

Fig. 6. Typical chromatograms of crude methanolic extract of the referential *Passiflora* plants
Compounds 1 to 4 are isoorientin, orientin, vitexin and isovitexin, respectively.
Each allow indicates the characteristic peak except for the referential compounds. MC means mass chromatogram.

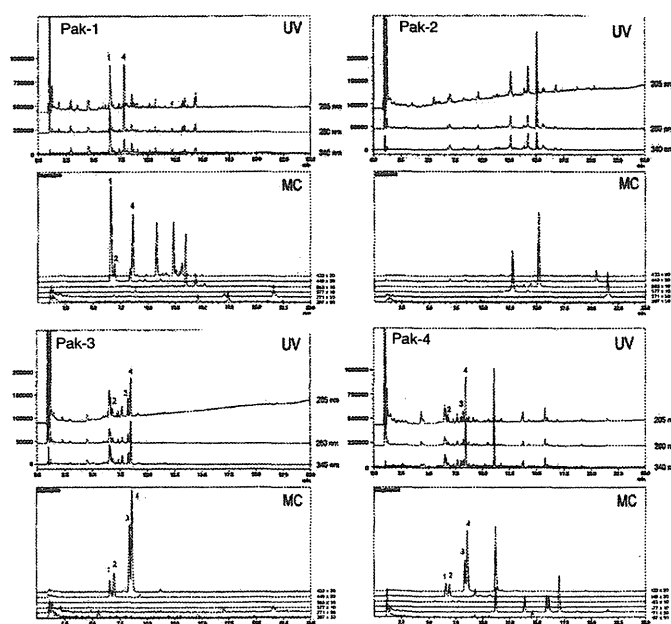


Fig. 7. Typical chromatograms of crude methanolic extract of the commercial passion flower products
Compounds 1 to 4 are isoorientin, orientin, vitexin and isovitexin, respectively. MC means mass chromatogram.

3)、各試料の帰属は、遺伝子型に基づく分類と良く一致し、type 3 が、type 1 と type 2 の中間型の成分組成を示した。ITS1 塩基配列において、type 1 と type 2 の混合物の配列である type 3 の遺伝子型を示した 4 試料のうち、Pa-19 ~ Pa-21 は、果実採集用に品種改良された種であり、これらは、*P. edulis* と *P. edulis* f. *flavicarpa* (キイロトケイソウ) の雑種であるとされている¹⁶⁾。今回、果実採集用の栽培品種 (Pa-19 ~ Pa-21) が雑種と推定される塩基配列を示したことは、この事実を裏付ける結果である。従って、type 1 及び type 2 の配列は、*P. edulis* 及び *P. edulis* f. *flavicarpa* のものであると思われるが、どちらの種が、どちらの遺伝子型に帰属されるかは、今後、慎重に検討する必要がある。

ITS1 塩基配列及び成分プロファイルから推定された passion flower 製品の推定原料植物を Table 5 にまとめた。上記の *P. edulis* で見出された 3 つの遺伝子型及び成分型を含め、今回、調査を行った *Passiflora* 属植物は、遺伝子型 (基原植物) と成分プロファイルに明瞭な相関が見られたことから、双方の結果から推定される原料植物の間に齟齬は無かった。従って、ITS1 塩基配列解析あるいは、フラボノイド成分プロファイルを調べる事で、passion flower 製品の原料植物を確認出来ることが明らかとなった。DNA 解析は、チンキ剤をはじめとするエキス由来製品に適用不可能である事、成分分析に比べコストが掛かる事を考慮すると、成分プロファイルによる試験の方が、有用性が高いと考えられる。一方で、根や花など、植物体の一部を使用した製品等、今回のプロファイル分析において指標とした成分に乏しい植物組織が使用された場合においては、DNA 解析による基原種

鑑別は、効力を発揮するものと思われる。

また、今回の研究では、いずれの試料からも β -carboline 系のアルカロイド類は検出されず、トケイソウ類を非医薬品としておくことについて、特に問題となるデータは得られなかった。しかしながら、今回の研究結果から、passion flower 製品 14 検体中、パッケージに記載の *P. incarnata* ではなく、*P. edulis* 由来の製品が 5 検体含まれていることが明らかとなった (Pak-9 は、パッケージに原料植物種の記載無し)。また、種によって含まれる化合物やその量が異なることも示された。

現在、食薬区分上、「専ら医薬品として用いる成分本質 (原材料)」に区分されているものでは、我々の研究成果¹⁷⁾に基づき、それぞれの規制の範囲が確定している。一方で、非医薬品として例示されているリストにおいては、それぞれの品目が指す植物種の範囲が明確ではない。今回の研究結果も含め、健康食品素材では、使用される植物の基原が曖昧である場合が多い¹⁸⁻²²⁾。使用者の安全と、表示の適正化を考えると、このような非医薬品リストにおいても、明確に学名で基原を規定することが重要であるものと考えられる。なお、今回の研究結果に基づけば、非医薬品リストに収載されているトケイソウは、流通実態等を考慮し、その範囲を、*P. incarnata* 及び *P. edulis sensu lato* に限定するのが適当であるものと考えられる。

V 結論

Passiflora 属植物試料の ITS 塩基配列解析及びフラボノイ

Table 4. LC/PDA/MS chromatogram types and their chemical composition observed in *P. edulis* samples

LC/PDA/MS chromatogram type	Peak detected in LC-PDA-MS analysis												Samples		
	Retention time (min)														
	6.6	6.9	8.3	8.6	10.5	10.8	12.4	12.7	13.1	13.4	15.2	20.3			21.5
	<i>m/z</i>														
	449	449	433	433	563	579 433	433	577	579 433	563	563	867 485 467 449	271	Referential	Commercial
Type 1								+						Pa-3 to Pa-8, Pa-22, 23	Pak-2, Pa-9
Type 2	+	+		+		+	+			+				Pa-35	Pak-1, 5, 6
Type 3	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	Pa-2, Pa-19 to Pa-21	

“+” means the presence of the corresponding peak.

Table 5. Putative source plants of the commercial passion flower products by DNA and chemical analyses

Sample No.	Putative species		Sample No.	Putative species	
	ITS sequence	Flavonoids		ITS sequence	Flavonoids
Pak-1	no amplicon	<i>P. edulis</i> type 2	Pak-8	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>
Pak-2	<i>P. edulis</i> type 1	<i>P. edulis</i> type 1	Pak-9	<i>P. edulis</i> type 1	<i>P. edulis</i> type 1
Pak-3	n. t.	<i>P. incarnata</i>	Pak-10	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>
Pak-4	no amplicon	<i>P. incarnata</i>	Pak-11	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>
Pak-5	<i>P. edulis</i> type 2	<i>P. edulis</i> type 2	Pak-12	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>
Pak-6	n. t.	<i>P. edulis</i> type 2	Pak-13	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>
Pak-7	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>	Pak-14	<i>P. incarnata</i>	<i>P. incarnata</i>

n. t.: not tested

ド類のプロファイル分析の結果、2つの分析結果には、良好な相関が認められ、同植物群では基原種によって含まれる化合物やその量が異なることが明らかとなった。また、健康食品市場に流通する passion flower 製品について、同様の分析を行った結果、passion flower 製品には、パッケージに記載の *P. incarnata* ではなく、*P. edulis* などの同属であるが種が異なる植物を使用しているものが、3割程度存在することが明らかとなった。一方、 β -carboline 系のアルカロイドについては、いずれの試料からも検出されず、passion flower 製品が、「非医薬品」リストに記載されている事に関し、特に問題となる事実は、認められなかった。

VI 謝辞

本研究を行うにあたり、*Passiflora* 属植物試料を御恵与いただきました日本新薬株式会社秋田徹先生に御礼申し上げます。本研究は、厚生労働科学研究費補助金の助成により行われた。

VII 参考文献

- 1) European Pharmacopoeia 5th Ed., 15, Jun., 2004.
- 2) Regulatory Control of Unapproved/Unlicensed Drugs (Pharmaceutical Affairs Bureau Notification No. 476 of Jun. 1, 1971; final major revision, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No. 0417001 of Apr. 17, 2007; final revision, Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No. 0220001 of Feb. 20, 2009), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 3) Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A.,: *Passiflora*: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, **94**, 1-23 (2004).
- 4) Farmacopéia Brasileira, 3rd Ed., 1977.
- 5) Pereira, C. A., Yariwake, J. H., Lanças, F. M., Wauters, J.-N., Tits, M., Angenot, L.,: A HPTLC densitometric determination of Flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochem. Anal.*, **15**, 241-248 (2004).
- 6) Allen, J. R. F., Holmstedt, B. R.,: The simple β -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, **19**, 1573-1582 (1980).
- 7) Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.,: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4673-4680 (1994).
- 8) Saitou, N., Nei, M.,: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425 (1987).
- 9) Kimura, M.,: A Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**, 111-120 (1980).
- 10) White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.,: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. eds., "PCR Protocols-A guide to methods and applications", San Diego, USA, Academic Press, 1990, p. 315-322. (ISBN: 0-12-372180-6)
- 11) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J.,: Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1105-1109 (1991).
- 12) Abourashed, E. A., Vanderplank, J. R., Khan, I. A.,: High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, **40**, 81-91 (2002).
- 13) Raffaelli, A., Moneti, G., Mercati, V., Toja, E.,: Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. *J. Chromatogr. A*, **777**, 223-231 (1997).
- 14) 塚本洋一郎監修、"園芸植物大事典、第3巻"、東京、小学館、1989, p. 381-386. (ISBN: 4-09-305103-8)
- 15) 塚本洋一郎監修、"園芸植物大事典、第3巻"、東京、小学館、1989, p. 581-582. (ISBN: 4-09-305103-8)
- 16) 尾松直志、岩井久、瀬戸口脩、鳥越博明、牟田辰朗、野島秀伸：奄美大島におけるパッションフルーツウツディネス病の発生生態、鹿児島県農業試験場研究報告、**32**, 41-54 (2004).
- 17) 厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業、専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）の有効性及び安全性等の評価に関する研究、平成17年度総括・分担研究報告書第2分冊。
- 18) Sakai, S., Otake, R., Toida, T., Goda, Y.,: Identification of the origin of chondroitin sulfate in "health foods", *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 299-303 (2007).
- 19) Maruyama, T.,: Authentication and chemical analysis in the regulation of natural products. *FFI Journal*, **212**, 374-379 (2007).
- 20) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I. K., Kamakura, H., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y.,: Authentication and chemical study of *Isodonis Herba* and *Isodonis* extracts. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1626-1630 (2007).
- 21) Maruyama, T., Kamakura, H., Miyai, M., Komatsu, K., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Goda, Y.,: Authentication of the traditional medicinal plant *Eleutherococcus senticosus* by DNA and chemical analyses. *Planta Med.*, **74**, 787-789 (2008).
- 22) Goda Y.: The safety of health foods and Importance of their origin. *Yakugaku Zasshi*, **128**, 837-838 (2008).

Three new triterpenyl esters, codonopilates A–C, isolated from *Codonopsis pilosula*

Daigo Wakana · Nobuo Kawahara ·
Yukihiro Goda

Received: 21 January 2010 / Accepted: 18 June 2010 / Published online: 17 July 2010
© The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer 2010

Abstract Three triterpenyl esters, codonopilates A–C (1–3), were isolated from *Codonopsis pilosula*, along with fourteen known compounds. Their structures were elucidated on the basis of chemical and spectroscopic investigations.

Keywords Tojin · *Codonopsis pilosula* ·
24-Methylenecycloartanol · Triterpenyl esters

Introduction

Recently, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan began to study the reclassification of raw materials exclusively used as pharmaceuticals, and a number of herbs were investigated for their toxicity and secondary metabolites. In this project, new phenylpropanoid glycosides [1], iridoid glycosides and a cucurbitacin glycoside [2] have been reported from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*.

The crude drug of *Tojin* is the roots of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. and *C. tangshen* Oliv., which is exclusively used as a pharmaceutical in Japan. Phenylpropanoid glycosides [3], a β -carboline alkaloid [4], have been isolated from the roots of this plant. In order to obtain information about secondary metabolites, we investigated the chemical constituents in commercial samples of *Tojin* obtained in Japan. This paper describes the isolation and the structural elucidation of three new triterpenyl esters and other known compounds.

Results and discussion

From the CHCl_3 -soluble portion at the MeOH extract of *C. pilosula*, three new triterpenyl esters, codonopilates A–C (1–3), along with nine triterpenoids, 24-methylenecycloartanyl linolate (4) [5], 24-methylenecycloartan-3-ol (5) [6], friedelan-3-one [7], 1-friedelen-3-one [8], stigmast-7-en-3-one [9], 14-taraxeren-3-ol [10], stigmast-7-en-3-ol [11], stigmast-7,22-dien-3-ol [12] and squalene, a sesquiterpenoid, atractylenolide III [13], a furfural, 5-hydroxymethylfurfural [14], a polyacetylene, lobetyolin [15], α -tocopherol and a pyrrolidine alkaloid, codonopyrrolidinium B (6) [16], were isolated by various chromatographic techniques. These known compounds were identified by spectroscopic comparison to reported data in the literature or standard compounds (Fig. 1).

Codonopilate A (1) was obtained as a colourless amorphous powder and the molecular formula was confirmed as $\text{C}_{49}\text{H}_{82}\text{O}_3$ by ESI-TOF-MS attached to a Direct-Analysis-in-Real Time (DART) ionisation system, with the unsaturated rate of 9. In the IR spectrum, absorption bands for a hydroxyl group (3440 cm^{-1}) and a carbonyl group (1730 cm^{-1}) were observed. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum (Table 1) showed the presence of a pair of methylene protons [δ 0.33 (d, 4.0), 0.57 (d, 4.0)], 2 oxygenated methine protons [δ 4.14 (td, 6.3, 6.9), 4.56 (m)], 2 singlet protons [δ 4.65 (s), 4.70 (s)] and 4 olefinic protons [δ 5.42 (td, 7.5, 11.2), δ 5.65 (dd, 6.9, 15.5), δ 5.96 (t, 11.2), δ 6.47 (dd, 11.2, 15.5)]. The $^{13}\text{C-NMR}$ and DEPT spectra (Table 1) showed the presence of 8 methyl carbons, 22 sp^3 methylene carbons, 5 sp^3 methine carbons, 2 oxygenated sp^3 methine carbons (δ 73.0, 80.5), 5 sp^3 quaternary carbons, an sp^2 methylene carbon (δ 106.0), 4 sp^2 methine carbons (δ 125.8, 127.9, 132.9, 136.0), 2 sp^2 quaternary carbons, including an ester carbon (δ 157.0, 173.8). For the structure elucidation of

D. Wakana · N. Kawahara · Y. Goda (✉)
National Institute of Health Sciences (NIHS), 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
e-mail: goda@nihs.go.jp

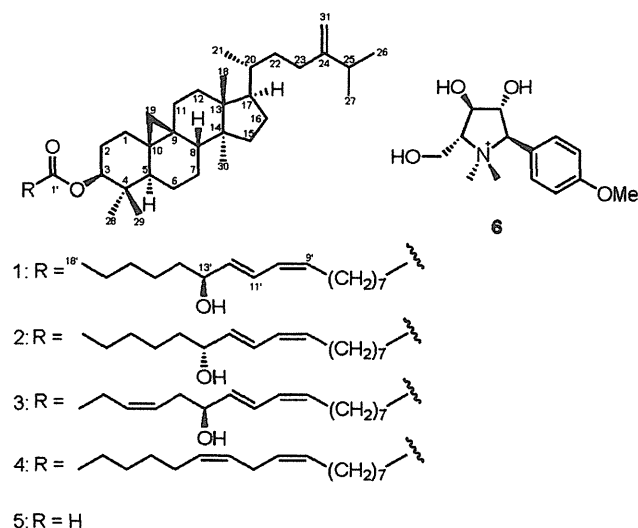


Fig. 1 Structures of the isolated compounds (1–6)

1, the 2D-incredible natural-abundance double-quantum transfer experiment (INADEQUATE) spectrum showed five ring systems that suggested triterpenyl skeleton (Figs. 2, 3). Based on the HMBC spectra (Fig. 2), correlations from 19-H₂ to C-1, C-5, C-8 and C-11, from 31-H₂ to C-23, C-24 and C-25 suggested that the genin of **1** was 24-methylene-cycloartan-3-ol. Furthermore, the residual portion had 3 unsaturated rates, and more had an ester carbon, 2 double bonds and a hydroxyl group. This suggested that the residual portion was straight-chained fatty acid. The position of these functional groups was decided by the INADEQUATE correlations (Figs. 2, 3). The linkage between the genin and fatty acid moiety was confirmed by HMBC correlations to C-1' (δ 173.8) from 3-H. Based on these data, **1** was elucidated as the triterpenyl ester with a hydroxyl group at the 24-methylene-cycloartan-3-ol linked to the carboxyl group of the coriolic acid. The determined double bonds showed that C-9' had the *Z* configuration and C-11' had the *E* configuration by their coupling constants. The relative stereochemistry was confirmed from the analysis of the NOESY spectra. The NOESY correlations were showed from the methyl protons at C-28 to the methine protons at C-3 and C-5. Also, NOESY correlations were observed from the methylene proton at C-19 to the methyl proton at C-29 and the methine proton at C-8, from the methyl proton at C-18 to the methine proton at C-8 and C-20. Moreover, the correlations from the methine proton at C-17 to the methyl proton at C-21 and C-30 were observed (Fig. 4). Therefore, the relative structure of **1** was determined, except for the stereochemistry of C-13'. In order to confirm the absolute stereochemistry, **1** was hydrolysed under alkaline conditions to give 24-methylene-cycloartan-3 β -ol that was identified by spectroscopic comparison with the reported data in the literature [6], although the fatty acid moiety was not obtained.

Finally, advanced Mosher's method [17] was applied to **1**. The (*R*)- and (*S*)-2-methoxy-2-(trifluoromethyl)phenyl acetic acid (MTPA) esters of **1** were synthesised and the values of the chemical shift differences between the (*S*)- and (*R*)-MTPA esters indicated that the secondary alcohol group at C-13' in **1** was assigned as the *S*-configuration (Fig. 5). Therefore, the structure of **1** was consequently confirmed as the (-)-coriolic acid 24-methylene-cycloartan-3 β -yl ester.

Codonopilate B (**2**) was obtained as a colourless amorphous powder, and the molecular formula was C₄₉H₈₂O₃ by DART-TOF-MS, equal to **1**. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra (Table 1) of **2** were very similar to **1**, but the CD spectra of **2** showed the opposite polarity to **1**. The double-bonds at C-9' and C-11' were determined as *Z* and *E*, respectively, by their coupling constants, and 24-methylene-cycloartan-3 β -ol was obtained by basic hydrolysis, so **2** was suggested as the stereoisomer of **1** at the C-13'. The absolute stereochemistry of the secondary alcohol at the C-13' of **2** was elucidated as the *R*-configuration based on the results of the advanced Mosher's method (Fig. 5).

Codonopilate C (**3**) was obtained as a colourless amorphous solid, and the molecular formula was determined to be C₄₉H₈₀O₃ by DART-TOF-MS with the unsaturated rate of 10 degrees. The detailed analysis of the ¹H- and ¹³C-NMR spectra (Table 1) showed that **3** was similar to **1** and **2**, except that it has 8 olefinic protons. As a result of hydrolysis, the genin of **3** was 24-methylene-cycloartan-3 β -ol, so the fatty acid moiety of **3** was suggested to be the straight-chained fatty acid which has 3 double-bonds, an ester carbon and a hydroxyl group. From the COSY spectrum (Fig. 6), 2'-H₂ to 3'-H₂ and 8'-H₂ to 18'-H₃ were observed, so the fatty acid moiety of **3** was confirmed to be 13'-hydroxy-9',11',15'-octadecatrienoic acid. The absolute stereochemistry of C-13' was deduced as the *S*-configuration based on the results of advanced Mosher's method (Fig. 5). Therefore, **3** was ester-derived from 13-hydroxy-9,11,15-octadecatrienoic acid and 24-methylene-cycloartan-3 β -ol.

To the best of our knowledge, codonopilates A–C (**1–3**), which are the esters of 13-hydroxy-fatty acid and 24-methylene-cycloartan-3-ol, are newly identified compounds.

Experimental

General experimental procedures

Optical rotations were measured on a JASCO DIP-370 (Tokyo, Japan) digital polarimeter, UV spectra on a SHIMADZU UV-2550 (Kyoto, Japan) spectrophotometer, IR spectra on a JASCO FT-IR-5300 (Tokyo, Japan) spectrophotometer and CD spectra on a JASCO J-720 (Tokyo, Japan) spectropolarimeter. ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on JEOL ECA-500 spectrometer (500.16 MHz for

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of **1–3** in CDCl_3

Carbon no.	1		2		3	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	31.7	1.23 m, 1.59 m	31.7	1.23 m, 1.59 m	31.7	1.24 m, 1.60 m
2	26.9	1.59 m, 1.74 m	26.9	1.59 m, 1.74 m	26.9	1.60 m, 1.74 m
3	80.5	4.56 m	80.4	4.56 m	80.4	4.56 m
4	39.6	–	39.6	–	39.6	–
5	47.3	1.38 m	47.3	1.38 m	47.3	1.39 m
6	21.0	0.79 dd (2.9, 12.6), 1.56 m	21.0	0.78 dd (2.5, 12.3), 1.56 m	21.0	0.78 dd (2.8, 6.9), 1.57 m
7	25.9	1.06 m, 1.31 m	25.9	1.07 m, 1.30 m	25.9	1.08 dd (2.8, 12.8), 1.32 m
8	47.9	1.49 m	48.0	1.50 dd (5.0, 11.9)	48.0	1.50 dd (4.8, 12.8)
9	20.2	–	20.2	–	20.2	–
10	26.0	–	26.0	–	26.0	–
11	26.6	1.10 m, 1.98 td (8.6, 14.9)	26.6	1.09 m, 1.98 td (8.6, 14.7)	26.5	1.10 dd (6.9, 14.2), 1.99 m
12	33.0	1.61 m	32.9	1.61 m	32.9	1.62 m
13	45.4	–	45.4	–	45.4	–
14	48.9	–	48.9	–	48.9	–
15	35.6	1.28 m	35.6	1.27 m	35.6	1.29 m
16	28.2	1.28 m, 1.90 m	28.2	1.28 m, 1.91 m	28.2	1.29 m, 1.91 m
17	52.3	1.59 m	52.3	1.59 m	52.3	1.60 m
18	18.1	0.96 s	18.1	0.96 s	18.1	0.96 s
19	29.9	0.33 d (4.0), 0.57 d (4.0)	29.9	0.32 d (4.1), 0.56 d (4.1)	29.9	0.33 d (4.1), 0.55 d (4.1)
20	36.2	1.37 m	36.2	1.38 m	36.2	1.39 m
21	18.4	0.88 m	18.4	0.88 m	18.4	0.88 m
22	35.1	1.12 m, 1.56 m	35.1	1.12 m, 1.54 m	35.1	1.14 m, 1.56 m
23	31.4	1.87 dd (5.2, 10.9), 2.12 t (4.0)	31.4	1.87 dd (5.0, 11.5), 2.11 ddd (4.3, 11.5, 15.2)	31.4	1.87 t (4.2), 2.11 m
24	157.0	–	157.0	–	157.0	–
25	33.9	2.22 m	33.9	2.22 m	33.9	2.22 m
26	21.9	1.03 d (6.9)	22.0	1.02 d (6.9)	22.0	1.02 d (6.9)
27	22.0	1.02 d (6.9)	22.1	1.01 d (6.9)	22.1	1.01 d (7.0)
28	15.3	0.88 m	15.4	0.87 m	15.3	0.88 m
29	25.5	0.83 s	25.5	0.83 s	25.5	0.83 s
30	19.4	0.88 m	19.4	0.88 m	19.4	0.88 m
31	106.0	4.65 s, 4.70 s	106.0	4.65 s, 4.70 s	106.0	4.65 s, 4.70 s
1'	173.8	–	173.8	–	173.8	–
2'	34.9	2.29 t (7.4)	34.9	2.28 dt (2.3, 7.3)	34.9	2.29 td (2.0, 7.6)
3'	25.1	1.61 m	25.2	1.60 m	25.2	1.62 m
4'	29.2 ^a	1.29 ^b m	29.2 ^c	1.30 ^d m	29.2 ^e	1.30 ^f m
5'	29.2 ^a	1.29 ^b m	29.3 ^c	1.30 ^d m	29.2 ^e	1.30 ^f m
6'	29.1 ^a	1.29 ^b m	29.5 ^c	1.23 m	29.1 ^e	1.30 ^f m
7'	29.6	1.36 m	29.4	1.37 m	29.6	1.36 m
8'	27.7	2.16 td (7.5, 7.5)	27.8	2.16 m	28.0	2.16 td (7.5, 7.5)
9'	132.9	5.42 td (7.5, 11.2)	133.2	5.44 td (7.4, 10.8)	133.0	5.42 td (7.5, 10.8)
10'	127.9	5.96 t (11.2)	127.7	5.95 t (10.8)	127.8	5.96 t (10.8)
11'	125.8	6.47 dd (11.2, 15.5)	126.0	6.47 dd (10.8, 15.1)	125.9	6.50 dd (10.8, 15.1)
12'	136.0	5.65 dd (6.9, 15.5)	135.8	5.64 dd (6.9, 15.1)	135.1	5.68 dd (6.4, 15.1)
13'	73.0	4.14 td (6.3, 6.9)	73.0	4.14 td (6.4, 6.9)	72.2	4.20 td (4.6, 6.4)
14'	37.4	1.50 m, 1.56 m	37.4	1.49 m, 1.55 m	35.4	2.31 t (6.4), 2.35 t (7.3)
15'	25.2	1.30 m, 1.37 m	25.4	1.29 m, 1.37 m	123.9	5.35 td (7.3, 10.6)
16'	31.9	1.28 m	31.6 ^g	1.28 m	135.4	5.56 td (7.3, 10.6)
17'	22.7	1.30 m	22.6 ^g	1.29 m	20.8	2.06 m
18'	14.1	0.88 t	14.2	0.87 t	14.3	0.96 t

^{a–g} The assignments may be exchanged

^1H , 125.77 MHz for ^{13}C) and/or ECA-800 (800.14 MHz for ^1H , 201.20 MHz for ^{13}C) spectrometers, using tetramethylsilane as an internal standard. The 2D-INADEQUATE spectrum was recorded on a JEOL ECA-600 (150.79 MHz for ^{13}C) spectrometer attached to a VARIAN cold probe (60H5CNC/COLD) on a 50-mg sample dissolved in about 100 μl of methanol- d_4 . Coupling patterns are indicated as follows: singlet, s; doublet, d; triplet, t; quartet, q; multiplet, m; and broad, b. Mass spectra were obtained on a JEOL JMS-

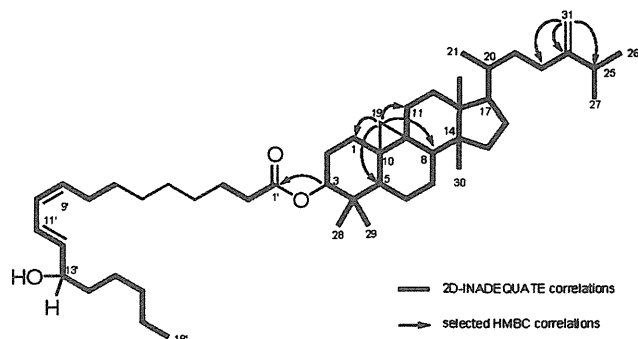


Fig. 2 2D-INADEQUATE and selected HMBC correlations of 1

T100LC spectrometer attached to a DART ion source system. A column chromatography was carried out on Sephadex LH-20 (GE Healthcare UK Ltd., England). Preparative low-pressure liquid chromatography (LPLC) was performed on an EYELA ceramic pump VSP-3050 (Tokyo, Japan) using a prepacked glass column SI-40B (Yamazen Chemical, 26 mm i.d. \times 300 mm, Tokyo, Japan) or ODS-S-40B (Yamazen Chemical, 26 mm i.d. \times 300 mm). High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a SHIMADZU LC-8A pump with the flow rate of 4 mL/min using an Inertsil SIL 100A, NH_2 (10 mm i.d. \times 250 mm, GL Science Inc., Tokyo, Japan), and/or Mightysil RP-18GP (10 mm i.d. \times 250 mm, Kanto Chemical, Tokyo, Japan) prepacked column equipped with a SHIMAMURA RI-monitor YRD-883 or SHIMADZU SPD-6AV monitor.

Plant material

The raw material of Tojin, *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf., was purchased from Uchida Wakan-yaku Co. Ltd. A voucher specimen was deposited in the National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan.

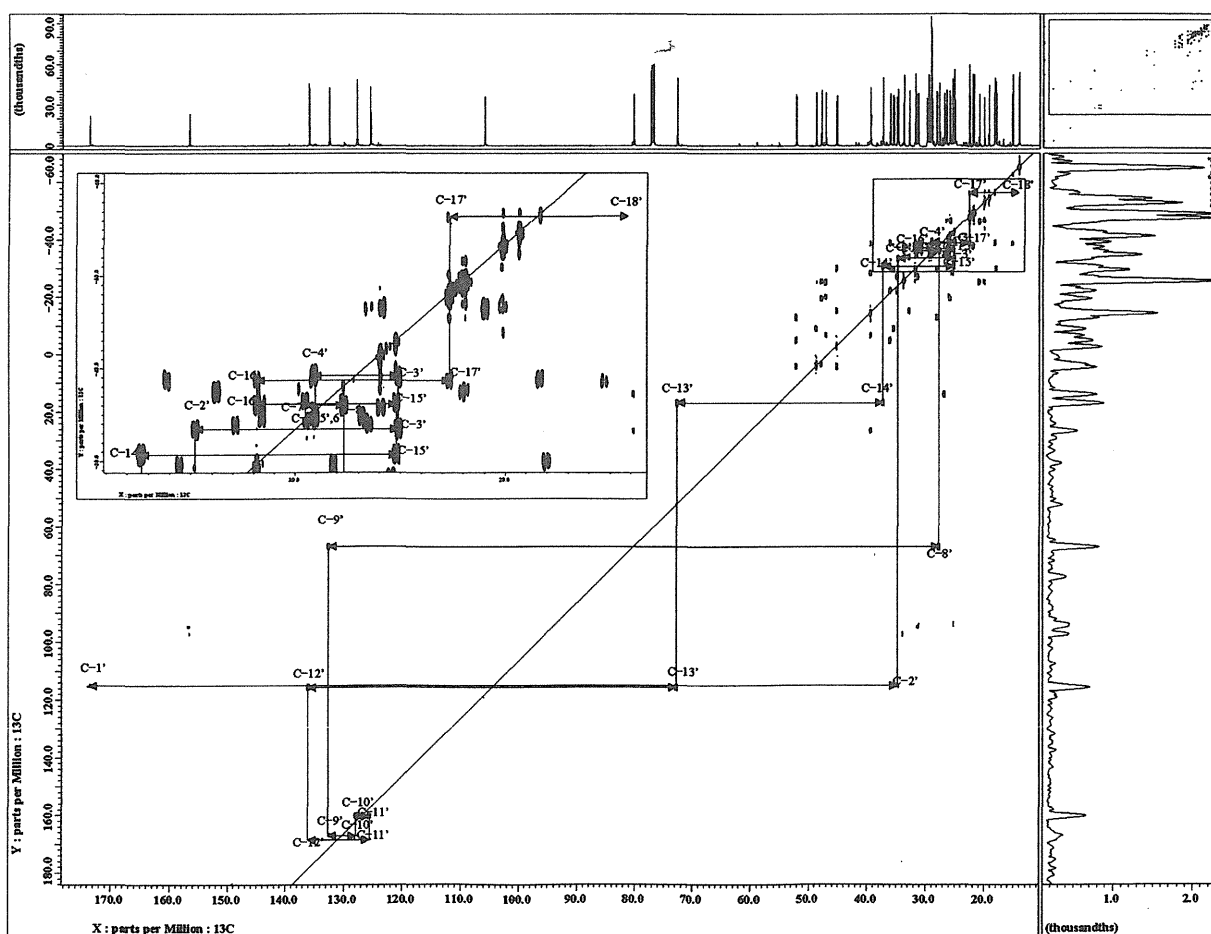


Fig. 3 The 2D-INADEQUATE spectra showing correlations of fatty acid moiety of 1

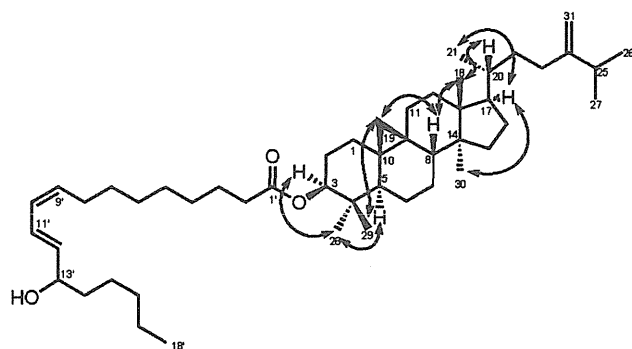


Fig. 4 The NOESY correlations of 1

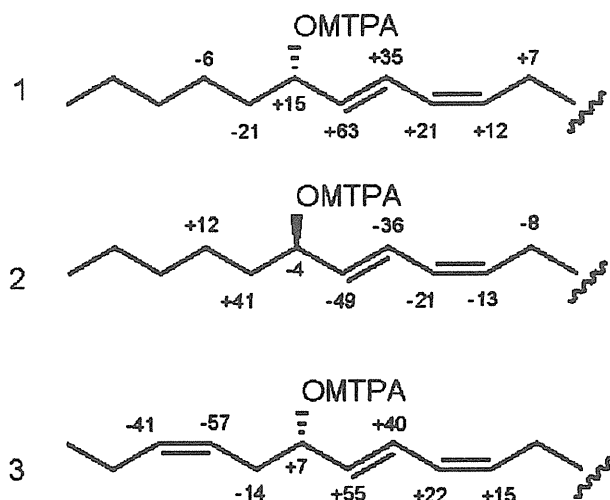


Fig. 5 Chemical shift differences (Hz) between (*S*)- and (*R*)-OMTPA esters of 1–3

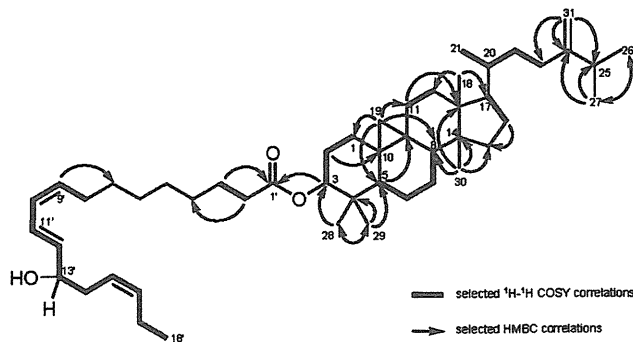


Fig. 6 Selected COSY and HMBC correlations of 3

Extraction and isolation

The dried roots of *C. pilosula* (5 kg) were divided into ten portions and each respective portion was extracted with MeOH (2 × 2 l) at room temperature and the solvent was evaporated in vacuo. The residue was suspended in H₂O and extracted with CHCl₃. The H₂O layer was added 4 M HCl to adjust to pH 2 and then partitioned with 1-BuOH.

The aqueous layer treated an aquarius NH₃ solution to adjust to pH 11 and then partitioned with 1-BuOH. The evaporated CHCl₃ fraction (120 g) was chromatographed on Sephadex LH-20 [hexane–CHCl₃ (4:1), CHCl₃–acetone: (3:2, 1:4), acetone and MeOH] to give 10 fractions (frs. 1–10) and fraction 2 was further chromatographed on silica gel [hexane–acetone (20:1, 10:1, 5:1 and 1:1)] to afford 9 fractions. The sixth fraction was chromatographed on LPLC [hexane–acetone (20:1) and benzene–EtOAc (40:1)] to give four fractions (fr. A1–A4). Fraction A2 was purified by HPLC with hexane–acetone (20:1) and (30:1) in turn, to give compounds 2 (80 mg) and 4 (250 mg). Fraction A3 was purified by HPLC [hexane–acetone (40:1) and benzene–acetone (100:1)] to give compounds 1 (120 mg) and 3 (100 mg). Fraction 3 was separated by LPLC [hexane–CH₂Cl₂ (1:1)] to give 10 fractions (fr. B1–B10). Fraction B3 was purified by HPLC [hexane–CH₂Cl₂ (2:1)] to give α-tocopherol (500 mg). Fraction B4 was purified by HPLC [hexane–CH₂Cl₂ (5:1) and hexane–EtOAc (50:1)] to give friedelan-3-one (250 mg). Fraction B5 was purified by HPLC [hexane–CH₂Cl₂ (2:1) and hexane–EtOAc (30:1)] to give friedelan-3-one (50 mg) and atractylenolide III (50 mg). Fraction B6 was purified by HPLC [hexane–EtOAc (30:1) and (50:1)] to give stigmast-7-en-3-one (200 mg). Fraction B7 was purified by HPLC [hexane–EtOAc (30:1)] to give 24-methylenecycloartan-3-ol (5: 750 mg) and 14-taxeren-3-ol (150 mg). Fraction 4 was repeatedly chromatographed on HPLC [hexane–EtOAc (20:1)] to give eight fractions (fr. C1–C8) and fractions C1 and C2 were squalene (1.2 g). Fraction C4 was purified by HPLC [benzene–EtOAc (50:1) and hexane–acetone (30:1)] to give stigmast-7-en-3-ol (280 mg) and stigmast-7,22-dien-3-ol (150 mg). Fraction 10 was purified by reverse-phase HPLC with 50% MeOH to afford lobetyolin (100 mg). The alkaline BuOH layer was evaporated in vacuo to give a residue (90 g). This BuOH fraction was chromatographed on LH-20 to give six fractions. Fr 2 was purified by HPLC on an amino column to give codonopyrrolidium B (6: 150 mg).

Codonopilate A (1)

Colourless amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +30^\circ$ (c 1.6, hexane); UV λ_{max} (hexane) nm (log ϵ): 234.2 (4.23); IR (KBr) cm^{-1} : 3440, 2940, 2860, 1730; CD (hexane) $\Delta\epsilon$ (nm): +2.60 (236.4). The ¹H- and ¹³C-NMR data are summarised in Table 1; HR-ESI-MS m/z : 717.6207 [$M-H$][−] (calcd. for C₄₉H₈₁O₃: 717.6186).

Codonopilate B (2)

Colourless amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +6^\circ$ (c 0.4, hexane); UV λ_{max} (hexane) nm (log ϵ): 234.4 (4.44); IR (KBr) cm^{-1} :

3450, 2930, 2870, 1730; CD (hexane) $\Delta\epsilon$ (nm): -6.05 (233.4). The ^1H - and ^{13}C -NMR data are summarised in Table 1; HR-ESI-MS m/z 717.6221 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{81}\text{O}_3$: 717.6186).

Codonopilate C (3)

Colourless amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +31^\circ$ (c 1.1, hexane); UV λ_{max} (hexane) nm (log ϵ): 235.0 (3.10); IR (KBr) cm^{-1} : 3440, 2950, 2860, 1730; CD (hexane) $\Delta\epsilon$ (nm): $+3.62$ (234.8). The ^1H - and ^{13}C -NMR data are summarised in Table 1; HR-ESI-MS m/z 715.6052 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{O}_3$: 715.6029).

Alkaline hydrolysis of compounds 1–3

Compounds 1–3 (1: 10 mg, 2: 8 mg, 3: 6 mg) were dissolved in a mixture of 10% KOH (4 ml), acetone (6 ml), MeOH (2 ml), and the solution was refluxed for 6 h. After cooling, the reaction mixture was extracted with CHCl_3 and the organic layer was concentrated in vacuo. The residue was purified by HPLC on silica gel with hexane–EtOAc (10:1) to give genin, 24-methylenecycloartan-3 β -ol (from 1: 1 mg, from 2: 0.5 mg, from 3: 3.4 mg).

Synthesis of (S)- and (R)-MTPA esters of 1–3

Well dried samples (each 3 mg) were dissolved in CDCl_3 (200 μl) and added to *N,N*-dimethyl-aminopyridine after being appended to 300 μl of *R*-(-)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenyl-acetyl chloride solution (40 mM) or *S*-(+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenyl-acetyl chloride solution (40 mM) in each NMR tube. Then, these NMR tubes were mixed and kept for 24 h at room temperature. The assignment was made on the basis of COSY correlations.

References

- Kim IH, Kaneko N, Uchiyama N, Lee JE, Takeya K, Kawahara N, Goda Y (2006) Two phenylpropanoid glycosides from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. Chem Pharm Bull 54:275–277
- Kim IH, Uchiyama N, Kawahara N, Goda Y (2006) Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. Phytochemistry 67:2691–2696
- Mizutani K, Yuda M, Tanaka O, Saruwatari Y, Jia M-R, Ling Y-K, Pu X-F (1988) Tangshenosides I and II from Chuan-Dangshen, the root of *Codonopsis tangshen* Oliv. Chem Pharm Bull 36:2726–2729
- Liu T, Liang W, Tu G (1988) Perlolirine: a β -carboline alkaloid from *Codonopsis pilosula*. Planta Med 54:472–473
- Kimura G, Hirose Y, Yoshida K, Kuzuya F, Fujita K (1988) Triterpenyl esters of organic acids and hypolipidemic agents composed of them. US Patent No. 4748161
- Ohta G, Shimizu M (1958) A new triterpenoid alcohol, 24-methylenecycloartanol, as its ferulate, from rice bran oil. Chem Pharm Bull 6:325–326
- Igoli OJ, Alexander GI (2008) Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*. Int J Phys Sci 3:156–158
- Tewari NC, Ayengar KN, Rangaswami S (1974) Triterpenes of the root-bark of *Salacia prenoioides* DC. J Chem Soc Perkin 1:146–152
- Wu F-E, Koike K, Nikaido T, Ishii K, Ohmoto T, Ikeda K (1990) Terpenoids and flavonoids from *Arenaria kansuensis*. Chem Pharm Bull 38:2281–2282
- Sakurai N, Yaguchi Y, Inoue T (1986) Triterpenoids from *Myrica rubra*. Phytochemistry 26:217–219
- Rubinstein I, Goad LJ, Clague ADH, Mulheirn LJ (1976) The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. Phytochemistry 15:195–200
- Sucrow W, Slopianka M, Kircher HW (1976) The occurrence of C_{29} sterols with different configurations at C-24 in *Cucurbita pepo* as shown by 270 MHz NMR. Phytochemistry 15:1533–1535
- Uchida M, Koike Y, Kusano G, Kondo Y, Nozoe S, Kabuto C, Takemoto T (1980) Studies on the constituents of *Chloranthus* spp. III. Six sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus*. Chem Pharm Bull 28:92–102
- Shimizu M, Zenko Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Morita N (1993) Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. V. Active components of Hachimi-jio-gan (Kampo Medicine). Chem Pharm Bull 41:1469–1471
- Ishimaru K, Yonemitsu H, Shimomura K (1991) Lobetyolin and lobetyol from hairy root culture of *Lobelia inflata*. Phytochemistry 30:2255–2257
- Tsai T-H, Lin L-C (2008) Phenolic glycosides and pyrrolidine alkaloids from *Codonopsis tangshen*. Chem Pharm Bull 56:1546–1550
- Wakana D, Hosoe T, Itabashi T, Okada H, Fukushima K, Kawai K (2008) Structures of new triterpene glycosides, Malbrancheosides A–D, from *Malbranchea filamentosa*. Heterocycles 75:1109–1122

雪茶製品の¹H NMR メタボローム解析

(2010年10月5日受付)

(2010年11月16日受理)

松本輝樹^{a)}、安食菜穂子^{b)}、有福和紀^{c)}、川原信夫^{d)}、合田幸広^{b)}

a) 国立健康・栄養研究所

b) 国立医薬品食品衛生研究所

c) 日本電子データム株式会社

d) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター

Metabolome analysis of Setsucha (*Thamnia vermicularis* Ach.) products based on ¹H NMR spectroscopy

(Received October 5, 2010)

(Accepted November 16, 2010)

Teruki Matsumoto^{a)}, Naoko Anjiki^{b)}, Kazunori Arifuku^{c)}, Nobuo Kawahara^{d)}, Yukihiro Goda^{b)}

a) National Institute of Health and Nutrition

b) National Institute of Health Sciences

c) JEOL DATUM Ltd.

d) Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation

Abstract

As a part of development of profiling analysis for raw material in the health foods, sixteen kinds of Setsucha products purchased from the Japanese market were performed principal component analysis (PCA) based on the bucket integration of ¹H NMR spectra.

The results of metabolome analysis by PCA in ¹H NMR spectrum showed a characteristic signal at δ 3.66 due to a sterol derivative. This signal was indicated to be existence of a reference compound to distinguish among Setsucha products. These data was different from the profiling results by HPLC analysis with UV detection and taste-sensing system.

However, by limiting analysis range of ¹H NMR spectrum into three regions observed in three reference compounds identified by HPLC analysis, the metabolome analysis by PCA confirmed a similar classification result to HPLC profiling.

Keywords: 雪茶、健康食品、プロファイル分析、NMR、メタボロミクス

Setsucha, health foods, profile analysis, NMR, metabolomics

I 緒言

核磁気共鳴分光法 (NMR) は、物質の分子構造を原子レベルで解析するため、物質の同定などに応用されている。一般にその測定は、非破壊であり、測定対象を網羅的に検出し、特殊な試薬なども必要としない。また、最も汎用されている溶液¹H NMRにおいては、測定対象物は μg オーダーで充分であり、短時間で測定が可能である。NMR は構造解析のみに止まらず、その特徴を活かした定量分析¹⁾や化学反応のモニタリング²⁾などにも応用されている。また最近では、食品分野でのプロファイル分析にも応用が見られ、茶の製造と発酵に関する分類化³⁾、プロポリスの地理的起源の

推定⁴⁾、マツタケの品質評価⁵⁾などに用いられている。

著者らはこれまでに、健康食品の原材料の品質評価に資するための基礎的研究の一環として、HPLC 及び味認識装置を用いた雪茶 [*Thamnia vermicularis* (Ach.) Asahina] (地衣類) のプロファイル分析について報告をしている^{6,7)}。雪茶の水抽出物は HPLC における含有成分のパターンが比較的単純であり、decarboxythamnolic acid (1)、thamnolic acid (2) 及び squamatic acid (3) の3種の主要化合物の含有量の違いによる分類化が可能であることが明らかとなった。また、味認識装置を用いた検討では、これら3種の化合物の含有量に起因すると考えられる味の差異が認められた。

本研究では、上記研究で使用した同じ試料を利用して、こ

連絡先: 〒305-0843 茨城県つくば市八幡台1-2 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 川原信夫

Corresponding author: Nobuo Kawahara, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2, Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

れまでに報告している評価法^{6,7)}よりも簡便かつ迅速な分析方法を構築するべく、試料に含まれる水素核を持つ全ての化合物情報を包括的に捕らえることが可能という特徴を持ち注目を浴びている、¹H NMR スペクトルデータに基づく主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) を利用し、メタボローム解析を行い、これまでの分析結果と比較したので報告する。

II 実験方法

1. 研究試料

今回 16 種の雪茶製品を試料として使用した。これらのうち、14 製品はインターネットを通じて購入し、他の 2 製品は福岡県より恵与されたものである。各種雪茶製品の製品形態、状態、色及び製品に記載されている飲用方法を Table 1 に示す。残余は国立医薬品食品衛生研究所生薬部に保管されている。

2. 試薬・試液

NMR 溶媒は重水 -d₂ 99.0 atom% (Isotec) を用い、内部標準物質として 3-(トリメチルシリル)-1-プロパンスルホン酸ナトリウム (TSPSA、東京化成工業) を用いた。

3. 試料の調製

各製品は粉砕器にて粉砕し、16号 (1 mm) ふるいを通してものを粉末試料とした。雪茶粉末約 100 mg を精密に測定し、0.05 % (w/v) の TSPSA を含んだ重水 2 mL をマイクロピペットにて正確に加え、5 分間超音波処理を行った。抽出後、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を 0.45 μm フィルターディスクにてろ過したものを ¹H NMR 測定に用いた。

4. 装置

NMR 装置は、JEOL 製 JNM-ECA 800 を用いた。¹H NMR スペクトルは、プレサチュレーションパルス (70 dB) を用い、軽水シグナルを消去しながら以下の測定条件で行った。測定温度 25 °C、観測幅 15024.0 Hz (X_offset= 5.0 ppm)、パルス角 45°、繰り返しパルス待ち時間 5.0 s、データ収集時間 2.18 s、観測データポイント数 32 k、積算回数 32 回。解析には、ウィンドウ関数 (指数関数) 1.0 Hz を用い、ケミカルシフト値は TSPSA を基準とした δ (ppm) で表した。

5. プロファイル分析

得られた ¹H NMR スペクトルは、10.4 ppm から 0.6 ppm までの範囲を 0.04 ppm 毎に 245 のバケットに分割、積分化した。その際、軽水シグナルの観測される 4.7 ppm から 4.9 ppm の範囲は除外し、最終的に 239 のバケットに対して解析を行った。各スペクトル間でのサンプル濃度の差を相殺するために、スペクトル上の総積分値を 240 とし、各バケットは比率標準化した。スペクトルの解析及び特徴的な成分を明らかにするためのパターン認識分析としての PCA は、ALICE 2 for metabolome version 5.2 software (JEOL) を用いた。その際、PCA 解析において計算される主成分 (PC) の数は 4 とした。

III 結果及び考察

雪茶製品の水溶性画分について ¹H NMR を測定した一例を Fig. 1 に示す。シグナル分布は一様に、δ 3.0 ~ 4.0 付近に多数が観測され、その他高磁場側に一部が、低磁場側にわずかなシグナルが観測されるのみであった。また、ベースライン付近では、単一化合物を測定した際と比較して細かいピークが連続的に出現し、微量成分による影響が反映されている

Table 1. List of Setsucha products

No.	Product type	Form and Color	How to drink
1	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 300 mL of water into 10 g of product and boil, then hold for 3 min
2	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 1 L of water into around 6 g of product, then boil for 8-10 min
3	Tea bag	Powder, Milk-white	Pour hot water into one tea bag
4	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour hot water into 2-3 g of product, then stay for 1-2 min
5	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 500 mL of water into 2-3 g of product, then boil for 10 min
6	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 500 mL of hot water into 5-7 g of product, then stay for 5 min
7	Dry material	Powder, Milk-white	Pour 300 mL of water into 10 g of product, then boil for 5 min
8	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Not described
9	Dry powder	Powder, Milk-white	Pour 500 mL of hot water into around 3 g of product, then stay for 5 min
10	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 1 L of water into 2.5 g of product, then boil for 10 min
11	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 500 mL of water into 2-3 g of product and boil, then hold for 10 min
12	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 500 mL of water into 2-3 g of product, then boil for 10 min
13	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 600 mL of water into 5 g of product and boil, then hold for 5 min
14	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Not described
15	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Not described
16	Dry material	Tea leaf form, Milk-white	Pour 500 mL of hot water into 5-7 g of product, then stay for 5 min

ことが示唆された。

16 検体の ^1H NMR スペクトルデータは、実験方法に記載した条件下でバケット積分を行い、得られたヒストグラムデータに対して多変量解析を行った。Table 2 は、その際に得られた第 1 主成分 (PC 1) と第 2 主成分 (PC 2) の主要なバケットとその寄与率を示したものである。ケミカルシフト値 (ppm) は積分を行ったバケットの midpoint として表し、寄与率として 0.01 % 以上のものを表中に選択記載した。

Fig. 2 は、 ^1H NMR スペクトルをバケット積分したものに対して PC 1 と PC 2 を選択し、中心化処理した際のスコアプロットである。PC 1 と PC 2 は、それぞれ寄与率として 76.0 % と 10.1 % を有しており、その合計 (86.1 %) は各検体の特徴を表現するに十分な値と思われた。ただし、PC 1 は寄与率が 76 % あり、検体に含まれる情報の大多数を占めることから、二軸化の必要性は薄いものと考えられた。また、このことは中心化しなかった際の PC 1 の寄与率が 97.4 % あったことから支持された (データ不記載)。

Fig. 2 の PCA スコアプロットでは、特に PC 1 軸に対して、検体 1, 4, 14 のグループ、検体 2, 10, 13 のグループと、検体 11 を除くそれ以外の検体グループ、検体 11 と、前述のものを除くそれ以外の検体グループの 4 つのグループに緩く分類化される。一方、我々は、これまでに UV 254 nm 検出 HPLC に基づく化合物分析⁶⁾ 及び味認識装置による分析結果⁷⁾ より、雪茶製品は、検体 1, 3-5, 7, 9, 11-15 の 11 製品 (A グループ) と検体 2, 6, 8, 10 及び 16 の 5 製品 (B グループ) に分類されることを示している。今回の結果は、これまでの分類結果と明らかに異なっており、雪茶のように比較的単純と考えられる成分組成を持つ試料においても、分析方法を変えることで、異なったグループ化がなされることを示し、興味深い。

Table 2 において PC 1 について個々のバケットの寄与率から推測すると、 δ 3.5 近辺のシグナルの影響が強く、中でも δ 3.66 は寄与率 47 % と非常に高い値を示している。従って、このシグナルに由来する化合物が同定できれば、これまでの分類とは異なった新たな指標成分になり得るものと考えられ

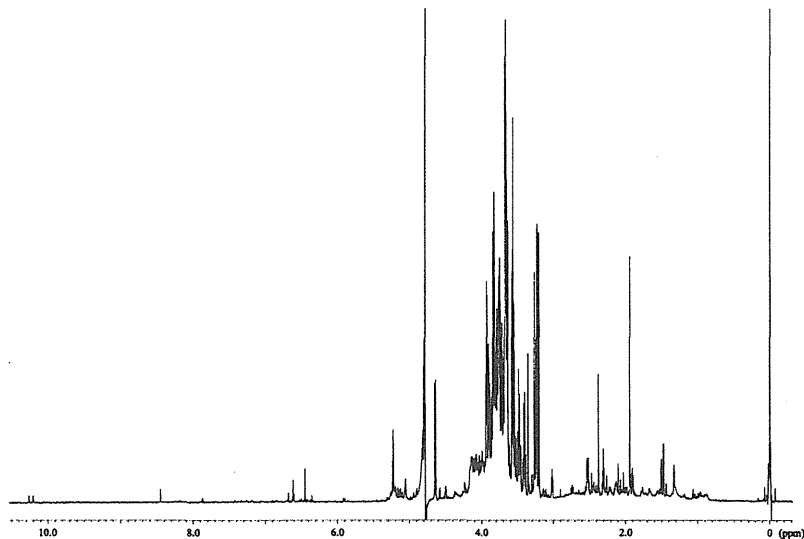


Fig. 1. Example of ^1H NMR spectrum of Setsucha product

Table 2. Principal buckets selected in descending order of contribution ratio (%)

PC 1 (76.0%)		PC 1 (76.0%)		PC 2 (10.1%)		PC 2 (10.1%)		PC 2 (10.1%)		PC 2 (10.1%)		PC 2 (10.1%)	
ppm*	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%
3.66	46.92	3.90	0.29	5.22	0.05	2.10	0.01	3.34	7.16	3.82	0.06	2.38	0.01
3.86	4.43	3.54	0.27	4.62	0.05	4.38	0.01	3.70	1.24	3.46	0.05	2.30	0.01
3.94	3.80	2.38	0.26	2.50	0.04	4.22	0.01	3.66	0.32	2.06	0.05	5.22	0.01
3.82	3.67	3.42	0.23	3.62	0.04	2.42	0.01	3.54	0.29	3.50	0.05	3.26	0.01
3.74	3.21	1.50	0.18	3.30	0.03	2.02	0.01	3.86	0.12	3.94	0.05		
3.22	3.01	1.34	0.17	1.46	0.03	1.54	0.01	3.74	0.09	3.78	0.04		
3.58	2.58	3.50	0.17	6.46	0.03	2.58	0.01	3.18	0.09	3.58	0.04		
3.70	2.22	4.66	0.16	2.26	0.02	8.46	0.01	3.22	0.08	1.46	0.03		
3.26	1.72	2.54	0.12	6.62	0.02	5.06	0.01	3.90	0.06	1.50	0.02		
3.78	1.06	3.46	0.09	3.34	0.02	4.58	0.01	4.62	0.06	3.42	0.01		
1.94	0.61	3.38	0.06	2.46	0.02	1.06	0.01	3.62	0.06	1.90	0.01		

*: All of values are with ± 0.02 ppm tolerance from the 0.04 ppm width of bucket integration.

る。これまでに、雪茶の成分として sterol 類が報告されており⁸⁾、 δ 3.66 のシグナルは、sterol 類の 3 位または 25 α 位のメチンに起因するシグナルである可能性が考えられる⁹⁾。しかし、今回の検討ではこれらのシグナルを同定するに耐えうる試料量を確保できなかったことから、さらなる分画及び同定は断念した。

HPLC により解析した先の報告⁶⁾において、A グループの検体では、主要 3 成分中化合物 2 が最も含量が高い一方、B グループの検体では、化合物 3 が最も含量が高く、これら両グループは、明らかに成分プロファイルが異なることを示した。また、これらの成分含量の差に相関して、味が異なることも判明している⁷⁾。化合物 1~3 は、DMSO 溶媒を用いた ¹H NMR スペクトルにおいて、 δ 10.2~10.1 にアルデヒド、 δ 6.8~6.4 に芳香族、及び δ 2.6~1.9 にメチル基にそれぞれ由来するプロトンが観測されている⁶⁾。本検討では、測定に用いた溶媒が異なるが、Fig. 1 に見られるように上述の 3 つの範囲付近にそれぞれの化合物に由来すると思われるシグナルが観測されていた。そこで、¹H NMR スペクトルデータに基づ

く天然物の品質評価の可能性を検討する目的で、引き続き先の報告^{6,7)}に対応する分類が、PCA の解析範囲を限定した際に再現可能か否か検討を行った。

解析は実際にシグナルが観測された範囲 (δ 10.26 ~ 10.18, δ 6.70 ~ 6.38 及び δ 2.94 ~ 1.98) の 37 変数に限定し、再解析を行った。しかし、この条件下でのグループ化は達成できず、 δ 2.54 及び δ 2.30 のバケットを削除した 35 変数に対して、PC 1 と第 3 主成分 (PC 3) を選択し中心化する条件で、これまでの報告同様、前述した A、B 二つのグループに収束した (Fig. 3)。これら 2 つのバケットのうち、 δ 2.54 は化合物 1~3 全てに共通するメチル基のシグナル、 δ 2.30 は化合物 2 及び 3 に共通するメチル基のシグナルと推測された⁶⁾。従って、これら 2 つのバケットは A、B グループに共通する主要化合物のシグナル由来ということが出来る。従って、PCA 解析においては複数グループ化を妨げる大きな要因となり得る。また、メチル基は、シグナル強度が大きく、グループ化への影響力も強い。これらを考慮すると、両バケットを削除することで、これまでの報告と同様のグループ化が

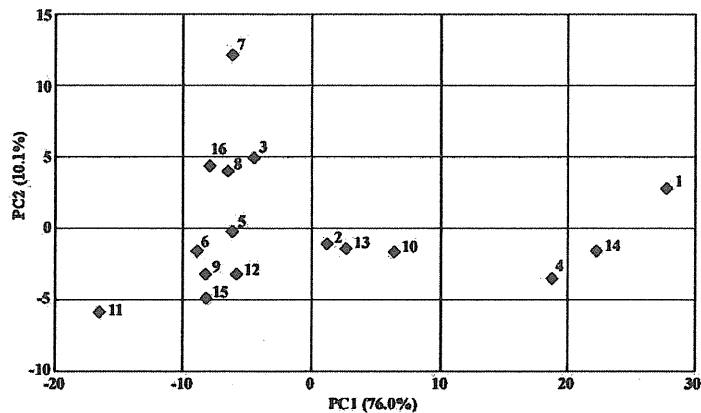


Fig. 2. PCA score plot of PC 1 and PC 2, in which 239 variables were equally accounted for the data sets

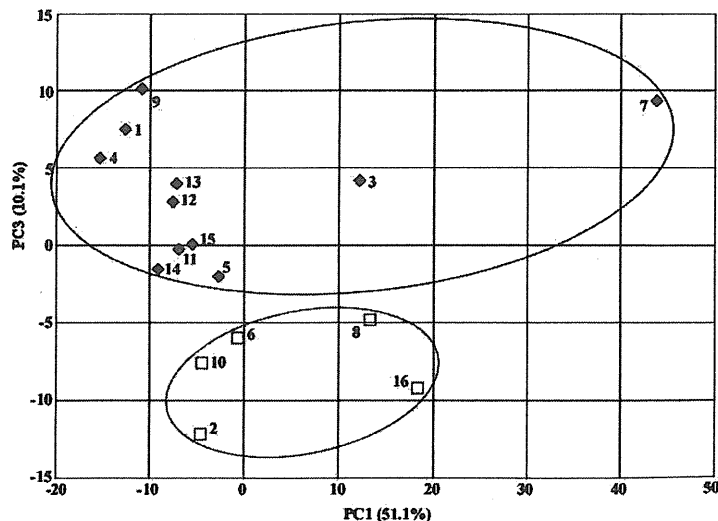


Fig. 3. Final PCA score plot of PC 1 and PC 3 based on the selection of the 35 variables
Each marker expresses the classification by difference of squamatic acid contents (Group A, ◆; Group B, □).

可能になったのは、容易に理解することが出来る。

PC 1 及び PC 3 両主成分の寄与率の合計は 61.2 % であり、検体の持つ情報量を充分反映していると考えられた。また、低磁場 (δ 10.26 ~ 10.18) 及び中磁場 (δ 6.70 ~ 6.38) の変数を各々または両方を完全に削除した際にもグループ化は保持される。しかしこの場合、A、B グループ間距離が短縮されてしまうため、明確なグループ化には低磁場及び中磁場の変数も重要であることが明らかとなった。以上、NMR を用いた検討でも、予想対象化合物にあった合理的な変数を選択することで、これまでの報告例と同様な結果を得ることが可能であることが判明した。

なお、検体 3 及び 7 は、A グループに属する他の検体と比較して X 軸の正方向に外れており、両グループに属していないとも見て取ることが出来る。一方、味認識装置を使った分析⁷⁾では、苦味及び苦味後味の両方で、検体 3 と 7 は、A グループの中で最も B グループに近い値をとることが判明している。これらの関係が、化合物レベルでどのように説明可能であるか、全く不明であり、今後の検討が必要である。

これまでの評価法 (HPLC 法では UV 検出⁶⁾、味認識装置では人工脂質膜センサによる電位差検出⁷⁾) と比較して、¹H NMR スペクトルに基づいたプロファイリング分析では、検体の持つ情報を消失させることなく分析に反映させるためには変数 (パッケージ数) が多くなる。また、天然物は一般に含有成分の種類及び含有量にばらつきが多く、本検討のように、変数が検体数よりも多い場合は検体の情報が分散する傾向が認められる。他方、化合物にメチル基が存在する場合、高磁場のメチル基領域は、¹H-NMR 上強い積分強度を示す。従って、事前にメチル基を持つ化合物を含むことが明らかかな場合には、この領域を外して、変数を少なくしグループ化が可能かどうか検討することも有用であるものと考えられる。

¹H NMR スペクトルを用いた解析は、これまでに報告しているプロファイル分析^{6,7)}と比較し、水素核を持つ全ての化合物データを包括的に捕らえることが可能という特徴を持つ上、データを得られるまでの分析時間が短く、検体を再利用できる点で優れており、天然物のプロファイル分析として、ひとつの有効な評価手段であると考えられる。

IV 結論

雪茶製品について ¹H NMR スペクトルデータに基づく PCA によるメタボローム解析を行い、検体のグループ化を行ったところ、UV 検出 HPLC や味認識装置による分析結果に基づいたグループ化とは異なった結果が得られた。また、このグループ化には、 δ 3.5 近辺のシグナルの影響が強いことが判明し、本シグナルの由来を明らかにすることで、品質評価のための新たな指標成分が得られる可能性が考えられた。

さらに、HPLC 分析の際の分類の指標成分の ¹H NMR シグナル情報に基づき、解析に利用するスペクトル領域を限定することで、HPLC 分析と同様の分類が行われることを確認

した。

V 謝辞

本検討を行うにあたり、雪茶製品を御恵与いただいた福岡県の関係各位に深謝します。

VI 文献

- 1) Sugimoto, N., Tada, A., Suematsu, T., Arifuku, K., Saito, T., Ihara, T., Yoshida, Y., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Ito, S., Yamazaki, T., Kawamura, Y., Nishimura, T.,: Absolute quantification of carminic acid in cochineal extract by quantitative NMR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science)*, 51, 19-27 (2010).
- 2) Gomez, M.V., Verputten, H.H., Díaz-Ortiz, A., Moreno, A., de la Hoz, A., Velders, A.H.,: On-line monitoring of a microwave-assisted chemical reaction by nanolitre NMR-spectroscopy. *Chem. Commun. (Camb)*, 46 (25), 4514-16 (2010).
- 3) Fujiwara, M., Ando, I., Arifuku, K.,: Multivariate analysis for ¹H-NMR spectra of two hundred kinds of tea in the world. *Analytical Sciences*, 22, 1307-14 (2006).
- 4) Watson, D.G., Peyfoon, E., Zheng, L., Lu, D., Seidel, V., Johnston, B., Parkinson, J.A., Fearnley, J.,: Application of principal components analysis to ¹H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochemical Analysis*, 17, 323-31 (2006).
- 5) Cho, I.H., Kim, Y.S., Choi, H.K.,: Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using ¹H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 900-04m (2007).
- 6) Part 1 of this series: Kawahara, N., Anjiki, N., Goda, Y.,: Studies on chemical components and HPLC profile analysis of Setsucha Products. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 14, 63-69 (2007).
- 7) Part 2 of this series: Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y.,: Studies on the taste profile analysis of setsucha products by a taste-sensing system. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 14, 121-27 (2007).
- 8) Zhimin, M.A., Chen, X.,: Chemical constituents of *Thamnia vermicularis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 12 (10), 872-73 (2001).
- 9) Matsuoka, K., Ishii, S., Honda, C., Endo, K., Saito, A., Moroi Y., Shibata, O.,: NMR study on solubilization of sterols and aromatic compounds in sodium taurodeoxycholate micelles. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 80, 2334-41 (2007).

鏡検による粉末センナ茎と粉末センナ葉軸の鑑別

徳本廣子^a, 下村裕子^a, 飯田 修^b, 袴塚 高志^a, 合田幸広^{*,a}^a 国立医薬品食品衛生研究所^b 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部**Morphological Discrimination of
Powdered Senna Stem and Powdered Senna Leaf rachis**Hiroko Tokumoto^a, Hiroko Shimomura^a, Osamu Iida^b
Takashi Hakamatsuka^a and Yukihiro Goda^{*,a}^a National Institute of Health Sciences (NIHS),

18-1, Kamiyoga 1-Chome, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b Tanegashima Division, Research Center for Medical Plant Resources,
National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO),

17007-2, Matubarayama, Noma,

Nakatane-cho, Kumage-gun, Kagoshima 891-3604, Japan

(Received January 27, 2011)

As per the Pharmaceutical Affairs Law in Japan, leaflets, leaf rachises, leaf stalks (petioles), and fruits of senna (Alexandrian senna: *Cassia acutifolia* Delile or Tinnevely senna: *C. angustifolia* Vahl) have been designated as raw materials for exclusive use in pharmaceuticals. In contrast, the stems of senna have been regarded as non-pharmaceuticals, unless their products have shown any “medical effects” or “dosage and administration”; this is attributable to the fact that the content of sennosides—the active constituents of crude drugs—is lower in stems than in the other parts mentioned above. Therefore, the stems of senna are used in health foods. However, health foods are sometimes found to contain sennosides in medicinal quantities; this is thought to be due to the illegal use of leaf rachises rather than stems. Inspectors can find leaf rachises when health foods consist of nonpowdered plant tissues, such as tea bags. However, when the product contains the plant in the powdered form, it is extremely difficult to distinguish the types of plant tissues therein. To overcome this problem, we developed a method of distinguishing powdered senna leaf rachises from powdered senna stems by using microscopy.

Our key findings are as follows. Epidermal cells in the stomata distributional region are distinct in shape in the case of leaf rachises and stems: the former cells are elliptical, while the latter are polygonal. In addition, the relative length of the longitudinal axis of the epidermal cells differs in these 2 parts of the plant: the epidermal cells from the leaf rachis are longer than the adjacent stomatal cells, whereas the epidermal cells from the stem are usually shorter than the adjacent stomatal cells. These morphological characteristics were observed both in slices and in powdered samples of the plant, and were

common to both Alexandrian and Tinnevely senna. When we tested powdered samples containing a mixture of leaf rachises (5%) and stems (95%), we could identify the leaf rachises. Since the microscopic method does not warrant any expensive equipment, we believe it could be very useful for on-site inspection.

Keywords: Senna, supplement, Alexandrian, Tinnevely, *Cassia acutifolia*, *C. angustifolia*, Leguminosae, stem, rachis, microscope, morphology, anatomy

緒言

センナは小葉が日本薬局方¹⁾に記載される医薬品であるのをはじめ、葉軸、葉柄、果実も含め「専ら医薬品として使用される成分本質」(「専ら医薬品」として規制されている。一方、茎は医薬品の効能効果を標榜しない限り、医薬品として判断しない成分本質(非医薬品)として扱われ、瘦身を目的とした食品としてティーバッグなどに用いられているが、市販製品中に医薬品の常用量に近いセンノシドが検出される例が後をたたず、そのような製品中に、「専ら医薬品」であるセンナの葉や葉軸、果実などが混入している例が明らかにされている²⁻⁹⁾。刻みの製品であれば、肉眼でもこれらの混入を判別することは可能であるが、製品が粉末状の場合、特に茎と葉軸の鑑別は難しく、多数の試みはなされているものの^{3,6,9)}、著者らが知る限り、両者を明確に区別できる特徴について報告された例はない。

このような問題を解決するため、本研究では、鏡検により、他の部位の組織も含め、組織の特徴点を順次明らかにした。次いで、部位により形態的特徴の現れやすい、表皮の組織に着目し、鑑別の指標とすることを試みた。その結果、センナ粉末中に観察される、気孔を伴う表皮片の細胞の形状が、茎と葉軸で明らかに異なることを見出した。さらに茎、葉軸を混合した粉末において、出現する表皮片は由来する組織に見られた特徴をよく表し、両者を容易に区別できることを確認したので報告する。

実験材料および実験方法

1.材料

1.1 栽培品

アレキサンドリアセンナ *Cassia acutifolia* Delile (2008-10-A21), チンネベリセンナ *C. angustifolia* Vahl (2008-10-B9).

医薬基盤研究所種子島研究部栽培品を東京都世田谷区

に移し継続栽培。2008年10月～2009年5月に簡易温室にて生育中の株を使用。

1.2 乾燥標本

アレキサンドリアセンナ *Cassia acutifolia* (2009-10-C1, 2009-10-C2), チンネベリセンナ *C. angustifolia* (2009-10-D1, 2009-10-D2)。

富山大学薬学部付属薬用植物園栽培品。2009年10月に採集し腊葉としたものを使用。

2.使用機器と試薬

2.1機器

外部形態の観察にはルーペおよびキーエンスデジタルマイクロスコープズームレンズ(VH-Z25)を用い、10～175倍(=15インチモニター上での倍率)にて観察、内部形態および粉末の観察には、オリンパス光学顕微鏡BH-2を用い、常光および偏光下で観察した。切片の作成には凍結マイクローム(ヤマト光機工業)を使用した。キーエンスデジタルマイクロスコープ(KEYENCE VH-8000C)を用い、測定および写真の撮影を行なった。

2.2試薬

封入剤としてグリセリン水(グリセリンと精製水を1:1で混合したもの)、染色液としてスダンIII液(スダンIIIのできるだけ濃厚なアルコール溶液)を使用した。

3.方法

3.1材料の調製

栽培品は生育中の株の中央部、先端部および基部を含む数箇所から、茎、葉軸、花軸¹⁰⁾(花序軸)、および小葉を採取して試料とした。花軸は、主として開花期以降で、未熟果実形成時以降の組織を試料として用いたため、使用時期を明確にするため本文中では果軸(Fruit axis)と表現し、開花期の組織と区別した。各部位の組織の概要を把握する

ため、切片を作成し観察に供した。ミクロームにより作成する切片の厚さは、細胞の大きさを考慮し、局方の生薬試験法に記載されている 10~20 μm よりやや厚い 20~40 μm とし、表皮細胞の観察は、各部位の最外層を徒手により剥離して試料とした。粉末の観察には、数日間風乾した試料を、部位別に粉末とし、主として 100 号篩通過粉末について、やや大型の組織片は 80 号篩通過粉末について組織片の出現状況を比較検討した。

茎、葉軸混在下での組織片の出現状況を把握するため、約 5cm の茎 1 本、葉軸 2 本を混合した粉末を作成し、表皮細胞の出現状況を確認、鑑別の際の留意点を検討した。さらに葉軸を 5%含有する、茎と葉軸の混合粉末を作成し、鑑別の可否を検討した。

乾燥品(富山大学より提供)は、茎、葉軸の異なる数箇所の部位より、組織を削り取りまたは粉末を作成し試料としたほか、適当な大きさに切断した組織片を、暫時水に浸したのち表皮を剥離し、表皮細胞の観察を行った。

3.2 プレパラートの作成および鏡検

3.2.1 切片及び剥離した表皮

切片および剥離した表皮は、スライドガラス上にとり、封入剤としてグリセリン水を 1~2 滴滴下した後、気泡が封入されないようカバーガラスで覆い、40 倍、100 倍、400 倍で鏡検し、計測を行なった。表皮の剥離片は各部位につき 10 検体を目安に作成し、観察、計測を行なった。気孔の副細胞、ならびに毛の周囲の表皮細胞を除く、10 個のほぼ連続した表皮細胞について、測定した長軸方向の径を比較検討に用いた。さらに同一視野および同一切片中に出現した気孔について、長軸方向の径(孔辺細胞の長径)を測定し、表皮細胞との比較に用いた。400 倍で鏡検した際の視野あたり、または撮影した写真(対物レンズ 40 倍×FK レンズ 2.5 倍)1 枚中に出現する気孔の数を、気孔の分布状態の目安とした。

3.2.2 粉末

時計皿にグリセリン水を数滴滴下し、ここに少量の試料をとりガラス棒でかき混ぜた後、2~3 分以上放置して気泡を除いた。この少量をガラス棒の先でスライドガラスにとり、封入剤としてグリセリン水を 1 滴加えた後、組織片が重ならずほぼ均等に広がるようカバーガラスで覆い、100 倍および 400 倍で鏡検した。

部位別に作成した粉末を用い、茎および葉軸に出現する要素の特徴を把握したうえで、表皮組織を中心に観察を重ねた。気孔を伴う表皮の破片は、気孔の分布状態を確認し、1 片あたり、副細胞および毛の周囲の細胞を除く 10 個の表

皮細胞について、長軸方向の径を測定した。気孔を伴わない表皮の破片は、表皮細胞の長径の測定を行なった。破片が小さく、細胞数が 10 に満たないものでは、測定可能な表皮細胞全てについて測定を行い、データを細胞数 10 あたりの数値に換算した。

3.2.3 顕微鏡写真の撮影

各部位に出現する特徴的な要素について顕微鏡写真を撮影し、組織の比較を行なうと共に、茎から葉軸を鑑別するための基本となる組写真を作成した。

結果

1. 外部形態

アレキサンドリアセンナ(*Cassia acutifolia*)およびチンネベリセンナ(*C. angustifolia*)の各組織の名称を示した写真ならびに、アレキサンドリアセンナについて各部位の特徴を示した写真を Fig. 1 に示す。

茎には、互生する葉およびその脱落した痕を認めた。節には托葉および芽またはそれらの脱落した痕を認めた。全体的に剛毛(hb)および腺毛と思われる球状の毛(hg)が分布していたが、球状の毛は、採取後、時間の経過とともに萎むものが多く、乾燥した試料ではほとんど認められなかった。

葉軸には、対生する小葉およびその脱落した痕を認め、向軸側に一条の長い溝を認めた。葉軸表面は全体的に多数の剛毛および球状の毛に覆われ特徴的であったが、乾燥したものは、多くのもので剛毛が目立ち、球状の毛は認め難かった(Fig. 1 の * 参照)。

果軸には、互生する果実(果柄)およびその脱落した痕を認めた。果軸の表面は滑らかで、毛はほとんど認められなかった。花蕾期、開花期の花軸も表面は滑らかであった。

小葉および果実の表面は、多数の毛で覆われていた。採取直後の検体では、小葉や果実の表皮にも球状の毛が観察できた。

以上、アレキサンドリアセンナの茎、葉軸、果(花)軸では、葉、小葉、果実の付き方や芽など付属する組織の有無が異なっていた。これらの外部形態的な特徴は、チンネベリセンナにおいても、同様に認められた。

2. 内部形態

2.1 切片の観察

粉末の試料において、出現する組織片の形態およびその由来を正しく把握するため、あらかじめ、植物体中央部の組織を用い、特徴を確認した。茎、葉軸、果軸および小葉の横

断面および縦断面に見られる組織の顕微鏡写真を Fig. 2～4 に示す。

2.1.1 茎 (Fig. 2)

茎の横断面および縦断面を Fig. 2 に示す。横断面 (Fig. 2-1) は、ほぼ円形を呈し表皮 (ep) に続き、わずかな厚角組織、皮層 (cx) の柔組織 (p)、環状に配列した繊維束 (fb) を認めた。その内側には環状に連なる並立維管束 (vb) および髄 (m) を認めた。

縦断面 (Fig. 2-2) は、主として長軸方向に長い細胞よりなるが、表皮細胞は小型で特徴的であった。表皮には 2 種の毛 (hb, hg) を認め、共にスダン III 液でわずかに赤染した。繊維束を形成する繊維は長く壁孔が明瞭。繊維束の外方に接し、シュウ酸カルシウムの結晶を含む結晶細胞列 (cf) を多数認めた。結晶は主として単晶 (cs)、薄壁方形の細胞におおむね 1 個ずつ含まれ、数細胞連なって観察された。結晶は皮層の柔組織や放射組織中にも認められ、放射組織 (r) では、主として集晶 (ca) を含む結晶細胞列をなしていた。道管は、単せん孔 (pfs) を有する短い有縁孔紋道管 (vd) のほか、螺旋紋道管 (vs) や網紋道管 (vr) 等が認められた。髄 (m) の細胞には小さな壁孔が多数認められ、中央部には大型の細胞が認められた。細胞中にはでんぷん粒 (sta) を認めた。

2.1.2 葉軸 (Fig. 3)

葉軸の横断面および縦断面を Fig. 3 に示す。横断面 (Fig. 3-1) は、ほぼ円形を呈すが、葉の向軸面に相当する側に、突出する 2 条の稜、背軸側には、ごくわずかな隆起を 2 箇所認めた。各稜には 2～数層の厚角組織 (co) が明瞭で、これに続く柔組織は葉緑体に満たされていた。各稜の中央部にはおおむね 1 条の並立維管束を認めた。稜を形成しない部位では、表皮に続き 1～2 層の厚角組織、ほぼ環状に配列した繊維束を認め、これに囲まれるように、独立した維管束が、向軸側に 3 条、背軸側に 1 条走行していた。中央部には髄を認めた。この形態的な特徴は、葉軸のみでなく、葉柄部においても同様に認められた。

縦断面 (Fig. 3-2) は、各組織とも主として長軸方向に長い細胞よりなり、繊維には壁孔が明瞭。シュウ酸カルシウムの単晶を含む結晶細胞列を認めた。維管束には、長方形の薄壁性の細胞よりなる師部 (ph)、および単せん孔を有する短い有縁孔紋道管、網紋道管、階紋道管 (vc)、径の細い螺旋紋道管や環紋道管 (vg) などを認めた。柔細胞中にはシュウ酸カルシウムの集晶を認めた。

2.1.3 果軸および小葉 (Fig. 4)

果軸の横断面および縦断面を Fig. 4-1 に示す。横断面はほぼ円形、各組織の配置は茎とほぼ同様であったが、1. 表

皮のクチクラが厚い、2. 繊維束を構成する繊維の数が少なく、壁の肥厚がわずかであるなどの点で茎とは形態が異なっていた。縦断面では、皮層に大型の柔細胞が観察された。皮層および髄中にはシュウ酸カルシウムの集晶が散在していた。繊維束の付近にはシュウ酸カルシウムの単晶を認めたが、結晶細胞列を形成せず、単独で観察されるものが多かった。維管束は、茎や葉軸に比べ螺旋紋道管が多く認められた。

小葉の横断面を Fig. 4-2 に示す。主脈部 (md) は下部に大きく突出、葉肉部 (mes) は両面の表皮下に各 1 層の柵状組織 (pa) を認めた。柵状組織は葉緑体に富み、シュウ酸カルシウムの集晶および単晶が散在していた。両柵状組織の間には、間隙の多い海綿状組織 (sp) を認めた。維管束は螺旋紋道管または仮道管 (ts) よりなり、不規則な分枝が認められた。維管束に伴い結晶細胞列を認めた。結晶は単晶、薄壁方形の細胞におおむね 1 個ずつ含まれ、数細胞連なって観察された。

2.1.4 小括

以上、切片による観察を行なった結果、各部位ごとの特徴的な形態を明らかにすることができた。しかしながら、同時に各組織に類似の形態を示す細胞が共通して出現することも確認され、全ての組織片を対象とした比較では、その由来の断定が極めて難しく、粉末となった製品を鑑別することの困難さも示唆された。そこで、部位により形態的特徴の現れやすい表皮の組織に着目し、鑑別の指標とすることを試みた。

2.2 表皮剥離 (表面視) による比較

茎、葉軸および果軸、小葉、果実の表皮を剥離し、表皮細胞を表面視した結果、得られた形態的な特徴を Fig. 5～7 に示す。

2.2.1 茎 (Fig. 5)

Fig. 5 中のイラストに示すように、主茎および側枝を先端部 (A, B-a)、中央部 (B, B-b)、基部 (C, B-c) に分けて観察を行った。各部位とも主茎と側枝には細胞の特徴に大きな差が見られなかったことから、以降、主茎または側枝の観察に基づいたデータを用い実験を進めることとした。

アレキサンドリアセンナの表皮を観察したところ、Fig. 5 写真 B に示すように、気孔が分布している部位 (*1) とほとんど気孔を認めない部位 (*2) が、交互に長軸方向 (茎の伸長方向) に長く配列していることが明らかとなったため、両者を分けて形態的特徴の検討を行なった。

気孔が分布している部位の表皮の写真を A, B-a～c, C に示す。いずれの部位の表皮も、主としてほぼ方形～等径性多角形の表皮細胞からなり、ときに 3～7 個以上連続した細

胞の両端に先端の尖った細胞が配列し、あたかも紡錘形の細胞が分裂したような形状を認めることがあった。所々に長軸方向に規則的に配列する気孔(sto)を認めた。気孔の周囲には、主として5~6、おおむね4以上のやや小型の細胞からなる副細胞が認められた。副細胞は近接した表皮細胞とほぼ同様の形状を示したが、気孔を取り囲むように放射状に配列し、特徴的であった。気孔は、茎の先端部より得られた表皮で分布が多く、400倍観察下で撮影した写真1枚中に3個以上の気孔を認めることもあったが、中央部および基部では、分布は少なく、写真1枚中におおむね0~1個、まれに2個の気孔が観察された。毛および毛の基部付近の細胞は、長軸方向に長いものや放射状に配列するものがあり、周囲の表皮細胞とは形態を異にしていた。以上の特徴はチンネベリセンナにおいても同様に認められた。

表皮細胞の径を各部位別に測定した結果を Table 1. に示す。茎においては長軸方向の径の平均値は、アレキサンドリアセンナで17~23 μm 、チンネベリセンナでは20~23 μm を示した。水平方向の径は、それぞれ15~21 μm 、17~26 μm 。先端部および中央部の表皮細胞は、水平方向の径に比べ長軸方向の径が大きい傾向にあったが、基部では、水平方向の径が長軸方向の径を上回る細胞が認められた。一方、気孔(孔辺細胞)の長軸方向の径はおおむね25~

35 μm で、基部のものが大きかった(以後、気孔の大きさの目安として30 μm を用いる)。各部位ごとに表皮細胞と気孔の平均径を比較したところ、茎ではいずれも表皮細胞のほうが小型であった。

さらに、今回測定に供した表皮細胞の長軸方向の径は、採取した部位や種によらず、約90%以上が、気孔の大きさのおおよその目安である30 μm に至らないことが明らかとなった。Table 2. に測定した表皮細胞の径の分布度数を累積百分率で示す。

気孔がほとんど存在しない部位は、主として長軸方向に長い長方形の表皮細胞よりなっていた。アレキサンドリアセンナでは部位別に測定した長軸方向の平均径は38~58 μm を示し、基部のものほど大型で、150 μm に至るものが認められた。水平方向の径は12~16 μm 。わずかに介在する気孔は、直接この大型の表皮細胞に接することはなく、小型の副細胞を伴い、その周囲には、気孔が分布していた部位と同様に、ほぼ方形~等径性多角形で気孔より小型の表皮細胞(長径11.30-27.34-39.42 μm)が、数列配列していた。

以上の結果から、茎ではアレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナともに、気孔の周囲に見られるほとんどの表皮細胞は、気孔に比べ小型であるといえる。

Table 1. Diameters (μm) of epidermal cells and the adjacent stomatal cells (guard cells) of stems, leaf rachises and fruit axes of Alexandrian senna and Tinnevelly senna

		Stems			Leaf rachises			Fruit axes ^{*5}
		Apical part(A) ^{*1}	Central part(B)	Basal part(C)	Adaxial part(a)	Adaxial part(b)	Abaxial part(c)	
Alexandrian senna	Epidermal cells	15.8-23.4-32.6 ^{*2}	10.9-21.6-46.4	9.6-16.8-27.9	19.6-32.5-53.9	20.6-40.3-59.5	12.4-40.5-79.6	16.0-35.5-77.4
		8.5-15.1-26.0 ^{*3}	10.3-20.5-29.2	11.3-19.4-31.3	11.0-21.3-30.5	10.0-19.0-32.5	9.1-15.4-24.8	9.9-19.0-30.5
	Stomatal cells (guard cell)	18.7-24.1-28.0 ^{*2}	27.7-29.3-31.3	30.5-34.0-37.0	24.5-27.4-30.5	25.0-27.5-29.6	—	31.8-34.5-37.7
		E<S ^{*4}	E<S	E<S	E>S	E>S		E>S
Tinnevelly senna	Epidermal cells	12.6-20.2-30.0 ^{*2}	13.7-23.4-32.7	11.3-20.3-32.3	19.3-29.7-47.9	20.9-41.1-63.1	21.8-33.9-65.4	12.8-39.6-94.5
		8.2-17.2-26.3 ^{*3}	10.4-18.0-33.7	15.3-25.7-49.2	13.3-21.5-29.2	9.0-16.5-25.5	9.0-14.1-20.7	12.3-23.7-42.6
	Stomatal cells (guard cell)	25.4-28.2-32.1 ^{*2}	24.5-29.3-35.5	30.9-32.4-34.7	22.5-29.4-38.1	26.8-31.1-35.2	29.5-31.2-33.0	31.3-36.0-44.8
		E<S ^{*4}	E<S	E<S	E>S	E>S	E>S	E>S

*1 The alphabet of each part shows the same position in the illustrations of Fig. 5 or 6.

*2 Diameters of longitudinal (long) axis direction. Each set of values represents the minimum-average-maximum.

*3 Diameters of lateral (short) axis direction. Each set of values represents the minimum-average-maximum.

*4 Comparison of the average diameters in longitudinal axis of epidermal cells(E) and stomatal cells(S).

*5 The axis of inflorescence in a fruiting stage.

Table2. Accumulative percentages of longitudinal axis diameters of the epidermal cells in the stomata distributional region in stems, leaf rachises and fruit axes of Alexandrian senna and Tinnevely senna

Diameters (μm) ^{*1}	Alexandrian senna						Tinnevely senna							
	Stems			Leaf rachises			Fruit axes ^{*3}	Stems			Leaf rachises			Fruit axes
	Apical part(A) ^{*2}	Central part(B)	Basal part(C)	Adaxial part		Abaxial part(c)		Apical part(A)	Central part(B)	Basal part(C)	Adaxial part		Abaxial part(c)	
			(a)	(b)					(a)	(b)				
0~5														
~10			1.4%											
~15		8.3%	34.3%			1.4%		10.0%	5.0%	11.0%		1.4%		
~20	16.0%	45.0%	81.4%	5.0%		4.3%	10.0%	52.5%	26.7%	53.0%	3.3%	8.6%		
~25	70.0%	75.0%	95.7%	30.0%	5.6%	7.1%	17.1%	85.0%	70.0%	86.0%	26.7%	4.3%	15.7%	20.0%
~30	94.0%	91.7%	100.0%	45.0%	10.0%	22.9%	37.1%	100.0%	95.0%	98.0%	53.3%	14.3%	38.6%	31.4%
~35	100.0%	96.7%		65.0%	23.3%	40.0%	54.3%		100.0%	100.0%	86.7%	31.4%	60.0%	40.0%
~40		98.3%		80.0%	53.3%	51.4%	67.1%				93.3%	48.6%	80.0%	55.7%
~45		98.3%		80.0%	71.1%	67.1%	80.0%				96.7%	67.1%	91.4%	65.7%
~50		100.0%		95.0%	83.3%	75.7%	92.9%				100.0%	81.4%	94.3%	74.3%
~55				100.0%	93.3%	85.7%	95.7%					88.6%	97.1%	81.4%
~60					100.0%	94.3%	95.7%					95.7%	98.6%	87.1%
~65						95.7%	98.6%					100.0%	98.6%	92.9%
~70						97.1%	98.6%						100.0%	94.3%
~75						98.6%	98.6%							95.7%
~80						100.0%	100.0%							97.1%
~														100.0%

*1 Longitudinal axis direction of epidermal cells.

*2 The alphabet of each part shows the same position in the illustrations of Fig. 5 or 6.

*3 The axis of inflorescence in a fruting stage.

2.2.2 葉軸 (Fig. 6)

稜が認められたことから、部位により表皮細胞の形状が異なることが推定された。そこで葉軸の表皮を、2条の稜にはさまれ溝を形成している部分(a)、稜の先端から葉軸側面にかけて(b)、背軸側(c)の3箇所に分けて形態的特徴の検討を行なった。各部位の表皮細胞をFig. 6に示す。

稜にはさまれた部位(a)は、主としてほぼ等径性の4~6角形の表皮細胞よりなり、多数の気孔や単細胞毛および腺毛が認められた。気孔はほぼ長軸方向に配列。副細胞は主として5~6個の細胞よりなり、放射状に配列していた。気孔の分布は多く、400倍での観察下、1視野あたり10数個を超える気孔を認めた。写真中にもおおむね3~5個の気孔を認めることができた。表皮細胞の長軸方向の平均径はアレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナ共に約30 μm を示し、近接した気孔よりわずかに大きかった。また、測定に用いた表皮細胞の約半数は、30 μm よりも大型であった(Table1. Table2.)。

稜から葉軸の側面に相当する部位(b)は、長軸方向に長い長方形~長六角形の表皮細胞よりなり、背軸面に近いほど、長径の大きい細胞が多く認められた。気孔はほぼ長軸方向に配列、主として5~6個の放射状に配列した副細胞に囲まれていた。毛の基部に隣接する表皮細胞は、放射方向に配列し、他に比べ長く特徴的であった。気孔や毛の分布は、

稜にはさまれた部位(a)より疎であったが、茎に比べて多かった。気孔は1視野あたり8~10個またはそれ以上、1枚の写真中にはおおむね1~4個認められた。表皮細胞の長軸方向の平均径は、アレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナ共約40 μm を示し、気孔の平均径を超えていた。また測定に用いた表皮細胞の約80%以上の細胞は、30 μm より大型であった(Table1. Table2.)。

背軸側(c)には、長軸方向に長い長方形の表皮細胞が多数認められた。気孔の分布は少なく、わずかに認められた気孔は、長軸方向に配列、副細胞は主として5~6個よりなっていた。表皮細胞の長軸方向の平均径は、アレキサンドリアセンナで約40 μm を示し、測定に用いた表皮細胞の約80%の細胞は30 μm を超えていた。チンネベリセンナの表皮細胞はアレキサンドリアセンナに比べ、小型であったが、約60%の細胞は30 μm を超えていた(Table1. Table2.)。

以上の結果から、葉軸では、アレキサンドリアセンナ、チンネベリセンナともに、ほとんどの表皮細胞は気孔に比べ大型であるといえる。

2.2.3 果軸 (Fig. 7-1)

果軸の表皮をFig. 7-1に示す。部位により方形~ほぼ等径性で茎の表皮細胞に類似するものや、長多角形で葉軸の表皮細胞に類似するものが認められた。気孔はわずかに出