

## 愛媛県産サイコの5種サイコサポニン含量の実態調査

曾我部翔多 大西美知代 望月美菜子 滝山広志 四宮博人

Keywords : Bupleurum Root, saikosaponin, HPLC, cholesteryl group stationary phase column

愛媛県内の圃場で栽培された「ミシマサイコ」の品質を評価するため、コレステリル基結合型カラムを用いた HPLC 法により、5 種サイコサポニン(サイコサポニン a(Sa), b1(Sb1), b2(Sb2), c(Sc), d(Sd))の同時分析を行った。水アセトニトリルのグラジエント条件(70:30→25 分→30:70, 5 分保持)により 68 試料の分析を行ったところ、すべての試料において、日本薬局方で定量規定のある総サポニンの含量規格を満たしていた。5 種サイコサポニン含量の相関は、Sa 及び Sd 間で高い相関を示し、Sa 及び Sc 間、Sc 及び Sd 間においても相関がみられた。

### はじめに

近年、国内で漢方製剤の生産金額が増加する中、原料として使用される生薬の約 80%は中国からの輸入に依存している<sup>1)</sup>。このため、原料生薬の安定供給の手段の一つとして、国内における薬用作物の生産拡大が期待されており、国や各自治体において産地化の支援が行われている。

当県においても、愛媛県農林水産研究所(以下、愛媛農水研)を中心に、中山間地域の薬用作物生産に係る支援事業が実施されており、当所は、試験栽培された薬用作物の有効成分の含有量検査を担っている。

ミシマサイコは、当県内で栽培されている主な薬用作物であり、平成 30 年には全国で 2 番目に多い栽培面積を有している品目である<sup>2)</sup>。

そこで今回、愛媛農水研で試験栽培された播種及び収穫月の異なる1年生ミシマサイコについて、その品質を評価するため、HPLC 法による 5 種のサイコサポニン含量の実態調査を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1 分析試料

愛媛農水研で試験栽培された栽培時期の異なる 1 年生ミシマサイコ 68 試料を用いた(表 1)。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

#### 2 標準品及び試薬等

標準品は、富士フィルム和光純薬製サイコサポニン a(Sa), b2(Sb2)及び d(Sd)局方生薬試験用並びにサイコサポニン b1(Sb1)及び c(Sc)生薬試験用を用いた。

試薬は、アセトニトリル及びメタノールは富士フィルム和光純薬製 HPLC 用を、その他は富士フィルム和光純薬製特級品を用いた。

精製固相カラムは、Waters 社製 Sep-PakC18 カラムを用いた。

#### 3 標準液の調製

各標準品をそれぞれメタノールに溶解し、Sa, Sc 及び Sd は 500µg/mL, Sb1 及び Sb2 は 250µg/mL の標準原液とした。さらに、各標準原液をメタノールで適宜希釈し、混合標準液を調製した。

#### 4 試料溶液の調製

第十七改正日本薬局方「サイコ」定量法に準じて調製した<sup>3)</sup>(図 1)。

#### 5 装置及び測定条件

装置及び測定条件を表2に示した。

表 1 分析試料(愛媛県産 1 年生ミシマサイコ)

試料No.	11-1~13	12-1~15	1-1~13	2-1~13	3-1~14
収穫月	11月	12月	1月	2月	3月
仕上げ乾燥後重量(g)	6.12~ 16.11	7.42~ 26.67	5.19~ 17.16	6.31~ 18.51	5.71~ 19.31
栽培年数	1年				

表 2 HPLC 測定条件

装置	Alliance e2695 Waters社製
分析カラム	COSMOSIL Colester ナカライテスク社製 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)
カラム温度	40 °C
流速	1.0 mL/min
注入量	20 μL
移動相	A:B=水:アセトニトリル
グラジエント条件	0min(70:30)→25min(30:70)→30 min(30:70)
検出器	PDA 2998 Waters社製
検出波長	Sa,Sc,Sd - 206 nm / Sb1,Sb2 - 254 nm

試料を細切し粉末にする(50メッシュ以下)

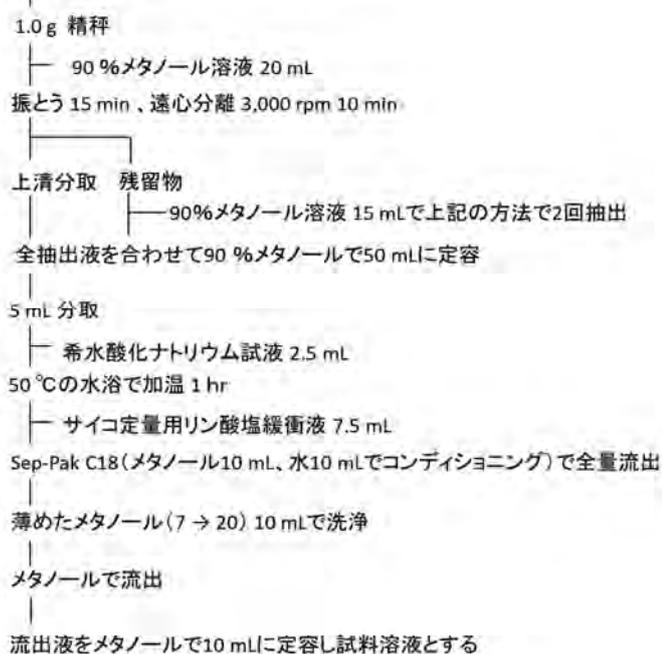


図 1 試料溶液の調製

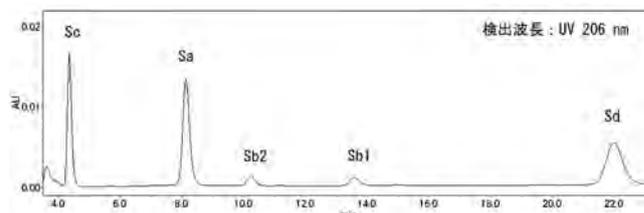
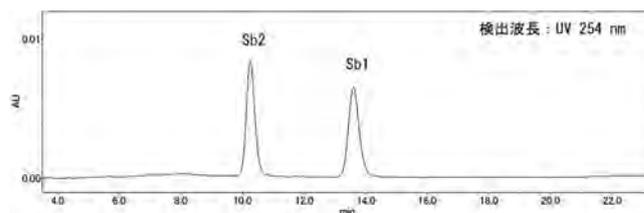
## 結果及び考察

### 1 分析法の検討

5 種サイコサポニンの同時分析について、コレステリル基結合型カラムを用いた伊達らの方法<sup>4)</sup>及び原田らの方法<sup>5)</sup>を参考に、移動相に水/アセトニトリルを用いたアイソクラティック条件(61/39)及びグラジエント条件を検討した(表 2)。その結果、両条件ともに各サイコサポニンの同時分析が可能であることが確認できた(図 2)。そこで、当所においては、より良好なピーク形状のクロマトグラムを得られたグラジエント条件で試料の分析を行った。

また、混合標準液を用いて、Sa, Sc 及び Sd は 2.5~100μg/mL, Sb1 及び Sb2 は 0.1μg/mL~5.0μg/mL の範囲でピーク面積を用いた絶対検量線を作成したところ、各サイコサポニンについて、相関係数 0.999 の良好な結果が

### (1)アイソクラティック条件



### (2)グラジエント条件

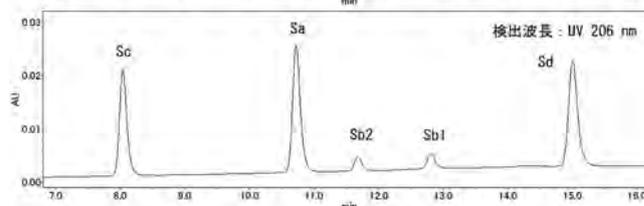
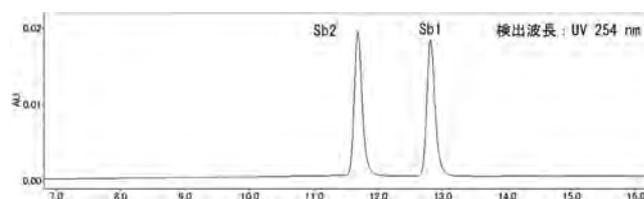


図 2 混合標準液の HPLC クロマトグラム  
(Sa, Sc, Sd: 各 25 μg/mL, Sb1, Sb2: 各 5 μg/mL)

得られた。

### 2 サイコサポニンの含量

検討した前述のグラジエント条件を用いて、試料中の各サイコサポニン含量を測定した結果を表 3 に示した。

Sa 及び Sd の含量はそれぞれ 0.22-0.97%及び 0.22 - 1.17%であった。また、日本薬局方で定量規定されている Sa と Sd の定量値の合計である総サポニン量は 0.44~2.05%であり、すべての試料において、含量規格である 0.35%以上を満たしていた。

Sc の含量は 0.07~0.43%, Sb1 の含量は定量下限値未満の試料を除き 0.0006~0.0022%, Sb2 の含量は 0.013~0.106%であり、既報<sup>4, 5)</sup>と同様に Sb1 及び Sb2 の含量は、Sa, Sc, Sd に比べ微量であった。

サイコサポニンの平均含量を収穫月別に比較したところ、含量規定のある Sa 及び Sd については、1 月収穫の試料で最も高く Sa が 0.59%, Sd が 0.78%であった(図 3)。しかし、5 種サイコサポニン含量の合計は収穫月ごとで明確な差は認められなかった(図 4)。

表 3-1 5種サイコサポニン含量の測定結果(11~1月)

単位 %, n = 3

収穫月	試料No.	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd	総サポニン (Sa+Sd)
11月	11-1	0.70	-	0.035	0.31	0.87	1.57
	11-2	0.62	0.0016	0.081	0.26	0.67	1.29
	11-3	0.22	-	0.016	0.15	0.32	0.54
	11-4	0.49	0.0011	0.040	0.18	0.58	1.07
	11-5	0.37	0.0011	0.053	0.18	0.48	0.85
	11-6	0.51	0.0008	0.050	0.19	0.64	1.15
	11-7	0.55	0.0020	0.106	0.25	0.63	1.18
	11-8	0.38	-	0.010	0.12	0.37	0.75
	11-9	0.59	-	0.036	0.31	0.86	1.45
	11-10	0.33	0.0006	0.032	0.14	0.44	0.77
	11-11	0.58	0.0008	0.051	0.19	0.61	1.20
	11-12	0.76	0.0010	0.082	0.29	0.98	1.74
	11-13	0.72	0.0007	0.046	0.22	0.83	1.54
12月	12-1	0.38	-	0.025	0.17	0.67	1.05
	12-2	0.40	-	0.015	0.17	0.53	0.93
	12-3	0.29	-	0.025	0.14	0.37	0.66
	12-4	0.65	-	0.019	0.34	0.95	1.60
	12-5	0.24	-	0.019	0.17	0.37	0.61
	12-6	0.50	-	0.031	0.23	0.82	1.32
	12-7	0.38	-	0.022	0.20	0.56	0.94
	12-8	0.75	0.0007	0.041	0.34	1.16	1.91
	12-9	0.44	-	0.026	0.24	0.43	0.87
	12-10	0.43	0.0022	0.066	0.17	0.44	0.87
	12-11	0.74	0.0017	0.077	0.42	0.84	1.58
	12-12	0.40	0.0008	0.035	0.19	0.46	0.85
	12-13	0.22	-	0.013	0.07	0.22	0.44
	12-14	0.54	0.0013	0.053	0.24	0.62	1.16
	12-15	0.47	0.0014	0.083	0.22	0.58	1.05
1月	1-1	0.84	-	0.027	0.27	1.11	1.95
	1-2	0.41	-	0.018	0.14	0.43	0.84
	1-3	0.40	-	0.018	0.13	0.55	0.96
	1-4	0.73	0.0006	0.041	0.31	0.88	1.61
	1-5	0.97	0.0007	0.035	0.40	1.08	2.04
	1-6	0.31	-	0.038	0.16	0.34	0.66
	1-7	0.57	0.0007	0.044	0.11	0.94	1.51
	1-8	0.54	-	0.029	0.19	0.92	1.47
	1-9	0.42	-	0.035	0.17	0.60	1.03
	1-10	0.75	-	0.020	0.32	1.13	1.88
	1-11	0.49	0.0018	0.053	0.26	0.56	1.05
	1-12	0.88	-	0.015	0.43	1.17	2.05
	1-13	0.39	-	0.022	0.10	0.45	0.84

表 3-2 5種サイコサポニン含量の測定結果(2,3月)

単位 %, n = 3

収穫月	試料No.	Sa	Sb1	Sb2	Sc	Sd	総サポニン (Sa+Sd)
2月	2-1	0.36	0.0008	0.038	0.12	0.37	0.73
	2-2	0.66	0.0007	0.048	0.42	0.89	1.55
	2-3	0.81	0.0010	0.025	0.24	0.98	1.79
	2-4	0.59	0.0006	0.033	0.34	0.58	1.16
	2-5	0.84	0.0009	0.067	0.33	0.93	1.77
	2-6	0.58	0.0017	0.079	0.28	0.77	1.35
	2-7	0.73	0.0008	0.065	0.30	0.86	1.59
	2-8	0.22	-	0.020	0.16	0.26	0.48
	2-9	0.42	-	0.042	0.23	0.55	0.97
	2-10	0.49	0.0010	0.033	0.17	0.53	1.02
	2-11	0.45	0.0013	0.059	0.26	0.51	0.95
	2-12	0.47	-	0.022	0.20	0.57	1.04
	2-13	0.76	-	0.038	0.21	0.80	1.55
3月	3-1	0.44	-	0.031	0.16	0.51	0.95
	3-2	0.64	0.0014	0.088	0.27	0.73	1.37
	3-3	0.35	-	0.019	0.15	0.39	0.74
	3-4	0.48	0.0008	0.030	0.17	0.55	1.03
	3-5	0.55	0.0006	0.033	0.21	0.66	1.21
	3-6	0.54	-	0.032	0.22	0.71	1.25
	3-7	0.53	0.0008	0.059	0.25	0.66	1.19
	3-8	0.80	0.0018	0.087	0.33	0.92	1.73
	3-9	0.35	-	0.032	0.20	0.44	0.79
	3-10	0.66	-	0.040	0.36	0.79	1.45
	3-11	0.52	-	0.041	0.28	0.67	1.19
	3-12	0.46	-	0.024	0.26	0.62	1.08
	3-13	0.97	0.0013	0.044	0.33	0.96	1.93
	3-14	0.65	0.0008	0.028	0.20	0.68	1.34

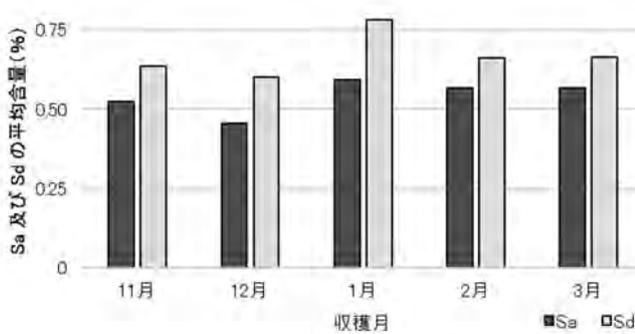


図3 収穫月別のSa及びSdの平均含量(%)

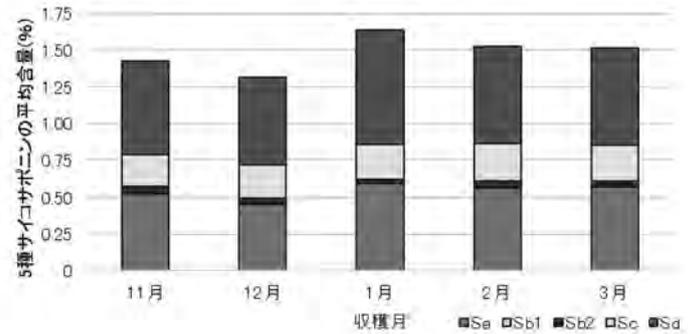
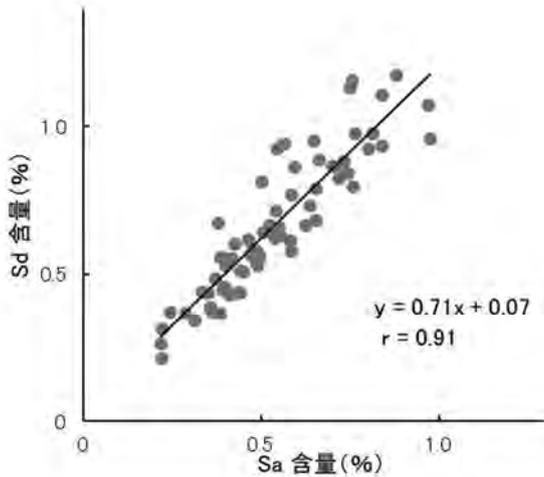
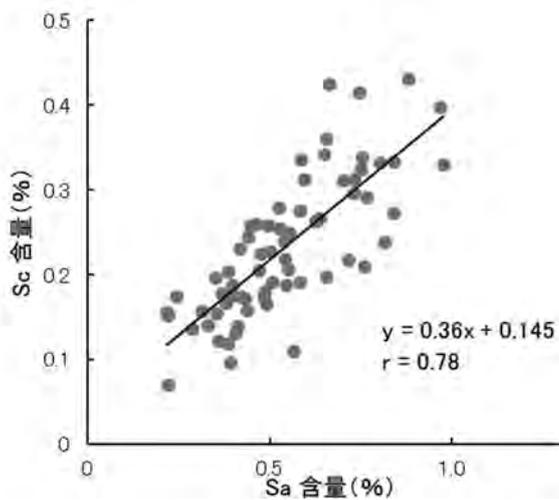


図4 収穫月別の5種サイコサポニンの平均含量(%)

(1) Sa 及び Sd 含量(%)の相関



(2) Sa 及び Sc 含量(%)の相関



(3) Sc 及び Sd 含量(%)の相関

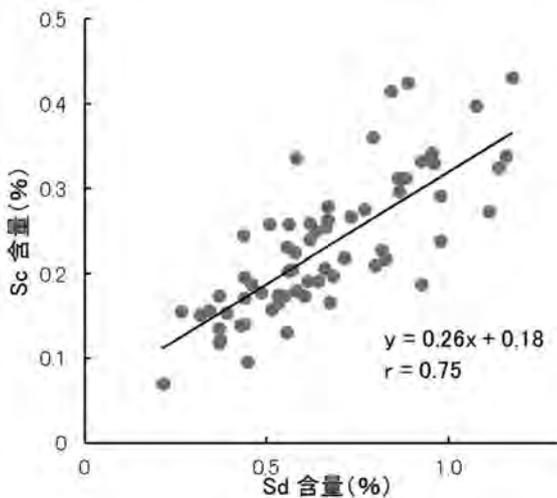


図 5 Sa, Sc 及び Sd の含量(%)の相関

3 サイコサポニン含量の相関

Sa, Sc 及び Sd の含量の相関を図 5 に示した. Sa と Sd 間においては, 相関係数が 0.91 と既報<sup>4,5)</sup>と同様に高い相関性が認められた. また, Sa 及び Sc 間, Sc 及び Sd の相関係数はそれぞれ 0.78 及び 0.75 であり相関性が認められた. なお, Sb1 及び Sb2 とその他のサイコサポニン間においては, 相関係数が 0.2 以下であり, 相関性は認められなかった.

これらの結果より, 栽培時期や収穫時の重量が異なる 1 年生ミシマサイコにおいて, Sa, Sc 及び Sd の含量は相関を示す可能性が考えられた.

まとめ

サイコに含まれる 5 種サイコサポニンについて, コレス テリル基結合型カラムを用いた HPLC 法により, グラジエ ント条件で感度良く同時分析することができた.

この分析法により, 県内の圃場で試験栽培された栽培 時期の異なる 1 年生ミシマサイコについて品質評価を行 ったところ, 68 試料すべてにおいて日本薬局方の総サポ ニンの含量規格を満たしていることを確認することができ た. また, 同試料における 5 種サイコサポニン含量の傾向 及び各サイコサポニン間の相関性を確認することができ た.

今回は県内の 1 か所で栽培されたミシマサイコの分析 であったが, 今後は県内の異なる地域の圃場で栽培され たミシマサイコについても分析を行い, 品質を評価するこ とによって, 各地域に適した栽培方法の検討に寄与した い.

謝辞

本研究にご協力いただいた愛媛県農林水産研究所の 関係者の皆様に深謝いたします.

参考文献

- 1) 山本豊ほか, 生薬学雑誌, 73, 16-35 (2019)
- 2) 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 30 年産), 34 (2020)
- 3) 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 (2016)
- 4) 伊達英代ほか, 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)
- 5) 原田卓也ほか, 鹿児島県環境保健センター所 報, 20, 52-57 (2019)

## Survey on amount of five kinds of saikosaponins of Bupleurum Root made in Ehime prefecture

Shota SOGABE, Michiyo OHNISHI, Minako MOCHIZUKI

Hiroshi TAKIYAMA , Hiroto SHINOMIYA

A simultaneous analytical method using high-performance liquid chromatography(HPLC) on a Cholesteryl group stationary phase column, under water/acetonitrile gradient condition(70:30→25min→30:70:5min hold) well separated five kinds of saikosaponins(saikosaponin a, saikosaponin b1, saikosaponin b2, saikosaponin c and saikosaponin d) in Bupleurum Root.

The analytical method was applied to Bupleurum Root cultivated in Ehime prefecture with different cultivation periods, all the samples met the saikosaponin content standard of the Japanese Pharmacopoeia.

The correlation of the five kinds of saikosaponins showed a high tendency between saikosaponin a and saikosaponin d.