人参サボゲニンのシリカゲル液・固クロマトグラフィー における溶出挙動

国弘 和雄[®]， 山口 啓之^{*}， 原 昭 二^{**}

(1981 年 9 月 21 日受理)

薬用人参サボゲニンと、その誘導体の高性能液体クロマトグラフィーで、シリカゲル、二成分溶媒系の保持比と溶出溶媒成分のモル濃度の相関を調査し、各サボゲニンの溶出挙動と溶媒の溶出強度を定量的に評価した。二成分系溶媒の希釈剤として、ヘキサン、ベンゼン、ジクロロメタンを、強溶出溶媒には、ジエチルエーテル (B_1)、酢酸エチル (B_2)、アセトン (B_3)、テトラヒドロフラン (B_4)、ジオキサン (B_5)、2-プロパノール (AB)、を用いた。サボゲニンとその誘導体の溶出は、パナキサジオールがパナキサトリオールより早く、又、ベンゾエートはアセテートより、アセテートは遊離サボゲニンより早かった。強溶出溶媒の溶出力は、 $B_1 < B_2 < B_4 \approx B_5 < B_3 < AB$ であった。

1 緒 言

医薬品としての天然物、生薬の成分を分離・同定し、定量することは、その品質を評価し、生物活性等を研究する上で重要な過程である。各種のクロマトグラフィーは有効な方法として応用されるが、特に高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) は、その高分離能や迅速性から大きな役割を果たしつつある。しかし、充てん剤、溶離液などの分離システムの選択は、経験や勘に基づく試行錯誤の繰り返しであり、最適条件を見いだすことは困難な作業である。そこで、分離条件の最適化を系統化するとは、研究の能率化・高度化に有用な試みと言える。

Snyder は、液・固クロマトグラフィー (LSC) の溶媒と溶質分子の吸着剤表面における競合のモデルを基礎として溶媒強度の概念を提出し、そのパラメーター (ϵ°) を実験的に算出した¹⁾。又、Neher は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) のデータから、等溶出力を持つ二成分溶媒組成を相対的に評価しようと試みた²⁾。著者らの一人、原は、溶媒・溶質間の吸脱着平衡に質量作用の法則を適用して導かれた、保持比と溶媒濃度の関係

$$\log k' = c - n \log X_s \quad \dots\dots\dots (1)$$

* 湧永薬品(株)中央研究所：広島県高田郡甲田町下甲 1624

** 東京薬科大学：東京都八王子市堀之内 1432

が、シリカゲルを充てん剤とする二成分溶媒系の LSC で多くの化合物について成り立つことを確認している³⁾。ここで、 k' は保持比、 X_s は強溶出溶媒成分の mol/mol %、 c , n は定数である。

今回著者らは、薬用人参のサボゲニンとその誘導体についてシリカゲル、二成分溶媒系での k' と X_s の相関を調査し、サボゲニンの溶出挙動及び溶媒の溶出強度を定量的に評価することを試みた。

2 実 験

2.1 装 置

送液ポンプとして SP 024 型 (日本分光製)、注入器として VL 611 型 (日本分光製)、検出器として示差屈折計 (LDC 製) を使用した。

2.2 カラム

250 mm × 4 mm i. d. のステンレスカラム管に球状シリカゲル [ワコーゲル LG-5K, 孔径 90 Å, 粒径 5 μm (和光純薬)], をクロロホルムのスラリーとしてカラム管に入れ、加圧送液して充てんした。

2.3 試 薬

薬用人参 (*panax ginseng*) より抽出精製したサボニン を分解して panaxadiol (PD), panaxatriol (PT) を得た⁴⁾⁵⁾。更に各々をビリジン中で無水酢酸によりアセチル化、ビリジン中で塩化ベンゾイルによりベンゾイル化して、panaxadiol acetate (PDA), panaxatriol acetate

(PTA), panaxadiol benzoate (PDB), panaxatriol benzoate (PTB), を得た。それぞれ TLC の挙動と IR, NMR スペクトルを標品と比較して構造を確認した。又、他のデータ⁸⁾⁹⁾との相関を可能とするため、保持挙動既知のコレステロール (和光純薬, 試薬特級) を基準物質として用いた。

溶離溶媒は市販品 (和光純薬, 試薬特級) を使用した。

2.4 HPLC 操作

流速を 1.0 ml/min, 圧力を (30~50) kg/cm² に設定した。サボゲニン試料を (1~5) mg/ml の割合で溶離溶媒 (不溶の場合はジクロロメタン) に溶解して試料液とし, (5~10) μ l の試料液をカラムに注入した。温度を (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度を (60 $\pm$ 5) % に設定した室内で HPLC を行った。

保持比 k' は次の式を用いて計算した。 $k' = (t_R - t_0) / t_0$, ただし, t_R は保持時間, t_0 はホールドアップタイムで, ヘキサンを注入して測定した。

3 結果と考察

3.1 サボゲニンの構造と溶出挙動

試料として用いた PD, PT 及びそれぞれのアセテート, ベンゾエート及びコレステロールの構造式を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 Structural formulas of triterpenoid sapogenins and their derivatives

シリカゲル LSC における溶質の溶出挙動は, シリカゲル表面のシラノール基に対する溶質と溶媒分子の吸・脱着モデルから説明できる。この場合, 水素結合能が重要な相互作用であるから, 溶質の構造と保持挙動との相関を検討するため, 水素結合能の無いヘキサンを希釈溶媒として用い, 種々の強溶出溶媒を加えて二成分系を調

製した。

著者らの一人, 原は, 溶離溶媒を希釈剤:ヘキサン (O), ベンゼン (P), ジクロロメタン (N), 強溶出溶媒: ジエチルエーテル (B₁), 酢酸エチル (B₂), アセトン (B₃), テトラヒドロフラン (B₄), ジオキサン (B₅), 2-プロパノール (AB) に分類し⁹⁾, 溶媒の最適化を系統化している。ここではヘキサン/強溶出溶媒, すなわち O+B₁, O+B₂, O+B₃, O+B₄, O+B₅, O+AB の二成分系を適用し, B 又は AB の濃度を変え各試料の保持容量を測定した。

既に Soczewinski らによって TLC で⁶⁾, 又, 原らによってステロイド^{7)~10)}, ペプチド¹¹⁾, アルカロイド¹²⁾, その他の HPLC で k' と X_s の両対数との直線関係 (1) 式が実験的に証明されているが, 薬用人参のサボゲニンとその誘導体においても広い濃度範囲で同じ関係が成り立つことを確認した。PD, PDA, PT, PTB の実験データからの相関直線を Fig. 2 に示した。相関係数は 0.994~0.999 であった。

ここに得られた結果から, 試料の各溶媒系での溶出順位について考察した。溶出順位は大部分の溶媒系において

PD>PT; ベンゾエート>アセテート>遊離サボゲニン

であった。ただし, 不等号の大きさは溶出が早いことを意味する。これは, 吸・脱着において, 溶質分子中の水酸基が最も大きな影響を持つこと, その数が溶質分子の充てん剤への吸着を強くすることを示している。同一のサボゲニンについてベンゾエートはアセテートより吸着が弱い。又, 水素結合力の強い溶媒として, B₄, B₅ を含む O+B₄, O+B₅ では PTA と PTB の溶出挙動が近接している。O+AB と O+B 系の溶媒とは溶出挙動が異なり, アセテートとベンゾエートとの分離係数は, 後者より前者で大きくなる。又, 溶出順位の逆転が観測された (試料 4, 5)。

O+B₁ 及び B₂ 系を適用した場合のように, 基準物質として用いたコレステロールの溶出挙動は, サボゲニン類と平行しないことがあり, 強溶出溶媒の組成が異なるとサボゲニン類との相対的な溶出順位も変化する。

3.2 溶離溶媒の溶出力の評価

3.2.1 強溶出溶媒 強溶出溶媒の相対強度をより定量的に評価するため, 一定の試料 PTB について, O+B 及び O+AB のすべての溶媒の k' と X_s の関係を同一の図にプロットし, 実線で示した (Fig. 3)。又, 他の試料 PT, PDA, PTA, PDB, PTB, コレステ

Fig. 2 (a)~(f) Correlation between the logarithm of the capacity ratio (k') and the logarithm of the stronger solvent composition in hexane-the stronger solvent binary system

Samples—1: panaxatriol; 2: panaxadiol; 3: panaxatriol acetate; 4: panaxatriol benzoate; 5: panaxadiol acetate; 6: panaxadiol benzoate; 7: cholesterol; Solvent systems—O+B₁=hexane-diethyl ether; O+B₂=hexane-ethyl acetate; O+B₃=hexane-acetone; O+B₄=hexane-tetrahydrofuran; O+B₅=hexane-dioxan; O+AB=hexane-2-propanol

ロールについては, 定数 c , n の PD との相対値を計算した。試料により相対強度は異なるが, この図から, 強溶出溶媒の相対的な強度を推定することができる。

強溶出溶媒のサポゲンin類への溶出力に関する実験結果 (Fig. 3) から, 同一の溶質についての溶出力の順位は, ほぼ次のようになる。

$$O+B_1 < O+B_2 < O+B_4 < O+B_5 < O+B_3 < O+AB$$

そこで, 強溶出溶媒の溶出力は

$$B_1 < B_2 < B_4 \approx B_5 < B_3 < AB \text{ となる。}$$

3.2.2 希釈溶媒 3.1 及び 3.2.1 ではヘキサン(O)を希釈溶媒として用いたが, 弱い水素結合能を持つベンゼン(P)やジクロロメタン(N)も希釈溶媒として使用できる。そこでこれらの希釈剤相互の溶出強度を比較するため, 強溶出溶媒として酢酸エチル(B₂)を用い, O+B₂, P+B₂, N+B₂ における X_s と k' との相関を PD と PT を溶質として調査した。その結果, k' と X_s の間の相関直線は, 軸上の一点に収れんすることが分かった (Fig. 4)。又希釈剤相互の溶出能は

Fig. 3 Logarithm of capacity ratios on silica gel as a function of the logarithm of the concentration of the stronger solvent-hexane
Sample: panaxatriol benzoate; Solvent components as in Fig. 2.

Fig. 4 Correlation between the logarithm of the capacity ratio (k') and the logarithm of the stronger solvent composition in diluent-ethyl acetate binary system

Samples: PD=panaxadiol; PT=panaxatriol; Diluents: O=hexane; P=benzene; N=dichloromethane

$$O < P < N$$

である。

3.3 溶媒最適化の考察

Fig. 3 に示した k' と X_s の相関から、一定の k' の点から横軸の平行線を引き、これと各相関直線の交点を求める。この交点の X 軸上の読みが強溶出溶媒のモル濃度を示し、等しい保持比を持つそれぞれの溶媒の濃度

を求めることができる。更に 3・2・1 で指摘したように、溶出順位の逆転する事実などにも注目し、与えられた試料に対して好ましい分離係数を持つ溶媒の種類と濃度を最適化することができる。

ここに述べたサボゲニンの溶出挙動及び溶媒の相対強度に関する知見は、類縁化合物をはじめとして、広い範囲の混合物試料の分離の設計にも適用できる。

(1980 年 10 月, 本会第 29 年会において発表)

文 献

- 1) L. R. Snyder: "Principles of Adsorption Chromatography", p. 192, (1968), (Marcel Dekker, New York).
- 2) R. Neher: Steroid Chromatography, 2nd. Ed. p. 249, (1964), (Elsevier, Amsterdam).
- 3) 原 昭二, 森 定雄, 花井俊彦: "クロマトグラフィー分離システム", p. 161 (1981), (丸善).
- 4) 藤田路一, 糸川秀治, 柴田承二: 薬誌, **82**, 1634 (1962).
- 5) S. Shibata, O. Tanaka, K. Sōma, Y. Iida, T. Ando, H. Nakamura: *Tetrahedron Lett.*, 207 (1965).
- 6) E. Soczewinski, J. Jusiak: *Chromatographia*, **14**, 23 (1981).
- 7) S. Hara: *J. Chromatogr.*, **137**, 41 (1977).
- 8) S. Hara, Y. Fujii, M. Hirasawa, S. Miyamoto: *J. Chromatogr.*, **149**, 143 (1978).
- 9) S. Hara, M. Hirasawa, S. Miyamoto, A. Ohsawa: *J. Chromatogr.*, **169**, 117 (1979).
- 10) S. Hara, A. Ohsawa: *J. Chromatogr.*, **200**, 85 (1980).
- 11) S. Hara, A. Ohsawa, A. Dobashi: *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 409 (1981).
- 12) S. Hara, N. Yamauchi, C. Nakae, S. Sakai: *Anal. Chem.*, **52**, 33 (1980).

☆

Retention behavior of panax ginseng sapogenins in silica gel liquid-solid chromatography Kazuo KUNIHIRO, Hiroyuki YAMAGUCHI*, and Shoji HARA** (*Central Research Laboratory, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., 1624, Shimokotachi, Koda-cho, Hiroshima; **Tokyo College of Pharmacy, 1432, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo)

To optimize the conditions of liquid-solid chromatographic system, it is necessary to examine systematically the retention behavior of given samples. In this paper, correlation between logarithm of capacity ratio (k') and logarithm of molar concentration of strong eluent (X_s) on silica gel-binary solvent system was quantitatively investigated. Sapogenins and its derivatives from *panax ginseng* were used as model samples. Experiments of HPLC were performed using a S.P. 024 pump (JASCO), VL 611 injector (JASCO), RI detector (LDC), and stainless steel column (250 mm×4 mm i.d.) packed with spherical shaped silica gel [LC-5K(Wako pure chem.)] as adsorbent. Binary solvent consisted of diluent [hexane (O), benzene

(P), dichloromethane (N)] and strongly eluting solvent [diethyl ether (B_1), ethyl acetate (B_2), acetone (B_3), tetrahydrofuran (B_4), dioxan (B_5), 2-propanol (AB)]. All experimental results were obtained at ambient temp $\{(23 \pm 2)^\circ\text{C}\}$ and humidity $\{(60 \pm 5)\%\}$. Panaxadiol was eluted faster than panaxatriol. Benzoate was eluted faster than acetate, and the latter faster than free sapogenin. The order of strength

of the eluents were found to be $B_1 < B_2 < B_4 \approx B_5 < B_3 < \text{AB}$, and the diluents $\text{O} < \text{P} < \text{N}$.

(Received Sept. 21, 1981)

Keyword phrases

liquid-solid chromatography; silica gel-binary solvent system; panax ginseng sapogenins.

ガスクロマトグラフィーを用いたヒト血しょう総脂質の 高級脂肪酸の定量法について

小沢 昭夫, 高柳香都子, 藤田 孝夫*, 平井 愛山®,
浜崎 智仁, 寺野 隆, 田村 泰, 熊谷 朗**

(1981 年 9 月 21 日受理)

エスキモー人の疫学調査により魚脂中に多く含まれる ω -3 の高級多価不飽和脂肪酸の抗血栓, 抗動脈硬化作用が注目されている。ヒト血しょう総脂質中の高級脂肪酸を精度よく測定するためにキャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフを用い血しょうより Folch らの方法で抽出し BF_3 メタノールでエステル化した試料を分離分析したところ良好な成績が得られた。本法での抽出操作を含めた再現性はアラキドン酸, エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸のいずれについても 5% 以下と良好で各々のメチルエステルを用いて得られた添加回収率もほぼ 100% と良好な値を示した。又検量線もいずれの脂肪酸について良好な成績が得られ, 又実際の実験食投与の健康人においても有意の脂肪酸の変動が認められたことから本法は血しょう総脂質中の高級脂肪酸の定量法の一つとして有用と考えられる。

1 緒 言

グリーンランドのエスキモー人についての疫学調査の結果, 魚脂中に多く含まれる ω -3 の多価不飽和脂肪酸特に ω -3, エイコサペンタエン酸 (以下 $\text{C}_{20:5}$ と略記) に抗血栓, 抗動脈硬化作用のあることが明らかにされ, 血栓性疾患の手段として注目を集めている¹⁾。それに伴い血しょう中の高級脂肪酸の測定は必ずのものとなりつつあるが, 従来から用いられている (10~20)% の DEGS を用いた充てんカラム²⁾³⁾ では ω -6, $\text{C}_{20:4}$ と $\text{C}_{22:1}$ との分離ができないなどの欠点があった。そこで著者らは DEGS キャピラリーカラムを用いて EPA を中心に血しょう中の総脂質中の高級脂肪酸を定量的に測

定する方法を確立したので以下に報告する。

2 試薬, 器具及び装置

2.1 試薬及び器具

アラキドン酸 (ω -6, $\text{C}_{20:4}$ 以下 $\text{C}_{20:4}$ と略記), $\text{C}_{20:5}$, ドコサヘキサエン酸 (ω -3 $\text{C}_{22:6}$ 以下 $\text{C}_{22:6}$ と略記) 及びその他の脂肪酸メチルエステルの標準品はアブライドサイエンスラボラトリー社の製品を用いた。クロロホルム, メタノール, エタノール, ヘキサン, ベンゼン, 水酸化カリウム, 塩酸, 無水硫酸ナトリウム, 14% トリフルオロベンゼン (BF_3) は和光純薬の特級品を用いた。又血しょう試料の調製には採血社製のヘパリンナトリウム入りベノジェット真空採血管を用いた。

2.2 装 置

ガスクロマトグラフは日立製 063 型水素炎イオン化検出器付きのものを用いた。データ処理装置としては島津製クロマトバック C-R1A を用いた。

* 日本水産 (株) 中央研究所: 東京都八王子市北野町 1134-1

** 千葉大学医学部第二内科: 千葉県千葉市亥鼻 1-8-1