root, d. danshen, e. peony root, f. moutan bark, g. atractylodes lancea rhizome, h. atractylodes rhizome, i. sophora root, j. astragalus root, k. pueraria root, l. glycyrrhiza licorice root, m. ginger, n. poria sclerotium, o. chuling, p. pinellia tuber, q. rhubarb, r. cassia seed, s. swertia herb, t. cassia bark. Conditions are described in "Experimental (3-2 and 4-2)".

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、TLC 上、希硫酸試液噴霧で fructose (化合物 3) を明確なスポットとして確認できたが、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。生薬の粉末を 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 (Fig. 6)。このスポットを示す化合物は、カラムクロマトによる分離精製、構造解析の結果、fructose の分解物と見なされる 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (化合物 4) と同定した。²¹⁾

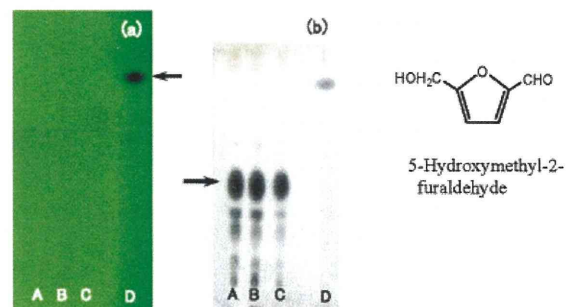


Fig. 6 TLC profiles of *Codonopsis* root (A-C) and its acid hydrolysate (D)

(a) UV 254 nm, (b) diluted H₂SO₄ solution. Conditions are described in "Experimental (3-2)".

5. トウジン中の Lobetyolin の検出

中国薬典では、lobetyolin をトウジンの指標成分として採用している。そこで、トウジンのメタノール振とう抽出物

における lobetyolin の指標成分としての適否についても検討した。lobetyolin の標品と比較したところ、単なる UV 照射下ではスポットは確認できなかった (Fig. 7a)。そこで中国薬典の方法に従い、希硫酸試液を噴霧し、加熱後、UV 照射 (365 nm) したところ、lobetyolin の標品と同じ Rf 値に小さなスポットが観察された (Fig. 7c)。一方で、同時に分析したキキョウ、ニンジンにも同じ Rf 値にスポットが観察された。

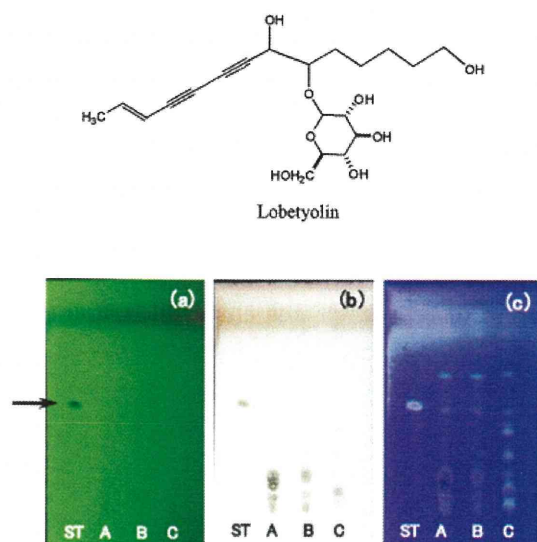


Fig. 7 TLC profiles of Codonopsis root (A), Platycodon root (B) and Ginseng (C)
ST; lobetyolin. (a) UV 254 nm, (b) diluted H₂SO₄ solution, (c) UV 365 nm after (b). Conditions are described in "Experimental (4-2)".

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中薬材標準において、tanshinone II_A および salvianolic acid B の 2 化合物が TLC の指標成分として採用されている。しかし前述のように、試験用試料調製に時間がかかり、操作も煩雑である。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。今回の検討では、指標となり得る成分として tanshinone II_A と lithospermic acid B が同定された。Lithospermic acid B と salvianolic acid B は立体異性体の関係にあり、いずれもタンジン含有成分として報告されている。しかし、最近、salvianolic acid B の立体配置を再検討した報告があり、lithospermic acid B と同配置であることが確認されている。²²⁾ それゆえ、これら 2 化合物は同じ化合物であることも示唆される。

試料調製においては、メタノール中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 (tanshinone II_A と lithospermic acid B) 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^{8,9)}、今回の結果においても同様に確認された。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^{8,9)}、これのみを指標とした分析では信頼性が確保されない。従って、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示唆される。また、これら 2 化合物を同じ TLC プレート上で一度に評価する方法が理想であり、それについても検討したが、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おり、指標成分として lobetyolin が採用されている。しかし、今回の抽出による lobetyolin の検出では、TLC 上で検出されるスポットは顕著とは言い難く、類似生薬のキキョウ、ニンジンとの判別も困難であった。本研究では、簡便法の提案を目指しており、単なる振とう抽出のみで調製した試料溶液の TLC に希硫酸試液を噴霧後、加熱することで鮮明なスポットを確認でき、これを fructose と同定した。これは単純な単糖類であることから、その分布の広さが考えられるため、同一条件で他の生薬抽出物について TLC 分析し、本化合物の指標成分としての可能性を検討した。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、トウジンにおけるスポットは際立って顕著であり、その含有量の多さが特徴的であった。それゆえ、さらに多ロットでの検討が必要ではあるが、判別可能な濃度に調整した fructose を標準溶液として用いることで、さらに区別しやすくなることが考察される。またトウジン末を舐めてみると非常に甘い。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。今回明らかにした指標成分は、糖 (fructose) あるいはその酸分解物 (5-hydroxymethyl-2-furaldehyde) であるが、方法の簡便性、結果の明瞭性 (一元性) において、上記 lobetyolin を指標とする方法より優れているとみなされる。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金により実施された。

参考文献

- 1) Namba T., “Coloured Illustrations of Wakan-Yaku vol. I”, Hoikusha Publishing, Tokyo, Japan, 1980, pp. 24–25.
- 2) Namba T., “Coloured Illustrations of Wakan-Yaku vol. I”, Hoikusha Publishing, Tokyo, Japan, 1980, pp. 121–122.
- 3) Department of Health Government of the Hong Kong Special Administrative Region ed., “Hong Kong Chinese Materia Medica Standards vol. 1”, Hong Kong, 2005, pp. 89–101.
- 4) Chinese Pharmacopoeia 2005 Edition, pp. 52–53.
- 5) Chinese Pharmacopoeia 2005 Edition, p. 199.
- 6) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, “The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition” (2006), p. 150.
- 7) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, “The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition” (2006), p. 239.
- 8) Tezuka Y., Kasimu R., Basnet P., Namba T., Kadota S., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1306–1311 (1997).
- 9) Li M.H., Chen J.M., Peng Y., Wu Q., Xiao P.G., *J. Ethnopharmacol.*, **120**, 419–426 (2008).
- 10) Liu A.H., Lin Y.H., Yang M., Guo H., Guan S.H., Sun J.H., Guo D.A., *J. Chromatogr. B*, **846**, 32–41 (2007).
- 11) Hu P., Liang Q.L., Luo G.A., Zhao Z.Z., Jiang Z.H., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 677–683 (2005).
- 12) Hu P., Luo Q.A., Zhao Z.Z., Jiang Z.H., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 481–486 (2005).
- 13) Yuan D., Pan Y.N., Fu W.W., Makino T., Kano Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 508–514 (2005).
- 14) Wang, Z.T., Xu G.J., Hattori M., Namba T., *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 339–342 (1998).
- 15) Mizutani K., Yuda M., Tanaka O., Saruwatari Y., Fuwa T., Jia M.R., Ling Y.K., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2689–2690 (1988).
- 16) Mizutani K., Yuda M., Tanaka O., Saruwatari Y., Jia M.R., Ling T.K., Pu X.F., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2726–2729 (1988).
- 17) Yuda M., et al., *Phytochemistry*, **29**, 1989–1993 (1990).
- 18) Tsai T.H., Lin L.C., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1546–1550 (2008).
- 19) Tanaka T., Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., Yokozawa T., Chung H.Y., Oura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 340–344 (1989).
- 20) Koukoulitsa C., Karioti A., Bergonzi M.C., Pescitelli G., Bari L.D., Skaltsa H., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5388–5392 (2006).
- 21) SDBSWeb.<http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology).
- 22) Watzke A., O’Malley S.J., Bergman R.G., Ellman J.A., *J. Nat. Prod.*, **69**, 1231–1233 (2006).

日本薬局方収載の TLC による生薬の確認試験について (1) 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液を展開溶媒とする確認試験

木内文之^{*a}, 合田幸広^b, 石崎昌洋^c, 糸 博之^d, 川崎武志^e, 川原信夫^f,
神本敏弘^g, 菊地祐一^g, 近藤誠三^h, 杉本智潮ⁱ, 成川佑次^a, 日向野太郎^j, 山本 豊^k
^a慶應義塾大学薬学部, ^b国立医薬品食品衛生研究所, ^c三和生薬株式会社, ^d和光純薬株式会社,
^e株式会社ウチダ和漢薬, ^f医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター, ^g株式会社ツムラ,
^h小太郎漢方製薬株式会社, ⁱ救心製薬株式会社, ^j大正製薬株式会社, ^k株式会社栃本天海堂

Crude Drug Identification Tests with TLC in the Japanese Pharmacopoeia (1) On the TLC Tests with a 1-Butanol/Water/Acetic Acid Solvent System

Fumiyuki Kiuchi^{*a}, Yukihiro Goda^b, Masahiro Ishizaki^c, Hiroyuki Ito^d, Takeshi Kawasaki^e,
Nobuo Kawahara^f, Toshihiro Kammoto^g, Yuichi Kikuchi^g, Seizo Kondo^h, Chishio Sugimotoⁱ,
Yuji Narukawa^a, Taro Higano^j and Yutaka Yamamoto^k

^aFaculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

^bNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^cSanwa Shoyaku Co., Ltd., 6-1 Hiraidekogyodanchi, Utsunomiya, Tochigi 321-0905, Japan

^dWako Pure Chemical Industries, Ltd., 3-1-2 Doshomachi, Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan

^eUchida Wakan-yaku Co., Ltd., 4-4-10 Higashinippori, Arakawa-ku, Tokyo 116-8571, Japan

^fResearch Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation,
1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

^gTsumura & Co., 3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-1192, Japan

^hKotaro Pharmaceutical Co., Ltd., Ro-91-1 Kashima-machi, Hakusan, Ishikawa 929-0201, Japan

ⁱKyushin Pharmaceutical Co., Ltd., 1-31-7 Wada, Suginami-ku, Tokyo 166-0012, Japan

^jTaisho Pharmaceutical Co., Ltd., 1-403 Yoshino-machi, Kita-ku, Saitama 331-9530, Japan

^kTochimoto Tenkaido Co., Ltd., Oniya, Kaibara, Tamba, Hyogo 669-3315, Japan

(Received June 22, 2010)

The crude drug identification tests which use a 1-butanol/water/acetic acid solvent system for TLC in the Japanese Pharmacopoeia were examined. Comparison of TLC chromatograms from 7 laboratories, using commercially available TLC plates purchased from Merck & Co. and Wako Pure Chemical Industries, revealed that in some cases the R_f values of the indicator spots were markedly influenced by the make of TLC plates, and in the tests of Lycium Bark and Plantago Herb, the R_f values observed were different from those indicated in the Japanese Pharmacopoeia. TLC chromatograms developed in two different lengths (7 cm and 10 cm) showed almost identical patterns for all the 12 identification tests examined. This indicates that it is possible to change the development length from 10 cm to 7 cm, which will save the time required for the

development by about 45%, without affecting the results of the identification tests.

Keywords: TLC, the Japanese Pharmacopoeia, crude drug tests, R_f value, Scutellaria Root

日本薬局方（日局）では、生薬の含有成分に関する規定として、確認試験、定量法、精油含量等を定めている。これらのうち確認試験には、その生薬に特徴的な成分（群）或は類似生薬との判別に有効な成分（群）を検出する方法が主として採用されており、指標成分を薄層クロマトグラフィー（Thin Layer Chromatography: TLC）で検出する方法が多く用いられている。TLCは、特別な装置を必要とせず、簡便に行える分析法であるが、厳密に条件を揃えないと R_f 値の再現性が確保できないため、分析に際してはサンプルと標準物質とを同時に展開するのが一般的である。日局の生薬の確認試験に於いても、多くの生薬でこの方法が採用されている。しかし、生薬の確認試験の中には、指標となる成分の標準物質が利用できない等の理由で、サンプルのみを TLC で分析し、発色試薬等による発色の色調並びに R_f 値で指標成分を確認するものもあることから、場合によっては指標成分を見誤る可能性も考えられる。また、TLC は一般的には簡便で迅速な分析手法であるが、使用する溶媒によっては展開に長時間を要する。特に生薬の確認試験で比較的良好に用いられる 1-ブタノール/水/酢酸(100)系の溶媒を用いると展開に 2 時間程度が必要であり、迅速な分析とは言い難いことから、時間の短縮が望まれている。

本研究では、第 15 改正日本薬局方 (JP15)¹⁾ に記載されている TLC を用いた生薬の確認試験のうち 1-ブタノール/水/酢酸(100)系の展開溶媒を用いるものについて、使用する TLC プレートの違いによる R_f 値の差を検討するとともに、展開距離を現行の 10 cm から 7 cm に変えることが可能かについて検討した。

実験の部

薄層クロマトグラフィーは、薄層板としてメルク社製（カタログ番号 1.057xx：使用する薄層板の大きさにより xx は 14, 15, 19；以下 Merck）と和光純薬社製（カタログ番号 199-08403；以下 Wako）を用い、JP15 の一般試験法 <2.03> 薄層クロマトグラフィーの規定²⁾ に従って実施した。なお、展開距離を 7 cm に変更した場合の R_f 値並びに分離パターンの検討には、高さ 10 cm の薄層板を用いた。

実験には、研究に参加した各社が取り扱っている生薬

(JP15 適合品) を用い、各生薬の確認試験は JP15 の各条の規定に従って実施した。

結果

1. TLC プレートが R_f 値に与える影響

日本薬局方の一般試験法 <2.03> 薄層クロマトグラフィーでは、通例として使用する薄層板の作製法を規定している。²⁾ この規定は、自作の薄層板を使用することを前提としたものであるが、現在では、通常市販の薄層板が使用されている。市販の薄層板はメーカーによって使用している担体の粒度や活性度が異なることから、現在最も一般的に使用されていると思われる Merck 社製の薄層板と、国産メーカー品として Wako 社製の薄層板を用い、展開結果に差があるかを検討した。

1-ブタノール/水/酢酸(100)を含む展開溶媒を用いている生薬の確認試験について、Merck と Wako のプレートを用いた場合の確認スポットの R_f 値を Table 1 に、また、TLC のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。まず全体的な R_f 値の再現性について見ると、JP15 の一般試験法 <2.03> 薄層クロマトグラフィーを厳密に守ることにより、良好な室内再現性が得られた (Table 1, オウゴンの TLC を Fig. 2 に示す)。薄層板の違いによる R_f 値の変化について見ると、検討した 12 品目の生薬のほとんどで Merck のプレートより Wako のプレートの方が大きな R_f 値を示す傾向があり、両者の間で指標成分の R_f 値の差が特に大きかった (差が 0.1 以上) のは、オウゴン、カンゾウ、マクリであった (Table 1, Fig. 1)。これらはいずれも指標成分がその分子内にカルボキシル基を持つものであり、両社のプレートの間には酸性物質に対する親和性に大きな差があることが明らかとなった。また、JP15 で 2 つのスポットを確認することが規定されているトウガシについては、³⁾ Merck のプレートでは対象となる 2 つのスポットが確認できたが、Wako のプレートではこれらが 1 スポットとなってしまう、分離確認ができないことが明らかとなった (Fig. 1b)。一方、ジコッピヤシャゼンソウでは、 R_f 値の差は小さく、Wako のプレートの方が、指標成分のスポットの形状が良かった (Fig. 1)。

日本薬局方の TLC を用いた生薬の確認試験では、標準物質を同時に展開しない場合には、確認するスポットの

Table 1. Comparison of R_f Values in Crude Drug Identification Tests by TLC with Butanol-Water-Acetic Acid Solvent System^{a)}

crude drug	solvent system	A		B		C		D		E		F		G		Average		JP15 R_f value
		7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	
Scutellaria Root (オウゴン)	1-butanol-water-acetic acid (4:2:1)	0.33	0.35	0.37	0.34	0.34	0.33	0.36	0.34	0.36	0.36	0.33	0.35			0.35	0.35	—
			0.62	0.55	0.49	0.57	0.52	0.56	0.54	0.57	0.52	0.54	0.54			0.56	0.54	
Phellodendron Bark (オウバク)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	0.33	0.33	0.31	0.30	0.29	0.29	0.29	0.32	0.29	0.30	0.25	0.28	0.29	0.30	0.29	0.30	—
			0.34	0.29	0.29	0.29	0.32	0.29	0.33	0.31	0.31	0.28	0.30	0.29	0.29	0.29	0.31	
Coptis Rhizome (オウレン)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	0.33	0.33	0.33	0.31	0.28	0.27	0.29	0.32	0.30	0.32	0.26	0.29			0.30	0.31	—
			0.34	0.29	0.29	0.26	0.29	0.29	0.29	0.31	0.32	0.30	0.29			0.29	0.30	
Processed Ginger (カンキョウ)	1-butanol-water-acetic acid (8:5:3)	0.30	0.30	0.31	0.29	0.31	0.29			0.31	0.30			0.30	0.28	0.31	0.29	—
			0.32	0.33	0.33	0.38	0.37			0.31	0.31			0.33	0.35	0.34	0.34	
Glycyrrhiza (カンゾウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	0.26	0.22	0.19	0.20	0.21	0.18	0.19	0.20	0.19	0.20	0.17	0.24	0.21	0.20	0.20	0.21	—
			0.56	0.57	0.53	0.55	0.53	0.55	0.52	0.53	0.51	0.51	0.52	0.54	0.52	0.54	0.53	
Magnolia Bark (コウボク)	1-butanol-water-acetic acid (4:2:1)	0.31	0.29	0.31	0.31	0.33	0.29	0.27	0.28	0.31	0.30					0.31	0.29	around
			0.35	0.33	0.35	0.28	0.32	0.29	0.31	0.31	0.35					0.30	0.34	0.3
Lycium Bark (ジコッピ)	1-butanol-water-pyridine- acetic acid (3:1:1:1)	0.41	0.40	0.41	0.40	0.38	0.39							0.34	0.36	0.39	0.39	around
			0.46	0.44	0.42	0.43	0.43							0.37	0.38	0.41	0.42	0.5
Lycium Bark ^{b)} (ジコッピ)	1-butanol-5% ammonium acetate-acetic acid (2:1:1)	0.38	0.39	0.36	0.35	0.38	0.35									0.37	0.36	
			0.38	0.39	0.37	0.36	0.36	0.39								0.37	0.38	
Plantago Herb (シャゼンソウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	0.60	0.53	0.54	0.51	0.55	0.54									0.56	0.53	around
			0.57	0.59	0.59	0.64	0.57									0.62	0.58	0.5
Asparagus Tuber (テンモンドウ)	1-butanol-water-acetic acid (10:6:3)	0.38	0.38	0.37	0.37	0.40	0.40									0.38	0.38	around
			0.47	0.43	0.44	0.40	0.40									0.42	0.44	0.4
Benincasa Seed ^{c)} (トウガシ)	1-butanol-water-acetic acid (8:6:3)	0.43	0.41	0.41	0.41	0.40	0.43									0.40	0.42	2 spots
			0.46	0.45	0.45	0.44	0.44	0.36	0.35							0.45	0.45	around
			0.53	0.54	0.53	0.53	0.50	0.45	0.42							0.51	0.50	0.4
Ephedra Herb (マオウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	0.37	0.40	0.36	0.35	0.36	0.36	0.36	0.35	0.37	0.36	0.35	0.36			0.36	0.36	around
			0.40	0.43	0.41	0.36	0.38	0.37	0.35	0.40	0.37	0.35	0.36			0.38	0.38	0.35
Digenea (マクリ)	1-butanol-water-acetic acid (5:4:1)	0.27	0.27	0.25	0.23	0.21	0.23									0.24	0.24	—
			0.41	0.39	0.38	0.40	0.38									0.40	0.39	

a) R_f values. Upper column: results with Merck plate, lower column: results with Wako plate.

b) Alternative solvent system proposed for the identification test.

c) The 2 spots were not separated by Wako plates.

Table 2. Comparison of Developing Time Required for Crude Drug Identification Tests by TLC with Butanol-Water-Acetic Acid Solvent System^{a)}

crude drug	solvent system	A		B		C		D		E		F		G		Average	
		7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm	7 cm	10 cm
Scutellaria Root (オウゴン)	1-butanol-water-acetic acid (4:2:1)	75	140	78	133	79	133	66	110	59	105	60	125			70	124
			86	40	72	46	81	44	75	36	63	45	80			42	76
Phellodendron Bark (オウバク)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	73	131	69	118	70	132	67	117	71	120	65	140	60	115	68	125
			70	38	67	40	72	44	78	41	70	45	85	33	68	40	73
Coptis Rhizome (オウレン)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	73	131	69	118	70	126	66	113	71	120	65	140			69	125
			70	38	67	40	74	44	77	41	70	45	85			42	74
Processed Ginger (カンキョウ)	1-butanol-water-acetic acid (8:5:3)	75	152	64	117	71	122			68	115			73	128	70	127
			77	41	71	46	77			44	69			36	67	42	72
Glycyrrhiza (カンゾウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	73	131	65	114	66	130	65	115	71	120	65	150			68	127
			70	42	74	37	77	43	73	40	70	45	85			41	75
Magnolia Bark (コウボク)	1-butanol-water-acetic acid (4:2:1)	71	138	67	120	68	123	66	110	70	113					68	121
			80	38	69	38	69	44	75	40	73					40	73
Lycium Bark (ジコッピ)	1-butanol-water-pyridine- acetic acid (3:1:1:1)	79	153	67	122	66	117							63	116	69	127
			82	42	72	36	66							40	67	39	72
Lycium Bark ^{b)} (ジコッピ)	1-butanol-5% ammonium acetate-acetic acid (2:1:1)	72	141	63	116	78	123									71	127
			40	75	37	64	43	79								40	73
Plantago Herb (シャゼンソウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	73	131	68	111	70	132									70	125
			70	42	78	40	72									41	73
Asparagus Tuber (テンモンドウ)	1-butanol-water-acetic acid (10:6:3)	85	140	70	111	70	136									75	129
			80	41	72	40	71									41	74
Benincasa Seed (トウガシ)	1-butanol-water-acetic acid (8:6:3)	72	140	66	114	80	148	59	118							69	130
			72	41	72	46	80	44	68							44	73
Ephedra Herb (マオウ)	1-butanol-water-acetic acid (7:2:1)	73	131	66	123	68	130	65	115	65	115	65	140			67	126
			70	45	78	45	72	43	75	42	79	45	85			44	77
Digenea (マクリ)	1-butanol-water-acetic acid (5:4:1)	79	159	67	112	87	144									78	138
			86	39	69	51	87									45	81

a) Time in minutes. Upper column: results with Merck plate, lower column: results with Wako plate.

b) Alternative solvent system proposed for the identification test.