薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104(7) 812-815 (1984)

サイコ含有漢方エキス製剤中の Saikosaponin の定量

山路 昭,^{*,a} 前田義美,^a 大石雅子,^a 廣谷芳彦,^a
紀氏汎恵,^a 平岡栄一,^a 米田該典^b
大阪大学医学部附属病院薬剤部,^a 大阪大学薬学部^b

Determination of Saikosaponins in Chinese Medicinal Extracts Containing Bupleuri Radix

AKIRA YAMAJI,^a YOSHIMI MAEDA,^a MASAKO OISHI,^a YOSHIHIKO HIROTANI,^a
HIROE KISHI,^a EIICHI HIRAOKA,^a and KAISUKE YONEDA^b

Department of Pharmacy, Osaka University Hospital,^a 1-50 Fukushima 1-chome,
Fukushima-ku, Osaka, 553, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University,^b 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565, Japan

(Received January 9, 1984)

The quantitative analysis of saikosaponins in Chinese medicinal preparations containing Bupleuri Radix was investigated. Saikosaponins-b₁ and -b₂ in the KOH-MeOH extracts from these preparations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) on LiChrosorb RP-18 column with a mobile phase of MeOH-H₂O-AcOH-Et₃N (75:25:0.2:0.2). Saikosaponins-a and -d were converted quantitatively into the corresponding -b₁ and b₂ by mild acid treatment of the extracts, and determined by HPLC method.

This methods were applied to pharmaceutical evaluation of seven kinds of Chinese medicinal preparations containing Bupleuri Radix and other miscellaneous crude drugs. The all preparations contained considerable amounts of saikosaponins-b₁ and -b₂ which were regarded as the secondary products from -a and -d at the manufacturing procedure. Nineteen commercial products of Daisaiko-tō and Shōsaiko-tō contained 33—526 of saikosaponin-a, —281 of -d, 8—449 of -b₁ and 5—335 μg/g of -b₂.

Keywords—saikosaponin; Bupleuri Radix; Chinese medicinal preparation; Daisaiko-tō; Shōsaiko-tō; HPLC

小柴胡湯、大柴胡湯などのサイコ (Bupleuri Radix) を含む漢方方剤は、抗炎症・抗アレルギー作用を有し、難治性の慢性肝炎、腎炎などの治療薬として、近年注目されている。サイコの有効成分である saikosaponin (-a, -c, -d) の定量法に関しては、高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す) 法,¹⁾ 薄層クロマトグラフィー法,^{2,3)} などの報告があるが、サイコを含む漢方エキス製剤中のそれらの定量法に関する報告はみられない。

著者らはサイコ含有漢方エキス剤中の saikosaponin (-a, -d) とエキス剤製造工程中に二次的に生成すると考えられる saikosaponin (-b₁, -b₂) の分別定量法を検討し、市販サイコ方剤中の saikosaponin を定量したので報告する。

実 験 の 部

試料および標準品 サイコを含有する漢方方剤として、大柴胡湯・小柴胡湯・柴胡桂枝湯・柴胡加竜骨牡蠣湯・加味逍遙散・四逆散・乙字湯を用い、各々、津村順天堂製のエキス顆粒を使用した。上記方剤の配合生薬 20 種類は生薬市場品を用いた。大柴胡湯および小柴胡湯については、品質試験を目的として、薬価収載品の市販銘柄を各々、11 品目、8 品目入手した。Saikosaponin-a, -c, -d, -b₁, -b₂ (以後各々 a, c, d, b₁, b₂ と略す) の各標準品はカネボウ薬品の供与品を使用した。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

測定方法 試料粉末約 2 g を精確に秤取し、0.2% KOH・メタノール溶液 4 ml で、共栓付遠沈管内にて 1

分間振とう抽出した。遠心分離後、上澄液の一部を HPLC に注入し、試料中の b_1 , b_2 を標準品の検量線より定量した。次に上澄液 1 ml に 4% 塩酸水溶液 1 ml を加え、室温 (25°C)・16 時間放置し、抽出液中の a , d を各々 b_1 , b_2 に変換させ、4% NaOH 水溶液 1 ml で中和後、HPLC 法で測定した。得られた b_1 , b_2 のピーク面積から酸処理前の b_1 , b_2 のピーク面積を差し引き、標準品の a , d の酸処理後の検量線より、試料中の a , d を算出した。

HPLC の条件 装置: 島津 LC-3A 型, カラム: メルク社製ハイパーカラム LiChrosorb RP-18 (250 mm × i.d. 4 mm), 溶離液: メタノール-水-酢酸-トリエチルアミン (75 : 25 : 0.2 : 0.2), 流量: 1.2 ml/min, 検出器: UV 254 nm, 定量: 島津 CR-1A 型クロマトパックでピーク面積を測定。

結果および考察

HPLC による Saikosaponin の定量法

生薬サイコ中の saikosaponin の定量法としては, a , d を緩やかな酸処理により, それぞれ diene 体の b_1 , b_2 に定量的に変換させ, UV に強い吸収をもたせて, HPLC など定量する方法が報告されている。¹⁻³⁾ しかし漢方エキ剤のような方剤では, 他の配合生薬の影響や, エキ剤製造工程ですでに a , d が b_1 , b_2 に変換していることも予測されるので, それらを考慮した分別定量法が必要である。著者らはサイコ含有漢方エキ剤を弱アルカリ性メタノールで抽出し, 製剤中に存在する b_1 , b_2 をあらかじめ測定し, その後, 酸処理により a , d を b_1 , b_2 として定量する方法を検討した。

HPLC の条件を種々検討した結果, 逆相分配型充填剤の LiChrosorb RP-18 を用い, メタノール・水・酢酸・トリエチルアミン系の溶離液で b_1 , b_2 , diene C の良好な分離を得ることができた (Fig. 1)。また標準品の a , c , d は, 無処理ではピークを示さなかったが, 酸処理により, b_1 , diene C, b_2 のピークが得られた。 b_1 , b_2 および a , c , d 酸処理物の各々の標準品の検量線は, 絶対量とピーク面積の間に良好な直線性を示した。

生薬サイコの弱アルカリ性メタノール抽出物では, saikosaponin のピークを認めなかったが, 酸処理後のクロマトグラムでは b_1 , diene C, b_2 のピークが得られ, それぞれ対応する a , c , d が確認された。つぎにサイコ含有漢方エキ剤中の他の常用配合生薬 (19 種) の影響をしらべた。ハンゲ, オウゴン, シャクヤク, タイソウ, キ

Fig. 1. High Performance Liquid Chromatograms of KOH-MeOH Extracts from Daisaikotō

Column: LiChrosorb RP-18 (250 × i.d. 4 mm).
Mobile phase: MeOH-H₂O-AcOH-(C₂H₅)₃N (75 : 25 : 0.2 : 0.2).
Flow rate: 1.2 ml/min, detector: UV 254 nm.
Peak 1: diene-saponin C, 2: saikosaponin b_2 , 3: saikosaponin b_1 .

ジツ, ショウキョウ, ダイオウ, トウキ, カンゾウ, ショウマ, ニンジン, ケイヒ, ブクリョウ, ボレイ, リュウコツ, ソウジュツ, サンシン, ボタンビ, ハッカの各抽出液および酸処理液について, b_1 , b_2 と重なるピークは認められなかった. しかし diene C については, ダイオウ, カンゾウ, ソウジュツ, キジツ, オウゴン成分ピークと重複し, C の定量は困難であった. 以上の事よりサイコ含有漢方エキ剤 (大柴胡湯・小柴胡湯・柴胡桂枝湯・柴胡加竜骨牡蠣湯・加味逍遙散・四逆散・乙字湯) 中に存在する b_1 , b_2 , a, d を本法の HPLC 法で定量できることが判った.

サイコを含む各種漢方エキ剤中の Saikosaponin の定量

漢方エキ剤からの抽出溶媒については, 既報⁴⁾ のメタノール抽出につき検討したが, この抽出過程で a, d が一部 b_1 , b_2 に変換するため, それらの安定性を考慮して, 弱アルカリ性メタノールを選択した. すなわち 0.2% KOH・メタノールを用いた漢方エキ剤 (7 種) の各抽出液の pH は 6.8—9.0 であり, 定量操作中, a, d は全く安定であった.

酸処理の条件については木全らの方法¹⁾ を参考とし, 4% 塩酸水溶液を添加して経時的に調べた. その結果室温 (25°C)・12 時間以上で, 定量的に a, d が b_1 , b_2 に変換されることが判った.

本法を用いて, 漢方エキ剤中の saikosaponin を定量した. 一例として大柴胡湯エキ剤での抽出液および酸処理液のクロマトグラムを Fig. 1 に示した. 大柴胡湯エキ剤中に b_1 , b_2 の存在がすでに認められ, 酸処理後, それらのピークが増加しているが, これはエキ剤中の a, d が b_1 , b_2 に変換したためである. なお本法の再現性を大柴胡湯エキ剤で 10 回測定したが, その変動係数は a 4.6%, d 8.4%, b_1 1.4%, b_2 1.3% であり, 良好な結果が得られた.

サイコ含有の常用方剤 (7 種) の市販エキ剤での定量結果を Table I に示した. 各製剤中に a, d および b_1 , b_2 が認められた. a は b_1 にくらべてかなり高い値であるが, d は b_2 にくらべて低い値を示した. これは d が a にくらべて不安定で, 漢方エキ剤中では b_2 の含量が高いものと考察される. サイコの KOH・メタノール抽出液では b_1 , b_2 は全く認められなかったため, エキ剤中の b_1 , b_2 は抽出などの製剤工程で, 配合生薬中の有機酸などによって, a, d のエーテル環が開裂するものと考えられる.⁵⁾ なお漢方エキ剤 7 種のメタノール抽出液の pH は 5.5—6.6 であった.

大柴胡湯, 小柴胡湯の市販エキ剤の品質試験

大柴胡湯および小柴胡湯については, 現在薬価の異なる多数の銘柄の医療用エキ剤が市販されている. 漢方エキ剤では原料生薬の品質とともに, 抽出・濃縮・エキ化・製剤化 (顆粒, 錠剤) などの製造工程が各社によ

TABLE I. Quantities of Saikosaponins in Chinese Medicinal Extracts Containing Bupleuri Radix

Medicine	Saikosaponin ($\mu\text{g/g}$)			
	a	d	b_1	b_2
Daisaiko-tō	183	50	76	135
Shōsaiko-tō	266	89	45	114
Saikokeishi-tō	132	3	19	64
Saikokaryūkotsuborei-tō	142	28	3	30
Kamishōyō-san	214	4	57	136
Shigyaku-san	559	77	119	343
Otsuji-tō	770	260	115	332

TABLE II. Quantities of Saikosaponins in Commercial Products of Daisaiko-tō and Shōsaiko-tō

Product	Saikosaponin ($\mu\text{g/g}$)			
	a	d	b_1	b_2
Daisaiko-tō				
A	33	N.D. ^{a)}	62	21
B	51	6	8	12
C	234	158	107	120
D	110	12	48	52
E	386	193	97	212
F	156	N.D.	101	165
G	66	12	190	98
H	183	50	76	135
I	306	281	330	182
J	148	38	96	140
K	208	168	449	335
Shōsaiko-tō				
A	65	N.D.	49	5
B	442	155	49	215
C	132	N.D.	34	104
D	137	36	96	207
E	266	89	45	114
F	526	213	58	205
G	391	190	322	291
H	236	65	136	158

a) N.D.: 1 $\mu\text{g/g}$.

って異なっており、有効成分の含量の相違が指摘されている。今回、著者らは大柴胡湯、小柴胡湯の市販製剤の品質試験の一環として、本法を適用した。Table II に大柴胡湯 11 銘柄および小柴胡湯 8 銘柄での各 saikosaponin の定量結果を示す。両方剤ともに、市販の銘柄間にかかなりの含量差が認められた。

Saikosaponin の薬理作用については、a・d が抗炎症・溶血活性が強く、b₁・b₂ は抗アレルギー作用が強いと報告されている。⁶⁾ Saikosaponin の薬理作用の違いを考慮すると、漢方エキス製剤中の saikosaponin-a, -d, -b₁, -b₂ の分別定量の必要性があり、本法の実用性も高いと思われる。

謝辞 本研究に際し、saikosaponin の各標準品を提供していただいたカネボウ薬品株式会社漢方研究所に謝意を表します。

引用文献

- 1) H. Kimata, C. Hiyama, S. Yahara, O. Tanaka, O. Ishikawa, M. Aiura, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1836 (1979).
- 2) 赤堀 昭, 香川清水, 島岡有昌, 生薬学, **29**, 99 (1975).
- 3) 木全裕子, 藤岡尚美, 田中 治, 宮崎幸男, 生薬学, **34**, 311 (1980).
- 4) 山路 昭, 前田義美, 廣谷芳彦, 紀氏汎恵, 大西 昇, 平岡栄一, 米田該典, 薬剤学, **43**, 175 (1983).
- 5) 赤堀 昭, 香川清水, *Proc. Symp. WAKANYAKU*, **10**, 62 (1977).
- 6) 有地 滋, 治療学, **7**, 693 (1981).