

生薬製剤に含まれるセンナとダイオウの TLC による判別

石井 俊靖、西條 雅明、長谷川貴志、高橋 市長、永田 知子

Judgement of Senna and Rhubarb in Herbal Preparations by TLC

Toshiyasu ISHII, Masaaki SAIJO, Takashi HASEGAWA,
Kazunaga TAKAHASHI and Tomoko NAGATA

Summary

The presence of senna and rhubarb in herbal preparations was examined. Components of senna and rhubarb, sennoside A (SA) and sennoside B (SB) were determined using high performance liquid chromatography. However, the origin of senna or rhubarb were not judged from the content ratio of SA and SB. Senna and rhubarb were extracted with methanol and the solutions then applied to thin-layer plates and developed with n-hexane/ethyl acetate/acetic acid (70:30:1). For rhubarb, spots of rhein, aloe-emodin, emodin, physcion and chrysophanol were clearly determined. For senna, spots of rhein, aloe-emodin and 3 pieces of vivid red purple color were observed. Herbal preparations containing senna and rhubarb were examined by the same method and spots from the sample were clearly separated. The presence of senna and rhubarb in the herbal preparations were determined from these results.

キーワード：TLC：センノシドA、B：アントラキノン誘導体

Keywords：TLC：Sennoside A、B：Anthraquinone derivative

はじめに

医薬品、医薬部外品及び化粧品の品質、有効性及び安全性を確保するため、千葉県においても薬事監視員による監視指導が毎年行われている。当該事業において、一般に流通している医薬品等を収去したものを衛生研究所において試験検査を行っているが、平成16年度、ダイオウを含有する生薬製剤中のダイオウの定性試験を行なった。本試験の際、各製品の承認試験法を基に行ったが、ダイオウとセンナの分別法は何れにも明確に示されてはいなかった。日本薬局方（JP）のダイオウ確認試験では、ダイオウ中の sennoside A（SA）を薄層クロマトグラフィ（TLC）で確認¹⁾しているが、センナの確認試験法も同様の試験法²⁾である。ダイオウとセンナの分別法としては、SA 以外のスポットからダイオウとセンナを確認している報告^{3,4)}があるが、操作がやや煩雑である。また、ダイオウの特徴的含有成分である rhein-8-glucoside を指標としてセンナと分別している報告^{5,6)}もあるが、標準品として流通していないため簡便に検査することが困難である。また、近年生薬エキ스가多く使用されており、その剤形も錠剤や顆粒剤が多いことから形態による鑑定も困難である。

そこで、両者の含有成分の違いを一般に標準品として入手しやすい成分で検索してみると、ダイオウの主要成分として SA 及び sennoside B（SB）のほか、anthraquinone 誘導体の rhein、aloe-emodin、emodin、physcion 及び chrysophanol¹⁾が、またセンナでは SA 及び SB のほか anthraquinone 誘導体の rhein、aloe-emodin 及び chrysophanol²⁾が知られている。よって、これら 5 種類の anthraquinone 誘導体含有状況の違いに着目し、市販されている生薬製剤中のダイオウとセンナの分別確認を TLC で試

みたところ良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1) 試料

(1) 日本薬局方センナ（センナ）；㈱前忠製（2004年購入）

(2) 日本薬局方ダイオウ（ダイオウ）；福田龍㈱製（2004年購入）

(3) 2004年中に市販されていたダイオウ及びセンナを含有する生薬製剤の A～H8 製品。以下に剤形及び主要表示成分を示す。

A：錠剤、大黃甘草湯エキス散 B：錠剤、大黃甘草湯水製乾燥エキス C：顆粒剤、ダイオウ D：錠剤、ダイオウ E：錠剤、ダイオウ末、センナ末 F：錠剤、センナ末、ダイオウ末 G：錠剤、日本薬局方センナ末 H：顆粒剤、センノシドA・B、プラントゴ・オバタ種皮末

2) 試薬

(1) 標準品：SA 及び SB 標準品は和光純薬工業㈱製、rhein 及び chrysophanol 標準品は ALDRICH 社製、aloe-emodin 及び emodin 標準品は SIGMA 社製、physcion 標準品は LKT Laboratories 社製を用いた。

(2) 標準溶液：各標準品10mgを精密に秤取し、1%炭酸水素ナトリウム溶液を加えて溶かし、全量を20mLとした。更にメタノールで希釈し SA 及び SB は50及び100 µg/mL、その他は 5 及び10 µg/mLを調製し高速液体クロマトグラフィ（HPLC）用標準溶液とし、各標準溶液を 100 µg/mLに調製したものを薄層クロマトグラフィ（TLC）用標準溶液とした。

(3) その他の試薬：アセトニトリルは和光純薬工業㈱製 HPLC 用試薬を用い、水は Milli-Q Labo 超純水製造

装置（日本ミリポア社製）により精製した超純水を用いた。その他の試薬は、すべて市販の試薬特級品を用いた。

3) 装置

HPLC 装置：Waters 社製616型ポンプ、Waters 社製 CHM 型カラムオープン、Waters 社製996型 Photodiode Array (PDA) 検出器を用いた。

4) 試料の調製及び試験方法

(1) HPLC による定性・定量試験

ダイオウ、センナ及び市販の生薬製剤をフードミキサーにより粉碎し300 μ mのふるいにかけて中末とし、著者らの簡易定量法³⁾に準じて調製し試験溶液とした。

(HPLC条件)

カラム：Inertsil ODS-3 (5 μ m 4.6 $\times$ 250mm)、カラム温度：50 $^{\circ}$ C

移動相 A 液：アセトニトリル・水・酢酸混液(10:39:1)

移動相 B 液：アセトニトリル・水・酢酸混液(40:9:1)

A 液：B 液；100:0(0分 $\rightarrow$ 15分) $\rightarrow$ 0:100 (18分 $\rightarrow$ 28分)

流量：1.0mL/min、注入量：20 μ L

取込波長：210 $\sim$ 400nm

検出波長：340nm (0 $\rightarrow$ 18分)、260nm (18 $\rightarrow$ 28分)

(2) TLC による条件検討試験

ダイオウ及びセンナをフードミキサーにより粉碎し300 μ mのふるいにかけて中末とし、それぞれ0.5gとり70%メタノール10mLを加え、超音波抽出を30分間行った後、抽出液を遠心分離(3000rpm 8分間)し、その上澄み液を展開溶媒検討用の TLC 試験溶液とした。別に70、80、90%及びメタノールで同様に調製した上澄み液を抽出溶媒検討用の TLC 試験溶液とした。

(TLC 条件)

薄層板：Kieselgel 60 F254 (Merck社製)

展開溶媒：n-ヘキサン・酢酸エチル・酢酸(75:24:1)

試験溶液：10 μ Lスポット、展開：約15cm

検出法：紫外線照射(365nm)

(3) 生薬製剤中の分別試験

製剤はフードミキサーにより粉碎し300 μ mのふるいにか

かけ中末とし、表示量に対しダイオウ及びセンナ0.5g相当量を取り、メタノール10mLを加え、超音波抽出を30分間行った後、抽出液を遠心分離(3000rpm 8分間)し、その上澄み液を TLC 試験溶液とした。展開溶媒をn-ヘキサン・酢酸エチル・酢酸混液(70:30:1)とし、(2)の TLC 条件で行なった。

結果及び考察

1) HPLC による測定結果からの検討

センナの SB 含有量はSAより多く²⁾、ダイオウは反対に約2:1の割合でSAの方が多いこと¹⁾が知られている。また、センナには rhein、aloe-emodin 及び chrysophanol が、ダイオウには更に emodin と physcion を加えた5成分の含有^{1,2)}が知られている。そこで、この含有成分の違いからセンナとダイオウ分別を HPLC の測定結果から検討してみた。Table.1 をみると、SA 含有量が SB よりも多かった製剤はA $\sim$ D であるが、A $\sim$ D はダイオウのみ配合されているにもかかわらずSA:SBの含有量比が約2:1になっているのは、製剤A及びCであり、B及びDはほぼ同程度の含有量であった。これはセンナ及びダイオウのエキス製造工程や生薬製剤製造工程中に主要成分であるSA及びSBの含有量に影響が出たことによるものであり^{7,8)}、よって、SA及びSBの含有量によるダイオウの判別は難しい。また、センナの特徴であるSB含有量が多い結果となっている製剤はE $\sim$ H であり、Anthraquinone 誘導体5成分をみると、ダイオウが含まれているA $\sim$ F 製剤全てから検出された。このことからダイオウのみ配合製剤であるA $\sim$ D とセンナ及びダイオウが混合配合されているE及びFとの分別は難しい。一方、センナのみ含有のGからはrhein及びaloe-emodinが検出されたが、chrysophanolは極微量のためか検出されなかった。しかし、このセンナのみ配合されているGの成分の検出パターンは、ダイオウのみ配合されているA $\sim$ D、センナとダイオウが配合されているE及びF、SA及びSB成分を配合されているHとの分別が可能であった。

Table 1. Contents (mg/g^{a)}) of SA, SB and Anthraquinones in Herbal Preparations, JP Grade Senna and Rhubarb

Sample	Sennoside A	Sennoside B	Aloe-emodin	Rhein	Emodin	Physcion	Chrysophanol
A	6.98 $\pm$ 0.14	3.91 $\pm$ 0.17	1.38 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.01
B	2.46 $\pm$ 0.39	2.11 $\pm$ 0.32	0.74 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.21	0.25 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.03
C	0.38 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00
D	3.19 $\pm$ 0.33	2.21 $\pm$ 0.26	0.42 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02
E	1.97 $\pm$ 0.13	2.12 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.01
F	4.58 $\pm$ 0.34	5.67 $\pm$ 0.42	0.99 $\pm$ 0.04	1.31 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.04
G	1.38 $\pm$ 0.07	2.37 $\pm$ 0.14	0.09 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01	N.D	N.D	N.D
H	0.76 $\pm$ 0.03	2.49 $\pm$ 0.09	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Senna	4.94 $\pm$ 0.01	7.95 $\pm$ 0.02	0.60 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.01	N.D	N.D	N.D
Rhubarb	7.95 $\pm$ 0.09	5.46 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01

a) Values represents mean $\pm$ S.D. (n=3)

b) ND; not detected (SennosideA,SennosideB; blow 0.10mg/g; other 5 Anthraquinones; blow 0.01mg/g)

2) TLC 条件の設定

(1) 展開溶媒の検討

ダイオウに含有されている rhein、aloe-emodin、emodin、physcion 及び chrysophanol¹⁾の5成分を分離したスポットが得られる展開溶媒として、ベンゼン・ギ酸エチル・ギ酸混液 (75:24:1) を用いた報告^{9,10)}があるが、この展開溶媒では SA 及び SB は展開せず原点に留まってしまった。しかし、事前に SA 及び SB を HPLC 法で測定し、SA 及び SB が含有されていることを確認しておくこと

により、5成分の相違からダイオウとセンナの判断が得られるものと考え、この展開溶媒を使用することとした。ところが、近年、ベンゼンなどの有害な試薬は、労働環境保全上の問題から別の試薬へと変更される傾向にある。そこで、ベンゼンを n-ヘキサンに、また、ギ酸エチルとギ酸をより安価で、取扱い易いという点から酢酸エチルと酢酸に順次変更し、5成分の標準溶液を展開したところ、Table.2 のとおり分離状況に大差のない結果が得られたので展開溶媒Ⅲを用いることとした。

Table.2 Rf Values of Standard Compounds in the Different Developing Solvents

compound	color	developing solvent ^{a)}		
		I	II	III
Chrysophanol	vivid yellow	0.85	0.86	0.70
Physcion	vivid yellow	0.84	0.85	0.59
Emodin	strong yellow	0.52	0.62	0.32
Aloe-emodin	vivid yellow	0.38	0.49	0.22
Rhein	strong yellow	0.27	0.30	0.16

a) I : benzene/ethyl formate/formic acid (75:24:1)

II : benzene/ethyl acetate/acetic acid (75:24:1)

III : n-hexane/ethyl acetate/acetic acid (75:24:1)

(2) 抽出溶媒の検討

展開溶媒Ⅲを用いて、センナを測定すると Anthraquinone 誘導体5成分のスポットの間にあざやかな赤紫色のスポットが見られたので、このスポットも分別に活用できないか検討することとした。

先ず、抽出溶媒メタノールの濃度を検討した。メタノール及び70、80、90%に希釈したメタノールを用い、ダイオウ及びセンナについて試験した結果、Table.3 から分かるように、ダイオウはメタノールの濃度に関係なく、目的の5成分は良好に分離し、他のスポットは確認されなかった。また、センナは anthraquinone 誘導体で確認できた成分が、rhein 及び aloe-emodin で、HPLC の結果と同様 chrysophanol を確認することはできなかった。しかし、含有報告のない emodin 及び physcion を含め TLC 結果からもこれらのスポットを確認できないことは、ダイオウとの相違となり判別の指標となり得る。更に、センナを70%メタノールで抽出した場合 rhein 及び aloe-

emodin 以外の特徴的なスポットが見られないが、メタノールで抽出すると3つのあざやかな赤紫色のスポットが現れ、これもダイオウとの判別の指標となり得るので、抽出溶媒としてメタノールを用いることとした。

(3) 展開溶媒比の検討

展開溶媒Ⅲの混合比を変えて行なった Anthraquinone 誘導体5成分の TLC 結果 Table.4 からは、どの混合比でもスポットの分離は良好であった。しかし、メタノール抽出による3つのあざやかな赤紫色のスポットを観測すると emodin の上下に見られるスポットが、混合比75:24:1では上のスポットと、また、混合比65:35:1では下のスポットとそれぞれ emodin に重なり良好な分離が得られなかった。Anthraquinone 誘導体5成分とセンナに見られる他のスポットとも明確に分離されている展開溶媒比は70:30:1であったので、TLC で使用する展開溶媒は n-ヘキサン・酢酸エチル・酢酸混液 (70:30:1) とした。

Table.3 Effects of the extraction solvent on Rf Values of Standard Compounds

compound	color	Rf values	senna		rhubarb	
			70% methanol	methanol	70% methanol	methanol
Chrysophanol	vivid yellow	0.70			○	○
Physcion	vivid yellow	0.59			○	○
	<vivid red purple>	<0.40>		○		
	<vivid red purple>	<0.32>		○		
Emodin	strong yellow	0.32			○	○
	<vivid red purple>	<0.25>		○		
Aloe-emodin	vivid yellow	0.22	○	○	○	○
Rhein	strong yellow	0.16	○	○	○	○

developing solvent : n-hexane/ethyl acetate/acetic acid (75:24:1)

Table.4 Effect of the Solvent Ratio on Rf Values of Standard Compounds

compound	color	n-hexane/ethyl acetate/acetic acid			
		75:24:1	70:30:1	65:35:1	60:40:1
Chrysophanol	vivid yellow	0.70	0.79	0.80	0.81
Physcion	vivid yellow	0.59	0.74	0.75	0.75
	<vivid red purple>	<0.40>	<0.63>	<0.71>	<0.74>
	<vivid red purple>	<0.32>	<0.53>	<0.59>	<0.69>
Emodin	strong yellow	0.32	0.47	0.51	0.55
	<vivid red purple>	<0.25>	<0.40>	<0.49>	<0.54>
Aloe-emodin	vivid yellow	0.22	0.35	0.40	0.43
Rhein	strong yellow	0.16	0.24	0.28	0.29

3) 生薬製剤への適用

市販の生薬製剤 8 製品、ダイオウ及びセンナについて 2) の TLC 条件の設定で改良した条件を用いて試験を行った結果、Fig.1 が得られた。

ダイオウが配合されている A~F は、ダイオウの 5 成分と同様の色調及び Rf 値を持つスポットパターンが観測された。また、センナが配合されている E~G からは、センナのスポットパターンである rhein 及び aloe-emodin の他、3 点のあざやかな赤紫色スポットと同様の色調及び Rf 値を持つスポットが観測された。そして、SA 及び SB 成分を配合した H からは観測されるスポットはなかった。この結果から A~D にはダイオウが、E 及び F にはダイオウ及びセンナが、G にはセンナが配合されて

おり、H にはセンナ及びダイオウが配合されていないことが判別され、このことは、各製剤に表示されていた成分と一致していた。

まとめ

生薬製剤中に配合されているセンナ及びダイオウの分別は、それぞれの主要成分である SA 及び SB の含有量の特性から判断することは難しい。そこで、展開溶媒を n-ヘキサン・酢酸エチル・酢酸混液 (70:30:1) とし、メタノール抽出した試験溶液を TLC で試験することによって得られた Anthraquinone 誘導体 5 成分及びセンナに特徴的に観察されるあざやかな赤紫色のスポットをパターン分析することにより、生薬製剤中に配合されたセンナ及びダイオウを良好に判別することができた。

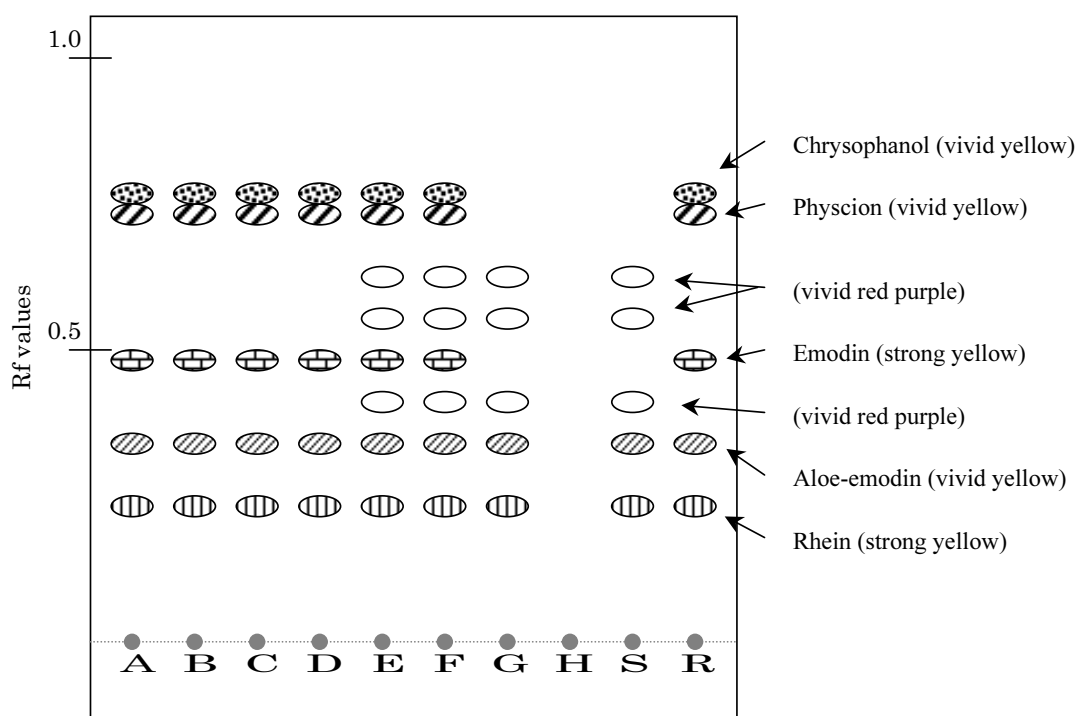


Fig.1 TLC of the Extracts from the Herbal Preparations (at 365 nm)

Sample : A~H ; herbal preparation , S ; JP grade senna , R ; JP grade rhubarb ,
Operating conditions : TLC plate ; Kieselgel 60 F254 (Merck) , developing solvent ;
n-hexane/ethyl acetate/acetic acid (70:30:1) , long ; 15 cm

引用文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会 (2006) : 第十五改正日本薬局方解説書、D-421-430、廣川書店
- 2) 日本薬局方解説書編集委員会 (2006) : 第十五改正日本薬局方解説書、D-387-393、廣川書店
- 3) 石井俊靖、宮本文夫、長谷川貴志、矢崎廣久 (2003) : 健康茶に含まれるセンノシドの試験検査について、千葉県衛生研究所研究報告、27、6-13
- 4) 浜野朋子、瀬戸隆子、塩田寛子、上村 尚、上田有理、早乙女芳明、他 (2001) : 瘦身を標榜する健康茶から検出された医薬品成分について、東京都立衛生研究所研究年報、52、43-47
- 5) 瀬戸隆子、塩田寛子、佐藤かな子、浜野朋子、大西和夫 (1998) : 瘦身効果を暗示する茶類からの医薬品成分センナ及びダイオウの検出、東京都立衛生研究所研究年報、44(3)、195-203
- 6) 小島 尚、土井佳代、廣武 豊、岸美智子、中岡正吉、谷 孝之 (1998) : ダイエット茶に含まれるセンナおよびダイオウの実態について、神奈川県衛生研究所研究報告、28、61-65
- 7) 大住 優子 (1997) : 緩下剤に使用される生薬間の相互作用について—生薬センナ及びダイオウに含まれるセンノシドA及びセンノシドBに及ぼす各種配合生薬の影響について—、奈良県薬事指導書、12、29-37
- 8) 瀬戸隆子、岩崎由美子、安田一郎、奥澤昌子、下平彰男 (1981) : 生薬製剤の品質評価に関する研究 (第1報) 漢方処方「桃核承気湯」製剤中のセンノサイドAの定量、東京都立衛生研究所研究年報、32-1、78-82
- 9) Rai PP, Turner TD, Greensmith SL. Anthracene derivatives in tissue culture of *Cassia senna* L.. J. Pharm. Pharmac. 1974 ; 26 : 722-726
- 10) Rai PP, Turner TD. A method for the estimation of anthraquinones using densitometric thin-layer chromatography. Journal of Chromatography 1975 ; 104 : 196-199