

博士論文 平成 26（2014）年度

薄層クロマトグラフィーを用いた生薬の確認試験に関する研究

慶應義塾大学大学院薬学研究科

神本 敏弘

目 次

序論	4
本論	
第 1 章 シャカンゾウ	7
1-1. カンゾウおよびシャカンゾウの TLC による比較	8
1-1-1. Glycyrrhithic acid 及び liquiritin の確認	
1-1-2. カンゾウ及びシャカンゾウの高極性領域に関する検討	
1-1-3. スポットが認められなかったロットに関する検討	
1-2. スポット A (化合物 1) に関する検討	13
1-2-1. 分析条件 I の改良	
1-2-2. 化合物 1 の単離	
1-2-3. 化合物 4 の単離	
1-2-4. Dimethyl 4-methoxybenzylmalonate (化合物 5) から化合物 4 の調製	
1-2-5. 化合物 4 の熱分解	
1-3. スポット B (化合物 2) に関する検討	18
1-3-1. カンゾウに含まれる糖類に関する検討	
1-3-2. 糖類の加熱による検討	
1-3-3. 化合物 2 の TLC-MS による検討	
1-3-4. 化合物 2a の単離	
1-3-5. Fructose から化合物 2 の調製	
1-4. スポット C (化合物 3) に関する検討	22
1-4-1. Fructose 及び各種アミノ酸の加熱試験	
1-4-2. 化合物 3 の単離	
1-4-3. Ethyl 4-methylpyrrole-3-carboxylate (化合物 8) から化合物 3 の調製	
1-5. カンゾウの加熱処理条件による各化合物の生成に関する検討	25
1-6. カンゾウの基原種の比較	26
1-7. 各化合物の特異性に関する検討	27
1-8. 小括	29
第 2 章 ショウバク	31
2-1. ショウバクの TLC 分析条件	32
2-2. 化合物 10 の単離	34
2-3. ショウバクの市場流通品による検討	36

2-4. 小括	37
第3章 ジオウ	39
3-1. Manninotriose(11)の調製	41
3-2. Manninotriose(11)の構造確認	42
3-2-1. 構成糖の確認		
3-2-2. 結合順序の確認		
3-2-3. 結合位置の確認		
3-3. ジオウ中の糖の TLC による比較	46
3-3-1. 噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液による検出		
3-3-2. 1,3-ナフタレンジオール試液による検出		
3-3-3. 2,3,5-トリフェニル-2 <i>H</i> -テトラゾリウム塩酸塩・メタノール試液による検出		
3-4. ジオウ中の糖の HPLC による比較	49
3-5. ジオウの確認試験の設定	51
3-6. 小括	53
第4章 タクシャ	54
4-1. タクシャの確認試験に関する検討	56
4-1-1. タクシャの TLC 分析による成分比較		
4-1-2. 抽出溶媒の検討		
4-1-3. スポット量の検討		
4-1-4. 展開距離の検討		
4-1-5. 検出試液の検討		
4-1-6. 展開溶媒の検討		
4-2. タクシャの市場流通品による検討	61
4-3. タクシャの確認試験の改良	64
4-3-1. 酢酸の濃度に関する検討		
4-3-2. タクシャ 9 ロットによる検討		
4-4. 小括	70
第5章 レンギョウ	71
5-1. レンギョウの TLC 分析による成分比較	73
5-2. スポット E~G (化合物 13~15) に関する検討	74
5-2-1. スポット E~G (化合物 13~15) の単離		
5-2-2. スポット E (化合物 13) の構造		
5-2-3. スポット F (化合物 14) の構造		
5-2-4. スポット G (化合物 15) の構造		

5-3. レンギョウの確認試験に関する検討	78
5-3-1. 抽出溶媒の検討		
5-3-2. 検出試液の検討		
5-3-3. 展開溶媒の検討		
5-4. 小括	82
総括	83
謝辞	85
実験の部	86
引用文献	113

序 論

漢方医学は、5～6 世紀以降に中国から直接あるいは朝鮮半島を経由して伝来した中国由来の医学が、その後、日本で独自の発展を遂げた日本の伝統医学である。隣国においては、中国の「中医学」、韓国の「韓医学」と中国を起源とする伝統医学が存在するが、それぞれ異なる医学体系を形成している。

漢方薬とは、日本の漢方医学に用いられる製剤であり、漢方理論や臨床経験に基づき、所定の生薬が定められた量で配合されたものである。2011 年に実施された「漢方薬処方実態調査」¹⁾によると、回答した医師の 89.0%が漢方薬（漢方製剤）を処方しており、漢方薬は西洋薬とならび日本の医療を支える重要な薬である。現在、漢方処方エキスの日本薬局方への収載も進められており、第 16 改正日本薬局方（以降、日局）第 2 追補までに 28 処方が収載されている。将来的には漢方製剤の日本国内の売上高上位 50 処方について日局に収載することが、漢方関連業界の課題である。

日局収載漢方処方エキスの規格は、日局に適合する生薬を用いることを前提に設定しており、漢方処方エキスの有効性及び安全性を担保するには、その処方に配合される生薬の品質管理が必須である。現在、日局及び日本薬局方外生薬規格 2012（以降、局外生規）を合わせると、200 種以上の生薬について公的な規格が定められており、生薬の性状、確認試験などによって品質が担保されている。

日局生薬には、基原となる植物が規定しており、その鑑定は、生薬の性状（外部形態、内部形態）と確認試験で判別している。前者は、生薬そのものを直接見て判別する方法であるが、その判別には高度な専門的知識を要し、習得に多くの経験が必要とされる。一方、後者の生薬の確認試験には、その生薬を特徴づける成分の検出や類似生薬との判別を行うための試験法が設定されている。日局の確認試験は「医薬品又は医薬品中に含有されている主成分などを、その特性に基づいて確認するための試験である」と通則に規定されているが、生薬の品質を化合物レベルでコントロールするためには、化合物レベルで確認試験を設定することが重要であり、生薬の確認試験には、その生薬に特徴的な化合物を指標として品質を確認すること、また、生薬を調製する際に、薬効の変化などを目的として、乾燥以外の処理（修治）する生薬については、修治過程で生成する化合物を指標として確実に修治できていることを確認することが望まれている。しかし、公定書の規格に、サポニン類の起泡試験、ステロールやトリテルペン類の Liebermann-Burchard 反応、アルデヒドや還元性

物質のフェーリング反応などのような、化合物群を検出する試験法が設定されている生薬や、確認試験自体が設定されていない生薬も存在する。

生薬では、その産地、収穫時期、乾燥方法などにより、含有成分の種類や量が変化する場合があり、さらに個体による差も大きいため、成分パターンが異なる場合がある。従って、個々の生薬に特徴的な成分を指標とした確認試験を設定するにあたっては、市場に流通している生薬を広く集め、その生薬に特徴的な成分または成分パターンを見出すことから始めなくてはならない。また、規定された基原植物以外でも、同属植物の中には類似した成分挙動を示す場合もあり、規定された基原種との差別化を含め、同一基本骨格を持つ類縁物質の存在及びその成分挙動や含量を把握しつつ、指標となる成分の選定や特徴的確認試験法を見出す必要がある。生薬の確認試験には、成分パターンを見出すことができ、類縁物質などの成分挙動や含量を把握できる簡便な試験方法である薄層クロマトグラフィー（以降 TLC）法が多く採用されている。しかし、TLC 分析による確認試験においては、いくつかの問題が存在する。まず、指標となる成分と共存する成分との判別や R_f 値の安定性については、標品を同時に展開することで解決できるが、指標成分自体が天然物であるため純粋な標品が用意できない場合には、指標成分に特徴的な検出方法を用いるなど、試験方法を工夫して特異性を持たせる必要がある。さらに、生薬中に含まれているときはある程度安定な状態で存在する成分でも、抽出されると不安定になり構造が変化してしまうなど、抽出法によって結果が異なる場合もあり、サンプルの調製法にも注意が必要である。

公定書に記載される生薬の確認試験の現状は、次の五種類に分類される。

1. 公定書に新規収載される生薬（確認試験を新たに設定）
2. 公定書に収載されているが確認試験が設定されていない生薬
3. 公定書に収載されているが確認試験が設定されていない、または呈色反応等特異性の低い確認試験が設定されている生薬で、処方エキスの確認試験では TLC 分析による確認試験が設定されている生薬
4. 公定書に収載されているが、確認試験として呈色反応等特異性の低い試験しか設定されていない生薬
5. 公定書に収載されており確認試験として TLC 分析が設定されている生薬

本研究では、上記 1~4 に該当する生薬のうち、第 1 章で、上記 1 の日局新規収載生薬としてシャカンゾウについて、第 2 章で、1 の局外生規新規収載生薬としてショウバクについて、第 3 章で、2 の確認試験が設定されていない生薬としてジオウについて、第 4 章で、3 の処方エキスで確認試験が設定してあるが、生薬各条で確認試験が設定されていないタクシャについて、第 5 章で、4 の確認試験として呈色反応のみであるレンギョウについて、それぞれの生薬に特徴的な成分を見出し、その成分を指標とした TLC による確認試験を設定するために検討した。

本 論

第 1 章 シャカンゾウ

シャカンゾウは、改訂一般用漢方処方の手引き²⁾に記載されている「炙甘草湯」に配合される生薬である。日本の漢方で用いられるシャカンゾウ (Prepared Glycyrrhiza) は、「日本薬局方カンゾウを煎ったものである」³⁾とされており、中華人民共和国薬典⁴⁾に記載されている炙甘草 (Prepared Liquorice Root, 蜂蜜とともに煎ったもの：蜜炙甘草) とは異なる生薬である。シャカンゾウには決められた製法がなく、一般的には、切断した日局「カンゾウ」⁵⁾を、褐色～淡褐色に色調が変化するまで焙煎 (120～160°C, 15～30 分間) して製されているが、シャカンゾウを特徴付ける化学的成分の指標は報告されていない。本研究を開始した時点では、その確認試験についても規定はなく、日局「カンゾウ」の確認試験を準用し、glycyrrhithic acid を確認するのが一般的であった。そこで、シャカンゾウを日局に記載するための基礎研究として、シャカンゾウに特異的に確認される成分で、とりわけカンゾウとの差異が認められる成分の探索を、生薬の確認試験として日局で多用されている TLC を用いて試みた。その結果、シャカンゾウのクロマトグラムにおいて、カンゾウには認められない三種類のスポットを見出し、これらの成分の構造をそれぞれ phloretic acid (1), 2,6-anhydrofructofuranose (2), 4-methylpyrrole-3-carboxamide (3) と決定した (Fig. 1-1)。さらに、これら化合物がシャカンゾウに特異的な成分か否かを検討し、phloretic acid (1) が TLC によるシャカンゾウの確認試験の指標成分として利用できることを明らかにした。

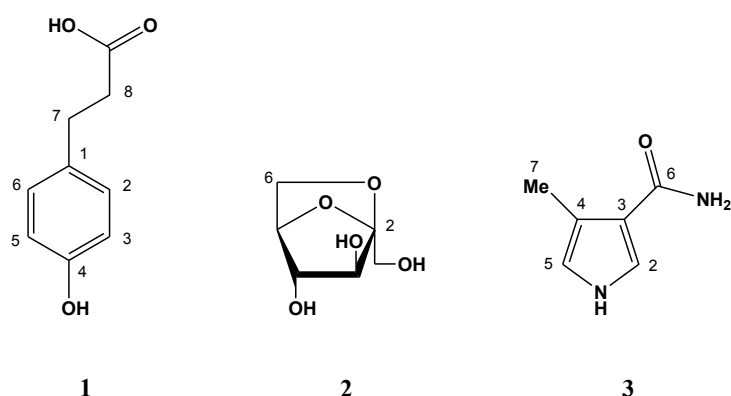


Fig. 1-1 Characteristic compounds found in Prepared Glycyrrhiza

1-1. カンゾウおよびシャカンゾウのTLCによる比較

1-1-1. Glycyrrhithic acid 及び liquiritin の確認

まず、生薬取扱い団体から集めた代表的な市場流通品のカンゾウ (*G. uralensis*由来, 1a~10a) 及びこれらのカンゾウから製したシャカンゾウ (1b~10b) を用いて、薄層クロマトグラフィーの各種条件を検討した。カンゾウの主な成分としては、甘味を有する配糖体であるglycyrrhithic acid や、各種フラボノイドが知られている。桑島らは、カンゾウの修治による成分変化を検討し、130°Cで30分間加熱すると配糖体の一部が加水分解され、glycyrrhithic acidは約1.6%減少し、加熱前には検出されていなかったglycyrrhithic acid monoglucuronide及びglycyrrhithic acidが検出され、liquiritin apiosideは約0.6%減少し、liquiritin及びliquiritigeninが僅かに増加したと報告⁶⁾している。これらの成分についてTLCで比較したが、カンゾウとシャカンゾウとの間に明確な差は見られなかった (Fig. 1-2, 1-3) .

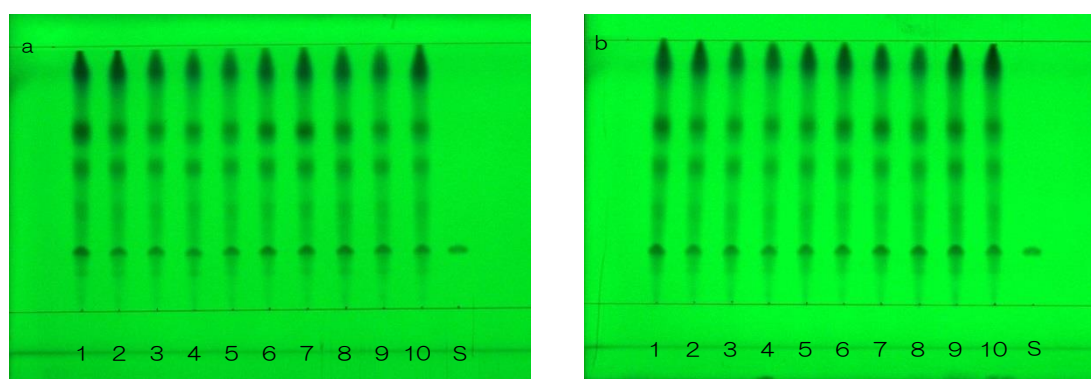
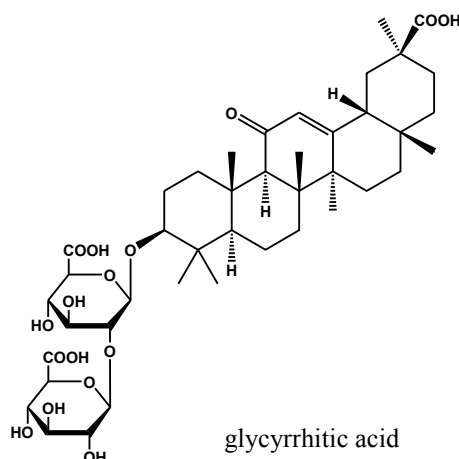


Fig. 1-2 TLC comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b) (glycyrrhithic acid)
Solvent system; 1-butanol/water/glacial acetic acid (7:2:1), detection; UV 254 nm.
S: glycyrrhithic acid



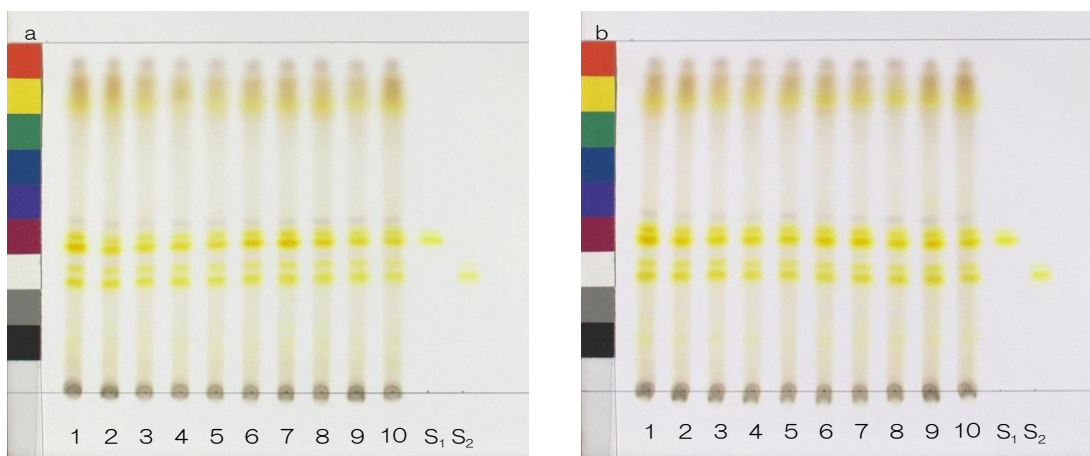
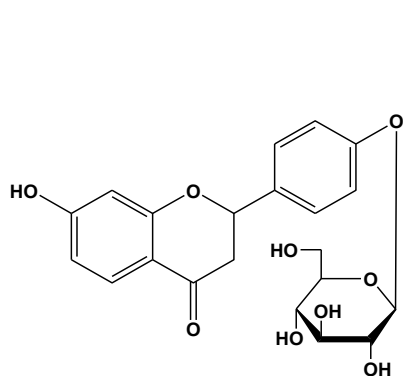
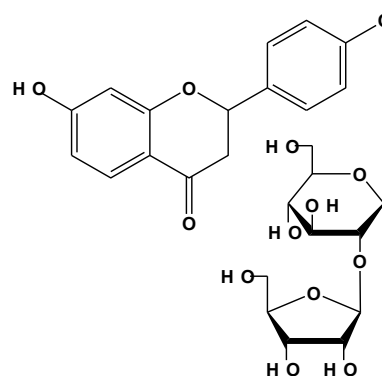


Fig. 1-3 TLC comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b) (liquiritin)
 Solvent system; ethyl acetate/methanol /water (20:3:2), detection; spraying 10% sulfuric acid then heating at 105°C.
 S₁: liquiritin; S₂: liquiritin apioside



liquiritin



liquiritin apioside

1-1-2. カンゾウ及びシャカンゾウの高極性領域に関する検討

そこで、シャカンゾウのメタノール抽出液を用い、さらに高極性領域について検討したところ、シャカンゾウにのみ見られるスポットA～Cを見出した。すなわち、Fig. 1-4に示す分析条件Iでは R_f 値0.6付近に赤紫色のスポットA（化合物1）を、Fig. 1-5に示す分析条件IIでは R_f 値0.3付近に赤紫色のスポットB（化合物2）を、Fig. 1-6に示す分析条件IIIでは R_f 値0.5付近に桃色のスポットC（化合物3）を認めた。但し、シャカンゾウ（6b～8b）では、これらのスポットがほとんど認められなかった。

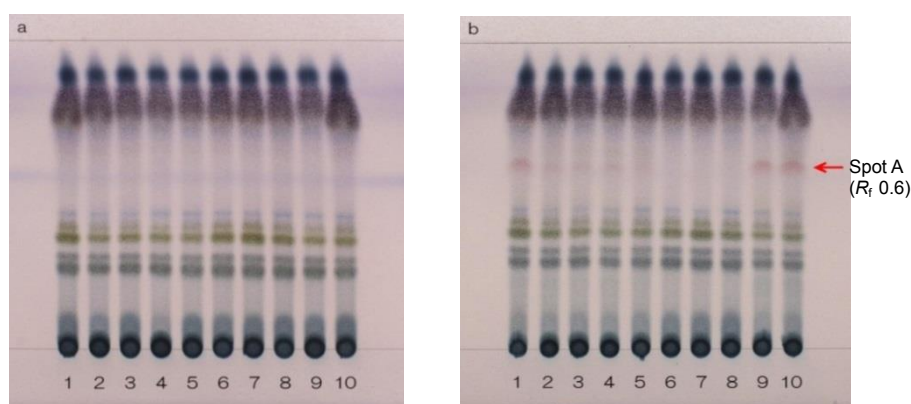


Fig. 1-4 TLC comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b)
(Condition I)

Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (20:3:2), detection; spraying 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105°C.
Red arrow indicates the spot specific for Prepared Glycyrrhiza (spot A, R_f 0.6).

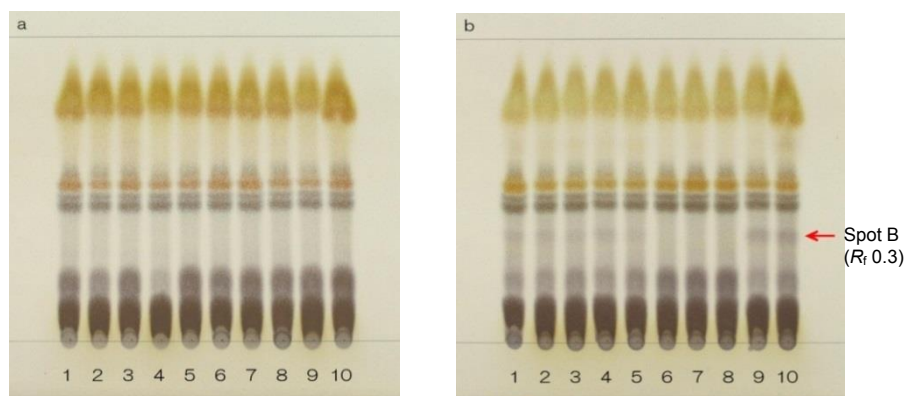


Fig. 1-5 TLC comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b)
(Condition II)

Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (7:2:1), detection; spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C.
Red arrow indicates the spot specific for Prepared Glycyrrhiza (spot B, R_f 0.3).

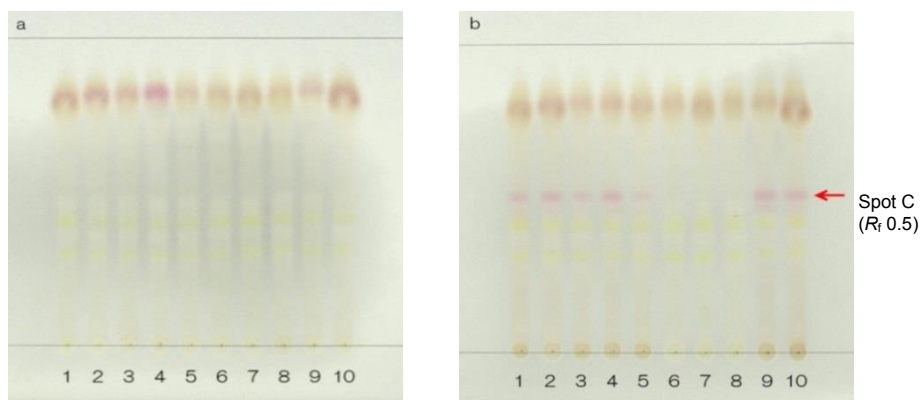


Fig. 1-6 TLC comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b)
(Condition III)
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (20:3:2), detection; spraying
4-dimethylaminobenzaldehyde TS for spraying.
Red arrow indicates the spot specific for Prepared Glycyrrhiza (spot C, R_f 0.5).

1-1-3 スポットが認められなかったロットに関する検討

シャカンゾウとその原料であるカンゾウについて、サンプルの色調、味、においを比較した。その結果、特異的なスポットがほとんど認められなかったシャカンゾウ（6b～8b）は、他のシャカンゾウに比べ対応する原料のカンゾウ（6a～8a）との性状（色、におい）の差があまり感じられなかった。従って、これらのシャカンゾウについては、調製時の加熱不足が考えられたため、プレートヒーター（約 130°C）で 30 分間加熱した後に、再び分析を実施した。その結果、いずれのサンプルについても全ての条件で特異的なスポットが確認できた（Fig. 1-7）。

以上の結果より、これらのスポットは加熱による生成物に由来することが明らかとなった。

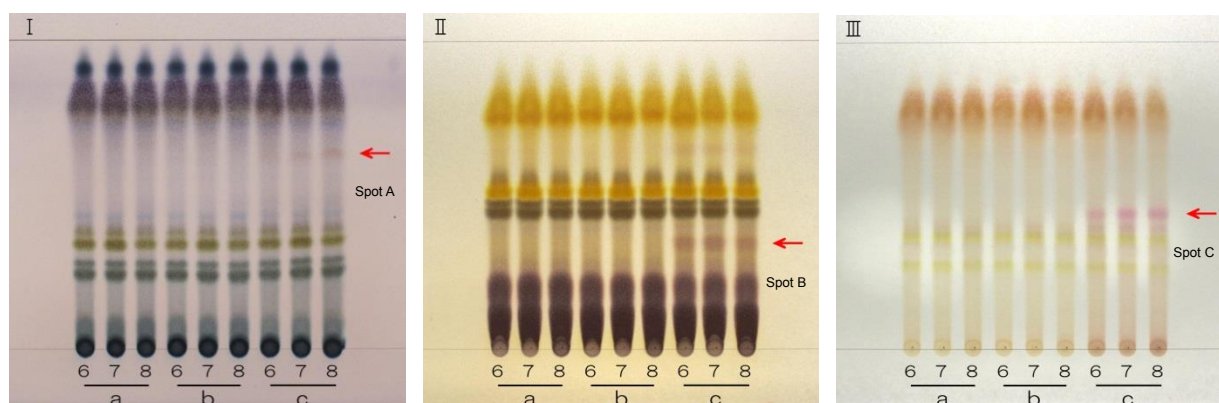


Fig. 1-7 TLC comparison of Glycyrrhiza (a), Prepared Glycyrrhiza (b) and re-heated Prepared Glycyrrhiza (c)

Solvent system and detection method in I, II and III are the same as in Fig. 1-4, Fig. 1-5 and Fig. 1-6, respectively.

Red arrows indicate spot A (I), spot B (II) and spot C (III), respectively.

以上の結果から、加熱によって生成するこれらのスポットを確認することにより、カンゾウとシャカンゾウを識別することが可能であると考えられた。そこで、それぞれの分析条件で検出されるスポット成分を、シャカンゾウのメタノール抽出物より単離し、その構造を明らかとすることとした。

1-2. スポット A (化合物 1) に関する検討

1-2-1 分析条件 I の改良

条件 I で分析した結果, シャカンゾウにのみ見られる R_f 値 0.6 付近のスポット A は, ロットにより明瞭に認められない場合があった. そこで, 展開溶媒について検討した結果, 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 2) から, 酢酸エチル/メタノール/水混液 (7 : 2 : 1) に変更することでスポットの形状が改善された. 抽出方法に関しては, 目的のスポットの上部に多くのスポットを認めたことより, 低極性化合物を除去するために, 酢酸エチルを用いて前処理した. さらに, 種々検討した結果, 酸性条件で酢酸エチル/水 (1 : 1) で分配抽出を行うことにより, スポット A が明瞭に認められるようになった. この結果から, スポット A は酸性化合物と推定した.

そこで, 試料溶液の調製方法を, シャカンゾウの粉末を酢酸エチルで抽出して低極性化合物を除いた後, 残渣を塩酸で酸性とし, 酢酸エチルで抽出する方法へと変更した (分析条件 IV, Fig. 1-8). その結果, いずれのロットからも R_f 値 0.6 付近に赤紫色のスポットが明瞭に認められるようになった.

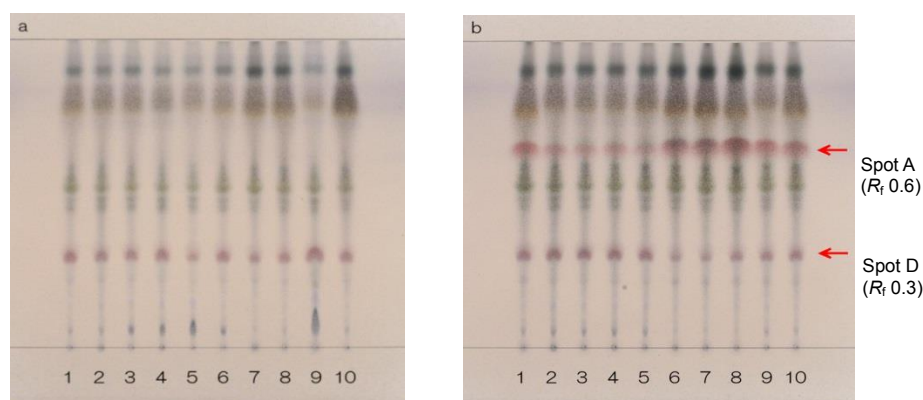


Fig. 1-8 Improved sample preparation method for comparison of Glycyrrhiza (a) and Prepared Glycyrrhiza (b) (Condition IV)
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (7:2:1), detection; spraying 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105°C.
Red arrows indicate spot A (R_f 0.6) and spot D (R_f 0.3).

1-2-2. 化合物 1 の単離

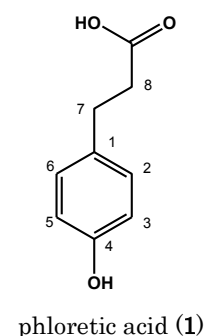
次にスポット A の単離を試みた。シャカンゾウの粉末に酢酸エチルを加え、低極性化合物を抽出した後、酢酸エチル層を取り除いた。その残渣を塩酸で酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル画分を得た。次いで酢酸エチル画分をシリカゲルカラムで分画し、スポット A を含むフラクションを集めた。さらに、目的物を含むフラクションを Sephadex LH-20 で精製し、化合物 1 を得た。

化合物 1 (スポット A) は、白色粉末として得られた。¹H および ¹³C NMR スペクトル (Table 1-1) より、1,4-置換ベンゼン環 [δ_{H} 7.03 (2H, d, $J=8.5$ Hz) and δ_{C} 130.2 \times 2 (C-2, 6), δ_{H} 6.69 (2H, d, $J=8.5$ Hz) and δ_{C} 116.2 \times 2 (C-3, 5), δ_{C} 156.7 (C-4), δ_{C} 132.9 (C-1)], 2 つのメチレン [δ_{H} 2.80 (2H, brt, $J=8.0$ Hz) and δ_{C} 31.2 (C-7), δ_{H} 2.53 (2H, t, $J=8.0$ Hz) and δ_{C} 37.2 (C-8)] およびカルボキシル炭素 (δ_{C} 177.0) の存在が明らかとなった。それらのスペクトルデータ及び HR ESI MS の結果 [m/z 189.0524 (calcd for C₉H₁₀O₃Na, 189.0522)] から、化合物 1 を phloretic acid と推定し、市販の phloretic acid のスペクトルデータと比較することにより、化合物 1 を phloretic acid と同定した (Table 1-1)。

Table 1-1 ¹H and ¹³C NMR spectral data for compound 1 and phloretic acid (Wako)
(methanol-*d*₄, TMS as int. standard)

position	1		phloretic acid (Wako)	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)
1	-	132.9 (C)	-	133.0 (C)
2	7.03 d (8.5)	130.2 (CH)	7.03 d (8.6)	130.3 (CH)
3	6.69 d (8.5)	116.2 (CH)	6.69 d (8.6)	116.2 (CH)
4	-	156.7 (C)	-	156.8 (C)
5	6.69 d (8.5)	116.2 (CH)	6.69 d (8.6)	116.2 (CH)
6	7.03 d (8.5)	130.2 (CH)	7.03 d (8.6)	130.3 (CH)
7	2.80 brt (8.0)	31.2 (CH ₂)	2.80 brt (7.6)	31.3 (CH ₂)
8	2.53 t (8.0)	37.2 (CH ₂)	2.53 t (7.6)	37.3 (CH ₂)
COOH	-	177.0 (C)	-	177.0 (C)

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.



1-2-3. 化合物 4 の単離

改良した分析条件 IV で試験を実施した際、シャカンゾウ及びカンゾウの TLC 上で、 R_f 値 0.3 付近に化合物 1 と同様な発色を示すスポット D (化合物 4) が認められた。シャカンゾウとカンゾウの TLC パターンを比較すると、化合物 4 の含量は化合物 1 の量と反比例する傾向があった (Fig. 1-8b) ことより、化合物 4 は、化合物 1 の前駆体と推測し単離した。

カンゾウの粗抽出物と Sepabeads SP-825 を精製水と混ぜて攪拌した後、ろ過し、ろ液を ODS カラムに吸着させ、水で溶出した画分を得た。この水溶出部を塩酸酸性としたのち、酢酸エチルで抽出した。得られた抽出物をシリカゲルカラムで分画し、スポット D を含むフラクションを集め、減圧下濃縮して析出物をろ取した。この析出物に 10% 塩酸を加え、酢酸エチルで抽出した後、減圧下濃縮して化合物 4 を得た。

化合物 4 は、融点 160~161°C (分解) を示す白色粉末として得られた。その分子式は HR ESI MS より $C_{10}H_{10}O_5$ [m/z 233.0421 (calcd for $C_{10}H_{10}O_5Na$, 233.0420)] であった。 1H NMR スペクトル (Table 1-2) において、1,4-置換ベンゼン環 [δ_H 7.04 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), δ_H 6.68 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5)] および 3 つの脂肪族プロトン [δ_H 3.54 (1H, brt, $J=8.0$ Hz, H-8), δ_H 3.06 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-7)] が認められた。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、2 つのカルボキシル基 [δ_C 172.8 (COOH \times 2)], ベンゼン環 [δ_C 157.2 (C-4), δ_C 130.9 \times 2 (C-2, 6), δ_C 130.5 (C-1), δ_C 116.3 \times 2 (C-3, 5)] および 2 つの脂肪族炭素 [δ_C 55.5 (C-8), δ_C 35.1 (C-7)] に由来するシグナルが認められた (Table 1-2)。

Table 1-2 1H and ^{13}C NMR spectral data for phloretic acid (1) and 4 (methanol- d_4 , TMS as int. standard)

position	phloretic acid (1) ^a		4 ^b	
	δ_H (J in Hz)	δ_C (type)	δ_H (J in Hz)	δ_C (type)
1	-	132.9 (C)	-	130.5 (C)
2	7.03 d (8.5)	130.2 (CH)	7.04 d (8.5)	130.9 (CH)
3	6.69 d (8.5)	116.2 (CH)	6.68 d (8.5)	116.3 (CH)
4	-	156.7 (C)	-	157.2 (C)
5	6.69 d (8.5)	116.2 (CH)	6.68 d (8.5)	116.3 (CH)
6	7.03 d (8.5)	130.2 (CH)	7.04 d (8.5)	130.9 (CH)
7	2.80 brt (8.0)	31.2 (CH ₂)	3.06 d (8.0)	35.1 (CH ₂)
8	2.53 t (8.0)	37.2 (CH ₂)	3.54 brt (8.0)	55.5 (CH)
COOH	-	177.0 (C)	-	172.8 \times 2 (each C)

^a 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.

^b 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

化合物 **4** の NMR サンプル（重メタノール溶液）を室温で 1 日放置後に再測定した結果、NMR スペクトルパターンが変化した。 ^1H NMR スペクトルにおいては、 δ_{H} 3.54 のメチンシグナルが消失し、 δ_{H} 3.06 のメチレンシグナルがブロードに変化した。また、 ^{13}C NMR スペクトルにおいては、 δ_{C} 55.5 のメチンシグナルがトリプレット ($J_{\text{C-D}} = 20 \text{ Hz}$) として観測され、0.4 ppm 高磁場シフトして δ_{C} 55.1 に移動した。これらの変化は δ_{H} 3.06 のメチンプロトンが重水素に置き換わったことを示している。以上の結果から、化合物 **4** は 4-hydroxybenzylmalonic acid と推定した^{7,8)}。

1-2-4. Dimethyl 4-methoxybenzylmalonate (化合物 **5**) から化合物 **4** の調製

化合物 **4** の構造を確かめるために、市販の dimethyl 4-methoxybenzylmalonate (化合物 **5**) から化合物 **4** を調製した (Fig. 1-9)。化合物 **5** を、三塩化ホウ素溶液で脱メチル化した後、水酸化ナトリウム溶液でアルカリ加水分解し、次いで酸性にして化合物 **4** を得た。このようにして得られた化合物 **4** の融点ならびにスペクトルデータはカンゾウから単離した化合物と一致した (Table 1-3)。本化合物は、自然界からは *Glycyrrhiza* 属植物のみから単離が報告されている⁷⁾。

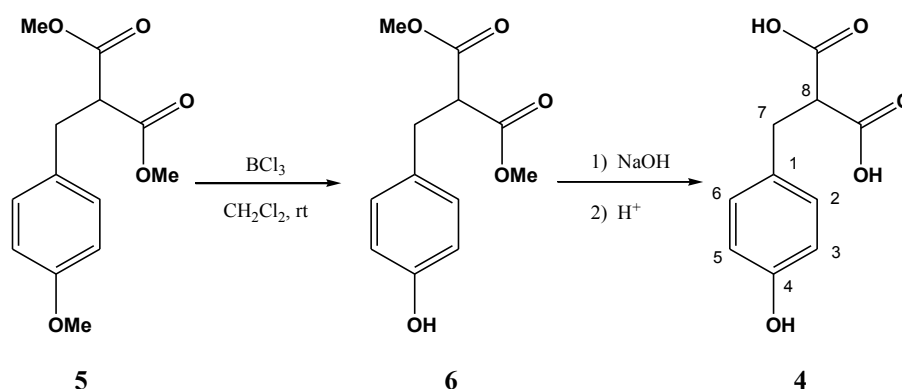


Fig. 1-9

Table 1-3 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for isolated **4** and synthetic 4-hydroxybenzylmalonic acid (methanol- d_4 , TMS as int. standard)

position	4		4-hydroxybenzylmalonic acid (synthetic)	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)
1	-	130.5 (C)	-	130.5 (C)
2	7.04 d (8.5)	130.9 (CH)	7.04 d (8.5)	130.8 (CH)
3	6.68 d (8.5)	116.3 (CH)	6.68 d (8.5)	116.2 (CH)
4	-	157.2 (C)	-	157.1 (C)
5	6.68 d (8.5)	116.3 (CH)	6.68 d (8.5)	116.2 (CH)
6	7.04 d (8.5)	130.9 (CH)	7.04 d (8.5)	130.8 (CH)
7	3.06 d (7.8)	35.1 (CH_2)	3.05 d (7.8)	35.2 (CH_2)
8	3.54 brt (7.8)	55.5 (CH)	3.54 brt (7.8)	55.4 (CH)
COOH	-	172.8×2 (each C)	-	172.7×2 (each C)

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

1-2-5. 化合物 **4** の熱分解

化合物 **4** を 160°C で加熱処理した結果、主生成物として化合物 **1** を得た。また、副生成物として phloretic acid の二量体（化合物 **7**）を確認した（Fig. 1-10）。この結果より、シャカンゾウに特有な化合物 **1** (phloretic acid) は、カンゾウを加熱処理する工程で化合物 **4** (4-hydroxybenzylmalonic acid) より生成することが明らかとなった。

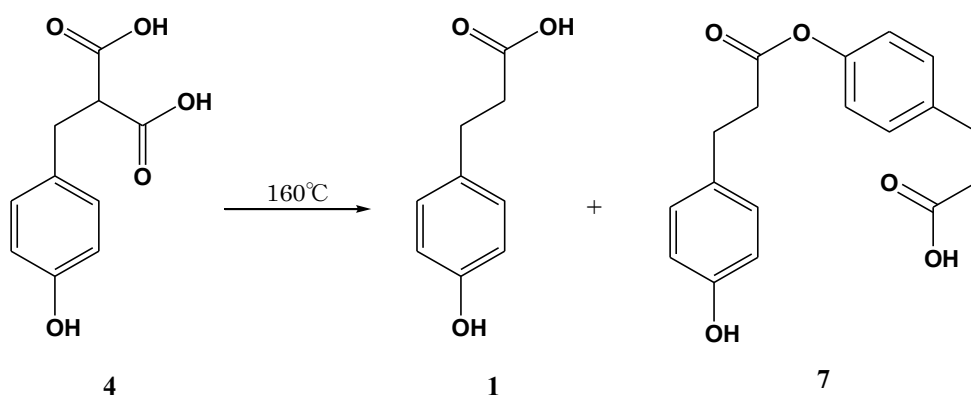


Fig. 1-10

1-3. スポット B (化合物 2) に関する検討

1-3-1. カンゾウに含まれる糖類に関する検討

分析条件 II でシャカンゾウにのみ見られる R_f 値 0.3 付近の赤紫色のスポット B は、糖類の発色試液である 1,3-ナフタレンジオール試液⁹⁾ で発色していることから、糖類が熱変化した生成物と推定した¹⁰⁾。そこでまず、カンゾウに含まれる糖類について TLC で分析した。カンゾウのメタノール抽出溶液を、シリカゲルの薄層板にスポットし、2-プロパノール/酢酸(100)/ジエチルエーテル/水混液(4:3:2:1)を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧し、105°C で 5 分間加熱した。その結果、主として fructose と sucrose を含むことが明らかとなった (Fig. 1-11)。

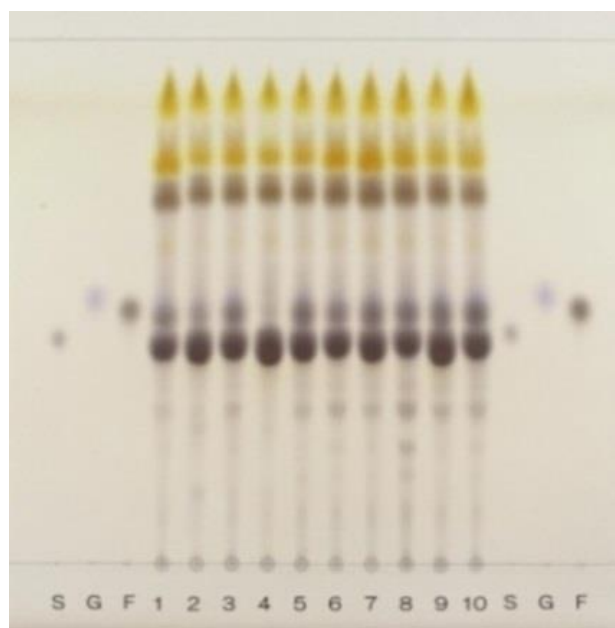


Fig. 1-11 TLC detection of sugars in Glycyrrhiza
Solvent system; 2-propanol/glacial acetic acid/diethylether/water (4:3:2:1),
detection; spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C.
S: sucrose; G: glucose; F: fructose; 1~10: Glycyrrhiza

1-3-2. 糖類の加熱による検討

そこで, sucrose 及びその構成糖の fructose, glucose を 150°C で 30 分加熱したサンプルについて, TLC 分析したところ, fructose 及び sucrose を加熱したサンプルから, シヤカンゾウの R_f 値 0.3 付近の赤紫色のスポット B と一致するスポットが確認できた (Fig. 1-12) ことから, スポット B は糖類が熱により変化した生成物であることが判明した.

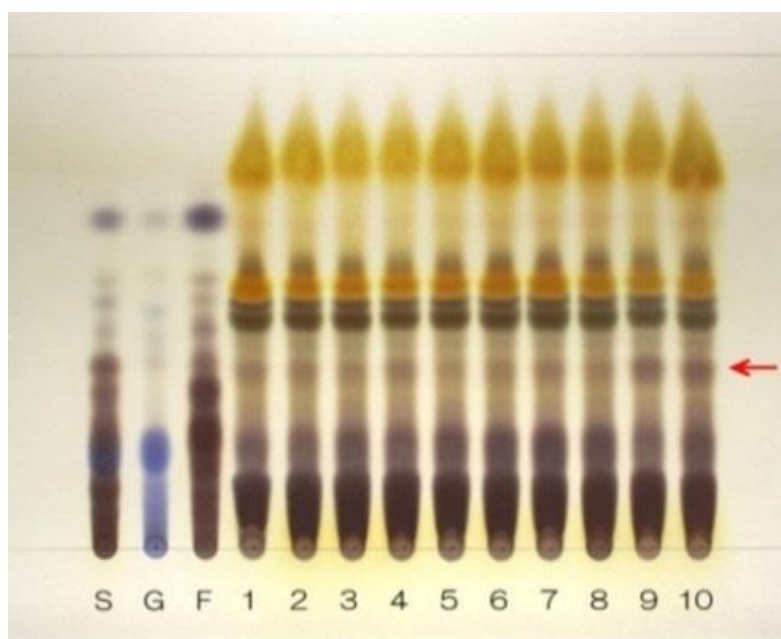


Fig. 1-12 TLC comparison of Prepared Glycyrrhiza and heat-treated (130°C, 30 min) sugars (Condition II)
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (7:2:1), detection; spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C.
Red arrow indicates spot B (R_f 0.3).
S: heat-treated sucrose; G: heat-treated glucose; F: heat-treated fructose;
1~10: Prepared Glycyrrhiza

1-3-3. 化合物2のTLC-MSによる検討

スポット B (化合物 2) は, TLC/HR ESI MS により分子式 $C_6H_{10}O_5$ [(positive) m/z 185.0421 (calcd for $C_6H_{10}O_5Na$, 185.0420); (negative) m/z 161.0449 (calcd for $C_6H_9O_5$, 161.0444)]であることが明らかになった. 目的化合物が糖類であることと, スポット B (化合物 2) の周辺には多くの化合物の夾雑が考えられたため, アセチル化し, acetate 2a として単離した.

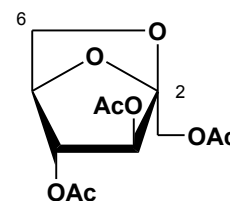
1-3-4. 化合物 **2a** の単離

シャカンゾウのメタノール抽出物をシリカゲルカラムで分画し、スポット B を含有しているフラクションを、ODS カラムに吸着させ、水で溶出した画分を得た。水溶出画分をピリジン、無水酢酸および 4-ジメチルアミノピリジンでアセチル化し、得られた反応物を分取 HPLC 及びシリカゲルカラムで精製し、化合物 **2a** を得た。

化合物 **2a** の分子式は HR ESI MS より $C_{12}H_{16}O_8$ [m/z 311.0743 (calcd for $C_{12}H_{16}O_8Na$, 311.0743)]であり、 1H NMR スペクトル (Table 1-4) では、3つのアセチル基 [δ_H 2.10, 2.09, 2.07 (each 3H, s)], 3つのオキシメチン [δ_H 4.96 (1H, t, $J=1.5$ Hz, H-4), δ_H 4.81 (1H, dd, $J=4.2, 1.5$ Hz, H-5), δ_H 4.80 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-3)]および2組のオキシメチレン [δ_H 4.39 (1H, d, $J=12.7$ Hz, H-1a) and δ_H 4.34 (1H, d, $J=12.7$ Hz, H-1b), δ_H 3.83 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6a) and δ_H 3.73 (1H, dd, $J=7.6, 4.2$ Hz, H-6b)]が認められた。 ^{13}C NMR スペクトルにおいては、1つのアノメリック炭素 [δ_C 106.8], 酸素が結合した5つの炭素 [δ_C 82.3, δ_C 80.9, δ_C 79.7, δ_C 67.7, δ_C 60.6]および3組のアセチル基由来の炭素シグナルを認めた。この結果より、化合物 **2a** の構造はアセチル基を3つ有する anhydrohexofuranose と推定した。さらにそれらの 1H 及び ^{13}C NMR スペクトルを文献値¹¹⁾と比較し、その構造を 2,6-anhydrofructofuranose triacetate と同定した (Table 1-4)。

Table 1-4 1H and ^{13}C NMR spectral data for **2a** and 2,6-anhydrofructofuranose triacetate (methanol-*d*₄, TMS as int. standard)

position	2a		2,6-anhydrofructofuranose triacetate ¹¹⁾	
	δ_H (J in Hz)	δ_C (type)	δ_H (J in Hz)	δ_C (type)
1a	4.39 d (12.7)	60.6 (CH ₂)	4.42 d (12.6)	60.6 (CH ₂)
1b	4.34 d (12.7)		4.40 d (12.6)	
2	-	106.8 (C)	-	106.7 (C)
3	4.80 d (1.5)	80.9 (CH)	4.84 d (1.5)	80.9 (CH)
4	4.96 t (1.5)	79.7 (CH)	5.00 t (1.5)	79.6 (CH)
5	4.81 dd (4.2, 1.5)	82.3 (CH)	4.85 m (4.1, 1.5)	82.2 (CH)
6a	3.83 d (7.6)	67.7 (CH ₂)	3.87 d (7.5)	67.7 (CH ₂)
6b	3.73 dd (7.6, 4.2)		3.77 dd (7.5, 4.1)	
<u>CH₃CO</u>	2.10, 2.09,	20.7, 20.5 × 2 (each CH ₃)	2.14, 2.13,	20.7, 20.6, 20.5 (each CH ₃)
	2.07 (each s)		2.11 (each s)	
<u>CH₃CO</u>	-	171.9, 171.7 × 2 (each C)	-	171.9, 171.7, 171.6 (each C)



2a

1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

1-3-5. Fructose から化合物 **2** の調製

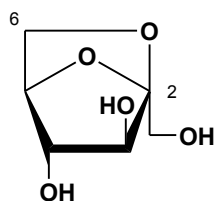
化合物 **2a** の構造から、さかのぼって化合物 **2** は 2,6-anhydrofructofuranose と考えられる。前述のように fructose と sucrose を加熱したサンプルの分析で、同じ R_f 値に同様な色調のスポットが認められることから、この化合物はシャカンゾウの加熱製造工程でカンゾウに含まれる fructose または sucrose から生成したと仮定した¹²⁻¹⁴⁾。そこで、fructose をプレートヒーターで加熱し、生成した化合物 **2** のスポット (スポット B) を単離した。得られた化合物のスペクトルデータを文献値¹³⁾と比較し、2,6-anhydrofructofuranose であることを確認した (Table 1-5)。

Table 1-5 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for **2** and 2,6-anhydrofructofuranose
(methanol- d_4 , TMS as int. standard)

position	2 ^a		2,6-anhydrofructofuranose ^{b 13)}	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	3.82 s	59.2 (CH ₂)	3.82 s	59.2
2	-	109.2 (C)	-	109.2
3	3.84 brt (1.5)	84.4 (CH)	3.84 dd (1.3)	84.4
4	3.70 d (1.5)	80.1 (CH)	3.69 d (1.5)	80.1
5	4.51 dd (4.0, 1.5)	83.0 (CH)	4.50 dd (3.9, 1.6)	83.0
6a	3.67 brd (7.0)		3.67 d (7.1)	
6b	3.61 dd (7.0, 4.0)	67.5 (CH ₂)	3.61 dd	67.5

a ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.

b ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.



2

1-4. スポット C (化合物 3) に関する検討

1-4-1. Fructose 及び各種アミノ酸の加熱試験

分析条件 III でシャカンゾウにのみ見られる R_f 値 0.5 付近の桃色のスポット C は、噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液^{15, 16)} により桃色に発色することから、ピロール環を有することが推測された。ピロール化合物はメイラード反応によって生じることが知られていることから¹⁷⁾、カンゾウに含まれる糖類(fructose)と各種アミノ酸の反応でこのスポットが生成するか検討した。

薄層板にアミノ酸をスポットした後、fructose の 50%メタノール溶液をスポットし、展開前に薄層板をプレートヒーター上で加熱 (130°C, 30 分間) した。薄層板を放冷した後、酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 2) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧したところ、シャカンゾウに特徴的な R_f 値 0.5 付近のスポット C は、asparagine と fructose から得られるスポットと一致した (Fig. 1-13)。よって、スポット C は、シャカンゾウの加熱製造工程において、カンゾウに含まれる asparagine と fructose が加熱されて生成すると推測した。

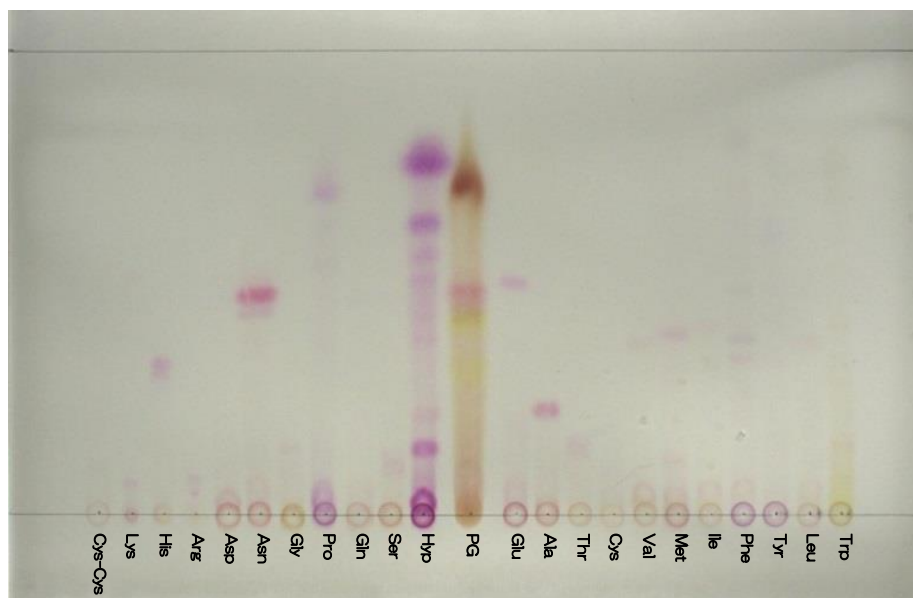


Fig. 1-13 TLC comparison of Prepared Glycyrrhiza and heat-treated (130°C, 30 min) amino acids with fructose (Condition III)

Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (20:3:2), detection; spraying dimethylamino-benzaldehyde TS for spraying.

Cys: Cys: cystine; Lys: lysine; His: histidine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Asn: asparagine; Gly: glycine; Pro: proline; Gln: glutamine; Ser: serine; Hyp: hydroxyproline; Glu: glutamic acid; Ala: alanine; Thr: threonine; Cys: cysteine; Val: valine; Met: methionine; Ile: isoleucine; Phe: phenylalanine; Tyr: tyrosine; Leu: leucine; Trp: tryptophan; PG: Prepared Glycyrrhiza

1-4-2. 化合物 3 の単離

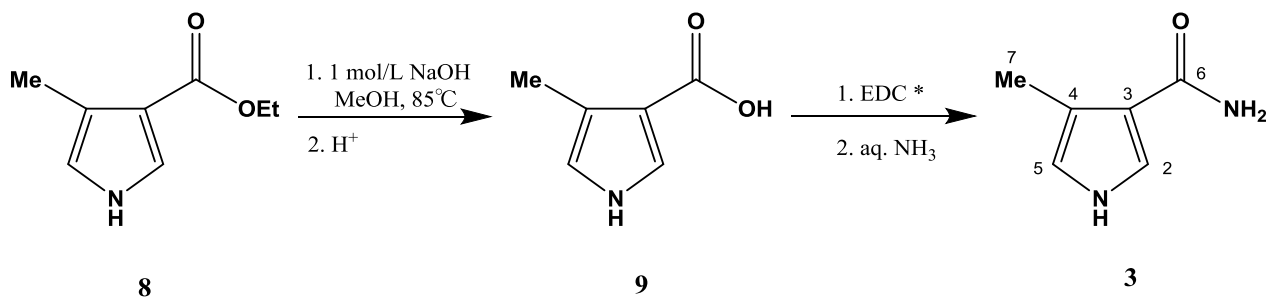
次にシャカンゾウから化合物 3 の単離を試みた。シャカンゾウのメタノール抽出物を DIAION HP-20 カラムクロマトに付し、50%メタノール溶出画分をシリカゲルで分画して、スポット C を含むフラクションを集めた。このフラクションを Sephadex LH-20 で精製し、化合物 3 を得た。

化合物 3 は、淡黄色の粘性油状物質として得られ、その分子式を、HR ESI MS により $C_6H_8N_2O$ [m/z : 147.0539 (calcd for $C_6H_8N_2ONa$, 147.0534)] と決定した。 1H NMR スペクトル (Table 1-6) において 2 つのピロール環由来のシグナル [δ_H 7.27 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2), δ_H 6.51 (1H, m, H-5)] と 1 つのメチル基 [δ_H 2.23 (3H, brd, $J=1.0$ Hz, H-7)] のシグナルが観測された。 δ 2.23 のメチル基プロトンには、 δ_H 6.51 のピロール環のプロトンとのロングレンジカップリングが認められた。 ^{13}C NMR スペクトルにおいては 1 つのカルボニル基 [δ_C 171.6], 4 つのピロール環由来 [δ_C 123.0, δ_C 120.1, δ_C 118.8, δ_C 117.6] および 1 つのメチル基 [δ_C 11.9] の炭素シグナルが認められた。ピロール環の置換様式については、ピロール環に由来するプロトンの J 値 (2.2 Hz) の文献値¹⁸⁾ との比較から 3,4 置換と推定し、化合物 3 を 4-methylpyrrole-3-carboxamide と推定した。

1-4-3. Ethyl 4-methylpyrrole-3-carboxylate (化合物 8) から化合物 3 の調製

化合物 3 は、文献未記載の化合物であることから、その構造を明確にするため、市販の ethyl 4-methylpyrrole-3-carboxylate (8) を Fig. 1-14 に示すように化合物 3 に導いた。得られた化合物のスペクトルデータは、単離した化合物のデータと一致したことから、化合物 3 の構造を確認した (Table 1-6)。

化合物 3 はシャカンゾウを製する加熱工程において、糖とアミノ酸のメイラード反応により生成する化合物と考えられる (Fig. 1-15)¹⁹⁾。



* EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl

Fig. 1-14

Table 1-6 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for isolated **3** and synthetic 4-methylpyrrole-3-carboxamide (methanol- d_4 , TMS as int. standard)

position	3		4-methylpyrrole-3-carboxamide (synthetic)	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)
1	-	-	-	-
2	7.27 d (2.2)	123.0 (CH)	7.27 d (2.2)	123.0 (CH)
3	-	120.1 (C)	-	120.1 (C)
4	-	117.6 (C)	-	117.6 (C)
5	6.51 m	118.8 (CH)	6.51 m	118.9 (CH)
6	-	171.6 (C)	-	171.7 (C)
7	2.23 brd (1.0)	11.9 (CH_3)	2.23 brd (1.0)	11.9 (CH_3)

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

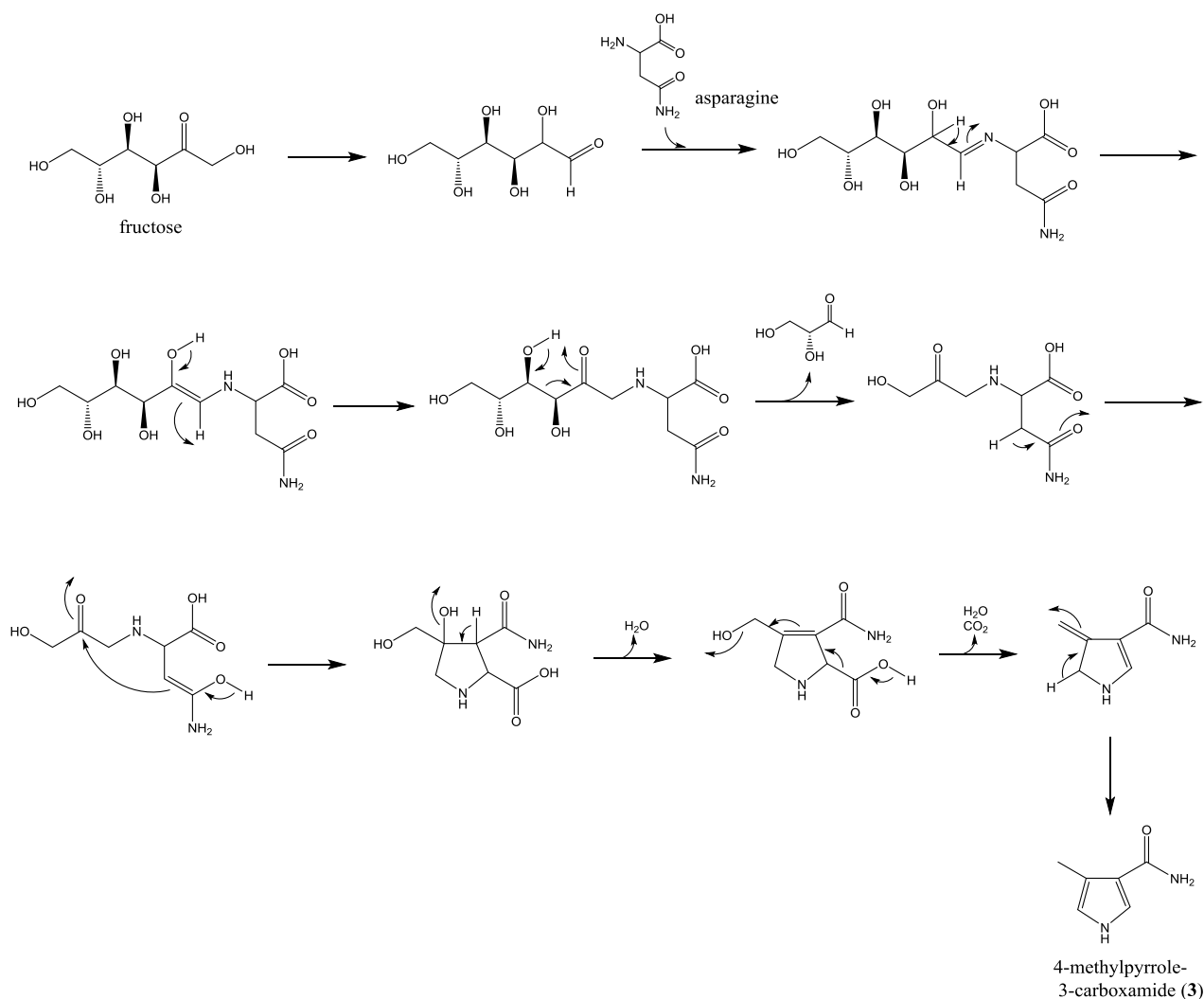


Fig. 1-15 Estimated reaction pass of the formation of **3**

1-5. カンゾウの加熱処理条件による各化合物の生成に関する検討

カンゾウの加熱温度及び加熱時間が、スポット A (化合物 1), B (2) および C (3) の生成量に与える影響を検討した. カンゾウの細切品を用い, プレートヒーター (110°C, 130°C 及び 150°C) で, それぞれ 10 分, 30 分及び 60 分加熱したサンプルを, 三種の分析条件で比較した. その結果, 加熱温度 110°C では 60 分間加熱したサンプルでも, いずれのスポットも見出されなかった (Fig 1-16 : 1~3). 一方, 130°C および 150°C では 30 分以上の加熱で, いずれのスポットも確認できた (Fig. 1-16 : 5, 6, 8, 9).

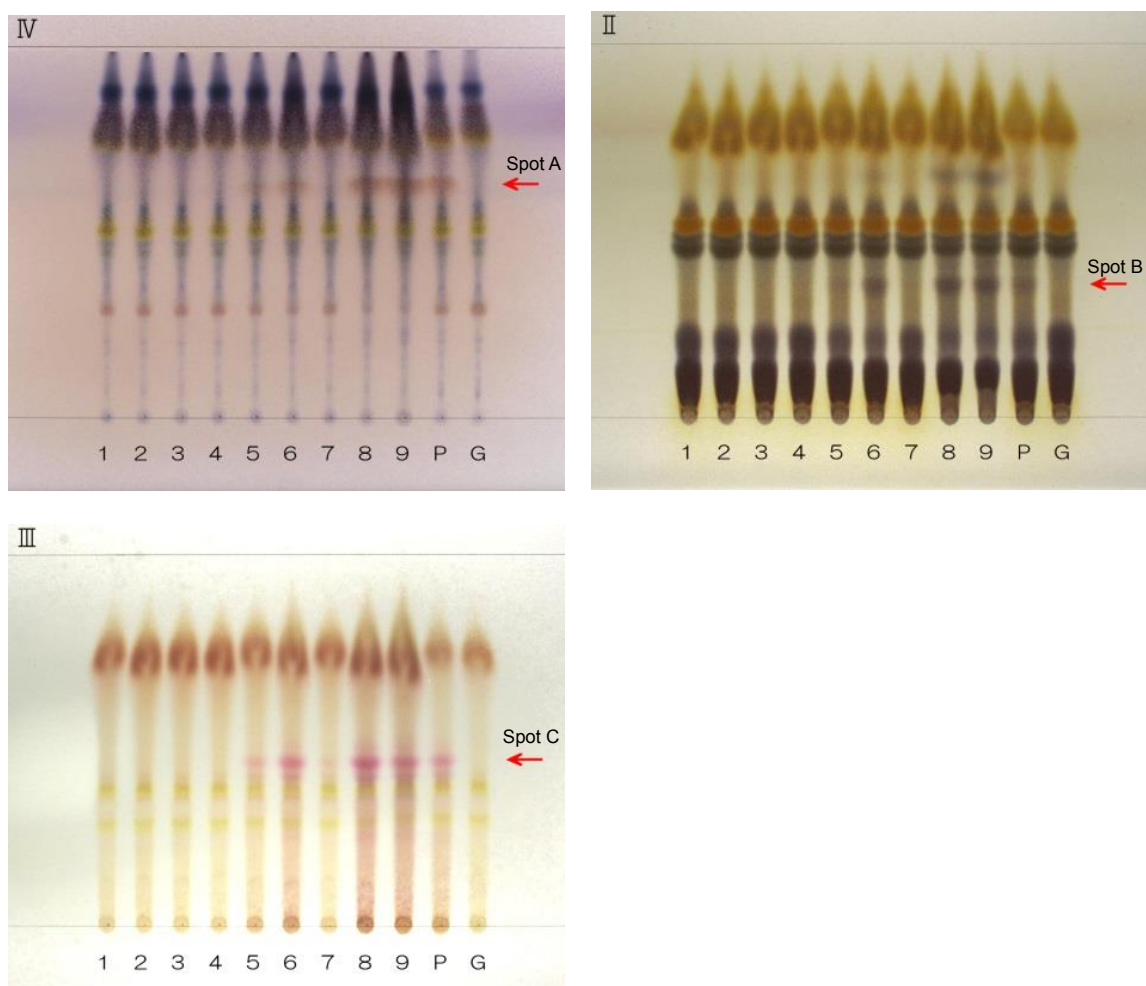


Fig. 1-16 Effect of temperature and time on TLC pattern of heat-treated Glycyrrhiza
Solvent system and detection method in IV, II and III are the same as in Fig. 1-8, Fig. 1-5 and Fig. 1-6, respectively.

Red arrows indicate spot A (IV), spot B (II) and spot C (III), respectively.

1: 110°C, 10 min; 2: 110°C, 30 min; 3: 110°C, 60 min; 4: 130°C, 10 min; 5: 130°C, 30 min;

6: 130°C, 60 min; 7: 150°C, 10 min; 8: 150°C, 30 min; 9: 150°C, 60 min; P: Prepared Glycyrrhiza;

G: Glycyrrhiza

1-6. カンゾウの基原種の比較

市場から収集したカンゾウは *G. uralensis* 由来の生薬であった。日局にはカンゾウの基原種として *G. uralensis* の他に *G. glabra* も収載されていることから、もう1つの基原種である *G. glabra* についても、分析条件 I~III で検討した。中国市場から入手した *G. glabra* 由来のカンゾウ (11a~13a) を、プレートヒーター (130°C, 30 分間) で加熱し、シャカンゾウ (11b~13b) を調製した。これらのカンゾウ及びシャカンゾウを、前述の各分析条件で比較した結果、いずれのロットにおいてもシャカンゾウに特異的なスポット A~C が検出可能であった (Fig. 1-17)。

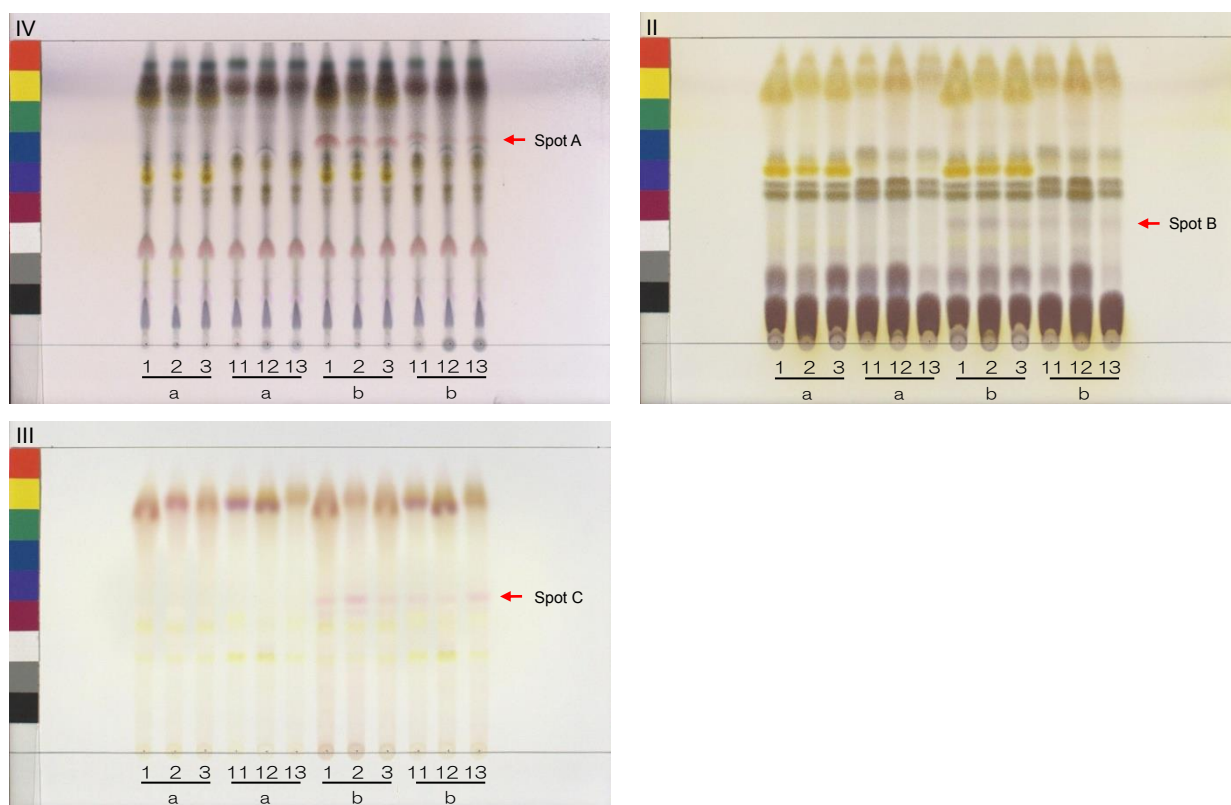


Fig. 1-17 Comparison of original plants

Solvent system and detection method in IV, II and III are the same as in Fig. 1-8, Fig. 1-5 and Fig. 1-6, respectively.

Red arrows indicate spot A (IV), spot B (II) and spot C (III), respectively.

1a~3a: Glycyrrhiza (*G. uralensis*); 11a~13a: Glycyrrhiza (*G. glabra*); 1b~3b: Prepared Glycyrrhiza (*G. uralensis*); 11b~13b: Prepared Glycyrrhiza (*G. glabra*)

1-7. 各化合物の特異性に関する検討

三種類のスポット（化合物 **1**～**3**）は、カンゾウを加熱することによって新たに生成したが、これらがカンゾウを加熱することによって特異的に生成するスポット、すなわちシャカンゾウに特異的なスポットであるかを検証するために、日局収載生薬でカンゾウと同じマメ科の地下部を使用する生薬であるカッコン及びオウギについて比較した。これら生薬は本来加熱処理することはない生薬であるが、シャカンゾウを製する条件（130°C, 30 分間）で加熱処理を行い、3つの分析条件によるクロマトグラムを比較した（Fig 1-18）。

スポット A（化合物 **1**）はシャカンゾウ（1～3）のみで検出され、加熱処理したカッコン（4～6）及びオウギ（7～9）では検出されなかった（Fig. 1-18-IV）。スポット B（化合物 **2**）については、いずれの検体にも R_f 値 0.3 付近の赤紫色の同様なスポットが認められ（Fig. 1-18-II）、スポット C（化合物 **3**）については、加熱処理したオウギにも、 R_f 値 0.5 付近に同様な桃色のスポットが認められた（Fig. 1-18-III）。以上の結果から、スポット A（化合物 **1**）が、スポット B（化合物 **2**）及びスポット C（化合物 **3**）と比較して、シャカンゾウの指標成分として、より特異性が高いと判断した。

化合物 **2** は sucrose 並びに fructose から、化合物 **3** は糖とアミノ酸から生成すると考えられることから、糖とアミノ酸を含む多くの生薬で加熱により生成する化合物と考えられる。

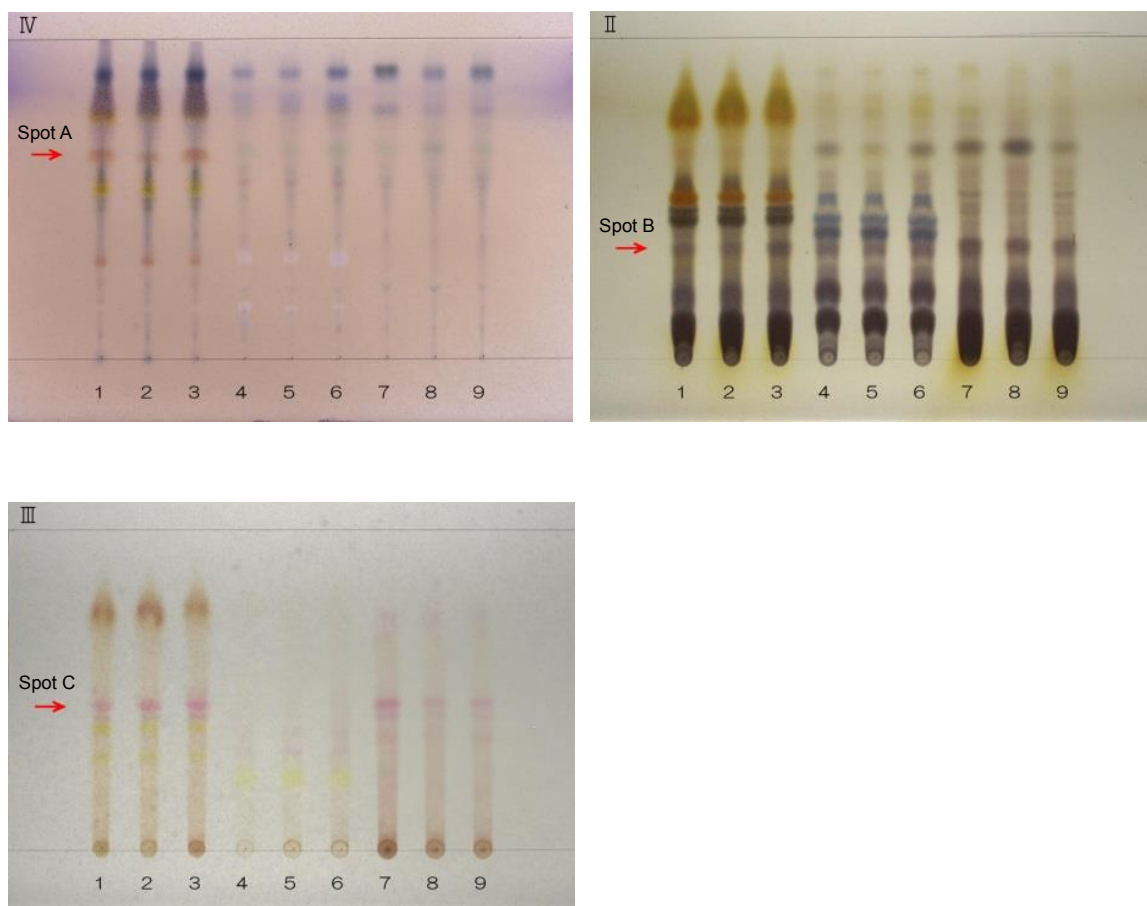


Fig. 1-18 TLC comparison of Prepared Glycyrrhiza, heat-treated Pueraria Root, and heat-treated Astragalus Root
 Solvent system and detection method in IV, II and III are the same as in Fig. 1-8, Fig. 1-5 and Fig. 1-6, respectively.
 Red arrows indicate spot A (IV), spot B (II) and spot C (III), respectively.
 1~3: Prepared Glycyrrhiza; 4~6: heat-treated Pueraria Root; 7~9: heat-treated Astragalus Root

1-8. 小 括

シャカンゾウを日局に収載するための基礎研究として、シャカンゾウに特異的に確認される成分で、とりわけカンゾウとの差異が認められる成分の探索を、TLC分析を用いて試みた。その結果、シャカンゾウのクロマトグラムにおいて、カンゾウに認められない三種類のスポットを見出し、これらの成分の構造を **phloretic acid (1)**, **2,6-anhydrofructofuranose (2)**, **4-methylpyrrole-3-carboxamide (3)** と決定した。化合物 **1** はその前駆物質である **4-hydroxybenzylmalonic acid (4)** の脱炭酸により、**2** は **fructose** の脱水環化により、**3** はアミノ酸と糖がメイラード反応して、いずれもシャカンゾウを製する際の加熱の工程で生成すると考えられる。この中で化合物 **1** の前駆物質である **4-hydroxybenzylmalonic acid (4)** は、これまで *Glycyrrhiza* 属植物のみから報告されていることから、化合物 **4** の加熱によって生成する **phloretic acid (1)** は、シャカンゾウに特異的なスポットと考えられた。

これらの化合物は、110°Cの加熱では生成せず、カンゾウを130°C以上で30分以上加熱処理することにより、TLC分析でスポットの生成が確認できた。ここで得られた結果は、シャカンゾウを調製する際の指標として利用できる。

本研究の結果をもとに設定した **phloretic acid** を指標成分とするシャカンゾウの確認試験は、日本薬局方原案審議委員会による審議を経て、第16改正日本薬局方第2追補に収載された。

確認試験 本品の粉末2.0 gに酢酸エチル10 mLを加え、15分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を除く。残留物に酢酸エチル5 mL及び0.1 mol/L塩酸試液5 mLを加え、15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20 μ 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(7:2:1)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3分間加熱した後、十分に放冷するとき、 R_f 値0.6付近に赤紫色のスポットを認める。

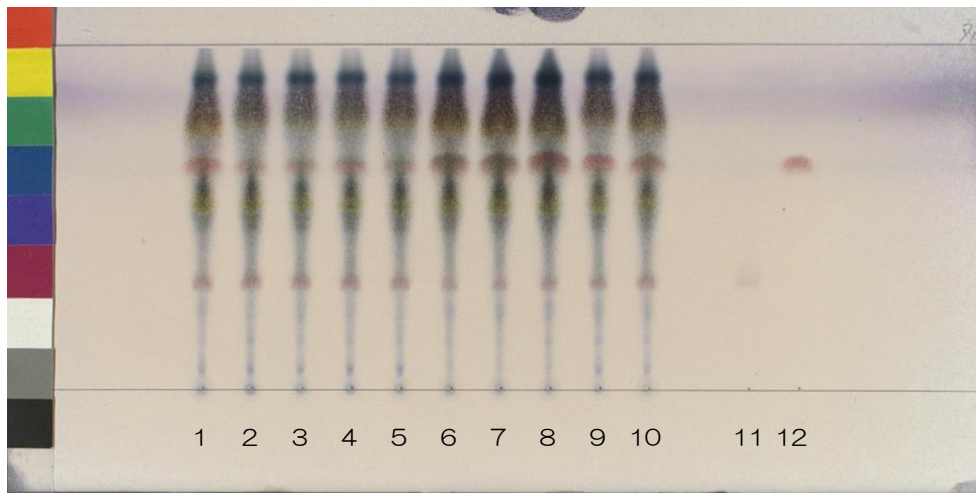
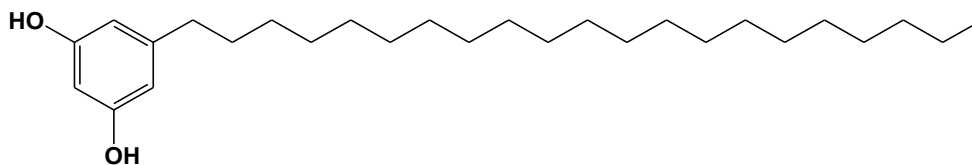


Fig. 1-19 TLC chromatograms of JP identification test of Prepared Glycyrrhiza
Solvent system; ethyl acetate/methanol/water (7:2:1), detection; spraying
4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105°C.
1~10: Prepared Glycyrrhiza, 11: 4-hydroxybenzylmalonic acid, 12: phloretic acid

第2章 ショウバク

ショウバクは、「名医別録」の中品に収載されており、イネ科 (*Gramineae*) のコムギ *Triticum aestivum* Lam.の種子を乾燥したものであり、「甘麦大棗湯」に配合される生薬である。コムギはアフガニスタンからイラン周辺を起源とし、世界で広く栽培されている穀物であり、コメ、トウモロコシと合わせ世界三大穀物である²⁰⁾。現在、ショウバクには公的な規格が設定されておらず、局外生規への収載が検討されている。ショウバクについては食品としての分析の観点から、主にグリセロ糖脂質などの分析が報告^{21, 22)}されているため、これらの成分を中心に TLC を用いた確認試験を検討した。一方、グリセロ糖脂質自体は植物の細胞膜由来の成分であることから、確認試験の指標成分としては、特異性の面から問題がある。そこで、グリセロ糖脂質以外の成分についても同時に検討した。その結果、グリセロ糖脂質が含まれる分画以外から TLC 分析において特徴的な発色を示す成分を見出した。この成分は、天然のフェノール性脂質 (アルキルレゾルシノール類) の一種である 5-henicosylresorcinol (10) であった (Fig. 2-1)。アルキルレゾルシノール類は、穀類の表皮などに含まれている成分であり^{23, 24)}、ショウバク以外の植物においても検出される可能性が高い。しかし、ショウバクは原形で流通していることから、生薬の性状の項と合わせて確認することで判別が可能と判断し、5-henicosylresorcinol を指標とした TLC 確認試験法を設定した。



5-henicosylresorcinol (10)

Fig. 2-1 Structure of alkylresorcinol in Tritici Semen

2-1. ショウバクのTLC分析条件

コムギに含まれることが文献に報告されている糖脂質^{21, 22)}を分析するために、ショウバクのメタノール抽出液を、糖脂質の分析で用いられているクロロホルム／メタノール／水混液 (70 : 30 : 6) (Fig. 2-2-I) 及び酢酸エチル／メタノール／水混液 (20 : 3 : 2) (Fig. 2-2-II) を展開溶媒として用いて検討した。これらの溶媒系で展開したプレートに、一般的な検出方法 (Fig. 2-2, a~m) を適用すると、高極性成分の領域に数個のスポットが確認できたが、いずれも特徴的かつ明瞭なスポットは見出せなかった。そこで次に低極性成分についても検討した。低極性領域を検討する溶媒として、ヘキサン／酢酸エチル／酢酸(100)混液 (14 : 6 : 1) を用いた結果、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液 (Fig. 2-2, g)²⁵⁾ において、 R_f 値0.3付近に、特徴的な赤橙色を呈するスポットを認めた (Fig. 2-2-III) 。そこで、この赤橙色を呈するスポット (化合物**10**) を単離し、構造の解明を試みた。

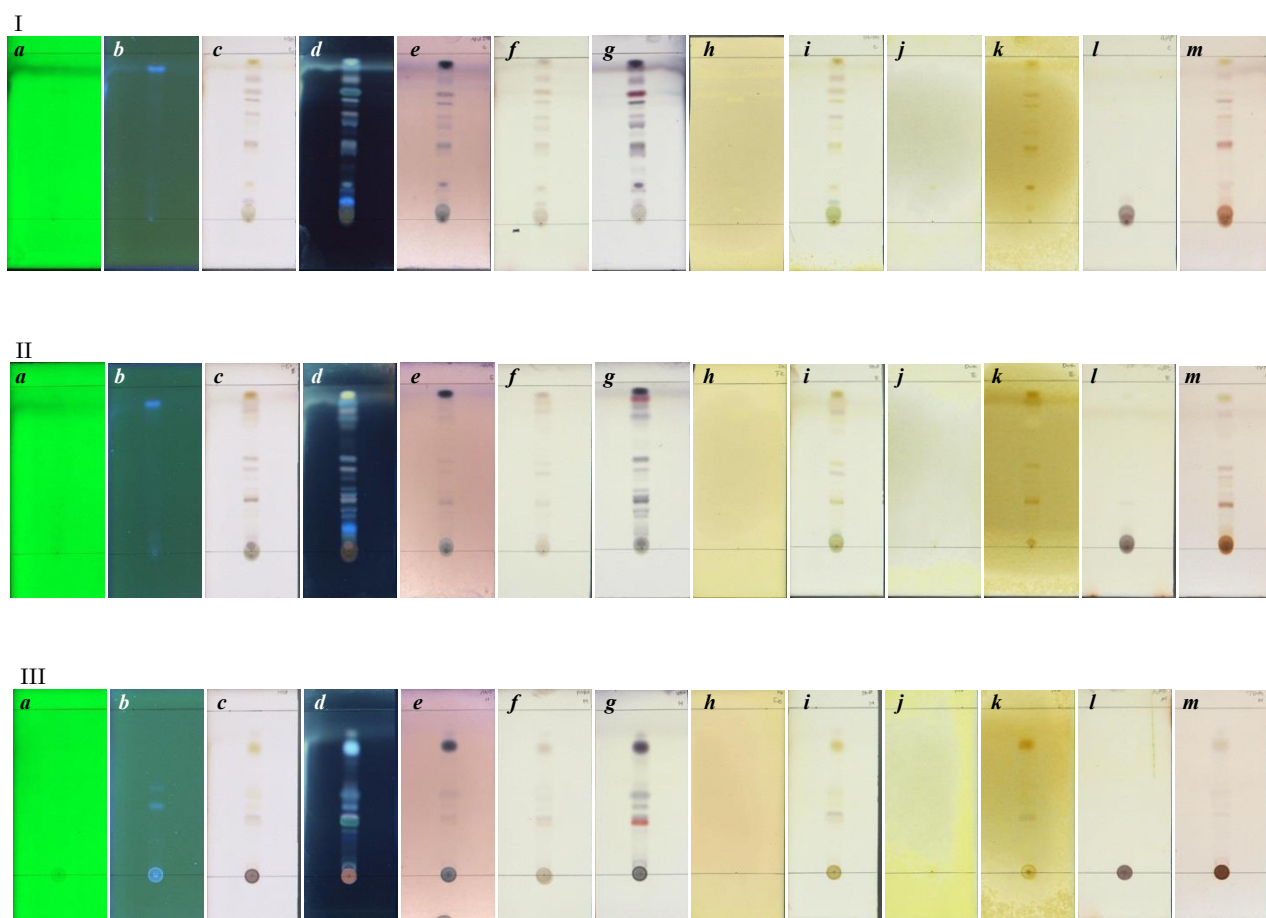


Fig. 2-2 TLC comparison of solvent system and detection method

Solvent system; I) chloroform /methanol/water (70:30:6), II) ethylacetate/methanol/water (20:3:2), III) hexane/ethylacetate/glacial acetic acid (14:6:1), detection; a) UV 254nm, b) UV 365nm, c) spraying dilute sulfuric acid then heated at 105°C, d) UV 365nm after spraying dilute sulfuric acid then heating at 105°C, e) spraying 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105°C, f) spraying 4-dimethylaminobenzaldehyde TS for spraying then heating at 105°C, g) spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C, h) spraying iron (III) chloride TS, i) spraying 2,4-dinitrophenylhydrazine TS then heating at 105°C, j) spraying dragendorff's TS for spraying, k) spraying dragendorff's TS for spraying then spraying sodium nitrate TS, l) spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C, m) spraying thymol-sulfuric acid-methanol TS for spraying then heating at 105°C.

2-2. 化合物 10 の単離

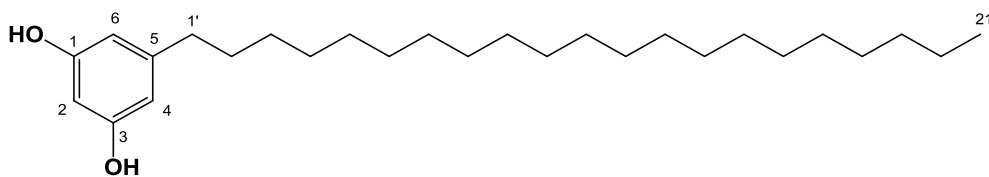
ショウバクの粉末をメタノールで抽出し、糖脂質を除去する目的で、シリカゲルカラムに付し、クロロホルム／メタノール／水混液で溶出し、1~3 の 3 つのフラクションに分画した。目的とする噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液で赤橙色を呈するスポットを含むフラクション 2 を Sephadex LH-20 カラムに付し、クロロホルム／エタノール混液 (3:1) で繰り返し分離精製した。更にシリカゲルカラムに付し、ヘキサン／酢酸エチル混液で精製し、化合物 10 を得た。

化合物 10 は白色の粉末として得られた。¹H 及び ¹³C NMR スペクトル (Table 2-1) より、3 置換ベンゼン環 [δ_{H} 6.17 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-2) and δ_{C} 100.1 (C-2), δ_{H} 6.24 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-4,6) and δ_{C} 108.0 (C-4,6), δ_{C} 146.2 (C-5) and δ_{C} 156.6 (C-1,5)]並びにアルキル鎖の存在が明らかになった。さらに HR APCI MS の結果、分子式が $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2$ [m/z : 405.3725 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{O}_2$, 405.3727)]であることから、化合物 10 をアルキル側鎖 C21 のアルキルレゾルシノール類と推定し、文献値²⁶⁾との比較から、5-henicosylresorcinol と推定した。5-henicosylresorcinol は市販されているため、市販品とスペクトルデータを直接比較して同定した (Table 2-1)。

Table 2-1 NMR spectral data for compounds **10** and 5-henicosylresorcinol (Fluka)
(CDCl₃, TMS as int. standard)

	10		5-henicosylresorcinol (Fluka)		
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} (type)	
1	-	156.6 s	-	156.6 s	
2	6.17 t (2.1)	100.1 d	6.17 t (2.2)	100.1 d	
3	-	156.6 s	-	156.6 s	
4	6.24 d (2.1)	108.0 d	6.24 d (2.2)	108.0 d	
5	-	146.2 s	-	146.2 s	
6	6.24 d (2.1)	108.0 d	6.24 d (2.2)	108.0 d	
1'	2.46 dd (7.9, 7.0)	35.8 t	2.48 dd (7.7)	35.8 t	
2'	1.56 m	31.1 t	1.53 m	31.1 t	
3'	1.25 m	29.3 t	1.25 m	29.3 t	
4'					29.4 t
5'					29.5 t
6'					29.6 t
7'					29.7 t
8'					
9'					
10'					
11'					
12'					
13'					
14'					
15'					
16'					
17'					
18'					
19'	31.9 t	31.9 t			
20'	22.7 t	22.7 t			
21'	0.88 t (7.0)	14.1 q	0.88 t (7.0)	14.1 q	

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.



5-henicosylresorcinol (**10**)

2-3. ショウバクの市場流通品による検討

ショウバクの市場流通品 13 ロット (Table 2-2) を用い、ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液 (14:6:1) で展開し、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧後、加熱した結果、いずれのロットからも 5-henicosylresorcinol (**10**) のスポットが確認できた (Fig. 2-3). ショウバク(13)は長期間保管 (1992 年入手) している生薬標本であり、指標としているアルキルレゾルシノールは、他のショウバクに比べ非常に薄かった。この結果から、**10** はショウバクの劣化度合いの指標として活用される可能性が高い。

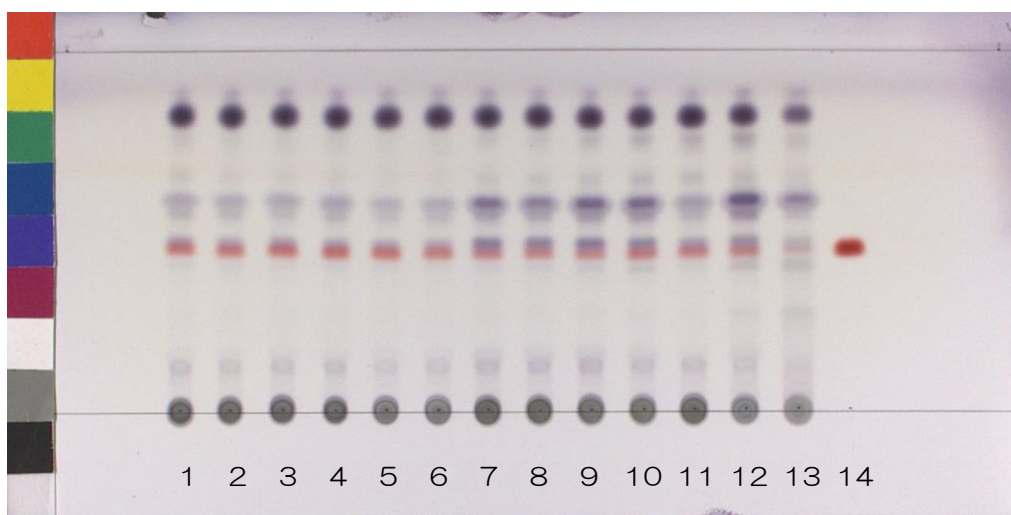


Fig. 2-3 TLC comparison of Tririci Semen
Solvent system; hexane/ethylacetate/glacial acetic acid (14:6:1), detection; spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C.
1~13: Tririci Semen, 14: 5-henicosylresorcinol

Table 2-2 List of Tririci Semen

TLC No.	Locality		Year/Month
1	Kanto	関東	2010/11
2	Hokkaido	北海道	2011/12
3	Hokkaido	北海道	2012/12
4	Hokkaido	北海道	2012/12
5	Hokkaido	北海道	2014/05
6	Hokkaido	北海道	2014/05
7	Kyusyu	九州	2013/11
8	Kyusyu	九州	2013/05
9	Kyusyu	九州	2012/08
10	Kyusyu	九州	2010/10
11	Unknown	不詳	2008/08
12	Unknown	不詳	2008/05
13	America	アメリカ	1992/12

2-4. 小 括

ショウバクは公定書に記載されていない生薬であり，局外生規 2015 への新規記載が予定されている．公定書への記載にあたっては，その生薬に特徴的な成分を指標とし TLC による確認試験の設定が望まれることから，ショウバクの確認試験の指標となりうる，特徴的な成分を探索した．

食品としてのコムギについては，グリセロ糖脂質の分析報告があったことから，高極性領域の成分について各種検出条件で検討したが，指標となりうる明瞭なスポットは見出せなかった．一方，低極性領域を検討した結果，噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液による検出において，特徴的な赤橙色のスポットを認めた．このスポットは，天然のフェノール性脂質の一種である 5-henicosylresorcinol であった．この成分は穀物の外皮などに含まれているアルキルレゾルシノール類の一種であることから，ショウバク以外の穀物からも検出される可能性が考えられる．しかし，ショウバクは原形で流通していることから，生薬の性状の項と合わせて確認することにより判別が可能と判断した．また，長期保管したショウバクでは新しいロットに比べて 5-henicosylresorcinol のスポットが薄かったことから，5-henicosylresorcinol はショウバクの劣化度合いの指標として活用される可能性が高い．

本研究による検討をもとに 5-henicosylresorcinol を指標成分とするショウバクの確認試験を以下のように設定した．本確認試験は局外生規 2015 原案審議委員会で現在審議されている．

確認試験 本品の粉末 2 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 5 μ 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／酢酸エチル／酢酸(100)混液(14 : 6 : 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， R_f 値 0.45 付近に赤橙色のスポットを認める．(5-ヘンイコシルレゾルシノール)．

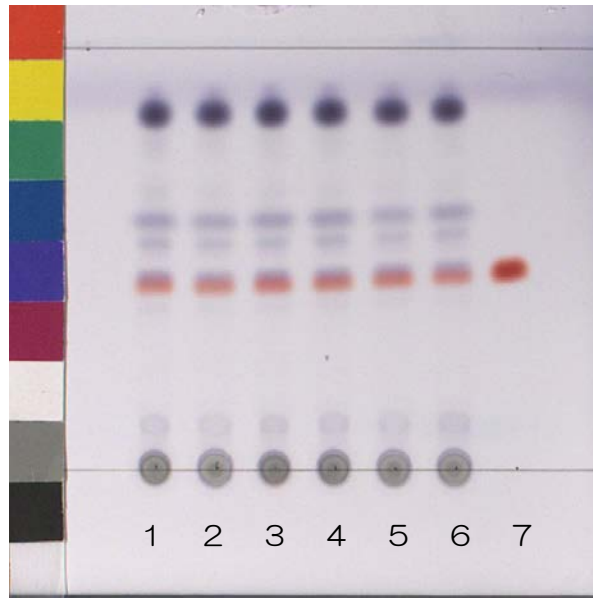


Fig. 2-4 TLC chromatograms of identification test of Tritici Semen
Solvent system; hexane/ethylacetate/glacial acetic acid (14:6:1),
detection; spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying
then heating at 105°C.
1~6: Tritici Semen, 7: 5-henicosylresorcinol

第3章 ジオウ

ジオウは、日局に収載されている「牛車腎気丸」,「十全大補湯」,「八味地黄丸」に配合される重要な生薬である。ジオウは調製法の違いにより、乾ジオウあるいは熟ジオウとして別々に市場に流通しており、中国ではその他に生地黄（鮮地黄,生の根）も用いられる²⁷⁾。日局では、ジオウを「本品はアカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino 又は *Rehmannia glutinosa* Liboschitz (*Scrophulariaceae*) の根（乾ジオウ）又はそれを蒸したもの（熟ジオウ）である」と規定しており、乾ジオウと熟ジオウは区別して記載されている²⁸⁾。本研究を開始した時点では日局「ジオウ」には確認試験が収載されていなかった。そこで、乾ジオウと熟ジオウを化合物レベルで区別できる確認試験の設定が可能か検討した。

ジオウに含まれる成分としては、catalpol, aucubinなどのイリドイド配糖体^{29, 30)}, acteosideなどのフェネチルアルコール類³¹⁾, stachyoseなどの多糖類³²⁾ が知られている。イリドイド配糖体は一般的に不安定なことが知られており、加熱や酵素等によって分解することから、ジオウの確認試験の指標とすることは困難と思われた³³⁾。また、フェネチルアルコール類は多くの植物に含まれていることから、特異性に欠ける化合物である。一方、乾ジオウの主糖である四糖類stachyoseは、修治の工程でmanninotriose（三糖類）やfructose（単糖類）などに分解し、熟ジオウでは減少していることが知られている³²⁾ (Fig. 3-1)。

そこで、乾ジオウと熟ジオウの含有成分の差を検討し、ジオウに特徴的に含まれる多糖類を指標とするTLC分析を用いた確認試験を検討した。その結果、乾ジオウについてはジオウに特徴的な四糖類であるstachyoseを、熟ジオウについてはstachyoseが分解して生成するmanninotriose (11)及びfructoseを指標とした確認試験を設定した。

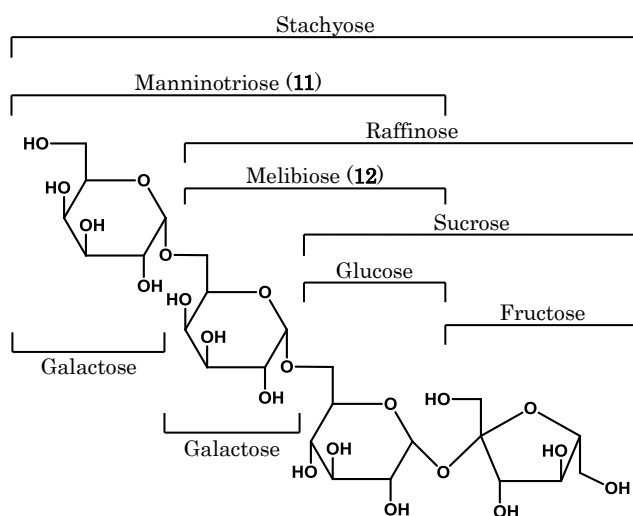
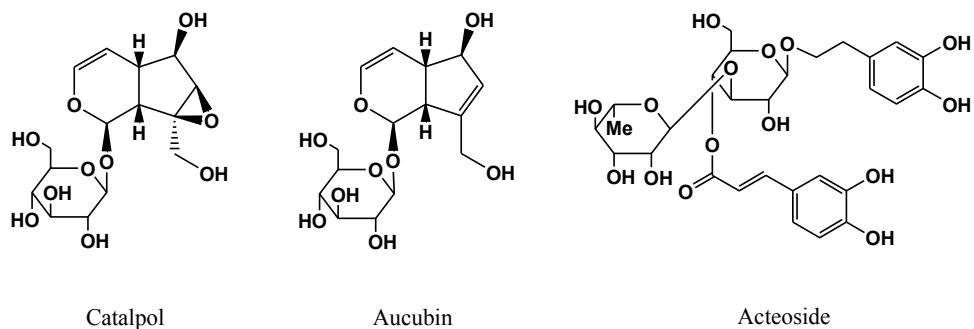


Fig. 3-1 Structure of iridoid glycoside, phenethyl alcohol glycoside and saccharide in *Rehmannia* Root

3-1. Manninotriose (11)の調製

糖類を検討するにあたり、manninotriose (11)の標品は入手困難なため、市販品のstachyoseから調製した。

Stachyoseからmanninotriose (11)への変換法として、希酸またはショ糖分解酵素であるインベルターゼを用いた加水分解が知られている^{34, 35)}。本研究では酵素による加水分解法を選択し、副産物の生成を抑えてより効率的な変換を実現するために、文献を参考に少量スケールの予備試験で適切な条件を検討した。この結果を基にstachyoseを適量の水に溶解した後、質量比で1/20の酵素を加え、35°Cの水浴中で3時間攪拌した後 (Fig. 3-2) , 遠心分離によって水に懸濁状態の酵素を取り除き、Sephadex LH-20で分画し、得られたmanninotriose画分を凍結乾燥した。

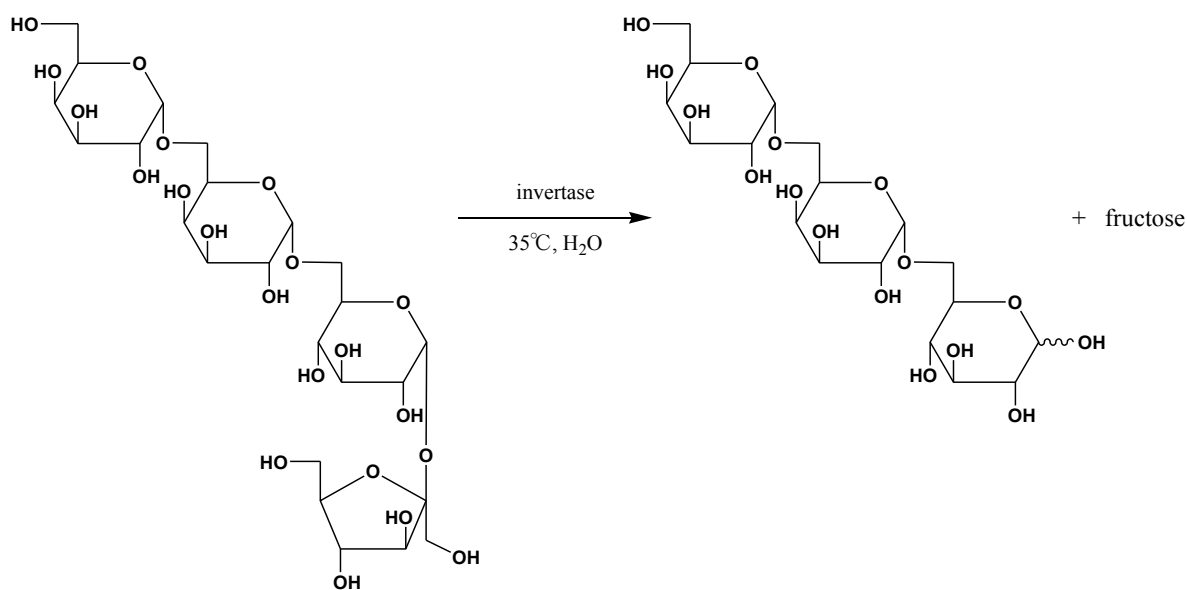


Fig. 3-2 Enzymatic hydrolysis of stachyose

3-2. Manninotriose (11)の構造確認

3-1で調製したmanninotriose (11)は、 ^{13}C NMRスペクトルが文献値³⁶⁾のそれと非常によく一致していた。しかし、標品が入手できなかったことから、化学的手法を用いて構造を再確認した (Fig. 3-3)。

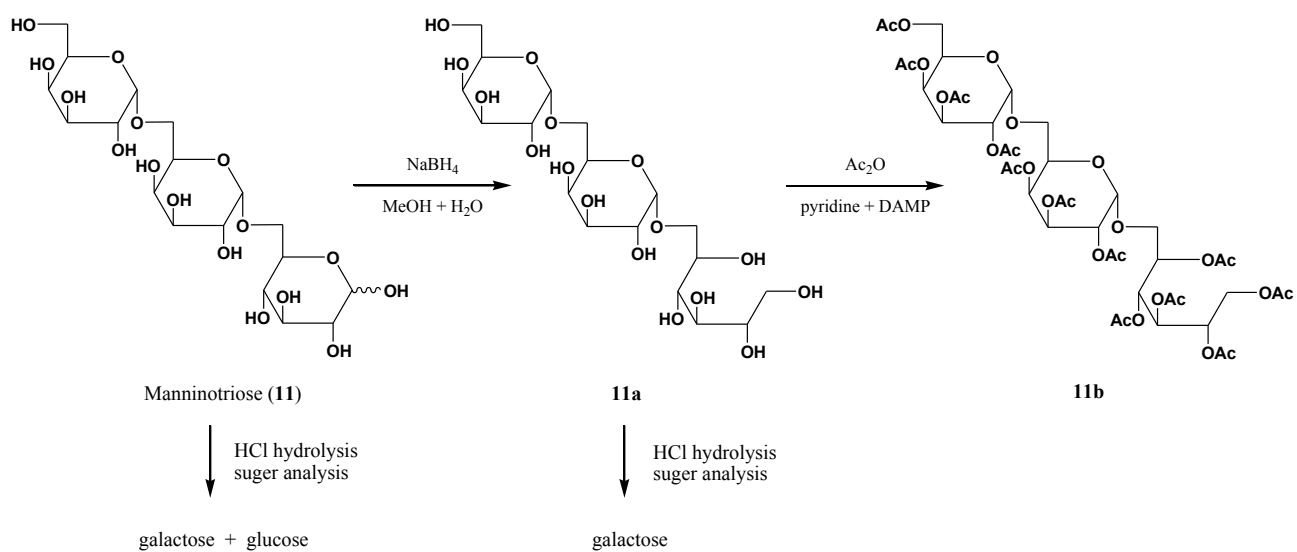


Fig. 3-3 Structure confirmation of manninotriose

3-2-1. 構成糖の確認

Manninotriose (**11**)を希塩酸で加水分解した後、TLC分析した結果、glucoseとgalactoseが検出され、galactoseのスポットは、glucoseのスポットに比べ濃かった (Fig. 3-4) .

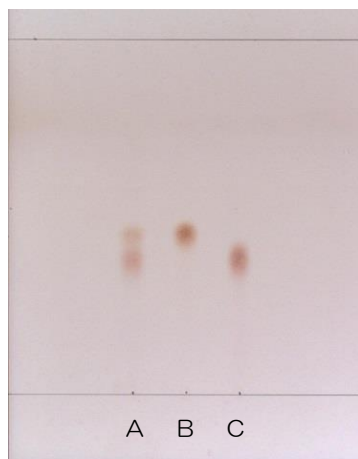


Fig. 3-4 TLC comparison of glucose, galactose and hydrolysate of manninotriose. Solvent system; 2-propanol/methanol/water (6:2:1), detection; spraying thymol-sulfuric acid-methanol TS for spraying then heating at 105°C for 5 minutes. A: hydrolysate of manninotriose; B: glucose; C: galactose

3-2-2. 結合順序の確認

還元末端を確認すべくmanninotriose (**11**)を水酸化ホウ素ナトリウムで還元し (**11a**) , 希塩酸で加水分解した後、TLC分析した結果、galactoseのみが検出された (Fig. 3-5) . よって、還元末端はglucoseであることを確認した.



Fig. 3-5 TLC comparison of glucose, galactose, sorbitol and hydrolysate of **11a**. solvent system; 2-propanol/methanol/water (6:2:1), detection; spraying thymol-sulfuric acid-methanol TS for spraying then heating at 105°C for 5 minutes. A: hydrolysate of **11a**; B: glucose; C: galactose, D: sorbitol

3-2-3. 結合位置の確認

Manninotrioseの末端glucoseを還元した化合物(11a)を、常法に従いアセチル化し、得られたアセチル体(11b)のNMRスペクトルを測定し、シグナルを帰属した。その際、11bのNMRスペクトルのみでは帰属が困難であったため、類縁糖であるmelibiose (12)について、同様に末端還元後、アセチル化した12b (Fig. 3-6) とNMRスペクトルを比較した (Table 3-1)。

その結果、二カ所のアノメリック炭素の ^{13}C NMRの化学シフト値 [δ_{C} 96.2 (C-1'), δ_{C} 94.4 (C-1'')] 及び ^1H NMRの結合定数 [δ_{H} 4.97 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-1'), δ_{H} 5.11 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-1'')] より、グルコシル結合はいずれも α 配置であることを確認した。また、2次元NMRスペクトルにより決定した末端glucitolの6位炭素及びgalactoseの6位炭素の化学シフト値がそれぞれ [δ_{C} 65.4 (C-6), δ_{C} 65.8 (C-6')] であることから、これらはグルコシド結合でアノメリック炭素と結合していることが確認された。

以上の結果より、ここで調製したmanninotrioseは、文献³⁶⁾の記載どおり α -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-glucopyranose (11)であることを確認した。

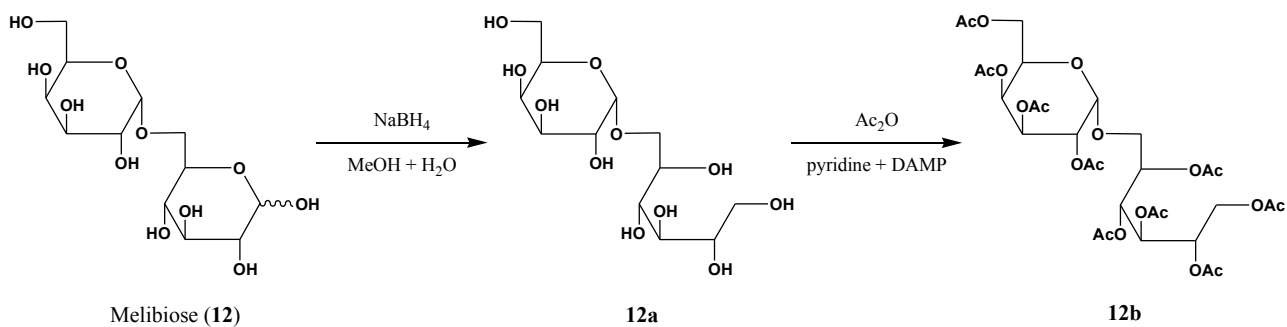


Fig. 3-6 Reduction and acetylation of melibiose

Table 3-1 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for compounds **11b** and **12b**(CDCl₃, TMS as int. standard)

position	11b		12b	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)
Glc				
1	4.40 dd (3, 12) 4.00 dd (7, 12)	62.3 (CH ₂)	3.99 dd (7, 12) 4.39 dd (3, 12)	62.1 (CH ₂)
2	5.40 ddd (3, 5, 7)	69.2 (CH)	5.35 ddd (3, 5, 7)	69.1 (CH)
3	5.45 - 5.49 m	69.1 (CH)*	5.42 - 5.47 m	69.4 (CH)*
4		69.6 (CH)*		68.9 (CH)*
5	5.07 q (5)	68.8 (CH)	5.05 q (5)	68.8 (CH)
6	3.67 - 3.76 m	65.4 (CH ₂)	3.73 dd (5, 11) 3.67 dd (5, 11)	65.2 (CH ₂)
Gal				
1'	5.11 d (4)	96.4 (CH)	5.13 d (3)	96.1 (CH)
2'	5.14 dd (4, 11)	67.8 (CH)	5.15 dd (3, 10)	67.8 (CH)
3'	5.31 dd (3, 7)	67.4 (CH)	5.32 dd (3, 10)	67.3 (CH)
4'	5.45 - 5.49 m	68.1 (CH)**	5.84 dd (1, 3)	68.0 (CH)
5'	4.21 t (7)	67.5 (CH)	4.21 td (6, 1)	66.7 (CH)
6'	3.42 dd (6, 10) 3.67 - 3.76 m	65.8 (CH ₂)	4.08 dd (6, 11) 4.11 dd (6, 11)	61.6 (CH ₂)
Gal				
1''	4.97 d (4)	96.2 (CH)	-	-
2''	5.12 dd (4, 11)	67.6 (CH)	-	-
3''	5.28 dd (3, 7)	67.3 (CH)	-	-
4''	5.50 dd (1, 3)	68.3 (CH)**	-	-
5''	4.33 t (7)	66.4 (CH)	-	-
6''	4.19 dd (6, 11) 4.04 dd (7, 11)	61.8 (CH ₂)	-	-
<u>CH</u> ₃ CO	2.15, 2.14 (×3), 2.12, 2.09, 2.08 (×2), 2.05, 2.04, 1.96 (×2)	20.7, 20.6, 20.5 (each CH ₃)	2.14 (×2), 2.13 (×2), 2.07, 2.05 (×2), 2.04, 1.98	20.5, 20.6, 20.7 (each CH ₃)
CH ₃ <u>C</u> O	-	170.7 (×2), 170.5, 170.4, 170.2 (×2), 169.9 (×2), 169.8, 169.7, 169.6, 169.5 (each C)	-	170.6, 170.5, 170.4, 170.1 (×2), 169.7 (×3), 169.5 (each C)

*, **: Assignments may be interchanged in each column.

 ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.

3-3. ジオウ中の糖のTLCによる比較

市場品の乾ジオウ（1, 2）及び熟ジオウ（3, 4）について、含有している糖類を中心に TLC クロマトグラムを比較した。検討した糖類は、ジオウに含まれる代表的な四糖類である stachyose, 三糖類の manninotriose, raffinose, 二糖類の melibiose, sucrose, 単糖類の galactose, glucose, fructose である (Fig. 3-1)。

3-3-1. 噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液による検出

まず、全般的な有機化合物に反応する噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液³⁷⁾を発色試液として用いた結果、乾ジオウには主として stachyose, raffinose, sucrose のスポットが認められた。一方、熟ジオウには主として manninotriose, fructose, melibiose のスポットが認められた。しかし、これらのスポットはすべて橙色～茶褐色に発色するため、指標となる成分を同時にスポットして試験しないと、*R_f* 値のみの規定では乾ジオウと熟ジオウの判別は困難であった (Fig. 3-7)。

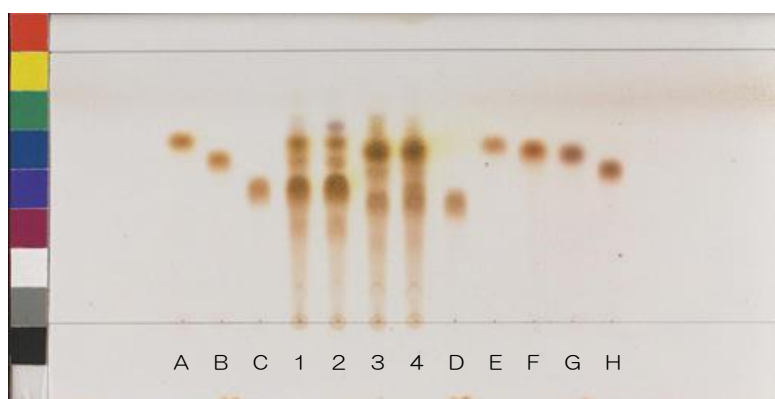


Fig. 3-7 TLC comparison of sugar components of Rehmannia Root. Solvent system; 2-propanol/water/methanol (3:2:2), detection: spraying thymol-sulfuric acid-methanol TS for spraying then heating at 105°C for 5 minutes.
A: sucrose; B: raffinose; C: stachyose; D: manninotriose; E: glucose; F: fructose; G: galactose; H: melibiose; 1~2: Kan-jio; 3~4: Juku-jio

3-3-2. 1,3-ナフタレンジオール試液による検出

糖類の一般的な検出試液である 1,3-ナフタレンジオール試液³⁸⁾ を用いて検出した結果、標準溶液では 105°C で 5 分間加熱すると、sucrose, raffinose, stachyose, fructose が褐色のスポットとして検出された。その後、続けてさらに 5 分以上加熱することにより、manninotriose, glucose, galactose, melibiose が青色のスポットとして検出された。この時、試料溶液においては、乾ジオウでは、主として R_f 値 0.5 付近に黒褐色の stachyose のスポットが認められ、熟ジオウでは、主として R_f 値 0.7 付近に fructose の黒褐色のスポットの他、 R_f 値 0.4 付近に manninotriose の青色のスポットが認められた。これらのスポットの存在と発色を見ることにより、乾ジオウと熟ジオウは判別が可能であった (Fig. 3-8)。

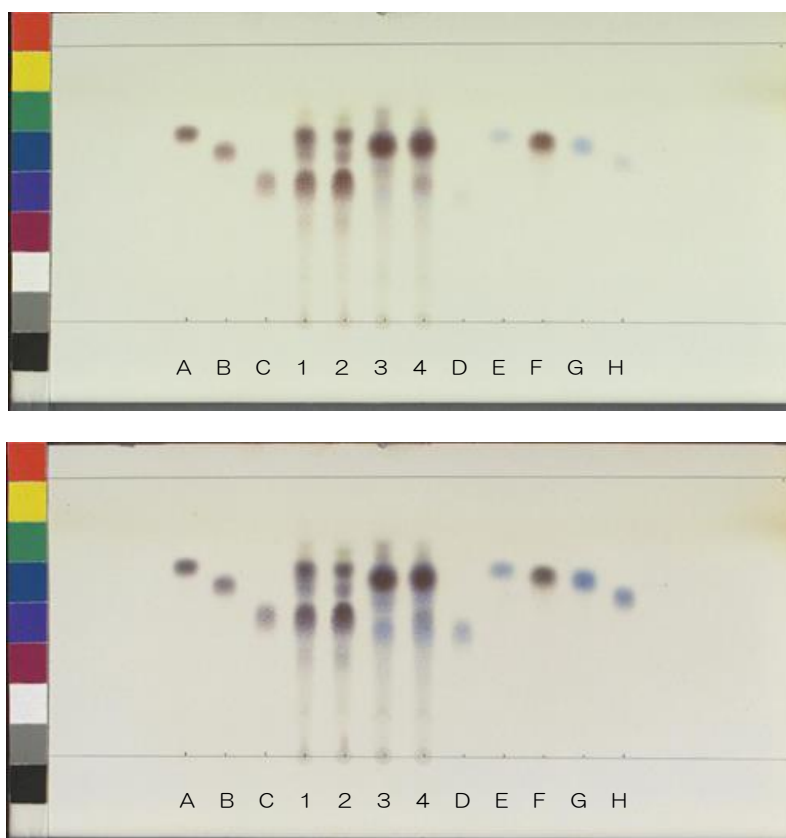


Fig. 3-8 TLC comparison of sugar components of Rehmannia Root. Solvent system; 2-propanol/water/methanol (3:2:2), detection; spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C for 5 minutes (upper) or 10 minutes (lower).
A: sucrose; B: raffinose; C: stachyose; D: manninotriose; E: glucose; F: fructose; G: galactose; H: melibiose; 1~2: Kan-jio; 3~4: Juku-jio

3-3-3. 2,3,5-トリフェニル-2*H*-テトラゾリウム塩酸塩・メタノール試液による検出

還元糖に反応する検出試液である 2,3,5-トリフェニル-2*H*-テトラゾリウム塩酸塩・メタノール試液³⁹⁾では、還元性のある、manninotriose, glucose, fructose, galactose, melibiose のスポットが発色した。この結果により、manninotriose を指標にすることにより、熟ジオウの検出が可能であると期待したが、乾ジオウにおいても量は少ないものの manninotriose が含まれ、完全に判別することは困難であった (Fig. 3-9)。

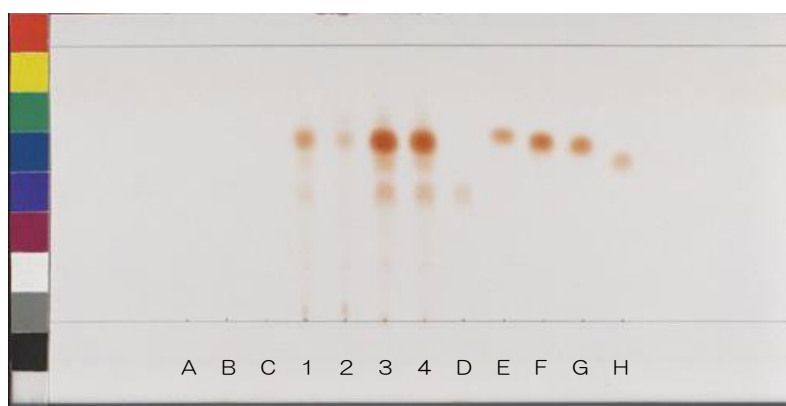


Fig. 3-9 TLC comparison of sugar components of Rehmannia Root.

Solvent system; 2-propanol/water/methanol (3:2:2), detection; spraying 2,3,5-triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride-methanol TS then heating at 105°C for 5 minutes.

A: sucrose; B: raffinose; C: stachyose; D: manninotriose; E: glucose; F: fructose; G: galactose; H: melibiose; 1~2: Kan-jio; 3~4: Juku-jio

以上の三種類の検出方法の比較より、乾ジオウ及び熟ジオウの確認試験には、1,3-ナフタレンジオール試液による検出方法が妥当と判断した。

3-4. ジオウ中の糖の HPLC による比較

ジオウに含まれる糖類の量的関係を明らかにするために、HPLC を用いて糖類を分析した。TLC による分析結果を考慮し、stachyose, glucose, fructose, sucrose, raffinose, manninotriose の 6 つの糖について分析した結果、TLC の結果とほぼ同様に、乾ジオウには主として stachyose, sucrose が、熟ジオウには、fructose, glucose 及び manninotriose が認められた (Fig. 3-10)。

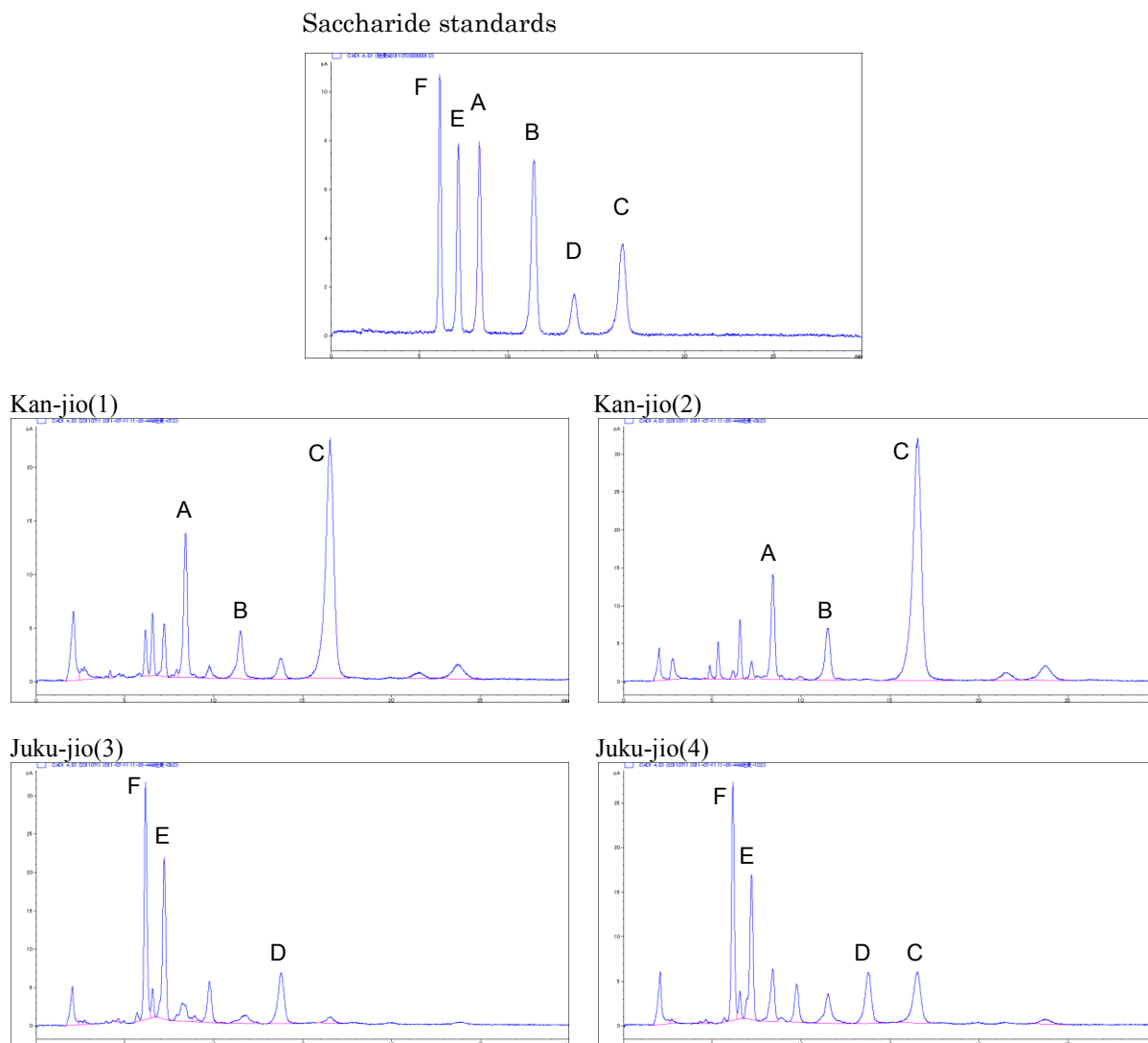


Fig. 3-10 HPLC chromatograms of the saccharide fraction of Rehmannia Root.
A: sucrose; B: raffinose; C: stachyose; D: manninotriose; E: glucose; F: fructose.

さらに、この HPLC 条件にて糖類を定量した結果、乾ジオウでは stachyose が主成分であるのに対し、熟ジオウでは、stachyose の量が減少しており、代わりに manninotriose と fructose の量が増加していた。この結果から、stachyose は、ジオウを加熱乾燥する工程（乾ジオウ）では変化せず、乾燥前に蒸す工程（熟ジオウ）において fructose と manninotriose に分解すると推定された (Fig. 3-11)。

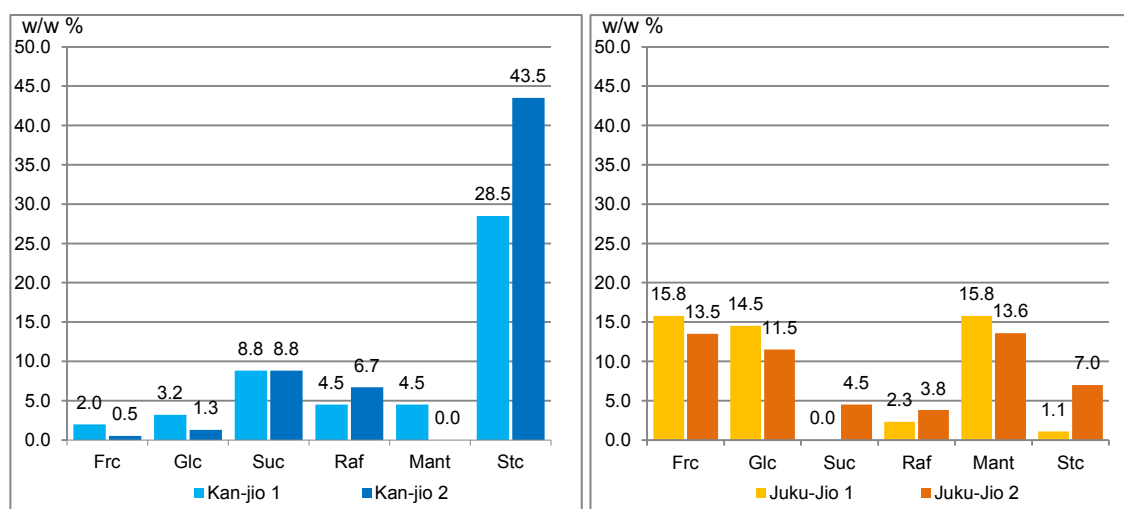


Fig. 3-11 Saccharide contents of Kan-jio and Juku-jio (w/w %).
 Frc: fructose, Glc: glucose, Suc: sucrose, Raf: raffinose, Mant: manninotriose,
 Stc: stachyose.

3-5. ジオウの確認試験の設定

3-3に述べたTLC及び3-4に述べたHPLCによる分析結果より,乾ジオウについてはstachyoseを,熟ジオウについては,fructoseとmanninotrioseを指標とし,次に示す試験方法を設定した.

(i) (乾ジオウ)本品の細切0.5gに水5mLを加えて振り混ぜた後,メタノール20mLを加えて,10分間振り混ぜ,遠心分離し,上澄み液を試料溶液とする.別に薄層クロマトグラフィー用スタキオース2mgを水/メタノール混液(1:1)1mLに溶かして標準溶液とする.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2 μ Lずつ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2-プロパノール/水/メタノール混液(3:2:2)を展開溶媒として約7cm展開した後,薄層板を風乾する.これに1,3-ナフタレンジオ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.また,これを更に5分間以上加熱するとき,上記のスポットのすぐ下に青色のスポットを認めないか,認めてもわずかである(Fig. 3-12-a, b).

(ii) (熟ジオウ)本品の細切0.5gに水5mLを加えて振り混ぜた後,メタノール20mLを加えて,10分間振り混ぜ,遠心分離し,上澄み液を試料溶液とする.別に薄層クロマトグラフィー用果糖2mgを水/メタノール混液(1:1)1mLに溶かして標準溶液(1)とする.また,薄層クロマトグラフィー用マンニトリオース3mgを水/メタノール混液(1:1)1mLに溶かして標準溶液(2)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,標準溶液(1)及び標準溶液(2)2 μ Lずつ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2-プロパノール/水/メタノール混液(3:2:2)を展開溶媒として約7cm展開した後,薄層板を風乾する.これに1,3-ナフタレンジオール試液を均等に噴霧し,105°Cで10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(1)から得たスポットと色調及び R_f 値が等しい.また,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(2)から得た青色のスポットと色調及び R_f 値が等しい(Fig. 3-12-c).

上記の乾ジオウの確認試験では,1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧し,5分間加熱することで,まず黒褐色に発色するstachyoseを標準溶液との比較により確認する.さらに続けて5分間以上加熱することにより,stachyoseのすぐ下に位置するmanninotriose(青色のスポット)が生薬の乾燥工程で生成していないこと,または生成していてもわずかであることを確認する.

一方,熟ジオウの確認試験では,修治によりstachyoseが分解して生成したfructoseと

manninotriose を、それぞれの標準溶液と比較することにより確認する。

これらの成分の確認により、乾ジオウと熟ジオウの区別が可能である。

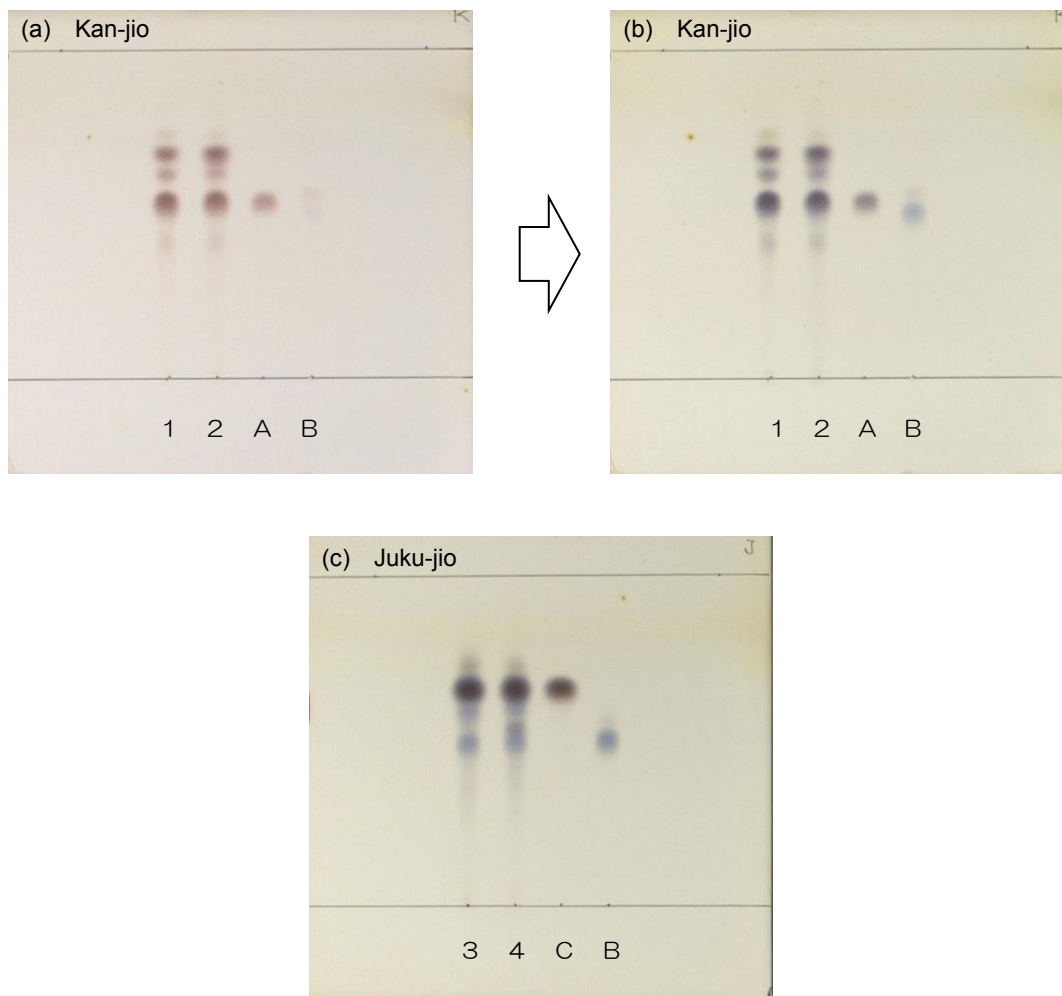


Fig. 3-12 TLC chromatograms of JP identification test of Rehmannia Root
Solvent system; 2-propanol/water/methanol (3:2:2), detection; spraying 1,3-naphthalenediol
TS then heating at 105°C for 5 minutes (a) or 10 minutes (b) and (c).
A: stachyose; B: manninotriose; C: fructose; 1~2: Kan-jio; 3~4: Juku-jio

3-6. 小 括

日局「ジオウ」を乾ジオウと熟ジオウに区分して収載するための確認試験の設定を目標に、糖類に注目し、両者の TLC による含有成分の違いについて検討した結果、乾ジオウでは **stachyose**、熟ジオウでは **fructose** が主スポットとして認められた。さらに熟ジオウにおいては、特徴あるスポットとして **manninotriose** も認められた。これらの結果は HPLC 分析によっても支持された。以上の結果をもとにして乾ジオウ（指標成分 **stachyose**）と熟ジオウ（指標成分 **fructose** と **manninotriose**）の確認試験を設定した。なお、本確認試験は日本薬局方原案審議委員会による審議を経て、第 16 改正日本薬局方第 1 追補から採用されている²⁸⁾。

第4章 タクシャ

タクシャは、日局では「オモダカ科 (*Alismataceae*) のサジオモダカ *Alisma orientale* Juzepczuk の塊茎で、通例、周皮を除いたもの」⁴⁰⁾とされており、「牛車腎気丸」、「五苓散」、「八味地黄丸」、「当帰芍薬散」、「猪苓湯」、「柴苓湯」などの水分代謝を調節する処方に配合されている。現在、市場では福建省を主産地とする“建沢（建沢瀉）”及び四川省を主産地とする“川沢（川沢瀉）”の主として2つに区分され流通している⁴¹⁾。また、“建沢”と類似し江西省で栽培されている“江沢（江沢瀉）”も一部流通している⁴²⁾。一般的に、“川沢”は球形で重く、一方、“建沢”は“川沢”よりもやや大きく楕円状球形で軽いとされている。タクシャの成分としては、トリテルペノイドであるアリソール類、セスキテルペノイドである *alismol* や *alismoxide* などが報告されており⁴³⁾ (Fig. 4-1)，“建沢”よりも“川沢”の方が、成分含量が高い傾向にある⁴⁴⁾。なお、遺伝子や形態の差異から両者を別種とする見解もある⁴⁵⁾。

現在、日局「タクシャ」には確認試験が設定されていないが、「牛車腎気丸エキス」、「柴苓湯エキス」、「当帰芍薬散エキス」及び「八味地黄丸エキス」のタクシャの確認試験として *alisol A* を指標とした試験が設定されている⁴⁶⁾。そこで、タクシャの確認試験を規定するにあたり、処方エキスのタクシャの確認試験を参考にして、タクシャに特異的な成分で、TLC で明瞭に認められ、比較的安定、かつ、試薬として市販されているトリテルペノイドであるアリソール類を指標として検討した。

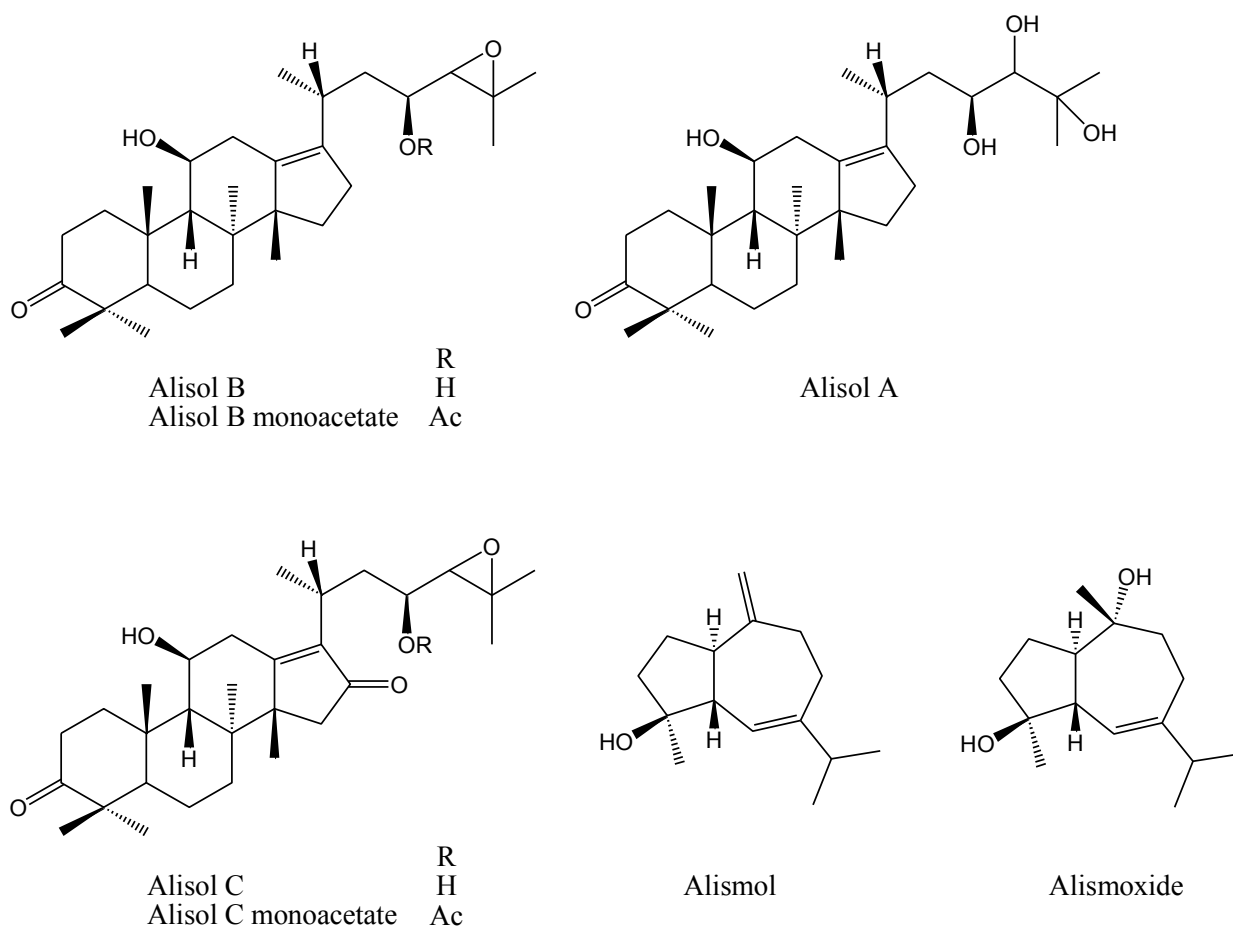


Fig. 4-1 Structure of the main constituents of Alisma Tuber

日局「牛車腎気丸エキス」の確認試験(3) (タクシャ) を以下に示す^{46a)}。

乾燥エキス 2.0 g (軟エキスは 6.0 g) をとり、炭酸ナトリウム試液 10 mL を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜ、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アリソール A 1 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により試験を行う。試料溶液 20 μ L 及び標準溶液 2 μ 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(100)混液 (10 : 10 : 3) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これにバニリン・硫酸試液を均等に噴霧し、105°C で 5 分間加熱した後、放冷するとき、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、標準溶液から得た紫色のスポットと色調及び R_f 値が等しい (タクシャ)。

4-1. タクシャの確認試験に関する検討

4-1-1. タクシャのTLC分析による成分比較

まず、日局「牛車腎気丸エキス」のタクシャの確認試験の条件を用いて、タクシャの市場品 4 ロット (1~4) 及びタクシャの主要成分 6 種の TLC を検討した。各主要成分の R_f 値を Table 4-1 に示す。紫外線照射 (主波長 254 nm) ではエノン構造を持つ alisol C 及び C monoacetate のみが検出できるが、これらのスポットが明瞭に検出できない市場品があった (Fig. 4-2a)。一方、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液による検出 (Fig. 4-2b) では, alisol A, B 及び B monoacetate のスポットが比較的明瞭に検出できたことから、これらを指標として検討した。

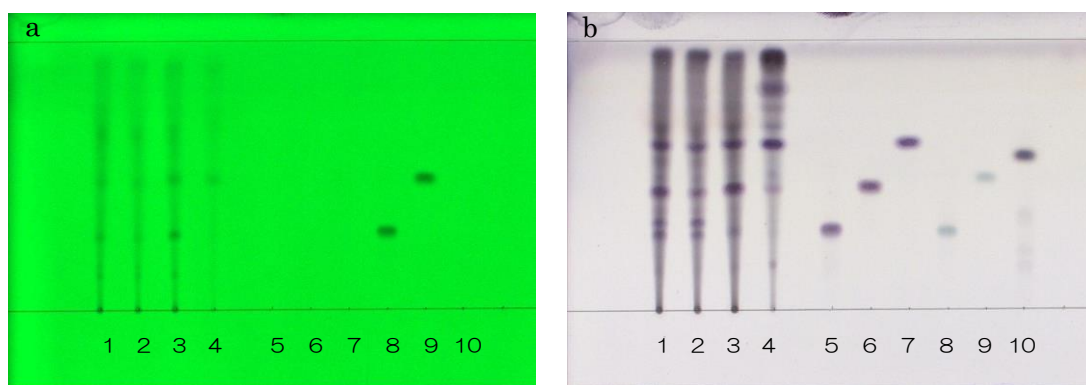


Fig. 4-2 TLC comparison of the main constituents of Alisma Tuber
Solvent system; ethyl acetate /hexane/glacial acetic acid (10:10:3), detection;
a) UV 254 nm, b) spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C.
1~4 : Alisma Tuber, 5: alisol A, 6: alisol B, 7: alisol B monoacetate, 8: alisol C, 9: alisol C monoacetate, 10: alismoxide

Table 4-1 R_f value of the main constituents of Alisma Tuber

Compound	R_f value
Alisol A	0.30
Alisol B	0.45
Alisol B monoacetate	0.63
Alisol C	0.29
Alisol C monoacetate	0.50
Alismoxide	0.58

4-1-2. 抽出溶媒の検討

処方エキスのタクシャの確認試験では、炭酸ナトリウム試液とジエチルエーテルによる分配抽出が行われている。そこで、メタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、1-ブタノール/水 (1:1)、酢酸エチル/水 (1:1)、炭酸ナトリウム試液/ジエチルエーテル (1:1) を抽出溶媒として用い、TLCパターンを比較した。タクシャの粉末1.0 gをそれぞれの溶媒10 mL (二種類の溶媒の場合はそれぞれ10 mL) で振とう抽出して試料溶液とし、その液5 μ LにつきTLCにより分析した。その結果、いずれの溶媒においてもalisol B及びB monoacetateのスポットは明瞭に確認可能であった。なお、alisol Aについても明瞭ではないがわずかに認められた (Fig. 4-3)。検討した抽出溶媒の中では、ジエチルエーテルで抽出した場合のスポット形状が最も良く、処方エキスで用いられている炭酸ナトリウム試液/ジエチルエーテル (1:1) については、ジエチルエーテルのみで抽出した場合と変わらなかったことから、炭酸ナトリウム試液はタクシャの試料溶液の調製に影響が少ないと判断し、ジエチルエーテルのみで抽出することとした。

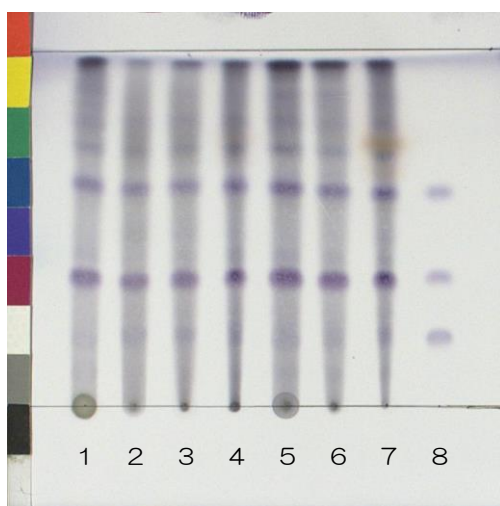


Fig. 4-3 TLC comparison of the solvents for extraction
Solvent system; ethyl acetate/hexane/glacial acetic acid (10:10:3), detection;
spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C.
1: methanol, 2: acetone, 3: ethylacetate, 4: diethylether, 5: 1-buthanol/water (1:1),
6: ethylacetate/water (1:1), 7: sodium carbonate TS/diethylether (1:1), 8: alisol A,
alisol B and alisol B monoacetate mixture solution (alisol mixture solution)

4-1-3. スポット量の検討

処方エキスにおいては、試料溶液のスポット量は20 μL とされている。そこで、タクシャの粉末1.0 gをジエチルエーテル10 mLで抽出した試料溶液を用い、スポット量 0.5 μL ~20 μL で検討した結果、5 μL 量のスポットで十分alisol類の確認が可能であった (Fig. 4-4)。

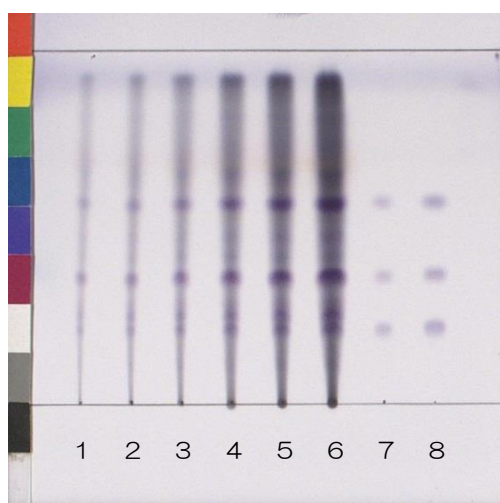


Fig. 4-4 Comparison of spot volume

Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.

1: 0.5 μL , 2: 1 μL , 3: 2 μL , 4: 5 μL , 5: 10 μL , 6: 20 μL , 7: alisol mixture solution (1 μL), 8: alisol mixture solution (2 μL)

4-1-4. 展開距離の検討

1-ブタノール/水/酢酸を含む展開溶媒を用いるとTLCの展開に長時間が必要で、10 cm展開するのに120~130分を要するが、展開距離を30%短縮して7 cmにすると展開に要する時間を70分程度に短縮(約45%短縮)できることが報告されている⁴⁷⁾。日局の生薬の確認試験では、TLC分析における展開距離として10 cmが用いられてきたが、試験の効率化の観点から、試験に支障がない場合は、溶媒系にかかわらず展開距離が7 cmへと変更されている。そこで、展開距離10 cmと7 cmを比較した結果、7 cmの展開でもalisol類のスポットは問題なく確認可能であった (Fig. 4-5)。

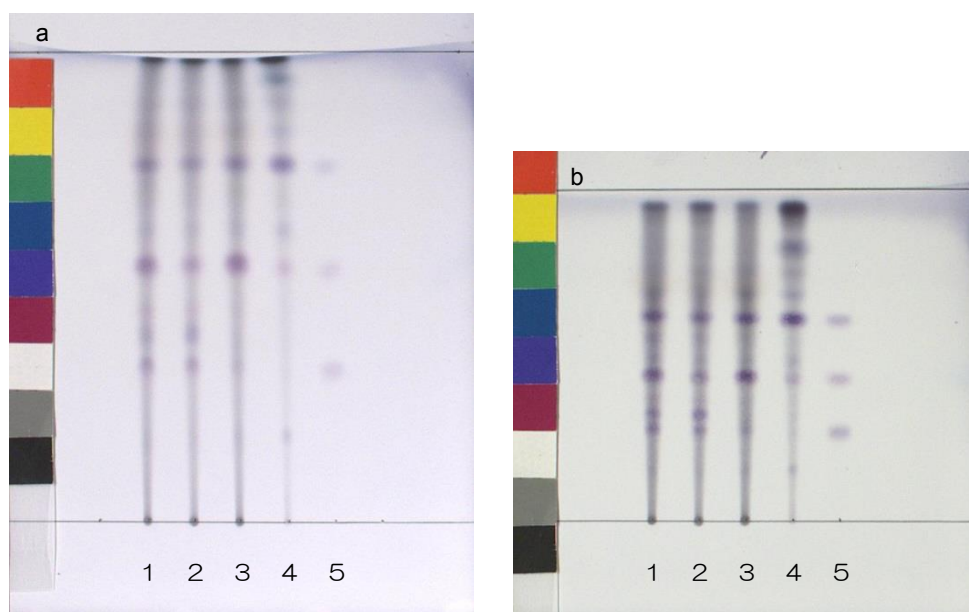


Fig. 4-5 Comparison of the development distance
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3, development distance:
a) 10cm, b) 7cm.
1~4: Alisma Tuber, 5: alisol mixture solution

4-1-5. 検出試液の検討

処方エキスの確認試験にはバニリン・硫酸試液⁴⁸⁾が用いられているが、この試液は、硫酸濃度が高く、粘性が高いことから、試験実施者の安全性も考慮し、より噴霧に適した噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液²⁵⁾ への変更を検討した。Fig. 4-6に示すように、硫酸濃度の低い噴霧用に調製された試液でもアリソール類のスポットは確認可能であったことから、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を用いるのが適切と考えられる。

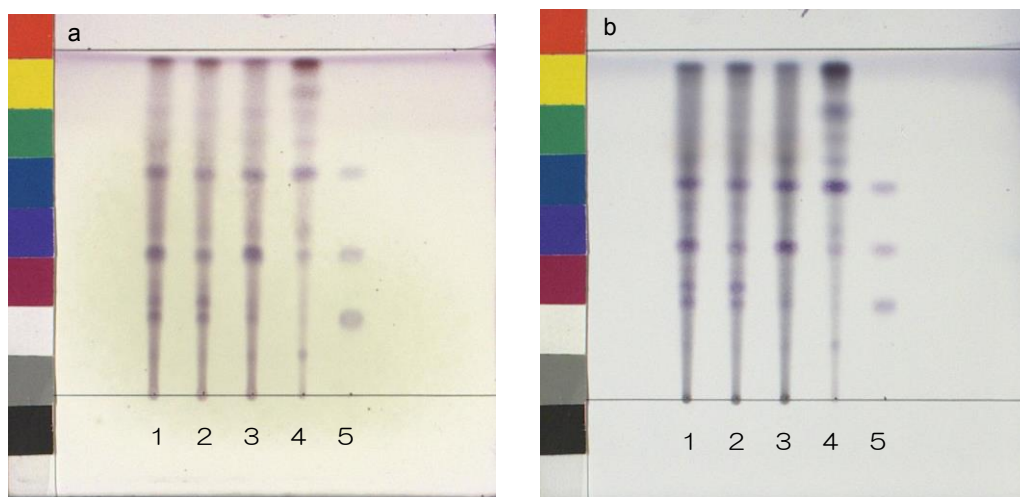


Fig. 4-6 Comparison of the detection
Solvent system is the same as in Fig. 4-3, detection; a) spraying vanillin-sulfuric acid TS then heating at 105°C, b) spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C.
1~4: Alisma Tuber 5: alisol mixture solution

4-1-6. 展開溶媒の検討

展開溶媒については、目的となるアリソール類が明確に確認可能であるため、処方エキスの展開溶媒をそのまま用いることとした。

4-2. タクシャの市場流通品による検討

前項で設定した条件を用い、タクシャの市場流通品 35 ロット (Table 4-2) の TLC パターンを比較した。市場流通品のタクシャは中国のさまざまな地域で広く栽培されており、Fig. 4-7 に示すように alisol 類の含有パターンが多様で、川沢、建沢の 2 群に収束しないことが判明した。Alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate の 3 成分を各ロットで比較すると、alisol B monoacetate は多くのロットに含まれていた。しかし、7~10 の様に含量が少ない場合は、同じ R_f 値にある成分のスポットと見分けがつかない場合があった。Alisol B 及び alisol A に関しては、検出できないロットがあった。しかし、いずれのロットにおいても、3 成分のうち一種類以上のスポットが確認可能であった。

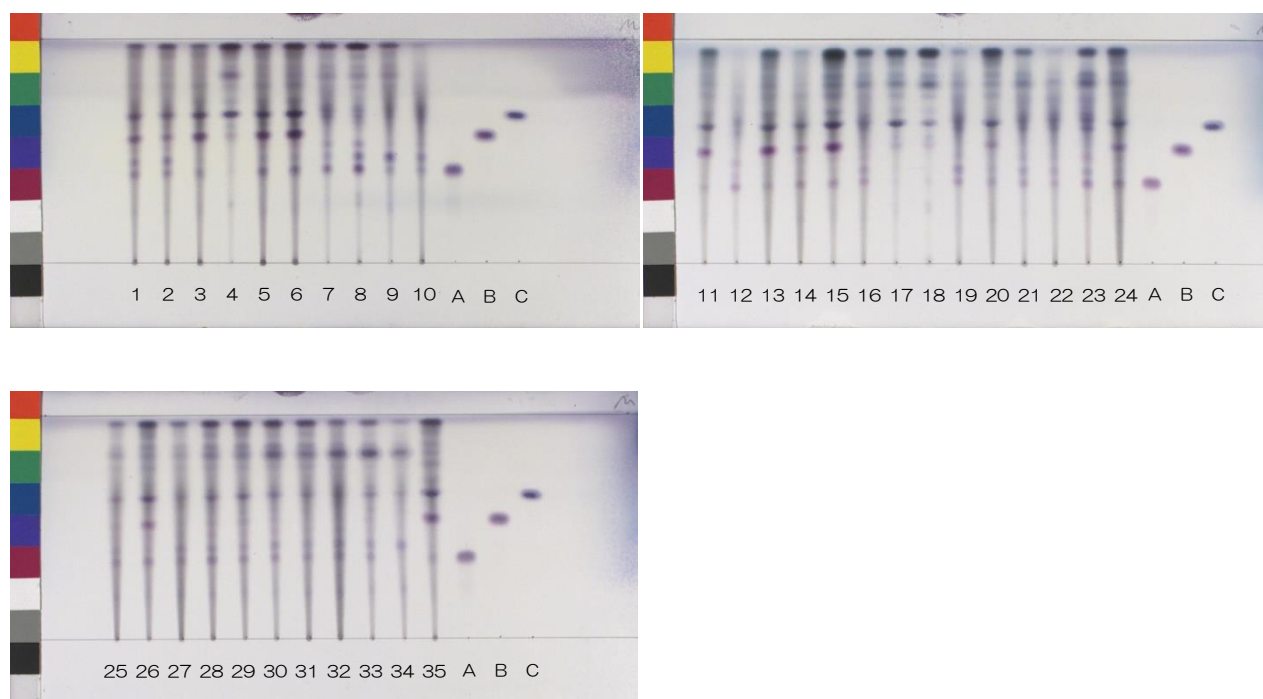


Fig. 4-7 TLC comparison of various samples of Alisma Tuber
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.
1~35: Alisma Tuber, A: alisol A, B: alisol B, C: alisol B monoacetate

Table 4-2 List of Alisma Tuber

TLC No.	Locality	TLC No.	Locality	TLC No.	Locality
1	Hubei 湖北	13	Sichuan 四川	25	Sichuan 四川
2	Sichuan 四川	14	Fujian 福建	26	Sichuan 四川
3	Sichuan 四川	15	Sichuan 四川	27	Sichuan 四川
4	China 中国	16	Guangdong 広東	28	Sichuan 四川
5	Sichuan 四川	17	Jiangxi 江西	29	Sichuan 四川
6	Sichuan 四川	18	Jiangxi 江西	30	Sichuan 四川
7	Guangxi 広西	19	Guangdong 広東	31	Sichuan 四川
8	Guangxi 広西	20	Sichuan 四川	32	Sichuan 四川
9	Guangdong 広東	21	Guangdong 広東	33	Sichuan 四川
10	Guangdong 広東	22	Guangdong 広東	34	Fujian 福建
11	Hebei 河北	23	Guangdong 広東	35	Sichuan 四川
12	China 中国	24	Sichuan 四川		

このように alisol 類を指標とした場合、生薬のロット間の TLC パターンがさまざまであり、単一の成分による設定は困難であると判断し、alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate の三種類の指標成分のうち、最低一種類のスポットを確認する方法として、以下の試験方法を提案した。

なお、本確認試験の標準溶液としては、alisol 類三種の混合溶液（タクシャトリテルペン混合試液）を用いることとした。

本確認試験は、日本薬局方原案審議委員会の審議を経て、第 17 改正日本薬局方から採用される予定である。

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により試験を行う。試料溶液 5 μ L 及び標準溶液 1 μ 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(100)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。

タクシャトリテルペン混合試液、確認試験用 薄層クロマトグラフィー用 alisol A 1 mg, alisol B 1 mg 及び alisol B monoacetate 1 mg をメタノール 5 mL に溶かす。

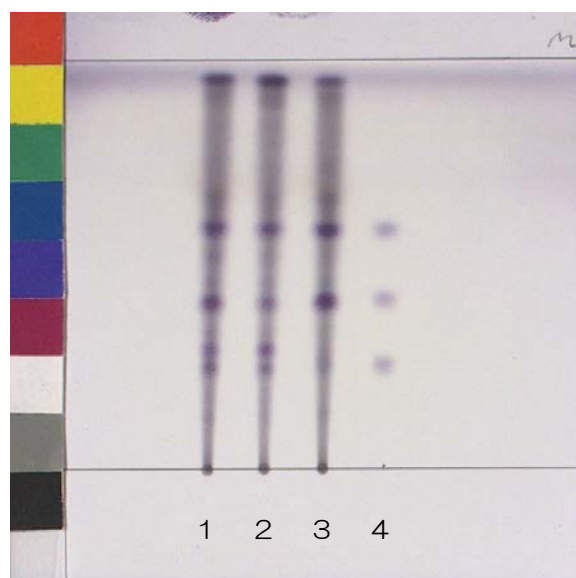


Fig. 4-8 TLC chromatograms of identification test of Alisma Tuber
Solvent system: ethyl acetate/hexane/glacial acetic acid (10:10:3), detection:
spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C.
1~3: Alisma Tuber, 4: alisol A, alisol B and alisol B monoacetate mixture solution
(alisol mixture solution)

4-3. タクシャの確認試験の改良

前節で alisol 類三種を指標成分として用いるタクシャの確認試験を設定したが、一般的には一種の化合物のみを用いた確認が望ましい。そこで、alisol 類の構造に着目し、簡単な前処理により一種類の化合物に集束させる方法を検討した。

Alisol B 及びその monoacetate は、側鎖末端にエポキシ基を有しており、酢酸によるエポキシ環の開裂により alisol A 及びその monoacetate へ変換できると報告されている⁴⁹⁾。そこで、その方法を参考に分析に適した方法を検討した (Fig. 4-9)。

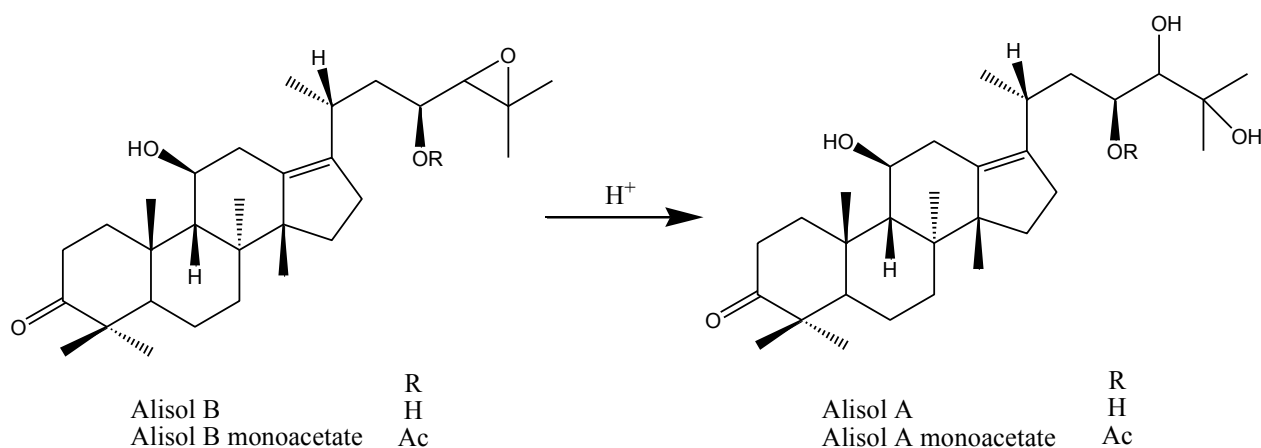


Fig. 4-9

4-3-1. 酢酸の濃度に関する検討

タクシャを酢酸で処理する際の酢酸濃度を検討した。タクシャの粉末に 100%, 80%, 50%, 20%, 10%の酢酸溶液及びコントロールとして水を加え、沸騰水浴上（約 100°C）で 60 分間還流した後、水及びジエチルエーテルを加えて振り混ぜ、ジエチルエーテル層を TLC で分析した。その結果、20%以上の酢酸溶液で alisol B 及び alisol B monoacetate のスポットは減少または消失し、alisol A 及びその上のスポットが増加していた (Fig. 4-10)。

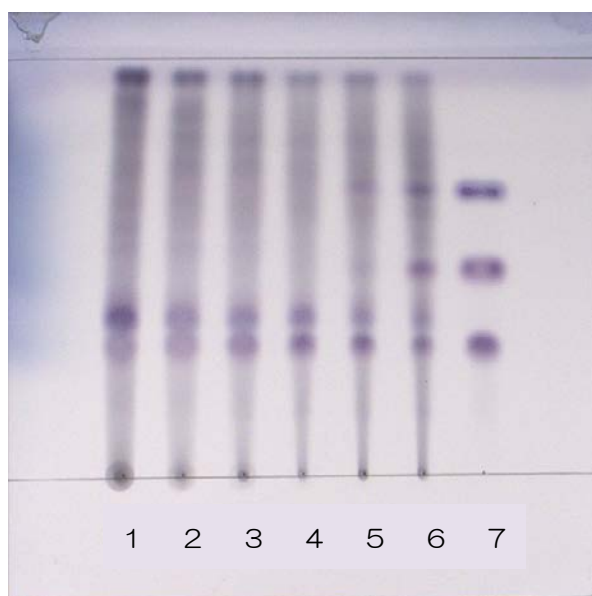


Fig. 4-10 TLC comparison of hydrolysis for acetic acid
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.
1: Glacial acetic acid (100%), 2: 80% acetic acid, 3: 50% acetic acid,
4: 20% acetic acid, 5: 10% acetic acid, 6: water, 7: alisol mixture solution

4-3-2. タクシャ9ロットによる検討

(i) 酢酸による酸処理

前項の検討結果から、20%酢酸溶液を用いてエポキシ環の開環反応を試みた。異なる alisol 類のパターンを示すタクシャ9ロットの粉末を、20%酢酸溶液中で1時間還流した。その結果、いずれのロットにおいても、alisol B 及び alisol B monoacetate のスポットが消失し、alisol A 及びその上の同様な色調のスポット (alisol A monoacetate) へ変化した (Fig. 4-11)。

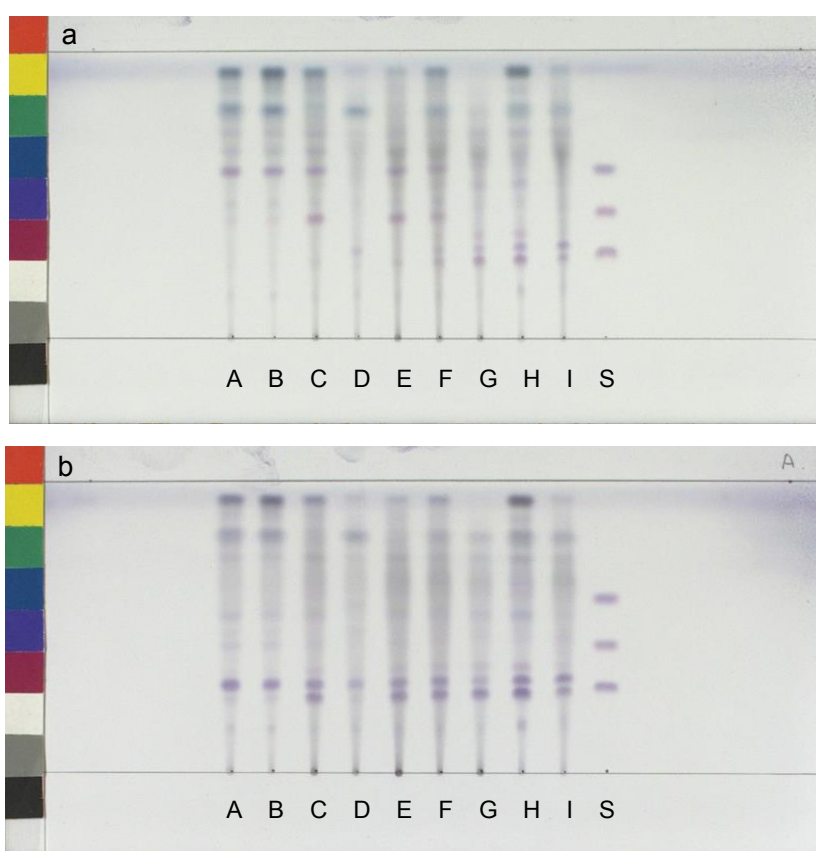


Fig. 4-11 TLC comparison of Alisma Tuber (a) and acid treated Alisma Tuber (b)
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.
A: Alisma Tuber (jiangxi, 17), B: Alisma Tuber (China, 4), C: Alisma Tuber (Sichuan, 35),
D: Alisma Tuber (Fujian, 34), E: Alisma Tuber (Sichuan, 3), F: Alisma Tuber (Hobei, 1),
G: Alisma Tuber (China, 12), H: Alisma Tuber (Guangxi, 8), I: Alisma Tuber (Guangdong, 9),
S: alisol mixture solution

(ii) 酸処理後のアルカリ処理

さらに前項(i)のタクシャ 9 ロットについて、20%酢酸で加水分解後、アルカリ処理により脱アセチル化した(Fig. 4-12). この方法で alisol 類を alisol A に集束させることができた(Fig. 4-13).

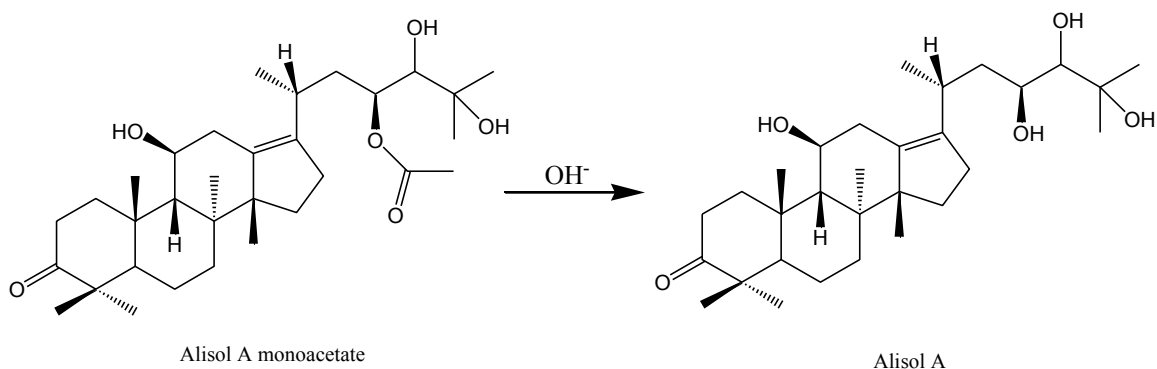


Fig. 4-12

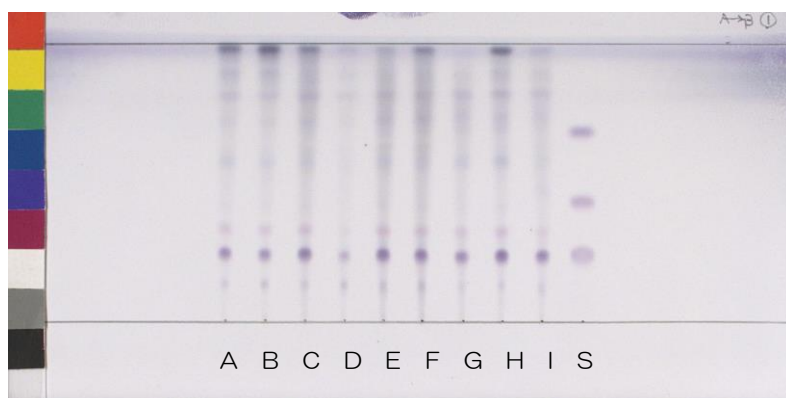


Fig. 4-13 TLC of acid and base treated Alisma Tuber
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-2.
Samples are the same as in Fig. 4-11.

(iii) タクシャ中に含まれる alisol 類の完全抽出の確認

前項(ii)の検討において、いずれのパターンを示したタクシャにおいても、検出スポットを alisol A に集束することが可能であった。そこで、生薬中の alisol 類の含量を簡便に推算可能であるか検討した。まず、前項(ii)のジエチルエーテル抽出後の水層を用い、 alisol 類が完全にジエチルエーテルで抽出されているか確認した。2回目の抽出において、わずかに alisol A のスポットが確認されたが、3回目の抽出では alisol A のスポットは認められなかった (Fig. 4-14)。これらの結果より、抽出操作はジエチルエーテルで2回行うことに決めた。

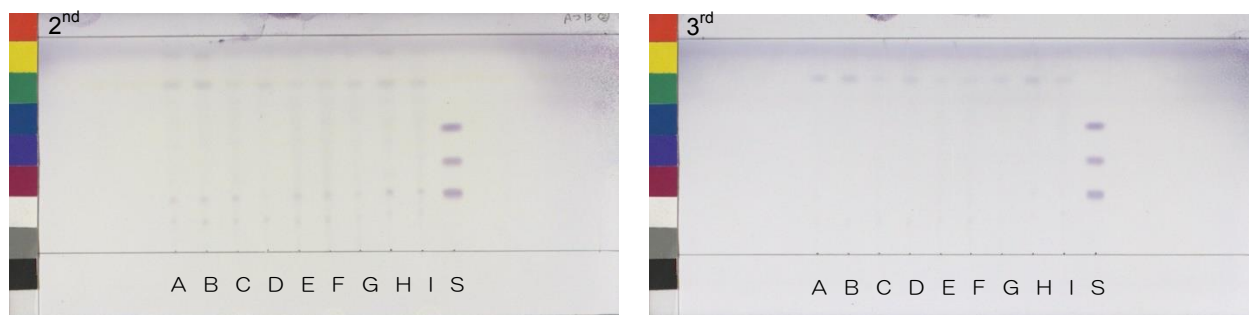


Fig. 4-14 TLC comparison of diethylether extract (2 and 3 times) of treated Alisma Tuber
Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.
Spots are the same as in Fig. 4-11.

(iv) タクシャ中に含まれる alisol 類の含量測定

次に、酸及びアルカリ処理したタクシャのジエチルエーテル抽出液 2 回分を合わせて、溶媒を留去した後、メタノールを正確に 2 mL 加えて試料溶液とした。別に標準溶液として 0.01 mg/mL ~1 mg/mL の alisol A のメタノール溶液を調製し、同量スポット (1 μ L) して、スポットの大きさと色の濃さを比較することとした。その結果、タクシャ 9 ロット (0.2 g) から得られた alisol A のスポットは、 alisol A の標準溶液の 0.1 mg/mL ~0.5 mg/mL のスポットとほぼ同等の大きさ及び濃さであった (Fig. 4-15)。この結果より、生薬中の alisol 類含量は約 0.1 ~0.5% と考えられる。

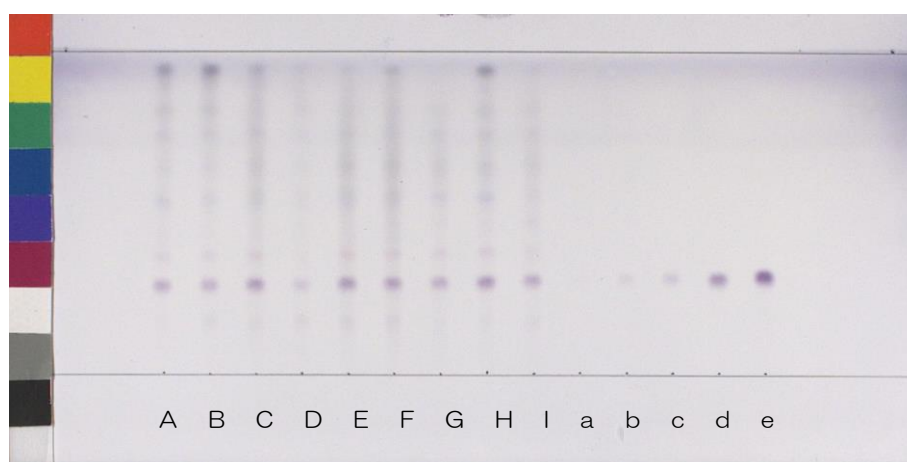


Fig. 4-15 TLC comparison of contents of alisols

Solvent system and detection are the same as in Fig. 4-3.

A: Alisma Tuber (jiangxi, 17), B: Alisma Tuber (China, 4), C: Alisma Tuber (Sichuan, 35), D: Alisma Tuber (Fujian, 34), E: Alisma Tuber (Sichuan, 3), F: Alisma Tuber (Hobei, 1), G: Alisma Tuber (China, 12), H: Alisma Tuber (Guangxi, 8), I: Alisma Tuber (Guangdong, 9), a: alisol A solution 5 (0.01 mg/mL), b: alisol A solution 4 (0.05 mg/mL), c: alisol A solution 3 (0.1 mg/mL), d: alisol A solution 2 (0.5 mg/mL), e: alisol A solution 1 (1 mg/mL),

4-4. 小 括

生薬「タクシャ」には確認試験は設定されておらず、タクシャを配合してある牛車腎気丸エキスなどに、**alisol A** を指標とした試験方法が設定されている。そこで、処方エキスの試験方法を参考にして、タクシャの確認試験を検討した。市場流通品のタクシャは産地の違い等により、多様な TLC パターンを示し、指標候補の **alisol** 類三種類 (**alisol A**, **alisol B** 及び **alisol B monoacetate**) の中のどれか一種類の化合物のみを指標とすると、指標成分を検出できない (確認試験不適) 場合があり、単一成分での確認試験の設定は困難と判断した。そこで、**alisol** 類三種類の混合溶液を用い、それらのスポットのうち、一種類以上のスポットを確認する方法を設定した。本確認試験は日本薬局方原案審議委員会の審議を経て、第 17 改正日本薬局方から採用される予定である。

さらに、タクシャの粉末を、酸及びアルカリで処理することにより、さまざまな TLC パターンを示すタクシャの **alisol** 類を **alisol A** を集束させ、単一成分で確認することを可能にした。この方法を用いてタクシャ中の **alisol** 類の含量を簡便に推算すると、市場品中の **alisol** 類の含量は約 0.1~0.5%であった。

現在、構成生薬としてタクシャを含む五苓散エキスの日局への収載が検討されており、五苓散の構成生薬で配合量も多く、薬効に深く関与しているタクシャの成分の定量が検討されている。現在の処方エキスの成分定量法としては UV 吸収による HPLC 分析が主流であるが、タクシャには UV 吸収を持つ成分はほとんどなく、HPLC 定量法の設定は困難である。本研究で検討した生薬の前処理による **alisol A** への集束方法を応用すれば、タクシャ中の **alisol** 類の含量を TLC で簡便に推算することが可能であることから、五苓散エキスにおいても、タクシャに由来する **alisol** 類の含量を大まかに見積もることが可能と考えられる。

第5章 レンギョウ

レンギョウは、「神農本草経」の下品に収載されており、モクセイ科 (*Oleaceae*) レンギョウ *Forsythia suspensa* Vahl またはシナレンギョウ *F. viridissima* Lindl. の成熟果実を乾燥したものである。一般に前者を用い、まれに後者が混入するとされているが⁵⁰⁾、近年の市場流通の調査の結果、後者は流通していないことがわかり、第17改正日本薬局方ではシナレンギョウは、生薬レンギョウの基原植物から削除されることになっている。レンギョウは「十味敗毒湯」, 「荊芥連翹湯」, 「防風通聖散」などに配合されており、その成分としては、トリテルペノイド (betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid)⁵¹⁾、リグナン及びその配糖体 (phillygenin, (+)-pinoresinol, phillyrin, arctiin, (+)-pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside)^{51~55)}、フラボノイド (rutin)⁵¹⁾、フェネチルアルコール配糖体 (forsythiaside, suspensaside, acteoside)^{55~59)}、環状アルコール (rengyol)^{59~61)} などが報告されている。現在、日局「レンギョウ」の確認試験としては、トリテルペノイドの一般的な確認方法である Liebermann-Burchard 反応と、フラボノイドの確認反応である塩酸-マグネシウム反応が規定されている⁶²⁾。しかしながら、いずれの確認試験も化合物群の呈色反応であることから、レンギョウに特徴的な単一化合物で確認する方法を設定することが望ましい。

上記のトリテルペノイド類、リグナン類、フラボノイド類、フェネチルアルコール類は、いずれも植物界に広く含まれる成分であり、レンギョウの確認試験の指標成分としては、いずれも特異性に乏しい化合物である。一方、環状アルコールである rengyol は、他の植物から数例報告^{63~65)}があるが、それらの植物の花や枝などから単離されており、レンギョウで用いる果実とは部位が異なることから、生薬レンギョウに特徴的な成分であると判断した。

まず、レンギョウの確認試験の指標成分として検討するため、生薬レンギョウより rengyol (13) の単離を試みた。Rengyol の単離と同時に近接の2つの成分についても単離した結果、リグナン配糖体である pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside (14)、phillyrin (15) であった (Fig. 5-1)。この2つの成分は、既にレンギョウから単離されている成分である^{53, 54)}。

今回、単離した rengyol について TLC の噴霧試液の検討した結果、特徴的な発色を呈した 4-

メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液による，レンギョウの確認試験を設定した．

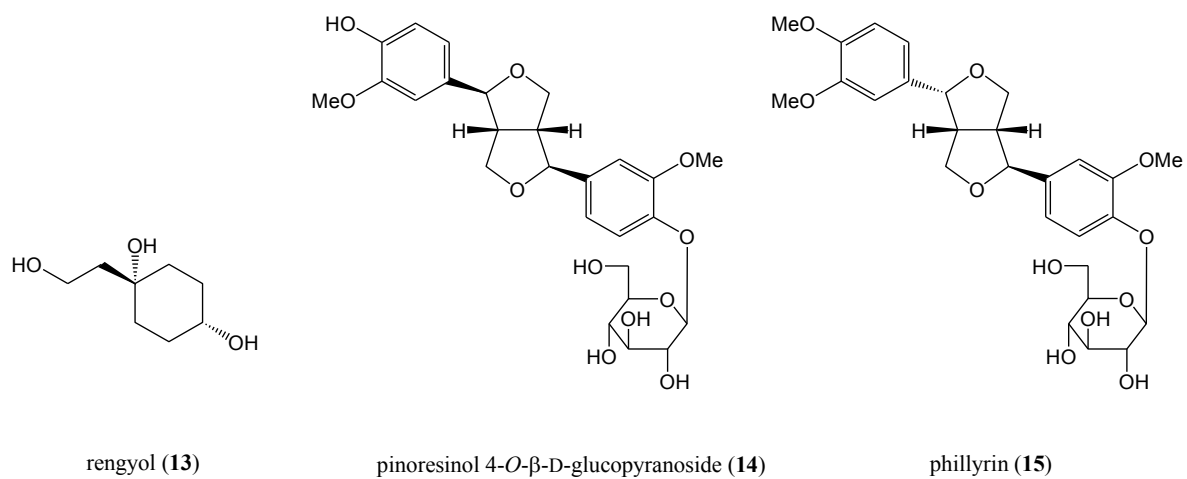


Fig. 5-1

5-1. レンギョウのTLC分析による成分比較

レンギョウの成分研究^{59~61)}において、rengyolの単離にジクロロメタンやクロロホルム系溶媒が多用されていたことから、クロロホルム/メタノール/水混液 (70 : 30 : 6) を用いて、市場流通品のレンギョウ3ロットのメタノール抽出液を分析した。展開後の発色については、希硫酸噴霧後、加熱したところ、0.4付近に黄褐色を呈するスポットE、 R_f 値0.45付近に褐色を呈するスポットF及び0.45付近に褐色を呈するスポットGを認めた (Fig.5-2)。これらのスポットについて単離した。

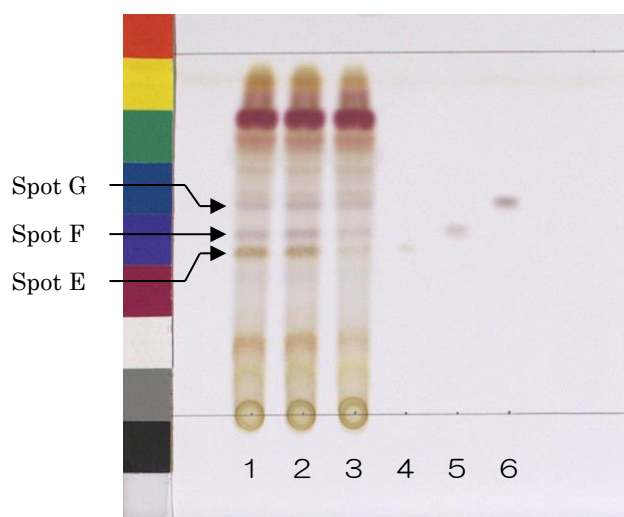


Fig. 5-2 TLC comparison of Forsythia Fruit

Solvent system; chloroform/methanol/water (70:30:6), detection; spraying dilute sulfuric acid then heating at 105°C.

1~3: Forsythia Fruit, 4: rengyol, 5: pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyraoside, 6: phillyrin

5-2. スポット E~G (化合物 13~15) に関する検討

5-2-1. スポット E~G (化合物 13~15) の単離

レンギョウのメタノール抽出エキスをシリカゲルカラムに付し、クロロホルム/メタノール混液で順次溶出し、スポット E を含むフラクションを集め、さらにシリカゲルカラムで繰り返し精製した後、さらに ODS 逆相系 HPLC を用いて分取し、化合物 13 (スポット E) 及び 14 (スポット F) を、各々単一成分として得た。また、シリカゲルカラムでこれらの化合物より早く溶出したフラクションも、ODS 逆相系 HPLC を用いて分取し、化合物 15 (スポット G) を得た。

5-2-2. スポット E (化合物 13) の構造

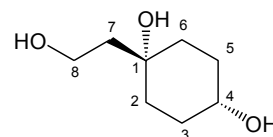
化合物 13 は白色の粉末として得られた。 ^1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトル (Table 5-1) より、1つのオキシメチン [δ_{H} 3.52 (1H, tt, $J=10.0, 4.5$ Hz, H-4) and δ_{C} 70.8 (d, C-4)], 2組のメチレン [δ_{H} 1.68 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-7) and δ_{C} 45.6 (t, C-7), δ_{H} 3.73 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-8) and δ_{C} 59.2 (t, C-8)], 1つの酸素に結合した4級炭素 [δ_{C} 70.8 (s, C-1)]の存在が認められた。 ^{13}C NMR スペクトルにおいて8本のシグナル [C \times 1, CH \times 1, CH₂ \times 6]が認められ、HR ESI MS [m/z 543.1830 (calcd for C₂₆H₃₂O₁₁Na, 543.1837)]の結果とあわせ、その分子式を C₈H₁₆O₃ と決定した。さらにこれらのスペクトルデータを文献値⁶⁶⁾と比較し、化合物 13 を renyol と同定した (Table 5-1)。

Table 5-1 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for renyol(13)
(methanol-*d*₄, TMS as int. standard)

position	13 ^a		renyol ^{b 66)}		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	
1	-	70.8 (C)	-	70.76	
2	1.41	td (13.4, 4.5)	1.37-1.43	m	36.04
	1.60-1.73		1.60-1.73		
3	1.60-1.73	31.3 (CH ₂)	1.60-1.73	m	31.28
4	3.52	70.8 (CH)	3.52	tt (9.9, 4.4)	70.76
5	1.60-1.73	31.3 (CH ₂)	1.60-1.73	m	31.28
	1.41		1.37-1.43		
6	1.60-1.73	36.1 (CH ₂)	1.60-1.73	m	36.04
	1.41		1.37-1.43		
7	1.68	45.6 (CH ₂)	1.68	t (7.2)	45.57
8	3.72	59.2 (CH ₂)	3.73	t (7.2)	59.15

^a ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

^b ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 500 MHz and 125 MHz, respectively.



renyol (13)

5-2-3. スポット F (化合物 14) の構造

化合物 14 は白色の粉末として得られた。 ^1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトル (Fig 5-2) より、1 つのアノメリック [δ_{H} 4.90 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'') and δ_{C} 102.7 (C-1'')], 2 つの三置換ベンゼン環 [δ_{H} 7.04 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2) and δ_{C} 110.5 (C-2), δ_{H} 7.13 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5) and δ_{C} 115.5 (C-5), δ_{H} 6.89 (1H, dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, H-6) and δ_{C} 119.1 (C-6), δ_{C} 134.1 (C-1), δ_{C} 146.8 (C-3) and δ_{C} 150.8 (C-4), δ_{H} 6.99 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2') and δ_{C} 111.5 (C-2'), δ_{H} 6.79 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5') and δ_{C} 117.9 (C-5'), δ_{H} 6.84 (1H, dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, H-6') and δ_{C} 119.6 (C-6'), δ_{C} 137.6 (C-1'), δ_{C} 148.3 (C-3') and δ_{C} 147.2 (C-4')]及び 2 つのメトキシ基 [δ_{H} 3.84 (3H, s) and δ_{C} 56.4 (OMe), δ_{H} 3.84 (3H, s) and δ_{C} 56.2 (OMe)]の存在が明らかとなった。さらに HR ESI MS より、分子式は $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$ [m/z : 543.1830 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}\text{Na}$, 543.1837)]であった。これらの結果から、化合物 14 をリグナンの配糖体と推定した。更にスペクトルデータを文献値⁶⁷⁾と比較した結果、化合物 14 を pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside と同定した (Table 5-2, 3)。

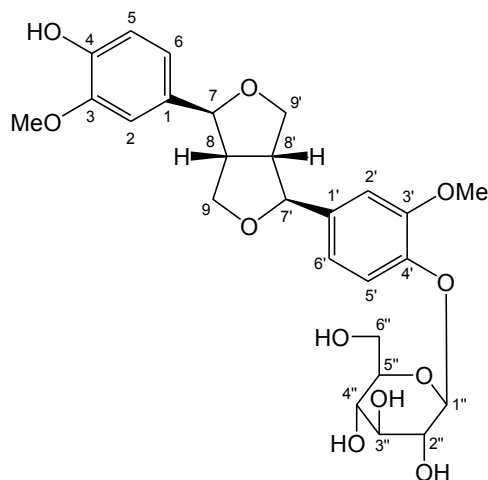
Table 5-2 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for **14** and (+)-pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside (methanol- d_4 , TMS as int. standard)

No.	14		(+)-pinoresinol glc. ⁶⁷⁾
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C} (type)	δ_{C}
1	-	137.5 (C)	137.7
2	7.03 d (2.1)	110.9 (CH)	111.9
3	-	151.0 (C)	151.2
4	-	147.5 (C)	147.6
5	7.15 d (8.3)	118.0 (CH)	118.3
6	6.92 dd (8.3, 2.1)	119.8 (CH)	119.9
7	4.76 d (4.1) *	87.1 (CH)	87.2
8	3.12 - 3.15 m	55.5 (CH)	55.6
9	3.85 - 3.88 m	72.7 (CH ₂)	72.8
	4.22 - 4.27 m		
1'	-	133.6 (C)	133.9
2'	6.95 d (2.1)	111.6 (CH)	111.2
3'	-	149.2 (C)	149.2
4'	-	147.5 (C)	147.6
5'	6.77 d (8.2)	116.1 (CH)	116.2
6'	6.81 brdd (8.2, 2.1)	120.1 (CH)	120.1
7'	4.71 d (4.5)*	87.5 (CH)	87.6
8'	3.12 - 3.15 m	55.3 (CH)	55.4
9'	3.85 - 3.88 m	72.7 (CH ₂)	72.8
	4.22 - 4.27 m		
1''	4.87 **	102.8 (CH)	103.1
2''	} 3.44 - 3.51 m	74.9 (CH)	75.0
3''		78.2 (CH)	78.3
4''		71.3 (CH)	71.5
5''		77.8 (CH)	78.0
6''		3.68 m	62.5 (CH ₂)
	3.85 - 3.88 m		
3-OMe	3.85 s	56.7 (CH ₃)	56.9
3'-OMe	3.87 s	56.3 (CH ₃)	56.6

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 600 MHz and 150 MHz, respectively.

* may be interchanged.

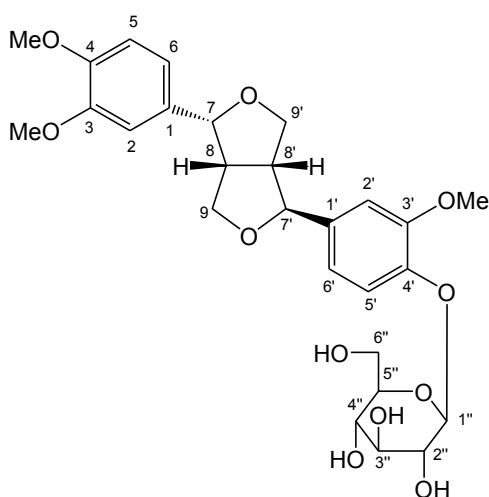
** was overlapped with H₂O.



pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**)

5-2-4. スポット G (化合物 15) の構造

化合物 **15** は ESI MS において m/z 557 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを与え、これは化合物 **14** より 14 マスユニット大きい値であった。分子量は HR ESI MS から $C_{27}H_{34}O_{11}$ [m/z 557.1998 (calcd for $C_{27}H_{34}O_{11}Na$, 557.1993)] であり、 1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトルにおいて、3つのメトキシ基 [δ_H 3.87 (3H, s, OMe), δ_H 3.84 (3H, s, OMe), δ_H 3.83 (3H, s, OMe) and δ_C 56.7 (q), δ_C 56.5 (q), δ_C 56.4 (q)] の存在が明らかとなった。これらの結果より、化合物 **14** より1つメトキシ基が多いリグナン配糖体であると推定した。さらに 1H NMR 及び ^{13}C NMR スペクトルを市販の phillyrin のスペクトルデータと直接比較し、phillyrin と同定した。



phillyrin (**15**)

5-3. レンギョウの確認試験に関する検討

化合物 **13** (rengyol, スポット E) を指標成分とし、レンギョウの確認試験を検討した。

5-3-1. 抽出溶媒の検討

レンギョウの試料溶液の調製に用いる溶媒として、メタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル、アセトンの4溶媒を検討した。レンギョウの粉末1gを各溶媒10mLで抽出し、その10 μ Lについて、クロロホルム/メタノール/水混液(70:30:6)を展開溶媒として、約7cm展開し、希硫酸噴霧後、加熱してスポットを検出した。メタノール以外の溶媒からは、目的とした rengyol (**13**) がほとんど見出せなかったため、抽出溶媒はメタノールとした (Fig. 5-3)。

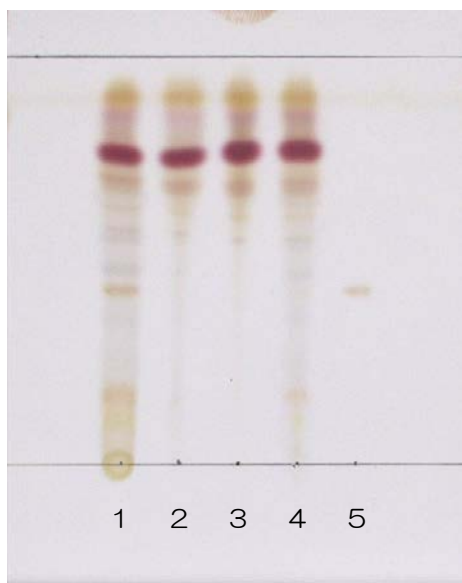


Fig. 5-3 Comparison of extraction solvent
Solvent system; chloroform/methanol/water (70:30:6),
detection; spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for
spraying then heating at 105°C
1: methanol ext., 2: ethylacetate ext., 3: diethylether ext.,
4: acetone ext. 5: rengyol (1mg/mL, methanol)

5-3-2. 検出試液の検討

Rengyol (13)のスポットは、希硫酸を噴霧し加熱する検出方法では不明瞭であり、感度が不十分と判断した。そこで、レンギョウのメタノール抽出液 (1 g/10 mL) を用いて、rengyolが明瞭なスポットとして確認可能な検出試液を探索した (Fig. 5-4)。その結果、rengyol (13)は、bの噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液 (噴霧後加熱) では灰緑色のスポット、cの4-メトキシベンズアルデヒド硫酸試液 (噴霧後加熱) では赤紫色のスポット、dの噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液 (噴霧後加熱) では黄褐色のスポットとして明瞭に確認できた。

一方、リグナン配糖体である pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside (14)及び phillyrin (15)は、dの噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液 (噴霧後加熱)、fの2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液 (噴霧後加熱) 及びjのチモール・硫酸・エタノール試液 (噴霧後加熱) において、aの希硫酸 (噴霧後加熱) の時と同様に検出が可能であったが不明瞭であった。

この結果から、rengyolの検出には、特徴的な赤紫色に発色するcの4-メトキシベンズアルデヒド硫酸試液を噴霧して加熱する方法を用いることとした。

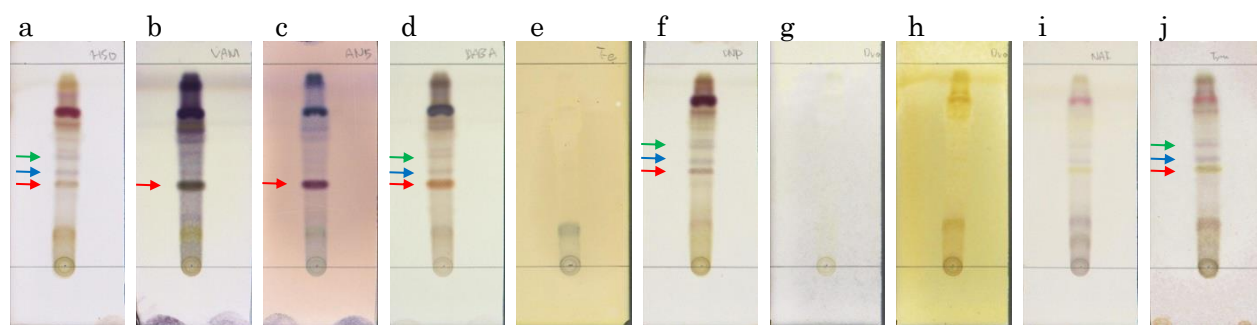


Fig. 5-4 Comparison of detection method

Solvent system; chloroform/methanol/water (70:30:6), detection; a) spraying dilute sulfuric acid then heating at 105°C, b) spraying vanillin-sulfuric acid-ethanol TS for spraying then heating at 105°C, c) spraying 4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105°C, d) spraying 4-dimethylaminobenzaldehyde TS for spraying then heating at 105°C, e) spraying iron (III) chloride TS, f) spraying 2,4-dinitrophenylhydrazine TS then heating at 105°C, g) spraying dragendorff's TS for spraying, h) spraying dragendorff's TS for spraying then spraying sodium nitrate TS, i) spraying 1,3-naphthalenediol TS then heating at 105°C, j) spraying thymol-sulfuric acid-methanol TS then heating at 105°C.

Red, blue and green arrows indicate rengyol (13), pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside (14) and phillyrin (15), respectively.

5-3-3. 展開溶媒の検討

5-3-2 までの検討に用いてきた展開溶媒には、クロロホルムが含まれているが、日局ではクロロホルムを用いない分析法への変更が進んでいることから、クロロホルムを用いない展開溶媒を検討した。クロロホルム/メタノール/水混液の代替としてよく用いられる、酢酸エチル/メタノール/水混液及び1-ブタノール/水/酢酸(100)混液を用い検討した結果、いずれの展開溶媒においても、rengyol のスポットは明瞭に確認可能であった (Fig. 5-5)。しかし、酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 1) の展開時間が約 10 分程度であるのに対し、1-ブタノール/水/酢酸(100)混液 (7 : 2 : 1) では約 60 分を要した。試験の効率化を考慮して、これより短時間で分析可能な酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 1) が有効である。この条件では、検討した三成分[rengyol (13), pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside (14)及び phillyrin (15)]はほぼ同一の R_f 値を示したが、rengyol 以外の成分は、4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液による検出において、ほとんど発色しないことから、rengyol のスポットを検出する際に妨害はないと判断した。また、Fig. 5-5a において rengyol のスポットの形状や R_f 値に変化がないことも確認した。

一般的には TLC による確認試験は、単一スポットで確認することが望ましいが、生薬の TLC 確認試験においては、単一の方法ですべての成分を検出することは難しく、見えない成分が同一 R_f 値に重なっていることが多い。今回の試験方法においては、二種類の成分 (pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside 及び phillyrin) は指標成分 (rengyol) と近接している。しかし、これらの化合物は rengyol との検出感度の差が大きく、rengyol の R_f 値や色調にも影響せず、rengyol が明瞭なスポットとして確認可能であったことから、各成分の分離より試験の効率性を重視して展開溶媒を選択した。生薬の供給市場において、ルーチンに行う確認試験を設定する際には、試験結果の明確さは重要であり、更に試験の効率性を高め生産コストを圧縮することが重要な課題である。今回、効率性を重視し設定した試験方法は、レンギョウの確認が明確なうえ、試験時間も短縮できることから極めて妥当である。

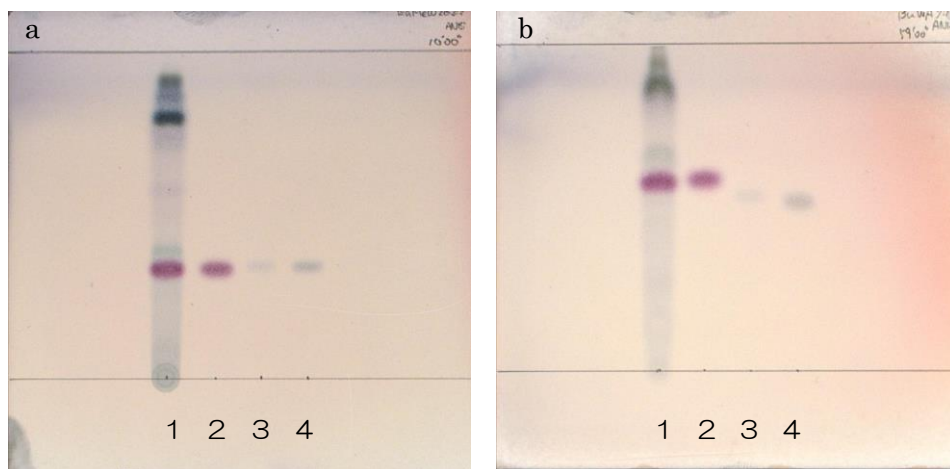


Fig. 5-5 TLC comparison of solvent system for TLC of Forsythia Fruit
 Solvent system; a) ethylacetate/methanol/water (20:3:1), b) 1-butanol/
 water/glacial acetic acid (7:2:1), detection; spraying 4-methoxybenzaldehyde-
 sulfuric acid TS then heating at 105°C.
 1: Forsythia Fruit, 2: rengyol, 3: pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside,
 4: phillyrin.

5-4. 小 括

日局「レンギョウ」の確認試験には二種類の化合物群の呈色反応が規定されている。しかし、確認試験としては特徴的な単一化合物で確認する方法が望ましい。そこで、レンギョウに特徴的な成分である rengyol を指標とし TLC 確認試験の設定を試みた。

レンギョウから単離した rengyol を用いて、確認試験の条件を検討し、以下のように設定した。本確認試験は、日本薬局方審議委員会の審議を経て、第 17 改正日本薬局方から採用される予定である。

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 μ 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 $^{\circ}$ 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。

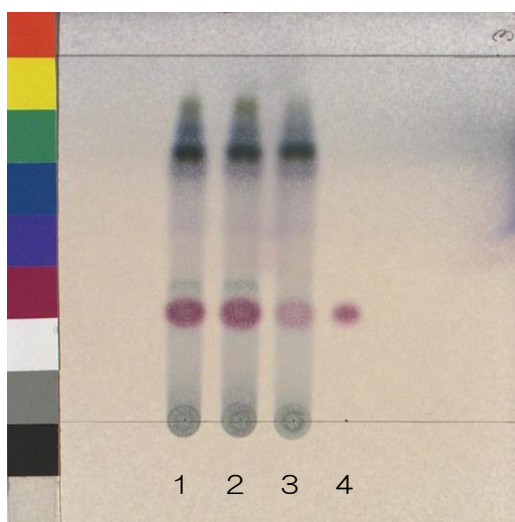


Fig. 5-6 TLC chromatograms of JP identification test of Forsythia Fruit
Solvent system; ethylacetate/methanol/water (20:3:1), detection; spraying
4-methoxybenzaldehyde-sulfuric acid TS then heating at 105 $^{\circ}$ C.
1~3: Forsythia Fruit, 4: rengyol.

総 括

本研究は、生薬 5 種（シャカンゾウ、ショウバク、ジオウ、タクシャ及びレンギョウ）について、公定書で用いる TLC による確認試験を設定するために、各生薬を特徴付ける TLC のスポット成分を検索し、化学的な品質評価の基礎データを得る目的で行ったものである。

シャカンゾウについては、日局「カンゾウ」の基原種である *G. uralensis* 及び *G. glabra* 由来のカンゾウとこれと同一のロットを用いて製したシャカンゾウの TLC パターンを比較して、シャカンゾウに特徴的なスポット三種 [phloretic acid (1), 2,6-anhydrofructofuranose (2), 4-methylpyrrole-3-carboxamide (3)] を見いだした。これらのスポットの中で、*Glycyrrhiza* 属植物のみから報告されている 4-hydroxybenzylmalonic acid (4) を前駆物質とする phloretic acid (1) は、他の糖とアミノ酸を前駆物質とする化合物(2)及び(3)より特異的な成分と判断し、このスポットを指標とする TLC による確認試験法を設定した。さらに、このスポットが生成するのに必要な加熱条件を明らかにすることより、シャカンゾウの調製法の目安を与えた。また、ジオウについては、乾ジオウと熟ジオウを区別できる確認試験の設定を目標として、修治の過程で変化する糖類に着目して検討し、乾ジオウでは stachyose, 熟ジオウでは fructose と manninotriose を指標とする確認試験を設定し、両者を区別することを可能にした。

日局に確認試験が規定されていないタクシャについては、タクシャ配合処方である牛車腎気丸エキスの確認試験を参考に、タクシャの特異的な成分であるトリテルペン alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate を指標成分とし、これら三種類のスポットのうち、一種類以上のスポットを確認する確認試験法を設定した。さらに、タクシャの粉末を、酸及びアルカリで処理し、alisol 類を alisol A に集束することにより、単一成分での確認を可能にした。この方法を用いて生薬中の alisol A の含量を簡便に推算すると、市場品中の含量は約 0.1~0.5%であった。現在、構成生薬としてタクシャを含む五苓散エキスの日局への収載の過程で、タクシャ成分の定量が検討されている。本研究で検討した生薬の前処理による alisol A への集束方法を応用することにより、五苓散エキスにおける、タクシャに由来する alisol 類の含量を大まかに見積もることが可能と考え

られる。また、ショウバク並びにレンギョウについては、展開溶媒と検出試液を工夫することによって各生薬に特徴的なスポットを見出し、このスポットを指標とする TLC による確認試験法を設定した。

本研究の結果をもとに設定した確認試験のうち、シャカンゾウ及びジオウの確認試験は、日本薬局方原案審議委員会による審議を経て、既に日局に収載されており、タクシャとレンギョウの確認試験についても、日本薬局方原案審議委員会による審議が終了し、第 17 改正日本薬局方に収載される予定である。さらに、ショウバクの確認試験はショウバクの局外生規への収載に際して採用される予定である。

本研究において、公定書に TLC による確認試験が設定されていない五種類の生薬について、その生薬の基原植物に特徴的な成分により類似生薬との判別可能な確認試験を設定できた。また、修治する生薬については、修治で生成する特徴的成分により原料生薬と識別できた。この成果は品質管理の観点から非常に有意義である。今後、本研究と同様に、TLC による確認試験が設定されていない生薬についても化合物レベルで検討し、漢方薬の基盤となる生薬の品質向上に努めることが必要である。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際し終始ご熱心なるご指導、ご鞭撻を賜りました、慶應義塾大学薬学部 天然医薬資源学講座 木内 文之 教授に慎んで厚く御礼申し上げます。

また、本論文の審査並びにご校閲いただきました慶應義塾大学薬学部 有機薬化学講座 須貝 威 教授、医療薬学センター 中村 智徳 教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に、終始、幾多のご助言と温かいご指導をいただきました、慶應義塾大学薬学部 天然医薬資源学講座 羽田 紀康 准教授、成川 佑次 講師に深く感謝いたします。

本研究を行う機会を与えていただき、その完遂までご配慮いただきました、株式会社ツムラ 杉田 亨 専務取締役、生産本部長 碓井 公利 執行役員、漢方製剤開発センター センター長 諸田 隆 博士、漢方品質設計部 部長 山本 藤輔 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり細部にわたりご指導とご助言をいただきました、株式会社ツムラ 西村 浩昭 博士、菊地 祐一 博士、平倉 一弘 博士、橋本 和則 博士、牧野 文昌 博士 並びに研究の多くの部分でご協力いただきました、勝原 孝雄 氏、余村かおり 氏、中村 雄一 博士、丸山 剛史 氏、故 嘉野 和明 氏 及び、株式会社ツムラ 生薬品質研究グループの皆様に深く感謝いたします。

生薬の鑑定をしていただきました、株式会社ツムラ 山路 弘樹 博士、司馬 真央 博士に厚く御礼申し上げます。

2,6-Anhydrofructose triacetate の NMR スペクトル解析において、参考スペクトルを測定いただきました、前 国立医薬品食品衛生研究所（現 星薬科大学 薬化学教室 助教）若菜 大悟 博士に厚く御礼申し上げます。

また、生薬の収集にご協力いただきました、公益社団法人 東京生薬協会、日本生薬連合会、ならびに日本漢方生薬製剤協会の方々に深く感謝いたします。

本研究に際し有益な情報をご供与いただきました、国立医薬品食品衛生研究所 合田 幸広 博士、袴塚 高志 博士、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 川原 信夫 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、この3年間応援してくれた私の両親に心より感謝いたします。

実験の部

実験材料及び方法

生薬材料

カンゾウ (1a~10a, *Glycyrrhiza uralensis* 由来) 並びにこれから調製したシャカンゾウ (1b~10b), ショウバク (1~12), 乾ジオウ (1, 2), 熟ジオウ (3, 4), タクシャ (1~35) 及びレンギョウ (1~3) の市場流通品は, 公益社団法人東京生薬協会, 日本生薬連合会, ならびに日本漢方生薬製剤協会の協力により収集した. *G. glabra* 由来のカンゾウ (11a~13a) は中国市場流通品を, カッコン並びにオウギは市場流通品を, ショウバク (13) は株式会社ツムラ保管の生薬標本を用いた.

化合物の単離に用いたシャカンゾウは, 株式会社ツムラで使用している *G. uralensis* 由来のカンゾウから調製されたサンプルを用いた. カンゾウの抽出物はアルプス薬品工業社製カンゾウ粗エキス (Lot No. 09E059) を用いた.

装置

粉碎ミル : New Power Mill (大阪ケミカル), Vibration Sample Mill TI-100 (HEIKO)

シェイカー : Recipro Shaker SR-1 (TAITEC)

展開槽 : 100-7D (矢沢科学)

噴霧瓶 : ガラス製噴霧器 M 型 (SANSYO)

プレートヒーター : TLC Plate Heater III (CAMAG)

撮影装置 : TLC Visualizer (CAMAG)

データ処理 : winCATS Planar Chromatography Manager, Ver. 1.4.4.6337 (CAMAG)

キャピラリ : MICROCAPS (Drummond Scientific)

天秤 : 化学天秤 ED224S (SARTORIUS), ミクロ天秤 QB6 (Mettler-Toledo International), ME36S (SARTORIUS)

高速液体クロマトグラフィー装置 : Agilent 1290 システム (Agilent), LC-10A システム (Shimadzu)

検出器 : CAD Corona *ultra* (Thermo Fisher SCIENTIFIC)

純水装置 : Milli-Q Integral 5 (MILLIPORE)

旋光度計 : P-1020 (JASCO)

赤外分光光度計 : FT/IR-4200 (JASCO)

紫外可視分光光度計：V-660 (JASCO)

核磁気共鳴装置：JNM AL-400, JNM ECA-600 (JEOL)

質量分析装置：Q-ToF micro (MICROMASS), maXis 3G ESI-UHR-TOF (Bruker Daltonix),
Q Exactive (Thermo Scientific)

熱分析装置：Q500 (TA Instruments)

TLC-MS：TLC-MS インターフェース (CAMAG), Q Exactive (Thermo Scientific)

HPLC のカラムは、分析用として SHODEX Asahipak NH2P-50 (4.6 mmφ×250 mm, 昭和電工) を用い、検出には荷電化粒子検出器 (CAD) により行った。分取用として TSKgel ODS-80Ts (2.0 mm i.d. × 250 mm, 10 μm, 東ソー株式会社) を用い、UV 検出器 (UV 230 nm) により行った。カラムクロマトグラフィーの充填剤として、シリカゲル 60 (70~230 mesh, Merck), YMCgel ODS-A-HG (12 nm, S-50 μm, 株式会社ワイエムシィ), Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia Biotech), DIAION HP-20 (三菱化学), Sepabese SP-800 (日本錬水) を用いた。薄層板は、Silica gel 60F₂₅₄ (層厚 0.25mm, Merck), Silica gel 60 RP-18 F_{254S} (層厚 0.25mm, Merck) をシリカゲルデシケーターで 24 時間以上乾燥し用いた。アルカリの中和にはイオン交換樹脂 AG50W-X8 (H⁺form, Bio-Rad) を用いた。NMR は、テトラメチルシラン(TMS)及び 3-(トリメチルシリル)プロパン酸-*d*₄-ナトリウムを内部標準物質とし、 δ (ppm) 値で表した。シグナルの多重度を次のように略記した。s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, dd : doublet of doublets, m : multiplet, br : broad.

溶媒・試薬

アセトン, エタノール(99.5), クロロホルム, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, ピリジン, ヘキサン, メタノール (国産化学), 亜硝酸ナトリウム, 28%アンモニア水, エタノール(95), 塩化鉄(III)六水和物, 塩酸, 希硫酸, 酢酸(100), ジクロロメタン, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン, 4-ジメチルアミノピリジン, 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド, 炭酸ナトリウム, チモール, テトラヒドロフラン, 1,3-ナフタレンジオール, バニリン, 1-ブタノール, 2-プロパノール, ヨウ化カリウム, 硫酸, 硫酸ナトリウム, リン酸 (和光純薬), インベルターゼ[powder from yeast 45,000 units/g, Lot. 0G6002], 塩化アンモニウム (純正化学), 三塩化ホウ素[1.0 mol/L ジクロロメタン溶液], 4-メトキシベンズアルデヒド (東京化成), エチル 4-メチル-3-ピロールカルボキシレート, ジメチル 4-メトキシベンジルマロネート (Alfa Aesar), アセトニトリル, 塩化 2,3,5-トリフェニル-2*H*-テトラゾリウム, 水酸化ナトリウム, 水素化ホウ素ナトリウム, 無水酢酸 (関東化学), 臭化カリウム (MERCK), 重水, 重メタノール, 重クロロホルム, 重

アセトン (Aldrich), 次硝酸ビスマス (日医工ファーマ)

標準物質

Phloretic acid, sucrose, glucose, fructose, raffinose, melibiose, alisol A, alisol B, alisol B monoacetate, phillyrin (和光純薬), galactose (Sigma), stachyose (東京化成), sorbitol (Merck), アミノ酸 (L-Amino acid and glycine, kit containing 22 standards) (Aldrich), glycyrrhithic acid (日本薬局方標準品), liquiritin (和光純薬, 局方生薬試験用 (薄層クロマトグラフィー用)), liquiritin apioside, alisol C, alisol C monoacetate, alismoxide (ツムラ, 化合物ライブラリー), 5-henicosylresorcinol (Fluka)

試液

TLC 用検出試液は, 日局 一般試験法の規定に従って調製した.

第 1 章の実験

1-1. カンゾウ及びシャカンゾウの TLC による比較

1-1-1. Glycyrrhithic acid 及び liquiritin の確認

Glycyrrhithic acid と liquiritin の確認には日局収載の方法を用いた。

(i) 日局「カンゾウ」の確認試験

カンゾウ及びシャカンゾウの粉末 2 g にエタノール(95)/水混液 (7 : 3) 10 mL を加え、水浴上で 5 分間振り混ぜながら加熱し、冷後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準品 5 mg をエタノール(95)/水混液 (7 : 3) 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により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 2 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲル（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 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液 (7 : 2 : 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。

(ii) 日局 葛根湯エキスの確認試験(5) カンゾウ

カンゾウ及びシャカンゾウの粉末 1.0 g をとり、水 10 mL 加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 10 mL を加えて振り混ぜ、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リクイリチン 1 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により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 5 μ L ずつ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 : 2) を展開溶媒として約 10 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、標準溶液から得た黄褐色のスポットと色調及び R_f 値が等しい。

1-1-2. カンゾウ及びシャカンゾウの高極性領域の関する検討

分析条件 I

試料溶液：シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(20 : 3 : 2)

展開距離：約 10 cm

スポット量：20 μ L

検出方法：4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を噴霧した後，105°C で 5 分間加熱

分析条件 II

試料溶液：シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え，10 分間振り混ぜた後，ろ過し，ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(7 : 2 : 1)

展開距離：約10 cm

スポット量：20 μ L

検出方法：1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後，105°Cで5分間加熱

分析条件 III

試料溶液：シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え，10 分間振り混ぜた後，ろ過し，ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(20 : 3 : 2)

展開距離：約10 cm

スポット量：20 μ L

検出方法：噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧した後，風乾

1-1-3 スポットが認められなかったロットに関する検討

分析条件 I～III でスポットが認められなかったシャカンゾウ (6b～8b) の粉末をプレートヒーター (約 130°C) で 30 分間加熱したサンプルについて，上記の分析条件 I～III で再度検討した。

1-2. スポット A (化合物 1) に関する検討

1-2-1 分析条件 I の改良

分析条件 IV

試料溶液：シャカンゾウ及びカンゾウの粉末 1.0 g に酢酸エチル 5 mL を加えて，15 分間

振り混ぜた後、遠心分離して上澄液を取り除き、その残渣に酢酸エチル 5 mL 及び 0.1 mol/L 塩酸 5 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、その酢酸エチル層を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水混液(7 : 2 : 1)

展開距離：約10 cm

スポット量：20 μ L

検出方法：4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

1-2-2. 化合物 1 の単離

シャカンゾウの粉末(17 g)に酢酸エチル(200 mL)を加え、室温で 15 時間抽出した後、酢酸エチル層を取り除き、その残渣に 1 mol/L 塩酸溶液 (150 mL) と酢酸エチル(150 mL)を加え、室温で 1 時間攪拌した後、遠心分離 (5000rpm, 5 分間) し上澄液を得た。同様に 3 回操作を行い、得られた上澄液をまとめて、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、酢酸エチル画分 (3.6 g) を得た。次いで酢酸エチル画分をシリカゲルカラム (7.0 i.d. \times 24 cm) に付し、ヘキサン/酢酸エチル混液 (3 : 2 \rightarrow 1 : 2) で順次溶出した。フラクションをヘキサン/酢酸エチル混液 (1 : 1) を展開溶媒とし、4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液で検出し、化合物 1 の赤紫色のスポットを含むフラクションを集めた。目的物を含むフラクション(0.73 g)を Sephadex LH-20 (3.5 i.d. \times 69 cm, エタノール) で精製し、化合物 1 (52 mg) を得た。

化合物 1 (phloretic acid)

Off-white powder. ESI MS (positive) m/z : 189 [M+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z : 165 [M-H]⁻; HR ESI MS m/z : 189.0524 [M+Na]⁺ (calcd for C₉H₁₀O₃Na, 189.0522); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz) δ : See Table 1-2.

1-2-3. 化合物 4 の単離

カンゾウの粗抽出物 (1 kg) を、Sepabeads SP-825 (5 L) と精製水 (20 L) と混ぜて 3 時間攪拌した後、ろ過した。残渣を精製水 (15 L) で洗浄し、すべてのろ液を合わせ、その一部 (4.5 L) を、ODS カラム (6.5 i.d. \times 35 cm) に吸着させ、精製水 (1.5 L) で溶出させ、化合物 4 を含む画分を得た。その水溶出画分の一部 (1 L) に、6%塩酸溶液を加え酸性にした後、酢酸エチル(1 L \times 2) で抽出した。酢酸エチル画分を硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮した。得られた残渣 (9.3 g) をシリカゲルカラム (6.0 i.d. \times 80 cm) に付し、酢酸エチル/メタノール/水 (8 : 2 : 1) で分画し、得られたフラクションを酢酸エチル/メタノール

／水混液 (14 : 5 : 4) を展開溶媒とし, 4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液で検出して, 化合物 **4** の赤紫色のスポットを含むフラクションを集めた. このフラクションを濃縮し, 析出物をろ過した. 析出物に 10%塩酸溶液 (20 mL) を加え, 酢酸エチル (20 mL × 3) で抽出し, 酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで乾燥した後, 減圧下濃縮し, 化合物 **4** (0.25 g) を得た.

化合物 **4** (4-hydroxybenzylmalonic acid)

White powder, mp 160–161°C (dec.) (lit. 160.5°C dec.)⁷⁾. ESI MS (positive) m/z : 233 [M+Na]⁺, 189 [M-CO₂+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z : 209 [M-H]⁻, 165 [M-CO₂-H]⁻; HR ESI MS m/z : 233.0421 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₀H₁₀O₅Na, 233.0420); UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 225 (3.93), 278 (3.21), 285 (sh 3.09); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3373, 3023 (br), 2668, 1703, 1612, 1599, 1514; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : See Table 1-3.

1-2-4. Dimethyl 4-methoxybenzylmalonate (化合物 **5**) から化合物 **4** の調製

(i) 化合物 **5** の脱メチル化

化合物 **5** (0.12 g) のジクロロメタン溶液 (0.8 mL) に, 1.0 mol/L 三塩化ホウ素溶液 (1.7 mL) を加え, 室温で窒素ガス下 3 日間攪拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム溶液 (13 mL) を加え, ジクロロメタン (20 mL × 3) で抽出した. ジクロロメタン層を硫酸ナトリウムで乾燥後, 減圧下濃縮した. 得られた残渣 (105 mg) をシリカゲルカラム (2.5 i.d. × 45 cm) に付し, ヘキサン／アセトン混液 (3 : 1) で精製し化合物 **6** (70 mg) を得た.

化合物 **6** (Dimethyl 4-hydroxybenzylmalonate)

Colorless oil. UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 226 (3.92), 278 (3.22), 285 (sh 3.11); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3440 (br), 2955, 1737, 1518, 1236; ESI MS (positive) m/z : 261 [M+ Na]⁺, 207, 193, 147, 107; ESI MS (negative) m/z : 237 [M-H]⁻, 205, 177, 149; HR ESI MS m/z : 261.0729 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₂H₁₄O₅Na, 261.0733); ¹H NMR (chloroform-*d*, 400 MHz) δ : 7.02 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2, 6), 6.72 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3, 5), 6.41 (1H, brs, C-4-OH), 3.69 (6H, s, COOMe), 3.66 (1H, brt, J = 8.0 Hz, H-8), 3.14 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-7); ¹³C NMR (chloroform-*d*, 100 MHz) δ : 169.6 (s × 2, COOMe), 154.8 (s, C-4), 129.8 (d × 2, C-2, 6), 129.1 (s, C-1), 115.4 (d × 2, C-3, 5), 53.9 (d, C-8), 52.6 (q × 2, COOMe), 33.9 (t, C-7).

(ii) 化合物 6 の加水分解

化合物 6 (70 mg) をメタノール (2 mL) に溶解した後, 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (4 mL) を加え 85°C で 1 時間攪拌した. 反応液に 1 mol/L 塩酸溶液 (5 mL) と飽和食塩水を加え, 酢酸エチル (20 mL × 3) で抽出した. 酢酸エチル層を減圧下濃縮し化合物 4 (53 mg) を得た. 得られた化合物 4 のスペクトルデータは, カンゾウから単離した化合物 4 と一致した.

1-2-5. 化合物 4 の熱分解

化合物 4 (9 mg) を TGA 熱分析装置で熱分解 (20°C から 160°C まで毎分 10°C で加温し, 160°C で 10 分間加熱) した. 分解物を分取 TLC (シリカゲル) で, 酢酸エチル/メタノール/水混液 (14:5:4) を展開溶媒とし分取し, 2 つのスポットを得た. 上のスポット (4 mg) は NMR および MS のスペクトルデータにより化合物 1 と同定した. 下のスポットを分取 TLC (ODS) で, アセトニトリル/水混液 (1:1) を展開溶媒とし, 再度精製を行うことにより化合物 7 (1 mg) を得た.

化合物 7

White powder. ESI MS (positive) m/z 337 [M+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z 313 [M-H]⁻, 165, 121, 93; HR ESI MS m/z 337.1041 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₈H₁₈O₅Na, 337.1046); UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 221 (4.09), 278 (3.18); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3477, 3325 (br), 2926, 1750, 1739, 1709, 1513; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.22 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.09 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.89 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.72 (2H, d, J = 8.8 Hz), 2.93 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.90 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.83 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.56 (2H, t, J = 8.0 Hz); ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 177.4 (s), 173.5 (s), 157.0 (s), 150.5 (s), 140.1 (s), 132.4 (s), 130.4 (d × 2), 130.3 (d × 2), 122.6 (d × 2), 116.3 (d × 2), 37.7 (t), 37.3 (t), 31.7 (t), 31.2 (t).

1-3. スポット B (化合物 2) に関する検討

1-3-1. カンゾウに含まれる糖類に関する検討

分析条件

試料溶液: カンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え, 10 分間振り混ぜた後, ろ過し, ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした.

標準溶液：Sucrose, glucose 及び fructose の 50%メタノール溶液 (1 mg/mL)
展開溶媒：2-プロパノール／酢酸(100)／ジエチルエーテル／水混液(4 : 3 : 2 : 1)
展開距離：約10 cm
スポット量：試料溶液 20 μ L, 標準溶液 5 μ L
検出方法：1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後, 105°Cで5分間加熱

1-3-2. 糖類の加熱による検討

分析条件

試料溶液：シャカンゾウの粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加え, 10 分間振り混ぜた後, ろ過し, ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした.
標準溶液：Sucrose, glucose 及び fructose をプレートヒーター (約 150°C) で 30 分間加熱し, 50%メタノールに溶解した (1 mg/mL).
展開溶媒：酢酸エチル／メタノール／水混液(7 : 2 : 1)
展開距離：約10 cm
スポット量：試料溶液 20 μ L, 標準溶液 5 μ L
検出方法：1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後, 105°Cで5分間加熱

1-3-3. 化合物2のTLC-MSによる検討

シャカンゾウ(1 g)にメタノール(10 mL)を加えて 10 分間振り混ぜた後, ろ過し, その液 20 μ L を TLC (シリカゲル) に数か所スポットした後, 酢酸エチル／メタノール／水混液 (7 : 2 : 1) で展開した. その TLC の両端を切り取り, 6-1 の検出方法で目的のスポットを検出した後, 中央の TLC に検出したスポットの位置を鉛筆でマークし, その位置を TLC-MS インターフェースを用い, 20%メタノールで HPLC ポンプを用い, 流速 0.1mL/min で溶出し, 質量分析装置へ導入した.

TLC/HR ESI MS (positive) m/z : 185.0421 [M+Na]⁺ (calcd for C₆H₁₀O₅Na, 185.0420).

TLC/HR ESI MS (negative) m/z : 161.0449 [M-H]⁻ (calcd for C₆H₉O₅, 161.0444).

1-3-4. 化合物 2a の単離

シャカンゾウの粉末 (64 g) をメタノール (500 mL \times 2) で 1 時間還流抽出し, メタノール抽出物 (15 g) を得た. このメタノール抽出物をシリカゲル (4.5 i.d. \times 40 cm) に付し, 酢酸エチル／メタノール／水混液 (8 : 2 : 1) で溶出し, 3 つのフラクション (フラクション

3-1, 1.7 g ; 3-2, 1.2 g ; 3-3, 0.56 g) を得た. 分析条件 II (1-1-2 項) で化合物 2 の紫色のスポットを含有しているフラクション 3-1 を集めて ODS カラム (2.5 i.d. × 48 cm) に付し, 水で溶出し, 水溶出部 (94 mg) を得た. 水溶出部の一部 (25 mg) にピリジン (0.5 mL), 無水酢酸 (50 μL) および 4-ジメチルアミノピリジンを加え, 室温で 16.5 時間攪拌した. 反応液に氷冷しながら飽和食塩水を加えた後, クロロホルム (20 mL × 3) で抽出し, クロロホルム抽出部を 6%塩酸溶液 (20 mL × 3) で洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 得られた残渣 (45 mg) を分取 HPLC で水/アセトニトリル混液 (65 : 35) で精製した後, シリカゲル (C.I.G カラムシステム, Si-50, 2.5 i.d. × 30 cm) でヘキサン/アセトン混液 (2 : 1) で溶出し化合物 **2a** (5 mg) を得た.

化合物 **2a**

Syrup. ESI MS (positive) m/z : 311 [M+Na]⁺; HR ESI MS m/z : 311.0743 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₂H₁₆O₈Na, 311.0743); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : See Table 1-4.

1-3-5. Fructose から化合物 **2** の調製

Fructose (10 g) をホットプレート (150°C) で 1 時間加熱し, 褐色のシロップ (9.7 g) を得た. 得られたシロップをシリカゲルカラム (5.0 i.d. × 47 cm) に付し, 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 2) で溶出し, 化合物 **2** (31 mg) を得た.

化合物 **2** (2,6-anhydrofructofuranose)

Syrup. ESI MS (positive) m/z : 185 [M+Na]⁺; HR ESI MS m/z : 185.0415 [M+Na]⁺ (calcd for C₆H₁₀O₅Na, 185.0420); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 125 MHz) δ : See Table 1-5.

1-4. スポット C (化合物**3**) に関する検討

1-4-1. Fructose 及び各種アミノ酸の加熱試験

薄層板にアミノ酸 (22種, 1 mg/mL, 水) 2 μL をスポットし風乾した. その後, fructose (1 mg/mL, 50%メタノール溶液) 2 μL をスポットし, ホットプレート (130°C) で約30分間加熱した. 冷後, 分析条件III (1-1-2項) で試験した.

1-4-2. 化合物 3 の単離

シャカンゾウの粉末 (1.5 kg) をメタノール (5 L × 2) で 1 時間還流抽出した。得られた抽出液を減圧下, 2.5 L まで濃縮し, 濃縮したメタノール抽出液 (2.5 L) を DIAION HP-20 (12 i.d. × 76 cm) に付し, 水 (10 L), 50%メタノール溶液 (10 L) およびメタノール (10 L) の順で溶出した。50%メタノール溶出部を減圧下濃縮し, 残渣 (15.4 g) をシリカゲルカラム (7.0 i.d. × 53 cm) に付し, クロロホルム/メタノール混液 (10 : 1) で溶出した。1-1-2 項の分析条件 III を用いて TLC で化合物 3 のスポットを確認しながら, 2 つのフラクション (4-1, 65 mg; 4-2, 157 mg) に分画した。フラクション 4-1 を Sephadex LH-20 (7.0 i.d. × 70 cm) に付し, エタノールで精製し化合物 3 (13 mg) を得た。

化合物 3 (4-methylpyrrole-3-carboxamide)

Pale yellow viscous oil. ESI MS (positive) m/z : 147 [M+Na]⁺, 125 [M+H]⁺, 108; ESI MS (negative) m/z : 123 [M-H]⁻, 105; HR ESI MS m/z : 147.0539 [M+Na]⁺ (calcd for C₆H₈N₂ONa, 147.0534); UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 228 (3.70); IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3337 (br), 2924, 1638, 1595, 1557; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : See Table 1-6.

1-4-3. Ethyl 4-methylpyrrole-3-carboxylate (化合物 8) から化合物 3 の調製

(i) 化合物 8 の加水分解

化合物 8 (0.21 g) のメタノール (2 mL) 溶液に, 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (4 mL) を加え, 85°C で 3 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮後, 1 mol/L 塩酸溶液を加え, 沈殿物として 4-methylpyrrole-3-carboxylic acid (9, 0.12 g) を得た。

化合物 9 (4-methylpyrrole-3-carboxylic acid)

White powder. ESI MS (positive) m/z : 148 [M+Na]⁺, 126 [M+H]⁺; ESI MS (negative) m/z : 124 [M-H]⁻; ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) δ : 7.32 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2), 6.51 (1H, m, H-5), 2.22 (3H, d, J = 1.0 Hz, H-7); ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : 169.7 (s, C-6), 126.2 (d, C-2), 121.7 (s, C-3 or 4), 118.7 (d, C-5), 114.9 (s, C-4 or 3), 11.9 (q, C-7).

(ii) 化合物 9 のアミド化

化合物 9 のテトラヒドロフラン (1.2 mL) 溶液に, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)

carbodiimide HCl (0.21 g, EDC) のジクロロメタン (1.8 mL) 溶液を加え室温で 30 分間攪拌した。この溶液に 28%アンモニアン水 (0.2 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、1 mol/L 塩酸溶液を加え酸性とした後、酢酸エチル (20 mL × 3) で抽出し、酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下濃縮した。得られた残渣 (85 mg) をシリカゲルカラム (2.3 i.d. × 21 cm) に付し、クロロホルム/メタノール (10 : 1) で分画し、3 つのフラクション (5-1, 20 mg ; 5-2, 31 mg ; 5-3, 30 mg) を得た。フラクション 5-3 を分取 HPLC (C.I.G.カラムシステム, Si-10, 1.5 i.d. × 30 cm) に付し、クロロホルム/メタノール混液 (10 : 1) で精製し、化合物 **3** (18 mg) を得た。得られた化合物 **3** のスペクトルデータはシャカンゾウから得られた化合物のデータと一致した (Table 1-6)。

1-5. カンゾウの加熱処理条件による各化合物の生成に関する検討

カンゾウの細切品を、プレートヒーター (110°C, 130°C 及び 150°C) で、各温度 10 分、30 分及び 60 分の加熱した。

(i) スポット A の確認

加熱処理したカンゾウの粉末を 1-2-1 項の分析条件 IV に従い試験し、 R_f 値約 0.6 に赤紫色のスポットの有無を確認した。

(ii) スポット B の確認

加熱処理したカンゾウの粉末を 1-1-2 項の分析条件 II に従い試験し、 R_f 値約 0.5 に赤紫色のスポットの有無を確認した。

(iii) スポット C の確認

加熱処理したカンゾウの粉末を 1-1-2 項の分析条件 III に従い試験し、 R_f 値約 0.6 に桃色のスポットの有無を確認した。

1-6. カンゾウの基原種の比較

G. glabra を基原とするカンゾウをプレートヒーターで加熱 (130°C, 30 分間) し、シャカンゾウを調製した。

(i) スポット A の確認

G. glabra 由来のカンゾウ及びそれらを加熱処理したシャカンゾウの粉末を 1-2-1 項の分析条件 IV に従い試験し、 R_f 値約 0.6 に赤紫色のスポットの有無を確認した。比較として、*G. uralensis* 由来のカンゾウおよびシャカンゾウも同時に試験した。

(ii) スポット B の確認

G. glabra 由来のカンゾウ及びそれらを加熱処理したシャカンゾウの粉末を 1-1-2 項の分析条件 II に従い試験し、 R_f 値約 0.3 に赤紫色のスポットの有無を確認した。比較として、*G. uralensis* 由来のカンゾウおよびシャカンゾウも同時に試験した。

(iii) スポット C の確認

G. glabra 由来のカンゾウ及びそれらを加熱処理したシャカンゾウの粉末を 1-1-2 項の分析条件 III に従い試験し、 R_f 値約 0.5 に桃色のスポットの有無を確認した。比較として、*G. uralensis* 由来のカンゾウおよびシャカンゾウも同時に試験した。

1-7. 各化合物の特異性に関する検討

カッコン及びオウギの細切を、プレートヒーターで加熱（130°C，30 分間）して調製したサンプルを用いて試験した。

(i) スポット A の確認

加熱処理したカッコン及びオウギの粉末を 1-2-1 項の分析条件 IV に従い試験し、 R_f 値約 0.6 に赤紫色のスポットの有無を確認した。

(ii) スポット B の確認

加熱処理したカッコン及びオウギの粉末を 1-1-2 項の分析条件 II に従い試験し、 R_f 値約 0.3 に赤紫色のスポットの有無を確認した。

(iii) スポット C の確認

加熱処理したカッコン及びオウギの粉末を 1-1-2 項の分析条件 III に従い試験し、 R_f 値約 0.6 に桃色のスポットの有無を確認した。

第2章の実験

2-1. ショウバクのTLC分析条件

2-1-1. 試料調製方法

ショウバクの粉末 2.0 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、上澄液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

2-1-2. TLC分析条件

展開溶媒：Ⅰ) クロロホルム／メタノール／水混液 (70 : 30 : 6)

Ⅱ) 酢酸エチル／メタノール／水混液 (20 : 3 : 2)

Ⅲ) ヘキサン／酢酸エチル／酢酸(100)混液(14 : 6 : 1)

展開距離：約7 cm

スポット量：5 μ L

検出方法：a) 紫外線 (主波長254 nm) 照射

b) 紫外線 (主波長365 nm) 照射

c) 希硫酸を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

d) 希硫酸を噴霧し、105°Cで5分間加熱後、紫外線 (主波長365 nm) 照射

e) 4-メトキシベンズアルデヒド硫酸試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

f) 噴霧用4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

g) 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

h) 塩化鉄(III)試液を噴霧

i) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

j) 噴霧用ドラーゲンドルフ試液を噴霧

k) 噴霧用ドラーゲンドルフ試液を噴霧後、亜硝酸ナトリウム試液を噴霧

l) 1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

m) 噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

2-2. 化合物10の単離

ショウバクの粉末(240 g)にメタノール (1.5 L)を加え、室温で1時間超音波抽出した。抽出液をろ過し、メタノール抽出液1を得た。残渣に再度メタノール(1.5 L)を加え、再び室温で1時間超音波抽出した。抽出液をろ過しメタノール抽出液2を得た。メタノール抽出液1と2を合わせて減圧下濃縮しメタノール抽出画分 (5.76 g) を得た。このメタノール抽出画分 (5.76 g) をセライト (11.8 g) にまぶし減圧乾燥した。これをシリカゲルカラム (4.1 i.d. × 9 cm) に付し、クロロホルム、クロロホルム/エタノール/水混液 (9 : 1 : 0 → 10 : 14 : 5) で順次溶出し、3つのフラクション (フラクション1, 1.32 g ; 2, 1.02 g ; 3, 1.45 g) を得た。

フラクション2 (1.02 g) を、Sephadex LH-20 カラム (2.8 i.d. × 48 cm) に付し、クロロホルム/エタノール混液 (3 : 1) で溶出し、ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液(14 : 6 : 1)を展開溶媒として、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧し加熱したときに赤橙色を呈するスポットを集めた。得られたフラクション (150 mg) を、シリカゲルカラム (2.1 i.d. × 48 cm) に付し、ヘキサン/酢酸エチル混液 (90 : 10 → 80 : 20) で精製し、化合物 10 (135 mg) を得た。

化合物 10 (5-henicosylresorcinol)

White powder. APCI MS (positive) m/z 405 [M+H]⁺; HR APCI MS m/z 405.3725 [M+H]⁺ (calcd for C₂₇H₄₉O₂, 405.3727); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ : See Table 2-1.

2-3. ショウバクの市場流通品による検討

試料溶液 : ショウバクの粉末2.0 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した

標準溶液 : 5-henicosylresorcinol 1 mgをメタノール1 mLに溶かした。

薄層板 : シリカゲル60F₂₅₄ (Merck)

展開溶媒 : ヘキサン/酢酸エチル/酢酸(100)混液 (14 : 6 : 1)

展開距離 : 約7 cm

スポット量 : 5 μ L

検出方法 : 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

第3章の実験

3-1. Manninotriose (11)の調製

Stachyose (4.37 g) を水 (40 mL) に溶解し、インベルターゼ (0.22 g) を加えて 35°C, 3 時間攪拌した。反応液を 3000 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄液を 4 回 (約 10 mL) に分けて Sephadex LH-20 (5.5 i.d. × 76 cm) に付し、水で溶出した。Manninotriose 含有部をメンブレンフィルター (孔径 1.0 μm) でろ過し、減圧下濃縮し、濃度を約 14% に調製後、凍結乾燥し、manninotriose (11, 3.6 g) を得た。

Manninotriose (11)

White amorphous powder, ESI MS (positive) m/z 527 [M+Na]⁺, 365, 203; ESI MS (negative) m/z 503 [M-H]⁻; HR ESI MS m/z 527.1584 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₈H₃₂O₁₆Na, 527.1583); IR λ_{max} (KBr) cm⁻¹: 3398 (br), 2925, 1646, 1078, 1024; [α]_D +162.9° (c = 1.24, H₂O); ¹H NMR (D₂O, TSP, 400 MHz) δ : 5.24 (1/3H, d, J = Hz 3.9, H-1α), 5.01-4.98 (2H, overlapped, H-1', H-1''), 4.68 (2/3H, d, J = 7.8 Hz, H-1β); ¹³C-NMR (D₂O, TSP, 100 MHz) δ : 100.9 (d × 2, C-1', 1''), 99.0 (d, C-1β), 95.1 (d, C-1α), 78.8 (d, C-3β), 77.0 (d, C-2β), 76.9 (d, C-5β), 75.9 (d, C-3α), 74.3 (d, C-2α), 73.9 (d, C-5''), 72.8 (d, C-5α), 72.6 (d, C-4α), 72.4 (d, C-4β), 72.3 × 2, 72.2, 72.1 (each d, C-3', C-4'', C-4', C-5'), 71.6, 71.3, 71.1 (each d, C-3'', C-2'', C-2'), 69.3 (t, C-6'), 68.7 (t, C-6α), 68.6 (t, C-6β), 64.0 (t, C-6'').

3-2. Manninotriose (11)の構造確認

3-2-1. 構成糖の確認

Manninotriose (11)の酸加水分解

Manninotriose (5.8 mg) を 2mol/L 塩酸 (5 mL) に溶解し、80°C で 4 時間加熱した。加水分解した反応液を次の TLC 分析条件で確認した。

分析条件

標準溶液 : glucose 及び galactose の 50%メタノール溶液 (1 mg/mL)

展開溶媒 : 2-プロパノール/メタノール/水混液 (6 : 2 : 1)

検出方法：噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液を噴霧した後，105°C で 5 分間加熱

展開距離：約 10 cm

スポット量：反応液 5 μ L，標準溶液 2 μ L

3-2-2. 結合順序の確認

Manninotriose の末端還元及び酸加水分解

Manninotriose (20.0 mg) にメタノール (2 mL) を加え，さらに少量の水を加え溶解した．これに水素化ホウ素ナトリウム (18.5 mg) を加えて室温で 1 時間攪拌した．反応終了後，反応液をイオン交換樹脂 (AG50W-X8, H⁺form) で処理し，減圧下濃縮し化合物 **11a** を得た．そのうちの少量をとり 2 mol/L 塩酸 (5 mL) を加え，80°C で 4 時間加熱還流した．得られた反応液を次の条件で分析した．

分析条件

標準溶液：glucose, galactose 及び sorbitol の 50%メタノール溶液 (1 mg/mL)

その他の条件は 3-2-1 と同様．

3-2-3. 結合位置の確認

(i) 化合物 **11a** のアセチル化

Manninotriose (**11**, 6.6 mg) をメタノール (0.5 mL) に溶解し，水素化ホウ素ナトリウム (9.6mg)を加えて室温で，3 時間攪拌した．反応終了後，反応液をイオン交換樹脂 (AG50W-X8, H⁺form) で処理し，減圧下乾固した．残渣をピリジン(0.2 mL)，無水酢酸 (50 μ L)に溶解し，4-ジメチルアミノピリジンを触媒量加えて室温で 1 時間攪拌した．反応終了後，少量の水を加え 10 分間攪拌した．この液にクロロホルム(10 mL)を加え，3%塩酸溶液(10 mL)で 3 回洗浄し，得られたクロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後，減圧下濃縮し，完全アセチル化体 (**11b**, 10 mg) を得た．

化合物 **11b**

ESI MS (positive) m/z : 1033 [M+Na]⁺, 619, 331

ESI MS (negative) m/z : 1055 [M+MeOH]⁻

HR ESI MS (positive) : 1033.3000 (calcd. For C₄₂H₅₈O₂₈Na [M+Na]⁺ : 1033.3007)

¹H NMR and ¹³C NMR : see Table 3-1

(ii) Melibiose (12)の末端還元及びアセチル化 (12b)

Melibiose (12, 20 mg)にメタノール(2 mL)を加え、さらに少量の水を加えて溶解した。これに水素化ホウ素ナトリウム(22 mg)を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、反応液をイオン交換樹脂 (AG 50W-X8, H⁺form) で処理し、12a (41 mg) を得た、これをピリジン (0.2 mL)に溶解し、無水酢酸(50 μ L)及び4-ジメチルアミノピリジン(触媒量)加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、反応液に水を加え10分間攪拌後、クロロホルム (10 mL) を加え、3%塩酸溶液(10 mL)で3回洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下乾固しアセチル化体 (12b, 29 mg)を得た。

化合物 12b

ESI MS (positive) m/z : 745 [M+Na]⁺, 685, 625

ESI MS (negative) m/z : 767 [M+HCOO]⁻

HR ESI MS (positive) : 745.2171 (calcd. For C₃₀H₄₂O₂₀Na [M+Na]⁺ : 745.2162)

¹H NMR and ¹³C NMR : see Table 3-1

3-3. ジオウ中の糖の TLC による比較

3-3-1. 噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液による検出

試料溶液：乾ジオウ及び熟ジオウの細切 1 g に水 3 mL を加えて振り混ぜた後、メタノール 8 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後、遠心分離した。

標準溶液：各糖類 1 mg を水／メタノール混液 (1 : 1) 0.5 mL に溶かした。

展開溶媒：2-プロパノール／水／メタノール混液 (3 : 2 : 2)

検出方法：噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

展開距離：約7 cm

スポット量：2 μ L

3-3-2. 1,3-ナフタレンジオール試液による検出

検出方法：1,3-ナフタレンジオール試液を噴霧した後、105°Cで5分間及び10分間加熱

試料溶液、標準溶液、展開溶媒、展開距離、スポット量は3-3-1と同様

3-3-3. 2,3,5-トリフェニル-2*H*-テトラゾリウム塩酸塩・メタノール試液による検出

検出方法：噴霧用2,3,5-トリフェニル-2*H*-テトラゾリウム塩酸塩・メタノール試液を噴霧した後，105°Cで5分間加熱

試料溶液，標準溶液，展開溶媒，展開距離，スポット量は3-3-1と同様

3-4. ジオウ中の糖の HPLC による比較

3-4-1. 試料溶液

薄層クロマトグラフィー用試料溶液（3-3-1 項）1 mL を正確にとり，水／アセトニトリル混液（1：1）を加えて正確に 10 mL とした。

3-4-2. 標準溶液

各糖類 10 mg ずつを，水／アセトニトリル混液（1：1）に溶かして正確に 5 mL とした。

3-4-3. 分析条件

検出器：Corona *ultra* 検出器

カラム：SHODEX Asahipak NH2P-50

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル／水混液（68：32）

流量：0.8 mL/min.

注入量：1 μ L

3-4-4. 糖類の定量

糖類の定量には 3-4-3 の分析条件を用いた。glucose, fructose, sucrose, raffinose, manninotriose, stachyose について 3-4-2 の方法に従い調製した標準溶液を用いて検量線を作成し，3-4-1 の方法に従い調製した試料溶液について糖類の含量(w/w)%を求めた。

第4章の実験

4-1. タクシャの確認試験に関する検討

4-1-1. タクシャの TLC 分析による成分比較

試料溶液：タクシャの粉末 1 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、上澄液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

標準溶液：Alisol A, alisol B, alisol B monoacetate, alisol C, alisol C monoacetate, alismoxide それぞれ 1 mg をメタノール 1 mL に溶かした液。

薄層板：シリカゲル 60F₂₅₄ (MERCK)

展開溶媒：酢酸エチル／ヘキサン／酢酸(100)混液 (10 : 10 : 3)

展開距離：約 7cm

スポット量：試料溶液 10 μ L, 標準溶液 2 μ L

検出方法：a) 紫外線 (主波長 254 nm) 照射

b) 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後、105°C で 5 分間加熱

4-1-2. 抽出溶媒の検討

試料溶液：タクシャの粉末 1 g に以下の溶媒 10 mL (2 液の場合は各溶媒 10 mL ずつ) を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を各試料溶液とした。

検討溶媒：メタノール, アセトン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, 1-ブタノール／水 (1 : 1), 酢酸エチル／水 (1 : 1), ジエチルエーテル／炭酸ナトリウム試液 (1 : 1)

標準溶液：Alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate 1 mg ずつとり、メタノールを加えて 10 mL とした。(alisol 混合溶液)

スポット量：試料溶液 5 μ L, 標準溶液 2 μ L

検出方法：噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後、105°C で 5 分間加熱

薄層板, 展開溶媒, 展開距離は 4-1-1 と同様

4-1-3. スポット量の検討

試料溶液：タクシャの粉末 1 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した。

スポット量：試料溶液 0.5 μ L, 1 μ L, 2 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 標準溶液 1 μ L, 2 μ L

標準溶液, 薄層板, 展開溶媒, 展開距離および検出方法は 4-1-2 と同様

4-1-4. 展開距離の検討

展開距離：a) 約 10 cm, b) 約 7 cm

試料溶液は 4-3, 標準溶液, スポット量, 薄層板, 展開溶媒および検出方法は 4-1-2 と同様

4-1-5. 検出試液の検討

検出方法：a) バニリン・硫酸試液を均等に噴霧した後, 105°C で 5 分間加熱

b) 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を均等に噴霧した後, 105°C で 5 分間加熱

試料溶液は 4-3, 標準溶液, スポット量, 薄層板, 展開溶媒および展開距離は 4-1-2 と同様

4-2. タクシャの市場流通品による検討

試料溶液：タクシャの粉末 1 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した。

標準溶液：Alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate それぞれにつき 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし標準溶液とした。

スポット量：試料溶液 5 μ L, 標準溶液 2 μ L

検出方法：噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後, 105°C で 5 分間加熱

薄層板, 展開溶媒, 展開距離は 4-1-2 と同様

4-3. タクシャの確認試験の改良

4-3-1. 酢酸の濃度に関する検討

試料溶液：タクシャの粉末 0.5 g に氷酢酸(100%), 80%酢酸, 50%酢酸, 20%酢酸, 10%酢酸及び水 5 mL を加え, 沸騰水浴上 (約 100°C) で 60 分間還流した。冷後, 水 20 mL 及びジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜた後, 遠心分離し, 上澄液を試料溶液とした。

標準溶液：Alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate 1 mg ずつとり, メタノールを加えて 10 mL とした。(alisol 混合溶液)

薄層板：シリカゲル 60F₂₅₄ (MERCK)

スポット量：試料溶液 5 μ L, 標準溶液 2 μ L

展開溶媒：酢酸エチル／ヘキサン／酢酸(100)混液（10：10：3）

展開距離：約 7 cm

検出方法：噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後，105°C で 5 分間加熱

4-3-2. タクシャ 9 ロットによる検討

(i) 酢酸による酸処理

試料溶液（酸処理前）：

タクシャの粉末 0.2 g にジエチルエーテル 5 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した。

試料溶液（酸処理後）：

タクシャの粉末 0.2 g に 20%酢酸 5 mL を加え，沸騰水浴上（約 100°C）で 60 分間還流し，冷後，水 20 mL 及びジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜた後，遠心分離し，上澄液を試料溶液とした。

その他の条件は，4-3-1 と同様

(ii) 酸処理後のアルカリ処理

試料溶液（酸処理後のアルカリ処理）：

タクシャの粉末 0.2 g に 20%酢酸 5 mL を加え，沸騰水浴上（約 100°C）で 60 分間還流し，冷後，1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加えて，沸騰水浴上（約 100°C）で 20 分間還流した。冷後，ジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜた後，遠心分離し，上澄液を試料溶液とした。

その他の条件は，4-3-1 と同様

(iii) タクシャ中に含まれる alisol 類の完全抽出の確認

試料溶液：4-3-2 (ii)でジエチルエーテルを除いた水層に，ジエチルエーテル 10 mL を加えて振り混ぜた後，遠心分離し，上澄液を試料溶液（2 回目）とした。更に同様の操作を繰り返し試料溶液(3 回目)とした。

その他の条件は，4-3-1 と同様

(iv) タクシャ中に含まれる alisol 類の含量測定

試料溶液：4-3-2 (ii)の試料溶液及び(iii)の試料溶液(2 回目)を合わせ，減圧下溶媒を留去した。

その残留物にメタノールを正確に 2 mL 加えて溶解し含量確認用試料溶液とした。

標準溶液 : Alisol A 3.0 mg を精密に量り, メタノールを加えて正確に 3 mL とし, 標準溶液 1 (1 mg/mL) とした。標準溶液 1 1 mL を正確にとり, メタノールで 2 mL とし, 標準溶液 2 (0.5 mg/mL) とした。標準溶液 1 1 mL を正確にとり, メタノールで 10 mL とし, 標準溶液 3 (0.1 mg/mL) とした。標準溶液 3 1 mL を正確にとり, メタノールで正確に 2 mL とし, 標準溶液 4 (0.05 mg/mL) とした。標準溶液 3 1 mL を正確にとり, メタノールで 10 mL とし, 標準溶液 5 (0.01 mg/mL) とした。

スポット量 : 含量確認用試料溶液及び標準溶液 1 μ L (スポットの径が均等になるようにスポットした。)

その他の条件は, 4-3-1 と同様

第5章の実験

5-1. レンギョウのTLC分析による成分比較

分析条件

試料溶液：レンギョウの粉末 1.0 g にメタノール 10 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を薄層クロマトグラフィー用試料溶液とした。

展開溶媒：クロロホルム／メタノール／水混液 (70 : 30 : 6)

展開距離：約 7 cm

スポット量：10 μ L

検出方法：希硫酸を噴霧した後、105°Cで5分間加熱

5-2. スポット E~G (化合物 13~15) に関する検討

5-2-1. スポット E~G (化合物 13~15) の単離

レンギョウの粉末(100 g)にメタノール (1 L)を加え、室温で 30 分間超音波抽出した。抽出液をろ取し、残渣にメタノール(1 L)を加え、再び室温で 30 分間超音波抽出を行い、抽出液をろ取し、1 回目の抽出液と合わせて減圧乾固し、その全量をメタノール(30 mL) に再溶解し、沈殿物(1.1 g)を取り除き、メタノール可溶部(4.2 g)を得た。

メタノール可溶部 (4.2 g)をシリカゲルカラム (4.2 i.d. \times 35 cm) に付し、クロロホルム／メタノール混液(19 : 1 \rightarrow 9 : 1 \rightarrow 8 : 2)で順次溶出した。5-1-2 の TLC 分析条件で確認しながら、スポット E~G を含むフラクション 1 (670 mg) を得た。さらにフラクション 1 をシリカゲルカラム (2.8 i.d. \times 48 cm) に付し、クロロホルム／メタノール (96 : 4 \rightarrow 84 : 6) で順次溶出し、スポット G を含むフラクション 2-1 (117 mg) とスポット E 及び F を含むフラクション 2-2 (324 mg) を得た。その全量を、下記の HPLC 分取条件 (移動相 ; アセトニトリル／水混液(20 : 80)) で分画した。5-1 の TLC 条件で確認しながら、スポット E または F を含むフラクションを集めた。スポット E を含むフラクション 2-2-1 から化合物 13 (84.9 mg) を、スポット F を含むフラクション 2-2-2 から化合物 14 (4.5 mg) を得た。フラクション 2-1 (117 mg) を HPLC 分取条件 (移動相 ; アセトニトリル／水混液(25 : 75)) で分画した。5-1 の TLC 条件で確認しながら、スポット G を含むフラクションを集めた。そのフラクションを濃縮し、化合物 15 (5.2 mg) を得た。

HPLC 分取条件

カラム : TSKgel ODS-80Ts (2.0 i.d. × 25 cm, 5 μm)

移動相 : アセトニトリル/水混液 (20 : 80 及び 25 : 75)

流速 : 4 mL/min.

カラム温度 : 40°C 付近の一定温度

検出波長 : UV 230 nm

5-2-2. スポット E (化合物 13) の構造

化合物 13 (rengyol)

White powder. ESI MS (positive) m/z 183 [M+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z 159 [M-H]⁻; HR ESI MS m/z 183.0991 [M+Na]⁺ (calcd for C₈H₁₆O₃Na, 183.0992); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 400 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 100 MHz) δ : See Table 5-1.

5-2-3. スポット F (化合物 14) の構造

化合物 14 (pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside)

ESI MS (positive) m/z 543 [M+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z 519 [M-H]⁻; HR ESI MS m/z 543.1830 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₆H₃₂O₁₁Na, 543.1837); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) and ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ : See Table 5-2.

5-2-3. スポット G (化合物 15) の構造

化合物 15 (phillyrin)

ESI MS (positive) m/z 557 [M+Na]⁺; ESI MS (negative) m/z 533 [M-H]⁻; HR ESI MS m/z 557.1998 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₇H₃₄O₁₁Na, 557.1993); ¹H NMR (methanol-*d*₄, 600 MHz) δ : 7.15 (1H, d, J = 8.6 Hz), 7.03 (1H, d, J = 2.1 Hz), 7.01 (1H, brd, J = 1.4 Hz), 6.92-6.95 (3H, m), 4.48 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.15 (1H, d, J = 9.6 Hz), 3.85-3.88 (2H, m), 3.87 (3H, s, OMe), 3.84 (3H, s, OMe), 3.83 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, t, J = 8.6 Hz), 3.69 (1H, m), 3.39-3.51 (5H, m), 3.27 (1H, brdd, J = 9.3, 8.3 Hz), 2.94 (1H, m); ¹³C NMR (methanol-*d*₄, 150 MHz) δ : 151.0 (s), 150.3 (s), 149.6 (s), 147.6 (s), 137.5 (s), 132.8 (s), 119.9 (d), 119.2 (d), 118.0 (d), 112.8 (d), 111.5 (d), 110.8 (d), 102.8 (d), 89.1 (d), 83.4 (d), 78.2 (d), 77.9 (d), 74.9 (d), 72.1 (t), 71.3 (d), 70.7 (t), 62.5 (t), 56.7 (q), 56.5 (q), 56.4 (q), 55.9 (d), 51.3 (d).

Phillyrin (和光純薬, Lot# KPL1774)

^1H NMR (methanol- d_4 , 600 MHz) δ : 7.15 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.03 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.00 (1H, brd, J = 1.4 Hz), 6.91-6.95 (3H, m), 4.48 (1H, d, J = 6.9 Hz), 4.14 (1H, d, J = 9.9 Hz), 3.85-3.88 (2H, m), 3.87 (3H, s, OMe), 3.84 (3H, s, OMe), 3.83 (3H, s, OMe), 3.80 (3H, t, J = 8.8 Hz), 3.69 (1H, m), 3.49 (1H, dd, J = 9.1, 7.4 Hz), 3.45 (1H, t, J = 8.6 Hz), 3.42 (1H, m), 3.39 (2H, m), 3.27 (1H, brdd, J = 9.1, 8.1 Hz), 2.93 (1H, m); ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 150 MHz) δ : 151.0 (s), 150.4 (s), 149.6 (s), 147.7 (s), 137.6 (s), 132.8 (s), 119.9 (d), 119.3(d), 118.0 (d), 112.9 (d), 111.6 (d), 110.9 (d), 102.9 (d), 89.1 (d), 83.4 (d), 78.3 (d), 77.9 (d), 75.0 (d), 72.1 (t), 71.4 (d), 70.8 (t), 62.5 (t), 56.8 (q), 56.6 (q), 56.5 (q), 55.9 (d), 51.3 (d).

5-3. レンギョウの確認試験に関する検討

5-3-1. 抽出溶媒の検討

レンギョウの試料溶液調製に用いる溶媒として、メタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル、アセトンの4溶媒を検討した。レンギョウの粉末1gに、各溶媒10mLを加えて、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、その上澄液を試料溶液とし、次のTLC条件で試験した。

薄層板：シリカゲル 60F₂₅₄ (MERCK)

展開溶媒：クロロホルム／メタノール／水混液 (70 : 30 : 6)

展開距離：約 7 cm

スポット量：10 μL

検出方法：希硫酸噴霧後、105°C で 5 分間加熱

5-3-2. 検出試液の検討

5-2-1 で調製したレンギョウのメタノール抽出液 (1 g/10 mL) を用いて、一般的に用いられる検出方法 a~j で検討した。

薄層板, 展開溶媒, 展開距離, スポット量は 5-1-1 と同様

検出方法：a) 希硫酸噴霧後、105°C で 5 分間加熱

b) 噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液噴霧後、105°C で 5 分間加熱

c) 4-メトキシベンズアルデヒド硫酸試液噴霧後、105°C で 5 分間加熱

d) 噴霧用 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液噴霧後、105°C で 5 分間加熱

- e) 塩化鉄(III)試液噴霧
- f) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液噴霧後, 105°C で 5 分間加熱
- g) 噴霧用ドラージェンドルフ試液噴霧
- h) 噴霧用ドラージェンドルフ試液噴霧後, 亜硝酸ナトリウム試液噴霧
- i) 1,3-ナフタレンジオール試液噴霧後, 105°C で 5 分間加熱
- j) チモール・硫酸・メタノール試液噴霧後, 105°C で 5 分間加熱

5-3-3. 展開溶媒の検討

一般的なクロロホルム/メタノール/水混液系の代替溶媒として用いられる, 酢酸エチル/メタノール/水混液系及び, 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液系の 2 溶媒で検討した. 試料溶液はレンギョウのメタノール抽出液 (1 g/10 mL, メタノール) を用いた. 薄層板, 展開距離は 5-1 と同様

標準溶液: Rengyol, pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside 及び phillyrin それぞれ 1 mg をメタノール 1 mL に溶かした.

スポット量: 試料溶液 10 μL, 標準溶液 5 μL

検出方法: 4-メトキシベンズアルデヒド硫酸試液

展開溶媒: a) 酢酸エチル/メタノール/水混液 (20 : 3 : 1)

b) 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液 (7 : 2 : 1)

引用文献

- 1) 日本漢方生薬製剤協会「漢方薬処方実態調査 2011」
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/jittaichousa2011.pdf>
- 2) 財団法人 日本公定書協会. ”改訂一般用漢方処方の手引き”, じほう, 2009.
- 3) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方 第二追補, p. 140 (2014).
- 4) Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010, China Medical Science Press, Beijing, p. 215 (2010).
- 5) a) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 1474 (2011), b) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方 第一追補, p. 156 (2012).
- 6) 桑島博, 種田裕喜子, 陳 偉衆, 川西聡政, 堀 一之, 谷山登志男, 小林資生, 任 家礼, 北川 勲; 甘草修治における成分変化: 皮去り甘草と炙甘草中のサポニン及びフラボノイド成分の定量分析, 薬学雑誌, **119**, 945-955 (1999).
- 7) Westfahi JC, Gresham TL; Vinylidene cyanide. V. The aluminum chloride catalyzed reaction of vinylidene cyanide and aromatic compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1076-1080 (1954).
- 8) Simmler C, Nikolic D, Lankin DC, Yu Y, Friesen JB, Breemen RB, Lecomte A, Qué éner CL, Audo G, Pauli GF; Orthogonal analysis underscores the relevance of primary and secondary metabolites in Licorice. *J. Nat. Prod.*, **77**, 1806-1816 (2014).
- 9) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 227 (2011).
- 10) Lato M, Brunelli E, Ciuffini G; Bidimensional thin-layer chromatography of carbohydrates on silica gel impregnated with boric acid. *J. Chromatog.*, **34**, 26-34 (1968).
- 11) Taba KM, Köster R, Dahlhoff WV; Organoboron-disaccharides;II. 2,6-anhydro- β -D-fructofuranose by *O*-ethylboron-induced cleavage of sucrose. *Synthesis*, 1036-1037 (1983)
- 12) Köll P, Deyhim S, Heyns K; Anhydrozucker mit 2,7-dioxabicyclo[2.2.1]heptan-system: 2,6-anhydrohexulosen. *Chem. Ber.*, **111**, 2909-2912 (1978).
- 13) Goursaud F, Peyrane F, Veyrières A; New synthesis of 2,6-anhydro- β -D-fructofuranoses, pivotal [2.2.1] bicyclic acetals for the conversion of D-fructose into 2,2,5-trisubstituted tetrahydrofurans. *Tetrahedron*, **58**, 3629-3637 (2002).
- 14) Pocini L, Richards GN; Thermolysis of sucrose in dimethyl sulphoxide solution. *Carbohydr. Res.*, **87**, 209-217 (1980).
- 15) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 198 (2011).

- 16) Feigl F; Spot tests in organic analysis sixth edition; Elsevier, Maruzen asian edition, Tokyo, p 289 (1960).
- 17) 奥村 丞司, メイラード反応によるフレーバーの生成, 澱粉科学, **38**, 81-92 (1991).
- 18) Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon Win; Tabellen zur strukturaufklärung organischer verbindungen mit spektroskopischen methoden; Boschke FL, Fresenius W, Huber JFK, Pungor E, Simon W, West ThS, Eds, Springer-Verlang, p H265 (1981).
- 19) Yuan Y, Zhao G, Chen F, Liu J, Wu J, Hu X; Correlation of methylglyoxal with acrylamide formation in fructose/asparagine Maillard reaction model system. *Food Chemistry*, **108**, 885-890 (2008).
- 20) 岡田 稔, 新訂 原色牧野和漢薬草大圖鑑, 北隆館, p. 595 (2002).
- 21) 伊藤精亮, 大庭 潔, 藤野安彦; 小麦種実中のグリコシルグリセリド, 日本農芸化学会誌, **57**, 1231-1234 (1983).
- 22) Prieto J. A., Ebri A., Collar C.; Composition and distribution of individual molecular species of glycolipids in wheat flour, *J. Am. Oil Chem.*, **69**, 1019-1022 (1992).
- 23) Wenkert, E., Loeser, E-M., Mahapatra, S. N., Schenker, F., Wilson E. M.; Wheat bran phenols, *J. Org. Chem.*, **29**, 435-439 (1964).
- 24) Ross, A. B., Shepherd M. J., Schupphaus, M., Sinclair, V., Alfaro, B., Kamal-Eldin, A., Aman, P.; Alkylresorcinols in cereals and cereal products, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4111-4118 (2003).
- 25) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 234 (2011).
- 26) Funai, N., Ozawa, H., Hirata, A., Horinouchi, S.; Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 6356-6361 (2006).
- 27) Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010, China Medical Science Press, Beijing, 2010, p. 372.
- 28) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方 第 1 追補, p. 160 (2012).
- 29) 大塩春治, 成瀬義知, 井上博之; 地黄のイリドイド配糖体の定量分析, 生薬学雑誌, **35**, 291-294 (1981)
- 30) Oshio H., Inouye H.; Iridoid glycosides of *Rehmannia glutinosa*, *Phytochemistry*, **21**, 133 (1982).
- 31) Sasaki H., Nishinura H., Chin M., Mitsuhashi H.; Hydroxycinnamic acid esters of phenethylalcohol glycosides from *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*, *Phytochemistry*, **28**, 875 (1989).
- 32) 久保道徳, 浅野年紀, 松田秀秋, 湯谷勝治, 本田 進; 地黄の研究 (第 3 報) 地黄の修治法の違いによる成分変化と血液レオロジー改善作用との関連性, 薬学雑誌, **116**, 158-166 (1996).
- 33) 陳 政雄, 第 5 回生薬に関する懇談会記録集 (テーマ: 地黄), p. 46-65, 東京 (1989).

- 34) 化学大辞典 8, 化学大辞典編集委員会編. 共立出版株式会社, 東京, p. 925-926 (1962)
- 35) M.Tomoda, S. Kato and M. Onuma; Water-soluble constituents of *Rehmanniae Radix*. I. Carbohydrates and acids of *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis*, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1445-1460 (1971)
- 36) Sugawara S., Nakagawa R., Urashima T., Sato T., Muratubaki T., Sayama K.; Transgalactosylation products from melibiose by the α -galactosidase of *Absidia corymbifera*, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 211 (1990).
- 37) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 213 (2011).
- 38) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 227 (2011)
- 39) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 164 (2011).
- 40) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 1544 (2011).
- 41) 難波恒雄, 和漢薬百科図鑑, 大阪, 保育社, Vol. I, p. 99-101.
- 42) Chen J., Su H., Huang Y., Ge P., Lv Z., Comparative studies on genetic resource of characteristics of *Alisma*. *China J. Chinese Materia Medica*, **34**, 2713-2717 (2009).
- 43) Yoshikawa M., Norimichi T., Murakami T., Ikebata A., Matsuda H., Matsuda H., Kubo M.; Studies on *Alismatis Rhizoma*. III. Stereostructures of new protostane-type triterpenes, alisols H, I, J-23-acetate, K-23-acetate, L-23-acetate, M-23-acetate, and N-23-acetate, from the dried rhizome of *Alisma orientale*, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 524-528 (1999).
- 44) Makino B., Kobayashi M., Kimura K., Ishimatsu M., Sakakibara I., Higuchi M., Kubo M., Sasaki H., Okada M., Local variation in the content of angiotensin II and arginine vasopressin receptor antagonistic terpenoids in the rhizomes of *Alisma orientale*, *Planta Med.*, **68**, 226-231 (2002).
- 45) Li X., Ding X., Chu B., Ding G., Gu S., Qian L., Wang Y., Zhou Q., Molecular authentication of *Alisma orientale* by PCR-RFLP and ARMS. *Planta Med.*, **73**, 67-70 (2007).
- 46) a) 牛車腎気丸エキス: 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 1492-1495, (2011), b) 柴苓湯エキス: 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 1504-1506, (2011), c) 当帰芍薬散エキス: 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 167-169, d) 八味地黄丸エキス: 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 1566-1569 (2011).
- 47) 木内文之, 合田幸広, 石崎昌洋, 糸 博之, 川崎武志, 川原信夫, 神本敏弘, 菊池祐一, 近藤誠三, 杉本智潮, 成川佑次, 日向野太郎, 山本 豊; 日本薬局方収載の TLC による生薬の確認試験について (1) 1-ブタノール/水/酢酸(100)混液を展開溶媒とする確認試験, *生薬学雑誌*, **65**, 25-32 (2011)
- 48) 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方, p. 234 (2011)

- 49) Miyamoto M., Murata T.; Alisol compounds, United states patent office 3,579,505
- 50) 難波恒雄, 和漢薬百科図鑑, 大阪, 保育社, Vol. I, p.296-298 (1980).
- 51) 西部三省, 千葉真理子, 久田末雄; 漢薬・レンギョウの成分研究 (第1報) 市販レンギョウの成分について, 薬学雑誌, **97**, 1134-1137 (1977).
- 52) 西部三省, 千葉真理子, 久田末雄; 漢薬・レンギョウの成分研究 (第2報) 第九改正日本薬局方レンギョウ基原植物の果実におけるリグナン配糖体成分の比較, 生薬学雑誌, **31**, 131-135 (1977).
- 53) Chiba, M., Hisada, S., Nishibe, S.; The position of glucose linkage in phillyrin, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3435-3436 (1977).
- 54) 千葉真理子, 久田末雄, 西部三省; 漢薬・レンギョウの成分研究 (第3報) シナレンギョウおよびレンギョウ果実の成分について, 生薬学雑誌, **32**, 194-197 (1978).
- 55) Zhang, Q., Wei, X., Wang, J.; Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, and endphytic fungus isolated from *Forsythia suspense*, *Fitoterapia*, **83**, 1500-1505 (2012).
- 56) Nishibe, S., Okabe K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S.; The structure of forsythiaside isolated from *Forsythia suspensa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1048-1050 (1982).
- 57) Nishibe, S., Okabe K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H., Akisada T.; Studies on the chinese crude drag "Forsythiae Fructus." VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspensa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4548-4553 (1982).
- 58) 野呂征男, 久田陽一, 奥田和代, 川村智子, 田中俊弘, 西部三省; レンギョウ果実の phenylethanoid 配糖体について, 生薬学雑誌, **45**, 327-332 (1991).
- 59) Endo, K., Hikino, H.; Structures of rengyol, rengyoxide, and rengyolone, new cyclohexylethane derivatives from *Forsythia suspensa* fruits, *Can. J. Chem.*, **62**, 2011-2014 (1984).
- 60) Seya, K., Endo, K., Hikino, H.; Structures of rengyosides A, B and C, three glucosides of *Forsythia suspense* fruits, *Phytochemistry*, **28**, 1495-1498 (1989).
- 61) Endo, K., Seya, K., Hikino, H.; Stereostructure of rengyol and isorengyol, phenylethanoids of *Forsythia suspensa*, *Tetrahedron*, **43**, 2681-2688 (1987).
- 62) 厚生労働省, 第16改正日本薬局方, p. 1598 (2011).
- 63) Navarro, E., Trujillo, J., Breton, J.L., Boada, J.; Cyclohexyl-ethanol derivatives from *Isoplexis chalcantha*, *Phytochemistry*, **25**, 1990-1991 (1986).
- 64) Abdullahi, H., Nyandat, E., Galeffi, C., Messana, I., Nicoletti, M., Marini Bettolo, G.B.; Cyclohexanols of *Halleria lucida*, *Phytochemistry*, **25**, 2821-2823 (1986).
- 65) Hase, T., Kawamoto, Y., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Picheansoonthon, C.;

- Cyclohexylethanoids and related glucosides from *Millingtonia hortensis*, *Phytochemistry*, **39**, 235-241 (1995).
- 66) Kobler, C., Effenberger, F.; Chemo enzymatic synthesis of rengyol and isorengyol, *Tetrahedron*, **62**, 4823-4828 (2006).
- 67) Matsunami, K., Otsuka, H., Kondo, K., Shinzato, T., Kawahata, M., Yamaguchi, K., Takeda, Y.; Absolute configuration of (+)-pinoresinol 4-*O*-[6''-*O*-galloyl]- β -D-glucopyranoside, macarangiosides E, and F isolated from the leaves of *Macaranga tanarius*, *Phytochemistry*, **70**, 1277-1285 (2009).