

漢方エキス製剤の品質評価について (第3報)<sup>1)</sup>

## 小半夏加茯苓湯における「半夏」の指標物質

鹿野美弘<sup>\*,a</sup>, 有元良幟子<sup>b</sup>, 趙昌代<sup>b</sup>, 田村きよみ<sup>a</sup>, 安田眞宰穂<sup>a</sup><sup>a</sup>北海道薬科大学, <sup>b</sup>順興薬品工業株式会社On the Evaluation of the Preparation of Chinese Medicinal Prescriptions(3)<sup>1)</sup>

## Marker Substance for "Pinelliae Tuber" Prescribed in

## "Shohangekabukuryo-To (小半夏加茯苓湯)"

YOSHIHIRO KANO,<sup>\*,a</sup> YOSHIKO ARIMOTO,<sup>b</sup> CHANG-DAE CHO,<sup>b</sup>KIYOMI TAMURA<sup>a</sup> and MASAHO YASUDA<sup>a</sup><sup>a</sup>Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences, 7-1 Katuraoka-cho,  
Otaru 047-02, Japan<sup>b</sup>Junkoh Medicinal Industries Co., Ltd., 20-9,  
Maruyama-cho, Shibuya-ku, Tokyo 150, Japan

(Received March 20, 1987)

Marker substances are needed for the control over the manufacturing process of the preparation of Chinese medicinal prescriptions.

As a marker substance for "Pinelliae Tuber," prescribed in "Shohangekabukuryo-To (小半夏加茯苓湯)," we isolated guanosine from the crude drug and examined its physical characteristics to find out if it was a suitable marker substance for the HPLC determination of the crude drug content. On the basis of these tests, guanosine was found to be satisfactory as the marker substance for "Pinelliae Tuber," prescribed in "Shohangekabukuryo-To (小半夏加茯苓湯)".

**Keywords**—marker substance; guanosine; Pinelliae Tuber; *Pinellia ternata*; Araceae; quantitative analysis; HPLC; evaluation of Chinese medicinal prescription

小半夏加茯苓湯は生姜 (5~8 g/day, ただし, 生姜は外皮を去った生のヒネショウガとして表示), 半夏 (5~8 g/day) および茯苓 (3~5 g/day) の3種の生薬から処方構成されている。また本処方前報<sup>1)</sup>で報告した生姜の 6-gingerol 以外に明確な指標物質の報告がなく, いわゆる2成分定量<sup>2)</sup>の行えない処方の一つであった。

今回, 半夏の指標物質の検索を行った結果, 粘液を除去した水溶性分画より guanosine を単離した。前報<sup>1)</sup>に準拠し, 本品の物性試験を行った結果, 小半夏加茯苓湯エキス製剤の指標物質として満足する結果を得たので以下に報告する。

なお, 半夏より guanosine が単離同定されたのは今回が初めてである。

## 実験の部

## 1. 3次元 HPLC による半夏および茯苓の比較

半夏および茯苓の微粉末 (<200 $\mu$ m) 各 1/10 日量 (800, 500 mg) を 60% MeOH 5 ml で 50°C, 30分間振盪抽出した後, 遠心分離 (3,500 rpm, 10 min) し, 上澄を 0.45 $\mu$ m のフィルターで濾過し, その濾液 20 $\mu$ l を HPLC に注入した。HPLC の条件: カラム: LiChro CART RP-18 250 mm $\times$ 4 mm i. d. Merck Co., 溶離液: A; H<sub>2</sub>O, B; acetonitrile, A/B=90/10 $\rightarrow$ A/B=20/80, 60 min リニアグラジエント, 流速: 1 ml/min, 検出波長: 220-300 nm (島津 SPD-M1A 使用), 検出感度: 0.08 ABS (Fig. 1).

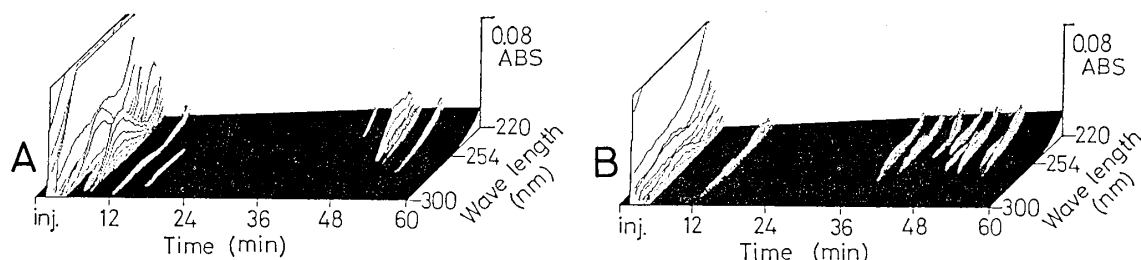


Fig. 1. 3DM-HPLC Profile of Pinelliae Tuber and Hoelen

A: Pinelliae Tuber; B: Hoelen. Conditions: column, LiChroCART RP-18 4 mm×250 mm; mobile phase: A=H<sub>2</sub>O, B=MeCN, A/B=90/10 → A/B=20/80, 60 min. linear gradient; flow rate, 1 ml/min at 30°C; detective wave length, 220 nm-300 nm; detective sensitivity, 0.08 ABS.

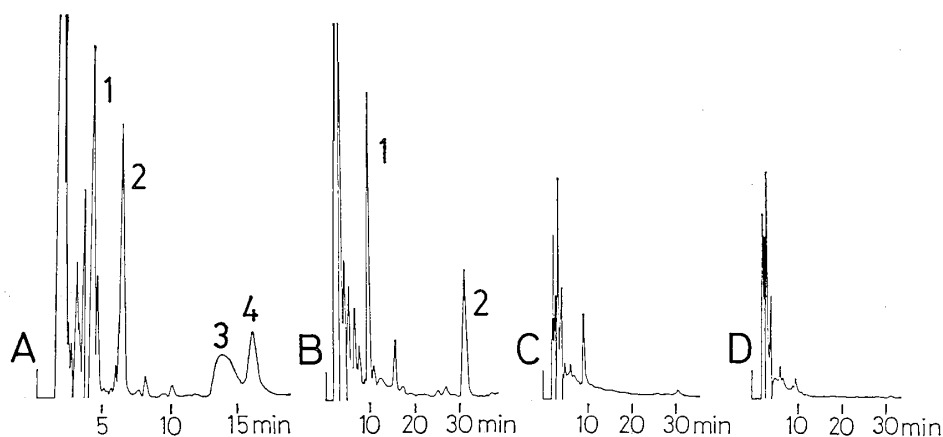


Fig. 2. HPLC Profile of Pinelliae Tuber, Hoelen and Fresh Zingiberis Rhizoma

A: Pinelliae Tuber, conditions: column, LiChroCART RP-18 250 mm×4 mm; mobile phase, 5% MeCN; flow rate, 1 ml/min at 30°C; detective wave length, 254 nm; detective sensitivity, 0.01 ABS. B: Water ext. of Pinelliae Tuber, C: water ext. of Hoelen, D: water ext. of fresh Zingiberis Rhizoma, HPLC conditions are the same as in the case of a determination method of guanosine (Fig. 5).

## 2. 半夏特異成分の検索

半夏の微粉末 (<200 $\mu$ m) 100 mg (1/80日量) を20% MeOH 5 ml で上記と同様に処理し, HPLC の試料溶液とした. HPLC の条件; 移動層: acetonitrile-H<sub>2</sub>O (5:95), 流速: 1 ml/min, 検出波長: 254 nm (島津 SPD-2A 使用), 検出感度: 0.01 ABS, 注入量: 10 $\mu$ l (Fig. 2-A). また別に半夏 (8 g), 茯苓 (5 g) および外皮を去った生のヒネショウガ (5 g) を用いそれらの煎剤 (20倍量, 半量煎じの湯液) を調製し, 構成生薬の成分ピークを比較検討した (Fig. 2-B~D, HPLC の条件は下記の定量操作に準拠).

## 3. 指標物質 (guanosine) の単離方法

上記の実験で確認された半夏由来のピーク 2 (Fig. 2-A, B) を目的の単離物質として以下の操作を行った. すなわち, 局方「半夏」(札幌市場品, 1985) 末 1 kg を50% MeOH 10 l で 40°C 10時間振盪抽出し, 得られた濾液を減圧下で約 2 l に濃縮した後, Et<sub>2</sub>O 2 l で分配し一夜放置し下層を分取した. 下層を減圧下で約 1 l に濃縮した後, MeOH 3 l を徐々に攪はんしながら加え, 沈澱する粘液を除去した. この操作 (濃縮, MeOH の添加, 濾過) を 4 回繰り返しながら徐々に MeOH 含有量を高め, 最終的に約 1 l の95% MeOH 可溶部を得た. MeOH 可溶部は減圧下で濃縮乾固し, 中圧分取用液体クロマトの試料溶液とした. 分離条件は次のとおりである. カラム: ODS 22 mm×300 mm, 溶離液: 5% acetonitrile, 流速: 5 ml/min, 測定波長: 254 nm. 分離された目的の分画 (ピーク 2) は減圧下で濃縮乾固し水より再結晶した (Fig. 3, Fig. 4).

## 4. Guanosine の物性試験 1. 乾熱および熱水の影響

Guanosine (和光純薬(株)) 10 mg/100 ml MeOH 溶液を調製し, 10 ml のメスフラスコに各 1 ml を分注した後, 水浴上で溶媒を留去したものを下記の試験に用いた. 比較標準液は試料分注後, 速やかに溶媒を留去し, 精製水で全

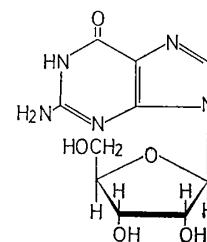
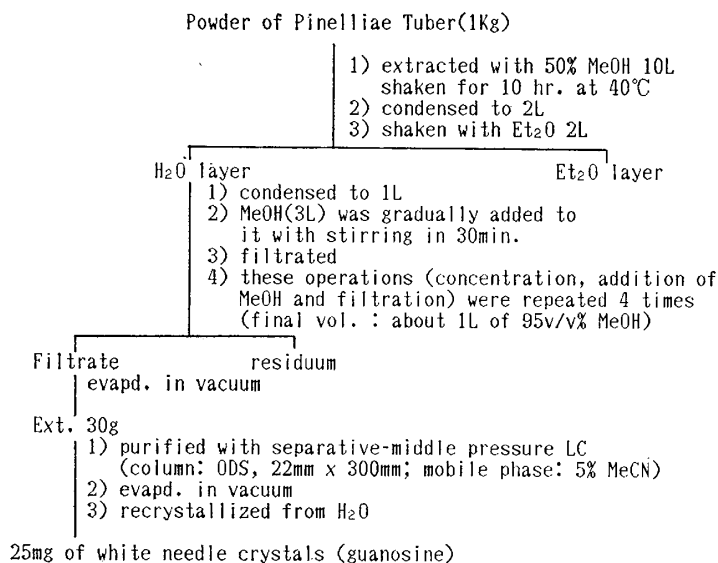


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 3. Isolation of Guanosine from Pinelliae Tuber

Fig. 4. Structure of Guanosine

TABLE I. Guanosine の物性試験 (残存率%)

| 処理方法      | 処 理 時 間 |       |       |       |       |
|-----------|---------|-------|-------|-------|-------|
|           | 1 hr    | 2 hr  | 3 hr  | 4 hr  | 5 hr  |
| 乾熱-150°C  | 101.5   | 98.5  | 100.0 | 99.3  | 97.8  |
| 乾熱-200°C  | 82.4    | 73.5  | 60.5  | 42.4  | 32.1  |
| 熱水-97°C   | 99.3    | 100.7 | 101.5 | 98.5  | 99.3  |
| pH 5-97°C | 98.5    | 100.0 | 100.7 | 100.0 | 101.5 |
| pH 7-97°C | 100.7   | 102.2 | 101.5 | 97.8  | 100.7 |
| pH 9-97°C | 99.3    | 100.7 | 98.5  | 99.3  | 100.0 |

量を 10 ml としたものを用い、他の試料は加熱処理終了後、精製水で全量を 10 ml として、HPLC で定量した。処理方法および HPLC の条件は次のとおりである。

乾熱試験：器内壁に guanosine を付着させたメスフラスコを常圧下、150°C および 200°C で加熱処理し、guanosine の残存率を経時的（1～5 時間）に測定した（TABLE I）。

熱水処理：器内壁に guanosine を付着させたメスフラスコに 2 ml の精製水を加え、沸騰水浴（97°C）中に放置し、guanosine の残存率を経時的（1～5 時間）に測定した（TABLE I）。

HPLC 溶離液：2% acetonitrile, 流速：1 ml/min, 測定感度：0.02 ABS, 測定波長：254 nm, 注入量 10 μl.

### 5. Guanosine の物性試験 2. 緩衝液 (pH) の影響

Guanosine の標準溶液、各試料溶液の調製および HPLC の条件は 4. の試験と同様である。処理方法：KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (各 1/15 M) 緩衝液 (pH 5, 7, 9) を常法により調製し、器内壁に guanosine を付着させたメスフラスコに 2 ml の緩衝液を加え、沸騰水浴（97°C）中に放置し、guanosine の残存率を経時的（1～5 時間）に測定した（TABLE I）。

### 6. Guanosine の物性試験 3. 蒸留試験

局方「精油定量器」を用い、guanosine (和光純薬) 10 mg に精製水 150 ml を加え、初留から経時的に 10 ml ずつ 5 回留液を分取し、上記と同様に HPLC で分析した。

### 7. 生薬半夏および小半夏加茯苓湯中の guanosine の定量法と移行率

原料生薬・半夏：半夏の微粉末 (<200 μm) 100 mg (1/80 日量) を 10 ml のバイアルビンに精密に秤量し、下記の HPLC 溶離液 4 ml および内部標準溶液 1 ml を加え、50°C, 30 分間振盪抽出した後、遠心分離 (3,500 rpm, 10 min)

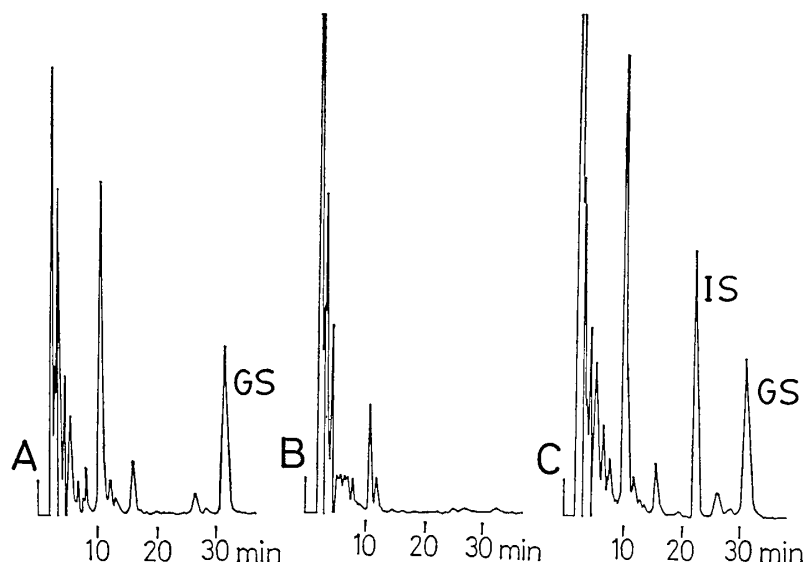


Fig. 5. HPLC Profile of Guanosine in Shohangekabukuryo-To (小半夏加茯苓湯)

A: Pinelliae Tuber, B: Water ext. of Hoelen and Zingiberis Rhizoma (小半夏加茯苓去半夏湯), C: Shohangekabukuryo-To (小半夏加茯苓湯) contained internal standard (phthalic acid).

Conditions: column, LiChroCART RP-18 4 mm × 250 mm; mobile phase, 0.5% AcOH adjusted to pH 4.2 with NH<sub>4</sub>OH (1→2); flow rate, 1 ml/min at 30°C; detective wave length, 254 nm; detective sensitivity, 0.01 ABS. Peaks: GS, guanosine; IS: internal standard (phthalic acid).

し、その上澄をフィルター濾過 (0.45 μm) し、試料溶液とした。

小半夏加茯苓湯 (標準湯液): 処方1日分 (半夏 8 g, 生姜 5 g, 茯苓 5 g) を20倍量の精製水 (360 ml) で半量に煎じ、熱時ガーゼ濾過し、冷後濾液に精製水を加え全量を 320 ml に調製した。次に本湯液 4 ml (半夏 100 mg に相当) に内部標準溶液 1 ml を加え均一にした後、原料生姜と同様に遠心分離し、試料溶液とした (Fig. 5-C)。

HPLC の条件は次のとおりである。カラム: LiChro CART RP-18 250 mm × 4 mm i. d. Merck Co., 溶離液: 0.5% AcOH 溶液を NH<sub>4</sub>OH (1→2) で pH 4.2 に調製, 流速: 1 ml/min, 検出波長: 254 nm (島津 SPD-2A 使用), 検出感度: 0.01 ABS, 試料注入量: 20 μl. 内部標準溶液: phthalic acid 5 mg/MeOH 100 ml. なお, 検量線は guanosine 20 ng~80 ng より得られたピーク高さとの内部標準 phthalic acid より得られたピーク高さに基づき, 局方 (X) 一般試験法・液体クロマトグラフ法の内部標準法に従って行った。また本法による HPLC の分離ならびに他の生薬由来のバックグラウンドを確認する目的で, 内部標準物質を添加しない生薬・半夏の試料溶液 (Fig. 5-A) と内部標準物質を添加しない小半夏加茯苓湯去半夏の湯液 (Fig. 5-B) また内部標準物質を添加した小半夏加茯苓湯の標準湯液 (Fig. 5-C) の比較を行った。

#### 8. 市場品半夏の guanosine の定量

1973~86年に入手した半夏 (21検体), 水半夏 (1検体) ならびに法製半夏 (4検体) の guanosine 含有率 (%) を測定した (TABLE II)。定量操作は上記の原料生薬・半夏の方法に準拠して行った。また1986年購入 No. 21 の検体を用いて塊茎上部 1/3 と塊茎下部 2/3 に分け guanosine の組織内分布について検討した。

#### 結果および考察

実験 1: 小半夏加茯苓湯の配合生薬のうち, すでに指標物質を確定した生姜を除く 2 種の生薬について検討した。半夏および茯苓の 500 mg (1/10日量)/5 ml 60% MeOH Ext. を3次元 HPLC により解析すると (Fig. 1-A, B), 極性の高い領域 (0~12 min) に大きなピーク群を認め, また極性のやや低い領域 (40 min 以降) に小型のピークを認めるが, 実際の湯液では, 極性の低い成分は移行率が低いため, さらに成分検出は困難になるものと考えられた。また両者の極性の高い領域の成分検出が適当であるとした。

実験 2: 極性の高い領域を十分抽出する目的から半夏の微粉末 100 mg (1/80日量) を20% MeOH 5 ml で抽出した。また本試料溶液を 5% acetonitrile (溶離液) で流出させると四つのピークが確認されたが (Fig. 2-A), ピーク

TABLE II. 市場品・半夏中の guanosine 含有率 (%)

| No. | 購入年  | 商品規格   | 産地—市場 | 含有率%   |
|-----|------|--------|-------|--------|
| 1   | 1973 |        | 韓国—大阪 | 0.0070 |
| 2   | 1973 | 2 級    | 中国—大阪 | 0.0132 |
| 3   | 1974 | 丙 級    | 中国—大阪 | 0.0031 |
| 4   | 1977 |        | 北海道   | 0.0031 |
| 5   | 1978 | 珍 珠    | 香港    | 0.0114 |
| 6   | 1978 |        | 韓国—大阪 | 0.0129 |
| 7   | 1978 |        | 中国—大阪 | 0.0059 |
| 8   | 1981 | 乙      | 大阪    | 0.0025 |
| 9   | 1981 | 三 級    | 雲南    | 0.0081 |
| 10  | 1981 | 大      | 大阪    | 0.0053 |
| 11  | 1981 | 丙      | 大阪    | 0.0089 |
| 12  | 1982 | 丙      | 中国—大阪 | 0.0060 |
| 13  | 1982 | 甲      | 大阪    | 0.0035 |
| 14  | 1982 | 三 級    | 河南—大阪 | 0.0047 |
| 15  | 1983 | 統 庄    | 貴州    | 0.0113 |
| 16  | 1983 | 二 級    | 雲南    | 0.0105 |
| 17  | 1984 | 珍 珠    | 香港    | 0.0088 |
| 18  | 1984 | 小      | 韓国—大阪 | 0.0075 |
| 19  | 1984 | 粗 皮    | 大阪    | 0.0035 |
| 20  | 1984 | 大      | 韓国—大阪 | 0.0084 |
| 21  | 1986 | 局 方 品  | 札幌    | 0.0085 |
| 21  | 同上   | 上部 1/3 | 同上    | 0.0125 |
| 21  | 同上   | 下部 2/3 | 同上    | 0.0065 |
| 22  | 1978 | 水 半 夏  | 中国—大阪 | 0.0045 |
| 23  | 1978 | 飲片(法)  | 台湾    | trace  |
| 24  | 1983 | 飲片(法)  | 中国    | trace  |
| 25  | 1984 | 法 半 夏  | 大阪    | trace  |
| 26  | 1984 | 仙 半 夏  | 香港    | trace  |

No. 1~21 の guanosine 平均含有率 0.0073%

1 は他の生薬に由来する成分と十分な分離が得られず (Fig. 2-B, C, D), またピーク 3 および 4 は定量に必要なピーク高さが得られないため, 今回の目的物質をピーク 2 とした.

実験 3: 分離図 Fig. 3 に従って, 上記の実験で確認されたピーク 2 の成分を半夏 1 kg から約 25 mg 単離した. また本品を 70°C 2 mmHg で一夜乾燥した後, 融点 (分解点), 元素分析, IR および  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 等の機器分析を行った結果, 各測定値は guanosine の文献値<sup>3)</sup>ならびに標品 guanosine (和光純薬㈱, 特級) と完全に一致し, 半夏から単離した本品 (ピーク 2) を guanosine (Fig. 4) と同定した. このように半夏から guanosine が単離同定されたのは, 今回が初めてである.

実験 4~6: 標準品 guanosine を用いた各物性試験の結果 (TABLE I), 95°C における熱水および緩衝液 (pH 5~9) の処理では guanosine の分解は認められなく, また精油定量器を用いた蒸留操作においても, guanosine はすべての蒸留分画で検出されなかった. さらに乾熱試験 150°C-5 時間の処理でも分解を認めなかったが, 200°C の処理では毎時約 13% の分解率をもって減少することが確認された. このことは通常のエキス製法において, guanosine の分解による含量変化を考慮しなくてよいと考えられ, 工程管理を意図した指標物質の条件を満たしているといえる.

実験 7: 原料生薬・半夏における guanosine の抽出方法は本品が塩基性物質であることから, その溶媒を HPLC と同様の弱酸性 (pH 4.2) に設定した. また精製水のみ抽出では粘液質溶出のため 0.45 $\mu\text{m}$  のフィルター濾過が困難になり, また逆に MeOH 濃度が高いと guanosine の抽出効果が低下する点を考慮し, 最終の MeOH 濃度が

20となるように調節した。

また本定量操作における HPLC の分離ならび他の生薬由来のバックグラウンドを確認するため、内部標準物質を添加しない生薬・半夏の試料溶液 (Fig. 5-A) と内部標準物質を添加しない小半夏加茯苓湯去半夏の湯液 (Fig. 5-B) ならびに内部標準物質を添加した小半夏加茯苓湯標準湯液 (Fig. 5-C) の比較を同濃度 (1/80 日量) で行ったその結果、小半夏加茯苓湯去半夏の湯液 (Fig. 5-B) において guanosine (GS) の Rt (約 30 min) にきわめて微量ではあるが分離不能なピークが認められた。またこのピークは使用する原料生薬 (茯苓および外皮を去った生のヒネショウガ) によっては、本分析条件で確認されない場合もある。繰り返し試験を行った結果、小半夏加茯苓湯における guanosine の定量値におよぼす分離不能なピークの影響は最大でも 2.5% 以下と考えられた。この成分ピークは茯苓もしくは生姜由来の guanosine の可能性も否定できないが、半夏由来の guanosine に対して、実際の定量上無視しうる量である。なお、溶離液の液性 (pH) の調節は内部標準物質 phthalic acid の溶出時間を変化させるが、pH 4.0~4.4 の間が良好と思われた。また guanosine の生薬・半夏から小半夏加茯苓湯・標準湯液への移行率は約 95% ときわめて良好な結果を示した。

実験 8: 1973~86年に購入した半夏 (No. 1~21)、水半夏 (No. 22) ならびに法製半夏 (No. 23~26) の guanosine 含有率 (%) は TABLE II に示す。

通常、処方用いられる「半夏」(No. 1~21) の guanosine 含有率は 0.0025~0.0132%, 平均値で 0.0073% を有し、また水半夏からも確認された。しかしながら、法製半夏においてはきわめて微量しか確認されなかった。この点に関しては、法製半夏が薄片状でかつ含有デンプンが糊化していることから、熱水処理されているものと考えられ、修治の過程で guanosine が溶出した可能性が高い。また No. 21 の検体を用いて塊茎上部 1/3 ならびに塊茎下部 2/3 の組織における guanosine の分布について検討した結果、塊茎の上部 1/3 の組織は guanosine を 0.0125% 含有するのに対し、塊茎の下部 2/3 の組織は 0.0065% であり、上部と下部では含有率に明らかな差を認める。この含有率の差は上部 1/3 で全 guanosine 含量の半分を有することから、単に組織の比重の違いにより生じているのではなく、植物・カラスビシャクの組織・生理上の違い (塊茎の上部は地上部と発根等の生長に関与する部分であるのに対し、塊茎の下部は貯蔵組織としてデンプン粒を含有する組織) に起因するものと考えられる。

## 結 論

以上の結果から、guanosine は小半夏加茯苓湯における半夏由来の指標物質として満足するものと考えられる。著者らがすでに生姜と乾姜の指標物質として報告した 6-gingerol と 6-shogaol<sup>1)</sup> に比べ guanosine の移行率とその安定性はきわめて良好である。市場品・生薬半夏の guanosine 含量は約 0.003~0.013% であり、上下限比約 4 倍と極端な含有分布を示していない。このことは今回の指標成分としての補足的な条件を満たしているといえる。また現在のところ、guanosine を高含量で含む生薬 (植物性) の報告は少なくマメ科植物の一部と、さらにリン酸エステル Cyclic-GMP の形で大棗などに含有することが確認<sup>4)</sup> されているが、guanosine と同様に含有率の差はあっても核酸を構成する要素として動植物全般に分布しうる物質であり、指標成分として他の半夏配合処方に応用する場合は個別に検討する必要がある。

また guanosine は局方半夏としては規格外になる水半夏にも含有されること、および経験的な品質評価による等級 (甲, 乙, 丙, 一級, 二級) とも相関性が高くないため、生薬半夏の品質評価のための成分として位置付けることには問題がある。また半夏は「六陳八新」の分類からいえば、「陳久なるもの (長期保存したもの) を良しとする」生薬に相当するが、guanosine 含有が保存期間の長短との相関性を推察する結果は得られなかった。ただし、guanosine は生薬の組織によって遍在するため、デンプン貯蔵部位の充実していない半夏が相対的に高含量になる傾向がある。

また半夏を修治した法半夏に guanosine がほとんど含有されず、guanosine と半夏および法半夏との薬効上の関連性については検討の余地がある。

以上のことから、小半夏加茯苓湯エキス製剤の指標成分として guanosine を採用できる。

謝辞: Guanosine の同定にご協力いただきました本学薬化学教室 坂東英雄助教授に深謝いたします。

## 引用文献および注

- 1) 第 1 報: 鹿野美弘, 齊藤謙一, 櫻井徹朗, 印牧 悟, 田部昌弘, 安田真幸穂, 生薬, 40, 333 (1986); 第 2 報: 生薬, 41, 277 (1987).

- 2) 野上 寿, 大塚恭男, 原田正敏, 月刊薬事, **27**, No. 8, 79 (1985); 野上 寿, 大塚恭男, 原田正敏, 丁 宗鉄, 野口 衛, 同上, **27**, No. 9, 135; No. 11, 99; No. 12, 147 (1985); 同上, **28**, No. 1, 95 (1986).
- 3) Charles J. Pouchert, "The Aldrich Library of Infrared Spectra," Aldrich Chemical Company, Milwaukee, 1981, p. 1297; *idem.*, "The Aldrich Library of NMR Spectra (III)," Aldrich Chemical Company, Milwaukee, 1974, Vol. 8, p. 121.
- 4) 丁 宗鉄, 英 清道, 大塚恭男, 和漢薬シンポジウム, **12**, 1 (1979); J. Cyong, K. Hanabusa, *Phytochemistry*, **19**, 2747 (1980).