

博 士 論 文

生薬オンジ及びハクシュウの指標成分解析と確認試験に関する研究

Identification and characterization of marker constituents for quality control of
Polygala Root and Cynanchi Wilfordii Radix

2019年3月

内倉 崇

松山大学大学院医療薬学研究科

生薬オンジ及びハクシュウの指標成分解析と確認試験に関する研究

目次

総論の部

緒言	1
第1章 オンジ（遠志）に関する検討	4
1-1 TLC 分析条件の検討	6
1-2 UV 検出成分の検討	
1-2-1 成分の抽出・分離精製	8
1-2-2 化合物の同定	10
1-3 新規化合物の構造解析	
1-3-1 Polygalaonijiside A の構造解析	12
1-3-2 Polygalaonijiside B の構造解析	16
1-4 TLC 指標成分の解析	19
1-4-1 スポットⅠの解析	20
1-4-2 スポットⅡの解析	21
1-4-3 スポットⅢの解析	22
1-4-4 セネガとの比較	23
1-5 TLC 分析の単味エキス製剤への適用	24
1-6 小括	25

第2章	ハクシユウ（白首鳥）に関する検討	27
2-1	UV 検出成分の検討	
2-1-1	成分の抽出・分離精製	29
2-1-2	Cynandione A の構造解析	31
2-2	イヨウイケマ（異葉牛皮消）との比較	
2-2-1	HPLC による比較	34
2-2-2	HPTLC による比較	36
2-2-3	スポット A の解析	37
2-3	小括	40
	まとめ	42
	実験の部	46
	謝辞	59
	本研究に関する論文及び学会発表	60
	参考文献	62
	化合物番号	68

総論の部

緒言

近年、高度な薬学的管理が必要な医薬品が増えている中、患者に最適な薬物療法を提供するとともに、OTC 医薬品（一般用医薬品）の適正使用を推進し、健康・栄養などの生活習慣全般に関するアドバイスができ、セルフメディケーションの実践をしっかりとサポートできることが特に薬局薬剤師の職能として問われるようになってきている。世界保健機構（WHO）の定義でセルフメディケーションとは、「Self-medication is the selection and use of medicines by individuals to treat self-recognised illnesses or symptoms」とあり¹⁾、これは「自分自身の健康に責任を持ち、軽度な身体の不調は自分で手当てすること」と訳される。セルフメディケーション普及の背景には、高齢化社会、生活習慣病の増加に伴い高騰する医療費の負担が国の財政を圧迫していることがある。厚生労働省の一般用医薬品承認審査合理化等検討会中間報告書「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について」の“「求められる」一般用医薬品であるために”の提言の一つに、“漢方薬・生薬の活用”があり²⁾、今後、生薬や漢方薬等の天然物を原料とする医薬品や健康食品のセルフメディケーションにおける位置づけがより重要かつ明確になることが予測される。それゆえ、生薬・漢方薬は勿論、天然由来の原料が多い健康食品の安全かつ適正使用に関する知識が求められ、その専門知識に基づいた臨床実践の追求がより色濃くなると考えられる。

また、医療の発展に伴う制度の変化の速さにも目を見張るものがある。薬の原点である「生薬」も例外でなく、薬を適正に使用するためには当然のことであるが、その内容を実践するには、制度についてもその背景を基本から認識する必要がある。それゆえ、薬のレギュラトリーサイエンス的要素からの生薬・漢方薬分野の制度や研究の理解が必要となる。制度としては、国が定めた医薬品の規格基準書には日本薬局方（日局）があり、現在の第 17 改正日局にも多くの生薬が収載されている³⁾。また、日局に収載され

ていない生薬については、日本薬局方外生薬規格（局外生規）⁴⁾としてまとめられ、国内で汎用されるおおよその生薬について、その規格基準が扱われている。生薬は多成分系で、合成医薬品のように単一成分でないため、日局や局外生規では、生薬の性状、確認試験、純度試験、定量法等の項目を総合的に評価し、一定範囲で品質の同等性を担保している。日局や局外生規は、一定期間ごとに改定され、レギュラトリーサイエンスに基づいた試験法が更新され、記載されている。第15改正日局より、漢方エキス製剤についても日局に掲載されるようになっており、日局掲載の生薬を原料にすれば、漢方エキス製剤の試験と二重チェックすることも可能になっている。

最近、日局における生薬の確認試験は、指標成分による薄層クロマトグラフィー（TLC）による試験法が多く採用されるようになってきている。TLC法は化学物質を分離・同定するための手法の一つで、迅速かつ簡便に分析できるのが特徴である。例えば、確認試験の一つとしてサポニン類を対象とした起泡試験や Lieberman-Burchard 反応などがあるが、これらは化合物群を対象としており、同様の化合物を有する可能性のある類縁植物を判別することは困難である。TLCはその生薬に特徴的な成分を標準品とし、直接比較することができることから、さらに一段上の評価をすることができる。一方で、日局においては TLC法が規定されていない生薬が約4割あり、それら試験法の設定がのぞまれている（下表）。

表. 第17改正日本薬局方掲載生薬（背景あり：TLC法なし）

アカメガシワ	ガイヨウ	ケヒ	サンザシ	センキユウ	トウガラシ	ビャクシ	モクツウ
アセニャク	カゴソウ	ケツメイシ	サンシシ	ゼンコ	トウキ	ビャクジュツ	モッコウ
アヘン	カシュウ	ケンゴシ	サンシュユ	ゼンコツ	トウジン	ビワヨウ	ヤクチ
アマチャ	ガジュツ	ゲンチアナ	サンショウ	センソ	トウニン	ビンロウジ	ヤクモソウ
アラビアゴム	カッコウ	ゲンノショウコ	サンソウニン	センナ	トウヒ	ブクリョウ	ユウタン
アロエ	カッコン	コウイ	サンヤク	センブリ	ドクカツ	ブシ	ヨクイニン
アンソッコウ	カッセキ	コウカ	ジオウ	ソウジュツ	トコン	ペラドンナコン	加水ラノリン
イレイセン	カノコソウ	コウジン	シゴカ	ソウハクヒ	トチュウ	ヘンズ	精製ラノリン
インチンコウ	カルナウバロウ	コウブシ	ジコッピ	ソボク	トラガント	ポウイ	リュウガンニク
インヨウカク	カロコン	コウベイ	シコン	ソヨウ	豚脂	ポウコン	リュウコツ
ウイキョウ	カンキョウ	コウボク	シツリシ	ダイオウ	ニガキ	ポウショウ	リュウタン
ウコン	カンゾウ	ゴオウ	シャカンソウ	タイソウ	ニクジュヨウ	無水ポウショウ	リュウキョウ
ウヤク	カンテン	ゴシツ	シャクヤク	タクシャ	ニクズク	ポウフウ	レンギョウ
ウワウルシ	キキョウ	ゴシュユ	ジャシヨウシ	タンジン	ニンジン	ボクソク	レンニク
エイジツ	キクカ	ゴボウシ	シャゼンシ	チクセツニンジン	ニンドウ	ポタンピ	ロジン
エンゴサク	キササゲ	ゴマ	シャゼンソウ	チモ	バイモ	ホミカ	ロートコン
オウギ	キジツ	ゴミシ	ジュウヤク	チヨウジ	バクガ	ボレイ	ローヤルゼリー
オウゴン	牛脂	コロソバ	シュクンヤ	チョウトウコウ	バクモンドウ	マオウ	
オウセイ	キョウカツ	コンズランゴ	ショウキョウ	チヨレイ	ハチミツ	マクリ	
オウバク	キョウニン	サイコ	ショウズク	チンピ	ハッカ	マシニン	
オウヒ	クコシ	サイシン	ショウマ	テンマ	ハマボウフウ	ミツロウ	
オウレン	クジン	サフラン	シンイ	テンモンドウ	ハンゲ	サラシミツロウ	
オンジ	ケイガイ	サンキライ	シンギ	トウガシ	ビャクゴウ	木クレオソート	

また、制度により規定されていない生薬原料については、その情報収集も必要となる。例えば、近年、韓国において白首烏（ハクシュウ）と異葉牛皮消（イヨウイケマ）の誤用が社会問題となっている⁵⁾。今後、日本にも白首烏配合健康食品が流通する可能性があり、韓国での基原種の混乱が波及することも考えられる。また、日局収載の何首烏（カシュウ）との誤用も懸念されるため、これについては、国外で何首烏、白首烏、異葉牛皮消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検討した結果、基原種の混乱が認められたことが報告されている⁶⁾。一方で、これらの判別には、現段階では遺伝子解析による方法しかなく、簡便法による判別がのぞまれる。

このような背景を踏まえ、本研究では、日局でTLC法が規定されていない生薬のうち、加味帰脾湯、加味温胆湯、人参養栄湯などの配合生薬の他、最近は中年期以降の物忘れの改善を目的に単味製剤が上市されているオンジ（遠志）について、TLCによる指標成分を解析し、試験法の開発を試みた。オンジは含有成分としてサポニンが知られているが、本研究では噴霧試薬なしで検出可能な紫外線（UV）ランプ照射による検出での分析法を目指した。また、国内流通していない生薬・健康食品の適正使用に関する基礎検討として、韓国で誤用が問題となった白首烏（ハクシュウ：Cynanchi Wilfordii Radix）と異葉牛皮消（イヨウイケマ：Cynanchi Auriculati Radix）について、両者の含有成分を比較し、TLCによる比較試験について検討した。

第1章 オンジ（遠志）に関する検討

オンジ（遠志）は第17改正日本薬局方（日局）（17局）において、「本品はイトヒメハギ *Polygala tenuifolia* Willdenow (Polygalaceae)の根又は根皮である」と定義される生薬である⁷⁾ (Fig. 1). 基原植物のイトヒメハギは、朝鮮半島北部、中国北部、シベリアに分布するヒメハギ科の多年草で、葉、茎が細く、種小名の *tenuifolia* は「細い葉」を意味するとされる。また、本生薬は神農本草経の上薬に「咳逆傷中を治す。不足を補い、邪気を除き、九竅を利し、智慧を益し、耳目聡明にし、忘れず。志を強くし、力を倍す。久服すれば、身を軽くし、老いず」と記載されており、古来より虚弱体質の改善等に用いられていたことがわかる⁸⁾.

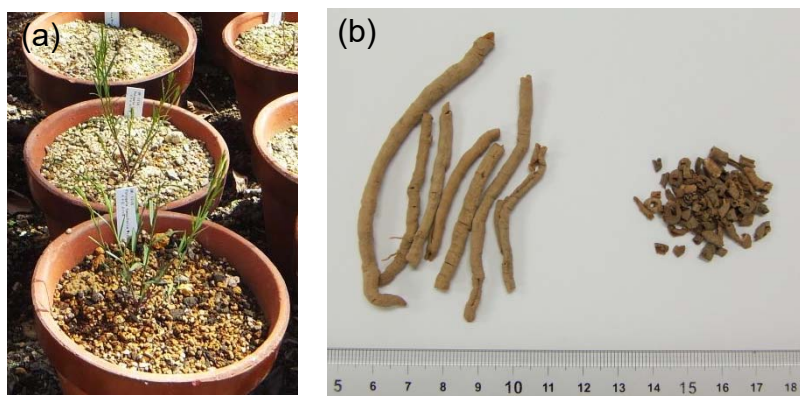


Fig. 1. (a) *P. tenuifolia* (taken at Takeda Garden for Medicinal Plant Conservation), (b) *Polygala* Root

オンジには同属植物を基原とするセネガ *P. senega* と類似の成分（サポニン）を含有していることから、日局には4局から、セネガの同効薬（去痰薬）として収載されてきたが、現在では去痰薬の製造原料としてよりも、加味帰脾湯、加味温胆湯、帰脾湯、人参養榮湯など、不眠・神経症、疲労倦怠・食欲不振改善などを目的とした漢方処方配

合生薬として用いられている。また最近では、オンジ単味のエキス製剤が、中年期以降の物忘れ改善薬として数社より上市され、オンジそのものが一般用医薬品として扱われるようになってきている注目すべき生薬の一つである。

日局では、含有成分として知られているオレアナン系トリテルペンサポニン (onjisaponin A~G 等)^{9,10)} を対象とした起沫試験及び Liebermann-Burchard 呈色反応がオンジの確認試験として規定されているが⁷⁾、本方法では他のサポニン含有生薬と明確に区別するのは困難である。そこで本研究では、オンジの確認試験として日局で広く規定されている薄層クロマトグラフ (TLC) 法による分析法の提案を目的に検討を行った。TLC 分析の検出には、紫外線 (UV) ランプ照射、酸試液等の噴霧試液を塗布後加熱によるものがあるが、本研究ではより簡便性を前提に、UV ランプ照射のみによる検出を検討することとした。オンジの UV 検出成分を明らかにするため、まず含有成分の分離精製を実施した。その結果、2 種の新規化合物を含む計 23 種の化合物を単離、構造解明した。そのうち、TLC の UV ランプ照射検出における指標成分となり得る化合物について精査した結果、3 つのオンジ特徴成分を見出した。

本章では、これらオンジの含有成分の単離と新規化合物の構造解析、さらに TLC の指標成分解析について述べる。

1-1 TLC 分析条件の検討

オレンジの TLC 分析条件を検討する目的で、入手できた国内市場品 9 品 (Table 1) についてそれぞれメタノール (MeOH) で抽出した試料溶液を調製し、TLC 分析した。分析はより精度を求めて高性能 (HP) TLC により行った。

Table 1. List of Market Samples of Polygala Root

No.	Code No.	Locality	Collection date (year)
1	NIB-0260	Shaanxi, China	unknown
2	NIB-0436	Shanxi, China	2011
3	NIB-0488	Shaanxi, China	2010
4	NIB-0489	Shaanxi, China	2007
5	NIB-0490	Shaanxi, China	2007
6	NIB-0491	Shaanxi, China	2006
7	NIB-0492	Shaanxi, China	2005
8	NIB-0493	Shaanxi, China	1997
9	NIB-0742	Shanxi, China	unknown

調製した各試料溶液 (1~9) について種々の展開溶媒で検討したところ、酢酸エチル (EtOAc) /MeOH/水 (H₂O) (6:1:1) で展開することで、分離のよい TLC データを得ることができた (Fig. 2)。各試料溶液のデータを比較したところ、 R_f 0.4~0.5 付近に共通して認められる明瞭な 3 つのスポットが観察された。これらは 254 nm における UV ランプ照射による検出においても確認された。よって、これら 3 スポットをオレンジの指標候補として検討することとした。

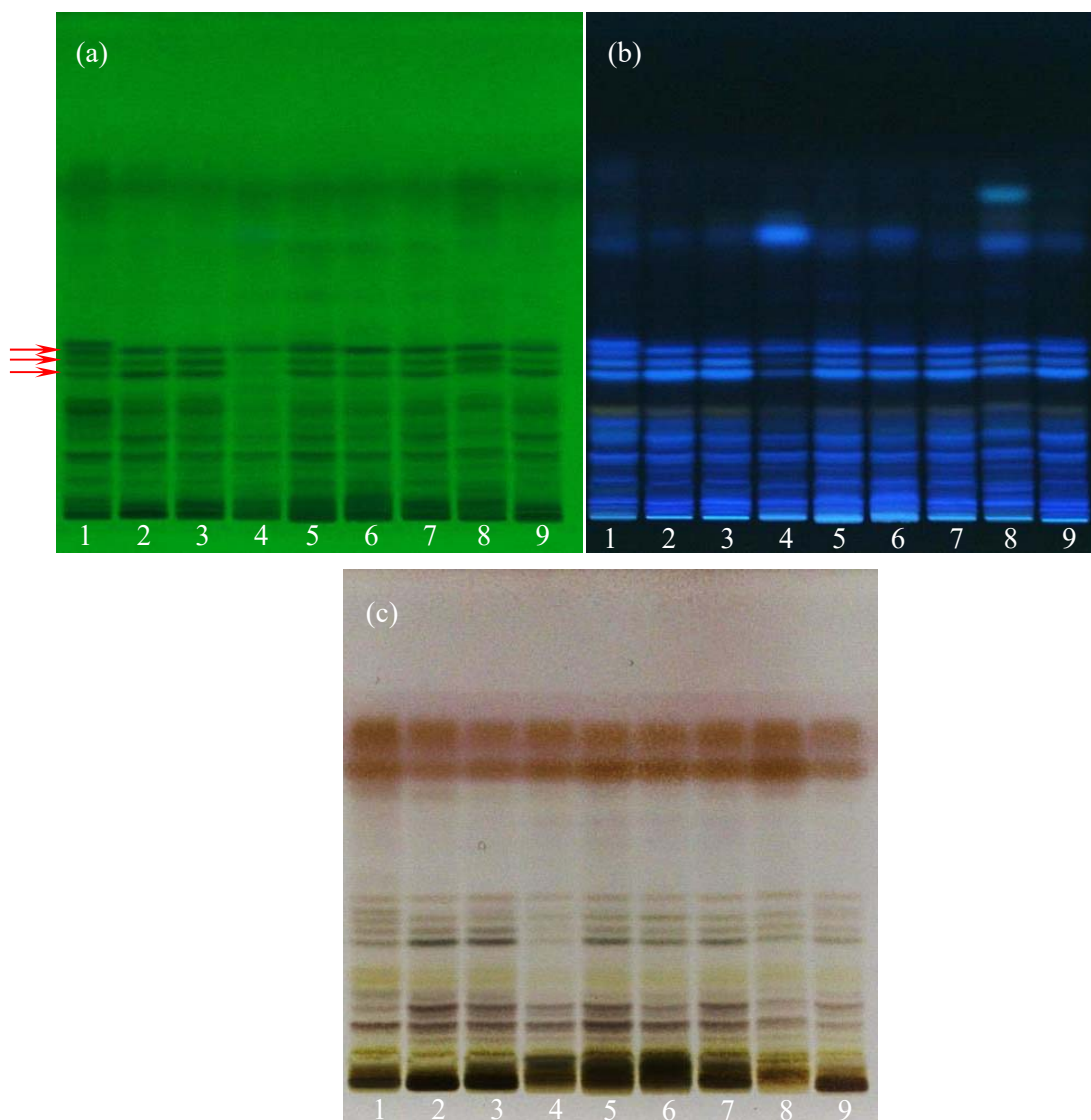


Fig. 2. HPTLC Chromatograms of the Crude Drug Products of Polygala Root Available the Japanese Markets

(a) 254 nm, (b) 366 nm, (c) diluted sulfuric acid/heat

1-2 UV 検出成分の検討

1-2-1 成分の抽出・分離精製

オンジの TLC における指標候補成分を明らかにするため、含有する UV 検出成分について精査することとした。日局オンジを MeOH 中でホモジナイズし、ろ過後、ろ液を濃縮して水を加え、再度濃縮し、*n*-ヘキサンで分配し、*n*-ヘキサンエキス及び水層を得た。得られた水層について、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーを行い、各画分を得た (Fig. 3)。

得られた画分について、HPTLC 及び HPLC 分析を行った (Fig. 4, 5)。HPTLC の結果から、50% MeOH 溶出部に指標候補とする 3 スポットが顕著に観察された。その HPLC クロマトグラムを見ると、保持時間 30~40 分付近にピークが観察されたため、まずこれらピークについて、分離精製を試みることにした。

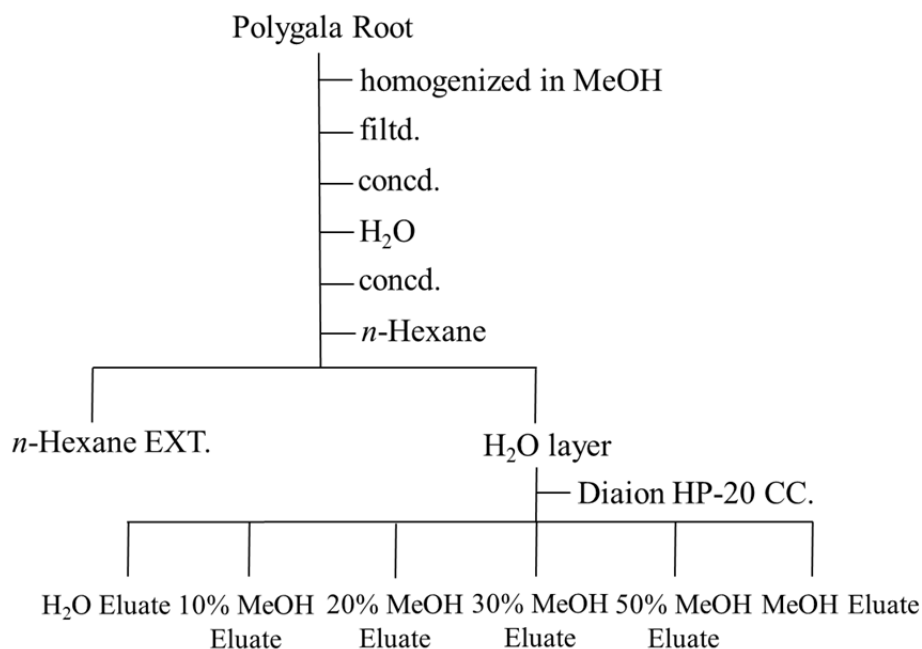


Fig. 3. Extraction and Fractionation Procedure of Polygala Root

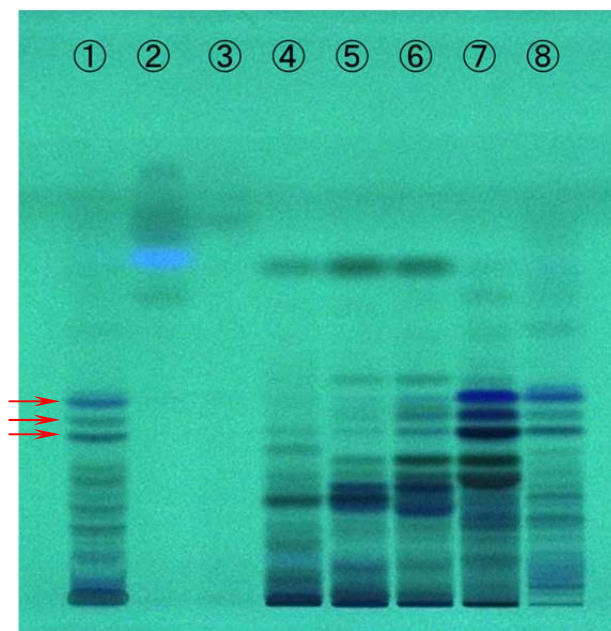


Fig. 4. HPTLC Chromatograms of Fractions from Polygala Root (254 nm).

①: Total Ext., ②: *n*-Hexane Ext., ③: Diaion HP-20 H₂O Eluate, ④: 10% MeOH Eluate, ⑤: 20% MeOH Eluate, ⑥: 30% MeOH Eluate, ⑦: 50% MeOH Eluate, ⑧: MeOH Eluate

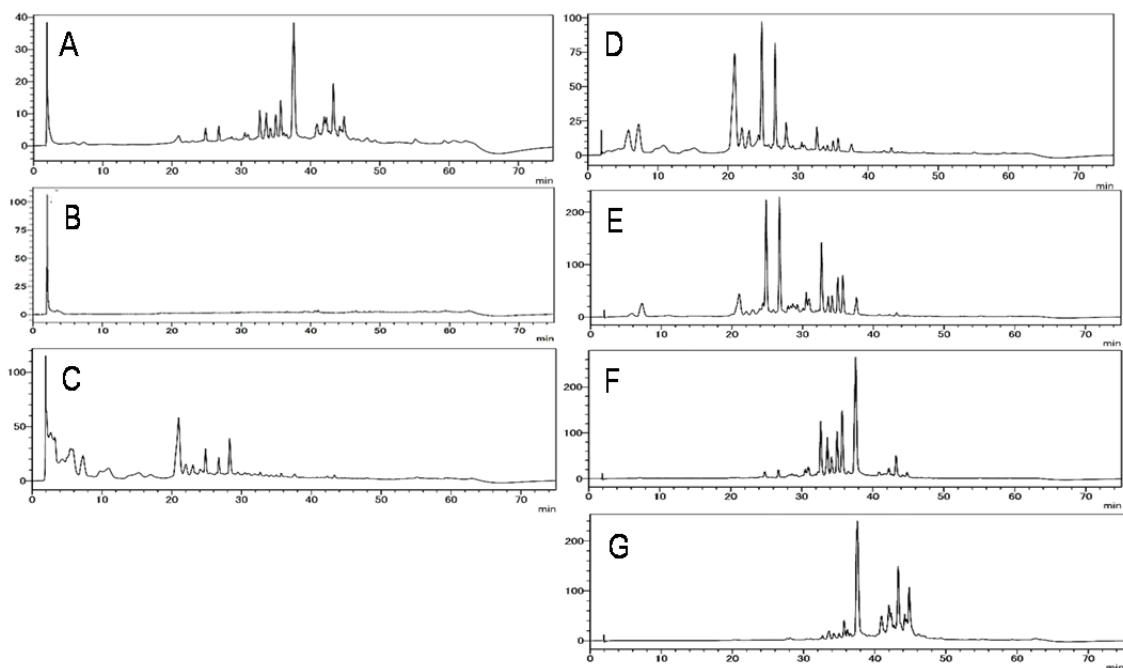


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Fractions from Polygala Root (254 nm).

A: Total Ext., B: Diaion HP-20 H₂O Eluate, C: 10% MeOH Eluate, D: 20% MeOH Eluate, E: 30% MeOH Eluate, F: 50% MeOH Eluate, G: MeOH Eluate

HPLC conditions are described in condition RP-1 of Experimental Section.

1-2-2 化合物の同定

50% MeOH 溶出部を中心に, 得られた各画分について各種カラムクロマトグラフィー (YMC GEL ODS AQ12S50, MCI-gel CHP-20P, Chromatorex ODS, Sephadex LH-20) 及び分取 TLC (p-TLC) を繰り返し, 新規化合物 2 種 [polygalaonjiside A (**1**), polygalaonjiside B (**2**)], 既知化合物 21 種 [4-hydroxybenzoic acid (**3**)¹¹, monordicophenoide A (**4**)¹², 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**5**)¹³, hemsleyanumoide (**6**)¹⁴, sibiricose A3 (**7**)¹⁵, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (**8**)¹¹, sibiricose A5 (**9**)¹⁵, sibiricose A6 (**10**)¹⁵, *trans*-ferulic acid (**11**)¹³, sibiricose A1 (**12**)¹⁵, glomeratose A (**13**)¹⁶, sibiricoxanthone B (**14**)¹⁷, tenuifoliside B (**15**)¹⁸, polygalaxanthone XI (**16**)¹⁷, polygalaxanthone III (**17**)¹⁹, 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose (**18**)²⁰, tenuifoliside A (**19**)¹⁸, 1'-cinnamoyl-3'-benzoyl-(2-*O*- β -glucosyl)-sucrose (**20**)²¹, 6-(4'''-methoxybenzoyl)-3'-(3'',4'',5''-trimethoxycinnamoyl)-sucrose (**21**)²¹, 1,3,7-trihydroxyxanthone (**22**)²², tenuifoliose J (**23**)²³] の計 23 種を得た (Fig. 6). 既知化合物については, HPLC による標品との直接比較, または各種スペクトルデータの文献値との比較により同定した.

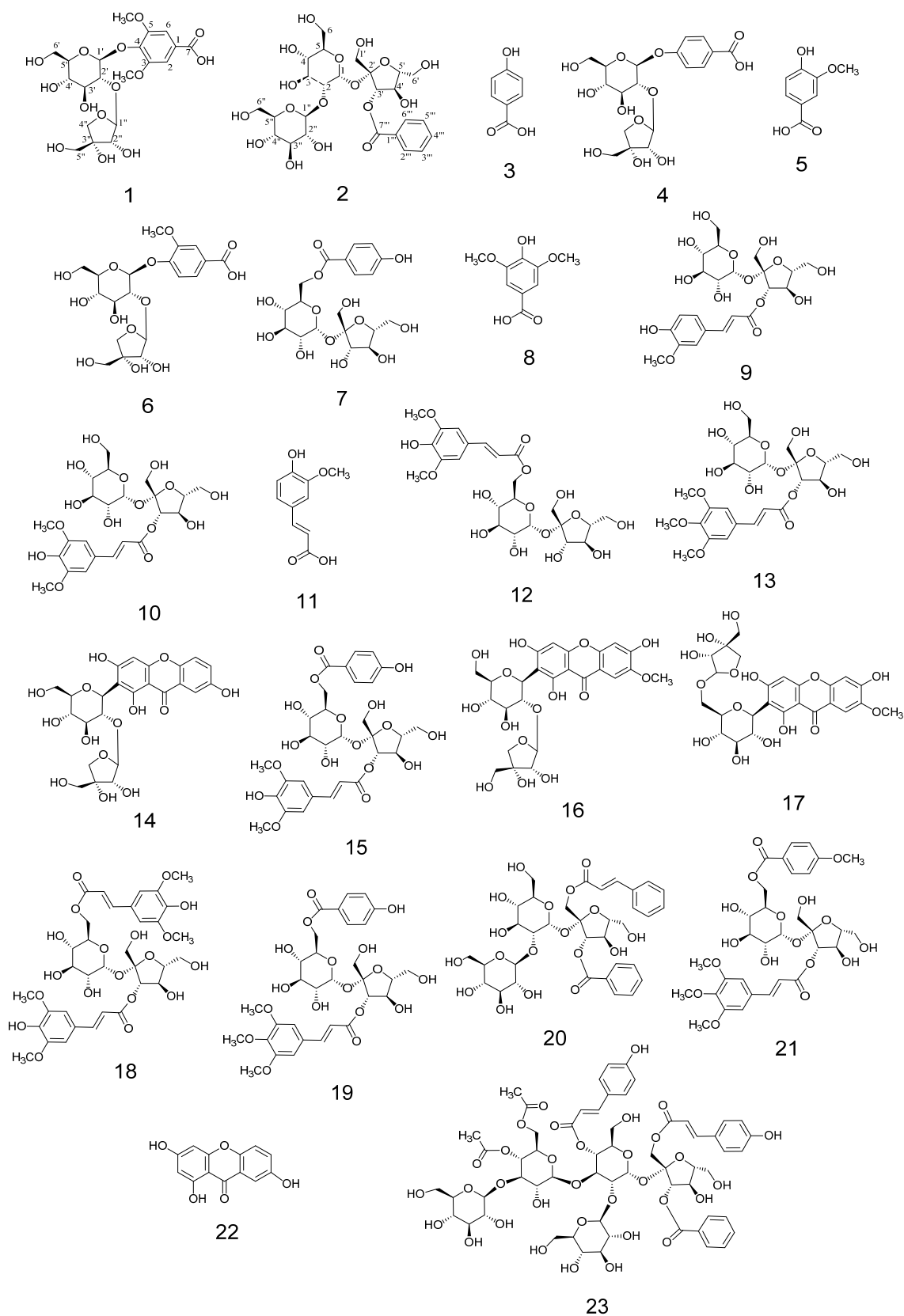
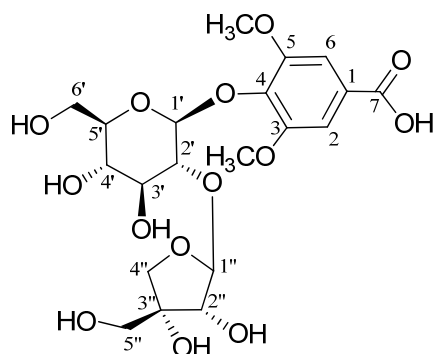


Fig. 6. Structures of Compounds 1-23

1-3 新規化合物の構造解析

1-3-1 Polygalaonjicide A の構造解析



1

Polygalaonjicide A (1) は淡褐色無晶形粉末として得られ、高分解能 (HR)-ESI-MS の測定結果より、 m/z 491.1384 に $[M-H]^-$ イオンピークを示したことから、分子式は $C_{20}H_{28}O_{14}$ であることが示された。また、UV スペクトルにおいて 208, 252 nm に極大吸収が観察された。

1H -NMR スペクトル (Fig. 7) では、芳香族プロトン領域において 2H 分の singlet が 1 本 (δ 7.32)、脂肪族プロトン領域に 2 つのメトキシ基に由来する 6H 分の singlet が 1 本 (δ 3.86) の他、糖由来と考えられるシグナルが観察された。また、 ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. 8) においては、6 つの芳香族カーボンと 1 つのエステルカルボニルカーボン [δ 129.7, 108.6 (2C), 154.0 (2C), 139.1, 171.0] が観察されたことより、アグリコン部分は syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid) であることが示唆された。アグリコン部分の化学的証拠を得るため、酸加水分解を行い HPLC で分析した結果、syringic acid を確認した。

糖部分については、2 つのアノメリックプロトン [δ 5.19 (d, $J=7.0$ Hz), δ 5.47 (d, $J=1.0$ Hz)] 及び 4 級カーボン (δ 80.9) と 3 つのメチレンカーボン (δ 62.6, 66.3, 75.6) を含む

11 個の炭素が観察されたことから 5 及び 6 単糖の 2 糖の存在が示唆された。 ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY) (Fig. 9) と heteronuclear single quantum coherence (HSQC) の測定を行い、糖由来のプロトンとカーボンを帰属した結果、apiosylglucose 由来のシグナルとよい対応を示した²⁴⁾。そこで、**1** の糖ユニットについて、L-cysteine methyl ester と *o*-tolyl isothiocyanate を用いて誘導体化する既報²⁵⁾ に従い、HPLC 分析により D-glucose と D-apiose であることを確認した。

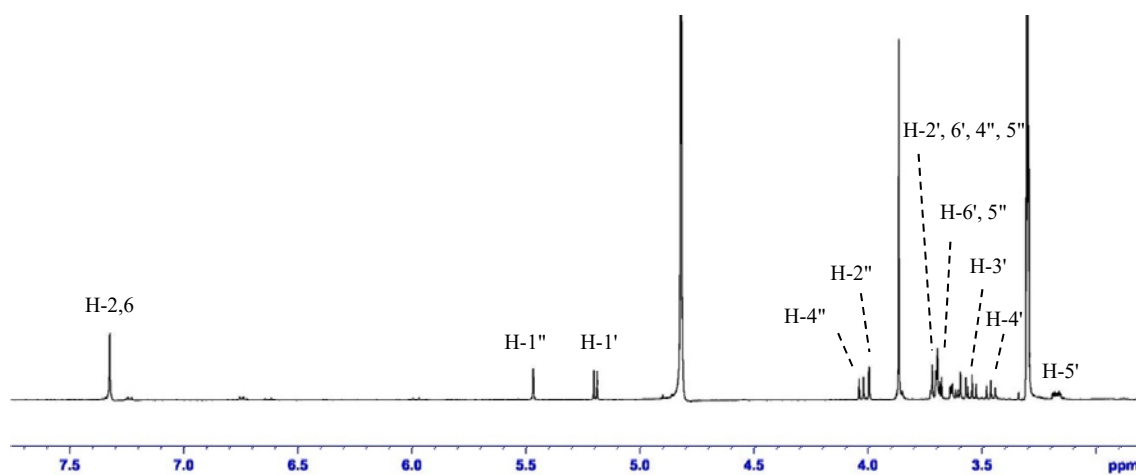


Fig. 7. ^1H -NMR Spectrum of **1** (500 MHz, MeOH- d_4)

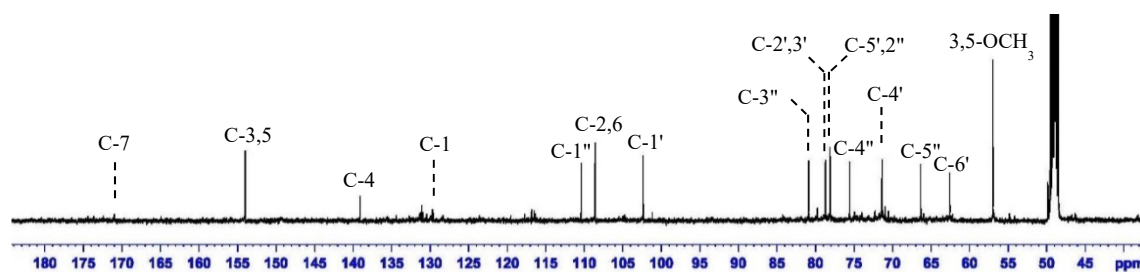


Fig. 8. ^{13}C -NMR Spectrum of **1** (126 MHz, MeOH- d_4)

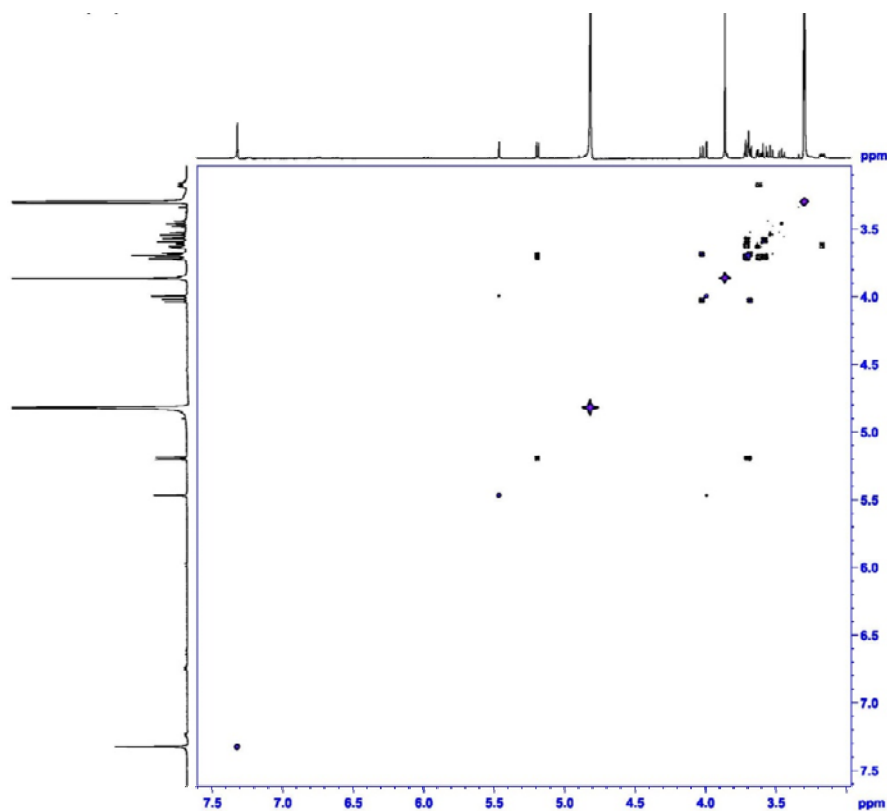


Fig. 9. ^1H - ^1H COSY Spectrum of **1** (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

糖とアグリコンのつながりを明らかにする目的で、heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) (Fig. 10) を測定した結果、glucose の H-1' 位 (δ 5.19) から syringic acid の C-4 位 (δ 139.1) に 3-bond coupling による相関が観察されたことより、糖の結合位置は 4 位であることが明らかとなった。また、apiose の H-1'' 位 (δ 5.47) から glucose の C-2' 位 (δ 78.73) への相関、及び glucose の H-2' 位 (δ 3.692) から apiose の C-1'' 位 (δ 110.4) への相関が観察されたことから、apiose の 1 位の結合位置は glucose の 2 位であることが示された。Glucose の結合様式については、アノメリックプロトン (H-1') のカップリング定数が 7.0 Hz であったことから β 配置であることが示された。Apiose の結合様式については、アノメリックカーボン (C-1'') が δ 110.4 であったこと、また

H-1''位のカップリング定数が 1.0 Hz を示したことから β 配置であることが支持された (26, 27).

以上のデータに基づき, **1** の構造は syringic acid 4-O-(2'-O- β -D-apiosyl)- β -D-glucoside であると決定し, polygalaonjiside A と命名した.

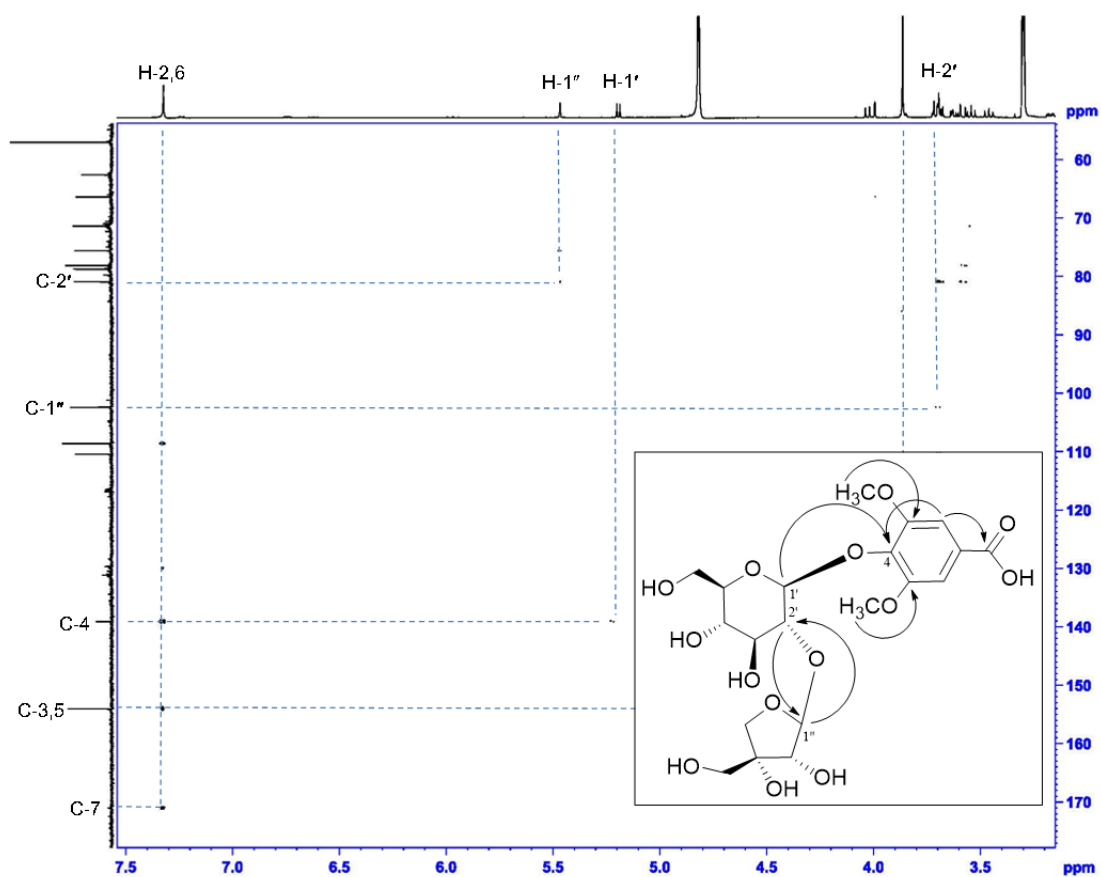
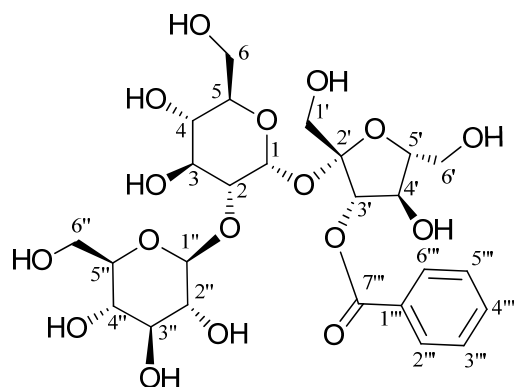


Fig. 10. HMBC Spectrum of **1** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

1-3-2 Polygalaonjicide B の構造解析



2

Polygalaonjicide B (**2**) は淡灰色無晶形粉末として得られ、HR-ESI-MS の測定結果より m/z 681.1832 に $[M+Na]^+$ イオンピークを示したことから、分子式は $C_{25}H_{36}O_{17}$ であることが示された。また UV スペクトルにおいて、231, 279sh nm に極大吸収が観察された。

1H -NMR スペクトル (Fig. 11) では、芳香族プロトン領域に 1 置換ベンゼン由来のシグナル [δ 8.10 (2H, dd, $J=1.0, 8.0$ Hz), δ 7.50 (2H, t, $J=8.0$ Hz), δ 7.61 (1H, tt, $J=1.0, 1.0, 8.0, 8.0$ Hz)] 及び糖 3 個分と考えられるシグナルが観察された。また、 ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. 12) においては、6 つの芳香族カーボンと 1 つのエステルカルボニルカーボン [δ 131.1, 131.0 (2C), 129.7 (2C), 134.5, 167.3] が観察され、アグリコンはベンゾイル基であると帰属した。アグリコン部分の化学的証拠を得るため、酸加水分解を行い HPLC で分析した結果、benzoic acid を確認した。

糖部分のシグナルは、 1H - 1H COSY, HSQC, HMBC スペクトルの結果より帰属し、これらのスペクトルデータは 2-*O*- β -D-glucosylsucrose の文献値とよい対応を示した^{21,28,29}。また、HMBC の測定結果より、H-1 (δ 5.65) と C-2' (δ 105.1), H-1'' (δ 4.41) と C-2 (δ 82.1), H-3' (δ 5.66) と C-7''' (δ 167.3) の相関が観察された (Fig. 13)。

以上のデータに基づき, **2** の構造は 2-*O*-(β -D-glucosyl)-3'-*O*-benzoylsucrose と決定し, polygalaonjiside B と命名した.

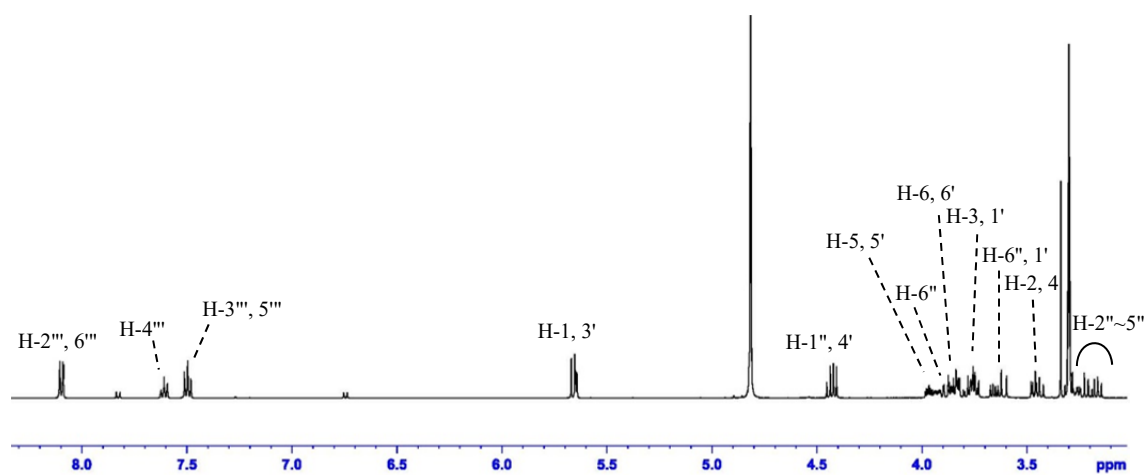


Fig. 11. ¹H-NMR Spectrum of **2** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

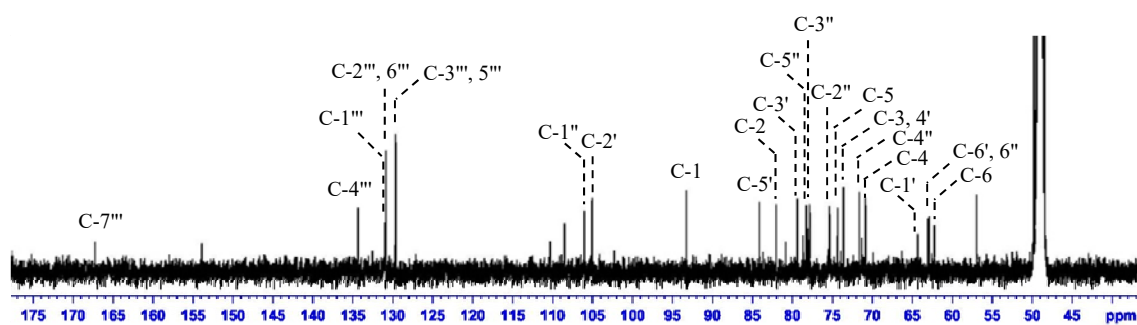


Fig. 12. ¹³C-NMR Spectrum of **2** (126 MHz, MeOH-*d*₄)

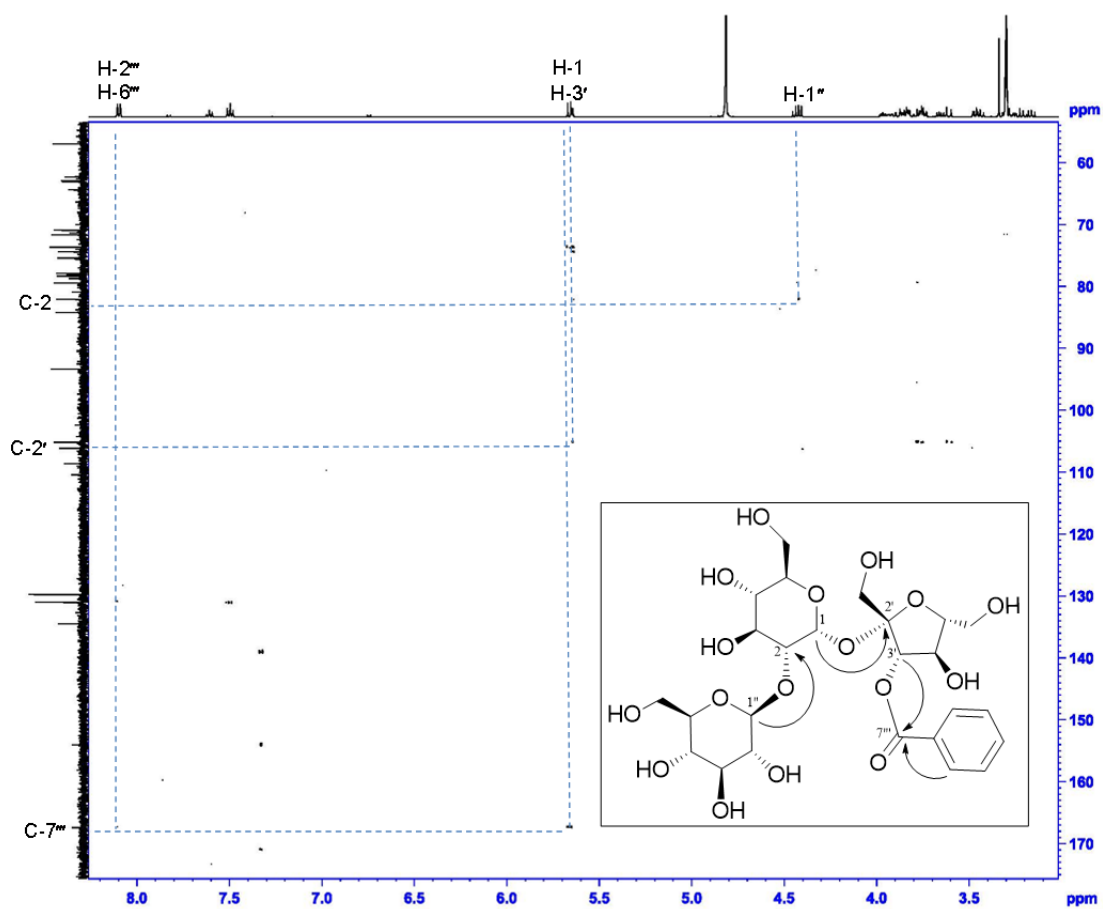


Fig. 13. HMBC Spectrum of 2 (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$)

1-4 TLC 指標成分の解析

1-1 におけるオンジの TLC 分析条件の検討により明らかとなった 3 スポット (Fig. 14) について, 単離, 同定した成分を標品として用い解析した. 以下にスポット I ~ III の構造解析について述べる.

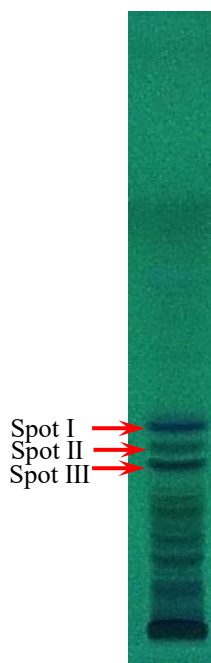


Fig. 14. HPTLC Chromatogram of MeOH Extract of Polygala Root (254 nm)

1-4-1 スポット I の解析

スポット I の化合物は、淡黄色無晶形粉末として得られた。¹H-NMR スペクトルより、脂肪族プロトン領域に 3,4,5-trimethoxycinnamoyl 基由来の 3 つのメトキシシグナル [(δ 3.78, 3H, s), (δ 3.85, 6H, s)], 芳香族プロトン領域に 1 組のトランスオレフィンプロトンシグナル (δ 6.53, 7.71, each 1H, d, $J=16.0$ Hz), 2H-singlet (δ 6.94) が観察された。また、芳香族プロトン領域に *p*-hydroxybenzoyl 基由来の 2H-doublet が 2 組 (δ 6.81, 7.90, $J=8.8$ Hz) 観察された。加えて、スクロースの α -glucopyranose のアノメリックプロトンに特徴的な 1H-doublet (δ 5.49, $J=3.8$ Hz) が観察された。以上の結果より、スポット I はスクロースを配糖体とする *p*-hydroxybenzoyl 基と 3,4,5-trimethoxycinnamoyl 基を有する化合物であることが推察された。本化合物の ¹H-NMR スペクトル (Fig. 15) 等を文献値¹⁸⁾と比較し、スポット I は **19** の tenuifoliside A と同定した。

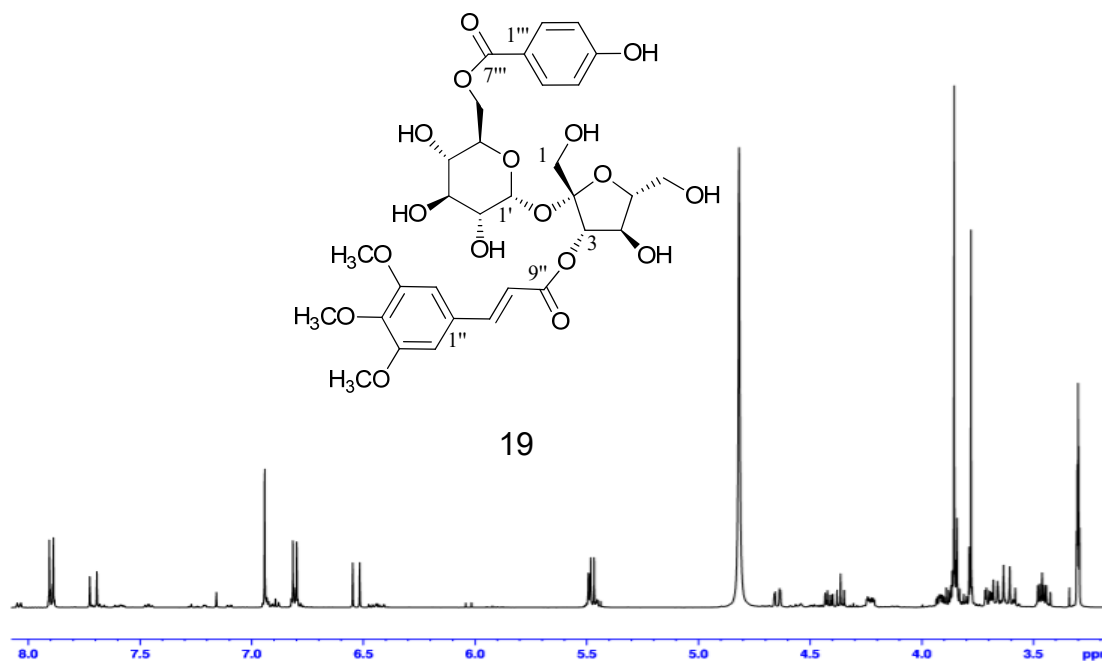


Fig. 15. ¹H-NMR Spectrum of **19** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

1-4-2 スポットIIの解析

スポットIIの化合物は、淡黄色無晶形粉末として得られた。¹H-NMR スペクトルより、脂肪族プロトン領域に sinapoyl 基由来のメトキシシグナル 6H-singlet (δ 3.87) が1本、芳香族プロトン領域に1組のトランスオレフィンプロトンシグナル (δ 6.44, 7.70, each 1H, d, $J=16.0$ Hz), 2H-singlet (δ 6.93) が観察された。また、芳香族プロトン領域に *p*-hydroxybenzoyl 基由来の 2H-doublet が2組 (δ 6.81, 7.91, $J=9.0$ Hz) 観察された。加えて、脂肪族プロトン領域にスクロースの α -glucopyranose のアノメリックプロトンに特徴的な 1H-doublet (δ 5.49, $J=4.0$ Hz) が観察された。以上の結果より、化合物 **15** はスクロースを配糖体とする *p*-hydroxybenzoyl 基と sinapoyl 基を有する化合物であることが推察された。本化合物の ¹H-NMR スペクトル (Fig. 16) 等を文献値¹⁸⁾と比較し、スポットIは **15** の tenuifoliside B と同定した。

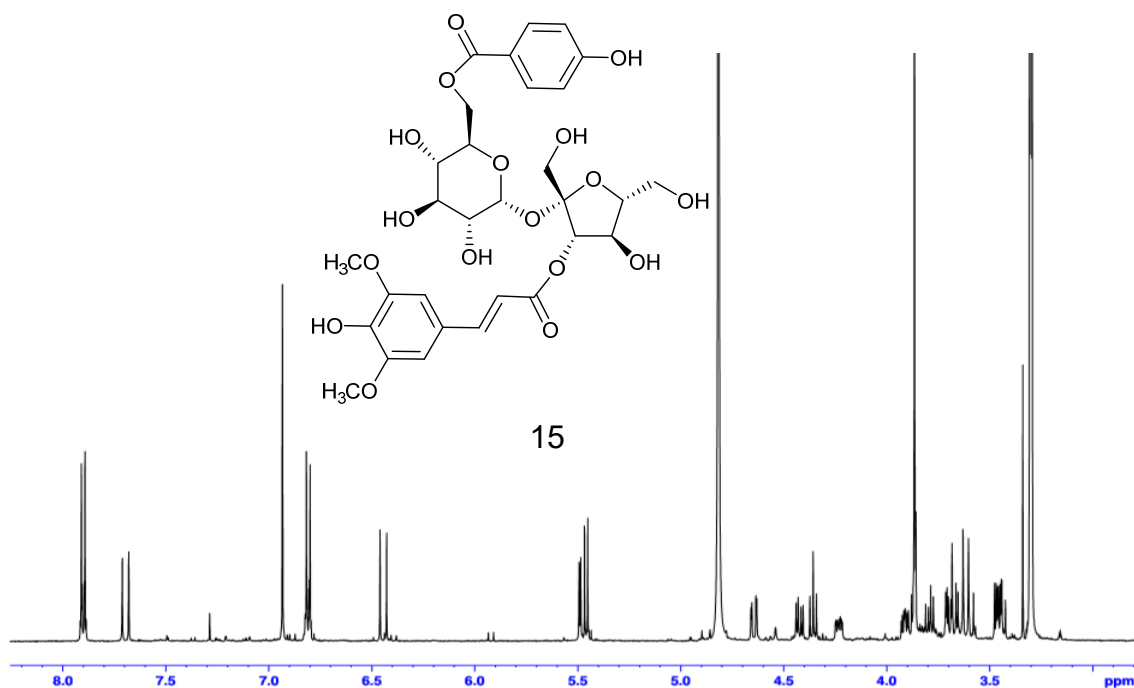


Fig. 16. ¹H-NMR Spectrum of **15** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

1-4-3 スポットⅢの解析

スポットⅢの化合物は、淡黄色無晶形粉末として得られた。¹H-NMR スペクトルより、脂肪族プロトン領域に sinapoyl 基由来のメトキシシグナル 6H-singlet (δ 3.83, 3.86) が 2 本、芳香族プロトン領域に 2 組のトランスオレフィンプロトンシグナル (δ 6.43, 6.45, 7.58, 7.66, each 1H, d, $J=16.0$ Hz), 2H-singlet が 2 組 (δ 6.86, 6.90) 観察された。また、脂肪族プロトン領域にスクロースの α -glucopyranose のアノメリックプロトンに特徴的な 1H-doublet (δ 5.51, $J=3.5$ Hz) が観察された。以上の結果より、化合物 **18** はスクロースを配糖体とする 2 つの sinapoyl 基を有する化合物であることが推察された。本化合物の ¹H-NMR スペクトル (Fig. 17) 等を文献値²⁰⁾と比較し、スポットⅢは化合物 **18** の 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose と同定した。

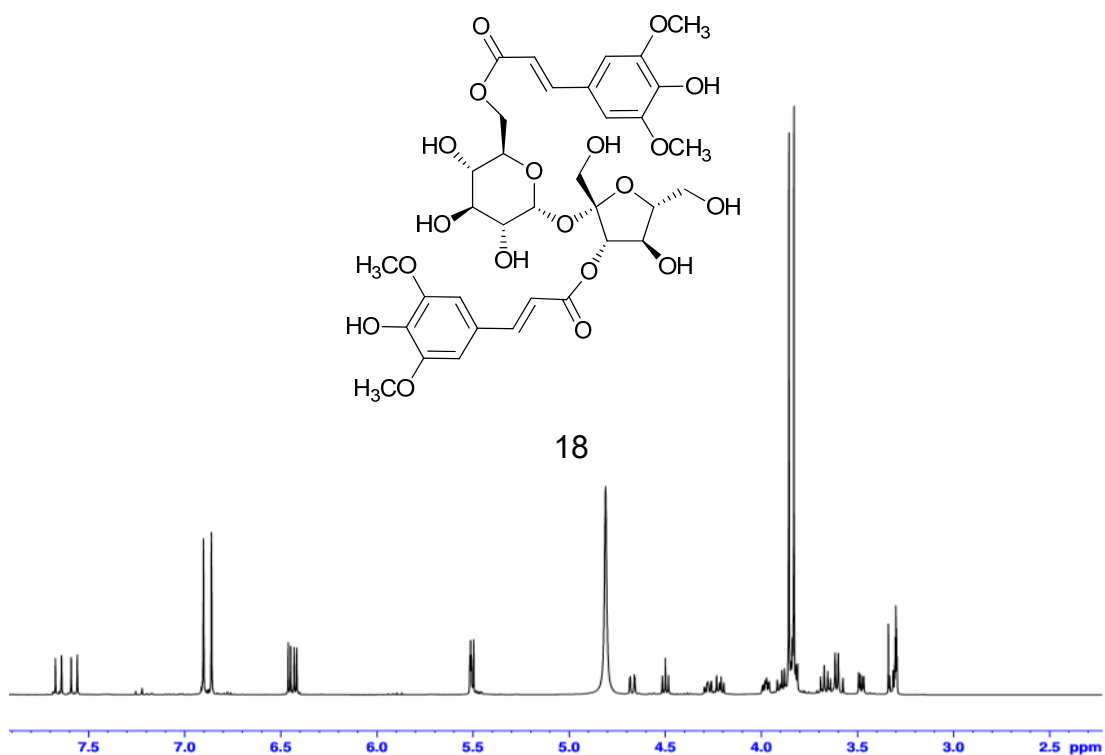


Fig. 17. ¹H-NMR Spectrum of **18** (500 MHz, MeOH-*d*₄)

1-4-4 セネガとの比較

スポット I ~ III (Fig. 18 矢印) はそれぞれ, tenuifolside A (**19**), tenuifolside B (**15**), 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose (**18**) と同定された. これらはオンジから既に単離報告のある化合物であるが, その他の植物からの単離はほとんど見あたらない. そこで, これらがオンジに特徴的な成分であることを確認する目的で, 同族植物を基原とするセネガの TLC 分析パターンと比較検討を試みた.

その結果 (Fig. 18 破線矢印), セネガにはスポット II に相当する tenuifolside B (**15**) とほぼ同じ R_f 値にスポットが認められたが, 残りの 2 つのスポットは明瞭に観察されなかった. それゆえ, オンジの TLC を用いた確認試験として, 3 つの指標成分を確認することが重要でそれによりセネガと区別し得ることが示唆された.

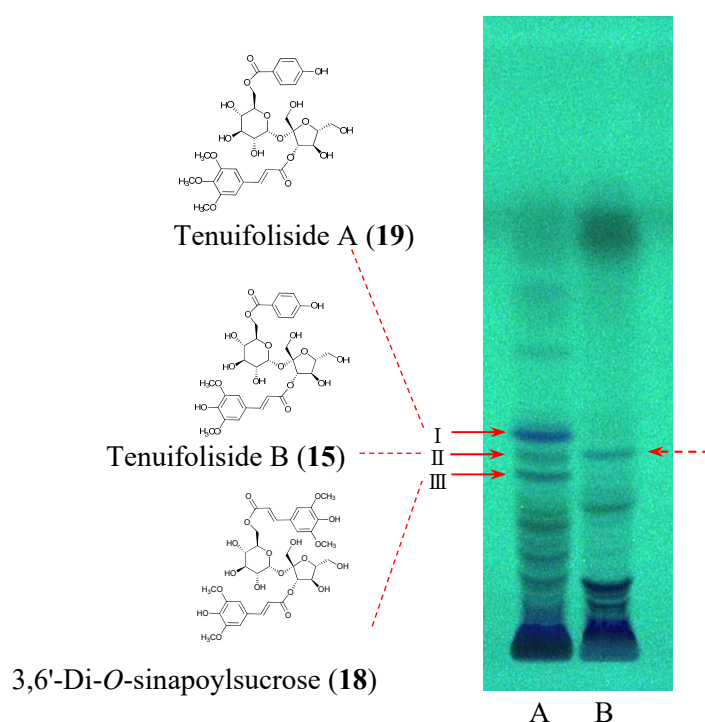


Fig. 18. HPTLC Chromatograms of the Crude Drug Products of Polygala Root and Senega (254 nm) A: Polygala Root, B: Senega

1-5 TLC 分析の単味エキス製剤への適用

TLC 分析条件の検討から示された分析法について, 市販されているオンジの単味エキス製剤 5 製品 (A~E) を用い, 適用の可能性を検討した. 比較試料として, オンジ MeOH 抽出物及び煎液凍結乾燥物を用いた. その結果, 単味エキス製剤 5 製品すべてに指標候補とする 3 つのスポットが観察され, オンジの単味エキス製剤においても分析可能であることが示された (Fig. 19).

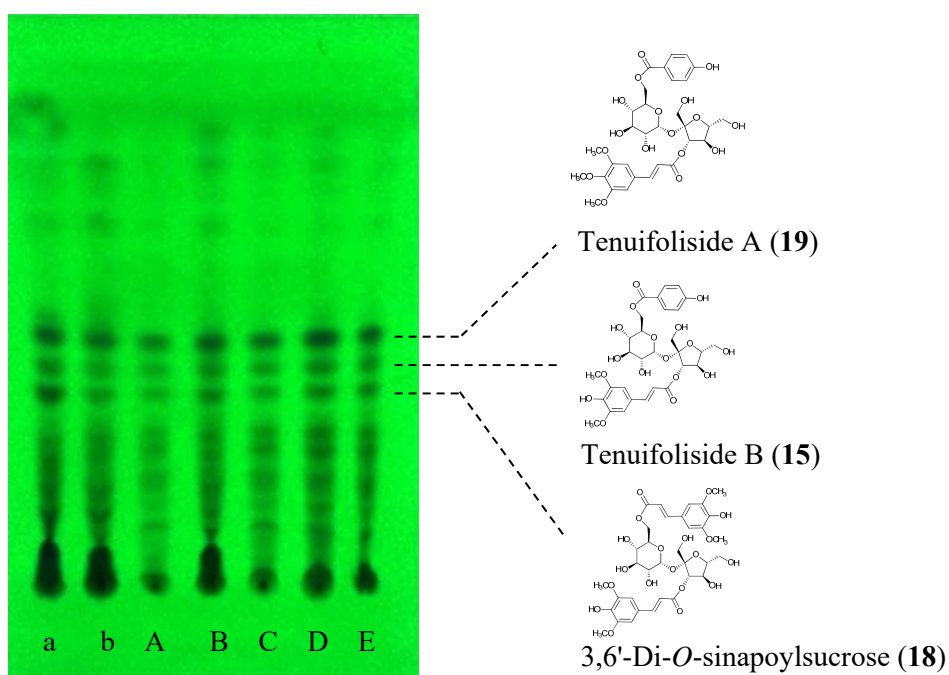


Fig. 19. TLC Chromatograms of the Crude Drug Products of Polygala Root (254 nm)
a: MeOH EXT., b: Freeze Dried EXT., A-E: Commercial Polygala Root Extract Products

1-6 小括

生薬オンジの UV ランプ照射検出による TLC 分析法の提案を目的に、オンジに含有する UV 検出成分について精査した結果、2 種の新規化合物及び既知化合物 21 種〔4-hydroxybenzoic acid (3), monordicophenoide A (4), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (5), hemsleyanumoide (6), sibiricose A3 (7), 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (8), sibiricose A5 (9), sibiricose A6 (10), *trans*-ferulic acid (11), sibiricose A1 (12), glomeratose A (13), sibiricoxanthone B (14), tenuifoliside B (15), polygalaxanthone XI(16), polygalaxanthone III (17), 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose (18), tenuifoliside A (19), 1'-cinnamoyl-3'-benzoyl-(2-*O*- β -glucosyl)-sucrose (20), 6-(4'''-methoxybenzoyl)-3'-(3'',4'',5''-trimethoxycinnamoyl)-sucrose (21), 1,3,7-trihydroxyxanthone (22), tenuifoliose J (23)] の計 23 種を単離、構造解析した。新規化合物 1 は, syringic acid 4-*O*-(2'-*O*- β -D-*apiosyl*)- β -D-glucoside であると決定し, polygalaonjiside A と命名した。新規化合物 2 は, 2-*O*-(β -D-glucosyl)-3'-*O*-benzoylsucrose と決定し, polygalaonjiside B と命名した。また既知化合物のうち, 4-hydroxybenzoic acid (3), monordicophenoide A (4), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (5), hemsleyanumoide (6), 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (8), *trans*-ferulic acid (11) は, オンジからはじめて単離された化合物である。

UV ランプ照射 (254 nm) 検出による TLC 試験法について, オンジの国内市場品 9 品を用いて条件検討した結果, EtOAc/MeOH/H₂O (6:1:1) を展開溶媒として用いることで, R_f 0.4~0.5 付近に共通して認められる明瞭な 3 つのスポットが観察された。単離, 同定した化合物に基づき, この 3 スポット (スポット I ~ III) について成分解析した結果, それぞれ tenuifoliside A (19), tenuifoliside B (15), 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose (18) と同定し, 指標となる成分候補として見出した。これら 3 成分は, いずれも他の植物からの報告が限られているオンジに特徴的な成分であることから¹⁸⁾, オンジの指標成分と

して適当であることがいえる。また、生物活性として、神経保護、認識機能改善、脳保護効果が報告されており³⁰⁻³⁴⁾、加えてこれら3成分のアグリコンである sinapic acid や 3,4,5-trimethoxycinnamic acid も脳保護効果や認識機能改善効果の報告がある³⁵⁻³⁷⁾。それゆえ、これら3成分は、オレンジの単味エキス製剤の効果・効能にある中年期以降の物忘れ改善に関与する成分であることが示唆される。よって、候補となる3成分は、オレンジの有効成分としても考えられ、指標成分として相応しい化合物であることが示唆される。同属植物を基原とするセネガとの比較を行った結果、**15**と同じ R_f 値にスポットが認められた。それゆえ、オレンジの確認には、3スポットすべてを認めることが必要であることが考察された。

オレンジの主要成分としてはサポニンが知られているが、それらを指標成分とした TLC 試験法とする場合、酸試薬等の噴霧試薬を噴霧後、加熱処理の操作が必要となる。生薬の確認試験は、安価で簡便性及び安全性を追求した方法が求められる。本研究における方法は、オレンジに特有の活性関与成分を指標とした UV ランプ照射のみの検出で判別可能であり、酸試薬噴霧や加熱処理といった手間を省略することができ、時間効率や安全面において優れていると考えられ、その有用性が示唆される。

第2章 ハクシュウ（白首烏）に関する検討

ハクシュウは日局や局外生規に記載されておらず、公的な定義はないが、韓国では The Korea Herbal Pharmacopoeia に記載されており、*Cynanchum wilfordii* Hemsley の根を基原とする生薬であると規定されている³⁸⁾。カシュウ（何首烏）はツルドクダミの塊根を基原とする第17改正日局記載の生薬であるが³⁾、韓国ではツルドクダミが自生しないため、カシュウの代わりにハクシュウ（白首烏）[*Cynanchi Wilfordii Radix* (CWR)] も使用されてきた。近年、韓国では更年期障害の改善効果を謳った健康食品としてハクシュウが多く流通している。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%がハクシュウと類似しているイヨウイケマ（異葉牛皮消）[*Cynanchi Auriculati Radix* (CAR)] 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⁾。誤用の要因としては、生薬原料として制度が規定されておらず、外観が類似していることがあげられる (Fig. 20)。イヨウイケマは、*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight の根を基原とし、体重減少や神経衰弱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³⁹⁾。ハクシュウとイヨウイケマの誤用については、韓国では古くから問題となっており、これまでに PCR 法による両者の鑑別法が報告されている^{40, 41)}。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、健康食品等で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で、それゆえ簡便法の提案が望まれる。

判別分析法については、これまで HPLC 分析により多成分を解析する方法や、TLC 分析においてハクシュウの特徴成分とされる *condurol F* を分析する方法が報告されているが^{42, 43)}、操作が煩雑で、また分析対象としたハクシュウとイヨウイケマの基原種の同定がなされていない可能性もある。そこで、本研究では、遺伝子解析により種の同定

されたハクシュウとイヨウイケマについて、両者を判別可能な簡便法として試薬噴霧を必要としないUVランプ照射によるTLC法を検討した。その結果、イヨウイケマに $R_f 0.5$ 付近の明瞭なスポットが観察され、両者を予備的に判別する方法を見出した。

本章では、ハクシュウとイヨウイケマについて両者の含有成分の比較検討及びTLC分析による比較試験について述べる。

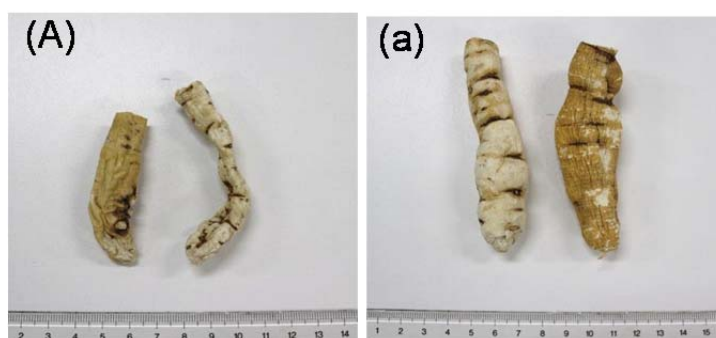


Fig. 20. Crude drugs identified: (A) *Cynanchi Wilfordii Radix* (CWR, the root of *Cynanchum wilfordii* Hemsley), and (a) *Cynanchi Auriculati Radix* (CAR, the root of *Cynanchum auriculatum* Royke ex Wight)

2-1 UV 検出成分の検討

2-1-1 成分の抽出・分離精製

遺伝子解析により種が同定されたハクシュウを 80% MeOH 中でホモジナイズし、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン、EtOAc、*n*-ブタノールで順次分配を行い、各エキスを得た。得られたエキスのうち、EtOAc エキス及び *n*-ブタノールエキスについて、各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP-20 , YMC GEL ODS , Chromatorex ODS) 及び分取 TLC を繰り返し、2-*O*- β -laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (**24**)⁴⁴⁾, cynandione A (**25**)⁴⁵⁾, uridine (**26**), guanosine (**27**), adenosine (**28**), tryptophan (**29**)⁴⁶⁾, bungeiside-C (**30**), bungeiside-D (**31**), *p*-hydroxyacetophenone (**32**)⁴⁷⁾, 2',5'-dihydroxyacetophenone (**33**)⁴³⁾, 2',4'-dihydroxyacetophenone (**34**)⁴⁷⁾ の計 11 種を同定した (Fig. 21, 22). これらは各種スペクトルデータの文献値との比較により同定した。

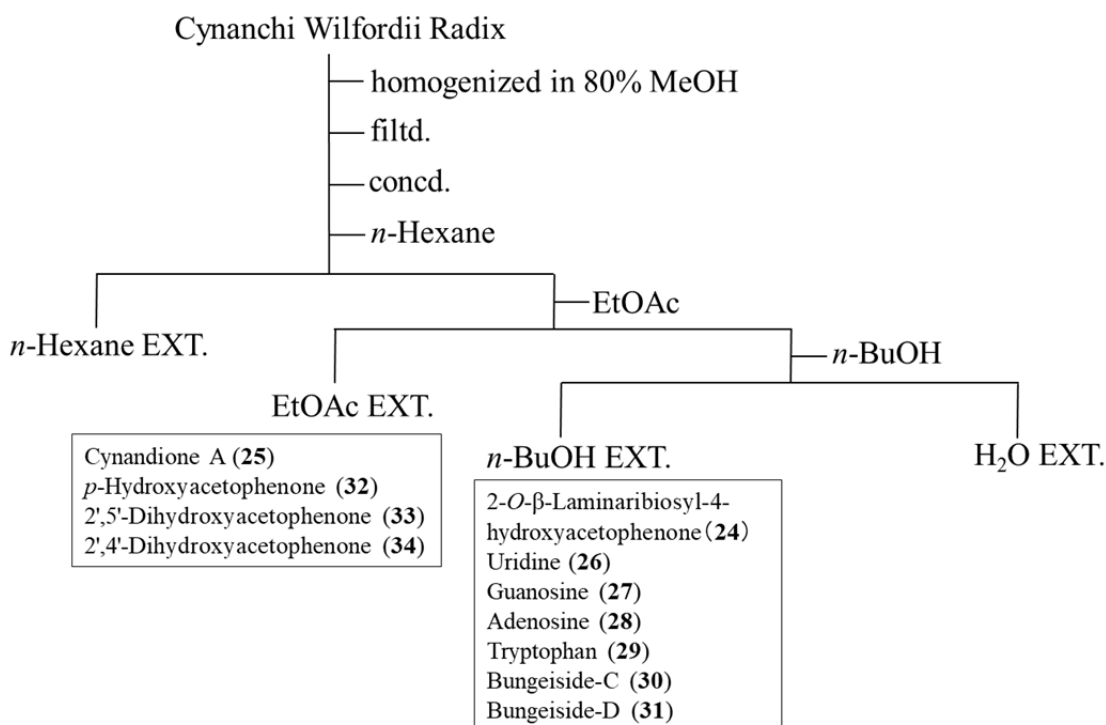


Fig. 21. Extraction and Isolation Procedure of Cynanchi Wilfordii Radix

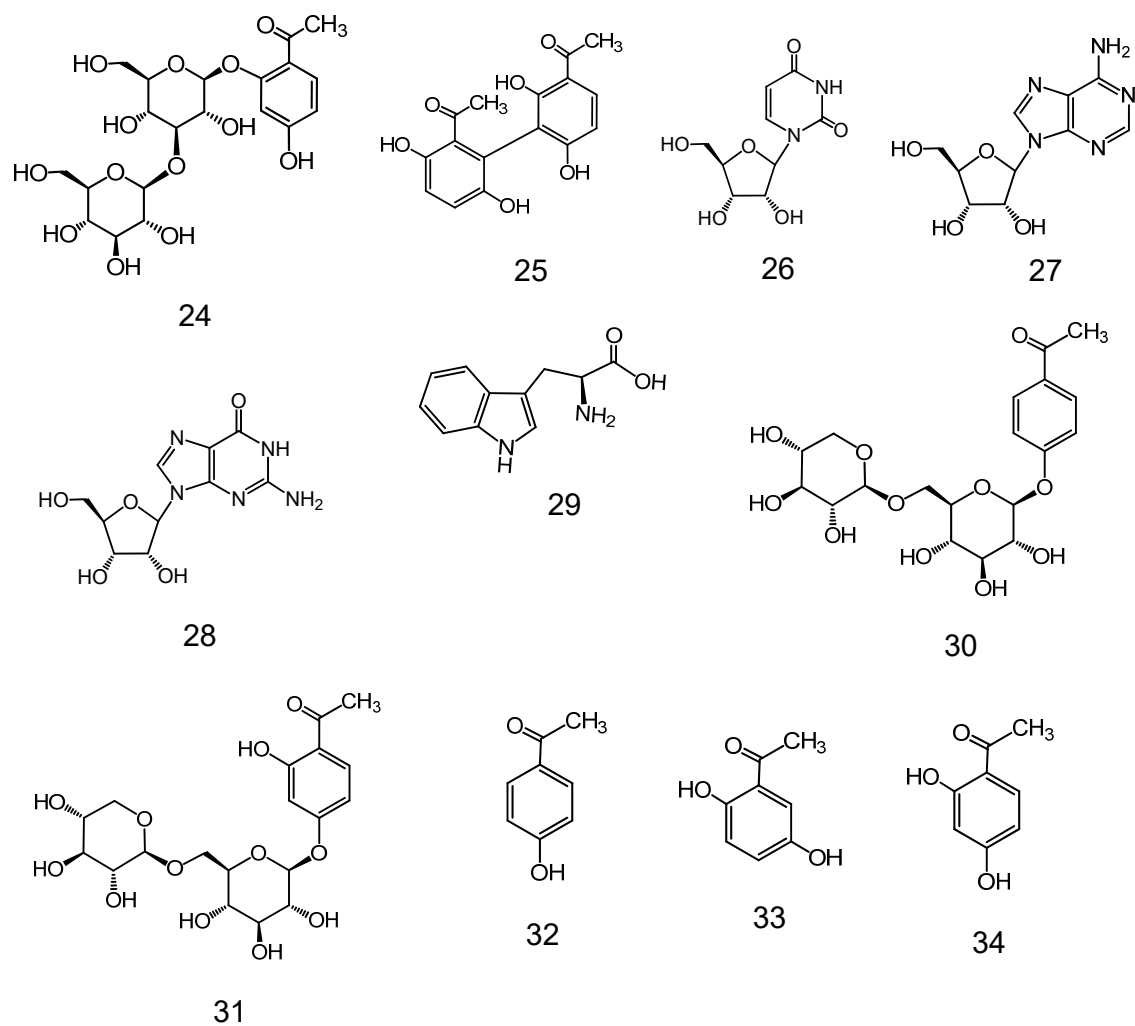


Fig. 22. Structures of Compounds 24-34

2-1-2 Cynandione A (25) の構造解析

Cynandione A (25) はビフェニル構造を有する特徴的なビアセトフェノン誘導体であるが、ビフェニル部分の C-1 と C-1' 間のつながりについては、HMBC による解析のみで決定するのは困難であるとされ、これまで、本化合物のビフェニル部分の C-C 結合に関する報告は見当たらない。そこで、 $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 23) 及び $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 24) を測定し、HMBC (Fig. 25) 及び two-dimensional (2D) incredible natural abundance double quantum transfer experiment (INADEQUATE) 解析 (Fig. 26) 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' 間は間違いなくつながっていることをはじめて明らかにした。

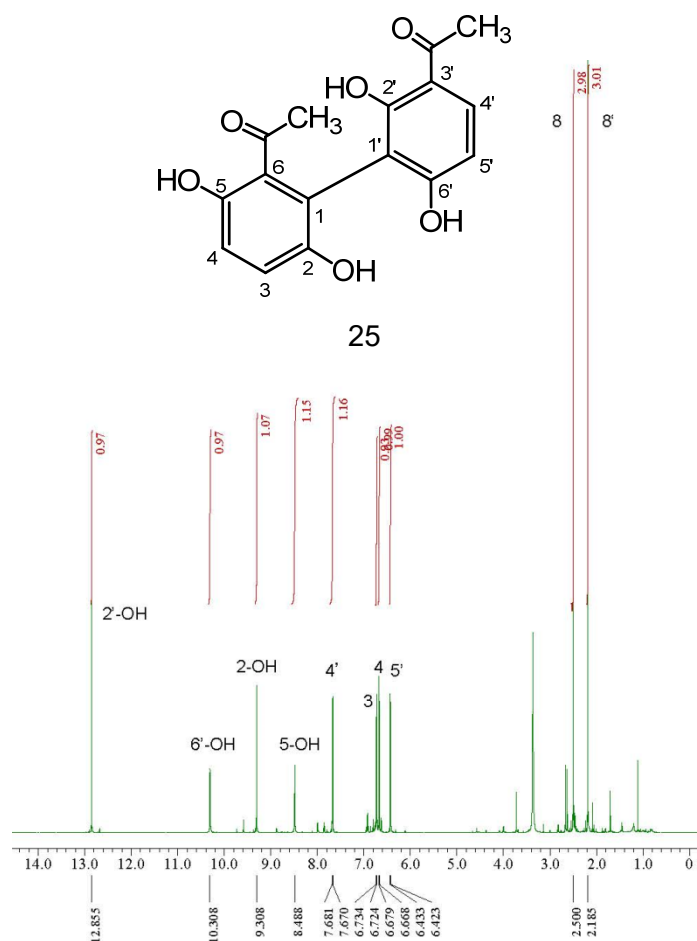


Fig. 23. $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of 25 (800 MHz, DMSO-d_6)

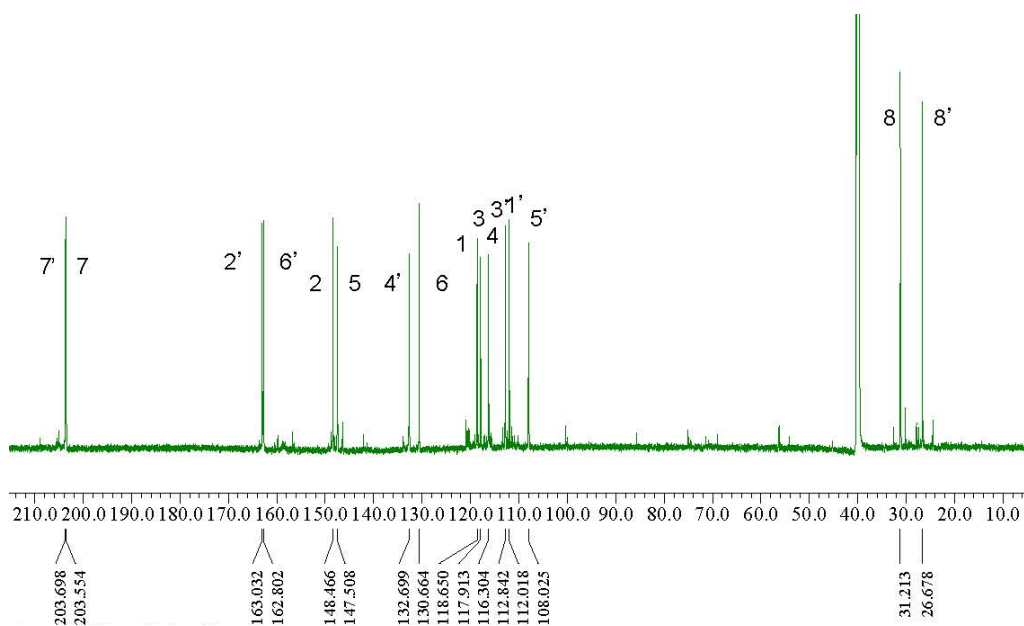


Fig. 24. ^{13}C -NMR Spectrum of **25** (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

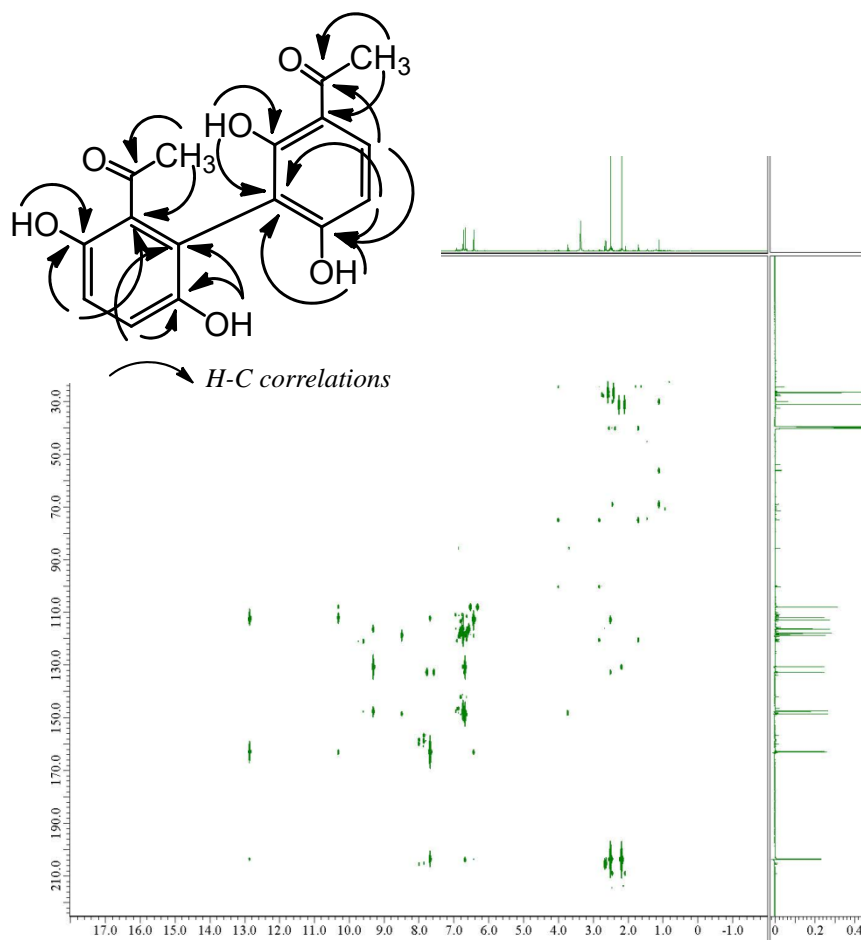


Fig. 25. HMBC Spectrum of **25** (800 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

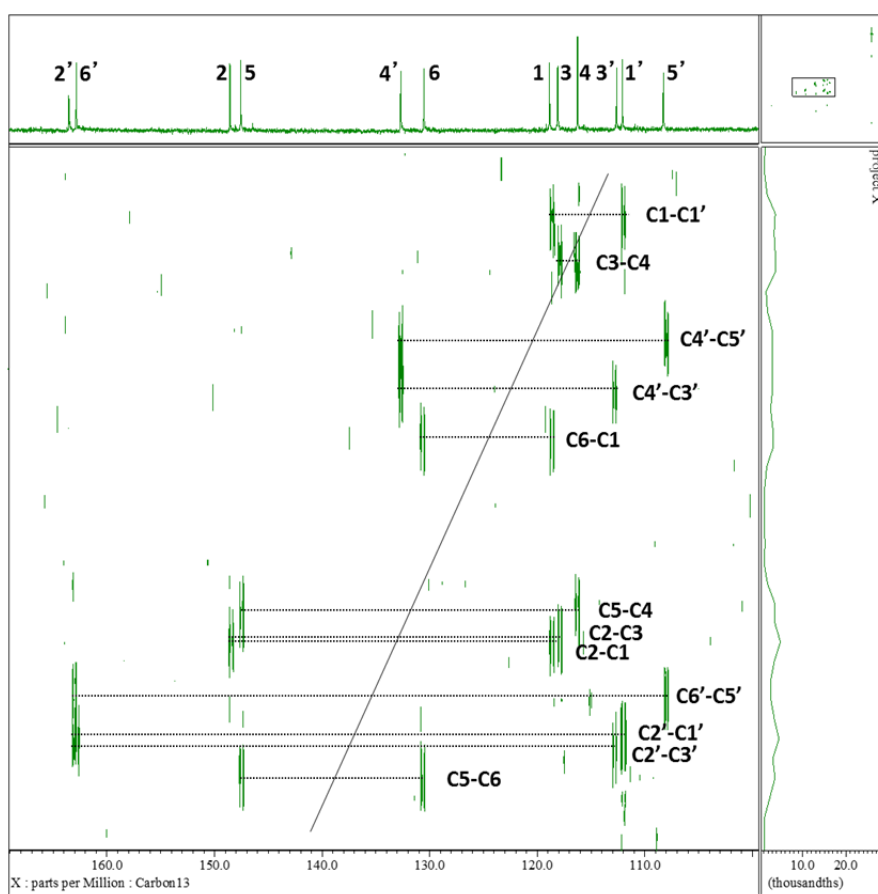
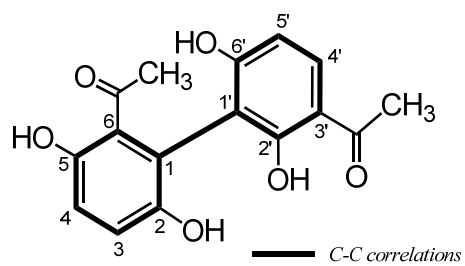


Fig. 26. 2D-INADEQUATE Spectrum of **25** (200 MHz, DMSO-*d*₆)

2-2 イヨウイケマ（異葉牛皮消）との比較

2-2-1 HPLC による比較

ハクシュウとイヨウイケマの含有成分を比較する目的で、遺伝子解析により種が同定された原料（ハクシュウ 4 品、イヨウイケマ 9 品）（Table 2）を用いて、それぞれ MeOH で抽出した試料溶液を調製し、HPLC 分析を行った。

Table 2. List of Market Samples of *Cynanchi Wilfordii Radix* and *Cynanchi Auriculati Radix*

Products	Crude Drug	Locality	Market
A	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (CWR)	Korea	Korea
B	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (CWR)	Korea	Korea
C	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (CWR)	Yeongcheon	Korea
D	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (CWR)	Yeongcheon	Korea
a	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
b	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
c	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
d	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
e	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
f	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
g	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Jiangsu	China
h	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Korea	Korea
i	<i>Cynanchi Auriculati Radix</i> (CAR)	Korea	Korea

調製した各試料溶液において、ハクシュウ（A～D）の HPLC 分析では保持時間 23～27 分間に 3 つのメインピーク〔*cynandione A* (**25**), *p*-hydroxyacetophenone (**32**), 2',4'-dihydroxyacetophenone (**34**)] が観察された (Fig. 27)。イヨウイケマ（a～i）においては a, f を除いたものにそれらのピークが観察された。それゆえ、両者を HPLC で区別することは困難であることが示唆された。

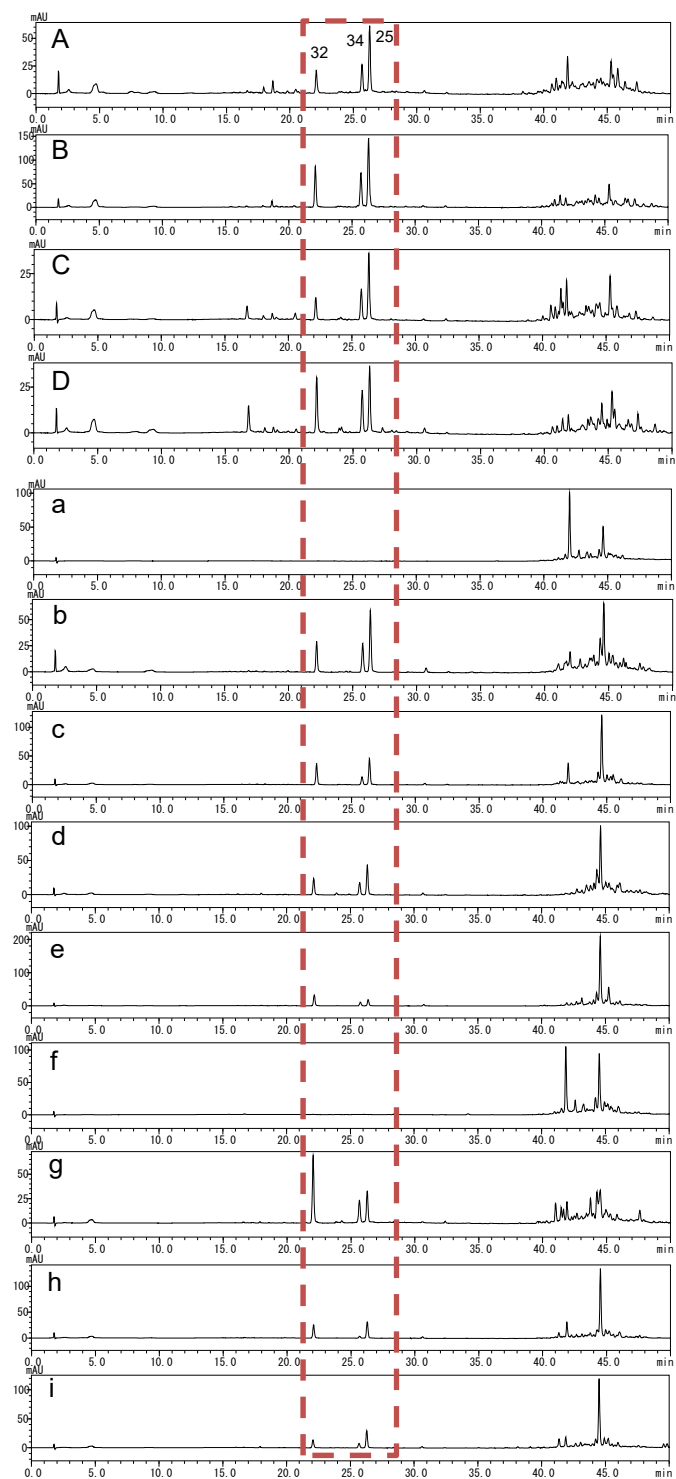


Fig. 27. HPLC Chromatograms of the Extracts Identified as *Cynanchi Wilfordii Radix* (A-D) and *Cynanchi Auriculati Radix* (a-i).

The number on the chromatogram corresponds to the compound number. HPLC conditions are described in condition RP-4 of Experimental Section.

2-2-2 HPTLC による比較

Table 2 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 MeOH で抽出した試料溶液を調製し, TLC 分析を行った. まず, 種々の展開溶媒で検討した結果, EtOAc/H₂O/MeOH/酢酸 (200:10:10:3) で展開した場合, UV ランプ照射 (254 nm) 検出のみで比較的分離のよいデータが得られた. そこで, 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 R_f 0.5 付近の明瞭なスポット A が観察された (Fig. 28). そこで, スポット A に相当する化合物を検討することとした.

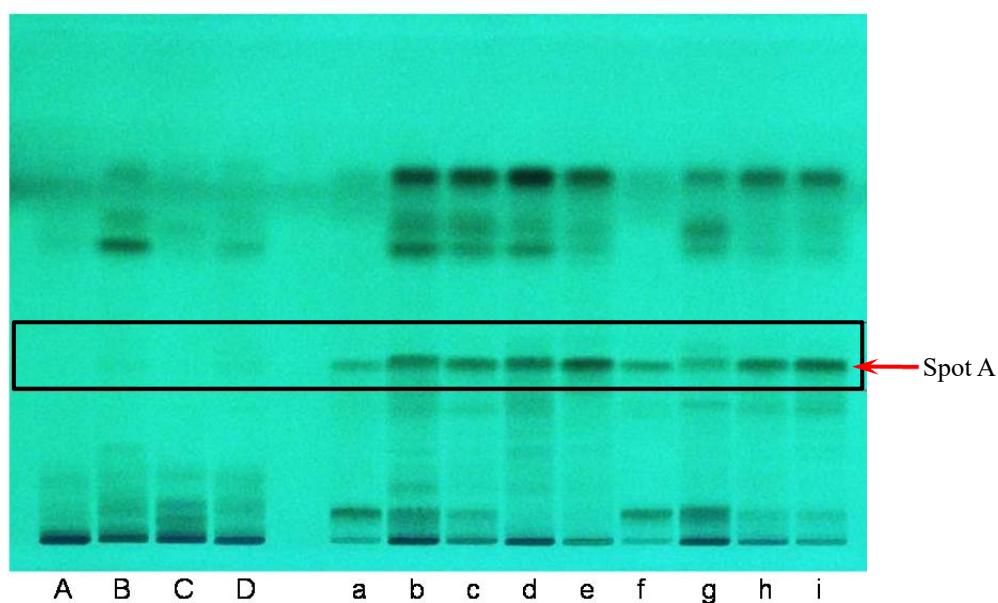


Fig. 28. HPTLC Chromatograms of the Extracts Identified as *Cynanchi Wilfordii Radix* (A-D) and *Cynanchi Auriculati Radix* (a-i).

2-2-3 スポット A の解析

イヨウイケマを 80% MeOH 中でホモジナイズし、ろ過、濃縮後、*n*-ヘキサン、EtOAc、*n*-ブタノールで順次分配を行い、各エキスを得た。スポット A を検出した EtOAc エキスについて分取 TLC を行い、成分の分離精製を行った結果、スポット A には 2 つの化合物が重複していることが示唆された。そこで、展開溶媒を *n*-ヘキサン/アセトン (1:1) で再度分取 TLC を行った結果、2 成分を単離することができ、¹³C-NMR データ (Fig. 29) をベースに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 (35)、wilfoside K1N (36)⁴⁸⁾ と同定した (Fig. 30)。

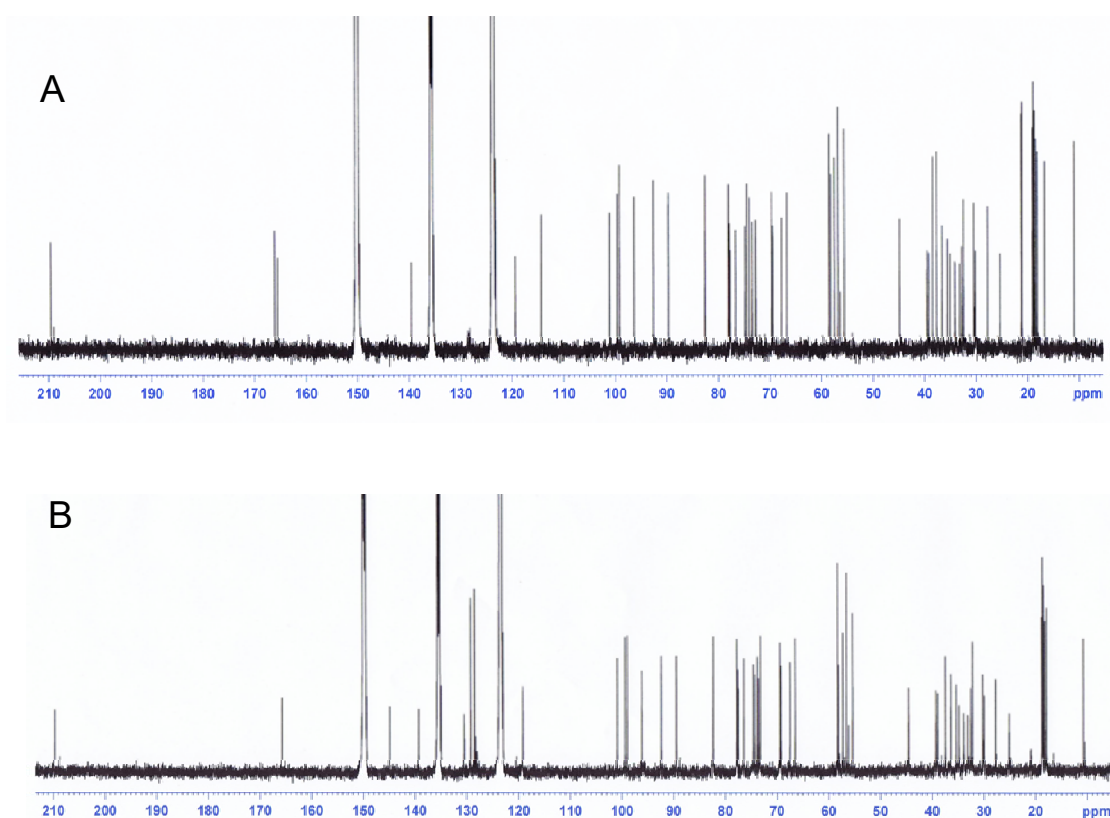
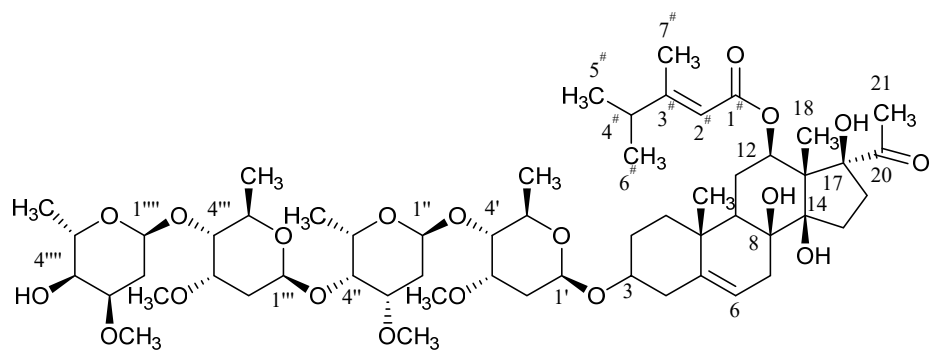
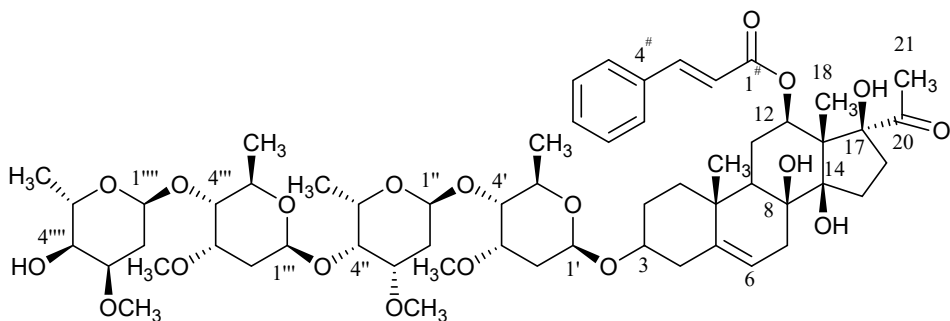


Fig. 29. ¹³C-NMR Spectrum of 35 (A) and 36 (B) (126 MHz, Pyridine-*d*₅)



35



36

Fig. 30. Structures of 35 and 36

確認のため、単離、同定した2成分(35, 36)について、それぞれHPTLC分析を行った(Fig. 31)。その結果、スポットAと同じ R_f 値であることが確認され、cinnamoyl基を有する36のスポットが濃く観察された。一方の35も薄いスポットが認められ、これらが重複してスポットとして観察されることで、イヨウイケマの試料溶液に特徴的で明瞭なスポットとして認められることが示唆された。

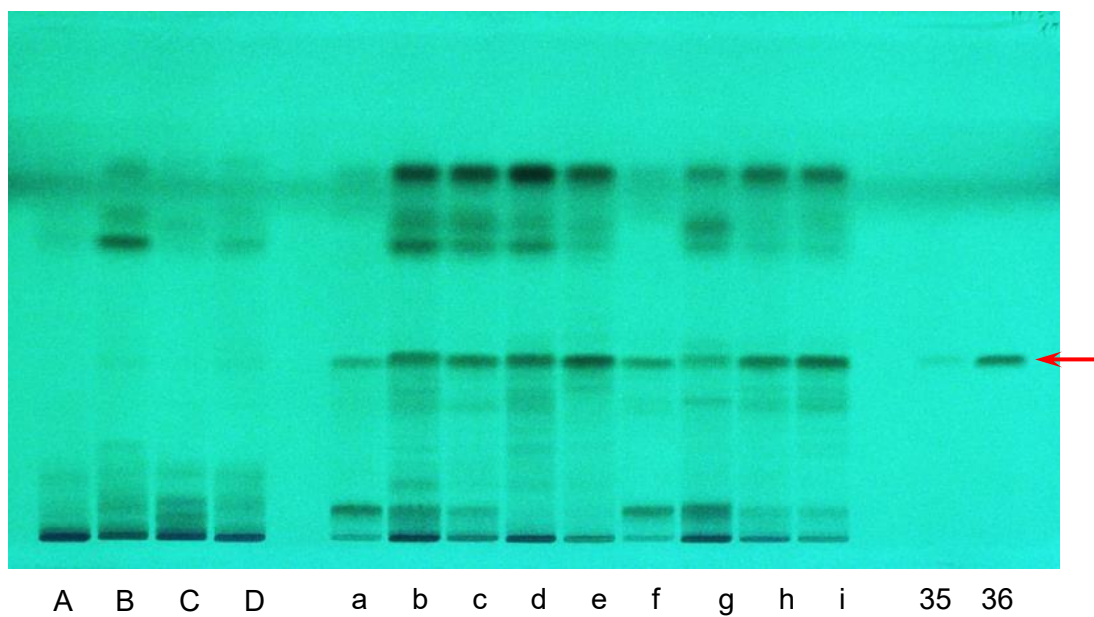


Fig. 31. HPTLC Chromatograms of the Extracts Identified as Cynanchi Wilfordii Radix (A-D) and Cynanchi Auriculati Radix (a-i). 35: wilfoside C1N, 36: wilfoside K1N.

2-3 小括

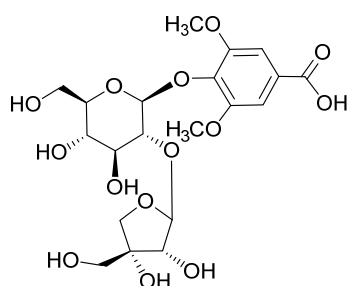
ハクシュウとイヨウイケマについて、両者を判別する簡便法として UV ランプ照射による TLC 法について検討する目的で、遺伝子解析により種が同定されたハクシュウの UV 検出成分について検討した。その結果、11 種の化合物 [2-*O*- β -laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (**24**), cynandione A (**25**), uridine (**26**), guanosine (**27**), adenosine (**28**), tryptophan (**29**), bungeiside-C (**30**), bungeiside-D (**31**), *p*-hydroxyacetophenone (**32**), 2',5'-dihydroxyacetophenone (**33**), 2',4'-dihydroxyacetophenone (**34**)] 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 (**25**) 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は、HMBC による解析のみで決定するのは困難であった。そこで、INADEQUATE 解析によりビフェニル構造の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' 間のつながりをはじめて明らかにした。また、HMBC による相関を確認することにより、**25** の構造が間違いないことを確認した。

ハクシュウの UV 検出による HPLC 分析では、cynandione A (**25**), *p*-hydroxyacetophenone (**32**), 2',4'-dihydroxyacetophenone (**34**) が主検出成分として観察されたが、それらはイヨウイケマにおいても確認された。よって、それら化合物を指標にハクシュウとイヨウイケマを区別するのは困難であることが示された。一方で、両者を TLC により比較検討した結果、EtOAc/H₂O/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 A が認められた。そこで、スポット A について精査した結果、wilfoside C1N (**35**) と wilfoside K1N (**36**) の 2 化合物が単離、同定された。それゆえ、スポット A は **35** と **36** が重複して検出していることが明らかとなった。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

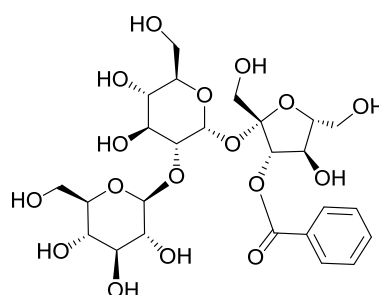
してスポット A が明瞭に観察され，それゆえ，スポット A に相当する **35** と **36** を TLC で比較することでハクシュウとイヨウイケマを予備的に判別できる可能性が示唆された。

まとめ

本研究では、日局で TLC 法が規定されていない生薬のうち、オンジについて UV ランプ照射検出による TLC 分析法について検討した。まず、オンジの指標となる候補成分を明らかにするために、オンジの UV 検出成分について精査した。その結果、既知化合物 21 種とともに、2 種の新規化合物を単離、構造解析した。化合物 **1** は, syringic acid 4-*O*-(2'-*O*- β -D-*apiosyl*)- β -D-glucoside であると決定し, polygalaonjicide A と命名した。化合物 **2** は, 2-*O*-(β -D-glucosyl)-3'-*O*-benzoilsucrose と決定し, polygalaonjicide B と命名した。



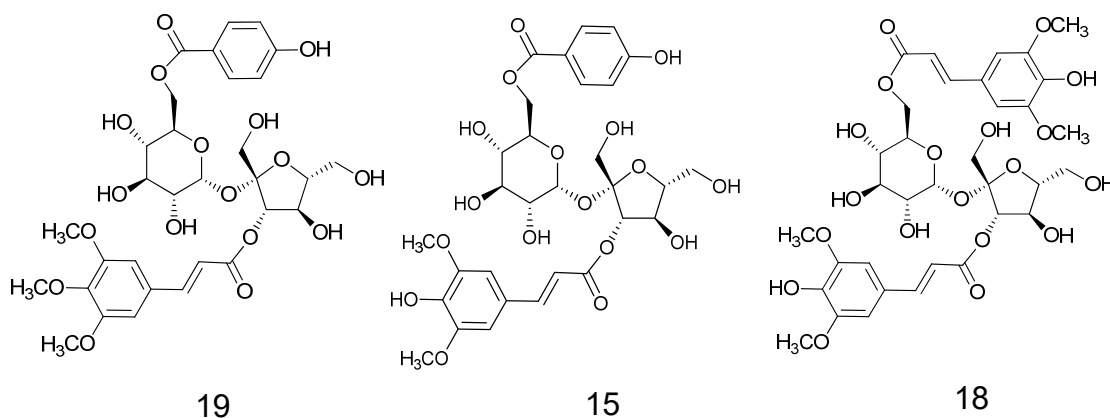
1



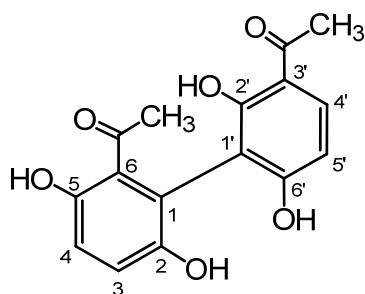
2

UV ランプ照射 (254 nm) 検出による TLC 法について、オンジの国内市場品 9 品を用いて条件検討した結果、EtOAc/MeOH/H₂O (6:1:1) を展開溶媒として用いることで、*R_f* 0.4~0.5 付近に共通して認められる明瞭な 3 つのスポットが観察された。この 3 スポットについて成分解析した結果、それぞれ tenuifoliside A (**19**)、tenuifoliside B (**15**)、3,6'-*di-O*-sinapoylsucrose (**18**) と同定し、指標となる成分候補として見出した。これら 3 成分は、オンジに特徴的な成分で、また神経保護、脳保護効果等が報告されており、さらに 3 成分のアグリコンである sinapic acid や 3,4,5-trimethoxycinnamic acid も脳保護効果

などの報告があるため、オンジの単味エキス製剤の効果・効能にある中年期以降の物忘れ改善に關与する成分であることが示唆される。それゆえ、候補となる3成分は指標成分として相応しい化合物であることが示唆された。また、同属植物を基原とするセネガでは、**15**と同じ R_f 値にスポットが認められたのみであるため、オンジの確認には3スポットすべてを認めることが要点であることが考察された。本方法は、オンジに特徴的な活性關与成分を指標としたUVランプ照射のみの検出で分析できる。酸試葉噴霧や加熱処理といった操作がなく、それゆえ作業や時間効率、及び安全面において優れていると考えられ、その有用性が示唆される。

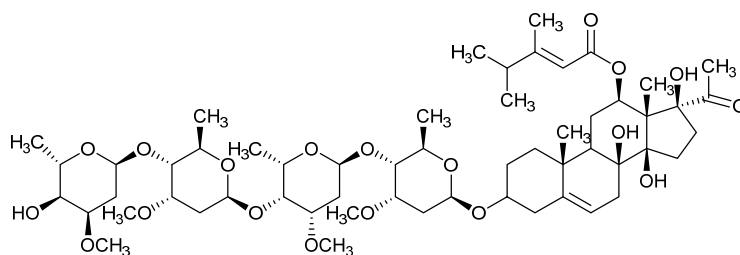


また、韓国で誤用が問題となったハクシュウとイヨウイケマについて、両者の含有成分を比較し、TLCによる比較試験について検討した。まず、遺伝子解析により種が同定されたハクシュウについてUV検出成分を精査した結果、11種の化合物を同定した。そのうち、主要成分の一つであるビフェニル構造を有するcynandione A (**25**)について、ビフェニル部分のC-1とC-1'間のつながりをINADEQUATE解析によりはじめて明らかにした。

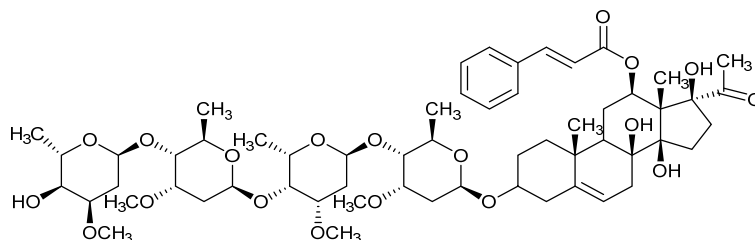


25

次に、両者を TLC 法で、EtOAc/H₂O/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 A が認められた。そこで、スポット A について精査した結果、wilfoside C1N (35) と wilfoside K1N (36) の 2 化合物が単離、同定され、スポット A は 35 と 36 が重複して検出していることを明らかにした。それゆえ、スポット A に相当する 35 と 36 を TLC で比較することでハクシユウとイヨウイケマを予備的に判別できる可能性を示すことができた。



35



36

本研究において、オンジ、ハクシュウについて示した TLC 法はいずれも簡便かつ安価に試験でき、天然物の適正使用につながるレギュラトリーサイエンスに資する一データになり得ることが期待される。

実験の部

NMR スペクトルは Bruker AVANCE500 (Bruker BioSpin, Billerica, MA, U.S.A., $^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 126 MHz) または JEOL ECA800 (JEOL, Tokyo, Japan, $^1\text{H-NMR}$: 800 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 200 MHz) を用い, 溶媒シグナルをそれぞれ [MeOH- d_4 : δ_{H} 3.30, δ_{C} 49.0], [dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 : δ_{H} 2.50, δ_{C} 39.5] に設定し測定を行った. ケミカルシフトはすべて TMS (tetramethylsilane) 基準のシフト値を δ (ppm) 値で表示した.

UV スペクトルは Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) と JASCO V-530 (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

旋光度は JASCO P-1020 (JASCO) を用いて測定した.

MS スペクトルは Bruker microTOF-Q [Bruker Daltonics, Billerica, MA, U.S.A., ESI-MS, HR-ESI-MS (positive, negative) : solvent, CH_3CN] を用いて測定した.

カラムクロマトグラフィーの充填剤は Diaion HP-20, MCI-gel CHP-20P (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan), Chromatorex ODS (Fuji Silysia Chemical Ltd., Aichi, Japan), Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.), YMC GEL ODS (YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) 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. TLC の担体には HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) (20×10 cm), TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) (5×7.5 cm) を用い, UV (254, 366 nm) 照射, 希硫酸試液噴霧 (加熱) により検出した.

溶媒の濃縮, 留去は, すべて 40℃以下でロータリーエバポレーターを用いて行った.

HPLC は以下の条件で実験を行った.

逆相 (Reversed Phase) HPLC

【RP-1】

Column: YMC-pack ODS AQ-3C2 (5 μm , 150×2.0 mm i.d.) (YMC Co. Ltd.)

Temperature: 40°C

Pump: LC-10AT (Shimadzu)

Flow rate: 0.25 mL/min

Detector: SPD-M20A (UV 200-400 nm, diode array detector, Shimadzu)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid in water, (B) MeOH [gradient: 0-30 min, 0-50% B in A, 30-50 min, 50-60% B in A, 50-70 min, 60-100% B in A]

【RP-2】

Column: YMC-pack ODS AQ-3C2 (5 μm, 150×2.0 mm i.d.) (YMC Co. Ltd.)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AT (Shimadzu)

Flow rate: 0.2 mL/min

Detector: SPD-20A (UV 254 nm, Shimadzu)

Mobile Phase: 10 mmol/L phosphate buffer-acetonitrile (85:15)

【RP-3】

Column: YMC-pack ODS AQ-3C2 (5 μm, 150×2.0 mm i.d.) (YMC Co. Ltd.)

Temperature: 35°C

Pump: LC-20AT (Shimadzu)

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-20A (UV 250 nm, Shimadzu)

Mobile Phase: 50 mmol/L phosphate buffer-acetonitrile (75:25)

【RP-4】

Column: L-column ODS (5 μ m, 150 \times 2.1 mm i.d.) (Chemicals Evaluation and Research Institute)

Temperature: 40°C

Pump: LC-20AB (Shimadzu)

Flow rate: 0.3 mL/min

Detector: SPD-M20A (UV 200-400 nm, diode array detector, Shimadzu)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid in water, (B) acetonitrile [gradient: 0-30 min, 0-50% B in A, 30-35 min, 50-85% B in A, 35-40 min, 85-85% B in A]

第 1 章の実験

試料

抽出・分画に使用したオンジは、ウチダ和漢薬製 (Lot. No. 9A60019) を用いた。国内市場品のオンジは、医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センターから入手したモデル生薬を使用した。各試料の詳細については Table 1 に示す。セネガは、栃本天海堂製 (Lot. No. 006105001) を用いた。オンジエキス製剤 (5 製品) は、ドラッグストアで購入したものをを用いた。

オンジの抽出・分画

オンジ (100 g) を MeOH (1 L) 中でホモジナイズし、ろ過後、約 0.2 L まで濃縮し、H₂O (0.2 L) を加えて再度濃縮後、*n*-ヘキサン (0.9 L) で分配し、*n*-ヘキサンエキス (944.6 mg) 及び H₂O 層を得た。H₂O 層 (0.1 L) について、Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィ (40 \times 5 cm i.d.) を行い、H₂O, 含水 MeOH (10% \rightarrow 20% \rightarrow 30% \rightarrow 50%), MeOH (各 1.0 L) で順次溶出させ、H₂O 画分 (19.2 g), 10% MeOH 画分 (130.2 mg), 20% MeOH

画分 (174.8 mg), 30% MeOH 画分 (292.0 mg), 50% MeOH 画分 (1179.7 mg), MeOH 画分 (4.9 g) を得た. 同様に, オンジ (300 g) を MeOH (3 L) 中で処理し, *n*-ヘキサノエキス (15.9 g) 及び H₂O 層を得た. H₂O 層について, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (35×5 cm i.d.) を行い, H₂O, 含水 MeOH (10%→30%→50%), MeOH で順次溶出させ, 10% MeOH 画分 (2.2 g), 30% MeOH 画分 (763.1 mg), 50% MeOH 画分 (2.0 g), MeOH 画分 (12.3 g) を得た.

10% MeOH 画分 (100 mg) について, YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, H₂O, 含水 MeOH (10%→20%), MeOH で順次溶出させ, 10% MeOH 溶出部から monordicophenoide A (**4**) (1.5 mg), hemsleyanumoid (**6**) (2.4 mg) を得た.

20% MeOH 画分 (120 mg) について, YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, H₂O, 含水 MeOH (10%→15%→20%→30%), MeOH で順次溶出させ, 10% MeOH 溶出部から polygalaonjiside A (**1**) (1.9 mg), polygalaonjiside B (**2**) (7.5 mg), 20% MeOH 溶出部から sibiricose A3 (**7**) (6.2 mg) を得た.

50% MeOH 画分 (1.0 g) について, YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, H₂O, 含水 MeOH (10%→20%→30%→40%), MeOH で溶出させ, 10% MeOH 溶出部から 4-hydroxybenzoic acid (**3**) (0.5 mg), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**5**) (1.0 mg), 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (**8**) (0.5 mg), Fr. Pt- I (26.4 mg), 20% MeOH 溶出部から Fr. Pt- II (20.6 mg), Fr. Pt- III (20.4 mg), Fr. Pt- IV (15.3 mg), Fr. Pt- V (40.8 mg), 30% MeOH 溶出部から polygalaxanthone III (**17**) (20.3 mg), 3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose (**18**) (39.8 mg), Fr. Pt- VI (10.6 mg), Fr. Pt- VII (34.2 mg) を得た. Fr. Pt- I (26.4 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (24×1.1 cm i.d.) に付し, エタノール (EtOH), MeOH で順次溶出させ, EtOH 溶出部から Fr. Pt- VIII (8.3 mg) を得た. Fr. Pt- VIII (8.3 mg) を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (20

×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%), MeOH で順次溶出させ, 30% MeOH 溶出部から sibiricose A5 (**9**) (4.9 mg) を得た. Fr. Pt-II (20.6 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (24×1.1 cm i.d.) に付し, EtOH, MeOH で順次溶出させ, EtOH 溶出部から sibiricose A6 (**10**) (5.6 mg) を得た. Fr. Pt-III (20.4 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, EtOH, MeOH で順次溶出させ, EtOH 溶出部からから glomeratose A (**13**) (3.9 mg), Fr. Pt-IX (5.1 mg) を得た. Fr. Pt-IX (5.1 mg) を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%), MeOH で順次溶出させ, 40% MeOH 溶出部から sibiricose A1 (**12**) (2.1 mg) を得た. Fr. Pt-IV (15.3 mg) を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%), MeOH で順次溶出させ 40% MeOH 溶出部から sibiricoxanthone B (**14**) (10.9 mg), tenuifoliside B (**15**) (2.0 mg) を得た. Fr. Pt-V (40.8 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (24×1.1 cm i.d.) に付し, EtOH, MeOH で順次溶出させ, 溶出部から tenuifoliside B (**15**) (8.0 mg) を得た. Fr. Pt-VI (10.6 mg) を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (24×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%), MeOH で順次溶出させ, 40% MeOH 溶出部から polygalaxanthone XI (**16**) (7.0 mg) を得た. Fr. Pt-VII (34.2 mg) を MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (30×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%→50%), MeOH で順次溶出させ, 50% MeOH 溶出部から tenuifoliside A (**19**) (10.5 mg) を得た.

MeOH 画分 (1 g) について YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (40%→50%→60%→70%→80%), MeOH で順次溶出させ, 40% MeOH 溶出部から Fr. Pt-X (20.4 mg), Fr. Pt-XI (36.2 mg) を得た. Fr. Pt-X (20.4 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, EtOH, MeOH で順次溶出させ, EtOH 溶出部から Fr. Pt-XII (6.3 mg) を得た. Fr. Pt-XII (6.3 mg) を Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (40%

→50%), MeOH で順次溶出させ, 50% MeOH 溶出部から Fr. Pt-X III (3.6 mg) を得た. Fr. Pt-XI (36.2 mg) を Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (40%→50%), MeOH で順次溶出させ, 50% MeOH 溶出部から Fr. Pt-XIV (2.7 mg) を得た. Fr. Pt-X III (3.6 mg) と Fr. Pt-XIV (2.7 mg) を合わせて MCI-gel CHP-20P カラムクロマトグラフィー (20×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (40%→50% → 60%), MeOH で順次溶出させ, 60% MeOH 溶出部から 1'-cinnamoyl-3'-benzoyl-(2-O-β-glucosyl)-sucrose (**20**) (4.2 mg) を得た. 再度, MeOH 画分 (2.0 g) について YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (50%→60%→70%→80%), MeOH で順次溶出し, 50% MeOH 溶出部から Fr. Pt-X V (103.2 mg) を得た. Fr. Pt-X V (103.2 mg) を分取 TLC [EtOH:MeOH:H₂O (7:1:1)] により分取し, 6-(4'''-methoxybenzoyl)-3'-(3'',4'',5''-trimethoxycinnamoyl)-sucrose (**21**) (2.0 mg) を得た. 新たに調製したオレンジの MeOH 画分 (2.0 g) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (40×1.1 cm i.d.) に付し, 70% MeOH, MeOH で順次溶出させ, 70% MeOH 溶出部から *trans*-ferulic acid (**11**) (9.4 mg), 1,3,7-trihydroxyxanthone (**22**) (2.1 mg), Fr. Pt-X VI (804.6mg) を得た. Pt-X VI (804.6mg) を YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (39×1.1 cm i.d.) に付し, 含水 MeOH (30%→40%→50%→60%), MeOH で溶出させ, 40% MeOH 溶出部から tenuifoliose J (**23**) (13.3 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.

Polygalaonjicide A (**1**)

淡褐色無晶形粉末. UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 252 (4.30), 208 (3.75). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -30.5^{\circ}$ (*c* 2.0, MeOH). HR-ESI-MS: *m/z* 491.1384 [M-H]⁻ (Calcd. for C₂₀H₂₈O₁₄-H, 491.1406). ¹H-NMR

(500 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 7.32 (2H, s, H-2, 6), 5.47 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-1''), 5.19 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1'), 4.03 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4''), 3.99 (1H, d, $J=1.0$ Hz, H-2''), 3.86 (6H, s, 3, 5-OCH₃), 3.71 (1H, dd, $J=2.0, 12.0$ Hz, H-6'), 3.692 (1H, dd, $J=7.0, 9.0$ Hz, H-2'), 3.689 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4''), 3.688 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-5''), 3.63 (1H, dd, $J=5.0, 12.0$ Hz, H-6'), 3.58 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-5''), 3.54 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.45 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-4'), 3.18 (1H, ddd, $J=2.0, 5.0, 9.0$ Hz, H-5'). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 171.0 (C-7), 154.0 (C-3, 5), 139.1 (C-4), 129.7 (C-1), 110.4 (C-1''), 108.6 (C-2, 6), 102.4 (C-1'), 80.9 (C-3''), 78.73 (C-2'), 78.66 (C-3'), 78.12 (C-5'), 78.07 (C-2''), 75.6 (C-4''), 71.4 (C-4'), 66.3 (C-5''), 62.6 (C-6'), 57.0 (3, 5-OCH₃).

Polygalaonjiside B (**2**)

淡白色無晶形粉末. UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 279sh (3.30), 231 (3.93). $[\alpha]_D^{26} -8^\circ$ (c 0.1, MeOH). HR-ESI-MS: m/z 631.1832 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₂₅H₃₆O₁₇+Na, 631.1845). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 8.10 (2H, dd, $J=1.0, 8.0$ Hz, H-2''', 6'''), 7.61 (1H, tt, $J=1.0, 1.0, 8.0, 8.0$ Hz, H-4'''), 7.50 (2H, t, $J=8.0$ Hz, H-3''', 5'''), 5.66 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3'), 5.65 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-1), 4.44 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-4'), 4.41 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1''), 3.97 (1H, ddd, $J=3.0, 5.5, 8.5$ Hz, H-5'), 3.93 (1H, ddd, $J=2.5, 4.5, 7.0$ Hz, H-5), 3.88 (1H, dd, $J=2.0, 12.0$ Hz, H-6''), 3.77-3.85 (4H, m, H-6, 6'), 3.77 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-1'), 3.75 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-3), 3.66 (1H, dd, $J=6.0, 12.0$ Hz, H-6''), 3.61 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-1'), 3.47 (1H, dd, $J=3.5, 10.0$ Hz, H-2), 3.44 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-4), 3.25-3.30 (2H, m, H-3'', 5''), 3.21 (1H, dd, $J=9.0, 9.5$ Hz, H-4''), 3.16 (1H, dd, $J=8.0, 9.5$ Hz, H-2''). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 167.3 (C-7'''), 134.5 (C-4'''), 131.1 (C-1'''), 131.0 (2C, C-2''', 6'''), 129.7 (2C, C-3''', 5'''), 106.1 (C-1''), 105.1 (C-2'), 93.3 (C-1), 84.2 (C-5'), 82.1 (C-2), 79.4 (C-3'), 78.3 (C-5''), 77.9 (C-3''), 75.4 (C-2''), 74.4 (C-5), 73.7 (C-3), 73.4 (C-4'), 71.7 (C-4''), 70.9 (C-4), 64.4 (C-1'), 63.1 (C-6'), 62.9 (C-6''), 62.3 (C-6).

Tenuifoliside B (**15**)

HR-ESI-MS: m/z 667.1899 [M-H]⁻ (Calcd. for C₃₀H₃₆O₁₇-H, 667.1880). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 7.91 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2''', 6'''), 7.70 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7''), 6.93 (2H, s, H-2'', 6''), 6.81 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3''', 5'''), 6.44 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8''), 5.49 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-1'), 5.46 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3), 4.65 (1H, dd, $J=2.0, 12.0$ Hz, H-6'), 4.42 (1H, dd, $J=5.0, 12.0$ Hz, H-6'), 4.36 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-4), 4.23 (1H, ddd, $J=2.0, 5.0, 7.0$ Hz, H-5'), 3.91-3.92 (1H, m, H-5), 3.87 (6H, s, 3'', 5''-OCH₃), 3.79 (1H, dd, $J=6.0, 12.5$ Hz, H-6), 3.68-3.71 (1H, m, H-6), 3.68 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.65 (1H, d, $J=12.2$ Hz, H-1), 3.59 (1H, d, $J=12.2$ Hz, H-1), 3.42-3.48 (2H, m, H-2', 4'). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 168.2 (2C, C-7''', 9'''), 163.7 (C-4'''), 149.5 (2C, C-3'', 5''), 147.9 (C-7''), 139.7 (C-4''), 133.0 (2C, C-2''', 6'''), 126.6 (C-1''), 122.1 (C-1'''), 116.2 (2C, C-3''', 5'''), 115.5 (C-8''), 107.1 (2C, C-2'', 6''), 104.9 (C-2), 93.1 (C-1'), 84.2 (C-5), 79.6 (C-3), 74.9 (C-3'), 74.1 (C-4), 73.2 (C-2'), 72.5 (C-5'), 71.6 (C-4'), 65.6 (C-1), 65.1 (C-6'), 63.4 (C-6), 56.9 (3'', 5''-OCH₃).

3,6'-Di-*O*-sinapoylsucrose (**18**)

HR-ESI-MS: m/z 753.2245 [M-H]⁻ (Calcd. for C₃₄H₄₂O₁₉-H, 753.2248). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 7.66 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7''), 7.58 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'''), 6.90, 6.86 (each 2H, s, H-2'', 6'', H-2''', 6'''), 6.45, 6.43 (each 1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'', H-8'''), 5.51 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3), 5.51 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-1'), 4.67 (1H, dd, $J=1.5, 11.5$ Hz, H-6'), 4.50 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-4), 4.27 (1H, m, H-5'), 4.21 (1H, dd, $J=7.0, 11.5$ Hz, H-6'), 3.98 (1H, m, H-5), 3.81-3.92 (overlapped, H-6), 3.86, 3.83 (each 6H, s, 3'', 5''-OCH₃, 3''', 5'''-OCH₃), 3.67 (1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.63, 3.59 (each 1H, d, $J=12.5$ Hz, H-1), 3.48 (1H, dd, $J=3.5, 9.0$ Hz, H-2'), 3.30 (overlapped, H-4'). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 169.1 (C-9'''), 168.2 (C-9''), 149.38, 149.36 (each 1C, C-3'', 3'''), 147.9 (C-7''), 147.3 (C-7'''), 139.6, 139.5 (each 1C, C-4'', 4'''),

126.59, 126.55 (each 1C, C-1", 1'''), 115.8, 115.4 (each 1C, C-8", 8'''), 107.1, 106.9 (each 2C, C-2", 6", 2''', 6'''), 104.8 (C-2), 92.7 (C-1'), 84.3 (C-5), 79.3 (C-3), 75.1 (C-3'), 74.2 (C-4), 73.1 (C-2'), 72.5 (C-5'), 71.9 (C-4'), 65.7 (C-1), 65.6 (C-6'), 63.8 (C-6), 56.89, 56.84 (3", 5"-OCH₃, 3''', 5'''-OCH₃).

Tenuifoliside A (**19**)

HR-ESI-MS: m/z 681.2040 [M-H]⁻ (Calcd. for C₃₁H₃₈O₁₇-H, 681.2036). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 7.90 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2''', 6'''), 7.71 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7''), 6.94 (2H, s, H-2", 6''), 6.81 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3''', 5'''), 6.53 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8''), 5.49 (1H, d, $J=3.8$ Hz, H-1'), 5.47 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-3), 4.65 (1H, dd, $J=2.0, 12.0$ Hz, H-6'), 4.42 (1H, dd, $J=4.9, 12.0$ Hz, H-6'), 4.36 (1H, t, $J=7.9$ Hz, H-4), 4.23 (1H, ddd, $J=2.0, 4.9, 9.0$ Hz, H-5'), 3.92 (1H, ddd, $J=3.0, 6.5, 7.9$ Hz, H-5), 3.85 (6H, s, 3", 5"-OCH₃), 3.79 (1H, dd, $J=6.5, 12.3$ Hz, H-6), 3.78 (3H, s, 4"-OCH₃), 3.70 (1H, dd, $J=3.0, 12.3$ Hz, H-6), 3.68 (1H, t, $J=9.2$ Hz, H-3'), 3.65 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-1), 3.64 (1H, d, $J=12.5$ Hz, H-1), 3.46 (1H, dd, $J=3.8, 9.2$ Hz, H-2'), 3.45 (1H, dd, $J=9.0, 9.2$ Hz, H-4'). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄) δ : 168.2 (C-7'''), 167.8 (C-9''), 163.6 (C-4'''), 154.8 (2C, C-3", 5"), 147.2 (C-7''), 141.4 (C-4''), 133.0 (2C, C-2''', 6'''), 131.5 (C-1''), 122.1 (C-1'''), 117.8 (C-8''), 116.2 (2C, C-3''', 5'''), 106.9 (2C, C-2", 6''), 104.9 (C-2), 93.1 (C-1'), 84.2 (C-5), 79.7 (C-3), 74.9 (C-3'), 74.1 (C-4), 73.1 (C-2'), 72.5 (C-5'), 71.6 (C-4'), 65.6 (C-1), 65.1 (C-6'), 63.4 (C-6), 61.2 (4"-OCH₃), 56.9 (3", 5"-OCH₃).

Polygalaonjiside A (**1**), polygalaonjiside B (**2**) の酸加水分解

Polygalaonjiside A (**1**), polygalaonjiside B (**2**) (各 0.2 mg) をそれぞれ H₂O (0.2 mL) 及び 1 mol/L HCl (0.1 mL) にそれぞれ溶解し、沸騰水浴中で 8 時間加熱した。反応液を

留去後, 残渣について HPLC 分析 (RP-2) したところ, それぞれ syringic acid, benzoic acid を確認した.

Polygalaonjiside A (1), polygalaonjiside B (2) の糖の確認

Polygalaonjiside A (1), polygalaonjiside B (2) (各 0.2 mg) (各 0.5 mg) にそれぞれ 1 mol/L HCl (0.2 mL) を加え, 沸騰水浴中で 1 時間加熱した. 反応液を Amberlite IRA400 で中和後, 反応液を留去した. 各残渣に L-cysteine methyl ester hydrochloride・ピリジン溶液 (5 mg/mL) (0.1 mL) を加え, 60°C の水浴上で 1 時間加熱した. 各反応液に, *o*-tolyl isothiocyanate・ピリジン溶液 (5 mg/mL) (0.1 mL) を加え, 60°C の水浴上でさらに 1 時間加熱した. 反応溶液を HPLC 分析 (RP-3) した結果, **1** については D-glucose と D-apiiose 誘導体の標品と一致し, **2** については D-glucose 誘導体の標品と一致した.

TLC におけるオンジの試料溶液の調製

粉碎したオンジ (1 g) を MeOH (5 mL) で超音波処理 (3 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. オンジエキス製剤については, エキス (100 mg) に対して MeOH (1 mL) で調製した. 試料溶液を TLC, HPTLC でそれぞれ 1 μ L, 3 μ L スポットし, 展開溶媒 [EtOAc:MeOH:H₂O (6:1:1)] で展開後, UV ランプ (254 nm) 照射下で検出した.

第 2 章の実験

試料

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 (ハクシュウ及びイヨウイケマ) 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。各試料の詳細については Table 2 に示す。

ハクシュウの抽出・分画

ハクシュウ (300 g) を 80% MeOH (3 L) 中でホモジナイズし、ろ過後、約 0.3 L まで濃縮し、*n*-ヘキサン (3 L), 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 (38.5×1.1 cm i.d.) または分取 TLC [*n*-ヘキサン:アセトン (2:1 または 1:1)] で分取し、cynandione A (**25**) (9.6 mg), *p*-hydroxyacetophenone (**32**) (13.8 mg), 2',5'-dihydroxyacetophenone (**33**) (1.0 mg), 2',4'-dihydroxyacetophenone (**34**) (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 (48.8×3.0 cm i.d.) を行い、H₂O, 含水 MeOH (10%→20%→30%→40%→50%), MeOH (各 1 L) で順次溶出させ、H₂O 画分 (11.6 g), 10% MeOH 画分 (142.9 mg), 20% MeOH 画分 (136 mg), 30% MeOH 画分 (95.2 mg), 40% MeOH 画分 (57.2 mg), 50% MeOH 画分 (46.7 mg), MeOH 画分 (126.8 mg) を得た。H₂O 画分 (3.0 g) を Chromatorex ODS カラムクロマトグラフィー (38.5×1.1 cm i.d.) に付し、uridine (**26**) (6.3 mg), adenosine (**28**) (2.3 mg) を得た。10% MeOH 画分 (120 mg), 20% MeOH 画分 (130 mg), 30% MeOH 画分 (89 mg), 40% MeOH 画分 (52 mg) を YMC GEL ODS-AQ カラムクロマトグラフィー (38.9×1.1 cm i.d.) に付し、それぞれ guanosine (**27**) (21.8 mg), tryptophan (**29**) (20.6 mg), 2-*O*-β-laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone (**24**) (2.4 mg) と bungeiside-C (**30**) (13.7 mg), bungeiside-D (**31**) (7.0 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。

Cynandione A (25)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 800 MHz) 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, $J=8.0$ Hz, H-4'), 6.72 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-3), 6.67 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-4), 6.43 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 2.50 (3H, s, 8-CH₃), 2.19 (3H, s, 8'-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) 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').

イヨウイケマの抽出・分画

イヨウイケマ (103 g) を 80% MeOH (1 L) 中でホモジナイズし、ろ過後、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 (35) (8.0 mg), wilfoside K1N (36) (10.5 mg) を得た。

化合物の同定は、NMR スペクトル等のデータを文献値と比較することにより行った。

Wilfoside C1N (35)

HR-ESI-MS m/z : 1089.5945 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₅₆H₉₀O₁₉+Na: 1089.5969). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, Pyridine- d_5) δ : 209.5 (C-20), 166.1 (C-1[#]), 165.5 (C-3[#]), 139.5 (C-5), 119.3 (C-6), 114.3 (C-2[#]), 101.0 (C-1^{''}), 99.5 (C-1^{'''}), 99.1 (C-1^{''''}), 96.3 (C-1'), 92.5 (C-17), 89.5 (C-14), 82.5 (C-4'),

82.4 (C-4'''), 77.9 (C-3'''), 77.8 (C-3), 77.6 (C-3'), 76.5 (C-3'''), 74.7 (C-3''), 74.4 (C-8), 73.9 (C-4''), 73.3 (C-12), 72.7 (C-4'''), 69.6 (C-5'''), 69.4 (C-5'), 67.6 (C-5''), 66.6 (C-5'''), 58.4 (3'''-OCH₃), 58.0 (C-13), 57.3 (3'-OCH₃), 56.7 (3'''-OCH₃), 55.5 (3''-OCH₃), 44.7 (C-9), 39.4 (C-1), 39.1 (C-4), 38.3 (C-4[#]), 37.5 (C-10), 36.5 (C-2'''), 35.4 (C-2'), 34.9 (C-7), 33.9 (C-15), 33.0 (C-16), 32.6 (C-2''), 32.3 (C-2'''), 30.3 (C-2), 27.6 (C-21), 25.2 (C-11), 21.0 (C-5[#]), 20.9 (C-6[#]), 18.9 (C-6'), 18.7 (C-6'''), 18.5 (C-19), 18.3 (C-6'''), 18.0 (C-6''), 16.6 (C-7[#]), 10.8 (C-18).

Wilfoside K1N (36)

HR-ESI-MS m/z : 1109.5643 [M+Na]⁺ (Calcd. for C₅₈H₈₆O₁₉+Na: 1109.5656). ¹³C-NMR (126 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 209.9 (C-20), 165.9 (C-1[#]), 145.0 (C-3[#]), 139.4 (C-5), 135.0 (C-4[#]), 130.7 (C-7[#]), 129.4 (2C, C-6[#], 8[#]), 128.7 (2C, C-5[#], 9[#]), 119.3 (C-6), 119.3 (C-2[#]), 101.0 (C-1''), 99.5 (C-1'''), 99.1 (C-1'''), 96.3 (C-1'), 92.5 (C-17), 89.6 (C-14), 82.5 (C-4'), 82.4 (C-4'''), 77.9 (C-3'''), 77.8 (C-3), 77.6 (C-3'), 76.6 (C-3'''), 74.7 (C-3''), 74.4 (C-8), 73.9 (C-4''), 73.7 (C-12), 73.4 (C-4'''), 69.6 (C-5'''), 69.4 (C-5'), 67.6 (C-5''), 66.6 (C-5'''), 58.4 (3'''-OCH₃), 58.2 (C-13), 57.4 (3'-OCH₃), 56.7 (3'''-OCH₃), 55.5 (3''-OCH₃), 44.6 (C-9), 39.4 (C-1), 39.0 (C-4), 37.5 (C-10), 36.5 (C-2'''), 35.4 (C-2'), 34.9 (C-7), 34.0 (C-15), 33.2 (C-16), 32.6 (C-2''), 32.3 (C-2'''), 30.3 (C-2), 27.8 (C-21), 25.1 (C-11), 18.9 (C-6'), 18.7 (C-6'''), 18.5 (C-19), 18.3 (C-6'''), 18.0 (C-6''), 10.8 (C-18).

TLC におけるハクシュウ及びイヨウイケマの試料溶液の調製

粉碎したハクシュウまたはイヨウイケマ (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 μ L スポットし, 展開溶媒 [EtOAc:H₂O:MeOH:酢酸 (200:10:10:3)] で展開後, UV ランプ (254 nm) 照射下で検出した.

謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり，テーマの選択から研究の方針，実験手法に至るまで，天然物研究における全ての段階で終始熱心にご指導，ご鞭撻を賜りました松山大学薬学部 天倉吉章教授に深謝し，厚く御礼申し上げます。

また，学部時代を通じ，ポリフェノール研究に関する広範囲な知識のご教授ならびに各種機器分析の測定及びそれらの解析方法のご指導を賜るとともに，公私両面において的確なご助言，激励をいただきました松山大学薬学部 好村守生准教授に心より感謝致します。また，生薬の抽出，分析等でご協力いただきました松山大学薬学部 杉脇秀美氏，田中宏昭氏に感謝致します。

学部時代を通じ，天然物研究，特にポリフェノール研究のすばらしさをご教授していただき，数多くのご指導，ご鞭撻を賜りました岡山大学 吉田隆志名誉教授（前松山大学薬学部教授）に心より感謝致します。

研究遂行にあたり，貴重なご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所生薬部長 袴塚高志博士に感謝致します。また，ハクシュウの研究でご協力いただきました国立医薬品食品衛生研究所 内山奈穂子博士，増本直子博士，辻本 恭博士，オンジの研究でご協力いただきました医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター 川原信夫博士，瀧野裕之博士に感謝致します。

本研究を行うにあたり，ご理解とご協力をいただきました株式会社レデイ薬局ならびにレデイ中央調剤薬局の皆様に感謝致します。

本研究に関する論文発表及び学会発表

論文発表

1. Takashi Uchikura, Hidemi Sugiwaki, Morio Yoshimura, Hiromi Mitsuhashi, Hiroyuki Fuchino, Nobuo Kawahara, Takashi Hakamatsuka, Yoshiaki Amakura, Characterization of UV-Sensitive Marker Constituents of Polygala Root for TLC: Applications in Quality Control of Single Crude Drug Extract Preparations, *Chem. Pharm. Bull.*, **66**, 1174-1180 (2018).
2. Takashi Uchikura, Hiroaki Tanaka, Hidemi Sugiwaki, Morio Yoshimura, Naoko Sato-Masumoto, Takashi Tsujimoto, Nahoko Uchiyama, Takashi Hakamatsuka, Yoshiaki Amakura, Preliminary Quality Evaluation and Characterization of Phenolic Constituents in *Cynanchi Wilfordii Radix*, *Molecules* 2018, **23**(3), 656; doi:10.3390/molecules23030656.

学会発表

1. 内倉 崇, 好村守生, 三橋ひろみ, 淵野裕之, 川原信夫, 袴塚高志, 天倉吉章, オンジ単味エキス製剤の TLC による確認試験の検討, 第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2018 年 11 月 10, 11 日 (鳥取: 米子コンベンションセンター)
2. 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, 2018 年 9 月 16, 17 日 (広島: 安田女子大学)
3. 内倉 崇, 杉脇秀美, 好村守生, 三橋ひろみ, 淵野裕之, 川原信夫, 袴塚高志, 天倉吉章, 生薬オンジの TLC 指標成分の探索と単味エキス製剤の評価への応用, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 27 日 (金沢: 金沢大学)

4. 内倉 崇, 田中宏昭, 杉脇秀美, 好村守生, 佐藤 (増本) 直子, 辻本 恭, 内山奈穂子, 袴塚高志, 天倉吉章, 白首鳥の成分研究, 日本生薬学会第 64 回年会, 2017 年 9 月 9, 10 日 (千葉: 東邦大学)
5. 内倉 崇, 杉脇秀美, 好村守生, 三橋ひろみ, 袴塚高志, 渕野裕之, 川原信夫, 天倉吉章, 生薬オンジの TLC 指標成分の探索と活性評価, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日 (仙台: 東北大学)

参考文献

- 1) World Health Organization “The Role of the Pharmacist in Self-Care and Self-Medication”, p. 3 (1998).
- 2) 厚生労働省 一般用医薬品承認審査合理化等検討会中間報告書 “セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について” 平成 14 年 11 月.
- 3) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, “The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition” (2016).
- 4) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, “The Japanese standards for non-Pharmacopoeial crude drugs 2015” (2015).
- 5) Division of Safety Information on Drug and Food, National Institute of Health Sciences. “Food Safety Information (Chemical substances) No. 9/2015. p. 22 (2015).
- 6) Sato-Masumoto N., Uchikura T., Sugiwaki H., Yoshimura M., Masada S., Atsumi T., Watanabe M., Tanaka N., Uchiyama N., Amakura Y., Hakamatsuka T., 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 (2017).
- 7) The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, “The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition” pp. 1757–1758 (2016).
- 8) 小根山隆祥, 佐藤知嗣, 飛奈良治, 神農本草経の植物, 谷口書店, pp. 213-214 (2017).
- 9) Sakuma S., Shoji J., Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. I. Isolation of Saponins and the Structures of Onjisaponins G and F. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2431–2441 (1981).

- 10) Sakuma S., Shoji J., Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. II. On the Structures of Onjisaponins A, B and E. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 810–821 (1981).
- 11) SDBSWeb (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), <<http://sdfs.db.aist.go.jp>>, cited 9 July, 2018.
- 12) Li Q.-Y., Liang H., Wang B., Zhao Y., Chemical Constituents of *Momordica charantia* L.. *Yaoxue Xuebao*, **44**, 1014–1018 (2009).
- 13) Prachayasittikul S., Suphamong S., Worachartcheewan A., Lawung R., Ruchirawat S., Prachayasittikul V., Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr.. *Molecules*, **14**, 850-867 (2009).
- 14) Liu H.-X., He L., Huang R.-M., Qiu S.-X., Chemical Constituents of the Rhizomes of *Tetrastigma hemsleyanum*. *Chem. Nat. Compd.*, **51**, 1077–1079 (2015).
- 15) Miyase T., Noguchi H., Chen X.-M., Sucrose Esters and Xanthone C-Glycosides from the Roots of *Polygala sibirica*. *J. Nat. Prod.*, **62**, 993–996 (1999).
- 16) Zhang D., Miyase T., Kuroyanagi M., Umehara K., Noguchi H., Oligosaccharide Polyesters from Roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, **47**, 45–52 (1998).
- 17) Jiang Y., Zhang W., Tu P., Xu X., Xanthone Glycosides from *Polygala tenuifolia* and Their Conformational Analyses. *J. Nat. Prod.*, **68**, 875–879 (2005).
- 18) Ikeya Y., Sugama K., Okada M., Mitsuhashi H., Four New Phenolic Glycosides from *Polygala tenuifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2600–2605 (1991).
- 19) Ikeya Y., Sugama K., Maruno M., Xanthone C-Glycoside and Acylated Sugar from *Polygala tenuifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2305–2308 (1994).

- 20) Wang Z., Lee H.-J., Wang L., Jiang C., Baek N.-I., Kim S.-H., Lü J., Anti-Androgen Receptor Signaling and Prostate Cancer Inhibitory Effects of Sucrose- and Benzophenone-Compounds. *Pharm. Res.*, **26**, 1140–1148 (2009).
- 21) Miyase T., Ueno A., Sucrose Derivatives from the Roots of *Polygala tenuifolia*. *Shoyakugaku Zasshi*, **47**, 267–278 (1993).
- 22) Wang H., Ye G., Ma C.-H., Tang Y.-H., Fan M.-S., Li Z.-X., Huang C.-G., Identification and Determination of Four Metabolites of Mangiferin in Rat Urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **45**, 793–798 (2007).
- 23) Miyase T., Iwata Y., Ueno A., Tenuifolioses G-P, Oligosaccharide Multi-Esters from the Roots of *Polygala tenuifolia* WILLD.. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2741–2748 (1992).
- 24) Cheng M.-C., Li C.-Y., Ko H.-C., Ko F.-N., Lin Y.-L., Wu T.-S., Antidepressant Principles of the Roots of *Polygala tenuifolia*. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1305–1309 (2006).
- 25) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., Facile Discrimination of Aldose Enantiomers by Reversed-Phase HPLC. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899–901 (2007).
- 26) Kitagawa I., Sakagami M., Hashiuchi F., Zhou J. L., Yoshikawa M., Ren J., Apio glycyrrhizin and Araboglycyrrhizin, Two New Sweet Oleanene-Type Triterpene Oligoglycosides from the Root of *Glycyrrhiza inflata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 551–553 (1989).
- 27) Yoshida T., Jin Z. X., Okuda T., Taxifolin Apioside and Davuriciin M1, a Hydrolysable Tannin from *Rosa davurica*. *Phytochemistry*, **28**, 2177–2181 (1989).
- 28) Li J., Jiang Y., Tu P.-F., Tricornoses A-L, Oligosaccharide Multi-Esters from the Roots of *Polygala tricornis*. *J. Nat. Prod.*, **68**, 739–744 (2005).
- 29) Li J.-C., Ono M., Nohara T., Three Oligosaccharide Esters, Telephioses A-C, from *Polygala telephoides*. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1223–1225 (2000).

- 30) Dong X.-Z., Huang C.-L., Yu B.-Y., Hu Y., Mu L.-H., Liu P., Effect of Tenuifoliside A Isolated from *Polygala tenuifolia* on the ERK and PI3K Pathways in C6 Glioma Cells. *Phytomedicine*, **21**, 1178–1188 (2014).
- 31) Karakida F., Ikeya Y., Tsunakawa M., Yamaguchi T., Ikarashi Y., Takeda S., Aburada M., Cerebral Protective and Cognition-Improving Effects of Sinapic Acid in Rodents. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 514–519 (2007).
- 32) Ikeya Y., Takeda S., Tsunakawa M., Karakida H., Toda K., Yamaguchi T., Aburada M., Cognitive Improving and Cerebral Protective Effects of Acylated Oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1081–1085 (2004).
- 33) Hu Y., Liu M.-Y., Liu P., Dong X. Z., Boran A. D. W., Neuroprotective Effects of 3,6'-Disinapoyl Sucrose Through Increased BDNF Levels and CREB Phosphorylation via the CaMKII and ERK1/2 Pathway. *J. Mol. Neurosci.*, **53**, 600–607 (2014).
- 34) Liu X., Wang D., Zhao R., Dong X., Hu Y., Liu P., Synergistic Neuroprotective Effects of Two Herbal Ingredients via CREB-Dependent Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, **7**, 337 (2016).
- 35) Sun X.-L., Ito H., Masuoka T., Kamei C., Hatano T., Effect of *Polygala tenuifolia* Root Extract on Scopolamine-Induced Impairment of Rat Spatial Cognition in an Eight-Arm Radial Maze Task. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1727–1731 (2007).
- 36) Kawashima K., Miyako D., Ishino Y., Makino T., Saito K., Kano Y., Anti-stress Effects of 3,4,5-Trimethoxycinnamic Acid, an Active Constituent of Roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1317–1319 (2004).
- 37) Wang S.-S., Saito K., Owada E., Kano Y., Pharmacological Properties of Galenical Preparations (XX): Screening of Natural Prodrugs in Polygalae Radix. *Wakan Iyakugaku Zasshi*, **12**, 102–108 (1995).

- 38) Korea Food and Drug Administration, “The Korean Herbal Pharmacopoeia” p. 98 (2002).
- 39) U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Poisonous Plant Database. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/Plantox/Detail.CFM?ID=11513>.
- 40) Kim M.-K., Wang H., Kim Y.-J., Sathiyamoorthy S., Kwon W.-S., Yang D.-C. Molecular Authentication by Multiplex-PCR of Three Similar Medicinal Plant Species: *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*). *J. Med. Plant Res.*, **7**, 2584–2589 (2013).
- 41) Kim K.-H., Kim Y.-S., Kim M.-R., Lee H.-Y., Lee K. H., Kim J. H., Seong R. S., Kang T. S., Lee J.-H., Jang Y.-M. Development of Primer Sets for the Detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*. *J. Food Hyg. Saf.*, **30**, 289–294 (2015).
- 42) Jiang Y. F., Choi H. G., Li Y., Park Y. M., Lee J. H., Kim D. H., Lee J.-H., Son J. K., Na M., Lee S.H., Chemical Constituents of *Cynanchum wilfordii* and the Chemotaxonomy of Two Species of the Family Asclepiadaceae, *C. wilfordii* and *C. auriculatum*. *Arch. Pharm. Res.*, **34**, 2021–2027 (2011).
- 43) Li Y., Piao D., Zang H., Woo M.-H., Lee J.-H., Moon D.-C., Lee S.-H., Chang H.W., Son J.K., Quality Assessment and Discrimination of the Roots of *Cynanchum auriculatum* and *Cynanchum wilfordii* by HPLC-UV Analysis. *Arch. Pharm. Res.*, **36**, 335–344 (2013).
- 44) 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).
- 45) Lin C.-N., Huang P.-L., Lu C.-M., Yen M.-H., Wu R.-R. Revised Structure for Five Acetophenones from *Cynanchum taiwanianum*. *Phytochemistry*, **44**, 1359–1363 (1997).

- 46) SDBSWeb (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), <<http://sdfs.db.aist.go.jp>>, cited 25 January, 2018.
- 47) Li J., Kadota S., Kawata Y., Hattori M., Xu G.-J., Namba T., Constituents of the Roots of *Cynanchum bungei* DECNE. Isolation and Structures of Four New Glucosides, Bungeiside-A, -B, -C, and -D. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3133–3137 (1992).
- 48) Liu S., Chen Z., Wu J., Wang L., Wang H., Zhao W., Appetite Suppressing Pregnane Glycosides from the Roots of *Cynanchum auriculatum*. *Phytochemistry*, **93**, 144–153 (2013).

化合物番号

- 1 Polygalaonjiside A
- 2 Polygalaonjiside B
- 3 4-Hydroxybenzoic acid
- 4 Monordicophenoide A
- 5 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid
- 6 Hemsleyanumoide
- 7 Sibiricose A3
- 8 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid
- 9 Sibiricose A5
- 10 Sibiricose A6
- 11 *trans*-Ferulic acid
- 12 Sibiricose A1
- 13 Glomeratose A
- 14 Sibiricoxanthone B
- 15 Tenuifoliside B
- 16 Polygalaxanthone XI
- 17 Polygalaxanthone III
- 18 3,6'-Di-*O*-sinapoylsucrose
- 19 Tenuifoliside A
- 20 1'-Cinnamoyl-3'-benzoyl-(2-*O*-β-glucosyl)-sucrose
- 21 6-(4'''-Methoxybenzoyl)-3'-(3'',4'',5''-trimethoxycinnamoyl)-sucrose
- 22 1,3,7-Trihydroxyxanthone

- 23 Tenuifoliose J
- 24 2-*O*- β -Laminaribiosyl-4-hydroxyacetophenone
- 25 Cynandione A
- 26 Uridine
- 27 Guanosine
- 28 Adenosine
- 29 Tryptophan
- 30 Bungeiside-C
- 31 Bungeiside-D
- 32 *p*-Hydroxyacetophenone
- 33 2',5'-Dihydroxyacetophenone
- 34 2',4'-Dihydroxyacetophenone
- 35 Wilfoside C1N
- 36 Wilfoside K1N