

性を検証した。

B.研究方法

実験材料

日本国内で販売されている赤ブドウ葉エキスを含有製品のうち、一般用医薬品 1 製品と、いわゆる健康食品 2 製品を入手した。一般用医薬品と健康食品 1 製品については、2013～2014 年にロットの異なる製品を用意した。試料の一覧を表 1 に示す。

LC/MS 分析

赤ブドウ葉エキス含有製品のカプセルまたは錠剤の中身を、乳鉢乳棒により均質な粉末とし、1mg/mL の濃度になるように 50% MeOH 溶液を加え 1 分間超音波照射の後、遠心分離した上清を 0.5mg/mL に希釈し、5 μ L を LC/MS 測定に供した。Technical replicates は 6 とした。測定条件は以下の通りである。

HPLC : Shimadzu UFLC (島津製作所)

- カラム Thermo Scientific
 Hypersil-GOLD, 2.1 x 100 mm, 1.9 μ m
- 移動相 A = 0.1 % ギ酸／超純水、B =
 0.1 % ギ酸／アセトニトリル
- グラジエント B = 1% (2 min) – 10% (2.1
 min) – 27% (22 min) – 100% (25 – 27 min)
- 流速 0.2 mL/min
- カラム温度 40°C
- 検出器 PDA (190 – 800 nm)

MS : LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific)

- ESIスプレー電圧 4,000 V
- キャピラリ温度 300°C
- スキャン m/z 範囲 100～2,000
- 質量分解能 30,000
- CID電圧 35V
- プリカーサー m/z 範囲 3.5

多変量解析

測定データを差異解析ソフトウェア SIEVE

2.0.1 (Thermo Scientific) で処理し、ピークの検出を行った後、SIMCA-P+ Ver. 12.0.1 (Umetrics) を用いて主成分分析および判別分析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び実験動物を使用しておらず、該当する事由はない。

C.結果

C.1. 主成分分析

3 製品 5 品目の赤ブドウ葉エキス含有製品について、Pos モードにおける LC/MS 測定データの主成分分析を行った結果、3 製品はスコアプロット上で明確に分離された (図 1a)。そこで、これらのグループ形成に寄与する成分の探索を行うこととした。

C.2. 医薬品 vs 健康食品 (Pos モード)

医薬品 1 製品と健康食品 2 製品を判別分析により群分けし、S-プロット上で医薬品および健康食品に特徴的な成分を探索した (図 1b,c)。

医薬品に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して負の寄与 ($p[1] < -0.15$) を示す成分を見出した。

・ m/z 911.329_RT 1.55 & 2.33

XIC において、このピークは健康食品のデータでは殆ど検出されておらず、医薬品特異的であることが確認できた。この成分分子の組成式は $C_{36}H_{64}O_{31}$ と推定され、プロダクトイオンスペクトルより、オリゴ糖であると推測された。

健康食品 2 製品に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して正の寄与 ($p[1] > 0.12$) を示す成分を見出した。

・ m/z 773.247_RT 18.05

XIC において、このピークは医薬品より 5,000 倍以上高いピーク強度を示し、健康食品特異的であることが確認できた。この成分分子の組成式は $C_{34}H_{46}O_{20}$ と推定され、プロダクトイオンスペクトルより、 m/z 449.144 (推定組成 $C_{22}H_{25}O_{10}$) に六単糖が二つ結合した構造であると推測された。

・ m/z 611.196_RT 18.30

XIC において上記成分と同様な傾向を示し、プロダクトイオンスペクトルでも m/z 449.1446 がメインピークとして観測されたことから、上記 m/z 773 の成分との共通骨格に六単糖が一つ結合した構造であると推測された。

以上の結果より、赤ブドウ葉エキス含有医薬品には健康食品にはないオリゴ糖が含まれており、一方、健康食品には $C_{22}H_{25}O_{10}$ の母格に六単糖が複数結合した化合物が含まれていることが明らかになった。

C. 3. 医薬品 vs 健康食品 (Neg モード)

医薬品 1 製品と健康食品 2 製品を判別分析により群分けし、S-プロット上で医薬品および健康食品に特徴的な成分を探索した (図 2)。

医薬品に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して負の寄与 ($p[1] < -0.10$) を示す成分を見出した。

・ m/z 549.167_RT 1.62 & 2.12

XIC において、このピークは健康食品より 10 倍以上高いピーク強度を示し、医薬品特異的であることが確認できた。 m/z 549 の推定組成式およびプロダクトイオンスペクトルより、この成分分子はオリゴ糖であると考えられた。

健康食品 2 製品に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して正の寄与 ($p[1] > 0.12$) を示す成分を見出した。

・ m/z 771.234_RT 16.99

Pos モード同様、XIC において、このピークは医薬品には殆ど検出されておらず、健康食品特異的であることが確認できた。

・ m/z 463.088_RT 14.13 & 13.62

XIC ピーク強度において、健康食品は医薬品より平均で 1.7 倍高い値を示した。このうち、保持時間 14.1 分のピークは、標品との比較により quercetin 3-*O*-glucoside と同定された。

・ m/z 609.182_RT 17.27

Pos モード同様、XIC において、このピークは医薬品には殆ど検出されておらず、健康食品特異的であることが確認できた。

C. 4. 医薬品の同一製品におけるロット差

医薬品 2 ロットについて判別分析を行い、同一医薬品のロット間の成分差異について検討した (図 3a, b)

Anti-5901 に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して正の寄与 ($p[1] > 0.15$) を示す成分を見出した。

・ m/z 219.027_RT 1.49

XIC ピーク強度において、Anti-5901 は Anti-6001 より約 2 倍高い値を示した。

・ m/z 383.116_RT 1.49

XIC ピーク強度において、Anti-5901 は Anti-6001 より約 3 倍高い値を示した。このイオンの組成式は $C_{12}H_{24}O_{12}Na$ と推定され、プロダクトイオンスペクトルより、オリゴ糖のナトリウム付加体であると推測された。

・ m/z 132.102_RT 3.29

XIC ピーク強度において、Anti-5901 は Anti-6001 より約 3~4 倍高い値を示したが、このピークはブロードであり、ピーク強度比がそのまま成分の含有量に反映するかの判断は難しかった (図 3c)。

Anti-6001 に特徴的な成分

S-プロット上で第一主成分に対して負の寄与を示す成分を複数見出したが、XICを確認したところ、いずれのピークについてもロット間で有意な差は認められなかった。

以上の結果から、赤ブドウ葉エキス含有医薬品のロット間の成分比較では、ピーク強度に 4 倍程度の差のある成分が存在することが明らかにになった。

C. 5. 健康食品の製品およびロット差

健康食品 2 製品 3 品目の Neg モードにおける LC/MS 測定データの主成分分析を行った結果、3 品目はスコアプロット上で明確に分離された。すなわち、第一主成分が正の値を示す Regc-12A のグループ、第一主成分は負、第二主成分が正の値を示す Regr のグループ、第一、第二主成分ともに負の値を示す Regc-7A のグループの 3 つのグループが確認された (図 4a, b)。一方、グループ内の同一品目由来の replicates は、スコアプロット上でそれぞれまとまって観測されたことから、実験手技上の誤差は少なく、同一製品であってもロットによって成分に差がある可能性が強く示唆された。そこで、それぞれのグループ形成に寄与する成分を探索し、製品間および製品内の差異成分を検討することとした。主な特徴的成分のピーク強度の比較を表 2 に示す。

Regc-7A に特徴的な成分

ローディングプロット上で、Regc-7A のグループ形成に寄与する成分 ($p[1] < -0.07$, $p[2] < -0.10$) を見出した。

・ m/z 447.093_RT 16.30

標品との比較により、保持時間 16.0 分のピークは kaempferol 3-*O*-glucoside (K3G) と同定された。XIC において、Regc-7A と Regr では

K3G の直後、16.3 分付近にピークが観測されており、Regc-7A では K3G と同程度、Regr では K3G の半分程度のピーク強度を有することが確認された (図 4c)。この成分分子はプロダクトイオンスペクトルから、K3G の異性体であると推察され、両者のピーク強度比によって、健康食品 3 グループを識別できると考えられた。

・ m/z 447.093_RT 15.30

XIC ピーク強度において、Regc-7A は Regc-12A および Regr よりも若干大きな値を示した。プロダクトイオンスペクトルから、この成分分子は kaempferol 3-*O*-glucoside と似た構造を有していることが示唆された。

・ m/z 431.098_RT 18.67

XIC ピーク強度において、Regc-7A は Regc-12A の 20 倍以上、Regr の 2 倍以上の大きな値を示した。この成分分子の組成式は $C_{21}H_{20}O_{10}$ と推定された。

Regc-12A に特徴的な成分

ローディングプロット上で、Regc-12A のグループ形成に寄与する成分 ($p[1] > 0.18$) を見出した。

・ m/z 477.067_RT 13.82

XIC において、このピークは製品間で殆ど差が見られなかった。

・ m/z 771.235_RT 16.84

XIC ピーク強度において、Regc-12A は Regc-7A とほぼ同程度、Regr よりも若干大きな値を示した。この成分分子は、前項で健康食品に特徴的な成分として見出された m/z 447.144 に六単糖が二つ結合した化合物と推測された。

・ m/z 433.208_RT 11.57

XIC ピーク強度において、Regc-12A は Regc-7A および Regr に対して 2 倍程度高い値を示した。

Regr に特徴的な成分

ローディングプロット上で、Regr のグループ形成に寄与する成分 ($p[1] < 0.015$, $p[2] > 0.02$) を見出した。

・ m/z 637.198_RT 10.66

XIC において、このピークは Regc より 100 倍以上高いピーク強度を示し、Regr 特異的であることが確認できた。この成分分子の組成式は $C_{26}H_{38}O_{18}$ と推定された。

以上の結果より、赤ブドウ葉エキス含有健康食品のうち、Regc と Regr の 2 製品の成分比較では、それぞれの製品に特徴的な成分が確認された。さらに、Regc 同一製品のロット間では、ピーク強度に 20 倍以上の差のある成分が存在することが明らかになった。

D. 考察

近年、高性能な機器分析により得られた膨大なデータの網羅的解析を行うメタボロミクス研究が急速な発展を遂げており、天然物医薬品のレギュラトリーサイエンス分野においても、薬用植物や生薬の品質管理・評価への活用が検討されつつある^{Ref)}。本研究では、同一原料に由来する一般用医薬品と健康食品との品質の違いを評価する上で、メタボローム解析の有用性を検討するため、赤ブドウ葉エキス含有製品 3 製品を対象として LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析を行った。

医薬品と健康食品との判別分析の結果、医薬品に特徴的な成分としてオリゴ糖、健康食品に特徴的な成分として配糖体を見出すことができた。商品ラベルの比較から、医薬品には健康食品にはないカラギーナン (紅藻由来の多糖類) が添加されていることから、医薬品に特徴的なオリゴ糖は、D-galactose が α -1,3 結合あるいは β -1,4 結合を繰り返した構造を有するカラギー

ナンである可能性が強く示唆された。他方、健康食品 2 製品には、医薬品にはない糖転移ヘスペリジンが添加されており、プロダクトイオンスペクトルも m/z 773 [hesperidine+glucose]⁺, m/z 627 [M-rhamnose]⁺, m/z 611 [hesperidin]⁺, m/z 449 [hesperidin-glucose]⁺, m/z 303 [hesperidin-rutinose]⁺ に合致することから、健康食品に特徴的な成分も、人為的に添加された糖転移ヘスペリジンである可能性が強く示唆された。

同一医薬品のロット間での成分比較では、ピーク強度比 2~4 倍の差を示す成分を見出した。これらの成分はいずれも分子量 350 未満の低分子であり、保持時間の早い高極性成分であった。

健康食品の製品間およびロット間の成分比較では、製品間でピーク強度比 100 倍以上、ロット間でもピーク強度比 20 倍以上の成分を見出し、品質にばらつきが大きいことが示唆された。

以上の結果より、メタボローム解析によって、同一の原料由来で添加剤の異なる 3 製品を明確に分類できることが示された。さらに、医薬品および健康食品のロット間の成分比較では、健康食品の成分のばらつきが大きいことが示され、メタボローム解析は天然物由来の医薬品および健康食品の品質評価に有用であることが示唆された。今後、添加剤を除いた線分比較により、同一原料からなる医薬品および健康食品の評価法の検討を続けていくことが必要である。

E. 結論

LC/MS 分析データに基づく赤ブドウ葉エキス含有製品の製品間およびロット間の成分比較により、それぞれの製品に特徴的に配合された添加剤を正しく検出するとともに、健康食品のロット間の品質のばらつきについて有用な

知見を得た。LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析は、天然物を原料とする医薬品および健康食品の品質評価に有用であると考えられた。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表等

論文発表等

なし

学会発表等

なし

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

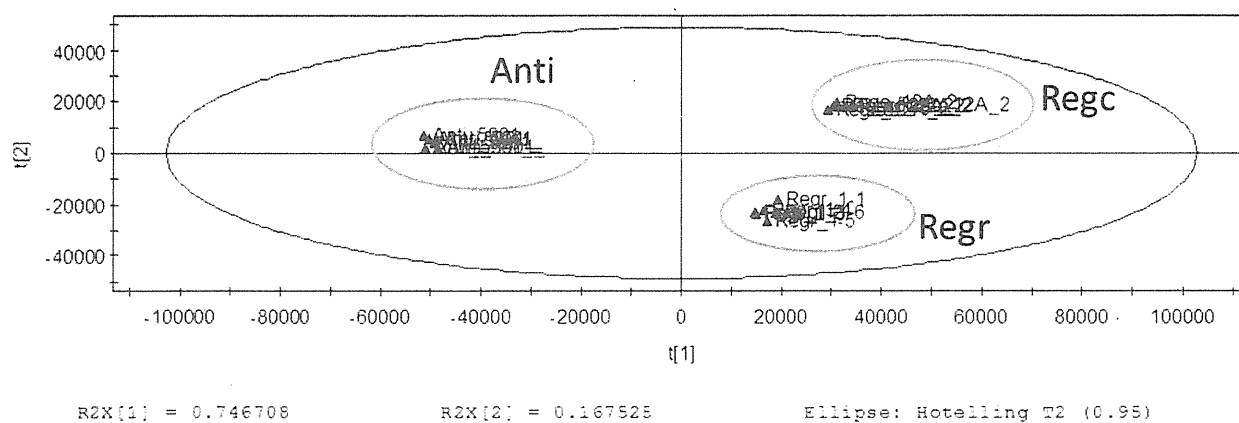
- 1) 若菜大悟, 丸山卓郎, 在間一将, 武田尚, 杉村康司, 安食菜穂子, 飯田修, 川原信夫, 合田幸広, 細江智夫, 日本食品化学学会誌, **21**(2), 135-138 (2014)
- 2) S. Kobayashi, S.P. Putri, Y. Yamamoto, K. Donghyo, T. Bamba, E. Fukusaki, *J Biosci. Bioeng.*, **114** (2), 232-236 (2012)

表 1. 研究試料とした赤ブドウ葉抽出エキス含有製品				
ID	分類	ロット	形状	一日量中の内容物
Anti-5901	要指導医薬品	D0115901	カプセル	RVLE 360 mg
Anti-6001	要指導医薬品	D0116001	カプセル	RVLE 360 mg
Regc-7A	栄養補助食品	7/A	カプセル	RVLE 360 mg 糖転移ヘスペリジン 15 mg
Regc-12A	栄養補助食品	12/A	カプセル	RVLE 360 mg 糖転移ヘスペリジン 15 mg
Regr	栄養補助食品		錠剤	RVLE 300 mg
RVLE, Red vine leaf extract (赤ブドウ葉乾燥エキス)				

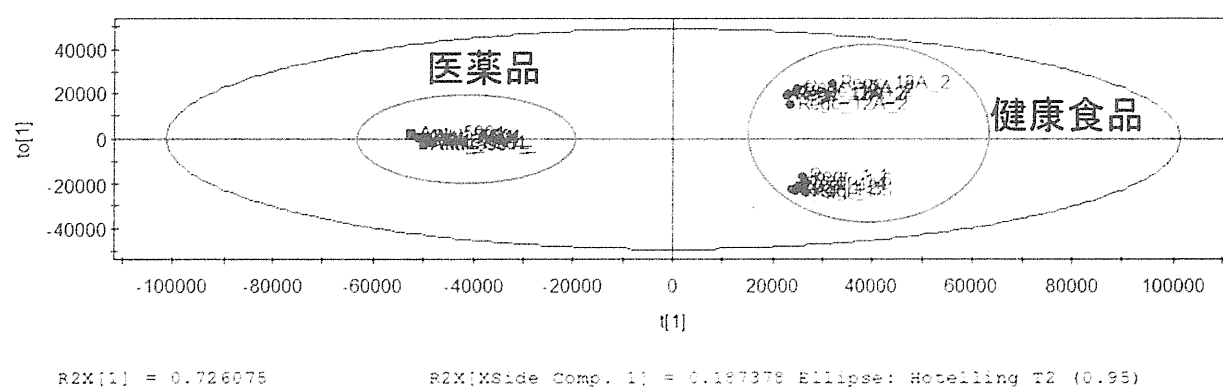
表 2. 健康食品それぞれに特徴的な成分のピーク強度比較							
<i>m/z</i>	447.093	447.093	431.098	477.067	771.235	433.208	637.198
RT (min)	16.04	15.30	18.67	13.82	16.84	11.57	10.66
Regc-7A_1	115,881,974	48,753,246	10,109,736	298,046,299	323,550,065	25,579,685	2,720
Regc-7A_2	115,504,383	37,814,067	10,852,318	291,882,215	318,772,753	25,221,887	6,719
Regc-7A_3	133,539,304	33,283,999	11,076,200	314,134,799	317,894,399	26,709,415	5,311
Regc-7A_4	131,126,474	54,210,785	10,947,007	296,647,015	339,365,016	29,410,504	9,976
Regc-7A_5	124,279,283	33,634,543	11,522,956	304,520,887	322,006,083	27,378,654	6,531
Regc-7A_6	140,233,126	49,261,278	12,079,909	328,018,417	309,765,534	27,694,523	11,462
Regc-12A_1	61,161,136	22,223,184	414,462	328,394,142	343,867,392	51,300,160	10,278
Regc-12A_2	59,204,440	25,475,809	399,002	312,621,497	334,339,122	48,599,228	3,242
Regc-12A_3	58,933,209	27,869,525	435,930	312,517,153	342,141,653	50,123,747	6,623
Regc-12A_4	69,125,348	18,722,993	416,610	351,989,854	381,718,025	56,335,760	10,358
Regc-12A_5	63,733,877	26,367,547	473,132	361,990,120	290,377,270	57,898,202	2,632
Regc-12A_6	65,391,280	19,118,869	425,471	349,424,672	330,590,929	58,812,567	7,789
Regr-1	100,583,985	23,059,555	4,691,833	283,265,445	295,390,323	31,635,603	809,359
Regr-2	92,402,726	22,349,608	4,363,870	296,777,339	268,026,747	27,874,559	745,415
Regr-3	95,075,450	27,608,634	4,505,150	289,300,522	278,699,171	28,042,582	782,881
Regr-4	84,797,189	22,502,853	4,155,946	267,295,214	270,317,785	26,657,428	791,943
Regr-5	85,625,691	21,832,901	4,295,310	265,796,596	260,652,471	26,968,331	720,146
Regr-6	91,614,363	28,761,687	4,651,911	289,034,011	275,506,686	32,391,029	745,442

図 1 LC/MS Pos データの多変量解析による赤ブドウ葉エキス含有医薬品と健康食品の成分比較

(a) PCA-X score plot



(b) OPLS/O2PLS-DA score plot



(c) OPLS/O2PLS-DA S-plot

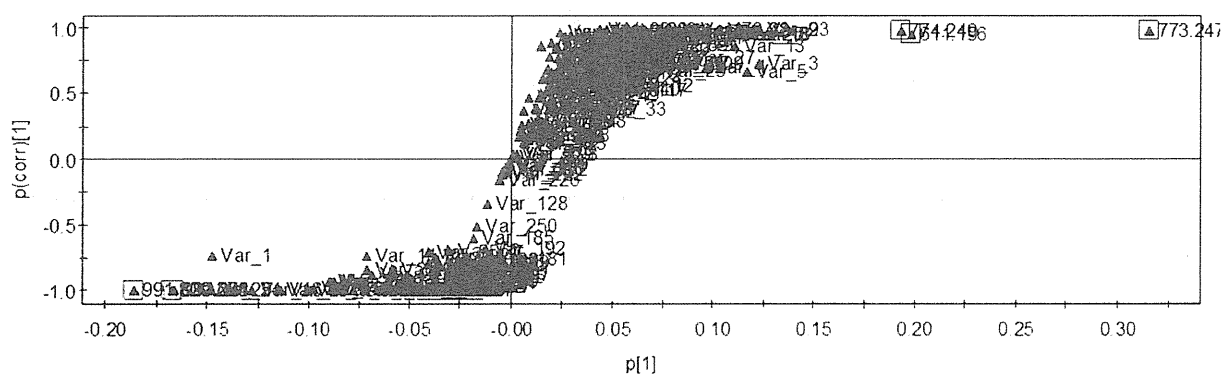
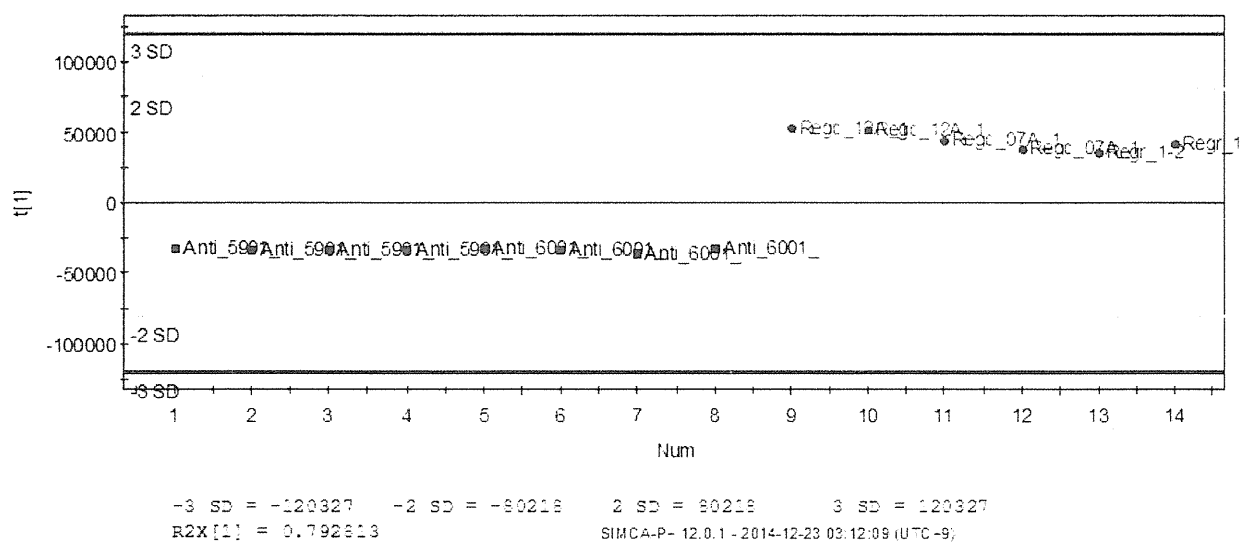


図 2 LC/MS Neg データの多変量解析による赤ブドウ葉エキスを含有医薬品と健康食品の成分比較

(a) OPLS/O2PLS-DA score plot



(b) OPLS/O2PLS-DA S-plot

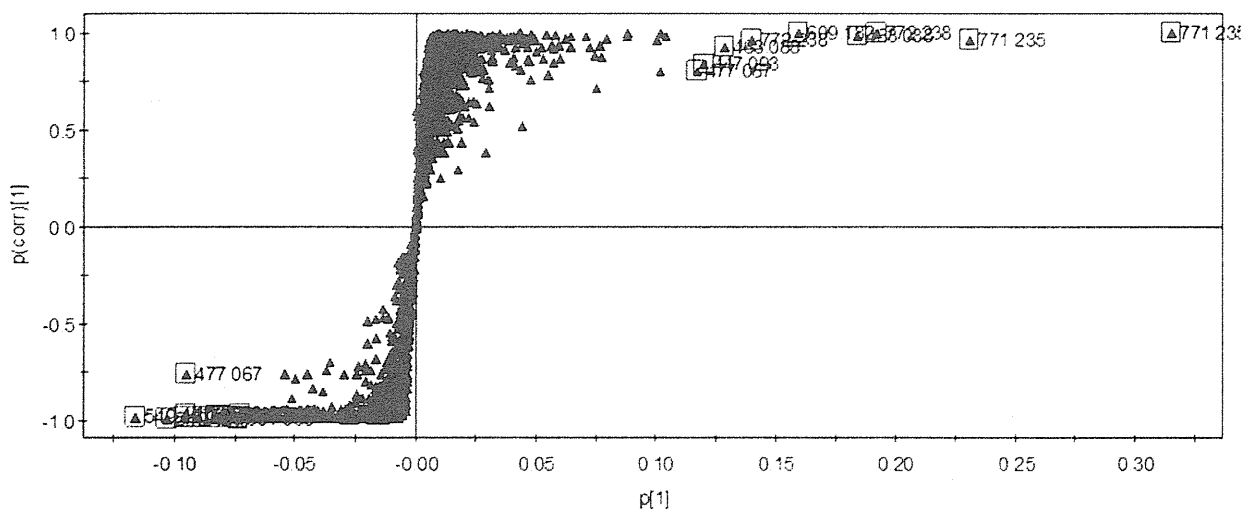
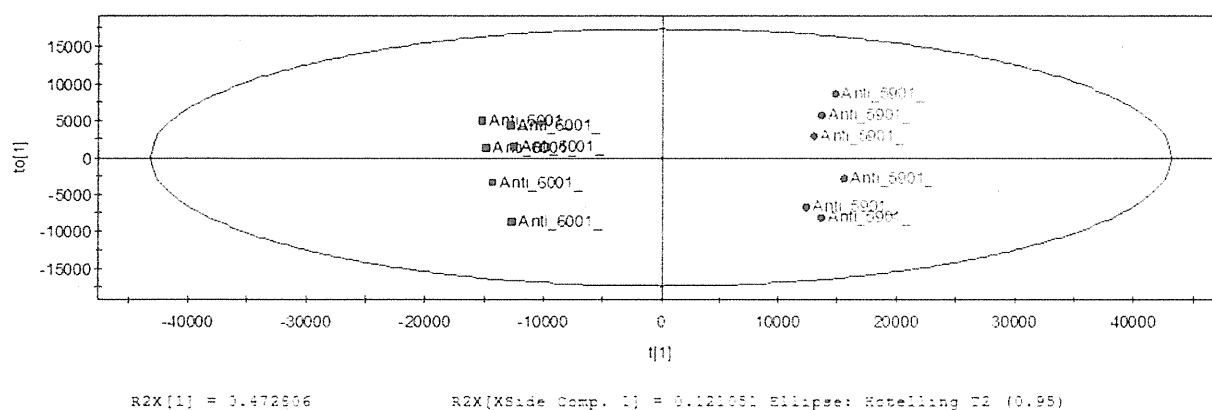
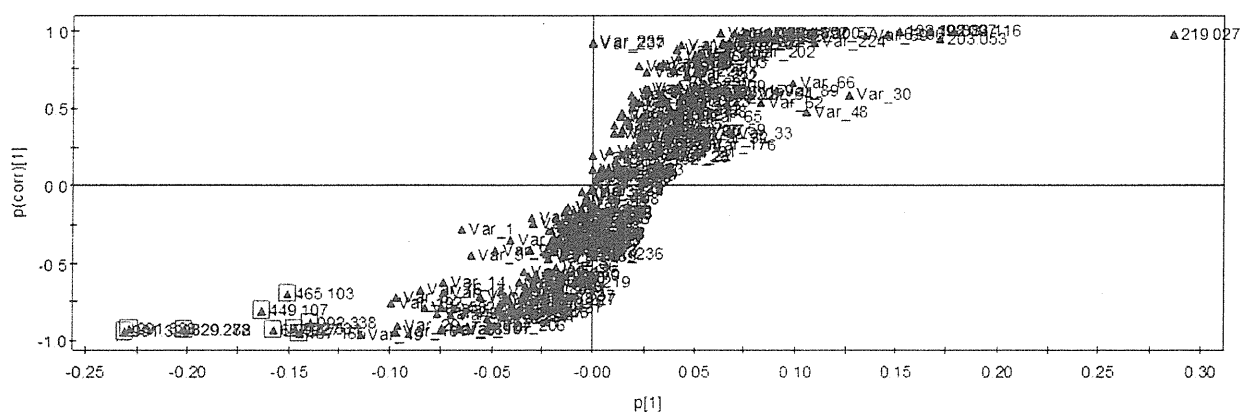


図 3 LC/MS Pos データの多変量解析による赤ブドウ葉エキス含有医薬品ロット間の成分比較

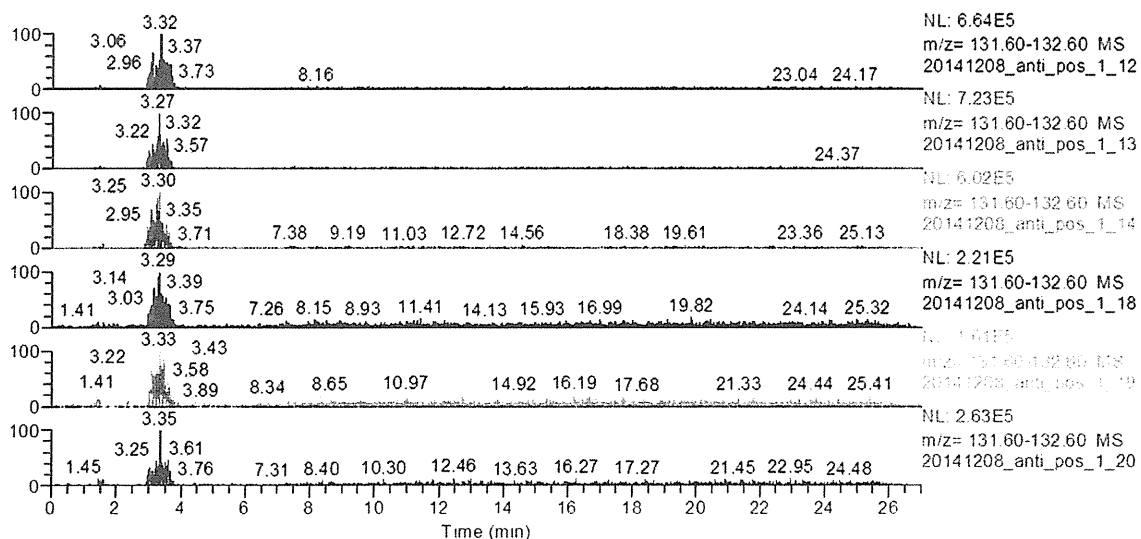
(a) OPLS/O2PLS-DA score plot



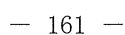
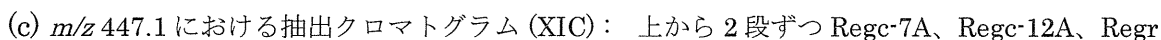
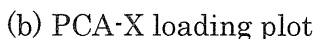
(b) OPLS/O2PLS-DA S-plot



(c) m/z 132.1 における抽出クロマトグラム (XIC): 上段 3 サンプルは Anti-5901、下段 3 サンプルは Anti-6001



(a) PCA-X score plot



厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 単味生薬製剤の理化学的品質評価法の開発

研究分担者 木内文之 慶應義塾大学薬学部 教授

標準煎剤とエキスとの同等性確保に資する指標の検討（センブリ）

単味生薬の標準煎剤とエキスとの同等性を担保するための具体的な評価指標を、センブリについて検討した。確認試験については、日本薬局方に規定されているセンブリの確認試験をそのまま適用することが可能であった。定量成分としては日本薬局方に規定のあるスウェルチアマリンの他に、センブリの成分として報告があり、定量が可能と考えられるゲンチオピクロシドを選定し、各成分についての定量法を作成した。ここで設定した試験法は、センブリエキスの品質管理に活用されることが期待される。

A. 目的

平成 14 年 11 月に一般用医薬品承認審査合理化等検討会が厚生労働省に提出した中間報告「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」の中で「国内で長期間医薬品として使用されてきた生薬に関する検討」の必要性が言及されていることを受け、単味生薬製剤承認基準の内規とも言える昭和 55 年出版の「局方医薬品承認申請の手引き」（以下、局方手引き）の内容整備の一環として、主に煎液または末での服用が規定されている局方手引きをエキス製剤の開発にも対応させるためのブリッジングガイドラインの策定のための検討が進められ、「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」（案）（以下、局方手引きガイドライン）がまとめられている。このガイドラインでは、単味生薬の標準煎剤と生薬エキスの指標成分を定量し、その比較を行うことでエキスの同等性を担保する方法を採用している

が、指標成分の選定並びに確認・定量法については、個々の生薬について具体的に検討する必要がある。

本研究では、生薬センブリについて標準煎剤とエキスとの同等性を確保するための指標成分を選定し、その確認試験法並びに 2 つの成分についての定量法を検討した。

B. 研究方法

確認試験及び定量法における指標成分の選定

指標成分の選定に関しては、下に挙げる薬局方等を参考にした。

- ・第十六改正日本薬局方（日局）
- ・中華人民共和国薬典 2010 年版（CP）

確認試験及び定量法の可用性の検討

局方手引きガイドラインに従って調製した生薬の煎出液を標準煎液とし、さらにその水分を除いてエキスを作成し、これらを用いて確認試験及び定量法の可用性を検討した。

<倫理面への配慮>

ヒト由来サンプル及び実験動物を使用していないため、該当する事由はない。

C. 結果

C.1. 指標成分の選定

各国薬局方及びそれに準ずる基準等を調査した結果、指標となりえる化合物として日局で指標成分とされているスウェルチアマリン (swertiamarin) の他に、CP に規定のあるスウェロシド (sweroside) 並びにセンブリの成分として報告されているゲンチオピクロシド¹⁾ (gentiopicroside) が考えられた。これらのうち定量に際して妨害ピークが少ないと考えられるより超波長側に極大吸収を持つゲンチオピクロシドを第2の指標成分とすることとした。

C.2. 試料の調製

日局「センブリ」1.59 g を、煎じ器を用いて水 300 mL で半量になるまで煎じ、熱時ろ過した。このうち10mLを標準煎液として使用し、残りを凍結乾燥してエキス 372mg を得た。

標準煎剤は 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、試料溶液とした。

C.3. 確認試験

日局「センブリ」の確認試験を参考に、エキスの収率を考慮して以下の確認試験法を設定した。この試験法により実施した薄層クロマトグラムを Fig. 1 に示す。

【確認試験法】

乾燥エキス 0.2 g にメタノール 10 mL を加え、5 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にスウェルチアマリン 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ー〈2.03〉

により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μL ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲル (混合蛍光剤入り) 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／1-プロパノール／水混液(6:4:3)を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(広域波長)を照射するとき、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、標準溶液から得た赤色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

C.4. 定量法

(1) スウェルチアマリン

日局「センブリ」の成分定量を参考に、エキスの収率を考慮して以下の定量法を設定した。この定量法により実施した HPLC クロマトグラムを Fig. 2 に示す。

【スウェルチアマリンの定量法】

乾燥エキス 0.2 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール 40 mL を加えて 15 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物には更にメタノール 40 mL を加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とし、資料溶液とする。別にスウェルチアマリン標準品 (別途水分を測定しておく) 約 10 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 20 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μL ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のスウェルチアマリンのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：238 nm)

カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填す

る.

カラム温度：50℃付近の一定温度

流量：スウェルチアマリンの保持時間が約 10 分になるように調整する.

システムの適合性

システムの性能：スウェルチアマリン標準品 1 mg 及びテオフィリン 1 mg を移動相に溶かして 10 mL とする. この液 10 μ L につき, 上記の条件で操作するとき, テオフィリン, スウェルチアマリンの順に溶出し, その分離度は 10 以上である.

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき, 上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき, スウェルチアマリンのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である.

(2) ゲンチオピクロシド

参考論文 2) で用いられている定量条件を参考に, エキスの収率を考慮して以下の定量法を設定した. その際, 文献の条件では妨害ピークが見られたことから, 溶媒の条件を変更した. この定量法により実施した HPLC クロマトグラムを Fig. 3 に示す.

【ゲンチオピクロシドの定量法】

乾燥エキス 0.3 g を精密に量り, 共栓遠心沈殿管に入れ, メタノール 40 mL を加えて 15 分間振り混ぜ, 遠心分離し, 上澄液を分取する. 残留物には更にメタノール 40 mL を加え, 同様に操作する. 全抽出液を合わせ, メタノールを加えて正確に 100 mL とし, 試料溶液とする. 別にゲンチオピクロシド約 2 mg を精密に量り, メタノールに溶かして正確に 100 mL とし, 標準溶液とする. 試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり, 次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い, それぞれの液のゲン

チオピクロシドのピーク面積を測定し, 含量を求める.

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：274 nm）

カラム：内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする.

カラム温度：50℃付近の一定温度

移動相：水／アセトニトリル混液（94：6）

流量：ゲンチオピクロシドの保持時間が約 18 分になるように調整する.

システムの適合性

システムの性能：標準溶液液 10 μ L につき, 上記の条件で操作するとき, ゲンチオピクロシドのピークの理論段数及びシンメトリー計数は, それぞれ 5000 段以上, 1.5 以下である.

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき, 上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき, ゲンチオピクロシドのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である.

D. 考察

センブリは日局に収載されており, TLC を用いたスウェルチアマリンの確認試験並びにスウェルチアマリンの定量が規定されている. そこで, 煎液とエキスの同等性を担保する指標の一つとしてスウェルチアマリンを用い, 日局に規定されている方法を準用することによって比較が可能であることを示した. また, 第二の定量成分としてセンブリに含まれていることが報告されており, 比較的長波長に吸収極大を

持つゲンチオピクロシドを選定し、HPLC を用いた定量法を設定した。文献に報告されているゲンチオピクロシドの含量を表 1 に示す。スウェルチアマリンの含量は日局に 2.0%以上と規定されており、ゲンチオピクロシドとスウェルチアマリンの含量にはかなり差があるが、ゲンチオピクロシドの吸収極大に合わせた 247 nm で検出する定量条件を用いることにより、スウェルチアマリンとゲンチオピクロシドのピーク面積がほぼ同程度の範囲に収まることから、両者を同時に定量することが可能である。しかし、定量の正確性の観点から、スウェルチアマリンについては検出感度の高い 238 nm で検出する方法を用いるのが適切である。

E. 結論

生薬「センブリ」の標準煎液とエキスの同等性を担保するための確認試験並びに 2 成分についての定量法を設定した。これらの試験法は、センブリのエキス製剤の品質を担保する手法として活用されることが期待される。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 引用文献

- 1) Demizu S., Ohshima Y., Hiraga Y., Takahashi K.: High-performance liquid chromatographic analysis of Swertia herb. Journal of Chromatography, **360**, 307-311 (1986).
- 2) 野村, 有本, 石原, 伊藤, 岡坂, 金谷, 川西, 河端, 酒井, 嶋田, 高井, 田上, 十倉,

久田, 守安, 山本, 横倉: ゲンチアナ, リュウタン, ジンギョウについて HPLC による分析法の検討と市場品の分析. 生薬学雑誌, **68**, 43-52 (2014).

- 3) 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎: 高速液体クロマトグラフ法による医薬品の分析 (第 11 報) センブリ中のスベルチアマリンの定量. 薬学雑誌, **100**, 770-773 (1980).
- 4) Sakamoto I., Morimoto K., Tanaka O., Inouye H.: Application of high performance liquid chromatography and field desorption mass spectroscopy to separative analysis of bitter secoiridoid glucosides of Swertiae herba. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **31**, 25-30 (1983).
- 5) Takido T., Koshioka M., Kawaguchi M., Miyahara T., Tanizawa H., Ishii Y., Higashino M., Hayashi T.: Quantitative determination of bitter components in Swertiae herba. Planta Medica, **38**, 351-355 (1980).

H. 研究発表等

論文発表

該当なし

学会発表

該当なし

報道発表

該当なし

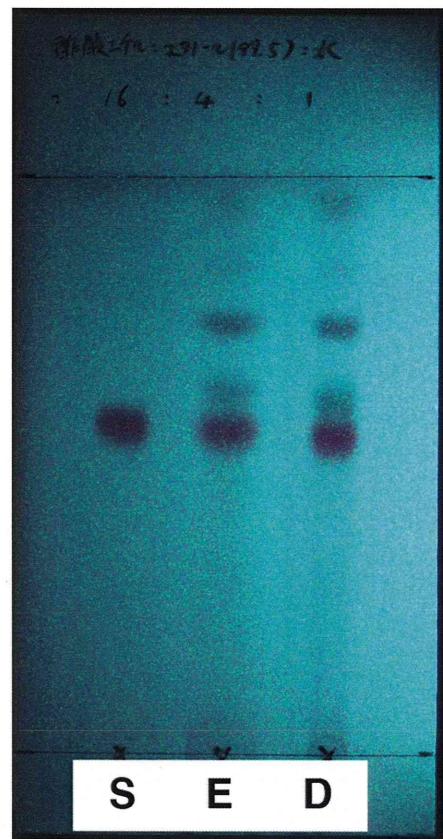
I. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 センブリ中のゲンチオピクロシド含量（文献値）

gentiopicroside (%)	swertiamarin (%)	試料	文献
0.30-1.95	—	生薬	3
0.03-0.35	0.17-2.57	生薬	4
0.06-0.16	<0.01-2.45	野生品	
0.04-0.21	0.35-2.03	植物(野生, 栽培)	1
0.45	—	生薬	5
0.27-0.38	—	植物	

*文献1の報告値はこの1/1000であるが，swertiamarinの報告値から考えて
単位の誤りと思われる．



S：標準溶液（スウェルチアマリン）
E：エキス試料溶液
D：標準煎液試料溶液

Fig. 1 確認試験のTLCクロマトグラム

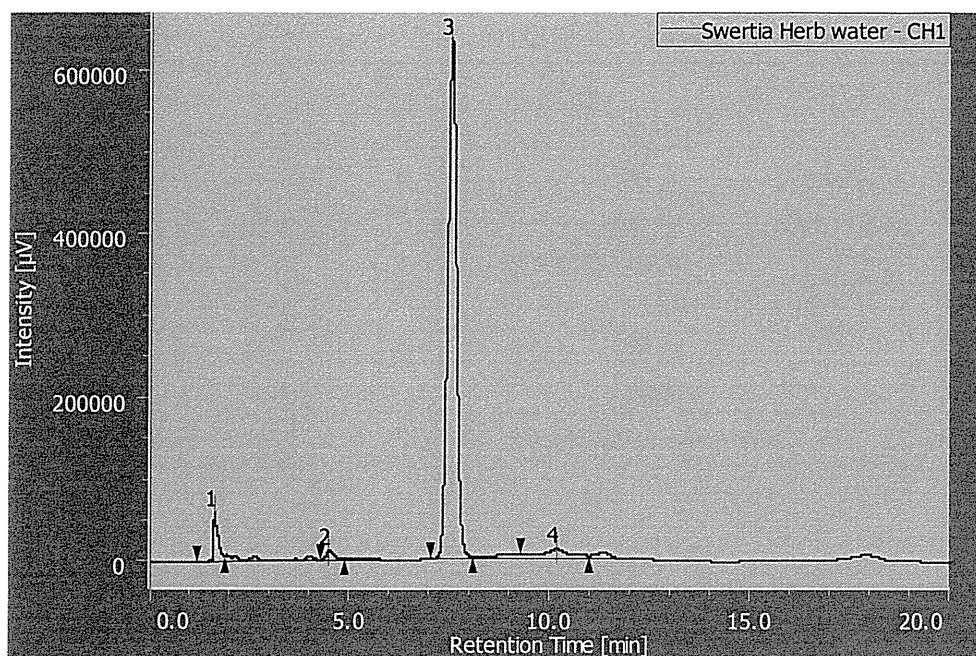


Fig. 2 センブリ標準煎液中のスウェルチアマリンの定量

カラム : Inertsil ODS-3 (内径4.6 mm, 長さ15 cm, 粒子径5 μm)

カラム温度 : 50°C

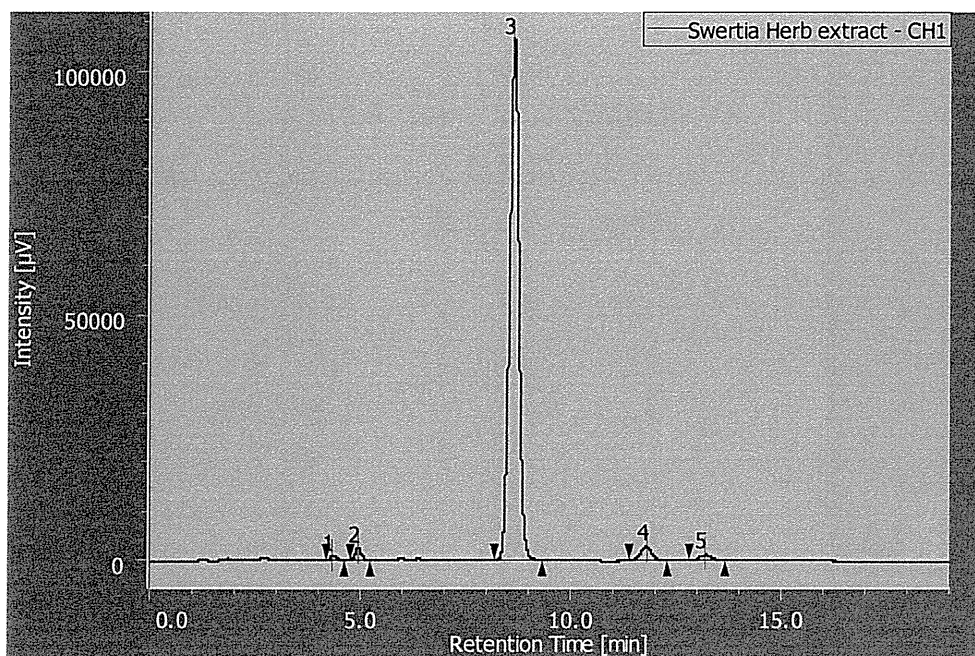


Fig. 3 センブリエキス中のスウェルチアマリンの定量

カラム : Inertsil ODS-3 (内径4.6 mm, 長さ15 cm, 粒子径5 μm)

カラム温度 : 50°C

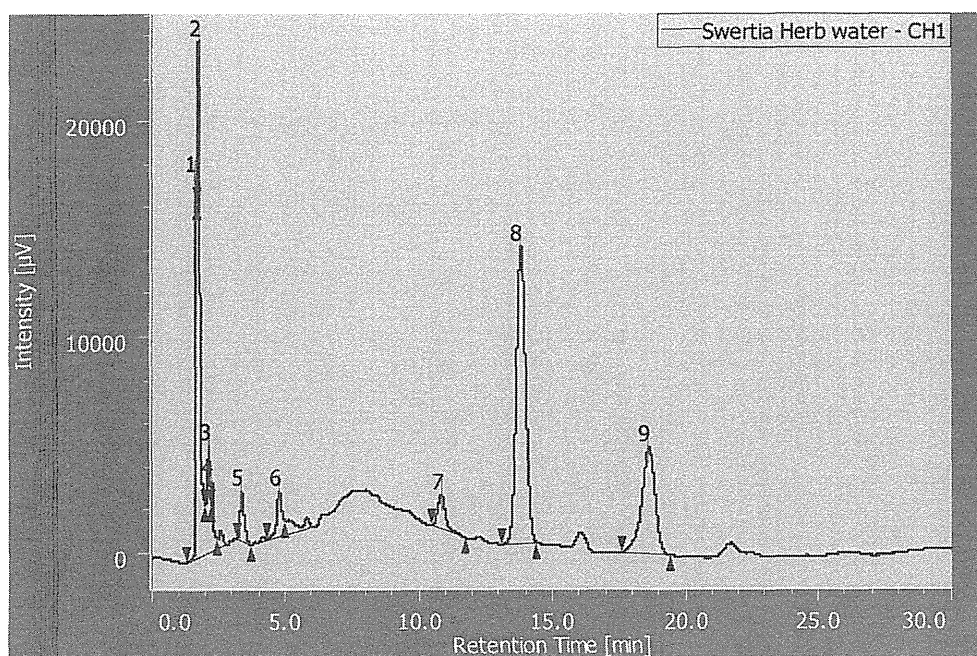


Fig. 4 標準煎液中のゲンチオピクロシドの定量

ピーク 8 : スウェルチアマリン, ピーク 9 : ゲンチオピクロシド

カラム : Inertsil ODS-3 (内径4.6 mm, 長さ15 cm, 粒子径5 μm)

カラム温度 : 50°C

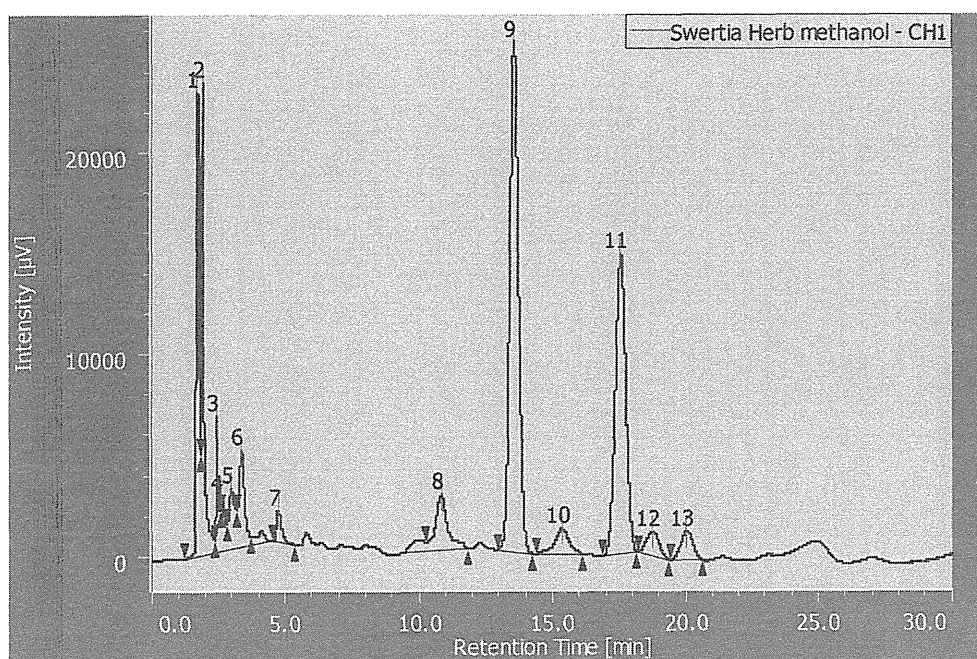


Fig. 5 センブリエキス中のゲンチオピクロシドの定量

ピーク 9 : スウェルチアマリン, ピーク 11 : ゲンチオピクロシド

カラム : Inertsil ODS-3 (内径4.6 mm, 長さ15 cm, 粒子径5 μm)

カラム温度 : 50°C

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 葉類生薬の成分化学的品質評価法に関する研究

研究分担者 京都大学 大学院薬学研究科 准教授 伊藤美千穂

要旨 生薬として用いられるハッカについて、日本国内で流通するものをひろく収集し、その基原や性状等について検討した。また、文献調査により、基原の植物種について検討した。近年は灰分の値が基準を超えるサンプルが多くなったという現状の原因を追究したところ、異種植物のものと思われる長毛がハッカ植物体に多数付着していることを発見した。

研究協力者

日本漢方生薬製剤協会

日本生薬連合会

A. 目的

ハッカは、第16改正日本薬局方に『本品はハッカ *Mentha arvensis* Linné var. *piperascens* Malinvaud (Labiatae) の地上部である。』と規定される生薬で、加味逍遙散や荊芥連翹湯などの汎用漢方処方に配合されるほか、生薬としてではなく、新鮮葉から精油成分を抽出し、ハッカ油として用いたり、エルメントールの製造に利用したりする薬用植物である。生薬として使用されるものの原材料はほとんどが中国産を輸入したものであるが、近年のハッカは灰分が高値になる傾向が強くなり、薬局方に基づく評価では不適品となるロットが増加しているとの情報を得た。灰分が高値になる原因として、1) 基原の植物種が異なっている、2) 植物種は間違っていないが、精油含量を向上させる目的で品種改良等が行われた結果、腺毛が多い系統が

選抜され、灰分が高値となる傾向となった、などの原因が予想された。そこで、生薬ハッカの品質と安全性確保を目的として、基原の植物種に関する検討、および植物体の、特に腺毛に関する形態観察を中心に、灰分高値となる原因の追究を行った。

B. 研究方法

B. 1. 文献調査

ハッカに関する文献を広く収集し、特に分類に関する事項について検討した。

B. 2. 形態観察

日本国内に流通する生薬ハッカをひろく収集し、実体顕微鏡にて形態を観察した。また、サンプルとして生産地から取り寄せたものの、灰分試験結果が高値のために薬局方不適となったものを入手し、同様に観察した。

<倫理面への配慮>

研究内容に特に倫理面への配慮が必要な項目

はなかった。

C. 結果と考察

C.1. 文献調査による分類学的検討

ハッカは北米、中国、インドなどで重要な商業作物であり、精油成分組成の異なるさまざまなタイプが生産されていることから、精油に関する文献情報は比較的豊富に存在する。しかしながら、ハッカ属植物の植物学的な分類については必ずしも情報は多くない。加えて、属内の交雑によりさまざまな種間雑種が生じているため、分類は非常に困難であるが、最近出版された “Mint” The genus *Mentha* (Edited by Brian M. Lawrence, Taylor & Francis Group LLC, 2007) によれば、植物分類学的には、日本薬局方にハッカの基原として記載されている *Mentha arvensis* Linné var. *piperascens* Malinvaud という学名は *M. canadensis* L. に書き換えられているということである。

ヨーロッパの *M. arvensis* は染色体数が $2n=72$ であるが (A. O. Tucker & H. L. Chambers, Taxon 51, 703-718, 2002), 日本や中国、インドなどアジア圏で *M. arvensis* とされる植物は染色体数が $2n=96$ である。日本で生薬ハッカの基原とされる植物 (var. *piperascens*) も $2n=96$ である。同一種内に染色体数が異なる変種が含まれるということは考えにくく、ヨーロッパとアジア圏の *M. arvensis* はそれぞれ別種であると考えるべきであろう。

先に示した B. M. Lawrence 著の Mint という書籍で、アジア圏 (と北米) のハッカの学名として挙げられている *M. canadensis* L. については、A. O. Tucker と H. L. Chambers が、種間雑種を作った実験と植物分類学的な標本類の照合とを合わせて以下のように述べている。*M. arvensis* L. ($2n=72$) と *M. longifolia*

(L.) L. ($2n=24$) の種間雑種をつくったところ、できた F_1 植物は、*M. arvensis* L. からの 36 本と *M. longifolia* (L.) L. からの 12 本が合わさって $2n=48$ になるだろうとの論文筆者ら予測に反して、すべての個体が $2n=96$ になり、形態学的には *M. canadensis* L. とそっくりの植物ができた。親植物と F_1 植物の精油成分組成の遺伝パターンなども加味して考察すると、*M. canadensis* L. は古第三期 (6500 万年前~2500 万年前) に生成した複二倍体 (遺伝的に異なる 2 種の雑種 F_1 植物が、遺伝的にヘテロなので不安定であるため染色体倍加を起こし、安定化したもの) が残ったものであろう、という結論に達している (A. O. Tucker & H. L. Chambers, Taxon 51, 703-718, 2002)。

ハッカは生薬としての利用のみならず、ハッカ油、さらにはハッカ油から精製したメントールという形で食品や香粧品、また医薬品にも世界中で多く利用されている。ヨーロッパ薬局方 “Mint oil, partly dementholised”, また米国薬局方 herbal drugs “Dementholised Mint Oil” の項の記述においては、基原の植物種は *M. canadensis* L. になっている。エルメントールやハッカ油を製造している会社にインタビューした結果では、これらの dementholised mint oils の基原植物は日本薬局方のハッカの基原と同じものであるということであった。このような事情を鑑みると、正しいハッカの基原植物を確保するため、また欧米薬局方との調和をも考慮すると、日本薬局方で表記されるハッカの基原の学名は *M. canadensis* L. としたほうがよいのではないだろうか。この点に関しては、ヨーロッパと北米とで *M. canadensis* L. として取り扱っている植物と日本薬局方ハッカの基原植物が確かに同一のものであることを確認する必要がある。

C. 2. 実体顕微鏡による形態観察

収集したハッカはすべて乾燥品であった。産地によって茎部分が紫色のものとそうでないものがあったり、葉の厚みが異なっていたりする違いはあったが、腺鱗の様子や腺毛などについて、大きく異なるサンプルは見当たらなかった。すなわち、通常の形態観察から、基原の種が異なっていると予想されるようなサンプルはなかった。

C. 3. 灰分が高値となったサンプルについて

灰分が高値となり局方不適となったサンプルについて、その原因として、1) 基原の種が異なっている、2) 選抜育種の結果、腺毛が特に多い系統が選ばれてしまった、などの理由が挙げられていた。そこでまず、1) について形態観察の上から検討したが(図1, 図2)、その他の局方適合品と形態はほぼ同じで、特に異なる種の特徴は見いだせなかった。

次に2) について検討した。図1, 図2に示す通り、精油を含む腺鱗の数は多いが、精油を含まない腺毛の数や密度が特に多い、高いというわけではなかったが、図3, 図4に示すように、白色～乳白色の非常に長い毛のようなものが、葉の基部や、乾燥中に丸まったと思われる葉の内側などに付着しているのを多数発見した。これらは慣れていなければ、ハッカの毛のように見える可能性があると思われた。ピンセットを用いてこの付着物をハッカの植物体から取り外したところ、図5, 図6に示す通り、小さな種子のような構造物、および丸い穴様の構造が観察される、植物の種子か果実のようなものであることが判明した。この付着物が見つかったサンプルは、中国安徽省豪州産のものであった。

この付着物は、形状から、タンポポやアザミなどのキク科植物またはポプラなどの、綿毛付の種子ではないかと予想した。種子であれば飛散する時期はある限られた期間であろうと予想され、それがハッカの収穫時期と重なっていたということではないだろうか。

この付着物が灰分高値の原因であろうと思われるが、これを確定するためには、ほかの灰分高値となったハッカサンプルについても入手に努めて観察することが必要である。また、灰分高値となったサンプルの産地にて現地調査を行い、付着物がなんであるかの同定をする必要がある。そのうえで、付着物や異物混入のない、安全な生薬の生産方法等を考えることが可能である。

E. まとめ

ハッカについて、文献調査により基原の種の分類学的検討を行った。その結果、*Mentha arvensis* Linné var. *piperascens* Malinvaud という学名は、植物分類学的には *M. canadensis* L. に変更されていることが判明した。欧州薬局方、米国薬局方では *M. canadensis* L. が採用されていた。

また、日本で生薬として流通しているハッカについて形態観察を行い、灰分高値で局方不適となったサンプルとの比較を行った。その結果、灰分高値となった原因として、異種植物の綿毛付種子様の付着物が混入していることを明らかにした。

学名については、北米および欧州で *M. canadensis* L. として栽培される植物についての調査が、また灰分高値のハッカについては、発見した付着物についての現地調査などによる追跡調査が必要であると考えられた。