

ITS sequence analysis. The ITS region is often used for molecular identification of various plant species owing to its high copy numbers and the presence of both conserved and variable segments as well as its variation rate suitable for the phylogeny.

The ITS sequences of the authentic samples (*A. graveolens*, Ce-1; *Cyclospermum leptophyllum*, Ce-62; *Seseli diffusum*, Ce-63) and the Indian celery (Ce-2) used for the phytochemical study were determined. The ITS sequence of the authentic *A. graveolens* (Ce-1) was identical to the corresponding sequences of *A. graveolens* (Acc. nos. U30552 and U30553) in the International Nucleotide Sequence Database (DDBJ/EMBL/GenBank: INSD) except for only one nucleotide in the ITS2 region. The ITS sequences of *C. leptophyllum* (Ce-62) and *S. diffusum* (Ce-63) showed high sequence similarities (86–97%) with *Bunium* sp. (Ex. Acc. nos. DQ435226, DQ435220, DQ435265 and DQ435259) and *Psammogeton* sp. (Acc. nos. AF008630, AF164839, AF009109, AF164864) in the INSD, respectively. However, no identical sequences to them were found in the databases. The ITS sequences of Ce-62 and Ce-63 were registered in the INSD as accession numbers AB243689 and AB243688, respectively. The sequence similarities among Ce-1, Ce-62 and Ce-63 were 82.9% for Ce-1 versus Ce-62, 83.0% for Ce-1 versus Ce-63 and 83.9% for Ce-62 versus Ce-63.

The ITS sequence of the Indian celery (Ce-2) was completely identical to that of the authentic *S. diffusum* (Ce-63) in ITS1 and ITS2 regions. *S. diffusum* (Roxb. ex Sm.) Santapau & Wagh (Syn: *Ligusticum diffusum*) is native to India. Späth et al. [13] also reported the isolation of the same coumarin derivatives (1–3) from the fruits of *S. indicum* (syn *S. diffusum* [14]). In addition to these data originating from the genetic and phytochemical approaches, the fruits of *S. diffusum* are known to be carminative and to be used in India to expel roundworms [15], and the plant has also been reported to be in the Rawalpindi dist., Pakistan [16]. These facts indicate that the Indian celery seeds used in our (and also the Indian authors') study are not derived from *A. graveolens* but from *S. diffusum*. In the future, the botanical identity of the Indian celery as *S. diffusum* might need to be carefully confirmed because only the one sample was used for the authentic *S. diffusum* in this study.

Market survey in the Pakistani and related countries' crude drugs/spice markets

Because it was found that the Indian celery differs from *A. graveolens*, we investigated different forms of celery seeds available in Pakistani and related countries' markets to clarify and establish the relationship between their local names, market places and the botanical sources. Fifty-two

celery seed samples collected during the market survey were applied to the ITS sequence analysis and were classified into four genotypes designated for types A–D on the basis of their ITS sequences (Table 2, Fig. 2). The ITS sequence alignment of these four genotypes is shown in Fig. S1, Supplementary material. Type A sequence completely matched that of Ce-1, and hence the source plant corresponding to this sample type was identified as *A. graveolens*. This genotype was found in 16 samples, most of which were obtained as 'Ajmod (h)' or 'Karafas' in the northern region of Pakistan. The celery, *A. graveolens*, is expressed as 'Ajmoda' in Sanskrit, Hindi and Unani, whereas the names 'Bazr-ul-karafs' and 'Tukhm-e-karafs' are used in Arabian and Persian, respectively [17]. These vernacular names probably shifted into the above local names in Pakistan. Type B sequence was completely identical to the authentic *S. diffusum* (Ce-63), and found in 23 samples. Type C showed the identical sequence to that of *Conium maculatum* (Acc. nos. U79609 and U79612) in the INSD except for one nucleotide in the ITS2 region. Only one sample, Ce-14, was classified into this genotype. This sample was easily distinguished from the other types by its appearance. This sample is considered to be a rare adulterant of celery in Pakistani crude drug markets.

Type D sequence found in 12 samples showed a genotype that correlated with that of *Trachyspermum ammi* (Acc. nos. U78380 and U78440) in the INSD except for

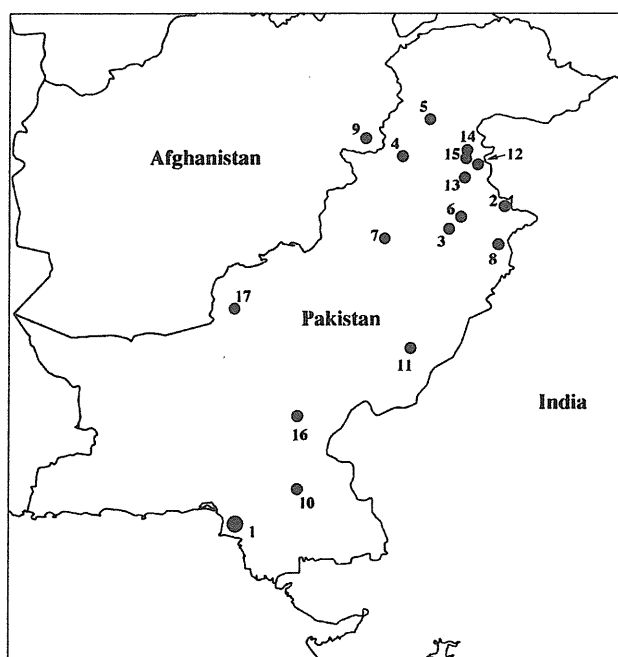


Fig. 2 Distribution map of the local markets surveyed in this study: 1 Karachi, 2 Sialkot, 3 Sargodha, 4 Peshawer, 5 Mongora, 6 Hasan Abdal and Taxila, 7 Dera Ismail Khan, 8 Lahore, 9 Jalalabad, 10 Hyderabad, 11 Bahawalpur, 12 Murree, 13 Rawalpindi, 14 Manshera, 15 Abbottabad, 16 Sukher, 17 Quetta

two nucleotides in the ITS1 region. The fruits of *T. ammi* are used as ‘Carvi oriental’ or ‘ajawain’ for treating stomach troubles and whooping cough by household ladies in northern India [18]. This fact and our sequence data indicate that the type D sample is derived from *T. ammi*. Various celery-related products derived from *A. graveolens*, *T. ammi*, *Carum roxburghianum*, *A. leptophyllum* and *P. crispum* are used for folk medicines and/or spices in India. The last three species were not observed in our market survey targeted at ‘celery seeds’ in Pakistan. Therefore, our results suggest that these three species are not common in the country or are not recognized as ‘celery seeds’ by Pakistani people.

Unlike type A samples found only in the northern area, samples of types B and D were distributed in the markets of most regions surveyed. Most of the type B samples have been sold as ‘wal ajowain’ or ‘wel ajowain’ whose meaning was found to be a wild form of ‘ajowain’ (*T. ammi*) through interviews during market survey. On the other hand, type B samples have been obtained as ‘ajmud’ in the Karachi area, although the name is applied to *A. graveolens* in the northern area. Furthermore, the local name of type D samples (*T. ammi*) was also variable: (thick/thin/Indian) ajowain, wal ajowain and so on. These data mean that the relationship between the local name and the botanical source of celery seeds varied depending on the market place. It is thought that each type of celery seeds is selectively used on the basis of their pharmacological effects, traditional cultures, rituals, usages and commercial values in indigenous communities of Pakistan. Therefore, the confusion regarding their botanical source should be resolved for their appropriate use.

Microscopic observation and TLC analysis of celery-related seeds from Pakistani markets

For rapid identification of the source plants of Indian celery and its analogues, we investigated their morphological features and chemical composition. Microscopic images of the major genotypes (types A, B and D) found in the Pakistani markets and three authentic samples (Ce-1, Ce-62 and Ce-63) are shown in Fig. S2, Supplementary material. They were cremocarp characteristic of the Umbelliferae plant and their morphological features are as follows:

Type A (*A. graveolens*)—The fruit was a laterally compressed globose. The size of a mericarp was 1.60 ± 0.14 mm long, 0.75 ± 0.07 mm wide and 0.71 ± 0.08 mm thick. The twenty-kernel weight of the mericarps was 9.37 ± 0.85 mg. Each mericarp had five small prominent ribs.

Type B (*S. diffusum*)—The fruit was almost globose. Each mericarp was flat and ellipsoid in a commissural face and had a semicircular cross section. The size of a mericarp

was 2.01 ± 0.18 mm long, 1.35 ± 0.16 mm wide and 0.85 ± 0.11 mm thick. The twenty-kernel weight of the mericarps was 13.4 ± 0.53 mg. Each mericarp had five large prominent ribs.

Type D (*T. ammi*)—The fruit was a laterally compressed ovoid. The commissural face of each mericarp was lanceolate and curved directed on the long side. The cross section of each mericarp was semicircular. The size of a mericarp was 2.35 ± 0.26 mm long, 0.95 ± 0.09 mm wide and 0.83 ± 0.08 mm thick. The twenty-kernel weight of mericarps was 19.6 ± 0.67 mg. Each mericarp had five prominent ribs.

Type A and type B were morphologically quite consistent with their corresponding authentic plants (Ce-1 and Ce-63, respectively). The sizes of the ribs significantly varied among the three genotypes in the order type B > type D > type A. A comparison of the rib size in section view can easily discriminate each genotype from the others.

In addition, the TLC analysis of the methanol extracts of the seeds is useful for the detection of the celery containing furocoumarins (Fig. S3, Supplementary material). The authentic *S. diffusum* (Ce-63) and type B samples (Ce-2 and Ce-27) have pale yellow and blue fluorescent spots characteristic of the furocoumarin derivatives, whereas the other samples (Ce-1 and Ce-30 for *A. graveolens* and Ce-33 for *T. ammi*) have no fluorescent spots.

The presence/absence of furocoumarin derivatives in feeding materials is an important factor from the viewpoint of the risk assessment for foods and drugs because the linear furocoumarin derivatives are well known to have phototoxicity and carcinogenic properties [19–21]. Our study indicated that the reported isolation of these compounds from *A. graveolens* seeds by the Indian researchers [2–10] was attributable to the misidentification of the material. Simultaneously, it was found that the unexpected intake of furocoumarin derivatives which pose a health risk to humans could occur by contamination of the common Indian celery with *S. diffusum*. The exact identification of the botanical source is thus important for the safety of the resulting foods and drugs.

Conclusions

In this study, we proved that the Indian celery seeds containing coumarin derivatives (1–9) are not derived from *A. graveolens* by using genetic and phytochemical approaches, even though Indian workers reported that *A. graveolens* seeds contain these compounds [2–10]. Furthermore, our results strongly suggested that the seeds were derived from *S. diffusum* based on their ITS sequences, characteristic components and distribution area. The

market survey in Pakistan and related countries established that the celery seeds available in Pakistani markets are mainly composed of three species (*A. graveolens*, *T. ammi* and probably *S. diffusum*) and that the relationship between the local name and their botanical source varied depending on the market place. The ambiguous botanical origin of the celery seeds in the Indian and Pakistani local markets could therefore have caused the disputable phytochemical results reported by the Indian researchers.

Acknowledgements We thank Prof. J. Kitajima, Prof. J. Pierre and Dr. S. Tenessi for kindly supplying the seeds of the authentic samples. We thank Dr. A. Takano in Showa Pharmaceutical University for kindly supplying the commercial seed samples from Nepal and India (Ce-22 to Ce-24). Part of this study was supported by a Health Labour Sciences Research Grant. We also thank Dr. F. Kiuchi in the Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, for his critical reading of the manuscript and his instructive advice.

References

1. Usmanhany K, Saeed A, Alam MT (1997) Indusyanic medicine, traditional medicine of herbal. Animal and mineral origin in Pakistan. Karachi University Press, Karachi, pp 104–106
2. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1978) Apiumetin—a new furanocoumarin from the seeds of *Apium graveolens*. *Phytochemistry* 17:2135–2136
3. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1979) Minor phenolics of *Apium graveolens* seeds. *Phytochemistry* 18:352
4. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1979) Coumarins from *Apium graveolens* seeds. *Phytochemistry* 18:1580–1581
5. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1979) Apiumoside, a new furanocoumarin glucoside from the seeds of *Apium graveolens*. *Phytochemistry* 18:1764–1765
6. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1980) Celerin, a new coumarin from *Apium graveolens*. *Planta Medica* 38:186–188
7. Garg SK, Gupta SR, Sharma ND (1980) Glucosides of *Apium graveolens*. *Planta Medica* 38:363–365
8. Garg SK, Sharma ND, Gupta SR (1981) A new dihydrofurocoumarin from *Apium graveolens*. *Planta Medica* 43:306–308
9. Jain AK, Sharma ND, Gupta SR, Boyd DR (1986) Coumarins from *Apium graveolens* seeds. *Planta Medica* 52:246
10. Ahluwalia VK, Boyd DR, Jain AK, Khanduri CH, Sharma ND (1988) Furanocoumarin glucosides from the seeds of *Apium graveolens*. *Phytochemistry* 27:1181–1183
11. Kitajima J, Ishikawa T, Satoh M (2003) Polar constituents of celery seed. *Phytochemistry* 64:1003–1011
12. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
13. Späth E, Bose PK, Matzke J, Guha NC (1939) Die cumarine von *Seseli indicum* und die konstitution des seselins. *Ber Dtsch Chem Ges* 72:821–830
14. French DH (1971) Ethnobotany of the Umbelliferae. In: Heywood VH (ed) *The biology and chemistry of the Umbelliferae*. Academic, London, pp 385–412
15. Datta SC, Banerjee AK (1978) Useful weeds of west Bengal rice fields. *Econ Bot* 32:297–310
16. eFloras (2008) *Seseli diffusum*. <http://www.efloras.org> Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA. Accessed 5 June 2008
17. Kapoor LD (1989) *Handbook of ayurvedic medicinal plants*. CRC, London, p 44
18. Shah NC (1982) Herbal folk medicines in Northern India. *J Ethnopharmacol* 6:293–301
19. Scheel LD, Perone VB, Larkin RL, Kupel RE (1963) The isolation and characterization of two phototoxic furanocoumarins (psoralens) from diseased celery. *Biochemistry* 2:1127–1131
20. Ashwood-Smith MJ, Ceska O, Chaudhary SK (1985) Mechanism of photosensitivity reactions to diseased celery. *Br Med J* 290:1249
21. International Agency for Research on Cancer (IARC) *Monographs supplement 7* (1986) 8-Methoxypsoralen (methoxsalen) plus ultraviolet radiation, p 126



Chemical constituents of *Pteris cretica* Linn. (Pteridaceae)

Liva Harinantenaina, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka*

Department of Pharmacognosy, Graduate School Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2008

Accepted 29 January 2009

Keywords:

Pteris cretica

Pteridaceae

Kauranoid

Diterpenoid

Flavonoid

Chemotaxonomical classification

1. Subject and source

The group of ferns from the genus *Pteris* (Pteridaceae) contains 250 cosmopolitan species (Mabberley, 1997). One species, *P. cretica* (Japanese name: ohbano-inomotoso) called Cretan brake fern is widely distributed in the temperate and warm area of Japan. Although some fern members of the family Pteridaceae are well known to contain carcinogenic C-14 illudane-type sesquiterpenoids (e.g. ptaquiloside, 1), the rhizome and the aerial part as well as the young fronds of *P. cretica* are used in Chinese traditional medicine as an antipyretic, an antidote, and to treat burns (Gan, 1958; Jiang, 1977). For safety reasons, investigation of the presence and distribution of the cytotoxic compounds in *Pteris* species is always necessary before use in traditional medicines, since C₁₄- and C₁₅-illudane-type sesquiterpenoids are the chemical markers of Pteridaceae.

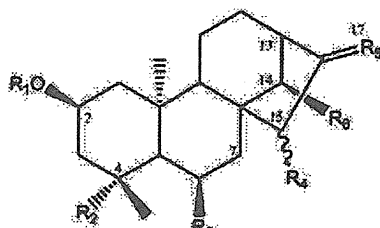
Plant material used in the present study was collected in May 2007 in Hiroshima City, Japan. A voucher specimen (07-PC-0513) has been deposited in the Department of Pharmacognosy, Graduate School Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Japan.

2. Previous work

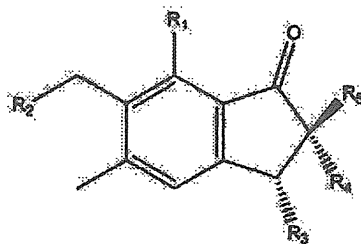
From the air-dried fronds of *P. cretica*, the presence of 19-hydroxycreticoside A (2), 2β,6β,15α-trihydroxy-*ent*-kaur-16-ene 2-O-β-D-allopyranoside (3), 2β,6β,15α-trihydroxy-*ent*-kaur-16-ene (4), 2β,6β,15α-trihydroxy-*ent*-kaur-16-ene 2-O-β-D-glucopyranoside (5), 2β,16α-dihydroxy-*ent*-kaurane (6), was reported (Hakamatsuka et al., 1997). In addition, luteolin 8-C-rhamnoside 7-O-rhamnoside (7), luteolin 7-O-glucopyranoside (8) and luteolin 7-O-gentiobioside (9) have been isolated from the aerial part of this fern (Imperato, 1994). In 1985, Murakami and co-workers isolated 2β,6β,16α-trihydroxy-*ent*-kaurane 2-O-β-

* Corresponding author. Tel./fax: +81 82 257 5335.

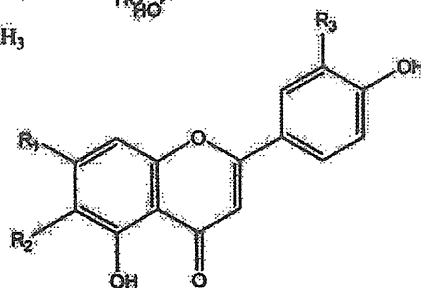
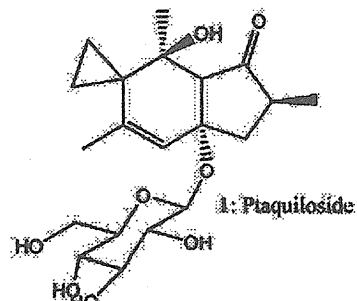
E-mail address: hotsuka@hiroshima-u.ac.jp (H. Otsuka).



- 2: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₂OH, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 3: R₁ β-D-allopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 4: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 5: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 6: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 10: R₁ β-D-allopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 11: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 12: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 13: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ α-OH, β-CH₂OH, R₆ H
 14: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ α-OH, β-CH₂OH, R₆ OH
 18: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 19: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 20: R₁ β-OH, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 21: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 22: R₁ H, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ H, R₅ α-OH, β-CH₃, R₆ H
 27: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ CH₃, R₃ OH, R₄ α-OH, R₅ CH₂, R₆ H
 25a: R₁ OH, R₂ CH₃, R₃ H, R₄ β-OH, R₅ CH₂, R₆ H



- 15: R₁ CH₃, R₂ CH₂OH, R₃ H, R₄ CH₂OH, R₅ CH₃
 16: R₁ CH₃, R₂ CH₂OH, R₃ OH, R₄ H, R₅ CH₃
 17: R₁ CH₂OH, R₂ CH₂OH, R₃ OH, R₄ H, R₅ CH₃
 23: R₁ CH₃, R₂ CH₂OH, R₃ H, R₄ CH₃, R₅ H
 24: R₁ CH₃, R₂ CH₂Cl, R₃ H, R₄ CH₃, R₅ H



- 7: R₁ rhamnosyl, R₂ O-rhamnoside, R₃ OH
 8: R₁ O-β-D-glucopyranosyl, R₂ H, R₃ H
 9: R₁ H, R₂ O-gentiobioside, R₃ OH
 27: R₁ β-D-glucopyranosyl, R₂ H, R₃ OH

Scheme 1. Structure of compounds isolated from *Pteris cretica*

D-allopyranoside (10), 2 β ,6 β ,16 α -trihydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-glucopyranoside (11), 2 β ,15 α -16 α -17-tetrahydroxy-*ent*-kaurane (12), 2 β ,15 α ,16 α ,17-tetrahydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-glucopyranoside (13), 2 β ,14 α ,15 α ,16 α ,17-pentahydroxy-*ent*-kaurane (14), pterosins A, C, and S (15–17), and compound 6, together with 2 β ,15 α -dihydroxy-*ent*-kaur-16-ene (18), creticoside A (19), 2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kaurane (20) and creticoside B (21) from the rhizome of the plant, while the investigation by the same authors on the aerial part of the same plant demonstrated the presence of 2 β ,6 β ,16 α -trihydroxy-*ent*-kaurane (22), pterosins B (23), and F (24) together with compounds 16 and 17 (Murakami et al., 1985; Chen and Murakami, 1971). Herein we report the isolation of the chemical constituents and the characterization of a new kauranoid (25) of *P. cretica* (Scheme 1).

3. Present study

The dried leaves of *P. cretica* (459 g) were extracted with MeOH (15 l) for a week. The concentrated MeOH extract (34 g) was suspended in H₂O and partitioned with EtOAc to give 7.6 g of EtOAc- and 25 g of H₂O-soluble fractions. The EtOAc-soluble fraction was chromatographed on a silica gel column (particle size 0.063–0.200 mm, Merck) eluting with a solvent system containing CH₂Cl₂, MeOH and H₂O (17:6:1). Fractions having similar TLC behavior were combined and eight fractions were obtained. Luteolin 7-O- β -D-glucopyranoside (8, 2.05 g) was precipitated from fraction 2. ODS MPLC (solvent system 10% aqueous MeOH to 100% MeOH) of the remaining of the fraction 2 afforded compounds: 10 (5.1 mg), 16 (2.4 mg), 17 (1.7 mg), 19 (3.6 mg), and 2 β ,16 α -dihydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-allopyranoside (26, 16 mg); (Katakawa et al., 2002). Fraction 3 was subjected to column ODS MPLC (solvent system 10% aqueous MeOH to 100% MeOH) to give 21 fractions. Pure compounds identified as 2 β ,6 β ,16 β -trihydroxy-*ent*-kaurane 2-O- β -D-allopyranoside, 8, and 26 were isolated from fractions 3-5, 3-8 and 3-16, respectively. ODS HPLC of fraction 3-10 (solvent system: CH₃CN 35%) afforded apigenin 7-O-glucopyranoside (27, 21.7 mg). Compounds 3 (1.2 mg), 19 (3.5 mg) and a new one identified as 2 β ,15 β -dihydroxy-*ent*-kaur-16-ene 2-O- β -D-glucopyranoside (25, 12 mg) were obtained from ODS column chromatography (CC) (solvent system 10% aqueous MeOH to 100% MeOH) of fraction 5.

Table 1
¹H, ¹³C NMR spectral data (400 and 150 MHz, respectively) for compounds 19, 25 and 25a (in C₅D₅N).

Position	25		19	25a
	H	C	C	C
Aglycone				
1a	2.11 (brd, <i>J</i> = 12 Hz)	47.9	48.0	50.2 (−2.3) ^a
1b	1.33 (s, <i>J</i> = 12 Hz)			
2	4.48 (m)	72.2	72.2	63.8 (+8.4) ^a
3a	1.00 (brt, <i>J</i> = 11 Hz)	49.6	50.0	52.0 (−2.4) ^a
3b	1.44 overlapped			
4	–	34.9	34.5	34.8
5	0.70 (dd, <i>J</i> = 11, 3 Hz)	55.4	56.0	55.3
6a	1.42 overlapped	19.2	19.6	19.3
6b	1.12 (m)			
7a,b	1.45 overlapped	34.5	34.7	34.7
8	–	48.0	48.0	47.7
9	1.40 (brd, <i>J</i> = 10 Hz)	54.0	54.4	53.9
10	–	41.3	41.3	41.3
11a	1.73 overlapped	18.5	18.3	18.5
11b	1.55 (brd, <i>J</i> = 10 Hz)			
12a	1.45 overlapped	33.0	33.1	32.9
12b	1.29 (m)			
13	2.69 (brs)	42.8	41.9	42.9
14a	1.78 (brd, <i>J</i> = 11 Hz)	37.4	36.9	37.5
14b	1.48 overlapped			
15	5.56 (brs)	84.2	82.9	84.3
16	–	155.8	160.9	155.7
17a	5.45 (brs)	110.7	107.8	110.6
17b	5.14 (brs)			
18	0.63 (s)	33.7	33.9	33.8
19	0.76 (s)	72.5	72.5	72.7
20	0.91 (s)	18.7	18.8	18.9
β-D-Glucopyranosyl				
1'	5.05 (d, <i>J</i> = 8 Hz)	102.8	102.6	
2'	4.04 (dd, <i>J</i> = 8, 8 Hz)	75.3	75.3	
3'	overlapped	78.7	78.3	
4'	overlapped	71.9	71.8	
5'	overlapped	78.4	78.6	
6'a	4.53 (dd, <i>J</i> = 12, 2 Hz)	63.0	63.0	
6'b	4.36 (dd, <i>J</i> = 12, 5 Hz)			

Assignments based on HSQC and HMBC.

^a $\delta_{25} - \delta_{25a}$.

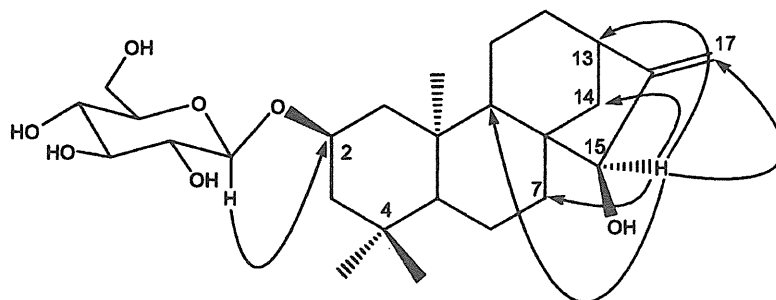


Fig. 1. Important HMBC correlations observed.

3.1. Enzymatic hydrolysis of 25

Seven milligrams of crude hesperidinase were added to an aqueous solution of 25 (11 mg). The mixture was incubated at 37 °C for 72 h. The solution was extracted with EtOAc to afford the aglycone 25a, 4.2 mg, $[\alpha]_D^{25} -32.4$ (0.19, MeOH). The remaining aqueous solution was evaporated and purified with silica gel CC (solvent system: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$) to give D-glucose as identified by comparison with the chromatogram of the authentic sample in HPLC equipped with an optical rotation detector.

3.2. Oxidation of 25a

Three milligrams of compound 25a were dissolved in CH_2Cl_2 (2 ml) and 10 mg of pyridinium chlorochromate (PCC) was added (Lightner and Toan, 1987). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h and evaporated to give a brown residue. Compound 25b (HRESIMS: m/z 323.1979 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{Na}$ requires 323.1981) was obtained from silica gel CC (solvent system hexane:EtOAc, 4:1) of the residue ($[\alpha]_D^{25} -56.1$ (0.15, MeOH).

2 β ,15 β -Dihydroxy-*ent*-kaur-16-ene 2-O- β -D-glucopyranoside [25, amorphous powder $[\alpha]_D^{25} -9.4$ (0.7, MeOH)] exhibited a molecular formula of $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$ as determined by the positive-ion HRESIMS (m/z 489.2820 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Na}$ requires 489.2822). Its IR spectral data displayed strong bands due to polyhydroxyl (3395, 1078 and 1021 cm^{-1}) and an exomethylene (3081, 1654 and 906 cm^{-1}). Inspection of the ^1H NMR spectrum revealed the presence of a β -oriented anomeric proton (δ 5.05, d, $J = 8$ Hz, 1H), three quaternary methyl groups (δ 0.76, 0.85, 0.91, each singlet), an exomethylene (δ 5.45 and 5.14, each singlet), and a broad singlet and a multiplet oxygen bearing methine proton signals (δ 5.56 brs, H-15 and δ 4.48 m, H-2). The ^{13}C NMR spectrum displayed 26 signals, six of which were ascribable to a β -glucopyranosyl unit and the remaining 20 to the aglycone of a kaurene-type diterpene (Murakami et al., 1997). The ^{13}C NMR data of 25 were very similar to those of 19 (Table 1), except for the downfield shift of the signals for C-13 (+0.9), C-15 (+1.3), C-17 (+2.9), and the upfield shift of that of C-16 (-5.1). These data suggested that the difference between 19 and 25 was the orientation of the hydroxyl group at C-15. In order to confirm the planar structure of 25, H-H COSY, HMQC, NOESY and HMBC experiments were carried out. Significant COSY correlations were observed between: H-1 and H-2, H-2 and H-3; H-5 and H-6, H-6 and H-7; H-9 and H-11, H-11 and H-12, H-12 and H-13, and H-13 and H-14. Moreover, the allocations of the functional groups were substantiated by careful interpretation of the HMBC spectral data. A strong long-range correlation between the proton at δ 5.56 (H-15) and the carbons at C-13 (δ 42.8), C-14 (δ 37.4), and C-17 (δ 110.7) (Figs. 1 and 2), and between the anomeric proton at δ 5.05 and the carbon (δ 72.2) concluded the attachment of the glucopyranosyl moiety to be at C-2 and the remaining hydroxymethine to be at C-15. The β -orientation of the C-2 and C-15 hydroxyl groups was concluded by the observation of the NOESY cross-peaks between

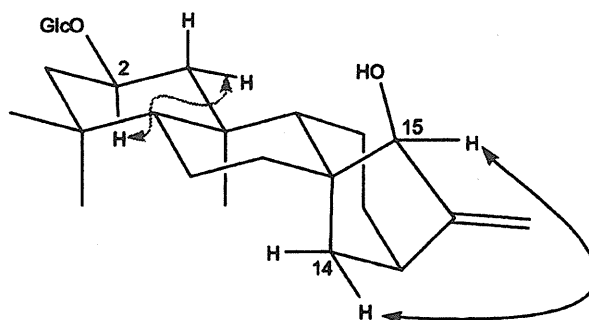


Fig. 2. Important NOESY correlation observed.

Table 2
Phytochemical investigation of six species of *Pteris*.

Species	8, 27	Pterosins	Kauranoids
<i>P. multifida</i> Poir. ^a	+	+	+
<i>P. multifida</i> Poir. ^b	+	+	ND
<i>P. cretica</i> Linn. ^c	+	+	+
<i>P. cretica</i> Linn. ^c	+	+	+
<i>P. tremula</i> R. Br. ^c	–	+	+
<i>P. dactyloides</i> Hook. ^c	–	+	+
<i>P. angustipinna</i> Tagawa ^c	–	+	+
<i>P. grevilleana</i> Wab. ^c	–	+	–

^a Previously reported investigation (Murakami et al., 1985).

^b Our previous investigation (Harinantenaina et al., 2008).

^c Present investigation.

H-2 (δ 4.48, m) and the equatorial-oriented H-1 (δ 2.11, brd, $J = 12$ Hz), and H-15 and H-14b. Enzymatic hydrolysis of **25** gave **25a** and D -glucose. Since the β - D -glucosylation-induced shift-trend rule (Kasai et al., 1977) could not be applied for **25**, when comparing its ^{13}C NMR data with those of **25a** (Table 1), the *ent*-kaurene nature of **25** was concluded by the observation of positive and negative Cotton effects at λ_{max} 241 nm ($\Delta\epsilon +0.42$) and λ_{max} 291 nm ($\Delta\epsilon -2.81$), respectively, of compound **25b** obtained from the oxidation of **25a** with PCC. From the above data the structure of **25** was concluded to be as depicted.

4. Chemotaxonomic significance

The dried leaves, fronds, aerial parts and rhizome of *Pteris cretica* contain pterosins and *ent*-kauranoids, which are the chemical markers of the family Pteridaceae. Pterosin B (**23**) derived from the carcinogenic compound **1** and since **23** has been detected in all species of *Pteris* investigated, it would suggest that **1** must be present in all species of *Pteris*. If this is the case then all samples of *Pteris* used medicinally should be processed so that the end product is free of any carcinogenic compounds. The two flavonoids (**8** and **27**) were isolated from the leaves of *P. cretica* in high amount during the present study. Interestingly, our previous phytochemical investigation on one species of *Pteris* (*P. multifida*) demonstrated the presence of pterosins, caffeate and/or coumarate derivatives of quinic acid, flavonoids and sucrose in the plant (Harinantenaina et al., 2008). So far, *P. multifida* is the only *Pteris* species which has been proved to contain a large amount of quinic acid derivatives. The phytochemical investigation of six species of *Pteris* has been carried out and the results are summarized in Table 2. The *ent*-kauranoids found in *Pteris* are C-2 and/or C-6, and/or C-15, and/or C-16 and/or C-17 and/or C-18 hydroxylated. Mainly glucopyranosyl and/or allopyranosyl are the sugar moieties attached at the C-2 and/or C-6 hydroxyl group of *ent*-kauranoids of *P. cretica*. Recently Ge et al. (2008) have isolated a tetrahydroxylated (at C-2, C-14, C-15, and C-18) *ent*-kaurene from *P. multifida*. Although C-15 hydroxylated kaurene has been isolated from *P. cretica*, this is the first report on the isolation of an *ent*-kaurene with a β -oriented C-15-hydroxyl group from *Pteris* species.

References

- Chen, C.-M., Murakami, T., 1971. Tetrahedron Lett. 16, 1121.
 Gan, W.S., 1958. Manual of Medicinal Plants of Taiwan, Vol. I. National Research Institute of Chinese Medicine, Taipei. 32.
 Ge, X., Ye, G., Li, P., Tang, W.-J., Gao, J.-L., Zhao, W.-M., 2008. J. Nat. Prod. 71, 227.
 Hakamatsuka, T., Tanaka, D., Namatame, Y., Wada, H., Tanaka, N., 1997. Nat. Med. 51, 278.
 Harinantenaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., 2008. J. Nat. Med. 62, 452.
 Imperato, F., 1994. Phytochemistry 37, 589.
 Jiang Su New College of Medicine, 1977. Dictionary of Chinese Traditional Medicine. Shang Hai People's Press, Shang Hai, 141 pp.
 Katakawa, J., Tetsumi, T., Terai, T., Katai, M., Sakaguchi, K., Kusunoki, M., Sato, M., 2002. J. Chem. Crystallogr. 32, 39.
 Kasai, R., Suzuno, M., Asakawa, J., Tanaka, O., 1977. Tetrahedron Lett. 175.
 Lightner, D.A., Toan, V.V., 1987. Tetrahedron 43, 4905.
 Mabberley, D.J., 1997. The Plant-Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants. Cambridge University Press, Cambridge.
 Murakami, T., Maehashi, H., Tanaka, N., Satake, T., Kuraishi, H., Komazawa, Y., Saiki, Y., Chen, C.-M., 1985. Yakugaku Zasshi 105, 640.

いわゆる健康食品中から検出されたシルデナフィル構造類似体について

高橋 市長、長谷川 貴志、西條 雅明、永田 知子、若菜 大悟¹⁾、合田 幸広¹⁾

Identification of Sildenafil Analogues Found in a Dietary Supplement

Kazunaga TAKAHASHI, Takashi HASEGAWA, Masaaki SAIJO, Tomoko NAGATA, Daigo WAKANA¹⁾ and Yukihiro GODA¹⁾

要旨

平成21年度「違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業」において、試買した1製品からシルデナフィル構造類似体と思われる不明成分を検出した。HPLC-PDA、LC-MS、UPLC-PDA、DART-TOF-MS及びNMR分析の結果から当該不明成分は国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例のないメチソシルデナフィルであると判断した。

キーワード：健康食品、HPLC-PDA、LC-MS、NMR、シルデナフィル構造類似体、チオアイルデナフィル、メチソシルデナフィル

Keywords : dietary supplement, HPLC-PDA, LC-MS, NMR, sildenafil analogue, thioaildenafil, methisosildenafil

はじめに

近年、「いわゆる健康食品」において、実効性のある医薬品成分に該当する成分を入れた製品が出回る例が後を絶たず、特に強壯強精作用を謳った製品では、勃起不全(ED)治療薬の有効成分であるシルデナフィル、タダラフィル及びバルデナフィル^{1,3)}、あるいは、これらED治療薬の構造の一部を変更した構造類似体が頻繁に検出されている^{1,4-16)}。

千葉県では「違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業」の中で、これら違法に医薬品成分を添加した製品による健康被害の発生を防ぐため、試買検査を行っている。今回、平成21年度に試買した製品を検査する中で、1製品からチオアイルデナフィルとともに国内では「いわゆる健康食品」から検出された事例がないシルデナフィル構造類似体であるメチソシルデナフィルが検出されたので報告する。

材料と方法

1. 試料

平成21年度、違法ドラッグ対策事業及び無承認無許可医薬品取締事業において、インターネットで試買した製品のうち不明なピークを検出した製品で、剤形はカプセル剤、製品に記載されていた表示内容量は250mgであった。

2. 試薬及び試液

1) 標準品

ホモシルデナフィル及びホモチオデナフィルは国立医薬品食品衛生研究所からの分与品を用いた。チオアイルデナフィルは当該強壯成分が検出された製品から精製し、それを標準品として用いた。

2) その他の試薬

アセトニトリルはHPLC用及びLC-MS用、リン酸はHPLC用、1-ヘキサンスルホン酸ナトリウムはイオンペアクロマトグラフ用(いずれも、和光純薬工業社製)を用いた。重炭酸アンモニウムは関東化学社製の特級品を用いた。DMSO-*d*₆はISOTEC社製を使用した。水は日本ミリポア社製MILLI-Q Labo超純水製造装置により精製した超純水を用いた。その他の試薬はすべて和光純薬工業社製の特級品を用いた。

3. 標準溶液の調製

各標準品をメタノールに溶解させ調製した標準原液をメタノールで100 µg/mLに適宜希釈し調製した。

4. 試験溶液の調製

カプセル内容物約50mgを精密に量り取り、メタノール2 mLを加え5分間超音波抽出後、メンブランフィルター(日本ミリポア社製)でろ過したろ液をメタノールで10倍に希釈し、試験溶液とした。HPLC-フォトダイオードアレイ検出器(PDA)及びLC-MS用試験溶液調製の際は0.45 µm、Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC)-PDA用試験溶液調製の際は0.20 µmのメンブランフィルターを使用した。

5. HPLC-PDA分析

機器には、日本分光社製PU-2089型ポンプ、同AS-2055型オートサンプラー、同CO-2065型カラムオープン、同MD-2015型PDA検出器から構成される装置を用いた。測定条件は次の通りである。
カラム：TSK-GEL ODS 80-Ts (4.6 mm i.d.×150 mm、5 µm、東ソー社製)、カラム温度：40℃、移動相A液：アセトニトリル/水/リン酸混液(100:900:1、5 mmol/Lヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、移動相B液：アセトニトリル/水/リン酸混液(900:100:1、

1) 国立医薬品食品衛生研究所

5mmol/L ヘキサンスルホン酸ナトリウム含有)、グラジエント条件: 0分 (A:B=90:10) → 25分 (A:B=55:45) → 44-49分 (A:B=10:90)、流速: 1.0 mL/min、注入量: 20 μ L、測定波長: 200-400 nm (Max Absorbance)

6. LC-MS 分析

装置として Waters 社製 2695 型セパレーションモジュール及び同 ZQ4000 型質量分析計を用いた。測定条件は次の通りである。

カラム: Atlantis T3 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m, Waters 社製)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、移動相 A 液: 0.01 mol/L ギ酸アンモニウム (pH3.0)、移動相 B 液: アセトニトリル、グラジエント条件: 0分 (A:B=90:10) → 50分 (A:B=80:20) → 60-70分 (A:B=30:70)、流速: 0.3 mL/min、注入量: 1 μ L、イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 ポジティブモード、脱溶媒ガス流量: N₂ 800 L/hr、脱溶媒温度: 350 $^{\circ}$ C、コーン電圧: 30 V、測定質量範囲: m/z 100-800

7. UPLC-PDA 分析

装置として Waters 社製 AQUITY UPLC シリーズを用いた。測定条件は次の通りである。

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. \times 50 mm, 1.7 μ m, Waters 社製)、カラム温度: 40 $^{\circ}$ C、移動相 A 液: 10 mmol/L 重炭酸アンモニウム溶液 (pH10.0)、移動相 B 液: アセトニトリル、アイソクラティック条件: A:B=70:30、流速: 0.6 mL/min、注入量: 1 μ L、測定波長: 200-400 nm (Max Absorbance)、検出波長: 296 nm (メチルシルデナフィル)、347 nm (チオアイルデナフィル)

8. 単離・精製

カプセル内容物約 50 mg にメタノール 2 mL を加え 5 分間超音波抽出後、0.45 μ m メンブランフィルターでろ過し、抽出した液を分取 TLC に供した。分取 TLC は次の条件で行い、R_f 値 0.49 部分を掻き取った後、酢酸エチル 4 mL で抽出し、0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過を行った。

薄層板: Silicagel 60 F₂₅₄ 1 mm (Merck 社製)、展開溶媒: アセトン/イソプロパノール (4:1)、展開距離: 約 8 cm、検出法: 紫外線照射 (365 nm)

上記操作を複数回行い、集めたる液を減圧乾燥して不明成分 (4.6 mg) を得た。

9. Direct Analysis in Real Time (DART) -Time of Fly (TOF)-MS 分析

DART-TOF-MS 測定装置としてイオン源 DART (日本電子社製) に、質量分析計 JMS-T100 (日本電子社製) を連結したものを使用した。測定条件は次の通りである。

1) DART 条件

ポジティブモード、ガス流量: He 2.5 L/min、ガス温度: 250 $^{\circ}$ C、ニードル電圧: 2500 V、電極 1: 100 V、電極 2: 250 V

2) TOF-MS 条件

ポジティブモード、イオンガイド電圧: 500 V、リフレクトロン電圧: 950 V、オリフィス 1 電圧: 15 V、オリフィス 2 電圧: 5 V、リングレンズ電圧: 5 V、オリフィス 1 温度: 100 $^{\circ}$ C、測定範囲: m/z 200-700、質量校正: PEG600、内部標準物質: PEG600

10. NMR 分析

装置として、日本電子社製 ECA-800 を用いた。測定条件は次の通りである。

測定核種: ¹H 及び ¹³C、NMR 測定溶媒: DMSO-*d*₆、内部標準物質: テトラメチルシラン、測定法: ¹H-NMR (800 MHz)、¹³C-NMR (200 MHz)、¹H-¹H correlation spectroscopy (¹H-¹H COSY)、heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC)、heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC)、nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY)

結果及び考察

不明成分が検出された製品の試験溶液、ホモシルデナフィルとホモチオデナフィル混合標準溶液及びチオアイルデナフィル標準溶液の HPLC クロマトグラムと対応する UV スペクトルを Fig.1 に示した。当該製品のクロマトグラム上からはいくつかのピークが検出され、その中で 21.0 分のピーク (成分 1) はホモシルデナフィルとほぼ同様の UV スペクトルを示し、保持時間もホモシルデナフィルの保持時間 20.1 分とほぼ同様であった。また、30.1 分のピーク (成分 2) はホモチオデナフィル及びチオアイルデナフィルと同様の UV スペクトルを示し、保持時間もホモチオデナフィル (29.7 分) 及びチオアイルデナフィル (30.2 分) とほぼ同様であった。

LC-MS 分析では、成分 1 はマスペクトル上で m/z 489 に [M+H]⁺ イオンと思われるピークを示し、ホモシルデナフィルとほぼ同様のマスペクトルを示した (Fig.2A、C)。また、成分 2 はマスペクトル上で m/z 505 に [M+H]⁺ イオンと思われるピークを示し、そのマスペクトルはホモチオデナフィル及びチオアイルデナフィルと同様であった (Fig.2B、D、E)。

成分 1 がホモシルデナフィルであるか及び成分 2 がホモチオデナフィルまたはチオアイルデナフィルであるか判断するため、UPLC-PDA を用いたアイソクラティック分析を行った。UPLC-PDA 分析の結果、UV クロマトグラム上で、成分 2 は保持時間 2.3 分に検出され、チオアイルデナフィルと同様の保持時間を示し、ホモチオデナフィルの保持時間 3.3 分とは異なる保持時間を示した (Fig.3)。このことから、HPLC-PDA 分析及び LC-MS 分析の結果と併せて成分 2 はチオアイルデナフィルであると判断された。

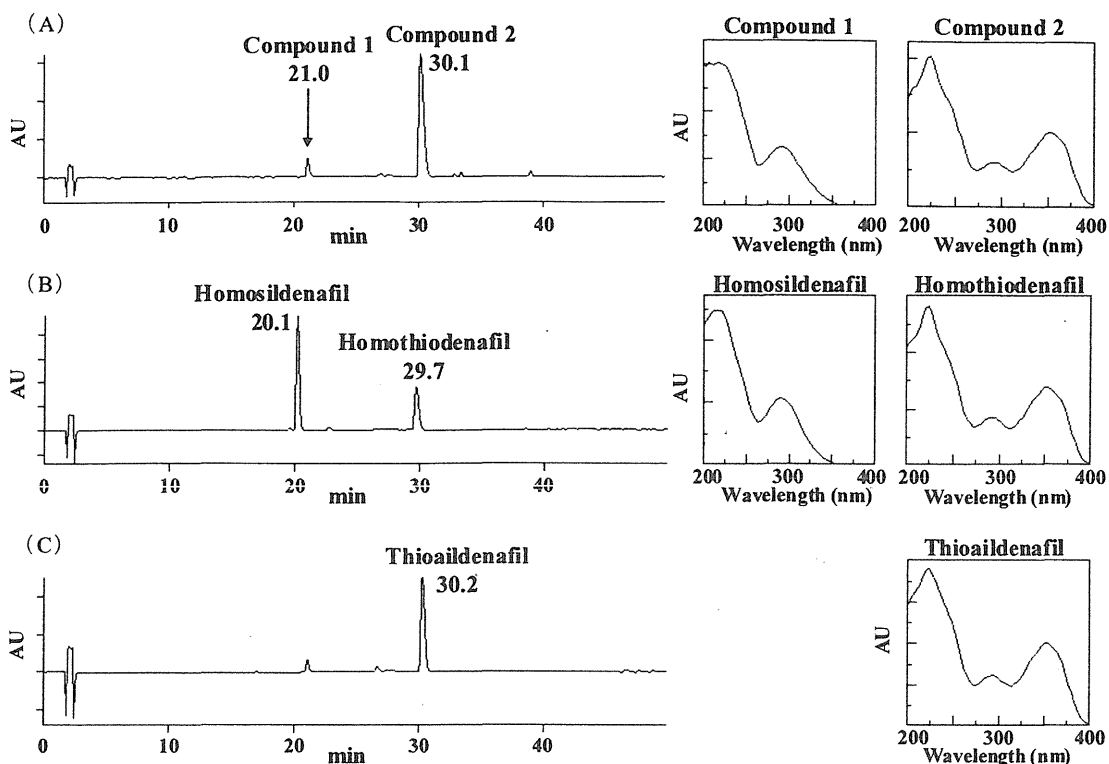


Fig.1. HPLC chromatograms and spectra of sample extract and standard solution
 $\lambda = 290 \text{ nm}$, (A) Sample extract, (B) Standard solution of homosildenafil (100 $\mu\text{g/mL}$) and homothiodenafil (100 $\mu\text{g/mL}$), (C) Standard solution of thioaildenafil (100 $\mu\text{g/mL}$)

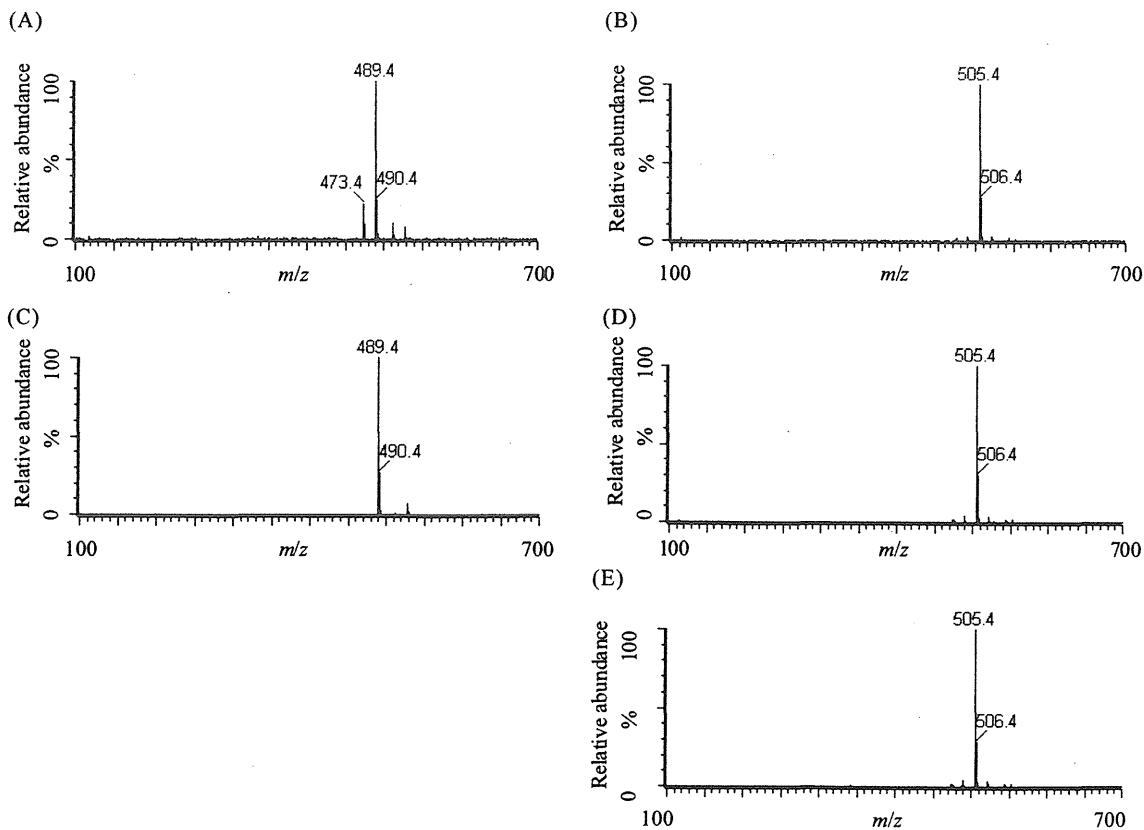


Fig.2. LC-ESI-MS spectra of the peaks in the MS chromatograms of sample extract and standard solution
 (A) compound 1, (B) compound 2, (C) homosildenafil, (D) homothiodenafil, (E) thioaildenafil

また、UPLC-PDA 分析において、成分 1 は保持時間 1.9 分に検出され、ホモシルデナフィルの保持時間 (3.0 分) とは異なる保持時間を示した (Fig.3)。そのため、成分 1 はホモシルデナフィルではないと判断された。

当該不明成分は、その UV スペクトルからシルデナフィル構造類似体であることが推測されたため、分取 TLC による単離・精製を行い、DART-TOF-MS 分析及び NMR 分析による構造解析を行った。分取 TLC により単離・精製を行ったところ、不明成分は白色の粉末であった。

不明成分を DART-TOF-MS で分析した結果、 m/z 489.2279 (Calcd 489.2284) に $[M+H]^+$ が得られ、分子式は $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ と推定された。また、 1H -NMR スペクトルから、 δ 4.16 (3H, s) よりメチル基、 δ 1.33 (3H, t, $J=6.9$ Hz)、 δ 4.20 (2H, q, $J=6.9$ Hz) よりエトキシ基、 δ 0.93 (3H, t, $J=7.5$ Hz)、 δ 1.73 (2H, qt, $J=7.5, 7.5$ Hz)、 δ 2.77 (2H, t, $J=7.5$ Hz) より *n*-プロピル基、 δ 7.37 (1H, d, $J=8.7$ Hz)、 δ 7.81 (1H, dd, $J=2.4, 8.7$ Hz)、 δ 7.83 (1H, d, $J=2.4$ Hz) より ABX タイプの芳香族水素の存在が示唆された (Table)。

一方、 ^{13}C -NMR スペクトルから、5つのメチル炭

素、1つのアルコキシ炭素 (δ 65.0) を含む5つのメチレン炭素、3つの芳香族炭素 (δ 130.0, 131.6 及び 113.4) を含む5つのメチン炭素、7つの芳香族四級炭素 (δ 145.1, 148.4, 138.0, 124.6, 126.6, 123.8 及び 159.9) 及びカルボニル炭素 (δ 153.9) の存在が示唆された (Table)。これら 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトルから得られるシグナルは、分子式 $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ を示しシルデナフィル構造類似体であるホモシルデナフィルのシグナル⁴⁾と類似していたが、ホモシルデナフィルに観察される *N*-エチルピペラジン環部分の *N*-エチル基のシグナルは観察されなかった。一方、同様に分子式 $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ を示し、ジメチルピペラジン環構造を有するシルデナフィル構造類似体のメチソシルデナフィルのシグナル¹¹⁾と不明成分のシグナルは非常によく類似しており、 1H -NMR スペクトルから、 δ 1.68 (2H, t, $J=10.7$ Hz) よりアキシアルのメチレン水素、 δ 3.45 (2H, dd, $J=2.0, 10.7$ Hz) よりエカトリアルメチレン水素、 δ 2.73 (2H, m) よりアキシアルのメチン水素と思われるシグナルが観察された。 1H - 1H COSY から H-25 (H-27) のメチン水素と H₂-24 (H₂-28) のメチレン水素、H₃-29 (H₃-30) のメチル水素の相関等がみられた (Fig.4)。

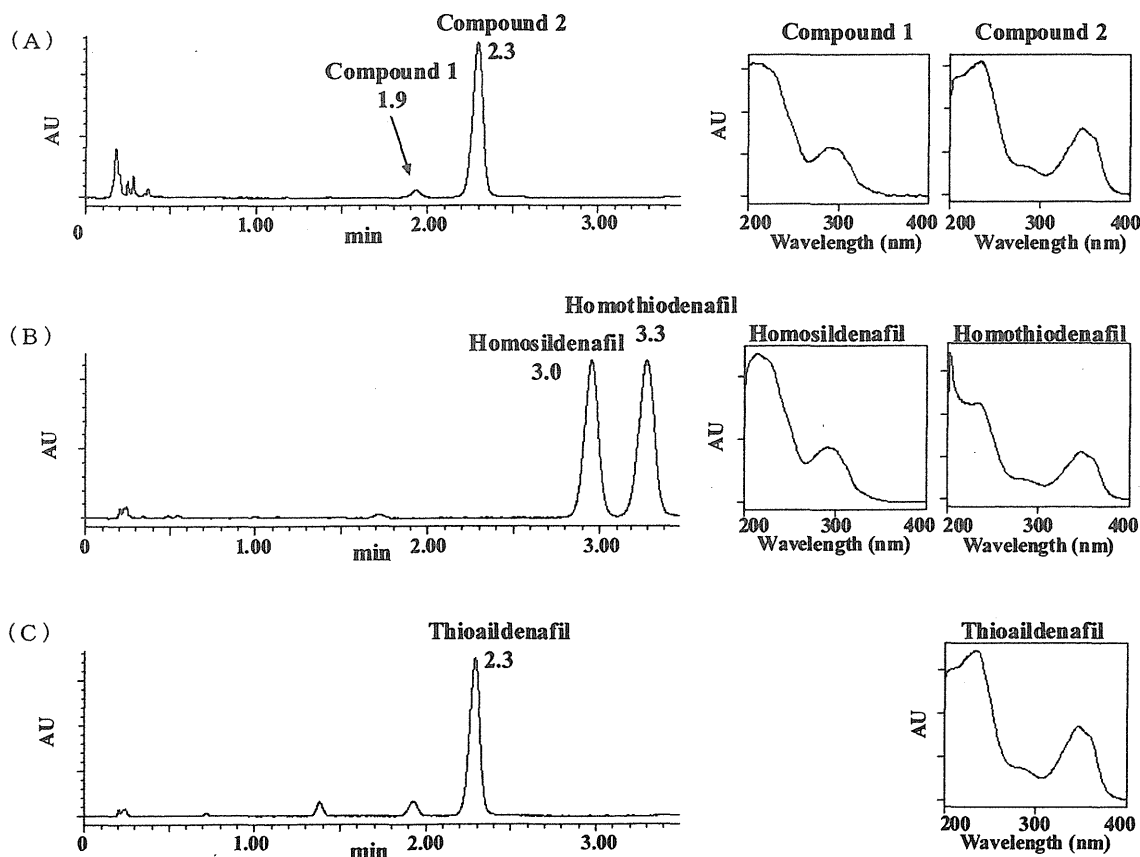


Fig.3. UPLC chromatograms and spectra of sample extract and standard solution
 $\lambda = 290$ nm, (A) Sample extract, (B) Standard solution of homosildenafil (100 μ g/mL) and homothiodenafil (100 μ g/mL), (C) Standard solution of thioildenafil (100 μ g/mL)

これらの結果とHMBCから不明成分はメチルピペラジン環以外はシルденаフィルと同様の構造で、ジメチルピペラジン環を有していると推定された (Fig.4)。また、NOESYからH-15のメチン水素とH₂-24 (H₂-28) のメチレン水素に相関がみられた (Fig.5)。このことから、ジメチルピペラジン環のメチレン炭素と結合した窒素原子と硫黄原子が結合しているものと推定された。以上の結果から、不明成分は1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]-sulfonyl]-3-(R), 5-(S)- dimethylpiperazine (メチソシルденаフィル) であると判断された (Fig.6)。

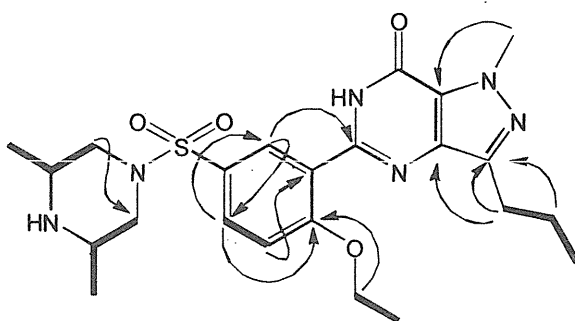
当該製品から検出されたチオアイルденаフィルとメチソシルденаフィルについて、UPLC-PDAを用いて定量を行った結果、含有量はそれぞれ48.2 mg/カプセル (166 µg/mg) 及び1.5 mg/カプセル (5.2 µg/mg) であった。

チオアイルденаフィルについては、近年、国内外で「いわゆる健康食品」から検出された事例が報告されており^{1, 15)}、シルденаフィルと類似の化学構造を有するため、当該物質を含有する「いわゆる健康食品」は無承認無許可医薬品として規制されている。メチソシルденаフィルは、国外では「いわゆる健康食品」から検出された事例が報告されているが^{10, 11)}、国内での検出事例は本件が初めてであった。このメチソシルденаフィルについても「専ら医薬品として使用される成分本質」に該当するものとの判断がされ、当該物質を含有する「いわゆる健康食品」は無承認無許可医薬品として規制されることとなった。

Table NMR data of the unknown compound

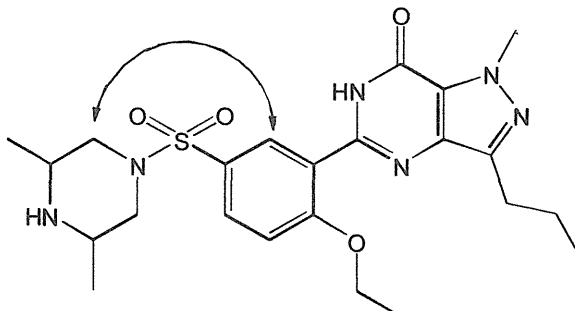
Position no.	measures	
	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	145.1	—
4	153.9	—
6	148.4	—
8	138.0	—
9	124.6	—
10 (3H)	38.0	4.16s
11 (2H)	27.4	2.77t (7.5)
12 (2H)	21.9	1.73qt (7.5, 7.5)
13 (3H)	14.0	0.93t (7.5)
14	126.6	—
15 (1H)	130.0	7.83d (2.4)
16	123.8	—
17 (1H)	131.6	7.81dd (2.4, 8.7)
18 (1H)	113.4	7.37d (8.7)
19	159.9	—
20 (2H)	65.0	4.20q (6.9)
21 (3H)	14.4	1.33t (6.9)
24/28 (4H)	52.0	1.68t (10.7) 3.45dd (2.0, 10.7)
25/27 (2H)	49.9	2.73m
29/30 (6H)	19.1	0.91d (6.4)

今回、「いわゆる健康食品」からチオアイルденаフィルに加えて、国内では検出されていなかったメチソシルденаフィルが新たに検出された。この様に、依然としてED治療薬類縁物質を「いわゆる健康食品」に添加する事例があることから、今後も新たなED治療薬類縁物質が検出される可能性を念頭において試験検査を行っていくことが必要であると考えられる。



— Important ¹H-¹H COSY correlations
 → Important HMBC correlations

Fig.4. Important ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of the unknown compound



↔ Important NOESY correlations

Fig.5. Important NOESY correlations of the unknown compound

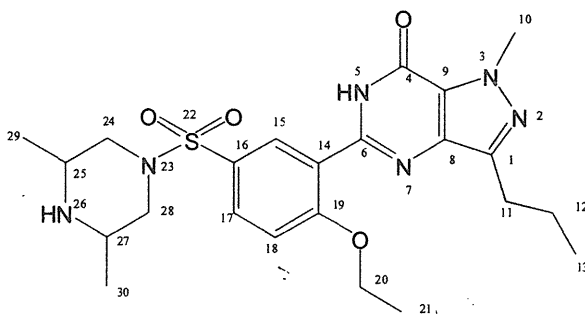


Fig.6. Chemical structure of methisosildenafil

文献

- 1) 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, 厚生労働省医薬食品局監査指導・麻薬対策課 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/musounin.html>)
- 2) 守安貴子, 重岡捨身, 岸本清子, 石川ふさ子, 中嶋順一, 上村尚, 他: 健康食品中に含有するシルデナフィルの確認試験, 薬学雑誌, 121, 765-769 (2001)
- 3) Zhu,X.,Xiao,S.,Chen,B.,Zhang,F.,Yao,S.,Wan,Z. et al.: Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry., *J.Chromatogr.A.*, 1066, 89-95 (2005)
- 4) Shin,M.H.,Hong,M.K.,Kim,W.S.,Lee,Y.J.,Jeoung,Y.C.: Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction., *Food Addit. Contam.*, 20, 793-796 (2003).
- 5) Blok-Tip,L.,Zomer,B.,Bakker,F.,Hartog,K.D, Hamzink, M.,Ten Hove,J et al.: Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products., *Food Addit. Contam.*, 21, 737-748, (2004).
- 6) Zou,P.,Hou,P.,Low,M.Y.,Koh,H.L.: Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product., *Food Addit. Contam.*, 23, 446-451 (2006).
- 7) Hou,P.,Zou,P.,Low,M.Y.,Chan,E.,Koh,H.L.: Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement., *Food Addit. Contam.*, 23, 870-875 (2006).
- 8) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.: Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a "natural" herbal dietary supplement., *J.Chromatogr.A.*, 1125, 67-75 (2006).
- 9) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.: Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement., *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 44, 887-93 (2007).
- 10) Reepmeyer,J.C.,Woodruff,J.T.,d'Avignon,D.A.: Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement., *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 43, 1615-1621 (2007).
- 11) Choi,D.M.,Park,S.,Yoon,T.H.,Jeong,H.K.,Pyo,J.S., Park,J. et al.: Determination of analogs of sildenafil and vardenafil in foods by column liquid chromatography with a photodiode array detector, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectrometry., *J.AOAC Int.*, 91, 580-588 (2008).
- 12) Hasegawa,T.,Saijo,M.,Ishii,T.,Nagata,T.,Haishima, Y.,Kawahara,N. et al.: Structural elucidation of tadalafil analogue found in a dietary supplement., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49, 311-315 (2008).
- 13) Zou,P.,Hou,P.,Oh,S.S.,Chong,Y.M.,Bloodworth, B.C.,Low,M.Y. et al.: Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements., *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 47, 279-284 (2008).
- 14) Hasegawa,T.,Takahashi,K.,Saijo,M.,Ishii,T., Nagata,T., Kurihara,M. et al.: Isolation and structural elucidation of cyclo-pentynafil and *N*-octylnortadalafil found in a dietary supplement., *Chem.Pharm.Bull.*, 57, 185-189 (2009).
- 15) Reepmeyer,J.C.,d'Avignon,D.A.: Structure elucidation of thio-ketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs., *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 49, 145-150 (2009).
- 16) Li,L.,Low,M.Y.,Aliwarga,F.,Teo,J.,Ge,X.W., Zeng,Y. et al.: Isolation and identification of hydroxythiohomosildenafil in herbal dietary supplements sold as sexual performance enhancement products., *Food Addit. Contam.*, 26, 145-151 (2009).

健康食品に使用されるパッションフラワーの基原種と成分について

(2010年8月25日受付)

(2010年10月28日受理)

鎌倉浩之^{a)}、丸山卓郎^{a)}、杉村康司^{b)}、飯田 修^{b)}、合田幸広^{a)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

b) 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

The source plants and the chemical composition of the passion flower products available as dietary supplements

(Received August 25, 2010)

(Accepted October 28, 2010)

Hiroyuki Kamakura^{a)}, Takuro Maruyama^{a)}, Koji Sugimura^{b)}, Osamu Iida^{b)}, Yukihiro Goda^{a)}

a) Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences

b) Tanegashima Division, Research Center for Medicinal Plant Sources, National Institute of Biomedical Innovation

Abstract

In our continuing research on guarantee for the safety of dietary supplements derived from medicinal plants, commercial passion flower products were investigated for their botanical origin on the basis of nrDNA ITS1 and cpDNA *trnL-F* IGS sequences, as well as with analyses of flavone glycoside and β -carboline alkaloid composition using LC-PDA-MS. Both nuclear and chloroplast DNA sequences well distinguished *P. incarnata*, from other species of the same genus, such as *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. quadrangularis* and others. Three ITS1 genotypes were found in passion flower products which were assigned to *P. incarnata*, *P. edulis* and *P. edulis* f. *flavicarpa* with reference to the sequences of referential *Passiflora* plants. Flavone glycoside composition showed the species- and forma-specific variation and the profile of each product supported the results of DNA sequence analyses. Fourteen passion flower products were analyzed for their source plant species, and were shown to be made from *P. incarnata* (nine samples) and *P. edulis* sensu lato (five samples) on the basis of the DNA and LC-PDA-MS analyses. Furthermore, β -carboline alkaloids such as harmine and harmaline which were reported as the constituents of *P. incarnata* were not detected in the products.

Plant materials legally restricted to medicinal use in Japan are specified by their scientific names and listed on the Pharmaceutical Affairs Bureau Notification. However, those for general herbal products are not specified. According to the results, plant material used for general herbal products are suggested to be specified by scientific names in order to ensure their safety.

Keywords: パッションフラワー、DNA 配列解析、LC-PDA-MS 分析、フラボン配糖体、nrDNA ITS1 領域
Passion flower, DNA analysis, LC-PDA-MS analysis, flavone glycosides, nrDNA ITS1 region

I 緒言

Passion flower は、European Pharmacopoeia (EP)¹⁾ において、*Passiflora incarnata* (和名: チャボトケイソウ) の地上部を乾燥させ、細断したものであり、1.5% 以上のフラボノイド (vitexin 換算) を含むと規定されている。日本国内において、passion flower は食薬区分上、「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) に記載されており²⁾、日本の健康食品市場では、主に鎮静及び睡眠誘導効果を期待し、単味あるいは

は *Valeriana officinalis* (セイヨウカノコソウ) などとの混合剤として流通している。しかし、*Passiflora* 属植物はおよそ 500 種からなり³⁾、現在においても *Passiflora* 属植物は、分類が混乱していることから、正しく *P. incarnata* が使用されているかは疑問である。また、先の非医薬品リストでは、passion flower は、トケイソウとして記載され、他名としてパッションフラワーが示されている。狭義のトケイソウは、*P. caerulea* を指すが、他名に示されるパッションフラワーは、上述の通り、EP では、*P. incarnata* を指すが、ブラジル薬局方では、*P. alata* が規定され、しばしばその代替として *P. edulis* が用

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 生薬部 合田幸広

Corresponding author: Yukihiro Goda, Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

いられている^{4,5)}。従って、現在の非医薬品リストに記載されるトケイソウは、*Passiflora* 属のどの種までを指すのか不明瞭である。また、*P. incarnata* には、monoamine oxidase (MAO) 阻害作用を持つ、 β -carboline 系のアルカロイドを含有するという報告もある⁶⁾ ことから、その安全性についても注意を要する。そこで本研究では、健康食品として流通する passion flower 製品の品質調査を目的に、DNA 塩基配列解析による基原種鑑別及び機器分析による含有成分調査を行った。

II 研究方法

1. 実験材料

Passiflora 属植物試料は、(独) 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株式会社山科植物資料館より分譲を受けた 28 検体を用いた (Table 1)。市場流通品については、インターネット上の販売店より購入した passion flower 関連製品 14 検体を用いた (Table 2)。その内訳は、カプセル剤 3、エキス剤 1、チンキ剤 2、茶葉等 8 で

ある。この内、チンキ剤は、DNA 塩基配列解析を行うことが難しいと思われたため、成分分析のみを行った。

LC-PDA-MS 分析に用いた各フラボノイド化合物 isoorientin (1), orientin (2), vitexin (3), isovitexin (4) 及び vitexin-2''-O-rhamnoside (5) の標品は、EXTRASYTHESE 社より、luteolin (6), hyperoside (7) 及び rutin (8) の標品は、和光純薬工業社よりそれぞれ購入した。また、 β -carboline 誘導体、harmine 及び harmaline の標品は、和光純薬工業社よりそれぞれ購入した。

2. 実験方法

2-1. 塩基配列解析

各試料を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉砕した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、genomic DNA を抽出、精製した。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 及び葉緑体 DNA, *trnL* (UAA) 3'-exon 及び *trnF* (GAA) 領域に保存性の高い配列に設計した各プライマー対を用いて、PCR を行うことにより、核 rDNA の ITS 領域 (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 及び葉緑体 DNA の *trnL*-F inter genic

Table 1. Details of referential *Passiflora* plants used in this study

Sample no.	Voucher no.	Scientific name	Conservation	Donor
Pa-1	S115	<i>P. caerulea</i>	TNGSM ^{*1}	Departamento de Botanica, PORTUGAL
Pa-2	S176	<i>P. caerulea</i>	TNGSM ^{*1}	Lushan Botanic Garden, CHINA
Pa-3	S26-1	<i>P. edulis</i>	TNGSM ^{*1}	Pharmazeutisches Institut der Universitat Kiel, D-24118 Kiel, Gutenberstr. 76, GERMANY
Pa-4	S288-1	<i>P. edulis</i>	TNGSM ^{*1}	Ogrod Botaniczny Univ. Warszawskiego, POLAND
Pa-5	S288-2	<i>P. edulis</i>		
Pa-6	S288-3	<i>P. edulis</i>		
Pa-7	S288-4	<i>P. edulis</i>		
Pa-8	S288-5	<i>P. edulis</i>		
Pa-9	S238-1	<i>P. quadrangularis</i>	TNGSM ^{*1}	Universität Tübingen Botanischer Garten, GERMANY
Pa-10	S238-2	<i>P. quadrangularis</i>		
Pa-11	S238-3	<i>P. quadrangularis</i>		
Pa-12	S238-4	<i>P. quadrangularis</i>		
Pa-13	S238-5	<i>P. quadrangularis</i>		
Pa-14	S58-1	<i>P. incarnata</i>	TNGSM ^{*1}	The Medic. Herb Garden at the Univ. of WA., USA
Pa-15	S58-2	<i>P. incarnata</i>		
Pa-16	S58-3	<i>P. incarnata</i>		
Pa-17	S58-4	<i>P. incarnata</i>		
Pa-18	S58-5	<i>P. incarnata</i>		
Pa-19	None	<i>P. edulis</i> cv. rubin star	TNGSM ^{*1}	Cultivar
Pa-20	None	<i>P. edulis</i> cv. summer queen	TNGSM ^{*1}	Cultivar
Pa-21	None	<i>P. edulis</i> cv. F1	TNGSM ^{*1}	Cultivar
Pa-22	None	<i>P. edulis</i> Tanegashima native strain-1	NIHS ^{*2}	Cultivar
Pa-23	None	<i>P. edulis</i> Tanegashima native strain-2	NIHS ^{*2}	Cultivar
Pa-31	None	<i>P. rubra</i>	NSY ^{*3}	Unknown
Pa-32	None	<i>P. incarnata</i>	NSY ^{*3}	Unknown
Pa-33	None	<i>P. vitifolia</i>	NSY ^{*3}	Unknown
Pa-34	None	<i>P. suberosa</i>	NSY ^{*3}	Unknown
Pa-35	None	<i>P. edulis</i>	NSY ^{*3}	Unknown

*1: Tanegashima division, Research center for medicinal plant resources, National Institute of Biomedical innovation

*2: Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences

*3: Nippon Shinyaku Institute for Botanical Research

Table 2. Details of passion flower products used in this study

Sample no.	Product name		Product form
	On internet	On package	
Pak-1	Passion flower extract	Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Capsule
Pak-2	Passion flower	Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Capsule
Pak-3	Passion flower · herb tea undiluted solution	Simple extract Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Tincture
Pak-4	Tokei-so* (passion flower) extract	Passion flower extract	Capsule
Pak-5	Tokei-so* capsule	Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Capsule
Pak-6	Tokei-so* tincture	Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Tincture
Pak-7	Organic passion flower	Organic passion flower	Leaf
Pak-8	Organic herb passion flower	Organic passion flower	Leaf
Pak-9	Passion flower	no text	Stem and leaf
Pak-10	Passion flower, <i>Passiflora incarnata</i> , organic	Passion flower	Leaf
Pak-11	[Organic] passion flower	Organic passion flower	Leaf
Pak-12	Passion flower	Organic passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Leaf
Pak-13	Passion flower herb tea (straight)	Passion flower (<i>Passiflora incarnata</i>)	Stem and leaf
Pak-14	Passion flower (organic)	Passion flower · organic	Stem and leaf

*: "Tokei" and "so" mean clock and herb in Japanese, respectively. "Tokei-so" indicates *Passiflora* spp.

spacer (IGS) 領域 (*trnL* (UAA) 3' exon-IGS-*trnF* (GAA)) を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、GoTaq Green Master Mix (Promega) を用い、以下の温度プログラムにより行った: 95°C, 2 min; (95°C, 30 sec; 50°C, 30 sec; 72°C, 45 sec) 40 cycles; 72°C, 5 min。得られた PCR 産物を、Montage-PCR (Millipore) により精製した後、ダイレクトシーケンスへと供した。Cycle sequencing 反応には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、解析は、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラム⁷⁾ を用いて行い、分子系統樹は、neighbor-joining (NJ) 法⁸⁾ により作成した。遺伝距離の算出は、Kimura's two parameter model⁹⁾ により行った。ただし、*P. incarnata* の ITS 配列は、ITS1 領域の末尾に adenine の homopolymer が存在し、以降の配列の解析が、ダイレクトシーケンスでは困難であったことから、分子系統樹の作成も含め、以降の解析には ITS1 領域のみを用いた。なお、プライマーは、White ら¹⁰⁾、Taberlet ら¹¹⁾ の報告にあるもの及び独自に設計したものをを用いた: ITS-S1, 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; ITS-AS1, 5'-GTA GTC CCG CCT GAC CTG-3'; *trnL*-e, 5'-GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC-3'; *trnL*-f, 5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3'。

2-2. LC-PDA-MS 分析

1) 試料調製

Passiflora 属植物試料は、可能なものは粉末 0.1 g (一部試料では 0.1 g 未満) をねじ口試験管にとり、メタノール 5 mL を加え、10 分間振とう抽出した。遠心分離後、上清を分取した。さらに、同様に抽出操作を 2 回行った後、分取した上清を合わせ、減圧下濃縮した。残渣に 1 mL のメタノールを加え溶解し、LC-PDA-MS 分析を行った。市場流通品に関しては、カプセル入り 4 検体は内容物 0.1 g を、乾燥植物を細断したと思われる 8 検体については粉末とした後、その

0.1 g をねじ口試験管にとり、植物試料の場合と同様に操作し、試料溶液を調製した。チンキ剤 2 検体については、減圧濃縮後、メタノールを加え振盪混和後遠心分離し、その遠心上清を分析に用いた。

2) 分析条件

既報^{5), 12-13)} の分析条件を参考に、以下の装置、条件により行った。

装置

LC 部に Shimadzu Prominence UFLC を配した Shimadzu LCMS-2010EV 質量分析計 (島津製作所) を用いた。

測定条件

カラム: Hypersil Gold C18 (1.9 μm), 2.1 mm × 50 mm (Thermo Fisher Scientific)、40°C

移動相: A 液 (0.1% ギ酸溶液); B 液 (0.1% ギ酸アセトニトリル溶液)

グラジエント条件: initial (%B = 10) - 20 min (%B = 40) - 30 min (%B = 80) - 50 min (%B = 80)

流速: 0.3 mL/min

フォトダイオードアレイ検出器 (PDA): 200 ~ 600 nm、1.2 nm 間隔でスキャン

注入量: 1 μL

インターフェース電圧: 4.5 kV

CDL 電圧: -20 V

CDL 温度: 250°C

ヒートブロック温度: 200°C

イオン化法: ESI ポジティブ

検出器: 100 ~ 1,000 amu を 2,000 amu/s でスキャン

III 研究結果

1. 塩基配列解析

Passiflora 属植物試料の塩基配列解析結果を基に作成し

た分子系統樹を Figs. 1, 2 に、また、多重配列解析を Figs. 3, 4 に示した。どちらの領域においても、それぞれの種に特徴的な配列を示し、塩基配列解析による基原種鑑別が可能であると思われた。この内、Pa-2 は、*P. caerulea* として導入したが、*trnL-F* IGS の塩基配列からは、*P. edulis* であることが示唆された。*P. edulis* として導入した 12 検体及び Pa-2 は、*trnL-F* IGS 領域において、同一の塩基配列を示したが、ITS1 領域においては、3 つの遺伝子型 (type 1 ~ 3) に分類された。その内部配列及び各試料の帰属を Table 3 にまとめた。Type 1 の配列を示したのは、Pa-3 ~ Pa-8, Pa-22, 23 だった。Type 2 の配列を持つものは、Pa-35 だった。Type 3 は、丁度、type 1 と type 2 の配列の混合物の配列を示し、この配列を持つものは、Pa-2, Pa-19 ~ Pa-21 だった。なお、同一系統の複数個体を解析した Pa-4 ~ Pa-8 (*P. edulis*), Pa-9 ~ Pa-13 (*P. quadrangularis*), Pa-14 ~ Pa-18 (*P. incarnata*) は、*trnL-F* IGS, ITS1 配列のどちらも、個体間の違いは認められなかった。

市場に流通する passion flower 製品の塩基配列解析では、液体試料である Pak-3 と Pak-6 を除く、12 検体を解析した。その結果、エキス由来の記載があった Pa-1, 4 からは、PCR 産物が得られなかった。塩基配列解析が可能だった残りの 10 検体の内、Pak-2, 5, 9 の 3 検体は、商品記載の *P. incarnata* ではなく、*P. edulis* を原料としていることが示された。これらの検体の ITS1 塩基配列は、Pak-2, 9 が、*P. edulis* type 1, Pak-5 が、*P. edulis* type 2 だった (Table 3)。その他の 7 検体は、商品記載の通り、*P. incarnata* を原料とし

ていることを示す結果が得られた。

2. LC-PDA-MS 分析

2-1. プロファイルデータの作成

K. Dhawan らの総説³⁾において、*Passiflora* 属植物の含有フラボノイドとして報告されている化合物群の内、1 ~ 6 の 6 化合物及び EP の確認試験において参照化合物とされている 7, 8 について、プロファイルデータを作成した。各化合物の保持時間 (Rt) 及び疑似分子イオン $[M+H]^+$ の質量荷電比 m/z はそれぞれ、1, Rt 6.6 min, m/z 449; 2, Rt 6.9 min, m/z 449; 3, Rt 8.3 min, m/z 433; 4, Rt 8.6 min, m/z 433; 5, Rt 8.5 min, m/z 579; 6, Rt 14.6 min, m/z 287; 7, Rt 8.6 min, m/z 465; 8, Rt 8.6 min, m/z 611 であった。1 ~ 8 および関連化合物の構造式等を Fig. 5 に示した。

これらの m/z 値の他に、今回試験に供した *Passiflora* 属植物において、種特異的な分布を示したピークの m/z 値 (563, 577, 271 及び 287) を選び、マスクロマトグラム (MC) を作成した。さらに、フラボノイドは UV 260 及び 340 nm 付近に吸収極大を持つことから、最も広く炭化水素化合物を検出すると考えられる UV 205 nm に加え、UV 260 及び 340 nm の 3 波長のクロマトグラムを作成した。

2-2. *Passiflora* 属植物試料

Passiflora 属植物試料から得られた代表的なクロマトグラムを Fig. 6 に示した。*P. caerulea* として導入された Pa-1, 2 では、Pa-1 において、1, 2 及び 4 に対応するピークが確認さ

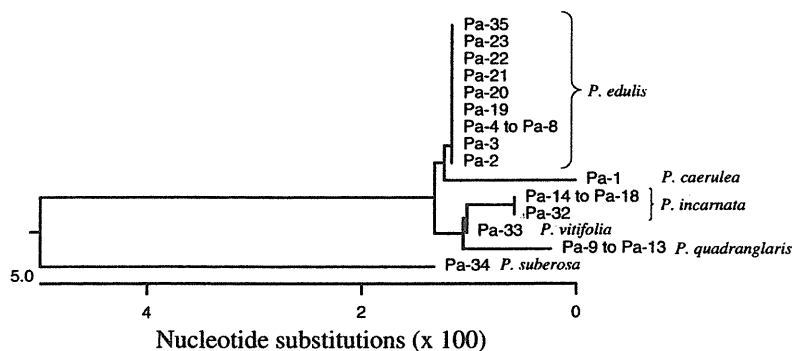


Fig. 1. NJ tree constructed from the *trnL-F* IGS sequences of *Passiflora* plants

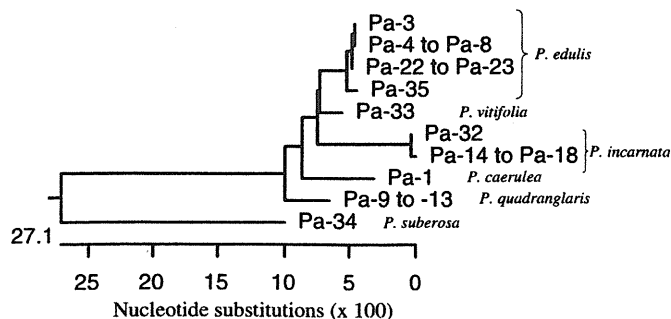
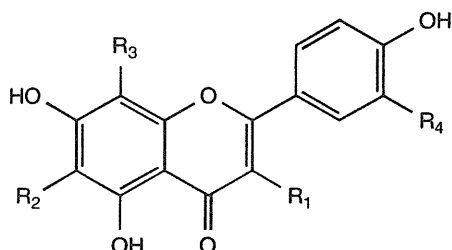


Fig. 2. NJ tree constructed from the ITS sequences of *Passiflora* plants

Table 3. ITS genotypes with 10 nucleotide substitutions observed in this study

Genotype	Nucleotide position										Samples	
	95	142	161	213	360	424	554	555	564	571	Referential	Commercial
Type 1	A	G	Y	C	A	A	C	C	T	G	Pa-3 to Pa-8, Pa-22, 23	Pak-2, Pa-9
Type 2	C	A	C	T	G	G	T	T	C	A	Pa-35	Pak-5
Type 3	M	R	Y	Y	R	R	Y	Y	Y	R	Pa-2, Pa-19 to Pa-21	

M: A/C, R: A/G, Y: C/T



Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Formula	MW
Apigenin	H	H	H	H	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270
Luteolin (6)	H	H	H	OH	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286
Quercetin	OH	H	H	OH	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302
Vitexin (3)	H	H	O-glc	H	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	432
Isovitexin (4)	H	O-glc	H	H	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	432
Orientin (2)	H	H	O-glc	OH	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	448
Isoorientin (1)	H	O-glc	H	OH	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	448
Hyperoside (7)	O-gal	H	H	OH	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	464
Vitexin-2''-Rha (5)	H	H	*	H	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₄	578
Rutin (8)	O-rutinosyl	H	H	OH	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₅	610

*: 2-rhamnosyl-glucosyl

Fig. 5. Chemical structures of the C-flavone glycoside markers (1-6), EP reference compounds, hyperoside (7) and rutin (8), and their aglycons

れ、さらに 12.8 min (m/z 563, $[M+H]^+$) にピークを認めた。一方、Pa-2 では、1 ~ 4 に対応するピークがわずかに認められる程度であり、その他に 10.5 min (m/z 563, $[M+H]^+$), 13.1 min (m/z 579, $[M+H]^+$; m/z 433, base peak), 13.4 min (m/z 563, $[M+H]^+$) にピークが確認されるなど、Pa-1 とは異なった成分プロファイルを示し、後述する *P. edulis* の栽培品種 (Pa-19 ~ Pa-21) に良く似たパターンを示した。

P. edulis として導入された Pa-3 ~ 8 及び Pa-22, 23 の 8 試料では、1 ~ 4 に対応するピークが検出されず、別に 12.7 min (m/z 577, $[M+H]^+$), 15.7 min (m/z 563, $[M+H]^+$) にピークが認められた。

P. quadrangularis として導入された Pa-9 ~ 13 の 5 試料では、2 及び 3 に対応するピークがわずかに認められた他、8.4 min (m/z 565, $[M+H]^+$) のピークに加え、マススペクトルにおいて base peak が m/z 421 または 423 を示し、特徴的な UV 吸収を持たない保持時間 19 ~ 24 min に存在する複数のピークが確認された (Fig. 6, Pa-10, 矢印)。

P. incarnata として導入された Pa-14 ~ 18, Pa-32 の 6 検体では、1 ~ 4 に対応するピークが確認され、また 7.8 min (m/z 595, $[M+H]^+$) にピークが認められた。

P. edulis の栽培品種である Pa-19 ~ 21 の 3 検体では、*P. edulis* として導入された Pa-3 ~ 8 及び Pa-22, 23 の 8 試料とは異なるプロファイルを示した。即ち、1 ~ 4 に対応するピークは、わずかに認められる程度であり、それ以外に 10.5 min

(m/z 563, $[M+H]^+$), 13.1 min (m/z 579, $[M+H]^+$; m/z 433, base peak), 13.4 min (m/z 563, $[M+H]^+$) にピークが確認された。さらに Pa-35 の *P. edulis* では、Pa-19 ~ 21 及び Pa-3 ~ 8, Pa-22, 23 の 11 試料のいずれとも異なるプロファイルを示した。従って、*P. edulis* として導入された 12 試料は、3 type (Type 1, Pa-3 ~ Pa-8, Pa-22, Pa-23; Type 2, Pa-35; Type 3, Pa-2, Pa-19 ~ Pa-21) の成分プロファイルに分類された。

2-3. Passion flower 製品

Passion flower 製品から得られた代表的なクロマトグラムを Fig. 7 に示した。Pak-1, 5, 6 は、互いに類似したプロファイルを示し、Pa-35 に比較的類似したものであった。Pak-2, 9 は Pa-3 ~ 8 (*P. edulis*) の 6 試料と類似性の高いプロファイルであった。Pak-3, 4, 7, 8, 10 ~ 14 の 9 検体は、pak-4 を除き Pa-14 ~ 18, 32 (*P. incarnata*) の 6 試料との高い類似性が認められた。Pak-4 に関しては、保持時間 10 min までは他の 8 検体及び 6 試料と類似したプロファイルを示したが、それ以降に他の試料及び検体には認められないピークが検出された。このものは、製品中にカモミールやセントジョーンズワート等も含まれており、そのため、保持時間 10 min 以降のプロファイルに違いがみられたと考えられた。

なお、 β -carboline 系のアルカロイドについては、harmine, harmaline を標品として、その保持時間及び質量数に基づきピーク同定を試みたが、いずれの *Passiflora* 属植物試料及び passion flower 製品からも該当ピークは、検出されなかった (検出限界: harmine, 48 pg; harmaline, 45 pg; S/N 3)。

IV 考察

Passiflora 属植物試料のうち、*P. caerulea* として導入した Pa-2 は、塩基配列解析の結果、*P. edulis* の type 3 に分類される配列を示した。Pa-2 は、同じく *P. caerulea* として導入した Pa-1 と、葉の形状が大きく異なっており、Pa-1 が、*P. caerulea* の特徴である¹⁴⁾ 5 深裂の葉を持つのに対し、Pa-2 は、*P. edulis* や *P. racemosa* の特徴である¹⁵⁾ 3 深裂した葉を有していた。従って、塩基配列解析の結果も考え合わせると、Pa-2 は、*P. edulis* の誤同定ではないかと推察される。このことは、成分プロファイル分析の結果からも支持された。

P. edulis として導入された 12 試料は、ITS1 塩基配列において、3 つの遺伝子型に分類された (Table 3)。また、成分プロファイルからも 3 つのタイプに分類され (Table 4; type 1 ~