

資料

日本薬局方「サイコ」の5種サイコサポニン含量の実態調査

伊達 英代, 中島 安基江, 平本 春絵, 井原 紗弥香, 新井 清, 高尾 信一, 野下 俊朗*, 甲村 浩之*

Actual Conditions Survey of Five Kinds of Saikosaponin Contents of the Japanese Pharmacopoeia “Bupleurum Root”

HIDEYO DATE, AKIE NAKASHIMA, HARUE HIRAMOTO, SAYAKA IHARA,
KIYOSHI ARAL, SHINICHI TAKAO, TOSHIRO NOSHITA and HIROYUKI KOUMURA

(Received October 17, 2016)

広島県で栽培された「ミシマサイコ」の品質を評価するため、HPLCにより、5種サイコサポニン（サイコサポニン-a (Sa), -b1 (Sb1), -b2 (Sb2), -c (Sc) 及び-d (Sd)）の同時分析法を開発した。分子形状認識能の高いコレステリル基結合型C18カラムを用いた、水/アセトニトリルのグラジエント条件（80：20→25分→20：80, 5分保持）により、5種サイコサポニンは良好に分離した。本法を用いて、日本薬局方「サイコ」12製品の分析を試みた。Sa, Sc及びSdはすべての製品から検出された。Sb1は2製品及びSb2は11製品からそれぞれ微量検出された。5種サイコサポニン含量の相関は、Sa及びSd間において、有意に高い相関が認められた。産地及び種類では、明瞭な差は認められなかった。栽培年数の長い物ほど、含量が高くなる傾向が認められたが、1年栽培品でも日本薬局方「サイコ」の含量規格を満たしていた。

Key words：日本薬局方「サイコ」、品質評価、サイコサポニン、コレステリル基結合型C18カラム

緒 言

広島県北部中山間地域は、人口減少や少子高齢化が進行し、産業や地域コミュニティの衰退等、様々な課題を有している。そのため、広島県では、「産業振興等による雇用機会の創出」を基本方針の一つとした、広島県中山間地域振興条例〔1〕を、平成25年度に策定した。一方、漢方製剤の原料である生薬は、約9割を輸入に頼る状況にあり〔2〕、多くの漢方製剤メーカーにおいても、品質の良い生薬の安定供給が課題とされている。

このような状況をうけ、国内使用量が多いにもかかわらず〔2〕、安定的な供給が危惧される日本薬局方（日局）「サイコ」を、広島県北部中山間地域の特産物として確立するため、薬用部位（根）が安定的かつ多収量に得られる「ミシマサイコ」栽培法を県立広島大学において開発し、当センターは、本栽培法による試験栽培品の品質評価を担当する共同研究を開始した。（平成27-28年度 県立広島大学重点研究事業 地域課題解決研究）。

本研究における品質評価の項目は、日局「サイコ」の含量規格「総サポニン（サイコサポニン-a (Sa) 及びサイコサポニン-d (Sd) 0.35 %以上）及び報告されている他のサイコサポニン〔3〕のうち、標準品が入手可能であったサイコサポニン-b1 (Sb1), -b2 (Sb2) 及び-c (Sc) の5種サイコサポニンを選択し、これらのHPLCによる同時分析法を検討・確立した。本法を用いて、日本薬局方「サイコ」（日局品）12製品中の5種サイコサポニン含量の実態調査を実施した。その概要を報告する。

材料及び方法

1 試料

漢方薬メーカー等4社から、日局品12品を購入した(表1)。

2 試薬

(1) 標準品

Sa (Lot No. AWE2493), Sb2 (Lot No. KPH5226) 及びSd (Lot No. TLH6406) は和光純薬製局方生薬試験用を、Sb1 (Lot No. AWE2542) 及びSc (Lot No. PDN8965) は、和光純薬製生薬試験用を用いた。

*県立広島大学 生命環境学部 生命科学科：Department of Life Science, Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima

表1 日局「サイコ」の表示

表示	試料No											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A社				B社		C社		D社			
産地	中国産	日本産	中国産	中国産	中国産	中国産	中国産	中国産	日本産	中国産	中国産	中国産
種類	記載なし	ミシマサイコ	ミシマサイコ	湖北柴胡*	ミシマサイコ	唐記載なし	ミシマサイコ	ミシマサイコ	ミシマサイコ	ミシマサイコ	北	
(栽培)年数	1年	1年	1年	1年	記載なし	記載なし	4年	年数不明	2年	1年	2年	5~7年
形態	刻	刻	刻	刻	刻	刻	刻	刻	〇切	〇切	〇切	〇切

*湖北柴胡：中国湖北省で自生（野生）している *Bupleurum falcatum* Linné (Umbelliferae) の変種の根を刻みとしたもの。

(2) その他試薬及び器材

メタノールはSIGMA-ALDRICH Inc.製HPLC用を、アセトニトリル及び蒸留水は、関東科学（株）製HPLC用を用いた。その他試薬は、特級品を使用した。精製用オクタデシルシリル化シリカゲルカラムはBond Elut C18 (Agilent Technologies製, 500 mg, 6 mL) を用いた。

3 装置

HPLCは、HP 1200(Agilent Technologies製)を用いた。

4 検量線用混合標準溶液の調製

各標準品約5 mgを精密に量り取り、それぞれメタノールで溶解して10 mLとし、各標準原液を調製した。さらに、各標準原液をメタノールで適宜希釈し、Sa, Sc及びSdについては5.0-50 µg/mL, Sb1及びSb2については0.5-5.0 µg/mLの範囲で、検量線用混合標準溶液を調製した。

5 試料溶液の調製

第十六改正日本薬局方「サイコ」の定量法に準じた(図1)。

6 分析条件

カラムは、COSMOSIL Colester (4.6×150 mm, 5 µm, ナカライテスク製)を用いた。移動相は、水(A液)及びアセトニトリル(B液)を用い、グラジエント分析を行った。グラジエント条件は、A液：B液(80：20)から25分で(20：80)とし、さらに5分間保持した。流量は1 mL/min, 注入量は20 µL, カラム温度は40 °Cとした。検出波長はSa, Sd及びScは206 nm, Sb1及びSb2は254 nmとした。

結果及び考察

1 5種サイコサポニンの同時分析の検討

報告されているHPLCによるサイコサポニンの分析

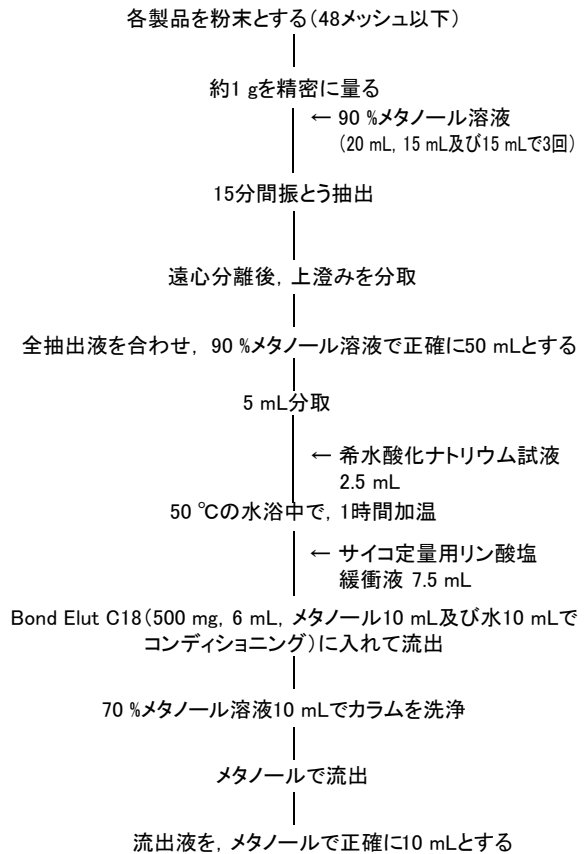


図1 試料溶液の調製

は、日局の方法、寺内らの方法 [4]、杉本らの方法 [5] 等があり、C18カラムを用いた水/アセトニトリルのアイソクラティック条件である。これらの方法を参考に、5種サイコサポニンが良好に分離する条件を検討したが、Sa及びSb2の完全分離が困難であった。そこで、C18カラムよりも高い分子形状認識能を有する、コレステリル基結合型C18カラムを用い、水/アセトニトリルのグラジエント条件を検討したところ、先に示した分析条件で5種サイコサポニンは良好に分離した(図2)。

また、検量線用混合標準溶液を注入し、ピーク面積に

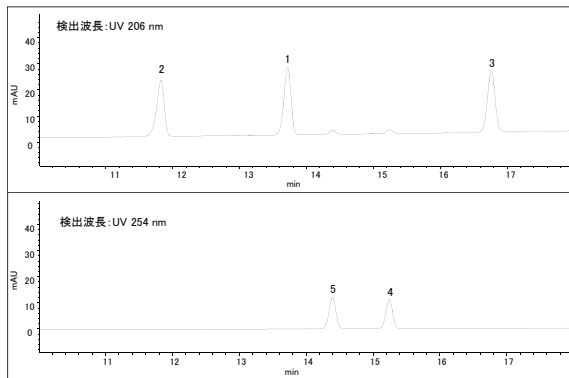


図2 5種サイコサポニンのHPLCクロマトグラム
1: Sa, 2: Sc, 3: Sd (各25 µg/mL), 4: Sb1, 5: Sb2 (各2.5 µg/mL)

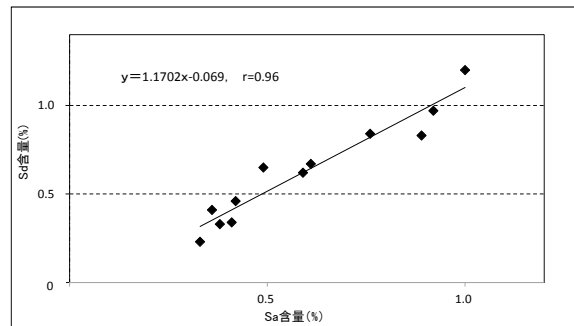


図3 Sa含量%とSd含量%の関係

表2 5種サイコサポニン測定結果 (n=3)

試料No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sa	0.38 ±0.02	0.41 ±0.01	0.49 ±0.01	0.92 ±0.03	0.61 ±0.00	0.33 ±0.01	1.0 ±0.0	0.36 ±0.00	0.59 ±0.01	0.76 ±0.01	0.42 ±0.00	0.89 ±0.02
Sb1	-	-	-	-	-	0.0056 ±0.0004	-	-	-	-	-	0.0028 ±0.0006
Sb2	0.012 ±0.000	0.010 ±0.000	-	0.016 ±0.000	0.016 ±0.000	0.028 ±0.000	0.0092 ±0.0000	0.0039 ±0.0014	0.028 ±0.0000	0.0064 ±0.0001	0.0053 ±0.0000	0.021 ±0.0000
Sc	0.10 ±0.00	0.15 ±0.00	0.18 ±0.00	0.22 ±0.01	0.14 ±0.00	0.091 ±0.002	0.12 ±0.00	0.14 ±0.00	0.25 ±0.01	0.29 ±0.01	0.18 ±0.00	0.19 ±0.00
Sd	0.33 ±0.01	0.34 ±0.01	0.65 ±0.02	0.97 ±0.04	0.67 ±0.01	0.23 ±0.00	1.2 ±0.0	0.41 ±0.00	0.62 ±0.02	0.84 ±0.02	0.46 ±0.00	0.83 ±0.02
総 サポニン	0.71 ±0.03	0.75 ±0.01	1.1 ±0.0	1.9 ±0.1	1.3 ±0.0	0.55 ±0.01	2.2 ±0.0	0.77 ±0.00	1.2 ±0.0	1.6 ±0.0	0.89 ±0.01	1.7 ±0.0

それぞれの値は、平均値±標準偏差 単位: %

よる絶対検量線法で検量線を作成したところ、5種サイコサポニンすべて、 $r = 0.999$ と良好な検量線が得られた。

2 日局品の5種サイコサポニン含量の測定結果

検討した分析条件を用いて測定した結果を表2に示した。

(1) Sa及びSd含量の測定結果

Sa及びSdは、すべての日局品から検出され、Sa含量は0.33-1.0%、Sd含量は0.23-1.2%の範囲であった。また、本法で得られたSa及びSdの定量値を合計した総サポニンは、0.55-2.2%であり、すべての日局品で含量規格(規格値: 0.35%以上)を満たしていた。鈴木らは、日本生薬協会提供「サイコ」18製品を分析し、Saは0.19-0.72%、Sdは0.16-0.77%、総サポニンは0.33-1.49%であったと報告している[6]。今回の結果は、これらの報告値と比較して、高い傾向にあった。

また、各日局品のSa及びSdの相関係数は $r = 0.96$ ($p < .001$)と高い相関が認められた(図3)。

(2) Sc含量の測定結果

Scは、すべての日局品から検出され、含量は0.091-0.29%の範囲であった。坂井らは、市場に流通する「サイコ」

市販品20製品のSa、Sc及びSdの測定を実施し、その相関性を検証しており、Sa及びSc間で寄与率0.6% ($r = 0.07$)と相関性はほとんどなく、ScおよびSd間には寄与率42.6% ($r = 0.65$)と高い相関性を認めたと報告している[7]。今回の測定結果について同様に検証したところ、Sa及びSc間、Sc及びSd間共に $r = 0.41$ と、相関は認められなかった。

(3) Sb1及びSb2含量の測定結果

Sb1はNo.6、及び12の2つの日局品から、Sb2はNo.3を除く11の日局品から検出され、Sb1含量は0.0028-0.0056%、Sb2含量は0.0039-0.028%であり、Sa、Sc及びSd含量と比較すると微量であった。これまで、日局品中のSb1及びSb2含量についての報告は見当たらず、今回、日局品中のSb1及びSb2含量の実態について、明らかにすることができた。

3 産地、種類及び栽培年数による5種サイコサポニン含量の比較

(1) 産地及び種類

5種サイコサポニン含量の測定結果について、産地及び種類等で比較したグラフを図4に示した。

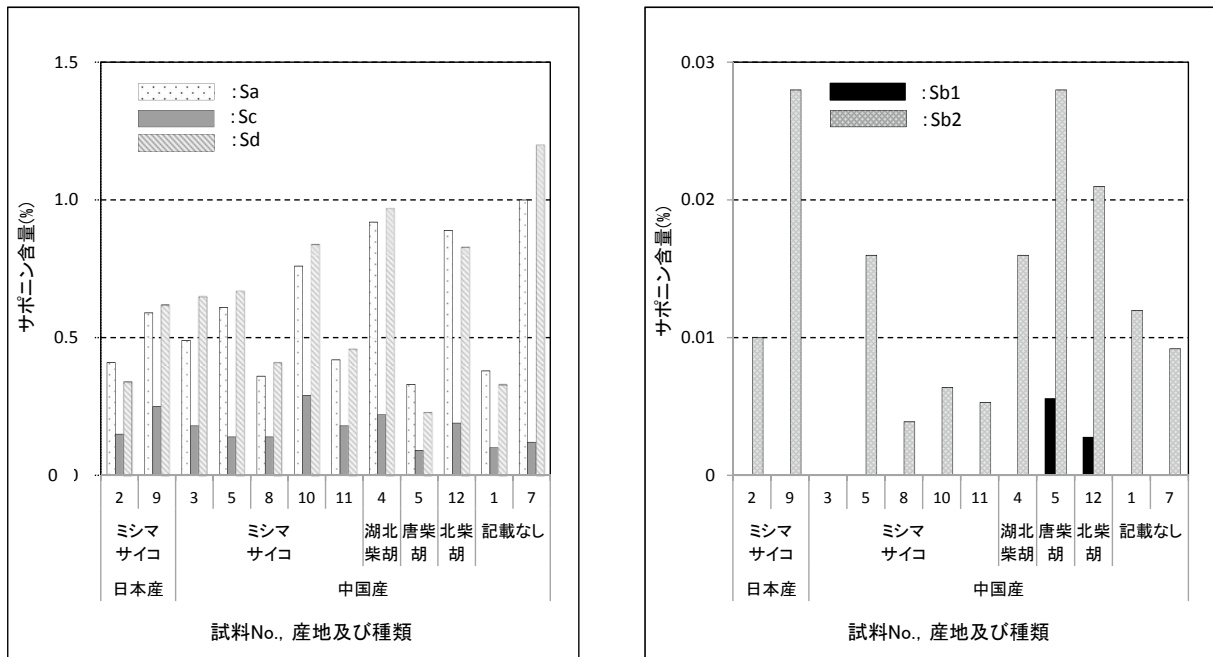


図4 産地及び種類による5種サイコサポニン含量の比較

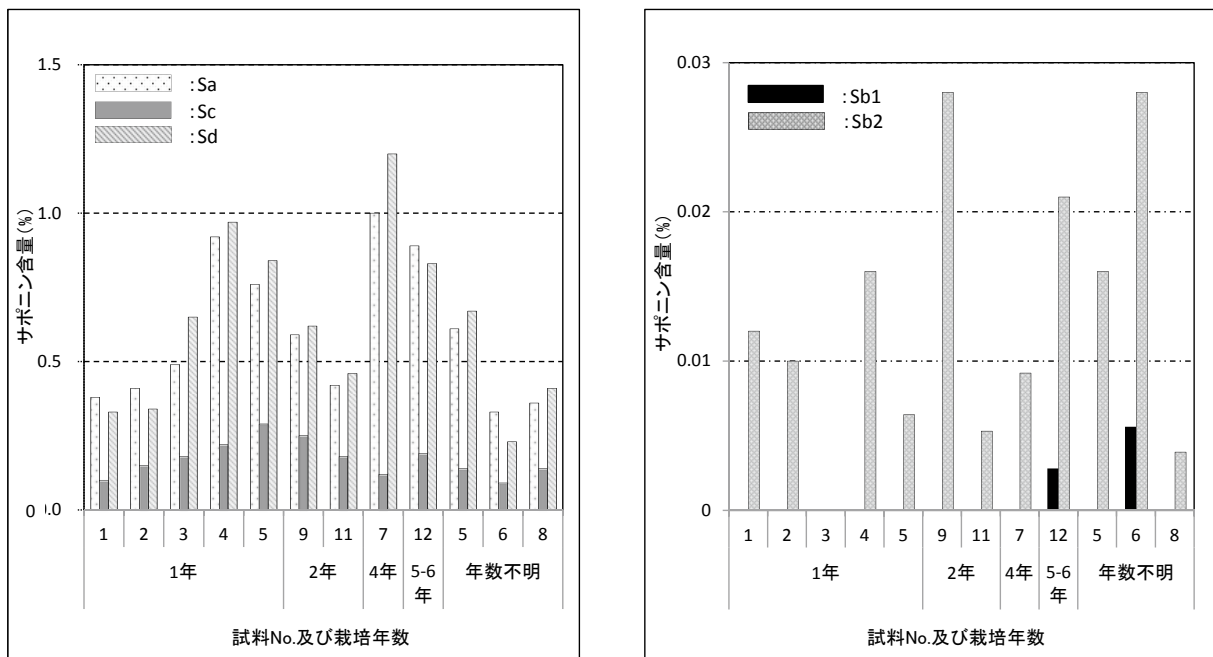


図5 栽培年数による5種サイコサポニン含量の比較

まず、日本産及び中国産で比較したところ、産地間による明瞭な差は認められなかった。

種類ごとの比較においても、Sa, Sb2, Sc及びSd含量に明瞭な差は認められなかった。なお、Sb1がNo.6の唐柴胡及びNo.12の北柴胡から検出された。この2品は、原植物の基原を異にする中国輸入品である。Sb1が、これら柴胡に特徴的に含有される成分である可能性については、さらなる実態調査が必要であると考え。

(2) 栽培年数

従来、「サイコ」は2-3年生の根を収穫するといわれていたが、現在ではほとんど1年生収穫となっている。そこで、栽培年数ごとの5種サイコサポニン含量を比較した(図5)。

Sa及びSd含量については、n = 1であるが、4年生が最も高濃度で、続いて5-7年生 (n = 1)、1年生 (n = 5 平均値: Sa = 0.59%, Sd = 0.63%), 2年生 (n = 2 平均値: Sa = 0.51%, Sd = 0.54%) であった。これにより、長期栽培による日局「サイコ」の含量規格である

総サイコサポニンの増加傾向が認められたが、栽培効率を考慮すると実栽培時には困難と思われる。1年生及び2年生の比較から、1年の栽培で含量規格を満たし、かつ、より含量の高い栽培品となる可能性が示唆された。

ま と め

広島県で栽培された「ミシマサイコ」の品質評価のため、分子形状認識能の高いコレステリル基結合型C18カラムを用いた5種サイコサポニン同時分析法を確立した。

本法を用いて日局「サイコ」12製品の5種サイコサポニン分析を実施し、市販品中の5種サイコサポニン含量の実態を把握した。また、産地、種類及び栽培年数による5種サイコサポニン含量の比較を実施し、試験栽培品を評価する基礎データを得た。

今回、確立した5種サイコサポニン同時分析法及び日局品の実態調査で得られたデータを基に、今後、県立広島大学の試験栽培品を評価し、栽培法の有用性を明らかにしたい。

【参考文献】

[1] 広島県中山間地域振興条例. 広島県ホームページ.

ジ. <https://www.pref.hiroshima.lg.jp/uploaded/attachment/109178.pdf> (参照 2016-9-29)

- [2] 原料生薬使用量等調査報告書(3) —平成23年度および24年度の使用量—. 日本漢方生薬製剤協会 <http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/shiyouyou-chousa03.pdf> (参照 2016-7-27)
- [3] 日本薬局方解説書編集委員会. 第十六改正日本薬局方解説書. 群馬県: 廣川書店; 2011. p.D-302-309.
- [4] 寺内正裕, 金森久幸, 坂本征則, 齋藤昭二三, 加藤睦子, 神田博史. 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. 生薬学雑誌. 1993; 47(2): 213-217.
- [5] 杉本育史, 池田憲廣, 城 尚信. 第37回全国衛生化学技術協議会年会要旨. p.176-177
- [6] Hideyo Suzuki, Yoichi Yokota, Sachiko Terasaki, Toshinori Tsuno and Morikazu Murakami. Component Determination of Total Saponins in Bupleurum Root by High-Performance Liquid Chromatography. Natural Medicines. 2004;58(4):138-144
- [7] 坂井至通, 清水英徳, 今井準三, 井口恒男. 第31回全国衛生化学技術協議会年会要旨. p.128-129