

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07120

研究課題名(和文)天然素材中の高分子量コンデンスドタンニンの品質保証に向けた評価法構築に関する研究

研究課題名(英文) Research on construction of evaluation method for quality assurance of high-molecular-weight condensed tannins in natural materials

研究代表者

天倉 吉章 (Amakura, Yoshiaki)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：50321857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高分子量コンデンスドタンニンを含む天然素材として、ヘーゼルナッツ抽出物から、catechin又はepicatechinがprocyanidin Bタイプの結合様式で縮合する重量平均分子量約1万～11万(ポリスチレン標準品換算)の4画分を得ることができた。また、チョウトウコウ抽出物からは、procyanidin Bタイプで重量平均分子量約2万の1画分を得ることができた。このように、本研究では化学的特徴を示した重量平均分子量の異なる高分子量コンデンスドタンニン画分を分離することができた。本結果は、分子量の違いによる高分子量コンデンスドタンニンの生物活性や品質評価等の検討につながることを示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の生物活性を有することが明らか高分子量コンデンスドタンニンであるが、分離精製が困難なため、高分子量で構造不特定な化合物群としてしか扱えず、それ自体を具体的に分析することができない。本研究は未だ達成されていない高分子量コンデンスドタンニンを分離、特徴付けし、個々の天然物由来の高分子量コンデンスドタンニンを分析・活性評価できるようにすることを目指したもので、一括りにされていた高分子量コンデンスドタンニンを化合物のように扱うことを可能とすることで新たなタイプの医薬品開発につなげる。

研究成果の概要(英文)：As natural products containing high-molecular-weight condensed tannins, 4 fractions with weight-average molecular weights of approximately 10,000 to 110,000 (converted to polystyrene standard) of procyanidin B-type containing catechin and/or epicatechin were obtained from the hazelnut kernel extract. In addition, one fraction with a weight-average molecular weights of approximately 20,000 possessing procyanidin B-type was obtained from the Uncaria hook extract. In this way, high-molecular-weight condensed tannin fractions with different weight-average molecular weights that showed chemical characteristics were isolated and characterized in this study. These results suggest that the biological activity and quality evaluation of high-molecular-weight condensed tannins with differences in molecular weight may be investigated.

研究分野：生薬学，天然物化学，食品化学

キーワード：タンニン 天然物 品質評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然医薬品開発における研究において、種々の生物活性を指標にしたスクリーニングの結果、高分子量縮合型タンニン(コンデンスドタンニン)画分にたどりつくことを天然物研究者はしばしば経験する。生物活性を有することが明らかな高分子量コンデンスドタンニンであるが、構造が不特定で複雑なものが多いため、その精査は敬遠されることが多い。一方、天然物の品質確保にはその素材に特徴的な含有成分の解析や含有量の数値化が不可欠で、それゆえ、高分子量コンデンスドタンニンにおいてもその具体的な評価法の提案が待望される。

2. 研究の目的

本研究は、未だ確立されていない高分子量コンデンスドタンニンの具体的な分析評価法確立のための基礎検討を目的とする。具体的には、天然素材の高分子量コンデンスドタンニンをカラムクロマトグラフィーにより分離し、その純度評価をゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で検出するピークにより行う。¹³C-NMR等を測定し、GPCにより重量平均分子量を算出することで構造不特定な高分子量コンデンスドタンニンの化学特性を解析する。各試料から異なった分子量の化学的に特徴付けされた高分子量コンデンスドタンニン画分を得ることで、個々の天然物由来の高分子量コンデンスドタンニンを化合物のように分析・活性評価できるようにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1)抽出、分画

生薬、食品等の天然素材のうち、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による予備検討で高分子量コンデンスドタンニンの存在が示唆された素材(チョウトウコウ、ヒシノミ、ヘーゼルナッツ)について、それぞれ70%アセトンまたは80%メタノール(MeOH)で抽出物を調製し、次いでDiaion HP-20、Sephadex LH-20(LH-20)カラムクロマトグラフィーにより分離精製を試みた。得られた各画分はGPC及び¹³C-NMR等による分析及びフロログルシノール分解反応に供した。

(2)分析、構造解析

得られた高分子量コンデンスドタンニン画分のGPC分析結果に基づき、各素材の高分子量コンデンスドタンニン画分の重量平均分子量(ポリスチレン標準品換算)を算出した。また、タンニン画分の構成ユニットを解析するため、¹³C-NMR分析及びフロログルシノール分解反応を行い、得られた情報から、重量平均分子量以外の高分子量コンデンスドタンニンの部分構造に必要な情報について検討した。

(3)活性評価

得られた高分子量コンデンスドタンニン画分を用いた活性試験の例として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)ラジカル消去活性を評価した。評価には、DPPH Antioxidant Assay Kit(同人化学)を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) チョウトウコウ

チョウトウコウの 70%アセトン抽出物について、LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分画した結果、70%アセトン溶出部に HPLC で高分子量コンデンスドタンニンに特徴的なブロードなピークが観察された。本溶出部について GPC 分析した結果、重量平均分子量 21,541 (ポリスチレン標準品換算)のブロードなピークを得ることができた(図 1)。本溶出部について ^{13}C -NMR 測定及びフロログルシノール分解を行った結果、部分構造として catechin 及び epicatechin が procyanidin B タイプで縮合している高分子化合物であることが明らかになった(図 2)。

以上のように、チョウトウコウ抽出物からフラバン 3-オール骨格を基本とした主に catechin 又は epicatechin が procyanidin B タイプの結合様式で縮合している重量平均分子量約 2 万 (ポリスチレン標準品換算) の高分子量縮合型タンニン 1 画分を得ることができた。

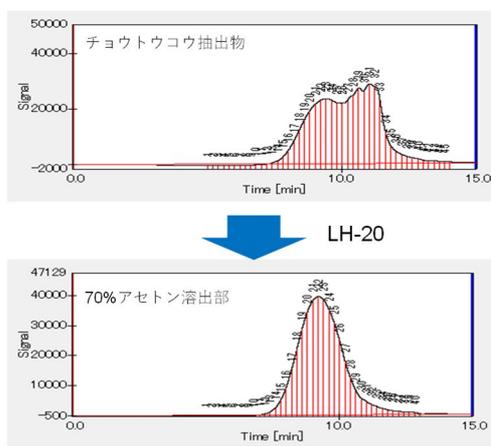


図 1

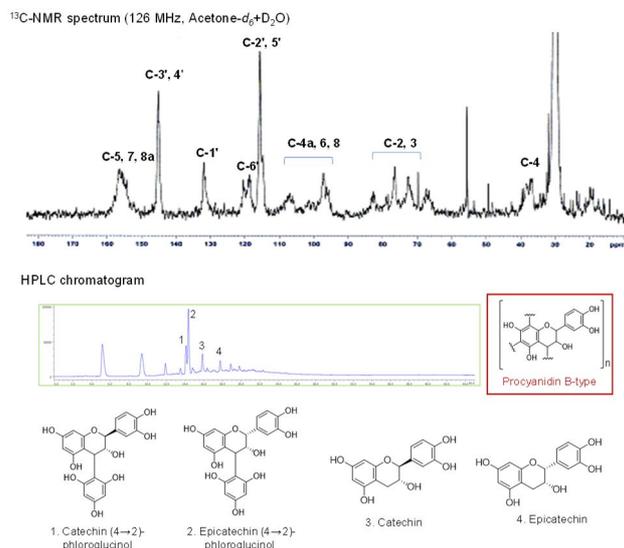


図 2

(2) ヒシノミ

ヒシノミの 70%アセトン抽出物について、LH-20 及び ODS カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返した結果、HPLC で認められたブロードピークは高分子量コンデンスドタンニンによるものではないことが示唆された。その高分子画分について成分精査した結果、cornusiiin A 等の加水分解性タンニンオリゴマーの存在が確認された。

(3) ヘーゼルナッツ

ヘーゼルナッツの 80%MeOH 抽出物について、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール(BuOH)で順次分配し、得られた *n*-BuOH エキス及び H_2O エキスについて Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。*n*-BuOH エキスの Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーの 50%MeOH 溶出部、 H_2O エキスの Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーの 40%MeOH 溶出部、50%MeOH 溶出部、MeOH 溶出部について LH-20 カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、分画物 a~d を得た。GPC 分析の結果、いずれも高分子領域に分布が見られるクロマトグラムを示し、重量平均分子量 a: 14,917, b: 28,124, c: 42,366, d: 113,274 (ポリスチレン標準品換算)の分子量の異なった高分子画分を得ることができた(図 3)。得られた分画物 a~d について ^{13}C -NMR を測定したところ、フラバン 3-オールが procyanidin B タイプで重合した縮合型タンニンに

特徴的なシグナルが分画物 a ~ d において共通して認められた(図 4). また, 部分構造を明らかにするためにフロログシノール分解を行った結果, catechin (4 2)-phloroglucinol, epicatechin (4 2)-phloroglucinol, catechin, epicatechin が分画物 a ~ d に共通して認められ, エクステンションユニット及びターミナルユニットとして catechin または epicatechin を

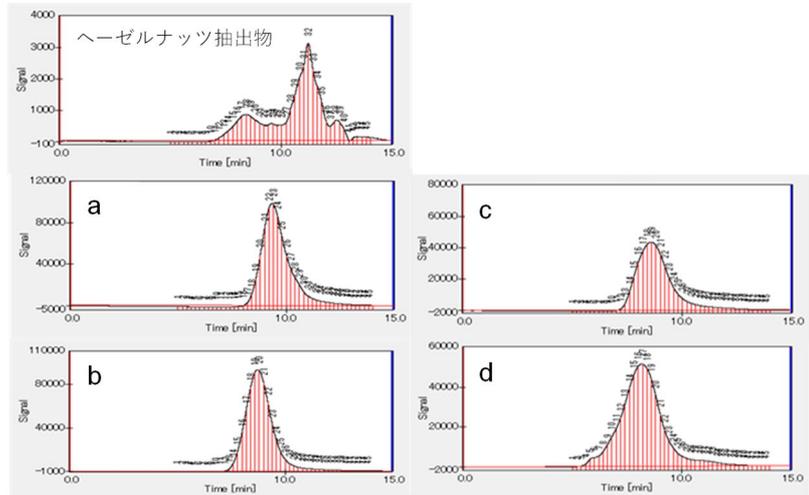


図 3

主に含むことが示唆された(図 5). このように, 一つの素材の中から, 分子量の異なる高分子量コンデンスタンニン 4 画分を得ることができた.

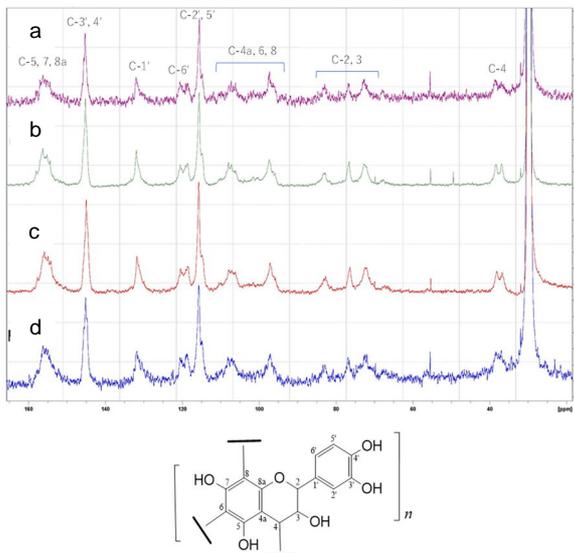


図 4

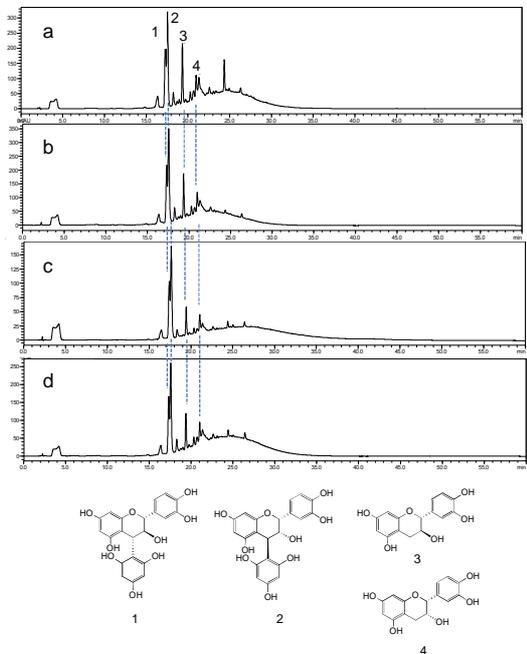


図 5

分子量の異なる 4 画分 a ~ d について, 活性評価として DPPH ラジカル消去活性を検討した. その結果, EC_{50} 値 a: 5.65, b: 5.54, c: 5.89, d: 6.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり, 化学的特性を示した高分子量コンデンスタンニン各画分について活性値を求めることができた.

以上のように, ヘーゼルナッツ抽出物からフラバン 3-オール骨格を基本とした主に catechin 又は epicatechin が procyanidin B タイプの結合様式で縮合している重量平均分子量約 1 万 ~ 11 万 (ポリスチレン標準品換算) の高分子量コンデンスタンニン 4 画分を得ることができた. 高分子量コンデンスタンニンについては, それを単離して評価することが確立されておらず, 化学的特性を示した標準品のような特徴づけは困難とされる. 今回, ヘーゼルナッツ抽出物から, 化学的特性を示した重量平均分子量の異なる高分子量コンデンスタンニン画分を分離できたことは, これまでできなかった天然素材中の分子量の違いによる高分子量コンデンスタンニンの活性評価等の検討につながることを示唆される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchikura Takashi, Kitano Tomoe, Yoshimura Morio, Amakura Yoshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of phenolic constituents in hazelnut kernels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbad043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部晟大, 内倉 崇, 好村守生, 天倉吉章
2. 発表標題 チョウトウコウのポリフェノール成分解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天倉吉章, 内倉 崇, 好村守生
2. 発表標題 ヘーゼルナッツの成分研究（第2報）
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天倉吉章, 内倉 崇, 好村守生
2. 発表標題 ヘーゼルナッツの成分研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------