

## 道産生薬の規格設定に関する研究 (第5報)

## 当帰中の Ligustilide の存在について

Studies on the Standardization of Crude Drugs Produced in Hokkaido (Part 5)

On the Existence of Ligustilide in Angelicae Radix (Touki)

山 岸 喬 金 島 弘 恭  
木 下 良 裕 森 三 佐 雄Takashi Yamagishi, Hiroyasu Kaneshima,  
Yoshihiro Kinoshita and Misao Mori

## 緒 言

当帰は古来から鎮静、鎮痙の目的で市広く用いられている生薬で北海道を主産地としている。しかし、北海道産当帰(北海当帰)は大深当帰(主に奈良県産)に比べ一般に商品価値が劣っているといわれ市場では低価格で取り引きされている。しかし、北海当帰と大深当帰の品質評価に関して化学的研究は行なわれていない。当帰成分の化学的研究はすでに三橋ら<sup>1)2)3)</sup>、刈米<sup>4)</sup>、野口<sup>5)</sup>らによって行なわれ Butyliden Phthalide, Ligustilide, Bergapten の化学構造が明らかにされた。一方、薬理作用については三橋、松村<sup>6)</sup>により Ligustilide の anticholinergic 作用、劉寿山編、中薬研究文献摘要<sup>7)</sup>に抗アセチルコリン作用が報告されている。又精油に大脳鎮静、延髄諸中枢の興奮ならびに麻痺作用<sup>8)</sup>を有することも知られている。これらのことから Ligustilide が有効成分の一部と考えられている。

生薬の品質評価にあたり、有効成分が化学的に明らかな物質の場合には何等かの方法で有効成分の含有量が求められなければならないが、この意味から本報では当帰の Ligustilide の定量を主目的としガスクロマトグラフィー(GLC)による Ligustilide の定量法の検討と産地別当帰 Ligustilide の定量および前報<sup>10)</sup>に引きつづき Ligustilide と関連のあるエーテルエキス量について試験を行ない、その結果について比較検討した。

## 実 験 方 法

## Ligustilide の標品の調製と同定

Ligustilide の定量に必要な標品を得るため Ligustilide 含有量の高い道産川芎を抽出原料に用いて Ligustilide の抽出、分離を次の方法で行なった。

乾燥川芎 700 g を粉碎し室温中 500 ml のエチルエーテルで3回抽出する。エチルエーテルを減圧下留法し 47.98

g のエキスを得た。この油状エキスを油浴上減圧蒸留し、bp. 125–135° (2 mmHg) の留分を集め淡黄色の油状物質 5.37 g を得た。さらに 120 ml のシリカゲル (Kieselgel 60) を用いて溶媒にヘキサン、エチルエーテル系を使用し、カラムクロマトグラフィーを行ない Table I に示すフラクションに分けた。

Table I Column chromatography of the ethereal extract of Senkyu on silica gel

Fr. No.	Solvent	Yield (mg)
1	Hexane : Ether =50 : 3	43.4
2	50 : 3	79.4
3	20 : 1	82.3
4	20 : 1	1173.0
5	15 : 1	962.1
6	15 : 1	292.6
7	10 : 1	171.3
8	20 : 3	98.1
9	30 : 3	225.1
10	5 : 1	796.5
11	5 : 1	1228.3
12	3 : 1	579.5
13	2 : 1	388.5
14	2 : 1	115.4
15	1 : 1	32.3
16	1 : 1	33.6
17	1 : 1	23.9
18	Ether	19.8

フラクション 4–6 を合わせ、さらに Preparative thin-layer chromatography (溶媒、ヘキサン : エチルエーテル = 4 : 1, 吸着剤, Kieselgel HF<sub>254</sub>) を行なった。薄層板上紫外線照射 (2540 nm) で明るい赤色を呈するスポットをかき取りエチルエーテルで抽出し, GLC, 薄層ク

ロマトグラフィー (TLC) で単一のピークおよびスポットを呈する油状物質を得た。上記の淡黄色油状物質は次の物理恒数を示した。 $[\alpha]_D^{20} = -92.31$  (C=0.9, CHCl<sub>3</sub>), IR :  $\nu_{\max}^{\text{neat}}$  1760, 1670, 1625, 960 cm<sup>-1</sup> UV :  $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$  325 nm Mass : m/e 190 (M<sup>+</sup>), 161, 148, 106, 78 NMR :  $\delta$  in CDCl<sub>3</sub> 6.26 (doublet, 10 Hz), 5.98 (multiplet), 5.22 (triplet, 8

Hz), 1.48 (sextet, 8 Hz), 0.96 (triplet, 6 Hz)。

IR, UV は三橋らの報告したデータ<sup>9)</sup> に一致した。さらに核磁気共鳴 (NMR), 質量分析 (Mass) の機器分析を行った。IR スペクトルは Fig. 1 に, NMR スペクトルは Fig. 2 に Mass スペクトルは Fig. 3 に示すとおりである。

Fig. 1 Infrared spectrum of Ligustilide (Neat)

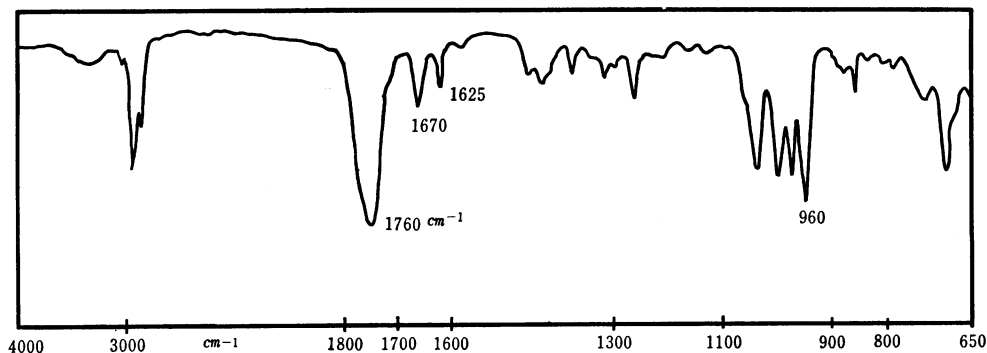


Fig. 2 NMR spectrum of Ligustilide (100 Mc)

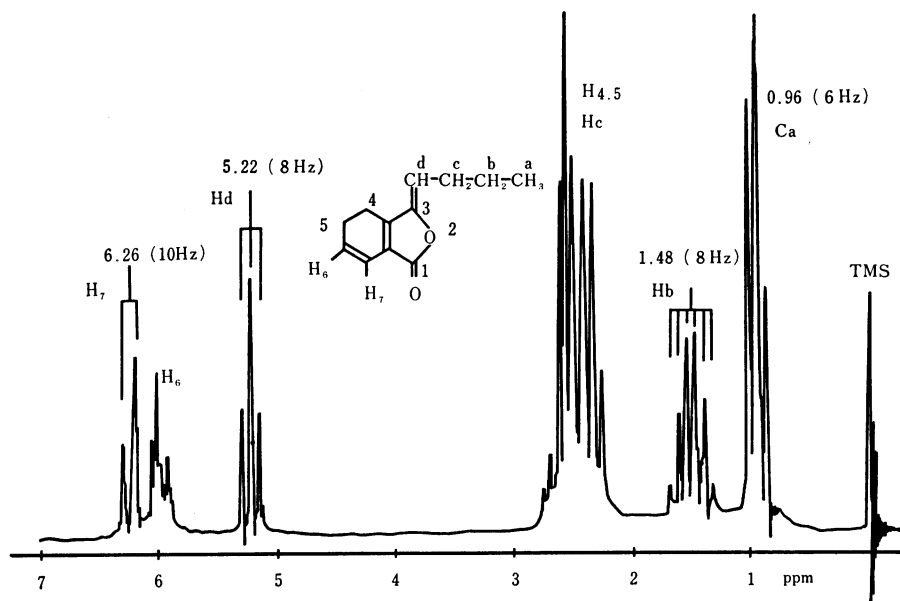
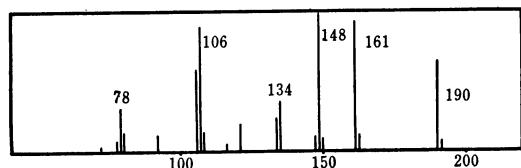


Fig. 3 Mass spectrum of Ligustilide



当帰のエーテルエキス量

当帰を風乾したのち粉碎し, 48時間, デシケーター中 (シ

リカゲル) で乾燥する。その約 2 g を精密に量り 200 ml のフラスコに入れ, エチルエーテル 70 ml を加え, 還流冷却器を付けて水浴上 4 時間おだやかに煮沸する。放冷後ろ過し, フラスコおよび残留物をろ液が 100 ml になるまでエチルエーテルで洗う。ろ液 50 ml をナスフラスコにとり水浴上 (30-40°) 減圧下で溶媒を留去したのち, 残留物を少量のエーテルに溶かし秤量ビンに移す。ナスフラスコはさらに少量のエーテルで洗い, 先のエーテル溶液に合わせる。窒素ガスをおだやかに吹込んでエーテルを留去し

残留物をデシケーター中（シリカゲル）で24時間乾燥したのち秤量してエーテルエキス量とする。

当帰エーテルエキス成分の GLC-直結質量分析 (GLC-Mass) による同定

当帰エーテルエキスの組成々分を知るため GLC-Mass による同定を試みた。

- 使用機種 日立 RMU-6 MG
- 条件
- PEG-20 M Glass capillary (0.25  $\phi$  × 30 m)
- Column temp. : 70-180° 5°/min
- Inj. temp. : 250°
- Carrier gas : He, 0.1 kg/cm<sup>2</sup>
- Total emission : 80  $\mu$ A
- Chamber Volt : 20 V
- Sensitivity : 10 × 0.2 V T. I. M.
- Set. mass range : m/e 1500 Max (3.2 KV)

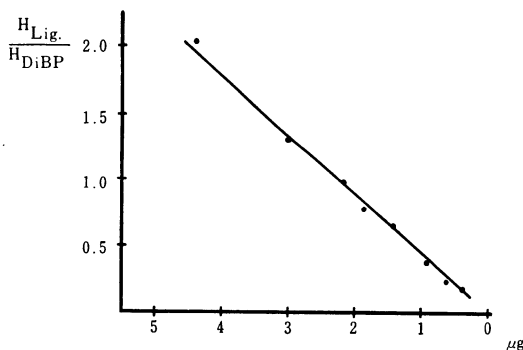
Ligustilide の検量線および定量法

Ligustilide の濃度が 0.25 mg/ml から 10 mg/ml になるようにクロロホルムに溶かす。これらの溶液に内部標準物質として当容量の Di-iso butyl phthalate (DiBP) のクロロホルム溶液 (3 mg/ml) を加えて、下記の条件でガスクロマトグラフィーを行なった。

- 機種 : 日立063型
- カラム : 1.5% OV-17, ガラスカラム 3 mm × 2 m
- 検出器 : 水素炎イオン検出器 (FID)
- キャリアーガス : N<sub>2</sub>, 30 ml/min
- カラム温度 : 180°
- 注入口温度 : 250°
- 検出器温度 : 250°

縦軸に Ligustilide/DiBP のピーク高さの比をとり、横軸に Ligustilide ( $\mu$ g) をとり検量線を作製した。この検量線 Fig. 4 には示すように 0.25-5  $\mu$ g の間で直線性が認められた。

Fig. 4 Calibration curve of Ligustilide



H. Peak height  
Lig. Ligustilide  
DiBP Di-iso-butyl phthalate

当帰中の Ligustilide の定量は先のエーテルエキスに DiBP のクロロホルム (3 mg/ml) 0.5~2.0 ml を加え GLC を行なった。得られたガスクロマトグラムは Fig. 5 に示すとおりである。試料中の Ligustilide の量は上記検量線を用いて求めた。

実験結果ならびに考察

1. 当帰エーテルエキス成分の同定

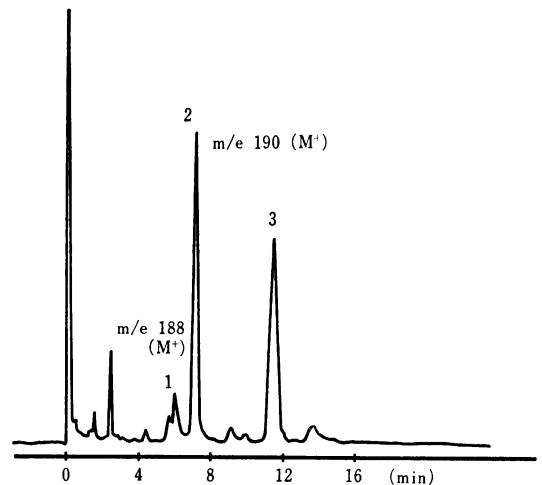
前報<sup>10)</sup>で当帰の各エキス量を測定し産地別および調製法別試料によりエキス量に差異のあることを認めたので Ligustilide を含むエーテルエキス成分の同定を試みた。成分の同定は分離操作をすることなく、迅速に Mass を測定できる利点のある GLC-直結 Mass によった。Ligustilide の基本骨格であるフタライド類の Mass のフラグメンテーションは化学構造に関連した規則性があることをすでに報告した<sup>11)</sup>。今回この規則性を基にして peak 1, peak 2 のフラグメンテーションを chart 1 に図示したように解析し、エーテルエキスのガスクロマトグラム (Fig. 5) の peak 1, peak 2 をそれぞれ Butylden phthalide, Ligustilide と同定した。

2. 産地別当帰の Ligustilide の定量およびエーテルエキス量の比較

産地別当帰のエーテルエキス量と Ligustilide 含有量は Table II に示すとおりで、Ligustilide 含有量について見ると香港市場品が0.62%と最高値を示した。他は0.04~0.17%の範囲を示し、この結果からは大深、北海当帰の区別は不可能であった。エーテルエキス量に関しては明らかな差異が認められ、大深当帰は北海当帰の約2倍を示した。

大深当帰と称し市場で取引されている当帰に明らかに北

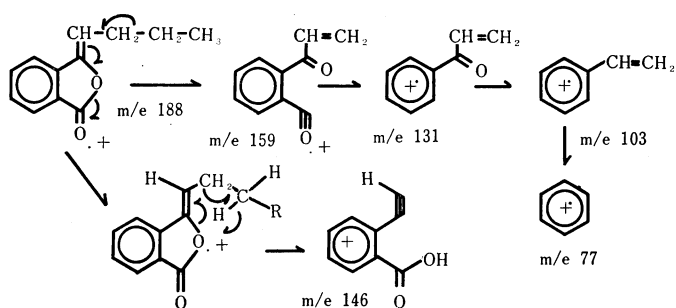
Fig. 5 Gas-chromatogram of the ethereal extract of Touki



- 1. Butylden phthalide
- 2. Ligustilide
- 3. internal standard (Di-iso-butyl phthalate)

Chart 1 Principal mass fragmentation of Butyliden phthalide (Peak 1) and Ligustilide (Peak 2)

Peak 1.



Peak 2.

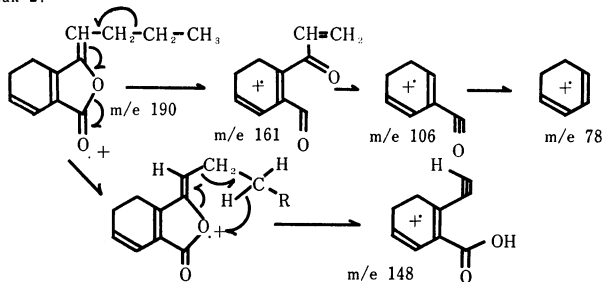


Table II Yield of the ethereal extracts and the Ligustilide contents in Touki cultivated in different places.

Sample No.	Location of cultivation	Ethereal extract (%)	Ligustilide content (%)
1	Hokkaido (Nayoro)	1.11	0.17
2	Hokkaido (Kunneppu)	0.99	0.07
3	Korea <sup>1)</sup>	2.38	0.08
4	Hongkong <sup>2)</sup>	3.03	0.62
5	Nara prefecture (Ooyodo)	2.33	0.04
6	Nara pref. (Nishiyoshino)	2.38	0.08
7	Nara pref. (Tenkawa)	1.14	0.09
8	Nara pref. (Shimoshi)	2.47	0.06
9	Nara pref.	1.75	0.06
10	Wakayama prefecture	1.18	0.07
11	Nara pref. (Seeds were obtained from Hokkaido and cultivated in Nara prefecture)	0.82	0.09

- 1) This sample was cultivated in Korea, and its seeds were obtained from Nara prefecture.  
 2) This sample was obtained from Hongkong market.

海当帰に形態が類似するものがあつた (Sample 7, 10)。北海道から北海当帰の種子が多量に近畿地方に出されている事実から奈良県から出荷されている当帰に北海当帰、又は北海当帰との交配種の混入が予想される。Sample 7, 10は北海当帰のエーテルエキス量に近い値を示し、北海当帰である可能性が高い。

Sample 11は北海当帰の種子を奈良県で栽培したものであるがエーテルエキス量は北海当帰の特徴を、一方、大

深当帰の種子を韓国で栽培した Sample 3は大深当帰の特徴を示した。

この結果より当帰のエーテルエキス量の差異は栽培地よりはむしろ種本来の形質に帰因すると考えられる。

本研究で GLC による Ligustilide の定量法を確立したが、Ligustilide が当帰の主要な有効成分として考えられているのでその定量は当帰の品質評価に有益な知見を与えるものとする。

結 語

1) 道産川芎より Ligustilide の抽出分離および、機器分析による同定を行なった。ついで GLC による Ligustilide の定量法を検討し、その結果 0.25-5  $\mu\text{g}$  の範囲で直線性のある検量線が得られた。

2) 当帰エーテルエキス成分の同定を GLC-Mass を用いて試み Butyliden phthalide, Ligustilide を同定することができた。

3) 産地別当帰のエーテルエキス量と Ligustilide 含有量を測定し比較検討を行なったが大深当帰は北海当帰の約2倍のエーテルエキス量を示した。

また、Ligustilide 含有量は香港市場品が0.62%と最高値を示し、他は0.04~0.17%の範囲を示した。Ligustilide は当帰の主要な有効成分と考えられるのでその定量は当帰の品質評価に有益な知見を与えるものとする。

本研究に当たり貴重な当帰のサンプルを恵与された武田薬品中央研究所今井俊司博士・後藤実博士、国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験所々長本間尚次郎氏、北海道生薬公社、道立北見農業試験場大槌良彦氏、東道共伸社白井良和氏に深謝します。また NMR を測定された北大理学部 NMR 室の方々、GLC-Mass を測定された日本電子板垣又丕博士、日立那珂工場応用技術部秋森伯美氏に合せて感謝します。

文 献

- 1) H. Mitsuhashi, U. Nagai, T. Muramatsu and H. Tashiro : Chem. Pharm. Bull., 8, 243 (1960)
- 2) H. Mitsuhashi, U. Nagai, and T. Muramatsu : Chem. Pharm. Bull., 9, 115 (1961)
- 3) H. Mitsuhashi, T. Muramatsu, U. Nagai, T. Nakano and K. Ueno : Chem. Pharm. Bull., 11, 13 17 (1963)
- 4) 刘米 : 薬学雑誌, 56, 662, 688 (1936)
- 5) 野口 : 薬学雑誌, 57, 769, 783 (1937)
- 6) H. Mitsuhashi, and T. Muramatsu : Tetrahedron, 20, 1971 (1964), 264 (1963)
- 7) 劉寿山編, 中葯研究文献摘要, 264 (1963)
- 8) 酒井和太郎 : 東京医会誌, 30, 1493 (1916)

- 9) H. Mitsuhashi, et al. : Chem. Pharm. Bull., 8, 243 (1960), 9, 115 (1961)
- 10) 金島弘恭他 : 道立衛生研究所々報, 24 (1974)
- 11) 金島弘恭他 : 日本薬学会第94年会講演要旨集, 228 (1974)

Studies on the Standardization of Crude Drugs Produced in Hokkaido (Part 5)

On the Existence of Ligustilide in Angelicae Radix (Touki)

Takashi Yamagishi, Hiroyasu Kaneshima,  
Yoshihiro Kinoshita and Misao Mori  
(Hokkaido Institute of Public Health)

- 1) Ligustilide was isolated from the roots of *Cnidium officinale* MAKINO, and identified by NMR, IR and Mass spectra.
- 2) Ligustilide and Butyliden phthalide were identified by the GLC-Mass, as [the components of the etherial extract of *Ligusticum actiloba* var. *sugiyamae* HIKINO (Hokkai-Touki).
- 3) The Ligustilide contents in the roots of *Ligusticum actilobum* SIEB. et ZUCC. (Yamato-Touki), and Hokkai-Touki were determined by GLC. The content of Ligustilide in sample No. 4 was the highest among 11 samples. Its value was 0.62% and the others indicated ranging from 0.04% to 0.17%.
- 4) The yields of etherial extract of Touki, which were cultivated in different places, were measured by the usual method. The yields of etherial extract of Yamato-Touki were about two times greater than that of Hokkai-Touki. The results are shown in Table II. From the above results the determination of Ligustilide in Touki was considered to be important for the evaluation of crude drugs.