

バイ・エム・エー

VMAシリーズ



VMA 25/37

VMA Type MA

ビルベリーエキス



Omnipotence in Natural Herbs

Elution Order HPLC	Compound Name	R'3	R'5	R3	molecular mass (m/z)	fragments (m/z)
1	Dp-3-O-Gal	H	OH	Galactose	465	303
2	Dp-3-O-Glc	H	OH	Glucose	465	303
3	Cn-3-O-Gal	H	H	Galactose	449	287
4	Dp-3-O-Ara	H	OH	Arabinose	435	303
5	Cn-3-O-Glc	H	H	Glucose	449	287
6	Pt-3-O-Gal	H	OCH3	Galactose	479	317
7	Cn-3-O-Ara	H	H	Arabinose	419	287
8	Pt-3-O-Glc	H	OCH3	Glucose	479	317
9	Pe-3-O-Gal	CH3	H	Galactose	463	301
10	Pt-3-O-Ara	H	OCH3	Arabinose	449	317
11	Pe-3-O-Glc	CH3	H	Glucose	463	301
12	Mv-3-O-Gal	CH3	OCH3	Galactose	493	331
13	Pe-3-O-Ara	CH3	H	Arabinose	433	301
14	Mv-3-O-Glc	CH3	OCH3	Glucose	493	331
15	Mv-3-O-Ara	CH3	OCH3	Arabinose	463	331

表:配糖体の分子量とHPLCによる溶出時間の序列、及び各分子量

Dp・・・デルフィニジン、Cn・・・シアニジン、Pt・・・ベツニジン、Pe・・・ペオニジン、Mv・・・マルビディン、Ara・・・アラビノース、Gal・・・ガラクトース、Glc・・・グルコース

Compound	Acai	Black Currant	Small Cranberry	Boysenberry	Chokeberry	Crowberry	Elderberry	Lingonberry (Cowberry)	Mulberry	Rabbiteye
Cn-										
3-O-gal			+			+		+		+
3-O-glc	+	+	+	+	+	+		+	+	+
3-O-ara			+			+		+		+
3-O-rut	+	+		+					+	
3-O-sop				+						
3-O-xyl					+					
3-O-sam	+									
3-O-sam-5-glc							+			
Dp-										
3-O-gal			+			+				+
3-O-glc		+	+			+				+
3-O-ara			+			+				+
3-O-rut		+								
Mv-										
3-O-gal			+			+				+
3-O-glc			+							+
3-O-ara			+			+				+
Pe-										
3-O-gal			+			+				+
3-O-glc	+	+	+							+
3-O-ara			+			+				+
3-O-rut	+									
Pt-										
3-O-gal			+			+				+
3-O-glc			+			+				+
3-O-ara			+			+				+

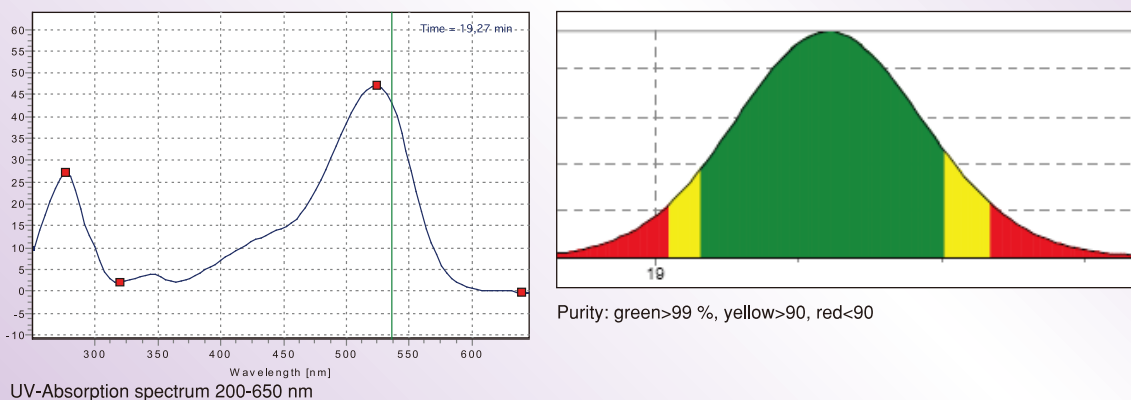
表 各ベリーに発生する特定のアントシアニン

⑦ アントシアニン配糖体の定量法

VMAシリーズの成分分析は、2重確認を行うが、一つ目は一般的なHPLC-UV法により基準物質の分離と標準品とを溶出エリアの対比する手法にて分析が行われる。

(A)10%蟻酸水から(B)メタノール20/アクトニトリル20/蟻酸10/水50(v/v)に40分(100%Aから30%B)45°Cで1.5mL/Min操作。基準ハイパーシルODSコラムを使用。この方法はビルベリーに生じる全ての15アントシアニンの分離(ビルベリーエキスに含まれる少量のアントシアニンを含む)に適する。その他のベリーとの混合エキスも証明できる。例えば、ブラックカラントエキスに生じる主なアントシアニン(dp-3-O-rut, cn-3-O-rut)は上述条件でビルベリーアントシアニンから分離可能だ。DADとともに使用されれば、UV吸収波と溶出ピークの純度チェックが可能である。限られた枠内での最大吸収域(275~525nm程度)が特定のアントシアニンを意味するので、吸収波の評価はアントシアニンの予備的判断に役立つ。例えば、上記したHPLC法を使用して、dp-3-Oグリコシドとcn-3-Oグリコシドの最大吸収はそれぞれ520nm~525nmと530nm~535nmの間で確定する。同時溶解ピークは最大純度の低下を生じるので純度チェックは混合物の相応な分離に役立つ。

下図 On-line DAD spectrum and purity check of Dp-3-O-Gal (own investigations) (Dp-3-O-ガルのDADスペクトラムと純度確認)



しかし、アントシアニン分析が一般化すると平行し、HPLC/UV分析の弱点が明らかになってきている。即ち、DADと純度チェックを利用して、溶解ピークの判定とその純度が不確かである点。アントシアニンの定量化は真正基準の有無に依存するし、そしてほとんどの場合、測定したサンプルの中に含まれると推察されたアントシアニン全ての中から、いくつかアントシアニンを選び、そして、外挿された基準カーブを選んだアントシアニンのために用意することを必要とする。よって不特定多数の標準抽出物との対比においてHPLC-UV分析は常に推定の域までしか及ばない。更に分析結果は、不可避的かまたは意図的に、外的な換算に影響される。更に、詳細な計算の基準(標準品に結合されたクロライドの投入または排除、基準結晶の反イオン)が新たな影響因として加わる。

マス・スペクトロメトリー

マス・スペクトロメトリー(MS)は、アントシアニンの詳細を調べることを可能にする。HPLCとのオンライン結合は多岐に渡るMS技術で溶解ピークの直接分析を可能にする。エレクトロスプレーイオン化(ESI)または正モードの気圧化学的イオン化(APCI)は4極子またはマスアナライザーのイオントラップを伴う最も頻度の高いイオン化技術である。MSによるアントシアニン分析の問題点は、果実ベリーに生じる様々なアントシアニンの典型的な3-O-配糖体類が同じ分子量(例:同じアントシアニンの3-O-glc, 3-O-gal)をもつことである。重複する分裂パターンとなることがしばしばある。故にHPLC/MC分裂は予想される全てのアントシアニンのクロマトグラフィによる分離が要求される。HPLCはひとつの4極子MS(アジリデント)と組み合わされている。ESIを使用し、中程度の分裂ボルト数を与えると、分子量を意味する集合スペクトラ[M]⁺とアントシアニン骨格がスキャンモードで得られる(Figure1参照)。スキャンモードでデータを収集後、単子音がシングルイオンモニタリング(SIM)モードで抽出可能である。Figure2にみられるように、m/z=287をビルベリーエキスから抽出すると、HPLC/MSクロマトグラムは4つのピークを生じる。これはビルベリーに生じる3cn-グリコシドを意味し、そして遊離cnの存在を見せる。

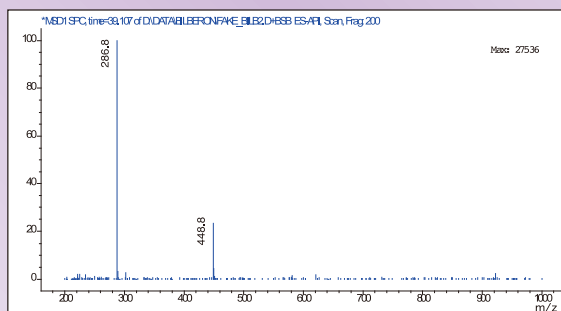


Figure 1, Mass spectrum (ESI-MS, positive mode) of Cn-3-O-glucoside (m/z [M]⁺ and [M-162]⁺)(Cn-3-O-グルコシドのマススペクトラム[ESI-MS 正モード])

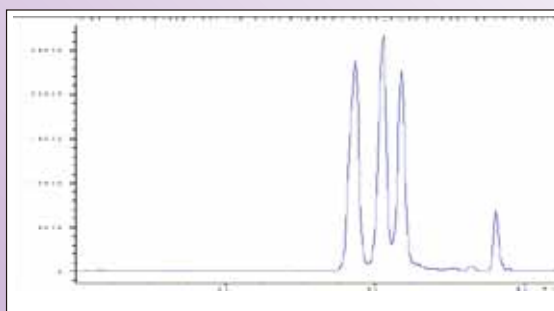


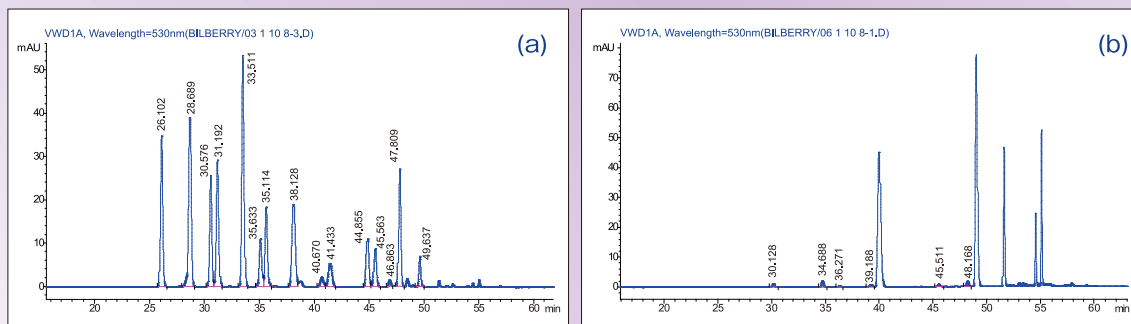
Figure 2, Single Ion Monitoring (ESI-MS, positive mode), m/z 287 (Cn) (シングルイオンモニタリング[ESI正モード])

⑧ アントシアニン配糖体の安定性

アントシアニン配糖体には構造損壊に2つのパターンがある。

一つ目は、加水分解により、アントシアニン遊離が発生すること。

下図(a) (b)は同一検体のHPLC-UVであるが、加熱によって意図的にアントシアニン配糖体を加水分解させ完全なアントシアニンアグリコンだけに代謝させた右図を導く。

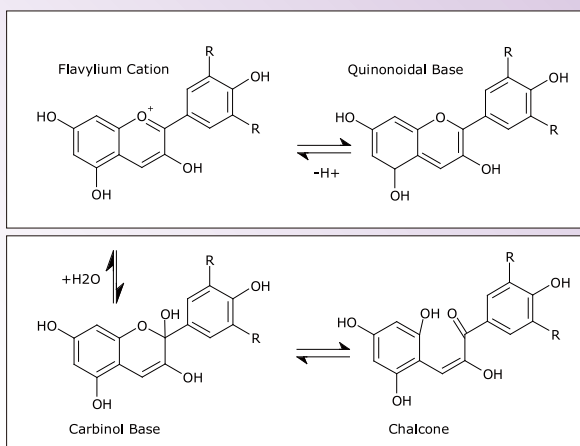


完全な加水分解を得る(ダメージを受ける)ための要因は、熱、pH変化に所要時間が変動する。

同じ加温条件においても酸性メタノール溶液中では、中性水と対比し、アントシアニン配糖体は5倍から10倍加水分解に対する強度が高い。

二つ目は酸化による退色である。

アントシアニンはpHが強酸の溶液中で安定している。中性から弱酸性を示すpHではアントシアニンは急速に変色を伴い分解される。



上図はアントシアニン分解のメカニズムを示したものである。pH1.50程度でフラビリウム陽イオンがキノンベースを形成させる。尚この反応は可逆的である。

pH値の高い(酸性から中性に接近する)場合はフラビリウム陽イオンは水に攻撃されて無色なカルビノール・ベースを形成させ、それは次にカルコンに変性させられる。同様の反応特性がアントシアニンにも見られる。デルフィニジン(3'4'5'-OH)環3'ハイドロキシル・グループは最も早い分解グループである。ペラルゴニン(4'-OH)環単ハイドロキシルは最も安定的なアントシアニンである。B環のハイドロキシル・グループのメチル化は安定性を増す(例: PelはCnより安定している)。グリコシド・パターンもまた、安定性に影響する。配糖体中のアントシアニンは比較的高い安定と遅い分解の複雑さを生み出す、溶解する際のアントシアニンの自己結合特性に関係なく、糖残渣が濃縮に貢献している可能性が高い。

⑨ アントシアニン配糖体の生物学的利用率

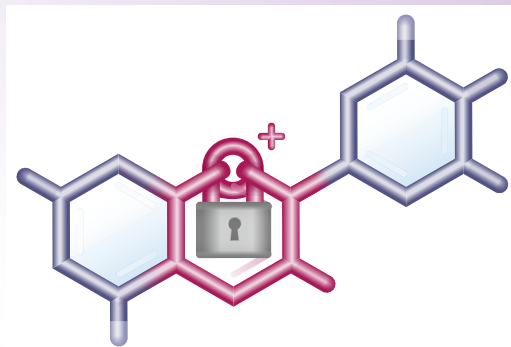
ビルベリーから由来するアントシアニン配糖体の生物学的利用率(バイオアベイラビリティ)はいくつかの文献によれば、他の天然食品由来物と対比して、極めて高いアントシアニンのバイオアベイラビリティをもたらすことが報告されている。

それでも、回収率は5%から13%と推定されており、必ずしも高い吸収率は認められない。

アントシアニン配糖体は体内動態において初期吸収が、単純受動拡散が吸収駆動力である。輸送において著しい不安定性があり、バイオアベイラビリティはクリアランス(臓器による代謝)の影響より、化学構造の不安定性から吸収時の酸化分解とより相関し初期通過効果の影響をより多く受ける。アントシアニンはグリコไซด์類の保護がなく、さらに不安定であり物理的に血中到達が不可能と考えられる。アントシアニン配糖体も小腸細胞膜の中性pHにて、化学構造第1位酸素陽イオン部分が酸化を受け、2重結合部分が開裂され、カルコンへの不可逆的な退色反応をもたらされる。

⑩ VMA Type MA アントシアニン配糖体として 吸収率・利用率150%以上である新機軸とその検証

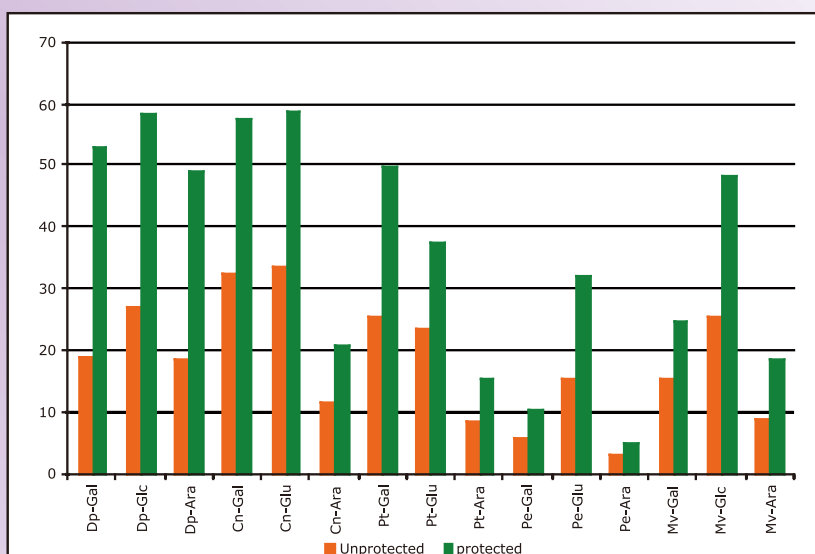
成分抽出行程の段階から、酸化防御をする画期的な技術と発明をVMA Type MAは実現しており、その結果、アントシアニンとしての生体利用率が150%以上まで高められている。申請されている特許の訴求点は、アントシアニン配糖体に対して中性不安定性を改善することで、腸管吸収率を改善し、結果的に生体利用率の改善をする組成物。



⑪ in vitro試験による考察

アントシアニン配糖体が定量された標準ビルベリーエキスと同一アントシアニン配糖体含有量が同一であるVMA Type MA型ビルベリーエキスを準備する。人工胃液にてサンプルを溶解させ、pH7.0に緩衝した後培養された小腸細胞膜に溶液を添加、通過された溶液をメタノール溶液にて回収しHPLC-UVにて成分分析を行う試験。

	Cmax (µg/mL)		AUC0-120 (µg x mL/min)**		%
	標準ビルベリー	VMA Type MA	標準ビルベリー	VMA Type MA	
Dp-Gal	0.197	0.543	19.23	53.05	276
Dp-Glc	0.282	0.666	27.20	58.47	215
Dp-Ara	0.201	0.502	18.62	49.13	264
Cn-Gal	0.390	0.648	32.70	57.75	177
Cn-Glu	0.460	0.614	33.91	58.86	174
Cn-Ara	0.146	0.230	11.77	21.02	179
Pt-Gal	0.279	0.549	25.44	49.99	197
Pt-Glu	0.283	0.393	23.73	37.46	158
Pt-Ara	0.105	0.167	8.416	15.633	186
Pe-Gal	0.075	0.120	5.996	10.599	177
Pe-Glu	0.188	0.351	15.46	32.31	209
Pe-Ara	0.039	0.066	3.143	5.062	161
Mv-Gal	0.191	0.324	15.45	24.87	161
Mv-Glc	0.346	0.514	25.65	48.51	189
Mv-Ara	0.111	0.220	8.823	18.47	209
			275.53	541.18	196.416

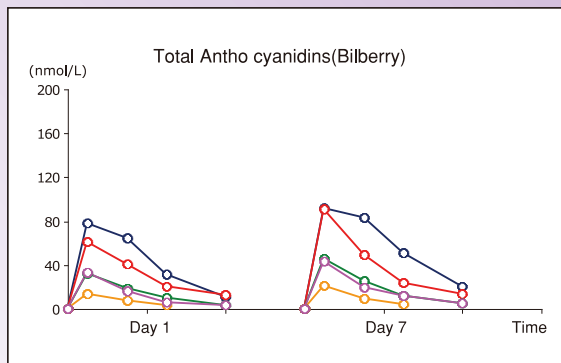


Unprotected : 標準ビルベリーエキス Protected : VMA Type MA

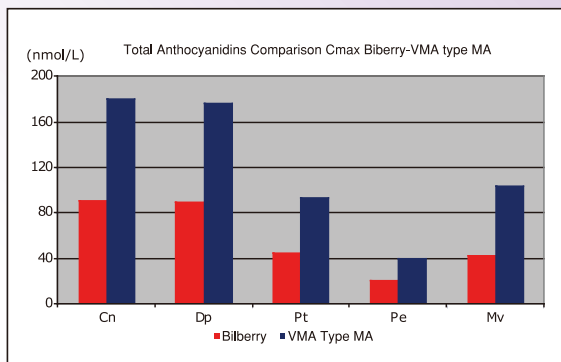
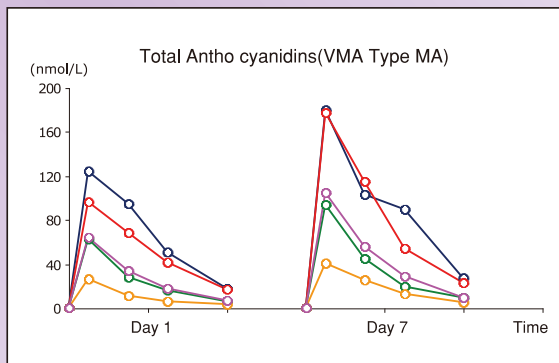
この試験において、VMA Type MAの吸収率は標準ビルベリーエキスと対して196%の吸収率が得られている。

⑫ 臨床的検証 健常者12人による投与試験

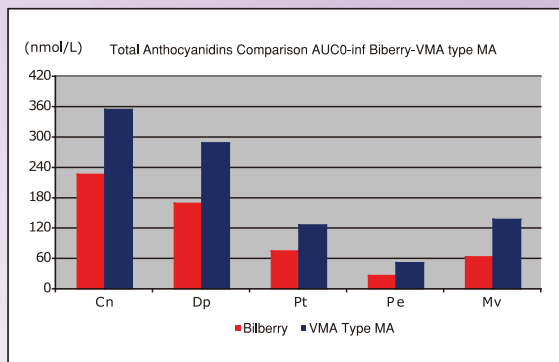
n=12を不作為に2群に分割し、VMA Type MAだけを含有するカプセルと標準ビルベリーエキスだけを含有するカプセル(各500mg)を7日間投与、1週間のウォッシュアウト期間を経てグループを交差させ他方の製剤を7日間投与、採血サンプルを投与30分後、90分後、150分後、240分後に行う。採血サンプルを加水分解をし5種アントシアニンへ代謝させHPLC-UV分析にてアントシアニンとしての血漿濃度を測定する。



青線・Cn、赤線・Dp、緑線・Pt、橙線・Pe、紫線・Mv の血中濃度を示す。



7日間の投与期間を経たアントシアニンとしての血中濃度の対比
赤棒：標準ビルベリーエキス 青棒：VMA Type MA



投与初日アントシアニンとしてのアントシアニンの吸収率
赤棒：標準ビルベリーエキス 青棒：VMA Type MA

⑬ 結論

VMA Type MAは、アントシアニン配糖体として37%含有し、吸光度法による試験にてデルフィニジン換算として吸光性が25%相当を示すビルベリー果実の抽出物である。同等成分含有量のビルベリー果実抽出物と経口投与を対比したとき、アントシアニン配糖体としての生物学的利用率は50%から100%向上されている。結果としてビルベリーに関わる生理機能、例として暗視順応性を含む眼の健康維持、循環系不全の予防や改善における機能性において同一投与量の条件において1.5倍から2.0倍の投与量相当の効果発現能力が期待される。

 **Omnic**® 株式会社オムニカ

本社 東京都中央区日本橋1丁目3-11 浅野ビル9F
TEL 03-3510-1351 FAX 03-3510-1353

板橋工場 東京都板橋区板橋4丁目21-7

URL: <http://www.omnica.co.jp> e-mail: info@omnica.co.jp