

分担研究報告書

分担研究課題 グレーゾーンの植物体に関する研究

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

ハクシュウの成分研究

研究協力者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

日本薬局方収載生薬であるカシュウは、韓国で頻用されるハクシュウやこれらと形態のよく似たイヨウイケマとの誤用が近年他国で問題となっている。我々の従前の研究において、日本国外でカシュウ、ハクシュウ、イヨウイケマとして流通する生薬について、韓国・中国市場の流通品を収集し、その基原を遺伝子解析により推定することで実態調査を行ってきた。その結果、ハクシュウとラベルされているにも関わらず、イヨウイケマの基原種である市場品も確認された。日本においては、ハクシュウとイヨウイケマの誤用は報告されていないが、今後、日本でも流通する可能性も考えられる。本研究では、形態鑑別では困難な両者（ハクシュウ及びイヨウイケマ）を簡便に判別するために、ハクシュウについて成分精査を行い、イヨウイケマと判別可能な簡便法として紫外線（UV）照射による薄層クロマトグラフ（TLC）法を検討した。ハクシュウの80%メタノール抽出物について成分精査した結果、文献未記載の化合物1種を単離し、2-O-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenoneと構造決定した。一方で、ハクシュウとイオウイケマを判別する簡便法としてUV照射によるTLC法について検討する目的で、種が同定されたハクシュウのUV検出成分について検討した結果、10種の化合物[cynandionene A, uridine, guanosine, adenosine, tryptophan, bungeiside-C, bungeiside-D, *p*-hydroxyacetophenone, 2',5'-dihydroxy acetophenone, 2',4'-dihydroxyacetophenone]を同定した。そのうち、主要成分の一つであるビフェニル構造を有するcynandione Aについて、ビフェニル部分のC-1とC-1'間のつながりについてINADEQUATE解析により炭素間解析を行った結果、すべての炭素間の相関が認められ、ビフェニル部分のC-1とC-1'間のつながりを明らかにした。一方で、ハクシュウとイヨウイケマをTLCにより比較検討した結果、酢酸エチル/水/メタノール/酢酸（200:10:10:3）を展開溶媒として分析したところ、イヨウイケマにのみ明瞭に観察されるスポットが認められた。このスポットについて精査した結果、wilfoside C1Nとwilfoside K1Nの2化合物が同定され、これらをTLCで比較することでハクシュウとイヨウイケマを予備的に判別できる可能性が示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部・准教授

内倉 崇 松山大学大学院医療薬学研究科

増本 直子 国立医薬品食品衛生研究所・食品

添加物部研究員（前・生薬部非常勤職員）

袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所・生薬

部長

A. 研究目的

カシュウ（何首烏）はツルドクダミ（*Polygonum multiflorum* Thunberg）の塊根を基原とする第17改正日本薬局方（17局）収載の生薬であるが¹⁾、韓国ではカシュウの代わりにハクシュウ（白首烏；*Cynanchum wilfordii* Hemsley の根）も使用されてきた²⁾。近年、ハクシュウ配合の健康食品が主に更年期障害を改善する目的で、韓国国内で流通している。一方で、2015年に韓国市場に流通するハクシュウ配合製品を調査した結果、65%の製品でハクシュウと形態が類似しているイヨウイケマ（異葉牛皮消）が使用されていることが明らかとなり、それらの誤用が社会問題となっている³⁾。イヨウイケマは、*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight の根を基原とし、体重減少などの毒性を有することが報告され、アメリカ食品医薬局（FDA）のデータベースでは有毒植物とされている⁴⁾。また、我々の従前の研究において、日本国外でカシュウ、ハクシュウ、イヨウイケマとして流通する生薬の基原種について、成分と遺伝子の両面から実態を調査した。その結果、カシュウとして販売されていたもののなかに誤った基原種由来のものが存在した。また、国外でハクシュウとして流通するもののなかには、イヨウイケマの基原種やその他の種由来のものがみられた⁵⁾。日本においては、ハクシュウとイヨウイケマの誤用は報告されていないが、今後、日本でも流通する可能性も考えられる。両者を区別する確実な方法は、現段階では遺伝子解析による判別が有力だが、判別までに時間を要するため、より簡便な方法の提案が望まれる。

このような背景から本研究では、ハクシュウについて成分精査を行い、イヨウイケマと判別可能な簡便法として紫外線（UV）照射による薄層クロマトグラフ（TLC）法を検討した。なお、ハクシュウとイヨウイケマの形態は酷似しており、その鑑別は熟練者でも困難であるため、

本研究では遺伝子解析により種が推定されたハクシュウ及びイヨウイケマ⁵⁾を用いて検討をすすめた。

B. 研究方法

装置等

NMR スペクトルは Bruker AVANCE500（Bruker BioSpin, Billerica, MA, U.S.A., ¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz）または JEOL ECA800（JEOL, Tokyo, Japan, ¹H-NMR: 800 MHz, ¹³C-NMR: 200 MHz）を用いた。HPTLC は試料溶液注入に Linomat V applicator（CAMAG, Muttenz, Switzerland）、画像撮影に visualizer documentation system（CAMAG）を用いた。担体には HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄（Merck, Darmstadt, Germany）（20×10 cm）を用いた。

試料

成分精査のための抽出、分画に使用したハクシュウは韓国市場品を用いた。分析に使用したその他の試料については、韓国または中国市場品で、いずれも DNA 解析により種の同定が行われているものを使用した⁵⁾。各試料については表1に示す。

抽出・分画

ハクシュウ（Sample D）（300 g）を 80% メタノール（MeOH）（3 L）中でホモジナイズし、濾過後、約 0.3 L まで濃縮し、*n*-ヘキサン（3 L）、酢酸エチル（EtOAc）（3 L）、*n*-ブタノール（BuOH）（3 L）で順次分配し、*n*-ヘキサンエキス（492.9 mg）、EtOAc エキス（7.0 g）、*n*-BuOH エキス（13.2 g）、H₂O エキス（43.2 g）を得た。

EtOAc エキス（1.0 g）を Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィー等で分取し、cynandionene A (**2**)（9.6 mg）、*p*-hydroxyacetophenone (**3**)（13.8 mg）、2',5'-dihydroxyacetophenone (**4**)（1.0 mg）、2',4'-dihydroxyaceto-

phenone (5) (3.8 mg) を得た.

n-BuOH エキス (12.5 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー等を繰り返し, uridine (6) (6.3 mg), adenosine (7) (2.3 mg), guanosine (8) (21.8 mg), tryptophan (9) (20.6 mg), 2-*O*-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (2.4 mg) (1), bungeiside-C (10) (13.7 mg), bungeiside-D (11) (7.0 mg) を得た.

イヨウイケマ (Sample i) (103 g) を 80% MeOH (1 L) 中でホモジナイズし, 濾過後, 約 0.1 L まで濃縮し, *n*-ヘキサン (300 mL), EtOAc (300 mL), *n*-BuOH (300 mL) で順次分配し, *n*-ヘキサンエキス (53.4 mg), EtOAc エキス (1.4 g), *n*-BuOH エキス (0.9 g), H₂O エキス (14.9 g) を得た. EtOAc エキス (100 mg) を MeOH に溶解し, 分取 TLC [*n*-ヘキサン:アセトン (1:1)] で分取し wilfoside C1N (12) (8.0 mg), wilfoside K1N (13) (10.5 mg) を得た.

得られた化合物については, NMR スペクトル等の各種機器分析データを文献値または標品データとの直接比較により同定した. 各化合物の構造を図 1 に示す. 以下に 2-*O*-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (1) と cynandione A (2) の NMR データを示す.

2-*O*-β-Laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (1): ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ: 7.68 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6), 6.69 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-3), 6.50 (1H, dd, *J*=2.0, 8.5 Hz, H-5), 5.05 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1'), 4.58 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1''), 3.93 (1H, dd, *J*=1.5, 12.0 Hz, H-6'), 3.89 (1H, dd, *J*=2.0, 11.5 Hz, H-6''), 3.75, 3.63 (each 1H, m, H-6', H-6''), 3.74, 3.30 (each 1H, m, H-2', H-2'') 3.67 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-3'), 3.54 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-4'), 3.52, 3.35, 3.30 (each 1H, m, H-5', H-5'', H-4''), 3.39 (1H, t, *J*=9.5 Hz, H-3''), 2.62 (3H, s, H-8). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 200.3 (C-8), 164.9 (C-4), 160.9 (C-2), 133.3 (C-6), 121.3 (C-1), 110.8 (C-5), 105.3 (C-1''), 103.7 (C-3), 102.1 (C-1'), 88.2 (C-3'), 78.2, 78.0,

77.9 (C-5'', C-5', C-3''), 75.5 (C-2''), 74.1 (C-2'), 71.6 (C-4''), 69.7 (C-4'), 62.6, 62.4 (C-6'', C-6'), 32.1 (C-8).

Cynandione A (2): ¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.86 (1H, s, 2'-OH), 10.31 (1H, s, 6'-OH), 9.31 (1H, s, 2-OH), 8.49 (1H, s, 5-OH), 7.68 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-4'), 6.72 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-3), 6.67 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-4), 6.43 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5'), 2.50 (3H, s, 8-CH₃), 2.19 (3H, s, 8'-CH₃). ¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 203.7 (C-7), 203.6 (C-7), 163.0 (C-2'), 162.8 (C-6'), 148.5 (C-2), 147.5 (C-5), 132.7 (C-4'), 130.7 (C-6), 118.7 (C-1), 117.9 (C-3), 116.3 (C-4), 112.8 (C-3'), 112.0 (C-1'), 108.0 (C-5'), 31.2 (C-8), 26.7 (C-8').

TLC による分析

粉碎したハクシュウ (Sample Nos. A-D) またはイヨウイケマ (Sample Nos. a-i) (各 1 g) をそれぞれ MeOH (1 mL) で超音波処理 (5 分間) により抽出し, 抽出液を遠心分離後, その上澄みを試料溶液とした. 試料溶液をそれぞれ 5 μL スポットし, 展開溶媒 [EtOAc:H₂O:MeOH:酢酸 (200:10:10:3)] で約 8 cm 展開後, UV (254 nm) 照射下で検出した.

C. 研究結果

2-*O*-β-Laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (1) の構造解析

本化合物は高分解能 (HR) マススペクトルのデータ (*m/z*: 457.1473 [M-H]⁻ calcd for C₂₀H₂₈O₁₃-H, 475.1457) から分子式が C₂₀H₂₈O₁₃ であることが示された. ¹H-NMR スペクトル (図 2) において芳香族領域に 3 置換ベンゼンに由来するシグナルが観察され, また脂肪族領域に糖 2 つ分のシグナル及びメチル基に由来する 3H-singlet が 1 本観察された. ¹³C-NMR スペクトル (図 3) においては, 200 ppm 付近にカルボニルカーボンに由来するシグナル, メトキシ基由来のシグナルがそれぞれ 1 本, またベ

ンゼン環由来のシグナルが6本観察された他、六単糖2つ分のシグナルが観察され、本化合物は、2',4'-dihydroxyacetophenoneの配糖体であると推察された。これらの相関を確認するため、heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC)を測定した結果、六単糖の1'位の水素からdihydroxyacetophenoneの2位の炭素及び六単糖の1''位の水素からもう一方の六単糖の3'位の炭素への相関が観察された(図4)。次に、既法⁶⁾に従い構成糖の確認を行った結果、本化合物の構成糖はD-glucoseであることが確認され、本化合物を2-O-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenoneと構造決定した。

Cynandione A (2)の構造解析

Cynandione Aについては、ビフェニル部分のC-C結合を確認した報告は見あたらない。そこで、¹H-及び¹³C-NMRを測定し、HMBC(図5)及びtwo-dimensional (2D) incredible natural abundance double quantum transfer experiment (INADEQUATE)解析(図6)により、ビフェニル構造の炭素間解析を行った。その結果、すべての炭素間の相関が認められ、ビフェニル部分のC-1とC-1'間は間違いなく直結していることが確認された。

TLCによる分析

表1に示されるハクシュウ4品(A~D)、イヨウイケマ9品(a~i)を用いて、それぞれ試料溶液を調製してTLC分析を行った。種々の分析条件で検討した結果、EtOAc/H₂O/MeOH/酢酸(200:10:10:3)で展開したところ、UV照射(254 nm)検出のみで比較的分離のよいデータが得られた。本条件で各試料溶液について検討したところ、イヨウイケマにハクシュウと判別しうる明瞭なスポットが観察された。そこで、スポットに相当する化合物を検討することとした。

イヨウイケマを80%MeOH中でホモジナイ

ズし、濾過、濃縮後、*n*-ヘキサン、EtOAc、*n*-BuOHで順次分配を行い、各エキスを得た。スポットを検出したEtOAcエキスについて分取TLCを行った結果、スポットには2つの化合物が重複していることが示唆された。各種スペクトルデータに基づき構造解析した結果、それぞれwilfoside C1N (12)、wilfoside K1N (13)と同一した(図7)。

D. 考察

遺伝子解析により種が同定されたハクシュウ4品及びイヨウイケマ9品について、本条件でTLC分析を行った結果、イヨウイケマにのみ共通して検出される明瞭なスポットが明瞭に観察された。さらに試料数が増やす必要性はあるが、このスポットを比較することでハクシュウとイヨウイケマを予備的に判別できる可能性が示唆された。

E. 結論

ハクシュウの80%MeOH抽出物について各種クロマトグラフィーを繰り返して成分精査した結果、文献未記載の化合物1種を単離し、2-O-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenoneと構造決定した。その他、ハクシュウから10種の化合物〔cynandione A, uridine, guanosine, adenosine, tryptophan, bungeiside-C, bungeiside-D, *p*-hydroxyacetophenone, 2',5'-dihydroxyacetophenone, 2',4'-dihydroxyacetophenone〕を同定した。そのうち、主要成分の一つであるビフェニル構造を有するcynandione Aについて、ビフェニル部分のC-1とC-1'間のつながりについてINADEQUATE解析により炭素間解析を行った結果、ビフェニル部分のC-1とC-1'間のつながりをはじめて明らかにした。さらに、ハクシュウとイヨウイケマをTLCにより比較検討した結果、EtOAc/水/MeOH/酢酸(200:10:10:3)を展開溶媒として分析したところ、イヨウイケマにのみ明瞭に観察されるスポットが認められ、

wilfoside C1N と wilfoside K1N の 2 化合物が同定された。

F. 研究発表

1. 学会発表

内倉 崇, 杉脇秀美, 好村守生, 増本直子, 内山奈穂子, 袴塚高志, 天倉吉章, TLC による白首烏と異葉牛皮消の比較検討, 日本生薬学会第 65 回年会, 広島 (2018.9)

2. 誌上発表

Uchikura, T., Tanaka, H., Sugiwaki, H., Yoshimura, M., Sato-Masumoto, N., Tsujimoto, T., Uchiyama, N., Hakamatsuka, T., Amakura, Y.: Preliminary quality evaluation and characterization of phenolic constituents in *Cynanchi Wilfordii Radix*. *Molecules*, 23, 656; doi:10.3390/molecules23030656 (2018).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) 厚生労働省, 第 17 改正日本薬局方(2016).
- 2) The Korean Herbal Pharmacopoeia. Korea Food and Drug Administration, p. 98 (2002).
- 3) Division of Safety Information on Drug and Food, National Institute of Health Sciences. “Food Safety Information (Chemical substances) No. 9/2015. p. 22 (2015).
- 4) U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Poisonous Plant Database. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/Planttox/Detail.CFM?ID=11513>.
- 5) N. Sato-Masumoto, T. Uchikura, H.

Sugiwaki, M. Yoshimura, S. Masada, T. Atsumi, M. Watanabe, N. Tanaka, N. Uchiyama, Y. Amakura, T. Hakamatsuka (2017) Survey on the original plant species of crude drugs distributed as *Cynanchi Wilfordii Radix* and its related crude drugs in the Korean and Chinese markets. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**: 1693-1699.

- 6) Tanaka T, Nakashima T, Ueda T, Tomii K, Kouno I (2007) Facile Discrimination of Aldose Enantiomers by Reversed-Phase HPLC. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**: 899-901.

表 1. 本研究で用いたハクシュウ及びイヨウイケマ試料

試料名	Sample No.	市場	DNA 解析により推定された基原種 ⁵⁾
ハクシュウ	A	韓国	<i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley
	B	韓国	
	C	韓国	
	D	韓国	
イヨウイケマ	a	中国	<i>Cynanchum auriculatum</i> Royle ex Wight
	b	中国	
	c	中国	
	d	中国	
	e	中国	
	f	中国	
	g	中国	
	h	韓国	
	i	韓国	

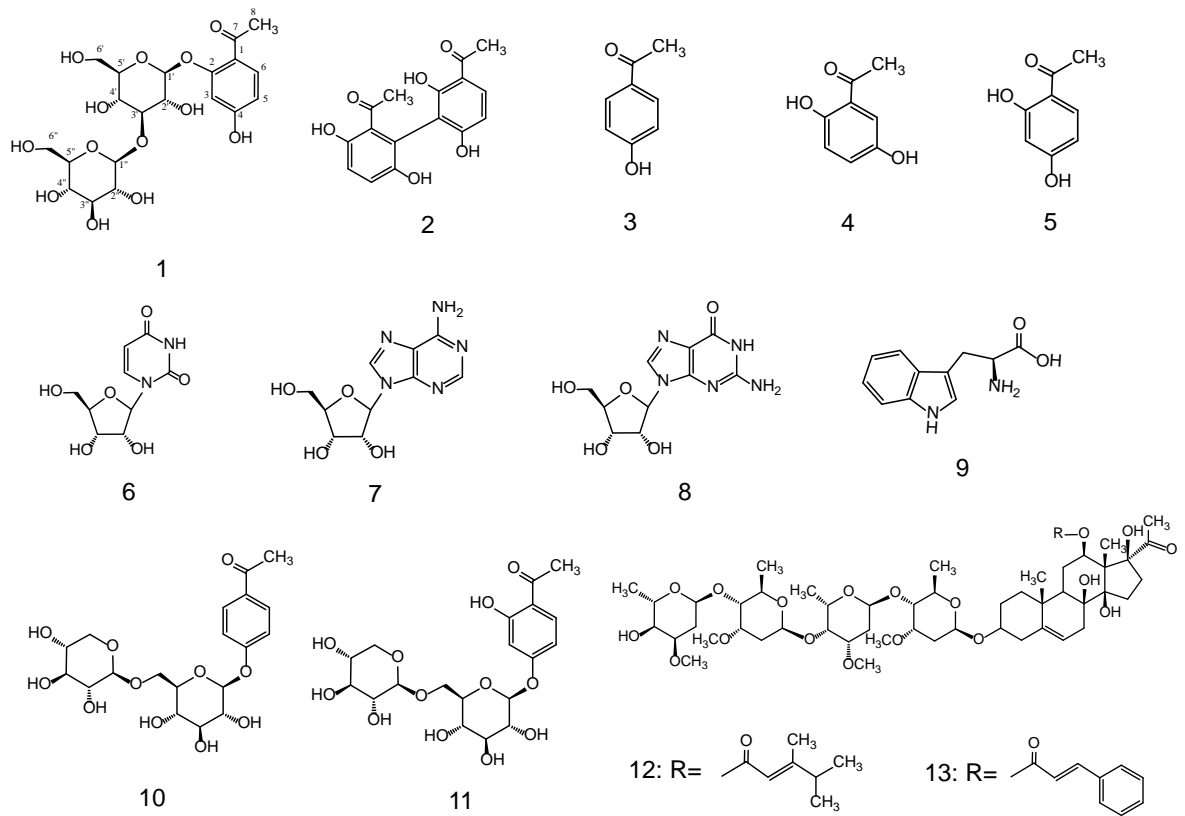


図 1. 化合物の構造

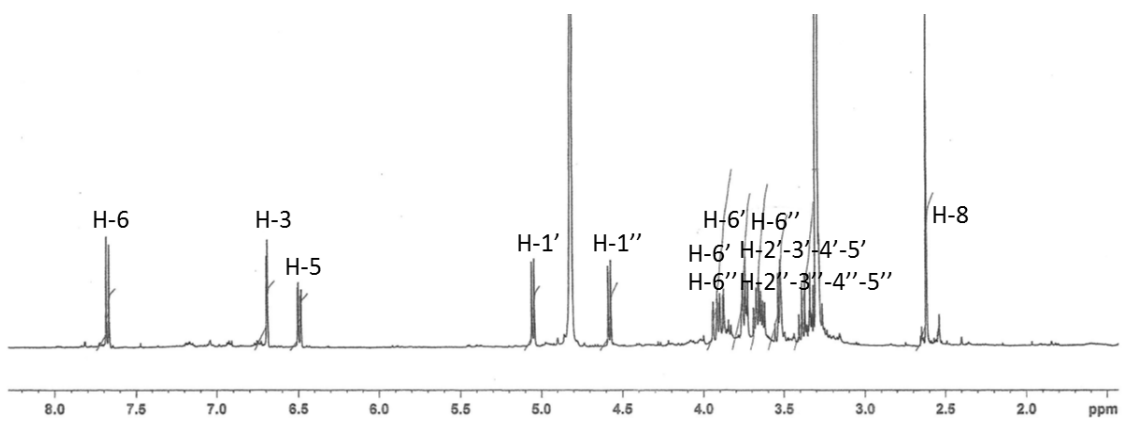


図 2. 2-O-β-Laminaribosyl-4-hydroxyacetophenone (1) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (500 MHz, MeOH- d_4)

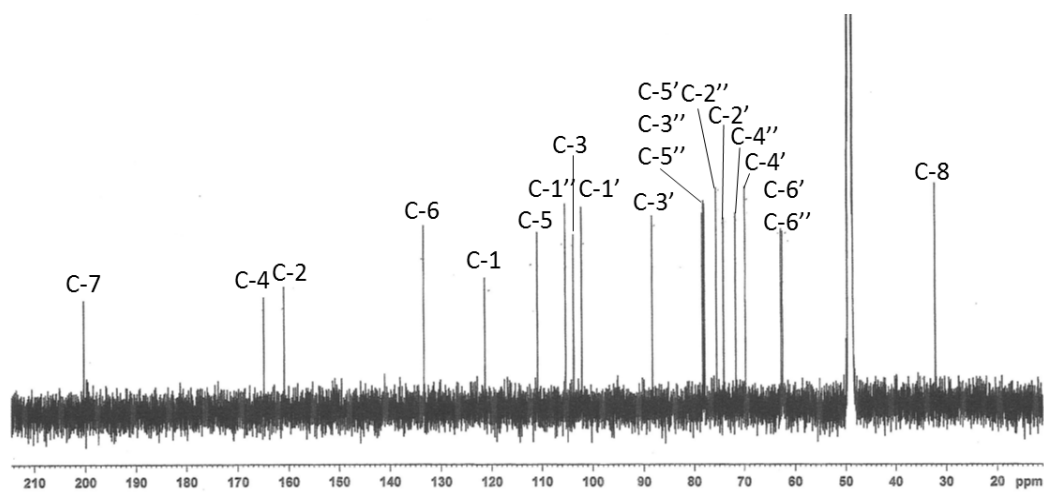


図 3. 2-*O*-β-Laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (**1**) の ¹³C-NMR スペクトル (126 MHz, MeOH-*d*₄)

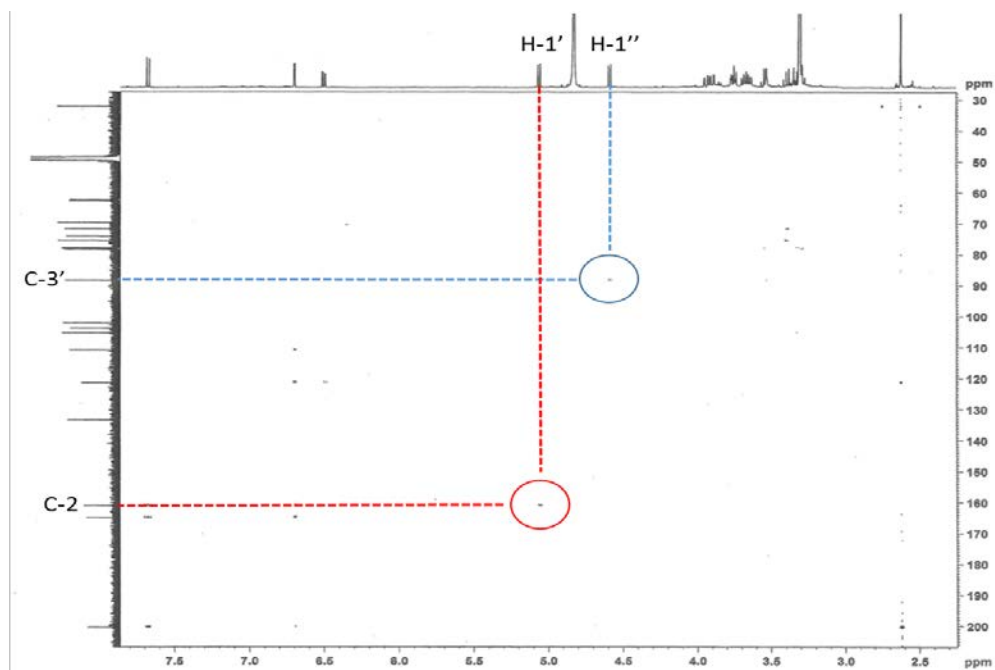


図 4. 2-*O*-β-Laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (**1**) の HMBC スペクトル (500 MHz, MeOH-*d*₄)

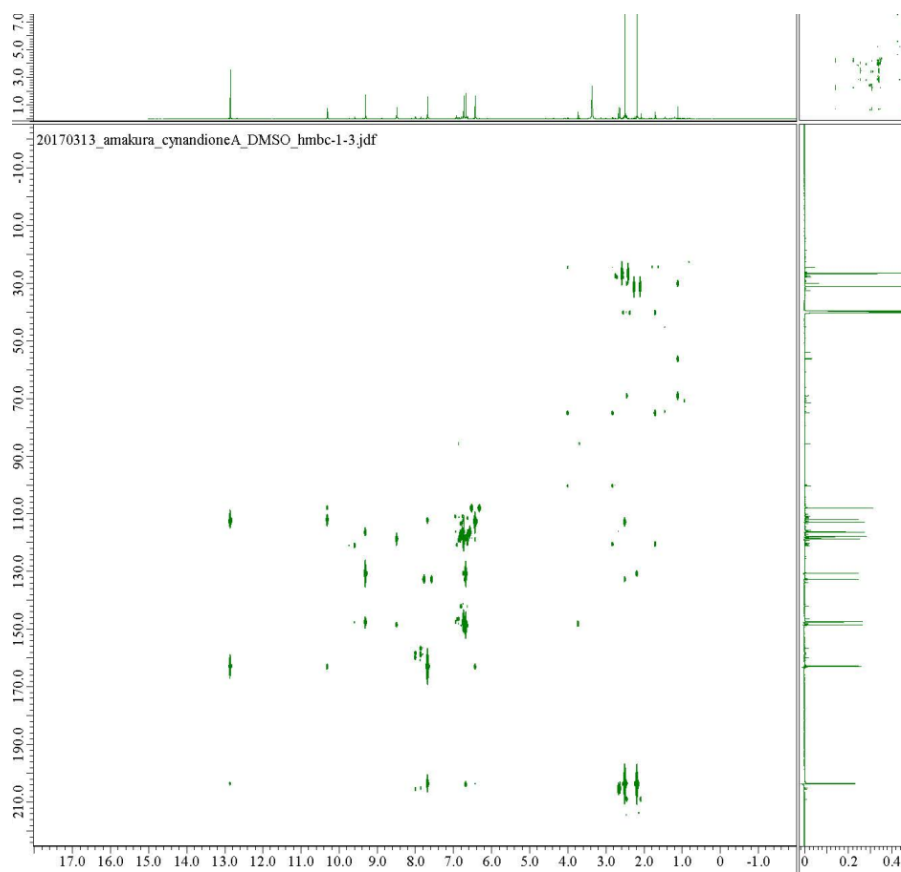


図 5. Cynandione A (2)の HMBC スペクトル (800 MHz, DMSO- d_6)

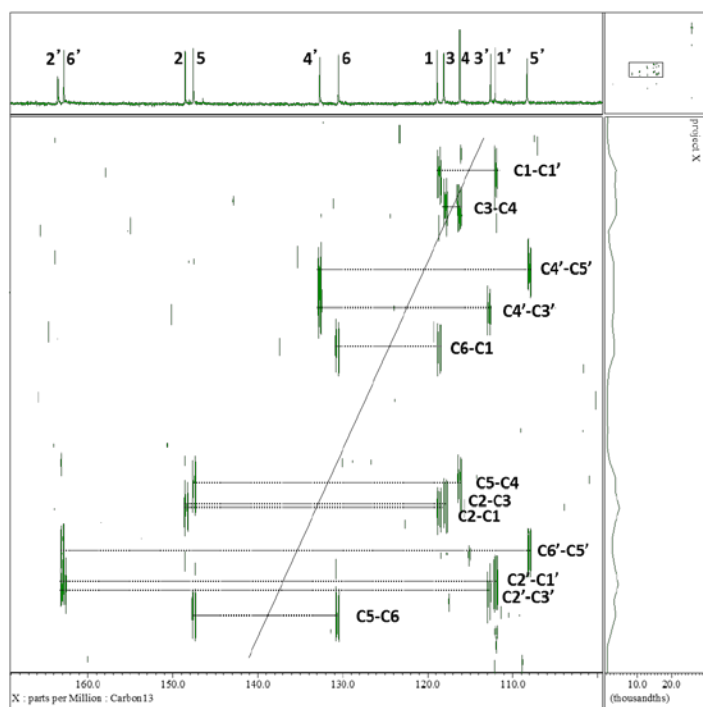


図 6. Cynandione A (2)の 2D-INADEQUATE スペクトル(200 MHz, DMSO- d_6)

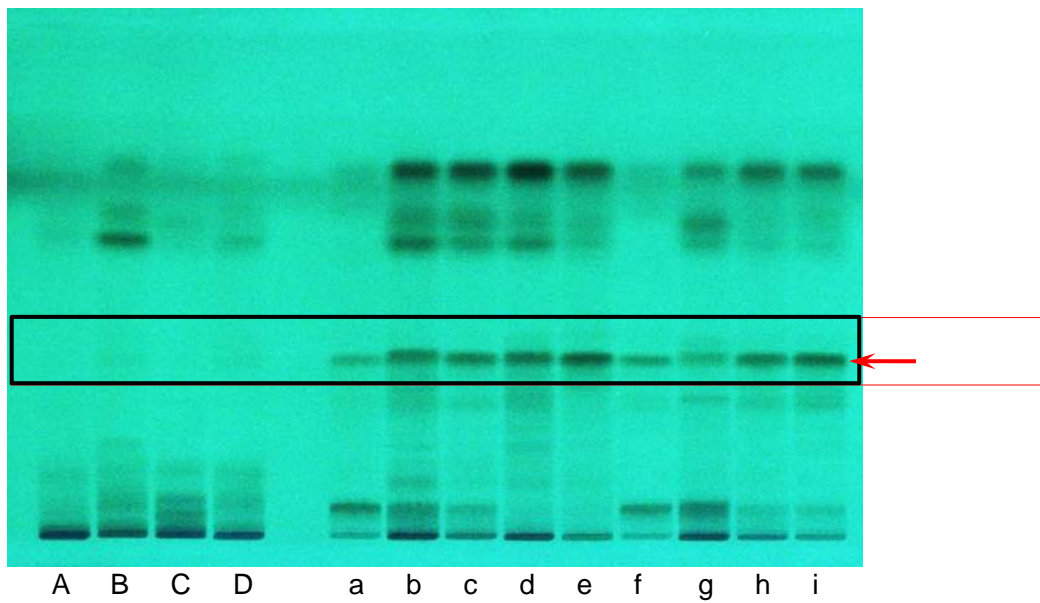


図7. ハクシュウ及びビヨウイケマの HPTLC データ
 (矢印：化合物 12 及び 13. 各試料については表 1 に示す)