

200808010B

厚生労働科学研究費補助金

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

「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

(H18-医薬-一般-014)

研究代表者 海老塚 豊

平成21(2009)年3月

目 次

I.	総合研究報告書	
	「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究	
	海老塚 豊 1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 13
III.	研究成果の刊行物・別刷 15

「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究

主任研究者 海老塚 豊 東京大学大学院薬学系研究科教授

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」¹⁾（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」）。申請者らは、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）の有効性およ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、徹底的な調査・分析を行い、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いる。同時に、現在食薬区分上分類がなされていない新規成分本質（原材料）について、国内外の医薬品としての使用実態、毒性、麻薬様作用、含有成分の構造等に基づき、食品又は医薬品のどちらに分類すべきものであるか調査を行い、さらに判断の根拠となる各種実験を行ってきた。（その結果を基礎に、平成 19 年 4 月に医薬品の範囲に関する基準が改正（平成 19 年 4 月 17 日 薬発第 1115003 号）された。）本研究では、引き続き、新規に申請のあった成分本質（原材料）について同様の検討を行った。また、上記 C、D に判断された成分本質（原材料）のうち、ダミアナ、ホウビソウ、ロウハクハ、スキャルキャップ、フタバアオイ、トウジン等について、食薬区分の観点から成分検討、基原種解析等を行った。また、違法ドラッグ取り締まり等で新たに発見される化合物、特に強壯を標榜する健康食品に含まれる化合物について、食薬区分の判断を行うため、構造の決定、活性の推定等を行うとともに、分析法についても検討を行った。さらに、「専ら医薬品」であるアルニカについてヨーロッパ・米国・日本で市場品を購入し、食薬区分で規定する個々の成分本質（原材料）の範囲を規定するための種の確定を行うとともに、諸外国の実態を調査した。さらに、中枢作用を標榜して健康食品市場に流通しているパッションフラワーについて市場品を購入するとともに、標準植物試料を集め、食薬区分で規定する個々の成分本質（原材料）について規制の範囲を規定するため遺伝子解析並びに成分のプロファイル分析による基原種鑑別を行った。また、日本で流通する商品の輸入元である可能性が高いパキスタン市場で混乱がおきているセロリ種子について、形態と遺伝子鑑別による種の同定を行った。本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、厚生労働省の健康機器管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知される。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に反映されるものである。

分担研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

大塚英昭 広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授

水上 元 名古屋市立大学大学院薬学研究科教授

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」⁴⁾（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」）、申請者らは、平成15年度より、上記「専ら医薬品リスト」に記載された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、徹底的な調査・分析を行い、最終的に「A 安全性に充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いる。同時に、現在食薬区分上分類がなされていない新規成分本質（原材料）について、国内外の医薬品としての使用実態、毒性、麻薬様作用、含有成分の構造等に基づき、食品又は医薬品のどち

らに分類すべきものであるか調査を行い、さらに判断の根拠となる各種実験を行ってきた。本研究では、引き続き、新規に申請のあった成分本質（原材料）及び、同様の検討を行うものである。

平成13年3月27日付薬発第243号厚生労働省医薬局長通知では、専ら医薬品リストにも、「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（原材料）リスト」（非医薬品リスト）にも収載されていない成分本質（原材料）を含む製品を輸入販売又は製造する事業者は、都道府県薬務担当課を通じて、厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に、その判断を求められることができると記載されている。本研究の第一の目的は、厚生労働省における本判断のための基礎資料を準備することにある。また、同通知では、「リストについては、科学的な検証に基づき定期的に見直しを行うこととし、概ね一年程度の期間毎に追加、訂正、削除等を行うこととする」としているが、前述したC、Dに判断された成分本質（原材料）は、現段階では、見直しが不可能である。本研究を遂行することで、これらの成分本質について、科学的な知見に基づいた見直しが可能になる。また、違法ドラッグ取り締まり等で新たに発見される化合物は、構造や、生理活性が不明の成分がほとんどであるため、本研究のような実証的な研究を遂行することで、初めて食薬区分の判断が可能になり、国民の健康保護に貢献することが出来る。また、天然由来の成分本質（原材料）について判断を行う際には、その範囲を規定するための基原を確定する必要がある。また、「専ら医薬品」と判断された成分本質（原材料）の場合、薬事法下での取り締まりが必要となるが、取り締まりを行うためには、同定するための分析法が必須である。従って、これらの検討を本研究で行うことで、初めて、保健衛生上実効ある食薬区分の判断が行えることになる。以上のように、本研究は、食薬区分に関連して、厚生

労働行政に直接貢献することを目的とした研究である。

なお、平成 15 年度からの一連の研究の成果に基づき、平成 18 年 11 月 10 日に、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長の招集により医薬品の成分本質に関するワーキンググループが開催され、E 評価を受けたほとんどの成分・本質について見直しが勧告され、その結果を基礎に、平成 19 年 4 月に医薬品の範囲に関する基準が改正（平成 19 年 4 月 17 日 医薬発第 1115003 号）され、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）が 321 成分（植物由来 242、動物由来 21、その他 58）となった。さらに、平成 19 年度までの成果に基づき、平成 20 年 3 月 13 日に、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長の招集により医薬品の成分本質に関するワーキンググループが開催され、本ワーキンググループでの議論の後、平成 21 年 2 月 20 日厚生労働省医薬食品局長通知（薬食 0220001 号）「医薬品の範囲に関する基準の一部改正について」が出された。

B. 研究方法

新規に申請のあった成分本質（原材料）について、国内外の医薬品としての使用実態、毒性、麻薬様作用、含有成分の構造等について文献調査を行い、その品目が「専ら医薬品」に分類すべきものであるかどうか検討した。

調査項目は、主に以下の①～⑩である。

- ①名称、他名等、部位等、備考
- ②学名、基原植物和名等、生薬名、英名等
- ③医薬品としての使用実態があるか
- ④毒性データ
- ⑤アルカロイド、毒性タンパク、毒薬劇薬指定成分等を含むか
- ⑥麻薬、向精神薬及び覚醒剤様作用があるもの（類似化合物も含む）及びその原料植物であるか
- ⑦主要な二次代謝産物等
- ⑧主要な生理活性

⑨その他注意すべき点

⑩指定医薬品または要指示医薬品に相当する成分を含むか

本調査では、原著論文以外に、主に以下の参考文献を使用している。

- 1：日本薬局方（15 局、15 局第一追補、JP フォーラム掲載の 15 局第二追補案）
- 2：日本薬局方外生薬規格
- 3：（新訂）和漢薬、医歯薬出版（赤松金芳）
- 4：中薬大辞典、小学館
- 5：The Complete German Commission E Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicines, The American Botanical Council (Com E)
- 6：Botanical Safety Handbook, American Herbal Products Association
- 7：Dictionary of Plant Toxins, Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Willey
- 8：WHO Monographs on Selected Medicinal Plants
- 9：ブラジル産 薬用植物事典（橋本悟郎）
- 10：和漢薬百科図鑑（難波恒雄）
- 11：原色牧野和漢薬草大図鑑、北隆館
- 12：（原色）牧野植物大図鑑：北隆館
- 13：日本の野生植物、平凡社
- 14：園芸植物大辞典、小学館
- 15：世界の植物、朝日新聞社
- 16：中国薬典 2005

これらの参考文献のうち、①名称、で規定する基原植物を確定するために、まず、日本の公定書である文献 1, 2 を優先した。次いで、和漢薬と考えられるものでは、医薬品の範囲に関する基準、別添 1 で参考文献に指定されている、文献 3, 4 での記載を優先し、次いで、10-16 等の記載内容等を考慮し、最も相応しいと考えられるものを選択した。また、欧米で用いられている生薬、ハーブについては、同様に別添 1 で記載のある 5, 6, 7, 8 の記載について優先的に考慮し、他文献も踏まえて最も相応しいと考えられるものを選択した。

また、南米原産の植物（生薬、ハーブ）については9の記載を、主に参考とした。さらに、英名については、主に文献5,6を参考とした。なお、局方での生薬の正名は、カタカナであるが、通知での生薬名は、参考情報であるので、基本的に、より情報が多い漢字で記載した。

③は、文献1-2, 5, USP, 一般用漢方処方の手引き（じほう, 通称210処方）, JAPICの日本医薬品集（医療用, 一般用）並びに、インターネット等の情報を参考にした。医薬品としての使用実態は、日本で医薬品並びにその成分として承認されている場合（210処方の構成生薬である場合を含む）、文献5（Com E）やUSPに記載されている場合には、使用実態があるとし、文献3, 4, 9, 10, 16等に記載されているだけでは、使用実態があると思わず、その情報を別に記載した。

④は、②の基原植物の学名や英名を、植物毒性データベースである RTECS で検索するとともに、Merck Index等の情報も参考とした。また、学名に対応するデータベースがない場合には、同属植物のデータベースも学名とともに記載した。さらに、基原植物が含有する化合物の毒性データベースについても、ここに記載した。

⑤, ⑥, ⑦は、学名でケミカルアブストラクト(CA)で検索した要旨並びに原著論文を参考にするとともに、文献7,10並びにPhytochemical Dictionary (Jeffery B. Harborne FRS, Herbert Baxter, Gerard P. Moss)等を参考にした。

⑧は、学名でケミカルアブストラクトで検索した要旨並びに原著論文, Phytochemical Dictionary並びに、文献4, 10, 11等を参考にした。

⑨は、①-⑧以外の情報で、インターネットを中心にして情報を収集した。

⑩は、日本医療用医薬品集（じほう）, JAPIC 一般用医薬品集（JAPIC）等を参考とした。

一方で、すでに「専ら医薬品リスト」に記載

されているが、現段階で、見直しをすべきかどうか判断根拠がない成分本質（原材料）であるダミアナ、ホウビソウ、ロウハクハ、スキャルクヤップ、フタバアオイ、トウジン等について、食薬区分の観点から成分検討、基原種解析等を行った。また、違法ドラッグ取り締まり等で新たに発見される化合物、特に強壯を標榜する健康食品に含まれる化合物について、食薬区分の判断を行うため、構造の決定、活性の推定等を行うとともに、分析法についても検討を行った。さらに、「専ら医薬品」であるアルニカについてヨーロッパ・米国・日本で市場品を購入し、食薬区分で規定する個々の成分本質（原材料）の範囲を規定するための種の確定を行うとともに、諸外国の実態を調査した。さらに、中枢作用を標榜して健康食品市場に流通しているパッションフラワーについて市場品を購入するとともに、標準植物試料を集め、食薬区分で規定する個々の成分本質（原材料）について規制の範囲を規定するため遺伝子解析並びに成分のプロファイル分析による基原種鑑別を行った。また、日本で流通する商品の輸入元である可能性が高いパキスタン市場で混乱がおきているセロリ種子について、形態と遺伝子鑑別による種の同定を行った。

<倫理面への配慮>

本研究では、ヒト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ないと考えられる。

C. 結果と考察

C.1 植物成分について

我が国の「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に例示される成分であるかどうか、依頼のあった植物由来物等42品目、動物由来物2品目の本質について文献調査等を行った。そのうち、*Tinospora gulanicha*の茎について、著名なアユルベエダ薬であること、本植物を含め*Tinospora*属には、

劇薬基準をみたすLD50, 135mg/kg (皮下, マウス)を持つpalmatine (局方収載薬)や他の多くのプロトベルベリンタイプのアルカロイドを含有すること, ジテルペンラクトンや, アラビノガラクトタン類など様々な生理活性物質も含有し, 免疫賦活活性等から, インドでエイズ治療薬としても用いられることから, 専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した. さらに, bergapten等のフラノ(フロ)クマリン類を含むもの3品目(トウキ, ボタンボウフウ, ヒュウガトウキ), 植物由来成分のうち有毒アルカロイド等を含む2品目(ウイザネアの葉, シヤタバリの根), 毒性タンパクを含む可能性がある1品目(モクベシンの種衣), 食欲抑制効果を期待して使用される植物でappetite suppressant化合物としてP57AS3 [3-O-[β -D-thevetopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-cymaropyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-cymaropyranosyl]-12 β -O-tigloyloxy-14-hydroxy-14 α -pregn-5-en-20-one]が同定されているフーディア・ゴードニー (*Hoodia gordonii*), duradolin (タンパク同化ステロイド剤, デカン酸ナンドロロン, 処方箋薬, 指定医薬品)様の作用があることが報告されているシッサス・クアドラングラリス (*Cissus quadrangularis*, 和名はヒスイカク)についても, 専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した. また, 動物由来の1品目(エゾジカの幼角)は, 含有化合物の活性や従来の区分の範囲等から, 専ら医薬品とすべき成分本質であるものと考察した. また別に, 従来すでにリストに掲載されている成分で, サイシンの地上部は, アリストロキア酸を含むため, 専ら医とすべき等の報告を行った.

ダミアナ(*Turnera diffusa*)では, 4種のフラボノイド誘導体及びこれまで明らかにされていなかったアルカロイド系脂肪酸関連化合物を単離構造決定した.

ホウビソウ(鳳尾草)は, 発がん性のあるptaquilosideを含むワラビと同じ科(イノモ

トソウ科)の植物で, ptaquilosideの分解物を含むことが知られている. 成分検討の結果, ptaquilosideの含有は確認されなかった. しかし, 細胞毒性作用を持つプレロシン類を多数含むことが確認され, 食薬区分について慎重な検討が必要なものと結論された. さらに, 近縁であるオオバノイノモトソウについても成分分析を行ったところ, ptaquilosideの含有は確認されなかったものの, プレロシン類を多数含むことが明らかとなり, 本植物についても慎重な検討が必要ながらかとなった.

ロウハクハの成分検討を行ったところ, 従来報告があった成分以外に, 新規な化合物として, dibenzoxepin誘導体及びstilbene系配糖体を単離構造決定した.

スカルキヤップ (*Scutellaria lateriflora*)の根と地上部(市場品)について, オウゴン(コガネバナ, *Scutellaria baicalensis*)と成分比較を行った. その結果, オウゴンの指標成分とされているbaicalin, wogonin-7-O-glucuronide, baicaleinおよびwogoninは, コガネバナの地上部に含まれていないにもかかわらず, スカルキヤップでは根よりも葉, 茎においてそれらの成分を多く含んでいることが判明した. 従って, 食薬区分の再考の必要性が考えられた.

フタバアオイは, ウマノスズクサ科フタバアオイ属の植物で, 同属の植物には腎毒性をもつ化合物, アリストロキア酸(aristolochic acid)を含むことが知られている. 検討の結果, 4検体中1検体の地上部からaristolochic acid Iを検出し, 含量はウスバサイシン地上部よりも高いことが判明した. しかしながら本検体は, カンアオイである可能性も残されたので, 引き続き遺伝子的に基原の鑑別を行った. その結果, 同試料はフタバアオイでなくカンアオイである可能性が非常に高いことが明らかとなった.

トウジンは, 毒性が不明の β -carboline ア

ルカロイドの含有が報告されている。本研究で国内で流通するトウジンについてドラージェンドルフ試薬を用いて成分の確認を行ったところ、アルカロイドを含有する可能性が強く示唆された。そこで、改めて成分研究を行ったところ、ピロリジンアルカロイドである codonopyrrolidium B を単離し、明らかにアルカロイドが含まれていることを確認した。また、新規のトリテルペン類も単離構造決定した。

北朝鮮産のエイジツの成分検討の結果、特徴的な成分と考えられるマルチフロリン類（ケンフェロール、クエルセチンをアグリコンとするフラボノイド配糖体）が含まれておらず、これまで知られているエイジツとは、含有成分が明らかに異なることが判明した。エイジツの基原種であるノイバラ (*Rosa multiflora* Thunb.) の近縁種にテリハノイバラ (*Rosa wichuraiana* Crepin) があり、それには、マルチフロリン類が含有されていないという報告がある。また、本種は、日本では本州以南、中国東部、朝鮮半島に分布していることが知られている。従って、北朝鮮産として流通しているエイジツが本種である可能性が高いものと考えられた。

アルニカでは、種子導入した試料の塩基配列解析結果から、ヨーロッパの薬草園においても *Arnica* 属植物の学名及び種の鑑別が混乱している様子がうかがえた。また、欧米のアルニカフラワー市場品、各 1 検体の分析結果からは、EP で規定する *A. montana* L. の他に、*A. chamissonis* などの同属植物や、Mexican *arnica* の原植物である *Heterotheca inuloides* と推定される試料が認められた。これまでの分析結果と併せると、ヨーロッパ市場品 3 検体、アメリカ市場品 1 検体のいずれの製品も、アルニカフラワーの正品である *A. montana* のみを原料としている製品はなかった。従って、欧米の市場では、アルニカの取り扱いに混乱が生じていることは間違いないと

考えられた。一方、国内の市場品 3 検体は、いずれも *A. montana* を原料としていることを示す結果が得られた。以上を考慮すると、食薬区分を行う際には、明確に基原種を定義付けするとともに、それを確認する分析法を確立しておくことが重要であると思われた。

トケイソウの場合、現在の食薬区分では他名等としてパッションフラワー、部位は果実・茎・葉・花と規定されているが、正確な学名が定義されていないため、その規制の範囲が不明確である。トケイソウといった場合、狭義にはクダモノトケイソウ (*P. edulis*) のみを指す場合がある一方、トケイソウ属全体を表しているとも考えることも可能である。また、パッションフラワーといった場合、ヨーロッパ薬局方の定義に従えば、チャボトケイソウ (*P. incarnata*) を指すことになるが、遺伝子情報に基づいた基原種鑑別の結果、市販の製品には *P. edulis* 由来の製品が 10 検体中 3 検体含まれていることが判った。そこでさらに、LC-PDA-MS を用い、遺伝子解析を行うことの出来ないエキス状、チンキ状の製品も含め 14 製品について、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及び日本新薬山科植物資料館より入手した *Passiflora* 属の標準植物試料 42 検体と合わせてプロファイル分析を行った。その結果、14 検体中 5 検体が本来の基原植物 *P. incarnata* ではなく、*P. edulis* などの同属植物を使用していることが明らかとなった。また、この結果は、昨年度の遺伝子解析による鑑別結果を支持する物であった。また、*P. edulis* には、少なくとも 3 種のケモタイプがあること、ケモタイプは、*P. edulis*、亜種 (*P. edulis* f. *flavicarpa*) 及び *P. edulisto* と同亜種との雑種という遺伝子解析による鑑別結果と完全に一致することが明らかとなった。食薬区分の判断には、正確な基原種の確認とそのものに含まれる化合物群との関係が明確である必要がある。今回の結果は、基原種と成分プロファイルの関係を明確に示した物であり、パ

ッションフラワー基原と称する製品がいわゆる違法薬物市場でも流通している点を含め、今後、規制の範囲を考える上で、重要な情報となる。

また、日本で流通する商品の輸入元である可能性が高いパキスタン市場で混乱が起きているセロリ種子について、外部形態比較及び核rDNA、ITS塩基配列解析による基原種鑑別を行った。その結果、3-n-butylphthalideを主二次代謝成分とする種子は、真正のセロリ(*Apium graveolens*)を基原とし、coumarin類を主二次代謝成分としフラノ(フロ)クマリン類を含む種子は、同じセリ科の*Seseli diffusum*を基原としていることを示唆する結果が得られた。国内に流通するセロリ種子には、インド周辺から輸入されているものもある。また、フラノ(フロ)クマリン類は、光過敏症誘発や発がん性が示唆されている。従って、偽セロリ種子の輸入について、注意が必要であること、もし実態調査で偽セロリ種子が輸入されていることが明らかとなった場合には、本植物について、専ら医薬品としての注意喚起が必要であるものと思われた。

千葉県において強壯を謳った「いわゆる健康食品」から検出された未知化合物について、各種NMR測定による構造解析を行い、その構造を決定した。本化合物は当該製品に含有されているコショウ科植物、キンマの主要成分であるdemethyleugenolと決定された。

C.2化学物質等について

新規に申請のあった化学物質であるクレアチン・エチルエステルは、筋力や筋持久力の補強を図る目的で使われる以外、利用目的がない。従って、目的性から考えると、薬事法の「人又は動物の身体の構造又は機能に影響を及ぼすことが目的とされている物」以外には対応しない可能性が高い。また、食べた量のうち約30%のエタノールが消化器官で生成され生体内に入り、このアルコール量はスピリッツや焼酎と同じレベルであり、この点で

も注意が必要であるものと考えられた。

また、痩身を標榜する健康食品から検出された脱N-メチルシブトラミンは、所謂痩身用の処方箋薬であるシブトラミン様の作用を期待して合成された化合物であり、シブトラミンと同様の作用を示すものと推定されることから専ら医薬品として使用される成分本質として規制すべきであると考察された。

強壯を標榜する健康食品等から新たに発見された物質、ノルネオシルデナフィル、ヒドロキシホンデナフィル、カルボデナフィル(アセチルデナフィル)、クロロプレタダラフィル、チオデナフィル、ホモチオデナフィル、ノルホンデナフィル、ウデナフィル、ニトロデナフィル、シクロペンチナフィル、N-オクタールノルタダラフィル、キサントアントラフィル、チオキナピペリフィルは、本研究班を中心に構造決定を行い、次図に示す構造であることを明らかにした。

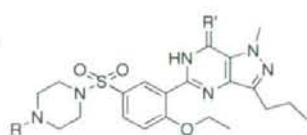
これらの化合物のうち、キサントアントラフィル及びチオキナピペリフィルは、医薬品としての開発が中止された結果、PDE5阻害剤として論文報告されたものであり、これらの化合物が検出された製品では、強壯を暗示する表示を行っていた。これらの点を考慮すると、両化合物は、明らかに処方箋薬と同等の効能・効果を期待して使用される成分と判断された。またPDEは、生体内に広く分布する酵素であり、それぞれの部位の酵素に選択的に阻害が行われることで医薬品としての有効性が期待されるが、非選択的、あるいは目的外の部位の酵素について阻害活性があると、重篤な副作用が予想される。医薬品としての開発がすでに中止されているこれらの物質では、特に後者の副作用についての懸念が大きい。以上の点を考え合わせると、本物質は、専ら医薬品として使用される成分本質として判断すべきものと考えられた。

また、クロロプレタダラフィルは、タダラフィルの合成前駆体として論文報告された化

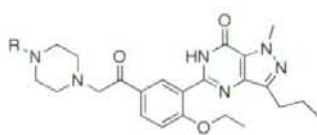
化合物、N-オクチルノルタダフィルは、タダフィルのメチル基をオクチル基に置換したものであり、明らかなシルденаフィルのアナログである他の化合物も含めて、これらの化合物は、PDE5を阻害することでED治療活性を持つものとして合成され、強壯を標榜する健康食品に意図的に添加されたものと推定された。そこで、これらの化合物及び研究班以外で検出された化合物も含めて、PDE5の三次元X線構造を元にした*in silico*コンフォメーションサーチを行い、得られた最安定構造を結合モデルとすることでそれぞれの化合物のPDE5阻害活性を推定した。その結果、これら

の化合物は、指定医薬品かつ医師の処方箋の必要な医薬品であるクエン酸シルденаフィルのPDE5阻害活性を持つことが予測され、「専ら医薬品」であるものと結論づけられた。

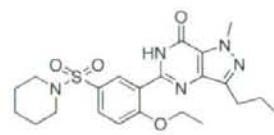
次いで、地方衛生研究所等の現場で、これらの化合物が迅速に検出できるよう分析法を検討した。本研究班では、特に、ヒドロキシホンデナフィル、カルボデナフィル、チオデナフィル、ホモチオデナフィル、ノルホンデナフィルについて、LC-PDA-MSによる分析法について取り扱い、10分以内に対象とした化合物が良好に分離、検出できる系を確立した。



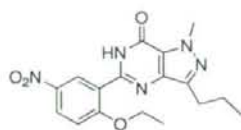
R = CH₃ R' = O sildenafil
 R = CH₃ R' = S thiodenafil
 R = CH₃CH₂ R' = S homothiodenafil
 R = cyclopentyl R' = O cyclopentynafil



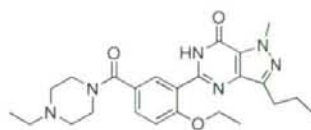
R = CH₂CH₃ hongdenafil (acetidenafil)
 R = CH₂CH₂OH hydroxyhongdenafil
 R = CH₃ norhongdenafil



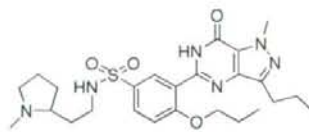
norneosildenafil



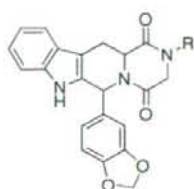
nitrodenafil



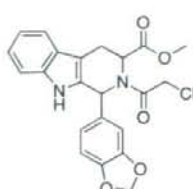
carbodenafil



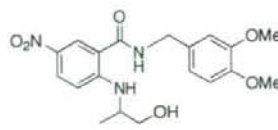
udenafil



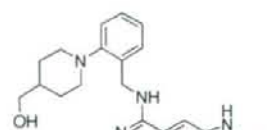
R = CH₃ tadalafil
 R = (CH₂)₇CH₃ N-octylnortadalafil



chloropretadalafil



xanthoantrafil



tioquinapiperfil

Structures of sildenafil, tadalafil and newly identified compounds in a dietary supplement promoted sexual enhancement

D. 結論

本研究では、新規に申請のあった品目について「専ら医薬品」であるかどうか判断するための調査を行うとともに、強壯を標榜する健康食品中のED治療薬関連成分について構造決定を

を行い、*in silico*でPDE5阻害活性を予測した。さらに、これらの化合物の分析法の確立を行った。また、既に「専ら医薬品」リストに掲載されている品目で、現段階で見直しをすべきかどうか判断根拠がない成分本質（原材料）につい

て、成分検討を行った。さらに、規制の範囲を明確にする目的で、同リスト収載品目、非医薬品リスト収載品目について、様々な市販品と多くの標準植物試料を入手し基原の確認と成分分析を行った。

本研究は、厚生労働省の監視指導・麻薬対策課との密接な連携の下行われる研究であり、本研究の成果で、厚生労働省の健康危機管理に直結するものは、迅速に報道発表されるとともに、都道府県等に通知された。また、食薬区分の判断等、様々な形で施策に直接反映されている。

E. 研究発表

論文発表等

- 1) Kim, I. H., Kaneko, N., Uchiyama, N., Kawahara, N., Goda, Y., Two phenylpropanoid glycosides from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. Chem. Pharm. Bull., **54**, 275-277 (2006).
- 2) Kim, I. H., Uchiyama, N., Kawahara, N., Goda, Y., Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. Phytochemistry, **67**, 2691-2696 (2006).
- 3) 合田幸広 健康食品の表示と実態, ファルマシア **42**, 905-907 (2006).
- 4) Sakai, S., Otake, R., Toida, T., Goda, Y., Identificataion of the origin of chondroitin sulfate in "health foods". Chem. Pharm. Bull., **55**, 299-303 (2007).
- 5) Kim, I. H., Umezawa, M., Kawahara, N., Goda, Y., The constituents of the roots of *Ampelopsis japonica*. J. Nat. Med., **61**, 224-225 (2007).
- 6) Sakai, S., Kawaguchi, K., Kamakura, H., Kawahara, N., Goda, Y., Characterization of major components in *Crataegus oxyacantha* L. leaves and analyses of the leaves and commercial hawthorn leave products. Japanese Journal of Food Chemistry, **14**, 56-62 (2007).
- 7) Kumasaka, K., Kawahara, N., Doi, K., Kojima, T., Goda, Y., Determination of [γ-xanthoanthrafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. Chem. Pharm. Bull., **56**, 227-230 (2008).
- 8) Goda, Y., The safety of health foods and importance of their origin. Yakugaku Zasshi, **128**, 837-838 (2008).
- 9) Goda, Y., Kamakura, H., Erectile dysfunction drug ingredients and related compounds found in health foods and their adverse effects. Functional Food, **2**, 198-202 (2008).
- 10) Uchiyama, N., Saisho, K., Kikura-Hanajiri, R., Haishima, Y., Goda, Y., Determination of a new type of phosphodiesterase-5 inhibitor, thioquinapiperifil, in a dietary supplement promoted for sexual enhancement. Chem. Pharm. Bull., **56**, 1331-1334 (2008).
- 11) Tokumoto, H., Shimomura, Y., Katsuki, S., Goda, Y., Morphological discrimination of *Curcuma longa* L. and *Curcuma aromatica* Salisb. Shoyakugaku Zasshi, **62**, 54-65 (2008).
- 12) Makino, T., Hishida, A., Goda, Y., Mizukami, H., Comparison of major flavonoid contents in *S. baicalensis*, *S. lateriflora* and their commercial products. J. Nat. Med. **62**, 294-299 (2008).
- 13) Harinantenaina, L., Matsunami, K. Otsuka, H., Chemical and biologically active constituents of *Pteris multifida*, J. Nat. Med., **62**, 452-455 (2008).

- 14) Kawakami, S., Matsunami, K., Otsuka, H., Kawahata, M., Yamaguchi, K., Chemical constituents of imported *Rosae fructus*, *J. Nat. Med.*, **63**, 46-51 (2009).
- 15) Hasegawa, T., Takahashi, K., Saijo, M., Ishi, T., Nagata, T., Haijima, Y., Goda, Y., Kawahara, N., Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement, *Chem Pharm. Bull.*, **57**, 185-189 (2009).
- 16) Maruyama T., Khan A. A., Choudhary M. I., Tsuda Y., Goda Y., Farille M., Reduro J. -P., Botanical origin of Indian celery seed (fruit), *J. Nat. Med.*, in press (2009).
- 17) Harinantenaina, L., Matsunami, K. Otsuka, H., Chemical constituents of *Pteris cretica* Linn. (Pteridaceae). *Biological Systematics and Ecology*, in press (2009).
- 学会発表等
- 1) 合田幸広, 「食薬区分と違法(脱法)ドラッグ」, 北里大学大学院特別講義(東京)2006.6
- 2) 丸山卓郎, 杉本直樹, 鎌倉浩之, 花尻瑠理, 柴田敏郎, 合田幸広, 欧州市場に流通するアルニカフラワーの基原種について, 日本生薬学会第53回年会(埼玉)2006.9
- 3) 鎌倉浩之, 丸山卓郎, 花尻瑠理, 柴田敏郎, 合田幸広, 欧州市場に流通するアルニカについて, 日本生薬学会第53回年会(埼玉)2006.9
- 4) 川上晋, 末吉恵津子, 松浪勝義, 大塚英昭, 花尻(木倉)瑠璃, 合田幸広, 営実の品質評価に関する研究, 第53回日本生薬学会年会(埼玉)2006.9
- 5) 熊坂謙一, 松阪綾子, 麻生順子, 宮沢真紀, 土井佳代, 小島尚, 川原信夫, 合田幸広, 強壯強精用医薬類似品の検査状況について, 第43回全国衛生化学技術協議会年会(米子)2006.11
- 6) 最所和宏, 内田洋子, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 平成17年度無承認無許可医薬品の買い上げ調査について -強壯用健康食品-, 第43回全国衛生化学技術協議会年会(米子)2006.11
- 7) 合田幸広, 健康食品や生薬の基原について, 静岡県環境衛生科学研究所特別講演(静岡)2006.12
- 8) 合田幸広, 食薬区分と違法(脱法)ドラッグ「漢方薬・生薬認定薬剤師研修会」(東京)2006.12
- 9) 熊坂謙一, 土井佳代, 小島尚, 川原信夫, 合田幸広, いわゆる健康食品より検出されたキサントアントラフィルの分析事例, 日本薬学会第127年会(富山)2007.3
- 10) 最所和宏, 川原信夫, 花尻(木倉)瑠理, 合田幸広, 強壯用健康食品中の医薬品類似成分について, 日本薬学会第127年会(富山)2007.3
- 11) 鎌倉浩之, 川原信夫, 栗原正明, 梶村計志, 高取聡, 岩上正蔵, 合田幸広, 「いわゆる健康食品」から検出された新規シルデナフィル類似化合物について, 日本薬学会第127年会(富山)2007.3
- 12) 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(富山)2007.3
- 13) 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(富山)2007.3
- 14) 牧野利明, 水上元, 菱田敦之, 合田幸広, 生薬「オウゴン」とその同属植物「スカルクキャップ」に関する食薬区分-化学成分レベルでの検討, 食品化学学会第13回総会・学術大会(東京)2007.5
- 15) 合田幸広, 健康食品の基原と品質, 天然薬物研究方法論アカデミー(埼玉)2007.7
- 16) 合田幸広, 最近の食薬区分について, お茶

- の水女子大学化学・生物総合管理の再教育講座（東京）2007.8
- 17) 合田幸広, 天然物の基原と品質, 共立薬科大学特色 GP フォーラム（東京）2007.10
 - 18) 合田幸広, 健康食品や生薬の基原と品質, 第9回富山県薬学会年会（富山）2007.10
 - 19) 合田幸広, 最近の食薬区分, 日本生薬学会関西支部講演会平成19年度秋期講演会（大阪）2007.11
 - 20) 合田幸広, 無承認無許可医薬品に関する最近の話題, 第44回全国衛生化学技術協議会年会（津）2007.11
 - 21) 梶村計志, 田上貴臣, 高取聡, 山本文雄, 岩上正蔵, 鎌倉浩之, 川原信夫, 栗原正明, 合田幸広, 新規シルデナフィル類似化合物であるカルボデナフィルが検出された清涼飲料水について, 第44回全国衛生化学技術協議会年会（津）2007.11
 - 22) 石原島栄二, 角野文代, 世取山守, 鎌倉浩之, 合田幸広, 強壮・強精などの男性機能回復を暗示する健康食品からの無承認無許可医薬品成分の検出事例について, 第44回全国衛生化学技術協議会年会（津）2007.11
 - 23) 合田幸広 食薬区分と違法（脱法）ドラッグ「漢方薬・生薬認定薬剤師研修会」（東京）2007.12
 - 24) 鎌倉浩之, 杉山直子, 中野昌枝, 合田幸広, 「いわゆる健康食品」から検出された新規シルデナフィル類似化合物ノルホンデナフィルについて, 日本薬学会第128年会（横浜）2008.3
 - 25) 鎌倉浩之, 平間祐司, 林隆章, 兼俊明夫, 合田幸広, 「いわゆる健康食品」から検出された新規シルデナフィル類似化合物チオデナフィル及びホモチオデナフィルについて, 日本薬学会第128年会（横浜）2008.3
 - 26) Harinantenaina Liva, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka Chemical constituents of *Pteris multifida* and their biological activity, 日本薬学会第128年会（横浜）2008.3
 - 27) 熊坂謙一, 土井佳代, 小島尚, 川原信夫, 合田幸広, いわゆる健康食品より検出されたキサントアントラフィルの分析事例, 日本薬学会第127年会（富山）2007.3
 - 28) 最所和宏, 内山奈穂子, 花尻（木倉）瑠理, 合田幸広, 強壯を標榜した健康食品より検出されたイミダゾキナゾリン誘導体（チオキナピペリフィル）について, 日本食品化学学会第14回総会・学術大会（西宮）2008.5
 - 29) 合田幸広, 食薬区分と違法（脱法）ドラッグ「漢方薬・生薬認定薬剤師研修会（東京）」（東京）2008.8
 - 30) Liva Harinantenaina, 松浪勝義, 大塚英昭, Chemical and Biologically Active Constituents from *Pteris cretica*, 日本生薬学会第55回年会（長崎）2008.9
 - 31) 長谷川貴志, 高橋市長, 西篠雅明, 石井俊靖, 永田知子, 藪島由二, 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シルデナフィル類縁化合物及び新規タグラフィル類縁化合物について, 第96食品衛生学会学術講演会（神戸）2008.9
 - 32) 長谷川貴志, 高橋市長, 西篠雅明, 石井俊靖, 永田知子, 藪島由二, 川原信夫, 合田幸広, いわゆる健康食品から検出された強壮成分について, 第45全国衛生化学技術協議会年会（佐賀）2008.11
 - 33) 合田幸広, ED治療薬関連物質の検出事例と無承認無許可医薬品対策, 第45回全国衛生化学技術協議会年会（佐賀）2008.11
 - 34) 丸山卓郎, A. A. Khan, M. I. Choudhary, 津田喜典, 合田幸広, M. Farille, J.-P. Reduro, パキスタン市場に流通するセロリ類似種子の基原植物, 成分, 生物活性, 第23回日本香辛料研究会,（金沢）2008.11
 - 35) 若菜大悟, 川原信夫, 合田幸広, トウジン（党参）の成分研究, 日本薬学会第129年会（京都）2009.3

報道発表等

- 1) 医薬品成分(キサントアントラフィル)を含有するいわゆる健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成18年5月22日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/05/h0522-3.html>
 - 2) 医薬品成分(ヒドロキシホンデナフィル)を含有するいわゆる健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成18年7月21日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/07/h0728-3.html>
 - 3) 平成17年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について(平成18年7月25日)医薬品成分(ノルネオシルデナフィル)が検出されたいわゆる健康食品について
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/07/h0725-2.html>
 - 4) 医薬品成分を含有するいわゆる健康食品の発見について(10月13日発表の追加分)
http://www.pref.chiba.jp/syozoku/c_yakumu/kenkoushokuhin/kenkoushokuhin3.html (クロプロレタダラフィル)
 - 5) 医薬品成分(シルデナフィル及び類似成分)が検出されたいわゆる健康食品について(平成19年1月21日)
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html>
 - 6) ゲンデナフィル・イミダゾサガトリアジンを平成17年11月22日の発表(ブソイドバルデナフィル)に追加 医薬品成分(ブソイドバルデナフィル)を含有するいわゆる健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成17年11月22日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/11/h1122-2.html>
 - 7) 医薬品成分(シルデナフィル及び類似成分)が検出されたいわゆる健康食品について(平成19年8月10日)
<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/other/050623-1.html> (ウデナフィル, ニトロデナフィル)
 - 8) 医薬品成分を含有する健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成20年2月26日)
http://www.city.shizuoka.jp/deps/seika tueisei/seikatueisei_hot_news.html (ノルホンデナフィル)
 - 9) 医薬品成分を含有する健康食品の発見(平成20年2月26日)
<http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2008/02/20i2r400.html>
 - 10) 医薬品成分(シクロペンチナフィル及びN-オクチルノルタダラフィル)を含有するいわゆる健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成20年6月11日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/06/h0611-1.html>
 - 11) 平成19年度無承認無許可医薬品等買上調査の結果について(平成20年8月26日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/08/h0826-1.html> (チオキナピペリフィル, ホモチオデナフィル)
 - 12) 医薬品成分(チオアイルデナフィル)を含有するいわゆる健康食品(無承認無許可医薬品)の発見について(平成20年12月5日)
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/12/h1205-2.html>
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文（天然物）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Kim, I. 他	Iridoid Glycosides and Cucurbitacin Glycoside from <i>Neopicrorhiza scrophulariiflora</i>	Phytochemistry	67	2691-2696	2006
Sakai, S. 他	Characterization of Major Components in <i>Crataegus oxyacantha</i> L. Leaves and Analyses of the Leaves and Commercial Hawthorn Leave Products	Jpn. J. Food Chem.	14 (2)	56-62	2007
Kim, I. 他	The Constituents of the Roots of <i>Ampelopsis japonica</i>	J. Nat. Med.	61	224-225	2007
Tokumoto, H. 他	Morphological Discrimination of <i>Curcuma longa</i> L. and <i>Curcuma aromatica</i> Salisb	Shoyakugaku Zasshi	62 (2)	54-65	2008
Makino, T. 他	Comparison of the Major Flavonoid Content of <i>S. baicalensis</i> , <i>S. lateriflora</i> , and Their Commercial Products	J. Nat. Med.	62(3)	294-299	2008
Harinantenaina, L. 他	Chemical and Biologically Active Constituents of <i>Pteris multifida</i>	J. Nat. Med.	62(4)	452-455	2008
Kawakami, S. 他	Chemical Constituents of Imported Rosae Fructus	J. Nat. Med.	63(1)	46-51	2009
Maruyama, T. 他	Botanical Origin of Indian Celery Seed (Fruit)	J. Nat. Med.	63 (2)	in press	2009

原著論文（合成物）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Takahashi, K. 他	Plant Components in Dietary Supplements and Illegal Drug	Chiba-ken Eiseikenkyusho Nenpo	56	60-65	2007
Kumasaka, K. 他	Determination of (<i>R</i>)-Xanthoantrafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement	Chem. Pharm. Bull.	56 (2)	227-230	2008
Hasegawa, T. 他	Structural Elucidation of a Tadalafil Analogue Found in a Dietary Supplement	J. Food Hyg. Soc. Jpn.	49(4)	311-315	2008

Uchiyama, N. 他	Determination of a New Type of Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Thioquinapiperifil, in a Dietary Supplement Promoted for Sexual Enhancement	Chem. Pharm. Bull.	56(9)	1331-1334	2008
Hasegawa, T. 他	Isolation and Structural Elucidation of Cyclopentynafil and <i>N</i> -Octylnortadalafil Found in a Dietary Supplement	Chem Pharm. Bull.	57(2)	185-189	2009

総説等

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Goda, Y.	The Safety of Health Foods and Importance of Their Origin	Yakugaku Zasshi	128(6)	837-838	2008
Goda, Y. 他	Erectile Dysfunction Drug Ingredients and Related Compounds Found in Health Foods and Their Adverse Effects	Functional Food	2(2)	198-202	2008



Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*

Ik Hwi Kim, Nahoko Uchiyama, Nobuo Kawahara, Yukihiro Goda *

National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 6 April 2006; received in revised form 10 July 2006

Available online 27 October 2006

Abstract

Three iridoid glycosides, picrorosides A (1), B (2) and C (3), and a cucurbitacin glycoside, scrophoside A (4), were isolated from the rhizomes of *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Scrophulariaceae), along with two known iridoid glycosides, picrosides I (5) and II (6), and three known cucurbitacin glycosides (7–9). Their structures were elucidated on the basis of both chemical and spectroscopic data.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Neopicrorhiza scrophulariiflora*; Scrophulariaceae; Iridoid glycoside; Cucurbitacin glycoside; Picrorosides A, B and C; Scrophoside A

1. Introduction

Neopicrorhiza scrophulariiflora (Pennell) Hong, a raw material exclusively used as pharmaceuticals in Japan, is distributed throughout the high altitude (>4400 m) regions in southeastern Tibet and the northwestern Yunnan Province of China (Wang et al., 1993). Iridoid glycosides (Li et al., 2000), triterpenoids (Smit et al., 2000), phenolic glycosides (Wang et al., 2004), and phenylethanoid glycosides (Li et al., 1998) have all been isolated from the rhizomes of this plant. Recently, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan began to study the reclassification of raw materials exclusively used as pharmaceuticals, and a number of herbs were investigated for their toxicity and secondary metabolites. In our previous paper (Kim et al., 2006), we reported the isolation and structural elucidation of two phenylpropanoid glycosides, scrophulosides A and B. In further studies on the rhizomes of this plant, we isolated three new iridoid glycosides, picrorosides A (1), B (2), and C (3), and a new cucurbitacin glycoside, scrophoside A (4), along with two known iridoid glycosides, picrosides I (5) (Kitagawa et al., 1971) and II (6) (Wang et al., 1993),

and three known cucurbitacin glycosides (7–9) (Stuppner et al., 1991). This paper describes the isolation and structural elucidation of the three new iridoid glycosides and one cucurbitacin glycoside.

2. Results and discussion

Silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH 1:0, 50:1, 10:1, 5:1, 1:1 and 0:1) of the EtOAc-soluble portion from a hot MeOH extract of the dried rhizomes of *N. scrophulariiflora* gave 10 fractions. After repeated reversed-phase HPLC using MeOH/H₂O or MeCN/H₂O, fr. 7 afforded a new iridoid glycoside, picroroside C (3), a new cucurbitacin glycoside, scrophoside A (4), and three known cucurbitacin glycosides (7–9); fr. 8 afforded two new iridoid glycosides, picrorosides A (1) and B (2), and picroside I (5); and fr. 9 afforded picroside II (6). Identification of the known compounds was accomplished by comparison of their spectral data with those in the literature.

Picroroside A (1) was obtained as a colorless amorphous powder. Its molecular formula was determined to be C₂₄H₃₀O₁₂ by the [M+H]⁺ quasi-ion peak at *m/z* 511.1820 (calcd for C₂₄H₃₁O₁₂ 511.1806) in the HR-ESI-MS. The ¹H NMR spectrum of 1 showed the presence of

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9154; fax: +81 3 3707 6950.
E-mail address: goda@nihs.go.jp (Y. Goda).

two acetal protons [δ 5.58 (*d*, $J = 1.8$), 5.27 (*d*, $J = 3.3$)], two oxygenated methine protons [δ 4.04 (*dd*, $J = 8.2$, 1.4), 4.01 (*dd*, $J = 8.2$, 2.8)], two oxygenated methylene protons [δ 3.95 (*dd*, $J = 11.9$, 1.4), 3.57 (*dd*, $J = 11.9$, 1.8)], two methine protons [δ 2.56 (*br d*, $J = 10.1$), 2.28 (*ddd*, $J = 8.7$, 8.3, 2.8)], two methylene protons [δ 2.43 (*dd*, $J = 13.8$, 8.3), 1.67 (*dd*, $J = 13.8$, 3.3)], five aromatic protons [δ 7.61 (2H), 7.40 (3H)], a pair of *trans* olefinic protons [δ 7.70 (*d*, $J = 16.1$), 6.58 (*d*, $J = 16.1$)], and a monosaccharide group (Table 1). The ^{13}C NMR spectrum of **1** showed the presence of a carbonyl carbon (δ 168.5), an aromatic ring [δ 135.7, 131.6, 130.0 ($\times 2$), 129.3 ($\times 2$)], two olefinic carbons (δ 146.4, 118.6), and characteristic signals of a glucopyranosyl group (δ 99.1, 78.0, 75.6, 74.6, 71.6, 64.8), in addition to the aglycone moiety containing nine carbon signals (Table 1). The HMBC correlation between H-1' and

C-1 demonstrated that the glucosyl moiety was connected to the C-1 oxygen atom (Fig. 2). The relatively large J value (7.8 Hz) of the anomeric proton (δ 4.72) of the glucosyl moiety indicated that the glucoside linkage was β . The HMBC correlation between H₂-6' and the carbonyl carbon, and the downfield shift of the oxygenated methylene protons at δ 4.51 and 4.37 (H₂-6') suggested that the *E*-cinamoyl group was attached at C-6' of the glucose moiety (Fig. 2). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **1** generally resembled that of **5** indicating that **1** was an iridoid glycoside. However, analysis of the ^1H and ^{13}C NMR, H-H COSY and HMBC spectra revealed that **1** has a rigid three ring skeleton. The HMBC correlations between H-3 and C-10, H-7 and C-10, and H-9 and C-10, and the NOESY correlation between H-10b and H-1 indicated that the methylenoxy linkage between C-3 and C-8 had an

Table 1
 ^1H and ^{13}C NMR spectral data for compounds **1**, **2** and **3** in CD_3OD^a

Position	1 ^b		2 ^c		3 ^c	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	93.5	5.58 (<i>d</i> , 1.8)	93.5	5.60 (<i>d</i> , 2.1)	93.3	5.59 (<i>d</i> , 2.1)
3	95.9	5.27 (<i>d</i> , 3.3)	96.0	5.33 (<i>d</i> , 3.3)	95.9	5.31 (<i>d</i> , 3.5)
4 α	34.8	1.67 (<i>dd</i> , 13.8, 3.3)	34.8	1.76 (<i>dd</i> , 13.8, 3.3)	34.8	1.73 (<i>dd</i> , 13.8, 3.5)
4 β		2.43 (<i>dd</i> , 13.8, 8.3)		2.50 (<i>m</i>)		2.48 (<i>dd</i> , 13.8, 9.0)
5	35.9	2.28 (<i>ddd</i> , 8.7, 8.3, 2.8)	35.0	2.33 (<i>m</i>)	34.8	2.31 (<i>ddd</i> , 9.4, 9.0, 2.9)
6	84.5	4.01 (<i>dd</i> , 8.2, 2.8)	83.1	4.13 (<i>dd</i> , 6.9, 2.9)	82.8	4.09 (<i>dd</i> , 6.9, 2.9)
7	74.7	4.04 (<i>dd</i> , 8.2, 1.4)	87.4	5.38 (<i>d</i> , 6.9)	87.0	5.33 (<i>d</i> , 6.9)
8	79.9		80.1		79.7	
9	48.0	2.56 (<i>br d</i> , 10.1)	47.5	2.74 (<i>br d</i> , 10.2)	47.3	2.71 (<i>br d</i> , 10.0)
10a	62.2	3.95 (<i>dd</i> , 11.9, 1.4)	62.0	3.91 (<i>d</i> , 12.0)	61.8	3.88 (<i>d</i> , 12.1)
10b		3.57 (<i>dd</i> , 11.9, 1.8)		3.63 (<i>d</i> , 12.0)		3.60 (<i>dd</i> , 12.1, 1.2)
1'	99.1	4.72 (<i>d</i> , 7.8)	99.0	4.74 (<i>d</i> , 8.0)	98.9	4.74 (<i>d</i> , 8.0)
2'	74.6	3.21 (<i>dd</i> , 9.1, 7.8)	74.7	3.23 (<i>m</i>)	74.6	3.23 (<i>dd</i> , 9.2, 8.0)
3'	78.0	3.38 (<i>m</i>)	78.0	3.40 (<i>m</i>)	77.9	3.39 (<i>m</i>)
4'	71.6	3.40 (<i>m</i>)	71.6	3.41 (<i>m</i>)	71.4	3.41 (<i>m</i>)
5'	75.6	3.55 (<i>m</i>)	75.5	3.57 (<i>m</i>)	75.5	3.56 (<i>m</i>)
6'a	64.8	4.52 (<i>dd</i> , 11.9, 1.8)	64.7	4.53 (<i>dd</i> , 12.0, 2.1)	64.6	4.53 (<i>dd</i> , 12.0, 2.3)
6'b		4.33 (<i>dd</i> , 11.9, 5.5)		4.34 (<i>dd</i> , 12.0, 5.5)		4.34 (<i>dd</i> , 12.0, 5.7)
1 ^{''}	135.7		135.7		135.6	
2 ^{''}	129.3	7.61 (^{-d})	129.3	7.62 (^{-d})	129.2	7.62 (^{-d})
3 ^{''}	130.0	7.40 (^{-d})	130.0	7.39 (^{-d})	129.9	7.42 (^{-d})
4 ^{''}	131.6	7.40 (^{-d})	131.5	7.38 (^{-d})	131.4	7.39 (^{-d})
5 ^{''}	130.0	7.40 (^{-d})	130.0	7.39 (^{-d})	129.9	7.42 (^{-d})
6 ^{''}	129.3	7.61 (^{-d})	129.3	7.62 (^{-d})	129.2	7.62 (^{-d})
α	118.6	6.58 (<i>d</i> , 16.1)	118.6	6.59 (<i>d</i> , 16.0)	118.5	6.59 (<i>d</i> , 16.0)
β	146.4	7.70 (<i>d</i> , 16.1)	146.6	7.72 (<i>d</i> , 16.0)	146.5	7.72 (<i>d</i> , 16.0)
CO	168.5		168.5		168.5	
1 ^{'''}			122.1		135.6	
2 ^{'''}			113.7	7.59 (<i>d</i> , 2.1)	129.2	7.62 (^{-d})
3 ^{'''}			148.9		129.9	7.42 (^{-d})
4 ^{'''}			153.4		131.4	7.39 (^{-d})
5 ^{'''}			116.0	6.85 (<i>d</i> , 8.2)	129.9	7.42 (^{-d})
6 ^{'''}			125.3	7.63 (<i>dd</i> , 8.2, 2.1)	129.2	7.62 (^{-d})
OMe			56.4	3.89 (<i>s</i>)		
α					118.5	6.63 (<i>d</i> , 16.0)
β					146.7	7.76 (<i>d</i> , 16.0)
CO			168.1		168.5	

^a Multiplicity and J values in Hz are given in parentheses.

^b Measured at 200 MHz (^{13}C NMR) and 800 MHz (^1H NMR).

^c Measured at 125 MHz (^{13}C NMR) and 500 MHz (^1H NMR).

^d Multiplicity was not determined due to overlapping of the signals.

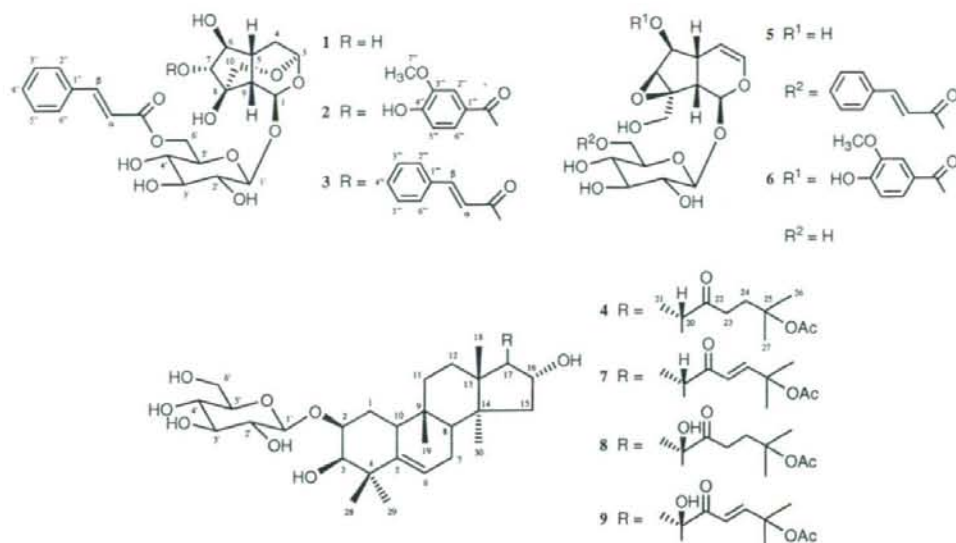


Fig. 1. Structures of picrorosides A (1)–C (3), scrophoside A (4) and related compounds.

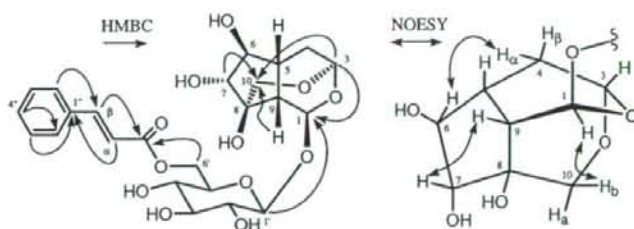


Fig. 2. Selected HMBC and NOESY correlations for 1.

α -configuration (Fig. 2). On the basis of these data, the structure of picroroside A (1) was determined to be that shown in Fig. 1.

Picroroside B (2) was obtained as a colorless amorphous powder. Its molecular formula was determined to be $C_{32}H_{36}O_{15}$ by the $[M+H]^+$ quasi-ion peak at m/z 661.2106 (calcd for $C_{32}H_{37}O_{15}$ 661.2132) in the HR-ESI-MS. The 1H NMR spectrum of 2 showed the presence of two acetal protons [δ 5.60 (*d*, $J=2.1$), 5.33 (*d*, $J=2.9$)], two oxygenated methine protons [δ 5.38 (*d*, $J=6.9$), 4.13 (*dd*, $J=6.9, 2.9$)], two oxygenated methylene protons [δ 3.91 (*d*, $J=12.0$), 3.63 (*d*, $J=12.0$)], two methine protons [δ 2.74 (*br d*, $J=10.2$), 2.33 (*m*)], two methylene protons [δ 2.50 (*m*), 1.76 (*dd*, $J=13.8, 3.3$)], eight aromatic protons (δ 7.63–6.85), a pair of *trans* olefinic protons [δ 7.72 (*d*, $J=16.0$), 6.59 (*d*, $J=16.0$)], a methoxy group (δ 3.89), and a monosaccharide group (Table 1). The ^{13}C NMR spectrum of 2 showed the presence of two carbonyl carbons (δ 168.5, 168.1), 14 olefinic carbons (δ 153.4–113.7), a methoxy group (δ 56.4), and characteristic signals of a glucopyranosyl group (δ 99.0, 78.0, 75.5, 74.7, 71.6, 64.7), in addition to the aglycone moiety containing nine carbon

signals (Table 1). The 1H and ^{13}C NMR spectra of 2 were quite similar to those of 1, except for the signals originating from an aromatic acid moiety, which was determined to be a vanilloyl group by analysis of the ^{13}C NMR (δ 153.4, 148.9, 125.3, 122.1, 116.0, 113.7, 56.4), H–H COSY, and HMBC spectra (Table 1). The HMBC correlation between H-7 and the carbonyl carbon of the vanilloyl group, and the downfield shift of the proton at δ 5.38 (H-7) suggested that the vanilloyl group was attached at C-7 (Fig. 3). Moreover, correlations observed between H-1' and C-1, and H₂-6' and the carbonyl carbon of the *E*-cinnamoyl group demonstrated that the glucosyl moiety and the *E*-cinnamoyl group were connected to the C-1 and C-6' oxygen atom, respectively (Fig. 3). Thus, the structure of picroroside B (2) was determined to be that shown in Fig. 1.

Picroroside C (3) was obtained as a colorless amorphous powder. Its molecular formula was determined to be $C_{33}H_{36}O_{13}$ by the $[M+H]^+$ quasi-ion peak at m/z 641.2220 (calcd for $C_{33}H_{37}O_{13}$ 641.2234) in the HR-ESI-MS. The 1H and ^{13}C NMR spectra of 3 were also quite similar to those of 1, except for the signals originating from the phenylpropanoid ester moiety, which was determined

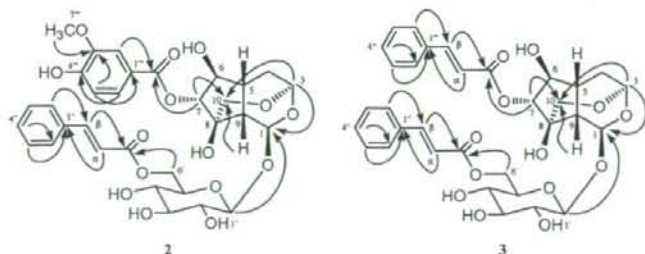


Fig. 3. Selected HMBC correlations for 2 and 3.

to be an *E*-cinnamoyl group by analysis of the ^{13}C NMR [δ 168.5, 146.7, 135.6, 131.4, 129.9 ($\times 2$), 129.2 ($\times 2$), 118.5], H–H COSY, and HMBC spectra (Table 1). The HMBC correlation between H-7 and the carbonyl carbon of the *E*-cinnamoyl group, and the downfield shift of the proton at δ 5.33 (H-7) suggested that the *E*-cinnamoyl group was attached at C-7 (Fig. 3). Thus, the structure of picroroside C (3) was determined to be that shown in Fig. 1.

Scrophoside A (4) was obtained as a colorless amorphous powder. Its molecular formula was determined to be $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$ by the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ quasi-ion peak at m/z 717.4204 (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{11}\text{Na}$ 717.4190) in the HR-ESI-MS. Its ^1H NMR spectrum showed resonances of a secondary methyl (δ 1.12), eight tertiary methyls [δ 1.94, 1.43 ($\times 2$), 1.18, 1.08, 1.03, 0.94, 0.93], an olefinic proton (δ 5.58), and a monosaccharide group. The ^{13}C NMR spectrum of 1 showed the presence of eight methyls [δ 28.4, 27.4, 26.2 ($\times 3$), 19.0, 17.4, 17.1], seven methylenes (δ 47.5, 37.0, 35.6, 32.8, 31.5, 29.0, 25.4), an acetoxy group (δ 172.5, 22.3), a carbonyl carbon (δ 217.6), two olefinic carbons (δ 141.7, 121.5), five quaternary carbons (δ 83.1, 49.5, 48.8, 42.2, 35.6), and characteristic signals of a glucopyranosyl group (δ 102.0, 78.1, 77.9, 75.2, 71.7, 62.8). The HMBC correlation between H-1' and C-2 demonstrated that the glucosyl moiety was connected to the C-2 oxygen atom. The relatively large J value (7.8 Hz) of the anomeric proton (δ 4.42) of the glucosyl moiety indicated that the glucoside linkage was β . The ^1H and ^{13}C NMR spectra of 4 were quite similar to those of 7, with all the resonances from the basic structure of 4 having corresponding signals in the spectrum of 7, suggesting that 4 had basically the same structure as 7 and that the difference was only in the side chain at C-17. Analysis of the ^{13}C NMR, H–H COSY and HMBC spectra revealed that 4 possessed two methylenes at C-23 and C-24, whereas 7 had a double bond between C-23 and C-24 in the side chain (Fig. 4). Accordingly, the structure of scrophoside A (4) was determined to be that shown in Fig. 1.

Though similar iridoids with a rigid three ring skeleton have been reported (Iwagawa et al., 1991; Jia et al., 1999; Yoshikawa et al., 1986), picrorosides A, B and C are the first examples of iridoid glycosides having a rigid three ring skeleton from *N. scrophulariiflora*.

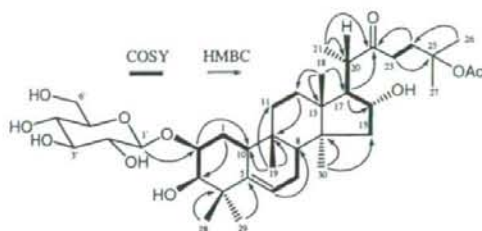


Fig. 4. Selected COSY and HMBC correlations for 4.

3. Experimental

3.1. General

Optical rotations were measured on a JASCO DIP-370 (Tokyo, Japan) digital polarimeter, UV spectra on a Shimadzu UV-2550 (Kyoto, Japan) spectrophotometer and IR spectra on a JASCO FTIR-5300 spectrophotometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CD_3OD on JEOL ECA-500 and ECA-800 (Tokyo, Japan) spectrometers, and chemical shifts were expressed in parts per million (ppm) relative to TMS as the internal standard. Mass spectra were obtained on a JEOL JMS-T100LC spectrometer. Preparative HPLC was carried out on a Shimadzu LC-8A with a Shimadzu SPD-6AV detector and a reversed-phase column, Wakosil 25C 18 column (20 mm i.d. \times 250 mm, ODS, 10 μm , Wako) or Capcell Pak C_{18} column (20 mm i.d. \times 250 mm, ODS, 5 μm , Shiseido).

3.2. Plant material

The rhizomes of *N. scrophulariiflora* were purchased from Uchida Wakanyaku Co. Ltd. A voucher specimen was deposited in the National Institute of Health Sciences, Japan.

3.3. Extraction and isolation

The dried and ground rhizomes of *N. scrophulariiflora* (300 g) were extracted with hot MeOH (5×500 mL). The solvent was removed in vacuo to give a residue (73.8 g), which was suspended in H_2O (500 mL). The suspension