

逆相 TLC／スキャニングデンシトメトリーによる生薬分析 —ヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ、クジンの確認試験—

池田清栄, 三上栄一, 大野勉
愛知県衛生研究所

Analysis of Crude Drugs Using Reversed-phase TLC/Scanning Densitometry. Identification of Bitter Cardamon, Epimedium Herb, Lithospermum Root, Rhubarb, Saussurea Root and Sophora Root

Seiei Ikeda, Eiichi Mikami and Tsutomu Ohno

Aichi Prefectural Institute of Public Health, 7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan

(Received March 21, 2008)

We performed identification tests of the main components (nootkatone, icariin, acetylshikonin, sennoside A, costunolide, and oxymatrine) of the following crude drugs in the *Japanese pharmacopoeia*, 15th edition (JP15): Bitter Cardamon, Epimedium Herb, Lithospermum Root, Rhubarb, Saussurea Root, and Sophora Root. The identification was carried out with reversed-phase TLC using water, acetonitrile, methanol, and 2-butanone as developing solvents. A single spot could be separated from other components (R_f value: 0.43-0.61). In addition, spectral information could be simultaneously obtained by scanning densitometry. Thus, the main components of crude drugs in the JP15 could be identified by this method simply, rapidly, and accurately.

Keywords: crude drug, reversed-phase TLC, scanning densitometry, identification

はじめに

第十五改正日本薬局方（以下JP15）収載生薬であるヤクチ、インヨウカク、シコン、ダイオウ、モッコウ及びクジンについて、逆相TLC／スキャニングデンシトメトリーによる主成分の確認試験方法を開発した。JP15収載の生薬は、原則的に、順相のTLCにより同定されるが、JP15にはヤクチの確認試験が設定されていない。一方、JP15のモッコウ、クジンの確認試験は、呈色反応によるものである¹⁾。これら生薬もTLCによる確認試験の設定が必要と考えられる。ところで、我々は、食品中のタール色素の確認において、逆相TLCは、順相TLCと比べて R_f 値の再現性に優れていることを報告した²⁻⁶⁾。また、多成分を含有している生薬の分析に逆相TLCは有効であることを報告した^{7,8)}。そこで、三種類の生薬に対して、逆相TLCによる分析法を開発した。加えて、確認試験に順相TLCが適用されているインヨウカク、シコン、ダイオウ¹⁾にも逆相TLCによる確認試験を適用した。

実験材料と実験方法

1. 生薬材料

生薬材料はすべて局方品であり、愛知県衛生研究所に保管する。それぞれの入手先、産地、同研究所における標本番号を示す。

A) ヤクチ, *Alpiniae Fructus*, Bitter Cardamon

A-1) ウチダ和漢薬(株), 中国・海南島, 1A00001

A-2) 高砂薬業(株), 中国・広東省及び近隣諸省, 1A00002

A-3) 紀伊国屋漢薬局(株), 中国・広東省, 1A00003

B) インヨウカク, *Epimedii Herba*, Epimedium Herb

B-1) 松浦薬業(株), 中国・東北地方, 1B00001

B-2) ウチダ和漢薬(株), 中国・吉林省, 1B00002

B-3) 紀伊国屋漢薬局(株), 中国・吉林省, 1B00003

C) シコン, *Lithospermi Radix*, Lithospermum Root

C-1) 紀伊国屋漢薬局(株), 中国・内蒙古, 1C00001

C-2) 松浦薬業(株), 中国・遼寧省, 1C00002

D) ダイオウ, *Rhei Rhizoma*, Rhubarb

- D-1) ウチダ和漢薬(株), 中国・四川省, 1D00001
 D-2) 紀伊国屋漢薬局(株), 中国・四川省, 1D00002
 E) モッコウ, *Saussureae Radix*, *Saussurea Root*
 E-1) 松浦薬業(株), 中国・雲南省, 1E00001
 E-2) ウチダ和漢薬(株), 中国・雲南省, 1E00002
 E-3) 大見生薬(株), 中国・雲南省, 1E00003
 F) クジン, *Sophorae Radix*, *Sophora Root*
 F-1) ウチダ和漢薬(株), 中国・河北省, 1F00001
 F-2) 大見生薬(株), 中国・貴州省, 1F00002
 F-3) 松浦薬業(株), 中国・陝西省, 1F00003

2. 試料溶液の調製

- A) ヤクチ粉末 2.0 g をメタノール 10 mL に溶解し, 5 分間振り混ぜ, ガラス繊維ろ紙でろ過した.
 B) 局方収載の確認試験の項における方法¹⁾に従った.
 C) シコン粉末 1.0 g にメタノール 10 mL を加え, 超音波で 30 分間抽出後, ガラス繊維ろ紙でろ過した.
 D) 局方収載の確認試験の項における方法¹⁾に従った.
 E) 局方収載の確認試験の項における方法¹⁾に従った.
 F) クジン粉末 1.0 g をメタノール 20 mL に溶解し, 20 分間振り混ぜ, ガラス繊維ろ紙でろ過した.

3. 標準溶液の調製

- A) ノートカトン (和光純薬(株)): 3.5 mg/mL メタノール溶液
 B) イカリイン (松浦薬業(株)): 局方収載の確認試験の項における標準溶液¹⁾
 C) アセチルシコニン (和光純薬(株) 生化学用): 1 mg/mL メタノール溶液
 D) センノシド A (和光純薬(株) 生化学用): 局方収載の確認試験の項における標準溶液¹⁾
 E) コスツノリド (和光純薬(株) 生薬試験用): 1 mg/mL メタノール溶液
 F) オキシマトリン (和光純薬(株) 生薬試験用): 1 mg/mL メタノール溶液

4. 測定条件

1) TLC 条件

プレート: メルク社製 RP-18 F₂₅₄S, Art.15389, Lot No. OB257917

展開溶媒: 5%硫酸ナトリウム溶液, 2-ブタノン, メタノール, アセトニトリル, 水の組合わせにより検討した.

スポット量: 10 μ L

検出: A) 暗所で紫外線 254 nm 照射, B) 暗所で紫外線 254 nm 照射, C) 暗所で紫外線 365 nm 照射による薄紫色の発色, D) 暗所で紫外線 254 nm 照射, E) 暗所で紫外線 254 nm 照射, F) ドラージェンドルフ試液の噴霧による茶褐色の発色

2) スキャンングデンシトメトリー条件

スキャンングデンシトメータ: 島津製作所製の 2 波長フライングスポットスキャンングデンシトメータ CS-9000, 波長走査範囲: 200–370 nm, スリットサイズ: 0.4×0.4 mm, 測光系: 反射吸光法

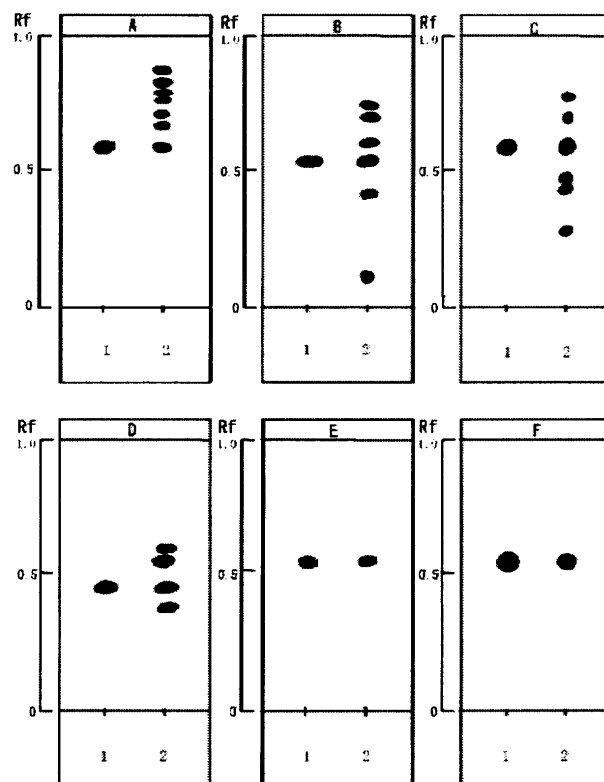


Fig.1 Reversed-phase Thin Layer Chromatograms of Standard and Sample Solutions of Crude Drugs

A) Bitter Cardamon: 1; standard solution of nootkatone, 2; sample solution (A-1). B) Epimedium Herb: 1; standard solution of icariin, 2; sample solution (B-1). C) Lithospermum Root: 1; standard solution of acetylshikonin, 2; sample solution (C-1). D) Rhubarb: 1; standard solution of sennoside A, 2; sample solution (D-1). E) Saussurea Root: 1; standard solution of costunolide, 2; sample solution (E-1). F) Sophora Root: 1; standard solution of oxymatrine, 2; sample solution (F-1).

実験結果及び考察

1. 逆相 TLC による生薬の主成分の確認

展開溶媒は、水、アセトニトリル、メタノール、2-ブタノン、5%硫酸ナトリウム溶液を用い、以下に示す最適な展開溶媒を選択することができた。すなわち、ヤクチは2-ブタノン/ 5%硫酸ナトリウム溶液/ メタノール混液 (3:1:1)、インヨウカクは水/ アセトニトリル/ メタノール混液 (6:5:5)、シコンはアセトニトリル/ メタノール/ 5%硫酸ナトリウム溶液混液 (10:4:1)、ダイオウは 5%硫酸ナトリウム溶液/アセトニトリル/ メタノール混液 (10:3:3)、モッコウはアセトニトリル/ 水混液 (5:1)、クジンは 5%硫酸ナトリウム溶液/ 2-ブタノン/ メタノール混液 (3:2:2) が最適であった。分離した標準溶液のスポットの R_f 値は、ノートカトンは 0.58, イカリインは 0.53, アセチルシコニン は 0.61, センノシド A は 0.43, コスツノリドは 0.56, オキシマトリンは 0.57 であり、それぞれの試料溶液から分離されたスポットの中に同じ R_f 値のスポットが観察された (Fig.1)。また、各々の生薬につき、入手先を異にする製品(A-2, 3, B-2, 3, C-2, D-2, E-2, 3, F-2, 3) についても同様であった。

2. 逆相 TLC における R_f 値の再現性

上記の条件で逆相 TLC を用いた生薬主成分の確認試験を 6 回繰り返し行ない、 R_f 値の再現性について、試料溶液の R_f 値/ 生薬標準溶液の R_f 値 (以下 R_a/R_s 値と略す) によって表すこととした (A-1, B-1, C-1, D-1, E-1, F-1 使用)。生薬別の R_a/R_s 値の最小値, 最大値, 平均値及び変動係数 (CV%) を Table 1 に示す。この結果, R_a/R_s 値の最小値は 0.97, 最大値は 1.02, 平均値は 0.99~1.00 であり, 変動係数は 0.7~1.6 %であった。このことは, 試料溶液の主成分のスポットは, 標準溶液のそれとほとんど同じ位置に現われ, 再現性に優れていることを示している。

3. スキャニングデンストメトリーによるスペクトルの確認

展開した標準溶液のスポット及びそれと R_f 値が一致した試料溶液のスポットについて, スキャニングデンストメータを用いて紫外吸収スペクトルを測定した。その結果, 試料溶液スポットのスペクトルは, 対応する標準溶液中に含まれる化合物 (ノートカトン、イカリイン、アセチルシコニン、センノシド A またはコスツノリド) の極大吸収波長及びスペクトルパターンと完全に一致した (Fig. 2)。

しかし, クジンについては長波長側に適度な極大吸収を

有しないため, そのスペクトルを同定に用いることができず, R_f 値とドラーゲンドルフ試液を用いたスポットの発色によって成分の確認を行った。

Table 1. R_a/R_s Value of Spots of Main Component in Each Crude Drug on Reversed-phase TLC Plates

Crude drugs (main component)	n	R_a/R_s Value*			
		Min.	Max.	Ave.	CV (%)
Bitter Cardamon (nootkatone)	6	0.98	1.02	1.00	1.1
Epimedium Herb (icariin)	6	0.98	1.00	0.99	1.0
Lithospermum Root (acetylshikonin)	6	0.97	1.00	0.99	1.6
Rhubarb (sennoside A)	6	0.98	1.00	1.00	0.9
Saussurea Root (costunolide)	6	0.98	1.00	0.99	0.9
Sophora Root (oxymatrine)	6	0.98	1.00	1.00	0.7

* Ratio of R_f (sample) to R_f (standard)

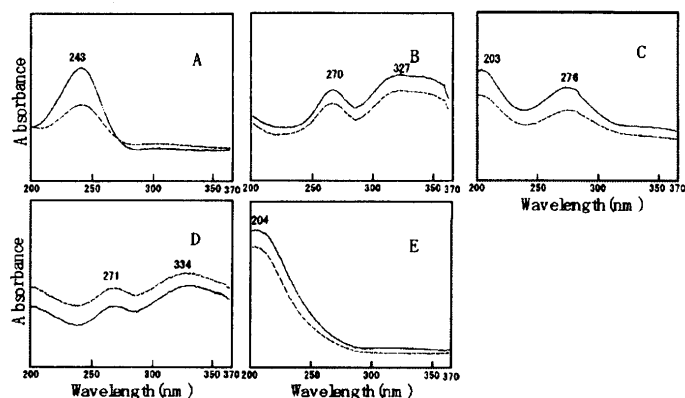


Fig.2 UV Absorption Spectra of Developed Spots of the Standard and Sample Solutions Measured by Scanning Densitometry on the Reversed-phase TLC Plates

Solid line: standard solution, Broken line: sample solution.

A) Bitter Cardamon, B) Epimedium Herb, C) Lithospermum Root, D) Rhubarb, E) Saussurea Root and F) Sophora Root.

まとめ

逆相 TLC を用いることにより, 展開溶媒に水, アセトニトリル等の非ハロゲン系の溶媒を選択することができるため, 人体及び環境に負荷をかけない確認試験法を開発することができた。本法は R_f 値の 6 回繰り返し再現性試験においても CV 値が 1.0%以下と精度に優れていた。また, 同時

にスキヤニングデンシトメトリーを行うことにより、スペクトルの情報も得られ、これらの方法により、生薬の主成分を、簡易、迅速、確実に同定することが可能であった。

参考文献

- 1) The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, “The Japanese Pharmacopoeia 15th Edition”, Japanese Version (2006), pp. 1178, 1203, 1222, 1236, 1274.
- 2) Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Inoue H., Ohno T., Inagaki K., Kuno A., Yamamoto N. Simple method for the analysis of food dyes on reversed-phase thin-layer plates. *J. Chromatogr.*, **411**, 437-444 (1987).
- 3) Ohno T., Ito Y., Mikami E., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Nakagawa T. Identification of coal tar dyes in cosmetics and foods using reversed-phase TLC/scanning densitometry. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **42**, 53-59 (1996).
- 4) Ueno E., Ohno T., Oshima H., Saito I., Ito Y., Oka H., Kagami T., Kijima H., Okazaki K. Identification of small amounts of coal tar dyes in foods by reversed-phase TLC/ scanning densitometry with sample concentration techniques. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **39**, 286-291 (1998).
- 5) Ohno T., Mikami E., Matsumoto H. Identification of oil-soluble coal tar dyes in cosmetics using reversed-phase TLC/scanning densitometry. *J. Health Sci.*, **49**, 401-404 (2003).
- 6) Ozeki N., Oka H., Ikai Y., Ohno T., Hayakawa J., Hayashi T., Aoyama T., Kushibiki Y., Sato T., Ito M., Suzuki R. Applicability of reversed-phase TLC to the analysis of coal tar dyes in food. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **34**, 542-545 (1993).
- 7) Ohno T., Mikami E., Matsumoto H., Oka H., Nin I. Analysis of crude drugs using reversed-phase TLC/scanning densitometry (I) identification of saiko, akamegasiwa and sanshuyu. *Nat. Med.*, **58**, 218-221 (2004).
- 8) Ohno T., Mikami E., Oka H. Analysis of crude drugs using reversed-phase TLC/scanning densitometry (II) identification of ginseng, red ginseng, gentian, Japanese gentian, pueraria root, gardenia fruit, schisandra fruit and ginger. *J. Nat. Med.*, **60**, 141-145 (2006).