薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107(3) 192-198 (1987)

生薬の品質評価に関する基礎研究 (第9報¹⁾), 軟X線による生薬分析 その1
セイロン桂皮のX線顕微像による品質評価²⁾

御影雅幸, 小松かつ子, 難波恒雄*

富山医科薬科大学和漢薬研究所

Fundamental Studies on the Evaluation of Crude Drugs. IX.¹⁾ Soft X-Ray
Analysis on Crude Drugs. (1) Evaluation on the Quality of
Cinnamomi veri Cortex by Microradiogram²⁾

MASAYUKI MIKAGE, KATSUKO KOMATSU and TSUNEO NAMBA*

Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical
University, 2630, Sugitani, Toyama, 930-01, Japan

(Received June 23, 1986)

To study the utilization of soft X-ray microradiogram for the evaluation of crude drugs, seven different grades of Cinnamomi veri Cortex were examined. As the result, through the surface image, broad-linear bands due to calcium oxalate crystals in the phloem rays were observed definitely in the lower grade ones, and scarcely in the higher grade. Moreover, comparing with the microradiogram of the stem bark of *Cinnamomum verum*, higher grade ones corresponded to the bark from slender parts and lower grades to thicker parts. By use of this method jointly with optical microscopic observation was found to be more useful for the histological study of crude drugs. In addition, this method might be superior to the observation of the internal structures of large sized crude drugs without any damages, and gives various interesting informations by treating the drugs beforehand with chemical reagents such as hydrochloric acid.

Keywords—Cinnamomi Cortex; *Cinnamomum verum*; Cinnamon bark; crude drug evaluation; microradiogram; plant anatomy; soft X-ray

X線は生物組織などの構造, 組成, 物理学的性状などが研究できるため, 特に医学の分野で病気の診断や治療に, また産業部門では非破壊検査などに応用されている. 今回, 生薬の品質評価にX線を使った顕微X線法を利用する方法を検討したので報告する. 顕微X線法とは生物組織内に含まれる化学物質の組織内における量的分布をX線吸収像として観察する方法である. X線はその波長の長さによって超硬, 硬, 軟及び超軟X線に分けられ, 単色X線 (波長 λ) が1つの元素 (原子番号 Z) 中を通過するとき, 次式が成り立つことが実験的に示されている.

$$I = I_0 \exp(-\mu t) = I_0 \exp(-\mu/\rho \cdot m), \quad [\mu = aZ^3 \rho \lambda^3]$$

このとき I は通過X線強度, I_0 は入射X線強度, μ は線吸収係数, t は吸収物質の厚さ, ρ は吸収物質の密度, μ/ρ は質量吸収係数, m は吸収物質の単位面積当りの質量, a は比例定数を示す. 生物試料の場合, 組織の単位容積当りの密度が極めて低く, 比較的軽元素から構成され, 質量吸収係数 μ/ρ が低くなるため, X線吸収像で試料の詳細な構造を観察するためには波長の長い軟X線又は超軟X線を利用するのが適当となる. したがって生薬の品質評価に応用できるX線は軟X線又は超軟X線である. そこで今回, すでに内部形態並びに精油成分の差異を明らかにしたスリランカ産のセイロン桂皮 (Cinnamomi veri Cortex)³⁾ の各種等級の軟X線吸収像による品質評価を試みたので報告する.

実験の部

I. 材料 生薬材料はスリランカ, Matara の P.V.P. Jayasekera 氏から入手 (1980年2月) した Continen-

tal 5 special (富山医科薬科大学和漢薬研究所, 民族薬物資料館所蔵標本, No. 04009), Continental 5 (同, 04010), Mexican 5 (同, 04011), Mexican 4 (同, 04012), Hamburg 1 (同, 04015), Hamburg 2 (同, 04014), Hamburg 3 (同, 04013) の7種の等級 (以下, それぞれを C-5 sp, C-5, M-5, M-4, H-1, H-2, H-3 と略称する). 比較材料はスリランカの Matara にて Deckman Buultjens 氏栽培の *Cinnamomum verum* J. S. PRESL セイロンニッケイの枝の基部, 中央部及び先端部の皮部. 1980年2月, T. Namba *et al.* No. 557.

II. 分析装置 軟X線発生装置は Softex 社製 CMR 型. X線管球: I-0105 油浸防電冷却式, ベリリウム窓 (対陰極物質 Cu; 焦点 $0.3\text{ mm} \times 0.3\text{ mm}$). 性能: 出力電圧 0—10 kV 可変; 出力電流 0—5 mA 可変; 照射時間 0—2 時間可変. カセット (試料フィルムホルダー): 中カセット (焦点から試料面までの距離 40 mm, 撮影有効面積 15 mm i.d. , マグネット付). X線吸収体の元素の解明には, 波長分散型の XMA を装備した走査電子顕微鏡, 日本電子製 JSM-35 FCS を用いた. 測定条件: 加速電圧 20 kV; 試料吸収電流 $2 \times 10^{-8}\text{ A}$; 分光結晶 PET; 分析線 $\text{Ca-K}\alpha_1$.

III. 感光及び現像材料 感光材料は Eastman Kodak 社製 spectroscopic film 649-O (解像力: 1000 line/mm), 現像液は処方 D-19 (メトール 2.0 g, 無水亜硫酸ナトリウム 90.0 g, ハイドロキノン 8.0 g, 無水炭酸ナトリウム 52.5 g, 臭化カリウム 5.0 g に蒸留水を加えて 1000 ml), 定着液は富士写真フィルム FUJIFIX を使用した.

IV. X線顕微像 (Microradiogram) の撮影¹⁾ と観察 撮影にあたっては試料を適当な方法でできるだけ平坦にし, かつフィルムとの密着性をよくした. カセットに直径 2 cm の円形に切り取ったフィルムを乳剤面を上にして載せ, その上に試料片 ($1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$), セロファン (直径 2 cm の円形) の順に載せ, 金属リングで上から押えて軟X線発生装置のヘリコート (管球の窓に接して取付けられた円筒) に装着し, X線を照射した. 現像定着処理後, 乾燥したフィルムを封入し, 光学顕微鏡で観察した. X線顕微像は通常, 試料である皮部の表面に垂直にX線を照射して撮影した (以下この像を平面X線顕微像とする). また必要に応じて, 厚さ $300\text{ }\mu\text{m}$ の横切面及び縦切面を作成し, 各切片のX線顕微像を得た (それぞれ, 横断面X線顕微像, 放射縦断面X線顕微像とする).

V. 撮影条件の選定 X線管球の電圧は管球が放出するX線の強度と波長を, 電流は線量を変化させる. すなわち, 電圧が上昇するとすべての波長のX線の強度が増大し, 短波長端及び強度の最大点は短波長側に移動し, 一方, 管球電流を変化させた場合には線量のみが比例して増減する. そこで, 今回の実験材料の観察目的に適し

Fig. 1. Microradiograms of Cinnamon in Various Conditions

The conditions of working voltage, current intensity and exposure time are shown in parentheses. The same sample of Cinnamon graded Hamburg 2 (850—1000 μm in thickness) is used.
bla, broad linear X-ray absorbed part; cla, cloudy X-ray absorbed part.

TABLE I. Mass Absorption Coefficients of Structure Materials and Ergastic Substances of *Cinnamomi veri Cortex*

Wavelength Materials	1.542Å (Cu-Kα)	<3.07Å (Ca-K absorp. edge)	3.359Å (Ca-Kα)
Calcium oxalate	51.28 cm ² /g	330.19	108.56
Cellulose	8.41	57.68	75.90
Lignin	7.47	51.35	67.56
Water	11.47	78.22	102.93

た撮影条件を選定するため、H-2の同一試料片を用いてX線管球の電圧、電流の強さ及び照射時間を変化させてそれぞれのX線顕微像を得た (Fig. 1). それぞれのX線顕微像から、電圧が高いものほど広線形のX線吸収部が明瞭になり、逆に電圧が低くなるに従って雲状の吸収部が現れ、この雲状の吸収部の障害で広線形の吸収部は不明瞭となった。解像力は高電圧のものほどよかったが、コントラストは低下した (Fig. 1-A). 電流の変化による影響は認められなかった (Fig. 1-B). そこで本研究ではこの広線形及び雲状のX線吸収部を品質評価の指標として観察することにし、撮影条件を管球電圧 9 kV, 管球電流 4 mA と設定した。なお、次項で述べるように広線形の吸収部は放射組織中のシュウ酸カルシウムに由来し、雲状の吸収部は厚膜細胞に由来するものである。

ところで、セイロン桂皮の細胞壁はセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンなどから構成され、細胞内含物として精油、粘液質、シュウ酸カルシウムの結晶などが認められる。本研究ではシュウ酸カルシウムの結晶に起因する広線形のX線吸収部を品質評価の一指標としたので、観察に際しては検索の対象であるシュウ酸カルシウムが他の共存物質に比して高いX線吸収を示す波長範囲の連続X線を使用するのが望ましい。シュウ酸カルシウム ($\text{C}_2\text{O}_4\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$) と共存する有機物質のセルロース ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n、リグニン ($\text{C}_{36}\text{H}_{20}\text{O}_{16}$)⁵⁾ 及び水 (H_2O) のX線の波長別質量吸収係数 (Table I)⁶⁾ は、カルシウムのK吸収端 ($\lambda_{\text{KCa}} = 3.07\text{\AA}$) より短波長側においてシュウ酸カルシウムの質量吸収係数と共存物質のそれとの比が高い。したがってセイロン桂皮の観察には 3Å以下を多く占める連続X線もしくはこの範囲に現れる特性X線が適当と判断され、ここで選定した管電圧 9 kVで放出されるX線はこの条件を満足している。

Fig. 2. Microradiograms of Sample Cinnamon Graded Hamburg 3 in Various Conditions.

A; a plane view of the bark. B; a front view through transverse section of the bark, about 300 μm in thickness. C; a side view through radial section of the bark, about 300 μm in thickness. D; a plane view of the bark after treatment with concentrated hydrochloric acid. E; a plane view of outer thin layer of the bark stripped off at the position of stone cell ring (outer cortex.) F; a plane view of inner thin layer of the bark (inner cortex).

VI. X線吸収物質の解明 H-3 を用いて検討した。試料を皮部外層と内層に分け、それぞれ平面 X 線顕微像を得 (Fig. 2-E, F), これらと分ける前に撮影した平面 X 線顕微像 (Fig. 2-A) とを比較した。また別に横断面 X 線顕微像 (Fig. 2-B) と放射縦断面 X 線顕微像 (Fig. 2-C) を得た。更に試料を濃塩酸中に一昼夜放置し、十分に水洗した後よく乾燥して平面 X 線顕微像 (Fig. 2-D) を撮影した。以上の X 線顕微像を判断した結果、広線形の X 線吸収部は皮部内層に由来し、横断面及び放射縦断面 X 線顕微像から放射組織により強い吸収が認められることが分かり、更に塩酸処理によってこの吸収部が消失することから、広線形の吸収部は放射組織中に多量に含まれるシュウ酸カルシウムの針状晶に起因することが判明した。なお針状晶は放射組織のうち横臥細胞中のみに存在し、また結晶を全く含まない細胞列があることも明らかになった。一方、雲状の吸収部は石細胞の放射方向の重なりによるものであった。次に広線形の吸収部がシュウ酸カルシウムの結晶に起因することを確証する目的で、横切片における吸収部位を X 線マイクロアナライザーで分析したところ、多量のカルシウムが検出された。カルシウムの X 線像 (Fig. 3) から、カルシウムは放射組織中に最も多く分布し、石細胞中にはほとんど認められないことが明らかになった。

Fig. 3. X-Ray Micro-analyzer Image of the Transverse Section of Cinnamon Graded Hamburg 3

A; Secondary electron image. B; X-Ray image of Ca on the same surface.
mph, phloem medullary ray; sc, sclerenchyma and stone cell.

VII. セイロン桂皮の各等級の X 線顕微像の比較 今回検討したセイロン桂皮の 7 種の等級は、品質のよいものから順に C-5 sp, C-5, M-5, M-4, H-1, H-2, H-3 と続く。ただし、Continental, Mexican, Hamburg の各等級は輸出先国の違いにより規格されているもので、Continental の低級品 (C-1 や C-2; 今回の実験材料中にはない) と Mexican の高級品 (同, M-5 sp など), また Mexican の低級品 (M-4) と Hamburg の高級品 (H-1) とは連続しない。³⁾ これらを比較するために、各等級品の平面 X 線顕微像及び横断面 X 線顕微像を検討した (Fig. 4)。平面 X 線顕微像において、等級が低い H-2, H-3 及び M-4 では放射組織中のシュウ酸カルシウムの結晶に起因する広線形の吸収部が明瞭であるが、等級が高いものほど不明瞭になり、確認される数も少なくなる。高級品の C-5 sp ではこの吸収部は全く認められない。また低級品ほど吸収部の幅が狭くなる。このような等級による放射組織の吸収の差異は皮の厚さから生じるシュウ酸カルシウムの放射方向の集積量の差異によるものと考えられる。一方、厚さが同一の横切片の X 線顕微像及び皮部内層の厚さがほぼ同様に等級の異なるものの平面 X 線顕微像を検討した結果、高級品ほど X 線吸収量が少ないことが判明し、単位体積当りのシュウ酸カルシウムの量 (絶対量) も等級間で差異があることが明らかになった。石細胞群に由来する雲状の吸収部については、等級の低いものほどその分布が不均一であった。雲状の吸収部の観察には横断面 X 線顕微像が適しており、上等級品では帯状に連なり、等級が低くなるに従って帯状の環が部分的に 2 次皮部中に突出するか又は群となって散在しており、このことが平面 X 線顕微像における雲状の吸収部の不均一の原因となっていることが分かる。

VIII. セイロン桂皮の各等級と *Cinnamomum verum* J. S. PRESL の皮部との比較 セイロン桂皮が *Cinnamomum verum* に由来することはすでに明らかにされている。本種の枝の基部、中央部及び先端部の皮部の平面 X 線顕微像を撮影し (Fig. 5), セイロン桂皮の各等級のものと比較したところ、基部の皮部の X 線顕微像は H-3 に、中央部の皮部は H-2, 先端部の皮部は M-5 又は 4 にそれぞれよく対応した。

Fig. 4

The microradiograms of plane view of the bark and front view of the transverse section of the bark, and the diagram illustration of the bark and the thickness of the secondary cortex, of each grade are shown in the order from left to right. The parenthesized letters show the conditions (working voltage, current intensity and exposure time).

bf, phloem fiber; cpr, primary cortex; cse, secondary cortex; f, fiber; mr, medullary ray; muc, mucilage cell; ph, phloem; sc, sclerenchyma cell; st, stone cell

Fig. 5. Microradiograms of Plane Views of the Bark of *Cinnamomum verum*

The Microradiograms A, B and C correspond to the portion a, b and c of illustrating branch, respectively. Parenthesized letters show the conditions (working voltage, current intensity and exposure time).

結論及び考察

1. セイロン桂皮の品質評価に軟X線を使った顕微X線法を利用する方法を検討したところ、平面X線顕微像を撮影し、放射組織中のシュウ酸カルシウムの結晶に起因する広線形の吸収部を観察するのみで本生薬の品質を評価することが可能であった。すなわち、皮部の平面視において、低等級品ほど広線形の吸収部が明瞭で、上等級品では不明瞭となり、C-5 sp ではまったく認められず、更に吸収部の幅は下等級品ほど狭くなることが明らかになった。また内部形態についての報告³⁾と同様、本法においても上等級品は枝の細い部分から調整されることが示された。なお、今回比較材料として用いた *C. verum* の枝には、上等級品に合致する部分が認められなかったが、これは比較材料が成長の悪い枝であったためと考えられる。我々が入手した枝は根元から出た3年生と思われるもので、かなり分枝が多く、このものは成長不良のために刈り取られなかったものであろう。セイロン桂皮の高級品は通常2年生の成長のよい枝から得られる。今回の比較材料のように成長の悪いものでは、細い枝であっても高級品は得られないことが分かる。また、今回の結果は光学顕微鏡による観察結果³⁾と完全には合致しなかったが、これは市場品には変異が多いことに加え、光学顕微鏡では放射組織中のシュウ酸カルシウムの観察が正確にできなかったことが原因と思われる、この点においては顕微X線法の方が優れていると言える。

2. 本法により得られた情報は、組織と細胞内含有物の和であり、これまでになかった情報である。このように顕微X線法を用いると光学顕微鏡による組織構造の観察では得られない情報を引き出すことができ、従来の方法に本法を併用することはたいへん有意義であることが明らかにできた。また本法はこれまで観察されにくかった大型の皮類生薬や葉類生薬の広範囲に及ぶ平面的な内部構造の解析に役立ち、更には本法の最大の利点である非破壊的にその透過像を観察できるという点で、貴重な試料の鑑別には特に効力を発揮するものと考えられる。今回、組織中のシュウ酸カルシウムの結晶を酸により除去し他のX線吸収部との識別を行ったが、更に今後種々の薬品処理により様々な情報が得られるものと考えられ、現在検討中である。

引用文献及び注

- 1) 第8報：久保田昌利，服部征雄，難波恒雄，生薬，**37**，229 (1983)。
- 2) 日本薬学会第101年会で発表，熊本，1981年4月。
- 3) 難波恒雄，菊池 徹，御影雅幸，門田重利，小松かつ子，清水岑夫，富森 毅，生薬，**41**，印刷中。
- 4) a) 星野 孝，須賀昭一，“顕微X線法”，医学書院，東京，1970；b) 小泉菊太，“X線とソフテックス写真”，共立出版，東京，1979。
- 5) リグニンの分子式については未だ定説がないが，計算の便宜上，次の書物を参考にした。本村康一，木島正夫，“薬用植物学総論”，広川書店，東京，1981，p. 56。
- 6) 内山 郁，渡辺 融，紀本静雄，“X線マイクロアナライザ”，日刊工業新聞社，東京，1972の付表データを用いて算出した。