

# 目的

トウキは、代表的な婦人薬として、また、漢方薬の原料としても用いられており、日本薬局方においてトウキの基原はトウキ (*Angelica acutiloba* Kitagawa) 又はホツカイトウキ (*Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino (*Umbelliferae*)) とされている。

奈良県では、漢方のメッカ推進プロジェクトにおいて、大和当帰のブランド認証を検討しているが、認証には、科学的な評価指標及び評価基準の設定が求められており、我々は第 135 年会 (神戸) において、水溶性成分を測定し、多変量解析を行ったところ大深当帰と北海当帰及び、修治加工の有無を判別する成分として G A B A が選抜されたことを報告した。そこで今回は、揮発性成分を測定し、多変量解析を行うことにより植物種間、産地間及び、修治加工の有無の比較に有用な成分を探索した。

# 試験検体

表1のとおりトウキを入手し、それぞれ6個体ずつを試験対象とした。6個体入手できなかったものは入手した個体すべてを試験対象とした。なお、中国産は「刻み」であり、複数個体が混合されているが、1包装を1個体として試験対象とした。

大深当帰（6産地、47個体）、北海当帰（2産地、12個体）、修治加工の行われていない大深当帰（1産地、12個体）を個体別に粉砕し試料として用いた。



サンプル名称	植物種	産地	湯揉みの有無	採取年月日	入手先※ <sup>1</sup>	規格※ <sup>2</sup>	入手数	試験数
YTU2013NS	大深当帰	奈良県宇陀市	有	2013 年秋	農研	小	3 個体	3 個体
YTH2013HB		富貴地方 (奈良、和歌山 両県境)		2013 年秋	福田商店	大	10 個体	6 個体
YTH2013HS				2013 年秋	福田商店	小	10 個体	6 個体
YTH2013HBN			無	2013 年秋	福田商店	大	10 個体	6 個体
YTH2013HSN				2013 年秋	福田商店	小	10 個体	6 個体
YTH2013MB			有	2013 年秋	前忠	大	10 個体	6 個体
YTT2013MS		奈良県十津川村		2013 年秋	前忠	小	10 個体	6 個体
YTG2013MS		奈良県五條市		2013 年秋	前忠	小	10 個体	6 個体
YTI2013MB		茨城県		2013 年秋	前忠	大	10 個体	6 個体
YTI2013MS				2013 年秋	前忠	小	10 個体	6 個体
YTC2013A		中国・四川省		2013 年秋	前忠	刻み	1 個体	1 個体
YTC2013B				2013 年秋	前忠	刻み	1 個体	1 個体
HTT2013MMN		北海当帰		北海道十勝芽室	無	2013 年秋	前忠	中
HTM2013MSN	北海道女満別		2013 年秋	前忠		小	10 個体	6 個体

表 1 検体リスト

※1 農研：奈良県農業研究開発センター 福田商店：（奈良県桜井市、生薬卸） 前忠（奈良県吉野郡下市町、生薬卸）

※2 入手先が、見た目の大きさのみで判定したもの。概ねの重量は、小：30g前後、中：50g前後、大：100g前後。大きいものが等級が高いと判定される。

# 試験方法（多変量解析）

トウキ末 1.0g、15%NaCl 20mL、内標準溶液（1.0ng/mL オクタノン溶液）を捕集瓶にとり、10 分間振り混ぜた後、MonoTrap（DCC18）を加えて、60°C60 分恒温振盪して捕集し、MonoTrapを抽出瓶にとり、ジクロロメタン 500  $\mu$ L 加え、超音波を 5 分間照射し、抽出液を遠心分離し、試料溶液とした。試料溶液 1  $\mu$ L につき、図 1 試験条件により、GC-MSを用いて測定した。GC-MSから得られたデータについて、ピークアライメント及び化合物同定を「GCMS solution」により行った。

GC-MS GCMS-QP2010 Ultra（島津製作所）	
GC	カラム：InertCap Pure-WAX（30m×0.25mmI. D. df=0.25 $\mu$ m） インジェクション温度：250°C カラム温度：40°C (5min)-(4°C/min)-250°C (5min) インジェクションモード：スプリットレス キャリアーガス：He カラム流量：圧力一定（120kPa） パージ流量：5mL/min インジェクション量：1 $\mu$ L
MS	イオン源：200°C インターフェース温度：250°C イオン化電圧：70ev 検出器電圧：Auto+0.02 kV（約 1.02 kV） スキャンレンジ：m/z30~350

図 1 試験条件

# 試験結果（多変量解析）

分析結果 データが得られた成分を表2に示す。

アルキルピラジン類、フロクマリン類等について、44成分のデータを得た※1。

※1 ライブラリー（MSスペクトルと保持指標）との比較による成分の同定であり、標準物質との比較による同定は行っていない。

化合物名	化合物名
Hexanal	Hexanoic acid
Heptanal	Benzyl alcohol
3-オクタノン(内標準物質)	1-Pentanone, 1-phenyl-
p-シメン	Phenylethyl Alcohol
2,6-ジメチルピラジン	Heptanoic acid
2,3-ジメチルピラジン	p-Cymen-7-ol
Formic acid, hexyl ester	2(3H)-Furanone, 5-hexyldihydro-
Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	チモール
2,3,5-トリメチルピラジン	Thymol
Pyrazine, 2,6-diethyl-	n-Decanoic acid
Ammonium acetate	trans-2-Decenoic acid ①
5-エチル-2,3-ジメチルピラジン	2-Propanol, 1-(hexadecyloxy)-
1-Octen-3-ol	trans-2-Decenoic acid ②
2,3,5,6-テトラメチルピラジン	ブチリデンフタリド
1-(3-Isopropenyl-2,2-dimethylcyclopropyl)-2-methylpropan-1-one	リグスチリド
ベンズアルデヒド	1(3H)-Isobenzofuranone, 3-butylidene-
2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	3-(1'-methylbutylidene)-4,5-dihydrophthalide
Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	プソラレン
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester
Butanoic acid	2H,8H-Benzo[1,2-b:5,4-b']dipyran-2-one, 8,8-dimethyl-
Tricosyl pentafluoropropionate	ベルガプテン
Nonadecyl pentafluoropropionate	キサントキシシン
Tiglic acid	

表2 データが得られた成分

# 試験結果（多変量解析）

試料のグループ分けを以下のとおりとし、それぞれの成分のピーク面積比について O P L S - D A 法により解析し、S - P 1 o t で寄与成分を選抜した。

- ① 植物種の比較：大深当帰 5 9 個体及び北海当帰 1 2 個体。
- ② 修治加工の比較：修治加工あり（国産大深当帰） 4 5 個体及び修治加工なし（国産大深当帰） 1 2 個体。

それぞれの結果を図 2 ～ 3 に示す。

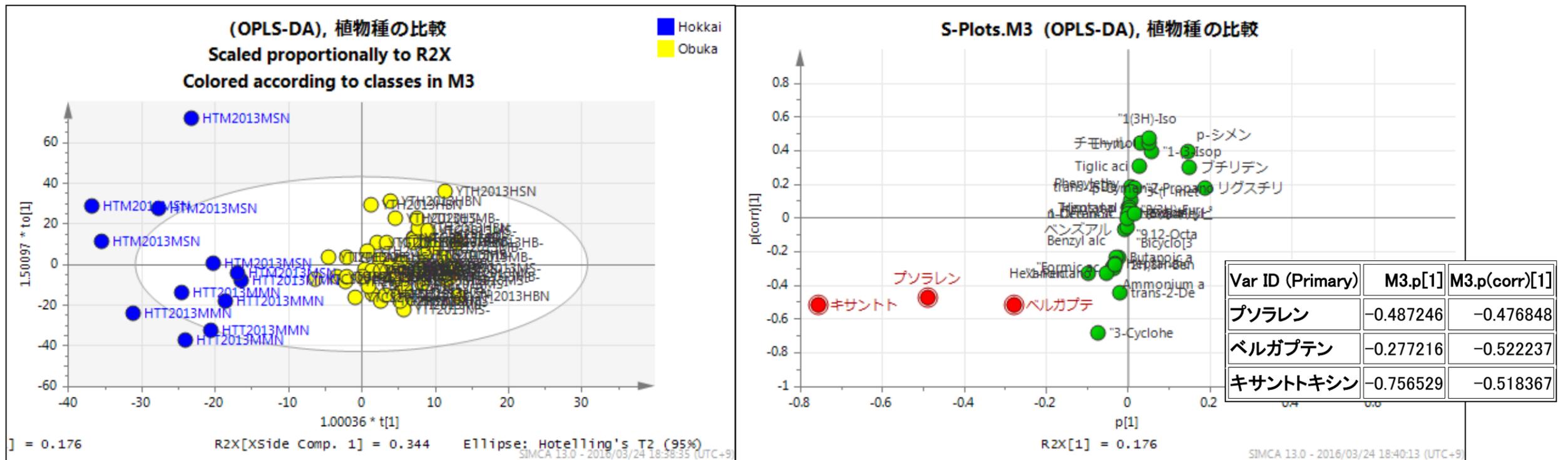


図2 植物種の比較 (OPLS-DA及びS-Plots)

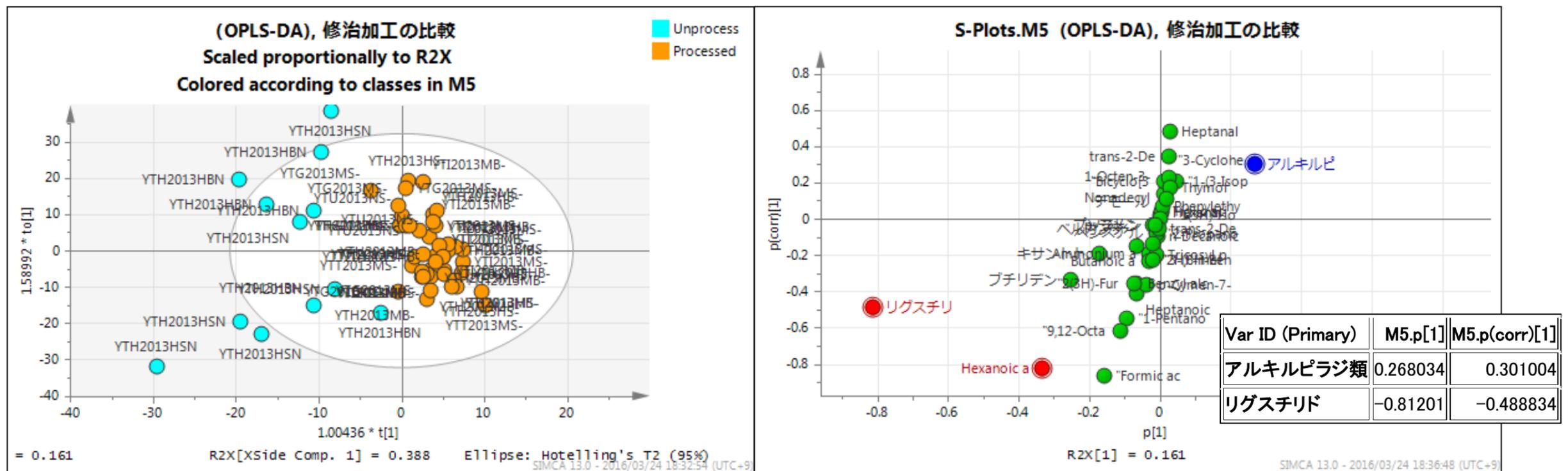


図3 修治加工の比較 (OPLS-DA及びS-Plots)

# 試験方法（定量分析）

多変量解析で選抜された成分のうち、プソラレン、キサントトキシシン、ベルガプテン及び、リグスチリドについて、HPLC法により以下の試験方法で定量を行った。

○ 標準溶液：リグスチリド標準原液 0.4 mL + フロクマリン標準原液 0.8 mL + メタノール/水混液（4:1） 2.8 mL

リグスチリド標準原液：(Z)-リグスチリド標準溶液※（0.1 mg/mL）

※ 和光純薬工業(株)製 (Z)-リグスチリド標準溶液（0.1 mg/mL メタノール溶液）表示純度 0.097~0.103 mg/mL

フロクマリン標準原液：各標準原液 1 mL + メタノール/水混液（4:1） → 50 mL

プソラレン標準原液：プソラレン 5 mg + メタノール → 10 mL

キサントトキシシン標準原液：キサントトキシシン 10 mg + メタノール → 20 mL

ベルガプテン標準原液：ベルガプテン 10 mg + メタノール → 20 mL

○ 試料溶液：粉末約 0.25g + メタノール/水混液（4:1）25 mL → 10分間振盪 → 20分間超音波処理 → 遠心分離 → 上澄液

→ 孔径0.20 μmのメンブランフィルターでろ過 → 試料溶液

○ 試験条件 検出器：PDA（測定波長 210nm~400nm, 300nm）

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18（粒径 1.7 μm, 2.1 mm φ x 100 mm, Waters 社）

カラム温度：40°C

移動相：A液：1%リン酸溶液/アセトニトリル混液（9:1），B液：アセトニトリル A液:B液（7:3）で混合する。

流速：0.4 mL/min

注入量：5 μL

# 試験結果（定量分析）

定量結果について、図4～7に示す。

試料のグループ分けを以下のとおりとし、各成分の定量値について t 検定を行った。

- ① 植物種の比較：大深当帰 5 9 個体及び北海当帰 1 2 個体。
- ② 修治加工の比較：修治加工あり（国産大深当帰） 4 5 個体及び修治加工なし（国産大深当帰） 1 2 個体。

リグスチリドで、②修治加工の比較では、5%の水準で有意差が認められたが、その他では、有意差は、認められなかった。それぞれの結果を図8～15に示す。

## 定量結果

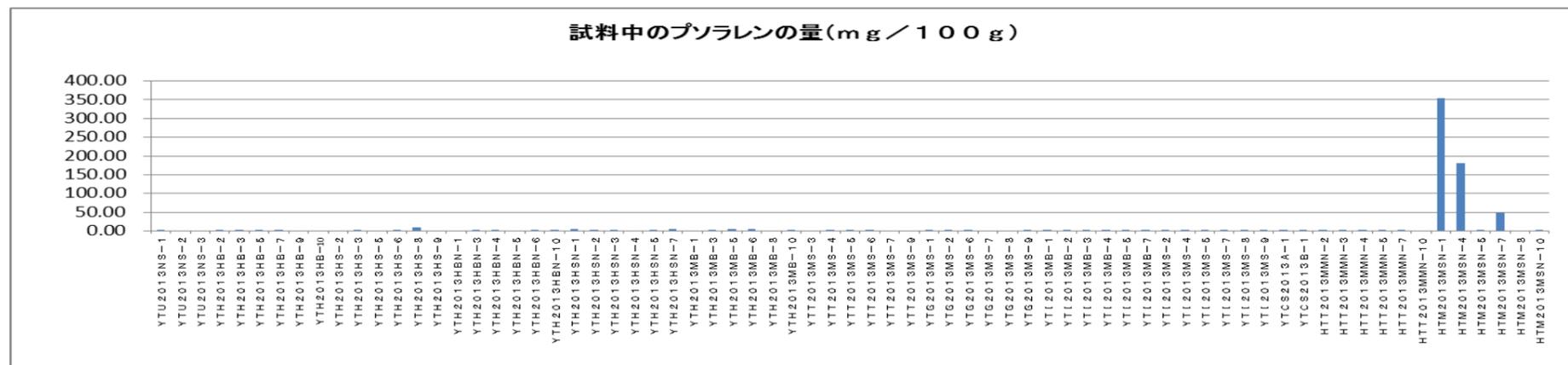


図4 プロソラレン 定量結果

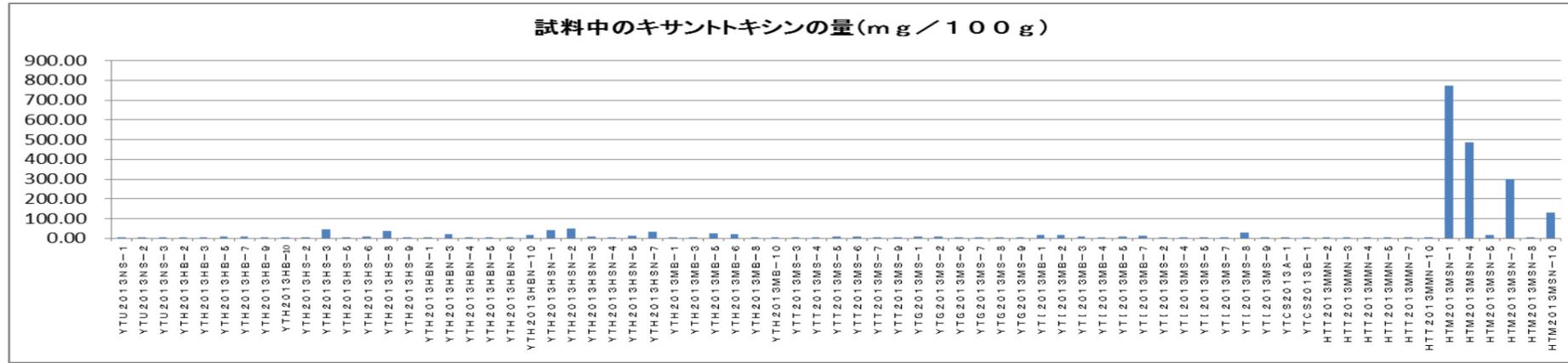


図5 キサントトキシンの定量結果

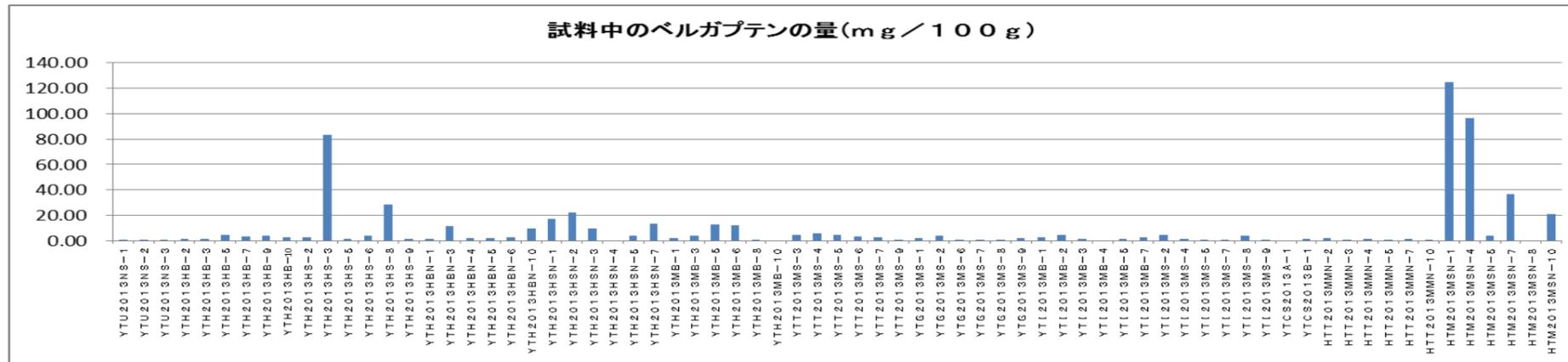


図6 ベルガプテンの定量結果

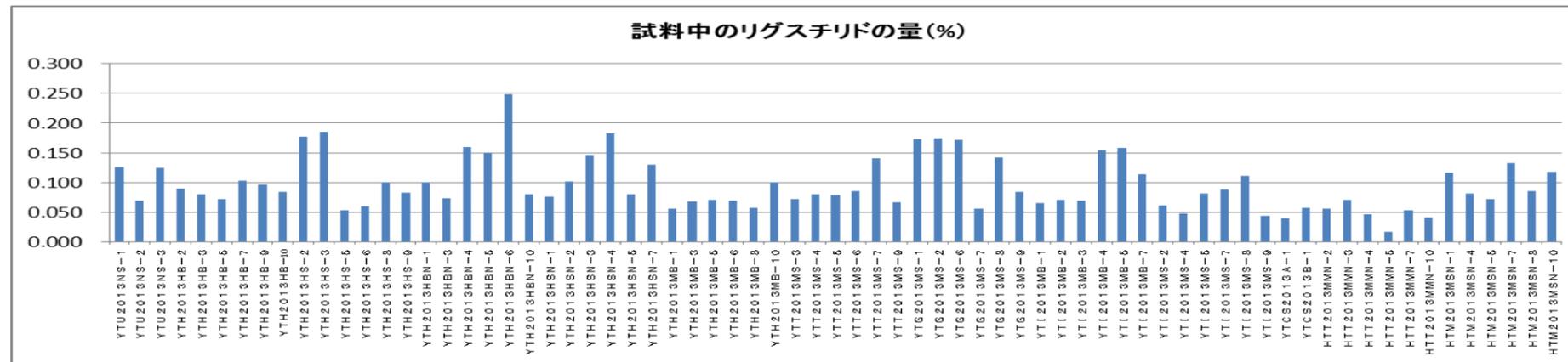


図7 リグスチリドの定量結果

# 植物種の比較

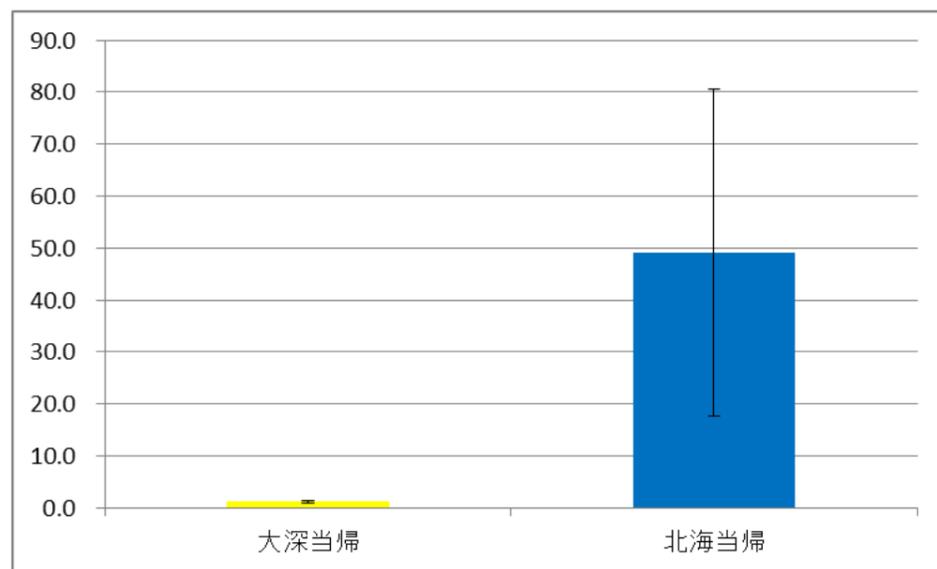


図 8 100 gあたりのプソラレン含有量 (mg) 平均値±S.E

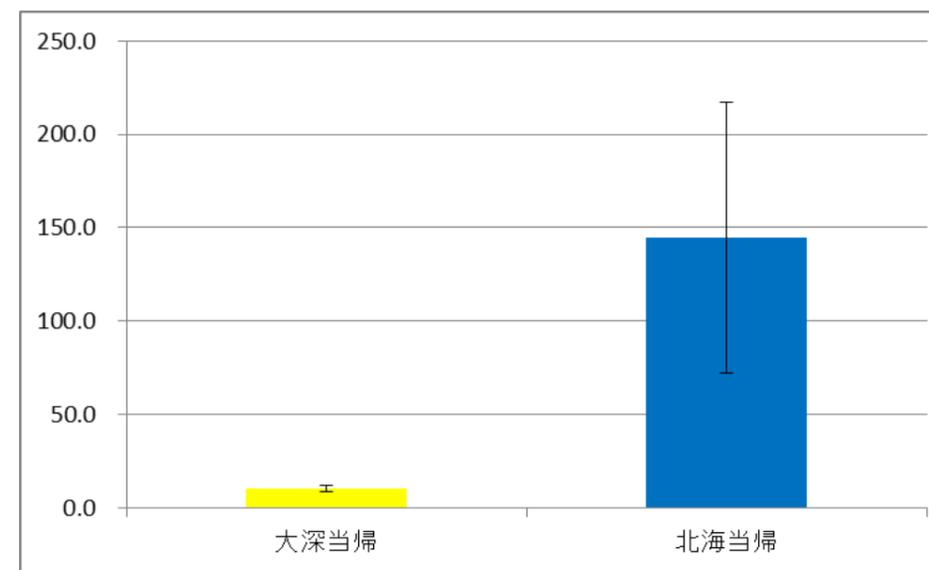


図 9 100 gあたりのキサントトキシン含有量 (mg) 平均値±S.E

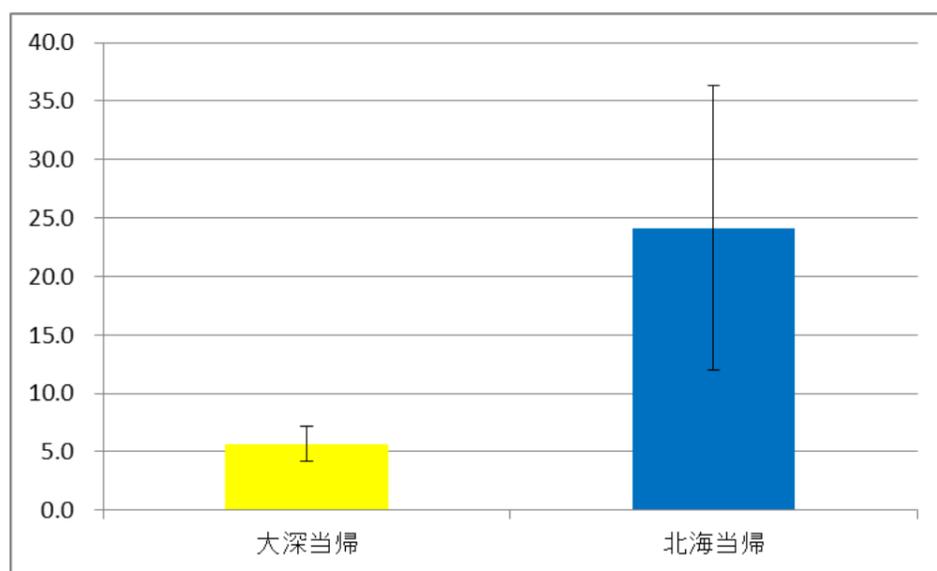


図 10 100 gあたりのベルガプテン含有量 (mg) 平均値±S.E

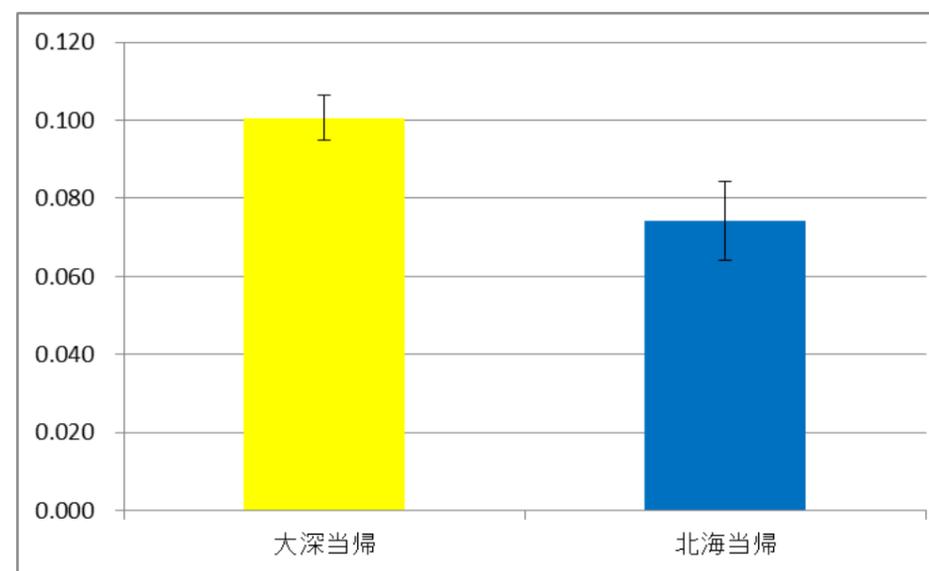


図 11 リグスチリド含有量 (%) 平均値±S.E

# 修治加工の比較

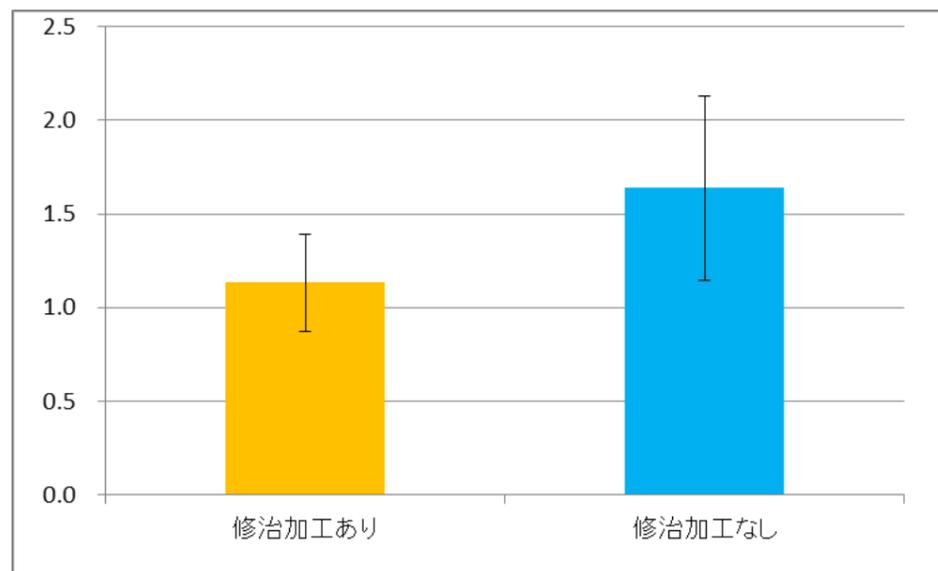


図 1 2 100 gあたりのプソラレン含有量 (mg) 平均値±S.E

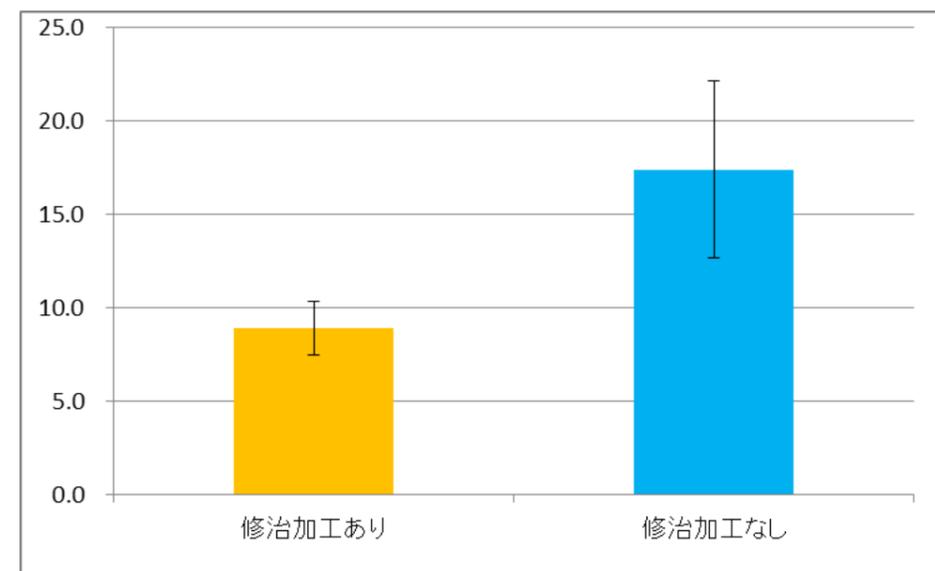


図 1 3 100 gあたりのキサントトキシン含有量 (mg) 平均値±S.E

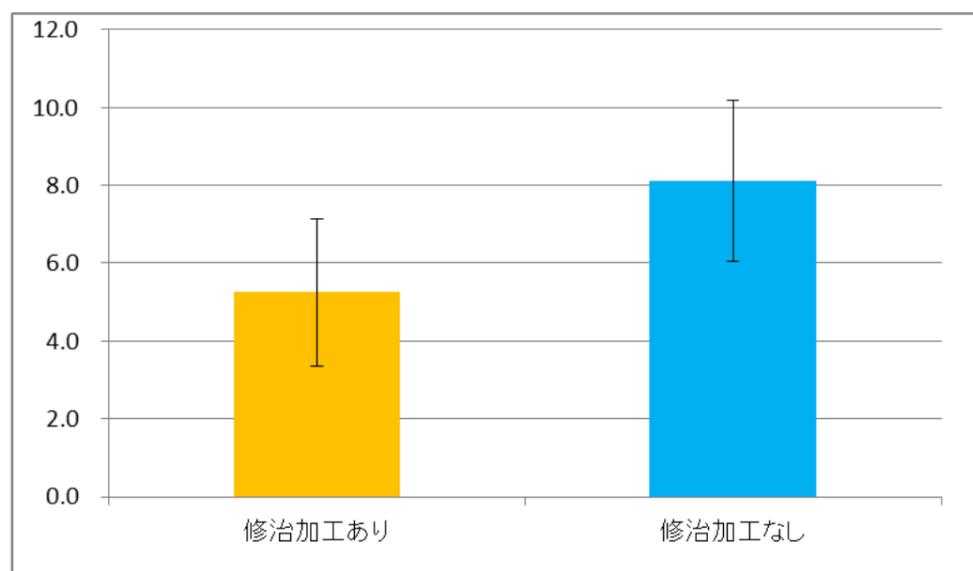
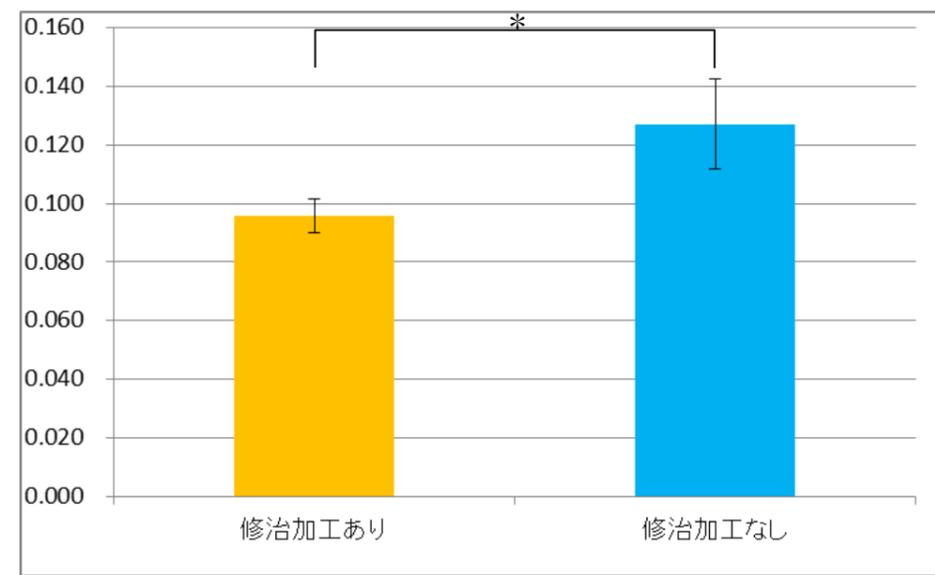


図 1 4 100 gあたりのベルガプテン含有量 (mg) 平均値±S.E



\* : P < 0. 0 5

図 1 5 リグスチリド含有量 (%) 平均値±S.E

# 考察

OPLS-DA法により解析した結果、①植物種の比較及び、②修治加工の比較、において、各グループの判別が可能であった。S-Plot で寄与成分を確認したところ、①植物種の比較で北海当帰と判別される寄与成分にキサントトキシン、プソラレン、ベルガプテンといったフロクマリン類が選抜された。②修治加工の比較で修治加工ありと判別される寄与成分にアルキルピラジン類が、修治加工なしと判別される成分にリグスチリド、Hexanoic acidが選抜された。

そこでHPLC法によりフロクマリン類及びリグスチリドについて定量を行った。

リグスチリドについて、修治加工ありと修治加工なしのグループでt検定を行ったところ、5%の水準で有意差が認められた。このことから大和当帰のブランド認証のための評価指標の一つとして検討していきたい。

フロクマリン類について、大深当帰と北海当帰のグループでt検定を行ったが有意差は、認められなかった。しかし、含量の平均値は大きく異なっている。このことは、一部の北海当帰の個体で大深当帰の平均と比較して非常に高値を示すものが複数認められたことが原因と考えられる。このことから、フロクマリン類は、大深当帰と他の当帰とを判別する指標に用いることはできないが、光過敏症を誘発することが示唆されていることから、ブランド認証の際は一定の基準を設定する必要があると考えられた。