

Fig. 1 オウゴンの CYP3A4 および CYP2D6 阻害活性 (IC₅₀ 値)

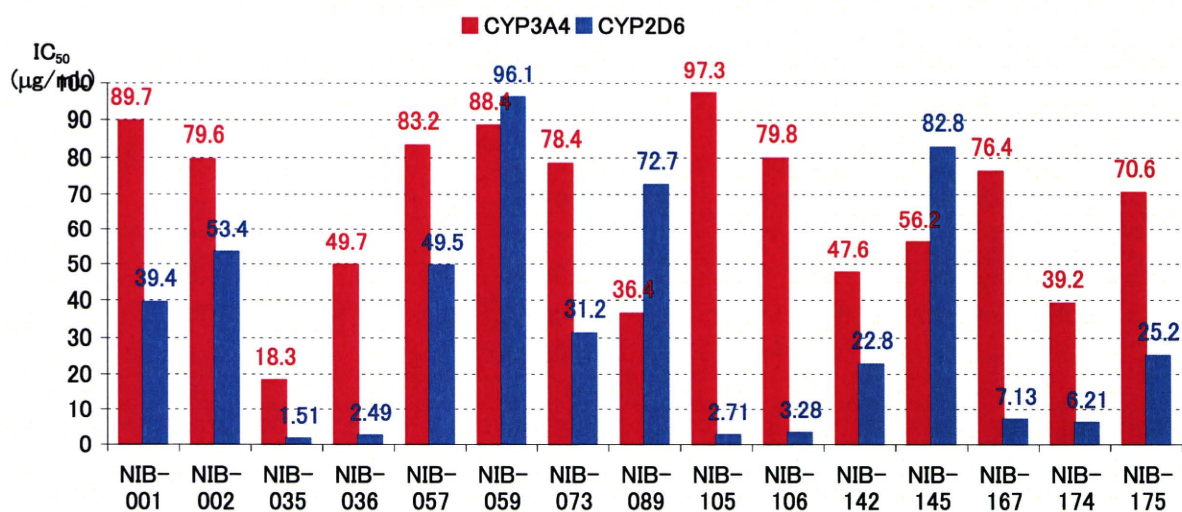
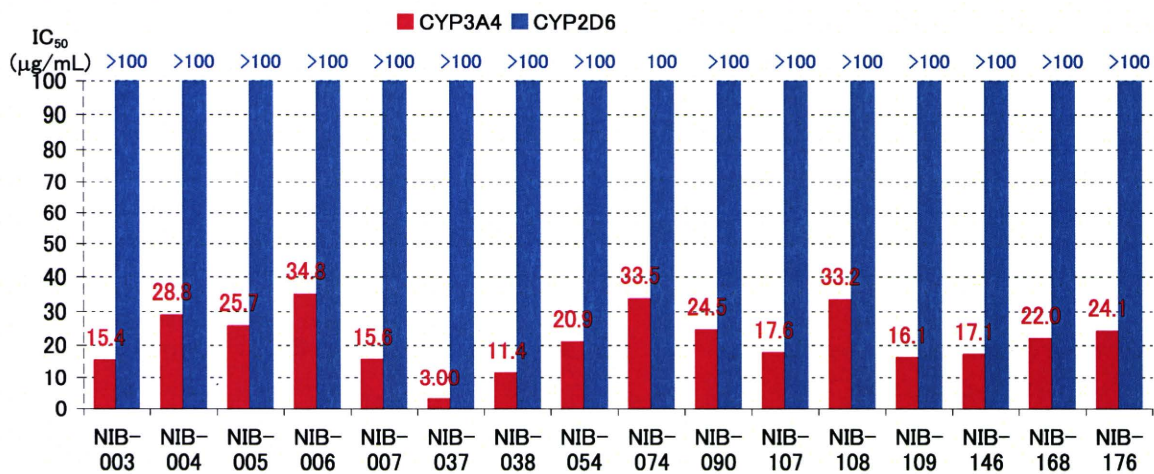


Fig. 2 カンゾウの CYP3A4 および CYP2D6 阻害活性 (IC₅₀ 値)



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

3種のヒトがん細胞株の増殖に対する各種生薬エキスの効果

研究協力者 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 櫻井 宏明

生薬エキス（オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、カンゾウ、およびニンジン）のロット差を生物活性によって検出するため、3種のヒトがん細胞株の増殖試験を行った。その結果、オウゴンに強い増殖阻害活性が認められ、3種の細胞とも同じような傾向が認められた。また、オウゴンはロット差が大きく、含有成分との相関性が認められた。また、ショウキョウについても若干の細胞増殖阻害活性が認められたが、その他の生薬の害効果は弱いものであった。

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、生薬エキスのロット差を生物活性を指標に検出することを目的とする。

がん細胞は、発生母地の正常細胞の性質をある程度は保持していると考えられ、細胞ごとに化学物質に対する感受性が異なっていることが知られている。したがって、生薬のような複合薬物の活性を評価するに当たり、特定の分子等に焦点を当てるのではなく、広範な制御機構の影響を受ける細胞増殖能を指標とする生物活性試験が有用であると考えられる。そこで、ヒトがん細胞株（子宮頸がん細胞株 HeLa、肺がん細胞株 A549、白血病 Tリンパ腫株 Jurkat）に対する各生薬エキスの活性を測定した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された生薬試料（オウゴン、ソウジュツ、ショウキョウ、カンゾウ、およびニンジン）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の一部である。

また、HeLa 細胞は DMEM+10% FCS で、また A549 および Jurkat 細胞は RPMI1640+10% FCS 培地で培養した。

2. 実験方法

各細胞を 96 ウェルプレートに播種し（ 3×10^3 cells/well）、翌日に生薬エキスを添加した。その 24 時間後に WST-1 試薬を加え、吸光度（450 nm）

を測定した。陽性コントロールとして、doxorubicin を $10\mu\text{g/ml}$ で添加した。生薬は 10mg/ml の水溶液を作製し（不溶物を遠心分離で除いた）、最終濃度 $500\mu\text{g/ml}$ で試験を実施した。50%以上の阻害効果が認められたオウゴンについては、さらに濃度依存性試験を実施した。

C. 研究結果

3種のヒトがん細胞株の増殖に対する各生薬エキスの効果を検討した。その結果、オウゴンに強い増殖阻害活性が認められ、3種の細胞とも同じような傾向が認められた（図1）。また、オウゴンはロット間で活性のバラツキが大きく、これは含有成分（バイカレインをはじめとしたいくつかの成分）との相関があることが示唆された（田中先生の報告書参照）。活性が強かったロットは、NIB-SC001, 002, 003, 009, 012であった。一方、NIB-SC006, 008, 010, 011は活性が非常に弱かった。実際、エキス溶液の色と増殖阻害活性に有意な相関が認められた（図2）。また、ショウキョウについても若干の細胞増殖阻害活性が認められ、ロット差も認められた（図3）。一方、その他の生薬については3種の細胞とも阻害効果は弱いものであった。

D. 考察

オウゴンエキスにおいて、活性が強いものとエキス溶液の色が相関していることから、細胞増殖阻害活性と含有成分との相関性が示唆された。実際、質量分析結果と照らし合わせると、

バイカレインなどの含有量と相関していることがわかったことから、オウゴンエキスの活性面からの標準化に細胞増殖活性が有用であることが示唆された。

一方、その他のエキスについては明確な細胞増殖阻害活性が認められなかった。これは、ロット差という観点からすると、どのロットも細胞増殖活性を示さなかったという点においては意味のあるデータであると捕らえることも可能であるが、より明確な活性が検出可能なアッセイ系の構築が必要であると考えられた。

E. 結論

オウゴンエキスの生物活性のロット差は、がん細胞の増殖試験で検定可能である。また、他のエキスについては、別のアッセイでの検討が必要である。

F. 研究発表

なし

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

表1. 本研究に使用された生薬リスト

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 | 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 | |

ショウキョウ

| 管理番号 | 形態 | 産地 | 入手年 | 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 | |

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) |

ニンジン

| 管理番号 | 形態 | 産地 | 入手年 | 備考(栽培・野生・等級) |
|---------|----|-------|-------|---------------|
| NIB-011 | 原形 | 中国吉林省 | 2009年 | 生干 |
| NIB-012 | 原形 | 中国吉林省 | 2008年 | 湯通 |
| NIB-040 | 原形 | 中国吉林省 | 2007年 | 5-6年根 |
| NIB-056 | 原形 | 中国吉林省 | 2009年 | |
| NIB-061 | 刻み | 中国吉林省 | 2009年 | 湯通し |
| NIB-067 | 原形 | 中国吉林省 | 2009年 | 栽培品 |
| NIB-076 | 刻み | 中国吉林省 | 2009年 | 栽培品・生干し(主に使用) |
| NIB-077 | 刻み | 中国吉林省 | 2009年 | 栽培品 湯通し |
| NIB-093 | 原形 | 中国遼寧省 | 2009年 | |
| NIB-112 | 原形 | 中国吉林省 | 2010年 | 栽培品・湯通し人参 |
| NIB-113 | 原形 | 中国吉林省 | 2009年 | 栽培品・紅参 |
| NIB-114 | 刻 | 中国吉林省 | 2007年 | 栽培品・生干(主に使用) |
| NIB-149 | 原形 | 中国吉林省 | 2008年 | |
| NIB-170 | 原形 | 中国吉林省 | 2009年 | 栽培品(主に使用) |
| NIB-183 | 原形 | 中国吉林省 | 2010年 | 生干人参 |
| NIB-184 | 原形 | 福島県 | 2009年 | 湯通人参 |

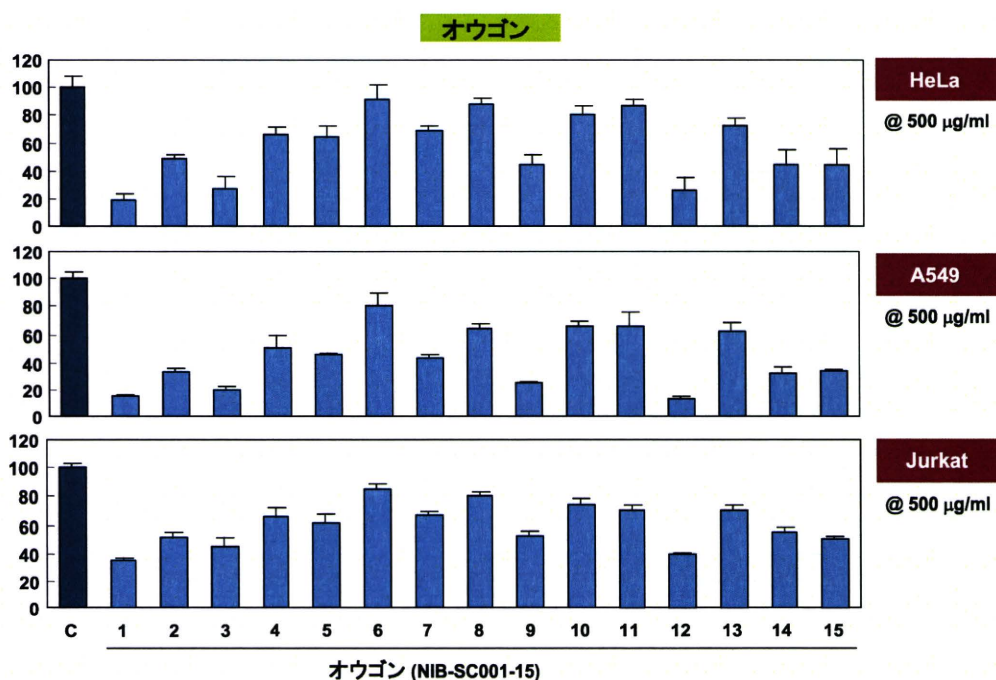


図1. オウゴンエキスの細胞増殖活性
各エキスの活性を3種の細胞で検討した。

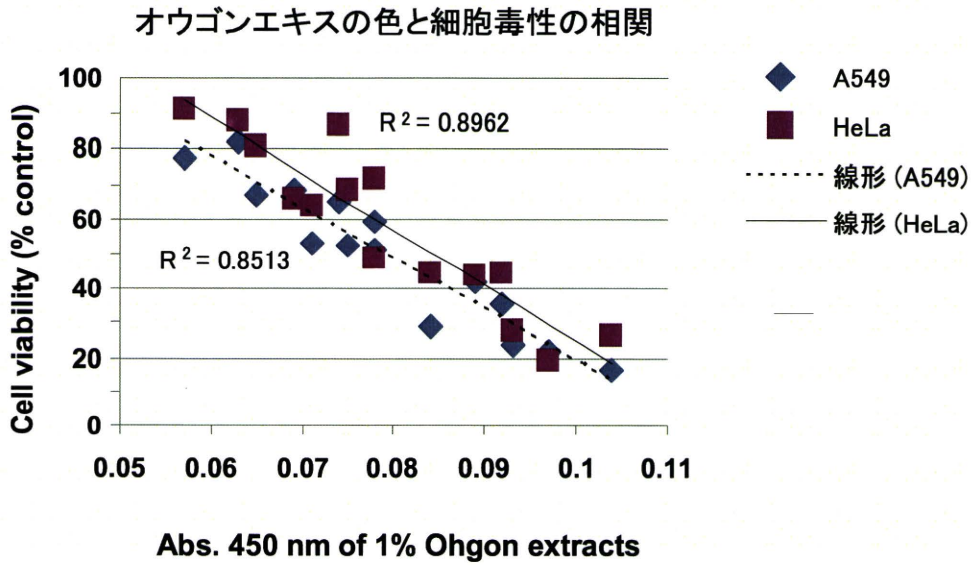


図2. オウゴンエキスの細胞増殖阻害活性とエキス溶液の吸光度との相関

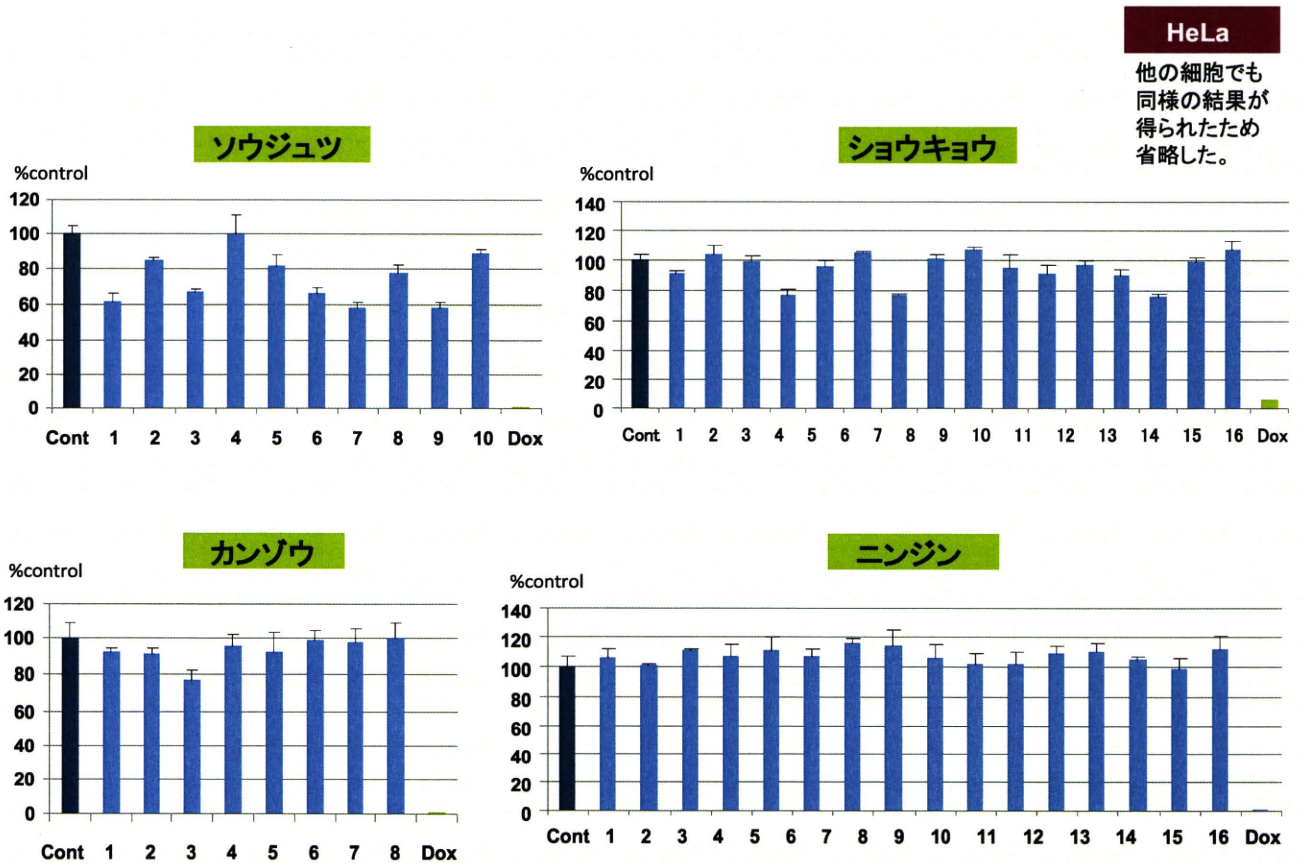


図3. その他エキスの細胞増殖活性
各エキスの活性を HeLa 細胞で検討した。他の細胞でもほぼ同様の活性であった。

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

各種測定データの掲載方法の検討

研究協力者 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 有田 正規

富山大学で計測する生薬のマスペクトル、クロマトグラム、生理活性情報等を格納するウィキデータベースを構築した。初年度は27生薬について1600枚の画像を用いた栽培情報や理化学的品質評価を掲載した。また118生薬のクロマトグラムをウェブ上で整理した。

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、生薬及びそれらの基原植物の遺伝子鑑別法に関する情報の収集ならびに、市場流通モデル試料の遺伝子情報の集積により、生薬の遺伝子鑑別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とともに遺伝子鑑別法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。

本報告では、富山大学グループが作成する生薬エキスのマスペクトル、クロマトグラム、生理活性情報等をデータベースとして整理し、データの偏りや統計情報を誰もが簡便に閲覧できる手法の開発について報告する。

B. 研究方法

生薬情報のようにデータ化・数値化の基準が明確に定まっていない情報をデータベース化する場合、実験系と計算機系の研究者が対等の立場でデータを閲覧し、議論・研究を進められる情報基盤の開発が必須である。22年度は情報基盤としてウィキを用いたデータベースを設計した。更に初期情報として、27種の生薬の①市場流通品と現状、②生産加工状況、③理化学的品質評価、④内部形態・鏡検の情報および約1600枚のデジタル写真を生薬関連会社のご厚意により提供していただき、それらの掲載方法を検討した。同時に、富山大学で計測したLC-MSクロマトグラムのデータ化及び掲載方法を検討し、クロマトグラム情報の表示手法を確立した。

C. 研究結果

今回は、生薬の起原植物に関する情報を生薬全体の「概要」と位置づけて情報を整理し

た。各生薬についてウィキ上に概要を掲載するページを作成し、このページを軸に植物の分類情報や生薬の学術情報をリンクした。さらに各生薬について①市場流通品と現状、②生産加工状況、③理化学的品質評価、④内部形態・鏡検を章として掲載するページを作成し、生薬の栽培情報データベースのプロトタイプとした。1600枚の画像はすべて画面内にコンパクトに収まるように縮小し、クリックして拡大する形式にした。

118生薬のLC-MS クロマトグラムはJCAMPと呼ばれるフォーマットでウェブ上に掲載し、JCAMP形式を閲覧するツールおよびそれをウィキ上に埋め込む仕組みを実現した。

D. 考察

生薬の栽培情報はウェブ上の読み物としては含蓄に富んだリソースだが、学術的な統計情報や比較検討とリンクさせることが難しい。現在は各ページの情報から自動的に一覧表を作る機能、TLCのような同一試験で品質評価を行うページへの自動リンク等の機能を付加しているが、将来これらの情報を半自動的に数値化して統計処理を可能とする機能が望まれる。同じことはクロマトグラムの情報についてもあてはまる。生データをアップロードするだけで、自動的にピーク検出をおこなって特徴的なピーク情報および

マススペクトルを登録するシステムにまで仕上げないと、当初の目標である異分野の研究者が協働できるシステムとして仕上がらない。

E. 結論

ウィキを用いた協働のための情報基盤のプロトタイプとして、27生薬に関する1600の画像と各種情報からなるデータベースを作成した。また118生薬のLS-MSデータを掲載し、クロマトグラムを自由に閲覧できる仕組みを整えた。

F. 研究発表

1. 学会発表

Arita M, Tanaka K, Shibahara N, Yoshimoto M, Kanaya S “Database for crude drugs and Kampo medicines” Proceedings of JSBi 2010, Fukuoka.

2. 論文発表

Tanaka K, Hayashi K, Fahad A, Arita M “Multi-stage Mass Spectrometric Analysis of Saponins in *Glycyrrhiza radix*” Natural Product Communications, 6(1):7-10, 2011

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）
漢方薬に使用される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 成分分析データ情報に関する研究（NMR 情報の集積）

研究分担者 赤木 謙一（独）医薬基盤研究所・共用機器実験室

漢方薬に使用される総合情報データベース構築するための基盤整備を目的として、漢方薬含有生薬成分の LC-MS-NMR 測定を行った。生薬オウゴンの LC-MS-NMR のデータを取得し、今後、データベースに登録予定である生薬約 75 種類のデータ取得方法の基礎となる LC、MS、及び NMR 測定手法及びパラメータ類の検討を行った。その結果、LC-MS 分析に約 1 時間、及び NMR 測定には全対象の積算時間合計 20 時間程度であり、今後、全 75 種類生薬 LC-MS-NMR データの取得は十分可能であることが示せた。

A. 研究目的

本研究は、漢方薬の品質、有効性、安全性等を確保するために、膨大な種類にのぼる薬用植物の総合的なデータベースを構築することを目的としている。薬用総合情報データベースに登録する情報として、（1）成分分析データ情報、（2）官能データ情報、（3）内部形態及びさく葉標本情報、（4）資源管理情報、（5）遺伝子の鑑別部位及び基原鑑別に関する情報、（6）組織培養物及び効率的増殖法に関する情報、（7）植物体栽培及び植物の効率的生産法に関する情報、（8）生物活性及び副作用情報、（9）漢方処方関連情報（エキス情報、食薬区分情報）、が挙げられている。これら（1）～（9）の登録データのうち、本研究分担者が担当するのは、（1）成分分析データ情報についてである。

漢方薬の品質を決定する生薬成分は、産地や基原、加工調製法により、化学的修飾が異なっていたり、化学的構成成分が変化を起こしたり

する場合がある。このような生薬成分の変化が、薬効に対してどのような影響を及ぼすのかを考察するためには、生薬に含まれる多種多様な低分子化合物についての個々の化学的な情報を得る必要がある。

本研究では、生薬成分の化学構造を詳細に研究するために、LC (Liquid Chromatography, 液相クロマトグラフィー)、MS (Mass Spectrometry, 質量分析装置)、NMR (Nuclear Magnetic Resonance, 核磁気共鳴装置)、の各種分析機器をオンラインで接続したシステムである LC-MS-NMR 装置を用いることにより、生薬構成成分の分析を試みた。LC-MS は、生薬混合物から個々の化合物成分を単離し、その分子量を素早く決定することによって、化合物を推定することが可能であることから広く用いられている。

MS によって得られる化合物情報は分子量についてであり、比較的高感度、高分解能の情報を得ることができるが、異性体のように分子量

が同じで化学構造が異なる化合物の場合は、各々の異性体構造を特定することは困難である。

NMR は、磁場中に置いた化合物に電磁波を照射し、化合物を構成している ^1H 核あるいは天然存在比 1.1% の ^{13}C 核からの応答を直接、あるいは間接的に観測することにより、化学構造を決定できる手法の一つである。しかし MS と比較すると、測定感度は 100 万分の 1 程度であることから、天然物由来成分に微量にしか含まれていないターゲット成分を解析するのは非常に困難なことが多い。

本研究で用いた LC-MS-NMR は、超高磁場 800 MHz マグネットに超高感度クライオプローブを装着した高感度 NMR であり、微量生薬成分の解析を可能にしている。また、LC-MS をオンラインで NMR に接続しているので、ターゲット成分の NMR 測定をハイスループットで行うことが可能である。

本報告では、国内に流通しているオウゴン 15 種類（河北省産 11 種類、山東省産 1 種類、内蒙古産 1 種類、陝西省産 2 種類）のうち、LC-MS の解析において、LC 測定時において、8 min 付近に溶出されるにおける m/z 462 のピーク（正イオン検出モード： m/z 463）が 3 つの試料中（内蒙古産および河北省産 2 種）にのみ認められ、本化合物に関しては産地あるいは調製における重要なマーカーとなる可能性が示唆された^(1,2)。3 つの試料中、このターゲット成分含有量が一番多いと考えられた中国河北省産（管理番号 NIB-142）について LC-MS、及び LC-MS-NMR による解析を試みた。

B. 研究方法

試料及び試薬

医薬基盤研究所・澁野が抽出、凍結乾燥した

試料「オウゴン（管理番号 NIB-142、産地 中国河北省）」を入手した。LC-MS-NMR 測定溶媒は D_2O 99% (Cambridge Isotope Laboratories, INC)、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO.,INC)、ギ酸- d_2 98% (ISOTECTM) を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。本研究において、動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

装置

LC 部は Agilent 1200 series (Agilent Technologies、ポンプ: Quat Pump、紫外可視検出器: VWD、オートサンプラー: ALS) に、カラムオープンとして BPFU-O (Bruker) を用いた。MS 部は、esquire 4000 (Bruker)、イオン化源には ESI を用いた。MS-NMR の送液スプリッターとして 20 分の 1 スプリッターを採用した BNMI (Bruker) を用いた。MS に試料を導入する際には、BNMI のミキシングシリンジを用いて、0.2% ギ酸添加済アセトニトリルを添加した。LC と NMR を接続するために、セル容量 $30\ \mu\text{l}$ を採用した Cryo-FIT (Bruker) を NMR に装着した。LC-MS-NMR を行うために、Loop storage 法を採用するために BPSU-36 (Bruker) を用いた。NMR は TCI クライオプローブ付き AvanceII800 (Bruker) を用いた。LC 及び LC-MS の制御には Hyster 3.2 (Bruker)、MS の制御には esquire Control version 5.3 (Bruker)、NMR の制御は Topspin2.0 (Bruker) を用いた。

試料準備と測定条件

オウゴン (NIB-142) を 5.3 mg 量り取り、500 μl のミリ Q 水に溶解し、20 min.間 voltex mixer を用いて攪拌した。その後、12,000 rpm で 10 min. 間遠心操作を行い、上清を取得した。

LC 測定条件：移動相は、(A) H₂O, (B) CH₃CN (0.1% ギ酸) を用いた。(A) 95%から 30 min. (A) 30%までリニアグラジエントを行い、30 min. から 35 min.までに (A) 0%にした。流速は 1 ml/min で行った。カラムは YMC-Triart C18 4.6 X 150, 粒子径 (5 μm) 細孔径 (10 μm) を用いた。UV 観測波長は 254 nm、インジェクト量は 25 μl とした。

MS 測定条件：LC から MS への導入の際、BNMI を経由することにより流速を 20 分の 1 に減速させ、同時に 20 μl/min の流速でアセトニトリル (0.2% ギ酸) の添加を行った。データは正イオンモードで取得した。詳細な測定パラメータは Table 1 にまとめた。

NMR 測定条件：LC 測定条件に記載した移動相のうち、H₂O を D₂O に、ギ酸をギ酸-d₂に変更した移動相を用いた。また、インジェクト量を 50 μl とした。UV 検出器信号、もしくはトータルイオンクロマトによる信号を目的シグナルとして検出し、BPSU-36 を利用した Loop-Storage 法を行った。NMR 測定パラメータの詳細に関しては Table 2 にまとめた。Table 2 中の NS (積算回数)、RG (レシーバーゲイン)、SPNAM6 (溶媒除去用シェイプドパルス) については各分画についてパラメータを最適化した。¹H-NMR の化学シフト値はアセトニトリルのメチル基シグナルが 1.93 ppm となるように合わせた。

C. 研究結果

重水移動相を用いる LC-MS-NMR 測定に先立ち、軽水溶媒を用いて LC-MS 測定を行った。LC-MS 測定結果を図 1 に示した。スペクトルは上から (a) UV chromatogram (254nm), (b) BPC (Base Peak Chromatogram), (c) EIC (Extracted Ion Chromatogram) 463, (d) EIC 462, (e) EIC 461, (f)

EIC 447, (g) EIC 271 で表した (全て正イオン検出モードで単位は m/z)。(e) EIC 461 の成分は 3 成分確認出来た。この中の 1 成分は Wogonoside (オーゴノシド) だと推定された。この 3 成分の MS はほぼ同一であることから、立体異性体の可能性が示唆された⁽²⁾。(c) EIC 463 の成分の内、8 min.付近に溶出する成分は、15 種類のオウゴン中、3 種類のみ特徴的に見られた成分であるが、非常に含有量が少なく、UV 吸収もほとんど見られなかった。(f) EIC 447 の成分は、Baicalin (バイカリン) とその異性体であると考えられるスペクトルを得ることができた。5 つのシグナルが生じているが、最も強度の大きなピークが Baicalin であると考えられた⁽²⁾。(g) EIC 271 の成分は、(f) の成分が ESI イオン化条件の下、フラグメンテーションを起こして生じた成分であることが示唆された⁽²⁾。また、分子量 270 は Baicalein (バイカレイン) が知られているので、20 min.付近に生じているシグナルは Baicalein の可能性を示唆している。

次に NMR 測定を行うため、移動相に重水を用いて分析を行った。結果を図 2 に示した。スペクトルは上から、軽水分析の表記にならない、(A) ~ (G) とした。NMR 測定には高濃度の試料が必要なことにより、インジェクト量を軽水分析の 2 倍にした。その結果、(A) UV 測定の分解能に顕著な劣化は見られなかった。MS スペクトルには顕著な変化が見られた。これは、移動相に重水もちいることにより、化合物中の交換性プロトンが ²H に置き換わり、同じ化合物においても、その交換した ²H の数に応じて、様々な分子量を取り得ることより生じた結果である。興味深いことに (C)~(E) の EIC において、保持時間が 8 min. のところにシグナルが集中して生じた。これらのことから、MS シグナルを指標にしてシグナルを同定することが困難

であることが判明した。UV シグナルでは、軽水、重水測定において保持時間に重水素効果による若干のずれが生じているが、目的シグナルを取得するのに大きな影響がなかったので、8 min. に溶出する物質を除き、UV シグナルを指標として取得した。取得した分画は、図2(A)中のloop 1~11で示した。

Loop 1のNMRスペクトルを図2-1に示した。このスペクトルは積算回数NS: 4096で、積算時間は約4時間で取得した。含有量は微量ではあるが、芳香環領域に7.04 ppm, 6.69 ppmのケミカルシフトをもった化合物であることが示された。Loop 3のNMRスペクトルを図2-2に示した。積算回数はNS: 1024で積算時間は約1時間であった(図中赤丸はアセトニトリル由来の不純物シグナル)。この分画は、最大のUV吸収を示していた化合物を含んでおり、LC-MSの結果からBaicalinと推測されたシグナルであった。Loop 4からloop 6のスペクトルを図2-3から図2-5に示した。この3スペクトルの積算回数は各々NS: 2048であった。Loop 4とloop 5を比較すると、スペクトル形状は非常に類似しているが、loop 4においては、芳香環由来と考えられる6.59 ppm, 6.75 ppmのケミカルシフトは、loop 5においては、6.79 ppm, 6.92 ppmとなっており、置換基等によって構造が異なっていることが推測された。Loop 7は積算回数はNS: 1024で積算時間は約1時間であった。

この分画はloop 3について2番目にUV吸収の強い化合物分画であるが、LC-MS分析よりEIC 461のWogonosideと推測でき、6.79 ppm, 6.57 ppmのケミカルシフトを有していた。これはloop 4の分画が有していた6.75 ppm, 6.59 ppmのケミカルシフトと非常に近いので、loop 4の分画化合物はWogonosideの異性体である可能性が示唆された。Loop 9の分画化合物は、

積算回数はNS: 2048で積算時間は約2時間であった。LC-MS測定より、EIC 271の成分を含む化合物であることが示唆されており、EIC 447の化合物がフラグメンテーションをおこしたのではないことがLC-MS測定の結果から示唆されていたので、loop 9に含まれるBaicalinであると推測された。

D. 考察

今回のオウゴン成分解析研究において、MSをトリガーとした目的試料取得が困難であることが判った。これは、化合物中の移動性プロトンが移動相に用いる重水素と交換することにより、分子量変動を生じることによる。化合物により、UVによるシグナル検出ができない場合には、MSによるトリガー信号によるみ目的分画を取得可能であるので、軽水移動相での解析を行う必要が生じる。軽水分析が可能になるオンラインSPE(Solid Phase Extraction)装置の利用を考慮し、目的化合物の解析を行う必要がある。

E. 結論

本研究により、データベースに登録予定である生薬約75種類のデータ取得方法のLC-MS-NMR取得法の基本的方向性が確認できた。UV吸収による試料分画が可能である場合には、重水移動相を用いたLC-NMR法でスペクトルを取得可能である。しかし、UV吸収による分画が困難な場合には、分析には軽水移動相を採用し、SPEを用いてNMR測定を行う必要がある。

天然物成分を扱うので、各生薬含有化合物の標準品との比較からシグナル帰属を進める必要があるが、今後これらの各生薬含有化合物標準品をコンスタントに手に入れて測定し、生薬

由来の化合物と比較することにより帰属を進める必要がある。また、新規の化合物が見つければ、各種一次元、二次元 NMR 測定を行い、構造決定を行う必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

渕野裕之、川原信夫、高橋 豊、赤木謙一、合田幸広：薬用植物総合データベース構築のための基盤整備に関する研究—オウゴン国内流通品の成分比較について（その1）日本薬学会第131年会（2011年3月28-31日、静岡）

G. 知的所有権の取得状況

1. 取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

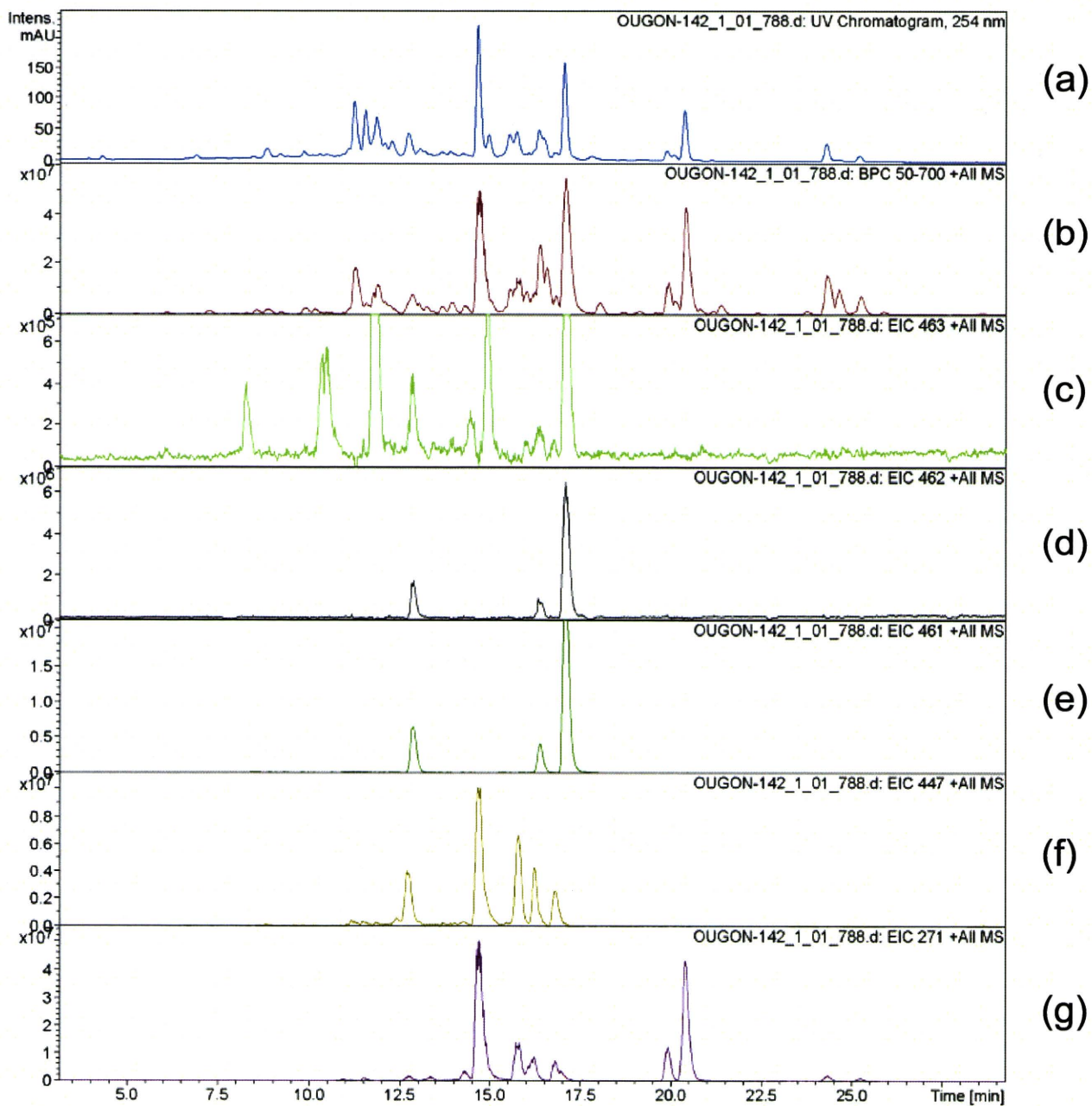
- 1) 薬用植物総合データベース構築のための基盤整備に関する研究—オウゴン国内流通品の成分比較について（その1）日本薬学会第131年会要旨 渕野他、
- 2) 研究分担者・渕野、協力研究者・高橋

Table 1. MS 測定条件

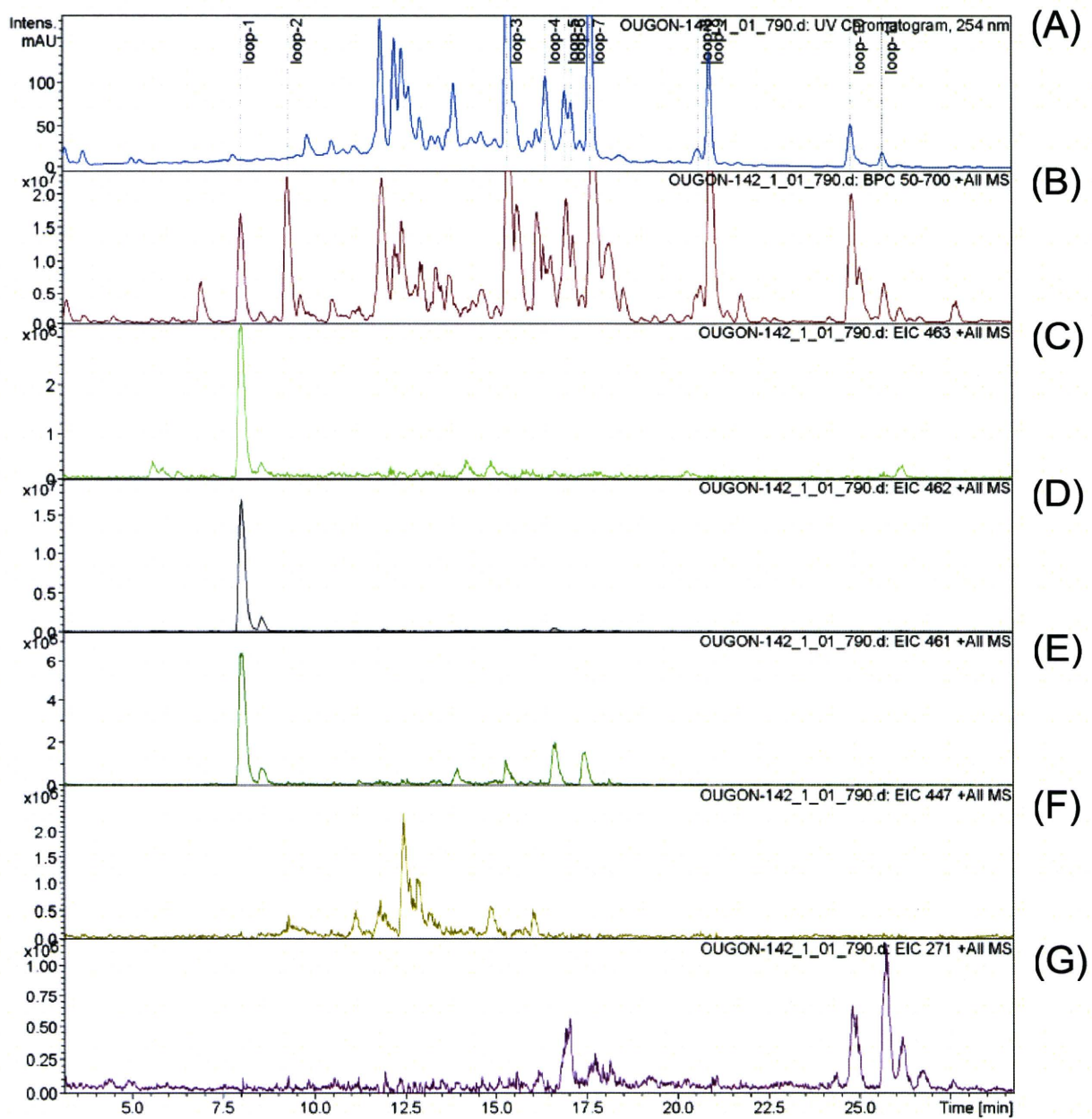
| | | | |
|-----------------------------|------------|-------------------------|-----------|
| Mode | | Tune SPS | |
| Mass Range Mode | Std/Normal | Target Mass | 500 m/z |
| Ion Polarity | Positive | Compound Stability | 90 % |
| Ion Source Type | ESI | Trap Drive Level | 100 % |
| Alternating Ion Polarity | off | Optimize | Normal |
| Current Alternating Ion Pol | Positive | Smart Parameter Setting | active |
| Divert Valve | to Source | | |
| Tune Source | | Trap | |
| Trap Drive | 36.9 | Rolling | on |
| Octopole RF Amplitude | 150.0 Vpp | Rolling, Averages | 2 cts |
| Lens 2 | -60.0 Volt | Scan Begin | 50 m/z |
| Capillary Exit | 116.7 Volt | Scan End | 700 m/z |
| Dry Temp (Set) | 320 °C | Averages | 8 Spectra |
| Nebulizer (Set) | 30.00 psi | Max. Accu Time | 200000 µs |
| Dry Gas (Set) | 7.00 l/min | ICC Target | -1 |
| HV Capillary | 4000 V | Charge Control | on |
| HV End Plate Offset | -500 V | | |

Table 2. NMR 測定条件

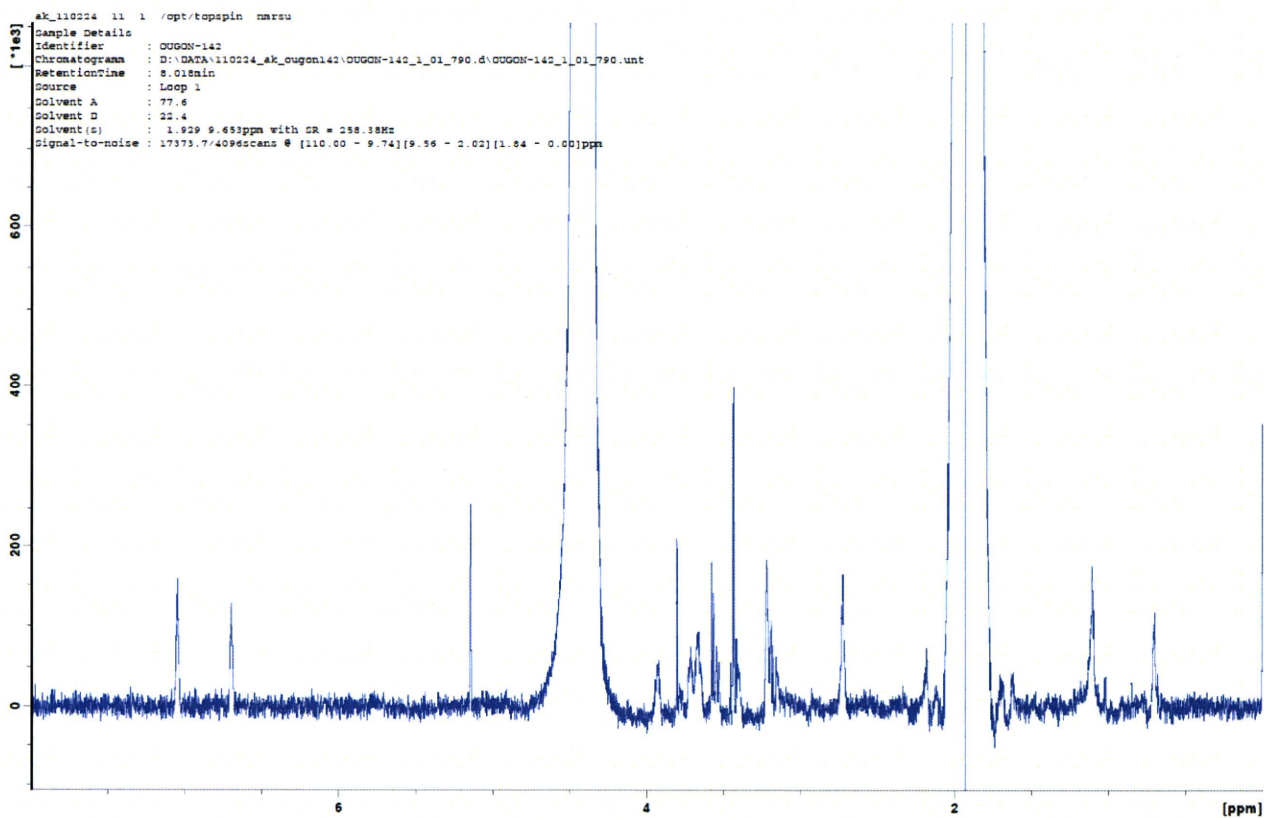
| | | | |
|------------|------------|----------------|---------------|
| PULPROG = | lc1pncwps | Channel f1 | |
| TD = | 16384 | NUC1 = | 1H |
| NS = | 1024 | P1 [µs] = | 10.00 |
| DS = | 8 | P18 [µs] = | 100000.00 |
| SWH [Hz] = | 16025.64 | PL1 [dB] = | 3.00 |
| AQ [s] = | 0.5112308 | PL1W [W] = | 9.30345917 |
| RG = | 203 | SFO1 [MHz] = | 800.2017941 |
| DW [µs] = | 31.200 | SP6 [dB] = | 53.98 |
| DE [µs] = | 20.00 | SP6W [W] = | 0.00007425 |
| D1 [s] = | 3.00000000 | SPNAM6 = | p_ak_11022413 |
| D11 [s] = | 0.03000000 | SPOAL6 = | 0.500 |
| d12 [s] = | 0.00002000 | SPOFFS6 [Hz] = | 0.00 |
| d13 [s] = | 0.00000400 | Channel f2 | |
| D8 [s] = | 0.10000000 | NUC2 = | 13C |
| l6 = | 30 | PL2 [dB] = | 0.00 |
| l7 = | 1 | PL21 [dB] = | 26.00 |
| TD0 = | 1 | PL21W [W] = | 0.27699026 |
| | | PL2W [W] = | 110.27181244 |
| | | SFO2 [MHz] = | 201.2108424 |



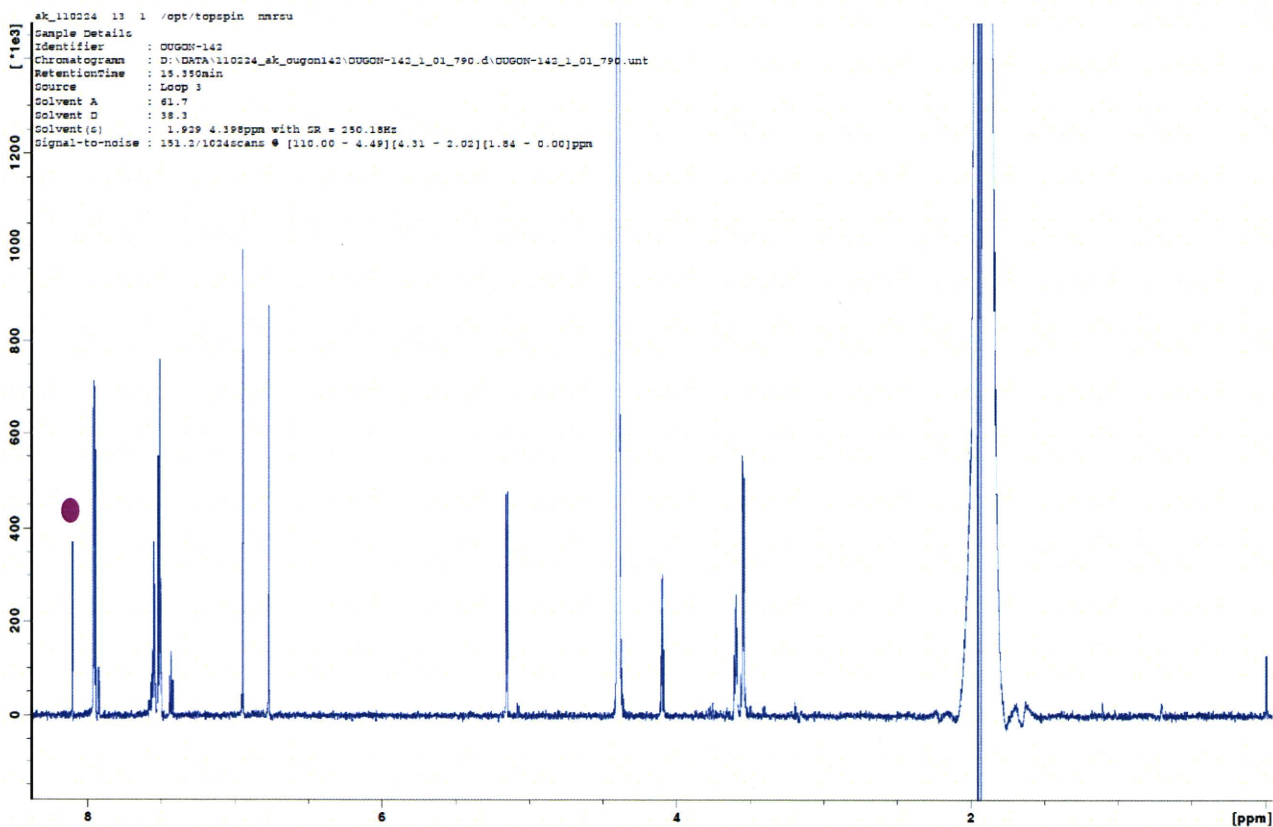
(图 1) LC-MS 測定 (軽溶媒使用時)



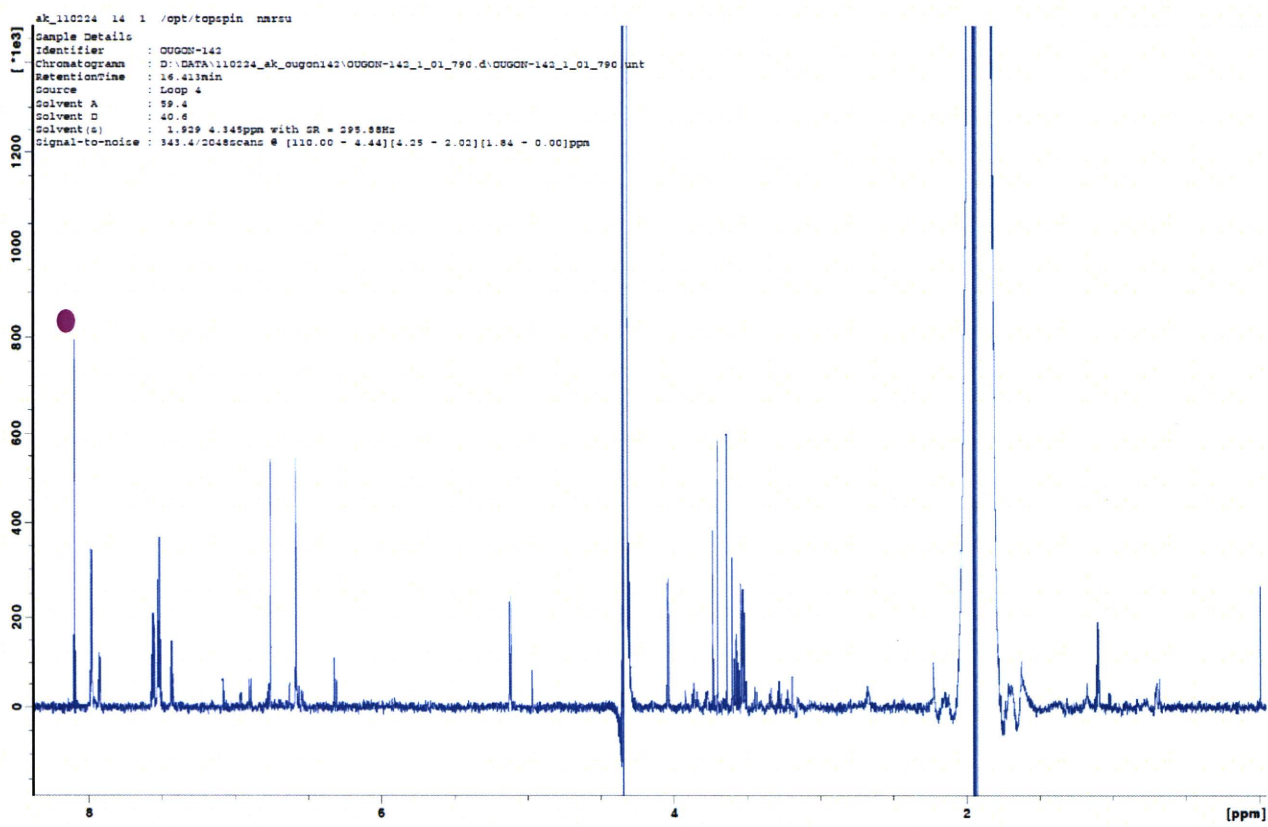
(图 1) LC-MS-NMR 測定 (重溶媒使用時)



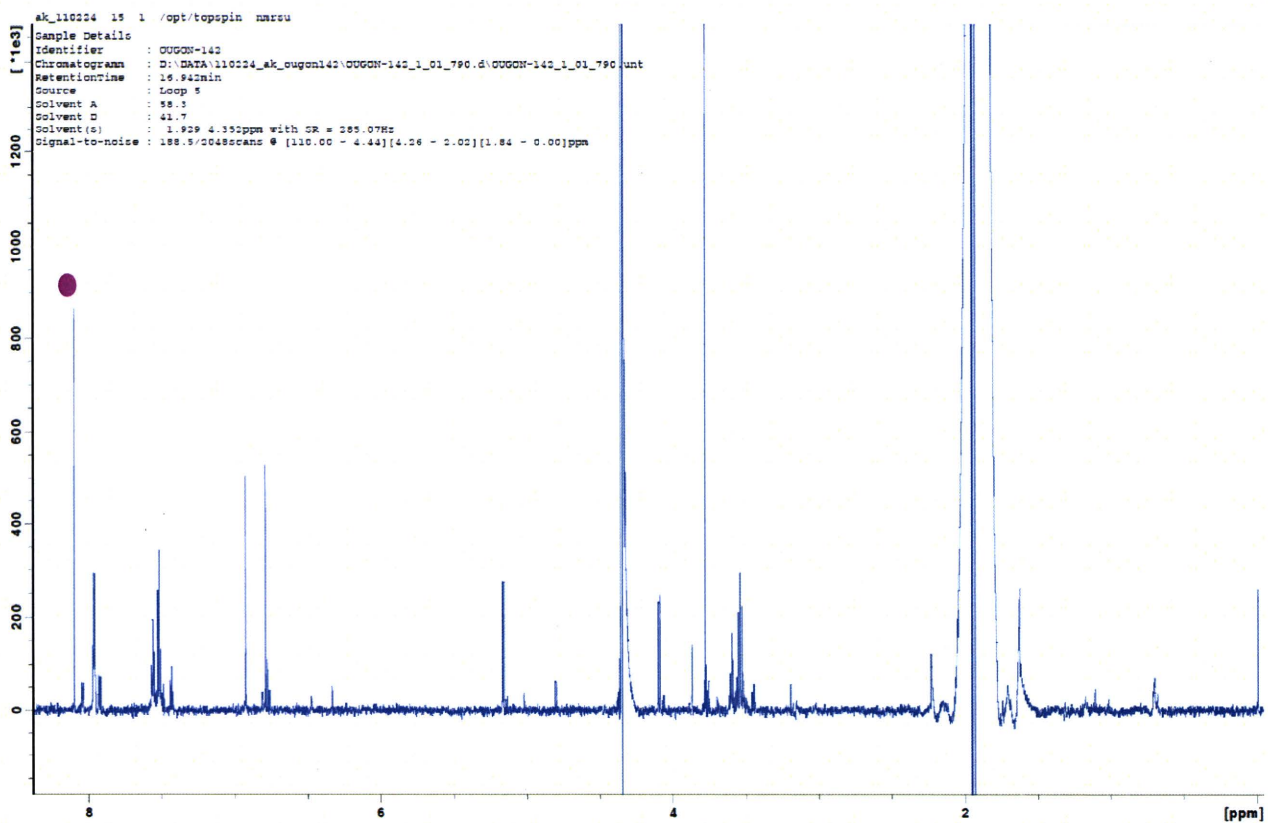
☒ 2-1



☒ 2-2



☒ 2-3



☒ 2-4

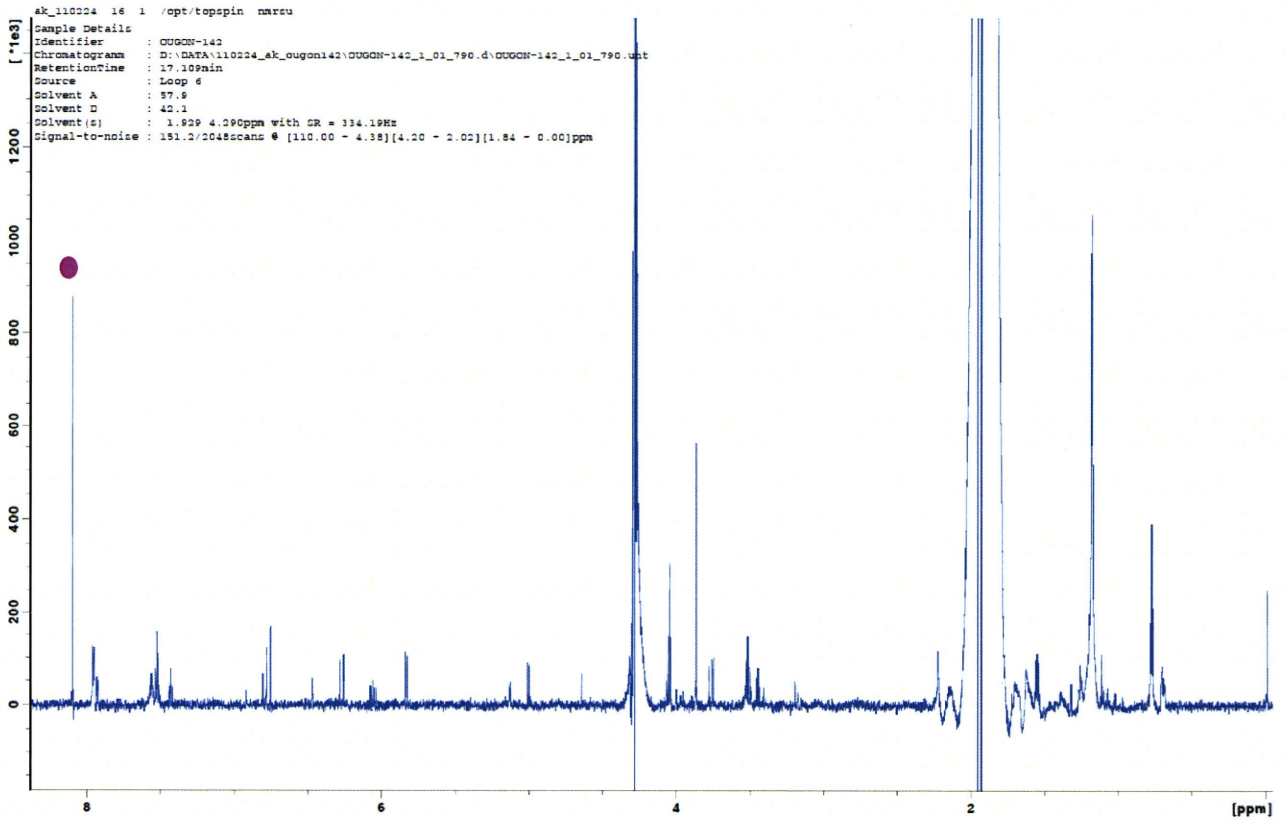


图 2-5

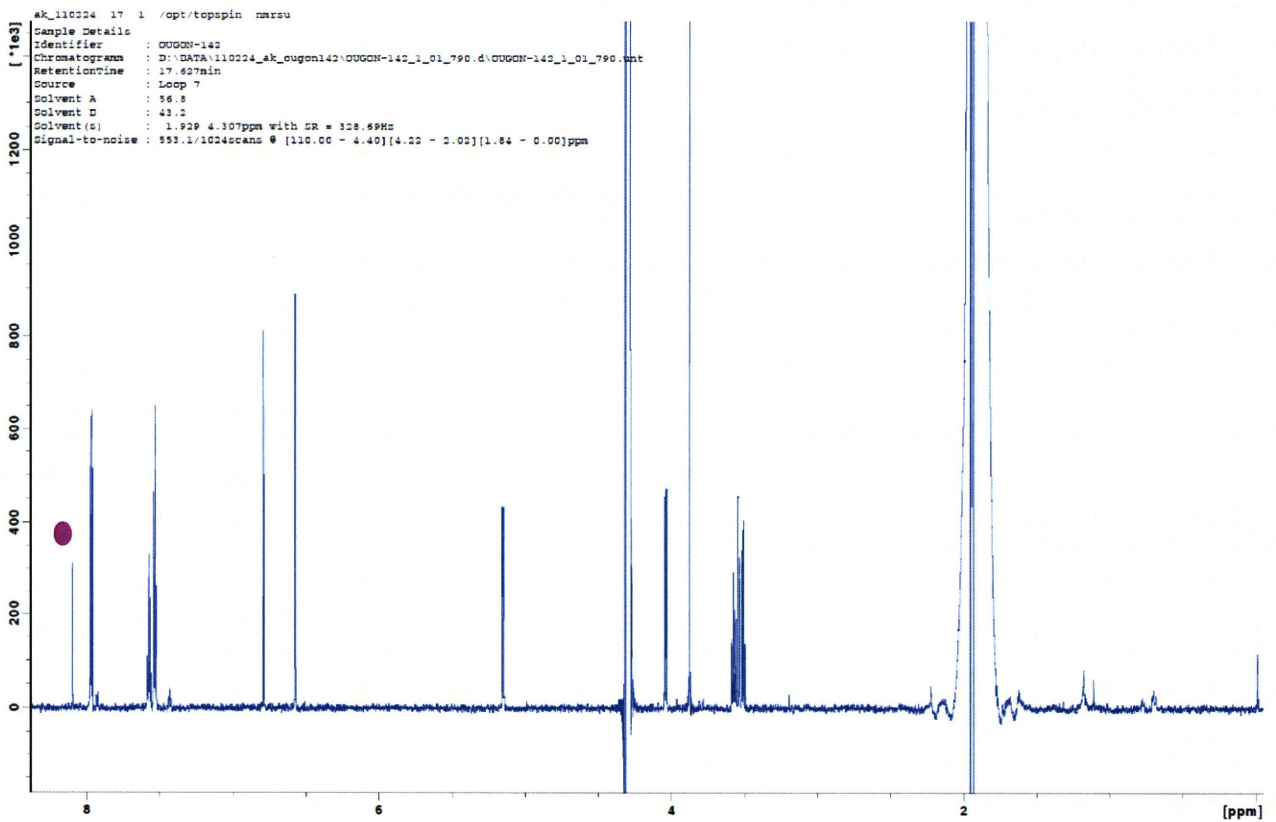
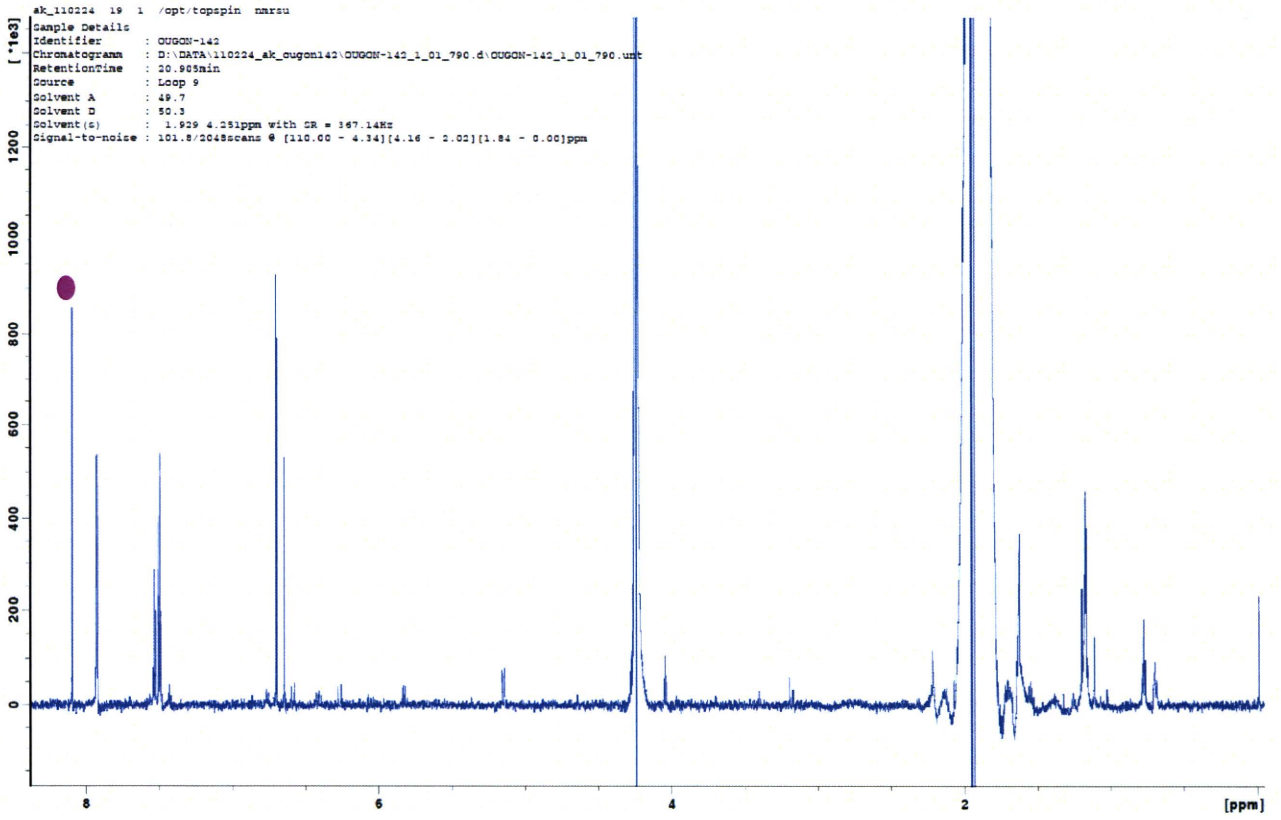
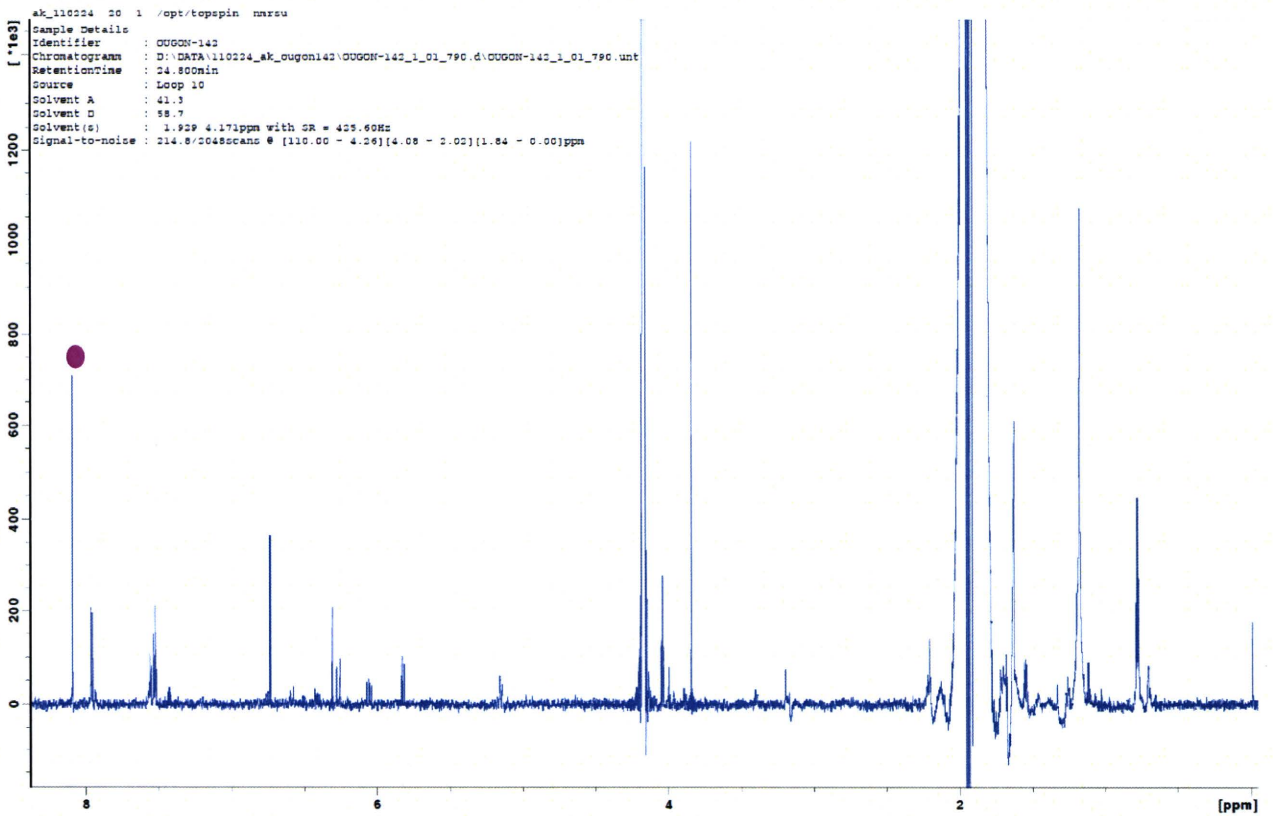


图 2-6



☒ 2-7



☒ 2-8