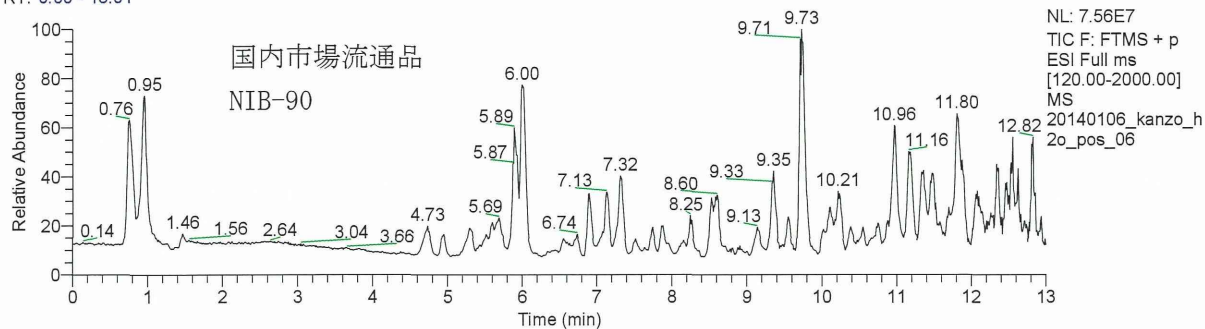
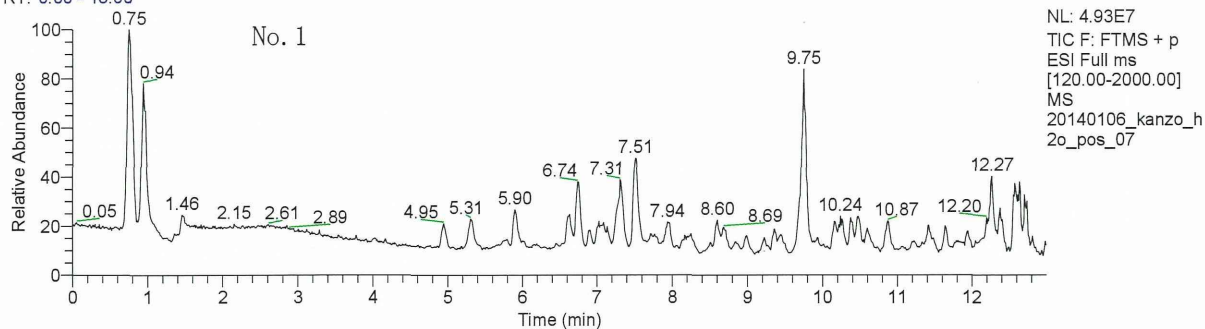


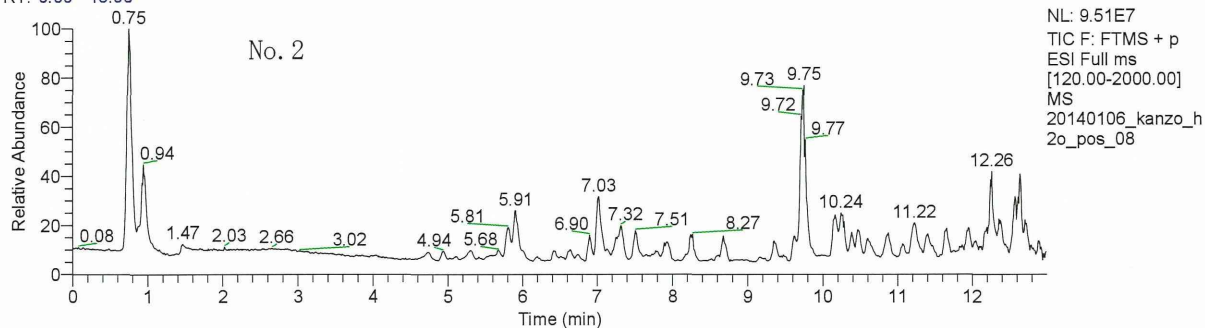
RT: 0.00 - 13.01



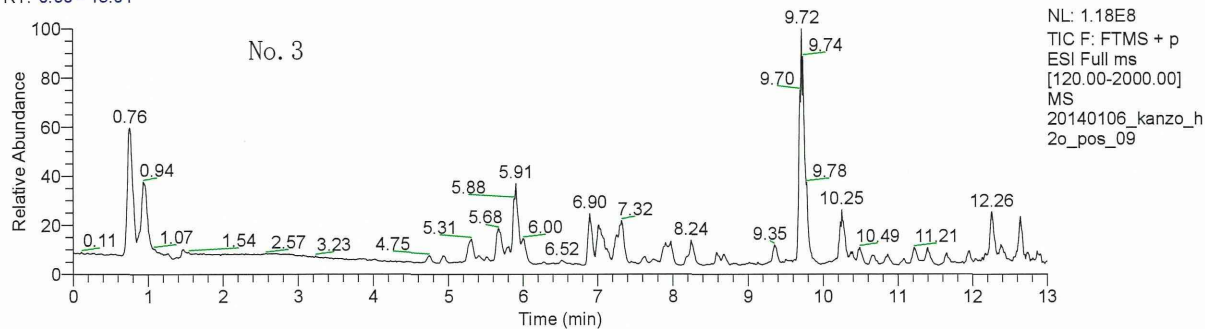
RT: 0.00 - 13.00



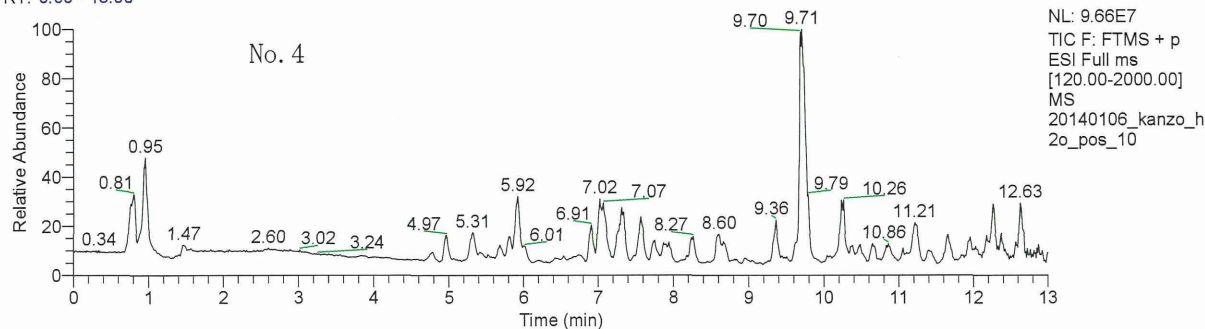
RT: 0.00 - 13.00



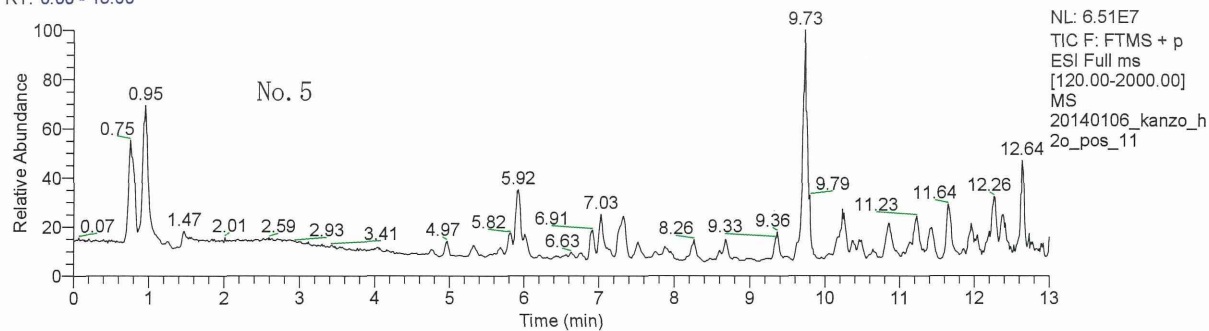
RT: 0.00 - 13.01



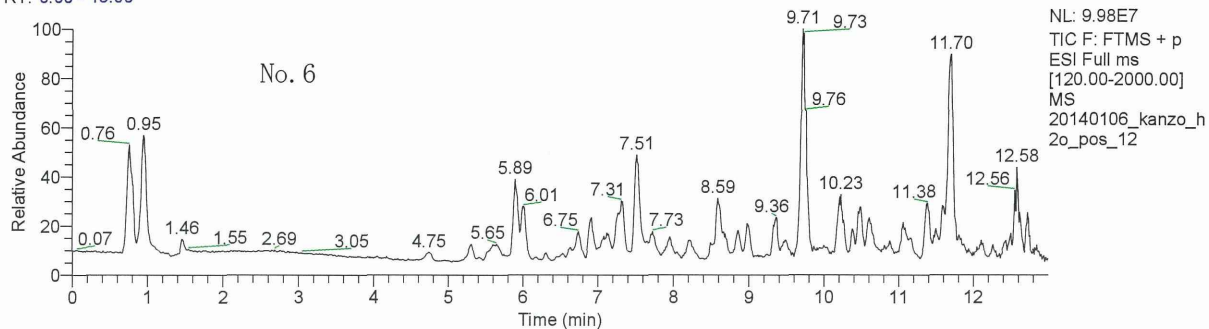
RT: 0.00 - 13.00



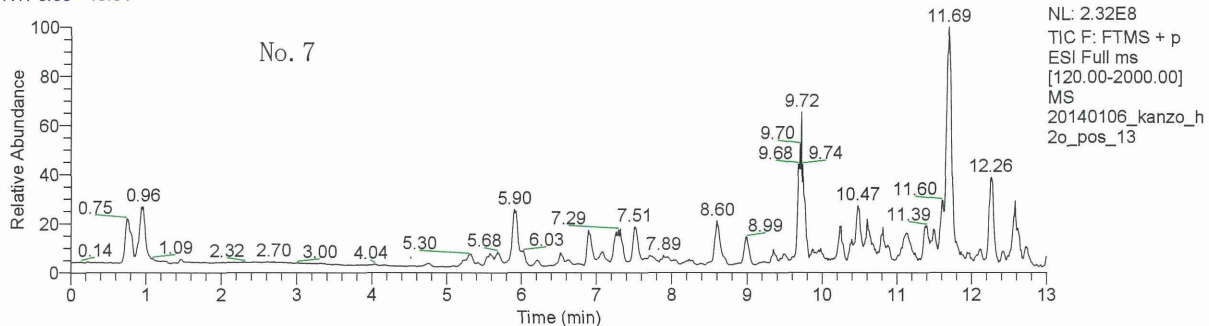
RT: 0.00 - 13.00



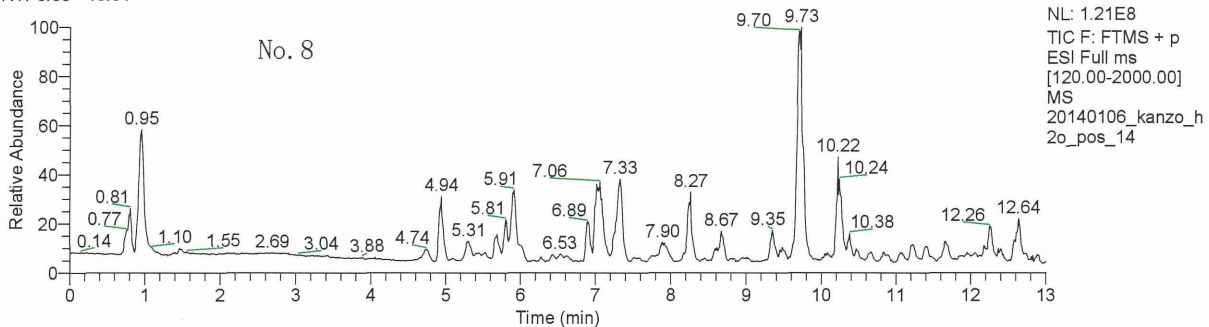
RT: 0.00 - 13.00



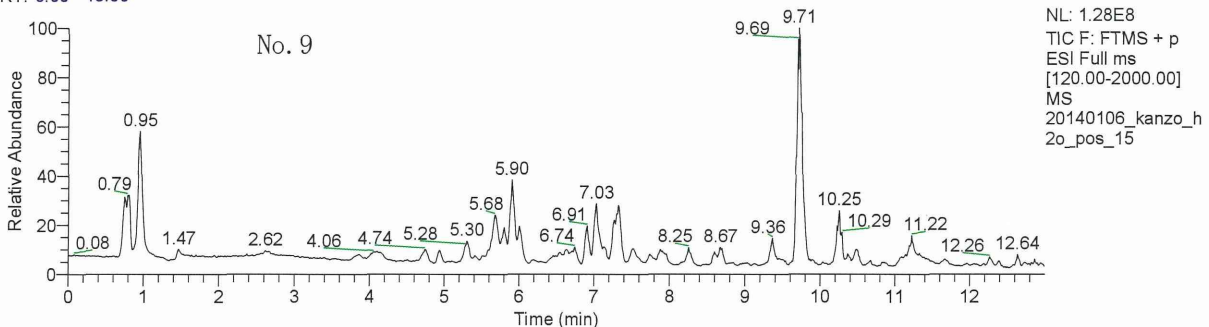
RT: 0.00 - 13.01



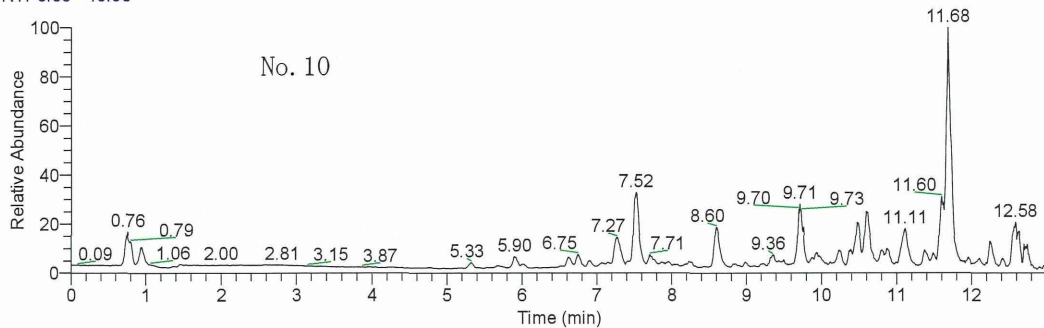
RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.00

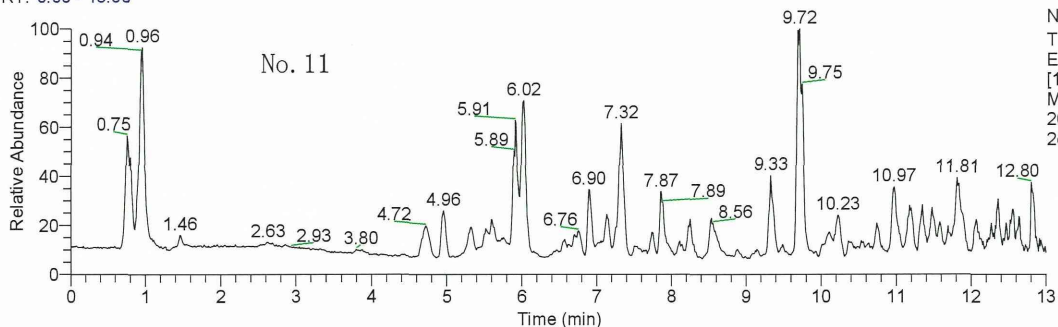


RT: 0.00 - 13.00



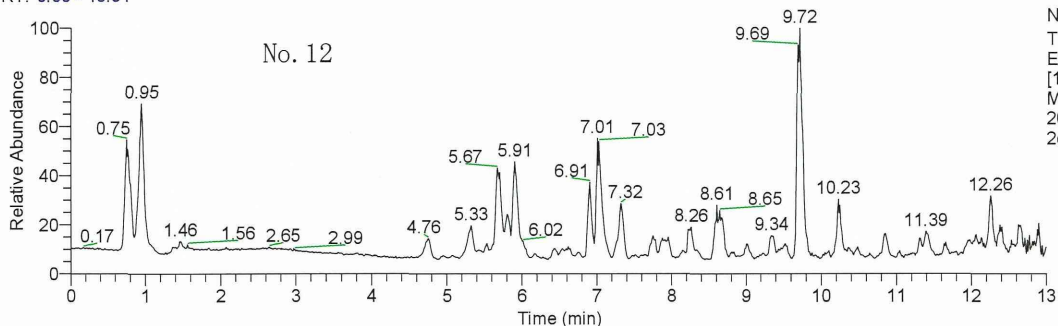
NL: 2.91E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_16

RT: 0.00 - 13.00



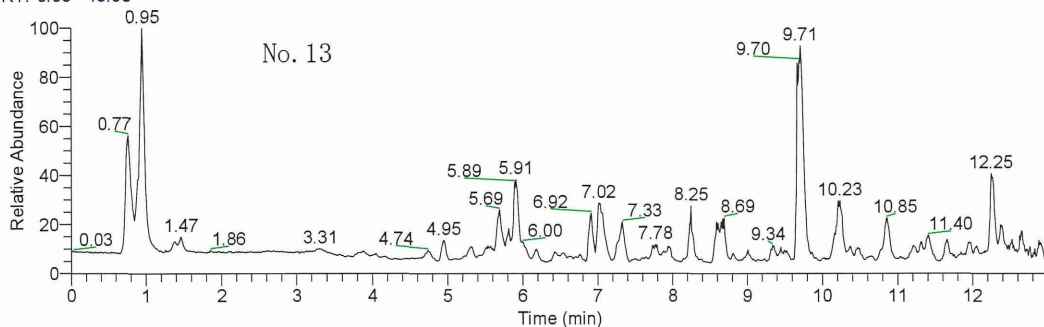
NL: 8.55E7
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_17

RT: 0.00 - 13.01



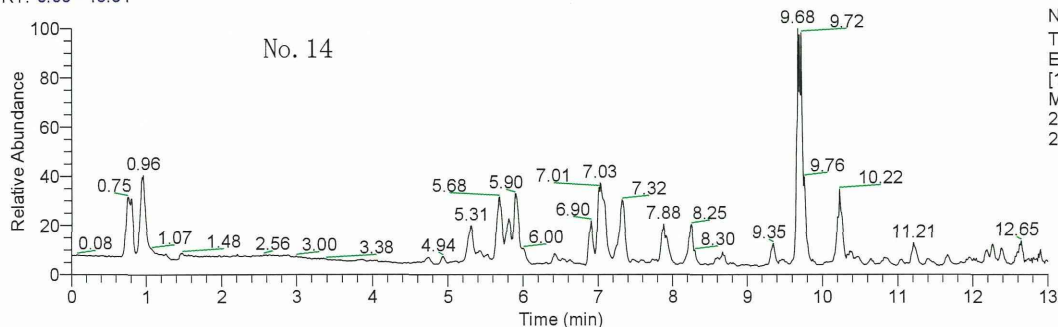
NL: 9.76E7
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_18

RT: 0.00 - 13.00



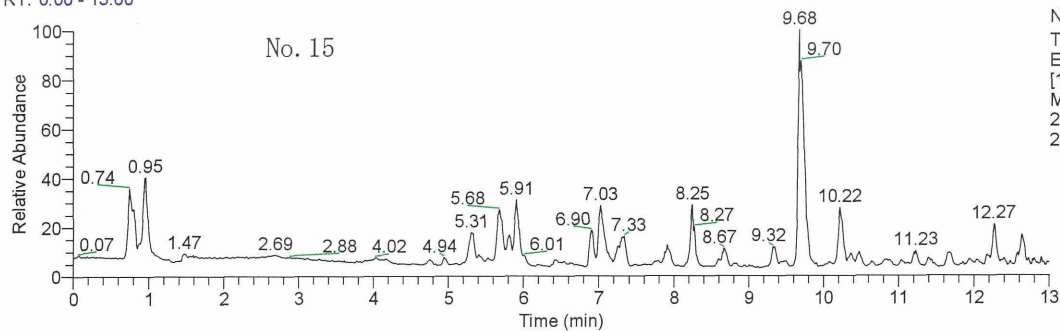
NL: 1.16E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_19

RT: 0.00 - 13.01



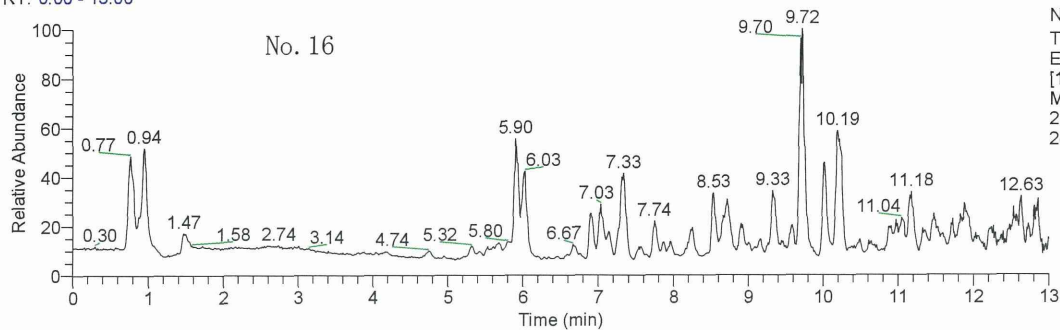
NL: 1.32E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_20

RT: 0.00 - 13.00



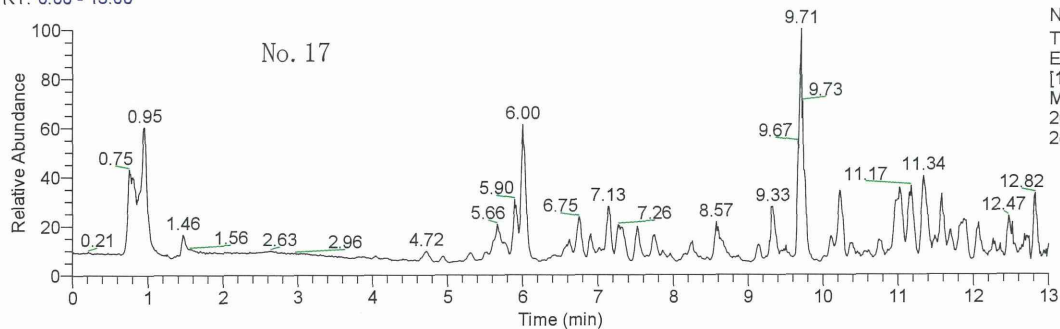
NL: 1.28E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_21

RT: 0.00 - 13.00



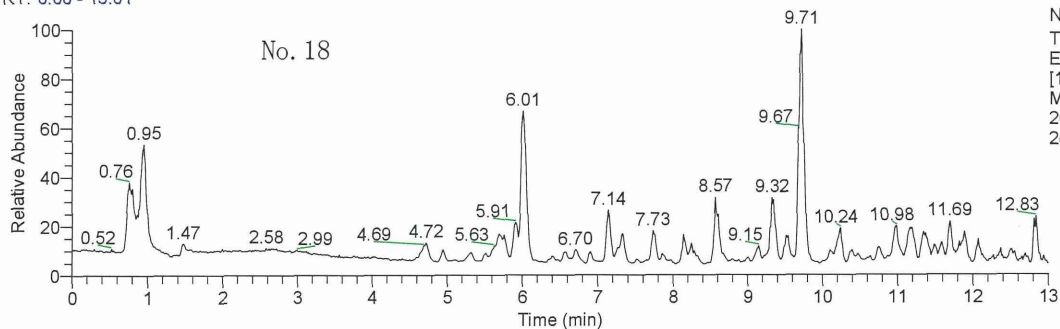
NL: 8.91E7
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_22

RT: 0.00 - 13.00



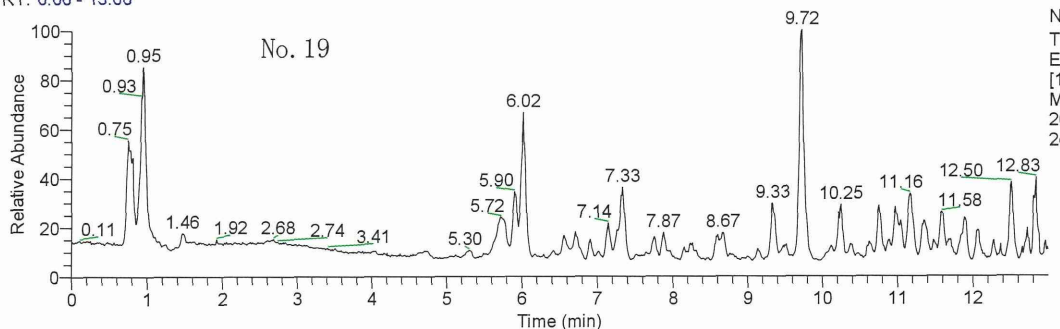
NL: 1.10E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_23

RT: 0.00 - 13.01



NL: 1.00E8
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_24

RT: 0.00 - 13.00



NL: 7.41E7
TIC F: FTMS + p
ESI Full ms
[120.00-2000.00]
MS
20140106_kanzo_h
2o_pos_25

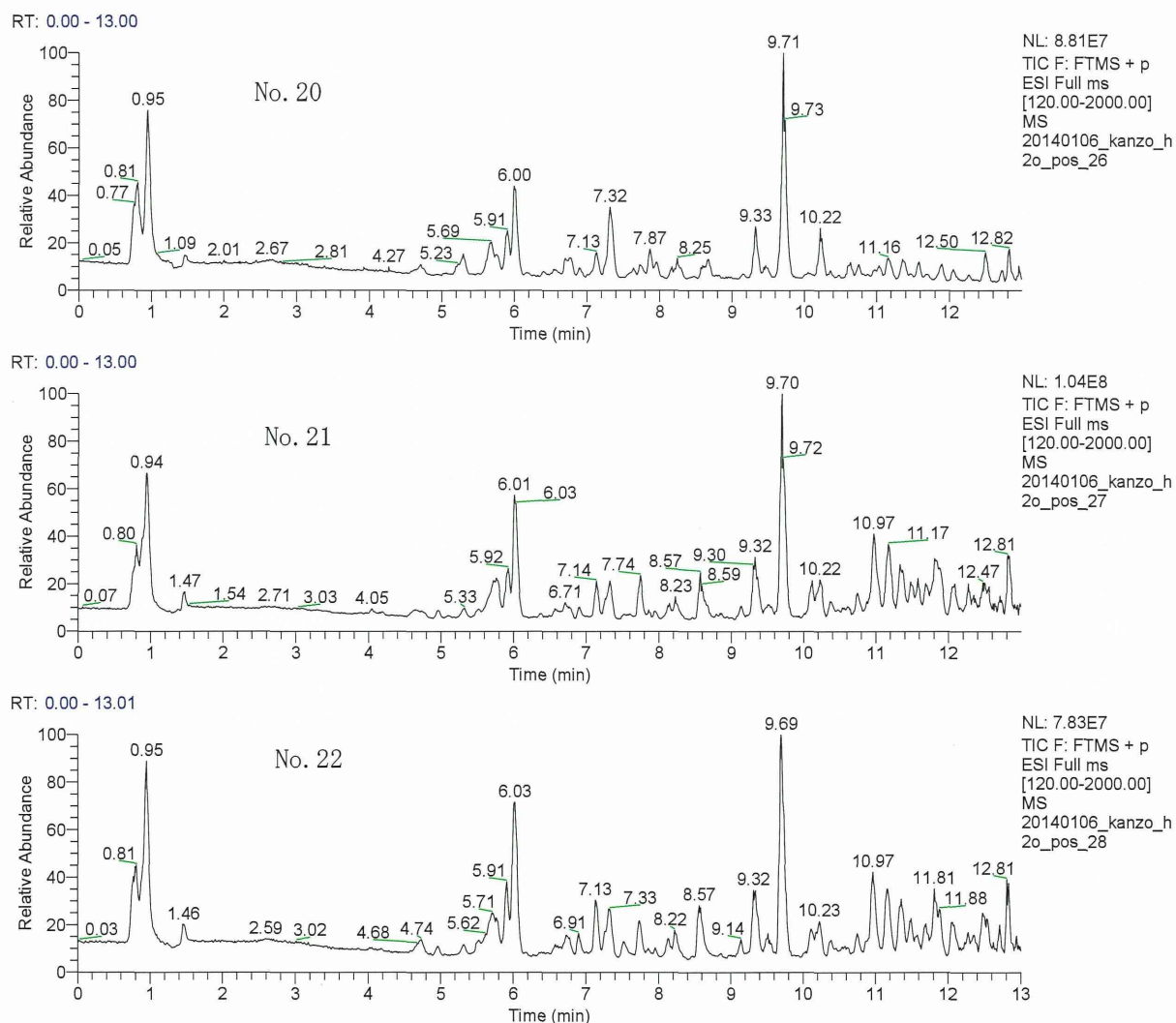
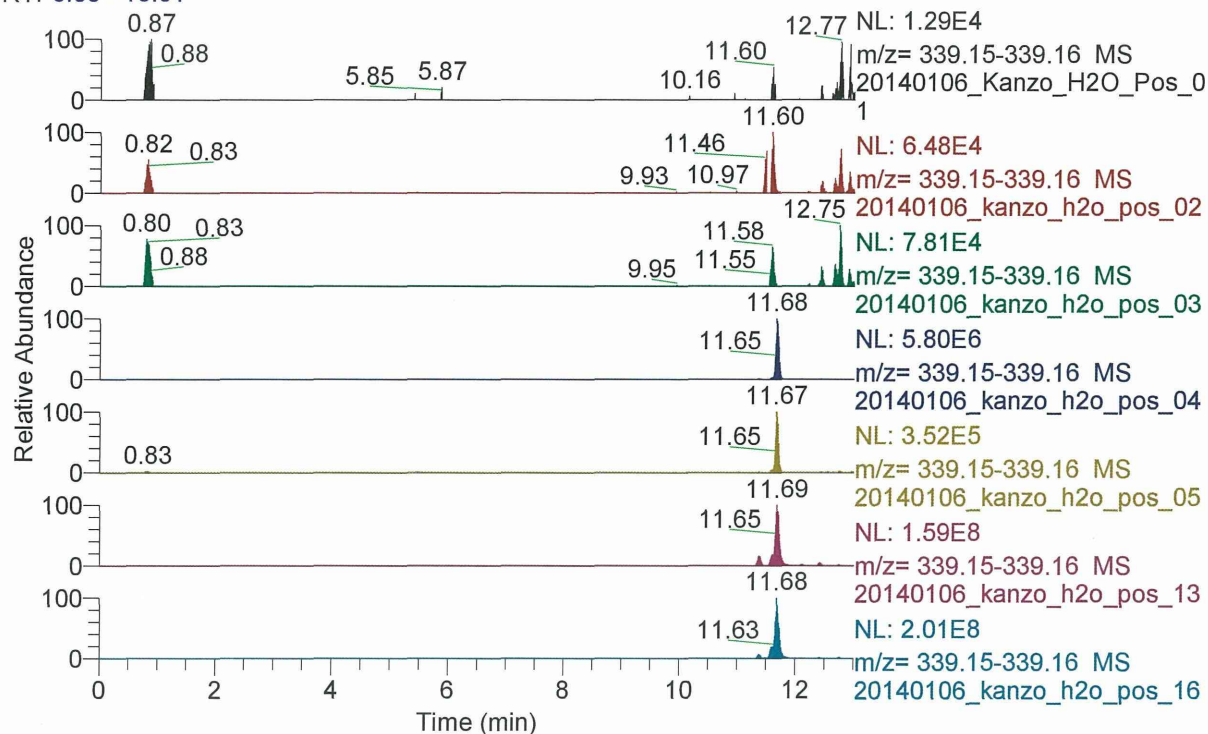
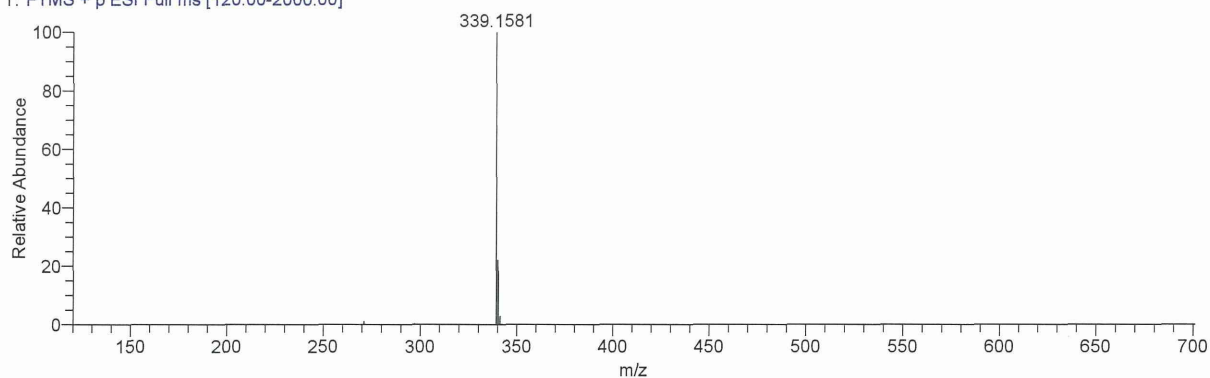


図1 分析に用いた全甘草類のTICクロマトグラム（正イオンESI）

RT: 0.00 - 13.01



20140106_kanzo_h2o_pos_16 #1881 RT: 11.68 AV: 1 NL: 2.01E8
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140106_kanzo_h2o_pos_16 #1874 RT: 11.65 AV: 1 NL: 7.77E7
T: FTMS + p ESI d Full ms2 339.16@cid35.00 [80.00-350.00]

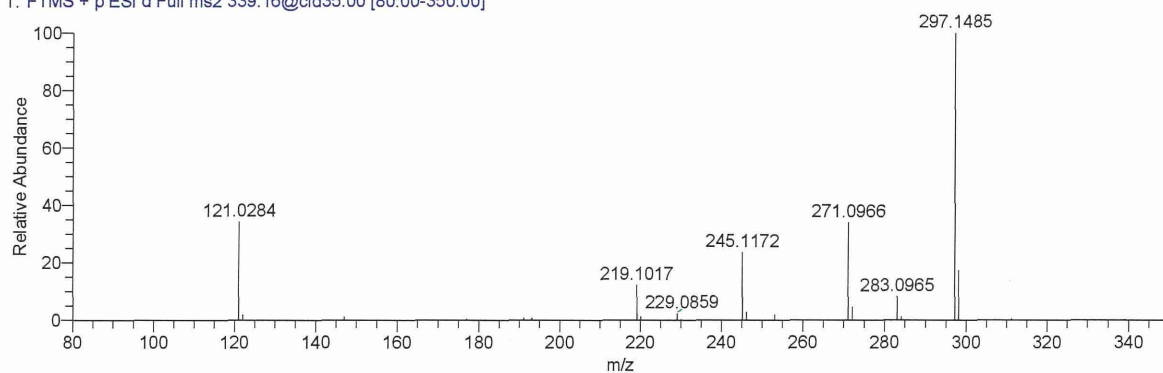


図2 試料No. 7と10のTICクロマトグラム上のメインピークから得られたマスペクトルとその抽出イオンクロマトグラム

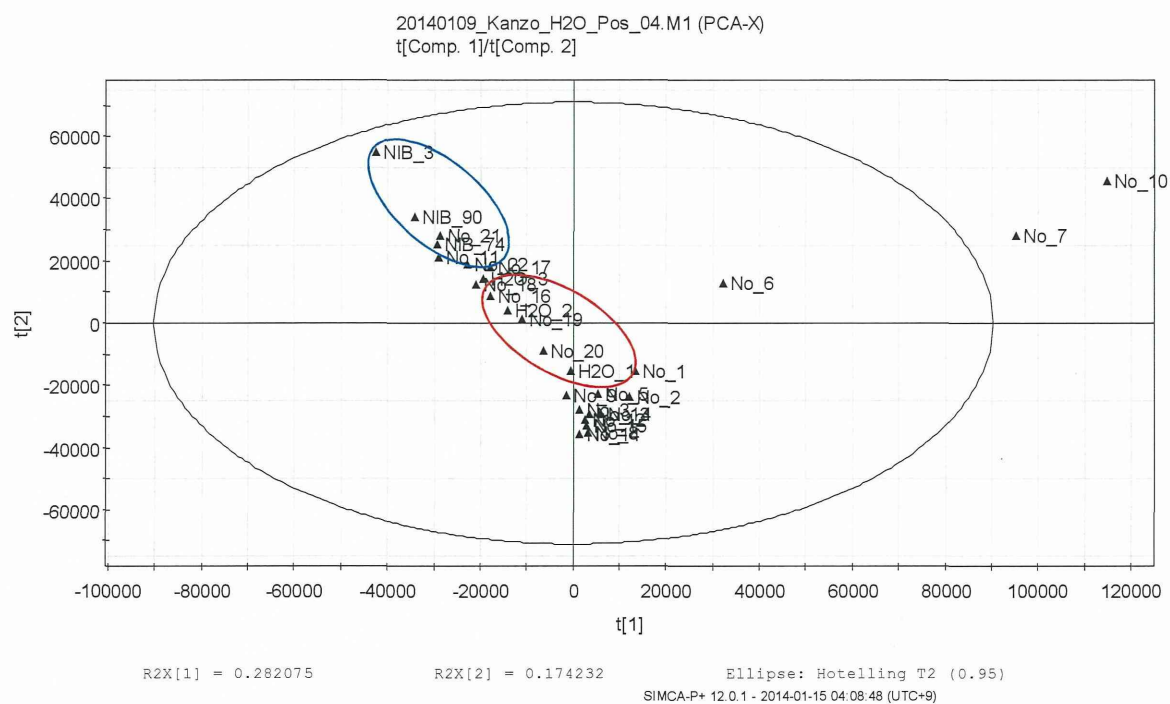


図3 正イオン検出データを用いた多変量解析によるスコアプロット

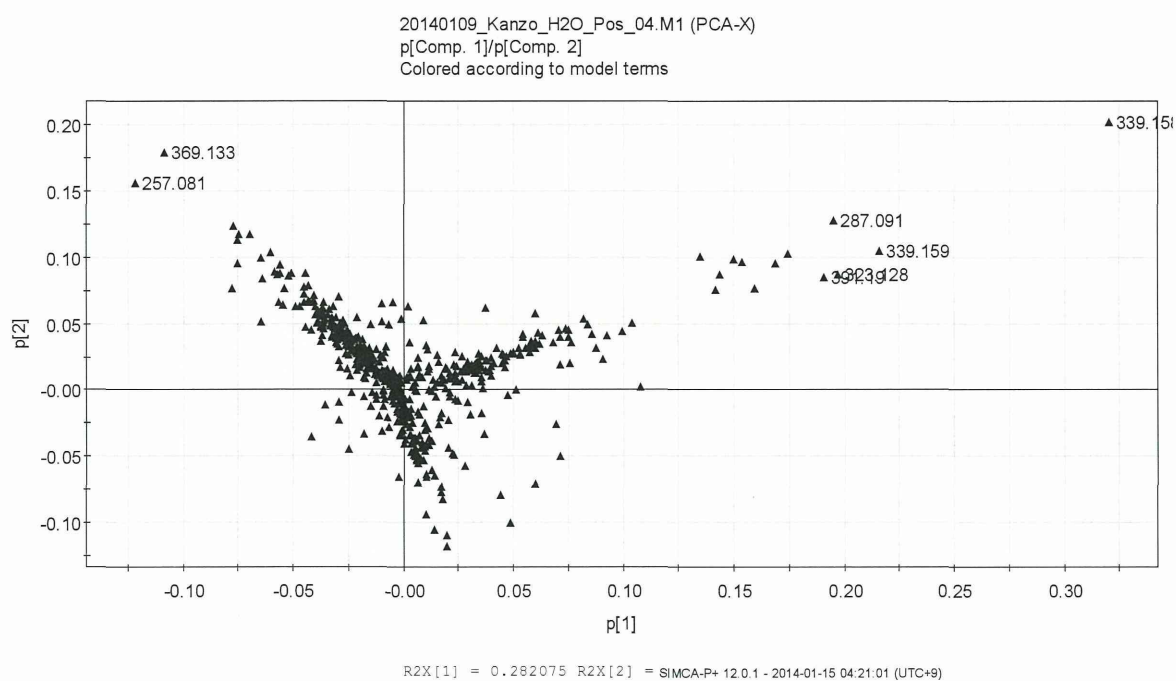
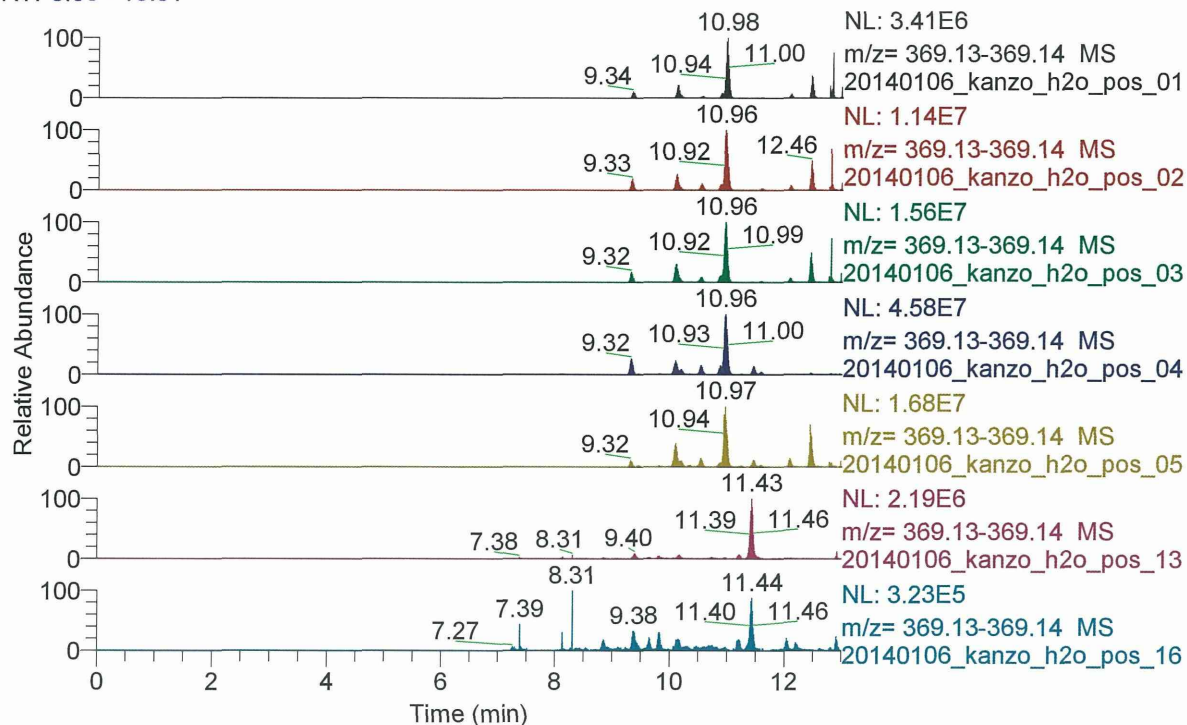
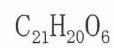
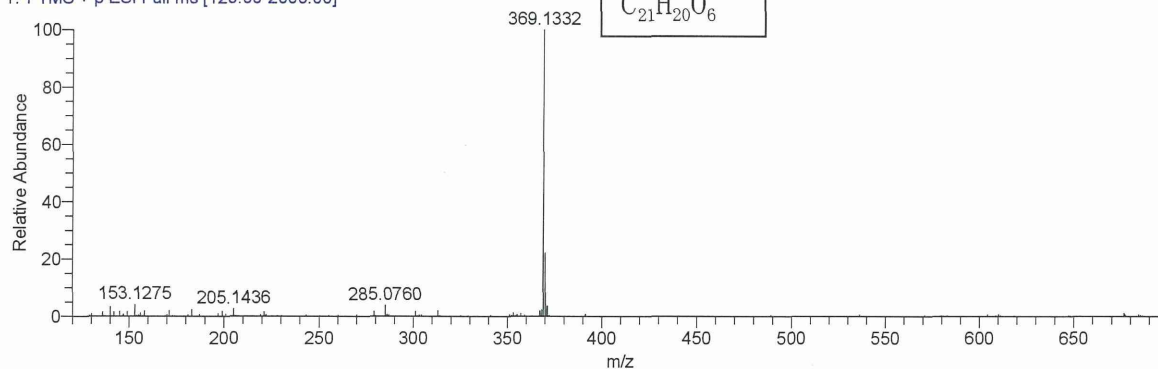


図4 正イオン検出データを用いた多変量解析によるローディングプロット

RT: 0.00 - 13.01



20140106_kanzo_h2o_pos_01 #1616 RT: 10.98 AV: 1 NL: 3.38E6
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140106_kanzo_h2o_pos_01 #1599 RT: 10.86 AV: 1 NL: 2.16E5
T: FTMS + p ESI d Full ms2 369.13@cid35.00 [90.00-380.00]

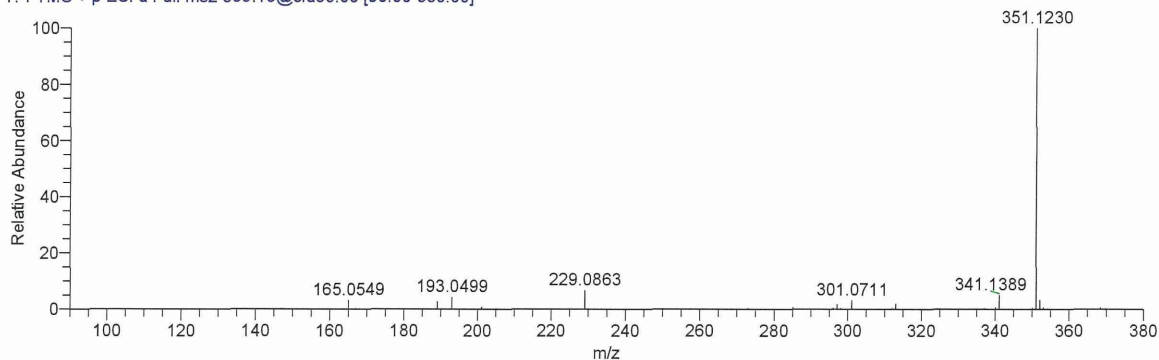


図5 スコアプロットにおいて左上に位置されたグループに特徴的な成分 (m/z 369、保持時間11.0分) のXICおよびマススペクトル

表2 ローディングプロットにおいて、水耕栽培品や国内市場流通品が含まれるグループに特徴的として観測された成分 (m/z 369、保持時間11分) のXICピーク強度

	m/z 369, RT 11.0
水耕-1	3.41E+06
水耕-2	1.14E+07
水耕-3	1.56E+07
NIB-3	4.58E+07
NIB-74	1.68E+07
No.7	5.09E+04
No.10	1.97E+04

RT: 4.98 - 6.98

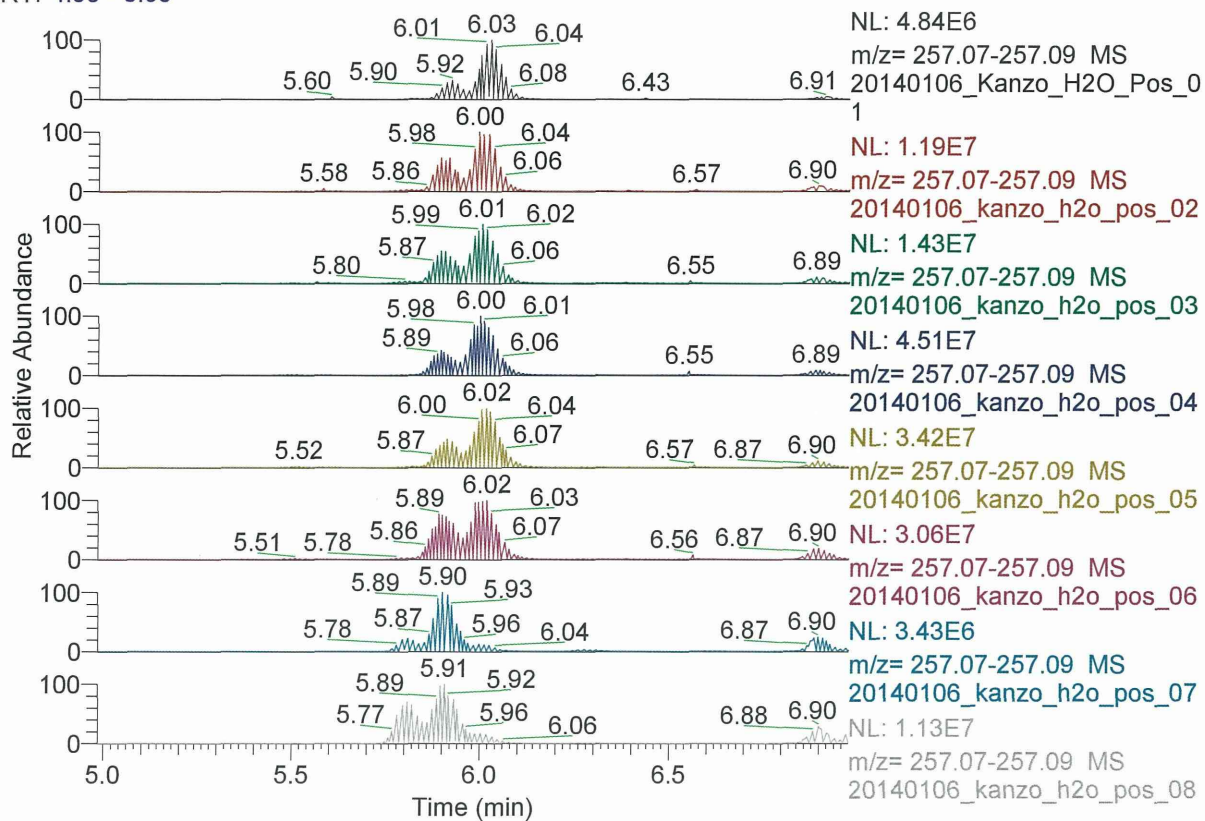


図6 m/z 257.07-257.09のXIC

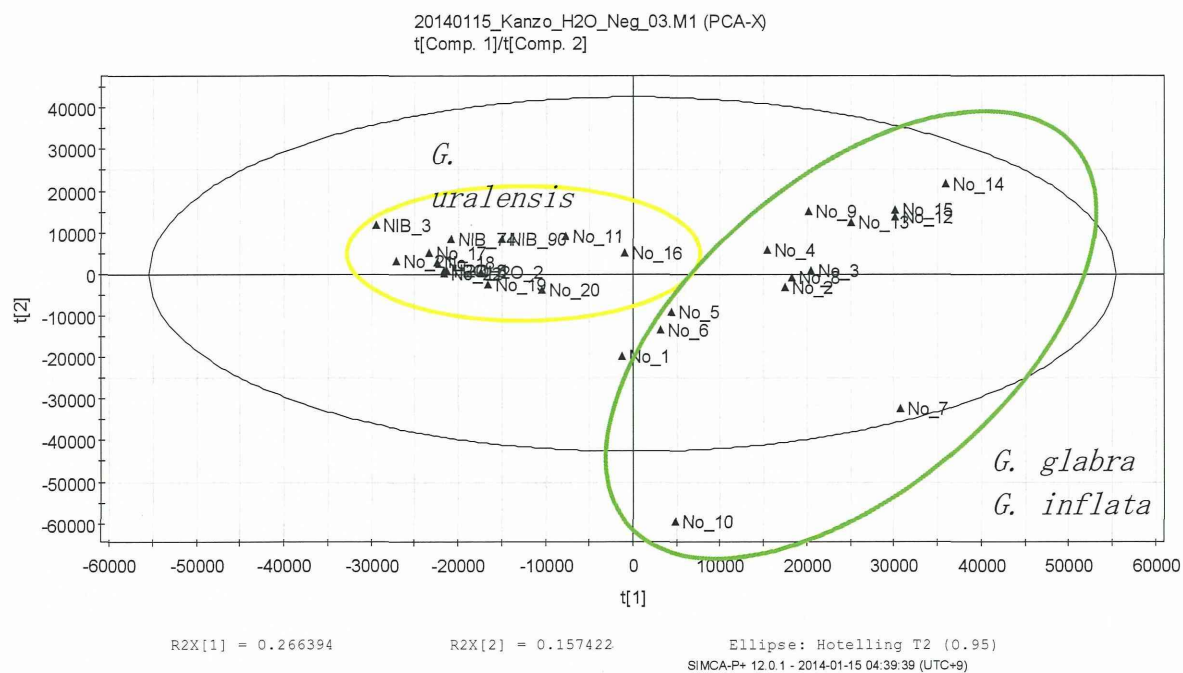


図7 負イオン検出データを用いた多変量解析によるスコアプロット

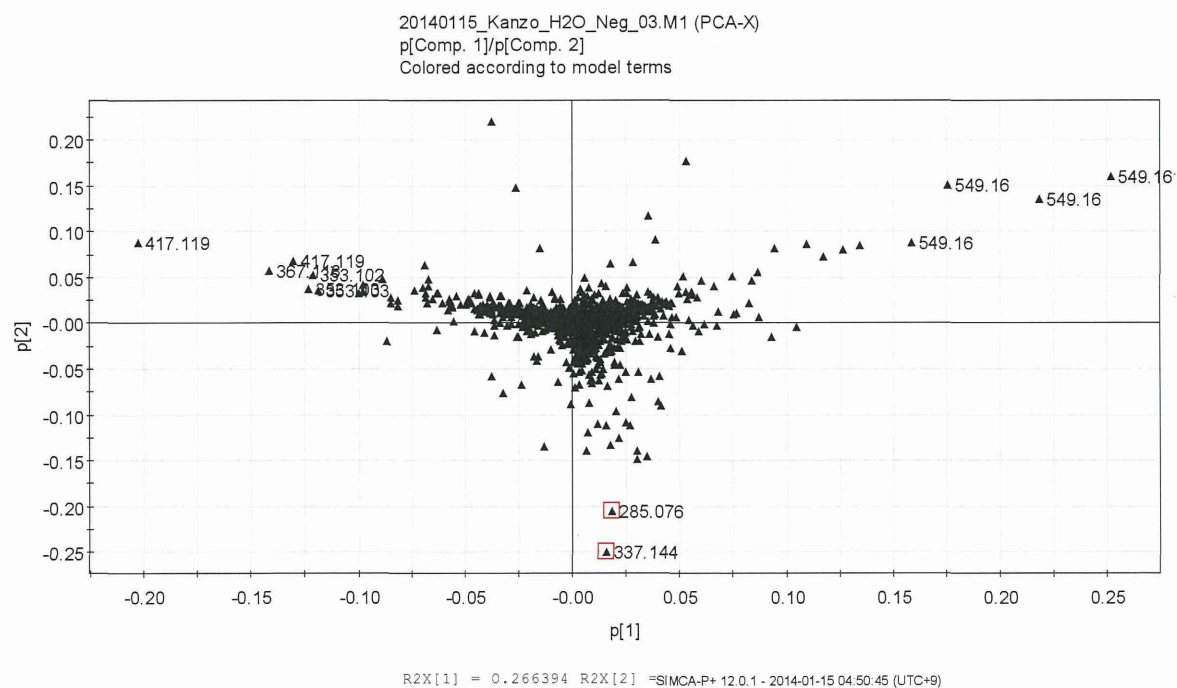
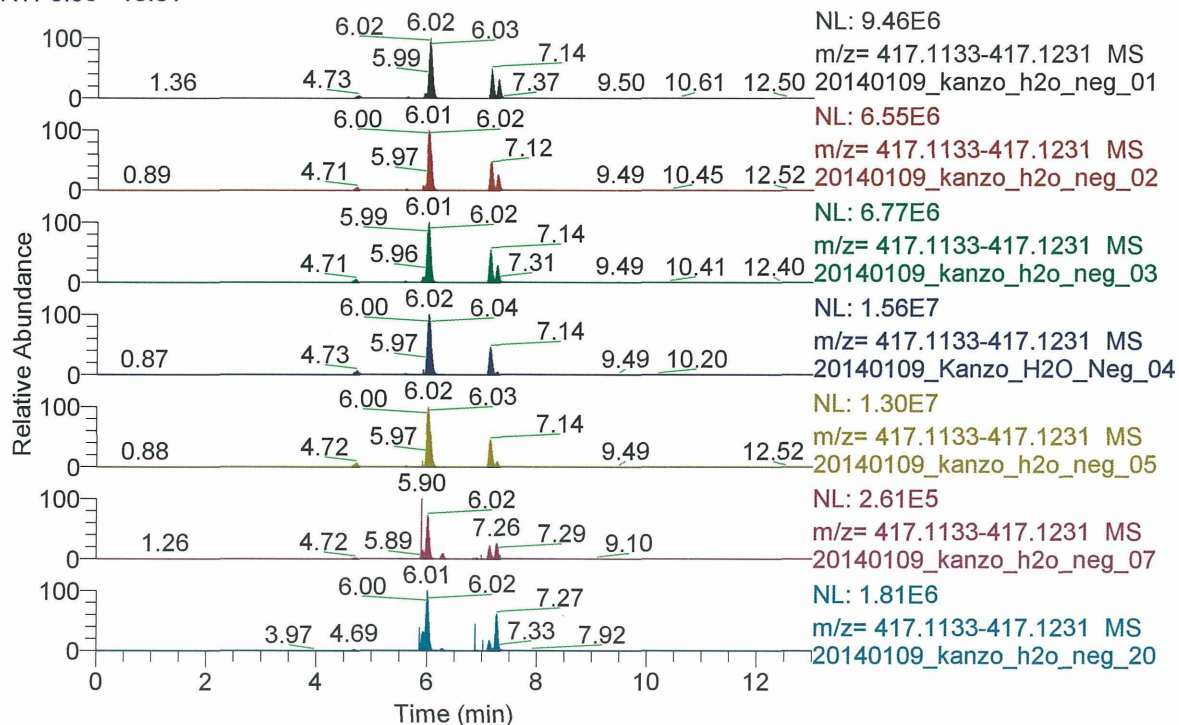
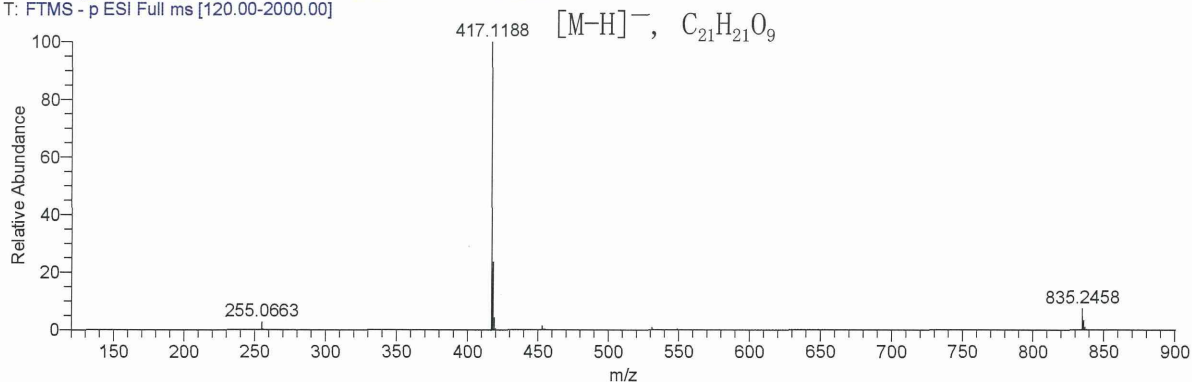


図8 負イオン検出データを用いた多変量解析によるローディングプロット

RT: 0.00 - 13.01



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #1177 RT: 6.02 AV: 1 NL: 9.38E6
T: FTMS - p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #1152 RT: 5.90 AV: 1 NL: 2.61E5
T: FTMS - p ESI d Full ms2 417.12@cid35.00 [100.00-430.00]

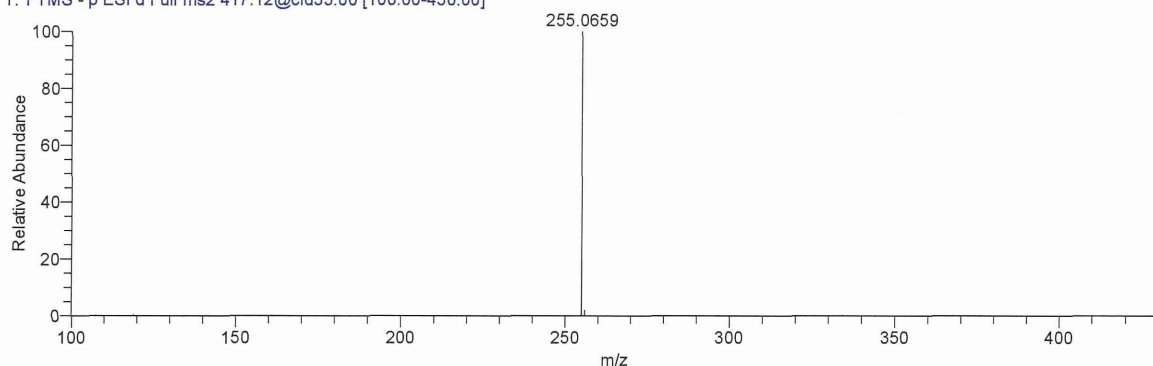
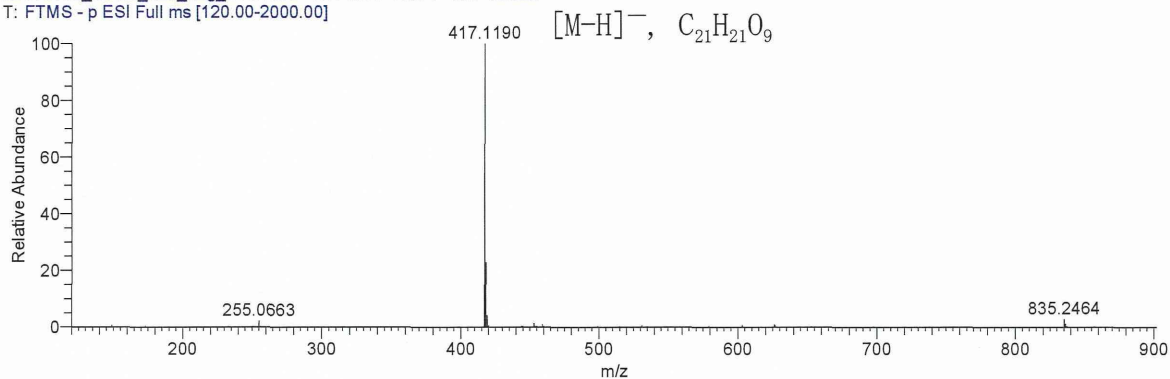


図9 m/z 417.11-417.12のXICと保持時間6分のマスペクトル、 m/z 417のプロダクトイオンスペクトル

20140109_kanzo_h2o_neg_01 #1395 RT: 7.14 AV: 1 NL: 4.65E6
T: FTMS - p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #1384 RT: 7.09 AV: 1 NL: 9.65E4
T: FTMS - p ESI d Full ms2 417.12@cid35.00 [100.00-430.00]

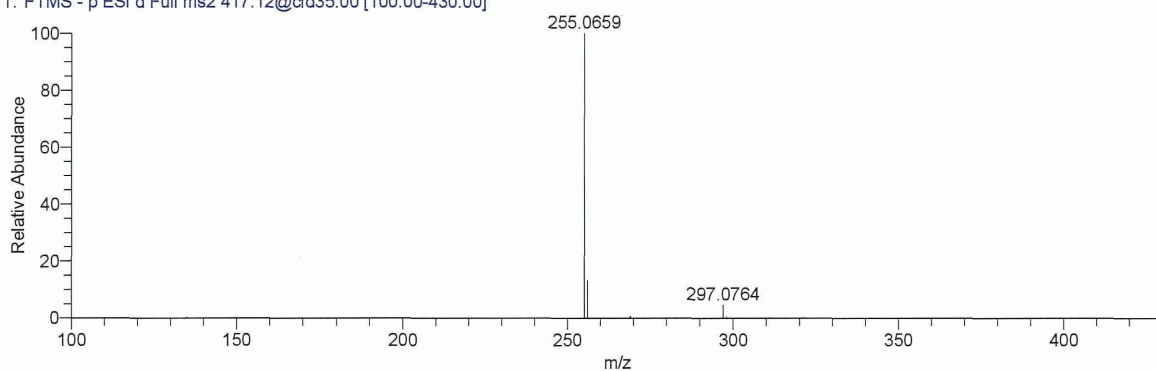
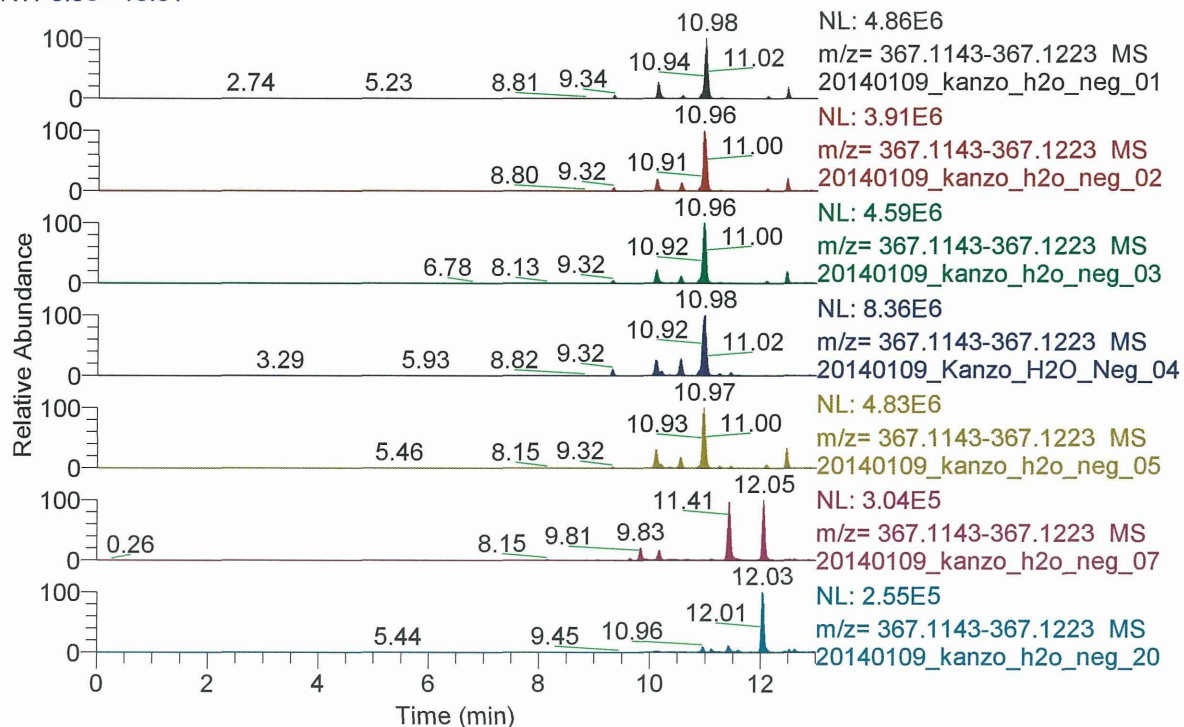
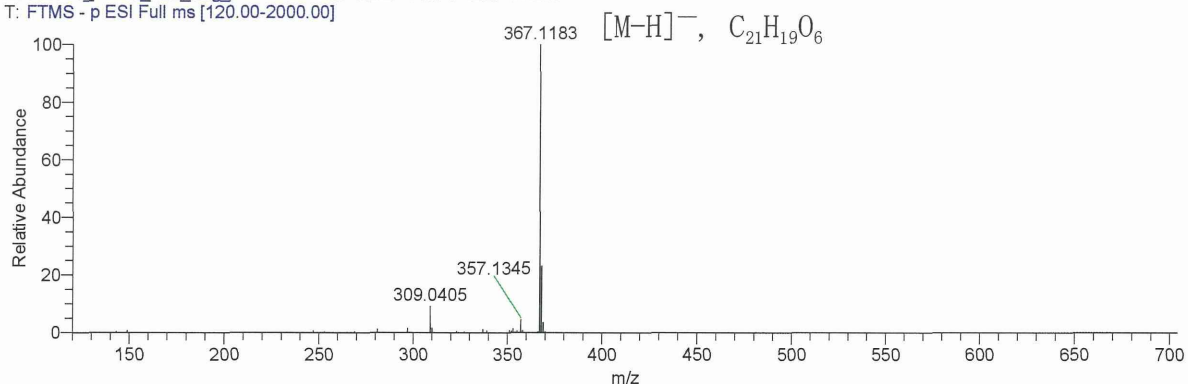


図10 保持時間7.1分のマススペクトル、 m/z 417のプロダクトイオンスペクトル

RT: 0.00 - 13.01



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #2151 RT: 10.97 AV: 1 NL: 4.08E6
T: FTMS - p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #2138 RT: 10.90 AV: 1 NL: 1.42E5
T: FTMS - p ESI d Full ms2 367.12@cid35.00 [90.00-380.00]

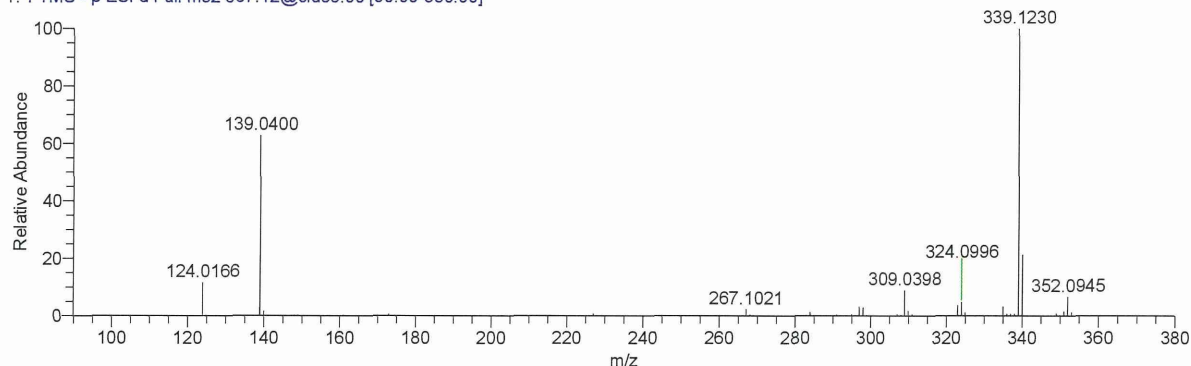
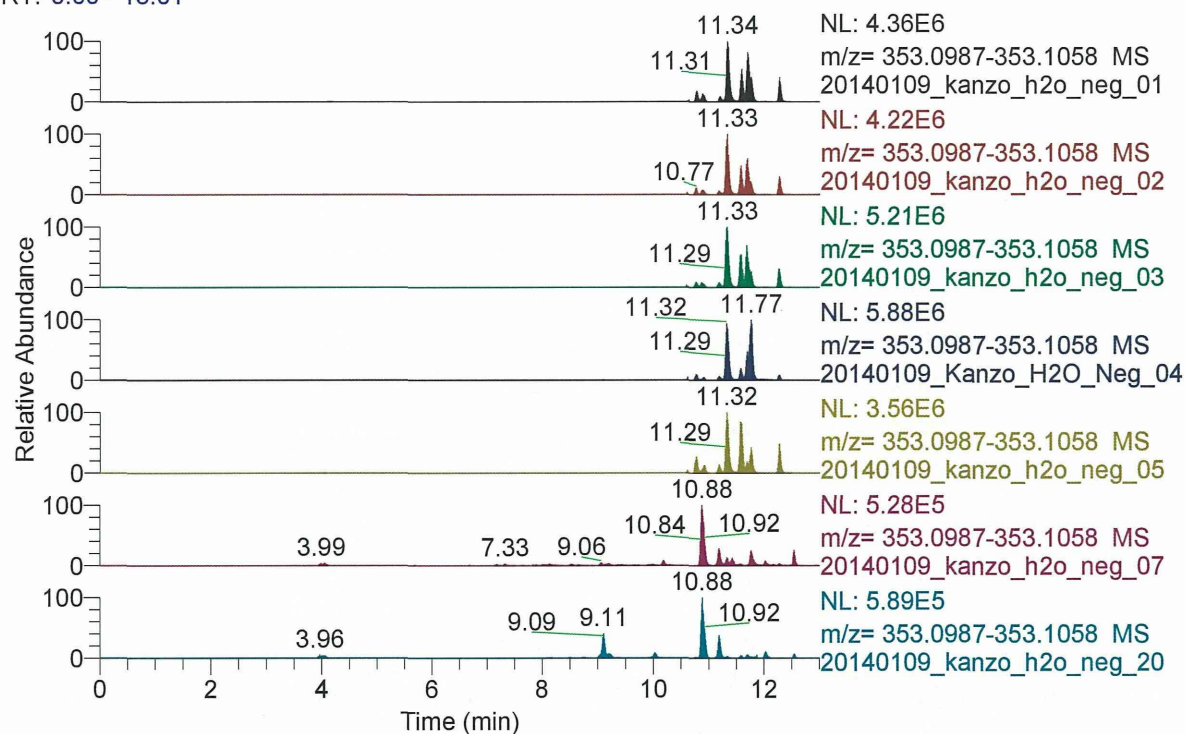
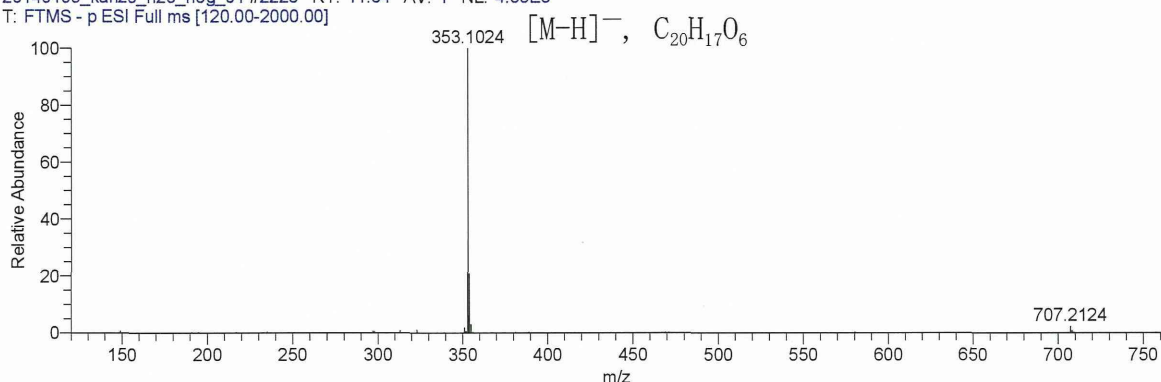


図11 m/z 367.11-367.12のXICと保持時間11分のマスペクトル、 m/z 367のプロダクトイオンスペクトル

RT: 0.00 - 13.01



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #2225 RT: 11.34 AV: 1 NL: 4.33E6
T: FTMS - p ESI Full ms [120.00-2000.00]



20140109_kanzo_h2o_neg_01 #2238 RT: 11.41 AV: 1 NL: 4.33E5
T: FTMS - p ESI d Full ms2 353.14@cid35.00 [85.00-365.00]

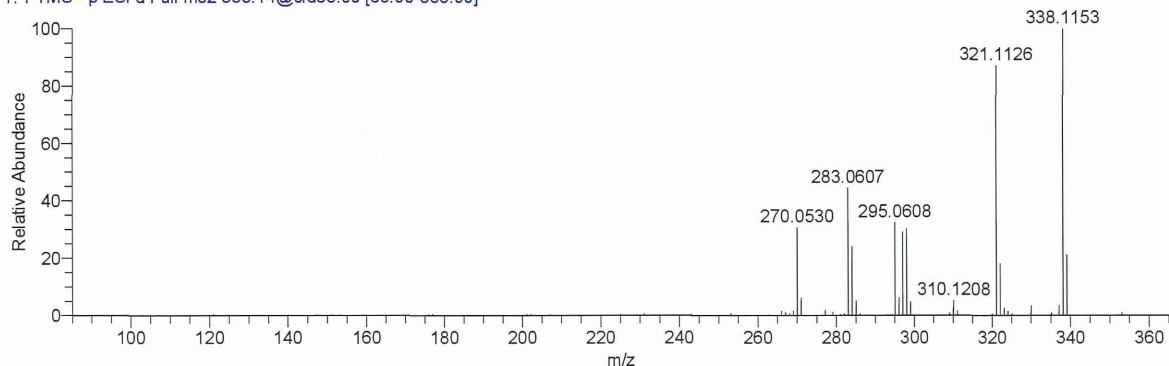


図12 m/z 353.10-353.11のXICと保持時間11.3分のマススペクトル、 m/z 353のプロダクトイオンスペクトル

表3 *G. uralensis*に特徴的な成分のXICピーク強度

	<i>m/z</i> 417, RT 6.0	<i>m/z</i> 417, RT 7.1	<i>m/z</i> 367, RT 11.0	<i>m/z</i> 353, RT 11.3
水耕-1	9.46E+06	4.70E+06	4.86E+06	4.36E+06
水耕-2	6.55E+06	3.15E+06	3.91E+06	4.22E+06
水耕-3	6.77E+06	3.70E+06	4.59E+06	5.21E+06
NIB-3	1.56E+07	7.21E+06	8.36E+06	5.52E+06
NIB-74	1.30E+07	5.91E+06	4.83E+06	3.56E+06
NIB-90	1.25E+07	4.58E+06	5.98E+06	3.56E+06
No.1	1.90E+05	5.90E+04	4.02E+03	7.33E+04
No.2	8.55E+05	2.06E+05	7.98E+03	2.81E+04
No.3	3.41E+06	9.22E+05	4.52E+03	1.30E+04
No.4	1.50E+06	3.76E+05	3.10E+03	2.09E+04
No.5	1.63E+06	5.19E+05	2.75E+03	1.44E+04
No.6	5.92E+06	2.12E+06	4.54E+05	5.13E+05
No.7	3.27E+06	7.14E+05	6.97E+03	5.11E+04
No.8	2.04E+06	7.13E+05	3.91E+03	7.87E+03
No.9	5.38E+06	1.84E+06	1.62E+03	4.97E+03
No.10	1.25E+06	1.94E+05	1.91E+03	1.20E+04
No.11	1.16E+07	4.24E+06	4.40E+06	3.49E+06
No.12	1.25E+06	2.51E+05	7.28E+03	6.56E+04
No.13	1.46E+06	3.38E+05	4.28E+03	3.99E+04
No.14	1.81E+05	3.23E+05	2.41E+04	1.88E+04
No.15	1.10E+06	2.53E+05	5.12E+03	8.89E+03
No.16	7.67E+06	2.69E+06	1.82E+06	1.70E+06
No.17	1.14E+07	5.84E+06	4.52E+06	6.15E+06
No.18	1.49E+07	5.68E+06	3.24E+06	2.57E+06
No.19	8.98E+06	3.41E+06	2.95E+06	2.80E+06
No.20	8.04E+06	2.46E+06	8.23E+05	7.63E+05
No.21	1.29E+07	4.70E+06	5.68E+06	5.04E+06
No.22	1.22E+07	5.04E+06	4.89E+06	3.05E+06

<i>G. uralensis</i>	
<i>G. glabra</i>	<i>G. inflata</i>

平成25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化学的評価に関する研究

—人工水耕栽培システムにより生産した生薬の日本薬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黄連及び甘草について日本薬局方（日局）試験及び個別元素分析を実施した。

黄連は水耕液（大塚A処方）の濃度を変えた4試験区15個体について、日局試験（性状、乾燥減量、成分定量、確認試験、灰分、酸不溶性灰分）及び個別元素を測定した。甘草は水耕栽培月数、循環量が異なる2クローン23検体について、グリチルリチン酸を定量した。また、水耕栽培甘草の特徴を明らかにするために、同様の苗で支持体を用いた養液栽培（パミス水耕及びハイドロボール水耕）甘草及び圃場栽培（北海道、つくば、種子島）甘草について性状の確認及びグリチルリチン酸の定量を行い、規格に適合した試料について日局理化学試験（乾燥減量、確認試験、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量）及び個別元素分析を実施した。

黄連、甘草とも性状は市場品と比較し、道管径が小さい等いくつか異なる傾向を認めたが、各々日局オウレン及びカンゾウに適合すると判断された。水耕栽培黄連は全個体でベルベリン含量及び理化学試験が日局規格値を満たした。一方、今回調査した水耕栽培甘草はグリチルリチン酸含量が低く、日局規格値（2.5%以上）を満たした検体は1個体のみであった。支持体養液栽培甘草は全個体、圃場栽培甘草は北海道栽培品でグリチルリチン酸含量が日局規格値を満たした。水耕栽培黄連および支持体養液栽培甘草は灰分が高い傾向を認め、使用した水耕液中の無機塩類の影響が考えられた。灰分以外の理化学試験は日局規格に適合した。

水耕栽培においては、使用する養液の組成が、生薬の品質に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究協力者

主任技術専門員

武田修己	東京生薬協会	菱田敦之	同	北海道研究部
吉松嘉代	（独）医薬基盤研究所			研究サブリダー
	薬用植物資源研究センター	林 茂樹	同	北海道研究部 研究員
	筑波研究部 育種生理研究室	杉村康司	同	種子島研究部
河野徳昭	同 筑波研究部			研究サブリダー
乾 貴幸	同 筑波研究部	特任研究員	工藤 善	鹿島建設株式会社 上席研究員
北澤 尚	同 筑波研究部			

A. 研究目的

現在、多くを外国からの輸入に頼っている薬用植物を人工水耕栽培において生産が可能となれば、安全性の向上、安定供給に寄与することが期待される。

昨年度、人工水耕栽培により生産された甘草について、日本薬局方（日局）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、酸不溶性灰分測定及びエキス含量の測定）を実施した。その結果、グリチルリチン酸含量が日局規格を満たした個体数は少なかったが、これらの個体はすべて理化学試験全項目で日局規格値に適合していた。

今年度は新たな条件で栽培した水耕栽培甘草と共に、黄連の水耕栽培品についても日局試験（性状、ベルベリン定量、確認試験TLC、乾燥減量、灰分及び酸不溶性灰分測定）の適合性を評価し、その有用性を検討した。

また、水耕栽培甘草の特徴をより明らかにするため、水耕栽培甘草と同様の苗を用いて支持体養液栽培した甘草及び圃場栽培した甘草についても日局への適合性を評価したので報告する。

B. 研究方法

1. 材料

＜黄連＞ 水耕液（大塚A処方）濃度が異なる条件で人工水耕栽培（19.5ヶ月）された黄連15検体、比較対照として市場品黄連5検体及び支持体養液栽培（パミス水耕）1年生1検体を用いた。材料の詳細、実施した試験項目を表1に示す。

＜甘草＞ 人工水耕栽培23検体、支持体養液栽培（パミス水耕及びハイドロボール水耕）9検体、圃場栽培8検体を用いた。なお、形態調査についてのみ、野生甘草（2012年度に報告した厚生労働省科学研究検討用甘草4サンプルNIB-0003、0007、0074、0176）を比較対照として用いた。材料の詳細、実施した試験項目を表2に示す。

2. 性状調査

2-1. 外部形態

＜黄連＞ 外部形態を観察後、市場流通形態に近づくように外皮の一部を除去した後に、重量を測定し、外皮除去品の外観を観察した。

＜甘草＞ 外部形態を観察後、日局記載の性状に基づき径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。

2-2. 内部形態

調査個体の外形と調査部位を図1～3に示した。甘草については各個体について径0.5 cm以上及び径0.5 cm未満より1箇所ずつ切り出し検討した。黄連、甘草ともに試験方法は日局＜5.01 生薬試験法＞に準じ、以下の方法にて試験した。

約24時間水浸・脱気したのち、大型滑走式マイクロトームREM-710・SBリトラトーム（大和光機）およびMC-802Aエレクトロフリーズ（大和光機）で厚さ30 μmの横切片を作製し、オードジャベル液で脱色後にメチレンブルーで染色し、グリセリン水で封入し、鏡検用試料とした。

3. 成分定量

＜黄連＞ 各試料について、日局オウレン定量法に準じてベルベリンを定量した。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：Atlantis 5 μm、4.6 mm × 250 mm (Waters)、カラム温度：40℃、流速：1.0 mL/min、移動相：水/アセトニトリル混液（1:1）1000 mL にリン酸二水素カリウム 3.4 g 及びラウリル硫酸ナトリウム 1.7 g を加えて溶かした溶液、標準化合物：日局標準品 ベルベリン塩化物標準品 (BER0121)

＜甘草＞ 各検体を径0.5 cm以上及び径

0.5 cm 未満に分け、各々について日局カンゾウ定量法の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 μ 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：日局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

黄連及び甘草試料を用いて乾燥減量を測定した。試験方法は日局<5.01 生薬試験法>に準じた。

4-2. 灰分

黄連は混合試料を用い、甘草においてはグリチルリチン酸含量が 2.5%以上あり、試料量が十分であった支持体養液栽培及び圃場栽培甘草を用いて灰分を測定した (表 1)。試験方法は日局<5.01 生薬試験法>に準じた。

黄連の株 No. 1 については、試料量が少なかったため、試料量約 1 g を用い、日局<5.01 生薬試験法>の 2 分の 1 量を用いて測定した。

4-3. 酸不溶性灰分

黄連は株 No. 1 及び混合試料を用い、甘草においてはグリチルリチン酸含量が 2.5%以上あり、試料量が十分であった支持体養液栽培及び圃場栽培甘草を用いて酸不溶性灰分を測定した (表 1)。試験方法は日局<5.01

生薬試験法>に準じた。

4-4. 確認試験

<黄連> 混合試料 0.25 g を用い TLC 確認試験を実施した。なお、試料量の都合上、日局記載の 2 分の 1 量にて実施した。すなわち、粉末 0.25 g にメタノール 10 mL を加え、2 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とした。

スポット量：5 μ L、展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (100) 混液 (7:2:1)、展開距離：7cm、TLC プレート：TLC ガラスプレート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck)、確認波長：365 nm

<甘草> グリチルリチン酸含量が 2.5%以上あり、試料量が十分であった支持体養液栽培及び圃場栽培甘草を用い TLC 確認試験を実施した。なお、試料量の都合上、日局記載の 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 μ 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 F₂₅₄ (Merck)、確認波長：254 nm

4-5 エキス含量

甘草において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支持体養液栽培及び圃場栽培甘草を用い、希エタノールエキス含量を測定した。なお、試料量の都合上、日局記載の 2 分の 1 量にて実施した。すなわち、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 $^{\circ}$ 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。

5. 個別元素分析

黄連および甘草についてマイクロ波試料前処理装置により処理後、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP/MS）を用いてヒ素、カドミウム、水銀、鉛を測定した。誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP/MS）：Agilens7500cx（Agilent Technologies）、マイクロ波試料前処理装置：ETHOS PRO STARTD（マイルストーンゼネラル㈱）

C. 結果

1. 性状調査

1-1. 外部形態

＜黄連＞ 水耕栽培品は、不整の円柱形で、長さ2～4 cm、まれに10 cmに達し、径0.2～0.7 cmで多少湾曲し、しばしば分枝する（図1）。外面は灰黄褐色を呈し、輪節があり、多数の根の基部を認める。おおむね一端に葉柄の残基がある。弱いにおいがあり、味は極めて苦く、残留性で、だ液を黄色に染める。

以上の性状は日局収載オウレンの性状に一致する。ただし、水耕栽培品は市場品と比べて1) 表面に葉柄の残基が瓦状に重なり、2) 多数の分枝がみられる点で異なる。支持体養液栽培品は全体的に小さなことを除いて、水耕栽培品とほぼ同じ特徴を有していた。

＜甘草＞ 水耕栽培品は2012年度調査品と同様の傾向を示した。すなわち細長い円錐形～円柱形を呈し、分枝する（図2）。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、放射状の構造を示す。

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で異なる。

特に1)は日局の性状記載とは異なるが、野生品においても個体全体を見れば円錐形であり、分枝しないことは無い。野生品は加工調製した結果、円柱形で分枝しない状態に整えられて流通すると考えられ、代表的な市場品の記載が日局の性状であることを考えると、水耕栽培品はこれから大きく外れるものではないと考える。

圃場栽培品は、細長い円柱形を呈し、水耕栽培品に比べて分枝は少ない。細根がある点が野生品と異なる（図3）。

1-2. 内部形態

＜黄連＞ 日局オウレンの内部形態性状の記載と比較したところ、水耕栽培品は、以下の特徴を有していた（図4、5）。

- 1) コルク層は薄膜のコルク細胞からなる。
- 2) 水耕液1/8のみで皮部柔組織中にはコルク層に近い部位に石細胞群、形成層に近い部位に黄色の師部繊維を認めるが、水耕液1/2、1/4、1/6ではどちらも認めない。日局性状では認めるものが多いとしている。
- 3) 木部は主として道管、仮道管、木部繊維からなり、放射組織は明らかで、髄は大きい。
- 4) 髄中には石細胞又は厚膜木化した細胞を伴う石細胞を認めない。日局性状では認めることがあるとしている。
- 5) 柔細胞には細かいでんぷん粒を含む。

以上の結果から、水耕栽培品は日局の内部形態性状記載と一致するといえる。ただし、水耕栽培品は、6) 市場品黄連に較べて木部が少なく、発達が弱いという特徴を有していた。

また、前記2)のとおり、皮部柔組織中の石細胞群、師部繊維の有無は水耕液の肥料濃度と相関があることが示唆された。

支持体養液栽培品は市場品よりも水耕栽培品に類似していた。

＜甘草＞ 水耕栽培品（図6-1～5）、圃場栽培品（図7-1～4）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