

漢方エキス製剤の品質評価について (第 1 報)

「生姜」中の 6-gingerol

鹿野美弘*, 斉藤謙一, 櫻井徹朗, 印牧 悟, 田部昌弘, 安田真幸穂

北海道薬科大学

On the Evaluation of the Preparation of Chinese Medicinal Prescriptions (I)

6-Gingerol in "Zingiberis Rhizoma"

YOSHIHIRO KANO,* KEN-ICHI SAITO, TETSURO SAKURAI,
SATORU KANEMAKI, MASAHIRO TANABE and MASAHO YASUDAHokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences, 7-1
Katuraoka-cho, Otaru 047-02, Japan

(Received February 20, 1986)

Marker substances are needed for manufacturing process control in the preparation of Chinese medical preparations. It is very important to determine the marker substance for "Zingiberis Rhizoma," which is prescribed in many Chinese medical prescriptions.

For this purpose, we isolated the main pungent compound 6-gingerol (6-G) and examined it for physical characteristics and usability as a marker substance in HPLC determination. On the basis of these tests, 6-G was found to be satisfactory as the marker substance.

Keywords—marker substance; 6-gingerol; 6-shogaol; Zingiberis Rhizoma; Zingiber officinale; Zingiberaceae; quantitative analysis; HPLC; evaluation of Chinese medicinal prescriptions

昭和60年5月、厚生省から漢方エキス製剤の工程管理を主要目的とする通達がなされ、一製剤中2成分(指標物質: marker substance)以上の定量の義務づけがなされた。漢方エキス製剤製造工程管理のための指標物質は、1) 水に溶けやすいか、やや溶けにくくても定率で溶解(移行率: availability %)するもの、2) 水蒸気蒸留や乾熱で揮散しにくいもの、3) 乾熱または熱水中で分解しないか、しにくいもの、4) 他成分と化学変化を起こさないもの、5) (かなり) 特定の生薬に含有される特異成分であること、および 6) 従来論じられている「薬効」成分であることにまったく拘束されないが、薬効成分であれば好ましい等の条件を満たすものである。また最終的には、漢方処方中からの定量を目的とすることから、生薬中の含有量が比較的高く、かつ HPLC 等により簡便に定量できうる成分であることが望まれる。

しかしながら、上記の条件を満たす漢方エキス製剤の指標物質の検索・研究は不十分であり、現在のところ、指標物質による2成分定量はもとより1成分定量さえ困難と思われる漢方処方を多数認めるのが実情である。

今回、著者らは当厚生省通達に関連して組織された厚生科学研究「漢方エキス製剤」班の一員として、生薬の指標成分検索を行った。そのうち、生姜(および乾姜)は漢方処方での配合頻度がきわめて高く、医療用漢方製剤143処方中71処方に配合され、指標物質の解決が急務である生薬の一つと考えられる¹⁾。「生姜」成分を漢方エキス製造工程条件に相当する各条件下で比較検討した結果、従来より主要香味成分²⁾ならびに有効成分³⁾として報告される 6-gingerol (6-G) が指標物質として満足する結果を得たので報告する。また 6-gingerol (6-G) を指標物質としての候補とするために次のような予試験を行っている。なお本文中にて単に生姜と記されたものは生ショウガの乾燥品、干(乾)生姜を意味する。

生姜粉末 1 g に熱水 100 ml を加え、沸騰水浴中で適時熱水を加え、初期水量を維持しながら5時間加熱した。その後、全量が約 50 ml になるまで加熱を続け、熱時ガーゼ濾過した。濾液はエバポレーターで濃縮乾固した後、熱

MeOH 100 ml で30分, 抽出し, 濾過した. 濾液は全量を 10 ml に濃縮し, 試料溶液とした. また, 比較用の標準試料溶液は生姜末を熱 MeOH 抽出のみの処理にて同様に調製した. 各試料溶液は TLC (薄層板: Silica gel 60F₂₅₄ Merck Art. 5554) を用い, 各種の展開溶媒にて展開し, 短長波長 UV 光線下および, 発色試薬: アニスアルデヒド硫酸にて検討した結果, benzene-MeOH=9:1 で *R_f* 0.5 付近に, UV ランプ下 254 nm で吸収を有するとともにアニスアルデヒド硫酸で濃紫色を呈し, 熱水処理にもかかわらずかなり安定であり, かつ生姜の主要成分である物質を確認した. 今回, 本成分が指標物質として有望と判断し, 以下の実験 I~VIII を行った.

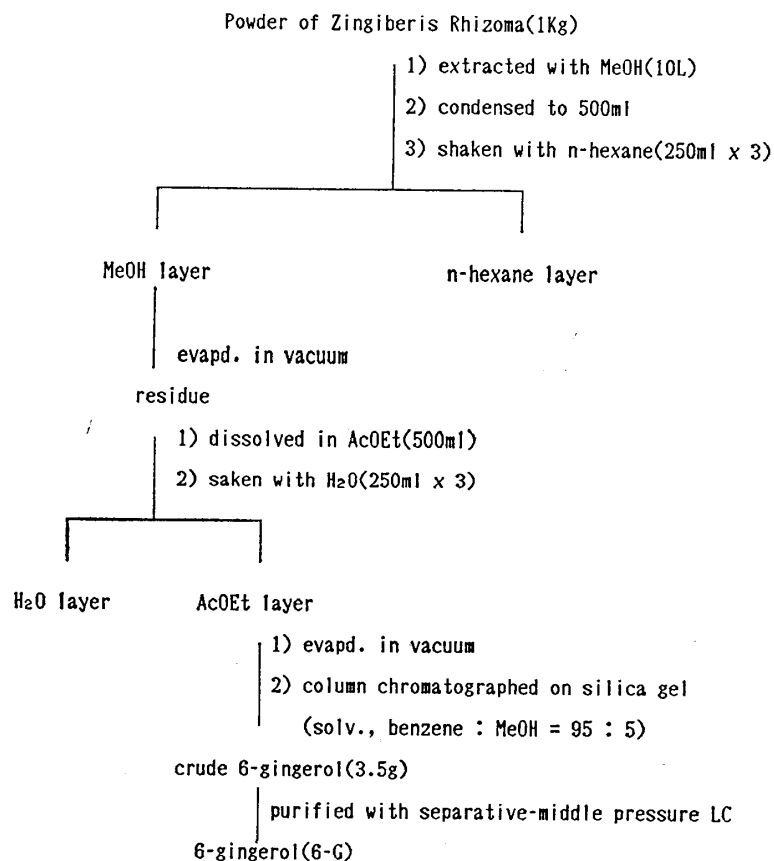


Fig. 1. Isolation of 6-Gingerol (6-G) from Zingiberis Rhizoma

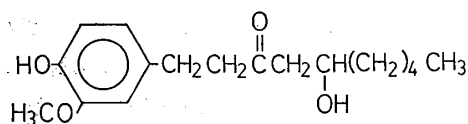


Fig. 2. Structure of 6-Gingerol (6-G)

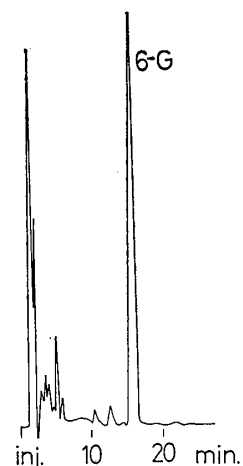


Fig. 3. HPLC Profile of 6-gingerol (6-G) in Zingiberis Rhizoma

Conditions: column, LiChroCART RP-18 250 mm × 4 mm; mobile phase, AcCN-H₂O=38: 62; flow rate, 1.2 ml/min at ambient; detective UV wave length, 280 nm; detector sensitivity, 0.16 AUFS; injection volume, 10 μl.

実 験 の 部

1. 指標物質 (6-gingerol) の分離および同定

局方「生姜」(札幌市場品, 1985) 粉末 1 kg を MeOH 10 l で 3 時間熱時抽出し, 得られた抽出液を減圧下で約 500 ml に濃縮した。以下, 予試験で得た目標物質にしたがって分離をすすめた。すなわち, MeOH (500 ml) 溶液を *n*-hexane (250 ml, 3 回) と分配し, MeOH 層を分取し, 減圧下で溶媒を留去した。次に, MeOH ext. を AcOEt (500 ml) と H₂O (250 ml, 3 回) で分配し, AcOEt 層を分取し, 減圧下で溶媒を留去した。次に, AcOEt ext. をシリカゲルクロマトグラフィー (benzene : MeOH=95 : 5) で溶出分離し, 目標の粗分画 (精製率90%以上) を約 3.5 g 得た。さらに, 最終的な精製は分取用中圧・逆層系カラム (条件は実験Ⅱの「HPLC の条件」に準拠) を用いて行った (Fig. 1)。

本物質は ¹H および ¹³C-NMR スペクトル解析を行うとともに, 標品 6-gingerol (Fig. 2) と直接 HPLC により同定した。

2. HPLC による 6-gingerol の定量

6-gingerol (6-G) の定量はすべて HPLC を用いた本法にしたがって行った。6-G 単独による物性試験Ⅲ), およびⅣ) では各実験で調製された 6-G control 溶液を 100% 標準溶液として用い (HPLC 注入量: 4, 6, 8, 10 μ l, AUFS=0.08), また生姜を用いた実験Ⅴ)~Ⅶ) では 6-G 5 mg/10 ml acetonitrile 標準溶液を用い (HPLC 注入量: 5, 7, 10, 15 μ l, AUFS=0.16), 各注入量より得られた HPLC のピーク高さの回帰方程式により定量した。

HPLC の測定条件は次のとおりである。カラム: LiChro CART RP-18 250 mm $\times$ 4 mm i. d. Merck Co., 移動相: acetonitrile-H₂O (38 : 62), 流速: 1.2 ml/min. 検出波長: 280 nm, 測定感度: 0.08 AUFS (実験Ⅲ, Ⅳ) または 0.16 AUFS (実験Ⅴ~Ⅶ), 試料溶液の注入量: 各 10 μ l (Fig. 3)。なお, 実験Ⅷの shogaol に関しては溶離時間短縮ならびに UV 吸収の強度から, 移動相: acetonitrile-H₂O (1 : 1), 検出波長: 240 nm で行った。

3. 6-G の物性試験・耐熱性と耐減圧性について

6-G 1 mg/1 ml acetonitrile 溶液を調製し, 5 ml メスフラスコに各 1 ml を分注し, 水浴中で溶媒を留去したものを用いた。なお, 6-G control 溶液は溶媒を留去した後, acetonitrile で全量を 5 ml としたものを用い, 他の試料は各処理終了後, acetonitrile で全量を 5 ml とし HPLC で定量した。

試験 1・熱水変化減量: 6-G を含むメスフラスコに 2 ml の蒸留水を加え, 沸騰水浴 (97°C) 中で加熱処理し, 6-G の残存率を経時的に測定した。

試験 2・乾熱変化減量: 6-G を含むメスフラスコを常圧下で 100°C に加熱処理し, 6-G の残存率を経時的に測定した。

試験 3・揮散減量: 6-G を含むメスフラスコを各加熱・減圧下 (50°C-8 mmHg, 100°C-8 mmHg, 100°C-2 mmHg) で処理し, 6-G の残存率を経時的に測定した (Fig. 4)。

4. 6-G の物性試験・pH による耐液性について

6-G control 溶液および各試料溶液の調製・定量は物性試験Ⅳと同様である。

処理方法: KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH 5, 6, 7, 8, 9) を常法により調製し, 6-G を含むメスフラスコに各 2 ml の緩衝液を加え, 緩衝液を加えた直後, ならびに沸騰水浴 (97°C) 中で加熱処理後の 6-G の残存率を経時的に測定した (Fig. 5)。

TABLE I. 6-G の物性

性 状:	無色の粘稠な油状物質, 無臭, 味は生姜と同様の強い辛味を有する。
沸 点:	235~250°C (18 mmHg) ^{4), 5)} 。
溶 解 性:	冷水にほとんど溶けないが, 熱水にやや溶け, 高濃度では乳状となる。その他 MeOH, EtOH, AcOEt, CHCl ₃ , benzene 等に可溶。
UV 吸収:	吸収極大波長は 205~210 nm, (220~240 nm ショルダー) および 280~290 nm (HPLC 溶離液中), 比吸光度は $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (282 nm): 110~115 (10 mg, MeOH, 100 ml)。
安 定 性:	紫外線 (254 nm および 360 nm) 下 48 時間照射に安定。
化学変化:	アルカリ分解により zingerone とアルデヒドを生成し, また脱水反応により 6-shogaol を生成する ²⁾ 。

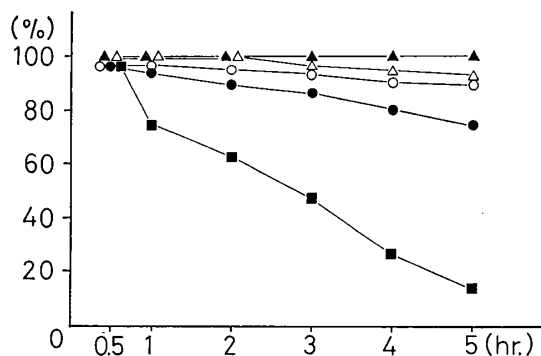


Fig. 4. Heat and Vacuum-Resistance Test of 6-G
Residual % of 6-G, ●: at 97°C-hot water, ○: at 100°C-dry, ▲: at 50°C-8 mmHg, △: at 100°C-8 mmHg, ■: at 100°C-2 mmHg.

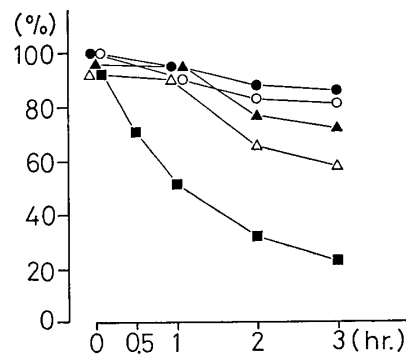


Fig. 5. Effect of pH (buffer solution) on 6-G
Residual % of 6-G in buffer solutions, ●: pH 5, ○: pH 6, ▲: pH 7, △: pH 8, ■: pH 9.

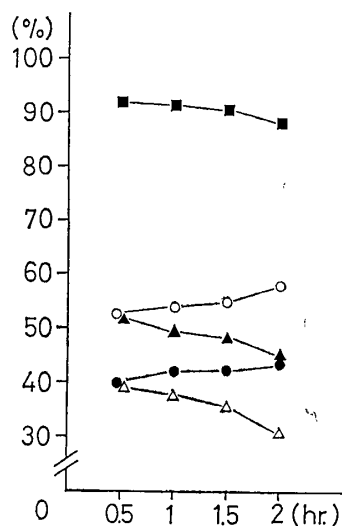


Fig. 6. Availability (%) of 6-G on Extraction Time

●: Availability (%) of 6-G from crude drug to water layer (○: theoretical value), ▲: residual rate (%) of 6-G in crude drug (△: theoretical value), ■: total amount (%).

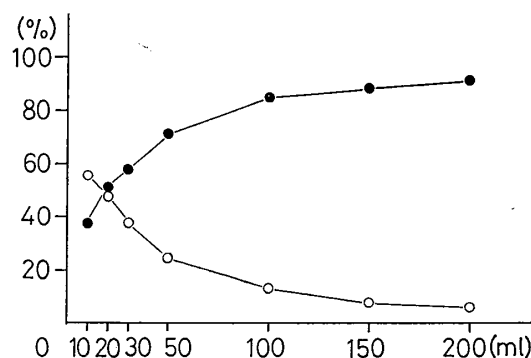


Fig. 7. Availability (%) of 6-G on the Amounts of Extractant (Water)

●: Availability (%) of 6-G from crude drug to water layer, ○: residual rate (%) of 6-G in crude drug.

5. 6-G の物性試験・濃縮および蒸留の影響

試験 1・濃縮：ロータリーエバポレーター（28 mmHg）を用いて、各外水温（50, 70, 90°C）における 6-G の残存率を測定した。処理および調製：生姜 1 g/1 ml MeOH ext. を調製し、本 MeOH ext. 1 ml に蒸留水 30 ml を加え、約 0.3 ml まで各外水温にて濃縮し、MeOH で全量を 10 ml とし試料溶液とした。6-G control 溶液は MeOH ext. 1 ml を MeOH で全量 10 ml とし HPLC で定量した。また比較として凍結乾燥で調製した試料の測定を行った。

試験 2・蒸留：局方「精油定量器」を応用し、生姜粉末 10 g に蒸留水 150 ml を加え蒸留し、初留から経時的に 10 ml ずつ 5 回分取した。各分画は 50°C 減圧濃縮し、MeOH で全量を 5 ml とし HPLC で分析した。

6. 生姜中からの 6-G 移行率・抽出時間について

生姜粉末 1 g に蒸留水 30 ml を加え、沸騰水浴中で 30, 60, 90, 120 分間それぞれ加熱還流した後、熱時、遠心分離（3,200 rpm, 10 min）した。次に、水相と残渣の重量を測定し、水相は減圧濃縮さらに凍結乾燥した後、熱 MeOH 100 ml で 30 分抽出した。MeOH 溶液は全量を 10 ml に濃縮した後、試料溶液とし HPLC で定量した。残渣は凍結乾燥した後、水相と同様に処理し調製した。なお、本操作の遠心分離では残渣中に約 7 g の水分（残渣：水相 = 7:23）を含むため、遠心分離された 2 相中の 6-G の単純な測定値、ならびに残渣中の水分をすべて水相に移したと

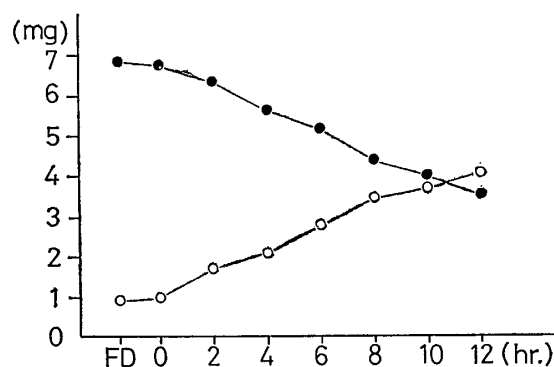


Fig. 8. Effect of Processing (steam-dry) on 6-G and 6-S

●: content (mg/g) of 6-G, ○: content (mg/g) of 6-S.

TABLE II. 姜類生薬中の 6-G と 6-S の含有量

実験材料	含 有 量 (mg/g)		実験材料	含 有 量 (mg/g)	
	6-G	6-S		6-G	6-S
鮮 姜*			生 姜		
札幌食品店 1	10. 21	0. 82	中国・雲南	7. 05	1. 13
札幌食品店 2	8. 42	0. 73	中国・貴州 1	3. 63	1. 67
札幌食品店 3	4. 84	0. 33	中国・貴州 2	5. 42	1. 72
台北食品店 1	13. 70	1. 04	乾 姜		
台北食品店 2	8. 15	0. 60			
台北食品店 3	5. 86	0. 37			
生 姜			札幌市場品 1		
自家製生姜 1 **	10. 93	0. 69	札幌市場品 2	4. 50	4. 15
自家製生姜 2 **	6. 36	0. 53	大阪市場品 1	5. 03	4. 02
札幌市場品	7. 92	1. 10	大阪市場品 2	1. 93	2. 71
台北市場品 1	2. 51	2. 86	大阪市場品 3	6. 49	6. 64
台北市場品 2	1. 81	3. 38	大阪市場品 3	7. 26	5. 30
			炮 姜		
			黒乾姜 (台北)	3. 21	2. 49
			黒 姜 (台北)	trace	1. 59

* 鮮姜: 生ショウガを凍結乾燥処理したものを用い, 測定値は乾燥物としての含有量を示す。

** 生ショウガを室内で4日間乾燥し, 引き続き 40°C で強制乾燥したもの。

仮定した 6-G の理論値を併記する (Fig. 6).

7. 生姜中からの 6-G 移行率・抽出液量の影響

生姜の粗末 1g に蒸留水 10~200 倍量 (10, 20, 30, 50, 100, 150, 200 ml) を加え, 沸騰水浴中で60分間それぞれ加熱還流した後, 熱時, ガーゼ2枚で絞りながら濾過した。さらに, 残渣は 5 ml の冷水で洗浄・濾過した。ここで得られた水相と残渣は減圧濃縮後, 凍結乾燥し, 実験VIと同様に MeOH で処理し HPLC で定量した (Fig. 7)。

8. 乾姜調製時の“蒸乾”処理による 6-G と 6-S への影響

実験材料は市場品生ショウガを用いた。塊茎の外皮を取り除き, 粗切とし混ぜ合わせたものを一定量ガーゼに包み, 2, 4, 6, 8, 10および12時間の蒸す処理を行った後, それぞれ室内で4日間乾燥し, 引き続き 40°C で強制乾燥した。また別に凍結乾燥処理だけのもの (鮮姜), ならびに蒸さずに乾姜と同様に乾燥させたもの (自家製生姜) を比較材料として調製し, “蒸乾”処理による 6-G と 6-shogaol (6-S) 変換への影響について HPLC を用い検討した (Fig. 8)。また参考までに生ショウガより調製した鮮姜 (凍結乾処理) と自家製生姜ならびに近年入手した市場品姜類生薬の 6-G と 6-S 含有量を TABLE II に示す。

結果および考察

6-G の物性は TABLE I に示す。

実験 II: 6-G の HPLC による定量においては, 6-G は他の成分の妨害吸収の比較的少ない 280 nm 付近に吸収

を有することから、ピークの分離は良好であり、かつ迅速（保持時間：16 min）な定量が可能である。また実験材料（実験Ⅴ～Ⅶ）として用いた局方「生姜」（6-G 含有量は 7.92 mg/g, 0.792%）の本法での HPLC を Fig. 3 に示す。

実験Ⅲ：6-G の耐熱性と耐減圧性においては Fig. 4 で示されるごとく、通常の漢方湯液の調製時間（1 時間前後）内では、6-G の分解はわずか 5% 前後に留まり、乾熱にもかなり安定であることが示され、この点に関しては指標物質として最も重要な条件を満たすものと考えられる。またきわめて強い減圧（2 mmHg）・強熱下では 6-G の揮散を認めるが、通常の製剤工程での減圧では揮散しないものと考えられる。

実験Ⅳ：6-G の pH による影響（Fig. 5）は、アルカリ性領域で顕著に現れるが、酸性領域では比較的安定である。また一般に漢方湯液は弱酸性を示すことから、湯液自体の pH による影響は少ないものと推察する。

実験Ⅴ：ロータリーエバポレーターでの濃縮の結果は外水温度にかかわらず濃縮による揮散の影響は認められない。また精油定量器を用いた今回の蒸留操作では、6-G はすべての蒸留分画において確認されなかった。

実験Ⅵ：抽出加熱時間における生姜中からの 6-G 移行率への影響（Fig. 6）については、抽出時間に比例して移行率は徐々に増加するが、逆に 6-G の合計量（水相＋残渣）は徐々に低下する。この低下は 6-G がわずかながら分解するためと考えられる。操作面においては、通常の湯液が 20～40 倍量の熱水抽出で行われることから、今回、生姜の一物湯を仮定し 30 倍量の熱水抽出で、遠心分離の操作を行ったが、全水量に対する残渣（生姜粉末）の含水量が非常に高く（30：7）実験操作上、改良が必要と思われる。

実験Ⅶ：抽出流量における生姜中からの 6-G 移行率への影響（Fig. 7）については、最も一般的な 1 時間抽出で行った結果、移行率は抽出流量に比例することが示されたが、100 倍量以降の移行率はほぼ一定となる。また本実験Ⅶでは、実験Ⅵを参考にし、遠心分離の操作からガーゼで絞る操作に変更し、また冷水で洗い込む操作を併用した結果、本実験Ⅶの 30 倍量の移行率および残渣中の 6-G 残存量は実験Ⅵの理論値（同じく 30 倍量抽出）とほぼ同様の値を得ることができ、遠心操作よりも絞る操作が有効と考えられた。

実験Ⅷ：“蒸乾”処理による 6-G への影響（Fig. 8）については、鮮姜（FD）と自家製生姜（0 hr）の測定値から、通常の乾燥処理においては、6-G はほとんど影響を受けないものと考えられる。蒸気で“蒸す”処理（2～12 hr）においては、処理時間に比例して 6-G 含量は徐々に低下し逆に 6-S 含量は徐々に増加するが、6-G の半減値（50% 分解）に要す時間は 11 時間以上であり、漢方湯液の調製工程を考慮すると 6-G は十分安定な物質といえる。また 6-G（mol wt. 294）から 6-S（mol wt. 276）への変換効率はかなり高いもの（≒95%）と推察する。

鮮姜（凍結乾燥品）と自家製生姜ならびに市場品姜類生薬の 6-G と 6-S 測定値は TABLE II に示す。鮮姜および自家製生姜においては、6-G 含量は 0.5～1.4% であるが、6-S 含量はその 1 割以下と明らかに微量しか含まれていない。しかしながら、市場品生姜においては 6-S が若干増加する傾向を示し、またとくに台北産・生姜の 6-S 含量は異常に高い値を示した（外見上は生姜様であるが調製方法が異なる可能性も考えられる）。また一般の市場品乾姜においては 6-G と 6-S の含量比がほぼ 1 対 1 程度まで調製（修治）されているようであり、この点から乾姜を用いた漢方処方の場合には指標物質を 6-S とする可能性も十分考えられる。

結 論

以上の結果から、「生姜」の辛味成分ならびに有効成分である 6-gingerol が漢方製剤の製造工程管理ならびに品質評価のための指標物質の条件を満たすものと考えられた。また 6-shogaol の物性、移行率、安定性等に関しては現在検討中であるが、6-shogaol は 6-gingerol の脱水反応（修治）により二次的に生成され、生ショウガ（鮮姜）中には微量しか含まれない成分であることは明らかである。したがって、古来より漢方で生ショウガ（鮮姜）もしくはその代用品である「生姜（干生姜）」を用いる処方においては 6-shogaol が微量であることが処方の一つの特徴となり、当然 6-gingerol の定量が要求されるが、修治された乾姜を用いる処方においては逆に 6-shogaol 含量の高いことが特徴となり、6-shogaol は乾姜を用いた処方の品質評価の重要な成分と推察する。

なお、姜類生薬を配合する漢方湯液への 6-gingerol および 6-shogaol の応用は次報にてその詳細を報告するが、容易に定量可能な処方、またとくに生姜と配合された生薬数の多い場合には、6-gingerol の移行率の変化、他成分との相関（含量比あるいは妨害）等の諸条件により定量困難な処方を認めた。

謝 辞：本実験において 6-gingerol の同定にご協力いただきました本学薬化学教室 和田浩二助手に深謝いたします。なお、本研究は厚生省科学研究費によって行ったものである。

引用文献および注

- 1) 野上 寿, 大塚恭男, 原田正敏, 月刊薬事, **27**, No. 8, 79 (1985); 野上 寿, 大塚恭男, 原田正敏, 丁 宗鉄, 野口 衛, 同上, **27**, No. 9, 135 (1985); 同上, **27**, No. 11, 99 (1985); 同上, **27**, No. 12, 147 (1985); 同上, **28**, No. 1, 95(1986).
- 2) D. W. Connell, M. D. Sutherland, *Aust. J. Chem.*, **22**, 1033 (1918); 正田芳郎, 井上武久, 橋本圭二, 藤岡美千代, 白木佳代子, 薬誌, **93**, 318 (1973); 正田芳郎, 井上武久, 橋本圭二, 藤岡美千代, 内野千代子, 薬誌, **94**, 735 (1974); 許 順吉, 孫 俊光, 許 鴻源, *Chemistry (The Chinese Chem., Taiwan, China)*, **39**, No. 2, 63 (1981).
- 3) 笠原義正, 斎藤恵利子, ヒキノヒロシ, 生薬, **37**, 73 (1983); M. Suekawa, A. Ishige, K. Yuasa, K. Suda, M. Aburada, E. Hosaya, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 836 (1984).
- 4) 啓業書局編, “現代本草中国薬材学”, 啓業書局有限公司, 台北, 1974, p. 493.
- 5) ただし, 強冷すれば固化し, その融解点は約 33~35°C である.