

## 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーを用いた トウキ中リグスチリド定量法の検討

福田裕子 石丸宗徳\*<sup>1</sup> 服部智子 大倉敏裕\*<sup>2</sup> 四宮博人

Study on determination of ligustilide in *Angelica Radix*  
by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

Yuko FUKUDA, Munenori ISHIMARU, Tomoko HATTORI  
Toshihiro OHKURA, Hiroto SHINOMIYA

An analytical method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection was employed for the determination of ligustilide in *Angelica Radix*.

This analyte was clearly separated with methanol - water (65 : 35) used in the mobile phase on a RP-Amide column under isocratic conditions. Within wide ranges, all peaks were proportional and the correlation coefficient (r) showed 1.000 in a linear regression analysis. The limit of quantification of the developed method was 0.001 mg/L (S/N=10).

Relative standard deviation of analyte admixed with real samples cultivated in the farm field was no more than 2% and was acceptable for quantitative analysis.

Keywords : *Angelica Radix*, ligustilide, high-perforumance liquid chromatograph, HPLC, fluorescence detector

### はじめに

現在、我が国における原料生薬は8割以上を中国からの輸入に依存している状況にあり、中国では主として山野に自生の薬用植物を採取していることから、資源の枯渇が懸念され、既に採取や出荷が制限されている品種もある。さらに、世界の薬用植物市場の約50%を欧米が占めるなど世界的にも需要が増加している。そのため、国内栽培への動きが加速しており、平成25年8月、国・地方公共団体等が主導で栽培を拡大し、産地化する取り組みが始まり、特に中山間地域の多い本県においては、葉たばこに替わる換金作物として薬用植物が有望とされ、愛媛県農林水産研究所(農水研)において、研究栽培等の産地化支援に向けた事業が開始されている。

当所では、これらの事業の一部として農水研が研究栽

培した薬用植物の品質評価のため、有効成分の含有量を測定している。現在対象となっている薬用植物は、ミヤマサイコ、カンゾウ、シヤクヤク及びトウキの4品種であり、トウキ以外の3品種は、日本薬局方に有効成分の定量法が規定されているが、トウキについては規定がなく、栽培結果を適正に評価するためにも、定量方法の確立が必要である。

トウキは、トウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino (*Umbelliferae*) の根<sup>1)</sup> で、血流促進作用などを有し、有効成分としてリグスチリド (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>) をはじめとする精油成分を含有することが知られており、平成24年度の使用量7位、生産金額上位30処方<sup>2)</sup> の漢方8種に配合される汎用生薬である<sup>2)</sup>。また、トウキエキスとして化粧品等の医薬関連製品にも配合されている。現在、トウキの品質評価方法としてはリグスチリドを指標成分とし、UV検出器を用いた液体クロマトグラフ法<sup>3)</sup> が報告されているが、薬用化粧

品を例にとると製品中の有効成分配合割合は9割程度が1%未満<sup>4)</sup>であり、製品試験で用いるには、感度が十分ではない。このため、リグスチリドを指標成分とし、UV検出器に比べ高感度が期待できる蛍光検出器<sup>5)</sup>を用いた高速液体クロマトグラフィーによる高感度定量法を検討したので報告する。

## 材料と方法

### 1 試料

分析法検討には日本薬局方トウキ(高砂薬業社ホッカイトウキ)を、分析法の確認には、農水研圃場で研究栽培されたトウキを用いた。

### 2 試薬

リグスチリドは、標準品(エキストラシンシース社製)を使用した。メタノールは高速液体クロマトグラフ用(和光純薬工業社製)を、エタノールは医薬品試験用(関東化学社製)を、その他は試薬特級グレードを使用した。ろ過にはPTFE製0.2 $\mu$ mメンブランフィルター(アドバンテック社製)を、精製水は超純水製造装置Autopure WRX(ヤマト科学社製)で精製したものをを使用した。

標準液は精秤したリグスチリド標準品25mgをメタノールで100mLに定容し、標準原液(0.25mg/mL)を調製後、メタノールで適宜希釈し調製した。

なおリグスチリドの構造式を図1に示した。

### 3 装置

高速液体クロマトグラフ(HPLC)はWaters社製alliance e2695システムを、検出器は同製蛍光検出器2475と同PDA検出器2998を、解析ソフトウェアは同Empower3を、振とう器はヤマト科学社製SA-31を、遠心分離機はKUBOTA社製KN-70を使用した。

### 4 測定条件

#### (1) 改良法

カラムはAscentis RP-Amide(4.6 $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m)(SUPELCO社)を、移動相はメタノール:水(65:35)溶液を、移動相の流速は1.0mL/min, カラム温度は40 $^{\circ}$ C, 試料注入量は10 $\mu$ L, 蛍光検出器の励起波長は320nm, 蛍光波長は415nm, PDA検出器の測定波長は326nmとした。

#### (2) 従来法

カラムはXBridgeC18(4.6 $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m)(Waters社)を、移動相はメタノール:水(70:30)溶液を、移動相の流速は1.0mL/min, カラム温度は40 $^{\circ}$ C, 試料注入量は10 $\mu$ L, PDA検出器の測定波長は326nmとした。

#### (3) 抽出法検討用測定条件

カラムはODS-3V(4.6 $\times$ 150mm, 5 $\mu$ m)(GLサイエンス社)を、移動相はメタノール:水(65:35)溶液を、移動相の流速は1.0mL/min, カラム温度は40 $^{\circ}$ C, 試料注入量は10 $\mu$ L, PDA検出器の測定波長は326nmとした。

## 5 実験操作

粉碎した試料0.2gを精秤し、50mLの共栓付遠沈管に入れ、メタノール35mLを加えて15分間振り混ぜ、3,000rpmで1分間遠心分離し、上澄み液を分取する。残留物はさらにメタノール35mLを加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に100mLとし、PTFE製0.2 $\mu$ mメンブランフィルターでろ過し試験溶液とした。

## 結果及び考察

### 1 定量法の検討

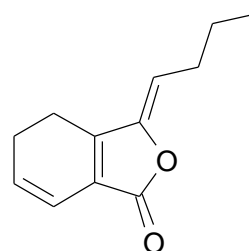
#### (1) 検出器の検討

従来は、トウキ中リグスチリドの定量にはUV検出器が用いられているが、通常、いわゆる薬用化粧品に含まれる有効成分量は医薬部外品原料規格2006にあるものうち多いもので5%程度であり、少ないものでは0.002%程度というものもある<sup>4)</sup>。このような中で、UV検出器では、製品試験に応用するには感度が十分とはいえない。そこで、製品の品質評価を行うことを考慮に入れ、より高感度に検出できる蛍光検出器による測定を試みた。まず、最適な励起波長と蛍光波長を求めるため、一方を固定波長で他方の波長を変動させ測定した結果、励起波長320nm, 蛍光波長415nmで最大強度の蛍光スペクトルを示したため、これを測定波長とすることとした。

#### (2) 抽出法の検討

##### ア 抽出溶媒の検討

トウキからリグスチリドが最も効率よく抽出される溶媒を検討した。極性の違いなどを考慮し、生薬エキス含量試験に用いられる水、エタノール、エーテル及び局方収載の薬用植物定量法の中で抽出溶媒として最も多く用いら



分子式: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

図1 リグスチリドの構造式

れているメタノールの4種類の溶媒を使用した。

トウキ粉末1gに4種の溶媒を各35mL加え15分間振とう後、上澄み液を0.2 $\mu$ mフィルターでろ過し試料溶液とし、抽出法検討用分析条件によりHPLCで測定した。その結果、図2のとおり、メタノールの抽出量を100とした場合、抽出比は水3.0、エタノール80.6、エーテル65.3であったため、抽出溶媒はメタノールとした。

なお、振とう抽出に加え、還流抽出も試みたが、加熱時間の増加に従い抽出率の減少が見られ、いずれの加熱時間より振とう抽出の方が高い抽出率を示した。

#### イ 試料分取量の検討

抽出効率には試料分取量と抽出溶媒の割合が影響を及ぼすことから、メタノール35mLで振とう抽出した場合における適切な試料分取量の検討を行った。

トウキ粉末0.1、0.2、0.5、1、2gと試料分取量を変更し、メタノール35mLを加え、15分間振とう後、上澄み液を0.2 $\mu$ mフィルターでろ過し試料溶液とし、抽出法検討用分析条件によりHPLCで測定した。その結果、図3のとおり、0.2g以下で抽出効率はほぼ一定となった。しかしながら、0.1gを採取する際には秤量誤差が大きくなる可能性が考えられるため、試料採取量は0.2gとした。

#### ウ 振とう時間の検討

振とう時間の違いも抽出効率に影響を及ぼすことから、適切な振とう時間を検討した。

トウキ粉末0.2gにメタノール35mL加え、各5、10、15、20分間振とう後、上澄み液を0.2 $\mu$ mフィルターでろ過し試料溶液とし、抽出法検討用分析条件によりHPLCで測定した。その結果、図4のとおり、5分間でのリグスチリド抽出量を100とした場合、10、15分までは上昇するが、20分では15分と同程度であったため、振とう時間は15分間とした。

#### エ 抽出回数の検討

抽出回数についても、含有される有効成分をすべて抽出するために適切な振とう回数を把握するため、抽出回数による抽出効率の違いを検討した。

トウキ粉末0.2gにメタノール35mL加え、15分間振とう後、遠心分離し上澄み液を30mL分取した。その残渣にメタノール30mL加え15分間振とう後、遠心分離して上澄み液を30mL分取する操作を4回行い、各回振とう後の上澄み液を0.2 $\mu$ mフィルターでろ過し試料溶液とし、抽出法検討用分析条件によりHPLCで測定した。その結果、図5のとおり、5回抽出で得られたすべてのリグスチリド量を100とした場合、1回目の抽出で97.4、2回目で2.3、3回目以降はほぼ0%であったため、抽出回数は2回とした。

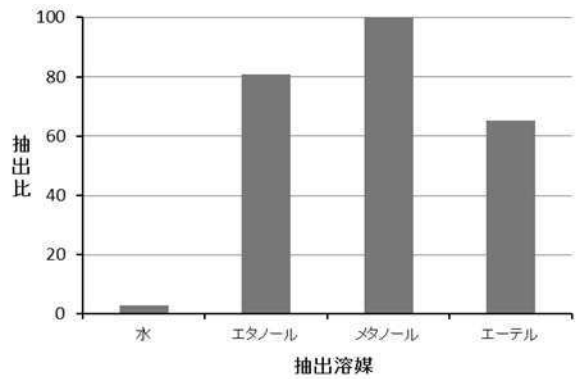


図2 抽出溶媒の違いによるリグスチリド抽出比  
(メタノールにより抽出したリグスチリドの量を100とした抽出比)

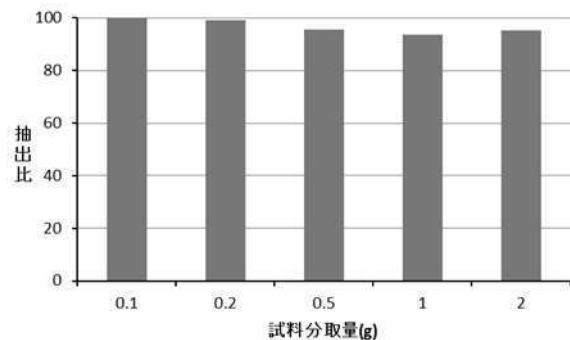


図3 試料分取量の違いによるリグスチリド抽出比  
(0.1g試料分取時に抽出したリグスチリドの量を100とした抽出比)

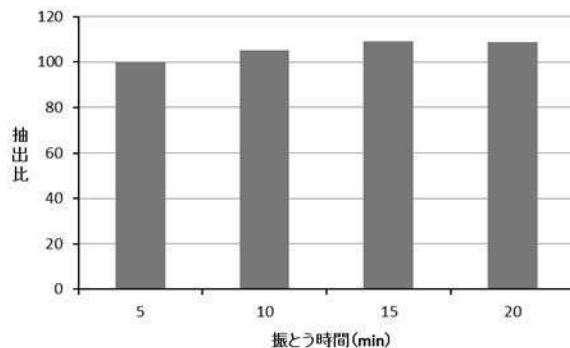


図4 振とう時間の違いによるリグスチリド抽出比  
(5分間振とうにより抽出されたリグスチリドの量を100とした抽出比)

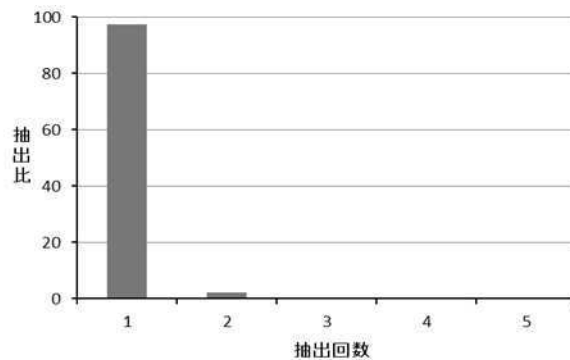


図5 振とう回数によるリグスチリド抽出比  
(5回の抽出で得られたすべてのリグスチリド量を100とした抽出比)

### (3) HPLC条件の検討

#### ア 分離条件の検討

姉帯らによると、トウキ中のリグスチリドの定量には、薬用植物中有効成分の分析に一般的に用いられるODSカラムとメタノールを使用することにより良好な分離が得られた旨報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、抽出法検討用測定条件により農水研から提供された試料を分析したところ、一部試料では図6のとおりリグスチリドとほぼ同一の保持時間を有する共存物質が含有されており、良好な分離を得ることができなかった。このため、固定相の全体でC8程度の疎水性相互作用とアミド結合における水素結合の二つの主な保持機能を有するRP-Amideカラムを用い移動相はメタノール水混液とし、組成を変化させ分離条件の検討を行った。その結果、図7のとおり、メタノール:水(65:35)で良好な分離を得ることができた。また、共存物質の保持時間がRP-AmideカラムではODSカラムに比較し長くなることから、共存物質は極性の偏りを有する化合物であることが推定された。

なお、図8~10のとおり、リグスチリド標準液と、試料の保持時間及び紫外外部吸収スペクトルはそれぞれ一致しており、同一化合物であることを示していた。

#### イ HPLCシステム適合性の検討

今回開発した方法のシステム適合性を確認するため、検量線、システム再現性及び定量下限値について、従来のPDA検出器を利用する方法と改良した蛍光検出器を使用する方法で比較し、その結果を表1に示した。

##### (ア) 検量線及び定量下限値

リグスチリドとして0.0025mg/Lから20mg/Lの範囲で検量線を作成した。その結果、改良法の直線関係を示した範囲はすべての濃度範囲であり、従来法の0.25mg/Lから20mg/Lの範囲の100倍であった。また、改良法の定量下限値は0.001mg/Lであり、従来法の下限值0.25mg/Lの250分の1であった。

##### (イ) システム再現性

リグスチリド0.025mg/L標準液の6回連続時の再現性を確認したところ、相対標準偏差は0.3%となり、十分なシステム再現性を示した。

#### 2 実試料での検討

今回開発した方法により、農水研で試験栽培されたトウキ3検体について定量を行った。その結果、表2のとおり定量値は0.052-0.160%であり、サンプル測定時の再現性における相対標準偏差も2%以下と低く良好な結果となった。

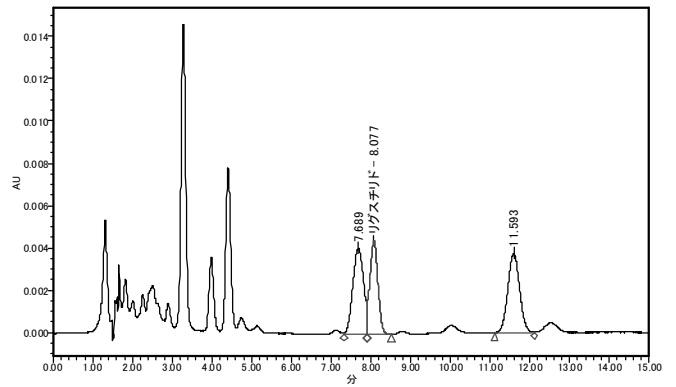


図6 抽出法検討用測定条件による農水研提供試料測定時クロマトグラム

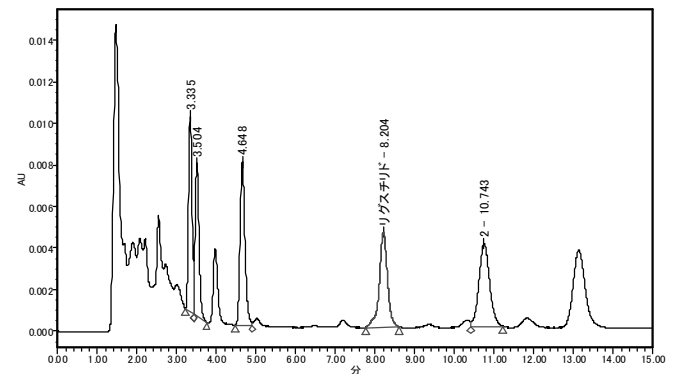


図7 測定条件による農水研提供試料測定時クロマトグラム

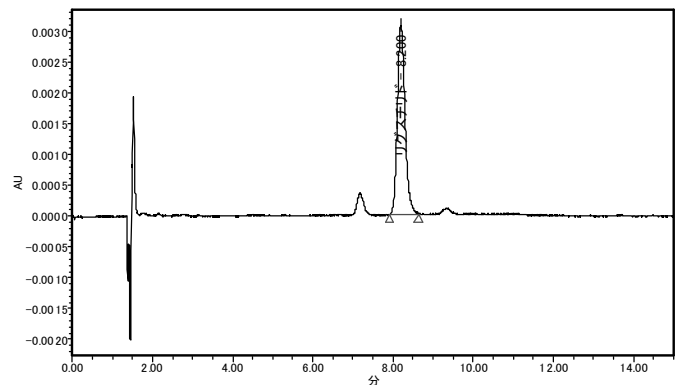


図8 測定条件によるリグスチリド標準品測定時クロマトグラム

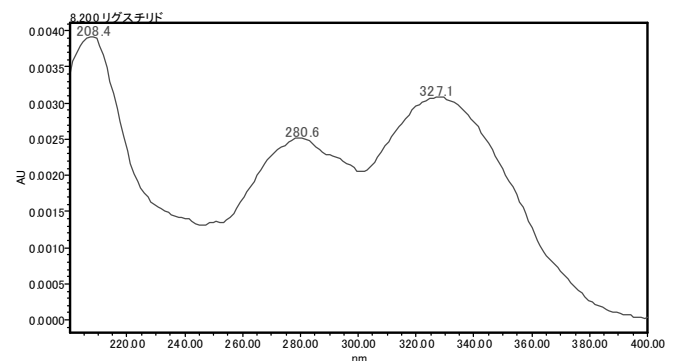


図9 測定条件によるリグスチリド標準品測定時紫外吸収スペクトル

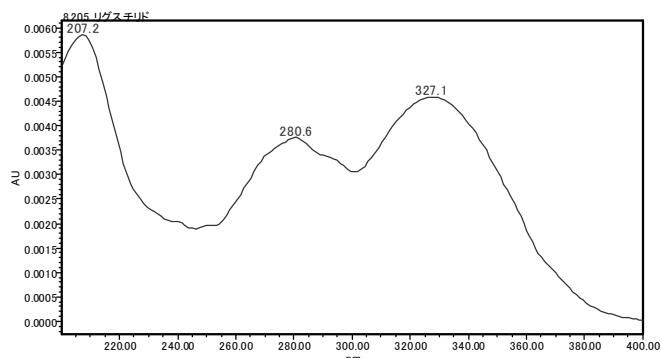


図10 測定条件による農水研提供試料測定時紫外吸収スペクトル

表1 トウキ中リグスチリドのHPLCシステム適合性検討結果

定量法	検量線 <sup>*1</sup>	システム再現性 <sup>*2</sup> (%)	定量下限値 <sup>*3</sup> (mg/L)
従来法	0.25-20 1.000	4.0	0.25
改良法	0.0025-20 1.000	0.3	0.001

\*1 検量線の上段は検量線の範囲(mg/L)を、下段は相関係数を示す

\*2 システム再現性は、定められた濃度の標準溶液6回繰り返し測定結果の相対標準偏差であり、許容範囲は1.5%以下である

\*3 定量下限値は、S/N10とした

表2 実試料トウキ中のリグスチリド定量結果

試料名	含量 (%)	相対標準偏差 (%)
トウキ小	0.122±0.002	1.49
トウキ中	0.160±0.001	0.74
トウキ大	0.052±0.001	0.93

## まとめ

トウキ中の有効成分であるリグスチリドの定量法について検討した結果、次のことが明らかとなった。

- 1 試料の振とう抽出効率を水、エタノール、メタノール及びエーテルの4溶媒について比較したところ、メタノールが最も良好な結果を示した。
- 2 移動相を水・メタノール混液とし、HPLCに用いるカラム

について検討したところ、ODSカラムでは、一部試料においてリグスチリドとほぼ同一の保持時間を有する共存物質の影響により、十分な分離を得ることができなかったが、RP-Amideカラムを用いることにより、良好な結果を得ることができた。

3 HPLCの検出器を蛍光検出器とPDA検出器について比較したところ、蛍光検出器は、検量線の範囲が100倍(蛍光検出器 範囲:0.0025-20mg/L 相関係数:1.000, PDA検出器 範囲:0.25-20mg/L 相関係数:1.0000)、定量下限値は250分の1(蛍光検出器:0.001mg/L, PDA検出器:0.25mg/L)であり、測定範囲及び感度においてPDA検出器より優れていた。

4 システム再現性について比較したところ、本法は0.3%でありODSカラム及びPDA検出器を用いる従来法の4.0%より良好な結果となり、再現性において優れていた。

5 本法を実試料に適用したところ、相対標準偏差は2%以下と良好な結果を示した。

なお、本研究は愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業により行われたものである。

## 謝辞

本研究にご協力いただきました、愛媛県農林水産研究所の皆様には深謝いたします。

## 文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会編:第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京(2011. 6. 26)
- 2) 日本漢方生薬製剤協会:原料生薬使用量等調査報告書(3), (2015. 4)
- 3) 姉帯正樹ほか:北海道立衛生研究所報, 50, 6-10 (2000)
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課:いわゆる薬用化粧品中の有効成分リストについて, 薬食審査発第1225001号, 平成20年12月25日
- 5) 中村洋ほか:液クロの巻, 96, 筑波出版会(2003)