

表2 各々の甘草に特徴的な成分のXICピーク強度（主要約30成分）

m/z	水耕栽培品に特徴的な成分			市場流通品に特徴的な成分		
	467.3	445.29	839.4	419.13	257.08	551.18
試料／保持時間	19	18.6	24.5	19	15	18.4
水耕栽培品1	1.30E+07	1.98E+07	1.48E+07	7.10E+06	2.09E+07	5.08E+06
水耕栽培品2	5.85E+06	1.00E+07	1.57E+07	8.44E+06	2.23E+07	5.38E+06
水耕栽培品3	6.08E+06	8.96E+06	1.46E+07	1.05E+07	2.66E+07	5.91E+06
市場流通品1	4.78E+06	7.88E+06	8.17E+05	4.14E+07	4.92E+07	1.98E+07
市場流通品2	3.17E+06	5.50E+06	1.09E+06	7.53E+07	6.68E+07	3.03E+07
市場流通品3	2.61E+06	4.12E+06	3.21E+06	7.13E+07	6.05E+07	2.80E+07

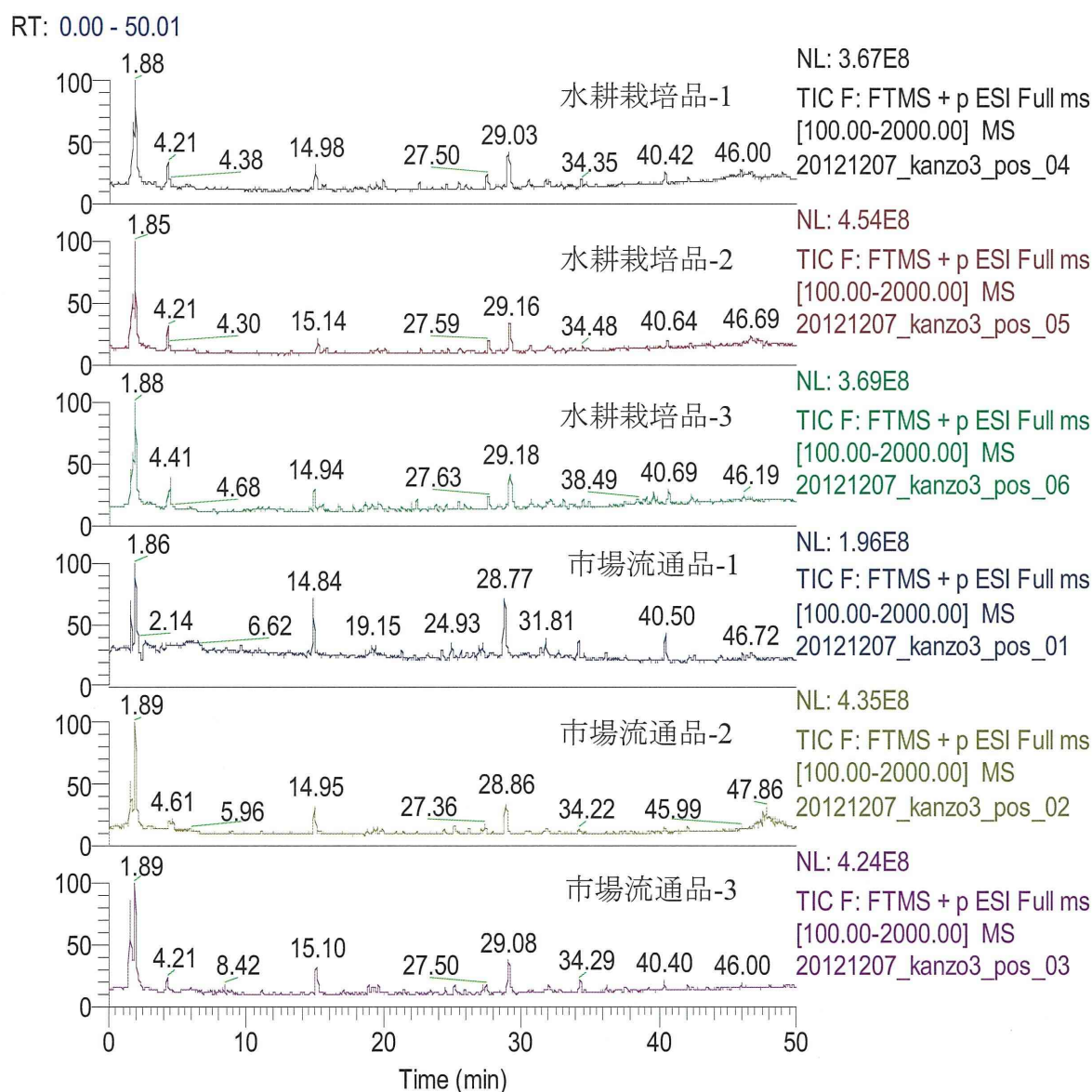


図10 人工水耕栽培「甘草」と市場流通「甘草」のメタノール抽出液のTICクロマトグラム

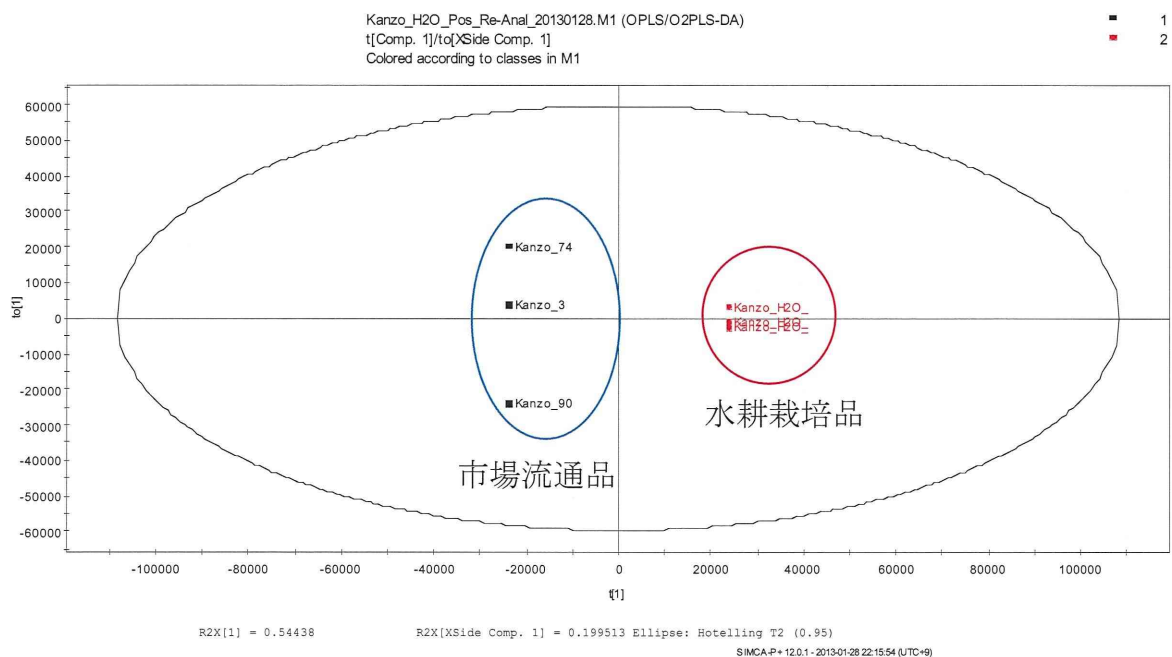


図11 人工水耕栽培「甘草」と市場流通「甘草」のメタノール抽出液のLC-MS/MSデータから多変量解析によって得られたスコアプロット

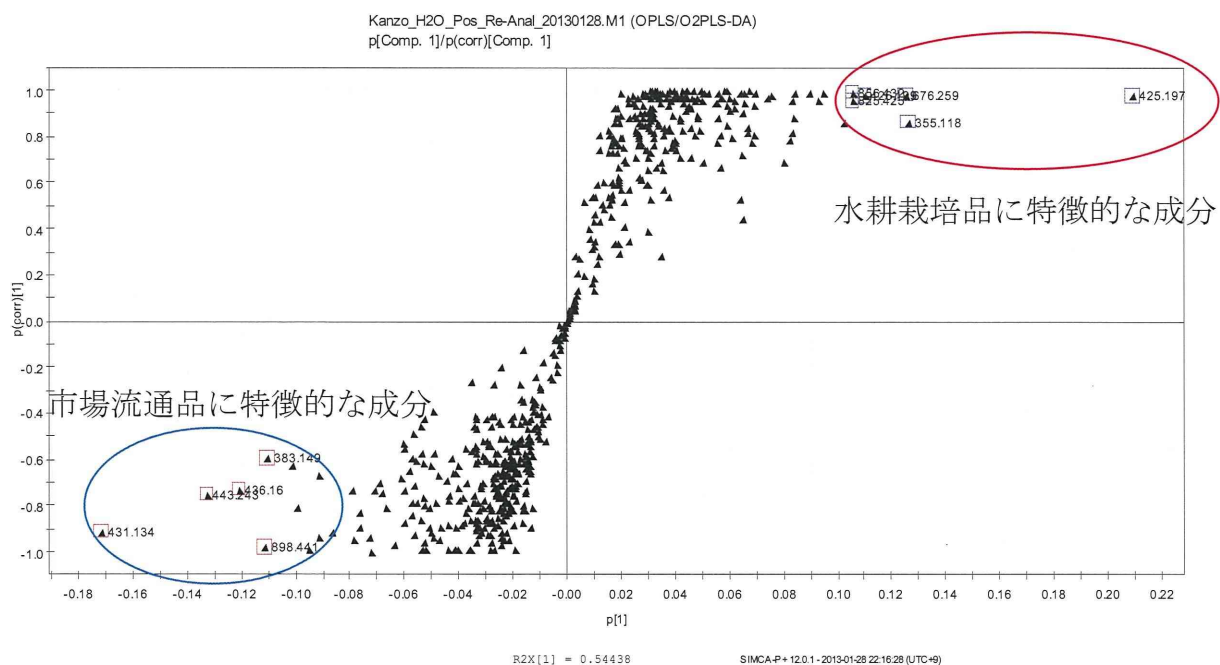
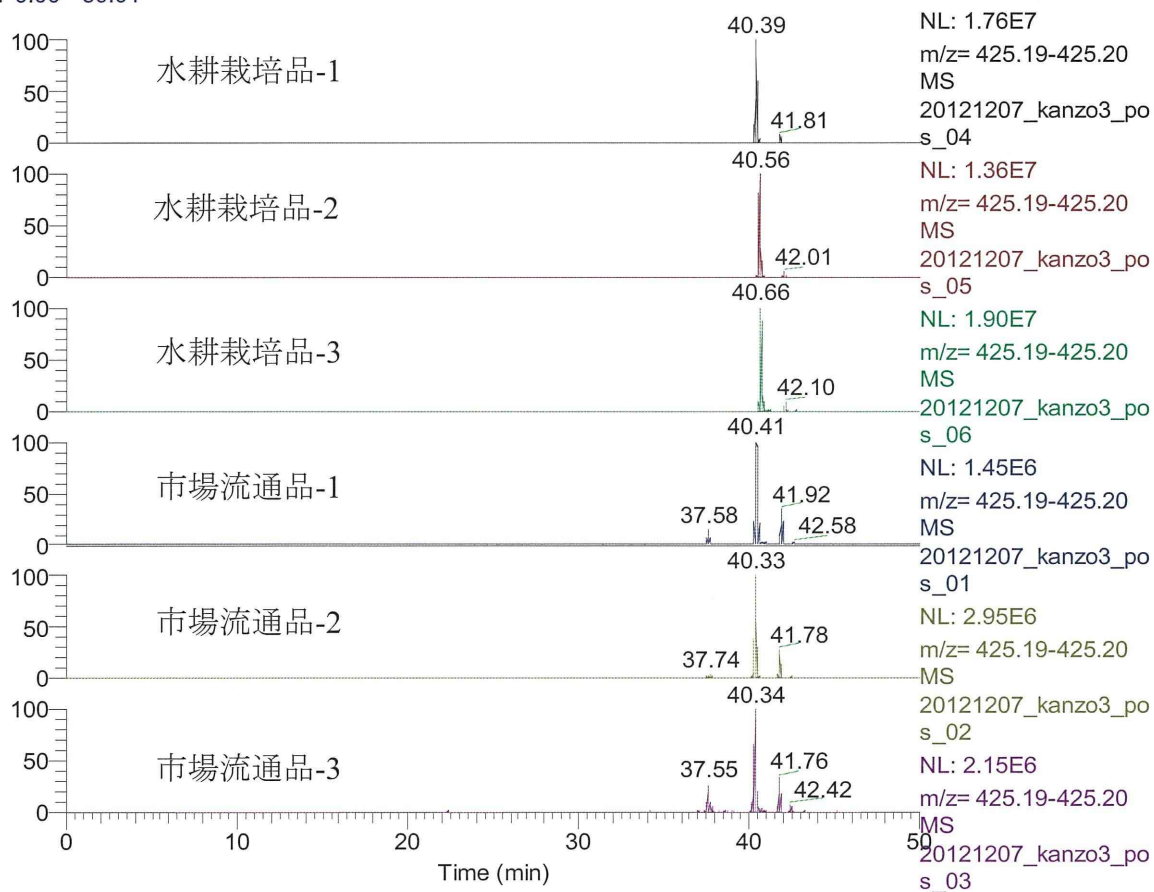
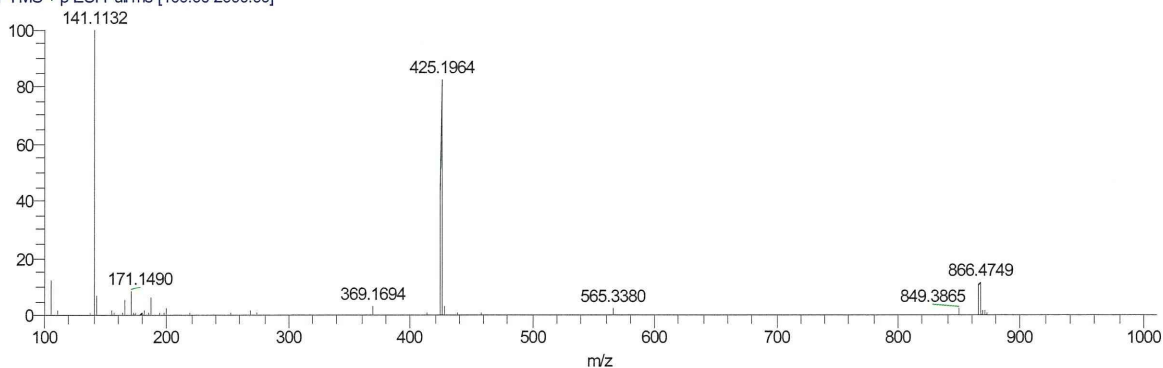


図12 人工水耕栽培「甘草」と市場流通「甘草」のメタノール抽出液のLC-MS/MSデータから多変量解析によって得られたS-プロット

RT: 0.00 - 50.01



20121207\_Kanzo3\_Pos\_04 #2711 RT: 40.39 AV: 1 NL: 2.13E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20121207\_Kanzo3\_Pos\_04 #2702 RT: 40.26 AV: 1 NL: 1.65E6  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 425.19@cid35.00 [105.00-440.00]

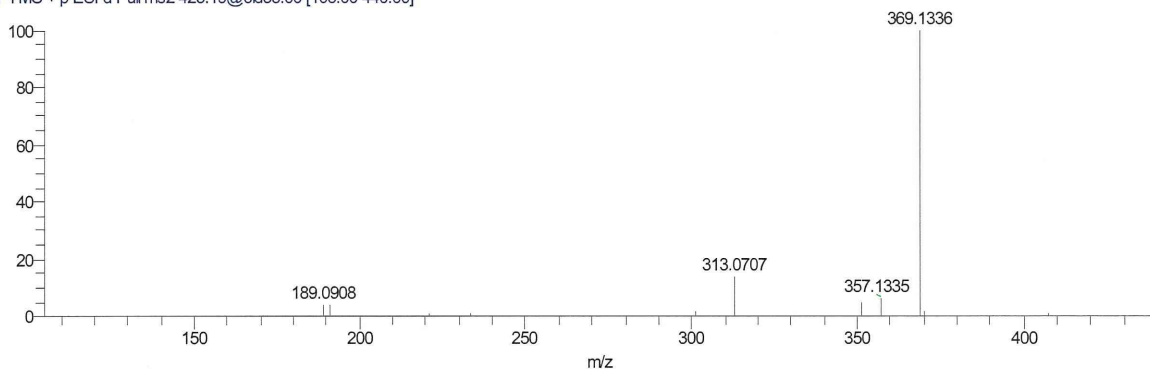
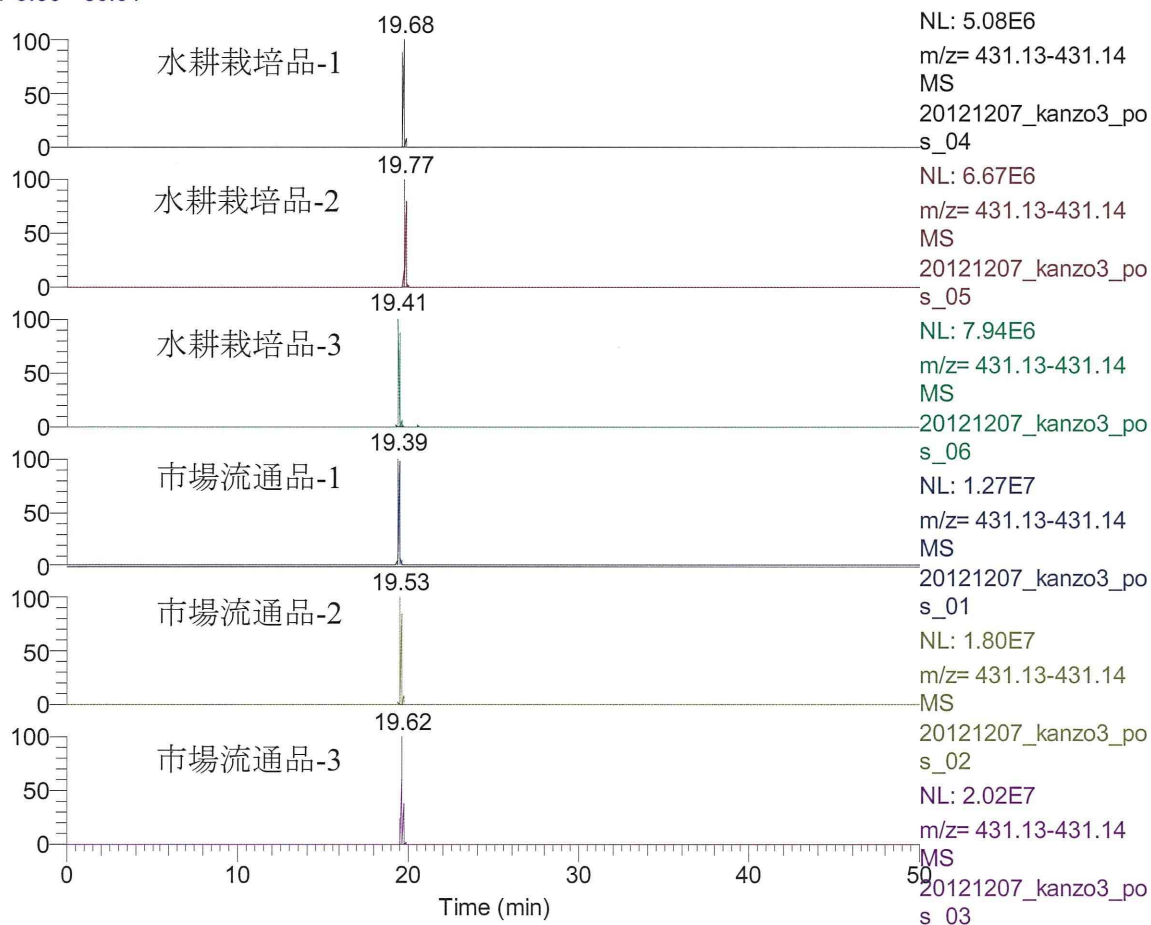
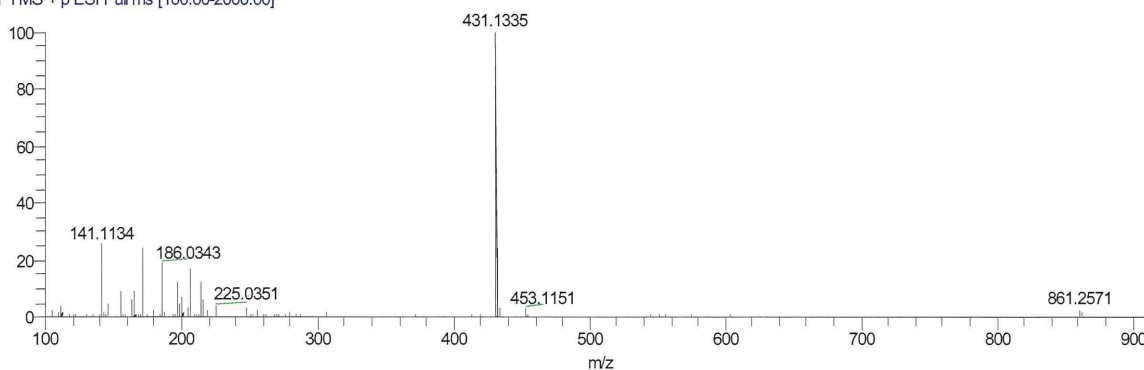


図13 人工水耕栽培「甘草」のメタノール抽出液に特徴的な成分 $m/z$  425.19のXICと保持時間40.4分のマスペクトルおよび $m/z$  425.19イオンのプロダクトイオンスペクトル

RT: 0.00 - 50.01



20121207\_kanzo3\_pos\_01 #1296 RT: 19.39 AV: 1 NL: 1.27E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20121207\_kanzo3\_pos\_01 #1291 RT: 19.31 AV: 1 NL: 1.88E6  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 431.13@cid35.00 [105.00-445.00]

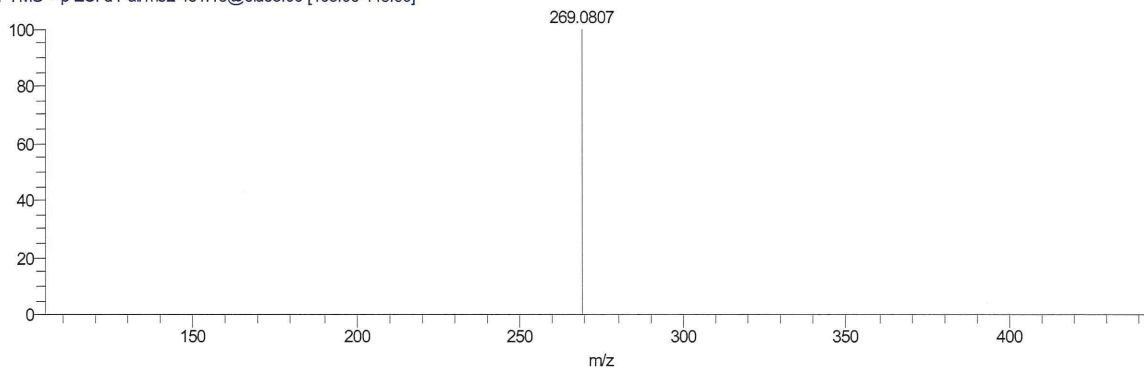


図14 市場流通「甘草」のメタノール抽出液に特徴的な成分 $m/z$  431.13のXICと保持時間19.5分のマススペクトルおよび $m/z$  431.13イオンのプロダクトイオンスペクトル

表3 各々の甘草に特徴的な成分のXICピーク強度（メタノール抽出液）

m/z	水耕栽培品に特徴的な成分			市場流通品に特徴的な成分		
	425.1971	355.1178	839.4060 (856.4322)	431.1335	443.2427	881.4140 (898.4406)
試料／保持時間	40.3 - 40.6	32.7-33.1	25.0-25.5	19.4-19.7	36.2	(24.9-25.3)
水耕栽培品1	1.76E+07	1.27E+07	5.09E6 (8.41E6)	5.08E+06	-	6.29E5 (9.29E5)
水耕栽培品2	1.36E+07	1.05E+07	4.29E6 (6.87E6)	6.67E+06	-	3.38E5 (6.11E5)
水耕栽培品3	1.90E+07	1.55E+07	5.06E6 (7.06E6)	7.94E+06	-	5.06E5 (8.16E5)
市場流通品1	1.45E+06	6.87E+06	-	1.27E+07	6.45E+06	3.46E6 (1.07E7)
市場流通品2	2.95E+06	6.14E+06	-	1.80E+07	2.82E+06	4.98E6 (7.96E6)
市場流通品3	2.15E+06	8.64E+06	-	2.02E+07	1.38E+07	5.88E6 (8.43E6)

平成24年度厚生労働科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）  
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた  
実証的研究（H24－創薬総合－一般－007）  
分担研究報告書

分担研究課題：人工水耕栽培システムにより生産した生薬の局方試験に関する研究

研究分担者 川原信夫（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター  
センター長

要旨 人工水耕栽培システムにより生産された甘草2系統（GuIV1、GuIV2）11検体について、日本薬局方試験（性状の確認、グリチルリチン酸定量、確認試験 TLC、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量の測定）を実施した。性状（外観）では0.5 cm以上に満たない部分を認めたとしたが、その他の性状及び内部形態は日局カンゾウの性状に適合すると判断された。グリチルリチン酸含量については、GuIV1系統の2個体が2.89%および3.62%を示し日局規格（2.5%以上）に適合していた。しかしながら各系統の平均値は日局規格値に適合しなかった。グリチルリチン酸含量が2.5%以上であった2個体（3検体）で理化学試験をおこなった結果、3検体とも全項目で日局規格値に適合していた。

研究協力者 武田修己 東京生薬協会

適合性を評価したので報告する。

## A. 研究目的

現在までに日本において人工水耕栽培環境下で栽培された生薬が製品化された事例は見出されていない。従って、上記のような生薬の使用に対して漢方・生薬業界、医師、薬剤師、患者等の潜在的な不安が存在することは否定できない状況である。

そこで本研究では、本法により生産された生薬、特に「甘草」の有効成分、有効性、安全性を担保し、漢方・生薬関連企業及び一般の方々の理解を深め、その普及を促進することを目的として、人工水耕栽培環境下で生産された「甘草」について、日本薬局方試験（性状の確認、グリチルリチン酸定量、確認試験 TLC、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量の測定）を実施し、日本薬局方への

## B. 研究方法

### 1. 材料

ウラルカンゾウ優良株の人工水耕栽培（15ヶ月）により生産された甘草（GuIV1系統：3検体、GuIV2系統：8検体）（表1）。

### 2. 性状

#### 2-1 外部形態

日局記載に基づき径0.5 cm以上及び径0.5 cm未満に分け、重量を測定し、外観を観察した（表2）。

#### 2-2 内部形態

水耕栽培品は GuIV2 株 No.1 及び GuIV1 株 No.7 を用い、各個体の太い部分と細い部分1箇所ずつについて検討した（図1）。

比較対象としての野生品は市場流通甘草4サンプル(NIB-0003、0007、0074、0176)の根の代表的な小片を用いた(図2)。

観察方法は、日本薬局方<5.01 生薬試験法>に準じた。約24時間水浸・脱気したのち、凍結マイクロトームで厚さ30 $\mu$ mの横切片を作成し、グリセリン水で封入し、鏡検用試料とした。オードジャベル液で脱色、メチレンブルーで染色したものと、無染色のものを比較した。

### 3. グリチルリチン酸定量

各検体を径0.5 cm以上及び径0.5 cm未満に分け、各々について日本薬局方カンゾウ定量法の2分の1量にてグリチルリチン酸を定量した。すなわち、粉末約0.25 gを精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、希エタノール35 mLを加えて15分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物は更にエタノール12.5 mLを加え、同様に操作した。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に50 mLとし試料溶液とした。

定量値の算出には後述の乾燥減量値を用いて換算した。

分析機器：LC-Solution (Shimadzu)、フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M10Avp (Shimadzu)、カラム：TSKGEL ODS-80Ts 5 $\mu$ m、4.6 mm $\times$ 250 mm (Tosoh)、カラム温度：20 $^{\circ}$ C、流速：1.0 mL/min、移動相：薄めた酢酸(31)(1 $\rightarrow$ 15)/アセトニトリル混液(3:2)、標準化合物：日本薬局方標準品 グリチルリチン酸標準品 GLY0606

## 4. 理化学試験

### 4-1 乾燥減量

各検体を径0.5 cm以上及び径0.5 cm未満に分け、各々について約2 gを用い、日本薬

局方<5.01 生薬試験法>に準じて、乾燥減量を測定した。なお、試料量が十分でなかった、株No.6、8、9及び11では測定していない。

### 4-2 灰分

グリチルリチン酸含量が2.5%以上であり、試料量が十分であった3検体(GuIV1株No.4 0.5 cm以上、0.5 cm未満及びGuIV1株No.8 0.5 cm未満)について、約2 gを用い、日本薬局方<5.01 生薬試験法>に準じて、灰分を測定した。

### 4-3 酸不溶性灰分

グリチルリチン酸含量が2.5%以上であり、試料量が十分であった3検体(GuIV1株No.4 0.5 cm以上、0.5 cm未満及びGuIV1株No.8 0.5 cm未満)について、日本薬局方<5.01 生薬試験法>に準じて、酸不溶性灰分を測定した。

### 4-4 確認試験

グリチルリチン酸含量が2.5%以上であり、試料量が十分であった3検体(GuIV1株No.4 0.5 cm以上、0.5 cm未満及びGuIV1株No.8 0.5 cm未満)について、日本薬局方カンゾウ確認試験に準じてTLC試験をおこなった。なお、試料量の都合上、日本薬局方記載の4分の1量にて実施した。すなわち、粉末0.5 gにエタノール(95)/水溶液(7:3)2.5 mLを加え、水浴上で5分間振り混ぜながら加熱し、冷後、ろ過し、ろ液を試料溶液とした。

スポット量：2 $\mu$ L、展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸(100)混液(7:2:1)、展開距離：7 cm、TLCプレート：TLCガラスプレート シリカゲル60 F<sub>254</sub>

(Merck)、確認波長：254 nm

#### 4-5 エキス含量

グリチルリチン酸含量が 2.5%以上であり、試料量が十分であった 3 検体(GuIV1 株 No.4 0.5 cm 以上、0.5 cm 未満及び GuIV1 株 No.8 0.5 cm 未満)について、日本薬局方<5.01 生薬試験法>に準じて、希エタノールエキスを測定した。なお、試料量の都合上、2 検体 (GuIV1 株 No.4 0.5 cm 以上及び 0.5 cm 未満) については、2 分の 1 量にて以下の方法にて実施した。

分析用試料約 1.15 g を精密に量り、適当なフラスコに入れ、希エタノール 35 mL を加え、時々振り混ぜて 5 時間浸出し、更に 16 時間放置した後ろ過した。フラスコ及び残留物は、ろ液が 50 mL になるまで希エタノールで洗った。ろ液 25 mL を水浴上で蒸発乾固し、105°C で 4 時間乾燥し、デシケーター (シリカゲル) で放冷後、その質量を精密に量った。

### C. 結果

#### 1. 外部形態

水耕栽培品は細長い円錐形～円柱形を呈し、分枝する。根頭に茎の基部をつけていたが、他部位に当たるため本研究では切除し、検討しなかった。外面は赤褐色で細かい縦じわと多数の皮目がある。横切面では、皮部と木部の境界がほぼ明らかで、放射状の構造を現す (図 1)。

野生品はほぼ円柱形を呈し、外面は暗褐色～赤褐色で縦じわがあり、NIB-0176 では皮目が散在するが、ほかでは見られない。横切面では、皮部と木部の境界がほぼ明らかで、放射状の構造を現し、放射状に裂け目がある (図 2)。

水耕栽培品は野生品に対して 1) 細長い円錐形をし、分枝する点、2) 多数の皮目をつける点、3) 横切面が緻密で、放射状に裂け目が見られない点が異なる。

特に 1) は日局性状記載とは異なるが、野生品においても個体全体では全て円柱形であり、分枝しないことはない。野生品を加工調製して流通する代表的なものを記載したものが日本薬局方性状であることを考えると、水耕栽培品は大きく外れるものではないと考えられる。

#### 2. 内部形態

水耕栽培品、野生品の横切面には、黄褐色の多層のコルク層とその内層に 1～3 細胞層のコルク皮層がある。皮部には放射組織が退廃師部と交互に放射状に配列し、師部には結晶細胞列で囲まれた厚壁で木化不十分な師部繊維群がある。木部には黄色で巨大な道管の列と 3～10 細胞列の放射組織が交互に放射状に配列する。道管は結晶細胞列で囲まれた木部繊維及び木部柔細胞を伴う。柔細胞はでんぷん粒を含み、また、しばしばシュウ酸カルシウムの単品を含む。

以上の特徴は日局性状記載に一致する。

ただし、水耕栽培品は野生品と比べて、1) 道管径が小さいこと、2) シュウ酸カルシウム単品が多い点で異なる。

日局においては道管は「巨大」とされているが、その具体的数値は示されていないため、日局性状に合致すると判断した。

#### 3. グリチルリチン酸含量

径 0.5 cm 以上及び径 0.5 cm 未満に分別した検体各々について、グリチルリチン酸含量を測定した (表 3)。系統ごとの平均値は径 0.5 cm 以上については、GuIV2 系統が 1.90% ± 0.15% (n=3) であり、GuIV1 系統が 2.16% ± 0.89% (n=8) であった。また、径 0.5 cm 未満



の検体については GuIV2 系統が 1.55%±0.13% (n=3)であり、GuIV1 系統が 1.90%±0.68% (n=8)であった。

いずれの系統ともに日局不適であった。しかしながら個体ごとでは、GuIV1 系統の 2 個体 (株 No.4 及び株 No.8) が日局規格値 (2.5%)に適合していた。

#### 4. 理化学試験

実施したすべての日局理化学試験項目 (確認試験 TLC、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量) において、日局規格に適合していた (表 4、図 12)。

#### D. 考察

##### 1. 性状

水耕栽培品は野生品に比べて道管径が小さいが、これは水耕栽培では水分が潤沢にあり、水分の通道にそれほど資源分配しなくてもよいよう適応した結果と推定される。

また、シュウ酸カルシウム単晶が多数見られることは、養液中の塩類が野生状態に比べて多いことと対応している可能性が示唆される。

##### 2. グリチルリチン酸含量

同一環境下で栽培された検体であっても、個体ごとのグリチルリチン酸含量のバラつきが大きかった。

径については、いずれの系統も 0.5 cm 以上の方が 0.5 cm 未満と比べて含量が高い傾向であった。しかしながら、径の太さとグリチルリチン酸含量に相関関係は認められなかった。(図 13)。

#### 3. 理化学試験

乾燥減量、エキス含量、酸不溶性灰分については市場品とほぼ同様の範囲にあった。灰分については、市場品よりも高い傾向であった。要因としては、水耕栽培時に使用する養液中の無機塩類の影響があると考えられる。

#### E. 結論

人工水耕栽培システムにより生産された甘草 2 系統 (GuIV1、GuIV2) 11 検体について、日本薬局方試験 (性状の確認、グリチルリチン酸定量、確認試験 TLC、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量の測定) を実施した。性状 (外観) では 0.5 cm 以上に満たない部分を認めたが、その他の性状及び内部形態は日局カンゾウの性状に適合すると判断された。グリチルリチン酸含量については、GuIV1 系統の 2 個体が 2.89%および 3.62%を示し日局規格 (2.5%以上) に適合していた。しかしながら各系統の平均値は日局規格値に適合しなかった。グリチルリチン酸含量が 2.5%以上であった 2 個体 (3 検体) で理化学試験をおこなった結果、3 検体とも全項目で日局規格値に適合していた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1. 試験サンプル

系統名	株No.	主根径 (mm)	主根長 (mm)	生重量 (g)	乾燥重量 (g)	乾燥歩留まり (%)
GuIV2	1	13.5	85	60.91	25.57	41.98
	2	12.2	78	85.34	26.38	30.91
	3	10.5	70	66.02	22.03	33.37
GuIV1	4	12.4	60	43.69	20.43	46.76
	5	11.6	60	87.73	30.08	34.29
	6	8.0	35	61.38	20.55	33.48
	7	8.6	70	44.82	26.31	58.70
	8	7.5	160	39.12	15.39	39.34
	9	6.7	130	41.30	15.34	37.14
	10	6.8	300	39.12	15.99	40.87
	11	5.0	100	32.03	10.83	33.81

表 2. 直径と重量

系統名	株No.	各重量g (除根頭部)		φ 0.5cm以上の 比率(%)
		φ 0.5cm以上	φ 0.5cm未満	
GuIV2	1	5.90	14.03	29.6
	2	4.89	16.28	23.1
	3	3.91	13.73	22.2
GuIV1	4	7.62	7.80	49.4
	5	4.01	20.11	16.6
	6	0.91	15.35	5.6
	7	8.48	13.12	39.3
	8	0.93	10.57	8.1
	9	0.65	11.00	5.6
	10	3.91	9.08	30.1
	11	1.51	6.33	19.3

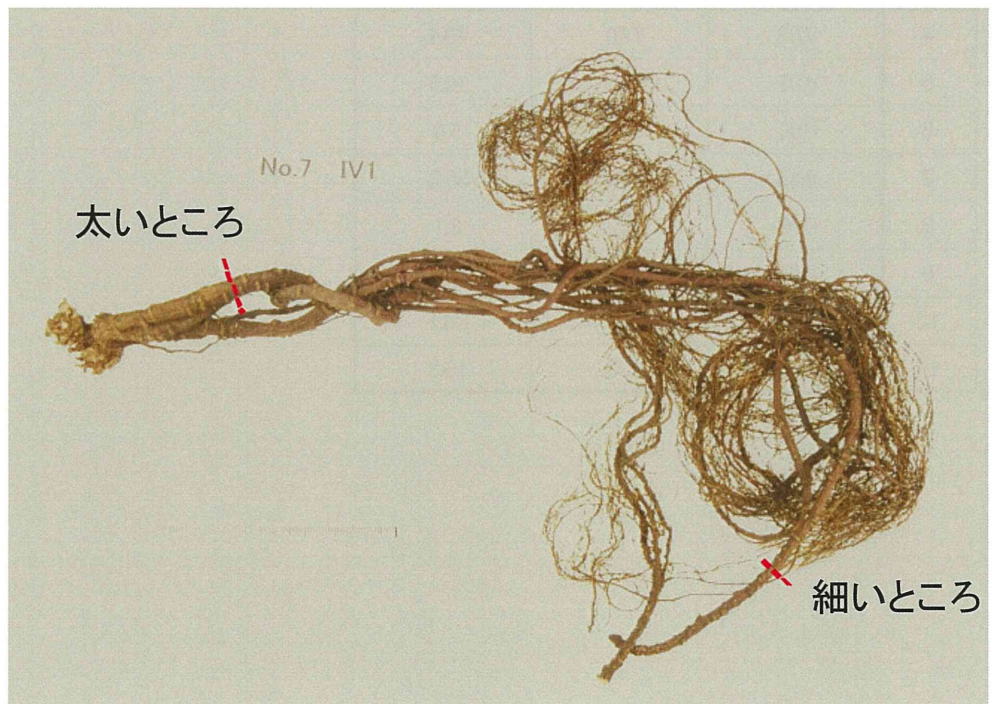
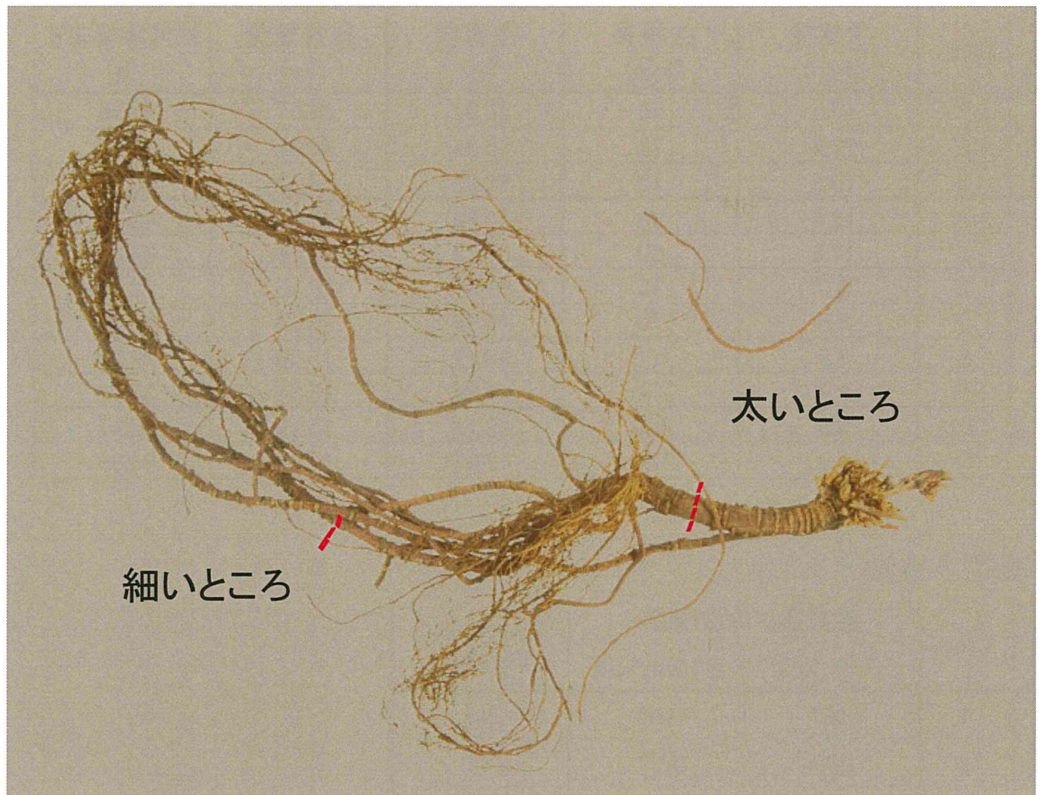
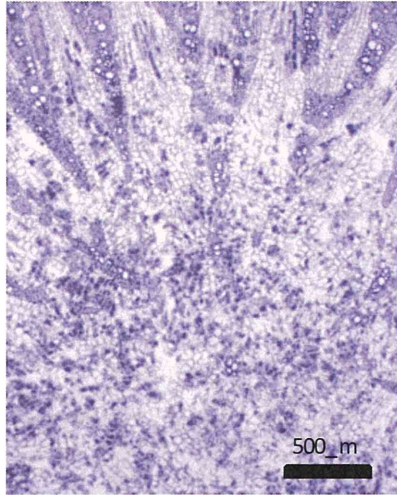
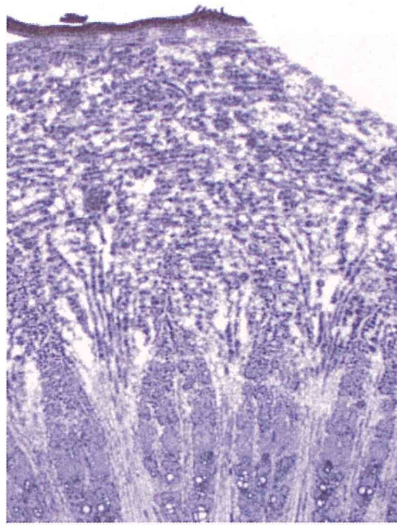


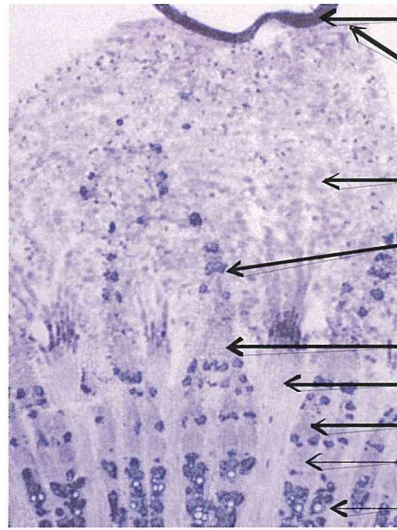
図1. 水耕栽培品カンゾウの外部形態及び内部形態の調査場所



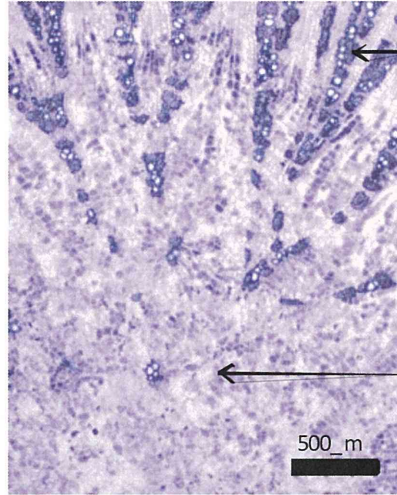
図 2. 野生品カンゾウの外部形態



横切片全体(未漂白)

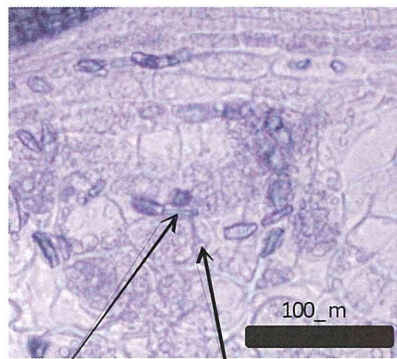


- ← コルク層
- ← コルク皮層
- ← 皮部繊維束
- ← 師部繊維群
- ← 退廃師部
- ← 放射組織
- ← 師部
- ← 形成層
- ← 道管



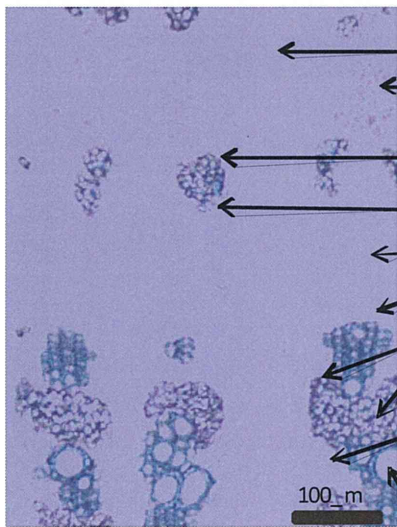
- ← 木部繊維
- ← 柔組織

横切片全体(漂白)



- ← シュウ酸カルシウム単晶
  - ← でんぷん粒
- 表皮付近

100\_μm

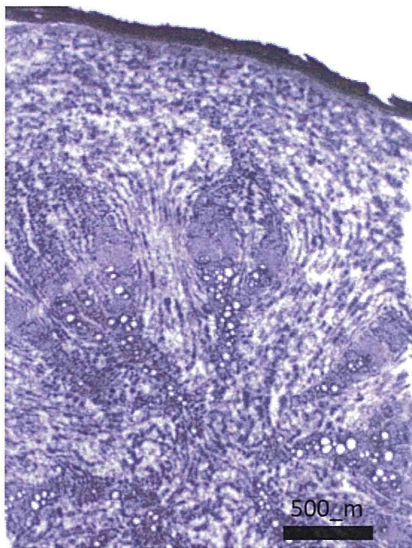


- ← 放射組織
- ← 退廃師部
- ← 師部繊維群
- ← 結晶細胞列
- ← 師部
- ← 形成層
- ← 結晶細胞列
- ← 木部繊維
- ← 木部柔組織
- ← 道管

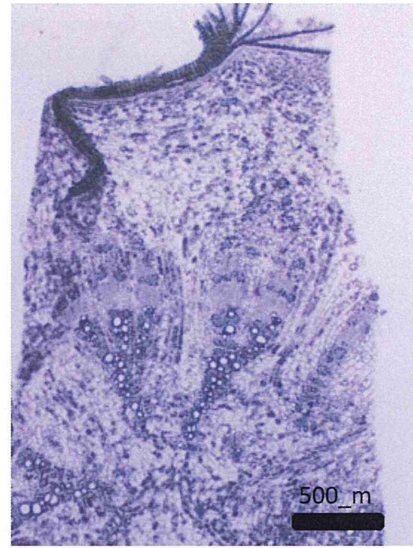
形成層付近

100\_μm

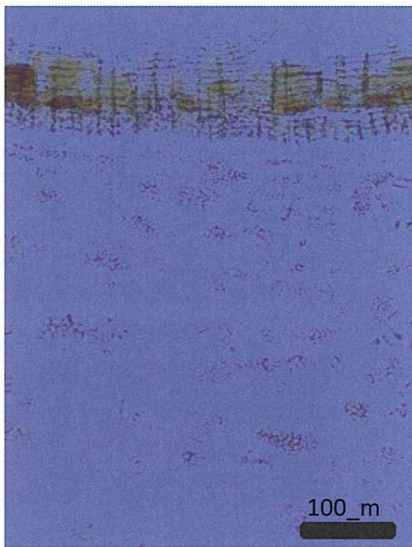
図3. No.1 IV2 (太いところ)



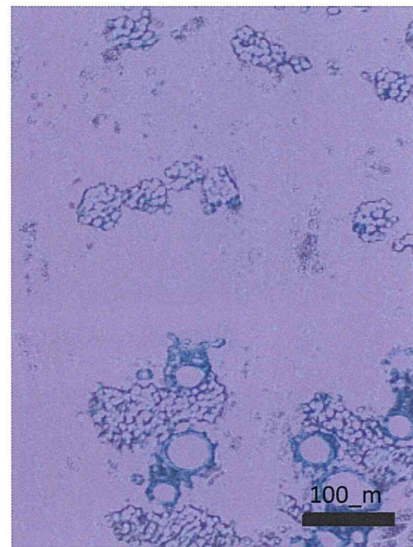
横切片全体(未漂白)



横切片全体(漂白)

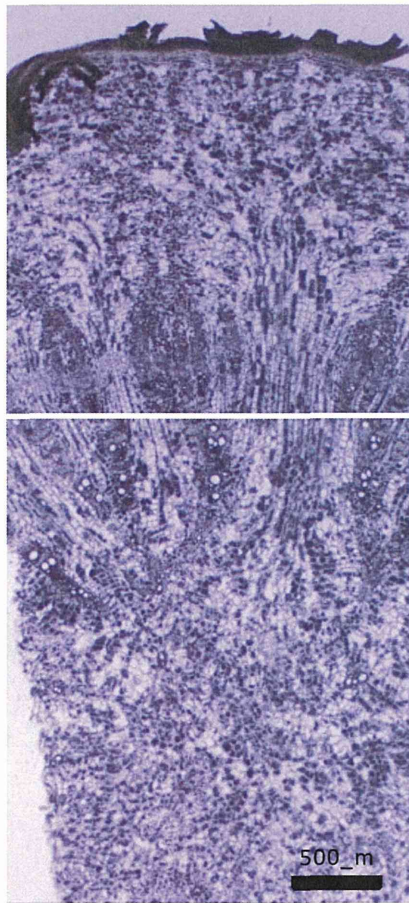


表皮付近

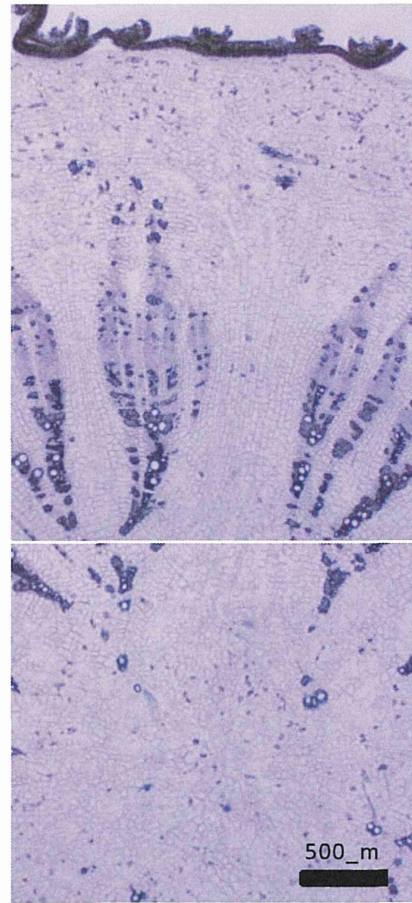


形成層付近

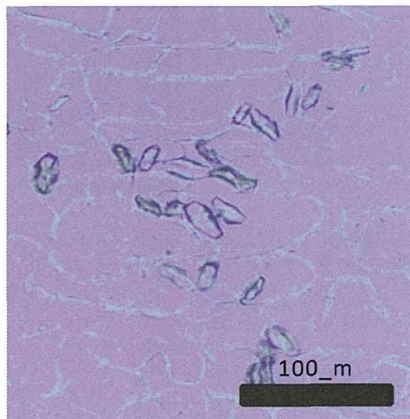
図 4. No.1 IV2 (細いところ)



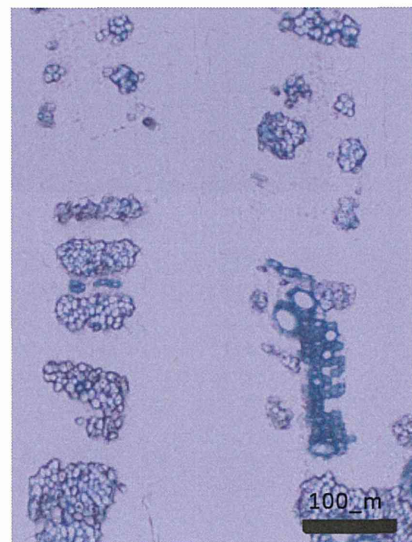
横切片全体 (未漂白)



横切片全体 (漂白)

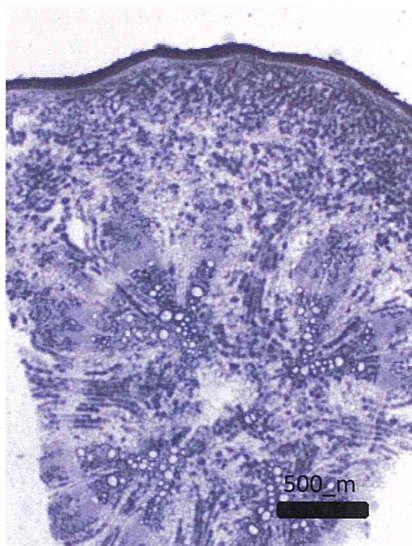


皮部柔組織中のシュウ酸カルシウム単晶

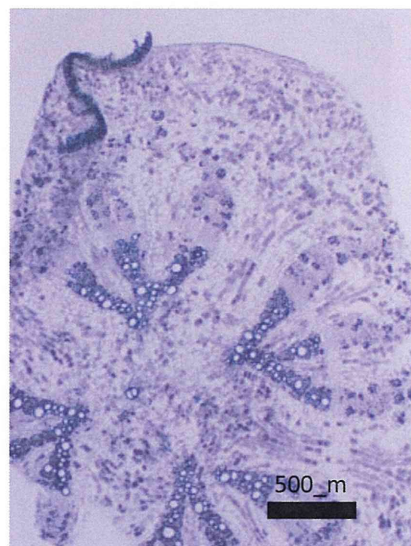


形成層付近

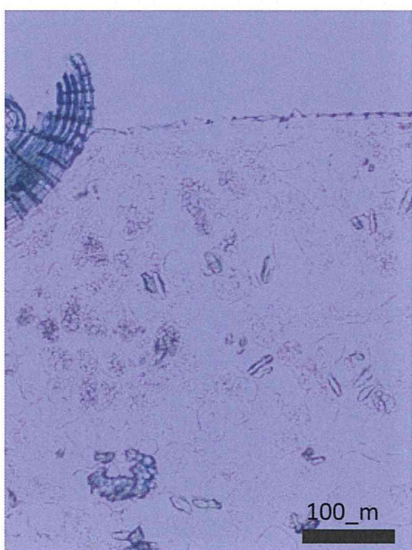
図 5. No.7 IV1 (太いところ)



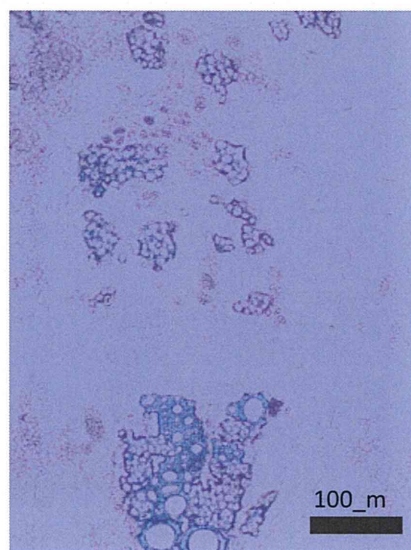
横切片全体(未漂白)



横切片全体(漂白)



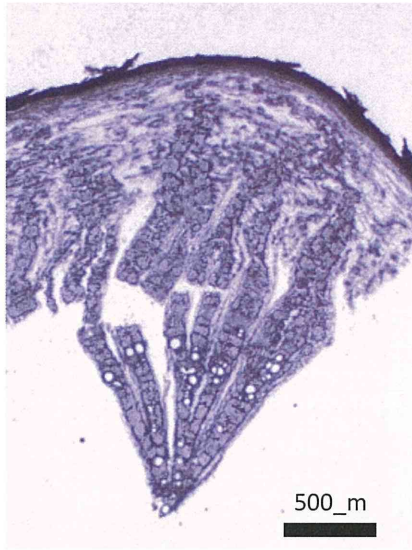
表皮付近



形成層付近

図6. No.7 IV1 (細いところ)

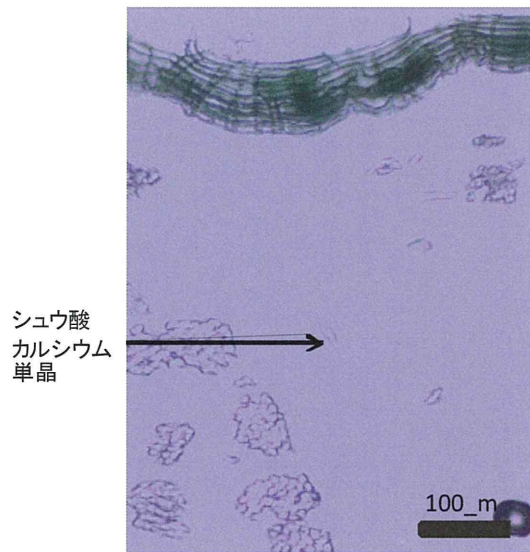




横切片全体(未漂白)



横切片全体(漂白)



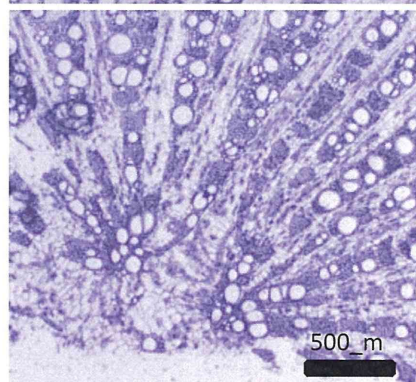
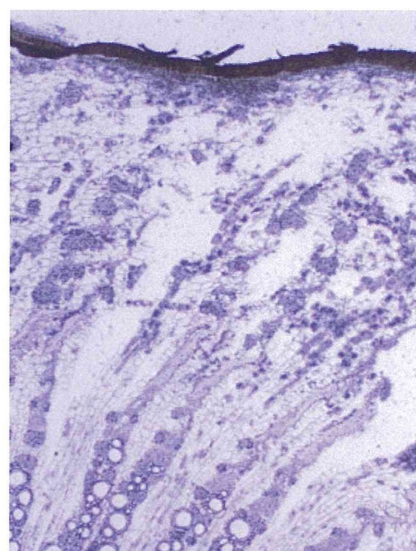
シュウ酸  
カルシウム  
単晶

表皮付近

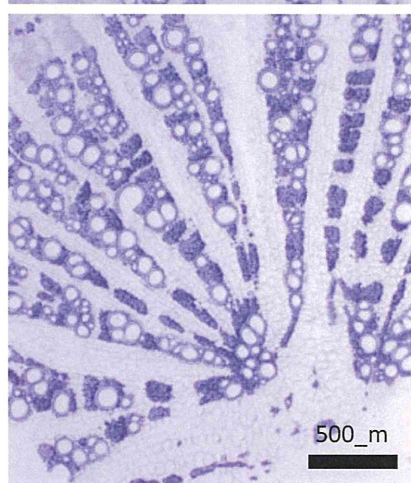


形成層付近

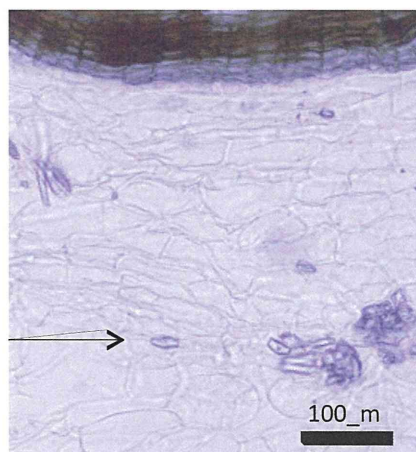
図7. 野生甘草 (N I B-0003)



横切片全体(未漂白)

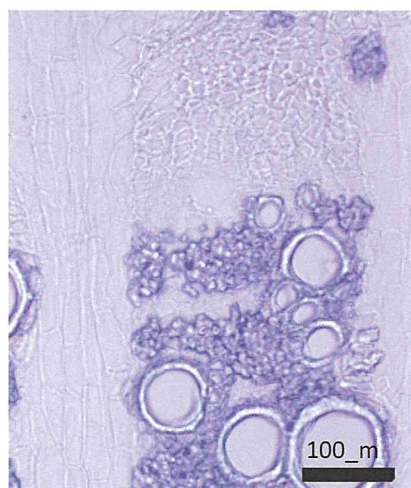


横切片全体(漂白)



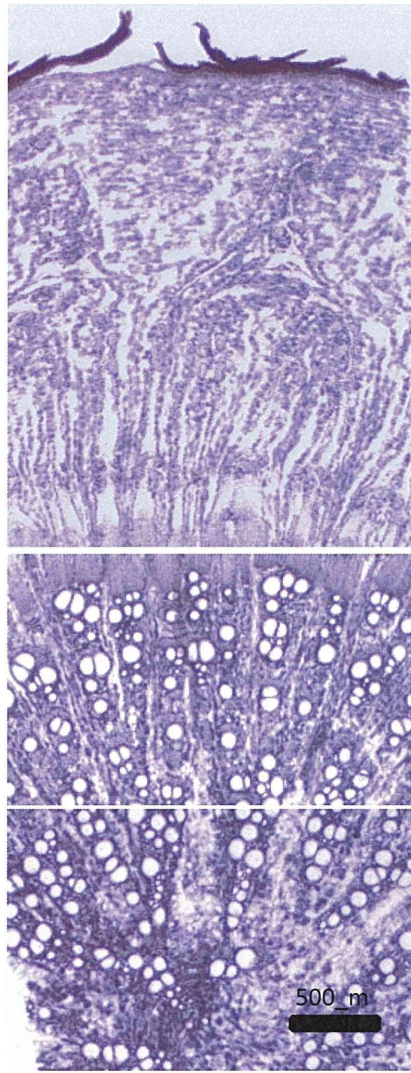
シュウ酸  
カルシウム  
単晶

表皮付近

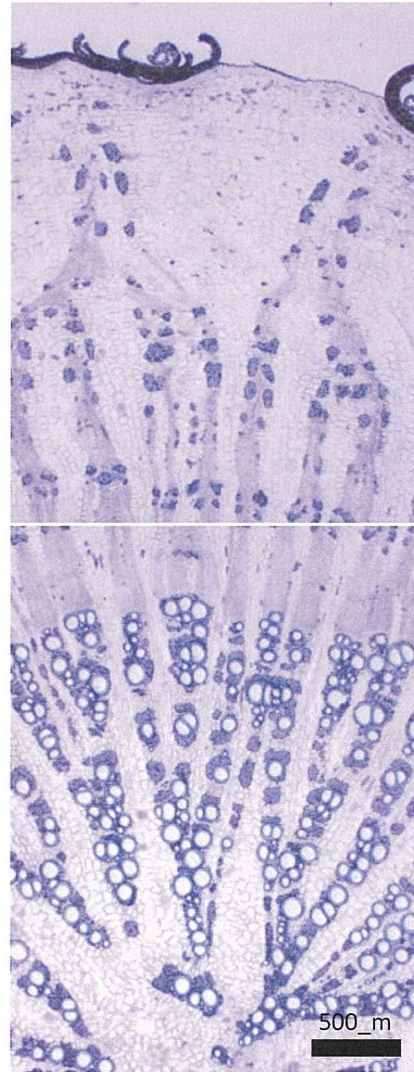


形成層付近

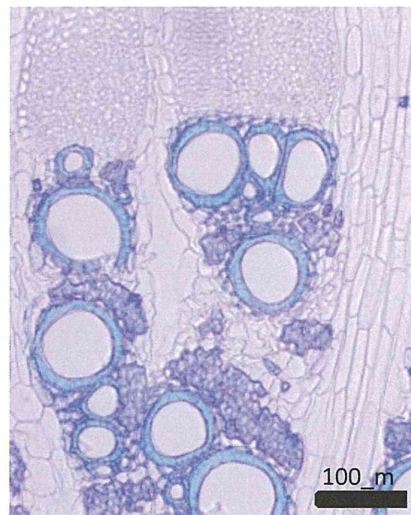
図8. 野生甘草 (N I B-0007)



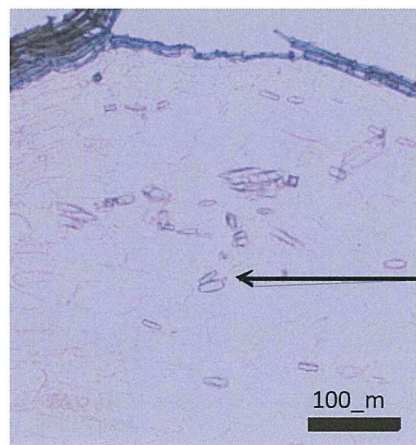
横切片全体(未漂白)



横切片全体(漂白)



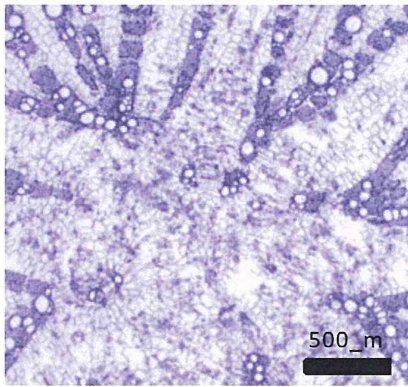
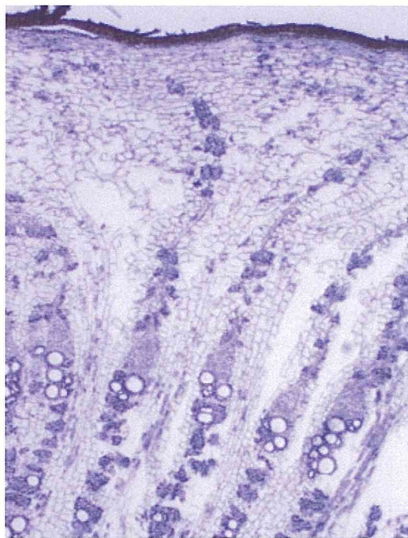
形成層付近



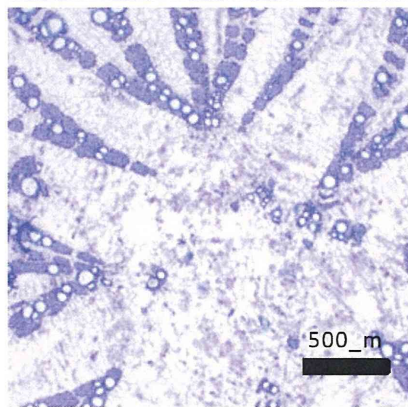
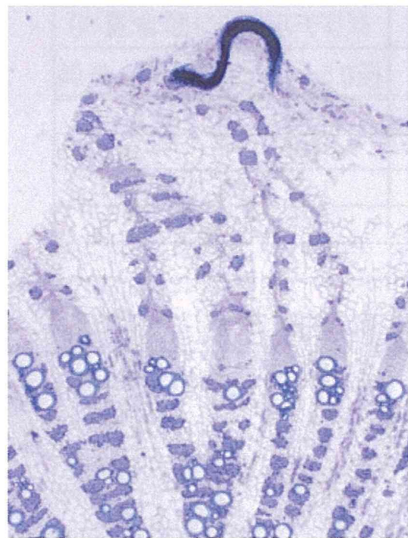
シュウ酸  
カルシウム  
単晶

表皮付近

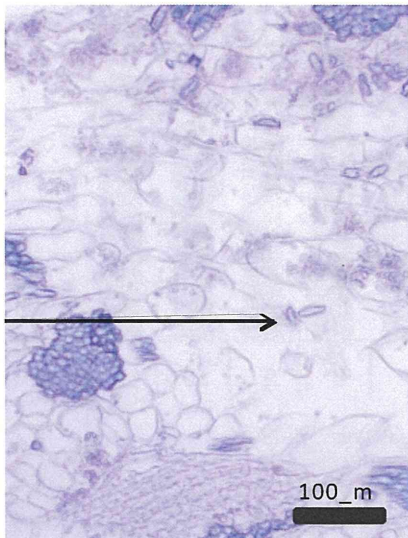
図9. 野生甘草 (N I B-0074)



横切片全体 (未漂白)



横切片全体(漂白)

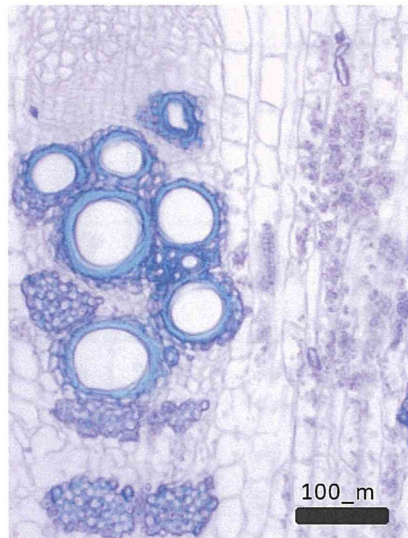


シュウ酸  
カルシウム  
単晶



100\_μm

表皮付近



100\_μm

形成層付近

図10. 野生甘草 (N I B-0176)