

表4 各試料の測定濃度(続き)

No.	サンプル名	測定濃度	備考
食品添加物			
FA1	イソ $\alpha$ 苦味酸	0.0003~0.3w/v%の7点	
FA2	カフェイン	0.01 mM~10 mM (0.0002~0.2w/v%) の7点	
FA3	ジャマイカカッシア 抽出物	0.0003~0.1w/v%の6点	0.1 w/v%は全量溶解せず、懸濁液の状態で測定
FA4	ナリンジン	0.01 mM~1 mM (0.0006~0.06w/v%) の5点	

表5 味認識装置による測定結果

検知できる物質 (相対値, CPA 値で検知)		検知できる物質 (相対値のみ検知)		検知できない物質	
		試 薬			
B1	キニン	(QA)	B10 カフェイン-水和物	(PrA)	B9 カフェイン
B2	キニン塩酸塩一水和物	(QA)	B11 テオブロミン	(PrA)	B16 スウエルチアマリン
B3	キニン硫酸塩二水和物	(QA)	B12 5'-デオキシ-5'-メチルチオアデニン	(Pr-G)	B18 エンメル
B4	キニン	(QA)	B15 ゲンチオクロン *	(monoTP-G)	B19 リモニン
B5	キニーネ塩酸塩二水和物	(QA)	B17 アントロラフオリド *	(diTP)	B20 ノリソ
B6	シヨニン	(QA)	B22 安息香酸ナトリウム	(Benz)	B21 クアジン
B7	シヨニン硫酸塩二水和物	(QA)	A2 エラガ酸二水和物	(trTP-G)	S5 レバウジオイド A
B8	ヘルバリン塩酸塩二水和物	(isoQA)	S1 グリチルリチン	(diTP-G)	
B13	ナリンギン水和物	(Fla-G)	S4 ステロイド		
B14	イソ酸	(Benz)			
B23	N-フェニルチオ尿素				
A1	タンニン				
A3	没食子酸				
S2	グリチルリチン酸アンモニウム塩	(trTP)			
S3	グリチルリチン酸二カリウム	(trTP)			
S6	サッカリン	(Benz)			
食 品 添 加 物					
FA 1	イソα 苦味酸				FA 2 カフェイン
FA 3	ジャマイカカッカシア抽出物				
FA 4	ナリンジン				

\* : エタノールを 30vol%含む 10 mM KCl 溶液を用いた場合の結果

(略称) QA: キニンアルカロイド Pr: プリン誘導体

isoQA: イソキニンアルカロイド Fla: フラバノン類

PrA: プリンアルカロイド Benz: ベンゼン誘導体及びベンズイミド

-G: 配糖体

monoTP: モノテルペン

diTP: ジテルペン

trTP: トリテルペン

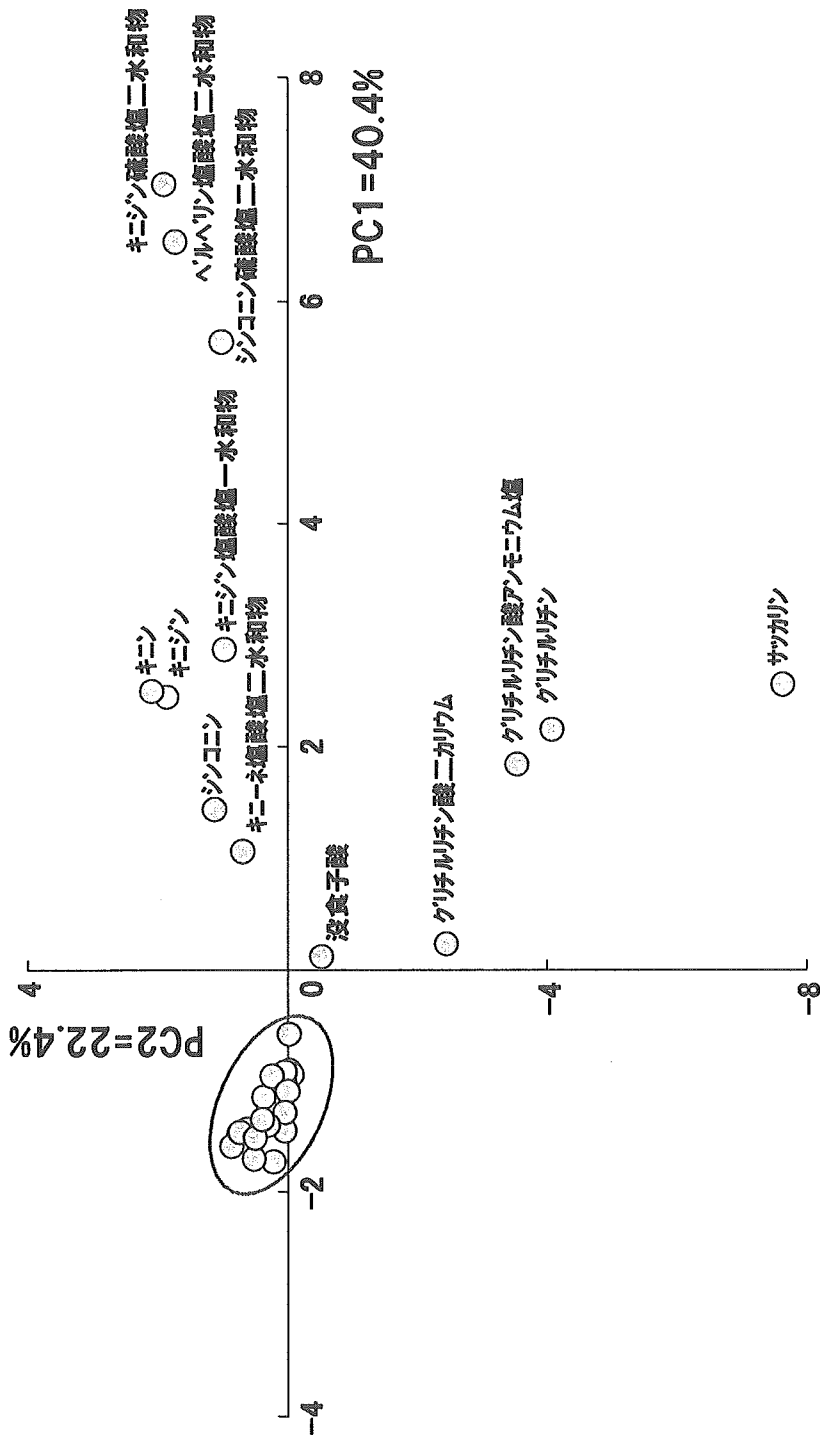


図1 各種試料の主成分分析  
(PC1=40.4%、PC2=22.4%、タンニン、イソα酸は除く)

## 2. 苦味料等の成分・品質に関する研究

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題：ヒキオコシ抽出物およびその基原植物の成分に関する研究

分担研究者	黒柳 正典	県立広島大学生命環境学部	教授
協力研究者	杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部	主任研究官
	山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部	室長
	丸山 卓郎	国立医薬品食品衛生研究所生薬部	研究員
	合田 幸広	国立医薬品食品衛生研究所生薬部	部長

研究要旨 昨年度のヒキオコシ抽出物の成分検索において、その起源植物が既存添加物名簿収載品目リストに記載されている延命草でなく中国産の延命草同属植物であることが予想された。そこでそのことを確認するために中国産および日本産の生薬延命草の成分分離構造決定を行った。

#### A 研究目的

既存添加物名簿収載品目リストによれば、苦味料ヒキオコシ抽出物はシソ科ヒキオコシ (*Isodon japonicus* Hara) あるいはクロバナヒキオコシ (*I. trichocarpus*) を原料として製造され、その主成分は苦味物質であるジテルペン誘導体 enmein とされている。しかし、厚生労働省科学研究費補助金「食品の安全性高度化推進研究事業」の一環で行った研究結果（平成16年度）において、市場に流通しているヒキオコシ抽出物 (Lot. No. IY0373) の成分を精査した結果 enmein の存在は認められず、ヒキオコシ抽出物の酢酸エチルエキスの薄層クロ

マトグラフィー (TLC) パターンは日本産の生薬延命草 (ヒキオコシ) の酢酸エチルエキスの TLC パターンとは異なり、中国産の日本市場品の生薬延命草 (ヒキオコシ) の酢酸エチルエキスの TLC パターンと一致した (図1)。このことから、我が国の市場においては、日本産生薬延命草とは成分の異なる中国産生薬延命草が広く流通しており、ヒキオコシ抽出物製造の原料としてこの中国産生薬延命草が使用されたことが伺われる。そこで、このことを確認するため中国産生薬延命草中の苦味成分と日本産生薬延命草中の苦味成分を比較するため両者の含有成分の分離構造決定を行う。

## B 研究方法

### 1, 実験材料および機材

成分の抽出分離に用いた中国産生薬延命草は小島漢方（大阪）製造、Lot No. 522421 を購入し用いた。日本産延命草は内田漢方（東京）製造、Lot No 452906 を購入し用いた。

TLC は Precoated TLC (分析は Silica gel 60F<sub>254</sub>, 200x200x0.25 mm, Merck, 分取は Silica gel 60F<sub>254</sub> 200x200x0.5 mm, Merck) を用いて行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーは Silica gel 60N (100 – 210 μm, Kanto Chemical Co., Inc.) を用いて行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は逆相系カラム (Mightysil RP-18, Kanto Chemical Co., Inc.) を用いて行った。

### 2, 方法

#### 2-1, 抽出と分離

購入後粉末にした中国産生薬延命草 (2 kg) をメタノールにより 2 時間還流抽出を行った。冷却後ガーゼを用いて濾過し、残渣をメタノールで洗浄し、洗浄液はメタノール抽出液と合わせ、減圧下 50 °C で濃縮した。得られたメタノールエキスは水に懸濁し酢酸エチルで抽出し酢酸エチル抽出エキスを得た。水相はブタノールで抽出しブタノール抽出エキスを得た。酢酸エチルエキス (30 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム-メタノール系の溶媒を用い、メタノールの比率

を上げながら溶出を行った。得られた多数のフラクションについては TLC を行い、類似したフラクションは一緒にし、最終的に 9 つのフラクションにまとめた。これらのフラクションのうち、TLC の結果多数の成分の存在が明らかになった Fr. 3 について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 TLC (PLC), 逆相系カラム (ODS カラム)、アセトニトリル-水系展開溶媒を用い HPLC を繰り返し行うことにより comp. 1 ~ comp. 7 の化合物を分離した。Fr. 5 を PLC を繰り返すことにより comp. 6, comp. 8 を分離した。Fr. 6 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い更に、PLC を繰り返すことにより comp. 9 を分離した。以上の抽出と分離の流れを図 2 に示す。

得られた各化合物については、ヒキオコシ抽出物から既に我々が分離している化合物との TLC および HPLC による比較を行った。一部の化合物についてはスペクトルの測定を行い構造の確認を行った。

日本産生薬延命草についても粉末化後中国産生薬延命草の場合と同様にメタノールで抽出後、酢酸エチル相、ブタノール相、水相に分け、酢酸エチルエキスについても成分分離を開始しつつある。

#### 2-2, 分離化合物の構造確認

今回中国産生薬延命草から分離精製した化合物については核磁気共鳴 (NMR) スペクトル等の分光学的測定を行うとともに、昨年の研究でヒキオコシ抽出物から既に得

られ構造が決定されている化合物と同一物と考えられる化合物については TLC および HPLC を用いて比較し同定を行った。

### C. 研究結果

中国産生薬延命草から分離精製された化合物をヒキオコシ抽出物から分離構造決定された成分 IJ-1～IJ-5 と TLC, HPLC を比較検討した結果、comp. 8 は IJ-4 と同一の化合物であることを確認した。同様に、comp. 5 は IJ-1 と comp. 6 は IJ-2 と、comp. 7 は IJ-3 と、comp. 9 は新規化合物である IJ-5 と同一化合物であることを確認した。以上の結果 comp. 1 はフラボン誘導体である

4',5-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone と、comp. 5, comp. 7 はともにアントカウラン骨格を持つジテルペン rabsosianone I, maocrystal A である事が明らかになった。Comp. 6 は ulsolic acid であることが判った。Comp. 9 は新規化合物と考える IJ-5 と同一の構造を持つことが明らかになった。

文献未記載の新規化合物と考えられる comp. 9 は FAB-MS において  $m/z$  361 に疑似分子イオン  $[M+H]^+$   $C_{20}H_{26}O_6$  を示すことから分子式は  $C_{20}H_{24}O_6$  と推定された。 $^1H$ -NMR において、rabsosianone I のデータと比較するとシングレットメチルが 1 本しか認められず、代わりにヒドロキシメチル基にもとづくシグナルが認められ、その他のシグナルは両化合物の間で良く類似している。Comp. 9 の  $^{13}C$ -NMR も新たなヒドロキシメチル基に基づくシグ

ナル以外は rabsosianone I のものと良く類似していた。以上のことより comp. 9 は rabsosianone I の 18 位のメチル基がヒドロキシメチル基になった構造と考えられ、2次元 NMR (HMQC, HMBC) スペクトルデータからもこの構造が支持された。以上、中国産生薬延命草から分離構造決定された化合物の構造を図 3 に示す。新規化合物と考えられる comp. 9 のスペクトルデータを図 4 に示す。

分離したその他の化合物については現在構造解析を行っているところである。

中国産生薬延命草の酢酸エチルエキスと日本産生薬延命草の酢酸エチルエキスとの TLC 比較ではお互いにクロマトグラムパターンが異なっており、ヒキオコシ抽出物の酢酸エチルエキスの TLC は日本産生薬延命草の酢酸エチルエキスとは異なっており、中国産生薬延命草酢酸エチルエキスと非常に類似していた。ヒキオコシ抽出物および中国産生薬延命草の酢酸エチルエキスには enmein の存在が全く確認できなかった。

### D. 考察

既存添加物名簿収載品目リストによれば、ヒキオコシ抽出物はヒキオコシ (*I. japonicus*) あるいはクロバナヒキオコシ (*I. trrichocarpa*) を原料として製造され enmein が主成分となっているが、ヒキオコシ抽出物には enmein の存在が全く認められず、しかもヒキオコシ抽出物の酢酸エチルエキスの TLC パターンが中国産生薬延

命草の酢酸エチルエキスのもと完全に一致すること、さらに、日本産生薬延命草の酢酸エチルエキスとは完全に異なることが明らかになった。

また、今回中国産生薬延命草の成分研究で分離され、構造の明らかになった5つの化合物はすべてヒキオコシ抽出物から分離されたものと一致した。

以上のような結果から、我が国の生薬市場の中では生薬延命草は、ヒキオコシ (*I. japonicus*) やクロバナヒキオコシ (*I. trichocarpa*) に代わって中国産のヒキオコシ同属植物が広く行き渡り、ヒキオコシ抽出物の作製にヒキオコシ (*I. japonicus*) とは成分組成の異なる中国産生薬延命草が用いられていることを示している。同じ生薬名で類縁同属生薬が用いられ、本来用いられるべき生薬素材とは異なる類縁材料が市場に広がっていることを示している。経済的理由、資源の枯渇等の理由から、本来用いられるべき生薬起源植物に代わって類縁植物が市場に流通してきていることは従来から大きな問題になっているが、既存添加物であるヒキオコシ抽出物にまで波及していることが推測された。

Enmein はエントカウラン骨格の B-環が解裂シラクトン骨格をまき直した構造を有しているが、中国産生薬延命草から得られたジテルペンはすべてエントカウラン骨格を有しており B-環の解列は起こっていない。このことから中国産生薬延命草の起源植物では、その生合成過程において、B-環の解列を起こすような酵素系が働いてい

ないことが考えられる。

#### E. 結論

既存添加物であるヒキオコシ抽出物に存在しなければならない enmein が市場品ヒキオコシ抽出物に認められなかった事から始まった本研究では、日本の生薬市場で流通している中国産生薬延命草がヒキオコシ抽出物の製造原料として使われていることが明らかになり、しかも本来流通すべきヒキオコシ (*I. japonicus*) とはその成分が大きく異なっていることも明らかになった。

#### F. 健康危機情報

特に無し

#### G. 研究発表

無し

#### H. 知的所有権の取得状況

無し



Hexane-AcOEt=1:2

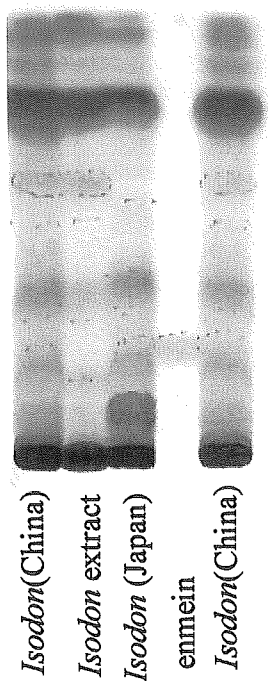


図1 ヒキオコシ抽出物、中国産延命草および日本産延命草のメタノールエキスの TLC による成分比較。

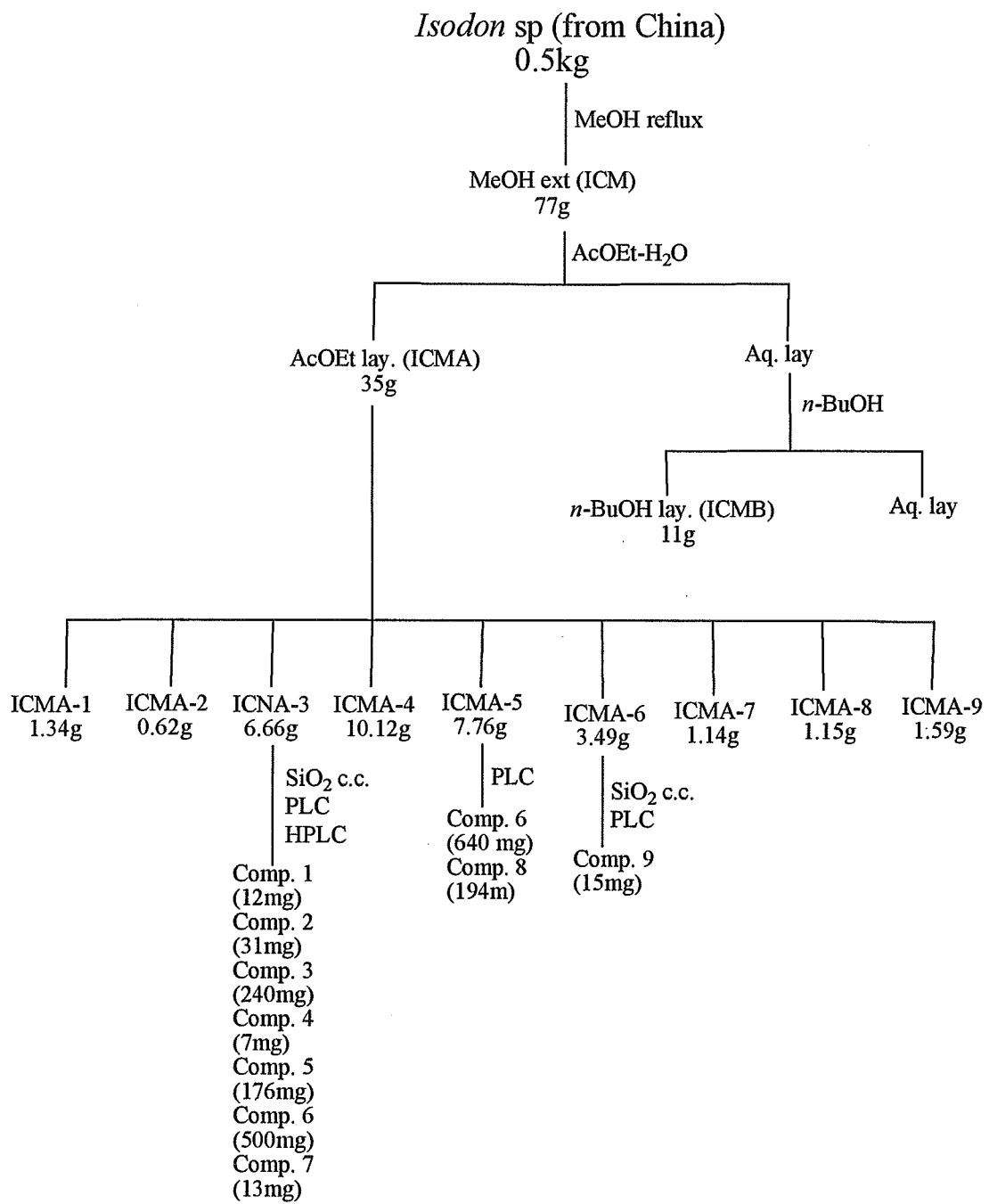


図2 中国産生薬延命草の成分分離の流れ

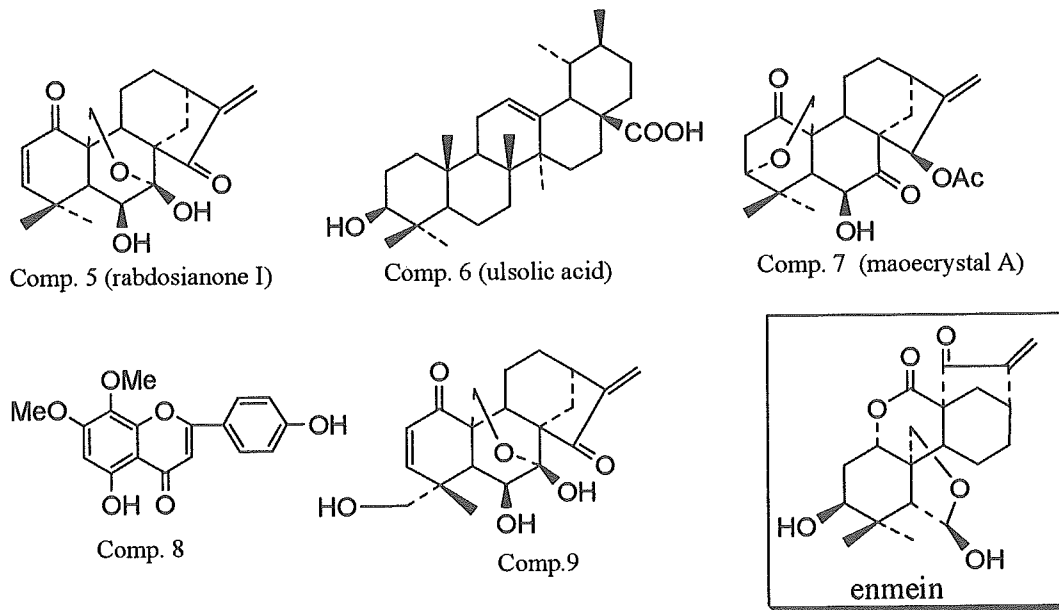
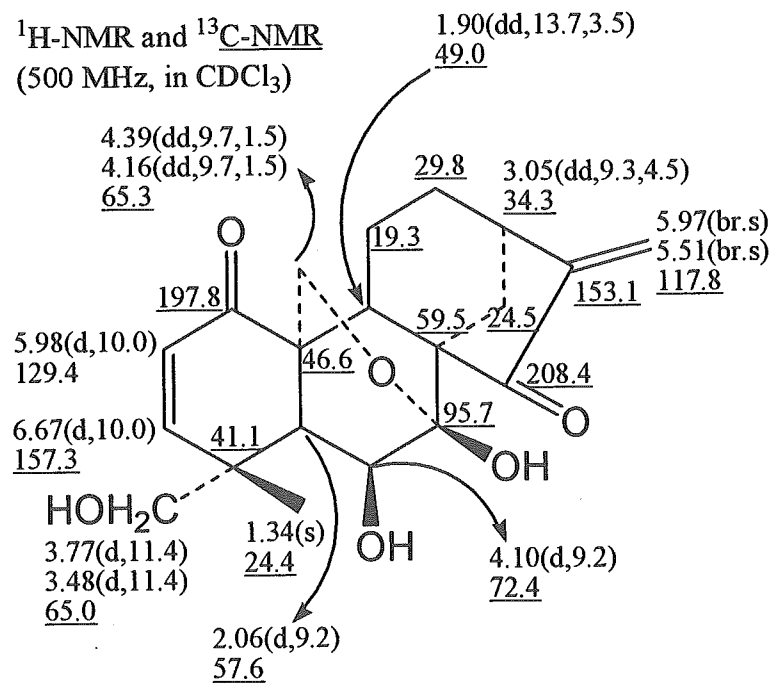


図3 中国産生薬延命草から得られた5つの化合物の構造とエンメインの構造

### IJ-5

$^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$   
(500 MHz, in  $\text{CDCl}_3$ )



EI-MS;  $m/z$  360.1573 [M]<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>

図4 新規化合物と予想される IJ-5 の  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  のアサインと MS.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
既存添加物の成分と品質評価に関する研究

平成 17 年度協力研究報告書

ヒキオコシ抽出物の成分と基原種に関する研究

研究協力者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長  
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部主任研究官  
丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 研究員  
黒柳 正典 県立広島大学生命環境学部 教授

研究要旨 昨年度に引き続き、ヒキオコシ抽出物の品質評価を目的に、生薬エンメイスウ及びヒキオコシ類縁植物の成分及び DNA 分析を行った。その結果、ヒキオコシ中のエンメイン含量には、個体差が認められた。また、ヒキオコシ抽出物の基原種が、中国産の同属植物であると推定された。

A. 研究目的

ヒキオコシ抽出物は、シソ科ヒキオコシ (*Isodon japonicus* HARA) の茎又は葉よりエタノールで抽出して得られたものであり、その主成分は、ジテルペノイド (エンメイン等) であるとされる (既存添加物名簿収載品目リスト)。しかし、昨年度に行ったヒキオコシ抽出物の成分探索では、エンメイン (1; 図 1) は認められず、別の骨格を有するジテルペノイド類 (2, 3 等) が確認された。一方、参考試料として用いた生薬エンメイスウと、ヒキオコシ抽出物は、TLC において、同一の分離パターンを示した。このことから、エンメインが検出されない原因として、以下の 2 つの可能性が考えられた。すなわち、1. ヒキオコシには、エンメインを含まない系統が存在する。2. ヒキオコシ抽出物及び生薬エンメイスウの原料に、ヒキオコシとは異なる植物が使用されている。そこで、本研究では、この点を明らか

にするため、ヒキオコシ及び近縁植物の DNA 及び LC/MS 分析を行い、ヒキオコシ抽出物の基原種と成分の関係を調査した。

B. 研究方法

1. 実験材料

エンメイスウ市場品 (Ra-1, 2) 及びヒキオコシ類標準試料 (Ra-3-7) には、表 1 に示した 7 検体を用いた。この内、Ra-1 は、昨年度の研究に用いたエンメイスウと同一のものである。また、クロバナヒキオコシ (*Isodon trichocarpus*) は、日本薬局方外生薬規格において、ヒキオコシと共にエンメイスウの基原種に規定されている種である。

2. 実験方法

2-1. DNA 分析

各検体、約 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎し、DNeasy Plant

Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の rDNA に保存性の高い領域に設計した各プライマー対を用いて、PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (約 600 bp) を増幅した。ただし、市場品 2 種については、nested PCR を用いた。Microcon-PCR (Millipore) により、PCR 溶液から余剰のプライマー及び dNTPs を除去した後、ダイレクトシーケンスへと供した。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムを用いて行った。

## 2-2. 成分分析

試料 1 g に対し、50 mL のエタノールで室温下、攪拌しながら 24 時間抽出し、抽出液をろ過後、ろ液を減圧下、留去した。残留物をエタノールで再溶解し、10 倍濃縮した抽出液を LC/MS 用試験溶液とした。LC/MS 分析は、装置に Waters 社の FractionLynx MS auto purification system (1525 ポンプ, 2767 サンプルマネージャ, カラム・流路オーガナイザ, ZQ マス検出器, 2996 PDA 検出器) を、カラムに YMC-J'sphere-ODS-H80 (4.6 x 250 mm; YMC) を用い、移動相は、40% MeOH (0 min)-100% MeOH (30 min) のグラジエント条件で流速 1.0 mL/min で用いた。上記試料溶液 5.0 mL を注入し、溶出液は、スプリッターにより 4:1 の比に分け、それぞれ PDA 及び MS 検出器へ導入した。MS 測定におけるイオン化は、ESI のポジティブモードで行い、キャピラリー電圧 4 kV、イオンソースおよび脱溶

媒ガス温度が、それぞれ 120、350°C、脱溶媒ガスおよびコーンガスの流速は、それぞれ 350、50 L/h、コーンガス電圧は 40 V とした。

## C. 研究結果

### 1. DNA 分析

DNA 配列解析の結果、ITS2 領域には、8 及び 9 塩基のグアニンの連続する配列が存在し、これら 2 つの配列の混合物として観察されるものが認められた。このような場合、ダイレクトシーケンスでは、該当箇所以降の配列の解析が困難である。このため、解析結果は、ITS1 領域のもののみを図 2 に示した。標品 5 種の配列は、ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシの配列にそれぞれ区別され、種内変異は認められなかった。両者は、ITS1 領域 (283 bp) において、9 塩基の違いを示し、明確な区別が可能であった。延命草市場品のうち、Ra-2 は、クロバナヒキオコシの配列と完全に一致した。Ra-2 は、新潟産であり、クロバナヒキオコシの分布域 (本州の日本海側) とも一致する。一方、Ra-1 は、複数の配列の混合物として検出された。

### 2. 成分分析

LC/MS 分析の結果は、1 を主成分とするもの (Ra-4, 7)、oridonin (5) を主成分とするもの (Ra-2, 5) 及びその中間型 (Ra-3, 6) に分かれたが、ITS 領域の genotype との明確な相関は見られなかった。一方、Ra-1 は上記の試料とは全く異なるパターンを示し、2 が主成分として認められた。このパターンは、ヒキオコシ抽出物のものと同様であった。代表的なクロマトグラムを図 3 に示した。

#### D. 考察

DNA分析の結果から、ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシは、それぞれの配列に区別可能であった。ただし、国内には、その他の同属植物として8種7変種の分布が知られており<sup>1)</sup>、これらとの関係は不明である。一方、中国産の延命草(Ra-1)は、複数の配列の混ざりであることから、雑種であるか、あるいは、複数の種の混合物であると考えられたが、単一個体に由来する茎及び葉より調製したDNA溶液からも混ざりの配列が得られていることから、雑種基原であると思われる。今回、Ra-1から検出された2は、京都市内の薬局で購入した*I. japonicus*より rabdosianone I として、単離の報告がある<sup>2)</sup>が、基原種の同定については、疑わしい。また、同一の化合物が、ericalyxin B の名で、*R. ericalyx* より最初に単離されている<sup>3)</sup>他、*Isodon ericalyx* var. *laxiflora* からも2,3の単離の報告がある<sup>4)</sup>。*R. ericalyx* (*I. ericalyx*) は、中国西部に分布する同属種である。Ra-1が、中国産である点及びDNA分析の結果を考え併せると、*R. ericalyx*、あるいはその近縁種が、Ra-1の基原種であると推察される。以上のことから、Ra-1と同一の成分パターンを示すヒキオコシ抽出物についても、*R. ericalyx* 及びその近縁種を基原としていると考えられる。

#### E. 結論

エンメイソウ市場品及びヒキオコシ、クロバナヒキオコシについて、DNA及びLC/MS分析を行った結果、ヒキオコシ抽出物の基原種は、既存添加物名簿収載品目リストに記載されているヒキオコシとは異なる同属植物であると推定された。

#### F.健康危機情報

特に、重要なものはない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

丸山卓郎、杉本直樹、黒柳正典、鎌倉浩之、合田幸広、延命草の成分と基原種について、日本薬学会第126年会、2006年3月、仙台。

#### H. 知的所有権の取得状況

無し

#### 参考文献

- 1) 原寛、ヤマハッカ属のアジア産種について、*植物研究雑誌*, 47, 193-203 (1972).
- 2) Yamada Y., Sako N., Ando E., Yamada M., Kikuzaki H., Yamamoto T., New bitter diterpenes, rabdosianone I and II, isolated from *Isodon japonicus* Hara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 524-529 (1999).
- 3) Wang Z., Xu Y., *Chemical Abstracts*, 98, 104285m (1983).
- 4) Sun H., Lin Z., Niu F., Shen P., Pan L., Lin L., Cordell G., Diterpenoids from *Isodon ericalyx* var. *laxiflora*, *Phytochemistry*, 38, 1451-1455 (1995).

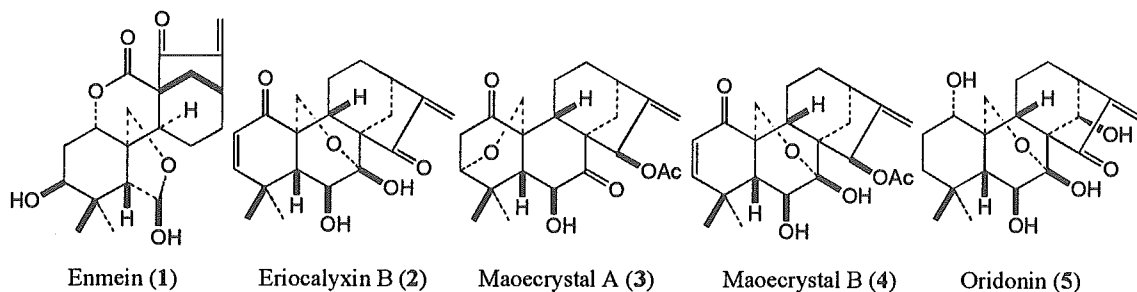


図1 ヒキオコシ関連化合物の構造

Ra-1	T T T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T G T C G A A A C C T G C A A A G C A G	50
<i>I. japonicus</i>	.....	50
<i>I. trichocarpa</i>	.....	50
Ra-1	A C C G M G A A C A C G T T T C T A A C G C C A T C C C C G C C G C R G C G C G C A C T C G T	100
<i>I. japonicus</i>	..... C ..... A .....	100
<i>I. trichocarpa</i>	..... C ..... T ..... C ..... T .....	100
Ra-1	G C C G C G C K R C G T G C G G G C T A A C G A A C C C C G G C G C G G A A M G C G C C A A G G A A	150
<i>I. japonicus</i>	..... G G ..... C .....	150
<i>I. trichocarpa</i>	..... T ..... G G ..... C .....	150
Ra-1	A A C T T A A A T T T A G C G T C G G T C C C G C C C G C A T C C C G T T C G C G G G C C G T G C	200
<i>I. japonicus</i>	.....	200
<i>I. trichocarpa</i>	..... T A ..... A A .....	200
Ra-1	G G T G Y G G A A C G G G C G T C T A T M G A A T G T C A T A A C G A C T C T C G G C A A C G G A T	250
<i>I. japonicus</i>	..... C ..... A .....	250
<i>I. trichocarpa</i>	..... C .....	250
Ra-1	A T C T C G G C T C T C G C A T C G A T G A A G A A C G T A G C G	283
<i>I. japonicus</i>	.....	283
<i>I. trichocarpa</i>	.....	283

図2 *Isodon* 属植物及び延命草市場品の ITS1 領域の配列  
 “.”は、Ra-1 のものと同一の塩基を示す

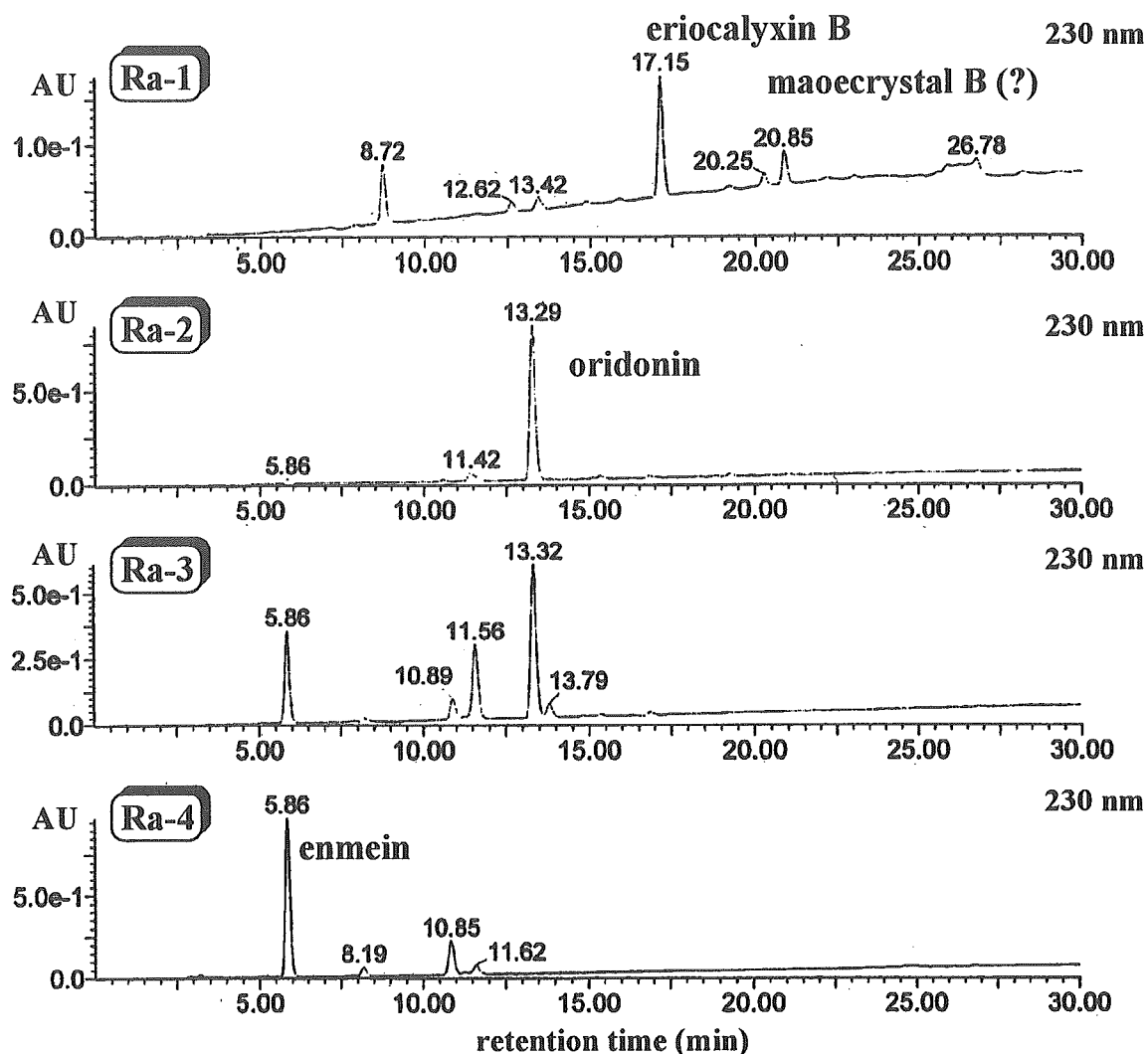


図3 *Isodon* 属植物及び延命草市場品の LC/PDA/MS クロマトグラム

表1 本研究に使用した検体及び標準植物試料

Sample #	species	locality	voucher #
Ra-1	?	中国	Lot no. 522421
Ra-2	putative <i>I. trichocarpus</i>	新潟	Lot no. 452906
Ra-3	<i>I. japonicus</i>	基盤研筑波	0548-79TS* <sup>1</sup>
Ra-4	<i>I. japonicus</i>	基盤研種子島	0068-99TN* <sup>2</sup>
Ra-5	<i>I. trichocarpus</i>	富山医薬大薬用植物園	none
Ra-6	<i>I. japonicus</i>	京都大薬用植物園	
Ra-7	<i>I. trichocarpus</i>	金沢市駒場	TM007* <sup>3</sup>

\*1: (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

\*2: (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部

\*3: 国立医薬品食品衛生研究所生薬部



厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

分担研究報告書

-レイシ(霊芝)苦味トリテルペン類の単離と同一-

協力研究者 服部征雄 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

#### 研究要旨

苦味料等の品質評価に関する研究の一環として、味覚センサーによる苦味の質の解析検討を目的として、レイシ子実体及び胞子に含まれる苦味トリテルペン類の単離とそれらの化学構造の決定を行った。

#### A. 研究目的

天然添加物として用いられている苦味料には約 17 種があり、その中の一つとしてレイシ（霊芝）抽出物が収載されている。

レイシの苦味成分は高度に酸素化されたトリテルペン類で、子実体、菌糸体、胞子などからこれまでに 130 種以上が単離されている。

苦味料等の品質評価に関する研究の一環として、味覚センサーによる苦味の質の解析検討を目的として、レイシ子実体及び胞子に含まれる苦味トリテルペン類の単離とそれらの化学構造の決定を行った。

#### B. 研究方法

##### (1) 胞子からトリテルペン類の単離

レイシの胞子 (250 g) をメタノールで (1.5 L×3) 3 時間還流させ、35.7 g のエキスを得た。このメタノールエキス (30 g) を 90%メタノールで懸濁後、ヘキサン

(150 mL×2) で再び抽出した。得られたメタノール可溶部は濃縮、懸濁（水、300 mL）後、クロロホルム (150 mL×2) で抽出し、23.2 g のクロロホルム可溶部を得た。ヘキサン—アセトン (3 : 2, 1 : 1, 2 : 3) と  $\text{CHCl}_3$ — $\text{MeOH}$  (4 : 1) の順の溶媒系を用い、クロロホルム可溶部 20 g をシリカゲルカラムにかけ、6 つのサブフラクション (fr. A~F ; 1.3, 5.5, 10.1, 1.84, 0.7, 0.4 g) を分離した。その後、 $\text{CHCl}_3$ — $\text{MeOH}$  (20 : 1) を溶出液とし、シリカゲルクロマトグラフィーを繰り返すことにより、fr. C を 3 つのサブフラクション (subfr. C1~C3 ; 6.68 g, 2.41g, 0.62 g), fr. D から 5 つのサブフラクション (subfr. D1~D5 ; 0.12, 0.26, 0.24, 0.30, 0.63 g) に分けた。

Subfr. C1 をセファデックス LH-20 カラム ( $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ =3:7) にかけて、3 つのサブフラクション (subfr. C1a~C1c ; 4.14, 1.98, 0.52 g) を分画した。 $\text{CH}_3\text{CN}$  (30%→70%) — $\text{H}_2\text{O}$  (2%  $\text{AcOH}$ ) の直

線濃度勾配を用いた高速液体クロマトグラフィーを繰り返し、subfr. C1a から化合物 2 (17.9 mg,  $R_t$  57.1 min), 3 (75.3 mg,  $R_t$  62.3 min), 4 (512.5 mg,  $R_t$  68.9 min) を単離した。濃度勾配を  $\text{CH}_3\text{CN}$  (25%→65%)— $\text{H}_2\text{O}$  (2%AcOH) に変更し、subfr. C1b から化合物 1 (7.8 mg,  $R_t$  70.0 min), 5 (78.3 mg,  $R_t$  73.9 min) を単離した。

又、 $\text{CH}_3\text{CN}$  (25%→65%)— $\text{H}_2\text{O}$  (3%AcOH) 溶媒系を用い、subfr. D4 から化合物 6 (11.4 mg,  $R_t$  81.0 min), 7 (1.0 mg,  $R_t$  82.8 min), 8 (18.6 mg,  $R_t$  72.6 min), 9 (1.5 mg,  $R_t$  74.4 min), 10 (12.5 mg,  $R_t$  70.4 min), 11 (2.4 mg,  $R_t$  67.0 min), 12 (5.0 mg,  $R_t$  91.0 min), 13 (11.9 mg,  $R_t$  78.6 min) を単離した。

## (2) 子実体からトリテルペン類の単離

レイシの田尾子実体粉末 3.1 kg を 20%メタノール—クロロホルムで (6 L×3) 室温で 3 時間抽出した。得られた液体エキス 500 g を 90%メタノール (1 L) で懸濁後、ヘキサン (500 mL×2) で再び抽出した。濃縮したメタノール可溶部 480 g をシリカゲルカラムにかけ、クロロホルム、クロロホルム—メタノール (9:1→8:1) の順の溶媒系溶出し、4 つのフラクション (frac. A~D; 263.1, 122.3, 54.9, 27.1 g) を分離した。その後、ヘキサン—アセトン (3:2→2:3) を溶出液とし、シリカゲルクロマトグラフィーを繰り返すことにより、frac. A を 4 つのサブフラクション (Subfrac. A1~A4; 17.8 g, 108.5 g, 101.9 g, 24.8 g) に分けた。

Subfrac. A1 をシリカとフロリジルカラム (ヘキサン—アセトン=3:2) で分画後、 $\text{CH}_3\text{CN}$  (75%→95%)— $\text{H}_2\text{O}$  (2%AcOH) の直線濃度公配を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離精製し、化合物 19 (24.8 mg,  $R_t$  58.1 min), 20 (36.8 mg,  $R_t$  63.5 min), 16 (2.6 mg,  $R_t$  68.9 min), 17 (3.9 mg,  $R_t$  74.4 min), 21 (4.6 mg,  $R_t$  79.4 min), 18 (2.8 mg,  $R_t$  85.7 min) を単離した。

濃度勾配を  $\text{CH}_3\text{CN}$  (70%→90%)— $\text{H}_2\text{O}$  (2%AcOH) に変更し、同様にシリカとフロリジルカラム及び分取 HPLC を繰り返すことにより、Subfrac. A2 から化合物 22 (44.7 mg,  $R_t$  70.0 min), 14 (12.0 mg,  $R_t$  83.1 min), 4 (16.7 mg,  $R_t$  89.0 min), 15 (32.0 mg,  $R_t$  98.6 min) を単離した。

## (3) 鹿角霊芝からトリテルペンアルコール類の単離

鹿角霊芝 190 g をクロロホルムで (1 L×3) 3 時間加熱還流抽出した。得られたクロロホルムエキス 9 g をシリカゲルカラムにかけ、ヘキサン:アセトン (9:1→7:3), クロロホルム—メタノール (1:1) の溶媒系で溶出し、fr. A—F (132 mg, 270 mg, 480 mg, 672 mg, 4.07 g, 222 mg) の 5 つのフラクションを分離した。fr. A から再結晶により化合物 26 (106 mg) を得た。fr. B をフロリジルカラム (ヘキサン:アセトン=8:2) にかけ、化合物 20 を 3 mg 単離した。fr. C をシリカゲルカラム (ヘキサン:アセトン=8:2) にかけた後、分取 HPLC により化合物 25

と 24 をそれぞれ 3.1 mg 及び 42.4 mg 単離した。f r. D をフロリジルカラム及びシリカゲルカラム (ヘキサン:アセトン=8:2→7:3) にかけた後, 分取 HPLC により化合物 22 と 23 (24.1 mg と 14.0 mg) を単離した。f r. E,F はトリテルペンカルボン酸を主に含むフラクションで, 分離は行わなかった。

### C. 研究結果

#### (1) レイシの胞子からトリテルペン類の単離と同定

レイシの胞子のメタノール抽出エキスを, シリカゲル及びセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて繰り返し分画後, 分取用高速液体クロ

マトグラフィー(HPLC, ODS)で分離精製し, 13 種のラノスタン型トリテルペン化合物(1-13)を単離した(Chart 1)。これらの構造は文献に記載されているデータを参考にし, NMR や MS などの分光学的方法や, 化学的方法に基づき明らかにした (Fig. 1)。化合物 1-13 はそれぞれ lucidenic acid SP1 (1), compound C6 (2), ganoderic acid G (3), ganoderic acid A (4), ganoderic acid B (5), ganoderic acid  $\square$  (6), ganoderic acid  $\delta$  (7), ganoderic acid  $\epsilon$  (8), ganoderic acid  $\zeta$  (9), ganoderic acid  $\eta$  (10), ganoderic acid  $\theta$  (11), ganoderic acid D (12), ganoderic acid C2 (13)と同定した(Fig. 1)。

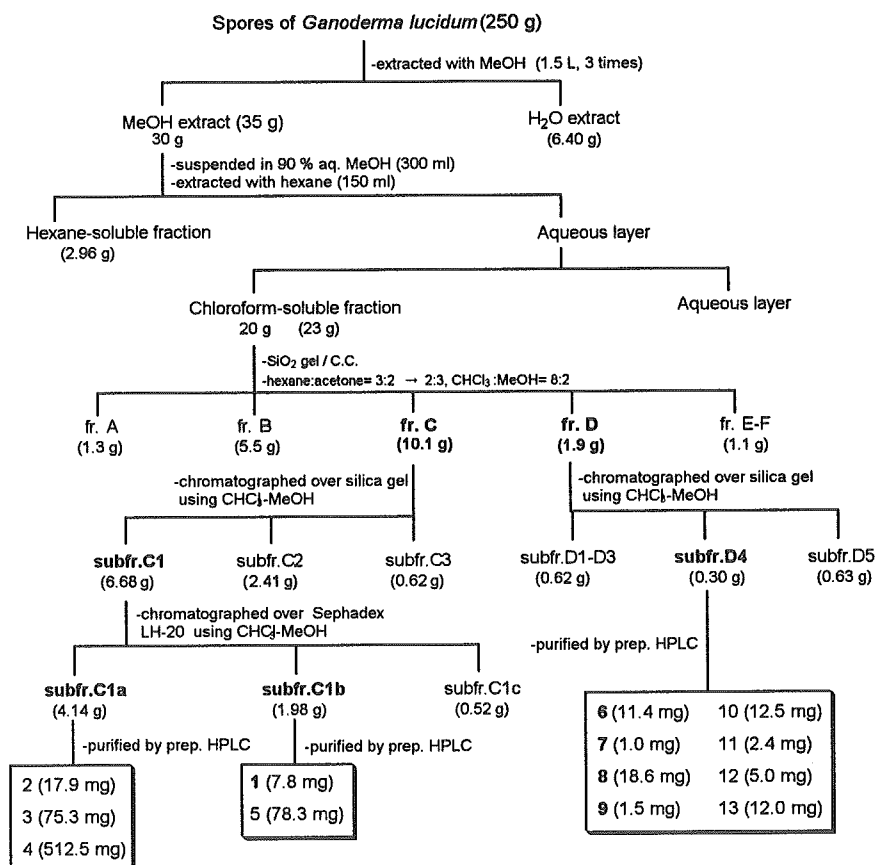


Chart 1 Scheme for the Isolation of Triterpenes from the Spores of *G. lucidum*

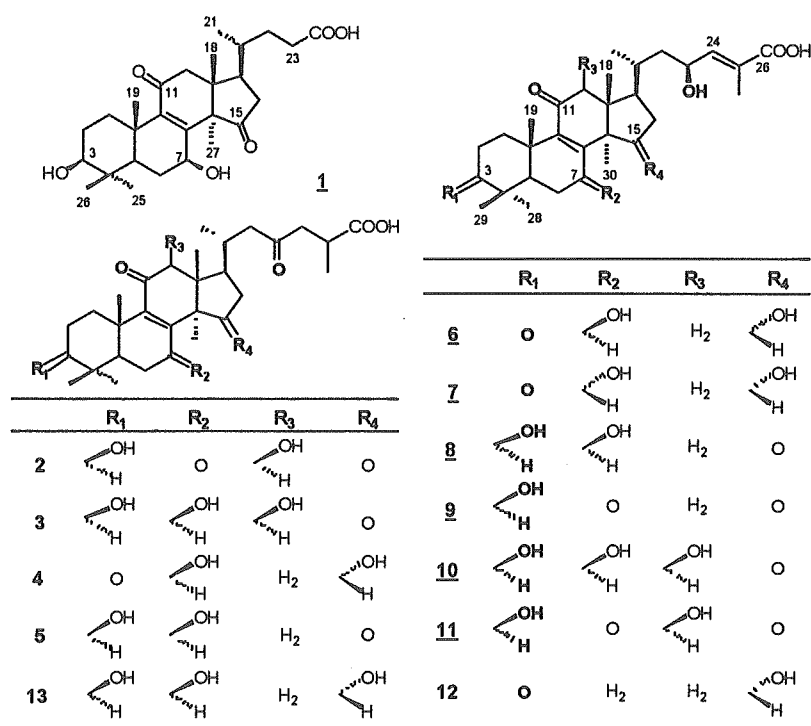


Fig. 1 Structures of Compounds Isolated from the Spores of *G. lucidum*

(2) レイシの子実体からトリテルペン類の単離と同定

レイシ子実体の乾燥エキスをメタノール-クロロホルム(1:5, vol/vol)で抽出した後、シリカゲルカラムにかけ分画を行い、更に分取用高速液体クロマトグラフィー(HPLC, ODS)で分画精製し、そのメタノール可溶部から10種のトリテルペン類(4, 14-22)を単離した(Chart 2)。文献に記載されているデータを参考にし、NMRや

MSなどの分光学的方法に基づき、単離した化合物の構造を明らかにした(Fig. 2)。化合物14-22はそれぞれ ganoderic acid C1(14), ganoderic acid B8(15), lucialdehyde A(16), lucialdehyde B(17), lucialdehyde C(18), ganodermanonol(19), ganodermediol(20), ganodermanondiol(21), ganodermanontriol(22)と同定した。