

資料

柴胡中のサイコサポニン分析法の検討

Examination of Analysis Method of Saikosaponin in Bupleurum Root

原田 卓也 吉田 純一¹ 二石 大介

1 はじめに

国内において医薬品原料として使用される生薬のうち国産は約10%であり、そのほとんどが中国等の海外からの輸入に頼っている状況である¹⁾。このため、国内での原料生薬の安定確保が望まれており、国は薬用作物の産地拡大や生産体制の強化に向けた取り組みを進め²⁾、当県においても、ミシマサイコ、ガジュツ、カンゾウ等の薬用作物が栽培されている³⁾。

医薬品原料として使用される生薬については他の農作物と異なり、日本薬局方で規定された規格基準に適合しなければならず、品質確保のためには有効成分等の含有量を測定する必要があるが、有効成分等の実態調査に関する知見は少ない。

そこで、当県で栽培されている薬用作物の品質評価を可能とするため、県内でも多く栽培され、解熱鎮痛、解毒、鎮静などの薬効を有する柴胡について、その有効成分とされるサイコサポニンの分析法の検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試料

HPLC及びUHPLCによる分析においては、漢方薬メーカー2社から購入した以下8品目及び県内圃場の柴胡を用いた(表1)。LC/MS/MSによる分析においては試料③を用い、添加回収用ブランク試料として、漢方薬メーカーから購入したガジュツ(中国産)を用いた。

表1 分析対象試料(柴胡)

試料	販売者	産地	種類	栽培年数
①	A社	中国産	ミシマ	1年
②	A社	中国産	ミシマ	2年
③	A社	中国産	北	不明
④	A社	日本産	ミシマ	2年
⑤	B社	中国産	河北	不明
⑥	B社	中国産	ミシマ	1,2年混合
⑦	B社	中国産	湖北	不明
⑧	B社	日本産	ミシマ	1年
⑨*	—	日本産 (県内圃場)	ミシマ	2年

*は水洗い後、乾燥し、根以外の部分を取り除いたものを用いた。

2.2 標準品

サイコサポニン-a(以下「Sa」という。)、サイコサポニン-b1(以下「Sb1」という。)、サイコサポニン-b2(以下「Sb2」という。)、サイコサポニン-c(以下「Sc」という。)、サイコサポニン-d(以下「Sd」という。)は和光純薬工業(株)製を用いた。

2.3 混合標準溶液

各標準品をそれぞれメタノールに溶解し、500 μ g/mLの標準原液とした。さらに、各標準原液を混合し、適宜希釈したものを混合標準溶液とした。

2.4 その他の試薬等

アセトニトリル(HPLC用、LC/MS用)及びメタノール(HPLC用)は関東化学(株)製、希水酸化ナトリウムは林純薬工業(株)製、メタノール(LC/MS用)及びリン酸二水素カリウム(特級)は和光純薬工業(株)製を用いた。オクタデシルシリル化シリカゲルカラムはジーエルサイエンス(株)製InertSepC18(500mg, 6mL)を用いた。

1 退職(2019年3月)

2. 5 装置

2. 5. 1 HPLC及びUHPLC

高速液体クロマトグラフはNexeraX2及びProminenceシリーズ（株）島津製作所製）を使用し、送液ポンプはLC-30AD, オートサンプラーはSIL-30AC, カラムオーブンはCTO-20AC, フォトダイオードアレイ検出器はSPD-M30Aを用いた。

2. 5. 2 LC/MS/MS

高速液体クロマトグラフはProminenceシリーズ（株）島津製作所製）を使用した。

質量分析装置は4000QTRAP（AB Sciex社製）を使用し、イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

表2 HPLC条件及びUHPLC条件

HPLC条件	
分析カラム	COSMOSIL Corester ナカライテスク(株)製 (内径4.6mm, 長さ150mm, 粒径5µm)
流速	1mL/min
注入量	20µL
カラム温度	40°C
移動相	水 : アセトニトリル = 60 : 40
検出波長	206nm (Sa, Sc, Sd), 254nm (Sb1, Sb2)
UHPLC条件	
分析カラム	COSMOSIL 2.5Corester ナカライテスク(株)製 (内径2.0mm, 長さ50mm, 粒径2.5µm)
流速	0.5mL/min
注入量	4µL
カラム温度	40°C
移動相	A) 水 B) アセトニトリル
移動相条件	0-11min (40%B) → 11-15min (100%B) → 15-20min (40%B)
検出波長	206nm (Sa, Sc, Sd), 254nm (Sb1, Sb2)

表3 LC/MS/MSの測定条件

LC条件(株)島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	COSMOSIL 2.5Corester ナカライテスク(株)製 (内径2.0mm, 長さ50mm, 粒径2.5µm)
流速	0.3mL/min
注入量	2µL
カラム温度	40°C
移動相	水 : アセトニトリル = 60 : 40
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化 (ESI・ネガティブ)
イオンスプレー電圧	-4.5kV
イオンソース温度	600°C
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

2. 6 測定条件

HPLC及びUHPLCの測定条件は、表2のとおり。

LC/MS/MSの測定条件は表3のとおり。また、化合物ごとのプリカーサーイオン (Q1), プロダクトイオン (Q3), MRMにおけるDP (Declustering Potential), CE (Collision Energy) 及び保持時間を表4に示す。

表4 化合物ごとのMS/MSパラメータ及び保持時間

成分名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	保持時間 (min)
Sa	779.39	617.4	52	170	4.57
Sb1	779.41	617.5	50	185	7.67
Sb2	779.44	617.6	48	175	5.72
Sc	925.47	58.9	130	225	2.57
Sd	779.47	617.5	52	170	12.16

2. 7 試験溶液の調製

HPLC及びUHPLC分析における試験溶液は第十七改正日本薬局方「サイコ」の定量法⁹⁾に準じ、図1のフローチャートに従って試験溶液を調製した。

LC/MS/MS分析における試験溶液は、図2のフローチャートに従って試験溶液を調製した。

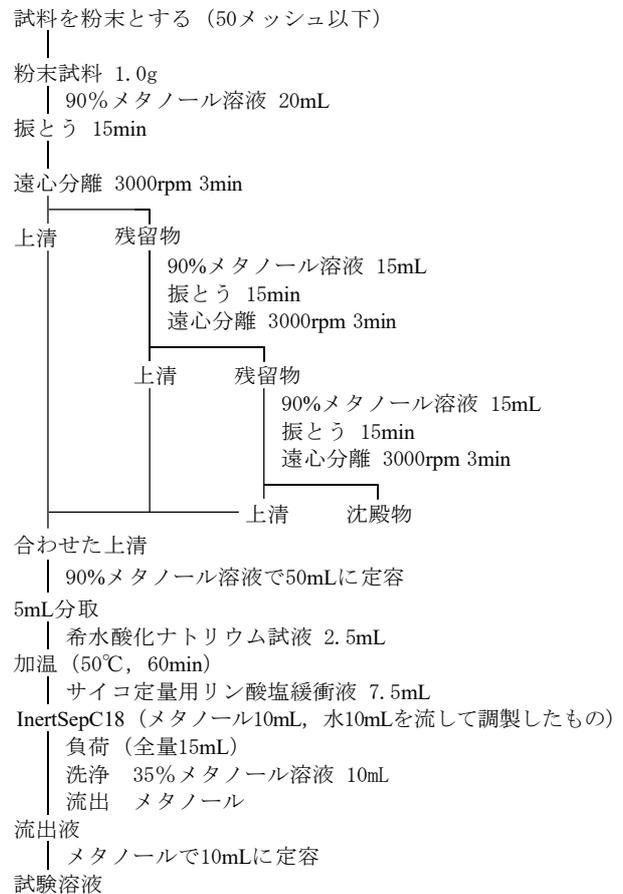


図1 試験溶液の調製 (HPLC及びUHPLC)

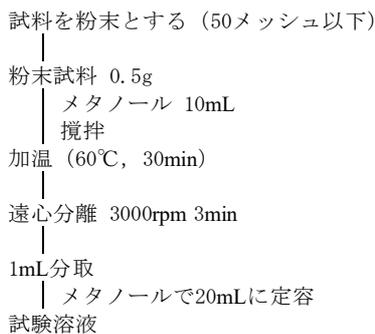


図2 試験溶液の調製 (LC/MS/MS)

3 結果及び考察

3. 1 HPLCによるサイコサポニン分析法の検討

3. 1. 1 カラム及び移動相条件の検討

日本薬局方で定量規定のあるSaとSdのほか、含有成分とされるSb1, Sb2, Scの同時分析について検討した。

汎用されるC18カラム及び水/アセトニトリルの移動相条件下で分析すると、SaとSb2のピークが重なり分離が困難であった。そこで各種カラムを用いて検討したところ、伊達らの報告⁵⁾で使用されていた高い分子形状認識能を有するとされるコレステリル基結合型カラムであるCOSMOSIL Coresterを用いることにより、図3に示すように5種類のサイコサポニンは良好に分離された。また、分離及び分析時間短縮のため移動相のグラジエント条件を検討したが、検出波長が低波長であるため、アセトニトリルの比率を上げるとベースラインも上昇してしまい分析に支障がでてしまった。したがって、カラムはCOSMOSIL Coresterを用いることとし、グラジエント条件ではなく、水/アセトニトリル (60 : 40) のアイソクラティック条件で分析することとした。

3. 1. 2 検量線の直線性

検量線は、混合標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.25~100µg/mLの範囲でピーク面積を用いて絶対検量線を作成したところ、相関係数が0.999以上となる良好な直線が得られた。

3. 1. 3 システム再現性及び添加回収試験

日本薬局方「サイコ」の定量法に準じ、混合標準溶液50µg/mLを6回繰り返し測定した時の相対標準偏差を求めたところ、許容範囲である1.5%以下を大きく下回り、ばらつきが小さく良好な結果となった。また、既知のサイコサポニンを含む試料に各サイコサポニンが最終濃度5µg/mLとなるよう添加回収試験を行ったところ、添加回収率は96.7~118.8%の範囲であり良好な結果が得

られた (表5)。

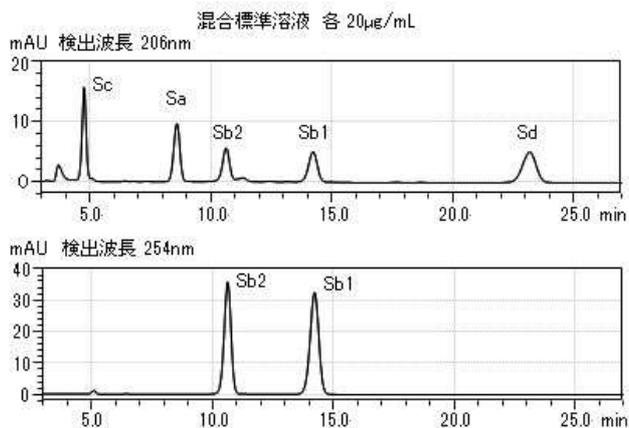


図3 HPLC法により得られたクロマトグラム

表5 システム再現性及び添加回収試験結果 (HPLC)

	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd
システム再現性 (%) (n=6の相対標準偏差)	0.17	0.04	0.03	0.32	0.23
添加回収率 (%) (n=3の平均値)	118.8	97.5	96.7	102.6	102.6

3. 1. 4 検出限界及び定量下限値

混合標準溶液0.25µg/mLを7回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差から装置検出限界及び装置定量下限を求めた (表6)。

表6 検出限界及び定量下限値 (HPLC)

	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd
装置検出限界 (µg/mL)	0.06	0.01	0.02	0.16	0.16
装置定量下限 (µg/mL)	0.15	0.02	0.04	0.41	0.41

3. 1. 5 サイコサポニン含量

検討したHPLC条件を用いて測定した結果は表7のとおりであった。すべての試料で5種類のサイコサポニンを確認することができた。このうち日本薬局方で定量規定のあるSa及びSdの含量はそれぞれ0.28~0.88%, 0.38~1.13%であり、日本薬局方で総サポニン量として定義されているSaとSdの定量値の合計は0.66~2.00%であり、すべての試料で総サポニン含量規格である0.35%以上を満たし、SaとSdの含量には高い相関が見られた。Sb1及びSb2の含量は他のサイコサポニンと比べ、Sb1は0.0012~0.0078%, Sb2は0.0033~0.0159%と微量であり、Sb1はSa及びSdと相関が見られた。Scの含量は0.05~0.67%であり、他のサイコサポニンと相関は見られなかった。日本産及び中国産でサイコサポニン含量を比較したところ、

産地による明確な差は認められなかった。成分別では県内で栽培された試料⑨のScが他に比べ高値を示した。

表7 HPLC法を用いたサイコサポニンの含量

(n=3, 単位: %)

試料番号	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd	総サポニン (Sa+Sd)
①	0.54	0.0054	0.0076	0.25	0.73	1.28
②	0.58	0.0056	0.0078	0.26	0.72	1.30
③	0.87	0.0058	0.0155	0.27	1.13	2.00
④*	0.58	0.0078	0.0159	0.37	0.74	1.32
⑤	0.28	0.0012	0.0033	0.05	0.38	0.66
⑥	0.49	0.0032	0.0004	0.20	0.61	1.09
⑦	0.88	0.0062	0.0063	0.09	1.08	1.95
⑧*	0.55	0.0051	0.0017	0.25	0.71	1.26
⑨*	0.65	0.0049	0.0019	0.67	0.79	1.44

*は日本産。

3. 2 UHPLCによるサイコサポニン分析法の検討

3. 2. 1 移動相条件の検討

分析時間を短縮するため、UHPLCを用いて5種類のサイコサポニンの分離が可能か検討を行った。カラムはHPLC条件で用いたCOSMOSIL Coresterと同様にコレステリル基を結合したカラムで、より粒子径の小さなCOSMOSIL 2.5Coresterを用いた。

その結果、図4に示すように5種類のサイコサポニンは良好に分離された。しかしながら、試料測定後に再度混合標準溶液を測定すると、ピーク形状が悪くなってしまった。内径の小さなカラムを使用しており、カラムの汚れによる影響が考えられたため、アセトニトリル100%でカラム洗浄を行ったところ、ピーク形状が改善した。

したがって、UHPLCでの移動相条件はアセトニトリル100%で洗浄する条件を組み込んだステップワイズ法による分析法とした。

UHPLCによる分析法により、HPLC条件時に比べ保持時間は半分以下となり、短時間での分析が可能となった。また、移動相の流量も半分以下となったため、使用溶媒の量も削減することができた。

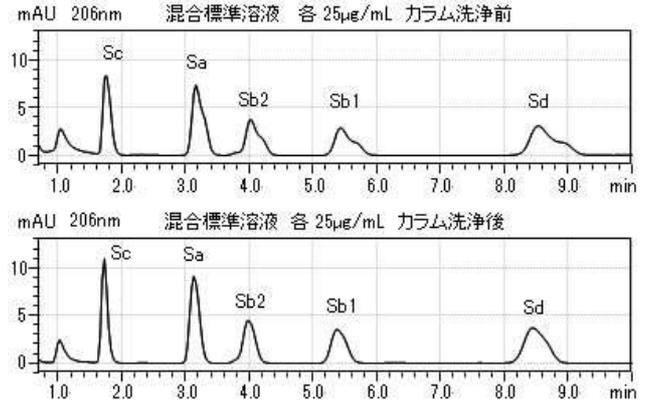


図4 UHPLC法により得られたクロマトグラム

3. 2. 2 検量線の直線性

検量線は、混合標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.25~100µg/mLの範囲でピーク面積を用いて絶対検量線を作成したところ、相関係数が0.999以上となる良好な直線が得られた。

3. 2. 3 システム再現性及び添加回収試験

日本薬局方「サイコ」の定量法に準じ、混合標準溶液50µg/mLを6回繰り返し測定した時の相対標準偏差を求めたところ、すべてのサイコサポニンで許容範囲である1.5%以下であった。しかしながら、HPLCでの分析と比較すると値が大きくばらつきのある結果となった。また、既知のサイコサポニンを含む試料に各サイコサポニンが最終濃度5µg/mLとなるよう添加回収試験を行ったところ、添加回収率は82.1~103.3%の範囲であり良好な結果が得られた(表8)。

表8 システム再現性及び添加回収試験結果 (UHPLC)

	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd
システム再現性 (%) (n=6の相対標準偏差)	0.52	0.12	0.10	0.11	1.40
添加回収率 (%) (n=3の平均値)	95.6	94.8	103.3	82.1	90.5

3. 2. 4 検出限界及び定量下限値

混合標準溶液0.25µg/mLを7回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差から装置検出限界及び装置定量下限を求めた(表9)。

表9 検出限界及び定量下限値 (UHPLC)

	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd
装置検出限界 (µg/mL)	0.06	0.03	0.02	0.17	0.18
装置定量下限 (µg/mL)	0.16	0.07	0.04	0.43	0.46

3. 2. 5 サイコサポニン含量

検討したUHPLC条件を用いて測定した結果は表10のとおりであった。5種類のサイコサポニンのうち日本薬局方で定量規定のあるSa及びSdの含量は、それぞれ0.33~0.91%、0.41~1.15%であり、日本薬局方で総サポニン含量として定義されているSaとSdの定量値の合計は0.74~2.05%とHPLC法と同様の値を示し、すべての試料で総サポニン含量規格である0.35%以上を満たしていた。Sb1及びSb2の含量は他のサイコサポニンと比べ微量であり、UHPLC法による分析では夾雑成分とピークが重なり定量下限値を下回る試料もあった。Scの含量は0.09~0.48%であり、HPLC法と同様に県内で栽培された試料⑨が他に比べて高値を示した。

表10 UHPLC法を用いたサイコサポニンの含量

(n=3, 単位: %)

試料番号	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd	総サポニン (Sa+Sd)
①	0.55	-	0.0072	0.23	0.75	1.30
②	0.59	0.0024	0.0082	0.27	0.81	1.40
③	0.90	0.0009	0.0120	0.25	1.15	2.05
④*	0.61	0.0045	0.0166	0.32	0.96	1.57
⑤	0.33	0.0009	0.0023	0.09	0.41	0.74
⑥	0.49	-	-	0.20	0.64	1.14
⑦	0.91	-	0.0056	0.14	1.11	2.01
⑧*	0.56	0.0043	0.0015	0.24	0.81	1.38
⑨*	0.66	0.0040	0.0020	0.48	0.97	1.63

*は日本産。また、定量下限値未满是 - と表記した。

3. 3 LC/MS/MSによるサイコサポニン分析の検討

3. 3. 1 分析条件の検討

インフュージョンによる各種パラメータの最適化及びフローインジェクションアナリシス (FIA) によるイオンソースの最適化を行った結果、表4に示すMRM条件が得られた。Sc以外のサイコサポニンはQ1, Q3ともほぼ同じ値であったが、保持時間の違いにより分析可能であった。

3. 3. 2 検量線の直線性

検量線は、混合標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.005~0.2µg/mLの範囲でピーク面積を用いて絶対量線を作成したところ、相関係数が0.998以上となる良好な直線が得られた。

3. 3. 3 定量下限値

検量線の最低濃度においてS/N比を求めたところ、全

てS/N比 ≥ 10を満たしていたため、定量下限値は0.005µg/mLとした。

3. 3. 4 抽出法の検討

HPLCによる分析では分離に影響する夾雑成分を除去するため前処理に時間を要するが、より高感度で選択性の高いLC/MS/MSを用いることで前処理の簡略化が期待できる。そこで、前処理時間の短縮及び操作の簡略化を図るため以下の5つの抽出法を検討した。

- ①メタノール10mLを加え、攪拌する。
- ②メタノール10mLを加え、攪拌後、30分超音波にかける。
- ③メタノール10mLを加え、攪拌後、30分振とうする。
- ④メタノール10mLを加え、攪拌後、60°C30分加温する。
- ⑤メタノール10mLを加え、攪拌後、60°C60分加温する。

抽出法①を用いて得られたピーク面積を100%としたときの各抽出法の割合を図5に示す。このように60°Cで加温した抽出法が他の抽出法より大きいピーク面積が得られた。加温時間を長くしても大きな差が見られなかったため、抽出は60°Cで30分加温とすることとした。

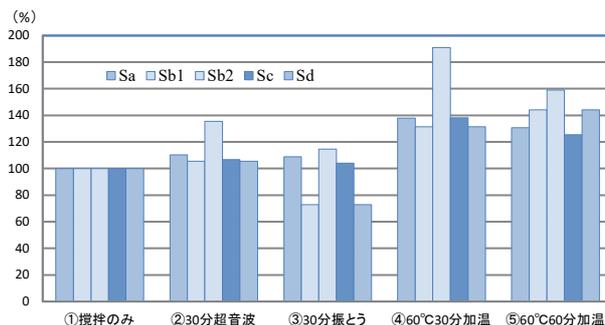


図5 LC/MS/MS分析での抽出法の検討 (n=1)

3. 3. 5 添加回収試験

サイコサポニンを含まないブランク試料として、生薬で同じく根を薬用部位とするガジュツを用いて、各サイコサポニンが最終濃度0.01µg/mLとなるよう添加回収試験を行ったところ、回収率は70.1~95.4%の範囲で良好な結果であった。しかしながら、HPLCの分析法に比べやや低い回収率となった (表11)。

表11 添加回収試験結果 (LC/MS/MS)

	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd
添加回収率 (%) (n=3の平均値)	75.0	95.4	88.7	70.1	93.4

4 まとめ

柴胡中に含まれる5種類のサイコサポニンについて、当センターで所有する機器を用いた分析が可能となった。日本薬局方の8品目及び県内圃場の柴胡における総サポニン含量について産地による明確な差は見られなかったが、Scの含有量については県内圃場で栽培されたものが高値を示した。しかしながら、県内で栽培された検体数が少なく、含量の差を明確にするにはさらに多くの検体数が必要である。UHPLC法による分析においては、微量に含有されるSb1やSb2の分析には適さなかったがそれら以外のSa, Sc, Sdについては分析可能であり、HPLC法に比べ分析時間の短縮を図ることができた。また、LC/MS/MSによる分析については分析条件を確立することができたため、今後、柴胡中に微量に含まれるSb1及びSb2の含有量について調査を実施し、柴胡の品質評価のための基礎としたい。

参考文献

- 1) 日本漢方生薬製剤協会；原料生薬使用量等調査報告書（4）－平成25年度および平成26年度の使用量－，
<http://www.nikkankyo.org/serv/pdf/shiyouryou-chousa04.pdf>（2018/2/22アクセス）
- 2) 農林水産省；茶・薬用作物等地域特産作物体制強化促進事業，
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/yakuyou/attach/pdf/yakuyou-2.pdf>（2019/8/13アクセス）
- 3) 公益財団法人日本特産農産物協会；地域特産作物（工芸作物，薬用作物及び和紙原料等）に関する資料（平成29年産）
http://www.jsapa.or.jp/pdf/Acrop_Jpaper/nousakumotuchousah29.pdf（2019/8/13アクセス）
- 4) 日本薬局方解説書編集委員会；第十七改正日本薬局方解説書，D-356～363，廣川書店（2016）
- 5) 伊達英代，中島安基江，他；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，広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告，24，27～31（2016）