

Figure 1.

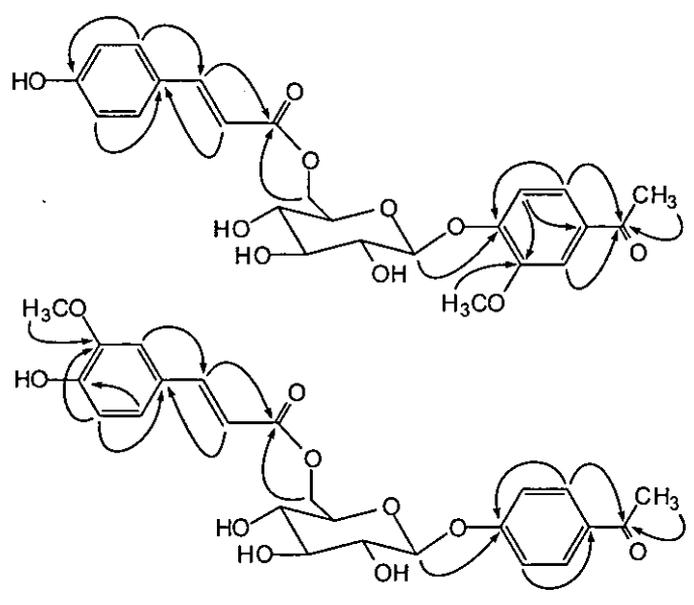


Figure 2. Selected HMBC correlations of compounds 1 and 2

Table 1. ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) spectral data for compounds **1** and **2** in CD₃OD

Position	1		2	
	δ _C	δ _H ^a	δ _C	δ _H ^a
1	150.8		161.5	
2	114.9	7.12 (d, 8.6)	116.0	7.12 (d, 9.2)
3	123.1	7.41 (dd, 8.6, 2.0)	130.3	7.86 (d, 9.2)
4	131.5		131.3	
5	110.8	7.51 (d, 2.0)	130.3	7.86 (d, 9.2)
6	149.3		116.0	7.12 (d, 9.2)
7	197.9		197.9	
8	24.9	2.29 (s)	24.9	2.33 (s)
9	55.3	3.87 (s)		
1'	100.3	5.03 (d, 7.8)	100.0	5.03 (d, 7.2)
2'	73.4	3.57 (dd, 9.2, 7.8)	73.4	3.51 (^{?b})
3'	76.5	3.52 (dd, 9.2, 8.9)	76.6	3.49 (^{?b})
4'	70.6	3.41 (dd, 10, 8.9)	70.6	3.41 (m)
5'	74.3	3.78 (m)	74.3	3.79 (m)
6'	63.3	4.51 (dd, 11.8, 2.0) 4.37 (dd, 11.8, 7.8)	63.2	4.53 (dd, 12.1, 2.3) 4.39 (dd, 12.1, 7.5)
1''	125.8		126.3	
2''	130.0	7.44 (d, 8.6)	110.3	7.19 (d, 2.0)
3''	115.7	6.81 (d, 8.6)	148.2	
4''	160.1		149.6	
5''	115.7	6.81 (d, 8.6)	115.3	6.82 (d, 8.3)
6''	130.0	7.44 (d, 8.6)	122.9	7.07 (dd, 8.3, 2.0)
7''			55.1	3.89 (s)
–	113.8	6.32 (d, 16.1)	114.0	6.39 (d, 16.0)
–	145.4	7.58 (d, 16.1)	145.8	7.61 (d, 16.0)
CO	167.4		167.5	

^a Multiplicity and *J* values in Hz given in parentheses. ^b Multiplicity not determined due to overlapping of the signals.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性、安全性等の評価に関する調査及び実証的研究
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長 合田幸広

セイヨウサンザシ葉関連製品の成分分析

研究要旨 ヨーロッパの市場より入手したセイヨウサンザシ葉関連製品について、日本で栽培されているセイヨウサンザシ葉とのHPLCのプロファイル比較を行った。その結果、主ピークが一致したことも含め、ほぼ同様のプロファイルを示すことが明らかとなった。さらに主ピークについてLC/MS分析を行い、構造を推定した。

協力研究者

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
主任研究官

酒井信夫 千葉大学大学院薬学研究院 助手

【A. 研究目的】

セイヨウサンザシ (*Crataegus oxyacantha* L., *C. laevigata* DC., *C. monogyna* Jacq., 英名: Hawthorn) は、バラ科サンザシ属の落葉低木で、欧州、地中海沿岸、中近東に広く分布し、その葉部及び偽果は、心臓瘻状動脈の機能調節、血行改善等に用いられてきた西洋ハーブである。Botanical Safety Handbook (American Herbal Products Association) では Class 1 に分類され、適切に使用すれば安全なハーブに分類され、また Commission E でも、用法上6週以上効果がないことが続く場合、もしくは下肢に腫脹がある場合に医師は相談すべきであり、特に心臓、腕、上腹部、首周りの痛み及び呼吸困難があるときに医師による診断は絶対に必要と記載されている以外は、特別な

禁忌や副作用は記載されていない。

現在日本では、葉は強心剤や滋養強壮保健薬の主成分として使用され「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」に記載されている。他方、その果実は「医薬品的効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質リスト」に記載されている。

本研究では、分担研究者の一人である花尻が、平成15年度に「諸外国における未承認医薬品等に関する研究 -欧州におけるボーダーライン製品の取り扱い状況に関する調査研究-」(分担研究者: 花尻瑠理)において、ヨーロッパ市場で買い上げを行った対象製品の中から、セイヨウサンザシ葉関連製品を選び、日本で栽培されているセイヨウサンザシ葉とのHPLCのプロファイル比較を行った。さらに主要成分についてLC/MSを用い、主ピークについて構造を推定したので報告する。

【B. 研究方法】

試料及び試薬 セイヨウサンザシ葉は、北里大

学薬用植物園より入手した。セイヨウサンザシ葉関連 6 製品[Fig. 1 ; Sample 1 : 薬草茶(チエコ), Sample 2 : 薬草茶(フランス), Sample 3 : 錠剤(スイス), Sample 4 : 丸剤 5CH(スイス), Sample 5 : 抽出液(フランス), Sample 6 : 抽出液(スイス)]は, ブラハ, ジュネーブ, パリの薬局で購入した。なお, sample 4, 6 はホメオパシー用である。メタノール及びアセトニトリルは Merck 製の HPLC 用を, 水は RO 水を更に Milli-Q(日本ミリポア製)により精製して得られた超純水を用いた。その他の試薬は, 全て試薬特級品を用いた。

本研究において, 動物由来試料を用いた実験は行わず, 倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置及び測定条件 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-10AT system (ポンプ: LC-10ATVP x 2, 紫外可視検出器: SPD-6A, カラム恒温槽: Water Bath Incubator BT-22) に, インテグレータとして Hitachi Chromato Integrator D-2500 を接続したものを用いた。LC/MS は LC 部に Agilent 1100 シリーズ (G1312A バイナリポンプ, G1314 紫外可視検出器, G1329A サンプルインジェクター, G1316A カラム恒温槽)を, MS 部に JEOL JMC-T1000LC “AccuTOF” を用いた。

HPLC 条件 カラム: Hypersil ODS-5(4 x 250 mm, ケムコ社製), 移動相: A: 2.5% 酢酸, B: 2.5% 酢酸 / アセトニトリル (20 : 80), 溶離グラジエント: B 7~20%: 0→50 分, B 20~40%: 50→60 分, B 100%: 60→70 分, 流速: 1 mL/min, 検出 279 nm, カラム温度 40℃。

LC/MS 条件 カラム: YMC-Pack Pro C18 RS (5 μ m, 2.0 x 250 mm, ワイエムシイ社製), 移動相: A: 2.5% 酢酸, B: アセトニトリル, 溶液グラジエント: B 6~16%: 0→50 分, 16~32%: 50→60 分, B: 80% 60→90 分, 流速 0.2 mL/min, 検出 279 nm, カラム温度 40℃。イオン化法: ESI-positive mode, オリフィス 1 電圧: 80V, リングレンズ電圧: 13V, ニードル電圧: 2,000V, 脱溶媒室温度: 250℃, 質量範囲: 100-2,000 m/z。また, 精密試料は質量校正試料として YOKUDELNA(日本電子社製)を用いミリマス値を得た。

試料の抽出 薬草茶は 5 g をメタノール(200 mL)で 3 回抽出し, 濃縮したものをメタノールで 10 mg/mL とし, その 10 μ L を HPLC に供した。錠剤及び丸剤は粉碎後 50 mg をメタノール 1 mL に懸濁させ超音波抽出, 遠心, フィルターろ過し, その 10 μ L を HPLC に供した。抽出液は原液をフィルターろ過し, その 10 μ L を HPLC に供した。セイヨウサンザシ葉は細断後, メタノールで抽出し, 濃縮したものをメタノールで 10 mg/mL とし, その 10 μ L を HPLC に供した。

【C. 研究結果】

HPLC プロファイル 北里大学薬用植物園より採取したセイヨウサンザシ葉のメタノール抽出物を HPLC に供したところ, 保持時間 10.31 分(ピーク A), 36.18 分(ピーク B), 58.54 分(ピーク C)に 3 本の主ピークが観察された[Fig. 2]。さらに, セイヨウサンザシ葉関連製品を同条件で分析したところ, Sample 1, 2, 3 及び 5 の 4 製品から, ピーク A, B, C が主ピークとして観察された[Fig. 3, 4, 5, 7]。一方, Sample 4

及び 6 のホメオパシー用の 2 製品は、濃度が非常に薄く、クロマトグラム上、ピーク A, B の保持時間に、僅かなピークが観測されるものの、ピーク C の位置には、ピークは観測されなかった。 [Fig. 6, 8].

LC/MS 分析 HPLC プロファイル分析によって確認された A-C の 3 ピークについて LC/MS 分析を行った。ピーク A は精密質量分析の結果、 m/z 1117, 823, 529 のイオンが観測された。ピーク B は、 $[M + H]^+$ に対応すると考えられる m/z 579 のイオンが観測され、精密質量数 579.16861 より推定組成式 $C_{27}H_{31}O_{14}$ が導かれた。ピーク C は $[M + H]^+$ に対応すると考えられる m/z 621 のイオンが観測され、精密質量数 621.17914 より推定組成式 $C_{29}H_{33}O_{15}$ が導かれた。

【D. 考察】

HPLC プロファイル分析及び、LC/MS のデータ比較より、セイヨウサンザシ葉製品は、植物抽出エキスと、基本的に同じ主成分を含んでいることが明らかとなった。主ピークのうち、ピーク A は、 m/z 1117 のイオンが観測されたが、 m/z 1117 付近を拡大すると、正規分布に似た強度で 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119 のイオンが観測され、これらを同位体ピーク由来とすると、通常のエLEMENTの組み合わせではない物質由来のピークであるものと考えられた。ピーク A のベースイオンである m/z 823 の精密質量数は 823.02306 であり精密質量数から $C_{33}H_{31}O_{21}$ の組成式が得られるものの、 m/z 823 のイオンピークを中心として、ほぼ対称の強度で 821, 822, 823, 824, 825 のイオンピークが観測され、これらのイオンの説

明がこの組成式では難しい。同様に m/z 529 のピークも周辺のイオンの強度比を考えると、合理的に説明出来る組成式は得られなかった。従って、ピーク A の構造は不明であるが、この 3 本の主イオンピーク間の分子量は 294 であり、デオキシ糖 $C_{12}H_{22}O_8$ で、デオキシ糖 2 糖分であることは興味深い。

ピーク B の推定組成式 $C_{27}H_{30}O_{14}$ について、CA で検索すると 167 化合物がヒットする。代表的な天然物としては、トリヒドロキシフラボンのグルコシルラムノシル体 (例えば apigenin の配糖体) 等が挙げられる。同時に観測される m/z 433 のデオキシ糖が脱離したものに相当するフラグメントイオン (質量差: -146.05794, $C_6H_{10}O_4$) と、アグリコンに由来するシグナルが観測されていないことを考慮すると、本ピークは C-glucoside である vitexin の rhamnoside 等由来とすると、合理的に説明が可能となる。

ピーク C は、推定組成式が $C_{29}H_{32}O_{15}$ で、ピーク B と比較して、 C_2H_2O だけ大きい。また得られたフラグメントピークは、B と同様 m/z 433 で、ピーク B のデオキシ糖部分がアセチル化した化合物である可能性が推定された。

以上の化合物については、現在セイヨウサンザシ葉抽出エキスより、単離を行っており、単離が終了次第 NMR 等の測定を行い最終的な構造を決定する予定である。

これまでにセイヨウサンザシ葉の二次代謝物として縮合型タンニンの重合体の存在が報告されている。また、平成 15 年度の報告において、セイヨウサンザシ葉 MeOH 抽出物の高極性画分より 3-O-caffeoyl-quinic acid, 9-O- β -D-glucopyranosyl-4, 9-dihydroxy-3-methoxypropiofenone 及び、4-O- β -D-glucopyranosyl-*p*-coumaric acid を単離・同

定した。さらに、塩基性画分にはアルカロイドが含まれている可能性が低いことを示した。今回、構造を推定したピークも、その構成元素は、C,H,O と考えられ、また不飽和度と酸素原子の多さから、テルペノイドではなく、フェノール性のデオキシ配糖体の可能性が考えられることから、セイヨウサンザシ葉を「専ら医薬品」として取り扱うべき成分が含まれている可能性は低いものと推定される。

なし
3.その他
なし

【E. 結論】

ヨーロッパの市場より入手したセイヨウサンザシ葉関連製品について、日本で栽培されているセイヨウサンザシ葉とのHPLCのプロファイル比較を行った。その結果、主ピークが一致したことも含め、ほぼ同様のプロファイルを示すことが明らかとなった。さらに主ピークについてLC/MS分析を行い、C,H,Oで構成される化合物であることを示した。これまでの知見と合わせると、セイヨウサンザシ葉中には「専ら医薬品」として取り扱うべき成分が含まれている可能性は低いものと推定される。

【F. 健康危機情報】

特になし。

【G. 研究発表】

- 1) 「セイヨウサンザシ(*Crataegus oxyacantha* L.)葉の成分研究」, 酒井信夫, 川原信夫, 合田幸広, 川口基一郎, 日本食品衛生学会第86回学術講演会。

【H. 知的所有権の取得状況】

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 専ら医薬品の有効性、安全性等の評価に関する調査及び
実証的研究並びに医薬品として用いられている生薬の指標成分の検討

分担研究者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部部長

—クスノハガシワの含有成分に関する文献調査—

クスノハガシワに専ら医薬品として取り扱うべき成分が含まれているかについて検討を行うことを目的とし、クスノハガシワの成分について文献調査を行い、得られたデータのリスト化を試みた。

協力研究者

大根谷章浩 日本大学薬学部

川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
室長

A. 研究目的

クスノハガシワ (*Mallotus philippinensis* Muell. Arg.) は、トウダイグサ科アカメガシワ属の常緑高木で、中国中南部の各省及びインド、東インド諸島、フィリピン、オーストラリアに分布し、その果実表皮の腺毛および束毛はカマラ (Kamala) と称し、主として糸虫駆除薬として用いられている。また、クスノハガシワは Botanical Safety Handbook (American Herbal Products Association) 並びに Commission E には記載されておらず、主としてアジア地域でのみ使用されていることが推測された。

現在日本ではクスノハガシワの樹皮は「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」に記載されている。他方、同属植物であるアカメガシワの樹皮は「医薬品の効能効果を標榜しない限り医薬品と判断しない成分本質リスト」に記載されている。

そこで本調査研究では、クスノハガシワに専ら医薬品として取り扱うべき成分が含まれているかについて検討を行うことを目的とし、クスノハガシワの成分について文献調査を行い、得られたデータのリスト化を試みた。

B. 研究方法

クスノハガシワの成分に関して、CA 等における各種文献検索を行い、得られたデータについて、文献リスト並びに構造式リストを作成する。

C. 研究結果

クスノハガシワの含有成分に関する文献調査の結果、以下の 15 文献より 61 種の化合物についての単離報告が明らかとなった。それぞれの文献、化合物の詳細について参考文献及び Chart 1-7 に記載する。

(文献1) Daikonya らは果実の acetone 抽出エキスのヘキサン溶出画分より新規フロログルシノール誘導体である mallotophilippen A (1) 及び mallotophilippen B (2) を報告している。

(文献2) Tanaka らは kamala の acetone 及び methanol の抽出エキスより新規カルコン誘導体 kamalachalcone A (3)、kamalachalcone B (4)、また、既知化合物である rottlerin (5)、(6) を報告している。

(文献3) Nair らは stem bark の petrol 抽出エキスより既知トリテルペンである friedelin (7) 及び新規トリテルペンである kamaladiol-3-acetate (8) を報告している。

(文献4) Saijo らは bark より bergenin (9)、6-O-galloylbergenin (10)、norbergenin (11)、3-O-galloylnorbergenin (12)、6-O-galloylnorbergenin (13)、2,3-(S)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose (14)、corilagin

(15)、geraniin (16)、furosin (17)、mallotinic acid (18)、mallotusinic acid (19)、repandusinic acid A monopotassium salt (20)、brevifolin carboxylic acid (21)、tergallic acid dilactone (22)、flavogallonic acid (23)を報告している。

(文献 5, 6) Widen らは Kamala より 6、rottlerone (24)、isoallorottlerin (25)、(26)、(27)を報告している。

(文献 7) Bandopachyay らはクスノハガシワの heartwood より betulin-3-acetate (28)、lupeol (29)、lupeol acetate (30)、sitsterol (31)、sitsterol glucoside (32)、amyrin (33)、bergenin (9)、acethylaleuritolic acid (34)、hydroxy carboxylic acid (35)、acetoxy methyl ester (36)、hydroxy methyl ester (37)を報告している。

(文献 8) Roberts らは(38)、corotoxigenin (39)、corotoxigenin rhamnoside (40)、coroglucigenin (41)、coroglucigenin rhamnoside (42)を報告している。

(文献 9) Crombie らはカマラより 6、43 を初めて報告している。

(文献 10) Ahluwalia らは、Kamala dye から既知フラボノイドである rottlerin (5)、(6)、(44)、isoallorottlerin (45)及び新規フラボノイドである 3'-prenylrubranine (46)、mallotus-A (47)、mallotus-B (48)、(49)、(50)を報告している。

(文献 11) Cardillo らはカマラのエーテル溶出画分より 45、3-hydroxyrottlerin (51)、3, 4-dihydroxyrottlerin (52)を報告している。

(文献 12) Mikusch らはカマラオイルの成分として(53-58)を報告している。

(文献 13) O'Neill らはカマラオイルの成分として 57 を報告している。

(文献 14) Gupta らはクスノハガシワ種子のカマラオイルより kamalolenic acid (59)を報告している。

(文献 15) Brockmann らは(60、61)を報告している。

D. 考察

クスノハガシワの含有成分に関する文献調査の結果、多種のフラボノイド、芳香族化合物及びその

配糖体類、トリテルペノイド類、脂肪酸誘導体等が含有されていることが明らかとなった。なおアルカロイド成分 60 については文献の年代がかなり古く、その後の文献にも本化合物に関する単離報告が確認できないため、アーティファクトあるいは他の構造であることが考えられた。

これらの結果より、クスノハガシワ樹皮中に医薬品として取り扱うべき成分が含まれている可能性は低いと考えられ、現行の「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」の見直しを行うことも重要であると考えられた。

E. 結論

クスノハガシワ樹皮に専ら医薬品として取り扱うべき成分が含まれているか検討を行うことを目的とし、クスノハガシワの成分について文献調査を行った。この結果、同植物樹皮にはアルカロイドが含まれる可能性が低いこと、多種のフラボノイド、芳香族化合物及びその配糖体類、トリテルペノイド類、脂肪酸誘導体等が含まれることを明らかにした。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

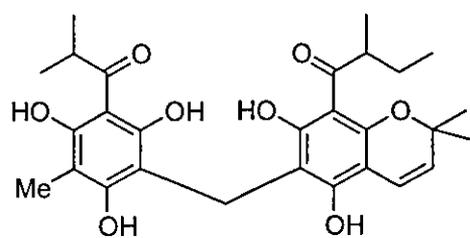
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

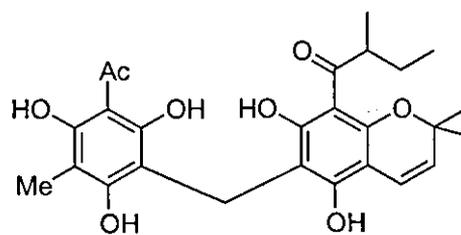
1. 取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参考文献

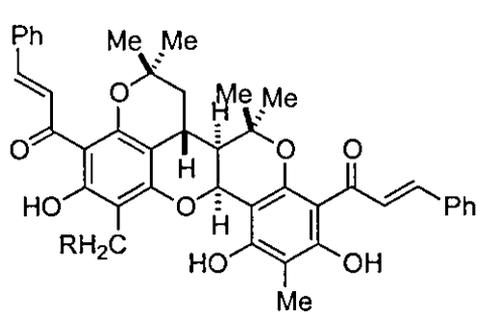
1. Daikonya, A.; Katsuki, S.; Wu, Jin-Bin; Kitanaka, S. Anti-allergic agents from natural sources (4) : Anti-allergic activity of new phloroglucinol derivatives from *Mallotus philippinensis* (Euphorbiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* (2002), **50** (12), 1566-9.
2. Tanaka, T.; Ito, T.; Iinuma, M.; Takahashi, Y.; Naganawa, H. Dimeric chalcone derivatives from *Mallotus philippinensis*. *Phytochemistry* (1998), **48** (8), 1423-7.
3. Nair, S. P.; Rao, J. M. Kamaladiol-3-acetate from the stem bark of *Mallotus philippinensis*. *Phytochemistry* (1993), **32** (2), 407-9.
4. Saijo, R.; Nonaka, G.; Nishioka, I.; Chen, I. S.; Hwang, T. H. Tannins and related compounds. LXXXVIII. Isolation and characterization of hydrolyzable tannins from *Mallotus japonicus* (Thunb.) Mueller-Arg. and *M. philippinensis* (Lam.) Mueller-Arg. *Chem. Pharm. Bull.* (1989), **37** (11), 2940-7.
5. Widen, C. J.; Puri, H. S. Natural occurrence and chemical variability of phloroglucinols in kamala. *Planta Medica* (1980), **40** (3), 284-7.
6. Lounasmaa, M.; Widen, C. J.; Tuuf, C. M.; Huhtikangas, A. Phloroglucinol derivatives of *Mallotus philippinensis*. *Planta Medica* (1975), **28** (1), 16-31.
7. Bandopadhyay, M.; Dhingra, V. K.; Mukerjee, S. K.; Pardeshi, N. P.; Seshadri, T. R. Triterpenoid and other components of *Mallotus philippinensis*. *Phytochemistry* (1972), **11** (4), 1511.
8. Roberts, K. D.; Weiss, Ek.; Reichstein, T. Glycosides and aglycons. CCLII. Cardenolides of the seed of *Mallotus philippinensis*. *Helv. Chim. Acta* (1963), **46** (7), 2886-93.
9. Crombie, L.; Green, C. L.; Tuck, B.; Whiting, D. A. Constituents of kamala. Isolation and structure of two new components. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* (1968), (21), 2625-30.
10. Ahluwalia, V. K.; Sharma, N. D.; Mittal, B.; Gupta, S. R. Novel prenylated flavanoids from *Mallotus philippinensis* Muell. Arg. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* (1988), **27B** (3), 238-41.
11. Cardillo, G.; Merlini, L.; Mondelli, R.; Moreschini, L. Two minor constituents of kamala. *Gazzetta Chimica Italiana* (1965), **95** (7), 725-34.
12. V. Mikusch, J. D. The structure of kamlolenic acid. *Deut. Farben-Z.* (1954), **8**, 166-9.
13. O'Neill, L. A.; Dennison, A. C.; Ahlers, N. H. E. Constitution of kamala oil. *Chemistry & Industry* (1954), 756-7.
14. Gupta, S. C.; Gupta, S. S.; Aggarwal, J. S. The component acids of kamala oil (*Mallotus philippinensis*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1954), **31**, 287-9.
15. Brockmann, H.; Maier, K. Rottlerin. *Naturwissenschaften* (1937), **25**, 460.



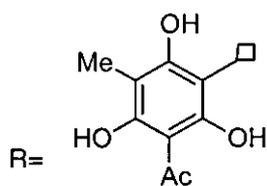
mallotophilippen A (1)



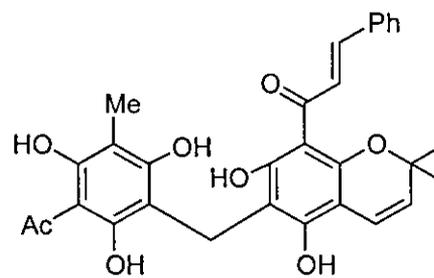
mallotophilippen B (2)



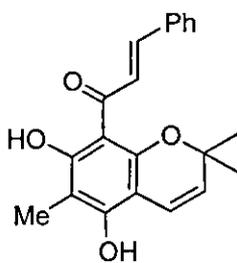
R=H Kamalachalcon A (3)



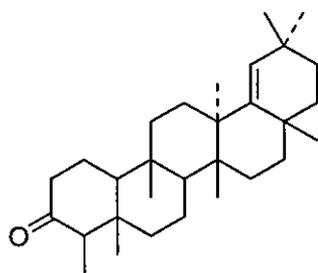
Kamalachalcon B (4)



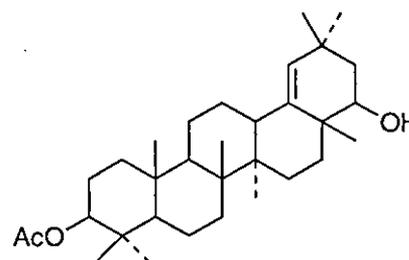
Rottlerin (5)



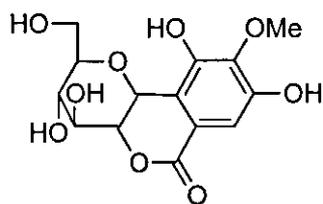
(6)



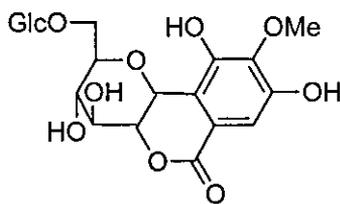
friedelin (7)



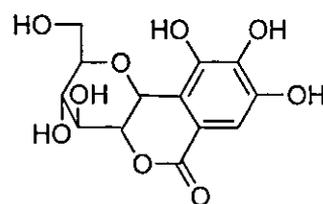
kamaladiol-3-acetate (8)



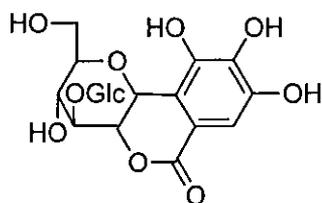
bergenin (9)



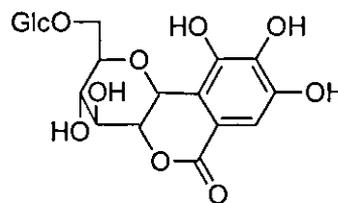
6-O-Glc-bergenin (10)



norbergenin (11)

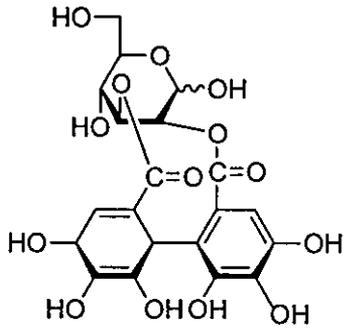


3-O-Glc-norbergenin (12)

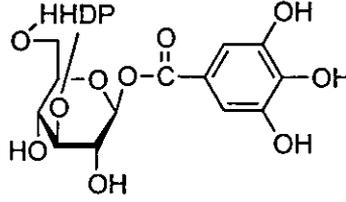


6-O-Glc-norbergenin (13)

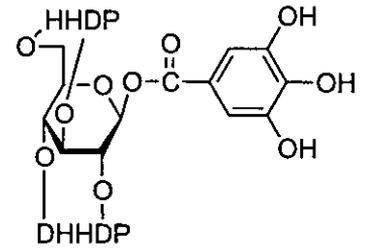
Chart 1. Chemical constituents of *Mallotus philippinensis*



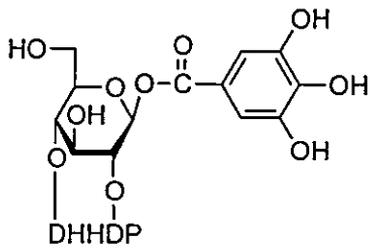
2,3-(S)-HHDP-glucose (14)



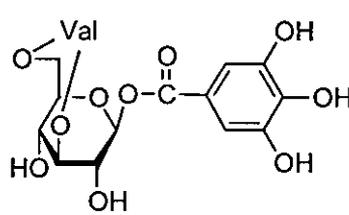
corilagin (15)



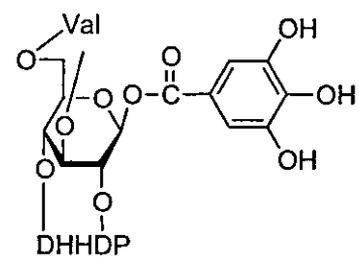
geraniin (16)



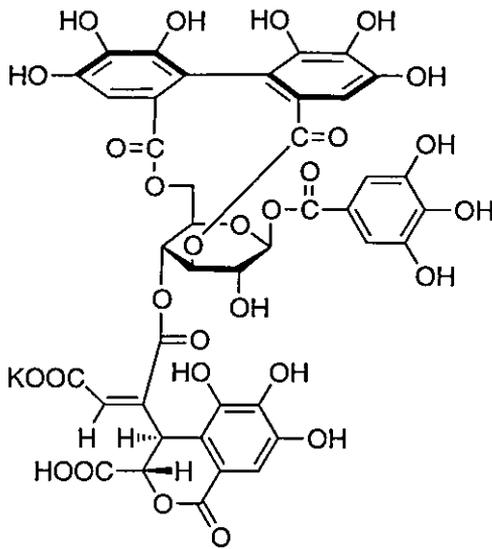
furosin (17)



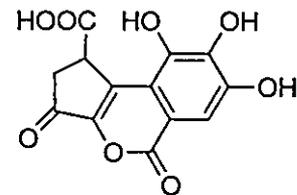
mallotinic acid (18)



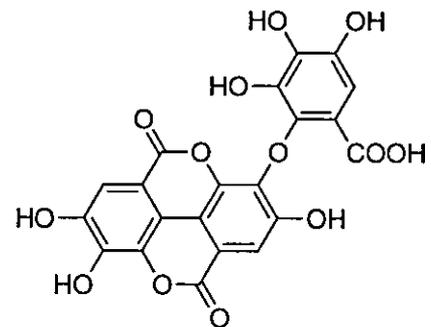
mallotusinic acid (19)



repandusinic acid A monopotassium salt (20)

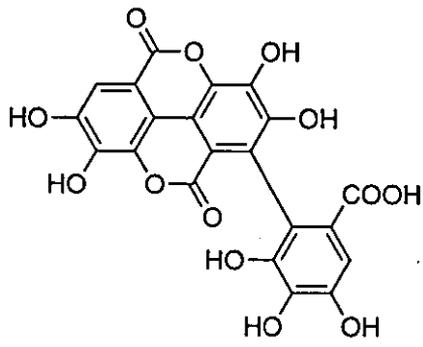


brevifolin carboxylic acid (21)

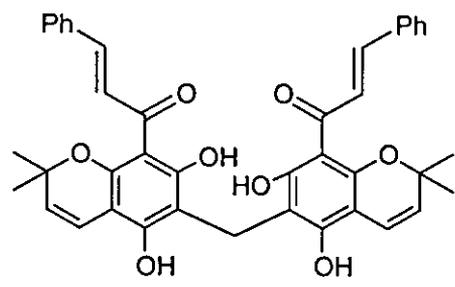


tergallic acid dilactone (22)

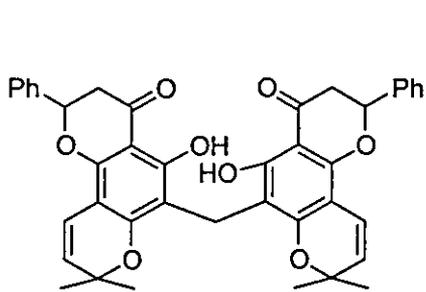
Chart 2. Chemical constituents of *Mallotus philippinensis*



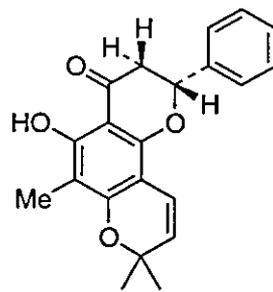
flavogallonic acid (23)



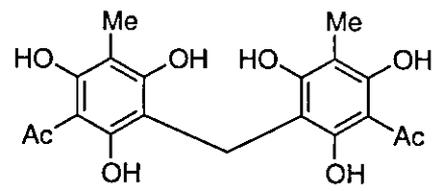
Rottlerone (24)



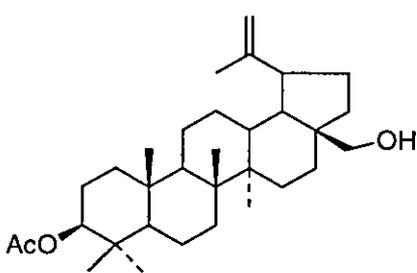
isoallorottlerin (25)



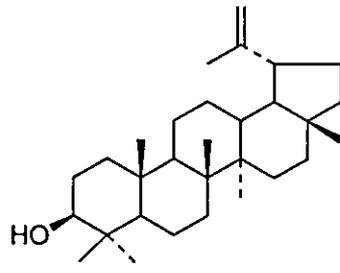
26



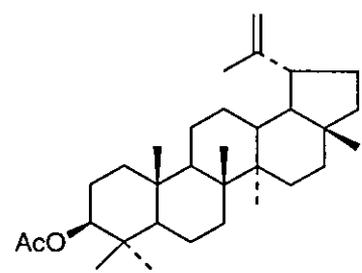
27



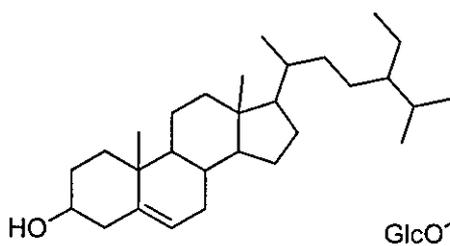
betulin-3-acetate (28)



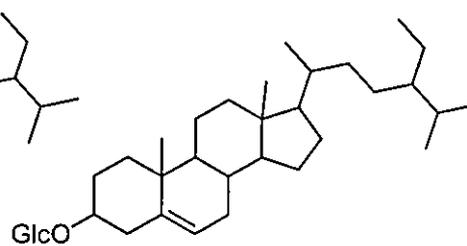
lupeol (29)



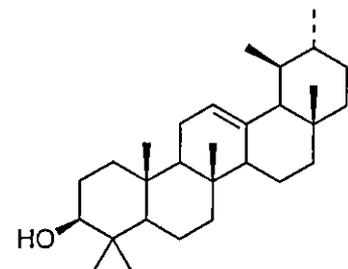
lupeol acetate (30)



sitosterol (31)



sitosterol glucoside (32)



alpha-amyrin (33)

Chart 3. Chemical constituents of *Mallotus philippinensis*

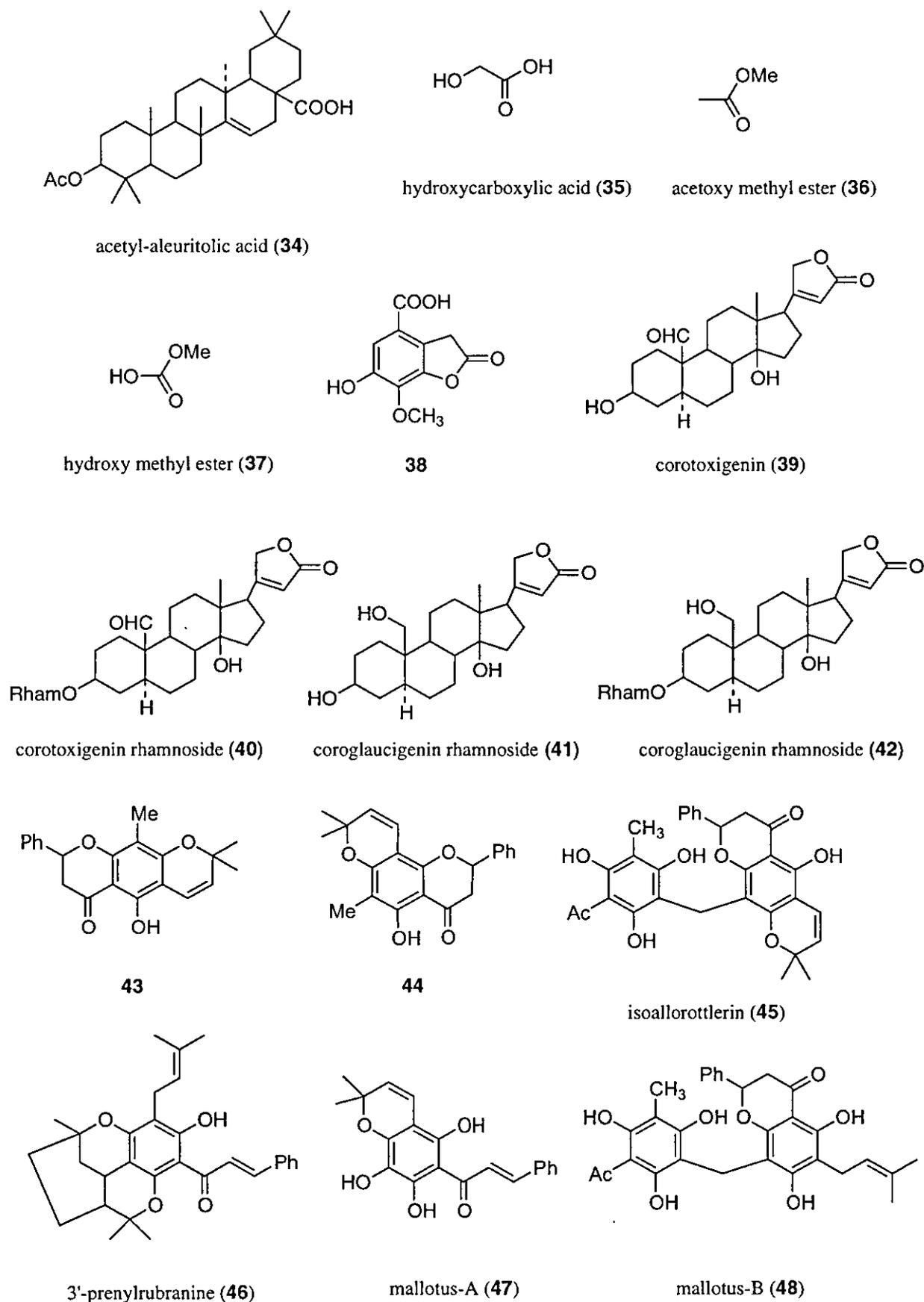
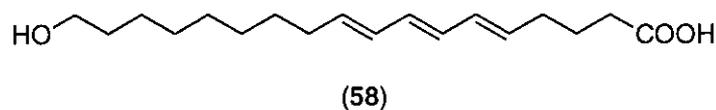
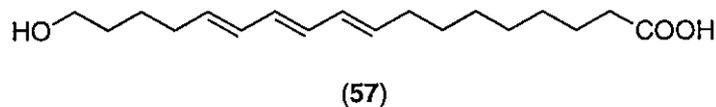
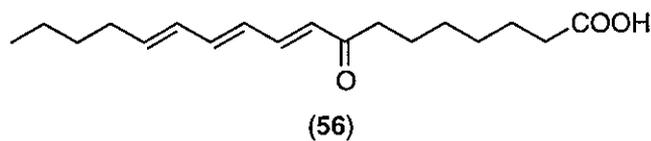
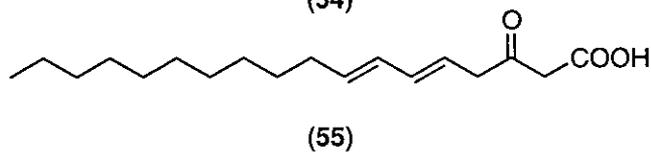
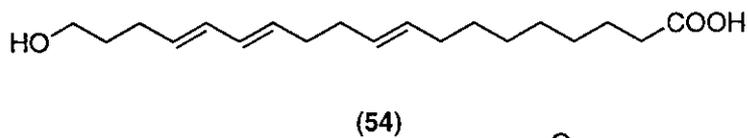
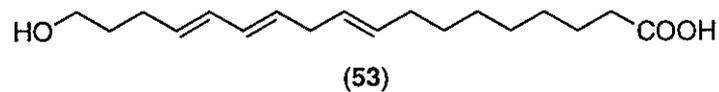
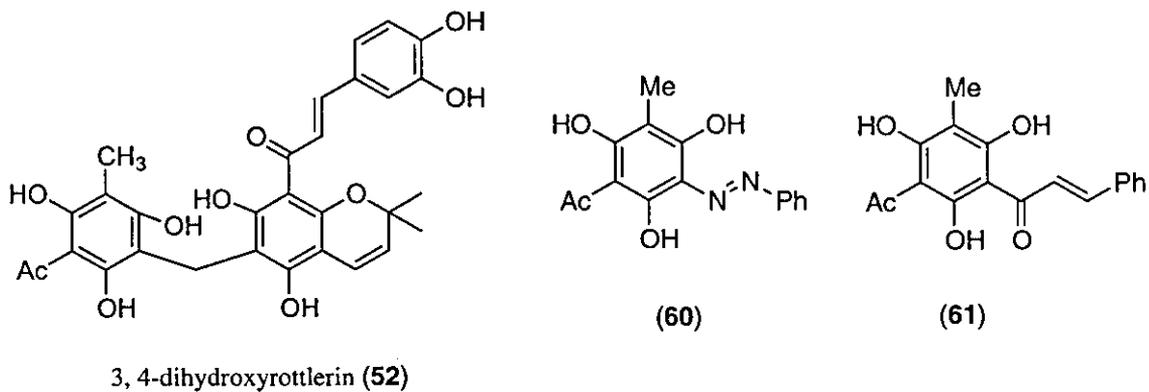
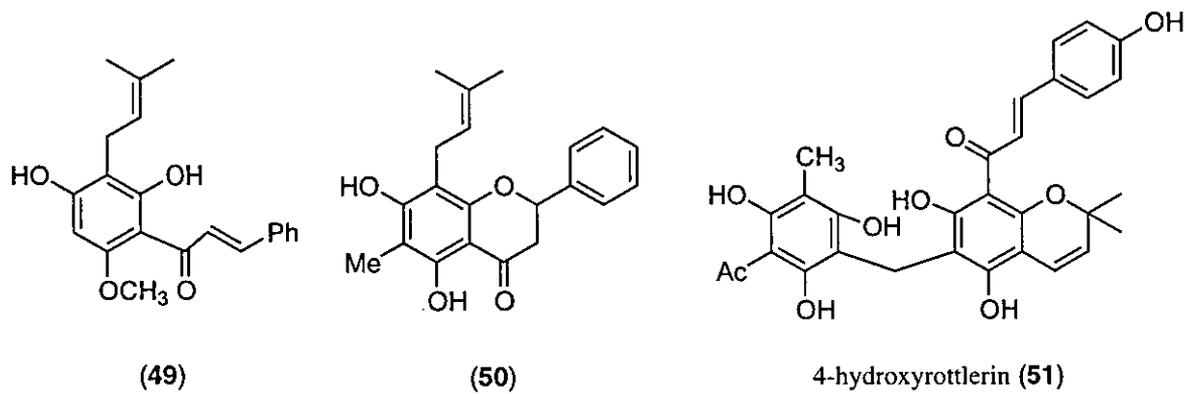


Chart 4. Chemical constituents of *Mallotus philippinensis*



ω -hydroxy, 9, 11, 13-octadeca trienoic acid (59)

Chart 5. Chemical constituents of *Mallotus philippinensis*

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療器機等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性、安全性等の評価に関する調査及び実証的研究
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長 合田幸広

ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata*) 含有商品のアルカロイド成分に関する研究

研究要旨 ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata*) についてアルカロイド成分に関する文献調査を行うと共に、ヨーロッパ市場で買い上げたミツガシワ含有商品にアルカロイド成分が含まれるかどうか、薄層クロマトグラフ法で検討した。

協力研究者 代田 修 徳島文理大学香川薬学部助教授

A. 研究目的

ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata* L.) は、ヨーロッパにおいて bogbean ボッグビーン、或いは buckbean バックビーンと呼ばれるハーブであり、中国・日本においては乾燥葉を睡菜葉（スイサイヨウ）と称し、苦味健胃薬として用いられる生薬である。苦味健胃薬として用いられるのは、ミツガシワ科がリンドウ科と近縁であり、成分として苦味配糖体（セコイリド配糖体）を含むからであると推測される。また、生薬名の睡菜の由来は、この葉に睡眠作用があるからとされる。

同植物は、日本ではスイサイとしてその葉または全草が「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」に記載されている。また、Botanical Safety Handbook では、class 2d であり、diarrhea, dysentery, colitis に対し禁忌が報告されており、Commission E にも収載されている。

本研究では、分担研究者の一人である花尻が、平成 15 年度に「諸外国における未承認医薬品等に関する研究 -欧州におけるボーダーライン製品の取り扱い状況に関する調査研究-」（分担研究者：花尻瑠理）において、ヨーロッパ市場で買い上げを行った対象製品の中から、スイサイ関連製品を選び、文献調査を行うとともに、ミツガシワからの単離が報告されているアルカロイド類が、薄層クロマトグラフ法により簡易に検知されるかどうか検討を行

ったので報告する。

B. 研究方法

1. ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata*) に関する文献調査

「*Menyanthes trifoliata*」をキーワードにして、SciFinder Scholar (CAS)により文献検索した。

2. 薄層クロマトグラフ法によるアルカロイド成分の検出

用いたサンプルは、1：薬草茶（チェコ）、2：薬草茶（フランス）、3：丸剤（スイス）、4：抽出液（フランス）であり、3番と4番のサンプルはホメオパシー用の製品である。ホメオパシーとはヨーロッパに浸透している民間医療であり、Homeo（同種のもの）、Opathy（治療）、から同毒療法、同病療法などと訳される薬物治療医学で、薬草（生薬）のエキスを極めて天文学的な数字で希釈して用いられる。

1, 2番の薬草茶については、それぞれ 30 g をメタノールにて温浸抽出し、メタノールエキスとして用いた。3番の丸剤は、粉末にしたものをそのまま少量の水に溶解させて用い、4番の抽出液はそのまま用いた。薄層クロマトグラフ法の条件として、ゲンチアナアルカロイド類の検出条件に準じて、展開溶媒にジエチルエーテル-酢酸エチル（8：2）を用い、一般的なアルカロイド呈色試薬であるドラージェンドルフ試液にて検出した。ドラージェンドルフ試液の陽性コントロールとして、セスキテルペンピリジンアルカロイドである

mayteine を用いた。

C. 研究結果

1. ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata*) に関する文献調査

「*Menyanthes trifoliata*」をキーワードとした SciFinder Scholar (CAS)による文献検索の結果、約160の文献が該当した。その内、成分に関しては、ロガニン、セコロガニンなどの苦味配棟体、ベツリン、ベツリン酸などのトリテルペノイドの他、フラボノイド類の報告があり、アルカロイド成分としては、ゲンチアニン、ゲンチアニジン、ゲンチアチピチン及びゲンチアルチンの報告が見つかった。この通称ゲンチアナアルカロイドと呼ばれる成分のミツガシワからの単離報告は、1969年になされたものである (Felicia Rulko; *Roczniki Chemii Ann. Soc. Polonorum*, 43, 1831-1836, 1969)。これらゲンチアナアルカロイドは、リンドウ科から広く単離報告されているモノテルペンアルカロイドであり、イリドイド類から生合成されることが、中間体としてのゲンチオフラビンの単離報告 (N. L. Marekov and S. S. Popov; *Tetrahedron*, 24, 1323-1326, 1968) によって示されている。しかしながら、植物抽出エキスをアンモニアにて処理することによりゲンチアナアルカロイドが生成されてくることや、ゲンチオピクロサイドやスウェルチアマリンをアンモニア処理とそれに続く塩酸処理により、ゲンチアニンに変換出来ることなどが知られている (S. S. Popov, N. L. Marekov, and T. N. Do; *J. Nat. Prod.*, 51, 765-768, 1988)。

2. 薄層クロマトグラフ法によるアルカロイド成分の検出

各サンプルの薄層クロマトグラフ (TLC) を図1. に示す。TLC に見られるように、ドラーゲンドルフ試液により陽性コントロールは橙色のスポットを示したが、ミツガシワのサンプル1~4では、いずれもドラーゲンドルフ試液に陽性のスポットは確認出来なかった。文献ではこの TLC 条件で、ゲンチアナアルカロイドは R_f 0.6 ~ 0.1 の範囲に橙色のスポットとして現れるとされる。なお、3番のサンプルに何もスポット類が確認できなかったのは、これがホメオパシー用製品であ

り、極度に含有植物エキスが希釈されている為と考えられる。

D. 考察

今回薄層クロマトグラフ法によりアルカロイド成分含有の有無を検討したサンプルでは、ドラーゲンドルフ試液に陽性のスポットは確認出来なかった。1969年の単離報告では、ミツガシワの乾燥葉に0.035%の粗アルカロイドが含有されていたと報告されている。しかしその抽出・分離過程は、アンモニア水を用いていた。イリドイド配棟体をアンモニアにて処理することによりゲンチアナアルカロイドが生成されることが知られていることから、ミツガシワから得られたとされるゲンチアナアルカロイドは副産物 (アーティファクト) である可能性が高い。図2. にイリドイド配棟体からゲンチアナアルカロイド生成の推定経路を示す。ある種の植物ではアンモニア処理をしなくてもゲンチアニンが単離される場合があるとされるので、生合成的にもセコイリドイド配棟体を經由した経路が推定されている。

E. 結論

今回、ミツガシワ (*Menyanthes trifoliata*) のアルカロイド成分について、文献調査および薄層クロマトグラフ法により、その含有の有無を調べた。文献上では4種のゲンチアナアルカロイドの単離報告が成されていたが、その抽出・分離過程においてアンモニア水が使用されていたため、それらは副産物 (アーティファクト) であることが疑われる。実際に薄層クロマトグラフ法によりそれらの含有の有無を調べたが、確認出来なかった。今後、薄層クロマトグラフ法以外の方法を含め、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

緊急を要する健康危険情報は特になし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

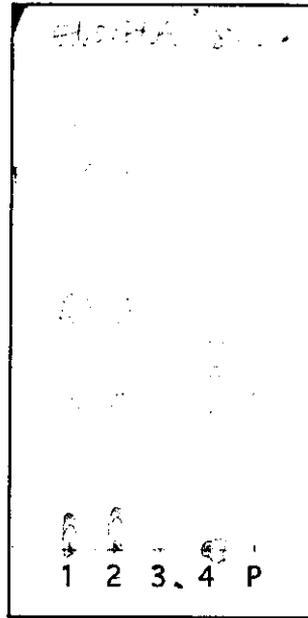


図1. サンプルの薄層クロマトグラフ (TLC)

1 : 薬草茶 (チェコ)、2 : 薬草茶 (フランス)、3 : 丸剤 (スイス)、4 : 抽出液 (フランス)、P : ドラージェンドルフ試液陽性コントロール (mayteine)

展開溶媒 : ジエチルエーテル-酢酸エチル (8 : 2)

呈色試薬 : ドラージェンドルフ試液

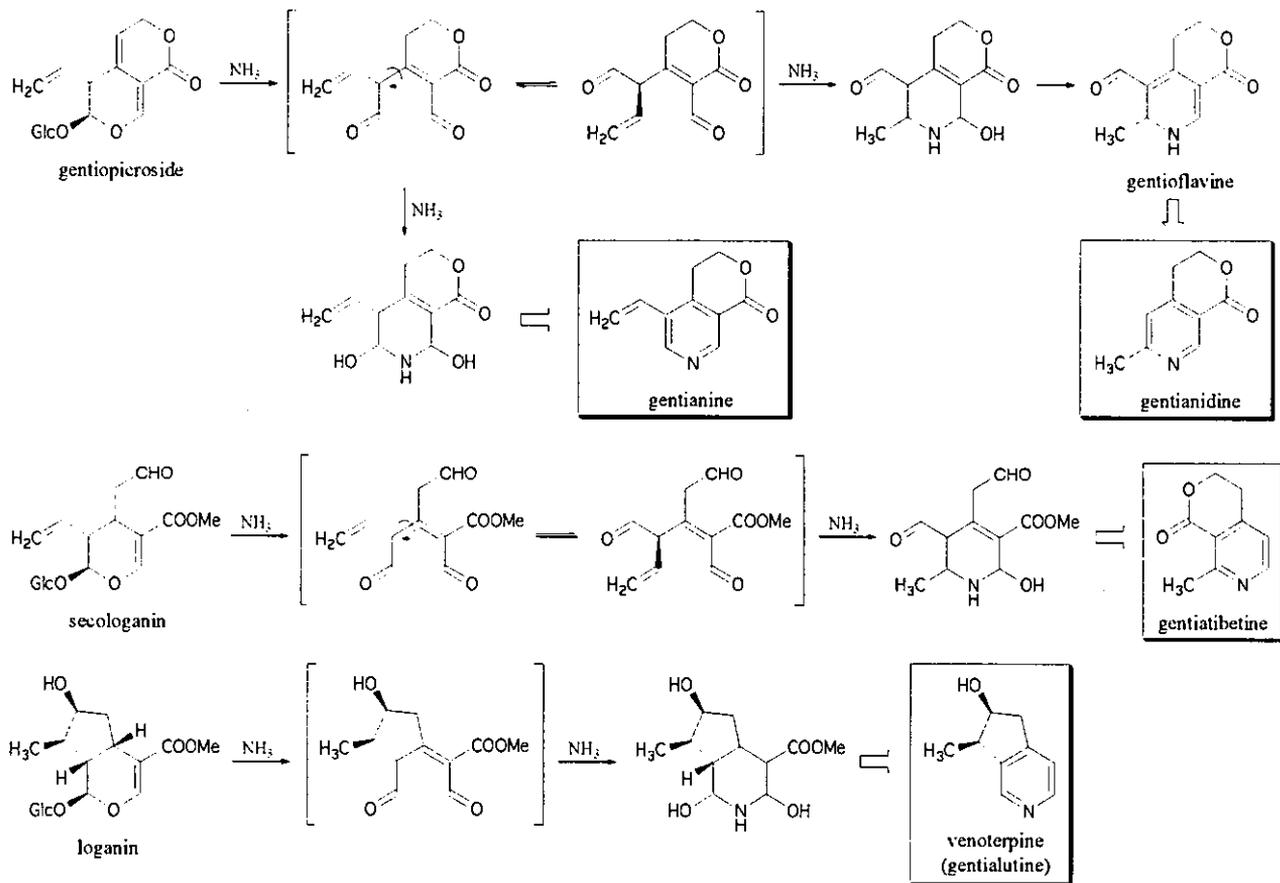


図 2. ゲンチアナアルカロイドの推定生成機構

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 「専ら医薬品」の有効性、安全性等の評価に関する調査及び実証的研究
並びに医薬品として用いられる生薬の指標成分の検討

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長 合田幸広

DNA 配列の比較によるヨーロッパ市場生薬についての原植物の検討

昨年度入手したチェコスロバキア、スイス及びフランス市場の生薬 5 種 8 検体について核 rDNA、ITS 領域及び葉緑体 DNA、*trnL* (UAA) intron 領域の DNA 配列を解析した。次いで、これらの生薬は *Aloe* 属、*Arctostaphylos* 属、*Polygala* 属、*Polygonum* 属及び *Gentiana* 属に由来すると推定されたため、同属植物について同領域の配列を解析した。生薬の基原植物の同定には解析した配列の比較により検討した。また、比較には国際塩基配列データベースの登録データとも比較検討した。その結果、8 検体中 5 種について同定でき、日本薬局方に収載されるウワウルシ、セネガ、ゲンチアナと同じ基原、*Arctostaphylos uva-ursi*、*Polygala senega*、*Gentiana lutea* であった。*Aloe* 属に由来するもの 1 種からは DNA を抽出することができなかった。また *Polygonum* 属及び *Gentiana* 属に由来する生薬 1 種ずつについては一致する配列を見出すことができなかったが、それぞれ、同属の植物であるものと推定した。

研究協力者

南雲清二 星薬科大学薬用植物研究室 助教授
佐々木陽平 星薬科大学薬用植物研究室 助手
丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部研究員

Polygonum 属及び *Gentiana* 属) の生薬 8 試料について、日本薬局方で規定される生薬と基原植物が同じであるか否かを調べる目的で、遺伝子配列をもとに基原植物の検討を行ったので報告する。

A. 研究目的

昨年度、花尻分担研究者が、日本における食薬区分対象物について、ヨーロッパにおける流通事情の調査を行い、また、食薬区分上問題の生じる可能性のある生薬について、ヨーロッパの薬局で買い上げを行った。本研究では、同分担研究者がヨーロッパ各地で入手した食薬区分上問題を生じる可能性のある 4 属 (*Aloe* 属、*Arctostaphylos* 属、*Polygala* 属、

B. 研究方法

生薬検体は、昨年度 3 月に、花尻分担研究者が、ヨーロッパの各地で購入したものをを用いた。検体リストを Table 1 にしめす。

生薬検体は、国立医薬品食品衛生研究所種子島、筑波及び北海道薬用植物栽培試験場、東京都薬用植物園、昭和大学薬学部薬用植物園、星薬科大学薬用植物園より、標準品として恵与されたものを使用し

た。植物毎のリストを Table 2 に示す。なお植物検体はすべて平成 16 年 11 月に採集したものである。また、全ての検体は現在星薬科大学薬用植物研究室に保管されている。

生薬検体からの DNA の抽出には次のようにサンプルを選択した。No.3 及び No.8 は個々の塊が大きいため 1 塊 (片) から、それ以外の生薬は多くの小塊 (片) を集めたものから抽出した。全ての検体は 2 回ずつ解析を行なった。

生薬及び植物検体約 20~50 mg から genomic DNA を抽出し核 rDNA、ITS 領域 (internal transcribed spacer 1、5.8S ribosomal DNA、internal transcribed spacer 2) 及び葉緑体 DNA、*trnL* (UAA) intron 領域を PCR にて増幅し、電気泳動で増幅を確認した後、塩基配列解析を行った。生薬検体の解析結果、植物の解析結果、及び国際塩基配列データベース (DDBJ、EMBL、GenBank) に登録されている配列を比較し基原を推定した。

C. 研究結果と考察

全ての検体に対して、核 rDNA、ITS 領域及び葉緑体 DNA、*trnL* (UAA) intron 領域について PCR を行なった。

その結果、生薬 No.1 を除いた全ての検体で両領域が増幅した。これらの領域を DNA シークエンサーで測定した結果、*Aloe* 属、*Polygonum* 属及び *Gentiana* 属植物の ITS 領域は数種類の配列が重なっており、単一の配列として表わすことが不可能であった。これは交配種であるために同一個体中に数種類の ITS 配列が存在することが原因であると考えられる。一方、*trnL* intron 領域は No.1 を除く全ての検体において解析可能であった。解析した結果は Fig.1~Fig.6 に示し、種内で塩基置換、欠失及び挿入が多く観察された *Aloe* 属 (Fig.1)、*Polygonum* 属 (Fig.5) は系統樹で近縁関係を、それ

以外は塩基置換及び場所を具体的に表わした。生薬 1 検体ずつの結果を以下に述べる

1) No.1 : *Aloe kapska* (性状 : 黒褐色の小塊)

本生薬はアロエ葉肉の液汁を乾固したものである。検討した 2 つの領域において共に PCR による増幅が確認できなかった。これは液汁に DNA が含まれていないか又は加工の際に DNA が分解してしまい、生薬中にほとんど存在していないことが考えられる。

植物は、5 種 13 検体を実験に供し *trnL* intron 領域 544 bp を解析した (Fig.1)。*Aloe felox* と *A. africana* は混在している一方、*A. ferox* と *A. vera* は明らかに異なる (4 箇所の塩基置換及び 14 箇所の塩基欠失) 配列であった。*A. ferox* と *A. vera* の区別には *trnL* intron 領域が有効であると思われる。

Aloe ferox に関しては雑種であるという文献^{1a,2a)}があり、今回の核 rDNA、ITS 領域が解析できなかったことを支持している。

2) No.2 : *Medvedice list* (性状 : 切断された葉)

本生薬では ITS 領域及び *trnL* intron 領域の両配列が解析でき、その結果 (Fig.2) は植物検体 AU1 及び AU2 と全く同じであった。そこで本生薬は *Arctostaphylos uva-ursi* と同定した。ただし、データベースに登録されている *Arctostaphylos uva-ursi* (Acc. no.: AF106822) の配列は 34 番目、46 番目、240 番目及び 316 番目の 4 箇所で塩基置換が存在する。これは同種内の変異であると考えられる。

3) No.3 : *BUSSEROLE* (性状 : 全形の葉)

No.2 と同様に *Arctostaphylos uva-ursi* と同定した。

4) No.4 : *Barentraubenblatter* (性状 : ティーバック中に切断された葉及び顆粒)

切断された葉と黄緑色顆粒の 2 種類が混在しており、別々に DNA の抽出、解析を行なった。その結果、これらは 2 領域で全く相同であり、共に *Arctostaphylos uva-ursi* と同定した。