

現、ほぼ長軸方向に配列、茎、葉軸に認められた気孔よりも径は大きかった。副細胞は主として 5~6 個。毛およびその脱落した痕はほとんど見られなかった。表皮細胞の平均径はアレキサンドリアセンナで約 36 μ m、チンネベリセンナで約 40 μ m を示した。表皮細胞の径にばらつきが大きかったが、測定に用いた表皮細胞の約 60%は、気孔よりも大型であった (Table1. Table2.)。

2.2.4 小葉 (Fig. 7-2)

粉末となった茎や葉軸の中に小葉の粉末が混入している場合も想定し、形状の再確認を行なったところ、センナ葉の特徴とされてきた多角形の表皮細胞¹¹⁻¹⁴⁾のほか、細胞壁が入り組み波型を呈した細胞が観察された。小葉の表皮細胞を Fig. 7-2 に示す。

アレキサンドリアセンナでは、上面表皮 (epd) 下面表皮 (epb) 共に、葉身全体に広く波型の細胞が認められた。多角形の表皮細胞は、主脈をはじめとする各葉脈付近で認められ、葉脈上は、長軸方向に長い長方形の細胞よりなっていた。葉脈部を除き多数の気孔が認められた。気孔の配列に方向性はなく、多くは、孔辺細胞に平行な 2 個、または大小異なる 3 個の副細胞により囲まれていた。毛の基部に隣接する細胞は放射状に配列しており、周囲の細胞とは形状を異にしていた。

チンネベリセンナでは、主として多角形の表皮細胞が観察されたが、葉縁部でわずかに細胞壁にやや入り組みのある波型の細胞が、認められた。葉脈上の表皮細胞は長軸方向に長い長形の細胞からなっていた。葉脈部を除き、多数の気孔を認めた。配列に方向性はなく、2~3 個の副細胞に囲まれていた。

2.2.5 果実 (Fig. 7-3)

果実には特殊な形態を示す要素が多いため、実際の鑑別の際には、表皮以外の要素が重要となる可能性が高い。表皮細胞を鑑別に用いる機会は少ないと思われるが、参考として果皮表皮の写真を Fig. 7-3 に示した。

2.2.6 葉軸の表皮細胞と形態が類似する細胞 (Fig. 8, Fig. 9)

前項までに各部位の特徴的な表皮細胞の形態を掲げ、葉軸の表皮細胞の形態が他と明らかに差があることを示してきたが、一方で葉軸の表皮細胞と類似した形態を示す細胞も多く認められた。粉末となった試料では、組織片はさまざまな角度で出現するため、その由来を正しく判定するためには、各部位の細胞の特徴をしっかりと把握しておくことが重要である。そこで、破片となった際、出現状態が葉軸の表皮細胞と類似すると思われる組織について写真を掲げ、鑑別の際の注意点を挙げた。Fig. 8-1 は葉軸の特徴となる、典型的な表

皮細胞を示した写真である。

表面視が葉軸の表皮と類似していた組織: 茎、果軸、小葉葉脈に由来する表皮に、長軸方向に長い細胞よりなる部位を認めたが、いずれも気孔の分布が少なかった。茎に気孔が認められる際には、その周辺に、方形~等径性多角形の表皮細胞が認められる点で区別が可能である (Fig. 8-2-(1))。果軸は気孔のみでなく毛の分布も少なかった。細胞の大きさにばらつきが見られた (Fig. 8-2-(2))。小葉に気孔が認められる際には、副細胞は主として 2~3 であった (Fig. 8-2-(3))。

縦断面が葉軸の表皮と類似していた組織: 茎や果軸の皮層の柔細胞、厚角組織、師部、放射組織などが、長軸方向に長く、類似の形状を示したが、いずれも気孔、毛およびその脱落した跡は認められない点で判別が可能である。細胞中にシュウ酸カルシウムの結晶やでんぷん粒 (sta) など内容物を認めることがあった (Fig. 9-1,2)。

2.2.7 小括

以上、葉軸の表皮と類似する細胞が認められる組織は多岐にわたっていたが、いずれも気孔の分布が非常に少ないことが明らかとなった。従って、粉末状態となった製品中に葉軸が混入していることを鑑定する際には、気孔を伴った表皮片を指標とすることにより、より正確に判定することが可能となるものと考えられた。なお、葉軸に由来する表皮であっても、背軸側に由来する表皮は気孔が少ない。葉軸由来の表皮であっても気孔を認めない場合があることを付記する。

2.3 粉末中に出現する表皮細胞の把握

予め、各部位の組織をできる限り細かく分けて作成した粉末を用い、出現する要素の特徴を把握したうえで、茎および葉軸の粉末を作成し、各要素の出現状態を確認した。さらに、茎および葉軸の混合粉末を作成して、表皮の破片を中心に観察を重ね、由来の判定の可否について検討を行なった。

2.3.1 粉末における各組織の出現状況 (Fig. 10)

アレキサンドリアセンナの茎、葉軸の粉末中に出現した組織片を Fig. 10 に示す。茎、葉軸共に最も多量に出現したのは柔細胞の破片 (p) で、髄 (m) に由来するものは大型であった。繊維 (fb) は主として数本が束となり、大型の組織片として認められた。各種道管 (vc, vd, vg, vs, vr) の破片も確認しやすい組織片である。単独で出現するほか他の道管や柔細胞を伴っていることが多かった。茎、葉軸で出現する道管の種類、量などに大きな差はみられなかったが、径の細い螺旋紋道管や環紋道管などは、葉軸に多く見られた。小さな破片ではあったが、H の字型を呈する厚角組織 (co) も比較的目立つ組織であった。毛は剛毛 (hb) の破片が出現し、確認が容

易であったが、円形の腺毛(hg)は確認が困難であった。葉軸の組織で葉緑体を伴う破片が多く出現した。

表皮(ep)の破片は出現頻度が少ないものの、比較的確認しやすい要素であった。破片は、主として表面視で出現、茎では方形〜ほぼ等径性の多角形の細胞が連なった破片として認められた。気孔(sto)を伴わない破片として出現することが多く、また結晶細胞列をなす方形の細胞が表皮細胞とよく似た形状を示すので、結晶の有無や、気孔、毛、毛の脱落跡などを確認し、表皮の破片を判定した。葉軸では長方形〜長六角形の細胞からなり、破片中に1〜2個の気孔を伴うものが多かった。葉緑体を伴い緑色の破片として出現することが多かったが、大型の細胞よりなることがあり、破片中の細胞数が10に満たないことも多かった。

なお写真には示さなかったが、果軸の粉末についても検討を行なった結果、出現した組織の種類は茎、葉軸とほぼ同様であった。表皮片の形状は葉軸のものに類似していたが、気孔や毛、毛の脱落跡などを伴い出現するものは、ごくわずかであった。

2.3.2 茎、葉軸を混合した粉末における表皮細胞の出現状況と由来する部位の判定 (Fig. 11)

表皮がほぼ等量出現するよう、茎と葉軸を混合して作成した粉末について、出現した表皮の破片の一部を Fig. 11 に示す。

観察開始より順次確認できた30個の表皮の破片について、各々10個の表皮細胞の径を測定したところ、全ての細胞の径が気孔の平均的な径と考えられる30 μm 以下であった破片が12個、反対に全ての細胞が30 μm 以上であった破片が10個、8〜9細胞が30 μm 以上であった破片が3個確認された。

前者12個の破片は、いずれも方形〜等径性の表皮細胞からなり、各破片で測定した細胞の径の平均は、おおむね15〜20 μm を示し、気孔よりも小型であったことから、茎に由来する表皮片と判定した (Fig. 11-1)。後者13個の破片は長方形〜長六角形の表皮細胞からなる破片で、平均径はおおむね40〜60 μm を示し、気孔よりも大型の細胞よりなっていた。複数の気孔を伴う破片も見られたことより、葉軸に由来する表皮片と判定した (Fig. 11-2)。これらの特徴は、粉末を作成する前に予め観察しておいた表皮の特徴とも一致した (Fig. 11-3)。

今回観察した組織片において、表皮細胞と気孔の大きさの関係から判定した由来部位は、表皮細胞の形状から判定した由来部位とよく一致していた。気孔より大型の細胞よりなる破片で、気孔を伴わないものについては、葉軸以外の組

織に由来する可能性があるため、判定には用いなかった。今回判定に用いなかった破片は30個のうち5個、従って出現した表皮片の約8割の破片において、由来の判定が可能であると考えられた。さらに葉軸5%を含有する、茎と葉軸の混合粉末についても検討を行なったところ、気孔を伴う葉軸の表皮片を確認することが可能であった。

以上の結果、試料が粉末となっている場合、表皮細胞の形および大きさを確認することで、由来する組織の鑑別が可能であることが明らかとなった。センナ茎の粉末を鏡検した際、気孔を伴う表皮の破片で、長方形〜長六角形の表皮細胞からなり、かつそれらの長軸方向の径が気孔(孔辺細胞)の径よりも大きいものが多く認められる場合には、葉軸組織の混入が推定される。

考察

植物の茎のように縦方向に長く伸びる組織では、その方向に長い細胞からなることが多い。センナ茎の場合も、多くの組織は長軸方向に長い細胞よりなっていたが、表皮細胞においては、長軸方向の径が短く、等径性のものが多く認められ、センナ茎の特徴と考えられた。観察する部位により、長軸方向に長い細胞が連なる部分も認めたが、その様な細胞からなる部位には、気孔がほとんど分布しておらず、前者との区別が可能であった。一方、葉軸の表皮細胞は主として長軸方向に長く、気孔の分布が多い点で、茎の表皮との区別が可能であった。なお、気孔の分布状態は Stomatal Index により表されることが多いが、本報においては、最終的に粉末の組織片を鑑定することが目的であること、組織内に気孔の分布状態が異なる部位が混在することなどの理由から、Stomatal Index は用いず、写真により、気孔の出現状態を把握できるよう考慮した。以上、茎および葉軸の特徴は、以下のようにまとめることができる。

茎では1. 規則的に気孔が分布する部位があり、この部位は、ほぼ方形〜等径性多角形の表皮細胞より形成されている。2. 気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は、ほとんど全て、近接した気孔(孔辺細胞)の径より小さい。葉軸では、1. 主として長軸方向に長い長方形〜長六角形の表皮細胞より形成されている。2. 気孔周辺の表皮細胞の長軸方向の径は近接した気孔よりも大きい。

これらの特徴はアレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナに同様に見られ、種にかかわらず認められる特徴である。また栽培地を種子島より世田谷に移した後に発生した枝葉から得られた試料、乾燥した標本より得られた試料にも同様の

傾向が見られた。詳細については今回記事を省いたが、栽培の条件、保管の状態によらず認めることのできる特徴であるといえる。従って、気孔を伴った表皮片を鑑別の指標とし、形状および表皮細胞と気孔の大きさの関係に着目することにより、粉末状態となった場合にも容易に由来を鑑別することが可能であると考えられた。表皮細胞の特徴を把握しておくことは、センナ茎の粉末に混入した小葉や、小葉の粉末に混入した茎や葉軸についても、鑑別を可能とするものと考えられる。また同属の、*C.alata* や *C.corymbosa* の小葉の表皮細胞の形態が、アレキサンドリアセンナやチンネベリセンナと異なることが報告⁹⁾されていることから、茎および葉軸についても相違が見出だせるものと推察される。同属植物を含め、夾雑物のある検体の鑑別を可能とすることを目標に、様々な検体を入し検討していくことが、今後の課題と考えられる。

センナの茎および葉軸を形態的に判別する試みは各所により行なわれてきたものと思われるが、これまで鑑別のための基準となる資料が示されていないため、本研究のまとめとして、外部形態の特徴も含め、鑑別のための要点を Table 3. に示した。

謝辞

本研究を行うにあたり、実験材料としてセンナの標本をご供与くださいました、富山大学和漢医薬学総合研究所小松かつ子先生に深謝いたします。本研究は、厚生労働科学研究費補助金により行なわれたものであり、関係各位に深謝する。

List of Abbreviations

ca: clustered crystal, cf: crystal fiber, co: collenchyma, collenchymatous cell, cs: solitary crystal, cx: cortex, ep: epidermis, epb: abaxial epidermis, epd: adaxial epidermis, fb: fiber bundle, hb: bristle hair, hg: glandular hair, m: medulla, md: midrib, mes: mesophyll, p: parenchyma, parenchymatous cell, pa: palisade tissue, pfs: simple perforation, ph: phloem, r: ray, sp: spongy tissue, sta: starch grain, sto: stoma, v: vessel, vb: vascular bundle, vc: scalariform vessel, vd: bordered pit vessel, vs: spiral vessel, vg: ring vessel, vr: reticulate vessel, x: xylem

References

- 1) The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition (Ministry Notification No.285), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, (Mar. 31, 2006).
- 2) 独立行政法人国民生活センター報告(2005.9.7) ダイエットなどをうたった「健康食品」～センナ茎を使った茶類を中心に～
- 3) Yokota Y., Terasaki S., Tsuno T., Annual Report of Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research, **32**, 45-51 (2005).
- 4) Morikawa M., Kosaka T., Nakamura K., Annual Report of Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, **18**, 66-69 (2006).
- 5) Ishii T., Saijo M., Hasegawa T., Takahashi K., Nagata T., Abstracts of papers, 45th Annual Meeting of Zenkoku Eisei Kagaku Gijutu Kyogikai, Saga, Nov. 2008, pp.203-204.
- 6) Suzuki Y., Aragane M., Yoshizawa M., Kitagawa S., Shioda H., Satou Y., Kishimoto K., Mori K. and Ogino S., Abstracts of papers, 45th Annual Meeting of Zenkoku Eisei Kagaku Gijutu Kyogikai, Saga, Nov. 2008, pp.205-206.
- 7) Kojima T., Kishi M., Sekita S. Satake M., J. Food. Hyg. Soc. Japan, **41**, 303-306 (2000).
- 8) Takahashi M., Miyazawa M., Sakurai K., Watabe K. and Kojima T., J. Food. Hyg. Soc. Japan, **50**, 297-303 (2008).
- 9) Takanashi M., Sakai E., Tanaka T., Maruyama Y., Arai M., Morinaga H., Abstracts of papers Vol.2, 128th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, Mar. 2008, p.4.
- 10) A Dictionary of Botanical Terms, Hirokawa Publishing Co., Tokyo (1991.11).
- 11) Heber W. Y., "Textbook of Pharmacognosy", 6th ed., The Blakiston Company, Philadelphia, 1950, pp. 459-465.
- 12) Betty P. J. and Derek W. S. "Atlas of Microscopy of Medical Plants Culinary Herbs and Spices", CRC Press, Inc., N.W., 1990, pp. 214-215.
- 13) Fujita M., "Shoyakugaku," Nanzando, Tokyo, 1957, pp. 220-222.
- 14) 徐国鈞ら, "中国薬材学", 中国医薬科技出版社, 北京, 1996, pp. 879-881.

Table 3. Morphological characteristics of stems, leaf rachises and fruit axes of senna

Observation	Characteristics	Stems	Leaf rachises	Fruit axes ^{*5}
	Appendage and trace	alternate leaves (petioles), buds	opposite leaflets (petiolules)	alternate fruits (pedicels)
Macroscopic	Illustrated shape ^{*1}			
	Shape of the epidermal cells near the stoma ^{*2}	square - isodiametric polygonal	oblong - long polygonal	oblong - long polygonal
	Appearance frequency of stoma	+	+++	±
Epidermis	Comparison of the diameters ^{*3}	E<S	E>S	E>S
	Numbers of subsidiary cells (cells adjoining the stoma)	4-6	4-6	4-6
	Appearance frequency and types of hairs	++ (hb, hg)	+++ (hb, hg)	± (hb, hg)
Microscopic	Collenchyma Appearance frequency	±	+	+
	Appearance configuration ^{*1}	circularly	circularly	circularly
	Fiber bundle Number of fibers	+++ (cr)	+	-
	Wall thickness	++	++	±
	Vascular bundle Appearance configuration ^{*1}	circularly	discretely	circularly
	Types of vessels ^{*4}	vc, vd, vg, vs, vr	vc, vd, vg, vs, vr	vd, vg, vs
	Crystal	ca (m), cr (cf, p)	ca (p), cr(cf)	ca (p), cr (fb)

*1: Transverse section. *2: Surface view of the epidermis collected by exfoliation.

*3: Comparison of the longitudinal axis diameters of the epidermal cells (E) and stomatal cell (S). (See the Table1.)

*4: The main types were indicated by boldfaces. *5: The axis of inflorescence in a fruting stage.

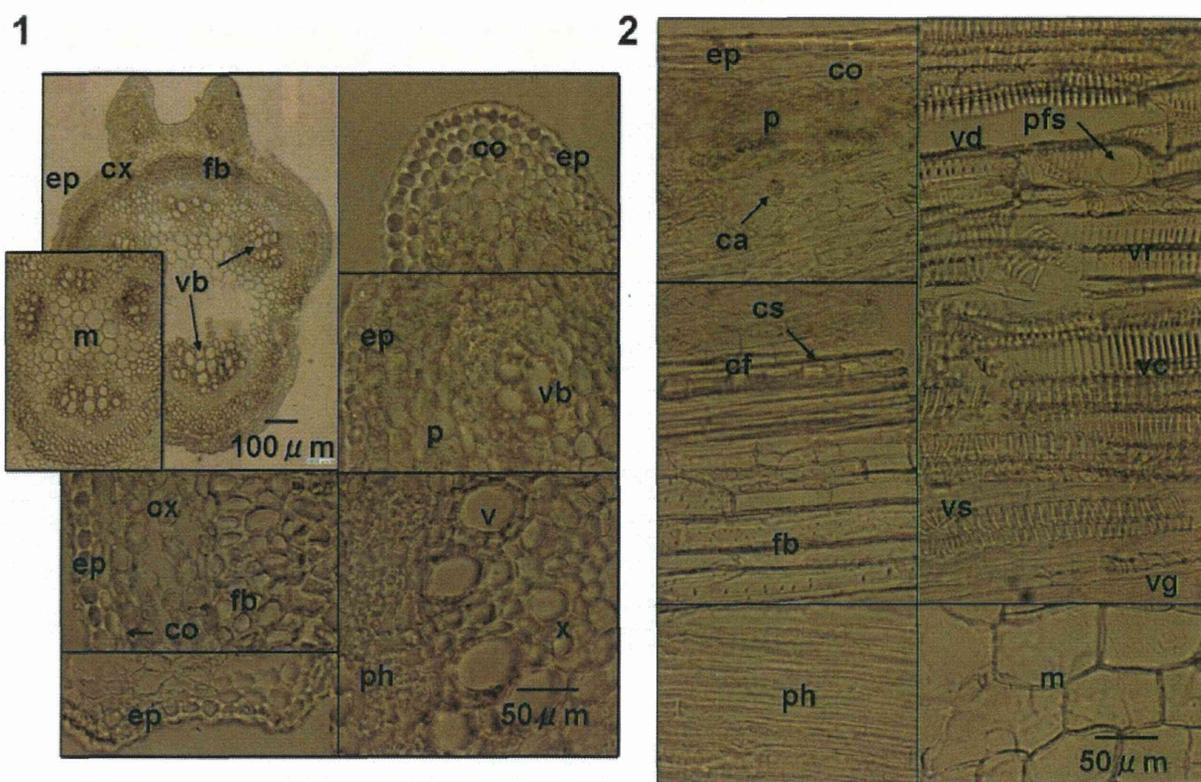


Fig.3 Morphological characteristics of the central part of the leaf rachis of Alexandrian senna

1: General view and enlarged view of transverse sections. Two ridges are existed in the adaxial side. 2: Longitudinal sections

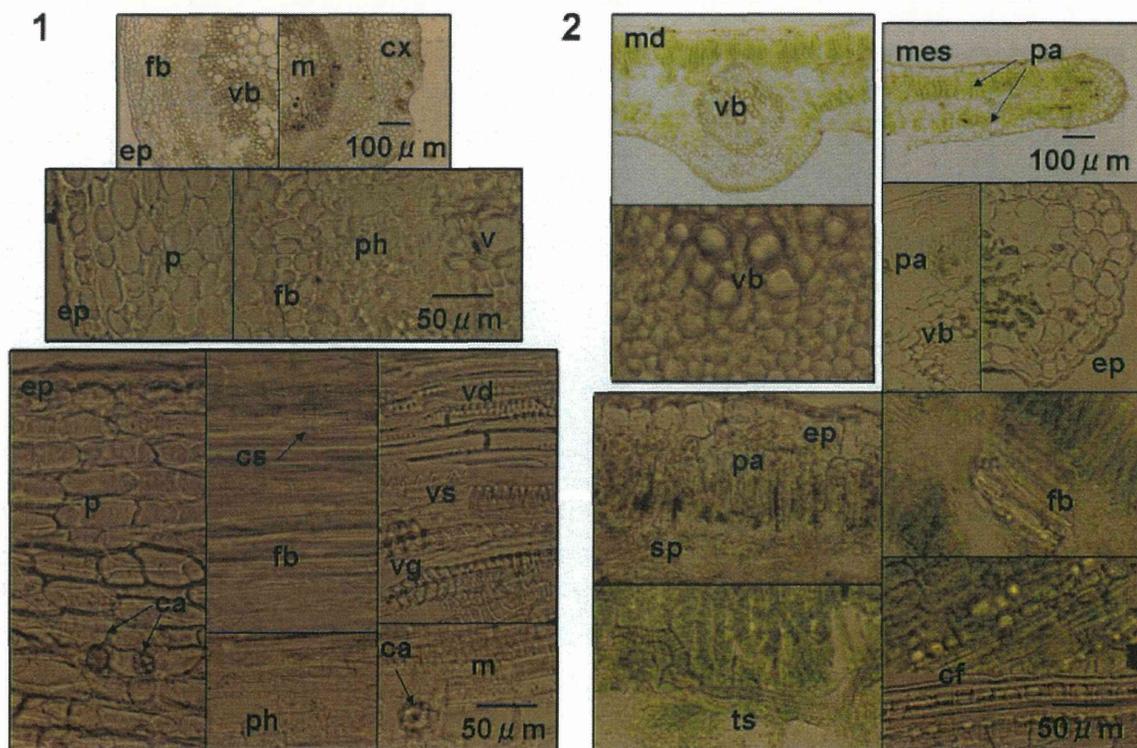


Fig.4 Morphological characteristics of the fruit axis and leaflet of Alexandrian senna

1: Transverse sections and longitudinal sections of the fruit axis 2: Transverse sections of the leaflet

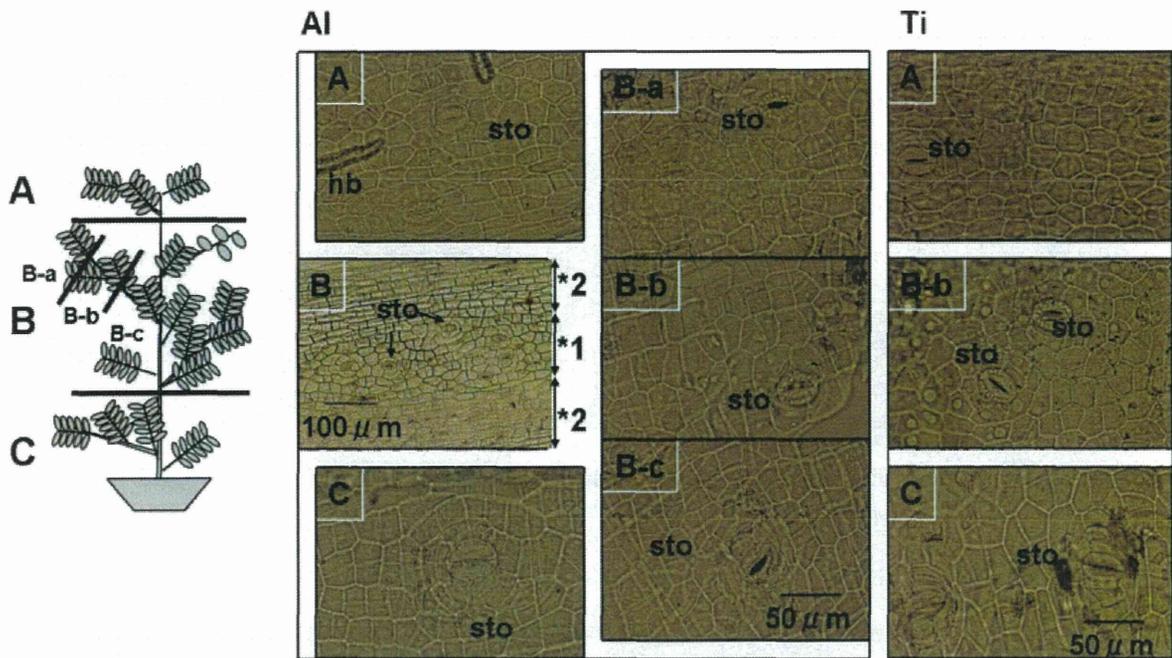


Fig.5 Morphological characteristics of epidermis in the stomata distributional region from the stem of Alexandrian senna (Al) and Tinnevelly senna (Ti)

The stems are collected from the plant parts designated by letters of the alphabet in the schematic illustration. Microscopic photographs indicate surface view of the epidermis collected by exfoliation. Almost all stomata orient the long axis direction.

*1: stomata distributional region in epidermis *2: stomata non-distributional region in epidermis

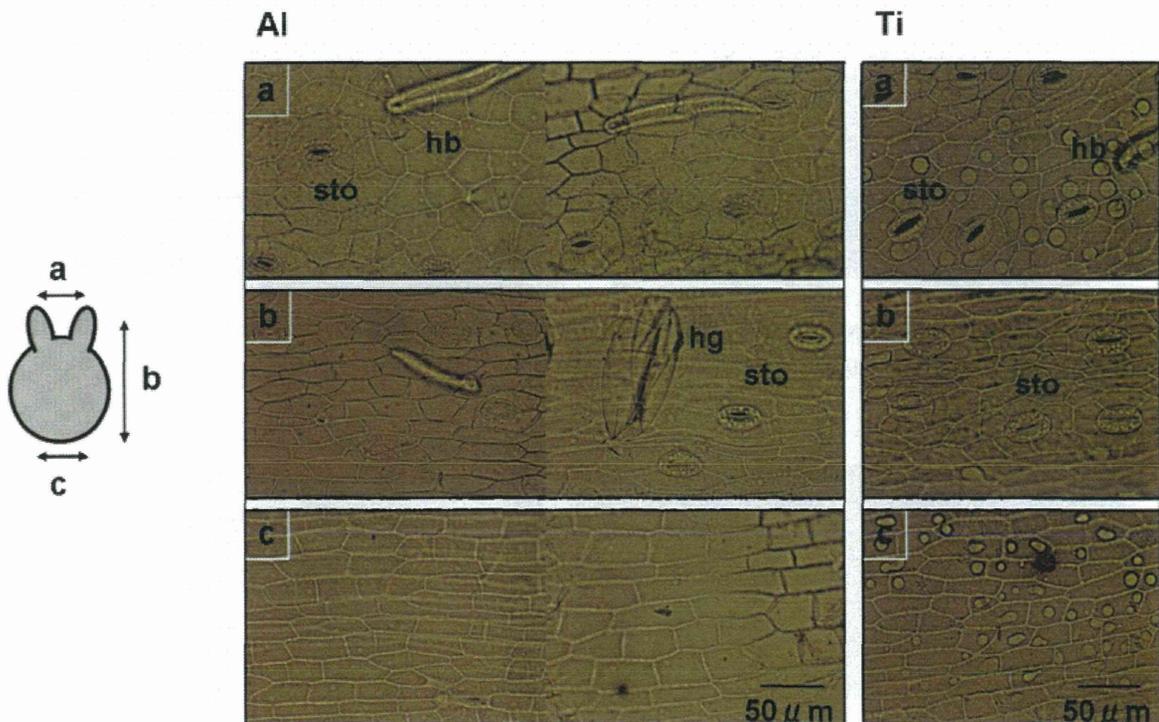


Fig.6 Morphological characteristics of epidermis from the leaf rachis of Alexandrian senna (Al) and Tinnevelly senna (Ti)

The transverse section image of leaf rachis is illustrated in the left. (See the photograph of Fig.3-1.)

The three parts of epidermis as shown a-c in the illustration were collected by exfoliation and analysed by microscopy.

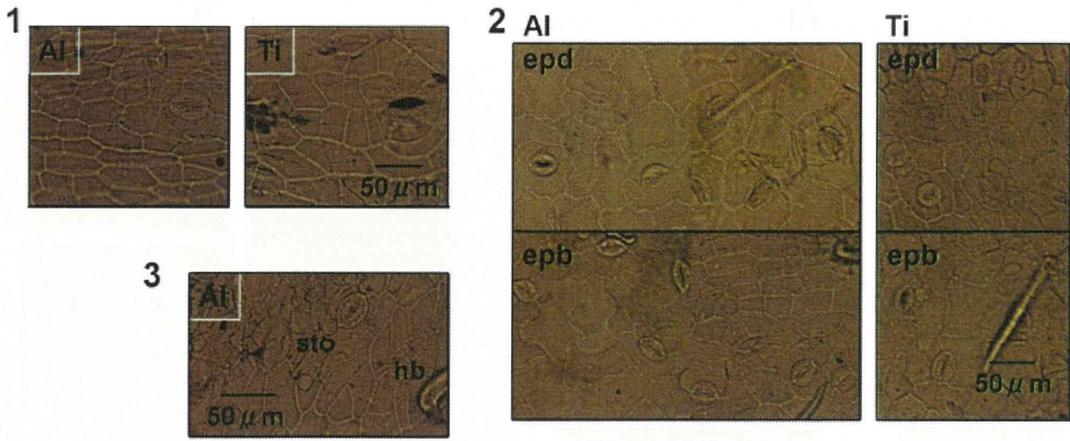


Fig.7 Morphological characteristics of surface view of epidermis from fruit axis (1), leaflet (2) and pod (3) of Alexandrian senna (Al) and Tinnevelly senna (Ti)

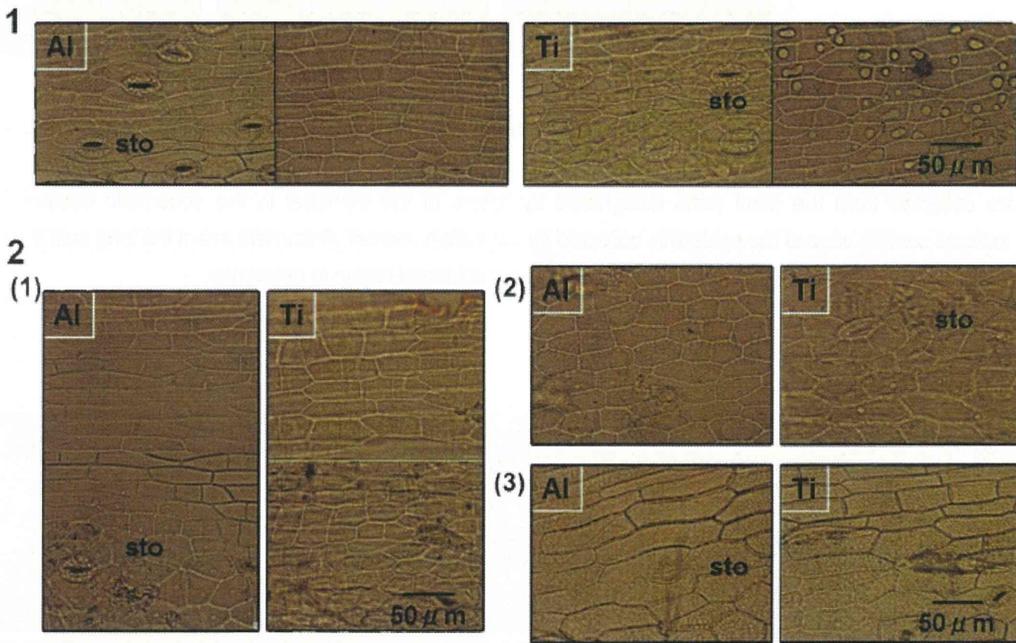


Fig.8 Surface views of typical epidermal cells from leaf rachis (1) and their ressembler from stem (2-1), fruit axis (2-2) and leaflet (2-3) of Alexandrian senna (Al) and Tinnevelly senna (Ti)



Fig.9 Mistakable cells appeared in the longitudinal sections to epidermal cells from stem (1), and fruit axis (2) of Alexandrian senna

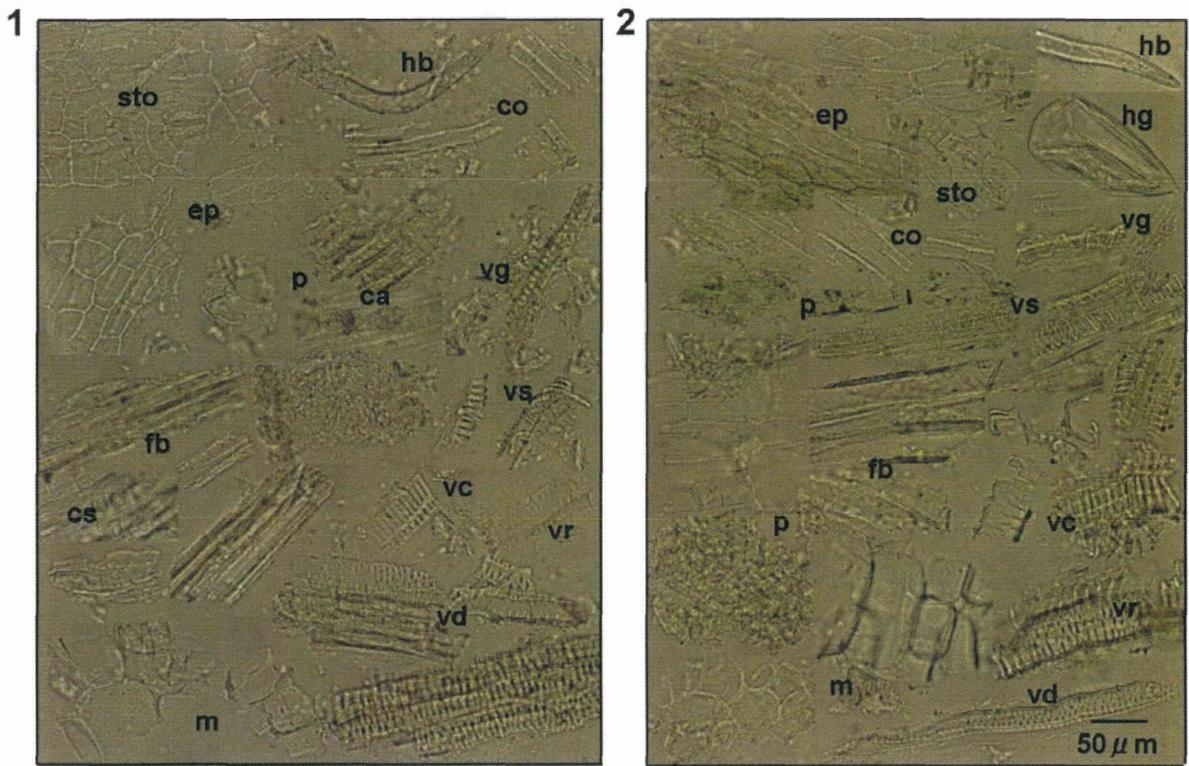


Fig.10 Characteristic elements from the powdered stem and leaf rachis of Alexandrian senna

1: Powdered stem of senna 2: Powdered leaf rachis of senna

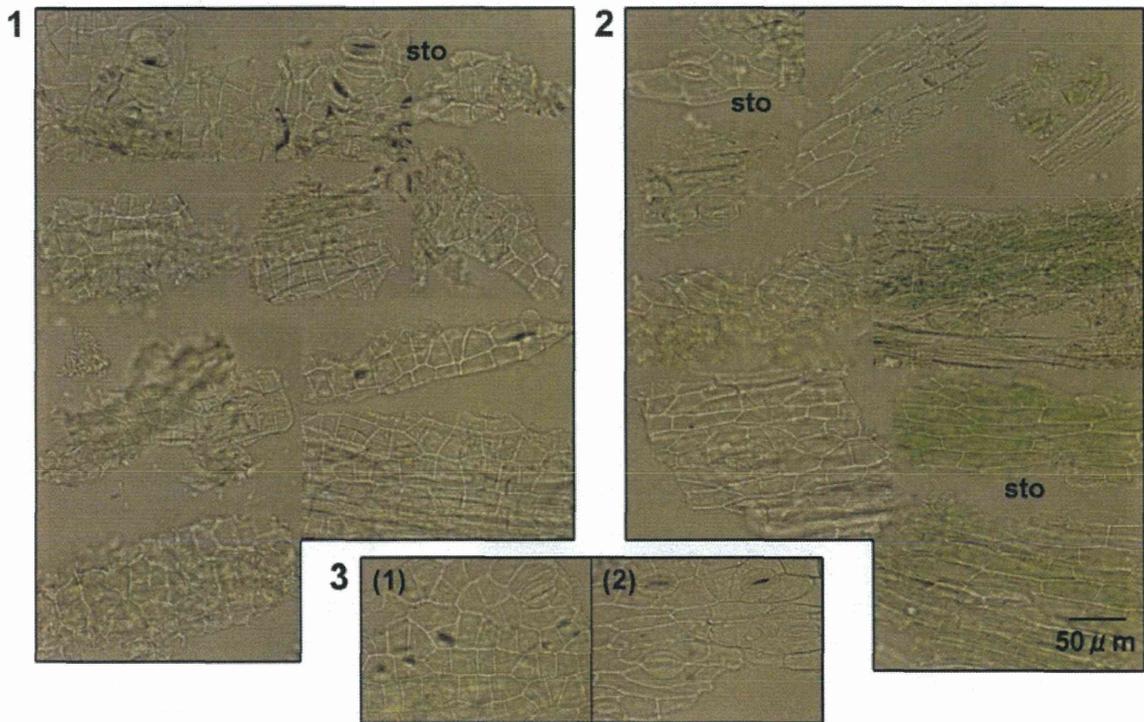


Fig.11 Observed elements in the powdered test sample from the mixture of stem and leaf rachis of Alexandrian senna

1: Elements identified as epidermis of the stem 2: Elements identified as the epidermis of leaf rachis

3: Reference epidermis from stem (1) and leaf rachis (2)

Identification of Mutaprodenafil in a Dietary Supplement and Its Subsequent Synthesis

Yosuke DEMIZU,[#] Daigo WAKANA,[#] Hiroyuki KAMAKURA, Masaaki KURIHARA, Haruhiro OKUDA, and Yukihiro GODA^{*}

National Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan.

Received June 16, 2011; accepted July 12, 2011; published online July 14, 2011

We isolated a new illegal sildenafil analogue named mutaprodenafil from a dietary supplement for erectile dysfunction (ED) and proposed that it is an aildenafil derivative containing an imidazole moiety. We subsequently synthesized mutaprodenafil from a thioaildenafil and authenticated its structure.

Key words aildenafil prodrug; sildenafil analogue; mutaprodenafil; phosphodiesterase-5 inhibitor; erectile dysfunction

In recent years, we have seen a dramatic increase in the consumption of dietary supplements along with the rise in the public's awareness of health matters. However, some of these products are illegally advertised as being effective for male sexual enhancement. Among these products, most are adulterated with synthetic compounds, such as sildenafil, vardenafil, and tadalafil, which are active ingredients used for the treatment of penile erectile dysfunction (ED), and their analogs or other unapproved phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors.^{1–14} In the last year, a new illegal sildenafil analogue was isolated from a dietary supplement for ED. It was reported that the compound is converted to aildenafil, a structural analogue of sildenafil,¹⁵ under physiological acidic conditions.¹⁶ Recently, Venhuis's group reported its structural determination, mainly based on a detailed discussion of the results of MS analyses, and concluded that it was a nitrosated prodrug (A) of aildenafil (Fig. 1A).¹⁶ We have also independently isolated the same compound from a dietary supplement and analyzed its structure. Most of our analytical data (1D-, ¹H-, ¹³C-NMR, and LC-MS spectra) matched Ven-

huis's data, and we predicted the structure to be an aildenafil derivative (Table 1). However, our proposed structure (Fig. 1B) was different from that of A.

The critical discussion points regarding the compound's structure are as follows: 1) The three carbons outside of the aildenafil moiety must be located in positions appropriate to their ¹³C chemical shifts (δ_C 150.1, 139.2, 115.2) because the chemical shifts assigned to the positions in the structure of A are abnormal. 2) The observed heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) correlations between the imino proton at δ_H 3.78 and the two carbons at δ_C 115.2 and δ_C 139.2 must be explained by the proposed structure. 3) The observed two paired N-HMBC correlations, namely, those between the methine proton at δ_H 7.86 or the imino proton at δ_H 3.78 and the nitrogens at δ_N 177.0 and δ_N 252.0, must be explained. 4) The structure must also satisfy the 2D INADEQUATE (the Incredible Natural-Abundance Double-Quantum Transfer Experiment) findings for the compound, which showed correlations between the carbons at δ_C 150.1 and δ_C 115.2. As shown in Fig. 2, our proposed structure completely satisfies all of these critical points.

Considering these results, we firmly believe that the structure of the isolated aildenafil derivative is as illustrated in Fig. 1B, and hence, contains an imidazole moiety. Therefore, we synthesized compound 1 to confirm its structure.

We were able to synthesize 1 as follows (Chart 1): A mixture of thioaildenafil (25 mg, 0.05 mmol),¹⁷ 5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole (8.0 mg, 0.05 mmol), and anhydrous sodium acetate (4.1 mg, 0.05 mmol) in 0.5 ml dimethylsulfoxide was stirred at 100 °C for 2 h.¹⁸ The reaction mixture was then poured into water, extracted with CHCl₃, and dried

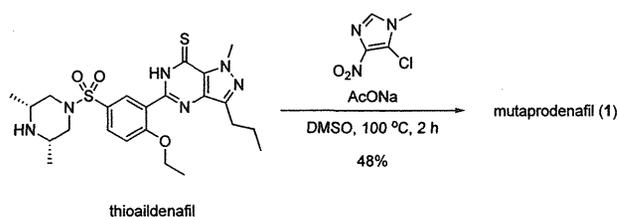


Chart 1. Synthesis of Compound 1

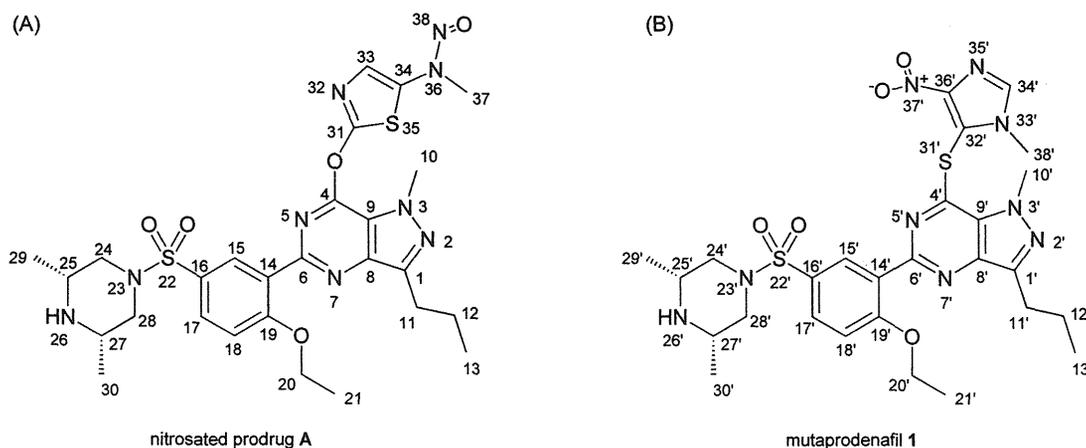


Fig. 1. Proposed Chemical Structures of the New Aildenafil Derivative

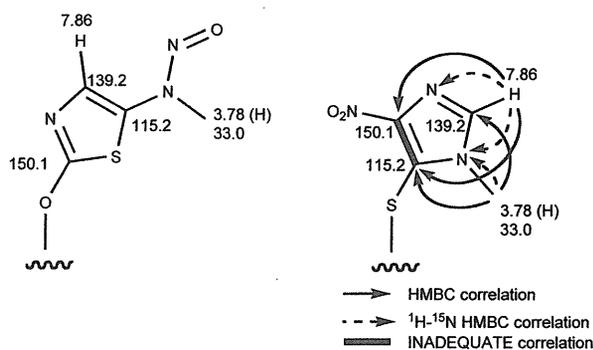
(A) Compound A proposed by Venhuis's group. (B) Compound 1 proposed by our group.

^{*} To whom correspondence should be addressed. e-mail: goda@nihs.go.jp

[#] These authors contributed equally to this work.

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of Isolated Aildenafil Derivative in Chloroform-*d*

Atom	Mutaprodenafil (1)	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1'	146.7	—
4'	149.0	—
6'	154.6	—
8'	143.5	—
9'	128.2	—
10'	39.1	4.37 s
11'	27.7	2.94 t (7.6)
12'	21.9	1.84 m
13'	13.8	0.95 t (7.3)
14'	127.3	—
15'	131.5	7.79 d (2.7)
16'	126.6	—
17'	130.0	7.60 dd (2.7, 9.2)
18'	113.1	6.99 d (9.2)
19'	160.7	—
20'	64.7	4.06 q (6.9)
21'	14.3	1.32 t (6.9)
24'/28'	51.7	1.71 t (11.0), 3.47 dd (2.8, 11.0)
25'/27'	50.1	2.88 m
29'/30'	19.2	0.96 d (6.3)
32'	115.2	—
34'	139.2	7.86 s
36'	150.1	—
38'	33.0	3.78 s

Fig. 2. HMBC, ^1H - ^{15}N HMBC, and INADEQUATE Correlations for Compound 1

over anhydrous sodium sulfate. Evaporation of the solvent gave an oily residue, which was purified by gel permeation chromatography (GPC) to give 1 (15 mg, 48%) as a white solid.¹⁹⁾

Then, we measured the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of the synthesized 1 and found that the data were almost identical to those of the isolated molecule. Furthermore, the retention time of the LC-MS spectrum of the synthesized 1 was the same as that of the isolated molecule (Fig. 3).²⁰⁾ These results indicate that the structure of the isolated sildenafil derivative can not be a nitrosated prodrug A, but rather that compound 1 contains an imidazole moiety. Since compound 1 can be converted to sildenafil by acidic treatment and we revised the structure proposed by Venhuis's group (nitroso-prodenafil), we named it mutaprodenafil (*mutatis*+prodenafil). In this communication, we have synthesized mutaprodenafil 1 and authenticated its veridical structure.

In conclusion, we isolated a new illegal sildenafil analogue

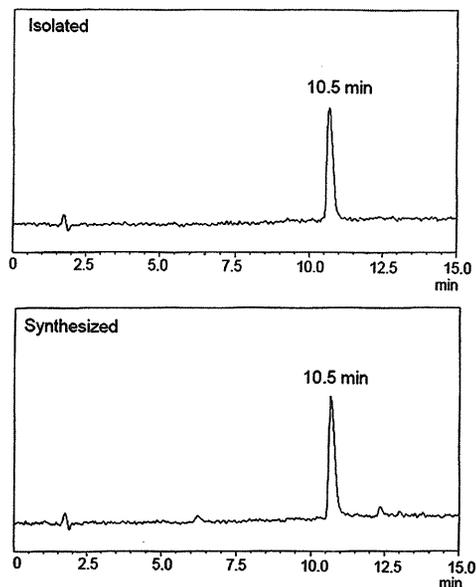


Fig. 3. LC-MS Spectra of the Isolated and Synthesized Compounds

named mutaprodenafil from a dietary supplement for ED and proposed that it is an sildenafil derivative with an imidazole moiety. Furthermore, we synthesized mutaprodenafil (1) from thioaildenafil to confirm its structure. We found that mutaprodenafil could be synthesized from thioaildenafil and commercially available 5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole. Mutaprodenafil is the first prodrug type analogue of the legal drugs used for the treatment of penile ED. In order to avoid illegal compounds being detected by routine inspections, counterfeit drug manufacturers synthesize new types of illegal compounds whenever possible. Normally, their detailed pharmacological activities are not examined. Thus, patients who unknowingly take dietary supplements adulterated with such compounds are at risk of suffering harmful side effects. Therefore, we must continuously monitor and prevent illegal drug manufacturing.

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

References and Notes

- Venhuis B. J., Barends D. M., Zwaagstra M. E., de Kaste D., "RIVM Report 370030001/2007," National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands, 2007, and references cited therein.
- Hou P., Zou P., Low M. Y., Chan E., Koh H. L., *Food Addit. Contam.*, **23**, 870—875 (2006).
- Park H. J., Jeong H. K., Chang M. I., Im M. H., Jeong J. Y., Choi D. M., Park K., Hong M. K., Youm J., Han S. B., Kim D. J., Park J. H., Kwon S. W., *Food Addit. Contam.*, **24**, 122—129 (2007).
- Hasegawa T., Saijo M., Ishii T., Nagata T., Haishima Y., Kawahara N., Goda Y., *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **49**, 311—315 (2008).
- Lam Y. H., Poon W. T., Lai C. K., Chan A. Y. W., Mak T. W. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 804—807 (2008).
- Uchiyama N., Saisho K., Kikura-Hanajiri R., Haishima Y., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1331—1334 (2008).
- Kumasaka K., Kawahara N., Doi K., Kojima T., Goda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 227—230 (2008).
- Goda Y., Kamakura H., *Functional Food*, **2**, 198—202 (2008).
- Zou P., Hou P., Oh S. S., Chong Y. M., Bloodworth B. C., Low M. Y., Koh H. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 279—284 (2008).
- Venhuis B. J., Zomer G., de Kaste D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 814—817 (2008).

- 11) Hasegawa T., Takahashi K., Saijo M., Ishii T., Nagata T., Kurihara M., Haishima Y., Goda Y., Kawahara N., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 185—189 (2009).
- 12) Singh S., Prasad B., Savaliya A. A., Shah R. P., Gohil V. M., Kaur A., *Trends Analyt. Chem.*, **28**, 13—28 (2009), and references cited therein.
- 13) Venhuis B. J., Zomer G., Vredendregt M. J., de Kaste D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 723—727 (2010).
- 14) Lee H.-M., Kim C. S., Jang Y. M., Kwon S. W., Lee B.-J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 491—496 (2011).
- 15) Baoshun L., WO 2003016313 (2003).
- 16) Venhuis B. J., Zomer G., Hamzink M., Meiring H. D., Aubin Y., de Kaste D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 735—741 (2011).
- 17) Shuxin L., Jianping R., Yanjin Z., Qiujun L., Jinhua G., *PCT Int. Appl.* 2005058899 (2005).
- 18) Yrowell H. N., Elion G. B., *J. Heterocycl. Chem.*, **10**, 1017—1019 (1973).
- 19) ESI-MS m/z : 630.2272 ($[M+H]^+$, Calcd for $C_{27}H_{36}N_9O_5S_2$: 630.2275). IR (ATR) cm^{-1} : 1700, 1600, 1580, 1520, 1500, 1460. UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 218 (4.44), 240 (4.60), 283 (4.10), 297 (4.11), 335 (3.98, sh).
- 20) HPLC analysis was carried out on a Hypersil GOLD column (2.1 mm \times 100 mm, Thermo Fischer Scientific Inc., U.S.A.) with isocratic elution with 40% acetonitrile and 60% water solution added 0.1% formic acid. The flow rate was 0.2 ml/min. LC-MS-2010EV liquid chromatography-mass spectrometer (Shimadzu, Japan), equipped with an LC-20AB pumps, DGU-20A₅ degasser, SIL-20AC auto sampler, were employed.

シャタバリ製品の基原種鑑別法の開発と同法を利用した
日本市場品の実態調査

(2011年10月7日受付)

(2011年11月4日受理)

桑田幸恵、丸山卓郎、若菜大悟、鎌倉浩之、合田幸広

国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

Method for identifying the botanical origin of shatavari products and its application for survey
analysis of products in the Japanese market

(Received October 7, 2011)

(Accepted November 4, 2011)

Yukie Kumeta, Takuro Maruyama, Daigo Wakana, Hiroyuki Kamakura, Yukihiro Goda

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

Abstract

Shatavari is a famous Ayurveda materia medica used as a tonic for woman, and its health food products have been distributed in Japan. The botanical origin of shatavari is specified as the tuberous root of *Asparagus racemosus* in the Ayurvedic Pharmacopoeia of India. However, several reports have pointed out that *Stemona* plants were sold as shatavari sometimes in markets in Southeast Asia and China because the shape of the tuberous root of *A. racemosus* was very similar to that of *Stemona* plants. Since most *Stemona* plants are rich in alkaloids, the contamination of the plant source species in shatavari products may cause various physical disorders to consumers. In the course of our study for the safety evaluations of health foods made from medicinal plants, we investigated the botanical origin of shatavari products obtained in Japanese markets on the basis of DNA sequence analysis. As a result, botanical origin of all products were revealed to be *Asparagus*. In order to confirm whether these products contained *Stemona* or not, ARMS-PCR method using *Stemona*-specific primers was performed. The application data indicated that none of the examined products contained *Stemona* plants at a concentration of >1%. ARMS-PCR method shown here is expected to be useful for quality control of shatavari products to check contamination of source plants.

Keywords : *Asparagus racemosus*, *Stemona* 属植物、健康食品、塩基配列解析、ARMS-PCR
Asparagus racemosus, *Stemona* plant, health food product, DNA analysis, ARMS-PCR

I 緒言

シャタバリは、インドのアユルヴェーダ薬局方において *Asparagus racemosus* の根を基原とする生薬と規定されており¹⁾、現地では古来より催乳、催淫、鎮痛、利尿などを目的として用いられてきた。近年、補完代替医療への関心の高まりから、主に女性用強壯剤としてシャタバリを原料に用いたいわゆる健康食品が日本をはじめ世界各国で流通している。シャタバリの基原植物である *A. racemosus* は、主にインドの森林地帯に分布するユリ科(クサスギカズラ科)の植物であるが、この植物のエキスの薬理作用は多く研究されており、免疫系の調整や神経変性疾患、下痢、消化不良の治療な

ど、さらに大きな可能性をもつことが示唆されている²⁻⁶⁾。

A. racemosus の成分としては、これまでに shatavarin 類などのステロイドサポニン、イソフラボンなどの他、毒性アルカロイドである asparagamine A が報告されている⁷⁻¹¹⁾。しかし、asparagamine A のような pyrrolo[1,2-a]azepine アルカロイドは、ジャクブ科 *Stemona* 属植物に広く分布が知られる化合物である¹²⁾。*Stemona* 属植物は、約 25 種が知られているが、その多くが塊根状の根を有しており、中国や東南アジアの市場では、塊根状の根の形状がよく似ていることから、異なる種由来であっても、また時には異なる科由来のものでも現地固有の同じ名称で呼ばれている^{12, 13)}。このことから、*A. racemosus* からの asparagamine A の単離の報告は、*Stemona*

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, National Institute of Health Sciences,

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

属植物を *A. racemosus* と誤同定した結果による可能性が以前より指摘されており¹²⁻¹⁴⁾、現地において *Asparagus* 属と *Stemona* 属植物の根が混同されていることが予想される。

我々はこれまでに、食薬区分と天然物の品質保証に関する研究の一環として、様々な手法を利用して、健康食品の基原の鑑別に関する研究を行ってきた。その結果、多くの製品において、本来の原材料とは異なる植物材料を使用している場合があることが確認、推定された¹⁵⁻²¹⁾。従って、シャタバリを標榜する製品においても、前述した理由による原材料の混同から、*Asparagus* 属だけでなく、*Stemona* 属植物を使用している可能性があるものと考えられた。

Stemona 属植物はアルカロイド成分を豊富に含むことから、シャタバリ製品の原料に *Stemona* 属植物が誤って使用された場合、重篤な健康被害の発生が懸念される。そこで本研究では、シャタバリ含有をうたった健康食品に *Stemona* 属植物が混入した製品がないか確認するため、PCR による基原種の確認法を開発し、各製品の実態調査を行ったので報告する。

II 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用したシャタバリ製品の詳細を Table 1 に示した。これらは全てインターネット上の販売店より購入された。

Table 1. Details of the commercial shatavari products used in this study

Sample no.	Product form	Composition*
Sha-1	Powder	100% shatavari powder
Sha-2	Powder	100% shatavari powder
Sha-3	Granule	Shatavari 0.56 g with sugar 4.44 g /5g
Sha-4	Granule	Shatavari with sugar and water
Sha-5	Powder	Shatavari powder
Sha-6	Tablet	Shatavari churna 500 mg /tablet
Sha-7	Capsule	Shatavari 400 mg /capsule
Sha-8	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-9	Capsule	Shatavari 250 mg /capsule
Sha-10	Capsule	Root extract 500 mg /capsule
Sha-11	Tablet	Root extract 250 mg, stem and root powder 400 mg /tablet

* Each composition is sourced to the product information.

また、*A. racemosus*、*S. collinsae* の標準植物試料は、東北大学菅野博士、タイ国 Kasetsart 大学 S. Jiwajinda 博士よりそれぞれ提供を受けた。

2. 実験方法

2-1. 塩基配列解析

A. racemosus 標準試料は、皮を取り除き粉碎した後 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽

出した。Sha-3, 4, 6, 11 以外のシャタバリ製品試料は、粉碎後上記同様に DNA を抽出した。Sha-3, 4 (砂糖含有)、Sha-6, 11 (錠剤) は粉碎後滅菌水に溶かし、遠心した後の沈殿物を乾燥させたものを DNA 抽出に用いた。

上記のように抽出した *A. racemosus* とシャタバリ製品の DNA を鋳型とし、全植物の葉緑体 DNA *trnL* 領域で保存性の高い配列に設計したユニバーサルプライマー c (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') と d (5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3')²²⁾、*Asparagus* 属植物に特異的な *trnL* 領域 (DDBJ/GenBank/EBI accession No. AJ441164-AJ441168, AB508807) に設計したプライマー Astrn-f (5'-GAC TAT ATT GCG TTG GTA ACG G-3') と Astrn-r (5'-CAA CTT CTA TTG GCA TAG ATC C -3') を用いてそれぞれ PCR を行い、目的とする配列を増幅させた。反応溶液は、KOD plus ver.2 buffer (Toyobo)、0.2 mM dNTP mix、0.5 U KOD plus polymerase (Toyobo)、0.5 μM プライマー、1.8 mM MgSO₄ を含む液に、1 または 2 μL DNA 溶液を加え、全量を 20 μL とした。PCR 反応は、DNA Engine thermal cycler (Bio-Rad) を用いて行い、温度プログラムは、94℃ 2 min; 98℃ 10 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 1 min, 40 cycles; 68℃ 2 min (ユニバーサルプライマーを用いた PCR)、または 94℃ 2 min; 98℃ 10 sec, 50℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 45 cycles; 68℃ 1 min (*Asparagus* 属特異的なプライマーを用いた PCR) とした。増幅産物は、マイクロチップ電気泳動装置 MCE202 MultiNA (Shimadzu) を用いて電気泳動した。得られた PCR 産物は、MinElute PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、ダイレクトシーケンシングまたは pCR-Blunt vector (Invitrogen) にサブクローニング後、塩基配列を決定した。PCR 産物または plasmid の蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/life technologies) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130-genetic analyzer (Applied Biosystems/life technologies) により行った。

2-2. *Stemona* 属植物検出のための ARMS (amplification refractory mutation system) PCR

Stemona 属植物の *trnL* 領域 (Genbank accession No. AB490125-AB490133²³⁾ に特異的な配列にプライマー Strn-f (5'-GGA TTG CCC TAT ATA CCT GTA C-3')、Strn-r (5'-GTG CGG GCT ATC CAA AAG ACT TG -3') を設計した。*A. racemosus* の根に *S. collinsae* の根を 0, 1, 5, 10, 20, 40, 100% 混合した試料から、前述同様に抽出した DNA を鋳型として、上記のプライマーを用いて PCR を行うことにより、検出限界及び特異性を調べた。反応溶液は、10 μL Ampdirect plus (Shimadzu)、0.5 U Ex Taq polymerase (Takara)、0.5 μM プライマーを含む液に、1 μL DNA 溶液を加え、全量を 20 μL とした。PCR プログラムは、94℃ 2 min; 98℃ 10 sec, 50℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 40 cycles; 72℃ 1 min で行った。全シャタバリ製品から抽出した DNA を鋳型に、同条件で PCR を行うことにより、各シャタバリ製品の *Stemona* 属植物混入の有無を確認した。

III 研究結果

1. 塩基配列解析

Fukudaらは、*A. racemosus*を含む*Asparagus*属植物24種について、*petB* intron、*petD-rpoA*領域及び*trnL* intron、*trnL-trnF*領域の配列解析を行っている(データベース上に*A. racemosus*の*trnL* intron、*trnL-trnF*領域の配列情報は登録されてない)。その結果、これらの領域において種間の特徴的な塩基配列の違いは極めて少ない、または全くみられなかったことから、*Asparagus*属植物種は形態に多様性があるにも関わらず、種間の遺伝的差異は小さいのではないかと推測している²⁴⁾。そのため、形態の全くわからない、食品製品の原料植物をDNA配列解析だけで*A. racemosus*と同定するのは困難であると予想される。一方、特に*trnL* intron、*trnL-trnF*領域は植物の遺伝子鑑別によく用いられる領域であり他の植物の配列情報も豊富にある。従って、これらの領域の配列を解析することにより、少なくとも*Asparagus*属植物由来のものであるかどうかの判断はできると考えられる。そこで、各シャタバリ製品の原料植物の同定を行うため、各シャタバリ製品及びデータベース上の情報が無い*A. racemosus*の標準植物試料の*trnL* intron領域の塩基配列解析を行った。

本研究で使用された*A. racemosus*標準植物試料の*trnL* intron領域の配列は、データベース上の*Asparagus*属植物(*A. cochinchinensis*, AB508807; *A. acutifolius*, AJ441168; *A. falcatus*, AJ441166; *A. officinalis*, AJ441164)の配列と99%の相同性を示した。また、11個のシャタバリ製品のうち、sha-1, 2, 5の*trnL* intron領域の配列は同一であり、*A. racemosus*の該当配列と487 bp中1 bpを除き一致した。しかし、その他の試料では複数の配列の混合物が得られ、正確な塩基配列解析は不可能だった。その要因としては、Sha-1, 2, 5以外の試料はカプセル剤や錠剤など、加工試料であるため、原料の段階で*Asparagus*属植物に別の植物が混入した可能性の他、粉砕剤の使い回しや賦形剤の添加等加工段階において混入した可能性が考えられる。

そこで、*Asparagus*属植物の*trnL* intron領域に特異性の高いプライマーを設計し、これを用いてPCRを行ったところ、全ての試料から183 bpの増幅産物が得られた(Fig. 1)。そ

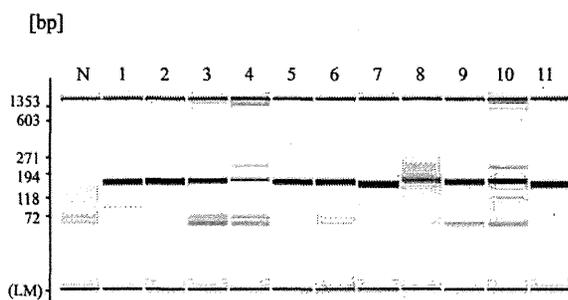


Fig. 1. PCR amplification of *Asparagus* specific *trnL* intron region of shatavari products
Lane numbers correspond to those in Table 1.
Lane N means no template control.

の内部配列は解析を行った全11検体で同一の配列を示し、*A. racemosus*の配列と100%の相同性を示した。

今回シャタバリ製品より得られた*trnL* intron配列は、*A. racemosus*標準植物試料を始めとする複数の*Asparagus*属植物のもとの相同性が高かったことから、*Asparagus*属植物の配列であると確認された。

2. ARMS-PCRによる*Stemona*属植物混入の確認法の開発とシャタバリ製品への応用

今回使用されたシャタバリ製品は、すべて*Asparagus*属植物を原料に含むことが確認されたが、前述の通りユニバーサルプライマーを用いた*trnL* intron領域のPCRでは、sha-1, 2, 5以外の製品から複数の増幅産物が得られたため、他の植物が混入している可能性が示唆された。そこで、シャタバリ製品中の*Stemona*属植物の混入の有無を確認するため、ARMS (amplification refractory mutation system)-PCRによる*Stemona*属植物の検出法を検討した。

まず、データベース中の*Stemona*属及び*Asparagus*属植物の*trnL*領域について配列比較を行い、*Stemona*属植物特異的な配列にプライマーを設計した。次に、*A. racemosus*標準試料に*S. collinsae*の標準試料を0, 1, 5, 10, 20, 40, 100% (w/w)混入させた試料を作製し、これらの試料から抽出したDNAを鋳型に、上記のプライマーを用いてPCRを行った。その結果、*S. collinsae* 0% (*A. racemosus* 100%)の試料からは増幅産物が認められない一方で、*S. collinsae* 1 - 100%の試料では、*S. collinsae*をわずかに1%混入させた試料からも、配列情報から予測される約450 bpの増幅産物が得られた(Fig. 2)。なお、Fig. 2では、*S. collinsae* 5%の試料より1%の試料から得られた増幅産物の方が多く観察された。本PCRは鋳型として標準試料の根から抽出したDNAを用いており、DNAの純度がやや低かったため、このような微量な鋳型のPCR反応の際に、鋳型量と増幅産物量が相関しなかったものと考えられる。しかし、*S. collinsae* 1%の試料でも増幅産物が得られることは複数回の分析により確認している。従って、本方法は*Stemona*属植物に高い特異性を持ち、少なくとも1%の混入を検知できる感度であることが確認できた。

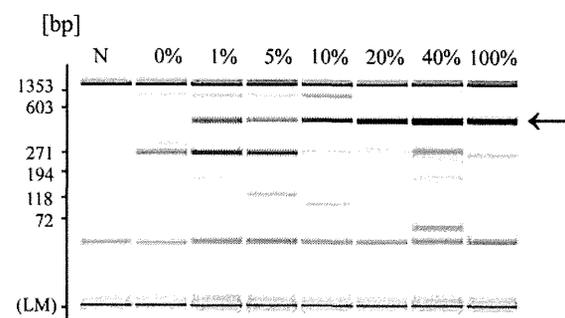


Fig. 2. Sensitivity of PCR with the primers based on *Stemona* specific *trnL* intron region
An arrow indicates the amplicons of *Stemona* specific sequence. Percentages mean the ratio of *S. collinsae* in *A. racemosus*. Lane N means no template control.

そこで、この方法を用いて、すべてのシャタバリ製品から抽出した DNA を鋳型に PCR を行った結果、増幅産物は得られなかった (Fig. 3)。このことから、今回分析したシャタバリ製品に *Stemona* 属植物は (少なくとも 1% 以上は) 混入していないと考えられた。

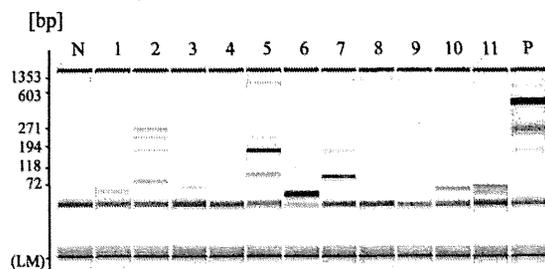


Fig. 3. Application of ARMS-PCR to shatavari products by specific *Stemona* DNA amplification

Lane numbers correspond to those in Table 1.

P, positive control (*S. collinsae*);

N, negative control (no template).

IV 結論

現在流通しているシャタバリ製品の原料植物種を確認するため、DNA 塩基配列解析を行ったところ、すべての製品は *Asparagus* 属植物を原料としていることが確認された。さらに、*Stemona* 属植物の混入の有無を確認するため、*Stemona* 属植物特異的なプライマーを用いた ARMS-PCR 法を構築し、各シャタバリ製品に適用した結果、すべての製品に *Stemona* 属植物は混入していないことが判明した。しかし、中国や東南アジアの市場では *Asparagus* 属と *Stemona* 属植物は混同されている可能性が高く、今後もシャタバリ製品の原料に *Stemona* 属植物が誤って使用される可能性は否定できない^{*1}。本研究で行った ARMS-PCR 法は特に簡便な方法であり、*Stemona* 属植物の検出感度も高いことから、シャタバリ製品中の *Stemona* 属植物の有無について簡易的に調査を行う手法として有用であると思われる。

V 謝辞

A. racemosus, *S. collinsae* の標準植物試料をそれぞれご恵与いただきました、東北大学菅野明博士、Kasetsart 大学 S. Jiwajinda 博士に感謝いたします。本研究は、厚生労働科学研究費補助金により行われた。

VI 文献

1) The Ayurvedic Pharmacopocia of India, 1st Ed., part-I,

Vol. IV, Ministry of Health and Family Welfare, India (2008).

- 2) Gautam, M., Diwanay, S., Gairola, S., Shinde, Y., Patki, P., Patwardhan, B., : Immunoadjuvant potential of *Asparagus racemosus* aqueous extract in experimental system. *J. Ethnopharmacol.* **91**, 251-255 (2004).
- 3) Bhattacharya, A., Murugandam, A. V., Kumar, V., Bhattacharya, S. K., : Effect of polyherbal formulation, EuMil, on neurochemical perturbations induced by chronic stress. *Ind. J. Exp. Biol.*, **40**, 1161-1163 (2002).
- 4) Parihar, M. S., Hemnani, T., : Experimental excitotoxicity provokes oxidative damage in mice brain and attenuation by extract of *Asparagus racemosus*. *J. Neural Transm.*, **111**, 1-12 (2004).
- 5) Venkatesan, N., Thiyagarajan, V., Narayanan, S., Arul, A., Raja, S., Kumar, S. G. V., Rajarajan, T., Perianayagam, J. B., : Anti-diarrhoeal potential of *Asparagus racemosus* wild root extracts in laboratory animals. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **8**, 39-45 (2005).
- 6) Dalvi, S. S., Nadkarni, P. M., Gupta, K. C., : Effect of *Asparagus racemosus* (Shatavari) on gastric emptying time in normal healthy volunteers. *J. Postgraduate Med.*, **36**, 91-94 (1990).
- 7) Hayes, P. Y., Jahidin, A. H., Lehmann, R., Penman, K., Kitching, W., De Voss, J. J., : Steroidal saponins from the roots of *Asparagus racemosus*. *Phytochemistry*, **69**, 796-804 (2008).
- 8) Saxena, V. K., Chourasia, S., : A new isoflavone from the roots of *Asparagus racemosus*. *Fitoterapia*, **72**, 307-309 (2001).
- 9) Sekine, T., Fukasawa, N., Kashiwagi, Y., Ruangrunsi, N., Murakoshi, I., : Structure of asparagamine A, a novel alkaloid from *Asparagus racemosus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1360-1362 (1994).
- 10) Sekine, T., Ikegami, F., Fukusawa, N., Kashiwagi, Y., Aizawa, T., Fujii, Y., Ruangrunsi, N., Murakoshi, I., : Structure and relative stereochemistry of a new polycyclic alkaroid, asparagamine A, showing anti-oxytocin activity, isolated from *Asparagus racemosus*. *J. Chem. Soc. Parkin. Trans.*, **1**, 391-393 (1995).
- 11) Wiboonpun, N., Phuwapraisirisan, P., Tip-pyang, S., : Identification of antioxidant compound from *Asparagus racemosus*. *Phytother. Res.* **18**, 771-773 (2004).
- 12) Gregner, H., : Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. *Planta Med.*, **72**, 99-113 (2006).
- 13) Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S., Greger, H., : Feeding deterrence and contact toxicity

*1 直近では、日本生薬学会第 58 回年会において、バングラディッシュで購入されたシャタバリ試料より、*Stemona* 属由来と推定されるアルカロイドの単離が報告されている。

- of *Stemona* alkaloids - A source of potent natural insecticides. *J. Agri. Food Chem.*, **50**, 6383-6388 (2002).
- 14) Brüggemann, M., McDonald, A. I., Overman, L. E., Rosen, M. D., Schwink, L., Scott, J. P., : Total synthesis of (±)-didehydrostemofoline (asparagine A) and (±)-isodidehydrostemofoline. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 15284-15285 (2003).
 - 15) Goda, Y., : Labeling and contents of "Health Foods". *Farumashia*, **42**, 905-907 (2006).
 - 16) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I. H., Kawamura, H., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., : Authentication and chemical study of isodonis herba and isodonis extract. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1626-1630 (2007).
 - 17) Sakai, S., Otake, R., Toida, T., Goda, Y., : Identification of the origin of chondroitin sulfate in "health food". *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 299-303 (2007).
 - 18) Goda, Y., : The safety of health foods and importance of their origin. *Yakugaku Zasshi (Journal of the Pharmaceutical Society of Japan)*, **128**, 837-838, (2008).
 - 19) Tokumoto, H., Shimomura, H., Katsuki, S., Goda, Y., : Morphological discrimination of *Curcuma longa* L., and *Curcuma aromatic Salisb.* *Shoyakugaku Zasshi*, **62**, 54-65 (2008).
 - 20) Kamakura, H., Maruyama, T., Sugimura, K., Iida, O., Goda, Y., : The source plants and the chemical composition of the passion flower products available as dietary supplements. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem. Safety)*, **17**, 198-206 (2010).
 - 21) Kakigi, Y., Hakamatsuka T., Ichio, T., Goda, Y., Mochizuki, N., : Investigation of biologically active components in ginkgo leaf products on the Japanese market. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 777-779 (2011).
 - 22) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., : Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1105-1109 (1991).
 - 23) Fan, L. L., Zhu, S., Chen, H. B., Yang, D. H., Cai, S. Q., Komatsu, K., : Molecular analysis of *Stemona* plants in China based on sequences of four chloroplast DNA regions. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1439-1446 (2009).
 - 24) Fukuda, T., Ashizawa, H., Suzuki, R., Ochiai, T., Nakamura, T., Kanno, A., Kameya, T., Yokoyama, J., Molecular phylogeny of the genus *Asparagus* (Asparagaceae) inferred from plastid *petB* intron and *petD-rpoA* intergenic spacer sequences. *Plant Species Biol.*, **20**, 121-132 (2005).

SHORT COMMUNICATION

Biological Activities of Indian Celery, *Seseli diffusum* (Roxb. ex Sm.) Sant. & Wagh

Ahmed Abbaskhan,¹ Muhammed Iqbal Choudhary,^{1,2*} Mohammed Nabeel Ghayur,³
Zeba Parween,¹ Farzana Shaheen,¹ Anwar-ul-Hassan Gilani,³ Takuro Maruyama,⁴
Kiran Iqbal¹ and Yoshisuke Tsuda^{1†}

¹H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan

²Department of Chemistry, College of Science, King Saud University, Riyadh-11451, Saudi Arabia

³Department of Biological and Biomedical Sciences, The Aga Khan University, Karachi -74800, Pakistan

⁴Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

In continuation of our work on Indian celery (*Seseli diffusum* (Roxb. ex Sm.) Santapau & Wagh; Umbelliferae), the fractionation of the 80% MeOH–H₂O extract of the seeds was performed to identify the principles responsible for its folk use as an antispasmodic and diuretic. Several compounds were isolated as active components: seselin (1) and anthriscinol methyl ether (4) showed a selective cytotoxicity to some yeast strains. Compound 1 also showed spasmolytic activity. On the other hand, isopimpinellin (3) and isorutarin (5) exhibited a spasmogenic effect on the smooth muscle preparations. Compound 5 was also found to have antioxidant activity. Among them, compound 4 was isolated for the first time from this plant. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Indian celery; *Seseli diffusum*; cytotoxicity; spasmolytic activity; spasmogenic activity; antioxidant activity.

INTRODUCTION

Previously it was reported that the celery (Indian celery) sold in southern areas of Pakistan is not the common celery, *Apium graveolens*. This was identified as *Seseli diffusum* (Umbelliferae) based on the nuclear rDNA, and ITS sequence analysis, morphological features and phytochemical compositions (Maruyama *et al.*, 2009). Seeds of *S. diffusum* are prescribed as an antispasmodic for the treatment of bronchitis, asthma, as well as in liver obstructions, intestinal debility and spleen disorders (Usmanghani *et al.*, 1997). In continuation of our work on Indian celery, 80% methanol–water extract of seeds (botanically fruits) showed some interesting biological activities, such as cytotoxicity against the yeast strains, smooth muscle relaxant and antioxidant activities. Bioassay-guided fractionation using yeast cytotoxicity assay has led to the isolation and identification of DNA damaging agents 1–2 in lipophilic extracts of *S. diffusum*. Then fractionation was performed of the extract of Indian celery to identify the compounds responsible for the biological activities, and four coumarin derivatives and one phenylpropanoid isolated as some of the active principles.

MATERIAL AND METHODS

General. Melting points (m.p.) were determined on a Yanaco MP-S3 apparatus and are uncorrected. The NMR spectra were recorded on Bruker AM-400 and AMX-500 spectrometers using a UNIX data system at 400 and 500 MHz. The ¹³C-NMR spectra were recorded on the same instruments at 100 and 125 MHz respectively. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra were measured using solvents CD₃OD or CDCl₃ and referenced with respect to the residual solvent signals. The chemical shift (δ) values were reported in ppm, and coupling constants (*J*) were measured in Hz. Electron impact mass spectra (EI-MS) were taken at 70 eV on Finnigan MAT-112 or MAT-312 instruments, and major ions are given by *m/z* (%). Optical rotations were measured on a digital polarimeter Jasco DIP-360 in methanol. Infrared spectra were obtained on a Vector 22 Bruker spectrophotometer, either in KBr pellets or in chloroform, and presented in cm⁻¹. The TLC was performed on pre-coated silica gel cards (E. Merck, Germany) and the spots were observed first under UV (254 nm), and then stained with cerium (IV) sulfate spray reagent, and heated until coloration developed.

Plant material. The seeds of Indian celery were purchased from a local market, Jodia Bazar, Karachi, Pakistan, in July 2000. This was then identified as *S. diffusum* (Maruyama *et al.*, 2009). The sample was deposited in the Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences, Japan.

* Correspondence to: M. I. Choudhary, H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan.

E-mail: hej@cyber.net.pk

† This publication is dedicated to the memory of the Professor Yoshisuke Tsuda (1932–2006).

Extraction and isolation. One hundred grams of Indian celery seeds (*S. diffusum*) was extracted successively with 400 mL of hexane, chloroform, acetone and methanol for 4 h under reflux. The extraction was performed four times for each solvent. The yields of extracts were 1.1, 2.2, 5.0 and 18 g, respectively. The silica gel column chromatography of the hexane extract was carried out with hexane–EtOAc and EtOAc–MeOH gradient elution to afford five fractions. Further chromatographic separation yielded compounds 1–3 (43, 14 and 5 mg, respectively) from the third fraction (Fr. 3, 64 mg), while compounds 1 and 4 (27 and 35 mg, respectively) were isolated from the second fraction (Fr. 2, 740 mg). Compounds 1–3 were also isolated from chloroform–acetone extracts through similar chromatographic processes. The methanol extract (water soluble part) was partitioned into EtOAc and water. The aqueous layer was evaporated and the residue was chromatographed on a silica gel column with an EtOAc–MeOH–BuOH–H₂O (80:10:0.5:0.5) elution to obtain isorutarin (5; 50 mg). The DNA damaging activities of fractions and pure compounds are presented in Table 1. Physical and spectral data of 1–5 (Fig. 1) were in agreement with those reported in the literature for seselin (Sattar *et al.*, 1978), bergapten (Masuda *et al.*, 1998), isopimpinellin (Elgamel *et al.*, 1979), anthriscinol methyl ether (Ikeda *et al.*, 1998) and isorutarin (Okuyama *et al.*, 1989), respectively.

Seselin (1). Colorless prisms from hexane, mp. 120–121 °C (119–120 °C, Murray *et al.*, 1982).

Bergapten (2). Colorless needles from EtOAc–hexane, mp. 188–189 °C, (188 °C, Murray *et al.*, 1982).

Isopimpinellin (3). Colorless needles from EtOAc–hexane, mp. 151–153 °C (lit. 149–150 °C, Murray *et al.*, 1982).

Anthriscinol methyl ether (4). Pale yellow oil. EI-MS (M^+ , m/z 222). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) : 6.59 (1H, d, $J_{2,6} = 1.4$ Hz), 6.51 (1H, d, $J_{6,2} = 1.4$ Hz), 6.46 (1H, dd, $J_{3,2} = 15.8$ Hz, $J_{3,1(a,b)} = 1.4$ Hz), 6.09 (1H, dt, $J_{2,3} = 15.8$ Hz, $J_{2,1(a,b)} = 6.0$ Hz), 5.92 (2H, s), 4.03 (2H, dd, $J_{1(a,b),2} = 6.0$ Hz, $J_{1(a,b),3} = 1.4$ Hz), 3.86 (3H, s), 3.35 (3H, s).

Isorutarin (5). Colorless prisms from EtOH, mp. 265–267 °C (lit. 261–263 °C, Okuyama *et al.*, 1989).

Cytotoxicity to DNA repair-deficient (*rad 52Y*) and repair-proficient (RAD⁺) yeast strain. The bioassay was performed according to the method reported by Gunatilaka *et al.* (1992, 1994). This mechanism-based bioassay, employing DNA repair-deficient (*rad 52Y*) and repair-proficient (RAD⁺) yeast strains, is a convenient method for the *in vitro* screening of potential antitumor compounds (Gunatilaka and Kingston, 1998). The two types of genetically engineered yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*), which were provided by Mr L. Faucette in SmithKline Beecham Pharmaceuticals (King of Prussia, Pennsylvania USA), were plated on YPD agar plates (9 × 9 cm; 7 mm layer). Each 96-well plate (6 mm diameter each) was filled for various concentrations of samples (100 µL in (1:1) DMSO–MeOH). The plates were read after 48 h at 30 °C. The activity was expressed as IC₁₂ (µg/mL) (concentration required to produce an inhibition zone of 12 mm diameter). The data are presented in Table 1. Streptonigrin was used as the positive control.

Activity on isolated smooth muscle contractility. The experiments on rabbits were performed in accordance with the guidelines of the Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences (National Research Council, Washington DC, USA) and were approved by the Aga Khan University's Ethics Committee for Research on Animals. The assay was carried out as described earlier by Ghayur and Gilani (2005). Briefly, segments of rabbit jejunum tissue were suspended in 10 mL tissue bath containing Tyrode's solution, aerated with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. A preload of 1 g was applied to each tissue, and then kept undisturbed for an equilibrium period of 30 min. Afterwards, responses to sub-maximal concentrations of acetylcholine (0.3 µM) were obtained. The tissues were presumed stable only after the reproducibility of these responses. Contractions for control and test

Table 1. Results of cytotoxicity bioassays on extracts and compounds of *Seseli diffusum*

Fraction/Compound	<i>rad 52Y</i> (mutant) ^a	RAD ⁺ (Wild) ^a	Muscle contractility	DPPH
80% MeOH–water	1000	> 1500	0.3 ± 0.05 ^b	22.51 ^e
Hexane extract	100	500	0.03 ± 0.002 ^b	-
Chloroform extract	800	> 1000	0.12 ± 0.005	-
Acetone extract	650	> 1000	0.14 ± 0.06 ^b	-
MeOH extract (water soluble)	> 1000	> 1000	0.24 ± 0.09 ^b	37.55 ^e
Seselin (1)	25	> 200	0.04 ± 0.005 ^b	-
Bergapten (2)	50	> 200	-	-
Isopimpinellin (3)	100	> 200	0.1 ± 0.01 ^c	-
Anthriscinol methyl ether (4)	20	50	-	-
Isorutarin (5)	40	> 100	0.3 ± 0.05 ^c	79.34 ^d
Streptonigrin (reference)	0.4	1.0	-	-
Propyl gallate (reference)	-	-	92.14 ^d	-

-, Inactive; NT, not tested.

^aIC₁₂ in µg/mL.

^bSpasmolytic activity, EC₅₀ (mg/mL) mean ± SEM.

^cSpasmogenic activity, EC₅₀ (mg/mL) mean ± SEM.

^d% inhibition at 1 mg/mL.

^e200 µg/mL/1 mM.

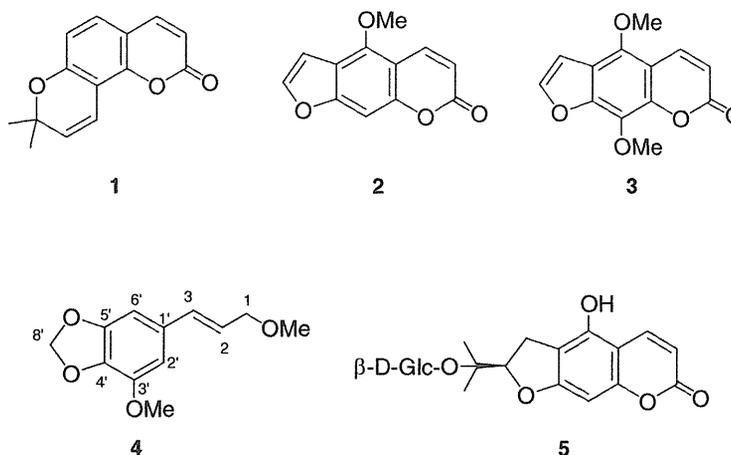


Figure 1. Structures of compounds 1–5.

were recorded isotonicity, using Harvard student oscillographs and transducers. Under these conditions, rabbit jejunum exhibited spontaneous rhythmic contractions, allowing the testing of relaxant (spasmolytic) or stimulant (spasmogenic) activities. Stock solutions of all the test extracts, fractions and compounds were made in saline or if not soluble, in 10% DMSO. All dilutions were made in saline. The final bath concentration was kept at <math>< 0.001\text{ mg/mL}</math> of DMSO, which had no effect on the contractions (data not shown).

DPPH Radical scavenging assay. The assay was performed according to the method developed by Lee *et al.* (1998). Briefly, reaction mixtures comprising incremental concentrations of test compounds and 300 μM of DPPH were prepared. After the incubation in a 96-well plate at 37 °C for 30 min, the absorbance at 515 nm was measured by an ELISA reader (SpectraMax plus, Molecular Devices, CA, USA). The percent radical scavenging activity was determined in comparison with the DMSO-treated control (3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole).

RESULTS AND DISCUSSION

The 80% methanol–water extract of the Indian celery, *Seseli diffusum* (Roxb. ex. sm.) Santapau & Wagh, showed significant cytotoxicity in the mechanism-based bioassay, employing DNA repair-deficient (*rad 52Y*) and repair-proficient (RAD^+) yeast strains. This fraction also showed spasmolytic and antioxidant activities. The cytotoxicity to yeast strains was found in hydrophobic (hexane and chloroform) extracts of the seeds. In contrast, the water-soluble fraction showed a potent antioxidant activity, but a weak cytotoxic activity. Spasmolytic activity was found in both hydrophobic and hydrophilic fractions (Table 1). The hexane fraction was found to be most active in the cytotoxicity assay. Two compounds, seselin (1) and anthriscinol methyl ether (4), were mainly isolated from this fraction. The chloroform fraction yielded mostly bergapten (2) and isopimpinellin (3). The compound 4, a known constituent from *Anthriscus sylvestris* (Ikeda *et al.*, 1998; Kozawa *et al.*, 1982), is reported for the first time from *Seseli diffusum*. The

activities of the isolated compounds were also determined (Table 1). Gunatilaka *et al.* (1994) reported that in the mutant yeast assay, angular pyrano-coumarins, such as seselin (1), isolated from Rutaceous plants, were active, while linear furanocoumarins were inactive. Interestingly, our results demonstrated that linear furanocoumarin, bergapten (2) and non-cyclized compound 4, were as active as angular pyrano-coumarins, such as seselin (1).

The 80% methanol–water extract of the seeds prepared for the preliminary random screening process demonstrated a dose dependent spasmolytic activity in spontaneously contracting isolated rabbit jejunum. Among the extracts prepared as a result of refluxing with various solvents, the hexane extract showed the most potent activity, followed by methanol, chloroform and acetone extracts. Among the lipophilic compounds isolated from Indian celery, compound 1 was the most potent in its spasmolytic activity, equipotent to that of its parent hexane fraction. Compounds 2 and 4 were inactive in a dose up to 0.5 mg/mL. By contrast, compound 3 showed a stimulant (spasmogenic) effect in the assay. Compound 5, isolated from the water-soluble fraction, also showed a spasmogenic effect. However, compound 1 was much more potent in its spasmolytic effect than the spasmogenic effects of 3 and 5. Judging from the content and potency of these compounds in Indian celery, the crude extract of the seed showed domination of spasmolytic activity. Isorutarin (5) also showed prominent radical scavenging activity in a DPPH assay, while the others were inactive.

It is worth mentioning here that the isolated compounds 1–5 were the major constituents in various fractions of the crude extract. This study, therefore, does not represent an account of the minor constituents contributing towards the observed bioactivities of the crude extract. A study of the spasmolytic and antioxidant constituent(s) from the water-soluble (hydrophilic) fraction will be made later.

CONCLUSION

In conclusion, the isolation study of Indian celery, guided by its biological activities, revealed that the cytotoxicity to yeast strains was mainly attributed to seselin (1) and anthriscinol methyl ether (4). Bioassay-guided