

Table 1. The list of food supplements which contain therapeutic agents for erectile dysfunction (ED) and their analogues as ingredients

製品名	含有成分
壮三天	sildenafil tadalafil
阴茎增大丸	sildenafil tadalafil
HIDEYOSHI ヒデオシ	hydroxyhongdenafil acetyl acid imidazosagatriazinone
三便宝	hydroxyhomosildenafil tadalafil
EROTIC SENSE	not detected

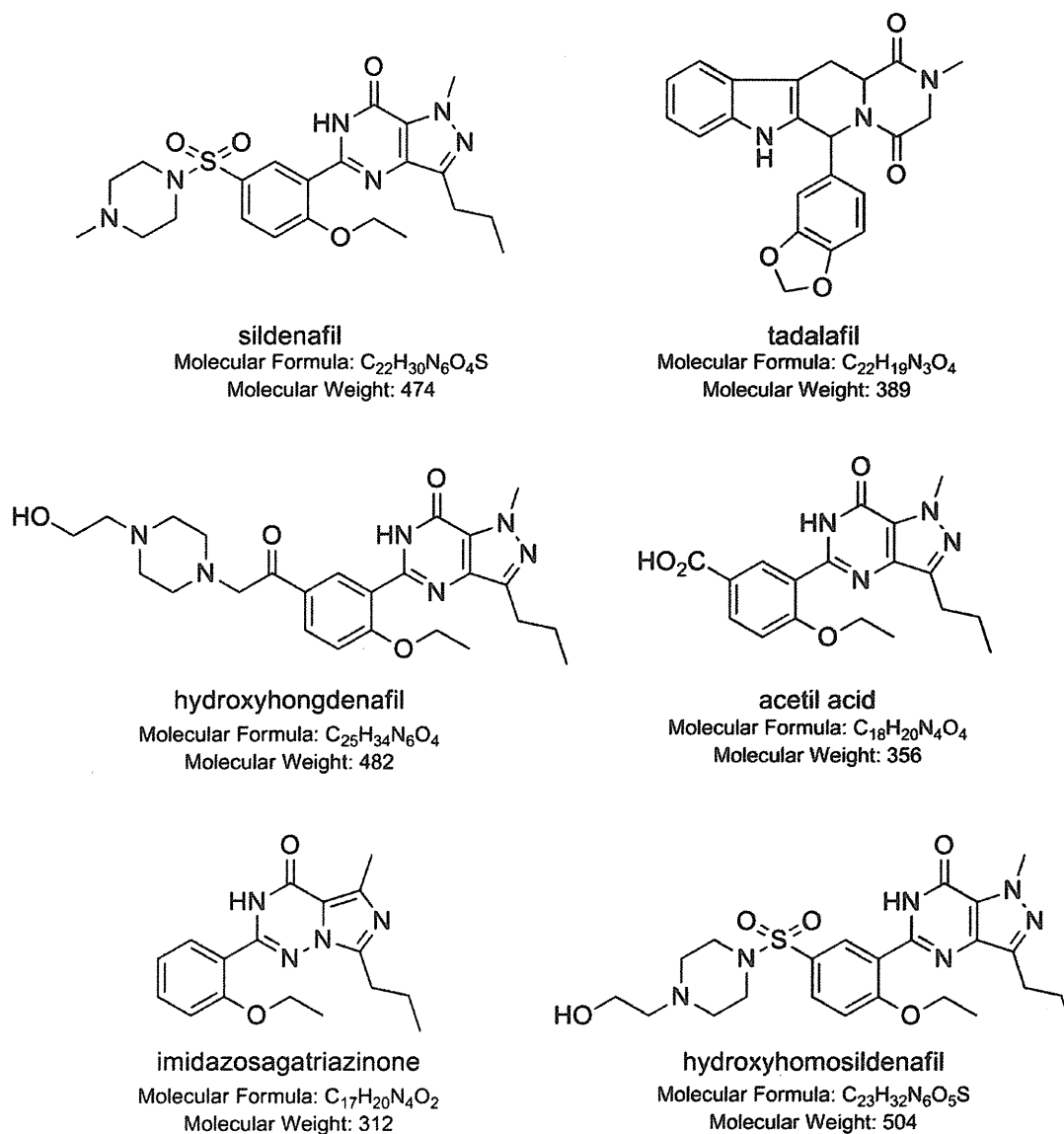
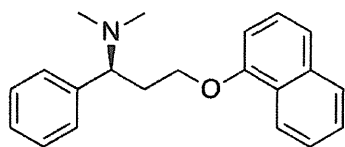
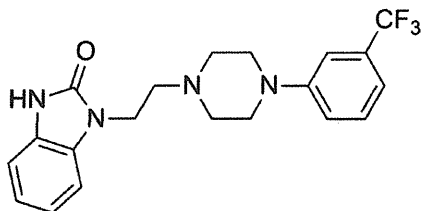


Fig. 1 Structures of several therapeutic agents for ED and their analogues



dapoxetine (1)

Molecular Formula: C₂₁H₂₃NO
Molecular Weight: 305



flibanserin (2)

Molecular Formula: C₂₀H₂₁F₃N₄O
Molecular Weight: 390

Fig. 2 Structures of dapoxetine (1) and flibanserin (2)

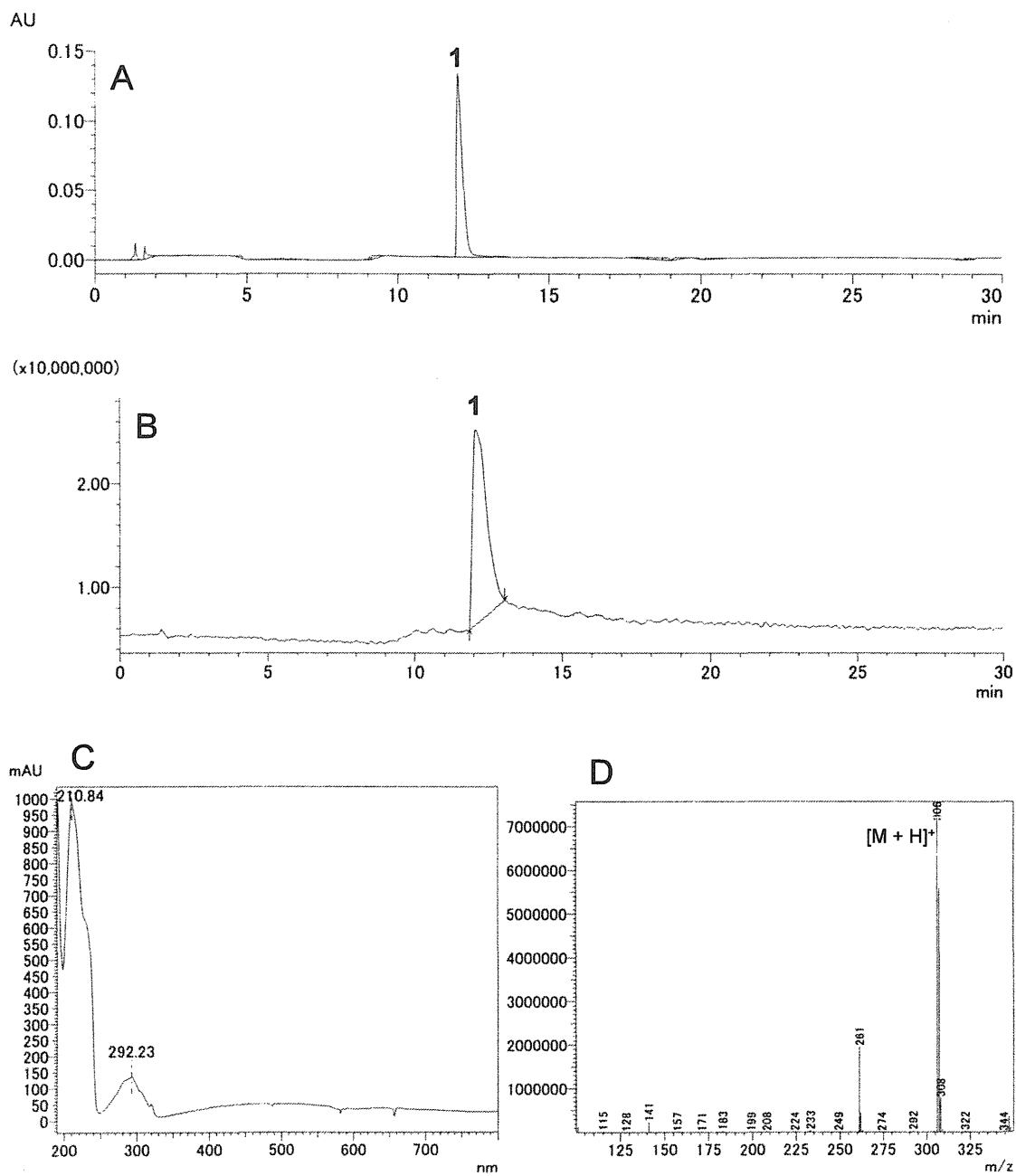


Fig. 3 LC chromatograms and spectroscopic data of dapoxetine (1)

- A: Chromatogram at 290 nm on LC-PDA-MS analysis
- B: Total ion chromatogram on LC-PDA-MS analysis
- C: UV spectrum of peak 1 (dapoxetine)
- D: Mass spectrum of 1 (dapoxetine)

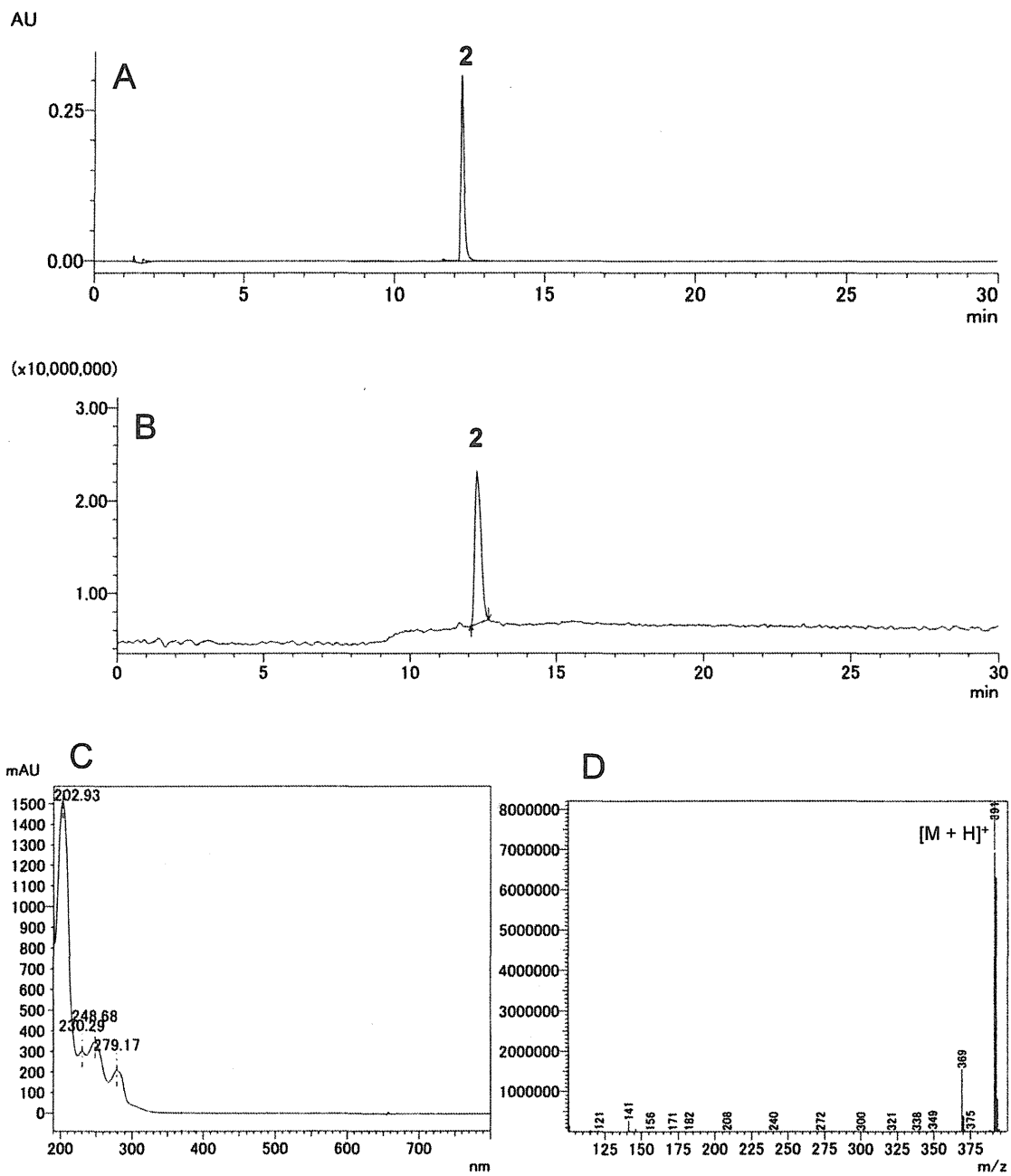


Fig. 4 LC chromatograms and spectroscopic data of flibanserin (2)

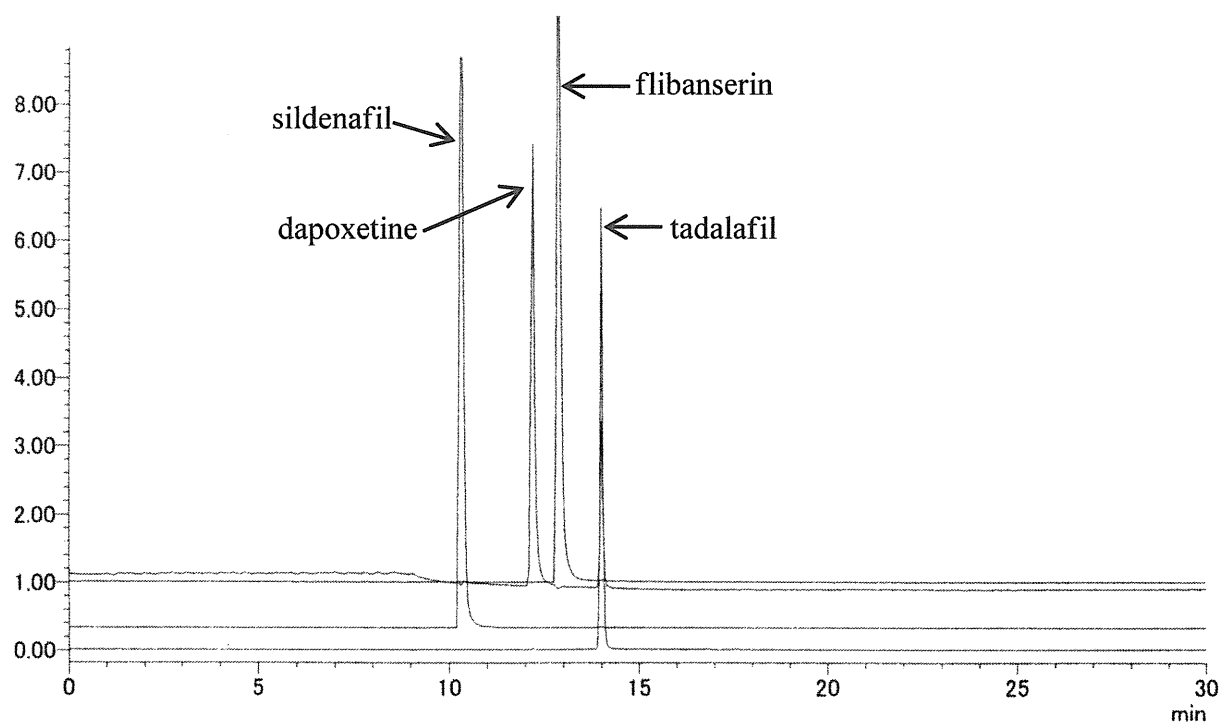
A: Chromatogram at 290 nm on LC-PDA-MS analysis

B: Total ion chromatogram on LC-PDA-MS analysis

C: UV spectrum of peak 2 (flibanserin)

D: Mass spectrum of 2 (flibanserin)

壮三天



阴茎增大丸

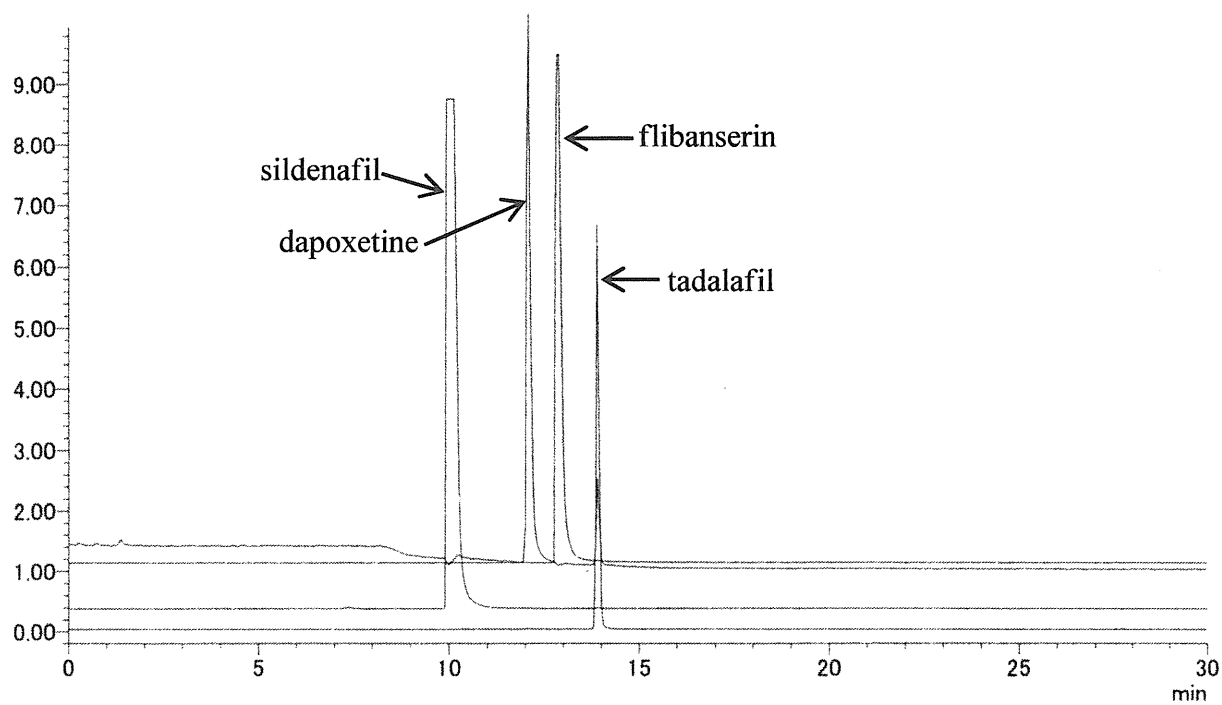
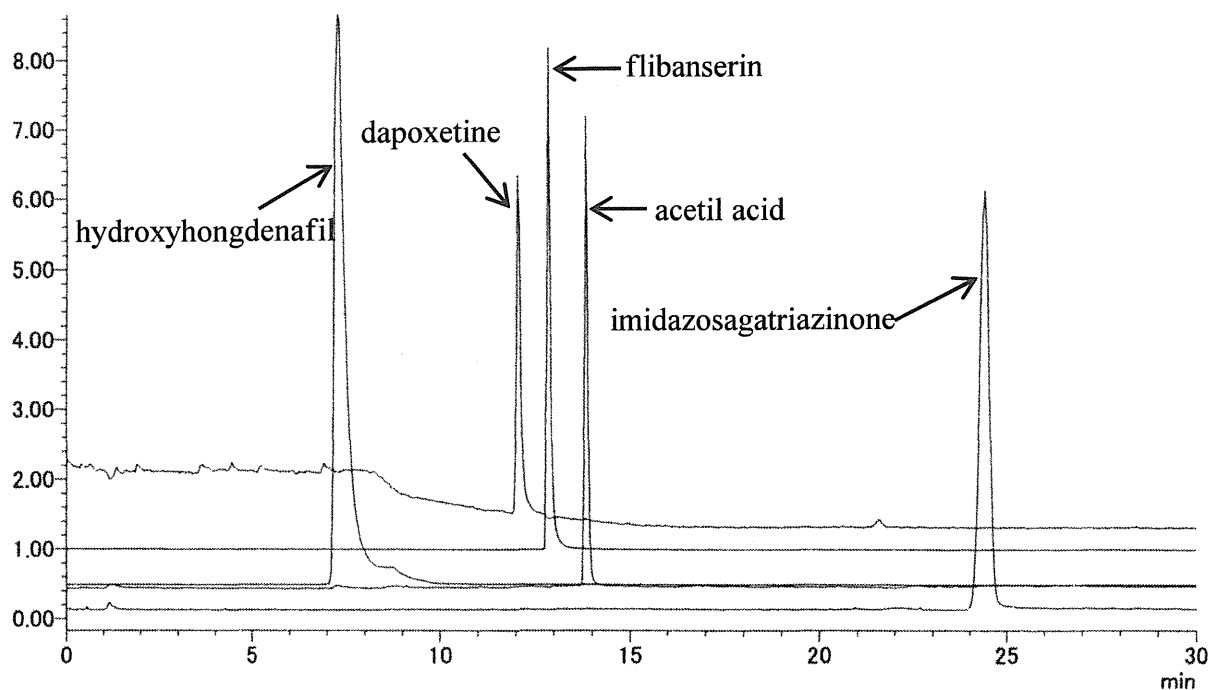


Fig. 5 Mass chromatograms of food supplements for tonicity spiked with authentic dapoxetine and flibanserin

HIDEYOSHI ヒデオシ



三便宝

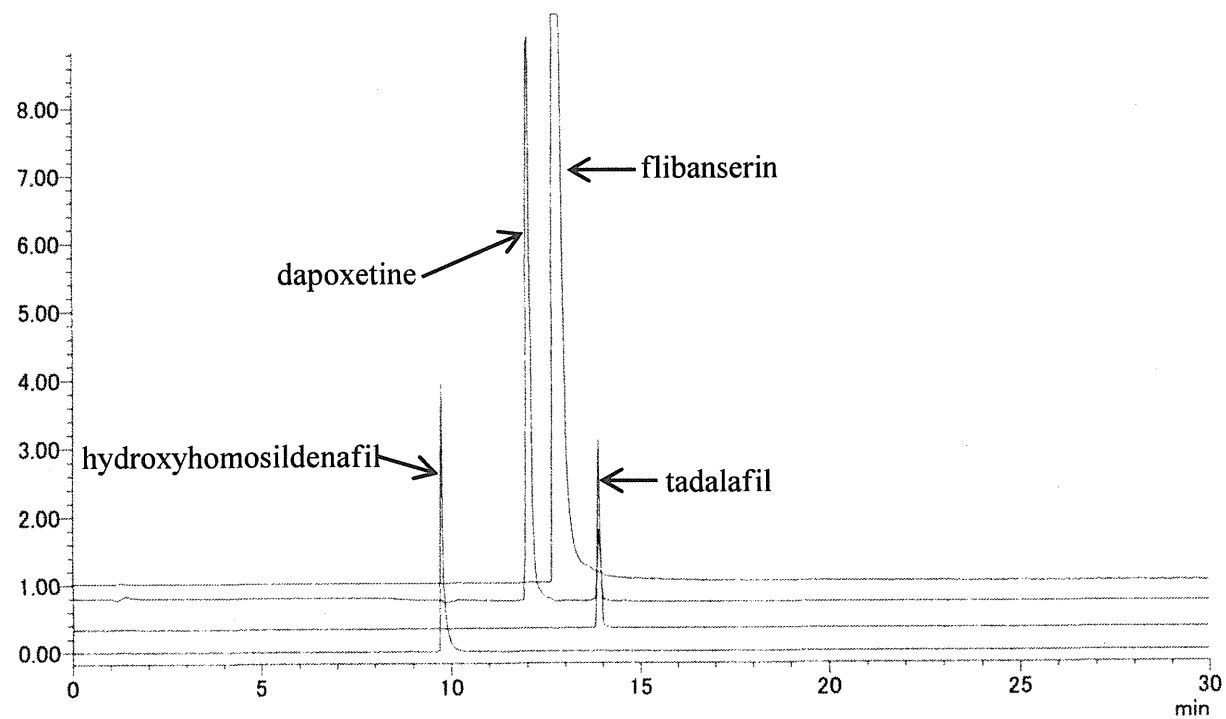


Fig. 5 Continued

EROTIC SENSE

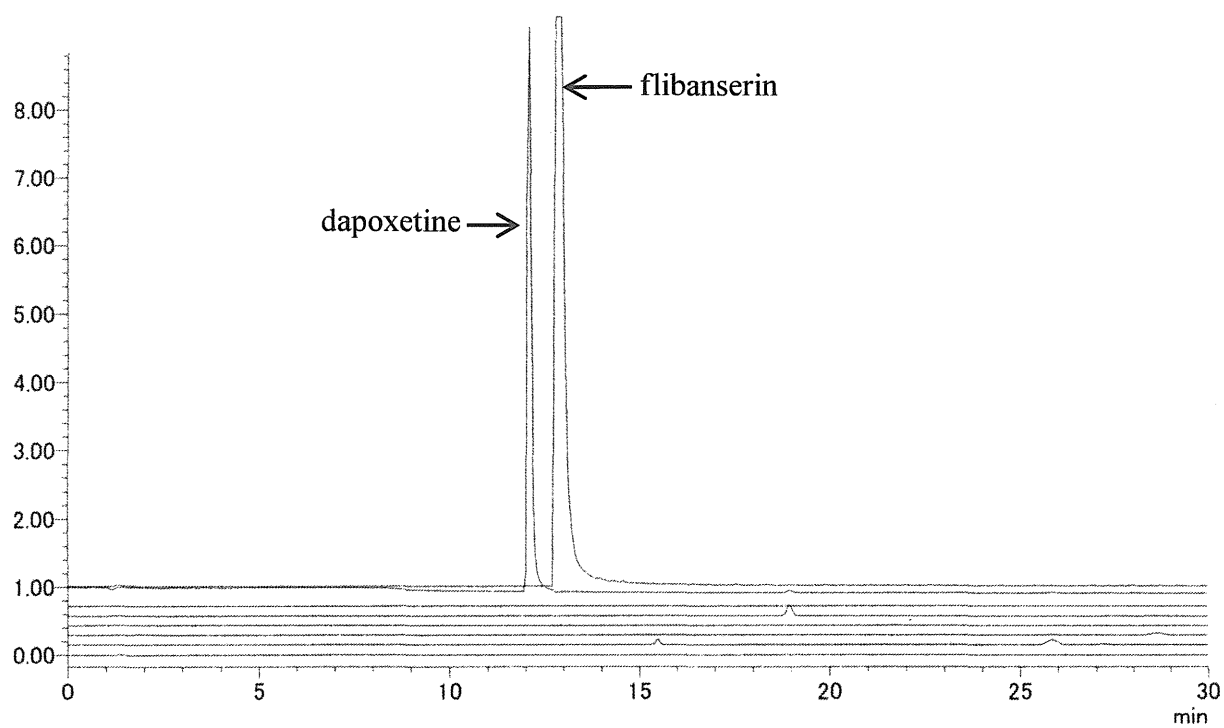


Fig. 5 Continued

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析・有害性予測と監視に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

市場で入手した *Inula* 属植物の基原について
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

研究要旨 食薬区分の判断の再検討が必要な *Inula* 属植物の成分研究を行うため、遺伝子解析による基原種鑑別を行い、センプクカは、*I. japonica*、ドモッコウは、*I. helenium* を基原としていることを確認した。

協力研究者

合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部 研究員

在間一将 国立医薬品食品衛生研究所 生薬

部 流動研究員

A. 研究目的

Inula (和名オオグルマ) 属植物は、温帯地域に分布するキク科植物であり、世界に 90 種あまりが知られている。その中には、薬用や観賞用、色素用に用いられる種もある¹⁾。

薬用種としては、*I. britannica*, *I. japonica* (*I. britannica* subsp. *japonica*), *I. linaliaefolia*, *I. helenium* などが知られており、前 3 種の花がセンプクカ (旋覆花)、残り 1 種の根が、ドモッコウ (土木香; 英名, *elecampane*) の名前で用いられている。

近年の健康食品ブームにより、特に米国でセンプクカやドモッコウを原料に用いた健康食品が流通していることから、本研究では、これらの植物由来製品の食薬区分の再検討を行うための成分研究を行うのに先立ち、遺伝子情報による基原植物の同定を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

センプクカの試料は、栃本天海堂社の市場品及びウチダ和漢薬より恵与された試料の 2 検体を用いた。ドモッコウは、米国 amazon を通じて購入した Star west botanical 社の市場品 (クロアチア産) を用いた。

2. 実験方法

各試料について、約 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて凍結粉碎し、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 に保存性の高い領域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 領域を増幅した。PCR は、センプクカについては、BIOTAQ HS DNA polymerase (Bioline)-Ampdirect plus (Shimadzu) の系を用い、ドモッコウは、KOD plus DNA polymerase (Toyobo) を用いて、いずれも PTC-200 (Bio-Rad) により行った。MinElute PCR purification Kit (Qiagen) により、PCR 産物を精

製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、蛍光ラベル化し、ABI Prism 3130 genetic analyzer により、塩基配列を決定した。

<倫理面での配慮>

本研究では、ヒト及び動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無い。

C. 研究結果及び考察

センブクカの塩基配列解析の結果を Fig. 1 に示した。栃本天海堂社製センブクカは、全長 637 bp、ウチダ和漢薬社より提供を受けたセンブクカは、全長 683 bp であり、両者の間には、ITS2 領域に 46 bp の塩基の挿入／欠失が認められた。ウチダ和漢薬の試料で見られたこの挿入配列は、Fig. 1 の傍線部で示した配列と一致しており、受精時に直列重複が起きたことに由来すると推定された。また、ウチダ和漢薬の試料では、444 番目の塩基に、adenine と thymine の重なりが認められたが、栃本天海堂の試料では、adenine のみであった。その他の配列は、両者の間で完全に一致していた。Blast search program により、両者の配列を相同性検索に供したところ、前者は、*I. japonica* の配列 (Acc. nos., GU724299, GU724300) と最も高い相同性を示し、637 bp 中、3 塩基の違い、*I. britannica* の配列 (GU724293, GU724294) と 10 塩基の違いであった。後者の配列においても、相同性の順位は、前者の 4 配列と変わらなかったが、挿入配列がある分、相同性は、93% に留まった。

一方、ドモッコウの ITS 配列は、国際塩基

配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) に登録されている *I. helenium* の ITS 配列 4 つのうち、3 つの配列 (EU239682, EU239683, FN870378) と完全に一致し (Fig. 2)、残る 1 つの配列 (FM995377) とも ITS1, ITS2 領域とも、各 2 塩基の違いで一致した。

上記の結果から、本研究で塩基配列解析に供したセンブクカの基原植物は、*I. japonica*、ドモッコウの基原植物は、*I. helenium* であると同定された。

D. 結論

市場で入手した *Inula* 属植物について、遺伝子解析による基原種鑑別を行い、センブクカは、*I. japonica*、ドモッコウは、*I. helenium* を基原としていることを確認した。

E. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 在間一将, 若菜大悟, 桑田幸恵, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広, 足立理絵子, 神谷洋, 川崎武志: センブクカ由来セスキテルペンラク トンの分析法の開発と基原種について, 日本生薬学会第 59 回年会 (2012 年 9 月 17, 18 日, 木更津)

G. 知的所有権の取得状況

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

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析・有害性予測と監視に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

センブクカに含まれるセスキテルペンラクトンの迅速分析について
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

研究要旨 専ら医薬品であるセンブクカの主成分であるセスキテルペンラクトンについて、コアシェルカラムを用いた迅速分析法の検討を行った。その結果、既報の分析法に比べ分析時間を 3 分の 1 に短縮することが可能であった。同分析法は、コアシェルカラムの利用により、一般的な HPLC を用いて、高い分離を得ることが出来ており、他の植物エキスの分析法にも有効な分析法の一例になると思われる。一方、センブクカ由来のセスキテルペンラクトンで、強い細胞毒性及びアポトーシス誘導活性が報告されている neobritannilactone B 及びそのアセチル化体は、認められなかった。

協力研究者

内山奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部主任研究官
在間一将 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員

工夫がなされたカラムが種々、開発されている。そこで本研究では、上記の HPLC カラムの内、コアシェルカラムを利用し、より実用性の高い分析法の開発を行うとともに、日米の市場に流通するセンブクカ製品のセスキテルペンラクトン組成を調査した。

A. 研究目的

センブクカは、キク科 *Inula britannica* や *I. japonica* (*I. britannica* subsp. *japonica*), *I. linaliaefolia* の頭花を基原とする生薬であり、米国等で、このものを原料にしたサプリメントが販売されている。このものに含まれるセスキテルペンラクトンには、種々の細胞に対する細胞毒性が示されていることから、品質管理法として HPLC 分析法が報告されている¹⁾が、同報告にある分析法は、所要時間が長く、実用性に難がある。

一方、近年では、従来のものに比べ、担体の粒子径を小さくした HPLC カラムや、それと同等の分離を有しながら、カラム圧を低く抑える

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用したセンブクカ製品を Table 1 に示した。また、セスキテルペンラクトンの単離には、栃本天海堂製のセンブクカを使用した。

2. 装置

2-1. 分取 HPLC

島津製作所製の LC-10A_{VP} システムを用い、カラムに Inertsil PREP-ODS (20.0 x 250 mm; Gasukuro Kogyo) を用いた。

2-2. LC/MS 分析

LC 部に Shimadzu Prominence UFLC システムを配した LCMS-2020 質量分析計（島津製作所製）を用いた。

2-3. NMR

Jeol ECA-600 を用いた。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR の化学シフト値は、TMS に対する δ 値 (ppm) で示した。Chemical Shift Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) 及び Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) の測定には磁場勾配システムを用いた。

3. セスキテルペンラクトンの単離

試料 500 g (栃本天海堂) を 3 L の MeOH で終夜、冷浸し、抽出エキスを得た。この操作を 3 回繰り返して、MeOH エキス 43.63 g を得た。このものの CHCl₃ 可溶部 8.32 g の内、3.0 g を取り、シリカゲルカラムクロマトグラフに付し、hexane-EtOAc の系で、順次、溶出した。得られた 13 個のフラクションの内、Fr. II, IV, V, VIII, XI, XIII の 6 つのフラクションを別々に逆相の分取 HPLC に供することにより、化合物 A-F を単離した (Fig. 1)。

4. LC/MS 分析

4-1. 試料調製

試料、各 1 g を 30 mL の MeOH で 5 Hz, 40 min 震盪抽出し、ろ過後、濃縮乾固し、エキスを得た。このものを 30 mL の MeOH に再溶解後、15 mL を取り、再び濃縮後、H₂O 10 mL に再溶解（懸濁）させ、CHCl₃ で、15 mL x 3 回

抽出した。CHCl₃ 層を濃縮し、1 mg/mL になるよう MeOH で溶解し、試料溶液とした。

4-2. LC/MS 分析

以下の測定条件によった。

カラム：Kinetex 2.6 μm C18 (2.1 x 150 mm; Phenomenex)

移動相：水 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液)

グラジエント条件：

initial (20% B)-20 min (65% B)-25 min (90% B)

流速：0.3 mL/min

注入量：1.0 μL

検出器 1：フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)

スキャン範囲：190-800 nm

検出器 2：質量分析計

イオン化：ESI positive

検出器電圧：1.1 kV

ネブライザーガス流量：1.5 L/min

乾燥ガス流量：15.0 L/min

DL 温度：250°C

ヒートブロック温度：200°C

スキャン範囲：*m/z* 100-1000

<倫理面での配慮>

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

C. 研究結果及び考察

単離、同定された化合物 A-F の構造を Fig.

2 に示した (化合物 C は, 未同定). これらの化合物の構造は, NMR 及び MS 分析の結果を文献値²⁻⁵⁾と比較することによって決定された.

これらの化合物を標品として, コアシェルカラムを用いた LC/MS 分析を行った (Fig. 3). その結果, 既報の分析法 (Fig. 4) に比べ, 分析時間を 3 分の 1 程度まで短縮する条件を設定することが可能であった. また, 本分析法では, カラム圧も 25 MPa 程度に抑えられており, 一般的な HPLC 装置においても, 高い分離を達成可能であることが明らかになった. さらに, 流速も 0.3 mL/min まで抑えられていることから, 本研究で開発された分析法は, 経済的かつ環境への負荷も低い, 実用性に優れた方法であると考えられる.

本法を用いて, 日本及び米国市場で流通するセンプクカ製品の分析を行った結果, 日本市場の 2 製品は, 同じプロファイルを示したが, 米国市場品とは, やや異なったパターンを示した. この要因としては, 米国市場品の基原植物が異なっている, あるいは, エキス粉末であることから, 加工過程での成分変化などが考えられる. 一方, *I. helenium* を基原とする *elecampane* (土木香) は, 全く異なった成分パターンを示した.

Bai らは, *Inula britannica* 由来の種々のセスキテルペンラクトンの細胞毒性及びアポトーシス誘導活性を報告している⁴⁾. 報告では, germacrene A 誘導体である neobritanilactone B 及び acetyl neobritannilactone B (Fig. 5) に特に強い活性を認めているが, 今回 LC-MS 分析した試料では, 対応する M+H のピークが観察されないこと

から, これらの化合物の存在は確認されなかった. 従って, センプクカの食薬区分の判断については, 引き続き, 調査が必要であると考えられる.

D. 結論

コアシェルカラムの利用により, *Inula* 属植物由来のセスキテルペンラクトンの迅速分析法を開発した.

E. 健康危険情報

直接的な健康危機情報はない.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 在間一将, 若菜大悟, 糸田幸恵, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広, 足立理絵子, 神谷洋, 川崎武志: センプクカ由来セスキテルペンラクトンの分析法の開発と基原種について, 日本生薬学会第 59 回年会 (2012 年 9 月 17, 18 日, 木更津)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

参考文献

- 1) X.-W. Shi, J.-L. Qi, Y.-B. Wu, Y. Fu, Y.-Z. Wang, D.-Q. Zhang, Simultaneous quantification of six sesquiterpene lactones in *Inula britannica* L. by RP-LC, *Chromatographia*, **68**, 281-285 (2008).
- 2) F. Jeske, S. Huneck, J. Jakupovic,

- Secoedesmanolides from *Inula japonica*, *Phytochemistry*, **34**, 1647-1649 (1993).
- 3) F. Bohlmann, P. K. Mahanta, J. Jakupovic, R. C. Rastogi, A. A. Natu, new sesquiterpene lactones from *Inula* species, *Phytochemistry*, **17**, 1165-1172 (1978).
- 4) N. Bai, C.-S. Lai, K. He, Z. Zhou, L. Zhang, Z. Quan, N. Zhu, Q. Y. Zheng, M.-H. Pan, C.-T. Ho, Sesquiterpene lactones from *Inula britannica* and their cytotoxic and apoptotic effects on human cancer cell lines, *J. Nat. Prod.*, **69**, 531-535 (2006).
- 5) J.-J. Qin, H.-Z. Jin, J.-X. Zhu, J.-J. Fu, Q. Zeng, X.-R. Cheng, Y. Zhu, L. Shan, S.-D. Zhang, Y.-X. Pan, W.-D. Zhang, New sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb. with their inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7 macrophages, *Tetrahedron*, **66**, 9379-9388 (2010).

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

No.	Name	Source	Description
T	センブクカ	栃本天海堂	市場品
U	センブクカ	ウチダ和漢薬	非売品(以前, 扱っていたもの)
B	Xuan Fu Hua/旋覆花/ <i>Inula britannica</i> flower	mayway	Herb Extract Powder/made in China
F	XUAN FU HUA/旋覆花/ <i>INULAE FLOS</i>	Min Tong Herbs	Herbal Tea Extract/Taiwan
E	elecampane root	Star west botanicals	

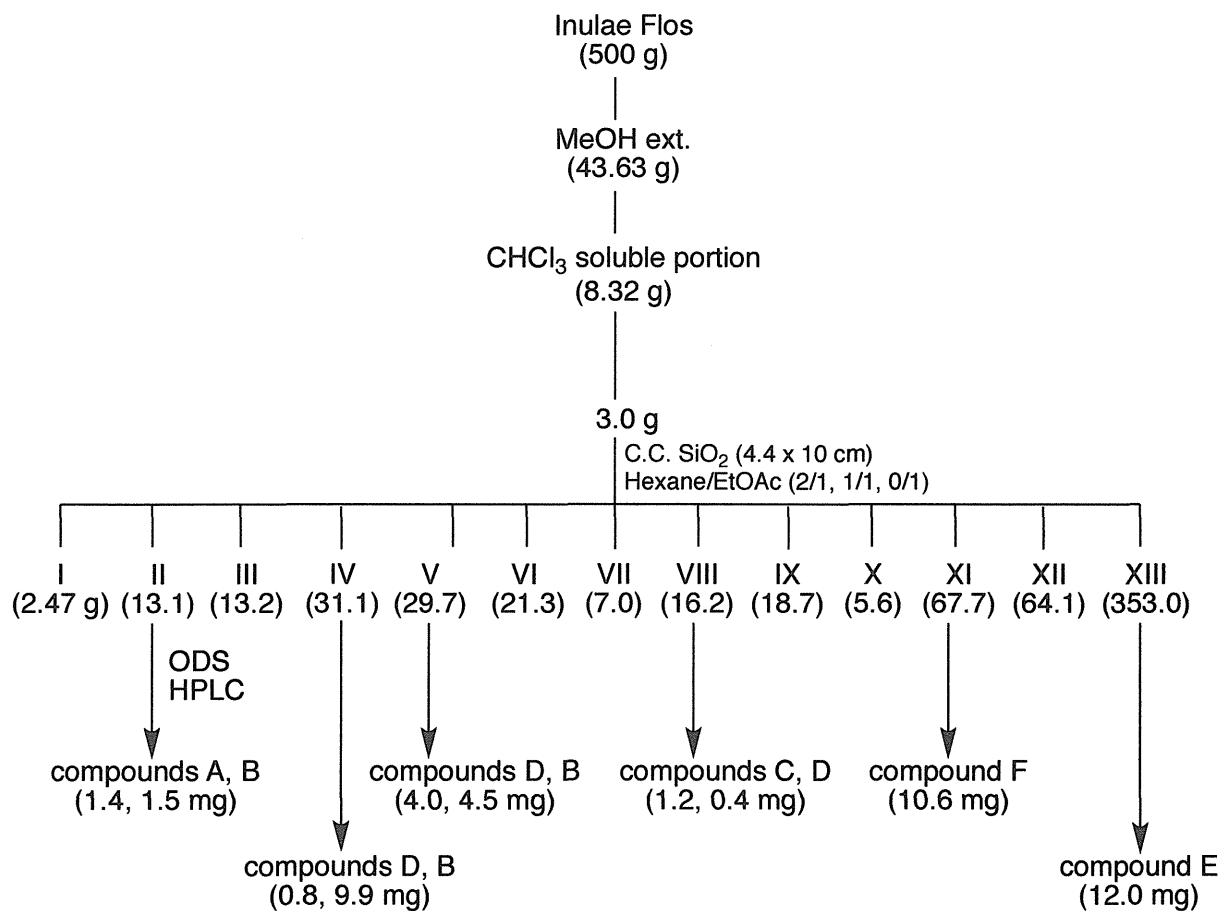


Fig. 1 Fractionation scheme for Inulae Flos

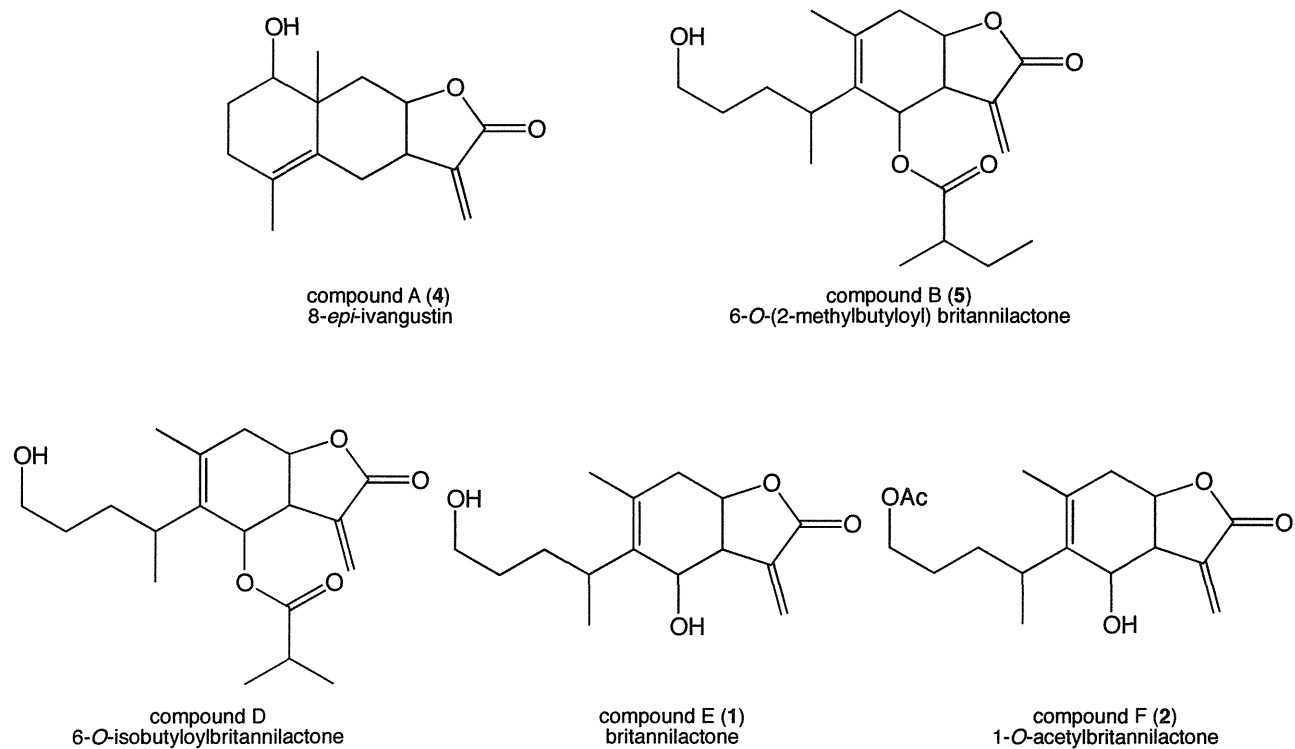


Fig. 2 Sesquiterpene lactones isolated from Inulae Flos product

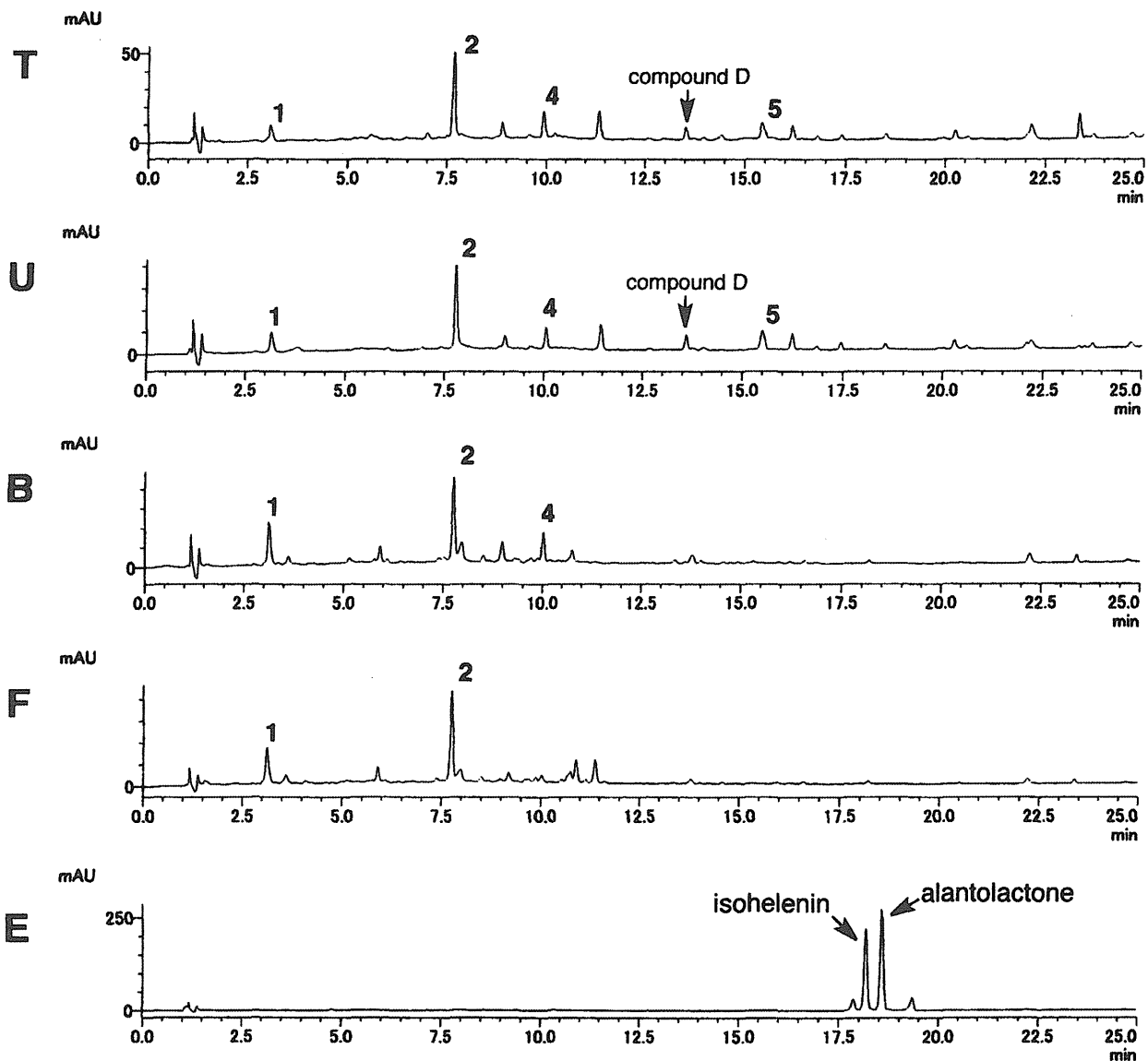
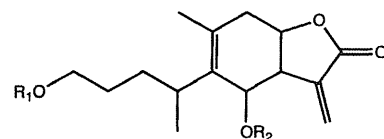
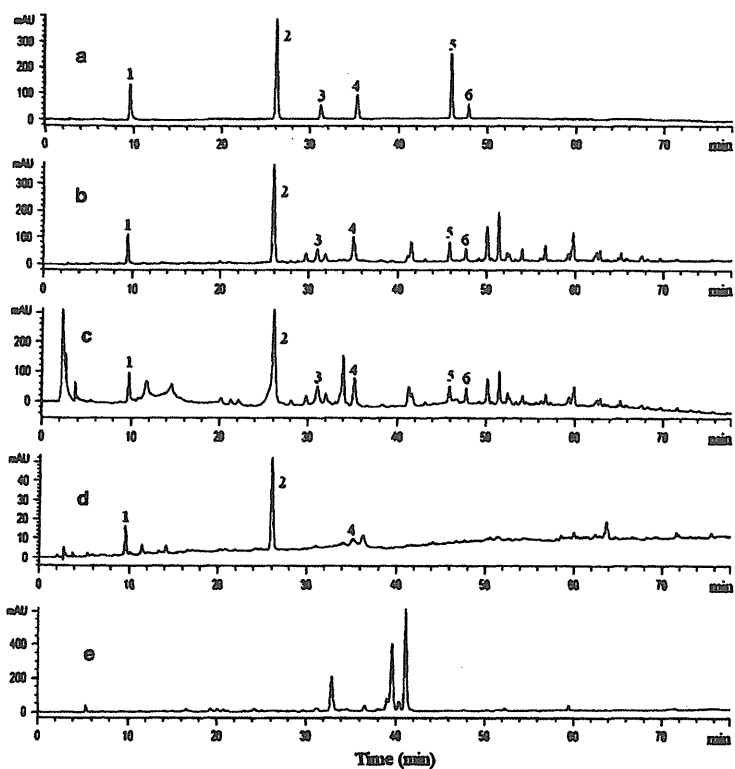
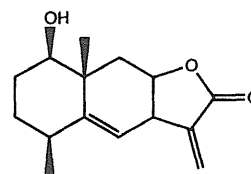


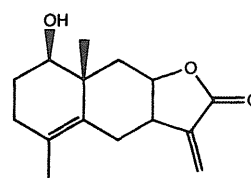
Fig. 3 LC chromatograms for Inulae Flos and elecampane products at 210 nm



- 1: $R_1 = R_2 = H$, britannilactone
 2: $R_1 = Ac, R_2 = H$, 1-*O*-acetylbritannilactone
 5: $R_1 = H, R_2 = \text{isobutyryl}$, 6-isobutyrylbritannilactone
 6: $R_1 = R_2 = Ac$, 1,6-*O,O*-diacetylbritannilactone



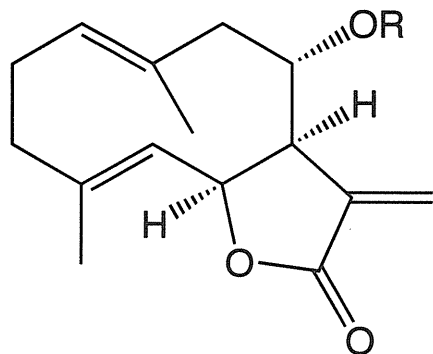
3: hydroxylantolactone



4: 8-*epi*-ivangustin

Fig. 2. HPLC chromatograms: standard substance mixture (a), chloroform-soluble fraction of *Inula britannica* L. methanol extract (b), crude methanol extract of *Inula britannica* L. (c), chloroform-soluble fraction of *Inula japonica* Thunb. methanol extract (d), chloroform-soluble fraction of *Inula hupehensis* Ling. methanol extract (e)

Fig. 4 LC chromatograms reported by Xiao-Wei Shi *et al.*



- R = H: neobritannilactone B
 R = Ac: acetyl neobritannilactone B

Fig. 5 Chemical structures of neobritannilactone B and its acetyl derivative.

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

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析・有害性予測と監視に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 合田幸広

ドモッコウ (*Inula helenium* の根) の成分探索について
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 在間一将

研究要旨 専ら医薬品として区分されるドモッコウ (*Inula helenium* の根) の安全性を再評価する目的で、市場流通品の *I. helenium* について成分探索研究を行った。その結果、セスキテルペンアルカロイドとして compound A (1) を、セスキテルペンラクトンとして isohelenin (2), alantolactone (3), 5 α -epoxyalantolactone (4) および 3-oxodiplophyllin (5) を単離した。

協力研究者

丸山卓郎 国立医薬品食品衛生研究所

生薬部室長

桑田幸恵 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
研究員

若菜大悟 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
流動研究員

A. 研究目的

人が経口的に服用する物が薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）第 2 条第 1 項第 2 号または第 3 号に規定する医薬品に該当するか否かについては、昭和 46 年 6 月 1 日付、薬発第 476 号厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」（以下、食薬区分）により判断される。医薬品と判断された成分本質（原材料）については、「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」（以下、専ら医薬品リスト）に例示として掲げられている。成分本質のみで専ら医薬品と判断される物は、

“専ら医薬品として使用実態のある物（解熱鎮痛消炎剤、ホルモン、抗生物質、消化酵素等）”、“毒性アルカロイド、毒性タンパク、毒薬劇薬指定成分に相当する成分を含む物（食品衛生法で規制される植物性自然毒、動物性自然毒を除く）”、“麻薬、向精神薬及び覚せい剤様作用がある物（構造類似物も含む）及びその原料植物”、“指定医薬品又は処方せん医薬品に相当する成分を含む物であって、保健衛生上医薬品として規制する必要がある物”のどれかでなくてはならない。したがって、アルカロイドの含有は、専ら医薬品と判断するための重要な指標となる。

Inula（和名：オグルマ）属はキク科植物であり、世界に約 90 種が存在し、ヨーロッパやアジアの温暖な地域に広範囲に分布している。*Inula* 属植物の含有成分として、セスキテルペンラクトンの単離報告が多数ある。また、*I. royleana* から royline や anthraniloyllycoctonine などのジテルペンアルカロイドの単離報告も

されている (Figure 1)¹⁾²⁾.

一方, *I. helenium* の根 (土木香) は *elecampane* と呼ばれ, 米国では気管支炎や気管支喘息の治療, 健胃を目的に健康食品として多くの製品が販売されている. *I. helenium* は“専ら医薬品リスト”に分類されており, 同属植物からは抗炎症作用や強い駆虫作用を有するセスキテルペンラクトン類の単離が報告されている³⁾⁴⁾. 本研究では食薬区分の妥当性確認のために *I. helenium* のアルカロイド成分の確認を行った.

B. 研究方法

1. 試料および試薬

I. helenium の根は米国 Amazon より購入し, 遺伝子解析により, 基原植物を同定されたものを用いた. オープンカラムの担体は, カラムクロマトグラフィー用シリカゲル PSQ 60B (富士シリシア化学) およびカラムクロマトグラフ用 Cosmosil 140C₁₈-OPN (ナカライテスク) を用いた. HPLC 用カラムには Inertsil ODS-3, 5 μm , 4.6 \times 250 mm (ジーエルサイエンス) および Mitysil, 5 μm , 10 \times 250 mm (関東化学) を用いた. NMR 溶媒は Chloroform-*d* 99.8% (メルク) を用いた. HPLC には HPLC 用溶媒を, その他の試薬は全て試薬一級品を用いた.

2. 装置および測定条件

分取 HPLC は島津製作所製ポンプ: LC-10ATVP, ダイオードアレイ検出器: SPD-M10AVP を用いた.

NMR スペクトルは JEOL ECA-800 または JEOL ECA-600 を用いて測定した. ¹H NMR お

よび ¹³C NMR の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値で示した. Correlation Spectroscopy (COSY), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) および Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (NOESY) スペクトルの測定には磁場勾配システムを用いた.

3. 化合物の分画

I. helenium の根 (4.5 kg) をメタノールで抽出し, 得られた抽出物を濃縮することにより, メタノールエキス (715 g) を得た. 続いて, このメタノールエキスを 3% 酒石酸水溶液に溶かし, 酢酸エチルで分配した. 得られた水溶性画分に, 炭酸ナトリウムを加え, pH 9 に調整した後, クロロホルムで分配した. 得られたクロロホルム画分について, シリカゲルカラム, ODS カラムおよび ODS HPLC を用いて分離・精製を行い, 新規セスキテルペンアルカロイド compound A (**1**; 1.8 mg, 0.00004%) と既知セスキテルペンラクトン *isohelenin* (**2**; 131.0 mg, 0.003%), *alantolactone* (**3**; 209.5 mg, 0.005%), *5 α -epoxyalantolactone* (**4**; 0.4 mg, 0.000009) および *3-oxodiplophyllin* (**5**; 1.2 mg, 0.00003%) を得た (Figure 2).

4. 化合物 **6** および **7** の合成

20 mg の化合物 **2** をジクロロメタン 0.2 mL およびエタノール 1.5 mL に溶解させ, トリエチルアミン 50 μL 存在下, 3 当量の L-プロリン (35 mg) または 3 当量の D-プロリンをそれぞれ加えた. 室温で 15 時間攪拌し, 濃縮した後 HPLC