薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (11) 1101-1103 (1988)

中国産紅花中の血小板凝集抑制物質の同定と定量

杏名 裕,^{*,a} 藤井誠史郎,^a 北村謙始,^a
小松一男,^b 中野幹清^b

(株)資生堂 基礎科学研究所,^a 安全性・分析センター^b

Identification and Determination of Platelet Aggregation Inhibitor from Safflower (*Carthamus tinctorius* LINNÉ)

HIROSHI KUTSUNA,^{*,a} SEISHIRO FUJII,^a KENJI KITAMURA,^a
KAZUO KOMATSU,^b and MOTOKIYO NAKANO^b

Shiseido Basic Research Laboratories^a and Shiseido Toxicological
and Analytical Research Center,^b 1050 Nippacho,
Kohokuku, Yokohama 223, Japan

(Received April 21, 1988)

Safflower (*Carthamus tinctorius* LINNÉ) has been traditionally used for the treatment of Oketsu, namely blood stasis in Chinese medicine. Aqueous extract from safflower inhibited the rabbit platelet aggregation induced by adenosine diphosphate. The sole inhibitor was isolated by high performance liquid chromatography (HPLC), and identified as adenosine by ¹³C- and ¹H-nuclear magnetic resonance. As the result of quantitative analysis by HPLC using the capsule type C₁₈ column, 16–550 ppm of adenosine were detected in safflowers collected from different districts.

Keywords—safflower; *Carthamus tinctorius*; platelet aggregation; adenosine; C₁₈ capsule type packing material

紅花 (*Carthamus tinctorius* LINNÉ; *Carthamus t.*) は、日本薬局方¹⁾ 収載の生薬であり、主に駆瘀血薬、通経薬として血行障害や婦人病の治療に古くから用いられてきた。紅花は、末梢循環血流量の増加作用、²⁾ アドレナリンと拮抗する血管拡張作用、¹⁾ ヒスタミンや抗血清と拮抗する血管透過性抑制作用、³⁾ 及び血液凝固抑制作用⁴⁾ を有することが薬理学的に確認されている。一方、紅花の成分は、赤色色素カルサミンと黄色色素サフラワイエロー、⁵⁾ また変異原物質のケンフェロールとケルセチン⁶⁾ の報告があるが、薬理作用の有効成分に関する報告はない。

著者らは、紅花の薬理作用について総合的に評価した結果、前述の薬理作用の他に血小板のアデノシン二リン酸 (ADP) による凝集に対し強い抑制作用を新たに見出した。そこで中国産紅花からこの血小板凝集抑制物質を単離、同定し、更に中国各産地の紅花中の血小板凝集抑制物質を定量したので報告する。

結 果

(1) 血小板凝集抑制物質の単離及び同定

Chart 1 に示した分画のフローシートにおいて、紅花中の血小板凝集抑制物質は総て最終分画に濃縮され、この分画以外には血小板凝集抑制作用は全く認められなかった。単離した血小板凝集抑制物質を ¹H- 及び ¹³C-核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにより構造解析したところ、その構造はアデノシンと推定された。また、単離した血小板凝集抑制物質とアデノシン標品を瞬間マルチ測光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定性分析したところ、保持時間及び紫外吸収スペクトル ($\lambda_{\max}=258\text{ nm}$) が共に一致した。更に、単離した血小板凝集抑制物質は、アデノシン標品と血小板凝集抑制作用の強度が全く一致したことから、アデノシンであると同定した。

Carthamus tinctorius LINNÉ 20 g

extracted with H₂O (200 ml×3)
condensed to 30 ml
precipitated by addition of (CH₃)₂CO 270 ml
dissolved ppt. in H₂O 30 ml
precipitated by addition of (CH₃)₂CO 270 ml
evaporated in vacuum

filt. 1.04 g (50 µg/ml, 56%)

ppt. 4.85 g
(250 µg/ml, 0%)

fractionated by HPLC
column: ODS (57 mm i.d.×300 mm)
eluent: AcOH:MeOH:H₂O=0.1:25:74.9,
100 ml/min
evaporated in vacuum

420 mg (25 µg/ml, 53%)

fractionated by HPLC
column: ODS (20 mm i.d.×250 mm)
eluent: AcOH:CH₃CN:H₂O
=0.1:10:89.9, 10 ml/min
evaporated in vacuum

adenosine 4.2 mg (0.25 µg/ml, 43%)

Chart 1. Isolation of Adenosine

() indicates concentration and inhibition %
of extent of aggregation.

(2) 血小板凝集抑制物質の定量

HPLC によるアデノシンの検量線は、0—30 µg の範囲で原点を通る直線 (相関係数 $r=0.99990$) を示した。紅花 2.0 g にアデノシン 1 mg を添加して回収実験 ($n=6$) を行ったところ、回収率 93.9%, 変動係数 3.5% と良好な結果を得た。紅花水抽出物のクロマトグラム (Fig. 1) においてアデノシンは、約 4.5 分にシャープなピークとして溶出した。Table I に中国産紅花 (5 カ所) と山形産餅紅中のアデノシンの定量結果を示す。アデノシンは、16—550 ppm といずれの中国産紅花からも検出され、特に甘肅省産と新疆ウイグル自治区産のものの含有量が高かった。一方、山形産餅紅ではアデノシンは 5 ppm 以下で検出されなかった。

Fig. 1. Chromatograms of Adenosine and Safflower Water Extract

TABLE I. Analytical Result of Adenosine in Safflower

Sample	Harvest year	Adenosine (ppm)
Xinjiang Urygur	'85	518±58
	'86	550±71
Gansu	'85	522±49
Sichuan	'85	163±36
Yunnan	'85	139±24
Henan	'85	16±5
Kyokuho	Unknown	336±45
Yamagata	'85	<5

$n=5$.

考

察

紅花の水抽出物が ADP による血小板凝集に対し強い抑制作用を有することを見出し、本作用成分をアデノシンと同定した。紅花水抽出物の血小板凝集抑制作用は、アデノシン以外の画分では全く認められないこと、また紅花水抽出物及び各画分の活性強度がそれらのアデノシン含有量に対応したことから、アデノシン単独による作用であるものと考えられる。アデノシンは従来より血小板の ADP による凝集を抑制することが知られているが、⁸⁻¹⁰⁾ 紅花中のアデノシンの存在を確認した報告は無い。今回の結果から、アデノシンが紅花の重要な有効成分の 1 つであることが確認された。しかしながら、紅花が有する血小板凝集抑制作用以外の多くの薬理作用についてはアデノシンのみでは説明できず、共存する他の有効成分に関する検討が更に必要である。

アデノシンは紅花以外にもサフラン、¹¹⁾ 薤白及び大蒜¹²⁾ 中にも血小板凝集抑制物質として存在することが報告されている。著者らによるアデノシンの分析法は、生薬中の未知の血小板凝集抑制物質を探索する際に、事前に

アデノシンの存在を確認する方法として有用であるものと考えられる。

実 験 の 部

試料 血小板凝集抑制物質の分画, 単離には, 新疆ウイグル自治区産紅花 (1985 年度産) を用いた. また, 中国新疆ウイグル自治区産 (1985, 1986 年度産), 河南省産 (1985 年度産), 雲南省産 (1985 年度産), 四川省産 (1985 年度産), 甘肅省産紅花 (1985 年度産), 日本山形産餅紅 (1985 年度産), 及び局方紅花 (東京市場品) 中の血小板凝集抑制物質を定量した.

装置 分取——Waters 社 System 500A 分取専用 HPLC 装置及び Waters 社 HPLC 装置 (M600-U6K-M410-M740) を用いた.

定性, 定量——Waters 社 HPLC 装置 (M600-M712-M400-M740) 及び大塚電子社瞬間マルチ測光検出器を用いた.

構造決定——日本電子社 JNM GX-400 型 ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR を用いた.

実験方法 血小板凝集抑制作用試験——日本白色種ウサギ (雄, 体重 2.5—3.5 kg) の頸動脈あるいは耳介静脈から 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として常法通り採血した. 採取した血液を 15 分間遠心分離し, 上層より多血小板血漿を得た. 血小板凝集はこの多血小板血漿及び凝集惹起剤として $2\ \mu\text{M}$ ADP (シグマ社) を用いて, 理科電気工業社製の凝集計により測定した.⁷⁾

血小板凝集抑制物質の単離——新疆ウイグル自治区産紅花の乾燥花卉 20 g を水 200 ml, 70°C で 3 回抽出し, 抽出液を合わせて 30 ml まで減圧濃縮した. これにアセトン 270 ml を添加して分別沈殿し, 沈殿に水 30 ml を加えて再溶解しアセトン 270 ml を添加して再度分別沈殿し, 上清を合わせて減圧乾固した (1.04 g). 抽出物を HPLC により Waters 社 ODS (57 mm i.d. $\times$ 300 mm) カラムを用い, 移動相; $\text{AcOH} : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 0.1 : 25 : 74.9$, 流速; 100 ml/min で粗分画した. 更に YMC 社 ODS (20 mm i.d. $\times$ 250 mm) カラムを用い, 移動相; $\text{AcOH} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 0.1 : 10 : 89.9$, 流速; 10 ml/min で分画を繰返すことによりアデノシン 4.2 mg を単離した (Chart 1).

血小板凝集抑制物質の定量——各産地の紅花 2.0 g を水 40 ml, 70°C で 2 回抽出し, 抽出液を合わせて水を加えて 100 ml に定容として, HPLC 用の試験液とした. HPLC の分析条件は, カラム; Shiseido Capcell Pak C_{18} (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm), カラム温度; 40°C , 移動相; $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 95$, 流速; 2.0 ml/min, 検出波長; 254 nm, 試料導入量; 10 μl とした.

アデノシンの核磁気共鳴スペクトル—— ^1H -NMR (in D_2O) δ : 3.94 (2H, dd, 5'-H), 4.36 (1H, s, 4'-H), 4.50 (1H, s, 3'-H), 4.85 (1H, s, 2'-H), 6.13 (1H, s, 1'-H), 8.31 (1H, s, 8-H), 8.39 (1H, s, 2-H). ^{13}C -NMR (in D_2O) δ : 62.3 (t, 5'-C), 71.4 (d, 2'-C), 74.5 (d, 3'-C), 86.6 (d, 4'-C), 89.2 (d, 1'-C), 119.8 (s, 5-C), 141.3 (d, 8-C), 149.1 (s, 4-C), 153.2 (d, 2-C), 156.3 (s, 6-C).

引 用 文 献

- 1) 第 11 改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京, 1986, p. D-294.
- 2) 塗々木和男, 岡部栄逸朗, 小川秀人, 藤沢 強, 伊藤春生, 神奈川歯学, **18**, 64 (1983).
- 3) 清重達夫, 長畑哲二, 山崎洋治, 長井 泉, 小野富士男, 基礎と臨床, **17**, 77 (1983).
- 4) 小菅卓夫, 石田均司, 山崎英洋, 石井美千代, 薬誌, **104**, 105 (1984).
- 5) 横山典子, 小野寺準一, 小原平太郎, 第 25 回天然有機化合物討論会, 東京, 1982 年 10 月, p. 368.
- 6) Nobuyuki Takeda, Yohko Yasui, *Agric. Biol. Chem.*, **49** (6), 1851—1852 (1985).
- 7) G. Born, M. Cross, *J. Physiol. (London)*, **168**, 178 (1963).
- 8) R. J. O'Brien, *J. Clin. Path.*, **15**, 446 (1962).
- 9) G. V. R. Born, R. J. Maslam, M. Goldman, R. D. Lowe, *Nature (London)*, **205**, 678 (1965).
- 10) G. V. R. Born, D. C. B. Mills, *J. Physiol. (London)*, **202**, 41 (1969).
- 11) 岡野周充, 深谷 力, 横山和正, 西尾 孝, 西本 隆, 松本克彦, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 292.
- 12) 奥山 徹, 藤田賢司, 柴田承二, 保尊正幸, 川田忠典, 正木久朗, 野口輝彦, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 292.