

#### D. 考察

抗アルツハイマー病活性を予測可能な *in vitro* アッセイ系として、本年度 3 種の実験を実施した。3 種のアッセイ系のうち特に初代培養大脳皮質神経細胞を用いたアッセイでは、そこで有効性を示す薬物がアルツハイマー病モデル動物においても記憶障害改善作用を良く示すことを、我々のこれまでの研究で示唆してきた。これらは簡便に結果を得られるアッセイではないが、実施する意義は大きいと考え、今後も他の生薬について実施していく予定である。

#### E. 結論

Calpain 酵素阻害活性については、次年度の生薬サンプルについて同様の検討を行う。A $\beta$ (25-35)

誘発神経細胞死抑制作用については、本年度活性を示したサンシシについて、個々の生薬サンプルについても活性検討を行うとともに、次年度の生薬サンプルについても検討を継続する。A $\beta$ (25-35)誘発神経突起萎縮作用については、今年度、樹状突起・軸索とともに伸展させた、カンゾウ、ニンジン、ゴシツについて個々の生薬サンプルについても活性検討を行うとともに、次年度の生薬サンプルについても検討を継続する。

#### F. 研究発表

本プロジェクトに関する発表：  
無し

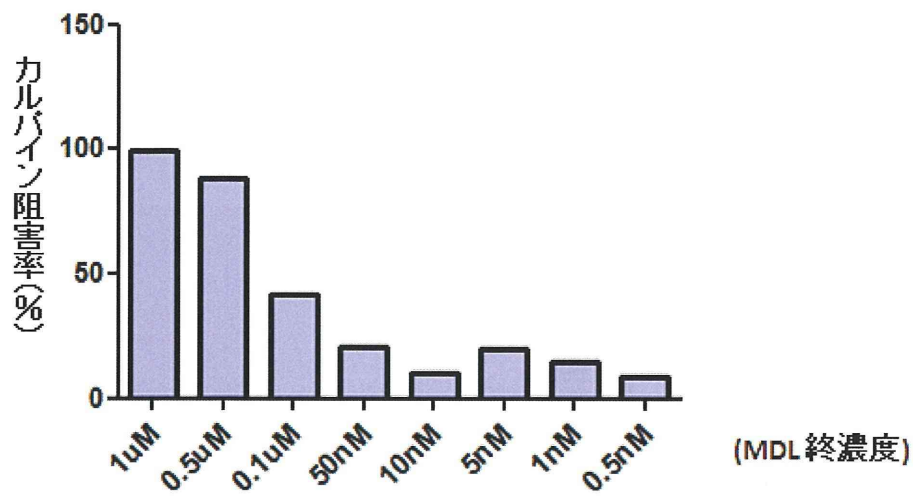


Fig. 1 MDL28170 による Calpain 活性阻害作用

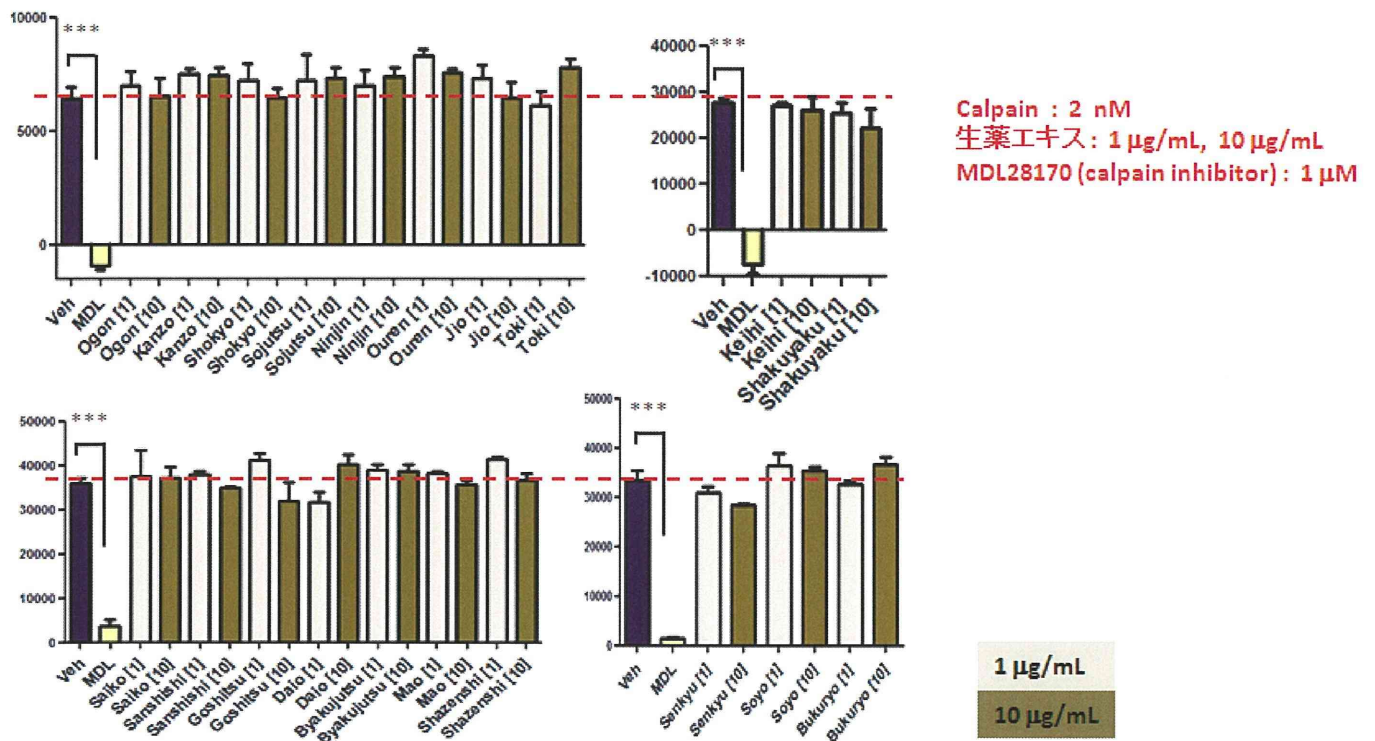


Fig. 2 生薬エキスの Calpain 活性に対する作用

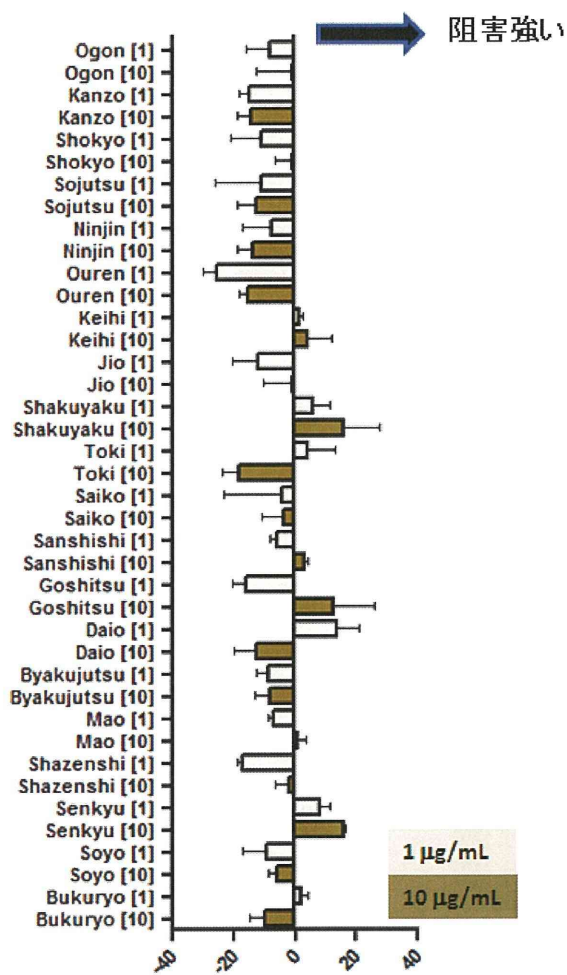


Fig. 3 生薬エキスの Calpain 活性に対する阻害率

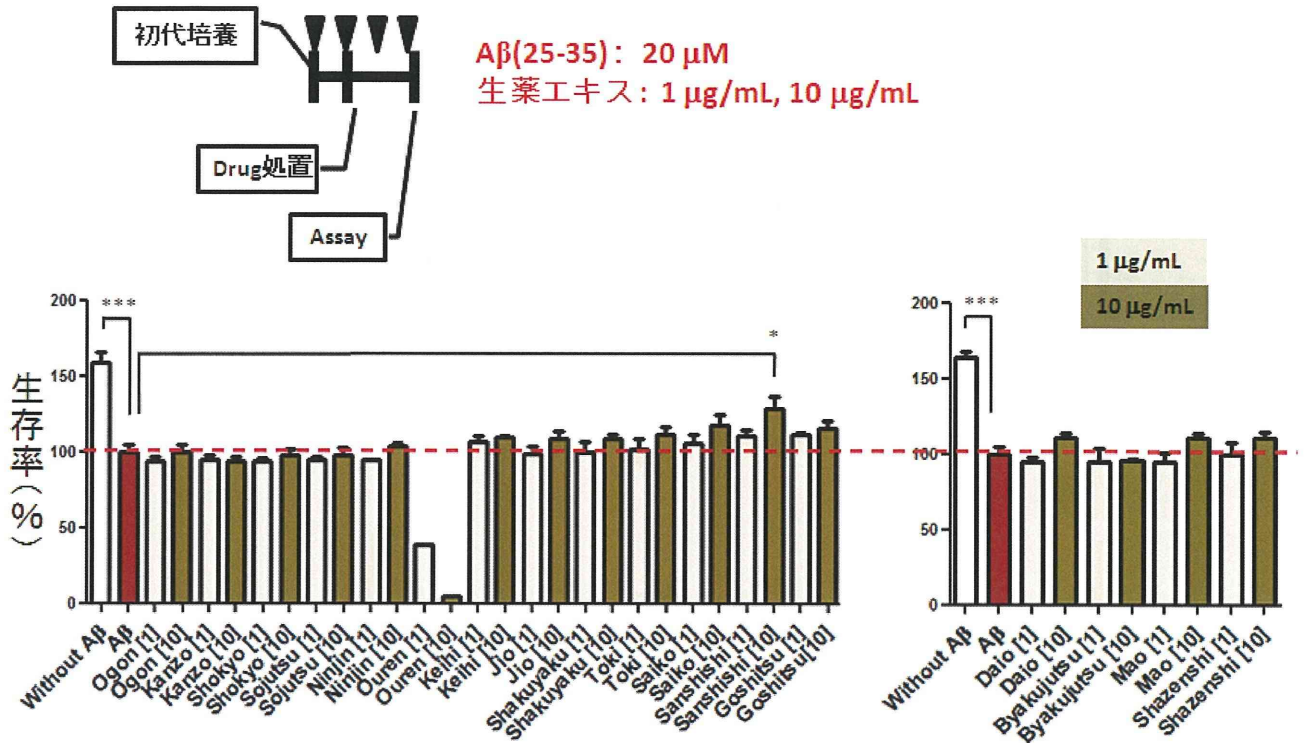


Fig. 4  $A\beta(25-35)$ 誘発の神経細胞死に対する生薬エキスの作用

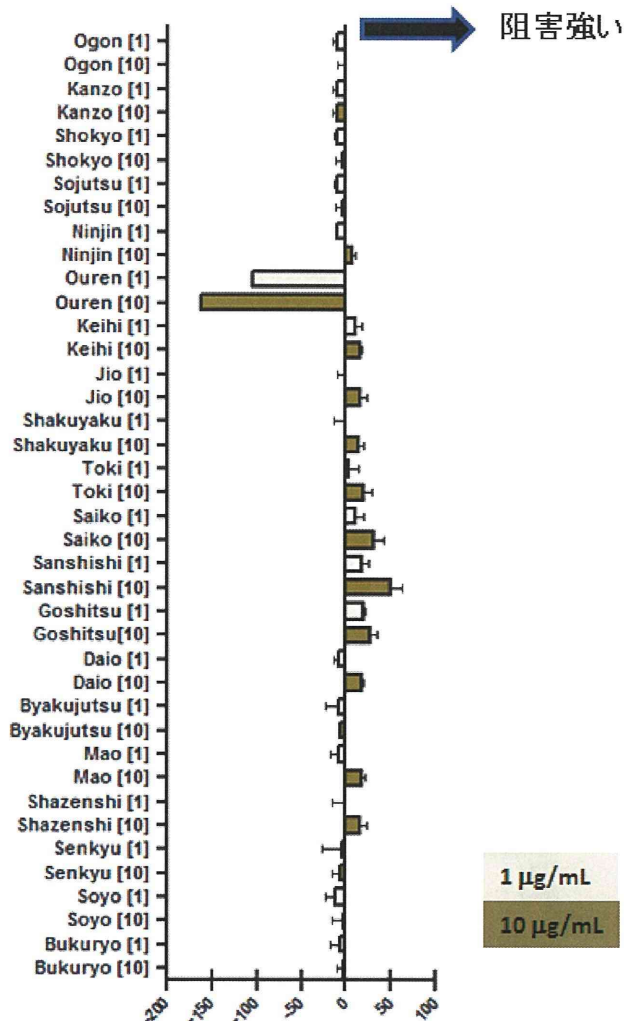


Fig. 5  $A\beta(25-35)$ 誘発の神経細胞死に対する生薬エキスの阻害率

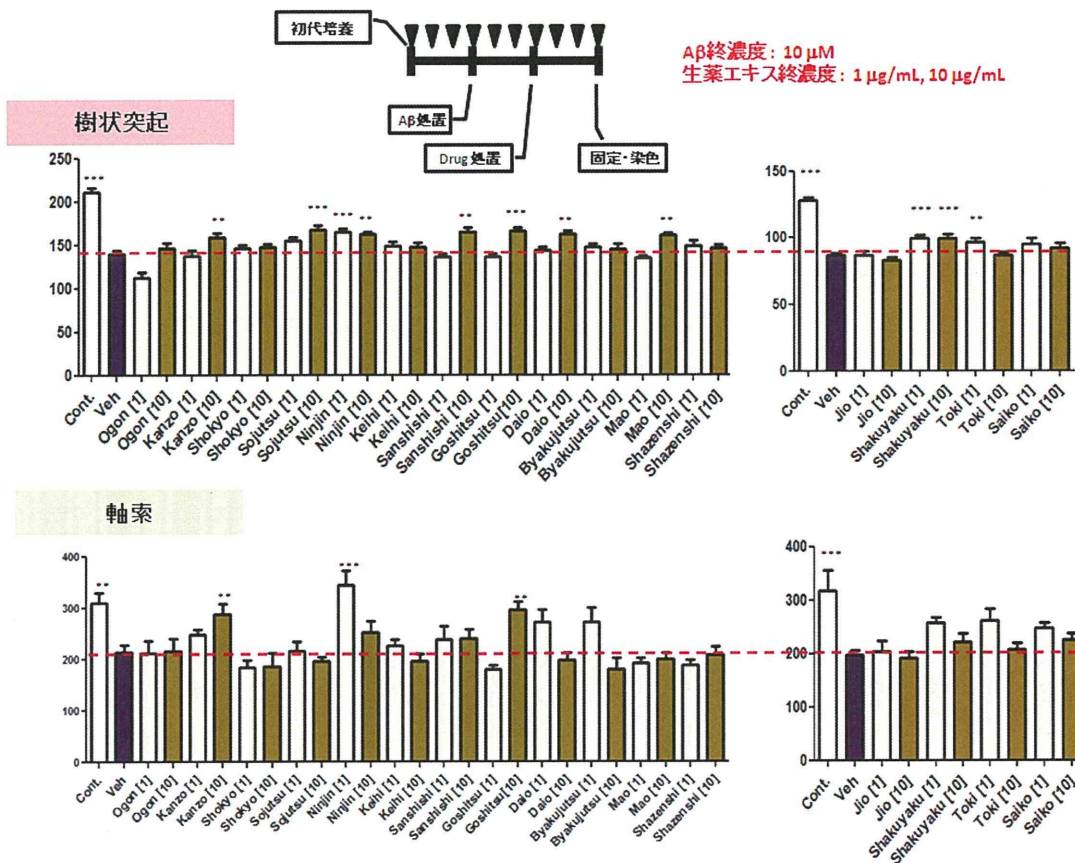


Fig. 6 Aβ(25-35)誘発の神経突起萎縮に対する生薬エキスの作用

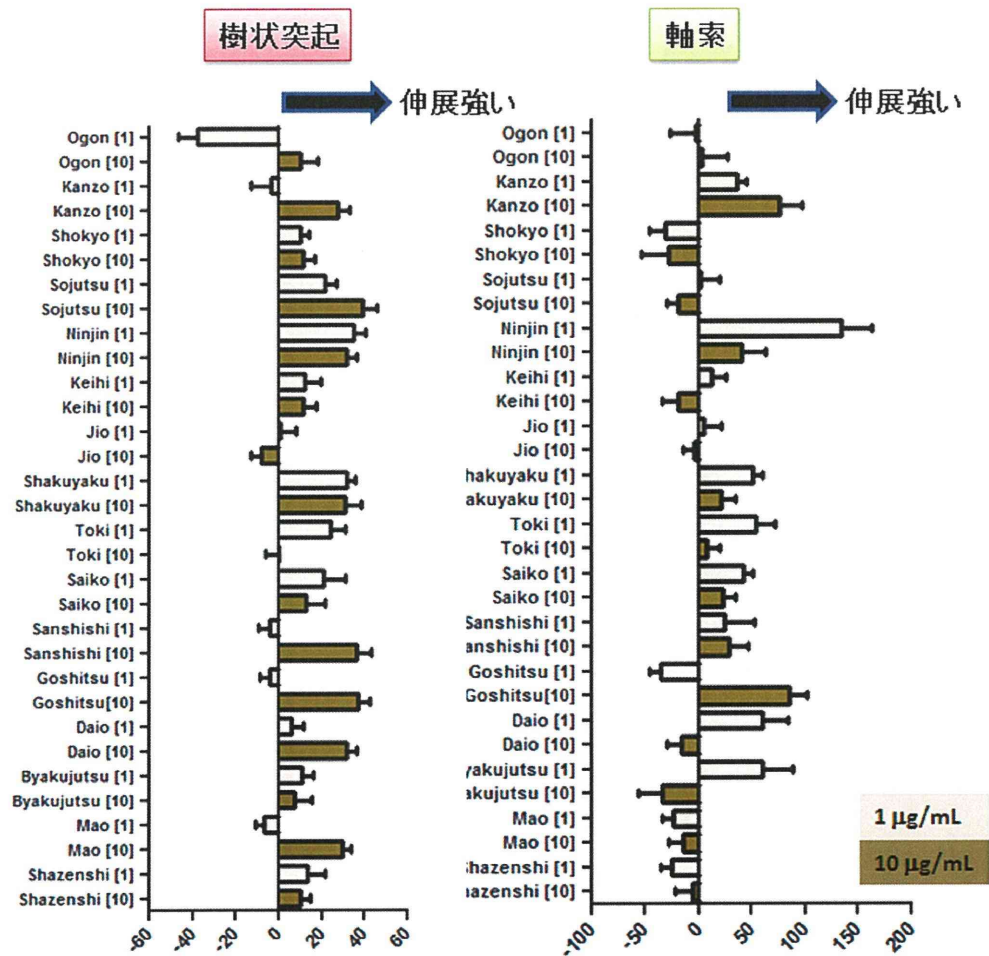


Fig. 7 Aβ(25-35)誘発の神経突起萎縮に対する生薬エキスの改善作用

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 生物活性情報及び成分分析データ情報に関する研究

研究分担者 富山大学和漢医薬学総合研究所 所長 済木 育夫

LC-MS 分析による成分プロファイル比較

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

生薬オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ及びブクリョウについて、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。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、いくつかの生薬エキスで、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、生薬オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ及びブクリョウについて 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。

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：

分析条件 1

（オウレン、ケイヒ、シャクヤク、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、マオウ、センキュウ、ソヨウ、ブクリョウ及び混合試料の分析条件）

カラム Waters Atlantis T3 (2.1 mm x 100 mm, 3 micron), カラム温度 40°C, 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.

分析条件 2

（ジオウ、トウキの LC 条件）

カラム Waters Atlantis T3 (2.1 mm x 100 mm, 3 micron), カラム温度 40°C, 移動相 A 5 mM Ammonium acetate solution, 移動相 B acetonitrile, Gradient 溶出 0% 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.

各生薬エキスは、10 mg/ml の濃度で溶解して LC-MS 分析を行なった。

### C. 研究結果

#### 1. オウレン

図1にオウレン10試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びオウレン10試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラムを示す。

混合試料のクロマトグラムに示すとおり、berberine, palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, columbamineが検出された。

#### 2. ケイヒ

図2にケイヒ17試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びケイヒ17試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラムを示す。ベトナム産ケイヒのクロマトグラムにおいて保持時間14分付近に強いピークが認められた。このピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  425.2155に[M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成はC<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>と推定されたことから cinnzeylanine であることが予想された。また、中国産試料ではこれに対応するピークがごくわずかに検出されたのみであった。

#### 3. ジオウ

図3にジオウ11試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びジオウ11試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム(分析条件1)を示す。

#### 4. シャクヤク

図4にシャクヤク13試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びシャクヤク13試料を混合して調製した試料のLC-MS クロマトグラムを示す。いずれの試料からも主要なピークとして paeoniflorin が検出された。

#### 5. トウキ

図5にトウキ12試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びトウキ12試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム(分析条件1)を示す。

#### 6. サイコ

図6にサイコ10試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びサイコ10試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラムを示す。いずれの試料からも保持時間19分付近に強いピークが認められた。このピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  779.4557に[M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成はC<sub>42</sub>H<sub>67</sub>O<sub>13</sub>と推定されたことから saikosaponin A であることが推定された。

#### 7. サンシシ

図7にサンシシ11試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びサンシシ11試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラムを示す。いずれの試料からも保持時間9分付近に強いピークが認められた。このピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  387.1267に[M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成はC<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>10</sub>と推定されたことから geniposide であることが推定された。また、保持時間8分付近に認められたピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  549.1781に[M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成はC<sub>23</sub>H<sub>33</sub>O<sub>15</sub>と推定されたことから genipin gentiobioside であることが推定された。

#### 8. ゴシツ

図8にゴシツ7試料の正負イオンLC-MS クロマトグラム及びゴシツ7試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラムを示す。いずれの試料からも負イオンTICで保持時間11.4分、12分、14.2分及び14.9分付近に強いピークが認められた。これらピークの負イオン質量スペクトルには、それぞれ  $m/z$  479.3016、 $m/z$  953.4347、 $m/z$  955.4825 及び  $m/z$  793.4310 に[M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、それぞれの組成はC<sub>27</sub>H<sub>43</sub>O<sub>7</sub>、C<sub>47</sub>H<sub>69</sub>O<sub>20</sub>、C<sub>47</sub>H<sub>71</sub>O<sub>20</sub>、C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>O<sub>14</sub>、と推定されたことから inokosterone、achyranthoside B、achyranthoside C または D 及び chikusetsusaponin IVa であることが推定され

た。

#### 9. シャゼンシ

図 9 にシャゼンシ 7 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びシャゼンシ 7 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。いずれの試料からも保持時間 11.2 分及び 11.8 分付近に強いピークが認められた。これらのピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  623.1936 に [M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成は C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>O<sub>10</sub> と推定されたことからそれぞれ acteoside 及び isoacteoside であることが推定された。

#### 10. ダイオウ

図 10 にダイオウ 9 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びダイオウ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。NIB-049、NIB-135 及び NIB-201 の試料では保持時間 11.7 分付近に強いピークが認められた。これらのピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  541.1320 に [M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成は C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>O<sub>7</sub> と推定されたことから 3,4,5-trihydroxystilbene 4'-O-beta-D-(6"-O-galloyl)glucopyranoside であることが推定された。

#### 11. ビャクジュツ

図 11 にビャクジュツ 9 試料の負イオン LC-MS クロマトグラム及びビャクジュツ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。いずれの試料からも保持時間 24.8 分及び 25.3 分付近に強いピークが認められた。これらのピークの負イオン質量スペクトルには、 $m/z$  677.3340 に [M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、その組成は C<sub>32</sub>H<sub>53</sub>O<sub>15</sub> と推定された。これらの化合物は以前構造解析について報告した 2,6,3',4'-tetra(3-methylbutanoyl)sucrose 及び 2,4,3',4'-tetra(3-methylbutanoyl)sucrose と一致した。

#### 12. マオウ

図 12 にマオウ 11 試料の負イオン LC-MS クロマトグラム及びマオウ 11 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。内モンゴル産の試料からは負イオン TIC において保持時間 15.1 分付近に強いピークが認められた。このピークの負イオン質量スペクトル

には、 $m/z$  315.1781 に [M-H]<sup>-</sup>イオンが検出されたが化合物の特定にはいたらなかった。

#### 13. センキュウ

図 13 にセンキュウ 9 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びセンキュウ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。

#### 14. ソヨウ

図 14 にソヨウ 5 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びソヨウ 5 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。いずれの試料からも負イオン TIC で保持時間 8.5 分、9.1 分及び 10.2 分付近に特徴的なピークが認められた。これらピークの負イオン質量スペクトルには、それぞれ  $m/z$  359.0733,  $m/z$  456.1477 及び  $m/z$  294.0964 に [M-H]<sup>-</sup>イオンが検出され、それぞれの組成は C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>8</sub>、C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>11</sub>、C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>6</sub> と推定されたことからそれぞれ rosmarinic acid, amygdalin 及び prunasin であることが推定された。

#### 15. ブクリョウ

図 15 にブクリョウ 9 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びブクリョウ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラムを示す。

### D. 考察

オウレン、ケイヒ、ジオウ、シャクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ及びブクリョウについて市場流通生薬試料の化学的成分情報の集積を目的として、エキスの LC-MS 分析を行なった。検出された化合物の精密質量及び組成からこれまで、単離が報告されている化合物の情報を検索することにより、ピークのアノテーションを行った。その結果、オウレンから berberine, palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, columbamine が、ケイヒから cinnzeylanine が、シャクヤクから paeoniflorin が、サイコから saikosaponin A が、サンシシから geniposide 及び genipin gentiobioside が、ゴシツから inokosterone, achyranthoside B, achyranthoside C または D 及び



chikusetsusaponin Iva が、シャゼンシから acteoside 及び isoacteoside が、ダイオウから 3,4',5-trihydroxystilbene 4'-O-beta-D-(6"-O-galloyl) glucopyranoside が、ビャクジュツから 2,6,3',4'-tetra(3-methylbutanoyl)sucrose 及び 2,4,3',4'-tetra(3-methylbutanoyl)sucrose が、ソヨウから rosmarinic acid, amygdalin 及び prunasin が検出された。さらに、ケイヒ及びダイオウに関しては、生薬により成分組成に大きな差異が認められた。

#### E. 結論

生薬オオウレン、ケイヒ、ジオウ、シヤクヤク、トウキ、サイコ、サンシシ、ゴシツ、シャゼンシ、ダイオウ、ビャクジュツ、マオウ、センキュウ、ソヨウ及びブクリョウ、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、質量スペクトルの詳細な解析により主

要な含有成分を推定した。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成分を良好に分離・検出することが可能であった。生薬によっては供試試料内で成分パターンに大きな差異が認められた。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

##### 2. 論文発表

(1) Arita M., Yoshimoto M., Suwa K., Hirai A., Kanaya S., Shibahara N., Tanaka K. Database for crude drugs and kampo medicine. *Genome Inform.* **25**, 1-11(2011).

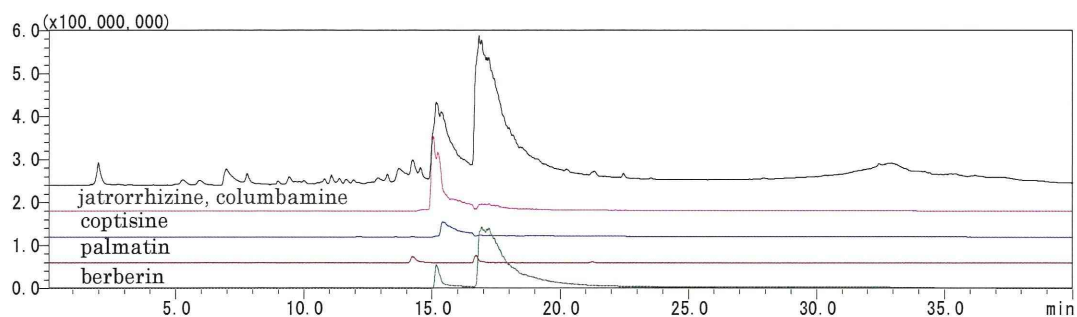
#### G. 知的財産権の出願，登録状況

無し

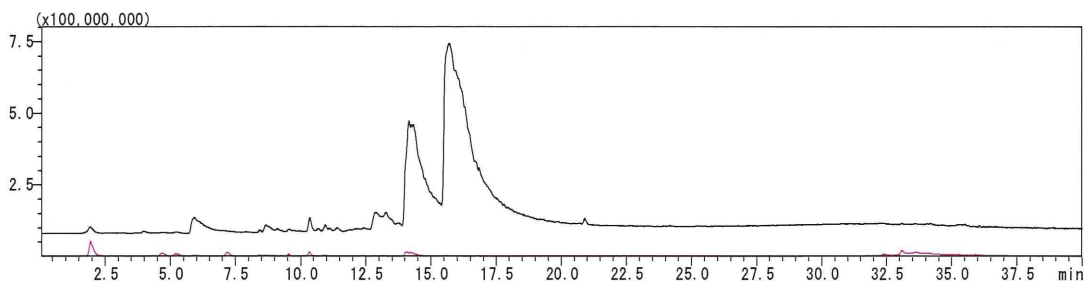
#### H. 健康危険情報

無し

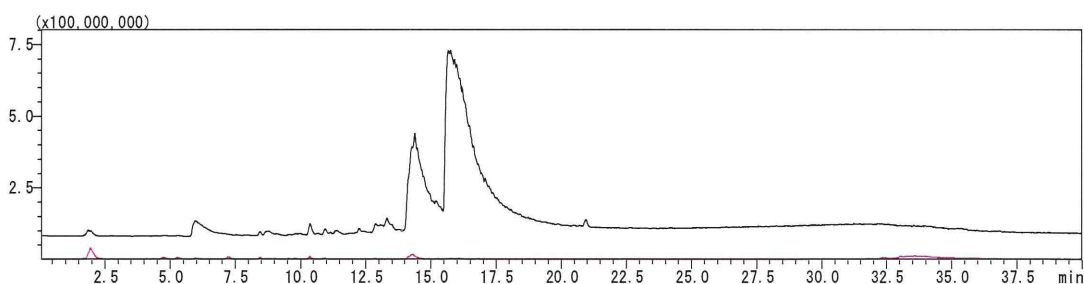
オウレン 10 試料を混合して調製した試料



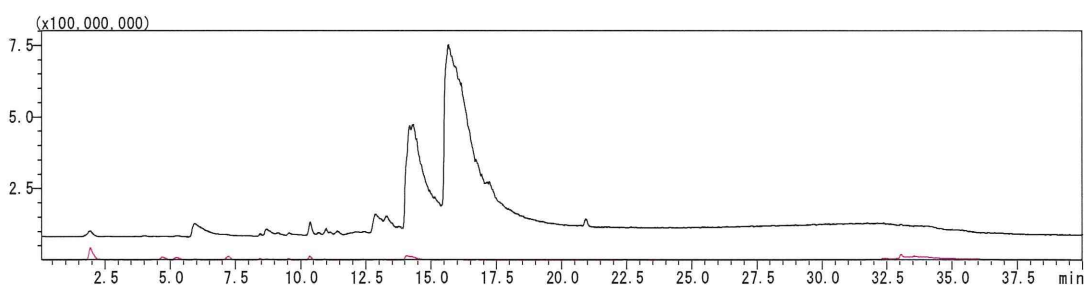
NIB-013



NIB-041



NIB-042



NIB-094

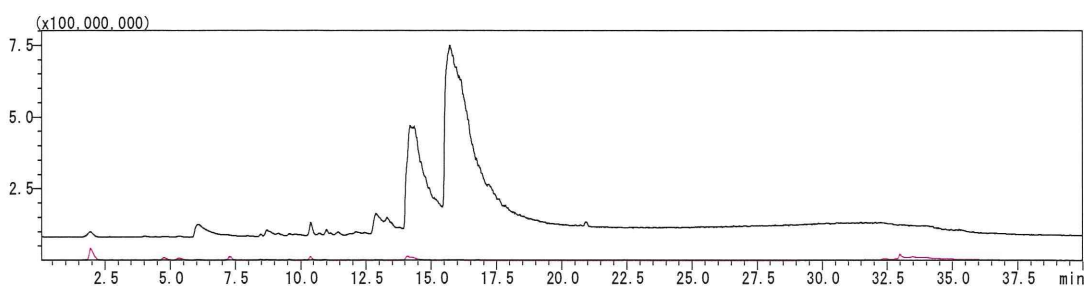
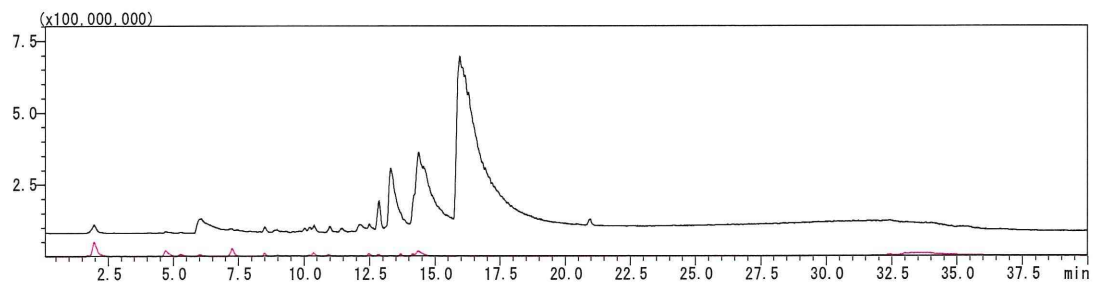
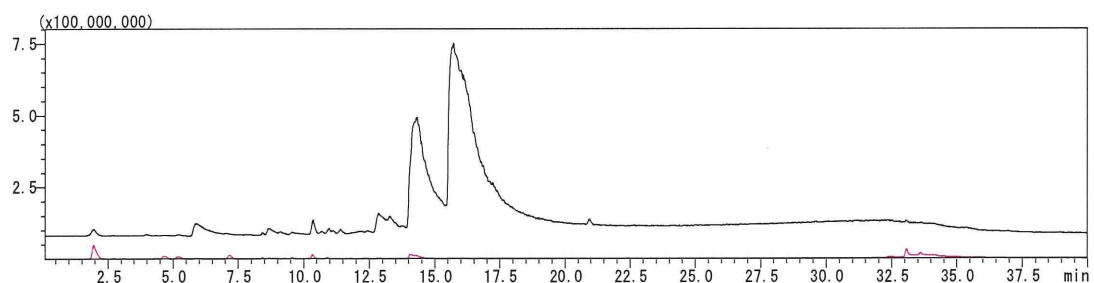


図 1 オウレン 10 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びオウレン 10 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

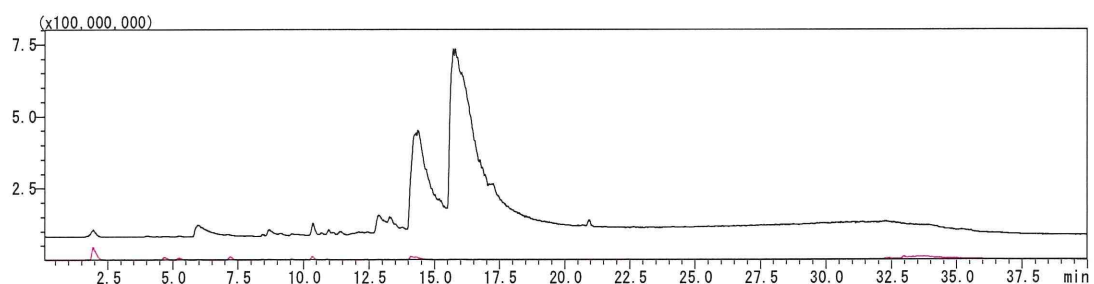
NIB-115



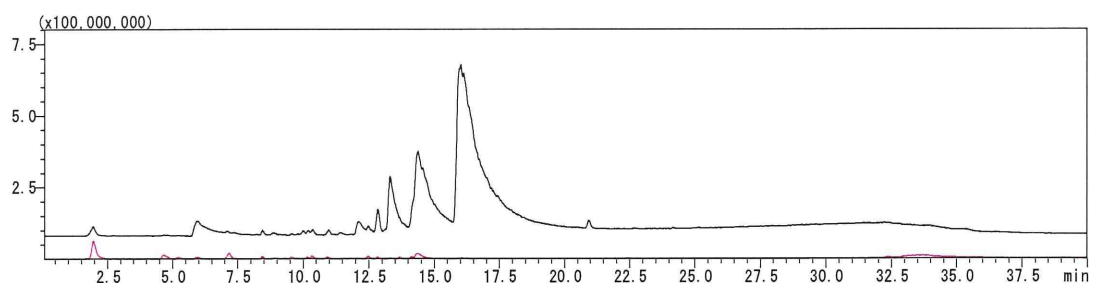
NIB-116



NIB-150



NIB-185



NIB-186

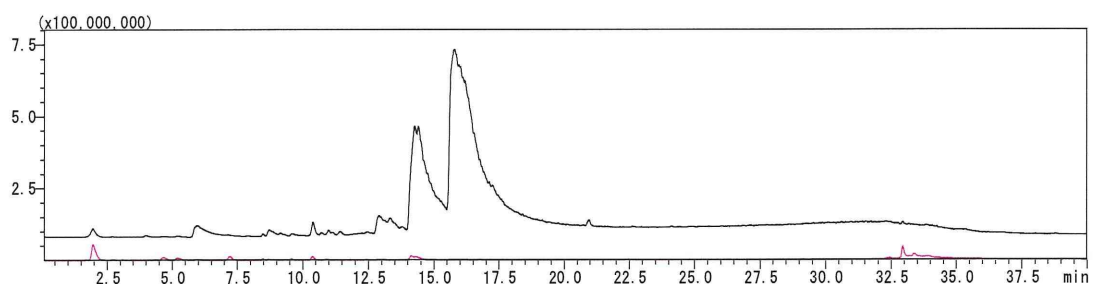


図1 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

NIB0215

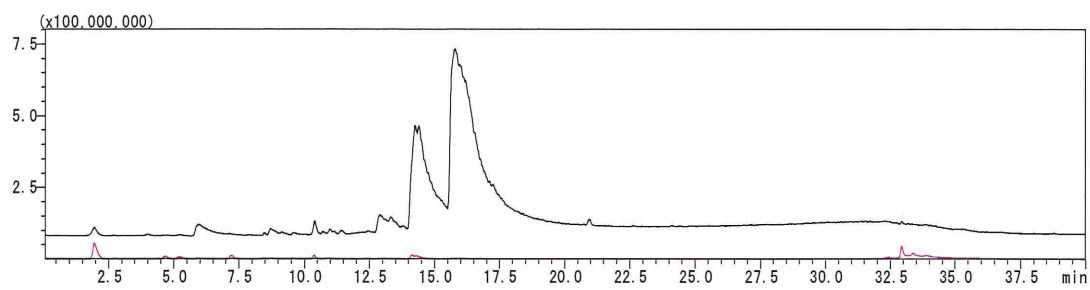
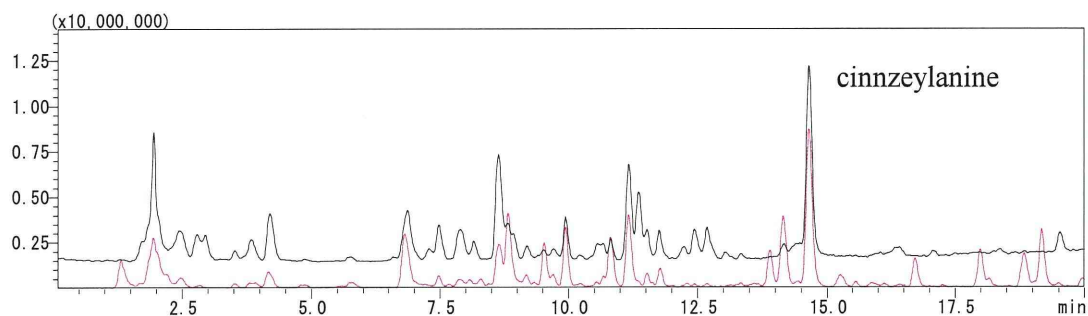
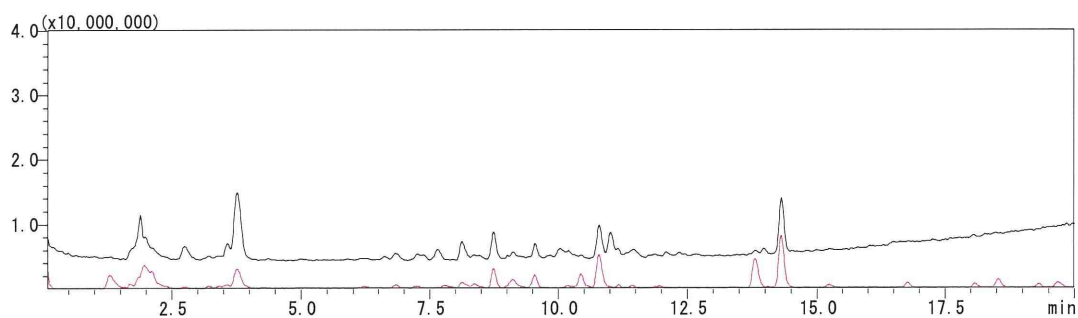


図1 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

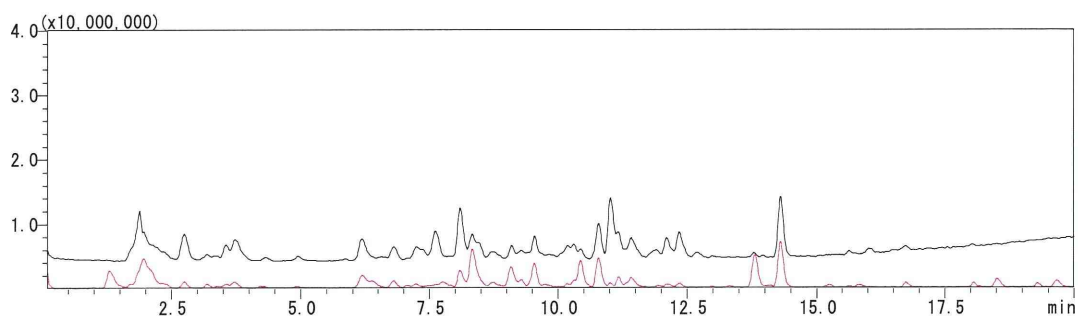
ケイヒ 17 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム



NIB-014



NIB-015



NIB-043

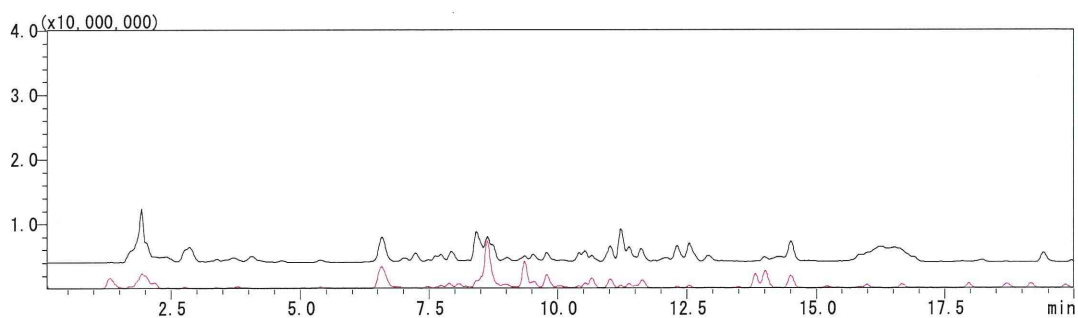
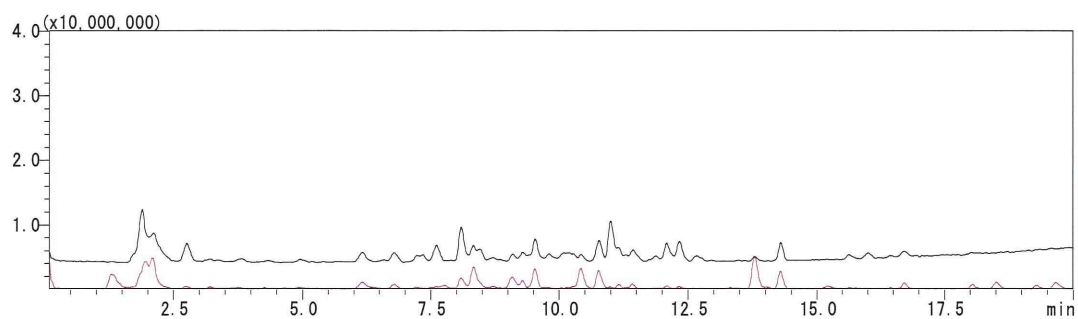
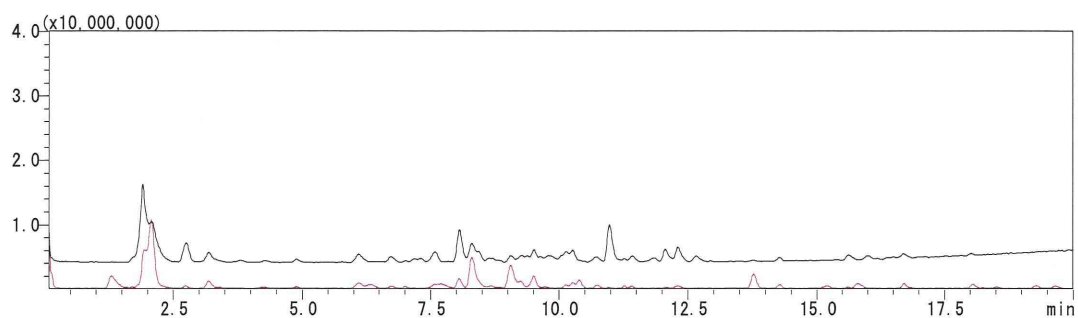


図 2 ケイヒ 17 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びケイヒ 17 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

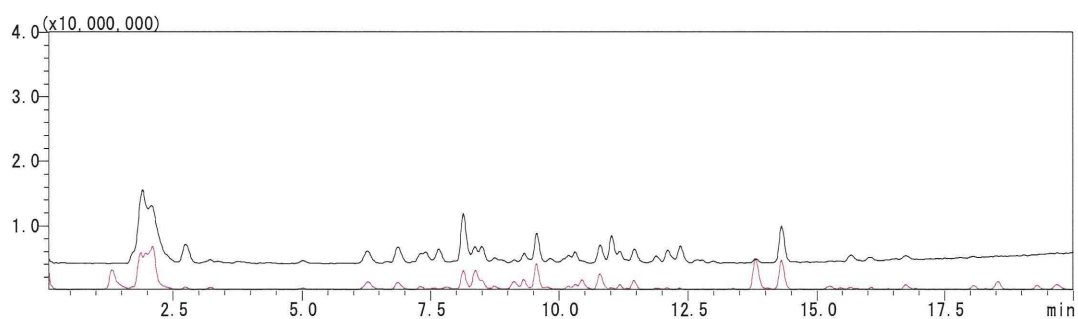
NIB-062



NIB-068



NIB-069



NIB-070

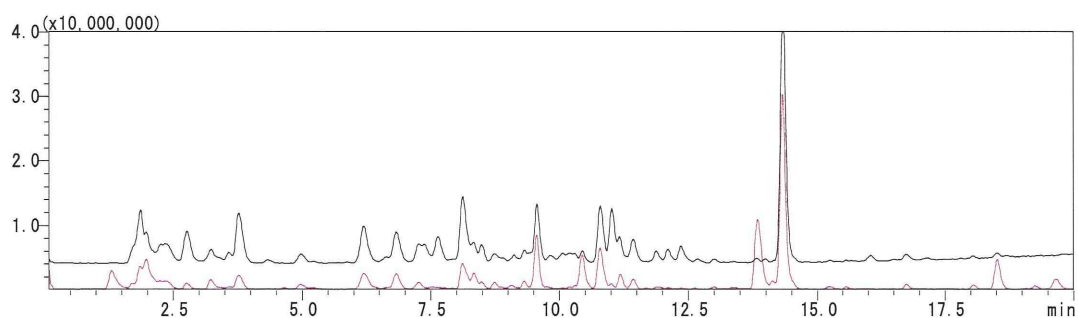
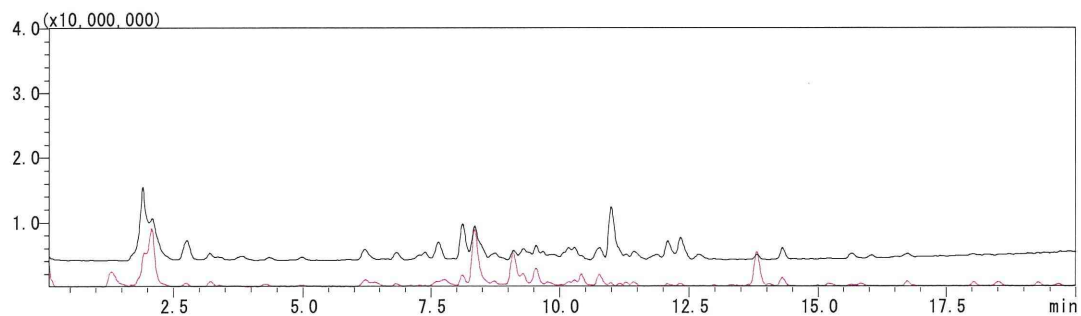
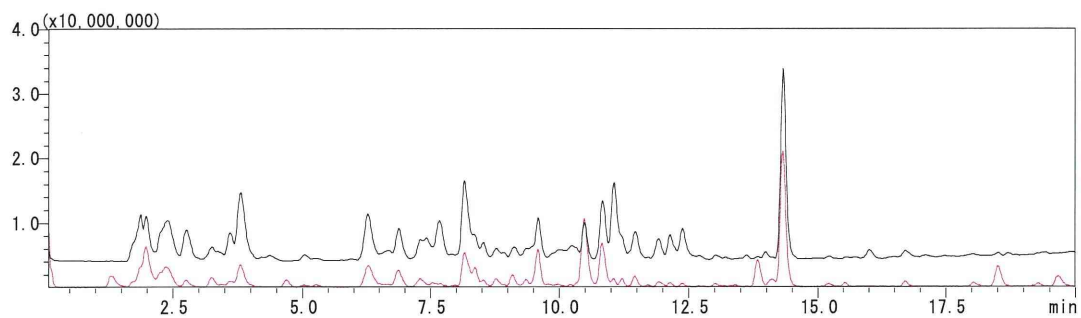


図2 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

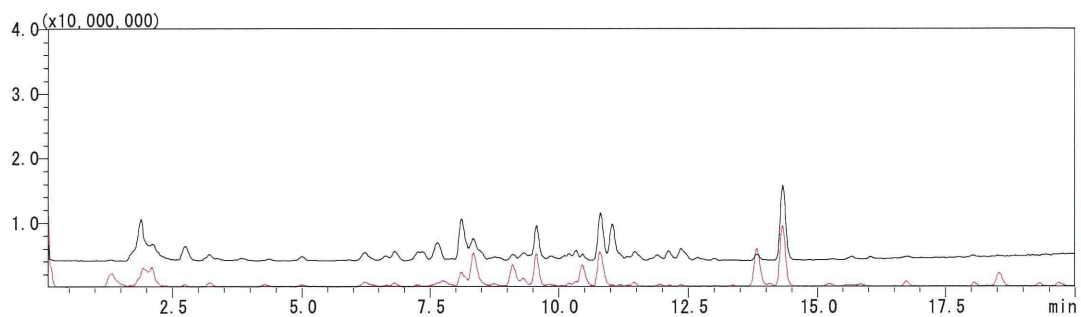
NIB-078



NIB-095



NIB-117



NIB-118

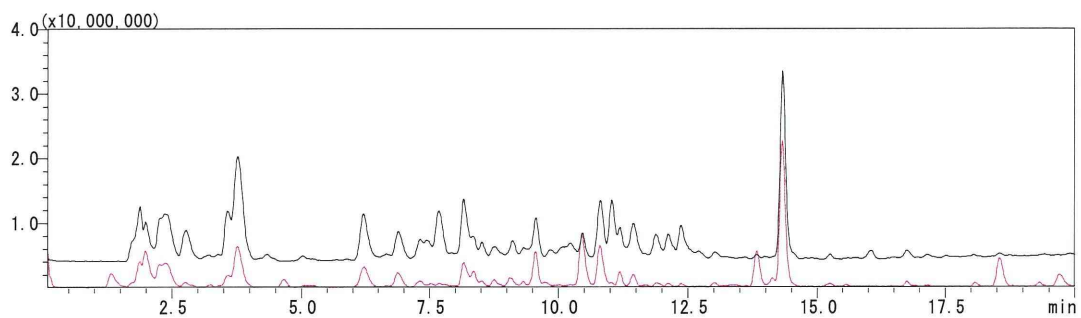
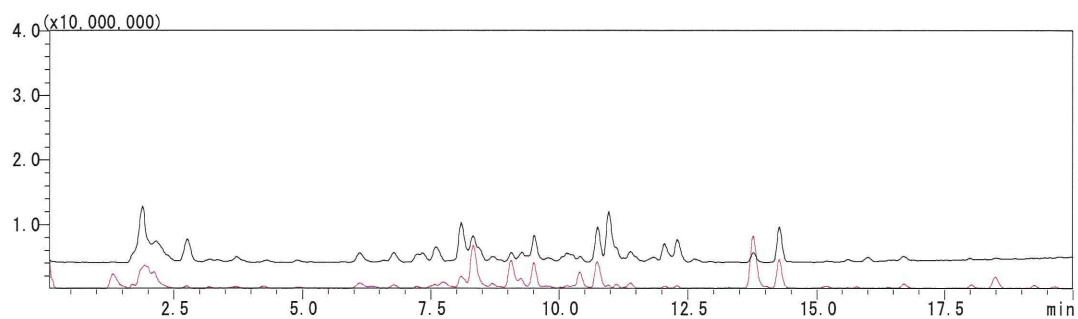
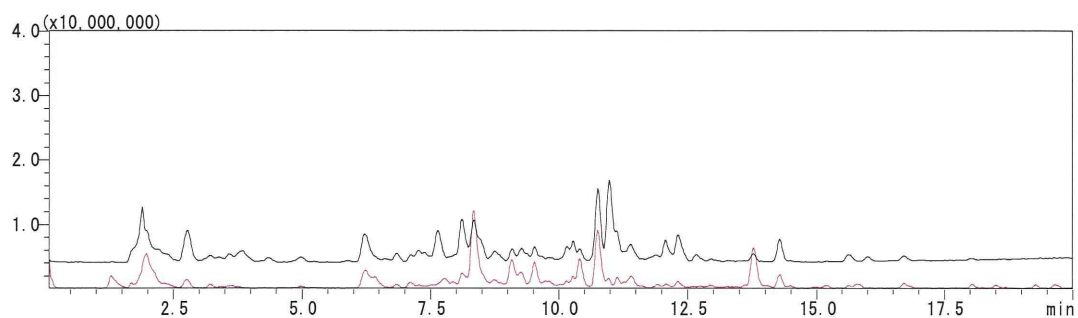


図2 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

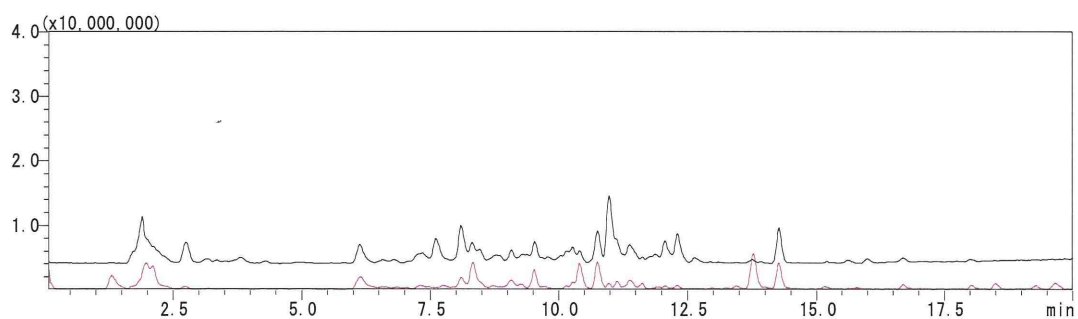
### NIB-119



### NIB-151



### NIB-171



### NIB-187

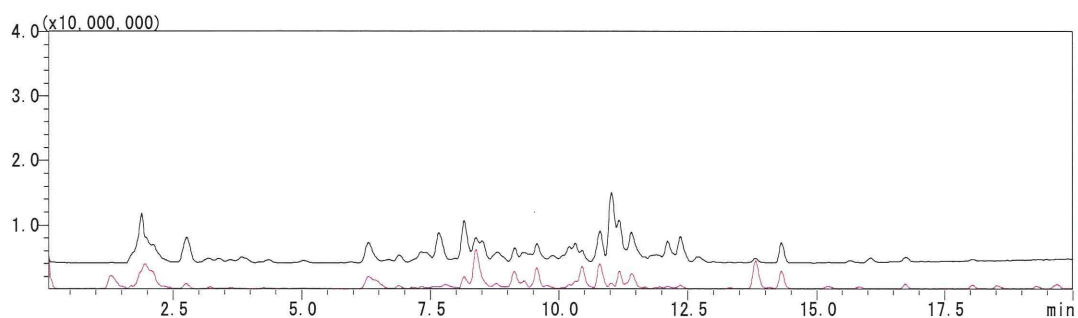
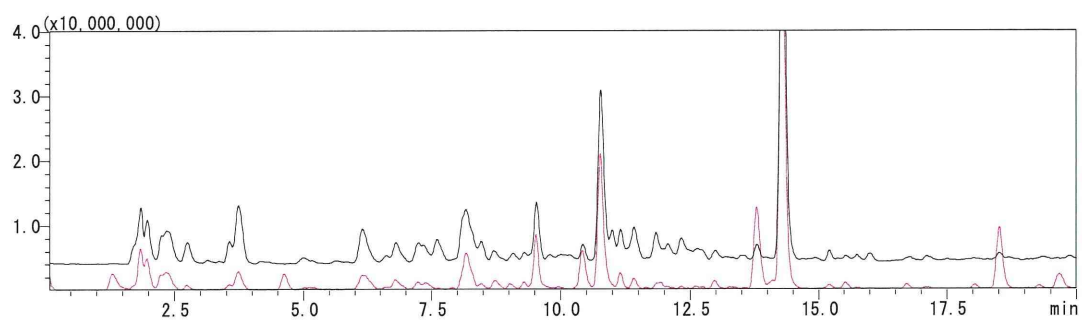


図2 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン



NIB-188



NIB-222

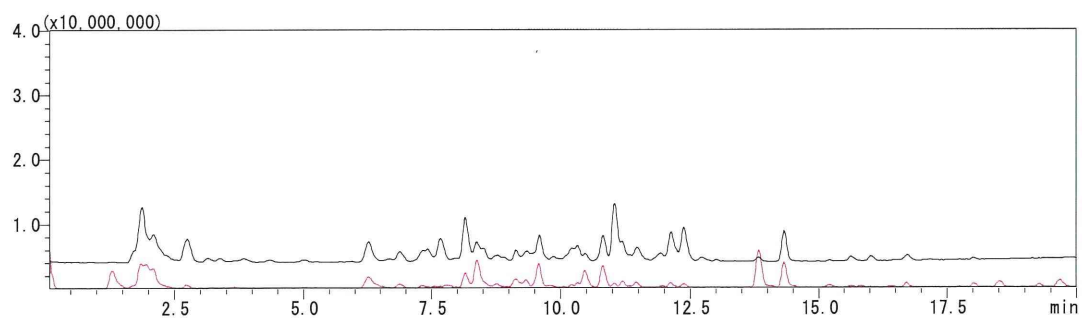
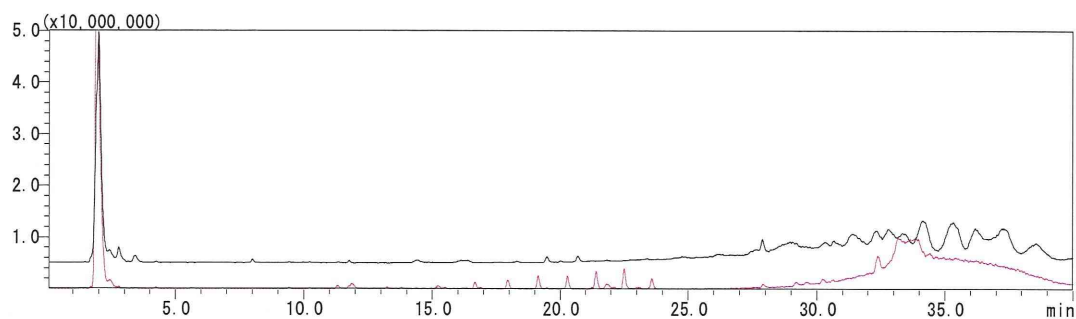
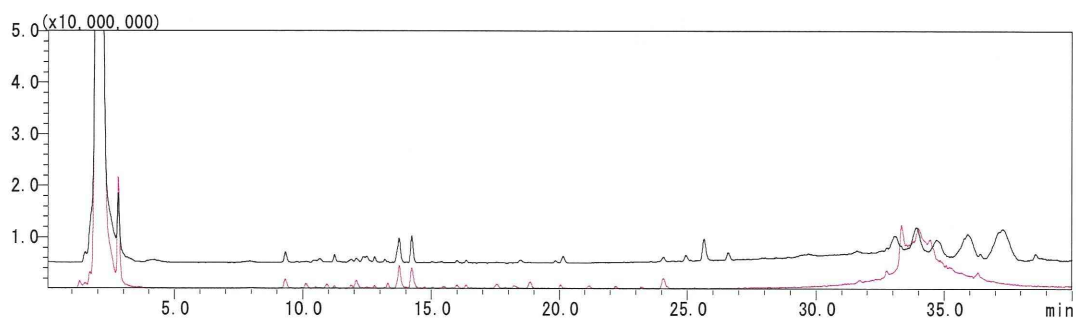


図2 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

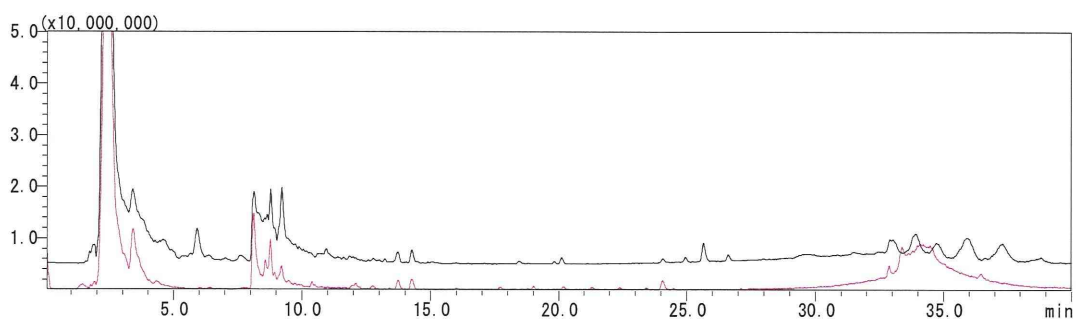
ジオウ 11 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム



NIB-021



NIB-022



NIB-045

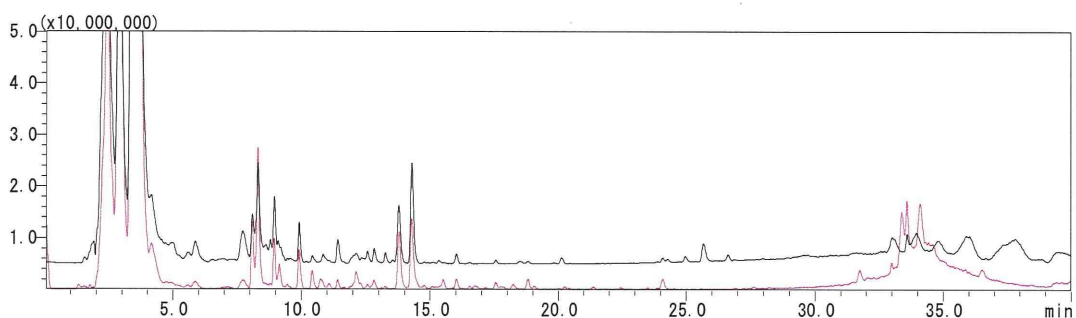
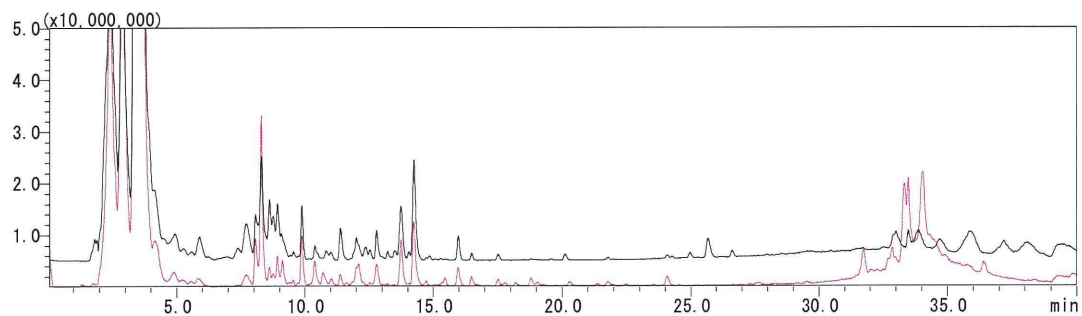
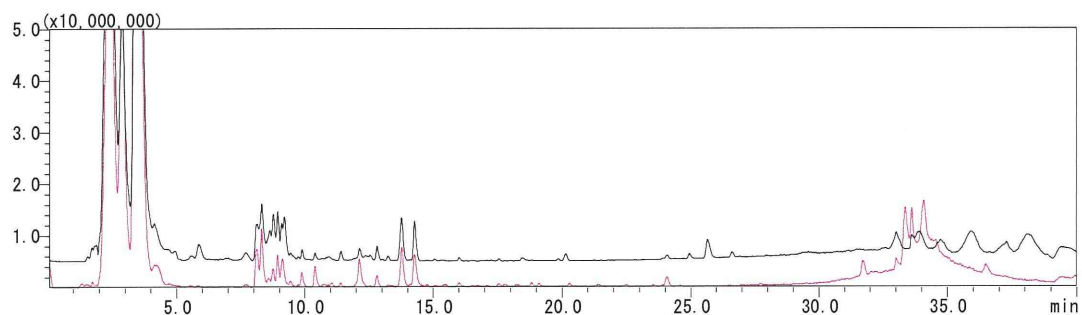


図 3 ジオウ 11 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びジオウ 11 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

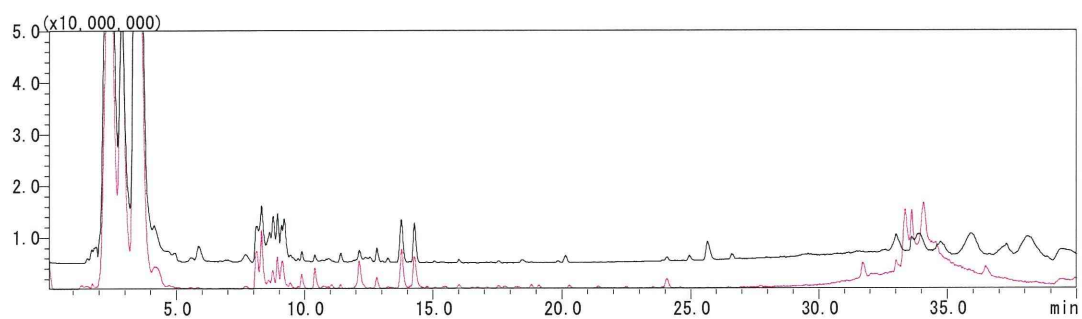
NIB-071



NIB-126



NIB-127



NIB-155

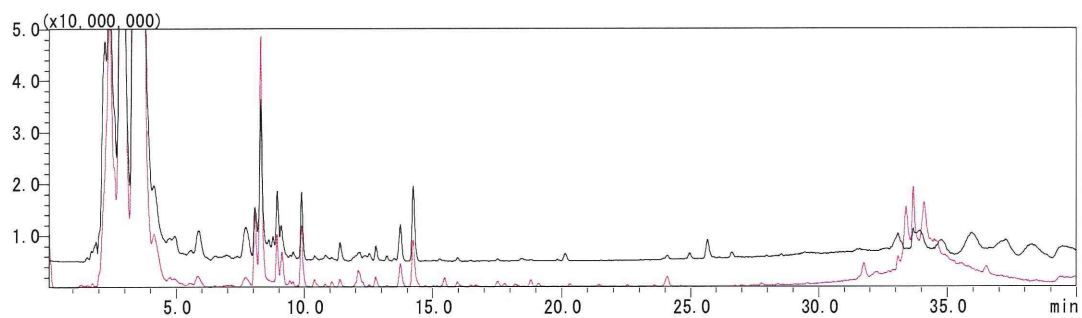
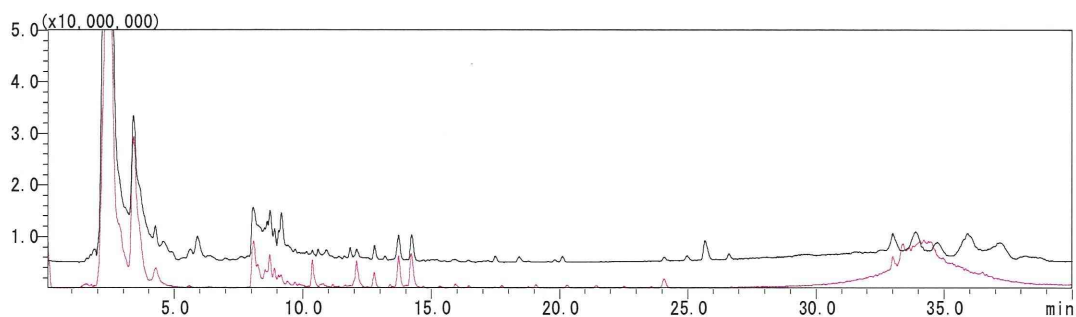
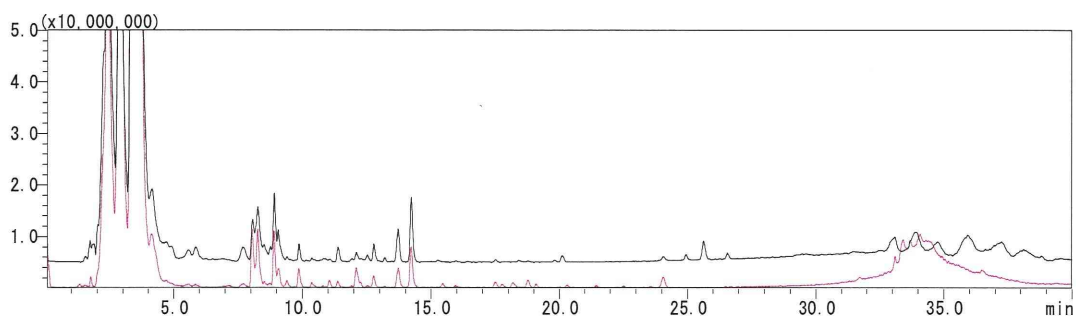


図3 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

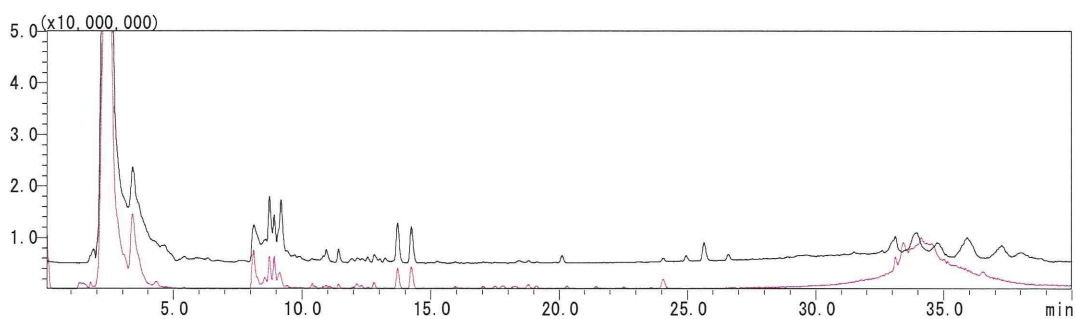
NIB-156



NIB-194



NIB-195



NIB-219

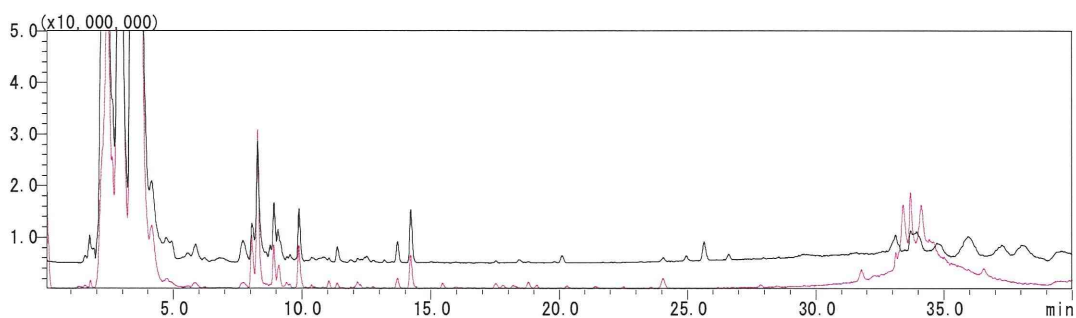


図3 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン