

HPLCによる藍のトリプタントリンおよびインジゴの同時定量

Simultaneous Determination of Tryptanthrin and Indigo in *Polygonum tinctorium* by High-Performance Liquid Chromatography

中西謙二*, 宮崎絵梨*, 武知博憲**, 村井恒治***
Kenji Nakanishi, Eri Miyazaki, Hironori Takechi and Kouji Murai

抄 録

藍に含まれるトリプタントリンとインジゴの簡便迅速な同時定量法について検討した。抽出溶媒としてはジメチルスルホキシドが最も適していた。HPLC条件は、ODSカラムを用いたイソクラティック溶出法により8分以内に両成分を分離溶出し、同時定量することが可能であった。確立した分析方法を用い11品種の藍について分析した結果、品種間でトリプタントリンは2倍以上、インジゴも2倍近い差があることが明らかになった。また、トリプタントリンとインジゴ含量の間には高い正の相関があった。両成分とも大千本の含量が最も多かった。

1 はじめに

藍のインジゴは染色原料として古くから利用されており、国内で商業的に利用される藍の大半を生産している徳島県では、小上粉が主力品種として栽培されている。しかし、小上粉は匍匐性のため栽培や収穫に労力を要するという欠点があるが、品種改良については進んでおらず、品種とインジゴ含量の関係についても明らかにされていない。

一方、近年藍に含まれるインジゴ以外の有用成分に関する研究も行われているが、そのなかでもトリプタントリンについては抗菌作用¹⁾²⁾、抗アレルギー作用³⁾、発癌抑制作用⁴⁾等様々な生理活性を有することが報告されている。このトリプタントリンの定量についてはOberthur Cら⁵⁾、Danz H.ら⁶⁾、トリプタントリンとインジゴの同時定量についてはBing-Chung Liaoら⁷⁾の報告があるが、いずれも高価なLC-MS装置を必要としている。著者らはHPLCによるトリプタントリンとインジゴの簡便な同時定量法について検討し、藍の品種改良および用途拡大に資する目的で、品種別の含量を明らかにしたので報告する。

2 実験方法

2・1 分析試料

試料は、徳島県立農林水産総合技術支援センター

農業研究所の圃場で2007年に栽培された藍11品種（小上粉白花、小上粉赤花、赤茎小千本、宮城、松江、広島神辺、大千本、千本、紺葉、那賀椿、百貫）を用いた。藍は7月18日に刈り取り（1番刈り）後、2日間天日乾燥したものを分析試料とした。

2・2 試料の調製

乾燥藍の葉をLabo Milser LM-PLUS（大阪ケミカル(株)）で粉碎し、抽出用試料とした。粉碎試料0.5gに抽出溶媒を適量加えてホモジナイズ後、3000rpm、5分間遠心分離を行い、得られた上清をメスフラスコに採取した。さらに残渣に溶媒を加え、ホモジナイズ、遠心分離を数回繰り返して上清を採取し、100mlに定容した。抽出溶媒としては50%エタノール、メタノール、アセトン、ジクロロメタン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド(DMF)の7種類の溶媒について検討した。

2・3 装置および分析条件

装置はWaters製HPLCシステムを用い、つぎの条件で分析を行った。

カラム：μボンダスフェアー 5μmC18 3.9×150mm

移動相：60%アセトニトリル

流速：0.5 ml/min

温度：40℃

検出波長：250nm

標準試薬のトリプタントリンとインジゴは、和光純薬工業(株)製を用いた。

*食品技術課, **企画情報課, ***徳島県立農林水産総合技術支援センター農業研究所

3 結果および考察

3・1 HPLC 条件の検討

種々のカラムおよび移動相について検討した結果、Waters 製 ODS カラムを用いた 60%アセトニトリルのイソクラティック溶出法により、トリプタントリンとインジゴを 8 分以内に妨害ピークもなく分離溶出することが出来た。

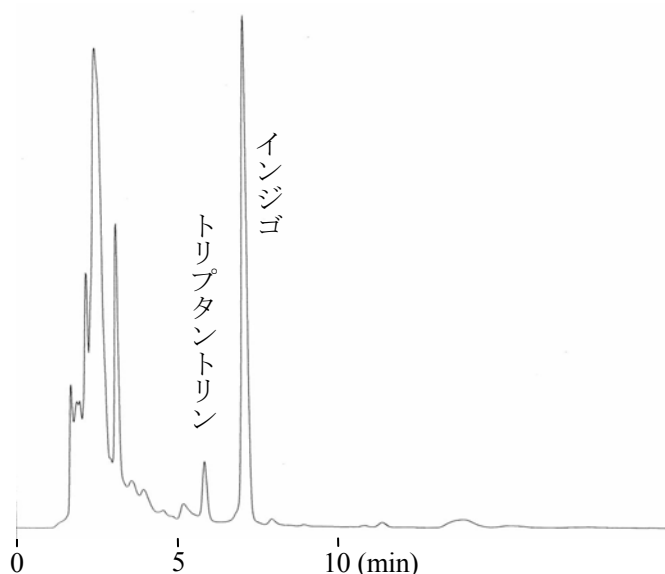


図 1 藍抽出物の HPLC クロマトグラム

カラム： μ ボンダスフェアー

($5\mu\text{mC18 } 3.9 \times 150\text{mm Waters}$)

移動相：60%アセトニトリル

流速：0.5 ml/min

温度：40°C

検出波長：250nm

UV-VIS 検出器による検出波長について、インジゴはこの分析条件においては 243nm, 285nm, 609nm 付近に極大吸収を持つがトリプタントリンは 250nm 付近にしか極大吸収を持たない (図 2)。

通常インジゴの分析においては特徴的吸収波長である約 600nm で検出されるが、トリプタントリンは 250nm 付近にしか吸収がないため、600nm では検出されない。しかし、インジゴは 250nm でも 600nm の 80%以上の吸光度を示すため検出は可能である。

そこで、検出波長の違いが定量性へ及ぼす影響について検討するため 10~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲のインジゴ標準溶液について検量線を作成した。その結果、図 3 に示すとおりいずれの波長においても検量線は高い直線性を示し、定量可能であることが分かった。

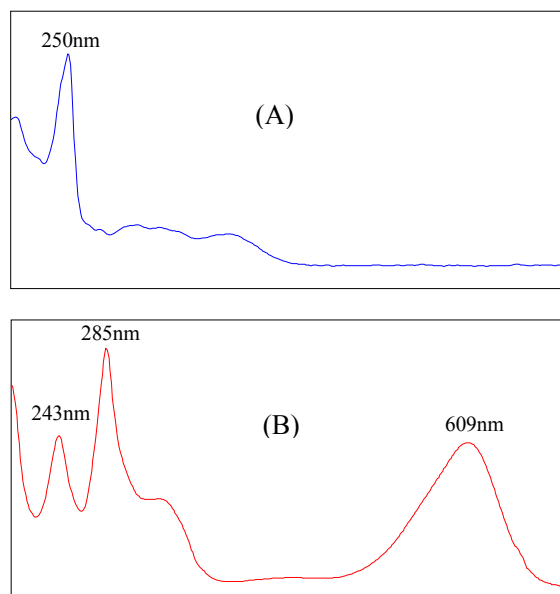


図 2 トリプタントリン (A) およびインジゴ (B) の UV-VIS スペクトル

トリプタントリンについても 0.5~10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で検量線を作成した結果、図 4 に示すとおり高い直線性を示した。このことから、トリプタントリンとインジゴともに検出波長 250nm で同時定量できることが分かった。

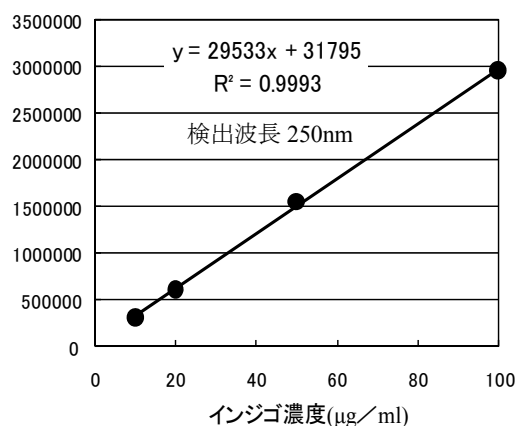
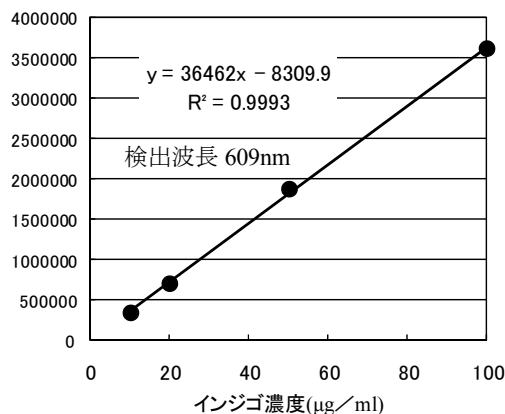


図 3 検出波長 609nm および 250nm で解析したときのインジゴの検量線

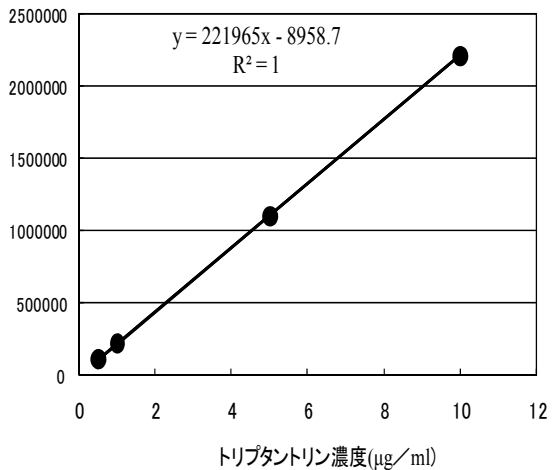


図4 トリプタントリンの検量線

3・2 抽出溶媒の検討

抽出溶媒として50%エタノール、メタノール、アセトン、ジクロロメタン、酢酸エチル、DMSOおよびDMFの7種類の溶媒について検討した。結果を図5に示す。

最もトリプタントリンの抽出効果が高かった溶媒はDMSOであり、ついでメタノール、50%エタノール、DMFであった。インジゴについては、DMSOとDMFの抽出効果が高かったが、他の溶媒では殆ど抽出されなかった。ジクロロメタンでは両成分とも殆ど抽出されなかった。トリプタントリンおよびインジゴともに抽出効果が高かったのはDMSOであり、品種別の成分抽出にはDMSOを用いた。

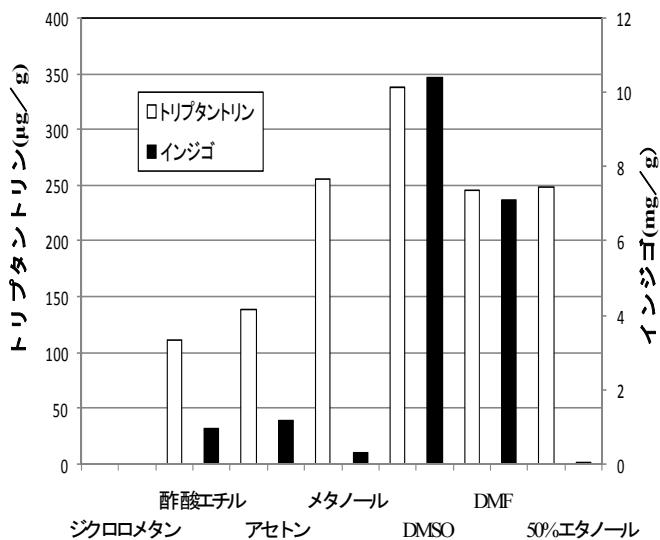


図5 各種溶媒によるトリプタントリンおよびインジゴの抽出効果

3・3 藍の品種別トリプタントリンおよびインジゴ含量

結果は図6に示すとおり、両成分とも大千本の含量が最も多く、赤茎小千本が最も少なかった。品種間の含量差をみると、トリプタントリンは2倍以上、インジゴも2倍近い差があった。また、トリプタントリンとインジゴ含量の間には高い正の相関があることが分かった。各品種を草姿で分けると、立性に属するのが赤茎小千本と宮城、中間型が千本と大千本であり、その他殆どの品種は匍匐性に属する。草姿と各成分含量の関係をみると、中間型品種の含量が多く、立性品種の含量が少なく、匍匐製品種はその中間であった。現在、徳島県において主力品種として栽培されている小上粉白花の含量は11品種中で平均よりやや上であった。

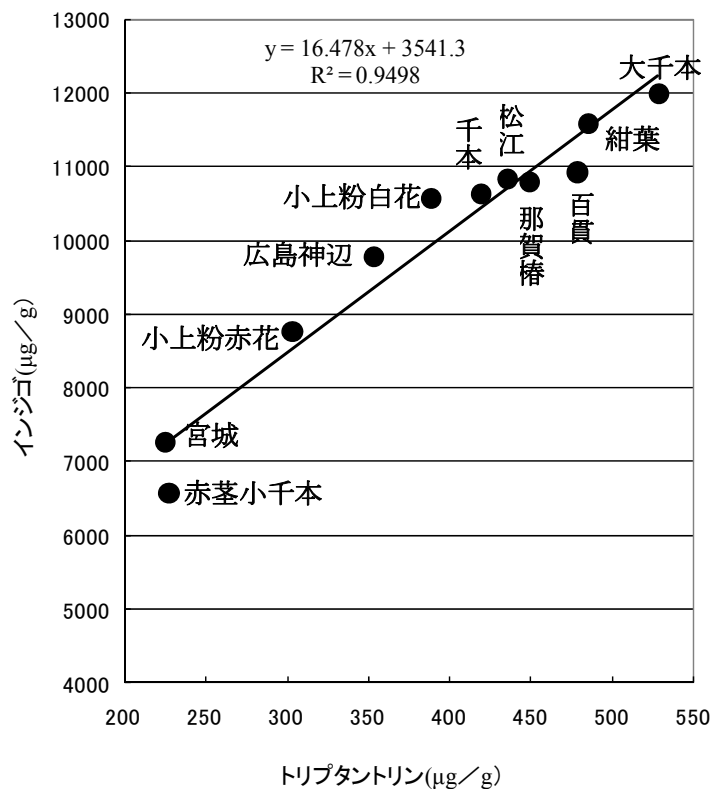


図6 11品種の藍のトリプタントリンおよびインジゴ含量

もともと藍にインジゴは含まれておらず、配糖体のインジカンとして存在する。このインジカンが藍の刈り取り時に受ける障害により加水分解酵素が働いてインドキシルになる。さらに刈り取った葉の乾燥過程において酸化的カップリング反応が起こりインジゴが生成するとされている⁸⁾。

また、Iwaki ら⁹⁾はトリプタントリンが藍の生葉を天日乾燥することにより 1.4~1.7 倍に増加することを報告している。

著者らの実験においても乾燥による変化について検討するため、乾燥方法を天日乾燥、熱風乾燥および凍結乾燥の 3 種類で行った。その結果、天日乾燥と熱風乾燥の場合にはトリプタントリン、インジゴ共に含量が数倍に増加することを確認した(未発表)。このことから、成分の増加は乾燥温度に依存すると考えられる。そのため、品種別の含量を比較する場合には、最適温度で乾燥した後に比較する必要があるが、現行の主力品種である小上粉より有用成分含量の多い品種が存在することは明らかと思われる。

今後さらに研究を進めることにより、有用成分含量が多く且つ作業性の良い品種作出に繋がると考えられる。

4 まとめ

HPLC による藍のトリプタントリンおよびインジゴの簡便迅速な同時定量法について検討し、以下の結果を得た。

- (1) ODS カラムを用いた 60%アセトニトリルのイソクラティック溶出法により、トリプタントリンとインジゴを迅速に同時定量することができた。
- (2) 抽出溶媒としてはジメチルスルホキシドが最適であった。
- (3) トリプタントリンおよびインジゴ含量には高い正の相関が認められた。
- (4) 藍の品種の違いにより、トリプタントリンとインジゴとも 2 倍前後の含量差があったが、最も多かったのは両成分とも大千本であった。

参考文献

- 1) 北原晴男・花田勝美・福井徹:「藍草から得られた抗菌活性物質およびこれを含有する各種組成物」, 特開 2004-189732
- 2) 阿賀創・新井成之・福田恵温・國方敏夫・栗本雅司:「生理活性抽出物」特開 2001-31581
- 3) 北原晴男・佐藤佑:「IV型アレルギー反応抑制剤」, 特開 2006-241080
- 4) 岩城完三・栗本雅司:「藍成分の癌抑制効果の発見とその応用」, ファインケミカル, Vol.31(11) pp5-11 (2002)
- 5) C.Oberthur and M.Hamburger: “Tryptanthrin content in *Isatis tinctoria* leaves A comparative study of selected strains and post-herbest treatments”, *planta medica*, vol.70(7),pp642-645(2004)
- 6) H.Danz,D.Baumann and M.Hamburger: “Quantitative determination of the dual COX-2/5-LOX inhibitor tryptanthrin in *Isatis tinctoria* by ESI-LC-MS”, *planta medica*,vol.68(2),pp152-157(2002)
- 7) Bing-Chung Liao,Ting-Ting Jong,Mau-Rong Lee and Shih-Shiung Chen: “LC-APCI-MS method for detection and analysis of tryptanthrin,indigo and indirubin in Daqingye and Banlangen”,*J.Pharm.Biomed.Anal.*vol43 (1),pp346-351(2007)
- 8) 北原晴男・肥田野豊・舩澤陸郎・川崎恵美子・宮本利行:「藍の化学」, 弘前大学教育学部紀要, 第 87 号 pp83-88(2002)
- 9) K.Iwaki,M.Fujii,T.Tatefujii,T.Shibuya,T.ohta and S. Fukuda: “Tryptanthrin Content in *Polygonum tinctorium* leaves”,*ITE Letters on Batteries new Technologies and medicine*,vol6(6),pp560-565(2005)