

生薬「猪苓」標準化のための指標成分の探索

袁 丹,^a 山本恵一,^b 畢 開順,^a 張 屏,^a 劉 芳,^a 鹿野美弘^{c,*}Studies on the Marker Compounds for Standardization of Traditional Chinese Medicine “*Polyporus Sclerotium* (猪苓)”Dan YUAN,^a Kei-ichi YAMAMOTO,^b Kaishun BI,^a
Ping ZHANG,^a Fang LIU,^a and Yoshihiro KANO^{c,*}Shenyang Pharmaceutical University,^a 103 Wenhua Road, Shenyang, China, Kanebo LTD.,
Kampo & Healthcare Research Laboratories,^b 3-1 Kanebo-machi, Takaoka, Japan,
and Hokkaido College of Pharmacy,^c 7-1 Katsuraokacho, Otaru, Japan

(Received July 31, 2002; Accepted December 2, 2002)

Natural products have been used for healthcare and pharmacotherapy. Because difficulties in quality control affect their production, processing, and marketing, it is necessary to establish adequate marker compounds for their effective application. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (I) was studied in the screening of the marker compounds for the standardization of *Polyporus Sclerotium* (猪苓), which has the advantage of easy qualitative and quantitative analysis because of its fluorescence. Its applicability in the standardization of *Polyporus Sclerotium* is discussed based on comparative studies of 30 crude samples of *Polyporus Sclerotium* and some other fungi herbs using TLC and HPLC analysis with I it as the marker compound, as well as its chemical synthesis.

Key words—marker compound; *Polyporus Sclerotium*; quantitative analysis; ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one

緒 言

近年、医薬先進国においても疾病の予防や治療のための補完・代替医療の一環として伝統医療に期待し、生薬を利用する傾向が強くなっている。生薬は世界各国でそれぞれの経験を基に各種の用途で用いているが、品質の規格が未整備のため、同名異物や類縁、類似物等が流通し易く、市場での混乱や誤用の原因となっている。^{1,2)} このような現状から最も良質の生薬を適切に生産し供給し、適正に利用するためには生薬の科学的品質評価法を確立し、正しく鑑別できる基準の設定が求められる。生薬の品質はまず薬効成分含量で行うべきであるが、多くの生薬では、その用途の特殊性から薬効成分の解析、確定が不十分な状態にある。そこで生薬の標準化の1つとして「指標成分」という概念を定義し、^{1,3-7)} 日中韓などの東洋の各国に限らず、生薬がサプリメントとして用いられているアメリカでも指標成分 (mark-

er compounds) の報告がみられるようになった。⁸⁾

猪苓 [*Polyporus umbellatus* Fries (*Polyporaceae*) の菌核] は水分代謝の調節に關与する漢方薬物 (利水薬) として猪苓湯や五苓散等に配合されている。この猪苓はいわゆる利尿薬とは異なった作用機序で用いられている。利尿作用に關連した生物活性については猪苓エキスとしての報告があるが、⁹⁾ 有効成分は未詳であり、日本薬局方や中華人民共和国薬典 (中国薬典) においても有効成分を確認し、あるいは定量することが規定されていない。

さらに猪苓の含有成分として既に ergosterol (II)¹⁰⁾ と 2-hydroxytetracosanoic acid¹¹⁾ あるいは数種の polyporusterone 類¹²⁾ が報告されているが、猪苓標準化のための指標成分としての検討が報告された例は認められない。日本薬局方では猪苓の確認試験に sterol 類に基づくリーベルマン反応が規定されているが、¹³⁾ II は天然に広く分布し、指標成分としての条件に不十分な点が多い。

そこで今回、著者らは猪苓規格の標準化のために、猪苓の指標成分の探索及び定量法を検討した結果、ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (I, Fig. 1)

^{a)} 沈陽薬科大学, ^{b)} カネボウ株式会社漢方ヘルスケア研究所,

^{c)} 北海道薬科大学

e-mail: kano@hokuyakudai.ac.jp

を選別し、指標成分としての有用性について検討した。

実験の部

1. 試料 試験に用いた生薬猪苓は主要産地及

び中国、日本市場で収集した 30 検体で、それらの産地又は入手先、年度等を Table 1 に示す。また、比較として用いた茯苓 5 検体及び靈芝 1 検体は中国産地あるいは市場から入手した (Table 2)。

2. 試薬 抽出、分離、及びクロマト用各種溶

Table 1. Samples of *Polyporus Sclerotium* Used in Our Studies

Sample No.	Production areas or markets	Date	Processing	Ethanol-soluble extractive (%)	Ash (%)		Loss on drying (%)
					total	acid-insoluble	
1	Herb Co. of Shanxi Prov. (陝西省薬材公司)	Sept. 2000	Whole	0.41	12.90	1.72	9.34
2	Herb Co. of Yunnan Prov. (雲南省薬材公司)	Oct. 1999	Whole	0.81	6.32	0.91	8.38
3	Tochimototenkaido Co., Japan (日本栃本天海堂)	Dec. 2000	Whole	0.54	6.26	0.94	11.07
4	Herb Co. of Shanxi Prov. (山西省薬材公司)	Mar. 2000	Cut	0.68	10.51	3.28	9.41
5	Herb Co. of Shanxi Prov. (山西省薬材公司)	Mar. 2000	Cut	1.09	11.39	2.97	9.11
6	Herb Co. of Shanxi Prov. (甘肅省薬材公司)	July 2000	Cut	1.25	5.96	1.75	9.21
7	Herb Co. of Shijiazhuang (石家庄薬材公司)	Sept. 2000	Cut	1.31	15.86	0.65	7.91
8	Herb Co. of Changchun (長春薬材公司)	Sept. 2000	Cut	0.84	6.22	0.79	8.88
9	Herb Co. of Zhengzhou (鄭州薬材公司)	Jun. 2001	Cut	1.28	12.07	3.94	9.41
10	Tochimototenkaido Co., Japan (日本栃本天海堂)	Dec. 2000	Whole	0.57	4.39	0.78	9.63
11	Tongjunge Drugstore, Chongqing (重慶桐君閣薬房)	July 2000	Cut	0.63	3.66	1.18	9.41
12	Pharm. Industry Drugstore, Changsha (長沙製薬工業薬房)	July 2000	Cut	1.00	5.43	0.85	10.72
13	Chushengtong Pharm. Co., Wuhan (武漢初升堂薬業公司)	July 2000	Cut	1.08	8.09	1.33	10.20
14	Baixin Drugstore, Nanjin (南京百信薬房)	July 2000	Cut	0.69	9.97	0.95	10.88
15	Chaidetongtang Drugstore, Shanghai (上海蔡同徳堂薬房)	Jun. 2001	Cut	0.68	9.66	0.81	10.99
16	Huqingyutang Drugstore, Hangzhou (杭州胡慶余堂薬房)	July 2000	Cut	0.75	8.22	1.02	10.58
17	Anbo Pharm. Co., Hefei (合肥安保薬業公司)	July 2000	Cut	1.00	7.29	1.35	9.98
18	Tongjitang Drugstore, Guiyang (貴陽同濟堂薬房)	July 2000	Whole	0.30	12.00	2.37	10.26
19	Herb Co. of Guangzhou (广州薬材公司)	July 2000	Cut	0.91	7.68	1.21	10.62
20	Herb Co. of Nanning (南寧薬材公司)	July 2000	Cut	0.70	3.63	0.48	10.70
21	Huichuntang Pharm. Co., Fuzhou (福州回春堂薬業公司)	July 2000	Cut	0.93	10.82	0.79	10.50
22	Herb Co. of Zhengzhou (鄭州薬材公司)	Sept. 2000	Cut	0.93	6.95	0.93	10.58
23	Tianyitang Drugstore, Shenyang (沈陽天益堂薬房)	June 2000	Cut	0.62	9.08	1.80	9.06
24	Herb Co. of QiQihaer (齊齊哈爾薬材公司)	Jun. 2001	Cut	0.65	8.73	3.68	8.99
25	Zhongxi Drugstore, Xian (西安中西大薬房)	July 2000	Cut	0.47	4.82	0.40	10.24
26	Lanzhen Drugstore, Lanzhou (蘭州蘭震大薬房)	July 2000	Cut	0.62	12.23	0.55	9.90
27	TCM Hospital of Neimenggu (内蒙中医院)	July 2000	Cut	0.66	10.51	1.72	10.74
28	Tochimototenkaido Co., Japan (日本栃本天海堂)	Dec. 2000	Whole	0.27	4.14	0.22	9.89
29	Tochimototenkaido Co., Japan (日本栃本天海堂)	Dec. 2000	Cut	0.69	6.42	0.29	9.16
30	Tochimototenkaido Co., Japan (日本栃本天海堂)	Dec. 2000	Cut	0.74	4.77	0.16	10.07

All the samples are botanically from *Polyporus umberllatus* Fries.

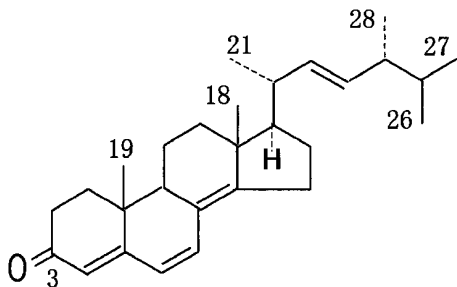


Fig. 1. Structure of Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (I)

Table 2. Samples of *Poria Sclerotium* and *Lucid Ganoderma* Used in the Studies

Sample No.	Production areas or markets	Date	Processing
31	Herb Co. of Anhui Prov. (安徽省薬材公司)	Oct. 2002	Whole
32	Herb Co. of Yunnan Prov. (雲南省薬材公司)	Sept. 2002	Whole
33	Herb Co. of Chengdu (成都市薬材公司)	Sept. 2002	Whole
34	Herb Co. of Shanxi Prov. (山西省薬材公司)	Sept. 2002	Cut
35	Herb Co. of Wuhan (武漢市薬材公司)	Oct. 2002	Cut
36	Tianyitang Drugstore, Shenyang (沈陽天益堂薬房)	June 2001	Cut

Samples of 31~35 are *Poria cocos* (Fr.) Wolf and *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst., respectively.

媒, 呈色試薬 (硫酸) などは分析純度の試薬を購入 (中国) して用いた. 薄層板は Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck No. 5554) を, またカラムクロマト充填剤はシリカゲル (中国青島化工廠, 200—300 メッシュ) 又はアルミナ (和光純薬工業, カラムクロマトグラフ用活性アルミナ, 200 メッシュ) を用いた. 成分 I の合成に用いた II, *p*-benzoquinone, トルエン及び aluminium *tert*-butoxide は特級試薬を和光純薬株式会社 (日本) より購入して用いた.

3. 実験装置 分析用 HPLC 装置には, Shimadzu LC-6A ポンプ, Shimadzu SPD-6A 検出器, Shimadzu CTO-6A 恒温槽, Shimadzu C-R7A plus データ処理器, また Waters 2996 型フォトダイオードアレイ検出器, Millennium Chromatography Manager を用いた. カラムは Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm, 5 μm, GL Sciences) を用いた. 分取 HPLC 装置には, GL Sciences SUD-16 ポンプ, Shimadzu SPD-2A 検出器, Shimadzu C-R6A デー

タ処理機を用いた. カラムは C.I.G.C₁₈₋₂₀ (22×300 mm, Kusano) を用いた. 機器分析には日立 M-600 型質量分析計, Perkin-Elmer 241MC 分光旋光計, Shimadzu UV-265FW 型紫外分光光度計, Bruker IFS55 型赤外分光光度計, 日本電子 GX-270 型核磁気共鳴装置 (¹H: 270, ¹³C: 68.7 MHz) を用いた. 超音波抽出器は B-5200 (Yamato), 恒温水槽は SHA-C 型 (中国江蘇常州国華電気), 遠心分離機は H-26F (Kokusan), 電子天秤は AG-245 (Mettler-Toledo) を用いた.

4. 方法

4-1. TLC パターンによる成分の識別とナンバリング 猪苓抽出物を TLC 薄層板 [展開溶媒系: クロロホルム—メタノール (95:5) 又はヘキサン: アセトン (90:10)] で日局十四一般試験法薄層クロマトグラム (TLC) 法に準じ操作した.

4-2. 成分 I 及び II の単離と同定 猪苓粗末 (2 kg) を 5L 分液ロートに充填し, アセトンで浸潤させ, 12 時間室温で放置した. その後, パーコレーション法に準じて 1 分間に 0.5 ml の流量で滴下させた. 得られた抽出液 (2L) を減圧濃縮し軟エキス (15.2 g) を得た. 酢酸エチル (100 ml) を加えて抽出し, 溶液を分離後, 残渣に再度酢酸エチル (100 ml) を加え抽出した. 全抽出液を合わせ減圧濃縮した (収量 5.6 g). 本エキスをシリカゲルカラム (500 g, 48 mm×295 mm) を用いクロロホルムで溶出した. 蛍光成分を含む分画 Fr-1 (125 mg) と Fr-2 (80 mg) を得た. 分取 HPLC に通じ, Fr-1 から I と II, Fr-2 から III—V の計 5 成分を得, その収量は, I が 18.5 mg, II は 35 mg, III—V は微量であった.

融点, UV 及び NMR から I は ergosta-4,6,8(14), 22-tetraen-3-one, II は ergosterol と同定した. また, IV 及び V は UV スペクトラム (3 次元検出器) から polyporusterone 類と推定された.

I の示性値: 淡黄色片状結晶 (メタノール), クロロホルム, 酢酸エチルに極めて溶けやすく, エタノール, アセトンにやや溶ける. 融点 113.5—115 °C (未補正).

UV λ_{max} (MeOH) nm (log ε): 237 (3.24), 282 (3.65), 349 (4.39).

¹H-NMR (CDCl₃, 270 MHz) δ: 0.82 (3H, d, J=6.6 Hz, CH₃-26), 0.84 (3H, d, J=6.6 Hz, CH₃-27),

0.93 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH₃-28), 0.96 (3H, s, CH₃-18), 1.00 (3H, s, CH₃-19), 1.04 (3H, d, $J=6.4$ Hz, CH₃-21), 5.25 (2H, m, H-22, -23), 5.74 (1H, s, H-4), 6.03 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-6), 6.60 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-7).

¹³C-NMR (CDCl₃, 68.7 MHz) δ : 16.7 (C-19), 17.7 (C-28), 19.0 (C-11, 18), 19.7 (C-27), 20.0 (C-26), 21.2 (C-21), 25.4 (C-15), 27.7 (C-16), 33.1 (C-25), 34.2 (C-2, -12), 35.6 (C-1), 36.8 (C-10), 39.3 (C-20), 42.9 (C-24), 44.0 (C-13), 44.4 (C-9), 55.7 (C-17), 123.0 (C-4), 124.5 (C-6), 132.6 (C-22), 134.0 (C-5, -7), 135.0 (C-23), 156.1 (C-8), 164.4 (C-14), 199.4 (C-3).

High Resolution EI-MS: m/z 392.3071 (Calcd. for C₂₈H₄₀O: 392.3079).

なお、本標準品の HPLC 面積純度は 99.2%であった。

4-3. I の合成 J. Elks の方法¹⁴⁾に準じて合成した。すなわち、II (10 g) と *p*-ベンゾキノン (20 g) をトルエン (220 ml) に溶解した後、減圧下で約 20 ml を留去して除いた。Aluminium *tert*-butoxide (10 g) を加え 1 時間加熱還流した。反応液を冷却後に濾過し、残渣を加温したベンゼンで洗浄した。全濾液合わせ 0.1N NaOH 水溶液で 1 回洗浄し、さらに水で洗浄した後、塩化カルシウムで乾燥した。本溶液を減圧下で濃縮し乾固物を得た (収量 4.3 g)。本乾固物をベンゼンに溶解し、ベンゼンを移動相としてアルミナ (250 g) を充填したカラムにかけた。赤色帯の流出後に移動相をベンゼン-エーテル (1:1) に換え、次に溶出する黄帯を分取し、減圧下で蒸発乾固した。残渣を石油エーテル (40–60°C) で再結晶し黄色の板状晶 (1.5 g) を得た。さらにメタノールで再結晶をくり返し精製した。

本品を猪苓より抽出精製した I と NMR により同定した。

4-4. 分析用試料溶液の調製

(1) **TLC 用試料溶液**: 猪苓粉末 (40 メッシュ以下) を 1.0 g 秤量し、メタノール 20 ml を加え、恒温水浴で 1 時間加熱還流抽出した後、濾過した。濾過液を減圧下濃縮乾固し、残留物に 5% Na₂CO₃ 溶液 15 ml を加え溶解した。本溶液からエーテルで分配抽出を行い、エーテル層を無水硫酸ナトリウム 10 g で乾燥した後、蒸発乾固した。残留物に酢酸エ

チル 1 ml を正確に加え、1 分間超音波照射した後、TLC 分析用試料溶液とした。

(2) **HPLC 用試料溶液調製法**: 加熱還流法—猪苓粉末 (40 メッシュ以下) を 1.0 g 精密に量り、抽出溶媒 (メタノール, 酢酸エチル又はアセトン) を正確に 20 ml 加え、恒温水浴で 1 時間加熱還流抽出した後、濾過し、残渣を抽出溶媒 5 ml で洗い、濾過液を合わせて減圧濃縮乾固した。残留物にメタノール 5 ml を正確に加え、1 分間超音波処理を施した後、0.45 μ m メンブランフィルターで濾過した後、分析用試料溶液とした。

超音波法—猪苓粉末 (40 メッシュ以下) を 1.0 g 精密に量り、遠心管に入れ、メタノールを 20 ml を正確に加えて超音波 (42 kHz, 30 分間) 照射した後、遠心分離 (3500 rpm, 15 分間) した。上澄液を取り、残渣にメタノール 5 ml を加えて洗い、再び遠心分離し上澄液を得た。両上澄液を合わせて減圧下濃縮乾固した。残留物にメタノール 5 ml を正確に加え 1 分間超音波照射した後、0.45 μ m メンブランフィルターで濾過し分析用試料溶液とした。

4-5. I の HPLC 定量法の検討

(1) **I の安定性**: I を 100°C で 48 時間、また I のメタノール溶液 (1 mg→1 ml) を 4°C で 1 ヶ月放置した。融点や溶液中の成分含量を経時的に HPLC 法により測定した。

(2) **抽出条件の検討**: HPLC 定量法により、抽出溶媒、抽出方法を変えて抽出効率を検討した結果 (Table 3), 操作の簡便性から比較試験では超音波抽出法を採用した。

(3) **検量線**: I を 0.008~0.040 mg/ml の各範囲でメタノールに溶解し、標準溶液とした。これらの 15 μ l を HPLC より分析し、絶対検量線法により検量線を作成した。また I の 0.024 mg/ml 溶液及び猪苓 (sample 1) 試料溶液につき 5 回繰り返し測定して再現性を検討した。

Table 3. Comparison of Extractive Methods

Solvents	Methods	Peak area	Effectiveness (%)
EtOAc	Reflux for 1 h	353884	68.4
Me ₂ CO	Reflux for 1 h	381305	73.7
MeOH	Reflux for 1 h	517374	100
MeOH	Ultrasonic for 0.5 h	504440	97.5

(4) 回収率試験：精秤した既知含量の猪苓末 (sample 4) 1.0 g に I の標準品溶液 (0.012 mg/ml) 1 ml を正確に加え、試料調製法に従い、試料溶液を調製し、HPLC 法により分析して I の回収率を算出した。

(5) HPLC 測定条件：HPLC パターン分析条件：カラム, Hypersil ODS (4.6×250 mm, 5 μm, 中国大連 Elite 公司)；カラム温度：40℃；移動相：メタノール/水混液 (92：8)；流速, 1.5 ml/min；検出波長：303 nm 及び 348 nm；試料注入量, 20 μl；感度, 0.01AUFS。

HPLC 定量条件：カラム, Inertsil ODS-3 (4.6×250 mm, 5 μm, GL Sciences)；カラム温度, 40℃；移動相, アセトニトリル；流速, 1.5 ml/min；検出波長, 348 nm；注入量, 15 μl；感度, 0.01AUFS。

結 果

1. 猪苓及び関連生薬の TLC パターン分析及び確認試験 指標成分を探索する目的で、猪苓の TLC 分析 [クロロホルム—メタノール (95：5)] を行い、検出された主要成分スポットを I—V とした (Fig. 2)。TLC 上, I は 365 nm 照射で強い青白色の蛍光を示し、50% 硫酸噴霧—加熱で黄褐色の呈色を示す。II は 254 nm で暗色のスポットとなり、噴霧呈色では茶褐色のスポットとなる。III は 254 nm 及び 360 nm の紫外線照射で検出されず、噴霧

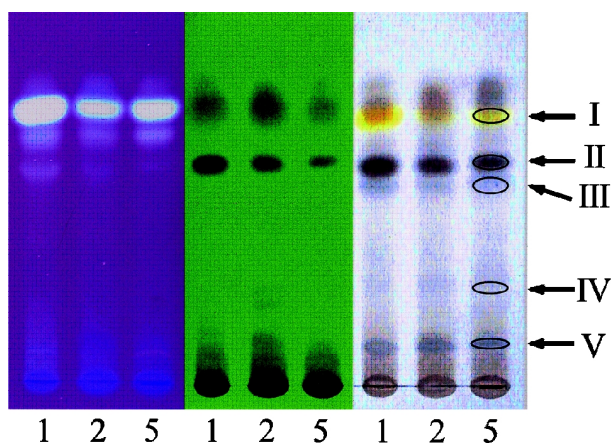


Fig. 2. TLC Chromatogram of Polyporus Sclerotium

Samples 1, 2 and 5 were the methanolic extracts of Polyporus Sclerotium collected from its main production areas, which were the same sample numbers as those listed in Table 1. Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) and a solvent system of chloroform/methanol (95：5, v/v) were used. The detections were at UV-365 nm (the left) and UV-254 nm (the middle), then by spraying with 50% H₂SO₄/EtOH and heated at 105℃ for 5 min (the right). The main components numbered from I to V.

呈色により暗緑色を呈した。IV と V は共に 254 nm 照射でかすかに検出され、噴霧呈色では灰青色を呈した。

また、猪苓と茯苓、靈芝の TLC の比較試験では靈芝には I がやや顕著に確認され、茯苓でもかすかに検出された (Fig. 3)。

さらに入手経路の異なる猪苓各種の比較試験として同様に行った結果、365 nm 波長ではいずれの検

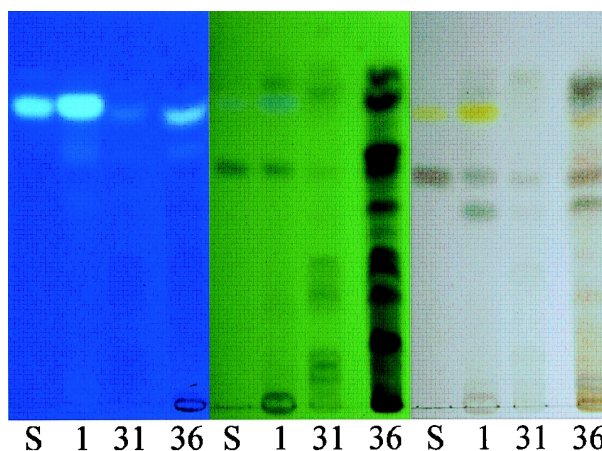


Fig. 3. Comparison of TLC Chromatogram of Some Fungi Crude Drugs

Samples of 1, 31 and 36 were the methanolic extracts of Polyporus Sclerotium (猪苓), Poria Sclerotium (茯苓) and Lucid Ganoderma (靈芝), listed in Tables 1 and 2. S represented a methanolic solution containing standard substances of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one ($R_f=0.77$) and ergosterol ($R_f=0.61$). Plate, the solvent system and the detection methods were as the same as Fig. 2.

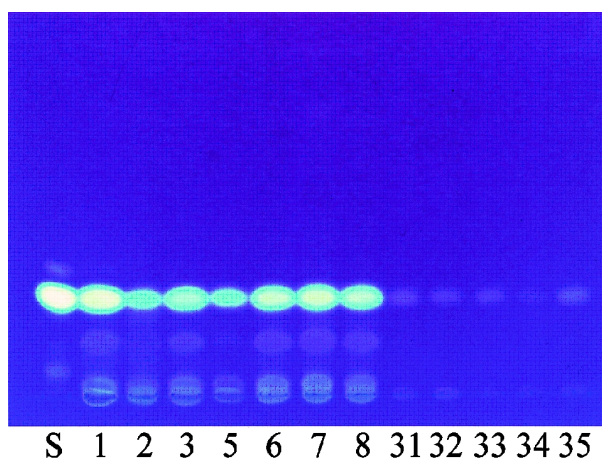


Fig. 4. TLC Chromatogram of Polyporus Sclerotium and Poria Sclerotium

Samples from 1 to 7 and from 31 to 35 were the methanolic extracts of Polyporus Sclerotium and Poria Sclerotium collected from both main production areas, respectively. For details of samples see Tables 1 and 2. S represented a methanolic solution of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one standard. Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) and a solvent system of Hexane/Acetone (90：10, v/v) were used. The fluorescent zones of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one was seen at UV-365 nm.

体においても I が顕著な青白色の蛍光スポットとして検出され、猪苓に普遍的に含有されていることが確認された (Fig. 4).

2. 猪苓及び関連生薬の HPLC 分析 HPLC [測定波長, 303 nm, 348 nm] による結果を Fig. 5 に示す. 波長 303 nm の測定では保持時間 (t_R) = 18 min—30 min の間に大きい 4 本のピーク (t_R : I = 23.2 min, II = 28.6 min, VI = 19.8 min, VII = 21.2 min,) が認められ, II は ergosterol と一致した. 348 nm の測定では I に相当するピークが顕著に認められるのみである. これら 4 本のピークの UV ス

ペクトルを Fig. 6 に示す.

I のピーク面積は他成分と比較すれば, 日本産及び 1—2 の中国産を除き, ほとんど定率であり, また, 成分 VI と VII 間の面積比は常にほぼ一定の値を示している. しかし, II の含量の分布は一定していない (Fig. 7).

3. I の安定性試験 I の紫外線下での不安定性が報告されているが,¹⁴⁾ 標品保管や測定中の標準溶液, 及びそれを冷暗所に保存する範囲での I の安定性を検討した結果を Table 4 に示す. I の結晶あるいはメタノール溶液中での化学変化は確認されな

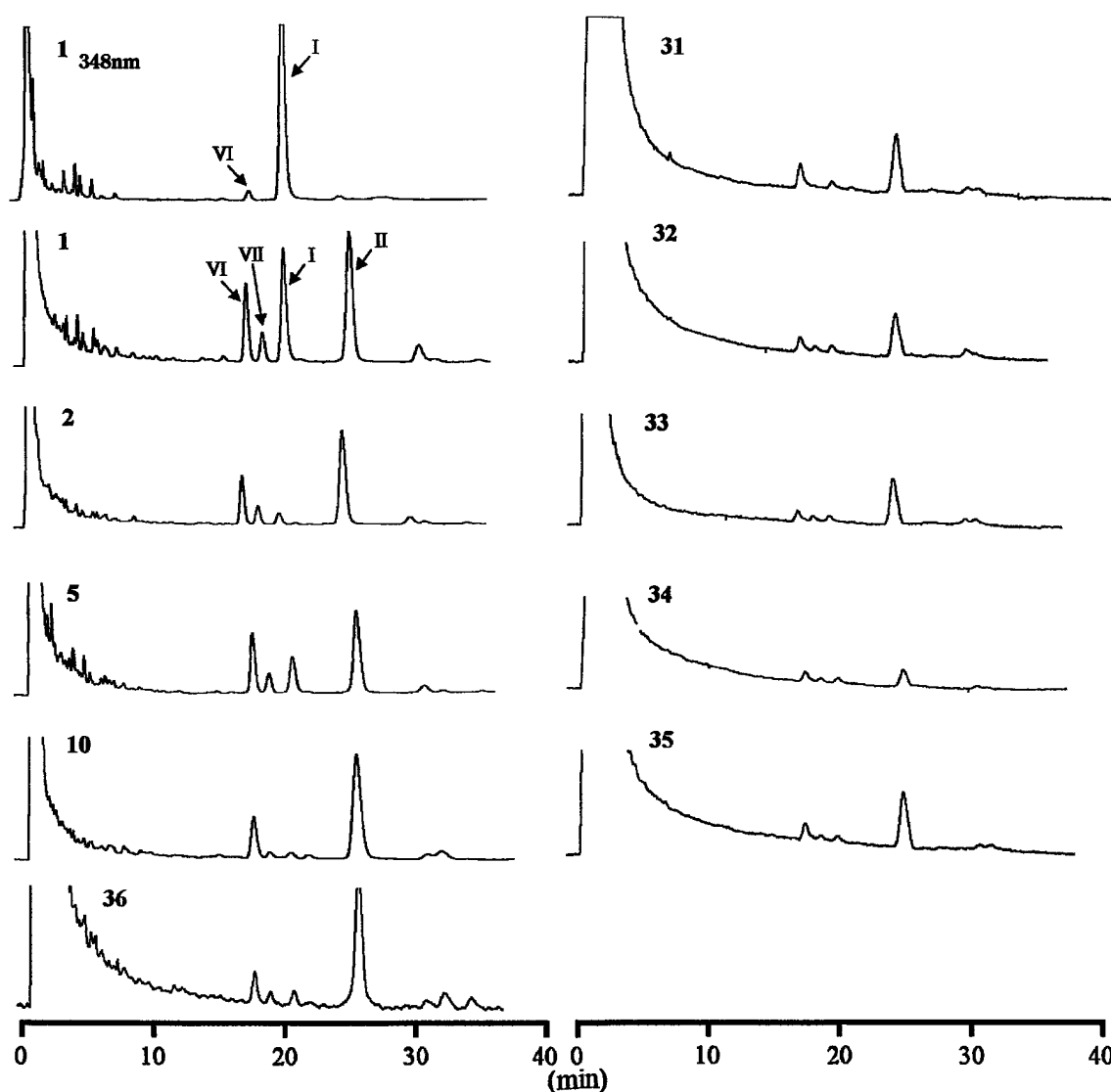


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Methanolic Extracts of Polyporus Sclerotium, Poria Sclerotium and Lucid Ganoderma

Column: Hypersil C₁₈ (ODS, 4.6×250 mm, 5 μm) at the column temperature of 40°C, Mobile phase: MeOH/H₂O (92 : 8) at the flow rate of 1.5 ml/min; Detector: Waters Photodiode array 2996. Detective wave were at 348 nm for Sample 1 and at 303 nm for the all of the samples. Samples of 1, 2, 5 and 10 were the methanolic extract of Polyporus Sclerotium, those from 31 to 35 were that of Poria Sclerotium and that of 36 was that of Lucid Ganoderma. For details of the samples see Tables 1 and 2. The injection volumes of the samples from 31 to 35 were as 5 times as those of the other samples. The peaks of I and II were identified as ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one and ergosterol, respectively, while those of VI and VII were not identified.

かった。

4. 検量線, 測定の再現性及び回収率 作成した検量線は 0.008—0.040 mg/ml の濃度範囲で $Y = 2088 \times 10^5 \times -72.3$ ($r = 1.000$, $n = 5$) のほぼ原点通る良好な直線が得られた。また, 各濃度の標準溶液及び猪苓抽出液の反復測定の結果, いずれも CV 値は 0.6% 以下となり再現性も良好である。また, 添

加回収率は 101.4%—104.4% ($n = 4$) であり, CV 値は 2.4% であった。

5. 猪苓及び関連生薬中の I の HPLC 定量結果 猪苓生薬試料 (30 検体) 中の I の含量を Table 5 に示す。I はすべての猪苓試料に含有され, その含量は 0.0006—0.0082% の範囲に分布し, 30 検体中 26 検体は 0.001—0.004% の範囲にある。I は極めて低

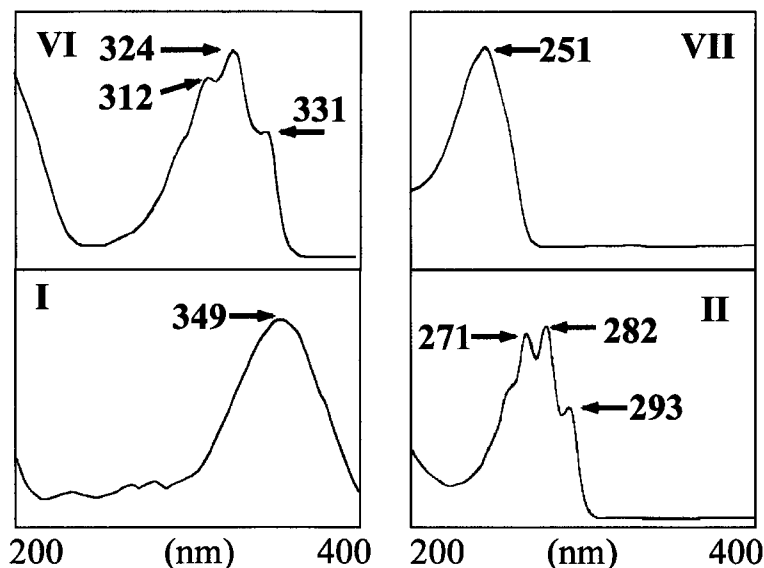


Fig. 6. UV Spectra of the Four Peaks in the HPLC Chromatograms of Methanolic Extract of Polyporus Sclerotium, Poria Sclerotium and Lucid Ganoderma

For the four peaks, I, II, VI and VII see Fig. 5. Their UV spectra were obtained from the detector of Waters Photodiode Array 2996 in the HPLC analysis of methanolic extracts of Polyporus Sclerotium.

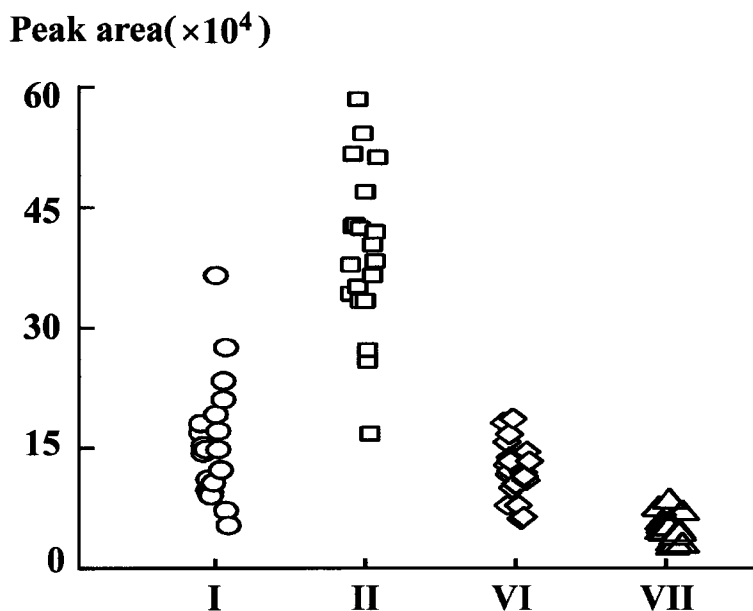


Fig. 7. Distribution of the Main Components, I, II, VI and VII in the 30 Samples of Polyporus Sclerotium For I, II, VI and VII see Figs. 5 and 6.

Table 4. Stability Tests of I

States	Storage conditions	mp (°C)		Area content by HPLC (%)	
		Initial	End	Initial	End
Crystal	100°C/48 h	113.5~115	114~116	99.23	99.12
Methanolic solution	4°C/30 days			99.23	99.16

Table 5. Content of I in Polyporus Sclerotium, *Poria cocos* and *Ganoderma lucidum*

Sample No.	I (%)	Sample No.	I (%)	Sample No.	I (%)	Sample No.	I (%)
1	0.0082	10	0.0007	19	0.0036	28	0.0015
2	0.0012	11	0.0010	20	0.0006	29	0.0013
3	0.0025	12	0.0025	21	0.0025	30	0.0030
4	0.0027	13	0.0014	22	0.0013	31	0.0001
5	0.0014	14	0.0025	23	0.0023	32	0.0002
6	0.0023	15	0.0045	24	0.0014	33	0.0002
7	0.0021	16	0.0022	25	0.0018	34	0.0001
8	0.0031	17	0.0035	26	0.0027	35	0.0003
9	0.0018	18	0.0035	27	0.0036	36	0.0012

The Sample No. are the same as Table 1 and Table 2.

含量にもかかわらず、348 nm における強い紫外部吸収のため、TLC の場合と同様に HPLC でも他の成分と明確に区別可能であった。一方、I の生薬中含量は霊芝では猪苓に近似するが、茯苓は猪苓に比べ微量であった。

考 察

猪苓メタノール抽出液の TLC 分析 [クロロホルム：メタノール (95 : 5), 365 nm 照射] では I が顕著な青白色の蛍光スポットが検出され、その上下及び $R_f=0.1$ 付近に極めて弱い 2—3 のスポットが確認されるのみである。希硫酸噴霧・加熱法により検出される最も顕著な成分は II が濃紺色のスポット、I が黄緑色のスポット、また、IV が濃青色のスポットとして認められる。他に数種の成分が認められるが顕著ではない。生薬中の含有量と HPLC—UV 定量による利便性を考慮すれば、本 TLC 条件で I が指標成分として最も有力である。

HPLC—UV 法では、303 nm によるチャートから $R_t=18-30$ min の間に顕著な 4 成分のピーク (I, II, VI, VII) が認められる。20 種の猪苓試料について、これら 4 成分の分布をピーク面積で比較したところ、Fig. 5 に示すごとく II は分散が大きく、

I 及び VI, VII は比較的均一に分布していた。

また、HPLC クロマトグラム (測定波長 348 nm) では、I が顕著なピークとして検出され、本成分 I を分離精製し ergosta-4,6,8 (14),22-tetraen-3-one と同定した。

I は既に 14-dehydroergosterol の酸化¹⁵⁾により得られ、天然からは酵母の *Candida*¹⁶⁾ や *Fomes officinalis*,¹⁷⁾ また、発光きのこ *Lamptteromyces japonica*,¹⁸⁾ 菱実,¹⁹⁾ *Aspergillus penicillium*, mold damaged wheat flower,^{20,21)} *Alternaria altenata*,²²⁾ *Ganoderma applanatum*²³⁾ から単離され、猪苓以外の菌類にもかなり分布するとされ、^{24,25)} 猪苓のような菌核ではないが、100 種以上の菌体について TLC 上で確認されている (未公表)。²⁶⁾ しかし、その含有量については明確にされていない。²⁶⁾ 実際、比較に用いた霊芝や茯苓にも検出されるが、茯苓中の I の含量は調査した 30 検体の猪苓試料で 2 例を除き、猪苓中の含量平均値の 12 分の 1 であり、I の標準濃度溶液を設定すれば TLC 上でも定量性のある両者の識別が可能になると考えられる。また、霊芝中の I の含量は猪苓に近似するが、猪苓が菌核に対して霊芝は菌体であり、薬用部位の点から性状や鏡検で比較鑑別が容易で、また、霊芝の場合は価格の点でも流通上でも猪苓に代替される可能性は少ない。さらに他の植物資源とは薬用部位、組織、細胞などが相違し生薬猪苓とは性状に差があり、必要ならば純度試験の設定で混入、誤用に対応できると考えられる。このような性状や成分などから総合的に判断する例は、日本薬局方でも杏仁と桃仁、黄连と黄柏、大黄とセンナなど数多くあり、現状では生薬規格上の一つの限界とも言える。また、生薬の指標成分が有効成分で、漢方エキス製剤等の指標成分でもあることが最も適切ではあるが、I は熱水に対する溶解性は極めて悪く、五苓散などの漢方製剤 (粉末製剤) の指標成分としては用いられるが、漢方エキス製剤等での指標成分としての利用は困難と

言える。

一方、既に明らかな成分のうち、polyporusterone 類は猪苓以外に他の生薬から単離された報告はなく、分布についてさらに精査が必要であるが指標成分の条件をかなり満たしていると言える。しかし、polyporusterone 類は猪苓中含有量が 0.0003—0.00002% であり、標準品の確保、供給に難点（猪苓 100 kg から約 300—20 mg の収量）がある。さらに、polyporusterone 類の吸光度係数も小さく、確認試験や定量法の設定の点でも難点がある。以上の点から、polyporusterone 類が猪苓の明白な有効成分でない限り、指標成分として規定することは実用的ではないと考えられる。

I は ergosterol に次いで高含量で、極大吸収波長と高い分子吸光度、また蛍光が強く検出が容易であり、化学合成による標準品の確保も容易である。

そこで本成分の定量法の検討を行い、抽出条件、HPLC 条件、検出波長の点から最適の定量条件を設定したが、定量の結果、本成分を猪苓の指標成分候補として適当であると考えられた。また、結晶及びメタノール溶液の安定性も高いため試験操作や管理上で扱い易い標準物質と考えられる。

なお、I は利尿剤として用いられる spironolactone 酸化物²⁷⁾と構造的共通性があり、利尿剤としての薬効との関連が推察されるが、この点については今後の検討課題である。

以上から I を標準物質とする猪苓の新試験法を次に提起した。

新試験法の提起 次の方法により猪苓の確認試験が可能と考える。猪苓粉末（40 メッシュ以下）を 1.0 g 精密に量り、メタノール 20 ml を加え、恒温水浴で 1 時間加熱還流抽出した後、濾過し、残渣を抽出溶媒 5 ml で洗い、濾過液を合わせて減圧濃縮乾固する。残留物にメタノール 1 ml を正確に加え、1 分間超音波処理を施し分析用試料溶液とする。一方、I の 10 mg/100 ml 溶液と、その希釈液（1→10）を上下限の比較溶液として TLC 分析（ヘキサン：アセトン＝90：10，v/v，365 nm 照射下で $R_f=0.3$ 付近の蛍光スポットの確認）を行えば、半定量的に、より正確に鑑別することが可能である。

結 論

1) 猪苓の指標成分として ergosta-4,6,8 (14), 22-

tetraen-3-one (I) を検討した。

- 2) I は猪苓のみに含有される成分ではないが、猪苓中の含量、検出性、定量性、各種猪苓での分布、さらに標準品の入手や安定性という点で優れている。
- 3) I を猪苓の指標成分としても茯苓とは含有量の点で差が大きく、両者の鑑別は可能である。霊芝に I が含有されるが、性状及び価格の点で霊芝が猪苓に代替される可能性は少なく、さらに I を含有するいくつかの動植物資源が報告されているが、いずれも性状及び流通などの点で猪苓に代替される可能性は少なく、混入は判別が可能である。
- 4) 以上から I は猪苓の指標成分の有力な候補と言え、TLC 法を用いた半定量的な猪苓の確認試験法を提起した。

ただし、本法は、漢方処方製剤で五苓散などの散剤の確認試験に応用可能であるが、漢方エキス製剤の指標成分としての可能性は I の猪苓中含有量と熱水に対する溶解性から困難であると言える。

謝辞 本研究は中国政府・科学技術部による「中薬現代化研究と産業化開発」研究の一環として研究資金の提供を受けて実施された。

REFERENCES

- 1) Satake M., "Remarkable Advance of Medicinal Plant," CMC, Osaka, 2001.
- 2) Ida Y., Nemoto Y., "Haabu ni kansuru sekaiteki doko to nihon no taiou," Syowa University Syoyaku·Syokubutu-yakuhin-kagaku, Tokyo, 1999.
- 3) Miao M.S., Li Z. G., "Xiang dai shi yong zhong yao zhi liang kong zhi ji shu," Ren min wei sheng chu buan she, Beijing, China, 2000.
- 4) Xu G.J., Xu L.S., "Chang yong zhong yao chai pin zhing zheng li he zhi liang yan jiu," Fu jian ke xue ji shu chu ban she, Fu jian, China, 1994.
- 5) Xu D.C., "Zhong yaohua xue dui zhao pin ging zuo shou ce," Zhong guo yi yai ke ji chu bang she, Baodin, China, 2000.
- 6) The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, "21seiki no Syouyaku·Kampo-

- seizai,” Sen-isya, Osaka, 1999.
- 7) Kampo-Gizutu-Kenkyukai, “*Kampo-Gizutu-Kenkyukai 15nen no ayumi*,” Kampo-Gizutu-Kenkyukai, Osaka, 2002.
 - 8) Ganzera M., Yayla Y., Khan I. A., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 465–467 (2001).
 - 9) Aburada M., Yuasa K., Ishige A., Shinpo M., *Hinyo kiyou*, **27**, 677–682 (1981).
 - 10) Sakurai Z., Kimura T., *Toyama-Yakugaku-Senmongakkou-iho*, **4**, 135–141 (1936).
 - 11) Yoshioka I., *Yakugaku Zasshi*, **84**, 742–744 (1967).
 - 12) Ohsawa T., Yukawa M., Takao C., Murayama M., Bando H., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 143–147 (1992).
 - 13) “14th *Japanese Pharmacopeia*,” Hirokawa-syoten, Tokyo, 2001, p. 770.
 - 14) Tanaka N., Hosoi K., Tanaka D., Takahashi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 843–846 (1996).
 - 15) Elks J., *J. Chem. Soc.*, 468–469 (1954).
 - 16) Barton D. H. R., Bruun T., *J. Chem. Soc.*, 2728–2733 (1951).
 - 17) Morimoto H., *Lie Bigs Ann. Chem.*, **708**, 230–240 (1957).
 - 18) Shulte K. E., Ricker G., Fachmann H., *Tetrahedron Lett.*, **9**, 4763–4764 (1968).
 - 19) Endo M., Kajiwara M., Nakanishi K., *J. Chem. Soc.*, 309–310 (1970).
 - 20) Irikura T., Patent Syowa 47–41522 (1972).
 - 21) Cooks R. G., Daftary R. D., Pomeranz Y., *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 620–623 (1970).
 - 22) Daftary R. D., Pomeranz Y., Cooks R. G., Walfe N. L., *Experimentia*, **26**, 1056–1057 (1970).
 - 23) Yamada Y., Hsu C. S., Suzuki M., *Tokyo Yakyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo*, **24**, 427–429 (1970).
 - 24) Settz L. M., Paukstelis J. V., *J. Agr, Food Chem.*, **25**, 838 (1977).
 - 25) Cooks R. G., Daftarg R. D., Pomeranz Y., *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 620 (1970).
 - 26) Tanaka N., Hoshi K., Tanaka D., Takahashi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 843–846 (1996).
 - 27) Medical Practice Hensyuiinkai, “*Medical Practice 1999–2000*,” Bunkodo, Tokyo, 1999, p. 256.