

図 7 cinnzeylanol (2)の¹H-NMR スペクトル

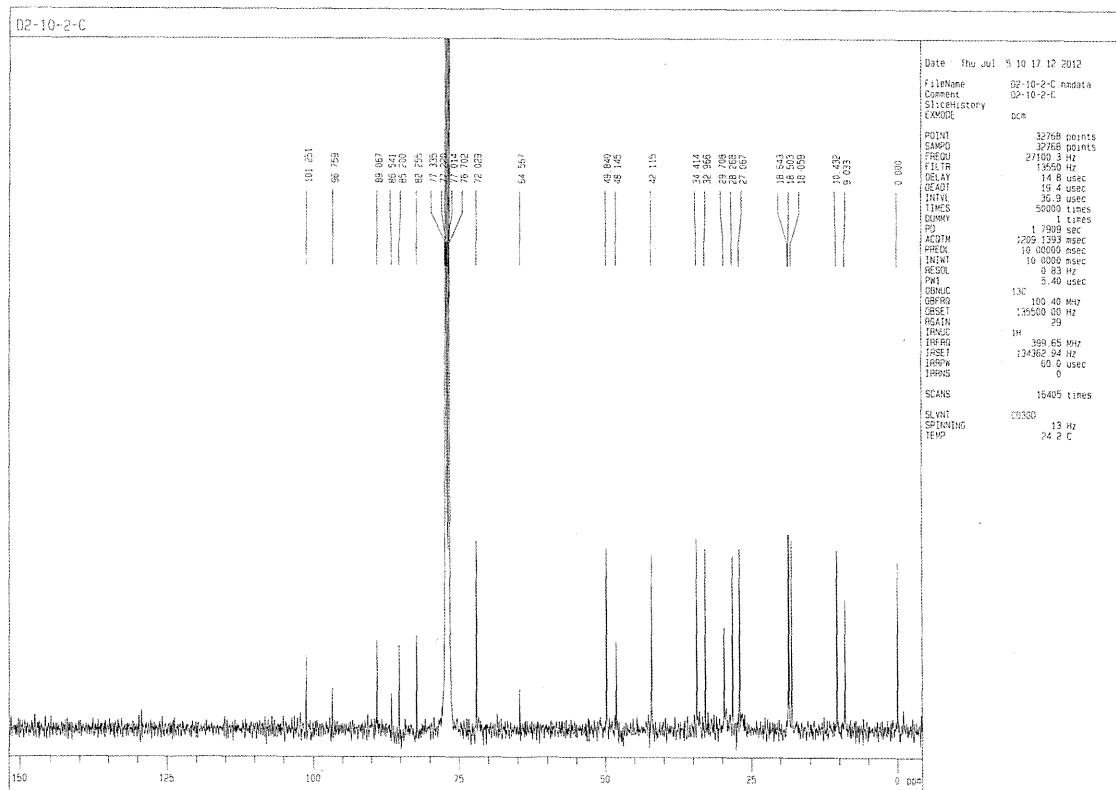
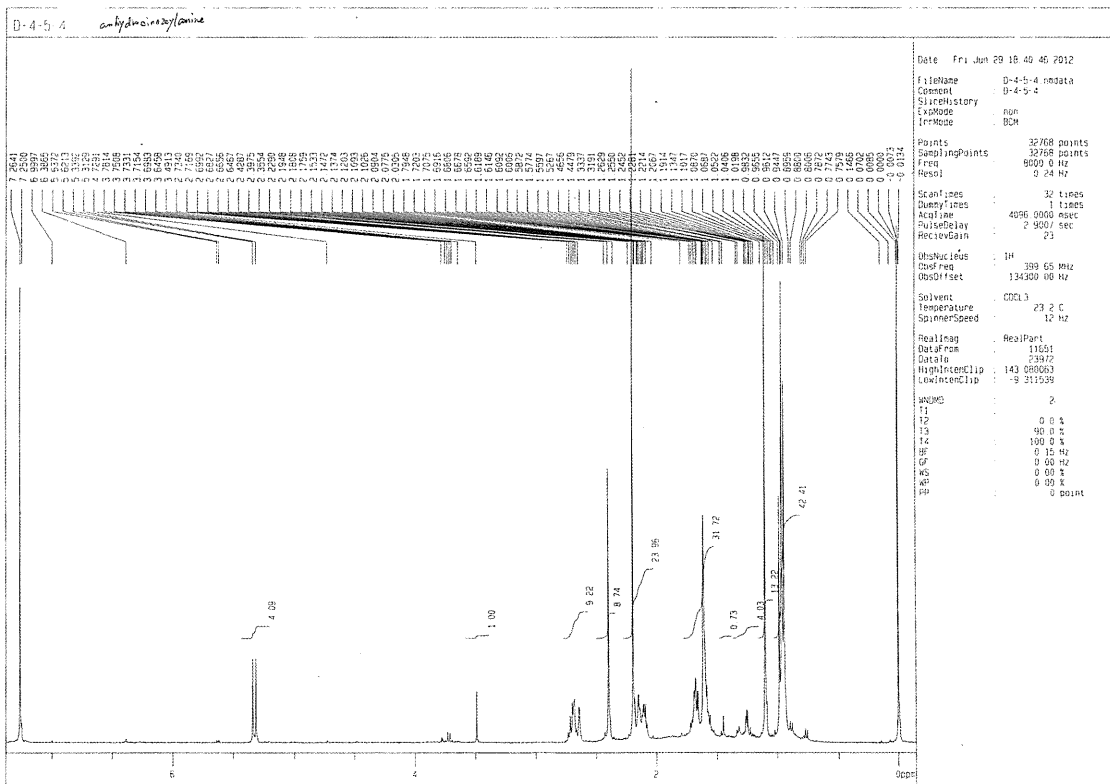
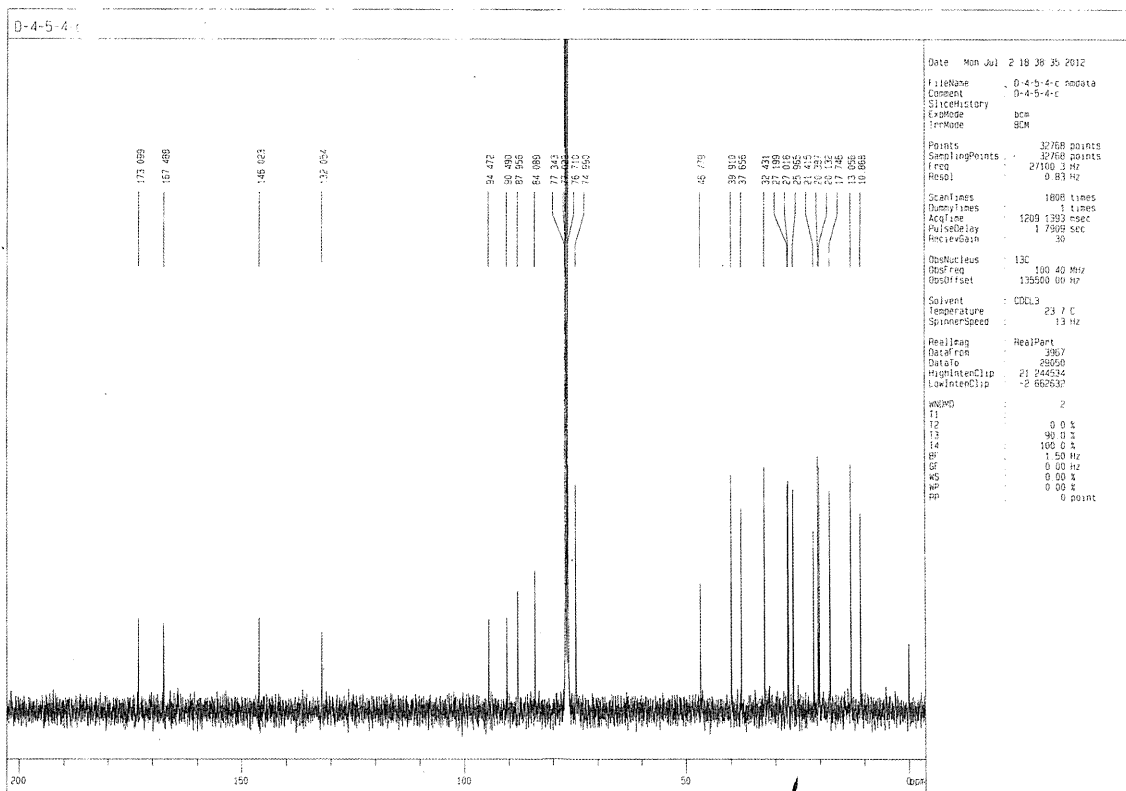


図 8 cinnzeylanol (2)の¹³C-NMR スペクトル



☒ 9 anhydrocinnylanol (3)の¹H-NMR スペクトル



☒ 10 anhydrocinnylanol (3)の¹³C-NMR スペクトル

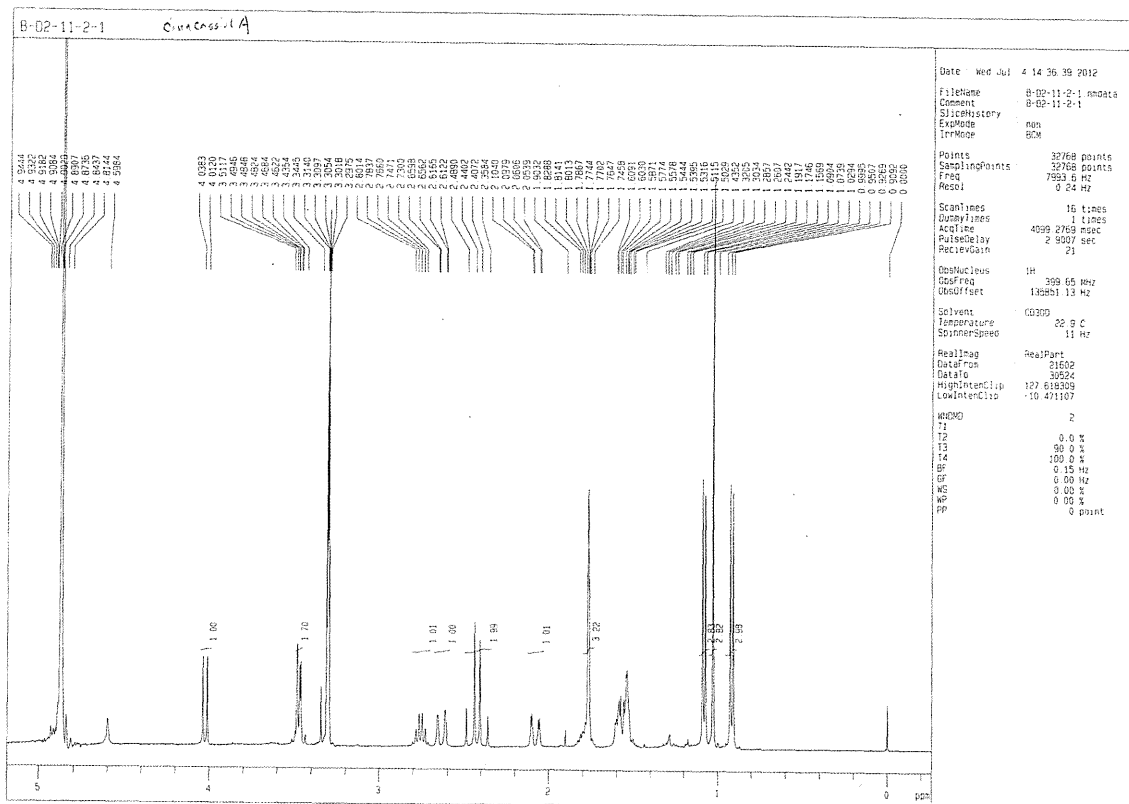


図 11 cinncasinol A (4)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

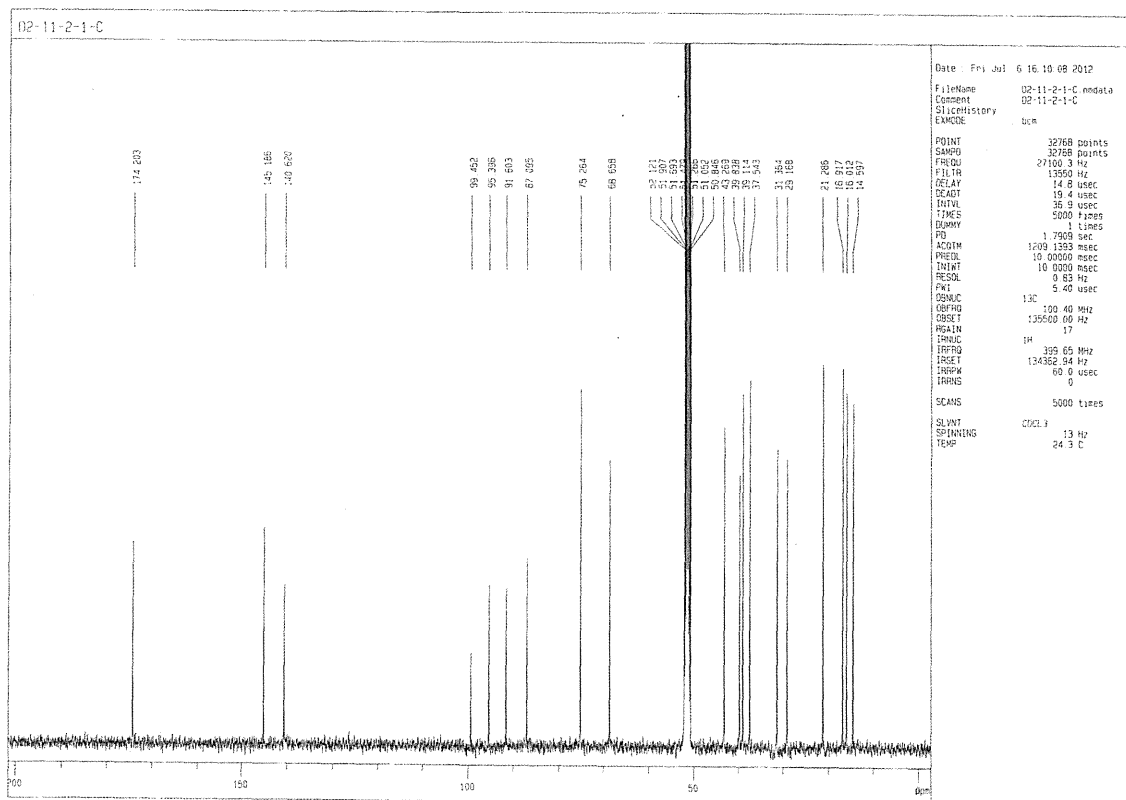


図 12 cinncasinol A (4)の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

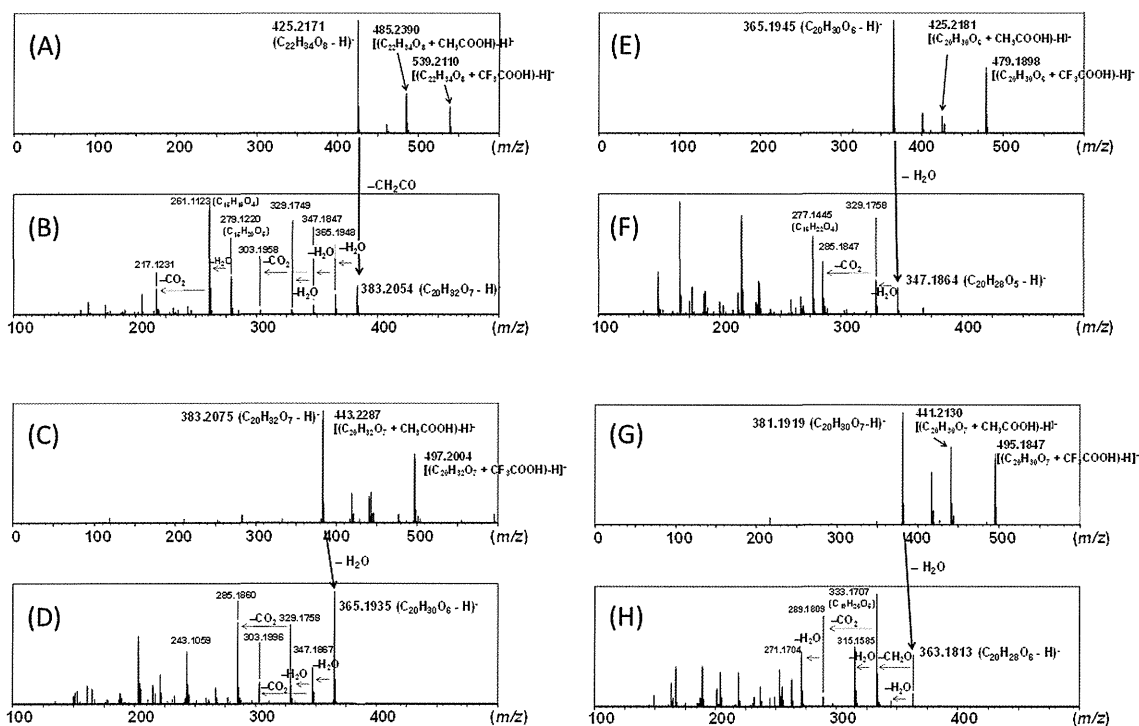


図 13 cinnzeylanine (1), cinnzeylanol (2), anhydrocinnzeylanol (3), cinncasinol A (4) のマススペクトル(MS)及び MS² スペクトル。

(A) cinnzeylanine (1) のマススペクトル; (B) cinnzeylanine (1) の MS² スペクトル

(C) cinnzeylanol (2) のマススペクトル; (D) cinnzeylanol (2) の MS² マススペクトル

(E) anhydrocinnzeylanol (3) のマススペクトル; (F) anhydrocinnzeylanol (3) の MS² マススペクトル (G) cinncasinol A (4) のマススペクトル; (H) cinncasinol A (4) の MS² マススペクトル。

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）
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

研究分担課題 成分分析データ情報に関する研究（NMR情報の収集）
－NMR及びLC-MS-SPE/NMR法を用いた生薬成分の解析－

研究分担者 赤木 謙一（独）医薬基盤研究所・共用機器実験室

漢方薬に使用される総合情報データベースを構築するための基盤整備を目的として、漢方薬含有生薬成分のLC-MS-SPE/NMR及びNMR測定を行った。生薬は処理方法や産地によって、含有化合物成分の化学修飾が異なる場合や、特有の化合物成分を有する場合がある。化合物成分の量的、質的差異がNMRシグナルに変動を与えることから、(A)生薬オウレンの1D-NMRスペクトルについて統計処理法を用いることにより、産地特有のシグナルを探索した。(B)生薬カンゾウのLC-MS-SPE/NMR測定により、主成分グリチルリチン酸類縁体の構造推定を行った。

研究協力者

西川忠輝 ブルカーバイオスピン（株）

A. 研究目的

本研究は、漢方薬の品質、有効性、安全性等を確保するために、膨大な種類にのぼる薬用植物の総合的なデータベースを構築することを目的としている。薬用総合情報データベースに登録する情報として、(1)成分分析データ情報、(2)官能データ情報、(3)内部形態及びさく葉標本情報、(4)資源管理情報、(5)遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、(6)組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、(7)植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、(8)生物活性及び副作用情報、(9)漢方処方関連情報（エキス情報、食薬区分情報）、が挙げられている。これら(1)～(9)の登録データのうち、本研究分担者が担当するのは、(1)成分分析データ情報についてである。

漢方薬の品質を決定する生薬成分は、産地

や基原、加工調製法により、化学的修飾が異なっていたり、化学的構成成分が変化を起こしたりする場合がある。このような生薬成分の変化が、薬効に対してどのような影響を及ぼすのかを考察するためには、生薬に含まれる多種多様な低分子化合物についての個々の化学的な情報を得る必要がある。

本年度における研究において、生薬成分の化学構造を詳細に研究するために、LC(Liquid Chromatography、液相クロマトグラフィー)、MS(Mass Spectrometry、質量分析装置)、NMR(Nuclear Magnetic Resonance、核磁気共鳴装置)、SPE(Solid Phase Extraction、固相抽出装置)の各種分析、濃縮機器をオンラインで接続したシステムであるLC-MS-SPE/NMR装置を用いることにより、生薬構成成分の分析を試みた。またNMRスペクトルを統計処理することによって、産地特有のNMRスペクトル成分を同定することにより、NMRスペクトルから生薬産地の特定が可能であるか試みた。

LC-MS法は、混合物中から個々の化合物成

分を単離し、それらの分子量を素早く決定することによって、化合物を推定することが可能であることから多種多様の化合物で構成されている生薬分析において広く用いられている。

MS 法によって得られる化合物情報は分子の大きさ（分子量）についてであり、比較的高感度、高分解能の情報を得ることができるが、異性体のように分子量が同じで化学構造が異なる化合物の場合は、各々の異性体構造を特定することは困難である。

NMR 法は、磁場中に置いた化合物に電磁波を照射し、化合物を構成している ^1H 核あるいは天然存在比 1.1%の ^{13}C 核からの応答を直接、あるいは間接的に観測することにより、化学構造を決定できる手法の一つである。MS 法と比較すると、測定感度は 100 万分の 1 程度であることから、天然物由来成分に微量にしか含まれていない成分を解析するのは非常に困難なことが多い。低感度を克服するための方法には、磁場強度を大きくすること（超高磁場化）、超高感度極低温検出器を装着すること（約 5 倍の感度を得ることができる）、LC により分画した試料を固相抽出装置に導入することにより、試料濃縮と測定溶媒交換とを同時に行うこと、などが挙げられる。

本研究で用いた LC-MS-SPE/NMR 装置は、低感度を克服するために、超高磁場 800MHz マグネットに超高感度極低温検出器を装着した高感度 NMR 装置であり、LC の分画試料を SPE 装置に導入可能な構成になっている。この装置構成は微量生薬成分の解析を実行するに最適な構成である。

本報告では、薬用植物総合情報データベース構築のための検討の一環として、

(A) 複数のオウレン市場流通品の熱水抽出エキスを NMR 測定することにより取得できた NMR スペクトルデータについて、その類似度に基づいて分類（クラスタリング）することにより、産地によって NMR スペクトル

が特徴づけられるかどうかを確認した。オウレンは、キンポウゲ科オウレンの根を除いた根茎を乾燥させた生薬であり、ベルベリンなどのアルカロイドを含む。産地は日本、中国である。

LC-MS の多変量解析により⁽¹⁾、352 m/z 及び、320 m/z の含有化合物が日本産と中国産を区別するための指標になる可能性が示された。このことから、NMR 法を用いたスペクトル解析を用いることにより、産地区別が可能であるかを目的とし、NMR 測定及び統計解析をおこなった。10 試料（中国産：四川省(4)、雲南省(1)、重慶市(1)、日本産：岐阜県(1)、福井県(1)）のオウレン生薬分析を行った。

(B) カンゾウエキスの LC-MS-SPE/NMR 測定

カンゾウは、マメ科の植物であり、薬用として（生薬）、あるいは食用に用いられている。漢方薬の原料として広く用いられ、日本で生産される約 70%の漢方薬に用いられる。また、砂糖の 30-50 倍の甘味があり、菓子や飲料、調味料等に利用されている。成分として、グリチルリチン酸、ショ糖、ブドウ糖など多くの化合物が含まれている。カンゾウに含まれる含有化合物のうち、グリチルリチン酸以外の類縁体の構造推定を行った。

B. 研究方法

試料及び試薬

オウレン及びカンゾウは、医薬基盤研究所・瀧野らが抽出、凍結乾燥した試料を用いた。オウレン及びカンゾウで使用した管理番号は、それぞれ、NIB-0013, NIB-0041, NIB-0042, NIB-0115(日本産), NIB-0116, NIB-0150, NIB-0185(日本産), NIB-0186, NIB-0215, NIB-0094, と NIB-003 であった。

LC-MS-SPE/NMR 測定溶媒は D_2O 99% (Cambridge Isotope Laboratories, INC)、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO.,INC)、ギ酸- d_2 98% (ISOTECTM)、重アセ

トニトリル(99.6-7% ATOM % D, ISOTEC™)を用いた。NMR 測定には、ケミカルシフト基準物質として、TSP-d₄(ISOTEC™)を用いた。試料測定管はシゲミ社製 5 mm 試料管(PS005)を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置

LC 部は Agilent 1200 series (Agilent Technologies、ポンプ: Quat Pump、紫外可視検出器: VWD、オートサンプラー: ALS) に、カラムオーブンとして BPFU-O (Bruker)を用いた。MS 部は、esquire 4000 (Bruker)、イオン化源には ESI を用いた。MS-NMR の送液スプリッターとして 20 分の 1 スプリッターを採用した BNMI (Bruker)を用いた。MS に試料を導入する際には、BNMI のミキシングシリンジを用いて、0.2%ギ酸添加済アセトニトリルを添加した。LC と NMR を接続するために、セル容量 30 μL を採用した Cryo-FIT (Bruker)を NMR に装着した。NMR 測定のための試料分取法は、Loop-Storage 法と SPE(固相抽出)法をおこなった。Loop-Storage 法は、分析移動相に D₂O(重水)-軽アセトニトリル系を用いた。分析した分画は 1 分画当たり 120 ul の容量のループコレクター BPSU-36 (Bruker) に分取した。SPE 法は分析移動相に H₂O(軽水)-軽アセトニトリル系を用いた。SPE 装置は PROSPEKT2 (Spark 製)を用いた。分析した分画は Hysphere Resin GP (5-20 μm)を用いて分取した。NMR 測定は TCI クライオプローブ付き AvanceII 800 (Bruker)を用いた。LC 及び LC-MS の制御には Hyster 3.2 (Bruker)、MS の制御には esquire Control version 5.3 (Bruker)、NMR の制御は Topspin2.1 (Bruker)を用いた。

試料準備と測定条件

(A) オウレンを 2 mg 量り取り、500 μL の

ミリ Q 水に溶解した。30 分間 voltex mixer を用いて攪拌した後、12,000 rpm で 10 分間遠心操作を行った後上清を取得し、0.2 μm フィルターを通した。その内の 400 μL にリン酸ナトリウム緩衝液 (200 mM, pH 7.4) 200 μL を加えた。その内の 450 μL に対して D₂O 45 μL を加えた。防黴剤としてアジ化ナトリウム (NaN₃) 2% を 5 μL と、ケミカルシフト基準物質として 3-(トリメチルシリル)(2,2,3,3-²H₄)プロピオン酸ナトリウム Tsp-d₄ (100mM in D₂O) 0.5 μL を加えて、全量約 500 μL に調製した。NMR 測定条件は Table 1 にまとめた。測定データは AMIX version 3.6.8 (Bruker)を用いて主成分解析 (PCA 解析) を行った。

(B) カンゾウ試料は 2 mg をはかり取り、Milli Q 水 1 mL へ懸濁し、ボルテックスにて 30 min 間攪拌した。その後 13,000 rpm にて遠心後、沈殿を除去した。上記ボルテックス、遠心操作を計三回行い、沈殿を除去した。その後、0.2 μm のフィルターに通した。

LC 測定条件: 移動相は、(A) Milli Q 水又は D₂O, (B) CH₃CN を用いた。(A) 95%から 15 分で、(A) 30%までリニアグラジエントを行った。流速は 1 mL/min で行った。カラムは YMC-Triart C₁₈ 4.6 Φ x 150 (mm), 粒子径(5 μm) 細孔径 (10 μm)を用いた。UV 観測波長は 210 nm で行った。カラム温度は 40 °C に設定した。試料注入量は 25 μL で行った。

MS 測定条件: LC から MS への導入の際、BNMI を経由することにより流速を 20 分の 1 に減速させ、同時に 20 μL/min の流速でアセトニトリル(0.2% ギ酸)の添加を行った。データは正イオンモードで取得した。詳細な測定パラメータは Table 2 にまとめた。

NMR 測定条件: UV 検出器信号、及び MS のトータルイオンクロマト (TIC) 信号を用いてグリチルリチン酸由来の信号を検出し、Hyster3.2 ソフトウェアを用いて目的分画を取得した。Loop-storage 法では、BPSU-36 に目的分画を取得した後に、取得した

D₂O-CH₃CN 濃度比において NMR 測定セルへ送液した。SPE 法においては、PROSPEKT2 を利用してトラップカラムへ目的分画を取得した後に重アセトニトリルを用いてカラムから溶出させて NMR 測定セルへ送液した。NMR 測定パラメータの詳細に関しては Table 3 にまとめた。Table 3 中の NS(積算回数)、RG(レシーバーゲイン)、SPNAM6(溶媒消去用シェイプドパルス)については各分画についてパラメータを最適化した。¹H-NMR の化学シフト値はアセトニトリルのメチル基シグナルが 1.93 ppm となるように合わせた。

C. 研究結果

(A) 図 1 にオウレン NIB-0013 の ¹H -1D-スペクトルデータを示した。スペクトル基準は TSP-d₄ の ¹H シグナルを 0 ppm とした。その他のオウレンについても同様のスペクトルを得ることができたのでそれらのスペクトル比較を行った(図 2, 実験番号 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 114 がそれぞれ NIB-0013, NIB-0041, NIB-0042, NIB-0115 (日本産), NIB-0116, NIB-0150, NIB-0185 (日本産), NIB-0186, NIB-0215, NIB-0094, に対応する)。全てのスペクトル形状は酷似しているが、9.4 ppm から 9.8 ppm の領域を拡大すると、105, 108 のスペクトルが、その他のスペクトルと異なっていた。この 2 つの試料は共に日本産のオウレンであった。この領域以外にも産地を特徴づけるシグナルを同定するために AMIX ソフトウェアを用いて解析を行った。スコアプロットを確認すると、第 1 主成分を示す PC1 軸に日本産のスペクトルがクラスタリングされた(図 4)。しかしながら 9.8 ppm 付近の日本産を特徴づけていると考えられたシグナルが、PC1 に寄与していることが確認できなかった(図 5)。そこでローディングプロットのアウトライナーを確認すると、シグナルのケミカルシフトの違いによっていることが判明した(図 6)。

(B) グリチルリチン酸についての構造と化学量について図 7 に示した。カンゾウ(NIB-003)を軽水-アセニト移動相の分析系によって分析した結果を図 8 に示した。図 8 中の上から順番にトータルイオンクロマトグラフィー、UV (210 nm) クロマトグラフィー、エクストラクトイオンクロマトグラフィー (839 m/z)、エクストラクトイオンクロマトグラフィー (823 m/z) を示した。UV 吸収が大きく、カンゾウの主成分である 823 m/z はグリチルリチン酸であることが推定された。重水(D₂O)-アセニト移動相の分析系によって分析した結果を図 9 に示した。832 m/z のチャートは、グリチルリチン酸に有する水酸基、及びカルボキシル基の交換性水素核が重水素核に置き換わったことにより、質量数が上昇したと考えられた。交換性水素核領域の NMR スペクトル比較を図 10 に示した。上段は D₂O 分析、下段は H₂O 分析を行い、それぞれ、Loop-storage 法、SPE 法で取得した NMR スペクトルを示した。非交換性水素核領域の NMR スペクトル比較を図 11 に示した。Loop-storage 法と SPE 法でほぼ同様のスペクトルを得ることができた。4.2 ppm 付近は移動相由来の ¹H シグナルが大きく出ていたが(上段) SPE 法においては、トラップカラムを N₂ ガスにおいて 60 min 間乾燥させるので残存 ¹H がなくなり、埋もれていたシグナルが確認された(下段)。832 m/z (グリチルリチン酸)と 849 m/z をもつグリチルリチン酸類縁体と考えられた分画を SPE 法により、2D-¹³C-¹H-HSQC スペクトルを取得した(図 12)。メチル基の ¹H-¹³C 相関を示す領域であるこの領域中に、メチル基由来のシグナルが、左図において 7 個確認された。同様に、右図においては 6 個確認された。

D. 考察

(A) NMR シグナルからオウレンの産地特定について試みた結果、日本産と中国産について

て、クラスタリングできることが判明した。

9.8 ppm 付近のスペクトル変化が認識されやすい領域が産地を特徴づけているのではなく、中国産、日本産共にシグナルを生じているが、ケミカルシフトのすこしのずれが大きく寄与していることが判明した。

E. 結論

(A) NMR シグナルを用いることによって、オウレンの産地クラスタリングに成功した。

(B) 分子量及びNMRスペクトルからグリチルリチン酸類縁体と考えられるLicoricesaponin G2と考えられる化合物を同定することに成功した。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参考文献等

- 1) 研究分担者・湊野、協力研究者・高橋

General			TD0	1	
PULPROG	noesygpprid		ZGOPTNS		
ID	65536		Channel f1		
SWH [Hz, ppm]	16025.64	20.027	SFO1 [MHz]	800.2037449	
AQ [sec]	2.0447233		O1 [Hz, ppm]	3744.94	4.680
RG	36		NUC1	1H	
DW [μsec]	31.200		P0 [μsec]	10.00	
DE [μsec]	6.50		P1 [μsec]	14.75	
D1 [sec]	6.000000000		PLW1 [W, -dBW]	9.3035	-9.69
D8 [sec]	0.100000000		PLW9 [W, -dBW]	0.00018563	37.31
d12 [sec]	0.00002000		Gradient channel		
D16 [sec]	0.00020000		GFNAM 1	SINE.100	
DS	32		GFNAM 2	SINE.100	
NS	512		GPZ1 [%]	50.00	
			GPZ2 [%]	-10.00	
			P16 [μsec]	1000.00	

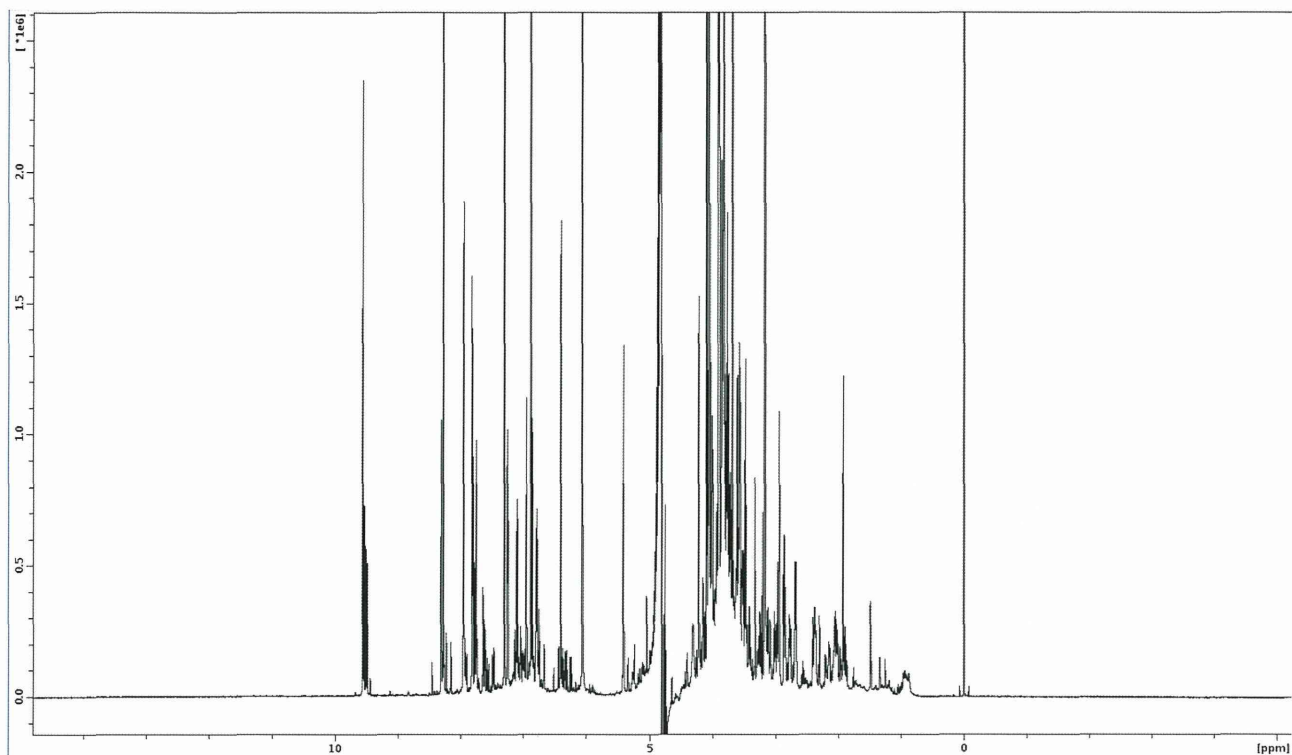
Table 1 オウレン ¹H-1D 測定条件

Mode		Tune SPS	
Mass Range Mode	Std/Normal	Target Mass	800 m/z
Ion Polarity	Positive	Compound Stability	90 %
Ion Source Type	ESI	Trap Drive Level	100 %
Alternating Ion Polarity	off	Optimize	Normal
Current Alternating Ion Pol	Positive	Smart Parameter Setting	active
Divert Valve	to Source		
Tune Source		Trap	
Trap Drive	48.2	Rolling	on
Octopole RF Amplitude	150.0 Vpp	Rolling, Averages	2 cts
Lens 2	-60.0 Volt	Scan Begin	100 m/z
Capillary Exit	135.1 Volt	Scan End	1100 m/z
Dry Temp (Set)	320 °C	Averages	8 Spectra
Nebulizer (Set)	30.00 psi	Max. Accu Time	500000 μs
Dry Gas (Set)	7.00 l/min	ICC Target	30000
HV Capillary	4000 V	Charge Control	on
HV End Plate Offset	-500 V		

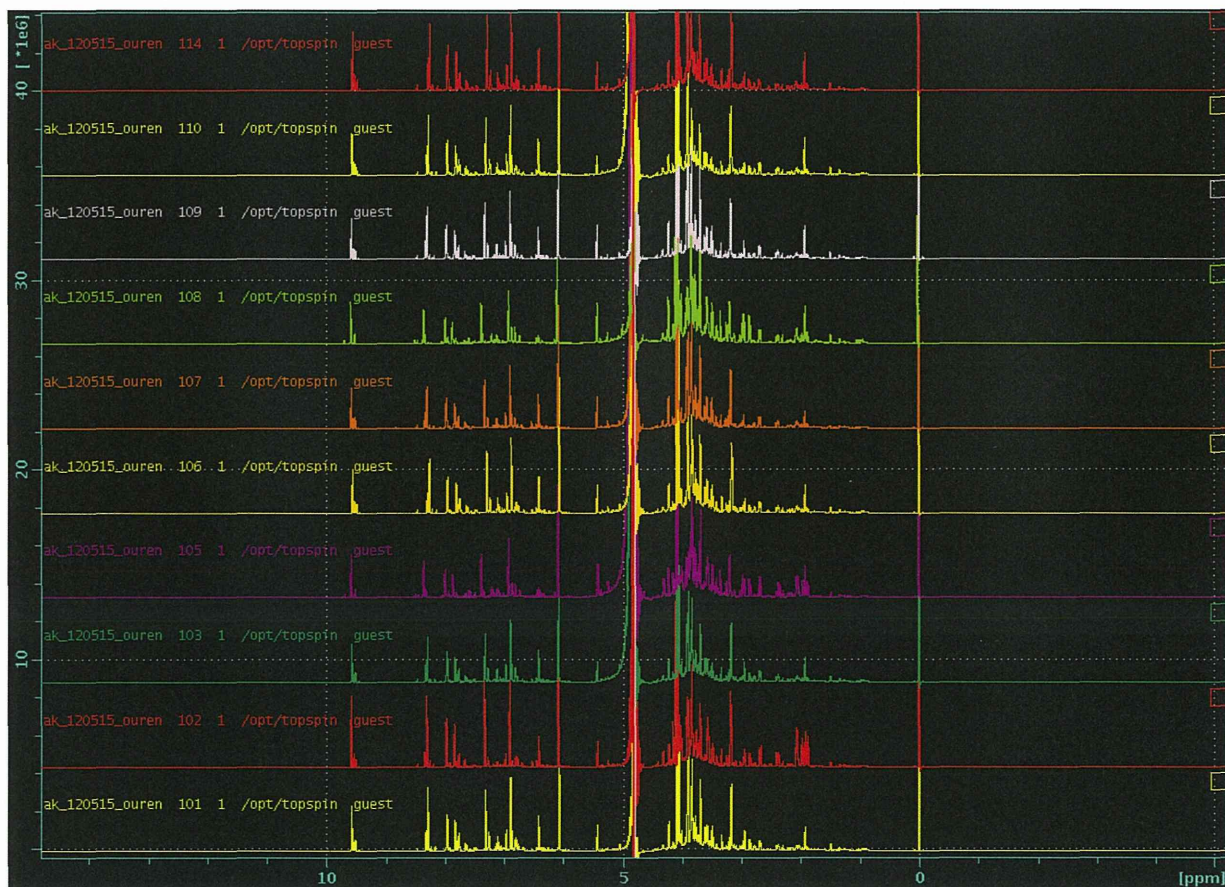
Table 2. MS 測定条件

General		NUC1	1H
PULPROG	lc1pnewps	P1 [μ s]	10.00
TD	16384	P18 [μ s]	100000.00
NS	1024	PL1 [dB]	5.30
DS	4	PL1W [W]	5.47828245
SWH [Hz]	16025.64	SF01 [MHz]	800.2019942
AQ [s]	0.5112308	SP6 [dB]	53.98
RG	512	SP6W [W]	0.00007425
DW [μ s]	31.200	SPNAM6	p_automation
DE [μ s]	20.00	SPOAL6	0.500
D1 [s]	3.00000000	SPOFFS6 [Hz]	0.00
D8 [s]	0.10000000	Channel f2	
D11 [s]	0.03000000	NUC2	13C
d12 [s]	0.00002000	PL2 [dB]	0.00
d13 [s]	0.00000400	PL2W [W]	110.27181244
16	30	PL21 [dB]	26.00
17	1	PL21W [W]	0.27699026
TD0	1	SF02 [MHz]	201.2108424
Channel f1			

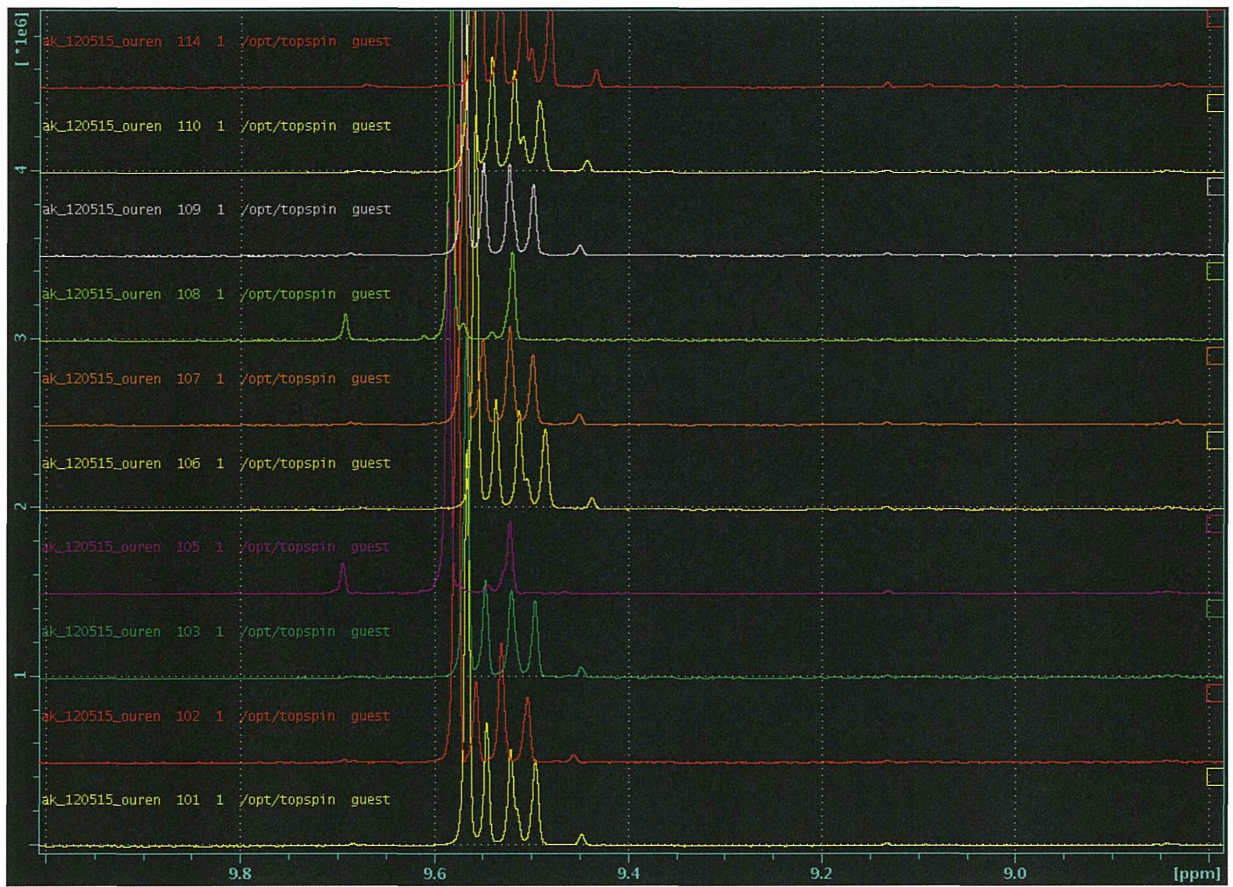
Table3. NMR 測定条件



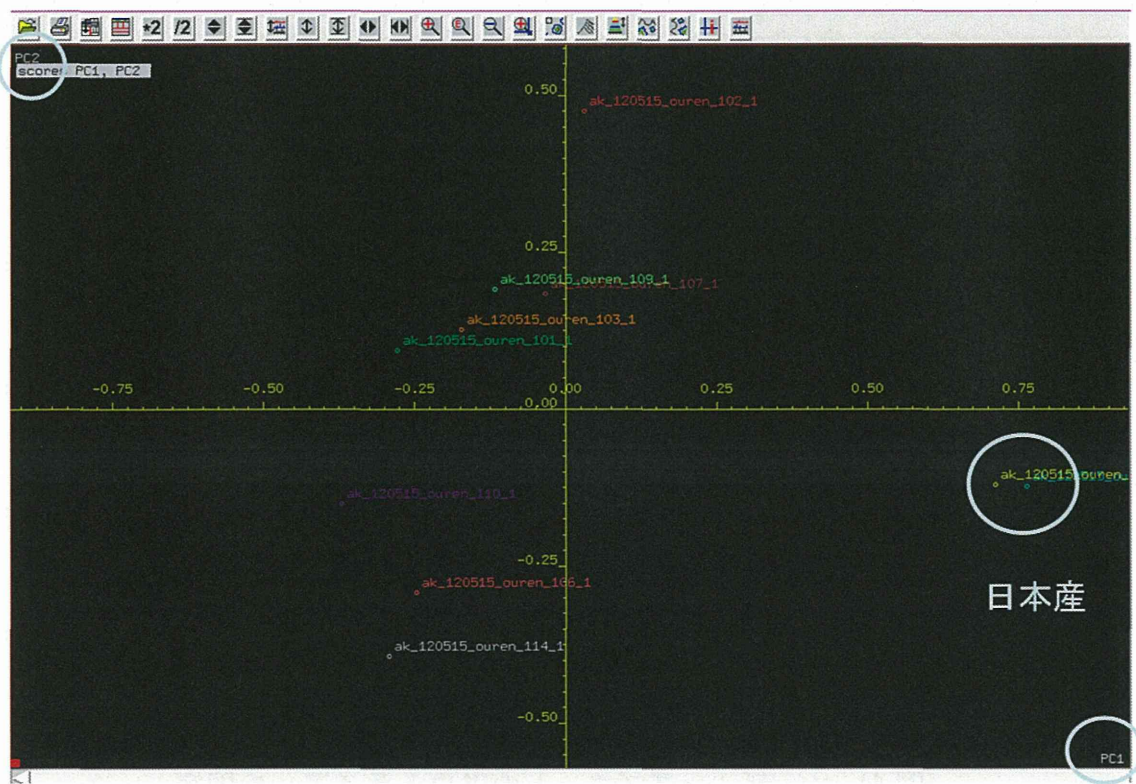
(図 1) オウレン (NIB-0013)の ^1H -1D スペクトル



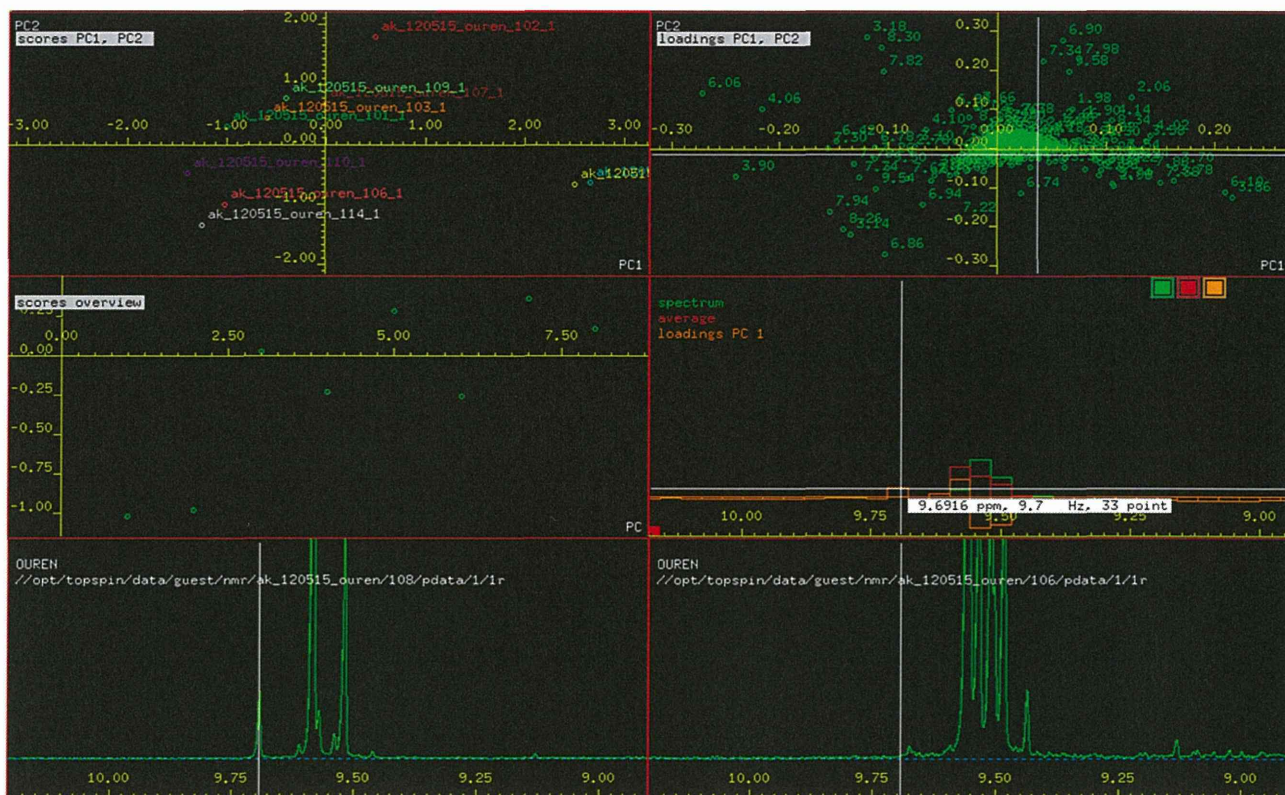
(図 2) オウレンの ^1H -1D スペクトル



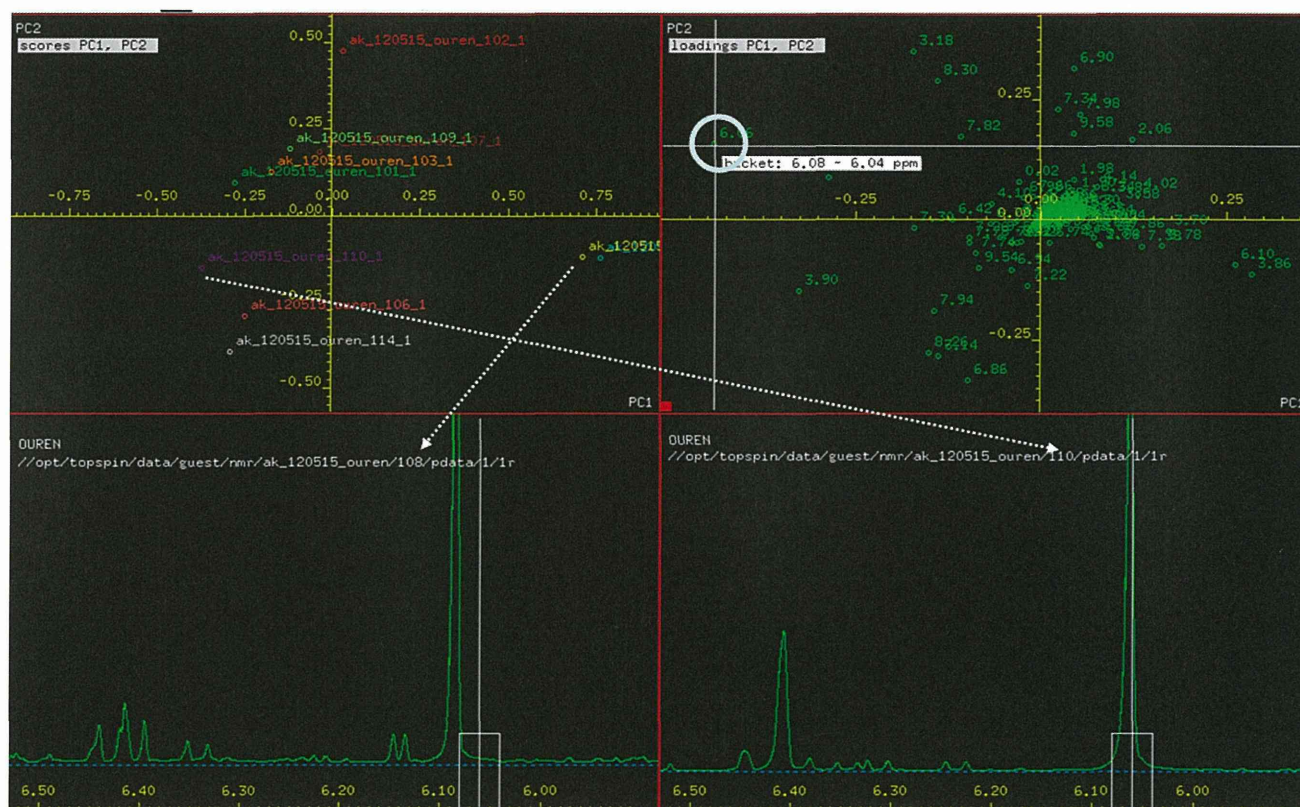
(図 3) 9.4-9.8 ppm 領域の拡大図



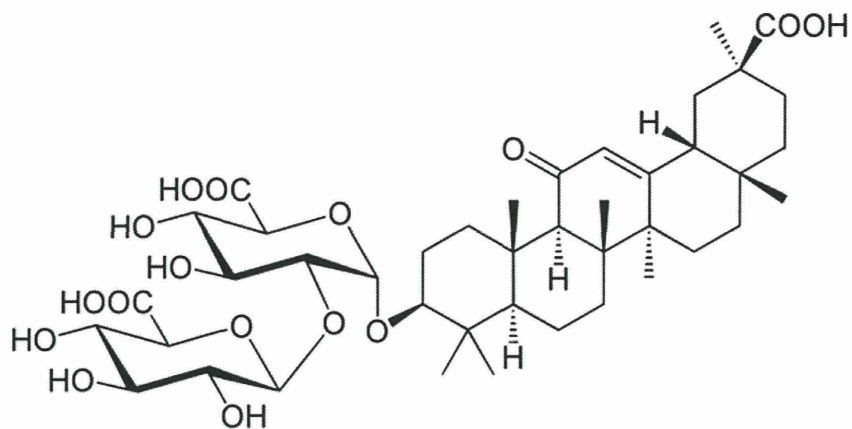
(図 4) AMIX による主成分解析 (スコアプロット)



(図5) 9.8 ppm 付近のシグナルのローディングプロットへの寄与

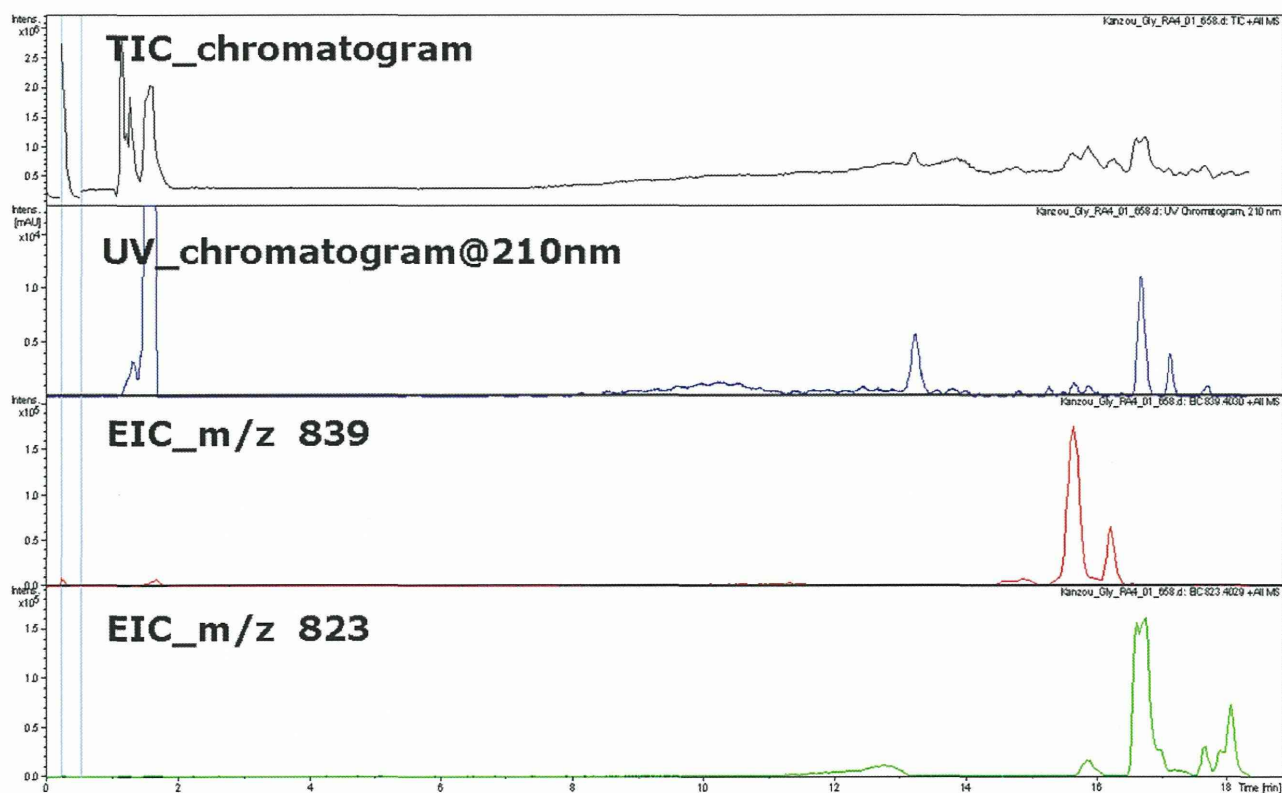


(図6) ローディングプロットのアウトライアーの同定

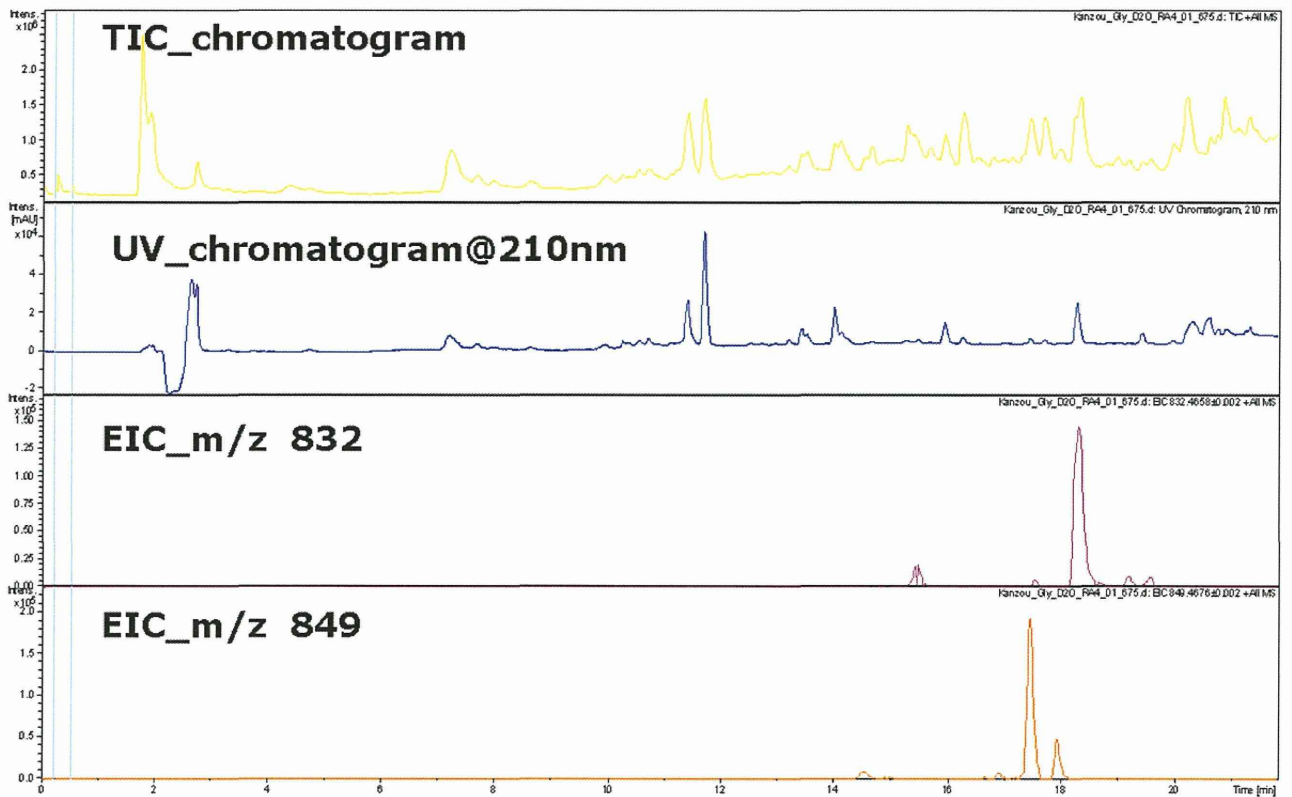


化学式： $C_{42}H_{62}O_{16}$
 分子量： 822.94

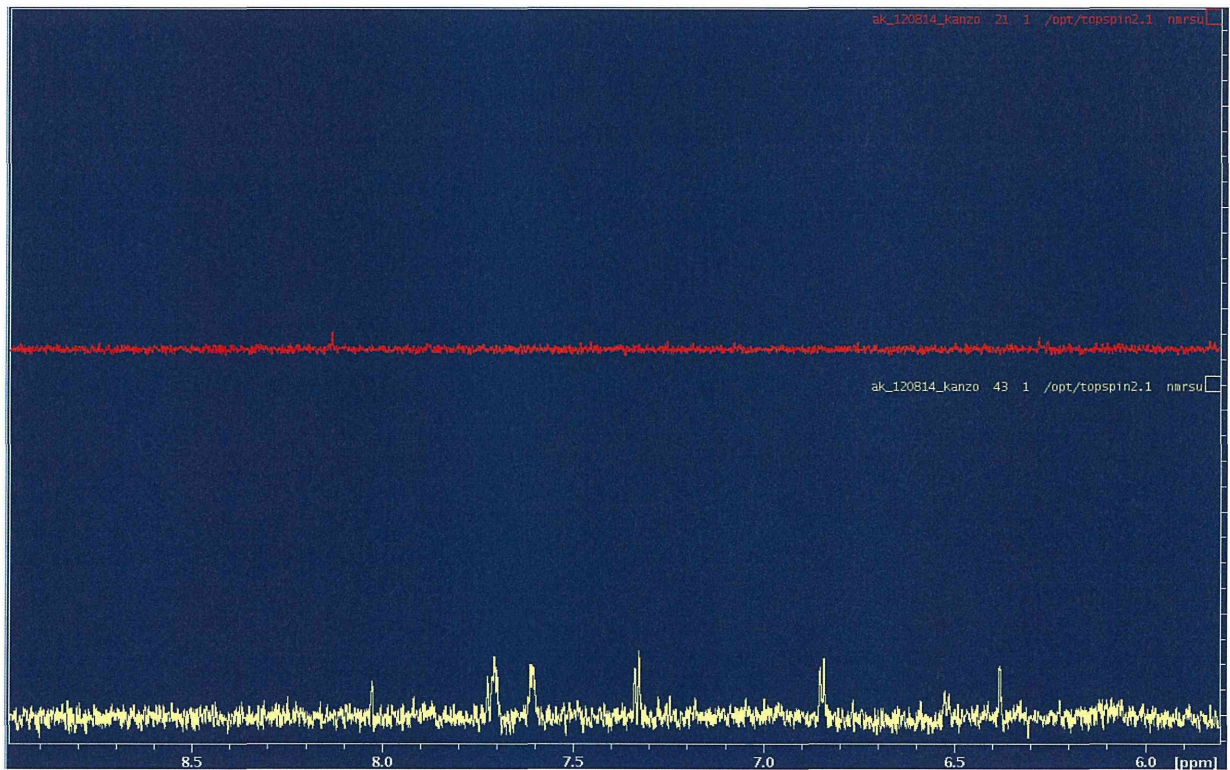
(図7) グリチルリチン酸の化学構造



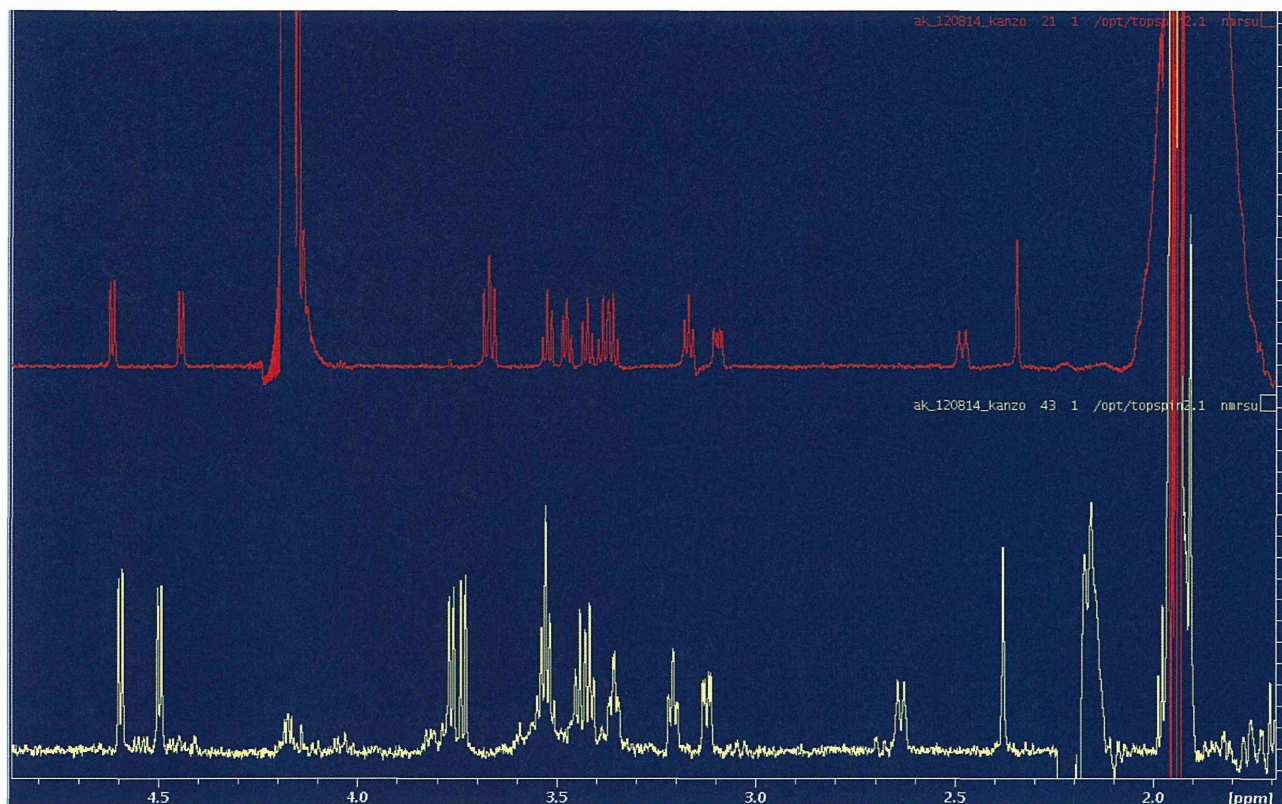
(図8) 軽水分析による甘草のLC-MS測定



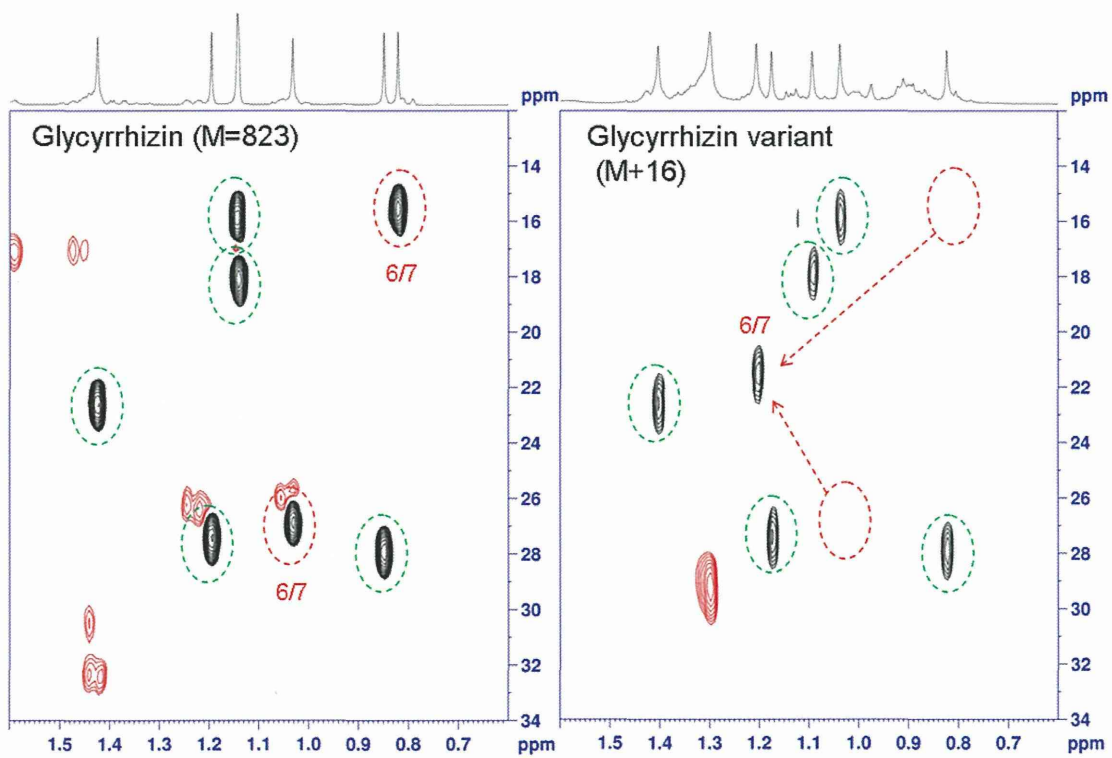
(図9) 重水分析によるカンゾウのLC-MS測定



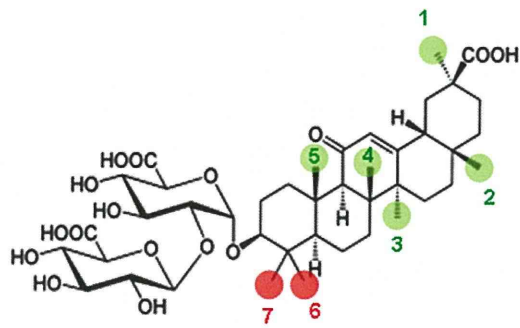
(図10) 交換性水素核領域のNMRスペクトル



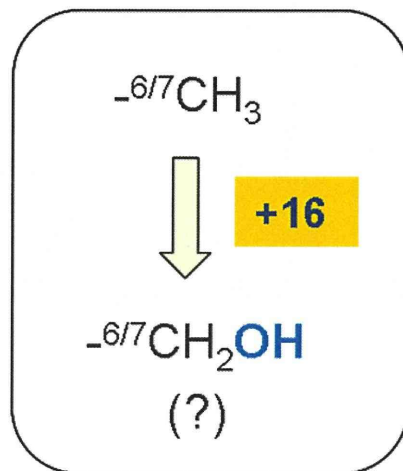
(図 10) 非交換性水素核領域の NMR スペクトル



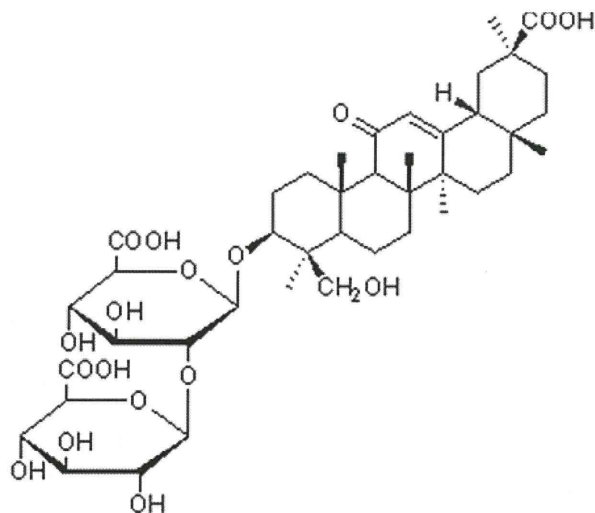
(図 11) メチル領域の ^1H - ^{13}C HSQC NMR スペクトル



グリチルリチン



(図 12) メチル領域の ^1H - ^{13}C HSQC と MS 値からの推定



(図 13) グリチルリチン酸類縁体の推定構造 (Licoricesaponin G2)

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
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

研究分担課題 成分分析データ情報に関する研究（TLC写真情報の集積）

研究分担者 木内 文之 慶應義塾大学薬学部・教授

日本薬局方に規定されている薄層クロマトグラフィーによる生薬の確認試験について、TLCの写真を画像データとして集積するために、生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者の協力を得て、昨年度に引き続き代表的なクロマトパターンの画像データの作成を行った。クロマトグラム公開の際に特に問題となると考えられる色の再現性については、色見本を添えてデータを収集することにより、相対的に色の再現性を確保することとした。今年度は、前年度からの継続検討品目も含め26品目の生薬について、TLC画像データの収集を行うとともに、個々の生薬についてTLCによる確認試験の実施上の問題点の検討も行った。

研究協力者

石崎昌洋 三和生薬株式会社
川崎武志 株式会社ウチダ和漢薬研究開発部
川原信夫 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
神本敏弘 株式会社ツムラ生産本部
菊地祐一 株式会社ツムラ生産本部
合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
近藤誠三 小太郎漢方製薬株式会社研究所
佐藤陽子 和光純薬株式会社試薬事業部
杉本智潮 救心製薬株式会社山梨工場技術研究部
高谷和宏 和光純薬株式会社試薬事業部
玉木智生 日本粉末薬品株式会社研究開発部
成川佑次 慶應義塾大学薬学部
日向野太郎 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所
山田裕子 和光純薬株式会社試薬開発本部
山本 豊 株式会社栃本天海堂品質管理部

の健康に対する漢方の役割に大きな期待が寄せられている。漢方薬の有効性・安全性を担保するためには、そこで用いられる原料薬物である生薬の品質の確保が必須であるが、生薬は天産品であるため、その品質の確保のための様々な努力が必要である。

日本薬局方では、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、第16改正日本薬局方では指標成分をTLCで検出する方法が多く採用されている。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Rf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。日本薬局方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

A. 研究目的

本格的な高齢化社会を迎えつつある現在、国民

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、成分の含量等の影響で、指標成分を見誤る可能性もある。そこで本研究では、日本薬局方に記載されている TLC を用いた生薬の確認試験を実施する際に参照できる、典型的な TLC クロマトグラムを集積し、これを公開することを目的として検討を行った。

B. 研究方法

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、実際に生薬各条に規定された TLC による確認試験を実施し、そのクロマトグラムを画像データとして収集した。実験には、Merck 社と和光純薬工業から市販されている TLC プレートを用い、日本薬局方の生薬各条の規定に従って確認試験を実施した。なお、TLC による確認試験を迅速化するために、従来 10 cm と規定されてきた TLC の展開距離について、これを 7 cm に変更した試験も並行して行い、 R_f 値並びに分離パターンに差があるかを検討した。また、クロマトグラムの色の再現性を確保するために、発色を伴う TLC 画像については日本色研の新色カード 129a の vivid (Lot No. 00706) から 9 色 (3:yR, 8:Y, 12:G, 16:gB, 19:pB, 24:RP, W, Gy5.5, Bk) を選んで順番に並べた色見本を作成し、これを同一画面に入れて画像データを取り込んだ。

C. 研究結果

1. TLC の画像データの集積

今年度は、昨年度からの継続分も含め、アラビアゴム、オウヒ、ガイヨウ、ケイガイ、コウイ、ゴマ、ゴミシ、サンザシ、サンシシ、サンシュユ、ジオウ、ゼンコ、センソ、センブリ、ソヨウ、ソウジュツ、ダイオウ、トウガラシ、トウヒ、ニクズク、ニンドウ、バクガ、ビャクジュツ、ブシ、ボタンピ、ユウタンについて画像データを集積した。各確認試験の TLC クロマトグラムの例を Fig. 1-19 に示す。また、研究に参加した機関毎の各確認試験の指標スポットの R_f 値を Table 1 に示す。

2. 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、使用する薄層板について、通例としてその作製法を規定している。¹⁾しかし、現在では通常市販の薄層板が使用されており、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 社製の薄層板を比較すると、品目によっては展開結果に差があることがこれまでの検討で明らかになっている。そこで、今年度も引き続きこの 2 社の TLC プレートを用いた場合の展開結果を比較検討した。

まず全体的な R_f 値の再現性について見ると、これまでの検討結果と同様に、試験法を厳密に守ることにより、良好な R_f 値の再現性を得ることができ (Table 1)、Merck 社と Wako 社の薄層板の差について見ると、やはりこれまでの結果同様 Merck 社より Wako 社のプレートで R_f 値が大きい傾向にあった。しかし、ゼンコ (1) のプエラロプトリン (Fig. 10) やソウジュツのアトラクチロジン (Fig. 12) の場合は、Wako のプレートの方がやや小さい R_f 値を示した。また、これまでの検討で、酸性物質では両社のプレート間で R_f 値に大きな差が見られることが明らかになっているが、今回の検討でもクロロゲン酸を指標成分とするニンドウの確認試験 (Fig. 15) で差が見られた。

日本薬局方に規定されている 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、指標成分の R_f 値が規定されている。今回検討した生薬のうち、日局に R_f 値が規定されているオウヒ、ケイガイ、バクガ、ビャクジュツについて、日局に規定された R_f 値と実際に得られた値を比較すると (Table 1)、バクガを除き、日局に規定された値は Merck 社製プレートで得られた値とほぼ一致していた。バクガについては、Merck 社製プレートで 0.45 付近にスポットが見られたことから、日局記載の R_f 値 0.4 付近を 0.45 付近に変更する必要がある。