薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
97 (8) 916-921 (1977)

UDC 615.322.011.5.073 : 543.544.062

生薬の品質評価に関する基礎研究 (第 5 報¹⁾) 水素炎イオン化検出器を用いた
薄層クロマトグラフィーによる生薬成分の定量法 その 2²⁾
芍薬中の Paeoniflorin および Albiflorin の定量

吉崎正雄,^{3a)} 富森 毅,^{3b)} 吉岡成美,^{3c)} 難波恒雄^{3a)}
富山大学和漢薬研究所,^{3a)} 北陸大学薬学部,^{3b)} 株式会社ヤトロン^{3c)}

Fundamental Studies on the Evaluation of the Crude Drugs. V.¹⁾ Quantitative
Analysis of Constituents in Crude Drugs by Rod-Thin-Layer
Chromatography with FID. (2).²⁾ Determination of
Paeoniflorin and Albiflorin in Paeony Roots

MASAO YOSHIZAKI,^{3a)} TSUYOSHI TOMIMORI,^{3b)} SHIGEYOSHI YOSHIOKA^{3c)}
and TSUNEO NAMBA^{3a)}

Research Institute for Wakan-Yaku, University of Toyama,^{3a)} School of Pharmacy,
Hokuriku University^{3b)} and Iatron Laboratories, Inc.^{3c)}

(Received April 4, 1977)

A new method for the determination of paeoniflorin and albiflorin in crude drug *Shaoyao* (芍薬, peony root) was established by the use of a rod-thin-layer chromatograph equipped with a flame ionization detector (rod-TLC-FID). The test solution was submitted to rod-TLC-FID method using a mixture of chloroform-methanol (5:1) as a developing solvent. The content of paeoniflorin and albiflorin was calculated from their calibration curves previously prepared using guaiacol glyceryl ether as an internal standard. The recovery rate of paeoniflorin and albiflorin was more than 95%. This method is considered to be useful for the chemical evaluation of *Shaoyao*.

Keywords—Paeoniae Radix; paeoniflorin; albiflorin; quantitative analysis; rod-thin-layer chromatog. with FID; guaiacol glyceryl ether as internal standard

芍薬は「神農本草経」に収載されて以来、多くの漢方々剤に繁用されてきた重要な漢薬の一つである。その薬効としては一般的に鎮痙、鎮痛、鎮静、収斂などの諸作用があるとされている。第 9 改正日本薬局方にはシャクヤクとして、シャクヤク末とともに収載されており、家庭薬原料としても需要の多い生薬である。

芍薬の化学的研究については従来 2, 3 の報告⁴⁾ がみられるが、近年柴田ら⁵⁾ は主成分の paeoniflorin (以下 pae. と略記) を単離し、副成分の albiflorin (以下 alb. と略記), oxypaeoniflorin および benzoylpaeoniflorin とともにその構造を明らかにしている。pae. は特異な cage-like pinane 骨格を有する配糖体であり、その存在は現在のところ *Paeonia* 属植物以外には未だ天然に知られていない。⁶⁾ 一方高木、原田⁷⁾ は pae. の薬理作用について検討し、鎮静、鎮痛、鎮痙作用の他に抗炎症作用、ストレス潰瘍予防作用等を認めており、芍薬の治療効果と pae. の薬理試験効果がよく一致するという結果が示されている。このような意味から pae. は芍薬を代表する

1) 第 4 報: 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森 毅, 坪井正彦, 加藤公代, 薬誌, 95, 809 (1975).

2) 日本薬学会第 93 年会, 東京, 1973 年 4 月: 第 2 回生薬分析討論会, 神戸, 1973 年 11 月一部発表.

3) Location: a) 3190, Gofuku, Toyama; b) 3, Ho, Kanagawa-machi, Kanazawa; c) 1-11-4, Higashi-kanda, Chiyoda-ku, Tokyo.

4) 朝比奈泰彦, 奥野政造, 薬誌, 27, 1237 (1907); 太田達男, 宮崎利夫, 東京薬大年報, 4, 266 (1945).

5) S. Shibata, M. Nakahara, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 11, 372 (1963); S. Shibata, M. Nakahara, N. Aimi, *ibid.*, 11, 379 (1963); N. Aimi, M. Inaba, M. Watanabe, S. Shibata, *Tetrahedron*, 25, 1825 (1969); M. Kaneda, Y. Iitaka, S. Shibata, *ibid.*, 28, 4309 (1972).

6) 柴田承二, 稲葉 実, 相見則郎, 生薬, 20, 37 (1966).

7) 高木敬次郎, 原田正敏, 薬誌, 89, 879, 887, 893 (1969).

Chart 1. Preparation of the Test Solution

有効成分の一つとして、芍薬の品質評価の上で重要な指標物質であると考えられる。

著者らはこれまでに生薬成分の量的評価を行なう一手段として薄層自動検出装置（以下 rod-TLC-FID と略記）⁸⁾を導入し、各種人参サポニンのパターン分析⁹⁾ならびに甘草中のグリチルリチンの定量¹⁾について報告してきた。今回これらの研究の一環として、芍薬の品質評価という観点から rod-TLC-FID 法による pae. の定量法の確立を目的として検討を行なった結果、主成分の pae. とともに副成分中比較的含量の多い alb. をも同時に定量し得る方法を見い出した。本法を市場の芍薬数種に適用した結果を示すとともに、シャクヤク根から真芍を調製する一方法として採られている“湯通し”過干の知見が得られたので併せて報告する。

芍薬のメタノールエキスの薄層クロマトグラムは Fig. 1 に示すように原点から溶媒先端附近まで多くのスポットが認められる。目的の pae. と alb. はお互いに分離し、他の夾雑成分とも比較的良好な分離を示しているが、このままでは定量値のバラツキを少なくし、再現性を確保するために必要な内部標準物質の添加が困難であることを示している。従って目的物以外の夾雑物をできるだけ除去する必要がある。この点について種々検討を加えた結果、Chart 1 および実験の部に示す検液調製法が操作も簡易であり、かつ良好な結果を与えることを認めた。すなわち芍薬検体を少量の炭酸カルシウムとともに微量連続抽出器¹⁰⁾を用いて抽出すると 2 時間で脱脂が完了する。この場合石油エーテルの代りにエーテルあるいはクロロホルムを用いると、Fig. 1 に示すように pae. の一部が溶出されるので不適当である。次にメタノールで連続抽出しエキスを得る。抽出時間の検討結果は Fig. 2 に示すごとく 3 時間以上で一定の定量値を与えた。メタノールエキスは水に溶解し、水飽和 *n*-ブタノールで処理する。操作は遠沈管を用いれば容易であり、4 回の振とう抽出で目的物質は *n*-ブタノール層に完全に転溶する。クロロホルム-メタノール (5:1) を展開溶媒とし、本 *n*-ブタノールエキスを rod-TLC-FID に付した結果

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Various Extracts from Japanese Paeony Root

Plate, Kieselgel G.
Solvent, CHCl_3 -MeOH (5:1).
Color reagent, 10% H_2SO_4 .
1, MeOH ext.; 2, CHCl_3 ext.; 3, ether ext.;
4, petr. ether ext.

8) 難波恒雄, 吉岡成美, ファルマシア, 10, 557 (1974).

9) 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森 毅, 小橋恭一, 三井健一郎, 長谷純一, 藥誌, 94, 252 (1974).

10) 木村康一，野呂征男，久田陽一，吉崎正雄，生薬，**26**, 133 (1972) を参考にして一部改良したもの，文献 1 参照。

Fig. 2. Effect of Extraction Time on the Paeoniflorin and Albiflorin Contents *Paeoniae Radix PULVERATA* (JP VIII) was used (see Table II)

Fig. 4. Calibration Curves of Paeoniflorin and Albiflorin

Each spot indicate the mean value of ten repeated determinations.

Fig. 3. Quantitative Thin-Layer Chromatogram of Test Solution (A) and the Same Solution without Internal Standard (B) from Japanese Paeony Root

Condition: apparatus, IATORON THINCHROGRAPH TFG-10; detector, H.F.I.D.; flow rate, H_2 , 165 ml/min, air, 2000 ml/min, scanning speed, 12.0 cm/min; TLC, $CHCl_3$ -MeOH (5:1)/ SiO_2 rod (Thinchród-S); internal standard, guaiacol glyceryl ether.

は Fig. 3 に示すごとく, pae. より高 R_f 値領域に最早他の夾雑成分の存在は認められず, 内部標準物質の添加が可能である. 内部標準物質の選択については種々検討した結果, guaiacol glyceryl ether が適度の R_f 値を示し, 入手ならびに精製が容易であることから適当と考えられる. 本内部標準物質の一定量を前記 n -ブタノールエキスとともにメタノールで一定容量となし検液を得る. 検液は予め本装置の水素炎中を走査して活性化したシリカゲル溶着棒の原点に約 2 μ l スポットし, 上記溶媒で展開, 乾燥後, rod-TLC-FID

に付し測定する. 測定結果の一例を Fig. 3 に示した. このピーク面積比と次の検量線から pae. と alb. の含量をそれぞれ算出する. 検量線の作成は実験の部に示すように, 一定量の内部標準物質を添加した pae. 標準品と alb. 標準品のそれぞれの濃度系列について rod-TLC-FID 法で測定した. 得られたピーク面積比と重量比から最小二乗法で求めた各回帰方程式は Fig. 4 に示すようである. これは pae. および alb. がいずれも, 1—16 γ /rod に相当する濃度範囲で比例関係が成立することを示している. また本法による pae. および alb. の回収率は Table I に示すごとくいずれも 95% 以上であり, 本定量法の妥当性を裏付けている.

Table II に示すごとく, 市場の奈良県産, 中国産芍薬および日本薬局方シャクヤク末 (JP VIII) 中の pae. の含量は, 前二者が 3% 強, 後者は 4% 強であった. alb. については三者とも 0.7% 前後の値を示した.

富山県薬草園で栽培された 6 年生シャクヤク根を根の直径の大小により, (a) 主根に基づく径 10 mm 以上のもの (b) 主根先端部および側根に基づく径 10 mm から 5 mm の間のもの, (c) 側根および細根に基づく径 5 mm 以下のもの, の 3 つに大別して定量した結果は Table III に示すごとく, pae. alb. とともに (a) < (b) < (c) という量的関係が認められた. すなわちシャクヤクの細根および側根は, 同株の太い主根よりも両成分の含量が高いことを示している. また現在生薬としては利用されていないシャクヤク根基部にも根部と同等量の両成分が存在することを認めたが, 前記局方不適の細根および側根部とともに今後 pae. 原料としての利用について検討

TABLE I. Recovery Percentage of Paeoniflorin and Albiflorin in This Method

Sample, ^{a)} pae., alb. (mg)				Calcd. (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
pae.	Sample (500.0) +	pae. (20.0)	pae. (20.0)	20.00	19.55	97.7
		pae. (20.0)	pae. (20.0)	20.00	19.08	95.4
		pae. (20.0)	pae. (20.0)	20.00	19.24	96.2
		pae. (20.0) ^{b)}	pae. (20.0) ^{b)}	41.90	40.20	96.0
		pae. (20.0) ^{b)}	pae. (20.0) ^{b)}	41.90	40.31	96.2
		pae. (20.0) ^{b)}	pae. (20.0) ^{b)}	41.90	40.00	95.5
alb.	Sample (500.0) +	alb. (20.0)	alb. (20.0)	20.00	19.15	95.8
		alb. (20.0)	alb. (20.0)	20.00	19.50	97.5
		alb. (20.0)	alb. (20.0)	20.00	19.32	96.6
		alb. (20.0) ^{b)}	alb. (20.0) ^{b)}	23.20	22.18	95.5
		alb. (20.0) ^{b)}	alb. (20.0) ^{b)}	23.20	22.25	96.0
		alb. (20.0) ^{b)}	alb. (20.0) ^{b)}	23.20	22.32	96.2

a) *Paeoniae Radix PULVERATA* (JP VIII) was used, and its paeoniflorin and albiflorin contents were shown in Table II.

b) Volume of the test solution was adjusted to 10 ml, containing 40 mg of internal standard.

TABLE II. Determination of Paeoniflorin and Albiflorin in Paeony Root

Sample (mg)	Peak area response ratio		Pae. and Alb. in sample (mg)		Content (%)		Average (%)	
	pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.
Yamato ^{a)}	517.3	0.92	0.09	17.0	3.9	3.29	0.75	
	506.1	0.89	0.10	16.6	4.0	3.23	0.80	
	526.3	0.90	0.10	16.7	4.0	3.17	0.77	3.26
	542.7	0.98	0.09	18.0	3.9	3.31	0.71	0.76
	503.6	0.90	0.09	16.7	3.9	3.29	0.77	
China ^{b)}	501.7	0.82	0.04	15.5	3.0	3.08	0.59	
	514.8	0.93	0.05	17.2	3.2	3.34	0.62	
	533.9	0.87	0.05	16.2	3.4	3.04	0.64	3.31
	556.0	0.96	0.05	17.7	3.2	3.17	0.58	0.61
	531.0	0.86	0.05	16.1	3.2	3.03	0.60	
Powder ^{c)}	503.4	1.25	0.05	22.2	3.2	4.42	0.64	
	501.4	1.22	0.05	21.7	3.2	4.33	0.64	
	510.5	1.24	0.06	22.0	3.4	4.31	0.67	4.38
	504.4	1.21	0.05	21.5	3.2	4.27	0.63	0.64
	521.0	1.36	0.05	23.9	3.2	4.59	0.61	

a) From Osaka market, cultivated in Nara Prefecture.

b) From Osaka market, imported from the People's Republic of China.

c) *Paeoniae Radix PULVERATA* (JP VIII).

する必要があると思われる。

次に現在真芍調製の一方法として、シャクヤク根のコルク層を除去し、“湯通し”する方法が採られているが、この際に pae. および alb. 含量がどの程度減少するかについて検討を行なった。すなわち前記の富山県薬草園にて栽培された6年生シャクヤク根からコルク層を除去したものを2分し、一方はそのまま乾燥して白芍とする。他方は実験の部に記す方法で“湯通し”処理し真芍とする。両者について両成分を比較定量した結果は Table IV に示すように、“湯通し”過程における損失は pae. の場合僅かに 3.9%, alb. の場合は 12.7% であり、少な

TABLE III. Relationship between the Paeoniflorin and Albiflorin Contents and the Size of Paeony Root, and Determination of Both Constituents in the Rhizome of *Paeonia albiflora* PALLAS var. *trichocarpa* BUNGE

	Sample (mg)	Peak area response ratio		Pae. and Alb. in sample (mg)		Content (%)		Average (%)	
		pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.
(a)	640.6	0.76	0.29	14.5	7.3	2.26	1.14	2.17	1.13
	550.8	0.58	0.22	11.7	6.1	2.12	1.11		
	540.5	0.57	0.22	11.5	6.1	2.13	1.13		
(b)	631.9	0.75	0.32	14.4	7.8	2.28	1.23	2.33	1.30
	578.4	0.72	0.33	13.9	8.0	2.40	1.38		
	570.3	0.67	0.29	13.1	7.8	2.30	1.28		
(c)	586.8	1.02	0.54	18.6	11.6	3.17	1.98	3.22	1.95
	563.9	0.97	0.49	17.8	10.7	3.16	1.90		
	551.8	1.00	0.50	18.3	10.9	3.32	1.98		
Rhizome	559.5	1.07	0.28	19.4	7.1	3.47	1.27	3.55	1.28
	522.9	1.04	0.26	18.9	6.8	3.16	1.30		
	510.1	0.99	0.24	18.1	6.4	3.56	1.26		

Each sample was cultivated in Toyama Prefectural Botanical Garden for Medicinal Plants.
Diameter of root: a>10 mm>b>5 mm>c.

TABLE IV. Comparison of Paeoniflorin and Albiflorin Contents between "Byakushaku" and "Shinshaku"

	Sample (mg)	Peak area response ratio		Pae. and Alb. in sample (mg)		Content (%)		Average (%)	
		pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.	pae.	alb.
"Byakushaku" ^{a)}	504.8	0.65	0.14	12.8	4.7	2.53	0.93	2.55	0.86
	501.2	0.66	0.10	12.9	4.0	2.57	0.80		
	500.5	0.65	0.11	12.8	4.2	2.55	0.84		
"Shinshaku" ^{b)}	503.9	0.62	0.08	12.3	3.7	2.34	0.78	2.45	0.75
	507.0	0.62	0.09	12.3	3.9	2.42	0.76		
	506.4	0.64	0.10	12.6	4.0	2.49	0.78		

Each sample was cultivated in Toyama Prefectural Botanical Garden for Medicinal Plants.

a) After removing a cork layer, the raw root was dried in a drying oven with warm air (50°) for 12 hr.

b) After removing a cork layer, the raw root was kept in water at 80° for 5 min, then dried in the shade to give constant weight.

くとも pae. の含量に関しては白芍と真芍の間に殆んど差はないとみなしてさしつかえないものと考えられる。なおこの際湯水中に溶出した僅少の両成分は別に定量して確認した。

以上、本法は芍薬中の pae. および alb. の定量法として十分実用に耐え得る方法であると考え、今後この定量法をもとに *Paeonia* 属植物中の両成分の定量を行なうとともに、ジャクヤク栽培時における両成分の量的変動についても検討し、品種の改良に資する予定である。

実 験 の 部

装置および測定条件 IATRON THINCHROGRAPH TFG-10 (株式会社ヤトロン製) を用いた。薄層棒は直径 0.9 mm, 長さ 152 mm の石英棒にシリカゲル粉末とガラス粉末の混合物を均一に塗布し、電気炉で焼結して薄層部の厚さ 0.1 mm としたもの (シンクロッド S, ヤトロン製) を使用直前装置の水素炎で 2 回活性

化したものを用いた。ロッドホルダーに 10 本単位でセットされた各薄層棒に 1 検液を約 2 μ l づつスポットし、 CHCl_3 -MeOH (5:1) で 11 cm 展開後、70°, 2 min 間乾燥して上記装置で測定する。ピーク面積比は装置に内蔵されたアナログ積分計の積分カーブから算出し、一検体につき薄層棒 10 本の値の平均値で表示した。その他の測定条件は Fig. 3 参照。

標準物質および試薬類 pae. および alb.——局方シャクヤク末 (JP VIII) より、柴田らの方法⁵⁾ に準じてそれぞれを無色無晶形粉末として単離。pae. は標品と TLC, IR (KBr) を比較し同定。さらに文献に基づき tetraacetate, mp 196°, 無色針状晶、となし標品との混融, IR, TLC にて同定。alb. は TLC, IR (KBr), NMR $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$ を標品と比較し同定した。

内部標準物質——市販の guaiacol glyceryl ether (試薬特級) を ether から再結晶して得た無色針状晶, mp 78.5—79°, を使用。

試薬類——petr. ether, CaCO_3 , *n*-BuOH, MeOH はいずれも試薬特級, 水は蒸留水を使用。

検量線の作成 Guaiacol glyceryl ether 4 mg/ml あたり pae. および alb. をそれぞれ段階的に 1, 2, 4, 6, 8 mg 含有する MeOH 溶液を調製し、検液の場合と同条件で測定。得られたピーク面積比 (Y) と対応する重量比 (X) から最小二乗法によって pae. と alb. のそれぞれの回帰方程式 (Fig. 4) を求めた。

検液の調製 (Chart 1) 芍薬検体を JP VIII ふるい 20 号に通過する粉末とし、シリカゲルデシケーター中で乾燥し恒量とする。この試料 約 500 mg を精秤、 CaCO_3 100 mg とともに連続抽出器¹⁰⁾ の抽出筒 (底部はグラスフィルター) に入れ、ガラス綿で覆い、水浴上 petr. ether 20 ml で 2 時間抽出、脱脂。次いで、MeOH 20 ml で 4 時間連続煮沸抽出。MeOH 抽出液は溶媒留去後、合計 10 ml の水を用いて加温溶解させ 50 ml の共栓付遠沈管に移す。冷後水飽和 *n*-BuOH 10 ml を加え 2 min 間振とう後遠心分離 (3000 r.p.m., 5 min) し上層を得る。この操作を 4 回繰り返し、合した *n*-BuOH 層から減圧下溶媒を留去、残渣を予め内部標準物質 20 mg を秤り取った 5 ml のメスフラスコに MeOH で移し、正確に 5 ml とし検液とする。

抽出時間の検討 (Fig. 2) 前記の検液調製過程で、MeOH による抽出時間のみを 1, 2, 3, 4 および 5 時間に分けて行ない、それぞれ定量した。

pae. および alb. の回収率 (Table I) pae. 20 mg を精秤し、前記検液調製法における検体芍薬末の代りにこれを用い、他は検液調製法の場合と同一操作、同一条件で測定し、算出した。alb. についてもこれと同一の方法で行なった。さらにシャクヤク末 (JP VIII) 500 mg に pae. 20 mg, alb. 20 mg を別々に添加、同様処理し、内部標準物質 40 mg を含む検液各 10 ml を調製、これについても測定し回収率を求めた。

白芍および真芍の調製 1973 年 11 月富山県薬草園にて栽培された 6 年生のシャクヤク株を掘り起こし根部を水洗、細根および側根を除いた直径 15 mm 以上の主根部を集め、コルク層を除去して 2 分する。一方 650 g はそのまま 50°, 12 時間送風乾燥して白芍 306 g (乾燥収率 47%) を得た。他方 680 g は 80° の蒸留水 1 l を満たした蒸発皿に投入し、同温度に 5 min 間保った後取り出し陰乾 1 週間、真芍 312 g (乾燥収率 46%) を得た。

“湯通し” 過程における pae. および alb. の損失量測定 上記白芍と真芍中の pae. および alb. 含量の比較は Table IV 参照。上記真芍 312 g (コルク層除去生シャクヤク根 680 g 相当分) の調製過程で得た湯水を petr. ether で 3 回振とう抽出。水層に CaCO_3 少量を加え減圧濃縮しエキスをとす。これを熱 MeOH で 3 回抽出、溶媒を留去、MeOH エキスを得る。これに再び MeOH を加えてろ過し、ろ液を正確に 50 ml とす。本 MeOH 溶液 5 ml を精秤、溶媒留去し、エキスをとし、検液調製法における MeOH エキス以後の操作を行なって定量した。結果：本湯水中の pae. 量は 261 mg (計算値 312 mg), alb. 量は 288 mg (計算値 343 mg) で前記白芍と真芍における両成分含量 (Table IV) のそれぞれの差にほぼ一致する。

謝辞 本研究の一部は昭和 51 年度文部省科学研究費補助金 (一般 144074) によって行なったものであり、ここに記して謝意を表する。本研究にあたり、貴重な paeoniflorin ならびに albiflorin 標品を恵与された明治薬科大学教授 柴田承二博士に深謝する。また実験材料の一部を提供された富山県薬草園、NMR を測定していただいた富山大学薬学部 森腰正弘、実験に協力された松本憲治、藤井則善、高橋範行の諸氏にも併せ感謝する。