

高速液体クロマトグラフィーによる柴胡中のサイコサポニン -a, -c, -d の同時分析¹⁾寺内正裕^{*,a}, 金森久幸^a, 坂本征則^b, 齋池昭二三^b
加藤睦子^b, 神田博史^c^a 広島県衛生研究所, ^b 広島県福祉保健部薬務課^c 広島大学医学部総合薬学科Simultaneous Analysis of Saikosaponin-a, -c, and -d in Bupleurum Root by High-Performance Liquid Chromatography¹⁾MASAHIRO TERAUCHI,^{*,a} HISAYUKI KANAMORI,^a IKUNORI SAKAMOTO,^b
AKIFUMI MOCHIIKE,^b MUTSUKO KATO^b and HIROSHI KOHDA^c^a Hiroshima Prefectural Institute of Public Health,
1-5-70 Ujina-kanda, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan^b Pharmaceutical Affairs Division, Welfare and Health Department, Hiroshima Prefecture,
10-52 Motomachi, Naka-ku, Hiroshima 730, Japan^c Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University, School of Medicine,
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734, Japan

(Received September 1, 1992)

To evaluate the quality of Bupleurum roots cultivated in Hiroshima prefecture, a method of simultaneous analysis of Saikosaponin-a, -c and -d by High-performance Liquid Chromatography (HPLC) was established.

The HPLC system used a ODS reversed-phase column, water-containing acetonitrile as the mobile phase, and UV absorption-monitoring at 203 nm. The samples were aqueous ammonia-methanol extracts of Bupleurum root, pretreated with Sep-Pak C₁₈ cartridge. The recoveries of the three saikosaponins added to the cartridge were over 98% for all the three components.

By this method, the saponin contents of cultivated and commercial Bupleurum roots were measured. The coefficients of variation of these data were below 6.9%.

Keywords—simultaneous analysis; *Bupleurum falcatum* L.; Bupleurum root; saikosaponin-a; saikosaponin-c; saikosaponin-d; HPLC; high-performance liquid chromatography; Sep-Pac C₁₈ cartridge

緒 言

柴胡はミシマサイコ *Bupleurum falcatum* L. またはその変種 (*Umbelliferae*) の根で、古くから広く漢方製剤に用いられ、その需要は年々増加している。わが国で消費される柴胡の大部分は中国あるいは韓国などからの輸入に依存しているが²⁾、最近各地で栽培が試みられており³⁾、厚生省監修の“薬用植物栽培と品質評価 Part 1”⁴⁾にも収載された。

今回、広島県で実験的に栽培したミシマサイコから調製した柴胡(栽培品)の品質評価を行うため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による神橋らの方法⁵⁾を用いたところ妨害物質が存在して定量できなかった。そこでこの方法を改良し、saikosaponin-a (1), -c (2), -d (3) (Fig. 1) を再現性が良く短時間で同時に分析できる方法を確立した。

この方法を栽培品と市場品に応用し、さらに栽培品の部位別サポニン含量および、乾燥重量とサポニン含量の関係についても調べたので報告する。

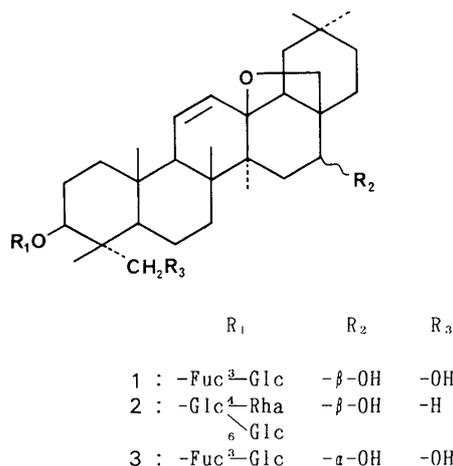


Fig. 1. Chemical Structures of Saikosaponins

実験の部

1. 装置と測定条件

高速液体クロマトグラフ：東ソー(株)製，HLC-803D 型.

検出器：東ソー(株)製，UV-8 model-II 紫外可視分光検出器.

カラム：TSK-gel ODS 80T_M (4.5 i. d. × 150 mm).

移動相：水-アセトニトリル (61 : 39 v/v).

流速：1.0 ml/min.

カラム温度：40℃

検出波長：UV 203 nm.

感度：0.16 AUFS.

試料注入量：20 μl.

2. 標準品及び試薬

1, 2, 3 : いずれも，和光純薬工業(株)製，生薬試験用標準品.

メタノール，アセトニトリルおよび蒸留水：片山化学工業(株)製，液体クロマトグラフ用.

Sep-Pak C₁₈ カートリッジ：ウォーターズ社製.

その他の試薬：試薬特級.

3. 試料

長崎大学薬用植物園保存種および国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場栽培種を用いて，1990年4月から1992年2月にかけて広島県内で実験栽培したミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* L.) を，一般的な柴胡の調製法に準じて処理し試料とした. また市場品の3試料 (株式会社小島漢方，株式会社ウチダ和漢薬，日本粉末薬品株式会社，いずれも産地未詳) を1990年6月に入手した.

栽培品，市場品いずれも日局の規格⁶⁾に適合していた.

4. HPLC 用試料液の調製

試料を粉碎 (48メッシュ以下) し 500 mg を精密に量り，アンモニア水-メタノール混液 (1 : 20) 35 ml を加え3時間加熱還流した. 冷後，メタノールで 50.0 ml とし，遠心分離後，上澄液 10.0 ml を取り溶媒をロータリーエバポレーターを用いて減圧留去した. 残留物を50%メタノール 5.0 ml に溶解し，その 1.0 ml を，あらかじめメタノール 10 ml，水 40 ml の順で前処理した Sep-Pak C₁₈ カートリッジに負荷した. このカートリッジを50%メタノール 10 ml で洗浄後，サポニン を 60℃ メタノール 5 ml で溶出した. 溶媒をロータリーエバポレーターを用いて減圧留去し，残留物をメタノール 1.0 ml に溶解した後，0.45 μm のフィルターでろ過し，HPLC 用試料溶液とした.

結果及び考察

1. 分析法の検討

saikosaponin の HPLC による分析については Kimata ら⁷⁾，および神橋ら⁵⁾の報告がある. Kimata らの方法

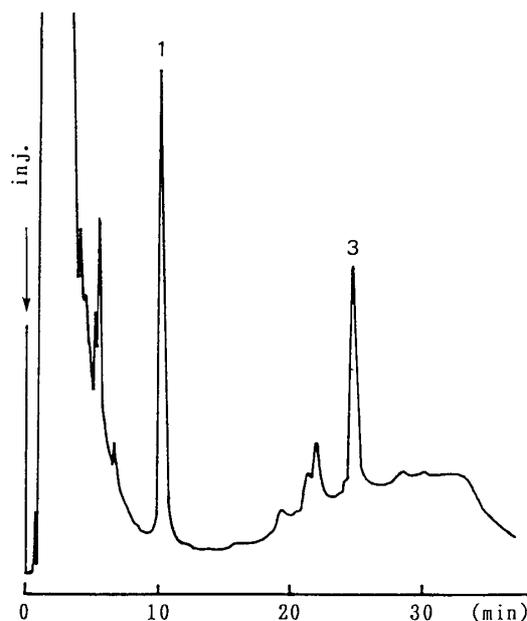


Fig. 2. High-performance Liquid Chromatograms of Saikosaponin-a, -d in Cultivated Bupleurum Root by Means of a Method of Kanbashi

1, saikosaponin-a; 3, saikosaponin-d. HPLC conditions: column, TSK-gel ODS 80T_M (4.5 i.d. × 150 mm); mobile phase, water-acetonitrile (60:40 v/v); column temp., 40°C; flow rate, 1.0 ml/min; detection, 203 nm, 0.16 AUFS; volume of injection, 20 μl.

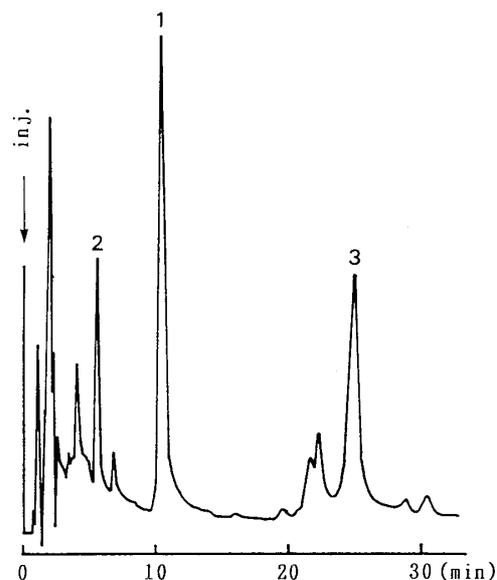


Fig. 3. High-performance Liquid Chromatograms of Saikosaponins in Cultivated Bupleurum Root Which Was Purified by Means of Sep-Pac C₁₈ Cartridge

1, saikosaponin-a; 2, saikosaponin-c; 3, saikosaponin-d. HPLC conditions: mobile phase, water-acetonitrile (61:39 v/v); For other conditions, see Fig. 2.

は、真正サポニンを経処理しジエン体に導くことにより UV 検出を可能としたものである。高感度に分析できるが、酸処理に時間を要する。神橋らの方法は、溶出の早い 2 が共存物質の妨害を受けるため、HPLC の移動相を変えて 2 と 1, 3 を別々に定量するものであり、柴胡の 3 種の主要サポニンをそのままの形で比較的短時間に分析できるという利点がある。

我々は神橋らの方法を用いて栽培品を分析したところ Fig. 2 に示すように 3 のピークに重なる幅広いピークが現れ 3 の定量はできなかった。

そこで Sep-Pak C₁₈ カートリッジによるクリーンアップを検討した。各 saikosaponin 0.5 mg の 50% メタノール溶液 1.0 ml をカートリッジに負荷し、次いで 50% メタノールで洗浄したところ、妨害物質は 5 ml で溶出し終わったが、サポニンは 15 ml まで溶出しなかった。したがって、カートリッジの洗浄は、50% メタノール 10 ml で行うことにした。サポニンのカートリッジからの溶出は常温のメタノールで行ったところ、1, 2, 3 いずれも回収率が悪かったので 60°C メタノールを用いて行うことにした。カートリッジからの各サポニンの回収率は、saikosaponin 標準品の各 50% メタノール溶液 (1, 2 0.025~0.50 mg/ml, 3 0.050~0.50 mg/ml) 1 ml をカートリッジに負荷し求めた。1, 2, 3 いずれの回収率も 98% 以上であった。

この操作により 3 に重なるピークを消去するとともに 2 付近の妨害物質も取り除くことができたので 1, 2, 3 の同時分析について、ODS 系のカラムを用い、水-アセトニトリル系の移動相で分離条件を検討した。水-アセトニトリルの比を (61:39 v/v) にすると、分離のよいクロマトグラムが得られたので、これを HPLC の条件とした (Fig. 3)。

以上の条件で検量線を作成したところ、1, 2 は 0.025~0.50 mg/ml, 3 は 0.050~0.50 mg/ml の範囲で良好な直線を示した (Fig. 4)。回帰方程式および相関係数 (r) は 1 が $y=330x-0.009$ ($r=0.999$), 2 が $y=390x+1.86$ ($r=0.999$), 3 が $y=159x+2.43$ ($r=0.999$) であった。

2. 栽培品及び市場品への応用

本法により、1 試料につき栽培品は 3 回、市場品は 6 回分析を行い、その平均値を TABLE I に示した。

分析の精度、再現性は、それぞれの変動係数が、1 が 0.0~4.0%, 2 が 0.0~6.9%, 3 が 0.0~4.7% であり、生薬分析として十分利用できるものであった。

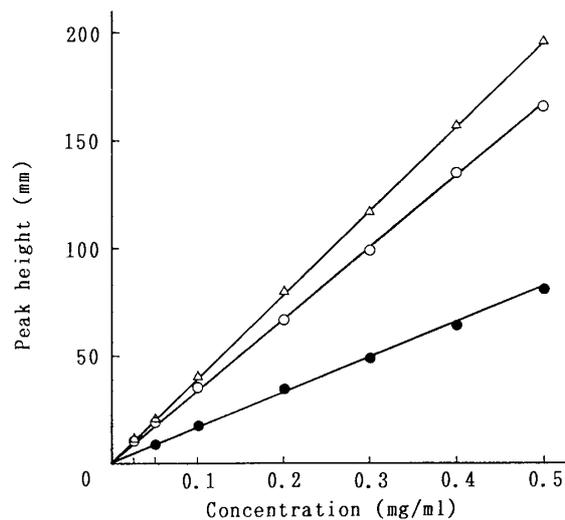


Fig. 4. Calibration Curves of Saikosaponins

○, saikosaponin-a; △, saikosaponin-c; ●, saikosaponin-d.

TABLE I. Saponin Contents (%) of Commercial and Cultivated Buplurum Root

Sample	Saponin content		
	1 (C. V. %)	2 (C. V. %)	3 (C. V. %)
Commercial (n=6)			
1	0.42 (3.8)	0.10 (5.8)	0.47 (2.3)
2	0.43 (4.0)	0.10 (6.9)	0.43 (4.0)
3	0.35 (2.7)	0.10 (4.7)	0.37 (4.1)
Cultivated (n=3)			
4	0.60 (0.78)	0.20 (4.1)	0.60 (2.8)
5	0.64 (2.5)	0.23 (0.0)	0.70 (0.67)
6	0.65 (1.3)	0.25 (1.9)	0.70 (1.2)
7	0.73 (1.9)	0.27 (3.5)	0.72 (2.2)
8	0.56 (2.9)	0.18 (5.2)	0.61 (2.3)
9	0.66 (0.0)	0.25 (3.2)	0.71 (2.4)
10	0.61 (2.8)	0.24 (0.0)	0.72 (1.7)
11	0.85 (1.9)	0.47 (1.0)	0.89 (1.9)
12	0.85 (1.1)	0.28 (2.9)	0.88 (1.9)
13	0.88 (1.1)	0.29 (1.6)	1.1 (0.0)

1, KOJIMA KAMPO Co., Ltd. 2, UCHIDA WAKANYAKU Co., Ltd. 3, NIPPON FUNMATSUYAKUHIN Co., Ltd. 4-7, seed from Medicinal Plants Garden, Nagasaki University. 8-13, seed from Tsukuba Experimental Station of Medicinal Plants, National Institute of Hygienic Sciences.

栽培品のサポニン含量は、1が0.56~0.88%、2が0.18~0.47%、3が0.60~1.1%で、1, 2, 3 いずれも今回入手した市場品より多く含有していたが、文献値^{3,5,7,8)}の範囲内であった。また、国立衛生試験所筑波薬用植物栽培場栽培種を用いて栽培したもののサポニン含量は、長崎大学薬用植物園保存種を用いたものよりやや多めではあるが、種の違いによる大きな差は認められなかった。

3. 栽培品における部位別のサポニン含量

栽培品5試料をそれぞれ、主根、側根、ひげ根に分け、さらに主根は均等に3等分し上部、中部、下部に分けて、各部位のサポニン含量を比較した。

TABLE II に示すように、1, 2, 3 いずれも側根で最も多く、ついで主根下部、ひげ根、主根中部、主根上部の順であった。

TABLE II. Saponin Contents (%) of Various Parts of Cultivated Bupleurum Root

Sample	Saponin content		
	1	2	3
Main root			
top part	0.10-0.26	0.05-0.10	0.18-0.30
central part	0.22-0.33	0.08-0.15	0.28-0.38
lower part	0.34-0.48	0.10-0.20	0.48-0.60
Lateral root	0.96-1.1	0.28-0.36	1.0-1.1
Fibrous root	0.24-0.36	0.08-0.15	0.39-0.50

n=5

TABLE III. Relation between Saponin Contents (%) and Dry Weight (g) of Cultivated Bupleurum Root

Sample weight	Saponin Content		
	1	2	3
<1.0	0.59-0.63	0.16-0.20	0.53-0.60
1.0~1.5	0.54-0.59	0.15-0.17	0.59-0.63
>1.5	0.50-0.57	0.16-0.23	0.54-0.60

n=3

4. 乾燥重量とサポニン含量の関係

栽培品の乾燥重量が1.0g未満, 1.0~1.5g, 1.5gを越えるものに分別し, それぞれ3試料ずつサポニン含量を測定して乾燥重量とサポニン含量の関係を調べた。

TABLE III に示すように, 重量に関係なく, 1, 2, 3 はいずれも一定の割合で含有されていた。

ま と め

Sep-Pak C₁₈ カートリッジを使用した前処理によって, 柴胡中の 1, 2, 3 の HPLC による同時分析を可能にした。

この方法により, 広島県内で実験栽培したミシマサイコから調整した柴胡と市場品を分析した結果, 1, 2, 3 の変動係数は 6.9% 以下と良好な再現性を示した。

本法は操作が簡便な上に, 短時間で精度の高い分析ができるため, 柴胡の迅速な品質評価の手法となりうると思われる。

謝 辞: ミシマサイコの栽培にご協力いただいた湧永製薬株式会社, 常石造船株式会社に深謝いたします。

引用文献及び注

- 1) 本論文の一部は第30回日本薬学会中国四国支部大会(高知, 1991年10月)で発表。
- 2) 川西史明, 長岡良典, 渡辺 斉, 大塩春治, 中本 清, 武田研究所報, 42, 57 (1983).
- 3) 田中俊弘, 伊藤寿美, 酒井英二, 水野瑞夫, 川村智子, 久田陽一, 奥田和代, 野呂征男, 鄭 学忠, 方 鼎, 生薬学雑誌, 42, 236 (1988).
- 4) 厚生省薬務局監修, “薬用植物栽培と品質評価 Part 1”, 薬事日報社, 東京, 1992, p. 53.
- 5) 神橋俊隆, 井上雅成, 奈良県薬事指導所報告, 9, 127 (1987).
- 6) “第十二改正日本薬局方”, 厚生省, 1991, p. 912.
- 7) H. Kimata, C. Hiyama, S. Yahara, O. Tanaka, O. Ishikawa, M. Aiura, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 1836 (1979).
- 8) H. Mizukami, K. Matsunaga, H. Ohashi, A. Amano, T. Maekawa, K. Fujimoto, *Shoyakugaku Zasshi*, 45, 342 (1991).