

分担研究報告書

分担研究課題 「専ら医薬品」たる成分本質の判断のための調査・分析及びその判断基準・範囲の整備に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長 丸山卓郎

カツアバ製品の含有成分について

カツアバ製品の有害性評価のため、昨年度の遺伝子解析に引き続き、1製品のアルカリ画分について、ドラーゲンドルフ試液陽性を指標に、成分分画を行い、クマリン誘導体の1つである braylin を単離した。他にも、ドラーゲンドルフ試液陽性スポットが検出されていることから、引き続き、成分分画を継続すべきと考える。

協力研究者

後藤佑斗 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

カツアバはブラジルなどで使用される生薬であり、日本国内においては食薬区分上、非医薬品に分類され、強壯などを目的とする健康食品の原料として流通している。カツアバの基原植物は *Erythroxylum catuaba* とされているが、*Trichilia catigua* を基原植物とする場合もあり、これらが混同されている可能性もある。実際、カツアバ製品を分析して、*T. catigua* と *Erythroxylum* 属植物が混在することを確認した報告がなされており¹⁾、我が国の市場品においても基原植物に関する情報が混乱している可能性がある。また、*Erythroxylum* 属にはコカノキ (*E. coca*) をはじめとして、アルカロイドを含有する種が存在しており、これらがカツアバとして製品中に入っていた場合、摂取した人が健康被害を起こす恐れがある。そこで我々は昨年度、国内及びアメリカの健康食品市場に流通するカツアバ含有食品の塩基配列解析を行い、原料植物の同定を行った (Tables 1, 2)。今年度は、カツアバ製品中に含まれるアルカロイドの探索を目的に、ドラーゲンドルフ試

液陽性成分について単離、同定を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用されたカツアバ製品の詳細を Table 1 にまとめた。また、昨年度に報告した遺伝子鑑別研究の結果を Table 2 に示した。

2. 実験方法

2-1. 一般操作

2-1-1. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

各検体の粉末 100 mg (A14 に関しては 100 μ L) に、AcOEt 1 mL と NH₄OH 0.5 mL を加えて 1 hr 振とうした後、上層 (AcOEt 層) を回収して、以下の条件で分析を行った；TLC plate, TLC Silica gel 60 F₂₅₄ glass plate (Merck)；展開溶媒, toluene / acetone / MeOH / NH₄OH 混液 (45 : 45 : 7 : 3)；塗布量, 各 20 μ L；検出, UV 照射 (254, 365 nm), ドラーゲンドルフ試薬噴霧後、風乾し、亜硝酸ナトリウム試液噴霧；画像撮影, Doc-ItLS Acquisition ver. 8 (UVP)。

2-1-2. Flash chromatography

装置, Isolera Dalton ACI (BIOTAGE)；カラム, SNAP Ultra 25 g；移動相, Hexane (A) と AcOEt (B) でグラジエント, 15% B (0-10 CV) → 50% B (10-20 CV) → 50% B (20-25 CV)；

流速, 75 mL/min; 検出波長, UV (254 nm, 365 nm).

2-1-3. 高分解能 LC-MS 分析

装置, OrbiTrap LTQ XL (Thermo Fisher) ; カラム, Inertsil ODS-3 (2.1 x 150 mm I.D., 5 μ m, GL Sciences) ; 注入量, 1 μ L ; 移動相, 0.1%ギ酸 (A) と 0.1%ギ酸含有アセトニトリル (B) でグラジエント, 10%B (0 min) \rightarrow 25%B (0-15 min) \rightarrow 55%B (15-75 min) \rightarrow 55%B (75-80 min), 10%B (80-85 min) ; 流速, 0.25mL/min ; キャピラリー電圧, 10.00 V ; Sheath Gas Flow, 50.00 ; Aux Gas Flow, 25.0 ; Sweep Gas Flow, 3.00, データ取得, スキャンモード, ESI⁺ ; m/z =100 ~1000 ; PDA 検出範囲, 190-600 nm.

2-1-4. NMR

ECZ600 又は ECZ800 (Jeol) を用いて測定し, 化学シフトは, DSS- d_6 からの δ 値 (ppm) で表した.

2-2. 成分分画

検体 A10 の粉末 100 g に, CHCl₃ 500 mL と NH₄OH 300 mL を加えて振とうした. CHCl₃層を回収した後, 再び CHCl₃ 500 mL を加えて, 同様の操作を計 3 回繰り返した. 3 回分の回収液を合わせ, ろ過した後, 溶媒を留去した. これに CHCl₃ 2 mL を加えて再溶解し, 1 mL をサンプルレットにチャージして真空乾燥したもの (約 150 mg) を, Flash chromatography により, 6 つの画分に分画した (Fr. 0, 15.3 mg; Fr. 1, 4.5 mg; Fr. 2, 2.2 mg; Fr. 3, 3.1 mg (化合物 A); Fr. 4, 1.5 mg; Fr. 5, 29.9 mg).

化合物 A (braylin): colorless amorphous; HR-MS (ESI⁺): m/z 259.0967 [M+H]⁺ (C₁₅H₁₅O₄; calcd. for 259.0965), ¹H-NMR (CDCl₃; 600 MHz): δ 7.56 (1H, d, J =9.6Hz), 6.89 (1H, d, J

=15Hz), 6.74 (1H, s), 6.24 (1H, d, J =9.6Hz), 5.73 (1H, d, J =14.4Hz), 3.90 (3H, s), 1.51 (6H, s); ¹³C-NMR: see Tables 3, 4.

C. 研究結果

全 15 検体について TLC 分析を行った結果, A6, A9, A10, A11, A12, J2 の 6 検体で UV 254 nm に吸収を持ち, 365 nm 照射により青色の蛍光を発するスポットを認めた. これらのスポットは, いずれもドラーゲンドルフ試液陽性であった (Fig. 1). また, A13, A14 の 2 検体で, 上記のスポットと R_f 値の異なるドラーゲンドルフ試液陽性のスポットを検出した. このものは, UV 照射による吸収/蛍光を認めなかった. J4, J8 の 2 検体では, クロロフィルと思われる赤色の蛍光スポットを認めた. ドラーゲンドルフ試液陽性スポットが検出された検体のうち, 検体 A10 について当該スポットの分離精製を行った.

成分分画の過程を Fig. 2 に示した. 検体 A10 100 g について CHCl₃ と NH₄OH で抽出を行い, 回収した CHCl₃ 層について TLC 分析を行ったところ, ドラーゲンドルフ試液陽性のスポットを検出した (Fig. 3). また, 多数の蛍光スポットを認めた. 続けて, CHCl₃ 画分について, Flash chromatography 分取を行い, 6 つの画分を得た. このうち Fr. 1~4 について TLC 分析を行った結果, Fr. 2, 3, 4 にドラーゲンドルフ試液陽性のスポットを検出した (Fig. 4). このうち, 最も精製度が高いと思われた Fr. 3 について, 高分解能 LC-MS 分析を行った結果, このものはほぼ単一の成分で構成されていた (Fig. 5; 以降, 化合物 A と表記). 化合物 A は, 擬似分子イオンピーク [M+H]⁺ 値 259.0966 を与え, 組成推定の結果, C₁₅H₁₅O₄ (理論値 259.0967; δ =0.1 mmu) であった. 従って, 化合物 A の分子式を C₁₅H₁₄O₄ と決定した.

化合物 A は, ¹³C-NMR において, 1 個のカルボニル炭素と 10 個の sp^2 炭素のシグナルを認めた. 分子式から不飽和度が 9 であり, 二重

結合が 6 つであることから、3 環性の化合物と推定された。さらに、 ^1H -、 ^{13}C -NMR 及び 2 次元 NMR から、クマリン骨格の α 、 β -不飽和ラクトンに特徴的なシグナル (δ 6.24, 7.55, 143.7, 113.2, 161) の相関が認められたこと、ジメチル基を有し、ヘテロ原子に結合したシグナル (δ 78.0) があること、メトキシ基の存在 (δ 3.90, 56.5) が認められたことから、化合物 A の構造は、クマリンにイソプレニル基が閉環した Fig. 6 に示す構造が推定された。

そこで、これらの候補化合物の文献値を、化合物 A のものと比較したところ、7 番の構造のものとよく一致した (Tables 3, 4, Fig. 7)。HMBC の相関も、本構造と矛盾しなかったことから、化合物 A を braylin と同定した。

D. 考察

ドラーゲンドルフ試液陽性スポットを指標に、カツアバ製品の 1 つ (A10) の成分分画を行い、ドラーゲンドルフ試液陽性成分として、braylin を単離した。Combined Chemical Dictionary 及び KNApSAcK により、本化合物の天然物中の分布を検索した結果、本化合物は、いずれもミカン科の *Cedrelopsis longibractata*, *Flindersia brayleyana*, *Pitavia punctata* より単離されている (Table 5)。一般に、braylin のようなイソプレニル化されたクマリン化合物は、フロクマリンも含めてミカン科及びセリ科植物に多く分布しており、他の候補化合物も、ミカン科植物への含有が確認された (Table 5)。一方で、昨年度に行った遺伝子解析による基原植物調査では、ミカン科植物の配列は検出されていない。遺伝子解析により検出されなかったミカン科植物が原材料として使用されていたのか、あるいは、遺伝子解析により検出された植物種の中に、クマリン化合物が含まれていたかは不明である。

今回、アルカロイドの単離を目的に、ドラーゲンドルフ試液陽性スポットを指標に成分探索を行ったが、アルカロイドの単離には至らな

かった。今後、A13, 14 で認められている別のスポットも含めて、成分探索を継続すべきと考えられる。

E. 結論

カツアバ製品の有害性評価を目的に、昨年度の遺伝子解析に引き続き、1 製品のアルカリ画分について、ドラーゲンドルフ試液陽性を指標に、成分分画を行い、クマリン誘導体の 1 つである braylin を単離した。引き続き、成分分画を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

Table 1 Details of commercial *Catuaba* products used in this study.

No.	形状	表示された原材料	原産国	内容量	一日摂取量
A5	樹皮粉末	カツアバ (<i>Juniperus brasiliensis</i>)	-	454 g	-
A6	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	750 mg x 100粒	1~2粒
A9	樹皮粉末	カツアバ (<i>Trichilia catigua</i>)	ブラジル	28 g	-
A10	樹皮粉末	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	ブラジル	-	-
A11	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	100 mg x 200粒	2~3粒
A12	樹皮粉末	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	25 g	-
A13	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Trichilia catigua</i>)	ブラジル	465 mg x 60粒	-
A14	チンキ剤	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	400 mL	-
J1	樹皮粉末	カツアバ	ブラジル北部	50 g	0.5 g~1 g x 1~2回
J2	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>)	-	465 mg x 100粒	2粒
J3	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ	-	320 mg x 180粒	3~5粒
J4	ティーバッグ	有機カツアバ カツアバ (<i>Erythroxylum catuaba</i>), ムイラプアマ (<i>Ptychopetalum olacoides</i>), マカ (<i>Lepidium spp.</i>), ハマビシ (<i>Tribulus terrestris</i>), チョウセンニンジン (<i>Panax ginseng</i>), イカリソウ (<i>Epimedium spp.</i>) など	パラグアイ	2 g x 20包	-
J6	カプセル (樹皮粉末)	カツアバ	-	650 mg x 60粒	2粒
J8	リーフ	有機カツアバ	パラグアイ	60 g	-
A: アメリカ市場品, J: 国内市場品			-: 記載なし		

Table 2 Botanical origin of *Catuaba* products identified by genetic analysis.

Sample No.	universal primer		amplification by specific primer	
	Sequence candidate	Accession	<i>Erythroxylum</i>	<i>Trichilia</i>
A5	<i>Trichilia cipo</i>	FJ037837.1	○	○
A6	<i>Coriandrum sativum</i>	KM051454.1	○	○
A9	Not Test		○	○
A10	<i>Trichilia emarginata</i>	LN833662.1	○	○
A11	<i>Coriandrum sativum</i>	KM051454.1	○	○
A12	<i>Matayba elaeagnoides</i>	KF420986.1	○	○
A13	No Amplicon		—	—
J1	<i>Trichilia lepidota</i>	LN833623.1	—	—
J2	<i>Senna alexandrina</i>	KF815491.1	—	—
J3	No Amplicon		—	—
J4	<i>Psidium cattleianum</i>	KM064972.1	—	—
J6	<i>Lepidium meyenii</i>	JX908826.1	—	—
J8	<i>Psidium cattleianum</i>	KM064972.1	—	—

Table 3 ¹³C-NMR data of compound A and candidate compounds (CDCl₃).

No.	δ_c (ppm)												
	compound A	1 ^a	2	3	4	5	6	7	8 ^c	9	10	11 ^c	12
2	161.3	160.72							161.1			161.2	
3	113.2								110.2			111.0	
4	143.7								138.9			138.4	
4a	110.3								103.5			102.4	
5	108.5								156.4			150.0	
6	145.7								95.2			106.3	
7	146.0								157.3			158.1	
8	111.4		No report	No report	No report	No report	No report	No report	102.4	No report	No report	91.3	No report
8a	144.9							(See Table 4)	150.9			155.7	
-OMe	56.5	61.51							55.8			55.8	
1'	115.2								114.8			115.9	
2'	130.9	131.33							127.4			127.4	
3'	78.0	77.88							77.8			77.8	
3'-Me	27.9	28.30							28.0			27.7	
	27.9	29.79							28.0			27.7	

a) K. Minato *et al.*, *J. Wood Sci.*, **56** (1), 41-46 (2010).b) I. Mester *et al.*, *Planta Med.*, **32**, 81-85 (1977).c) E. Melliou *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **68**, 78-82 (2005).

Table 4 ^{13}C -NMR data of compounds A and 7 (braylin)(CD_3OD).

No.	δ_{C} (ppm)	
	compound A	7 ^a
2	163.4	163.4
3	113.4	113.4
4	146.0	146.3
4a	113.2	113.2
5	110.6	110.5
6	146.3	146.6
7	147.4	147.3
8	111.1	111.1
8a	147.3	146.7
-OMe	57.0	56.9
1'	115.7	115.7
2'	132.5	132.5
3'	79.1	79.1
3'-Me	28.1	28.1
	28.1	28.1

a) A. Kubba *et al.*, *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**, 305-307 (2005).

Table 5 Search results of biological sources of candidate compounds

No.	Chemical Name	Database	Biological Source
7	Braylin	CCD	<i>Cedrelopsis longibractata</i> (ミカン科, マダガスカル) <i>Flindersia brayleyana</i> (ミカン科, オーストラリア) <i>Pitavia punctata</i> (ミカン科, チリ)
		KNAPSAcK	<i>Cedrelopsis longibractata</i> <i>Pitavia punctata</i>
1	Luvangetin	CCD	<i>Luvunga scandens</i> (ミカン科, インド) <i>Ruta pinnata</i> (ミカン科, カナリア諸島)
		KNAPSAcK	<i>Brosimum rubescens</i> (クワ科, ブラジル・ペルー・仏領ギアナ) <i>Boenninghausenia albiflora</i> (ミカン科, インド・ネパール・台湾) <i>Chloroxylon swietenia</i> (ミカン科, インド) <i>Hesperethusa crenulata</i> (ミカン科, インド・東南アジア) <i>Luvunga scandens</i> <i>Phebalium clavatum</i> (ミカン科, オーストラリア)
2	Xanthoxyletin	CCD	<i>Zanthoxylum americanum</i> (prickly ash) (ミカン科, アメリカ) <i>Melicope ternata</i> (ミカン科, ニューージーランド・オーストラリア) <i>Halfordia scleroxyla</i> (ミカン科, オーストラリア) <i>Afraegle paniculata</i> (ミカン科, セネガル・ナイジェリア) <i>Eriostemon trachyphyllus</i> (ミカン科, オーストラリア) <i>Chloroxylon swietenia</i> (ミカン科, インド・スリランカ)
		KNAPSAcK	<i>Plumbago zeylanica</i> (イソマツ科, インド・スリランカ・東南アジア) <i>Citrus junos</i> (ミカン科, 日本・韓国・中国) <i>Clausena excavata</i> (ミカン科, インド・バングラデシュ・中国・東南アジア) <i>Zanthoxylum americanum</i> <i>Zanthoxylum dipetalum</i> (ミカン科, アメリカ(ハワイ))
8	5-Methoxyseselin	CCD	<i>Citrus grandis</i> (pummelo) (ミカン科, インド・東南アジア)
		KNAPSAcK	<i>Plumbago zeylanica</i> <i>Citrus grandis</i> <i>Citrus tamurana</i> (ミカン科, 日本)
11	Alloxanthoxyletin	CCD	<i>Chloroxylon swietenia</i> <i>Zanthoxylum americanum</i>
		KNAPSAcK	no hit

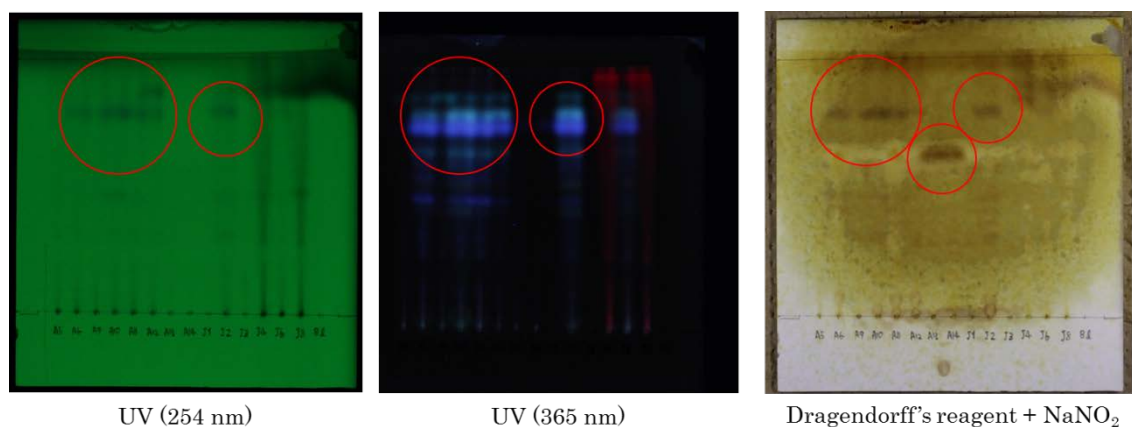


Fig. 1 TLC chromatograms of sample A5 ~ J8

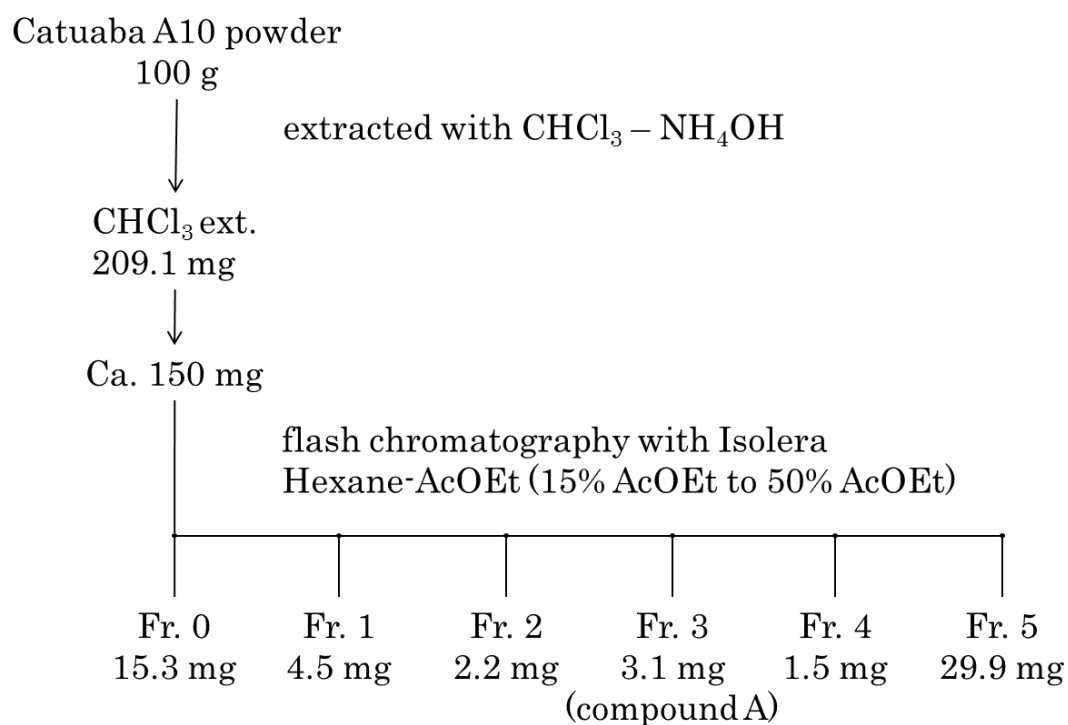


Fig. 2 Fractionation scheme of Catuaba extract

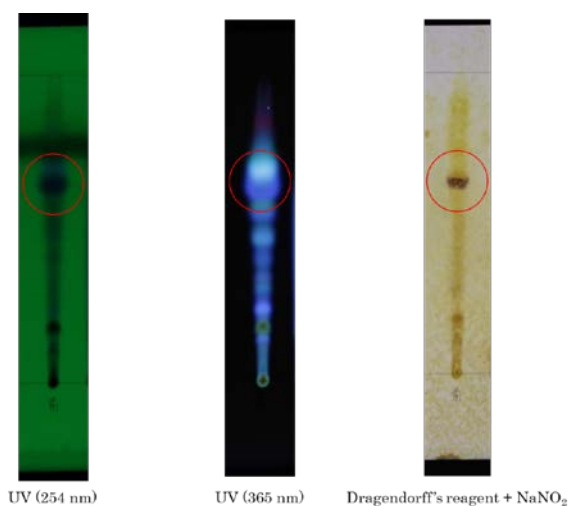


Fig. 3 TLC chromatograms of CHCl₃ extracts

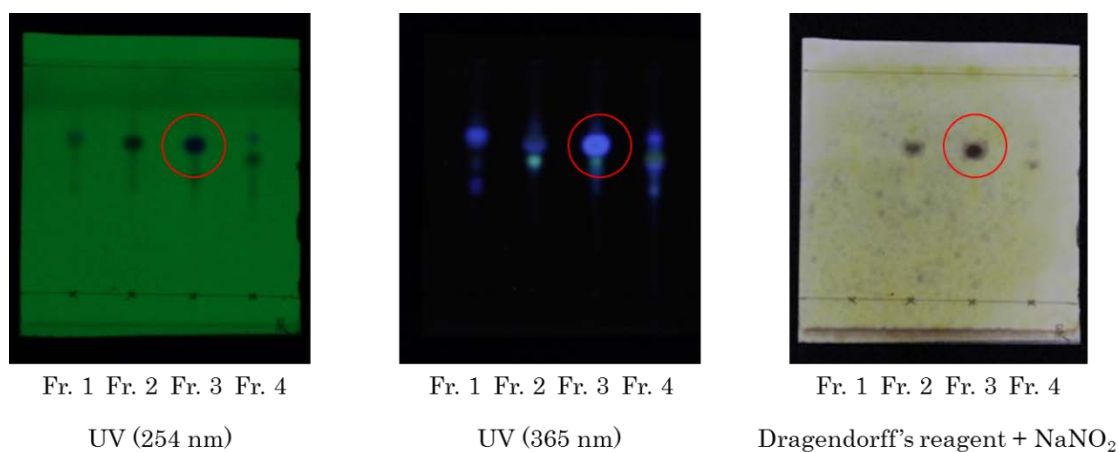


Fig. 4 TLC chromatograms of Fr. 1 – Fr. 4

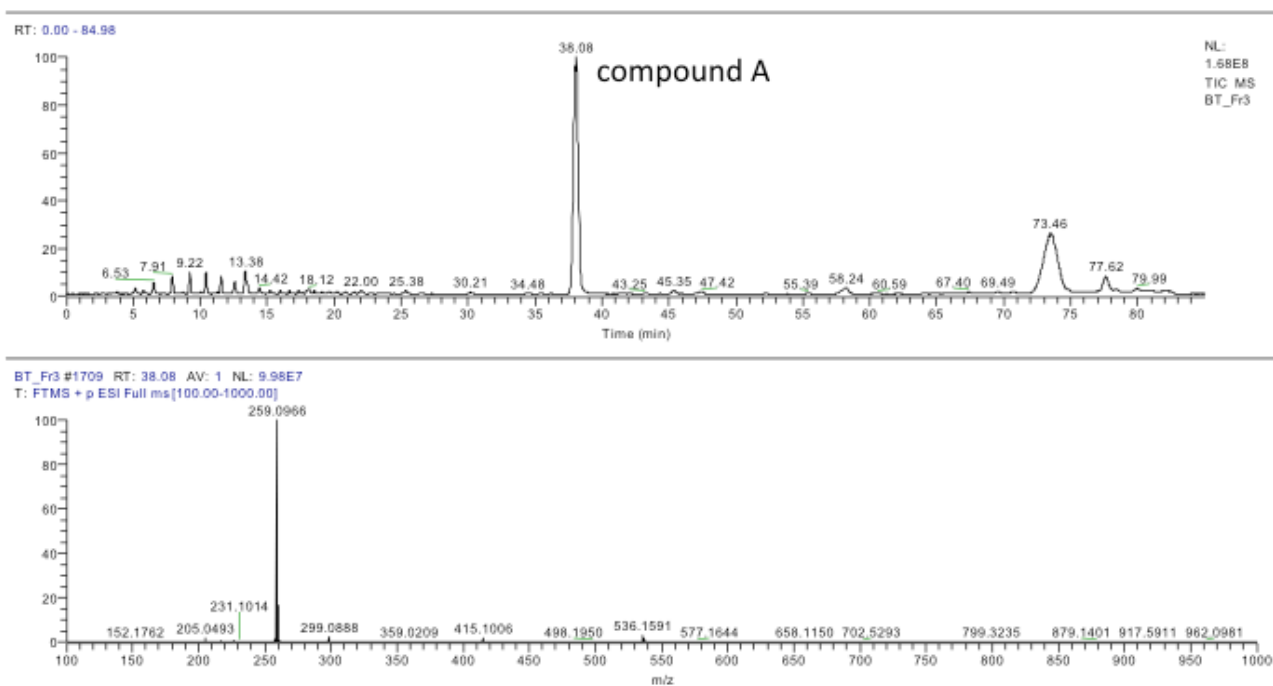
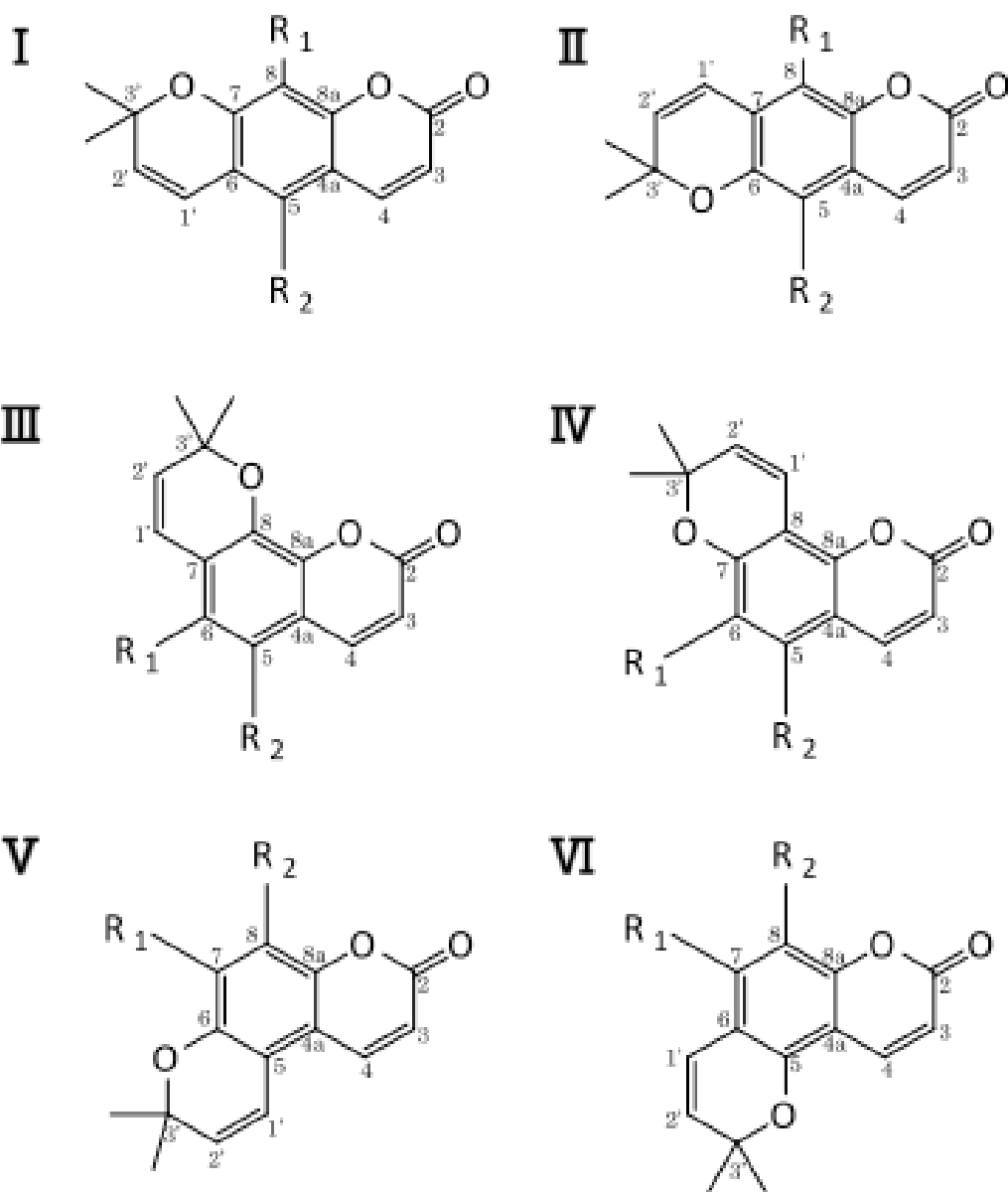


Fig. 5 Mass chromatogram of Fr. 3 and its mass spectrum on LC/HRMS analysis



	I		II		III		IV		V		VI	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R1	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H
R2	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe	-H	-OMe

Fig. 6 Chemical structures of candidate compounds

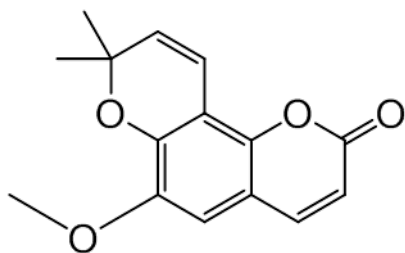


Fig. 7 Chemical structure of braylin