

図 17 ポジティブイオン化モードにおける全イオンクロマトグラム (TIC)

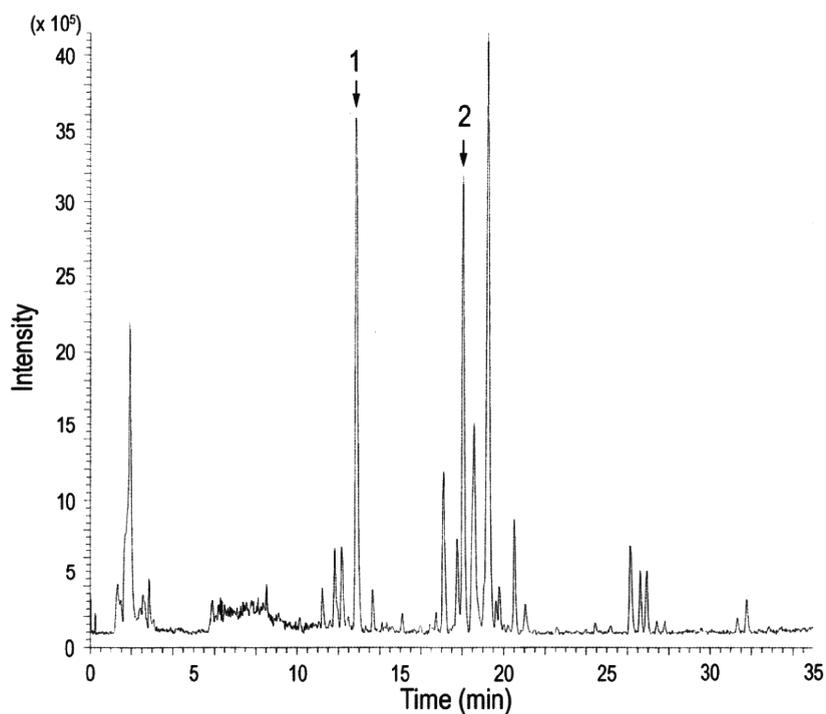


図 18 ネガティブイオン化モードにおける全イオンクロマトグラム (TIC)

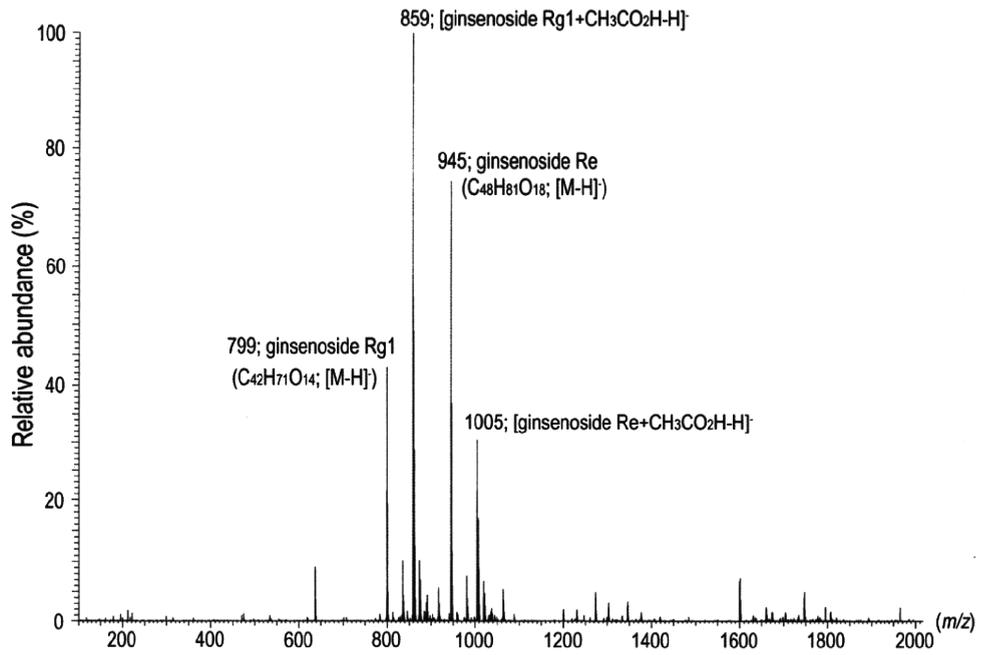


図 19 ピーク 1 (Rt 12.8 min) の MS (neg.)

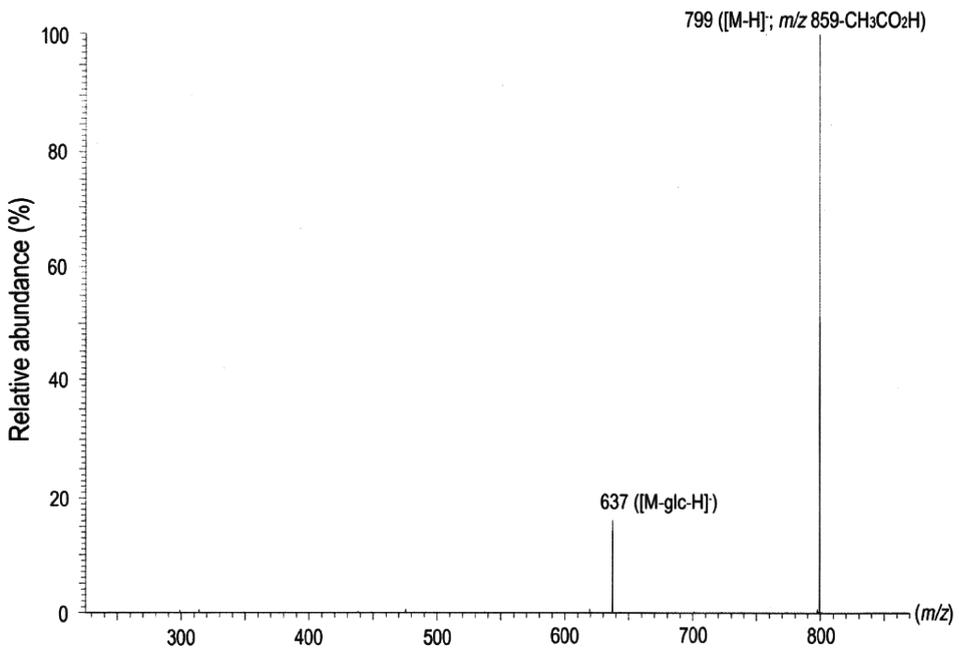


図 20 ジンセノシド Rg1 (Rt 12.8 min) の MS/MS (neg., precursor  $m/z$  859)

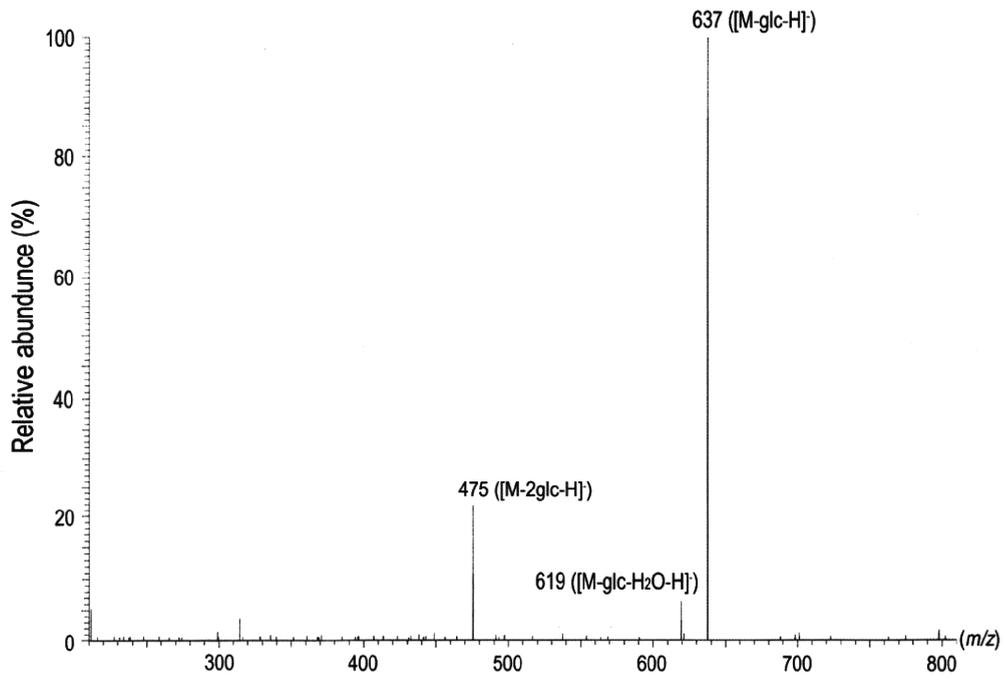


図 21 ギンセノシド Rg1 (Rt 12.8 min) の MS/MS (neg., precursor  $m/z$  799)

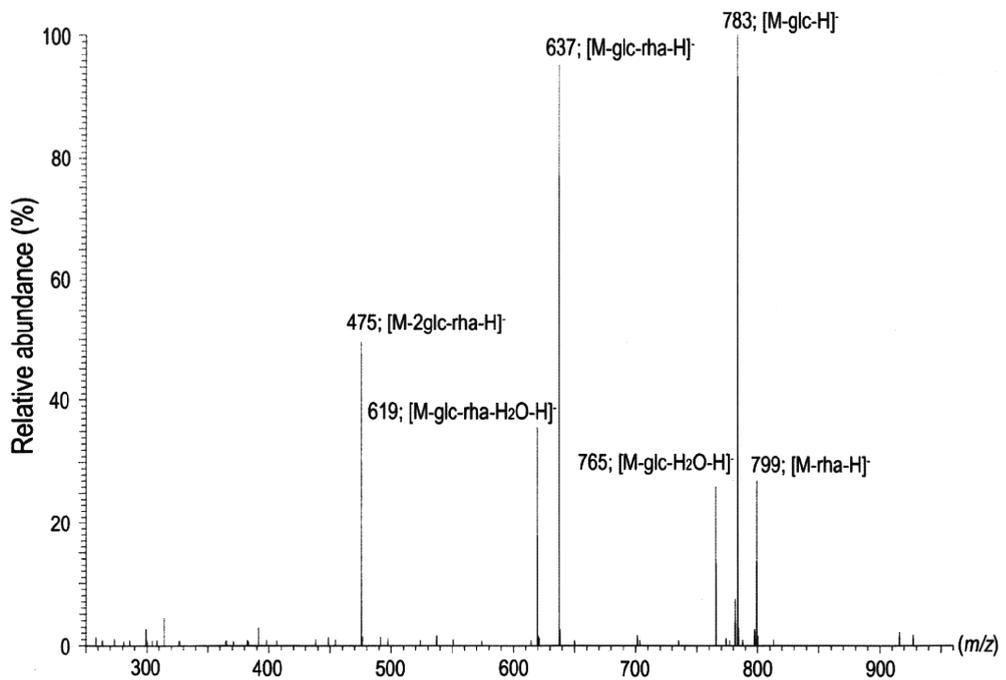


図 22 ギンセノシド Re (Rt 12.8 min) の MS/MS (neg., precursor  $m/z$  945)

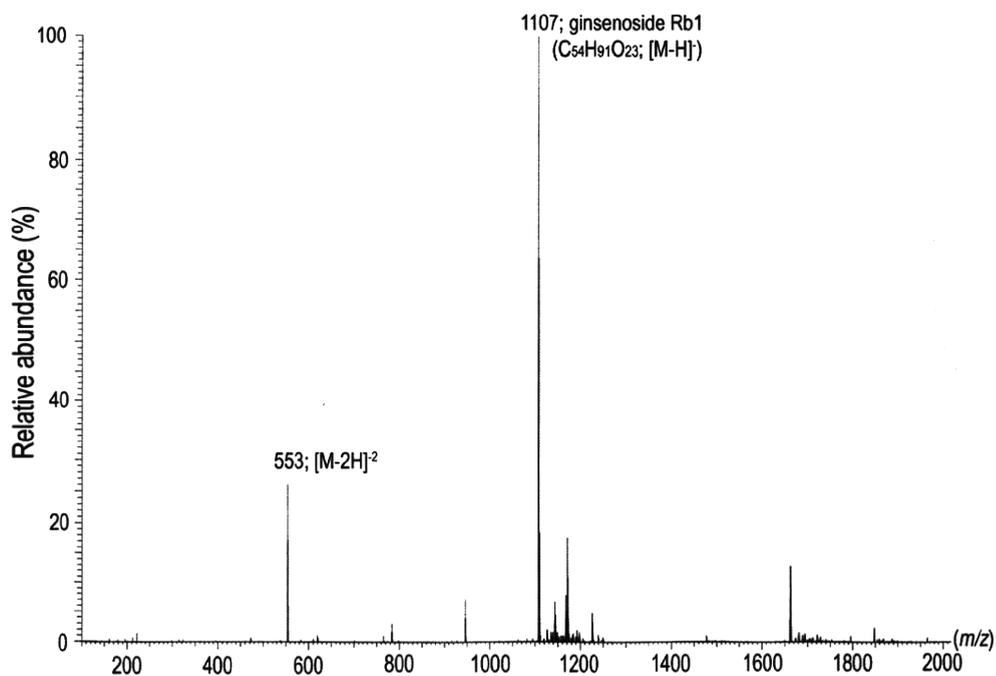


図 23 ピーク 2 (ギンセノシド Rb1, Rt 18.1 min) の MS (neg.)

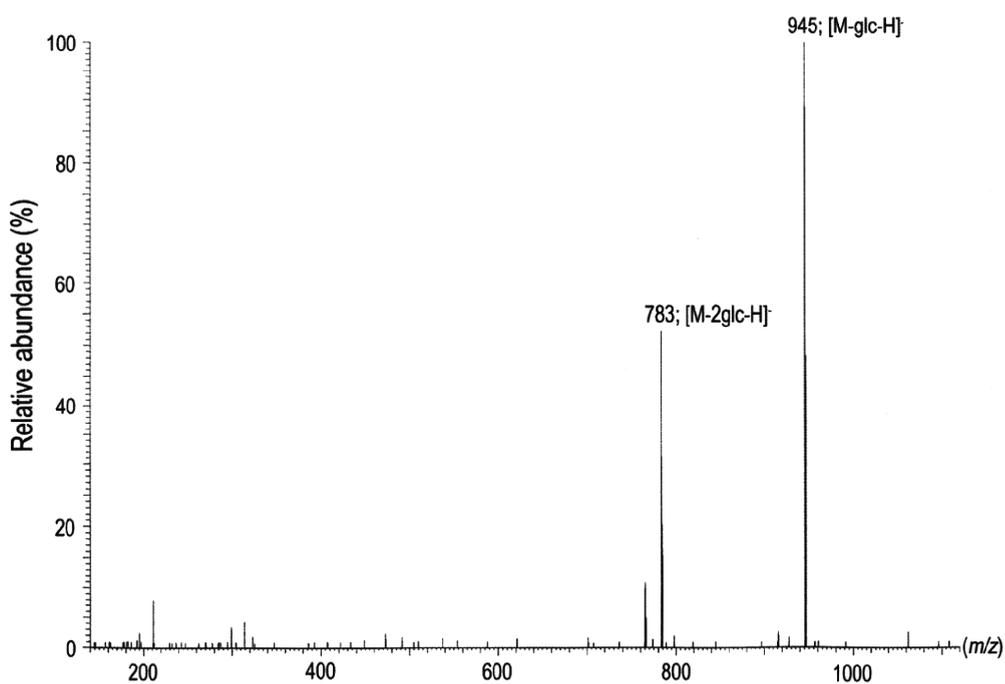


図 24 ギンセノシド Rb1 (Rt 18.1 min) の MS/MS (neg., precursor  $m/z$  553)

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
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（H22-創薬総合-一般-013）  
分担研究報告書

分担研究課題 遺伝子鑑別情報及び成分分析情報に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部长 合田 幸広

生薬ショウキョウの遺伝子情報に関する研究

研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長 丸山 卓郎

国内に流通するショウキョウの遺伝子情報を整備する事を目的に核 rDNA ITS 領域及び葉緑体 DNA *trnL-F* 領域の塩基配列解析を行った結果、後者の遺伝子領域で塩基配列情報を取得可能であった。*TrnL* intron 領域と *trnL-F* IGS 領域の比較では、前者が系統判別に、後者が種の同定に適していると推定された。

#### A. 研究目的

天然物である生薬の品質は、まずその基原をもって適否の判定基準となされるべきであり、この点は、第十五改正日本薬局方より生薬総則第4項に明記されている。従来、生薬の基原種の鑑定は、内部及び外部形態の特徴に基づいてなされるが、専門的な知識、技術を必要とし、近年、その担い手は減少傾向にある。一方で、近年の分子生物学的手法の進歩から、遺伝子塩基配列の違いから、生薬の基原種を判別する研究がさかんになされている。従って、漢方薬に使用される生薬の基原植物の遺伝子塩基配列情報の整備は、正しい基原植物に由来する生薬の流通を促すとともに、生薬の品質の向上及び安定化に貢献するものである。

そこで本研究では、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に際

し、基原植物の遺伝子情報をコンテンツの一つとすることとし、その情報整備を行った。本報告書では、分担研究者が担当したショウキョウの遺伝子情報について報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 1 にまとめた。これらの試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。

##### 2. 実験方法

各試料をナイフで削り、その 20 mg を液体窒素下、MM-300 (Qiagen) を用いて粉碎した。このものに、SNET buffer (20 mM Tris/HCl

pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200 µg/mL Proteinase K) 400 µL を加え、55°C, 18 時間インキュベーションし、genomic DNA を抽出した。インキュベーション終了後、95°C, 10 分加温し、Proteinase K を失活させた後、20000 x G, 1 分間遠心し、上清 100 µL を分取し、DNA 試料液とした。このものを鋳型とし、植物の核 rDNA あるいは葉緑体 DNA *trnL-F* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS 領域あるいは、葉緑体 DNA *trnL-F* 領域を含む DNA 断片を増幅した。ただし、*trnL-F* 領域については、*trnL* intron 領域と *trnL-F* intergenic spacer (IGS) 領域に分けて増幅を行った。PCR は、Ampdirect Plus (Shimadzu)-Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck) の系を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 40 cycle; 72°C 7 min。得られた PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。ダイレクトシーケンスにおける PCR 産物の蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems) により行った。得られた塩基配列の多重配列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

## C. 研究結果

### 1. 核 rDNA ITS 領域

ダイレクトシーケンスの結果、得られたシーケンスデータは、複数の配列の混合物と思われる波形を示した (Fig. 1)。このよう

な現象は、多コピー遺伝子である rDNA においては、度々観察されており、ショウキョウと同じショウガ科に属する *Curcuma* 属植物でも見出されている。このような場合、塩基配列解析を行うには、PCR 産物をプラスミド DNA へ組み込み、大腸菌へと形質転換し、個々の塩基配列に分離した後に、シーケンス解析を行う必要がある。しかし、そのような方法を用いた場合においても、得られた塩基配列は、試料として用いられた個体が持つ多数の rDNA 遺伝子の 1 コピーの配列に過ぎない。このような手法は、ショウキョウの基原植物である *Zingiber officinale* の種としての進化、成立過程等を考察する際には、有用であると思われるが、種の鑑別を目的とした塩基配列情報の整備を指向する本研究の目的には適さない。以上のことから、ITS 領域については、これ以上の解析は行わなかった。

### 2. 葉緑体 DNA *trnL-F* 領域

ITS 領域と異なり、葉緑体 DNA *trnL* intron 領域及び *trnL-F* IGS 領域共に、配列解析は可能であった。ただし、*trnL-F* IGS 領域については、一塩基の挿入/欠失に基づくと思われるマイナーなピークが認められた (Fig. 2)。この領域については、メインのピークを基に、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、*trnL* intron 領域、*trnL-F* IGS 領域共に、全試料において同一の配列を示し、前者が、519 bp、後者が、328 bp だった。

## D. 考察

塩基配列を決定出来た *trnL* intron 領域、*trnL-F* IGS 領域共に、全試料において同一の配列を示したことから、国内市場に流通するシ

ヨウキョウは、上記の遺伝子領域において、遺伝的に均質である事が明らかになった。それぞれの領域について、Blast search programにより国際塩基配列データベース(DDBJ/EMBL/GenBank; INSD)に登録されている配列と相同性検索を行った結果、*trnL-F* IGS領域については、データベース上の4つの *Z. officinale* の配列 (Acc. no.: HM567394~HM567397) と完全に一致した。一方、*trnL* intron 領域は、Fig. 3 に示すように、上記4つの *Z. officinale* の配列と前半部の配列に大きな違いが認められた。これらの配列は、論文報告されていないが、試料の来歴については、マレーシア産の *Z. officinale* の内の Bentong, Bara, Muda 及び Padi と呼ばれる系統であることが、データベース上に記載されている。従って、今回の結果からは、国内市場に流通するシウキョウは、*trnL* intron 領域の塩基配列において、マレーシア産の *Z. officinale* の各系統と判別が可能であると推定された。また、同領域が *Z. officinale* の産地及び系統

判別に有用である可能性が示された。

#### E. 結論

2つの遺伝子領域について、シウキョウの塩基配列情報を取得した結果、シウキョウの遺伝子鑑別に、核 rDNA ITS 領域の使用は、不適當であった。また、葉緑体 DNA *trnL-F* 領域では、*trnL* intron 領域が系統判別に、*trnL-F* IGS 領域が種の同定に適していると推定された。

#### F. 研究発表

1. 学会発表  
なし
2. 論文発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

Table 1 本研究に使用された試料の詳細

試料番号	管理番号	生薬名	産地	形態	入手年
Sho-1	NIB-008	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-2	NIB-039	ショウキョウ	雲南省	全形	2009
Sho-3	NIB-055	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-4	NIB-060	ショウキョウ	雲南省	刻み	2008
Sho-5	NIB-075	ショウキョウ	雲南省	刻み	2006
Sho-6	NIB-091	ショウキョウ	雲南省	スライス	2009
Sho-7	NIB-110	ショウキョウ	雲南省	刻み	2010
Sho-8	NIB-147	ショウキョウ	雲南省	全形	2010
Sho-9	NIB-169	ショウキョウ	雲南省	全形	2009
Sho-10	NIB-179	ショウキョウ	雲南省	全形	2010

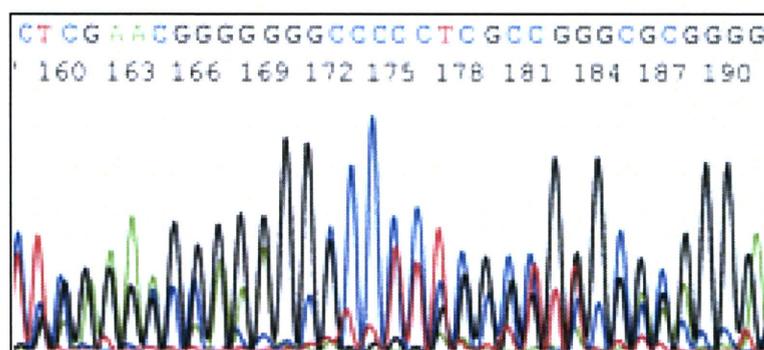


Fig. 1 ITS sequence の生データ

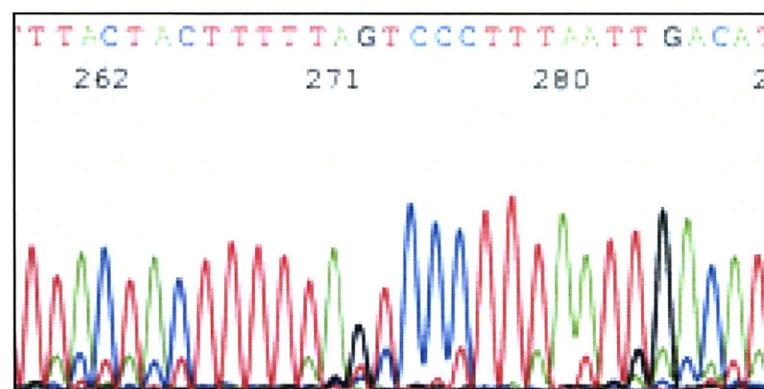


Fig. 2 *TrnL-F* IGS sequence の生データ

メジャーなピークの一塩基前に同一塩基のマイナーピークが認められる。

All samples	G A T T G G A T T G A G C C T T A G T A A G G A A C C T G C T A A G T G G T A	40
Z. officinale Bentong	- - - G N . T G C . G . . . G C C T A . . A . . G . A . . . . . - . . . . .	36
Z. officinale Bara	. N C . A A T . A . C . A . - C T T G T . . . . . - . . . . . - . . . . .	37
Z. officinale Muda	- T N G . C . G C A T . . . A C C T A T . A . . . . . - . . . . . - . . . . .	37
Z. officinale Padi	. . G N . C G A G A C . A . G C G T G C C . . T . G G . . . . . C . . . . .	40
All samples	A C T T C C A A A T T C A G A - G A A A C C C T G G A A T T T A A A A T G G G C	79
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	75
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	76
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	76
Z. officinale Padi	. . . . . A . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	80
All samples	A A T C C T G A G C C A A A T C C T T A G T T T T A T C A A A C T A G A A T A A	119
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	115
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	116
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	116
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	120
All samples	A A A A A A G G A T A G G T G C A G A G A C T C A A T G G A A G C T G T T C T A	159
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	155
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	156
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	156
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	160
All samples	A C G A A T G A A G T T G A C T A C G T T T C G T T G G T A G T T G G A A T C C	199
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	195
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	198
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	196
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	200
All samples	G T C T A T C A A A A T T A C A G A A A A G A T G T T C C T A T A T A C C T A A	239
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	235
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	236
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	236
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	240
All samples	T A C A T A C G T A T A C A T A C T G A C A T A T C A A A T C A A A C G A T T A	279
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	275
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	276
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	276
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	280
All samples	A T C A T G A C T C G A A T C C A T T A T A T T A T A T G A A T A A T T A T A A	319
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	315
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	316
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	316
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	320
All samples	T A T G A A A A A T T C A G A A T T A G A G T T A T T G T G A A T C C A G T C C	359
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	355
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	356
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	356
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	360
All samples	A A T G G A A G T T G A A A G A A G A A T T G A A T A T T C A A T T C A A T T A	399
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	395
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	396
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	396
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	400
All samples	T T A A A T C A T T C A T T C C A G A G T T T G A T A G A T C T T T T G A A A A	439
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	435
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	436
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	436
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	440
All samples	A C T G A T T A A T T G G A C G A G A A T A A A G A G A G A G T C C C A T T C T	479
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	475
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	476
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	476
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	480
All samples	A C A T G T C A A T A C C G A T A A C A A T G A A A T T T A T A G T A A G A G G	519
Z. officinale Bentong	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	515
Z. officinale Bara	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	516
Z. officinale Muda	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	516
Z. officinale Padi	. . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . . - . . . . .	520

Fig. 3 *TrnL* intron 配列の多重整列

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
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（H22-創薬総合一般-013）  
分担研究報告書

分担研究課題 遺伝子鑑別情報及び成分分析情報に関する研究

研究分担者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 部長

漢方処方構成生薬の水煎出エキス収量に関する研究

研究協力者 袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定したところ、黄芩、甘草及び蒼朮については会社間のばらつきが小さく、生姜及び人參では大きなばらつきが観察された。また、黄芩については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定した。黄芩については、異なる産地由来であってもエキス収量がばらつかないものの、一方で、エキス収量による産地の特徴付けは困難と思われた。

#### A. 研究目的

漢方製剤は天然物の生薬を原料とするため、その品質確保を考える場合に合成医薬品では該当しない問題点をはらんでいる。すなわち、採集と栽培の違い、天候、産地、収穫時期等により生薬の成分含量がばらつきやすく、乾燥や貯蔵の方法が適切でないとカビや虫の被害を受けることがあり、不安定な成分や揮発性の成分を含有する場合もあり、指定部位以外の部位やその他の異物等が混入しやすく、また、その有効成分が明らかになっていない生薬も多く、それぞれの成分に対する定量法が整っていない場合が多い。

本研究事業では、漢方薬に使用される薬用植物の情報データベースの構築を行うが、その一環として、産地や収穫時期等の異なる様々な生薬原料について、形態学、理化

学、分析化学、生化学、薬理学、分子遺伝学等の種々の観点から実測データを付加し、総合的に生薬サンプルの分類を進める予定である。

そこで我々は、本研究事業において平成22年度の重点検討生薬（コア生薬）に指定された黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定した。さらに、黄芩については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定した。

#### B. 研究方法

##### 植物材料

局方生薬のエキス収量測定においては、黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に関して、国内主要生薬メーカー5社（A社、B社、C社、D社及びE社と仮称）より日本薬局方

規格品で漢方処方調剤用の刻み生薬を購入して用いた。また、生薬原料のエキス収量測定においては、黄芩に関して、医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集したものをを用いた。煎出用の水は、Milli-Q Synthesis (Milipore) により調製した超純水を用いた。

#### 機器

生薬あるいは生薬原料を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830 (東京理化工械) を用いて行った。生薬の粉末化には、Vibrating Sample Mill TI-200 (HEIKO 製作所) を用いた。

#### 局方生薬煎出エキスの調製と収量測定

黄芩、甘草、生姜、蒼朮あるいは人参について、刻み生薬 20 g をポット (らくらく煎) に取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を 3000 rpm で 5 分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃ で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

#### 生薬原料煎出エキスの調製と収量測定

黄芩の生薬原料サンプルについて、原形のものハサミで 5~10 mm に切り刻んだ。刻んだサンプルを Vibrating Sample Mill で粉砕した。粉末サンプル 20 g をポット (らくらく煎) に取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を 3000 rpm で 5 分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量

を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃ で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

#### 倫理面への配慮

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

#### C. 研究結果

##### 局方生薬のエキス収量

局方生薬として流通する黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人参に関して、それぞれの 20 g に相当するエキス収量を測定し、生薬重量あたりのエキス収率を表 1 に示した。また、5 社の平均値を 100 とした場合の相対値も示した。

それぞれの生薬について会社間の変動係数 (Cv) を算出したところ、黄芩、甘草及び蒼朮は 10%以下に収まっていたが、生姜では 26.5%、人参では 26.7%と大きなばらつきを示した。一方、会社内変動係数はいずれも数パーセントであり、同じ会社の生薬に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。ただし、例外的に生姜についてはばらつきが大きかった。

##### オウゴン生薬原料のエキス収量

医薬基盤研究所薬用植物資源センターが収集したオウゴン生薬原料は、原形のものと同刻みのものがあつたため、抽出効率を揃える目的で、全サンプルについて粉末化した後に煎出した。それぞれの粉末 20 g に相当するエキス収量を測定し、生薬原料重量あたりのエキス収率を表 2 に示した。15 種

類の生薬原料におけるエキス収率の変動係数は、16.6%であった。また、一方、同じサンプルを3回測定する中での変動係数はいずれも数パーセントであり、同じ生薬原料に関する測定間のばらつきは小さいことが分かった。

#### D. 考察

漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベースに実測データを付加する目的で、黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に関して、5つの主要生薬メーカーの局方規格製品についてエキス収量を比較した(表1)。生姜及び人參に関してはメーカー間のばらつきが無視できないほど大きいことが分かった。いずれも、C社における収率が他と比較して目立って低く、この特例によるばらつきの影響が出たものと思われた。生姜については、エキス自体の収率が小さく(5社平均8.8%)、しかも揮発性成分が多いため、わずかなばらつきが大きな数字に反映された可能性も考えられる。一方で、エキスの重量も充分であり、揮発性成分が多いわけでもない人參においてメーカー間のばらつきが大きかったことは、局方において2~3倍の含量幅が許容されている低分子成分ほどではないが、生薬の種類によっては、エキス収量においても、採集と栽培の違い、天候、産地、収穫時期等の違いが反映されるものと思われる。

また、規格化されていない黄芩の生薬原料について、15種類のサンプルのエキス収量を測定したところ、サンプル間の変動係数は16.6%であり、5社の局方規格黄芩における14.1%と比較してほぼ同等な値であった。さらに、産地は、河北省、山東省、

内モン古及び陝西省にまたがっているが、河北省以外のサンプルが少ないこともあり、エキス収量に産地毎の特徴は見出せなかった。従って、エキス収量に関して、黄芩は人參と異なり、環境要因などの影響を受けにくいものと思われた。

#### E. 結論

本研究事業において平成22年度の重点検討生薬(コア生薬)に指定された黄芩、甘草、生姜、蒼朮及び人參に関して、5つの主要生薬メーカー局方規格製品についてエキス収量を測定した。黄芩、甘草及び蒼朮については会社間のばらつきが小さく、生姜及び人參では大きなばらつきが観察され、ばらつきの大小も生薬の特徴の一つと考えるべきと思われた。

黄芩については、様々な産地に由来する生薬原料についてエキス収量を測定した。異なる産地由来であっても黄芩のエキス収量はばらつかないが、一方で、エキス収量による産地の特徴付けは困難と思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

袴塚高志、漢方製剤の品質確保と標準化～安心できる医療と質の高い基礎研究のために～、第13回天然薬物研究方法論アカデミー覚王山シンポジウム、2010年8月22日(名古屋)

##### 2. 誌上発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 生薬メーカー主要5社における平成22年度コア生薬の凍結乾燥エキス収率

	A社	B社	C社	D社	E社	会社間 平均	会社間 標準偏差	会社間 変動係数	
オウゴン	1回目	44.05	42.35	37.50	30.70	46.85	40.29	5.68	14.09
	2回目	44.25	41.20	40.95	31.65	50.60	41.73	6.12	14.68
	3回目	46.00	42.00	41.65	32.20	49.70	42.31	5.85	13.82
	会社内平均	44.77	41.85	40.03	31.52	49.05	41.44	5.82	14.05
	会社内標準偏差	0.88	0.48	1.81	0.62	1.60	1.08	0.53	
	会社内変動係数	1.96	1.15	4.53	1.97	3.26	2.57	1.19	
	相対値	108.02	100.98	96.60	76.05	118.35	100.00	14.05	14.05
カンソウ	1回目	21.15	24.10	22.00	24.00	26.70	23.59	1.93	8.17
	2回目	21.35	26.15	20.90	26.50	28.20	24.62	2.94	11.94
	3回目	20.45	22.75	19.15	22.10	25.95	22.08	2.31	10.46
	会社内平均	20.98	24.33	20.68	24.20	26.95	23.43	2.34	9.98
	会社内標準偏差	0.39	1.40	1.17	1.80	0.94	1.14	0.47	
	会社内変動係数	1.84	5.74	5.67	7.45	3.47	4.83	1.96	
	相対値	89.56	103.86	88.28	103.29	115.02	100.00	9.98	9.98
シヨウキョウ	1回目	11.05	10.60	4.40	10.40	7.45	8.78	2.53	28.83
	2回目	10.20	11.25	4.95	13.20	8.05	9.53	2.83	29.70
	3回目	9.85	8.15	5.05	10.00	7.20	8.05	1.83	22.75
	会社内平均	10.37	10.00	4.80	11.20	7.57	8.79	2.33	26.53
	会社内標準偏差	0.50	1.33	0.29	1.42	0.36	0.78	0.49	
	会社内変動係数	4.86	13.35	5.95	12.71	4.71	8.32	3.88	
	相対値	117.98	113.81	54.63	127.47	86.12	100.00	26.53	26.53
ソウジュツ	1回目	34.20	31.35	26.85	28.70	29.05	30.03	2.53	8.42
	2回目	34.10	30.10	26.75	28.45	29.60	29.80	2.44	8.18
	3回目	33.15	29.15	27.80	30.15	29.80	30.01	1.76	5.88
	会社内平均	33.82	30.20	27.13	29.10	29.48	29.95	2.19	7.30
	会社内標準偏差	0.47	0.90	0.47	0.75	0.32	0.58	0.21	
	会社内変動係数	1.40	2.98	1.74	2.58	1.08	1.96	0.72	
	相対値	112.92	100.85	90.61	97.17	98.45	100.00	7.30	7.30
ニンジン	1回目	22.40	34.40	14.15	28.50	31.45	26.18	7.21	27.53
	2回目	22.55	33.30	13.45	29.65	27.85	25.36	6.89	27.17
	3回目	22.65	33.60	14.30	29.85	27.20	25.52	6.65	26.05
	会社内平均	22.53	33.77	13.97	29.33	28.83	25.69	6.87	26.73
	会社内標準偏差	0.10	0.46	0.37	0.59	1.87	0.68	0.62	
	会社内変動係数	0.46	1.37	2.65	2.03	6.48	2.60	2.07	
	相対値	87.72	131.46	54.37	114.20	112.25	100.00	26.73	26.73

表2 オウゴン生薬原料の凍結乾燥エキス収率

通し 番号	NIBIO 管理番号	産地	形態	凍結乾燥	エキス収率 (%)	平均収率 (%)	収率 標準偏差	収率 変動係数
1	NIB-001	河北省	原形	1回目	43.1	42.5	1.5	3.5
				2回目	44.0			
				3回目	40.5			
2	NIB-002	河北省	原形	1回目	39.9	39.6	0.2	0.5
				2回目	39.4			
				3回目	39.4			
3	NIB-035	河北省	原形	1回目	26.2	32.6	5.6	17.3
				2回目	31.8			
				3回目	39.9			
4	NIB-036	河北省	原形	1回目	36.5	35.1	1.1	3.1
				2回目	35.0			
				3回目	33.8			
5	NIB-057	山東省	原形	1回目	44.5	44.6	0.5	1.0
				2回目	45.2			
				3回目	44.1			
6	NIB-059	河北省	刻み	1回目	39.2	41.8	1.8	4.4
				2回目	42.8			
				3回目	43.3			
7	NIB-073	河北省	刻み	1回目	38.1	38.2	0.2	0.6
				2回目	38.0			
				3回目	38.5			
8	NIB-089	河北省	原形	1回目	27.9	29.0	0.7	2.6
				2回目	29.8			
				3回目	29.2			
9	NIB-105	河北省	刻み	1回目	45.0	44.3	0.8	1.9
				2回目	43.2			
				3回目	44.9			
10	NIB-106	内 蒙 古	刻み	1回目	29.6	30.5	0.8	2.6
				2回目	30.4			
				3回目	31.6			
11	NIB-142	河北省	原形	1回目	24.3	23.4	0.7	3.2
				2回目	23.6			
				3回目	22.4			
12	NIB-145	河北省	原形	1回目	33.0	33.2	1.4	4.1
				2回目	34.9			
				3回目	31.6			
13	NIB-167	陝西省	原形	1回目	35.1	36.3	1.7	4.7
				2回目	38.8			
				3回目	35.2			
14	NIB-174	河北省	小刻	1回目	38.5	37.7	1.1	3.0
				2回目	36.1			
				3回目	38.5			
15	NIB-175	陝西省	原形	1回目	36.1	35.6	0.6	1.7
				2回目	35.9			
				3回目	34.7			
15検体平均収率(%)					36.3			
15検体収率標準偏差					6.0			
15検体収率変動係数					16.6			

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
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（H22-創薬総合-一般-013）

分担研究報告書

分担研究課題 漢方薬に用いられる薬用植物の成分分析データ情報  
及び生物活性情報に関する研究

研究分担者 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長 門田 重利

各種生薬の LC-MS 情報の集積に関する研究

研究協力者 富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野 田中 謙

生薬オウゴン、カンゾウ、ニンジン、ショウキョウ及びソウジュツについて、成分解析情報の整備を目的に、わが国で流通する各生薬の複数の試料を収集し、水抽出エキスを調製して、それらの LC-MS 分析を行った。また、単離した標準物質の LC の保持時間及び質量スペクトルから主要な含有成分を同定した。産地、メーカーの異なる供試生薬試料内で、成分組成を比較したところ、成分パターンの差異は小さいものの、含有分量に差異が認められた。

A. 研究目的

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」構築プロジェクトの一環として、市場流通生薬試料の化学的成分情報の集積により、生薬の含有成分に関する情報の整備を目的とする。

成分情報等生薬に関する多角的な情報のデータベース化を行うことは、国内に流通する生薬の安全性の確保ならびに品質の向上に貢献するものと期待される。

本報告書では、生薬オウゴン、カンゾウ、ニンジン、ショウキョウ及びソウジュツにつ

いて LC-MS による成分分析情報について報告する。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を表1にまとめた。これらの試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料を同センターで抽出したエキスである。

標準試料の baicalin, norwogonin-7-glucuronide,

oroxylin A-7-glucuronide, wogonin-7-glucuronide, baicalein, wogonin, liquiritin apioside, liquiritin, licoricesaponin G<sub>2</sub>, glycyrrhizin, licoricesaponin H<sub>2</sub>, licoricesaponin A<sub>3</sub>, licoricesaponin E<sub>2</sub>, licoricesaponin C<sub>2</sub>, licoricesaponin B<sub>2</sub>, ginsenoside Re, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb<sub>1</sub>, ginsenoside Rc, ginsenoside Rd, chikusetsusaponin III 及び chikusetsusaponin IV は、それぞれ別途オウゴン、カンゾウ、ニンジンエキスから単離し、種々のスペクトルデータを文献記載データと比較して同定したものを使用した。

## 2. 実験方法

分析装置は Shimadzu LC-IT-TOF MS ESI を使用した。

LC 条件は以下のとおり：

カラム Waters Atlantis T3 (2.1 mm x 100 mm, 3 micron), カラム温度 40℃, 移動相 A 5 mM Ammonium acetate solution, 移動相 B acetonitrile, Gradient 溶出 10% to 100% Solvent B (0-30 min), 100% Solvent B (30-40 min), 1.5 ml/min.

MS 条件は以下のとおり：

Source voltage 4.5 kV (Positive ion mode) – 3.5 kV (Negative ion mode), Capillary temperature 200 °C, Nebulizer gas 1.5 l/min.

PDA 条件：

検出波長 190-800 nm, スリット幅 1.2 nm.

オウゴン、ニンジン、ショウキョウ及びソウジュツ抽出物は水に 10 mg/ml の濃度で溶解し、カンゾウエキスは、1 mg/ml の濃度で溶解して LC-MS 分析を行なった。また、標準化合物は、全て 0.1 mg/ml の濃度でメタノールに溶解して分析した。

## C. 研究結果

### 1. オウゴン

図1にオウゴン15試料の正イオンLC-MSクロマトグラム比較を、図2～16に各分析試料の正イオンTIC及び負イオンTICを示す。また、標品のbaicalin, norwogonin-7-glucuronide, baicalein, wogonin, oroxylinA-7-glucuronide, wogonin-7-glucuronideを同じ条件で分析した結果を図17に示す。

今回分析した15試料のエキスは、いずれもbaicalin, norwogonin-7-glucuronide, oroxylin A-7-glucuronide, wogonin-7-glucuronideを主成分とし、同様のパターンを示したが、試料により含有量に違いが認められた。

図18に試料NIB-001のPDA3次元クロマトグラムを示す。baicalin, norwogonin-7-glucuronide, oroxylin A-7-glucuronide, wogonin-7-glucuronideに特徴的なUV吸収が認められた。

### 2. カンゾウ

図19にカンゾウ16試料の負イオンLC-MSクロマトグラム比較を、図20～35に各分析試料の正イオンTIC及び負イオンTICを示す。また、標品のliquiritin apioside, liquiritin, licoricesaponin G<sub>2</sub>, glycyrrhizin, licoricesaponin H<sub>2</sub>, licoricesaponin A<sub>3</sub>, licoricesaponin E<sub>2</sub>, licoricesaponin C<sub>2</sub>, licoricesaponin B<sub>2</sub>を同じ条件で分析した結果を図36に示す。

今回分析した16試料のエキスは、いずれも同様のパターンを示した。

図37に試料NIB-003のPDA3次元クロマトグラムを示す。liquiritin apioside, liquiritin等フラボノイド類のUV吸収が認められた。

### 3. ニンジン

図38にニンジン16試料の負イオンLC-MSクロマトグラム比較を、図39～54に各分析

試料の正イオン TIC 及び負イオン TIC を示す。また、標品の ginsenoside Re, ginsenoside Rg1, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rc, ginsenoside Rd, chikusetsusaponin III 及び chikusetsusaponin IV を同じ条件で分析した結果を図 55 に示す。

今回分析した16試料のエキスは、同様のパターンを示したが、試料により含有量に違いが認められた。

図 56 に試料 NIB-011 の PDA3 次元クロマトグラムを示す。ニンジンに含有される成分は主としてサポニン類であり、弱い UV 吸収しか示さないため、今回の分析条件では、ピークの確認が困難であった。

#### 4. ショウキョウ

図 57 にショウキョウ 10 試料の正イオン LC-MS クロマトグラム比較を、図 58~67 に各分析試料の正イオン TIC 及び負イオン TIC を示す。

今回分析した 16 試料のエキスは、同様のパターンを示した。

図 68 に試料 NIB-008 の PDA3 次元クロマトグラムを示す。今回の分析条件では、ピークの確認が困難であった。

#### 5. ソウジュツ

図 69 にソウジュツ 8 試料の正イオン LC-MS クロマトグラム比較を、図 70~77 に各分析試料の正イオン TIC 及び負イオン TIC を示す。

LC の保持時間 25~30 分付近に特徴的な acylsucrose 類 (2,1',3',6'-tetra(3-methylbutanoyl)-sucrose  $m/z$  737.3550 [(M+CH<sub>3</sub>COOH)-H], 1',3',4',6'-tetra(3-methylbutanoyl)sucrose  $m/z$  737.3550 [(M+CH<sub>3</sub>COOH)-H]) が検出された。今回分析

した 8 試料のエキスは、異なる acylsucrose 類の含有パターンを示した (図 78)。

図 79 に試料 NIB-009 の PDA3 次元クロマトグラムを示す。今回の分析条件では、ピークの確認が困難であった。

#### D. 考察

オウゴン、カンゾウ、ニンジン、ショウキョウ及びソウジュツについて市場流通生薬試料の化学的組成情報の集積を目的として、エキスの LC-MS 分析を行なった。

網羅的成分分析を行なうため、HPLC 分析において疎水性の低いカラムを使用した。その結果、MS 分析で負イオンの検出に有利な中性付近の移動相で良好な分離を行なうことが可能であり、カンゾウ及びニンジンに含有されるサポニン類の検出に有効であった。

今回は、LC-MS 分析に有利な移動相条件で分析した結果、PDA による検出では、アセトニトリルの比率の増加に伴い、短波長領域の検出が妨害され、フラボノイド等の強い UV 吸収を有する化合物以外の検出が困難であった。

オウゴン、カンゾウ、ニンジン及びショウキョウの市場流通生薬試料の成分パターン比較を行なった結果、成分パターンは一定しているが、成分全体の含量に差異が認められるものがあつた。

ソウジュツについては、LC-MS で検出可能な化合物が特に検出されず、成分比較は困難であったが、LC の保持時間 25~30 分付近に検出される acylsucrose 類の含有パターンに大きな違いが認められた。

ショウキョウ及びソウジュツに関しては、揮発性成分の分析が必要と考えられ、今後検討していく予定である。

## E. 結論

生薬オウゴン、カンゾウ、ニンジン、ショウキョウ及びソウジュツについて、成分解析情報の整備を目的に、わが国で流通する各生薬の複数の試料を収集し、水抽出エキスを調製して、それらの LC-MS 分析を行った。また、単離した標準物質の LC の保持時間及び質量スペクトルから主要な含有成分を同定した。分析に際しては、LC-MS での成分網羅的分析に有利な条件を適用した。その結果、各生薬エキス中の主要な成分を良好に分離・検出することが可能であった。産地、メーカーの異なる供試生薬試料内で成分組成を比較したところ、成分パターンの差異は小さいものの、含有分量に差異であることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

田中 謙、有田正規、「和漢薬 Wiki データベースの構築とその応用」、MS インフォマティクスワークショップ、2011.3. 富山

## 2. 論文発表

- (1) Tanaka K., Ina A., Hayashi K., Komatsu K.: Comparison of Glycyrrhizae Radix from various sources using a multivariate statistical approach. *J. Trad. Med.* **27** 210-216 (2010).
- (2) Tanaka K., Hayashi K., Fahad A., Arita M.: Multi-stage mass spectrometric analysis of saponins in Glycyrrhiza radix. *Nat. Prod. Comm.*, **6**, 7-10 (2011).
- (3) Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K., Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T "MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences" *Journal of Mass Spectrometry* **45**(7), 703-714 (2010).

G 知的財産権の出願，登録状況  
なし

表1 本研究に使用された生薬市場流通品モデル試料

オウゴン

管理番号	形態	産地
NIB-001	原形	中国河北省
NIB-002	原形	中国河北省
NIB-035	原形	中国河北省
NIB-036	原形	中国河北省
NIB-057	原形	中国山東省
NIB-059	刻み	中国河北省
NIB-073	刻み	中国河北省
NIB-089	原形	中国河北省
NIB-105	刻み	中国河北省
NIB-106	刻み	中国内蒙古自治区
NIB-142	原形	中国河北省
NIB-145	原形	中国河北省
NIB-167	原形	中国陝西省
NIB-174	小刻	中国河北省
NIB-175	原形	中国陝西省

ソウジュツ

管理番号	形態	産地	入手年	備考（栽培・野生・等級）
NIB-009	原形	中国湖北省	2008年	古立
NIB-010	原形	中国内蒙古自治区	2010年	津
NIB-058	原形	中国湖北省	2010年	
NIB-092	原形	中国湖北省	2008年	
NIB-111	原形	中国湖北省	2009年	野生品
NIB-148	原形	中国湖北省	2009年	
NIB-181	原形	中国湖北省	2010年	古立蒼朮
NIB-182	原形	中国陝西省	2010年	

カンゾウ

管理番号	形態	産地	入手年	備考
NIB-003	原形	中国内蒙古自治区	2009年	西北丁級
NIB-004	原形	中国寧夏	2008年	西北丁級
NIB-005	原形	中国内蒙古自治区	2008年	東北1号
NIB-006	原形	中国内蒙古自治区	2008年	東北2号
NIB-007	原形	中国内蒙古自治区	2008年	東北3号
NIB-037	原形	中国内蒙古自治区	2010年	
NIB-038	原形	中国甘肅省	2010年	西北丁級
NIB-054	原形	中国吉林省	2010年	
NIB-074	刻み	中国甘肅省	2008年	野生品西北「主に使用」
NIB-090	刻み	中国寧夏	2008年	西北甘草
NIB-107	刻み	中国寧夏	2010年	野生品・西北甘草・丙（主に使用）
NIB-108	刻み	中国寧夏	2009年	野生品・西北甘草・乙
NIB-109	刻み	中国内蒙古自治区	2010年	野生品・東北甘草・丙
NIB-146	刻み	中国甘肅省	2006年	西北
NIB-168	原形	中国内蒙古自治区	2009年	野生品（主に使用）
NIB-176	原形	中国内蒙古自治区	2010年	野生品（東北甘草2号）

ショウキョウ

管理番号	形態	産地	入手年	備考(栽培・野生・等級)
NIB-008	原形	中国雲南省	2010年	無硫片
NIB-039	原形	中国雲南省	2009年	
NIB-055	原形	中国雲南省	2010年	
NIB-060	刻み	中国雲南省	2008年	
NIB-075	刻み	中国雲南省	2006年	栽培品(主に使用)
NIB-091	スライス	中国雲南省	2009年	
NIB-110	刻み	中国雲南省	2010年	栽培品
NIB-147	原形	中国雲南省	2010年	
NIB-169	原形	中国雲南省	2009年	栽培品(主に使用)
NIB-179	原形	中国雲南省	2010年	