

2:15 – 2:30 pm	New Technology and Methods of TCM Testing  <i>Mr Jiandong <u>YU</u>, Chief Pharmacist, Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine, National Institutes for Food and Drug Control, China Food and Drug Administration, China</i>
2:30 – 2:45 pm	Evaluation of the Botanical Origin of <i>Cimicifuga</i> Products in the Japanese Market  <i>Dr Sayaka <u>MASADA</u>, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, Japan</i>
2:45 – 3:00 pm	Metabolomics Approach for Analysis of Natural Products  <i>Prof Dongho <u>LEE</u> College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Korea</i>
3:00 – 3:30 pm	Q&A
3:30 – 4:00 pm	Tea Break
<b>Session 4: Developments in Analysis of Herbal Medicines – Part II</b> <b>Facilitator: Prof Fumiyuki Kiuchi</b>	
4:00 – 4:15 pm	Phytochemical and Biological Comparative Study on Hulled and Unhulled Adlay  <i>Prof Eun-Kyoung <u>SEO</u>, College of Pharmacy, Ewha Womans University, Korea</i>
4:15 – 4:30 pm	Origin Discrimination Method - case study on the Umbelliferae  <i>Dr Rack Seon <u>SEONG</u>, Director of Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Korea</i>
4:30 – 4:45 pm	Screening of Toxic Natural Substances in Herbal Medicines by Liquid Chromatography-Coupled Quadrupole Tandem Mass Spectrometry  <i>Dr Yun <u>ZENG</u>, Analytical Scientist, Pharmaceutical Laboratory, Pharmaceutical Division, Applied Sciences Group, Health Sciences Authority, Singapore</i>

4:45 – 5:00 pm	High Performance Thin-Layer Chromatography – For Identification of Medicinal plants and the Detection of Possible Adulteration  <i>Dr Eike <u>REICH</u>, Head of Laboratory, CAMAG Laboratory, Switzerland</i>
5:00 – 5:30 pm	Q&A
5:30 pm	End of Symposium

\*: Session topics and presentation titles are subject to further changes.

## 分担研究報告書

分担研究課題 生薬の薄層クロマトグラフィー試験法に関する研究

研究分担者 木内 文之 慶應義塾大学薬学部 教授

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、日本薬局方に薄層クロマトグラフィーによる確認試験が規定されていない生薬について、TLCによる確認試験法を検討し、適切な条件が設定できた生薬については、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に新たな生薬の確認試験法として提案することを目的として研究を実施した。今年度は、アマチャ、カロコン、キキョウ、シャゼンシ、シュクシャ、タクシャ、チンピ、ハッカ等14品目について新たなTLCによる確認試験を検討し、アマチャ、シャゼンシ、シュクシャ、モッコウ、レンギョウについてTLCによる確認試験法を設定した。本研究の成果は、日本薬局方の信頼性の向上と日本で用いられる生薬の品質の確保に貢献することが期待される。

### 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  
薬品部

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

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

袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部

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

平川尚子 和光純薬株式会社品質保証部

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

### 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 $R_f$ 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

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。これまで我々は日本薬局方に収載されている TLC を用いた生薬の確認試験について典型的な TLC クロマトグラムを集積し、その際に明らかとなった問題点について改良法を設定し、日本薬局方の確認試験の改正案として日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案してきた。これまでの研究で、日本薬局方に収載されている TLC を用いた総ての確認試験並びに純度試験についての検討が終了したことから、本研究では、TLC による確認試験が設定されていない生薬 (Table 1) について、新たな TLC による確認試験法を検討し、適切な条件が見出せた生薬については、新たな確認試験法として日本薬局方原案審議委員会に提案することとした。

## 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、TLC による確認試験が設定されていない生薬について、TLC による新たな確認試験を設定するために、設定品目の検討、指標成分の選定、試験法の構築を行い、試験法が確立できた品目については、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案した。実験には、Merck 社と和光純薬工業から市販されている TLC プレートを用いた。なお、TLC による確認試験を迅速化するために、TLC の展開距離は 7 cm とした。

今年度検討した生薬の試験に用いた展開溶媒並びに指標スポットとその  $R_f$  値の平均値を Table 2 に示す。

## C. 研究結果

### 1. TLC を用いた新たな確認試験法の検討

#### (1) アマチャ

昨年度検討を開始したフィロズルチンとヒドランゲノールを指標とする確認試験について、ヒドランゲノールが薄い試料の取扱いを検討した。抽出溶媒にメタノールを用いると、ヒドランゲノールが薄い試料でも 2 つの成分の確認が可能であることから、抽出溶媒をアセトンからメタノールに変更することとした。なお、メタノールで抽出するとヒドランゲノールの上にもう一つ UV 吸収のあるスポットが認められるが、この 3 つ目のスポットは 4-ヒドロキシ安息香酸であった。

以上の検討結果を基に、アマチャの確認試験を以下のように設定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。(Fig. 1)

#### 【確認試験】

本品の粉末 1 g にメタノール 10 mL を加えて、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィ用アマチャジヒドロイソクマリン 2 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にジエチルエーテル／ヘキサン／ギ酸混液 (5 : 5 : 1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、試料溶液から得られた数個のスポットのうち 2 個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び  $R_f$  値が等しい。

#### (2) カロコン

$\alpha$ -スピナステロールを指標とし、希硫酸を噴霧して加熱後 365 nm の紫外線を照射して検出する新規確認試験法が提案された。ステロールを多く含むニンジン、キキョウ、バイモ、カッコン、ビャクゴウ、サンヤク、バクモンドウ、テンモンドウ、ゴシツと比較検討した結果、 $\alpha$ -スピナステロールはキキョウ

に多く含まれ、ゴシツにも若干含まれていたが (Fig. 2)、これらの生薬とは形状が異なることから、判別は可能である。α-スピナステロールの標品は 25 mg 48,000 円と高価である点が問題である。カロコンにはキカラスウリ、オオカラスウリなど複数の基原種が規定されているが、市場ではほぼチョウセンカラスウリ (*Trichosanthes kirilowii*) を基原とする生薬のみである。確認試験を設定するにはすべての基原種の TLC パターンを確認する必要があることから、医薬基盤研で栽培している植物を用いて今後検討することとした。研究協力者が実施した TLC データを比較すると  $R_f$  値が 0.5 付近のものと 0.35 付近のものがあることから、その原因も調査する必要がある。

### (3) キキョウ

昨年度検討を開始したアシル基を加水分解で除いたサポニンを 1,3-ナフタレンジオールによって検出する方法について、継続して検討した。この試験法でプラチコジン D の下に検出されるスポットは、ポリガラシン D<sub>2</sub> の可能性が高いが、さらに確認する必要がある。追試の結果プラチコジン D の下に 2 つスポットが見えるものがあった。(Fig. 3) スポットの確認には標品を同時に展開する方が良いことから、TLC 用標準生薬を基盤研で作る方向で 1 年程度かけて検討することとした。市場品は皮去りであるが、皮の部分にサポニン含量が高いことから皮付きと皮去りの両方を検討することとした。

### (4) ゴオウ

日局のゴオウの確認試験には Liebermann-Burchard 反応による胆汁酸の呈色反応とビリルビンの沈殿反応が設定されているが、ビリルビンについては成分含量の規定がある。そこで、胆汁酸 (デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸) を指標にし、増

量の目的で使用される可能性のある豚胆汁に対する純度試験 (指標物質: ヒオデオキシコール酸) を兼ねた TLC による新規確認試験が提案された。(Fig. 4) ゴオウは一般用医薬品に広く使用されており、メーカーへの影響が大きいと考えられる。提案された試験法案では展開溶媒にトルエンを使っているが、トルエンを使わない溶媒系に変更するとともに、指標成分を日局に規格があるコール酸のみとし、ゴオウ自体が高価であることから試料量をより少なくできるように再検討することとした。また、豚胆汁による混ぜ物の頻度がどの程度かを調査し、日局の純度試験として設定する必要があるかどうかを検討することとした。

### (5) シャゼンシ

日局の薄層クロマトグラフィー用シャゼンシの規格に用いられている試験法を準用し、標品として薄層クロマトグラフ用シャゼンシを用いることとした。過去の市場品調査では、日局で規定している *Plantago asiatica* の他に、中国薬典に規定されている *P. asiatica* と *P. depressa*、さらに *P. japonica* が市場で混在している可能性が指摘されている<sup>1)</sup>が、*P. asiatica* は粒が大きく 100 粒重が 50 mg 以上となり、他の 2 種 (100 粒重 40 mg 以下) とは区別でき、薄層クロマトグラフィー用シャゼンシの規格を設定した際の調査でも混在は見られなかった。追試した結果、色調が JPTI<sup>2)</sup> に掲載されているカラー写真と異なる ( $R_f$  値 0.5 付近の赤色のスポットが黒っぽくみえる) 例が報告されたが、加熱時間によって色調が変化する。プランタゴグアニジン酸は安定して青系統に発色するが時間によってくすんでくる。薄層クロマトグラフィー用シャゼンシを同時に展開することにし、確認スポットは  $R_f$  値 0.25 付近の濃青色のスポット (プランタゴグアニジン酸) とすることとして、確認試験法を以下のように設

定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。

#### 【確認試験】

本品の粉末 1g をとり、メタノール 5mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用シャゼンシの粉末 0.3 g をとり、メタノール 1 mL を加え、水浴上で 3 分間加温する。冷後、遠心分離し、上澄液を標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液 5 $\mu$ L 及び標準溶液 10 $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にアセトン/酢酸エチル/水/酢酸 (100) 混液 (10 : 10 : 3 : 1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱するとき、試料溶液から得た  $R_f$  値 0.25 付近の濃い青のスポットは、標準溶液から得た  $R_f$  値 0.25 付近のスポットと色調が等しい(プランタゴグアニジン酸)。(Fig. 5)

#### (6) シュクシャ

昨年度の検討結果に基づいて酢酸ボルニルを標品としてスポットし、酢酸ボルニルとボルネオール ( $R_f$  値 0.3 付近) のスポットを確認する試験法を設定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。この試験法を日生連で追試した結果、粉碎時にボルネオールが揮発して薄くなり、またシュクシャ末では粉碎後、時間が経過すると検出が困難になる場合があることが報告された。また、ミャンマー、ラオス産に比べ、ベトナム産は指標スポットが薄い傾向があった。日局ではシュクシャ末の精油含量がシュクシャの 2 / 3 に設定されていることから、シュクシャ末ではスポット量を 1.5 倍と 2 倍にして追試をしてもらうこととした。

#### 【確認試験】

本品の粉末 1.0g をとり、ヘキサン 20mL を加えて、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に酢酸ボルニル/ヘキサン混液 (1 : 1000) を標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液 10  $\mu$ L 及び標準溶液 2  $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/ジエチルエーテル/メタノール混液(15 : 5 : 1)を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び  $R_f$  値が等しい。また、 $R_f$  値 0.3 付近に標準溶液から得たスポットと同様の色調のスポットを認める。(Fig. 6)

#### (7) タクシャ

昨年度検討を開始した試験法について、市場品を集めて検討した結果、アリソール B およびアリソール B モノアセテートが見え難いものがあったが、そのようなサンプルではアリソール A が見える。建沢には成分が少ないものがあった。現在流通している生薬は、アリソール B とそのモノアセテートを含むものが主流であった。広西産のサンプル (7-9) は、一般市場にはないサンプルと考えられる (Fig. 7)。以上の点をふまえ、3 つのスポットのうちのどれか 1 つを確認することにし、アリソール A、B 並びに B モノアセテートの混合物を標品としてスポットする試験法を設定した。

また、20%酢酸を用いて 60 分間還流抽出すると、アリソール B モノアセテートはアリソール A モノアセテートへ、アリソール B はアリソール A へ変化することが報告された。別途検討が進んでいる処方中のタクシャ

の確認試験ではアリソール A を確認することとなっていることから、この結果は処方での確認試験に応用可能である。

#### 【確認試験】

本品の粉末 1.0 g にジエチルエーテル 10 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。また、確認試験用タクシャトリテルペン混合試液を標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液 5  $\mu$ L 及び標準溶液 1  $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/ヘキサン/酢酸混液 (10 : 10 : 3) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を均等に噴霧し、105°C で 5 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち少なくとも 1 個のスポットは、標準溶液から得た 3 個のスポットのうちの 1 個のスポットと色調及び  $R_f$  値が等しい。

#### (8) チンピ

ミカン科植物の果皮を基原とする代表的生薬にはチンピの他にトウヒなどがある。ミカン科を基原とする日局収載生薬について検討した結果、チンピに特有と思われる青色蛍光を持つ 3 つのスポットを見出し、シネンセチン、ノビレチン、3,3',4',5,6,7,8-ヘプタメトキシフラボンと同定した。これらの化合物を確認するための TLC 分析条件を設定し、基盤研提供のチンピ 18 サンプルについて分析した結果が報告された。(Fig. 8a) 広東省新会産サンプル (16, 17) にのみ、 $R_f$  値 0.8 付近にスポットが認められた。*Citrus unshu* を基原とするものと、*Citrus reticulata* を基原とするもの (薄い皮のミカン) の成分的な違いとして、5-demethylnobiletin が *C. reticulata* には比較的多く含まれるが *C. unshu* にはほとんど含まれていないことや nobiletin が *C.*

*reticulata* には著しく多く含まれていることなど幾つかの成分の組成や有無で鑑別可能であることが報告されている。この方法での鑑別によると現在の中国産は *C. reticulata* を基原とするものが非常に少なくなっている。なお、中国薬典 2010<sup>3)</sup> では、*C. unshu* は *C. reticulata* の栽培変種とされている。サンプル 16, 17 は、基原が違う可能性がある (このサンプルは、かなり古いもので、通常では市場に流通しないものである。成分的にはナリンギンが多いサンプルである)。この分析法を追試した結果、*Citrus reticulata* 基原のもので主要 3 つのスポット以外にもスポットがでるサンプルがあることが報告された。

(Fig. 8b, サンプル 5) 皮の厚いミカンの仲間では主要 3 スポット以外にもスポットが認められる。(Fig. 8b, サンプル 8~10) 市場品は *C. unshiu* がほとんどであるので *C. reticulata* 基原のものを探するのは難しいが、遺伝子鑑別で *C. unshiu* と *C. reticulata* の区別は可能であることから、鑑別済みの *C. reticulata* を分析して、明瞭な 3 つのスポットのみが認められるかをチェックすることとした。

#### (9) バクモンドウ

生薬品質集談会での検討結果を基にした方法が提案された (Fig. 9a)。この方法だとヤブラン類 (*Liriope*) を基原とするものが区別できる。また、麦門冬エキスのバクモンドウの確認試験に用いられている、イヌリン様粘液質多糖類を検出する方法の提案があった (Fig. 9b)。ただし、この方法ではヤブラン類 (*Liriope* spp.) とは区別できない。生薬品質集談会の報告をもとにした方法はヤブラン類との区別ができるが、スポットが多くどれが指標成分か分かりにくい。糖類と思われるスポットが大きく出ているため、抽出溶媒を 1-ブタノールからエーテルなどに変えるなど更なる条件検討が必要である。17 局

第一追補収載を目指して継続して検討することとした。

#### (10) ハッカ

昨年度の検討結果を基に、メントールを同時に展開し、検出試薬に4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液を用いる確認試験法を設定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。メントールは日局の試薬・試液に収載されており（各条品を使っている）、日局各条品が25g千円程度で入手可能である。

##### 【確認試験】

本品の粉末1.0gにジエチルエーテル10mLを加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別にL-メントール1mgをジエチルエーテル1mLに溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液及び標準溶液2μLを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン混液（7:3）を展開溶媒として約7cm展開した後、薄層板を十分に風乾する。これに4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液を均等に噴霧し、105°Cで5分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち1個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び $R_f$ 値が等しい。

(Fig. 10)

#### (11) ボウフウ

ボウフウに特異的な成分と考えられる4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノールを確認する試験法が提案されたが、1'-*O*-グルコシルシミフギンとの分離が十分ではなかった。1'-*O*-グルコシルシミフギンの方が含量が多いが、こちらはボウフウに特異的ではない。展開溶媒を酢酸エチルからギ酸エチルに変更し、2-ブタノンの割合を増やしてギ酸エチ

ル/2-ブタノン/ギ酸/水混液（20:5:5:1）にすることにより分離は改善された。(Fig. 11a) この試験法では、指標成分の4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノールとその下のスポットである1'-*O*-グルコシルシミフギンが、スポット量を増やすあるいは濃度を濃くすることにより分離しなくなる可能性があることから、試料濃度についてさらに検討することとした。

また、関連する生薬であるハマボウフウと区別できるかの検討が必要である。ハマボウフウとの区別に関しては、スコポレチンの上のスポットがボウフウには認められるがハマボウフウには認められないため、指標として利用できる可能性が認められた。(Fig. 11b) スコポレチンの $R_f$ 値が0.2付近になるように展開溶媒を調整し、再度検討することとした。

#### (12) モクツウ

3,4-ジヒドロキシフェネチルアルコールグルコシドを指標とした新規試験法が提案された。(Fig. 12) この指標成分は他のアケビ科植物からも報告があり、特異性が劣り、多くのスポットの中の一つのスポットなので標品を同時に展開する必要がある。このスポットは加熱開始2分後に赤紫色に呈色し、徐々に黄褐色に変化し、最終的に灰緑色に呈色することから、色の変化で特異性を出すということも考えられる。形態が類似するアオツツラフジやムベとの区別が可能か比較検討し、よりよい条件を探すこととした。

#### (13) モッコウ

昨年度の検討を基に、デヒドロコスツスラク톤を指標成分とする確認試験法を設定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。デヒドロコスツスラク톤の発色には希硫酸を採用し、スポットの表現を「 $R_f$ 値0.5付近に赤紫色のスポットを認め、その直下に灰



青色～灰褐色のスポットを認める」とすることとした。

#### 【確認試験】

本品の粉末1.0 gをとり、メタノール10 mLを加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 5  $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン混液 (7:3) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧し、105°C で 5 分間加熱後、放冷するとき、 $R_f$  値 0.5 付近に赤紫色のスポットを認め、その直下に灰青色～灰褐色のスポットを認める。

(Fig. 13)

#### (14) レンギョウ

レンギョウに特異的な成分と考えられるレンギョールを指標成分とする試験法が提案された。追試の結果問題なく実施できたことから、レンギョールを指標成分とする確認試験法を設定し、日本薬局方原案審議委員会に提案した。なお、検出試薬の噴霧量が多すぎると、バックグラウンドの色が赤くなる。

#### 【確認試験】

本品の粉末1 gにメタノール10 mLを加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 10  $\mu$ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105°C で 5 分間加熱するとき、 $R_f$  値 0.3 付近に赤紫色～赤褐色のスポットを認める。(Fig. 14)

## 2. FHH での情報収集

Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH)の第12回 Standing Committee Meeting 並びにこの会議に関連した国際シンポジウムが、2014年11月25-27日にシンガポールで開催された。この会議には、中国、香港、日本、韓国、シンガポール、カナダ、ベトナム並びにWHOの代表が参加し、西太平洋地域内での生薬に関する国際調和をテーマに討議が行われた。セッションの概略をTable 3に示す。会議並びにシンポジウムでは、各国/地域での生薬に関連する規制等の最新情報が発表され、質疑討論が行われた。この会議並びにシンポジウムは、日本と共通した多くの生薬を使用している中国、韓国、香港などの状況を把握し、これらの国々と協調して生薬を有効に利用して行く上で、非常に有用であった。

#### D. 考察

薄層クロマトグラフィーは、特別な装置を必要とせず、簡便に行えることから、日本薬局方の生薬の確認試験として多用されているが、一般的に  $R_f$  値の再現性が悪いなどの問題もある。本研究では、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、日本薬局方に TLC による確認試験が設定されていない生薬について TLC を用いた新たな確認試験法の検討を行ってきた。

今年度、日局に TLC による確認試験が設定されていない 14 の生薬について検討を行い、アマチャ、シャゼンシ、シクシヤ、タクシヤ、モッコウ、レンギョウについて新たに TLC による確認試験を設定した。これらの生薬は、これまで確認試験が設定されていないか呈色反応のような特異性が低い方法が設定されていたものであり、今回設定した TLC による確認試験は、日局生薬の品質の担保に貢献することが期待される。

## E. 結論

日本薬局方に収載されている生薬のうち、TLC による確認試験が設定されていないものについて、あらたな TLC による確認試験を設定するために、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を中心とする研究班を組織し、試験法の設定のための検討を行った。

今年度検討した 14 品目の生薬のうち、アマチャ、シャゼンシ、シユクシヤ、タクシヤ、モッコウ、レンギョウについては新規確認試験法案を作成して、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案した。これらの試験法は、日本薬局方原案審議委員会生薬等 (B) 委員会での審議を経て、日本薬局方への収載が予定されている。これらの試験法は、日本薬局方の信頼性の向上と日本で用いられる生薬の品質の確保に貢献することが期待される。

### (参考文献)

1. 川村智子, 久田陽一, 奥田和代, 星野哲志, 野呂征男, 田中俊弘, 児玉朝香, 西部三省: 車前草の生薬学的研究 (第 13 報) オオバコ属植物の趣旨の成分と車前子の品質について. *Natural Medicines*, **52**: 5-9 (1998).

2. 日本公定書協会編: 日本薬局方技術情報 2010 第十五改正第一追補/第二追補対応, 生薬の鏡検写真と生薬及び漢方処方エキス の薄層クロマトグラフィー確認試験例. *じほう*, 2010, p. 9.
3. 国家薬典委員会編: 中華人民共和国薬典 2010 年版, 中国医药科学技术出版社, 2010, p. 176-177.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

神本敏弘, 余村かおり, 菊地祐一, 平倉一弘, 牧野文昌, 橋本和則, 西村浩昭, 碓井公利, 袴塚高志, 合田幸広, 川原信夫, 木内文之: TLC による炙甘草と甘草の化学的識別, *生薬学雑誌*, **68**, 70-77 (2014).

### 2. 学会発表

木内文之: 生薬の品質評価と有効成分. 日本生薬学会第 61 回年会, 福岡 (2014.9).

## G. 知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得: 該当なし
2. 実用新案登録: 該当なし
3. その他: 該当なし

Table 1 TLCによる確認試験が設定されていない生薬(日局 16 第2追補)

確認試験なし

	生薬	備考
1	カゴソウ	
2	ガジュツ	
3	カノコソウ	
4	カロコン	H26 検討開始
5	ケンゴシ	
6	コウブシ	
7	サイシン	H25 確認試験作成済
8	サンキライ	
9	シュクシャ	H26 確認試験作成
10	ショウズク	
11	ショウマ	処方:フェルラ酸・イソフェルラ酸混合物
12	センキュウ	処方:::(Z)-リグスチリド
13	タイソウ	
14	タクシャ	H25 検討開始, H26 継続
15	トウキ	処方:::(Z)-リグスチリド
16	ニガキ	
17	バクモンドウ	H25 検討開始, H26 継続
18	ハチミツ	
19	ハマボウフウ	H25 検討開始, H26 継続
20	ハンゲ	
21	ヤクチ	
22	ロジン	

	生薬	備考
14	ゲンノショウコ	
15	ゴオウ	
16	ゴシツ	処方:理化学試験用ゴシツ
17	ゴシュユ	
18	コメデンプン	
19	コロンボ	
20	コンズランゴ	
21	サフラン	
22	サンヤク	H25 確認試験作成済
23	シャゼンシ	H26 確認試験作成
24	ジュウヤク	
25	セッコウ	
26	セネガ	
27	センコツ	
28	ソウハクヒ	
29	ソボク	
30	チモ	H25 確認試験作成済
31	チョウジ	
32	チョウトウコウ	処方:リンコフィリン・ヒルスチン
33	チヨレイ	
34	チンピ	H26 検討開始
35	トコン	
36	トチュウ	
37	トラガント	
38	ハッカ	H25 確認試験作成済
39	ビヤクシ	
40	ブクリョウ	
41	ボウイ	
42	ボウコン	
43	ホミカ	
44	ボレイ	
45	モクツウ	
46	モッコウ	H26 確認試験作成
47	ヨクイニン	
48	リュウガンニク	
49	リュウコツ	
50	レンギョウ	H26 確認試験作成
51	レンニク	

呈色等の確認試験あり

	生薬	備考
1	アセンヤク	
2	アマチャ	H26 確認試験作成
3	アンソッコウ	
4	イレイセン	
5	エイジツ	
6	オウセイ	
7	オンジ	
8	カッセキ	
9	カンテン	
10	キキョウ	H25 検討開始, H26 継続
11	キジツ	
12	クジン	
13	ケツメイシ	

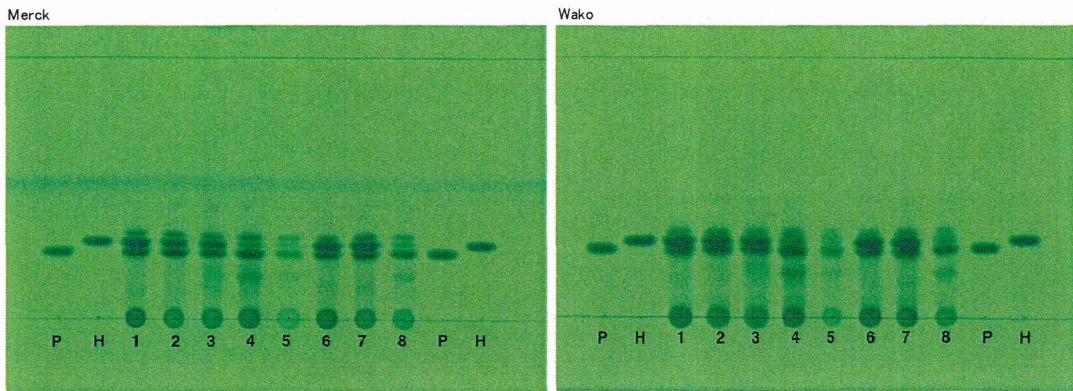
Table 2 指標成分の Rf 値(実測値の平均, 7 cm 展開)

生薬	溶媒系	Merck	Wako	指標成分
アマチャ	ジエチルエーテル/ヘキサン/ギ酸 (5:5:1)	0.32	0.34	ヒドラングエノール
		0.27	0.29	フィロズルチン
カロコン	ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液 (20:10:1)	0.39	0.36	$\alpha$ -スピナステロール
キキョウ	酢酸エチル/1-プロパノール/水/酢酸(100) 混液(7:5:4:1)	0.28	0.38	プラチコジン D
シャゼンシ	アセトン/酢酸エチル/水/酢酸(100)混液 (10:10:3:1)	0.24	0.25	プランタゴグアニジン酸
シュクシャ	ヘキサン/ジエチルエーテル/メタノール (15:5:1)	0.55	0.56	酢酸ボルニル
		0.31	0.30	ボルネオール
タクシャ	酢酸エチル/ヘキサン/酢酸(100)混液 (10:10:3)	0.54	0.53	アリソール B モノアセテート
		0.36	0.36	アリソール B
		0.22	0.21	アリソール A
チンピ	ヘキサン/アセトン混液(1:1)	0.43	0.43	3,3',4',5,6,7,8- ヘプタメキシフラボン
		0.38	0.39	ノビレチン
		0.34	0.35	シネンセチン
ハッカ	ヘキサン/アセトン(7:3)	0.51	0.51	トメントール
バクモンドウ	エタノール(99.5)/水/酢酸(100)(120:80:1)	0.33	0.77	イヌリン様フルクタン化合物
	酢酸エチル/メタノール/水(8:3:1)	0.53	0.55	成分不明
ボウフウ	ギ酸エチル/2-ブタノン/ギ酸/水混液 (20:5:5:1)	0.28	0.25	4'-O-グルコシル-5- O-メチルピサミノール
モッコウ	ヘキサン/アセトン(7:3)	0.49	0.47	デヒドロコスツスラクトン
		0.46	0.44	コスツノリド
レンギョウ	酢酸エチル/メタノール/水(20:3:1)	0.32	0.29	レンギョール
ゴオウ	トルエン/酢酸(100)混液(2:1)	0.45	0.42	デオキシコール酸
		0.42	0.39	ケノデオキシコール酸
		0.35	0.33	ヒオデオキシコール酸
		0.17	0.18	コール酸

Table 3 12th FHH Standing Committee Meeting and 5th International Symposium

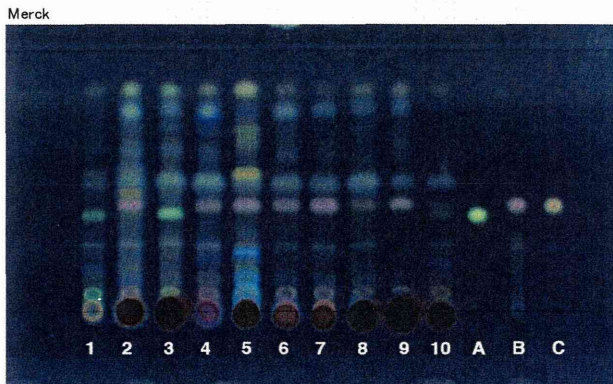
<b>12th FHH Standing Committee Meeting</b>	
Presentation of country/region report related to the latest development on herbal medicines	
Australia	Australian regulation of complementary medicines
Canada	Pharmacovigilance of Natural Health Products and Nonprescription Drugs in Canada Progress of TCM Regulation In China and Prospect of FHH
China	
Hong Kong	Progress Report on Regulation on Chinese Medicine in Hong Kong
Japan	Pharmacopoeial topics on Herbal Medicines in Japan from 2013 to 2014
Korea	Recent progress on regulations of Herbal Medicines in Korea
Singapore	Regulation of Complementary Health Products in Singapore and ASEAN Traditional Medicines & Health Supplements Harmonisation – An Update
Vietnam	Update and development of materia medica monographs to prepare for VP V publishing
Report of Sub-committee I: Nomenclature and standardization	
Japan	Comparative studies on Japanese Pharmacopoeia and Hong Kong Chinese Materia Medica Standards
Report of Sub-committee II: Quality assurance and information	
Korea	Update on FHH RMPM establishment guideline
CAMAG (observer)	Quantitative High Performance TLC of RMPM to be used for identification and semi-quantitative limit tests
Korea	Report for FHH Website Revitalization
Report of Sub-committee III: Adverse drug reaction	
China	ADR Monitoring & Technical Requirement for Registration of TCM in China
<b>5th International Symposium of FHH</b>	
Session 1: Pharmacovigilance and Challenges of Herbal Medicines	
Duc VU	Pharmacovigilance of Natural Health Products in Canada Case Studies: 1) Ibogaine use in Detoxification and 2) Melatonin use in Pediatric Patients
Hwee-Ling KOH	Adulterated Sexual Performance Enhancers with PDE-5 Inhibitors and Their Analogues
Chee Leong KEE	Adulteration and Authentication of Herbal Medicines
Session 2: Quality Control of Herbal Medicines and Developments in Regulation	
Jiangyong YU	Research and Development of TCM Quality Control Standard
Polly CHAN	Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS)
Alice WONG	Regulation of Chinese Medicine in Hong Kong
Alex LAW	Comparison between Chinese and Western Approaches to Medicine
Jie LIU	Global Herbal Medicines Standard Initiative by United States Pharmacopoeia

Session 3: Developments in Analysis of Herbal Medicines – Part I	
Jiandon YU	Preparation and Testing of TCM Reference Materials
Jiandon YU	New Technology and Methods of TCM Testing
Sayaka MASADA	Evaluation of the Botanical Origin of Cimicifuga Products in the Japanese Market
Dongho LEE	Metabolomics Approach for Analysis of Natural Products
Session 4: Developments in Analysis of Herbal Medicines – Part II	
Eun-Kyoung SEO	Phytochemical and Biological Comparative Study on Hulled and Unhulled Adlay
Rack Seon SEONG	Origin Discrimination Method - case study on the Umbelliferae
Yun ZENG	Screening of Toxic Natural Substances in Herbal Medicines by Liquid Chromatography-Coupled Quadrupole Tandem Mass Spectrometry
Eike REICH	High Performance Thin-Layer Chromatography – For Identification of Medicinal plants and the Detection of Possible Adulteration



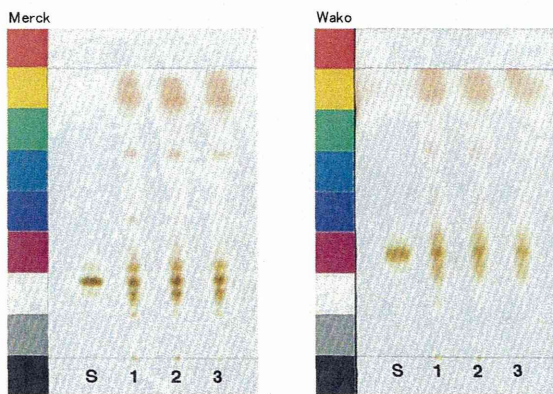
P:フィロズルチン, H:ヒドロコルチゾール, 1~8:市場品サンプル  
 展開溶媒: ジエチルエーテル/ヘキサン/ギ酸混液 (5:5:1), 検出方法: 紫外線 (主波長254 nm) 照射

Fig. 1 アマチャの確認試験



1:カロコン, 2:ニンジン, 3:キキョウ, 4:パイモ, 5:カッコン, 6:ピャクゴウ, 7:サンヤク,  
 8:バクモンドウ, 9:テンモンドウ, 10:ゴシツ, A:α-スピナステロール, B:β-シトステロール,  
 C:ステグマステロール  
 展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液(20:10:1)  
 検出方法:希硫酸噴霧,105°C10分間加熱,その後紫外線(主波長365 nm)照射

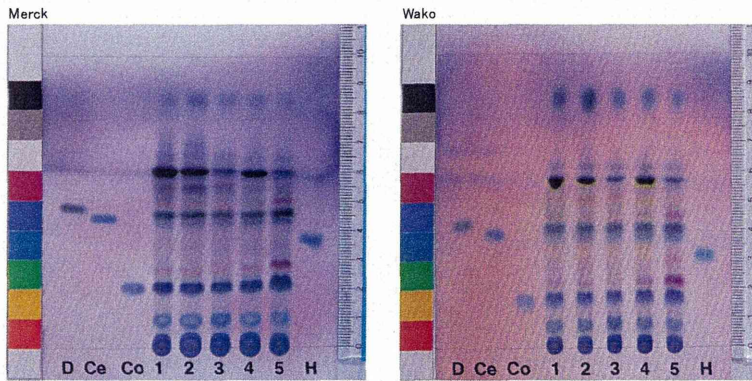
Fig. 2 カロコンのTLC分析



S:プラチコジD, 1~3:市場品  
 展開溶媒:酢酸エチル/1-プロパノール/水/酢酸(100)混液(7:5:4:1)  
 検出方法:希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱

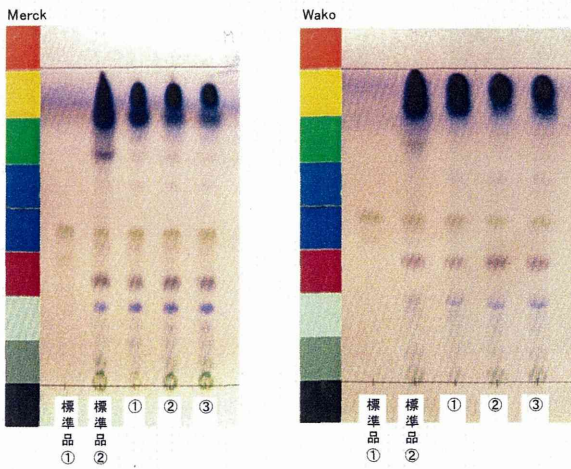
Fig. 3 キキョウのTLC分析





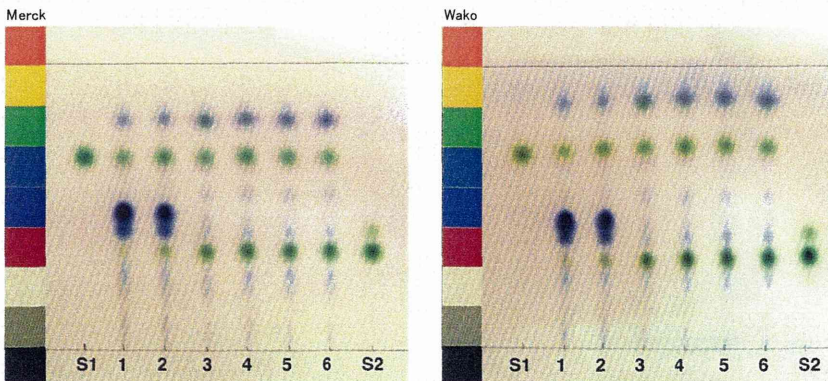
D: デオキシコール酸, Ce: ケノデオキシコール酸, Co: コール酸, H: ヒデオキシコール酸  
 1~5: 市場品  
 展開溶媒: トルエン/酢酸(100)混液(2:1)  
 検出方法: 噴霧用4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 4 ゴオウのTLC分析



標準品1: プラタゴアニン酸, 標準品2: 薄層クロマトグラフィー用シャゼンシ, 1~3: 市場品  
 展開溶媒: アセトン/酢酸エチル/水/酢酸(100)混液(10:10:3:1)  
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧, 105°C10分間加熱

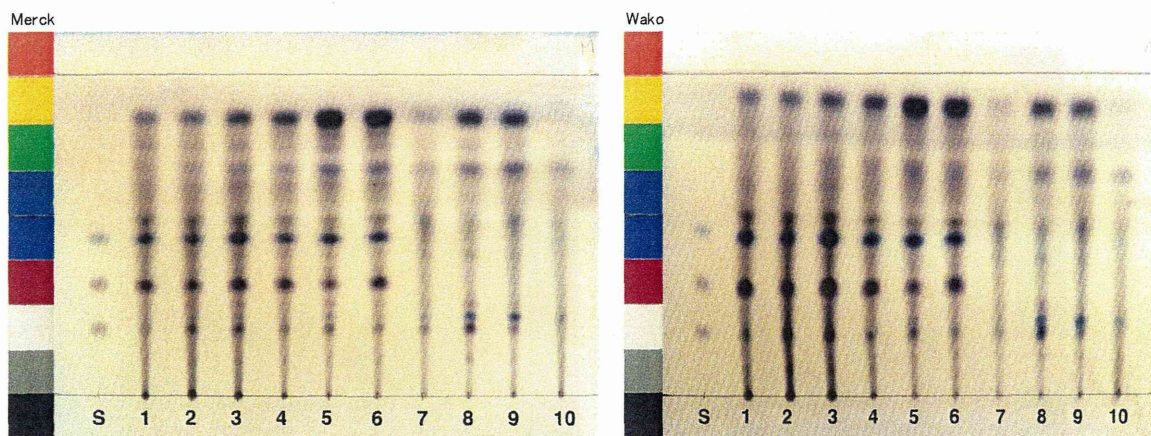
Fig. 5 シャゼンシの確認試験



S1: 酢酸ボルニル, S2: ボルネオール  
 展開溶媒: ヘキサン/ジエチルエーテル/メタノール混液(15:5:1)  
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 6 シュクシャの確認試験





S: アリゾールA, アリゾールB, アリゾールBモノアセテート混合物, 1~10: 市場品  
 展開溶媒: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸(100)混液(10:10:3)  
 検出方法: 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧, 105℃5分間加熱

Fig. 7 タクシャの確認試験

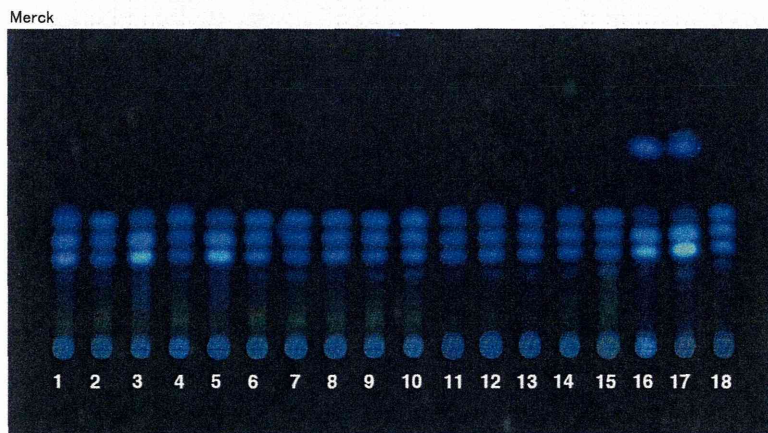


Fig. 8a 1~18: 基盤研提供サンプル

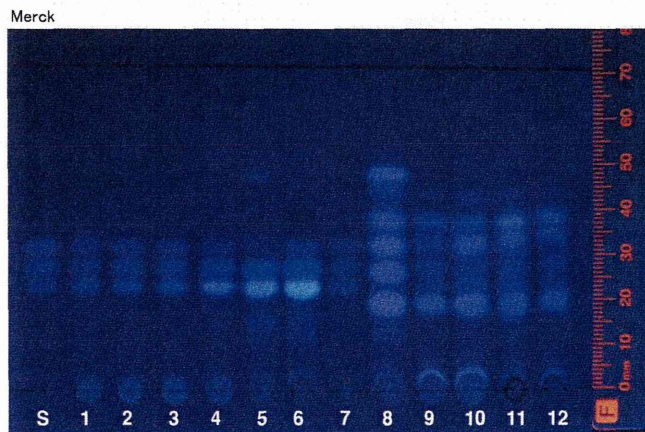


Fig. 8b S: 混合物, 1~5: 陳皮, 6~7: 青皮, 8: 付桔紅, 9~10: 橙皮, 11~12: 枳実

展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液(1:1)  
 検出方法: 紫外線(主波長365 nm)照射

Fig. 8 チンピのTLC分析



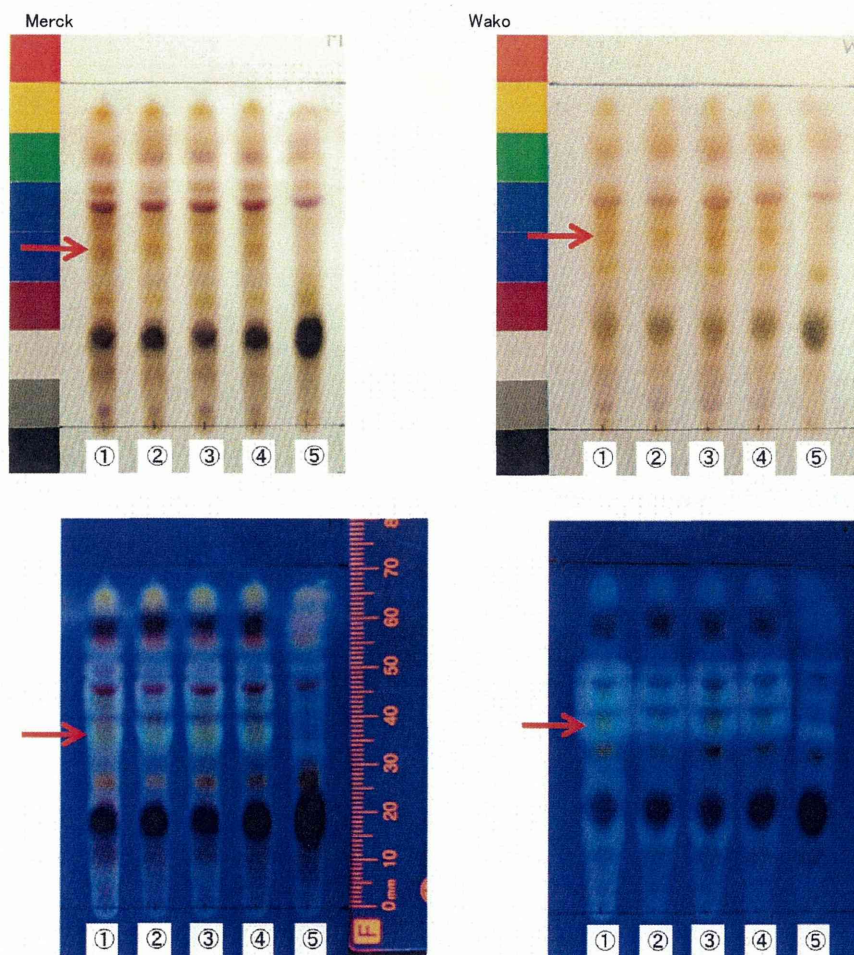


Fig. 9a. 1~5: 市場品  
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液(8:3:1)  
 検出方法: 希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱(上), その後紫外線(主波長365 nm)照射(下)

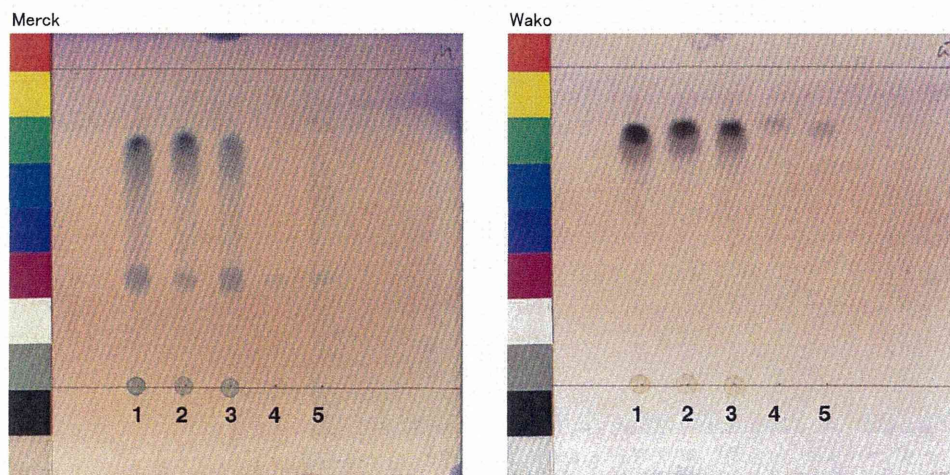
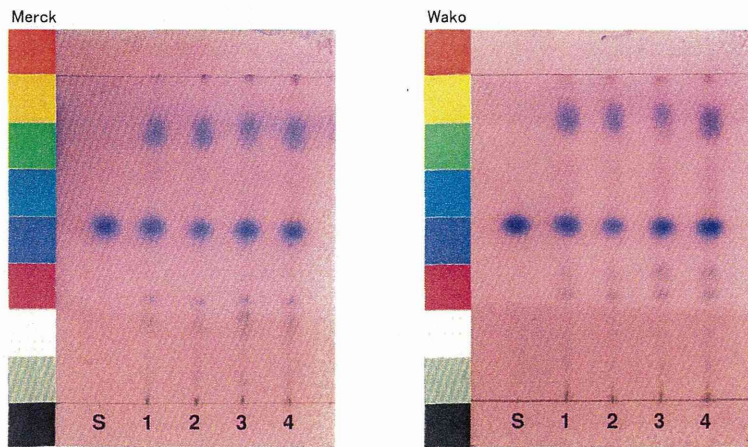


Fig. 9b. 1~3: 市場品, 4: イヌリン, 5: バクモンドウの多糖画分  
 展開溶媒: エタノール(99.5)/水/酢酸(100)混液(120:80:1)  
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液, 105°C5分間加熱

Fig. 9 バクモンドウのTLC分析





S: メントール, 1~3: 市場品  
 展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液(7:3)  
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸・酢酸・エタノール試液噴霧, 105℃5分間加熱

Fig. 10 ハッカの確認試験

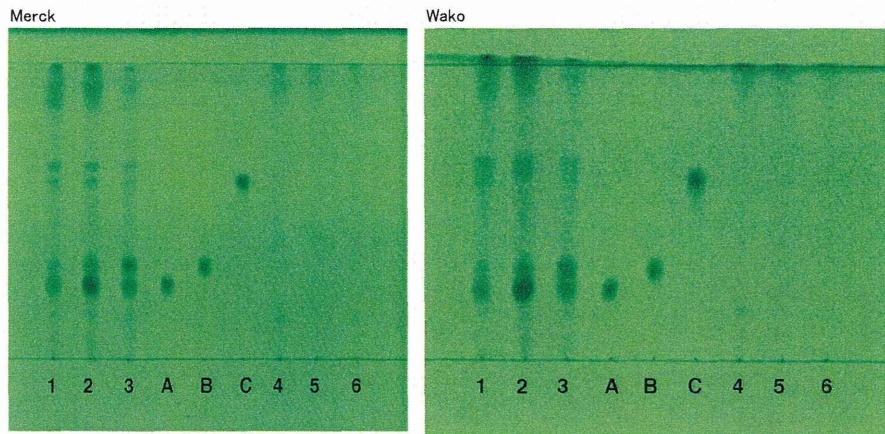


Fig. 11a. A: 1'-*O*-グルコシルシミフギン, B: 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノール, C: *sec*-*O*-グルコシルハマウドール  
 1~3: ボウフウ, 4~6: ハマボウフウ  
 検出方法: 紫外線(主波長254 nm)照射

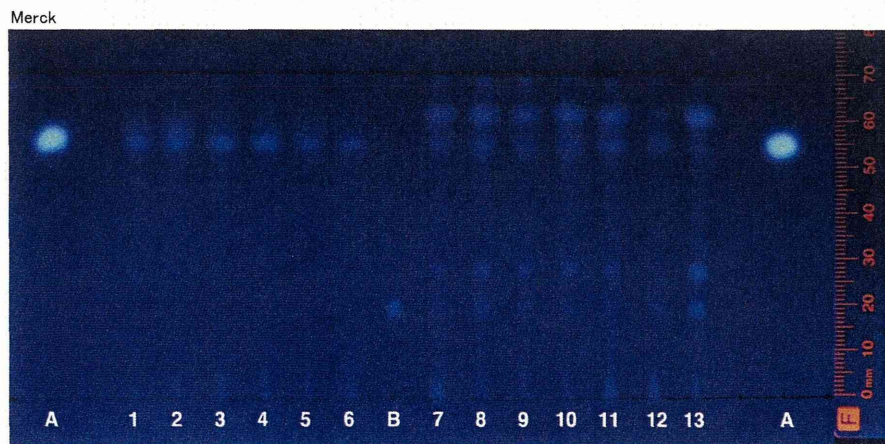
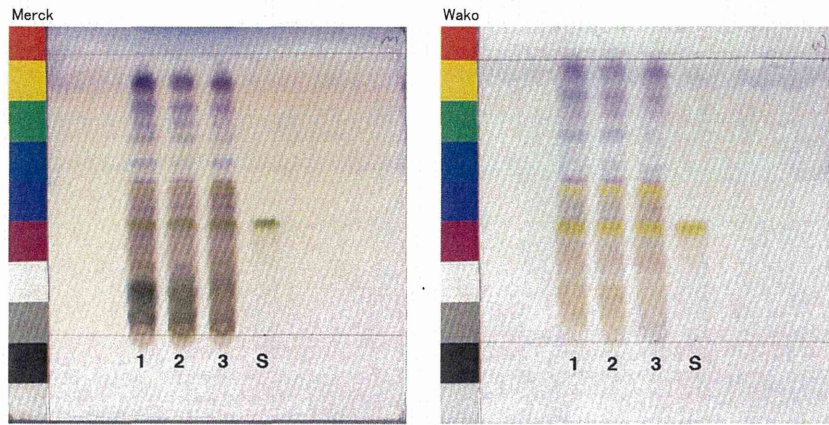


Fig. 11b. A: スコポレチン, B: 4'-*O*-グルコシル-5-*O*-メチルピサミノール, 1~6: ハマボウフウ, 7~13: ボウフウ  
 検出方法: 紫外線(主波長365 nm)照射  
 展開溶媒: 辛酸エチル/2-ブタノン/辛酸/水混液(20:5:5:1)

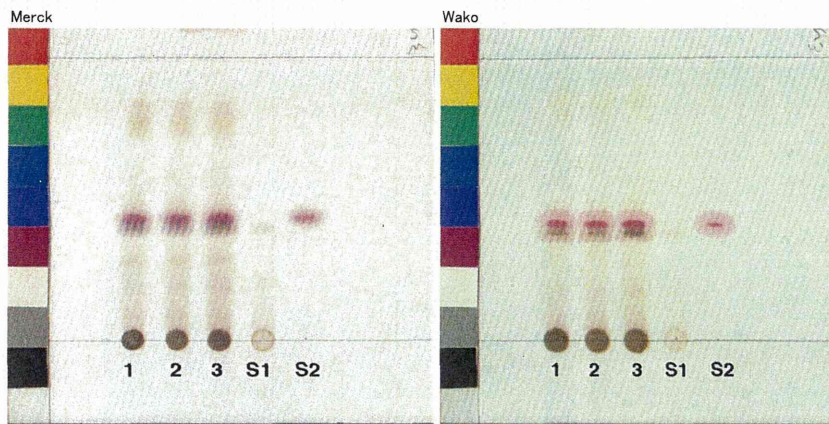
Fig. 11 ボウフウのTLC分析





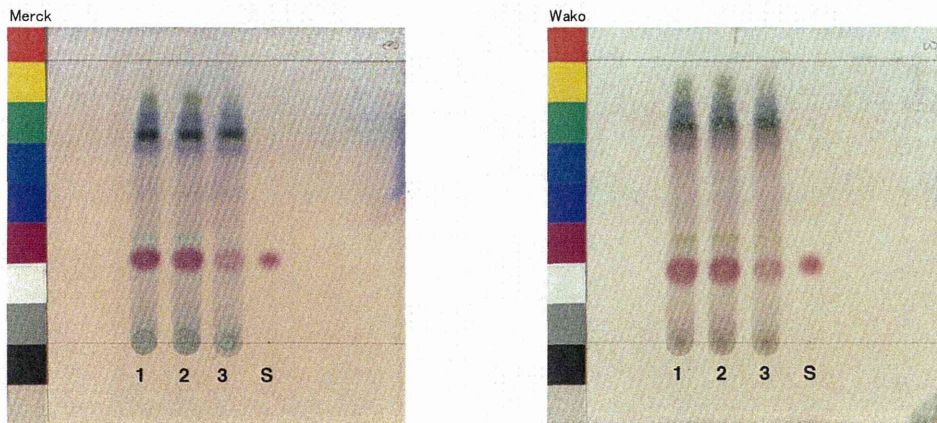
S: 3,4-ジヒドロキシフェネチルアルコールグルコシド, 1~3: 市場品  
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20:5:4)  
 検出方法: 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 12 モクツウのTLC分析



S1: コスツノリド, S2: デヒドロコスツノラクトン, 1~3: 市場品  
 展開溶媒: ヘキサン/アセトン混液 (7:3)  
 検出方法: 希硫酸噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 13 モッコウの確認試験



S: レンギョール, 1~7: 市場品  
 展開溶媒: 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20:3:1)  
 検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液噴霧, 105°C5分間加熱

Fig. 14 レンギョウの確認試験