

ラメチルシランに対する δ 値 (ppm) で示した。構造未知化合物を DMSO- d_6 99.96%に溶解し、 ^1H -NMR (800 MHz)、 ^{13}C -NMR (200 MHz)、COSY (^1H - ^1H 2D 相関)、HMQC (^1H 観測 ^1H - ^{13}C - ^1H 2D 隣接相関) 及び HMBC (^1H 観測 ^1H - ^{13}C - ^1H 2D 遠隔相関) 等のスペクトル測定を行った。なお、単離された化合物の ^1H -NMR 及び ^{13}C -NMR のデータの帰属は、ケミカルシフト値、上記各種相関 NMR のデータによって行った。

C. 研究結果

化合物 **1** は、LC-MS における測定結果から分子量 426 得られ、APCI ポジティブモードの測定において m/z 427 及び 429 にほぼ 3:1 の強度を示すシグナルが観測されたことより分子中に塩素原子を含むことが明らかとなった。さらに、高分解能 MS スペクトルのデータより分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_5$ が得られた。

1 の ^1H -NMRにおいて δ 3.02 (3H, s) よりメトキシ基、 δ 7.54 (1H, d, J = 7.8 Hz), δ 7.02 (1H, dd, J = 7.3, 7.8 Hz), δ 7.09 (1H, dd, J = 7.3, 8.3 Hz) 及び δ 7.27 (1H, d, J = 8.3 Hz) より1, 2置換ベンゼン環、また δ 6.63 (1H, br s), δ 6.80 (1H, d, J = 8.2 Hz) 及び δ 6.44 (1H, br d, J = 8.2 Hz) より1, 2, 4 置換ベンゼン環の存在が示唆された。さらに δ 5.19 (1H, d, J = 6.9 Hz), δ 3.45 (1H, d, J = 14.7 Hz) 及び δ 3.07 (1H, dd, J = 6.9, 14.7 Hz) よりフェニルアラニン、トリプトファン等の芳香族アミノ酸の α 位及び β 位に特徴的なシグナルパターンが観測された。

一方、 ^{13}C -NMR において観測された2つのカルボニル炭素 (δ 170.4及び δ 166.8) 並びにメチレンジオキシ基に特徴的なシグナル (δ 101.0) 等より、**1** は既知ED治療薬であるタダラフィル (商品

名シアリス、国内未承認) と同一の部分構造を有する化合物と推定された。また、**1** は ^1H 及び ^{13}C -NMR においてタダラフィルに存在するN-メチル基及び窒素原子とカルボニル炭素に挟まれたメチレンに由来するシグナルが観測されないことから、タダラフィルにおけるジオキシピペラジン環が開裂し、カルボン酸メチルエステル並びにクロルメチレンを有する構造に変換したものと考えられた。そこでHMBCスペクトルを測定し、**1** の平面構造を最終的に Fig 1 に示すように決定した。

続いて **1** の1位及び3位の立体配置を決定する目的で、1D ROE 測定を行った。この結果、1位及び3位のプロトン同士にROEが観測され、1位と3位の相対配置はシスであることが明らかとなった (Fig. 2)。この相対立体配置はタダラフィルと同一のものであったが、絶対立体配置に関しては今回の検討では決定に到っていない。

本化合物について文献検索を行ったところ、最近、タダラフィルの合成前駆体としての報告がなされており¹⁾、その ^1H 及び ^{13}C -NMR のケミカルシフト値は **1** のそれと完全に一致した (Table 1)。以上の結果より **1** の構造を methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(chloroacetyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylate と決定した。

D. 考察

1 はタダラフィルの合成前駆体であり、**1** をメタノール中でメチルアミンを 50°Cで 16 時間、反応させることにより 65%の収率でタダラフィルが合成される旨、報告がなされている¹⁾。従って今回、本化合物が強壮を謳った「いわゆる健康食品」から検出されたことは、製造販売業者が摘発

の目を逃れるために監視体制が強化されているタダラフィルを添加せず、その合成前駆体である本化合物を意図的に添加し、流通させたものと考えられた。近年、このような事例が全国各地で増加しており、さらなる監視体制の強化、確立が重要であると考えられた。

E. 結論

千葉県において強壮を謳った「いわゆる健康食品」から検出された新規 ED 治療薬類似化合物について、各種 NMR 測定による構造解析を行い、その相対立体配置を含めた構造を決定した。本化合物は分子中に塩素原子を有し、既知の ED 治療薬であるタダラフィル（商品名シアリス、国内未承認）の合成前駆体であったことから、クロロブレタダラフィルと命名された。

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無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 長谷川貴志、西篠雅明、永田知子、川原信夫、合田幸広：いわゆる健康食品から検出された新規タダラフィル類縁物質について
日本薬学会第 127 年会（2007 年 3 月 28-30 日、富山）

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) Jefferson, D. R., Natarajan, S., Ganesan, A. *SYNLETT* (8), 1428-1430 (2004)

Table 1 Comparison of ¹H and ¹³C-NMR data of chloropretadalafil (1) and *cis* -tadalafil precursor

Position	chloropretadalafil ¹ H	<i>cis</i> -tadalafil precursor ¹ H*	chloropretadalafil ¹³ C	<i>cis</i> -tadalafil precursor ¹³ C*
1	6.75 (1H. s)	6.82 (1H. s)	51.3	51.9
3	5.19 (1H. d. <i>J</i> = 6.9 Hz)	5.25 (1H. d. <i>J</i> = 6.5 Hz)	52.3	52.9
4	3.07 (1H. dd. <i>J</i> = 6.9, 14.7 Hz)	3.14 (1H. dd. <i>J</i> = 6.5, 16.0 Hz)	21.0	21.7
	3.45 (1H. d. <i>J</i> = 14.7 Hz)	3.49 (1H. d. <i>J</i> = 16.0 Hz)		
4a			106.2	106.7
4b			125.8	126.4
5	7.54 (1H. d. <i>J</i> = 7.8 Hz)	7.60 (1H. d. <i>J</i> = 7.5 Hz)	118.1	118.5
6	7.02 (1H. dd. <i>J</i> = 7.3, 7.8 Hz)	7.08 (1H. app t. <i>J</i> = 7.3 Hz)	118.7	119.2
7	7.09 (1H. dd. <i>J</i> = 7.3, 8.3 Hz)	7.15 (1H. app t. <i>J</i> = 7.3, 7.8 Hz)	121.6	122.0
8	7.27 (1H. d. <i>J</i> = 8.3 Hz)	7.34 (1H. d. <i>J</i> = 7.8 Hz)	111.2	111.7
8a			136.3	137.0
9	10.87 (1H. s)	10.91 (1H. s)		
9a			129.9	130.5
1'			133.5	134.0
2'	6.63 (1H. br s)	6.70 (1H. s)	109.1	109.6
3'			146.9	147.5
4'			146.6	147.2
5'	6.80 (1H. d. <i>J</i> = 8.2 Hz)	6.85 (1H. d. <i>J</i> = 8.0 Hz)	107.6	108.0
6'	6.44 (1H. br d. <i>J</i> = 8.2 Hz)	6.52 (1H. d. <i>J</i> = 7.8 Hz)	122.4	122.9
7'	5.97 (2H. d. <i>J</i> = 16.6 Hz)	6.02 (2H. d. <i>J</i> = 7.3 Hz)	101.0	101.5
COCH ₂ Cl			166.8	167.3
COCH ₂ Cl	4.44 (1H. d. <i>J</i> = 13.8 Hz)	4.46 (1H. d. <i>J</i> = 13.8 Hz)	43.2	43.4
	4.83 (1H. d. <i>J</i> = 13.8 Hz)	4.85 (1H. d. <i>J</i> = 13.8 Hz)		
COOCH ₃			170.4	170.9
COOCH ₃	3.02 (3H. s)	3.09 (3H. s)	51.8	52.2

* Jefferson, D. R., Natarajan S., Ganesan, A. *SYNLETT* , (8), 1428-1430 (2004)

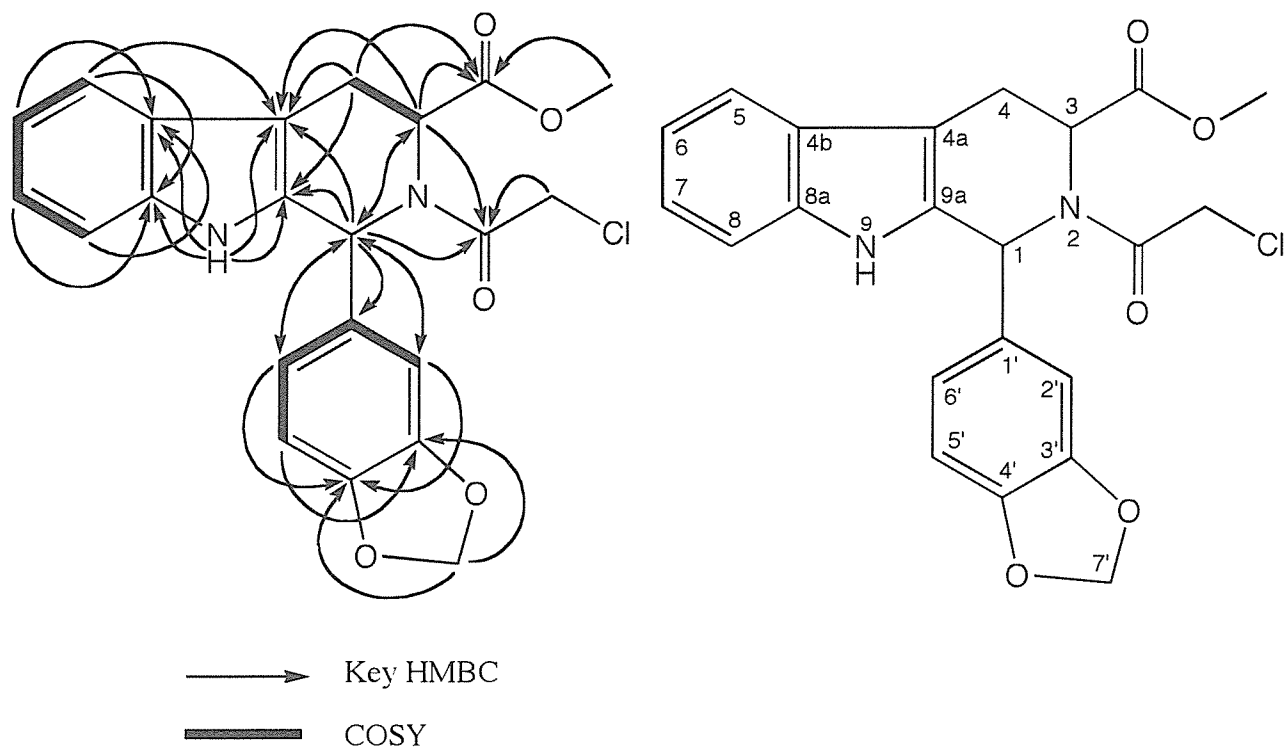


Fig. 1 ^1H - ^1H and Long-Range ^1H - ^{13}C NMR Correlations of chloropretadalafil (1)

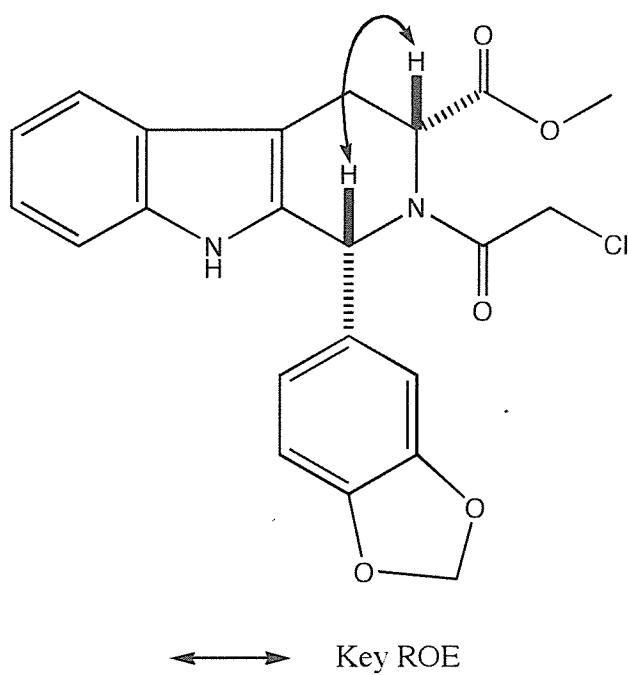


Fig. 2 Relative Structure of 1

厚生労働省科学研究費補助金（医薬品・医療機器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：専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

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
協力研究者：栗原 正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

－無承認無許可医薬品の規制のためのインシリコ評価法に関する研究－

無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発に関する研究を行っている。本年度は、ヒドロキシホンデナフィル、ノルネオシルデナフィル、カルボデナフィル、クロロブレタダラフィルと Human phosphodiesterase 5 (PDE5) とのコンピュータシミュレーションによる結合モデルを構築し、活性について考察した。

A. 研究目的

健康食品等に含まれる無承認無許可医薬品であるシルデナフィル類似物質（PDE5 阻害剤）が健康被害の危険性があり、大きな問題となっている。これら無承認無許可医薬品を迅速に規制、検挙するためには、これら不適切な化合物の迅速な活性評価スクリーニングが必要である。しかし、*in vitro*, *in vivo* 試験では時間がかかり、迅速な対応が困難である。そこで本研究では *in silico* による評価法の開発を目的とする。

B. 研究方法

昨年度と同様に、薬物と Human Phosphodiesterase 5 (PDE5) との結合モデルを以下のようにして構築した。PDE5 の三次元構造は X 線構造（PDB ID: 1UDT, 1UDU）を用いた。タンパク質内の薬物のコンフォメーションは、プログラム MacroModel (Schrodinger, Inc.) のコンフォメーションサーチ（条件：Mixed MCMM / Low Mode, Amber*)を用いて求

めた。コンフォメーションサーチで得られた最安定構造を結合モデルとした。水素結合を中心に結合モデルの評価を行った。

本年度はヒドロキシホンデナフィル、ノルネオシルデナフィル、カルボデナフィル、クロロブレタダラフィルについて行った。

C. 研究結果と考察

1. ヒドロキシホンデナフィル、ノルネオシルデナフィル、カルボデナフィルと PDE5 の結合モデル

ヒドロキシホンデナフィル、ノルネオシルデナフィル、カルボデナフィルと PDE5 (1UDT) の結合モデルをそれぞれ構築した。（図 3）その結果、これらはシルデナフィルが結合した部位にほぼ同一の配向性で結合することが明らかとなった。さらに、シルデナフィルは活性ドメインにおいて Gln817 と水素結合を形成するが、これらも同様に Gln817 と水素結合を形成しうることが示された。このことにより、これらは同一の作用機序でシルデナフィルの標的分子

である PDE5 を阻害しうることを極めて強く示唆する。

2. クロロプレタダラフィルと PDE5 の結合モデル

タダラフィル (Tadalafil) と PDE5 が結合した X 線構造 (1UDU) を基にして、クロロプレタダラフィルと PDE5 の最安定構造を構築した。その結果、クロロプレタダラフィルはタダラフィルと同様な結合様式をとり、Gln817 との水素結合も維持されている。(図 3) クロロプレタダラフィルは PDE5 を阻害することが予測される。

D. 結論

ヒドロキシホンデナフィル、ノルネオシルデナフィル、カルボデナフィル、クロロプレタダラフィルが PDE5 と結合し、阻害活性を有することを定性的に予測した。今後、定量性を得るためにはさらなる検討が必要である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 関連研究発表等

Y. Suhara, M. Kurihara, A. Kittaka, M. Ichikawa, Y. Ichikawa
Efficient Synthesis of Carbopeptoid Oligomers and their Conformational Studies.
Tetrahedron, **62**, 8207-8217 (2006)

W. Hakamata, M. Muroi, T. Nishio, T. Oku, A. Takatsuki, H. Osada, K. Fukuhara, H. Okuda, M. Kurihara

N-Linked Oligosaccharide Processing Enzymes as Molecular Targets for Drug Discover

J. Appl. Glycosci., **53**, 149-154 (2006)

T. Fujishima, R. Tsutsumi, Y. Negishi, S. Fujii, H. Takayama, A. Kittaka, M. Kurihara.
Methyl-introduced A-ring Analogues of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃: Synthesis and Biological Evaluation

Anticancer Res., **26**, 2633-2636 (2006)

M. Kurihara, Y. Sato, W. Hakamata, H. Okuda, Y. Demizu, M. Nagano, N. Kawabe, M. Doi, M. Tanaka, H. Suemune

Computational Study on Conformation of Oligopeptides Containing Chiral Cyclic α , β -Disubstituted α -Amino Acids

Peptide Science 2005, 371-372 (2006)

W. Hakamata, H. Okuda, M. Kurihara

Design and Screening Strategy of α -Glucosidase Inhibitor Based on Enzymological Information

Current Topics in Medicinal Chemistry in press

Y. Demizu, M. Tanaka, M. Nagano, M. Kurihara, M. Doi, T. Maruyama, H. Suemune
Controlling 3_{10} -Helix and α -Helix of Short Peptides in the Solid State

Chem. Pharm. Bull., in press

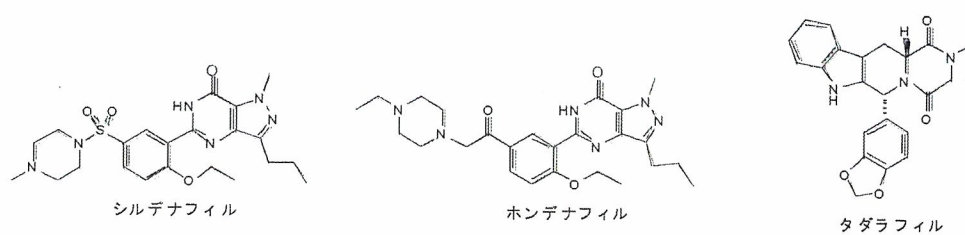


図 1

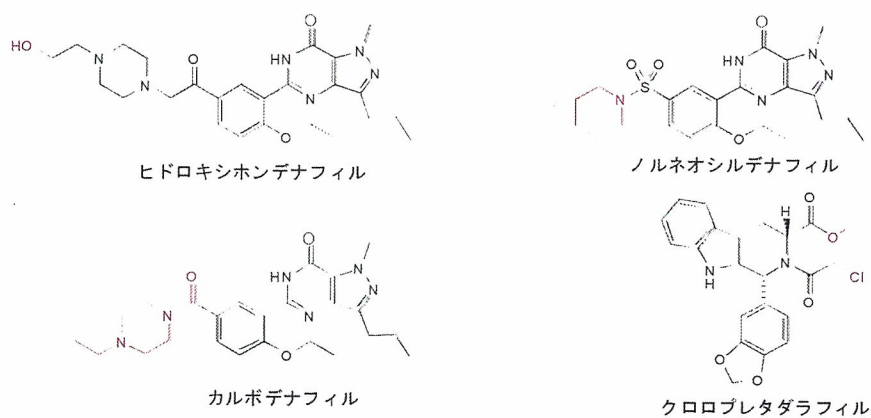


図 2

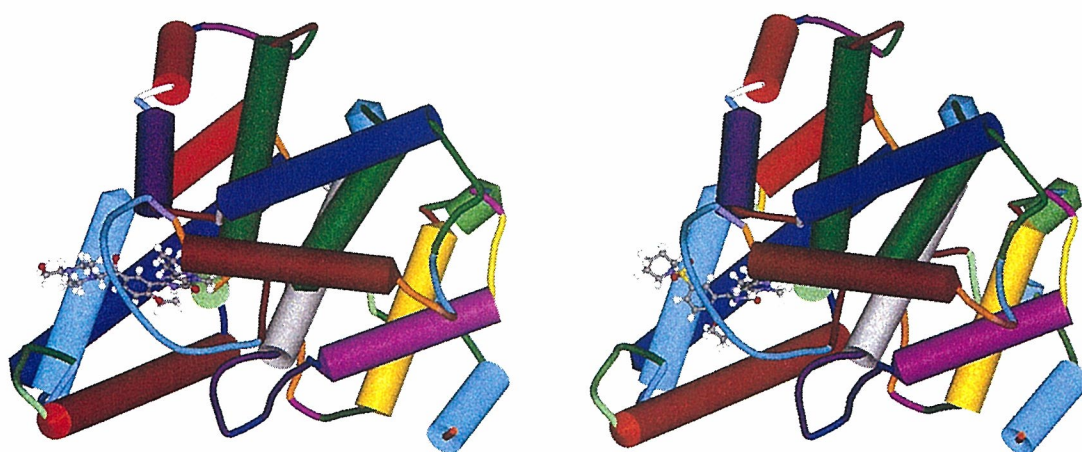


図 3 : ヒドロキシホンデナフィル (左)、ノルネオシルデナフィル (右) と PDE5 との結合モデル

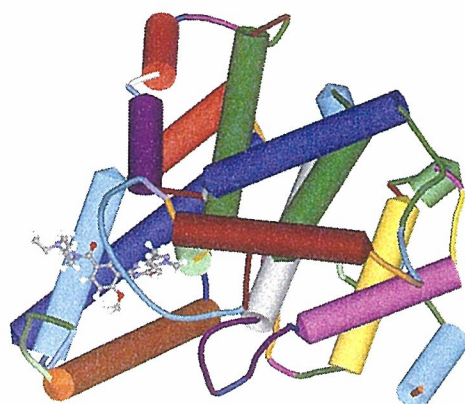


図4：カルボデナフィルと PDE5 との結合モデル

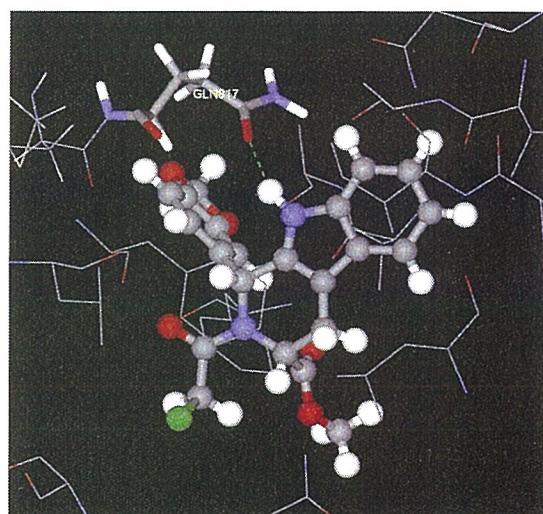
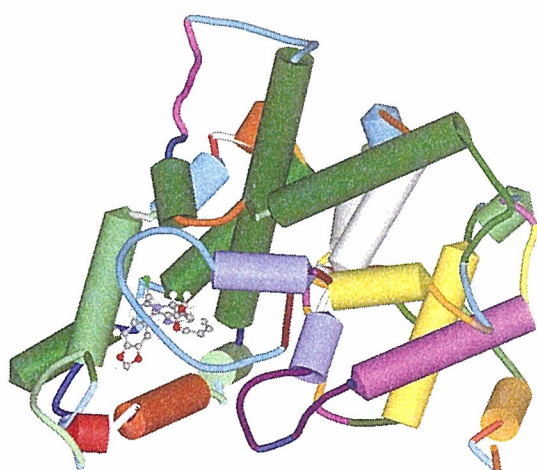


図5：クロブプレタダラフィルと PDE5 の結合モデル。タダラフィルと同様に、817 のグルタミンと水素結合を形成することが予想される

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器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 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

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
研究協力者 川原信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

ダミアナ (*Turnera diffusa* Willd) の成分研究

専ら医薬品として区分されるダミアナの安全性を評価する目的で、不確定要素に関する研究報告の有無を調査すると共に、海外から入手したダミアナ (*Turnera diffusa* Willd) の成分研究を行った。ドラージェンドルフ試薬による呈色反応を指標とし分画を行った結果、一部の画分においてアルカロイドと推定される成分が検出された。

協力研究者

松本輝樹 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
花尻瑠理 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
室長

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」³⁾(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」に収載された331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。

ダミアナ (*Turnera diffusa* Willd) は、「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」において、C評価が下されており、その処遇に関してはさらに検討の必要があると見なされた。¹⁾ 問題とされているのは、わが国において使用実績がないこと及びWeb上で大麻様の幻覚作用を有するとの報告があることに起因している。前者に関しては現在も使用実績はなく、健康被害に関しても報告がない。加えて、長期間にわたり大量に摂取すると、肝臓を害するとの説があるが、これに該当する研

究報告も認めることは出来なかった。後者に関しては、海外においてその効果を実証するべく試用報告が、非公式に Web 上に記載されているが、大多数のものはその様な効果は得られなかったとしている。以上のことを踏まえると、本植物において、特に問題は見当たらないが、以下に示すような興味深い報告も近年、散見された。

生理活性に関する報告では Arletti らによると、水抽出物の経口投与による影響を雄ラットにて評価したところ、性的に活発な個体に関しては影響を与えないが、性的に活発でないまたは無能な個体に関しては、射精能の向上など性行動の亢進を認めたと報告している。²⁾ また Kumar らによると、市販されているチンキ剤をマウスに経口投与し、高架式十字迷路における不安行動を観察したところ、明らかな行動変化が見て取れたと報告している。³⁾

他方成分に関する報告では、CHCl₃ 抽出物及び MeOH 抽出物においてアルカロイドの存在を示唆する結果が得られ、それらはダミアナ由来の既知化合物である cyanogenic glycoside (Tetraphyllin B) とは別のものであるとの記載があった。⁴⁾ またこれとは別に、フラボノイド、テルペン、サッカライド等の二次代謝産物 35 種を単離・構造決定した報告例もあった。⁵⁾

最近ダミアナに関し報告されているものは、どれも興味深いものであり、生理活性に関しては直接健康被害に関与し兼ねないものでもある。性行動に関する報告は、ヒトに置き換えた際健常者に対しての影響は軽微であることが想像される。しかし、抗不安作用に関しては、近年興味本位での抗不安薬の悪用が取り立たされており、楽観視することは出来ない。ただし、どちらの報告に関しても、活性本態の特定は出来ていないことから、今

後の展開を注視する必要があるものと思われる。一方含有成分に関する報告ではアルカロイドの存在は注目に値する。アルカロイドは総じて強い生物活性を有し、医薬品として利用されるものも多く、また激しい生理作用や生物活性のために、有毒物質として存在することも多い。故にアルカロイドを含むものに関しては細心の注意を払う必要のある場合もある。本研究班にて報告している詳細データにおいても、アルカロイドの存在有無に関し調査内容を記載しており、無視することは出来ない。

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ダミアナ *Turnera diffusa* Willd (ツルネラ科) 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、特にアルカロイドの存在を確認するべく研究に着手したので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬

ダミアナ (*T. diffusa*) は海外よりインターネットを利用して地上部を入手した。オープンカラムの担体は、Kieselgel 60 (Merck 製) を用い、アルカロイドの検出は、蛍光剤入り TLC plates Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck 製) にて各画分を展開後、ドラージェンドルフ試薬にて確認を行った。なお、ドラージェンドルフ試薬は日本薬局方第十四改正に従い用時調製した。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。

ダミアナ (*T. diffusa*) の分画操作

ダミアナの抽出及び分画

ダミアナ (*T. diffusa*) の地上部 400 g を MeOH 3.0 L にて温浸し、この操作を三回繰り返し、得られた抽出液を減圧下濃縮することにより、抽出物 92.4 g を得た。抽出物は MeOH 1.5 L に溶解させ、MeOH/CHCl₃ 混液を用いた活性炭カラムに付し、4 画分 (fr. A ~ D) を得た。そのうち MeOH/CHCl₃ (1 : 2) 及び CHCl₃ にて溶出させた fr. C 及び D に関し、シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにて分画し、それぞれ 14 画分 (fr. C1 ~ C14) 及び 6 画分 (fr. D1 ~ D6) を得た。(Chart 1)

C. 研究結果

ドラーゲンドルフ試薬によるアルカロイド様成分の検出

本検討にて得られた全ての画分は、その一部を取り、TLC にて展開・乾燥した後、ドラーゲンドルフ試薬にディップすることにより、アルカロイドの有無を確認した。その結果、MeOH 抽出物及び fr. A ~ D においてその存在を示唆する反応は見られなかったが、さらに分画した fr. C4 ~ C14 からは R_f 値の異なる 3 種の陽性反応が検出された。

D. 考察

ダミアナに含まれるドラーゲンドルフ試薬の陽性反応は、精製段階の向上に伴い表れていることから、その存在は微量であることが示された。また、fr. A 及び B は現状では陽性反応を示していないが、今後継続的に精製を行うことにより、その存在を示すことも想像される。現在、アルカロイドの存在が示唆されている fr. C4 ~ C14 に関し、関与成分の特定を行っているが、ドラーゲンドルフ試薬には偽陽性反応を示す化合物の存

在も報告されていることから、⁶⁾ 真偽も含めて検討を行う必要があるものと考えられる。

E. 結論

専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) の有効性および安全性等の評価に関する研究より、詳細な成分検索が必要と判断がなされたダミアナの含有成分を明らかにすることを目的とし、成分研究に着手した。その結果、画分の一部にアルカロイドの存在を示唆する呈色スポットが確認された。

今後はこれら呈色成分の構造を決定すると共に、未着手の画分に関しても同様の手法を用い、単離、精製を行う予定である。また幻覚性成分の存在が確認された場合、指定医薬品として収載すべきであるかの判断に関しても検討する必要があると考えられる。

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

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

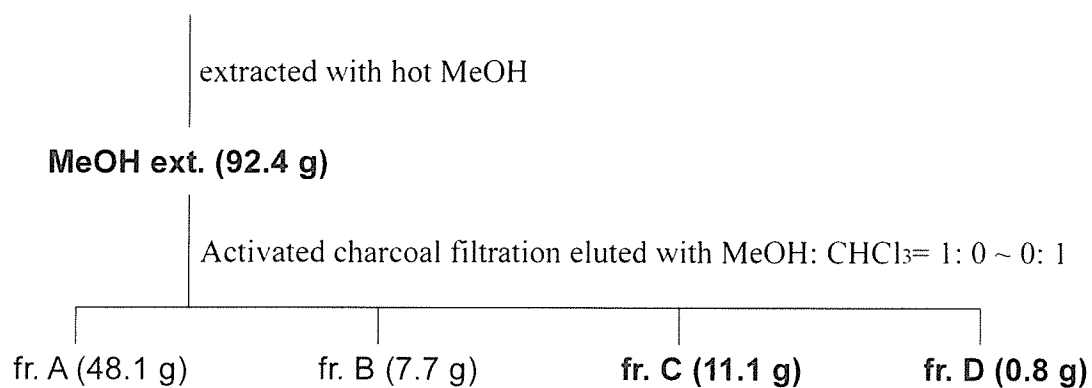
3. その他

なし

参考文献

- 1) 専ら医薬品として使用される成分本質の有効性及び安全性等の評価に対する研究。平成 17 年度 総括・分担研究報告書、P179
- 2) Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A, Psychopharmacology (Berl), **143**(1), 15-19 (1999)
- 3) Kumar S, Sharma A, Evid Based Complement Alternat Med, **2**(1), 117-119 (2005)
- 4) Kumar S, Taneja R, Sharma A, J Med Food, **9**(2), 254-260 (2006)
- 5) Zhao J, Pawar RS, Ali Z, Khan IA, J Nat Prod., (2007) in press.
- 6) Furgieuele AR, Farnsworth NR, Buckley JP, J. Pharm. Sci., **51**(12), 1156-1162 (2006); Akaike S, Sumino M, Sekine T, Seo S, Kimura N, Ikegami F, Chem. Pharm. Bull., **51**(2), 197-199 (2003)

***Turnera diffusa* (400 g)**



1) fr. C (11.1 g)

- 1) Silica gel column eluted with CHCl₃: MeOH= 1: 0 ~ 0:1
- 2) Dragendorff's reagent is used to detect the presence of alkaloid

2) fr. D (0.8 g)

- 1) Silica gel column eluted with CHCl₃: MeOH= 1: 0 ~ 0:1
- 2) Dragendorff's reagent is used to detect the presence of alkaloid

Chart 1. Procedures for extraction of the dried aerial parts of *T. diffusa*

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器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 専ら医薬品の規制範囲と見直しに関する研究

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长
研究協力者 川原信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

—ロウハクカ (*Bauhinia variegata*) の成分研究 —

専ら医薬品として区分されるロウハクカについて、確実な成分情報を入手する目的で、日本において入手したロウハクカ (*Bauhinia variegata*) について成分研究を行った。その結果、新規化合物として dibenzoxepin 誘導体 **1** 及び **2** 並びに stilbene 系配糖体 **3** 及び **4** と共に既知化合物として β -sitosterol、pacharin、(+)-catechin、(-)-epigallo-catechin 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。

研究協力者

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」^{注)}(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」)。分担研究者らは、平成 15 年度より、本研究班の前身である「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等の評価に関する研究」において、上記「専ら医薬品リスト」に記載された 331 品目について、文献調査や実証的研究を行い、最終的に「A 安全性に十分な配慮が必要であり、専ら医薬品と考えられる、B 国内外を含め医薬品として使用実態があり、専ら医薬品と考えられる、C さらに調査を続ける必要がある、D 現在のところ判断データがない、E 医薬品としての使用実績が乏しく、含有成分等からも食薬区分の見直し対象となり得ると考えられる」の 5 段階の評価を行って来た。

ロウハクカ (老白花、*Bauhinia variegata* L.) は、マメ科 (Leguminosae)、あるいはジャケツイバラ科 (Caesalpinaceae) 植物由来の生薬で、使用部位は樹皮と花とされている。中薬大辞典では主要な

生理活性として消炎、解毒が記載されている。毒性データとして、マウスに対し LD50 値が >1 g/kg (部位不明)、TDL0 値が 250 mg/kg (樹皮) と報告されている。また、これまでにロウハクカに含有されている成分として、 β -sitosterol、friedelin、palmitic acid、aplysterol、taraceran-3 α -ol、naringenin、kaempferol、quercetin、lupeol、dihydrodibenzoxepin、flavonoid 等が報告¹⁻³⁾されているが、食薬区分を確実に判断するためのデータが乏しく、前回の調査報告書での評価は、C or D (生薬として日本で入手できるのであればC) とされた。本研究では、日本で入手できたロウハクカについて、食薬区分の判断を行うための確実な成分情報を入手する目的で、含有成分の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

試料及び試薬

ロウハクカは (株) ウチダ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_4 99.8%、Chloroform- d_1 99.5% (Merck 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 を用いた。¹H-NMR 及び ¹³C-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。

化合物の分画

ロウハクカ (*B. variegata*) の樹皮 850 g を粉碎した。これをメタノールで温浸した後、溶媒を除去し、メタノール抽出物 (72.4 g) を得た。このエキスを水を加えてヘキサン、酢酸エチル及び 1-ブタノールで順次分配することにより、ヘキサン移行分画 (447.6 mg)、酢酸エチル移行分画 (9.5 g)、1-ブタノール移行分画 (43.3 g) を得た (Chart 1)。

ヘキサン分画をシリカゲルカラムクロマトに付し、ヘキサン/クロロホルム (3:1、2:1、1:1、1:2、0:1) の順に溶出した後、更にシリカゲルカラムクロマトを繰り返し分離、精製した。その結果、新規化合物として 2 種の dibenzoxepin 系化合物 **1** (2.8 mg) と **2** (9.8 mg)、既知化合物として β -sitosterol (61.1 mg) を単離、同定した (Chart 2、Figure 1)。

また、酢酸エチル分画をシリカゲルカラムクロマトに付し、クロロホルム/メタノール (10:1、5:1、3:1、1:1、0:1) の順に溶出した後、更にシリカゲルカラムクロマト、または充填剤に ODS を用いた HPLC で分離、精製した。その結果、新規化合物として 2 種の stilbene 系配糖体化合物 **3** (2.2 mg) と **4** (5.2 mg)、既知化合物として pacharin (15.9 mg)、(+)-catechin (10.2 mg)、(-)-epigallocatechin (18.7 mg) を単離同定した (Chart 3、Figure 1)。

C. 研究結果

化合物 **1** は無色無定形物質として得られた。¹H-NMR スペクトルでは 6 つの二重結合上のプロトン (δ 7.12, 6.95, 6.89, 6.75, 6.56, 6.39)、2 つの *O*-メチル基 (δ 3.97, 3.78)、1 つのメチル基 (δ 2.14) のシグナルが観測された (Table 1)。更に ¹³C-NMR スペクトルにおいて、14 個の二重結合上炭素 (δ 160.0-105.1)、2 つの *O*-メチル基 (δ 61.6, 55.9) 及び 1 つのメチル基 (δ 9.2) のシグナルと推測される、合計 17 本のシグナルが観測された (Table 1)。化合物 **1** の ¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトルデータを既に報告されている pacharin の値と比較すると、C-1 位の *O*-メチル基シグナルを除き、pacharin のものと類似していることから、化合物 **1** は pacharin と同様な dibenzoxepin 系化合物と推測した (Figure 1)。HMBC スペクトルにおいて 2 つの *O*-メチル基は C-1 と C-3 位にそれぞれ結合していると考えられた (Figure 2)。以上のスペクトルデータと ¹H-¹H COSY、HMQC 及び HMBC スペクトル等の 2 次元 NMR 解析により本化合物の構造を **1** 式と決定した (Figure 1)。

化合物 **2** は無色無定形物質として得られた。¹H-NMR スペクトルでは 5 つの二重結合上のプロトン (δ 7.00, 6.91, 6.68, 6.56, 6.44)、3 つの *O*-メチル基 (δ 4.11, 3.85, 3.77) のシグナルが観測された (Table 1)。更に ¹³C-NMR スペクトルにおいて、14 個の二重結合上炭素 (δ 107.7-150.0) 及び 3 つの *O*-メチル基 (δ 61.8, 56.5, 56.3) のシグナルと推測される、合計 17 本のシグナルが観測された (Table 1)。化合物 **2** の ¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトルデータを化合物 **1** の値と比較すると、もう 1 つの *O*-メチル基のシグナルが観測されたが、C-2 位のメチル基が観測されなかった。化合物 **2** の C-2 位の炭素シグナル (δ 139.7) が化合物 **1** の値 (δ 121.8) と比べ 17.9 ppm 低磁場にシフトし

ていることから化合物 **2** の C-2 位には水酸基が結合していると推測した。また、HMBC スペクトルにおいて 3 つの *O*-メチル基は C-1、C-3、C-7 位にそれぞれ結合していると考えられた (Figure 2)。以上のスペクトルデータと ¹H-¹H COSY、HMQC 及び HMBC スペクトル等の 2 次元 NMR 解析により本化合物の構造を **2** 式と決定した (Figure 1)。

化合物 **3** は無色無定形物質として得られた。¹H-NMR スペクトルでは 6 つの二重結合上のプロトン (δ 7.09, 6.99, 6.75, 6.73, 6.32, 6.25)、1 つの *O*-メチル基 (δ 3.81) 及び 2 つのメチレン基 (δ 2.97, 2.89, 2.86, 2.84) のシグナルが観測された (Table 2)。更に ¹³C-NMR スペクトルにおいて、12 個の二重結合上炭素 (δ 156.2-99.5)、1 つの *O*-メチル基 (δ 56.3)、2 つのメチレン基 (δ 32.1, 31.8) 及びヘキソース (δ 105.2, 78.1, 78.0, 75.9, 71.6, 62.8) のシグナルを含む、合計 21 本のシグナルが観測され、化合物 **3** は stilbene 系配糖体と推測した (Table 2)。また、HMBC スペクトルにおいて結合糖のアノーマプロトンと 4 位の炭素間に、*O*-メチル基と 3 位の炭素間に相関が観測されたことから、糖は 4 位の酸素原子に、*O*-メチル基は 3 位にそれぞれ結合していると考えられた (Figure 3)。以上のスペクトルデータと ¹H-¹H COSY、HMQC 及び HMBC スペクトル等の 2 次元 NMR 解析により本化合物の構造を **3** 式と決定した (Figure 1)。

化合物 **4** は無色無定形物質として得られた。¹H-NMR スペクトルでは 6 つの二重結合上のプロトン [δ 7.04, 6.56, 6.52, 6.37 (x 2), 6.27]、2 つの *O*-メチル基 [δ 3.73 (x 2)] 及び 2 つのメチレン基 (δ 2.93, 2.87, 2.84, 2.82) のシグナルが観測された (Table 2)。更に ¹³C-NMR スペクトルにおいて、12 個の二重結合上炭素 (δ 162.1-107.7)、2

つの *O*-メチル基 [δ 55.6 (x 2)], 2 つのメチレン基 (δ 37.7, 33.4) 及びヘキソース (δ 104.0, 78.4, 78.1, 75.3, 71.5, 62.7) のシグナルを含む、合計 22 本のシグナルが観測された。化合物 **4** の ^1H - 及び ^{13}C -NMR スペクトルデータが化合物 **3** の値と類似していることから、化合物 **4** は **3** と同様な stilbene 系配糖体と推測した (Figure 1)。また、HMBC スペクトルの解析により、糖は 4 位の酸素に、*O*-メチル基は 3' と 5' 位にそれぞれ結合していると考えられた (Figure 3)。以上のスペクトルデータと ^1H - ^1H COSY、HMQC 及び HMBC スペクトル等の 2 次元 NMR 解析により本化合物の構造を **4** 式と決定した (Figure 1)。

D. 考察

今回の成分研究において、化合物 **1-4**、 β -sitosterol、pacharin、(+)-catechin、(-)-epigallocatechin 等が単離、構造決定された。それらのうち、dibenzoxepin 誘導体である **1** 及び **2** 並びに stilbene 系配糖体である **3** 及び **4** は天然から初めて単離された新規化合物であった。

E. 結論

「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等の評価に関する研究」において、評価 C 「（さらに成分等について）調査を続ける必要がある」であったロウハクカについて成分検討を行い、既知化合物 β -sitosterol、pacharin、(+)-catechin、(-)-epigallocatechin を単離した。さらに新規化合物として dibenzoxepin 誘導

体 **1** 及び **2**、stilbene 系配糖体 **3** 及び **4** 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っ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、今後、これらの分画について引き続き成分検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 金益輝、川原信夫、合田幸広：ロウハクカの成分について。日本薬学会第 127 年会 (2007 年 3 月 28-30 日、富山)

G. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

- 1) 専ら医薬品として使用される成分本質の有効性及び安全性等の評価に対する研究。平成 17 年度 総括・分担研究報告書、P298
- 2) Gupta A. K., Vidyapati T. J., Chauhan J. S., *Planta medica*, **38**, 174-176 (1980)
- 3) Reddy M. V. B., Reddy M. K., Gunasekar D., Caux C., Bodo B., *Phytochemistry*, **64**, 879-882 (2003)

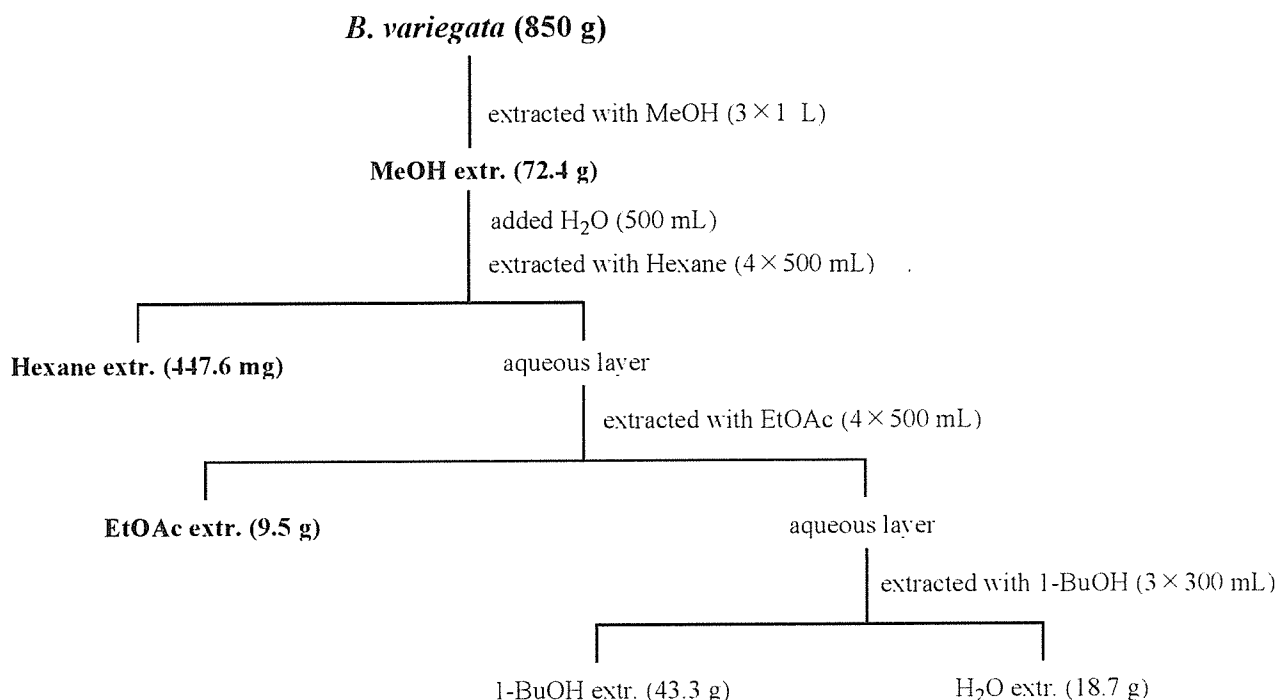


Chart 1. Procedures for extraction of the roots of *B. variegata*

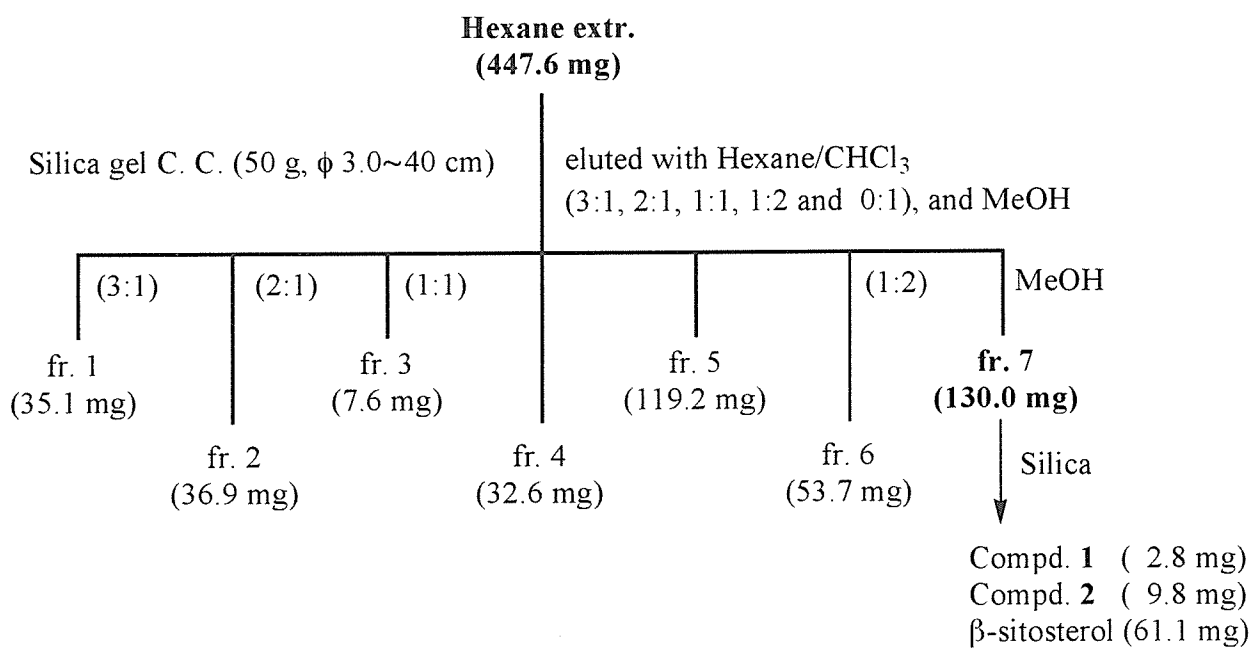


Chart 2. Procedures for separation of Hexane extr.

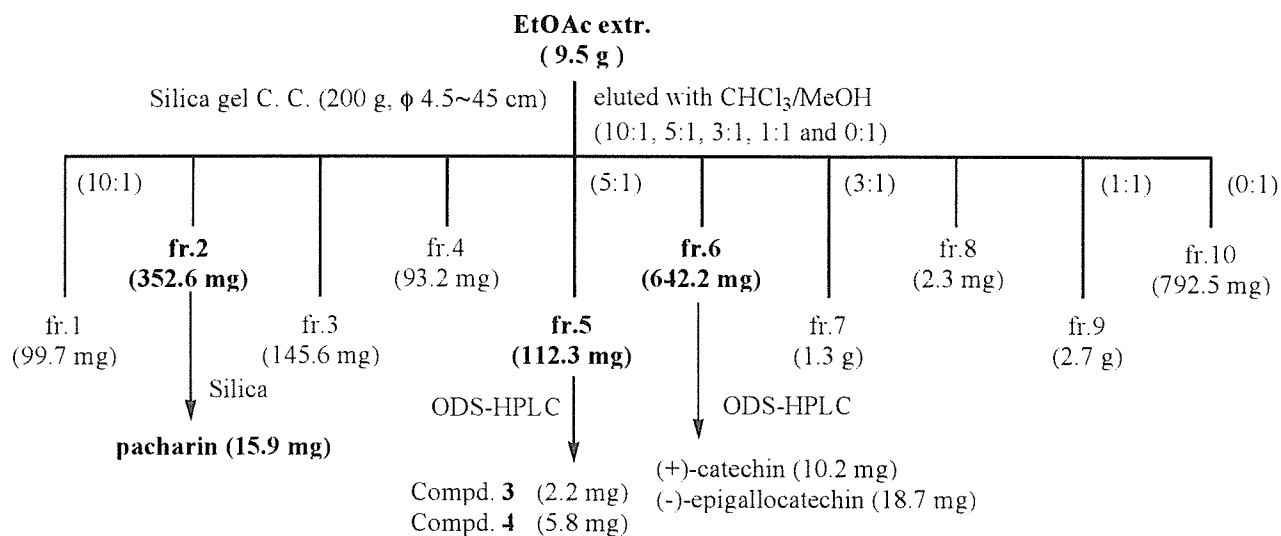


Chart 3. Procedures for separation of EtOAc extr.

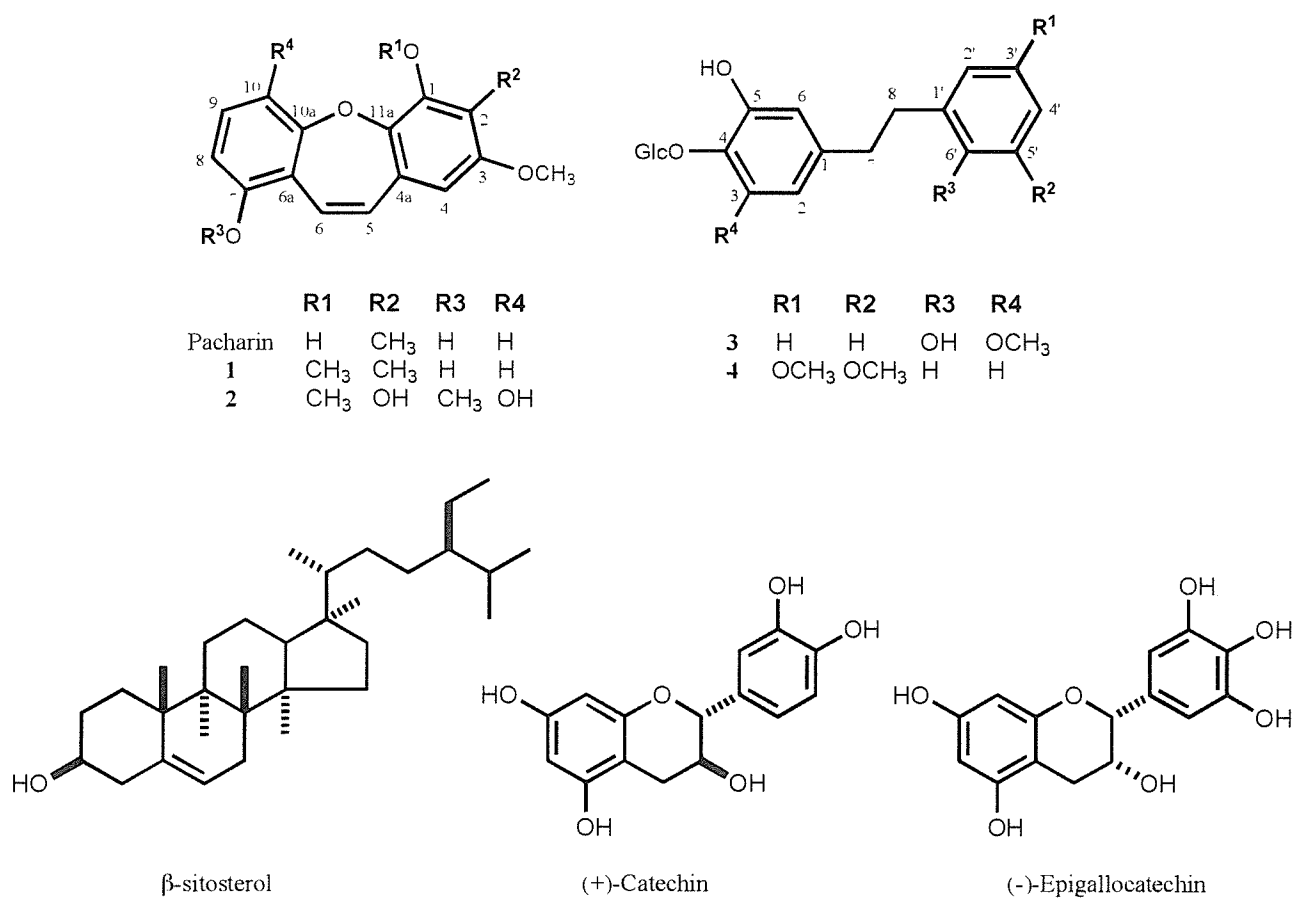


Figure 1.

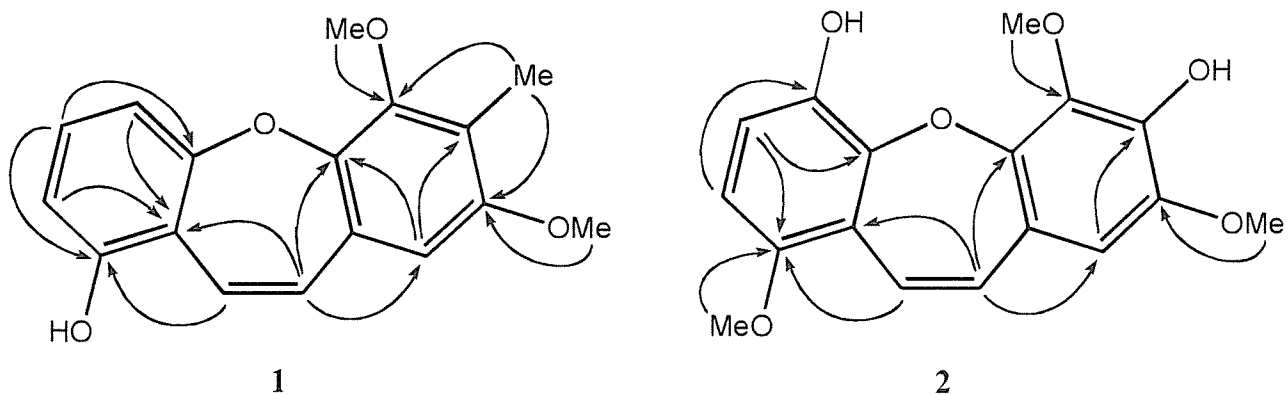


Figure 2. Selected HMBC correlations for **1** and **2**

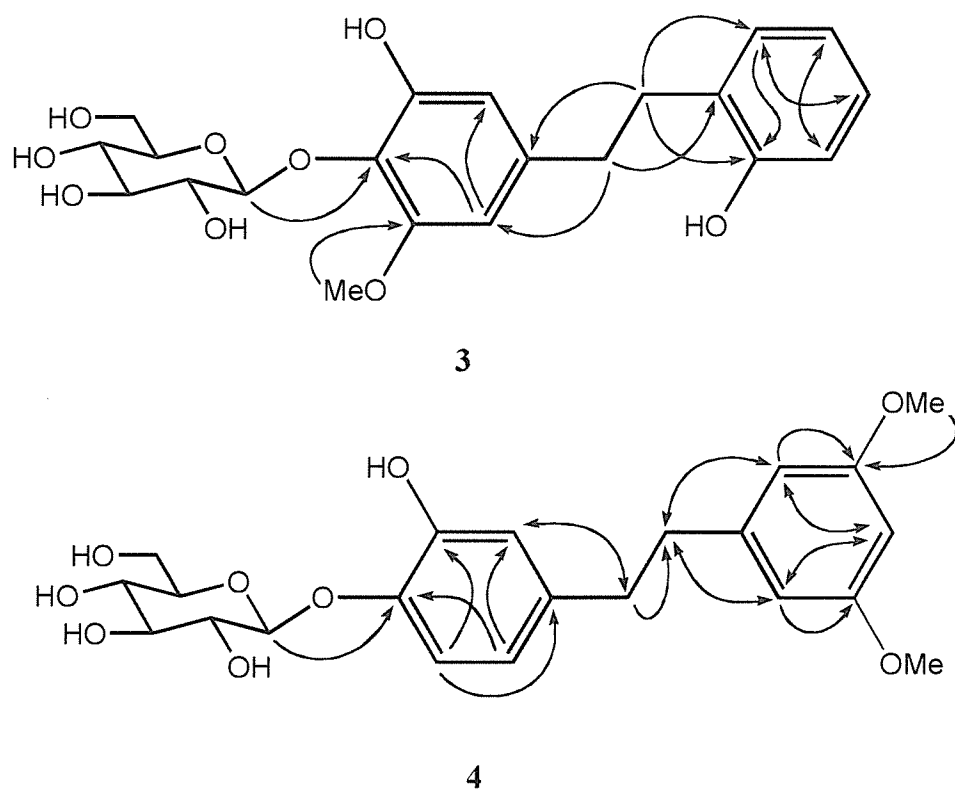


Figure 3. Selected HMBC correlations for **3** and **4**