

ノート

当帰の品質評価に関する研究 (第2報) — ligustilide のキャピラリーGC分析 —

金森 久幸 信宗 正男 麴池昭二三* 坂本 征則**

Studies on the Evaluation of Angelicae Radix (Part 2) — Quantitative Analysis of Ligustilide by Capillary Gas-chromatography —

HISAYUKI KANAMORI, MASAO NOBUSO, AKIFUMI MOCHIIKE*
and IKUNORI SAKAMOTO**
(Received Sep.30, 1996)

Summary

A capillary gas-chromatographic method was established for the quantitative analysis of ligustilide in Angelicae Radix. This method was also applied to determination of ligustilide in commercial and cultivated plant. A stereoisomer of ligustilide was also determined.

keywords --- ligustilide, Angelicae Radix, *angelica acutiloba*, quantitative analysis, capillary gas-chromatography

緒 言

当帰はトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa またはその他近縁植物 (Umbelliferae) の根を、通例、湯通ししたもので、主として漢方処方薬であり、婦人薬、冷え性用薬、保健強壮薬精神神経用薬、尿路疾患用薬などの処方に比較的高頻度に配合されている。成分としては、ligustilide, butylidenephthalide, butylphthalide, sedaonic acid lactone のフタリド類[1]のほか falcarinol などのポリアセチレン化合物, scopoletin などのクマリン類など[2]が知られている。品質評価の手法としては、抗アセチルコリン作用、抗喘息、鎮けい作用[3]を有する ligustilide を指標物質とするガスクロマトグラフ法 (GC) が報告されている[4]が、ligustilide は非常に不安定であり、標準品も市販されていない。前報において我々は、当帰から ligustilide を比較的容易に単離する方法を開発し、ligustilide をクロロホルム溶液とし、遮光して保存すれば、室温でも1年間は安定に存在することを報告した[5]。今回は、ligustilide のキャピラリーガスクロマトグラフ (キャピラリーGC) を用いた定量法を検討し、市販当帰、四川省産当帰及び

広島県内の3ヶ所で栽培したトウキから調製した生薬の品質評価に応用したので報告する。

実験方法

1. 試 料

市販当帰は1992年に広島市場で購入した。四川省産当帰は1992年に中国四川省より持ち帰ったものを用いた。栽培当帰は国立衛生試験所北海道試験場保存の種苗を用い、広島県の沿岸部 (沼隈郡沼隈町) と内陸部 (高田郡甲田町) で1991年5月から1992年12月まで栽培したもの、佐伯郡佐伯町で1993年5月から1993年12月まで栽培したものの根茎を乾燥して調製したものを用いた。

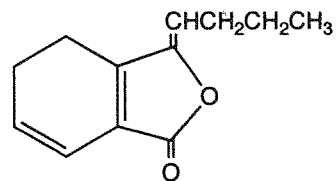


Chart 1. Structure of ligustilide

*広島県福山保健所: Hiroshima Prefectural Fukuyama Community Health Center

**広島県福祉保健部薬務課: Pharmaceutical Affairs Division, Welfare and Health Affairs Department, Hiroshima Prefectural Government

ligustilideの標準品は、前報[5]で得たものを用いた。

2. GC分析

GC分析は、次の条件によった。装置：GLサイエンス社製G-380，カラム：DB-17 0.53mm IDx30m 膜厚1 μ m（ヒューズドシリカキャピラリー；J&W社製），カラム温度：50°（1min）；50～165°（20°/min）；165～230°（1.5°/min）；230°（2min），注入口温度：200°，検出器温度：250°，キャリアーガス：He 15ml/min，データ処理機：クロマトコーダー12。

GC-MS分析は、次の条件によった。装置：JEOL JMS AX505，カラム：DB-17 0.25mm IDx30m 膜厚0.25 μ m（ヒューズドシリカキャピラリー；J&W社製），キャリアーガス：He 10 psi，その他の条件はGCに準じた。

3. 検量線

ligustilide 10.0mgを精密に量り、ヘキサンに溶解して正確に25mlとし、標準原液とした。標準原液に内標準溶液1.0mlを加えたのちアセトンで5.0mlに希釈し、1～150 μ g/mlの各種濃度溶液を調製した。それぞれの標準溶液4 μ lを上記GC条件で測定し、検量線を作成した。

内標準溶液：フタル酸ジイソブチル50mgをアセトンに溶かして100mlとする。

4. 試料溶液の調製

試料を60メッシュ以下の粉末とし、その250mg（四川省産は含有量が多いので50mg）を精密に量り、内標準溶液1.0mlおよびアセトン4.0mlを加えたのち、超音波で10分抽出後、遠心分離し、その4 μ lをGC分析に供した。定量値は3回の平均値で表した。

結果および考察

山岸らはligustilideを始めとするphtalideの分析方法としてGC法[4]および高速液体クロマトグラフ（HPLC）法[6]を報告しているが、パックドカラムを用いるGCではphtalideの完全分離が困難である。また、当帰中のligustilideの含有量が0.05～0.1%と比較的少ないため、前処理に濃縮操作が必要であり、ligustilideは気散しやすいので定量値が低くなる可能性がある。一方、HPLC法は、順相法であるため有機溶媒を多量に必要とする。そこで高分離能を有するキャピラリーカラムを用いたGCによる分析法を検討した。

1. 抽出条件の検討

試料溶液調製時の抽出溶媒を検討するためとして各々5.0mlのヘキサン、酢酸エチル、アセトンおよび

クロロホルムを用いて市販当帰について、超音波抽出を行ったところ、大きな差はなかったが、クロロホルム、アセトン、酢酸エチル、ヘキサンの順であった。しかし、クロロホルムは有害試薬であるため、抽出溶媒としてはアセトンを使用することにした。抽出時間は、抽出率が10分以上続けても高くなることはなかったため、室温で10分間超音波抽出を行うこととした。

2. GC分析条件の検討

キャピラリーカラムとして、無極性（DB-1，HP-1），微極性（DB-5），中極性（DB-17），強極性（DB-WAX）

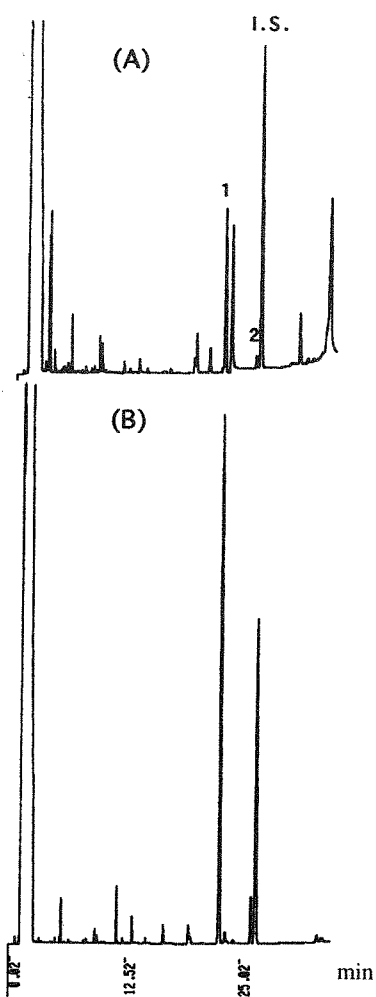


Fig. 1. Capillary Gas Chromatograms of the Acetone Extract of Commercial (A) and Cultivated (B) *Angelicae Radix*.

1, ligustilide ; 2, ligustilide isomer ; I. S., internal standard (diisobutylphtalate), column : DB-17 (0.53 mm ID x 30 m, 1 μ m), carrier gas : He (15ml/min), column temperature : 50° (1min) ; 50～165° (20°/min) ; 165～230° (1.5°/min) ; 230° (2min), detector : FID.

のカラムについて温度条件等を検討した。その結果、DB-17のメガボアカラムを用いFig.1に示す温度条件で他の成分と良好に分離された。スプリットレス注入法により4 μ lまでは定量的に注入することができ、試料溶液を濃縮せずにそのまま注入しても十分分析感度が得られることがわかった。また、内標準物質を検討し、フタル酸ジイソブチルを用いることとした。

検量線はligustilideのフタル酸ジイソブチル(内標準物質)に対する面積比が1~150 μ g/mlの範囲で原点を通る直線となった。このことから当帰中のligustilideの定量限界値を0.002%とした。

3. 当帰中のligustilideの異性体の確認

内標準物質を検討中にフタル酸ジイソブチルに近い溶出時間に溶出する物質についてGC-MSによる分析

を行ったところ、Fig.2に示すようにligustilideとほとんど同じマススペクトルを与える物質であった。この物質の単離を試みたが、ligustilideの10分の1以下と低い含有量であるため、NMR分析ができるほどの量を得ることができなかった。しかしこの物質は、紫外吸収スペクトル、蛍光スペクトルがligustilideと一致すること、ligustilideは二重結合を有し、理論上幾何異性体が存在することから、ligustilideの幾何異性体と推定された。GCでの溶出順位、文献等からligustilideがZ型、本物質がE型と推察される。

4. 当帰中のligustilideの定量分析

キャピラリーGCを用いて分析した各種当帰中のligustilideの定量結果をTable 1に示した。市販当帰は大深当帰で、これまでの報告[4]とほぼ同程度の含有量

Table 1. Ligustilide Content of Angelicae Radix

	Ligustilide (%)	Ligustilide isomer (%)
commercial	0.050	0.002
cultivated (saeki-2years)	0.10	0.003
(saeki-1year)	0.19	0.005
(kouda)	0.14	0.009
(numakuma)	0.046	0.002
china (sisen)	0.71	0.081

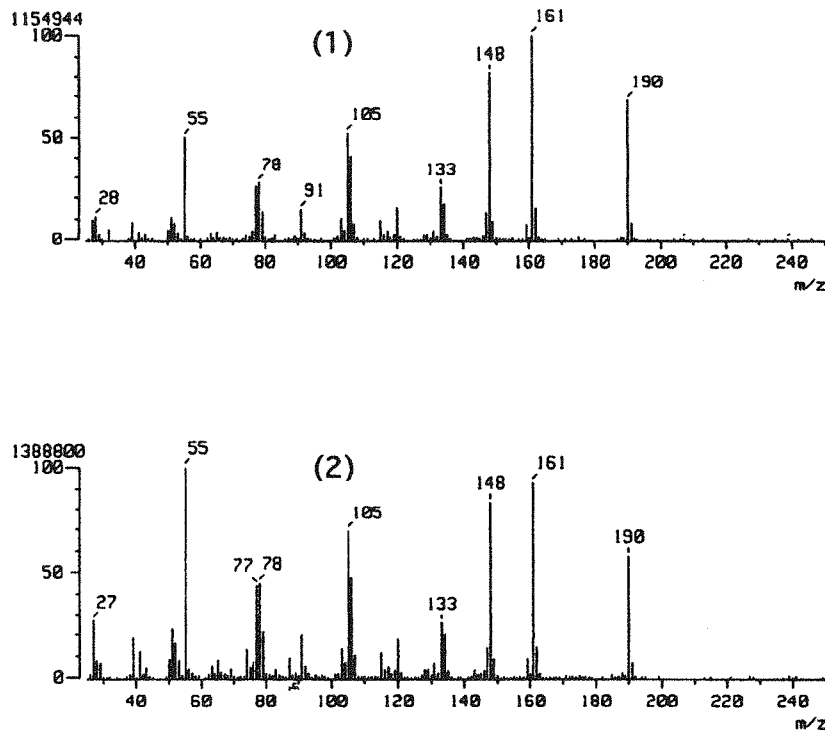


Fig. 2. Mass Spectra of ligustilide(1) and ligustilide isomer(2).

であった。栽培当帰では沿岸部で栽培したものは市販のものと同程度の含有量であったが、内陸部で栽培したものは0.14%とほぼ3倍のligustilideが含まれていた。この違いが、気候によるものか、土壌の質によるものかはわからない。一方、栽培期間が1年のものと2年のものでは、1年のものの方がligustilideの含有量が高かった。今回分析した2年のものは、1年目は違う場所で栽培したものであるため、必ずしも1年のものの方がligustilideの含有量が高いとはいえない。生薬としての当帰は通常2年ものを用いるが、ligustilide含有量の点では1年ものでも生薬として用いることができると考えられる。市販当帰と栽培当帰ではligustilide含有量の点では栽培品の方が高かったが、これは市販品は刻みになっておりligustilideが気散している可能性もあり、今回の栽培品が特別ligustilideを多く含んでいるということにはならない。むしろFig.1のようにGCのパターンが市販品と栽培品で異なっており、これらの意味するところを解明する必要がある。四川省産当帰のligustilide含有量は0.71%と市販の当帰の10倍以上含まれていた。中国産の当帰についてはこれまでにligustilide含有量が異常に高く、日本産のものと同じ薬効を期待して用いるには、化学的、薬理的な研究が必要とされているが、四川省産当帰もこれを輸入して日本産のものと同様に用いることはむ

ずかしいと考えられる。

広島県では平成2年度より、薬用植物需給体制整備事業と題された事業を行った。これは毎年2ヶ所で、県内で成育可能な2種類の薬用植物を実験的に栽培し、その品質評価をし有望植物の栽培指針を作成するものであるが、本研究はこの事業の一つとして行ったものである。

また、本事業を行うに当たり、薬用植物の実験栽培に協力をいただいた、湧永製薬株式会社及び常石造船株式会社に深謝します。

文 献

- [1] 高橋真太郎, ヒキノヒロシ, 佐々木靖子, 薬学雑誌, **78**, 1156-1161 (1958).
- [2] 田中重雄, 星野千恵子, 池城安正, 田端守, 木島正夫, 薬学雑誌, **97**, 14-18 (1977).
- [3] 陶静儀, 阮干平, 梅其炳, 劉深, 田巧蓮, 陳耀祖, 張惠迪, 段志興, 薬学学報, **19**, 561-568 (1984).
- [4] 山岸喬, 金島弘恭, 木下良裕, 森三佐雄, 北海道立衛生研究所報, **24**, 47-51 (1974).
- [5] 金森久幸, 坂本征則, 広島県衛生研究所研究報告, **39**, 23-26 (1992).
- [6] 山岸喬, 北海道立衛生研究所報, **32**, 12-16 (1982).