

was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 500$  mL), EtOAc ( $3 \times 500$  mL), and 1-BuOH ( $3 \times 500$  mL), successively, and the solvent was removed in vacuo to afford  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -soluble (6.3 g), EtOAc-soluble (8.9 g), and 1-BuOH-soluble (24.8 g) portions, respectively. The EtOAc-soluble portion was placed on a silica gel column and eluted sequentially with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  mixtures (1:0, 50:1, 10:1, 5:1, 1:1 and 0:1) to give 10 fractions (frs. 1–10). Fraction 7 (857.6 mg) was further separated by reversed-phase HPLC using  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (60:40 and 1:0) to afford five fractions (frs. 7A–7E). Repeated reversed-phase HPLC of fraction 7D (189.1 mg) using mixtures of either  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  afforded compounds **8** (18.1 mg) and **9** (140.6 mg). Repeated reversed-phase HPLC of fraction 7E (140.1 mg) using mixtures of either  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  afforded compounds **3** (0.9 mg), **4** (1.2 mg) and **7** (2.4 mg). Fraction 8 (2.46 g) was further separated by reversed-phase HPLC using  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (38:62 and 1:0) into four sub-fractions (frs. 8A–8D), which were evaporated to dryness. Fraction 8C (287.5 mg) was pure picroside I (**5**). After reversed-phase HPLC using  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  or  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ , fraction 8D (409.3 mg) afforded compounds **1** (11.2 mg) and **2** (1.5 mg). Fraction 9 (1.9 g) was further subjected to reversed-phase HPLC using  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (34:66 and 1:0) to afford five sub-fractions (frs. 9A–9E). After removal of the solvent, reversed-phase HPLC of fraction 9C (67.3 mg) using  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  (15:85) afforded picroside II (**6**, 56.6 mg).

### 3.4. Picroside A (1)

Colorless amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -56.3^\circ$  ( $c$  1.12,  $\text{MeOH}$ ); UV ( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 277 (4.32), 217 (4.21); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3434, 1701, 1636; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, see Table 1; HR-ESI-MS  $m/z$  511.1820  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{12}$  511.1806).

### 3.5. Picroside B (2)

Colorless amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -46.7^\circ$  ( $c$  0.15,  $\text{MeOH}$ ); UV ( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 269 (4.52), 217 (4.62); IR (film)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3428, 1635; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, see Table 1; HR-ESI-MS  $m/z$  661.2106  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{O}_{15}$  661.2132).

### 3.6. Picroside C (3)

Colorless amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -44.4^\circ$  ( $c$  0.09,  $\text{MeOH}$ ); UV ( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 278 (4.81), 217 (4.79); IR (film)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3380, 1705, 1636; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra, see Table 1; HR-ESI-MS  $m/z$  641.2220  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_{13}$  641.2234).

### 3.7. Scrophoside A (4)

Colorless amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -33.3^\circ$  ( $c$  0.12,  $\text{MeOH}$ ); UV ( $\text{MeOH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\log \epsilon$ ): 279 (3.59); IR (film)

$\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3410, 2928, 1717, 1262;  $^1\text{H}$  NMR (800 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  5.58 (1H,  $d$ ,  $J = 5.9$  Hz, H-6), 4.42 (1H,  $d$ ,  $J = 7.8$  Hz, H-1'), 4.20 (1H,  $m$ , H-2), 3.99 (1H,  $t$ ,  $J = 7.8$  Hz, H-16), 3.89 (1H,  $dd$ ,  $J = 11.9$ , 2.2 Hz, H-6'a), 3.66 (1H,  $dd$ ,  $J = 11.9$ , 6.0 Hz, H-6'b), 3.60 (1H,  $br s$ , H-3), 3.37 (1H,  $dd$ ,  $J = 9.2$ , 8.7 Hz, H-3'), 3.30 (1H,  $m$ , H-5'), 3.27 (1H,  $d$ ,  $J = 8.7$  Hz, H-4'), 3.18 (1H,  $dd$ ,  $J = 9.2$ , 7.8 Hz, H-2'), 2.71 (1H,  $m$ , H-20), 2.68 (1H,  $m$ , H-23a), 2.56 (1H,  $m$ , H-23b), 2.45 (1H,  $m$ , H-10), 2.40 (1H,  $m$ , H-7a), 2.03 (1H,  $dd$ ,  $J = 10.6$ , 6.4 Hz, H-17), 1.98 (2H,  $m$ , H-24a and H-24b), 1.94 (3H,  $s$ ,  $\text{OCOMe}$ ), 1.94 (1H,  $m$ , H-12a), 1.84 (1H,  $m$ , H-7b), 1.77 (1H,  $m$ , H-1a), 1.76 (1H,  $m$ , H-8), 1.73 (1H,  $m$ , H-11a), 1.72 (1H,  $m$ , H-15a), 1.65 (1H,  $d$ ,  $J = 12.4$  Hz, H-1b), 1.50 (1H,  $m$ , H-11b), 1.47 (1H,  $m$ , H-12b), 1.43 (6H,  $s$ , H-26 and H-27), 1.26 (1H,  $d$ ,  $J = 12.8$  Hz, H-15b), 1.18 (3H,  $s$ , H-29), 1.12 (3H,  $d$ ,  $J = 6.7$  Hz, H-21), 1.08 (3H,  $s$ , H-30), 1.03 (3H,  $s$ , H-28), 0.94 (3H,  $s$ , H-19), 0.93 (3H,  $s$ , H-18);  $^{13}\text{C}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  217.6 (C-22), 172.5 ( $\text{OCOMe}$ ), 141.7 (C-5), 121.5 (C-6), 102.0 (C-1'), 83.1 (C-25), 78.1 (C-5'), 77.9 (C-3'), 77.5 (C-16), 77.5 (C-2), 77.1 (C-3), 75.2 (C-2'), 71.7 (C-4'), 62.8 (C-6'), 58.0 (C-17), 50.3 (C-20), 49.5 (C-14), 48.8 (C-13), 47.5 (C-15), 44.9 (C-8), 42.2 (C-4), 38.0 (C-10), 37.0 (C-23), 35.6 (C-24), 35.6 (C-9), 32.8 (C-11), 31.5 (C-12), 29.0 (C-1), 28.4 (C-19), 27.4 (C-28), 26.2 (C-29), 26.2 (C-27), 26.2 (C-26), 25.4 (C-7), 22.3 ( $\text{OCOMe}$ ), 19.0 (C-30), 17.4 (C-18), 17.1 (C-21); HR-ESI-MS  $m/z$  717.4204  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_{11}\text{Na}$  717.4190).

### Acknowledgement

This work was supported by a Health and Labour Science Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

### References

- Iwagawa, T., Hamada, T., Kurogi, S., Hase, T., Okubo, T., Kim, M., 1991. Iridoids from *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry* 30, 4057–4060.
- Jia, Q., Hong, M.F., Minter, D., 1999. Pikuroside: a novel iridoid from *Picrorhiza kurroa*. *J. Nat. Prod.* 62, 901–903.
- Kim, I.H., Kaneko, N., Uchiyama, N., Lee, J.E., Takeya, K., Kawahara, N., Goda, Y., 2006. Two phenylpropanoid glycosides from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. *Chem. Pharm. Bull.* 67, 863–868.
- Kitagawa, I., Hino, K., Nishimura, T., Iwata, E., Yoshioka, I., 1971. On the constituents of *Picrorhiza kurroa*. (1). The structure of picroside I, a bitter principle of the subterranean part. *Chem. Pharm. Bull.* 19, 2534–2544.
- Li, J.X., Tezuka, Y., Namba, T., Kadota, S., 1998. Three phenylethanoid glycosides and an iridoid glycoside from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Phytochemistry* 48, 537–542.
- Li, P., Matsunaga, K., Ohizumi, Y., 2000. Nerve growth factor-potentiating compounds from *Picrorhizae rhizoma*. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 890–892.
- Smit, H.F., Van den Berg, A.J.J., Kroes, B.H., Beukelman, C.J., Quarles van Ufford, H.C., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 2000. Inhibition of

- T-lymphocyte proliferation by cucurbitacins from *Picrorhiza scrophulariaeflora*. *J. Nat. Prod.* 63, 1300–1302.
- Stuppner, H., Muller, E., Wagner, H., 1991. Cucurbitacins from *Picrorhiza kurroa*. *Phytochemistry* 30, 305–310.
- Wang, D.Q., He, Z.D., Feng, B.S., Yang, C.R., 1993. Chemical constituents from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Acta Bot. Yunnanica* 15, 83–88.
- Wang, H., Sun, Y., Ye, W.C., Xiong, F., Wu, J.J., Yang, C.H., Zhao, S.X., 2004. Antioxidative phenylethanoid and phenolic glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 615–617.
- Yoshikawa, M., Fukuda, Y., Taniyama, T., Kitagawa, I., 1986. Absolute stereostructures of rehmaglutin C and glutinoside, a new iridoid lactone and a new chlorinated iridoid glucoside from Chinese *rehmanniae radix*. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 1403–1406.

セイヨウサンザシ(*Crataegus oxyacantha* L.)葉の主成分  
並びに同植物葉及び市販セイヨウサンザシ葉製品の分析

(2007年3月8日受付)

(2007年4月23日受理)

酒井信夫<sup>a)</sup>, 川口基一郎<sup>b), c)</sup>, 鎌倉浩之<sup>a)</sup>, 川原信夫<sup>a)</sup>, 合田幸広<sup>a)</sup>

- a) 国立医薬品食品衛生研究所  
b) 北里大学薬学部附属薬用植物園  
c) 現 いわき明星大学薬学部

Characterization of Major Components in *Crataegus oxyacantha* L. Leaves  
and Analyses of the Leaves and Commercial Hawthorn Leaf Products

(Received March 8, 2007)

(Accepted April 23, 2007)

Shinobu Sakai<sup>a)</sup>, Kiichiro Kawaguchi<sup>b), c)</sup>, Hiroyuki Kamakura<sup>a)</sup>, Nobuo Kawahara<sup>a)</sup>, Yukihiko Goda<sup>a)</sup>

- a) National Institute of Health Sciences  
b) Medicinal Plant Garden, Kitasato University  
c) Present Address: Faculty of Pharmacy, Iwaki Meisei University

## Abstract

The leaves of hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) has been classified in the raw materials exclusively used as pharmaceuticals in Japan. In the course of our continuous studies for identification of secondary metabolites of the raw materials exclusively used as pharmaceuticals, we isolated three main components (A ~ C) and two minor components (D, E) from the methanol extract. Each component was identified as 3-O-caffeoylquinic acid (A), vitexin 2''- $\alpha$ -L-rhamnoside (B), vitexin 2''-(4-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnoside) (C), 9-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4, 9-dihydroxy-3-methoxypropiophenone (D) and 4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-*p*-coumaric acid (E) by using NMR and LC-MS techniques. In addition, we did not detect any alkaloid-like spot on the thin layer chromatography of the extract with the Dragendorff reagent.

Next, we performed HPLC analyses of the commercial hawthorn leaf products obtained in European markets. The main components of the products are the same of the methanol extracts of the leaves and the HPLC profiles are similar to that of the leaves. This suggests that the species used for the European hawthorn leaf products are that closely related to *C. oxyacantha* L.

**Keywords** : セイヨウサンザシ葉, ホーソーン, フェニルプロパノイド, タンニン, アミノ酸

*Crataegus oxyacantha* leaves, hawthorn leaves, phenylpropanoid, tannin, amino acid

## I 緒言

セイヨウサンザシ(*Crataegus oxyacantha* L. em Jacq., *C. laevigata* (Poir.) DC., *C. monogyna* Jacq., 英名: Hawthorn)は、バラ科サンザシ属の落葉低木で、欧州、地中海沿岸、中近東に広く分布し、その葉部及び偽果は、心臓環状動脈の機能調節、血行改善等に用いられてきた西洋ハーブである。<sup>1)</sup>セイヨウサンザシ由来の二次代謝物に関する研究は古くから行われ、縮合型タンニンの重合体等のポリフェノール類の存在が数多く報告されている。<sup>2-10)</sup>

現在日本では、セイヨウサンザシ葉は強心剤や滋養強壮保健薬の主成分として使用され「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。<sup>11)</sup>他方、その果実は「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」に記載されている。<sup>12)</sup>本品は「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト」の判断のための参考文献に指定されている Botanical Safety Handbook (American Herbal Products Association)<sup>13)</sup>ではClass 1に分類され、適切に使用すれば安全なハーブに分類されている。またThe Complete German Commission E

連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 合田幸広

Corresponding author: Yukihiko Goda, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Monographs Therapeutic Guide to Herbal Medicinesでは, Hawthorn leaf with flowerはApproved herbsに分類されている一方で, Hawthorn leafとしてはUnapproved herbsに分類され, 特別なリスクは知られていないと記述されている.<sup>14)</sup>

本研究では, セイヨウサンザシ葉について主成分の分離・同定及びアルカロイド成分の確認分析を行い, セイヨウサンザシ葉中に専ら医薬品として取り扱うべき成分が含まれているかどうか検討を行うことを目的とした。また, 欧州市場で買い上げたセイヨウサンザシ葉関連製品についても成分分析を行い, それらの製品が, 本研究で用いた植物と同様の成分パターンを持っているか, 確認を行ったので報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料及び試薬

セイヨウサンザシ (*Crataegus oxyacantha* L.) 葉は, 北里大学薬用植物園より入手した<sup>15)</sup>。セイヨウサンザシ葉関連6製品 (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 (スイス), Sample 5; 抽出液 (フランス), Sample 6; 抽出液 (スイス)) は, ブラハ, ジュネーブ, パリの薬局で購入した。アセトニトリルはMerck製の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用を, 水は日本ミリポア製のElix-UV5で調製した逆浸透水を更にMilli-Qにより, 18 MΩ/cmまで精製して得られた超純水を用いた。オープンカラムの担体は, 三菱化学製DIAION HP-20 (HP-20), 及びPharmacia Fine Chemicals製Sephadex LH-20 (LH-20) を用いた。NMR溶媒はメタノール-*d*<sub>4</sub> 99.96%及びDMSO-*d*<sub>6</sub> 99.96% (いずれもIsotec製) を用いた。その他の試薬は, 全て試薬特級品を用いた。

### 2. 装置

HPLC装置は島津製作所製Shimadzu LC-10AT system (ポンプ: LC-10ATVP 2台, 紫外可視検出器: SPD10AVVP, カラムオープン: CTO-10ACVP) に, インテグレートとしてShimadzu C-R7A plusを接続したものを用いた。NMRは, 日本電子製JNM-ECA500及びJNM-ECP600を, LC/MSはLC部にAgilent 1100シリーズ (G1312A バイナリポンプ, G1314 紫外可視検出器, G1329A サンプルインジェクター, G1316A カラム恒温槽) を, MS部にJEOL JMS-T100LC "AccuTOF" を用いた。

### 3. 化合物の単離と構造決定

#### (1) 抽出と粗画分

セイヨウサンザシの主成分を確認するため, 葉部642.8 g (wet) をメタノール5 Lで3回抽出した。メタノール抽出液を濃縮乾燥後, 得られた抽出物102.9 gをジクロロメタンと含水メタノール (70%) で分配した。更に得られた含水メタノール層を濃縮乾燥し, 酢酸エチル, *n*-ブタノールで順次分配を行い, 濃縮乾燥後, ジクロロメタン画分, 酢酸エチル画分, *n*-ブタノール画分, 含水メタノール画分をそれぞれ20.7 g (収

率 3.22%), 5.2 g (0.81%), 28.6 g (4.45%), 35.0 g (5.44%) 得た。

#### (2) 分析HPLC

メタノール抽出物及び各画分を下記分析条件を用いてグラジエント溶出によって分析した。メタノール抽出物のクロマトグラムをFig. 1に示す。なお, これまでに同植物の主化合物として縮合型タンニン重合体が報告されていることから, 分析条件はSvedströmらによる報告に準じた。<sup>16)</sup>

#### 分析HPLC条件

カラム: Hypersil ODS-5 (5 µm, 4 x 250 mm, ケムコ製), 移動相: A: 2.5% 酢酸, B: 2.5% 酢酸 / アセトニトリル (20 : 80), リニア溶出グラジエント: 7→20%B (0→50分); 20→40%B (50→60分); 100%B (60→65分), 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40°C, 検出波長: 紫外279 nm。

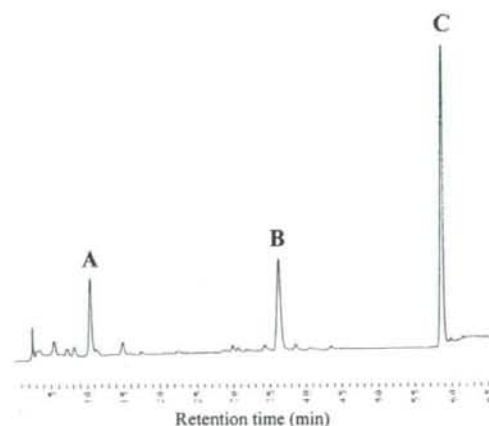


Fig. 1 Chromatogram of methanol extract of *Crataegus oxyacantha* leaves

Conditions; column: Hypersil ODS-5 (5 µm, 4 x 250 mm), flow rate: 1.0 mL/min, mobile phase: solvent A: 2.5% acetic acid, solvent B: 2.5% acetic acid / acetonitrile (20 : 80), (0-50 min, 7-20% B in A; 50-60 min, 20-40% B in A; 60-65 min, 100% B stay), column temp.: 40°C, detection: UV 279 nm.

#### (3) 化合物の単離

得られた*n*-ブタノール画分を50%メタノールに溶解させた後, その飽和溶解量をHP-20カラム (60 mm φ x 400 mm) に負荷し, 50%メタノールで洗浄後, 100%メタノール溶出画分を, 高極性化合物含有画分として画分した。更に, 同画分をLH-20カラム (60 mm φ x 400 mm) に負荷し, 50~100%メタノールを移動相に用いてFr. 1~5まで画分した。更にFr. 1及び2に含まれる化合物A (13.9 mg), D (6.8 mg) 及びE (1.9 mg), また, Fr. 4に含まれる化合物B (215.8 mg) 及びC (497.8 mg) について下記分取条件を用いてHPLCで精製・単離した。

なお, 得られた化合物はTLC及びNMRを用いて高純度であることを確認した。化合物の単離に使用した分取HPLC条件を下記に示す。

## 分取条件

カラム: Inertsil ODS-3(5  $\mu$ m, 20 x 250 mm, GLサイエンス製), またはInertsil ODS-3 (5  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, GLサイエンス製), 移動相: 25~40% メタノール(2.5% 酢酸含有), 流速: 10.0 mL/min(カラム内径20 mm使用時), または1.0 mL/min(カラム内径4.6 mm使用時), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 紫外279 nm.

## (4) 主化合物のNMR測定

$^1$ H-NMR及び $^{13}$ C-NMRの化学シフト値はテトラメチルシランに対する $\delta$ 値(ppm)で示した。単離された化合物をメタノール-*d*<sub>4</sub> 99.96%(化合物A, D, E), 及びDMSO-*d*<sub>6</sub> 99.96%(化合物B, C)に溶解し,  $^1$ H-NMR(600 MHz及び500 MHz)及び $^{13}$ C-NMR(150 MHz及び125 MHz), Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY;  $^1$ H- $^1$ H-2D相関), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC;  $^1$ H観測 $^1$ H- $^{13}$ C-2D隣接相関), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC;  $^1$ H観測 $^1$ H- $^{13}$ C-2D遠隔相関)スペクトルの測定を行った。なお, 単離された $^1$ H-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及び文献値<sup>17-21)</sup>との比較によって行った。

## (5) 主化合物のLC/MS測定

MS測定は試料をHPLCより導入し, エレクトロスプレー(Electrospray ionization; ESI)法によりイオン化を行い, 下記条件を用いてポジティブモードで測定した。また, 質量校正試料としてYOKUDELNA(日本電子製)を用い精密質量を得た。

## LC/MS分析条件

カラム: YMC-Pack Pro C18 RS (5  $\mu$ m, 2 x 250 mm, ワイエムシー製), 移動相: A: 2.5% 酢酸, B: アセトニトリル, リニア溶出グラジエント: 6 $\rightarrow$ 16%B (0 $\rightarrow$ 50分); 16 $\rightarrow$ 32%B (50 $\rightarrow$ 60分); 80%B (60 $\rightarrow$ 90分), 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 検出波長: 紫外279 nm, オリフィス1電圧: 80 V, リングレンズ電圧: 13 V, ニードル電圧: 2,000 V, 脱溶媒室温度: 250 $^{\circ}$ C, 質量範囲: 100~2,000 *m/z*.

## (6) 物性データ

**化合物A:** HR-TOFMS (ESI, positive mode); *m/z*: 377.08371 [M + Na]<sup>+</sup>, 163.0930 [caffeoyl]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>Na requires 377.08486.  $^1$ H-NMR [measured at 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD]:  $\delta$  2.06, 2.19 (each 1H, *m*, H-2'), 2.06, 2.19 (each 1H, *m*, H-6'), 3.72 (1H, *dd*, *J* = 8.6, 2.9 Hz, H-4'), 4.16 (1H, *br-s*, H-5'), 5.33 (1H, *m*, H-3'), 6.26 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-7), 6.77 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, H-5), 6.95 (1H, *dd*, *J* = 8.3, 2.0 Hz, H-6), 7.04 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2), 7.55 (1H, *d*, *J* = 16.0 Hz, H-8).  $^{13}$ C-NMR [measured at 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD]:  $\delta$  175.9 (COOH), 167.4 (C-9), 148.3 (C-3), 145.7 (C-4), 145.5 (C-8), 126.5 (C-1), 121.7 (C-6), 115.2 (C-5), 114.0 (C-2), 113.9 (C-7), 74.9 (C-1'), 72.3 (C-4'), 70.7 (C-3'), 70.1 (C-5'), 37.6 (C-2'), 36.9 (C-6').

**化合物B:** HR-TOFMS (ESI, positive mode); *m/z*: 579.16861

[M + H]<sup>+</sup>, 433.11067 [M - rhamnose + H]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>O<sub>14</sub> requires 579.17139.  $^1$ H-NMR [measured at 600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO]:  $\delta$  0.48 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H<sub>3</sub>-6'''), 2.14 (1H, *dq*, *J* = 9.4, 6.1 Hz, H-5'''), 2.92 (1H, *t*, *J* = 9.4 Hz, H-4'''), 3.10 (1H, *dd*, *J* = 13.9, 3.1 Hz, H-2'''), 3.26 (1H, *m*, H-5''), 3.40 (1H, *m*, H-4''), 3.45 (1H, *m*, H-3''), 3.54 (1H, *m*, H-6''), 3.59 (1H, *m*, H-3'''), 3.77 (1H, *d*, *J* = 11.3 Hz, H-6''), 4.07 (1H, *dd*, *J* = 9.9, 8.0 Hz, H-2''), 4.77 (1H, *d*, *J* = 9.9 Hz, H-1''), 4.99 (1H, *br-s*, H-1'''), 6.27 (1H, *s*, H-6), 6.77 (1H, *s*, H-3), 6.90 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-3' and H-5'), 8.04 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-2' and H-6').  $^{13}$ C-NMR [measured at 150 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO]:  $\delta$  182.0 (C-4), 163.9 (C-2), 162.2 (C-7), 161.1 (C-4'), 160.6 (C-5), 155.8 (C-9), 128.9 (C-2'), 128.9 (C-6'), 121.5 (C-1'), 115.8 (C-3'), 115.8 (C-5'), 104.4 (C-8), 104.2 (C-10), 102.4 (C-3), 100.2 (C-1'''), 98.2 (C-6), 81.7 (C-5''), 79.8 (C-3''), 75.1 (C-2''), 71.6 (C-1''), 71.5 (C-4'''), 70.7 (C-4''), 70.4 (C-3'''), 70.2 (C-2''), 68.1 (C-5'''), 61.1 (C-6''), 17.6 (C-6''').

**化合物C:** HR-TOFMS (ESI, positive mode); *m/z*: 621.17914

[M + H]<sup>+</sup>, 433.10891 [M - acetylramnose + H]<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>O<sub>15</sub> requires 621.18195.  $^1$ H-NMR [measured at 600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO]:  $\delta$  0.38 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, H<sub>3</sub>-6'''), 1.95 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-Ac2), 2.13 (1H, *dq*, *J* = 9.4, 6.1 Hz, H-5'''), 3.28 (1H, *m*, H-2'''), 3.28 (1H, *m*, H-5''), 3.41 (1H, *m*, H-4''), 3.48 (1H, *m*, H-3''), 3.56 (1H, *m*, H-6''), 3.61 (1H, *m*, H-3'''), 3.79 (1H, *d*, *J* = 11.5 Hz, H-6''), 4.02 (1H, *dd*, *J* = 10.2, 9.3 Hz, H-2''), 4.45 (1H, *t*, *J* = 9.9 Hz, H-4'''), 4.80 (1H, *d*, *J* = 10.2 Hz, H-1''), 5.14 (1H, *br-s*, H-1'''), 6.33 (1H, *s*, H-6), 6.79 (1H, *s*, H-3), 6.91 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-3' and H-5'), 8.06 (2H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-2' and H-6').  $^{13}$ C-NMR [measured at 150 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO]:  $\delta$  182.0 (C-4), 169.7 (C-Ac1), 163.9 (C-2), 162.2 (C-7), 161.2 (C-4'), 160.8 (C-5), 155.7 (C-9), 128.9 (C-2'), 128.9 (C-6'), 121.4 (C-1'), 115.8 (C-3'), 115.8 (C-5'), 104.4 (C-8), 104.1 (C-10), 102.3 (C-3), 99.3 (C-1'''), 98.3 (C-6), 81.8 (C-5''), 79.9 (C-3''), 74.1 (C-2''), 73.6 (C-4'''), 71.6 (C-1''), 70.6 (C-4''), 70.2 (C-3'''), 67.7 (C-2''), 65.3 (C-5''), 61.1 (C-6''), 20.7 (C-Ac2), 17.1 (C-6''').

**化合物D:** HR-TOFMS (ESI, positive mode); *m/z*: 381.12469

[M + Na]<sup>+</sup>, 197.12918 [M - glucose + H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>Na requires 381.11616.  $^1$ H-NMR [measured at 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD]:  $\delta$  3.14 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, H-2'), 3.26 (1H, *m*, H-5'), 3.27 (1H, *m*, H-4'), 3.29 (2H, *m*, H<sub>2</sub>-8'), 3.34 (1H, *m*, H-3'), 3.90 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-OMe), 3.65, 3.83 (each 1H, *m*, H-6'), 3.99, 4.25 (each 1H, *ddd*, *J* = 22.9, 10.0, 2.6 Hz, H<sub>2</sub>-9), 4.31 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, H-1'), 6.86 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, H-5), 7.54 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2), 7.60 (1H, *dd*, *J* = 8.3, 2.0 Hz, H-6).  $^{13}$ C-NMR [measured at 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD]:  $\delta$  198.0 (C-7), 152.1 (C-3), 147.7 (C-4), 129.1 (C-1), 123.5 (C-6), 114.5 (C-5), 110.6 (C-2), 103.3 (C-1'), 76.7 (C-3'), 76.5 (C-5'), 73.7 (C-2'), 70.3 (C-4'), 65.2 (C-9), 61.4 (C-6'), 55.1 (C-OMe), 38.0 (C-8).

**化合物E:** HR-TOFMS (ESI, positive mode); *m/z*: 349.09033

[M + Na]<sup>+</sup>, 147.04673 [M - glucose + H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na requires

349.08994. <sup>1</sup>H-NMR [measured at 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD]: δ 3.40 (1H, *m*, H-3'), 3.45 (1H, *m*, H-2'), 3.46 (1H, *m*, H-4'), 3.46 (1H, *m*, H-5'), 3.69 (1H, *dd*, *J* = 5.8, 12.0 Hz, H-6'), 3.89 (1H, *dd*, *J* = 2.3, 12.0 Hz, H-6'), 4.94 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 5.86 (1H, *d*, *J* = 12.9 Hz, H-8), 6.83 (1H, *d*, *J* = 12.9 Hz, H-7), 7.05 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-3 and H-5), 7.64 (2H, *d*, *J* = 8.6 Hz, H-2 and H-6). <sup>13</sup>C-NMR [measured at 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD]: δ 169.2 (C-9), 158.2 (C-4), 141.0 (C-7), 131.4 (C-2 and C-6), 129.3 (C-1), 118.4 (C-8), 115.7 (C-3 and C-5), 100.6 (C-1'), 76.9 (C-3'), 76.6 (C-5'), 73.6 (C-2'), 70.0 (C-4'), 61.2 (C-6').

#### 4. アルカロイドの存在確認

##### (1) 抽出と粗分画

セイヨウサンザシ葉中のアルカロイドの存在を確認するため、メタノール抽出物について塩基性70%メタノール(pH 10)とで分配し、得られた水層について、更に酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配を行い、非塩基性画分、塩基性酢酸エチル画分、塩基性*n*-ブタノール画分を得た。

##### (2) TLC分析

アルカロイドのTLCは以下に示す方法で行った。薄層板: silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck社製), 展開液: *n*-ブタノール/酢酸/水 = 2/1/1, 検出液: ドラゲンドルフ液(次硝酸ピスマス酢酸水溶液: ヨウ化カリウム水溶液=1/1)。アミノ酸のTLCは以下に示す方法で行った。薄層板: silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck社製), 展開液: エタノール/水=7/3, 2-プロパノール/水=7/3, *n*-ブタノール/酢酸/水=4/1/1, 2/1/1, 検出液: ニンヒドリン溶液。

#### 5. セイヨウサンザシ葉及び関連製品のHPLC分析

北里大学薬用植物園より採取したセイヨウサンザシ葉は細断後、メタノールで抽出し、濃縮したものをメタノールで10 mg/mLとし、その10 μLをHPLCに供した。葉草茶(Sample 1及び2)は5 gをメタノール(200 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 μLをHPLCに供した。錠剤(Sample 3)及び丸剤(Sample 4)は粉砕後50 mgをメタノール1 mLに懸濁させ超音波抽出、遠心、フィルターろ過し、その10 μLをHPLCに供した。抽出液(Sample 5及び6)は原液をフィルターろ過し、その10 μLをHPLCに供した。分析条件は上記3. (2)に示したとおりである。

### III 結果

#### 1. 化合物の単離, 精製

セイヨウサンザシ葉のメタノール抽出物をHPLCに供したところ、保持時間10.34分(化合物A), 36.18分(化合物B), 58.54分(化合物C)に主成分と推定される3本の主ピークが観察された(Fig. 1)。次に、液液分配によって得られた各画分のHPLC分析を行った結果、主化合物が*n*-ブタノール画分に多く含まれることが判った。そこで、これらの主ピークを単離し、構造を明らかにするため、*n*-ブタノール画分をHP-20カ

ラム, LH-20カラムに順次供し、更に分取HPLCを用いて主化合物A~Cを単離, 精製した。また、化合物Aを単離する過程において、保持時間の近いピークD及びEを副次化合物として単離, 精製した。

#### 2. 化合物の構造解析

単離された化合物Aは、精密質量分析の結果、[M + Na]<sup>+</sup>に対応する*m/z* 377.08371を与え、推定構造式C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>を導き、*m/z* 163.0930のフラグメントからcaffeoyl基の結合が示唆された。<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRのデータからはフェニルプロパン化合物に特徴的なシグナルが観察され、最終的に各種2D-NMRスペクトルの詳細な検討を行い、その化学構造は1, 3, 4, 5-tetrahydroxycyclohexane carboxylic acid 3-(3, 4, -dihydroxycinnamate)であり、3-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)と同定した。

化合物Bは、精密質量分析の結果、[M + H]<sup>+</sup>に対応する*m/z* 579.16861を与え、推定組成式C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>を導き、apigenin配糖体等、トリヒドロキシフラボンのグルコシルラムノシル体と考えられた。また*m/z* 433.11067のフラグメントから推定構造式C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub>を導き、デオキシ糖の脱離(質量差: -146.05794, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)が推定されたことからvitexin rhamnoside等の可能性が考えられた。更に、各種2D-NMRスペクトルの詳細な検討を行い、その化学構造をvitexin 2''- $\alpha$ -L-rhamnosideと同定した。

化合物Cは、精密質量分析の結果、[M + H]<sup>+</sup>に対応する*m/z* 621.17914を与え、推定組成式C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>を導いた。また、化合物Cは化合物Bと同じ433.10891(推定構造式C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub>)のフラグメントが観察されることから、化合物Bの[M + H]<sup>+</sup>との質量差+42.01053(-CH<sub>2</sub>CO)を考慮し、化合物Bのアセチル体と考えられた。また、化合物Cは<sup>1</sup>H-NMRにおいて化合物Bと類似したスペクトルを示したが、2.92 ppmに観測されたトリプレットのシグナルが4.45 ppmに低磁場シフトしていることから化合物Cが化合物Bのアセチル体であることが示唆された。更に、各種2D-NMRスペクトルの詳細な検討を行い、その化学構造をvitexin 2''-(4-*O*-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnoside)と同定した。

化合物Dは、精密質量分析の結果、[M + Na]<sup>+</sup>に対応する*m/z* 381.12469を与え、推定組成式C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>を導いた。更に、*m/z* 197.12918のフラグメントからグルコース1分子の結合が示唆された。<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRのデータからは化合物Aと同様にフェニルプロパン化合物に特徴的なシグナルが観察され、最終的に各種2D-NMRスペクトルの詳細な検討を行い、その化学構造を9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4, 9-dihydroxy-3-methoxypropiofenoneと同定した。

化合物Eは、精密質量分析の結果、[M + Na]<sup>+</sup>に対応する*m/z* 349.09033を与え、推定構造式C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>を導いた。更に、*m/z* 147.04673のフラグメントから化合物Dと同様にグルコース1分子の結合が示唆された。<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRのデータからは*p*-coumaric acidに特徴的なシグナルが観察され、最終的に各種2D-NMRスペクトルの詳細な検討を行い、その化学構造を4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-*p*-coumaric acidと同

定した。

以上、化合物A~Eの化学構造をFig. 2に示す。

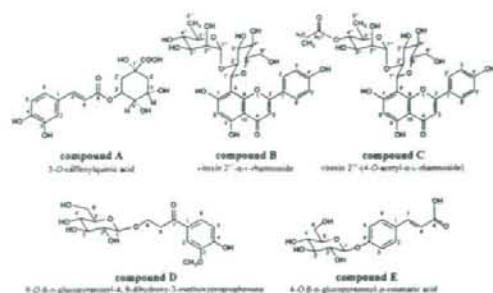


Fig. 2 Chemical structures of compound A-E

### 3. アルカロイドの存在確認

非塩基性画分、塩基性酢酸エチル画分及び塩基性*n*-ブタノール画分について、ドラージェンドルフ試薬を用いたTLC分析を行ったところ、塩基性酢酸エチル画分及び塩基性*n*-ブタノール画分にはクロロフィル等の色素由来のスポットが認められ、ドラージェンドルフ試薬で新たに発色するスポットは認められなかった。他方、非塩基性画分には含窒素化合物由来と考えられるスポットが確認された(Fig. 3)。そこで本画分に含まれる含窒素化合物が、アミノ酸であるかどうか明らかにするために、ニンヒドリン試薬を用いた

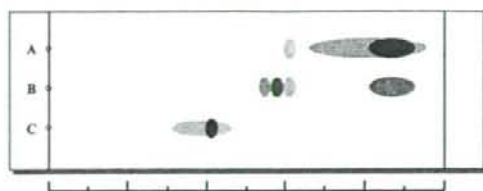


Fig. 3 Thin-layer chromatographic analysis for alkaloids

A, basic EtOAc layer; B, basic *n*-BuOH layer; C, non basic layer. Color of spots; A: yellow - green; B: yellow - green; C: brown. TLC conditions; adsorbent: silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), developing solvent: *n*-BuOH / HOAc / H<sub>2</sub>O = 2 / 1 / 1, detection: Dragendorff's spray reagent.

TLC分析を行った。その結果、Ala, Asp, Glu, Thr, Gln, Asnが非塩基性画分に見られたスポットと同一のR値を示した。従って、本画分に含まれる含窒素化合物は、塩基性を示すアルカロイドではなく、これらのアミノ酸である可能性が非常に高いものと考えられた。TLCによるアミノ酸分析の結果をTable 1に示す。

### 4. セイヨウサンザシ葉関連製品のHPLCプロファイル分析

セイヨウサンザシ葉関連製品を上記3. (2)に示した条件で分析したところ、Sample 1, 2, 3及び6の4製品からは、セイヨウサンザシ葉メタノール抽出物のクロマトグラムと

Table 1 R<sub>f</sub> values of non basic layer and amino acid standards

	developing solvent			
	EtOH/H <sub>2</sub> O=7/3	2-PrOH/H <sub>2</sub> O=7/3	<i>n</i> -BuOH/HOAc/H <sub>2</sub> O=4/1/1	<i>n</i> -BuOH/HOAc/H <sub>2</sub> O=2/1/1
non basic layer	0.56, 0.61, 0.65, 0.71	0.42, 0.47, 0.65	0.15, 0.25, 0.43	0.31~0.46
Alanine	0.59	0.47	0.25	0.45
Arginine	0.02	—	—	—
Aspartic acid	0.65	0.47	0.15	0.34
Cysteine	0.38	—	—	—
Glutamic acid	0.65	0.48	0.25	0.41
Glycine	0.46	—	—	—
Isoleucine	0.75	0.66	0.50	—
Leucine	0.76	0.69	0.53	—
Lysine	0.02	—	—	—
Methionine	0.73	0.65	0.45	0.58
Asparagine	0.71	0.47	0.14	0.32
Glutamine	0.61	0.41	0.16	0.35
Serine	0.45	—	—	—
Threonine	0.57	0.47	0.25	0.40
Valine	0.50	—	—	—
Cystine	0.23	—	—	—
Phenylalanine	0.79	—	—	—
Tyrosine	0.79	—	—	—
Histidine	0.13	—	—	—
Proline	0.52	—	—	—
Hydroxyproline	0.60	0.46	0.19	—
Tryptophan	0.81	—	—	—

adsorbent: silica gel 60 F<sub>254</sub> (merck), detection: ninhydrin spray reagent.

同様に化合物A, B, Cが主成分として観察された。一方, Sample 4及び5の2製品からは, それらのピークは観察されなかった。これら, 主ピークが観察されなかった製品には, "Homéopathique"の表記があったことから, 本品は, ホメオパシー用のもので, 濃度が非常に薄いものとして, これ以上の検討は行わなかった。

#### IV 考察

これまでにセイヨウサンザシ葉部より縮合型タンニン重合体の存在が報告されている<sup>2,10)</sup>本研究において高極性画分より同定したフェニルプロパノイドやタンニン化合物群は, 生合成的にそれらの化合物の類縁体であることから, 酢酸エチル分配画分にそれらの化合物が含まれる可能性が考えられた。また, 本研究で主成分として単離されたvitexin 2''- $\alpha$ -L-rhamnoside及びvitexin 2''-(4-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnoside)は, これまでに*C. oxyacantha*と同じバラ科サンザシ属の植物である*C. monogyna*及び*C. pentagyna*より単離された報告がある<sup>18)</sup>が, 他にもチャノキ(*Camelia sinensis*)<sup>19)</sup>やエンバク(*Avena sativa*)<sup>22)</sup>などの食用植物の葉部より広く単離されている。他方, セイヨウサンザシ葉中に含まれるアルカロイドを確認する目的で, 70%メタノール(pH 10)抽出エキスのTLC分析を試みたところ, 塩基性酢酸エチル画分, 塩基性*n*-ブタノール画分には窒素含有化合物由来の明確なスポットは確認されず, 非塩基性画分にのみスポットが確認された。更に同画分をTLCで詳細に分析したところ, 複数のアミノ酸が含まれることが明らかとなった。また, 外国市場より入手したセイヨウサンザシ葉関連製品に「専ら医薬品」として取り扱うべき成分が含まれているかどうか検討することを目的として, HPLCを用いてプロファイル分析を行った。その結

果, 4製品は同植物のメタノール抽出物と極めて類似したクロマトグラムが得られ, 主要なピークは同一で, 類似した成分パターンを持つことを確認した。従って, ヨーロッパで用いられているセイヨウサンザシ葉も, 我々が成分検討した植物と同様あるいは, 類似した基原を持つものであると推定された。

以上の結果より, セイヨウサンザシ葉及びその関連製品中に「専ら医薬品」として取り扱うべきアルカロイド等の有毒成分や麻薬・向精神薬及び覚せい剤様作用成分が含まれている可能性は低いと考えられた。

#### V 結論

セイヨウサンザシ葉より単離された主化合物として3-O-caffeoylquinic acid, vitexin 2''- $\alpha$ -L-rhamnoside及びvitexin 2''-(4-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnoside)を単離同定し, 副次化合物として9-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-4, 9-dihydroxy-3-methoxypropiphenone及び4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-*p*-coumaric acidを初めて単離同定した。また, セイヨウサンザシ葉には, アルカロイドが含まれる可能性は低く, 複数のアミノ酸が含まれていることを示した。さらに, 欧州市場で入手したセイヨウサンザシ葉関連製品中の成分パターンは, 我々が成分単離を行った*Crataegus oxyacantha* L.と同様であることを確認した。

#### VI 謝辞

本研究は, 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)「専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)の有効性及び安全性等の評

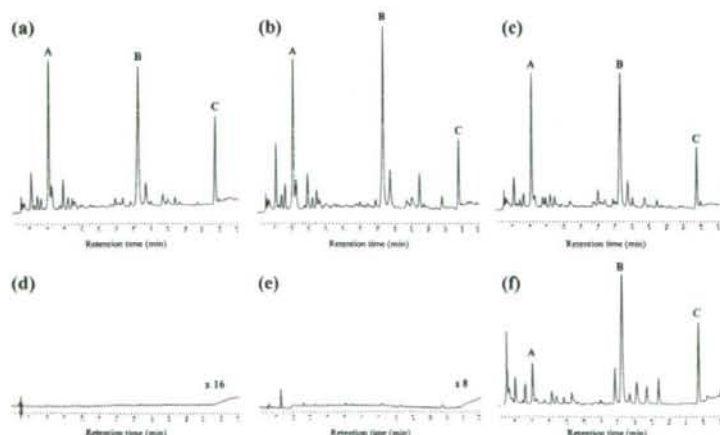


Fig. 4 Chromatograms of the medicinal products of *Crataegus oxyacantha*

(a) Sample 1 (herbal tea; Czech), (b) Sample 2 (herbal tea; France), (c) Sample 3 (tablets; Switzerland), (d) Sample 4 (pills; Switzerland), (e) Sample 5 (extracts; France), (f) Sample 6 (extracts; Switzerland).



価に関する研究]及び「専ら医薬品」としての規制の範囲に関する研究]による。

## VII 文献

- 林彌栄監修, “原色世界植物大図鑑”, 北隆館, pp. 45 (1986).
- Bersin, T., Müller, A. and Schwarz, H.; Studies on the Ingredients of *Crataegus oxyacantha* L. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 5, 490-491 (1955).
- Kranen-Fiedler, U.; New Ingredients obtained from *Crataegus oxyacantha*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 5, 609-610 (1955).
- Hahn, F., Klinkhammer, F. and Oberdorf, A.; Preparation and pharmacological investigation of a new therapeutic agent obtained from *Crataegus oxyacantha*. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 10, 825-829 (1960).
- Rewerski, W. and Lewak, S.; Some pharmacological properties of flavan polymers isolated from Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 17, 490-491 (1967).
- Rewerski, W., Piechocki, T., Rylski, M. and Lewak, S.; Some pharmacological properties of oligomeric procyanidin isolated from Hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 21, 886-888 (1971).
- Schrall, R. and Becker, H.; Production of catechins and oligomeric proanthocyanidins in tissue and suspension cultures of *Crataegus monogyna*, *C. oxyacantha* and *Ginkgo biloba*. *Planta Med.*, 32, 297-307 (1977).
- Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastre, R.; TLC-densitometric determination of 2, 3-*cis*-procyanidin monomer and oligomer from Hawthorn (*Crataegus laevigata* and *C. monogyna*). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7, 1871-1875 (1989).
- Witting, J., Leipolz, I., Graefe, E. U., Jaki, B., Treutter, D. and Veit, M.; Quantification of procyanidins in oral herbal medicinal products containing extracts of *Crataegus* species. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 52, 89-96 (2002).
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostiaainen, R., Tuominen, J., Kokkonen, J., Rauha, J. P., Laakso, I. and Hiltunen, R.; Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*, 60, 821-825 (2002).
- 厚生労働省医薬局長通知“別添2 専ら医薬品として使用される成分本質(原材料)リスト”(平成13年3月27日). 医薬発第243号 (2001).
- 厚生労働省医薬局長通知“別添3 医薬品の効果を標ぼうしない限り食品と認められる成分本質(原材料)リスト”(平成13年3月27日). 医薬発第243号 (2001).
- McGuffin, M., Hobbs, C., Upton, R. and Goldberg, A. (eds); *American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 37 (1997).
- Blumenthal, M. (ed); *The Complete German Commission E Monographs, Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Thieme Medical Pub., pp. 142-144, 334-335 (1999).
- 本研究で用いた *Crataegus oxyacantha* L. の植物体は北里大学薬学部附属薬用植物園において植栽, 同体保存されている。
- Svedström, U., Vuorela, H., Kostiaainen, R., Huovinen, K., Laakso, I. and Hiltunen, R.; High-performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidins from dimers up to the hexamer in hawthorn. *J. Chromatogr. A*, 968, 53-60 (2002).
- Corthout, J., Pieters, L., Claeys, M., Vanden Berghe, D. and Vlietinck; Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, 31, 1979-1981 (1992).
- Nikolov, N., Seligmann, O., Wagner, H., Horowitz, R. M. and Gentili, B.; New flavonoid-glycosides from *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna*. *Planta Med.*, 44, 50-53 (1982).
- Scharbert, S., Holzmann, N. and Hofmann, T.; Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3498-3508 (2004).
- Andersson, R. and Lundgren, L. N.; Monoaryl and cyclohexenone glycosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, 27, 559-562 (1988).
- Cui, C. B., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Nakano, H., Tamaoki, T. and Park, J. H.; Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. I. Isolation and structures of davallialactone and a new flavanone glucuronide. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 3218-3225 (1990).
- Chopin, J., Dellamonica, G., Bouillant, M. L., Besset, A., Popovici, G. and Weissenböck, G.; C-Glycosylflavones from *Avena Sativa*. *Phytochemistry*, 16, 2041-2043 (1977).

## The constituents of the roots of *Ampelopsis japonica*

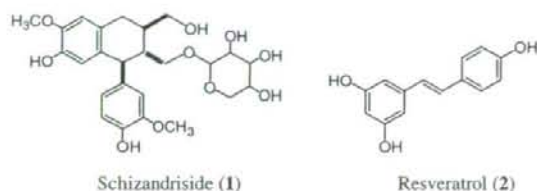
Ik Hwi Kim · Michiyo Umezawa · Nobuo Kawahara ·  
Yukihiro Goda

Received: 5 July 2006 / Accepted: 2 November 2006 / Published online: 19 December 2006  
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2006

**Abstract** Six compounds, schizandriside, resveratrol, (+)-catechin, (–)-epicatechin, (+)-gallocatechin, and (–)-epicatechin gallate, were isolated from the roots of *Ampelopsis japonica* (Vitaceae). Their structures were determined on the basis of both chemical and spectroscopic data.

**Keywords** *Ampelopsis japonica* · Vitaceae · Schizandriside · Resveratrol

*Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino (syn. *Ampelopsis serjaniaefolia* Bunge), a raw material exclusively used as pharmaceuticals in Japan, is distributed in eastern Asia. Its dried roots have been used as traditional medicine for the treatment of anodyne and febrifuge [1]. 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. As part of this study, we have isolated six compounds, schizandriside (1), resveratrol (2), (+)-catechin (3), (–)-epicatechin (4), (+)-gallocatechin (5), and (–)-epicatechin gallate (6), from the roots of this plant of herbal medicines market in Japan. This paper describes the isolation and identification of the six compounds from this plant. The plant material was purchased from Uchida Wakanyaku Co. Ltd. A voucher specimen was deposited in the National Institute of Health Sciences, Japan.



The dried and ground roots of *A. japonica* (500 g) were extracted with hot MeOH. The solvent was removed in vacuo to give a residue (39.1 g), which was suspended in H<sub>2</sub>O. The suspension was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, and 1-BuOH, successively, and the solvent was removed in vacuo to afford CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble (4.6 g), EtOAc-soluble (2.9 g), and 1-BuOH-soluble (10.6 g) portions, respectively. The EtOAc-soluble portion was placed on a silica gel column and eluted sequentially with CHCl<sub>3</sub>/MeOH mixtures (20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1 and 0:1) to give ten fractions (frs. 1–10). By repeated reversed-phase HPLC using mixtures of MeOH/H<sub>2</sub>O, fr. 4 (40.2 mg) afforded compound 2 (8.5 mg), fr. 5 (120.8 mg) afforded compounds 3 (54.1 mg) and 4 (25.2 mg), fr. 6 (284.6 mg) afforded compounds 1 (5.2 mg), 5 (4.0 mg), and 6 (2.6 mg). Compounds 1–6 were identified as schizandriside (1) [2], resveratrol (2) [3], (+)-catechin (3) [4, 5], (–)-epicatechin (4) [4, 5], (+)-gallocatechin (5) [6], and (–)-epicatechin gallate (6) [4, 5] by comparison of their spectral data with those in the literature. Schizandriside (1) and resveratrol (2) have been isolated from *Schisandra nigra* (Schisandraceae) and *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae), respectively. These compounds were obtained from *A. japonica* and Vitaceae plants also for the first time.

I. H. Kim · M. Umezawa · N. Kawahara · Y. Goda (✉)  
National Institute of Health Sciences (NIHS),  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
e-mail: goda@nihs.go.jp

## References

1. Kato T, Yamane F, Morita Y (1992) Chemical components of a commercial crude drug "Byakken" (*Ampelopsis Radix*). *Shoyakugaku Zasshi* 46:302–309
2. Takani M, Ohya K, Takahashi K (1979) Studies on constituents of medicinal plant. XXII. Constituents of *Schizandra nigra* Max. *Chem Pharm Bull* 27:1422–1425
3. Jayatilake GA, Jayasuriya H, Lee ES, Geahlen RL, Koonchanok NM, Ashendel CL, McLaughlin JL, Chang CJ (1993) Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *J Nat Products* 56:1805–1810
4. Nonaka G, Kawahara O, Nishioka I (1983) Tannins and related compounds. XV. A new class dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf (1). *Chem Pharm Bull* 31:3906–3914
5. Kumar NS, Rajapaksha M (2005) Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1083:223–228
6. Dat NT, Cai XF, Shen Q, Lee IS, Kim YH (2005) New inhibitor against nuclear factor of activated T cell transcription from *Ribes fasciculatum* var. *chinense*. *Chem Pharm Bull* 53:114–117

## 鏡検による *Curcuma longa* L. (ウコン) と *Curcuma aromatica* Salisb. (ハルウコン) の鑑別について

徳本廣子<sup>a</sup>, 下村裕子<sup>a</sup>, 香月茂樹<sup>b</sup>, 合田幸広<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

<sup>b</sup> 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

### Morphological Discrimination of *Curcuma longa* L. and *Curcuma aromatica* Salisb.

Hiroko Tokumoto<sup>a</sup>, Hiroko Shimomura<sup>a</sup>, Shigeki Katsuki<sup>b</sup> and Yukihiro Goda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Health Sciences (NIHS),

18-1, Kamiyoga 1-Chome, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Tanegashima Division, Research Center for Medical Plant Resources,

National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO),

17007-2, Matubarayama, Noma,

Nakatane-cho, Kumage-gun, Kagoshima 891-3604, Japan

(Received December 17, 2007)

The first step for ensuring the quality of natural products is to use the right parts from the right origin. By using a microscope we studied morphological differences between the rhizomes of *Curcuma longa* L. and *C. aromatica* Salisb., both of which are used as health food ingredients.

We found a sharp contrast between the shapes of starch grains of *C. longa* and those of *C. aromatica*, namely long triangle to long ovate in *C. longa* and ovate to wide ovate in *C. aromatica* (pl.3), regardless of the degree of processing. There is a clear difference in the ratio of the major diameter to the minor one between these two species. In addition, we also found that the color of the contents of the secreting cells differed between the species: reddish-brown in *C. longa*, colorless or pale yellow in *C. aromatica* (pl.4).

We then applied the morphological discrimination method to samples of health foods, the origins of which had been determined by DNA analyses. The result was identical with that determined by molecular biology techniques. This study shows that microscopic identification is a useful method for the authentication of the origin of health food products.

**Keywords:** *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica*, turmeric, starch grain, microscope, anatomy

#### 緒言

天然物由来製品の品質確保のための第一歩は、原材料として常に正しい基原種と部位を用いることである。日本薬局方や日本薬局方外生薬規格に記載されている生薬の多くは、基原に学名と並列で和名が掲載されており、それらの和名

は公的なものとなる。一方多くの外来植物や外国産の植物では、標準和名がなく、その植物や植物由来品の導入者が都合の良いように適当に日本語で名前をつけたり、商品名としてその名称をつける場合が多い。そのため、同一の植物に由来する製品であっても、異なった日本語で植物名が表示されていたり、逆に異なった植物に由来する製品でも、同じ

日本語名が通用している場合がある。特に健康食品の原料ではこのようなものが多く、原材料の基原種と使用部位に関する表示に明確な規定が設けられていないため、明らかな虚偽の事例も含め、多くの混乱が生じている<sup>1)9)</sup>。

現在、健康食品として市販されているウコン(鬱金)は、主にショウガ科の*Curcuma longa* L.(ウコン)または*C. aromatica* Salisb.(ハルウコン)の根茎を調製したものである。*C. longa*は、第15改正日本薬局方<sup>9)</sup>に記載される「ウコン」の基原植物でもあり、その根茎は医薬品としても取り扱われている。*C. longa*の和名は、局方でウコンと規定されているにもかかわらず、*C. longa*が健康食品として用いられる際には、*C. aromatica*と区別するために、アキウコンとよばれることがある。また*C. longa*の根茎は、中国では姜黄(Jianghuang)という生薬名で取り扱われているが、日本で姜黄(キョウオウ)という、一般に*C. aromatica*の植物和名をさす。このようなことが原因となり、健康食品の表示において、基原として示される植物名や生薬名の混乱が生じやすくなっている。このような混乱を回避するためには、健康食品であっても、基原植物の鑑別法を整備し、基原植物名として、必ず学名を用いることが重要であると考えられる。

本研究では、健康食品(原材料)の安全性確保のための基礎的研究として、基原となる*C. longa*および*C. aromatica*をとりあげた。これらは、熱帯及び亜熱帯アジア諸国、台湾などを主な産地とし、色素のクルクミンは抗酸化作用をはじめ、抗腫瘍作用、抗認知症作用、抗炎症作用が報告されており<sup>7)</sup>様々な生活習慣病の予防を期待して用いられるほか、ターメリック色素の名で食品添加物に用いられている。市販される製品の多くは、粉末や粒状あるいは錠剤などに加工されており、国内産の原料は、根を除去した根茎を薄切りまたは千切りにし、乾燥し調製したものが多く、輸入した原料は湯通ししたのち、陽干したものが多くといわれている<sup>8)9)</sup>。なお*C. longa*の根茎の切断面は黄橙色～淡黄色、*C. aromatica*は明黄色～淡黄色を呈するため、根茎の断面視による区別が比較的容易と考えられているが、製品として調製されたものについては、当然のことではあるが、色彩により原植物を推定することは危険である。

今回、化学的手法を用いず、鏡検により原植物の根茎の内部形態の観察を行い、*C. longa*と*C. aromatica*では、でんぷん粒の形、および短径に対する長径の比の値、分泌物の色に差があることを明らかとした。さらに、この結果に基づき市販の製品中の基原植物を鑑別することが可能であったので報告する。

## 1. 材料

使用した検体の外部形態を写真1(plate:pl.1)に示す。

### 1) 栽培品

種子島薬用植物栽培試験場 現医薬基盤研究所種子島研究部栽培品を使用した。いずれの品種も、2005年9月(生育期)および2006年2月(地上部が枯死し、養分が地下部に集積され充実する、収穫適期)に採取したものをを使用した。

(1)*Curcuma longa* L.の根茎3種。No.1はインドネシア産、No.2は台湾産、No.3はジャワ系を導入したものである。それぞれの種子島薬用植物栽培試験場における導入番号および検体に付した標本番号は、以下のとおりである。

No.1 導入番号0016-78-554, 標本番号/-16-2005-9,  
/-16-2006-2

No.2 0003-77-003, ね-3-2005-9, ね-3-2006-2

No.3 0007-71-003, ツ-7-2005-9, ツ-7-2006-2

(2)*Curcuma aromatica* Salisb.の根茎3種。No.4は沖縄県にて生産されていた品種を福岡県より導入、No.5は沖縄県、No.6は熊本県より導入したものである。導入番号および標本番号は以下のとおりである。

No.4 0012-98-777, J-12-2005-9, J-12-2006-2

No.5 0003-87-095, め-3-2005-9, め-3-2006-2

No.6 0021-96-095, H-21-2005-9, H-21-2006-2

### 2) 市販ウコン製品

予め葉緑体*trnK*遺伝子の塩基配列を調べ、種を同定<sup>7)</sup>してある市販の健康食品6検体(Nos.7~12)および市販の粉末生薬1検体(No.13)の計7検体を使用した。製品名と同定結果は以下の通りである。

(1)*C. longa*と同定された製品は、沖縄産秋ウコン粉(黄色粉末)No.7, 沖縄産純正ウコン粉末(黄褐色粉末)No.8, うっちん粒(黄色錠剤)No.9, うっちんスライス(黄色飲片)No.10の4種である。

(2)*C. aromatica*と同定された製品は奄美うこん粉末(灰黄色粉末)No.11。

(3)*C. longa*, *C. aromatica*以外の植物を基原とする製品とされたのは春ウコン粉末(灰緑黄色粉末)No.12。

(4)生薬ウコン末は松浦漢方(黄褐色粉末)No.13を用いた。葉緑体*trnK*遺伝子の塩基配列は未同定である。

## 2. 使用機器と試薬

### 1) 機器

外部形態の観察にはルーペおよびキーエンスデジタルマ

イクロスコブズームレンズ(VH-Z25)を用い、10~175倍(=15インチモニター上での倍率)にて観察、内部形態および粉末の観察には、オリンパス光学顕微鏡BH-2を用い、常光および偏光下で観察した。切片の作成には凍結マイクローム(ヤマト工機)を使用した。キーエンスデジタルマイクロスコブ(KEYENCE VH-8000C)を用い、測定および写真の撮影を行なった。

## 2) 試薬

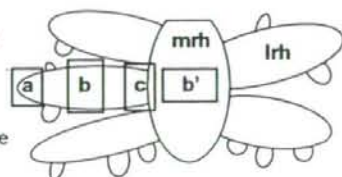
封入剤としてグリセリン水(グリセリンと精製水を1:1で混合したもの)または精製水を使用した。

## 3. 方法

### 1) 材料の調製

栽培品は、根茎より細根を取り除き、そのまま又は湯通しし、切片および粉末(細末~微末)を作成した。切片の作成には、主として数ヶ所から切り取った側根茎の中央部(b)を用い、参考として先端部(a)、基部(c)、主根茎の中央部(b')を用いた。各使用部位の根茎上の位置をFig.1に模式的に示す。

Fig.1 Schematic location of the utilized parts (a, b, c, b') in *Curcuma* rhizome



次に a~c, b' の各部位を、肉眼により組織ごとに可能な限り細かく分けて粉末を作成、組織片の出現状態および由来する部位の確認に用いた。さらに各部位の全ての組織が含まれる粉末を作成し、組織片の出現頻度の確認に用いた。湯通しには径約 2cm、長さ約 5cm の側根茎を用い、1分、5分、10分間、沸騰した湯にて加熱した。常温に冷ましたのち、中央部の切片を作成、一部の側根茎は風乾後、粉末の作成に用いた。市販のウコン製品のうち、錠剤と飲片は、粉末としたのち、プレパラートを作成し、栽培品の形状と比較した。

### 2) プレパラートの作成および鏡検

(1) 切片:マイクローム又は徒手により作成した切片をスライドガラス上にとり、封入剤としてグリセリン水又は精製水を1~2滴下した後、気泡が封入されないようカバーガラスで覆い、40倍、100倍、400倍で鏡検し、それぞれの特徴となる要素を把握した。観察に用いた切片の厚さは20~40 $\mu$ m。

(2) 粉末:時計皿に精製水を数滴滴下し、ここに少量の試料

をとりガラス棒でかき混ぜた後、2~3分以上放置して気泡を除いた。粉末を鏡検する際、気泡を除くためにはグリセリン水で潤すのが一般的であるが、*C. long* および *C. aromatica* では、グリセリン水を滴下し放置している間に、原植物を判定する際有力な手がかりとなる、有色の分泌物が溶出する。これを防ぐため、グリセリン水は使用せず、精製水で潤して気泡を取り除いた。この少量をガラス棒の先でスライドガラスにとり、封入剤としてグリセリン水または精製水を1滴加えた後、組織片が重ならずほぼ均等に広がるようカバーガラスで覆い、100倍および400倍で鏡検し、それぞれの特徴となる要素を把握した。

なお、切片、粉末とも分泌物の分布を確認する際には、封入剤として精製水を用い、速やかに観察を行った。

(3) 顕微鏡写真の撮影:特徴的な要素について顕微鏡写真を撮影し、組織の比較を行なった。切片の写真は主として側根茎の中央部(Fig.1 b)のものを掲げた。栽培品を粉末としたものは、主として側根茎中央部の粉末より出現した組織片の写真を掲げ、これに側根茎先端部、基部、主根茎中央部(Fig.1 a, c, b')より出現した、特徴的な要素を加え、鑑別のための基準写真とした。

## 結果および考察

### 1. *Curcuma* 属の組織の概要

製品の原材料に *C. longa* あるいは *C. aromatica* の根茎が用いられていることを確認するための指標として、両者に見られた組織を pl.2 に示した。側根茎中央部横断面の最外層はコルク層(kl)で、これに続き皮層(cx)の柔組織を認める。中心柱(ste)は不整中心柱(atactostele)。閉鎖性の並立維管束(vb)が散在し、その外側を内皮(en)が取り囲む。皮層部にも小さな維管束(vbcx)が点在する(pl.2-1-1)。皮層部にも維管束が散在する不整中心柱は、単子葉植物根茎の特徴である。単子葉植物根茎に見られる不整中心柱の模式図を Fig.2 に示す。

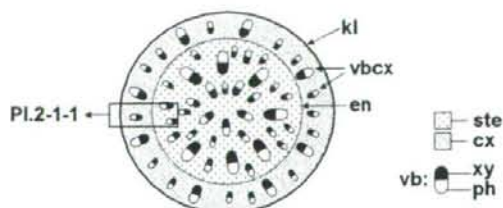


Fig.2 Diagram of the atactostele

各組織を詳細に観察するとコルク層 (kl) は褐色を帯び、コルク細胞が規則正しく配列。ときに表皮細胞 (ep) が残存し、毛を認めるものがあった。道管 (v) の横断面は多角形～円形 (pl.2-1-2)。柔組織 (p) にはでんぷん粒 (sta) が充満するほか、シュウ酸カルシウムの微細な結晶 (ca) を含んでいた。所々に黄色または赤褐色の分泌物 (sec) が認められた。分泌物は主として単独の分泌物貯蔵細胞中にたくわえられて存在していた。 (pl.2-1-3)。

側根茎を粉末として観察すると、毛 (h) は全形または破片として出現し、表皮細胞およびコルク層を伴うものがあった。毛の出現頻度は少ないが、大型、線形の破片として出現するため、認めやすい要素であった (pl.2-2-1)。コルク層の破片 (k) は主として表面視で認められた。道管は主として階紋道管、側面視での出現が多く、単独または他の道管や組織片を伴い出現。肥厚部分の間隔が広いもの (vc1) と狭いもの (vc2) のが主で、前者は、多角形の道管に由来し、*C. longa* および *C. aromatica* の特徴となる要素である。階紋穿孔 (pfc) を認めた。螺旋紋道管 (vs) は単独の破片または数本の束で出現。環紋道管 (vg) は出現頻度が低く、鑑別のための指標とはならない。各種道管はときに多角形～円形の横断面の破片として認められた。でんぷん粒は単独又は柔細胞を伴って出現、粉末中最も多量に出現する要素であった。単独で出現するでんぷん粒は主として単粒、長三角形 (sta1)、長楕円形～卵形～広卵形 (sta2)、三角状卵形 (sta3) などで、一端がややとがり、突出するものがあった。小型のでんぷん粒の中にはあたかも複粒が分裂したような形状をなすものが認められた。へそは偏在し点状、層紋が明瞭に認められるものが多かった。分泌物貯蔵細胞の出現はごくまれで、分泌物は、組織片に伴い出現した。

主根茎の粉末では出現する要素の特徴は、側根茎のものと顕著な差はなかったが、木部柔細胞 (wp) や木部繊維など厚膜した組織が認められた (pl.2-2-2)。

## 2. *C. longa* と *C. aromatica* の組織の差異

*C. longa* および *C. aromatica* に認められる組織の種類は、少ない。このようなものでは、組織の把握は容易であるが、近縁の植物との鑑別は困難なことが多い。今回、でんぷん粒の形状および含有物の色に差異を認め、種を鑑別するための有効な指標とすることが可能であった。でんぷん粒の形状および加熱による糊化でんぷんの出現状態を pl.3 に、有色の分泌物の出現状態を pl.4 に示す。

### 1) でんぷん粒の形状

採取時期の異なる側根茎を用い、でんぷん粒の形状を比

較したところ、いずれも、生育期 (9月) に採取した根茎では形状が不均一であったが (pl.3-A-1-1, B-1-1)、収穫適期 (2月) に採取したものは、形状が均一化していた。収穫適期における *C. longa* のでんぷん粒は、一端のとがった長楕円形～長三角形 (sta1) で、長径 14～47 $\mu$ m、短径は 10～19 $\mu$ m。*C. aromatica* のでんぷん粒は一端のとがった卵形～広卵形を呈 (sta2) し、長径 18～46 $\mu$ m、短径は 15～32 $\mu$ m であった。 (pl.3-A-1-2, B-1-2)。でんぷん粒の短径に対する長径の比の値にも明らかな差が認められ、*C. longa* では平均が 1.9、2.0 以上のものが 30% 以上を占め、1.3 以下のものは認められなかった。一方 *C. aromatica* では平均が 1.4 で、1.7 以上のものは 3% に満たなかった。両者の径の比の値の分布を Fig.3 に示す。

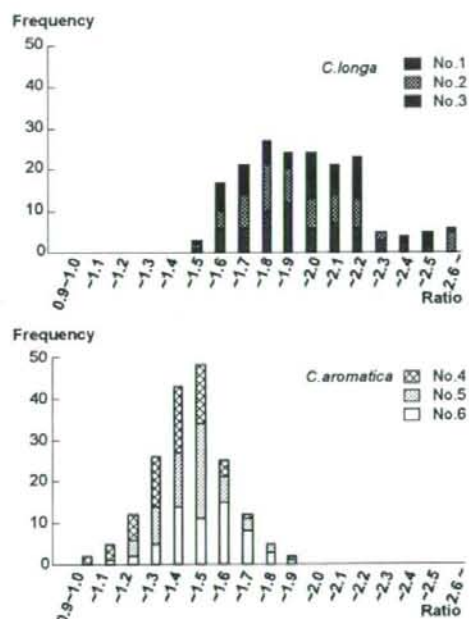


Fig. 3 Histogram of the value of ratios of diameter of starch grains

All samples were collected in February. The ratio divided major diameter by minor one.

次に *C. longa* と *C. aromatica* の粉末について、ほぼ 1:1 で混合し、両者の鑑別性について検討した。その結果、両者のでんぷん粒の形状的な差は、両者が混合されている場合であっても、顕微鏡下で十分鑑別が可能なのであることが明らかとなった。

### 2) 修治によるでんぷん粒の糊化

*C. longa* および *C. aromatica* は、製品に調製される際、加

熱による修治がなされることがある。熱が加えられると、柔細胞(p)中のでんぷん粒は糊化し、その形状をとどめなくなる(糊化でんぷん(gst))。湯通しの状態により、糊化でんぷんの出現量は異なり、1分間湯通しした側根茎の中央部を切片として観察すると、コルク層の周辺で部分的に糊化(pl.3-A-2-2, B-2-2)、5分間の湯通しでは広い範囲で部分的に糊化、10分間の湯通しでは、ほぼ完全に糊化していた(pl.3-A-2-3, B-2-3)。糊化でんぷんは根茎に含まれる有色の分泌物により、黄～黄赤褐色に着色することがある。

十分に湯通しした検体を粉末とし鏡検した場合にも、わずかではあるが、でんぷん粒が単独で出現した。でんぷん粒の径およびそのばらつきは、Table1, Fig.4に示す通りである。でんぷん粒は層紋、へそが不明瞭となり、径がやや大きくなる傾向にあるが、形および径の比の値は修治前のでんぷん粒とほぼ等しく、それぞれの種の特徴をよく表していた(pl.3-A-2-4, B-2-4)。この結果、修治がなされている検体においても、でんぷん粒の形状は、基原植物を推定するため

の指標として用いることが可能であると考えられた。また糊化でんぷんの出現状況により、湯通しの程度の推定も可能と考えられる。なお、Fig.4中の直線は、y切片を0とした、線形近似による近似曲線で、直線の傾きがでんぷん粒の径の比の値の平均値に相当する。

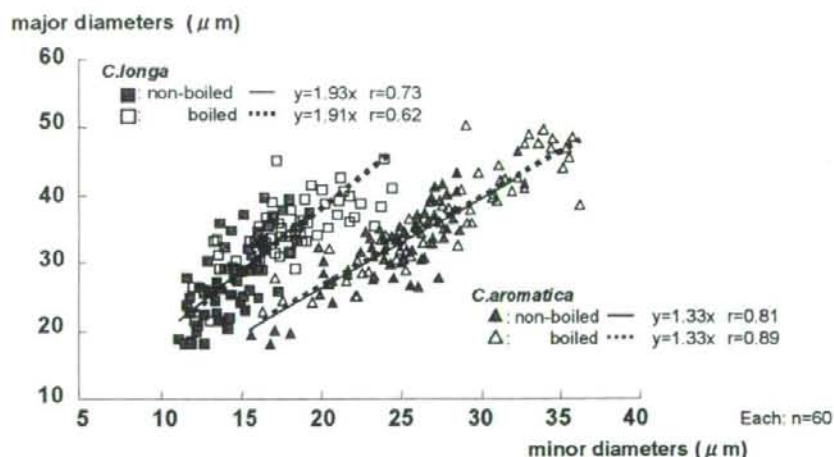
**Table 1** Comparison of the diameters of the starch grains in non-boiled and boiled rhizomes of *Curcuma* species

Species	Diameters ( $\mu\text{m}$ )*3		Ratio *3	
	major	minor		
<i>C. longa</i> *1	non-boiled	18-(28)-40	11-(15)-21	1.4-(1.9)-2.6
	boiled	21-(35)-45	12-(18)-25	1.5-(1.9)-2.6
<i>C. aromatica</i> *2	non-boiled	18-(32)-46	16-(24)-32	1.0-(1.3)-1.6
	boiled	22-(37)-50	16-(28)-36	1.1-(1.3)-1.7

Each : n=60

\*1 No.1 sample was used. \*2 No.4 sample was used.

\*3 Each set of values represents the minimum-(average)-maximum.



**Fig.4** Scatter diagram of the diameters of the starch grains in non-boiled and boiled rhizomes of *C. longa* and *C. aromatica*

Solid line (—) and dotted line (\*\*\*\*) were indicated the results on straight-line approximation of the relationship between major and minor diameters of non-boiled and boiled rhizomes, respectively, by least-square method.

### 3) 分泌物の色

各試料をグリセリン水で封入すると、有色の分泌物の溶解により、組織片が瞬時に着色し、鏡検が困難であった。このようなものは一般に、透明化処理を施し観察するが、今回封入剤として精製水を用いたことにより、分泌物をほぼそのままの状態を観察することが可能となり、*C. longa*および

*C. aromatica*の分泌物の状態に明らかな差を認めた。

側根茎中央部の内皮付近を観察すると、*C. longa*の組織中には赤褐色分泌物を含む分泌物貯蔵細胞が多量に認められた(pl.4-A-1)が、*C. aromatica*の分泌物は、ほぼ無色～主として黄色で、赤褐色を呈するものは極めてわずかであった(pl.4-B-1)。



試料が粉末の場合、分泌物は単独油状または組織片に付着した状態で認められる。C. longaでは、ほぼ全ての組織片が赤褐色分泌物を伴い、プレパラート全体が赤褐色を帯びていた(pl.4-A-2)が、C. aromaticaでは、淡黄色の分泌物を伴う組織片がわずかに出現するのみであった(pl.4-B-2)。

### 3. 市場品への応用

#### 1) 市場品の形状と原材料の推定

市場品Nos.7~13の7種すべてにおいて、でんぷん粒の確認が可能であった。No.11を除く6種の製品には、C. longa型のでんぷん粒を、No.11にはC. aromatica型のでんぷん粒を認めた。各粉末中の組織の出現状態をTable3ならびにpl.5~pl.7に示す。なお、No.9およびNo.12には原材料以外の要素を認めたため、詳細は別途記載した。これらの組織の出現状態は、pl.8に示した。

No.7は主として無色のでんぷん粒よりなるが、糊化でんぷんがわずかに出現したことにより、軽く加熱(湯通し)されたものと推定した。でんぷん粒は、長三角形~一端のとがった長楕円形(sta1)、径の比の値は平均1.8。栽培品のC. longa

(Nos.1~3)に比べ、長径の短いものが多く見られたが、形状はC. longaのでんぷん粒の特徴をよくあらわしていた。道管が黄色を帯び出現するほか、組織片は赤褐色の分泌物を伴っていた。コルク層の破片の出現により、コルク層を取り除くことなく調製された製品であることがわかる。また木部繊維など厚膜化した要素が認められ、主根茎も使用されていることが推定できる。でんぷん粒の形状、および分泌物の色より、C. longaを原料とした製品であると判定(pl.5)。この結果は、予め葉緑体遺伝子trnK遺伝子の塩基配列により明らかにされている種と一致した<sup>7)</sup>。

No.8は主として黄色~黄褐色を帯びた糊化でんぷんよりなり、充分加熱されているものと推定した。でんぷん粒は、長三角形~一端のとがった長楕円形、径の比の値は2.0。多くの組織片が黄~赤褐色の分泌物を伴っていたため、C. longaを原料とした製品であると判定(pl.6-1)。No.10を粉末としたものは、主として黄褐色を帯びた糊化でんぷんよりなり、充分加熱処理されているものと推定した。でんぷん粒は長三角形~一端のとがった長楕円形、へそ、層紋ともに明瞭、径の比の値は1.8。組織片は全体的に黄色~赤褐色を帯び、

Table 2 The morphological characters of starch grains and other tissues of commercial turmeric

Starch type*1	Samples Nos.	Starch grains	Diameters of starch grains (μm)*3		Ratio*3 major/minor	Gelatinized starch	Other characteristic tissues and colors	
			major	minor				
A	7	+++ colorless	17-(25)-36	10-(15)-20	1.2-(1.8)-2.4	+	vc1,vc,vs	pale yellow
						pale yellow	sec	reddish-brown
	8	(+)*2 colorless	20-(28)-38	11-(14)-17	1.4-(2.0)-2.4	++++	vc1,vc2,vs	pale yellow, yellow
						yellowish-brown	sec	reddish-brown
	9	(+) colorless	20-(31)-46	12-(17)-24	1.5-(1.8)-2.4	++++	vc1,vc,vs	yellow
						yellowish-brown	sec	reddish-brown
	10	(+) colorless	19-(29)-47	11-(16)-27	1.3-(1.8)-2.4	++++	vc1,vc,vs	pale yellow, yellow
reddish-brown						sec	reddish-brown	
12	++ colorless	21-(35)-52	10-(20)-32	1.5-(1.8)-2.2	++	vc1,vc3	pale yellow, yellow	
					colorless	ca,st	pale yellow	
13	(+) colorless	24-(38)-56	14-(19)-26	1.5-(1.9)-2.5	++++	vc1,vc2	pale yellow, yellow	
					yellowish-brown	sec	reddish-brown	
B	+++ colorless	15-(30)-49	12-(19)-27	1.2-(1.5)-2.0	+	vc1,vc2,vr	colorless	
					colorless	sec	pale yellow	
						k,wf	colorless, pale yellow	

\*1 A: The morphology of starch grains resembled starch grains of C. longa. B: The morphology of starch grains resembled starch grains of C. aromatica.

\*2 Slightly recognized. \*3 Each set of values represents the minimum-(average)-maximum.

多くの組織片が赤褐色分泌物を伴っていたため、*C. longa*を原料とした製品であると判定(pl.6-2)。これらの結果も、予め明らかにされている種と一致した。

No.13は主として黄色～黄褐色を帯びた糊化でんぷんよりなり、充分加熱されたものと推定した。でんぷん粒は、一端のとがった長三角形～長楕円形、径の比の値は1.9。形状は加熱処理後の*C. longa*のでんぷん粒とよく一致していた。組織片は全体的に赤褐色を帯び、分泌物を伴っていた。肥厚部分の間隔が広い階紋道管や、毛が認められた(pl.6-3)。

No.11は、主として無色のでんぷん粒よりなり、軽く加熱されたものと推定した。でんぷん粒は、主として一端のとがった楕円形～広卵形の単粒(sta2)、小型のものの中には、三角状卵形のもの(sat3)が認められた。径の比の値は1.5。有色の分泌物はほとんど認められず、組織片に着色が少ないことから、“奄美うこん粉末”という商品名であったが、*C. aromatica*を材料とした製品であると判定した。この結果も予め明らかにされている種と一致するものであった。粉末中に認められた三角状卵形のでんぷん粒は、生育期の根茎に多く見られた形状(pl.3-A-1-1, B-1-1)で、根茎の採集が収穫適期より以前であった可能性を示唆するものである(pl.7)。

## 2) 原材料以外の要素を含む製品

No.9の粉末は、主として黄色～赤褐色を帯びた糊化でんぷんよりなり、充分加熱されているものと推定した。でんぷん粒は一端のとがった長楕円形、径の比の値は1.8。でんぷん粒以外の組織の出現が少ない粉末であった。コルク層の組織片の確認はできなかったが、表皮に由来する毛の存在を認めたことにより、コルク層を除かず調整されたものであると推定した。組織片に伴う赤褐色の分泌物が多量に認められた。でんぷん粒の形状、および分泌物の色より、*C. longa*を原料とした製品であると判定した。この結果も予め明らかにされている種と一致した。粉末中には錠剤を成形する際に使用されたと考えられる、添加物(add)を認めたが、鏡検の際、支障となることはなかった(pl.8-1)。

No.12は主として無色のでんぷん粒および糊化でんぷんからなり、加熱したものと推定した。また、それぞれの要素には本報の*Curcuma*属の組織の概要の項で示した、*Curcuma*属の組織の特徴が認められた。しかし、でんぷん粒の形状が*C. longa*のものに類似しているにもかかわらず、*C. longa*の特徴として挙げられる赤褐色分泌物の出現、および組織片への付着はほとんど認められなかった。糊化でんぷんは、多角形の破片として出現するものが多く見られた。糊化でんぷん中に認められるシュウ酸カルシウムの結晶は、楕円形または方形の単晶で、数個が集まっているものが多く、偏光下での

観察が容易であった。結晶は、栽培品の*C. longa*、*C. aromatica*(Nos.1-6)に見られたものに比べ大型であった。階紋道管は肥厚部分の間隔の広いもの(vc1)のほか、肥厚部分の間隔が非常に狭く、かつ径の大きい破片が認められた(vc3)。これは、かなり大型の道管に由来するものと思われる。さらに栽培品の*C. longa*および*C. aromatica*に認められなかった石細胞(st)を認めた。石細胞は単独又は数個が連なって出現。ほぼ無色～わずかに黄色を帯び、内腔の広い方形～長方形、大型の組織片として出現するため、目立つ要素であった(pl.8-2)。以上のことから、本品は“春ウコン粉末”という商品名であったが、*C. longa*および*C. aromatica*以外の*Curcuma*属植物を材料に用いていると判定した。なお、予め明らかにされている葉緑体遺伝子遺伝子の塩基配列も*C. longa*および*C. aromatica*のものとは異なるものであった。他の*Curcuma*属植物についての、形態学的な詳細な検討は今後の課題である。

本論文で明らかにした*C. longa* および*C. aromatica*のでんぷん粒の形状は、他属の植物に比べ非常に特徴的である。さらに分泌物の色や道管などの組織片の特徴を考慮することで、製品中に他の生薬が配合されると考えられる場合においても、その中からこれらを鑑別できる可能性が高いものと考えられる。

## 結論

*C. longa*と*C. aromatica*の根茎において、修治や添加物の有無にかかわらず、でんぷん粒の形状、特に径の比の値に明らかな差が認められたこと、封入剤として精製水を用いたプレバートにおいて、分泌物の色や組織片の着色に明らかな差が認められたことは、両者を鑑別するうえで、重要な指標となるものである。

さらに鏡検により組織の詳細な観察を行なった結果、基原植物の判定のみでなく、糊化でんぷんの出現割合から修治の程度を、出現する組織片の種類から使用部位や夾雑物の有無を把握することが可能であった。また、採集時期の異なる栽培品において、でんぷん粒の形状が異なっていたことにより、収穫時期の推定が可能であることが示された。

以上、鏡検による組織形態学的な研究は、少量の試料から短時間で多くの情報が得られる点で、簡便かつ有用な方法である。従って、健康食品の基原の鑑別においても、有効に活用されるべき方法であると考えられる。

## 謝辞

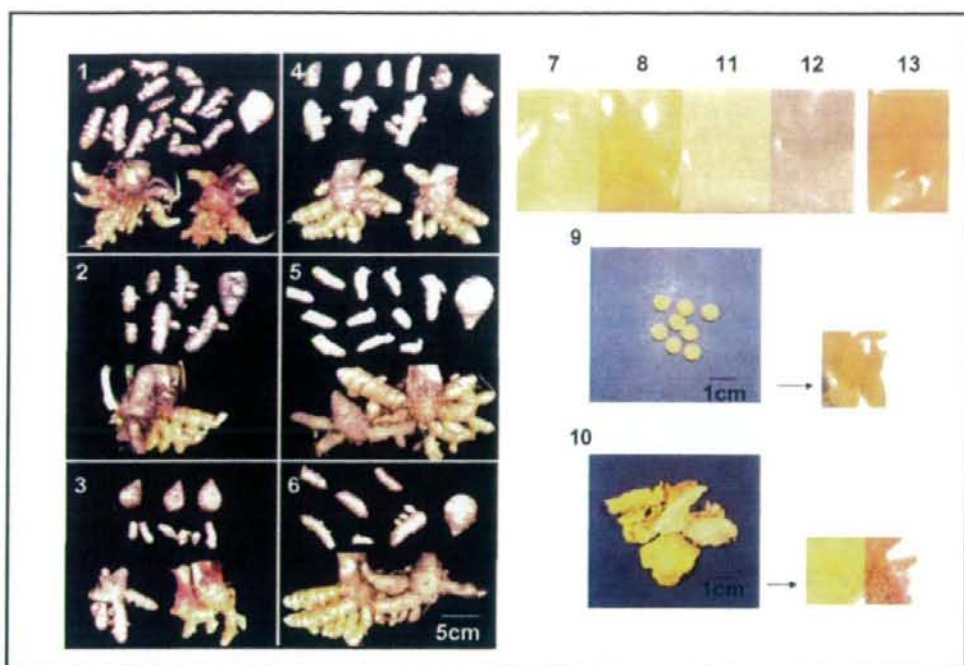
本研究は、厚生労働省食品等検査費、健康安全確保研究費および、厚生労働科学研究費により行われたものであり、ここに深謝いたします。

## List of Abbreviations

add: additive, cx: cortex, en: endodermis, ep: epidermis, gst: gelatinized starch, h: hair k: cork cell, kl: cork layer, lrh: lateral rhizome, mrh: main rhizome, p: parenchymatous cell, pfc: scalariform perforation, ph: phloem, sec: secretion, st: stone cell, sta(sta1,sta2,sta3): starch grain, ste: stele, v: vessel, vb: vascular bundle, vbcx: cortical bundle, vc(vc1,vc2,vc3): scalariform vessel, vs: spiral vessel, vg: ring vessel, wf: wood fiber, wp: wood parenchyma, x: xylem

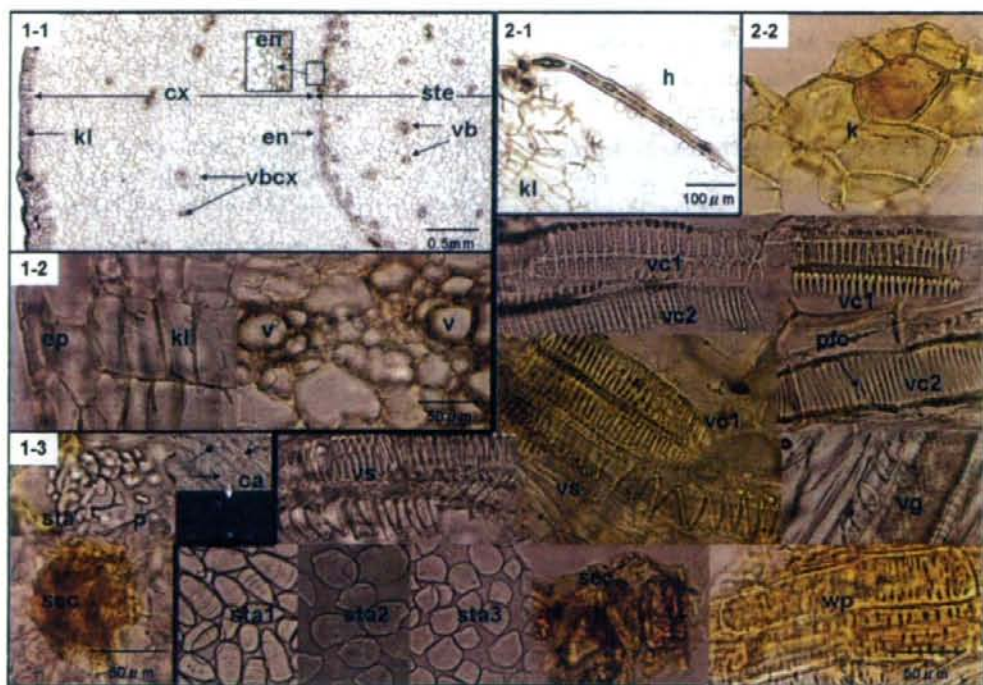
## References

- 1) Goda Y., *Farumashia*, **42**, 905-907 (2006).
- 2) Sakai S., Otake R., Toida T. and Goda Y., *Chem. Pharm Bull.*, **55**, 299-303 (2007).
- 3) Maruyama T., Miyai M., Kamakura H., Komatsu K., Kawasaki T., Fujita M., Shimada H., Yamamoto Y. and Goda Y. *Planta Medica*, accepted (2007).
- 4) Maruyama T. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **212** (5), 374-379 (2007).
- 5) Maruyama T., Sugimoto N., Kuroyanagi M., Kim L-H., Kamakura H., Kawasaki T., Fujita M., Shimada H., Yamamoto Y., Tada A., Yamazaki T. and Goda Y. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1626-1630 (2007).
- 6) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition (Ministry Notification No.285), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, (Mar. 31, 2006).
- 7) Komatsu K., Sasaki Y., Tohda C. and Tanaka K., *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **212** (5), 345-356 (2007).
- 8) Komatsu K., Sasaki Y., Sasaki S., Hushimi H. and Nagumo S. *Iyakuhiin Kenkyu*, **35**, 416-424 (2004).
- 9) Katsuki S., Abstracts of papers, 6th "Kaga-Noto no Yakuso" symposium, Kaga, Ishikawa, Oct. 2005, pp. 6-13.



PI.1 Macroscopic characteristics of used samples

Nos.1-3: rhizomes of *C. longa*, Nos.4-6: rhizomes of *C. aromatica*, Nos.7-12: commercial turmeric as health foods, No.13: commercial turmeric as a crude drug.



PI.2 Characteristic tissues of rhizomes of *C. longa* and *C. aromatica*

1: cross sections of lateral rhizome, 2: elements of powdered lateral rhizome of *C. longa* and *C. aromatica*.