

杏仁基原植物の成分分析パターンの比較

牧野文昌^a, 近藤健児^a, 余村かおり^b, 菊地祐一^b, 橋本和則^a, 武田修己^a

^a(株) ツムラ 生薬研究部 300-1192 茨城県稲敷郡阿見町吉原 3586

^b(株) ツムラ 製剤・品質部 300-1192 茨城県稲敷郡阿見町吉原 3586

Comparison of HPLC Analytical Patterns of Botanical Origins of Armeniaceae Semen

Bunsho MAKINO^a, Kenji KONDO^a, Kaori YOMURA^b, Yuichi KIKUCHI^b,
Kazunori HASHIMOTO^a and Osami TAKEDA^a

^aBotanical Raw Materials Research Department, Botanical Raw Materials Division, Tsumura & Co.,
3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki, 300-1192 JAPAN;

E-mail: makino_bunshou@mail.tsumura.co.jp

^bPharmaceutical & Quality Research Department, Product Division, Tsumura & Co.,
3586 Yoshiwara, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki, 300-1192 JAPAN

(Received on July 2, 2009)

For quality assessment of *Prunus sibirica* L. and *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne (*Rosaceae*), compared to *P. armeniaca* L., *P. armeniaca* L. var. *ansu* Maxim., prescribed in the Chinese Pharmacopoeia as Kuxingren (苦杏仁), HPLC analysis of the chief constituent groups, *i.e.*, (A) a group of polar ones containing amygdalin, and two groups of fat component: (B) triacylglycerols and (C) free fatty acids, were carried out. Based on the comparison of these chromatogram patterns, no remarkable difference was observed among the species. Furthermore, the suitability of *P. sibirica* and *P. mandshurica* as Armeniaceae Semen was confirmed in the identification test describing in the current Japanese Pharmacopoeia (XV supplement D).

Key words: Armeniaceae Semen, Kuxingren, *Prunus sibirica*, *Prunus mandshurica*, *Prunus armeniaca*, *Prunus armeniaca* var. *ansu*, *Prunus persica*, *Prunus davidiana*, *Rosaceae*.

第十五改正日本薬局方(厚生労働省 2006)では生薬, 杏仁の基原植物として *Prunus armeniaca* L. (ホンアンズ) ならびに *P. armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. (アンズ) の 2 種類のみが規定されているが, 2005 年版中華人民共和国薬典(中国薬典)(国家薬典委員会 2005)では苦杏仁として *P. armeniaca*, *P. armeniaca* var. *ansu* に加えて *P. sibirica* L. (モウコアンズ) および *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne (マンシュウアンズ) の計 4 種類が規定されている。日本薬局方ではその第十三

改正(日本公定書協会 1996)までは杏仁を「ホンアンズ *Prunus armeniaca* L., アンズ *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 又はその他近縁植物 (*Rosaceae*) の種子」と規定していたが, 第十三改正第一追補(日本公定書協会 1998)では「又はその他近縁植物」の部分が削除された。そこで, 局方調和の観点から日本薬局方と中国薬典に違いの認められる *P. sibirica* と *P. mandshurica* について, 特に, 中国における生薬としての流通量の多い *P. sibirica* について主要成分を調査した。

Table 1. Botanical origin, locality and voucher of the sample examined in this study

	Sample No.	Botanical origin	Locality	Voucher*
Armeniacae Semen 杏仁	1	<i>Prunus armeniaca</i>	China, Shanxi	THS 73842
	2	<i>P. armeniaca</i>	China, Shanxi	THS 73573
	3	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	Japan	THS 83088
	4	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	Japan, Nagano	THS 75649
	5	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	Japan, Nagano	THS 83090
	6	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	Japan, Nagano	THS 83092
	7	<i>P. sibirica</i>	China, Hebei	THS 78708
	8	<i>P. sibirica</i>	China, Heilongjiang	THS 72108
	9	<i>P. sibirica</i>	China, Neimenggu	THS 72195
	10	<i>P. sibirica</i>	China, Jilin	THS 72939
	11	<i>P. sibirica</i>	China, Neimenggu	THS 77785
	12	<i>P. mandshurica</i>	China, Heilongjiang	THS 72106
Persicae Semen 桃仁	13	<i>Prunus persica</i>	China, Yunnan	THS 78735
	14	<i>P. persica</i>	China, Xingjiang	THS 74581
	15	<i>P. persica</i>	China	THS 76581
	16	<i>P. davidiana</i>	China, Hubei	THS 72171
	17	<i>P. davidiana</i>	China, Shanxi	THS 73815

*THS: Tsumura Herbarium Specimen.

このうち、*P. sibirica* は中国の東北、河北、内蒙古地域をはじめとしてモンゴル、シベリア極東部に亘る広範囲な地域に野生種として分布しており、その資源量も多い。この *P. sibirica* の中果皮は乾燥して薄く、苦味もあって食用には耐えないことから、主に種子が医薬品向けあるいは食品用途として採取されている。基原植物の鑑別に関しては、*P. sibirica* とその他の基原植物は通常、葉や核果あるいは内果皮の形態学的特徴によって容易に鑑別可能であり（陸 1986a, 陸 1986b, Lu and Bartholomew 2003a, Lu and Bartholomew 2003b）、また、葉緑体 DNA の *rpl16* イントロン領域の遺伝子型の分析によっても明瞭に鑑別できることが報告されている（Yamaji et al. 2009）。しかしながら、生薬とする種子の部分の形態学的特徴だけでは一般的に基原植物の鑑別は困難である。

そこで本稿では各基原植物の内果皮の形態学的特徴を文献（陸 1986a, 1986b, Lu and Bartholomew 2003a, Lu and Bartholomew 2003b）をもとにして整理するとともに、*P. sibirica* および *P. mandshurica* と他の基原植物との品質の差異に関して主要な含有成分の観点から検討した。また、同じ *Prunus* 属植物の種子を基原とする生薬、桃仁の2種類の基原植物（*P. persica* (L.) Batsch, *P. davidiana* (Carr.) Franch.）に関しても比較対象とした。

成分分析の対象として、アミグダリンを代表とする一般成分類（A）、さらに、脂質を多く含む種子生薬であることから脂質成分としてトリアシルグリセロール類（B）および遊離脂肪酸類（C）の計3種類の成分群について、高速液体クロ

マトグラフィー（以下 HPLC）分析を行うとともに、日本薬局方で確認試験として規定されている薄層クロマトグラフィー（以下 TLC）分析を実施し、それぞれの成分群について *P. sibirica* および *P. mandshurica* を含めた基原植物間でその分析パターンを比較した。

材 料

杏仁の4種類の基原植物ならびに桃仁の2種類の基原植物に関して、基原が確実に鑑別できる内果皮の付いたものを市場より収集し、検討対象試料とした（Table 1）。

方 法

試料溶液の調製

A. 一般成分分析

共存する加水分解酵素のエムルシンによる影響を最小限とするため、まず試料の溶媒懸濁液を湯浴にて加熱処理を行って酵素を失活させた後に振盪抽出を行う方法を用いた。抽出処理操作の直前に内果皮より注意深く種子を取り出し、種皮をつけたまま磁製乳鉢を用いて手早く粉砕した。この粉末試料 0.50 g をナスフラスコに精秤し、メタノール 8 mL を加え、還流冷却管を装着し 10 分間加熱還流処理を行う。冷後、内容を遠沈管に移し往復振盪装置（SR-1, TAITEC 社製）にて 10 分間振盪処理（振盪強度 250 min⁻¹）を行い、遠心上清液をメスフラスコ（20 mL）に移す。残渣にはさらにメタノール 9 mL を加えて同様な振盪処理（250 min⁻¹, 10 分間）を行い、その遠心上清を先のメスフラスコに合わせ、メタノールを加えて

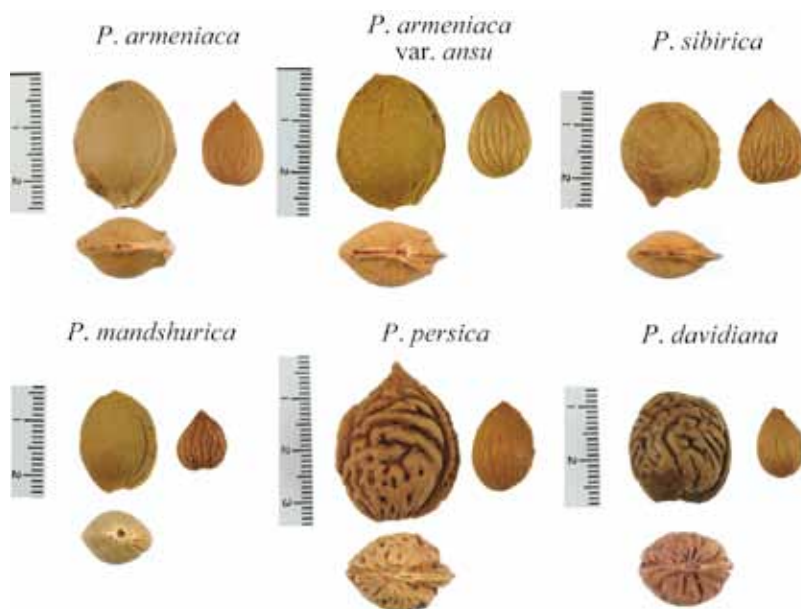


Fig. 1. Typical endocarp in the six taxa examined in this study. *Prunus armeniaca* (sample No. 1), *P. armeniaca* var. *ansu* (No. 3), *P. sibirica* (No. 7), *P. mandshurica* (No.12), *P. persica* (No. 13), *P. davidiana* (No.16).

20 mL に定容する。この溶液より一部量をサンプリングし、ディスポーザブルメンブレンフィルター (0.45 μm , DISMIC-13HP, ADVANTEC 社製) にてろ過し、ろ液を一般成分分析用の試料溶液とした。

B, C. 脂質成分分析

上述の粉末試料 0.50 g を遠沈管に精秤し、抽出溶媒 [2-プロパノール/メタノール (1/1)] 10 mL を加え、往復振盪装置にて 30 分間振盪処理 (振盪強度 250 min^{-1}) を行い、遠心上清液をメスフラスコ (20 mL) に移す。残渣にはさらに抽出溶媒を 9 mL 加えて同様な振盪処理 (250 min^{-1} , 20 分) を行い、その遠心上清を先のメスフラスコに合わせ、抽出溶媒を加えて 20 mL に定容する。この溶液より一部量をサンプリングし、ディスポーザブルメンブレンフィルターにてろ過し、ろ液を脂質成分分析用 (トリアシルグリセロール分析, 遊離脂肪酸分析兼用) の試料溶液とした。

分析機器

2 ポンプ高圧グラジエント仕様の HPLC システム (島津製作所製) [フォトダイオードアレイ検出器 (以下 PDA): SPD-M20A, ポンプ: LC-10ADvp, オートインジェクター: SIL-10ADvp, カラムオープン: CTO-10ACvp] に蒸発光散乱検出

器 (以下 ELSD) (ELSD-LT, 島津社製) を接続した分析システムを使用した。ELSD 検出における溶液の気化は窒素ガス発生装置 (24S, システムインストルメンツ社製) より窒素ガスを定圧 (360 kPa) で供給して行った。

なお、分析ならびにデータ解析に関しては専用ソフトウェア (LC-Solution, 島津製作所製) を用いて行い、特に一般成分に関しては PDA 検出により得られた 190–400 nm の 3 次元クロマトグラムデータを各保持時間における最大吸光度でのクロマトグラム (maxplot) に変換した。これらのクロマトグラムデータは外部出力した後、データ可視化ソフトウェア (Origin, Origin Lab 社製) によりグラフ化した。

分析条件

いずれの分析に関しても直線グラジエント溶出条件にて実施した。

A. 一般成分分析

カラム: ϕ 4.6 \times 250 mm (粒子径 5 μm) XBridge C18 (Waters 社製), カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$, 移動層: [20 mM リン酸 (A) / アセトニトリル (B) 混合比] 95% (A) / 5% (B) (0 min) \rightarrow 0% (A) / 100% (B) (60 min) \rightarrow 0% (A) / 100% (B) (80 min), 流量: 1.0 mL/min, 注入量: 3 μL , 検出器:

PDA (測定波長: 190–400 nm)

B. トリアシルグリセロール分析

カラム: ϕ 4.6 × 250 mm (粒子径 5 μ m) Delvosil RPAQUEOUS-AR-5 (野村化学社製), カラム温度: 40°C, 移動層: [アセトニトリル (A) / エタノール (B) 混合比] 100% (A) / 0% (B) (0 min) → 0% (A) / 100% (B) (60 min) → 0% (A) / 100% (B) (90 min), 流量: 1.0 mL/min, 注入量: 3 μ L, 検出器: ELSD (ドリフトチューブ温度: 35°C)

C. 遊離脂肪酸分析

カラム: ϕ 4.6 × 250 mm (粒子径 5 μ m) TSKgel ODS-80Ts (東ソー社製), カラム温度: 40°C, 移動層: [水 (A) / アセトニトリル (B) 混合比] 20% (A) / 80% (B) (0 min) → 0% (A) / 100% (B) (40 min) → 0% (A) / 100% (B) (60 min), 流量: 1 mL/min, 注入量: 50 μ L, 検出器: ELSD (ドリフトチューブ温度: 35°C)

日本薬局方確認試験

杏仁および桃仁の基原植物 (計 6 種類) についてそれぞれ典型的な形態学的特徴を有する 1 検体を選び, 第十五改正日本薬局方第一追補 (厚生労働省 2007) において生薬, 杏仁ならびに桃仁に対して規定されている確認試験 (TLC 分析) を記載の方法に準じて実施した。

結果

1. 各基原植物の内果皮の形態学的特徴

Prunus 属植物を鑑別する上で重要なポイントとなる内果皮に関する形態学的な特徴を文献 (陸 1986a, 陸 1986b, Lu and Bartholomew 2003a, Lu and Bartholomew 2003b) を基にして整理した (Fig. 1). 杏仁

P. sibirica の内果皮の形態に関する最大の特徴は基部の形状であり, 杏仁の他の基原植物では基部の形状が左右相称に近いのに対して *P. sibirica* の基部は明瞭に非対称で片側が扁斜している。また, *P. mandshurica* に関しては側稜が発達しておらず浅い縦溝が認められる。腹面の縫合部に関しては *P. armeniaca* と *P. mandshurica* が鈍いのに対して, *P. armeniaca* var. *ansu* と *P. sibirica* では鋭利な形状を呈する。

桃仁

杏仁の 4 種類の基原植物の内果皮の表面は平滑ないしは網紋・皺が認められる程度であるが, 桃仁の 2 種類の基原植物 (*P. persica*, *P. davidiana*) では内果皮の表面に縦・横方向の深い溝が明瞭に認められる。また, *P. persica* と *P. davidiana* とで

は, 前者は内果皮の形が扁平な楕円形に近い形であり, 頂端部の形状が尖るのに対して, 後者の内果皮は球形に近く, 頂端部の形状も鈍円であることが特徴である。

2. 一般成分に関する含有状況

一般成分に関してはいずれの基原植物に関してもアミグダリンが組成の大部分を占める成分であり, *P. sibirica* および *P. mandshurica* に関しても杏仁のその他の基原植物と比較して顕著な差異は認められなかった (Fig. 2)。アミグダリン以外の一般成分に関しては, 杏仁の 4 種類の基原植物にはアミグダリンの加水分解物であるプルナシンやベンズアルデヒドが殆ど検出されなかったのに対して, 桃仁の 2 種類の基原植物には, いずれも微量ではあるもののプルナシンあるいはベンズアルデヒドの含有が認められた。これは基原植物としての差異, あるいは保存状態や経年変化の影響が関与していると思われるが, それぞれの影響を識別することはできなかった。なお, アミグダリンのピーク強度は, 全般的に杏仁のほうが桃仁よりも大きい傾向が認められた。

3. 脂質成分 (トリアシルグリセロール類) の含有状況

以下, トリアシルグリセロール成分に関しては慣用的な 3 文字の略記法 (グリセロールの 1 位から 3 位の 3 つの水酸基に結合する脂肪酸の種類をその略号にて結合位置の順番に並べたもの) にて表記する。

トリアシルグリセロール類の含有状況の比較の結果 (Fig. 3), いずれの試料もオレイン酸 (O) とリノール酸 (L) を構成脂肪酸とする OOO, OOL, および LLO の 3 種が主要なトリアシルグリセロール成分であり, その他に, パルミチン酸 (P) を含む OOP と POL, また LLL の含有も確認された。

また, 同じ基原植物でも異なる試料間においてトリアシルグリセロール類の含有パターンには若干のバラつきが認められた。なお, 基原植物間での違いは個々の試料間のバラつきの範囲内であり, 特定の基原植物のみが他の基原植物と明らかに異なる含有パターンを示すというような状況は認められなかった。

4. 脂質成分 (遊離脂肪酸類) の含有状況

遊離脂肪酸類の含有状況に関しては, 同じ基原植物でも試料間での差異が顕著であった (Fig. 4)。これは, 基原植物の違いによる差異よりも, むし

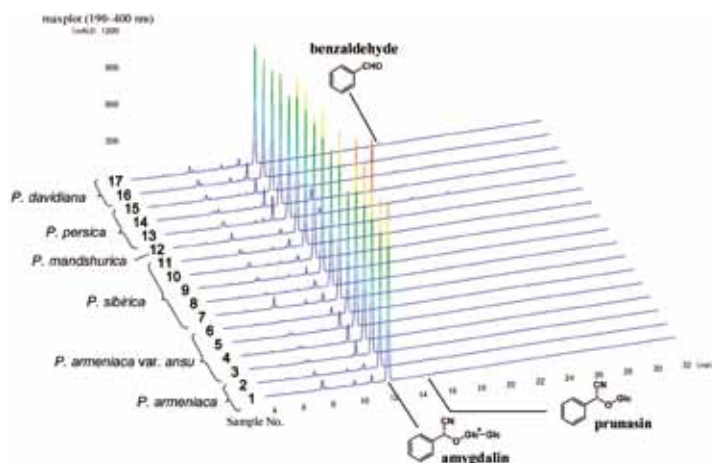


Fig. 2. HPLC analytical patterns of the characteristic constituents including amygdalin and its derivatives.

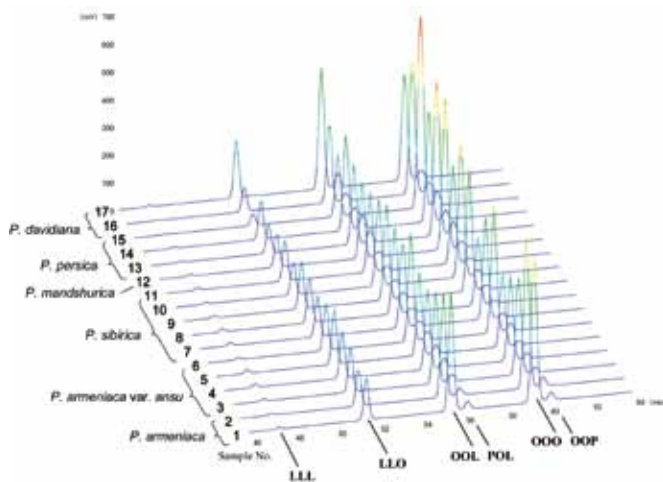


Fig. 3. HPLC analytical patterns of triacylglycerols. Triacylglycerols are abbreviated by means of three letters corresponding to the fatty acids bound to glycerol (L, linoleic acid; O, oleic acid; P, palmitic acid).

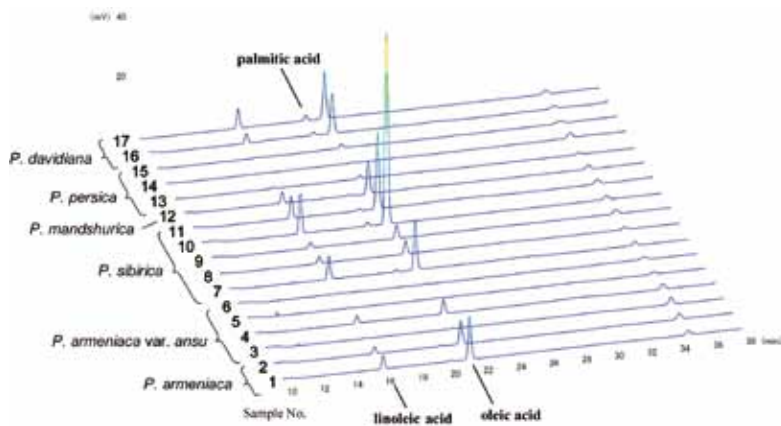


Fig. 4. HPLC analytical patterns of free fatty acids.

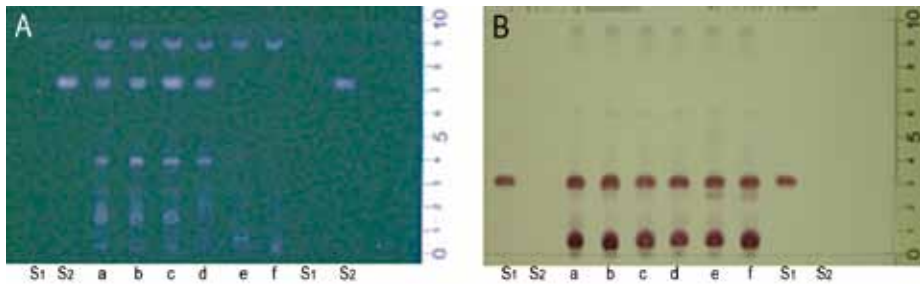


Fig. 5. TLC chromatogram patterns in the identification test describing in the current Japanese Pharmacopoeia (XV supplement I). A. fluorescence under ultraviolet (365 nm) irradiation, B. visible color developed by thymol-sulfuric acid-methanol reagent followed by heating. a. *Prunus armeniaca* (sample No. 1). b. *P. armeniaca* var. *ansu* (No. 3). c. *P. sibirica* (No. 7). d. *P. mandshurica* (No.12). e. *P. persica* (No. 13). f. *P. davidiana* (No.16). S1. Amygdalin standard. S2. Scopoletin standard.

ろ、経時変化や保存条件などの影響（酵素反応やその他の要因などによりトリアシルグリセロール類が加水分解されて構成脂肪酸が遊離すると推測）が反映されたものと考えられた。事実、検出された遊離脂肪酸類としてはオレイン酸、リノール酸がその組成の大部分を占め、加えて微量のパルミチン酸が認められるという組成は、確認されたトリアシルグリセロール類の組成に符合している。

5. 日本薬局方確認試験

TLC パターンの比較の結果 (Fig. 5), 検討した基原植物すべての試料にアミグダリンのスポットが共通して検出された。また、*P. sibirica* および *P. mandshurica* を含む 4 種類の杏仁の基原植物に関してはいずれも、紫外線 (365 nm) 照射下において $R_f 0.7$ に第十五改正日本薬局方第一追補 (厚生労働省 2007) において生薬、杏仁に対して規定されている青白色の蛍光スポット (=スコポレチン) が検出された一方で、桃仁の 2 種類の基原植物 (*P. persica*, *P. davidiana*) ではスコポレチンの蛍光スポットは認められなかった。

考 察

中国薬典で苦杏仁の基原植物として記載されるが、現行の第十五改正日本薬局方においては杏仁の基原植物には記載されていない *P. sibirica* および *P. mandshurica* に関しては、主要な含有成分 (アミグダリンなどの一般成分、脂質成分: トリアシルグリセロール類) に関する HPLC 分析パターンの比較、および、日本薬局方で規定される確認試験 (TLC) の結果、他の基原植物との比較において品質の違いは認められなかった。

研究に使用した検体試料は (株) ツムラ生薬研究部の山路弘樹博士ならびに中村理恵氏により選定あるいは提供していただいた。また山路博士には本研究を進めるうえでも各種の有益な助言をいただいた。両氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 国家薬典委員会 (編) 2005. 中華人民共和国薬典 2005 年版 (一部). 化学工業出版社, 北京.
- 日本公定書協会 1996. 第十三改正日本薬局方. 第一法規出版, 東京.
- 日本公定書協会 1998. 第十三改正日本薬局方第一追補. 薬業時報社, 東京.
- 厚生労働省 2006. 第十五改正日本薬局方. 厚生労働省, 東京.
- 厚生労働省 2007. 第十五改正日本薬局方第一追補. 厚生労働省, 東京.
- 陆 玲娣 1986a. 桃属. 俞 德浚 (編), 中国植物志 **38**: 8–24. 科学出版社, 北京.
- 陆 玲娣 1986b. 杏属. 俞 德浚 (編), 中国植物志 **38**: 24–33. 科学出版社, 北京.
- Lu L.-T. and Bartholomew B. 2003a. *Armeniaca*. In: Wu Z.-Y., Raven P. H. and Hong D.-Y. (eds.), *Flora of China* **9**: 396–401. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Lu L.-T. and Bartholomew B. 2003b. *Amygdalus*. In: Wu Z.-Y., Raven P. H., and Hong D.-Y. (eds.), *Flora of China* **9**: 391–395. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Yamaji H., Kondo K., Miki E., Iketani H., Yamaguchi M. and Takeda O. 2009. Discrimination of Xingren from seeds of *Prunus* sect. *Armeniaca* species (*Rosaceae*) by partial *rpl16* intron sequences of cpDNA, and the botanical origin of Xingrens in markets in Japan. *J. Jpn. Bot.* **84**: 85–91.