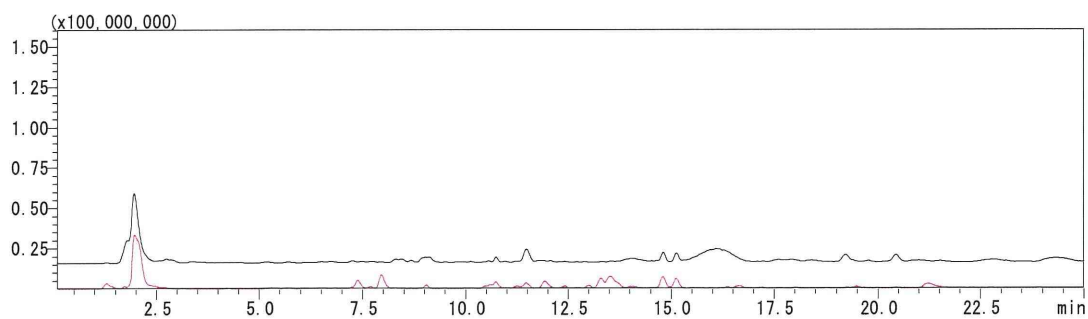


NIB-202



NIB-223

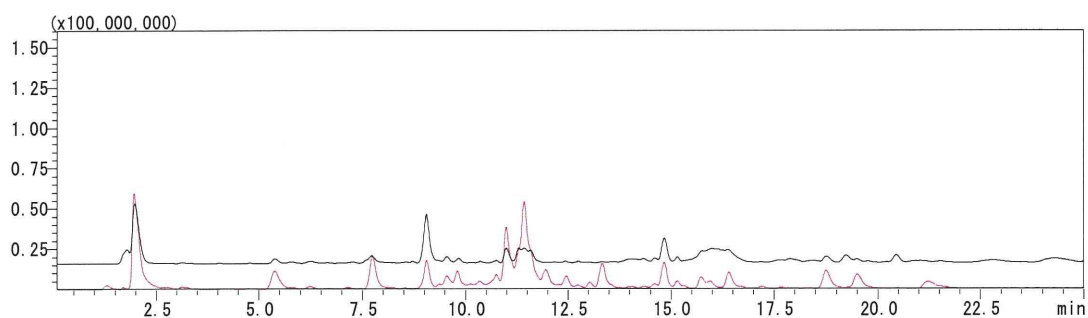
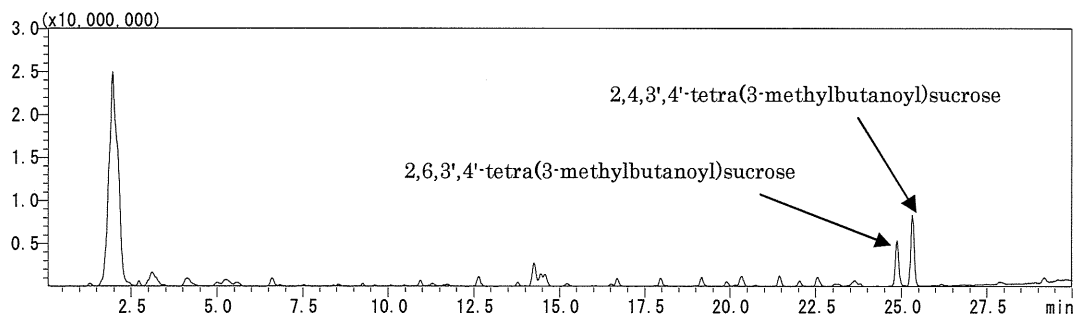
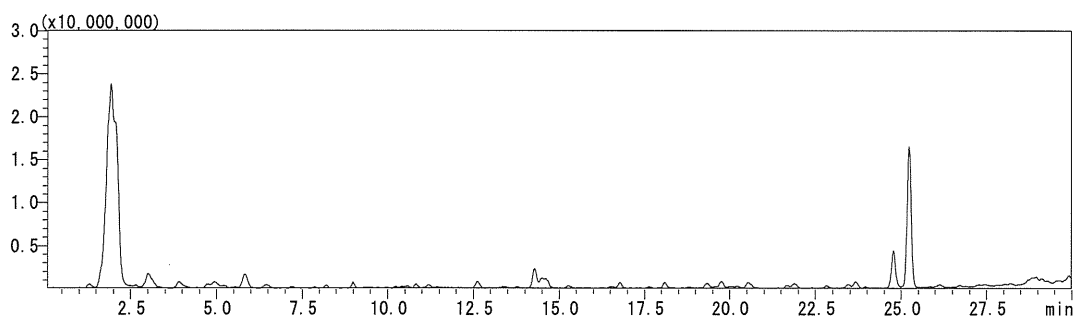


図 10 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

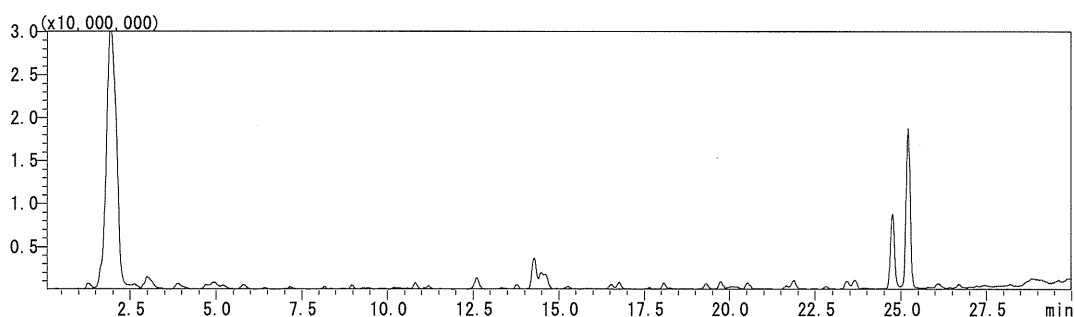
ビャクジュツ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム



NIB-030



NIB-050



NIB-086

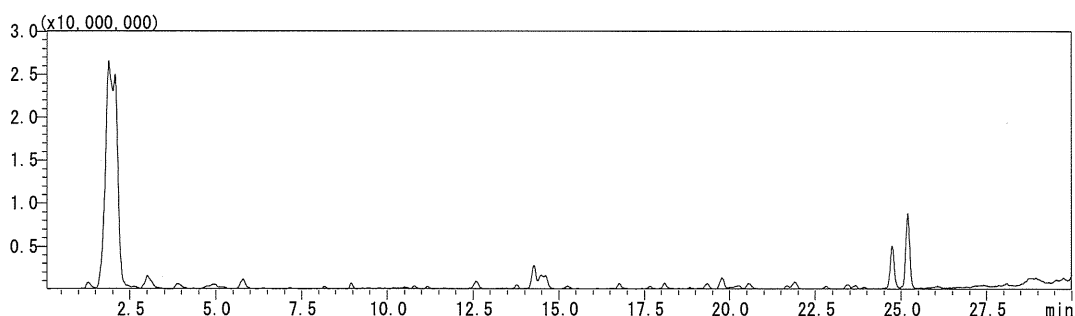
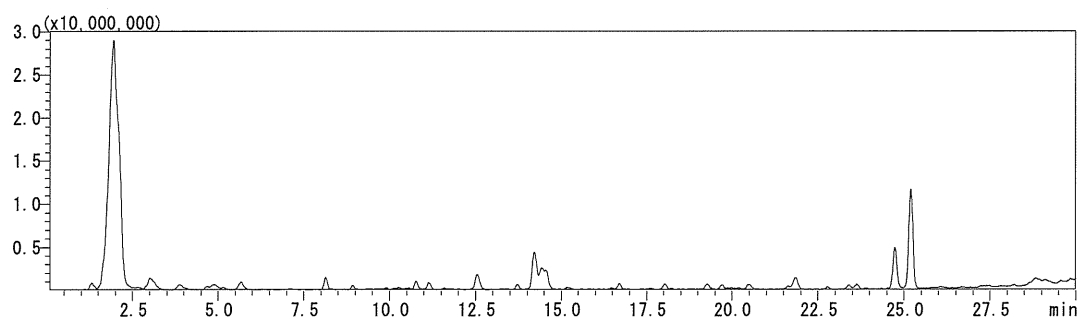
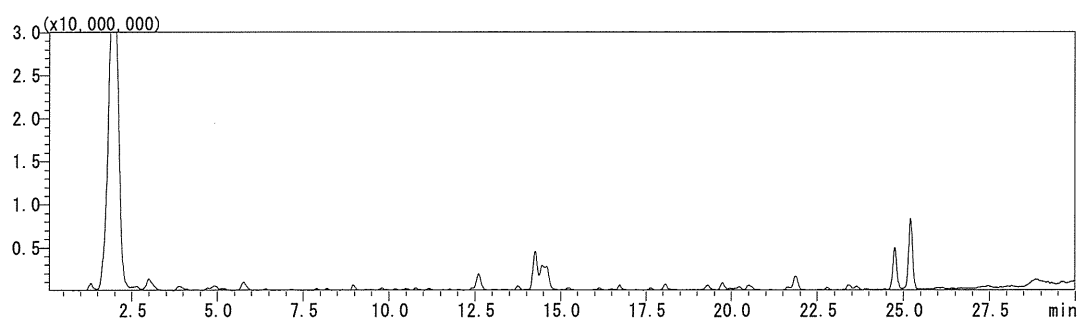


図 11 ビャクジュツ 9 試料の負イオン LC-MS クロマトグラム及びビャクジュツ 9 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：負イオン

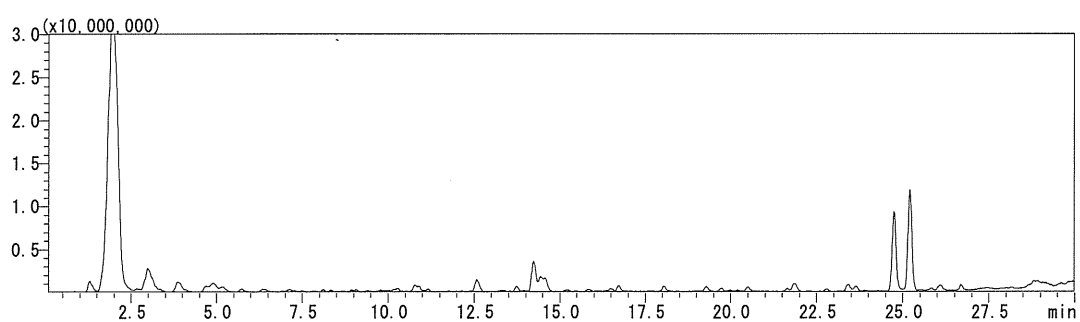
### NIB-103



### NIB-139



### NIB-163



### NIB-164

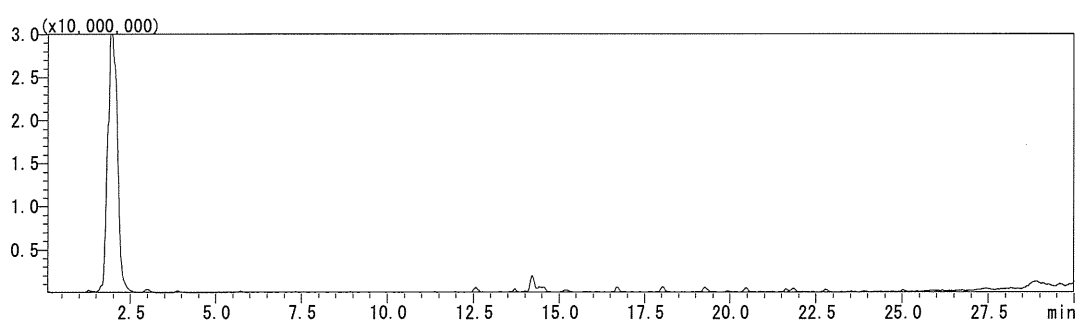
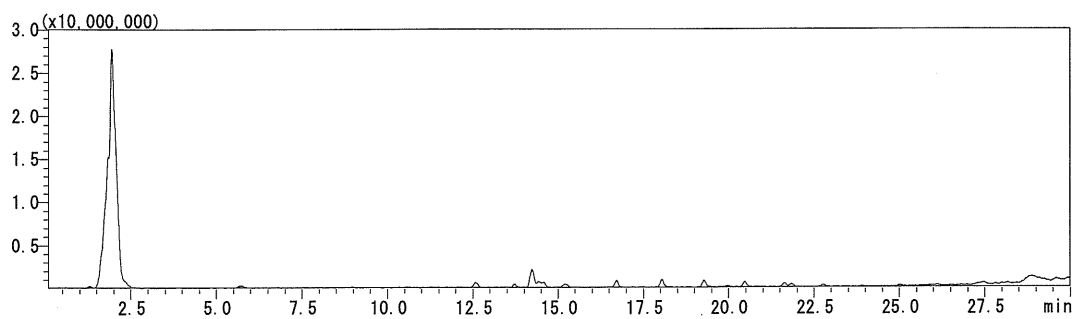


図 11 (続き) 黒線：負イオン

NIB-206



NIB-217

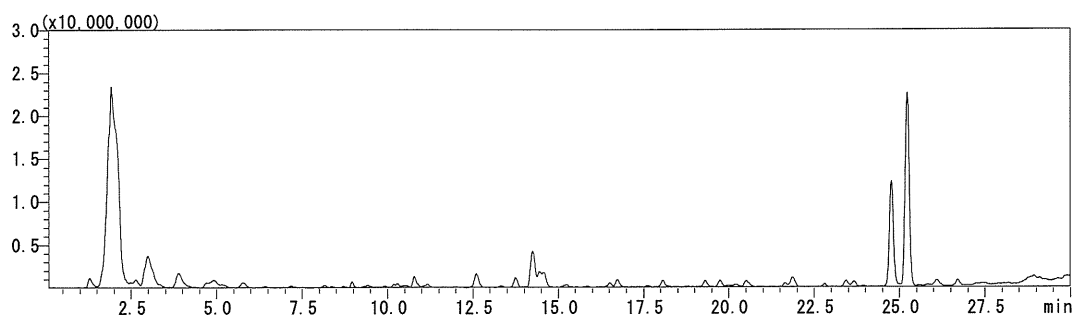
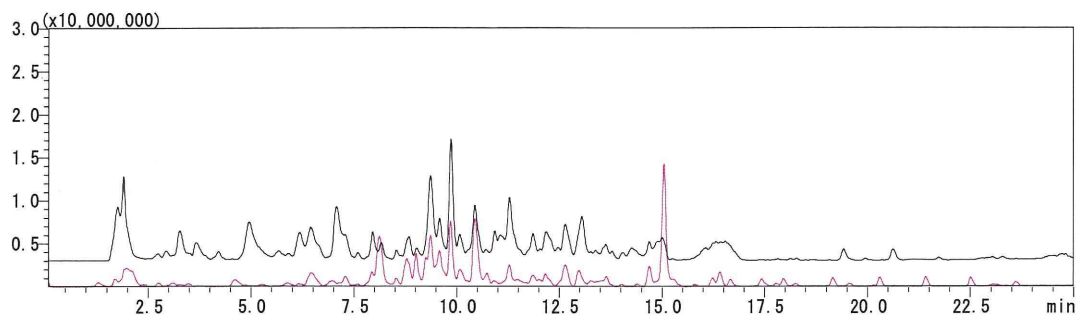
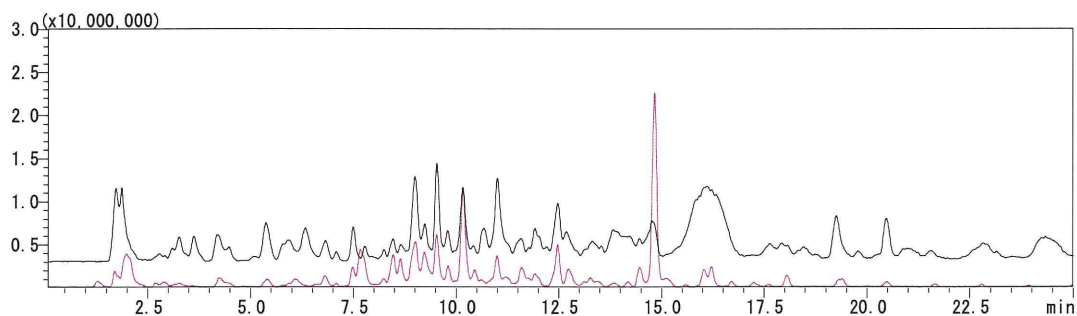


図 11 (続き) 黒線：負イオン

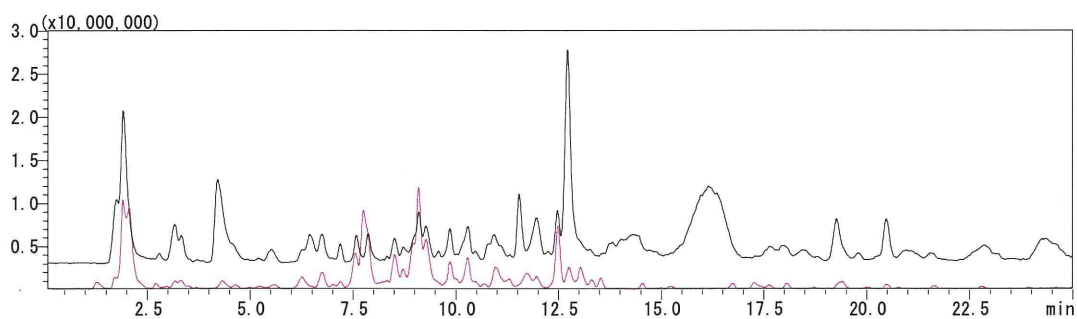
マオウ 11 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム



NIB-033



NIB-034



NIB-053

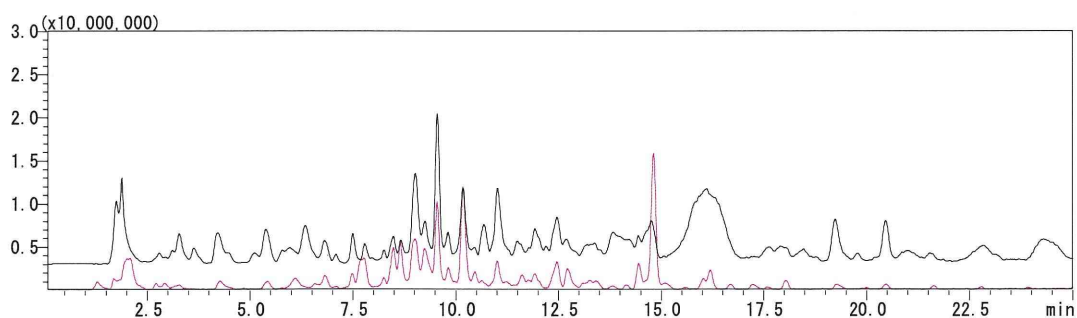
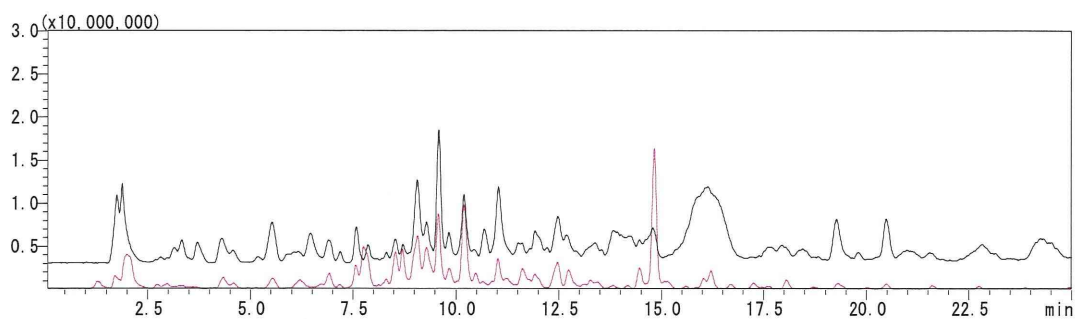
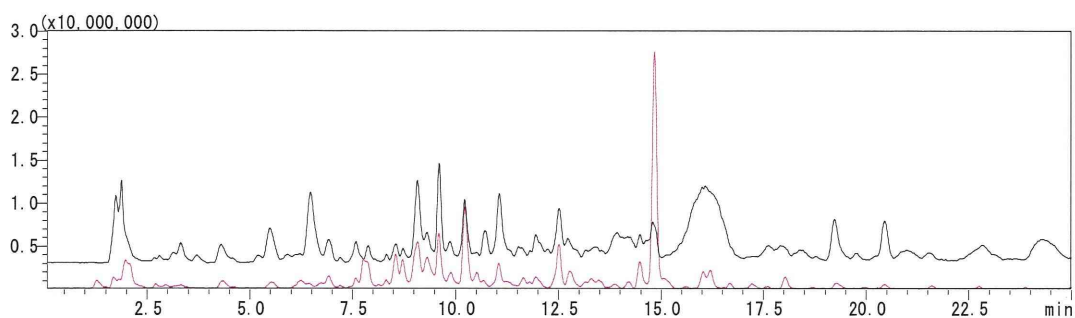


図 12 マオウ 11 試料の負イオン LC-MS クロマトグラム及びマオウ 11 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

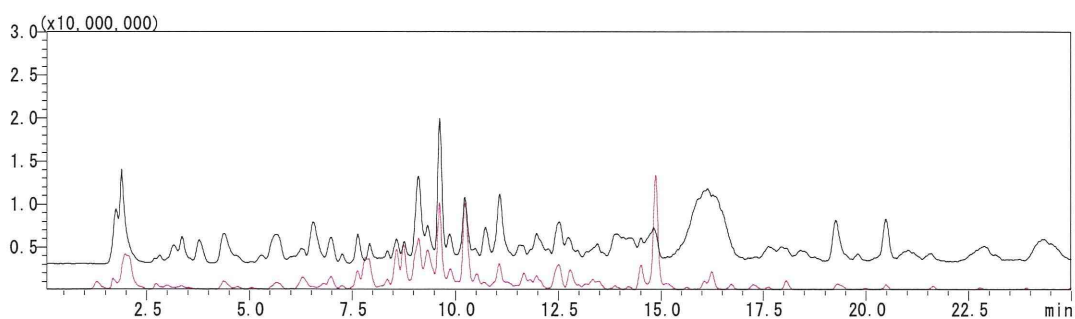
NIB-088



NIB-104



NIB-141



NIB-144

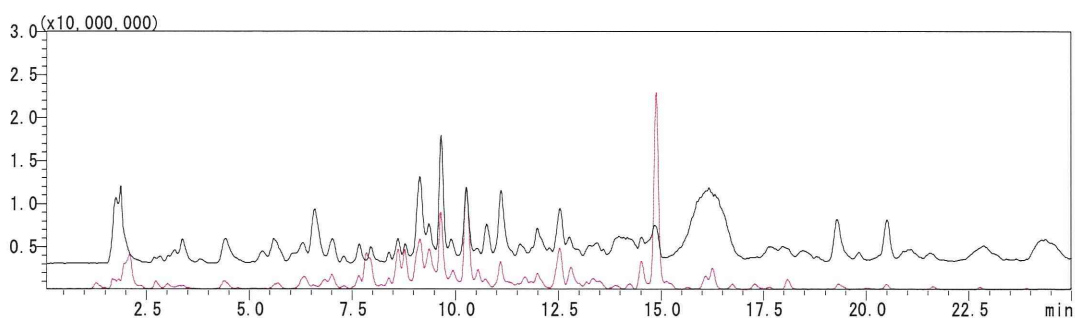
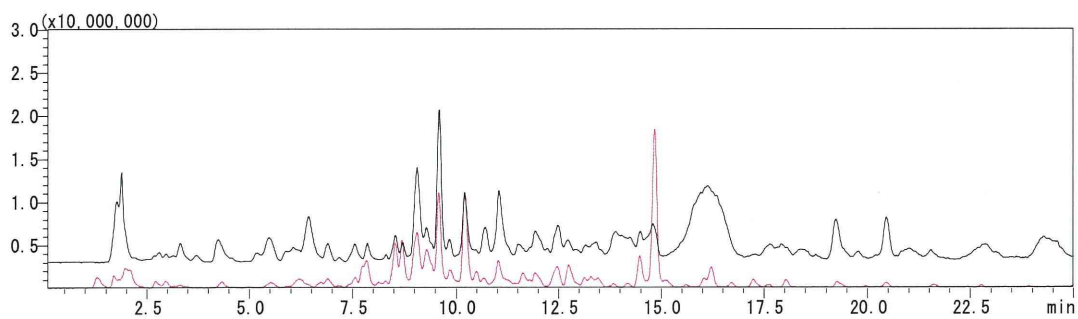
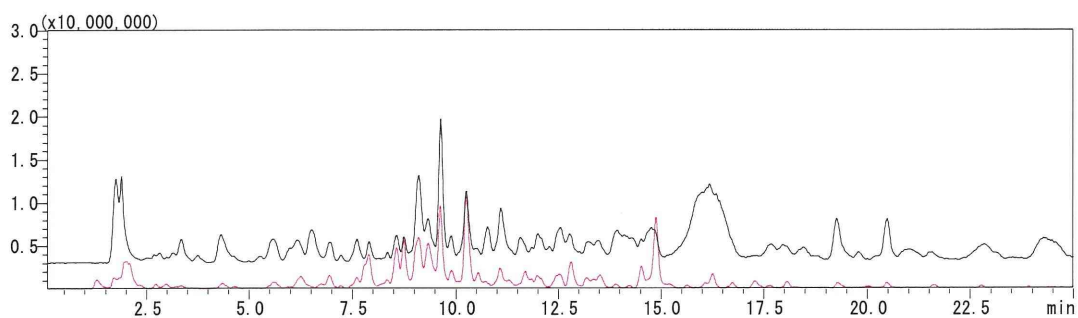


図 12 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

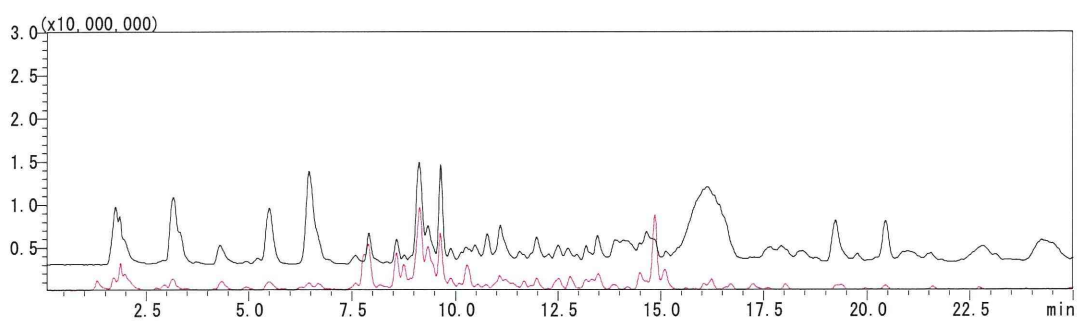
### NIB-166



### NIB-209



### NIB-210



### NIB-216

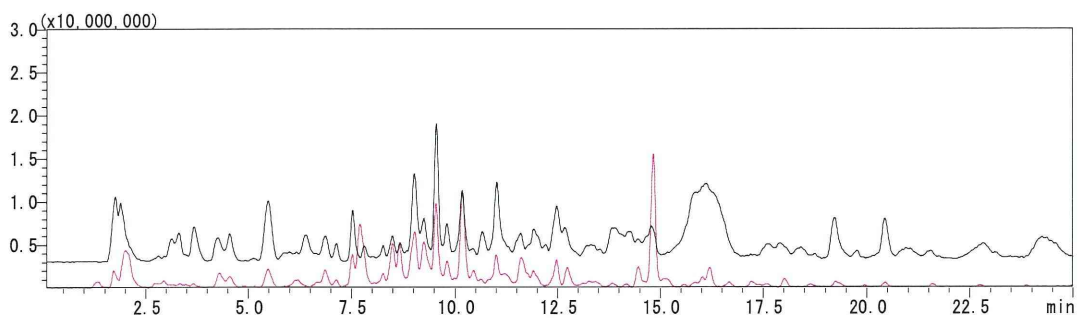
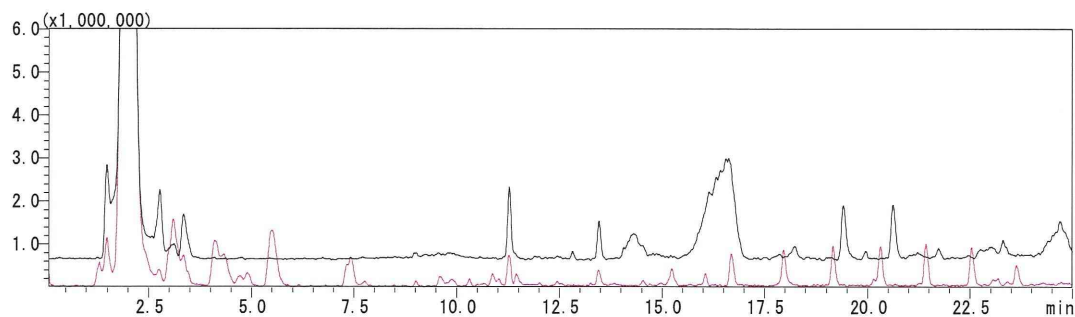
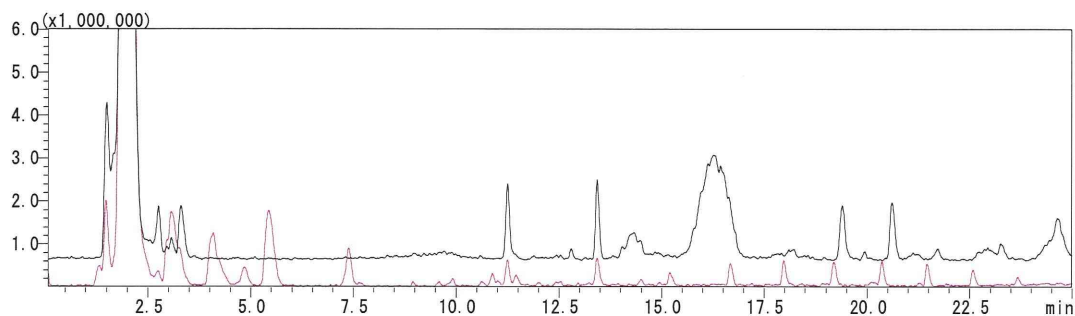


図 12 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

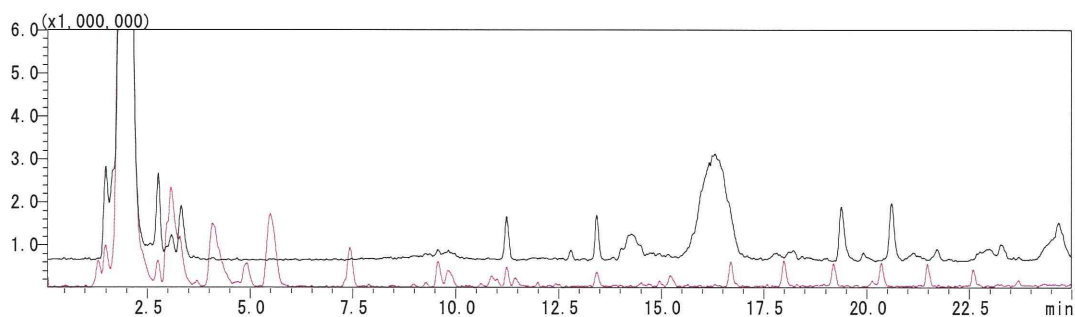
センキュウ9試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム



NIB-026



NIB-048



NIB-064

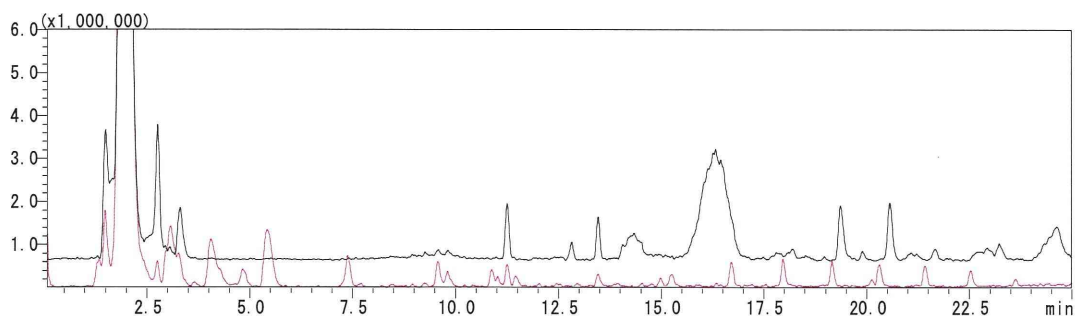
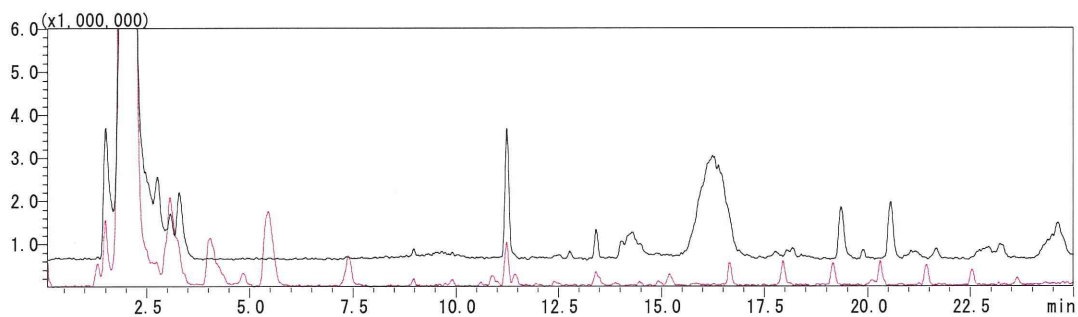


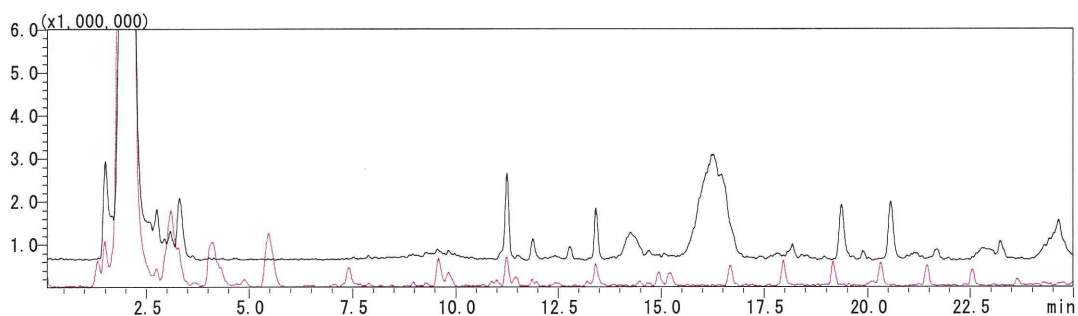
図 13 センキュウ9試料の正負イオンLC-MSクロマトグラム及びセンキュウ9試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン



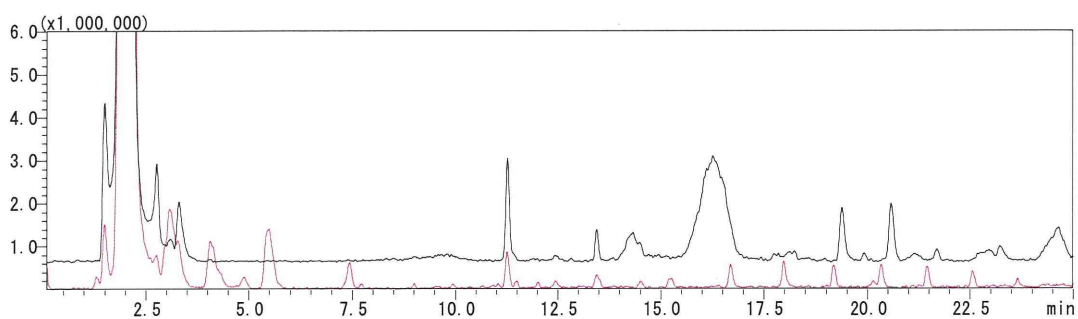
NIB-084



NIB-100



NIB-132



NIB-159

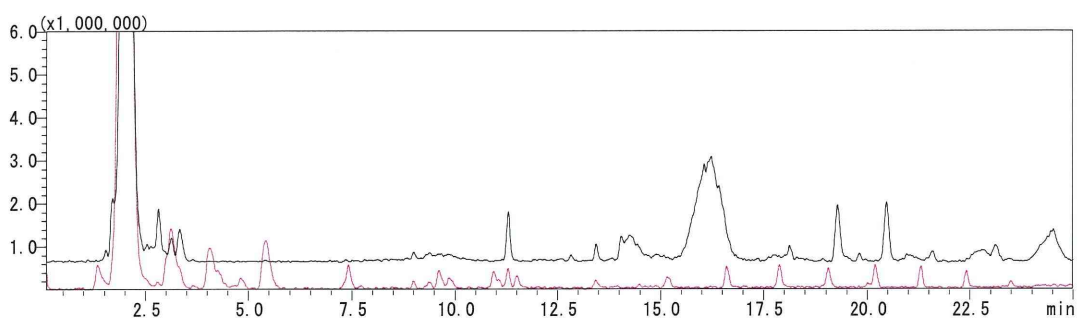
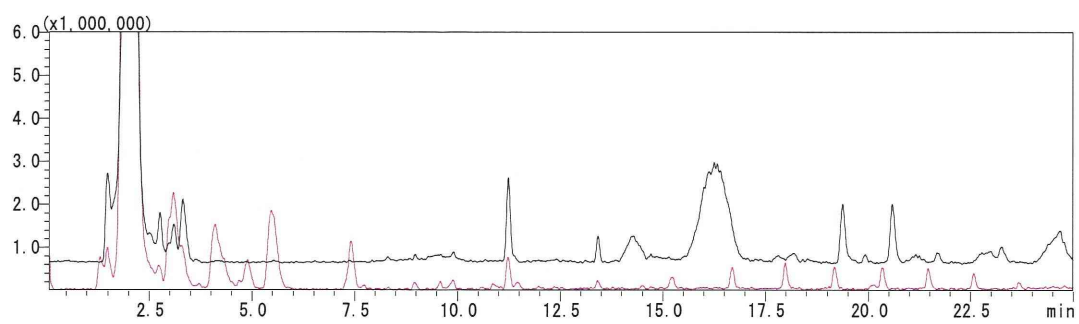


図 13 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

NIB-199



NIB-214

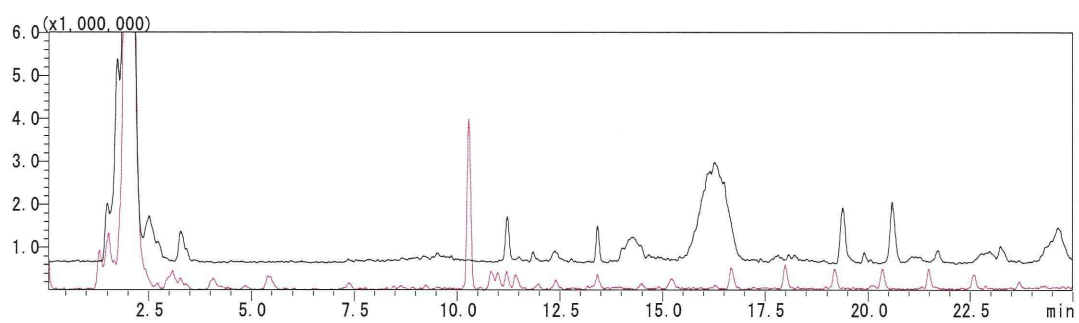
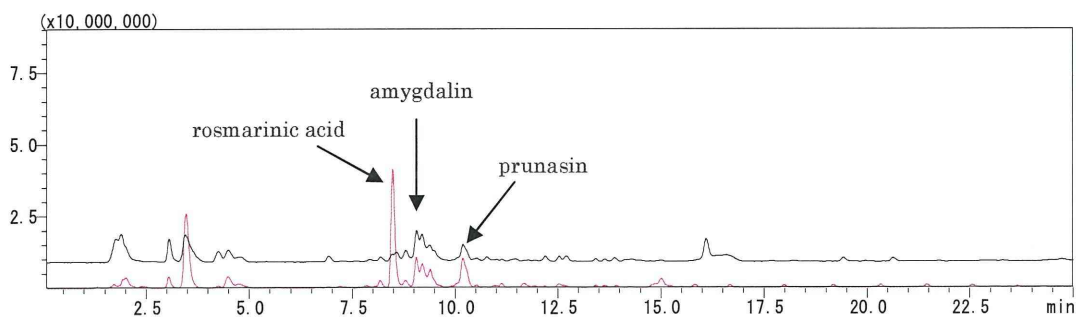
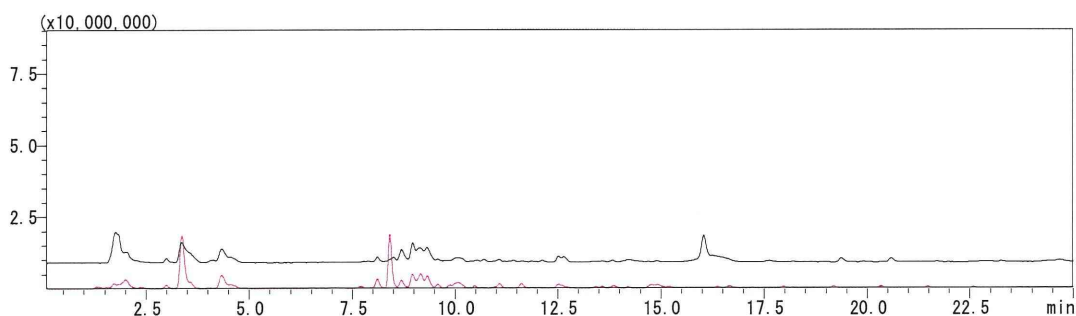


図 13 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

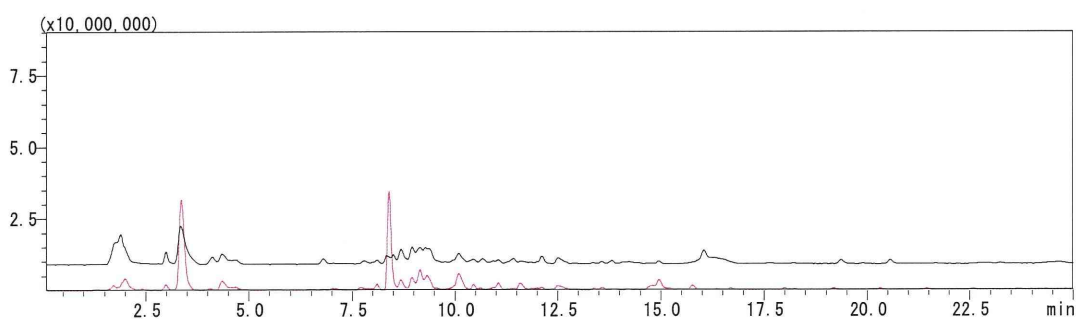
ソヨウ 5 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム



NIB-027



NIB-133



NIB-160

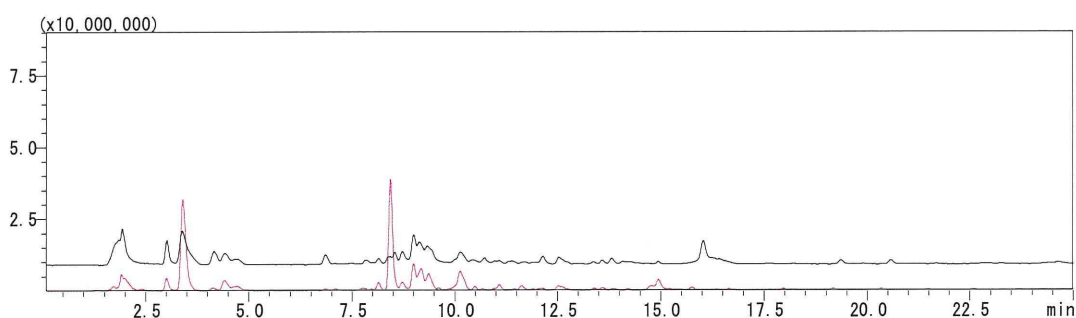
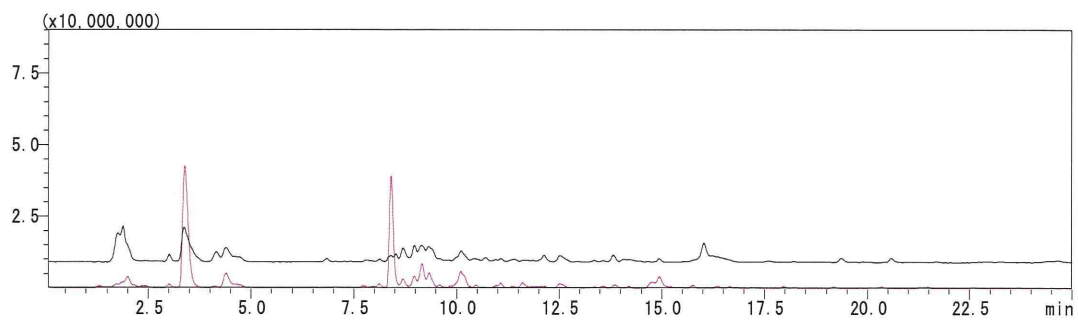


図 14 ソヨウ 5 試料の正負イオン LC-MS クロマトグラム及びソヨウ 5 試料を混合して調製した試料の LC-MS クロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

NIB-200



NIB-211

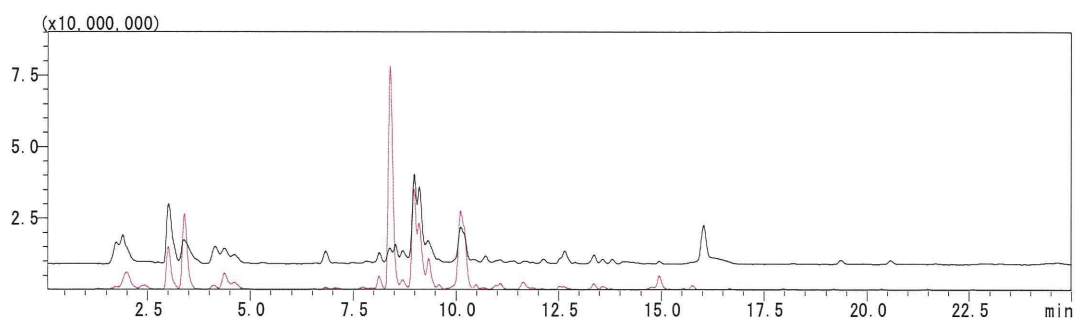
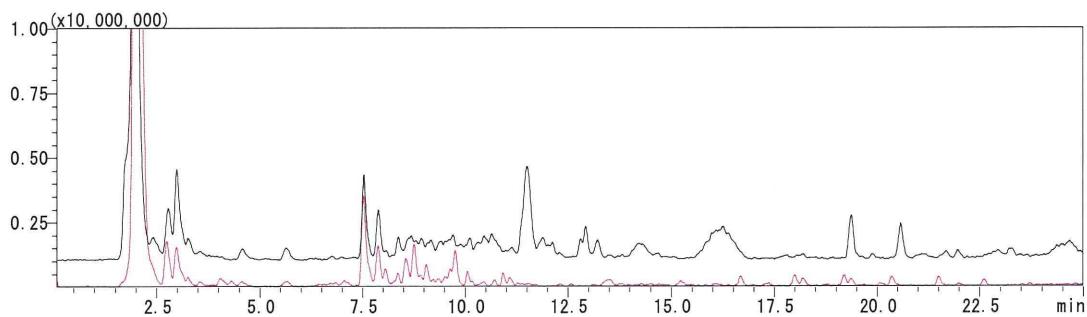
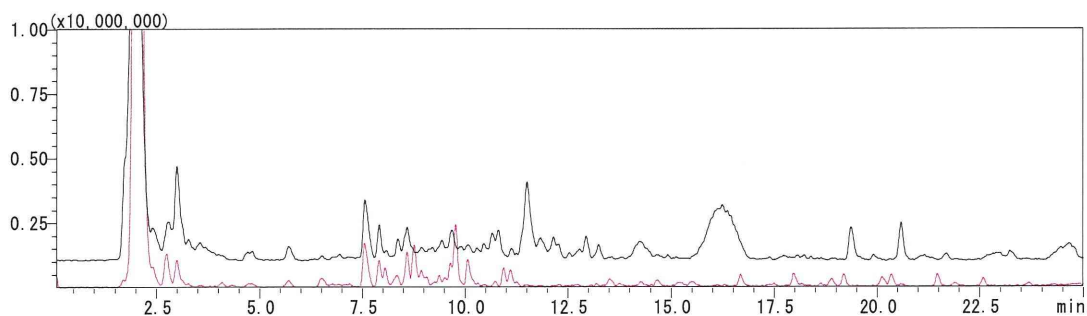


図 14 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

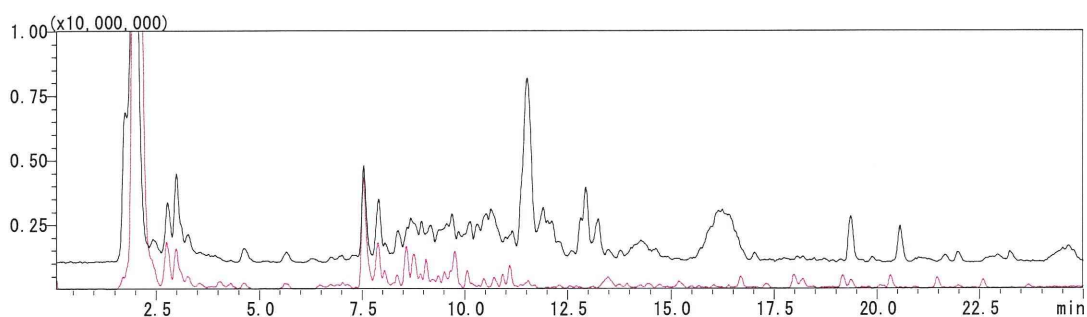
ブクリョウ9試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム



NIB-031



NIB-051



NIB-052

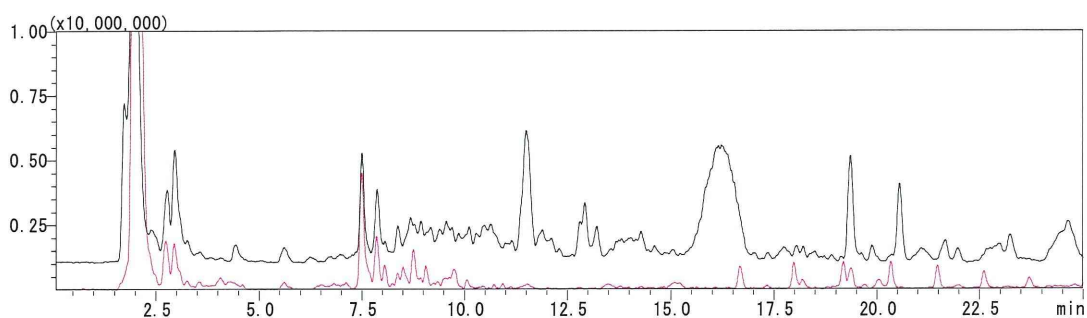
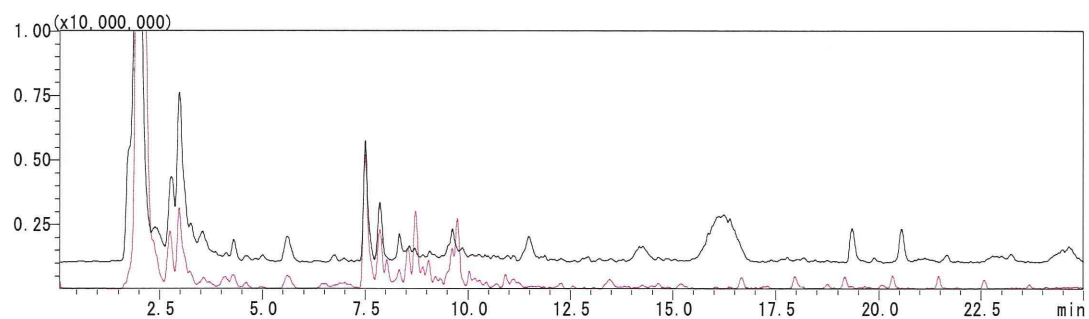
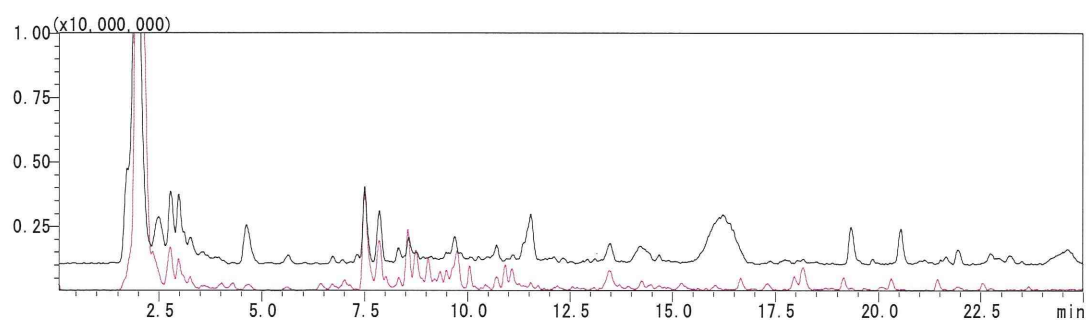


図 15 ブクリョウ9試料の正負イオンLC-MSクロマトグラム及びブクリョウ9試料を混合して調製した試料のLC-MSクロマトグラム 黒線：正イオン，赤線：負イオン

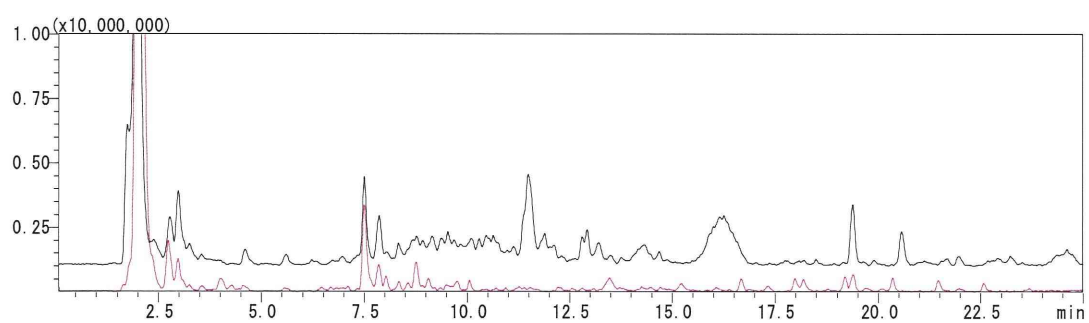
NIB-087



NIB-140



NIB-143



NIB-165

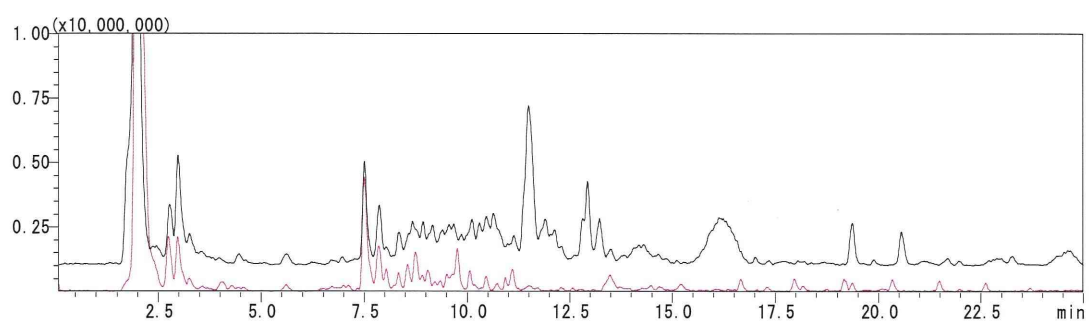
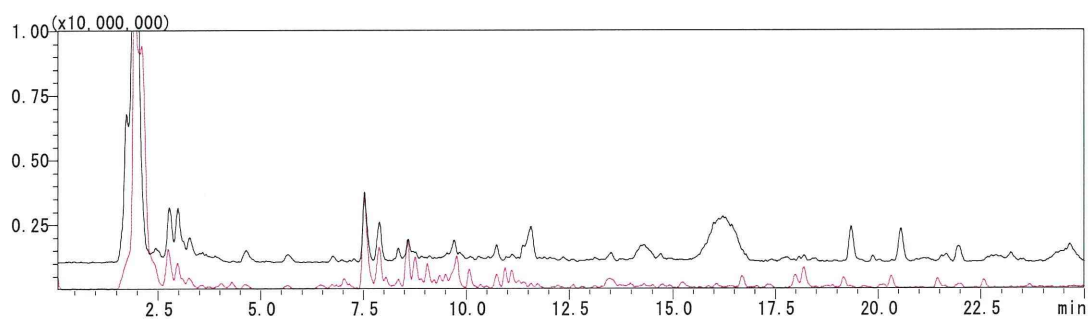


図 15 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

NIB-207



NIB-221

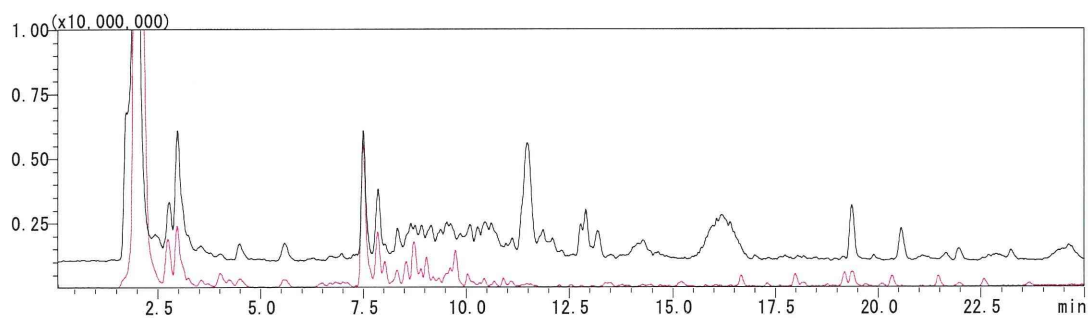


図 15 (続き) 黒線：正イオン，赤線：負イオン

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 成分分析データ情報に関する研究（MNR 情報の集積）  
－LC-MS-SPE/NMR を用いた生薬成分の解析－

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-SPE /NMR 測定を行った。生薬サンシシ（山梔子）の LC-MS-SPE/NMR のデータを取得した。SPE 装置を利用することにより、NMR 測定を行う際に以下の点で効力を発揮することが判明した。（1）LC 分析の際に重水素化溶媒を使用しなくてよいので、LC-MS データとの比較が容易になる。（2）同一トラップカラムに分収することにより、試料濃度を濃縮することができ、NMR シグナル取得が可能になった。

#### 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たり、化学的構成成分が変化を起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。

本年度における研究において、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)、SPE(Solid Phase Extraction, 固相抽出装置)の各種分析、濃縮機器をオンラインで接続したシステムである LC-MS-SPE/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  $^1\text{H}$  核あるいは天然存在比 1.1%の  $^{13}\text{C}$  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。低感度を克服するための方法には、磁場強度を大



きくすること（超高磁場化）、超高感度クライオプローブを装着すること（装着によって約5倍の感度を得るることができる）、LCにより分画した試料を固相抽出装置に導入することにより、試料濃縮と測定溶媒交換とを同時に行うこと、などが挙げられる。

本研究で用いたLC-MS-SPE/NMR装置は、低感度を克服するための方法全てを装備している超高磁場800MHz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、LCの分画試料をSPE装置に導入可能な構成になっており、微量生薬成分の解析を可能にしている。

本報告では、薬用植物総合情報データベース構築のための検討の一環としてサンシシ市場流通品の熱水抽出エキスのLC-MS-SPE/NMR測定を行った。

サンシシは、一般に果実の形態が丸様のものを山梔子（サンシシ）、長様のものを水梔子（スイシシ）といい、またその中間種もあるとされる。産地別また長手、丸手別にLC-MSの多変量判別解析を行ったところ良好な結果が得られた<sup>2)</sup>。

LC-MSの多変量解析により分子量330の含有化合物が山梔子と水梔子を区別するための指標になる可能性が示されたので、この化合物の構造決定を目的とし、LC-MS-SPE/NMR測定をおこなった。11種類（浙江産4種類、江西産2種類、広西壮族自治区2種類、広西自治区1種類、安徽省1種類、四川1種類）の中から、浙江産の試料を分析することとした。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

医薬基盤研究所・渋野らが抽出、凍結乾燥した試料「サンシシ(管理番号NIB-019、浙江産、提供者 前忠)」を入手した。LC-MS-SPE/NMR測定溶媒はD<sub>2</sub>O 99% (Cambridge Isotope Laboratories, INC)、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO.,INC)、ギ酸-d<sub>2</sub> 98% (ISOTEC<sup>TM</sup>)、重アセトニトリル(99.6-7% ATOM % D, ISOTEC<sup>TM</sup>)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、esquire4000 (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 $\mu$ lを採用したCryo-FIT (Bruker)をNMRに装着した。LC-MS-SPE/NMRを行うために、SPE装置として、PROSPEKT2 (Spark)を用いた。トラップカラムにはHysphere Resin GP (5-20 $\mu$ m)を用いた。NMRはTCIクライオプローブ付きAvanceII800 (Bruker)を用いた。LC、LC-MS及びSPEの制御にはHyster 3.2 (Bruker)、MSの制御にはesquireControl version 5.3 (Bruker)、NMRの制御はTopspin2.1 (Bruker)を用いた。

### 試料準備と測定条件

サンシシ(NIB-019)を4.20 mg量り取り、1000 $\mu$ lのミリQ水に溶解し、30min間vortex mixerを用いて攪拌した。12,000rpmで10min間遠心操作を行った後上清を取得し、0.2 $\mu$ mフィルターを通した。

LC測定条件: 移動相は、(A)H<sub>2</sub>O, (B)CH<sub>3</sub>CN(0.1%ギ酸)を用いた。(A)100%から30min。(A)30%までリニアグラジエントを行い、30min.から35min.まで(A)0%にした。流速は0.5ml/minで行った。カラムはYMC-Triart C18 4.6 X 150, 粒子径(5 $\mu$ m)細孔径(10 $\mu$ m)を用いた。UV観測波長は230nm、インジェクト量は10 $\mu$ l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 $\mu$ l/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: UV検出器信号を目的シグナルとして検出し、PROSPEKT2を利用したSPE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(溶媒消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。<sup>1</sup>H-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 1.93ppm となるように合わせた。

### C. 研究結果

浜野らが行った LC-MS 多変量解析の結果から分子量 330 の含有化合物が示唆されていたことから、NMR 測定のための LC-MS 分析を行い、データが再現するかを確認した。図 1 は浜野らが分析した結果を示している。このデータを取得した測定条件を Table3 に示した。このデータからリテンションタイムが 16.17min. の分画が 331.197 m/z となっており、この分画が目的の化合物を含む分画と考えられた。図 2 に LC-MS 測定の結果を示した。カラム、流速等が異なっている分析条件であるが、スペクトルはよく再現できた。この分画に相当する 16.6min. のマススペクトルを図 3 に示した。この分画の質量数は、353.2 m/z であった。浜野らの測定データ 331.197 m/z と比較すると、差は 22 m/z となり、ナトリウム付加体のマススペクトルが得られていることが分かった。15.8min. のメインピークのマススペクトルを図 4 に示した。これから 411.2 m/z の質量数であることが分かった。この値から、分子量 388.37 である Geniposide のナトリウム付加体であることが推察された。これらの分画を SPE 装置に導入し、NMR 測定を行った。図 5 に 15.8min. の分画を 6 回インジェクトし、重アセトニトリルで溶出したスペクトルを示した。積算は 640 回で行った。ピンクの図形は重アセトニトリル由来の不純物を示している。図 6 に 16.6min. の分画の NMR スペクトルを示した。この分画も同様に 6 回インジェクトしたものを同一トラップカラムに乗せ、重アセトニトリルで溶出した。積算回数は 6144 回で行った。

### D. 考察

サンシシに含まれている分子量 330 の化合物としては Epijasminoside A の可能性があるが<sup>6)</sup>、今回の LC-MS-SPE/NMR 測定において、3~4ppm 付近に糖由来と考えられるシグナルが観測されたことから、Epijasminoside A であると推察された。また、軽水分析が可能になるオンライン SPE(Solid Phase Extraction) 装置の利用を実行したことによ

り、LC-MS 解析の結果との整合性がとれ、より確実な化合物同定が可能になった。

### E. 結論

重水による可換な水素原子による帰属不確実性を極力減らすため、また、同一トラップカラムへの繰り返しアプライによる試料濃縮が実行可能な SPE 装置利用により、LC-MS データとの整合性をとることが可能にあり、より確実性の高いデータ取得が可能になった。

### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

浜野裕之、大根谷章浩、川原信夫、赤木謙一、寺林進、合田幸広、高橋豊：薬用植物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—オウゴン、サンシシ、オウレン市場流通品の成分比較について 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月 28-31 日、札幌)

### H. 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) 薬用植物総合情報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、サンシシ、オウレン市場流通品の成分比較について 日本薬学会第 132 年会要旨 浜野他、
- 2) 研究分担者・浜野、協力研究者・高橋 私信
- 3) Pyronane Monoterpenoids from the Fruit of Gardenia jasminoides, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 995–999

<b>Mode</b>		<b>Tune SPS</b>	
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		
<b>Tune Source</b>		<b>Trap</b>	
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 1. MS 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

Table 2. NMR 測定条件

【分析条件】

○ 試料量：0.5 mg/mL (水/メタノール溶液) × 10 μL

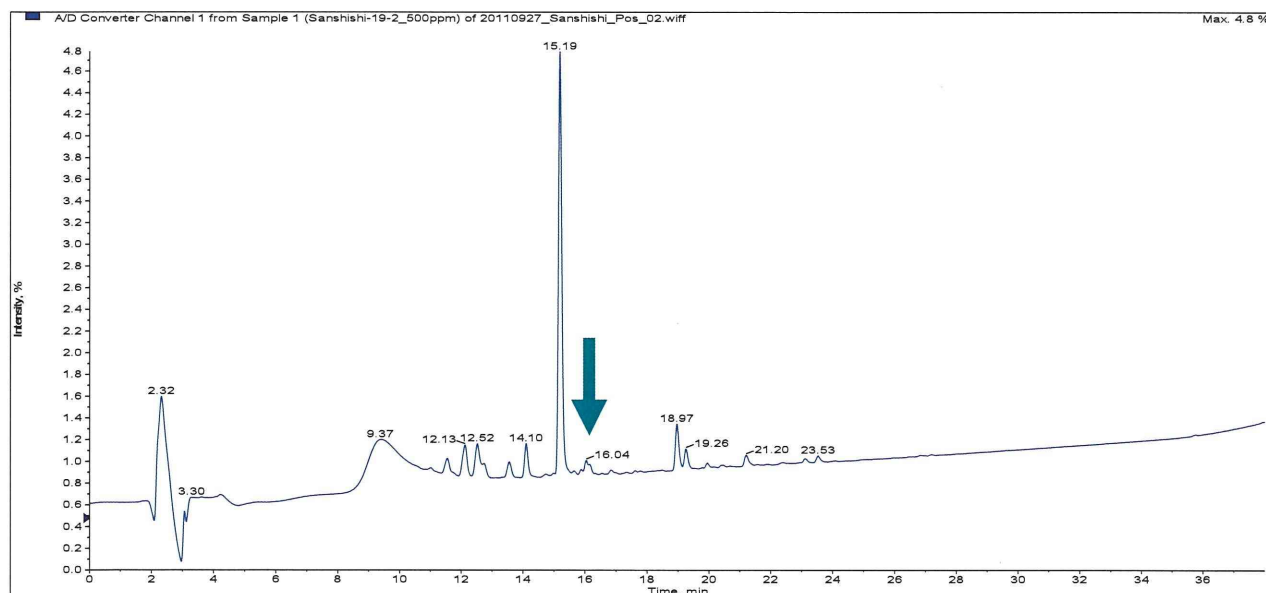
○ MS : AB Sciex, QSTAR-XL

- ESI ニードル電圧 4,000 V
- 脱溶媒温度 450 °C
- 測定  $m/z$  範囲 100~2,000
- CID 電圧 30 V
- Declustering Potential +65 V

○ HPLC : Agilent 1100

- カラム 関東化学 Mightysil ODS, 2.0×150, 3 μm
- 移動相 A = 0.1 % 酢酸/超純水、B = 0.1 % 酢酸/アセトニトリル  
B = 0 – 70 % (30 min) – 100 % (35 min) – 100 % (38 min)
- 移動相流量 0.2 mL/min

Table 3.LC-MS 測定条件 (澁野ら)



(図 1) LC-MS 測定 (澁野ら)