

非破壊分析法による大黃中の Sennoside A, B 及び水分の定量

高内 誠二^a, 白木 真美^b, 藤岡 章二^{*,a},
伊藤 正行^c, 宮坂 智哉^c

^a武田薬品工業(株)・分析代謝研究所, ^b武田ヘルスケア(株)・品質管理部, ^c(株)チノー・研究部

Quantitative Determination of Sennosides A, B and Water in Rhubarb by a Nondestructive Method

SEIJI TAKAUCHI,^a MAMI SHIRAKI,^b SHOJI FUJIOKA,^{*,a}
MASAYUKI ITO^c and TOMOYA MIYASAKA^c

^aDrug Analysis & Pharmacokinetics Research Laboratories, Takeda Chemical Ind., Ltd.,
17-85, Juso-Honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

^bDepartment of Quality Control, Takeda Healthcare Products Co. Ltd., 21, 2-chome
Osadano-cho, Fukuichiyama, Kyoto 620, Japan

^cResearch & Development Laboratory, Chino Corporation, 32-8, Kumano-cho,
Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received June 22, 1994)

A simple and rapid method for the quantitative determination of sennosides A and B in rhubarb was established by near infrared spectroscopic analysis (NIRA), nondestructively. By using this method, the amounts of sennosides A, B and water in powdered rhubarb were measured. The results obtained by HPLC or by the decrease in weight on drying were compared with those obtained by this method. The correlation coefficients (r) were found to be 0.94-0.98. The throughput rate was 10 samples/3 min.

Keywords—rhubarb; nondestruction method; near infrared spectroscopic analysis (NIRA); sennoside A; sennoside B

生薬では原植物、産地、栽培年数及び調製方法などがその品質を左右することが知られている。そのため現在の品質評価は五感による評価に加え、有効成分などの含量を指標にした方法が多用されている。

最近の有効成分の定量法は精度が向上したが、試料溶液の調製など操作が煩雑で時間がかかり、さらに経験も必要とする場合も多い。

そこで著者らはより簡易で迅速な定量法を開発すべく、近年、医薬品研究、食品研究などに用いられ始めた近赤外分光分析法 (Near Infrared Spectroscopic Analysis, 以下 NIR 法と略) に注目し、本法を生薬の品質評価に適用することを試み興味ある知見を得た。

NIR 法は非破壊分析の一方であり、粉末試料を抽出などの操作をすることなく直接測定できることを特徴としている。

一般に本法の試料は粉末状あるいはスラリー状など不透明なものが多く、この場合には拡散反射光で得たスペクトルを数学的処理を行い定量を行う方法 (拡散反射法) を採用している。すなわち、試料に照射された光は試料の表面に反射し、反射光となり一部の照射光は粉末層を透過し、

成分に吸収されて透過、さらに反射を繰り返し多くの情報を持つ拡散反射光となる。この光を集めスペクトルを得る方法を拡散反射法と称している。

拡散反射光と物質の吸収との量的関係は Kubelka-Munk の式で説明されており、NIR 法での定量はこの原理を利用している¹⁾。本法は前述したように非破壊で、かつ迅速に定量できる方法であることから、ロット内から多数の検体を測定するなどの必要性の高い生薬の品質評価には最適と考えられる。

NIR 法での測定主波長領域は 1,200~2,400 nm で、この領域は水素原子に結合した原子団 (CH, OH, NH など) の基準振動に関係した倍音振動、あるいは結合振動による吸収が観察されるため有機化合物の多くの情報が得られる。一般に近赤外領域のスペクトルは吸収が弱いため、水のような強い吸収に他の吸収帯が影響されることなく赤外領域での多成分の情報が得られる。しかし、スペクトルがブロードなため当初は定性分析のみに用いられてきたが、コンピューターの発達によりデータ処理の自動化、複雑な統計学的数学手法 (相関、回帰、多変量解析など) によりデータ解析が容易となり、最近ではスペクトルの吸収度が

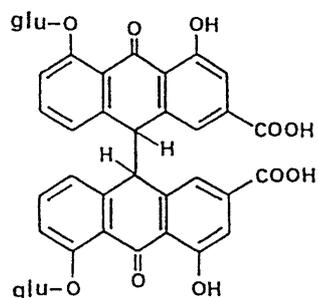
ら成分量を求める定量分析にも応用され、その理論及び実施例の報告が見られるようになってきた¹⁻³⁾。

そこで本法を生薬の成分定量に応用することを試みた。

対照生薬としては、緩下、健胃、消炎作用があり、大黃甘草湯、三黃瀉心湯など、多くの漢方方剤に配合されている代表的な生薬「大黃」(*Rheum palmatum* L., *R. tanguticum* MAXIM., *R. coreanum* NAKAI, *R. officinale* BAILL. など) をとりあげた。

大黃の化学的、生物学的研究は古くから行われ、活性成分としては140余種の化合物が単離証明されている^{4,5)}。

主薬効成分(緩下作用)は sennoside 類であることから、大黃の品質評価は五感によるほか、sennoside A (I) 及び sennoside B (II) などの含量を指標としている場合が多い。



Sennoside A (I); 10-10' (*trans*)
Sennoside B (II); 10-10' (*meso*)

今回、信州大黃(本邦栽培品)及び市場品大黃(中国からの輸入品)の合計51検体を用い、本法によるI及びIIの定量並びに水分の測定につき検討を行ったので報告する。

実験の部

実験材料 大黃は北海道にて栽培した信州大黃29検体を武田ヘルスケア(株)から、市場品の大黃22検体は武田薬品工業(株)・京都薬用植物園、三国(株)及び栃本天海堂から入手した。次いでそれらの中から任意に信州大黃20検体及び市場品大黃17検体を選抜しキャリブレーションモデル作成用とした。その他(信州大黃;9検体、市場品大黃;5検体)はバリデーションサンプルとした。

標準品及び試薬 I及びIIの標準品は和光純薬工業(株)製、生薬試験用標準品を用いた。HPLC用移動相には同社のHPLC用試薬を、イオン対試薬には東京化成工業(株)製のtetra-*n*-butyl ammonium bromide (TBAB)を用いた。

緩衝液調製用試薬はいずれも和光純薬工業(株)製の試薬特級を用いた。

試料粉末の調製 各大黃検体の一定量(約30g)をステンレス製筒に入れ、ステンレス製ボールと共に約10分間スペックスマイルで破碎した。

高速液体クロマトグラフ(HPLC)法 相楽ら⁶⁾の方法を改良して設定した。即ち、column, LiChroCART (LiChrospher 100) RP-18 [(4 mm i.d.×250 mm), Cica-Merck]; column temp., 45°C; mobile phase, 0.15 M AcOH buffer・MeOH・CH₃CN (20:3:2) containing 0.006 M TBAB; sample size, 15 μl; detection, 308 nm; flow rate, 1.0 ml/minで行った。

試料溶液及び標準溶液の調製法についても相楽ら⁶⁾の方法に準じた。

乾燥減量(LOD)の測定 試料粉末約0.5gを秤量瓶に精秤した後、105°C、6h乾燥し、デシケーター(SiO₂ gel)で室温まで放冷した後、秤量しLODを算出した。

NIRスペクトルの測定条件 試料粉末約1.5gを粉末測定用セル中に叩きながら均一に充填し測定した。I及びIIの標準品はセラミック板上にて双方向ファイバーを用いて測定した。その他の条件は測定波長、1,200~2,400 nm; モード、拡散反射式; バックグラウンド、白色セラミック板; スキャン方向、1,200→2,400 nm; スキャン回数、バックグラウンドは100回、試料は25回; 測定回数、3回; 測定環境、25°C、45% RHで行った。

NIRスペクトルの演算処理及びデータ解析 平均データを吸光度変換し、更にその二次微分スペクトル変換を実施。各データを重回帰分析法によりI、II、I+II及び水分含量を算出した。

装置 ①HPLC装置: ポンプは島津製LC-6A型、検出器は島津製SPD-6A型、オートインジェクターは島津製SIL-6A型、システムコントローラーは島津製SCL-6A型、データ処理装置は島津製C-R4A型をそれぞれ装着して用いた。恒温槽は東京理化製ユニクールUC-65型を用いた。

②NIR装置: LT Industries製QUANTUM 1200型を用い、演算処理及びデータ解析にはIBM 5170型電算機を用いた。

③ソフトウェア: LT Industries製のSpectraMatrix及びLighTcalを用いた。

結果と考察

今回の定量手順についてその概要をChart 1に図示した。

すなわち、被測定試料群を代表する複数検体(37検体)を選抜し、慣行分析(HPLC法及びLOD)で目的成分含量を測定し、次いで同一試料及び標準品についてNIRスペクトル測定を行い、それらのスペクトルを二次微分処理を行った。

処理後、スペクトルの帰属を行い、慣行分析で得た定量値を基にその値に最も近似する値を示す波長(数)を、測定した領域(1,200~2,400 nm)からコンピューターで重回帰分析により選抜し、可能性の高い複数のキャリブレーション

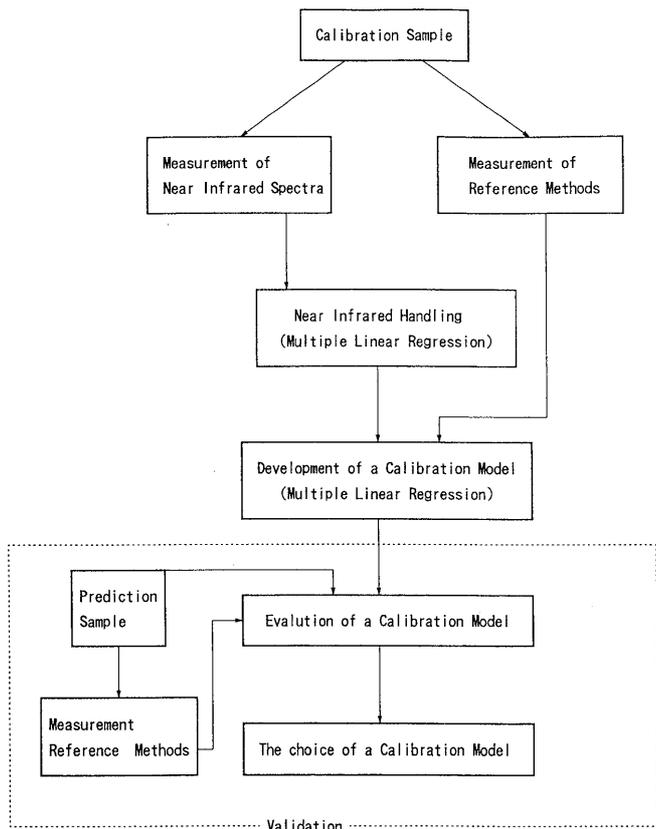


Chart 1. Block Diagram of NIRA Method

ションモデルを算出した。その後、このキャリブレーションモデルを用いて未知試料（14 検体）の目的成分含量を NIR 法により測定し、更に慣行分析で同成分量を測定して両定量値の相関を求め、最も良好な成績を示したキャリブレーションモデルを選択した。

大黄（天然物）など多成分からなる試料では吸収スペクトルそのものがそれぞれの成分量に比例して影響を受け、

単純な回帰式では表せない場合が多い。そのため多成分の吸収を要素に入れる重回帰分析（Multiple Linear Regression）によって回帰式を算出し、検量線を作成して定量に用いられる。

重回帰分析とは、変数増加法と称され、単相関（1 波長）から出発して慣行分析値と相関関係が最も良くなるまで、変数の数を増加させて回帰式を求める方法である。

重回帰式は次の式によって表すことができる。

$$C_a = K_0 + K_1\alpha_a + K_2\alpha_b + K_3\alpha_c + K_4\alpha_d \cdots + K_n\alpha_n$$

（ここでの $\alpha_a \cdots \alpha_n$ は重回帰式の説明変数であって定量に影響する成分に由来する波長における吸収の強さを示す指標。 $K_0 \sim K_4$ は未知母数であり、慣行分析で正確な成分量が得られたキャリブレーション用試料をもとに、重回帰分析の手法で決定される定数。）

大黄の水分並びに I 及び II の測定にも重回帰分析を採用し、以下の成績を得た。

1. HPLC 法による I 及び II の定量結果

各試料（大黄末）中の I 及び II の含量を実験の部に記載した HPLC 条件により測定し、その含量分布を Fig. 1 (a) に示した。その結果、信州大黄（栽培品）では I+II の含量は 1.5~2.7% を示したが、市場品では trace~2.7% と幅広い分布を示した。

これら各々の定量値を基に、後述する NIR 法による sennoside 含量測定用キャリブレーションモデルを作成した。

2. LOD 測定結果

各試料中の水分を LOD として測定し、その含量分布を Fig. 1 (b) に示した。その結果、信州大黄（栽培品）では 5~11% の範囲であり、試料の約 8 割は 5~9% であった。今回の実験の範囲では市場品は概して信州大黄より高く 7~13% の範囲であり、主に 7~11% であった。

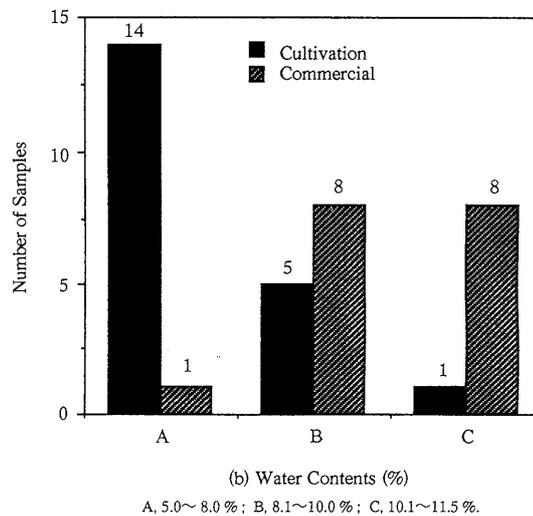
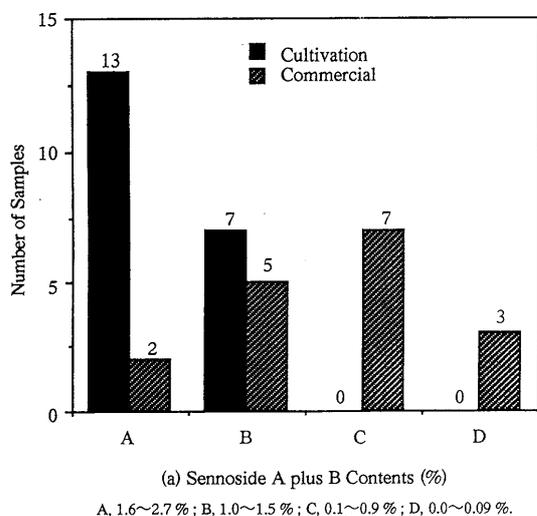


Fig. 1. Distribution of Sennoside A Plus B Contents (HPLC Method) and Water Contents (Official Method: Loss on Drying)

これら各々の LOD 値を基に、後述する NIR 法による水分測定用キャリブレーションモデルを作成した。

3. 試料の粒度

反射光測定の場合、試料の粒度分布がスペクトルの再現性に影響することが知られている。そこで今回の試料については一定条件で粉碎すると共に、抜取検査で粒度分布を測定し、100 mesh 以下の粉末が 60% 以上であることを確認し測定試料とした。この粉末試料につき、同一試料で繰り返し NIR スペクトル測定を行い、二次微分スペクトルでその粒度の影響を調査した結果、ほとんど同一のスペクトルが得られた。これはスペクトル演算処理で粒度差が改善されたものと判断した。

4. NIR 法による大黃中の水分の測定並びに I 及び II の定量

4-1. NIR スペクトル 天然物中の成分を NIR 法で分析した場合、そのスペクトルは各種成分が互いに影響し合

い、複雑でブロードなものとなるが、これを解析し易くするために波形処理したものに微分スペクトルがある。一般に用いられる微分の次数は一次及び二次で、前者はオリジナルスペクトルの変化率を差吸光度 (ΔOD) の変化で表したもので、オリジナルスペクトルの極大吸光の微分値はゼロになる。後者は前者の変化率でオリジナルスペクトルの吸収帯と位相が逆になるが、極大吸収は二次微分スペクトルでも極大値として表れるので、吸収帯の帰属には都合が良い。更に、複数の吸収帯が小波長差で重なった場合でも、吸収帯の確認が容易であり、隠れた吸収帯の確認も可能である。また微分値と濃度の間に直線性が成立するので、定量分析が容易になるなどの特長がある。

I 及び II の標準品の NIR スペクトル及び大黃末 (信州大黃, Lot No. 405) の NIR 一次吸収スペクトル (Fig. 2) 及びその二次微分吸収スペクトルと各吸収ピークの帰属 (Fig. 3) を示した。

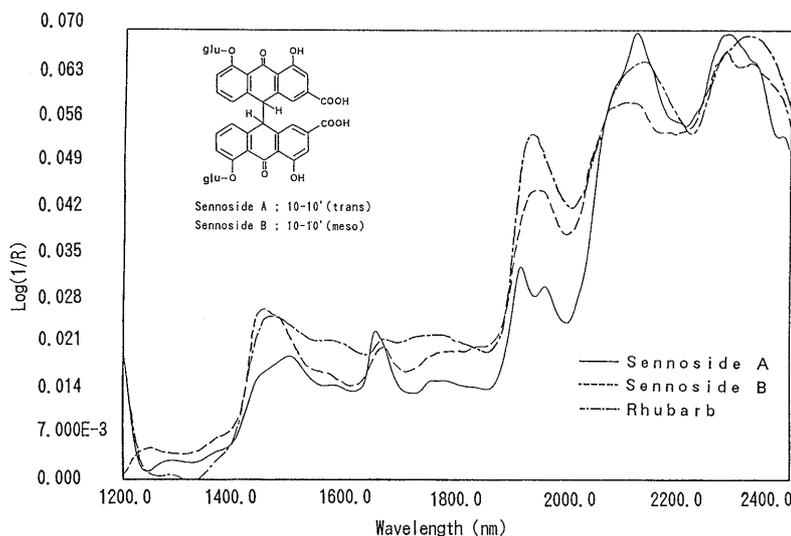


Fig. 2. Near Infrared Spectra of Sennoside A, Sennoside B and Rhubarb

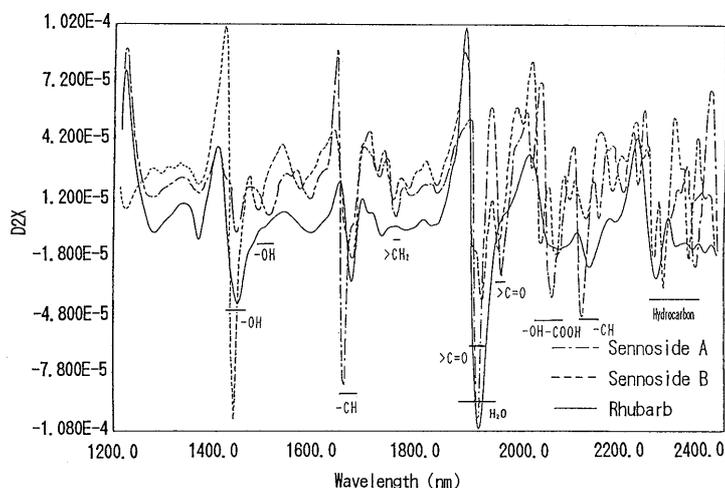


Fig. 3. Second Derivative Spectra of Sennoside A, Sennoside B and Rhubarb

なお、各試料のスペクトルはコンピューターに取込み、波形処理及び演算処理を行った。その結果、I及びIIが持つ2つの環構造 (bianthrone) を支持する吸収が観察されたが、環に結合している糖 (glucose) に由来する特徴的な吸収は特定できなかった。すなわち、I及びIIの全体スペクトルを比較すると、① 1,400~1,450 nm : IIの吸収がIの吸収より大である。② 1,480~1,500 nm : Iの吸収がIIより長波長側にシフトしている。③ 1,910~1,920 nm及び1,950~1,960 nm : Iの吸収がIIの吸収より大である。④ 2,000~2,100 nm : I及びIIの相違が顕著に現れた領域。⑤ 1,630~1,670 nm及び2,100 nm : Iの吸収がIIの吸収より大であり、かつIの吸収がIIより短波長側にシフトしていることなどが観察された。

これらの相違は両化合物の10-10'位のプロトンの結合位置 (*trans*, *meso* 体) に基づくものと、それに伴う分子内、分子間の水素結合の違いによるものと思われる。

大黃末では1,640~1,690 nm, 2,140 nmの2吸収はI及びIIのaromatic -CHの吸収に共通するものと思われるが、いずれもIはIIに比べ長波長側にシフトしていることがわかる。大黃中にはsennoside類以外に芳香族化合物を含むことから、この2吸収がsennoside類含量を直接反映した結果とは言い難い。

1,400~1,450 nm, 1,850~1,960 nmのH₂Oと推定される吸収は両化合物ともH₂O以外の吸収との重なりが推定される。これらの中で1,400 nm付近の吸収は、他の-OH伸縮振動吸収や水素結合による吸収、あるいはH₂Oと他の-OHとの水素結合による吸収などの影響を受けやすいが、1,900 nm付近の吸収は、1,400 nm付近の吸収に比べて大きく、1,400 nm付近の吸収より重なりの影響は少ないと思われる。

4-2. 重回帰分析による演算処理 (定量値の算出)

4-2-1. キャリブレーションモデルの作成 (水分, I及びII) : 前述したとおり、まず、被試験検体群を代表する試料37検体のNIRスペクトルを測定した。次いで、慣行分析で得られた値 (水分はLOD値, I及びIIはHPLC法による定量値) をもとに、測定したスペクトルの中から、各指標化合物の特徴を表している波長 (1,200~2,400 nm間の6波長) をコンピューターにより自動選択し、最も相関の高い単相関 (1波長) から出発し、順次波長を組み合わせ、相関係数 (r) が最大で、かつ標準誤差 (SE) が最小になるまで自動計算を行った (Software: Spectra-Matrix)。

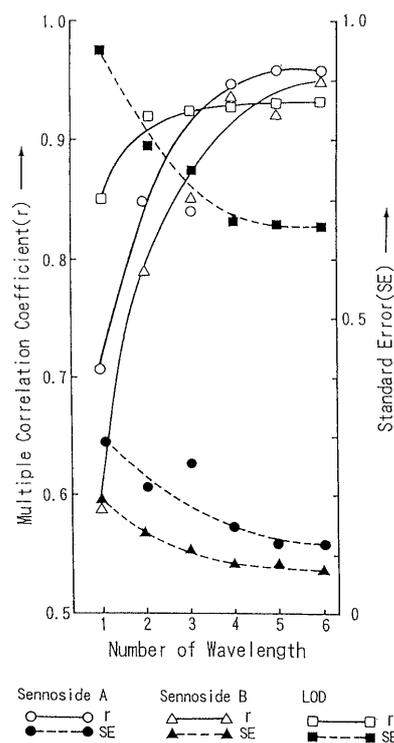


Fig. 4. Relationship between Wavelength and Multiple Correlation Coefficient (r) or Standard Error (SE)

その相関係数、標準誤差とを組み合わせた波長数の推移を Fig. 4 に示した。この成績から H₂O, I 及び II とも波長数を増加するに従い相関係数が高くなり、標準誤差が小さくなる傾向が観察されたが、4 波長以上の組合せではその改善傾向が小さくなったことから、今回は 4 波長に絞りキャリブレーションモデルを作成した (TABLE I)。

大黃中の水分量測定時、最も大きく寄与した波長は 1934.5 nm であった。当該波長は H₂O の結合吸収領域であり、Fig. 2 の二次微分スペクトルからも分かるように I 及び II の C=O 吸収の谷間に位置し他のピークの干渉が少ないため、良好な結果が得られたものと推定された。

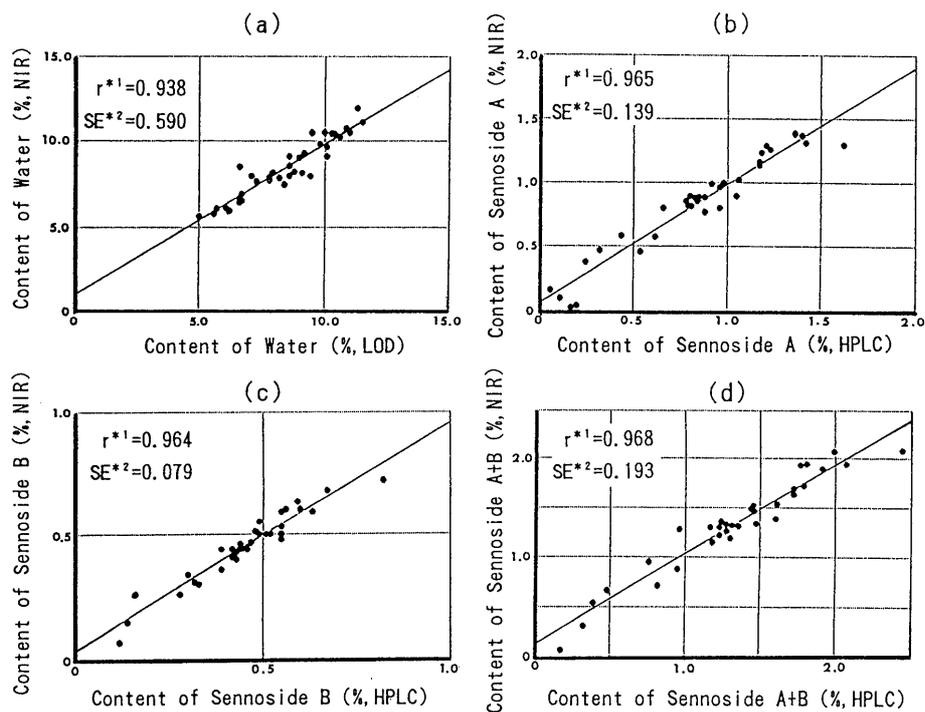
その他 3 波長を組み合わせることにより、より LOD 値に近似し比較的良好な結果を得ることができた。

NIR 法により測定された水分含量 (Y 軸) と LOD 測定値 (X 軸) との関係を Fig. 5 (a) に示した。

I, II 及び I+II 含量の測定では、寄与率大として選択した 4 波長のいずれもが 1,650, 2,150 nm 付近の aromatic -CH 関係領域であったことから、他の共存物質の影響を受け易いと推察された。しかし、後述するように定量精度検証試料測定結果から考察すると、選択した波長の組

TABLE I. Calibration Model: Number of Wavelength by NIRA Data Handling (Multiple Linear Regression)

Item	Water		Sennoside A		Sennoside B		Sennoside A plus B	
Wavelength (nm)	1934.5	1533.5	2136.5	1660.5	1631.5	1469.5	2135.5	1745.5
	1806.5	1644.5	2182.5	1567.5	1682.5	2331.5	1660.5	1564.5



*1;r=Multiple Correlation Coefficient, *2;SE=Standard Error

Fig. 5. Relationship between Contents Measured by NIR Method and These Measured by LOD or HPLC

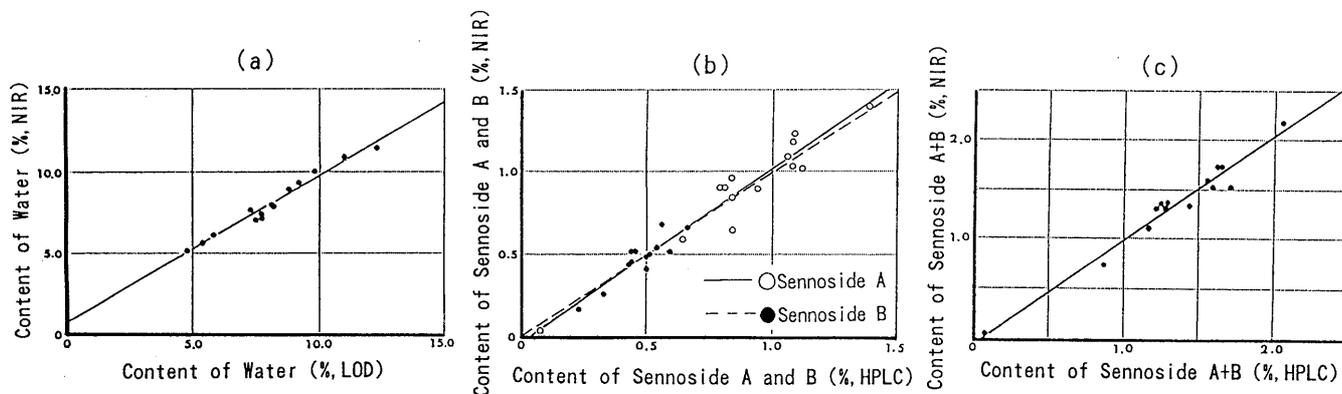


Fig. 6. Relationship between Contents in Unknown Samples Measured by Calibration Model (NIR Method) and These Measured by LOD and HPLC

TABLE II. Validation on Determination (n=8) (%)

Sample Item	A				B				C			
	Water	S-A	S-B	A+B	Water	S-A	S-B	A+B	Water	S-A	S-B	A+B
Max.	10.32	0.86	0.62	1.31	9.94	0.97	0.54	1.45	9.37	1.45	0.87	2.08
Min.	9.61	0.76	0.48	1.21	9.67	0.73	0.43	1.14	8.69	1.33	0.70	1.85
Ave. (x)	10.02	0.84	0.54	1.27	9.81	0.86	0.51	1.33	9.10	1.39	0.79	1.99
CV	2.40	5.10	8.10	2.71	1.05	9.61	8.41	6.39	2.89	2.48	6.24	3.98
HPLC and LOD data (y)	9.5	0.84	0.44	1.28	9.4	0.81	0.44	1.25	9.1	1.39	0.66	2.05
Ratio*	5.5	0.0	22.7	0.78	4.4	6.2	15.9	6.4	0.0	0.0	19.7	7.8

*100(x-y)/y.

S-A, sennoside A; S-B, sennoside B; A+B, sennoside A plus B; CV, coefficient of variation; LOD, loss on drying.

合せて求めた値はいずれも慣行分析値と近似した結果が得られた。この結果から今回の4波長による重回帰分析の演算処理で、充分目的が達せられたと判断した。

NIR法により測定されたI、II及びI+IIの含量(Y軸)とHPLC法で得た測定値(X軸)との関係をFig.5(b~d)に示した。

4-2-2. バリデーション：慣行定量法を検証する場合、添加回収率を求める実験が一般的に行われる。しかし、NIR法で天然物中の成分量を測定する場合、それらは何がしかの塩を形成している場合が多く、単純に標準品の添加が定量目的成分の増量とは考え難く、必ずしも添加回収実験が検証法として望ましい方法ではないと推察された。

そこで、まず未知試料(14検体)を用意し、確立したNIR条件(キャリブレーションモデル)を用い、それらの水分、I及びIIの含量を測定し、次いで慣行分析法で測定し、両者の相関を求める方法で定量精度を評価することとした。

その結果、Fig.6に示したように未知試料においても慣行分析値と良く一致した値が得られ、また標準誤差もキャリブレーションモデル作成時の値と大差なく、NIR法での定量は極めて有効であることが確認された。

更に、再度任意に3検体選抜し、同試料を本法で繰り返し測定を行い、バラツキ(CV)及び再現性などを検証した結果、非破壊下における簡易迅速定量法としてはほぼ満足できる成績を得ることができた(TABLE II)。

結 論

以上の諸検討の結果、今回のNIR法による大黄中の水分、sennoside A及びBの定量結果は、慣行分析法による値と対比すると、その相関係数は0.94~0.98、定量限界が0.1%程であった。

HPLC法により若干精度は劣るが、多数の検体を極めて短時間(10検体/約3分)に測定可能であり、生薬のロット内、間の品質のバラツキなどを迅速に評価する測定法

としてはほぼ期待した結果であった。

本法は相対分析法であることから、多数の検体からの情報をデータベース化することにより精度が向上するという短所がある。しかし、キャリブレーションモデル作成後は極めて簡易で、かつ迅速な分析法であることが、今回の大黄を用いての実験からも確認された。

今回の知見は本法が他の生薬の品質管理、栽培研究、公定書記載の定量法の補助的手段、エキス製造時の工程及び品質管理などにも、慣行分析法と併用して有効利用できることも合わせて示唆した成績といえる。

医薬品原料として用いる生薬の成分量は公定書記載法が望ましいため、直ちに本法を広く採用することはできないが、今後ハード、ソフト両面の開発が進めば本法の利用範囲がより広がるものと期待される。

謝 辞：本研究にあたり、終始有益なご助言を賜った奈良女子大学・家政学部・食品学研究室・的場輝佳博士、貴重な試料をご恵与賜った三国(株)・永井吉澄博士に深謝する。

引 用 文 献

- 1) 河野澄夫, 第6回非破壊計測シンポジウム講演要旨(日本食品工業会), p.7 (1990).
- 2) 田中誠之, 有機合成化学協会誌, **19**, 662 (1961).
- 3) J. K. Drennen, R. A. Lodder, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 622 (1990).
- 4) 宮本益雄, 今井俊司, 篠原正和, 藤岡章二, 後藤 実, 松岡敏郎, 藤村 一, 薬誌, **87**, 1040 (1967); 松岡敏郎, 八田亮三, 武田研究所報, **29**, 776 (1970); 松岡敏郎, 代謝, **10**, 2477 (1973); H. Oshio, S. Imai, S. Fujioka, T. Sugawara, M. Miyamoto, M. Tsukui, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 823 (1974); Y. Kasiwada, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 99 (1989).
- 5) K. Sasaki, K. Yamauchi, S. Kuwano, *Planta Med.*, **37**, 370 (1979); T. Nagasawa, H. Oura, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4494 (1985); 鄭 平東, 横沢隆子, 大浦彦吉, 和漢医学会誌, **3**, 65 (1986).
- 6) K. Sagara, T. Oshima, T. Yoshida, *J. Chromatogr.*, **403**, 253 (1987).