

プロトベルベリン類含有染料植物の成分組成分析による同定

佐々木 良子¹⁾・佐々木 健²⁾

●キーワード：プロトベルベリン (Protoberberine), 蛍光分光分析 (Fluorescence spectroscopy), 高速液体クロマトグラフ (HPLC), ESI-質量分析 (ESI mass spectrometry), 黄檗 (Amur cork tree), 黄連 (Goldthread), 目木 (Japanese barberry), 黄藤 (Huang teng)

1. はじめに

黄檗 (ミカン科, Amur cork tree, *Phellodendron amurense* 及び *Phellodendron chinense*) は古くから用いられている天然黄色染料である。主要成分はベルベリン (Berberine) である (土佐ら: 1989)。ベルベリンと同じカチオン性基本骨格を有する黄色アルカロイド類

は, 一般にプロトベルベリン (Protoberberine) と呼ばれ, 主要なものとして Fig.1 に示したパルマチン (Palmatine), ヤトロリジン (Jatrorrhizine), コプチシン (Coptisine) などが知られている。これらのプロトベルベリン類は黄檗における副成分として存在し, また, 黄檗以外にもこれらを含む多様な植物が日本, 中国およびそれ以外の世界各地において認められている (Grycová *et al.*: 2007)。その中で黄連 (キンポウゲ科, Goldthread, *Coptis japonica* 及び *Coptis chinensis*), 目木 (メギ科, Japanese Barberry, *Berberis thunbergii*) はいずれも生薬としての利用が主であるが, 含有のプロトベルベリン類が塩基性黄色染料として機能するため, 黄檗と同様に古くから染料として使用されてきた (山崎: 1985, 1987)。例えば, 黄檗および黄連は養老令 (757年) 第十賦役令一条に調絹絶条の調副物として「其調副物。正丁一人。紫三両。紅三両。茜二斤。黄連二斤。東木綿十二両。安芸木綿四両。麻二斤。熟麻十両十六銖。藁十二両。黄檗七斤。(以下略)」と紅や茜などとともに列記され, また, 目木は江戸時代の重修本草綱目啓蒙 (1847年) に「木皮白色粗皮を削り去れば鮮黄色なり, 故に古は黄芩に偽りしことあり, 唐山にては染料に用いること集解に見えたり」との記載がある (後藤・山川: 1937)。

黄藤 (Huáng téng, *Fibraurea tinctoria*) は, 土黄

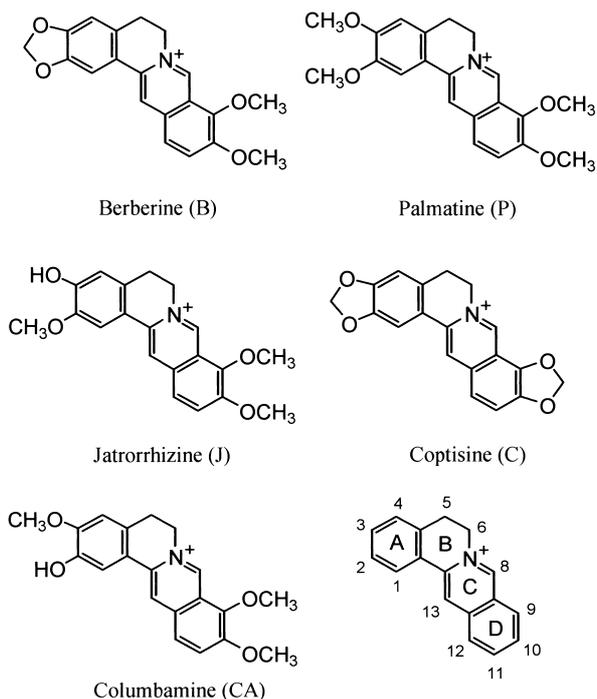


図1 代表的なプロトベルベリンアルカロイド類の構造と基本骨格。
Fig. 1 Structure of typical protoberberine alkaloids and numbering of basic protoberberine skeleton.

¹⁾ 京都工芸繊維大学美術工芸資料館 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

²⁾ 京都工芸繊維大学生体分子工学部門 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

連とも呼ばれ、中国南部から東南アジアにかけて自生するツツラフジ科植物である。生薬として根茎の利用（中薬大辞典：1985）に加えて、黄色染料として使用され、最近、中国製の文化財染織品での検出事例が報告されている（Zhang *et al.* : 2007）。アフリカ原産のコロンボ（ツツラフジ科, Columbo, *Jateorhiza columba*）も生薬として用いられる代表的なプロトベルベリン含有植物の一つである。

一般に、プロトベルベリン類を含有する染料として黄檗が最も多用されている。そのため、化学的な分析ではその主要成分であるベルベリンの特徴、主にその蛍光特性を観測することで一義的に黄檗と判断されることが多い（松田：1997, 下山・野田：1997）。しかしながら、ベルベリンの特徴を観測するだけでは、黄檗とそれ以外のプロトベルベリン含有染料植物の区別は困難であり、これら染料植物の相互区別のための方法を別途確立する必要がある。プロトベルベリン類の微量分析に対するラマン分光等の適用の可能性なども検討されているが（Cañamare *et al.* : 2008）、いずれの染料植物においてもきわめて構造が類似した複数成分の混合物であるため、染料植物の明確なる決定には各材料に含まれる各成分の特徴を明確にした上で、それらの定量的な解析が必要である。

本研究では、これらの染料植物に含まれる代表的な4種のプロトベルベリン類について各成分固有の分光学的特性を明確にし、次いで含有染料植物での染色布からの抽出液の分光特性ならびに HPLC による構成成分の定量分析を行い、染料植物の成分組成分析による同定の可能性を検討した。さらに ESI-質量分析手法を適用し、極微量での各構成成分の検出手法の開発を試みた。紫外可視並びに蛍光分光は非破壊分析に有効であり（佐々木・藤井・佐々木：2010）、PDA-HPLC 分析は各成分の分離分析と同定に有効である。さらに、ESI イオン化質量分析ではきわめて微量による分析が可能であり、類似構造の化合物であれば混合物中の成分組成を直接観測可能である（佐々木・佐々木：2009, 佐々木・佐々木：2011）。ここではこれら分析手法を適用したプロトベルベリン含有染料植物の同定への有効性を詳述する。

2. 実験

2.1. 機器

質量分析：エレクトロスプレーイオン化ーイオントラップ質量分析（ESI-IT-MS）は Thermoelectron LCQ（イオン化電圧 4keV, イオン源温度 60°C）あるいは Bruker Amazon SL（イオン化電圧 4keV, イオン源温度 220°C）を使用し、いずれも陽イオンモードで測定した。高分解質量分析（HRMS）は日本電子 JMS-700（FAB）を用いた。

¹H NMR スペクトル：Bruker AV-600 を使い、CD₃OD 溶媒にて 300K で測定した。

紫外可視吸収スペクトルならびに反射スペクトル：Shimadzu UV-3101PC を使用し、反射スペクトルの測定には積分球アタッチメントを用いた。

蛍光スペクトル：Hitachi F-4500 を使用した。

高速液体クロマトグラフ：送液には Hitachi L-7000 低圧グラジエントシステムを、PDA 検出器として JASCO MCD 2010 を用いた。波長範囲は 200nm-650 nm, 波長分解能 4nm で測定した。カラムには Cosmosil 5C18-ArII (Nacalai), 移動相には SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）/H₂O/CH₃CN（1：1）を流速 1ml/min で使用した。

2.2. 試薬

塩化ベルベリン：市販品（東京化成）を MeOH より再結晶して用いた。

塩化コプチシン：市販品（和光純薬）をそのまま用いた。

塩化パルマチン（山岸・森：1976）：コロンボ根茎（吉見製薬）を熱 MeOH で抽出し、得られた黄色成分をカラムクロマトグラフィー（BuOH:AcOH:H₂O = 7:1:2）を用いて分離した。パルマチン分画を濃縮し、少量の塩酸共存下で EtOH より再結晶した。HRMS (*m/z*, FAB, *m*-NBA): [M-Cl]⁺ Calcd. for C₂₁H₂₂NO₄, 352.1549; Found 352.1549 (0.0 mmu); ¹HNMR (600 MHz, CD₃OD): δ 9.79 (s, 1H, H-8), 8.84 (s, 1H, H-13), 8.14 (d, *J* = 9Hz, 1H, H-11), 8.04 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-12), 7.70 (s, 1H, H-1), 7.08 (s, 1H, H-4), 4.96 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-6), 4.24 (s, 3H, 9- or 10-OCH₃), 4.14 (s, 3H,

9- or 10-OCH₃), 4.02 (s, 3H, 2-OCH₃), 3.97 (s, 3H, 3-OCH₃), 3.31 (t, *J* = 6.6Hz, 2H, H-5)

ヨウ化ヤトロリジン (谷・高尾:1957): 黄連 (中国産, 高砂薬業) を熱 EtOH で抽出して濃縮後, 水に溶解し, NaI を加えてプロトベルベリン類混合物粉末を得た。この粉末から NaOH 水溶液で抽出し, 濃 HI で中和後, EtOH から再結晶してヨウ化物結晶を得た。¹HNMR により同じ元素組成を有する位置異性体のコロンバミンを 12% 含むものであった。HRMS (*m/z*, FAB, *m*-NBA): [M-I]⁺ calcd. for C₂₀H₂₀NO₄, 338.1392; Found, 338.1398 (+0.5 mmu), ¹HNMR (600MHz, CD₃OD): δ 9.75 (s, 1H, H-8), 8.79 (s, 1H, H-13), 8.13 (d, *J* = 9Hz, 1H, H-11), 8.02 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-12), 7.68 (s, 1H, H-1), 7.05 (s, 1H, H-4), 4.93 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-6), 4.23 (s, 3H, 9- or 10-OCH₃), 4.13 (s, 3H, 9- or 10-OCH₃), 4.04 (s, 3H, 2-OCH₃), 3.31 (t, *J* = 6.6Hz, 2H, H-5)

2.3. 染色用染料植物

いずれも生薬として市販のものを用いた。なお, 黄藤は日本国内での入手が困難であるため, 中国三か所で入手したものである。

黄檗 A: 高砂黄檗 M 日本産 (高砂薬業)

黄檗 B: 高砂黄檗 M 中国産 (高砂薬業)

黄連 A: 高砂オウレン日本産 (高砂薬業)

黄連 B: 高砂オウレン中国産 (高砂薬業)

目木: 目木 刻 トリトマラズ (高砂薬業)

黄藤 A: 黄藤 (河北省眞草堂)

黄藤 B: 土黄連 (安徽省本草養生坊)

黄藤 C: 黄藤 (上海市我愛玉書房)

コロンボ: 吉見コロンボ末 M (吉見製薬)

2.4. 分析試料の作成

染色絹布の作成:

ベルベリン, パルマチン, ヤトロリジンおよびコプチシン染色絹布: 染料成分 1mg を蒸留水 30ml に溶解し, 5% NH₃ 水溶液で洗浄した絹布 0.1g (6cm x 3.5cm) を浸漬し, 60°C で 1 時間染色した。染色絹布は水洗後, 常温で風乾した。

黄檗, 黄連, 目木, 黄藤およびコロンボ染色絹布: 染料植物 0.2g を蒸留水 30ml に分散し, 60°C で 1 時間, 染料成分を抽出した。この抽出液に 5% NH₃ 水溶液で洗浄した絹布 0.1g (6cm x 3.5cm) を浸漬し, 60°C で 1 時間染色した。染色絹布は水洗後, 常温で風乾した。

2.5. 分析試料の測定

紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの測定: ベルベリン, パルマチン, ヤトロリジンおよびコプチシンは各試料 1 x 10⁻⁵M の MeOH 溶液を用いた。黄檗, 黄連, 目木, 黄藤およびコロンボは染色絹布 2.5mg から 5% ギ酸 (FA)/MeOH 0.3ml で抽出し, その抽出液をそのまま測定した。

HPLC 測定試料: 上記吸収スペクトル測定用の溶液ならびに抽出液 20μl を用いて測定した。

ESI-MS の測定: HPLC 測定用溶液を MeOH で 1/100 に希釈し, 10μl を直接イオン源に導入するインフュージョン法で測定した。

3. 結果と考察

3.1. プロトベルベリン類の分光特性

黄色染料植物である黄檗, 黄連, 目木, 黄藤ならびにコロンボなどに含まれる主要なプロトベルベリン類は, 同一の基本骨格を有するベルベリン (B), パルマチン (P), ヤトロリジン (J), およびコプチシン (C) である。Fig. 1 に示したように, いずれも A~D の 4 個の環からなるベルベリン骨格上の A, D 環の 2, 3 位と 9, 10 位にエーテルあるいは水酸基等の酸素官能基を有する陽イオン性有機化合物である。プロトベルベリン類としてこれらの主要物質類似の構造化合物が多種知られているが, 上記の代表的な生薬・染料植物には主にこの 4 種が主要成分として含まれている。

各染料植物の成分組成分析に先立ち, これら 4 種のプロトベルベリン基本成分の吸収スペクトル並びに蛍光スペクトルを個別に測定し, それらの分光学的な特徴を調べた。なお, ベルベリン, コプチシンは市販品をそのまま用いたが, パルマチンはコロンボ根茎からの MeOH 抽出 (山岸・森:1976), ヤトロリジンは黄連のエクノール抽出液から既知の方法により単離した (谷・高尾:

1957)。パルマチンは¹H NMR および HRMS によりほぼ純粋なものであることを確認した (Wafo, *et al.* : 1999)。また、ヤトロリジンは HRMS では組成式に一致する質量数が得られたが、¹HNMR ではヤトロリジンに相当するピークに加えて (Kim, *et al.* : 2000), 少量の 8.67ppm, 7.59ppm, 7.04ppm にピークが観測された。このピークは元素組成が同一の位置異性体であるコロンバミンの H-13, H-4, H-1 に相当した (Hsieh, *et al.* 2004)。このように試料には少量の位置異性体を含むものであったが、さらなる精製は困難であったため、以下の測定にはこれをヤトロリジンとして用いた。

ベルベリン, パルマチン, ヤトロリジンおよびコプチシンの MeOH 溶液 (1×10^{-5} M) とそれらによる染色絹布を調製し, 吸収および蛍光スペクトルを測定した。吸収極大ならびに蛍光極大波長の数値データを Table 1 に示した。いずれの成分溶液とも黄色を呈し, Fig. 2A に示したように 265nm, 350nm ならびに 400-500nm に吸収を有する特徴的なスペクトルを示した。成分の色を決定づける最も長波長の吸収極大はベルベリン, パルマチンでは 430nm 付近に観測されたが, ヤトロリジンでは 440nm 付近, コプチシンではさらに長波長の 470nm 付近へのシフトが認められた。

Fig.2B に 350nm および 430nm で励起したときの蛍光発光スペクトル (実線) ならびに 535nm の発光をモニターした励起スペクトル (破線) を示した。各成分とも励起波長における吸光度は同一である。ベルベリンとパルマチンは 535nm 付近に蛍光発光極大を示し, 励起スペクトルも 350nm 付近と 430nm 付近にピークを有するほぼ同一のスペクトルを与えた。コプチシンでは蛍光発光が長波長側にシフトして 550nm 付近に観測され, 励起スペクトルにおいても, 吸収スペクトルと同様に長波長へのシフトを示した。ここで観測された特徴的な励起ならびに発光スペクトルがプロトベルベリン成分の存在を示すものである。蛍光強度を比較するとベルベリンとパルマチンはほぼ同一の強度を示したが, コプチシンはおおよそ 5 倍の蛍光強度を示した。一方, ヤトロリジン溶液では前三者とは異なり蛍光強度は微弱であった。このように蛍光量子収率がベルベリン骨格上のわずかな置換基の相違により大きく変化することを示した。

ベルベリン, パルマチン, ヤトロリジンおよびコプチシン水溶液 (33 mg/l) を用いて平絹を染色し, それら染色布の反射スペクトルならびに蛍光スペクトルを測定した。Fig.2C に示したように反射吸収スペクトルではいずれの成分においても 350nm 付近と 430-470nm 付近に吸収を示し, MeOH 溶液に比べて可視領域の吸収が長波長側にシフトした。特に, コプチシンは溶液中と同様に最も長波長側に吸収極大を示した。各成分染色布の蛍光スペクトルを Fig.2D, 2E に示した。ベルベリンとパルマチンの励起スペクトルにおいて, 吸収と同様に 350nm と 440nm にピークが認められ, また, 520nm 付近に発光を示した。コプチシンでは励起スペクトルのピークが 470nm 付近に現れるとともに, 蛍光発光が 550nm 付近に認められ, ベルベリン, パルマチンに比べこれらが長波長側に現れることが特徴であった。また, ヤトロリジンで, 溶液中と同様に他に比べては蛍光がきわめて弱かった。このように, MeOH 溶液におけるプロトベルベリン成分の特徴とおおむね一致したが, 反射ならびに蛍光励起スペクトルにおける 400nm 半ばの吸収極大ならびに発光極大の長波長へのシフトとして絹布染色に伴う影響が認められた。

3.2. プロトベルベリン含有染料植物染色絹布抽出液の分光特性

黄檗, 黄連, 目木, 黄藤およびコロンボで染色した絹布からの抽出液ならびに染色絹布そのものの吸収 (反射)・蛍光スペクトルを測定した。

抽出液ならびに絹布の可視反射スペクトルを Fig.3 に示した。吸収極大ならびに蛍光発光・励起スペクトルのピーク波長を Table 1 に併記した。吸収ならびに反射スペクトルでは日本産黄檗 (黄檗 A), 中国産黄檗 (黄檗 B) と目木染色絹布はいずれもきわめて類似したものであった。抽出液ではいずれも 350nm と 430nm 付近に極大吸収を, 絹布の反射スペクトルでは 10nm 程度の長波長へのシフトが認められ, ベルベリンなどで見られた結果と同様の挙動を示した。一方, 黄連では日本産 (黄連 A), 中国産 (黄連 B) とともに 360nm 付近と 440-470nm に極大吸収を示し, 特に, 中国産黄連において 400nm 代の可視領域の吸収の長波長シフトが顕著であり, ほかの染料植物に比べて赤色成分を含むことを示し

表1 プロトベルベリン類およびそれらを含む染料植物による染色絹布抽出液の分光データ。

Table 1 Spectral data for typical protoberberines and extracts from silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines.

materials / concentration ^{a)} 資料 / 濃度	methanol solution (10 ⁻⁵ M) or extract メタノール溶液(10 ⁻⁵ M)または抽出液					dyed silk 染色絹布				
	fluorescence spectra 蛍光スペクトル, λ _{max} (nm)			absorption spectra 吸収スペクトル λ _{max} (nm)		fluorescence spectra 蛍光スペクトル, λ _{max} (nm)			reflection spectra 反射スペクトル λ _{max} (nm)	
	emission at 350nm 蛍光発光 (350nm励起)	excitation at 520nm 蛍光励起 (520nm発光)				emission excited at 350nm 蛍光発光 (350nm励起)	excitation monitored at 520nm 蛍光励起 (520nm発光)			
berberine 1 x 10 ⁻⁵ M	520	351	451	350	429	521	352	453	369	438
palmatine 1 x 10 ⁻⁵ M	520	350	452	348	431	519	357	452	361	434
coptisine 1 x 10 ⁻⁵ M	554	359	469	359	466	550	370	482	373	472
jatrorrhizine 1 x 10 ⁻⁵ M	550 (weak)	n.d.	n.d.	348	432	530	341	459	362	440
Amur cork tree A (Japan) 黄檗 A (日本) (5.6 x 10 ⁻⁵ M)	521	355	453	265 347	428	522	353	455	371	440
Amur cork tree B (China) 黄檗 B (中国) (4.8 x 10 ⁻⁵ M)	519	357	453	265 347	428	520	356	455	371	438
Goldthread A (Japan) 黄連A (日本) (4.4 x 10 ⁻⁵ M)	525	360	456	265 348	428	527	358	456	371	440
Goldthread B (China) 黄連B (中国) (12.6 x 10 ⁻⁵ M)	542	366	472	265 349	431	543	361	471	375	445
Japanese barberry 目木 (2.0 x 10 ⁻⁵ M)	520	352	450	265 348	428	518	352	452	364	433
Huang teng A 黄藤A (1.8 x 10 ⁻⁵ M)	535	351	430	265 348	396(sh ^b) 428	525	345 355	458	365	438
Huang teng B 黄藤B (4.1 x 10 ⁻⁵ M)	535	358	433	266 348	395(sh ^b) 427	529	348 359	464	372	441
Huang teng C 黄藤C (2.5 x 10 ⁻⁵ M)	536	338	431	265 349	393 435(sh ^b)	528	343 358	462	370	440
Columbo コロンボ (7.9 x 10 ⁻⁵ M)	521	351	451	265 348	396 435(sh ^b)	523	347	458	361	434

^{a)} The concentrations in parentheses were estimated values as berberine..

^{b)} Shoulder.

た。黄藤，コロンボ溶液の吸収スペクトルにおいて400nm 付近の未知成分による吸収が観測されたが，反

射スペクトルではこのような吸収は認められず，黄檗などと類似の結果であった。

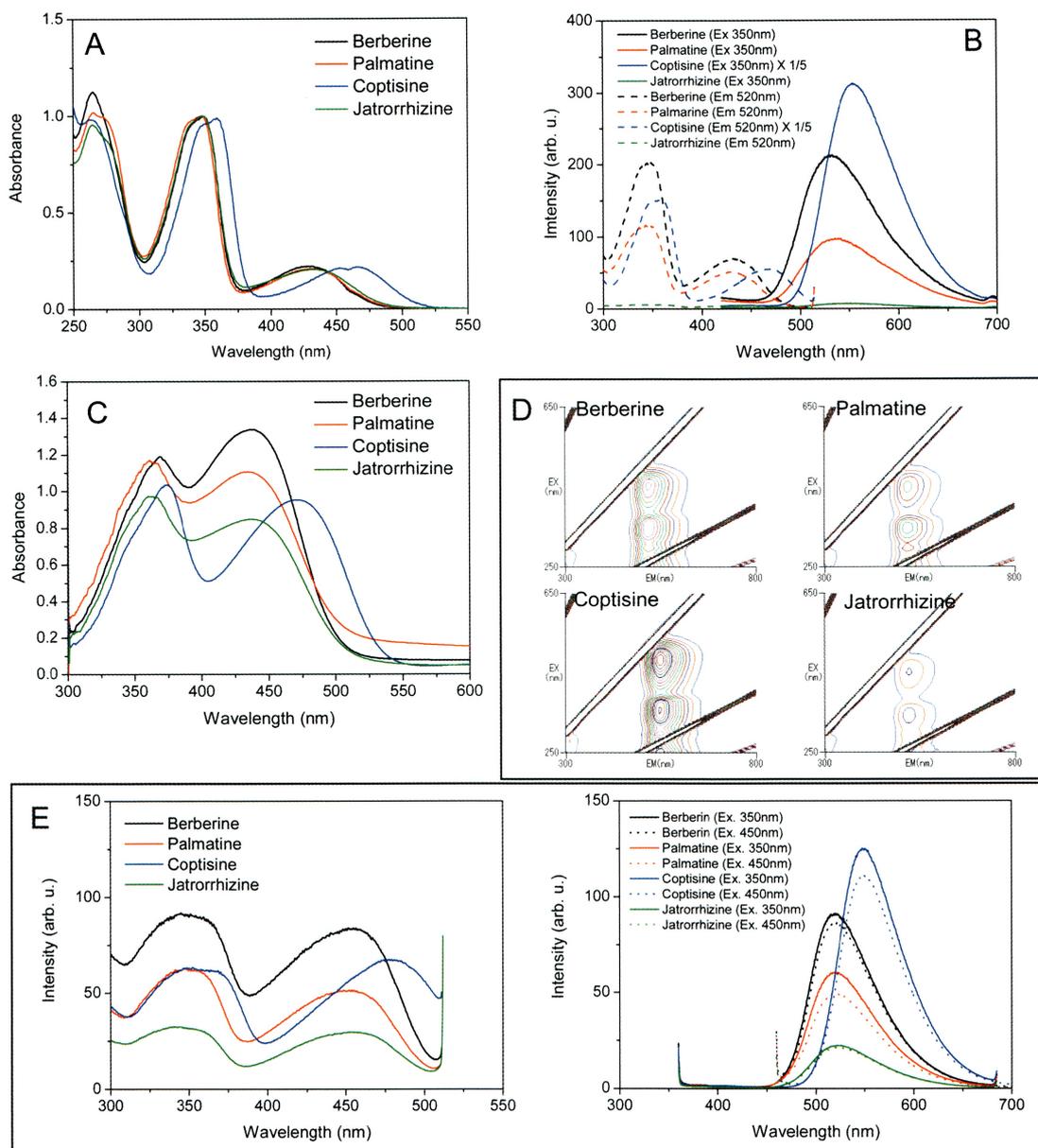


図2 代表的なプロトベルベリン類の MeOH 溶液および染色絹布の紫外可視吸収, 反射ならびに蛍光スペクトル, ベルベリン(黒), パルマチン(赤), コプチシン(青), ヤトロリジン(緑).

A:MeOH 溶液の紫外可視吸収スペクトル, B:MeOH 溶液の蛍光発光スペクトル(実線, 350nm で励起)および蛍光励起スペクトル(破線, 520nm で観測), C:染色絹布の可視反射スペクトル, D: 染色絹布の蛍光発光・励起相関三次元スペクトル, E:染色絹布の蛍光励起スペクトル(左, 520nm で観測)および蛍光発光スペクトル(右, 350nm (実線)および450nm (破線)で励起).

Fig. 2 UV-visible absorption, reflection, and fluorescence spectra of methanol solutions and silk clothes dyed by typical protoberberines, berberine (black), palmatine (red), coptisine (blue), and jatrorrhizine (green).

A: UV-visible absorption spectra of methanol solutions, B: fluorescence emission (straight lines, excited at 350nm) and excitation (dashed lines, monitored at 520nm) spectra of methanol solutions, C: visible reflection spectra of dyed silk clothes, D: fluorescence three dimensional excitation-emission correlation spectra of dyed silk clothes, E: left: fluorescence excitation spectra monitored by 520nm, right: emission spectra excited by 350nm (straight lines) and 450nm (dotted lines).

各染色絹布そのものの350nmおよび450nmで励起したときの蛍光・発光スペクトル, および520nmの発光における励起スペクトルは蛍光スペクトルをFig.4に示した。いずれの染料植物による染色絹布においてもきわめて類似の蛍光スペクトルを示し, 中国産黄連を除いて, 520-525nm付近の発光と350-360nmおよび450-

460nm付近の励起スペクトルにおける発光極大が認められた。これらのスペクトルは前述のベルベリン, パルマチンによるものとおおむね一致した。一方, 中国産黄連では発光スペクトルが顕著に長波長シフトし, 蛍光極大波長が550nm付近に観測され, また, 励起スペクトルにおいても470nm付近にピークが移動した。この挙

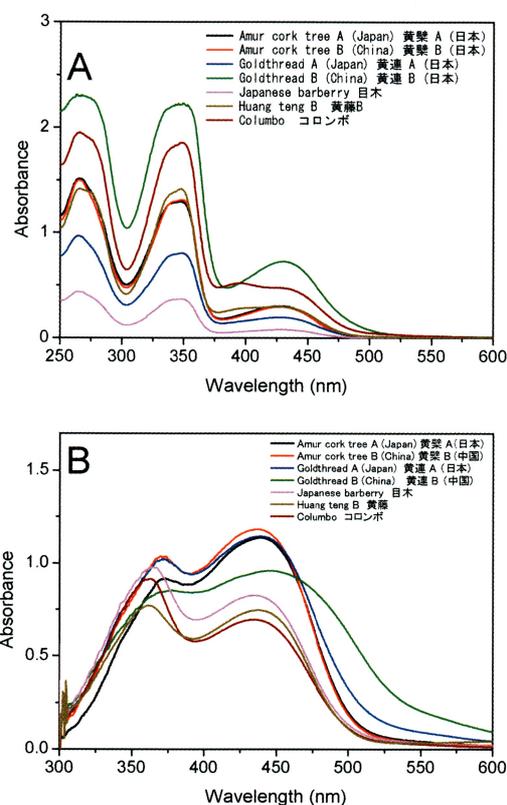


図3 プロトベリベリン含有染料植物染色絹布の紫外可視吸収および反射スペクトル。
A:MeOH抽出液の吸収スペクトル, B:染色絹布の反射スペクトル。

Fig. 3 UV-visible absorption and reflection spectra of silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines.
A: absorption spectra of methanol extracts, B: reflection spectra of dyed silk clothes.

動は前述の反射吸収スペクトルと一致し、中国産黄连に特徴的なものであった。

3.3. プロトベルベリン含有染料植物のHPLCによる組成分析

プロトベルベリン類のHPLC分析には通常のODS逆相系にSDSのような陰イオン溶液を移動相として用いるイオンペア型クロマトグラフィーを適用することにより各成分が容易に分離して定量が可能になる(Masaki *et al.*:1982)。ここでは、日本産黄檗(黄檗A)、中国産黄檗(黄檗B)、日本産黄连(黄连A)、中国産黄连(黄连B)、日本産黄藤(黄藤A, B, C三種類)、コロンボ根茎抽出液を用いて染色した絹布からの抽出液のHPLC分析を行った。移動相はpH7のSDS水溶液/CH₃CN系を用いた。

主要なプロトベルベリン成分であるベルベリン、パルマチン、ヤトロリジンおよびコプチシンのHPLCによる分析をこの条件にて行い、350nmにおける吸収を観

測した。Fig.5に示したように本条件下にてヤトロリジン(J)、コプチシン(C)、パルマチン(P)、ベルベリン(B)の順に完全に分離して溶出し、各成分を容易に特定可能であった。そこで、各染色絹布から5%FA/MeOHで成分を抽出し(Zhang・Lausen:2005)、その抽出液を用いて同じ条件下にてHPLC分析を行った。各抽出液の350nmの吸収で測定したクロマトグラムはFig.5に示したようにそれぞれの染料植物によって特徴的であった。各ピークの保持時間の標品との比較により含有成分を特定し、その成分とそれらのピークの面積比から求めた成分比をTable2にまとめた。

黄檗は日本産および中国産ともベルベリンが主成分であった。副成分として日本産では顕著な量のパルマチンとヤトロリジンが認められたが、中国産ではそれらの量はごく微量であった。同様の日本産と中国産におけるパルマチン量の成分分布が過去に報告されているが(相良ら:1986, 姉帯ら:1987)、ヤトロリジンについても日本産と中国産で違いが認められた(佐々木・藤井・佐々

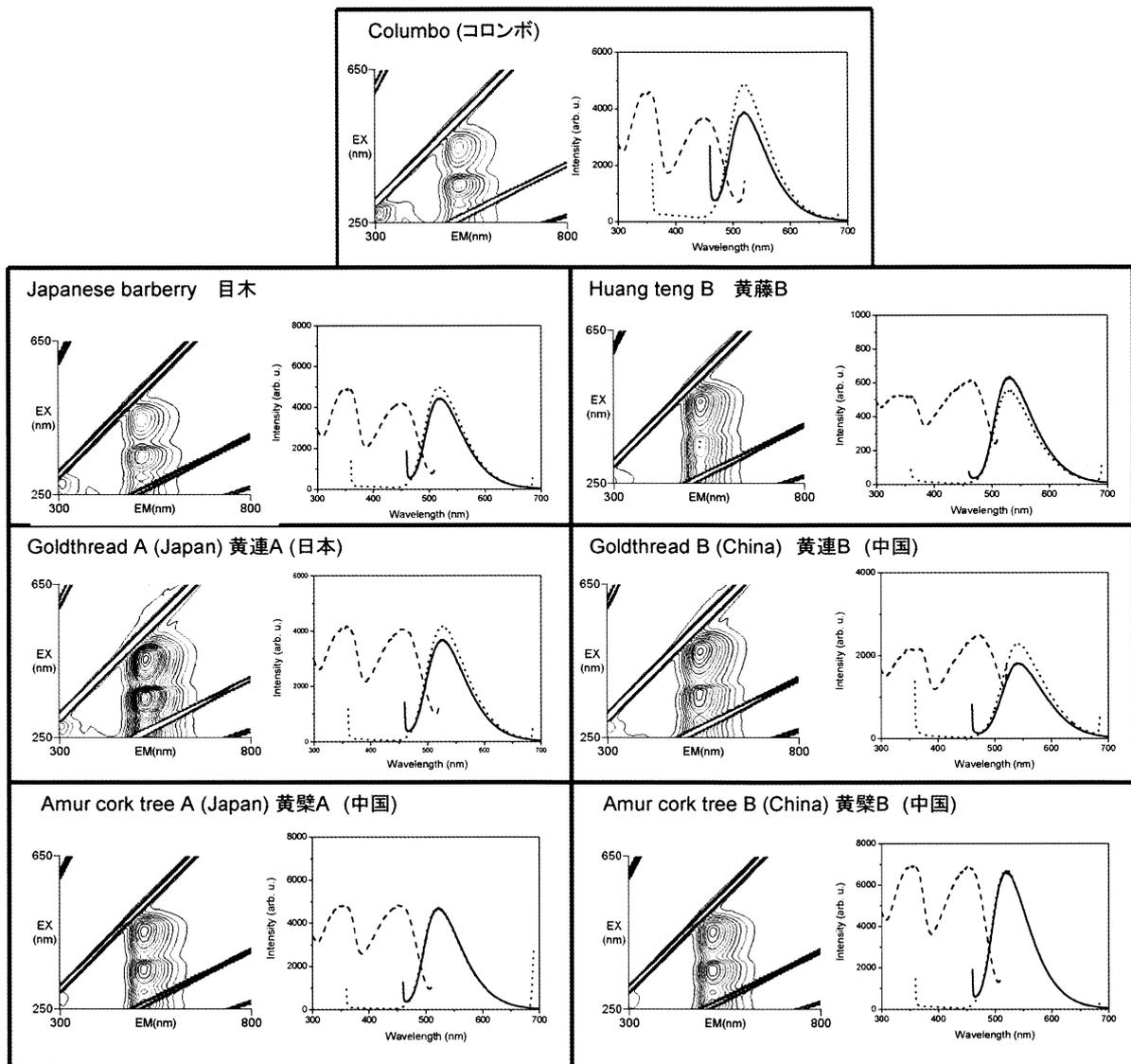


図4 プロトベルベリン含有染料植物染色絹布の蛍光スペクトル。

右：520nmで観測した励起スペクトル（破線），350nm（点線）および450nm（実線）で励起した発光スペクトル
左：励起-発光相関三次元蛍光スペクトル。

Fig. 4 Fluorescence spectra of silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines.

right: excitation spectra monitored by 520nm (dashed line) and emission spectra excited by 350nm (dotted line) and 450nm (straight line), left: three dimensional excitation-emission correlation spectra.

木：2012)。

黄連には日本産，中国産ともにベルベリンとパルマチンのほかに黄檗では認められない成分が検出された。その成分の吸収スペクトルはベルベリンに比べて長波長に極大吸収を有するコプチシンの特徴を示し，さらにそのHPLCにおける保持時間も一致した。ベルベリンに対するパルマチン量は日本産では微量であったが，中国産では逆にその量が顕著に増加し，黄檗とは逆の結果であった（相良ら：1986）。黄連では日本産，中国産ともコプチシンの存在が特徴であり，この成分の検出により，他

の染料植物と容易に区別しての同定が可能であった。中国産黄連にはヤトロリジンの前後に複数の未知成分のピークが認められた。また，パルマチンとコプチシンの含有量は日本産黄連と中国産黄連によって大きく異なり，成分分布に基づいて黄連の由来についての情報が得られることを示している（米田ら：1988）。コプチシンは前述のようにベルベリンやパルマチンに比べて吸収極大波長ならびに蛍光発光・励起波長が長波長側に認められる。黄連類が他の染料植物に比べて長波長側に吸収並びに蛍光を有したのはこのコプチシンの存在によるものである。

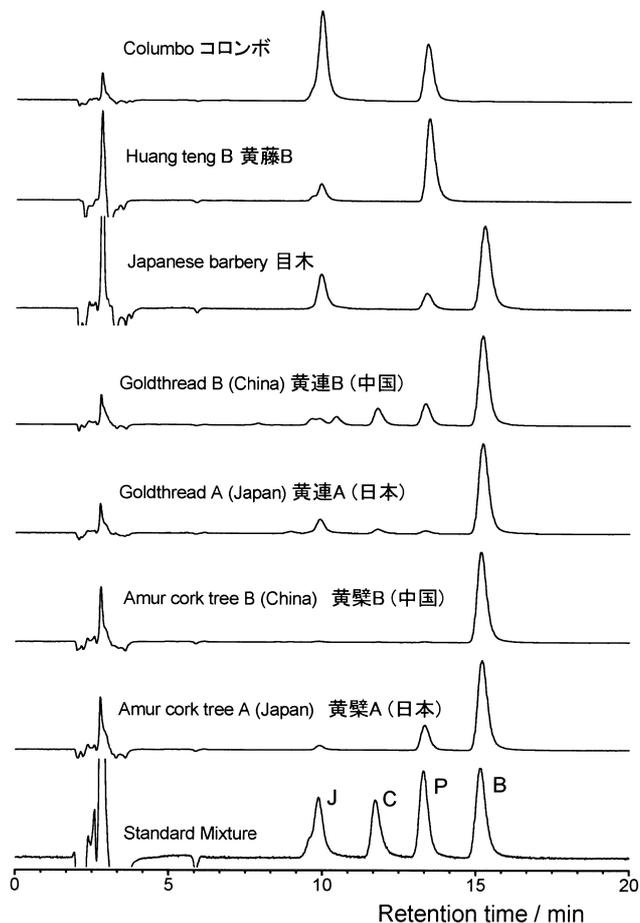


図5 プロトベルベリン含有染料植物染色絹布抽出液のHPLCクロマトグラム。
J, C, P, Bはヤトロリジン, コプチシン, パルマチン, ベルベリンを示す。

Fig. 5 HPLC chromatogram of extracts from silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines.
J, C, P and B indicated jatrorrhizine, coptisine, palmatine, and berberine, respectively.

また、この含有量の大小により日本産黄連よりも中国産黄連で大きな波長シフトを示したものと考えられる。

目木では黄檗と同様にベルベリンが主成分であり、副成分としてパルマチンとヤトロリジンが認められた。黄檗に比べて抽出された総ベルベリン量が低く、ベルベリンに対するパルマチン、特にヤトロリジン含有量が高かった。TLC-DM法でのヘビノボラズ（目木の別名）の分析に関する過去の報告ではベルベリンのほかに大量のパルマチンが含まれるとの記載があり（山岸ら：1977）、この大量の二つの副成分の存在が他の染料植物との鑑別を行う上での特徴であろう。

黄藤（あるいは土黄連）ではベルベリンがほとんど検出されず、主成分はパルマチンであった。今回測定した三種の黄藤ともパルマチンに対し20%程度のヤトロリジンが認められ、この二つのプロトベルベリン成分を含むものであった。これはパルマチンを主成分としベルベ

リンを含まない染料植物であるとする報告と一致する結果である（Zhang *et al.*: 2007）。黄藤はツヅラ藤科の植物であり、中国南部から東南アジアに分布している（中薬大辞典：1985）。生薬としての利用のほかに染料としての利用されることがあるとされており、実際に、Peabody Essex Museum所蔵の絹の裂と糸の輸出用見本帖（1830-1840）及び19世紀中国製国内用の絹糸・肩掛け及び官服においてベルベリン成分不含有を根拠にその使用が想定されている（Zhang *et al.*: 2007）。

コロンボでは、ベルベリンが全く認められず、主要成分としてパルマチンのほかヤトロリジンと同じ保持時間にピークが検出された。この成分構成はベルベリンを主成分とする黄檗、黄連、目木などの染料植物とは異なる成分組成であり、コロンボと黄藤に特徴的なものであった。二つの成分組成に注目すると黄藤ではパルマチンが主成分であるのに対し、コロンボではヤトロリジンが主

表2 プロトベルベリン含有染料植物染色絹布抽出液の HPLC 分析による成分組成分析.

Table 2 Composition of typical protoberberines extracted from silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines, determined by HPLC analysis.

dye plants 染料植物	protoberberines (%) ^{a)}			
	jatrorrhizine	coptisine	palmatine	berberine
Amur cork tree A (Japan) 黄檗A (日本)	4	0	20	100
Amur cork tree B (China) 黄檗B (中国)	< 1	0	< 1	100
Goldthread A (Japan) 黄连A (日本)	13	4	3	100
Goldthread B (China) 黄连B (中国)	4	18	21	100
Japanese barberry 目木	32	0	17	100
Huang teng A 黄藤A	20	0	100	< 1
Huang teng B 黄藤B	21	0	100	< 1
Huang teng C 黄藤C	18	0	100	2
Columbo コロンボ	100	0	66	0

^{a)} Relative area monitored by 350nm absorption.

成分であった。このように黄藤等の分析においてベルベリン、パルマチンだけではなくヤトロリジンなどの成分の定量的な解析を行うことでより明確な分析結果を提示できるものと考えられる。

以上のように、HPLC 分析によりベルベリンの有無を容易に判定可能であり、さらにパルマチンとヤトロリジン成分比率を定量的に取得することができる。コロンボ、黄藤などのベルベリン非含有染料植物の特定がこの組成分析により容易に行えることを示している。

3.4. ESI 質量分析による微量組成分析

3.4.1. プロトベルベリン類の ESI 質量分析

エレクトロスプレーイオン化による質量分析を、イオ

ントラップ型分析器を用いて行った。HPLC の測定に用いた溶液を 1/10000 に希釈したベルベリン 3 ng/ml (10^{-8} mol/l) の MeOH 溶液を用いて測定を行ったところ、陽イオンモードにおいて $[M]^+$ に相当する m/z 336 のイオンが高感度で選択的に観測された (Fig. 6A)。ベルベリンの濃度変化により検出限界となる濃度を求めたところ、上記溶液をさらに 1/10000 に希釈した約 0.3 pg/ml (10^{-12} mol/l) の濃度においておよそ 100 の S/N 比で測定が可能であった (Fig. 6B)。この濃度付近が測定限界であるものと考えられる。この溶液を 10 μ l 用いて測定した場合に換算すると必要とする最小量のベルベリン量は 3 fg (0.01 fmol) 程度と見積もることができ、ベルベリンの検出のみに限定されるが、きわめて微量で

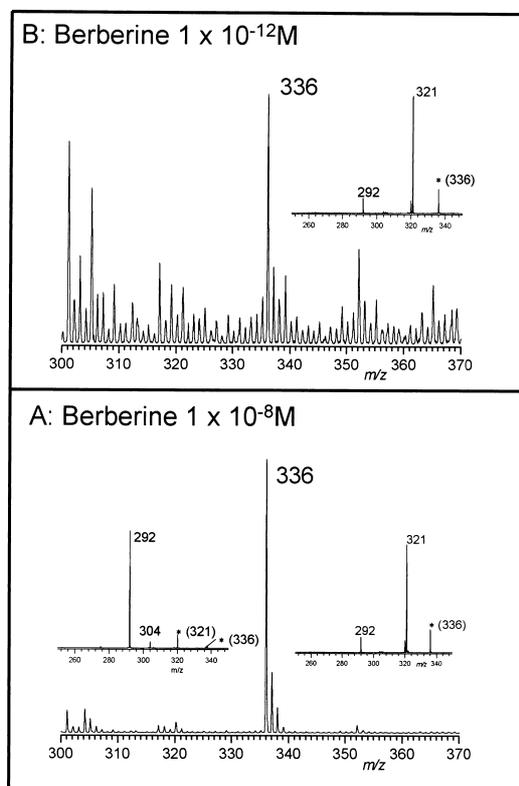


図6 ベルベリンの MeOH 溶液の ESI-MS, MS/MS および MS3 スペクトル. MS_n での標的イオンは(*)で示した.

A: 1×10^{-8} M 溶液, B: 検出限界付近の高希釈溶液 (1×10^{-12} M).

Fig. 6 ESI-MS, MS/MS, and MS₃ spectra of methanol solutions of berberine.

Targeted ions in MS_n spectra were shown as (*).

A: diluted solution (1×10^{-8} M), B: highly diluted solution (1×10^{-12} M) indicating detection limit.

の分析が可能である。ベルベリンの分子イオンである m/z 336 をターゲットとする MS/MS 測定を行ったところ、エーテル結合の開裂に伴う脱メチル化体に相当する m/z 321 $[M-CH_3]^+$ およびさらなる CH_3O の脱離と水素移動を経た m/z 292 $[M-CH_3-OCH_3+2H]^+$ のプロダクトイオンを生成し、段階的なエーテル結合の解裂による $-CH_3$ と $-OCH_3$ に相当するピークを与えた。分子イオンの検出限界である 10^{-12} mol/l の溶液を用いて MS/MS 測定を行った場合においてもきわめて高い S/N 比 (およそ 2000) で全く同一のプロダクトイオンを与え、分子イオンの直接的な検出に加えて、MS/MS を併用することにより SN 比の著しい改善が実現可能であり、ごく微量で高精度の分析が行いうることを示した。

パルマチン, ヤトロリジン, コプチシンにおいても MeOH 溶液 (1×10^{-6} M) を用いてベルベリンと同じ条件で測定した (Fig. 7)。いずれにおいても各成分の分子イオン $[M]^+$ に相当する m/z 352, 338, 320 のイ

オンとそれらの同位体イオンのみが観測され、選択的に分子イオンが得られた。この分子イオンに対し MS/MS を行うと、パルマチン, ヤトロリジンではベルベリンと同様 $-CH_3$ と $-CH_3O$ に相当するプロダクトイオンを、コプチシンでは $-CH_2O-$ 基の脱離によるプロダクトイオンが得られ、いずれにおいてもエーテル結合の開裂によるイオンを与えた。このように $[M]^+$ に相当する分子イオンの質量数と MS/MS によるプロダクトイオンのパターン双方を観測することにより、各プロトベルベリン成分を容易に同定できることを示した。

3.4.2. プロトベルベリン含有植物による染色布抽出液の ESI 質量分析

HPLC の分析に用いた黄檗, 黄連, 目木, 黄藤およびコロンボによる染色試料からの抽出液を ESI-質量分析にて測定し、プロトベルベリン類の同定と成分組成の定量を行った。試料溶液は抽出液を MeOH で 1/100 濃度に希釈し、前記各成分の分析と同じ条件で行った。各抽出液の測定結果を Fig. 8 に、各成分の相対強度を

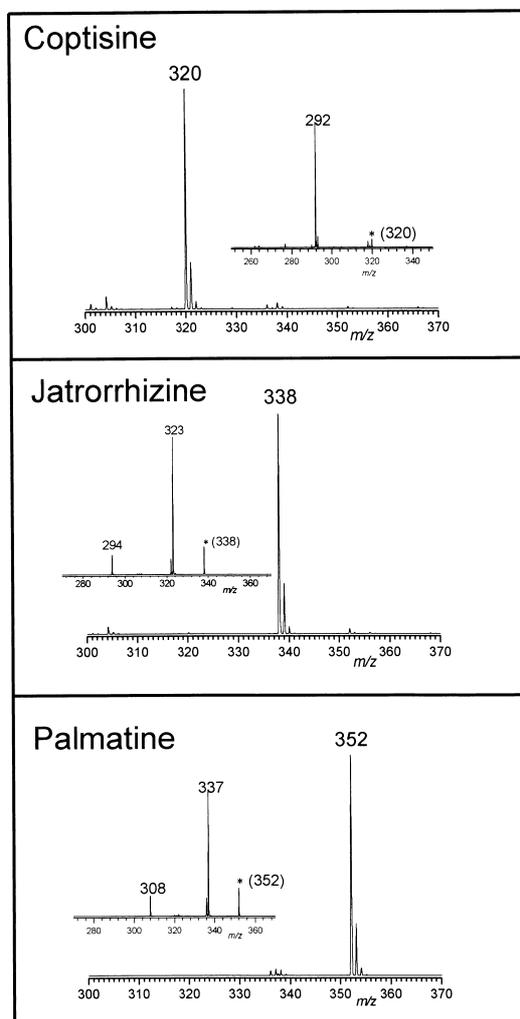


図7 パルマチン,ヤトロリジンおよびコプチシンの MeOH 溶液($1 \times 10^{-6} \text{M}$)の ESI-MS ならびに MS/MS スペクトル MS/MS での標的イオンは(*)で示した

Fig. 7 ESI-MS spectra of methanol solutions of palmatine, jatrorrhizine, and coptisine ($1 \times 10^{-6} \text{M}$). Inset: MS/MS analysis targeted on their molecular ions shown as (*).

Table 3 に示した。

日本産黄蘗の分析ではベルベリンの分子イオン $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 336 のイオンが最大のピークとして認められ、パルマチンの $[\text{M}]^+$ の相当する m/z 352 とヤトロリジンの $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 338 のイオンが少量検出された。ベルベリン強度を 100% とする相対強度はそれぞれ 29% および 7% であった。同様に中国産黄蘗を測定した結果はベルベリンの $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 336 が主ピークとして認められ、パルマチンの $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 352 (2%) とヤトロリジンの $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 338 (4%) が検出された。

黄連は HPLC による分析では黄蘗に含まれる成分に加えて、コプチシンの存在がその特徴である。中国産黄連を測定した結果、ベルベリンの $[\text{M}]^+$ 、パルマチンの

$[\text{M}]^+$ 、ヤトロリジンの $[\text{M}]^+$ に相当する m/z 336, 352, 338 に加えて、 m/z 320 にピークが認められた。これはコプチシンの分子イオン $[\text{M}]^+$ に相当する。また、日本産黄連も同様に同じ四成分に相当するイオンが検出され、いずれにおいても構成成分は HPLC による分析結果と一致した。

目木も同様に測定するとベルベリン、パルマチン、ヤトロリジンに相当するイオンが認められ、黄蘗、コロンボはパルマチンとヤトロリジンの相当する質量数の分子イオンのみが観測され、ベルベリンに相当する m/z 336 が認められなかった。ここで観測された成分はいずれも HPLC によって検出された成分とおおむね一致した。ここで検出された各プロトベルベリンの分子イオンに相当する質量数のイオンに対して MS/MS を行うと各成

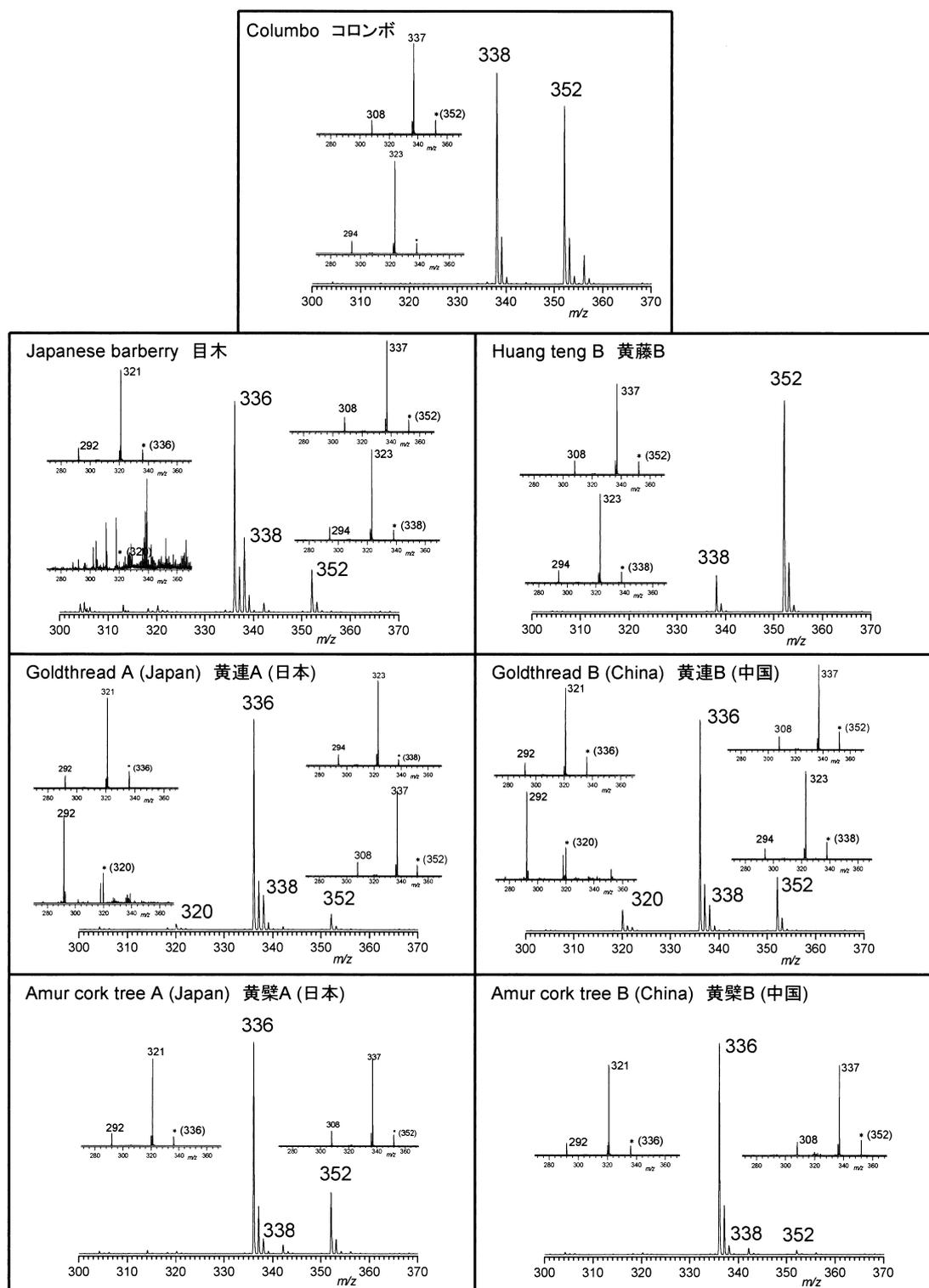


図8 プロトベルベリン含有染料植物染色絹布抽出液のESI-MSおよびMS/MSスペクトル。MS/MS分析はベルベリン(m/z 336)、パルマチン(m/z 352)、コプチシン(m/z 320)及びヤトロリジン(m/z 338)に相当する分子イオンを標的イオンとした(図中*で示した)。

Fig. 8. ESI-MS and MS/MS spectra of extracts from silk cloths dyed by the dye plants including protoberberines. MS/MS analysis targeted on molecular masses shown as * corresponding to berberine (m/z 336), palmatine (m/z 352), coptidine (m/z 320), and jatrorrhizine (m/z 338).

分のMS/MSの結果と一致し、各質量数を示す成分がいずれもプロトベルベリンに由来することがわかる。しかしながら、目木の分析においてコプチシンに相当する

m/z 320に少量のピークが観測されたが、このMS/MSではコプチシンとの一致は見られず、HPLC分析と同様コプチシンは含まないものと考えられる。こ

表3 プロトベルベリン含有染料植物染色絹布抽出液のESI質量分析による成分組成分析.

Table 3 Composition of typical Protoberberines extracted from silk clothes dyed by the dye plants including protoberberines, determined by ESI-MS analysis.

染料植物 dye plants	relative intensity 相対強度 (%)			
	jatrorrhizine ^{a)} <i>m/z</i> 338	coptisine ^{b)} <i>m/z</i> 320	palmatine <i>m/z</i> 352	berberine <i>m/z</i> 336
Amur cork tree A (Japan) 黄檗A (日本)	7 (4)	0	29	100
Amur cork tree B (China) 黄檗B (中国)	4 (1)	0	2	100
Goldthread A (Japan) 黄连A (日本)	17 (14)	3 (5)	7	100
Goldthread B (China) 黄连B (中国)	12 (9)	10 (17)	24	100
Japanese barberry 目木	36 (33)	3 ^{c)}	21	100
Huang teng A 黄藤A	22	0	100	0
Huang teng B 黄藤B	18	0	100	0
Huang teng C 黄藤C	20	0	100	0
Columbo コロンボ	100	0	80	0

a) The calculated values eliminating the contribution by stable isotopes of berberine were given in parentheses.

b) The values corrected for the relative intensities between ESI-MS in *m/z* 320 and HPLC analysis were given in parentheses.

c) MS/MS analysis targeted on the *m/z* 320 were quite different from that of coptisine.

のようにESIイオン化質量分析により主要なプロトベルベリンの検出が可能であり、これらの構成成分を確定することと組成比を検討することで各染料植物類の相互区別と同定が可能である。

ベルベリンに対する相対強度をHPLC分析において350nmでモニターしたときの結果と質量分析の結果とを比較すると、質量分析ではパルマチン、ヤトロリジン量が過大に評価されるのに対し、コプチシンでは過少な数値を示した。ヤトロリジンの分子イオンと同じ質量数 *m/z* 338 にはベルベリンの ¹⁸O の存在による同位体イオン [M+2]⁺ が *m/z* 336 の強度に対し理論的に3.02%の

割合で含まれる。従って、ベルベリンが存在する場合、ヤトロリジンで観測された分子イオン強度にはこの同位体イオン強度が含まれる値である。そのため、実際のヤトロリジン量を反映するにはこれを減ずる必要がある。また、ベルベリンに対する各プロトベルベリン成分の相対感度を350nmでモニターしたHPLC分析における面積比と質量分析による相対強度で比較すると他の成分に比べてコプチシンが質量分析で特異的に感度が低く、対ベルベリンの補正値は1.65であった。この同位体イオンの強度と相対感度両者の補正を行って得られた結果をTable 3のカッコ内に示した。この補正を行った結果は

概ね HPLC による分析結果と一致する数値が得られ、ESI-MS による分析で成分組成の相対強度求め、その比率から染料植物の由来を論じることが可能であることを示す。パルマチン量の相対値が HPLC に比べて過大に評価される原因についてはパルマチンと同じ質量数を示す未知成分の混在の可能性があり、今後の検討を要するところである。また、中国産黄連のヤトロロジン量が HPLC 分析と MS 分析によってもっとも異なる結果を示したが、これは HPLC において構造未知の成分とヤトロロジンとの分離不十分により、正確な面積比として得られていないことが原因であるものと考えられる。

4. 結 語

プロトベルベリン類は特徴的な可視吸収スペクトルと蛍光発光・励起スペクトルを示す。そのため、非破壊的な検出が容易である。この中で一般に染料として用いられるものは黄檗であるが、同様のスペクトル挙動を示す染色可能な染料植物として、黄連、目木、黄藤などが存

在する。本研究では、主要なプロトベルベリン類 4 成分と特徴のある成分組成を有する代表的な染料植物の分光特性と HPLC 分析による定量分析を行ない、4 成分の検出と組成比の特定によりこれらの染料植物の相互鑑別が可能であることを示した。また、HPLC による成分分析に加えて、ESI-イオン化による質量分析は陽イオン性のプロトベルベリン類の高感度微量分析が可能であり、4 成分の相対強度に若干の補正を要するものの HPLC 分析と同様に染料植物の特徴を捉え、特定することができることを示した。本極微量成分分析手法を非破壊的な蛍光スペクトル法と組み合わせることにより、サンプリング対象の絞り込みと微量サンプリングによるプロトベルベリン類含有染料特定手法としてきわめて有効なものになるものと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は日本学術振興会からの科学研究費補助金基盤研究 20550123 および 23550153 により行った。

引用文献

- 姉帯正樹・林 隆章・山岸 喬 1987「黄柏中の Berberine 型アルカロイドの定量」北海道衛生研究所報 37 pp.18-21
- 姉帯正樹 1994「黄連の化学的品質評価—HPLC 法と吸光度法による Berberine 型アルカロイドの定量—」北海道衛生研究所報 44 pp.1-6
- 相楽和彦・伊藤裕二・尾島光春・大島俊幸・吉田継親・糸川秀治 1986「イオン対クロマトグラフィーによるオウレン、オウバク及び漢方方剤中のベルベリン型アルカロイドの定量」分析化学 35 pp.326-329
- 後藤捷一・山川隆平 1937「染料植物譜」染色文化社 pp.209-210
- 佐々木良子、佐々木健 2009「染織文化財に用いられた染料の微量分析手法の開発（1）ESI イオン化質量分析によるアントラキノン系赤色染料の同定」考古学と自然科学（文化財科学会誌）59 pp.83-96
- 佐々木良子、佐々木健 2009「染織文化財に用いられた染料の微量分析手法の開発（1）ESI イオン化質量分析によるアントラキノン系赤色染料の同定」考古学と自然科学（文化財科学会誌）59 pp.83-95
- 佐々木良子・藤井健三・佐々木健 2010「京都工芸繊維大学所蔵裂地『匹田縫裂菊松竹梅に宝尽くし縫（AN.106）』について」文化財保存修復学会誌 55 pp.38-66
- 佐々木良子・佐々木健 2011「染織文化財に用いられた染料の超微量分析の試み（3）ESI 質量分析による初期合成染料の分析」考古学と自然科学（文化財科学会誌）62 pp.1-18
- 佐々木良子・藤井健三・佐々木健 2012「黄檗の成分分析による染織文化財の産地同定に関する研究—日本産と中国産の識別—」考古学と自然科学（文化財科学会誌）63 pp.71-88

- 下山 進・野田裕子 1997「光ファイバーを用いる三次元蛍光スペクトルによる古代中国の染織物”錦”の色糸に使用された染料の同定」分析化学 46 pp.571-578
- 上海科学技術出版社編 1985 中薬大辞典 小学館 1 p.155
- 谷 千秋・高尾梢雄 1957「黄連のフェノール性塩基について」薬学雑誌 77 pp.805-806
- 土佐政二・石原朗子・野瀬康代・牛川 務・吉田節也・中澤裕之・富松利明 1989「生薬の品質管理に関する研究（第1法）黄檗中のアルカロイドの分析とその分布」生薬学雑誌 43 pp.28-34
- 松田泰典 1997「黄色系天然染料の三次元蛍光スペクトル測定による非破壊染料分析」文化財保存修復学会誌 41 pp.54-63
- 山岸 喬・森三佐雄 1976「道産生薬の規格設定に関する研究（第10報）黄柏中のベルベリン型アルカロイドの定量」北海道衛生研究所報 26 pp.26-31
- 山岸 喬・森三佐雄・木下良裕・本間正一 1976「道産生薬の開発に関する研究（第2報）ヒロハのヘビノボラズのベルベリン型アルカロイドの存在について」北海道衛生研究所報 26 pp.102-104.
- 米田諒典・山形悦子・華 龍津・水野瑞夫 1988「生薬資源の研究（第2報）中国産黄連の組織形態とベルベリン型アルカロイド組成について」生薬学雑誌 42 pp.116-121
- 山崎青樹 1985 草木染染料植物図鑑 美術出版社 p.46
- 山崎青樹 1987 続草木染染料植物図鑑 美術出版社 p.224
- Cañamares, M. V., Lombardi, J. R., Leona, M. 2008 “Surface-enhanced raman scattering of Protoberberine alkaloids” J. Raman Spectrosc, 39 pp.1907-1914
- Grycová, L., Dostal, J., Marek, R. 2007 “Quaternary Protoberberine alkaloids,” Phytochemistry 68 pp.150-175.
- Hsieh, T. J., China, Y. C., Wo, Y. C., Chen, C. Y. 2004 “Chemical constitutions from the stems of *Mahonia japonica*”, J. Chin. Chem. Soc. 51 pp.443-446.
- Kim, J. P., Jung, M. Y., Kim, J. P., Kim, S. Y. 2000 “Antiphotooxidative activity of protoberberines derived from *Coptis japonica* Makino in the chlorophyll-sensitized photooxidation of oil” J. Agric. Food Chem. 48 pp.1058-1063.
- Misaki, T., Sagara, K., Ojima, M., Kakizawa, S., Oshima, T., and Yoshizawa, H. 1982 “Simultaneous determination of Berberine, Palmatine, and Coptisine in crude drugs and oriental pharmaceutical preparations by ion-pair high-performance liquid chromatography” Chem. Pharm. Bull. 30 pp.354-357
- Wafo, P., Nyasse, B., Fontaine, C. 1999 “A 7, 8-dihydro-8-hydroxypalmatine from *Enantia chlorantha*” Phytochemistry 50 pp.279-281.
- Zhang, X, Laursen, R. A. 2005 “Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS” Analytical Chemistry 77 pp.2022-2025.
- Zhang, X., Corrigan, K., MacLaren, B., Leveque, M., and Laursen, R. A., 2007 “Characterization of yellow dyes in nineteenth-century Chinese textiles” Studies in Conservation 52 pp.211-220.

(2011年9月2日受付, 2012年5月7日受理)

Determination of Dye Plant Materials Including Protoberberines by Component Analysis Using HPLC and ESI-Mass Spectrometry

Yoshiko SASAKI¹⁾ and Ken SASAKI²⁾

¹⁾ Museum and Archives, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

²⁾ Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

Plant materials including protoberberine alkaloids have been used as medicinal herbs and yellow dyestuffs since ancient times in East Asia. Amur cork tree (Kihada, *Phellodendron amurense* and *Phellodendron chinense*) has generally been recognized as traditional protoberberine dye material and has been easy to detect non-destructively based on the characteristic spectroscopic properties of its major protoberberine ingredient, berberine. Goldthread (Ohren, *Coptis japonica* and *Coptis chinensis*) and Japanese barberry (Megi, *Berberis thunbergii*) have also been recognized as dye plants and include several kinds of protoberberines. Recently, Huang teng, which is a Chinese local medicinal herb, was reported as a yellow dye in Chinese traditional textiles. In this research, determination of dye plants (Amur cork tree, Goldthread, Japanese barberry, and Huang teng), as well as their protoberberine alkaloids, was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) on the basis of quantitative analysis of four major chemical ingredients, berberine, palmatine, coptidine, and jatrorrhizine. HPLC analysis easily discriminated Goldthread by the presence of coptisine, and Huang teng and Columbo by the absence of berberine. Whereas, Amur cork tree and Japanese barberry were characterized by the presence of palmatine and jatrorrhizine in small amounts, in addition to the major ingredient, berberine. Relative amounts of minor ingredients such as berberine could be largely affected by their origins, which is useful for discriminating Japanese Amur cork tree from the Chinese variety. ESI-MS analysis was highly sensitive to cationic protoberberines, which made it possible to detect berberine in the amount of 10^{-12} mol/l. Microanalysis to identify plant materials including protoberberine alkaloids by ESI-MS and tandem MS as an alternative to HPLC analysis was achieved by determining the relative amounts of ingredients based on the relative intensity of their molecular ions.