

グレーゾーンの植物体に関する研究

ツルニチニチソウ中のインドールアルカロイド含量に関する研究

研究分担者 政田 さやか 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

研究要旨

ツルニチニチソウ (*Vinca major*) は、全草が「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」に掲載されているニチニチソウ (*Catharanthus roseus* L.) 及びヒメツルニチニチソウ (*Vinca minor*) の近縁種であり、海外ではサプリメント原料として流通しているが、我が国の食薬区分上は未分類である。昨年度の調査結果から、ツルニチニチソウはヒメツルニチニチソウと類似の毒性の強いアルカロイド類を産生することが推定されたため、本研究では、昨年度確立したインドールアルカロイド類の LC/MS/MS 定量法を用い、ツルニチニチソウ 7 個体の根、茎、葉に含まれるアルカロイド含量を測定した。その結果、医薬品成分である yohimbine や vincamine と推定される成分が、ヨヒンベやヒメツルニチニチソウと同程度含まれることが明らかとなった。

研究協力者

後藤佑斗：国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
派遣研究員

A. 研究目的

キョウチクトウ科のツルニチニチソウ (*Vinca major*) は、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus* L.) やヒメツルニチニチソウ (*Vinca minor*) の近縁種であり、全草が「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」（「専ら医薬品リスト」）に掲載されるこれらの品目と同様に、毒性の強いアルカロイドを含有すると推定される。しかしながら、既報では含有成分の情報が十分ではなく、ヒメツルニチニチソウから単離報告のある reserpine, strictamine, vincamone など毒劇物相当の毒性を有する化合物について、本当にツルニチニチソウに含有されないのか、含有しているが報告されていないのかの判断が難しかった。そこで、本研究では、食薬区分を判断するための基礎データとして、LC/MS/MS を用いて植物中のアルカロ

イド定量を行った。

B. 研究方法

1. 試薬・試液

標準試薬（ajimaline, ajimalicine, reserpine, serpentine, vinblastine sulfate, vincristine sulfate, vindesine sulfate, vindoline, vinpocetine, yohimbine hydrochloride）及び溶媒は国内試薬メーカーより購入した。

2. 標準溶液の調製

各標準試薬 1.0 mg を MeOH 1.0 mL に溶解し、標準原液とした。この原液全 11 種を混和して 100 µg/mL 溶液を調製した。これを MeOH で希釈し、0.001 - 1 µg/mL 溶液を調製した。

3. 試料の調製

ツルニチニチソウの植物体は、国内園芸店より購入した (Table 1)。

7 個体から根、茎、葉を採取し、自然乾燥し

た後、MM-400 (大阪ケミカル) で粉碎した。各検体について 10 mg 秤量し、MeOH 1 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出後、5000×g で 3 分間遠心分離した得られた上清を 1 mL にメスアップし、0.45 µm フィルター (日本ポール) でろ過後に LC/MS/MS 分析に供した。

3. UPLC-MS/MS 分析

昨年度の検討結果を基に、一部の条件を最適化して測定を行った。

【UPLC 条件】

装置, ACQUITY UPLC system (Waters); カラム, ACQUITY UPLC BEH T3 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm, Waters 社); サンプル注入量, 2 µL; 移動相, A 液: 0.1%ギ酸水, B 液: 0.1%ギ酸-アセトニトリル; グラジエント (A 液/B 液), 15%B (0-1 min hold) -25%B (1-10 min) -45%B (10-16 min) -98%B (16-16.5 min), 98%B (16.5-18.5 min hold); 流速, 0.3 mL/min; カラム温度, 35°C。

【MS/MS 条件】

装置, Xevo TQD (Waters); イオン化法, ESI ポジティブモード; Source gas flow: Desolvation, 1000 L/Hr, Cone, 0 L/Hr; DL 温度, 500°C; ヒートブロック温度, 150°C; キャピラリー電圧, 4kV

MRM パラメータ

No.	Analyte	Formula	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
1	Ajmaline	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	327.2314 [M+H] ⁺	144	62	40
2	Yohimbine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	355.2263 [M+H] ⁺	144	52	32
3	Vincamine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	355.2263 [M+H] ⁺	144	50	36
4	Vindesine	C ₄₃ H ₅₅ N ₅ O ₇	754.4421 [M+H] ⁺	144	88	78
5	Ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	353.2106 [M+H] ⁺	144	52	26
6	Serpentine	C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₃ ⁺	349.1656 [M] ⁺	317	58	26
7	Vincristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	825.4954 [M+H] ⁺	225	96	66
8	Vindoline	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₆	457.2580 [M+H] ⁺	188	66	36
9	Vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	811.5161 [M+H] ⁺	224	88	40
10	Vinpocetine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₂	351.2313 [M+H] ⁺	280	52	32
11	Reserpine	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	609.3053 [M+H] ⁺	195	62	44

C. 研究結果・考察

標準溶液と各試料の MS クロマトグラムを Fig. 1 に示す。各化合物の略称と保持時間は以下の通り。Ajmaline (AJM, 3.7 min), Yohimbine (YHB, 4.3 min), Vincamine (VCM, 5.2 min), Vindesine (VDS, 5.6 min), Ajmalicine (AJC, 7.3 min), Serpentine (SER, 8.8 min), Vincristine (VCR,

9.9 min), Vindoline (VDL, 10.9 min), Vinblastine (VBL, 11.5 min), Vinpocetine (VPC, 12.9 min), Reserpine (RES, 14.6 min)。標準溶液に含まれるアルカロイド類のうち、VCR のピークは TIC では確認できず MRM クロマトグラムでのみ検出できた。MRM クロマトグラム下での相対検量線法により、11 化合物に対して良好な相関を有する検量線を作成できた。

植物試料の分析では、類似構造を有する成分が多く含まれるため、MRM クロマトグラムでも標準溶液とは保持時間の一致しないピークが複数検出された。そのため、検出されたピークと標準溶液から得られたピークの保持時間及び MS スペクトル, MSMS スペクトルを比較確認しながら、ピーク同定と定量を行った。その結果、全試料から医薬品成分である YHB と VCM と一致するピークが検出され、7 個体中 6 個体からは AJC と一致するピークが確認された。YHB の LD50 は 43 mg/kg (mouse, oral)であり強い毒性化合物である。一方、VCM の LD50 は 1,000 mg/kg (mouse, oral)であり、AJC の毒性情報は確認できなかった。3 化合物の含量の輪として算出した総アルカロイド量は、植物の部位に関わらず 12~40 µg/g だった (Table 2, Fig. 2)。この値は、専ら医薬品であるヒメツルニチニチソウやヨヒンベのアルカロイド量と同程度であった[1, 2]。

ツルニチニチソウからの YHB 及び AJC の単離報告はないため、化合物の同定は慎重に行う必要があるが、専ら医薬品中の YHB や VCM と同程度のアルカロイドが含まれることから、ツルニチニチソウは非医ではなく専ら医薬品として扱われることが妥当と考えられた。

D. 結論

ツルニチニチソウ 7 検体の植物体から、部位に関わらず、ヒメツルニチニチソウやヨヒンベと同程度の含量で yohimbine, vincamine と推定されるアルカロイドが検出された。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 参考文献

- [1] B. Proksa and E. Grossmann “High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* L.” *Phytochemical Analysis* 2 (1991): 74-76.
- [2] Joseph M Betz *et al.* “Gas chromatographic determination of yohimbine in commercial yohimbe products.” *Journal of AOAC* 78 (1995): 1189-1194

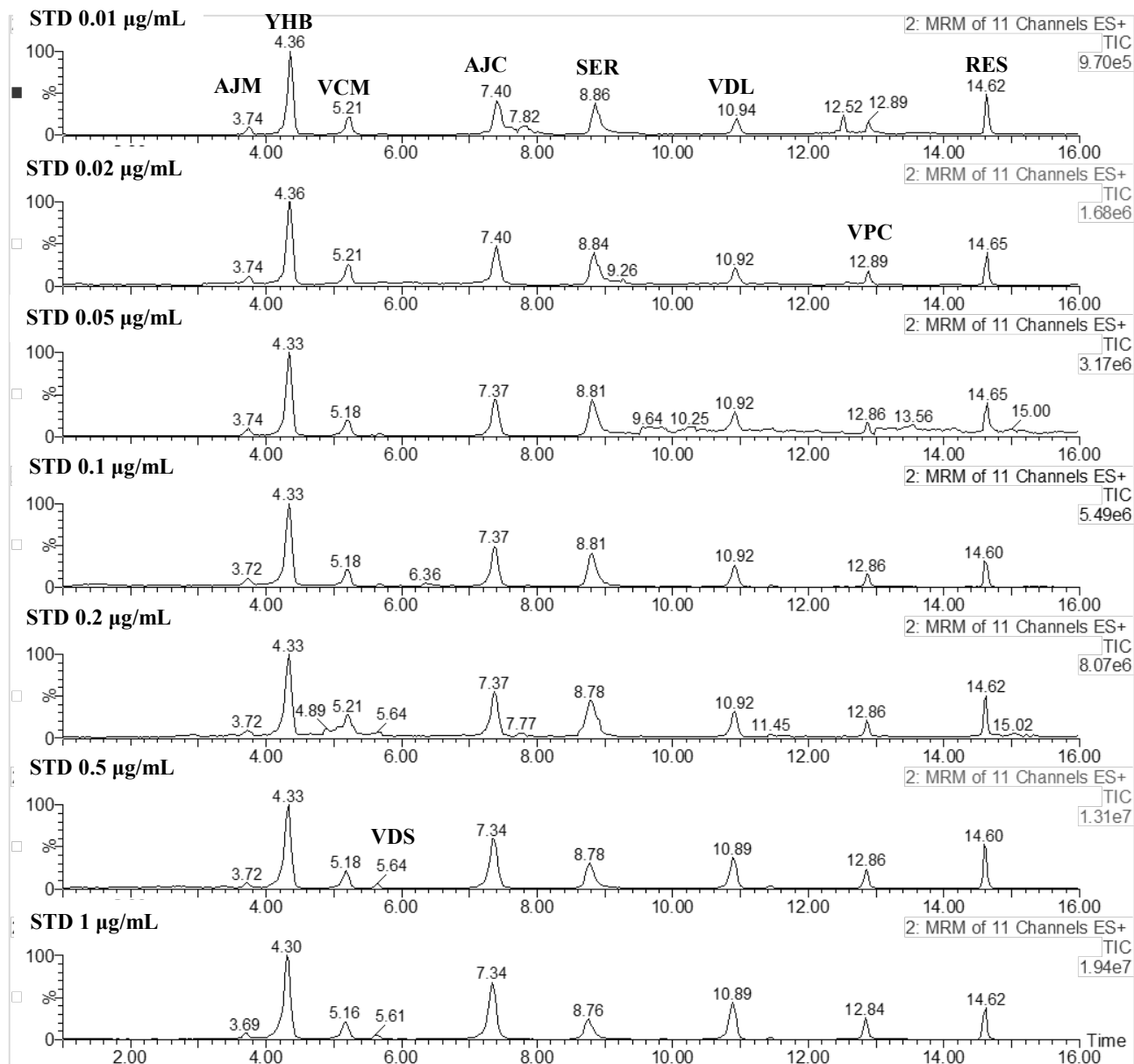
Table 1 ツルニチニチソウ試料

個体No.	Leaf (葉)	Stem (茎)	Root (根)	購入店
V1	○	○	○	A店
V2	○	○	○	A店
V3	○	○	-	A店
V4	○	○	-	B店
V5	○	○	-	C店
V6	○	○	-	D店
V7	○	○	-	E店

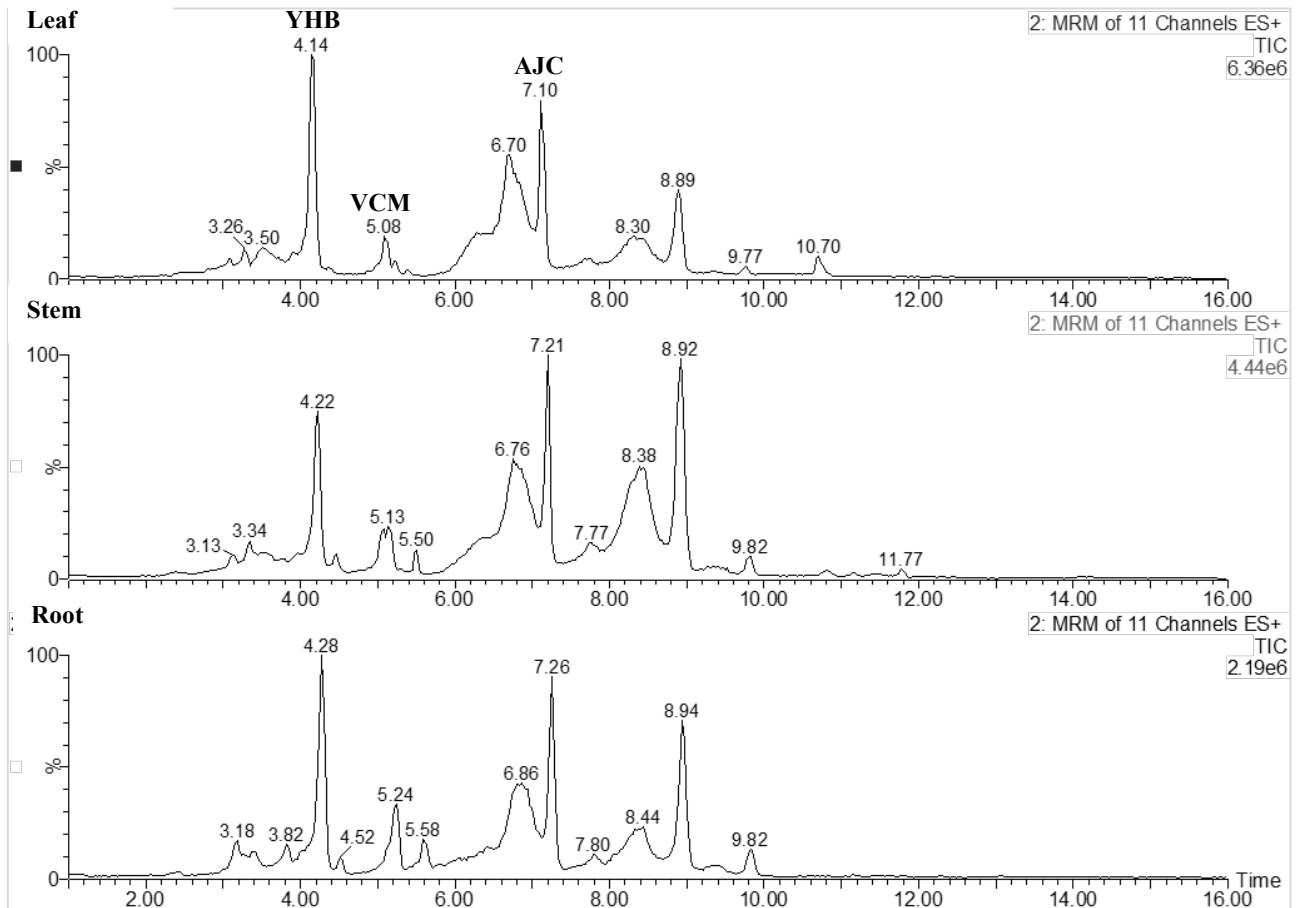
Table 2 ツルニチニチソウ中のアルカロイド含有量

		濃度 ($\mu\text{g/g}$)			
		YHB	VCM	AJC	Total
V1	Leaf	11.3	9.7	15.5	36.5
	Stem	5.9	12.8	13.3	32.0
	Root	3.9	7.2	5.9	17.0
V2	Leaf	11.6	9.1	17.6	38.3
	Stem	1.7	10.7	27.5	39.9
	Root	4.3	9.2	7.4	20.9
V3	Leaf	15.2	13.0	0.4	28.7
	Stem	6.7	17.1	ND	23.8
V4	Leaf	19.8	17.3	3.6	40.7
	Stem	11.6	26.7	0.9	39.2
V5	Leaf	15.3	9.4	1.1	25.8
	Stem	7.1	13.5	11.5	32.1
V6	Leaf	6.2	6.8	ND	12.9
	Stem	6.2	10.7	ND	16.9
V7	Leaf	13.2	13.8	9.6	36.6
	Stem	5.7	13.0	4.1	22.8

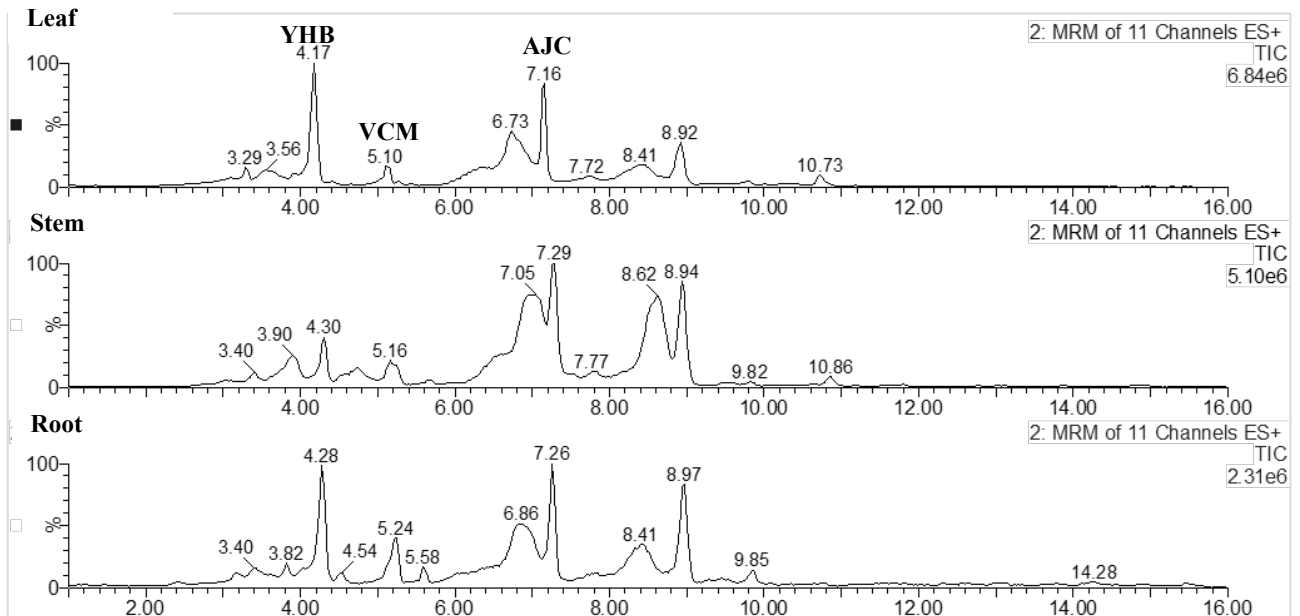
(a) 標準溶液



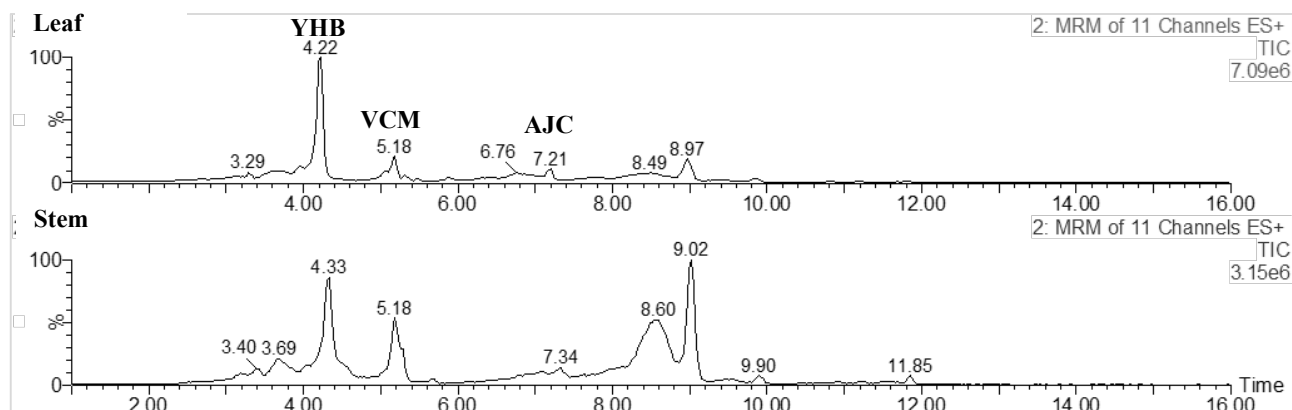
(b) V1



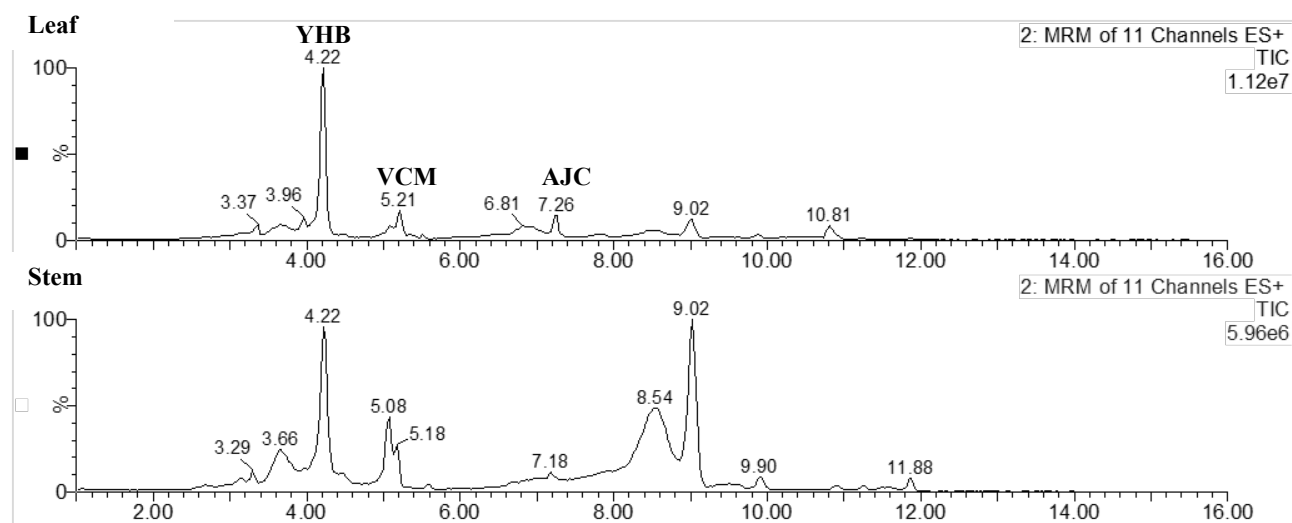
(c) V2



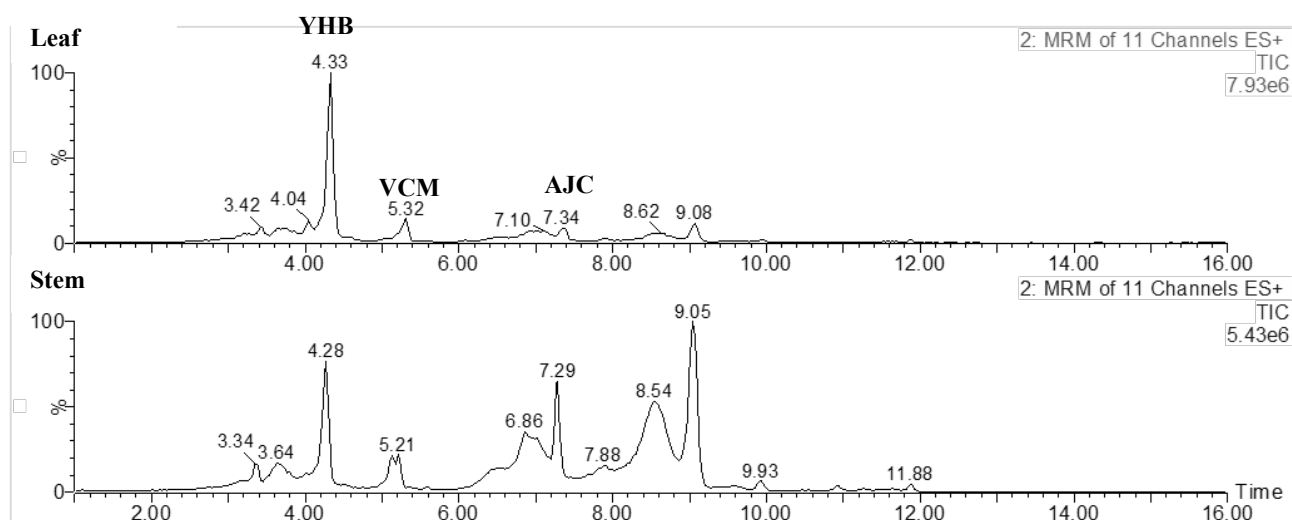
(d) V3



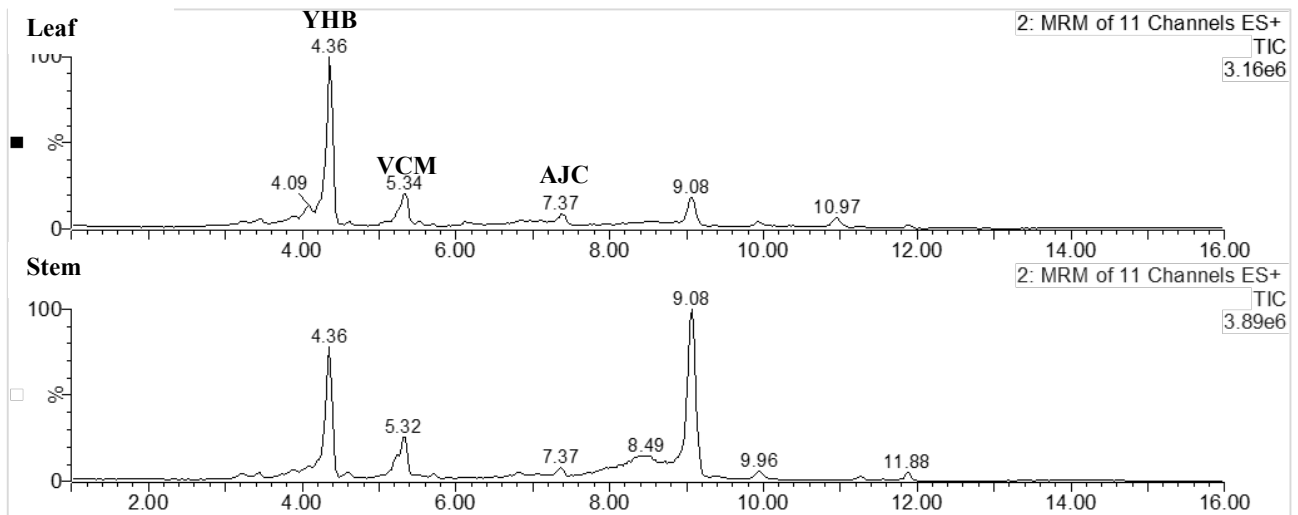
(e) V4



(f) V5



(g) V6



(h) V7

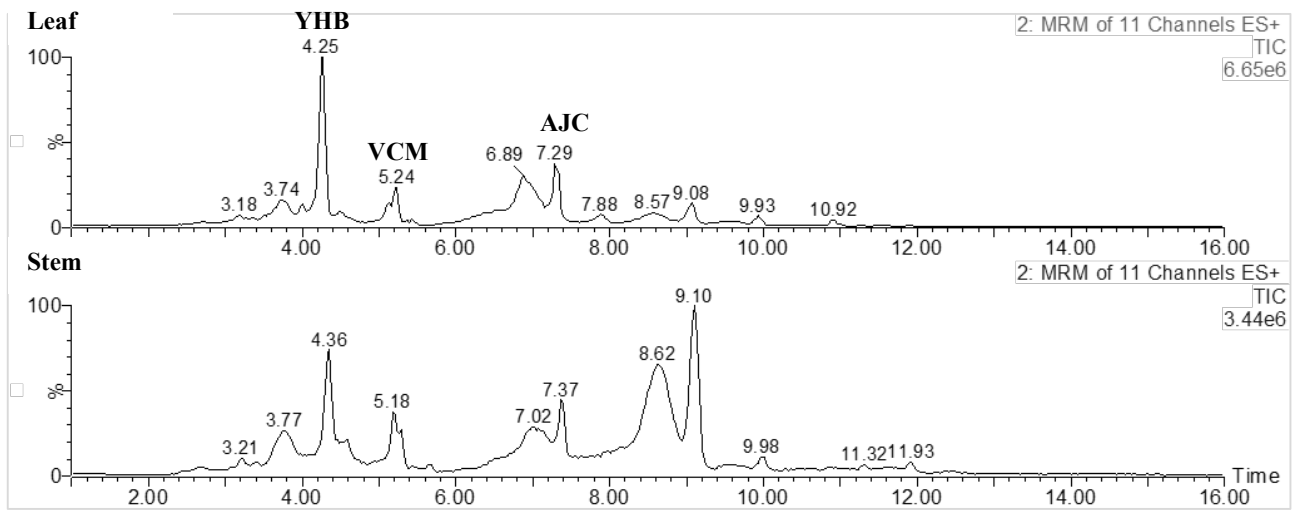


Fig. 1 標準溶液と各試料の TIC クロマトグラム

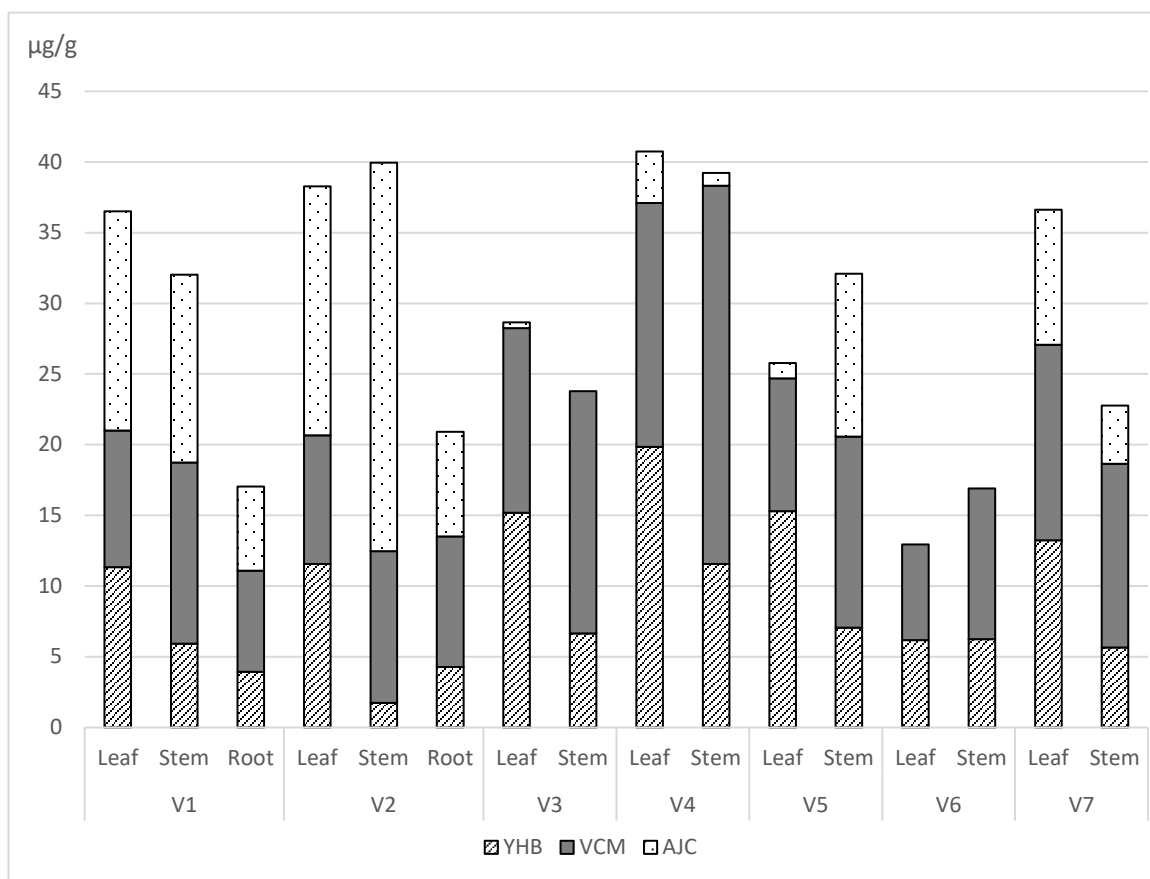


Fig. 2 ツルニチニチソウから検出されたアルカロイドの種類と含有量

