

サフラン中の血小板凝集抑制物質の単離・同定¹⁾岡野 周充^{a)}西尾 孝^{b)} 深谷 力^{a)} 横山 和正^{a)} 西本 隆^{b)} 松本 克彦^{b)}^{a)}(株)ミドリ十字・中央研究所, ^{b)}兵庫県立東洋医学研究所Isolation and identification of a platelet aggregation inhibitor from
Saffron (*Crocus sativus* LINNE, Iridaceae)Kanemichi OKANO,^{a)} Takashi NISHIO,^{b)} Chikara FUKAYA,^{a)}
Kazumasa YOKOYAMA,^{a)} Takashi NISHIMOTO,^{b)} Katsuhiko MATSUMOTO^{b)}^{a)}Central Research Laboratories, The Green Cross Corporation^{b)}Institute for Oriental Medicine, Hyogo

(Received February 14, 1992. Accepted September 16, 1992.)

Abstract

Thirteen milligrams of a platelet aggregation inhibitor were isolated from 50 g of Saffron (stigma of *Crocus sativus* LINNE). The IC_{50} values of the active substance against platelet aggregation induced by ADP and Collagen were $7.5 \mu\text{g/ml}$ and $0.82 \mu\text{g/ml}$, respectively. The active substance was identified as "adenosine" by ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, IR, UV, HPLC, TLC, *et al.* The contents of adenosine in saffron were determined by HPLC.

Key words saffron, *Crocus sativus* LINNE, platelet aggregation, adenosine.

緒 言

生薬サフランは、サフラン (*Crocus sativus* LINNE, Iridaceae) の柱頭および花柱上部を乾燥したもので、一般に、鎮静・鎮痛・通経の目的で家庭薬製剤の原料として用いられている。

また、生薬サフランは、漢方医学において活血薬に分類されており、瘀血証に対し用いるとされている。瘀血が血液性状の異常あるいは末梢循環不全であるという認識のもとに、近年、活血薬について血液学的に広範な検索がなされている。しかし、サフランについては検索されていないことに着目し、著者らは生薬サフランの凝固・線溶系に及ぼす影響について検討し、生薬サフランの熱水エキ스가活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトロンビン時間を延長することにより抗凝固作用、ADP およびコラーゲンにより惹起される血小板凝集を抑制する作用、フィブリン平板法においてウロキナーゼならびにプラスミン線溶活性を亢進する作用を有するこ

と²⁾、さらに、合成基質法ではウロキナーゼならびにプラスミン線溶活性を阻害する作用を有していること³⁾を報告した。

今回、これら作用のうち特に強い活性を示した血小板凝集抑制活性を指標にして、サフラン中の活性成分を単離・同定したので報告する。

材料と方法

(1) 試料：血小板凝集抑制物質の抽出・単離には Chroma 社 (西独) 製のサフランを用いた。また、血小板凝集抑制物質の含有量の定量には Chroma 社製の他に、栃本天海堂 (株) 製 (大分県産)、Sigma 社 (米) 製のサフランおよび紅花 (栃本天海堂 (株) 製；中国産) を用いた。

ADP は Sigma 社製、コラーゲン・ホルムは Hormon-Chemie 社製、Adenosine は和光純薬 (株) 製のものを使用した。

(2) 装置：高速液体クロマトグラフィーによる分取ならびに分析には 6000 A 型高速液体クロマトポ

*〒 573 大阪府枚方市招提大谷2-25-1
2-25-1, Shodai-Ohtani, Hirakata, Osaka 573, Japan

ンプ, U6K 型インジェクター, MODEL 440 型紫外-部検出器 (以上 Waters 社製) および C-R1A 型データ処理装置 (島津製) を用いた。 ^1H -NMR と ^{13}C -NMR スペクトルは Bruker モデル AC-200 NMR スペクトロメーター (200 MHz), 赤外線吸収スペクトルは島津 IR-420 型赤外線吸収スペクトロメーター (島津製), 紫外線吸収スペクトルは JASCO UVIDEK-505 型二波長分光光度計 (日本分光製), 旋光度は JASCO DIP-181 型旋光度計 (日本分光製) を用いて測定した。

(3) 使用動物: 日本白色種ウサギ (雄, 体重 2.5~3.5 kg, (株) ケアリーより購入) を購入後 2 日以上固形飼料で予備飼育した後に用いた。

(4) ウサギ多血小板血漿の調製: ウサギの頸動脈から 3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容を入れたプラスチック容器に採血し, 1,000 rpm, 10 分間遠心分離し, 上清を採取しこれを多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) とした。沈澱層をさらに 3,000 rpm, 15 分間遠心分離し, 上清に乏血小板血漿 (platelet poor plasma; PPP) を得た。PRP 中の血小板数を自動血球計数器 Sysmex PL-100 (東亜医用電子 (株) 製) を用いて測定し, 血小板数が $3 \times 10^5/\mu\text{l}$ になるように PPP で希釈調整した。

(5) 血小板凝集抑制活性測定法: 血小板凝集抑制活性はマルチチャンネルプレートレットアグリゴメーター (理化電機工業社製) を用いて測定した。

PRP 250 μl を小撹拌子の入った凝集用セルにとり, 撹拌し (1200 rpm), 試料溶液 10 μl を加えて 37°C で 3 分間ブレインキュベートしたのち, 凝集惹起剤溶液 20 μl を加え凝集率を測定した。凝集惹起剤は ADP の場合終濃度が 3 μM , コラーゲンの場合 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。対照として試料液の代わりに生理食塩液を加えた時の凝集度を 100 として抑制率を算出し, 抑制物質の活性を IC_{50} で比較した。

(6) 血小板凝集抑制物質の単離: 血小板凝集抑制活性を指標にして活性成分の分画・精製を行った。Chroma 社 (西独) 製のサフラン 50 g に 2500 ml の熱水を加えて 15 分間抽出し, 熱時濾過後, 凍結真空乾燥してエキスを調製した。エキスをメタノールで抽出し, メタノール可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 2 回繰り返し分画した。溶出溶媒は酢酸エチル/イソプロパノール/水 (1 回目: 65:25:18, 2 回目: 168:34:10) の溶出溶媒を用いた。さらに, 得られた活性画分を高速液体クロマトグラフィーで 254 nm の紫外線吸収をモニターしながら分画した。カラムは YMC-Pack ODS S-343-

15 (20 $\phi \times 250$ mm, 15 μ) ((株) ワイエムシイ) を用い, 移動相に先ず 32%, 次に 4% アセトニトリル/水の溶媒系を用いて繰り返し分画・精製し, 白色粉末として血小板凝集抑制物質を単離した。

単離した血小板凝集抑制物質の ^1H -NMR, ^{13}C -NMR のスペクトルデータおよび元素分析の結果を以下に示す。

^1H -NMR (in DMSO- d_6) δ_{ppm} : 3.55 (1H, dd, $J=3.5, 12.1$ Hz, 5'-H), 3.68 (1H, dd, $J=3.5, 12.1$ Hz, 5'-H), 3.97 (1H, m, 4'-H), 4.15 (1H, dd, $J=3.0, 4.9$ Hz, 3'-H), 4.62 (1H, dd, $J=4.9, 6.2$ Hz, 2'-H), 5.40 (2H, bs, 6-NH $_2$), 5.88 (1H, d, $J=6.2$ Hz, 1'-H), 7.35 (1H, s, H $_2$ O), 8.14 (1H, s, 8-H), 8.35 (1H, s, 2-H)。

^{13}C -NMR (in DMSO- d_6) δ_{ppm} : 61.5 (t, 5'-C), 70.5 (d, 2'-C), 73.3 (d, 3'-C), 85.8 (d, 4'-C), 87.8 (d, 1'-C), 119.2 (s, 5-C), 139.8 (d, 8-C), 149.0 (s, 4-C), 152.3 (d, 2-C), 156.0 (s, 6-C)。

元素分析: Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_5 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 43.48; H, 5.11; N, 25.35. Found: C, 43.55; H, 4.85; N, 25.25。

(7) TLC 分析: TLC プレートは Pre-coated Silica Gel 60 Plate F254 (Merck) を用い, 酢酸エチル/イソプロパノール/水 (65:25:18 又は 168:34:10) の 2 種類の展開溶媒で展開し, 紫外線ランプ (254 nm) で検出した。

(8) HPLC 分析

下記の 2 条件で分析した。

(1) カラムは YMC-Pack R-ODS 10 (4.6 $\phi \times 150$ mm, 10 μ) ((株) ワイエムシイ) を用い, 5% アセトニトリル/水の移動相を 2.0 ml/min の流速で送液した。

(2) カラムは YMC-Pack ODS AQ-312 (6 $\phi \times 150$ mm, 5 μ) ((株) ワイエムシイ) を用い, 5% メタノール/50 mM リン酸緩衝液 (pH 2.1) の移動相を 1.0 ml/min の流速で送液した。

両方とも波長 254 nm の紫外線吸収でモニターした。

(9) 血小板凝集抑制物質の定量: サフラン中のアデノシン含有量を高速液体クロマトグラフィーで定量した。試料 0.2 g を 100°C の蒸留水 100 ml で 15 分間抽出し, 熱時濾過後抽出液に蒸留水を加えて正確に 100 ml とし, その 20 μl をカラムに注入した。HPLC は上記の HPLC 分析の (2) の条件で行った。保持時間 6.2 分のピークを波長 254 nm の吸光度で測定し, 絶対検量線法で定量した。

結 果

1. 血小板凝集抑制物質の抽出・単離

サフラン 50 g の熱水エキスから、血小板凝集抑制活性を指標にして Fig. 1 に示す工程で分画・精製し、白色粉末として 13 mg の血小板凝集抑制物質を単離した。各画分の収量と血小板凝集抑制活性を Table I に示す。サフラン 25 g から熱水エキス末 (12.5 g) をメタノールで抽出すると全活性がメタノール可溶部 (7.1 g) に回収された。1 回目のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで Fr. A-3~4 の画分に特に強い活性が認められた。収量を増やすために、さらにサフラン 25 g から同様の抽出・精製処理を行い、Fr. A-3~4 に相当する画分 (909 mg) を得、これらの画分をまとめた (1.36 g)。まとめた画分を 2 回目のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した結果、Fr. B-4~6 の画分に活性は集中した。これらの画分の中で最も強い活性を示した活性画分

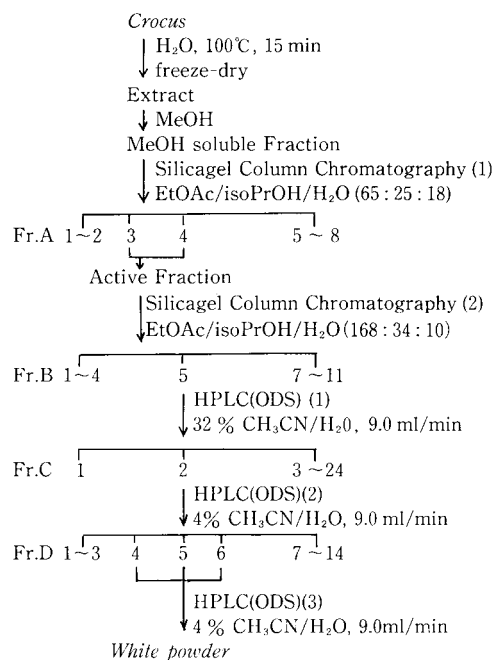


Fig. 1 Isolation of platelet aggregation inhibitor from *Crocus sativus* L.

Table I Inhibition of platelet aggregation.

-Silicagel column chromatography (1)-						-Silicagel column chromatography(2)-			
Samples	Yields (mg)	ADP : Inhibition (%)		Collagen : Inhibition (%)		Samples	Yields (mg)	Inhibition(%) : 1mg/ml	
		10 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml	2 mg/ml			ADP	Collagen
MeOH Ext.		83.8	—	100.0	—	Fr.B-1	32	0.0	—
Fr.A-1	427	76.9	—	100.0	—	2	82	8.3	—
2	505	100.0	0.0	—	5.1	3	148	0.0	—
3	314	100.0	95.0	—	100.0	4	138	38.2	87.6
4	141	100.0	90.0	—	100.0	5	82	50.8	92.8
5	233	96.2	20.0	—	100.0	6	407	26.9	27.8
6	566	53.8	—	100.0	—	7	162	3.1	1.0
7	1871	26.9	—	16.1	—	8	131	5.4	—
8	2490	0.0	—	0.0	—	9	66	0.8	—
						10	37	6.9	—
						11	44	0.0	—

-High performance liquid chromatography (1)-				-High performance liquid chromatography (2)-		
Samples	Yields (mg)	Inhibition (%) : 1 mg/ml		Samples	Yields (mg)	Inhibition (%) : 1 mg/ml
		ADP	Collagen			ADP
Fr.C-2	42	75.5	100.0	Fr.D-3	5	0.0
3	16	0.0	81.2	4	1	4.0
4	5	0.0	28.1	5	6	53.8
5-21	13	0.0	0.0	6	3	73.1
				7	4	42.9
				8	0	30.6
				9	2	47.8
				10-14	16	0.0

Fr. B-5 (82 mg) を高速液体クロマトグラフィーで分画・精製した。先ず移動相に 32 % アセトニトリル/水を用いてクロマト分取したところ、活性は溶出先端付近の Fr. C-2 (42 mg) に認められ、この溶媒系ではカラムにほとんど保持されなかった。そこで移動相を 4 % アセトニトリル/水に変えて行くと、活性は Fr. D-5~7 に認められた。これらの活性画分は HPLC 分析で同じ主ピークを与えたので、これらの画分をまとめて同一条件で再クロマトし、白色粉末として 13 mg の血小板凝集抑制物質を単離した。

Table II IC_{50} values of inhibitor in Crocus and antiplatelet drugs.

Samples	IC_{50} (μ g/ml)	
	ADP	Collagen
Inhibitor in Crocus	7.5	0.82
Adenosine	7.0	1.75
Anagrelide	0.31	0.08
Aspirin	512	5.6
Dipyridamole	512	35.1
Sulfinpyrazone	512	39.6

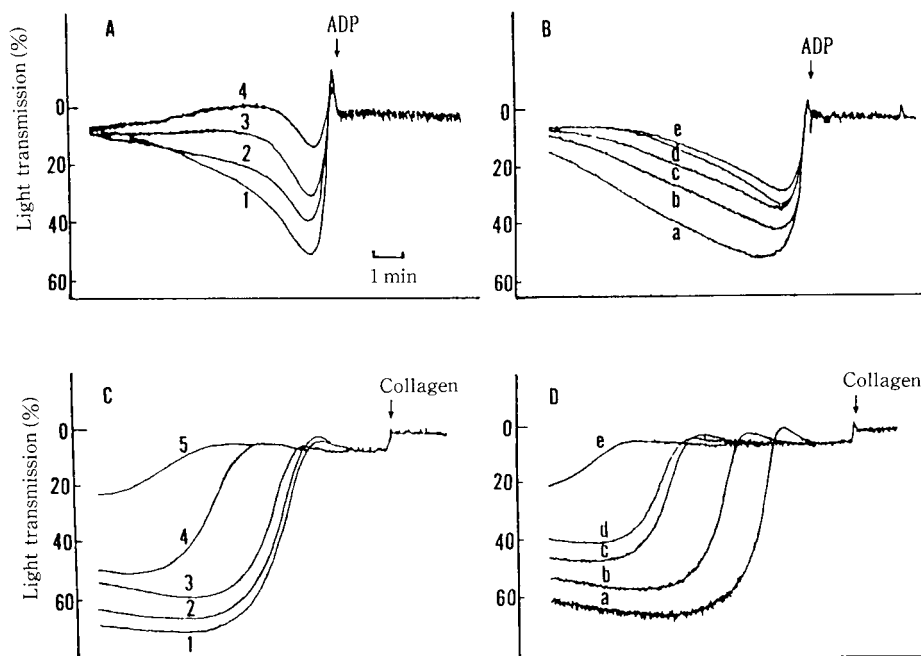


Fig. 2 Inhibition of ADP-induced and collagen-induced rabbit platelet aggregation by the inhibitor in Crocus (A,C) and adenosine (B,D). Platelet rich plasma (250 μ l) was incubated for 3 min at 37°C with a sample solution (10 μ l), then ADP or collagen (20 μ l) was added. The concentration of sample solutions were (A); (1) Inhibitor, 0 μ g/ml, (2) 10 μ g/ml, (3) 100 μ g/ml, (4) 1000 μ g/ml, (C); (1) Inhibitor, 0 μ g/ml, (2) 5 μ g/ml, (3) 10 μ g/ml, (4) 20 μ g/ml, (5) 50 μ g/ml, (B), (D); (a) Adenosine, 0 mM, (b) 50mM, (c) 100mM, (d) 200mM, (e) 400mM,

2. 血小板凝集抑制活性

得られた活性成分は非常に強い血小板凝集抑制活性を示し、Fig. 2 に示すように ADP およびコラーゲンのいずれの惹起剤による凝集に対しても用量に依って抑制し、アデノシンとほぼ同様の抑制作用を示した。その測定結果と市販の抗血小板薬との比較を Table II に示す。

この活性物質は、ADP を惹起剤としたときの

IC_{50} 値は 7.5 μ g/ml、コラーゲンの場合は 0.82 μ g/ml であり、アデノシンとほぼ同じであった。この値を市販の抗血小板薬と比較すると、アナグレライドにはやや劣るが、アスピリンやジピリダモール、スルフィンピラゾンなどよりはかなり強い抑制活性を持っていた。

3. 活性成分の同定

Fig. 3 に ^1H -NMR スペクトル、Fig. 4 に ^{13}C -

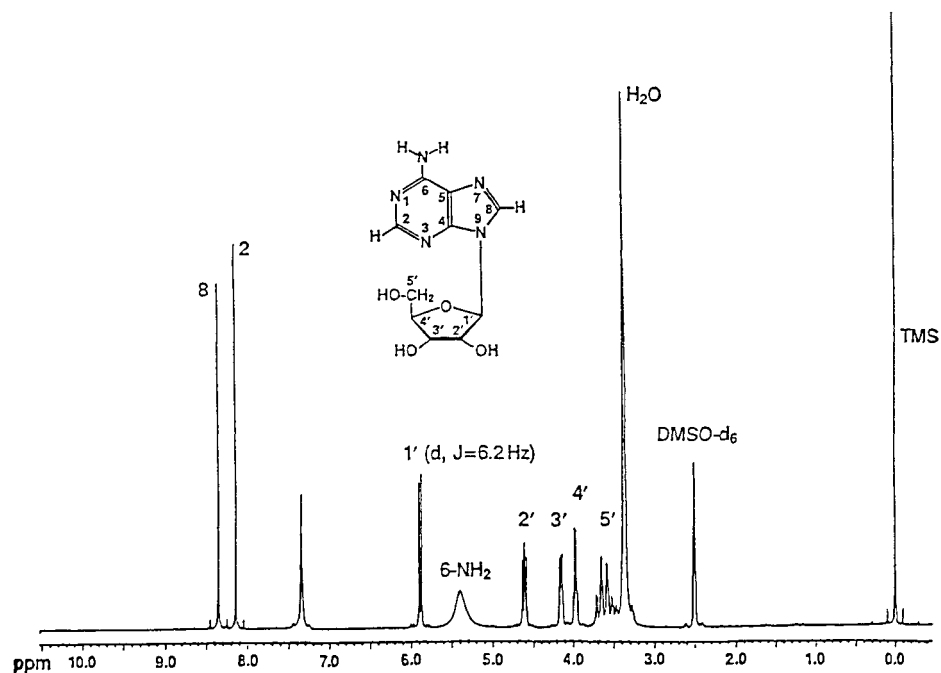
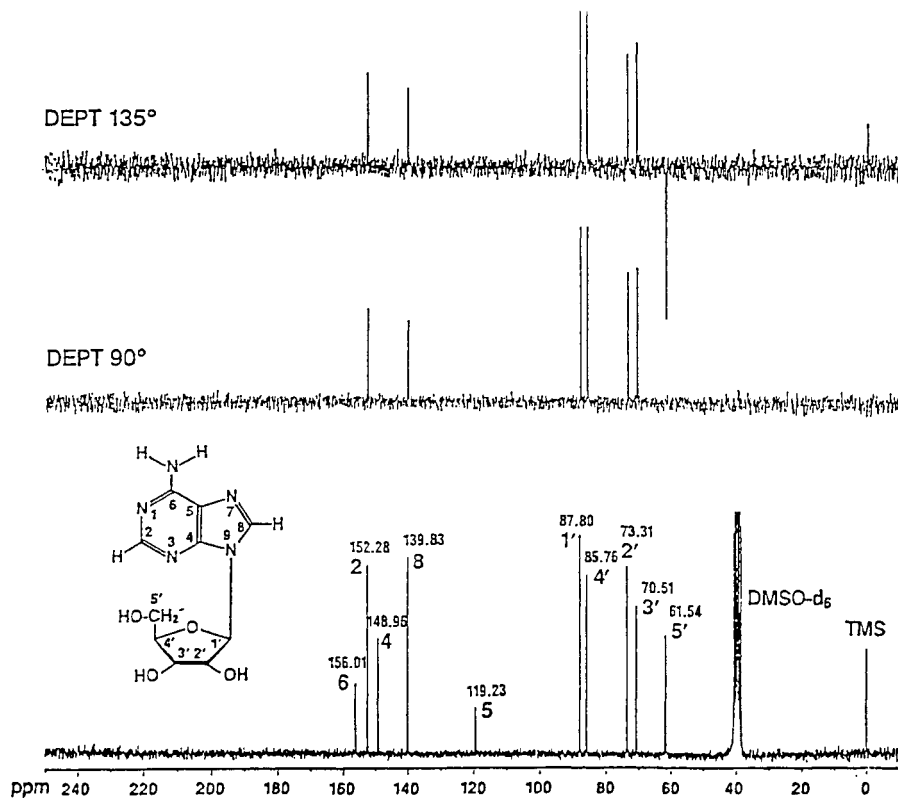
Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of platelet aggregation inhibitor in Crocus.Fig. 4 ^{13}C -NMR spectrum of platelet aggregation inhibitor in Crocus.

Table III Physicochemical properties of inhibitor in Crocus and adenosine.

	Inhibitor in Crocus	Adenosine
m.p.	235~237°C	234~236°C
$[\alpha]_D$	-62.4° (c0.5, H ₂ O, 20°C)	-61.7° (c0.706, H ₂ O, 11°C)
UV $\lambda_{\max}$ nm (ϵ)	204 (20200) 259 (14200) (H ₂ O)	259 (15400) (H ₂ O, pH7.0)
IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3300, 1675, 1640, 1610 1575, 1420, 1375, 1335	

NMR スペクトルのチャートを示す。

これらの NMR スペクトルから活性成分はアデノシンと推定できたので、確認のためその他の物理化学的性状についてアデノシンと比較した。Table III に示すように融点、旋光度、紫外線吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトルの測定値はアデノシンのデータとよく一致した。

また、元素分析の結果もアデノシンの分子式から求めた計算値とよく一致した。

Fig. 5 に示すように高速液体クロマトグラフィーの保持時間や薄層クロマトグラフィーの Rf 値もアデノシンとよく一致していた。

以上の種々のスペクトル・データや物理化学的性状の測定結果から、サフラン中の血小板凝集抑制物質をアデノシンと同定した。

4. 血小板凝集抑制物質の定量

サフラン中のアデノシン含有量を高速液体クロマトグラフィーで定量した。サフランの熱水エキスのクロマトグラムを Fig. 6 に、そして定量結果を Table IV に示す。産地の異なる 3 種類のサフランについて定量したところ、活性成分の単離に用いた Chroma 社 (西独) 製のサフランは 444 $\mu\text{g/g}$ のアデノシンを含んでいた。最も含有量が高かったのは大分県産のもので、580 $\mu\text{g/g}$ のアデノシンを含有しており、Sigma 社 (米) 製のものは 250 $\mu\text{g/g}$ であった。なお、中国産の紅花についても同様に定量したところ、紅花のアデノシン含有量は 144 $\mu\text{g/g}$ であった。

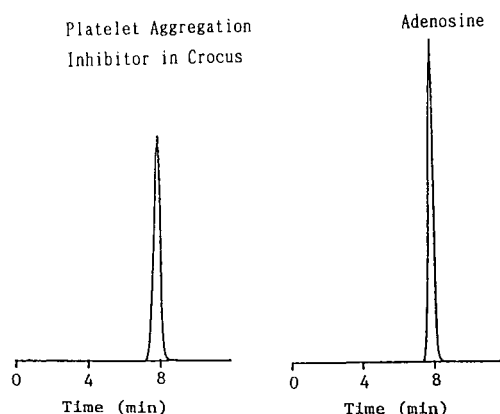


Fig. 5 Identification by high performance liquid chromatography.

Column: YMC-Pack R-ODS 10 (4.6×250 mm, 10 μ)
Mobile phase: 5 % CH₃CN/H₂O
Flow rate: 2.0 ml/min
Detection: UV 254 nm

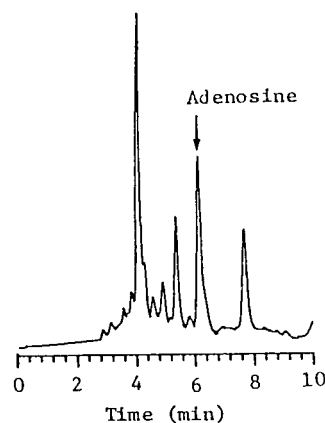


Fig. 6 Chromatogram of hot water extract from Crocus.

Column: YMC-Pack ODS AQ-312 (6 × 150 mm, 5 μ)
Mobile phase: 5 % MeOH/50 mM, Phosphate buffer (pH 2.1)
Flow rate: 1.0 ml/min
Detection: UV 254 nm

Table IV Contents of adenosine in Crocus and Carthami Flos.

Samples (Origin)	Contents ($\mu\text{g/g}$)
Crocus	
Japan (Ohita-ken)	580
USA	250
West Germany	444
Carthami Flos	
China	144

考 察

今回、サフランの熱水エキスから血小板凝集抑制物質を単離し、アデノシンと同定した。アデノシンはこれまでに生薬からは薬用人参からインシュリン様物質⁴⁾として、そして紅花やその他生薬から血小板凝集抑制物質^{5, 6)}として単離された例が報告されている。

アデノシンの血小板凝集抑制作用については既に1963年にBornら⁷⁾により見出されている。アデノシンは、 A_2 タイプのアデノシン受容体を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、血小板内のcAMP濃度を上昇させる。⁸⁾ 増加したcAMPはシクロオキシゲナーゼやホスホリパーゼを阻害してトロンボキサン A_2 の産生を抑制し、また細胞内 Ca^{2+} イオンの動員を阻止することにより血小板凝集を抑制する、と考えられている。

サフランの薬効とアデノシンの生理作用を対比してみると、サフランは冷え症、血色不良のほか鎮静、鎮痛、通経などの薬効があるとされている。一方、アデノシンには血小板凝集抑制作用のほか血管拡張作用、血圧降下作用、冠血管拡張作用、鎮静作用、鎮痙作用など多彩な生理作用のあることが知られている。この様にサフランの薬効とアデノシンの生理作用の間には深い関連性のあることが推察される。しかし、サフランが有する薬効のうちアデノシンの生理作用では説明できない作用もあり、共存する他の有効成分に関する検討が必要であると考え

る。

また、サフランは紅花の代用品として用いられることから、両者に共通の活性成分が見つかったことは興味深いものと考えられる。

結 論

サフランから血小板凝集抑制物質としてアデノシンを単離・同定した。また、含有量が比較的高いこと、並びにサフランの薬効とアデノシンの生理作用の間に関連性のあることから、アデノシンはサフランの薬効のかかなりの部分に関与しているものと思われる。

文 献

- 1) 岡野周充, 深谷 力, 横山和正, 西尾 孝, 西本 隆, 松本克彦: サフラン中の血小板凝集抑制物質の単離・同定, 日本薬学会第108年会(広島)講演要旨集, p.292, 1988.
- 2) 西尾 孝, 奥川 斉, 加藤 篤, 橋本庸平, 松本克彦, 藤岡辰宏: サフランの凝固・線溶系に及ぼす影響, 生薬学雑誌 41 (4), 271-276, 1987.
- 3) 西尾 孝, 奥川 斉, 赤木慶子, 松本克彦, 藤岡辰宏, 守安正基, 加藤 篤: サフランの線溶系におよぼす影響—合成基質をもちいて—, 日本生薬学会第35回年会(新潟)講演要旨集, p.159, 1988.
- 4) 檜山千都子, 宮井幸枝, 吉田久信, 山崎和男, 田中 治: 高速液体クロマトグラフおよび二波長薄層クロマトデンシトメトリの生薬分析への応用: 薬用人参中の核酸遊離塩基およびヌクレオシドについて, 薬学雑誌 98 (8), 1132-1137, 1978.
- 5) 杵名 裕, 藤井誠史郎, 北村謙始, 小松一男, 中野幹清: 中国産紅花中の血小板凝集抑制物質の同定と定量, 薬学雑誌 108(11), 1101-1103, 1988.
- 6) 奥山 徹, 藤田賢司, 柴田承二, 保寿正幸, 川田忠典, 正木久朗, 野口輝彦: 和漢薬の血小板凝集に及ぼす影響(その6) ヒト血小板凝集に対する *Allium* 属植物の作用, 日本薬学会第108年会(広島)講演要旨集, p.292, 1988.
- 7) G.V.R. Born & M.J. Cross: THE AGGREGATION OF BLOOD PLATELETS. *J. Physiol.*, 168, 178-195, 1963.
- 8) R.J. Haslam & N.J. Cusack: Blood Platelet Receptors for ADP and for Adenosine. Purinergic Receptors (ed. G. Burnstock) Vol. 12, Chapman & Hall, London, pp. 221-285, 1981.