

特集 技術開発 3 品質評価及び利用技術

LCMS を用いた生薬の評価について

(独) 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター筑波研究部

栽培研究室室長 瀧野 裕之

はじめに

生薬は天産品であることからその品質には大きくばらつきがある。そのばらつきの要因は例えば産地や収穫後の加工調製法など多くのことが考えられる。

薬用植物総合データベースは平成22年度から厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究（創薬総合推進研究）事業にて独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター長川原信夫が主任研究者となり「漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための基盤整備に関する研究」という研究課題にてその構築が開始された。本データベースは、薬用植物を扱うすべての人に対して有用な情報を与えるデータベースを目指し構築を開始した (<http://mpdb.nibio.go.jp/>)。本研究は、漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースの構築を通じて、漢方薬の品質、有効性並びに安全性確保と国内における効率的増殖法の確立及びその情報公開による薬用植物栽培振興による行政支援並びに漢方製剤原料となる貴重な遺伝資源の緊急的確保と維持を目的とした生物資源に関する研究支援、産業振興に寄与することを目的とする。本データベースの中核をなすのは、国内市場流通生薬を業界団体の協力のもと収集した「モデル試料生薬」であり、それをもとに成分分析データ情報（TLC 写真）、官能データ情報（味、色）、内部形態情報、遺伝子の鑑別部位及

び基原鑑別に関する情報、生物活性情報のデータを付加し総合的薬用植物データベースの構築を行っている（図1）。本稿においては、このモデル試料生薬を用いて LCMS を用いた品質評価について詳しく述べる。

モデル試料生薬の利用方法と管理

各モデル生薬は、漢方処方としての使用方法を考えいづれも熱水抽出を行い（2時間）、その後1週間凍結乾燥を行った。得られたエキスは、LCMS 分析、TLC 分析のほか、本データベースに登録する各種情報（官能試験、生物活性、遺伝子解析、局方試験、内部形態観察）を担当研究拠点にて検討された（図1）。なお、このモデル試料生薬は当研究所の管理番号（NIB-〇〇〇〇）を付与し、モデル試料管理システムにより在庫管理されている。入手後に入手元からのその生薬に関する情報をこのシステムによりエキスの保管状況、生



図1

モデル試料を用いて何が出来るか？



図2

1. 多変量解析で生薬の品質評価を行う

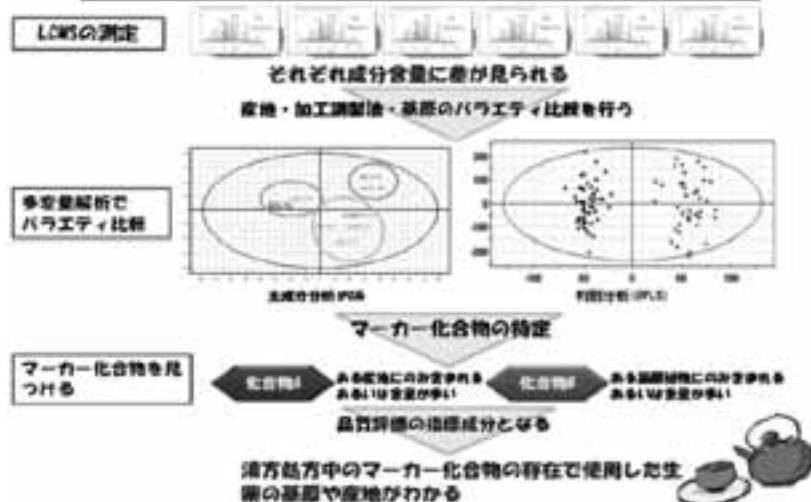


図3

2. 多変量解析で生物活性化合物を探索する

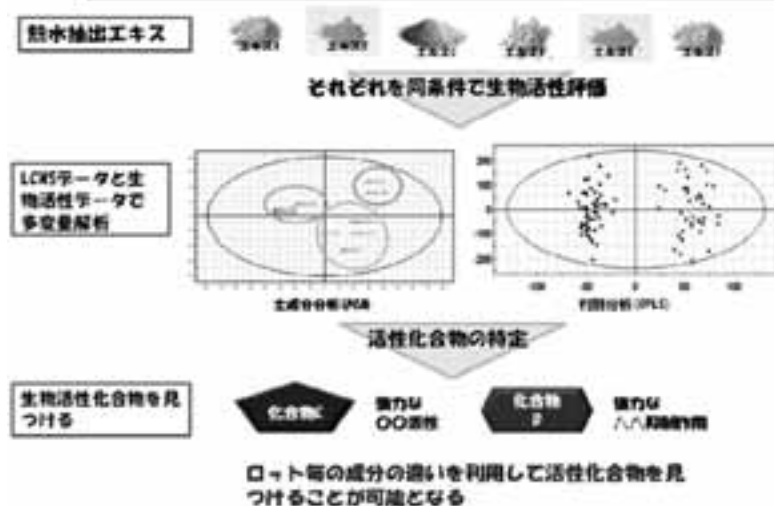


図4

薬の入出庫記録などがすべて管理されている。また各モデル生薬は実体顕微鏡を用いた高精細な画像を取得後（上記 DB より閲覧可能）、真空パックされ生薬名ごとに基盤研の温度制御された標本室内に厳重に保管されている。2012年10月現在、46品目751種類のモデル生薬が収集されている。

作成された熱水抽出エキスはまず LCMS の測定を行なった（図2）。これらのデータ比較は LCMS データ（ m/z と保持時間の組み合わせ）の alignment 後に umetrics 社製 SIMCA P+にて多変量解析を行なった。LCMS データの取り扱いにおいては alignment 処理が重要であり、これを疎かにすると異なった結果を与えてしまう。得られた LCMS データを SIMCA P+に流し込み、産地、基原、調製法などの情報を元に主成分分析（PCA）、判別分析（O2PLS）を行い、マーカーとなるような化合物を LCMS から推定した（図3）。また LCMS では構造を確定できないものは LCNMR/MS にて確認した。また、生薬の品質評価にあたっては生物活性との比較が必要となる。生物活性評価として当センターにおいては抗炎症作用の指標となる NO 産生抑制活性評価を行った。LCMS データと活性値を多変量解析で判別分析を行い活性化合物を特定することを検討した（図4）。

1) オウレンの産地による成分差

オウレンは10種類（四川省産5、雲南省1、重慶市2、福井県1、岐阜1）の流通品が収集された（図5）。TLC による比較によれば日

オウレンのパラエティ比較について

オウレン

Coptis japonica Makino, *Coptis chinensis* Franchet, *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao又は*Coptis teeta* Wallich (*Ranunculaceae*)の種をほとんど除いた種茎である (16局)

管理番号	形態	産地	等級など
NIB-0013	根形	中国四川省	3品級
NIB-0041	根形	中国雲南省	
NIB-0042	根形	中国重慶市	3等
NIB-0094	根形	中国四川省	
NIB-0115	根形	日本	栽培品 岐阜県産
NIB-0116	根形	中国重慶市	栽培品(主に使用)
NIB-0150	根形	中国四川省	栽培品
NIB-0185	根形	日本福井県	越前
NIB-0188	根形	中国四川省	1等
NIB-0215	根形	中国四川省	

オウレンモデル試料の確認試験

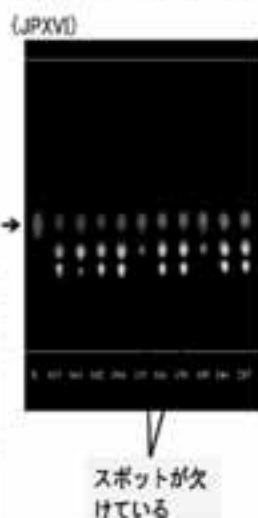


図5

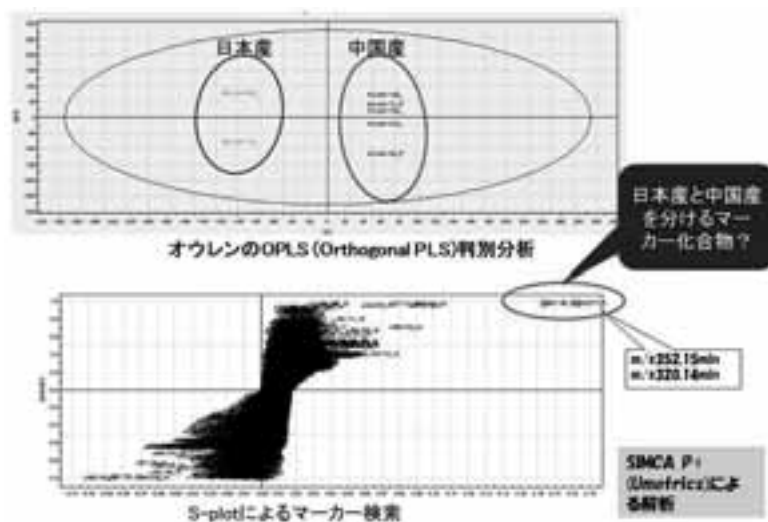


図6

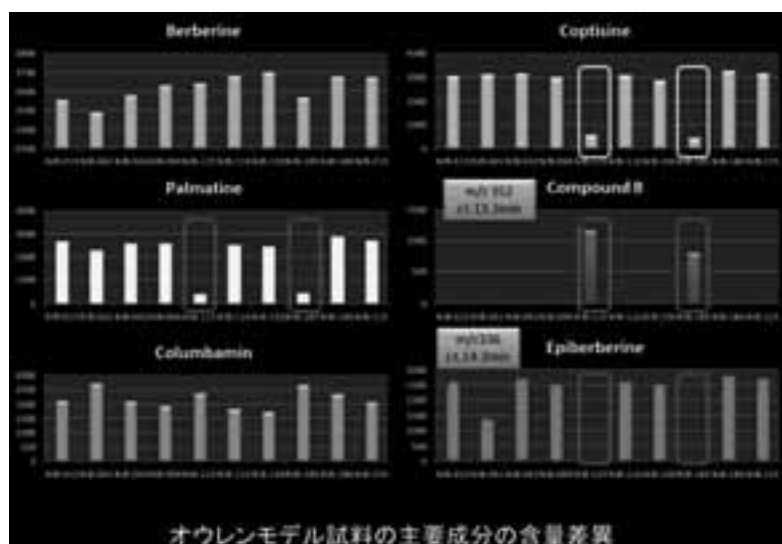


図7

本産と中国産では明確な差が見られた。LCMS データと産地との相関における O2PLS では高い信頼性で判別が可能であり、いくつかの産地を決定づけるマーカー化合物ともいべき成分が確認された。結果的には palmatine、coptisine は国内産は含量が少なく、epiberberine は全く含まれていなかった。また逆に m/z 352の分子量を与える化合物を日本産にのみ含有することが分かった (図6)。本化合物は現在同定中であるが、日本産と中国産を判別する重要なマーカー化合物となる可能性がある。現在これらモデル試料生薬の遺伝子による鑑別が並行して行われており、その結果との比較により明確になるとと思われるが、日本産は *Coptis japonica* の系統と考えられ、中国産とは異なっていると思われる。また日本産に含有されていない epiberberine は濃い赤色を示す成分であり、今回のオウレンモデル試料の熱水抽出エキスの色調からも明確に差が見られた。

2) サンシシの基原による成分差について

サンシシは国内産の山梔子のほか、中国産の水梔子と呼ばれる長手のものが流通している。またその中間種もあるとされる。LCMS データと産地別また長手、丸手別に判別解析を行ったところ良好な結果が得られた。判別分析の S-plot において m/z 331のピークが判別に寄与していることがわかり、その構造を確認するために LC-NMR/MS を用いて解析を試みた。使用した LC-NMR/MS は Bruker 社製 NMR に Agilent 社

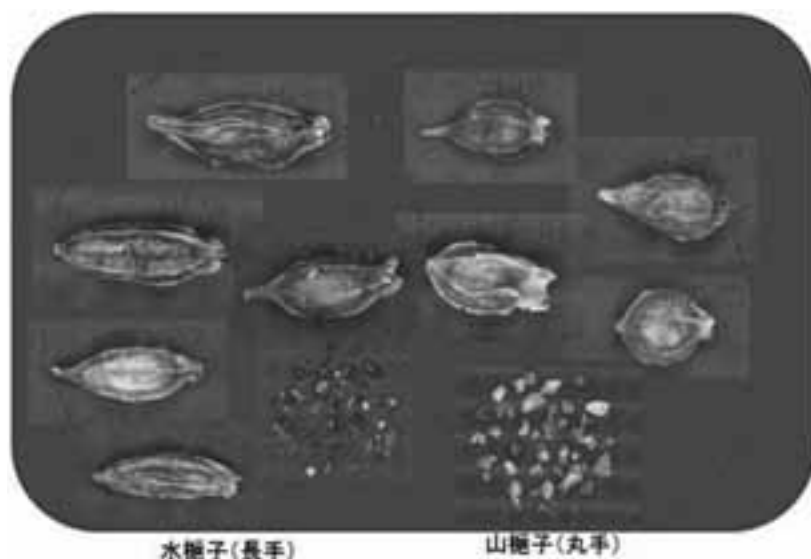


図8

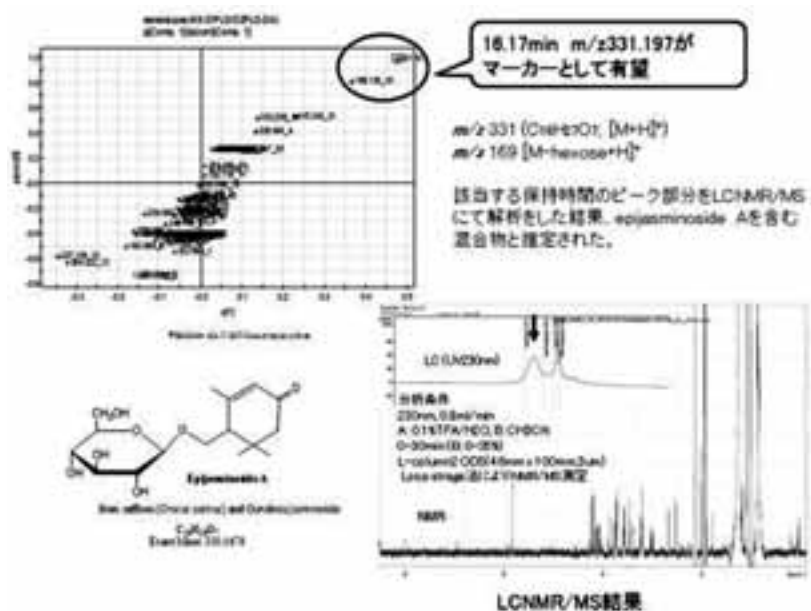


図9

ビャクジュツの市場流通品

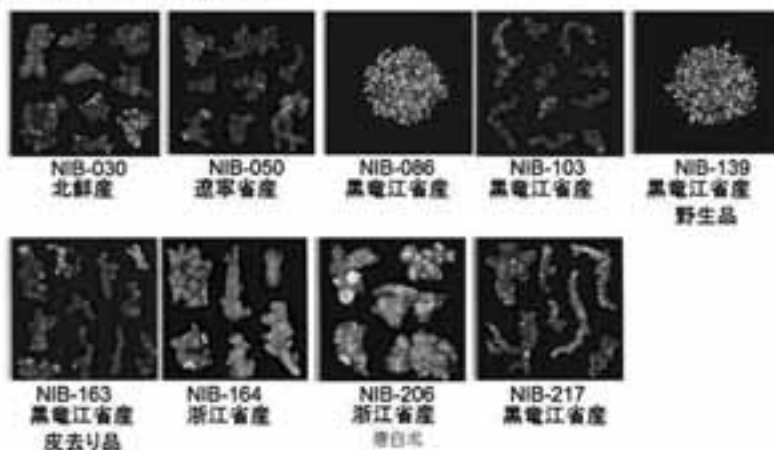


図10

製 LC を接続した LC-NMR に流路を split させ MS を検出に用いたものである。LCMS において得られた LC 情報を元に該当するピークを loop strage 法にて¹H-NMR 測定を行った (図 9)。その結果 Epigallocatechin A を含む混合物と推定されたが本化合物については引き続き解析を行っている。

3) ビャクジュツの atractysucrose 類について

ビャクジュツの熱水抽出エキスの LCMS においては ESI, APCI 両イオン源を用いたが、ともに精油成分の検出には至らなかった。産地別では浙江省産の LCMS パターンは他の産地とは異なる TIC パターンを与えた。浙江省産以外ではいずれも ESI-TOFMS の negative mode では m/z 593 を示す 3 つのピーク、m/z 737 を示す 5 つのピークが観測された。これらはいずれも MS/MS のデータが一致しており異性体と考えられた。ビャクジュツからは sucrose に様々なアシル基が結合した atractysucrose 類が報告されているがそれらの構造から推定される MS と一致する。浙江省産にはほとんど含まれていなかった。ビャクジュツ、ソウジュツは精油成分ばかりが注目されるが、熱水抽出では主に抽出されるのはこれら atractysucrose 類である。これらの生物活性は一部報告されているものの情報は不十分であり今後の生物活性評価が待たれる。

4) チンピの産地間の成分差について

チンピは市場流通品 18 種類 (浙江省 7、陝西省 1、吉林省 1、湖

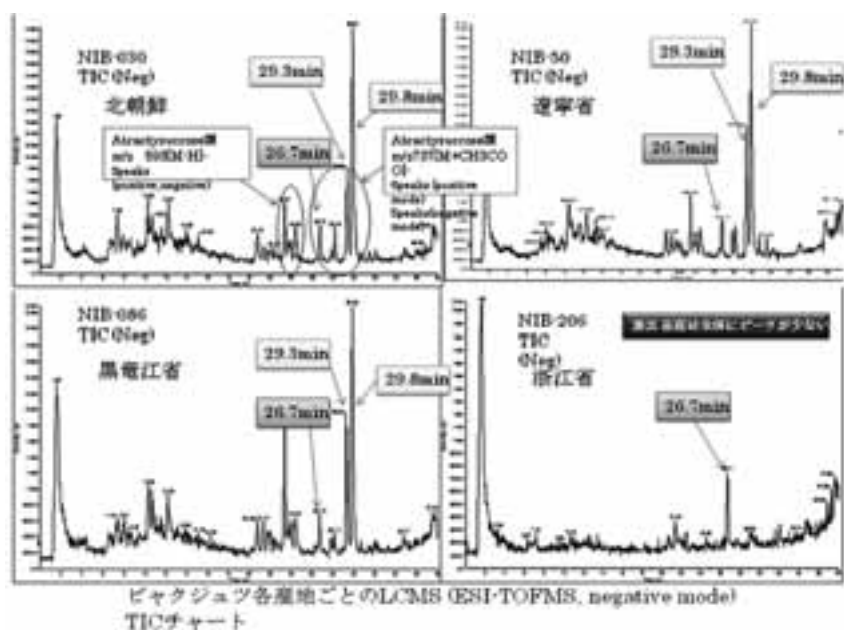


図11



図12

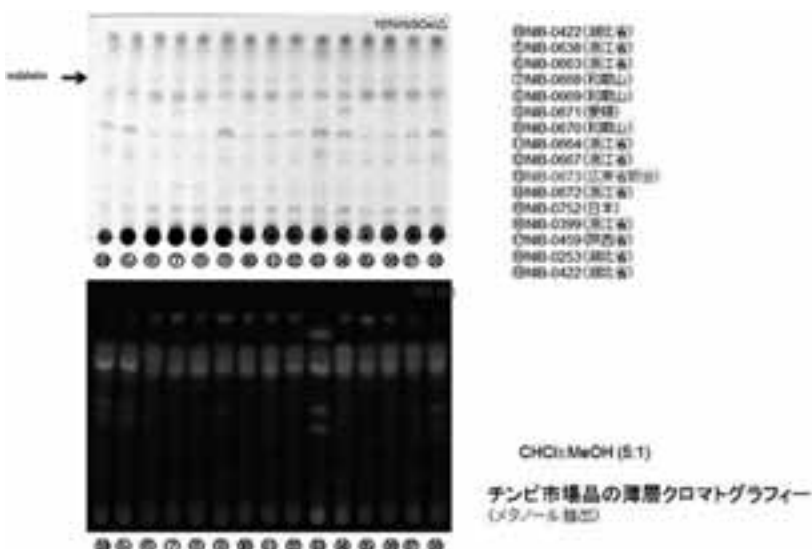


図13

北省1、広東省新会2、和歌山4、愛媛1、日本産地不明1)が収集された。メタノール抽出エキスの薄層クロマトグラフィー (TLC) 比較においては、広東省新会産のみ異なるプロフィールを与えた (図13)。熱水抽出エキスのLCMSからはやはり精油成分が失われておりフラボノイド類が主に検出された。主成分分析を行うと広東省新会産のみが全く異なるグループを形成した (図14)。検出されたフラボノイド類の含量を比較すると例えば浙江省産の中でもかなりの幅があることが分かった。新会産チンピは最も良質とされているが、他産地と比較してNobiletin、Tangeretin含量が突出して多く、逆にNarirtinが極めて少なかった。チンピの基原植物は *Citrus unshiu* および *C. reticulata* と局方には規定されているが、成分的な比較から新会産は *C. reticulata* である可能性が高いが、遺伝子鑑別の結果を待たねばならない。チンピは古いものほど良品とされるいわゆる「六陳」の一つであり、今後は収穫年ごとのデータを比較していく予定である。

5) 生薬のNO産生抑制活性について

モデル試料生薬における生物活性と多変量解析による活性成分分析一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性は抗炎症活性の一つのスクリーニング法として知られるが、今回収集されたモデル試料生薬の熱水抽出エキスの各試料ごとのNO産生を調べた。そのうちのショウキョウを例にとり説明する。

ショウキョウの熱水抽出エキスでの活性において試料間に大きな

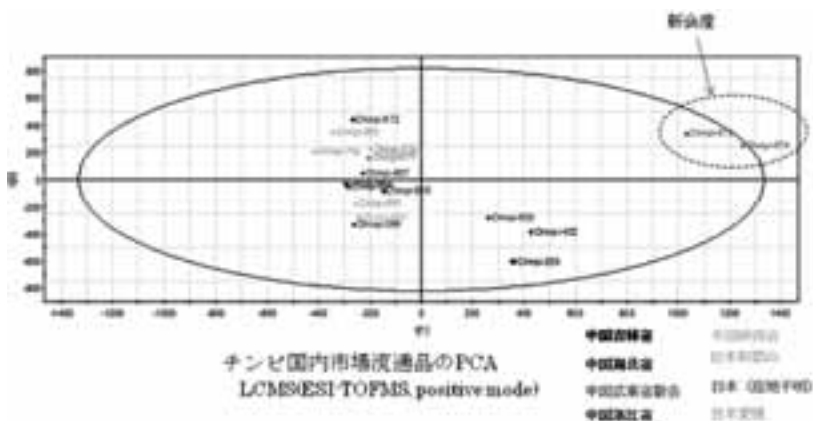


图14

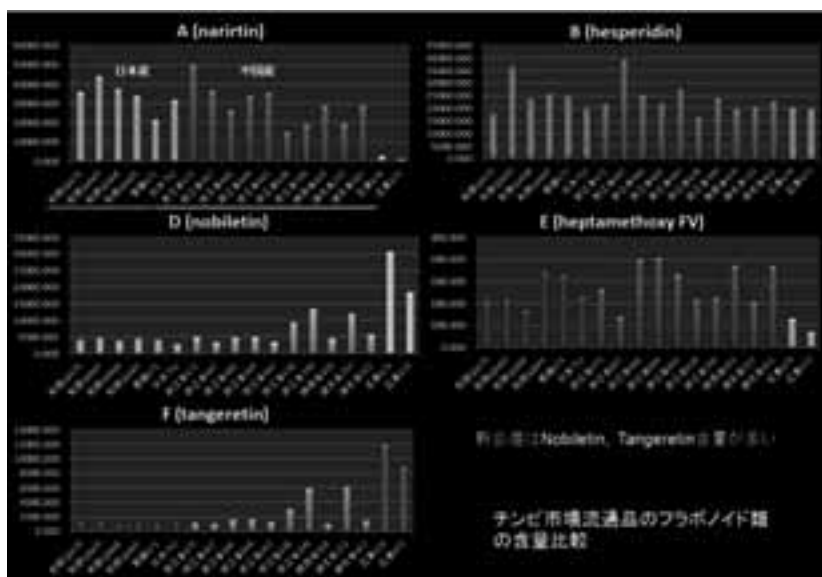


図15

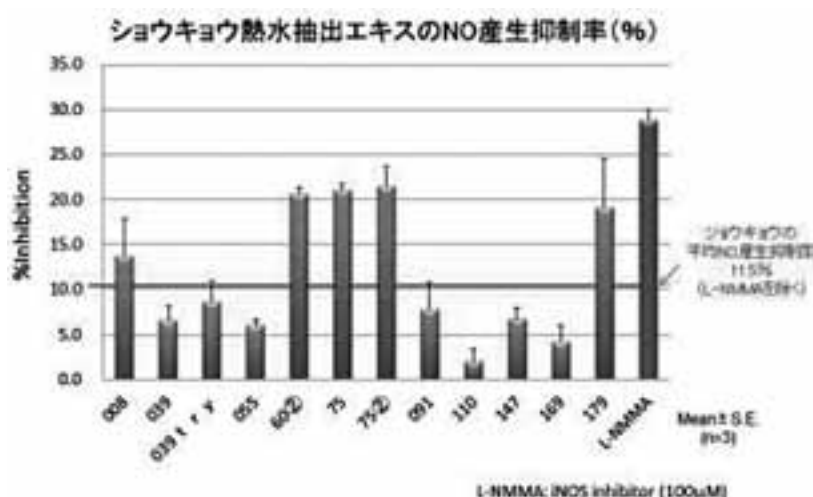


圖16

差が見られた (図 16)。LCMS データと NO 産生抑制活性結果を SIMCA-P + に流し込んだ。最初に述べたように、両データ間の判別分析での s-plot 解析を行うことで、活性の発現に大きく寄与していると思われる成分を容易に推定することが可能になる。ここで得られた活性成分と思われる *m/z* から、活性本体はショウキョウの主要成分である [6]-gingerol であると推定された。その後市販標品にて同定された。[6]-gingerol は濃度依存的に NO 産生抑制活性を示すことがわかり、ショウキョウの抗炎症作用の活性本体の一つと考えられた。ショウキョウの場合すべてのモデル試料は雲南省産であるために産地と活性との相関を見ることはできなかったが、産地と活性の比較を行うことも可能である。

結論

薬用植物総合情報データベース構築の一環として、モデル生薬を用いた LCMS 分析を行い産地や調製法、基原間での成分差異を考察した。その結果、多くの場合産地や基原により成分の違いを見出すことができた。また生物活性データとして NO 産生抑制活性を検討したがロット間で差が見られた生薬に関しては多変量解析により活性化合物を特定することができた。これらのデータは順次アップロードされる予定であり、今後生薬関係の研究者のみならず、漢方関連企業にも役立つ情報になると考える。

本稿においては薬用植物総合情報データベースでの成分分析情報

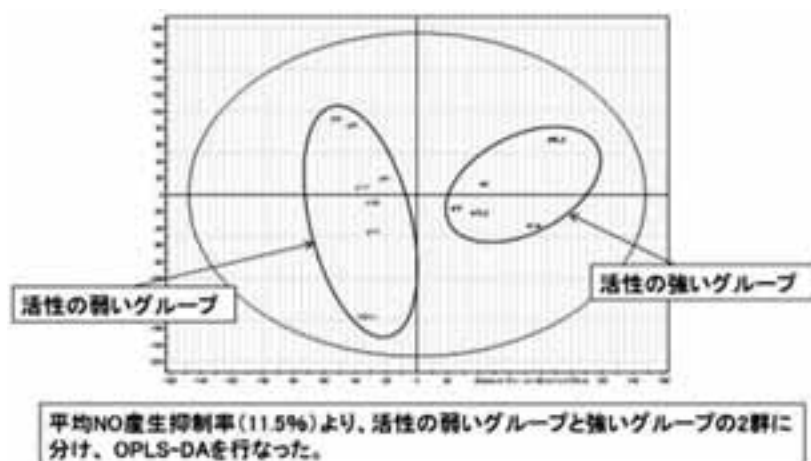


図17

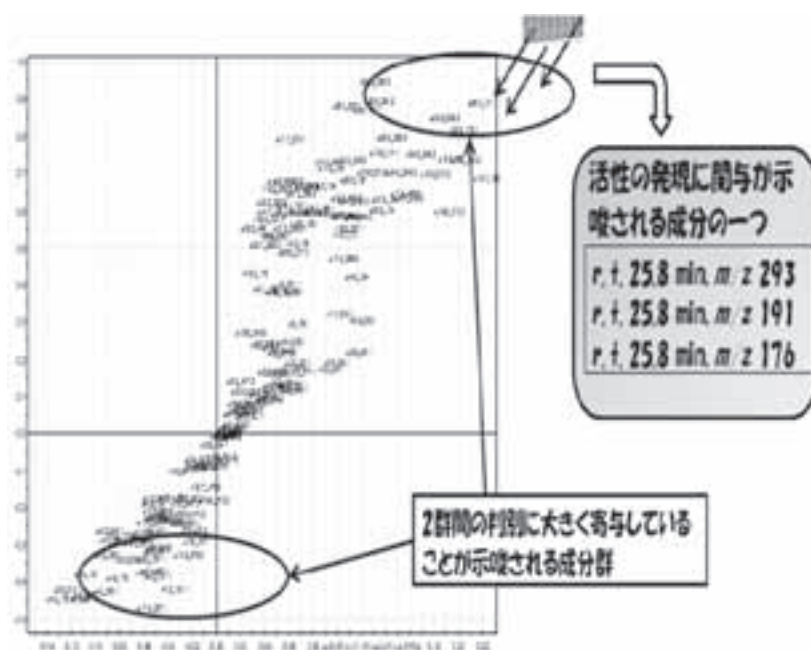


図18

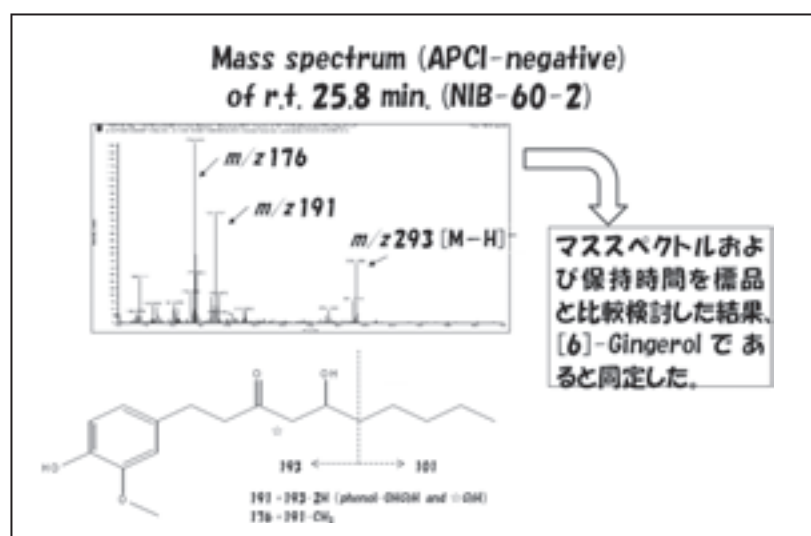


図19

の内容のみを重点的に紹介したが、同時に遺伝子解析、組織培養、栽培・増殖、副作用情報、エキスを収量、各種生物活性などの検討が行われておりこれらの総合的なデータベースは最終的に今後の漢方関連産業の振興に寄与するものと期待する。

謝辞

今回の内容において生薬の NO 産生抑制活性を行っていただいた元医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター特任研究員（現小太郎漢方製薬研究員）大根谷章浩博士、LCNMR/MS 測定を行っていただきました医薬基盤研究所共用機器実験室赤木謙一副室長に深謝いたします。またモデル生薬の収集に関しまして日本漢方生薬製剤協会、日本生薬連合会、東京生薬協会にご協力いただきました。深謝いたします。