

化合物として3種のイリドイト配糖体、1種のクルビタシン配糖体、2種のフェノール性化合物を含む16種の化合物を単離し、それらの構造を決定した。今回の研究では、本植物を医薬品に区分すべきであると判断するような、強い生理活性を予想させる化合物は得られなかった。しかしながら、今回、成分検索を行うことのできなかつた他の分画においても、数多くの化合物を含有していることがTLC及びHPLC分析によって確認されており、これらの点についてどのように評価するか検討が必要なものと考えられる。

#### 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無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ik Hwi Kim, Noriko Kaneko, Nahoko Uchiyama, Ji Ean Lee, Koichi Takeya, Nobuo Kawahara, Yukihiro Goda: Two Phenylpropanoid Glycosides from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*, *Chem.*

*Pharm. Bull.*, **54**, 275-277 (2006)

##### 2. 学会発表

- 1) 金益輝、金子訓子、内山奈穂子、川原信夫、合田幸広：コオウレンの成分について。第11回日本食品化学学会総会・学術大会（2005年4月27-28日、東京）
- 2) 金益輝、内山奈穂子、川原信夫、合田幸広：コオウレンの成分について（2）。第52回日本生薬学会総会・学術大会（2005年9月16-17日、金沢）

#### 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

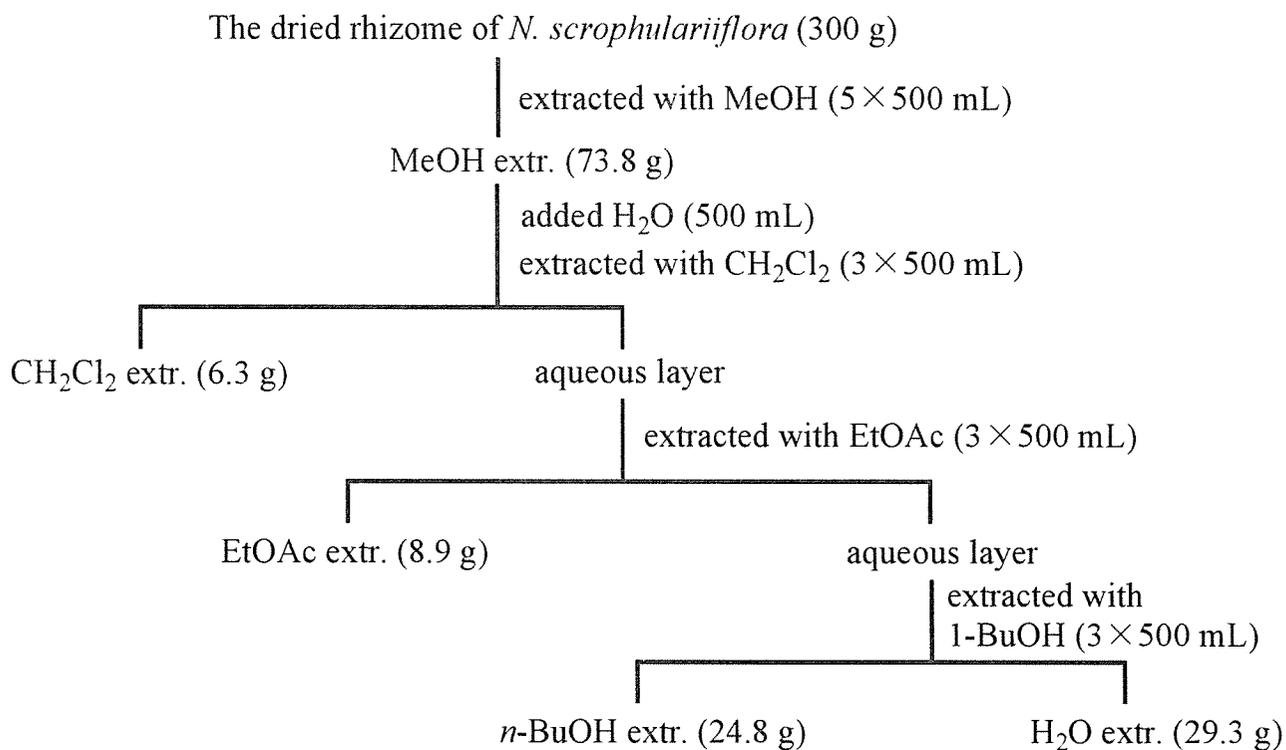


Chart 1. Procedures for extraction of the rhizome of *N. scrophulariiflora*

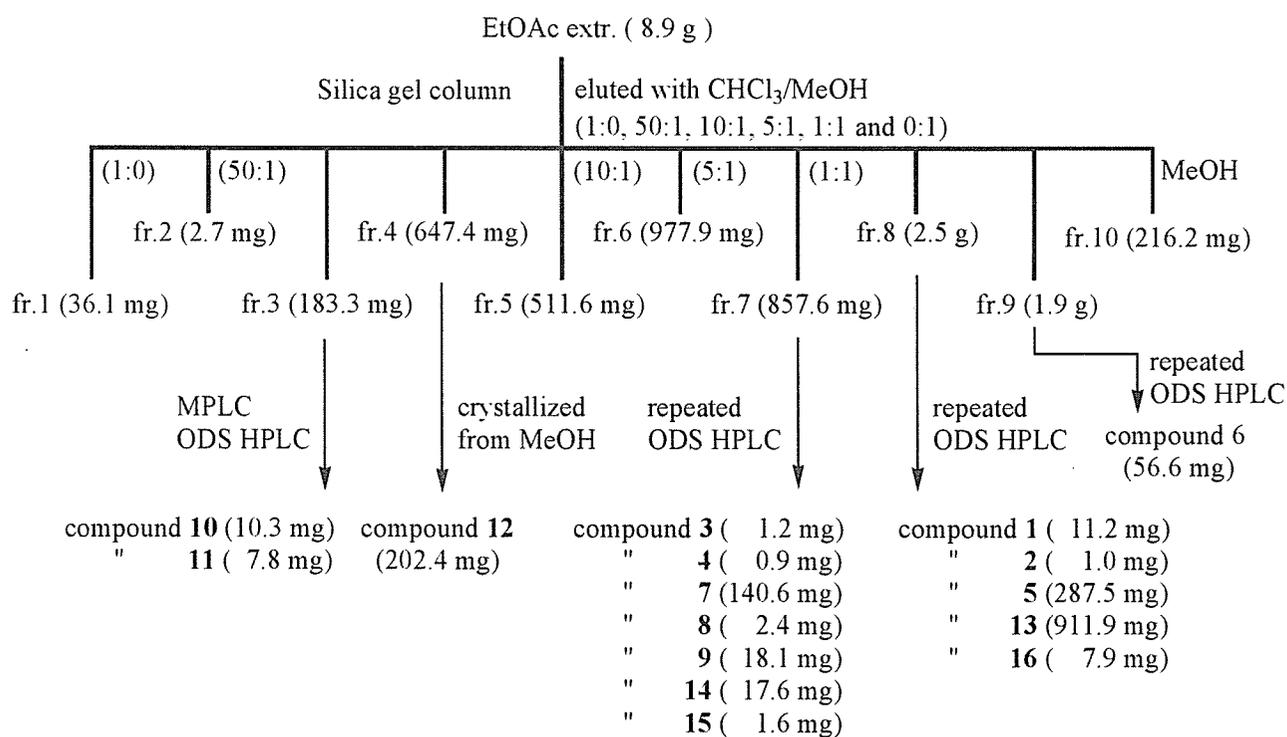


Chart 2. Procedures for separation of EtOAc extr.

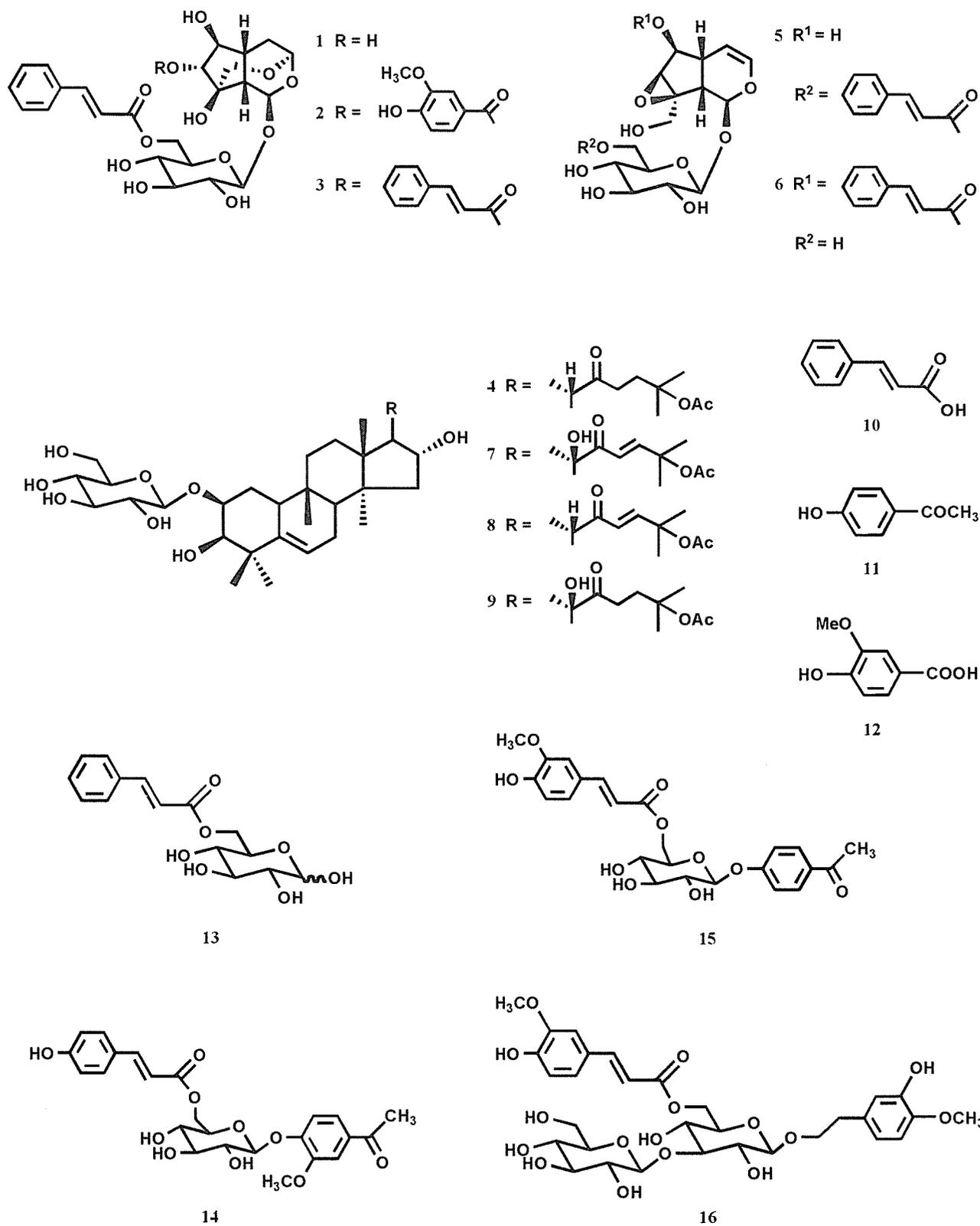


Figure 1.

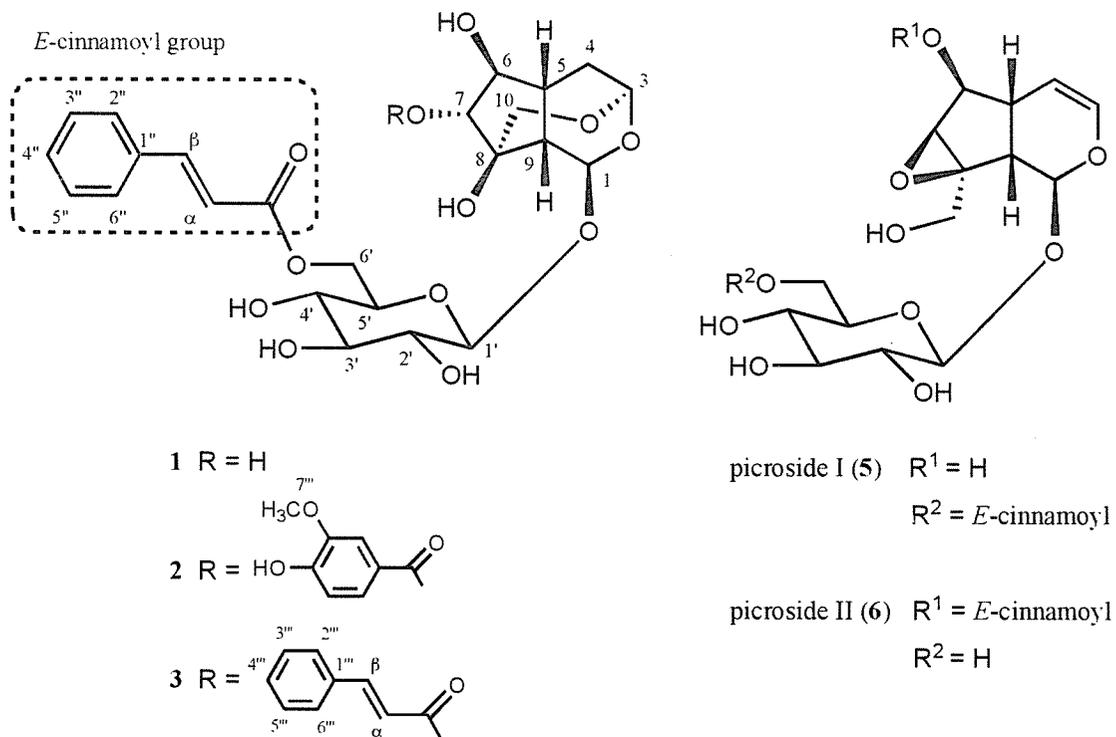


Figure 2.

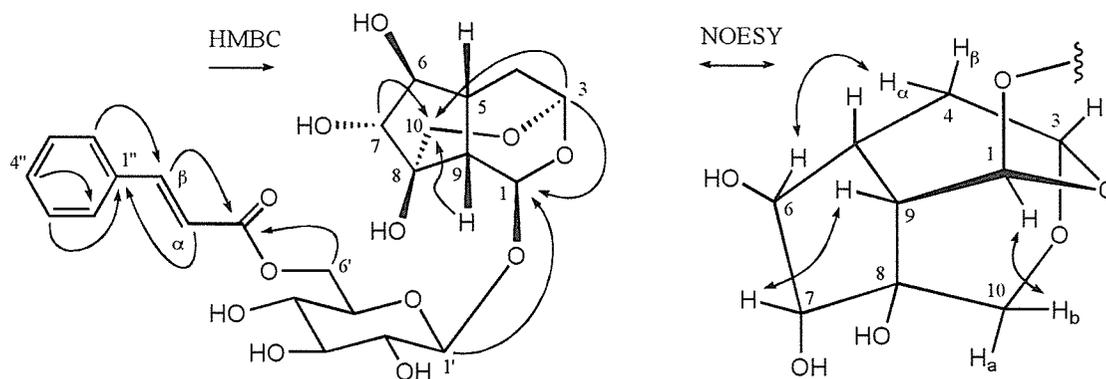


Figure 3. Selected HMBC and NOESY correlations for **1**

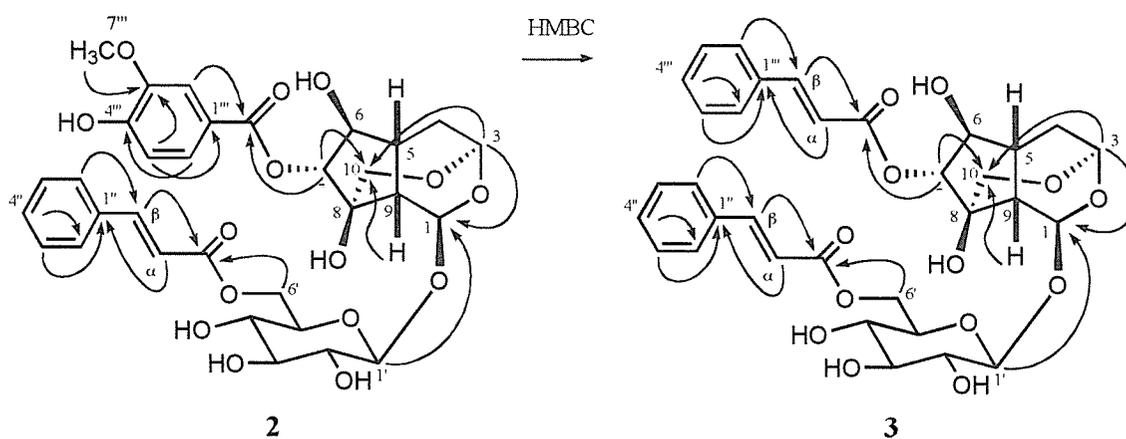
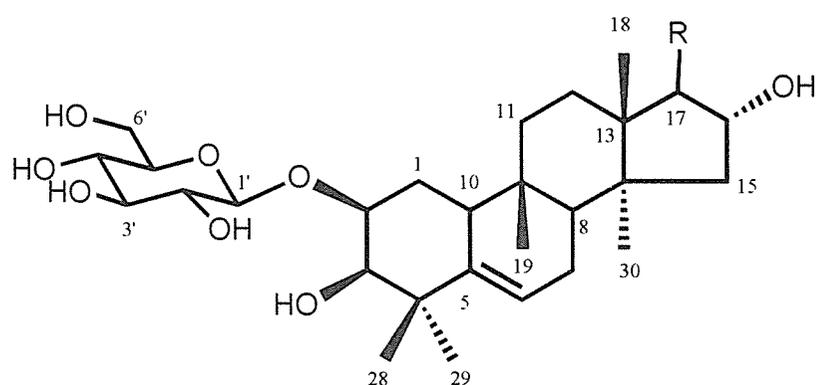


Figure 4. Selected HMBC correlations for **2** and **3**



	Posion	$\delta_C$	20	21	22	23	24	25	26	27
<b>4</b> R =	Compd <b>4</b>	50.3	17.4	217.6	37.0	35.6	83.1	26.2	26.2	
<b>7</b> R =	Compd <b>7</b>	81.1	25.1	205.4	122.9	151.1	80.8	26.5	26.8	
<b>8</b> R =	Compd <b>8</b>	47.1	17.8	207.5	127.6	151.1	80.9	26.7	26.6	
<b>9</b> R =	Compd <b>9</b>	81.4	25.5	216.8	35.9	32.7	83.1	26.3	26.2	

Figure 5.

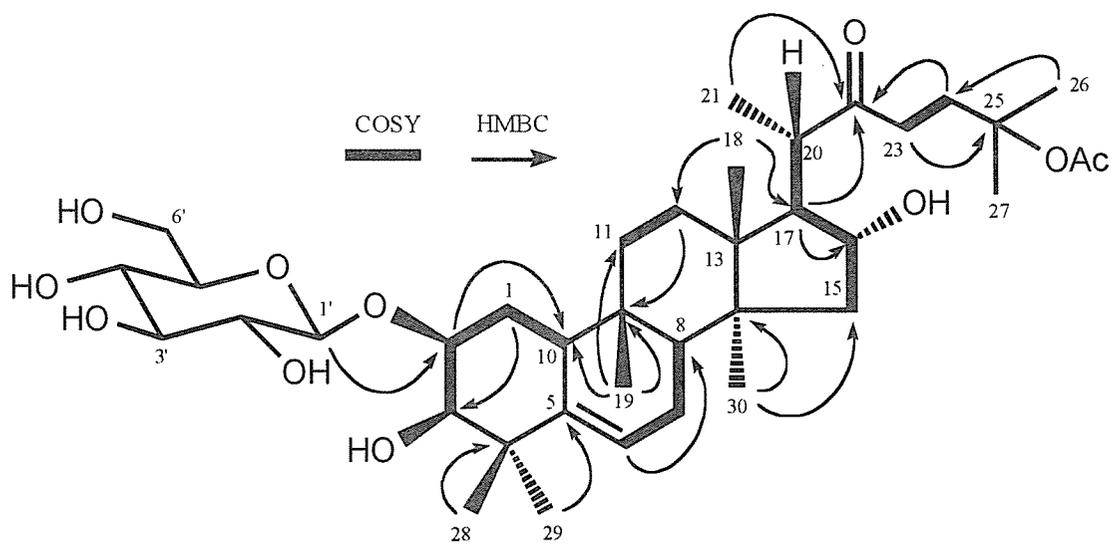


Figure 6. Selected COSY and HMBC correlations for 4

Table 1. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectral data for compounds **1**, **2** and **3** in CD<sub>3</sub>OD<sup>a</sup>

Position	<b>1</b> <sup>b</sup>		<b>2</b> <sup>c</sup>		<b>3</b> <sup>c</sup>	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>
1	93.5	5.49 (d, 1.8)	93.5	5.60 (d, 2.1)	93.3	5.59 (d, 2.1)
3	95.9	5.18 (d, 3.2)	96.0	5.33 (d, 2.9)	95.9	5.31 (d, 3.5)
4 α	34.8	1.58 (dd, 14.2, 3.3)	34.8	1.76 (dd, 13.8, 3.3)	34.8	1.73 (dd, 13.8, 3.2)
β		2.34 (dd, 13.8, 8.2)		2.50 (m)		2.48 (dd, 13.2, 8.6)
5	35.9	2.19 (ddd, 8.7, 8.3, 2.7)	35.0	2.33 (m)	34.8	2.31 (ddd, 9.4, 9.0, 2.9)
6	84.5	3.92 (dd, 8.2, 2.8)	83.1	4.13 (dd, 6.9, 2.9)	82.8	4.09 (dd, 6.9, 2.9)
7	74.7	3.95 (dd, 8.0, 1.4)	87.4	5.38 (d, 6.9)	87.0	5.33 (d, 7.5)
8	79.9		80.1		79.7	
9	48.0	2.47 (d, 10.1)	47.5	2.74 (d, 10.2)	47.3	2.71 (d, 10.0)
10 a	62.2	3.86 (dd, 11.9, 1.4)	62.0	3.91 (d, 12.7)	61.8	3.88 (d, 10.9)
b		3.48 (dd, 12.4, 1.8)		3.63 (d, 12.0)		3.41 (dd, 5.5, 2.0)
1'	99.1	4.63 (d, 8.3)	99.0	4.74 (d, 8.0)	98.9	4.74 (d, 7.7)
2'	74.6	3.12 (dd, 9.1, 7.8)	74.7	3.23 (m)	74.6	3.23 (dd, 9.2, 8)
3'	78.0	3.29 (m)	78.0	3.40 (m)	77.9	3.39 (m)
4'	71.6	3.31 (m)	71.6	3.41 (m)	71.4	3.40 (m)
5'	75.6	3.46 (m)	75.5	3.57 (m)	75.5	3.56 (m)
6' a	64.8	4.43 (dd, 11.9, 1.8)	64.7	4.53 (dd, 12.1, 2.1)	64.6	4.53 (dd, 12.0, 2.3)
b		4.24 (dd, 11.9, 5.5)		4.34 (dd, 12.0, 5.5)		4.34 (dd, 12.0, 5.7)
1''	135.7		135.7		135.6	
2''	129.3	7.52 ( - <sup>d</sup> )	129.3	7.62 ( - <sup>d</sup> )	129.2	7.62 ( - <sup>d</sup> )
3''	130.0	7.31 ( - <sup>d</sup> )	130.0	7.39 ( - <sup>d</sup> )	129.9	7.42 ( - <sup>d</sup> )
4''	131.6	7.31 ( - <sup>d</sup> )	131.5	7.38 ( - <sup>d</sup> )	131.4	7.39 ( - <sup>d</sup> )
5''	130.0	7.31 ( - <sup>d</sup> )	130.0	7.39 ( - <sup>d</sup> )	129.9	7.42 ( - <sup>d</sup> )
6''	129.3	7.52 ( - <sup>d</sup> )	129.3	7.62 ( - <sup>d</sup> )	129.2	7.62 ( - <sup>d</sup> )
α	118.6	6.49 (d, 16.1)	118.6	6.59 (d, 16.0)	118.5	6.59 (d, 16.0)
β	146.4	7.61 (d, 16.1)	146.6	7.72 (d, 15.9)	146.5	7.72 (d, 16.1)
CO	168.5		168.5		168.5	
1'''			122.1		135.6	
2'''			113.7	7.59 (d, 1.9)	129.2	7.62 ( - <sup>d</sup> )
3'''			148.9		129.9	7.42 ( - <sup>d</sup> )
4'''			153.4		131.4	7.39 ( - <sup>d</sup> )
5'''			116.0	6.85 (d, 8.2)	129.9	7.42 ( - <sup>d</sup> )
6'''			125.3	7.63 (dd, 8.2, 2.1)	129.2	7.62 ( - <sup>d</sup> )
OMe			56.4	3.89 (s)		
CO			168.1			
α					118.5	6.63 (d, 16.0)
β					146.7	7.76 (d, 16.0)
CO					168.5	

<sup>a</sup> Multiplicity and *J* values in Hz are given in parentheses. <sup>b</sup> Measured at 200 MHz (<sup>13</sup>C NMR) and 800 MHz (<sup>1</sup>H NMR). <sup>c</sup> Measured at 125 MHz (<sup>13</sup>C NMR) and 500 MHz (<sup>1</sup>H NMR). <sup>d</sup> Multiplicity was not determined due to overlapping of the signals.

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

カガミグサ (*Ampelopsis japonica* Makino) の成分研究

専ら医薬品として区分されるカガミグサの成分化学面での安全性を評価する目的で、日本において入手したブドウ科のカガミグサ (*Ampelopsis japonica* Makino) の成分研究を行い、リグナン配糖体、スチルベン系化合物、カテキン類などの化合物を単離し、それらの構造を決定した。今回の研究では、本植物を医薬品に区分すべきであると判断するような、強い生理活性を予想させる化合物は得られなかった。

協力研究者

川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

金 益輝 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

A. 研究目的

人が経口的に服用する物が薬事法に規定する医薬品に該当するか否かについては、昭和46年6月1日付、薬発第476号厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」<sup>注1</sup>（以下、食薬区分）により判断し、医薬品と判断された成分本質（原材料）については、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」（専ら医薬品リスト）に例示として掲げられている（注：大改正 平成13年3月27日付、医薬発第243号厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の改正について」、一部改正 平成14年11月15日付、医薬発第1115003号厚生労働省医薬局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一

部改正について」、平成16年3月31日付、薬食発第0331009号厚生労働省医薬品局長通知「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」）。国立医薬品食品衛生研究所を中心とする研究班では、平成15年度より、上記「専ら医薬品リスト」に記載された品目について、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性の評価に関する研究」として、これらの品目について、まず文献調査を行い、最終的に5段階の評価を行っている。

カガミグサは、専ら医薬品リストにおいて、部位は根と規定されているが、どのような植物（学名）であるかは記述がない。また、和名カガミグサは日本薬局方等の公定書には未記載である。しかし、専ら医薬品リストの参考文献として上記通知で指定されている、赤松金芳著<sup>1)</sup>の「新訂和漢薬」では、和名カガミグサはブドウ科 (Vitaceae) の植物 *Ampelopsis japonica* Makino とされており、生薬ビャクレンの基原植物として記載されて

いる。また、同植物は、同様に参考文献に指定されている中薬大辞典では記載がない。他方、通知で指定されていないが、刊行が比較的新しく幅広く和漢薬について記載があり、研究班で参考としている難波恒雄著<sup>2)</sup>の「和漢薬百科図鑑」では和名カガミグサは生薬ビャクレンの基原植物として以下のように記載されている。「カガミグサ *A. japonica* (Thunb.) (= *A. serianaefolia* Bunge) の肥大根を乾燥したもの。この植物は中国原産でわが国には享保年間に渡来し、各地で栽培されているが、日本産の市場品はない。通常、肥大根を斜め切りした飲片として市販されている。」

さらに本書によれば、中国西北地方ではブドウ科の同属 *A. aconitifolia* Bunge の肥大根を、貴州、四川省ではガガイモ科 (Asclepiadaceae) の *Cyananchem auriculatum* Royle やコイケマ *C. wilfordi* Hemsl. の根を、また福建、広西省ではウリ科 (Cucurbitaceae) スズメウリ属の *Melothria heterophylla* (Lour.) Cogn. や *M. indica* Lour. の根をビャクレンまたは土ビャクレンと称し薬用とすることが記載されており、生薬ビャクレンは複数の基原植物由来のものが存在することが判明している。

研究班では、専ら医薬品「カガミグサ」はその通知の参考文献からブドウ科 (Vitaceae) の植物 *Ampelopsis japonica* Makino であると定義している。本植物についての成分研究はこれまでに殆ど行われていない。城西大学の加藤ら<sup>3,4)</sup>は、国内に流通する生薬「白剣」及びビャクレンについて、市場品の基原種に関する検討を含めて成分研究を行っている。その結果、「白剣」とビャクレンは同一の生薬で、生薬は3タイプに分類され、タイプ I は bryonolic acid と 2,4-ethylsterols を含み、ウリ科

(Cucurbitaceae) のもの、タイプ II は momordin 類等を含みウリ科 *Momordica* 属のもの、タイプ III の成分は、現在検討中と記述しているが、それ以降報告がない。

他方、中国の Yu ら<sup>5)</sup>、Guo ら<sup>6)</sup>は、*A. japonica* より gallic acid 及び4種のガロイルグルコース並びに *n*-pentacosane、tiacontanoic acid、octacosanoic acids、 $\beta$ -sitosterol、stigmasterol、quercetin、stigmasterol- $\beta$ -D-glucoside の単離を報告している。

最近になって、韓国 Kyung Hee 大学の Kim ら<sup>7)</sup>は、*A. japonica* より momordin I の単離を報告している。しかしながら、本化合物はウリ科 *Momordica* 属に特徴的な成分であり、加藤ら<sup>3,4)</sup>の HPLC を用いた上記の成分研究で報告がないこと及び、ビャクレンとして、日本、中国で *Momordica* 属のものが流通していることを考慮すれば、*Momordica* 属のものを誤同定した可能性が非常に高い。

本研究では、このような背景の下、専ら医薬品として区分されるカガミグサ *Ampelopsis japonica* Makino (ブドウ科) について、食薬区分の見直しが必要かどうか成分化学的な情報を入手する目的で、本植物の成分探索を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

カガミグサは(株)内田和漢薬より入手した。オープンカラムの担体は、Kieselgel 60 (Merck 製)を用いた。NMR 溶媒は Methanol-*d*<sub>4</sub> 99.8% (Isotec 製)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

分取 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-8A system (ポンプ: LC-8A, 紫外可視検出器: SPD6AV, カラムオープン: TOSO RE8000) に、インテグレーターとして Shimadzu CR-5A を接続したものを用いた。NMR スペクトルは JEOL ECA-500 及び ECA-800 を用いた。<sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>C-NMR の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値 (ppm) で示した。Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY)、Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)、Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 及び Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) スペクトルの測定には磁場勾配システムを用いた。また、単離した化合物の質量分析 (FAB) は、JMS-MS700 (JEOL) に直接導入して測定した。

#### 化合物の分画

##### 1. カガミグサの抽出及び分画

カガミグサ (*A. japonica*) 500 g を粉碎した。これをメタノール 1.5 L 用いて温浸し、この操作を三回繰り返す、抽出物を濃縮乾固後、39.12 g を得た。抽出物を蒸留水 500 mL に懸濁し、ジクロロメタン (5×500 mL)、酢酸エチル (5×500 mL)、1-ブタノール (3×500 mL) を加えて順次分配した。各分画を濃縮乾固後、ジクロロメタン移行画分 4.58 g、酢酸エチル移行画分 2.92 g、ブタノール移行画分 10.56 g、水移行画分 21.05 g を得た (Chart 1)。

##### 2. ジクロロメタン移行画分の分離・精製

ジクロロメタン移行画分 (4.58 g) をシリカゲル 100 g を用いてカラムクロマトグラフィー (φ

3.0×27 cm) を行い、fr. 1<sup>~</sup>8 を得た。fr. 1 から β-sitosterol + 脂肪酸、fr. 2<sup>~</sup>7 から β-sitosterol、β-sitosterol-3-O-glucoside、fr. 1<sup>~</sup>8 から脂肪酸が得られたが脂肪酸の明確な構造は確認していない。

##### 3. 酢酸エチル移行画分の分離・精製

酢酸エチル移行画分 (2.92 g) をシリカゲル 100 g を用いてカラムクロマトグラフィー (φ 3.0×27 cm) を行い、fr. 1<sup>~</sup>10 を得た。fr. 4 (284.6 mg) は 40% メタノールを移動層に用い HPLC-ODS カラムクロマトグラフィーに付加し、化合物 **2** (8.5 mg) を得た。fr. 5 (103.9 mg) は 35% メタノールを移動層に用い HPLC-ODS カラムクロマトグラフィーに付加し、化合物 **3** (54.1 mg)、化合物 **4** (25.5 mg) を得た。fr. 6 (130.2 mg) は 30% メタノールを移動層に用い HPLC-ODS カラムクロマトグラフィーに付加し、化合物 **1** (5.2 mg)、**5** (4.0 mg)、**6** (2.6 mg) を得た。

##### 4. 水移行画分の分離・精製

水移行画分 (21.05 g) に水 70 mL を加える。この溶液にメタノール 30 mL を少しずつ加えていき、無定形結晶と溶液をろ過した。無定形結晶 (291.0 mg) をシリカゲル 45 g を用いてカラムクロマトグラフィー (φ 2.5×17 cm) を行い fr. 1<sup>~</sup>4 を得た。Fr. 1<sup>~</sup>4 を順層 TLC (クロロホルム/メタノール/水=2:1:0.1)、10% 硫酸発色、標準品と比較した結果、グルコースとスクロースと確認された。

#### C. 研究結果

##### 1. 化合物 **1**

化合物 **1** は無色無定形物質として得られ、FAB-マススペクトルにおいて m/z 491 に [M-H]<sup>-</sup> 疑似フラグメントピークを示した。<sup>1</sup>H-NMR スペク

トルでは2つのメトキシ基 ( $\delta$  3.79、3.80)、5つの二重結合上のプロトン ( $\delta$  6.77、6.73、6.64、6.62、6.16) のシグナルが観測された。また、*meta*カップリングしている1,2,4-置換ベンゼン環 [( $\delta$  6.77、1H、d、 $J=1.8$  Hz)、( $\delta$  6.73、1H、d、 $J=7.8$  Hz)、( $\delta$  6.62、1H、dd、 $J=7.8$ 、1.8 Hz)] の存在が示唆された (Table 1)。更に  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて12本の二重結合上のカーボン ( $\delta$  148.9、147.2、145.9、145.2、138.6、134.3、129.1、123.1、117.4、116.1、114.3、112.4) 及びペントース ( $\delta$  105.8、77.9、75.0、71.3、66.9) と推測されるシグナルを含む合計25本のシグナルが観測された (Table 1)。H-H COSY スペクトルでは1位 [ $\delta$  4.06 (d、11.0)] と2位 [ $\delta$  1.84 (t、10.8)]、2位と3位 [ $\delta$  2.06 (m)]、3位と4位 [ $\delta$  2.83 (dd、16.0、11.0)、2.79 (dd、16.0、5.2)] の間にクロスピークが観測された。また、2位と3位のプロトンからそれぞれ2a位 [ $\delta$  3.97 (dd、9.8、2.6)、3.21 (dd、9.6、3.2)] と3位に結合しているメチレンプロトン [ $\delta$  3.75 (dd、11.0、3.7)、3.70 (dd、11.0、6.0)] との間に相関が観測された。また、2'位 [ $\delta$  6.77 (d、1.8)]、5'位 [ $\delta$  6.73 (d、7.8)] と6'位 [ $\delta$  6.62 (d、7.8、1.8)] の間にそれぞれクロスピークが観測された。HMBC スペクトルでは、1位のプロトンと3つの二重結合上の炭素 [1'位、2'位、6'位 ( $\delta$  138.6、114.3、123.1)] との間に相関が観測され、1,2,4-置換ベンゼン環は1位の炭素に結合していると考えられた。また、メトキシ基プロトン  $\delta$  3.79 及び  $\delta$  3.80 と4級炭素 ( $\delta$  147.2、C-6) 及び ( $\delta$  148.9、C-3') との相関が観測されたことから、メトキシ基は6位と3'位の炭素にそれぞれ結合していると考えられた (Figure 2)。

一方、結合糖については、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル

の化学シフト値 ( $\delta$  105.8、77.9、75.0、71.3、66.9) より xylose と推定し、HMBC スペクトルにおいて糖のアノマープロトン ( $\delta$  4.04) と2a位の炭素間に相関が観測されたことから、糖は2a位の酸素原子に結合していることがわかった

これらのスペクトルデータの解析結果を基に文献検索したところ、マツブサ科 (Schisandraceae) のマツブサ (*Schisandra nigra* Max.) 等より単離、構造決定されている schizandriside<sup>8)</sup> と推定された。 (Figure 1)。本化合物はブドウ科 (Vitaceae) のカガミグサ (*A. Japonica*) からは初めての単離報告である。

## 2. 化合物 2

化合物 2 は無色無定形物質として得られ、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて  $\delta$  6.93 (d、 $J=16.3$  Hz) 及び  $\delta$  6.78 (d、 $J=16.3$  Hz) に1組のトランスカップリングしたオレフィンプロトンを含む9個の二重結合上のプロトン [ $\delta$  7.33 (x2)、6.93、6.78、6.74、6.43 (x2)、6.14] のシグナルが観測された。また、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルより14本の二重結合上のカーボン ( $\delta$  158.3、157.0、140.0、129.1、128.1、127.5、125.7、115.1、104.4、101.3) と推測されるシグナルが観測された (Table 2)。 $^1\text{H}$ -及び  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの化学シフト値の帰属と各種スペクトルデータの比較により、タデ科 (Polygonum) のイタドリ (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) より単離、構造決定されている resveratrol<sup>9)</sup> と推定された (Figure 1)。

## 3. 化合物 3 - 6

化合物 3 - 6 は無色無定形物質として得られ、 $^1\text{H}$ -及び  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの化学シフト値の帰属と各種スペクトルデータの比較により、

(+)-catechin (3)、(-)-epicatechin (4)、(+)-gallo catechin (5)、(-)-catechin gallate (6) などのカテキン類<sup>10,11)</sup>であると推定された (Figure 1)。

#### D. 考察

今回の成分研究においてリグナン配糖体、スチルベン系化合物、カテキン類が単離、構造決定された。そのうち、リグナン配糖体である化合物 1 (schizandriside) はブドウ科 (Vitaceae) のカガミグサ (*A. Japonica*) からは初めて単離された。

#### E. 結論

専ら医薬品として使用される成分本質 (原料) の有効性および安全性等の評価に関する研究の研究班の検討により、詳細な成分検索が必要と判断がなされたカガミグサの含有成分を明らかにすること目的に成分研究に着手した。その結果既知化合物 schizandriside (1)、resveratrol (2)、(+)-catechin (3)、(-)-epicatechin (4)、(+)-gallo catechin (5)、(-)-catechingallate (6)、 $\beta$ -sitosterol、 $\beta$ -sitosterol-3-O-glucoside を単離、構造決定した。今後は未着手の分画の化合物を単離、精製する予定である。

#### 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無い。

#### G. 研究発表

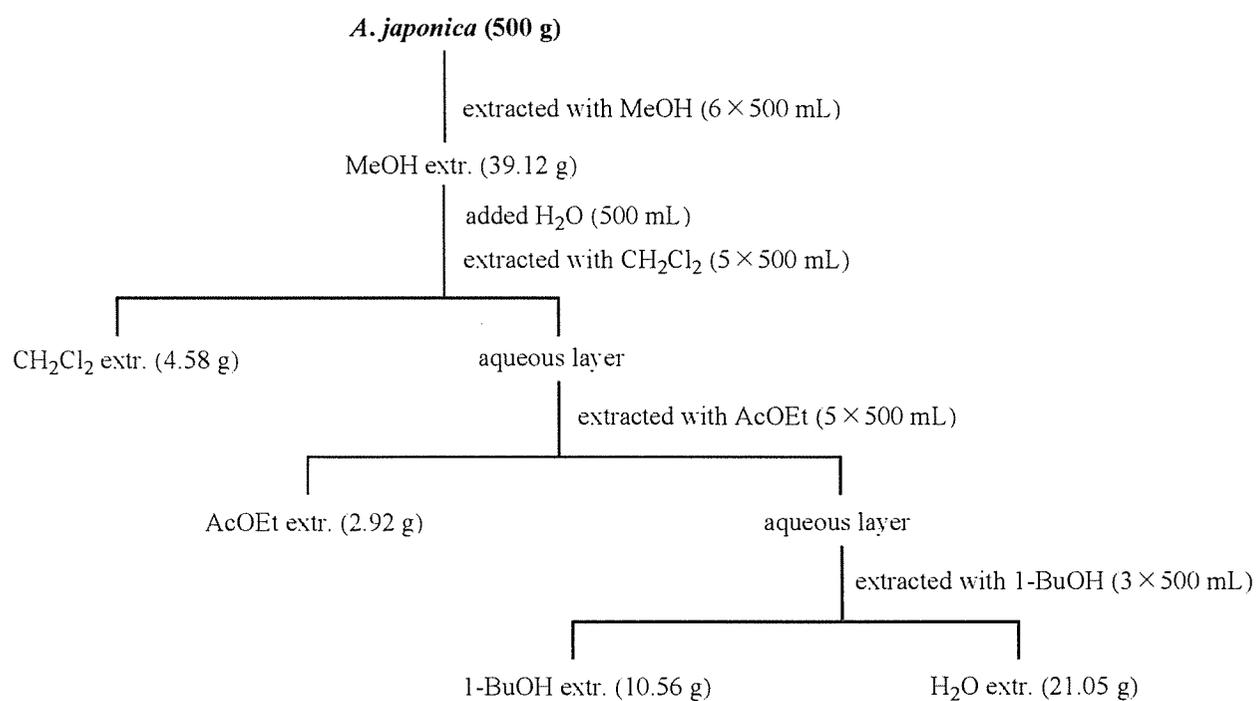
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

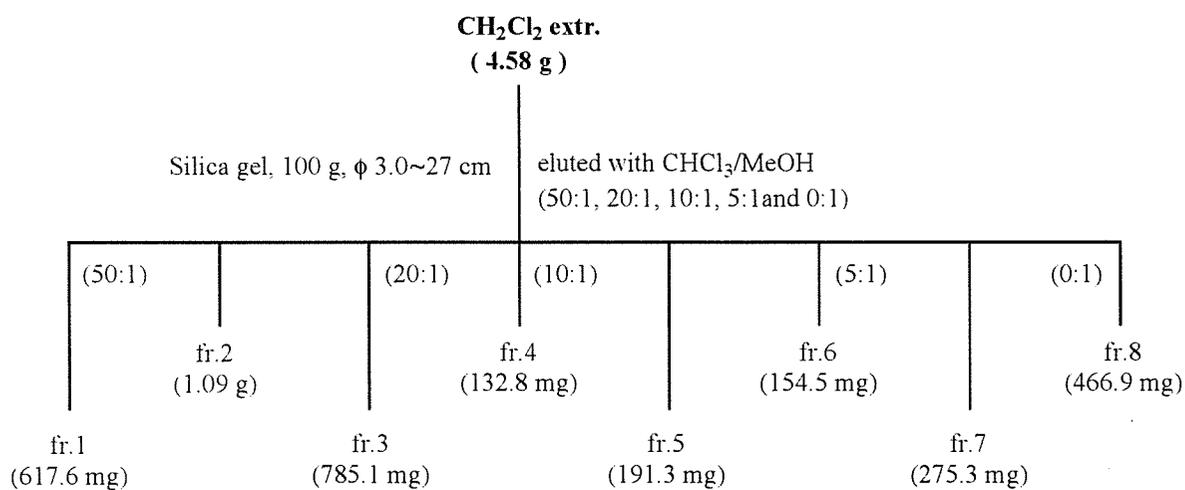
1. 取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### 参考文献

1. 赤松金芳著 新訂和漢薬 p 246 医歯薬出版
2. 難波恒雄著 和漢薬百科図鑑 p 66 保育社
3. T. Kato, F. Yamane, Y. Morita, *Natural Medicines* **49** (4), 478-483 (1995)
4. T. Kato, F. Yamane, Y. Morita, *生薬学雑誌* **46** (4), 302-309 (1992)
5. W. Yu, X. Chen, L. Yang, Y. Li, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* **7** (1) 15-18 (1995) CA. 123: 138806
6. L. Guo, Y. Lu, S. Chen, *Guangdong College Pharmacy* **12** (3), 145-147 (1996) CA. 125: 243164
7. Kim. J. H., Ju. E. M., Lee. D. K., Hwang. H. J. *Anticancer Research* **22** (3) 1885-1889 (2002)
8. M. Takani, K. Ohya, K. Takahashi, *Chem. Pharm. Bull.* **27** (6) 1422-1425 (1979)
9. G. A. Jayatilake, H. Jayasuriya, E. S. Lee, R. L. Geahlen, N. M. Koonchanok, C. L. Ashendel, J. L. Mclaughlin, C. J. Chang, *Journal of Natural Products* **56** (10) 1805-1810 (1993)
10. G. Nonaka, O. Kawahara, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.* **31** (11) 3906-3914 (1983)
11. N. S. Kumar, M. Rajapaksha, *J. Chromatogr: A* **1083** 223-228 (2005)



**Chart 1. Procedures for extraction of the dried rhizome of *A. japonica***



**Chart 2. Procedures for separation of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extr.**





**Table 1.**  $^1\text{H}$  - (800 MHz) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (200 MHz) Chemical Shifts and Heteronuclear Multiple Bond Correlations (HMBC) of Compound **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}^{\text{a}}$

	$^1\text{H}$		$^{13}\text{C}$	HMBC
1	4.06	d (11.0)	47.9	2, 2a, 4a, 8a, 1', 2', 6'
2	1.84	t (10.8)	45.9	1, 3
2a	3.21	dd (9.6, 3.2)	69.4	3
	3.97	dd (9.8, 2.6)		1
3	2.06	m	39.6	3- $\text{CH}_2\text{OH}$
3- $\text{CH}_2\text{OH}$	3.70	dd (11.0, 6.0)	65.1	3
	3.75	dd (11.0, 3.7)		3
4	2.79	dd (16.0, 5.2)	33.8	2, 3, 4a, 8a
	2.83	dd (16.0, 11.0)		4a
4a			129.1	
5	6.64	s	112.4	4, 6, 7, 8a
6			147.2	
6- $\text{OCH}_3$	3.79	s	56.4	6
7			145.2	
8	6.16	s	117.4	1, 4a, 6, 7
8a			134.3	
1'			138.6	
2'	6.77	d (1.8)	114.3	1, 3', 4', 6'
3'			148.9	
3'- $\text{OCH}_3$	3.80	s	56.5	3'
4'			145.9	
5'	6.73	d (7.8)	116.1	1', 3', 4'
6'	6.62	dd (7.8, 1.8)	123.1	1
1''	4.04	d (7.8)	105.8	
2''	3.18	t (8.3)	75.0	1''
3''	3.28	t (8.8)	77.9	4''
4''	3.44	m	71.3	
5''	3.10	t (11.0)	66.9	4''
	3.81	m		3'', 4''

<sup>a</sup>Multiplicity and  $J$  values in Hz are given in parentheses.

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

### アルニカ関連製品の分析

研究要旨 ヨーロッパの市場より入手したアルニカ関連製品について、*Arnica* 属全草試料との比較分析並びに、ヨーロッパ薬局方(EP)に対応した分析を行った。その結果、フランスの薬局で購入した 1 製品が、*Arnica* ではなく、EP の純度試験法で混入を制限している *Heterotheca inuloides* 由来のものである可能性が非常に高いことが明らかとなった。また、LC/MS の結果から、チェコで購入した別な 1 製品は、EP で規定している *Arnica montana* ではなく、*A. chamissonis* Less.. ssp. *foliosa* である可能性が示唆された。

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

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、外国市場で買い上げを行った製品の中から、アルニカ関連 9 製品を選択し、*Arnica* 属全草試料との HPLC による比較分析並びに、EP に対応した分析を行った。さらに、これらの製品について、LC/MS 及び GC/MS を用い、主成分について構造を推定するとともに、一部の製品について、その基原種を推定したので報告する。

#### 【A. 研究目的】

アルニカ(*Arnica montana* L., 英名: *Arnica*)は、キク科ウサギギク属の多年草で、欧州のイベリア半島、ピレネー山脈、アルプス、アペニン山脈北部及び欧州中部から北部の標高 1,000~2,800 m の高山帯に分布し、その花や根は外用の消炎、鎮痛薬として外傷や打撲傷、皮膚炎などに用いられてきた西洋ハーブである<sup>1)</sup>。同植物の主二次代謝物としては、セスキテルペンやフラボノイドが報告されており<sup>2-4)</sup>。現在日本では、その全草が「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、ヨーロッパ薬局方(EP)では、*A. montana* L. 由来の ARNICA FLOWER 並びに ARNICA TINCTURE が規定されている。

本研究では、平成 15 年度「諸外国における未

#### 【B. 研究方法】

##### 試料及び試薬

*Arnica* 属全草試料(Ar-1, Ar-2, Ar-3)は、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より入手した。これらの植物は、*Arnica* 属植物であることは確認されているが、正確な基原種は不明である。アルニカ関連 9 製品 [Fig. 1. Sample 1: 薬草茶(チェコ), 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: 丸剤 30CH(フランス), Sample 6: ゲル(スイス), Sample 7: ゲル(フランス), Sample 8: 抽出液(スイス), Sample 9: 抽出液(フランス)]は、ブラハ、ジュネーブ、パリで購入した。このうち、Sample 1-3, 6, 7は薬局で、Sample 4, 5, 8, 9はホメオパシーの専門店で購入した製品である。また Sample 3-5, 7-9 にホメオパシー関連製品と考えられる *homöopathisches* あるいは、*homeopathique* の表示があった。これらの製品の写真を Fig. 1 に示した。

メタノールは 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。

#### *Arnica* 属全草試料との HPLC 比較分析

##### 試料の抽出

*Arnica* 属全草試料 0.5 g をメタノール(25 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  $\mu$ L を HPLC に供した。薬草茶 (Sample 1, 2) は 1 g をメタノール 20 mL で 2 時間抽出し、ろ液を濃縮乾固したのちメタノール 1 mL に溶解させ、その 10  $\mu$ L を HPLC に供した。錠剤及び丸剤 (Sample 3, 4, 5) は粉碎後 100 mg をメタノール 20 mL に懸濁させ 2 時間抽出し、ろ液を濃縮乾固したものをメタノール 1 mL に溶解させ、その 10  $\mu$ L を HPLC に供した。なお、Sample 6-9 は、その形状からメタノールによる抽出が困難であると考えられたことから行わなかった。

##### 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: CTO-10A) 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。

##### HPLC 条件

カラム: Merck 100PR 18 LiChroCart cartridge (4 x 250 mm, Merck 社製), ガードカラム: Merck 100PR 18 LiChroCart (4 x 4 mm), 移動相: A: 水, B: メタノール, 溶離グラジエント: 0分(45% B) - 22分(50% B) - 35分(60% B) - 37分(65% B) - 40分(85% B), 流速: 1 mL/min, 検出: 225 nm, カラム温度: 35°C.

##### EP 対応分析

##### TLC 分析

EP の ARNICA FLOWER 並びに ARNICA TINCTURE に規定されている純度試験に準拠した。<sup>5)</sup> 即ち、試料 2 g を精密に量り、これに 10 mL のメタノールを加え 60°C で 5 分間振盪抽出した後、ろ過したろ液を試験液とし、その 15  $\mu$ L をスポットした。入手した試料によっては、上記量での秤取が困難であったため同一比率になるようメタノール量を秤取量に合わせ抽出を行った。

展開溶媒: ギ酸(1容), 水(1容), メチルエチルケトン(3容), 酢酸エチル(5容) 混液

発色: A 液(10 mg/mL ジフェニルホウ酸アミノメチルエステル メタノール溶液), B 液(50 mg/mL ポリエチレングリコール 400 メタノール溶液), 105°C, 5分

A 液, B 液順次噴霧後、過熱発色し、UV365nm で観察した。

##### LC/PDA/MS 分析

試料は、EP の ARNICA FLOWER 並びに ARNICA TINCTURE に規定されている HPLC による成分含量測定法試験 (assay) に準拠した方法で調製した。即ち、試料 1 g を精密に量り、これに 50 mL の 50% メタノール溶液を加え、60°C で 30

分間振盪抽出を行った。冷後、ろ紙でろ過しろ液を集めた。残渣に 50 mL の 50% メタノール溶液を加え、同様に処理した。更にこの操作を繰り返し、ろ液を合わせ、減圧下 18 mL 程度まで濃縮した。濃縮液を 2mL の水で洗い込み、全量をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、20 分間放置した。その後、200 mL の酢酸エチル-ジクロロメタン等容混液中で流出し、得られた流出液を減圧下、濃縮乾固した。これを 20 mL の 50% メタノールに溶かし、中性酸化アルミナ末と 2 分間振盪混和後、ろ過し、ろ液を試験溶液とした。

LC/PDA/MS 条件は、EP の HPLC による成分含量測定法試験 (assay)<sup>5)</sup>を参考とし、同時に MS による化合物の同定が行えるように設定した。

LC/PDA/MS は LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム、MS 部に Waters LCT Premier oa-TOF 型マス検出器を用いた。

カラム: YMC-Pack Pro C18 RS (2.0 x 250 mm, ワイエムシー社製)。移動相: A: 水、B: メタノール。溶離グラジエント: 0 分 (50% B) - 50 分 (75% B)。流速: 0.2 mL/min。PDA 検出波長: 200-500 nm。カラム温度: 室温。イオン化法: ESI-positive mode。キャピラリー電圧: 3.0 kV。コーン電圧: 50 V。ソース温度: 100°C。脱溶媒温度: 300°C。質量範囲: 100-1,000 amu。

GC/MS による構造推定

#### GC/MS 条件

GC/MS は島津製作所製 GCMS-QP2010 システムを用いた。

カラム: DB-1 (内径 0.25 mm x 30 m, 膜厚 0.25 μm), カラムオープン温度: 120°C (0 分) - 8°C/分 - 280°C (12 分)。気化室温度: 120°C (0 分) - 60°C/分 - 240°C (30 分)。インターフェース温度: 280°C, イオン源温度: 200°C, キャリアガス: He (106.4

kPa)。カラム流量: 1.30 mL/min (線速度一定)。注入量: 1.0 μL (スプリット)。

### 【C. 研究結果】

*Arnica* 属全草試料との HPLC 比較分析

*Arnica* 属全草試料のメタノール抽出物を HPLC に供したところ、3 種の試料においてピークの大きさは異なるものの、保持時間 7.3 分 (ピーク A)、10.2 分 (ピーク B)、17.3 分 (ピーク C)、18.4 分 (ピーク D)、19.4 分 (ピーク E) の 5 本の主ピークが観察された (Fig. 2)。さらに、アルニカ関連製品を同条件で分析したところ、Sample 1 のメタノール抽出物からは、ピーク C~E と保持時間が同一のピークが観察された。他方、Sample 2 のメタノール抽出物からはこれらのピークは観察されなかった。また、Sample 3、4、5 のメタノール抽出物は、高極性化合物を若干含むものの、本条件では、保持時間 10 分以降、sample3 の 31 分付近のピークを除いて、殆どピークが観測されなかった (Fig. 3)。

EP 対応分析

#### TLC 分析

EP に準拠した純度試験法で *Arnica* 属全草試料並びにアルニカ関連製品について TLC 分析を試みたところ、Sample 2 の薬草茶において、ルチンの R<sub>f</sub> 値に一致する同様の黄緑色の蛍光を発するスポットを認めた。他方、他のものからは、同様のスポットは、検出されなかった (Fig. 4)。

#### LC/PDA/MS 分析

EP に準拠した方法で調製した *Arnica* 属全草試料並びにアルニカ関連製品について、LC/PDA/MS を用いて分析した。EP では、サントニンの保持時間以降の UV225 nm で観測されたピークの合計面積をセスキテルペンラクトン類に由来するものとして、ジヒドロヘレナリンチグリニン酸エステルのもの

に換算して成分含量を規定している。本系では、サントニンは、約 8 分に検出される。従って、それ以降のクロマトグラムを Fig.5 に示した。

UV 225 nm で検出したクロマトグラムにおいて、Sample 1, 2, 6, 8, 9 の抽出液で、複数のピークが検出された (Fig.5)。特に、Sample 1 由来のクロマトグラムでは、全草試料由来のものと同じ保持時間 (13 分～15 分) に、特徴的な 3 本のピークが検出された。他方、Sample 2 由来のクロマトは、全草試料のものとは全く異なった。Sample 6 及び 9 では、保持時間 13.7 分前後に、強いピークが観察され、標準試料並びに Sample 1 の 3 本のピークのうちの 1 本である可能性が示唆された。

次に、ARNICA FLOWER 中に存在するヘレナリン (1, R=H) 及び ジヒドロヘレナリン (2, R=H) のカルボン酸エステル類 (Fig.6) の Na 付加イオンに相当する  $m/z = 367, 369$  でマスクロマトグラムを作成した (Fig. 7)。その結果、*Arnica* 属全草試料及び、Sample 1, 7, 9 で、ほぼ同一の保持時間 (17.5 分, 19.5 分) にそれぞれ  $m/z = 367, 369$  のピークが観測された。他方、Sample 2 では、全草試料と同一の保持時間を持つ明確なピークはなく、Sample 6 では、全くピークが検出されなかった。

次に、UV 225 nm で Sample 1 及び全草試料に観測された特徴的な 3 本のピーク (Fig.5, 保持時間 13～15 分) について化合物情報を得るため、3 ピークについてマススペクトルを作成した。その結果、全てのピークで  $m/z 385$  が疑似イオンピークとして観測され (Fig. 8)、高分解能測定の結果より分子式  $C_{20}H_{26}O_6Na_1$  が得られた。

#### GC/MS 分析

TLC 分析用試料溶液について GC/MS 分析を試みた。その際、TIC だけでなく、Willuhn らによる報告をもとにジヒドロヘレナリンカルボン酸エステル類 ( $m/z 246, 231$ ) 及びヘレナリンカルボン酸エ

ステル類 ( $m/z 244, 216$ ) のフラグメントピークに基づく抽出マスクロマトグラムを作成した (Fig.9)。その結果、Sample 1, 9 の抽出液において、アルニカに含有するセスキテルペンラクトン体由来の可能性が考えられる  $m/z 216, 244, 231, 246$  に一致するフラグメントを示すピークが検出された (Fig. 9)。他方 Sample 3-8 では、これらのフラグメントピークは全く観測されなかった。さらに Sample 2 の薬草茶については、これらのピークは非常に弱く、TIC で観測されるピークと一致したものはほとんどなかった。そこで Sample 2 について、TIC で観測される主ピークについて、NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database 検索を行ったところ、*cadalene*, *carryophyllen oxide*, *7-hydroxycadalene* に一致するマススペクトルを示すピークが検出された。さらに、文献をもとに解析を行ったところ、*4-methoxyisocadalene*, *7-hydroxy-3, 4-dihydrocadalene* と考えられるピークが検出された (Fig 10)。

#### 【D. 考察】

*Arnica* 属全草試料との HPLC 比較分析において、Sample 1 は、全草試料と同様のピークが観測され、*Arnica* 属由来のものである可能性が示唆された。他方、Sample 2 は、全くピークパターンが異なり、他の植物由来である可能性が示唆された。さらに、EP 準拠の TLC 分析では、異物として混入の恐れがある植物として規定している *Heterotheca inuloides* で検出されるベキスポットが検出された。本展開溶媒は、フラボノイド配糖体検出用のもの<sup>6)</sup>で、ケルセチン、ルテオリン、ケルシトリン、ルチン等の分離分析が可能であるが、本システムにおいて検出されたものは、標品との比較からルチンであるものと考えられる。入手した *Arnica* 属全草試料は、花期を過ぎたものであったため、花をほとんど欠いた地上部で、単純に比較は出来ないが、こ