

Original

## イオン交換樹脂を利用した人蔘サポニン分離法の開発

成鍾煥<sup>1</sup>, 蔡熙政<sup>2</sup>, 金義鏞<sup>†</sup>ソウル市立大学校化学工学科, <sup>1</sup>株一和中央研究所, <sup>2</sup>湖西大学校食品加工工学科

## Development of Separation Method of Ginseng Saponins using Ion Exchange Resin

Jong-Hwan Sung<sup>1</sup>, Hee Jeong Chae<sup>2</sup> and Eui Yong Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

<sup>1</sup> Central Research Institute, IL-HWA Co., Ltd., 471-030, Korea<sup>2</sup> Department of Food Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Received, November 8, 1999. Accepted, March 13, 2000.

### Abstract

A new method to prepare saponin fractions from Ginseng whole extracts was developed. A separation procedure was established using HP-20, a porous adsorption resin. After adsorption, followed by elution with water and methanol, high yield and high content of Ginseng Total saponins (GTS) were obtained. The recovery yields of GTS prepared by conventional methods such as n-butanol (BuOH) method and sep-pak C18 cartridge method were compared with that by HP based method. Ginsenoside content in GTS prepared by HP method was significantly higher than that by BuOH-method. In addition, when HP method was used, GTS was separated completely into protopanaxadiol (PPD)- and protopanaxatriol (PPT)-type saponins with high rapidity. Consequently HP-20 method was found to be superior to BuOH method in the preparation of GTS, PPD and PPT fractions from Ginseng whole extracts.

Key words : Ginseng total saponins(GTS), HP resin, Protopanaxadiol(PPD), Protopanaxatriol(PPT), Recovery yield.

### はじめに

人蔘(*Panax ginseng* C. A. Mayer, Araliaceae)は、韓国並びに中東北部の山岳地帯に自生している多年生草本である。数千年前から神秘の霊薬として珍重された薬草で、中国本草学の原典である“農神本草経”に上薬として収載されている。現在は、そのほとんどが栽培品として、健胃消化剤、整腸剤、鎮痛剤、滋養強壯剤などの多くの漢方処方で使用されている。

人蔘成分の中でサポニン(ginseng total saponins, GTS)

が薬理活性を持つ物質として確認された(1)。サポニンとはスペイン語の泡に由来し、持続的に泡があり、水やアルコールによく溶ける物質を意味する。Fig.1に表わすように、GTSはtriterpene骨格のR1、R2、R3の位置に糖類が結合した構造を持つ。1966年、柴田らは人蔘に含有される配糖体を、薄層クロマトグラフでのRF値の順でginsenoside-Ra(Ra)、-Rb1、-Rb2、-Rc、-Rd、-Re、-Rf、-Rg、-Rh等と命名した(2)。Ginsenosideは、2(S)protopanaxadiol(PPD、doil系、Rb1、

<sup>†</sup>Corresponding author

Rb2、Rc、Rdなど)と20(S)protopanaxatriol(PPT、triol系、Re、Rf、Rgなど)に分けることができる。

GTSの生体内代謝に関する研究が最近活発に進み、GTSの代謝中間物質から発癌制御及び癌転移抑制作用が有ることが確認され、GTSから抗癌剤を開発しようとする研究が進行している(3-7)。また、抗糖尿、抗血小板作用、免疫増強作用と共に、PPTは血圧を上昇させ、PPDは血圧を降下させる相反する薬理作用があることも知られている(8)。この様に人蔘の主な薬理活性成分であるGTSは多方面に用いられる重要な物質で、人蔘からGTSを分離、回収する技術の開発は大変重要だと言える。今までは、人蔘をエタノールで抽出した後、さらに水飽和ブタノール(BuOH)で再抽出することによってGTSを回収する方法が使用されていた(2,9,10)。しかし、この方法ではエタノールに加えて沸点の高いブタノールを使用するために、濃縮するの時間がかかり、大量生産が難しい

という短所を持っている。

この研究は、より速く効率的にGTSを分離、回収のために、吸着型樹脂を利用する新しい分離法を開発し、同法による新しいPPTとPPDの分離法を確立し、簡便で速やかなサポニン分離法を開発しようとする。

#### 材料及び方法

##### 実験材料

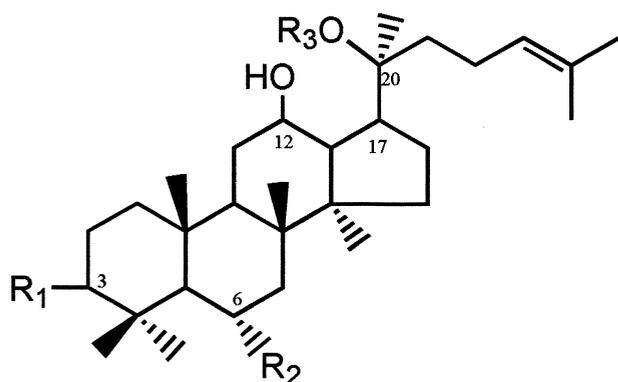
人蔘は、韓国の金山で栽培された水分含有量が約7-10%である6年根乾蔘を購入し、実験に使用した。人蔘濃縮液は、人蔘200gを細断後、50%エタノール1200mlで6時間、4回還流抽出し、そのろ液を減圧濃縮して調製した。標準品として使用したRb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rf、Rgは既存の方法で単離した(11)。

##### 機器及び試薬

HPLCはWaters Millennium systemを、TLCはsilica gel 60 F254(Merck)を使用した。GTS分離に、DIAION HP-20担体(三菱化成、日本)を使用した。Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridgeはWaters社製を、アセトニトリル(AcCN)はHPLC用を使用した。

##### ブタノール法によるGTSの分離

人蔘濃縮物2000mgを水60mlに溶解し、分液ポートに入れ、同量のエーテルで3回抽出した。水層は水飽和ブタノールで3回抽出し、ブタノール層を集め、水で3回洗浄し、ろ過し



Name	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Ginsenoside-Ra1	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Ara(p) <sup>4</sup> -Xyl
Ginsenoside-Ra2	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Ara(f) <sup>4</sup> -Xyl
Ginsenoside-Ra3	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Glc <sup>3</sup> -Xyl
Ginsenoside-Rb1	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Glc
Ginsenoside-Rb2	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Ara(p)
Ginsenoside-Rb3	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Xyl
Ginsenoside-Rc	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc <sup>6</sup> -Ara(f)
Ginsenoside-Rd	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-Glc
Ginsenoside-Re	-OH	-O-Glc <sup>2</sup> -Rha	-Glc
Ginsenoside-Rf	-OH	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H
Ginsenoside-Rg1	-OH	-O-Glc	-Glc
Ginsenoside-Rg2	-OH	-O-Glc <sup>2</sup> -Rha	-H
Ginsenoside-Rg3	-O-Glc <sup>2</sup> -Glc	-H	-H
Ginsenoside-Rh1	-OH	-O-Glc	-H
Ginsenoside-Rh2	-O-Glc	-H	-H

Fig. 1 Chemical structures of ginseng saponins  
Glc; β-D-glucopyranosyl, Xyl; β-D-xylopyranosyl, Ara(p); α-L-arabino-pyranosyl, Ara(f); α-L-arabinofuranosyl, Rha; α-L-rhamnopyranosyl

た後、減圧濃縮してGTSを得た。

#### ブタノール法によるPPT、PPDの分離

GTS 2000mgを5% NaOH 60mlに溶解し、水飽和ブタノールで3回抽出した。ブタノール層を水で洗浄した後、ろ過し、減圧濃縮してPPTを得た。一方、水層に10% HClを加え中和した後、水飽和エタノールで3回抽出し、水で3回洗浄した後、ろ過し、減圧濃縮してPPDを得た。GTSからアルカリ条件下で分離されたPPTは680mgであり、中和した後得られたPPDは760mgであった。

#### HP法によるGTSの分離

イオン交換樹脂DIAION HP-20は多孔性吸着樹脂である。吸着力が強く、特に糖分の吸着分離が容易で、糖分に多く使用されている。この研究では配糖体であるGTSの効率的な分離のためにGHP-20を利用した。まずHP-20をメタノールに一晩浸した後、蒸留水で洗浄して使用した。正確に計り取ったHP-20(10ml, v/v)を、底部を脱脂綿で栓をしたガラスカラム(10mm × 300mm)に充填した。試料及び容媒を入れるときHPが盛り上がっていることを防止するために、上部を脱脂綿で止めた。HPの吸着能を計るために人蔘濃縮液を300mg、500mg、800mg、1200mg、1700mg、2200mgを各各量り、水0.5mlに溶かして、カラム上部からゆっくり注入し、約2ml/minの流速で担体に吸着させた。吸着後はHPの3倍量の水で糖画分を溶出し、3倍量の50%メタノールで非糖画分を溶出した後、最後にメタノールでGTS画分を溶出した。吸着されなかったGTSを定量するために、水溶出液を別のHPカラムに吸着させ、同じ方法で糖部と非糖部を除去して、メタノール溶出液を得た。溶出速度による影響を試験するために同法0.5ml/minから2.5ml/minまで溶出速度を変えて実験した。以上の方法で確立した実験法は、繰り返し実験を通してその再現性を確認した。

#### HP法によるPPT、PPDの分離

人蔘濃縮液500mgを水0.5mlに溶かしてHPカラムに吸着させた後、水及び50%メタノールで糖部及び非糖部を溶出した。さらに、55%メタノールから85%メタノールまで5%間隔でメタノール濃度を変えながら溶出した。各溶出液をTLCで確認した後、減圧濃縮して各々の画分を得た。

#### TLC及びHPLCによるGTS、PPT、PPDのパターン分析

各実験の過程で得たGTS、PPT及びPPD画分は、一定量を各各メタノール及びHPLC用移動相に溶かし、TLC及びHPLCで分析した(12)。TLC分析はsilica gel 60 F254(Merck)を使用し、CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O(65 : 35 : 10, lower phase)

溶媒で展開し、発色のために10%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を噴射して、120にて5分間加熱した。HPLCはWaters Millennium systemを利用し、AcCN : H<sub>2</sub>O溶媒を移動相として使用し分析した。はじめの30分まではAcCN : H<sub>2</sub>O(18 : 82)とし、33分まで30 : 70に調節した後、以後同じ濃度で維持した。検出器はUV-203nm、カラムはLiChrospher RP-8(5 μm)を使用し、流量は1.5ml/minにした。カラム温度は40 に調節した。その結果をFig. 2 及びFig. 3 に表わす。

#### Sep-Pak法による試料のHPLC定量分析

Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridgeは、人蔘濃縮液中のginsenoside定量分析に汎用されている(13)。Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridgeは小さな前処理用完成品で、機器分析の微量成分分析用前処理に使われるので、HP法やブタノール法のように大量分離には利用できない。従ってこの実験で使用したHP法により分離したGTSの分離能をSep-Pak法と比較した。ブタノール法、HP法、並びにSep-Pak C<sub>18</sub> cartridge法によるGTSの分離能をHPLCを用いて分析した。人蔘濃縮液20mgを量り取り、少量の水に溶かした後、予めメタノール2 mlと水5 mlに浸潤させたSep-Pak C<sub>18</sub> cartridgeに注入した。水と30%メタノールで先浄後、メタノールで溶出した。溶出液は減圧濃縮後、HPLC用移動相に溶かして分析試料とした。ブタノール法とHP法で分離したGTSも同じ濃度になるよう分析試料を調製した。

#### 結果及び考察

##### HP法の吸着及び回収限界

人蔘濃縮液300mgから2,200mgを用いてHP 10mlに対する吸着量を調べた。

Table 1 に示すように、吸着させた濃縮液の量の増加とともにGTSの量も増加した。しかし、濃縮液の量が800mgを境として、GTSの回収率(%)が量依存的に減少した。これは、10mlのHPに対する人蔘濃縮液の限界吸着量が500mgであることを示唆している。さらに、HPに吸着されずに溶出したGTSを定量した結果、500mgの人蔘濃縮液を吸着した場合、GTSは検出されなかったが、800mgから約1%が検出され、以後検出量が量依存的に増加し、2200mgの場合、3.7%が検出された。また、GTSの吸着量と非吸着量を比較した場合、吸着量は濃縮液の量が800mgまでは14.4~14.8%と一定しているが、1200mg以後からは徐々に減少していることが分かる。これは水で先浄するときは残留しているが、不安定な吸着状態であるために、50%メタノールで非糖部を先浄する時、溶出させたと思われる。以上の結果から見ると、HP 10mlを基準として人蔘濃縮液からGTSを吸着分離する場合、500mgの人蔘濃縮液を吸着されるのが好ましいことが分かった。

次に、先浄液の溶出速度がGTSの吸着分離に与える影響を

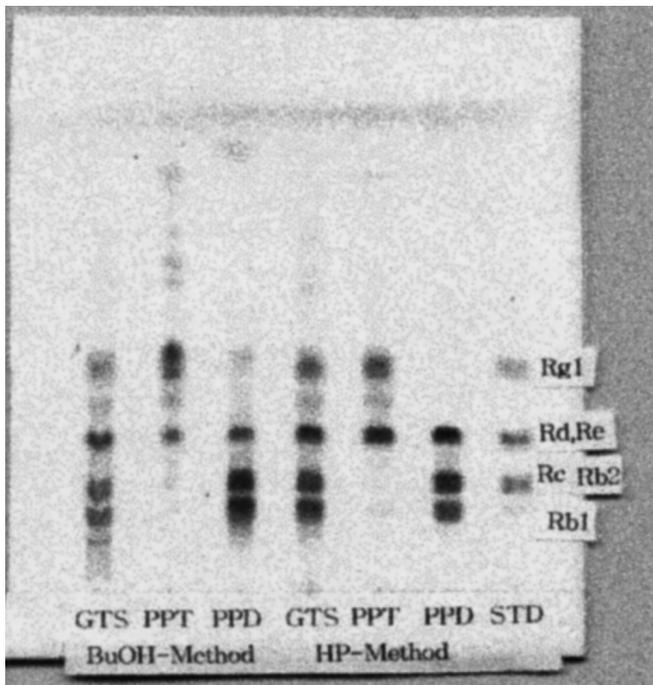


Fig. 2 TLC spots of GTS, PPT and PPD obtained by BuOH and HP method

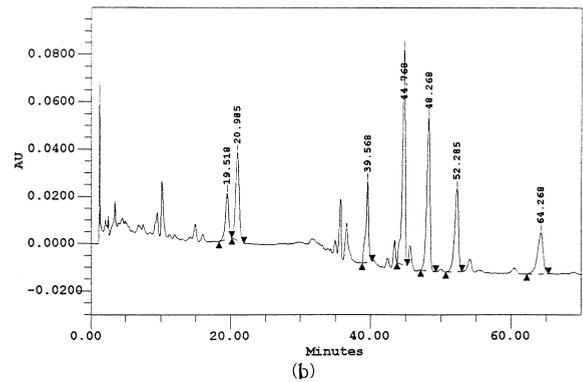
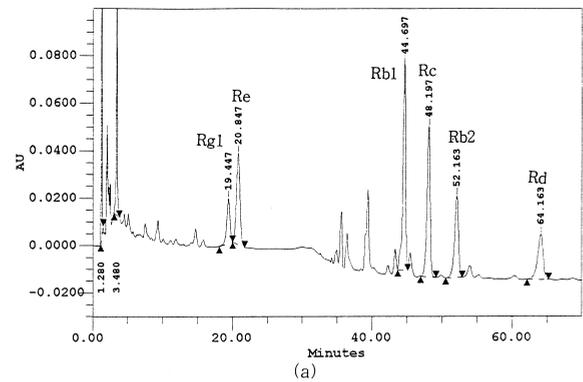


Fig. 3 Comparison of HPLC profile of GTS obtained by BuOH method(a) and HP method(b)

Table 1. Capability of HP resin to separate GTS from ginseng extract

Weight of ginseng extract (mg)	GTS weight obtained in MeOH phase (mg)	GTS weight obtained in H <sub>2</sub> O phase (mg)	Total weight of GTS obtained (mg)	Recovery yield of GTS (%)
300	44.4	-	44.4	14.8
500	72.1	-	72.1	14.4
800	106.9	8.1	115.0	13.4
1200	146.2	16.9	163.1	12.2
1700	184.4	40.7	225.1	10.8
2200	199.7	81.1	280.8	9.1

Table 2. Effect of elution rate on the isolation yield of GTS in HP method

Elution rate (ml/min)	Total weight of GTS obtained (mg)	Recovery yield of GTS (%)
0.5	70.7	14.1
1.0	71.5	14.3
1.5	70.4	14.1
2.0	72.3	14.5
2.5	70.6	14.1

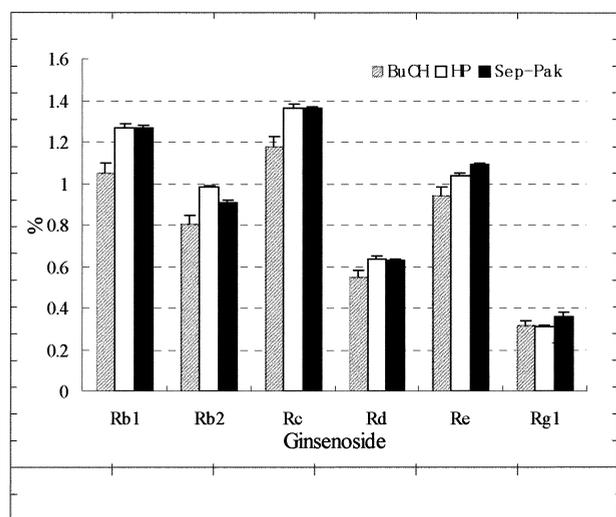


Fig. 4 Comparison of the recovery yields of ginsenosides obtained by BuOH, HP and Sep-Pak Method

調べた結果を Table 2 に表わす。HPカラムの最大自然溶出速度である2.5ml/minまでは、溶出速度が増加してもGTS含量に影響を与えることなく、平均14.2%の一定値が得られることが分かった。

#### HP法によるPPT、PPDの分離

HPカラムに吸着された濃縮液中のPPTとPPDを分離するために、GTS分離法と同様に水と50%メタノールで糖部と非糖部を除去した後、55%メタノールから80%メタノールまで5%間隔でメタノール濃度を変えながら溶出した。55~65%メタノールからの溶出画分にはPPT成分だけが検出され、次に70%メタノール以上での溶出画分にはPPD成分だけが検出された。各々の溶出液を減圧濃縮して、人蔘濃縮液508.1mgから、65%以下のメタノール溶出液から21.3mgのPPT、70%以上のメタノール溶出液から48.6mgのPPDを得た。従って、人蔘濃縮液をHPカラムに吸着先浄後、メタノール濃度を70%以下と以上に区別して溶出すれば、PPTとPPDを分離できることが分かった。

#### ブタノール法とHP法の比較

人蔘濃縮液からGTSを分離してその含量を比較した結果、ブタノール法は14.8%、HP法は14.2%でブタノール法のGTS含量が少し高かった。これはブタノール法の場合、ブタノール抽出物を水で先浄するとき、遊離の糖が残存するのに対し、HP法では完全に糖が除去されることに起因すると思われる。

このことは、Fig. 2 に示すように、ブタノール法の場合、TLC下端に黄色いバンドの発現が遊離糖成分の存在を示していることから裏付けられる。ブタノール法で分離した場合、

遊離糖が残存することによりサポニン含量が高くなったと推察される。Fig. 3 の結果を見ると、二つの方法により分離したGTSのHPLCのパターンには大きな差は見られなかった。

ブタノール法とHP法によるPPTとPPDパターンをTLC (Fig. 2) とHPLCで分析した。その結果、ブタノール法で分離したPPTからはPPD成分であるRb1、Rb2、Rc、Rdなどが検出され、PPDからもPPT成分であるReが検出され、完全に分離されないことが分かった。しかし、HP法から分離したPPTやPPDからは各々の成分だけが検出され、HP法によるPPTとPPDの分離がブタノール法よりも選択性において優れていることが分かった。さらに、HP法はブタノール法とは違って、人蔘濃縮液をHPカラムに吸着させた後、溶出液媒であるメタノール含量を変えることによってPPT、PPD、GTSを選択的に分離できる長所がある。

#### Ginsenosideの定量分析

各分離方法における6種の主要ginsenoside成分に対するHPLC分析を行った結果をFig. 4に表わす。HP法並びにSep-Pak法によるGTS含量は、ほとんど同量であったが、ブタノール法によるGTS含量は著しく低い。また、Sep-Pak法に対する回収率を比較すると、ブタノール法は86.5~88.7%(平均86%)であるのに比べ、HP法では88.8~106.5%(平均99.8%以上)の高い回収率が得られた。従って、HPを用いたGTSの分離法は、既存のブタノール法による低回収率、低分離能、並びに操作の煩雑さを解決するものであって、迅速、簡便で、高選択的に分離でき、大量生産にも耐えうる分離方法であると考えられる。

#### HP法の特長

ブタノール法の最も大きな短所は溶媒分離が悪くて時間がたんさくかかり、刺戟的な有機溶媒を使用するという点である。実際、本実験でもブタノール法でGTSを分離するのに濃縮、乾燥まで含めて48時間以上所要した。これに比べてHP法はわずか4~5時間あればすべての実験が終了できた。またHP法はメタノールと水だけを使うので実験環境も多く改善されており、沸点が比較的低いメタノール層を濃縮するので低温でも速やかな濃縮が可能で、カラムを装着できる小さなスペースでも実験が可能で比較的少量の溶媒で結果が得られる。従って、スケールアップによる大量生産が容易で、時間的な面からも、コスト的な面からもブタノール法により良い新規な方法が確立できた。

#### 結 論

高麗人蔘の成分中で最も重要な薬理活性を持つGTSを分離

するために、既存のブタノール抽出法の短所を解決し、これに変わる新しい分離方法を確立した。多孔性イオン交換吸着樹脂であるDIAION HP-20をガラスカラムに充填した後、高麗人蔘濃縮液を吸着させ、水と50%メタノールで順次溶出し、最終的にメタノールで溶出してGTSを得ることができた。この方法では10ml容量のHPを用いた場合、500mgの人蔘濃縮物を分離することができた。得られたGTSは既存のブタノール抽出法で得たものと比べ、サポニン含量が高く、吸着分離能に優れていた。さらに、65%以下のメタノール溶出液からPPTを、70%メタノール以上のメタノール溶出液からはPPDを、それぞれ特異的に回収できた。従って、高麗人蔘濃縮液をHPカラムに吸着させ、溶出溶媒のメタノール含量を変えらることによってGTS、並びにPPT、PPDを選択的に分離することが可能となった。本研究を通して開発されたイオン交換樹脂法による人蔘サポニンの簡便な分離精製法が確立でき、これにより人蔘サポニンに対する新しい研究の展開が期待される。

#### 参考文献

- 1 ) S. Shibata, O. Tanaka, J. Shoji and H. Saito, *Economic and Medicinal Plant Research*, Academic Press, London 1985 pp 217
- 2 ) S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima and T. Osawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 17 (1966) 595-600
- 3 ) 成鍾煥, 長谷川秀夫, 松宮智之, 内山雅守, 河周永, 李文淳, 許才斗, *生薬学会誌*, 26 (1995) 360-367
- 4 ) 成鍾煥, 長谷川秀夫, 河周永, 朴世浩, 松宮智之, 内山雅守, 許才斗, *生薬学会誌*, 28 (1997) 35-41
- 5 ) H. Hasegawa, J. H. Sung, S. Matsumiya, and M. Uchiyama, *Planta Medica*, 62 (1996) 453-457
- 6 ) B. H. Lee, S. J. Lee, J. H. Hui, S. Y. Lee, J. H. Sung, J. D. Huh and C. K. Moon, *Planta Medica*, 64 (1998) 500-503
- 7 ) H. Hasegawa, J. H. Sung and J. D. Huh, *Arch. Pharm. Res.*, 20 (1997) 539-544
- 8 ) T. Kaku, T. Miyata, T. Uruno, I. Saco and A. Kinoshita, *Arzneim. Forsch.*, 25 (1978) 539-547
- 9 ) 安藤利夫, 田中 治, 柴田承二, *生薬学雑誌*, 25 (1971) 28-32
- 10) 藤田路一, 糸川秀治, 柴田承二, *薬学雑誌*, 82 (1962) 1634-1638
- 11) H. Hasegawa, S. Matsumiya, M. Murakami, T. Kurokawa, R. Kasai, S. Ishibashi and K. Yamasaki, *Planta Medica*, 60 (1994) 153-156
- 12) 田中 治, 笠井良次, 松浦廣道, 山口啓之, *Pharm. Tech. Japan*, 2 (1986) 475-481
- 13) H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Mastushima, M. Tomoda and N. Takai, *Chromatographia*, 24 (1987) 517-519