

## 阿仙薬のポリフェノール性成分による品質評価

谷口抄子,<sup>a</sup> 黒田佳代,<sup>a</sup> 土居功一,<sup>b</sup> 稲田和敏,<sup>a</sup> 吉門直美,<sup>a</sup>  
米田裕治,<sup>b</sup> 田部昌弘,<sup>b</sup> 柴田 高,<sup>b</sup> 吉田隆志,<sup>a,c</sup> 波多野 力\*,<sup>a</sup>

## Evaluation of Gambir Quality Based on Quantitative Analysis of Polyphenolic Constituents

Shoko TANIGUCHI,<sup>a</sup> Kayo KURODA,<sup>a</sup> Kou-ichi DOI,<sup>b</sup> Kazutoshi INADA,<sup>a</sup>  
Naomi YOSHIKADO,<sup>a</sup> Yuji YONEDA,<sup>b</sup> Masahiro TANABE,<sup>b</sup> Takashi SHIBATA,<sup>b</sup>  
Takashi YOSHIDA,<sup>a,c</sup> and Tsutomu HATANO\*,<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama City 700-8530, Japan, <sup>b</sup>Taiko Pharmaceutical Co., Ltd., 3-34-14 Uchihonmachi, Suita City 564-0032, Japan, and <sup>c</sup>Present address, College of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, 4-2 Bunkyo-cho, Matsuyama City 790-8578, Japan

(Received April 3, 2007; Accepted May 7, 2007; Published online May 11, 2007)

Gambir (asen'yaku in Japanese), an aqueous extract of leaves and young twigs of *Uncaria gambir* Roxb., has traditionally been used as a treatment for diarrhea and dysentery as an internal medicine and for sore throat as a gargle. Although it is a pharmacopoeic medicine in Japan, the quantitative evaluation of its constituents has not yet been adopted in the Japanese pharmacopoeia. We analyzed polyphenolic constituents in 31 gambir and related products to establish evaluation methods, since gambir contains large amounts of polyphenolic constituents. The total flavan contents in the samples revealed using the vanillin-HCl estimation method ranged from 24–79%. Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) analysis indicated that catechin was the most abundant constituent in each sample, with contents in the range of 7–76%. The catechin contents in the gambir products between the first and third quartiles were 28–54%. Thus, the lower limit of the catechin content in gambir products can be set at around 20% for quality management. Fifteen tested samples were subjected to HPLC analysis to show the presence of epicatechin (1.5% on average) and the dimeric compounds procyanidin B1, procyanidin B3, and gambirinin A1 (ca. 1% each). The molecular weight distributions of polymeric flavans in the gambir products were analyzed by gel permeation chromatography (GPC) and showed that the average degree of polymerization for each sample was 3 to 7. These results indicate that the combination of the vanillin-HCl method, RP-HPLC analysis, and GPC analysis gives valuable information for evaluating the polyphenolic profiles of gambir products.

**Key words**—gambir; *Uncaria gambir*; catechin; polyphenol; quantitative analysis

## 緒 言

阿仙薬 gambir は *Uncaria gambir* Roxb. (アカネ科) の葉及び若枝から得た乾燥水製エキスであり、止瀉薬・整腸薬として用いられる。主成分として (+)-catechin (1) を含むほか,<sup>1)</sup> フラバン 2 量体関連物質<sup>2,3)</sup> 及びインドールアルカロイド類<sup>4)</sup> を含むことが知られる。

本生薬は日本薬局方 (局方) 収載生薬であり、局

方においては確認試験として、タンニン類のゼラチンとの定性的な沈殿反応、及び catechin 類のバニリン-塩酸試液での呈色反応が規定されている。<sup>5)</sup> その他灰分、酸不溶性灰分及びエキス含量も規定されている。<sup>5)</sup> しかし、多量含まれるポリフェノール又はタンニンに関する定量的規格は局方にはない。また、阿仙薬は葉及び小枝からのエキス調製時に加熱処理が行われることから、基原植物の産地による成分構成の差異のほかに、生産地における製法による成分のばらつきも大きいと考えられ、定量的規格の設定が必要と考えられる。実際、阿仙薬製品は色などの性状も様々である。

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, <sup>b</sup>大幸薬品㈱,  
<sup>c</sup>現住所: 松山大学薬学部

\*e-mail: hatano@pharm.okayama-u.ac.jp

阿仙薬は catechin 類を 20–40% 前後含有するとする報告もあるが,<sup>1)</sup> 現在の阿仙薬市場品に関するポリフェノール類の定量的な情報はほとんどない。そこで本研究では、国内流通品のほか、主な産地であるインドネシア各地の生産品、シンガポール及び中国市場品等入手し、これらの阿仙薬製品について、catechin を始めとしたポリフェノール成分の定量的な検討を以下のように行った。

まず、これまでに局方で定性的な試験として利用されているバニリン-塩酸反応を利用して総フラバン含有量を算出した。バニリン-塩酸反応は catechin 類の A 環とバニリンとの反応によるとされており、<sup>6)</sup> 縮合型タンニンを含む catechin 骨格を持った物質の定量に広く利用されている。

一方、筆者らは阿仙薬中の主成分であるポリフェノール成分の組成や含有量について検討を行っており、その結果、(+)-catechin (1), (+)-epicatechin (2) のほか、catechin 関連 2 量体類として procyanidin B1 (3), B3 (4), gambiriin A1 (5), A2, B1, B2, C を単離し、gambiriin A1 (5), A2, B1, B2 については構造訂正を行い報告している。<sup>7)</sup> 本研究ではこれらポリフェノールのうち、主成分の catechin のほか、比較的含有量の高い epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B3, 及び gambiriin A1 について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量を行った。

さらに、通常の HPLC 条件では分析できない高分子ポリフェノール成分については、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によって分子量分布を検討した。<sup>8)</sup> 阿仙薬の製造過程に関与すると考えられる加熱の影響については、先に (+)-catechin からの 2 量体形成について報告しているが、<sup>7)</sup> 今回は加熱処理による高分子化合物の生成についても解析を行った。

それらに加え、局方の規定である灰分、酸不溶性灰分、希エタノールエキス含量についても評価した。さらに、色調についても含有ポリフェノールとの関連を検討した。

## 材料と方法

1. 分析対象とした阿仙薬 Table 1 に示すように、国内の各社より購入した製品 13 点 (J01–J13)、インドネシア各地 (Bandung, Denpasar,

Table 1. Contents of Catechin and Total Flavans in Gambir Samples

Sample Number	Country	Catechin <sup>e,f)</sup> (g/g)	Total flavans <sup>e,g)</sup> (g/g)	Ratio of catechin /total flavans (C/F)
J01	Japan <sup>a)</sup>	0.39	0.58	0.67
J02	Japan <sup>a)</sup>	0.41	0.62	0.67
J03	Japan <sup>a)</sup>	0.26	0.41	0.64
J04	Japan <sup>a)</sup>	0.34	0.54	0.63
J05	Japan <sup>a)</sup>	0.43	0.51	0.84
J06	Japan <sup>a)</sup>	0.36	0.45	0.80
J07	Japan <sup>a)</sup>	0.07	0.24	0.30
J08	Japan <sup>a)</sup>	0.28	0.42	0.66
J09	Japan <sup>a)</sup>	0.26	0.48	0.54
J10	Japan <sup>a)</sup>	0.24	0.52	0.46
J11	Japan <sup>a)</sup>	0.29	0.51	0.57
J12	Japan <sup>a)</sup>	0.24	0.45	0.54
J13	Japan <sup>a)</sup>	0.54	0.64	0.85
I01	Indonesia <sup>b)</sup>	0.63	0.71	0.88
I02	Indonesia <sup>b)</sup>	0.26	0.37	0.69
I03	Indonesia <sup>b)</sup>	0.39	0.48	0.82
I04	Indonesia <sup>b)</sup>	0.66	0.72	0.92
I05	Indonesia <sup>b)</sup>	0.60	0.74	0.81
I06	Indonesia <sup>b)</sup>	0.76	0.79	0.96
I07	Indonesia <sup>b)</sup>	0.53	0.63	0.83
I08	Indonesia <sup>b)</sup>	0.54	0.68	0.79
I09	Indonesia <sup>b)</sup>	0.22	0.43	0.50
I10	Indonesia <sup>b)</sup>	0.54	0.67	0.80
I11	Indonesia <sup>b)</sup>	0.35	0.59	0.59
I12	Indonesia <sup>b)</sup>	0.44	0.56	0.80
I13	Indonesia <sup>b)</sup>	0.46	0.64	0.73
I14	Indonesia <sup>b)</sup>	0.62	0.68	0.90
I15	Indonesia <sup>b)</sup>	0.75	0.79	0.94
S01	Singapore	0.69	0.77	0.90
-----				
C01	China <sup>c)</sup>	0.25	0.67	0.37
C02	China <sup>c)</sup>	0.17	0.33	0.52
-----				
Average <sup>d)</sup>		0.43	0.57	0.73
Quartile (25%) <sup>d)</sup>		0.28	0.48	0.63
Median <sup>d)</sup>		0.41	0.58	0.79
Quartile (75%) <sup>d)</sup>		0.54	0.68	0.84

a) Purchased from five companies in Japan. b) Purchased or collected from Bandung, Denpasar, Padang, Salisian, Pasaman, Siguntur, Payakumbuh, or Singkep in Indonesia. c) Catechu samples were purchased from Hainan and Yunnan in China. Catechu (pegu-asen'yaku in Japanese), derived from *Acacia catechu* (Leguminosae), has been used in a manner similar to gambir products. d) Values were calculated based on the results from 29 gambir samples. e) Average from three experiments. f) Estimated based on the RP-HPLC method. g) Estimated based on the vanillin-HCl method.

Padang, Salisian, Pasaman, Siguntur, Payakumbuh, Singkep) で購入・収集した製品 15 点 (I01–I15)、及びシンガポール市場品 1 点 (S01) の合計 29 点を試料とした。また、中国産のベグ阿仙薬 (*Acacia*

catechu 由来)<sup>9)</sup>2 点 (C01, C02) についても合わせて検討した。

2. バニリン-塩酸法による総フラバンの定量<sup>10)</sup> 阿仙薬粉末 (1 mg) に水 (1 ml) を加えて溶かし 5 倍希釈して得た被検溶液 (0.5 ml) をアルミ箔で遮光した試験管に入れ, バニリンのメタノール溶液 (4%, 3 ml) 及び濃塩酸 (1.5 ml) を加えてよく混ぜ, 15 分間放置した後, 500 nm で吸光度を測定した。 (+)-Catechin についても同様の操作を行い, バニリン-塩酸陽性物質量を catechin 換算量として示した。各試料について 3 回同じ操作を繰り返し, 平均値を求めた。

3. HPLC による単量体及び 2 量体の定量 阿仙薬粉末の 50% MeOH 溶液 (1 mg/1 ml) について以下に示す条件で HPLC 分析を行い, 各標品との比較に基づいて含有量を算出した。分析条件: カラム, YMC-Pack ODS-A302 (4.6 mm × 150 mm, YMC); 流速, 1.0 ml/min; 検出波長, 280 nm; カラム温度, 40°C; 展開溶媒, 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-MeOH (2:2:1) (catechin の分析用), 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-MeCN (9:9:2) (epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B3, 及び gambirinin A1 の分析用)。各試料について 3 回同じ操作を繰り返し, 平均値を求めた。Catechin 及び epicatechin は Sigma 社から購入したもの, 及び別途阿仙薬から単離した化合物<sup>7)</sup>を標品として使用した。

4. GPC によるポリフェノール類の分析 各阿仙薬試料の *N,N*-dimethylformamide (DMF) (1 mg/1 ml) 溶液について, 以下の条件で GPC 分析を行った。分析条件: カラム, TSK-Gel Super AW3000 (6.0 mm × 150 mm, TOSOH); 流速, 0.5 ml/min; 検出波長, 280 nm; カラム温度, 40°C; 展開溶媒, DMF-3 M HCOONH<sub>4</sub> (199:1)。各試料について 3 回同じ操作を繰り返し, 平均値を求めた。

分子量マーカーとして (-)-epicatechin (MW 290.3) とその重合体である procyanidin B2 (MW 578.5), procyanidin C1 (MW 866.8), cinnamtannin A2 (MW 1155.0) を使用し, 数平均分子量  $M_n$ , 重量平均分子量  $M_w$  を算出した。<sup>11)</sup> これらの分子量用標品として使用した化合物は, 別途カカオから単離したものを使用した。<sup>12)</sup> また, フラバン単量体及び 2 量体以上に相当する部分のピーク面積について

catechin のピーク面積に基づき総フラバン含有量を求め, バニリン-塩酸法から求めた総フラバン含有量との比較を行った。

5. Catechin の加熱処理による分子量分布の変化 (+)-Catechin (10 mg) に水 (10 ml) を加え, オートクレーブ (120°C) で 0.5, 1, 2 及び 4 時間加熱を行った。また, 別途 (+)-catechin (1 g) を同様に処理し, それぞれの溶液を前述と同じ GPC 条件で分析を行った。

6. 灰分, 酸不溶性灰分, エキス量の定量 日本薬局方の生薬試験法<sup>5)</sup>に示されている方法で定量を行った。

7. 色調の測定 粉末とし 100 メッシュのフルイを通過した試料について Color Meter ZE2000 (NIPPON DENSHOKU) により,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  値を求めた。

## 結 果

1. 総フラバン含有量と Catechin 含有量 今回, 国内流通品 13 点, 及びインドネシア各地で入手した阿仙薬等 18 点, 計 31 検体について, バニリン-塩酸法で比色定量を行い, 総フラバン含有量を求めた (Table 1)。各試料における総フラバン含有量は, catechin 換算で 0.24 (J07)–0.79 g/g (I06, I15) までと幅広い分布を示した。これらの中では約 9 割の 28 検体が 0.4–0.8 g/g の範囲の値を示し, 他の 3 点はこれらより低い値を示した。また, 阿仙薬製品の四分位点の範囲 (25–75%) に入る検体は 0.48–0.68 g/g の値を示した。

次に主成分である catechin について HPLC 法での定量を行った結果, これについても 0.07 (J07)–0.76 g/g (I06) までの幅広い分布を示した。阿仙薬製品の四分位点の範囲 (25–75%) に入る検体は 0.28–0.54 g/g の値を示した。

総フラバン含有量と catechin 含有量のそれぞれについて 0.1 g/g 毎の区切りで示したヒストグラムは Fig. 1 のように表される。総フラバン含有量はヒストグラムで見ると 0.4–0.8 g の間に広がっているのに対し, catechin 含有量についてみると比較的 low 含量である 0.2–0.3 g/g の範囲に最も多い 9 個の試料があった。Catechin 含有量が比較的高い試料は, 加熱などによる変性や他の無機成分などの混入が少ないとみなされることから, 品質上問題がない

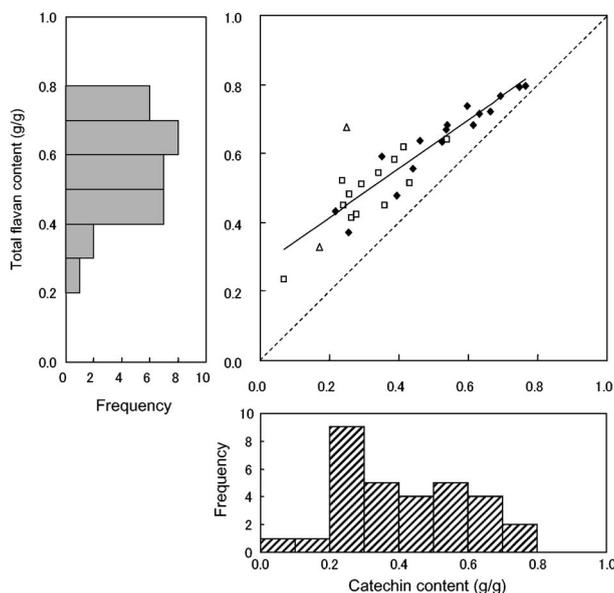


Fig. 1. Distribution of the Contents of Catechin and Total Flavans in Gambir and Related Products

Striped and gray bars in the histograms represent catechin and total flavan contents (g/g), respectively. The symbols in the correlation graph for the catechin and total flavan contents (g/g) indicate, open squares (□): purchased in Japan, closed diamonds (◆): purchased or collected in Indonesia and Singapore, and open triangles (△): catechu samples purchased from China. The solid line in the correlation graph is the regression line ( $r=0.90$ ). The dashed line in the correlation graph represents points where the ratio of the catechin and total flavan contents is 1 : 1.

と考えられ、阿仙薬の品質評価の基準としては、0.2 g/g 程度の catechin 含有量を下限とすることが適当であると考えられる。

Figure 1 の catechin 含有量と総フラバン含有量の相関を示すグラフ上の実線は両者の相関を示す回帰直線であり、これら 2 つの含有量の間には強い正の相関が認められた ( $r=0.90$ )。また破線は catechin 含有量と総フラバン含有量が等しい点を示し、この破線より上に離れるほど両者の比に大きな差があり、catechin 以外のバニリン-塩酸陽性物質を多い割合で含むことを示している。今回の分析結果によると、catechin 高含有量の試料では catechin 含有量と総フラバン含有量の比が 1 近くにあり、これに対し catechin 低含有量の試料は総フラバン含有量に対する catechin 含有量の割合が小さい傾向がみられた。今回分析を行った試料では、総フラバン含有量に対する catechin 含有量の比 (C/F) は平均で 0.7 程度であった (Table 1)。また、catechin 含有量及び総フラバン含有量ともに比較的高い値を示した試料は、インドネシア及びシンガポールで入手した製品 (Fig. 1, ◆) が多く、これに対し、国内市場品

(Fig. 1, □) は catechin 含有量及び総フラバン含有量が低いか、又は中程度のものが多くみられた。また中国産のペグ阿仙薬 (C01, C02, Fig. 1, △) はいずれも catechin 含有量が低かった。また総フラバン含有量に対する catechin 含有量の比 (C/F) が 0.5 以下の値を示したのは J07, J10, I09, C01 であった (Table 1)。その中で J10 はヤニテと呼ばれる暗褐色の阿仙薬であり、ヤニテはヌカテ (伝統的に製造した阿仙薬) を水とともに鍋に入れて炊いたものであるとされており、この製造過程で主成分の catechin が変化、減少し、結果としてバニリン-塩酸陽性物質の相対的な割合が増加したと考えられる。

**2. Catechin 関連単量体及び 2 量体の定量** 次に阿仙薬から単離した定量可能な catechin 関連の単量体及び 2 量体のうち比較的含有量が高い化合物について 15 試料の分析を行った。すなわち単量体の epicatechin (2)、2 量体の procyanidin B1 (3)、procyanidin B3 (4) および gambiriin A1 (5) (Fig. 2) について逆相 HPLC による定量を行った。その結果、平均値として epicatechin については 15 mg/g、procyanidin B1、procyanidin B3 及び gambiriin A1 についてはそれぞれ 10 mg/g、7 mg/g、及び 9 mg/g の含有量であったが、試料によってかなりの差があった (Table 2)。化合物 2-5 の含有量がいずれも低く検出されない J07 を除くと、epicatechin は 1.4-46.3 mg/g、procyanidin B1 は 2.9-19.5 mg/g、procyanidin B3 は 1.3-12.4 mg/g、及び gambiriin A1 は 3.0-19.9 mg/g の値を示した。J07 については後述のようにポリマーの相対的含量が多いことから、加熱による反応が進行した試料と思われる。

今回定量を行った比較的含有量の高いポリフェノール成分のうち、(+)-epicatechin 及び gambiriin A1 については (+)-catechin の熱処理により形成されることを認めている。<sup>7)</sup> そこで主成分の catechin 含有量と catechin から変化して生じたとみなされる成分 epicatechin 及び gambiriin A1 の含有量に相関があるかを検討した。Catechin 含有量の高い試料は他のポリフェノール含有量も高い可能性があると考えられたが、主成分の catechin と epicatechin (Fig. 3 (A),  $r=0.03$ )、catechin と gambiriin A1 ( $r=0.33$ ) との間には相関が認められなかった。これに対し、epicatechin 含有量と gambiriin A1 含有

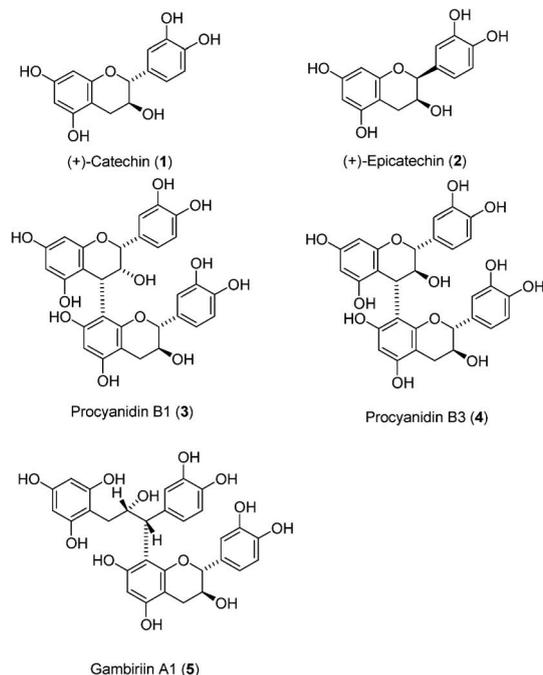


Fig. 2. Structures of (+)-Catechin (1), (+)-Epicatechin (2), Procyanidin B1 (3), Procyanidin B3 (4), and Gambiriin A1 (5)

Compounds 1–5 were isolated from gambir, and 2 and 5 were also obtained upon heating of an aqueous solution of catechin.<sup>7)</sup>

Table 2. Contents of Epicatechin, Procyanidin B1, Procyanidin B3, and Gambiriin A1 in Gambir Samples

Number	Epicatechin <sup>a,b)</sup> (mg/g)	Procyanidin B1 <sup>a,b)</sup> (mg/g)	Procyanidin B3 <sup>a,b)</sup> (mg/g)	Gambiriin A1 <sup>a,b)</sup> (mg/g)
J01	41.9	16.8	11.2	15.5
J04	11.3	6.4	6.0	4.9
J06	10.1	7.3	4.5	6.7
J07	0.0	0.0	0.0	0.0
J09	31.6	12.0	9.1	13.4
J10	15.3	8.4	6.6	8.3
J12	13.4	5.5	6.9	5.6
J13	46.3	19.5	12.4	19.9
I02	1.4	2.9	1.3	3.0
I03	2.8	7.8	6.9	3.5
I05	1.6	11.4	6.1	11.4
I06	5.0	8.6	4.0	6.9
I10	9.8	12.6	11.3	6.8
I11	23.9	12.8	9.7	18.5
I13	4.9	9.8	3.7	9.7
Average	14.6	9.5	6.6	8.9

<sup>a)</sup> Average from three experiments. <sup>b)</sup> Estimated based on the RP-HPLC method.

量の間には正の相関 ( $r=0.82$ ) が認められた (Fig. 3 (B)). この結果は, epicatechin 及び gambiriin A1 は catechin の熱処理によって生じることとよい対

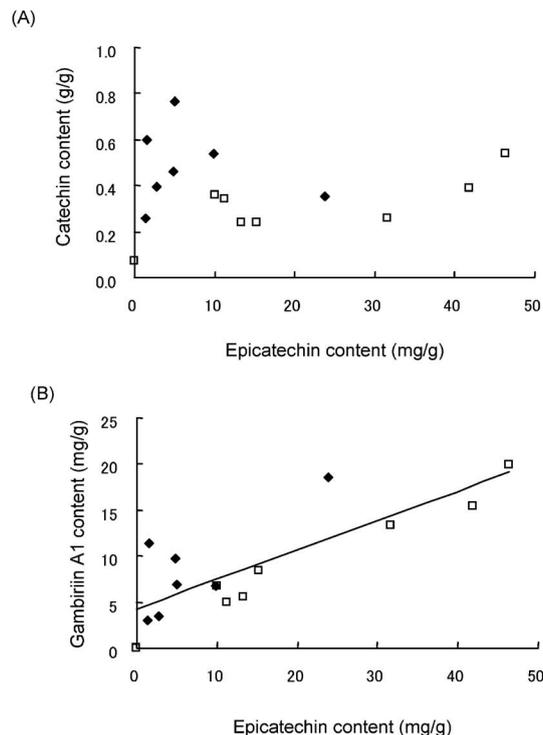


Fig. 3. Correlation between the Contents of Polyphenolic Constituents in Gambir Samples

The symbols in the graphs indicate, open squares (□): purchased in Japan; closed diamonds (◆): purchased or collected in Indonesia. (A) Correlation of epicatechin (mg/g) and catechin (g/g) contents. (B) Correlation of epicatechin and gambiriin A1 contents (mg/g). The solid line in the graph (B) is the regression line ( $r=0.82$ ).

応を示していると考えられる。

**3. GPC によるポリフェノール類の分析** さらに阿仙葉中のポリフェノール成分の高分子成分も含めた全体像を確認するため, GPC による分析を行った. GPC は TSK-gel Super AW3000 カラムを用い DMF を主溶媒として分析することによって, 試料の誘導体化などの処理を経ることなくポリマー成分を含めた分析が可能であった.<sup>11)</sup> この分析条件において, 単量体成分 (M) 及び 2 量体以上の成分 (P) についてクロマトグラムの形状に基づいて分離し評価を行った.

その結果, 各クロマトグラムは単量体とポリマーの含有量や組成, ポリマーの重合度を反映し, その形状に大きな差が認められた. 今回分析を行った試料の中で典型的なクロマトグラム 3 種を Fig. 4 に示す. Table 1 に示した各試料中 catechin 含有量及び総フラバン含有量ともに低い試料 J07 は, 単量体の比が小さくポリマーの比率の高いクロマトグラムを示した (Fig. 4 (A)). また, catechin 含有量及び

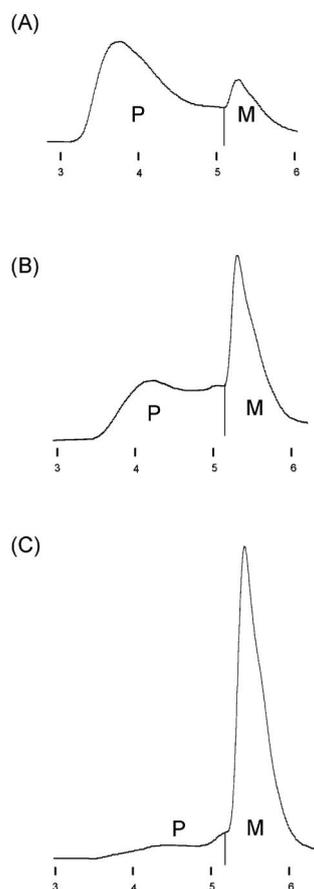


Fig. 4. GPC Profiles of Extracts of the Gambir Products J07 (A), J04 (B), and I06 (C)

M and P represent monomer and polymer (including oligomer), respectively.

総フラバン含有量ともに高い試料 I06 は、ポリマーの比率が小さく、ほとんどが単量体のクロマトグラムを示した (Fig. 4(C)). またその中間の含有量の試料 J04 はクロマトグラムも両者の中間の形状であった (Fig. 4(B)).

これらのクロマトグラムに基づきその分子量分布について数平均分子量  $M_n$ 、重量平均分子量  $M_w$  を算出した。単量体部分の寄与を含めて算出した数平均分子量を  $M_n(M+P)$ 、重量平均分子量を  $M_w(M+P)$ 、2 量体以上の部分のクロマトグラムに基づく数平均分子量を  $M_n(P)$ 、重量平均分子量を  $M_w(P)$  で示し、さらに  $M_n(P)$  に基づき catechin のポリマーとしての平均重合度 DP を算出した (Table 3).

その結果、ポリマー成分の平均重合度は 3 から 7 程度であることが示された。また、catechin 含有量の低い試料は、重量平均分子量  $M_w(M+P)$  が大きい傾向が認められた (Fig. 5 (A)). この結果は catechin からポリマー成分が生成していることを示

Table 3. Molecular Weight Data for Gambir Samples based on GPC Profiles

Number	$M_n(M+P)^{a,b}$	$M_w(M+P)^{a,c}$	$M_n(P)^{a,d}$	$M_w(P)^{a,e}$	DP <sup>f</sup>
J01	$3.8 \times 10^2$	$7.4 \times 10^2$	$9.8 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	3.4
J04	$4.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	4.4
J06	$5.1 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	4.7
J07	$9.7 \times 10^2$	$3.1 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$3.7 \times 10^3$	6.8
J09	$4.2 \times 10^2$	$9.1 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	3.6
J10	$5.2 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	4.0
J12	$5.8 \times 10^2$	$1.7 \times 10^3$	$1.4 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	4.7
J13	$3.9 \times 10^2$	$7.6 \times 10^2$	$9.7 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	3.3
I02	$3.7 \times 10^2$	$7.5 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	3.6
I03	$3.4 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$	$9.9 \times 10^2$	$1.5 \times 10^3$	3.4
I05	$3.5 \times 10^2$	$7.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$	3.8
I06	$3.2 \times 10^2$	$5.3 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	3.7
I10	$3.6 \times 10^2$	$7.5 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	3.7
I11	$3.9 \times 10^2$	$7.1 \times 10^2$	$9.2 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	3.2
I13	$3.7 \times 10^2$	$9.8 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	4.5
Average	$4.5 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	4.1

a) Average from three experiments. b) Number average molecular weight calculated for monomers and polymers. c) Weight average molecular weight calculated for monomers and polymers. d) Number average molecular weight calculated for polymers. e) Weight average molecular weight calculated for polymers. f) The degree of polymerization, calculated from the  $M_n(P)$ , is expressed based on the molecular weight of catechin.

唆している。

そこでさらに、catechin 以外のフラバン成分が総フラバンに占める割合 [(F-C)/F] と GPC の結果から算出した  $M_w(M+P)$  との相関を検討したところ、正の相関 ( $r=0.75$ ) が認められた (Fig. 5 (B)). したがって catechin 以外のポリフェノール成分は主として 2 量体以上のポリマーからなり、catechin の減少に伴ってポリマーが増加し、その結果  $M_w(M+P)$  が増加したと考えられる。しかし (F-C)/F と  $M_w(P)$  との間では弱い相関 ( $r=0.53$ ) を示すに留まり (Fig. 5 (C)), catechin の減少はポリマー部分の分子量の増大には直接つながらないようである。

さらに、GPC の面積から求めた catechin 換算の総フラバン含有量と、先のバニリン-塩酸法より求めた総フラバン含有量をプロットした。全体に GPC の面積から求めたフラバン含有量の方が大きな値を示し、2 検体 (I02, I03) を除き 0.65–0.82 g/g の比較的狭い範囲に分布がみられた (Fig. 6). これは、高分子成分がバニリン-塩酸法では低く見積もられていることを示している。すなわち、バニリ

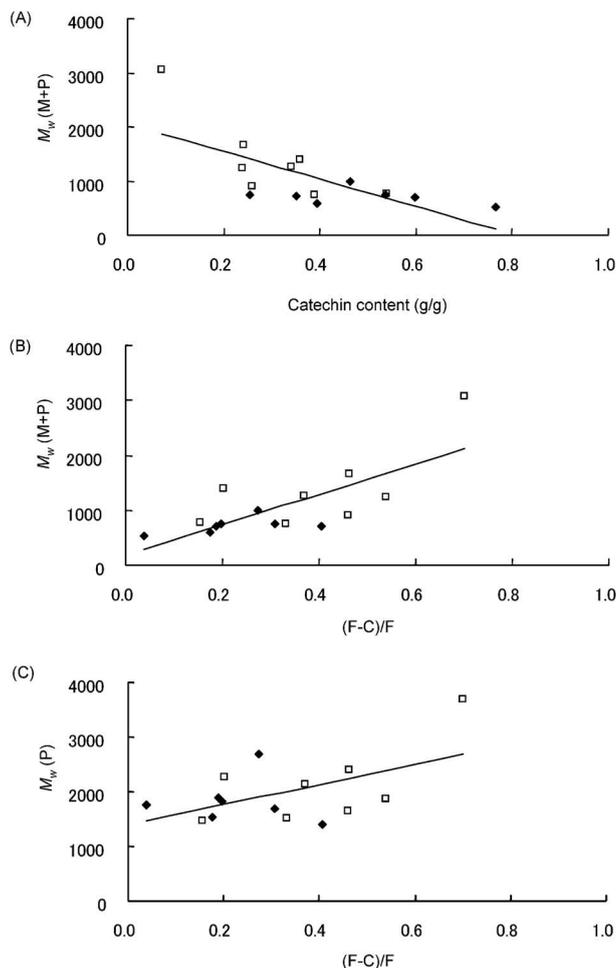


Fig. 5. Correlations of Total Flavan and Catechin Contents to Molecular Weight

$M_w(M+P)$  represents the weight average molecular weight calculated for monomers and polymers.  $M_w(P)$  indicates the weight average molecular weight calculated for polymers. F and C are the total flavan and catechin contents (g/g), respectively. The symbols in the graphs indicate, open squares ( $\square$ ): purchased in Japan, closed diamonds ( $\blacklozenge$ ): purchased or collected in Indonesia. (A) Correlation of catechin (g/g) contents and  $M_w(M+P)$  values. The solid line in the graph (A) is the regression line ( $r=0.69$ ). (B) Correlation of (F-C)/F and  $M_w(M+P)$  values. The solid line in the graph (B) is the regression line ( $r=0.75$ ). (C) Correlation of (F-C)/F and  $M_w(P)$  values. The solid line in the graph (C) is the regression line ( $r=0.53$ ).

ン-塩酸法による発色の程度は、A 環周辺の化学構造や重合度に依存すると考えられるが、この方法は、ポリマーの場合も含めてその A 環に対する結合性が一様であることを前提とした評価であり、この点に問題があると考えられる。したがって以上のように、GPC のクロマトグラムに基づいて得られる高分子成分に関する情報をバニリン-塩酸法や HPLC から得られる情報と合わせて検討することによって、阿仙薬のポリフェノール成分全体の評価が可能であると考えられる。

#### 4. Catechin の加熱処理による変化 先の

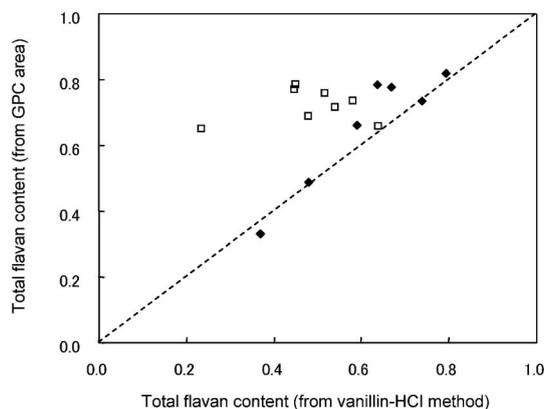


Fig. 6. Correlation of Total Flavan Contents Based on the Vanillin-HCl Method and GPC Analysis.

The dashed line in the graph represents points with 1 : 1 ratios of flavan contents estimated using the vanillin-HCl method or the area calculated by GPC analysis. The symbols in the graphs indicate, open squares ( $\square$ ): purchased in Japan, closed diamonds ( $\blacklozenge$ ): purchased and collected in Indonesia.

GPC 分析により、試料によっては、比較的多量の高分子成分が存在することが示された。先にわれわれは、(+)-catechin のオートクレーブ処理による加熱変化産物について阿仙薬製品と共通の成分の存在を認めており、<sup>7)</sup> オートクレーブ処理が阿仙薬製造時の加熱処理のモデルとして利用できると考えられる。これらポリマー類も 2 量体類と同様、阿仙薬主成分の (+)-catechin から加熱処理の過程で生成する可能性があることから、(+)-catechin の加熱によって実際に高分子成分が生成するか否か、また処理時間の延長によって高分子成分の生成量が増加するかについて、検討を加えた。すなわち、濃度の異なる 2 種の (+)-catechin 水溶液 (10 mg/10 ml, 1 g/10 ml) について、0.5, 1, 2 及び 4 時間オートクレーブ処理後、GPC 分析を行った。その結果、加熱時間とともに、試料の平均分子量  $M_w(M+P)$ 、 $M_w(P)$  のいずれも増加する傾向が認められた (Table 4, Fig. 7)。特に薄い溶液 (10 mg/10 ml) のとき、4 時間後に顕著な分子量の増加が認められた。実際の阿仙薬調製時には、酸化的な重合や共存金属イオンなどの反応が起こっていると考えられるが、このようなオートクレーブ加熱の条件下においてもこれらポリマー類は 2 量体類と同様 (+)-catechin の加熱処理により生成すること、及び加熱時間の延長によってその分子量が増加することが示された。

#### 5. 灰分及びエキス量 局方においては、阿仙

Table 4. Change in Molecular Weight upon Heating of Aqueous Solutions of Catechin

Concentration	h	$M_n$ (M+P) <sup>a,b</sup>	$M_w$ (M+P) <sup>a,c</sup>	$M_n$ (P) <sup>a,d</sup>	$M_w$ (P) <sup>a,e</sup>
1 g/10 ml	0.0	$3.0 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$6.4 \times 10^2$	$6.4 \times 10^2$
	0.5	$3.3 \times 10^2$	$3.9 \times 10^2$	$7.4 \times 10^2$	$8.7 \times 10^2$
	1.0	$3.4 \times 10^2$	$4.4 \times 10^2$	$7.6 \times 10^2$	$9.5 \times 10^2$
	2.0	$3.7 \times 10^2$	$5.2 \times 10^2$	$7.9 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$
	4.0	$4.0 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$	$8.3 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$
10 mg/10 ml	0.0	$3.0 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$6.4 \times 10^2$	$6.4 \times 10^2$
	0.5	$3.3 \times 10^2$	$4.4 \times 10^2$	$9.9 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$
	1.0	$3.4 \times 10^2$	$5.6 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$
	2.0	$3.7 \times 10^2$	$7.1 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$
	4.0	$4.5 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$

a) Average from three experiments. b) Number average molecular weight calculated for monomers and polymers. c) Weight average molecular weight calculated for monomers and polymers. d) Number average molecular weight calculated for polymers. e) Weight average molecular weight calculated for polymers.

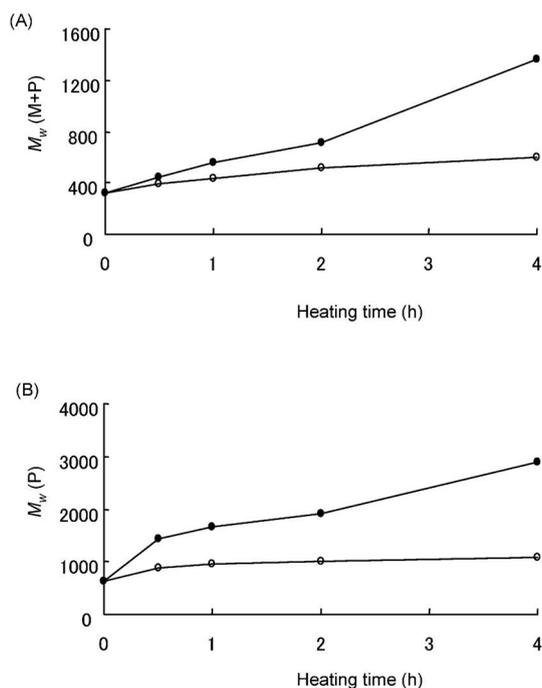


Fig. 7. Changes in Molecular Weight upon Heating of Aqueous Solutions of Catechin

$M_w(M+P)$  represents the weight average molecular weight calculated for monomers and polymers.  $M_w(P)$  is the weight average molecular weight calculated for polymers. The symbols in the graphs indicate, closed circles (●): concentration of 10 mg/10 ml, open circles (○): concentration of 1 g/10 ml. (A) Correlation of heating time (h) and  $M_w(M+P)$  values. (B) Correlation of heating time (h) and  $M_w(P)$  values.

薬について、灰分 6.0% 以下、酸不溶性灰分 1.5% 以下、希エタノールエキス含量 70.0% 以上であることが規定されている。<sup>5)</sup> そこで本研究で使用した阿仙薬試料のうち Table 5 に示す 11 検体について

Table 5. Ash Contents, Acid Insoluble Ash Contents, and Amounts of 50% Aqueous Ethanol Extracts Based on Methods according to the Japanese Pharmacopoeia (JP)<sup>5)</sup>

Number	Ash (%)	Acid insoluble ash (%)	Extract (%)
J02	4.2	0.2	93.9
J03	4.9	0.1	91.1
J04	3.8	0.2	93.7
J09	3.8	0.2	94.0
I01	2.4	0.2	88.8
I02	13.5 <sup>b)</sup>	6.6 <sup>c)</sup>	48.7 <sup>d)</sup>
I03	33.1 <sup>b)</sup>	19.9 <sup>c)</sup>	54.2 <sup>d)</sup>
I04	3.2	0.3	89.8
I05	3.0	0.2	91.3
C01 <sup>a)</sup>	4.2	0.2	90.8
C02 <sup>a)</sup>	3.0	0.0	70.4

a) Catechu samples. b) Above the upper limit (6.0%) of the regulation in the JP. c) Above the upper limit (1.5%) of the regulation in the JP. d) Below the lower limit (70.0%) of the regulation in the JP.

局方で規定されている試験法<sup>5)</sup>に従ってこれら 3 項目の定量を行い、どの程度が局方に適合しているのかを検討した。

その結果、9 検体についてはこの 3 項目の定量値は局方の規定に適合したが、2 検体 (I02, I03) は、高い灰分及び酸不溶性灰分を示し、エキス含有量も低く、これらいずれの値についても局方の規定からはずれる結果となった。阿仙薬には多少粘土を含むことがあるといわれており、<sup>13)</sup>この 2 検体は土砂・粘土の混入によりエキス含量が低くなっている可能性が示唆された。この 3 項目が規定内であり、ペグ阿仙薬を除く局方に適合する試料は、それぞれ灰分 2-5%、酸不溶性灰分 0.1-0.3%、エキス量 89-94% の範囲の値を示した。

**6. 阿仙薬の色調** 生薬の色調は、生薬の品質の評価の中で重要なものとされており、これまで、色彩計を利用して人参、大黄、茯苓、センソ等における色調と含有成分の相関について一連の研究が行われている。<sup>14-17)</sup> 阿仙薬製品の場合、色は明るい淡褐色のものからほとんど黒に近いものまで様々である。そこで、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  表色系による粉末の表面色の測定を行った。 $L^*$  が大きいほど明るく、 $a^*$  は + 側が赤、- 側が緑、 $b^*$  は + 側が黄、- 側が青を表し、それぞれ絶対値が大きいほど色が濃いことを示すとされている。<sup>14)</sup> 一般に catechin 類は酸化によって褐色を呈することから、加熱時間の増加や高分子成分の増加に伴い、阿仙薬の色調が変化する可

能性があると考え、ポリフェノール成分含有量と色調との相関についても検討した (Table 6, Fig. 8).

その結果、今回測定した 17 検体はいずれも、 $a^*$ 、 $b^*$  の値は + を示した。国内市場品 (Fig. 8, □) は幅広い色調を示し、相対的にインドネシアで入手した試料 (Fig. 8, ◆) は、国内市場品に比べ明るく黄味が強く、また、中国産のペグ阿仙薬 (Fig 8, △) は、今回分析した試料の中では暗い色調を示した。

次にポリフェノール成分含有量と色調との相関についてみると、catechin 含有量及びバニリン-塩酸陽性物質に基づく総フラバン含有量と  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  の値の間には、明瞭な相関は認められなかった。一方、catechin 含有量と総フラバン含有量の比 (C/F) と  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  の値をプロットしたところ、 $L^*$  及び  $b^*$  の値との間に弱い相関が認められた ( $L^*$ ,  $r=0.58$ ;  $b^*$ ,  $r=0.62$ )。総フラバン中の catechin 含有量の比が低いとき、すなわち、catechin 含有量が少なくポリマー含有量が高いときに試料の色調は暗く、黄色味が薄い傾向を示した。すなわち、加熱時間の増加や高分子成分の増加に伴い、阿仙薬の色調が暗い方向に変化している傾向が認められた。

Table 6. Estimation of the Color of Gambir Product Powders by the  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  Values

Number	$L^{*b)}$	$a^{*c)}$	$b^{*d)}$
J02	52.7	7.1	18.0
J03	33.0	10.4	12.0
J04	45.0	8.7	14.2
J05	41.4	11.2	15.2
J06	36.2	10.3	12.5
J07	32.5	11.5	12.1
J08	34.2	10.6	12.4
J09	51.3	9.9	18.5
I01	52.4	12.7	20.7
I02	60.3	7.8	19.9
I03	70.1	5.7	20.6
I04	42.7	10.1	19.9
I05	45.0	6.6	17.0
I06	64.8	8.2	19.9
I09	45.5	12.4	19.0
C01 <sup>a)</sup>	20.5	7.2	6.1
C02 <sup>a)</sup>	29.0	10.0	11.4

a) Catechu samples. b)  $L^*$  indicates the hue from dark to light using numerical values from 0 to 100. c)  $+a^*$  indicates a red hue. d)  $+b^*$  indicates a yellow hue.

## 結 論

阿仙薬の品質評価方法と規格の確立のために、31 試料について、バニリン-塩酸法による総フラバンの含有量の定量及び HPLC による catechin 含有量の定量を行った。その結果、catechin 含有量とバニリン-塩酸法による総フラバンの含有量には正の相関が認められた。また catechin の含有量については 7-76% の範囲に分布がみられた。今回検討した結果からみると、現在入手可能な阿仙薬試料の catechin 含有量の基準として 20% 程度を下限とすればよいことになる。また、阿仙薬の成分として単離した catechin 関連の単量体 epicatechin 及び 2 量体類 procyanidin B1, procyanidin B3, gambirinin A1 について定量を行ったところ、それぞれ平均で約 1% 程度の存在が認められたが、これらの含有量が低

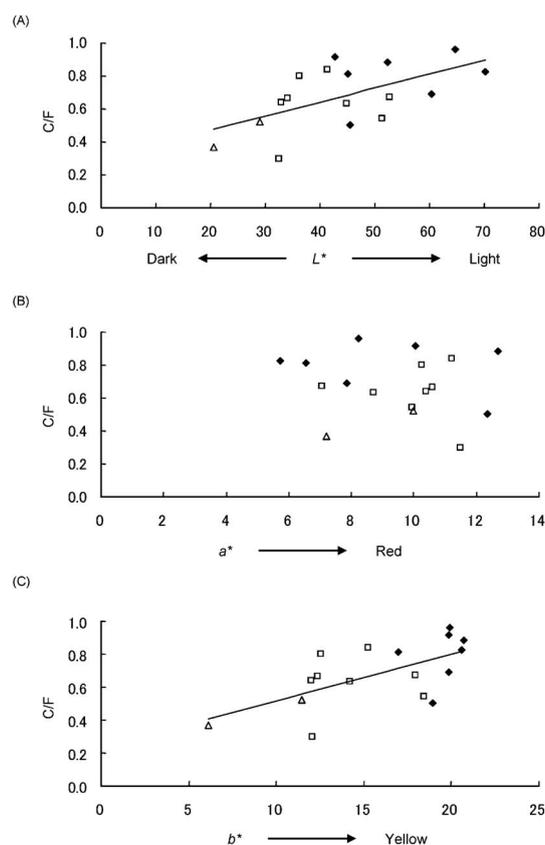


Fig. 8. Correlation between Polyphenolic Contents and Color Values in the  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  System

F and C are the total flavan and catechin contents (g/g), respectively. The symbols in the graphs indicate, open squares (□): purchased in Japan, closed diamonds (◆): purchased and collected in Indonesia, open triangles (△): catechu samples purchased from China. (A) Correlation of  $L^*$  and C/F values. The solid line in the graph (A) is the regression line ( $r=0.58$ ). (B) Correlation of the  $a^*$  and C/F values. (C) Correlation of the  $b^*$  and C/F values. The solid line in the graph (C) is the regression line ( $r=0.62$ ).

く、全く検出されない検体 (J07) もあった。

また、GPCにより分子量分布の分析を行ったところ、catechin含有量の低い試料は、分子量分布が高い傾向を認めた。また、GPCの結果との比較から、バニリン-塩酸法では高分子成分含有量が低く見積もられている傾向がみられ、阿仙薬の品質を評価する際に、クロマトグラムの形状も含め、高分子成分に関する情報も必要であることが示された。さらに阿仙薬調製時に加熱処理の工程が含まれることから、主成分の (+)-catechinの加熱実験を行ったところ、2量体を含む高分子成分が加熱に伴い増加することが示された。

一方、局方の規定である、灰分、酸不溶性灰分、エキス含有量のうち、灰分については、今回分析した試料の中で局方の規定からはずれた検体はエキス分も少なく、このような規格も品質管理上必要と思われる。また、阿仙薬の色調 (明るさと黄色味) と catechin 含有量及びバニリン-塩酸陽性物質含有量の比との間には弱い相関が認められた。

以上のように、阿仙薬の含有成分に関する品質評価には、バニリン-塩酸法による総フラバン含有量の定量及び HPLC による catechin 含有量の定量とともに、GPC 分析を組み合わせた評価が有用であることが明らかとなった。

#### REFERENCES

- 1) Kimura K., Satomi Y., Kuwano S., *Yakugaku Zasshi*, **78**, 325-329 (1958).
- 2) Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3145-3149 (1980).
- 3) Eisai Co., Japan, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 57054181, 7 (1982).
- 4) Chan K. C., *Tetrahedron Lett.*, 3403-3406 (1968).
- 5) "The Japanese Pharmacopoeia 15th edition," Ministry of Health, Labour and Welfare, 2006.
- 6) Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N., *Anim. Feed Sci. Technol.*, **91**, 21-40 (2001).
- 7) Taniguchi S., Kuroda K., Doi K., Tanabe M., Shibata T., Yoshida T., Hatano T., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 268-272 (2007).
- 8) Bae Y. S., Foo L.Y., Karchesy J. J., *Holzfor-schung*, **48**, 4-6 (1994).
- 9) Uchibayashi M., *Yakushigaku Zasshi*, **37**, 100-103 (2002).
- 10) Broadhurst R. B., Jones W. T., *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 788-794 (1978).
- 11) Kusuda M., Inada K., Ogawa T., Yoshida T., Shiota S., Tsuchiya T., Hatano T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1423-1431 (2006).
- 12) Hatano T., Miyatake H., Natsume M., Osakabe N., Takizawa T., Ito H., Yoshida T., *Phytochemistry*, **59**, 749-758 (2002).
- 13) Shimizu T., "Yakkyoku no Kampo (Oriental Medicine in Pharmacy)," 4th ed. Nanzando, Tokyo, 1970, p. 72.
- 14) Mikage M., Takeda A., Tsuda Y., *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 1-8 (1992).
- 15) Kondo S., Mikage M., Takano A., Tsuda Y., *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 174-178 (1992).
- 16) Tai T., Mikage M., Tsuda Y., Akahori A., *Nat. Med.*, **48**, 219-222 (1994).
- 17) Kawahara K., Togashi M., Konishi H., Tsujimoto M., Mikage M., *Nat. Med.*, **53**, 242-248 (1999).