

ミセル動電クロマトグラフィーによる生薬分析(2)
—ビャクジュツ中の Atractylenolide III の分析—

栗原由佳里,* 中村考志, 橋本晶夫, 西 博行

Analysis of Natural Medicines by Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) (II)
—Determination of Atractylenolide III in *Atractylodes Rhizoma*—

Yukari KUWAHARA,* Takashi NAKAMURA, Akio HASHIMOTO, and Hiroyuki NISHI
Analytical Development Laboratories, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 16-89,
Kashima 3-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8505, Japan

(Received February 13, 2003; Accepted March 22, 2003)

We have investigated a method to analyze the marker substance of natural medicines by employing capillary electrophoretic techniques such as micellar electrokinetic chromatography (MEKC). We previously reported a simple MEKC assay method for calycosin in *Astragali Radix* and its fluid extract. In this investigation, we analyzed the marker substance atractylenolide III in *Atractylodes Rhizoma*. Atractylenolide III was clearly separated from the other components in *A. Rhizoma* and its dried extract by simple solvent extraction with hexane and subsequent MEKC analysis with sodium dodecyl sulfate (SDS) within 10 min. Validation of the analytical procedures of the assay method was performed according to the *Japanese Pharmacopoeia* and International Conference on Harmonization guidelines. As a result, we confirmed that capillary electrophoresis, including MEKC, is a powerful method for estimating the quality of natural medicines and traditional Chinese medicines consisting of various components.

Key words—micellar electrokinetic chromatography; atractylenolide III; *Atractylodes Rhizoma*; validation of analytical procedure

緒 言

多数の成分の相乗効果で薬効が期待される生薬及び漢方製剤は、医療現場において汎用されているものの、多成分ゆえに生薬及び漢方製剤の品質管理、すなわち理化学的な品質評価（品質管理）が困難な場合が多い。

近年、生薬製剤を迅速かつ精度良く分析する方法として、高分離能を有するキャピラリー電気泳動 (CE) 法が注目され、様々な生薬の分析に応用され始めている。¹⁻⁹⁾ 我々は、電氣的に中性な成分の分析に有効なミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) 法による生薬の指標成分の分析について検討を行っており、前報⁹⁾でオウギに関する検討結果を報告した。そこで今回は、日局収載品であるビャクジュツについて、その指標成分である atractylenolide III (Fig. 1) の迅速分析について検討を行った。

ビャクジュツの成分に関する研究には、吉岡らによる atractylon,¹⁰⁾ 西川らによる 3 β -hydroxyatractylon 及び 3 β -acetoxyatractylon¹¹⁾ 並びに 5 α , 10 β -selina-4 (14), 7 (11)-dien-8-one,¹²⁾ ヒキノラ¹³⁾ による atractylenolide I, II, III などのセスキテルペノイド、高橋ら¹⁴⁾ による acetaldehyde 及び 2-furaldehyde など多数の報告がある。一般的にビャクジュツの指標成分としては atractylon が用いられており、「日局」の生薬総則、ビャクジュツの項に確認試験として atractylon の呈色反応が収載されている。

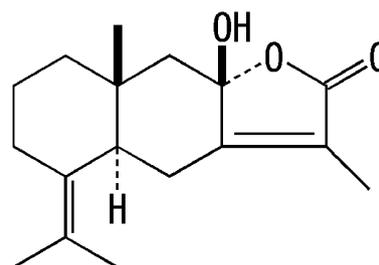


Fig. 1. Chemical Structure of Atractylenolide III

る。しかし、atractylon は自動酸化されて atractylenolide II, III になる¹⁰⁾ こと、atractylenolide III の安定性が優れている¹⁵⁾ ことに加え、生薬標準品として純度の良い (99.0%以上) atractylenolide III 標準品の入手が容易であることから、ビャクジュツの指標成分として atractylenolide III を選択した。また、ビャクジュツの指標成分 atractylenolide III の分析に関しては、これまでに HPLC 法による検討報告¹⁵⁾があるが、CE 法を適用した報告はない。そこで、複雑な成分の迅速分析に有利である MEKC 法を利用したビャクジュツ中の指標成分の分析法の実用化について検討した。すなわち、atractylenolide III の定量法を検討するにあたり、抽出方法を検討し、設定した試験法について、ICH (International Conference on Harmonisation) ガイドライン及び日局の分析法バリデーションを参考に、特異性、真度、直線性、精度及びシステム適合性試験のデータを取得した。また、atractylenolide III 定量法の実用化検討として、ビャクジュツ及びビャクジュツ配合の漢方製剤 (防已黄耆湯乾燥エキス-F) 各 3 ロットについて atractylenolide III の含量の測定を行った。

実験の部

1. 試料 ビャクジュツ 3 ロットは日本粉末薬品株式会社より購入したものを使用した。また、ビャクジュツの指標成分である atractylenolide III は、和光純薬工業株式会社より生薬試験用として市販されている標準品をそのまま使用した。ビャクジュツ配合漢方製剤には、アルプス薬品工業株式会社より入手した防已黄耆湯乾燥エキス-F3 ロットを使用した。Table 1 に防已黄耆湯の一般的な処方 (中医処方解説より) を示す。

2. 試薬 四ほう酸ナトリウム十水和物：ナカライテスク特級品、硫酸ドデシルナトリウム (SDS)：ナカライテスクイオンペアークロマト用、水酸化ナトリウム及び酢酸エチル：片山化学特級品、メタノール及びヘキサン：片山化学液体クロマトグラフ用、ジエチルエーテル：和光純薬工業株式会社残留農薬試験用、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル (HBAE)：東京化成特級品を使用した。

3. 実験装置 実験には、CE 装置：Beckman P/ACE 5510 system, 分析ソフト：Beckman System

Table 1. Common Prescription of Boui-Ougi-Tou (According to Explanation of Chuui-Shohou)

Boui-Ougi-Tou
ASTRAGARI RADIX (黄耆)
SINOMENI CAULIS ET RHIZOMA (防已)
ZIZYPHI FRUCTUS (大棗)
ATRACYLLODIS RHIZOMA (白朮)
GLYCHYRRHIZAE RADIX (甘草)
ZINGIBERIS RHIZOMA (生姜)

Gold V8.01, レコーダー：EPSON SP-500, キャピラリー：スベルコ社製、内径 75 μm , 有効長 20 cm のフューズドシリカ管を用いた。なお、キャピラリーはクーラントを用いて 20°C の一定温度に保った。泳動液には 20 mM 四ほう酸ナトリウム+水和物に水酸化ナトリウムを加えて pH 9.25 としたもの (以下、ほう酸塩緩衝液) を基本として用い、これに添加剤として 50 mM の SDS を添加し検討を行った。泳動液は、使用前に孔径 0.45 μm のメンブランフィルター (ゲルマンサイエンス社、アクロ LC) でろ過し、超音波洗浄器 (BRANSON 3200) を用いて脱気後、使用した。検出は 210 nm で行い、atractylenolide III のピークの UV スペクトルの確認に Beckman 社製 168 型フォトダイオードアレイ検出器を使用した (波長：200—300 nm)。印加電圧は 15—25 kV 一定とした。試料注入は、2 秒間圧力注入法 (0.5 psi, 1 psi = 6894.76 Pa) により行った。

4. ビャクジュツ中の Atractylenolide III の定量

4-1. ビャクジュツ中の Atractylenolide III の抽出 ビャクジュツ中から atractylenolide III を抽出するにあたり、メタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル及びヘキサンを用いて抽出溶媒の検討を行った。

4-2. 分析法バリデーション ビャクジュツ中からの atractylenolide III の抽出操作を含めた分析法の妥当性を示すため、ICH ガイドライン及び日局の分析法バリデーションを参考に、特異性、直線性、真度、精度及びシステム適合性試験について検討を行った。

特異性では、atractylenolide III 標準溶液と一致した泳動時間が得られたビャクジュツ抽出液中のピークの単一性を示すため、フォトダイオードアレ

イ検出器を用いてピーク純度試験（ピーク単一性の確認）を行った。また、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、atractylenolide III を正確に測定できることを確認するために、ビャクジュツからの抽出溶液、atractylenolide III 標準溶液、I.S. 溶液及びビャクジュツからの抽出溶液に I.S. 溶液を添加したクロマトグラムを用いて検討を行った。

直線性に関しては、生葉中の atractylenolide III 含量にバラツキがあることを想定し、atractylenolide III の定量濃度を含む 7 点の濃度範囲（試験濃度の 25—250%）において検量線を作成し、その回帰式及び相関係数から直線性を評価した。

真度に関しては、atractylenolide III がビャクジュツ中の成分であるため、atractylenolide III のみを除いたプラセボが調製できない。そこで、あらかじめ atractylenolide III 含量を測定したビャクジュツに、濃度既知の atractylenolide III 標準品を添加し、その添加回収率を求めることで真度を評価した。なお、atractylenolide III 標準品の添加濃度は、ビャクジュツ 1 ロットを用いて、繰り返し 3 回の atractylenolide III の定量を行い、それら 3 回の平均含量の 80%、100% 及び 120% の 3 濃度とし、各濃度につき繰り返し 3 回の添加回収実験を行った。

精度としては、上記の真度の試験で得られた 9 個の測定値（添加回収率）より併行精度を評価するとともに、ビャクジュツ 1 ロット（北朝鮮産）を用いて、試験日、試料溶液及び泳動液を変え、室内再現条件（中間条件）下で、atractylenolide III の定量を繰り返し 6 回行った。

また、システム適合性試験としては、I.S. 物質を含む定量法の atractylenolide III 標準溶液を用いて、移動時間比、ピーク面積比及びピーク高さ比について、繰り返し 6 回注入時の再現性を試験するとともに、atractylenolide III と I.S. 物質の分離度について試験を行った。

4-3. ビャクジュツ中の Atractylenolide III の定量 ビャクジュツ 3 ロットについて、以下の方法に従って各ロット繰り返し 3 回の atractylenolide III の定量試験を行った。

I.S. 溶液は、HBAE をメタノールに溶かし、約 62.5 µg/ml 濃度としたものを用いた。試料溶液は、設定した抽出操作法により抽出を行った試料に、I.S. 溶液 5 ml を正確に加え、超音波処理を行って

溶解させたものをメンブランフィルターでろ過し試料溶液とした。別に、atractylenolide III 標準品約 3.5 mg を精密に測り、I.S. 溶液を加えて正確に 10 ml としたものを正確に 5 ml 量り、さらに I.S. 溶液を加えて正確に 10 ml とし標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液をそれぞれ 150 µl ずつサンプルカップにとり、2 秒間、圧力法によりキャピラリー内に導入し、試料溶液中の I.S. 物質に対する atractylenolide III のピーク面積比 (Q_T) 及び標準溶液中の I.S. 物質に対する atractylenolide III のピーク面積比 (Q_S) を求めた。

また、ビャクジュツ 1 g 中の atractylenolide III 含量は以下の式により算出した。

ビャクジュツ 1 g 中の atractylenolide III 含量 (mg)
= atractylenolide III 標準品採取量 (mg)

$$\times \frac{Q_T}{Q_S} \times \frac{1}{4}$$

結果及び考察

1. Atractylenolide III の抽出方法 メタノール、酢酸エチル、ジエチルエーテル及びヘキサンを用いて、ビャクジュツからの atractylenolide III 抽出溶媒の検討を行った結果、ヘキサンを抽出溶媒に用いた場合、他の夾雑物から atractylenolide III が良好に分離し、抽出効率も高いことが分かった。以上より、ヘキサンを抽出溶媒として選択し、Fig. 2 の抽出法に従ってビャクジュツから atractylenolide III を抽出した。

2. 分析法バリデーション Figure 3 に atractylenolide III の抽出方法に従って抽出を行ったビャクジュツ抽出溶液のクロマトグラム、atractylenolide III 標準品のクロマトグラム、I.S. 溶液のクロマトグラム及び atractylenolide III の抽出方法に従って抽出を行ったビャクジュツ抽出溶液に I.S. 溶液を添加した溶液のクロマトグラムを示す。

Atractylenolide III 標準溶液中のピークと一致した移動時間が得られたピークがビャクジュツ抽出溶液にも確認されたことより、フォトダイオードアレイ検出器を用いて、波長 200—300 nm の範囲において、両者の UV スペクトルの比較を行った。その結果を Fig. 4 に示す。ビャクジュツ抽出溶液から得られたピークの UV スペクトルは、atractylenolide III 標準溶液から得られたピークの UV ス

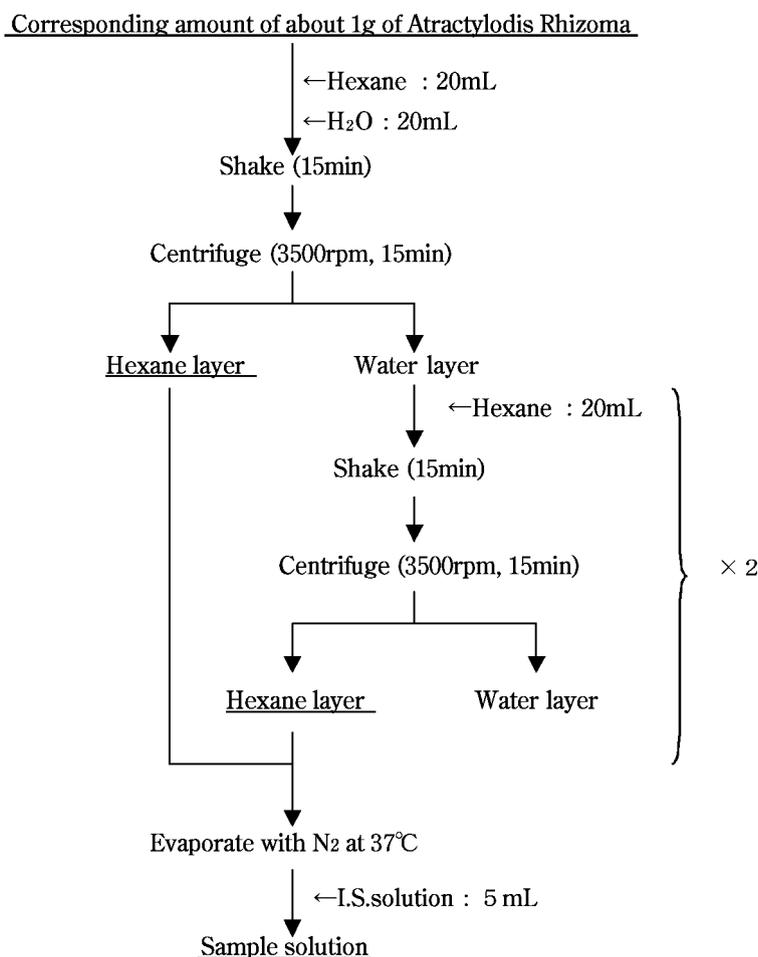


Fig. 2. Extraction Procedure of Atractylenolide III from *Atractylodis Rhizoma* and Kampo Formulations

ベクトルと波形がよく一致することが確認できた。よって、ビャクジュツ抽出溶液中のピークが *atractylenolide III* であると確認した。

直線性に関しては、*atractylenolide III* 定量濃度を含む7種の異なる濃度（検量線範囲：定量濃度を100%とした時の25—250%の範囲）の試料溶液を用いて、*atractylenolide III* 濃度（X軸：単位 mg/ml）と I.S. 物質に対する *atractylenolide III* のピーク面積比（Y軸）から検量線を作成した。結果を Fig. 5 に示す。検量線は、回帰式： $y = 5.7417x - 0.0178$ ，相関係数：0.9999 の良好な直線性を示し、*atractylenolide III* 濃度 25—250% の範囲において、直線性に問題のないことが確認された。

真度については、あらかじめ *atractylenolide III* 含量を繰り返し3回測定したビャクジュツ1ロットを用いて *atractylenolide III* の添加回収実験を行った。すなわち、ビャクジュツ中の *atractylenolide*

III の平均含量の80%、100%及び120%に相当する3濃度の *atractylenolide III* を添加したビャクジュツについて、繰り返し3回の添加回収実験を行った。その結果を Table 2 に示す。平均添加回収率（%）：98.9，標準偏差（ σ_{n-1} ）（%）：1.15，相対標準偏差（%）：1.16 であり、真度の95%信頼区間は 98.9 ± 0.88 （%）であった。各濃度とも、多少のバラツキは認められたものの、原生薬を対象とした抽出操作を含む分析法の回収率であるということを考慮すると良好な結果であると判断された。

次に、真度の試験で得られた9個の測定値（添加回収率）より併行精度を評価した結果を Table 3 に示す。標準偏差（ σ_R ）（%）：1.15，相対標準偏差（%）：1.16，標準偏差の90%信頼区間は $0.83 \leq \sigma_R \leq 1.99$ （%）となった。

次に、ビャクジュツ1ロット（北朝鮮産）を用いて、室内再現条件の中間的な条件で、*atrac-*

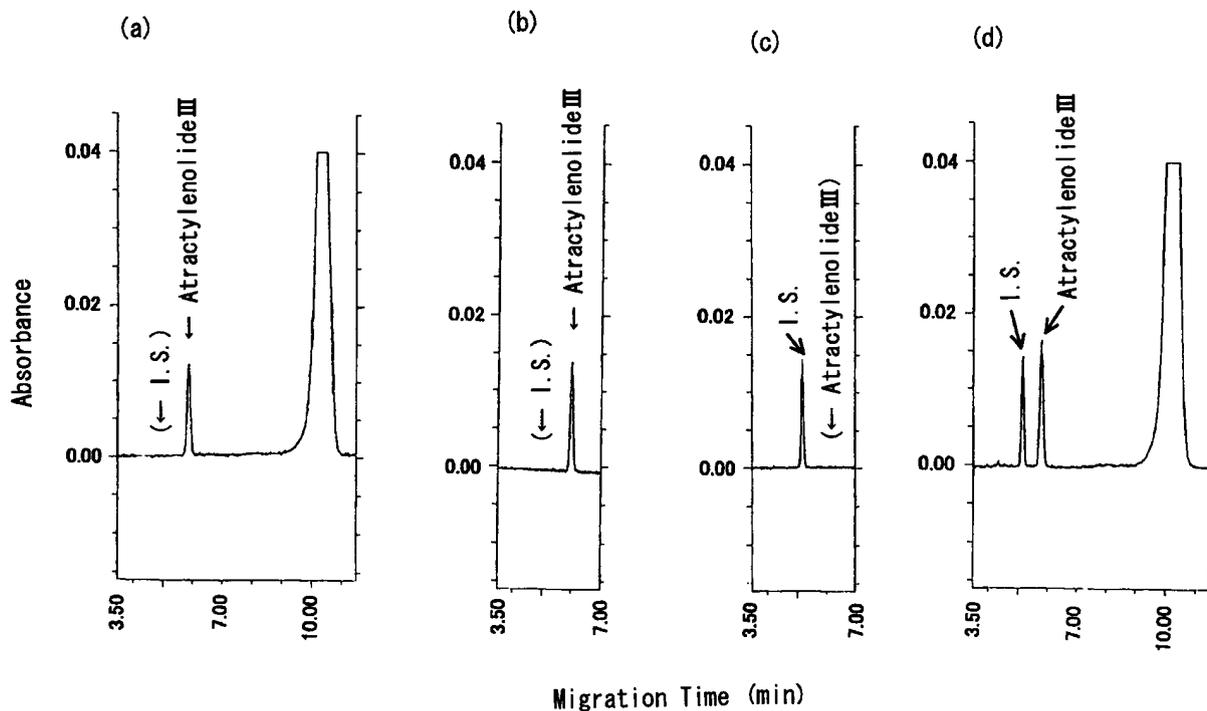


Fig. 3. Validation of Analytical Procedures —Specificity—

(a) Extract solution from *Atractylodis Rhizoma*, (b) Standard solution [attractylenolide III], (c) Internal standard solution, (d) Extract solution from *Atractylodis Rhizoma* added internal standard solution.

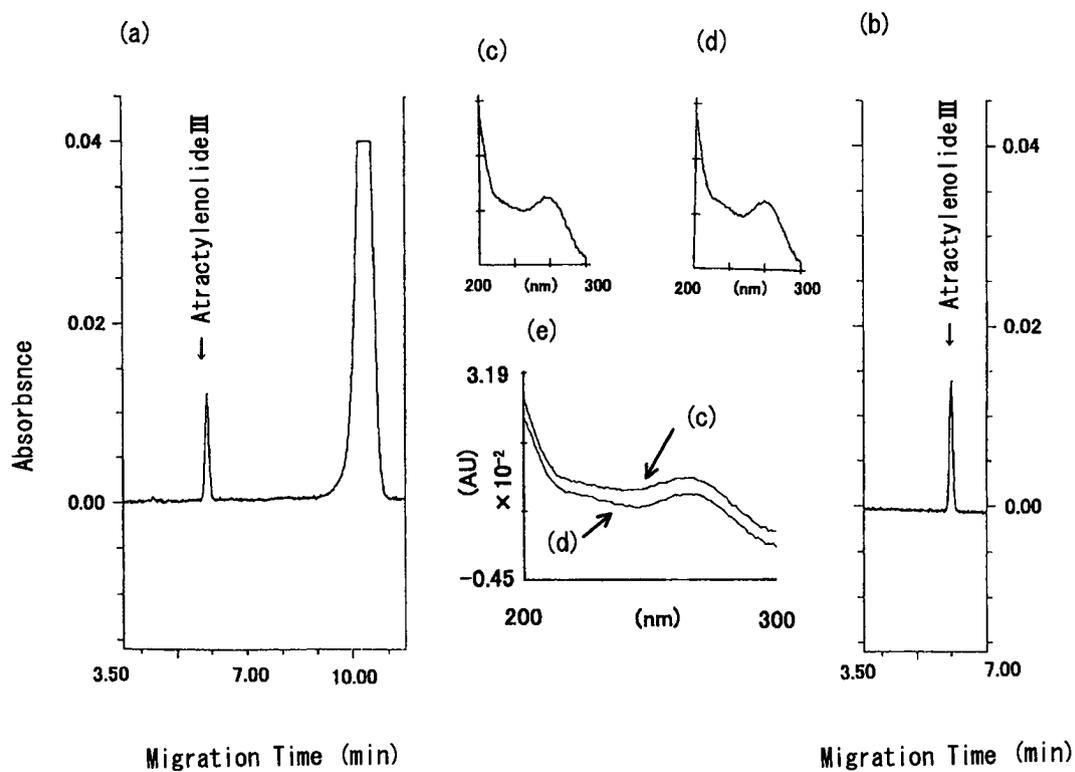


Fig. 4. Identification by UV Spectra with a Photodiode Array Detector

(a) Extract solution from *Atractylodis Rhizoma*, (b) Standard solution [attractylenolide III], (c) UV spectrum of extract solution from *Atractylodis Rhizoma*, (d) UV spectrum of standard solution, (e) UV spectrum of extract solution from *Atractylodis Rhizoma* and standard solution.

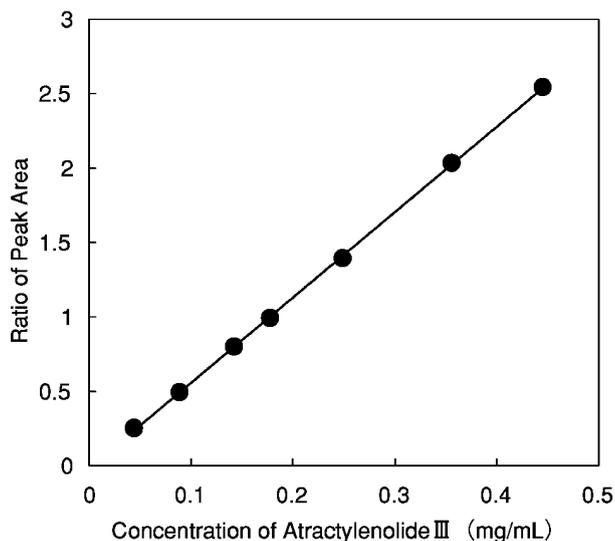


Fig. 5. Validation of Analytical Procedures —Linearity—

Table 2. Validation of Analytical Procedures —Accuracy—

Repetition	Recovery value (%)		
	80%	100%	120%
1	100.3	99.3	97.2
2	98.0	97.5	99.1
3	99.4	100.5	98.7
Average (%)	99.2	99.1	98.3
SD (%)	1.16	1.51	1.00
RSD (%)	1.17	1.52	1.02
Average (%)	98.9		
SD (%)	1.15		
RSD (%)	1.16		
*95% confidence interval	98.9±0.88		

* $\bar{x} - t(n-1, 0.05) \cdot (\sigma/\sqrt{n}) < \mu < \bar{x} + t(n-1, 0.05) \cdot (\sigma/\sqrt{n})$
 \bar{x} : average n : sample size σ : standard deviation.

tylenolide III の定量試験を繰り返し 6 回行った試験結果を Table 4 に示す。繰り返し 6 回の定量試験の標準偏差は 0.02%，相対標準偏差は 1.79% となり，attractylenolide III の抽出操作も含めた結果であること及び分析対象物が生薬由来成分であることなどを考慮すると良好な結果であると判断された。

また、システム適合性試験として attractylenolide III 標準溶液の繰り返し 6 回注入時の再現性を検討した結果を Table 5 に示す。Atractylenolide III と I.S. 物質との泳動時間比、ピーク面積比及びピーク高さ比の相対標準偏差 (RSD) は、それぞれ 0.36

Table 3. Validation of Analytical Procedures —Repeatability—

Standard deviation: $[\sigma_R]$ (%)	1.15
Relative standard deviation (%)	1.16
*90% confidence interval	$0.83 \leq \sigma_R \leq 1.99$

* 90% confidence interval: $\sqrt{\frac{S}{\chi^2(n-1, 0.05)}} \leq \sigma_R \leq \sqrt{\frac{S}{\chi^2(n-1, 0.95)}}$

S: sum of squares, n : sample size.

Table 4. Assay of Atractylenolide III in 1 g of *Atractylodis Rhizoma* (from North Kores)

Repetition	Quantity of atractylenolide III (mg)
1	1.128
2	1.132
3	1.103
4	1.106
5	1.098
6	1.143
Average (mg)	1.118
SD (mg)	0.02
RSD (%)	1.79

Table 5. Validation of Analytical Procedures —System Suitability Test—

Repetition	Ratio of migration time (min)	Ratio of peak area	Ratio of peak height
1	1.11	1.794	1.333
2	1.11	1.806	1.333
3	1.11	1.791	1.313
4	1.11	1.805	1.313
5	1.11	1.784	1.294
6	1.12	1.790	1.333
Average	1.11	1.795	1.320
SD	0.004	0.009	0.016
RSD (%)	0.36	0.50	1.21

%, 0.50% 及び 1.21% となり良好な結果であった。しかし、attractylenolide III と I.S. 物質との比を用いない場合は、泳動時間の RSD は約 0.5% 程度であるのに対し、ピーク面積及びピーク高さの RSD は約 7—8% 程度と大きな値となった。一定時間、加圧法で試料注入しても、その注入量のバラツキは大きく、CE 法で加圧法を採用する場合は、I.S. 法

Table 6. Assay of Atractylenolide III in 1 g of *Atractylodis Rhizoma*

Repetition	Quantity of atractylenolide III (mg)		
	Lot A (from North Korea)	Lot B (from North Korea)	Lot C (from China)
1	1.113	1.498	0.554
2	1.137	1.511	0.546
3	1.129	1.551	0.543
Average (mg)	1.126	1.520	0.548
SD (mg)	0.012	0.028	0.006
RSD (%)	1.07	1.84	1.09

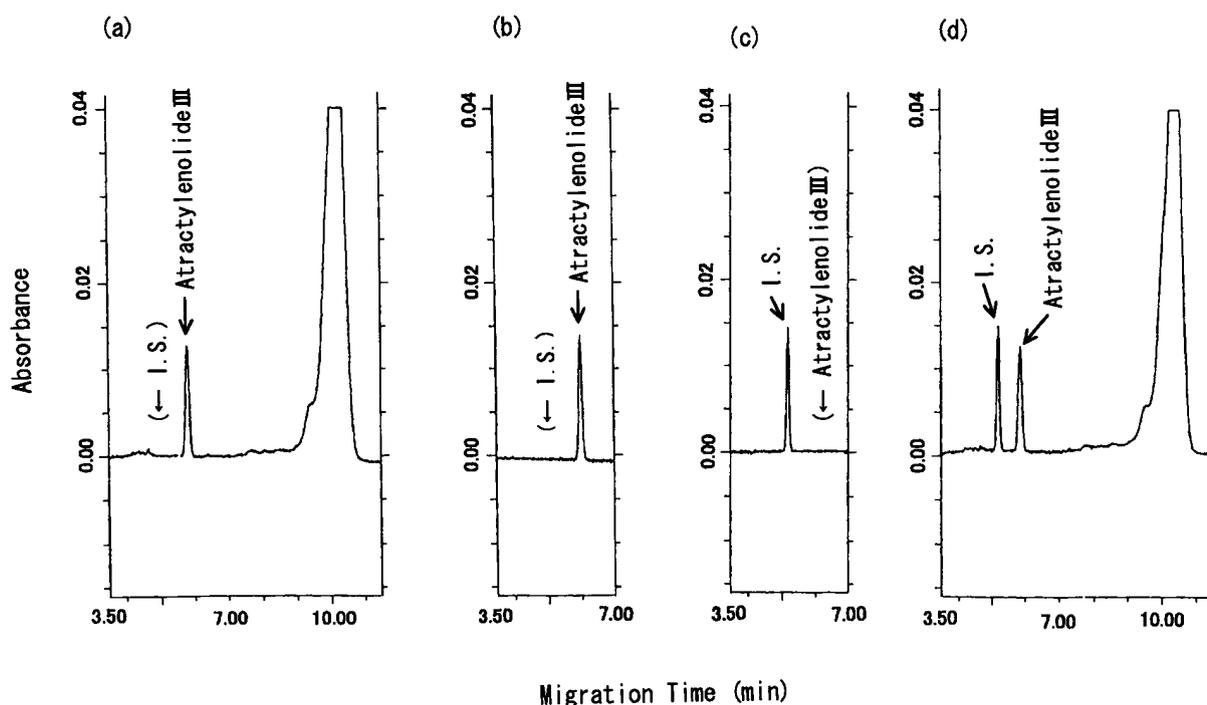


Fig. 6. Analysis of Boui-Ougi-Tou Dried Extract F

(a) Extract solution from boui-ougi-tou dried extract F, (b) Standard solution (attractylenolide III), (c) Internal standard solution, (d) Extract solution from boui-ougi-tou dried extract F added internal standard solution.

を選択することが分析の精度向上に必須であることが分かった。また、attractylenolide III と I.S. 物質は良好にベースライン分離し、その分離度 R_s を式 (1) より算出したところ、 $R_s=3.1$ であった。

$$R_s = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2}) \quad (1)$$

t_{R2} , t_{R1} : 分離度測定に用いる 2 つの物質の保持時間 ($t_{R1} < t_{R2}$)

$W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: それぞれのピーク高さの midpoint におけるピーク幅

以上の分析法バリデーション結果より、今回設定した attractylenolide III 定量法は、分析対象物が生

薬由来成分であること及び試験法中に抽出操作が含まれることを考慮すると、ビャクジュツ中の attractylenolide III の含量を測定するのに十分適用可能な簡便な手法であることが示された。

3. ビャクジュツ中の Atractylenolide III の定量
設定した試験方法に基づき、ビャクジュツ 3 ロットを用いて、各ロット繰り返し 3 回の attractylenolide III の定量を行った結果を Table 6 に示す。各ロットとも、繰り返し 3 回測定での RSD は 1.07—1.84 % と良好な結果であった。また、今回定量に用いたビャクジュツは北朝鮮産 2 ロット及び中国産ビャク

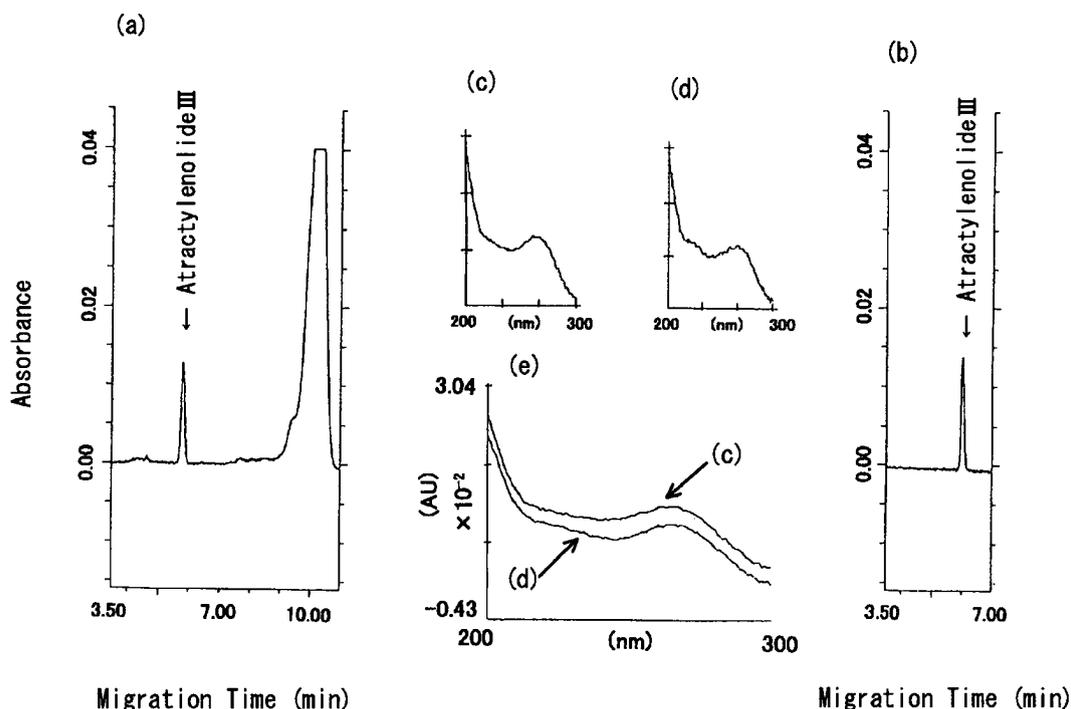


Fig. 7. UV Spectra of Atractylenolide III in Boui-Ougi-Tou Dried Extract F

(a) Extract solution from boui-ougi-tou dried extract F, (b) Standard solution [attractylenolide III], (c) UV spectrum of extract solution from boui-ougi-tou dried extract F, (d) UV spectrum of standard solution, (e) UV spectrum of extract solution from boui-ougi-tou dried extract F and standard solution.

ジュツ 1 ロットであるが, attractylenolide III の定量結果は, 韓国産ビャクジュツ 17 ロット及び北朝鮮産ビャクジュツ 7 ロット中の attractylenolide III 含量を HPLC 法にて測定した文献値¹⁰⁾ [attractylenolide III 含量の最小値—最大値: 0.33—2.09 mg/1 g 原生薬] と一致した値であった。

4. ビャクジュツ配合漢方製剤中の Atractylenolide III の定量 ビャクジュツ配合の漢方製剤に, 今回検討した attractylenolide III 定量法の適用を試みた。今回はビャクジュツ配合漢方製剤のうち, 防已黄耆湯乾燥エキス -F 製剤を用いて検討を行った。

まず, Fig. 6 に防已黄耆湯乾燥エキス -F に応用した時の特異性を示すクロマトグラムを, Fig. 7 にフォトダイオードアレイ検出器を使用したピーク単一性の確認の結果を示す。防已黄耆湯乾燥エキス -F 抽出溶液中に, attractylenolide III 標準溶液中のピークと一致した移動時間を持つピークを確認したので, これらの UV スペクトルをフォトダイオードアレイ検出器で確認したところ, 両者のスペクトル波形がよく一致した。よって, 防已黄耆湯乾燥エキス -F 抽出溶液中のピークは attractylenolide III と確

Table 7. Assay of Atractylenolide III in 1 g of Boui-Ougi-Tou Dried Extract F

Repetition	Quantity of attractylenolide III (mg)		
	Lot A	Lot B	Lot C
1	0.063	0.131	0.103
2	0.065	0.129	0.102
3	0.063	0.128	0.099
Average (mg)	0.064	0.129	0.101
SD (mg)	0.001	0.002	0.002
RSD (%)	1.56	1.55	1.98

認した。

Table 7 に防已黄耆湯乾燥エキス -F3 ロット中の attractylenolide III 測定結果 [防已黄耆湯乾燥エキス -F 1 g 中の attractylenolide III 含量] を示す。各ロットとも繰り返し 3 回測定での RSD は 1.55—1.98% であり, 生薬エキス製剤からの抽出操作を含めた定量であることを考慮すると良好な結果と判断された。以上より, 防已黄耆湯乾燥エキス -F 中の attractylenolide III の定量に今回設定した定量法が適用でき, attractylenolide III の測定が可能である

ことが確認された。

結 論

これまで CE 法による分析の検討が行われていなかったビャクジュツを対象に、その指標成分である atractylenolide III の定量を MEKC 法で行った。その結果、10 分以内にビャクジュツ中の atractylenolide III の定量を行うことが可能であることが分かった。また、ビャクジュツ配合のエキス剤中から atractylenolide III を抽出し、MEKC 法により定量を行ったところ、atractylenolide III 含量を精度良く求めることができた。

多成分で複雑な組成を持つ生薬や漢方製剤の分析に HPLC 法を用いる場合は、条件検討が複雑である、分析時間に長時間を要する、カラムの洗い出しなどで有機溶媒の使用量が多くなり、環境的にも問題がある。また、カラムや機器への吸着の問題があり、カラムの劣化を早めてしまったり、HPLC の部品交換などが頻繁となり、分析を行う上での負荷が大きかった。しかし、今回ビャクジュツを対象とした生薬分析に CE 法を応用した結果、試料の抽出操作を含むものの指標成分の 1 つである atractylenolide III を簡便に短時間で精度良く分析することができた。また、繰り返し分析によりキャピラリー内壁へ吸着が起こる場合もあるが、0.1 mol/l の水酸化ナトリウムでキャピラリーを洗浄するだけで容易に内壁表面の状態回復が可能で分析コストの低減化にも繋がる。以上より、CE 法は複雑な成分を含む生薬や漢方製剤の品質評価法の 1 つとして有用な手法であると判断された。

REFERENCES

- 1) Issaq H. J., *Electrophoresis*, **18**, 2438–2452 (1997).
- 2) Isozaki T., Yamamoto K., Hitomi N., Kosaka N., Abstracts of papers, the 24th Symposium on Natural Drug Analysis, 1995, pp. 10–19.
- 3) Satoh K., Seto T., Miyatake N., Hamano T., Shioda H., Onishi K., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 88–92 (1999).
- 4) Iwagami S., Sawabe Y., Nakagawa T., *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 49–54 (1992).
- 5) Wu H.-Kai, Shue S.-Jyi, *J. Chromatogr. A*, **753**, 139–146 (1996).
- 6) Isozaki T., Yamamoto K., Kosaka N., Abstracts of papers, the 27th Symposium on Natural Drug Analysis, 1998, pp. 25–32.
- 7) Akada Y., Ishii N., *Bunseki Kagaku*, **46**, 491–494 (1997).
- 8) Akada Y., Kurogi M., *Bunseki Kagaku*, **46**, 931–935 (1997).
- 9) Kuwahara Y., Nakamura T., Hashimoto A., Nishi H., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 391–400 (1999).
- 10) Hikino H., Hikino Y., Yoshioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 755–760 (1964).
- 11) Nishikawa Y., Watanabe Y., Seto T., Yasuda I., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1089–1093 (1976).
- 12) Nishikawa Y., Seto T., Watanabe Y., Yasuda I., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 515–518 (1977).
- 13) Endo K., Taguchi T., Taguchi F., Hikino H., Yamahara J., Fujimura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2954–2958 (1979).
- 14) Takahashi S., Hikino H., Sasaki Y., *Yakugaku Zasshi*, **79**, 541–543 (1958).
- 15) Tai T., Idaka K., Kondo S., Akahori A., *Shoyakugaku Zasshi*, **44**, 1–4 (1990).