

ドールアルカロイド [*N*-methyltryptophan methyl ester, 2-(1'-aminobutyl)indol-3-one], キナゾリンアルカロイド (vasicine, vasicinone, vasicinol) などが確認されている<sup>1) - 3)</sup>.

従って, *Sida* 属植物の規制の範囲は不十分である可能性が示唆された. そこで本研究では食薬区分上の指定の範囲の再検討を行う目的で, 海外市場より *Sida* 属植物製品を収集するとともに, その成分探索を行った.

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

今回大量に入手できた海外市場品4種 (以下 SCA, SCR, ISC-3, BSS-2 とそれぞれ呼称する) について含有成分の検討を行った.

SCA は Bouncing Bear Botanicals 社から, SCR は新和物産 (株) から購入した. ISC-3 および BSS-2 は三栄源エフ・エフ・アイ (株) を通じそれぞれインド, および, ブラジルの現地メーカーから入手した (Table 1). オープンカラムの担体は, Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア バイオサイエンス社製) を用いた. NMR 溶媒は Methanol-*d*<sub>4</sub> 99.96 % (ISOTEC 製) を用いた. HPLC には HPLC 用溶媒を, その他の試薬は, 全て試薬一級品を用いた.

### 装置及び測定条件

分取 HPLC は島津製作所製ポンプ: LC-8A もしくは LC-9A, 紫外可視検出器: SPD-6AV にインテグレーターとして Shimadzu CR-7A plus を接続したものを用いた.

NMR スペクトルは JEOL ECA-500 もしくは

JEOL ECA-800 を用いた. <sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>C-NMR の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値 (ppm) で示した. Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 及び Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) スペクトルの測定には磁場勾配システムを用いた.

### 化合物の分画

SCA, ISC-3 はそれぞれ 300 g, 500 g をメタノールで冷浸した後, 溶媒を留去し, メタノール抽出物を得た. このエキスに水を加え, 4 M 塩酸を用い pH 2 に調整した後酢酸エチルを加え分配を行い, 酸性分画を得た. さらにアンモニア水で pH 11 に調整し酢酸エチルで分配し塩基性分画を得た. 塩基性分画を各種クロマトグラフィーで分離・精製し, SCA, ISC-3 の両者より 20-hydroxyecdysone (1) およびキナゾリンアルカロイド cryptolepine (2) を得た (Chart 1, 2, Fig. 1). SCR においても同様に酸性および塩基性条件下でそれぞれ酢酸エチルと水で分配し, 酸性分画からは *p*-hydroxyphenethyl *trans-p*-coumarate (3) および *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate (4) を得た (Chart 3, Fig. 1).

BSS-2 は 200 g をメタノールで冷浸した後, 溶媒を留去し, メタノール抽出物を得た. このエキスに水を加え, 4 M 塩酸を用い pH 2 に調整した後酢酸エチルを加え分配を行い, 酸性分画を得た. 次いでアンモニア水を用い pH 11 に調整しクロロホルム, 酢酸エチル, 1-ブタノー

ルを用い、順次分配を行った。塩基性クロロホルム層を、LH-20 を担体としたオープンカラムに負荷し分画した。次いで、ODS カラムを用いた LPLC にて分画した。ここで得られた分画 3 は vasicine (5: 22 mg) と決定した。分画 5 をさらに ODS カラムを用いた HPLC で精製し vasicinone (6: 9 mg) を得た。塩基性酢酸エチル層は LH-20 を担体としたオープンカラムで分画後、ODS を用いた HPLC で精製し天然物として新規キナゾリンアルカロイドである 3-hydroxypegamine (7: 2 mg) を単離した。酸性酢酸エチル層はオープンカラムで分画後、得られた分画 7 について ODS カラムを用いた HPLC でさらに分画を行った。得られた分画 2 は rutin (8: 16 mg) だった。分画 3, 4, 5 を、それぞれ ODS カラムを用いた HPLC で分画し、分画 3 からは caffedymine (9: 3 mg) および isoquercitrin (10: 4 mg) を単離し、分画 4 からは astragalin (11: 4 mg) を単離し、分画 5 からは *trans*-tiliroside (12: 30 mg) および *cis*-tiliroside (13: 3 mg) が得られた (Chart 4, Fig. 2).

#### <倫理面への配慮>

本研究において、ヒト、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

#### C. 研究結果

化合物 1 は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{27}H_{44}O_7$  と決定した。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 5 つのメチル基、3 つの酸素原子に隣接したものを含む 6 つのメチン基、7 つのメチレン基、1 組の二重結合、

および、カルボニル基 1 つを含む 7 つの 4 級炭素が観測された (Table 2)。以上からステロイド骨格を持ち *S. spinosa* から単離例のある 20-hydroxyecdysone<sup>4)</sup> ではないかと考え、各種機器データを文献値と比較し、構造を決定した。

化合物 2 は黄色非晶系物質として得られ、分子式は DART-TOF-MS から  $C_{16}H_{22}N_2$  と決定した。 $^1H$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 2 つ、低磁場シフトした二重結合上プロトンが 1 つ (89.09s)、同じく低磁場シフトしたメチル基が 1 つ (85.07s) が観測された。 $^{13}C$ -NMR スペクトルからはオレフィン炭素が 15 個、メチル炭素が 1 つ確認された (Table 3)。以上から本化合物は *S. cordifolia* からの単離が報告されている cryptolepine<sup>5)</sup> と推定し、各種機器データから構造を決定した。

化合物 3 は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{17}H_{16}O_4$  と決定した。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 2 つ、*E* 配置の二重結合が 1 つ、隣り合ったメチレン基が 2 つ観測された。以上から 3 は *p*-hydroxyphenethyl *trans*-*p*-coumarate<sup>6)</sup> と推定し、各種二次元 NMR スペクトルから構造を決定した (Fig. 3)。

化合物 4 は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{18}H_{18}O_5$  と決定した。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 1 つ、1,2,4-置換ベンゼンが 1 つ、*E* 配置の二重結合が 1 つ、隣り合ったメチレン基が 2 つ、およびメトキシ基が観測された。以上から本化合物は *S. spinosa* からの単離が報告されている *p*-hydroxyphenethyl *trans*-ferulate<sup>4)</sup> と推定し、各種機器データを文献値と比較し構

造を決定した。

化合物 **5** は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{11}H_{12}N_2O$  と決定した。 $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 1 つ、酸素原子に隣接したメチン基が 1 つ、低磁場シフトしたメチレン基 1 つ、およびメチレン基が 2 つ観測された (Table 4)。以上から本化合物を *S. cordifolia*, *S. rhombifolia*, *S. acuta*, *S. humilis*, *S. spinosa* など *Sida* 属に広く分布している vasicine<sup>2),7)</sup> と推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析および機器データの文献値との比較から構造を決定した (Fig. 4)。

化合物 **6** は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{11}H_{10}N_2O_2$  と決定した。 $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 1 つ、酸素原子に隣接したメチン基が 1 つ、メチレン基が 2 つ観測されたが、**5** に特徴的だったジェミナルカップリングを示すメチレン基が観測できずアミド基 ( $\delta$ 161.8) が確認された (Table 4)。以上から本化合物は **5** の 10 位のメチレン基がカルボニル基へと酸化された構造を持つ vasicinone<sup>8)</sup> と推定し、各種機器データの比較から構造を決定した。

化合物 **7** は無色非晶系物質として得られ、**6** と同じく  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,4-置換ベンゼンが 1 つ、酸素原子に隣接したメチン基が 1 つ、カルボニル基が 1 つ、および、メチレン基が 2 つ観測された。分子式  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  と水素原子が **6** より 2 個多く、かつ  $sp^2$  炭素数は同じだったことから、**6** が開環した構造を持つと推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。 $^1H$ - $^1H$  COSY スペクトルから 5 位

( $\delta$ 7.68) と 6 位 ( $\delta$ 7.81), 6 位と 7 位 ( $\delta$ 7.51), 7 位と 8 位の水素 ( $\delta$ 8.19) 間に相関が観測され、HMBC スペクトルからは、5 位の水素から 9 位の炭素 ( $\delta$ 122.2) へ、6 位の水素から 10 位の炭素 ( $\delta$ 149.9) へ、7 位の水素から 9 位の炭素へ、8 位の水素から 10 位の炭素へそれぞれ相関が見られたことから、1,4-置換ベンゼンの存在が確認された。さらに、8 位の水素からは 11 位のアミド炭素 ( $\delta$ 164.1) へも相関が観測されたことから、ベンゼン環に隣接してアミド結合のカルボニル基が存在すると決定した。次いで、 $^1H$ - $^1H$  COSY スペクトルから 1 位のメチレン水素 ( $\delta$ 3.78) と 2 位のメチレン水素 ( $\delta$ 2.00,  $\delta$ 2.12), 2 位のメチレン水素と 3 位のメチン水素 ( $\delta$ 4.75) 間に相関が観測され、HMBC スペクトルから 2 位および 3 位の水素から 4 位の炭素 ( $\delta$ 161.1) へ相関が見られたことから 1-プロパノール基の 3 位にオレフィン炭素が結合している構造と決定した。

以上から、本化合物は *Peganum harmala* などから単離報告がなされている pegamine の 3 位が水酸化された構造<sup>8)</sup> と決定した (Fig. 4)。

化合物 **9** は分子式  $C_{17}H_{17}NO_5$  を示した。 $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 1,2,4-置換ベンゼンが 2 つ、*E* 配置を示す二重結合が 1 つ、および互いに隣り合ったメチレン基が 2 つ確認された (Table 5)。以上から、本化合物は化合物 **3**, **4** と同じく *p*-ヒドロキシフェネチル誘導体であり、また、分子式からエステル結合ではなくアミド結合を持つ化合物と推定し、各種二次元 NMR スペクトルから構造を決定した (Fig. 5)。

化合物 **8**, **10**-**13** は  $^1H$ - および  $^{13}C$ -NMR スペクトルから、フラボノール骨格に特有の  $\delta$ 6.1 -

δ6.2 と δ6.3 - δ6.4 の 2 つのピークが観測され、8 と 10 は 1,2,4-置換ベンゼンが、11-13 は 1,4-置換ベンゼンが観察されたことから、8 および 10 は quercetin 誘導体、11-13 は kaempferol 誘導体と推定した。また、これらの化合物はすべて配糖体であり、糖由来のアノマー水素が 8 は 2 個、10 および、11-13 は 1 個観測された。一方、12、および、13 はクマル酸由来と思われる 1,4-置換ベンゼン、二重結合、およびエステル炭素が確認された (Table 6)。以上を元に各種二次元 NMR スペクトルの解析、もしくは、<sup>1</sup>H-および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルの文献値<sup>9), 10)</sup>との比較から構造を決定した (Fig. 6)。

#### D. 考察

*Sida* 属植物製品 4 品目について成分探索を行った結果、含窒素化合物として 2, 5-7, 9 が、その他の化合物として、ステロイド化合物 1、桂皮酸誘導体 3 および 4、およびフラボン誘導体 8, 10-13 が単離、同定された。これらのうち、7 は天然物としては新規化合物であった。1 はゴシツに含まれる昆虫ホルモンの一種であり、抗不整脈作用や抗炎症作用が報告されている<sup>11)</sup>。2 は *Cryptolepis sanuinolenta* から単離されたアルカロイドであり、抗腫瘍活性<sup>12)</sup>や抗マラリア活性<sup>13)</sup>、抗ヘルペス活性<sup>14)</sup>等多彩な生物活性が報告されている。また、5 および 6 はそれぞれ、LD<sub>50</sub>:640 mg/kg (oral, rat)<sup>15)</sup>、LD<sub>50</sub>:1100 mg/kg (oral, mus)<sup>16)</sup>の細胞毒性が示されているほか、気管支拡張作用などが報告されている。

また、*S. cordifolia* 含有製品は主に痩身用

サプリメントとして販売されていたが、BSS-2 から脂肪燃焼作用が期待される ephedrine 以外に、耐糖能改善、内臓脂肪減少効果<sup>17)</sup>が報告されている 12 が単離されたことは興味深い。

今回、成分探索を行った 4 製品のうち、“専ら医薬品”である *S. cordifolia* と推定された BSS-2 を除く 3 製品からは化合物 1-4 が単離されたが、その含有量、および、生理活性の強度から考えて直ちに健康被害を危惧するものではないと考えられた。しかし、今回調査した 4 製品の TLC 分析では全ての製品において ephedrine と同一および近似の R<sub>f</sub> 値を持つスポットが確認されている (データ未掲載)。従って、次年度以降も継続して *Sida* 属植物製品の収集を行うと共に、ephedrine 類、及び、今回単離したアルカロイド類 (2, 5-7, 9) を標品として LC/MS 分析などを行う必要があると考えられる。

#### E. 結論

*Sida* 属植物含有製品 4 品目の成分探索を行い、アルカロイド成分 5 種を含む 12 成分を単離・同定した。また、全製品に ephedrine 類の含有を示唆する結果を得た。

今後、成分分析による調査の継続が必要と考えられる。

#### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

## 2. 学会発表

若菜 大悟<sup>1</sup>, 丸山 卓郎<sup>1</sup>, 鎌倉 浩之<sup>1</sup>,

杉村 康司<sup>2</sup>, 飯田 修<sup>2</sup>, 合田 幸広<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立衛研・生薬部, <sup>2</sup>医薬基盤研・薬植  
セ・種子島) : *Sida* 属植物の含有成分か  
ら見た安全性の評価に関する研究, 日本薬  
学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28-30 日,  
岡山)

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 参考文献

- 1) A. Prakash, R. K. Varma, S. Ghosal, *J. Med. Plant Res.*, **43**, 384-388 (1981)
- 2) S. Ghosal, R. B. P. S. Chauhan, R. Mehta, *Phytochem. Reports*, **14**, 830-832 (1975)
- 3) R. K. Sutradhar, A. K. M. Matior Rahman, M. U. Ahmad, K. Saha, *Ind. J. Chem.*, **46B**, 1896-1900 (2007)
- 4) F. M. M. Darwish, M. G. Reinecke, *Phytochemistry*, **62**, 1179-1184 (2003)
- 5) S. Y. Ablordeppey, C. D. Hufford, R. F. Borne, D. Dwuma-Badu, *Planta Med.*, **56**, 416-417 (1990)
- 6) R. Kaewamatawong, N. Ruangrunsi, K. Likhitwitayawuid, *J. Nat. Med.*, **61**, 349-350 (2007)
- 7) B. S. Joshi, M. G. Newton, D. W. Lee, A. D. Barber, S. W. Pelletier, *Tetrahedron: asymmetry*, **7**, 25-28 (1996)
- 8) S. B. Mhaske, N. P. Argade, *J. Org. Chem.*, **66**, 9038-9040 (2001)
- 9) K. Kazuma, N. Noda, M. Suzuki, *Phytochemistry*, **62**, 229-237 (2003)
- 10) S. Tsukamoto, K. Tomise, M. Aburatani, H. Onuki, H. Hirota, *J. Nat. Prod.*, **67**, 1839-1841 (2004)
- 11) K. Slama, R. Lafont, *Eur. J. Entomol.*, **92**, 355-377 (1995)
- 12) T. Matsui, Y. Sowa, H. Murata, K. Takagi, R. Nakanishi, S. Aoki, M. Yoshikawa, M. Kobayashi, T. Sakabe, T. Kubo, T. Sakai, *Int. J. Oncology*, **31**, 915-922 (2007)
- 13) K. Cimanga, T. D. Bruyne, L. Pieters, A. J. Vlietinck, *J. Nat. Prod.*, **60**, 688-691 (1997)
- 14) K. Cimanga, T. D. Bruyne, A. Lasure, B. V. Poel, L. Pieters, M. Claeys, D. V. Berghe, K. Kambu, L. Tona, A. J. Vlietinck, *Planta medica*, **62**, 22-27 (1996)
- 15) *Arzneimittel-Forschung Drug Research*, **13**, 474 (1963)
- 16) H. L. Bhalla, A. Y. Nimbkar, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **8**, 833-846 (1982),
- 17) K. Ninomiya, H. Matsuda, M. Kubo, T. Morikawa, N. Nishida, M. Yoshikawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3059-3064 (2007)

Table 1 Details of the samples collected as *Sida* spp.

Sample	Source	Habitat	Part	Putative species*
SCA	Bouncing Bear Botanicals	Unknown	Stem and leaf	mixture including <i>Desmodium</i> spp. and <i>Sida</i> spp.
SCR	Shinwa Bussan	Unknown	Root	<i>S. fallax</i>
ISC-3	San-ei gen F.F.I.	India	Root powder	<i>S. spinosa</i>
BSS-2	San-ei gen F.F.I.	Brazil	Cutting leaf	<i>S. cordifolia</i>

\*: speculated from their ITS sequences of rDNA

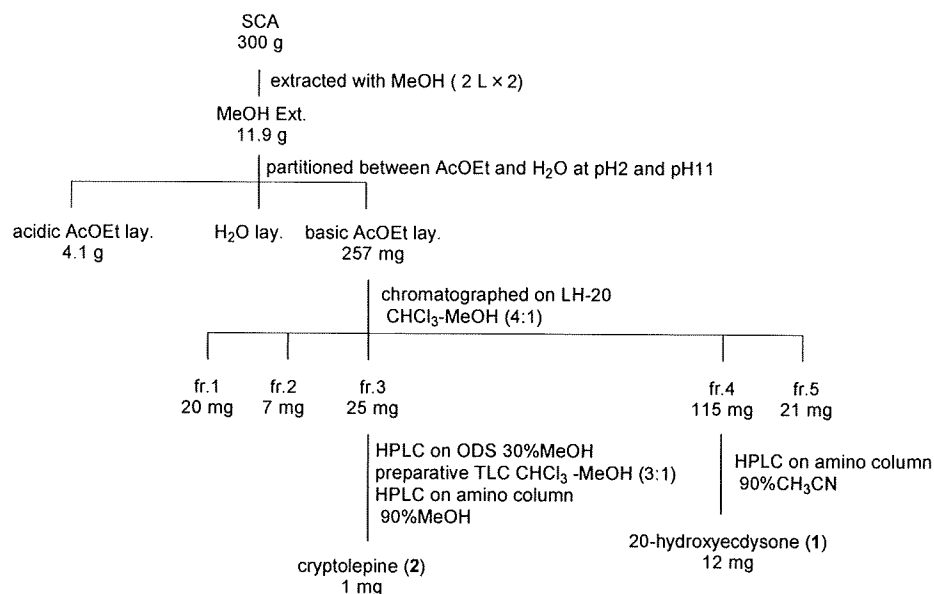


Chart 1 Procedures for extraction and fractionation of SCA

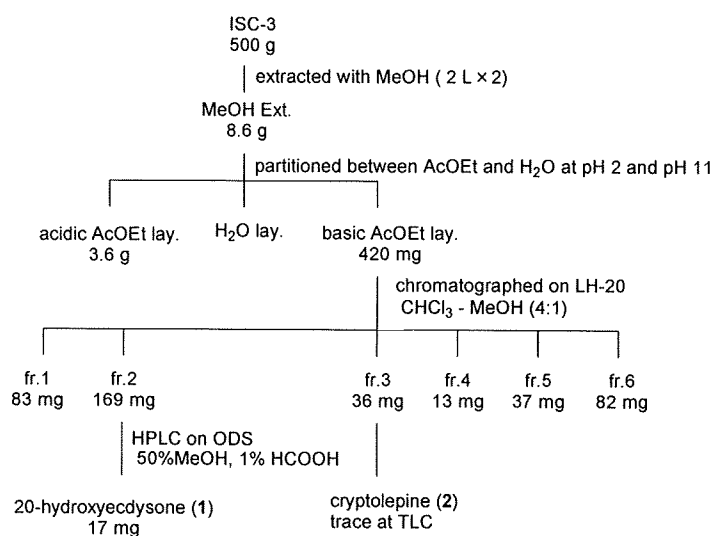


Chart 2 Procedures for extraction and fractionation of ISC-3



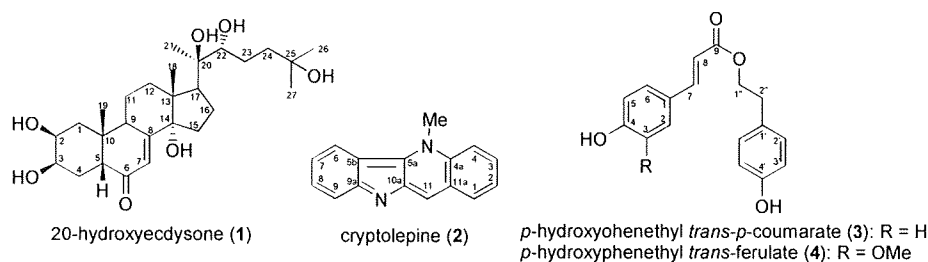


Fig. 1 Compounds isolated from SCA, SCR and ISC-3

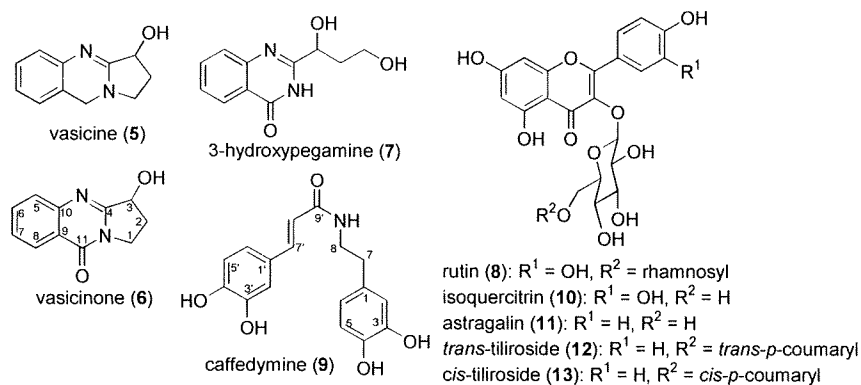


Fig. 2 Compounds isolated from BSS-2

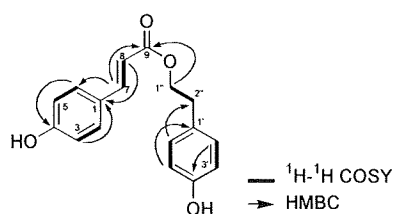


Fig. 3 Important <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations of compound 4

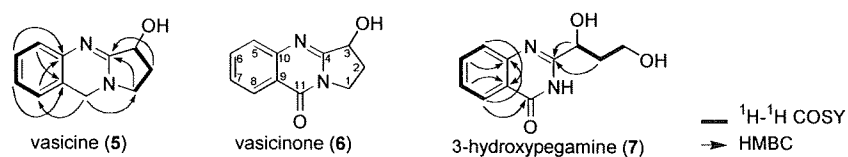


Fig. 4 Important <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC and NOESY correlations of quinazoline alkaloids 5-7



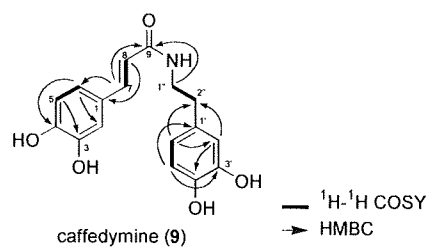


Fig. 5 Important  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compound 9

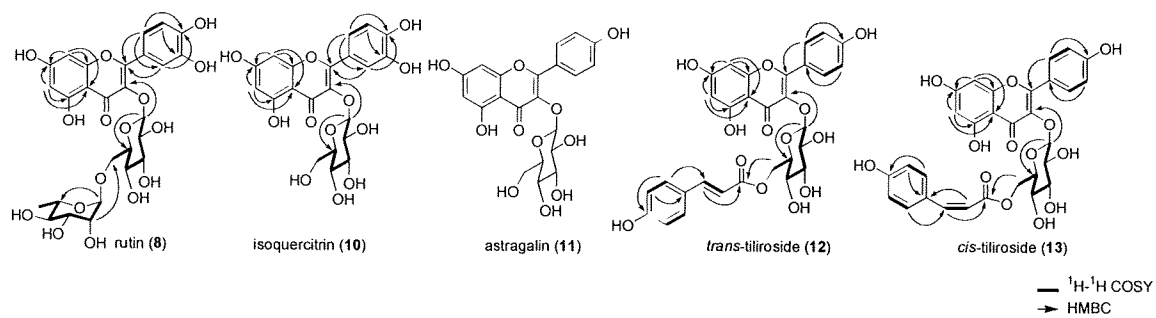


Fig. 6 Important  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of flavons 8, 10-13

Table 2  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **1** in methanol- $d_4$ .

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	37.3	1.43t (12.7), 1.79m
2	68.7	3.84td (3.6, 11.9)
3	68.5	3.95bs
4	32.8	1.69m, 1.76m
5	51.8	2.38dd (13.1, 4.0)
6	206.5	-
7	122.1	5.81bd (2.5)
8	168	-
9	35.1	3.15m
10	39.3	-
11	21.5	1.70m, 1.81m
12	32.5	1.88dd (3.0, 12.6) 2.13td (4.6, 12.6)
13	48.6	-
14	85.2	-
15	31.8	1.60dd (9.6, 11.7) 1.95m
16	21.5	1.73m, 1.98m
17	50.5	2.39m
18	18.1	0.89s
19	24.4	0.97s
20	77.9	-
21	21.1	1.20s
22	78.4	3.32t (10.8)
23	27.3	1.28m 1.66td (3.8, 12.2)
24	42.2	1.43t (12.7) 1.80m
25	71.3	-
26	29.7	1.21s
27	29	1.19s

Table 3  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compound **2** in methanol- $d_4$ .

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	131.1	8.46d (8.5)
2	128.2	7.91t (8.5)
3	133.7	8.16t (8.5)
4	118.2	8.63d (9.5)
4a	137.0	-
5a	139.9	-
5b	115.4	-
6	126.8	8.71d (8.3)
7	122.6	7.51t (8.3)
8	135.1	7.89t (8.3)
9	114.8	7.80d (8.3)
9a	149.0	-
10a	136.0	-
11	126.2	9.09s
11a	127.9	-
<i>N</i> -CH <sub>3</sub>	40.6	5.07s

Table 4 <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data of quinazoline alkaloids 5-7 in methanol-*d*<sub>4</sub>.

No.	vasicine (5)		vasicinone (6)		3-hydroxypegamine (7)	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J in Hz)
1	52.0	3.66m 3.75ddd (2.6, 9.1, 10.9)	44.6	4.00m 4.26m	59.3	3.78m (2H)
2	30.7	2.11m, 2.65m	31.1	2.13m, 2.62m	39.6	2.00m, 2.12m
3	72.5	5.10t (8.1)	73.2	5.10t (7.1)	70.0	4.75dd (4.3, 8.6)
4	164.8	-	162.6	-	161.1	-
5	118.3	7.13d (7.7)	128.0	7.74d (8.0)	127.8	7.68d (7.8)
6	130.5	7.34t (7.7)	135.7	7.82t (8.0)	135.9	7.81t (7.8)
7	128.4	7.26t (7.7)	128.0	7.53t (8.0)	127.8	7.51t (7.8)
8	128.2	7.20d (7.7)	127.2	8.23d (8.0)	127.2	8.19d (7.8)
9	118.2	-	121.9	-	122.2	-
10	132.2	-	150.4	-	149.9	-
11	47.5	4.81d (15.4), 4.90d (15.4)	161.8	-	164.1	-

Table 5  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data  
of compound **9** in methanol- $d_4$ .

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	128.3	
2	115.0	6.98d (1.9)
3	146.7	-
4	148.7	-
5	116.4	6.75d (8.2)
6	122.1	6.89dd (1.9, 8.2)
7	142.1	7.37d (15.6)
8	118.4	6.32d (15.6)
9	169.3	-
1'	132.1	-
2'	116.9	6.66d (1.8)
3'	146.3	-
4'	144.8	-
5'	116.3	6.68d (8.0)
6'	121.0	6.54dd (1.8, 8.0)
1''	42.6	3.43t (7.4)
2''	36.4	2.68t (7.4)

Table 6 <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data for compounds **8** and **10-13** in methanol-*d*<sub>4</sub>.

No.	isoquercitrin (10)		astragalin (11)		rutin (8)		trans-tiitroside (12)		cis-tiitroside (13)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J in Hz)
2	159.0	-	159.0	-	158.5	-	159.3	-	159.5	-
3	135.6	-	135.8	-	135.6	-	135.2	-	135.1	-
4	179.5	-	179.4	-	179.4	-	179.4	-	179.4	-
5	163.1	-	163.0	-	162.9	-	162.9	-	163.1	-
6	99.9	6.19d (1.8)	99.9	6.20d (2.0)	99.9	6.19bs	99.9	6.11bs	99.9	6.19d (2.0)
7	166.0	-	166.0	-	166.0	-	165.9	-	165.9	-
8	94.7	6.39d (1.8)	94.7	6.39d (2.0)	94.8	6.38bs	94.8	6.28bs	94.8	6.31d (2.0)
9	158.5	-	158.4	-	159.3	-	158.4	-	158.5	-
10	105.7	-	105.7	-	105.6	-	105.6	-	105.7	-
phenyl 1'	123.1	-	122.0	-	123.1	-	122.7	-	122.7	-
2'	123.2	7.70d (2.0)	110.0	8.05d (9.0)	117.7	7.66bs	132.2	7.97d (8.6)	132.3	7.96d (8.8)
3'	136.0	-	146.5	6.88d (9.0)	145.8	-	116.0	6.79d (8.6)	116.0	6.81d (8.8)
4'	149.8	-	138.1	-	149.8	-	161.5	-	161.5	-
5'	145.9	6.86d (8.4)	146.5	6.88d (9.0)	116.0	6.86d (8.2)	116.0	6.79d (8.6)	116.0	6.81d (8.8)
6'	117.5	7.58dd (2.0, 8.4)	110.0	8.05d (9.0)	123.5	7.62bd (8.2)	132.2	7.97d (8.6)	132.3	7.96d (8.8)
Glc 1''	104.2	5.26d (7.8)	104.4	5.24d (7.3)	104.7	5.10d (7.6)	104.0	5.24d (7.2)	104.0	5.20d (7.3)
2''	75.7	3.47dd (7.8, 9.2)	75.7	3.44dd (7.3, 9.1)	75.7	3.46m	78.0	3.47m	78.0	3.42m
3''	78.1	3.42t (9.2)	78.4	3.41t (9.1)	78.1	3.41m	75.8	3.47m	75.7	3.44m
4''	71.2	3.34t (9.2)	71.1	3.32t (9.1)	71.4	3.26m	71.7	3.31t (9.1)	71.7	3.27t (9.1)
5''	78.4	3.21ddd (2.3, 5.5, 9.2)	78.2	3.19ddd (2.3, 5.4, 9.1)	77.2	3.31m	75.7	3.48m	75.6	3.40m
6''	62.5	3.57dd (5.5, 11.9)	62.5	3.68dd (2.3, 11.9)	68.5	3.38m	64.3	4.18dd (7.2, 11.8)	64.0	4.17dd (6.3, 11.6)
		3.71dd (2.3, 11.9)		3.52dd (5.4, 11.9)		3.80bd (11.0)		4.30dd (1.7, 11.8)		4.19dd (2.6, 11.6)
Rha 1'''					102.4	4.51bs	168.8	-	167.7	-
2'''					72.1	3.63m	114.7	6.06d (15.8)	116.0	5.50d (13.0)
3'''					72.2	3.54m	146.5	7.38d (15.8)	145.4	6.68d (13.0)
4'''					73.9	3.27m	127.0	-	127.5	-
5'''					69.7	3.44m	131.2	7.28d (8.3)	133.8	7.51d (8.6)
6'''					17.9	1.08d (6.3)	116.8	6.77d (8.3)	115.7	6.67d (8.6)
							161.2	-	160.0	-

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査と分析，有害性評価に関する研究  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

トウジン (*Codonopsis pilosula* および *C. tangshen*) の成分研究  
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 専ら医薬品として区分されるトウジンの安全性を評価する目的で，日本において入手したトウジン (*Codonopsis pilosula* および *C. tangshen*) の成分研究を行い，新規ピロリジンアルカロイドとして化合物 1-4 と共に既知ピロリジンアルカロイドとして codonopyrrolidium B (5) および radicamine A (6) を単離した。

協力研究者

川原信夫 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター センター長

細江智夫 星薬科大学薬化学教室 準教授

河合賢一 星薬科大学薬化学教室 教授

省医薬食品局長通知「医薬品の範囲に関する基準等の一部改正について」).

トウジン [ 党参, *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. および *C. tangshen* Oliv.] は，キキョウ科 (Campanulaceae) 植物由来の生薬で，使用部位は根である。本品は，上記食薬区分において，専ら医薬品に分類され，生薬としては去痰，強壮に用いられるが，日本では一般用医薬品原料としての使用が多い。毒性データとして，抽出エキスはマウスに対し LD<sub>50</sub> 値が 1.7 g/kg，トウジン由来のポリサッカライドは LD<sub>50</sub> 値が 20.89 g/kg (部位不明)，LDLo 値が 90 g/kg (部位不明) と報告されている。また，これまでにトウジンに含有されている成分として，*N*-butoxycarbonylurea，hexyl glucoside，erigeside B，*cis*-3-hexenyl glucoside，attractylenolide III，5-hydroxy-2-pyridinemethanol，codopiloic acid，5-propyltridecane，tangshenoside I 等といった成分研究結果が報告されている。

#### A. 研究目的

人が経口的に服用する物が薬事法に規定する医薬品に該当するか否かについては，昭和 46 年 6 月 1 日付，薬発第 476 号厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」<sup>注)</sup> (以下，食薬区分) により判断し，医薬品と判断された成分本質 (原材料) については，「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト」 (専ら医薬品リスト) に例示として掲げられている (注：大改正 平成 19 年 4 月 17 日付，薬食発第 0417001 号厚生労働省医薬食品局長通知「医薬品の範囲に関する基準等の一部改正について」，最新改正 平成 21 年 2 月 20 日付，薬食発第 0220001 号厚生労働

我々は、これまでに専ら医薬品として区分されるトウジンの安全性を含有成分の面から評価する目的で、日本で入手出来る同試料について含有成分の検討を行い、既知化合物 12 種とともに新規トリテルペンエステル codonopilate A - C を単離・報告した<sup>1)</sup>。さらにメタノール抽出エキスにはアルカロイドの存在を示唆するドラージェンドルフ陽性物質が確認されていることから、本研究では引き続きドラージェンドルフ陽性物質の単離を目的とし成分研究を行った。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

トウジンは(株)ウチダ和漢薬より入手した。オープンカラムの担体は、Kieselgel 60 (Merck 製) もしくは Sephadex LH-20 (GE ヘルスケア バイオサイエンス社製) を用いた。NMR 溶媒は Methanol-*d*<sub>4</sub> 99.96 % (ISOTEC 製) を用いた。HPLC には HPLC 用溶媒を、その他の試薬は、全て試薬一級品を用いた。

### 装置及び測定条件

分取 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-8A system (ポンプ: LC-8A, 紫外可視検出器: SPD6AV) にインテグレーターとして Shimadzu CR-7A plus を接続したものを用いた。

NMR スペクトルは JEOL ECA-500 もしくは JEOL ECA-800 を用いた。<sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>C-NMR の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値 (ppm) で示した。Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY) , Heteronuclear Single-

Quantum Coherence (HSQC) , Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) 及び Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) スペクトルの測定には磁場勾配システムを用いた。

### 化合物の分画

トウジン 500 g をメタノールで冷浸した後、溶媒を留去し、メタノール抽出物を得た。このエキスに水を加え、クロロホルムで分配しクロロホルム抽出エキス (17.7 g) を得た。次に水層を 4 M 塩酸を用い pH 2 に調節した後 1-ブタノールを加え分配を行い酸性分画 (18.0 g) を得た。さらにアンモニア水で pH 11 にし 1-ブタノールで分配し塩基性分画 (12.0 g) を得た (Chart 1)。

塩基性抽出エキスを、LH-20 を担体としたカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム / メタノール (1:1) で溶出し、6 分画を得た。更にシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、その結果、分画 2 からは新規化合物として化合物 3 (3 mg) および化合物 4 (2 mg) , 分画 3 からは化合物 1 (3 mg) , 2 (3 mg) , および既知化合物 codonopyrrolidium B (5: 15 mg) , 分画 5 からは radicamine A (6: 11 mg) を単離、同定した (Chart 2, Fig. 1)。

### 細胞毒性試験

試験細胞は A549 ヒト肺がん細胞, HeLa ヒト子宮頸がん細胞, および LNCap ヒト前立腺がん細胞を用い、細胞数の測定には同仁堂 cell counter kit8 を用いた。

<倫理面での配慮>

本研究では、ヒト及び動物由来試料を用いた

実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

### C. 研究結果

化合物 1 は無色非晶系物質として得られ、DART-TOF-MS から分子式  $C_{13}H_{19}NO_5$  と決定した。 $^1H$ -NMR スペクトルでは 1, 2, 4-置換ベンゼン環 [ $\delta$ 6.81 dd ( $J = 2.0$  and  $8.3$  Hz),  $\delta$ 6.87 d ( $J = 2.0$  Hz),  $\delta$ 6.90 d ( $J = 8.3$  Hz)], メトキシ基 ( $\delta$ 3.85 s), *N*-メチル基 ( $\delta$ 2.22 s), およびヘテロ原子に結合した 6H 分のプロトン ( $\delta$ 3.10,  $\delta$ 3.65,  $\delta$ 3.82,  $\delta$ 3.86,  $\delta$ 3.96,  $\delta$ 4.01) が確認された (Table 1). よって、本化合物は既知化合物 6 の類縁体と考え、二次元 NMR スペクトルの測定を行った (Fig. 2).  $^1H$ - $^1H$  COSY スペクトルでは 2 位の水素原子 ( $\delta$ 3.65) から 3 位 ( $\delta$ 3.95), 4 位 ( $\delta$ 4.01), 5 位 ( $\delta$ 3.10), そして、6 位の水素原子 ( $\delta$ 3.82,  $\delta$ 3.86) まで連続した相関が確認された。HMBC スペクトルでは *N*-メチル基から 2 位 ( $\delta$ 75.4) および 5 位の炭素 ( $\delta$ 71.1) へ相関が見られたことからピロリジン環を持ち、3 位の水素原子からベンゼン環の 1' 位 ( $\delta$ 133.5) へ、2 位の水素原子から 2' 位 ( $\delta$ 116.2) および 6' 位の炭素 ( $\delta$ 121.3) に相関が観測されたことからピロリジン環の 2 位にベンゼン環が結合していると決定した。また、メトキシ基からは 4' 位の炭素 ( $\delta$ 148.8) へ相関が見られたことからその結合位置を 4' 位と決定した。NOESY スペクトルでは 2' 位から 4' 位, 3' 位から 5' 位への相関が見られたことから相対配置を決定した (Fig. 3). 本化合物は radicamine A の *N*-メチル化体であり、絶対配置は誘導体化により報告されている *N*-methyl

radicamine A<sup>2), 3)</sup> との旋光度の比較により (2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*) と決定した [*N*-methyl radicamine A ( $[a]_D = +6.3^\circ$ ), 1 ( $[a]_D = +5^\circ$ )].

化合物 2 は無色非晶系物質として得られ、分子式は  $C_{13}H_{19}NO_4$  と決定した。 $^1H$ -および  $^{13}C$ -NMR スペクトルを 1 と比較した結果、1, 4-置換ベンゼンが存在する以外は 1 とほぼ同じ値を示した (Table 1). そこで 2 は 1 の脱水酸基体と推定し、各種二次元 NMR スペクトルから本化合物の構造を決定した (Fig. 2, 3). 本化合物はすでに合成品として報告されており<sup>3)</sup>、旋光度の比較により、絶対配置を 1 と同じく (2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*) と決定した。

化合物 3 は無色非晶形物質として得られ、分子式  $C_{12}H_{17}NO_4$  と決定した。 $^1H$ -NMR スペクトルを 2 と比較したところ、メトキシ基が存在しない以外はほぼ同じ値を示した。よって 3 は 2 の脱 *O*-メチル体と推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析結果から本化合物の構造を 3 式と決定した (Fig. 2, 3). 化合物 3 は 2 との旋光度および円二色性スペクトルの比較から絶対配置を 2 と同じ、(2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*R*) と推定している。

化合物 4 は無色非晶形物質として得られ、分子式  $C_{19}H_{29}NO_9$  と決定した。 $^1H$ -NMR スペクトルを 2 と比較したところ、新たに糖と思われるアノメリック水素 1 個 ( $\delta$ 4.28 d  $J = 8.0$  Hz) を含む 7H 分の水素原子 ( $\delta$ 3.24,  $\delta$ 3.29,  $\delta$ 3.29,  $\delta$ 3.37,  $\delta$ 3.67,  $\delta$ 3.88) が観測された以外は 2 とほぼ同じ値を示した。よって、4 は 2 の配糖体と推定し、各種二次元 NMR スペクトルから構造を決定した (Fig. 4). 絶対配置を決定するため 4 を酸加水分解した。その結果得られた物



質は、各種機器データから radicamine A, および, D-glucose と決定し、4 の絶対配置を決定した。

今回得られた6種のアルカロイドについて細胞毒性試験を行った。その結果、1 - 6 全ての物質において、100 mM でも活性は示さなかった。

#### D. 考察

今回の成分研究において、新規化合物として1-4が、既知化合物として codonopyrrolidium B, radicamine A が単離、構造決定された。それらのうち、3 および 4 は新規化合物であった。また、1 および 2 に関しては合成品としてはすでに報告されているものの、天然物からの単離は初めての例である。

ピロリジンアルカロイドである 1 - 6 は濃度 100 mM で細胞毒性を示さなかったが、1 および 2 に関してはグルコシダーゼ阻害活性が報告されている<sup>3)</sup>。

ピロリジンアルカロイドであるサトイモ科植物 *Arisarum vulgare* から単離が報告された bbugaine<sup>4)</sup> や、Irniine<sup>5)</sup> はラット及びヒトの肝細胞に対する強い毒性が確認されている。また、*n*-butyl pyrrolidine のような単純な構造を持つ化合物においても LD<sub>50</sub> 51.1 mg/kg (oral, mus) の 50%致死量が報告されている<sup>6)</sup>。これらの化合物は、脂溶性が高い構造を持ち、今回単離した 1-6 とは、極性が異なるため、同種のアルカロイドであっても、毒性予測を行うことは危険であるが、直接的な安全性試験が行われていないこと、トウジンは、日本薬局方への優先収載候補品目であり、日本では医薬品としての使用実態があることを考え合わせれば、本品

は引き続き、専ら医薬品の区分であることが適切であるものと考えられる。

#### E. 結論

本研究は、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性および安全性等の評価に関する研究の研究班（平成 15-17 年度）において、毒性不明のアルカロイド成分が存在するため、詳細な成分検索が必要と判断がなされたトウジン [ *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. および *C. tangshen* Oliv. ] について、含有成分を明らかにする目的で、研究が開始されたものである。本年度の研究の結果、既知ピロリジンアルカロイドとして codonopyrrolidium B, radicamine A を単離された。さらに新規化合物としてピロリジンアルカロイド 1- 4 が単離され、それらの構造を決定した。ピロリジンアルカロイドには、bbugaine のように、強い肝毒性を持つ化合物が知られており、本植物から複数のピロリジンアルカロイドが単離されたこと及びトウジンが日本において医薬品としての使用実態があること等を考え合わせると、トウジンは引き続き、専ら医薬品の区分であることが適切であるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wakana, D., Kawahara, N., Goda, Y.,  
"Three new triterpenyl esters,  
codonopilates A-C, isolated from

Codonopsis pilosula." *J. Nat. Med.* **64**,  
accepted (2010).

## 2. 学会発表

- 1) 若菜大悟, 川原信夫, 細江智夫, 河合賢一,  
合田幸広: トウジン (党参) のアルカロイド  
成分, 日本生薬学会第56回年会 (2009年10  
月3-4日, 京都)

## H. 知的所有権の取得状況

特になし

## 参考文献

- 1) D. Wakana, N. Kawahara, Y. Goda, *J. Nat. Med.*, 投稿中.
- 2) M. Shibano, D. Tsukamoto, A. Masuda, Y. Tanaka, G. Kusano, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1362-1365 (2001).
- 3) E.-L. Tsou, S.-Y. Chen, M.-H. Yan, S.-C. Wang, T.-R. Rachel Cheng, W.-C. Cheng, *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 10198-10204 (2008).
- 4) N. Rakba, A. Melhaou, P. Loyer, J.G. Delcros, I. Morel, G. Lescoat, *Toxicology Letters*, 104, 239-248 (1999).
- 5) N. Rakba, A. Melhaoui, M. Rissel, I. Morel, P. Loyer, G. Lescoat, *Toxicon*, **38**, 1389-1402 (2000).
- 6) H. Yoshikawa, K. Kawai, *Jpn. J. Ind. Health*, **8**, 211 (1966).

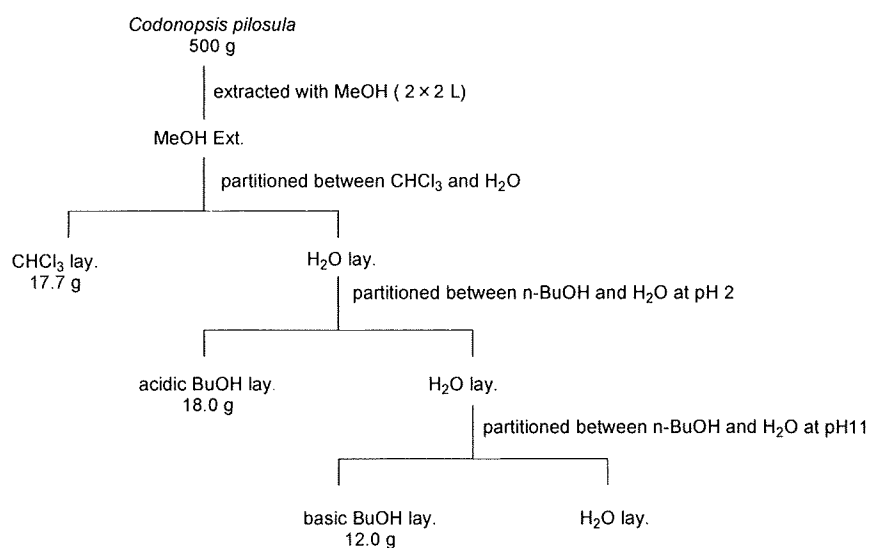


Chart 1 Procedures for extraction of the roots of *C. pilosula*

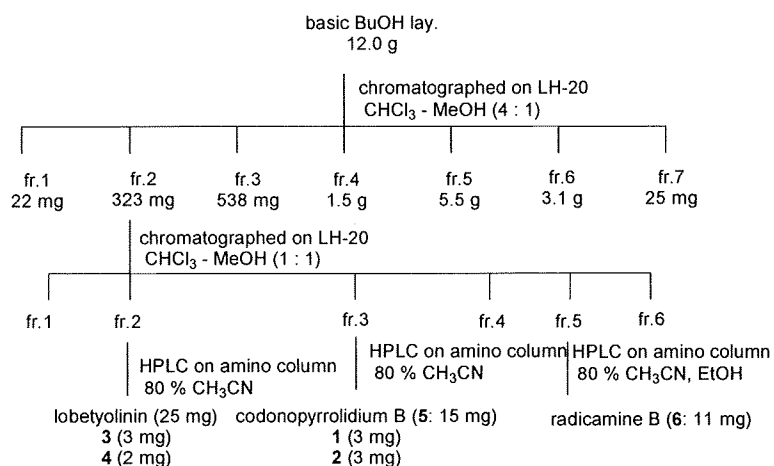


Chart 2 Procedures for separation of basic BuOH lay.

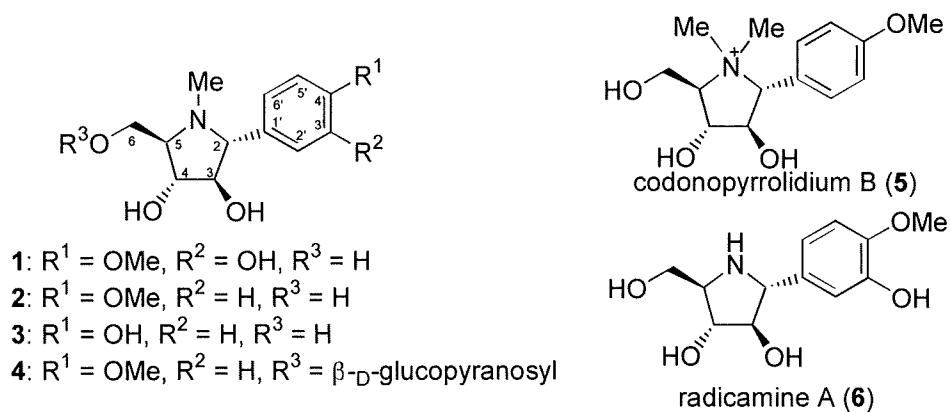


Fig. 1 Alkaloids isolated from *C. pilosula*

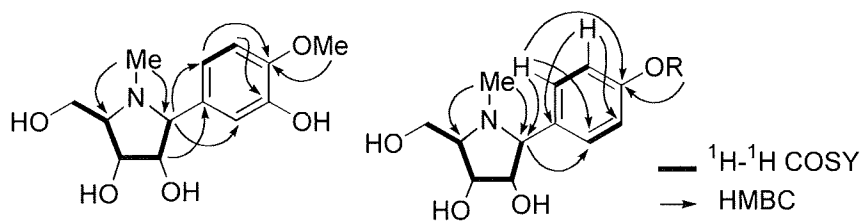


Fig. 2 Important  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of compounds 1 - 3

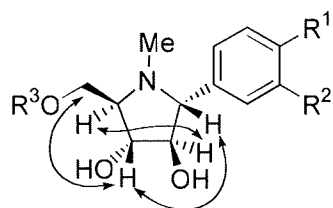


Fig. 3 Important NOESY correlations commonly shown at compounds 1 - 3

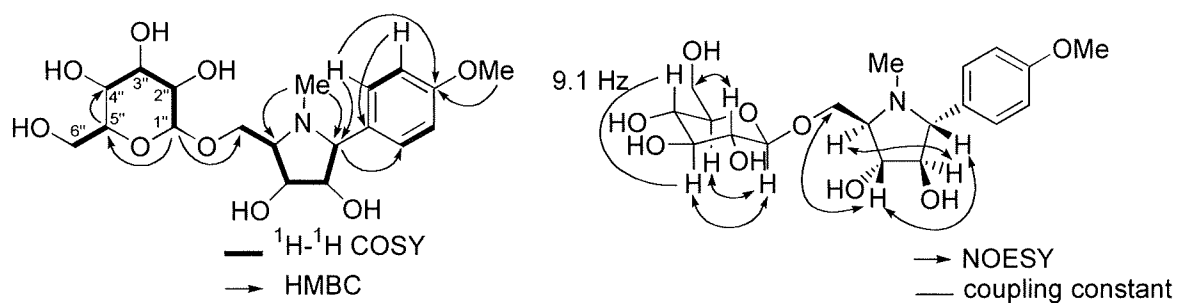


Fig. 4 Important COSY, HMBC and NOESY correlations of compound 4