薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (4, 5) 234-240 (1991)

ヘッドスペースガスクロマトグラフィーによる生薬含有成分の検討 (第1報)
サイシンの含有成分について¹⁾

岡 由季恵*,^a 大槻一夫,^a 片木宗弘,^b 土橋 均^b
近畿大学薬学部,^a 大阪府警察本部科学捜査研究所^b

Study of Components in Crude Drugs by Head Space Gas
Chromatography. I. Components of Asiasari Radix¹⁾

Yukie OKA*,^a Kazuo OTSUKI,^a Munehiro KATAGI,^b
and Hitoshi TSUCHIHASHI^b

Faculty of Pharmaceutical Science, Kinki University,^a 3-4-1, Kowakae,
Higashiosaka, Osaka, 577, Japan and Forensic Science Laboratory,
Osaka Prefectural Police Headquarters,^b 3-1-16, Otemae,
Chuo-ku, Osaka, 540, Japan

(Received October 11, 1990)

Determinations of volatile components of essential oil contained in Asiasari Radix were studied by head space gas chromatography. The head space gas, which was generated by heating 0.2 g of crude drug with 1.0 ml of water at 90°C for 45 min, was analyzed directly by gas chromatography or gas chromatography-mass spectrometry. This method was rapid, and did not require tedious procedures and time consuming, and without contamination of the column.

Keywords—head space gas; head space gas chromatography; crude drug; Asiasari Radix; essential oil

一般的に生薬は、まず、外観、におい、味などの性状で識別する。しかし、性状の識別は長年の経験によるところが大きく、特に加工された生薬の識別は難しい。生薬は、成育地、採取時期、加工方法、保存状態、保存期間など種々の条件によって、性状に変化が認められなくても含有成分の組成が大きく変化することが認められている。また、成育場所や栽培条件によっては近縁植物との雑種化も多々認められる。日本薬局方では、生薬の確認試験として主な含有成分の定性試験を規定しているが、存在量についてはほとんど規定していない。大半の生薬は合成医薬品と異なり、数十種類の成分が存在し、その検出、確認には、呈色試験や薄層クロマトグラフィー (TLC)、最近では、ガスクロマトグラフィー (GC) や液体クロマトグラフィー (LC) など利用されている。しかし、従来の方法では、試料を多量に必要としたり、含有成分の溶媒抽出や純化など分析にあたっての前処理操作が煩雑で、長時間を要する。そこで、生薬を加熱処理したときの揮発性成分をヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HSGC) 法で迅速かつ簡便に分析・確認する方法を検討した。生薬の特定成分の分析についての HSGC 法の使用は報告されているが、²⁾ 生薬成分のパターン分析への利用は検討されていない。

HSGC 法は、血中アルコール、³⁾ 尿中覚せい剤、⁴⁾ 樹脂中の残留モノマー⁵⁾ など揮発性成分の微量分析にすぐれ、前処理にも煩雑な操作を必要としない。

今回、加熱によって比較的揮発しやすい成分を主に含有するサイシン (Asiasari Radix) をとりあげ、HSGC 法による精油成分の分析を試みた。

サイシンは、神農本草経上品に収載されている主要な漢方処方用薬であり、2—3% の精油を含有し、その主要成分は、safrole, methyleugenol, eucarvone, asaricine などである。^{6,7)} 漢方薬として使用されるサイシンは、ケイリンサイシンかウスバサイシンの根と根茎であるが、由来によっては主要成分の組成比が大きく異なる事が報告されている。⁸⁾ また、近縁植物が多く、代替品としてクロフネサイシンやオクエゾサイシンが混入している場合

がある。

そこで、サイシンについて HSGC の測定条件を検討すると共に、入手先の異なるサイシンや近縁植物の含有成分についても比較検討を行った。

実 験 の 部

生薬試料 サイシン (*Asiasari Radix*) は大阪市場品であるケイリンサイシン (*Asiasarum heterotropoides*) を使用した。二カ所の入手先からロット番号の異なる 3 種類のサイシンを入手した。近縁植物であるウスバサイシン (*Asiasarum sieboldii*: 山形県産, 奈良県産), クロフネサイシン (*Asiasarum dimidiatum*: 奈良県産), ミヤコアオイ (*Heterotropa aspera*: 奈良県産) は、採取後, 3 カ月間デシケーター中, 室温で乾燥したものを使用した。試料は、測定直前に粉砕機と乳鉢で 20 号ふるいを通過する大きさに粉末化して用いた。

内部標準物質 ピーク面積比法により検討を行うときは, 0.05% (w/v) の *p*-ジエチルベンゼンのメタノール溶液 0.1 ml を内部標準物質として水と同時に添加した。*p*-ジエチルベンゼンの GC での保持時間は 10.2 分である。

含有成分の標品 標品は, 東京化成工業 (株) 及び和光純薬工業 (株) 社製を使用した。

使用機器と測定条件 1) GC: 島津製作所製 GC-9A 型に CLH-702 型スプリット, FID 検出器を装着して使用した。カラムは CBP1-M25-025, 内径 0.20 mm, 長さ 25 m (島津製作所製, 溶融シリカキャピラリーカラム) を用いた。試料注入口温度は 220°C, カラム温度は 70°C から 190°C まで昇温 (5°C/min) した後, 190°C の定温で測定した。キャリアーガスにはヘリウムガスを用い, 線速度 17 cm/s で流した。スプリット比は 1:80 とした。

2) ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS): 島津製作所製 GC-MS, QP1000 型を使用した。カラムは CBP1-M25-025, 内径 0.20 mm, 長さ 25 m (島津製作所製, 溶融シリカキャピラリーカラム), 試料注入口温度は 220°C, カラム温度は 70°C から 190°C まで昇温 (5°C/min) した後, 190°C の定温で測定した。イオン化電圧は 70 eV, イオン源温度は 220°C である。

3) 恒温槽: 大洋科学工業 (株) 社製アルミブロック恒温槽 (TAH-B 型) を使用した。

4) バイアル瓶: 全容積 11 ml のアルミシールバイアルに, シリコンセプタムを組合せて使用した。

一般的操作法 サイシン 0.2 g, 水 1.0 ml をバイアル瓶に入れて密栓し, 90°C に設定した恒温槽にバイアル瓶全体が加熱されるように設置して, 45 分間加熱した。そのヘッドスペースガスをあらかじめ 150°C で保温しておいたガスタイトシリンジで 0.5 ml 分取して, 素早く GC 又は GC-MS に注入し測定した。

結 果 及 び 考 察

サイシンの分析条件の検討

1. 含有成分の同定 一般的操作法の項に記載している条件で測定したクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

各ピークの同定は, 標品の保持時間との比較, 並びに, 同一条件で測定した HSGC-MS から得られたマススペクトルを比較検討して行い, その結果を Table I に示した。

今回, HSGC によって, サイシンの成分としては未報告の物質であるピーク No. 10 の 3-carene を含有して

Fig. 1. Headspace Gas Chromatogram of Asiasari Radix

TABLE I. Determined Components of Asiasari Radix by Headspace Gas Chromatography

Peak No.	Component	Retention time (min)		Molecular ion peak	Fragment ion peaks (m/z)
		Standard	Found		
3	α -Pinene	7.56	7.57	136	93, 91, 92, 77, 41, 79, 121, 105
4	Camphene	7.89	7.91	136	41, 93, 67, 79, 121, 53, 91, 77
7	β -Pinene	8.51	8.52	136	93, 41, 69, 91, 79, 77, 121, 80
9	α -Phellandrene	9.11	9.10	136	93, 91, 77, 136, 65, 51, 79, 105
10	3-Carene	9.32	9.32	136	93, 91, 77, 79, 92, 41, 121, 80
11	<i>p</i> -Cymene	9.48	9.47	134	119, 91, 134, 77, 65, 117, 51, 115
13	D-(+)-Limonene	9.73	9.75	136	68, 67, 93, 41, 53, 79, 121, 106, 136
15	γ -Terpinene	10.43	10.41	136	93, 91, 77, 43, 41, 136, 121, 79
17	Terpinelene ^{a)}	—	11.23	136	93, 121, 136, 91, 79, 77, 105, 53
19	Eucarvone ^{a)}	—	12.68	150	107, 91, 150, 41, 79, 77, 136, 122
20	Borneol	13.28	13.26	154	95, 110, 55, 41, 139, 67, 69, 121
23	Estragol	13.88	13.84	148	148, 147, 121, 117, 77, 91, 105, 133
27	3,5-Dimethoxytoluene ^{b)}	—	15.57	152	152, 123, 91, 77, 79, 109, 121, 66
28	Safrole	16.33	16.30	162	162, 131, 51, 104, 103, 77, 135, 78
31	Methyleugenol	19.05	19.02	178	178, 164, 147, 107, 103, 91, 77, 135
32	3,4,5-Trimethoxytoluene ^{b)}	—	19.26	182	182, 167, 166, 139, 69, 58
35	Asaricine ^{b)}	—	21.48	192	192, 147, 53, 119, 91, 69, 65, 77
38	<i>n</i> -Pentadecane	22.18	22.12	212	43, 57, 71, 41, 85, 55, 56, 42
40	Elemicine ^{a)}	—	22.68	208	208, 193, 58, 43, 55, 91, 105, 77
41	Euasarone ^{b)}	—	23.13	208	208, 193, 58, 177, 165, 133, 69, 91
42	Kakuol ^{a)}	—	24.70	194	165, 44, 194, 107, 57, 69, 79

a) Assumed with the MS and a data book of MS.⁹⁾ b) Assumed with the MS only.

いることが確認された。

加熱時間、加熱温度、添加する水の量について検討するため、サイシンの主要成分である α -pinene, eucarvone, safrole, methyleugenol, asaricine のピーク面積の変化について、ピーク面積比法により検討した。

2. 加熱時間の検討 加熱時間を 15, 30, 45, 60, 90 分間に变化させたときの *p*-ジエチルベンゼンに対するピーク面積比を比較した結果を Fig. 2 (a) に示す。30 分以上の加熱で各成分とも面積比はほぼ一定になったので、測定時間の短縮とデータの再現性を考えて加熱時間は 45 分とした。

3. 加熱温度の検討 次に、加熱温度を 50°C, 70°C, 90°C, 110°C に設定し、45 分間加熱したときの結果を Fig. 2 (b) に示す。各々のピーク面積は、加熱温度が高いほど大きくなったが、110°C では面積比のバラツキが大きくなるので、加熱温度は水浴での温度調整も可能である 90°C に設定した。

4. 添加する水の量の検討 サイシン 0.2 g に水を加えないとき、及び、1.0 ml, 2.0 ml, 3.0 ml, 4.0 ml, 5.0 ml の水を加えた時の各ピーク面積を比較した結果を Fig. 2 (c) に示す。 α -Pinene は水を加えないときの方が加えたときより圧倒的にピーク面積は大きい、eucarvone, safrole, methyleugenol, asaricine は水を 1.0 ml 加えたときに最も大きなピーク面積を示し、水の添加量が増加するに伴って、各成分のピーク面積は小さくなった。クロマトグラフを全体的にみて、保持時間 10 分付近に検出される物質は、水を加えないときの方が加えたときより圧倒的に検出感度が良好であったが、保持時間の長い物質は水を加えたほうが検出感度がよくなった。 α -Pinene, β -pinene, camphene, limonene などのような低沸点物質は、精油成分含有生薬に共通の成分である事が多いので、今回は、保持時間が 10 分以上であるサイシンに特徴的な成分の検出に適した条件を設定することを目的に、水の添加量は 1.0 ml にした。

5. 塩析剤の検討 添加する水 1.0 ml に塩析剤として、KCl, NaCl, Na₂SO₄ を飽和量加えたときの塩析効果について検討した。各塩析剤での面積値の変化を Fig. 3 に示す。

Methyleugenol では KCl の使用で約 1.3 倍のピーク面積の増加が認められ、asaricine では、KCl, NaCl,

Fig. 2. Effect of Heating Time of the Vial (a), Heating Temperature of the Vial (b) and Water Volume in the Vial (c)

(a), heated at 90°C with 1.0 ml of water; (b), heated for 45 min with 1.0 ml of water; (c), heated at 90°C for 45 min.

○, α-pinene; △, eucarvone; ■, safrole; □, methyleugenol; ●, asaricine.

Na₂SO₄ とともに約 1.5 倍のピーク面積の増加効果が認められたが, safrole では塩析効果が小さかった. 塩析効果はすべての成分に認められるわけではなく, また操作を簡素化するために, 今回は塩析剤の添加を行わなかった.

6. 定量性の検討 1.0 ml の水が入っているバイアル瓶に, 0.1% の methyleugenol のメタノール溶液を 0.1 ml 加えて, 90°C で 45 分間加熱したときのヘッドスペースガスについて連続 14 回繰り返し分析した結果, methyleugenol の面積値の変動係数は 6.7% であった.

次に, 一般的操作法の項に記載してある条件で safrole と methyleugenol の添加回収率を求めた. まず, 水 1.0 ml に safrole と methyleugenol を加

えて HSGC による検量線を求めたところ, safrole, methyleugenol とともに 0.1–10.0 mg の範囲で直線性を示した. そこで, サイシン 0.2 g に safrole, methyleugenol 各 1.0 mg を添加し回収率を求めたところ, それぞれ 96%, 102% ($n=3$) であった.

また, サイシン 30.0 g を水蒸気蒸留して得られた精油 1.2 ml 中の safrole と methyleugenol の含量 % を GC による絶対検量線法で求め, safrole と methyleugenol の含量 % に換算したところ, それぞれ 0.99% 及び 1.35% であった. これらの値は, 一般的操作法の項に記載してある条件で, safrole と methyleugenol の標

Fig. 3. Effect of Salting-out

□, no salt; ▨, KCl; ▩, NaCl; □, Na₂SO₄.

品を一定量加えた標準添加法により求めた、サイシン 0.2 g に含まれる safrole と methyleugenol の含量 %, それぞれ 1.02%, 1.35% とよく一致した。

以上の結果より, HSGC 法により含有成分を定量できることが明らかになった。

種々のサイシンの HSGC

1. 入手先による差異の検討 ロットの異なる 3 種類のサイシンの HSGC によるクロマトグラム (Ia, IIa, IIIa), 及び, 日本薬局方に記載してある精油定量法に従って水蒸気蒸留で得られた精油のガスクロマトグラム (Ib, IIb, IIIb) を Fig. 4 に示す. 3 種類のサイシンのうち, I と II の入手先は同一であり, III の入手先は I, II と異なる. 水蒸気蒸留で得られた精油のガスクロマトグラムの 3 分から 4 分の大きなピークは, 水蒸気蒸留を
行ったときに用いたキシレンと, そのキシレン可溶画分の希釈に用いたメタノールのピークである。

HSGC で測定したサイシンの主要成分のクロマトグラムと, 水蒸気蒸留で得られたサイシンの精油成分のガスクロマトグラムはほぼ同じピークパターンを示した. Fig. 4 に示すように, I と II のサイシンは同一の入手先にもかかわらずロットの違いによって, ピーク No. 27, 28, 35, 40, 41 など多くのピークに差異が認められ, 入手先の異なるサイシン III の成分組成は, II に比較的好く似ている. 同一名称のサイシンとして市販されていても, 入手先, 及びロットによって含有成分の組成に大きな違いが認められた。

2. 近縁植物の HSGC HSGC を用いて, サイシン類の含有成分について根と根茎を区別して分析し, 成分の組成比について検討を行った. ウスバサイシン属のウスバサイシン (*Asiasarum sieboldii*: 山形県・小朝日岳, 奈良県・国県岳), クロフネサイシン (*Asiasarum dimidiatum*: 奈良県・葛城山), カンアオイ属のミヤコアオイ (*Heterotropa aspera*: 奈良県・葛城山) の根と根茎のガスクロマトグラムを Fig. 5 に, 主なピークの面積百分率を Table II に示す。

齋木らは, 産地による成分組成の差異を認めながらも, ウスバサイシンの第一主成分は methyleugenol であると報告している.⁷⁾ しかしながら, 今回の測定では, 山形県産のウスバサイシンは methyleugenol が第一主成分であるが, 奈良県産のウスバサイシンの第一主成分は limonene であり, 次いで safrole を多量に含有している

Fig. 4. Gas Chromatograms of Headspace Gas and Steam Distillates of Three Kinds of Asiasari Radix (I, II, III)

Fig. 5. Headspace Gas Chromatograms of Roots and Rhizomes of Various *Asiasarum* Species and *Heterotropa aspera*

(a), *Asiasarum sieboldii* (Yamagata); (b), *Asiasarum sieboldii* (Nara); (c), *Asiasarum dimidiatum* (Nara); (d), *Heterotropa aspera* (Nara).

TABLE II. Comparison of the Main Essential Oil in Various *Asiasarum* Species and *Heterotropa aspera*

	Peak No. (%)							
	3	7	13	17	19	28	31	35
<i>Asiasarum sieboldii</i> (Yamagata)								
Root	1.7	6.3	5.7	—	26.6	3.9	35.3	1.4
Rhizome	0.4	1.1	10.2	—	37.5	2.7	34.7	0.4
<i>Asiasarum sieboldii</i> (Nara)								
Root	2.2	4.4	45.2	2.5	—	20.9	0.5	0.3
Rhizome	1.5	2.9	46.5	3.5	—	26.9	—	—
<i>Asiasarum dimidiatum</i> (Nara)								
Root	2.0	7.3	39.7	4.0	—	18.3	3.3	9.0
Rhizome	1.0	2.0	56.7	5.2	—	3.3	13.1	3.2
<i>Heterotropa aspera</i> (Nara)								
Root	17.6	66.0	3.1	4.5	—	—	—	—
Rhizome	19.6	60.5	4.2	5.8	—	—	—	—

3, α -pinene; 7, β -pinene; 13, (+)-limonene; 17, terpinelene; 19, eucarvone; 28, saffrole; 31, methyleugenol; 35, asaricene.

が methyleugenol の含有量は極めて小さい。また、クロフネサイシンは, safrole と methyleugenol の含有量が根と根茎では逆転している。ミヤコアオイの主要成分は, α -pinene, β -pinene である。以上のように, サイシン類では同一種でも産地や測定部位による成分組成の差異は大きく, より詳細な, 成分によるケモタクソノミーの検討に HSGC 法は大いに有用であると思われる。

結 語

HSGC 法は, サイシンをはじめとする精油成分含有生薬の成分分析に十分活用でき, 水蒸気蒸留などの従来の方法に比べて少量の試料で短時間 (サイシンでは全行程 1 時間 30 分以内) に分析することができる。また, HSGC-MS の併用により, 未知生薬のパターン分析, 主要成分の確認を迅速に行うことができ, 生薬の品質管理のシステム化や成分によるケモタクソノミーの検討に大変有効な手段であると思う。

引 用 文 献

- 1) 本報の一部は, 第 39 回日本薬学会近畿支部大会にて発表, 1989.
- 2) 松居正巳, 浅井正子, 島津評論, **44**, 37 (1987).
- 3) A. S. Curry, G. Hurst, N. R. Kent, H. Powell, *Nature* (London), **195**, 603 (1962).
- 4) 土橋 均, 中島邦夫, 小野広孝, 松下 晃, 西川真弓, 衛生化学, **34**, 146 (1988).
- 5) J. R. Startin, J. Gilbert, *J. Chromatogr.*, **294**, 427 (1984); R. A. Sanders, T. R. Morsch, *J. Chromatogr.*, **351**, 525 (1986).
- 6) 長沢元夫, 薬誌, **81**, 129 (1961).
- 7) 斎木保久, 赤堀幸男, 野呂忠敬, 森永邦夫, 平良武男, 福島清吾, 薬誌, **87**, 1529 (1967).
- 8) 中村輝子, 遠藤次郎, 長沢元夫, 日本生薬学会第 31 年会講演要旨集, 1984, p. 74.
- 9) S. R. Heller, G. W. A. Milne, "EPA/NIH Mass Spectral Data Base," Vol. 1—4 and Index, U.S. Department of Commerce/NBS, 1978.