



YAKUGAKU ZASSHI

Journal of the Pharmaceutical Society of Japan

Z19-411
125(-)(Suppl.3)
2005.11.10・11



1200600361380



Vol.125 Suppl.3

薬学 雑誌

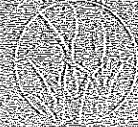
第15回 天然薬物の開発と応用シンポジウム

15th Symposium on the Development and Application
of Naturally Occurring Drug Materials

講演要旨集

2005年11月10日(木)~11月11日(金)

東京



http://www.psj.or.jp

PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN

B2-3

エストロゲン活性「プエラリア」の分析的ならびに臨床的アプローチ

¹千葉大院薬, ²白鳥製薬, ³群大医下川 聡子¹, ○熊本 卓哉¹, 石川 勉*¹, 樋口 義洋², 澤田 芳枝³, 佐藤 哲郎³, 酒巻 哲夫³

ANALYTICAL AND CLINICAL APPROACHES TO ESTROGENIC "PUERARIA"

Satoko Shimokawa,¹ ○ Takuya Kumamoto,¹ Tsutomu Ishikawa,*¹ Yoshihiro Higuchi,² Yoshie Sawada,³ Tetsuro Sato³ and Tetsuo Sakamaki³

1 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

2 Shiratori Pharmaceutical Co. Ltd.

3 Medical Informatics and Decision Sciences, Gunma University School of Medicine

Identification method of estrogenic "Pueraria", tuberous root of *Pueraria mirifica*, by HPLC analysis was established. This HPLC condition was successfully applied to the quantification of representative components, miroestrol and kwakhurin and the simple isolation of estrogenically active miroestrol and deoxymiroestrol. Preliminarily clinical approaches suggested that "Pueraria" could be used as a complementary alternative medicine.

Keywords: *Pueraria mirifica*, phytoestrogen, miroestrol, deoxymiroestrol, kwakhurin.

緒言 「プエラリア」は、タイ原産マメ科ズ属の *Pueraria mirifica* の塊状根を乾燥したもので、現地では回春秘薬 "Kwao Keur" として用いられている。強力なエストロゲン活性を示すことから、更年期障害や骨粗鬆症などに有効な女性ホルモン剤の代替品として期待されている。活性本体は、ユニークな架橋構造を持つ変形イソフラボノイド miroestrol (1) であることが知られていたが、¹⁾ 我々は *P. mirifica* の成分について再検討を行い、1 の約 10 倍程度強い活性を持つ新規化合物 deoxymiroestrol (2) の単離に成功した。²⁾ また、本植物の固有成分として知られている kwakhurin (3) に、弱いもののエストロゲン活性があることを示した (Fig. 1)。³⁾ この植物は日本でも健康食品として販売されているが、本植物の地上部が他のマメ科植物と類似していること、タイからの輸出が粉末状に破碎されたものに限定されているなどの問題から、いわゆる「紛い物」が出回っており、本植物の品質管理のための鑑定法の確立は急務であった。また、1, 2 いずれも含有量は微量であるが、活性本体ということで、効率的な単離法の開発が望まれていた。今回我々は、「プエラリア」およびその活性成分の安定供給を目指し、(1) 1 および 3 の含有の有無を指標とする「プエラリア」の鑑定法の開発、(2) 1 および 2 (以下ミロエステロール類) の簡易単離法の開発を目的とし、検討を行った。さらに初期データではあるが、「プエラリア」の臨床学的アプローチも行った。

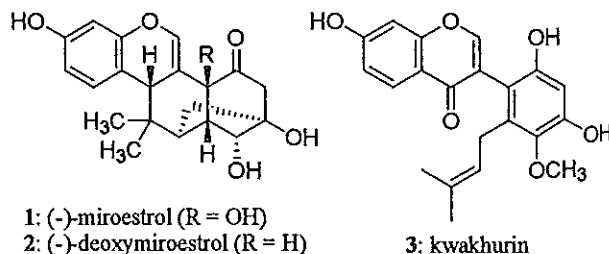


Fig. 1. Structures of Representative Components of *P. mirifica*

(1
わ
は、
器
に
1,
cou

Fig.
UV
H₂C

Fig
UV
H₂

(1) Miroestrol (1) および kwakhurin (3) を指標とする「プエラリア」の鑑定法の開発 い
 わゆる「プエラリア」中の miroestrol (1) および kwakhurin (3) 含有の有無の分析について
 は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の保持時間およびフォトダイオードアレー検出
 器による UV スペクトルの比較により決定することとした。すなわち、天然より単離した
 1, および全合成⁴⁾ により得た 3 を標品として用い、他の成分 (daizein, genistein,
 coumestrol など) のピークを同定しながら分離条件を検討したところ、1 についてはカラ

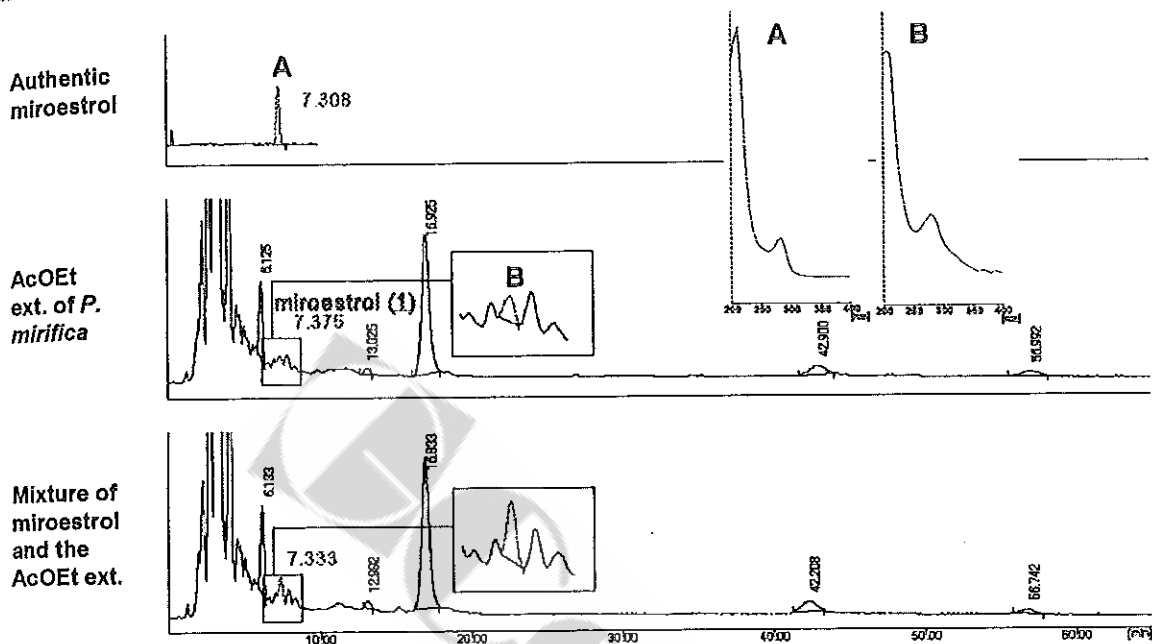


Fig. 2. HPLC Charts of Miroestrol (1) (top), AcOEt Extract of *P. mirifica* (middle), and their Mixture (bottom) and UV Spectra of Pure 1 (A) and Separated-Peak Corresponding to 1 (B). Conditions: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, CH₃CN : H₂O = 1 : 3, 1.0 mL/min, 254 nm.

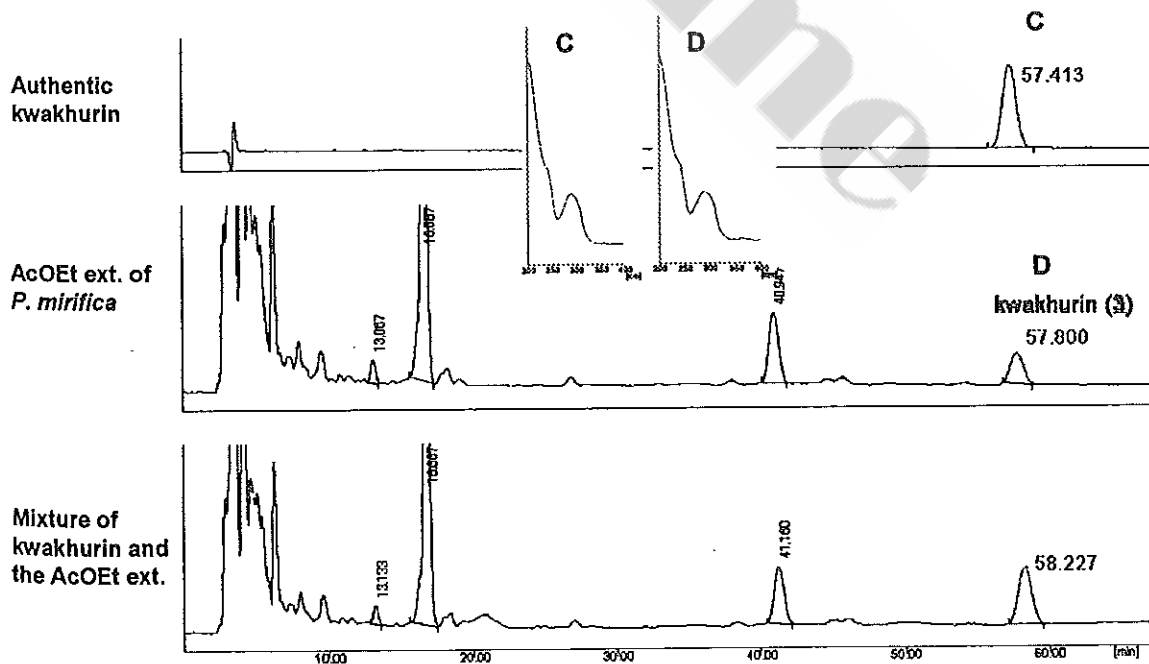


Fig. 3. HPLC Charts of Kwakhurin (3) (top), AcOEt Extract of *P. mirifica* (middle), and their Mixture (bottom) and UV Spectra of Pure 3 (C) and Separated-Peak Corresponding to 3 (D). Conditions: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, CH₃CN : H₂O : AcOH = 250 : 750 : 1, 1.0 mL/min, 254 nm.

ムとして COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 展開溶媒 CH₃CN : H₂O = 1 : 3, そして 3 については先の展開溶媒に少量の酢酸を添加すると, 分析に耐え得ることがわかった. その際, 1 は 6.5 min 付近に他のピークと近い位置に観察されたが (Fig. 2), 3 は 56 min 付近に観測され他のピークと十分に分離しており, 基準物質としてより適当である (Fig. 3). ここで確立された方法を用い, 他の異なるロットのタイ産, およびミャンマー産の *P. mirifica*, およびいくつかの加工品について分析したところ, 我々が研究材料とするいずれも 1 および 3 を含むことを確認した. また, この分離条件を元に検量線を作成し, 酢酸エチル (AcOEt) エキス中の 1 および 3 の定量を行ったところ, それぞれ 0.004%, 0.006% となり, 以前の単離実験での結果^{2,3)} とほぼ一致した.

(2) Miroestrol (1) および deoxymiroestrol (2) の簡易単離法の開発 *P. mirifica* の AcOEt エキスの MeOH 可溶部 (Fig. 4, 左) に対し, 順相カラムクロマトグラフィー (CC) (Biotage 社製シリカゲル, hexane : AcOEt = 1 : 3) で精製し, ミロエステル類を含む画分 (Fig. 4, 右) を得た. このものをさらに逆相 CC (Biotage C18HS 25+M, CH₃CN : H₂O : AcOH = 200 : 800 : 1 → 250 : 750 : 1) により精製し, それぞれ比較的高い純度の 1 および 2 を含むフラクション (Fig. 5, 上段) を得た. これらは EtOH で洗浄すると, ほぼ純品の 1 および 2 を与えた (Fig. 5, 下段). このことは, たった 2 回のカラム精製と 1 回の洗浄操作により, 活性本体のミロエステル類を高純度で単離することが可能であることを意味する. ここで収率はそれぞれ 0.0013% (1), 0.0027% (2) であった.

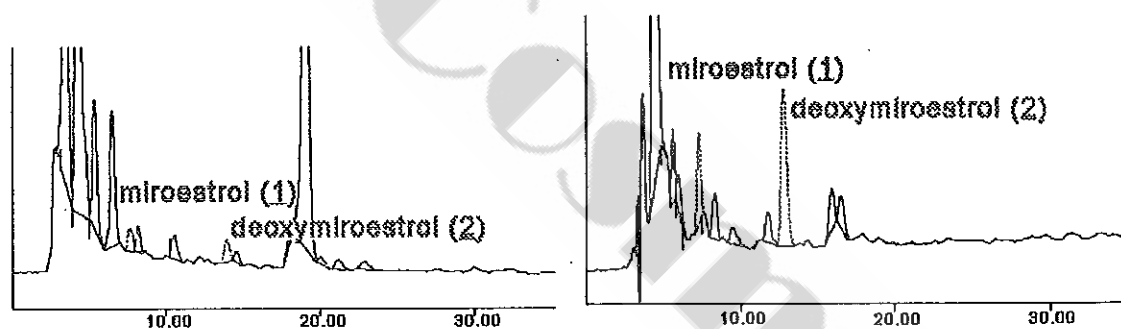


Fig. 4. HPLC Charts of Fractions from *P. mirifica*. Left: MeOH-soluble Part of AcOEt Extract. Right: Fraction Purified by Normal Phase CC (Conditions: Biotage Si 40+M, Hexane : AcOEt = 1 : 3).

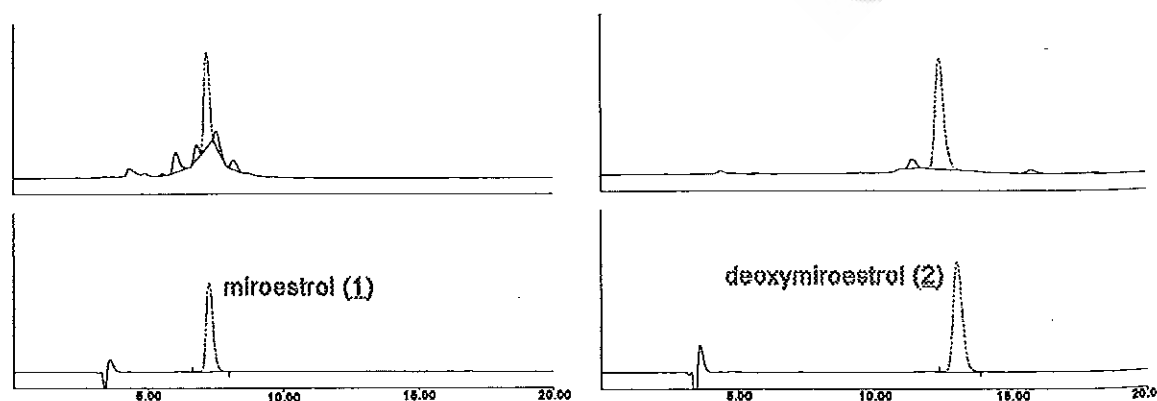


Fig. 5. HPLC Charts of Fractions Containing 1 (left) and 2 (right). Uppers: after Reverse Phase CC (Conditions: Biotage C18HS 25+M, CH₃CN : H₂O : AcOH = 200 : 800 : 1 → 250 : 750 : 1, Lovers: Washed with EtOH.

Fig

結 っ kv エリ 率 回 っ 下 し

参 1) Cl H I S I D

(3) 臨床的アプローチ

これまでに単離されたミロエステロール類についての若干の生化学的データ⁵⁾がすでに報告されていたが、今回健康常人に対し、直接「プエラリア」を用いて臨床的にアプローチした。「プエラリア」投与前、投与開始1ヶ月後および2ヶ月後、さらに投与中止後1ヶ月のホルモンレベルなどをプラセボと比較し調査した。その結果、「プエラリア」服用者では卵胞刺激ホルモン (FSH) の減少、高比重リポタンパク (HDL) の増加、および低比重リポタンパク (LDL) の減少が観察された (Fig. 6)。

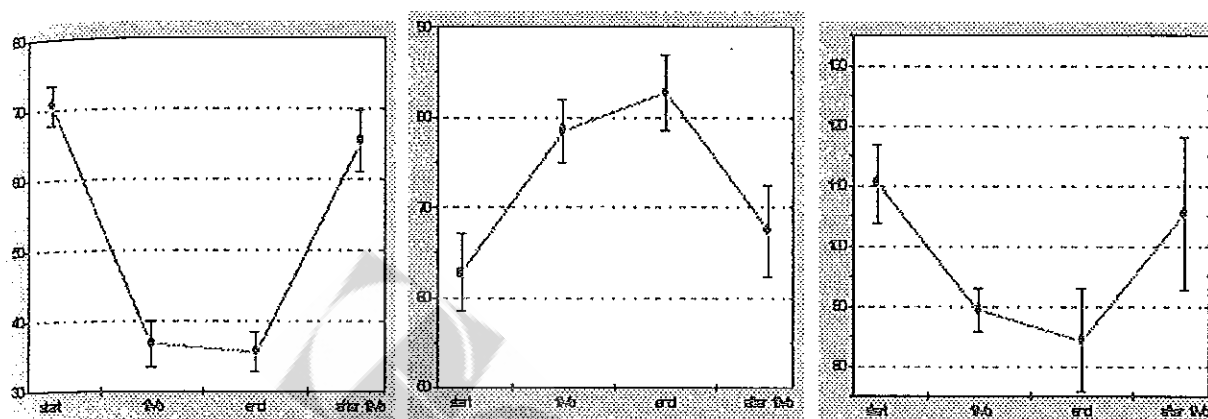


Fig. 6. Effects of *P. mirifica* on FSH (left), HDL (middle), and LDL (right)

結論 このように、我々は、新規女性ホルモン代替品として期待される「プエラリア」について、HPLCの保持時間とUVスペクトルの比較によるmiroestrol (1) およびkwakhurin (3) を指標とした新規鑑定法を開発した。さらにここで得られた分離条件を元に、エキス中の1と3を定量した。本法は、そのエキスを1度HPLC分析にかけることにより、それが「プエラリア」であるかどうかの同定、および含有有効成分の定量が行える効率的な方法であるといえる。一方、*P. mirifica*のAcOEtエキスから2回のカラム精製と1回の洗浄操作により活性本体のミロエステロール類が比較的容易に単離できることがわかった。さらに初期データではあるが、「プエラリア」を服用することで、FSHやLDLの低下、およびHDLの増加などの現象が観察され、真の「プエラリア」はホルモン代替品として極めて有望で、高齢化社会でのQOL改善に薬学的に寄与し得ることが示唆された。

参考文献

- 1) Cain J. C., *Nature*, 188, 774-777 (1960).
- 2) Chansakaow S., Ishikawa T., Seki H., Sekine K., Okada M., Chaichantipyth C. *J. Nat. Prod.*, 63, 173-175 (2000).
- 3) Chansakaow S., Ishikawa T., Sekine K., Okada M., Higuchi Y., Kudo M., Chaichantipyth C. *Plant Med.*, 66, 572-574 (2000).
- 4) Ito F., Iwasaki M., Watanabe T., Ishikawa T., Higuchi Y., *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 674-681.
- 5) Matsumura A., Ghosh A., Pope G. S., Darbre P. D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 94, 431-443 (2005).