

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	LC MS分析を活用した植物由来サポニン成分の化学構造解析研究
作成者（著者）	劉, 丹陽
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 東屋, 功/
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1112号
学位記番号	甲第143号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225121

LC-MS 分析を活用した植物由来サポニン成分の化学構造解析研究

所属 医薬品分子設計学

氏名 劉 丹陽 印

【背景・目的】

サポニンとは、トリテルペノイドやステロイドに複数の糖が結合した構造を有する化合物群である。一般的に溶血作用、魚毒性、界面活性を持つことが知られているが、さらには鎮咳、去痰、消炎、鎮痛、解熱、鎮静、抗腫瘍、抗アレルギー作用、抗酸化作用、胃液分泌抑制、抗潰瘍、末梢血管拡張作用など多彩な薬理作用を有し、薬用人参など多くの局方生薬に含まれる重要な成分である。本研究はサポニンに関する植物化学的研究の一環として、キジカクシ科アマドコロ属 (*Polygonatum*) 植物およびナデシコ科マンテマ属 (*Silene*) 植物 *S. vulgaris* に着目し、ステロイドサポニンおよびトリテルペノイドサポニンについて LC-MS を活用した成分研究を行った。

第1章 LC-MS を活用した *Polygonatum* 属植物のステロイドサポニン成分解析

キジカクシ科アマドコロ属 (*Polygonatum*) 植物は、北半球の温帯域を中心に生育する多年草であり、日本には9種4雑種が分布する。アマドコロ属植物は古くから滋養強壯薬として利用されており、例えばカギクマバナナルコユリ *P. sibiricum* やその他同属植物の根茎は生薬「黄精」として、アマドコロ *P. odoratum* の根茎を乾燥または蒸乾したものは生薬「玉竹」として用いられている。玉竹と黄精の基原植物には従来混乱があり、取扱いについて古来諸説がある。アマドコロ属植物の外形は類似するものが多く、形態から区別することは難しい。

これまでの化学研究でステロイドサポニン成分が報告されているが、ほとんど単一の植物種に着目したものであり、薬用品種間の比較はまだ研究されていない。そこで本研究では、アマドコロ属植物に由来する生薬の主成分であるステロイドサポニンに着目して、LC-MS 分析による成分比較を行い、化学成分による基原種の差異を評価した。

1. 標準品を用いたステロイドサポニンの MS フラグメント解析

当教室のこれまでの研究で単離したフロスタン型ステロイドサポニン: polygonatumoside F (**4**), timosaponin H1 (**12**) およびスピロスタン型ステロイドサポニン: sibiricoside B (**15**), (25*R*)-(3β,14α)-dihydroxy-spirost-5-ene-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-galacopyranoside (**25**), 25*S*-aspidistrin (**30**) を標準品とし、LC-MS におけるフラグメントパターン解析を行い、以下のことを明らかにした。

ポジティブイオンモードにおいて、フロスタン型ステロイドサポニンは、22位に結合する水酸基の開裂により、イオンピーク $[M-H_2O+H]^+$ が常に強く観察される。それに対して、スピロスタン型は生成しない。またネガティブイオンモードにおいて、スピロスタン型はギ酸付加イオン $[M+HCOOH-H]^-$ が強く形成されるが、フロスタン型は非常に小さいピークになる。アグリコン部のフラグメントイオンについては、どちらの型においても水分子の脱離により、水酸基1つにつき、2 Da 小さいイオンが観察されることから、アグリコンの水酸基の数が推定できる。糖鎖については、スピロスタン型ステロイドサポニンは、3位に結合する糖鎖が連続的な開裂により、アグ

リコン部由来のイオンピークがより強く観察される。一方、フロスタン型ステロイドサポニン、3β,26-ビスデスモンドであり、3位に結合する糖鎖は一個ずつ開裂し、糖鎖の開裂と共に、26位のグルコシル基の脱離に由来するイオンピークが強く観察される（図1）。

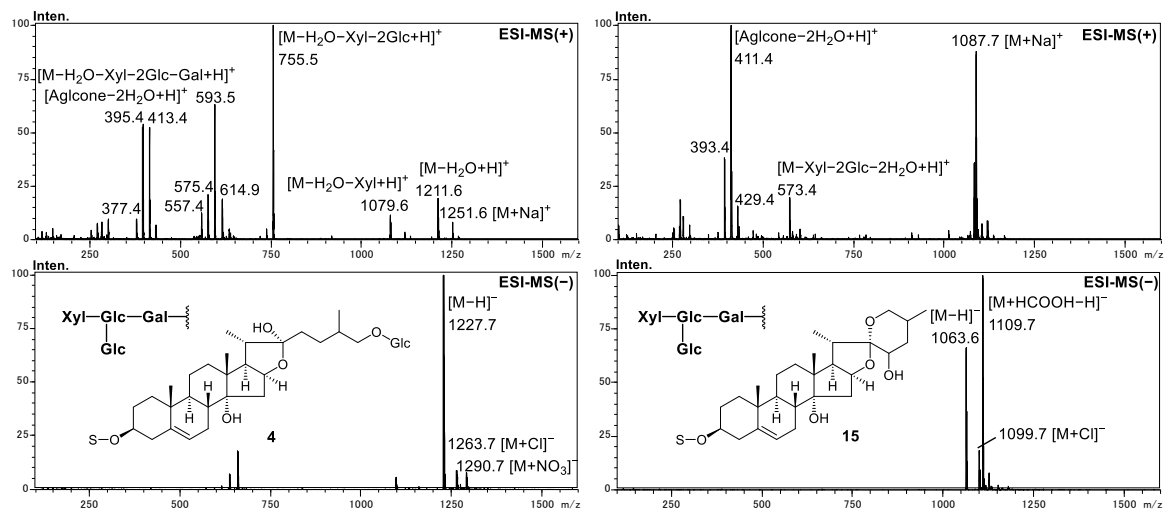


図1. アマドコロ属植物由来ステロイドサポニンの ESI-MS

2. LC-ESI-MS による *Polygonatum* 属植物のステロイドサポニン成分解析

本学薬学部付属薬用植物園にて栽培された4種のアマドコロ属植物アマドコロ *P. odoratum*、カギクマバナナルコユリ *P. sibiricum*、ナルコユリ *P. falcatum* およびオオナルコユリ *P. macranthum* の乾燥した根茎を研究材料とし、これらのメタノール抽出液を Shimadzu LCMS-8040 トリプル四重極質量分析計を用いて Full Scan モードおよび SIM モードによる測定を行った結果、4種の植物のうち、原種の黄精であるカギクマバナナルコユリではステロイドサポニンは検出されなかった。他の3種については、アマドコロで15種、黄精類植物ナルコユリで22種、オオナルコユリで23種のステロイドサポニン成分が検出された（図2）。特徴的なフラグメントイオンおよび保持時間の解析により化学構造を推定した。

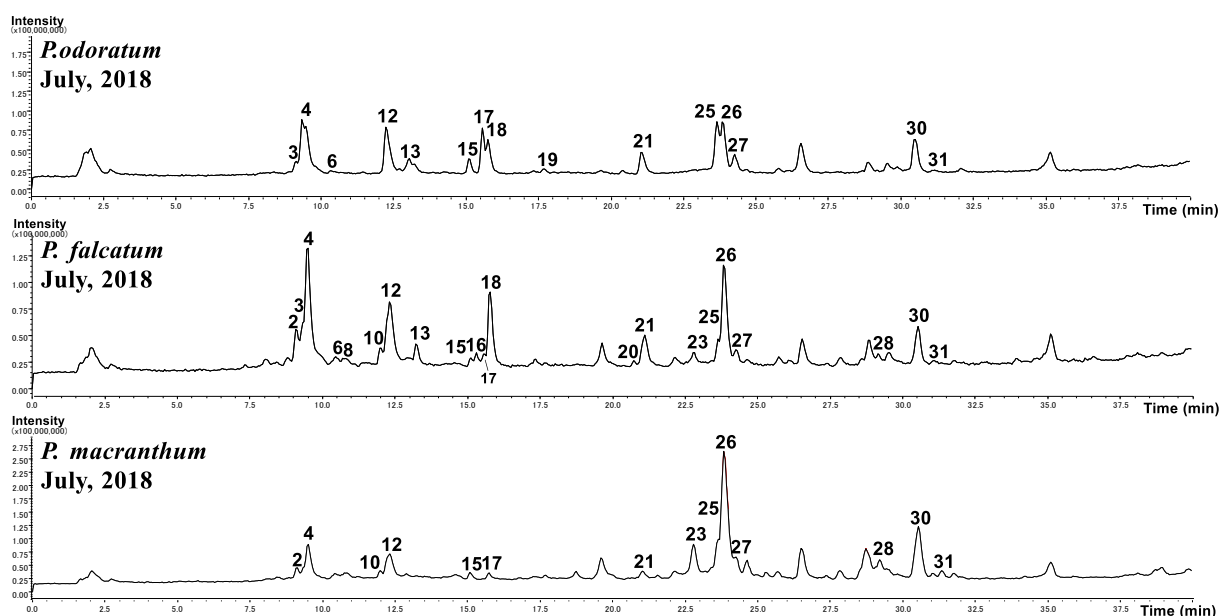


図2. アマドコロ属植物のトータルイオンクロマトグラム (positive ion mode)

アマドコロ *P. odoratum*、ナルコユリ *P. falcatum*、オオナルコユリ *P. macranthum* で検出したステロイドサポニンは、いずれもフロスタノール型ステロイドサポニンもしくはスピロスタノール型ステロイドサポニンであった。和産黄精の基原植物であるナルコユリおよびオオナルコユリに含まれるステロイドサポニンのプロファイルは玉竹の基原植物アマドコロと比較し、生合成的に水酸化やアセチル化が進んでいるが、主成分は類似していることを明らかにした。すなわち、ナルコユリ、オオナルコユリは、ステロイドサポニンのプロファイルの観点から生薬「黄精」より生薬「玉竹」に近いと示唆されている。

第2章 LC-MS を活用したナデシコ科マンテマ属植物シラタマソウ *Silene vulgaris* のトリテルペノイドサポニン成分研究

ナデシコ科マンテマ属 (*Silene*) 植物は約 700 種以上が存在する大きな属である。古くからサポニンが多く含まれていることが知られていたが、それらに関する成分研究は限られている。本研究では、サポニンに関する植物化学的研究の一環として、マンテマ属植物シラタマソウ *Silene vulgaris* に着目した。シラタマソウはヨーロッパ原産の多年草であり、明治末年に観賞用に日本に導入され、逸出帰化した。本研究ではシラタマソウに含まれるトリテルペノイドサポニンに着目し、トリテルペノイドサポニンの単離、構造決定および LC-MS/MS による成分解析を行った。

1. トリテルペノイドサポニン成分の単離および構造決定

東邦大学薬学部付属薬用植物園にて栽培したシラタマソウ *S. vulgaris* の全草をメタノールにて常温で抽出した。減圧濃縮後、得られたメタノールエキスを水、酢酸エチルおよび *n*-ブタノールにて順次分配した。それらのうち *n*-ブタノール画分を、粗サポニン画分として ODS カラムクロマトグラフィーで分離精製した。LC-MS 分析により、得られた各画分で、構成糖やアグリコンにカルボキシ基をもつ酸性トリテルペノイドサポニンの存在を確認した。そこで、得られた各画分について、トリメチルシリルジアゾメタンで分子中のカルボキシ基をメチル化した後、HPLC で分離精製を行った。その結果、5 種のトリテルペノイドサポニン (I, III-VI) を含む 6 種の化合物を単離した (図 3)。単離した化合物の化学構造は、MS および NMR スペクトル解析など、各種スペクトル解析により決定した。化合物 I および III-VI は、デメチル体がシラタマソウ中の化合物であることが推定でき、IV および V については、シラタマソウに neogyposide A および B として存在すると考えられる。一方、I、III および VI のデメチル体については、これまでに報告がない。化合物 II については、トリテルペノイドサポニンからの糖鎖の脱離と新たな環形成により生じた生成物と考えられる。

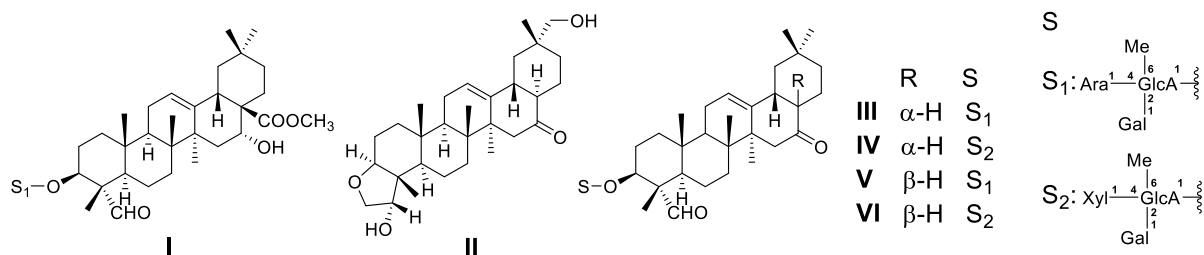


図 3. メチル化反応を行った *S. vulgaris* 各画分から単離したトリテルペノイド

2. トリテルペノイドサポニンの MS/MS フラグメント解析

単離したトリテルペノイドサポニン (I, III–VI) を標準化合物とし、Q-Exactive Orbitrap 四重極質量分析計を用いて MS/MS 解析を行い、トリテルペノイドサポニンの LC-ESI-MS における特徴的なフラグメンテーションを明らかにした。ポジティブイオンモードにおいて、サポニン分子由来のイオンをプリカーサーイオンとした MS/MS スペクトルでは、アグリコン骨格や、アグリコン骨格から官能基が順次脱離したプロダクトイオンが観察された。また構成糖に由来するプロダクトイオンも観察された。一方、アグリコン由来のイオンをプリカーサーイオンとした MS/MS では、トリテルペノイド骨格の C 環がレトロディールズアルダー反応により開裂し、AB 環や DE 環のユニットに由来するイオンが観察された。これら特徴的なプロダクトイオンを利用し、シラタマソウのトリテルペノイドサポニンの構造解析をさらに行った。

3. LC-MS/MS によるシラタマソウのトリテルペノイドサポニン成分解析

シラタマソウのブタノール画分について、LC-MS/MS 解析を行った (図 4)。特徴的な MS/MS フラグメンテーションの解析により、23 種のトリテルペノイドサポニン成分の化学構造を推定した。これらトリテルペノイドサポニンは、オレアナン型もしくはノルオレアナン型であり、いずれも 23 位にカルボキシ基もしくはアルデヒド基を有していた。オレアナン型トリテルペノイドサポニンについては、共通して 28 位にカルボキシ基を有していた。16 位についてはヒドロキシ基を有する化合物も存在した。一方、ノルオレアナン型については、いずれも 16 位がカルボニル基であり、28 位カルボキシ基が、 β -ケトン酸構造により脱炭酸したと考えられる。全般的に 23 位にカルボキシ基を有する化合物の保持時間は、23 位がアルデヒド基のものよりも短かった。

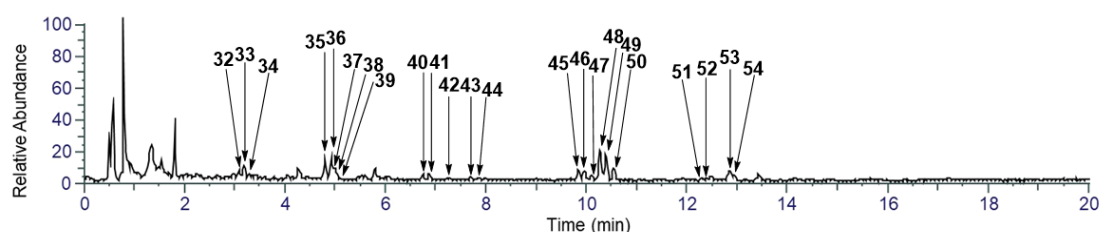


図 4. *S. vulgaris* ブタノール画分のトータルイオンクロマトグラム (positive ion mode)

【総括】

本研究において、LC-MS 分析を活用して、4 種のキジカクシ科アマドコロ属植物アマドコロ、カギクマバナルコユリ、ナルコユリおよびオオナルコユリに含まれるステロイドサポニン、および 1 種のナデシコ科マンテマ属植物シラタマソウに含まれるトリテルペノイドサポニンを明らかにした。本研究で得られた知見は、今後これら植物資源の産地、季節および品種による指標成分変動の解析研究や体内代謝の解析による作用機序解明研究に繋がることが期待される。

【対象論文】

- 1) Liu, D.; Kikuchi, T.; Li, W. Characterization and Comparison of Steroidal Glycosides from *Polygonatum* Species by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* **2023**, *28*, 705.

学位論文審査報告書

報告書記載:2024年 2月 6日

学位申請者名	劉 丹陽
論文題目	LC-MS分析を活用した植物由来サポニン成分の化学構造解析研究
審査委員名	主査 東屋 功 副査 福島 健、加藤 恵介
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>劉氏の論文は、植物由来サポニンとして、キジカクシ科アマドコロ属植物に含まれるステロイドサポニン成分、及びナデシコ科マンテマ属植物に含まれるトリテルペノイドサポニンを対象とした成分解析に関するものである。分析手法としてLC-MSを用い、既知、新規を含む化合物の構造解析を行うと共に、それぞれの植物に含まれるサポニンの構造に関する知見を、網羅的かつ効率的に得ることに成功している。</p> <p>第1章では、キジカクシ科アマドコロ属植物に含まれるサポニン成分の分析について述べられている。</p> <p>まず、標準品のLC-MS分析から、フラグメントパターンの比較により、フロスタン型とスピロスタン型のステロイドサポニンを区別することができることを示した。また、アグリコン部のフラグメントイオンについて、アグリコンのヒドロキシ基の数が推定できる共に、糖鎖についても、開裂パターンの違いから、両サポニンを区別することができることを示した。</p> <p>続いて、東邦大学薬学部付属薬用植物園にて採取した4種類のアマドコロ属植物、すなわち黄精の基原植物カギクマバナルコユリ、並びに日本に広く分布するナルコユリ、オオナルコユリ、アマドコロに含まれるステロイドサポニンのLC-MSによる成分解析を行った。原種の黄精であるカギクマバナルコユリでは、ステロイドサポニンは検出されず、他の3種については、アマドコロで15種、黄精類植物ナルコユリで22種、オオナルコユリで23種のステロイドサポニン成分が検出され、いずれもフロスタノール型ステロイドサポニンもしくはスピロスタノール型ステロイドサポニンであることを明らかにした。これらの成分解析により、日本産の黄精は、生薬「黄精」より生薬「玉竹」に近いことが示唆された。</p> <p>次に、第2章では、シラタマソウの成分抽出と、単離したトリテルペノイドサポニンの構造決定について述べられている。</p> <p>同薬用植物園にて採取したシラタマソウの抽出液について、含まれる酸性トリテルペノイドサポニン成分のカルボキシ基をメチル化した後、分離精製を行い、5種のトリテルペノイドサポニンを含む6種の化合物を単離した。単離した化合物の化学構造を、MS及びNMRスペクトル測定など、各種スペクトル解析により決定すると共に、MS/MSフラグメント解析を行い、構造とフラグメントパターンとの対応について、詳細に検討を行った。</p> <p>続いて、先に得られた情報を基に、シラタマソウのトリテルペノイドサポニン成分についてLC-MS/MS分析を行い、23種のトリテルペノイドサポニンの化学構造を明らかにした。</p> <p>本研究で得られた知見は、これら植物資源の産地、季節及び品種による成分の差異を明らかにすることに繋がると考えられ、また本研究で用いたLC-MSを用いた成分分析法は、構造が複雑でかつ量の少ない試料化合物に対して、構造を推定する際に有用な手法であることが示されている。</p> <p>審査委員3名による審査において、すべての審査項目の評価はAであった。</p> <p>以上より、本論文は博士（薬学）を授与するに十分に値するものと判断する。</p> <p>なお、本論文の研究成果について、劉氏を筆頭著者とする英文原著論文1報が公開されていることを確認した。</p>	