

## 逆相薄層クロマトグラフィーを用いた生薬の確認試験

### 1 はじめに

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、従来から吸着剤にシリカゲルを用いた順相 TLC が汎用されてきた。また、その展開溶媒として、クロロホルム、ジクロロメタン等のハロゲン系溶媒が用いられてきたが、第 15 改正日本薬局方 (局方) においては、これら有害試薬使用の低減化の方針が示されている<sup>1)</sup>。しかし、局方に収載されている生薬サイコの TLC 確認試験においては、展開溶媒に依然としてクロロホルム / メタノール / 水 (30 : 10 : 1) の系が用いられている<sup>2)</sup>。

一方、化学修飾型シリカゲルプレートを用いた逆相 TLC は固定相の極性が小さいため、展開溶媒として水、アセトニトリル等の極性の高い溶媒系を選択できるので、ハロゲン系溶媒等の有害試薬使用を避けることができる。最近われわれは逆相 TLC を食品・化粧品中のタール色素のルーチン検査に用い<sup>3)</sup>、逆相 TLC は順相 TLC に比べて Rf 値の再現性に優れていることを報告した<sup>4)</sup>。

そのため、逆相 TLC は多成分が含まれた生薬成分の分析に有用であると思われた。これらのことから、逆相 TLC を生薬の確認試験に応用した。逆相 TLC を用いた生薬分析はプレートの担体としてシラナイズドシリカゲル (シリカゲルをジクロロジメチルシランで化学修飾したもの) を用いた方法が報告されている<sup>5)</sup>。われわれは逆相 TLC プレートの担体として食品・化粧品中のタール色素分析において良好な分離が得られた RP-18 (シリカゲルを C-18 の炭化水素鎖で化学修飾したもの) を選択した<sup>3,4)</sup>。また、展開溶媒としてハロゲン系溶媒の有害試薬を含有しない溶媒系を検討

した。さらにスキャニングデンシトメータを用い、プレート上に展開したスポットの紫外吸収スペクトルを直接測定することにより、生薬成分の確認を行った。われわれは、これらの逆相 TLC を用いた生薬の確認試験について専門誌に報告したが<sup>6)</sup>、今回は、生薬のサイコ、アカメガシワ、サンシュユの確認試験について紹介する。

### 2 実験方法

#### 1. 試料

A) サイコ (Lot No. 992074)、B) アカメガシワ (Lot No. 421122)、C) サンシュユ (Lot No. 021102) : A)、B) C) は局方生薬品 (マツウラ製)

#### 2. 試料溶液の調製

試料 A)、B)、C) のそれぞれについて、局方収載の確認試験の項における方法に従い、試料溶液を調製した<sup>2,7)</sup>。

#### 3. 標準溶液の調製

A)、B)、C) の有効成分を確認試験の標準品とした。すなわち、A) はサイコサポニン a、c、d、B) はベルゲニン、C) はログニンを標準品とした。サイコサポニン a、c、d、ベルゲニン、ログニンは和光純薬製のものを使用した。それぞれについて、局方収載の確認試験の項における方法に従い、標準溶液を調製した<sup>2,7)</sup>。その他試薬はすべて特級の和光純薬工業製を用いた。

#### 4. 測定条件

1) TLC 条件 プレート : メルク社製 RP-18 F 254S, Art. 15389、展開溶媒 : A) ; 2-ブタノン / メタノール / 水混液 (1 : 1 : 1)、B) ; 水 / メタノール / アセトニトリル混液 (10 : 3 : 2)、C) ; 水 / アセト

ニトリル混液 (5:2)、スポット量: 10  $\mu$  L、展開距離: 約 10cm、検出: A); 硫酸/エタノール (95) 混液 (1:1) 噴霧・50°C 5分加温、B)、C); 暗所で紫外線 254 nm 照射

2) スキャニングデンシトメトリー条件 スキャニングデンシトメータ: 島津製の2波長フライングスポットスキャニングデンシトメータ CS-9000、波長走査範囲: 200 - 370 nm、スリットサイズ: 0.4  $\times$  0.4 mm、測光系: 反射吸光法

### 3 結果及び考察

#### 1. サイコの確認試験

サイコについては、局方記載の展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水混液 (30:10:1) で TLC の確認試験をしたところ、局方の解説書記載のとおり、サイコサポニン a とサイコサポニン d は同じ Rf 値 (0.55) を示し分離しなかった (Fig. 1)。<sup>8)</sup> われわれは、逆相 TLC を用い、サイコサポニン a とサイコサポニン d を分離し、さらにサイコの有効成分サイコサポニン c を加え、これら 3 成分を分離することができ、また、ハロゲン系溶媒等の有害試薬を用いない展開溶媒を検討した。種々検討した結果、2-ブタノン/メタノール/水混液 (1:1:1) の系を用いることにより、これら 3 成分を分離することができた。分離したスポットの Rf 値はサイコサポニン a は 0.47、d は 0.35、c は 0.58 であった。これに対し、サイコ試料溶液も良好な分離が得られ、同じ Rf 値にスポットがあることが確認された (Fig. 2)。

#### 2. アカメガシワの確認試験

アカメガシワの有効成分を確認するため逆相 TLC を用い、検討した結果、展開溶媒は水/メタノール/アセトニトリル混液 (10:3:2) の系を用いることにより、ベルゲニン標準溶液は Rf 値 0.53 を示した。これに対し、アカメガシワ試料溶液も良好に分離し、同じ Rf 値にスポットがあることが確認された (Fig. 2)。

#### 3. サンシュユの確認試験

サンシュユの有効成分を確認するため逆相 TLC を用い、検討した結果、展開溶媒は水/アセトニトリル混液 (5:2) 系を用いることにより、ロガニン標準溶液は Rf 値 0.55 を示した。これに対し、サンシュユ試料溶液も良好に分離し、同じ Rf 値

にスポットがあることが確認された (Fig. 2)。

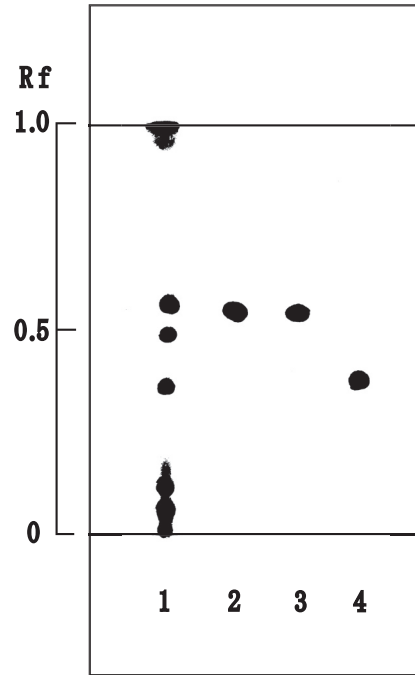


Fig. 1. サイコの標準溶液と試料溶液の TLC クロマトグラム

TLC クロマトグラムの Rf 値: 1, サイコの試料溶液 (0.37, 0.49, 0.56); 2, サイコサポニン a の標準溶液 (0.55); 3, サイコサポニン d の標準溶液 (0.55); 4, サイコサポニン c の標準溶液 (0.38). プレート: Silica gel 60 F<sub>254</sub> (E. Merck, 97221387). 展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水 (30:10:1).

#### 4. スキャニングデンシトメトリーによるスペクトルの確認

逆相 TLC 上に展開したアカメガシワ及びサンシュユの標準溶液について、スキャニングデンシトメータを用いて紫外吸収スペクトルを測定した。さらに、展開した標準溶液スポットと Rf 値が一致した試料溶液スポットについてスキャニングデンシトメータを用いて、紫外外部吸収スペクトルを測定した。その結果、それら標準溶液の極大吸収波長は、ベルゲニンは 213、274 nm、ロガニンは 237 nm であった。また、アカメガシワ試料溶液及びサンシュユ試料溶液のスポットのスペクトルは、それぞれベルゲニン及びロガニンの標準溶液スポットのスペクトルと極大吸収波長及びスペクトルが一致していた (Fig. 3)。しかし、サイコサポニン a、d は紫外部に吸収がないためスペクトルがとれなかった。そこで、文献により<sup>9)</sup> サイコサポニン a、d の標準溶液に酸処理 (4% 塩酸水

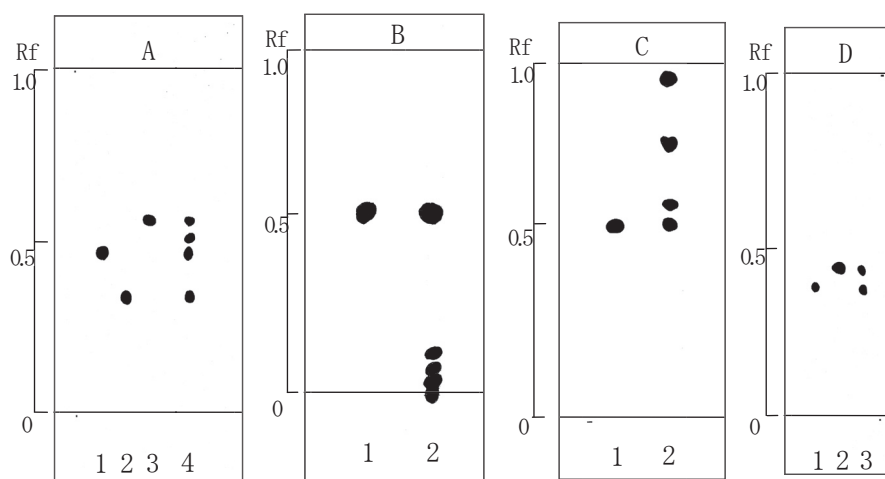


Fig.2. 生薬(サイコ、アカメガシワ、サンシュユ)の標準溶液と試料溶液の逆相 TLC クロマトグラム

逆相 TLC クロマトグラムの Rf 値: A) サイコ: 1. サイコサポニン a の標準溶液 (0.47), 2. サイコサポニン d の標準溶液 (0.35), 3. サイコサポニン c の標準溶液 (0.58), 4. サイコの試料溶液 (0.35, 0.47, 0.53, 0.58). B) アカメガシワ: 1. ベルゲニンの標準溶液 (0.53), 2. アカメガシワの試料溶液 (0.03, 0.06, 0.12, 0.53). C) サンシュユ: 1. ロガニンの標準溶液 (0.55), 2. サンシュユの試料溶液 (0.55, 0.61, 0.76, 0.90). D) 酸処理したサイコ: 1. サイコサポニン b1 の標準溶液 (0.38), 2. サイコサポニン b2 の標準溶液 (0.44), 3. 酸処理したサイコの試料溶液 (0.38, 0.44). プレート: RP-18F<sub>254</sub> S (E. Merck, OB257917). 展開溶媒: A) 1) 2-ブタノン/メタノール/水 (1:1:1). B) 水/メタノール/アセトニトリル (10:3:2). C) 水/アセトニトリル (5:2).

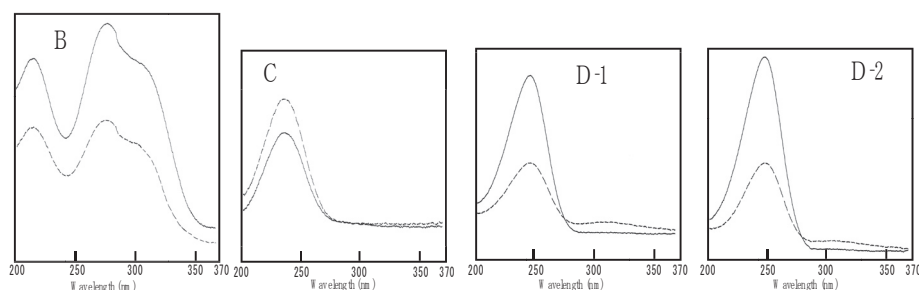


Fig.3. 逆相 TLC プレートに展開した標準溶液と試料溶液をスキャニングデンシトメーターを用い測定した紫外外部吸収スペクトル

紫外外部吸収スペクトルの極大波長 (nm):

B) ——— ベルゲニンの標準溶液 (213, 274), - - - - - アカメガシワの試料溶液 (213, 274).

C) ——— ロガニンの標準溶液 (237), - - - - - サンシュユの試料溶液 (237).

D-1) ——— サイコサポニン b1 の標準溶液 (248), - - - - - 酸処理したサイコの試料溶液 (248).

D-2) ——— サイコサポニン b2 の標準溶液 (248), - - - - - 酸処理したサイコの試料溶液 (248).

溶液を加え、16 時間室温静置) を行なった。そして、サイコサポニン a、d をサイコサポニン b 1、b 2 に変化させた。また、サイコの試料溶液も同様に酸処理を行なった。それらの溶液を上記 A) の系で展開し、暗所で紫外線 254 nm 照射し、スポットを確認した。そのクロマトグラムは Fig. 2 の D) に示した。その Rf 値はサイコサポニン b 1 :

0.38、b 2 : 0.44 であり、酸処理したサイコ試料溶液スポットも同じ Rf 値を示した。同様に、スキャニングデンシトメータを用いて、紫外外部吸収スペクトルを測定した。その結果、それらスペクトルの極大吸収波長はサイコサポニン b 1、b 2 及び酸処理したサイコともに 248 nm であり、また、スペクトルも一致していた (Fig. 3)。

以上のことから、サイコの確認試験において、局方に記載されている有害試薬であるクロロホルムを含む展開溶媒ではなく2-ブタノン/メタノール/水混液(1:1:1)を展開溶媒とした逆相TLCを用いることにより、サイコの有効成分を確認することができた。さらにスキャニングデンストメトリーにより、それら成分の紫外部吸収スペクトルの情報も得ることができ、確認試験の確度を高めることができた。これらのことから、試料に供した生薬A)サイコ、B)アカメガシワ、C)サンシュユは、それぞれその成分として、A)はサイコサポニンa、c、d、B)はベルゲニン、C)はログニンを含有していることが確認された。

#### 4 おわりに

逆相TLCは生薬の確認試験に応用できた。展開溶媒に水、アセトニトリル等の高極性の溶媒系を用いることにより、人体及び環境に有害なクロロホルム及びジクロロメタンを排除できた。同時にスキャニングデンストメトリーにより、スペクトルの情報も得られ、本法により、生薬の有効成分を、簡易、迅速、確実に同定することが可能であった。塩素系溶媒を用いない人体にやさしいクリーンアナリシスという観点から、今後ますます逆相TLCを用いた生薬分析の有用性が高まると思われる。

#### 参考文献

- 1) The Society of Japanese Pharmacopoeia, "The Japanese Pharmacopoeia Technical Information", Jiho Publishing, Tokyo, 2006, p. 39
- 2) The Japanese Pharmacopoeial editorial committee, "The Japanese Pharmacopoeia 15th Edition", Hirokawa Publishing, Tokyo,

2006, p. D-266.

- 3) a) Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Inoue H., Ohno T., Inagaki K., Kuno A., Yamamoto N., J. Chromatogr., 411, 437-444 (1987), b) Ohno T., Ito Y., Mikami E., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Nakagawa T., Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 42, 53-59 (1996), c) Ueno E., Ohno T., Oshima H., Saito I., Ito Y., Oka H., Kagami T., Kijima H., Okazaki K., J. Food Hyg. Soc. Jpn., 39, 286-291 (1998), d) Ohno T., Mikami E., Matsumoto H., J. Health Sci., 49, 401-404 (2003).
- 4) Ozeki N., Oka H., Ikai Y., Ohno T., Hayakawa J., Hayashi T., Aoyama T., Kushibiki Y., Sato T., Ito M., Suzuki R., J. Food Hyg. Soc. Jpn., 34, 542-545 (1993).
- 5) Kido T., Baba K., Natural Medicines, 54, 219-236 (2000).
- 6) a) Ohno T., Mikami E., Matsumoto H., Oka H., Nin I., Natural Medicines, 58, 218-221 (2004). b) Ohno T., Mikami E., Oka H., J Nat Med, 60, 141-145 (2006).
- 7) The Japanese Pharmacopoeial editorial committee, "The Japanese Pharmacopoeia 15th Edition", Hirokawa Publishing, Tokyo, 2006, p. D-5, D-298.
- 8) The Japanese Pharmacopoeial editorial committee, "The Japanese Pharmacopoeia 15th Edition", Hirokawa Publishing, Tokyo, 2006, p. D-268.
- 9) Harada, "Hanyou-shouyaku-no-seibun-teiryuu", Hirokawa Publishing, Tokyo, 1989, p. 166.  
(文責: 衛生化学部 大野 勉)

