

モロヘイヤ種子中の主強心配糖体の同定,分析及び,マウスに 対する経口毒性について

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	合田, 幸広 酒井, 信夫 中村, 高敏
巻/号	39巻4号
掲載ページ	p. 256-265
発行年月	1998年8月

報 文

モロヘイヤ種子中の主強心配糖体の同定, 分析及び,
マウスに対する経口毒性について

(平成 10 年 1 月 16 日受理)

合田幸広* 酒井信夫* 中村高敏*
種山 浩* 豊田正武*Identification and Analyses of Main Cardiac Glycosides in *Corchorus olitorius*
Seeds and Their Acute Oral Toxicity to MiceYukihiro GODA, Shinobu SAKAI, Takatoshi NAKAMURA, Hiroshi AKIYAMA
and Masatake TOYODA(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

Two digitoxigenin glycosides (coroloside and glucoevatromonoside) as well as strophanthidin glycosides (erysimoside, olitoriside, corchoroside A and helveticoside) were identified as main cardiac glycosides in the methanol extract of "Moroheiya" (*Corchorus olitorius*) seeds. HPLC analyses revealed that *C. olitorius* seeds collected in Japan contained cardiac glycosides at the level of 0.1~1.0% (wet weight). Also, it was suggested that dark greyish green seeds contained more cardiac glycosides than dark greyish yellow~dark greyish yellow-green seeds. Gluco-(1→6)-olitoriside and olitoriusin which had been reported as the main cardiac glycosides by Mahato *et al.*, were not detected by HPLC and ¹H-NMR analyses.

The acute oral toxicity of isolated cardiac glycosides was tested in male ddY mice (6 weeks of age). The LD₅₀ values of a mixture of erysimoside-olitoriside (6:4), and a mixture of coroloside-glucoevatromonoside (1:1) were >500 mg/kg. Further toxicity testing could not be carried out because the amounts of the cardiac glycosides isolated were insufficient.

(Received January 16, 1998)

Key words: モロヘイヤ *Corchorus olitorius*; 強心配糖体 cardiac glycoside; ジギトキシゲン配糖体 digitoxigenin glycoside; ストロファンチジン配糖体 strophanthidin glycoside; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 経口毒性 oral toxicity

緒 論

モロヘイヤ (*Corchorus olitorius* L.) はシナノキ科 (Tiliaceae) の一年生種子繁殖植物で, 南アジア, 中央アジアからアフリカにかけて広く栽培され, その種子は灰黄緑色~青緑色をしている。その葉は, カロテノイド, ビタミン B₁, B₂, C, E, ミネラルなどを豊富に含むことから, 我が国でも, 野菜として利用されるようになり, また健康食品材料として注目されている。

他方, 種子には, 強心配糖体を含むことが古くから知られており, 医用原料として, ロシア, インド, エジプトなどの諸国で研究されてきた。1957年, Senらにより, モロヘイヤ種子の強心活性本体としての corchorin (corchorgenin, corchsularin, corchortoxin) が, strophanthidin (SP) と同一化合物であることが確認された¹⁾。次いで, olitoriside (olitorin)^{2)~5)}, corchoroside A^{6), 7)}, gluco-(1→6)-olitoriside⁸⁾, olitoriusin⁸⁾, erysimoside⁸⁾ という SP 配糖体が単離構造決定され, これら SP 配糖体が, モロヘイヤ中の主強心配糖体であると考えられている。このような強心配糖体の薬理活性や毒性

* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

Table 1. Color of *C. olitorius* Seeds Collected from Four Local Cities in Japan

Sample	Color of seeds	City (Prefecture)
H1	Dark greyish green~dark greyish yellow	Hamada (Shimane)
H2	Dark yellow~dark greyish yellow	Hamada (Shimane)
OT	Dark greyish yellow-green~dark greyish green	Ohtake (Hiroshima)
K	Dark greyish green~dark greyish yellow	Kumagaya (Saitama)
OK	Dark greyish green	Okayama (Okayama)

についての研究は、ウズベキスタン、ロシア、エジプトを中心に行われているが、原報入手が困難で、詳細は不明である^{9)~13)}。

著者らは、モロヘイヤ及びモロヘイヤ加工品の安全性を確保する目的でモロヘイヤ各部位及び数種加工品中のSP強心配糖体含有量を調査した¹⁴⁾。その結果、通常の食生活に用いられるモロヘイヤ及びモロヘイヤ加工品中にはSPをアグリコンとする強心配糖体は存在しないことを報告した。他方、熟した種子中に強心配糖体がSPとして5 mg/g程度存在していることが判明し、種子の取り扱いには注意が必要であることが確認された。本研究では、日本各地で栽培されているモロヘイヤの種子から、強心配糖体を単離精製し、その構造決定を行い、成分ごとの含有量を明らかにした。更に、大量調製した主強心配糖体を用いて経口毒性実験を行い、これまでほとんど明確な情報のないモロヘイヤの安全性に関する知見を蓄積することにした。

実験方法

1. 試薬及び試料

メタノールは、和光純薬工業製又は片山化学工業製のHPLC用を用いた。水は、Milli-Q (日本ミリポア製)により精製して得られた超純水を用いた。オープンカラムの担体としては、日本錬水製 DIAION HP-20 (HP-20), Pharmacia Fine Chemicals 製 Sephadex LH-20 (LH-20)を用いた。NMR用溶媒としては、メタノール- d_4 100% (Isotec社製)を用いた。他の試薬は、すべて試薬特級品を用いた。

熟したモロヘイヤ種子は、島根県浜田市産出の2試料(H1, H2)、広島県大竹市(OT)、埼玉県熊谷市(K)及び、岡山県岡山市(OK)産出の各1試料、計4地域5試料を主に地方公共団体を通じて入手した。抽出に用いた種子量は、それぞれH1: 38.4 g, H2: 70.1 g, OT: 51.5 g, K: 27.6 g, OK: 194.3 gである。JIS Z 8102「物体色の色名」に準拠した種子の色をTable 1に示す。

標品として使用したSPは、松浦薬業社製のものを、digitoxigenin (DG)は、Aldrich社製のものを購入した。

2. 装置

HPLCには、Shimadzu LC-10AD system (ポンプ: LC-10AD, 紫外可視検出器: SPD-10AV, カラムオープン: CTO-10A)に、インテグレーターとして、Shima-

dzu C-R4Aを接続したもの、又は、Shimadzu LC-10AT system (ポンプ: LC-10AT×2, 紫外可視検出器: SPD-10AV, カラムオープン: CTO-10A)にインテグレーターとして、Shimadzu C-R7A plusを接続したもの、又は、Tosoh CCPS system (ポンプ: CCPS×2, 紫外可視検出器: UV-8020, カラムオープン: Shimadzu CTO-6A)に、インテグレーターとして、Shimadzu C-R4Aを接続したものをを用いた。

NMRスペクトルは、JEOL A-600並びに、JEOL A-500を用いて測定した。また、homonuclear shift-correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC)及び、heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)スペクトルの測定には、磁場勾配システムを用いた。なお、¹H-NMR及び¹³C-NMRのデータの帰属は、化学シフト、上記各種相関NMR及びnuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY)の結果、SP及びDGのデータとの比較によった。

MSは、JEOL JMS-SX-102Aを用い、glycerolをマトリックスとして、FABイオン化、negative modeで測定した。

3. HPLC分析用試料の調製

熟したモロヘイヤ種子(5試料)を、それぞれそのまま石油エーテルで脱脂し、その後、室温下でかくはんしながら5回メタノール抽出した。抽出液をエバポレーターで濃縮乾固し、H1: 657 mg, H2: 3418 mg, OT: 872 mg, K: 575 mg, OK: 5753 mgの抽出物試料を得た。

4. 分析HPLC条件

カラムとして、Inertsil ODS-3 (4.6 mm φ×250 mm, GL Sciences社製)を用い、カラム温度40℃、検出波長220 nm又は260 nm、流速1.0 mL/min、注入量10 µLで、移動相に40%メタノール又は、50%メタノールを用いた条件で分析した。

5. 分取HPLC条件

条件1: カラムとして、C.I.G Pre-packed Column C₁₈-20 (22 mm φ×100 mm, 草野科学製作所製)を用い、カラム温度40℃、流速4.0 mL/min、検出波長220 nm、移動相50%メタノールの条件で分取を行った。

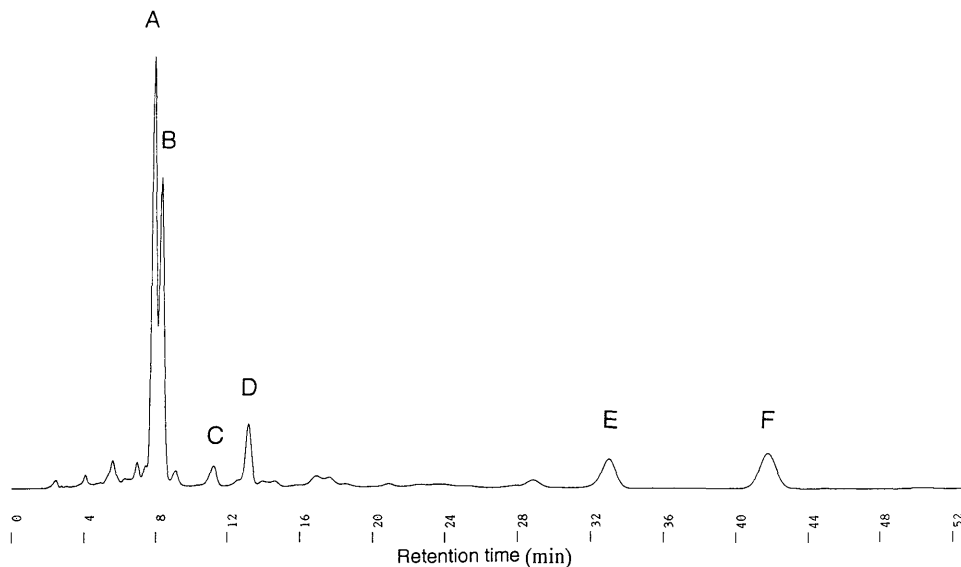


Fig. 1. High performance liquid chromatogram of the cardiac glycoside fraction of HP-20 column

Methanol extract of *C. olerius* seeds was partitioned with hexane and aqueous methanol. The aqueous methanol fraction was further partitioned with water and butanol. The butanol fraction was applied to HP-20 column. After washing with 50% methanol, the methanol eluate was collected as the cardiac glycoside fraction. HPLC conditions were as follows: column, Inertsil ODS-3 (4.6×150 mm); mobile phase, 50% methanol; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40°C; injection, 10 μ L (10 mg/mL); detection, 220 nm. A, erysimoside; B, olitoriside; C, corchoroside A; D, helveticoside; E, coroloside; F, glucoevatromonoside

条件2: カラムとして STR PREP-ODS H (20 mm ϕ × 250 mm, 島津製作所製) を用い, カラム温度 37°C, 流速 8.0 mL/min, 検出波長 220 nm, 移動相 50% メタノールの条件で分取を行った.

6. 強心配糖体成分の単離

メタノール抽出した種子残さを5試料全部合わせ, 粉碎した後, 更にメタノール抽出を行った. 得られたメタノール抽出液を濃縮乾固後 (41.3 g), ヘキサンと含水メタノールで分配し, 得られた含水メタノール層を濃縮乾固後, ブタノール, 水で分配を行った. 次に, ブタノール層抽出物を HP-20 カラム (55 mm ϕ × 400 mm) に負荷し, 50% メタノールで洗浄後, 100% メタノール溶出画分を強心配糖体画分として分取した. 更に同画分を LH-20 カラム (55 mm ϕ × 450 mm) に負荷し, 50% メタノールを移動相に用い, 20 mL ずつ画分1から画分50まで分画した. 各画分を HPLC で分析したところ, 画分18から画分27までに主成分が濃縮されていることが判明した. そこで, これらの画分を集め, 更に分取 HPLC (条件1, 2) で分画し, 最終的に化合物 A (26.1 mg), B (17.6 mg), C (22.7 mg), D (58.2 mg), E

(54.7 mg), F (50.4 mg) 及び, A と B の混合物 (500.7 mg) を得た.

7. HPLC による定量分析

3. の抽出物試料について, 移動相で 10 mg/mL の濃度に調製し, 220 nm の検出波長を用い, 分析 HPLC 条件で定量分析を行った. 配糖体の糖部には二重結合がなく, 糖部由来と考えられる UV 吸収 (220 nm) は, ほとんど存在しないと考えられる. そこで, 化合物 A~D については SP と, E, F については DG とほぼ同じモル吸光係数であるものと考え, SP 及び DG についてピーク面積法で検量線を作成し, この結果を元に各化合物の含量を計算した. なお, 移動相として, 化合物 A~D 及び SP の定量には 40% メタノールを, E, F 及び DG には 50% メタノールを用いた.

8. ddY 系マウスに対する経口毒性試験

マウスは, 5 週齢 ddY 系雄性を, 日本エスエルシーから購入し, 固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) と水道水で 1 週間検疫馴化飼育した後, 6 週齢 (30~35 g) のものを試験に供した. マウスの飼育は, バリヤーステムの飼育室にて室温 24±1°C, 湿度 55±5%, 換気回

Table 2. ¹H-NMR (500 or 600 MHz) Spectral Data for Cardiac Glycosides in Methanol-d₄*1

	(SP)	(A)	(B)	(C)	(D)	(DG)	(E)	(F)
	Strophanthidin*2	Erysimoside*3	Olitoriside*3	Corchoroside A*2	Helveticoside*2	Digitoxigenin*3	Coroloside*3	Glucosylatromonoside*3
Aglycone								
3	4.13, 1H, m	4.15, 1H, m	4.17, 1H, m	4.17, 1H, m	4.15, 1H, m	4.05, 1H, m	4.04, 1H, m	4.02, 1H, m
17	2.82, 1H, m	2.82, 1H, m	2.82, 1H, m	2.82, 1H, m	2.82, 1H, m	2.83, 1H, m	2.83, 1H, m	2.83, 1H, m
18	0.86, 3H, s	0.85, 3H, s	0.85, 3H, s	0.84, 3H, s	0.84, 3H, s	0.88, 3H, s	0.88, 3H, s	0.88, 3H, s
19	10.05, 1H, s	10.05, 1H, s	10.05, 1H, s	10.04, 1H, s	10.04, 1H, s	0.97, 3H, s	0.94, 3H, s	0.94, 3H, s
21a	4.91, 1H, dd (18, 2)	4.91, 1H, dd (18.5, 1.5)	4.91, 1H, dd (18.5, 2)	4.90, 1H, dd (18.5, 1.8)	4.90, 1H, dd (18.5, 1.8)	4.91, 1H, dd (18.5, 1.5)	4.92, 1H, dd (19, 2)	4.92, 1H, dd (18.5, 1.5)
21b	5.02, 1H, dd (18, 2)	5.02, 1H, dd (18.5, 1.5)	5.02, 1H, dd (18.5, 2)	5.02, 1H, dd (18.5, 1.8)	5.01, 1H, dd (18.5, 1.8)	5.03, 1H, dd (18, 1.5)	5.04, 1H, dd (19, 2)	5.04, 1H, dd (18.5, 1.5)
22	5.90, 1H, s	5.90, 1H, s	5.90, 1H, s	5.89, 1H, s	5.89, 1H, s	5.90, 1H, s	5.90, 1H, s	5.90, 1H, s
Sugar I								
1	4.94, 1H, dd (10, 2)	4.94, 1H, dd (10, 2)	4.90, 1H, dd (9, 1.5)	4.87, 1H, dd (9.5, 1.8)	4.93, 1H, dd (9.5, 1.8)	4.87, 1H, dd (10, 2)	4.87, 1H, dd (10, 2)	4.91, 1H, dd (10, 2)
2a	1.72, 1H, m	1.72, 1H, m	1.69, 1H, m	1.67, 1H, m	1.70, 1H, m	1.68, 1H, m	1.68, 1H, m	1.73, 1H, m
2b	1.96, 1H, m	1.96, 1H, m	1.95, 1H, m	1.86, 1H, m	1.95, 1H, m	1.93, 1H, m	1.93, 1H, m	1.95, 1H, m
3	4.29, 1H, brq (18, 2)	4.29, 1H, brq (18, 2)	4.14, 1H, m	3.96, 1H, m	4.01, 1H, m	4.16, 1H, m	4.16, 1H, m	4.29, 1H, m
4	3.31, 1H, m	3.31, 1H, m	3.45, 1H, m	3.21, 1H, m	3.15, 1H, dd (9.5, 3)	3.46, 1H, m	3.46, 1H, m	3.29, 1H, m
5	3.88, 1H, dq (6.5, 9.5)	3.88, 1H, dq (6.5, 9.5)	4.05, 1H, m	3.95, 1H, m	3.75, 1H, dq (6.5, 9.5)	4.03, 1H, m	4.03, 1H, m	3.87, 1H, m
6	1.31, 3H, d (6.5)	1.31, 3H, d (6.5)	1.26, 3H, d (6.5)	1.22, 3H, d (6.5)	1.23, 3H, d (6.5)	1.25, 3H, d (6.5)	1.25, 3H, d (6.5)	1.30, 3H, d (6.5)
Sugar II								
1	4.38, 1H, d (7.5)	4.38, 1H, d (7.5)	4.30, 1H, d (7.5)	4.30, 1H, d (7.5)	4.32, 1H, d (7.5)	4.32, 1H, d (7.5)	4.32, 1H, d (7.5)	4.38, 1H, d (7.5)
2	3.22, 1H, m	3.22, 1H, m	3.21, 1H, m	3.21, 1H, m	3.21, 1H, m	3.22, 1H, m	3.22, 1H, m	3.23, 1H, m
3	3.33, 1H, m	3.33, 1H, m	3.36, 1H, m	3.36, 1H, m	3.36, 1H, m	3.36, 1H, m	3.36, 1H, m	3.35, 1H, m
4	3.35, 1H, m	3.35, 1H, m	3.28, 1H, m	3.28, 1H, m	3.28, 1H, m	3.29, 1H, m	3.29, 1H, m	3.35, 1H, m
5	3.28, 1H, m	3.28, 1H, m	3.25, 1H, m	3.25, 1H, m	3.25, 1H, m	3.27, 1H, m	3.27, 1H, m	3.29, 1H, m
6a	3.69, 1H, dd (12, 5)	3.69, 1H, dd (12, 5)	3.65, 1H, dd (11.5, 5.5)	3.65, 1H, dd (11.5, 5.5)	3.66, 1H, dd (12, 5)	3.66, 1H, dd (12, 5.5)	3.66, 1H, dd (12, 5.5)	3.70, 1H, dd (12, 5)
6b	3.82, 1H, dd (12, 2)	3.82, 1H, dd (12, 2)	3.87, 1H, dd (11.5, 2)	3.87, 1H, dd (11.5, 2)	3.87, 1H, dd (12, 2)	3.87, 1H, dd (12, 2)	3.87, 1H, dd (12, 2)	3.83, 1H, dd (12, 2)

*1Chemical shift value (δ), intensity and multiplicity are given successively in each set. Coupling constants (J values) in Hz are given in parentheses.

*2Measured at 600 MHz

*3Measured at 500 MHz

Table 3. ¹³C-NMR Chemical Shifts for Cardiac Glycosides in Methanol-d₄

	(SP)	(A)	(B)	(C)	(D)	(DG)	(E)	(F)
	Strophanthidin* ¹	Erysimoside* ²	Olitoriside* ²	Corchoroside A* ¹	Helveticoside* ¹	Digitoxigenin* ²	Coroloside* ²	Glucoevatromonoside* ²
Aglycone								
1	25.2	25.2	25.2	25.1	25.1	30.8	31.4	31.4
2	27.6	25.9	26.0	25.9	25.9	28.5	27.5	27.5
3	68.0	76.3	76.4	76.0	76.2	67.7	74.3	74.4
4	38.5	36.8	36.9	36.8	36.7	34.2	31.0	31.0
5	75.8	75.3	75.4	75.3	75.3	37.5	37.9	37.9
6	37.5	37.2	37.2	37.1	37.1	27.9	27.9	27.8
7	23.2	23.3	23.3	23.2	23.2	22.5	22.6	22.5
8	42.6	42.6	42.7	42.5	42.6	42.7	42.7	42.7
9	40.3	40.4	40.5	40.4	40.4	36.7	36.9	36.9
10	56.2	56.1	56.2	56.1	56.1	36.5	36.3	36.3
11	18.5	19.0	19.0	18.9	18.9	22.3	22.3	22.3
12	40.6	40.5	40.6	40.5	40.5	41.0	41.0	41.0
13	50.8	50.7	50.8	50.7	50.7	51.1	51.0	51.0
14	85.9	85.9	86.0	85.9	85.9	86.5	86.4	86.4
15	32.5	32.5	32.5	32.4	32.4	33.4	33.4	33.4
16	27.9	27.9	28.0	27.9	27.9	28.1	28.1	28.0
17	51.8	51.8	51.8	51.7	51.7	52.2	52.1	52.1
18	16.2	16.2	16.2	16.1	16.1	16.4	16.4	16.4
19	210.2	210.2	210.0	210.1	210.0	24.3	24.3	24.3
20	178.1	178.1	178.2	178.1	178.1	178.4	178.4	178.4
21	75.3	75.2	75.3	75.3	75.3	75.4	75.3	75.3
22	117.9	117.9	118.0	117.8	117.9	117.8	117.7	117.7
23	177.1	177.2	177.2	177.2	177.2	177.3	177.3	177.2
Sugar I								
1		98.2	99.2	99.0	98.3		97.6	96.8
2		38.9	35.1	34.7	39.6		35.2	39.0
3		68.4	66.7	70.3	69.0		66.6	68.5
4		84.0	76.0	70.9	74.2		75.9	84.2
5		69.8	70.3	70.3	70.9		70.0	69.6
6		18.6	17.3	16.9	18.5		17.2	18.6

Table 3. Continued

Sugar II	Erysimoside*1 (SP) (A)	Oltoriside*2 (B)	Corchoroside A*1 (C)	Helveticoside*1 (D)	Digitoxigenin*2 (DG)	Coroloside*2 (E)	Glucovatromonoside*2 (F)
	105.8	102.5				102.1	105.7
1	75.1	75.0				74.9	75.0
2	77.9	78.0				77.8	77.8
3	71.2	72.0				71.8	71.1
4	77.7	78.2				78.0	77.7
5	62.3	63.1				63.0	62.3
6							

*1 Measured at 150 MHz; *2 Measured at 125 MHz; Assignments were confirmed by HMQC and HMBC analyses.

Table 4. Cardiac Glycoside Contents (%) in Methanol Extracts of *C. oltorius* Seeds Collected from Four Local Cities in Japan

Sample	Cardiac glycosides						Relative content ratio			
	Erysimoside (A)	Oltoriside (B)	Corchoroside A (C)	Helveticoside (D)	Coroloside (E)	Glucovatromonoside (F)	Total	A+B/ C+D*1	A+B/ E+F*2	A+D+F/ B+C+E*3
H1	0.51 (40)	0.27 (21)	0.06 (5)	0.13 (10)	0.18 (14)	0.15 (12)	1.29	4.1	2.4	1.5
H2	0.26 (25)	0.23 (21)	0.16 (15)	0.13 (12)	0.12 (11)	0.16 (15)	1.06	1.8	1.8	1.1
OT	0.12 (16)	0.13 (18)	0.16 (22)	0.17 (23)	0.12 (16)	0.03 (4)	0.73	0.75	1.7	0.78
K	0.48 (39)	0.39 (32)	0.08 (7)	0.06 (5)	0.07 (6)	0.14 (11)	1.22	6.2	4.1	1.2
OK	2.27 (43)	1.47 (28)	0.21 (4)	0.55 (10)	0.32 (6)	0.49 (9)	5.31	4.9	4.6	1.6

Values in parentheses indicate percent contents relative to total cardiac glycoside content as 100%.

*1 The ratio of strophanthidin (SP) diglycoside to SP monoglycoside

*2 The ratio of SP diglycoside to digitoxigenin diglycoside

*3 The ratio of cardiac glycosides containing digitoxose to those containing boivinose

数 18回/時 (オールフレッシュ), 12 時間蛍光灯照明, 12 時間消灯の条件下, ポリカーボネートゲージに 5 匹ずつ収容し行った. 床敷は, 三協ラボサービスのソフトチップを用い, 週 2 回交換した.

まず, 市販の digitoxin (Sigma 社製) を用いて予備実験を行った. Digitoxin 50 mg を, 水, コーンオイル (Sigma 社製), 0.5% Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt (CMC, 和光純薬工業製) 水溶液 1 mL に懸濁し, マウス用経口ゾンデの通過特性を調べたところ, 水を用いたものが最も良好な結果を得た. 次に, 被検液の濃度を Lorke による LD₅₀ の算出方法¹⁵⁾ に基づき決定した後, 強心配糖体 A, B 混合物及び E, F 混合物について, マウス 1 匹当たり 500, 50, 5 mg/kg の投与量となるように水 200 μ L に懸濁して投与実験を行った. なおマウスは, 投与の 4 時間前から絶食させた後, 各濃度につき 3 匹ずつ経口投与し, 直後からの薬理作用 (死亡, 麻痺, 利尿などの行動や症状) を観察した.

結果及び考察

1. 種子抽出物試料の HPLC 分析

各抽出物試料について HPLC 分析を行った結果, いずれの試料とも保持時間 7.9, 8.3, 11.2, 13.2, 33.0, 41.7 分に, 6 つの主ピークが存在することが明らかになった. 各主成分のピーク高さ比は, 試料ごとにかなり異なるものの, どの試料にも, これらのピークはある程度存在することが判明した. また強心配糖体は, その構造から, 220 nm での吸収強度が 260 nm でのものより強いものと考えられるが¹⁶⁾, これらのピークは, すべて 220 nm/260 nm のピーク強度比が 1 以上を示した. そこで, すべての抽出残さをまとめ, 粉碎後大量抽出し, 6 つの主成分について単離構造決定を行うことにした.

2. 主強心配糖体の単離構造決定

種子粉砕物のメタノール抽出物について, 常法に従い液液分配を行い, 配糖体画分 7.5 g を得た. 次いで, 各種クロマトグラフィーを用い化合物の単離を行い, A~F 及び A と B の混合物を得た. HP-20 カラムで部分精製した抽出物の HPLC クロマトグラムを Fig. 1 に, A~F の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR のデータをそれぞれ, Table 2, 3 に示す.

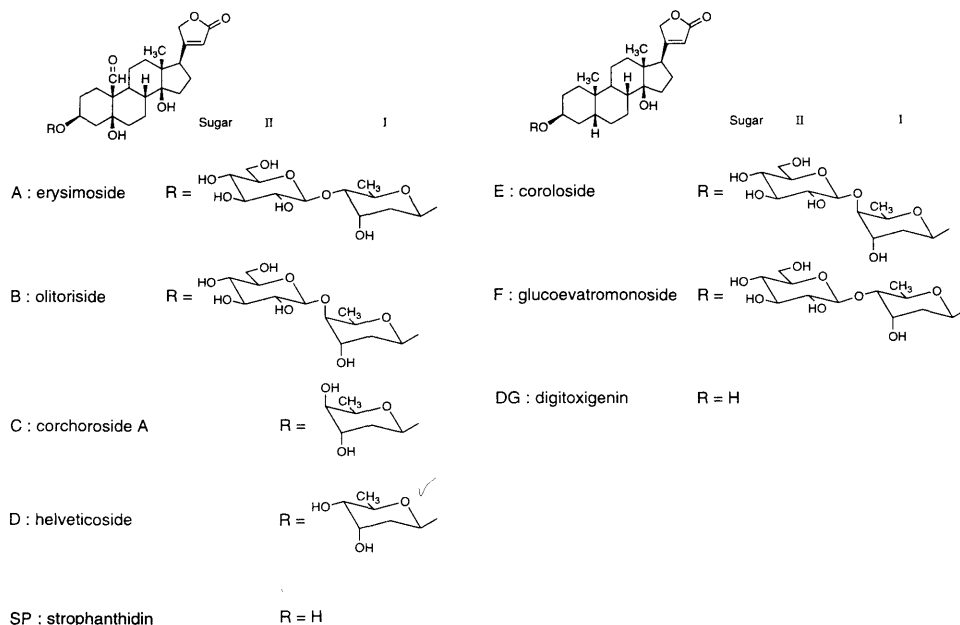
A~F の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルにおいて, 強心配糖体の構造に特徴的な不飽和 5 員環ラクトン基のシグナル及び糖部に由来するシグナルが検出された. したがって, これらの化合物が強心配糖体であることが確認された. また, FAB-MS の測定結果より, A~F は, それぞれ, [M-H]⁻ に対応する *m/z*, 695, 695, 533, 533, 665, 665 の擬似分子イオンピークが観測された.

A~D の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルからは, SP に特徴的なアルデヒド基のシグナルが検出された.

更に, FAB-MS の結果及び, COSY, NOESY, HMQC, HMBC の 2D-NMR スペクトルの詳細な検討から, A~D は SP をアグリコンとし, A は第 1 糖の β -D-digitoxose の 4 位に第 2 糖の β -D-glucose が結合した erysimoside, B は第 1 糖の β -D-boivinose の 4 位に第 2 糖の β -D-glucose が結合した olitoriside, C は糖部が β -D-boivinose の単糖からなる corchoroside A, D は β -D-digitoxose の単糖からなる helveticoside と同定した. なお, boivinose と digitoxose の区別は, NOESY の解析によった. これらの化合物のうち, A~C はモロヘイヤ種子中に存在することが既に知られている²⁾⁻⁸⁾. D は, 同種子の自家発酵液中から単離されているが¹⁶⁾, 種子抽出物からの単離は初めてである.

E, F の糖部の ¹³C-NMR は, それぞれ B, A と極めて類似したスペクトルを示した. 一方, アグリコン部ではかなり異なったスペクトルを示した. 特に ¹³C-NMR ではアルデヒド基由来のシグナル (19 位) 及び水酸基のついた四級炭素シグナル (5 位) が検出されず, 新たにメチル及びメチン炭素シグナルが検出されたことから, アグリコンは DG であると推定し, DG の標品の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR の化学シフト値及び ¹³C-NMR の文献値¹⁷⁾ と比較した. その結果, よく一致をみたことから, E, F のアグリコンは DG である可能性が非常に高いことが明らかになった. また, SP がアグリコンである A, B より, *m/z* が 30 少ない擬似分子イオンピークも, E, F が DG をアグリコンとする強心配糖体であることを強く示唆した. 最終的に, COSY, HMQC, HMBC 等の 2D-NMR スペクトルを用いて構造決定を行い, E は DG をアグリコンに持ち, 第 1 糖の β -D-boivinose の 4 位に第 2 糖の β -D-glucose が結合した coroloside, F は DG をアグリコンに持ち, 第 1 糖の β -D-digitoxose の 4 位に第 2 糖の β -D-glucose が結合した glucoevatromonoside と同定した^{18), 19)}. これまで, モロヘイヤ種子から SP 以外をアグリコンとする強心配糖体が単離されたという報告は, Maslennikova による coroloside 1 例しかない¹⁸⁾. したがって, DG をアグリコンとする強心配糖体がモロヘイヤ種子に存在するかどうか疑問視されていた. しかし, 今回の実験から, DG をアグリコンとする強心配糖体も主成分のひとつであることが明らかとなった. なお, モロヘイヤから, glucoevatromonoside が単離されたのは初めてである. A~F の構造を Fig. 2 に示す.

モロヘイヤ由来の強心配糖体は, 逆相 HPLC において, SP をアグリコンとする二糖配糖体, SP をアグリコンとする単糖配糖体, DG をアグリコンとする二糖配糖体という順で, それぞれ 2 化合物ずつ対となって溶出した. Mahato らによりモロヘイヤ種子中の主強心配糖体として報告されている, SP をアグリコンとする三糖配糖体 (gluco-(1 \rightarrow 6)-olitoriside 及び olitoriusin)

Fig. 2. Structures of cardiac glycosides in *C. olerarius* seeds

は⁸⁾, A, B より glucose が 1 つ余分についた構造を持つ。したがって, その極性を考えると, 逆相 HPLC において, A, B より早く溶出すると考えられた。そこで, A, B より早く溶出されるピークについて, 220 nm/260 nm のピーク強度比 1 以上を指標として単離し, ¹H-NMR 分析を行ったが, 三糖強心配糖体の存在は確認できなかった。

HPLC において, 同じアグリコンと糖の数であれば, 糖部に boivinoside を含むものと digitoxose を含むものが, 近い保持時間に互いに対になって検出された (Fig. 1)。しかし, SP をアグリコンとする二糖配糖体間では, digitoxose 含有体, boivinoside 含有体の順に検出されるのかかわらず, SP をアグリコンとする単糖配糖体間及び DG をアグリコンとする二糖配糖体間では, その順が逆転した。配糖体と糖の組み合わせの差により, 極性が逆転し興味深い。

3. 強心配糖体の定量分析

主に NMR を用いた構造決定により, A~D は, SP をアグリコンに持つ強心配糖体であり, E, F は DG をアグリコンに持つ強心配糖体であることが明らかになった。そこで, 栽培地方や色合いが異なった種子由来の抽出物ごとの強心配糖体含量を検討, 比較するため, HPLC を用い, 抽出物試料を加水分解をせず, 配糖体として直接定量分析を行うことにした。結果を Table 4 に示す。

定量分析の結果, 栽培地方や種子の色が相違するにもかかわらず (Table 1), モロヘイヤ種子抽出エキス中

は, 約 1~5% 強心配糖体が含まれていることが判明した。また, 主強心配糖体と考えられる A~F のうち, SP をアグリコンとするものが, すべての抽出物試料において全体の 73~85% を占め, DG をアグリコンとするものより明らかに多いことが判明した。種子粉碎後のメタノール再抽出物 (41.3 g) を合わせた, 種子 382 g からの総抽出物量は 52.6 g で, その収率は約 14% である。メタノール再抽出物からは, 計 0.73 g の強心配糖体 (収率 1.7%) が単離されていることを考え合わせると, 種子中には, 0.1~1% 程度強心配糖体が含まれているものと推定される。

色合いが異なった 5 試料のうち, H1, K, OK はどちらかといえば濃い灰緑色 (dark greyish green) の種子が多く, H2 と OT は, やや黄色味をおびた灰緑色 (dark greyish yellow ~ dark greyish yellow-green) の種子が多い (Table 1)。種子の色合いと強心配糖体含量について焦点を絞り, 両グループを比較すると, 前者の方が強心配糖体含量が高く, 後者の方が低いことが判明した。また, SP をアグリコンとする二糖の配糖体と単糖の配糖体の比は, 前者のグループで 4.1~6.2 なのに対し, 後者では, 0.75 及び 1.8 と大きく異なった。また, A, B の E, F に対する比 (同じ構造の二糖のついた SP をアグリコンとする配糖体と DG をアグリコンとする配糖体の比) は, 前者が 2.4~4.6 なのに対し, 後者では 1.7, 1.8 と低い。更に, A, D, F の B, C, E に対する比 (digitoxose を含む配糖体と boivinoside を含む配糖体の比) でも, 前者が 1.2~1.6 なのに対し, 後者

Table 5. Effects of Cardiac Glycosides Orally Administered to Mice

Sample	Dose	Death No./ used No.	Depression of spontaneous behavior/ used No.	Ataxia/ used No.	Increase of heartbeat/ used No.	Diuresis/ used No.
Digitoxin	5 mg/kg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	50 mg/kg	2/3	3/3	3/3	3/3	0/3
	500 mg/kg	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	LD ₅₀	10~80 mg/kg				
60% Erysimoside+ 40% Olitoriside (A+B)	5 mg/kg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	50 mg/kg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	500 mg/kg	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3
	LD ₅₀	>500 mg/kg				
50% Coroloside+	5 mg/kg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
50% Glucoevatromonoside (E+F)	50 mg/kg	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3
	500 mg/kg	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
	LD ₅₀	>500 mg/kg				

では 0.78, 1.1 と低いことが判明した。

生合成的に考えると, DG の酸化により SP が生じるものと推定される。また, 単糖配糖体より, 二糖配糖体の方が生合成下流にあるものと考えられる。したがって, 強心配糖体の含量が多い濃い灰緑色の種子の方が, より生合成的に下流にある成分の比率が多いと推定された。また, boivinoside と digitoxose では, 4 位の酸素が axial に配向した前者より equatorial に配向したもののほうが安定と考えられる。したがって, 強心配糖体の含量が多い濃い灰緑色の種子の方が, 安定な digitoxose を含む成分の比率が多いことも判明した。

埼玉県の園芸試験場の発芽実験において, 青色の種子の発芽率に比べて茶色の種子の発芽率が低いことが報告されている²⁰⁾。また, 色あいの異なる H1 と H2 は同じ地方から入手した試料であり, 栽培品種が同一である可能性が高い。したがって, 種子の色に対応する強心配糖体の含有量及び成分比の違いは, 栽培品種の違いというより, 種子の熟度の違いにより生じた可能性が高いものと思われる。

4. 強心配糖体成分のマウスに対する経口毒性試験

まず, digitoxin を用いて予備実験を行ったところ, LD₅₀ 値 10~80 mg/kg が得られた。Reddy らは, 同物質をマウスに 70 mg/kg 投与した場合, 20% 致死が見られることを報告しており²¹⁾, この結果は, 本実験で得られた LD₅₀ 値とほぼ一致した。

次に, モロヘイヤ強心配糖体成分の経口毒性実験を行った。強心配糖体の活性にはアグリコン部の影響が大きいことが知られている。そこで, 投与に必要な量を確保するため, アグリコンが SP である A, B の 6 対 4 混合物 (A+B) 及び, アグリコンが DG である E, F の 1 対 1 混合物 (E+F) を用い実験を行った。実験の結果を Table 5 に示す。

A+B 投与マウスでは, 500 mg/kg 投与群のマウスのみ行動にわずかに影響が見られ, 投与 1 時間後に全 3 匹とも, やや鎮静化し, 2 時間後そのうち 1 匹に心拍数の増加が見られた。しかし, 2.5 時間後にはマウス全匹の症状が回復した。一方, E+F 投与マウスでは, 投与 1.5 時間後, 500 mg/kg 投与群の 3 匹のマウスと 50 mg/kg 投与群の 1 匹に自発運動の抑制及び鎮静が見られた。更に 2 時間後には 500 mg/kg 投与群の 3 匹のマウスと 50 mg/kg 投与群の 1 匹に心拍数増加が見られ, 症状に量依存性があることが推定された。2.5 時間後, それらマウスは活発に行動するようになり, 4 時間後には, 完全に正常に戻り, digitoxin を投与した予備実験で見られた運動失調及び麻痺, 利尿は, 観察されなかった。したがって, A+B 及び E+F とも LD₅₀ 値は 500 mg/kg 以上であるが, 一部観察された結果より, モロヘイヤ由来の強心配糖体では, SP をアグリコンとするものより, DG をアグリコンとするもののほうが急性毒性が強いことが推定された。

以上の毒性実験では死亡には至らなかったもので, 二次試験として更に高濃度の実験を行う必要が考えられた。しかし, 強心配糖体成分をこれ以上単離することが困難であり, 二次試験は行えなかった。

Chemical Abstracts (CA) によれば, エジプトの Sharaf と Negm は, モロヘイヤ種子由来の, 7 つの Kedde 反応陽性化合物を含む強心配糖体画分を, 10% エタノール溶液にしてマウスに経口投与した結果, 画分の LD₅₀ 値は, 500~750 mg/kg であると報告している¹³⁾。この結果は, 著者らの, 精製した化合物で推定したものとよく一致する。

CA によれば, ウズベキスタンの Sultanov と Kamulin は, モロヘイヤ由来の強心配糖体 (純度不明, corchoroside A と思われる) のネコの対する LD₅₀ 値を調

べ, その値は, k-strophanthin より少し強い, 0.080 mg/kg であると報告している⁹⁾. また, 同物質のアグリコンでは, 値は 0.241 mg/kg で, SP とほぼ同じであったと報告している. 投与方法は不明であるが, 値を考慮すれば, 静注と推定される.

一般に, SP をアグリコンとするものは消化管からの吸収が 1% 程度しかなく, 強心作用を得るには, 静脈注射が必要とされている²²⁾. 一方, DG をアグリコンとする digitoxin は, 消化管で 90~100% とよく吸収される²²⁾. したがって, 経口毒性は, SP をアグリコンとするものより, DG をアグリコンとするものが強いものと考えられる. 著者らは, 前報で, モロヘイヤ各部位及び数種加工品中の SP をアグリコンとする強心配糖体含有量を調査した. 本研究の結果, モロヘイヤ種子中には, DG をアグリコンとする強心配糖体が, SP をアグリコンとするものに対し 17~35% 程度存在することを確認した. したがって, 食品衛生上, モロヘイヤ可食部及びモロヘイヤ加工品中の, DG タイプの強心配糖体含有量を再調査する必要があると考えられる. 現在, これら食品中の DG 分析法を検討し, 含有量について調査中である.

一般に, 強心配糖体では, 糖部が, 吸収並びに透過の程度を支配しており, 糖部の差により心筋に対する親和性に違いが出ることが知られている²²⁾. 単糖及び二糖配糖体の強心活性の差, 糖の違いによる強心活性の差についても今後の検討課題である.

結 語

1. モロヘイヤ種子から, 主強心配糖体として, 4 種の SP 配糖体, 2 種の DG 配糖体を単離構造決定した.

2. モロヘイヤ種子中の強心配糖体含有量は, 種子湿重量の 0.1~1% で, 種子の色の違いによって, 含有量及び成分組成が異なることが判明した.

3. モロヘイヤ由来の強心配糖体の LD₅₀ 値は, ddY 系雌性マウスに対し, 経口投与で 500 mg/kg 以上であることが明らかになった.

謝 辞

経口毒性実験を行うに当たり, ご協力頂いた, 国立医薬品食品衛生研究所北嶋 聡博士をはじめとする毒性部の方々に深謝する. 本研究の一部は厚生科学研究費補助金で行われた. 記して謝意を表す.

文 献

1) Sen, N. K., Chakrabarti, J. K., Kreis, W., Tamm, Ch.,

- Reichstein, T.: *Helv. Chim. Acta* **40**, 588~592 (1957).
- 2) Abubakirov, N. K., Maslennikova, V. A., Gorovits, M. B.: *Doklady Akad. Nauk Uzbek. S.S.R.* No. 6, 23~27 (1957) (C.A. 53-6290).
- 3) Abubakirov, N. K., Maslennikova, V. A., Gorovits, M. B.: *Zhur. Obshechi Khim.* **28**, 2,279~2,283 (1959) (C.A. 53-2280).
- 4) Chernobal, V. T., Kolesnikov, D. G.: *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.* **127**, 568~588 (1959) (C.A. 53-20696).
- 5) Soliman, G., Saleh, W.: *Egypt. Pharm. Bull.* **42**(4), 555~559 (1960) (C.A. 58-1301).
- 6) Loshkarev, P. M.: *Tr. Vses. Nauch. Issled. Inst. Lek. Aromal. Rast.* **15**, 618~628 (1969) (C.A. 75-67424).
- 7) Turakhozhaev, M. T., Zubkova, L. P., Shamsutdinov, M. I., Genkina, G. L., Shakirov, T. T.: *Khim. Prir. Soedin.* **8**(1), 81~83 (1972) (C.A. 77-85668).
- 8) Mahato, S. B., Sahu, N. P., Roy, S. K.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1989**, 2,065~2,068.
- 9) Sultanov, T. G., Kambulin, N. A.: *Doklady Akad. Nauk. Uzbek. S.S.R.* **1958**(1), 33~36 (C.A. 53-11653).
- 10) Turova, A. D., Leskov, A. I., Sokolova, L. N.: *Lekarstv. Sredstva iz Rast.* **1962**, 43~55 (C.A. 58-4945).
- 11) Kel'ginbaev, N. S.: *Sb. Nauchn. Tr. Tashkentsk. Gos. Med. Inst.* **22**, 402~410 (1962) (C.A. 64-16503).
- 12) Bashkevich, V. I.: *Nauch. Kong. Vop. Morfol. Patol. Serdechno-Sesudistoi Sist.*, 21 st, Yaroslavsk. Med. Inst. **1965**, 44~45 (C.A. 67-31504).
- 13) Sharaf, A., Negm, S. A. R.: *Qual. Plant. Mater. Veg.* **17**(4), 305~312 (1969) (C.A. 72-119927).
- 14) 近藤一成, 龜山 浩, 合田幸広, 豊田正武: *食衛誌*, **38**, 412~417 (1997).
- 15) Lorke, D.: *Arch. Toxicol.* **54**, 275~287 (1983).
- 16) Rao, E. V., Rao, K. N., Rao, D. V.: *Curr. Sci.* **42**, 731~732 (1973).
- 17) Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Cole, J. R., Tempesta, M. S., Bates, R. B.: *J. Org. Chem.* **46**, 1,946~1,947 (1981).
- 18) Maslennikova, V. A., Abubakirov, N. K.: *Khim. Prir. Soedin.* **11**, 525~526 (1975).
- 19) Imre, Z., Yurdun, T.: *Planta Medica* **1987**, 43~46.
- 20) 飯盛かをる: "野菜健康法モロヘイヤ" p. 140 (1996) 土屋書店.
- 21) Reddy, R. K., Khalil, S. A., Gouda, M. W.: *J. Pharm. Sci.* **65**, 1,753~1,758 (1976).
- 22) 金戸 洋他編: "薬理学" p. 222~223 (1986) 廣川書店.