

踏襲することにした。

医薬基盤研究所薬用植物資源部和歌山研究部で栽培された *E. distachya* 50 g を粉碎し 70 % acetone に浸漬し、1 週間室温で抽出。ろ液は減圧下濃縮して 1/4 量とした後、水を加えて HP-20 カラムに付した。水、30 % MeOH, 50 % MeOH, 70 % MeOH, MeOH で順次溶出した。各フラクションを薄層クロマトグラフィー (TLC)  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O} = 65:35:10$  の下層を用いて展開) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (ODS カラム使用) で分析した結果、特に、30 % (30 % MeOH) および 50 % 溶出フラクション (50 % MeOH) に多くの成分の存在が確認された。そこで、30 % MeOH および 50 % MeOH フラクションからの成分分離を行った。これらフラクションの HPLC 分析の結果、0.1 %  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (TFA) 含有溶媒系で分離が良好に行われることが明らかになった。そこで、両フラクションの分離は 13 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0.1 % TFA 含有) 溶媒を用いて分離を行った。分離採集された各フラクションは  $\text{CH}_3\text{CN}$  を溜去後、水を加え、HP-20 カラムに通し、水で十分洗浄し TFA を洗い出した後、MeOH の溶出を行った。また、得られた化合物は質量分析 (MS) および核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、特に、2次元 NMR (H-H COSY, HSQC, HMBC, ROESY) を詳細に解析することにより構造決定を行った。

## C. 研究結果

### 1、抽出分離

粉碎した *E. distachya* 50 g を 70 % アセトン水に浸漬し、室温下、1 週間放置し抽出。この操作を 2 回繰り返す、得られた抽出溶液は減圧下 4 分 1 量に濃縮しアセトンをできる限り除き、これに水を加え元の量とした。その際生じた不溶物を吸引ろ過して除いた。ろ液を三菱ダイアイオン HP-20 を用いたカラムクロマトグラフィーに付した。最初に水で十分に洗浄後、30 % MeOH, 50% MeOH, 70 % MeOH, 100 % MeOH で順次溶出した。各溶出フラクションの収量は以下のよ

うになった。

$\text{H}_2\text{O}$ ; 7.0 g, 30 % MeOH; 1.9 g, 50 % MeOH; 1.8 g, 70 %; 530 mg, 100 % MeOH; 130 mg, 不溶物; 1.4 g.

各フラクションの TLC および HPLC パターンを検討した結果、30 % MeOH フラクションおよび 50 % MeOH フラクションに多くの成分が含まれていることが明らかとなり、フラクションの収量も比較的高かったため、これらのフラクションを優先的に成分分離の対象とした。

30 % MeOH フラクションを Mightysil RP-18 GP column (20 x 250 mm, Kanto Chemical co. ltd.), 13 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  (0.1 % TFA 添加) 溶媒を用い、205 nm で検出して分離を行った。その結果、化合物 1, (11 mg), 2 (9 mg), 3 (6 mg), 4 (5 mg), 5 + 6 (5 mg) を得た。同様に分離を行い、50 % MeOH フラクションからは化合物 3 (12 mg), 4 (11 mg), 5 + 6 (20 mg), 7 (10 mg) を得た。抽出分離の流れを図 1 に示す。

### 2、分離化合物の構造決定

化合物 1 は、HR-ESI-MS で  $m/z$  395.1319  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (Calcd. 395.1318 for  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$ ) に疑似分子イオンを示し、その分子式は  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$  と決定された。1 の  $^1\text{H-NMR}$  (in pyridine-*d*<sub>6</sub>) において、芳香環に結合した 2 個分のメトキシ基 ( $\delta$  3.73, 6H, s), 2 個分の等価な芳香環プロトン ( $\delta$  6.86, 2H, s), 芳香環及びメチレンに挟まれたトランス-オレフィン ( $\delta$  6.60, 1H, dt,  $J=15.8, 5.0$  Hz,  $\delta$  6.86, 1H, dt,  $J=15.8, 1.8$  Hz), メチレン ( $\delta$  4.73, 2H, dd,  $J=5.0, 1.8$  Hz) 及びグルコシル基のアノメリックプロトン ( $\delta$  5.79, 1H, d,  $J=6.9$  Hz)、グルコシル基の 5 位 ( $\delta$  3.93, 1H, m) 等が認められた。 $^{13}\text{C-NMR}$  に於いては 2 個分の芳香環上のメトキシ基 ( $\delta$  56.5), 対称構造を持つと考えられるフェニル基 ( $\delta$  153.8 x 2, 135.6, 133.9, 105.1 x 2), グルコシル基 [ $\delta$  104.8 (G-1), 76.0 (G-2), 78.4 (G-3), 71.5 (G-4), 78.7 (G-5), 6.26 (G-6)] が観察された。さらに HSQC, HMBC, ROESY 等の 2次元 NMR を

検討した結果、1 は 3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl-propenol (sinapyl alcohol) にグルコシル基の結合した構造と考えられた。HMBC スペクトルにおいて、グルコシル基のアノメリック H ( $\delta$  5.79, 1H, d,  $J$  = 6.9 Hz) が芳香環の炭素 ( $\delta$  135.6) に相関が認められたことから、1 は sinapyl alcohol の 4'- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside である syringin と決定した。

化合物 4 は ESI-MS で  $m/z$  617  $[M + Na]^+$  に擬似分子イオン ( $C_{27}H_{30}O_{15}Na$ ) と考えられるシグナルが観察され、分子式は  $C_{27}H_{30}O_{15}$  と推定された。 $^1H$ -NMR スペクトルにおいて、4-ヒドロキシフェニル基と考えられるシグナル ( $\delta$  7.24, 2H, d,  $J$  = 8.3 Hz,  $\delta$  8.75, 2H, d,  $J$  = 8.3 Hz), シングレットオレフィン H ( $\delta$  6.59, 1H, s), グルコシル基の2つのアノメリック H ( $\delta$  5.85, 1H, d,  $J$  = 9.8 Hz,  $\delta$  5.73, 1H, d,  $J$  = 10.0 Hz) が認められる。 $^{13}C$ -NMR において、フラボンに基づくシグナルおよび2つのグルコシル基によると考えられるシグナルが認められた。しかしながら、HSQC でアノメリック炭素と確認されたシグナルが、通常の  $O$ -グルコサイドの場合に比べかなり高磁場 ( $\delta$  76.3, 75.2) に認められることから、 $C$ -グルコサイドと推定された。 $^1H$ -NMR において、フラボン骨格の A-環部のプロトンが認められないことから、アピゲニンの6, 8位の炭素にグルコースが結合した構造と推定された。HMBC スペクトルにおいて、アノメリック H ( $\delta$  5.73, 1H, d,  $J$  = 10.0 Hz) は C-5, 6, 7 ( $\delta$  160.2, 108.4, 162.5) に相関が、もう一方のアノメリック H ( $\delta$  5.85, 1H, d,  $J$  = 9.8 Hz) は C-7, 8, 9 ( $\delta$  162.5, 106.4, 156.3) に相関が認められることから、2つのグルコシル基は6位および8位炭素に結合していることが明らかになった。以上の結果、4 は apigenin-6,8-di- $C$ - $\beta$ -D-glucopyranoside と決定した。

そのほかの化合物についても同様の方法で構造解析を行い、構造を決定した。化合物 2 は coniferyl alcohol の 9- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside である isoconiferin と、化合物 3 は catechin と、

化合物 5 と 6 は apigenin の 6- $C$ -glucosyl-8- $C$ -arabinoside およびグルコシル基とアラビノシル基が入れ替わった異性体の約 1 : 1 の混合物として得られている。化合物 7 は epicatechin の 3'- $O$ -methyl-7- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside である symplocoside と決定した。*E. distachya* から得られた化合物を図2に示す。

#### D. 考察

マオウからタンニン誘導体を検索する目的で、アジア起原のマオウの一つである *E. distachya* を 70% アセトン水で抽出し、HP-20 カラムクロマトグラフィーによる粗分けを行い、その一部のフラクションについて、さらに、逆相系カラムによる HPLC 分離を行った結果、上に述べたような極性物質を分離構造決定した。これら化合物は、*E. distachya* からの分離報告はなく、本植物から初めての分離例である。しかしながら、現在まで本植物からタンニンの確認にはいたっていない。HPLC の分析結果では、今回分離できた化合物以外に数多くの微量成分の存在が確認されているが、使用した材料が 50 g と比較的少量であったため、それらの化合物を取得することはできなかった。今後、より多くの材料を用いてより多くの化合物を分離取得する必要があると考える。

#### E. 今後の予定

*E. distachya* の HP-20 カラム処理の 30% MeOH, 50% MeOH フラクションの未処理部分の更なる分離を行う。また、未着手の 70% MeOH フラクションの成分分離を行う。さらに、医薬基盤研究所薬用植物資源部筑波研究部で栽培された *E. distachya* をやや多量(200 g)を入手することが出来たので、上に述べた方法で、抽出粗分け処理を行った結果、30% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH フラクションを収量良く得ることが出来。これらフラクションから微量成分の分離を行う。

#### E. 研究発表

論文発表、学会発表等

なし

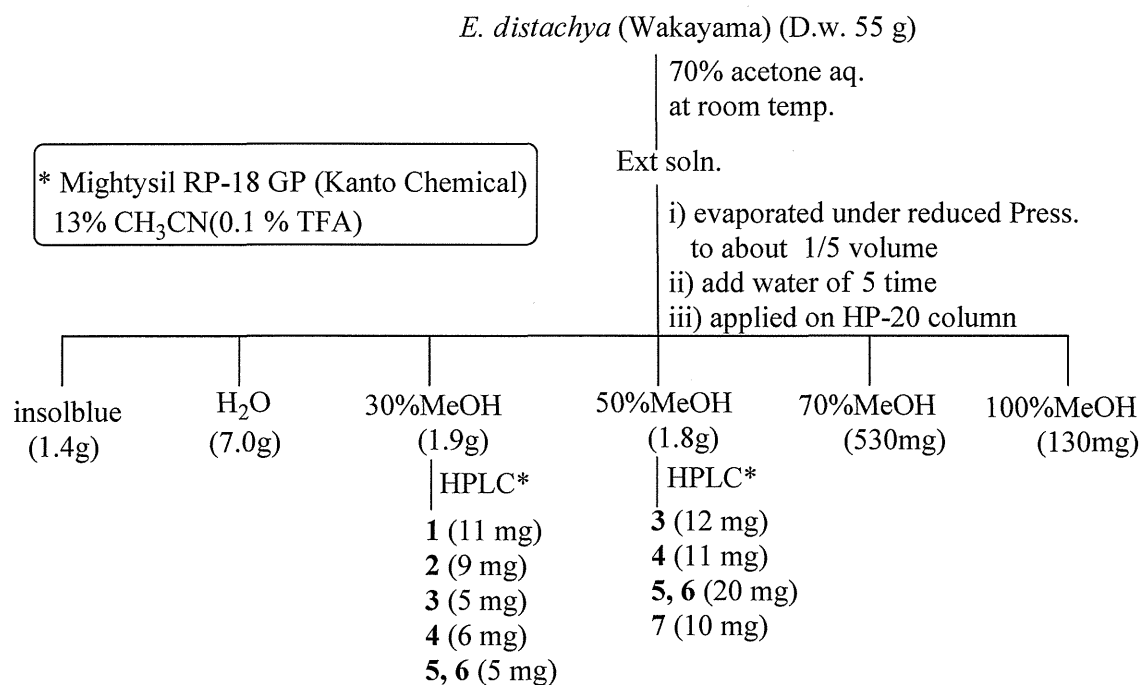


図1 *E. distachya* から成分の抽出分離スキーム

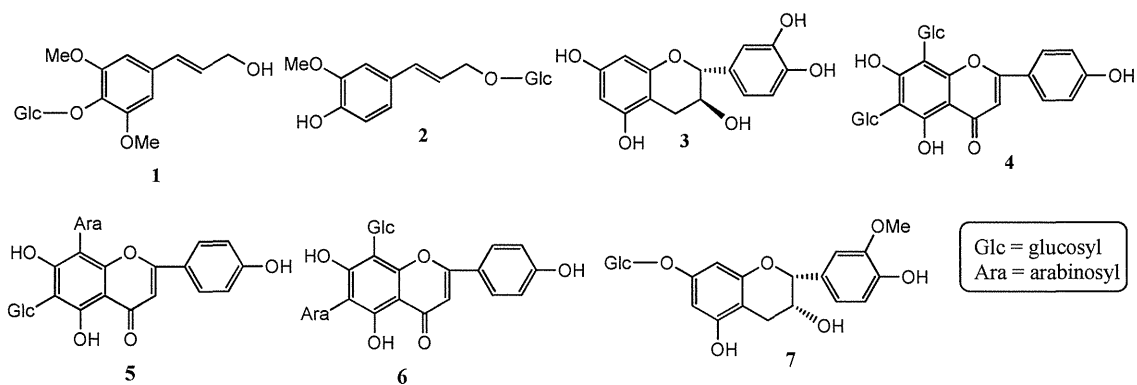


図2 *E. distachya* から分離された化合物の構造

## ペルー産マオウ属植物 *Ephedra americana* の成分に関する研究

研究代表者 御影 雅幸 東京農業大学 教授  
研究分担者 関田 節子 昭和薬科大学 特任教授  
分担研究者 高野 昭人 昭和薬科大学 教授  
協力研究者 代田 修 徳島文理大学香川薬学部 教授  
協力研究者 中根 孝久 昭和薬科大学 准教授

ペルー産マオウ属植物 *Ephedra americana* のメタノール抽出物からポリフェノール類の成分検索を引き続き行い、新たに 21 個の化合物を単離した。二次元 NMR による構造解析及び CD による絶対立体配置解析を行ったところ、A-type プロアントシアニン 8 種、フラボノイド 4 種、リグナン・ネオリグナン 4 種、ナフトレン誘導体 2 種、 $\alpha$ -テトラロン類 1 種の構造が明らかとなった。構造一致検索の結果、A-type プロアントシアニン 2 種とナフトレン誘導体 1 種が新規化合物であり、ナフトレン誘導体 1 種と  $\alpha$ -テトラロン類 1 種が天然から初めての単離であることが判明した。

### A. 研究目的

現在日本で使われているマオウ（麻黄）は、日本薬局方では、*Ephedra sinica* Stapf、*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge (*Ephedraceae*) の地上茎であり、乾燥したものに総アルカロイド〔エフェドリン ( $C_{10}H_{15}NO$  : 165.23) 及びプソイドエフェドリン ( $C_{10}H_{15}NO$  : 165.23)] を 0.7% 以上を含むものとされている。マオウ属 (*Ephedra* sp.) はマオウ科 (*Ephedraceae*) 唯一の属であり、ユーラシア大陸に約 40 種、アフリカに 11 種、アメリカ大陸南部に約 30 種分布している。その中で、*Ephedra americana* は、南米アンデス山脈のエクアドルからアルゼンチンにかけての石の多い斜面や砂利の大地に分布している。この種は、砂地や中程度の粘性の土壌や水はけのよい土壌を好み、干ばつにも耐えられるが、日陰では成長できないとされる。成長すると 1.8m 位になる常緑低木であり、南米の過酷な環境や霜でも痛まず一年中葉をつけ、6 月から 7 月にかけて花を咲かせる。花は雌雄異体で雄花と雌花があるが、一つの株にどちらかの花しかなく、雄花と雌花が育つことで種子ができるが、自家受粉はしない。また、果実を食用とすることがある。果実の直径は 8mm で空洞がある。茎は生のものと乾燥したものをお茶として使われ、生でも食べられている。生で食べる場合、若い茎がよく、お茶にするなら古い茎がよいされる。茎は年中収穫でき乾燥させて使うと

いう。また、*E. americana* はエフェドリンを含まれていないとされているが、現地ではその地上部を民間薬として使用している。

本研究では、このエフェドリンを含まれていないとされている *E. americana* の成分に興味を抱き、その成分検索を進めている。今回、更なる化合物の単離を目的とし、80% メタノール 溶出画分の精査を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 研究試料、試料の抽出及び分画

試料としてペルー産の *Ephedra americana* の地上部 9.15 kg を用いた。試料の抽出にはメタノール (MeOH) を用い、得られた MeOH 抽出物はイオン交換樹脂 (DIAION HP-20) を用いて分画した。(前年度研究報告書参照)

#### 2. 成分の単離精製

80%メタノール溶出画分 31.39 g をジメチルホルムアミド (DMF) 30 mL に溶解し、30% MeOH 70 mL にて希釈後、オクダデシルシリル化シリカゲル (ODS) オープンカラムクロマトグラフィー (OCC ; 5 cm x 50 cm) に付し、30% MeOH (500 mL)、40% MeOH (1 L)、50% MeOH (1 L)、60% MeOH (1 L)、70% MeOH (1 L)、80% MeOH (1 L)、90% MeOH (1 L)、100% MeOH (1 L) で溶出させ、ODS-TLC における紫外線照射 254 nm と希硫酸噴霧後の加熱呈色スポットを元にして 14 個のフラクションに分画した。

さらに Sephadex LH-20 を用いた OCC (移

動相：MeOH) による分画を行い、最後に ODS を用いた分取高速液体クロマトグラフィー (Prep-HPLC; 移動相：アセトニトリル/0.1% 酢酸) による精製により、化合物 1 (12.7 mg)、2 (56.7 mg)、3 (1.4 mg)、4 (69.3 mg)、5 (6.0 mg)、6 (2.1 mg)、7 (14.9 mg)、8 (2.4 mg)、9 (3.7 mg)、10 (9.4 mg)、11 (3.9 mg)、12 (12.5 mg)、13 (29.8 mg)、14 (1.9 mg)、15 (7.8 mg)、16 (8.5 mg)、17 (3.3 mg)、18 (2.0 mg)、19 (12.2 mg)、20 (7.5 mg) をそれぞれ単離した。

### 3. 単離化合物の構造解析

NMR 測定には以下の装置を用いた。

AVANCE 700 (Bruker BioSpin)

Unity INOVA 500 (Varian)

また、NMR のデータ処理ソフトには MNovo (Mestrelab Research) を用いた。

MS 測定には Q-ToF micro (MICROMASS/Waters) を用い、MassLynx 4.0 (Waters) にて解析を行った。

UV 及び CD は J-820 Spectropolarimeter (JASCO) と ORDM-401 (JASCO) を用いて測定した。IR は FT/IR-6300 Fourier Transform Infrared Spectrometer (JASCO) を用いて測定した。

## C. 研究結果

### 1. 単離化合物の構造解析

化合物 4 は茶褐色の非結晶性物質として得られ、HR-MS、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$ -NMR より分子式は  $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$  と推定された。二次元 NMR (COSY, HMBC, ROESY) の詳細な解析 (図 1) により、相対配置を含む A-type プロアントシアニジンの分子構造が判明した。また、フラボノイド結合部分の絶対立体配置について、CD スペクトルデータを基に検討したところ、 $[\theta]_{288} = +0.4$ 、 $[\theta]_{256} = -13.0$  より、(2*S*,4*S*)-体であると推定された。SciFinder による構造一致検索の結果、本化合物は新規化合物であることが判明した。

化合物 14 は黄褐色の非晶質物質として得られ、HR-MS、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$ -NMR より分子式は窒素原子が含まれる  $\text{C}_{34}\text{H}_{25}\text{NO}_{12}$  と推定された。二次元 NMR の詳細な解析の結果、A-type プロアントシアニジンの A 環部分にピロリジノン環が結合した構造であると判明した (図 2)。また、CD スペクトルデータ ( $[\theta]_{285} = +0.3$ 、 $[\theta]_{256} = -2.7$ ) より、プロアントシアニジン部分の絶対立体配置は、(2*S*,3*S*,4*S*)-体であると推定されたが、ピロリジノン環部分の立体配置は

推定できなかった。構造一致検索の結果、本化合物は新規化合物であることが判明した。

化合物 19 及び 20 は茶褐色の非晶質物質として得られ、分子式はそれぞれ  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_5$  および  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_3$  と推定された。二次元 NMR の解析 (図 3) により、両化合物は 2-naphthoic acid 誘導体であると判明した。構造一致検索の結果、化合物 19 は新規化合物であり、化合物 20 は天然から初めての単離であることが判明した。

化合物 5 は茶褐色の非晶質物質として得られ、HR-MS、 $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$ -NMR より、分子式は  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$  と推定された。二次元 NMR の解析 (図 3) により、 $\alpha$ -テトラロン類であると決定された。構造一致検索の結果、本化合物は天然から初めての単離であることが判明したが、絶対配置については今後検討する予定である。

その他の単離化合物については、詳細なスペクトル解析により、既知物質であるフラボノイド類 (化合物 1,2,6,12,13,15)、リグナン類 (化合物 8,16,17,21)、A-type プロアントシアニジン類 (化合物 3,7,9,10,11,18) であると判明した (図 4)。これらの内、化合物 18 は、フラボノイドが 3 分子結合した構造を有するが、立体配置については決定できなかった。

## D. 考察

新たに 22 個の化合物を単離し、二次元 NMR による構造解析及び CD による絶対立体配置解析を行ったところ、A-type プロアントシアニジン 8 種、フラボノイド 7 種、リグナン・ネオリグナン 4 種、ナフトレン誘導体 2 種、 $\alpha$ -テトラロン類 1 種の構造が明らかとなった。構造一致検索の結果、A-type プロアントシアニジン 2 種とナフトレン誘導体 1 種が新規化合物であり、ナフトレン誘導体 1 種と  $\alpha$ -テトラロン類 1 種が天然から初めての単離であることが判明した。

単離構造決定した化合物のうち、新規 A-type プロアントシアニジンである化合物 14 は、ephedrannin A<sup>1)</sup> の A 環 8 位にピロリジノンが結合した構造を有したものであった。窒素原子を含むフラボノイドはまだあまり報告されておらず<sup>4)</sup>、また、二量体であるプロアントシアニジンに結合した構造は今回が初めての報告となる。

今後、更なる化合物の精査を行うと共に、単離された化合物の絶対立体配置決定について検討を進める予定である。

#### E. 参考文献

- 1) Hikino H., Takahashi M., Konno C., *Tetrahedron Lett.* (1982) *23*, 673-676.
- 2) Hikino. H., Shimoyama, N., Yoshimasa. K., Takahashi. M., *Heterocycles* (1982) *19*, 1381-1386.
- 3) Kasahara Y, Hikino H., *Heterocycles* (1983) *20*, 1953-1956.
- 4) Ren, D.-M., Guo, H.-F., Yu, W.-T., Wang, S.-Q., Ji, M., and Lou, H.-X., *Phytochemistry* (2008) *69*, 1425-1433.

#### F. 研究発表

論文発表等  
なし

学会発表等

- 1) ペルー産 *Ephedra americana* の成分研究 (2) . 眞鍋留奈, 代田 修, 関田節子, 日本生薬学会第 61 回年会 (福岡) 1P-19.

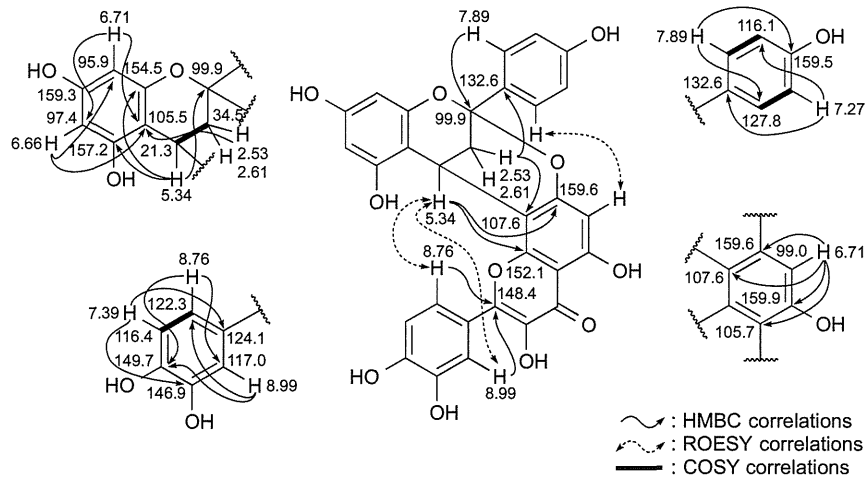


図 1. 化合物 4 の二次元 NMR による構造解析

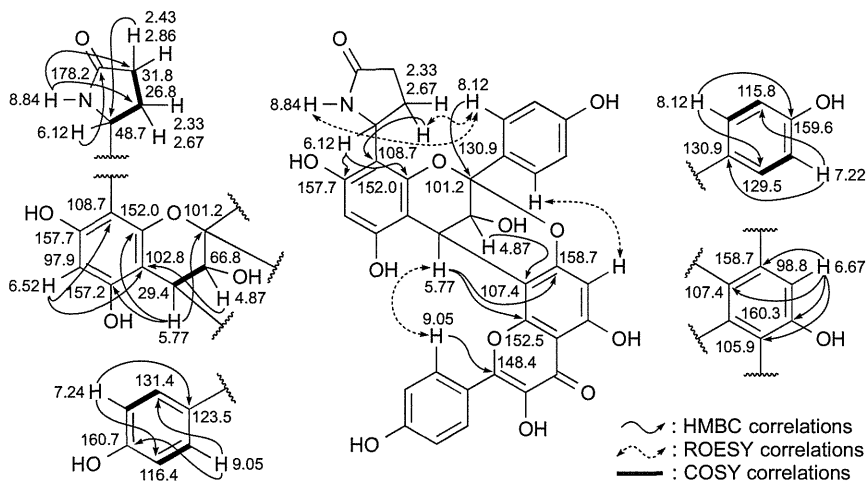


図 2. 化合物 14 の二次元 NMR による構造解析

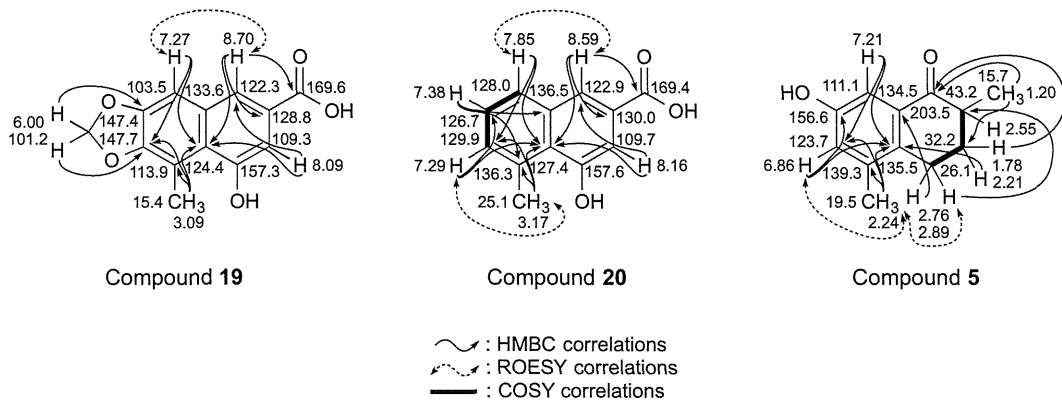
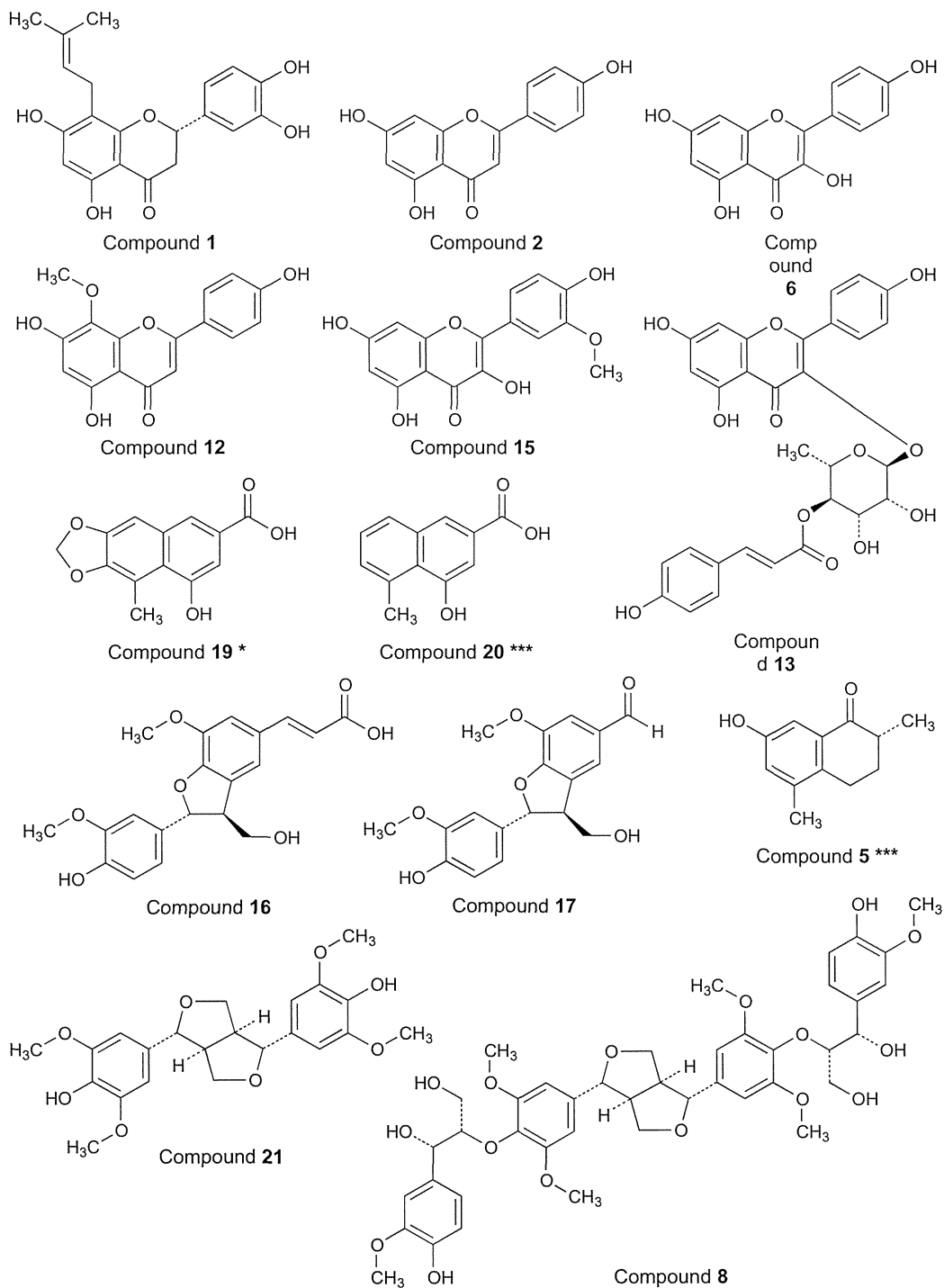


図 3. 化合物 19, 20 及び 5 の二次元 NMR による構造解析



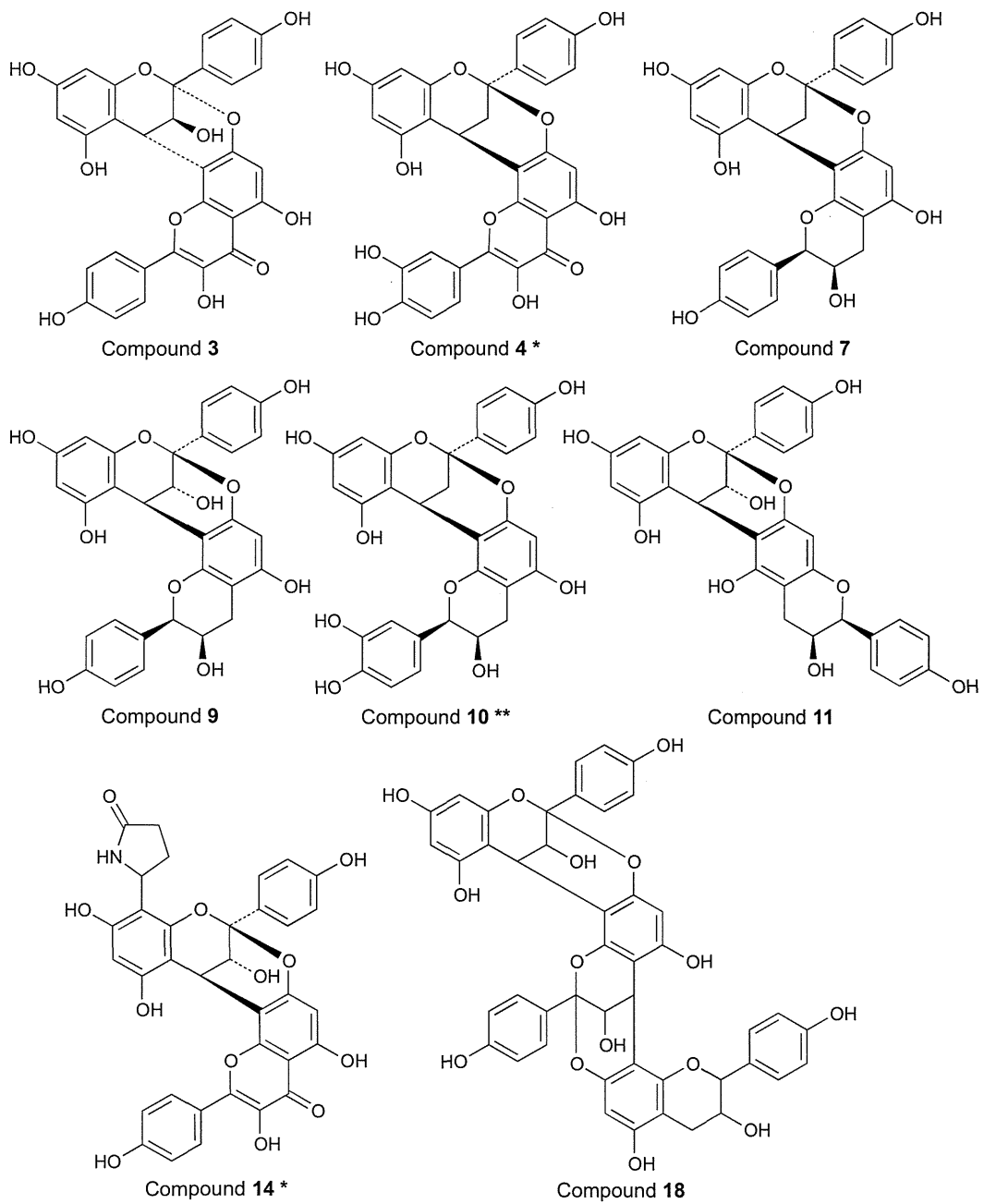
\* New compounds

\*\* New compound isolated in previous work

\*\*\* The first isolated compounds from nature

図 4-1. 単離化合物の構造 (1)





\* New compounds  
 \*\* New compound isolated in previous work  
 \*\*\* The first isolated compounds from nature

図 4-2. 単離化合物の構造 (2)

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
研究報告書

マオウ含有成分の生合成遺伝子の解析

研究代表者	御影 雅幸	東京農業大学	教授
研究分担者	関田 節子	昭和薬科大学	特任教授
研究分担者	高野 昭人	昭和薬科大学	教授
研究協力者	中根 孝久	昭和薬科大学薬学部	准教授
研究協力者	久城 哲夫	明治大学農学部農芸化学科	准教授
研究協力者	吉澤 祐介	明治大学農学部農芸化学科	大学院生
研究協力者	鈴木 秀幸	公益財団法人かずさDNA研究所	グループ長

研究要旨 生薬マオウの主要成分であるエフェドリン系アルカロイドの生合成酵素遺伝子のクローニングと、その詳細な機能解析を目的とした研究の一環として、生合成の鍵反応である、benzoyl-CoAとピルビン酸の縮合を行う酵素遺伝子の探索を行った。まず、マオウ属植物3種から mRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて EST 解析を行い、EST data の構築を行った。次に得られたデータの中から、候補遺伝子を選抜して組み換えタンパク質を発現させ、酵素活性試験を行った。しかし、目的の反応生成物を検出できなかった。現在、酵素反応条件の再検討や新たな候補遺伝子の探索を行っている。

この EST data の解析を行うことで、エフェドリン生合成に関与する遺伝子の同定への足がかりになると期待できる。

## A. 研究目的

第16改正日本薬局方では、生薬マオウは、*Ephedra sinica* Stapf、*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge (*Ephedraceae*) の地上茎を乾燥したもので、総アルカロイド〔エフェドリン ( $C_{10}H_{15}NO$ : 165.23) 及びプソイドエフェドリン ( $C_{10}H_{15}NO$ : 165.23)〕を0.7%以上を含むものと規定されている。

生薬マオウの主要成分であるエフェドリンは、フェニルアラニン由来の benzoyl-CoA とピルビン酸が縮合した後、アミノ化、還元、メチル化を経て生合成される（図1）。これら生合成経路や生合成中間

体は解明されているものの、生合成に関与する酵素遺伝子に関してはほとんど明らかになっていない。

そこで、マオウ属植物からエフェドリン生合成酵素遺伝子をクローニングし、その詳細な機能解析をすることを目的として本研究に着手した。

今回は、特に、エフェドリン系アルカロイド生合成の鍵反応である、benzoyl-CoA とピルビン酸の縮合を行う酵素遺伝子の探索を行った。これら生合成遺伝子が明らかになることで、物質生産や生合成遺伝子を駆使したマオウの分子育種が可能になると考えられる。

我々はエフェドリン生合成遺伝子解明の遺伝子的なアプローチとしてかずさ DNA 研究所の協力のもと EST data の構築を行った。この EST data の解析を行うことで、エフェドリン生合成に関与する遺伝子の同定への足がかりになると期待できる。

## B. 研究方法

### 1. 実験材料とサンプリング

#### (1) *Ephedra sinica* :

金沢大学薬用植物園で栽培保存している個体。

#### (2) *E. distachya* :

昭和薬科大学薬用植物園で栽培保存している個体。

#### (3) *E. gerardiana* :

昭和薬科大学薬用植物園で栽培保存している個体。

それぞれの個体から、次のように部位ごとにサンプリングし、実験に供した。

*E. sinica*: 節、節間上部、節間下部、側部、地下部、種子。

*E. distachya*: 節、節間上部、節間下部、側部、地下部。

*E. gerardiana*: 節、節間上部、節間下部、地下部。

### 2. 次世代シーケンサーによる EST 解析

サンプリングした各部位から mRNA を抽出し、かずさ DNA 研究所が所有している次世代シーケンサー (illumina HiSeq 1500) による mRNA ショットガンシーケンスを行った。次いで得られた配列データについて CLC Genomics Workbench version 5.5.2 (clcbio社) を用いたアセンブルを行うことでコンティグを作成し、データベースとした。

### 3. エフェドリン生合成に関与する候補遺伝子の探索

Benzoyl-CoA とピルビン酸の縮合酵素は Thiamine diphosphate (ThDP) を補酵素とする酵素であることが推測されている (図 2)。そこで、EST data を用いて、既知の ThDP 依存酵素で、保存されている配列を検索し、候補遺伝子の探索を行った。

### 4. 組み替えタンパク質による酵素反応試験

*E. sinica* の地上茎から抽出した RNA を用いて cDNA の合成を行った。これら cDNA を用いて PCR をおこない、それぞれ候補遺伝子の全長 cDNA 配列を取得した。取得した配列を pCold ベクターに組み込み大腸菌 BL21 株にプラスミドを導入し形質転換を行った。その後、組み替えタンパク質を発現させ、超音波による菌体破碎を行い粗タンパク質での酵素反応を行った。反応液より酢酸エチルによる抽出を行い、HPLC による分析を行った。

カラム : inertsil ODS-3(GL Science)

検出波長 (UV) : 280 nm

移動層溶媒 : 100% MeOH(A)、H<sub>2</sub>O(B)

0-3 min A:B=50:50

gradient

20 min A:B=95:5

## C. 研究結果

(1) 次世代シーケンサーによる EST 解析の結果、*E. sinica* で 30016、*E. distachya* で 40590、*E. gerardiana* で 36922 個の cDNA 断片の塩基配列を取得した。

(2) 候補遺伝子の探索を行った結果、ピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) および 2-hydroxy-phytanoyl CoA lyase (2HPL) と相同性のある 2 つの遺伝子が選抜された。

それぞれの候補遺伝子をクローニング後、大腸菌を用いて組み替えタンパク質を発現させた。Benzoyl-CoA とピルビン酸

を用いて酵素反応試験を行い、目的の反応生成物である 1-phenylpropane-1,2-dione が検出されるかどうか分析を行ったが現在のところ目的の反応生成物は検出できていない。

#### D. 考察

今回3種のマオウ属植物 (*E. sinica*, *E. distachya*, *E. gerardiana*) について、EST解析を行い、新たに EST data を構築することができた。本 EST data 内にはエフェドリン生合成酵素遺伝子が含まれている可能性が高いと考えられる。また、本 EST data はエフェドリン生合成遺伝子同定だけでなく他のマオウ由来代謝物の生合成研究においても大変有効であると考えられる。

今回、候補遺伝子である PDC、2HPL の酵素活性試験を行った結果、目的の反応の触媒活性は見られなかった。今後、反応温度や pH など条件の検討が必要であると考えられる。また現在、構築した EST data を用いて新たな候補遺伝子の探索を行っている。植物の ThDP を補酵素とする酵素であるアセト乳酸合成酵素 (ALS) や1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸合成酵素 (DXS)、微生物由来である Oxalyl-CoA decarboxylase (OXC) と相同性がある配列を探索し、活性部位を比較することで新たな候補遺伝子の選抜を目指している。

#### E. 結論

今回3種のマオウ属植物 (*E. sinica*, *E. distachya*, *E. gerardiana*) について、EST解析を行い、新たに EST data を構築することができた。

残念ながら、今回は生合成遺伝子の特定には至らなかったが、このデータはエフェドリン生合成遺伝子同定だけでなく、他のマオウ由来代謝物の生合成研究においても大変貴重なデータであると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

#### H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

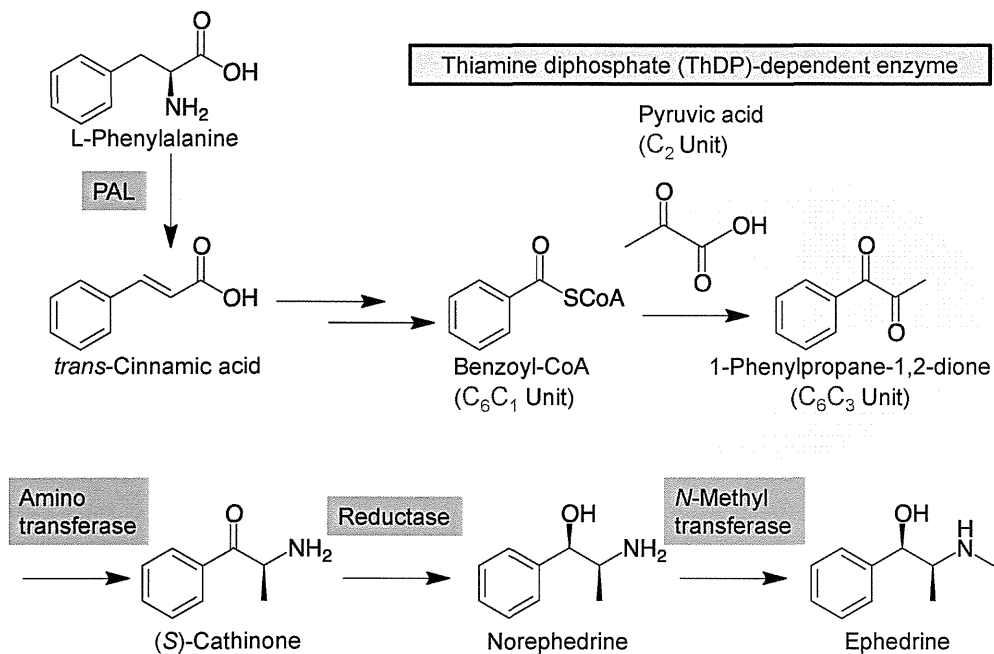


図1 エフェドリン系アルカロイドの生合成経路

Thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymeによって触媒されることが推定されている。

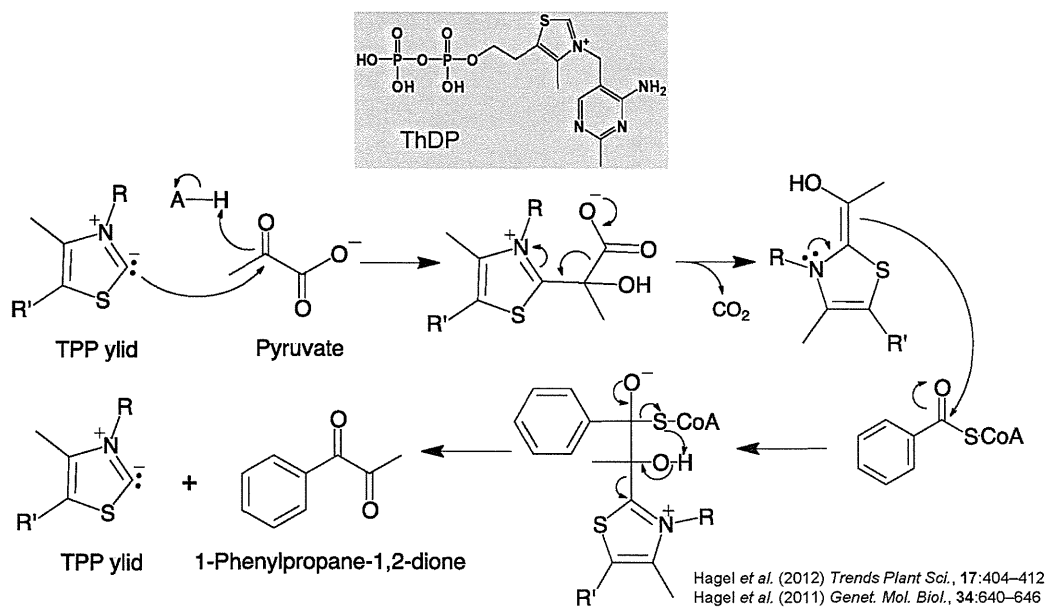


図2 エフェドリン基本骨格の生合成経路 (推定)



## Influence of genetic factors on the ephedrine alkaloid composition ratio of *Ephedra* plants

Masashi Matsumoto · Manabu Hirayama · Norihiro Ohtomi · Takeshi Ohno ·  
Yukihiro Nomura · Osamu Iida · Koji Sugimura · Nobuo Kawahara ·  
Takashi Tsuchida · Masayuki Mikage

Received: 2 October 2013 / Accepted: 27 July 2014 / Published online: 13 August 2014  
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer Japan 2014

**Abstract** We investigated the ephedrine alkaloid [(–)-ephedrine and (+)-pseudoephedrine] composition ratio of a crude Chinese herbal drug described in the Japanese Pharmacopoeia ‘Ephedra herb (Chinese name: Mahuang)’. There were marked changes in the alkaloid composition ratio of wild plants in areas where both male and female clusters coexisted. However, in genetically homogeneous areas with the growth of male or female clusters alone, all of the coefficients of the regression lines were positive, but each gradient varied. This suggests that the alkaloid composition ratio has a clear tendency in each individual.

A part of this study was already reported in the 131th conference of the Pharmaceutical Society of Japan [2011.3, Shizuoka (this conference had to be cancelled due to the disaster)].

M. Matsumoto (✉) · T. Tsuchida  
Kracie Pharma Ltd., 3-1, Kanebo-machi, Takaoka,  
Toyama 933-0856, Japan  
e-mail: matsumoto\_masashi@phm.kracie.co.jp

M. Matsumoto · M. Hirayama · N. Ohtomi · T. Ohno ·  
Y. Nomura · M. Mikage  
Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa  
University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan  
e-mail: mikage@p.kanazawa-u.ac.jp

O. Iida · K. Sugimura  
Tanegashima Division, Research Center for Medicinal Plant  
Resources, National Institute of Biomedical Innovation,  
17007-2, Matsubarayama, Noma, Nakatane-cho, Kumage-gun,  
Kagoshima 891-3604, Japan  
e-mail: iida@nibio.go.jp

N. Kawahara  
Tsukuba Division, Research Center for Medicinal Plant  
Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2,  
Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan  
e-mail: kawahara@nibio.go.jp

Based on this, we cultivated individuals for vegetative propagation, and evaluated the alkaloid content ratio. Those propagated by separating the roots showed a specific tendency regardless of the cultivation area (Wakayama, Tanegashima). Those propagated by separating the herbaceous stem showed a specific tendency regardless of the soil or harvest time. In addition, we surveyed the (–)-ephedrine content ratio of 3- to 6-year-old strains. There was a high positive correlation coefficient between the previous and subsequent years. These findings suggest that the ephedrine alkaloid composition ratio of Ephedra herb depends on genetic factors, but not on environmental factors or the growth period.

**Keywords** *Ephedra sinica* Stapf · Ephedrine · Pseudoephedrine · Cultivation · Division · Cuttage

### Introduction

The 16th Revision of the Japanese Pharmacopoeia [1] describes the total ephedrine alkaloid [(–)-ephedrine (Eph) and (+)-pseudoephedrine (P-Eph)] content of a crude Chinese herbal drug ‘Ephedra herb (Chinese name: Mahuang)’ as  $\geq 0.7\%$ . The two components are diastereomer with similar structures, but their drug efficacy differs; however, their contents are not described. Concerning their drug efficacy, Eph shows more potent asthma-reducing action [2] [3] and blood pressure-increasing [4] action compared to P-Eph. On the other hand, the anti-inflammatory effects of P-Eph are more marked than those of Eph [5]. Therefore, Ephedra herb preparations should be selected in accordance with the content ratio of the two components. Zhang et al. [6] recommended that Ephedra herb, containing a higher level of Eph, should be used to resolve coldness through sweating or

reduce cough/asthma (maoto, makyokansekitou), while Ephedra herb, containing a higher level of P-Eph, should be used for anti-inflammatory/analgesic effects (dokkatsukakk-onto) [7]. Previous studies reported Ephedra class/regional differences in the alkaloid content ratio. Concerning the former, the P-Eph content is higher than the Eph content in *Ephedra intermedia*, while *E. sinica* and *E. equisetina* are the opposite [8, 9]. Concerning the latter, among commercially available Ephedra Herb, the P-Eph content is higher than the Eph content in the Gansu and Qinghai Provinces in China [10]. Among wild plants, the alkaloid content of Ephedra herb and the P-Eph composition ratio are higher in areas with a low rainfall [11]. However, in these studies, the relative ratio of Eph and P-Eph in Ephedra herb was reversed in some cases despite having the same place of origin. This was possibly associated with complex factors such as the growth environment/period and genetic factors; however, the details remain to be clarified. In this study, assuming that differences in the content ratio are primarily related to genetic diversity, we first surveyed wild Chinese plants in genetically diverse areas where both male and female clusters coexisted and genetically homogeneous areas with the growth of male or female clusters alone. The latter refers to areas with clusters consisting of the same individual connected at the rhizome, although they seem to be several individuals on the ground. For example, *E. sinica* extensively elongates its rhizome under the ground in comparison with other *Ephedra* plants such as *E. intermedia* and *E. equisetina*, forming such a cluster. In this study, we evaluated clusters in the Hebei Province and Inner Mongolia region of China.

Second, we cultivated genetically stable clonal strains through cuttage/division to investigate the influence of growth environments and the alkaloid content ratio. As the aerial part is used to prepare a crude drug, Ephedra herb, the rhizome remains, and it is possible to harvest this plant every year [12]; however, it is unclear whether the alkaloid content ratio is stable. We cultivated several genetically different strains, and investigated 3- to 6-year-old strains for a follow-up survey for several years.

## Materials

### *Ephedra sinica* Stapf (wild plants)

Collection area: Chifeng 1 in Inner Mongolia (male and female clusters coexisted, altitude 330 m and 430 m in 2010 and in 2011, respectively). Sample nos. 100623-3, 100623-4 (several individuals in the same cluster), 110725A1-1~A1-4, and 110725B1-2~B1-5. Dates of collection: June 23, 2010, July 25, 2011. No. of samples: 14. Deposit site: Kracie Pharma, Ltd.

Collection area: Chifeng 2 in Inner Mongolia (male and female clusters coexisted, altitude 680 m in 2010 and in 2011). Sample nos. 100623-1 (several individuals in the same cluster), 110726A1-1~A1-4, and 110726B1-1~B1-7. Date of collection: June 23, 2010, July 26, 2011. No. of samples: 14. Deposit site: Kanazawa University.

Collection area: Chengde in Hebei Province (male cluster consisting of a single individual, altitude 1,350 m). Sample no. 02139. Date of collection: June 10, 2002. No. of samples: 9. Deposit site: Kanazawa University.

Collection area: Baotou in Inner Mongolia (gender: unclear, cluster consisting of a single individual despite its appearance involving different individuals on the ground, altitude 1,380 m). Sample no. 100720-10. Date of collection: July 20, 2010. No. of samples: 5. Deposit site: Kanazawa University.

Collection area: Xilinhot in Inner Mongolia (gender: unclear, cluster consisting of a single individual despite its appearance involving different individuals on the ground, altitude 1,060 m). Sample no. 7081801. Date of collection: August 1, 2007. No. of samples: 5. Deposit site: Kanazawa University.

### Uncertain species (cultivated plants)

The EP-13 strain, which was introduced as *Ephedra distachya*, was used. Cultivation area: Wakayama or Tanegashima Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation. Cultivation method: division/outdoor cultivation. Date of collection: Wakayama, December 15, 2011, Tanegashima, December 13 and 14, 2011. No. of samples: Wakayama 9; Tanegashima 26. Deposit site: Kracie Pharma, Ltd.

### *E. sinica* (cultivated plants)

Collection area: Medicinal Plant Garden of Kanazawa University. Cultivation method: cuttage/cultivation with wagnerpots for 2 years (annual transplantation). Soil: river/mountain sand, loamy soil (small, hard grains); Kanuma pumice (small grains); volcanic gravel in Kiryu, or commercially available soil ('Soil for Planters'; Akimoto Tensanbutsu Co., Ltd.). Date of collection: (1) November 22, 2011, (2) September 18, 2012. No. of samples: (1) 12, (2) 11. Deposit site: Kracie Pharma, Ltd.

Collection area: Medicinal Plant Garden of Kanazawa University. Cultivation method: seedlings were planted in 1/5,000 or 1/2,000 wagnerpots, and cultivated from 2004 (Autumn) until 2010. Soil: river sand (the inferior layer of the soil was mixed with a chemical fertilizer [Futsukasei no. 8, Fujikawa Egg, N:P:K = 8:8:8, 10 g/pot]) or one of the following 5 types: (1) commercially available soil ('Soil for Planters'; Akimoto Tensanbutsu Co., Ltd.), (2)

loamy soil, (3) commercially available soil + loamy soil (volumetric ratio: 28:18), (4) commercially available soil + alkaline agent, or (5) loamy soil + alkaline agent (alkaline agent: 10 g/pot of magnesium-lime carbonate or nitrogen-lime). Watering conditions: diluted artificial seawater was given once a week, and groundwater once a week (composition of artificial seawater: NaCl [special class] at 86.8 g, MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O [first class] at 20.8 g, MgCl<sub>2</sub>/6H<sub>2</sub>O [special class] at 15.7 g, CaCl<sub>2</sub>/2H<sub>2</sub>O [first class] at 4.5 g, and KCl [special class] at 2.2 g were dissolved in groundwater to prepare a volume of 3 L). Dates of collection: September 2007, September 2008, September 2009, and September 2010. No. of samples: 100 (some of the samples were blighted during the study: 5-year-old plants 95 samples, 6-year-old plants 90 samples). Deposit site: Kanazawa University.

**Methods**

**Quantification of alkaloids**

Quantification was performed as described below. Some tests were conducted in accordance with the quantification method described in the Japanese Pharmacopoeia. In some samples, we compared differences in the Eph/P-Eph ratio between the two methods, and confirmed that the rate of difference was ≤ 5 %.

Preparation of sample solution: the mobile phase of HPLC at 5.0 mL (described below) was added to each sample powder at 100 mg, and placed at room temperature for 20 min. Subsequently, ultrasonic extraction was performed for 25 min. Each solution was centrifuged at 3,000 rpm for 15 min. The supernatant was filtered using a 0.45-μm membrane filter (Minisart RC25; Sartorius Stedium Biotech), and used as the sample solution.

HPLC conditions: an L-2130 pump, L-2200 autosampler, L-2400 UV detector, D-2500 integrator (Hitachi), and Handy ODS column (4.6 mm I.D. × 250 mm, no. 14562) (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.) were used. Column temperature: room temperature. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection wavelength: 210 nm. Mobile phase: 27 mM sodium lauryl sulfate (SDS) solution/MeCN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (305:195:0.8).

**Result**

**Correlation coefficient of Eph and P-Eph in wild plants**

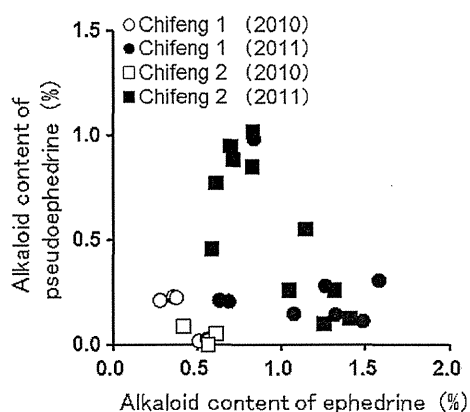
In two areas where both male and female clusters coexisted (Inner Mongolia Chifeng), all of the coefficients of the regression lines were negative (apart from the regression

equation in Chifeng 1 (2010) which was  $y = -0.85639x + 0.5013$  ( $r = -0.9335$ ) and in Chifeng 2 (2011) which was  $y = -0.8817x + 1.4036$  ( $r = -0.7605$ ); regression equation:  $y = ax + b$ ,  $a$ : regression coefficient); however, there were individual differences in the alkaloid content ratio (Fig. 1). In samples obtained in 2010, the alkaloid content was lower than in 2011. This was possibly because samples were collected earlier (late June) in 2010, and seasonal variations occur in alkaloid contents. A study reported that the alkaloid content of samples collected in June was lower than in July [13].

On the other hand, in individuals obtained in an area with male clusters (Hebei Province) and the herbaceous stem of the same individual connected at the rhizome (two areas in Inner Mongolia), all of the coefficients of the regression lines were positive, but each gradient varied. The regression equation in Baotou was  $y = 2.2874x - 0.0703$  ( $r = 0.9544$ ), in Xilinhot was  $y = 0.0707x - 0.0007$  ( $r = 0.9597$ ), and in Hebei was  $y = 0.9931x - 0.084$  ( $r = 0.8603$ ) (Fig. 2). In those from Hebei Province, the correlation coefficient was markedly lower than in those from Baotou and Xilinhot.

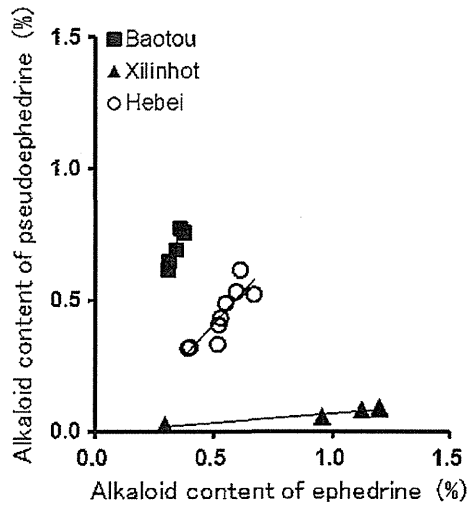
Eph-to-P-Eph content ratio in cultivated plants (division, outdoor cultivation, cuttage, cultivation with wagnerpots)

There was a high correlation coefficient in the alkaloid content ratio even when *Ephedra* plants were cultivated using the division method in the two distant areas of Wakayama and Tanegashima (the regression equation was  $y = 0.1318x + 0.0002$  [ $r = 0.9799$ ]) (Fig. 3). When the cuttage method was used, there was also a high correlation coefficient in the alkaloid content ratio, although the type



**Fig. 1** Relationship between ephedrine content of wild *Ephedra* plants (*Ephedra sinica* Stapf) increased by sexual production and pseudoephedrine. Regression equation: Chifeng 1 (2010) ( $n = 6$ )  $y = -0.85639x + 0.5013$  ( $r = -0.9335$ ); Chifeng 1 (2011) ( $n = 8$ )  $y = -0.2811x + 0.195$  ( $r = -0.2841$ ); Chifeng 2 (2010) ( $n = 3$ )  $y = -0.2242x + 0.5465$  ( $r = -0.6687$ ); Chifeng 2 (2011) ( $n = 11$ )  $y = -0.8817x + 1.4036$  ( $r = -0.7605$ )





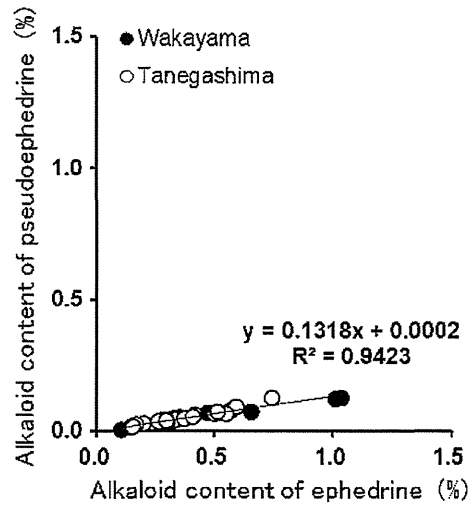
**Fig. 2** Relationship between ephedrine content of wild *Ephedra* plants (*Ephedra sinica* Stapf) increased by asexual reproduction (genetically homogeneous areas with the growth of male or female clusters alone) and pseudoephedrine. Regression equation and correlation coefficient: Baotou (filled square) ( $n = 5$ )  $y = 2.2874x - 0.0703$  ( $r = 0.9544$ ); Xilinhot (filled triangle) ( $n = 5$ )  $y = 0.0707x - 0.0007$  ( $r = 0.9597$ ); Hebei (open circle) ( $n = 9$ )  $y = 0.9931x - 0.084$  ( $r = 0.8603$ )

of soil and harvest time differed (the regression equation was  $y = 0.9837x - 0.0233$  [ $r = 0.9799$ ]) (Fig. 4).

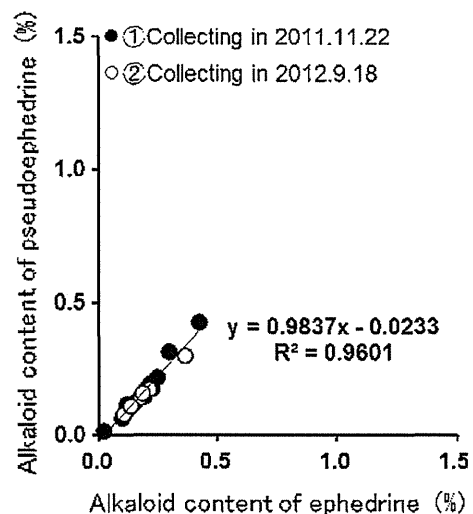
In several 3- to 6-year-old genetically different seedlings, there was a high correlation coefficient in the content ratios (Eph/Eph + P-Eph) of individuals between each year and the previous year over 4 consecutive years despite different soil/water compositions. The regression equation between 3-year-old and 4-year-old was  $y = 0.9519x + 0.0666$  ( $r = 0.9534$ ), between 4-year-old and 5-year-old was  $y = 0.9284x + 0.0687$  ( $r = 0.9719$ ), between 5-year-old and 6-year-old was  $y = 0.9565x + 0.0373$  ( $r = 0.9835$ ), and between 3-year-old and 6-year-old was  $y = 0.8786x + 0.1421$  ( $r = 0.9564$ ) (Fig. 5). There was also a high correlation coefficient in the alkaloid content ratios (Eph/Eph + P-Eph); however, the coefficient of the regression lines was slightly lower and the intercept was higher than those between each year and the previous year. This suggests that the Eph content ratio slightly increased in comparison with the previous year.

## Discussion

In areas where male and female clusters coexisted, the alkaloid content ratio varied (Fig. 1); this was possibly because several individuals with different genetic information through sexual reproduction coexisted in such areas. This is also supported by the results of a study investigating serial changes in cultivated plants (Fig. 5). The test strains were genetically different seedlings. The

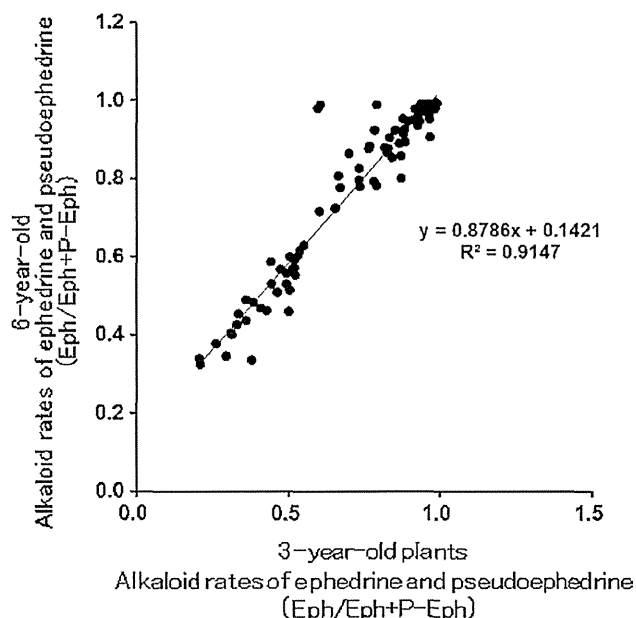


**Fig. 3** Relationship between ephedrine content of cultivated *Ephedra* plants (uncertain species, EP-13) (dividing roots/raising outdoors) and pseudoephedrine. Wakayama (filled circle) ( $n = 9$ ); Tanegashima (open circle) ( $n = 26$ )



**Fig. 4** Relationship between ephedrine content of cultivated *Ephedra* plants (*Ephedra sinica* Stapf) increased by dividing shoots/cultivating in wagnerpot in Kanazawa and pseudoephedrine. Collection dates: November 22, 2011 (filled circle) ( $n = 12$ ) and September 18, 2012 (open circle) ( $n = 11$ )

alkaloid content ratio (Eph/Eph + P-Eph) ranged from 0.2–1.0. On the other hand, there was a high positive correlation coefficient of the regression line in areas with the same individual male clusters alone (Fig. 2), which suggests that the alkaloid composition ratio has a clear tendency in each individual. In the area of Hebei Province surveyed in this study, almost all strains had male flowers, whereas there were no female flowers or flower-free individuals. In areas with male clusters, plants undergo asexual propagation. Therefore, a cluster may be derived from a



**Fig. 5** Relationship between alkaloid rates (content of ephedrine/the total content of ephedrine and pseudoephedrine) of 3-year-old ( $n = 90$ ) cultivated *Ephedra* plants (*Ephedra sinica* Stapf) in Kanazawa and 6-year old plants ( $n = 90$ )

single individual elongating its rhizome. However, the correlation coefficient was markedly lower than those of a single individual or cultivated clonal strain. This may be associated with the possibility of multiple strains and growth period-related changes in the content ratio in the same individual. Concerning growth period-related changes, a 4-year follow-up survey showed that the Eph content ratio (Eph/Eph + P-Eph) slightly increased in comparison with the previous year (average Eph content ratio of 0.72 in the 3-year-old strain; 0.75 in the 4-year-old strain; 0.76 in the 5-year-old strain; and 0.77 in the 6-year-old strain). Even in the same individual, there may be a variation between two points with an interval of >10 years. A long-term survey should be performed every 10 years. The scale of the area with male clusters in Hebei Province was relatively large, but it was very rare autogenesis ground. The scale of areas with the cluster of a single individual was extremely small. Based on these findings, it may be difficult to continuously obtain *Ephedra* herb in which the component content ratio is stable, from wild or seed propagation-mediated cultivated plants. On the other hand, the alkaloid content ratio in cultivated plants multiplied through division or cuttage was constant despite different cultivation areas/conditions (Figs. 3, 4). Briefly, the alkaloid content ratio depends on genetic factors, but not on the environment or growth period. We can obtain target *Ephedra* herb by selecting a strain with an alkaloid content ratio at which the target pharmacological activity is more

potent than those of other alkaloids, and cultivating clonal strains using the vegetative propagation method.

On the other hand, as a limitation, the ephedrine alkaloid contents (Eph + P-Eph) of genetically equivalent clonal strains cultivated in the same area ranged from 0.1–1.0 % (Figs. 3, 4). Even among wild strains connected at the rhizome, the ephedrine alkaloid content of the aerial parts differed (Fig. 2), suggesting the influence of differences in growth. However, it is very difficult to standardize growth of all individuals and a method to increase the average content should be investigated.

Using these methods, it is possible to obtain a stable crude drug, *Ephedra* herb.

**Acknowledgments** Japan Society for the Promotion of Science, Grant-in-Aid for Scientific Research (nos. 13575010, 17405014) supported this study.

## References

1. Society of Japanese Pharmacopoeia (2011) The Japanese pharmacopoeia, 16th edn. Yakuji Nippo, Tokyo, p 1589
2. Liu Z, Shi Q, Yang Y, Li R-J, Zhu Y-Y, Bai G (2009) A comparative study of effect to asthma and mechanism in ephedrine and pseudoephedrine. *Zhong Cao Yao* 40(5):771–774 in Chinese
3. Laitinen LA, Empey DW, Bye C, Britton MG, McDonnell K, Hughes DTD (1982) A comparison of the bronchodilator action of pseudoephedrine and ephedrine in patients with reversible airway obstruction. *Eur J Clin Pharmacol* 23(2):107–109
4. Akiba K, Miyamoto A, Suzuki T, Anezaki K, Tadano T, Sakurada S, Kisara K (1979) Effects of d-pseudoephedrine on tracheo-bronchial muscle and the cardiovascular system. *Folia Pharmacol Japon* 75(4):383–390
5. Hikino Hiroshi, Konno Chohachi, Takata Hiroshi, Tamada Mitsuru (1980) Antiinflammatory principle of *Ephedra* herbs. *Chem Pharm Bull* 28(10):2900–2904
6. Zhang JS, Tian Z, Lou ZC (1989) Quality evaluation of twelve species of Chinese *Ephedra* (mahuang). *Yao Xue Xue Bao* 24(11):865–871 in Chinese
7. Nagase Chiaki (1996) The effect of Chinese herbal medicine Dokkatsu-Kakkon-To (Chinese name: Du-Huo-Ge-Gen-Tang) on the symptom of shoulder stiffness. *Clinical Report* 30(3):633–643
8. Liu Ying-Mei, Sheu Shuenn-Jyi, Chiou Shioh-Hua, Chang Hsien-Chang, Chen Yuh-Pan (1993) A comparative study on commercial samples of *Ephedrae Herba*. *Planta Med* 59:376–378
9. The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan (1999) 21 century's herbal medicine. *Kampo products*. Senisya, Osaka, pp p87–p88
10. Tanaka T, Ohba K, Kawahara K, Sakai E (1995) Comparison of the constituents of *Ephedra* herbs from various countries on Ephedrine type alkaloids. *Nat Med* 49(4):418–424
11. Wang Li-Li, Kakiuchi Nobuko, Mikage Masayuki (2010) Studies of *Ephedra* plants in Asia. Part 6: geographical changes of anatomical features and alkaloids content of *Ephedra sinica*. *J Nat Med* 64:63–69
12. Editorial Committee of Guidelines for Good Agricultural Practice of Chinese Crude Drugs (2006) Guidelines for good agricultural practice of Chinese crude drugs. China Agriculture Press, Beijing, pp 840–849 (in Chinese)
13. Cheng Da-Dun, Guo Ping, Zhao Jun (1992) Seasonal variation of alkaloids contained in *Ephedra sinica* Herba in Inner Mongolia. *Zhongguo Yaoke Daxue xuebao* 23(2):82–87 in Chinese

同一環境下で8年間栽培した *Ephedra equisetina* Bunge と *E. sinica* Stapf  
のアルカロイド含量

A study of alkaloid contents in the herbal stems of *Ephedra equisetina*  
Bunge and *E. sinica* Stapf cultivated in the same field for 8 years.

松本昌士<sup>a,b\*</sup>・土田貴志<sup>a</sup>・佐々木陽平<sup>b</sup>・蔡少青<sup>c</sup>・御影雅幸<sup>d</sup>

<sup>a</sup>クラシエ製薬株式会社・<sup>b</sup>金沢大学・<sup>c</sup>北京大学薬学院・<sup>d</sup>東京農業大学

Masashi Matsumoto<sup>a,b\*</sup>, Takashi Tsuchida<sup>a</sup>, Yohei Sakaki<sup>b</sup>, Shao-Qing Cai<sup>c</sup> and Masayuki Mikage<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Kampo Research Labs., Kracie Pharma, Ltd., 3-1, Kanebo-machi, Takaoka, Toyama 933-0856 Japan

<sup>b</sup>Laboratory of Herbal Medicine and Natural Resources, Division of Pharmaceutical Sciences,  
Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192 Japan

<sup>c</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100082 China

<sup>d</sup>Department of Human and Animal-Plant Relationships, Faculty of Agriculture, Tokyo University of  
Agriculture, 1737, Funako, Atsugi, Kanagawa 243-0034 Japan

2014年10月28日受付

要 旨

中国の新疆ウイグル自治区博楽市において、同所的に8年間栽培した *Ephedra equisetina* Bunge と *E. sinica* Stapf の草質茎のアルカロイド含量を測定した結果、前者が有意に高かった。すなわちアルカロイド含量に影響する要因として、環境だけではなく、種の違いも影響をしている可能性が示唆された。現在、薬用麻黄の栽培は一般に後者で行なわれているが、自然環境下では多雨多湿に生育する株にはアルカロイド含量が低い傾向にあることが知られている。今後、日本において安定して日局16の含量規格に適合するアルカロイド含量の高い麻黄を供給するためには、これまで栽培が困難であるとされてきた *E. equisetina* の栽培化を検討することも重要である。

Abstract

We collected the herbal stems of *Ephedra equisetina* Bunge and *E. sinica* Stapf cultivated in the same conditions for 8 years in Pole, Xinjiang autonomous region, China. Comparing the alkaloid contents of them, those of *E. equisetina* were apparently higher than those of *E. sinica*. The result indicated that not only the habitat but also the species affected the alkaloid content of *Ephedra* plants. Generally, *E. sinica* is cultivated in China, but it is said that the alkaloid content of wild

*Ephedra* plants in a rainy or high humidity area is lower. The result of this study suggested that cultivating *E. equisetina* is worth to harvest high quality *Ephedra* in alkaloid content in Japan, though it has been thought to be rather difficult than *E. sinica*.

## 序論

生薬「麻黄」は第16改正日本薬局方において、*Ephedra sinica* Stapf, *E. intermedia* Schrenk et C.A. Meyer, *E. equisetina* Bunge の3種が規定されている<sup>1)</sup>。3種のうちの *E. equisetina* は、総アルカロイド含量 (ephedrine と pseudoephedrine の含量の合計) が他の2種よりも高いという結果が多数報告されている<sup>2),3),4)</sup> が、これらの結果は野生品を比較したもので、アルカロイド含量に影響を及ぼすと考えられる生育地、生育年数、生育環境などの生育条件が一定ではない。本種は根茎を伸長させる性質が弱く、圃場での栽培が困難であることから、栽培品の成分含量についてはほとんど報告されていない。局方収載の *E. sinica* 及び *E. intermedia* と本種を比較した報告例はないが、未収載の *E. distachya*, *E. gerardiana* と比較した報告はあり、6年生実生株における *E. equisetina* の総アルカロイド含量が、株分け後4年生の *E. distachya* 及び7年生実生株の *E. gerardiana* よりも低かった<sup>5)</sup> (*E. equisetina* 1.15%。 *E. distachya* 1.85%。 *E. gerardiana* 1.59%)。栽培方法、生育年数が一定ではないことに加え、他種の植物体の高さが100 cm以下であったことに対し、*E. equisetina* では350 cmと著しく大型化したものであり、植物体の大きさの違いがアルカロイド含量に影響している可能性も考えられる。また野生の *E. sinica* において、アルカロイド含量は降水量などの生育環境に影響を受け、降水量の少ない自生地ではアルカロイド含量が

高い傾向があることが明らかにされている<sup>6)</sup>。

野生の *E. equisetina* は水分環境が悪い瓦礫地や岩上のみ自生している<sup>7)</sup>ため、本種のアルカロイド含量が *E. sinica* などよりも高いのは生育環境の違いが原因である可能性があり、種の特徴であるか否かはまだ明確にされていない。

今回、中国新疆ウイグル自治区博楽市において、*E. equisetina* と *E. sinica* が同所的かつ同一期間栽培した株を入手したため、これらのサンプルについてアルカロイド含量を比較した結果について報告する。

## 材料

*Ephedra equisetina* Bunge 6株。標本番号 130625A-1~A-2, 130625A-8~A-11。 *Ephedra sinica* Stapf 7株。標本番号 130625A-3~A-7, 130625A-12~A-13。これらは栽培地調査にて得た情報によると、2005年に播種後8年間栽培した(2005年春に播種、秋に定植)株から得た地上部草質茎である。

採取地：新疆ウイグル自治区 博楽市 (alt.950 m)。採取日：2013年6月25日。試料標本は金沢大学薬学系が所蔵。

また、これらの栽培育成過程について、栽培管理者から得た情報を以下に記す。2005年に公的に栽培が奨励され、政府から配布された種子を4月にセルトレイに播種して育苗し、実生苗を9月に今回検体を採取した圃場に定植した。活着後は灌水、施肥、除草などはほとんど行わずに2012年まで継続して栽培し