

天然素材の品質評価へのメタボロミクス手法の応用
～コーンシルク、チャ、サイシンを例に～

城西大学大学院薬学研究科 博士後期課程

天然物化学講座 2021年度入学

佐野 愛子

目次

序論 p.4~

本論

第1章

コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性を指標としたメタボロミクスによる品質評価 p.8~

第1節

コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性成分の探索 p.11~

第2節

Glycation 阻害活性の高いコーンシルクをより簡便に判断する品質評価方法の開発 p.22~

第2章

「狭山茶」のチャ葉を用いたメタボロミクス研究 p.28~

第1節

狭山茶代表チャ品種「さやまかおり」の成分的特徴付け研究 p.31~

第2節

チャ樹の老齢化に関連する指標成分の探索 p.42~

第3章

生薬「サイシン」のメタボロミクス研究 p.50~

第1節

「サイシン」の市場品比較 p.51~

第2節

「サイシン」の含有成分探索 p.59~

結語 p.71~

謝辞 p.75~

実験の部 p.76~

引用文献 p. 105~

序論

天然素材は多種多様な代謝産物を含む混合物であり、様々な機能を有することが知られている^{1,2)}。しかし、実際にどのような成分が機能を担っているのか、天然素材がどのくらいの数のまた、どれほどの種類の成分を含有しているのか明らかになっていないケースも多いのが現状である。さらに、天然素材は同一の種 (species) であっても、収穫時期や栽培環境などが異なる場合、成分組成も異なる可能性がある。よって、天然素材においては品質評価や品質維持が特に重要である。

従来一般的な天然素材の品質評価は、天然素材中に含まれる含量の多い成分を指標成分として定め、その成分を定性・定量する手法がとられている。しかし、その指標成分が天然素材の機能性成分であるとは限らないこともある。また、薬効が1つの成分に由来しないことも散見される。これらのことから、天然素材の品質や機能性を評価する場合、従来の単一成分に着目した解析手法よりも、多成分を網羅的に解析することで全体像を把握できる手法のほうが良く、更にこの手法であれば検体を新たな面から説明できる有用な情報を引き出すことも可能である³⁾。

そこで、着目したのがメタボロミクス手法である。「メタボローム」とは代謝物 (メタボライト) の総体 (オーム) を指す言葉であり、メタボロームを網羅的に定性・定量することを「メタボロミクス」という^{4,5)}。

メタボロミクスには、大きく2つのアプローチがある。1つ目は生体試料の代謝産物を対象とし、既知化合物を網羅的に測定するターゲット解析であり、これは、代謝異常の発見などに役立てられている。2つ目は対象化合物を特定せずに試料中に含まれる多成分を包括的に解析するノンターゲット解析である。

これは、多成分系を網羅的に解析して全体像を把握することで、有用な情報を引き出すものである。この 2 つは組み合わせて解析することも可能である。例えば、Fig. 1-1 に示すように、まず複数の植物サンプルを分析装置で検出可能な代謝産物を包括的に測定し、データを取得する。次に、得られたスペクトルデータを多変量解析などの統計処理により、2 次元マップ上に表し、複数のサンプル間の違いを比較して、化学構造が似ている成分同士のグループ分けを行う（ノンターゲット解析）。次に、グループ分けに寄与したマーカー因子が見つかった場合は、高精度にマーカー成分の定量などを行う（ターゲット解析）^{2, 6)}。

データ測定には、核磁気共鳴 (NMR) 装置や質量分析 (MS) 装置が使用されることが多い。NMR 装置を使用する利点は、代謝混合物をそのまま測定することが可能であるため試料の前処理が容易であること、試料を NMR 試験管に入れて測定するため分析システムを汚染しないこと、化学構造の情報が直接得られることが挙げられ、再現性も高い。よって、ノンターゲット解析に主に用いられる。一方、MS は NMR に比べて高感度であることから、ごく少量の試料で済むことが最大の利点である。また、測定の前段階にあるクロマトグラフにより物質を分離してから質量情報を得ることができる。しかし、包括的なプロファイルを得るためには大量の試料を注入する必要があるため、キャリーオーバーやイオン源の汚れなどの課題もあり、頻度の高いメンテナンスが必要である。マーカー因子の極性や、分子量が把握できている場合、分析条件を検討して行われることから、ターゲット解析に用いられることが多い³⁾。天然素材の品質評価の研究例としては、NMR 装置を用いたノンターゲット解析によるメタボロミクス研究が行われており、産地によって形態が異なるクララ (*Sophora flavescens* Aiton) の多成分比較から産地に特徴的な成分を解明した研究⁷⁾や、カンゾウ属植物の種の判別⁸⁾などの研究報告がある。

本研究ではメタボロミクスの手法を応用し、多種多様な代謝産物を含む天然素材に適した品質評価方法の検討や特徴的な成分の探索を行った。今回は、特に再現性が高く、豊富な構造情報を与える NMR 及び FT-IR スペクトルに着目した。本研究を行うことで、これまで困難であった天然素材の品質の良否の判別や天然素材を機能性原料とする製品開発にも貢献できると考えられる。

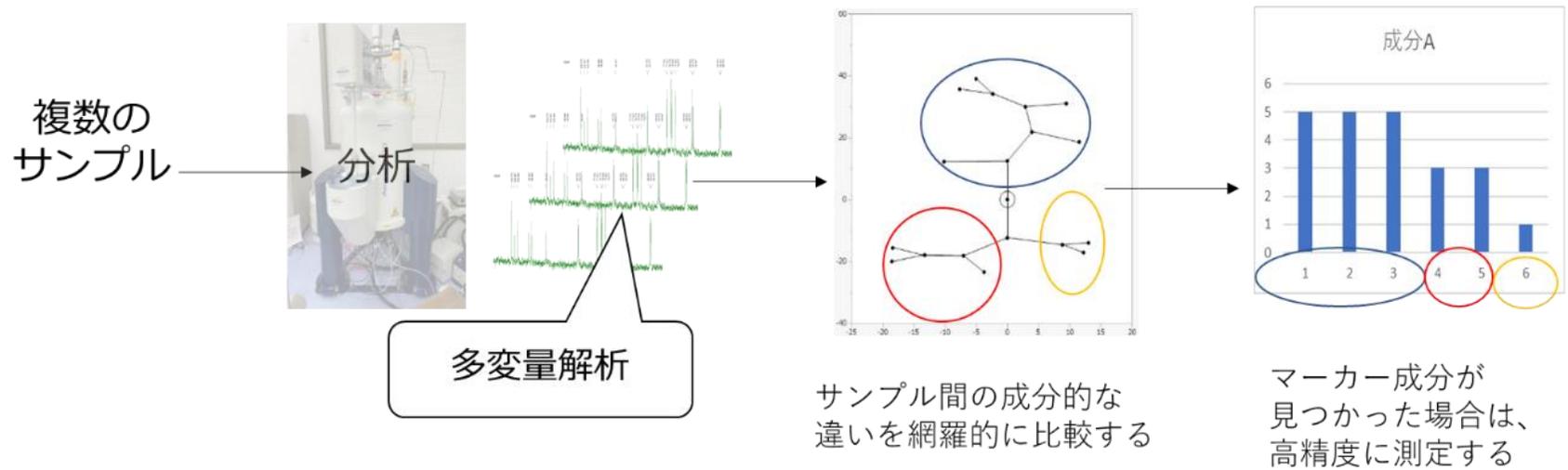


Fig. 1-1 メタボロミクス解析の流れについて

第1章

コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性を指標としたメタボロミクスによる品質評価

コーンシルク (corn silk)、STIGMATA MAYDIS はイネ科 (Gramineae) に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) の花柱及び柱頭を乾燥させたものを指し、利尿や血圧降下作用^{9,10)}を示す生薬として日本や中国、韓国などで用いられている。かつては「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト (専ら医薬品リスト)」に記載されていたが、現在はリストから外れ、市場ではむくみ改善の健康食品の原材料として利用されるようになった。コーンシルクには vitamin K、vitamin C、タンパク質、揮発性油、steroid、saponin、tannin、flavonoid などが含まれている (Fig. 1-2)¹¹⁻¹³⁾。

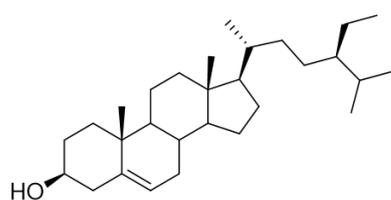
基原： *Zea mays* L., トウモロコシ
(Gramineae, イネ科)



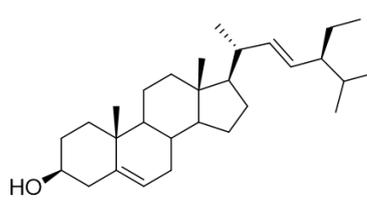
部位：花柱及び柱頭

効能：利尿、血圧降下、胆汁分泌促進作用、糖尿病性腎症改善作用

含有成分： β -sitosterol、stigmasterol、vitamin K など



β -sitosterol



stigmasterol



Fig. 1-2. コーンシルクの基原、薬効及び含有成分について

Glycation とは、グルコースなどの還元糖とタンパク質が非酵素的に反応することによって不可逆的な変性を起こし、advanced glycation end products (AGEs) と呼ばれる終末糖化産物を生成する反応である。また、発見者の名前からメイラード (Maillard) 反応とも呼ばれている。反応は、大きく二つに大別される。まず、glucose などの還元糖の carbonyl 基がタンパク質の amino 窒素上の孤立電子対の求核攻撃を受け、Schiff base を生成する。この生成した Schiff base は Amadori 転位反応を経て比較的安定な Amadori products へと変化する。ここまでの反応を前期反応という。さらに、Amadori products が酸化、脱水、縮合、転位などの様々な反応を経て AGEs が生成するまでを後期反応という¹⁴⁾ (Fig. 1-3)。

Pentosidine、*N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) など多数の物質が AGEs として同定されており、これら AGEs の生体内生成や蓄積は、糖尿病性合併症、動脈硬化症、骨粗しょう症、アルツハイマー病、皮膚の老化などに関与するといわれている¹⁵⁾。Glycation による生体内 AGEs の生成や蓄積を抑制することは、人々の quality of life (QOL) の維持や向上に大きく貢献できると考えられており、セルフメディケーションを推進する現代において注目される事柄の一つであると言える。

コーンシルクの MeOH 抽出エキス、水抽出エキスには glycation 阻害活性があることが報告されており、コーンシルク MeOH 抽出エキスについては glucose と bovine serum albumin (BSA) の反応を阻害し、糖化アルブミンの生成を抑制することが明らかとなっている¹⁶⁾。BSA のような血清アルブミンは、内因性および外因性のリガンドに対する結合や輸送タンパク質として機能し、糖化アルブミンはその機能を抑制する。また、MeOH 抽出エキスについては glycation の阻害物質として知られる aminoguanidine に匹敵する活性を示すいくつかの flavone C-glycosides の単離報告がある¹⁶⁾。さらに、コーンシルク水抽出エキスには streptozotocin で誘発したラット糖尿病性腎症に効果があることも報告されている¹⁷⁾。しかし、水抽出エキス中の glycation 阻害活性成分は未同定のままであった。そこで、本研究では、コーンシルクを機能性原料として活用することを目指し、「glycation 阻害活性成分の探索」を行った (第 1 節)。また、glycation 阻害活性の評価には、7 日間にも及ぶインキュ

ベーションが必要であるため、より短時間で簡便な手法で glycation 阻害活性を評価する手法が求められる。そこで、「glycation 阻害活性の高いコーンシルクをより簡便に判別するメタボロミクスの手法を用いた品質評価方法の開発」について述べる（第2節）。

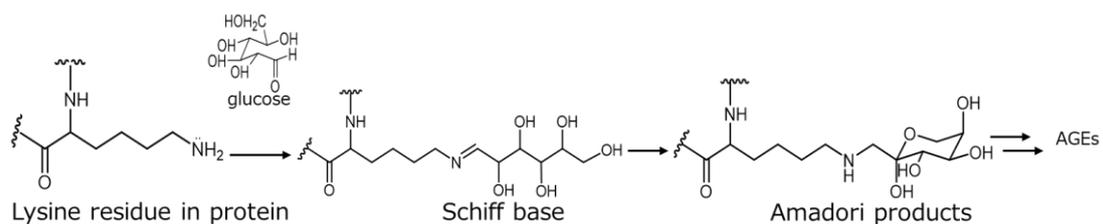


Fig. 1-3. Glycation における AGEs 生成反応の過程

第1節 コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性成分の探索

コーンシルクを機能性素材原料として扱うためには、品質を担保するための基準となる関与成分の同定を行う必要があるため、水抽出エキスの glycation 阻害活性成分の探索を行った。市場で販売されている 10 種類のコーンシルクを入手後、H₂O で冷浸抽出し、glycation 阻害活性試験用冷浸水抽出エキスを作製した。なお、10 種類のコーンシルクのサンプルリストを Table 1-1 に記載した。

次に、これらのエキスについて glycation 阻害活性評価（終濃度 25 µg/mL）を行った。pH 7.4 の phosphate buffered saline (PBS) に BSA、glucose、サンプル（10 種類の冷浸水抽出エキス）を溶解後、それぞれのサンプル存在下及び非存在下 37 °C で 7 日間インキュベーションを行った。なお、positive control として、aminoguanidine（終濃度 10 mM）を用いた。抗 AGEs 抗体を用いた直接 ELISA（enzyme-linked immuno sorbent assay）により求めた AGEs の生成量（吸光度）から、各サンプルの glycation 阻害率を算出した（Table 1-2）。その結果、市場で販売されている複数のコーンシルクには glycation 阻害活性が高いものと低いものが存在することが明らかとなった。

次に、glycation 阻害活性成分に関与する成分の特定を行うために再度、コーンシルク冷浸水抽出エキスの作製を行った。Glycation 阻害率が高く、入手が容易であった小島漢方（No. 8）のコーンシルク 500 g を H₂O で冷浸抽出し、抽出物を凍結乾燥させ、関与成分探索用冷浸水抽出エキス（大量冷浸水抽出エキス）とした。次に、大量冷浸水抽出エキス 560.0 mg を H₂O に溶解後、カットオフ値 3 k のセントリコンプラス-70 遠心式フィルターユニットを用いて遠心分離を行い、分画した。得られた画分 3 kDa 以上冷浸抽出分画サンプル（3 kDa 以上画分）、3 kDa 以下冷浸抽出分画サンプル（3 kDa 以下画分）の収量はそれぞれ 288.8 mg、208.8 mg であった。これらの画分について、glycation 阻害活性試験を行った（終濃度 100 µg/mL）。各分画物の glycation 阻害率は、3 kDa 以上画分が 79.1%、3 kDa 以下画分が 71.1%であった。

既知の glycation 阻害活性成分は低分子であり¹⁶⁾、新しい活性化合物を単離するために、3 kDa 以上画分中に含まれる関与成分に焦点を絞り研究を進めた。3 kDa 以上画分は、水溶性高分子構造が含まれる画分であり、そのような特徴を持つものとしてポリフェノールが知られている。ポリフェノールは、天然ハーブや食品に含まれる抗糖化活性化合物としても知られている¹⁸⁾。よって、3 kDa 以上画分に含まれている化合物は、高分子ポリフェノールではないかと考えた。

続いて含有化合物の構造に関する詳細な情報を取得するために、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析、¹H-NMR、¹³C-NMR 及び FT-IR スペクトルの測定を行った。

コーンシルク水抽出物中の高分子量ポリフェノールの存在を確認するため、RP-HPLC 分析のピークパターンを確認した。3 kDa 以上画分を 10 mg/mL となるように H₂O に溶解し、254 nm の UV 検出器を取り付けた RP-HPLC システムを用いて分析を行った。その結果、3 kDa 以上画分のクロマトグラムは、ブロードなピークを示した (Fig. 1-4)。このようなパターンは、HPLC を用いたポリフェノール分析で報告されており^{19,20)}、3 kDa 以上画分には高分子ポリフェノールが含まれていることが示唆された。

一般的に、高分子ポリフェノールは構造が特定されておらず、サイズが大きくその分布幅も広いため、質量分析法で分子量を決定することは困難である。そこで、GPC により、3 kDa 以上の画分の重量平均分子量算出を試みた (Fig. 1-5)。クロマトグラム上の赤色ピークは 3 kDa 以上画分を示している。GPC 分析の検出データを μ 7 Data Station software を用いて処理を行った。その結果、3 kDa 以上の画分の平均分子量は 225,749 Da であった。その後、フロログルシノール分解とベンジルメルカプタン分解を行った²¹⁻²⁴⁾。その結果、縮合型タンニンに特異的な flavan-3-ol ユニットは検出されなかった。更に、酸加水分解実験においてもエラグ酸や没食子酸²⁴⁾のような加水分解型タンニンを構成する成分も検出されなかった。

そこでコーンシルクの水抽出エキスに含まれる成分の構造を明らかにするために、NMR スペクトル分析を行った。NMR 解析は、主に有機化合物の官能基を分析し、その構造を解明するために用いられる。3 kDa 以上の画分を 100 mg/mL となるように NMR 用溶媒 D_2O : acetone- d_6 = 1 : 1 に溶解後、 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトル測定を行った。 1H -NMR スペクトル (Fig. 1-6) では、6.5~7.3 ppm に芳香族プロトンに起因するシグナルが観測された。3.0~4.0 ppm に観測された強いシグナルは、メトキシ基に由来するものであると考えられた。更に 0.5~1.5 ppm には脂肪族に起因するシグナルが観測された。3 kDa 以上画分の ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. 1-7) では、23 ppm と 56 ppm にシグナルが認められた。これらは sp^3 脂肪族炭素に起因するものであった。特に 56 ppm のシグナルはメトキシ基の炭素と考えられた。糖由来のシグナルも 70~80 ppm に観測された。また、115、130、145 ppm には sp^2 芳香族炭素に起因するシグナル、173 ppm、175 ppm にはカルボニルに起因するシグナルが認められた。

次に、3 kDa 以上画分の構成因子の同定を行うために、2 種類の酸加水分解を行った。酸加水分解①では、3 kDa 以上画分 50.0 mg を 10 mL の H_2SO_4 (0.5 N) 水溶液で加水分解 (105 °C、5 時間) を行った。加水分解物を ethyl acetate で分配抽出、溶媒留去して 1 mL の MeOH に溶解して LC-MS 分析を行った (Fig. 1-8 (a))。また、標品として vanillin を MeOH に溶解させて同時分析を行った (Fig. 1-8 (b))。その結果、分子量 152 の vanillin が 11.4 分に検出された。

酸加水分解②では、3 kDa 以上画分 50.0 mg を 10 mL の H_2SO_4 (0.5 N) 水溶液で加水分解 (90 °C、5 時間) した。加水分解物をイオン交換樹脂で中和し、凍結乾燥処理を行い、1 mL の H_2O に溶解して HPLC 分析を行った。また、標品として、L-rhamnose、D-(-)-fructose、D-(+)-xylose、L-(+)-arabinose、sucrose、D-(+)-glucose もそれぞれ 10 mg/mL となるように H_2O に溶解して同時分析を行った。その結果、3 kDa 以上画分には、xylose と glucose 由来のピークが検出された (Fig. 1-9)。

加水分解①によって vanillin が検出されたことから、高分子化合物は植物特有重合体化合物である lignin ではないかと予測し、FT-IR 分析 (KBr プレート法) を行い、3 kDa 以上の画分中に lignin が存在するか確認した。Fig. 1-10 で示すように、FT-IR スペクトルでは、 3370 cm^{-1} に水酸基に起因する吸収が観測された。 2925 cm^{-1} は、メチルとメタンの C-H 伸縮振動に由来するものと考えられた。また 1640 cm^{-1} は共役カルボニル基によるもので、 1567 cm^{-1} と 1550 cm^{-1} の領域には、ベンゼン骨格に特徴的な吸収が見られた。更に 1246 cm^{-1} はグアイアシル核に由来するものと予想された。一方、 1036 cm^{-1} のバンドは多糖のエーテル結合の伸縮振動に起因していると考えられた。グアイアシル単位は lignin の構成単位の一つである coniferyl alcohol に由来することが知られており、これらの結果は、報告されている lignin のスペクトルと一致した²⁵⁾。よって、3 kDa 以上の画分には、lignin が含まれていることが明らかとなり、糖を構造内に含む lignin 炭水化物複合体 (lignocellulose) であると同定した。Lignin は多糖類と共に、植物体細胞壁を構成する主要成分であり、植物体において物理的強度の付与などの役割を果たすことが知られている。

考察

コーンシルクを機能性素材原料として扱うためには、品質を担保するための基準となる関与成分（ターゲット因子）を同定する必要があるため、本研究では水抽出エキスの glycation 阻害活性成分の探索を行った。その結果、コーンシルクの水抽出物から得られる 3 kDa 以上画分に抗糖化活性があることを確認し、lignocellulose が糖化に対する阻害活性成分として同定された。なお、本研究により見出した lignocellulose の glycation 阻害活性は、これまでに報告されたことのない新しい機能性であった。

AGEs の生成には、様々なフリーラジカルの発生を伴うことが知られており、抗酸化物質が糖化由来のフリーラジカルを消去することが明らかとなっている²⁶⁾。Lignin もまた、ラジカル消去活性を示し、抗酸化物質として働くことが知られており²⁷⁾、化粧品や医薬品の機能性素材として期待されている²⁵⁾。Lignin は細胞壁の構成成分のひとつで、通常、製紙やパルプ化、lignocellulose 系バイオエタノール産業の副産物²⁸⁾ であり、*p*-coumaryl alcohol、coniferyl alcohol、sinapyl alcohol の 3 つの基本構造単位からなる。なお、これらの構造単位は、エーテル結合と C-C 結合で構成されている²⁹⁾。今回、コーンシルクが含有する複雑な lignocellulose の構造情報を明らかにしたことで、機能性食品素材として扱うための品質管理の基礎を築けたと考えている。

Table 1-1. 10 種類のコーンシルクサンプルの入手先・商品名及び産地

Sample No.	入手先・商品名	産地
1	小西製薬・トウモロコシ（花柱）	中国
2	中嶋生薬・寸切 ナンバの毛	中国浙江省
3	高砂薬業・南蚕毛 生	中国山東省
4	永大薬業・ナンバンゲ	中国山東省
5	金原市兵衛商店・ナンバンゲ	中国浙江省
6	栃本天海堂・ナンバン毛	中国河北省
7	ウチダ和漢薬・南蚕の毛	中国安徽省
8	小島漢方・ナンバンゲ	中国
9	ヤマダ薬研・南蚕毛	中国
10	堀江生薬・トウモロコシの毛	中国

Table 1-2. 10 種類のコーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害率

Sample No.	Inhibition(%) (25 ug/mL)
1	72.1
2	82.4
3	46.1
4	82.2
5	85.9
6	63.1
7	78.8
8	87.8
9	82.9
10	69.1

Aminoguanidine_1mM 73.2%

Inhibition(%)

$$= 1 - \frac{As-Ab}{Ac-Ab} \times 100$$

As: Absorbance of Sample
Ab: Absorbance of Blank
Ac: Absorbance of Control
At wavelength 492 nm

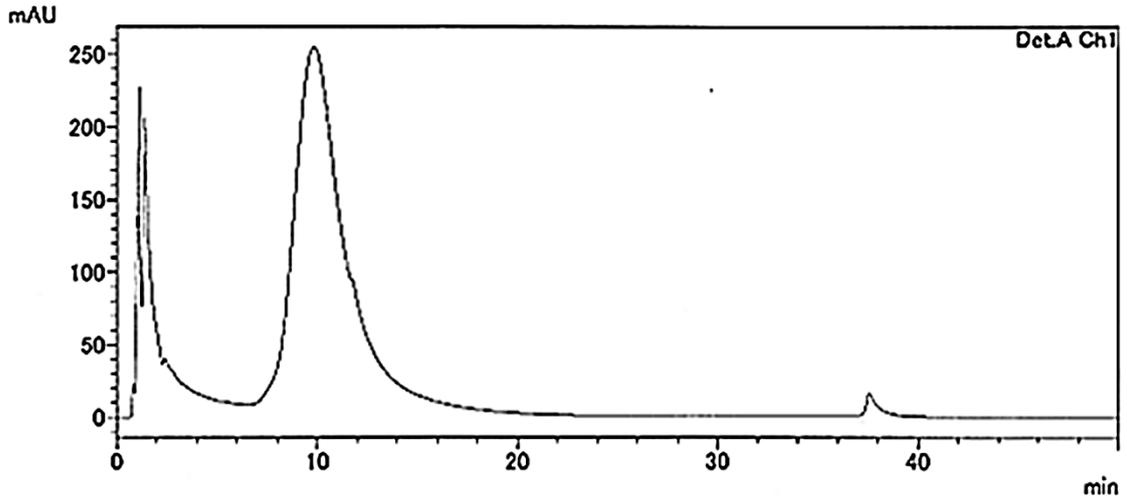


Fig. 1-4. コーンシルク水抽出エキスの 3 kDa 以上画分の
RP-HPLC クロマトグラム

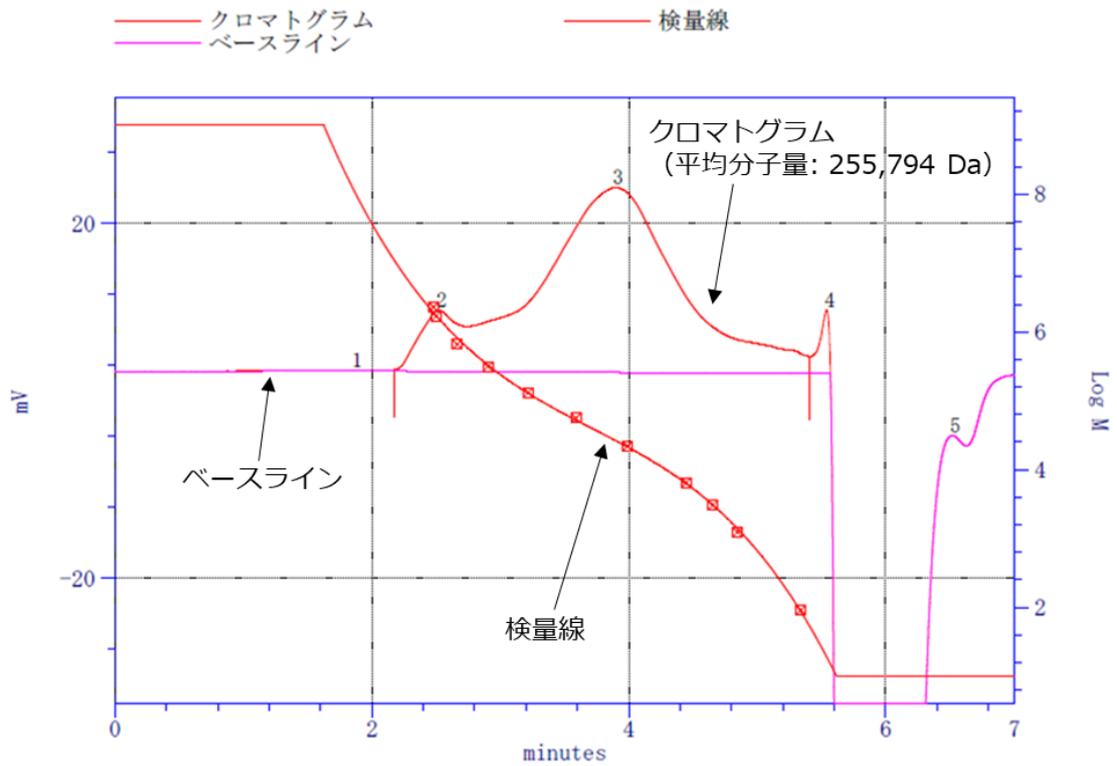


Fig. 1-5. コーンシルク水抽出エキスの 3 kDa 以上画分の
GPC クロマトグラム

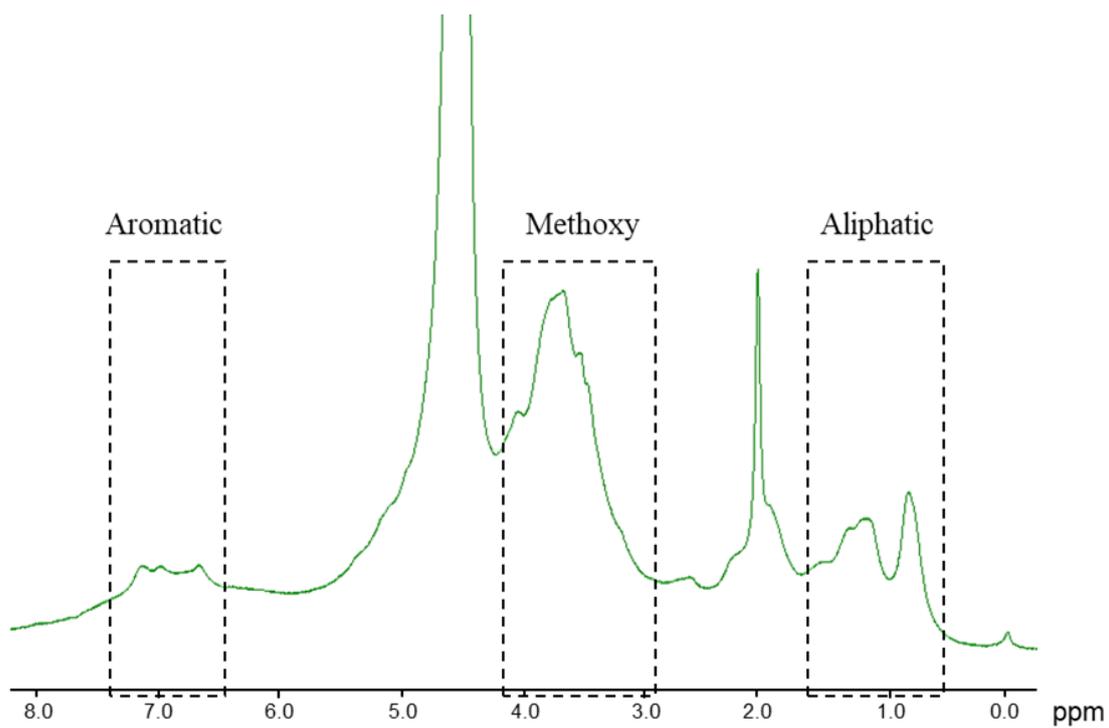


Fig. 1-6. コーンシルク水抽出エキスの 3 kDa 以上画分の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{acetone-}d_6=1:1$)

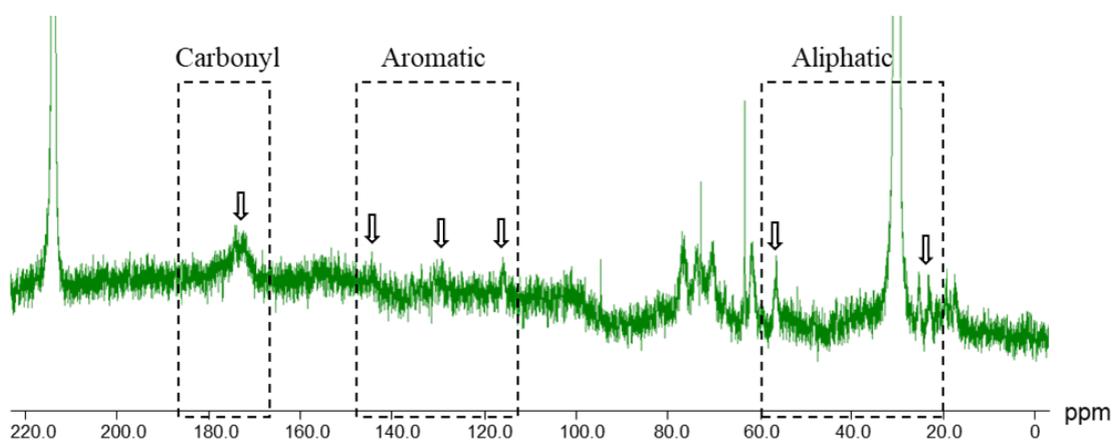
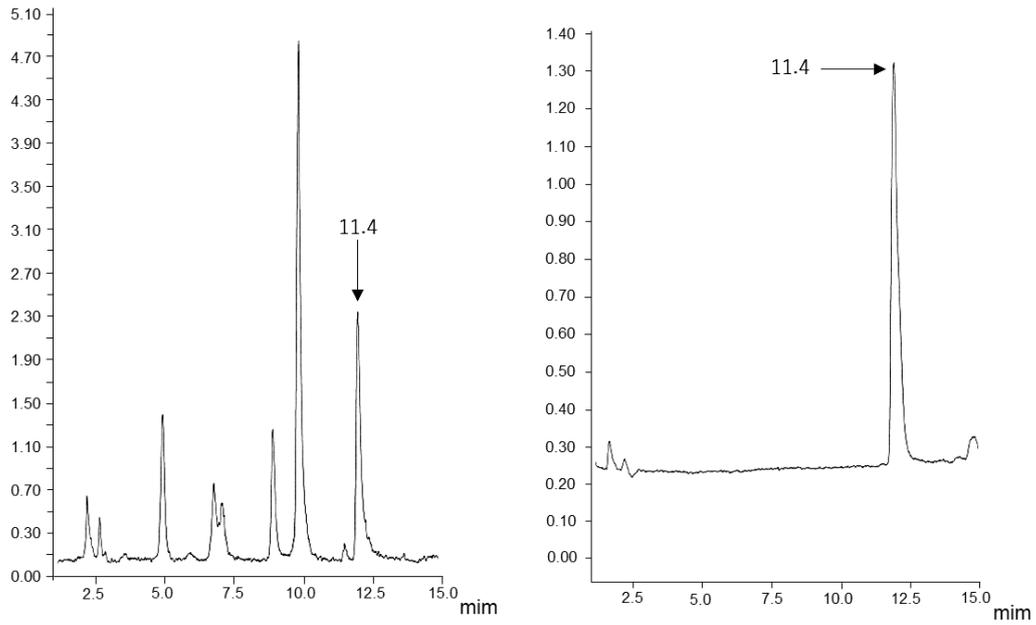
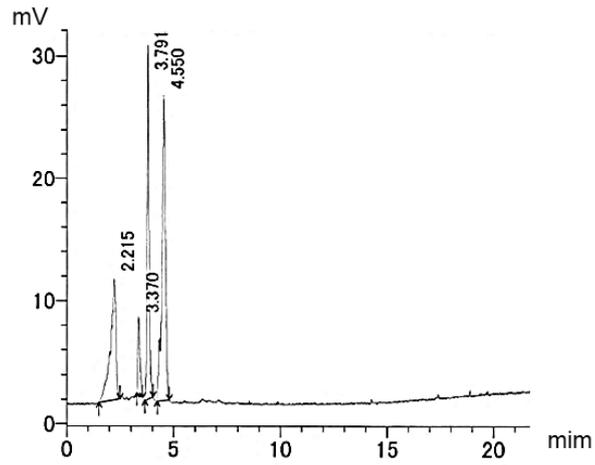


Fig.1-7. コーンシルク水抽出エキスの 3 kDa 以上画分の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{acetone-}d_6=1:1$)

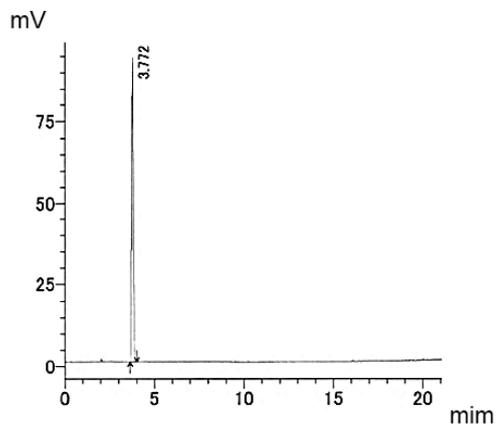


(a) コーンシルク3 kDa以上加水分解物 (b) vanillin

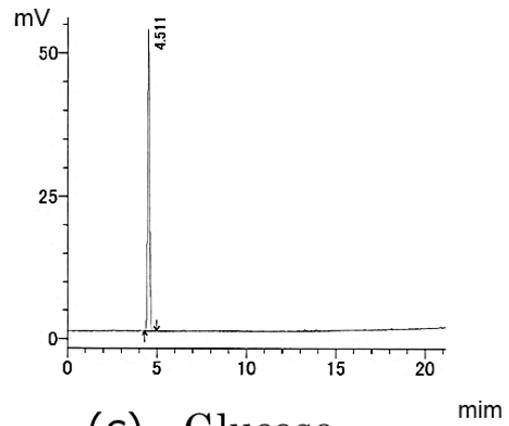
Fig. 1-8. コーンシルク水抽出エキスの3 kDa 以上画分の
酸加水分解①後のLC-MS クロマトグラム



(a) コーンシルク加水分解物



(b) Xylose



(c) Glucose

Fig. 1-9. コーンシルク水抽出エキスの 3 kDa 以上画分の
酸加水分解②後の LC-MS クロマトグラム



Fig. 1-10. コーンシルク水抽出エキスの上画分の
FT-IR スペクトル

第2節 Glycation 阻害活性の高いコーンシルクをより簡便に判断する品質評価方法の開発

コーンシルクを機能性原料として開発することを目的に、第1節では販売元が異なるコーンシルクを複数入手し、それらの glycation 阻害活性が販売元によって差があることを確認した。さらに、glycation 阻害活性成分（関与成分）が lignocellulose であることも明らかにした。

従来の glycation 阻害活性試験では、7日間のインキュベーションが必要であることから、健康食品や機能性原料としての品質を評価・検討する際には、より短期間で glycation 阻害活性を判別する手法が求められる。そこで第2節では、第1章第1節にて構造決定に大きく寄与した FT-IR を用いて glycation 阻害活性の判別検討を実施し、メタボロミクス手法を用いた品質評価方法の開発を行うことを目的とした。FT-IR は簡便で高い再現性³⁰⁾を長所とし、普及率が高く、特徴を持つ。FT-IR を用いたメタボロミクス研究の実施例としては、食用油の混合物分析などの報告がある^{31,32)}。

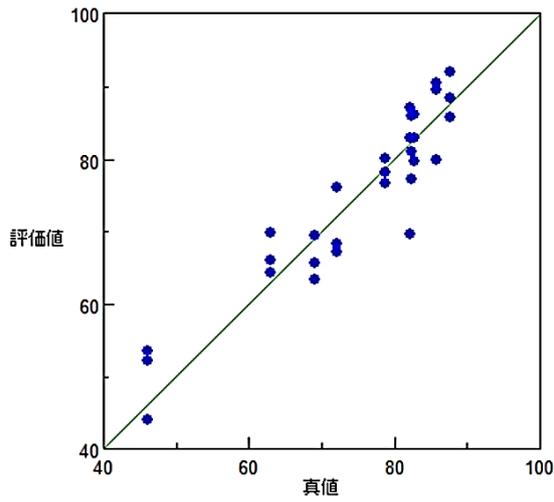
まずは、第1節で算出した glycation 阻害率（終濃度 25 $\mu\text{g/mL}$ ）と FT-IR の分析結果に相関があるのかを検討するために、第1節で作製した 10 種類の glycation 阻害活性用冷浸水抽出エキスについて ATR-FT-IR 分析（attenuated total reflection, 全反射測定法, ATR 法）を行った（ $n=3$ ）。3 回測定のアverageスペクトルを算出し、水蒸気と CO_2 減算を行った。分析結果を計算ソフトウェア（Spectra Manager）で主成分回帰：PCR（principal component regression）と部分的最小二乗回帰：PLSR（partial least squares regression）検量モデルを作成した。PCR 検量モデルの全領域計算では、主成分数を 10 とし、計算範囲をスペクトルの全範囲とした。計算の結果、相関係数が 0.932 となり、真値と予測値の乖離を定量的に示す RMSEP（root mean squared error of prediction）は 4.436 となった（Fig. 1-11）。次に、相関係数を向上させるために相関係数スペクトル（Fig. 1-12）から、計算領域の範囲を設定（633.5~880.3 cm^{-1} 、1191.8~1359.6 cm^{-1} 、1423.1~1492.6 cm^{-1} 、2572.6~2974.7 cm^{-1} ）して主成分数 14 の条件

で計算を行った。その結果、相関係数が 0.981 となり、RMSEP は 2.356 となった (Fig. 1-13)。計算領域を絞ることで、相関係数が向上する結果となった。

次に、PLSR 検量モデルの作成を行った。PLSR 検量モデルの計算範囲をスペクトル全範囲に設定して主成分数 16 の条件で計算を行った。その結果、相関係数 0.976、RMSEP が 2.660 となった (Fig. 1-14)。次に、RMSEP の値を減少させるために、統計的に計算領域を絞り、 $983.5\sim 985.5\text{ cm}^{-1}$ 、 $1021.1\sim 1107.9\text{ cm}^{-1}$ を計算範囲とした。その結果、相関係数 0.994、RMSEP が 1.325 となった (Fig. 1-15)。こちらも、計算領域を絞ることで、相関係数が向上し、RMSEP の値も小さくなった。今回の検量モデルの検討により、コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性を FT-IR の分析情報から統計的に予測できることが明らかとなった。

考察

本研究では、FT-IR を用いたコーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性の判別検討を実施し、品質評価方法の開発を行うことを目的として、2つの回帰検量モデルを作成した。PCR 検量モデルに関しては、FT-IR スペクトルの形状を考慮した解析であるため、スペクトルが示す官能基の情報に重きを置いて解析を進める場合には、このモデルを用いて回帰を行うことが妥当と考えられる。また、PLSR 検量モデルでは、スペクトル形状以外の情報（官能基の情報を持たないスペクトル領域）も含めてモデル作成を行っているため、見落としになってしまう可能性のある情報も含めて網羅的に glycation 阻害活性の予測をすることが可能である。今回、計算領域を指定して測定モデルの算出も行ったが、PLSR 検量測定モデルのほうが相関係数、RMSEP の値が共に回帰分析を行う上で、より適切な値を示した。このことから、コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性予測モデルとして、PLSR 検量測定モデルが妥当ではないかと思われる。今回行った手法では、インキュベーションに 1 週間を要する長期の glycation 阻害活性試験を実施しなくても、FT-IR 分析を行うだけで、glycation 阻害活性の高低が判断できる。これは、コーンシルクを機能性食品原料として取り扱う際の、品質評価方法の 1 つとして活用できると考えられる。FT-IR は普及率が高く、簡便性と高再現性を持ち、品質評価を行う上で最適な分析装置であるが、メタボロミクス研究で用いられる分析装置としては、NMR や MS に比べて実施例が少ない。よって、本研究はメタボロミクス研究の分析技術の発展にも繋がる。加えて、本研究で行った手法は、他の天然素材でも応用が可能であることから、今後の新たな品質評価方法として広く導入されることを期待したい。



計算条件
 スペクトルのセンタリング
 濃度のセンタリング
 主成分数：10
 計算範囲
 全範囲

相関係数0.932
 RMSEP 4.436

Fig. 1-11. 全領域計算における PCR 検量モデルの作成結果

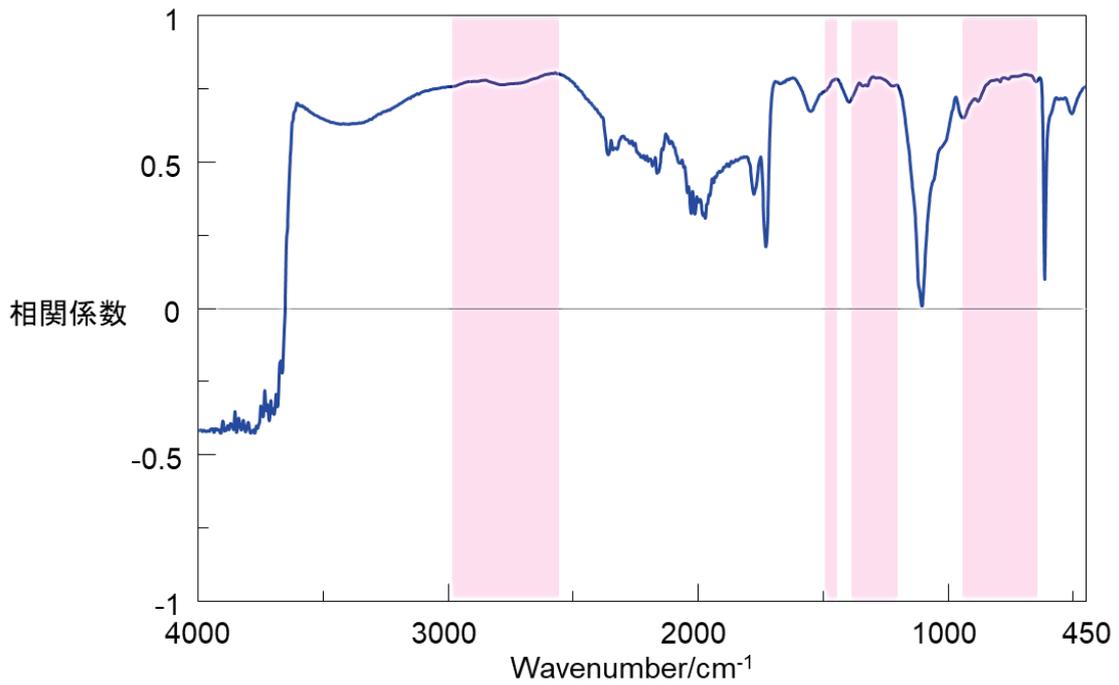
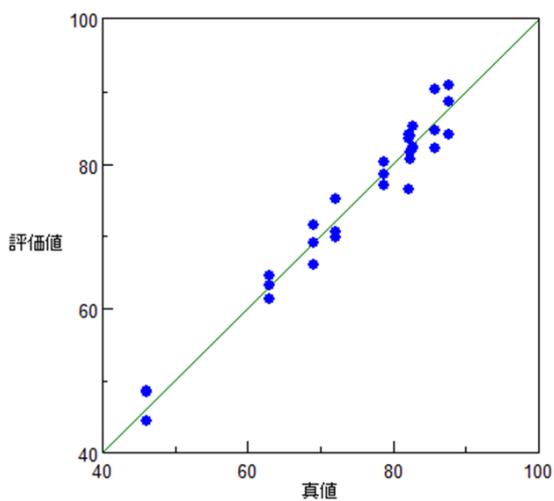


Fig. 1-12. PCR 検量モデル作成における計算領域の選択範囲



計算条件

スペクトルのセンタリング

濃度のセンタリング

主成分数：14

計算範囲

633.5 ~ 880.3 cm^{-1}

1191.8 ~ 1359.6 cm^{-1}

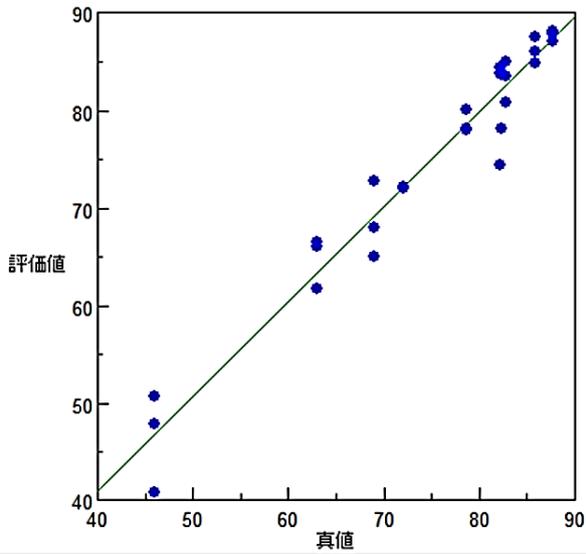
1423.1 ~ 1492.6 cm^{-1}

2572.6 ~ 2974.7 cm^{-1}

相関係数0.981

RMSEP 2.356

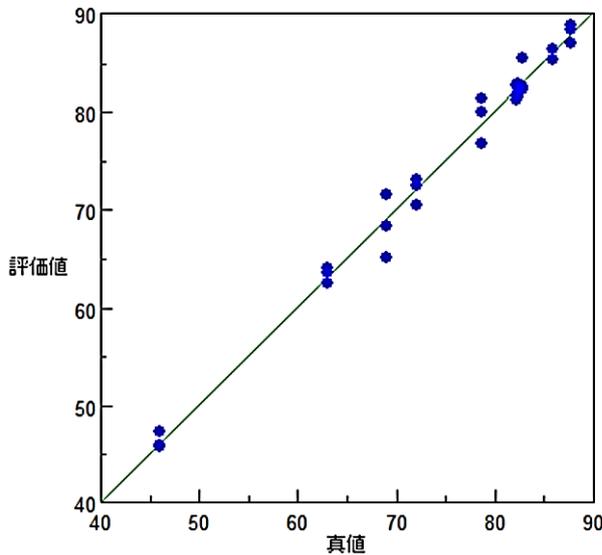
Fig. 1-13. 計算領域指定における PCR 検量モデル作成結果



計算条件
 スペクトルのセンタリング
 濃度のセンタリング
 スケーリング
 主成分数：16
 計算範囲
 全範囲

相関係数0.976
 RMSEP 2.660

Fig. 1-14. 全領域計算における PLSR 検量モデル作成結果



計算条件
 スペクトルのセンタリング
 濃度のセンタリング
 スケーリング
 主成分数：15
 計算範囲
 983.5 ~ 985.5 cm⁻¹
 1021.1 ~ 1107.9 cm⁻¹

相関係数0.994
 RMSEP 1.325

Fig. 1-15. 計算領域指定における PLSR 検量モデル作成結果

第2章

「狭山茶」のチャ葉を用いたメタボロミクス研究

チャ葉はチャノキ *Camellia sinensis* Kuntze (Theaceae) の葉であり、日本を含む諸外国においても経済的に重要な作物の一つである。また、日本薬局方局外生薬規格に記載されている生薬でもある（生薬名：チャヨウ）。新鮮なチャ葉の含有成分としては、**theanine** などのアミノ酸、**flavan-3-ol**、**phenolic acids**、**purine alkaloid**、縮合型タンニン、加水分解型タンニン、サポニン類、フラボノール類及び、それらの配糖体が挙げられる。特に、**flavan-3-ol** は(-)-epicatechin (EC)、(-)-epicatechin gallate (ECG)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG) の基本骨格であり、緑茶成分としてよく知られている³³⁻³⁵⁾。上記に挙げたチャ葉の含有成分には、抗がん作用、抗心血管系疾患作用、神経保護作用、抗肥満作用、抗糖尿病作用、抗菌作用、抗ウイルス作用などが報告されている^{36,37)}。

日本の茶栽培は全国各地で行われているが、栽培面積の 70%を占めているチャ品種は *C. sinensis* var. *sinensis* cv. *Yabukita* (「やぶきた」) であり、日本茶の代表品種とされている。そのほかにも各地の栽培環境に適したチャ品種が開発されており、品種間の成分評価に関する成分研究も行われている³⁸⁻⁴⁰⁾。

埼玉県では西部地区の入間市、所沢市、狭山市を中心に狭山茶が生産されており、宇治茶、静岡茶とともに「日本三大茶」と称されている（本研究での狭山茶の定義は、埼玉県茶業協会が平成 16 年に制定した「狭山茶の表示に関する基準」より埼玉県内産及び埼玉県に隣接する東京都西部地域産の荒茶を 100%使用した茶を指す）。埼玉県は主要茶産地の中で最も北に位置しており、温暖な気候を好む茶樹にとっては、寒冷的な地域であることから、茶産地の経済的北限とも言われている。よって、埼玉県では耐寒性を有する霜の被害に強い品種の育成が盛んに行われている (Fig. 2-1)^{41, 42)}。狭山茶の代表品種の一つとして、埼玉県茶業研究所で育成された *C. sinensis* var. *sinensis* cv. *Sayamakaori* (「さやまかおり」) が栽

培されている。農林水産省が令和4年に調査した結果では、「さやまかおり」の栽培面積は日本全体の2%ほどであり、5番目に多く栽培されている品種である⁴³⁾。この品種は「やぶきた」とは異なる強い若芽香と苦みを有し、耐寒性を持つことが特徴で、収穫量が多いと言われている (Fig. 2-2)。このように、「さやまかおり」は「やぶきた」とは特徴が異なることから、生成される代謝産物も異なることが予想される。しかし、「さやまかおり」に着目した網羅的な成分研究は行われていない。そこで第2章第1節では、狭山茶代表チャ品種「さやまかおり」に特徴的な成分の探索について述べる。本研究の目的を達成することにより、成分の観点から「さやまかおり」の特徴付けが可能となるほか、その成分に何らかの機能性が見いだせれば機能の面からの差別化も可能となると考えられる。本研究は、全国的な狭山茶の普及に繋がるものである。

茶産地が直面する課題の一つとして、チャ樹の老齢化があり⁴³⁾、チャ樹の40%が樹齢30年以上と言われている。老齢化の進行は、根系の老化を引き起こすことから、チャ葉の収穫量減少や品質低下に繋がる。チャ樹の改植を行うことにより、この問題を解決することが出来ると言われているが、費用や労働力、経済的生産可能な成木となるまでに7年を要するなどの理由から積極的な改植が進んでいないのが現状である。また、樹齢に伴うチャ葉の全含有成分を詳しく分析した研究は無く、改植の目安も茶農家の長年の経験のみで判断されている。そこで、品質が低下し、改植が必要なチャ樹を含有成分の面から選択することが出来れば、改植を効率良く進めることが出来るのではないかと考えた。よって本研究の目的として、メタボロミクス的手法を用いて老齢化したチャ樹を判断する指標成分を探索することを設定した (第2章 第2節)。本目的を達成することにより、樹齢が高く品質が低いものと、そうでないものを指標成分に基づき判別することが可能となる。指標成分の含有量に基づき、改植の目安が判別できれば、栽培分野への客観的な指標に基づいた科学的アプローチが実現し、チャ葉の品質向上を目的とした改植が進むと考える。

チャヨウ (日本薬局方外生薬規格に記載)

基原: *Camellia sinensis* K., チャノキ
(Theaceae, ツバキ科)

部位: 葉

含有成分: caffeine, theophylline, epicatechinなど



効能: 利尿、収斂、抗菌作用、頭痛・多眠などを改善する薬方(川芎茶調散)に配合されている

「狭山茶」

主要茶産地の中で北に位置する埼玉県西部地域の茶を指す
埼玉県は茶樹にとって寒さが厳しいため、耐寒性を有した品種育成を行っている

Fig. 2-1. 生薬チャヨウの基原と含有成分及び狭山茶について

「さやまかおり」

C. sinensis var. *sinensis* cv. Sayamakaori (Sayamakaori)

狭山茶の代表品種の一つ

埼玉県茶業研究所にて開発された

「やぶきた」に比べて耐寒性のある品種、味や香り、収穫量も異なる



埼玉県茶業研究所にて撮影

「やぶきた」

C. sinensis var. *sinensis* cv. Yabukita (Yabukita)

日本の茶面積の75%を占める品種

静岡県にて開発された

スタンダード茶品種



埼玉県茶業研究所にて撮影

Fig. 2-2. チャ品種「さやまかおり」と「やぶきた」について

第1節 狭山茶代表チャ品種「さやまかおり」の成分的特徴付け研究

狭山茶の全国的な普及を目指し、狭山茶代表チャ品種「さやまかおり」に特徴的な成分の探索を行った。埼玉県茶業研究所で栽培された「さやまかおり」と「やぶきた」の新鮮なチャ葉（一芯二葉）を入手し、その乾燥物を MeOH で冷浸抽出し、得られたエキスについて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。測定で得られた $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、積分値を hierarchical cluster analysis (HCA) 及び principal component analysis (PCA) に供し、両品種の比較を行った。更に、HCA と PCA の結果に基づき「さやまかおり」に特徴的な成分の探索も行った。

また、チャ葉のポリフェノール類には抗糖化作用を持つ⁴⁴⁻⁴⁶⁾ことが知られているため、単離化合物についても抗糖化作用を有するのか確認を行った。

Table 2-1 に示す「さやまかおり」10 サンプルと「やぶきた」13 サンプルの乾燥物 1.5 g を MeOH で冷浸抽出後、綿栓ろ過を行った後に、ロータリーエバポレーターにより MeOH を留去し、多変量解析用 MeOH エキスを得た。次に、このエキスを NMR 用溶媒 methanol- d_4 に溶解し、10 mg/mL で調製して $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。測定で得られた $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、スペクトル上に観測される溶媒に由来するシグナルと溶媒に溶解している水に由来するシグナルを除いて、0.04 ppm 刻みにバケット積分し、その積分値を HCA 及び PCA に供した。なお、 $^1\text{H-NMR}$ 測定で得られたスペクトルは Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を使用してバケット積分処理を行った。一方、JMP Pro 16 にて HCA と PCA などの多変量解析を行った。

Fig. 2-3 に示すように $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを HCA することにより、「さやまかおり」と「やぶきた」を分類することが可能であった。

PCA でも検討を行ったところ、Fig. 2-4 に示すように、データの分散が最も大きい PC1 及び 3 番目に大きい PC3 を用いた 2 次元平面上で、PC1 軸の方向に品種が分類された。PCA の loading plot (Fig. 2-5) の結果から δ 8.02 が分類に寄与している可能性があったため、「さ

やまかおり」及び「やぶきた」の δ 8.02 の積分値の違いに有意差があるか Mann-Whitney の U 検定を行った (Fig. 2-6)。その結果、 δ 8.02 の積分値は「さやまかおり」の方が「やぶきた」よりも有意に大きく、 δ 8.02 は「さやまかおり」と「やぶきた」を区別するマーカーシグナルとなることが明らかとなった。各サンプルの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの直接比較においても、 δ 8.02 は「さやまかおり」に特徴的に認められた (Fig. 2-7)。そこで次に、このシグナルに由来する化合物を探索することとした。

「さやまかおり」の葉 400 g を MeOH で冷浸抽出を行い、抽出液を綿栓ろ過し抽出物を得た。得られた抽出物をロータリーエバポレーターにて溶媒留去し、MeOH エキスを作製した。作製したエキスを NMR 用溶媒 methanol- d_4 に溶解し、10 mg/mL に調製後、 $^1\text{H-NMR}$ 分析を行い、 δ 8.02 に $^1\text{H-NMR}$ シグナルが出現するか確認した。目的とするシグナルが認められたため、次に、MeOH エキス 100 g を合成吸着剤 Diaion HP-20 に付し、 H_2O 、30% MeOH、50% MeOH、70% MeOH、MeOH と溶出させ、それぞれ H_2O fraction (26.7 g)、30% MeOH fraction (31.7 g)、50% MeOH fraction (21.0 g)、70% MeOH fraction (3.4 g)、MeOH fraction (10.7 g) を得た。そのうち δ 8.02 の認められた 70% MeOH fraction (3.4 g) について silica gel カラムに供し、 CHCl_3 : MeOH = 5 : 1 で溶出させ、溶出物 (2.9 g) を得た。そのうちの 200.0 mg を中圧分取クロマトグラフィーを用いて Fr. 1~Fr. 240 に分画し、HPLC 分析によって Fr. 92~95 を単一化合物であると確認し、compound **T1** (4.7 mg) とした。

T1 は FAB-MS より分子量 756 であることが示された。HPLC-PDA の解析から **T1** は 265.6 及び 347.8 nm に吸収極大波長を示したことから、flavanonol と推定された。さらに $^1\text{H-NMR}$ においては δ 8.02 (2H, d, $J=8.9$ Hz)、 δ 6.90 (2H, d, $J=8.9$ Hz) に A_2B_2 系のシグナルが、 δ 6.14 (1H, d, $J=2.0$ Hz)、 δ 6.31 (1H, d, $J=2.0$ Hz) にはメタカップリングのシグナルが観測されたことから kaempferol をアグリコンとする化合物であると予測した。また、糖の 1 位に帰属されるシグナルが δ 5.05 (1H, d, $J=7.5$ Hz)、 δ 4.54 (1H, d, $J=1.4$ Hz) 及び δ 4.38 (1H, d, $J=7.7$ Hz) にそれぞれ観測されたことから **T1** は糖が 3 つ結合した kaempferol 配糖体であることが推測された。二次元 NMR の詳細な解析と文献値^{47, 48)}との比較から **T1** を kaempferol-3-*O*- β -D-

glucopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside であると同一した (Fig. 2-8)。なお、 δ 8.02 のシグナルはフラボノール骨格の B 環の 2' と 6' に由来するものであることも明らかとなった。

次に、単離同一した化合物について、glycation 阻害活性を有するかの確認を行った。Glycation 阻害活性試験については、第 1 章と同様の手法を用いて化合物の終濃度を 20 mM、4 mM、1 mM に調製して実施した。その結果、glycation 阻害活性率は終濃度 20 mM では、73.9%、終濃度 4 mM では、40.1%、終濃度 1 mM では、21.1%となった。なお、IC₅₀ 値は 5.71 mM であった。

考察

今回の研究では NMR メタボローム解析の手法を用い、「さやまかおり」の特徴的な成分の一つとして kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside を同定した。物部らは様々な緑茶試料中の **T1** を含む 37 種のフラボノール配糖体を LC-MS により定量している。その試料の中には「さやまかおり」と「やぶきた」も含まれており、それらの **T1** の含量もそれぞれ 92.8、20.8 μg/mL と報告している⁴⁸⁾が、それ以上の言及はない。通常の LC-MS 分析では **T1** が「さやまかおり」に特徴的な成分とまでは気付かなかった可能性がある。この化合物は、D-galactosamine による肝障害に対して保護作用を持つこと⁴⁷⁾や、HepG2 細胞において脂質蓄積抑制活性を示すことも示されている⁴⁹⁾。**T1** の glycation 阻害活性は、positive control の aminoguanidine (終濃度：10 mM、阻害率：95.9%) には及ばなかったが、適度な阻害率であった。チャの代表成分カテキン類の catechin、epicatechin、epigallocatechin の glycation 阻害活性率 (終濃度 20 mM) を算出したところ、59.6%、64.4%、77.0%であった。よって、**T1** はカテキン類と同程度の glycation 阻害率を示す化合物であることが明らかとなり、チャの glycation 阻害活性成分の一つとしての機能を有していることが考えられた。また、**T1** はフラボノイド構造を持ち、フラボノイドは機能性を有する化合物として知られていることから、本研究で単離した化合物にもまだ解明されていない機能性を有している可能性が考えられる。

ところで、「さやまかおり」のサンプルは PCA スコアプロットでは、2 群に分類された。¹H-NMR スペクトルでは δ 2.64 が分類に関与しており、カテキン類ではないかと予想しているが詳細な成分同定には至っていない。なぜ「さやまかおり」が PCA スコアプロット上で 2 群に分類されたのかは、興味の持たれるところである。

本研究は「さやまかおり」のブランド化や狭山茶の全国的な普及の一助になると考えられる。今後、**T1** について新たな機能性が見いだせれば、より一層全国的に「さやまかおり」及び狭山茶が注目されるのではないかと期待している。

Table 2-1. チャサンプルの品種及びチャ樹を植えた年

Sample No.	Tea cultivars	Year the tree was planted	Sample No.	Tea cultivars	Year the tree was planted
1	Sayamakaori	1982	11	Yabukita	1971
2		1993	12		1971
3		2010	13		1980
4		2014	14		1992
5		2015	15		1993
6		2015	16		2010
7		2017	17		2014
8		2018	18		2015
9		2019	19		2015
10		2012、Deep pruning 2019	20		2017
		21	2018		
		22	2019		
		23	2012、Deep pruning 2019		

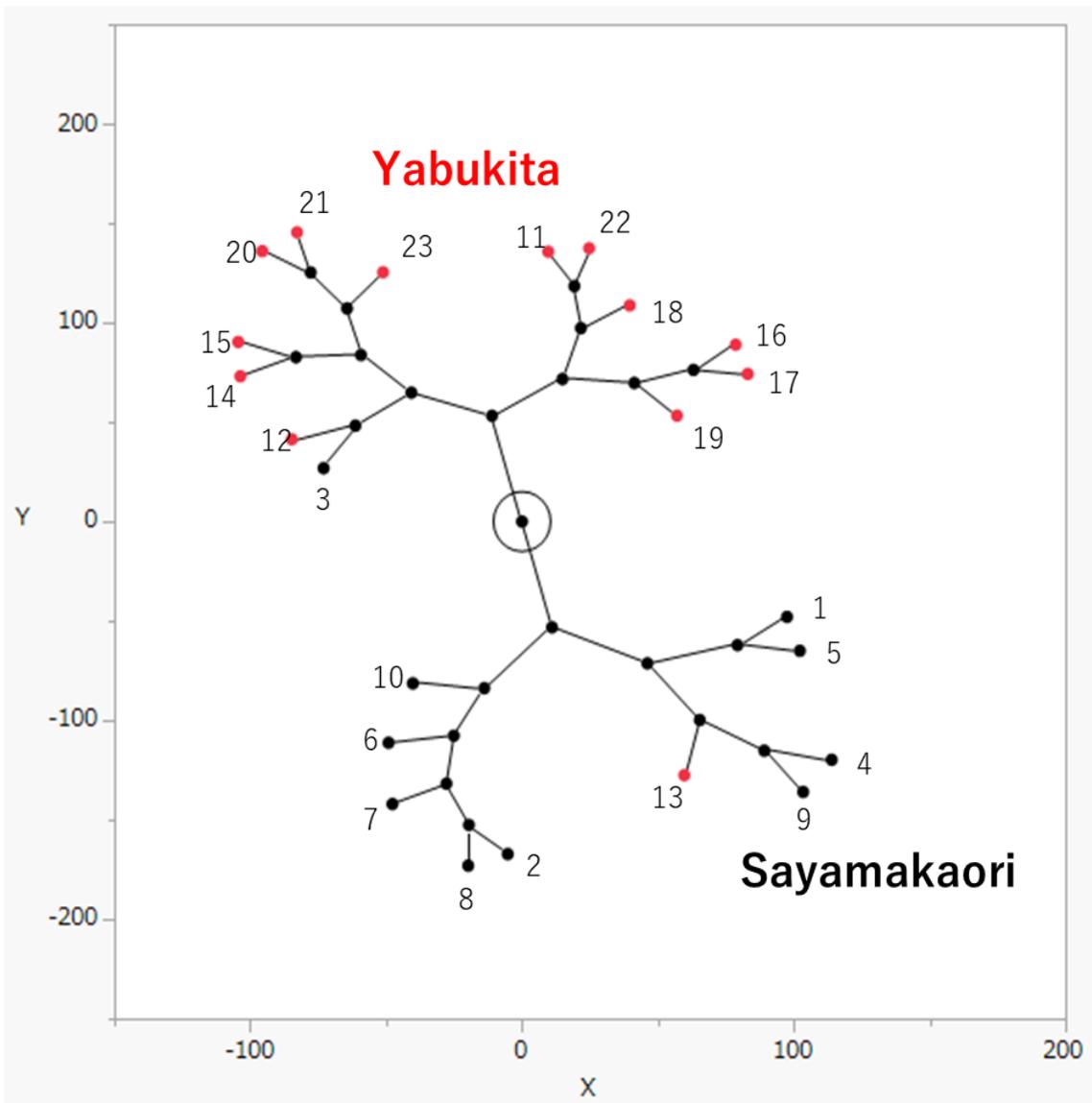


Fig. 2-3. チャ品種間の¹H-NMR スペクトルの HCA 結果

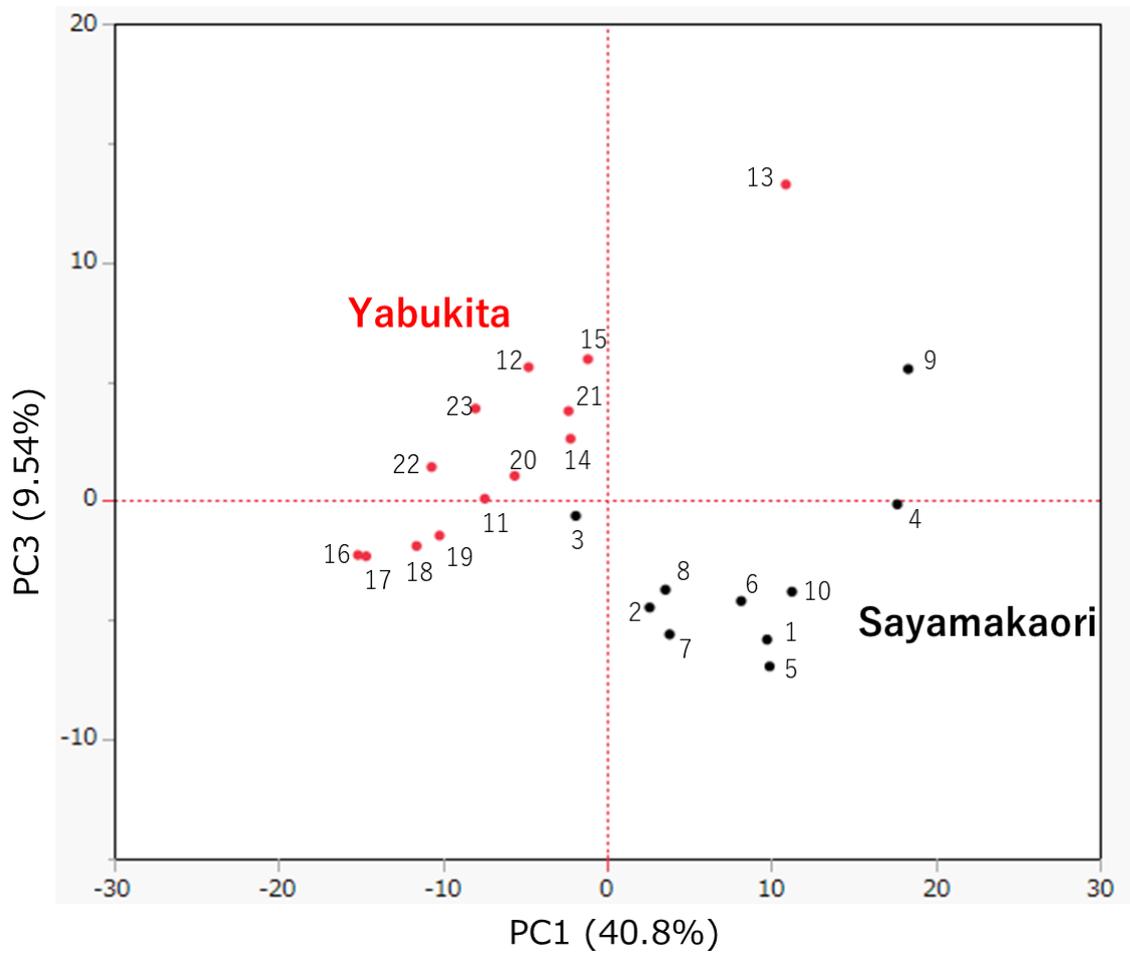


Fig. 2-4. チャ品種間の ¹H-NMR スペクトルの PCA score plot

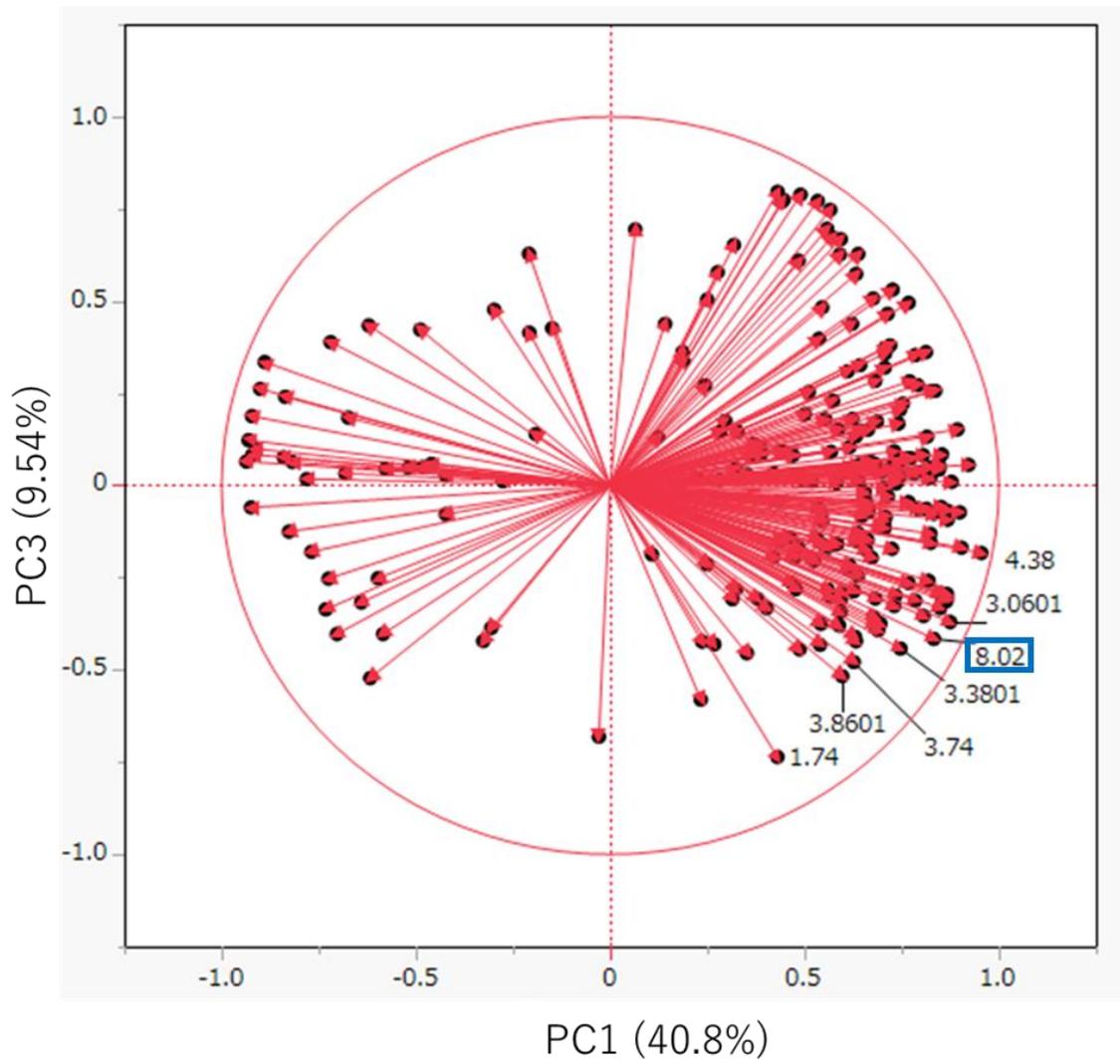


Fig. 2-5. チャ品種間の¹H-NMR スペクトル PCA loading plot

δ 8.02
 $P < 0.0001$

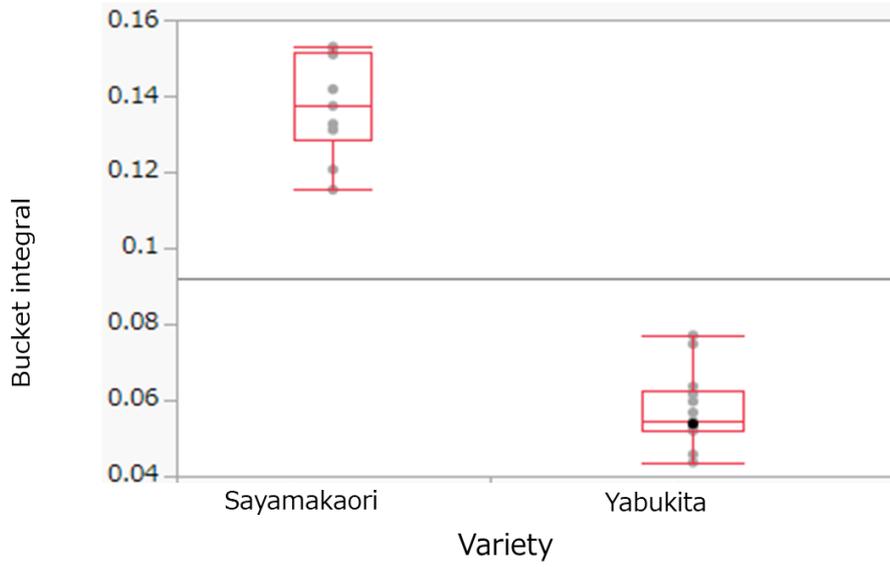


Fig. 2-6. δ 8.02 における「さやまかおり」と「やぶきた」の Mann-Whitney の U 検定

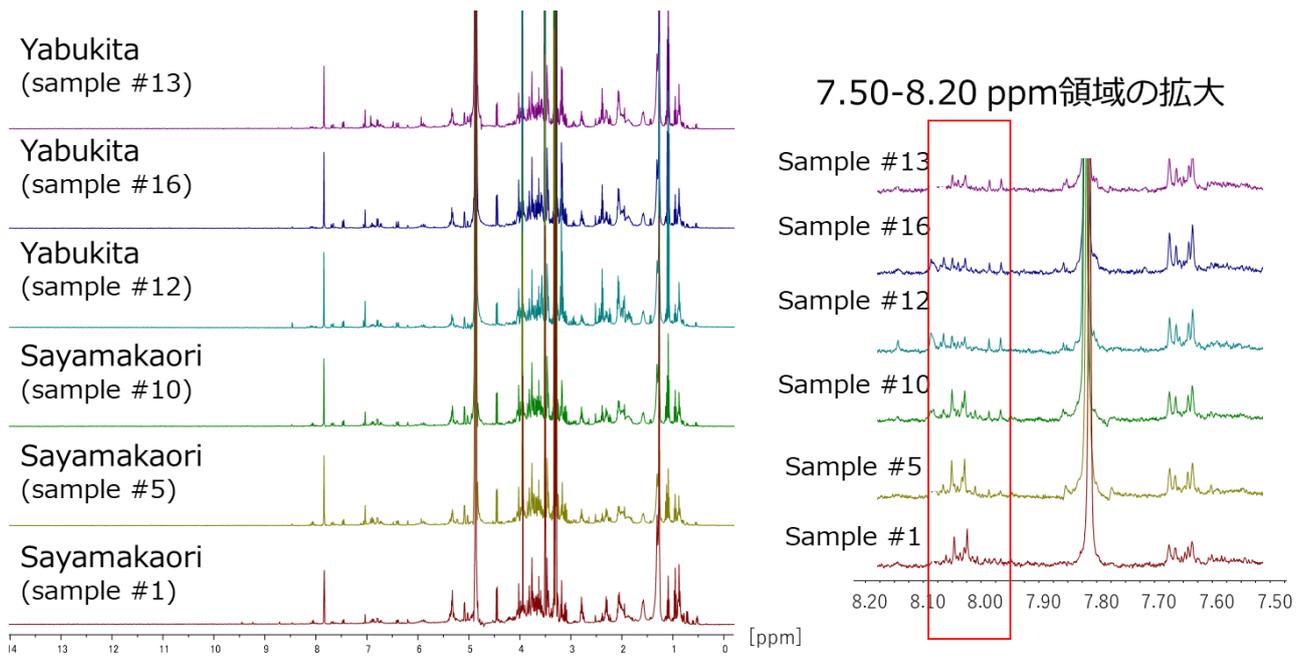
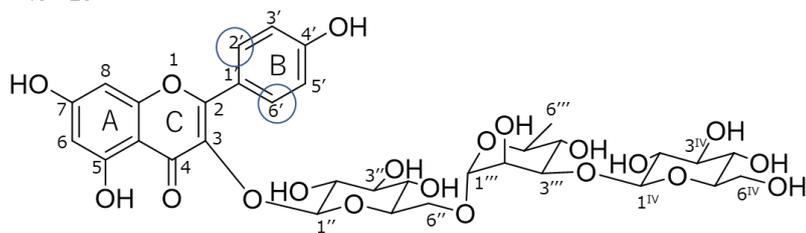


Fig. 2-7. 「さやまかおり」と「やぶきた」の¹H-NMR スペクトル

C₃₃O₄₀H₂₀ MW:756



Kaempferol 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

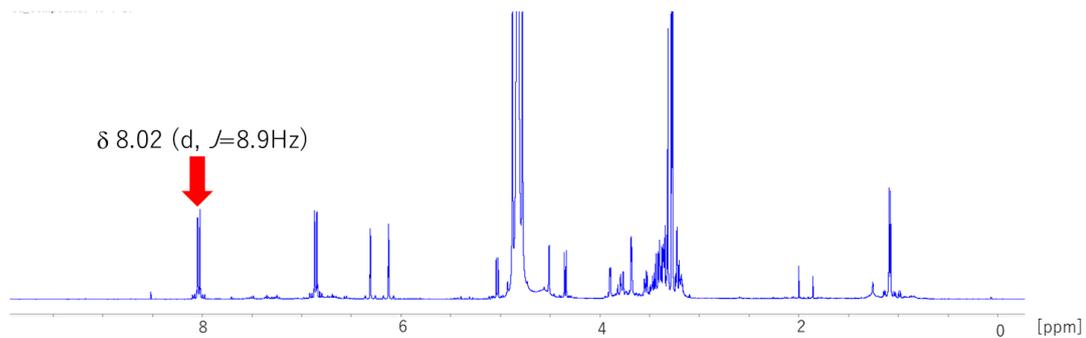


Fig. 2-8. Compound **T1** の構造式及び¹H-NMR スペクトル

第2節 チャ樹の老齢化に関連する指標成分の探索

メタボロミクスの手法を用いて、老齢化により品質が低下したチャ樹（改植が必要なチャ樹）を判断する指標成分の探索を行った。

まず、お茶の味はアミノ酸の含有量が影響すると考えられたため、チャ葉中のアミノ酸測定を行った。第一節で使用した樹齢の異なる「やぶきた」乾燥物 1.0 g を H₂O (150 mL) で加熱抽出し、得られた抽出物を凍結乾燥機にて乾燥処理を行い、チャの熱水抽出エキスを作製した。このエキスを 10 mg/mL となるようにクエン酸リチウム緩衝液 (P-21、pH 2.98) に溶解し、全自動アミノ酸分析機でアミノ酸分析を行った。分析結果については、検出されたアミノ酸に由来するピーク面積値を HCA 及び PCA に供した。また、二次代謝産物の関連性を調べるために、第一節で作製した MeOH エキスを ¹H-NMR 測定に供した。得られた NMR スペクトルデータはバケット積分後、スペクトル上に観測される溶媒に由来するシグナルと溶媒に溶解している水に由来するシグナルを除いて、0.04 ppm 刻みにバケット積分し、その積分値を PCA に供し、両品種の比較を行った。それぞれの測定結果について、チャ樹の老齢化により含有成分が変化するのか、変化する場合、どのような成分が老齢化に関与しているのかを確認し、チャ樹の老齢化の指標となる成分を探索した。

チャの熱水抽出エキスのアミノ酸含量の HCA 結果を Fig. 2-9 に示す。なお、図中で 2010 年から 2019 年に植えられたものを丸印、1971 年から 1993 年に植えられたものを三角印で示した。実験の結果、三角印で示したサンプルが、概ね一か所に集まっていたことから、樹齢とアミノ酸には相関する傾向があることが明らかとなった。次に、PCA loading plot の検討を行ったところ、Fig. 2-10 に示すように、PC1 及び PC2 を用いた 2 次元平面上で、PC1 軸の方向に対して三角印で示したサンプルが概ね一か所に集まっていた。PCA の loading plot (Fig. 2-11) の情報から樹齢の高いサンプルと低いサンプル間では theanine、serine (Ser)、lysine (Lys)、glutamic acid (Glu)、leucine (Leu)、arginine (Arg) など複数のアミ

ノ酸がグループ分けに関与していることが明らかとなり、樹齢別にグループ分けができることが明らかとなった。

また、チャの MeOH エキスの $^1\text{H-NMR}$ の PCA では、樹齢別に分類することができなかった (Fig. 2-12)。

考察

今回の研究では、メタボロミクス的手法を用いて、老齢化により品質が低下したチャ樹（改植が必要なチャ樹）を判断する指標成分の探索を行った。チャ葉中のアミノ酸含量を HCA 及び PCA したところ、「やぶきた」のチャ葉（新芽）は樹齢に応じて概ねグループ分けができ、複数のアミノ酸の含量が樹齢と相関することを明らかにした。

全自動アミノ酸分析機は精度と再現性に優れ、簡便にアミノ酸分析を実施できる特徴を持つ⁵⁰⁾。この分析装置から得られた情報を包括的に取り扱い、視覚的に品質が低下したチャ葉を判断できた点は、茶園などの栽培現場においても、客観的な情報に基づいて簡便に品質評価ができると考えられる。

また本研究結果から、チャ樹の成長に伴って新芽に含まれる複数のアミノ酸量に変化していくことが考えられた。今回使用したチャ葉は樹齢が一番高いサンプルで、1971 年（測定当時の樹齢 50 年）だったが、さらに樹齢が高いサンプルの分析結果を統計処理の際に組み込むことで、よりグループ分けに寄与したアミノ酸を絞り込むことができるのではないかと考えられる。成長が進んだチャ樹の木化根では arginine 含有量が多いとの報告がされている⁵¹⁾が、Fig. 2-10 に示すように樹齢の異なるチャ葉のアミノ酸含量の PCA score plot 結果から、樹齢が進んだチャ葉でも arginine が多いことが明らかとなった。それ以外のグループ分けに関与したアミノ酸に関しては、樹齢との関係性を示した論文は調べた限り見当たらなかったため、本研究結果は新規性を有するものであった。

茶の代表アミノ酸である theanine はリラックス作用、ストレス軽減作用、うつ・統合失調症の症状軽減作用⁵²⁾を持つと報告がある。本研究から theanine 量が多いことが明らかとなり、樹齢が高い茶樹から収穫されたチャ葉のほうが高い機能性を有するのではないかと考えられる。また、チャ葉を MeOH で抽出して調製したエキスの ¹H-NMR スペクトルの PCA では、樹齢に応じたサンプルのグループ分けはできなかった。このことから、MeOH で抽出されるチャ葉成分で樹齢を判断することは難しいと考えられる。お茶の品質評価方

法として一般的には官能評価が挙げられるが、含有成分に基づく本研究の結果と官能評価の結果を組み合わせることで、新たな知見が得られるのではないかと考えられる。

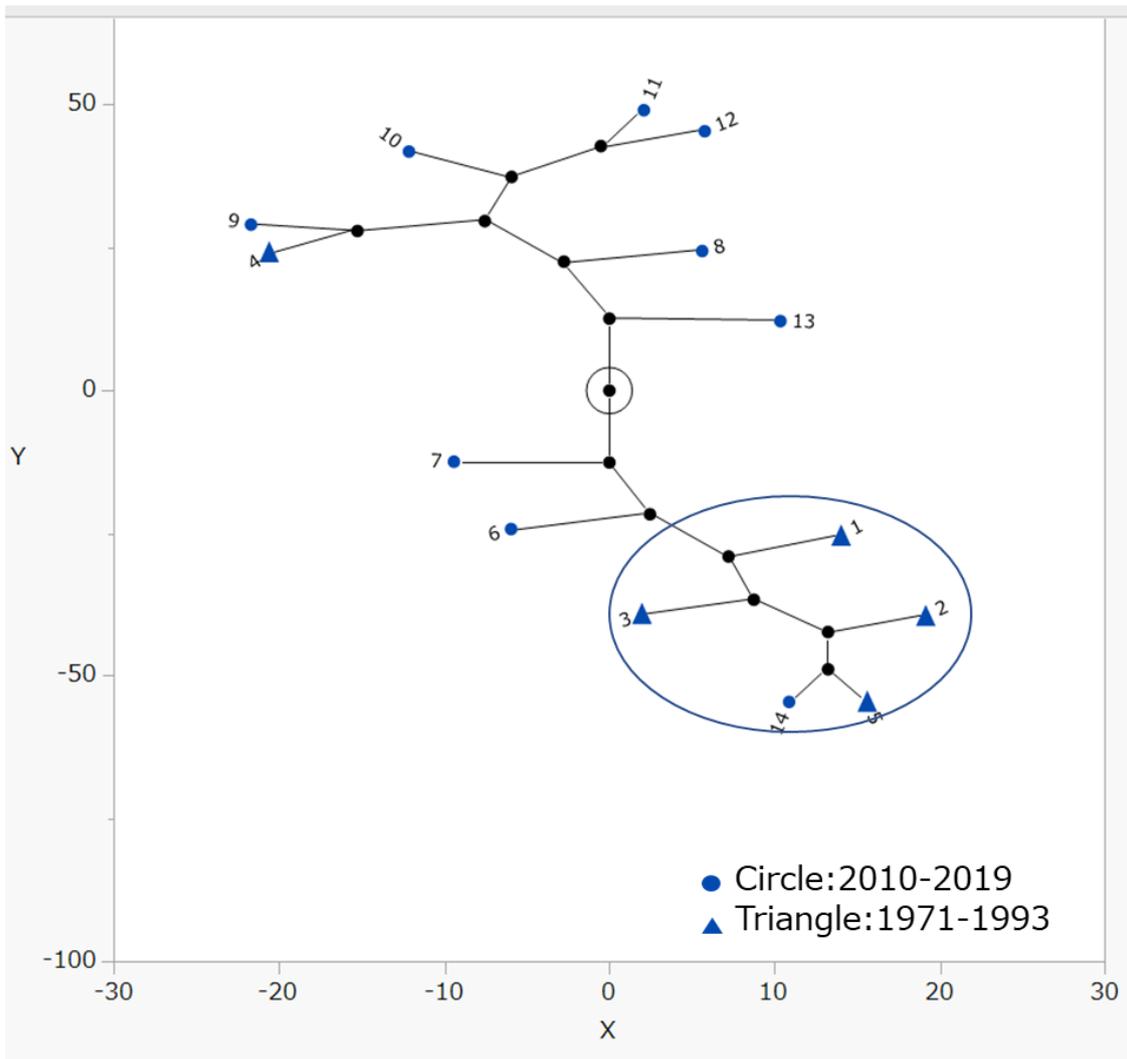


Fig. 2-9. 樹齡の異なるチャ葉のアミノ酸含量のHCA結果

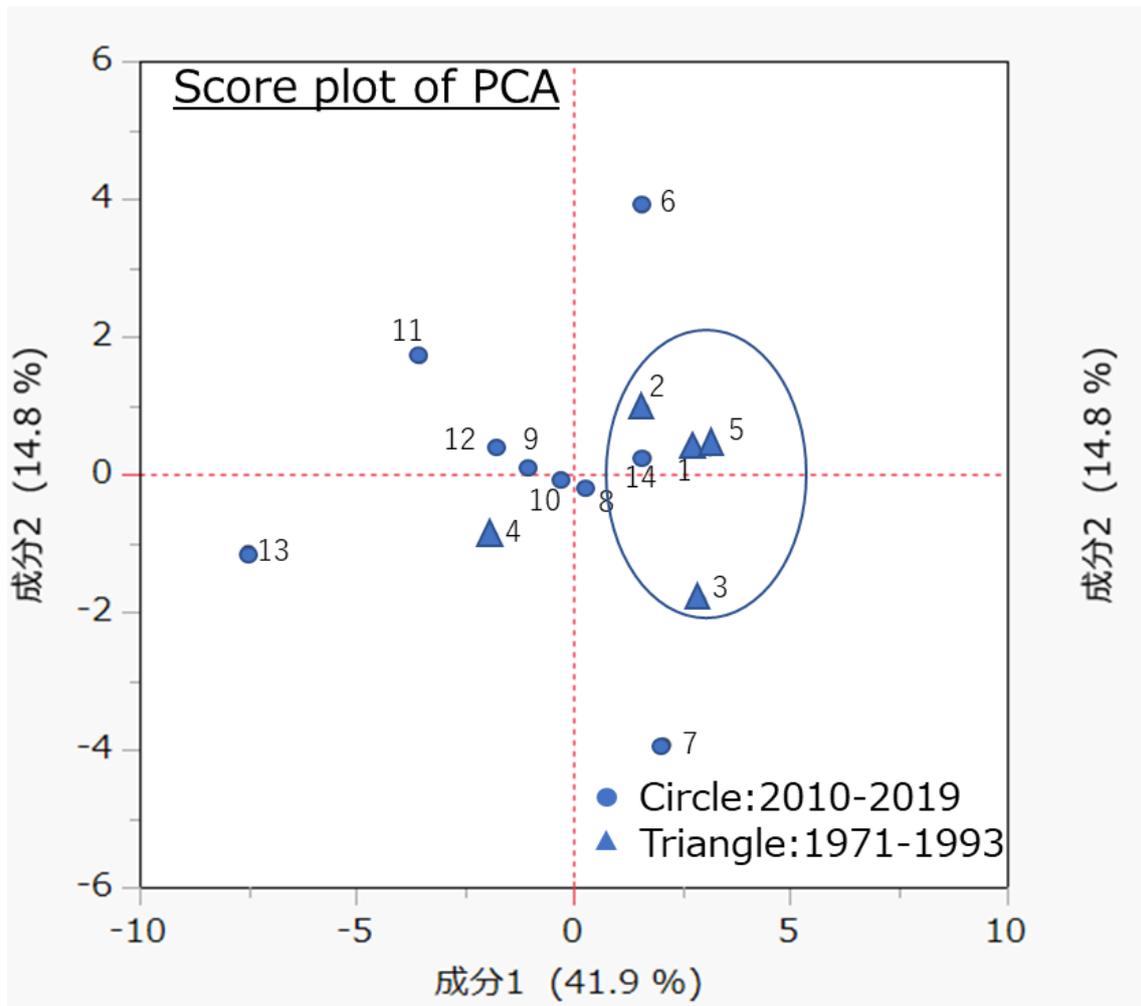


Fig. 2-10. 樹齡の異なるチャ葉のアミノ酸含量の PCA score plot

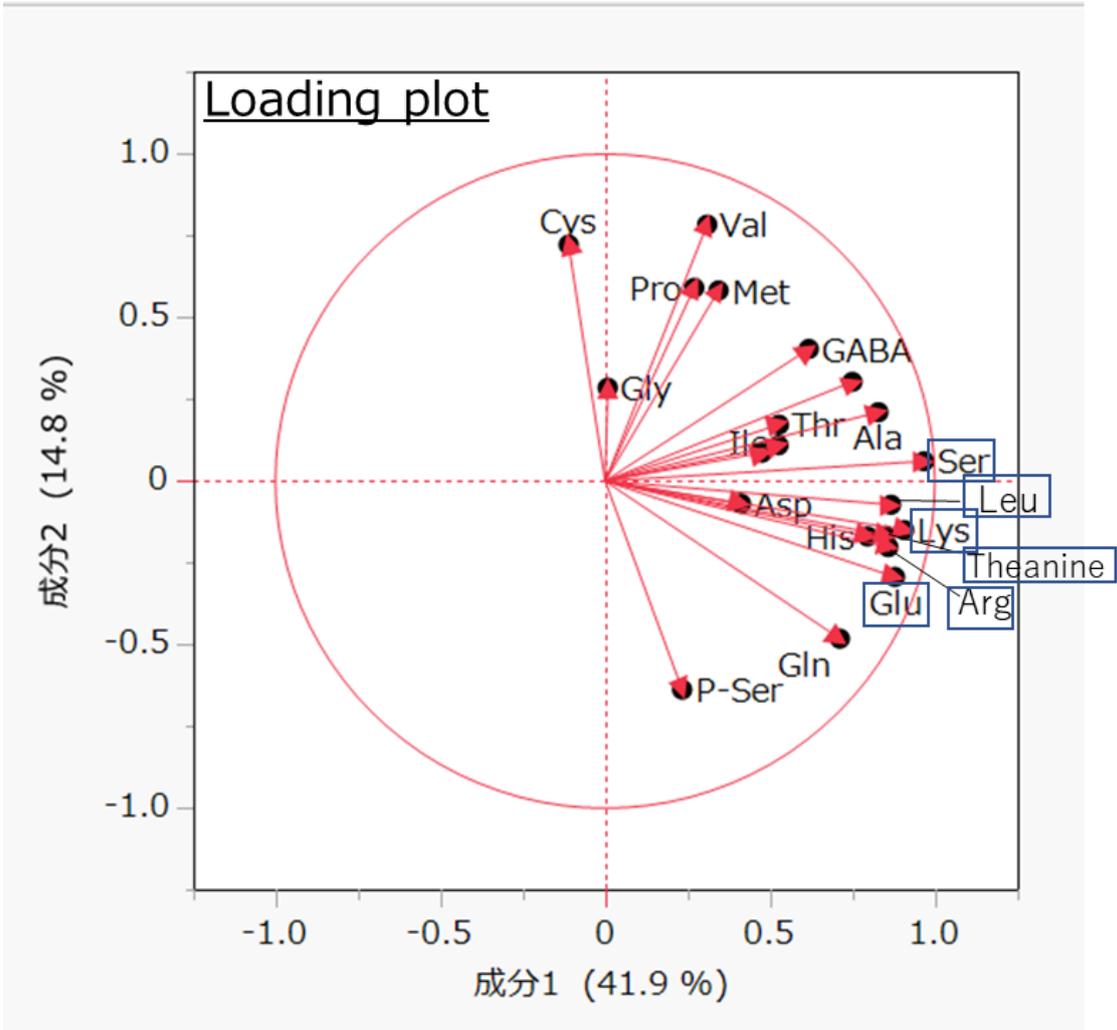


Fig. 2-11. 樹齡の異なるチャ葉のアミノ酸含量の PCA loading plot

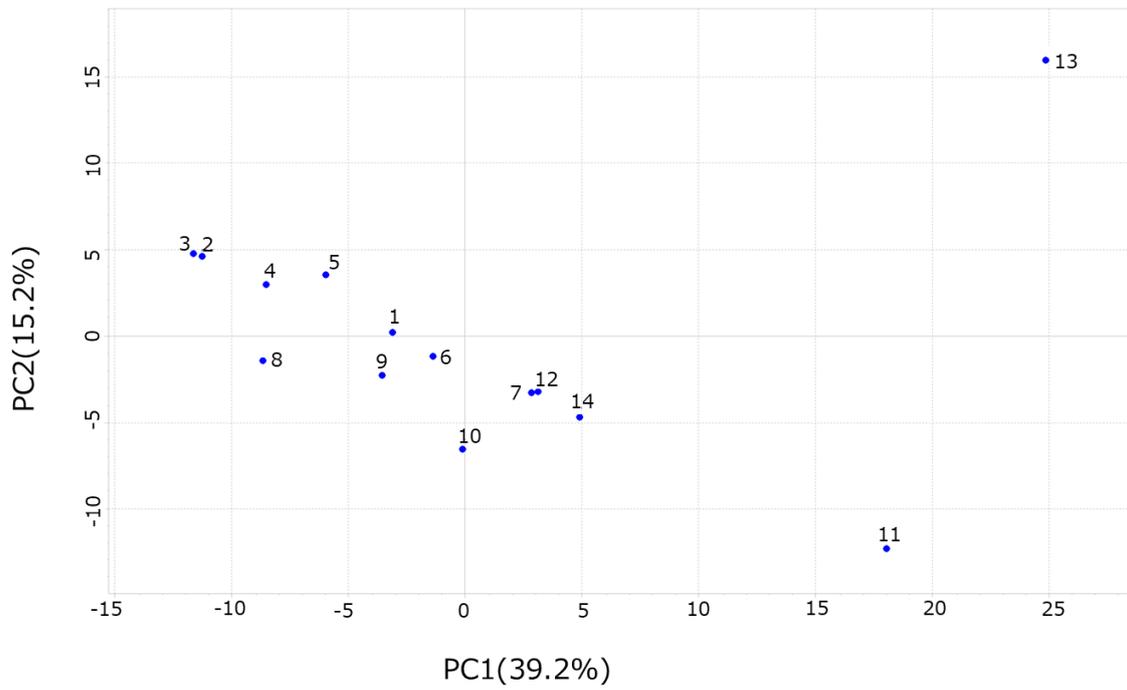


Fig. 2-12. 樹齡の異なるチャ葉 (MeOH エキス) の¹H-NMR スペクトルの PCA Score plot

第3章

生薬「サイシン」のメタボロミクス研究

第十八改正日本薬局方 (JP18) において、生薬 サイシン ASIASARI RADIX はケイリンサイシン (*Asiasarum heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa) 又はウスバサイシン (*Asiasarum sieboldii* F. Maekawa) (Aristolochiaceae ウマノスズクサ科) の根及び根茎と定められている。効能としては鎮咳、去痰などが挙げられ、気管支喘息や鼻炎などに効果を有する小青竜湯、悪寒のする感冒、気管支炎などに用いられる麻黄附子細辛湯などに配合されている。含有成分としては essential oils (safrole, eucarvone, α -pinence, cineole)、monoterpene、lignan ((-)-asarinin、(-)-sesamin、xanthoxyol) 、alkaloid (hygenamine) 、phenylpropanoids (methyleugenol) が知られている⁵³⁻⁵⁷⁾。これらの含有成分には鎮咳作用⁵⁸⁾、抗ガン作用^{56, 59)}、抗菌作用⁶⁰⁾、抗アレルギー作用^{61, 62)}などの報告がある。また、JP18に記載されているサイシンの確認試験方法では、薄層クロマトグラフィーによる asarinin の確認のみが規定されているが、市場で取り扱われている各生薬メーカーが販売するサイシンの見た目や色合いが異なるため、asarinin 以外の成分に差異がある可能性が示唆される (Fig. 3-1)。これらのことから、第3章第1節では、メタボロミクスの手法を用いて網羅的に成分分析を行ったときにどの程度、含有成分にばらつきがみられるのかを確認し、そのばらつきに関与する成分の同定について述べる。また、サイシンの高極性成分の探索研究があまり実施されていないことから、併せて成分探索も実施し、サイシン含有化合物のリスト作成も実施した (第3章第2節)。

第1節 「サイシン」の市場品比較

各生薬メーカーが販売するサイシンの見た目や色合いが異なるため、メタボロミクスの手法を用いて網羅的に成分分析を行い、含有成分にばらつきがみられるのかを確認し、そのばらつきに關与する成分の同定を行うこととした。また、サイシンに含まれている成分の研究はあまり実施されておらず、含有成分の解明が十分されていないため、成分同定を行うことで「サイシン」の品質評価に役立つと考えられる。

Table 3-1 に示す7種類のサイシンをミルで粉碎し、粉碎した生薬にNMR用溶媒 *methanol-d₄* を 10 mg/mL の濃度になるように加え、成分を抽出し (n=3)、得られたエキスをNMR用チューブに移して、¹H-NMR 測定を行った。測定で得られたスペクトルはスペクトル上に観察される溶媒に由来するシグナルと溶媒に溶解している水に由来するシグナルを除いて、0.04 ppm 刻みにバケット積分し、その積分値を HCA 及び PCA に供した。なお、¹H-NMR 測定で得られたスペクトルは Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を使用してバケット積分処理を行った。一方、JMP Pro 16 にて HCA と PCA などの多変量解析を行った。

HCA では、Fig. 3-2 に示すように7種類のサイシンは2つのグループに分かれる結果となった。PCA でも検討を行ったところ、Fig. 3-3 に示すように、PC1 及び PC2 を用いた2次元平面上で、PC1 軸方向に分類された。PCA の loading plot (Fig. 3-4) の結果から、各グループの間で δ 5.42 付近のシグナルの強度が異なることが明らかとなったため、このシグナルに由来する化合物の探索を行うこととした。

δ 5.42 付近のシグナル強度の高いグループに属していた小島漢方 (No. 6) のサイシン 500 g を MeOH で冷浸抽出し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒留去を行い、サイシン MeOH 抽出エキスを作製した。

続いて、pilot スケールでの分画検討を行うために、サイシン MeOH 抽出エキス 1.2 g を H₂O に懸濁させ、その溶液を ethyl acetate、chloroform、1-butanol の順に液液分配を行い、ロ

ロータリーエバポレーターで溶媒留去し、各画分を得た。分画物の収量はそれぞれ、ethyl acetate 画分 (P-EA) 90.0 mg、chloroform 画分 (P-CH) 31.1 mg、1-butanol 画分 (P-BU) 209.8 mg、H₂O 画分 (P-H₂O) 764.8 mg であった。これらの分画物を NMR 溶媒 methanol-*d*₄ に 10 mg/mL となるように溶解して、¹H-NMR 分析を行った。その結果、P-BU に δ 5.42 のシグナルが確認された。

Pilot スケールでの検討結果から、液液分配を行った 1-butanol 画分にターゲットとなる化合物が含まれていることが明らかとなったので、単離、同定のためにより大きいスケールでの分画作業を行った。サイシン MeOH 抽出エキス 10.2 g を H₂O に懸濁させ、その溶液を ethyl acetate、chloroform、1-butanol の順に液液分配を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒留去した。分画物の収量はそれぞれ、ethyl acetate 画分 (L-EA) 1.5 g、chloroform 画分 (L-CH) 0.1 g、1-butanol 画分 (L-BU) 2.1 g、H₂O 画分 (L-H₂O) 6.6 g であった。次に、L-BU 0.4 g の中圧分取クロマトグラフィーを行い、12 mL ずつ 120 個に分画し、Fr. 1~Fr. 120 を得た。Fr. 10 から 10 個ずつ ¹H-NMR 分析を行い、 δ 5.42 のシグナルの有無を確認した結果、Fr. 20 (25.1 mg) に δ 5.42 のシグナルが確認された。 δ 5.42 は糖のアノメリックプロトンの可能性が考えられたため、ELSD 検出器を取り付けた HPLC にて、糖分析を行った。なお、標品として、L-rhamnose、D-(-)-fructose、D-(+)-xylose、L-(+)-arabinose、sucrose、D-(+)-glucose もそれぞれ 1 mg/mL となるように H₂O で溶解して同時分析を行った。

その結果、Fr. 20 においては保持時間 15.18 min にシグナルが検出された (Fig. 3-5)。また、標品として分析した sucrose の保持時間は 15.22 min となった (Fig. 3-6)。このことから Fr. 20 には、sucrose が含まれており、 δ 5.42 は sucrose の glucose 由来のアノメリックプロトンであることが明らかとなった。

考察：

本研究において、見た目や色合いが異なるサイシンを用いて、メタボロミクスの手法で網羅的に成分分析を行った際に、含有成分にばらつきが認められるのか確認をし、そのばらつきに關与する成分の同定を行った。その結果、市場品サイシン7種類はPCAのloading plotにおいて、2つのグループに分かれ、これらのグループはsucroseの量に違いがあると推測された。Sucroseは主に光合成で合成される物質であり、生育のエネルギー源として利用されるほか、一部は根などの貯蔵器官に貯蓄されることが知られている⁶³⁾。よって、日光や土壌といった生育環境の違いが今回のグループ分けの要因の一つに挙げられることが考えられた。また、基原植物であるケイリンサイシンは多年草であることから、過去の生育環境も影響していると考えられる。今回の研究では、NMRで検出できる成分を網羅的に測定したが、サイシンはその芳香が特徴的であるため、抽出条件やエキスの前処理を検討した上で、精油成分の検出に利用されるガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて検討することで、新たな発見が見込まれると考えられる。

「サイシン」 ASIASARI RADIX (日本薬局方収載生薬)
 ケイリンサイシン (*Asiasarum heterotropoides* F. Maekawa)
 及びウスバサイシン (*A. sieboldii* F. Maekawa) の根及び根茎
 含有成分：methyleugenol、 α -pineneなど
 効能：鎮咳、去痰など (小青竜湯などに配合)

- ◇確認試験ではasarininの1成分のみが規定
- ◇各メーカーが販売する「サイシン」の見た目や色合いが異なる
- ◇高極性成分の探索研究があまり実施されていない

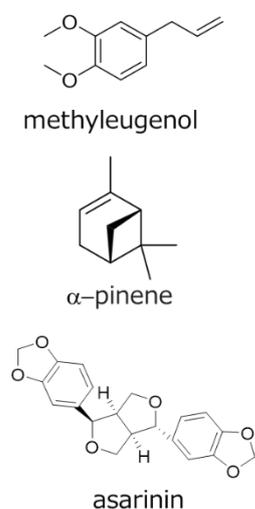


Fig. 3-1. 生薬 サイシンの基原、含有成分、効能、確認試験について

Table 3-1. 7種類のサイシンサンプルの入手先及び商品名

Sample No.	入手先・商品名
1	金原市兵衛商店・金原サイシンM
2	堀江生薬・ホリエサイシンK
3	小西製薬・花扇サイシンK
4	高砂薬業・高砂サイシンM
5	ウチダ和漢薬・ウチダのサイシンM
6	小島漢方・小島サイシンM
7	栃本天海堂・トチモトのサイシン

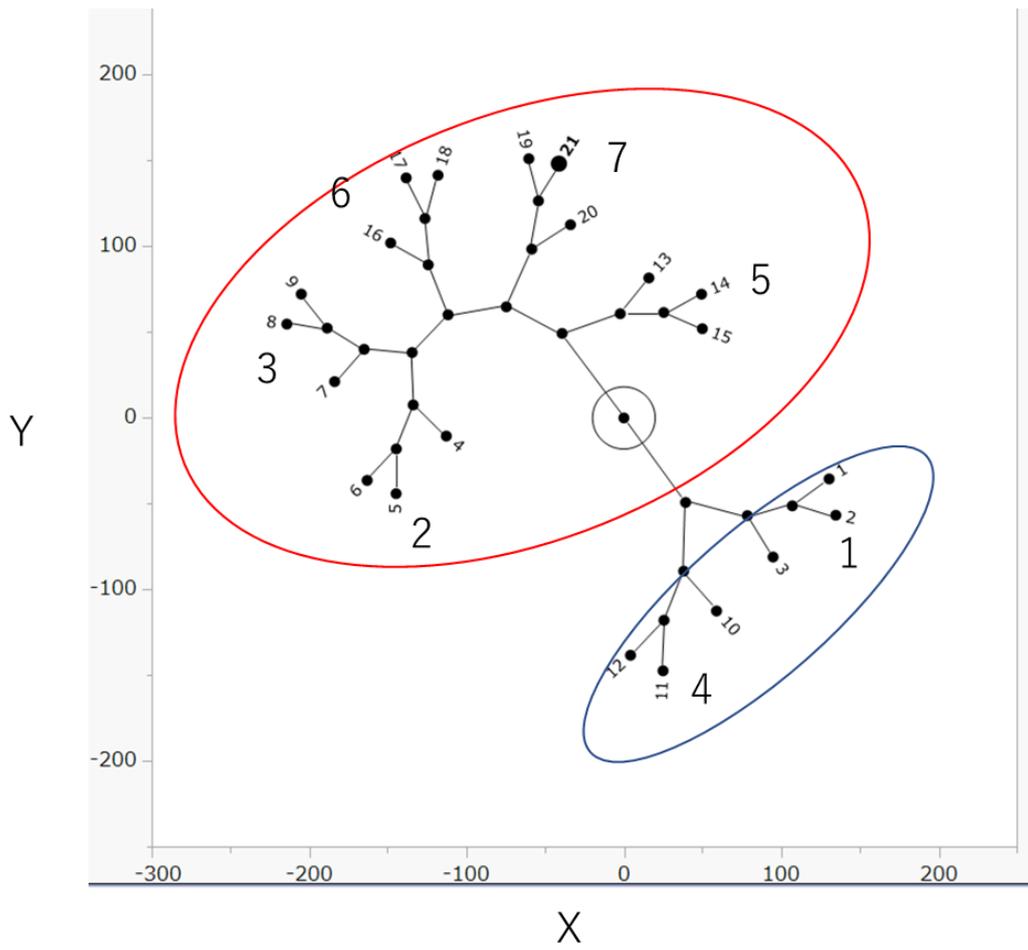


Fig. 3-2. サイシンエキスの¹H-NMR スペクトルの HCA 結果

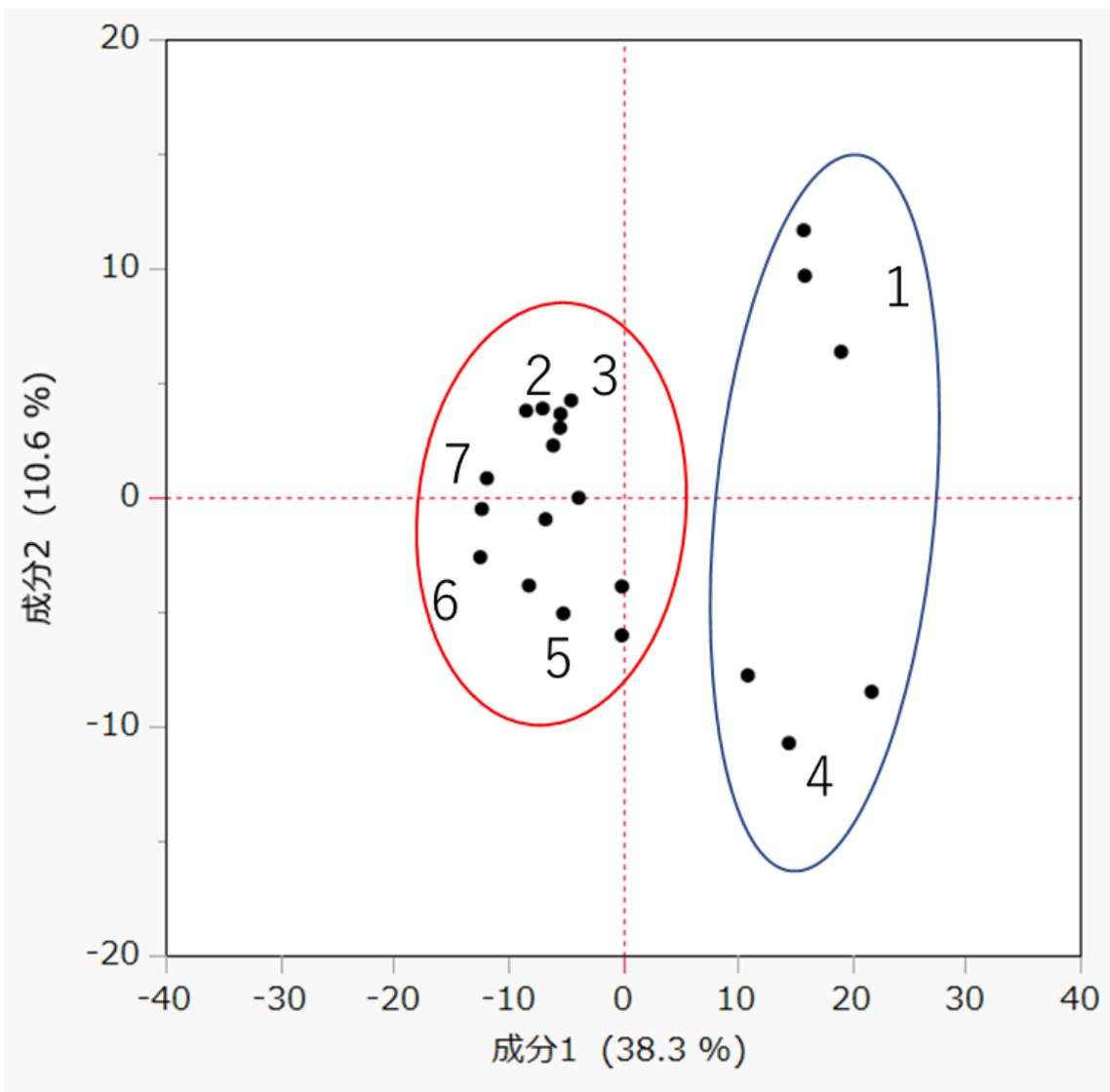


Fig. 3-3. サイシンエキスの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの PCA score plot

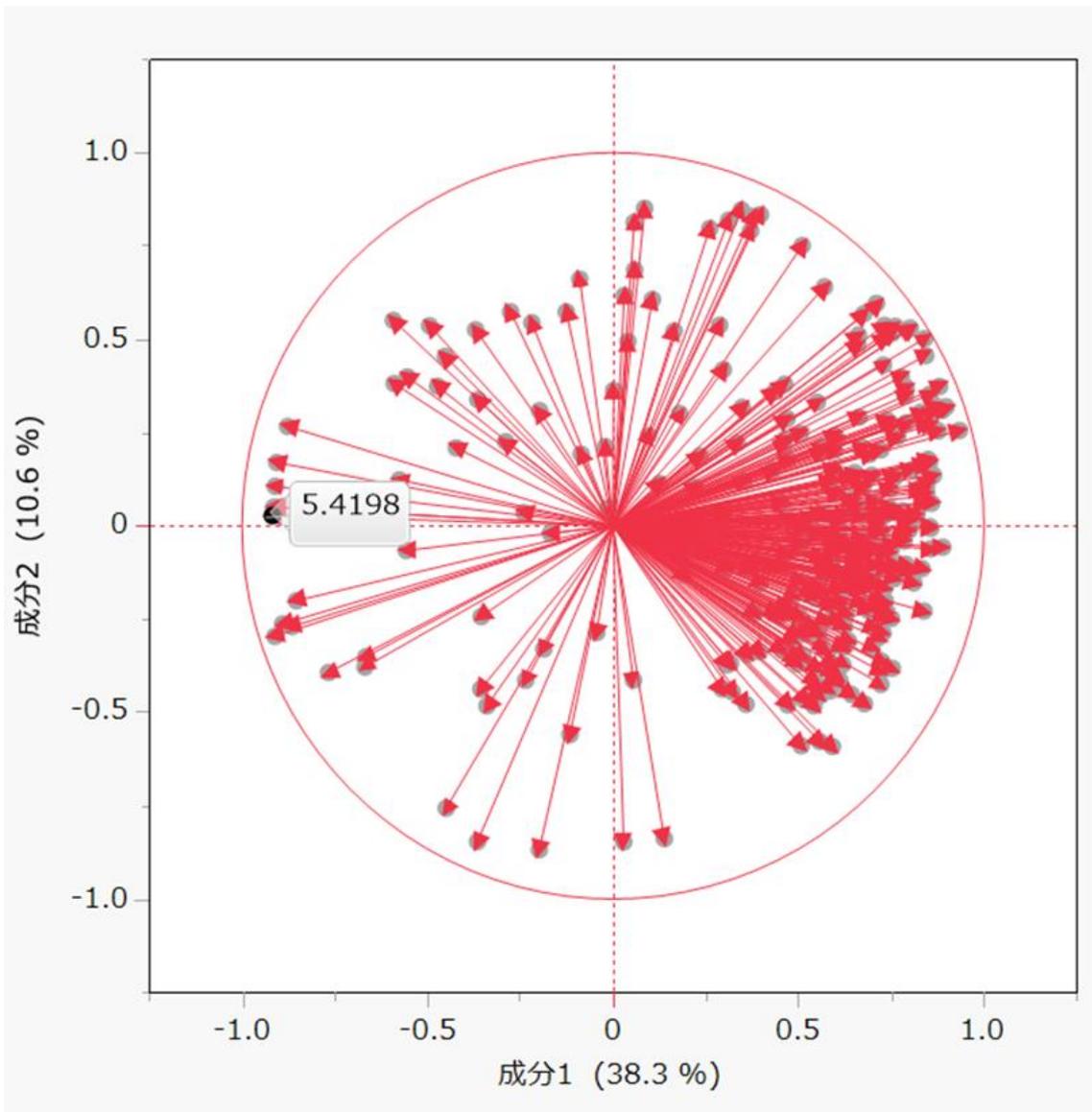


Fig. 3-4. サイシンエキスの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの PCA loading plot

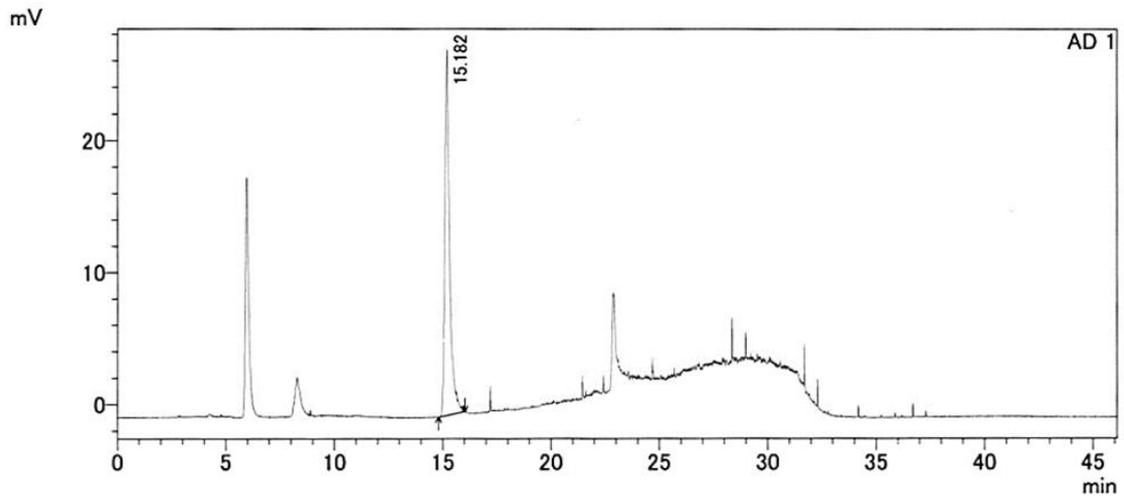


Fig. 3-5. サイシン分画物 Fr. 20 の HPLC クロマトグラム

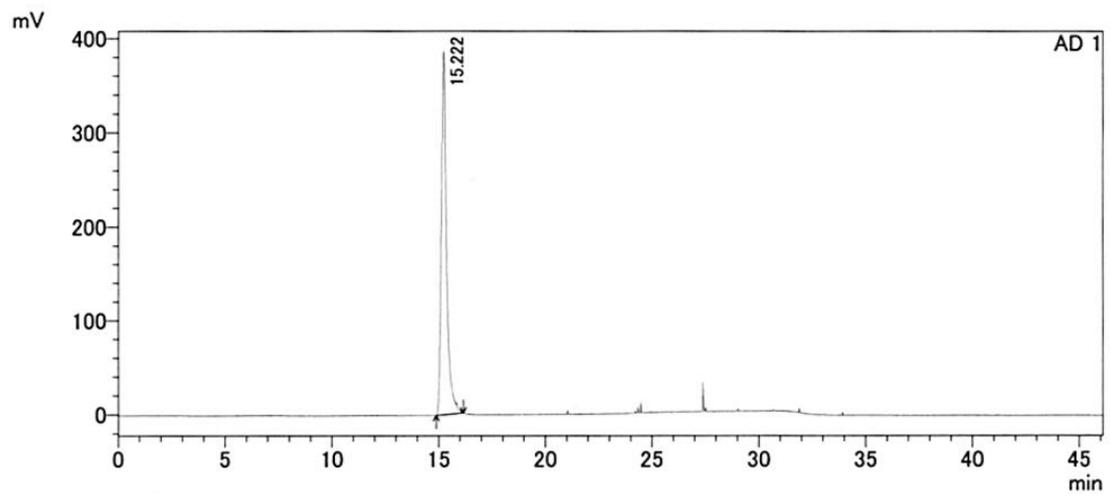


Fig. 3-6. Sucrose の HPLC クロマトグラム

第2節「サイシン」の含有成分探索

サイシンは精油成分を多く含むことが知られており、safrole、eucarvone、 α -pinen、cineole といった低極性成分の単離報告が多い。一方、配糖体を含む高極性成分の単離報告があまり実施されていないためサイシンの高極性成分の探索研究を行い、サイシン含有化合物のリストを作成することを目的とした。

市場品のサイシン4 kgをFig. 3-7に示すようにMeOHで抽出し、MeOH抽出エキス(354.7 g)を得た。生薬残渣は、乾燥後に *n*-hexane で抽出し、*n*-hexane 抽出エキス(5.6 g)を得た。

MeOH エキス(15.0 g)をMCI GELに付し、30% MeOH、50% MeOH、70% MeOH、MeOH、acetoneの順に溶出させた。そのうち30% MeOH 溶出画分(2.7 g)についてTOYOPEARL HW-40F($H_2O : MeOH = 1 : 1$)の条件で分画を行い、Fr. m1~Fr. m25を得た。Fr. m4(797.9 mg)についてsilica gelをつめたカラム($CHCl_3 : MeOH : H_2O = 65 : 35 : 10$)による分画を行い、Fr. m4-1~Fr. m4-25を得た。そのうちFr. m4-6(101.6 mg)についてHPLC精製を行いcompound S1(7.9 mg)を得た。またFr. m4-7(86.4 mg)については、HPLCで分画、精製を行いFr. m4-7-1(2.6 mg)、Fr. m4-7-2(9.0 mg)、Fr. m4-7-3(34.9 mg)、Fr. m4-7-4(4.8 mg)、Fr. m4-7-5(4.9 mg)を得、Fr. m4-7-1をcompound S2(2.6 mg)、Fr. m4-7-3をcompound S3(34.9 mg)とそれぞれした。Fr. m5(195.3 mg)についてはsilica gelをつめたカラム($CHCl_3 : MeOH : H_2O = 65 : 35 : 10$)による分画を行い、Fr. m5-1~Fr. m5-20を得、Fr. m5-8(12.7 mg)を更に、HPLC精製しcompound S4(2.0 mg)とした。

一方、Fr. m9(3.4 mg)についてはsilica gelをつめたカラム($CHCl_3 : MeOH : H_2O = 65 : 35 : 10$)による分画を行い、Fr. m9-1~Fr. m9-25を得、Fr. m9-2(17.4 mg)をcompound S5(2.1 mg)とした。Acetone 溶出画分(5.9 mg)については、ロータリーエバポレーターにて溶媒留去時に、沈殿物(60.8 mg)がみられたため、HPLC精製を行い、compound S6(3.4 mg)とした。

n-Hexane エキス (3.6 g) については、silica gel をつめたカラム (*n*-hexane : EtOAc = 3 : 1) による分画を行い、Fr. he1~Fr. he47 を得た。Fr. he5 (68.8 mg) について HPLC 精製を行い、compound **S7** (2.6 mg) とした。また、Fr. he7 (31.8 mg) についても HPLC 精製を行い、compound **S8** (17.4 mg) を、Fr. he8 (32.1 mg) については HPLC 精製を行い、compound **S9** (15.6 mg) とそれぞれした。なお、各種化合物の分画、精製条件は「実験の部」に記載した。次に、今回単離した化合物の構造解析について記す。

Compound **S1** は FAB-MS より分子量 462 であり、高分解能 FAB-MS により分子式 $C_{20}H_{30}O_{12}$ であることが示された。 1H -NMR スペクトルにおいて、 δ 6.54 (1H, s)、 δ 6.52 (1H, s)、 δ 6.44 (1H, s) に積分値 1H 分のシングレットのシグナルが 3 本観測されたことから、1, 3, 5-三置換ベンゼンであることが推定された。また、 δ_H 2.97 (s) には CH_3 由来のシグナルが観測され、ベンゼン環上の δ_c 109.90 及び δ_c 141.58 との間に HMBC スペクトルにおいてロングレンジ相関がみられたことから、このメチル基はベンゼン環に結合していることが明らかとなった。また、 δ_H 3.77 (s) には OMe 基由来のシグナルが観測され、ベンゼン環上の δ_c 162.23 との間にロングレンジ相関がみられたことから、OMe 基もベンゼン環に結合していることが推定された。 δ_c 105.06 と δ_c 102.37 に β -D-glucopyranose の 1 位と推定されるシグナルが観測され、文献情報^{64, 65}から 1 つ目の β -D-glucopyranose の 6 位に 2 つ目の β -D-glucopyranose が酸素原子を介して結合していることが推定された。加えて 1 つ目の β -D-glucopyranose の 6 位である δ_H 4.17 と 2 つ目の β -D-glucopyranose の 1 位である δ_c 105.06 との間にロングレンジ相関が HMBC スペクトルで認められたことから、 β -D-glucopyranose 同士が結合していることが明らかとなった。更に、1 つ目の β -D-glucopyranose の 1 位である δ_H 4.90 が、エステルカルボニルと推定される δ_c 160.19 とロングレンジ相関していた (Fig. 3-8)。以上の情報から、**S1** を 3-methoxy-5-methyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside と決定した。**S1** の単離報告はこれまでになく、今回が初めてである。

Compound **S2** は FAB-MS より分子量 488 であり、高分解能 FAB-MS により分子式 $C_{21}H_{28}O_{13}$ であることが示された。 1H -NMR スペクトルにおいて、 δ 6.40 (1H, d, $J=15.9$)及び δ 7.48 (1H, d, $J=15.9$ Hz)が観測され、カップリング定数から 1, 2-二置換オレフィンの *trans* 体由来するシグナルと推定された。また、 δ 7.22 (1H, d, $J=1.9$ Hz)及び δ 7.11 (1H, dd, $J=1.9, 8.2$ Hz)が観測され、カップリング定数からこれらのプロトンはベンゼン環上でメタカップリングしていることが予測された。更に、 δ 7.11 (1H, dd, $J=1.9, 8.2$ Hz)及び δ 6.83 (1H, d, $J=8.2$ Hz)はカップリング定数からベンゼン環上でオルトカップリングしていることが推定された。さらに、 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、carbonylに由来する δ_c 167.80のシグナルが観測されたことから、feruloyl 基の存在が明らかとなった。また、分子量から六炭糖と五炭糖が構造中に存在することが予測でき、 β -D-glucopyranose の 1 位及び α -D-arabinofuranose の 1 位と推定される δ_c 95.89 と δ_c 110.15 のシグナルがそれぞれ認められた⁶⁶⁻⁷⁰。それぞれの糖は HSQC と HMBC スペクトルの解析から arabinofuranose の 1 位 (δ_H 4.94)が glucopyranose の 6 位 (δ_c 68.09)と結合していることが推定された。さらに、carbonyl の炭素である δ_c 167.80 と glucopyranose の 1 位 δ_H 5.57 との間にロングレンジ相関が観測されたことから、feruloyl 基中の carbonyl に glucopyranose が結合していると考えられた。以上のことから、**S2** を 1-*O*-feruloyl- α -D-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (Fig. 3-9) と決定した。**S2** の単離報告は今回が初めてである。

Compound **S3** は FAB-MS より分子量 488 であり、本化合物の 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトルは、**S2** と類似しており、 1H -NMR スペクトルにおいて δ 6.48 (1H, d, $J=15.9$ Hz)及び δ 7.64 (1H, d, $J=15.9$ Hz)が観測され、カップリング定数から 1, 2-二置換オレフィンの *trans* 体由来するシグナルと推定された。また、 δ 7.34 (1H, d, $J=1.9$ Hz)及び δ 7.14 (1H, dd, $J=1.9, 8.2$ Hz)にシグナルが観測され、カップリング定数からこれらはベンゼン環上でメタカップリングしていることが推定された。更に、 δ 7.11 (1H, dd, $J=1.9, 8.2$ Hz)及び δ 6.80 (1H, d, $J=8.2$ Hz)にはベンゼン環上でオルトカップリングしているシグナルも観測された。 ^{13}C -

NMR スペクトルにおいて、carbonyl に由来する δ_c 165.36 のシグナルが観測されたことから、feruloyl 基の存在が明らかとなった。また、分子量から六炭糖と五炭糖が構造中に存在し、 β -D-glucopyranose の 1 位及び β -D-xylopyranose の 1 位と推定される δ_c 94.08 と δ_c 103.73 のシグナルがそれぞれ認められ、文献値⁶⁶⁾との比較から **S3** を 1-O-feruloyl- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside と同定した (Fig. 3-10)。

Compound **S4** は FAB-MS より分子量 596 であり、HPLC-PDA の解析において **S4** は 226.6 nm 及び 277.4 nm に吸収極大を示した。 ^{13}C -NMR スペクトルでは、 δ_c 105.50, δ_c 104.40, δ_c 101.66, δ_c 101.58 にシグナルが観測され、 β -D-glucopyranose が構造中に存在することが推定された。しかし、分子量と糖の数が理論上一致しなかったため、 β -D-glucopyranose が 2 つ結合した化合物が 2 つ混在している可能性を考えた。 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて糖を除くシグナルが 15 本ずつ観測されていたことから、アグリコンは HPLC-PDA 解析結果も勘案し、フラバノンであることが予測された。また、 δ_c 191.23、 δ_c 190.75 にシグナルが観測されたことから、構造内にケトンが存在することが推測され、フラバノンの特徴と一致した。更に δ_c 160.03、 δ_c 159.95 が観測されたことから、各化合物に OH 基が結合した芳香族炭素が 1 つ存在することが明らかとなった。 ^1H -NMR では、 δ 7.30 (1H, d, $J=2.3$ Hz) 及び δ 6.66 (1H, d, $J=2.3$ Hz) にシグナルが観測され、これらはカップリング定数からベンゼン環上でメタカップリングしていることが推定された。これらはフラバノンの A 環の H-6 及び H-8 であると考えた。これらのことから、アグリコンは naringenin であると推定した。文献値⁶⁶⁾との比較から、**S4** は β -D-glucopyranose が naringenin の A 環の 5 位と 7 位に酸素原子を介して結合している 5,7-di-O- β -D-glucopyranosyl naringenin (Fig. 3-11) であると同定した。なお、この化合物は C2 位が単離後溶液中で容易にエピメリ化することが文献で報告されている。本研究においても、HPLC で単離した化合物を再度、HPLC 分析すると 2 つのピークが認められ、エピメリ化していることが推定された。

Compound **S5** は FAB-MS より分子量 138 であり、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、 δ 7.87 (2H, d, $J=8.9$ Hz)と δ 6.80 (2H, d, $J=8.9$ Hz)にシグナルが観測され、カップリング定数よりこれらはベンゼン環上でオルトカップリングしていることが推定された。このことから **S5** は 1,4 置換ベンゼンと考えられた。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて、carbonyl に由来する δ_c 170.73 が観測された。以上の結果と文献値⁷¹⁾との比較により、**S5** を 4-hydroxybenzoic acid と同定した (Fig. 3-12)。

Compound **S6** は EI-MS より分子量 354 であり、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、 δ 5.96 (4H, s)にメチレンジオキシ基に帰属されるシグナルが観測され、芳香族領域に δ 6.79 (2H, dd, $J=8.1$ Hz)、 δ 6.81 (2H, dd, $J=1.6, 8.1$ Hz)及び δ 6.86 (2H, d, $J=1.6$ Hz)の ABX 系に由来するシグナルが認められた。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいては、10 本のシグナルが観測された。しかし、炭素数 10 では EI-MS より推定された分子量を満たさないことから、本化合物は対称面をもつ二量体構造を有していることが推測された。これらの情報に基づき、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルデータを文献値^{72,73)}と比較することで **S6** を sesamin と推定し、旋光度が $[\alpha]_D^{20} = -67.0$ と負の値を示したことから (-)-sesamin と同定した (Fig. 3-13)。

Compound **S7** は EI-MS より分子量 194 であり、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、 δ 5.98 (2H, s)が観測され、メチレンジオキシ基が構造式内に存在していることを予測した。また、 δ 7.27 (1H, s)と δ 6.42 (1H, s)にそれぞれベンゼン環に結合したシングレットのシグナルが観測され、また、 δ 2.95 (2H, q, $J=7.3$ Hz)及び δ 1.18 (3H, t, $J=7.3$ Hz)にはエチル基に由来するシグナルが認められた。その他 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルのデータを文献値⁷⁴⁾と比較することにより、**S7** を kakuol と同定した (Fig. 3-14)。

Compound **S8** は EI-MS より分子量 208 であり、本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは、**S7** と類似していたことから、kakuol に類似した構造であることが予測された。本

化合物は **S7** とは異なり δ_{H} 3.86 (3H, s) 及び δ_{C} 56.42 が観察されたことから、OMe 基の存在が推測された。以上のこと及び文献値⁷⁵⁾との比較から、**S8** を methyl kakuol と同定した (Fig. 3-15)。

Compound **S9** は EI-MS より分子量 354 であり、本化合物の $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは、**S6** と類似していたことから、lignan である sesamin 類縁体と予測された。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて δ_{C} 50.30 及び δ_{C} 54.79 にそれぞれ C-5、C-1 に帰属されるシグナルが観測されたことから **S6** の立体異性体ではないかと推測した。旋光度測定から、 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -132.1$ であり、文献値⁷⁶⁻⁷⁸⁾との比較から、**S9** は (-)-episesamin であると同定した (Fig. 3-16)。

第 2 節では、サイシンの高極性化合物の探索を目的に研究を行い、3-methoxy-5-methyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (compound **S1**)、1-*O*-feruloyl- α -D-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (compound **S2**)、1-*O*-feruloyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (compound **S3**)、5,7-di-*O*- β -D-glucopyranosyl naringenin (compound **S4**)、4-hydroxybenzoic acid (compound **S5**)、(-)-sesamin (compound **S6**)、kakuol (compound **S7**)、methyl kakuol (compound **S8**)、(-)-episesamin (compound **S9**) の 9 つの化合物を単離し、その構造を明らかにした。そのうちの 2 つ (**S1**、**S2**) は新規化合物であった。

考察

メタボロミクスの手法を用いて含有成分の比較を行う上で、含有化合物のリスト作成は価値のあるものだと考え、本研究では、サイシンの高極性成分を中心に成分探索を行った。その結果、新規化合物2種を含め、9種類の化合物を単離することができた。今後さらに、高極性成分の探索を進めることによって新規化合物を発見できると考えられる。今回は、単離した化合物について、収量の都合上、それらの機能性評価試験は行えなかったが、芳香族化合物の配糖体やフラボノイドには多くの生物活性報告があるため、今回単離した化合物にも新たな活性が見つかるのではないかと期待している。

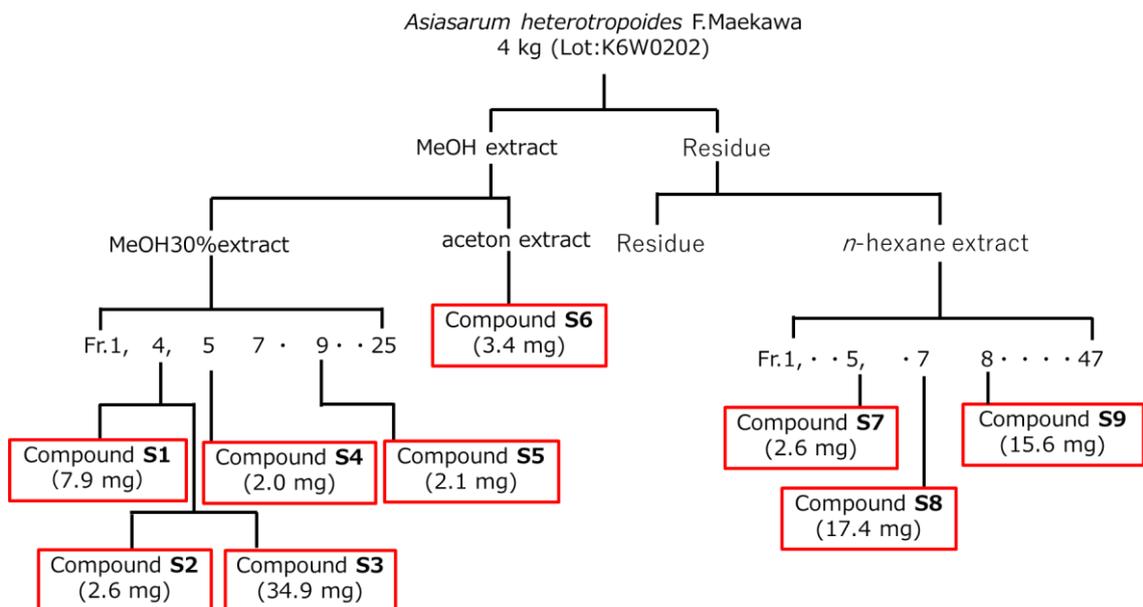


Fig. 3-7. サイシンの分画図と単離化合物の収量

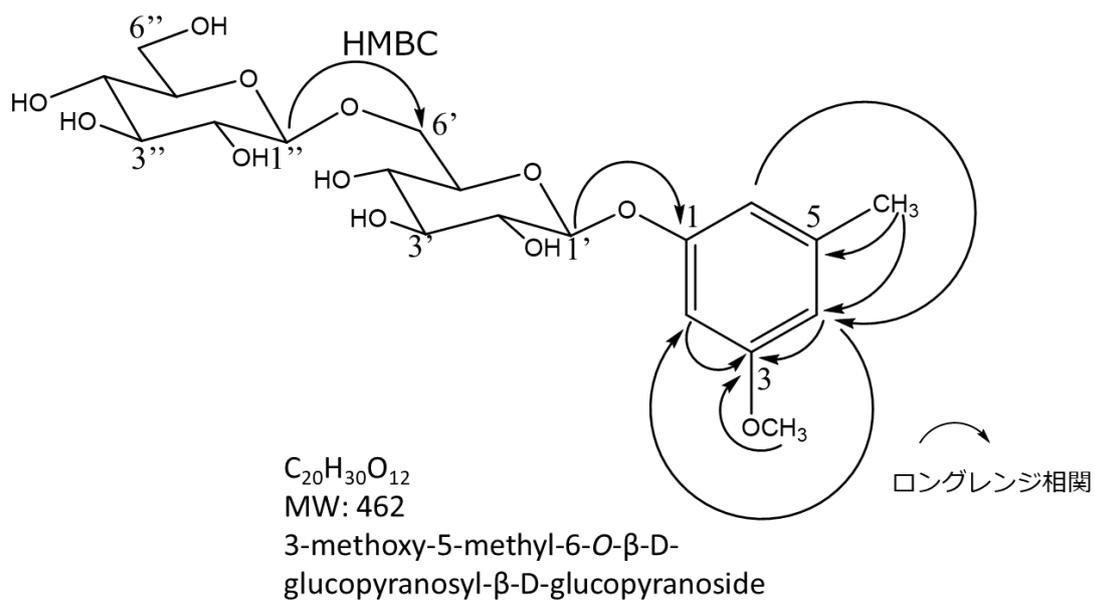
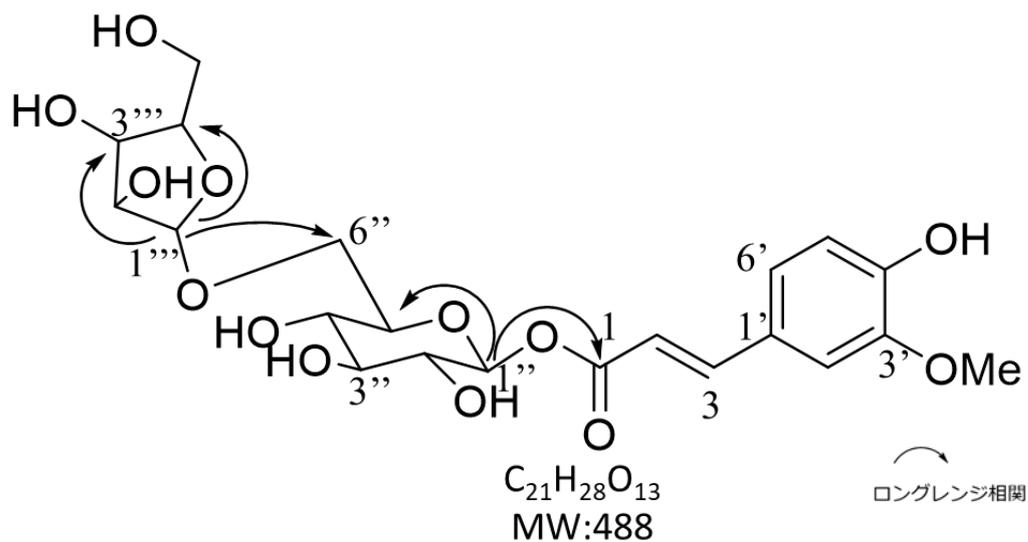
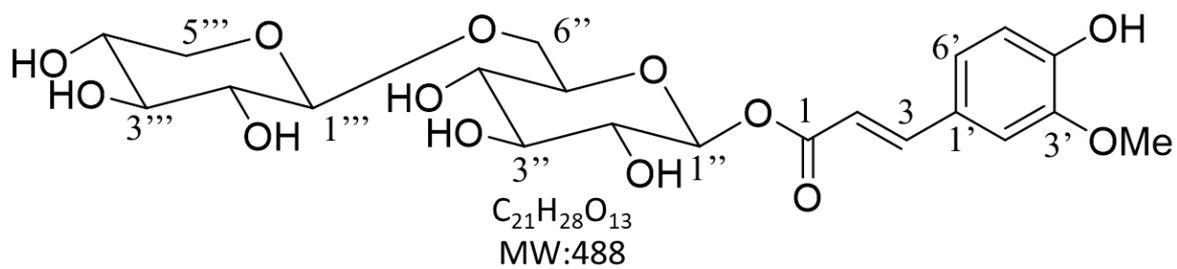


Fig. 3-8. Compound **S1**



1-*O*-feruloyl- α -D-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

Fig. 3-9. Compound **S2**



1-*O*-feruloyl- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

Fig. 3-10. Compound **S3**

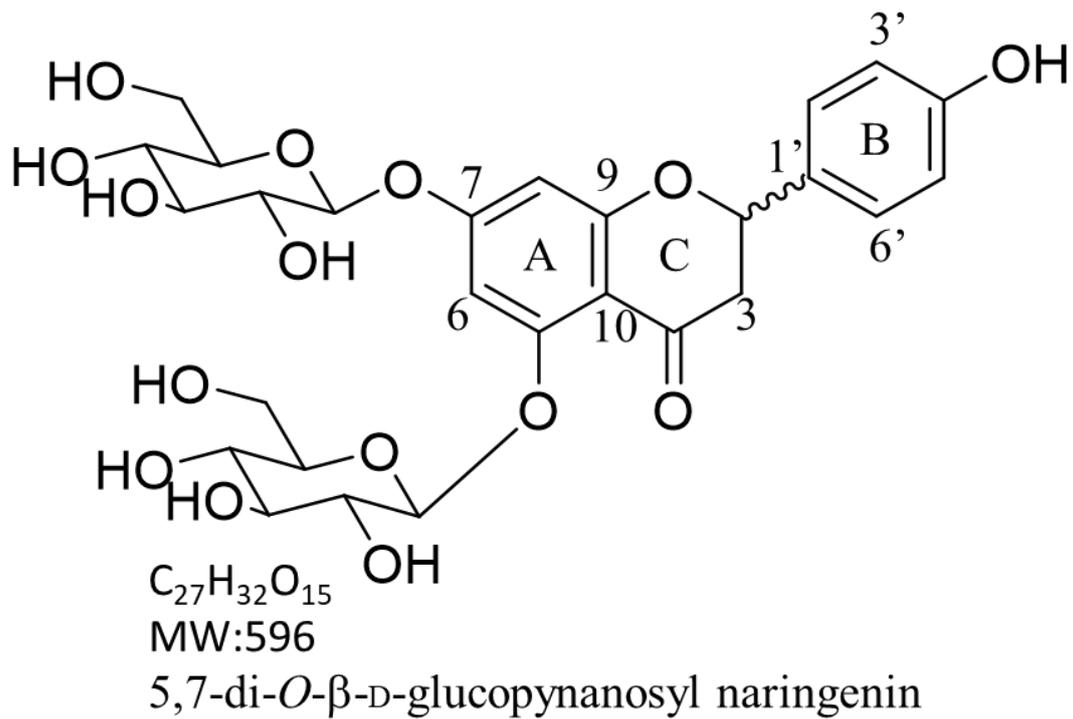


Fig. 3-11. Compound **S4**

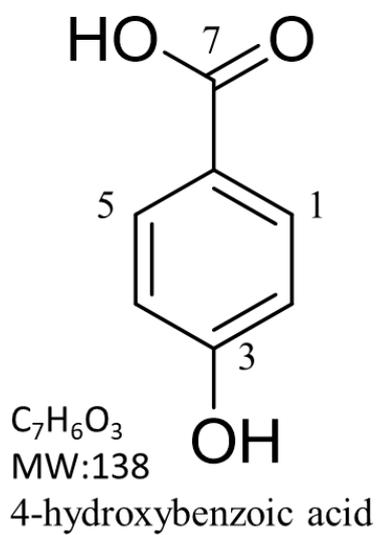


Fig. 3-12. Compound **S5**

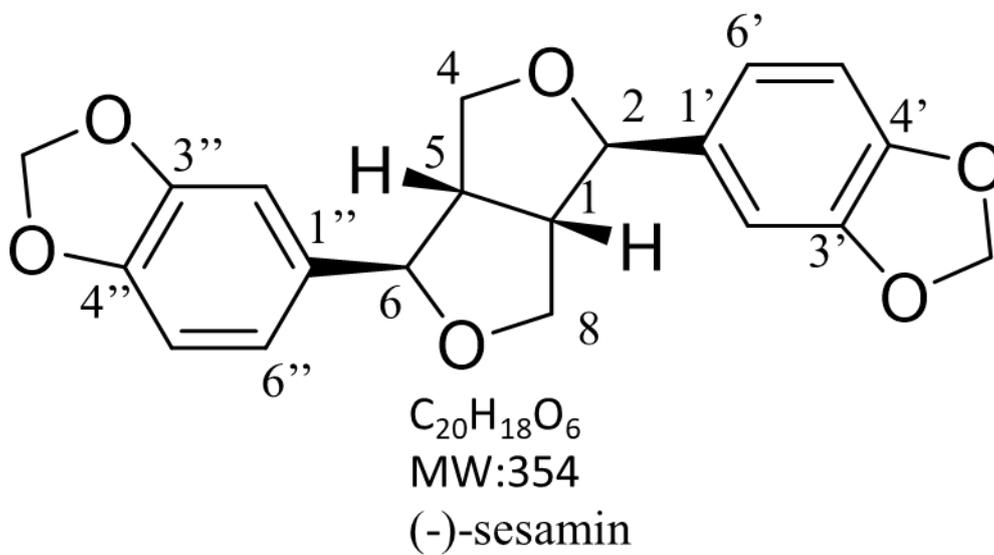


Fig. 3-13. Compound **S6**

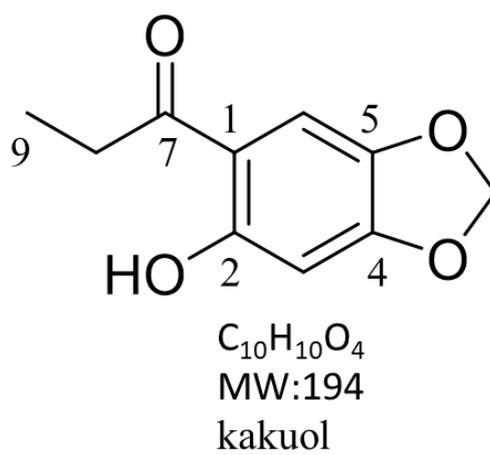
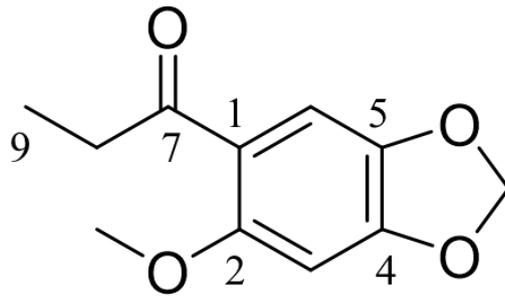


Fig. 3-14. Compound **S7**

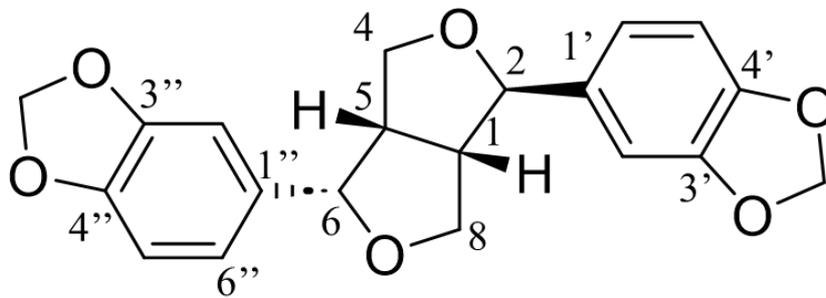


$C_{11}H_{12}O_4$

MW:208

methyl kakuol

Fig. 3-15. Compound **S8**



$C_{20}H_{18}O_6$

MW:354

(-)-episesamin

Fig. 3-16. Compound **S9**

結語

本研究ではメタボロミクス的手法を応用し、多種多様な代謝産物を含む天然素材に適した品質評価方法の検討や特徴的な成分の探索を行った。今回は、特に再現性が高く、豊富な構造情報を与える NMR 及び FT-IR スペクトルに着目した。

第 1 章では、glycation 阻害活性を有するコーンシルクを機能性原料として活用するために、活性成分の探索とそれを指標としたメタボロミクス的手法を用いた品質評価方法の検討を行った。

まず品質を担保するための基準となる関与成分（ターゲット因子）を同定するため、第 1 節ではコーンシルク水抽出エキスから glycation 阻害活性成分の探索を実施した。水抽出エキスを作成し、限外ろ過後、加水分解反応や各種分析装置を用いて詳細に構造解析した結果、lignocellulose が活性成分であることが明らかとなった。なお、lignocellulose の glycation 阻害活性はこれまでにない新規なものであった。

第 2 節では、1 週間を要していた glycation 阻害活性評価に代わる、メタボロミクス的手法を応用した短時間で簡便な glycation 阻害活性予測法の検討を行った。第 1 節にて lignocellulose の構造決定に大きく貢献した FT-IR スペクトルを用いて glycation 阻害活性の判別検討を実施した。市場品 10 種類のコーンシルクの glycation 阻害率情報と、FT-IR の分析結果を用いて計算ソフトウェアで PCR と PLSR 検量モデル（全範囲計算領域）を作成した。その結果、どちらのモデルにおいても、glycation 阻害活性とスペクトルデータに相関が認められた。さらに、計算領域を絞りモデルを作成したところ、相関係数が向上するモデルを作成できた。特に PLSR 検量モデルにおいては、PCR 検量モデルよりも相関係数が向上し、RMSEP の値も小さくなった。これらのことから、コーンシルク水抽出エキスの glycation 阻害活性を FT-IR スペクトルの統計処理により予測できることを明らかにした。本研究の検討結果は、コーンシルクを機能性原料として取り扱う際の新たな品質評価方法の

1つとして活用できると考えられる。また、本研究で使用した FT-IR は普及率が高く、簡便性と高再現性を持つことから、品質評価を行う上で適した装置であるが、メタボロミクス研究においては NMR や MS と比べて活用例が少ないため、今回の結果はメタボロミクス研究の発展にも繋がると考えられる。

第2章では「狭山茶」のチャ葉を用いたメタボロミクス研究を行った。

第1節では、狭山茶の全国的な普及を目指し、メタボロミクスの手法を用いて狭山茶代表品種「さやまかおり」に特徴的な成分の探索とその化合物の glycation 阻害活性率の算出を行った。「さやまかおり」とチャのスタンダード品種「やぶきた」のチャ葉（新芽）の MeOH 抽出エキスの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、積分値を多変量解析（HCA と PCA）に供し、品種間の比較を行った。その結果、両品種間で統計的に差がみられ、「さやまかおり」の δ 8.02 のシグナル強度は「やぶきた」のそれと比べて有意に高く、両品種を区別するマーカーシグナルであることが明らかとなった。そこで、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル情報を基に分画、精製を行い FAB-MS と NMR の解析結果から、 δ 8.02 のシグナルは *kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside* の 2' と 6' に由来するものと帰属した。また、この化合物の glycation 阻害活性率は 73.9%（終濃度 20 mM）であり、チャに含まれる glycation 阻害活性成分であるカテキン類と同程度の阻害率を示したことから、本研究で単離した化合物もチャの glycation 阻害活性の一部を担っていることが示唆された。本研究の結果は「さやまかおり」のブランド化や狭山茶の全国的な普及の一助になると考えられる。今回明らかになった成分について今後、新たな機能性が見いだせれば、より一層全国的に「さやまかおり」及び狭山茶が注目されるのではないかと期待できる。

第2節では、メタボロミクスの手法を用いて、老齢化により品質が低下したチャ樹（改植が必要なチャ樹）を判別する指標成分の探索を行った。複数の樹齢の異なる「やぶきた」のチャ葉（新芽）の熱水抽出物を全自動アミノ酸分析機で分析し、検出されたアミノ酸含量を多変量解析（HCA と PCA）に供した。その結果、樹齢別にグループ分けができ、樹齢

とアミノ酸含量が相関する傾向が認められた。さらに、*theanine* や *arginine* などの複数のアミノ酸の含量が樹齢と相関していることも判明した。なお、これらの結果は未だ報告はなく、新規なものであった。また、「やぶきた」MeOH抽出エキスを¹H-NMR測定し、スペクトルデータを多変量解析（HCAとPCA）に供し、品種間の比較を行ったが、樹齢別に判別することはできなかった。本研究で使用した全自動アミノ酸分析機は精度と再現性に優れ、簡便にアミノ酸を分析できる装置である。この装置により得られたデータを統計処理することにより、品質が低下したチャ葉を判断できることは、茶園などの栽培現場においても、客観的な情報に基づいた品質評価に貢献できると考えられる。

第3章では、生薬「サイシン」のメタボロミクス研究を行った。

第1節では、市場で取り扱われている各生薬メーカーが販売するサイシンの見た目や色味の違いが異なることから、JP18で指標成分として規定されている *asarinin* 以外の成分も含め、網羅的に解析を行い含有成分にばらつきがあるのかを確認し、新たな指標成分の探索も併せて行った。市場品7種類のサイシンMeOH抽出エキスの¹H-NMR測定を行い、得られた積分値を多変量解析（HCAとPCA）に供し、品種間の比較を行った。その結果、2つのグループに分かれる結果となった。また、各グループ間で δ 5.42のシグナル強度が異なることが明らかとなり、シグナル強度が高かったグループのMeOH抽出エキスを分画し、NMRとHPLCの結果から δ 5.42のシグナルは *sucrose* の *glucose* 由来のアノメリックプロトンであることが明らかとなった。*Sucrose* は主に光合成で生合成される物質であり、生育のエネルギー源としての利用や、一部は根などの貯蔵器官に蓄えられる。よって、日光や土壌といった発育環境の違いが今回のグループ分けに寄与したと考えられた。サイシンは精油成分を多く含む生薬であるため、抽出方法や前処理方法、分析手法をさらに検討することにより、新たな指標成分の発見が見込まれる。

第2節では、サイシンの高極成分の探索研究があまり実施されていないことから、サイシンの高極性成分の探索を行い、サイシン含有化合物のリストを作成した。サイシン抽出

エキスを分画、精製、構造解析し、9種類の化合物を単離した。それらのうち、3-methoxy-5-methyl-6-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside、1-O-feruloyl- α -D-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside は新規化合物であった。メタボロミクス手法を用いて含有成分の比較を行う上で、含有化合物のリストは、分類に寄与した成分の同定を容易にするため、そのリストの作成は価値のあるものだと考える。

本研究では、「コーンシルク」、「チャ」及び「サイシン」を例にメタボロミクス手法を応用した品質評価方法の検討を行い、その有用性を明らかにした。多成分系から成る天然素材品質評価において、従来のような「ある特定の成分に着目する方法」では限界がある。検出可能な成分を網羅的に解析するメタボロミクスは、この問題を解決できる手段の1つであると考えられる。本手法は、素材の品質評価にとどまらず、様々な分野での活用が期待される。例えば、生薬や野菜の栽培は栽培者の主観的な判断（経験や勘）で行われていることがほとんどであるが、栽培の過程で本手法を用いて生産物の品質チェックができれば客観的な指標に基づく栽培が可能となる。客観的な指標に基づいて栽培を行うことができるようになれば、品質や生産性の高い栽培品をより確実に生産することができると考えられる。本研究の成果が、天然素材の品質評価方法への導入をはじめ、天然素材を扱うその他の分野においてもメタボロミクス手法の活用のきっかけになれば本望である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり本研究の機会を与えて頂き、ご指導並びに多くの助言を賜りました 主指導研究員の本学 天然物化学講座 鈴木龍一郎 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり副指導研究員としてのご指導、FT-IR 測定に関する有益なご助言をして頂きました 本学 栄養治療学講座 井上裕 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり副指導研究員として、有益なご助言をして頂きました 本学 医薬品化学講座 坂本 武史 教授に厚く御礼申し上げます。

狭山茶のチャ葉のサンプル提供の御協力、狭山茶に関する有益なご助言をして頂きました 埼玉県茶業研究所 高橋淳研究員、柴田貴子研究員に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり狭山茶のチャ葉採取の御協力、有益なご助言をして頂きました 本学 生薬学講座 北村雅史 准教授に厚く御礼申し上げます。

FT-IR 測定を行うにあたり測定機器の貸与、統計処理に関する有益なご助言をして頂きました 日本分光株式会社 赤尾賢一氏、樋口祐士氏に御礼申し上げます。

NMR、MS を測定して頂きました 本学機器分析センターの各職員の方々に御礼申し上げます。

本論文作成、学位審査にあたり、御教授と御閲覧を賜りました城西大学薬学部 生物有機化学講座 杉田義昭 教授、公衆衛生学講座 河合洋 教授、生体分析化学講座 古地 壯光 教授に感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたりご協力頂きました天然物化学講座配属学生、並びに生薬学講座配属学生の皆様に厚く御礼申し上げます。

実験の部

第1章

使用試薬及び機器

試薬類：

Glycation 阻害活性試験の使用試薬：

Bovine serum albumin (BSA)、phosphate buffer saline (PBS)、aminoguanidine は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

Anti-AGEs KH-001 はトランスジェニック株式会社 (神戸、兵庫) から購入した。

Anti-IgG (H+L), Mouse, Goat-poly, HRP はフナコシ株式会社 (文京区、東京) から購入した。

Gelatin (一級)、D(+)-glucose (特級) Na_2CO_3 (特級)、 NaHCO_3 (一級)、 NaN_3 (特級)、 NaCl (一級)、 KH_2PO_4 (特級)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (特級)、citric acid monohydrate (特級)、1,2-phenylenediamine dihydrochloride (一級)、 H_2O_2 (精密分析用) 及び H_2SO_4 (特級) はいずれも富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。

Tween20 は東京化成工業株式会社 (北区、東京) から購入した。

その他の実験使用試薬：

L-Rhamnose monohydrate (特級)、D(-)-fructose (特級)、D-(+)-xylose (特級)、L-(+)arabinose (特級)、sucrose (一級) 及び vanillin (特級) は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

溶媒：

N,N-dimethylformamide（高速液体クロマトグラフ用）、ammonium formate（特級）、MeOH（分光分析用）、deuterium oxide, 100%、acetone-*d*₆, 99.9% 及び acetonitrile（高速液体クロマトグラフ用）は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

GPC用標準試料 Shodex STANDARD SM-105 は株式会社レゾナック（東京、日本）から購入した。

Ethyl acetate（特級）は関東化学株式会社（東京、日本）から購入した。

カラム類：

Senshu Pak ODS（φ 4.6×150 mm）は株式会社センシユウ科学（東京、日本）から、イオン交換樹脂の Amberlite IRA96SB はオルガノ株式会社（東京、日本）から、TSK-gel Super AW 4000 column（φ 6.0×150 mm）は東ソー株式会社（東京、日本）から、Unison UK-Amino column（φ 3.0×250 mm）はインタクト株式会社（京都、日本）からそれぞれ購入した。また、X Bridge C18 column（φ 2.1×150 mm）は Waters Co.（MA, USA）製を使用した。

機器類：

凍結乾燥機は FDU2110（東京理化学器械株式会社、東京、日本）を使用した。

遠心分離機は KUBOTA Model 6200（久保田商事株式会社、東京、日本）を使用した。

RP-HPLC 分析では、Shimazu Prominence HPLC [pump : LC-20AD、degasser unit : DGU-20A₃、auto injector : SIL-20AC、column oven : STO-20A、system controller : CBM-20A、UV detector : SPD-20A]、ELSD-LTII（株式会社島津製作所、京都、日本）を使用した。

GPC では、pump : SSC-3461（株式会社センシユウ科学）、column oven : SSC-2320（株式会社センシユウ科学）、RI detector : ERC-7517（IDEX Health & Science 株式会社, WA, USA）をそれぞれ使用した。

$^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの測定は Agilent 400MR-vnmrs 400 spectrometer (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) を使用した。

LC-MS は Nexera series SCL-40 system [pump : LC-40D XS、degasser unit : DGU-405、auto injector : SIL-40CXS、column oven : CTO-40C、system controller : SCL-40、UV detector : SPD-40、Liquid chromatograph mass spectrometer : LC-MS-8050 (triple quadrupole mass spectrometer)] (株式会社島津製作所) を使用した。

FT-IR では、成分探索測定に FT/IR-410 を使用し、統計処理モデル作成用測定には FT/IR-4X [付属品 : ATR PRO 4X, PKS-D1] (日本分光株式会社、東京、日本) をそれぞれ使用した。

ソフトウェア :

RP-HPLC のデータ処理には LabSolutions software (株式会社島津製作所) を使用した。

GPC のデータは $\mu 7$ Data Station software (システム・インスツルメンツ株式会社、東京、日本) で処理した。

FT-IR のデータは Spectra Manager (日本分光株式会社) を使用し、解析した。

実験材料 :

市場に流通する 10 種類のコーンシルクを使用した (第 1 章 Table 1-1 を参照)。

Glycation 阻害活性試験用冷浸水抽出エキスの作製 :

乾燥物 50 g に H₂O を加えて 24 時間室温下で冷浸抽出し、qualitative filter paper No.2 (東洋濾紙株式会社、東京、日本) を用いて濾紙ろ過を行った。得られた抽出物を凍結乾燥機にて溶媒留去して、冷浸水抽出エキスを作製した。

直接 ELISA 法を用いた AGEs (CML) の測定 :

本研究で用いた ELISA 法は「糖尿病研究ストラテジー」清野進、岡芳知監修 (秀潤社) に基づいて行った。

pH 7.4 に調整した PBS 95 μ L (sodium azide 3 mM 入り)、BSA 溶液 50 μ L (終濃度 4 mg/mL)、glucose 溶液 50 μ L (終濃度 200 mM)、10 種類のコーンシルク冷浸抽出エキス (終濃度 25 μ g/mL、PBS に溶解し調製した) を 5 μ L 加え全量 200 μ L とした。Blank は、PBS 150 μ L に BSA 溶液 50 μ L を加え全量 200 μ L とし、control は、PBS 100 μ L に BSA 溶液 50 μ L、glucose 溶液 50 μ L を加え全量 200 μ L とした後、7 日間 37 $^{\circ}$ C でインキュベーションを行った。Positive control として aminoguanidine を用いた (終濃度 10 mM、PBS に溶解し調製した)。

インキュベート後のサンプルのうち 100 μ L を 96 well プレートに加え、室温条件下で 1 時間インキュベートを行い固相化を行った。インキュベート終了後、洗浄バッファーで 3 回洗浄し、200 μ L のブロッキングバッファーを加えた。1 時間のインキュベーション終了後、洗浄バッファーで 3 回洗浄し、1 次抗体 100 μ L を加えた。1 時間のインキュベート終了後、洗浄バッファーで 3 回洗浄し、2 次抗体 100 μ L を加えた。1 時間のインキュベート終了後、洗浄バッファーで 3 回洗浄し、基質 100 μ L を加え、発色させた。20 分のインキュベート終了後、ストップソリューション 100 μ L を加え、反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 492 nm の吸光度を測定した。なお、阻害率は次式より求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{As} - \text{Ab}) / (\text{Ac} - \text{Ab})\} \times 100$$

As : Absorbance of sample, Ab : Absorbance of blank, Ac : Absorbance of control

AGEs (CML) の測定用試薬の調製 :

基質バッファー : citric acid monohydrate 2.1 g を H₂O 100 mL に溶解し 0.1 M とした。

Na₂HPO₄ · 12H₂O 7.16 g を H₂O 200 mL に溶解し 0.1 M とした。この 2 つの溶液全量を混合し、pH 5.0 に調整し 4 °C で冷蔵保存した。

基質 : 基質バッファー 20 mL に 1,2-phenylenediamine dihydrochloride 11 mg と H₂O₂ 10 μL を溶解し調製した(用時調製)。

コーティングバッファー : Na₂CO₃ 1.59 g、NaHCO₃ 2.93 g、NaN₃ 0.2 g を H₂O に溶解し 1 L とした。

ブロッキングバッファー : 10 mL のコーティングバッファーに 0.05 g のゼラチンを加え溶解した。

洗浄バッファー : NaCl 8.0 g、KH₂PO₄ 0.2 g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.89 g、Tween20 0.5 g を H₂O に溶解し 1 L とした。

希釈バッファー : 30 mg の BSA を 10 mL の洗浄バッファーに溶解し、調製した。

ストップソリューション : H₂O 100 mL に H₂SO₄ 6 mL を溶解し、調製した。

Glycation 阻害活性探索用冷浸水抽出エキス (大量冷浸水抽出エキス) の作製 :

入手が容易で、阻害率が高い結果となった No. 8 の小島漢方のコーンシルク乾燥物 500 g に H₂O を加えて 24 時間室温下で冷浸抽出し、qualitative filter paper No.2 を用いて濾紙ろ過を行った。得られた抽出物を凍結乾燥機 (-83 °C、3.1Pa の条件で 24 時間凍結乾燥) にて溶媒留去して、glycation 阻害活性探索用冷浸水抽出エキス (大量冷浸水抽出エキス) を作製した。得られたエキスの収量は 19.7 g であった (収率 3.94%)。

コーンシルク冷浸水抽出エキスの分画（限外ろ過）：

大量冷浸水抽出エキス 560.0 mg を H₂O に溶解後、カットオフ値 3 k のセントリコンプラス-70 遠心式フィルターユニット（Merck KGaA, Darmstadt, Germany）を用いて遠心分離を行い、分画した（2000×g、1 時間）。得られた画分である 3 kDa 以上冷浸抽出サンプル（3 kDa 以上画分）、3 kDa 以下冷浸抽出サンプル（3 kDa 以下画分）の glycation 阻害活性試験を行った（終濃度 100 µg/mL）。それぞれの画分の収量は 3 kDa 以上画分 288.8 mg、3 kDa 以下画分 208.8 mg であった。

RP-HPLC 分析：

Glycation 阻害活性率が高かった 3 kDa 以上画分を 10 mg/mL となるように H₂O に溶解し、0.45 µm の Minisart syringe filter（Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany）でろ過した分析サンプル 10 µL をインジェクションして RP-HPLC 分析を行った。

[測定条件]

Shimadzu Prominence HPLC system（株式会社島津製作所）

システムコントローラー：CBM-20A

検出器：UV 検出器 SPD-20A（254 nm）

カラムオーブン：STO-20A

ポンプ：LC-20AD

脱気ユニット：DGU-20A₃

インジェクター：SIL-20AC

カラム：Senshu Pak ODS -1151-N φ 4.6×150 mm（Lot. No. 1401061Y）

溶媒：A：H₂O, B：90% MeCN

グラジエント条件：A 95%→95%（3 min）→0%（18 min）→0%（33 min）

流速：1 mL/min、カラム温度：40 °C、インジェクション量：10 µL

GPC 分析 :

3 kDa 以上画分を 10 mg/mL となるように H₂O : *N,N*-dimethylformamide=1 : 1 で溶解後、0.45 μm の minisart syringe filter を用いて、ろ過し、ろ過サンプル 5 μL を GPC 分析した。サイズ排除クロマトグラフィー用標準試料 SM-105 を *N,N*-dimethylformamide に溶解 (10 mg/mL) して 1 μL を GPC 分析した。

[測定条件]

検出器 : ERC-7517 RI 検出器

カラムオーブン : SCC-2320

ポンプ : SCC-3461

カラム : TSK-gel SuperAW 4000 column (φ 6.0×150 mm)

溶媒 : *N,N*-dimethylformamide+0.5% Ammonium formate (3 mol/mL)

流速 : 0.6 mL/min、カラム温度 : 40 °C、インジェクション量 : 10 μL

ソフトウェア : μ7 Data Station software

¹H-NMR、¹³C-NMR 分析 :

3 kDa 以上の画分を NMR 用溶媒 D₂O : acetone-*d*₆=1 : 1 に溶解後、100 mg/mL に調製した。以下の測定条件で ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 測定を行った。

[¹H-NMR の測定条件]

測定温度：20 °C、ポイント数：65536 個、スペクトル幅：8196.722 Hz、スペクトル取得時間：3.998 秒、緩和時間：1.000 秒、検出パルスのフリップ角：30°、内部標準は溶媒由来のシグナルを使用した。

[¹³C-NMR の測定条件]

測定温度：20 °C、ポイント数：65536 個、スペクトル幅：23809.523 Hz、スペクトル取得時間：1.376 秒、緩和時間：2.000 秒、検出パルスのフリップ角：30°、内部標準は溶媒由来のシグナルを使用した。

酸加水分解①：

3 kDa 以上の画分 50.0 mg を 10 mL の H₂SO₄ (0.5 N) で加水分解を行った (5 時間、105 °C)。加水分解物を 10 mL の ethyl acetate で 3 回分配抽出、溶媒留去して 1 mL の MeOH に溶解して LC-MS 分析を行った。また、標品として vanillin を MeOH に 10 mg/mL となるように溶解させて同時分析を行った。

[測定条件]

Nexera series SCL-40 system

システムコントローラー：SCL-40

検出器：UV detector：SPD-40、LC-MS-8050 (triple quadrupole mass spectrometer)、(ESI：negative ionization scan mode *m/z* 100-600)

ネブライザーガス流量：3.0 L/min

ドライガス流量：10.0 L/min

ヒーティングガス流量：10.0 L/min

脱溶媒部温度：250 °C

ブロックヒーター温度：400 °C

インターフェース温度：300 °C

カラムオーブン：CTO-40C

ポンプ：LC-40D XS

脱気ユニット：DGU-405

インジェクター：SIL-40CXS

カラム：X Bridge C18 (φ 2.1×150 mm) (Lot. No. 0157340271)

溶媒：A: H₂O, B: 90 %MeCN

グラジエント条件：A 95%→80% (10 min)→0% (33 min)

流速：0.2 mL/min、カラム温度：40 °C、インジェクション量：1 μL

酸加水分解②：

3 kDa 以上の画分 50.0 mg を 10 mL の H₂SO₄ (0.5 N) で加水分解 (90 °C、5 時間) を行った。加水分解物をイオン交換樹脂で中和し、凍結乾燥処理を行い、1 mL の H₂O で溶解して HPLC 分析を行った。また、標品として、L-rhamnose monohydrate、D- (-)-fructose、D-(+)-xylose、L-(+)arabinose、sucrose、D-(+)-glucose もそれぞれ 10 mg/mL となるように H₂O で溶解して同時分析を行った。

[測定条件]

Shimadzu Prominence HPLC system

システムコントローラー：CBM-20A

ELSD 検出器：ELSD-LTII

カラムオーブン：STO-20A

ポンプ：LC-20AD

脱気ユニット：DGU-20A3

インジェクター：SIL-20AC

カラム：Unison UK-Amino column (φ 3.0×250 mm) (Lot. No. UG15S1G)

溶媒：A：H₂O, B：90%MeCN

グラジエント条件：A 10%→10% (6 min)→25% (20 min)→25% (25 min)

流速：0.6 mL/min、カラム温度：60 °C、インジェクション量：2 μ L

FT-IR 分析：

3 kDa 以上の画分は、JASCO FT/IR-410 を用いて分析した。KBr タブレット法（分解能：4 cm^{-1} 、測定波数範囲：400-4000 cm^{-1} ）。バックグラウンド補正は KBr タブレット錠を用いて行った。

第 1 章第 2 節

機器：

FT/IR-4X (JASCO)

付属品：ATR PRO 4X,PKS-D1

測定法：ATR 法

光源：高輝度セラミック光源

検出器：TGS 検出器

積算回数：50 回

分解能：4 cm^{-1}

計算ソフトウェア：Spectra Manager

第2章第1節

使用溶媒及び機器

溶媒：

Methanol（一級）、acetone（一級）、chloroform（一級）、methanol-*d*₄, 99.8%、methanol（高速液体クロマトグラフ用）及び acetonitrile（高速液体クロマトグラフ用）は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル 60（球状）は関東化学株式会社から購入した。

カラム類：

合成吸着剤 DIAION™ HP20 は三菱ケミカル株式会社（千代田区、東京）から購入した。

ULTRA PACK ODS-SM-50C（φ 37×300 mm）は山善株式会社（大阪市、大阪）から購入した。

Senshu Pak ODS-1151-N（φ 4.6×150 mm）は株式会社センシュエ科学から購入した。

機器類：

¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 測定は、デジタル NMR AVANCE NEO 400（Bruker Corporation, Billerica, MA, USA）で行った。

質量分析では、高解能磁場セクター型質量分析装置 JMS-700(2)（日本電子株式会社）を使用した。吸光度測定は、Spectra Max 190（Molecular Devices, LLC., San Jose, CA, USA）を使用した。HPLC 分析は Waters alliance e2695 Separations Module で行った。

統計ソフトウェア：

Alice2 for Metabolome ver. 2.1（日本電子株式会社）及び JMP Pro 16（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を使用した。

実験材料：

2021年5月7日に埼玉県茶業研究所（入間市、埼玉）にて供与された「さやまかおり」10サンプル、「やぶきた」13サンプルを使用した（第2章 Table 2-1 を参照）。なお、収穫した新鮮な茶葉（一芯二葉）を2週間、23 °C で乾燥させ、紙袋内で保存した。

多変量解析用 MeOH 抽出エキスの作製：

乾燥物 1.5 g に methanol (50 mL) を加えて3日間室温下で冷浸抽出し、綿栓ろ過を行った。得られた抽出物をロータリーエバポレーターにて溶媒留去し、多変量解析用メタノール抽出エキスを作製した。

多変量解析用 $^1\text{H-NMR}$ 測定サンプルの調製と測定条件：

多変量解析用メタノール抽出エキスを NMR 用溶媒 methanol- d_4 に溶解し、10 mg/mL に調製した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定は以下の条件で行った。

[測定条件]

測定温度：20 °C、ポイント数：65536 個、スペクトル幅：8196.722 Hz、スペクトル取得時間：3.998 秒、緩和時間：1.000 秒、検出パルスのフリップ角：30°、内部標準は溶媒由来のシグナルを使用した。

NMR スペクトル処理：

$^1\text{H-NMR}$ 測定で得られたスペクトルは Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を使用して処理を行った。まず、各スペクトルは 0.00 から 10.00 ppm (幅 0.04 ppm) の 250 領域に分割した。次に各領域を積分し、NMR 用溶媒 methanol- d_4 と水のシグナルを含む 1.12~1.24 ppm、3.20~3.36 ppm、4.76~4.92 ppm の積分領域を除去した 243 領域を多変量解析に使用した。

多変量解析条件：

主成分分析 (principal component analysis : PCA) と階層型クラスター分析 (hierarchical cluster analysis : HCA) は、JMP Pro 16 を使用した。変数は平均を 0、標準偏差を 1 として標準化した。HCA については、ユークリッド距離とウォード法を用いて、樹形図を作成した。

$^1\text{H-NMR}$ シグナルの PCA の loading plot の確認は、Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を用いて行った。Mann-Whitney の U 検定には、JMP Pro 16 を使用した。

「さやまかおり」に特異的な成分探索：

「さやまかおり」の葉 400 g を MeOH で 24 時間 3 回冷浸抽出を行い、綿栓ろ過を行った。得られた抽出物をロータリーエバポレーターにて溶媒留去し、MeOH 抽出エキスを作製した。

作製したエキスを NMR 用溶媒 methanol- d_4 を添加し、10 mg/mL に調製後、 $^1\text{H-NMR}$ 分析を行ったところ、 δ 8.02 に特異的な $^1\text{H-NMR}$ シグナルが観測された。

このシグナル由来の化合物を単離、同定するため、MeOH エキス 100.0 g を合成吸着剤 Diaion HP-20 に付し、 H_2O 、30%MeOH、50%MeOH、70%MeOH、MeOH と溶出させ、それぞれ H_2O fraction (26.7 g)、30% MeOH fraction (31.7 g)、50% MeOH fraction (21.0 g)、70% MeOH fraction (3.4 g)、MeOH fraction (3.7 g) を得た。そのうち 70% MeOH fraction (3.4 g) について silica gel (ϕ 50×420 mm) をつめたカラムに供し、 CHCl_3 : MeOH=5 : 1 で溶出させ、溶出物 (2.87 g) を得た。そのうちの 200.0 mg を MPLC-1 に示した条件で Fr. 1~Fr. 240

に分画し、得られたフラクションを HPLC-1 の条件で分析した。Fr.92~95 を単一化合物であると確認し、compound **T1** (4.7 mg) とした。

MPLC-1 : ULTRA PACK ODS-SM50C ϕ 37 \times 300 mm (Lot. No. U07210)

MeOH : H₂O = 1 : 1、6 mL/min

HPLC-1 : Waters alliance e2695 Separations Module (Waters)

検出器 : 2298 PDA Detector (Waters)

カラムオーブン : SSC-2300

カラム : Senshu Pak ODS-1151-N ϕ 4.6 \times 250 mm (Lot. No. 1401061Y)

溶媒 : A: H₂O, B: 90% MeCN

グラジエント条件 : A 95% \rightarrow 95% (5 min) \rightarrow 0% (65 min) \rightarrow 0% (85 min)

流速 : 1 mL/min、カラム温度 : 40 °C、インジェクション量 : 10 μ L

構造解析 (NMR 測定) :

[¹H-NMR の測定条件]

測定温度 : 20 °C、ポイント数 : 65536 個、スペクトル幅 : 8196.722 Hz、スペクトル取得時間 : 3.998 秒、緩和時間 : 1.000 秒、検出パルスのフリップ角 : 30°、内部標準は溶媒由来のシグナルを使用した。

[¹³C -NMR の測定条件]

測定温度 : 20 °C、ポイント数 : 65536 個、スペクトル幅 : 23809.523 Hz、スペクトル取得時間 : 1.376 秒、緩和時間 : 2.000 秒、検出パルスのフリップ角 : 30°、内部標準は溶媒由来のシグナルを使用した。

化合物の物理的性質

kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

Yellow amorphous, formula : C₃₃ H₄₀O₂₀, molecular weight : 756, FAB-MS (pos.) *m/z* : 757.3 [M+H]⁺, 779.2 [M+Na]⁺, ¹H-NMR : H-6: 6.14 (1H, d, *J*=2.0), H-8: 6.31 (1H, d, *J*=2.0), H-2': 8.02 (1H, d, *J*=8.9), H-3': 6.90 (1H, d, *J*=8.9), H-5': 6.90 (1H, d, *J*=8.9), H-6': 8.02 (1H, d, *J*=8.9), H-1'': 5.05 (1H, d, *J*=7.5), H-2'': 3.44 (1H, m), H-3'': 3.37 (1H, m), H-4'': 3.24 (1H, m), H-5'': 3.42 (1H, m), H-6''(a): 3.41 (1H, m), H-6''(b): 3.81 (1H, br d, *J*=10.8), H-1''': 4.54 (1H, d, *J*=1.4), H-2''': 3.93 (1H, dd, *J*=1.6, 3.1), H-3''': 3.58 (1H, dd, *J*=3.3, 9.0), H-4''': 3.46 (1H, m), H-5''': 3.51 (1H, m), H-6'''(a): 1.15 (3H, d, *J*=5.8), H-1^{IV}: 4.38 (1H, d, *J*=7.7), H-2^{IV}: 3.26 (1H, m), H-3^{IV}: 3.39 (1H, m), H-4^{IV}: 3.39 (1H, m), H-5^{IV}: 3.21 (1H, m), H-6^{IV}: 3.72 (2H, d, *J*=3.4), ¹³C-NMR : C-2: 159.11 (s), C-3: 135.63 (s), C-4: 179.11 (s), C-5: 163.00 (s), C-6: 101.57 (d), C-7: 170.39 (s), C-8: 96.19 (d), C-9: 159.11 (s), C-10: 104.71 (s), C-1': 123.06, C-2': 132.58 (d), C-3': 116.36 (d), C-4': 161.7 (s), C-5': 116.36 (d), C-6': 132.58 (d), C-1'': 105.22 (d), C-2'': 75.96 (d), C-3'': 77.34 (d), C-4'': 71.73 (d), C-5'': 78.45 (d), C-6'': 69.18 (t), C-1''': 102.53 (d), C-2''': 71.45 (d), C-3''': 83.44 (d), C-4''': 72.78 (d), C-5''': 69.62 (d), C-6''': 18.2 (t), C-1^{IV}: 105.86 (d), C-2^{IV}: 75.65 (d), C-3^{IV}: 77.74 (d), C-4^{IV}: 71.01 (d), C-5^{IV}: 77.74 (d), C-6^{IV}: 62.21 (t) (ppm referring to residual CD₃OD δ _H 3.31, δ _C 49.2 in CD₃OD, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

第2節 茶樹の老齡化に関連する指標成分の探索

使用試薬及び測定機器

アミノ酸分析：

アミノ酸混合標準液 B 型、AN-II 型、H 型、日本電子用ニンヒドリン発色溶液キット-II、全自動アミノ酸分析機専用試薬・生体系用（クエン酸リチウム緩衝液5種[P-21（pH 2.98）、P-12（pH 3.28）、P-13（pH 3.46）、P-14（pH 2.83）、P-15（pH 3.65）]）、水酸化リチウム水溶液（P-19）はすべて富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

測定機器類：

アミノ酸分析では、JLC-500/V（日本電子株式会社、立川市、東京）を使用した。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 測定は、デジタル NMR AVANCE NEO 400（Bruker Corporation, Billerica, MA, USA）を使用した。

統計ソフトウェア：

Alice2 for Metabolome ver. 2. 及び JMP Pro 16 を使用した。

実験材料：

第1節で用いた「やぶきた」13 サンプルを使用した。

チャの熱水抽出エキスの作製：

乾燥物 1.0 g を H₂O（150 mL）で1時間1回加熱抽出し、綿栓ろ過を行った。得られた抽出物を凍結乾燥機にて乾燥処理を行い、チャの熱水抽出エキスを作製した。

アミノ酸測定用サンプルの調製と測定条件：

チャの熱水抽出エキスを 10 mg/mL となるようにクエン酸リチウム緩衝液（P-21、pH 2.98）に溶解し、全自動アミノ酸分析機でアミノ酸分析を行った。

[測定条件]

検出法：ニンヒドリン法、測定波長：440、570 nm、カラム温度 30-70 °C

第 2 節で使用した $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータは第 1 節の「やぶきた」のデータを使用しているため、「多変量解析用 MeOH 抽出エキスの作製」、「多変量解析用 $^1\text{H-NMR}$ 測定サンプルの調製と測定条件」「NMR スペクトル処理」、「多変量解析条件」は第 1 節と同一条件である。

第3章

生薬「サイシン」のメタボロミクス研究

第1節 実験方法

使用試薬及び使用機器

試薬類：

L-Rhamnose monohydrate（特級）、D(-)-fructose（特級）、D-(+)-xylose（特級）、L-(+)-arabinose（特級）、sucrose（一級）及び vanillin（特級）は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

溶媒：

Ethyl acetate（一級）、chloroform（一級）、1-butanol（一級）は富士フイルム株式会社から購入した。

カラム類：

ULTRA PACK ODS-SM50D（ ϕ 50×300 mm）は山善株式会社から購入した。

糖分析には Unison UK-Amino column（ ϕ 3.0×250 mm）を使用した。

機器：

UV 分析は Waters alliance e2695 Separations Module で行った。HPLC による糖分析は Shimadzu Prominence HPLC を使用した。

ソフトウェア：

Alice2 for Metabolome ver. 2.1 及び JMP Pro 16 を使用した。

実験材料：

市場に流通する7種類のサイシンを使用した（第3章 Table 3-1 を参照）。

多変量解析用 MeOH エキスの作製：

市場に流通する7種類のサイシンをミルで粉碎し、粉碎した生薬にNMR用溶媒 methanol- d_4 に溶解し、10 mg/mL の濃度で抽出し（n=3）、得られたエキスをNMR用チューブに移して、 $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。

$^1\text{H-NMR}$ の測定条件：

[測定条件]

測定温度：20 °C、ポイント数：65536 個、スペクトル幅：8196.722 Hz、スペクトル取得時間：4.0 秒、緩和時間：1.00 秒、スキャン回数：16 回、検出パルスのフリップ角：30°、ケミカルシフトは溶媒由来のシグナルを基準に、ppm で示した。

NMR スペクトル処理：

$^1\text{H-NMR}$ 測定で得られたスペクトルは Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を使用して処理を行った。まず、各スペクトルは 0.00 から 14.00 ppm（幅 0.04 ppm）の 250 領域に分割した。次に各領域を積分し、NMR 用溶媒 methanol- d_4 と水のシグナルを含む 1.24~1.36 ppm、3.16~3.56 ppm、4.64~5.12 ppm の積分領域を除去した 325 領域を多変量解析に使用した。

多変量解析条件：

主成分分析（principal component analysis : PCA）と階層型クラスター分析（hierarchical cluster analysis : HCA）は、JMP Pro 16 を使用した。変数は平均を 0、標準偏差を 1 として標準化した。HCA については、ユークリッド距離とウォード法を用いて、樹形図を作成した。

$^1\text{H-NMR}$ シグナルの PCA の loading plot の確認は、Alice2 for Metabolome ver. 2.1 を用いて行った。

生薬「サイシン」に特徴的な成分探索：

pilot スケールでの検討：

多変量解析の結果、7 種類のサイシンは 2 つのグループに分かれる結果となり、loading plot の結果から各グループのサイシンの δ 5.42 付近のシグナルを確認したところ、強度が異なることが明らかとなったため、このシグナルに由来する化合物の探索を行うこととした。

シグナルの強度が高いグループに分けられ、入手が容易であった小島漢方 (No. 6) のサイシン 500.0 g を MeOH で冷浸抽出し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒留去を行い、サイシン MeOH エキスを作製した。

続いて、サイシン MeOH エキス 1.2 g を H_2O に懸濁させ、その溶液を ethyl acetate、chloroform、1-butanol の順に液液分配を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒留去した。分画物の収量はそれぞれ、ethyl acetate 画分 (P-EA) 90.0 mg、chloroform 画分 (P-CH) 31.1 mg、1-butanol 画分 (P-BU) 209.8 mg、 H_2O 画分 (P- H_2O) 764.8 mg を得た。これらの分画物を NMR 溶媒 methanol- d_4 に 10 mg/mL となるように溶解して、 $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った。その結果、P-BU に δ 5.42 が確認された。

大量スケールでの分画：

Pilot スケールでの検討結果から、液液分配を行った 1-butanol 画分にターゲットとなる化合物が含まれていることが明らかとなったので、単離、同定のためにより大きいスケールでの分画作業を行った。

サイシン MeOH エキス 10.2 g を H_2O に懸濁させ、その溶液を ethyl acetate、chloroform、1-butanol の順に液液分配を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒留去した。分画物の収

量はそれぞれ、ethyl acetate 画分 (L-EA) 1.5 g、chloroform 画分 (L-CH) 0.1 g、1-butanol 画分 (L-BU) 2.1 g、H₂O 画分 (L-H₂O) 6.6 g を得た。次に、L-BU 0.4 g を MPLC-1-S の条件で中圧分取を行い、12 mL ずつ試験管 120 本に分画し、Fr. 1~Fr. 120 を得た。Fr. 10 から 10 本ずつ ¹H-NMR 分析を行い、 δ 5.42 のシグナルの有無を確認した結果、Fr.20 (25.1 mg) に δ 5.42 のシグナルが確認された。 δ 5.42 は糖のアノメリックプロトンの可能性が考えられたため、HPLC-S-1 の条件で ELSD 検出器を取り付けた HPLC にて糖分析を行った。また、標品として、L-rhamnose、D(-)-fructose、D(+)-xylose、L(+)-arabinose、sucrose、D(+)-glucose もそれぞれ 1 mg/mL となるように H₂O で溶解して同時分析を行った。

MPLC-1-S : ULTRA PACK ODS-SM50D ϕ 50×300 mm (Lot. No. E26109)、MeOH : H₂O=3 : 2, 12 mL/min

HPLC-S-1 : Shimadzu Prominence HPLC system

システムコントローラー : CBM-20A

ELSD 検出器 : ELSD-LTII

カラムオーブン : STO-20A

ポンプ : LC-20AD

脱気ユニット : DGU-20A3

インジェクター : SIL-20AC

カラム : Unison UK-Amino column (ϕ 3.0×250 mm) (Lot. No. UG15S1G)

溶媒 : A: H₂O, B: 90% MeCN

グラジエント条件 : A 10%→10% (6 min)→25% (20 min)→25% (25 min)

流速 : 0.6 mL/min、カラム温度 : 60 °C、インジェクション量 : 2 μ L

第2節実験方法

使用試薬及び機器

溶媒：

Methanol (一級)、methanol (高速液体クロマトグラフ用) *n*-hexane (一級)、ethyl acetate (一級)、acetonitrile (高速液体クロマトグラフ用)、chloroform (一級)、chloroform (高速液体クロマトグラフ用)、methanol-*d*₄, 99.8%、pyridine-*d*₅, 99.8%は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

Chloroform-*d*₁, 99.8%は関東化学株式会社から購入した。

カラム類：

MCI GEL CHP20/P120は三菱ケミカル株式会社から購入した。TOYOPEARL HW-40Fは東ソー株式会社から購入した。

PEGASIL ODS SP100、PEGASIL C8 SP100、AQUASIL SP100は株式会社センシユール科学から購入した。

測定機器：

NMR測定にはデジタルNMR AVANCE NEO 400 (Bruker Corporation) を使用した。なお、NMR測定はすべて室温で行った。質量分析では、高解能磁場セクター型質量分析装置JMS-700(2)を使用した。HPLC-PDA測定はWaters alliance e2695 Separations Moduleを使用した。旋光計はP-2200 (日本分光株式会社) を使用した。

分画、精製に使用したHPLC：

Pump：SSC-3415 (センシユー科学)、semi-preparative pump：PU-4086 (日本分光株式会社)、UV detector：UV-4070 (日本分光株式会社)、RI detector：RI-4030 (日本分光株式会社)、column oven：CO631C (ジーエルサイエンス株式会社、東京、日本) を使用した。

サイシン抽出エキスの分画、精製：

サイシン4 kgをMeOHで抽出し、MeOHエキス(354.7 g)を得た。生薬残渣は、乾燥後に*n*-hexaneで抽出し、*n*-hexaneエキス(5.6 g)を得た。

MeOHエキス(15.0 g)についてMCI GELに付し、30% MeOH、50% MeOH、70% MeOH、MeOH、acetoneと溶出させ、それぞれ2.7 g、1.9 g、2.8 g、6.0 g、2.0 gを得た。30% MeOH溶出画分(2.7 g)についてTOYOPEARL HW-40F (H₂O：MeOH=1：1)の条件で分画を行い、Fr. m1~Fr. m25を得た。Fr. m4(797.9 mg)についてsilica gelをつめたカラム(CHCl₃：MeOH：H₂O=65：35：10)による分画を行い、Fr. m4-1~Fr. m4-25を得た。Fr. m4-6(101.6 mg)をHPLC-1の条件で精製を行いcompound S1(7.9 mg)を得た。Fr. m4-7(86.4 mg)については、HPLC-2の条件で分画、精製を行いFr. m4-7-1(2.6 mg)、Fr. m4-7-2(9.0 mg)、Fr. m4-7-3(35.0 mg)、Fr. m4-7-4(4.8 mg)、Fr. m4-7-5(4.9 mg)を得、Fr. m4-7-1をcompound S2(2.6 mg)、Fr. m4-7-3をcompound S3(34.9 mg)とした。Fr. m5(195.3 mg)についてはsilica gelをつめたカラム(CHCl₃：MeOH：H₂O=65：35：10)による分画を行い、Fr. m5-1~Fr. m5-20を得、Fr. m5-8(12.7 mg)について、HPLC-3の条件で精製を行い

compound **S4** (2.0 mg) とした。なお、**S4** は、以下の条件で、HPLC-PDA1 の条件で、吸収極大波長を測定した。一方、Fr. m9 (3.4 mg) については silica gel をつめたカラム (CHCl₃ : MeOH : H₂O=65 : 35 : 10) による分画を行い、Fr. m9-1~Fr. m9-25 を得、Fr. m9-2 (17.4 mg) を compound **S5** (2.1 mg) とした。Acetone 溶出画分 (5.9 mg) については、ロータリーエバポレーターにて溶媒留去時に、沈殿物 (60.8 mg) がみられたため、HPLC-4 の条件で精製を行い、compound **S6** (3.4 mg) とした。

n-Hexane エキス (3.6 g) については、silica gel をつめたカラム (*n*-hexane : EtOAc = 3 : 1) による分画を行い、Fr. he1~Fr. he47 を得た。Fr. he5 (68.8 mg) について HPLC-5 の条件で精製を行い、compound **S7** (2.6 mg) とした。Fr. he7 (31.8 mg) について HPLC-6 の条件で精製を行い、compound **S8** (17.4 mg) とした。Fr. he8 (32.1 mg) については HPLC-7 の条件で精製を行い、compound **S9** (15.6 mg) とした。

HPLC-1 : PEGASIL ODS SP100 φ10×150 mm No. 196041S, H₂O : MeOH=1 : 2.5, 3 mL/min, 25 °C, RI, 12.4 min (compound **S1**) .

HPLC-2 : PEGASIL ODS SP100 φ10×150 mm No. 196041S, H₂O : MeOH=1 : 2.5, 3 mL/min, 25 °C, RI, 8.7 min (compound **S2**)、10.3 min (compound **S3**) .

HPLC-3 : PEGASIL ODS SP100 φ10×150 mm No.1901312Y, H₂O : MeCN=1 : 6, 3 mL/min, 25 °C, RI, 7.1 min (compound **S4**) .

HPLC-4 : AQUASIL SP100 φ10×250 mm No. 1312183Y, CHCl₃, 3 mL/min, 30 °C, RI, 6.0 min (compound **S6**) .

HPLC-5 : PEGASIL ODS SP100 φ10×150 mm No.1901312Y, H₂O : MeOH=2 : 5, 3 mL/min, 45 °C, RI, 7.2 min (compound **S7**) .

HPLC-6 : PEGASIL ODS SP100 φ10×150 mm No.1901312Y, H₂O : MeCN=1 : 2, 3 mL/min, 20 °C, RI, 5.5 min (compound **S8**) .

HPLC-7 : PEGASIL ODS SP100 ϕ 10 \times 150 mm No.1901312Y, H₂O : MeOH=1 : 3, 3 mL/min, 45 °C, RI, 9.6 min (compound **S9**) .

HPLC-PDA :

Waters alliance e2695 Separations Module (Waters)

検出器 : 2298 PDA Detector (Waters)

カラムオーブン : SSC-2300

カラム : Senshu Pak ODS-1151-N ϕ 4.6 \times 250 mm (Lot. No. 1401061Y)

溶媒 : A: H₂O, B: 90% MeCN

グラジエント条件 : A 95% \rightarrow 95% (5 min) \rightarrow 0% (65 min) \rightarrow 0% (85 min)

流速 : 1 mL/min、カラム温度 : 40 °C、インジェクション量 : 10 μ L

化合物の物理的性質

Compound **S1** : 3-methoxy-5-methyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside

White-yellow amorphous, formula : C₂₀H₃₀O₁₂, molecular weight : 462, HR-FAB-MS (pos.) *m/z* : 463.1831, (Calcd for C₂₀H₃₁O₁₂: 463.1813), ¹H-NMR : H-2: 6.52 (1H, s), H-4: 6.44 (1H, s), H-6: 6.54 (1H, s), H-1': 4.90 (1H, d, *J*=7.5), H2'~6', H2''~6'': 3.56 (11H, m), H-6': 4.17 (1H, dd, *J*=1.95, 11.5), H-1'': 4.35 (1H, d, *J*=7.7), 5-CH₃: 2.97 (3H, s), 3-OMe: 3.77 (3H, s), ¹³C-NMR : C-1: 160.19 (s), C-2: 101.49 (d), C-3: 162.23 (s), C-4: 109.90 (d), C-5: 141.58 (s), C-6: 110.99 (d), C-1': 102.37 (d), C-2': 75.34 (d), C-3': 78.03 (d), C-4': 71.61 (d), C-5': 77.37 (d), C-6': 71.24 (t), C-1'': 105.06 (d), C-2'': 75.08 (d), C-3'': 78.17 (d), C-4'': 71.78 (d), C-5'': 78.19 (d), C-6'': 62.93 (t), 3-OMe: 55.95 (q), 5-CH₃: 22.07 (q) (ppm referring to residual CD₃OD δ _H 3.31, δ _C 49.2 in CD₃OD, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

Compound **S2** : 1-*O*-feruloyl- α -D-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

White-yellow amorphous, formula : C₂₁H₂₈O₁₃, molecular weight : 488, HR-FAB-MS (neg.) *m/z* : 467.1465, (Calcd for C₂₁H₂₇O₁₃ : 467.1448), ¹H-NMR : H-2: 6.40 (1H, d, *J*=15.9), H-3: 7.48 (1H, d, *J*=15.9), H-2': 7.22 (1H, d, *J*=1.9), H-5': 6.83 (1H, d, *J*=8.2), H-6': 7.11 (1H, dd, *J*=1.9, 8.2), H-1'': 5.57 (1H, d, *J*=7.8), H-2''~5'': 3.50 (4H, m), H-6'': 4.03 (2H, m), H-1''' : 4.94 (1H, d, *J*=1.3), H-2'''~4''' : 3.80 (3H, m), H-5''' : 3.69 (2H, m), 3'-OMe: 3.91 (3H, s) ¹³C-NMR : C-1: 167.80 (s), C-2: 114.74 (d), C-3: 148.57 (d), C-1': 127.58 (s), C-2': 112.04 (d), C-3': 151.55 (s), C-4': 149.73 (s), C-5': 116.81 (d), C-6': 124.66 (d), C-1'': 95.89 (d), C-2'': 74.23 (d), C-3'': 78.15 (d), C-4'': 71.80 (d), C-5'': 77.76 (d), C-6'': 68.09 (t), C-1''' : 110.15 (d), C-2''' : 83.42 (d), C-3''' : 79.04 (d), C-4''' : 85.92 (d), C-5''' : 63.19 (t), 3'-OMe: 56.64 (q) (ppm referring to residual CD₃OD δ _H 3.31, δ _C 49.2 in CD₃OD, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

Compound **S3** : 1-*O*-feruloyl- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside

Yellow amorphous, formula : C₂₁H₂₈O₁₃, molecular weight : 488, ¹H-NMR : H-2: 6.48 (1H, d, *J*=15.9), H-3: 7.64 (1H, d, *J*=15.9), H-2': 7.34 (1H, d, *J*=1.9), H-5': 6.80 (1H, d, *J*=8.2), H-6': 7.14 (1H, dd, *J*=1.9, 8.2), H-1'': 5.46 (1H, d, *J*=7.9), H-2''~5'': 3.65 (4H, m), H-6'': 3.56 (2H, dd, *J*=11.3, 5.8), H-1''' : 4.14 (1H, d, *J*=7.6), H-2'''~4''' : 3.10 (3H, m), H-5''' : 3.67 (2H, dd, *J*=11.1, 5.3), 3'-OMe: 3.82 (3H, s), ¹³C-NMR : C-1: 165.36 (s), C-2: 113.84 (d), C-3: 146.41 (d), C-1': 125.45 (s), C-2': 111.40 (d), C-3': 149.60 (s), C-4': 146.94 (s), C-5': 115.50 (s), C-6': 123.38 (d), C-1'': 94.08 (d), C-2'': 72.38 (d), C-3'': 76.42 (d), C-4'': 69.26 (d), C-5'': 76.35 (d), C-6'': 68.10, C-1''' : 103.73 (d), C-2''' : 73.14 (d), C-3''' : 76.12 (d), C-4''' : 69.43 (d), C-5''' : 65.62 (t), 3'-OMe: 55.70 (q) (ppm referring to residual CD₃OD δ _H 3.31, δ _C 49.2 in CD₃OD, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

Compound **S4** : 5,7-di-*O*- β -D-glucopyranosyl naringenin

Yellow amorphous, formula : C₂₇H₃₂O₁₅, molecular weight : 596, ¹H-NMR : H-6: 7.30 (1H, d, *J* = 2.3), H-8: 6.66 (1H, d, *J* = 2.3), Glc-H-1: 5.57 (1H, d, *J* = 7.4), ¹³C-NMR : C-2: 79.98, 79.51 (s), C-3: 46.3 (t), C-4: 191.23, 190.75 (s), C-5: 162.11, 161.49 (s), C-6: 100.09 (d), C-7: 165.30, 165.20 (s), C-8: 100.09 (d), C-9: 165.30, 164.80 (s), C-10: 108.59 (s), C-2': 129.29, 129.23 (d), C-3': 116.93, 116.91 (d), C-4': 160.03, 159.95 (s), C-5': 116.93, 116.91, (d), C-6': 129.29, 129.23 (d), Glc-C-1: 105.50, 104.40, 101.66, 101.58 (d), Glc-C-2: 75.66, 75.53, 75.20, 75.17 (d), Glc-C-3: 79.83*, 78.52, 78.09 (d), Glc-C-4: 71.99, 71.86, 71.85 (d), Glc-C-5: 80.06*, 79.49*, 78.95, 78.93 (d), Glc-C-6: 63.25, 63.17, 63.02 (t) *May be interchanged. (ppm referring to residual pyridine δ_{H} 8.74, δ_{C} 150.4 in pyridine, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

Compound **S5** : 4-hydroxybenzoic acid

White amorphous, formula : C₇H₆O₃, molecular weight : 138, ¹H-NMR : H-2, 6: 7.87 (2H, d, *J* = 8.9), H-3, 5: 6.80 (2H, d, *J* = 8.9), ¹³C-NMR : C-1: 123.52 (s), C-2: 133.13 (d), C-3: 116.16 (d), C-4: 163.34 (s), C-5: 116.16 (d), C-6: 133.13 (d), C-7: 170.73 (s) (ppm referring to residual CD₃OD δ_{H} 3.31, δ_{C} 49.2 in CD₃OD, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

Compound **S6** : (-)-sesamin

White amorphous, formula : C₂₀H₁₈O₆, molecular weight : 354, ¹H-NMR : H-1, 5: 3.05 (2H, m), H-2, 6: 4.72 (2H, d, *J* = 4.4), H-4, 8: 3.88 (2H, dd, *J* = 9.2, 3.7), H-4, 8: 4.24 (2H, dd, *J* = 9.2, 6.9), H-2', 2'': 6.86 (2H, d, *J* = 1.6), H-5', 5'': 6.79 (2H, dd, *J* = 8.1), H-6', 6'': 6.81 (2H, dd, *J* = 1.6, 8.1), OCH₂O: 5.96 (4H, s) ¹³C-NMR : C-1: 54.35 (d), C-2: 85.81 (d), C-4: 71.73 (t), C-5: 54.35 (d), C-6: 85.81 (d), C-8: 71.73 (t), C-1', C-1'': 135.06 (s), C-2', C-2'': 106.51 (d), C-3', C-3'': 147.12 (s), C-4', C-4'': 147.98 (s), C-5', C-5'': 108.20 (d), C-6', C-6'': 119.37 (d), OCH₂O: 101.08 (t) (ppm referring to

residual CDCl_3 δ_{H} 7.27, δ_{C} 77.0 in CDCl_3 , r.t. at 400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C . Coupling constants (J in Hz) are given in parentheses)

Compound S7 : kakuol

Light brown amorphous, formula : $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, molecular weight : 194, ^1H -NMR : H-3: 6.42 (1H, s), H-6: 7.27 (1H, s), H-8: 2.95 (2H, q, $J=7.3$), H-9: 1.18 (3H, t, $J=7.3$), OCH_2O : 5.98 (2H, s) ^{13}C -NMR : C-1: 113.13 (s), C-2: 163.08 (s), C-3: 99.30 (d), C-4: 155.93 (s), C-5: 142.25 (s), C-6: 108.15 (d), C-7: 206.80 (s), C-8: 32.52 (t), C-9: 8.96 (q), OCH_2O : 103.65 (t) (ppm referring to residual CD_3OD δ_{H} 3.31, δ_{C} 49.2 in CD_3OD , r.t. at 400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C . Coupling constants (J in Hz) are given in parentheses)

Compound S8 : methyl kakuol

White-yellow amorphous, formula : $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$, molecular weight : 208, ^1H -NMR : H-3: 6.54 (1H, s), H-6: 7.27 (1H, s), H-8: 2.95 (2H, q, $J=7.2$), H-9: 1.14 (3H, t, $J=7.3$), OCH_2O : 5.98 (2H, s), OMe : 3.86 (3H, s) ^{13}C -NMR : C-1: 120.74 (s), C-2: 156.84 (s), C-3: 94.35 (d), C-4: 152.26 (s), C-5: 141.75 (s), C-6: 109.37 (d), C-7: 200.86 (s), C-8: 37.12 (t), C-9: 8.81 (q), OCH_2O : 102.06 (t), OMe : 56.42 (q) (ppm referring to residual CDCl_3 δ_{H} 7.27, δ_{C} 77.2 in CDCl_3 , r.t. at 400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C . Coupling constants (J in Hz) are given in parentheses)

Compound S9 : (-)-episesamin

White amorphous, formula : $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$, molecular weight : 354, ^1H -NMR : H-1, 8: 3.31 (2H, m), H-2: 4.84 (1H, d, $J=5.4$), H-4, 8: 3.84 (2H, m) H-4: 4.11 (1H, d, $J=9.5$), H-5: 2.87 (1H, dd, $J=6.8$, 14.4), H-6: 4.40 (1H, d, $J=7.2$), H-2', 5', 6', 2'', 5'', 6'': 6.83 (6H, m), OCH_2O : 5.96 (2H, s), 5.97 (2H, s), ^{13}C -NMR : C-1: 54.79 (d), C-2: 87.80 (d), C-4: 71.06 (t), C-5: 50.30 (d), C-6: 82.18 (d), C-8: 69.83 (t), C-1': 132.38 (s), C-2': 106.71 (d), C-3': 147.36 (s), C-4': 148.10 (s), C-5': 108.31 (d), C-6': 119.76

(d), C-1'': 135.22 (s), C-2'': 106.54 (d), C-3'': 146,71 (s), C-4'': 147.78 (s), C-5'': 108.31 (d), C-6'': 118.83 (d), OCH₂O:101.21, 101.14 (t) (ppm referring to residual CDCl₃ δ_H 7.27, δ_C 77.2 in CDCl₃, r.t. at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C. Coupling constants (*J* in Hz) are given in parentheses)

引用文献

1. 木村孟淳, 薬学生のための天然物化学, 第1版, 南江堂, (2004).
2. 奥山徹, エッセンシャル天然物化学, 第1版, 医歯薬出版株式会社, (2007).
3. 福田枝里子, 天然薬物の指標成分検索及び品質評価への混合物解析の応用, 明治薬科大学博士論文, (2013).
4. 河原崎正貴, 食品分野におけるメタボリックプロファイリングの活用 NMR・MS を用いた包括的な食品成分分析 日本農芸化学会, 化学と生物, **56**, No. 8, (2017).
5. Kai H., Predicting the Pharmacologic Activity of Natural Materials Based on Metabolomics, *YAKUGAKU ZASSHI*, **140**, 1251-1258 (2020).
6. メタボロミクス総説, Human Metabolome Technologies, Inc.
7. Suzuki R., Ikeda Y., Yamamoto A., Saima T., Fujita T., Fukuda T., Fukuda E., Baba M., Okada Y., Shirataki Y., Classification using NMR-based metabolomics of *Sophora flavescens* growing in Japan and China, *Nat. Prod. Commun.*, **7**, 1453-1455 (2012).
8. Suzuki R., Nakano F., Ohno H., Murakami T., Okada Y., Shirataki Y., Distinguishing *Glycyrrhiza* species using NMR-based metabolomics, *Nat. Prod. Commun.*, **13**, 71-73 (2018).
9. 難波恒雄著, 和漢薬百科図鑑 II, 保育社, p. 131 (1994).
10. 中薬大事典, 第一巻, 初版, 上海科学技術出版社, 小学館編, 小学館, pp. 504-505 (1985).
11. Farsi A. D., Harris S. C., Reid L., Bennett L. A. S., Haddad S. P., Martineau C. L., Arnason T. J., Inhibition of Non-enzymatic Glycation by Silk Extracts from a Mexican Land Race and Modern Inbred Lines of Maize (*Zea mays*), *Phytother. Res.*, **22**, 108-122 (2008).
12. Hasanudin K., Hashim P., Mustafae S., Corn silk (*Stigma maydis*) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review, *Molecules*, **17**, 9697-9715 (2012).
13. Suzuki R., Okada Y., Okuyama T., Two flavone C-glycosides from the style of *Zea mays* with glycation inhibitory activity, *J. Nat. prod.*, **66**, 564-565 (2003).

14. Sarmah S., Roy S. A., A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications, *International Journal of Biological Macromolecules*, **195**, 565-588 (2022).
15. 米井嘉一, 糖化による疾患と抗糖化食品・素材, シーエムシー出版 (2010).
16. Suzuki R., Iijima M., Okada Y., Okuyama T., Chemical Constituents of the Style of *Zea mays* L. with Glycation Inhibitory Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 153-155 (2007).
17. Suzuki R., Okada Y., Okuyama T., The Favorable Effect of Style of *Zea mays* L. on Streptozotocin Induced Diabetic Nephropathy, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 919-920 (2005).
18. Bartosz S. I., Bartosz G., Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds, *Molecules*, **20**, 3309-3334 (2015).
19. Kusano R., Andou H., Fujieda M., Tanaka T., Matsuo Y., Kouno I., Polymer-Like Polyphenols of Black Tea and Their Lipase and Amylase Inhibitory Activities, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 266-272 (2008).
20. Degenhardt A., Engelhardt H. U., Wendt S. A., Winterhalter P., Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5200-5205 (2000).
21. Ramsay A., Harvey M. I., Proanthocyanidins from *Averrhoa bilimbi* fruits and leaves, *Journal of Food Composition and Analysis*, **47**, 16-20 (2016).
22. Akagi T., Suzuki Y., Ikegami A., Kamitakahara H., Takano T., Nakatsubo F., Yonemori K., Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **79**, 275-281 (2010).
23. Foo Y. L., Karchesy J. J., Procyanidin tetramers and pentamers from douglas fir bark, *Phytochemistry*, **30**, 667-670 (1991).
24. Yang B., Liu P., Composition and Biological Activities of Hydrolyzable Tannins of Fruits of *Phyllanthus emblica*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 529-541 (2014).

25. An L., Wang G., Jia H., Liu C., Sui W., Siet C., Fractionation of enzymatic hydrolysis lignin by sequential extraction for enhancing antioxidant performance, *International Journal of Biological Macromolecules*, **99**, 674-681 (2017).
26. Favre C. L., Rolandelli G., Mshicileli N., Vhangani N. L., Ferreira S. D. C., Wyk V. J., Buera P. D. M., Antioxidant and anti-glycation potential of green pepper (*Piper nigrum*): Optimization of β -cyclodextrin-based extraction by response surface methodology, *Food Chemistry*, **316**, 126280 (2020).
27. De S., Mishra S., Poonguzhali E., Rajesh M., Tamilarasanet K., Fractionation and characterization of lignin from waste rice straw: Biomass surface chemical composition analysis, *International Journal of Biological Macromolecules*, **145**, 795-803 (2020).
28. Meng Y., Lu J., Cheng Y., Li Q., Wang H., Lignin-based hydrogels: A review of preparation, properties, and application, *International Journal of Biological Macromolecules*, **135**, 1006-1019 (2019).
29. Kang S., Li X., Fan J., Chang J., Hydrothermal conversion of lignin: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**, 546-558 (2013).
30. 福崎英一郎, 馬場健史, 小林昭雄, 植物メタボロミクス研究の現状と展望, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **78**, 39-42 (2004).
31. Riyanta A. B., Riyanto S., Lukitaningsih E., Rohman A., Analysis of sunflower oil in ternary mixture with grapeseed oil and candlenut oil in the ternary mixture system using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Food Research*, **4**, 1726-1731 (2020).
32. Kumari S., Amit, Singh K. D., Swift and precise detection of argemone oil adulteration in virgin coconut oil by implementing ATR-FTIR spectroscopy integrated with multivariate chemometrics and regression modelling, *Vibrational Spectroscopy*, **126**, 103525 (2023).

33. Manir M. M., Kim K. J., Lee G. B. Moonet S. S., Tea catechins and flavonoids from the leaves of *Camellia sinensis* inhibit yeast alcohol dehydrogenase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20**, 2376-2381 (2012).
34. Hasegawa T., Hayakawa Y., Chueamchaitrakun P., Takahashi A., Nakajima K., Fujihara T., The Aroma Profiles of Thai Green Teas Derived from Two Varieties, Chinese and Assam, *Natural Product Communications*, **12**, 1317-1319, (2017).
35. Zhang L., Ho C. T., Zhou J., Santos S. J., Armstrong L., Granato D., Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Teas: A Comprehensive Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **18**, 1474-1495 (2019).
36. Wu J. Z., Li H. X., Liu W. Z., Xu S. Z. Zhuang J., De novo assembly and transcriptome characterization: novel insights into catechins biosynthesis in *Camellia sinensis*, *BMC Plant Biology*, **14**, 1471-2229 (2014).
37. Bedrood Z., Rameshrad M., Hosseinzadehet H., Toxicological effects of *Camellia sinensis* (green tea): A review, *Phytotherapy Research*, **32**, 1163-1180 (2018).
38. Yamamoto M., Sano M., Matsuda N., Miyase T., Kawamoto K., Suzuki N., Yoshimura K., The Change of Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate Content in Tea of Different Varieties, Tea Seasons of Crop and Processing Method, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, **48**, 64-68 (2001).
39. Shira N., Gas chromatographic Analysis of Organic Acids in Japanese Green Tea Leaves, *J. Oleo Sci.*, **12**, 1271-1277 (2019).
40. Sawai Y., Yamaguchi Y., Tanaka J., Methyl Anthranilate is the Cause of Cultivar-Specific Aroma in the Japanese Tea Cultivar ‘Sofu’, *JARQ*, **38**, 271-274 (2004).
41. 高橋淳, 北限のお茶の伝統を引き継いだ狭山茶の香り, におい・かおり環境学会誌, **46**, 127-132 (2015).
42. 内野博司, 茶育種指定試験事業(埼玉県)の軌跡と現状, 野菜茶業研究集報, **1**, 73-77 (2004).
43. 茶をめぐる情勢, 農林水産省, 令和 5 年, 8 月.

44. Shin R. E., Jung W., Kim K. M., Chong Y., Identification of (-)-epigallocatechin (EGC) as a methylglyoxal (MGO)-trapping agent and thereby as an inhibitor of advanced glycation end product (AGE) formation, *Appl. Biol. Chem.*, **61**, 587-591 (2018).
45. Wu H. C., Huang M. S., Lin A. J., Yen C. G., Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs, *Food Funct.*, **2**, 224 (2011).
46. Yokozawa T., Nakagawa T., Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage, *Food and Toxicology*, **42**, 975-981 (2004).
47. Wada S., He P., Hashimoto I., Watanabe N., Sugiyama K., Glycosidic Flavonoids as Rat-Liver Injury Preventing Compounds from Green Tea, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2262-2265 (2000).
48. Monobe M., Nomura S., Ema K., Matsunaga A., Nesumi A., Yoshida K., Maeda-Yamamoto M., Horie H., Quercetin Glycosides-rich Tea Cultivars (*Camellia sinensis* L.) in Japan, *Food Science and Technology Research*, **21**, 333-340 (2015).
49. Morikawa T., Ninomiya K., Miyake S., Miki Y., Okamoto M., Yoshikawa M., Muraoka O., Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity and simultaneous quantitative analysis of 15 polyphenols and caffeine in the flower buds of *Camellia sinensis* from different regions by LCMS, *Food Chemistry*, **140**, 353-360 (2013).
50. アミノ酸分析特集、HPLC を用いたアミノ酸分析, 日本分光
51. 岡野邦夫, 大前 英, チャの根系を構成する様々な直径の根の生理機能の定量的評価, 日本作物学会紀事, **65**, 605-611 (1996).
52. 海野けい子, テアニン-テアニンによるストレス軽減-, 日本農芸化学会, 化学と生物, **58**, 667-672 (2020).
53. Park D. J., Baek I. N., Lee H. Y., Kim I. S., Isolation of a Cytotoxic Agent from *Asiasari Radix*, *Arch. Pharm. Res.*, **19**, 559-561 (1996).
54. Shirataki Y., 野山の花-身近な山野草の食効・薬効- *New Food Indust.*, **60**, 76-77 (2018).

55. Lee J., Lee J. Y., Oh M. S., Yi M. J., Kim S. Bang S. O., Bioactive Compounds from the Roots of *Asiasarum heterotropoides*, *Molecules*, **19**, 122-138 (2014).
56. Takasaki M., Konoshima T., Yasuda I., Hamano T., Tokuda H., Inhibitory Effects of Shouseiryu-to on Two-Stage Carcinogenesis. II. Anti-tumor-promoting Activities of Lignans from *Asiasarum heterotropoides* var. *mandshuricum*, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 776-780 (1997).
57. Han Y., Kim J. S., Memory enhancing actions of Asiasari radix extracts via activation of insulin receptor and extracellular signal regulated kinase (ERK) I/II in rat hippocampus, *Brain research*, **974**, 193-201 (2003).
58. Kosuge T., Yokota M., Nukaya H., Gotoh Y., Nagasawa M., Studies on Antitussive Principles of Asiasari Radix, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2284-2285 (1978).
59. Oh M. S., Kim J., Lee J., Yi M. J., Oh S. D., Bang S. O., Kim S. N., Anticancer potential of an ethanol extract of *Asiasari radix* against HCT-116 human colon cancer cells *in vitro*, *Oncology letters*, **5**, 305-310 (2013).
60. Ohmoto T., Sung I. Y., Antimycotic Substances in the Crude Drugs II, *生薬学雑誌*, **36**, 307-314 (1982).
61. 橋本和則, 岡田稔, 丸野政雄, 細辛の原植物の成分分析, *Natural Medicines*, **48**, 39-48 (1994).
62. Yamahara J., Kimata M., Sawada T., Fujimura H., Anti-allergic effect of Mao-busi-saisin-to and active principles of *Asiasarum sieboldi*, *和漢医薬学雑誌*, **3**, No. 3, (1986).
63. 青木直大, 廣瀬竜郎, 新たな糖輸送体 SWEET とその多様な機能-植物がもつ'スイーツ'の話, *日本農芸化学会, 化学と生物*, **56**, No.1, (2018).
64. Usiyama M., Furuya T., Glycosylation of phenolic compounds by root culture of *Panax ginseng*, *Phytochemistry*, **28**, 3009-3013, (1989).
65. Gil R. R., Lin Z. L., Cordell A. G., Kumar R. M., Ramesh M., Reddy M. B., Mohan K. G., Rao A. N. V. A., Anacardoside from the seeds of *Semecarpus anacardium*, *Phytochemistry*, **39**, 405-407 (1995).

66. Hasimoto K., Katsuhara T., Niitsu K., Ikeya Y., Okada M., Mitsuhashi H., Two glycosides from roots of *Asiasarum sieboldi*, *Phytochemistry*, **31**, 2477-2480 (1992).
67. Comte G., Chulia J. A., Vercauteren J., Allaisset P. D., Phenylpropane Glycosides from *Juniperus phoenicea*, *Planta Med.*, **62**, 88-89 (1996).
68. Tolonen A., Pakonen M., Hohtola A., Jalonen J., Phenylpropanoid Glycosides from *Rhodiola rosea*, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 467-470 (2003).
69. Latza S., Ganber D., Berger G. R., Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of *Physalis peruviana*, *Psidium guajava* and *Vaccinium vitis-idaea*, *Phytochemistry*, **43**, 481-485 (1996).
70. Akihisa T., Akihisa T., Seino K., Kaneko E., Watanabe K., Tochizawa S., Fukatsu M., Banno N., Metori K., Kimura Y., Melanogenesis Inhibitory Activities of Iridoid-, Hemiterpene-, and Fatty Acid-glycosides from the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni), *J. Oleo. Sci.*, **59**, 49-57 (2010).
71. SDBSWeb : <https://sdfs.db.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2023, 10).
72. Jayasinghe L., Kumarihamy M. M. B., Jayarathna N. R. H. K., Udishani G. M. W. N., Bandara R. M. B., Hara N., Fujimoto Y., Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa*, *Phytochemistry*, **62**, 637-641 (2003).
73. Dar A. A., Verma N. K., Arumugam N., An updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans - Sesamin and sesamolin, from sesame oil, *Industrial Crops and Products*, **64**, 201-208 (2015).
74. Lee Y. J., Moon S. S., Hwang K. B., Isolation and antifungal activity of kakuol, a propiophenone derivative from *Asarum sieboldii* rhizome, *Pest Management Sci.*, **61**, 821-825 (2005).
75. Santos O. V. L., Chaves O. C. M., Assignments of ¹H And ¹³C Resonance Signals in 2-Methoxy-4,5-Methylenedioxypropiophenone with the Assistance of 1D And 2D NMR Experiments, *Acta Farm. Bonaerense*, **19**, 45-48 (2000).

76. Quang H. T., Ngan T. T. N., Minh V. C., Kiem V. P., Tai H. B., Thao P. N., Song B. S., Kim H. Y.,
Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of
Asarum sieboldii, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 2527-2533 (2012).
77. Ju Y., Still C. C., Sacalis N. J., Li J., Ho C., Cytotoxic coumarins and lignans from extracts of the
northern prickly ash (*Zanthoxylum americanum*), *Phytother. Res.*, **15**, 441-443 (2001).
78. Kienast T. W., Ruhl M., Kim. Y. K., Emmerling F., Erben U., Somasundaram R., Freise C.,
Absolute Configuration of Antifibrotic (+)-Episesamin Isolated from *Lindera obtusiloba* BLUME,
Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences, **66**, 460-464 (2011).