

漢薬“丹参”のアルドース還元酵素阻害活性

Aldose Reductase Inhibitory Activity of Chinese Crude Drug “Danshen”

和漢薬研究所 化学応用部門

門田 重利, 手塚 康弘

要約

漢薬“丹参”の基源植物である丹参 (*Salvia miltiorhiza*) 及び中国新疆において丹参 (*S. miltiorhiza*) の代用品として用いられている新疆丹参 (*S. deserta*) のアルドース還元酵素阻害活性成分を調べたところ、両者の活性成分は全く異なっていた。さらに、丹参 (*S. miltiorhiza*) の代用品として用いられている10種を含む17種類の *Salvia* 属植物について、水およびメタノールエキスのアルドース還元酵素阻害活性およびLC-MS分析を比較した結果も、それら *Salvia* 属植物が同等ではない事を示していた。これらの結果から、丹参 (*S. miltiorhiza*) の代用品として他の *Salvia* 属植物を用いる場合には、作用や成分に関する考慮を払った上で用いる必要があると考えられた。さらに、このような同属植物間の成分比較にLC-MS分析と主成分分析の組み合わせが有用な手法となると思われた。

Summary

We examined the aldose reductase (AR) inhibitory constituents of *Salvia miltiorhiza*, the original plant of Chinese crude drug Danshen, and *S. deserta*, a plant mixed in Danshen at Xinjiang province, China in short supply of *S. miltiorhiza*, and found that their AR inhibitory constituents differed very much. Then, we also examined the AR inhibitory activity and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) of water and MeOH extracts of seventeen *Salvia* plants, including ten species used as Danshen resources and indicated that the seventeen plants were not the same as *S. miltiorhiza*. Thus, it has been concluded that on usage of other *Salvia* plant(s) instead of *S. miltiorhiza* their activity and/or constituents should be considered. Moreover, these results have also suggested that for the comparison of the plants of the same genus a combination of LC-MS and principle component analysis would be useful method.

Key Words *Salvia*; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); aldose reductase inhibitor; principle component analysis; 丹参 (Danshen)

1. はじめに

漢薬“丹参”は古くは『神農本草経』に上品として収載され、現在では中国薬典にも収載されている漢薬である¹⁾。本漢薬はシソ科サルビア属植物丹参 (*Salvia miltiorhiza* BUNGE,

Lamiaceae) の根または根茎を乾燥したもので、『本草綱目』によると雲南省、山東省、安徽省、四川省西部等に分布するとされている。漢方では、活血、調経、消腫等を目的として婦人病、循環器病等に使われてきたが²⁾、近年、その他に肝臓病、糖尿病合併症などにも有効との報告がなされている³⁾。

漢薬“丹参”の基源植物としては、中国薬典には丹参 (*S. miltiorhiza*) だけが規定されているが¹⁾、その他にも11種類の *Salvia* 属植物が代用品として用いられ、漢薬“丹参”中に混入しているとの調査結果が報告された^{4,5)}。ここで報告された代用品の幾つかに関しては成分研究が行われているものの⁶⁾、活性あるいは成分について丹参 (*S. miltiorhiza*) と比較、検討した報告はほとんど見られない。

我々は、丹参 (*S. miltiorhiza*) の糖尿病合併症に有効な成分の研究として、糖尿病合併症の発症や進展に深い係わりが示唆されているアルドース還元酵素⁷⁾ に対する阻害活性を指標として、丹参 (*S. miltiorhiza*) 及び中国新疆ウイグル自治区で代用品の一つとして用いられている新疆丹参 (*S. deserta* SCHANG, Lamiaceae) の成分検索を行い両者の比較を行った。さらに、*S. miltiorhiza*, *S. deserta* を含む17種の *Salvia* 属植物について、アルドース還元酵素阻害活性の比較及び liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 分析による含有成分の比較を行った。これらの結果について以下に詳述する。

2. 丹参 (*S. miltiorhiza*) のアルドース還元酵素阻害活性成分

漢薬“丹参”の起源植物丹参 (*S. miltiorhiza*) を初めとする *Salvia* 属植物の成分研究はテルペノイドを中心に約50年前から行われ、50種以上の norabietane-type diterpene が知られている他、一連の caffeic acid 誘導体も知られている^{6,8,9)}。一方、漢薬“丹参”中の活性成分に関しては、主として、古来からの用方である活血、調経、消腫等に関係する心臓保護成分、抗菌活性成分などが研究され、tanshinone 類が活性を有するとの報告がある^{6,10)}。また、lithospermate B が腎障害に有効との報告も見られ^{9,11)}、我々も丹参 (*S. miltiorhiza*) の肝保護活性成分として lithospermate B を報告した¹²⁾。しかし、近年新たな用途として報告された糖尿病合併症に有効な成分に関しては、salvianolic acid A がアルドース還元酵素阻害活性を有するとの報告¹³⁾ が見られるのみで系統的な研究はなされていなかった。そこで、我々は丹参 (*S. miltiorhiza*) の肝保護活性成分の研究に引き続いて、そのアルドース還元酵素阻害活性成分の研究に取り掛かった。

2.1. 丹参 (*S. miltiorhiza*) の成分¹⁴⁾

中国山東省で採集した丹参 (*S. miltiorhiza*) の根から水及びメタノールエキスを作製し、アルドース還元酵素阻害活性を指標として分離精製を行い (Chart 1)、新 diterpene 2 種 [danshenol A (1), danshenol B (2)] を既知 diterpene 6 種 [dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6), (-)-danshexinkun A (7), sugiol (8)] と共に得た (Chart 2)。

新化合物の danshenol A (1), danshenol B (2) の ¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトルは、それぞれ dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4) のものとよく似ていたが、高分解能マスペクトル測定の結果から共に C₃H₆O (62 amu) 多い組成を持つ事が明らかとなった。その平面構造は、¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY, HMBC スペクトルの解析から決定した。さらに、NOE 差スペクトルの解析によって相対配置を、tris(dipivaloylmethanato)europium [Eu(DPM)₃] による retro-aldol 反応の結果から絶対配置をそれぞれ決定した (Chart 3)。これら両化合物は、

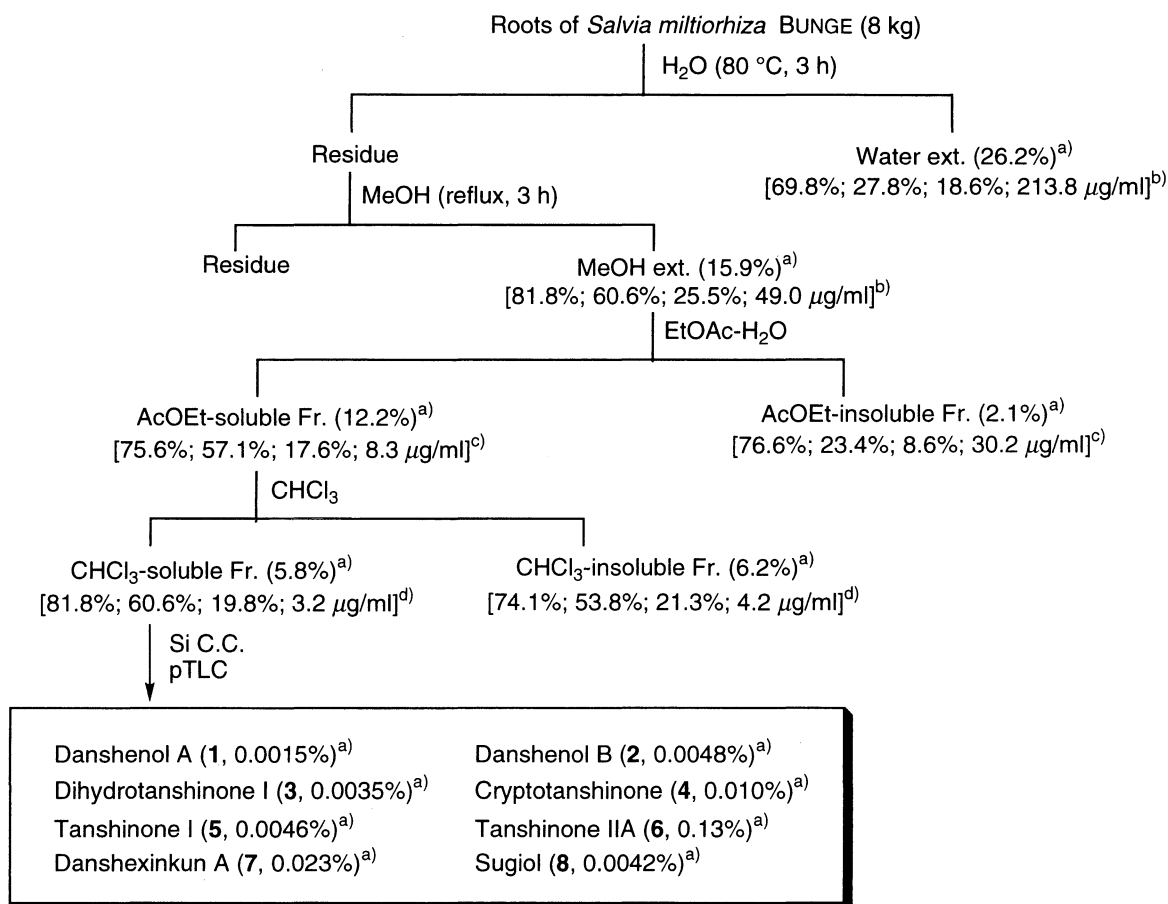


Chart 1 Isolation Procedure of Constituents of *Salvia miltiorhiza* and Inhibitory Activity of Each Fraction. a) Yields from the roots (8 kg). b) Inhibitory rate at 500, 100, and 10 μg/ml and IC₅₀. c) Inhibitory rate at 100, 10, and 5 μg/ml and IC₅₀. d) Inhibitory rate at 10, 5, and 1 μg/ml and IC₅₀.

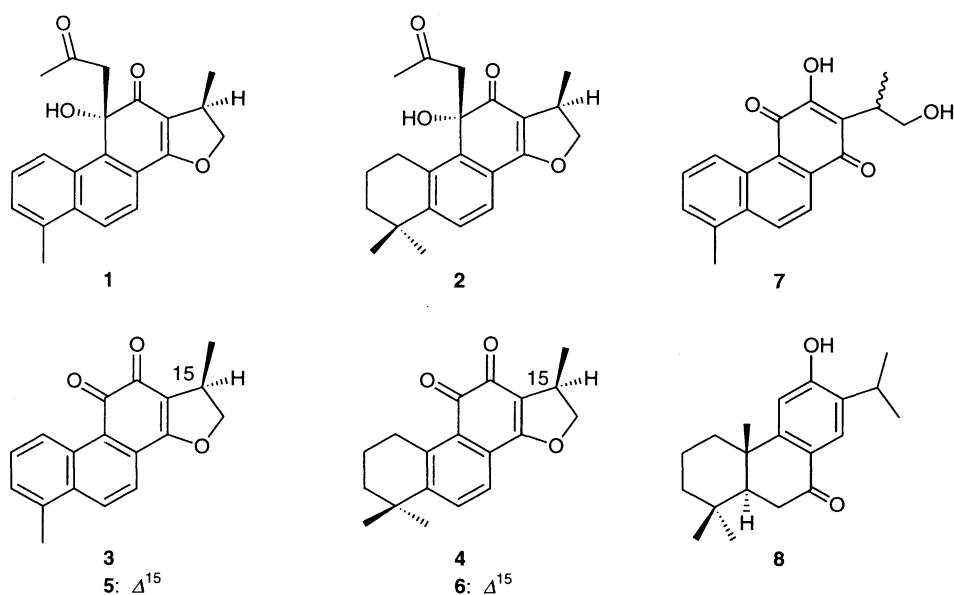


Chart 2 Structures of Diterpenes Isolated from MeOH Extract of *Salvia miltiorhiza*

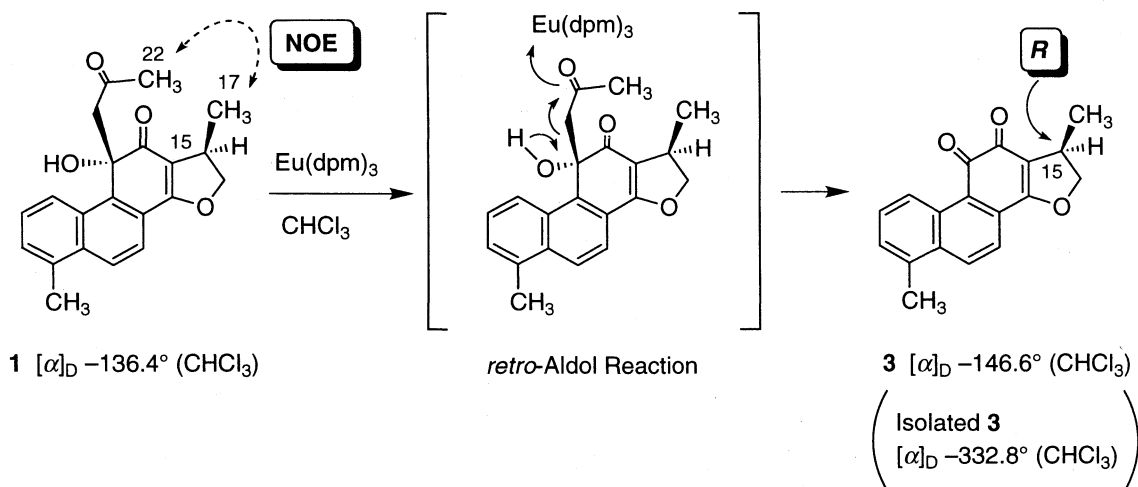


Chart 3 Determination of Stereochemistry of Danshenol A (1)

dihydrotanshinone I (3) 及び cryptotanshinone (4) が acetoacetyl-CoA 由来と推察される C3 unit とアルドール縮合して生じたと考えられる¹⁵⁾。

2.2. 丹参 (*S. miltiorhiza*) 成分のアルドース還元酵素阻害活性¹⁴⁾

上述の丹参 (*S. miltiorhiza*) から単離した diterpene 1-8 のラットレンズ・アルドース還元酵素に対する阻害活性を Table 1 に示した。Danshenol A (1), danshenol B (2), dihydrotanshinone I (3), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6), (-)-danshexinkun A (7) の 5 つは、天然のアルドース還元酵素阻害剤である quercetin¹⁸⁾ (Chart 4) よりも強い阻害活性を示した。特に、最も活性の強かった danshenol A (1) は、臨床で使用されている合成薬の epalrestat¹⁹⁾ (Chart 4) に匹敵する阻害活性を示した。

Table 1. Aldose Reductase Inhibitory Activity^{a)} (IC_{50} , μM) of Compounds 1-8

	Molecular Weight	Experimental IC_{50} (μM)	Yield ^{b)} (%)	Calcd. IC_{50} ^{c)} (μM)
Danshenol A (1)	336	0.10	0.0015	0.014
Danshenol B (2)	354	1.75	0.0048	0.042
Dihydrotanshinone I (3)	278	1.19	0.0035	0.039
Cryptotanshinone (4)	296	10.0	0.010	0.10
Tanshinone I (5)	276	4.80	0.0046	0.051
Tanshinone IIA (6)	294	1.14	0.13	1.39
(-)-Danshexinkun A (7)	296	0.87	0.023	0.24
Sugiol (8)	300	$> 10^{\text{d}}$	0.042	0.043
Quercetin		5.60		
Epalrestat		0.038		

a) Rat rene aldose reductase was prepared by the method of Shimizu *et al.* (reference 16) and inhibitory assay was done by the method of Kador *et al.* (reference 17). b) Yield from the MeOH extract. c) Calculated from the yield (%) of each compound and the IC_{50} of the MeOH extract ($49.0 \mu\text{g}/\text{ml} = 4.9 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{l}$) by the formula; Calcd. IC_{50} (μM) = $(4.9 \times 10^4 \times \text{Yield}) / (\text{Molecular Weight})$. d) Inhibitory rate at $10 \mu\text{M}$ was 30.2%.

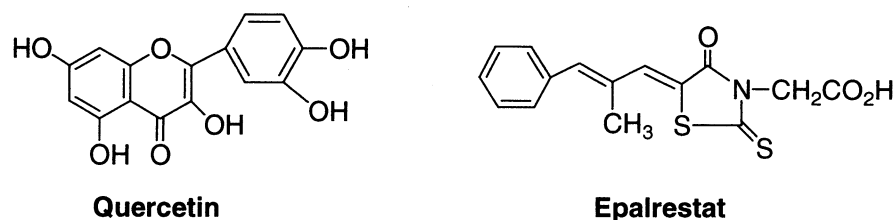


Chart 4 Structures of Quercetin and Epalrestat

ところで、これら各成分の活性と収率を並べて見ているだけでは、どの化合物が丹参メタノールエキスの活性本体かを明らかにするのは困難である。そこで、メタノールエキスの IC_{50} 値 (49.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と化合物の収率 (%) からメタノールエキス中の活性成分がその化合物のみと仮定した時に予想される IC_{50} 値 (理論的 IC_{50} 値) を求めた。その結果、tanshinone IIA (6) の実験的 IC_{50} 値 (1.14 μM) は理論的 IC_{50} 値 (1.39 μM) にほぼ一致し、danshenol A (1) 及び (-)-danshexinkun A (7) の実験的 IC_{50} 値 (1, 0.10 μM ; 7, 0.87 μM) は理論的 IC_{50} 値の数倍 (1, 7倍; 7, 3倍) であった。その他の化合物では、両者の間に一桁から二桁の開きがある。したがって、tanshinone IIA (6) が丹参メタノールエキス中の主活性成分であり、danshenol A (1) 及び (-)-danshexinkun A (7) も活性に寄与していると結論した。

一般に、アルドース還元酵素阻害剤の特徴として、疎水性 (芳香族性) の領域を持つ平面的構造で、電荷移動相互作用が可能な領域を有する必要があるといわれている^{17,20)}。丹参 (*S. miltiorhiza*) から単離した阻害活性を有する化合物 7 種は、naphthalene ring (1, 3, 5, 7) 又は tetrahydronaphthalene ring (2, 4, 6) を平面の疎水性芳香環として持っている。またそれらは、ketone carbonyl (1, 2), ortho-quinone (3-6) 又は para-quinone (7) を有しており、これらが電荷移動相互作用を行う領域を形成していると考えられる。一方、naphthalene ring を有する化合物 (1, 3, 5, 7) は、対応する tetrahydronaphthalene ring を有する化合物 (2, 4, 6) に比べて強い活性を示し、前者の中での活性の強さは 1>7>3>5 の順であり、後者の中での活性の強さは 6>2>4 の順であった。前者の場合、naphthalene ring の存在が適切な疎水性を提供しているため、対応する tetrahydronaphthalene ring を有する化合物よりも強い活性を示し、その活性の強さは電荷移動相互作用を行うカルボニル炭素の電子密度に依存していると考えられる。逆に、tetrahydronaphthalene ring を有する化合物の場合は疎水性が不十分なため、疎水性グループ (6のD環, 2の2-oxopropyl基) の存在によって活性の強さが影響を受けたと考えられる。

3. 新疆丹参 (*S. deserta*) のアルドース還元酵素阻害活性成分

新疆丹参 (*S. deserta*) は、主に中国新疆省および天山山脈中央アジア諸地域に産する *Salvia* 属植物であり²¹⁾、漢薬“丹参”中に混入しているとの調査結果がある⁵⁾。その成分研究はごくわずかであり²²⁾、生理活性成分に関する報告は見られない。前述したように、我々は本植物のメタノールエキスがアルドース還元酵素に対して阻害活性を示した事から、その阻害活性成分の研究に取り掛かった。

3.1. 新疆丹参 (*S. deserta*) の成分²³⁾

中国新疆ウルムチ市郊外にて採取した *S. deserta* の根から丹参 (*S. miltiorhiza*) の場合と同様にメタノールエキスの分離精製を行い (Chart 5)、新 caffeic acid 誘導体 salvianolic acid K (9)

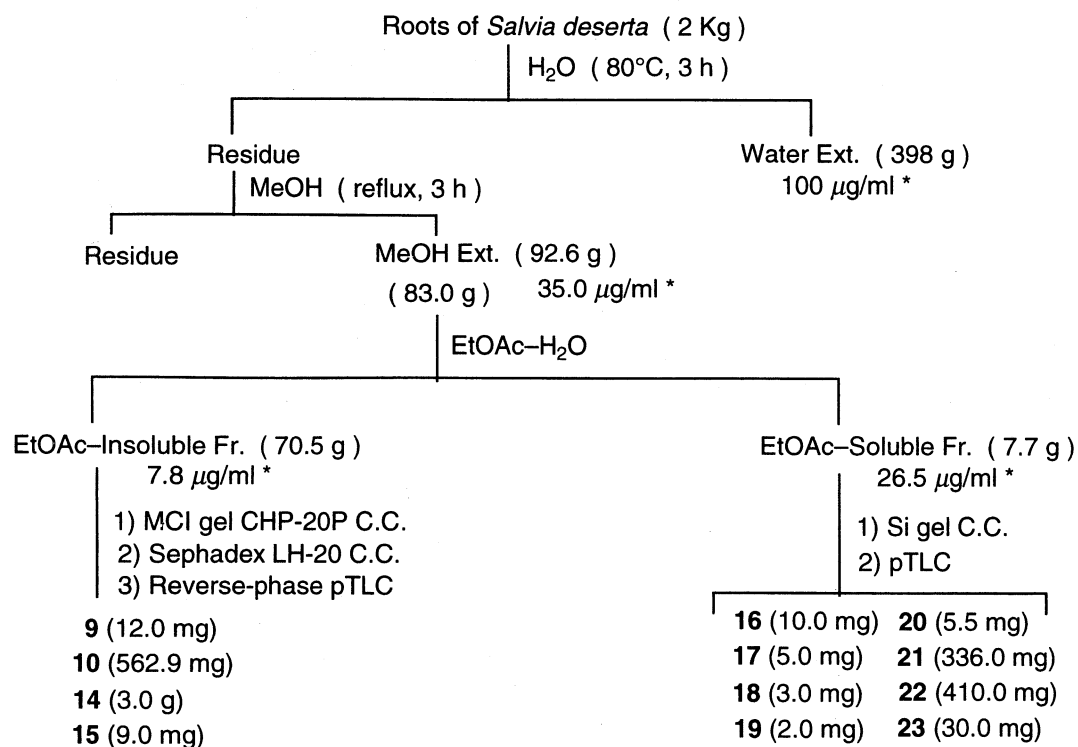


Chart 5 Isolation Procedure of Constituents of *Salvia deserta* and Inhibitory Activity of Each Fraction

*Aldose reductase inhibitory activity (IC_{50}).

を既知 caffeic acid 誘導体 3 種 [salviaflaside (10), rosmarinic acid (11), lithospermic acid B (12)] 及び既知 terpenoid 8 種 [6,7-dehydroroyleanone (13), royleanone (14), taxodione (15), ferruginol (16), 7-*O*-methylhorminone (17), 7-*O*-acetylhorminone (18), horminone (19), daucosterol (20)] と共に得た (Chart 6)。

新化合物 salvianolic acid K (9) の構造は，二次元 NMR を含む各種スペクトルデータの解析 (平面構造)，メチル化とそれに続く diisobutylaluminium hydride (DIBAH) 還元 (C-7''/C-8'' erythro)，改良 Mosher 法²⁴⁾ (7''*R*,8''*R*) 及び heptamethylate 9a のメタノリシス反応 (8'*R*) から決定した (Chart 7)。

3.2. 新疆丹参 (*S. miltiorhiza*) 成分のアルドース還元酵素阻害活性²⁵⁾

新疆丹参 (*S. deserta*) の MeOH エキスから得た caffeic acid 誘導体 4 種 (9-12) 及び terpenoid 8 種 (13-20) の 12 種について，ラットレンズ・アルドース還元酵素に対する阻害活性を測定した (Table 2)。先の丹参 (*S. miltiorhiza*) の活性成分が terpenoid であったのと異なり，新疆丹参 (*S. deserta*) の活性成分は salvianolic acid K (9)，salviaflaside (10)，rosmarinic acid (11)，lithospermic acid B (12) の caffeic acid 誘導体であった。これらの活性はほぼ同程度 (IC_{50} 2.63-3.91 μ M) であるのに対して，含量は大きく異なり salvianolic acid K (9) が主成分であった。したがって，新疆丹参 (*S. deserta*) メタノールエキス中の活性本体は salvianolic acid K (9) と考えられる。これら化合物は carboxylic acid グループに含まれる阻害剤⁷⁾であり，その carboxyl group もしくは phenolic 水酸基が活性発現に重要と思われる。

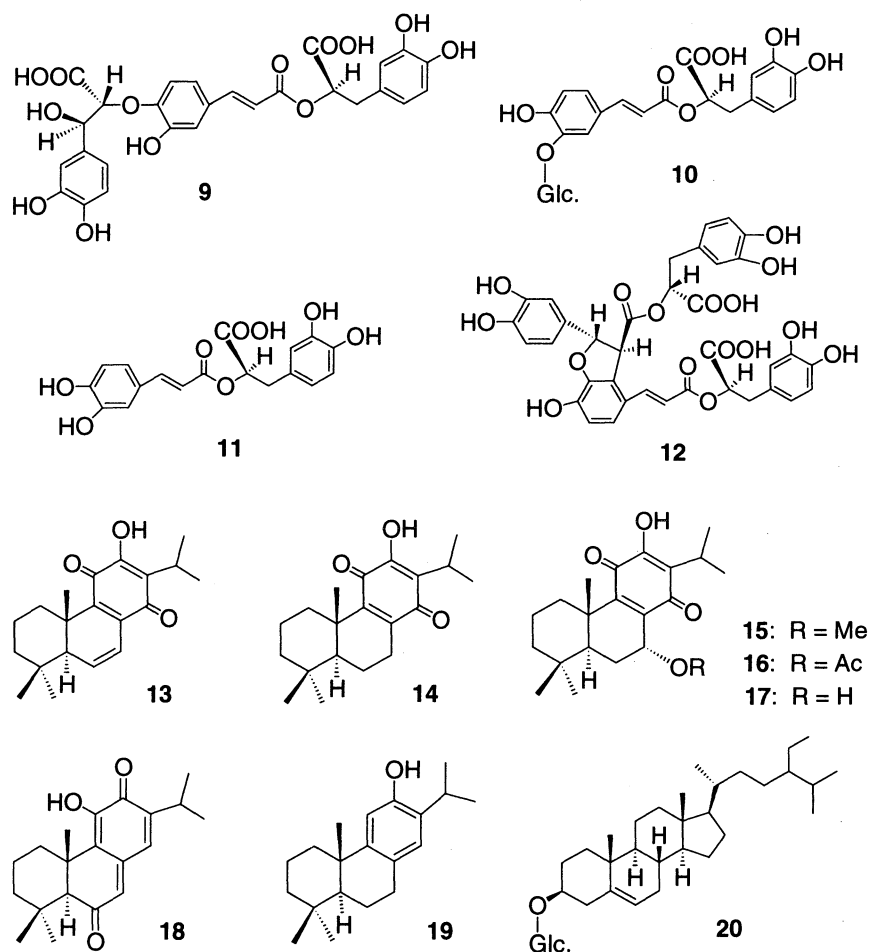
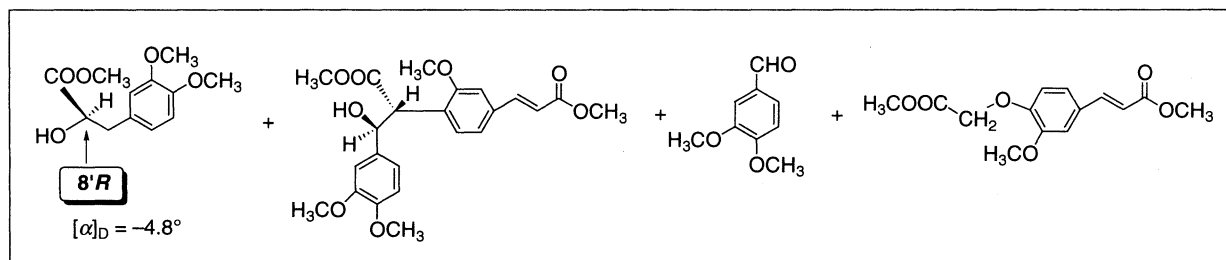
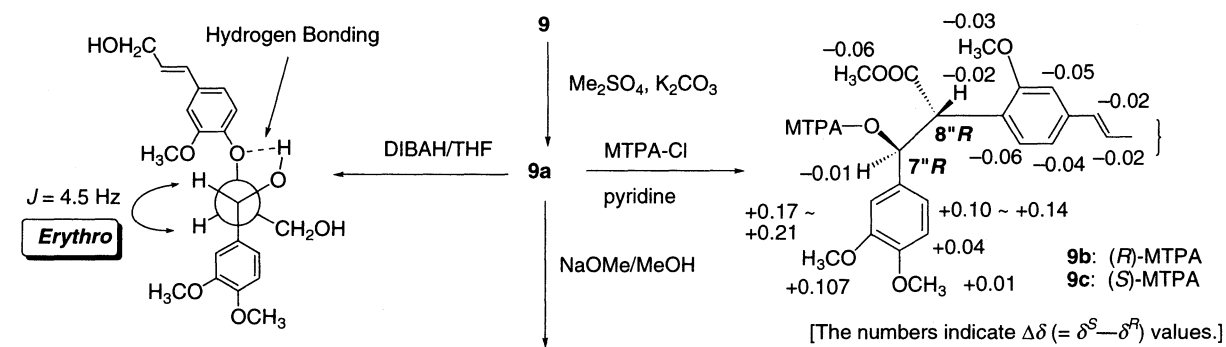
Chart 6 Structures of Compounds Isolated from MeOH Extract of *Salvia deserta*

Chart 7 Determination of Stereochemistry of Salvianolic Acid K (9)

Table 2. Aldose Reductase Inhibitory Activity^{a)} (IC₅₀, μ M) of Compounds 9–20

	Inhibition Rate at 10 μ M	IC ₅₀ (μ M)
9	89.28	2.81
10	87.40	3.15
11	86.79	3.91
12	91.20	2.63
13	37.50	
14	13.90	
15	9.43	
16	14.99	
17	8.56	
18	11.76	
19	36.10	
20	33.52	
Quercetin		5.60
Epalrestat		0.038

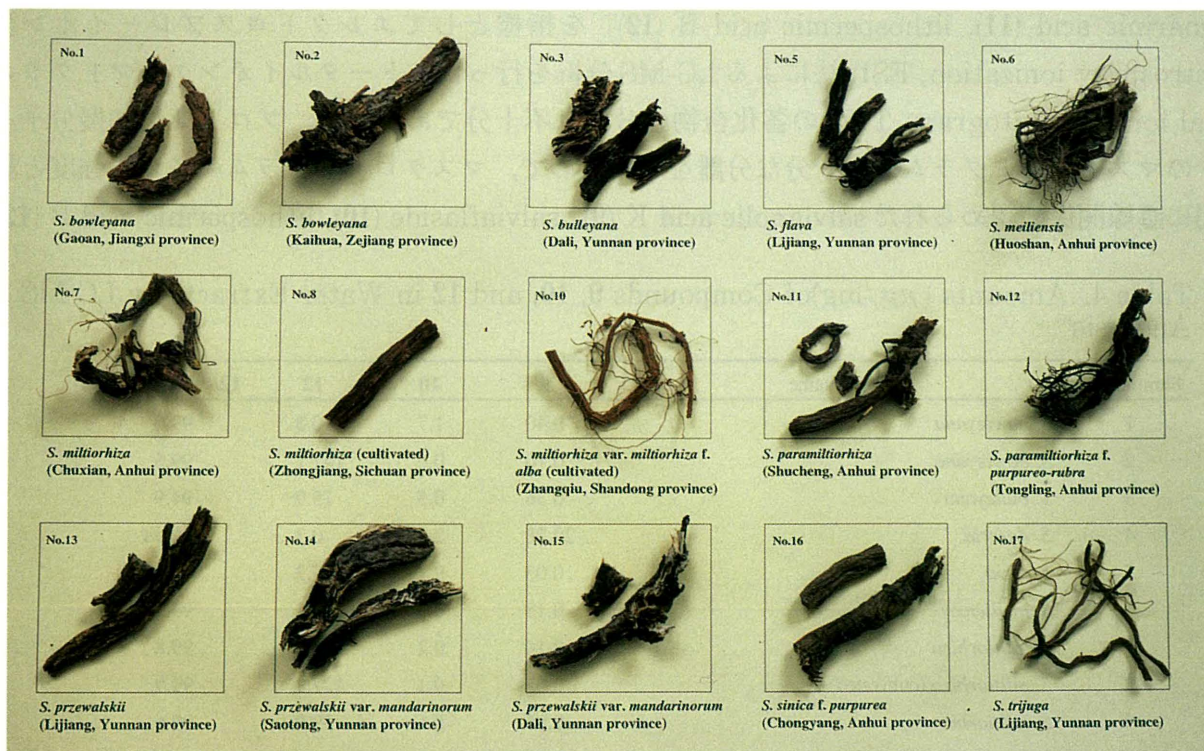
a) Rat rene aldose reductase was prepared by the method of Shimizu *et al.* (reference 16) and inhibitory assay was done by the method of Kador *et al.* (reference 17).

4. *Salvia* 属植物17種類の比較

漢薬“丹参”の基源植物としては、中国薬典に丹参 (*S. miltiorhiza*) の根又は根茎と規定されているが⁴⁾、近年、その他にも11種類の *Salvia* 属植物 (*S. bowleyana*, *S. deserta*, *S. miltiorhiza* var. *miltiorhiza* f. *alba*, *S. paramiltiorhiza*, *S. paramiltiorhiza* f. *purpureo-rubra*, *S. przewalskii*, *S. przewalskii* var. *mandarinorum*, *S. sinica*, *S. sinica* f. *purpurea*, *S. trijuga*, *S. yunnanensis*) が代用品として用いられ、漢薬“丹参”中に混入しているとの調査がなされている^{4,5)}。しかしながら、上述の様に丹参 (*S. miltiorhiza*) の terpenoid 成分は主として ortho-quinone 型の norabietane-type diterpene (1–6) であるのに対し、新疆丹参 (*S. deserta*) の terpenoid 成分は主として para-quinone 型の abietane-type diterpene (13–18) であった。また、酢酸エチル不溶部の caffeic acid 誘導体に関しても、丹参 (*S. miltiorhiza*) は主として四量体12を含んでいるのに対して、新疆丹参 (*S. deserta*) は主として三量体9を含んでいた。さらにアルドース還元酵素阻害活性成分も、丹参 (*S. miltiorhiza*) の場合は低極性の terpenoid であり、新疆丹参 (*S. deserta*) の場合は高極性の caffeic acid 誘導体と全く異なっていた。このように、同じ *Salvia* 属植物でありながら、丹参 (*S. miltiorhiza*) と新疆丹参 (*S. deserta*) では種々の点で違いが見られ、漢薬“丹参”の代用品として用いられている他の *Salvia* 属植物と丹参 (*S. miltiorhiza*) の同等性にも疑問を抱かせる結果であった。そこで、中国より *Salvia* 属植物15種 (Table 3) を入手し、丹参 (*S. miltiorhiza*)、新疆丹参 (*S. deserta*) と共にアルドース還元酵素阻害活性及び LC-MS 分析による比較を行った。

Table 3. List of Plant Name, and Locality of *Salvia* Plants and Yields (% against Roots) and Inhibitory Activities (IS₅₀, $\mu\text{g}/\text{ml}$) of Extracts and Fractions

Sample No.	Plant name	Locality	Water extract		MeOH extract		AcOEt-soluble Fraction		AcOEt-insoluble Fraction	
			Yield ^(a)	IC ₅₀ ^(b)	Yield ^(a)	IC ₅₀ ^(b)	Yield ^(a)	IC ₅₀ ^(b)	Yield ^(a)	IC ₅₀ ^(b)
1	<i>S. bowleyana</i> DUNN	Gaoan, Jiangxi province	23.7	364.7	2.02	99.3	1.37	70.2	0.59	90.0
2	<i>S. bowleyana</i> DUNN	Kaihua, Zhejiang province	27.6	365.1	3.02	98.0	1.99	60.9	0.72	86.1
3	<i>S. bulleyana</i> DIELS	Dali, Yunnan province	11.7	96.9	2.91	99.8	2.18	93.3	0.65	87.1
4	<i>S. deserta</i> SCHANG.	Urumuqi, Xinjiang province	23.4	84.3	3.34	78.5	2.02	76.8	1.16	7.2
5	<i>S. flava</i> FORREST et DIELS	Lijiang, Yunnan province	21.4	228.2	2.14	98.6	1.18	86.3	0.86	70.0
6	<i>S. meliensis</i> S.W.SU	Huoshan, Anhui province	14.6	298.0	3.34	97.2	2.39	61.0	0.87	92.6
7	<i>S. miltiorhiza</i> BUNGE	Chuxian, Anhui province	25.2	223.6	3.38	93.1	2.37	10.8	0.87	89.0
8	<i>S. miltiorhiza</i> BUNGE (cultivated)	Zhongjiang, Sichuan province	24.6	199.8	3.89	93.8	2.53	11.2	1.10	91.3
9	<i>S. miltiorhiza</i> BUNGE	Heze, Shandong province	21.6	211.5	3.56	93.0	2.34	9.9	1.04	91.9
10	<i>S. miltiorhiza</i> BUNGE var. <i>miltiorhiza</i> f. <i>alba</i> C.Y.WU et H.W.LI (cultivated)	Zhangqiu, Shandong province	40.4	197.3	5.17	95.2	3.53	12.5	1.48	88.6
11	<i>S. paramiltiorhiza</i> H.W.LI et X.L.HUANG	Shucheng, Anhui province	40.5	348.7	3.35	96.6	2.22	40.1	0.92	84.0
12	<i>S. paramiltiorhiza</i> f. <i>purpureo-rubra</i> H.W.LI	Tongling, Anhui province	19.7	346.5	2.91	99.1	1.78	41.2	0.99	87.8
13	<i>S. przewalskii</i> MAXIM.	Lijiang, Yunnan province	23.4	83.5	3.34	33.1	2.20	8.6	1.07	8.0
14	<i>S. przewalskii</i> MAXIM. var. <i>mandarinorum</i> STIB.	Saotong, Yunnan province	16.4	84.2	2.55	27.9	1.75	9.3	0.77	8.3
15	<i>S. przewalskii</i> MAXIM. var. <i>mandarinorum</i> STIB.	Dali, Yunnan province	14.5	86.2	3.06	29.8	2.05	7.9	0.87	7.2
16	<i>S. sinica</i> MIGO f. <i>purpurea</i> H.W.LI	Chongyang, Anhui province	28.8	213.1	2.37	97.5	1.30	86.7	0.98	90.9
17	<i>S. trijuga</i> DIELS	Lijiang, Yunnan province	23.3	79.9	5.88	98.8	4.37	19.5	1.26	70.1



4.1. アルドース還元酵素阻害活性の比較²⁵⁾

17種の *Salvia* 属植物から作製した水エキス, メタノールエキス, メタノールエキス酢酸エチル可溶画分, メタノールエキス酢酸エチル不溶画分のアルドース還元酵素阻害活性を収率と共に Table 3 に示した。一般にメタノールエキスが水エキスに比べて強いアルドース還元酵素阻害活性を示すが, *S. bulleyana* (No.3),²⁶⁾ *S. deserta* (No.4),²²⁾ *S. przewalskii* (No.13),²⁷⁾ *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15),²⁸⁾ *S. trijuga* (No.17)²⁹⁾ の水エキスはかなり強い活性を示し高極性活性成分 (例えば caffeic acid 誘導体) の存在を示唆した。またメタノールエキスについて見てみると, *S. miltiorhiza* (No.7-9), *S. miltiorhiza* var. *miltiorhiza* f. *alba* (No.10),²⁶⁾ *S. przewalskii* (No.13),²⁷⁾ *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15),²⁸⁾ *S. trijuga* (No.17)²⁹⁾ は酢酸エチル可溶画分が強い活性を示し低極性活性成分 (例えば tanshinone 類) の存在を示し, *S. deserta* (No.4),²²⁾ *S. przewalskii* (No.13),²⁷⁾ *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15)²⁸⁾ は酢酸エチル不溶画分が強い活性を示し高極性活性成分の存在を示唆した。このようにアルドース還元酵素阻害活性の点から見ると, 同じ *Salvia* 属植物であっても 1) 低極性活性成分を含むタイプ (No. 7-10), 2) 高極性活性成分を含むタイプ (Nos. 3, 4), 3) 両者を含むタイプ (No. 13-15, 17), 4) その他, の複数のタイプの存在が明らかになった。

4.2. 水エキスの LC-MS 分析²⁵⁾

上記の水エキスについて caffeic acid 誘導体 4 種 [salvianolic acid K (**9**), salviaflaside (**10**), rosmarinic acid (**11**), lithospermic acid B (**12**)] を指標としてエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) 法による LC-MS 分析を行った。トータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram, TIC) の各化合物の分離は不十分であったが, プロトン付加擬分子イオンのマスクロマトグラムでは十分な分離を示したので, マスクロマトグラムのイオン強度と量の間に関係の認められた salvianolic acid K (**9**), salviaflaside (**10**), lithospermic acid B (**12**)

Table 4. Amounts ($\mu\text{g}/\text{mg}$) of Compounds **9**, **10**, and **12** in Water Extracts by LC-MS Analysis^{a)}

Sample No.	Plant name	9	10	12	12/(9+10+12) (%)
1	<i>S. bowleyana</i>	0.40	1.7	210.3	99.0
2	<i>S. bowleyana</i>	0.10	0.6	141.1	99.5
3	<i>S. bulleyana</i>	0.36	0.5	15.9	94.9
4	<i>S. deserta</i>	29.28	2.5	0.3	0.94
5	<i>S. flava</i>	0.03	9.7	7.3	42.9
6	<i>S. meiliensis</i>	0.18	0.8	118.1	99.2
7	<i>S. miltiorhiza</i>	0.10	0.2	145.4	99.8
8	<i>S. miltiorhiza</i> (cultivated)	0.05	0.1	127.1	99.9
9	<i>S. miltiorhiza</i>	0.06	0.1	39.0	99.6
10	<i>S. miltiorhiza</i> var. <i>miltiorhiza</i> f. <i>alba</i> (cultivated)	0.14	0.3	116.5	99.6
11	<i>S. paramiltiorhiza</i>	0.02	0.4	130.0	99.7
12	<i>S. paramiltiorhiza</i> f. <i>purpureo-rubra</i>	0.04	0.6	258.3	99.8
13	<i>S. przewalskii</i>	0.02	5.0	6.9	57.9
14	<i>S. przewalskii</i> var. <i>mandarinorum</i>	0.19	5.6	19.0	76.6
15	<i>S. przewalskii</i> var. <i>mandarinorum</i>	0.01	1.5	6.2	80.4
16	<i>S. sinica</i> f. <i>purpurea</i>	0.11	0.4	125.8	99.6
17	<i>S. trijuga</i>	0.04	1.2	77.5	98.4

a) Mass number of the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion and retention time of each compound: **9**, m/z 557.3, t_R 8.82 min; **10**, m/z 523.3, t_R 7.48 min; **11**, m/z 361.3, t_R 8.01 min; **12**, m/z 719.2, t_R 9.20 min.

について定量を行った (Table 4)。一般には lithospermic acid B (12) が高含量に含まれているが, *S. bowleyana* (No.3), *S. deserta* (No.4), *S. flava* (No.5), *S. przewalskii* (No.13), *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15) では低含量であり, lithospermic acid B (9) の含有比は一般には高率であるが, *S. deserta* (No.4), *S. flava* (No.5), *S. przewalskii* (No.13), *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15) は低率であった。したがって lithospermic acid B (12) の含量, 含有率から見ても, *Salvia* 属植物に 1) lithospermic acid B (12) を高含量かつ高率に含むタイプ, 2) lithospermic acid B (12) は低含量だが含有率の高いタイプ, 3) lithospermic acid B (12) の含量も含有率も低いタイプ, 4) その他, の複数のタイプの存在が認められた。さらに, 同じ種に属する植物 [*S. bowleyana* (No.1, 2), *S. miltiorhiza* (No.7-9), *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14, 15)] は同じタイプに属しているが, 化合物 9, 10, 12 の含量にはかなりのバラツキが見られ, 生薬間での成分含量に差が出る可能性を示唆していた。

4.3. メタノールエキスの LC-MS 分析³⁰⁾

メタノールエキス酢酸エチル不溶性画分の LC-MS 分析では, 水エキスと同じ caffeic acid 誘導体が検出された。次に, メタノールエキス酢酸エチル可溶性画分の LC-MS 分析を diterpene 13 種 (1-4, 6-8, and 13-18) を標品として大気圧化学イオン化 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 法にて行った (Chart 8)。

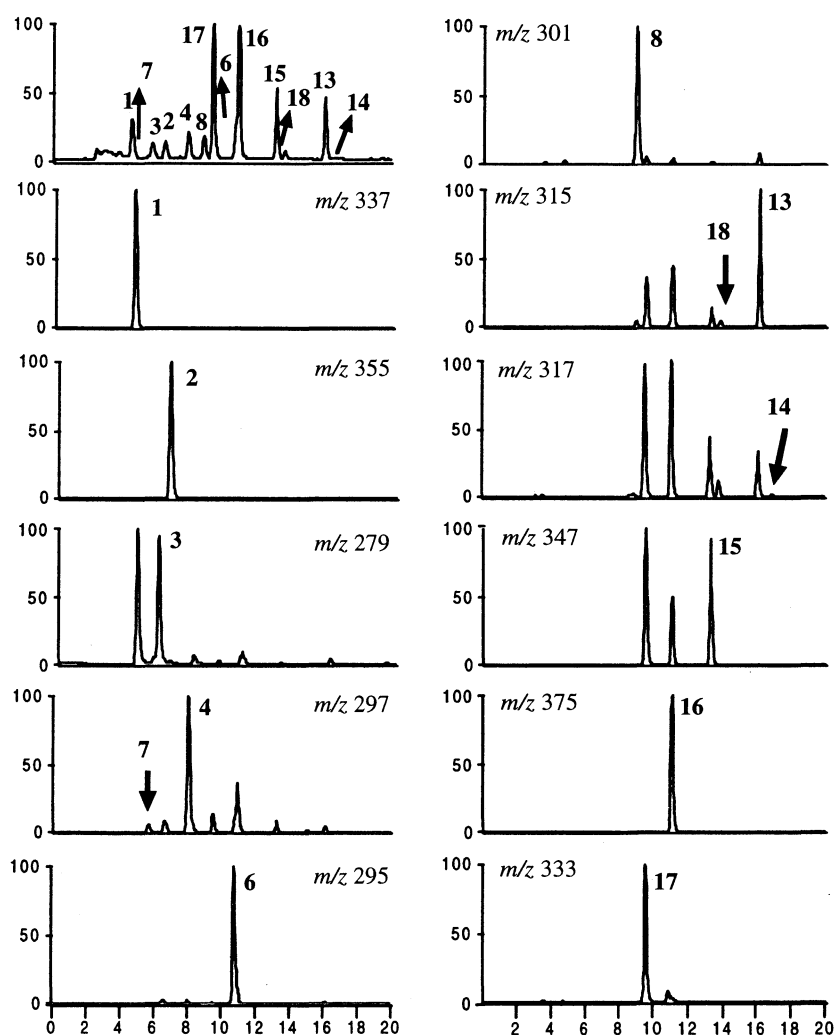


Chart 8 TIC and Mass Chromatograms of a Mixture of Standard Diterpenes

トータルイオンクロマトグラムでは分離（例えば6と19）や感度（例えば17）の不十分なものもあったが、各化合物のプロトン付加擬分子イオンのマスクロマトグラムでは十分な分離と感度が得られた。この条件で各植物のメタノールエキス酢酸エチル可溶部のAPCI-LC-MS測定を行い、得られた各化合物のイオン強度に対して主成分分析³¹⁾を行った。得られた第1から第3主成分までの%Varは71.6%になり、もとのイオン強度の状況を良好に反映していた。各植物の第1から第3主成分についてのKarhunen-LoèveプロットをChart 9に示したが、第3主成分の値は*S. deserta* (No.4) と *S. paramiltiorhiza* f. *purpureo-rubra* (No.12) が他と離れる以外はほぼ原点にまとまっていた。しかし、第1主成分と第2主成分の分布を見ると (Chart 9a), ほぼ同じ主成分値を有するもの [*S. bulleyana* (No.3), *S. flava* (No.5), *S. przewalskii* var. *mandarinorum* (No.14), *S. sinica* (No.16)] もあるが、その分布は様々であり、同じ *Salvia* 属植物であっても terpenoid 成分の組成や含量が様々である事を示していた。

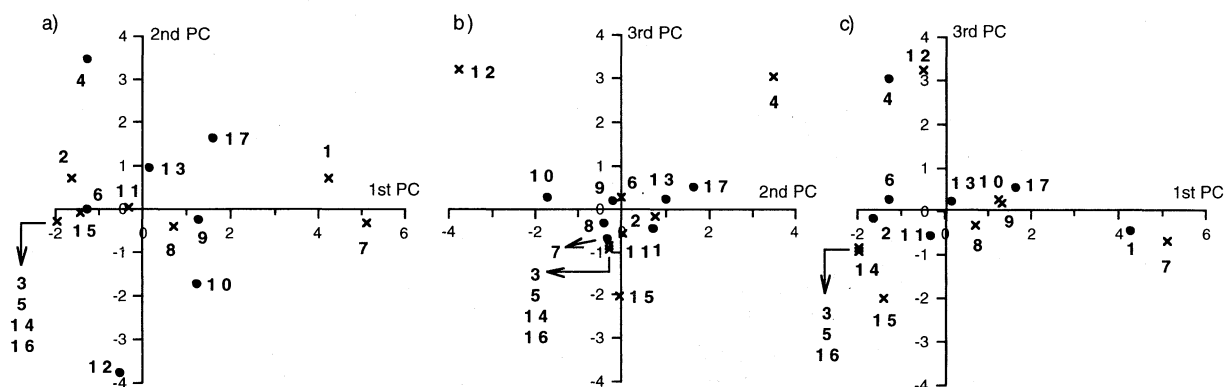


Chart 9 Karhunen-Loève Plots of 1st-2nd(a), 2nd-3rd(b), and 1st-3rd(c) Principle Components Each number indicates the each sample number in Table 3.

●, × : Positive and negative sign, respectively, with regard to the third axis.

5. おわりに

丹参 (*S. miltiorhiza*) と新疆丹参 (*S. deserta*) の成分及びアルドース還元酵素阻害活性成分において、両者の間に大きな差が見られた。また、*Salvia* 属植物17種について行ったアルドース還元酵素阻害活性の比較、水エキスのLC-MS分析、メタノールエキスのLC-MS分析においても、複数のタイプの存在や成分含量のバラツキが認められた。これらの結果は、漢薬“丹参”として用いられている *Salvia* 属植物は必ずしも同等ではない事を示している。この植物間の活性及び成分のバラツキの原因は、種の違い、採集時期の違い、産地の違い、個体の違い等、種々考えられ、これらの点は今後検討する必要がある重要な課題である。しかし、特別の考慮を払わずに集めた植物間で上記のような差が見られたという事から、丹参 (*S. miltiorhiza*) の代用品として他の *Salvia* 属植物を用いる場合には、作用や成分を考慮した上で用いる必要があると考えられる。

このように同属植物が代用品として用いられる事は漢薬“丹参”に限らず多くの生薬において認められる事である。今回の結果はそのような生薬においても成分や活性の差異に注意を払う必要がある事を示している³²⁾。また、それら同属植物間の成分比較にLC-MS等のクロマトグラフィ連結マススペクトルと主成分分析の組み合わせが有用な手法となる可能性も示している。

謝 辞 本研究は、主として熱娜卡斯木博士によって行われたことを付記する。丹参 (*S. miltiorhiza* BUNGE) を同定して頂いた富山医科薬科大学和漢薬研究所付属薬効解析センター小松かつ子助教授、新疆丹参 (*S. deserta* SCHANG) を同定して頂いた中国新疆医学院 X.-H. Ma 教授に深謝致します。*S. miltiorhiza*, *S. deserta* の入手に御協力頂いたアルプス薬品工業(株)並びに他の *Salvia* 属植物を提供して頂いた中国薬科大学 Z.-N. Gong 博士に深謝致します。その他本研究に御協力頂いた多くの方々に深謝致します。

引用文献及び注記

- 1) Pharmacopoeia Committee of the Health Ministry of the People's Republic of China (ed.), "Pharmacopoeia of People's Republic of China," Vol.1, Guangdong Scientific Technologic Publisher, Guangdong, 1995, pp. 62-63.
- 2) Jiang Su New Medicinal College (ed.), "Dictionary of Chinese Crude Drugs," Shanghai Scientific Technologic Publisher, Shanghai, 1977, pp. 478-482; Namba T., "The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with Color Pictures," Vol. I, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, 1993, pp. 24-25.
- 3) Bai Y.-L., *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, **4**, 86 (1984); Bi X.-L., Zhou G.-L., Wang Z., Pan W.-M., Zhu L., Kang Y.-P., *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, **8**, 84-85 (1988).
- 4) Xu G. J., Xu L. S. (ed.), "Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs," South-China Edition Vol. I, Fujian Science and Technology Press, Fuzou, 1994, pp. 140-168.
- 5) Komatsu K., Sato T., Li X. B., Yamaji S., Namba T., Abstracts of Papers, The 117th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 1997, Part 2, pp. 119.
- 6) Tang W., Eisenbrand G., "Chinese Drugs of Plant Origin," Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp. 891-902.
- 7) Kador P. F., Kinoshita J. H., Sharpless N. E., *J. Med. Chem.*, **28**, 841-849 (1985); Hotta N., Sakamoto N., *The Diabetes Annual*, **5**, 330-361 (1990); Sarges R., Oates P. J., *Prog. Drug. Res.*, **40**, 99-161 (1993).
- 8) Li L.-N., Tan R., Chen W.-M., *Planta Med.*, **50**, 227-228 (1984); Ai C.-B., Li L.-N., *J. Nat. Prod.*, **51**, 145-149 (1988); Ai C.-B., Li L.-N., *Planta Med.*, **58**, 197-199 (1992).
- 9) Tanaka T., Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., Yokozawa T., Chung H. Y., Oura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 340-344 (1989).
- 10) Fang C.-N., Chang P.-L., Hsu T.-P., *Acta Chim. Sinica*, **34**, 197-209 (1976); Zu X.-X., Yu M.-H., Wang Z.-Q., Zhong X.-L., Cheng S.-H., Jin H.-M., Yan Y.-Z., Zhu Z.-R., *Chinese Journal of Internal Medicine*, **24**, 197-199 (1985); Honda G., Koezuka Y., Tabata M., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 408-411 (1988); Yokozawa T., Chung H. Y., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 316-320 (1988); Kohda H., Takeda O., Tanaka S., Yamasaki K., Yamashita A., Kurokawa T., Ishibashi S., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1287-1290 (1989).

- 11) Yokazawa T., Zhou J. J., Hattori M., Inaba S., Okada T., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Jpn. J. Nephrol.*, **37**, 105–111 (1995).
- 12) Hase K., Kasimu R., Basnet P., Kadota S., Namba T., *Planta Med.*, **63**, 22–26 (1997).
- 13) Du G.-H., Qiu Y., Tian Y.-E., Zhang J.-T., *Acta Pharm. Sinica*, **30**, 561–566 (1995).
- 14) Tezuka Y., Kasimu R., Basnet P., Namba T., Kadota S., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1306–1311 (1997); Kasimu R., Basnet P., Tezuka Y., Kadota S., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 564–566 (1997).
- 15) Keogh M. F., O'Donovan D. G., *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 1792–1797.
- 16) Shimizu M., Ito T., Terashima S., Hayashi T., Arisawa M., Morita N., Kurokawa S., Ito K., Hashimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2733–2736 (1990).
- 17) Kador P. F., Sharpless N. E., *Biophys. Chem.*, **8**, 81–85 (1978).
- 18) Varma S. D., Mikuni I., Kinoshita J. H., *Science*, **188**, 1215–1216 (1975); Varma S. D., Kinoshita J. H., *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2505–2513 (1976).
- 19) Terashima H., Hama K., Yamamoto R., Tsuboshima M., Kikkawa R., Hatanaka I., Shigeta Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 226–230 (1984).
- 20) Lee Y. S., Pearlstein R., Kador P. F., *J. Med. Chem.*, **37**, 787–792 (1994); Kador P. F., Sharpless N. E., *Mol. Pharmacol.*, **24**, 521–531 (1983); Kador P. F., Goosey J. D., Sharpless N. E., Kolish J., Miller D. D., *Eur. J. Med. Chem.*, **16**, 293–298 (1981).
- 21) Konta F., Shimizu T., “Flowering Plants and Ferns of the Tianshan Mountains in China,” Tombow Publisher, Osaka, 1996, pp. 110, 195; Borisova A. G., Volkova E. V., Gorshkova S. G., Klokov M. V., Knorring O. E., Kupriyanova L. A., Pobedimova E. G., Poyarkova A. I., Yuzepchuk S. V., “Flora of the U.S.S.R.,” Shishkin B. K. (ed.), Vol. 21, Koeltz Scientific Books, Koenigstein, 1987, pp. 248–249; Botanical Institute of Yunnan, Nanjing College of Pharmacy (ed.), “Flora Reipublicae Popularis Sinicae,” Vol. 66, Science Press, Beijing, pp. 161, 166, 168.
- 22) Savona G., Bruno M., Rodriguez B., Marco J. L., *Phytochemistry*, **26**, 3305–3308 (1987); von Patudin A., Romanowa A., Sokolow W. S., Pribylowa G., *Planta Med.*, **26**, 201–207 (1974); Romanova A. S., Pribylova G. F., Patudin A. V., Leskova E. S., Pakaln D. A., Ban'kovskii A. I., *Khim. Prirodn. Soedin*, **1972**, 237 [*Chem. Nat. Prod.*, **1971**, 231–232].
- 23) Tezuka Y., Kasimu R., Li J.-X., Basnet P., Tanaka K., Namba T., Kadota S., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 107–112 (1998).
- 24) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092–4096 (1991).
- 25) Kasimu R., Tanaka K., Tezuka Y., Gong Z.-N., Li J.-X., Basnet P., Namba T., Kadota S., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 500–504 (1998).
- 26) *Salvia miltiorhiza* var. *miltiorhiza* f. *alba* 及び *Salvia bulleyana* の成分に関する報告は見られない。
- 27) *S. przewalskii* の成分に関する報告 : Xu X.-L., Xiao Z.-Y., *Chin. Trad. Herb. Drugs*, **13**, 485–488 (1982); Xu X.-M., Xiao Z.-Y., *Chin. Trad. Herb. Drugs*, **15**, 1–4 (1984); Wang N., Niwa M., Luo H.-W., *Phytochemistry*, **27**, 299–301 (1988); Wang N., Luo H.-W., *Chin.*

- Trad. Herb. Drugs*, **20**, 150–151 (1989); Li B., Niu F.-D., Lin Z.-W., Zhang H.-J., Wang D.-Z., Sun H.-D., *Phytochemistry*, **30**, 3815–3817 (1991); Lu X.-Z., Xi W.-H., Shen J.-X., Naoki H., *Chin. Chem. Lett.*, **2**, 301–302 (1991).
- 28) *S. przewalskii* var. *mandarinorum* の成分に関する報告 : Yang B., Qian M., Qin G., Chen Z., *Acta Pharm. Sin.*, **16**, 837–841 (1981); Yang B.-J., Huang X.-L., Zhou Q.-R., *Acta Pharm. Sin.*, **19**, 274–281 (1984).
- 29) *S. trijuga* の成分に関する報告 : Yang B., Huang X., Hu Z., Chen Z., *Acta Pharm. Sin.*, **17**, 517–520 (1982); Yang B.-J., Huang T.-L., Hu Z.-B., Chen Z.-X., *Chin. Pharm. Bull.*, **17**, 242 (1982); Lu X., Luo H., Niwa M., *Planta Med.*, **56**, 87–88 (1990); Lu X. Z., Luo H. W., Ji L., Cai H., *Acta Pharm. Sin.*, **26**, 193–196 (1991).
- 30) Kasimu R., Tezuka Y., Tanaka K., Gong Z.-N., Li J.-X., Basnet P., Namba T., Kadota S., *J. Trad. Med.*, **15**, 109–115 (1998).
- 31) Aries R. E., Lidiard D. P., Spragg R. A., *Chemistry in Britain*, **1991**, 821–824; 宮下芳勝, 佐々木慎一, “ケモメトリックス 化学パターン認識と多変量解析,” 共立出版株式会社, 東京, 1995, pp. 17–46.
- 32) 我々の行った升麻や中国・東北地方産 *Veratrum* 属植物の成分研究においても, 代用植物間の成分の違いが認められている。升麻関連文献 : Li J. X., Kadota S., Hattori M., Yoshimachi S., Shiro M., Ogami N., Mizuno H., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 832–841 (1993); Li J. X., Kadota S., Pu X. F., Namba T., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4575–4576 (1994); Kadota S., Li J. X., Tanaka K., Namba T., *Tetrahedron*, **51**, 1143–1166 (1995). *Veratrum* 属植物関連文献 : Zhao W., Tezuka Y., Kikuchi T., Chen J., Guo Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2920–2928 (1989); Zhao W., Tezuka Y., Kikuchi T., Chen J., Guo Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 549–554 (1991); Tezuka Y., Kikuchi T., Zhao W., Chen J., Guo Y., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1078–1081 (1998); Tezuka Y., Kikuchi T., Zhao W., Chen J., Guo Y., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1397–1399 (1998).