

ブシ及びブシ含有漢方製剤、生薬製剤中の アコニチン系アルカロイドの定量

能勢充彦^a、新井哲也^a、趙 長崎^a、小島啓介^a、荻原幸夫^{a*}、
関田節子^b、佐竹元吉^b

^a名古屋市立大学薬学部生薬学教室、^b国立医薬品食品衛生試験所生薬部

Quantitative Determination of Aconitine Alkaloids in Aconiti Tuber and Kampo Prescription containing Aconiti Tuber Commercially Available

Mitsuhiko NOSE^a, Tetsuya ARAI^a, Cheng-Qi Zhao^a, Keisuke KOJIMA^a,
Yukio OGIHARA^{a*}, Setsuko SEKITA and Motoyoshi SATAKE^b

^a*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.*

^b*Division of Pharmacognosy and Phytochemistry, National Institute of Health
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan*

(Received December 21, 2000)

In order to evaluate the contents of aconitine alkaloids in Aconiti Tuber and Kampo prescription containing Aconiti Tuber commercially available, especially Hachimi-jio-gan, the quantitative analysis of monoester and diester alkaloids was carried out using high performance liquid chromatography (HPLC). We found significantly variance in their contents than we expected, especially with regard to the contents of monoester alkaloids. These differences are thought to be due to the processing method and the original materials.

Keywords ——— Aconiti Tuber ; Hachimi-jio-gan ; aconitine alkaloids ;
HPLC analysis

ブシ（附子：Aconiti Tuber）は、古来より 患者に対して主に鎮痛、新陳代謝の賦活、利
漢方薬の中でも重要な位置を占め、虚寒症の 尿、強心などの治療効果を期待して用いられ

ており、八味地黄丸、牛車腎気丸、桂枝加朮附湯、麻黄附子細辛湯、真武湯、大防風湯などに配合される重要な生薬である。

ブシはキンポウゲ科 (Ranunculaceae) のトリカブト属植物の塊根から調製されたものであり、充実した塊根をそのまま風乾したものを草烏頭、川烏頭とも呼ぶが、毒性が強く、現在ではほとんど使用されない。そこで、いわゆる「修治」という各種の減毒処理が施され、特に中国では伝統的に塩附子、炮附子、白附片、黒附片、黄附片、熟附片などに調製され、また本邦でも白河附子などとして用いられてきた。このように、伝統的にも修治方法の違いによる分類がなされており、一口に「修治ブシ」といっても様々な種類がある。現在では、昭和 30 年代に高橋らによって開発されたオートクレーブを用いた湿熱処理をした、いわゆる「加工ブシ」が開発され、漢方処方配合生薬ならびに漢方製剤及び生薬製剤として安全な利用が可能となったとされる。¹⁻³⁾

しかしながら、市場には数多くの「修治ブシ」が流通しており、中国から輸入される種々の修治ブシ (片) や国内で加工製剤化された種々の修治 (あるいは加工) ブシ末などがあり、原料とされるトリカブト属植物の種類、産地、採取時期の違いをも考慮に入ると、それらのアコニチン系アルカロイド含量をはじめ、薬理効果などには大きなばらつきがあるのではないかと考えられる。また、ブシは漢方医学上重要な生薬の一つとして考えられているにも関わらず、日本薬局方の生薬総則 468 品目には含まれていない。

そこで、現在市場に流通しているブシ及びブシ含有漢方製剤のばらつきを調査する目的で、数種の修治ブシならびに医療用漢方製剤

あるいは一般医薬品 (OTC) として販売されているブシ含有漢方製剤・生薬製剤中のアコニチン系アルカロイドの成分定量を行ったので報告する。

実験の部

1. 実験材料

修治ブシ (片) サンプルとして、名古屋市場品である炮附子 (Material A) を、また生薬製剤として流通している各種「修治 (加工)」ブシ末として、3 社の製品 (Material B-D) を入手した。さらに、ブシ含有漢方製剤として、八味地黄丸を医療用漢方製剤 (Material A、B、ともにエキス剤)、一般医薬品 (Material C-J、エキス剤：C、D、I、J、丸剤：E、G、H、修治ブシ末添加エキス剤：F) を含め、10 品目入手して検体とした。また、その他のブシ含有漢方製剤あるいは生薬製剤として、麻黄附子細辛湯 (医療用)、桂枝加朮附湯 (OTC)、牛車腎気丸 (OTC)、真武湯 (OTC) についても入手し、検体とした。

検体はすべて 1998 年に入手したものである。

2. アコニチン系アルカロイドの定量

2-1 試料調製法：

(1) 酢酸エチルによる抽出：粉末化した検体 100 mg を PYREX 試験管 (遠心機用キャップ付) に精秤し、酢酸エチル 2.0 ml および 28% アンモニア水 2 ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 60 分間超音波抽出した。10 分間遠心 (3000 rpm) し (×2：超音波による抽出の 2 回目は 30 分)、分取した上清に 1M HCl 1.5 ml を加え分配した (×2)。HCl 層を 28% アンモニア水でアルカリ性にし、酢酸エチル 1.5 ml で抽出 (×2) した後、濃縮乾固し、分析用のサンプルとし

た。

(2)塩酸による抽出：粉末化した検体 100 mg を PYREX 試験管（遠心機用キャップ付）に精秤し、1M HCl 2.0 ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間攪拌後、室温で 60 分間超音波抽出した。10 分間遠心（3000 rpm）し（×2：超音波による抽出の 2 回目は 30 分）、分取した上清に 28%アンモニア水を適量加えてアルカリ性にし、酢酸エチル 1.5 ml で抽出（×2）した後濃縮乾固し、分析用のサンプルとした。

2-2：標準品による添加回収試験：炮附子（Material A）を用いて、各アコニチン系アルカロイドの標準品を添加し、前述のように試料を調製して各成分の回収率を検討した。

2-3：HPLC 条件：カラム：Cosmosil 5C18-AR-300 (4.6 mm I.D.×150 mm、ナカライテスク)、移動相：0.1%トリフルオロ酢酸・テトラヒドロフラン (10：1)、流速：1.0 mL/min、カラム温度：40℃、検出器：フォトダイオードアレイ紫外可視検出器（測定波長：235 nm、260 nm）

2-4：定量法：上記に従って調製したサンプルのアコニチン類（ベンゾイルメサコニン：BM、ベンゾイルアコニン：BA、ベンゾイルヒパコニン：BH、アニソイルアコニン：AA、アコニチン：A、メサコニチン：M、ヒパコニチン：H）の定量については、各標準品を用いた絶対検量線法にて行った。すなわち、各標準品 0.1–1.0 µg/10 µL を HPLC に注入し、その面積値をもとに検量線を作成した。

HPLC の標準クロマトグラムから、各化合物の保持時間ならびに紫外吸収スペクトルによ

り各クロマトグラム中の化合物を同定した。

各成分の定量値は、製品中の含有率（%）で示した。

結果

1. 修治附子（片）及び修治（加工）附子生薬製剤中のアコニチン系アルカロイドの定量

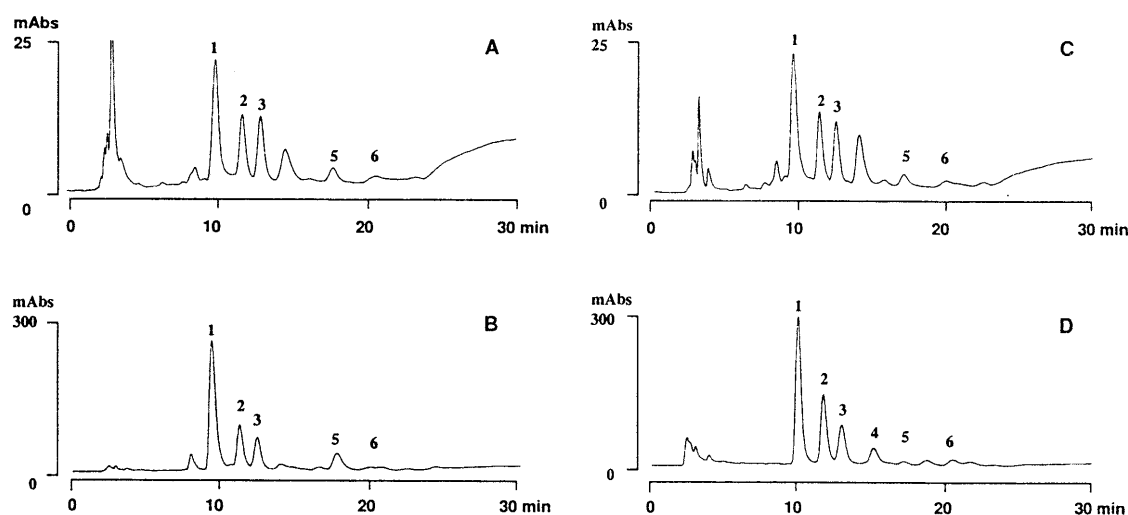
これまでに、ブシ及びブシ含有漢方方剤中のアコニチン系アルカロイドの分析方法が幾つか報告されている。それらは、ジエステル類、モノエステル類、さらには修治の結果生成されるリポアコニチン類の分析をも指向しているため、比較的大量のサンプルを用い、またその長い抽出時間を含め、前処理カラムの使用など操作が煩雑であるものが多い。⁴⁻⁶⁾

本研究においては、市場調査を目的とするため、特にモノエステル型のアコニチン系アルカロイドの分析を主眼において、その定量法を構築した。その結果、100 mg という少量で、またアンモニア性酢酸エチルあるいは 2%塩酸を抽出溶媒とし、粉末化した試料を超音波抽出することで、短時間の試料調製を可能とすることが判明した。

さらに、標準品の添加回収実験の結果、Table 1 に示すように、各モノエステル、ジエステル型アルカロイド成分の回収率は、アンモニア性酢酸エチルあるいは 2%塩酸による抽出で、90%前後の回収率を示し、十分定量法として用いることができると判断し、目的の検討を行った。

Table 1. Recovery of aconitine alkalids

Method	Recovery (%)					
	BM	BA	BH	M	A	H
AcOEt ext.	90.8 ± 0.7	91.8 ± 0.7	81.3 ± 0.9	90.0 ± 0.4	96.0 ± 1.4	97.1 ± 2.2
HCl ext.	90.2 ± 3.3	93.6 ± 5.6	91.3 ± 4.7	89.3 ± 5.0	93.3 ± 6.3	95.9 ± 3.5

Fig. 1 HPLC profiles of aconitine alkaloids in *Aconiti* Tuber

1, benzoylmesaconine; 2, benzoylaconine; 3, benzoylhypaconine; 4, anisoylaconine;
5, mesaconitine; 6, hypaconitine

Table 2 Aconitine alkaloid contents in *Aconiti* Tuber

Material	Method	Aconitine alkaloids (%)						
		BM	BA	BH	AA	M	A	H
A	HCl ext.	0.028 ± 0.006	0.007 ± 0.000	0.015 ± 0.003	N.D.	0.005 ± 0.001	N.D.	0.001 ± 0.001
	AcOEt ext.	0.034 ± 0.005	0.011 ± 0.003	0.015 ± 0.002	N.D.	0.008 ± 0.001	N.D.	0.003 ± 0.002
B	HCl ext.	0.170 ± 0.028	0.027 ± 0.003	0.070 ± 0.006	N.D.	0.005 ± 0.005	N.D.	0.003 ± 0.002
	AcOEt ext.	0.164 ± 0.011	0.025 ± 0.05	0.064 ± 0.011	N.D.	0.004 ± 0.003	N.D.	N.D.
C	HCl ext.	0.025 ± 0.001	0.006 ± 0.000	0.014 ± 0.001	N.D.	0.006 ± 0.001	N.D.	0.001 ± 0.001
	AcOEt ext.	0.028 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.016 ± 0.001	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	HCl ext.	0.130 ± 0.004	0.057 ± 0.001	0.046 ± 0.001	0.074 ± 0.028	0.005 ± 0.003	N.D.	0.008 ± 0.004
	AcOEt ext.	0.152 ± 0.026	0.068 ± 0.019	0.058 ± 0.019	0.059 ± 0.052	0.003 ± 0.005	N.D.	0.006 ± 0.006

BM, Benzoylmesaconine; BA, Benzoylaconine; BH, Benzoylhypaconine; AA, Anisoylaconine;
M, Mesaconine; A, Aconitine; H, Hypaconitine.
Each data represents the mean ± S.D. of three experiments.

現在、市場に流通しているブシには、中国で修治された後本邦に輸入され、そのまま片として、あるいは粉末化したもののほか、オートクレーブにより湿熱処理した後粉末化したいわゆる生薬製剤がある。これらのうち、入手可能であった 4 品目について HPLC を用いて、それらのアコニチン系アルカロイド含量を定量した (Figure 1)。

4 品目すべてにおいて、毒性の強いとされるアコニチン系ジエステルアルカロイドの含量は低く、その大部分は修治によって毒性の低いモノエステルアルカロイドに加水分解されていた。各品目による特徴として、残存しているジエステルアルカロイドではこれら 4 品目ともにあまり顕著な違いは認められず、ア

コニチン、メサコニチン、ヒパコニチンの総和でもそれぞれ 0.01%程度とあまり差は認められなかった。一方、修治の結果生成したモノエステルアルカロイド含量では、品目 A、C よりも B、D の方が、ベンゾイルメサコニチン、ベンゾイルアコニチン、ベンゾイルヒパコニチンともに多いことが判明した。代表的な成分としてベンゾイルメサコニチンを挙げて検証すると、塩酸抽出の結果その含量は 0.025%~0.17%と約 7 倍の違いが、また酢酸エチル抽出の結果でも 0.028%~0.164%と約 6 倍の差があることがあきらかとなった。また、品目 D においては、アニソイルアコニチンのピークが検出され、他の品目からは検出されなかった (Table 2, Figure 2)。

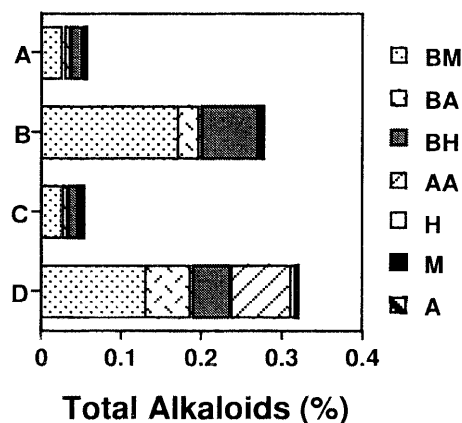


Fig. 2 Aconitine alkaloid composition in Aconiti Tuber

2. 八味地黄丸漢方製剤及び生薬製剤中のアコニチン系アルカロイドの定量

医療用漢方製剤 2 種と一般医薬品 8 種を含む 10 種の八味地黄丸、あるいは八味地黄丸関連生薬製剤を用いて、アコニチン系アルカ

ロイドの定量を行った。代表的なクロマトグラムを Figure 3 に示したように、これら漢方製剤及び生薬製剤サンプルでも、修治附子サンプルと同様モノエステルアルカロイド類は良好な分離を示し、定量可能であった。一方、

附子サンプルでは検出可能であった残存ジエステルアルカロイド類は検出限界以下であった。

Table 3 や Figure 4 に示すように、医療用漢

方製剤と一般医薬品との間には特に違いはなく、むしろ製品間に大きな含量差が認められ、各モノエステルアルカロイドの総和で見ると0.001%～0.02%と20倍もの差が認められた。

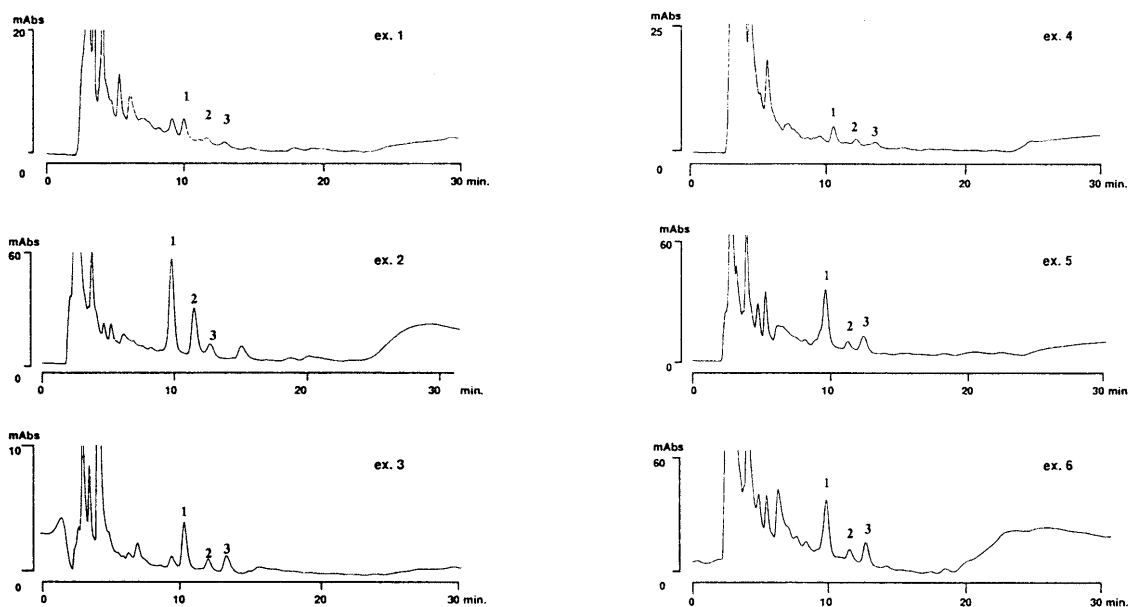


Fig. 3 Typical HPLC profiles of Hachimi-jio-gan

1, benzoylmesaconine; 2, benzoylaconine; 3, benzoylhypaconine

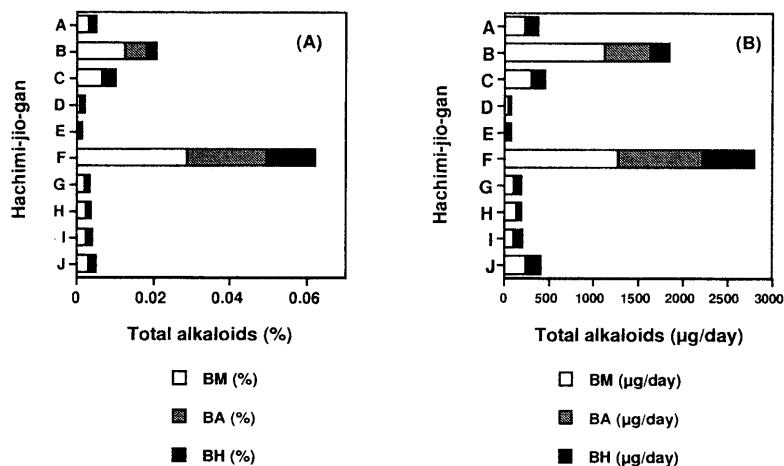


Fig. 4 Monoester alkaloid compositions in Hachimi-jio-gan

Table 3. Aconitine alkaloid contents in Hachimi-jio-gan

Material	Aconitine alkaloid (%)		
	BM	BA	BH
A	0.0031 ± 0.0001	0.0003 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0001
B	0.0126 ± 0.0018	0.0057 ± 0.0006	0.0023 ± 0.0003
C	0.0067 ± 0.0006	0.0007 ± 0.0001	0.0027 ± 0.0002
D	0.0012 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0006 ± 0.0000
E	0.0007 ± 0.0001	0.0002 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0001
F	0.0286 ± 0.0009	0.0207 ± 0.0008	0.0128 ± 0.0009
G	0.0020 ± 0.0001	0.0004 ± 0.0002	0.0012 ± 0.0003
H	0.0030 ± 0.0003	0.0007 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0003
I	0.0023 ± 0.0005	0.0004 ± 0.0001	0.0016 ± 0.0001
J	0.0032 ± 0.0005	0.0005 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0001

BM, Bezoylmesaconine; BA, Benzoylaconine; BH, Benxoylhypaconine.
Each data represents the mean ± S.D. of three experiments.

3. その他ブシ配合漢方製剤及び生薬製剤中のアコニチン系アルカロイドの分析

Figure 5.に示すように、その他のブシ配合漢方製剤、生薬製剤においても分析可能かどうか検討を行った。検体として、麻黄附子細辛湯、桂枝加朮附湯、牛車腎気丸、真武湯を

八味地黄丸の場合と同様にして試料調製を行い、HPLC 分析を行った。3-D HPLC により精査した結果、各モノエステルアルカロイド類は良好な分離を示し、その定量が可能であることが判明した。

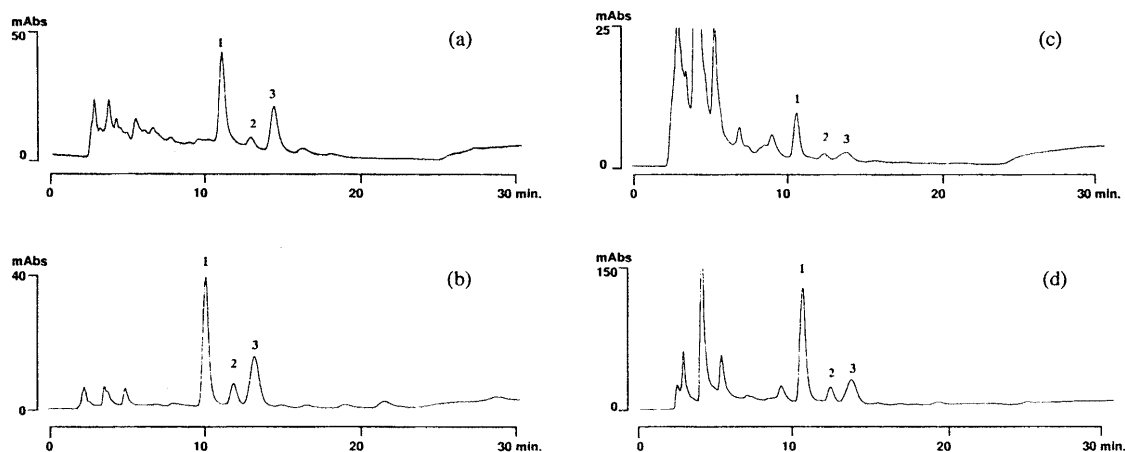


Fig. 5 Typical HPLC profiles of Kampo medicines containing *Aconiti Tuber*

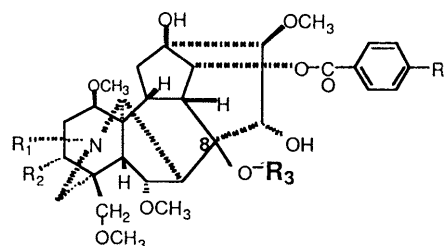
(a), Mao-bushi-saishin-to,; (b), Keishi-ka-kyutsu-bu-to ; (c), Gosha-jinki-gan ; (d), Shimbu-to.

考察

ブシはキンボウゲ科 (Ranunculaceae) のトリカブト属植物の塊根から調製されたものである。その基原となるトリカブト属植物は北半球の山野に自生する北方の植物と考えられ、その種類は300を超えるといわれている。⁷⁾ また、そのアルカロイド含量は産地及び収穫時期によって大きく異なることが知られている。⁸⁻¹⁰⁾ 本邦では、主に中国から輸入される四川省産のハナトリカブト (*Aconitum carmichaeli* Debeaux、カマトリカブトとも呼ばれる) や自生するオクトリカブト (*A. japonicum* Thunb.) 及びヤマトリカブト (*A. japonicum* Thunb. var. *montanum* Nakai) 等が使用されており、また近年は栽培により安定供給が可能となった日本産ハナトリカブトが用いられるようになってきている。¹¹⁻¹⁵⁾ これらトリカブト属植物中には、毒性の強いアコニチン系ジエステルアルカロイドが含有されていることから、古来より種々の減毒処理が行われてきた。修治によって、アコニチン、メサコニチン及びヒパコニチンなどのアコニチン系ジエステルアルカロイドは加水分解を受け、対応するモノエステルアルカロイドに変換され、毒性の減弱となる。¹⁶⁾ しかし、一方で過剰な減毒処理でこれらの成分が消失し、期待した鎮痛効果が得られないなどという問題点もあり、¹⁷⁾ その効力を安全に引き出させるような修治条件の設定についての報告も多い。^{18, 19)}

このようにブシは漢方医学上重要な生薬の一つに数えられ、またその基原植物が有毒植物であり、かつその修治法に微妙な条件設定が必要とも考えられているにも関わらず、日本薬局方の生薬総則 468 品目に含まれておらず、そのため確認試験ならびに品質評価法も

規定されていない。現行のブシに関する規定は、昭和40年1月11日の厚生省令第2号に「アコニチンを含有する注射剤以外の製剤であって、アコニチン含量が製剤1個中に0.01 mg 以下であれば劇薬から除外される」とあるように、それが劇薬に相当するかどうかには過ぎない。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Aconitine	C ₂ H ₅	OH	COCH ₃	H
Mesaconitine	CH ₃	OH	COCH ₃	H
Hypaconitine	CH ₃	H	COCH ₃	H
Benzoylaconine	C ₂ H ₅	OH	H	H
Benzoylmesaconine	CH ₃	OH	H	H
Benzoylhypaconine	CH ₃	H	H	H
Anisoylaconine	C ₂ H ₅	OH	H	OCH ₃

Fig. 5 Structure of aconitine alkaloids

本研究で検討したように、修治附子 (片) および修治 (加工) ブシ末においては、その修治方法に関わらず、ジエステルアルカロイド類の残量は0.01%前後とあまり違いは認められなかったが、モノエステルアルカロイド含量は大きく異なり、検討した4品目は2つに大別された。すなわち、総モノエステルアルカロイド含量が低値を示した2品目は中国から輸入された炮附子を原料とした片や粉末であり、高値を示した2品目はオートクレーブによる湿熱処理で製造されたものであった。これらの違いには、単にその修治方法によるものだけではなく、原料となったトリカブト

属植物の種類や産地、収穫時期など他の要因もあると考えられるが、このように明確にその違いが検出されたことは興味深い。また、オートクレーブ処理による修治を受けた 2 品目においても、一方ではアニソイルアコニンの存在が確認され、添付文書に記載されているように原料となった植物の相違を支持している。これらの 4 品目を用いて、酢酸ライジング法による鎮痛試験を行ったところ、これらのアコニチン系アルカロイド含量の差に相関する鎮痛活性の違いは認められなかった (data not shown)。これまでに、含量の高いベンゾイルメサコニンなどモノエステルアルカロイド類はその鎮痛活性が極めて低いことが知られ、²⁰⁾ また鎮痛活性の高いメサコニチンのようなジエステルアルカロイド類もその活性への関与を含有量のみでは論じられないことなどが報告されていることから、¹⁹⁾ このような化学的品質評価法と薬理学的・生物学的評価方法との相関についてはまだ今後課題を残している。

附子含有漢方製剤や生薬製剤中のアコニチン系アルカロイドの定量を八味地黄丸を例に取り行ったところ、医療用、一般用に関わらず、また八味地黄丸料エキス剤あるいは丸剤の区別に関わらず、含有されるモノエステルアルカロイド類の総和にはかなりのばらつきが観察された。1 日服用量中の総モノエステルアルカロイド量においても、D、E のように低値を示すものもあれば、G、H、I あるいは A、C、J のような値のもの、また B、F のように高値を示すものもあり、そのばらつきは予想以上に大きかった。

モノエステルアルカロイドの毒性は、ジエステルアルカロイドの 100 分の 1 以下になるといわれている。そのため、市場に流通し

ている附子や八味地黄丸製剤中のアコニチン系モノエステルアルカロイド含量に今回明らかとなったような含量差が認められても、使用上特に問題とはならなかったのかもしれない。

本研究で用いた分析方法により、モノエステルアルカロイド類は良好な分離を示し、漢方処方分析にも有効であることが判明した。今回は結果を示さないが、麻黄附子細辛湯、桂枝加朮附湯、牛車腎気湯、真武湯などでも良好なクロマトグラムが得られている。これらの結果は、モノエステルアルカロイド類を指標成分とした HPLC 定量法がブシの確認試験ならびに品質管理に適していることを示している。これらの処方についても、市場に流通している製品間のアコニチン系アルカロイド含量にどの程度ばらつきが存在するのか、検討する必要があると考えている。

引用文献

- 1) S. Takahashi, M. Nishino, *Nihon Toyo Igaku Zasshi*, **12**, 51(1961).
- 2) S. Takahashi, *Wakan-yaku*, **125**, 1(1963).
- 3) S. Takahashi, *Wakan-yaku*, **132**, 1(1964).
- 4) H. Hikono, C. Konno, H. Watanabe, O. Ishikawa, *J. Chromatogr.*, **211**, 123 - 128(1981).
- 5) I. Kitagawa, Z. L. Chen, M. Yoshikawa, *Yakugaku Zasshi*, **104**, 867 - 872(1984).
- 6) H. Hikono, M. Murakami, C. Konno, H. Watanabe, *Planta Medica*, **48**, 67 - 71(1983).
- 7) T. Nakai, *Botanical magazine*, **49**, 501(1935).
- 8) E. Ochiai, T. Sekimoto, S. Sakai, A. Saito, *Yakugaku Zasshi*, **76**, 1414 - 1418(1956).
- 9) F. Kurosaki, T. Yatsunami, T. Okamoto, Y. Ichinohe, *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1267 -

- 1273(1978).
- 10)H. Hikino, S. Shiota, M. Takahashi, M. Murakami, *Natural Medicine*, **37**, 68 - 72(1983).
- 11)財団法人日本特殊農産物協会、"薬用作物(生薬)関係資料"、平成6年3月、p57.
- 12)T. Horikoshi, N. Honma, S. Ishizaki, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **95**, 56(1977).
- 13)T. Horikoshi, H. Bando, N. Honma, S. Ishizaki, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **101**, 115(1983).
- 14)T. Horikoshi, H. Bando, N. Honma, S. Ishizaki, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **102**, 120(1984).
- 15)T. Horikoshi, H. Bando, N. Honma, S. Ishizaki, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **102**, 123(1984).
- 16)Y. Suzuki, T. Oyama, A. Ishige, T. Isono, A. Asami, Y. Ikeda, M. Noguchi, Y. Omiya, *Planta Med.*, **60**, 391(1994).
- 17)J.C. Cyong, K. Yakazu, T. Kikutani, S. Ohno, *Toyo Igaku*, **20**, 21(1992).
- 18)H. Hikino, C. Yamada, K. Nakamura, H. Sato, Y. Ohizumi, *Yakugaku Zasshi*, **97**, 359 - 366(1977).
- 19)M. Taki, Y. Omiya, Y. Suzuki, Y. Ikeda, M. Noguchi, T. Matsubara, M. Kubo, K. Niitsu, Y. Komatsu, M. Okada, *Natural Medicines*, **52**, 343 - 352(1998).
- 20)H. Hikino, T. Ito, C. Yamada, H. Sato, C. Konno, Y. Ohizumi, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 78 - 83(1979).