

生薬成分の超高速液体クロマトグラフィー ——薬用人参、柴胡、甘草中の酸性サポニン類の分析——

High-Performance Liquid Chromatography of Crude Drugs with Chemically Modified Porous Glass
——Analysis of Acidic Saponins of Ginseng, Bupleurum Root and Glycyrrhiza——

高井 信治*・金沢 秀子**・松島 美一*
永田 佳子*・友田 正司**

Nobuharu TAKAI, Hideko KANAZAWA, Yoshikazu MATSUSHIMA
Yoshiko NAGATA and Masashi TOMODA

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は最も繁用される分析手段の一つで、各方面で広く用いられている。応用面の拡大にともない、分離能の向上や分析時間の短縮が要求されるようになった。われわれは、HPLCを用いた分析の高速化を目的としてカラム充填剤の開発を行い、オクタデシルシリル化した多孔質ガラス (IPG-ODS) がカラム充填剤として優れた特性を示すことを見いだした。このカラムにより解熱剤¹⁾、免疫抑制剤²⁾の迅速分析が可能となった。この技術は超高速液体クロマトグラフィーとも言われている^{2,3)}。われわれはこの技術の生薬成分への応用についても検討し、薬用人参や柴胡の主要成分のサポニンの分析で良好な結果を得た⁴⁾。

薬用人参のサポニンには dammarane 系の Ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂ の中性サポニンのほかに酸性の oleanolic acid のサポニン ginsenoside-Ro が知られていた。北川らは加熱に対して不安定な酸性サポニンの存在を報告し、dammarane 系サポニンの malonic acid の酸性エステルである Malonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd を単離した⁵⁾。最近、柴胡の中性サポニン saikosaponin に対しても酸性のマロニル体 malonyl-saikosaponin-a, d の存在が報告された⁶⁾。甘草は人参、柴胡等のほかの生薬と併用されることが多いが、主要成分として酸性サポニン的一种であるグリチルリチンを含んでいる。これらの酸性サポニンを含めたサポニン類について IPG-ODS カラムを用いた HPLC 分析を検討した。その結果酸性サポニンと中性サポニンを同時に室温で分離分析することに成功した。

漢方薬剤は、臨床に広く使われているが、その含有成分間の複合作用や薬効の発現と成分の相関などの化学的説明は不十分である。本法は、これらの説明に有用であるばかりでなく、生薬の品質評価、漢方処方中の含有成

分均一化の指標としても応用可能である。

2. 実 験

2.1 試薬

HPLC の溶離液に使用したアセトニトリルは液体クロマトグラフ用試薬 (和光純薬工業)、水はイオン交換後蒸留した水である。その他の試薬および有機溶媒は、市販の特級品を使用した。試料前処理には Waters 製 Sep-Pak C₁₈ cartridge を用いた。

標準品のサポニンのうち Ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Ro の 9 種類は昭和大学薬学部庄司順三教授、Malonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd は大阪大学薬学部北川勲教授、malonyl-saikosaponin-a, d はツムラの田口平八郎博士より、それぞれ恵与された。また、Ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁ の 6 種類は生薬試験用 (フナコシ薬品) 標準品もあわせて使用した。

2.2 HPLC

高速液体クロマトグラフは東ソー製 CCPM 型ポンプ、東ソー製 UV-8000 型紫外外部吸収検出器、日立製 833A 型データ処理装置を組み合わせた装置を使用した。カラムは伊勢化学工業製の化学修飾多孔質ガラス IPG-ODS (粒子径、10 μ m; 孔径 550 Å) をステンレス製カラム (4.0mm I.D. \times 150mm または 4.0mm I.D. \times 250mm) に充填して作成した。

HPLC 分析においては、カラム温度は室温とし、検出は 203nm における吸収によった。クロマトグラム記録のチャートスピードは 5 mm/min とした。カラムの使用後は、カラム汚染を防ぐため、30~40ml のメタノール (流速 2~3 ml/min) で洗浄した。

2.3 分析試料の調製

試料の調製は次の手順で行った。

①サポニンの抽出：生薬を粉砕後、その 1g を精密に秤取りし、70%メタノール 20ml を加え、室温 (20°C) で 30分

*東京大学生産技術研究所 第4部

**共立薬科大学

研 究 速 報

間振とう抽出した。吸引ろ過し残渣を少量のメタノールで洗い、ろ液を合わせた。この操作を5回繰り返して行い、抽出液を合わせ、減圧濃縮乾固した。

②Sep-Pak処理：抽出物の濃縮残渣は、水に溶解し全量を10mlとし、あらかじめメタノール2mlと水5mlに湿潤したSep-PakC₁₈ cartridgeに通した。水10mlと20%メタノール15mlで洗浄後、メタノール5mlで溶出させた。溶媒を留去し、残渣は溶離液で溶解し全量を2mlとし試料液とした。

3. 結 果

薬用人参の中性サポニンのIPG-ODSカラムを用いたHPLC分析においては移動相としてアセトニトリル-水を用いた⁴⁾。酸性サポニンについてもアセトニトリル15%~50%の移動相について検討した。その結果、薬用人参の酸性サポニンではGinsenoside-Roは分離検出されたが、malonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rdはこの条件では検出されなかった。移動相に50mM KH₂PO₄

を添加しクロマトグラフ分離を試みた。アセトニトリル量15%~50%の間で30分間のリニアグラジェント溶離の結果、酸性サポニンのmalonyl-ginsenosideは対応する中性サポニンginsenosideより溶出時間が短い、アセトニトリル量25%付近で検出された。いずれのサポニンもほぼ同様の条件で分析可能であることが確認された。しかし、グラジェントモードはベースラインのドリフト等のため定量分析には不適當であった。

定量分析のために次のイソクラティックな溶離条件を確定した。IPG-ODSカラム(4mmI.D.×150mm)の場合では、移動相組成アセトニトリル:50mM KH₂PO₄=25.5:74.5、流速1.0ml/minにより、Ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rdおよびmalonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rdは図1に示すように良好に分離した。生薬中では、このほかにGinsenoside-Rf, Rg₂, Roなども存在するため、さらに分離をよくするために長いカラム(4mm I.D.×250mm)を用いて検討した。この場合は移動相組成

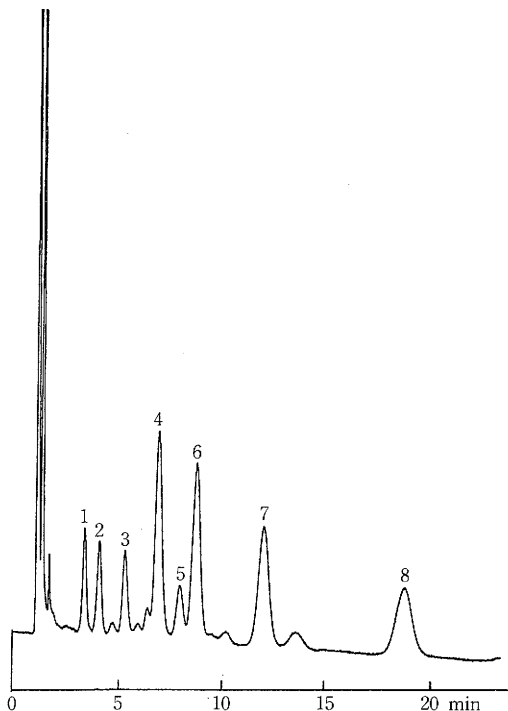


図1 GinsenosideとMalonyl-ginsenosideのクロマトグラム(1)

1, malonyl-ginsenoside-Rb₁; 2, malonyl-ginsenoside-Rc; 3, malonyl-ginsenoside-Rb₂; 4, ginsenoside-Rb₁; 5, malonyl-ginsenoside-Rd; 6, ginsenoside-Rc; 7, ginsenoside-Rb₂; 8, ginsenoside-Rd.

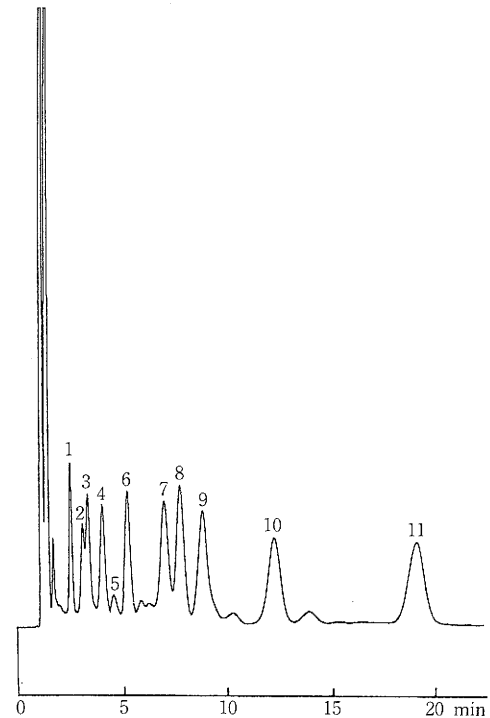


図2 GinsenosideとMalonyl-ginsenosideのクロマトグラム(2)

1, ginsenoside-Ro; 2, ginsenoside-Rf; 3, malonyl-ginsenoside-Rb₁; 4, malonyl-ginsenoside-Rc; 5, ginsenoside-Rg₂; 6, malonyl-ginsenoside-Rb₂; 7, ginsenoside-Rb₁; 8, malonyl-ginsenoside-Rd; 9, ginsenoside-Rc; 10, ginsenoside-Rb₂; 11, ginsenoside-Rd.

研究速報

アセトニトリル：50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4=25.5:74.5$ 、流速 2.0ml/minで、malonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rd およびginsenoside-Ro, Rf, Rg₂, Rb₁, Rb₂, Rc, Rdの 11種のサポニンが20分以内に良好に分離した(図2)。山口ら⁷⁾はオクタデシルシリカ系カラムのHPLCによる中性および酸性ginsenosideの分析を報告している。この方法ではクロマトグラフ分離に40~70分を要するので、IPG-ODSカラムにより分析時間は半分以下に短縮されたことになる。

薬用人参生薬中の酸性サポニンは不安定で、加熱に対してその一部が分解する。上記分析法により生薬の抽出液のサポニンを定量し、抽出法の検討を行った。その結果、抽出溶媒には70~80%のメタノールが最も適当であった。この溶媒を用いて室温で30分振とう抽出を5回繰り返すことにより、生薬中のほとんどすべての酸性サポニンおよび中性サポニンが抽出されることがわかった。またHPLC注入用の試料の前処理には、固相抽出法であるSep-PakC₁₈ cartridge処理が有効であることが明らかとなった。

漢方処方では薬用人参は水で加熱抽出を行った煎液として用いられることが多い。加熱抽出により酸性サポニンは分解される。しかし、生干人参、白参の煎液を本法により分析すると、未分解のmalonyl-ginsenosideがわずかではあるが存在することが確認された。製造中に加熱処理を行っている紅参の抽出液にはmalonyl-ginsenosideは検出されなかった。

柴胡の酸性サポニンとしてはmalonyl-saikosaponin-a, dが報告されている⁶⁾。これらは、malonyl-ginsenoside

と同様に50mM KH_2PO_4 を溶離液に添加することにより、分析可能であった。酸性サポニンであるmalonyl-saikosaponin-a, dと中性サポニンsaikosaponin-a, c, dは、IPG-ODSカラム(4mmI.D.×150mm)を用いた場合、移動相アセトニトリル：50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4=27.5:72.5$ 、流速2.0ml/minで20分以内に良好に分離した(図3)。

甘草の成分として甘味トリテルペン配糖体のグリチルリチン(glycyrrhizin)が知られている。glycyrrhizinはIPG-ODSカラム(4mmI.D.×150mm)を用いた場合には、アセトニトリル：50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4=25.5:74.5$ 、流速1.5ml/minで2分以内に溶出した。甘草は薬用人参と配合されることの多い生薬である。そこでglycyrrhizinとmalonyl-ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rdおよびginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rc, Rdの同時分析の可能性を検討した。IPG-ODSカラム(4mmI.D.×250mm)を用いた場合には、アセトニトリル：50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4=25.5:74.5$ 、流速2.0ml/minで図4に示したように9種のサポニンが20分以内に分離分析された。

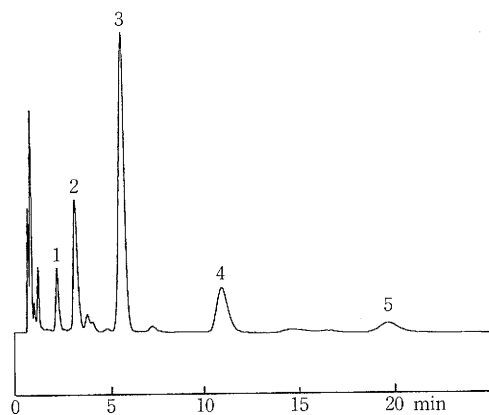


図3 SaikosaponinとMalonyl-saikosaponinのクロマトグラム

1, saikosaponin c; 2, malonyl-saikosaponin a; 3, saikosaponin a; 4, malonyl-saikosaponin d; 5, saikosaponin d.

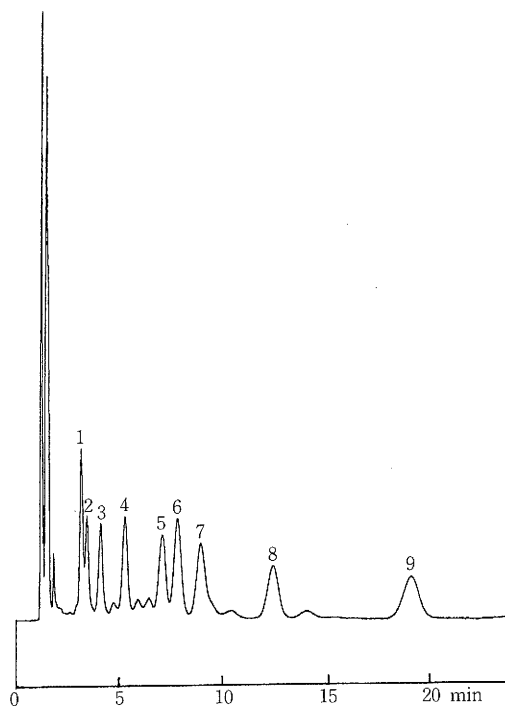


図4 Glycyrrhizinと人参サポニンのクロマトグラム

1, glycyrrhizin; 2, malonyl-ginsenoside-Rb₁; 3, malonyl-ginsenoside-Rc; 4, malonyl-ginsenoside-Rb₂; 5, ginsenoside-Rb₁; 6, malonyl-ginsenoside-Rd; 7, ginsenoside-Rc; 8, ginsenoside-Rb₂; 9, ginsenoside-Rd.

研究速報

4. 結 語

薬用人参の酸性サポニンと中性サポニンと同様に、IPG-ODSカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより室温で迅速、正確に分離分析される。柴胡や甘草の酸性サポニンも同様に分析が可能であった。この方法は加熱に対して不安定なこれらの酸性サポニンを含めたサポニンの分析に適している。生薬または漢方製剤の分析など実際面での応用に有用な方法である。

(1989年6月23日受理)

参 考 文 献

1) Y. Matsushima et. al., J. Chromatogr., 332, 265

(1985).

- 2) 高井信治 ほか, 生産研究, 41, 179 (1989).
- 3) 山辺武郎 編著「超高速液体クロマトグラフィー」産業図書, 東京, 1989.
- 4) H. Kanazawa et. al., Chromatographia, 24, 517 (1987).
- 5) I. Kitagawa et. al., Chem. Pharm. Bull., 31, 3553 (1983).
- 6) 江橋尚文 ほか, 日本生薬学会第33回年会講演要旨集(1988), p 95.
- 7) H. Yamaguchi et. al., Chem. Pharm. Bull., 36, 3468 (1988)

