

Fig. 3 呈味物質および既存添加物苦味料の味パターンの分類(2)

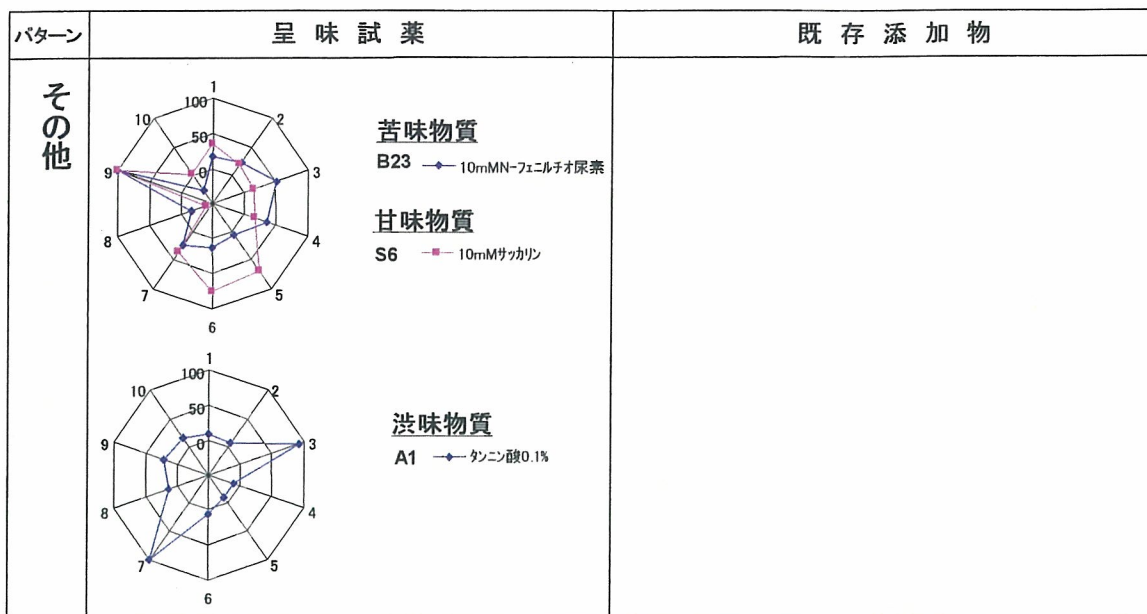
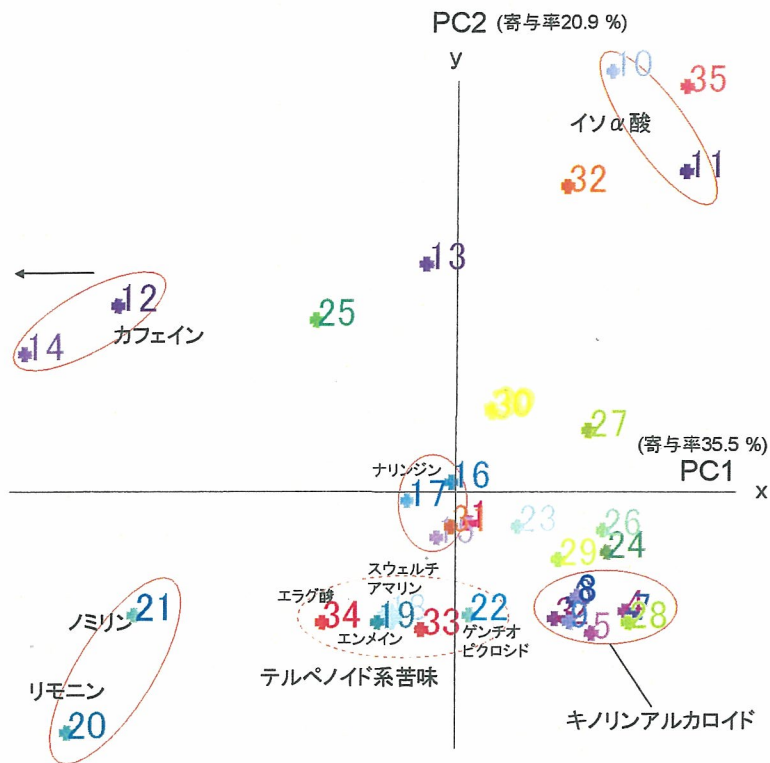
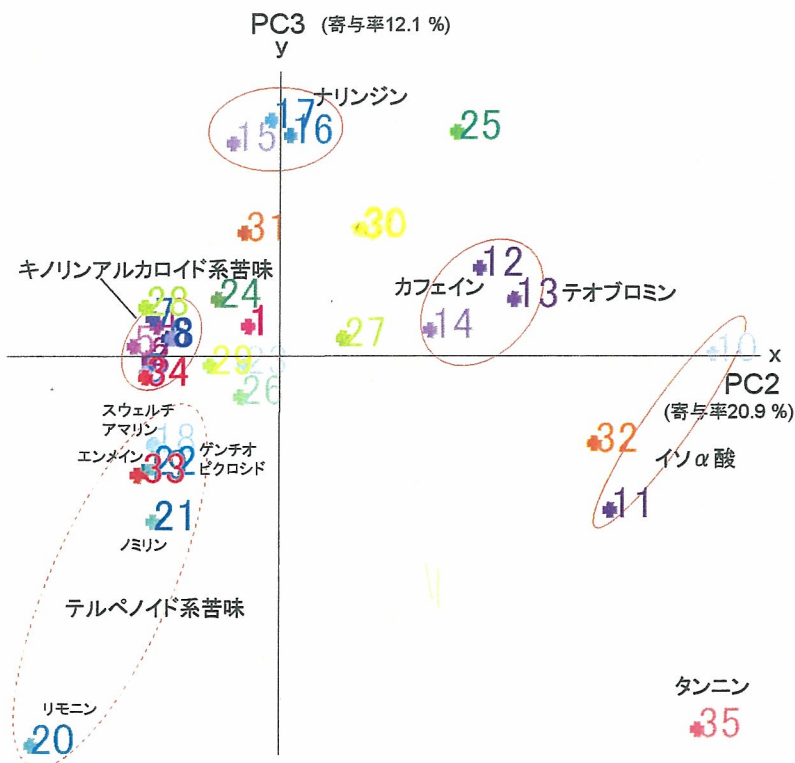


Fig. 4 呈味物質および既存添加物苦味料の味パターンの分類(3)



1	標準液 (10mM KCl)	19	エンメイン
2	キノリン硫酸塩二水和物	20	リモニン
3	シコニン硫酸塩水和物	21	ノミリン
4	キノシン	22	ゲンチオピクロシド
5	キノニン塩酸塩一水和物	23	クアニン
6	キノニン塩酸塩二水和物	24	食添ジャマカシア抽出物
7	キノン	25	アンドログラフィド
8	シコニン	26	食添キオン抽出物
9	ベルバリン塩酸塩	27	食添カゴメキ抽出物
10	イソα酸	28	食添マンダク抽出物
11	食添イソα苦味酸	29	食添イソ抽出物
12	カフェイン	30	安息香酸ナリウム
13	テオブロミン	31	5-デオキシ-5-メチルチオアデニン
14	食添カフェイン	32	N-フェニルチオ尿素
15	ガリギン	33	没食子酸
16	食添ガリギン(A)	34	エラグ酸二水和物
17	食添ガリギン(B)	35	タンニン
18	スウェルチアマリリン		

Fig. 5 主成分分析 (1)



1	標準液 (10mM KCl)	19	エンメイン
2	キノリン硫酸塩二水和物	20	リモニン
3	シコニン硫酸塩水和物	21	ノミリン
4	キノシン	22	ゲンチオピクロシド
5	キノニン塩酸塩一水和物	23	クアニン
6	キノニン塩酸塩二水和物	24	食添ジャマカシア抽出物
7	キノン	25	アンドログラフィド
8	シコニン	26	食添キオン抽出物
9	ベルバリン塩酸塩	27	食添カゴメキ抽出物
10	イソα酸	28	食添マンダク抽出物
11	食添イソα苦味酸	29	食添イソ抽出物
12	カフェイン	30	安息香酸ナリウム
13	テオブロミン	31	5-デオキシ-5-メチルチオアデニン
14	食添カフェイン	32	N-フェニルチオ尿素
15	ガリギン	33	没食子酸
16	食添ガリギン(A)	34	エラグ酸二水和物
17	食添ガリギン(B)	35	タンニン
18	スウェルチアマリリン		

Fig. 6 主成分分析 (2)

4. 苦味料の成分・品質に関する研究

既存添加物の成分と品質評価に関する研究

分担研究課題；ヒキオコシ抽出物の起源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
	多田 敦子	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

研究要旨 ヒキオコシ抽出物が中国産延命草を起源とする可能性が明らかになったので、中国産延命草と日本産延命草の成分の分離・構造決定を行い、成分の差異を比較検討した。その結果、主成分としてウルソール酸を共通成分とするが、ヒキオコシに特徴的な主要成分であるジテルペン誘導体に関して両者に共通成分は認められなかった。

A 研究目的

「既存添加物名簿収載品リスト」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 japonica* HARA) の茎又は葉を起源とし、その主成分は苦味物質であるエントカウレン型ジテルペン誘導体である enmein 等とされている。しかし、厚生労働科学研究補助金「食品の安全性高度化推進事業」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) の成分研究の結果、enmein の存在が認められず、ヒキオコシ抽出物のエキスが日本産ヒキオコシ（延命草）のエキスとは TLC パターンが異なり、中国産ヒキオコシ（延命草）のエキスと TLC パターンが一致した。以上の結果に鑑み昨年度は中国産生薬「延命草」の成分研究を行った。本年は中国産ヒキオコシの成分研究をさらに完結すると共に、新たに日本産生薬「延命草」（ヒキオコシ）の成分分離を詳細に行い、分離した化合物については核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$,

$^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR) および質量スペクトル (MS) 等のデータを詳細に解析することにより化学構造の決定を行い、中国産と日本産ヒキオコシの成分の比較を行った。

B 研究方法

1. 実験材料および機材

抽出材料として、中国産ヒキオコシとしては、小島漢方より購入した中国産生薬「延命草」 (Lot. No. 522421) を用いた。日本産ヒキオコシとしてはウチダ和漢薬から購入した日本産生薬「延命草」 (Lot. No. 452906) を用いて実験を行った。

TLC は Merck 社製 Precoated TLC (分析は Silica gel 60F254, 100 x 50 x 0.25 mm, 分取は Silica gel 60F254 200 x 200 x 0.5 mm) 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関東化学社製 Silica gel 60N (100 – 210 μm) を用いて行った。高速液体クロマトグラフィー

ー (HPLC) は逆相系カラム (Mightysil RP-18, 関東化学社製) を用い、溶媒としてはアセトニトリル-水系の溶媒を用いて行った。

2. 方法

2-1, 抽出と分離

ウチダ和漢薬より購入した日本産生薬「延命草」をさらに粉末とし抽出を行った。粉末サンプル (IJJ) 1.5 kg をメタノール (MeOH) で2時間還流抽出を行った。冷却後ろ過し、MeOH 溶液はロータリーエバポレーターを用い減圧下、50°C で濃縮した。得られた MeOH エキス (IJJM, 138 g) を水と酢酸エチル (AcOEt) に懸濁し分液ロートで振り分け、AcOEt 相 (IJJMA, 62 g) と水相を得た。水相はさらにブタノール (*n*-BuOH) で抽出を行い *n*-BuOH 相 (IJJMB, 19 g) と水相を得た。ヒキオコシの苦味物質は比較的極性が低いジテルペン誘導体であるため、AcOEt 相の分離を行った。AcOEt 相 (ca 60 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。溶媒はクロロホルム (CHCl₃) から始まり、MeOH を少しずつ加えることにより展開溶媒の極性を上げながら行った。得られた多くのフラクションを TLC により検討を加え最終的に7つのフラクションにまとめた。このうち Fr. 2, Fr. 3, Fr. 4 について、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 TLC, さらに、逆相系 (ODS) カラムを用いた HPLC をくり返すことにより20余種類の化合物を分離した。そのうち IJJ-1 ~ IJJ-12 と仮称した化合物は純度にも問題なく化学構造を決定或いは推定を行った。以上述べた抽出分離の流れを図1に示した。

2-2, 分離化合物の化学構造の決定。

分離化合物の分子式は ESI-MS データの解析により決定した。これら化合物の ¹H-NMR および ¹³C-NMR の測定を行い、構造のアウトラインを推定し、さらに2次元 NMR (HMQC,

HMBC, HH-COSY, NOESY 等) の測定を行うことにより各化合物の構造を決定した。

C. 研究結果

日本産ヒキオコシからは28種類の化合物が得られているが、このうちいくつかは同一化合物であったり、純度に問題があり再度精製が必要であるものもあり、また、各種スペクトルの測定は行っているが、構造解明に至っていないものもある。以上の結果、純度にも問題無く構造決定に至った化合物は図1に示すように12種類である。このうちいくつかの化合物を例に構造決定について述べる。

IJJ-1 (1) は、ESI-MS (negative) で *m/z* 363 [M-H]⁻ に分子量関連イオンが認められ、ESI-MS (positive) で *m/z* 387 [M+Na]⁺ と [M+H]⁺ に分子量関連イオンが検出されたこと及び ¹³C-NMR データから分子式が C₂₀H₂₈O₆ と推定された。IJJ-1 (1) は ¹H-NMR (in CD₃OD) において、2本のシングレットメチル基 [δ 1.06 (3H, s), 1.11 (3H, s)] の存在、一組のエキソメチレン [δ 5.47 (1H, s), 5.90 (1H, s)] の存在、3つの2級カービニールグループ [δ 4.44 (1H, dt, *J*=8.1, 10.1 Hz), 3.72 (1H, d, *J*=5.8 Hz), 3.74 (1H, dd, *J*=11.5, 6.3 Hz)], ヒキオコシのジテルペン成分に特徴的な20位と7位の間でヘミケタール環を巻いた20位の特徴的なメチレングループ [δ 4.06 (1H, dd, *J*=10.3, 2.3 Hz), 4.14 (1H, dd, *J*=10.3, 1.5 Hz)] の存在等が認められる。¹³C-NMR (in CD₃OD) において、エキソメチレングループ (δ 116.0, 153.0), カルボニール基 (δ 210.1), ヘミケタール炭素 (δ 94.5), 4つのカービニール炭素 (δ 73.4, 72.8, 63.7, 62.6) の存在が認められる。以上のデータからヒキオコシに特徴的なエントカウラン型のジテルペンと推定され、各官能基の位置関係については2次元 NMR によって決定した。特に HMBC スペクトルによる C-H ロングレンジ相関の詳細な解析により平面構造

を決定した。ヒキオコシのジテルペンの構造情報から、IJJ-1 の立体構造を含めて図 2 に示すような構造と決定した。図 2 には IJJ-1 の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ のアサインおよび MS データを記載した。

IJJ-4 (4) は、ESI-MS (positive) で m/z 385 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ と m/z 363 $[\text{M}+\text{H}]^+$ に分子量関連イオンが検出されたこと及び $^{13}\text{C-NMR}$ データから分子式が $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$ と推定された。 $^1\text{H-NMR}$ (in CD_3OD) において、2つのシングレットメチル基 [δ 0.92 (3H, s), 1.05 (3H, s)] の存在、エキソメチレン [δ 5.54 (1H, s), 5.98 (1H, s)] の存在、ヘミアセタールプロトン [δ 5.34 (1H, s)] の存在、20位と6位の間で巻いたヘミアセタール環の特徴的な20位のメチレン基 [δ 3.99 (1H, dd, $J=8.9$ Hz), 3.84 (1H, d, $J=8.9$ Hz)] の存在、2つの2級カービニールプロトン [δ 3.56 (1H, dd, $J=3.7, 2.1$ Hz), 4.95 (1H, dd, $J=11.2, 6.6$ Hz)] の存在が認められる。 $^{13}\text{C-NMR}$ (in CD_3OD) においては、カルボニール基 (δ 200.8) の存在、ラクトンカルボニール基 (δ 173.1) の存在、エキソメチレン基 (δ 117.2, 151.3) の存在、ヘミアセタール炭素 (δ 101.7) の存在、3つのカービニール炭素 (δ , 74.8, 73.6, 73.5) の存在が認められる。以上の結果 IJJ-4 はエントカウレン型ジテルペンの6, 7位の間でB環の解裂が起こり4位と7位の間でラクトン環を巻いた構造を持つ enmein ではないかと考えられる。IJJ-4 の HMBC スペクトルを詳細に検討した結果、IJJ-4 を enmein と決定した。IJJ-4 の $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ のアサインと MS データを図 2 に示す。

IJJ-9 (9) は、ESI-MS (negative) で m/z 389 $[\text{M}\cdot\text{H}]^-$ に、ESI-MS (positive) で m/z 419 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ に分子量関連イオンが検出されたこと及び $^{13}\text{C-NMR}$ データから分子式が $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$ と推定された。 $^1\text{H-NMR}$ (in CDCl_3) において、エキソメチレン [δ 5.10 (1H, br. s),

5.15 (1H, br.s)] の存在、2つのシングレットメチル基 [δ 1.03 (3H, s), 1.15 (3H, s)]

の存在、アセチル基 [δ 2.03 (3H, s)] の存在、ホルミル基 [δ 9.85 (1H, d, $J=4.3$ Hz)] の存在が認められる。 $^{13}\text{C-NMR}$ (in CDCl_3) において、カルボニール基 (δ 203.0) の存在、エステル及びラクトン (δ 170.3, 175.0) の存在3つのカービニール炭素 (δ 82.8, 75.4, 67.0) の存在が認められる。以上の結果 IJJ-9 は6, 7位の間でB環が解裂し、6位はホルミル基となり、20位水酸基と7位のカルボキシル基の間でラクトン環を形成し、さらに1位の水酸基がアセチル化した構造と考えられた。このことは HMQC と HMBC のスペクトルデータを詳細に検討することにより図 2 に示す様な構造と決定した。

分離化合物のうち代表的な化合物として、今回構造解析の説明を行った、IJJ-1, IJJ-4, IJJ-9 の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ のアサインと MS データを図 2 に示す。

その他のジテルペン誘導体、IJJ-2, IJJ-3, IJJ-5, IJJ-6, IJJ-7, IJJ-8, IJJ-10, IJJ-11 についても同様に、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR および MS のデータを詳細に検討することによりその構造を決定した。IJJ-12 は日本産ヒキオコシだけでなく、中国産ヒキオコシに於いても主成分である ursolic acid と決定した。

今回日本産ヒキオコシから得られ、構造の推定が出来た化合物を図 3 に示す。

D 考察

日本市場品として提供された苦味料であるヒキオコシ抽出物には、ヒキオコシの代表的成分として「既存添加物名簿収載リスト」に主成分として記載されている enmein が全く認められず、中国産生薬「延命草」(ヒキオコシ) にも enmein が全く存在していない事が明らかになり、ヒキオコシ抽出物と中国産生薬「延命草」の成分はほとんど同じであることが明らかになった。一方、今回成分研究を行った日本産ヒキ

オコシからは11種類のエントカウラン型ジテルペンを分離し、その構造を明らかにすることが出来た。日本産ヒキオコシからは enmein を分離すると共に、6,7-位の間で環の解裂が起こった enmein の類縁化合物が得られたが、このような 6,7-*seco*-タイプの化合物は必ずしも主成分ではなかった。また、中国産と日本産のヒキオコシの成分の比較では、中国産では A-環が 2-en-1-one 型を持つが、2-en-1-one 型から生じたと考えられるジテルペンが得られ、6,7-*seco*-型ジテルペンは全く得られていない。ヒキオコシ抽出物および中国産生薬「延命草」(ヒキオコシ) から得られた化合物を図4に示す。これに対して、日本産ヒキオコシからは A-環に 2-en-1-one 構造が存在せず、しかも

6,7-*seco*-型ジテルペンもいくつか得られた。日本産ヒキオコシから得られた化合物のうち、IJJ-9 は新規化合物の可能性があるのでさらに慎重に推定構造の確認を行っていく必要がある。

以上の結果、昨年度の成果の中でも述べたとおり、市場品ヒキオコシ抽出物の製造では、日本産ヒキオコシに代わって中国産ヒキオコシが使用されており、しかも我が国に於いて、市場品の生薬延命草(ヒキオコシ)として、中国産延命草が広く流通していることが伺われる。トリテルペンである ursolic acid 以外は日本産と中国産の延命草の間では共通成分が確認されていない。このことから、ヒキオコシ抽出物が「既存添加物名簿収載リスト」の記載に一致しないことが明らかとなった。

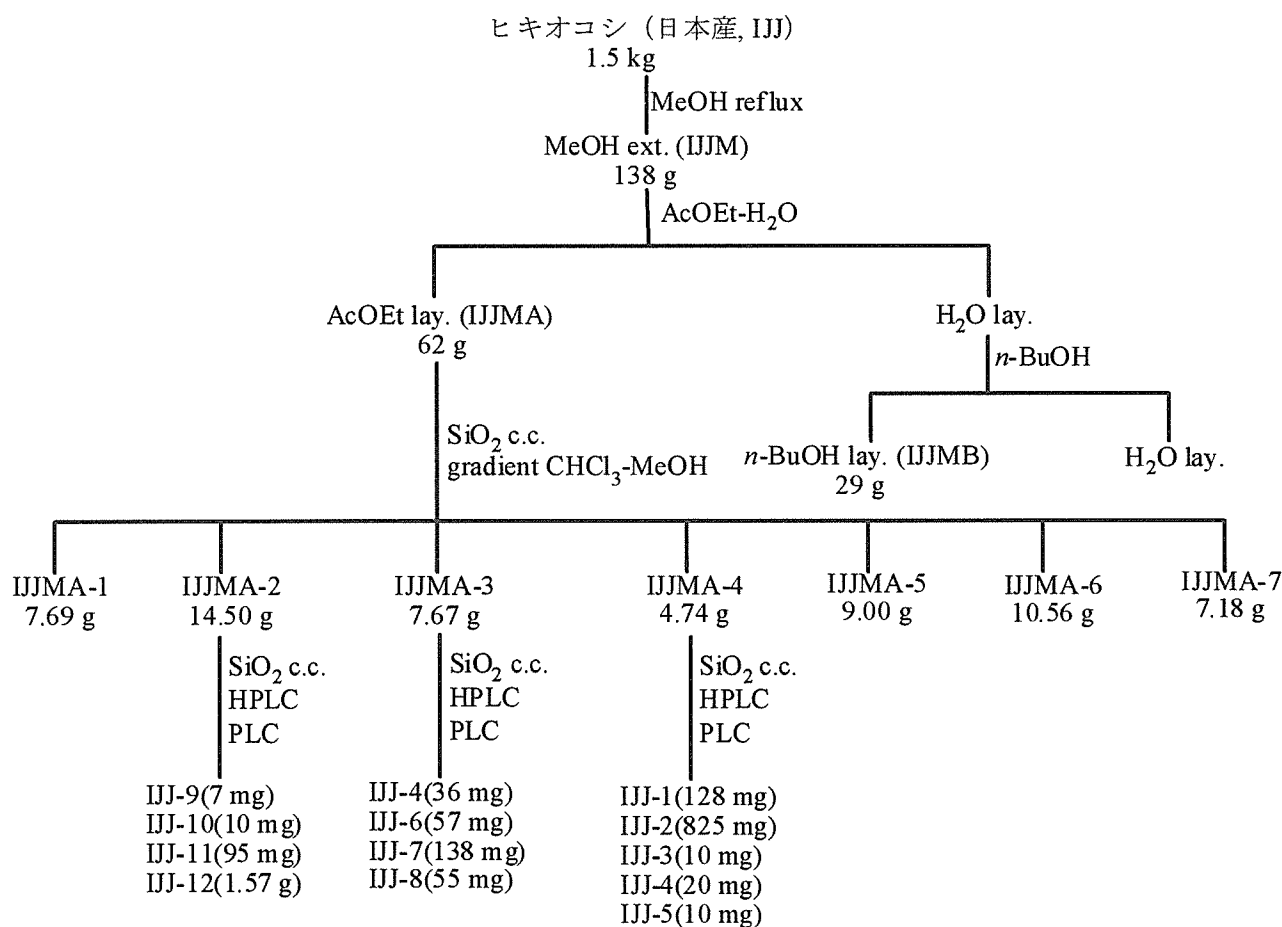


図1 日本産ヒキオコシの抽出と分離

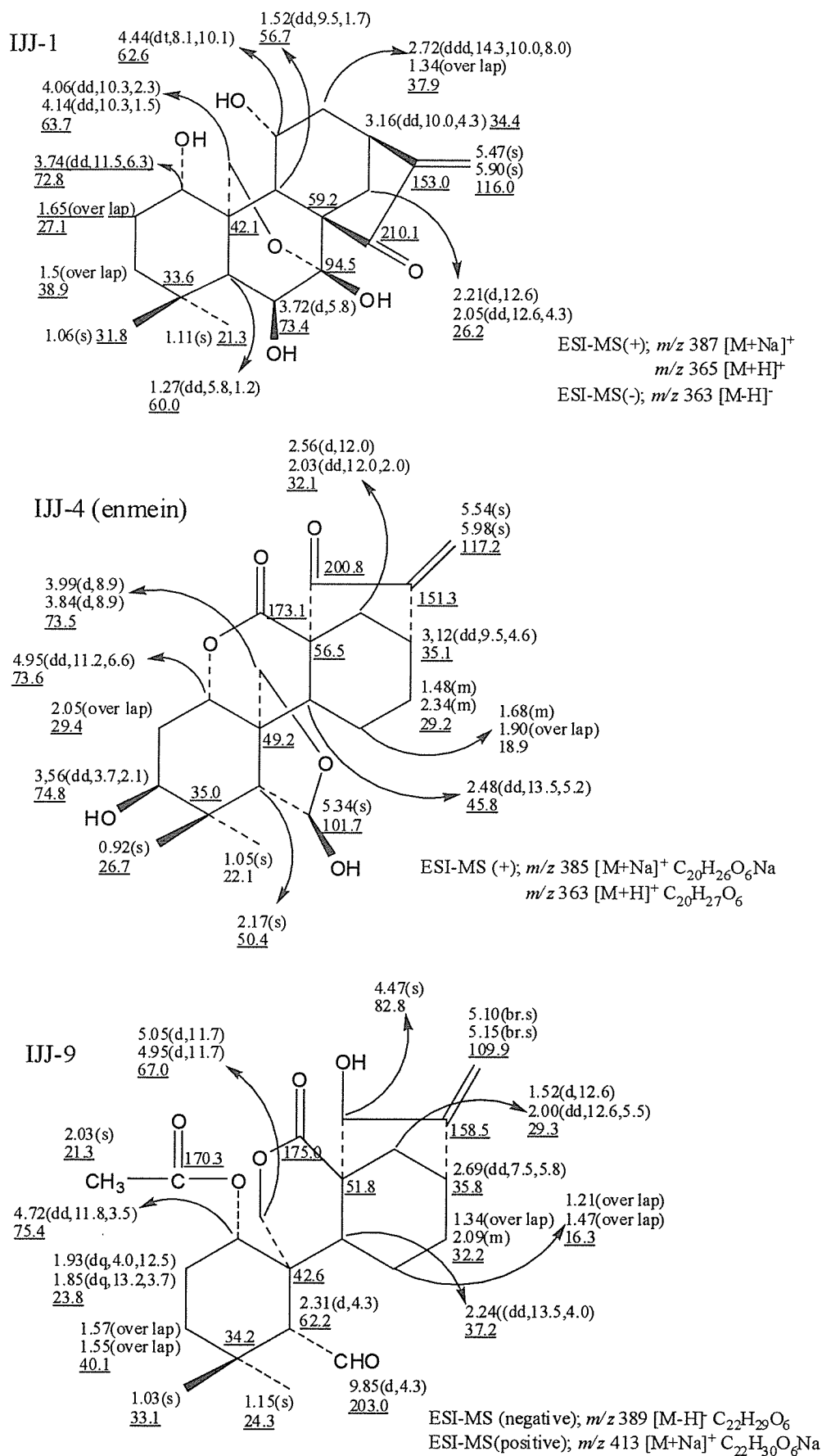


図2 IJJ-1, IJJ-4, IJJ-9 の NMR データのアサインと MS データ

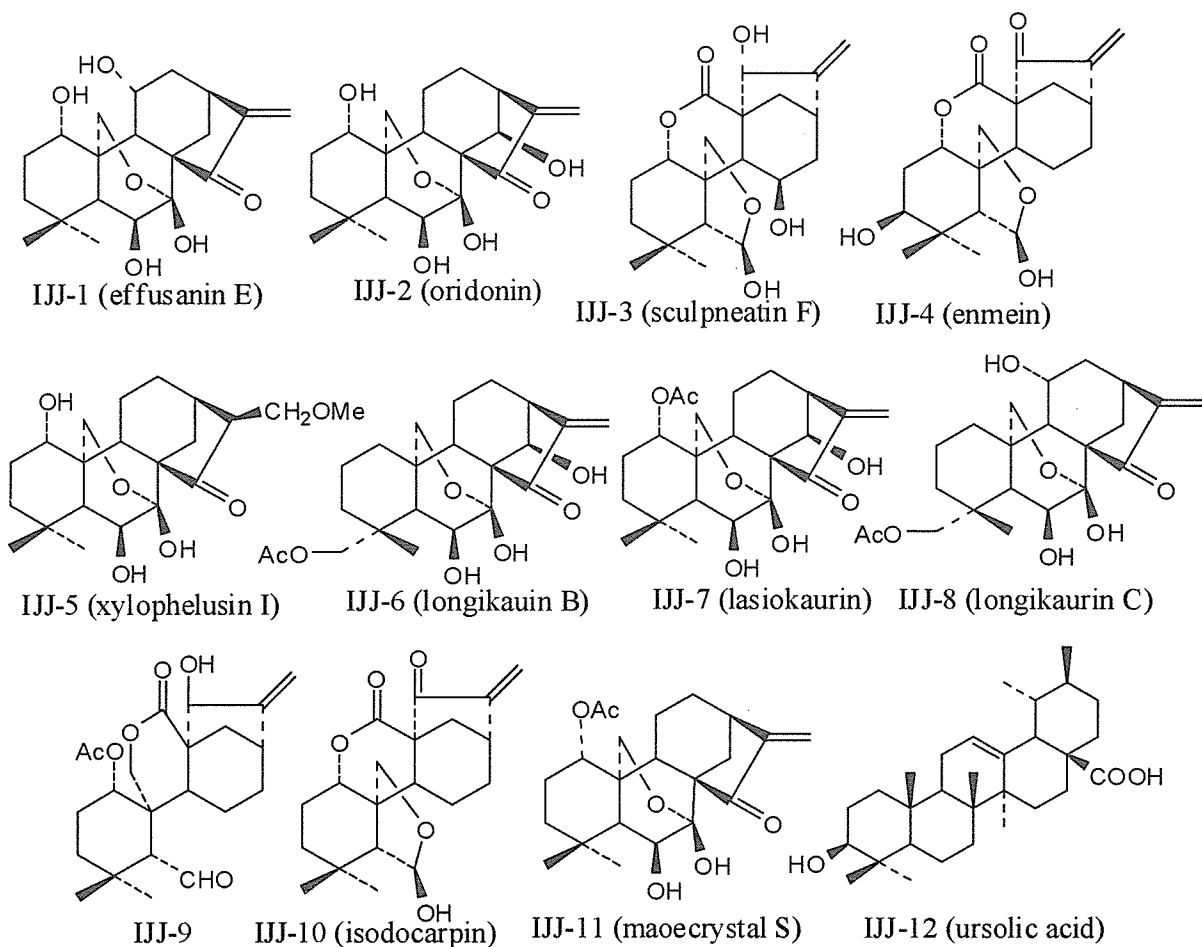


図3 日本産延命草（ヒキオコシ）から分離した化合物

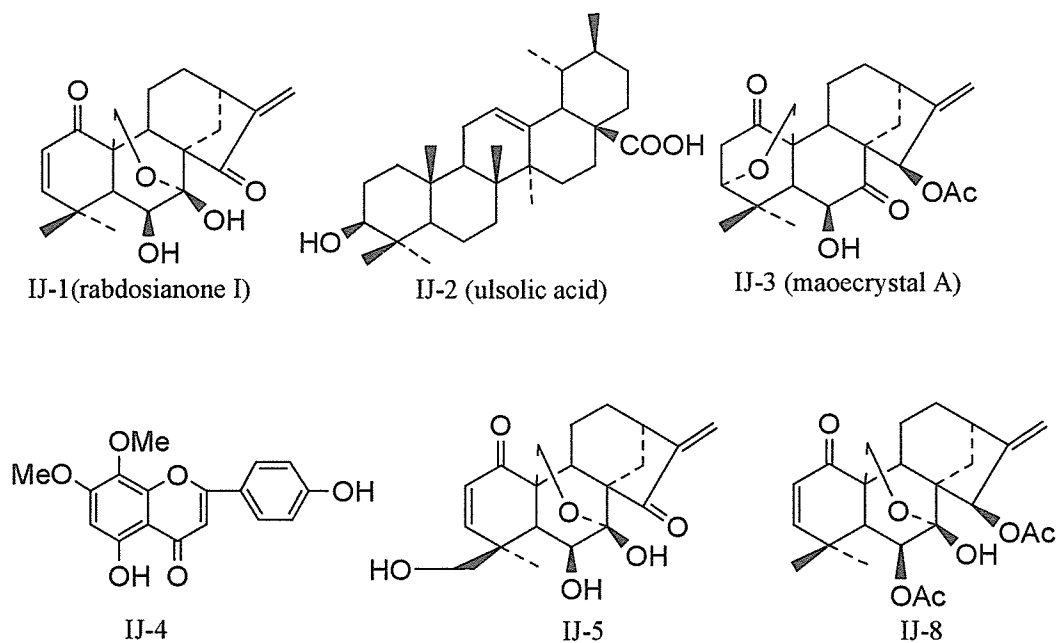


図4 ヒキオコシ抽出物及び中国産延命草から得られた化合物

E. 結論

既存添加物ヒキオコシ抽出物は、「ヒキオコシの茎又は葉から得られた、エンメイン(enmein)を主成分とするものと既存添加物名簿に定義されているが、市場より入手可能であったヒキオコシ抽出物製品に enmein 認められなかった事実から始まった研究過程で、昨年度は、その基原と考えられた中国産生薬「延命草」(ヒキオコシ)を、本年度は日本産同生薬の成分について丹念な成分分離と構造解析を行った。その結果、日本産生薬「延命草」(ヒキオコシ)より、11種類のエントカウラン型ジテルペンを分離し、主成分と考えられる enmein の存在も明らかにした。

F. 健康危機情報

特に無し

G. 研究発表

論文発表

Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I.K., Kamakura, H., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., Authentication and chemical study of Isodonis Herba and Isodonis extract. J. Agric. Food Chem., submitted (2007).

H. 知的所有権の取得状況

無し

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 18 年度研究報告書

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、既存添加物ヒキオコシ抽出物の基原植物シソ科ヒキオコシ (*Isodon japonicus* HARA)を含む日本産 *Isodon* 属植物、日本及び中国の市場にエンメインウとして流通する生薬について、LC/PDA/MS 分析及び DNA 配列解析を行った。これまでに得られている結果と比較検討した結果、市販のヒキオコシ抽出物製品は、定義に記載されているヒキオコシ (*I. japonicus*) 以外の中国産の *Isodon* 属植物を原料に製造されたと推定された。したがって、ヒキオコシ抽出物の原料として、多種多様の *Isodon* 属植物が用いられる可能性が考えられ、その品質に充分注意する必要があると考えられた。

A. 研究目的

既存添加物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) であると定義されている (既存添加物名簿収載品目リスト)。一方、我が国では、ヒキオコシの全草を延命草と称し、苦味健胃の目的の民間薬に用いてきた。日本薬局方外生薬規格には、延命草の基原植物として、ヒキオコシ *Plectranthus japonicus* Koidzumi 及びクロバナヒキオコシ *Plectranthus tricharpus* Maximowicz の二種を規定している。ヒキオコシ及びクロバナヒキオコシの学名に関しては、この他に、原らの分類¹⁾に従い *Rabdosia japonica* 及び *R. trichocarpa* が使用された時期があったが、現在では、Li²⁾の分類に従い、*Isodon*

japonicus 及び *I. trichocarpus* を使用するのが一般的である。ヒキオコシは、国内、中国東部、朝鮮半島、極東ロシアに分布し、クロバナヒキオコシは、国内の日本海側に分布する。また、我が国に分布する *Isodon* 属植物は、他に、8 種 7 変種が知られている。

本研究では、ヒキオコシ抽出物に関する公的規格基準の見直しに資する基礎的知見を得ることを目的に、市販のヒキオコシ抽出物製品の成分探索を行うとともに、ヒキオコシ抽出物の原料としての使用が予想される日本及び中国の生薬市場の *Isodon* 属植物について、LC/PDA/MS を用いた成分分析及び DNA 配列解析による基原種鑑別を行ってきた。これまでの結果では、市販のヒキオコシ抽出物製品に *enmein* (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; 図 1) が確認された。また、生薬とし

て流通しているエンメイソウ 2 検体 (Ra-1, 2) 及びヒキオコシ類縁植物 5 検体 (Ra-3 ~7) を用いて、LC/PDA/MS 分析を行った結果、中国産のエンメイソウ (Ra-1) とヒキオコシ抽出物製品が同一の成分組成を持ち、2 が主成分であった。一方、国内産のエンメイソウ (Ra-2) 及びヒキオコシ類 (Ra-3 ~7) では、1 あるいは、oridonin (4) が主成分であった。さらに、DNA 配列解析による基原種鑑別の結果、Ra-1 は、複数の *Isodon* 属植物の複雑な交配種であると推定され、国内のヒキオコシ及びクロバナヒキオコシとは、異なる植物であった。このことから、ヒキオコシ抽出物製品中に 1 が検出されなかった理由として、中国産の同属植物を原料にしていることが原因である可能性が考えられた。

そこで、今年度は、新たに日本及び中国の生薬市場から購入した *Isodon* 属植物 (以降、エンメイソウ類と記述) の DNA 及び LC/PDA/分析を行い、ヒキオコシ抽出物の基原植物および成分組成との関係を調査した。

B. 研究方法

1. 実験材料

昨年度から引き続き検討中の試料を含め、本研究に用いた植物試料を表 1 に示した。この内、Ra-15 及び Ra-16 は、単一ロット中に植物形態上、明らかに別種である 2 種が観察されたため、分別したものである。

2. 実験方法

2-1. LC/PDA/MS 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。

2-2. DNA 配列解析

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 6 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。また昨年度、複数の配列が検出された Ra-1 の PCR 産物については、TOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて、プラスミドへと導入し、3 つのクローンについて、シーケンス解析を行った。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。

C. 研究結果

1. LC/PDA/MS 分析

LC/PDA/MS 分析の結果を図 2 に示した。新たに加賀市で採集した標準植物試料 2 検体の内、Ra-8 は、4 を主成分としていた。一方、Ra-9 からは、主成分として、保持時間 15.5 分に未同定のピークが検出された。精密質量分析の結果から、この成分は、分子式 $C_{20}H_{28}O_7$ と推定され、文献検索の結果から、*I. trichocarpus* あるいは、*I. xerophilus* より単離報告のある trichorabdonin (5)³⁾ や xerophilusin L (6)⁴⁾ などのジテルペンであると考えられた。

日本産のエンメイソウ 3 検体 (Ra-10~12) は、比率の違いはあるものの、いずれも 1 及び 4 を主成分としており、昨年度、国内で採集したヒキオコシ及びクロバナヒキオコシの分析において得られた結果と同様の傾向を示した。一方、中国の市場より得たエンメイソウ類 4 検体の内、Ra-13 からは、主成分として 2 が認められ、昨年度の研究で得られた Ra-1 及びヒキオコシ抽出物製品と良く似た成分パターンを示した。Ra-14, -15 は、主として、4 を含有していた。また、Ra-16 には、目立ったピークは検出されなかった。

2. DNA 配列解析

標準植物試料 2 検体の内、Ra-8 は、昨年度の Ra-5, 7 の配列と一致し、種内変異は認められなかった。Ra-9 は、*I. japonicus* 及び *I. trichocarpus* の配列と 198 塩基中、それぞれ 7, 4 塩基の違いを示し、これら 3 種は、明確に区別が可能であった。本年度及び昨年度の塩基配列解析結果を基に作成した分子系統樹を図 3 に示した。ただし、Ra-16 は、Blast search program による相同性検索の結果から、マメ科植物と推定されたため、系統樹からは除いた。日本産のエンメイソウの内、徳島産の Ra-10 は、*I. japonica*、新潟産の Ra-11, 12 は、*I. trichocarpus* と同一の塩基配列

を示した。この結果は、両種の分布域¹⁾と一致していた。一方、中国産のエンメイソウ類の内、ヒキオコシ抽出物と同じ成分パターンを示した Ra-1 由来の 3 つのクローンは、それぞれのクラスターに分類された。この内の一つは、同じ中国産の Ra-13 と一致した。また、4 を主成分としていた Ra-14, 15 は、同一の配列を示し、Ra-1 のクローンの一つと同じクラスターに分類された。

D. 考察

一昨年度からの全研究結果から、以下のことが明らかになった。市販のヒキオコシ抽出物製品は、主成分とされている 1 を含まず、別の骨格のジテルペノイドである eriocalyxin B などを含むことが明らかになった。また、日本に分布するヒキオコシ及びクロバナヒキオコシは、遺伝子型が安定しており、その成分は、enmein 型、oridonin 型及びその中間型に分類されることが確認出来た。一方、中国産のエンメイソウ類には、多くの遺伝子型が見出された。その成分は、oridonin 型と eriocalyxin B 型に大別され、既存添加物名簿収載品目リストにある 1 を含むものは、皆無だった。以上の結果から、今回の研究で使用したヒキオコシ抽出物製品は、中国産の *Isodon* 属植物を原料に用いたことが示唆された。ただし、文献上では、ヒキオコシから、2 や kamebakaurin (7), excisanin A (8) など他のジテルペノイド類の単離報告もある^{5),6)} ことから、ヒキオコシには、様々な chemotype が存在する可能性もあり、今回の研究結果から、このヒキオコシ抽出物製品がヒキオコシと異なる植物から製造されたとは結論出来ない。

なお、ヒキオコシ由来のジテルペンの苦味と構造については、既に構造活性相関が調べられており、それによれば、分子内水素結合の有無が、苦味の発現と密接に関連している⁷⁾。この理論に従えば、今回の研究でヒキオコシ抽出物製品及びエンメイソウ類か

ら見出された化合物の内、1, 2, 4 は、その強度は不明ながら、苦味を有すると推定され、苦味剤としての品質には、大きな問題は無いとも考えられる。

E. 結論

市販のヒキオコシ抽出物製品の成分分析の結果から、このものは、既存添加物名簿収載品目リストにある1を含まず、別のジテルペンである2を主成分とすることが明らかになった。日本及び中国産の *Isodon* 属植物の成分分析及び DNA 配列解析結果と比較検討した結果、このヒキオコシ抽出物製品は、中国産の *Isodon* 属植物を原料として製造されたと推定された。また、本研究で、日本及び中国の *Isodon* 属植物から見出されたジテルペノイドの多くは、その構造から、苦味を有すると推定された。

従って、既に中国産の *Isodon* 属植物が基原と思われる製品が流通している現状からも、公定書の規格基準としては、ヒキオコシ抽出物の原料植物は、*Isodon* 属植物に範囲を広げ、その主成分も特定の化合物名を挙げず、ジテルペン類などに留めるのが、適切であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

T. Maruyama, N. Sugimoto, M. Kuroyanagi, I. K. Kim, H. Kamakura, T. Kawasaki, M. Fujita, H. Shimada, Y. Yamamoto, Y. Goda, Authentication and chemical study of *Isodonis* extract and *Isodonis* Herba, *J. Agric. Food Chem.*, submitted.

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

参考文献

- 1) H. Hara, On the Asiatic species of the genus *Rabdosia* (Labiatae), *Journ. Jap. Bot. (Shokubutsu Kenkyu Zasshi)*, **47**, 193-203 (1972).
- 2) H.-W. Li, Taxonomic review of *Isodon* (Labiatae), *J. Arn. Arb.*, **69**, 289-400 (1988).
- 3) Y. Takeda, K. Takeda, T. Fujita, Structures of ememogin and trichorabdonin, minor diterpenoids from *Rabdosia trichocarpa*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1986**, 689-694.
- 4) S.-H. Li, X.-M. Niu, L.-Y. Peng, H.-J. Zhang, P. Yao, H.-D. Sun, *ent*-Kaurene diterpenoids from the leaves of *Isodon xerophilus*, *Planta Med.*, **68**, 946-948 (2002).
- 5) Y. Yamada, N. Sako, E. Ando, M. Yamada, H. Kikuzaki, T. Yamamoto, New bitter diterpenes, rabdosianone I and II, isolated from *Isodon japonicus* Hara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 524-529 (1999).
- 6) B. Y. Hwang, J.-H. Lee, T. H. Koo, H. S. Kim, Y. S. Hong, J. S. Ro *et al.*, Kaurene diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E₂ production and NF-κB activation in LPS-stimulated macrophage RAW264.7 cells, *Planta Med.*, **67**, 406-410 (2001).
- 7) T. Kubota, I. Kubo, Bitterness and chemical structure, *Nature*, **223**, 97-98 (1969).

表1 本研究に使用した植物試料

Sample #	species	locality	vouchor #
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
Ra-4	<i>I. japonicus</i>	基盤研種子島	0068-99TN
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	none
Ra-7	<i>I. trichocarpus</i>	金沢市駒埴	TM007
Ra-8*	<i>I. trichocarpus</i>	加賀市県民の森	TM008
Ra-9*	<i>I. shikokiana</i> var. <i>occidentalis</i>	加賀市県民の森	TM009
Ra-10*	?	日本・徳島	
Ra-11*	?	日本・新潟	
Ra-12*	?	日本・新潟	
Ra-13*	?	中国・貴州 (修水)	
Ra-14*	?	中国・河南 (済源)	
Ra-15*	?	中国・河南 (孟津)	
Ra-16*	?	中国・河南 (孟津)	

エンメイソウ類市場品を太字で示した

*: 今年度調査品

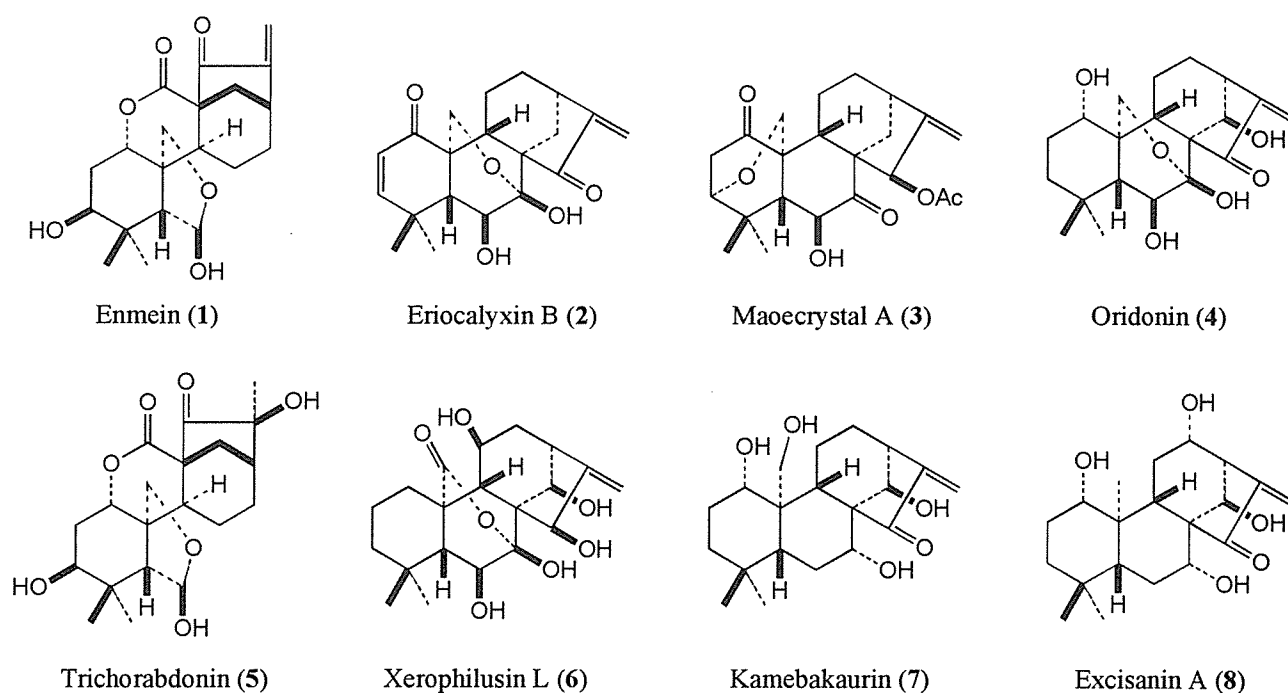


図1 ヒキオコシ抽出物及びエンメイソウに含まれる主な成分の構造

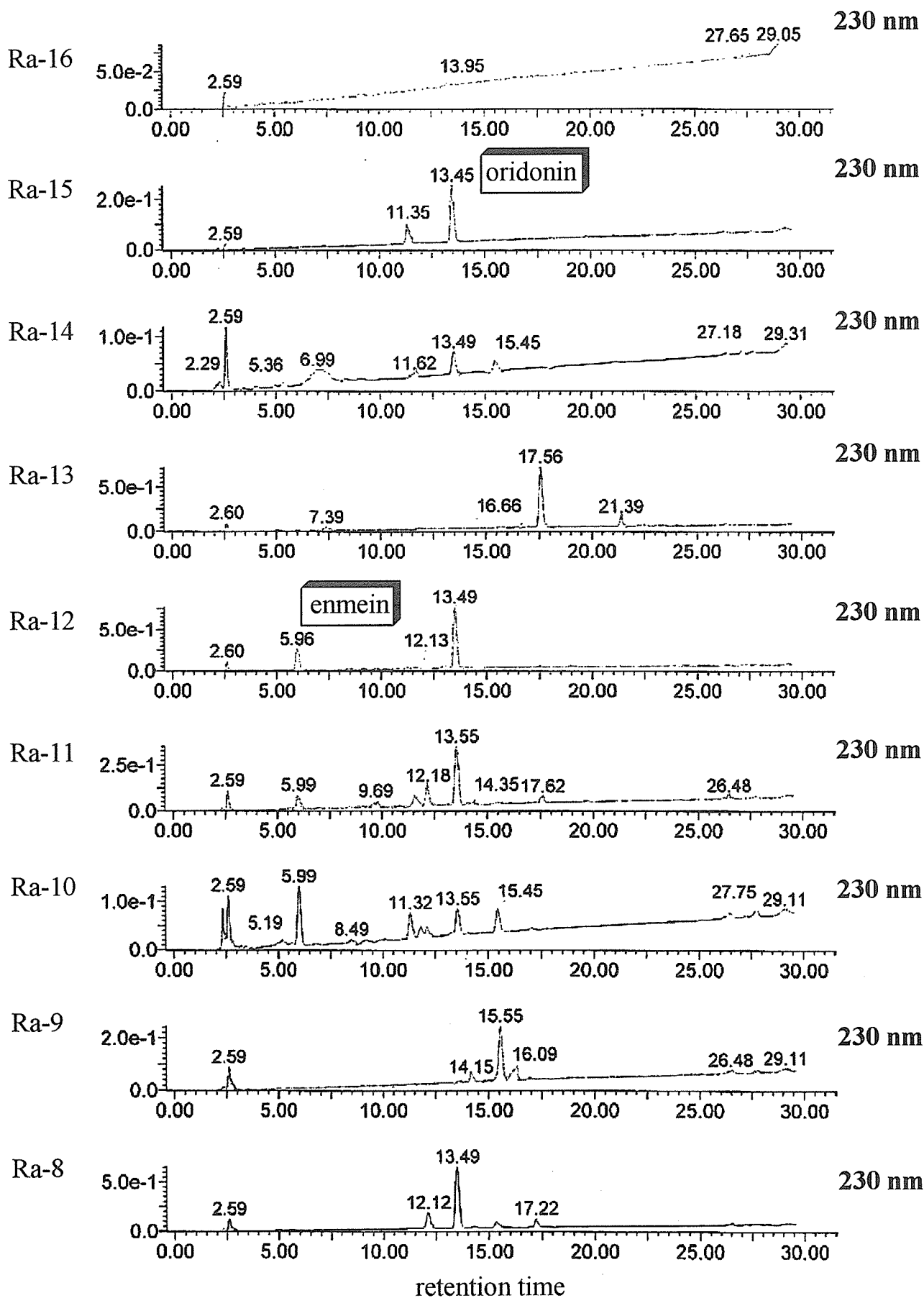


図2 *Isodon* 属植物及びエンメイソウ類の LC/PDA/MS クロマトグラム

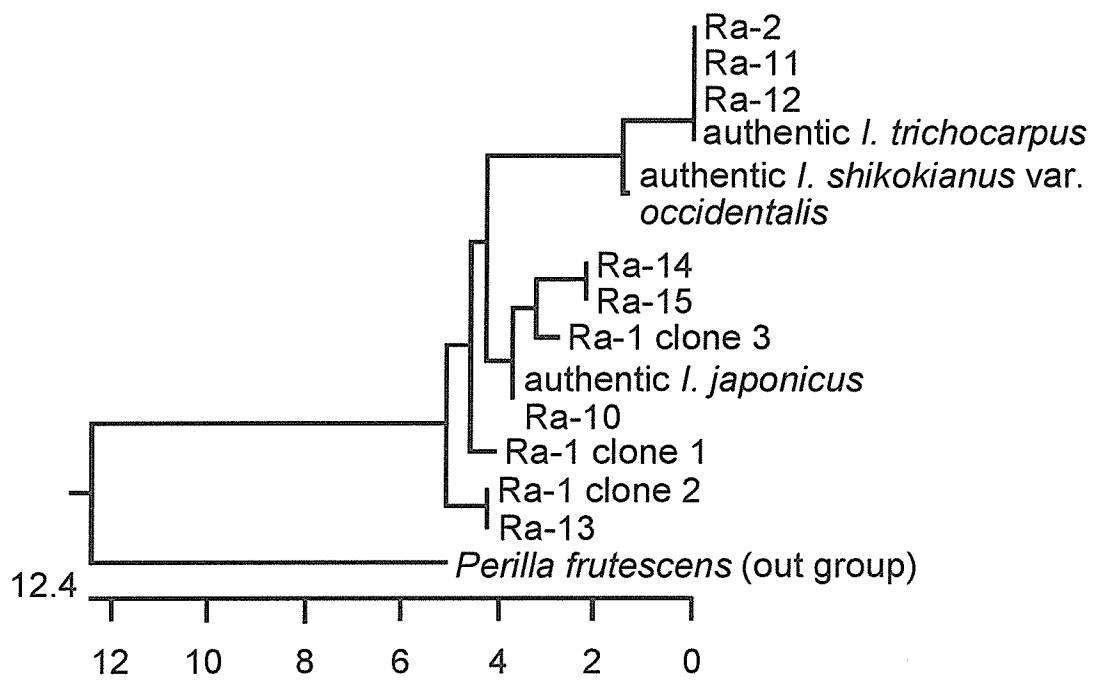


図3 ITS1塩基配列を基に作成したエンメイソウ類の分子系統樹

霊芝苦味成分に関する研究

研究協力者 服部征雄 富山大学・和漢医薬学総合研究所教授

研究要旨

紫芝に含まれる苦味成分の探索を行い、炭素数 27 の lucidenic acid 型の新化合物 4 種の単離、構造決定を行なった。紫芝と赤芝の HPLC による成分分析を行い、紫芝に含まれるトリテルペンは赤芝のものとは比べ著しい差異が認められた。これら化合物は苦味試験に用いられる標準物質となる。

A. 研究目的

霊芝は日本、中国、韓国など多くの東アジア諸国で古くから民間薬として用いられてきた。世界最古の薬物書である神農本草経では、霊芝は「久しく食すれば身を軽くし、老いず、天年を延べ、神仏となる」と、不老長寿の薬として記され、また、その色・形の違いから、「赤芝、青芝、黄芝、白芝、黒芝、紫芝」の6種に分類し、上品に位置づけられている。実際民間では赤芝 *Ganoderma lucidum* と紫芝 *Ganoderma sinense* が主に衰弱疲労に対して強壮薬として用いられてきた。現在、赤芝から約 140 種類のラノスタン型トリテルペンが単離され、抗HIV-1 作用¹⁾、抗コレステロール作用²⁾、鎮痛作用³⁾、抗ヒスタミン作用⁴⁾、抗補体作用⁵⁾、抗HIV-1 プロテアーゼ作用⁶⁾細胞毒性(Meth-A, LLC, T-47D)^{7,8)}などの様々な生理活性を示すことが報告されている。紫芝の成分に関する報告はほとんどなく、著者は苦味成分の構造と活性相関を考察する上の標準物質を得る目的で研究を開始した。これにより、霊芝に含まれる苦味成分を明らかにし、苦味と化学構造の関係を明らかにし、苦味添加の目的で用いられる霊芝の品質の規格化を行なうことをめざした。

B. 研究方法

中国成都荷花池生薬市場にて2006年1月に購

入した紫芝 (*Ganoderma sinense* Zhao, Xu et Zhang、本品は中国貴陽中医学院の陳徳媛女史により同定された)を使い、紫芝に含まれる成分と赤芝に含まれる成分とを比較する目的で、本研究室が開発した赤芝成分の分析方法⁹⁾に習い紫芝成分の分析を試みた。クロロホルム抽出し、フロリジルカラムで脂肪酸、霊芝酸、霊芝アルコールに分画し、含まれるトリテルペンを HPLC 法により定量した。また、赤芝に含まれる成分と異なるものは、クロロホルム抽出後、カラムクロマトグラフィー、HPLC により分離し、構造決定した。

なお、測定は、特にこだわらない限り、以下の装置、条件によったものとする。

- 核磁気共鳴スペクトル(NMR): Varian UNITY Plus 500 (¹H, 500 MHz; ¹³C, 125 MHz) 核磁気共鳴装置で測定。
- カラムクロマトグラフィー: Silica gel BW-820MH (Fuji Silysia) , ODS DM 1020T (Fuji Silysia)を使用。
- 高速液体クロマトグラフィー (HPLC): 東ソー CCPM- II &8020&8022 システム、島津 C-RA chromatopac を使用し、分析には、東ソー TSKgel ODS-80Ts Column (4.6i.d.×150mm) を、分取には、東ソー TSKgel ODS-80Ts Column (20i.d.×250mm)を使用。

C. 研究結果

1. 分析用紫芝エキスサンプルの調製

紫芝子実体の粉碎物を Chloroform で3時間還流抽出し、溶液を濾過後、残渣を同様の方法で2回抽出した。抽出液をあわせてエバポレーターで減圧濃縮し、紫芝 Chloroform エキスを得た。得られたエキスを Florisil column で Fr. 1 [hexane-acetone (9:1)], Fr. 2 [hexane-acetone (7:3)], Fr. 3 [chloroform-methanol (1:2)]の3つの画分に分け、Fr. 2 及び Fr. 3 を分析用サンプルとした。同様の操作を計3回行い、サンプルを調製した。(Chart 1)

2. HPLCを用いた紫芝成分の定量分析

1で得た紫芝エキスを下記の条件の下、HPLCで定量分析を行い、Fig. 1, 2 のクロマトグラムを得た。

Fr. 2 (Ganoderma アルコール画分)

・移動相

Time [min]	1%AcOH/H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
0	45	55
40	40	60

- ・分析時間 60 min
- ・流速 1.0 ml/min
- ・測定波長 243 nm
- ・カラム温度 室温

Fr. 3 (Ganoderma 酸画分)

・移動相

Time [min]	2%AcOH/H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
0	75	25
50	70	30
70	60	40

- ・分析時間 75 min
- ・流速 1.0 ml/min
- ・測定波長 250 nm
- ・カラム温度 室温

得られたクロマトグラムから、検量線を用いて各成分の定量を行った。(Table.1)

この結果から、

- ① 紫芝には赤芝と異なる多くの成分含んでいる。
- ② 紫芝に含まれる各トリテルペンの含有率は赤芝のものとは全く異っている。特に赤芝の主成分である ganoderic acid A をあまり多く含まない。

ことが明らかとなった。

3. 紫芝に含まれる化合物の単離

紫芝に含まれる既知化合物の定量分析を行ったが、その際、同定できなかったトリテルペン様ピークが確認されたため、紫芝からの未知化合物の単離を試みた。

上述と同様の方法で紫芝の Chloroform エキスを調製し、各種クロマトグラフィーを用いて分離を進め、8種の化合物を単離した。(Chart 2)

4. 単離した化合物の構造決定

NMR (¹H1, ¹³C, COSY, HMQC, HMBC, NOESY) を用いて a~h の構造を解析したところ、

a は 20(21)-dehydrolucidenic acid A (15)

b は 7β-hydroxy-3,11,15-trioxo-lanosta-8,24(E)-dien-26-oic acid (16)

c は 7β,15α-dihydroxy-3,11-dioxo-lanosta-8,24(E)-dien-26-oic acid (17)

d は cerevisterol (18)

e は 20-hydroxylucidenic acid A (19)

f は 20(21)-dehydrolucidenic acid N (20)

g は 20-hydroxylucidenic acid N (21)

h は ganodermanontriol (2)

と構造決定され、このうちb(16), c(17), e(19), f(20)の4種は新規化合物であることがわかった。

(Fig. 3) また、新規化合物の ¹³C-NMR のケミカルシフトを Table 2 に示す。

5. 紫芝に含まれる主要トリテルペノイドのHPLCによるの同定

調製した紫芝 Chloroform エキスの ganoderma 酸画分に紫芝に含まれる主要トリテルペノイドである a (15), e (19), f (20), g (21)をそれぞれ少量