

生薬・キキョウのサポニン成分の HPLC による品質評価

佐伯 剛,* 二階堂 保

Evaluations of Saponin Properties of HPLC Analysis
of *Platycodon grandiflorum* A.DC.

Tsuyoshi SAEKI* and Tamotsu NIKAIDO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, 2-2-1 Miyama,
Funabashi City 274-8510, Japan

(Received October 29, 2002; Accepted March 5, 2003)

Platycodon root, one of the most important Chinese herbal medicines, has been used as an antiphlogistic, antitussive, and expectorant agent since ancient times. In the *Japanese Pharmacopoeia XIV* this is listed as the root of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle (Campanulaceae) and called KIKYOU (Platycodi Radix) in Japanese. HPLC analysis showed that commercial samples of P. Radix all contained platycodins, and a total of 12 peaks were identified by co-HPLC analysis with authentic samples isolated earlier from this laboratory. The peak purity and identity were checked with a photodiode array detector. The contents of the major saponins, platycodins A, C, and D, were determined and the peak-area ratios of platycodins A, C, and D, were shown to be correlated with their sources of origin. Fourteen commercial samples of Platycodon root, the origin of which was *Platycodon grandiflorum*, were collected from China (5 samples), Korea (5 samples), and Japan (4 samples). The commercial samples from China, Korea, and Japan each gave a distinct HPLC pattern with peak-area ratio of platycodins A, C, and D, of 1 : 2 : 3 and 2 : 8 : 1, respectively. HPLC analysis showed that those on the Japanese market were either imported from China or Korea based upon their HPLC patterns.

Key words—*Platycodon grandiflorum*; Platycodi Radix; HPLC; kikyousaponin; platycodins A, C, and D

1. はじめに

キキョウ *Platycodon grandiflorum* A.DC. はキキョウ科 (Campanulaceae) に属する多年草で、第十四改正日本薬局方に生薬名 キキョウ (Platycodi Radix) として収載されている。生薬部分は根であり、中国最古の本草所「神農本草経」の中品 (日本薬局方では、「下品」と記載されている) に収載され、病を治す生薬として用いられてきた。効能として喉の炎症や痛み、排膿・動悸・去痰効果があり、喘息、肺疾患、気管支疾患に応用され、漢方では、桔梗湯、排膿散、五積散などに、家庭薬では龍角散などに処方されている。基原植物の分布は、野生又は栽培の形で日本、韓国、中国に生育している。キキョウの有効成分とされるトリテルペノイドサポニンについては、庄司らによって詳しく研究され、サポニン成分として、生薬中に約 3—5% 含有し、オ

レアナン型サポニンと多糖類のイヌリンについて報告されている。¹⁻⁶⁾ 特にサポニンの主要成分とされている Platycodin A, C 及び D の構造は詳しく検討されていたが、1980 年代にキキョウに含まれる成分に関する報告を境に途絶えていたが、近年新たに、花卉よりアントシアニンの Platycodin, 種子よりフラバノノール配糖体の Flavoplatycoside, 3-methy-1-butanol 配糖体の Grandoside がそれぞれ単離、報告された。⁷⁾ 我々の研究室でも、新規サポニンの単離を目的としてキキョウの根の成分研究に着手し、5 種類の新規サポニン Platycoside A,⁸⁾ B,⁹⁾ C,⁹⁾ D,⁹⁾ E⁹⁾ を報告した。このように、キキョウサポニンの構造研究を中心とした数多くの報告が発表されているが、品質評価を中心としたものは少ない。元来、生薬の品質は、伝統的に内部形態的な特徴と外観上の特徴を調べることによって優劣の判断がされてきた。古来より中国においては皮去りのキキョウの根が良品とされてきたが、比較研究などに

よれば皮付きのキキョウの根も使用されるようになってきた。¹⁰⁻¹²⁾

キキョウサポニンを始めとするサポニン類は通常皮部に多く含まれていると言われているが、キキョウの場合、皮を去らないと乾燥するのに非常に時間がかかることも報告されている。¹³⁾ 野口らは、生薬は乾燥時間の長さによりその成分含量にかなりの違いが生じ、キキョウにおいては、皮去りの根の場合には乾燥方法による Platycodin D 含量の変化は認められないが、皮付きでの根では Platycodin D 含量が大きく変化すると報告している。¹¹⁻¹³⁾ ところで、生薬の持つ有効成分についても、積極的な研究が行われるようになってきた。最近、吉川らがサポニン類について、消化管表面での神経系や受容体に作用して食後の急激な血糖値の上昇を抑制することによって、糖尿病の予防効果を発揮するとの報告をしている。¹⁴⁻¹⁹⁾ この作用は、サポニンによる血糖上昇抑制活性の作用機序については、これまでサポニン成分の体内への吸収メカニズムについては、その代謝作用が明らかにされていなかったが、サポニン成分は吸収代謝されることなく、消化管表面での神経系や受容体に作用して血糖値の上昇を抑制する大変興味ある報告をしている。²⁰⁻²²⁾ さらに、サポニンを薬効成分とする生薬は、抗腫瘍、抗炎症作用を始めとする種々の生理活性も注目されており、*in vitro* において臨床で用いられている薬剤に比べ100倍以上の強い抗腫瘍活性を持つものも見つけられている。²³⁾ このような背景に加え、キキョウの薬理活性である鎮咳、去痰作用などもサポニンに由来するとの報告もあることから、²⁴⁻²⁶⁾ サポニン成分を指標とした品質評価法の開発が必要と思われる。しかし、キキョウの品質は従来、局方試験や内部形態的な特徴と外観上の特徴を調べるのみで優劣の評価がされており、局方試験としては確認試験しか行っておらず、企業などの品質評価法においても、定性試験である TLC をその評価の手段に用いているに過ぎない。

そこで、Platycodin A, C 及び D を含めた Platycodin 類を指標としたキキョウサポニン成分の定量法や生産地の異なるキキョウの根の比較分析を行った報告がないことから、HPLC を用いた定量法を開発し、市場品、栽培品及び野生種のキキョウの定量を行い、サポニン成分の違い及び含量について検討し

た。さらに、この定量法で得られた結果から、総サポニン含量の異なるキキョウを用いて去痰作用についても検討した。

2. 従来の品質評価 (TLC を用いた評価)

韓国産キキョウの根 (流通しているほとんどが晒キキョウ) は高品質であり、日本への輸出品は価格及び供給も安定している。一方、中国産キキョウの根 (ほとんどが生干キキョウ) は日本への輸出について安定供給に問題があったが、最近では安定し、価格も韓国産より安く、日本の市場品の約 8 割を中国産が占めるようになってきた。そこで、各国からの市場品 [中国産 5 ヲ所: C1-C5 (ハルピン, 安徽省, 黒龍江省等), 韓国産 5 ヲ所: K1-K5 (忠清道, 京畿道, 全羅道等), 日本産 4 ヲ所: J1-J4 (北海道, 青森県, 長野県, 群馬県)] を用いて庄司らの条件^{1,2)} で TLC による評価を行った。なお、市場品は、日本薬局方に適合した生薬を購入した。中国 (C1-C3) 及び韓国 (K1-K4) の各生産地の市場品 (50 g) のメタノール抽出液について比較検討したところ、Platycodin D (以後、PD と略す) 付近のスポットの濃度及び大きさは、各国の生産地による違いは認められたが、総じて韓国産に比べて中国産の方がスポットの濃度及び大きさが優れているのではないかと推察された。そこで PD の標品を用いる HPLC 分析を行い、PD 含量が多い生産地の市場品を購入すれば良いのではないかと考え、PD の単離を目的とした分取 TLC を行った。中国産 (C1) のメタノール抽出液の TLC について、硫酸加熱発色により PD と近似値の *R_f* 値を示す黒色のスポット部分を分取し、分離精製して 2 種の化合物 (A, B) を単離した。これらの単離された化合物のうち、化合物 A は、無色粘稠性液体として得られ、¹³C-NMR において 3 個のアノメリックカーボン [δ 99.5, 103.8, 106.2] のシグナルが観測されたことから、三糖類と推定されたが、既知の三糖類 (例えばラフィノース) の標品との TLC を用いた直接比較においては一致しなかった。そこで、キキョウに多く含まれるイヌリンの構成糖であるフラクトースの可能性を疑い TLC を行った結果、フラクトースのスポットと一致した。フラクトースは溶液中で 3 種 (β -ピラノース体, α -フラノース体, β -フラノース体) のコンフォマーの混合物として存在することを考慮すると、¹³C-NMR においてアノメリッ

クカーボンのシグナルが3個観測された結果とも一致する。以上の結果より、この化合物の構造をフラクトースと推定し、TLC並びにHPLCを用いた標品との直接比較においてフラクトースと同定した。同時に得られたフラクトースよりも極性の高い化合物Bは、無色粘稠性液体として得られ、 ^{13}C -NMRにおいて2個のアノメリックカーボン [$\delta 93.5$, 105.6] のシグナルが観測されたことから、二糖類と推定し、TLC並びにHPLCを用いた標品との直接比較においてシュクロースと同定した。以上の結果より、PDとTLC上で近似値のRf値を示す成分はフラクトースであった (Fig. 1)。さらに、黒色スポットの抽出部分をHPLCによる定量を行った結果、これまでキキョウの主成分とされていたスポットは、少量のPDを含むフラクトースと結論された。中国産並びに韓国産においてはPDと近似値のRf値を示すフラクトースの含有量がシュクロースに比べて多かった (Fig. 1)。一方、日本産 (J1-J4: 50 g) のメタノール抽出液においては、生産地により含有量のバラツキが見られたが、一般にシュクロースの方が多く含まれていた (Fig. 1)。日本市場で流通しているキキョウのほとんどが中国や韓国からの輸入品で、国産品が少ないことを考慮すると、これまでフラクトースをPDと誤認していた原因の一端が上記の含有量の差にあると推測される。すなわち、これらの方法で正確な品質評価を行

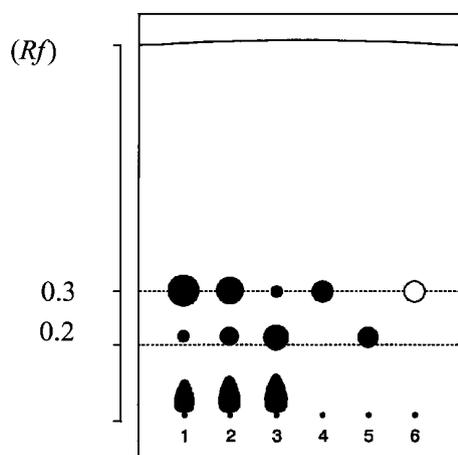


Fig. 1. TLC Analysis Condition of MeOH Extracts of *P. Radix*

[Silica Gel 60F₂₅₄, CHCl₃: MeOH : H₂O (6 : 4 : 1), 10% H₂SO₄ (heating)].

1: MeOH ext. of *P. Radix* from China market (C1), 2: MeOH ext. of *P. Radix* from Korea market (K1), 3: MeOH ext. of *P. Radix* from Japan market (J4), 4: Fructose, 5: Sucrose, 6: Platycodin D.

うには不適切と判断され、正確に品質評価を行うためにはHPLCを用いた定量方法が必要である。そこで、キキョウからPDを含むHPLCを用いた定量法のサポニン成分の標品の単離を行った。

3. HPLCを用いた定量法の確立

東邦大学薬草園内で栽培したキキョウの根 (2 kg) をメタノールで抽出し、定法^{8,9)}に従い分離精製し、単離した各標品につき、 $[\alpha]_D$, IR, FAB-MS, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR を文献値^{1-4,8,9)}と比較することにより同定を行い、Platycodin A, C及びDを含めたPlatycodin類, Polygalacin類及びPlatycoside類の標品を得た。一般に、生薬の定量法は1種類だけの標準品を用いた方法は少なく、ニンジン²⁷⁾やサイコ²⁸⁾のように複数の標準品を用いた定量法が主流となっている。キキョウでは、東らの報告でPDのみを指標にした定量を行っている。¹²⁾しかし、庄司らは、PDはPlatycodin A (以後、PAと略す)並びにPlatycodin C (以後、PCと略す)のアセチル基が脱離することによっても生成され、PA並びにPCのアセチル基は、容易に転移することを報告している。¹⁻²⁾よって、PDだけで定量を行うことは、精度の高い方法とは言えない。キキョウのようにサポニン成分が複数存在する場合、その検出をより正確に行える必要がある。そこで、検出器に三次元検出器のPhoto Diode Array (以下、PDAと略す)を用いた3D-HPLCの定量法を検討した。PDA検出器を用いた方法は、多成分を含有する生薬の品質評価には有用な分析方法であると報告²⁹⁾されていることから、単離したPA, PC及びPDの標品を用いて分析を検討したところ、固定相にODSを、移動層にリン酸/アセトニトリルを用いた条件が最適であった。そこで、東邦大学薬草園で栽培したキキョウの根10gをメタノールで温時抽出後、減圧濃縮し、SEP-PAK C₁₈で前処理を行い、メタノール画分をHPLC用の試料溶液とし、この分析条件のクロマトグラムから溶媒ピークを除く各ピークのリテンションタイム (RT) が10分から60分まで分離能が高く、吸収極大は210 nm付近と良好な分離を示すピークが認められた (Fig. 2)。

また、このクロマトグラムの成分ピークは、PA, PC及びPDの標品ピークの吸収極大の210 nm付近と一致することからサポニン成分であると判断した。さらに複数のサポニンの標品を用いた定量法の

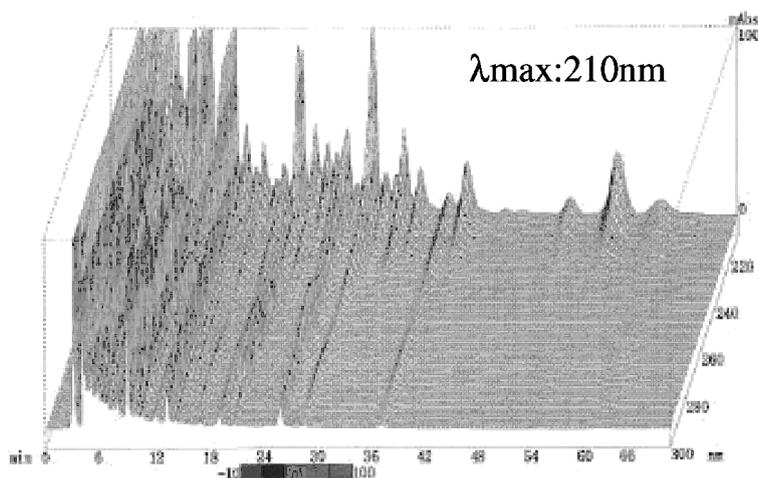


Fig. 2. 3D-HPLC Chromatograms for Determination of Platycodon Root (Toho Univ. Herb Garden)

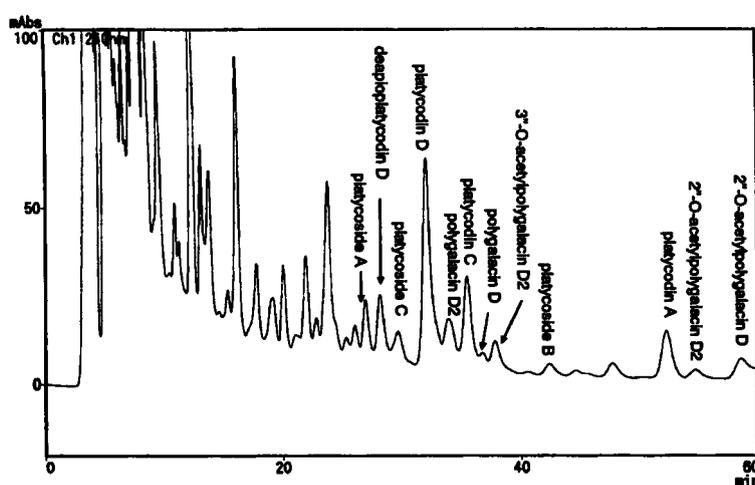


Fig. 3. HPLC Profiles of Standard Kikyo-Saponins

Table 1. Quantitative Analysis Data of Platycodins A, C and D

Standard saponin	Calibration curve	λ	Dynamic range (5 points) (μg)
Platycodin A	$y=8.77 \times 10^{-6} \chi^{-0.50}$	0.999	5-15
Platycodin C	$y=1.34 \times 10^{-5} \chi^{-0.61}$	0.999	5-15
Platycodin D	$y=1.30 \times 10^{-5} \chi^{-3.41}$	0.996	2.5-7.5

y: peak area count. χ : injection amount (μg).

開発を目的に HPLC profile の検討を行った。最適波長を 210 nm とした条件で単離したサポニンの標品を用いて分析した結果、12 種類の標品を帰属することができる Profile が得られた (Fig. 3)。Figure 4 には、今回帰属した 12 種類の標品の構造式とクロマトグラム上に示すピーク No を示した。

Profile の結果から、PA, PC 及び PD の標品の波

形が他の標品よりもピーク面積が大きく、帰属しやすい点や庄司らの報告^{1,2)}を考慮して、この 3 標品を中心に 12 種類の全標品を用いた定量法の確立を目指した。そこで、絶対検量線法を用いた定量を行うために、この 3 標品について相関係数を求めた結果、いずれも 0.99 以上と非常に高い数値が得られた (Table 1)。また、PA, PC 及び PD の変動係数

Table 2. Kikyo-Saponins Contents (mg/g) of the Roots of *P. Radix* from Different Sources

	Location	Route	PA	PC	PD	PA+PC+PD	TS
China 1	Helongjiang Prov.	Market	2.0	3.7	6.3	11.9	20.7
China 2	Hebei Prov.	Market	2.6	4.7	6.8	14.2	26.3
China 3	Auhui Prov.	Market	2.7	5.6	8.3	16.6	27.8
China 4	unknown	Market	2.0	3.5	6.0	11.5	21.8
China 5	unknown	Market	2.3	4.4	6.2	12.9	22.7
Korea 1	Gyeonggi Do.	Market	1.9	10.8	1.1	13.7	26.7
Korea 2	Gyeonggi Do.	Market	1.9	9.8	1.0	12.6	23.5
Korea 3	Chungcheong Do.	Market	1.7	12.5	0.9	15.1	23.0
Korea 4	Jeonra Do.	Market	1.5	10.0	0.9	12.4	20.3
Korea 5	unknown	Market	1.4	8.7	0.8	10.9	20.0
Japan 1	Hokkaido-2	Market	3.1	17.2	1.7	22.0	23.4
Japan 2	Aomori Pref.	Market	2.9	6.2	8.6	17.6	26.4
Japan 3	Nagano Pref.	Market	3.4	6.8	10.1	20.2	28.7
Japan 4	Gunma Pref.	Market	6.8	12.7	6.3	25.7	34.7
Japan 5	Chiba Univ.-1	Botanical	4.7	10.2	4.8	19.6	25.9
Japan 6	Chiba Univ.-2	Botanical	5.6	11.9	6.0	23.6	29.0
Japan 7	Toho Univ.-1	Botanical	4.1	8.6	4.4	17.1	21.7
Japan 8	Toho Univ.-2	Botanical	5.3	10.3	5.9	21.5	29.9
Japan 9	Tokyo Univ. of Pham. and life sci	Botanical	4.5	9.5	5.0	18.9	26.0
Japan 10	Yamaguchi Pref.-1	Botanical	5.3	11.6	5.6	22.5	27.2
Japan 11	Yamaguchi Pref.-2	Botanical	7.8	12.1	7.7	27.5	31.7
Japan 12	Hokkaido-1	Wild	6.3	12.3	6.8	25.4	29.9
Japan 13	Chiba Pref.	Wild	6.5	13.4	7.0	27.0	33.2
Japan 14	Ooita Pref.	Wild	6.2	13.3	6.6	26.1	30.3

PA: Platycodin A, PC: Platycodin C, PD: Platycodin D, TS: Total saponin.

は、分析法バリデーションに従い各試料とも3種類用意し、その平均値を示した。その結果、各国の市場品では、主サポニン成分であるPA+PC+PDの合計量を含む総サポニン含量は、中国(C1—C5)でPA+PC+PDの合計量：16.6—11.5 mg/g (±5.1 mg/g)、総サポニン含量：27.8—20.7 mg/g (±7.1 mg/g)、韓国(K1—K5)でPA+PC+PDの合計量：15.1—10.9 mg/g (±4.2 mg/g)、総サポニン含量：26.7—20.0 mg/g (±6.7 mg/g)、日本(J1—J4)でPA+PC+PDの合計量：25.7—17.6 mg/g (±8.1 mg/g)、総サポニン含量：34.7—23.4 mg/g (±11.3 mg/g)と生産地でかなりのバラツキがあり、日本の市場品で最も大きな差が認められた(Table 2)。栽培品(J5—J11)でも日本の市場品と同様に生産地で大きなバラツキが認められ、PA+PC+PDの合計量：27.5—17.1 mg/g (±10.4 mg/g)、総サポニン含量：31.7—21.7 mg/g (±10.0 mg/g)であった(Table 2)。一方、野生種(J12—J14)は、生産地による大きなバラツキが認められず、

PA+PC+PDの合計量：27.0—25.4 mg/g (±1.6 mg/g)、総サポニン含量：33.2—29.9 mg/g (±3.3 mg/g)であった(Table 2)。

また、各国の生産地によるPA+PC+PDの合計量の平均値は、野生種(26.2 mg/g) > 栽培品(21.5 mg/g) > 日本産市場品(21.4 mg/g) > 中国産市場品(13.4 mg/g) > 韓国産市場品(12.9 mg/g)の順で、PA+PC+PDの合計量を含む総サポニン含量の平均値は、野生種(31.1 mg/g) > 日本産市場品(28.3 mg/g) > 栽培品(27.3 mg/g) > 中国産市場品(23.9 mg/g) > 韓国産市場品(22.7 mg/g)の順であった(Fig. 5, Table 2)。また、総サポニン含量中の含まれるPA+PC+PDの合計量の比率は、中国産、韓国産の市場品で約56%に対し、日本産の市場品で約76%と高く、栽培品が約79%、野生種で約84%と日本産のいずれの生産地の総サポニン含量中のPA+PC+PDの合計量の比率が高いことが分かった(Fig. 5)。

さらに、各生産地のPA, PC, PDのそれぞれの

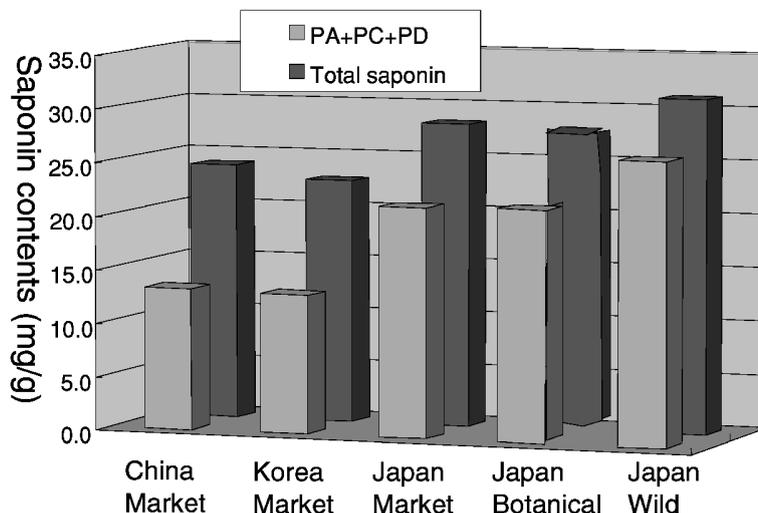


Fig. 5. Variation of Saponin Contents of Each of *P. Radix*

含量 (mg/g) 比は、中国産及び韓国産の市場品で生産地の違いに関わらず、その含量比率は、1 : 2 : 3 及び 2 : 8 : 1 であった。日本産の市場品では、青森県産及び長野県産が中国と同じ含量比率を、北海道産が韓国産と同じ含量比率であった。栽培品及び野生種でも生産地の違いに関わらず、その含量比率は 1 : 2 : 1 であり、群馬県産の市場品も同じ含量比率であったことから、野生種のキキョウを市場品として流通した可能性が高い (Table 2)。これらの結果から、日本産の市場品 (J1, J4)、栽培品 (野生種も含む) 及び韓国産の市場品 (K1—K5) では、PC が主サポニンであり、含量も PD を含む他のサポニン成分よりも多く含まれていた (Fig. 6)。一方、日本の市場品 (J2, J3) 及び中国産の市場品 (C1—C5) では、PD が主サポニンであり、含量も他のサポニン成分よりも多く含まれていたことから、従来の品質評価では良品と見なすことができる (Fig. 6)。

また、生産地の違いによる PA, PC, PD の含量比率に違いは認められなかったが、国間で含量比率及び PA+PC+PD の合計量を含む総サポニン含量に明らかな差が認められた。この理由として生育環境や株の違いに加えて、生薬調製の処理過程に原因があるのではないかと考えられたので、処理を行う上で影響の受けやすい外皮の有無について検討した。東邦大学薬草園のキキョウの根を用いて皮付き根 (外皮がなるべく付いた状態) と皮去り根 (外皮を完全に剥した状態) に処理し、乾燥後、前項の方

法に従い試料溶液を調整し定量を行った。その結果、皮付きの根の PA+PC+PD の合計量と総サポニン含量は、27.0 mg/g と 33.0 mg/g で、総サポニン含量中の含まれる PA+PC+PD の合計量の比率は約 82% と栽培品と近似値を示した。一方、皮去りの根は、PA+PC+PD の合計量と総サポニン含量は、14.5 mg/g と 26.8 mg/g で総サポニン含量中の含まれる PA+PC+PD の合計量の比率は約 54% と中国産及び韓国産の市場品と近似値を示した (Fig. 7)。

また、皮付き根と皮去り根では、PA+PC+PD の合計量で、±13.5 mg/g (皮付き根を 100% とした場合の減少率 50%)、総サポニン含量で ±6.2 mg/g (皮付き根を 100% とした場合の減少率 19%) とそれぞれ含量低下が認められた。この結果から、皮去り根は洗浄処理を行うことで PA+PC+PD の合計量を著しく減少させたことから、外皮と根の間に PA, PC, PD のサポニン成分が多量に含まれていることが示唆された。

今回、中国及び韓国の生産地から取寄せた市場品は、いずれも外観は茶色-うす茶色を帯び、形、重さ、匂い、味などの大きな違いは認められなかった。日本産は、市場品、栽培品及び野生種とも中国や韓国産に比べて外観が濃い茶色を帯びていたが、形、重さ、匂い、味などの明確な違いは認められなかった。今回の結果から、外観の色の違いは処理過程の違いであると推測されるが、中国や韓国の処理方法が、どのような方法で処理を行っているのかに

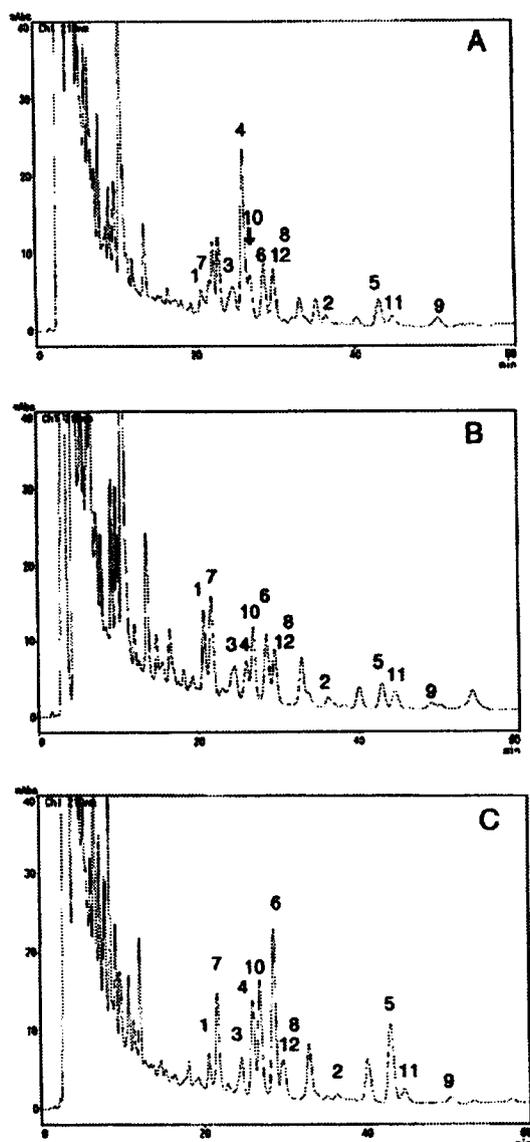


Fig. 6. HPLC Chromatograms of Roots of *P. Radix*
(Peak labels correspond to the compound numbering in Fig. 4)
A: China Market (C1), B: Korea Market (K1), C: Japan Market (J1).

については現在調査中である。しかし、処理過程の違いで PA, PC, PD 含量を含む総サポニン含量が大きく違っていたことから、HPLC を用いた定量を行うことで、従来の品質評価法では判らなかった生産地間の違いや、サポニン成分の含量規格を設定することで良品のキキョウの根を購入することが可能になった。

5. 去痰作用の検討

キキョウは咳を去る去痰作用を示すと言われ、鎮咳去痰薬として使われている。また、喉の痛みや咽喉痛に有効であると報告されている。^{21,22)} 去痰作用について李らは、モルモットに 5% Evans Blue 液

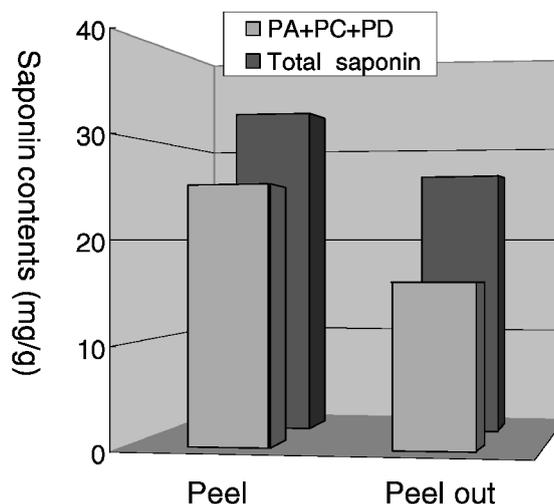


Fig. 7. Peel and Peel out of Saponin Content of Platycodon Root

を静脈注射すると、色素は血漿蛋白質と結合して気道に分泌される色素は、正常時には 20—30 μg であるのに対し、モルモット口腔内にサポニン成分を経口投与すると顕著に増加することを報告している。²⁴⁾ またサポニン成分を直接胃内に注入した場合に色素分泌量は増加しないことも報告している。²⁵⁾

一方、鎮咳作用について東海林らは、モルモットの気管から細い鋼鉄線を挿入して気管を刺激すると咳が起こるが、これをサポニン成分が抑制することを報告している。³⁰⁾ この作用は去痰作用と関係なく起こるものであり、キキョウには鎮咳、去痰と言った異なる 2 つの作用がある。一般にキキョウサポニンは、サイコサポニンよりも鎮静作用は弱い、内服させると酸による局所刺激作用を抑制する働きがあることが報告されている。^{25,31,32)} また、マウスへのパイロジェン注射による発熱に対して解熱効果を示すと同時に、ラットのカラゲニン浮腫と酢酸による浮腫に対しても弱いものの若干の効果を示すことも報告されている。^{24,25)} そこで、前項の結果から、総サポニン含量中の含まれる PA+PC+PD の合計量の比率の割合の差が大きい生産地と PC と PD の主サポニンが他のサポニン成分よりも含量が明確に多い生産地を試料として選択した結果、中国の市場品 (C3: PA+PC+PD の合計量 16.6 mg/g, 総サポニン含量: 27.8 mg/g) 及び韓国の市場品 (K3: PA+PC+PD の合計量 12.4 mg/g, 総サポニン含量: 20.3 mg/g) と東邦大学薬草園のキキョウの根 (J8: PA+PC+PD の合計量 21.5 mg/g, 総サポニ

Table 3. Effect of Crude Platycodins and Ammonium Chloride on the Permeability of Evans Blue

Drug (Sample no.)	Dose mg/kg <i>p.o.</i>	No. of animals	Amount of E.B. ^{a)} exudation ($\mu\text{g} \pm \text{S.E.}$)	Increase (%)
Control	—	6	33.4 \pm 4.8	—
Toho Univ. (J8)	80 ^{b)}	6	84.2 \pm 7.1 ^{c)}	60.3
China Market (C3)	80 ^{b)}	6	82.3 \pm 9.2 ^{c)}	59.4
Korea Market (K3)	80 ^{b)}	6	65.4 \pm 6.2 ^{c)}	48.9
Ammonium Chloride	200	6	60.2 \pm 6.3 ^{c)}	44.5

a) 5% Evans Blue, 1 mg/kg i.v., b) The drug was ingested through the mouth in four divided doses.

c) Significant at $p=0.05$.

Each value represents the mean \pm SE from six animals.

ン含量：29.9 mg/g) を選択した。それぞれの根のメタノール抽出液を定法^{24,25)}に従ってブタノールで抽出し、HP-20 分画を行ったエキスを試料溶液とした。モルモットに 20%ウレタン麻酔後背位で固定し、大腿静脈カニューレを挿入後、薬物投与用カニューレの下部に透過した色素を集めるためにゴム管を付け、コックで締め、Evans Blue 生理食塩液を大腿静脈に注射し、気管へ滲出した色素の量を波長 605 nm における吸光度を測定した。標準薬物に塩化アンモニウムを、コントロールとして 10%の生理食塩水を用いた。対照薬物であるメタノール抽出液は、色素注射後、15 分おきに 80 mg/kg を 4 回に分けて経口投与し、各実験群における Evans Blue の滲出量を測定した結果、モルモットに Evans Blue 液を静脈に注射後、4 時間で気道へ滲出した色素量は、東邦大学 (J8) で平均 84 μg 、中国産市場品 (C3) で平均 82 μg 、韓国産市場品 (K3) で平均 65 μg とコントロール (33 μg) に比べ約 2 倍以上の増加が認められた (Table 3)。この結果から、標準薬物とした塩化アンモニウム投与の場合と同様、東邦大学及び中国産市場品の方が、韓国産市場品よりも強く増加させる傾向が認められた。すなわち、主サポニンが PD 若しくは PC に関係なく、さらに PA+PC+PD の合計量の違いよりも総サポニン含量の違いの方が、去痰作用に影響を与えることが示唆された。

6. 考察

キキョウの歴史は古く、日本でも平安時代から薬の原料として用いられ、消炎薬、排膿薬、鎮咳薬、去痰薬として漢方薬や家庭薬に他の生薬とともに配合される利用度の高い重要な生薬である。しかし、キキョウの国内生産量は 2—3 t/年に過ぎず、国内

で消費されるキキョウのほとんどが主に韓国や中国からの輸入に頼っているのが現状である。その輸入量 (約 170 t/年) は、生薬の分野で年間第 5 位を占めている。そのため、輸入品の品質評価法が重要になるが、現在の評価方法は外観検査を含む局方試験の性状の項を現地で確認し、企業等での TLC を用いた品質評価を行っているに過ぎない。また、生薬の品質を考える上で、常に一定以上の薬効が示されることが重要な点であり、近年、漢方処方の見直しと共に生薬の品質維持の必要性も高まってきたことから、これまでの経験的な品質評価法から、化学的根拠に基づいた客観的な生薬の品質評価法への見直しが必要とされていた。今回の報告から、キキョウの根のメタノール抽出液のスポットが主サポニンである PD と糖と近似値の R_f 値を示したことから、今までスポットの大きさ及び色の判断と外観検査で判別した評価方法に疑問点があり、品質評価手段としては適当な方法ではないと結論され、早急な見直しが必要になった。そこで、新たな品質評価法の検討を行い、PA, PC, PD を指標にした HPLC による定量法を確立し、この方法を駆使することで市場品を購入する場合、出荷されるまでの処理過程 (洗浄や乾燥等) における総サポニン含量の低下や乾燥手段により若干の含量変動が認められると言う報告^{11—13)}などから、企業等で社内規格値を設定する (総サポニン含量 26 mg/g 以上、PA+PC+PD の合計量 15 mg/g 以上を良否の判断基準と考える) ことで、生産地を限定しなくても良品のキキョウを安定供給することが可能になった。また、生産地の異なるキキョウの薬理作用について検討を行ったところ、総サポニン含量の違いから去痰作用の効果に差異が認められた。これは主サポニンである PA、

PC, PD の含量や成分組成の違いより, それ以外のサポニン含量の違いが起因しているものと推測される。横山らは, オレアナン骨格の C4 位に CH_2OH の存在が生理活性に深く関係しているとの報告^{26,30,31)}からも, PA, PC, PD 以外の Platycodin 類, Polygalacin 類及び Platycoside 類を含む総サポニン含量の違いが薬理に影響するのではないかと思われる。よって, 従来の品質評価では, PD 含量が多く含まれているキキョウが良品であったが, 今回の結果から総サポニン含量の多いキキョウが良品であると判断できる。今回, 筆者らは医薬品として使用されるキキョウの選定には, PA, PC, PD を含めた Platycodin 類, Polygalacin 類及び Platycoside 類を指標にした HPLC による定量法が品質評価法として有効な手段であることを報告した。³³⁾

謝辞 この研究を遂行するに本学薬学部生薬学教室 二階堂保教授に御指導を頂き厚く御礼申し上げます。また, サポニン成分に関する有益な御指導を頂きました本学薬学部 小池一男助教授並びに本研究に際し, 様々な御協力を頂きました本学薬学部生薬学教室のスタッフ, 卒業生に厚く御礼申し上げます。また, キキョウのサポニン標品を御分与下さいました昭和大学薬学部 庄司順三名誉教授に深謝いたします。生薬検体の入手にご協力頂きました, 北海道医療大学薬学部 西部三省先生, 千葉大学薬学部 奥山恵美先生, 東京薬科大学薬学部 指田豊先生, 国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験場 畠山好雄先生, 飯田修先生, 北日本生薬 佐々木恵一氏, 元保寧製薬中央研究所 成烈益博士, 黛漢薬店 黛一氏, ウチダ和漢薬榎垣鋭司氏, 山本薬品(株)大橋賢治氏, 中井廣進堂薬局 中井康雄氏, 青森市 進藤みのる氏, 名寄市 猿谷繁明氏, 君津市 網島(山口)孝子氏, 川崎市 山田美栄子氏に深謝致します。

REFERENCES

- 1) Tada A., Kaneiwa Y., Shoji J., Shibata S., *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2965–2972 (1975).
- 2) Konishi T., Tada A., Shoji J., Kasai R., Tanaka O., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 668–673 (1978).
- 3) Ishii H., Tori K., Tozyo T., Yoshimura Y., *Chem. Lett.*, **1**, 719–722 (1978).
- 4) Ishii H., Tori K., Tozyo T., Yoshimura Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 674–677 (1978).
- 5) Ishii H., Kitagawa I., Matsushita K., Shirakawa K., Tori K., Tozyo T., Yoshikawa M., Yoshimura Y., *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1529–1532 (1981).
- 6) Ishii H., Tori K., Tozyo T., Yoshimura Y., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 661–668 (1984).
- 7) Inada A., Murata H., Somekawa M., Nakanishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3081–3086 (1992).
- 8) Nikaido T., Koike K., Mitsunaga K., Saeki T., *Nat. Med.*, **52**, 54–59 (1998).
- 9) Nikaido T., Koike K., Mitsunaga K., Saeki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1946–1947 (1999).
- 10) Pfeffer P. E., Valentine K.M., Parrish F. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1265–1268 (1979).
- 11) Hosoda K., Noguchi M., *Shouyakugaku Zasshi*, **43**, 271–278 (1989).
- 12) Higashi A., Arimoto K., Iwata Y., Ujita K., Kawai T., Kobayashi Y., Sakurai K., Shimada Y., Takagi A., Taniyama T., Nakajima K., Hisata Y., Hosoda K., Yamamoto K., Yamamoto Y., Noguchi M., *Nat. Med.*, **51**, 56–62 (1997).
- 13) Noguchi M., *Food Ingredients J. Jpn.*, **162**, 10–15 (1994).
- 14) Matsuda H., Murakami T., Shimada H., Matsumura N., Yoshikawa M., Yamahara M., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 717–719 (1997).
- 15) Matsuda H., Murakami T., Li Y., Yamahara M., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1019–1023 (1998).
- 16) Matsuda H., Li Y., Murakami T., Matsumura N., Yamahara M., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1399–1403 (1998).
- 17) Matsuda H., Li Y., Murakami T., Yamahara M., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 323–327 (1999).
- 18) Matsuda H., Li Y., Yamahara M., Yoshikawa M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 729–734 (1999).
- 19) *Chemical and Engineering News*, September **11**, 28 (1995).
- 20) Matsuda H., Li Y., Murakami T., Yamahara M., Yoshikawa M., *Eur. J. Pharmacol.*, **368**, 237–243 (1999).
- 21) Li Y., Matsuda H., Yoshikawa M., *Bioorg.*

- Med. Chem.*, **7**, 1201–1205 (1999).
- 22) Matsuda H., Li Y., Yoshikawa M., *Life Sci.*, **65**, 27–32 (1999).
- 23) Mimaki Y., Sashida Y., Kuroda M., Nishino A., Satomi Y., Nishino H., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 467–469 (1995).
- 24) Takagi K., Lee E. B., *Yakugaku Zasshi*, **92**, 951–973 (1972).
- 25) Lee E.B., *Yakugaku Zasshi*, **93**, 1188–1192 (1973).
- 26) Yokoyama H., Hiai S., Ooura H., *Yakugaku Zasshi*, **102**, 1191–1194 (1982).
- 27) Harada M., “Han-you Shoyaku no Seibun Teiryoku,” Hirokawa, Tokyo, 1989, pp. 120–133.
- 28) Watanabe T., Yoshikawa T., Isoda S., Takada A., Ishiguro H., Namera A., Kohda H., Malla K., Takano A., *Nat. Med.*, **52**, 421–425 (1998).
- 29) Sakurai T., Yamada H., Saito K., Kanamaki Y., *Nat. Med.*, **48**, 291–296 (1994).
- 30) Shouji T., Kisara K., *J. Soc. Pharm.*, **10**, 407–410 (1975).
- 31) Hiai S., Yokoyama H., Nagasawa H., Ooura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 495–499 (1981).
- 32) Yokoyama H., Hiai S., Ooura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 500–504 (1981).
- 33) Saeki T., Koike K., Nikaido T., *Planta Med.*, **47**, 183–187 (1999).