

は 1.5 mL の PP チューブに入れ凍結保存した。

4. 脳内モノアミンの抽出・測定

嗅球画分を試料として DA, DOPAC の抽出をエイコム社のモノアミン抽出方法に従い実施した。測定は ECD-HPLC (電気化学検出器-HPLC) を用いて DA, DOPAC の標準品を用いた検量線作成後、嗅球抽出液を測定した。

5. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスへの影響

5-1. 被験薬の調製

Nomifensine maleate (ノミフェンシン; Research Biochemicals International, MA, USA) を用いた。これらの試薬は生理食塩液に溶解し、実験に供した。

5-2. 投与実験

4-5 週齢の雄性 ddY 系マウスあるいは C57BL/6 を日本 SLC より購入し実験に用いた。動物実験室にて 1 週間の馴化後、4 匹ごとに対照群 (Control)、嗅覚障害 (OBL) 対照群、ノミフェンシン投与 + 嗅覚障害群 (NOM+OBL) に分けた。

5-3. 記憶学習試験

OBL 処置 72 時間後に Step-through 型受動的回避学習試験装置を用い獲得試行を行った。電気刺激の強度は予備実験より 0.5mA, 3.2sec と設定した。獲得試行 24 時間に記憶保持能の測定を行った。5 分間 (300sec) を観察時間としてそれ以降はカットオフした。

C. 結果

1. 記憶学習試験結果

昨年度に報告した結果と同様に、OBL-コントロールマウスは経日的に反応潜時の短縮傾向がみられた。一方、嗅覚障害マウスに KSS,あるいは UKT を投与した群では反応潜時の短縮が認められなかった。本年度は ddY マウス, C57BL/6 マウスで検討したが同じような結果になり種差は認められなかった。嗅覚障害により種差なく受動的回避学習試験では記憶学習能の低下が認められることを確認した。

なおオープンフィールドを用いた自発運動量を測定した結果では、群間での相違はなく、鎮静などによる影響ではないと考えられた。

2. 温経湯の後投与実験

嗅覚障害後に UKT を摂取させたマウスにおいても、嗅覚障害による反応潜時の低下を抑制した。この結果は、予防的な前投与だけでなく、治療的な意義も示唆する成績であった。

(図1)

嗅球はドーパミン神経系が有意なことが分かっているため、DA, DOPAC 量の変動に着目し検討した。DA では漢方薬投与で含量の増加傾向が観察された。DOPAC では OBL で低下し、これに対して漢方薬投与で低下の抑制傾向が示された。

3. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスの記憶学習能への影響

図2に示したような実験プロトコールで、嗅覚障害の 30 分前にノミフェンシンを腹腔内投与した。ノミフェンシン濃度と投与タイミングはドー

パミン再取り込み部位での
6-hydroxydopamine の阻害実験より求め 5.0
mg/kgとした。(図2)

嗅覚障害で記憶学習能の低下が見られたが、
ドーパミン再取り込み阻害剤のノミフェンシンを
嗅覚障害前に投与した場合には、反応潜時の
延長が観察された。(図3)

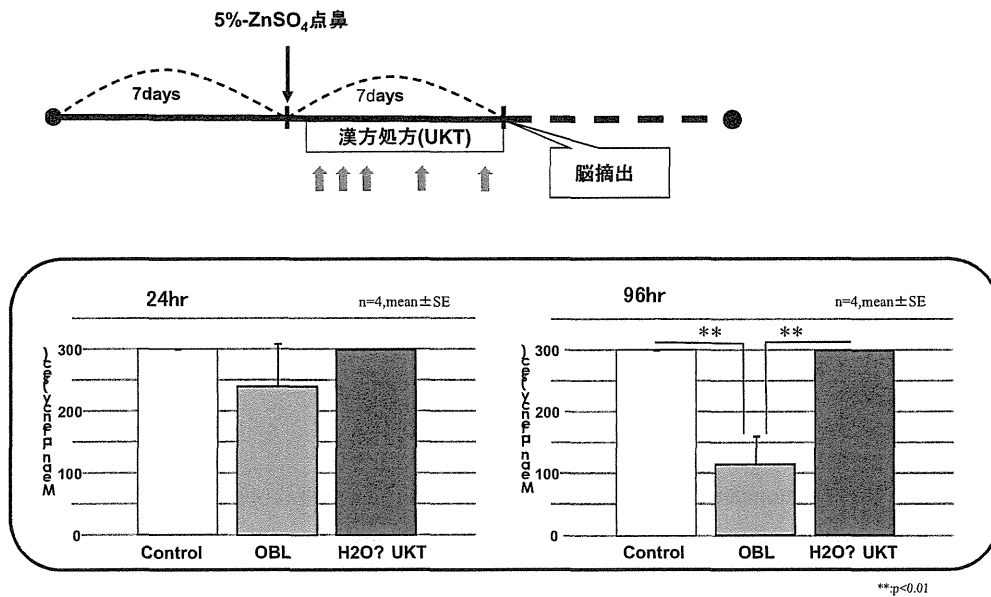


図1. 嗅覚障害モデルマウスへの漢方薬の後投与による記憶保持能の変化

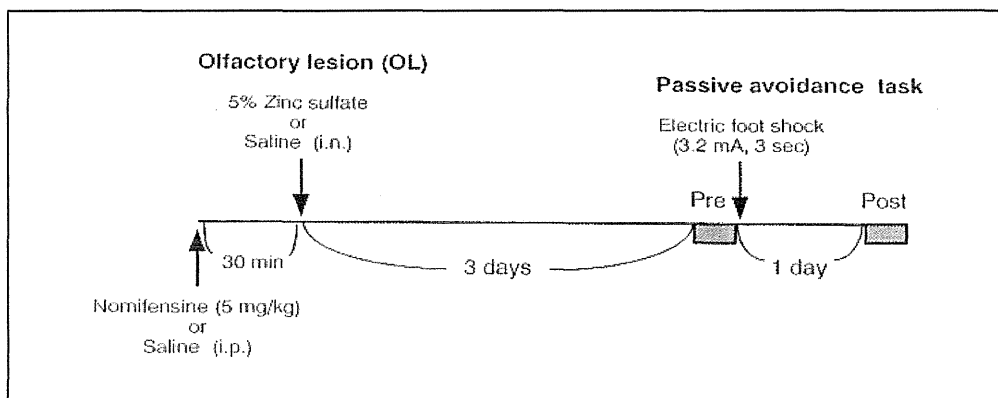


図2. Experimental design for testing the effects of nomifensine pretreatment on peripheral olfactory lesion-induced changes in the passive avoidance task in mice.

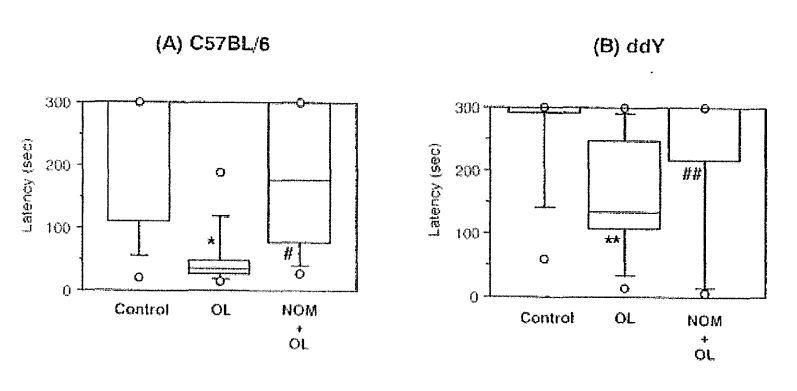


图3. Effects of nomifensine (NOM) pretreatment on peripheral olfactory lesion (OL) - induced impairment of passive avoidance task in C57BL/6 (A: n=9-11) and ddY mice (B: n=9-11). Nomifensine maleate (5 mg/kg) or saline was injected i.p. 30 min before intranasal irrigation with 5% zinc sulfate solution or saline. Three days later, passive avoidance acquisition trials were performed. ** p<0.01, *p<0.05 vs control, ## p<0.01, # p<0.05 vs OL

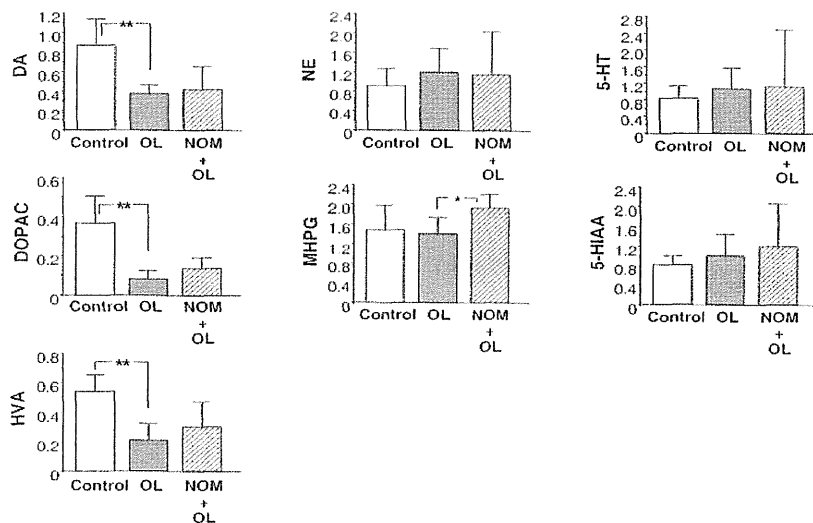


图4. Effects of nomifensine (NOM) pretreatment on peripheral olfactory lesion (OL) - induced monoamines changes in C57BL/6 mice olfactory bulb (p mol/mg tissue). Control; saline pretreatment (-30 min, i.p.) + saline irrigation, OL; saline pretreatment (-30 min, i.p.) + zinc sulfate irrigation, NOM+OL; nomifensine maleate pretreatment (-30 min, i.p.) + + zinc sulfate irrigation. ** p<0.01, *p<0.05 vs control

5. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスの脳内モノアミン類の変化

嗅球中の DA, DOPAC 量は OBL で低下した。しかしノルアドレナリンやセロトニン系の神経伝達物質の変化は認められなかった。これに対するノミフェンシン前投与では、これら DA, DOPAC, HVA (homovanillic acid) などの低下には影響しなかった。MHPG (3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol) で増加が観察された。(図4)

D. 考察と結論

記憶学習試験より嗅覚障害(OBL)により記憶学習試験記憶保持能低下が認められた。これに対し、漢方処方剤の経口投与は反応潜時が延長され、記憶保持能の低下を抑制した。経目的にも低下を抑制することが確認できた。温経湯では、OBL 処置後投与においても記憶保持能を改善することが示された。

嗅球での DA, DOPAC 含量は、OBL により DOPAC の減少が認められたが、DA では認められなかった。しかし、漢方処方投与により含量の増加あるいは減少抑制が示唆された。今後、未測定試料を測定し、解析する必要があると考えている。また対照群に対する漢方処方を投与時の影響も検討する必要があると考えられる。

昨年度は、カルノシンは神経細胞保護の作用を示し、ドーパミン神経系の制御に重要な役割を担っていることを示した。これらは嗅覚が感情や記憶形成機能に深く関わっていることを示唆している。本年度は、このような嗅覚障害が種差にかかわらずに惹起されること、嗅

覚への入力刺激が感情や記憶形成に重要であることを示した。特にノミフェンシン投与では自発運動量に顕著な影響を及ぼさなかったことから、嗅覚障害が記憶学習能へ影響していると考えられる。

一方、ドーパミン系神経系への影響を、神経伝達物質を指標に検討したが、ノミフェンシン投与ではドーパミン含量などの低下を抑制せず、顕著な影響を与えなかった。このことは、記憶学習能には嗅覚のドーパミン系神経系が唯一関与しているわけではないことを示唆する。ノミフェンシンにより、大脳辺縁系、アミグダラ、海馬、視床下部などにおける変容を抑制したと考えられる。

臨床比較試験において、現代薬は実薬とプラセボの作成は、カプセルや錠剤といった剤形を選択でき、患者に判別出来ない製剤を比較的容易に作成できる。漢方薬はエキス製剤であることが多く、実薬とプラセボの作成は容易ではない。特に嗅覚はその識別能力は味覚に比べて数段に高く、プラセボ投与の際に与えている影響は少なくない。ヒトにおいても実薬とプラセボの識別を無意識下にも行い、結果に影響する可能性も考慮される。

これら一連の研究より、感覚器障害により高次中枢機能の変化が惹起されること、その背景にはドーパミン神経系やカルノシンなどの化学物質が関与することなどを明らかにしたが、嗅覚系は感情や記憶形成に重要な役割を果たしていることがわかった。また、このような嗅覚障害モデル動物は実薬およびプラセボの差

について、生物学的力価の評価法になる可能性が考えられた。

加えて、嗅覚障害という疾患やそれに伴う症状の改善に、漢方薬投与は有効な治療法となる可能性があることを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 国際学会

なし

2. 国内学会

1. 鳥居塚和生:嗅覚障害モデルマウスに対する漢方処方の影響, 日本生薬学会第58回年会, 2011.09.24-25, 東京

2. Mizowaki M, and Toriizuka K.: Pretreatment with nomifensine protects from the impairment of passive avoidance task induced intranasal irrigation with zinc sulfate in mice. Pharmacology Biochemistry and behavior, (under preparation)

3. Mizowaki M, and Toriizuka K.: L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine)-induced stereotypy in mice, Neuroscience Letter, , (under preparation)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金（認知症対策総合研究事業）

分担研究報告書

抑肝散プラセボ分析に関する研究

—抑肝散プラセボの化学分析評価に関する研究—

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

本研究では、漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第2相試験として実証することを到達目標としている。今回我々は、抑肝散エキスの LC-NMR-MS を用いた化学分析を継続するとともに、2009 年に新規開発された「抑肝散」プラセボについて、日本薬局方収載確認試験法に関する評価の一環として TLC を用いた化学分析を行い、両者の成分比較を行った。

この結果、グリチルリチン酸標準品と抑肝散の LC-NMR-MS の比較から、抑肝散エキスにはグリチルリチン酸が確実に存在していることが確認された。

また、TLC による検討では、抑肝散エキスとそのプラセボ薬について成分比較を行なった。その結果プラセボ薬には目立った成分は含まれず、実薬には広範囲の極性に多くの成分が認められた。

研究協力者

淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研究所筑波研究部栽培研究室長

赤木謙一 独立行政法人医薬基盤研究所共用機器実験室副室長

あたる家族は自らの生活の質を犠牲にしなが
らその精神的・肉体的負担は計り知れない。
認知症において従来研究者が注目してきた
のは主として中核症状であるが、実際患者を
介護する家族にとって最も深刻な問題となる
のは精神症状や問題行動、すなわち幻覚、妄想、
脱抑制、昼夜逆転、徘徊、易興奮性、介護
への抵抗、暴言、抑うつ、意欲障害、不安、
焦燥などの周辺症状である。これらの周辺症
状に対して今日では Behavioral and
Psychological Symptoms of Dementia (BPSD)

A. 研究目的

アルツハイマー病は人生の収穫期とも言う
べき晩年において、人間らしく生きるための
様々な生活機能を奪い取り、アルツハイマー
病の発症は実社会との決別を意味し、介護に

という用語が用いられている。BPSD は介護負担感を増強する大きな要因であり、さらに重い介護負担感、介護者のうつ傾向を一層助長することが知られている。認知症患者を抱える家族の介護負担の軽減を計るにはまずこの BPSD への対策が第一となる。本研究では漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第 2 相試験として実証しようとするものである。認知症における抑肝散の有効性と安全性を報告した研究は多いが、これまではプラセボが開発されなかったため、プラセボを比較対照として検証したエビデンスレベルの高い研究は皆無であった。

2009 年、(株)ツムラから抑肝散のプラセボの作成に成功したことが初めて報じられた。本研究では昨年度に引き続き両者の成分比較を目的として、特に抑肝散に含まれる生薬の内、多くの漢方処方に用いられている甘草の主成分であるグリチルリチン酸が抑肝散中での程度検出されるかを物理化学的手法である LC-MS/NMR (loop-storage) 法及び LC-MS-SPE/NMR(SPE)法を用いて確認した。

また我々は、昨年度 GCMS を用いて実薬とプラセボ薬との比較を行なった。その結果、プラセボにはステアリン酸、パルミチン酸と推定される脂肪酸が多く含まれていることが確認された。抑肝散には同様にステアリン酸、パルミチン酸と思われるピークも確認されたが、生薬由来と思われるいくつかのピークを確認した。特に hinesol、eudesmol と推定される成分が検出され、これらは本来ソウジュツの成分と

考えられた。

一方、日局に掲載されている生薬は、確認試験において TLC を用いた生薬特異的成分の定性試験を行っている。そこで今回は生薬特異的成分の評価の一環として TLC を用いた化学分析を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

抑肝散エキス(臨床研究用)及びプラセボ(臨床研究用)は株式会社ツムラより入手した。

2. 装置

1) LC-NMR-MS による検討

LC-NMR-MS の測定に関して、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、カラムオープンとして 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・L を採用した Cryo-FIT (Bruker) を NMR に装着した。LC-MS-SPE/NMR 法を行うために、SPE (Solid Phase Extraction) 装置として PROSPEKT2 (Spark 社)を用いた。NMR 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 esquireControl version 5.3 (Bruker)、NMR の制御は Topspin 2.0 (Bruker)を用いた。

2) TLC による検討

TLC 画像は、カマグ社製 TLC ビジュアライザーを用いて撮影した。

3. 試薬・試液

1) LC-NMR-MS による検討

LC-MS 測定溶媒は、MilliQ 水、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO., INC) を用いた。NMR 測定には、重水化アセトニトリル(99.9%, ATOM % D, ISOTEC inc.)を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。

2) TLC による検討

用いた標準物質は以下のとおりである。

- ①リキリチン(和光純薬)
- ②サイコサポニン A(和光純薬)
- ③サイコサポニン B2(和光純薬)
- ④サイコサポニン D(和光純薬)
- ⑤リンコフィリン(和光純薬)
- ⑥グリチルリチン酸(日本公定書協会)

4. 試料の調製

1) LC-NMR-MS による検討

抑肝散エキス試料10mgをはかり取り、milliQ 水1 mLに懸濁し、ボルテックスにて30 min 攪拌した。その後13000 rpmにて遠心後、沈殿を除去した。上記ボルテックス、遠心操作を計三回繰り返し、沈殿を除去した。その後、0.2・ μ mのフィルターに通した。グリチルリチン酸試料は水への可溶性が低いので、500・gを250・Lの

MilliQ水と50・LのCD₃CNの混合溶液に可溶化させた。ボルテックスにて30 min間攪拌した。その後13000 rpmにて遠心後、沈殿を除去した。その後、0.2・ μ mのフィルターに通した。

2) TLC による検討

実薬及びプラセボを各1g正確に量り、乳鉢にてすりつぶした。これを遠沈管に入れ、メタノール1mL を加え、振とう器にて 10 分間振とうした。その後、遠心機にて 2000 rpm にて 20 分遠心した。上澄み液をとり、TLC に供した。

標準物質については、濃度が 1mg/mL になるように 70%メタノールで溶かしたものを TLC に供した。

5. 測定方法

1) LC-NMR-MS による検討

LC 測定条件: 移動相は、(A) D₂O, (B) CH₃CNを用いた。(A) 95%から 15 min で、(A) 30%までリニアグラジエントを行い、20 min から 25 min (A) 0%にて送液した。流速は 1 mL/min で行った。カラムは YMC-Triart C18 4.6 X 150, 粒子径(5・ μ m) 細孔径 (10・ μ m)を用いた。UV 観測波長は 210 及び 254nm、カラム温度は 40°Cに設定した。試料注入量は抑肝散、グリチルリチン酸それぞれで 25・L、10・L (20・g 相当) で行った。

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(BPC) 信号を用いてグリチルリチン酸由来の信号を検出し、Hystar3.2 ソフトウエ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、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表2にまとめた。表2中のNS(積算回数)、RG(レシーバーゲイン)、SPNAM6(溶媒除去用シェイブドパルス)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。

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・L/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表1にまとめた。

2) TLCに関する検討

実薬、プラセボ、標準物質について、各5 μ Lずつスポットした。

尚、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。

C. 研究結果

1) LC-NMR-MSによる検討

グリチルリチン酸についての構造と化学量について図1に示した。グリチルリチン酸の標準品を軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図2に示した。図2-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図2-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間11.0 minにおいて溶出した化

合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、435.4, 453.4, 471.4, 647.4, 823.4, 845.4 m/zの値を得た。矢印は各値との差のm/z値を示した。抑肝散を軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図3に示した。図3-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図3-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間7.9 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、453.4, 471.4, (487.2), (512.2), (579.3), 647.4, (677.3), (711.3), (752.3), 823.4, 845.4 m/zの値を得た。括弧はグリチルリチン酸標準品には確認されなかったMS値を示す。グリチルリチン酸の標準品を重水(D₂O)-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図4に示した。図4-AはUV(210nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図4-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間12.6 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、454.4, 474.4, 652.5, 674.4, 832.5, 853.5, 869.5 m/zの値を得た。抑肝散を軽重水(D₂O)-アセトニトリル移動相によって分析した結果を図5に示した。図5-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図5-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間7.9 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、454.4, 474.4, 652.5, 674.4, 831.5, 853.5, 869.5 m/zの値を得た。軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した分画はSPE法によりNMR測定を行った(図6-Aはグリチルリチン酸標準品、図6-Bは抑肝散のNMRスペクト

ルをそれぞれ示す)。軽水-アセニト移動相の分析系によって分析した分画は SPE 法により NMR 測定を行った(図 6-C はグリチルリチン酸標準品、図 6-D は抑肝散の NMR スペクトルをそれぞれ示す)。

2) TLC による検討

抑肝散エキス、プラセボ及び各種標準物質の各種波長及び試薬噴霧後の TLC チャートを図 7 に示す。抑肝散の組成は、一般的にはビャクジュツ、ブクリョウ、センキュウ、チョウトウコウ、トウキ、サイコ、カンゾウである。しかし、ビャクジュツをソウジュツにかえた処方もあり、前年度の GCMS 検討の結果、本実薬にはソウジュツが使われていると推定された。今回の TLC 検討では、標準品としてカンゾウの成分としてリキリチン、グリチルリチン酸、サイコの成分としてサイコサポニン A、B、B2、チョウトウコウの成分としてリンコフィリンを同時に展開した。

プラセボについては UV 照射下、希硫酸噴霧後加熱下の観察では顕著なスポットを確認するには至らなかった。しかし白色光下において、クロロホルム/メタノール/水混液(6:4:0.8)による展開において R_f 値約 0.3 付近に青色のスポットを認めた。また実薬においては多くのスポットが観察された。リキリチンは希硫酸噴霧後加熱すると UV366 nm 照射下において黄色の蛍光を発するが、実薬において同 R_f 値付近に同様の黄色の蛍光スポットを認めた。

D. 考察

グリチルリチン酸の標準品を軽水-アセニト

移動相の分析系によって分析した結果からグリチルリチン酸と考えられる 823.4 (m/z) の値を得た。グリチルリチン酸の分子量は 822.99 であるので、823.4 (m/z) はグリチルリチン酸の H^+ 付加体であると考えられる。理論的には 823.99 (m/z) になるが、装置の検出感度、分解能等を考慮すると妥当だと考えられる。 Na^+ イオン付加体の場合は、分子量+23(ナトリウム付加)の値で検出されることから、845.4 (m/z) 値は Na^+ イオン付加体だと考えられる(823.4-1+23=845.4)。グリチルリチン酸から構成糖であるグルクロン酸1つが解離した MS 値が 647.4 (m/z) を示し、2つ解離している MS 値が 453.4 (m/z) を示していると考えられる。647.4 (m/z) と 453.4 (m/z) の差は 194 となり、グルクロン酸の分子量と一致する。823.4 (m/z) と 647.4 (m/z) の差は 176 となり、647.4 (m/z) と 471.4 (m/z) の差も同様に 176 となる。図 6-A と図 6-B の NMR スペクトルから、交換性プロトン領域である 3-4ppm の領域にはシグナルが消えている。これは移動相中の deuterium がグリチルリチン酸の交換性プロトンと交換した結果である。図 6-E に図 6-A と図 6-B の重ね合わせのスペクトルを示した。図 6-F に図 6-C と図 6-D の重ね合わせのスペクトルを示した。これから非交換性プロトンのシグナルが確認された。

グリチルリチン酸の標準品を重水(D_2O)-アセニト移動相の分析系によって分析した結果からグリチルリチン酸と考えられる 832.5 (m/z) の値を得た。軽水での分析結果と比較すると、832.5-823.4= 9.1 の差が確認された。グリチルリチン酸には、3 つのカルボン酸と 5

つの水酸基が含まれており、溶媒中の H⁺と可換な H⁺存在部位が 8 箇所存在しているので、8 カ所全てのプロトンが交換した場合には、軽水での MS 値に比べて 8 (m/z) 大きな値がでると予想されたが、1 (m/z) 大きな値が得られた。MS 値の生じ方は軽水分析の場合とよく似ているのでグリチルリチン酸を観測していると考えてよいと思われる。図 6-C,D から、図 6-A,B と比較すると交換性プロトンが観測されており、グリチルリチン酸を観測していると考えられた。

また、TLC による検討ではプラセボにおいて検出された青色のスポットは、展開溶媒及び R_f値から糖質あるいは配糖体と推測された。

E. 結論

本研究では、漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第 2 相試験として実証することを到達目標としている。今回我々は、抑肝散エキスの LC-NMR-MS を用いた化学分析を継続するとともに、2009 年に新規開発された「抑肝散」プラセボについて、日本薬局方収載確認試験

法に関する評価の一環として TLC を用いた化学分析を行い、両者の成分比較を行った。

この結果、グリチルリチン酸標準品と抑肝散の LC-NMR-MS の比較から、抑肝散エキスにはグリチルリチン酸が確実に存在していることが確認された。

また、TLC による検討では、抑肝散エキスとそのプラセボ薬について成分比較を行なった。その結果プラセボ薬には目立った成分は含まれず、実薬には広範囲の極性に多くの成分が認められた。

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. 誌上発表 なし
2. 学会発表等 なし

H. 知的所有権の取得状況

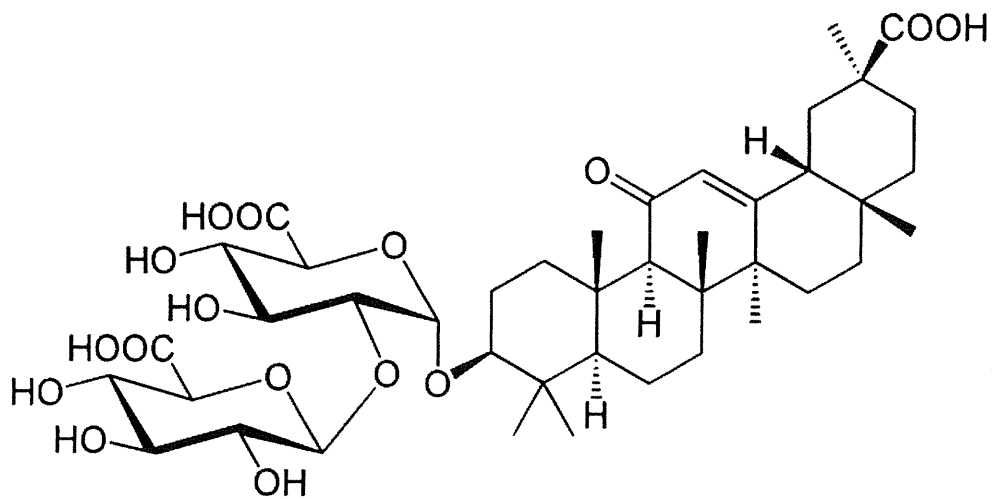
1. 取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 MS 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		

表2 NMR 測定条件

General		NUC1	1H
PULPROG	1c1pncwps	P1 [µs]	10.00
TD	16384	P18 [µs]	100000.00
NS	1024	PL1 [dB]	5.30
DS	4	PL1W [W]	5.47828245
SWH [Hz]	16025.64	SFO1 [MHz]	800.2019942
AQ [s]	0.5112308	SP6 [dB]	53.98
RG	512	SP6W [W]	0.00007425
DW [µs]	31.200	SPNAM6	p_automation
DE [µs]	20.00	SPOAL6	0.500
D1 [s]	3.0000000	SPOFFS6 [Hz]	0.00
D8 [s]	0.1000000	Channel f2	
D11 [s]	0.0300000	NUC2	13C
d12 [s]	0.0000200	PL2 [dB]	0.00
d13 [s]	0.0000040	PL2W [W]	110.27181244
16	30	PL21 [dB]	26.00
17	1	PL21W [W]	0.27699026
TD0	1	SFO2 [MHz]	201.2108424
Channel f1			



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

図1 グリチルリチン酸の化学構造

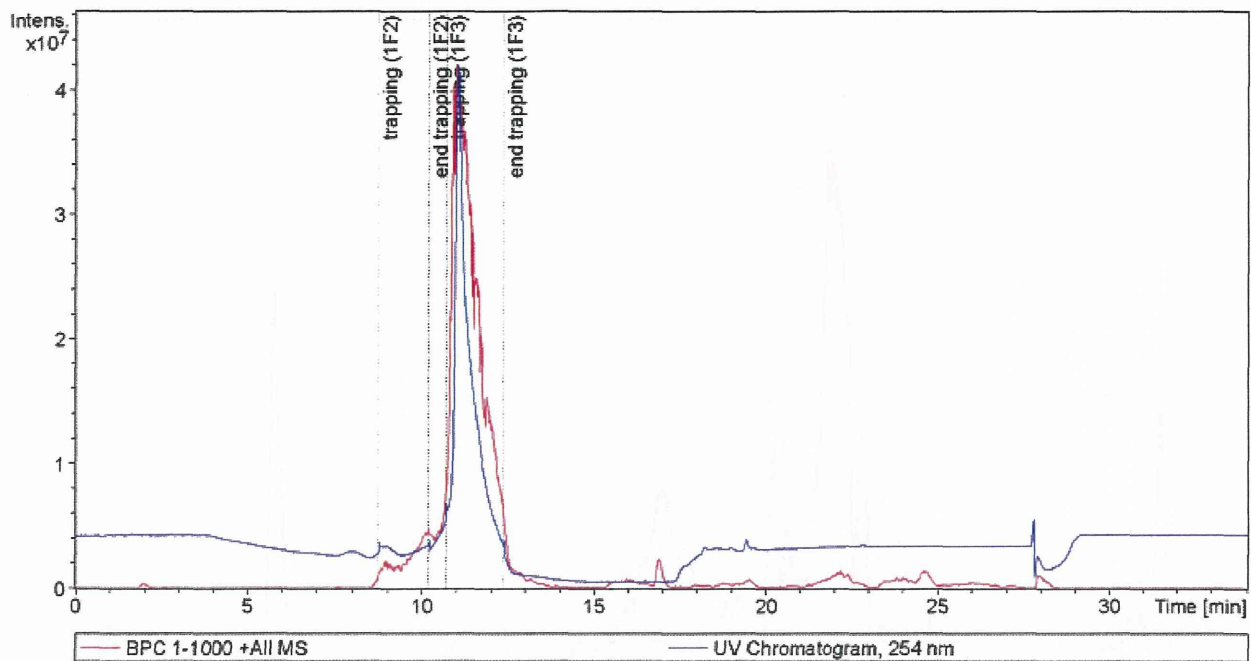


図 2-A グリチルリチン酸標準品の UV, BPC スペクトル

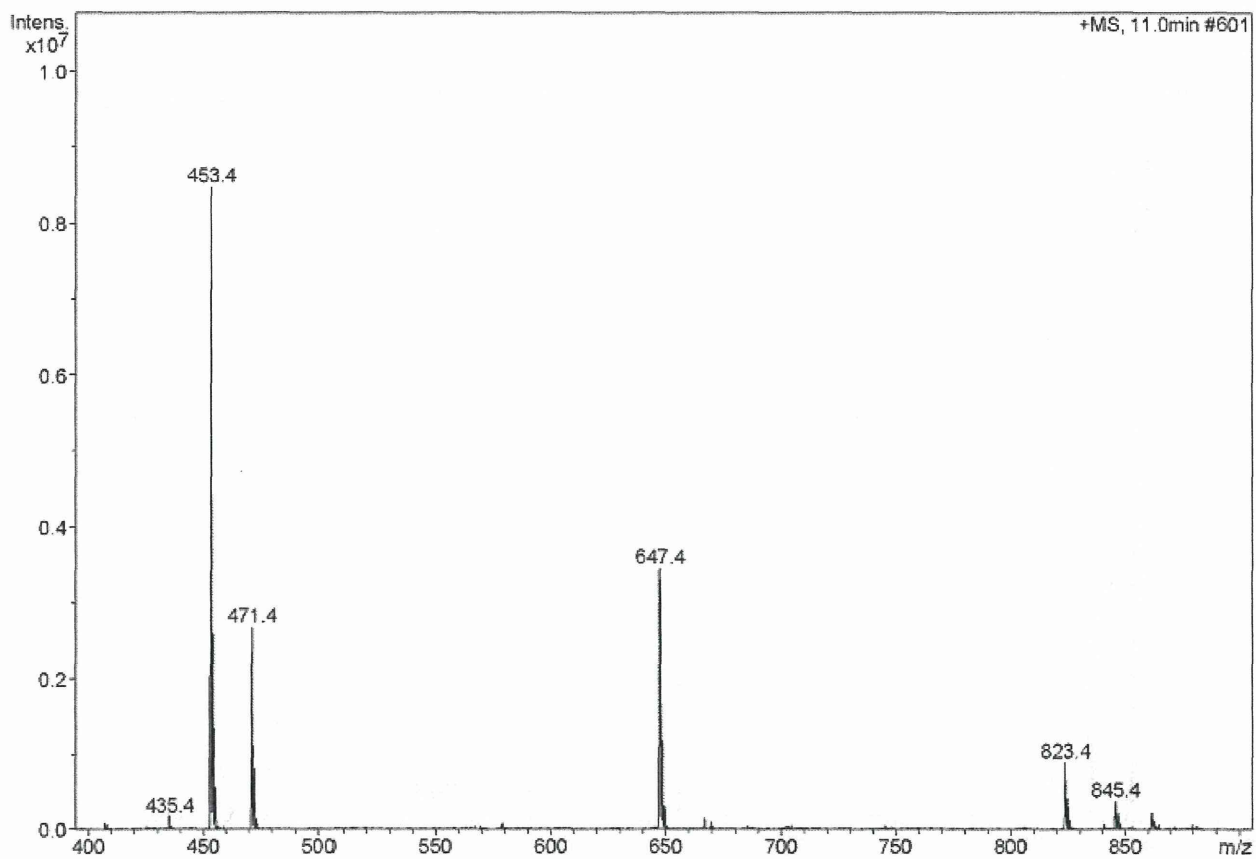


図 2-B グリチルリチン酸標準品主ピークの MS (m/z) 値

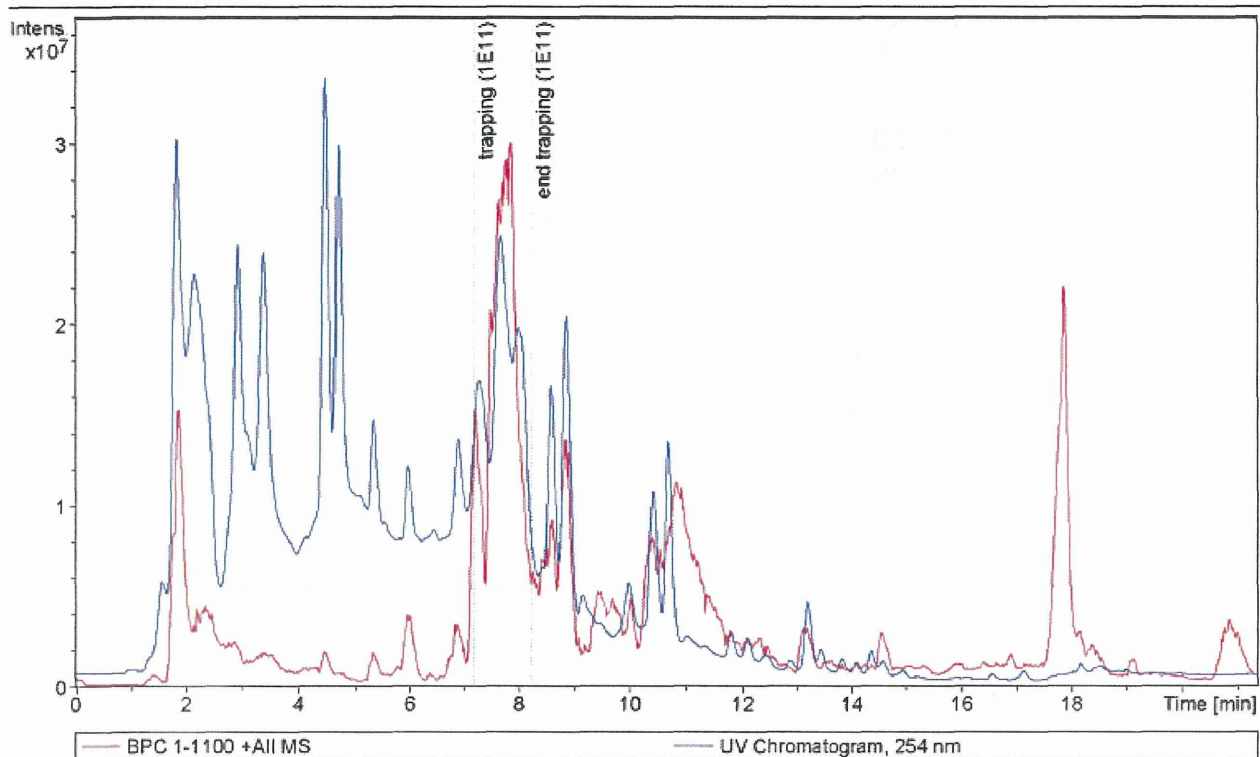


図 3-A 抑肝散エキスの UV, BPC スペクトル

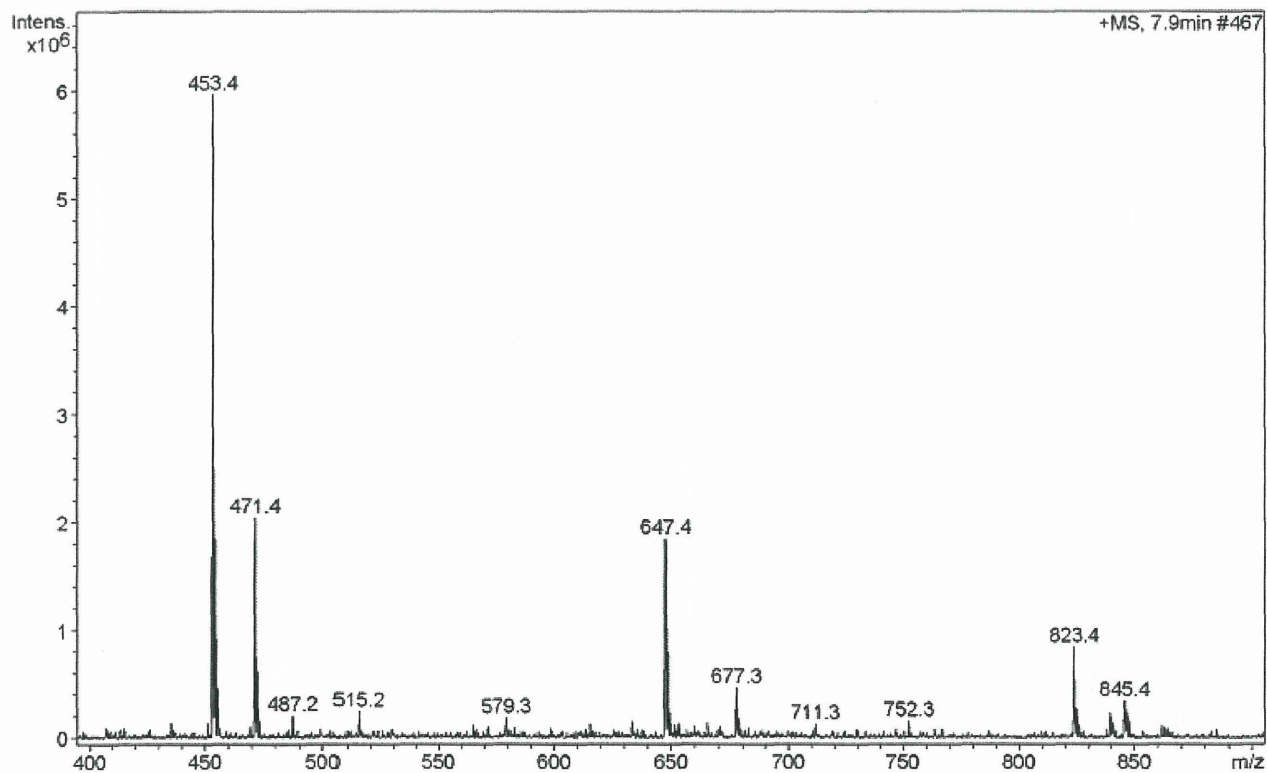


図 3-B 抑肝散エキスの主ピークの MS (m/z) 値

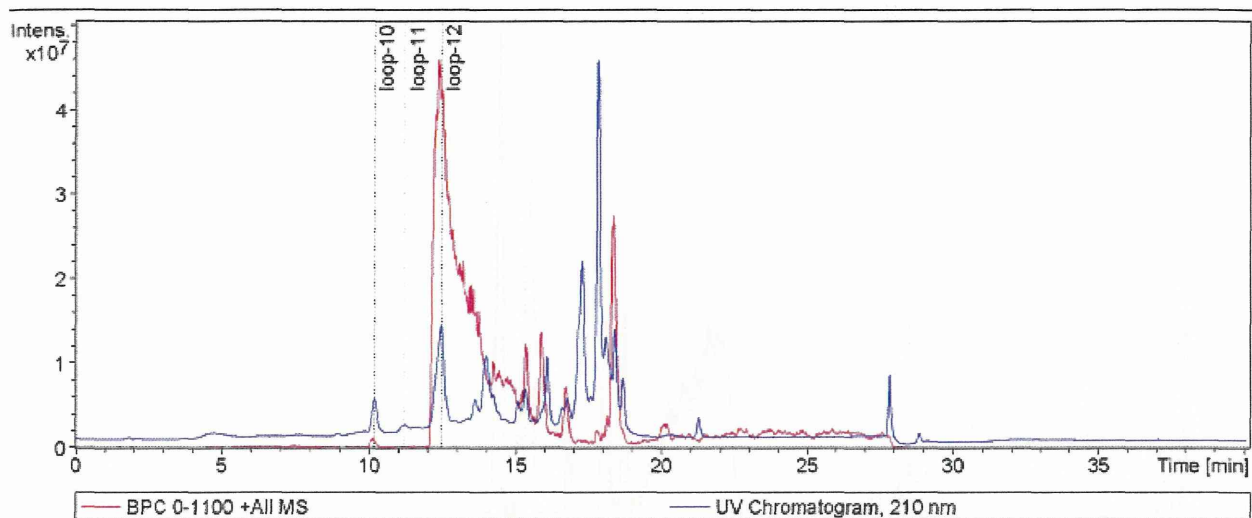


図 4-A グリチルリチン酸標準品の UV, BPC スペクトル

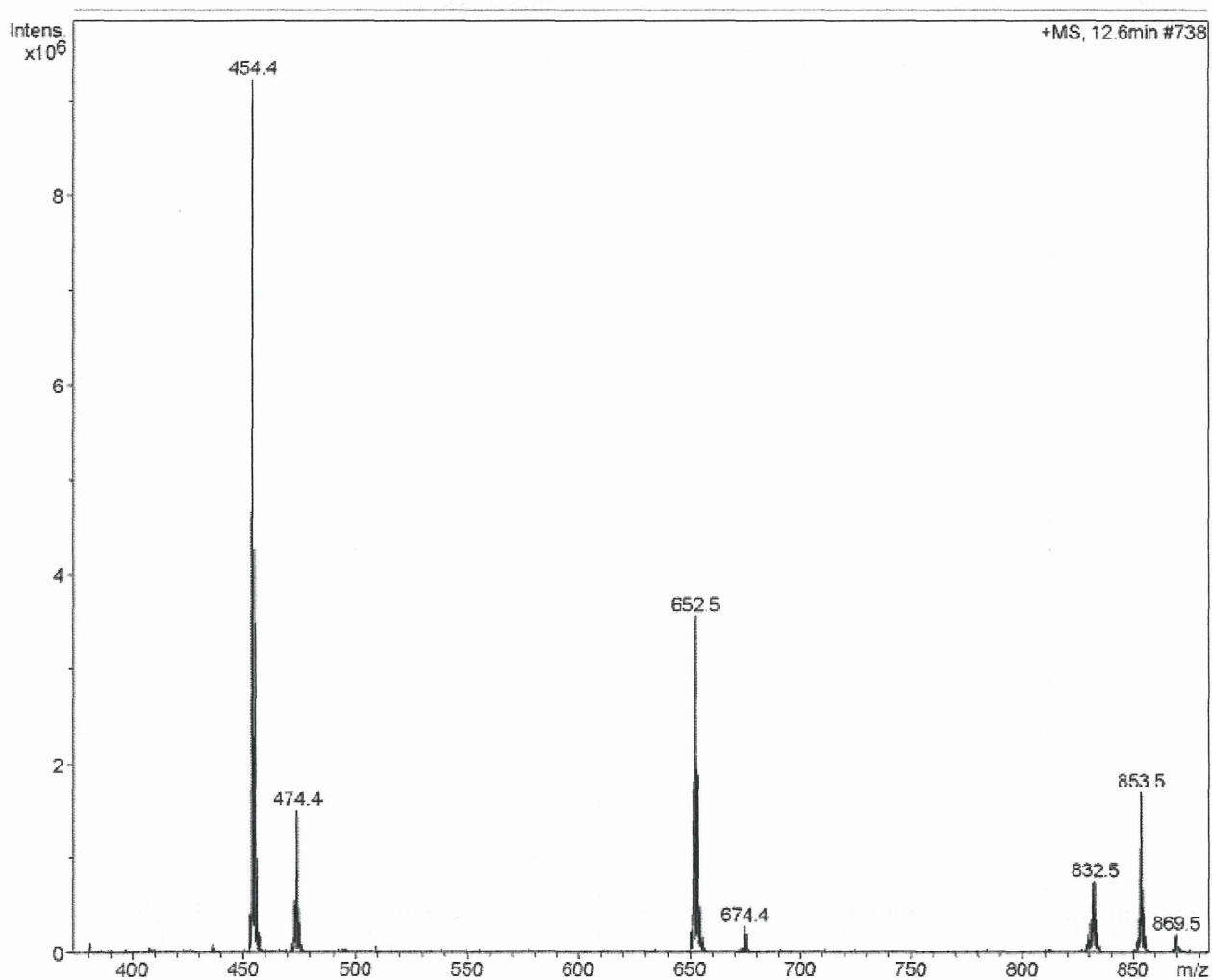


図 4-B グリチルリチン酸標準品主ピークの MS (m/z) 値

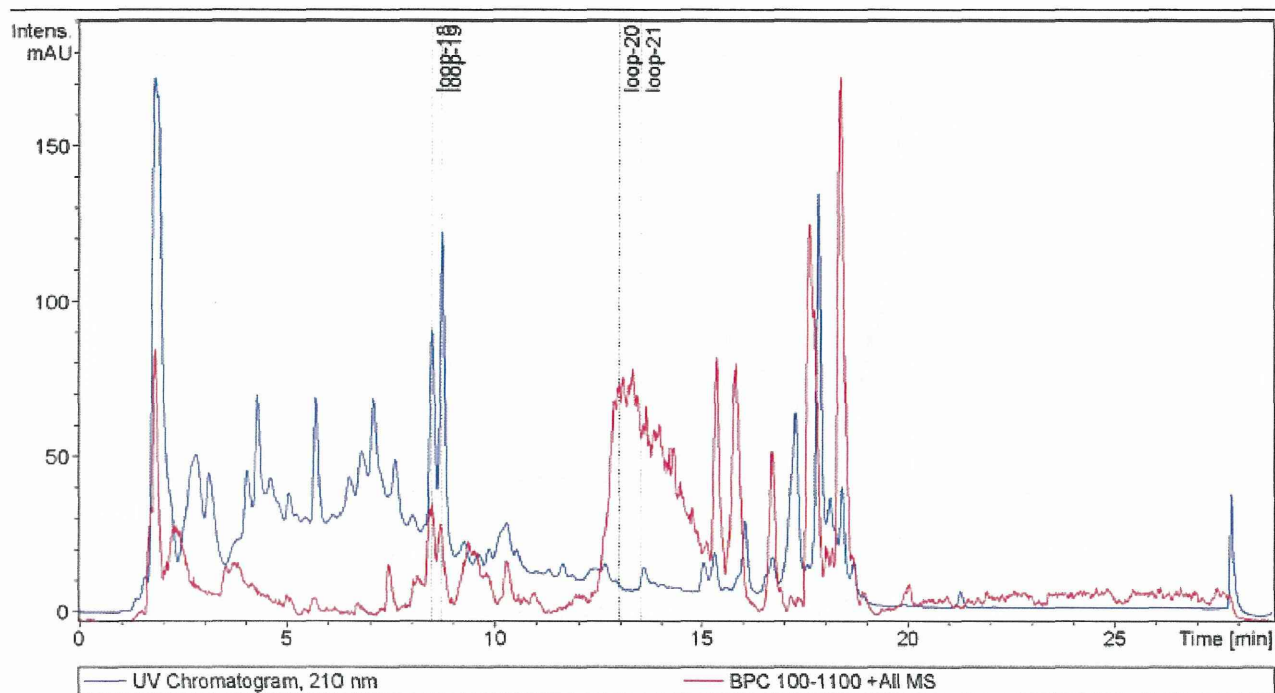


図 5-A 抑肝散エキスの UV, BPC スペクトル

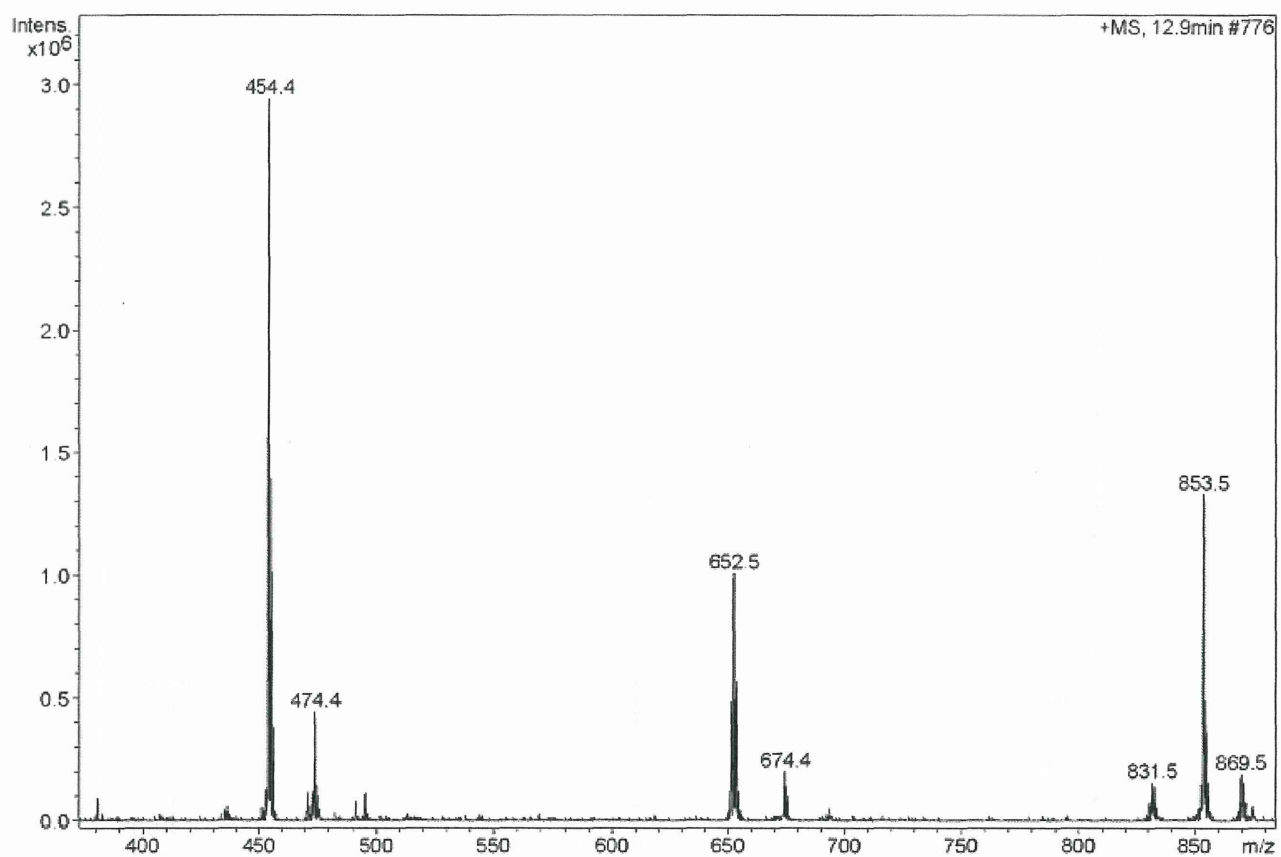


図 5-B 抑肝散エキスの主ピークの MS (m/z) 値

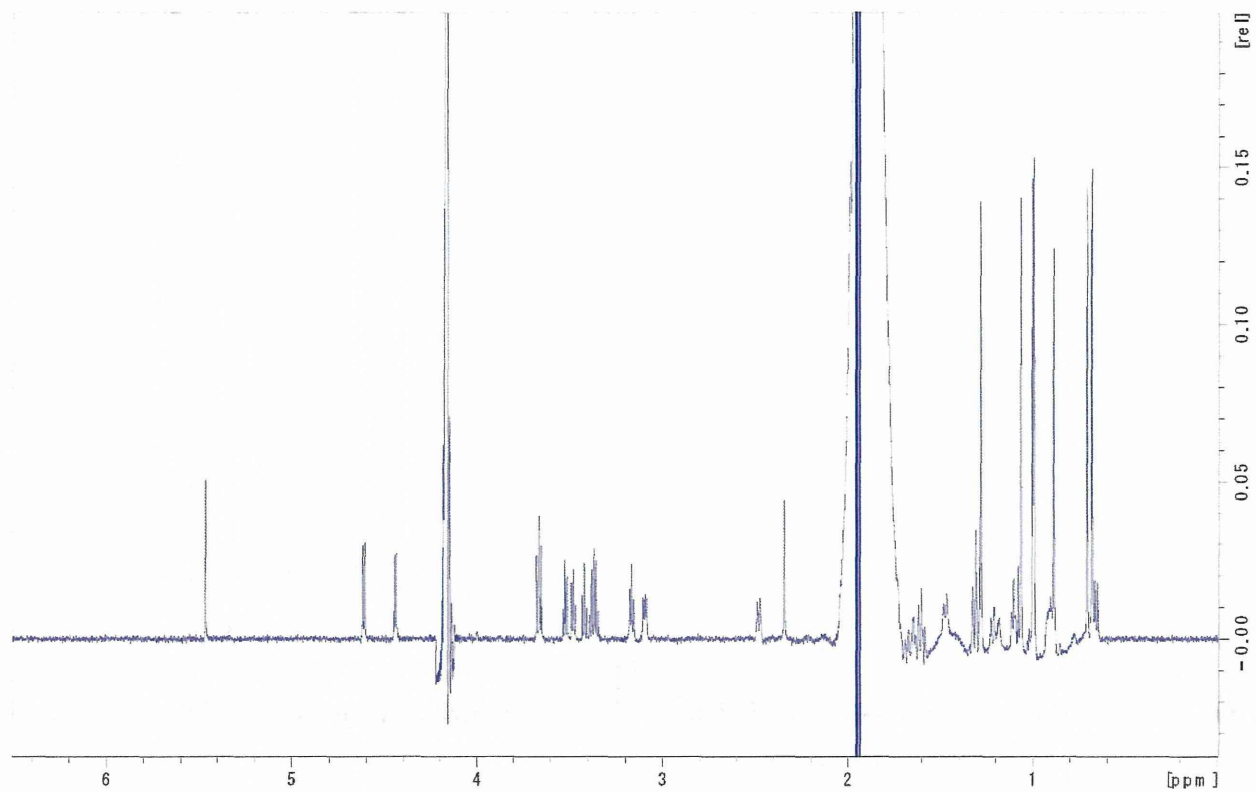


図 6-A グリチルリチン酸標準品の NMR スペクトル(重水分析)

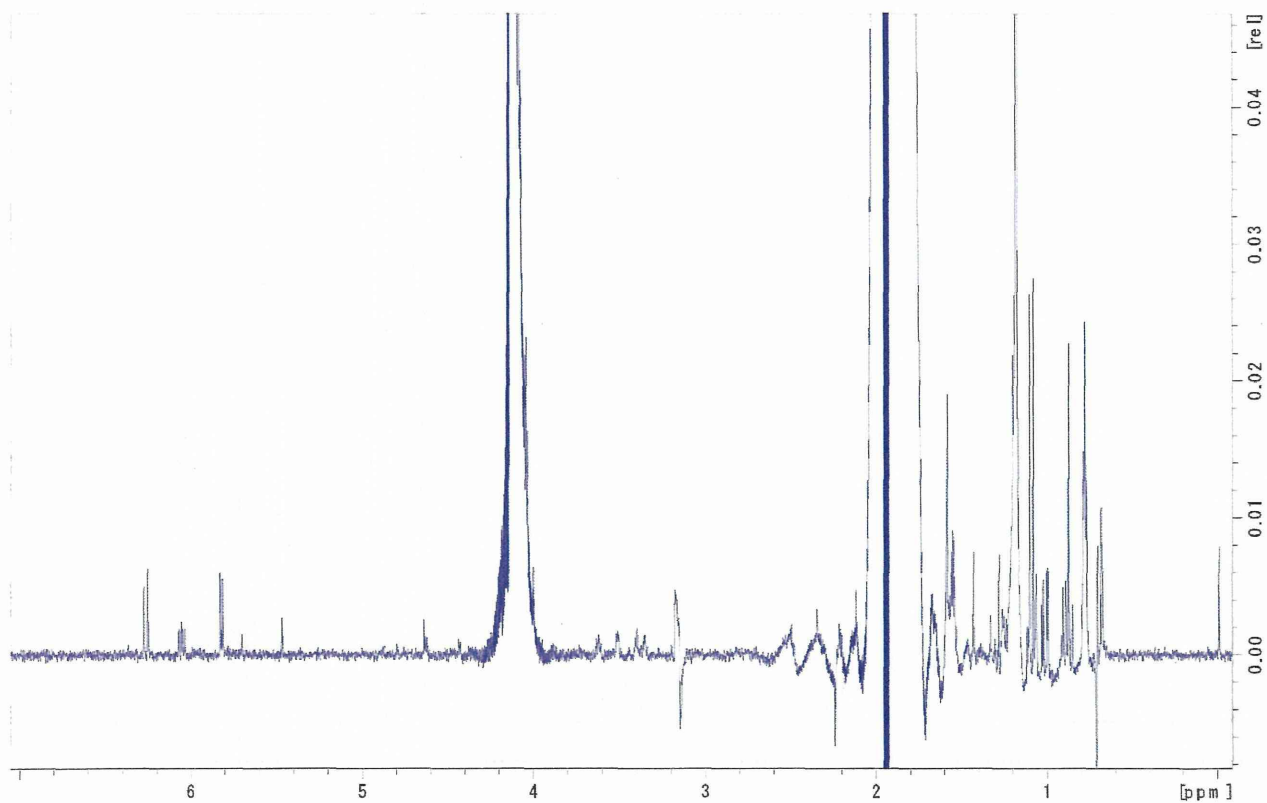


図 6-B 抑肝散エキスの NMR スペクトル(重水分析)

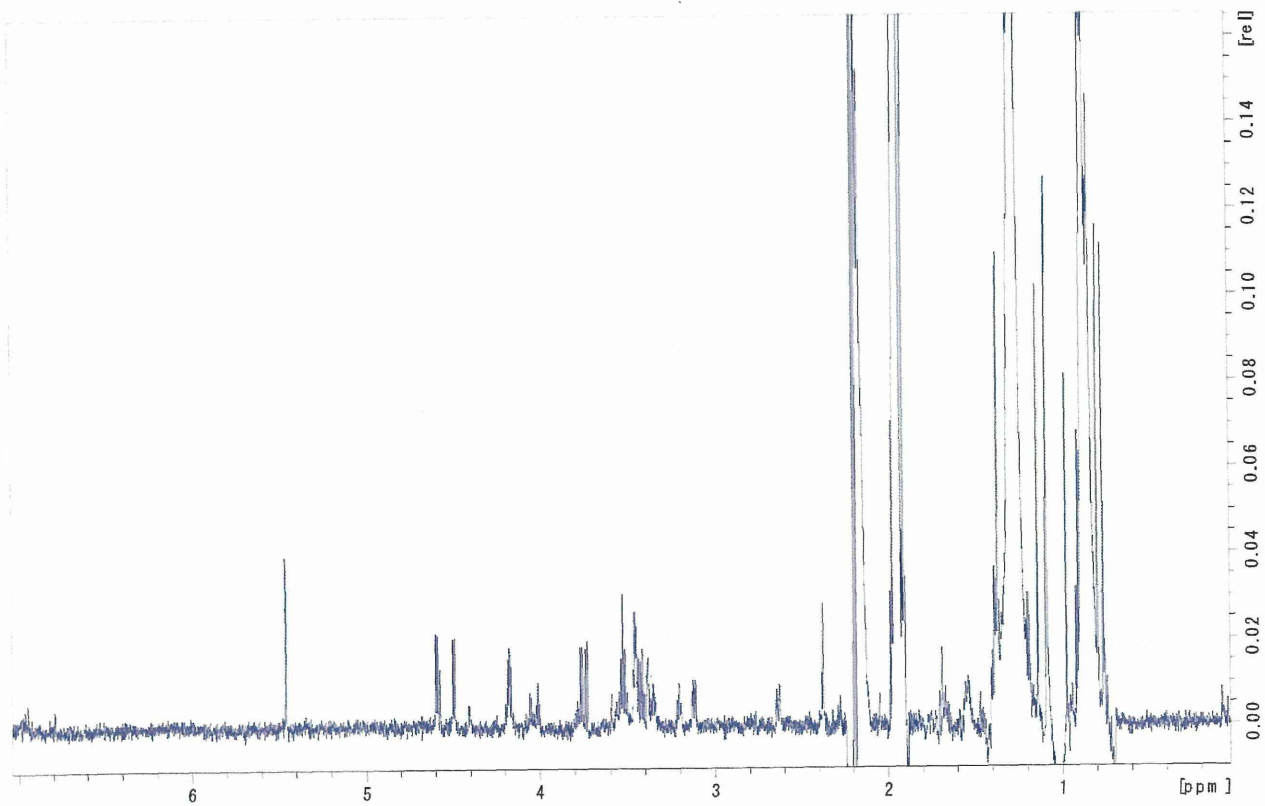


図 6-C グリチルリチン酸標準品の NMR スペクトル(軽水分析)

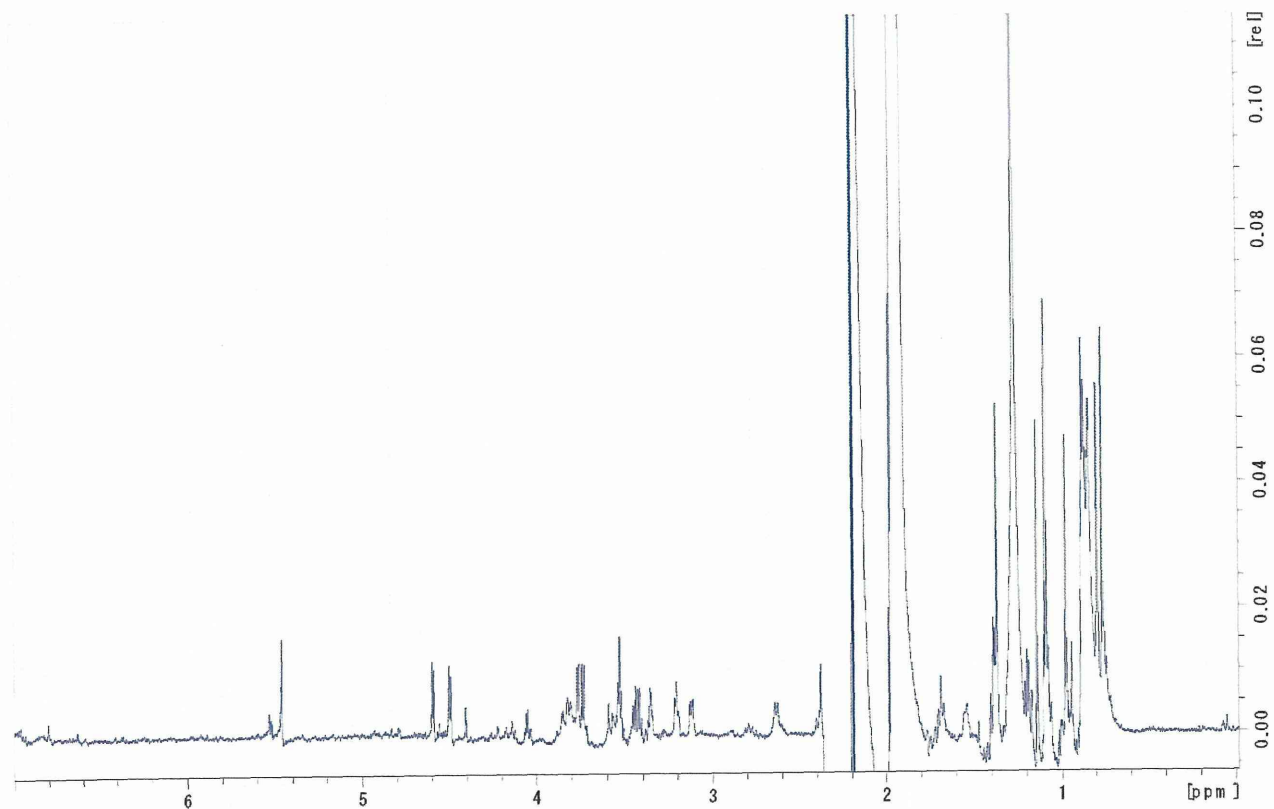


図 6-D 抑肝散エキスの NMR スペクトル(軽水分析)