

HPLC による当帰葉および茎中のフタライド類および フロクマリン類成分の同時分析

(2014 年 10 月 27 日受付)

(2015 年 2 月 10 日受理)

北野文理^{a)}、大住優子^{b)}、植山高光^{b)}、北田善三^{a)}

a) 畿央大学 健康科学部

b) 奈良県薬事研究センター

Simultaneous analysis of phthalide and furocoumarin group components in *Angelica acutiloba* leaves and stems using HPLC

(Received October 27, 2014)

(Accepted February 10, 2015)

Noriri Kitano^{a)}, Yuko Osumi^{b)}, Takamitsu Ueyama^{b)}, Yoshimi Kitada^{a)}

a) Faculty of Health Science, Kio University

b) Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

Abstract

In this study, the analytical method was developed for the simultaneous analysis of the two components of phthalide group, those are ligustilide and butylidene phthalide, and the three components of furocoumarin group, those are psoralen, xanthotoxin and bergapten, in angelicae leaves and stems using high performance liquid chromatography (HPLC).

The components in angelicae leaves and stems extracted with methyl alcohol using an ultrasonic bath. HPLC was performed on an Inertsil ODS-3 column (4 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm) with ultraviolet detection set to 240 nm, using H₂O-acetonitrile in the mobile phase.

The measurement of the concentration of each component in angelicae leaves and stems by the above mentioned method showed the following results: ligustilide 1678 ~ 12363 μ g/g, butylidene phthalide 199.3 ~ 362.5 μ g/g, xanthotoxin 65.4 ~ 271.0 μ g/g and bergapten 137.4 ~ 299.3 μ g/g, and psoralen was under the limit of quantification.

Keywords : フタライド類、フロクマリン類、当帰葉、高速液体クロマトグラフィー
phthalide, furocoumarin, *Angelica acutiloba* leaf, HPLC

I 緒言

当帰はセリ科シシウド属に属する多年性草本植物で、その根は当帰芍薬散や四物湯に代表される漢方の要薬として使用されており、临床上は主に婦人や虚弱体質者の補血、滋養、鎮痛、鎮静、強壮薬として利用されている¹⁾。

当帰の基原植物として日本薬局方²⁾では「トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyama* Hikino」と規定されているが、当初から薬用当帰として規定されていた大深当帰 (*Angelica acutiloba* Kitagawa) の栽培は減少している³⁾。そこで、奈良県では官民をあげて大深当帰の復活をめざし、奈良県五條

市、宇陀市、葛城市などで栽培に取り組んでいるところであるが、2012 年に厚生労働省から出された通知⁴⁾により、葉に限って食用にも使用できるようになったことから、従来利用されていなかった葉の有効活用も含めた検討が現在行われている。

当帰の主な含有成分は、Ligustilide や Butylidene phthalide などのフタライド類である^{1, 3, 5-8)}。また、植物などの野菜類に対して、切除、乾燥、加熱などの加工処理を行い、従来の植物自体には含まず、過酷な条件下で生成する成分 (ストレス化合物: フロクマリン類) である Psoralen、Xanthotoxin および Bergapten が含まれている⁸⁻¹⁰⁾。それらの各成分のうちフタライド類は抗アセチルコリン作用を有し、Ligustilide では抗

喘息、鎮痙作用を有することが認められている²⁾。フロクマリン類である Psoralen は光過敏作用を有し、Xanthotoxin、Bergapten はペントバルビタール催眠活性を有することが、またフロクマリン類が日光に対する皮膚の感受性を増し、健康障害を引き起こすことが知られている¹⁰⁾。これらフトライド類、フロクマリン類がホッカイトウキやホソバトウキ、ミヤマトウキなどの葉にも根と同様に含まれていることが知られているが⁸⁾、特に食用目的に栽培された大深当帰の葉について調べた報告はなく、フトライド類やフロクマリン類の含有量によっては生理作用の発現する可能性も考えられる。

フトライド類およびフロクマリン類の分析法としてはガスクロマトグラフ (GC) を用いた方法^{1, 3, 5)}、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた方法⁸⁻¹¹⁾、高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC/MS) を用いた方法¹²⁾などが報告されているが、当帰中のフトライド類とフロクマリン類の同時分析法についての報告はない。

そこで、著者らは HPLC による Ligustilide、Butylidene phthalide、Psoralen、Xanthotoxin および Bergapten の 5 つの成分 (Fig. 1) の同時分析法を開発するとともに、当帰葉および茎中の 5 成分について予備調査を行ったので報告する。

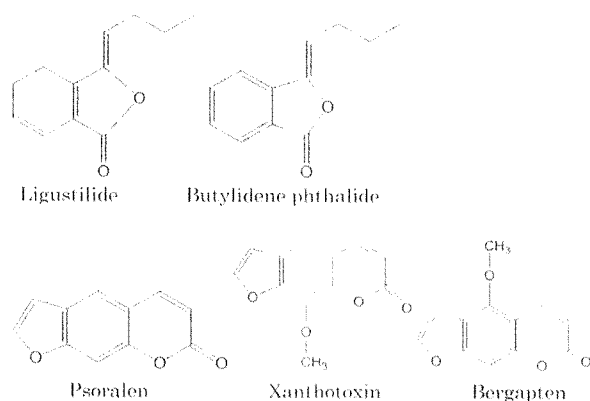


Fig. 1. Structural formula of ligustilide, butylidene phthalide, psoralen, xanthotoxin and bergapten

II 実験方法

1. 試料

奈良県五條市内の圃場で栽培、収穫した以下の大深当帰の葉および茎を用いた。なお、当帰葉⑥だけがハウス栽培でそれ以外は露地栽培であり、播種時期も⑥だけが収穫した年の4月であるのに対し、それ以外は収穫した年の前年であった。

- 1) 当帰葉① (Leaf ①) : 2013年11月に収穫し、熱風乾燥器により30℃で100時間乾燥、室温で4ヶ月保存したものを、コーヒーミルで粉砕後さらに室温で5ヶ月間保存した。
- 2) 当帰葉② (Leaf ②) : 2013年11月に収穫し、熱風乾燥器により30℃で100時間乾燥、室温で9ヶ月間保

存後、コーヒーミルで粉砕した。

- 3) 当帰葉③ (Leaf ③) : 2013年11月に収穫し、-85℃で6ヶ月間凍結保存した後、熱風乾燥器により30℃で100時間乾燥、室温で3ヶ月間保存後、コーヒーミルで粉砕した。
- 4) 当帰葉④ (Leaf ④) : 2014年8月に収穫し、熱風乾燥器により30℃で100時間乾燥後、コーヒーミルで粉砕した。
- 5) 当帰葉⑤ (Leaf ⑤) : 2014年9月に収穫し、室内で2週間乾燥後、コーヒーミルで粉砕した。
- 6) 当帰葉⑥ (Leaf ⑥) : ハウス栽培品を2014年9月に収穫し、室内で2週間乾燥後、コーヒーミルで粉砕した。
- 7) 当帰茎① : 当帰葉①の茎をコーヒーミルで粉砕した。
- 8) 当帰茎④ : 当帰葉④の茎をコーヒーミルで粉砕した。
- 9) 当帰茎⑤ : 当帰葉⑤の茎をコーヒーミルで粉砕した。
- 10) 当帰茎⑥ : 当帰葉⑥の茎をコーヒーミルで粉砕した。

2. 試薬類

- 1) 標準溶液 : Psoralen (フナコシ製研究用試薬、純度97%)、Xanthotoxin (和光純薬工業製化学用、純度98%)、Bergapten (東京化成工業製、純度98%)、Butylidene phthalide (Alfa Aesar 社製、純度95%) 各50 mg をメタノール50 mL に溶解し、この溶液1 mL をメタノールで10倍希釈したものを4成分の標準原液とした。Ligustilide は100 μg/mL メタノール溶液 (和光純薬工業製、500 μL アンプル入り) を標準原液とした。これらの標準原液を適宜混合し、必要によりメタノールで希釈して標準溶液を調製した。
- 2) メンブランフィルター : 東洋濾紙製 DISMIC-13HP (0.45 μm) を用いた。
- 3) その他 : メタノールは和光純薬工業製試薬特級を、アセトニトリルは同社製 HPLC 用をそれぞれ用いた。

3. 装置

- 1) コーヒーミル : 岩谷産業製 IFM-720G-W/Y 型
- 2) 超音波槽 : BRANSON 社製 Yamato3510
- 3) 高速回転抽出装置 : IKA Works 社製 シャフトジェネレーター S25N-18G 型
- 4) 遠心分離器 : TOMY 社製 LC-121 型
- 5) 乾燥器 : アドバンテック社製 PRN420DB 型
- 6) 熱風乾燥器 : 三和化機工業製 DAE55 型
- 7) HPLC : 島津製作所製 LC-20AD ポンプ、SIL-10ADvp オートインジェクター、SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器、CTO-20A カラムオーブン、LC solution ワークステーション

4. 試験溶液の調製

試料0.5 g を50 mL メスフラスコに正確に秤取し、メタノールで全量50 mL とした後、超音波槽に浸漬し、30分間超音波を照射した。その後、メンブランフィルターでろ過したろ液

を試験溶液とし、HPLCで測定した結果、検量線の最高濃度を超えるものについては、メタノールで定量的に希釈したものを試験溶液とした。

5. HPLC 測定条件

カラム: GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 (4 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm)、移動相A液: 水、移動相B液: アセトニトリル、グラジエント条件: 0分B液 40%-20分B液 56%、カラム温度: 40°C、流速: 0.8 mL/min、測定波長: 240 nm、注入量: 20 μ L

III 結果および考察

1. HPLC 条件の検討

カラムに逆相分配型の Inertsil ODS-3 を用いて移動相の検討を行った。まず有機溶媒としてアセトニトリルを用い、水系として水および酢酸アンモニウムについて検討したところ、水だけでも5成分のピーク形状、分離とも良好な結果が得られたことから水を用いることにした。

次に有機溶媒としてアセトニトリルおよびメタノールを用いて水とのグラジエントモードで5成分の分離を検討した。その結果、アセトニトリルでは5成分がほぼ良好に分離したが、メタノールでは Psoralen と Xanthotoxin が重なり分離が困難であったことから、有機溶媒としてアセトニトリルを用いることにした。

また、検出波長については、フォトダイオードアレイ検出器を用いて各成分の吸収スペクトルを確認したところ、大きく分けて 220 nm 付近、240 nm 付近および 300 nm 付近に強い吸収が見られたが、試料中の含有量をもっとも少ない Psoralen の感度を確保するために測定波長を 240 nm とした。この波長では Ligustilide の吸収は弱いが、試料中の含有量をもっとも多いため測定に支障はなかった。

以上の条件で測定した標準溶液および試験溶液のクロマトグラムを Fig. 2 に示したが、各成分の分離、ピーク形状はともに良好で、妨害ピークもみられなかった。なお、19.4 分および 21.8 分に出現したピークは、もっとも純度が低い Butylidene phthalide (純度 95%) 由来のものであり、合成副生成物もしくは分解物の可能性が指摘されるが、定量には問題がなかったため、本実験ではそのまま用いた。また、1回の測定に要する時間は 30 分であった。

2. 試験溶液の調製

HPLC を用いたフライト類およびフロクマリン類の測定において、当帰根からの Ligustilide の抽出に 40% アセトニトリル⁹⁾、川芎根からの抽出にメタノール¹³⁾、当帰根からのフロクマリン類の抽出にメタノール-水 (4:1)^{9, 10)}、ハマボウフウ根からの抽出にメタノール¹⁴⁾ がそれぞれ用いられている。また、高橋らは 70% アセトニトリルを用いて当帰の根および葉から Ligustilide およびフロクマリン類を同時に抽出している⁸⁾。

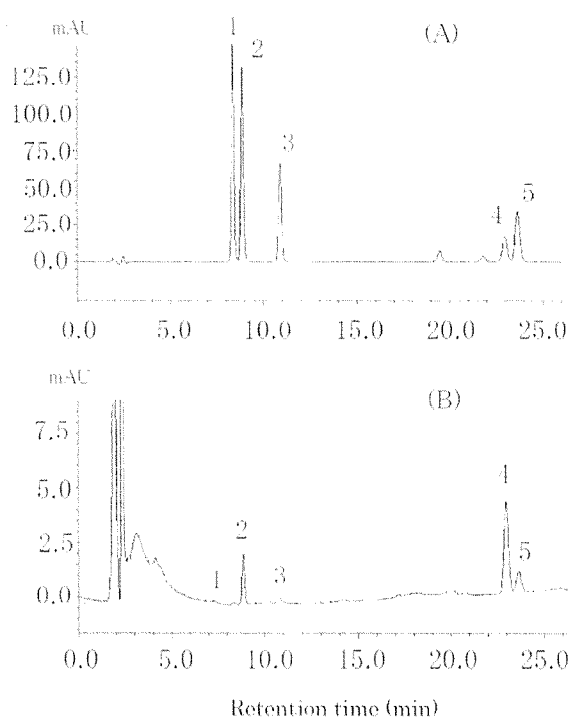


Fig. 2. HPLC chromatograms of standard (A) and sample solution (B)

Peaks : 1. psoralen, 2. xanthotoxin, 3. bergapten, 4. ligustilide, 5. butylidene phthalide

Absolute injection quantity of standard : each component, 0.2 μ g

Conditions : column, Inertsil ODS-3 (4 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm) ; mobile phase A, H₂O ; mobile phase B, acetonitrile ; gradient, 0 min B 40% - 20 min B 56% ; column temperature, 40°C ; flow rate, 0.8 mL/min ; detection, 240 nm ; injection volume, 20 μ L.

そこで、著者らは当帰葉および茎からのフライト類およびフロクマリン類5成分の抽出溶媒として、HPLCの移動相とも容易に混合するメタノールおよび70%アセトニトリルを、抽出装置として超音波槽および高速回転抽出装置を用いて当帰葉について比較検討した。超音波抽出は、試料 0.5 g を 50 mL メスフラスコに正確に秤取し、抽出溶媒で 50 mL とした後、超音波槽に 30 分間浸漬した後、メンブランフィルターでろ過したろ液を試験溶液とした。一方、高速回転抽出装置を用いたホモジナイズ抽出は、試料 0.5 g を 40 mL 容の遠心管に正確に秤取し、抽出溶媒を 20 mL 加えて 13,500 rpm で 30 秒間抽出し、抽出溶媒 5 mL で装置を洗浄し、洗液を先の遠心管に合わせて 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を 50 mL メスフラスコに移した。次に、残渣に抽出溶媒 20 mL を加えて先と同じ操作を繰り返す、得られた上澄み液を 50 mL メスフラスコに集め、抽出溶媒で全量 50 mL とした後、メンブランフィルターでろ過したろ液を試験溶液とした。

各試験溶液を測定した結果、Table 1 に示したように Bergapten では 70% アセトニトリルを用いた超音波およびホモ

ジナイズ抽出がもっとも高濃度であったが、他の方法と大きな違いはみられず、その他の成分ではメタノールを用いた超音波抽出がもっとも高濃度であった。そこで、操作性も考慮して抽出にはメタノールによる超音波抽出を用いることにした。

3. 検量線および定量限界

今回検討した測定条件で検量線を作成したところ、Psoralen および Xanthotoxin が 0.02 ~ 50 µg/mL、Bergapten が 0.03 ~ 50 µg/mL、Butylidene phthalide および Ligustilide が 0.2 ~ 50 µg/mL の範囲でいずれも寄与率 (R^2) が 0.999 以上の良好な直線性を示した。定量限界は、標準溶液として Psoralen および Xanthotoxin が 0.02 µg/mL (試料として 2 µg/g)、Bergapten が 0.03 µg/mL (3 µg/g)、Butylidene phthalide および Ligustilide が 0.2 µg/mL (20 µg/g) であった。

4. 添加回収試験

当帰葉 0.5 g を用い各成分 25 µg ずつを添加 (試料として 50 µg/g) して 30 分間放置した後、回収試験を行った。その

結果、Table 2 に示したように 5 成分の平均回収率は 106.0 ~ 131.6% とやや高値であったが、ブランクにも 5 成分が含まれており、しかも購入した Ligustilide の標準品が 100 µg/mL と低濃度であったため、低濃度での添加回収試験しかなかったことを考慮すれば比較的良好な結果といえる。

5. 当帰葉および茎中の 5 成分の含有量測定

測定した結果を Table 3 に示した。フタライド類の Ligustilide では葉、茎ともに 2013 年収穫品より 2014 年収穫品の方が高濃度であり、その理由として保存中の揮散が考えられた。また、フロクマリン類では Xanthotoxin が葉、茎ともに室内乾燥品で低濃度であり、これらの試料がいずれも室内乾燥という穏やかな乾燥条件であるとともに、乾燥後短期間で測定しているため試料にとってのストレス負荷が小さかったと考えられる。

高橋らがホッカイトウキの葉 5 件について測定したところ、Ligustilide が 634 ~ 1672 µg/g、Butylidene phthalide が 2 ~ 4 µg/g、Psoralen が検出限界以下 (ND)、Xanthotoxin が 3

Table 1. Comparison of extracted methods of phthalide and furocoumarin components from *Angelica acutiloba* leaf (µg/g)

Method		Xanthotoxin	Bergapten	Ligustilide	Butylidene phthalide
Solvent	Instrument				
Methyl alcohol	Ultrasonic	176.8	149.8	1693	214.0
	Rotary grinder	161.8	139.8	1596	200.8
70%Acetonitrile	Ultrasonic	173.0	151.3	1675	212.7
	Rotary grinder	172.0	151.6	1628	211.4

Psoralen : under the limit of quantification

Table 2. Recovery of phthalide and furocoumarin components from *Angelica acutiloba* leaf

	Blank (µg/g)	Added (µg/g)	Recovery (%)
Ligustilide	1913 ± 0.3*	1966 ± 0.3	106.0
Butylidene phthalide	118.3 ± 0.6	173.0 ± 0.6	109.4
Psoralen	5.2 ± 3.8	71.0 ± 1.9	131.6
Xanthotoxin	140.6 ± 1.0	204.0 ± 6.3	126.8
Bergapten	23.9 ± 13.4	84.2 ± 0.7	120.6

*Values are means (µg/g) ± RSD (%) of three determinations.

Table 3. Analytical results of phthalide and furocoumarin components in *Angelica acutiloba* and stems (µg/g)

Sample	Harvest time	Xanthotoxin	Bergapten	Ligustilide	Butylidene phthalide
Leaf ①	November, 2013	178.0	147.3	1894	277.8
Leaf ②	November, 2013	201.7	149.1	1830	220.3
Leaf ③	November, 2013	124.2	140.9	1678	199.3
Leaf ④	August, 2014	205.1	234.7	12363	335.0
Leaf ⑤	September, 2014	68.0	181.9	8015	255.0
Leaf ⑥	September, 2014	65.4	255.3	4977	206.8
Stem ①	November, 2013	95.6	137.4	2216	321.3
Stem ④	August, 2014	271.0	219.1	9391	337.1
Stem ⑤	September, 2014	81.3	299.3	5162	333.9
Stem ⑥	September, 2014	73.3	264.0	9702	362.5

Psoralen : under the limit of quantification

~ 25 µg/g、Bergapten が ND ~ 8 µg/g であったと報告しており、今回著者らが測定した大深当帰の葉と比べ Butylidene phthalide とフロクマリン類が大幅に低い値であった。また、姉帯らが奈良県産大深当帰根の市場品について測定したところ、Psoralen が 1 ~ 42 µg/g、Xanthotoxin が 7 ~ 268 µg/g、Bergapten が 4 ~ 117 µg/g と大きな差が認められたと報告しており¹⁵⁾、今回著者らが測定した大深当帰の葉や茎と比べ、含量に大きなばらつきがみられている。

今回は予備的な調査であり例数も少なく断定的なことがいえないことから、今後さらに多くの試料について調査していく必要がある。なお、測定した試料の各成分濃度は、135°C で 1 時間乾燥して求めた水分含量¹⁶⁾を用いて乾燥重量当たりの濃度に補正した。

6. まとめ

大深当帰葉中のフクライド類 2 成分およびフロクマリン類 3 成分の HPLC による同時分析法を開発し、奈良県内で栽培された当帰についてその葉と茎の含有量を測定した。

- 1) 試料からの各成分の抽出は、メタノールを用いた超音波照射法により行った。
- 2) HPLC はカラムには逆相分配型を、移動相には水-アセトニトリルによるグラジエント法を、検出には波長 240 nm の紫外外部吸収をそれぞれ用いた。
- 3) 測定した試料の収穫年による比較では、2013 年ものに比べて 2014 年ものでは Ligustilide が高濃度であり、2013 年ものでは 1 年間の保存中に揮散したと考えられた。

VI 文献

- 1) Lay, H.L., Lin, W.Y., Motota, Y., Tamai, F., Tanabe, T. : Studies on the production and the improvement in quality of *Angelica acutiloba* KITAGAWA (I): Effects of manurial elements on the plant growth and yield, extract contents, ligustilide and butylidene phthalide contents of *Angelicae radix*. *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 321-327 (1992).
- 2) The Committee of Japanese Pharmacopoeia Guide Book, ed., "The Guide Book of Japanese Pharmacopoeia, 15th Ed.", Tokyo, Hirokawa Publishing, 2006, p. D-490-D495.
- 3) Sekizaki, H., Agata, I., Kimura, K. : Studies on the variation of ligustilide contents for cultivating process of *Angelica acutiloba* var. *acutiloba* KITAGAWA. *Shoyakugaku Zasshi*, **38**, 361-362 (1984).
- 4) 厚生労働省医薬食品局長通知 "医薬品の範囲に関する基準の一部改正について" 平成 24 年 1 月 23 日、薬食発 0123 第 3 号 (2012).
- 5) Takano, I., Yasuda, I., Takahashi, N., Hamano, T., Seto, T., Akiyama, K. : Analysis of essential oils in various species of *angelica* root by capillary gas chromatography. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **41**, 62-69 (1990).
- 6) Takano, I., Takahashi, N., Hamano, T., Yasuda, I., Seto, T., Watanabe, Y., Akiyama, K. : Simultaneous analysis of various components in kampo medicine "Un-Sei-In" (温清飲) by high performance liquid chromatography. *Nat. Med.*, **48**, 111-115 (1994).
- 7) Anetai, M., Aoyagi, M., Hayashi, T., Hatakeyama, Y. : Preparation and chemical evaluation of *angelicae radix* produced in Hokkaido (Part III) Time course study of dilute ethanol-soluble extract and sucrose contents. *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **50**, 6-10 (2000).
- 8) Takahashi, T., Tsuchida, T., Uno, T., Sekita, S., Satake, M., Yoshida, N. : Study on the botanical origins of "Toki" analysis of chemical constituents of wild *angelica* species distributed in Hokkaido. *Nat. Med.*, **59**, 157-163 (2005).
- 9) Anetai, M., Masuda, T., Takasugi, M., Shibata, T., Hatakeyama, Y. : Preparation and chemical evaluation of *angelicae radix* (Part V) Induction of stress compounds during preparation process. *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **52**, 12-18 (2002).
- 10) Anetai, M., Shibata, T., Sato, M. : Preparation and chemical evaluation of *angelicae radix* (Part IX) Increase in contents of some constituents by drying at 40°C of fresh root of *Angelica acutiloba* var. *sugiyamae*. *Pharm. Med. Device Regul. Sci.*, **41**, 736-741 (2010).
- 11) Cardoso, C.A.L., Pires, A.E., Honda, N.K. : A method for quantitative determination of furanocoumarins in capsules and tablets of phytochemical preparations. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 442-447 (2006).
- 12) Yang, W., Feng, C., Kong, D., Shi, X., Cui, Y., Liu, M., Wang, Q., Wang, Y., Zhang, L. : Simultaneous and sensitive determination of xanthotoxin, psoralen, isoimipinellin and bergapten in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **878**, 575-582 (2010).
- 13) Anetai, M., Aoyagi, M. : Preparation and chemical evaluation of *Cnidii Rhizoma* (Part IV) Effect of blanching conditions on contents of some components. *Pharm. Regul. Sci.*, **38**, 435-441 (2007).
- 14) Anetai, M., Masuda, T., Takasugi, M. : Preparation and chemical evaluation of *glehnia* root prepared from *Glehnia littoralis* cultivated in Tottori prefecture. *Nat. Med.*, **51**, 442-446 (1997).
- 15) Anetai, M., Masuda, T., Takasugi, M. : Preparation and chemical evaluation of *angelicae radix* (Part VI) Examination of furanocoumarins used as indicator substances. *Rep. Hokkaido Inst. Pub. Health*, **52**, 19-23 (2002).
- 16) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会資料 "五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル" 2005, p. 1-2.