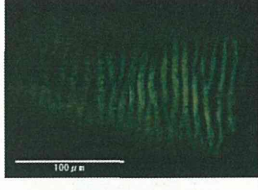
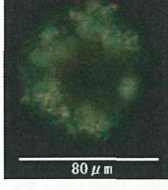
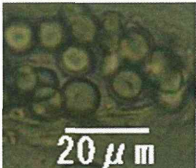
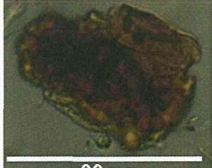
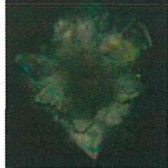
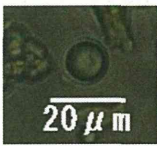
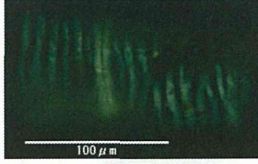
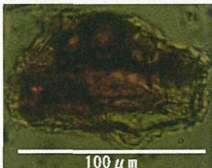
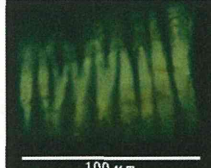
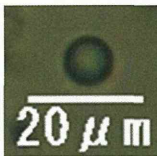
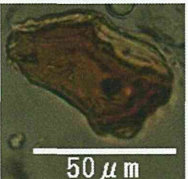
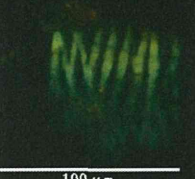
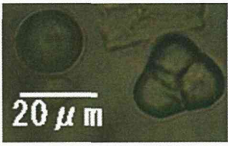
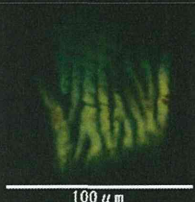
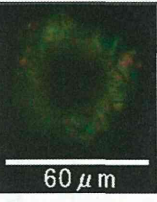
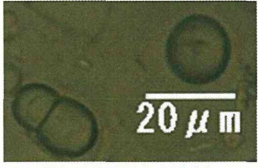
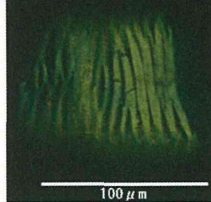
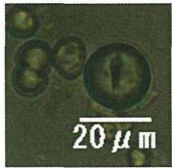
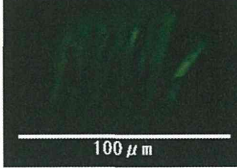
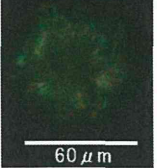


表2 性状及び検鏡(粉末)の結果

検体	性 状
15-2B	円柱形を縦割、半径 3.8 cm、長さ 17.8～22 cm、コルク層を付けており、外面は淡灰褐色～黒褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は茶褐色で、褐色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
17-5B	円柱形を縦割、直径 3.5～4.2 cm、高さ 6.5～9.3 cm、コルク層を付けており、外面は灰白色～灰褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄褐色～赤橙色、白色の模様がある。髄部分は淡黄褐色、白色～黄色の維管束が放射状にある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
17-13B	円柱形を横切及び縦切し、直径 3.0～6.2 cm、高さ 0.7～6.4 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色～黒褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡褐色～暗褐色で、淡黄色～淡褐色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
17-15B	円柱形を縦割、半径 0.9～2.6 cm、高さ 10.8～18 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄色～淡赤橙色で、白色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
17-18B	円柱形を縦割、直径 3 cm、高さ 8.9～15 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄色～黄褐色で、白色類の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
17-19B	円柱形を縦割、直径 1.3～4.1 cm、長さ 1.7～13.8 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色～暗灰褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は短褐色～黒褐色で、白色～淡黄色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
18-9A	円柱形を横切、直径 7.2～8 cm、高さ 0.9～2.3cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色～暗褐色、破碎部分が淡橙赤色の部分もあり、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡褐色～黒色で、淡黄色の模様がある。つむじ様組織は不明瞭。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
18-4B	円柱形を縦割、直径 3.5～4 cm、長さ 6.6～13.2 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色～暗褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は灰褐色～黒色で、褐色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
18-9B 18-9B	円柱形を縦割、直径 2.2～2.3 cm、高さ 11.5～15 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄色～淡赤橙色で、白色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。

検体	性 状
29-1B	円柱形を横切及び縦割し、直径 1.4～6.1 cm、高さ 0～22 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色～褐色、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄色～褐色で、白色～淡黄色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
29-2B	円柱形を縦割、半径 1～2.6 cm、高さ 18.5 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色、粗くはないが皺があり、質は硬いがコルク層は崩れやすい。横切面は暗褐色～茶褐色で白色～茶褐色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
29-4B	円柱形を横切、径 3.7～6.5 cm、高さ 0.5～2.4 cm、コルク層をつけており、外面は灰褐色、質はかたいがコルク層は崩れやすい。横切面は褐色～暗褐色で淡黄色の入り組んだ複雑な模様あり。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
43-7B	円柱形を縦割、半径 1.1～2.2 cm、長さ 4.2～9 cm、コルク層を付けており、外面は灰褐色、粗い皺があるものもあり、質は堅いがコルク層は崩れ易い。横切面は淡黄色～褐色で白色～淡黄色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
43-11B	円柱形を縦割、半径 2.1～3.1 cm、高さ 6.8～14.7 cm、コルク層を付けて外面は灰褐色～暗褐色、質は堅いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡褐色～暗褐色で灰褐色や淡黄色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
43-16B	円柱形を縦割、半径 1.2～1.8 cm、高さ 18.2～19.5 cm、コルク層を付けて外面は灰褐色、質は堅いがコルク層は崩れやすい。横切面は褐色～暗褐色で淡黄色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
45-2B	円柱形を縦割、半径 1.5～1.8 cm、高さ 0～19.7 cm、コルク層を付けて外面は灰褐色～黒色、質は堅いがコルク層は崩れやすい。横切面は淡黄色～褐色で淡黄色～白色の模様あり、質は堅いがコルク層は崩れやすい。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。
45-3B	円柱形を縦割、半径 2.2～5.6 cm、高さ 6.7～7 cm、コルク層を付けて外面は灰褐色～黒褐色、質は堅いがコルク層は崩れやすい。横切面は褐色で黒褐色の模様がある。 わずかに特異なおいがあり、味はわずかに渋くて苦い。かめば細かい砂をかむような感じがあり、唾液を黄色に染める。 粉末を鏡検した結果、でんぷん粒、暗褐色の着色物、シュウ酸カルシウムの集晶、それらを含む柔細胞の破片、網紋道管の破片を確認した。

図4 粉末の検鏡画像

№	でんぶん粒	暗褐色の着色物	網紋道管	シュウ酸 Ca 集晶
15-2B				
17-5B				
17-13B	 			
17-15B	 			
17-18B	 			
17-19B				
18-9A				
18-4B				

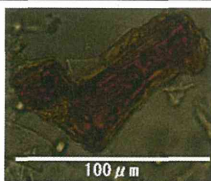
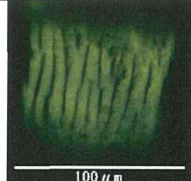
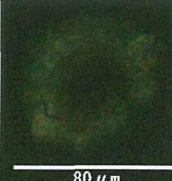
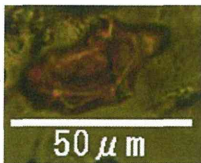
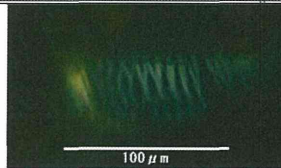
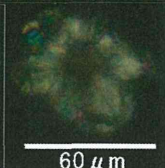
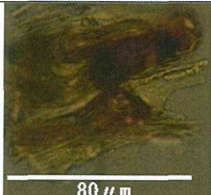
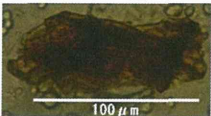
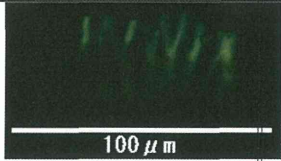
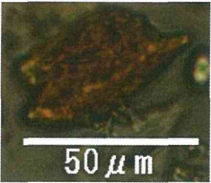
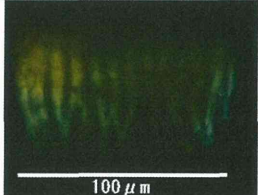
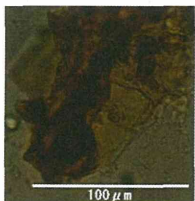
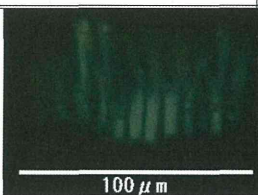
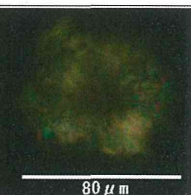
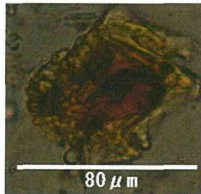
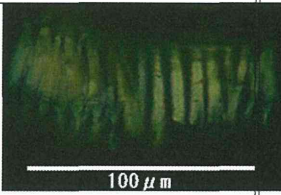
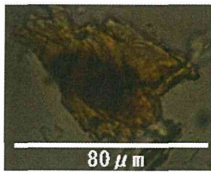
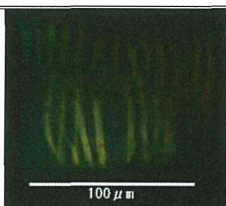
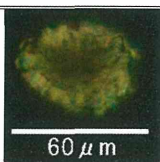
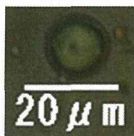
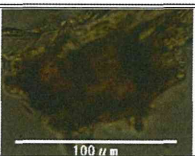
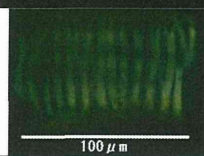
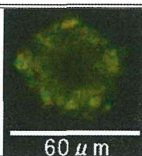
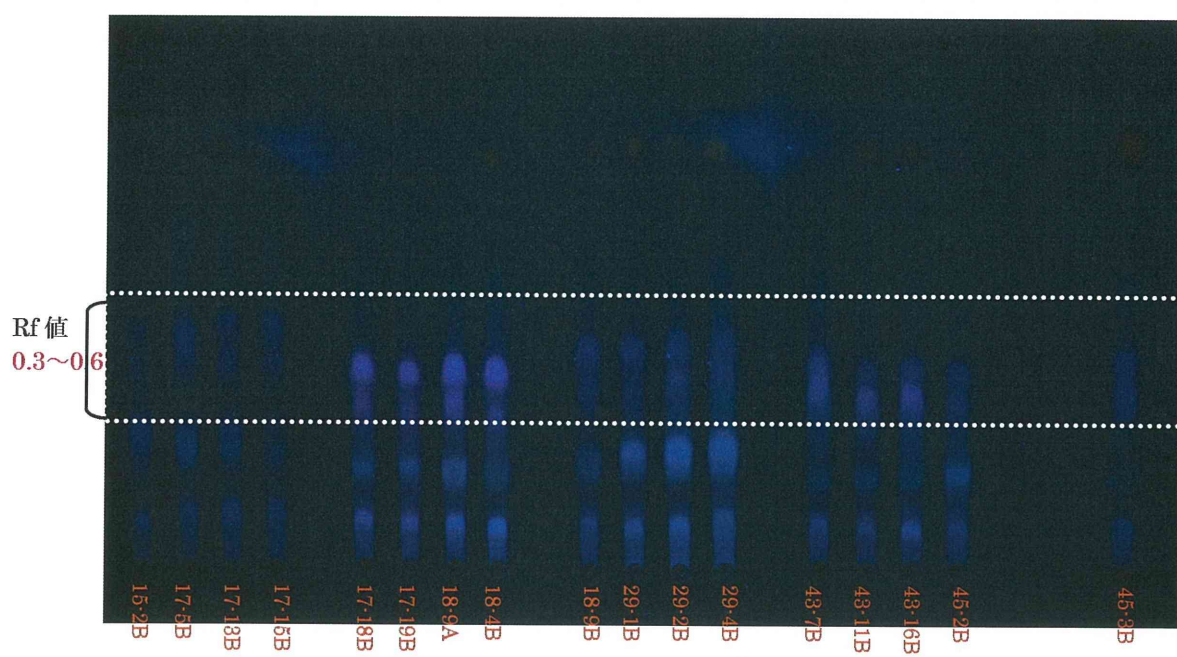
18-9B	 20 μm	 100 μm	 100 μm	 80 μm	
29-1B	 20 μm	 20 μm	 50 μm	 100 μm	 60 μm
29-2B	 20 μm	 30 μm	 80 μm	 100 μm	 100 μm
29-4B	 20 μm	 100 μm	 100 μm	 100 μm	
43-7B	 20 μm	 20 μm	 50 μm	 100 μm	 100 μm
43-11B	 20 μm	 100 μm	 100 μm	 80 μm	
43-16B	 20 μm	 20 μm	 80 μm	 100 μm	 60 μm
45-2B	 20 μm	 20 μm	 80 μm	 100 μm	 60 μm
45-3B	 20 μm	 20 μm	 100 μm	 100 μm	 60 μm

表3 確認試験、純度試験、乾燥減量、灰分、エキス含量及び定量の結果

局方 試験	確認試験	純度試験			乾燥減量	灰分	エキス含量	定量法
	センゾイド [*] A	重金属 10 ppm 以下	ヒ素 5ppm 以下	ラボ ^ン チン	13.0% 以下	13.0% 以下	希エタノールエキス 30.0%以上	センゾイド [*] A 0.25%以上
15-2B	Rf 値 0.33 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.85%	4.42%	47.88%	0.26% *(0.47%)
17-5B	Rf 値 0.33 赤色	5~10 ppm	適合 (着色無し)	認めない	8.53%	5.65%	40.56%	0.60% (0.63%)
17-13B	Rf 値 0.33 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.79%	5.85%	47.90%	0.12% (0.33%)
17-15B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.31%	4.20%	50.51%	0.30% (0.49%)
17-18B	Rf 値 0.41 赤色	5~10 ppm	適合 (着色無し)	認めない	8.56%	5.76%	49.26%	0.32% (0.40%)
17-19B	Rf 値 0.41 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.28%	4.10%	48.16%	0.47% (0.70%)
18-9A	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.05%	4.01%	43.20%	0.28% (0.42%)
18-4B	Rf 値 0.45 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.41%	4.18%	51.72%	0.51% (0.23%)
18-9B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.44%	3.96%	46.59%	0.37% (0.50%)
29-1B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.38%	5.16%	38.52%	0.18% (0.29%)
29-2B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	7.98%	4.06%	52.98%	0.28% (0.32%)
29-4B	Rf 値 0.32 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.41%	5.60%	48.07%	0.08% (0.24%)
43-7B	Rf 値 0.33 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.59%	6.63%	45.88%	0.53% (0.57%)
43-11B	Rf 値 0.33 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.85%	5.71%	33.60%	0.19% (0.26%)
43-16B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	8.31%	4.66%	32.79%	0.22% (0.29%)
45-2B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.94%	4.58%	30.62%	0.17% (0.28%)
45-3B	Rf 値 0.38 赤色	5 ppm 以下	適合 (着色無し)	認めない	9.46%	5.51%	33.17%	0.46% (0.51%)

*カッコ内には平成 24 年度にセンゾイド A を定量した結果を示す。

図5 純度試験のTLC画像



平成25年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—LC/MSによるダイオウの網羅的成分分析—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 ダイオウのプロシアニジン類の分析に有効なカラムを選択するため、シリカゲルカラム、Size exclusion chromatography (SEC) カラム、HILIC カラムの有効性を検討した。結果としては、LC-MS による分析を考えた場合には、HILIC カラム (Tosoh Amide-80) が分離パターン、使用溶媒とイオン化法との適切な組み合わせ等を鑑みたとき、最も優れた方法であり、縮合度が4までのプロシアニジンの検出は比較的容易である。

研究協力者

数馬恒平 富山大学和漢医薬学総合研究所
助教

A. 研究目的

生薬ダイオウは、*Rheum palmatum* L.、*R. tanguticum* Maxim.、*R. officinale* Baillon、*R. coreanum* Nakai 又はそれらの種間雑種の通例根茎である。主な薬効は、sennosides A、B による瀉下作用であり、その他アントラキノン類による抗菌作用、lindreyin（フェニルブタノン類）や resveratrol 4'-*O*-glucopyranoside（スチルベン類）による抗炎症作用などが知られている。日本薬局方では生薬の乾燥重量に対して sennoside A を 0.25%以上含有することが求められている。

一般に生薬の基源植物はクローンではなく多様な遺伝的背景を持っている。遺伝的多様性を背景にした様々な成分組成の特徴をもつ系統に関して、それらの遺伝資源としての重要性は局方規格に一義的に代表されるものではないといえる。

ダイオウにはRG-tanninやrhatanninなどのタンニン類がアントラキノン類と共に主成分として含まれている（図1）^{1,2)}。タンニン類は植物由来ポリフェノールの総称であり、化学的特徴からa) 没食子酸と糖類から構成される加水分解型タンニン類と、b) 主に種々のflavan-3-olが縮合した縮合型タンニン類に分類される。ダイオウに含まれるのは、b) 縮合型タンニン類である。主にcatechinを単位として縮合したプロシアニジン類で、これまでに40種類ほど報告されている（図1）^{3,4,5)}。

近年ポリフェノールは、抗炎症、抗酸化、抗腫瘍形成、抗脂肪形成、抗肥満や慢性疾患リスクの低減などの健康増進作用が広く報告されており^{6,7)}、ダイオウにおいてもタンニン類の生理作用への寄与に興味を持たれる。しかし、最近のダイオウの成分と薬理に関する総説においてさえも、ダイオウのタンニン類の生理作用についての報告は1例のみしか記載されておらず⁵⁾、生理学的評価はほとんどなされていないと考えられる。このような生理的評価を行うためには、構成成分

評価の基盤としてタンニン類の単離と構造決定およびクロマトグラフィー分析法の開発は必要不可欠である。しかし、ダイオウではLC-MSによる網羅的分析はこれまでに例がない。

縮合型タンニンのクロマトグラフィー分析では、食品特にリンゴなどの果実に含まれるプロシアニジンの分析例が多い⁸⁾。疎水性相互作用を分離の基盤とするODSカラムを用いた分離は、縮合度の小さい(モノマーからトリマー程度の)分子までは一般的により分離をもたらすが、縮合度が増えるに従い分離が悪くなる欠点がある⁸⁾。それに対して、未修飾のシリカゲルでは、重合度の差を持って分離するが、同一の重合度の異性体は分離できない^{9, 10, 11, 12)}。また、より積極的に分子サイズで分ける方法として、オープンカラムを用いたゲル濾過も試みられてきた^{13, 14, 15)}。

近年の生薬の高速液体クロマトグラフィーでは、C18カラムを用いる分離が定番であるが、タンニン類などでは重合度が大きくなるとピークの広幅化が著しくなり、分析を難しくしている¹⁾。一方、カラムクロマトグラフィーに用いられるカラム充填材は、近年日進月歩で改良が進んでおり、分子ふるいや親水性相互作用、イオン相互作用を分離機構とする充填材が充実しつつあることから、それらを選択する事で良い結果を得られる可能性が考えられる。

本研究では、ダイオウに特徴的なタンニン類の網羅的分析を目指して、主にマススペクトル検出の高速液体クロマトグラフ(LC-MS)による分析法の開発を行った。昨年度は、C18カラムを用いた逆層クロマトグラフィーによる分析を検討し、溶出のプロファイルを明らかにした。今年度はプロシアニジン類により特化した方法を模索するため、分子ふるいクロマトグラフィー(size exclusion chromatography, SEC)、および親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)、シリカゲルクロマトグラフィーにて分析を行ったのでその詳細を報告する。

B. 研究方法

1. 植物材料

昨年度分析に用いた植物材料(2012年長野県菅平で収穫した栽培5年目のダイオウ)のうち、系統29より29-2、系統42より42-4、加えて、タンニン高含有系統から2010D1-4(2010年中国収集品)、2010D1-3(2010年中国収集品)、および2013D4(2013年菅平収穫の栽培3年目の株)を用いた。これらは、地下部を掘り上げた後、水洗し、根茎および根に分別し、低湿度低温条件で完全に乾燥させた。

また、ダイオウのプロシアニジン類の対照として、プロシアニジン類を豊富に含むオオミサンザシ果実を用いた。オオミサンザシの乾燥果実は、中国山東省産の生果実を、スライス後、天日に干して調製した。

2. 試薬

水はMilli-Q水、有機溶媒は断りが無ければ和光純薬社製特級溶媒を用いた。LC/MS用の有機溶媒は和光純薬社製LC/MSグレード、LC/MS用の水は和光純薬社製の純水を用いた。

3. 標準物質および標準溶液の調製

センノシドA標準品(和光純薬)、センノシドB標準品(和光純薬)、Rhein(和光純薬)、(-)-Epicatechin gallate(ナカライテスク)、Physcion(LKT Laboratories)、Aloe-emodin(Sigma)、Emodin(Sigma)、Chrysophanol(LKT Laboratories)、Gallic acid(ナカライテスク)、(+)-Catechin(ナカライテスク)を用いた。これらは、1 mg/mLの50% DMSO含有メタノール溶液として標準溶液を調製し、適宜メタノールで希釈して用いた。

4. 試料溶液の調整

根茎、根および果実の乾燥品それぞれにつき、粉碎機で粉碎し、150 μ mのふるいにかけて細粒とした。このものの各200 mg(オオミサンザシは2.0 g)につき、80%エタノール10 mLで超音波照射下15分間抽出し、遠心分離(2000回転10分)後、上清を回収

した。同じ操作をさらに2回繰り返し、回収した上清を一つにまとめて減圧乾固した。このものを10 mLの90% (v/v) メタノール水溶液に溶解し、0.45 μ m のフィルターを通してLC/MS 用試料溶液とした。特に記載がない限り、分析の際は10 μ L をオートサンプラーより分析装置へ導入した。

5. 分析装置と検出条件

5. 1. 装置1

MS検出高速液体クロマトグラフは、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器付き1100HPLC システム (Agilent) とEsquire3000 plus イオントラップ質量分析計 (Bruker) で構成した。PDA波長範囲は200-600 nm。MS検出条件は、electrospray ionization (ESI) 正イオンモード、nebrizerは50 psi、dry gasは10 mL/min、dry temp. は360°C、capillary voltageは-4500 V、target massは m/z 1500、compound stabilityは20%、測定範囲は m/z 50 - 3000、auto MS²モード (2 most abundant ions)。

5. 2. 装置2

MS検出高速液体クロマトグラフは、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器付きAccela 高速液体クロマトグラフ (ThermoScientific) とLTQ Orbitrap XL 高分解能質量分析計 (ThermoScientific) で構成した。PDA波長範囲は200-600 nm。MS検出条件は、electrospray ionization (ESI) 正イオンモード、ion spray voltageは4600 V、分解能は60,000、測定範囲は m/z 50 - 2000、sheath gas flowは50 arbitrary unit、aux gas flowは30 arbitrary unit、ion spray voltageは4.6 kV、capillary temp. は350°C、capillary voltageは19 V、tube lensは35 V、他の条件はメーカーデフォルト値を設定。

5. 3. 装置3

AS-950-10 オートサンプラー (JUSCO)、LC-20A ポンプおよびSPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器 (Shimadzu)、860-C0 カラムオープン (JUSCO) を用いて構成した高速

液体クロマトグラフ。PDA波長範囲は200-600 nm。

6. 分析カラムおよび溶媒条件

6. 1. Size exclusion chromatography (SEC) カラム

SEC用カラムとして、Ultrasphere 250 (7.6 i.d. x 300 mm; Waters) を用いた。溶出は、イソクラティック条件およびグラジェント条件の2通りで行った。a) イソクラティック条件ではMeOH:H₂O = 1:1を用いた。b) グラジェント条件では、0.1%ギ酸水溶液 (溶媒A)、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (溶媒B)、溶媒Aに対して50分間で0-50% 溶媒Bのリニアグラジェント後、続けて20分間50% Bを継続、流速 1.0 mL/min、カラム温度 60°C。

6. 2. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラム

HILIC用カラムとして、Amide-80 (2.0 i.d. x 250 mm; Tosoh) を用いた。溶出は、5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (溶媒A)、アセトニトリル (溶媒B)、溶媒Aに対して50分間で90-40% 溶媒Bのリニアグラジェント、流速 0.5 mL/min、カラム温度 35°C。

6. 3. シリカゲルクロマトグラフィーカラム

シリカゲルクロマトグラフィー用カラムには、Wakoshil-II 5 SIL-100 (4.6 i.d. x 250 mm; Wako) を用いた。溶媒は、CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/HOAc = 41:7:1:1 (v/v/v/v) (溶媒A)、CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/HOAc = 5:43:1:1 (v/v/v/v) (溶媒B)、溶媒Aに対して40分間で0-40% 溶媒Bのリニアグラジェント後、5分間で40-100%溶媒Bのリニアグラジェント、その後100%溶媒Bで5分保つ¹¹⁾。流速1.0 mL/min、カラム温度 35°C。

6. 4. 逆層クロマトグラフィーカラム

逆層クロマトグラフィーカラムには、Capcell Pak C18 (2.0 i.d. x 150 mm; Shiseido) を用いた。溶媒は、0.1%ギ酸水溶液 (溶媒A)、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (溶

媒B)、溶媒Aに対して25分間で5-95% 溶媒Bのリニアグラジェント。流速0.2 mL/min、カラム温度 35℃。

C. 研究結果および考察

1. 逆層カラムによる分離

装置2で逆層カラムを用いた分析条件は、昨年度の網羅的分析で用いた。今年度、同様に分析したところ、全く同様の解析結果が得られた（データ示さず）。

2. シリカゲルカラムによる分離

装置3でPDA検出器を用いたシリカゲルカラムによる分離では、まず対照としてオオミサンザシ果実の分析を行った（図2）。オオミサンザシからは、プロシアニジンのオリゴマーに相当すると考えられる複数のピークが検出された。これらのピークの紫外可視吸収スペクトルは、プロシアニジンに特徴的なスペクトルであり、280nmに吸収極大をもっていた。続いて、ダイオウのサンプルを分析したところ、オオミサンザシで検出された溶出時間の範囲で顕著なピークは検出されなかったが、小さなピーク一つ一つを確認すると、プロシアニジン型スペクトルが多く、ピークで確認された（図3）。Hellstromらは、蛍光検出で選択的かつ高感度に Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia*) のプロシアニジンを10 merまで分離して検出している¹¹⁾。ダイオウでも蛍光検出すれば、シリカゲルによる分離は有効な方法の一つになるに違いない。

シリカゲルカラムによる分離では、溶出溶媒の組成が理由で、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）によるLC-MSを測定できない。今回、大気圧化学イオン化法（APCI）でもプロシアニジン類がイオン化できるかどうかは検討しなかった。

3. Size exclusion chromatography (SEC) カラムによる分離

SECとは分子ふるいによる、分子サイズによる分離の事である。高分子多糖類によるゲル濾過法は、タンパク質や核酸の分離や脱塩

を目的に使われてきた。また、スチレン重合体の様な化学高分子ビーズによるゲル濾過では、合成高分子の分子量分布を評価するために使われてきた。近年、圧力耐性のある合成樹脂が充填されたHPLC用カラムが市販され、微量高速分析が可能になった。

プロシアニジン類は、種々の縮合度からなる混合物であるから、直感的にはSECカラムによる分析は、それらの縮合度の分布を明らかにするよい手法と考えられる。しかし、充填材へのサンプルの吸着が障害となって、有効な検量線が引けない場合には、分子量測定ができない。Yanagidaらは、Tyoparl HW-40を用いたリンゴプロシアニジン類のゲル濾過で、吸着を回避するために8 Mもの尿素を加えている¹³⁾。Nonierらは、親水性ゲルを用いたHPLC用カラムで水を溶媒として用い、カテキンとゲルとの相互作用を調べた結果、硝酸ナトリウムを加えたとき最も吸着がなくなることを明らかにした¹⁴⁾。

今回行った親水性ゲルカラム (Ultrahydrogel 250) ではダイオウのサンプルを直接導入する場合にいくつかの問題点があった。まず、サンプルは完全に水には溶けず、最低でも50%はMeOHを加えなければならない。Ultrahydrogelの使用上の制限として、溶出溶媒には有機溶媒を30%までしか加えられない（ただし、グラジェント法でゆっくり加える場合には最大で50%まで加えられる）。また、LC-MS検出のためには、不揮発性の塩は用いる事が難しいことから、揮発性の酸や塩基で、吸着が回避される事が望まれる。

実際の分析では、50%MeOH、0.1%ギ酸添加50%MeOH、あるいは5 mM ギ酸アンモニウム添加50%MeOHによる溶出を試みたが、分離のパターンはほとんど変化がなかった。50%MeOHの溶出パターンを図4に示す。標品のアントラキノン類やカテキンなどは分子サイズがほとんど一緒に関わらず溶出後半で分離している。また、カルボキシル基を持つ化合物でピークがリーディングしている。これらの事は、この分離パターンが、親水性相互作用による吸着と、イオン性官能基同士の

相互作用が、分離に大きく影響を与えている事を示している。これらの影響を回避する試みは、今回これ以上は行わなかった。

ゲル濾過ではあり得ないが、このような相互作用を活用した吸着クロマトグラフィーによる分離は考えられる。そこで、MS検出にて、100%水から50%MeOHまでリニアグラジェントによる溶出を行ったところ、比較的良好な分離を得た(図5、図6)。注目する点は、多糖類と考えられる質量数1390のピークが、保持時間10分と他の成分よりかなり早く溶出している点である。粗抽出物に含有する多糖類の特異的検出に有効かもしれない。加えて、低縮合度のプロシアニジン類も検出できたが、溶出時間と質量数の関係からも、分離モードが分子ふるいでない事は明らかである(図7)。

ダイオウのプロシアニジンを、ガロイル基を持たないType-I型、Type-II型(すべてガロイル基を持つrhatannin型)、Type-III型(一つだけガロイル基を持たないRG-tannin型)に分類すれば(図1)、Type-I型ではtrimerまで、Type-II型ではdimerまで、Type-III型ではtrimerまではっきりと検出されているが分離はよくない。

これまでに、SEC用親水性ゲルを用いた吸着クロマトグラフィーは *Maytenus ilicifolia* の葉抽出物中のフラボノイドの分析¹⁶⁾、紅茶と緑茶の分析がある¹⁷⁾。

4. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラムによる分離

近年HILICカラムを使用した分析は、カラムの選択肢の一つとして欠かせない物となった¹⁸⁾。シリカゲルなどの古典的な順層クロマトグラフィーでは通常、非水溶性有機溶媒を用いる事から、分析サンプルが溶解せず分析できないことがあったが、HILICでは移動層に水を用いることができるため、高極性化合物の分析ができるという特徴からである¹⁹⁾。HILICの固定層は種々知られているが、プロシアニジン類ではdiolとamideが使われている^{20, 21, 22)}。

今回はamideカラムの一つ、Tosoh

Amide-80を用い、溶媒条件はYanagidaらを参考にした²²⁾。MS検出によるオオミサンザシ抽出液の分析では、カテキンをはじめとして、モノマーからセプタマー(7 mer)までを検出し、オクタマー(8 mer)もかろうじて検出されている(図8)。Yanagidaらは、リンゴ果実よりデカマー(10 mer)まで検出している。オオミサンザシでも、サンプル導入量の増量や前処理による高分子分画の濃縮により、より高分子の検出ができると考えられる²²⁾。

Rhatanninは、分子量が3962(9 mer) および 4402(10 mer) であり、RG-tanninでは3370である。ここまで大きいばあい、装置1では効率的なイオン化がおこるかどうか別としても、イオントラップの質量精度を落として m/z 6000 までの範囲で測定することで、1価イオンを検出できる可能性があるが、今回測定した限りでは観測できなかった(データ示さず)。装置2では装置の観測質量範囲外で1価イオンの観測は不可能であり、多価イオンの生成があれば測定できる。このような大きな分子のMS検出には、MALDI-TOF/MSが有効であり縮合度の大きなプロシアニジン類も測定されている²³⁾。

ダイオウサンプルの分析では、type-Iではオオミサンザシと共通と考えられるピークを多数検出した(図9、図10)。ダイマーは最低でも4分子種あり、これらはprocyanidin Bに相当すると言える。トリマーは少なくとも2分子種あり、それらは、procyanidin Cなどに相当する。type-Iはテトラマーからペンタマー(5 mer)までは検出した。type-IIおよびtype-IIIでは複数のダイマーからテトラマー(4 mer)を検出した。加えて、サンプル間のプロシアニジンの構成の異なりについて知見が得られている。例えば、42-4でみられる溶出時間18分付近に溶出するtype-Iダイマーの小ピークが、29-2では検出されていない。type-IIIのダイマーおよびトリマーに関しては、29-2では42-4よりも相対的に多い成分が検出されている。

このことは、Amide-80カラムを用いたLC-MS分析では、少なくとも縮合度が4までの

プロシアニジンについて、ダイオウ各系統間あるいは個体間における含有量の差を(定量解析も含めて)明らかにすることができるという事を示している。

D. 結論

今年度はダイオウのプロシアニジン分析に有効なカラムを、異なる分離モードの中から選んで、それらの有効性を検討した。結果としては、LC-MS による分析を考えた場合には、HILIC カラム (Tosoh Amide-80) が分離パターン、使用溶媒とイオン化法との適切な組み合わせ等を鑑みたとき、最も優れた方法であり、縮合度が 4 までのプロシアニジンの検出は比較的容易である。

縮合度が 5 より大きなプロシアニジン類の分析に関しては、サンプル中の濃度が十分にあれば検出でき、少なくともデカマー (10 mer) までは ESI-MS でも検出できる事が文献からは示唆されている²²⁾。この件は、次年度に課題を残したと言える。

参考文献

- 1) Komatsu, K., Nagayamama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Basnet, P., Meselhy, M. R.: Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in Rhubarb, *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 941-947 (2006).
- 2) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Cai, S.-Q., Omote, T., Meselhy, M. R.: Comparative study of chemical constituents of Rhubarb from different origins, *Chem. Bull. Pharm.*, 54, 1491-1499 (2006).
- 3) Zheng, Q.-x., Wu, H.-f., Guo, J., Nan, H.-j., Chen, S.-l., Yang, J.-S., Xu, X.-D.: Review of Rhubarbs: chemistry and pharmacology, *Chinese Herbal Medicine*, 5, 9-32 (2013).
- 4) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I.: Tannins and related compounds. XLV. Rhubarb. (5), Isolation and characterization of flavan-3-ol and procyanidin glucosides, *Chem. Pharm. Bull.* 34, 3208-3222 (1986).
- 5) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I.: Tannins and related compounds. XLVIII. Rhubarb (7), Isolation and characterization of new dimeric and trimeric procyanidins, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 4083-4091 (1986).
- 6) Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipania, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I.: Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1415-1422 (2013).
- 7) Prior, R. L., Gu, L.: Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet, *Phytochemistry*, 66, 2264-2280 (2005).
- 8) Valls, J., Millána, S., Martí, M. P., Borràs, E., Arola, L.: Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A* 1216, 7143-7172 (2009).
- 9) Yanagida, A., Kanda, T., Takahashi, T., Kamimura, A., Hamazono, T., Honda, S.: Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 890, 251-259 (2000).
- 10) Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Kanda, T., Ohtake, Y.: Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS, *Journal of Chromatography A*, 1102, 206-213 (2006).
- 11) Hellstrom, J., Sinkkonen, J., Karonen,

- M., Mattila, P.: Isolation and structure elucidation of procyanidin oligomers from Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia*), *J. Agric. Food Chem.*, 55, 157-164 (2007).
- 12) Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R. L.: *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4852-4860 (2002).
 - 13) Yanagida, A., Kanda, T., Shoji, T., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T.: Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 855, 181-190 (1999).
 - 14) Nonier M. F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, E.: Development of direct size-exclusion chromatography separation for the determination of molar mass of native procyanidins in the phenolate form, *Journal of Chromatography A*, 1089, 263-269 (2005).
 - 15) Sarnoski, P. J., Johnson, J. V., Reed, K. A., Tanko, J. M., O'Keefe, S. F.: Separation and characterization of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC-MSn, *Food Chemistry*, 131, 927-939 (2012).
 - 16) de Souza, L. M., Cipriani, T. R., Sant' Ana, C. F., Iacomini, M., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L.: Heart-cutting two-dimensional (size exclusion $\times$ reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*, *Journal of Chromatography A*, 1216, 99-105 (2009).
 - 17) Scoparo, C. T., de Souza, L. M., Dartora, N., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini, M.: Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performanceliquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion $\times$ reversed phase), *Journal of Chromatography A*, 1222, 29-37 (2012).
 - 18) Bernala, J., Aresa, A. M., Pólb, J., Wiedmer, S. K.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7438-7452 (2011).
 - 19) Ikegami T., Takubo, H., Tanaka, N.: A perspective of hydrophilic interaction chromatography - development and the characteristics of the separation mode, *Chromatography*, 29, 1-6 (2008).
 - 20) Kalili, K. M., de Villiers, A.: Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography $\times$ reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins, Part I: Theoretical considerations, *Journal of Chromatography A*, 1289, 58- 68 (2013).
 - 21) de Souza, L. M., Cipriani, T. R., Sant' Ana, C. F., Iacomini, M., Gorin, P. A. J., Sasaki, G. L.: Heart-cutting two-dimensional (size exclusion $\times$ reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*, *Journal of Chromatography A*, 1216, 99-105 (2009).
 - 22) Yanagida, A., Murao, H., Ohnishi-Kameyama, M., Yamakawa, Y., Shoji, A., Tagashira, M., Kanda, T., Shindo, H., Shibusawa, Y.: Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1143, 153-161 (2007).
 - 23) Monagas, M., Quintanilla-Lopez, J. E.,

Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B.,
Lebron-Aguilar, R.: MALDI-TOF MS
analysis of plant proanthocyanidins,
Journal of Pharmaceutical and
Biomedical Analysis, 51, 358-372
(2010).

E. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

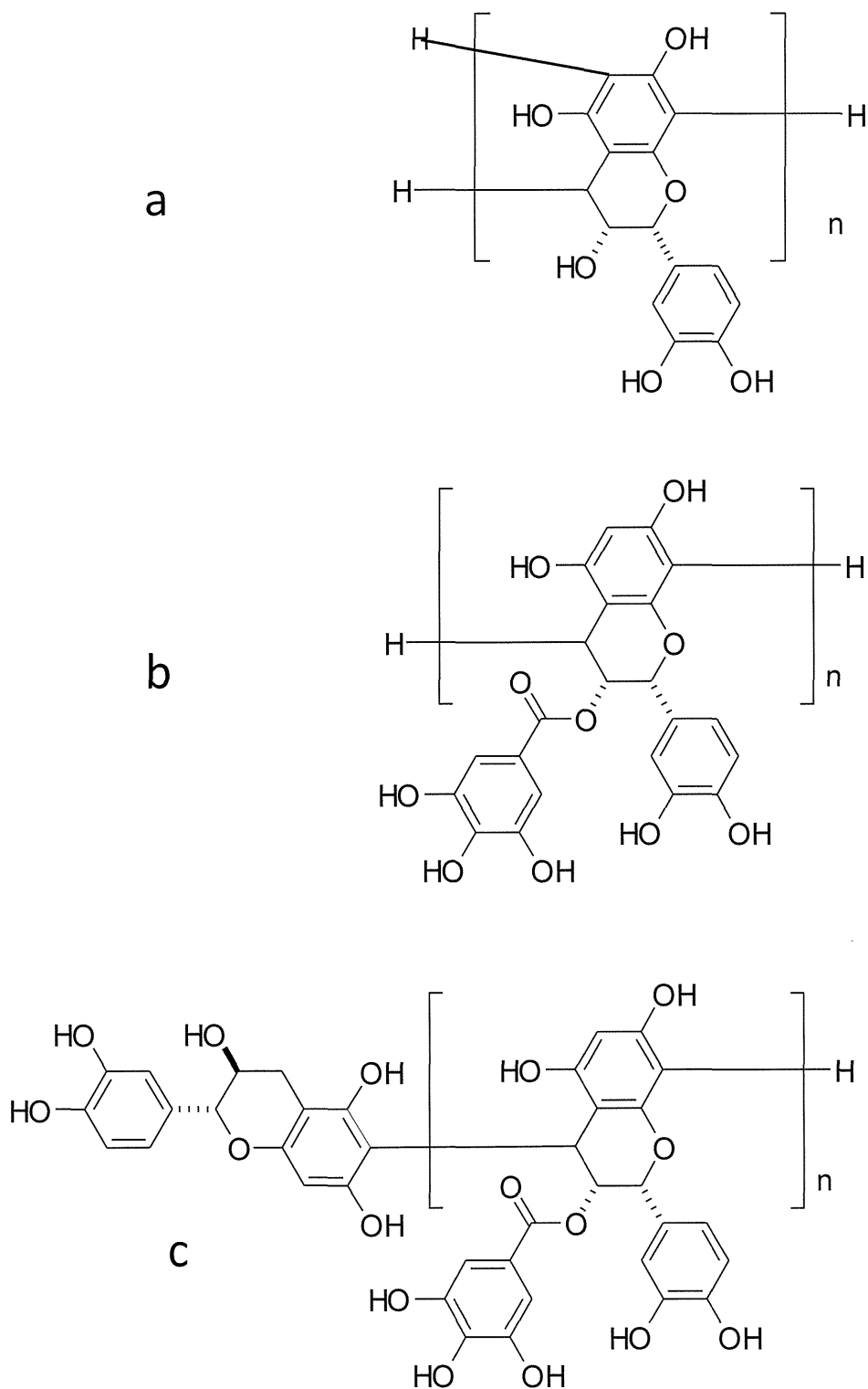


図1. ダイオウのプロアントシアニン類の化学構造
a, type-I; b, type-II (rhatannin, $n = 9, 10$); c, type-III (RG-tannin, $n = 7$)

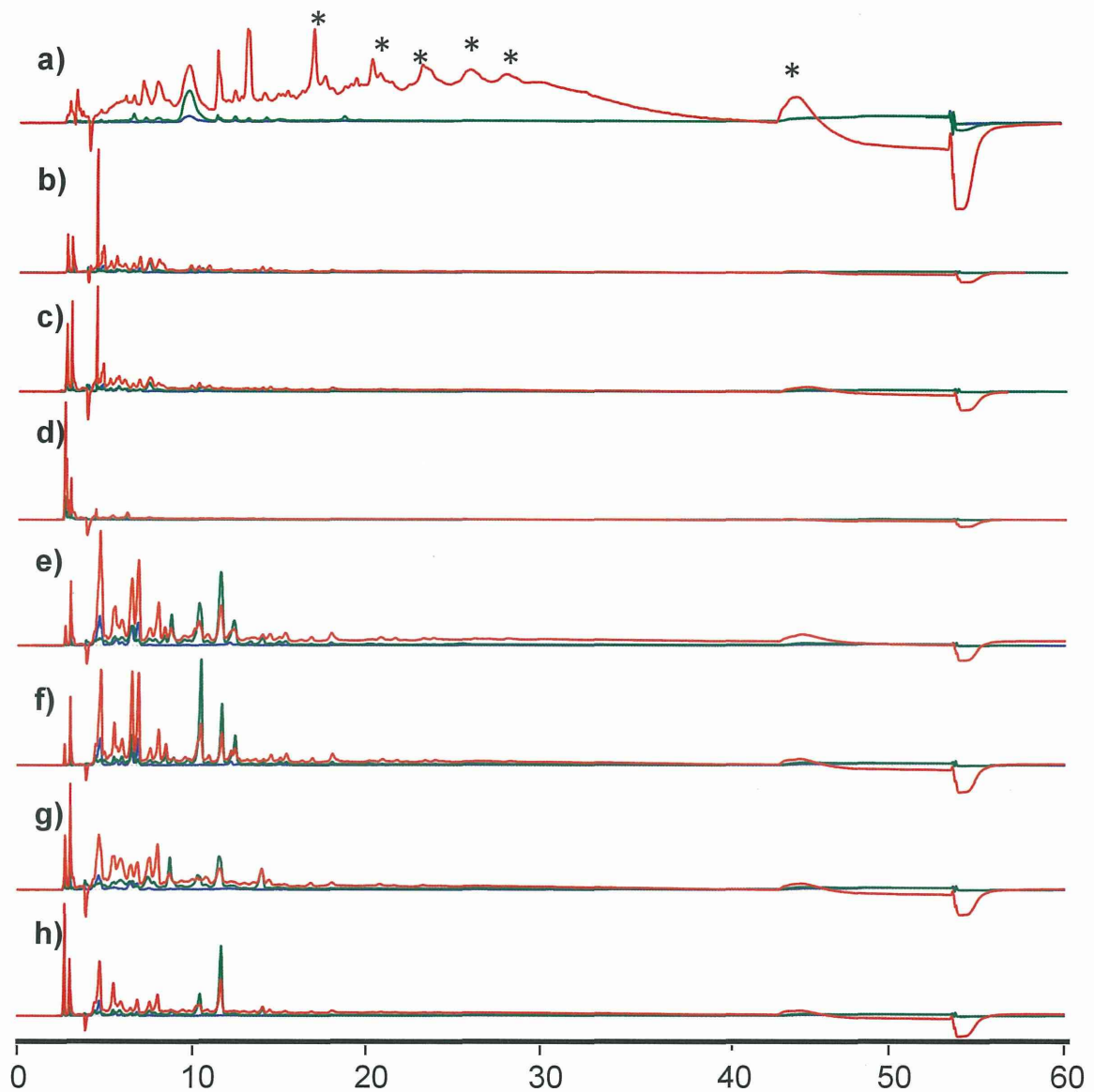


図2. シリカゲルクロマトグラフィーのクロマトグラム

a)オオミサンザシ果実; b) 2013D4; c) 2010D1-3; d) 2010D1-4; e) 29-2 rhizome; f) 29-2 root; g) 42-4 rhizome; h) 42-4 root.

* は、紫外可視スペクトルから推測されるプロシアニジンのピークを表す。

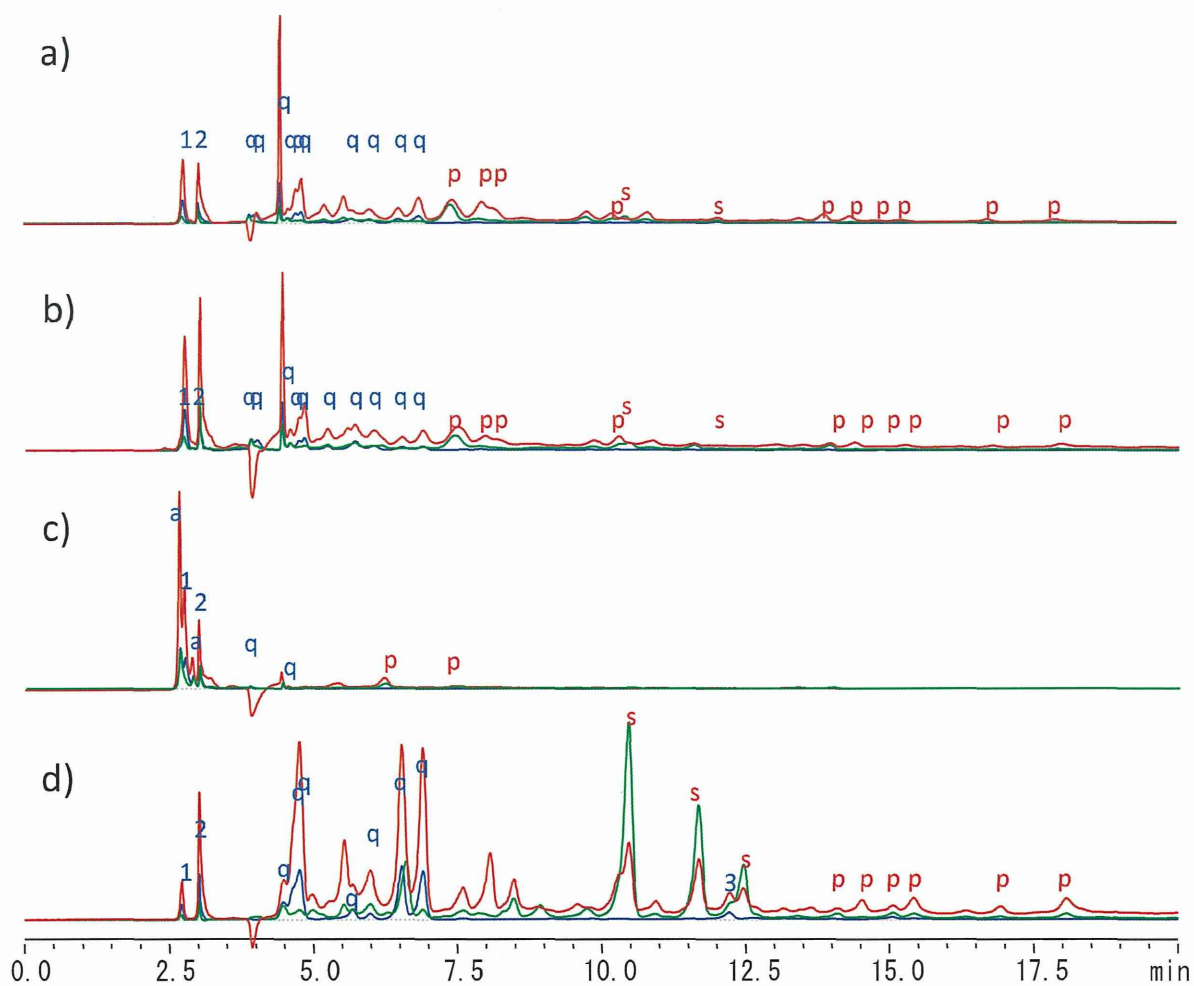


図3. シリカゲルクロマトグラフィーのクロマトグラム(拡大)

a) 2013D4; b)2010D1-3; c)2010D1-4; d)29-2 root; 1, physcion; 2, emodin; 3, sennoside A; a, anthrones; p, procyanidins; q, anthraquinones; and s, stilbenes.

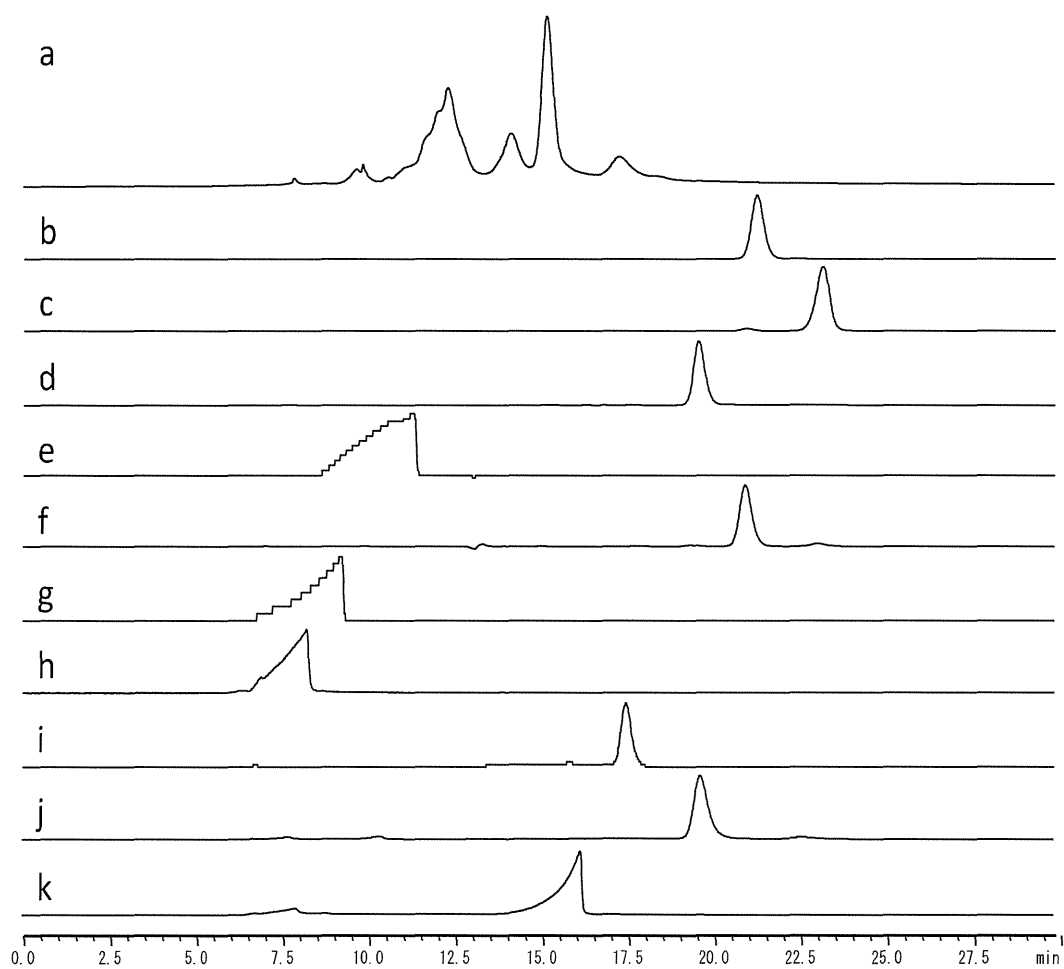


図4. Ultrahydrogel 250 カラム(イソクラティック溶出)によるダイオウ抽出液と標品の分離プロファイル

a, 29-2 rhizome UV chromatogram at 230 nm; b, chrysophanol; c, emodin; d, aloe-emodin; e, rhein; f, physion; g, sennoside A; h, sennoside B; i, catechin; j, epicatechin gallate; and k, gallic acid.

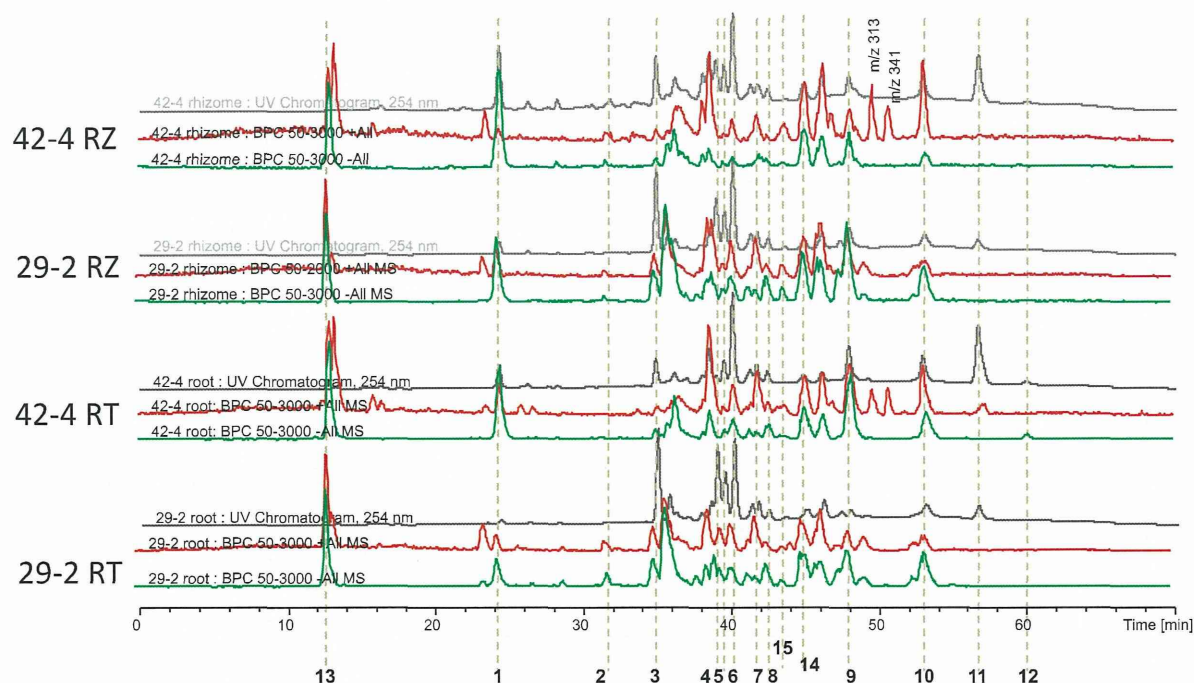


図5. Ultrahydrogel 250 カラム(グラジエント溶出)によるダイオウ抽出液のMSクロマトグラム

1, Galloyl-glucose; 2, unidentified ($\lambda_{\max}$ 314, m/z 331 [M-H]⁻); 3, Emodin/aloe-emodin 8-glucoside; 4, unidentified anthraquinone monoglucoside (m/z 409 [M+H]⁺); 5, Chrisophanol monohexoside; 6, chrisophanol monohexoside; 7, rhein/physcion 8-glucoside; 8, emodin/aloe-emodin 8-glucoside; 9, resveratrol 4'-(6''-galloyl)glucose; 10, aloe-emodin and physcion/rhein; 11, chrisophanol, 12, emodin; 13, a polysaccharide (ca. 7-mer); 14, catechin; and 15, a dimeric procyanidin.

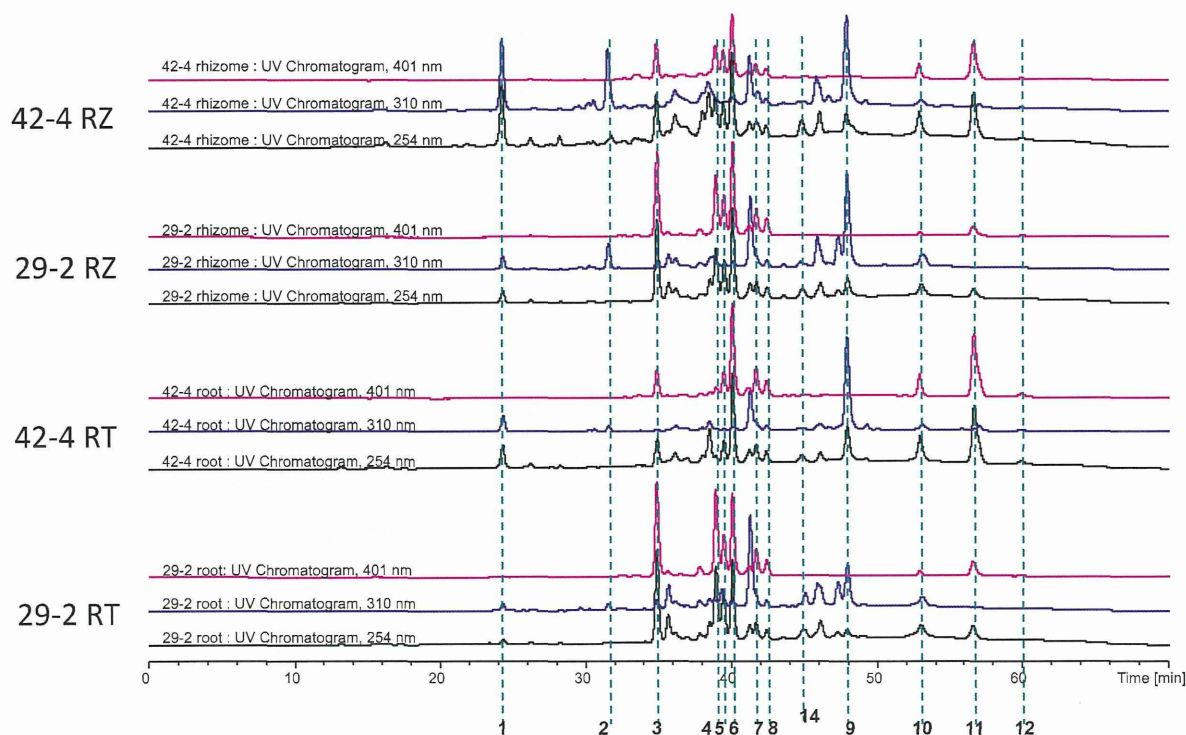


図6. Ultrahydrogel 250 カラム(グラジエント溶出)によるダイオウ抽出液のUV/Visクロマトグラム

1, Galloyl-glucose; 2, unidentified ($\lambda_{\max}$ 314, m/z 331 [M-H]⁻); 3, Emodin/aloe-emodin 8-glucoside; 4, unidentified anthraquinone monoglucoside (m/z 409 [M+H]⁺); 5, Chrisophanol monohexoside; 6, chrisophanol monohexoside; 7, rhein/physcion 8-glucoside; 8, emodin/aloe-emodin 8-glucoside; 9, resveratrol 4'-(6''-galloyl)glucose; 10, aloe-emodin and physcion/rhein; 11, chrisophanol, 12, emodin; 13, a polysaccharide (ca. 7-mer); 14, catechin; and 15, a dimeric procyanidin.

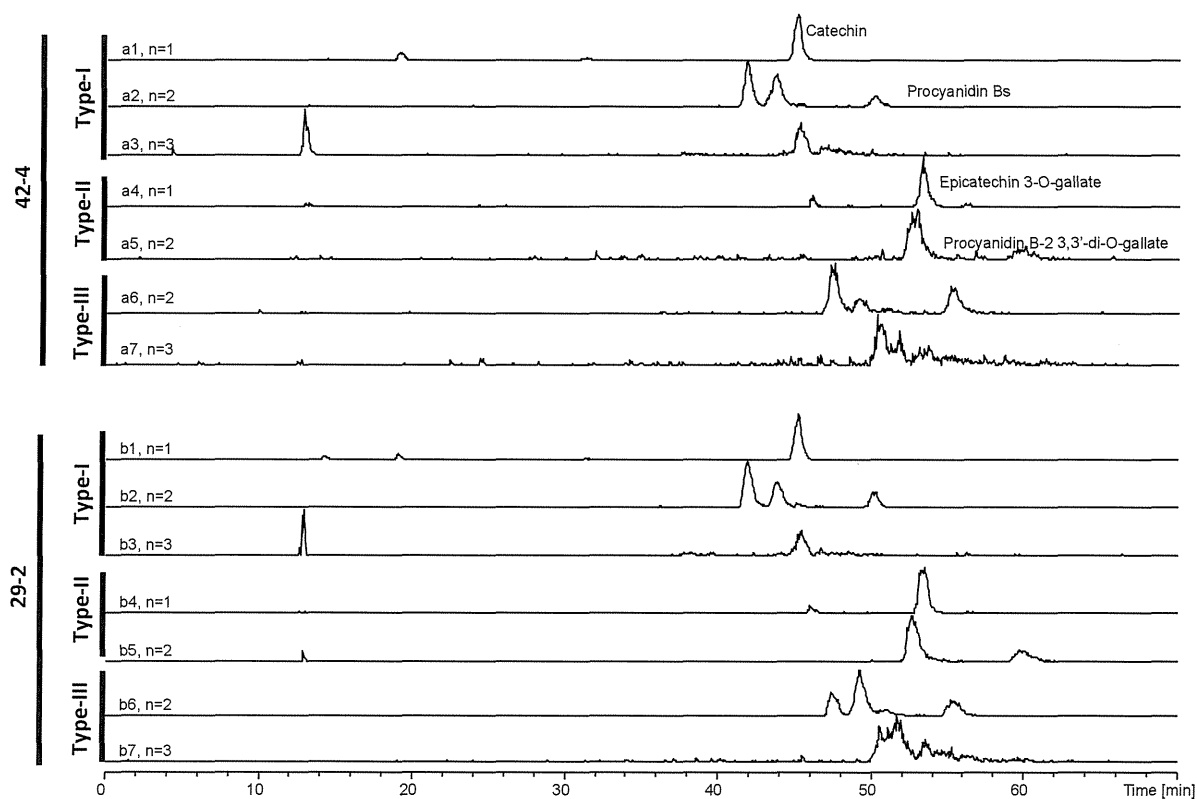


図7. Ultrahydrogel 250 カラム(グラジエント溶出)によるダイオウ抽出液中のプロシアニジン類のextracted ion chromatograms.

a1, Extracte ion chromatogram (EIC) at m/z 291.1; a2, EIC at m/z 579.2; a3, EIC at m/z 867.2; a4, EIC at m/z 443.1; a5, 883.2; a6, EIC at m/z 731.2; a7, EIC at m/z 1171.2. b1, EIC at m/z 291.1; b2, EIC at m/z 579.2; b3, EIC at m/z 867.2; b4, EIC at m/z 443.1; b5, 883.2; b6, EIC at m/z 731.2; b7, and EIC at m/z 1171.2.

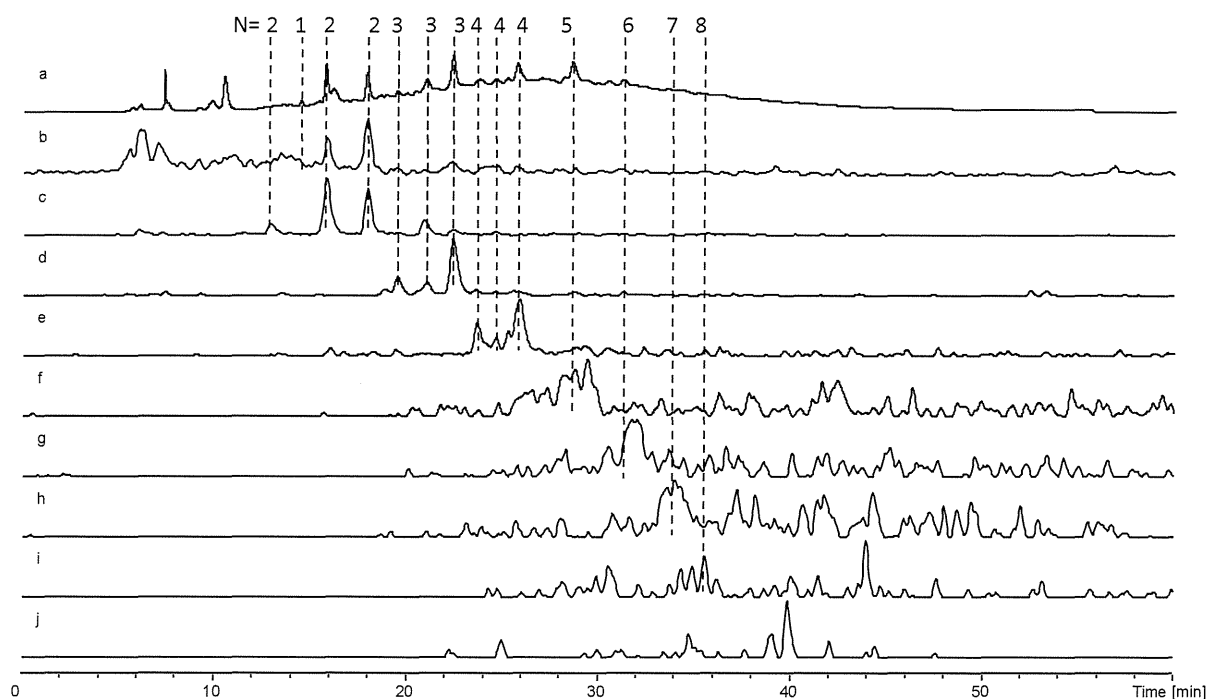


図8. Amide-80 (Tosoh)によるオオミサンザシ果実抽出液の分離

a, UV chromatogram at 230 nm; b, extracted mass chromatogram (EIC) at m/z 291.1; c) EIC at m/z 579.2; d) EIC at m/z 867.2; e) EIC at m/z 1155.3; f) EIC at m/z 1443.3; g) EIC at m/z 1731.4; h) EIC at m/z 2019.5; i) EIC at m/z 2307.5; j) EIC at m/z 2595.6.