

で 10 分間遠心分離をし、得られた上清 600 μ L を試験溶液として用いた。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

NMR スペクトルの測定には ECA-500 型核磁気共鳴装置 (Jeol) を用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは non spin 系で x offset = 5 ppm, x sweep = 30 ppm の範囲を測定した。積算回数は 64 回とした。この時、relaxation time は 5 s とした。

2-3. パケット積分単位及びダイナミックレンジの検討

試料粉末, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 及び 250 mg をそれぞれ正確に量り取り, 抽出溶媒 1 mL を加え, 各濃度の試験溶液を調製し, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。得られたスペクトルデータは Alice2 for metabolome (Jeol) を用いパケット積分を実行した。

<倫理面での配慮>

本研究では, ヒト及び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。

C. 結果及び考察

1. 測定試料調製法の検討

測定試料作製は大きく分けて 3 段階に分けられる。一つ目として, 試料の裁断と粉末化, 二つ目は抽出操作, 三つ目として NMR チューブへの充填が挙げられる。これらの操作は測定データの均一性に大きくかわるため, まず, 試料調製法に関して検討を行った。

1-1. シャクヤクの粉末化

シャクヤク試料は, 各個体を 4 分割し, それぞれについて, メタボローム解析を行うことにより, 個体内のばらつき及び抽出・測定時の誤差を確認する事とした。また, 粉末化及び次項の抽出操作は, ボールミル及び震とう抽出機を用い, 一定の条件下で行う事により, 操作時のヒューマンエラーの影響を排除した。30 sec^{-1} の条件下時に 30 秒では一部粉末化されていないものが見られたため, 粉碎時間を 1 分に変更した所, 良好な粉末が得られた。

1-2. 抽出方法の検討

$^1\text{H-NMR}$ を用いたシャクヤクのメタボローム解析に最適な抽出溶媒を選択するため, 重クロロホルム, 重メタノール, 重水を用いて抽出を行い, $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した (Fig. 2)。その結果, 重クロロホルム抽出時には脂肪酸のピークのみが確認され, 含有成分を包括的に解析するには不向きと考えられた。重メタノール抽出時には第 16 改正日本薬局方において, シャクヤクの確認試験及び定量規格における指標成分に規定されているペオニフロリンをはじめ, 複数の成分由来と考えられるピークが確認できた。重水抽出時にもペオニフロリン由来のピークは観測され, その他のピークも重メタノール抽出時と比較すると高濃度で抽出されていた。しかし, 高磁場側に重メタノール抽出時のみ観測されるピークが存在する事から, 重メタノールと重水の 1:1 混液が抽出溶媒として適当と考えられた。

また, 一部のピークにおいて, 試料間におけるケミカルシフトのずれが観測された。これは測定溶媒として重水の代わりに, 重水を用いて調製したリン酸緩衝液を抽出溶

媒に用いる事で解消された。以上のことから、抽出溶媒は、重メタノールとリン酸緩衝液を含む重水溶液の 1:1 混液を用いる事とした。

さらに、後述の PACKET 積分をする際、基準物質の積分値に対する各範囲 (PACKET) の積分値を求める事でサンプル間の定量性を確保する事とした。基準物質を添加するタイミングは抽出時及び抽出後が考えられるが、抽出時に加える場合は操作数が増え、人的誤差が生じる恐れがあるため、測定溶媒に添加することとした。基準物質としては水溶性であり、かつ不揮発性である trimethylsilyl-2, 2, 3, 3- d_4 -propionic acid Na 塩 (d_4 -TMSP) を用いる事とした。

1-3. 抽出エキスの NMR チューブへの充填

NMR を測定する際、不溶物が存在するとピーク形状が悪化するため、抽出エキス中の生薬粉末をできるだけ除去することで良好なスペクトルが得られる。そのための手法としてろ過、もしくは遠沈が考えられる。しかし、メタボローム解析を行う際にはサンプル数が多量になるため、全サンプルについてろ過操作を行う事は多大な労力を要する。そこで、遠沈による不溶物の除去を試みた。遠心分離の条件として回転数は 1000 rpm, 2000 rpm 及び 3000 rpm を、遠心時間は 5 分もしくは 10 分を検討した。1000 rpm 及び 2000 rpm の時、10 分間遠心分離を行っても微細な不溶物が目視で確認できた。しかし、3000 rpm で 10 分の場合には不溶物を確認できなかったため、この条件で遠沈を行う事とした。また、NMR チューブにはここで得られた上清 600 μ L を充填する事とした。

2. $^1\text{H-NMR}$ 測定法の検討

$^1\text{H-NMR}$ の測定は田原らにより報告されている qNMR の条件を参考にした⁴⁾。すなわち、測定範囲を -15 ppm から 15 ppm, データポイントを 32000 とした。緩和時間は、より長くとることにより、折り返しピークの発生を防止し、良好なベースラインが得られるが、今回の抽出方法ではサンプル濃度が薄いため、積算回数を多くとる必要がある。このため、一つの試料に要する総測定時間も考慮し、緩和時間を 5 秒、積算回数を 64 回とした。

3. データ処理方法の検討

3-1. PACKET 積分範囲の検討

多変量解析を行う際には $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを表の形にまとめたデータマトリックスが必要になる。これにはピークごとに積分値を測定する方法と単位範囲ごとの積分値を計測する方法がある。前者の場合、ピークが重なり合うことがあるため、自動でピークごとに分離する事は難しく、手動ではピークを選択が恣意的になってしまうおそれがある。そのため、目的成分が決定されていない場合は、後者の方法が一般的である。この方法では積分単位の範囲により得られる結果が変わってくるため、その検討を行った。

各濃度の試験溶液を調製し、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。得られたスペクトルを 0.01, 0.05 及び 0.1 ppm 単位で PACKET 積分し、濃度と積分値の直線性を相関係数で確認した (Table 1)。その結果として、積分範囲が広いほど抽出濃度と積分値の直線性は良い結果を示した。しかし、0.01 単

位の場合と 0.05 ppm 単位の場合では、直線性の指標である相関係数が 0.9 以上を示す割合が 51.5% から 65.0 % へと大きく上昇しているのに対し、0.1 ppm 単位では 69.4% と顕著な改善は見られなかった。積分範囲を広くすると複数のピークを同一範囲としてしまう可能性が高くなるので、0.05 ppm 単位が適当と判断した。

3-2. ダイナミックレンジの検討

0.05 ppm 単位でパケット積分を行った場合、全範囲のうち 65.0% のサンプルが相関係数 0.9 以上を示した (Table 1)。どのようなものにおいて相関が強いかわかるため、100 mg/mL で調製した際の積分値と相関係数の関係を観察した (Fig. 3)。その結果、積分値の大きい範囲が高い相関係数を持つ事が分かった。よって、一定以上の積分値を持つ範囲では十分なダイナミックレンジが確保されていると判断した。

D. 結論

今回、¹H-NMR を用いたメタボローム研究を行う際の試料調製及び ¹H-NMR の測定法に関する研究を行った。ここで作製した実験条件をそのままあるいは、一部改変して用いる事により、生薬のメタボローム解析に最適なデータが得られると考えられる。以下に方法を記す。

- ①試料を 4 分割し、ボールミルを用い 1 min, 30 sec⁻¹ の条件で粉碎する。
- ②重メタノールと重水で調製したリン酸緩衝液に d₄-TMS を 0.025% 添加し抽出溶媒とする。試料の粉末 100 mg に抽出溶媒 1 mL を加え、30 min, 300 min⁻¹ で振とう抽出する。

③ 10 分間、300 rpm で遠心分離をし、その上清 600 μL を NMR チューブに充填する。

④¹H-NMR スペクトルを xsweep 30 ppm, scan 64 times, auto filter off の条件で測定する。

⑤スペクトルデータを 0.05 ppm 単位でパケット積分する。

⑥多変量解析を行う。

E. 研究発表

1. 論文発表
特に無し

2. 学会発表

若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 神谷洋, 川崎武志, 山本豊, 林茂樹, 柴田敏郎, 合田幸広, メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価 (第 2 報), 日本生薬学会第 58 回年会 (2011. 09, 東京)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特に無し

2. 実用新案登録
特に無し

3. その他
特に無し

参考文献

- 1) S. Hayashi, S. Akiyama, Y. Tamura, Y. Takeda, T. Fujiwara, K. Inoue, A. Kobayashi, S. Maegawa, E. Fukusaki, A novel application of metabolomics in vertebrate development, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **386**, 268-272 (2009)

- 2) R. P. Hopton, E. Turner, V. J. Burley, P. C. Turner, J. Fisher, Urine metabolite analysis as a function of deoxynivalenol exposure: an NMR-based metabolomics investigation, *Food Additives and Contaminants*, **27**(2), 255-261 (2010)
- 3) H. Wen, S. Kang, Y. Song, Y. Song, S. H. Sung, S Park, Differentiation of cultivation sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach, *Phytochem. Anal.*, **21**, 73-79 (2010)
- 4) M. Tahara, N. Sugimoto, T. Suematsu, K. Arifuku, T. Saitou, T. Ihara, Y. Yoshida, A. Tada, R. Kubota, K. Shimizu, T. Yamazaki, K. Tanamoto, H. Nakazawa, T. Nishijima, Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **16**(1), 28-33 (2009)

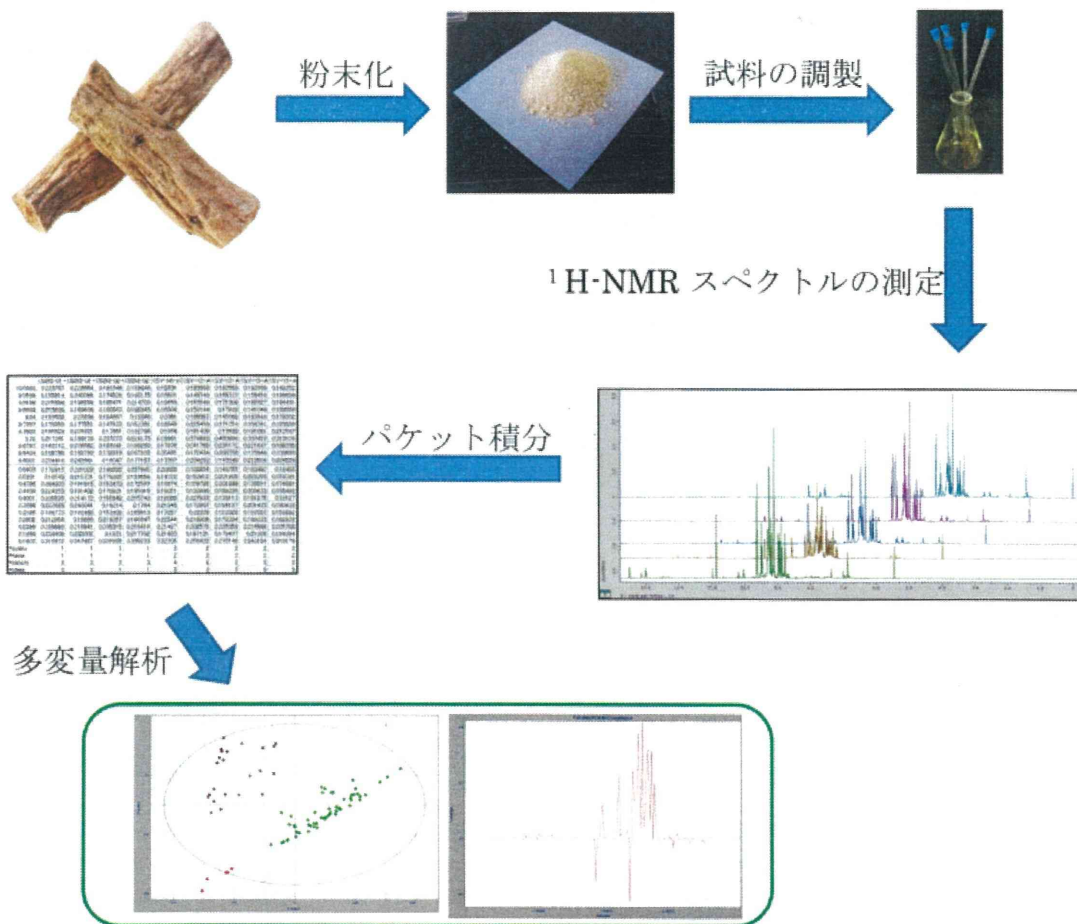


Fig.1 Scheme of $^1\text{H-NMR}$ based metabolomics

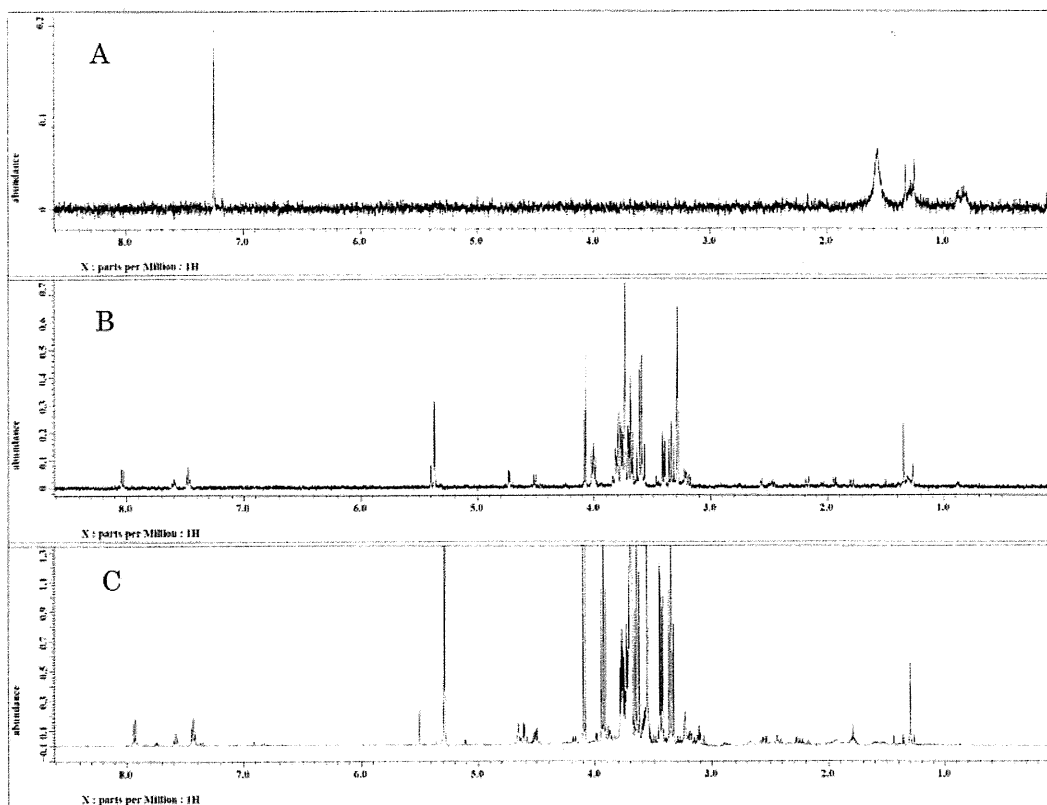


Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ spectra measured in each solvent

A: extracted with CDCl_3

B: extracted with CD_3OD

C: extracted with D_2O

Table 1 Detail of packet integration and percentage of correlation coefficient

	0.01 ppm 単位		0.05 ppm 単位		0.1 ppm 単位	
	個数	割合	個数	割合	個数	割合
全サンプル数	985		197		98	
0.9 以上	507	51.5%	128	65.0%	68	69.4%
0.8 以上	656	66.6%	141	71.6%	75	76.5%
0.7 以上	722	73.3%	160	81.2%	86	87.8%
0.6 以上	790	80.2%	176	89.3%	91	92.9%
0.5 以上	846	85.9%	189	95.9%	98	100%

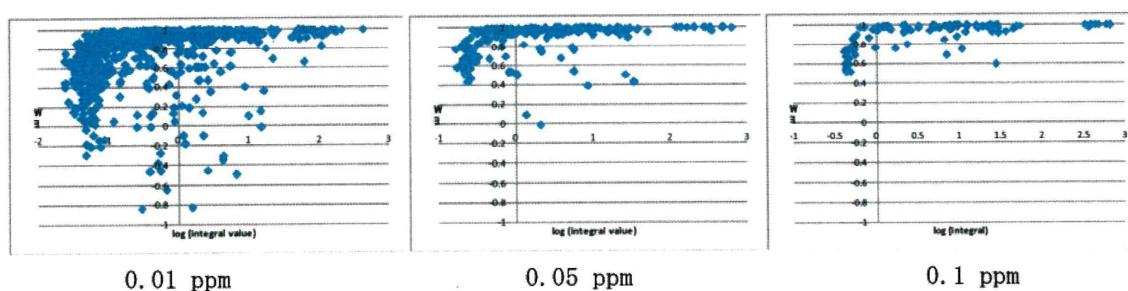


Fig. 3 Correlation between integral value and correlation coefficient

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 主任研究官

シャクヤクの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いた

メタボローム解析に関する研究

協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 若菜大悟

研究要旨 成分情報のオミクス解析を用いた生薬の品質評価及び標準化を検討するため、シャクヤク（ビャクシャク）及びセキシャクの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析を試みた。その結果、主成分分析ではグルコース及びスクロースの含有量により 3 群に分類可能だった。この 3 群は、採集後の貯蔵期間・乾燥方法の違いが反映されている可能性がある。シャクヤクはほぼ全てが一つの群に属していたため、このシャクヤクに着目し、主成分解析を行ったところ、産地の違いにより群を形成した。この分類に関与する化合物としてアルビフロリン、ペオニフロリン、カテキン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースなどが確認された。

研究目的 近年の急速な高齢化と疾病構造の変化に伴い、代替医療及びセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を浴びている。漢方医学における治療の本体は数百種に及ぶ生薬であるが、これらは天産品であるため基原植物種、産地、気候条件、栽培年数、加工・調製法などの違いにより、品質にバラツキが生じるという欠点がある。本研究では、これまで限られた数の指標成分の分析により行われている生薬の品質管理の場に、近年、進歩の著しいケモメトリクス的手法を取り入れる事により、基原植物、生育環境、加工調製法など、品質の変化に寄与する因子を化学成分の総体として規格化することを目的とした。

実験材料には、シャクヤク類を取り上げ

た。シャクヤクは、トウキとともに代表的な補血薬として、主に婦人科系疾患を目標とした漢方処方に多く配合される汎用生薬の一つであり、その使用量は、年間 1000 トンを超え、カンゾウに次いで使用量の多い生薬である。この内、国内産は、40 トン程度であり、需要の大部分が中国からの輸入により賄われている。

第 16 改正日本薬局方等において、シャクヤク（ビャクシャク）及びセキシャクは、ボタン科 (Paeoniaceae) 植物を基原とし、シャクヤクは *Paeonia lactiflora*、セキシャクは、*P. lactiflora*、*P. obovata*、*P. veitchii* の根と規定されている。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

シャクヤクは株式会社栃本天海堂より 17 ロット, 株式会社ウチダ和漢薬より 13 ロット, 医薬基盤研・薬用植物資源センター北海道研究部より 2 ロット譲り受けた (Table 1). D-グルコース (1) は関東化学, アルギニン (2) は味の素株式会社, 安息香酸 (3) は石津製薬株式会社から購入した. HPLC には HPLC グレードの溶媒を用いた. 重溶媒は太陽日酸から購入し, 重水は 99.8% のもの, 重メタノールは 99.9% のものを用いた. 成分分画用シャクヤクは栃本天海堂より購入した.

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

シャクヤクを 4 分割し, ボールミルを用い 30 sec^{-1} , 1 min の条件で粉砕した. その粉末 100 mg を正確に測り取り, 抽出溶媒 1 mL を加え, 300 rpm, 30 分振とう抽出を行った後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離を実行し, 得られた上清を試験溶液として用いた. 抽出溶媒は重メタノールと重水で調製したリン酸緩衝液を 1:1 で混合したものに, 基準物質として trimethylsilyl-2,2,3,3- d_4 -propionic acid Na 塩を 0.025% 添加したものをを用いた.

2-2. 多変量解析の前処理法の検討

前処理は各データポイントについて下記の計算式を適用した.

- 平均化 (mean center)

$$x_{(mc)} = x - \bar{x}$$

x =raw data, \bar{x} =mean center of raw data

- オートスケール (auto scale)

$$x_{(as)} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (x - \bar{x})^2}}$$

- パレートスケール (pareto scale)

$$x_{(rs)} = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (x - \bar{x})^2}}$$

2-3. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には ECA-500 型核磁気共鳴装置 (Jeol) を用いた. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは non spin 系で x offset = 5 ppm, x sweep = 30 ppm の範囲を測定した. 積算回数は 64 回とした. この時, relaxation time は 5 s とした.

2-4. データ解析

パケット積分は Alice2 for metabolome (Jeol) を用い, 0.05 ppm 単位で行った. 多変量解析は Pirouette (Infometrix) を用いた.

2-5. 成分分離

市販のシャクヤク 200 g をメタノール 2 L で二回抽出し, 抽出エキス 62.5 g を得た. このエキスをヘキサン, クロロホルム, 酢酸エチル, 1-ブタノールで順次液々分配を行い, ヘキサン層 (1.1 g), クロロホルム層 (1.5 g), 酢酸エチル層 (3.6 g), ブタノール層 (20.2 g) 及び水層 (35.0 g) を得た. クロロホルム層を LPLC [SiO_2 , CHCl_3 -MeOH (100:1)] で分画後, HPLC で精製し, パルビノン (4: 10 mg) 及びペオニフロリゲノン (5: 14 mg) を単離した. 酢

酸エチル層をシリカゲルによるカラムクロマトグラフィー [CHCl₃-MeOH (10:1), (5:1), (3:1), (1:1), MeOH] で分画し, 12画分を得た. 画分 8 (419 mg) を HPLC (ODS, 20% to 80% MeOH) で分画し, 画分 1-3 を得た. 画分 1 (41 mg) を HPLC (amino, MeOH) で精製し, 没食子酸 (6: 38 mg) を得た. 画分 2 (67 mg) を HPLC (ODS, 30% MeOH) で精製し, エピカテキン (7: 20 mg) を得た. 画分 3 (160 mg) は HPLC (ODS, 40% MeOH) で分画し, 画分 1-6 を得た. 画分 3 (7 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し 3-ガロイルエピカテキン (8) と 5-ガロイルエピカテキン (9) の 3:5 混合物 (2 mg) を得た. 画分 4 (67 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し, アルビフロリン (10: 5 mg) 及び ペオニフロリン (11: 30 mg) を得た. 画分 5 (12 mg) を HPLC (ODS, 50% MeOH, 25% CH₃CN) で順次精製し, 3''-ガロイルペオニフロリン (12: 2 mg) 及び 4''-ガロイルペオニフロリン (13: 1 mg) を得た. 画分 6 (65 mg) を HPLC (ODS, 30% CH₃CN) で精製し 6''-ガロイルペオニフロリン (14: 23 mg) を得た. 酢酸エチル層を分画した画分 10 (492 mg) を HPLC (ODS, 40% MeOH) で分画し, 画分 1-4 を得た. この画分 3 (186 mg) を HPLC (amino, 90% MeOH) で精製し, ペンタガロイルグルコース (15: 38 mg) を得た.

<倫理面での配慮>

本研究では, ヒト及び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.

C. 研究結果

1. 主成分分析の条件検討

多変量解析は適正な評価を行うため, データマトリックスを様々な前処理を行ってから計算を行う事が可能である. 前処理方法の差異により解析結果は変化するため, この点について検討を行った.

今回, ①無処理, ②平均化処理, ③オートスケール, ④パレトスケール, ⑤平均化+対数処理について検討を行った. 無処理の場合, データマトリックスを線形で表現すると ¹H-NMR スペクトルとほぼ同じ形を示す (Fig. 1, A1). この時, 第一主成分のローディングベクトルはデータマトリックスとほぼ同じ形を示した (Fig. 1, A3). 平均化処理をした場合, データマトリックスのみの観察でサンプルごとの違いが見やすくなる場合がある (Fig. 1, B1). ローディングベクトルはデータマトリックスそのままではなく一部のピーク範囲が負の影響を与えていた (Fig. 1, B3). オートスケール処理は平均化後, 標準偏差で除す計算を行う. 今回のデータマトリックスは ¹H-NMR スペクトルのピークがない部分も含んでいるので, オートスケール処理をするとベースラインのばらつきが大きく表現されてしまう (Fig. 1 C1). そのため PCA の結果もばらつきが大きくなり, ピークが存在しない範囲に関してもローディングベクトルが存在していた (Fig. 1 C2, C3). パレトスケールは平均化処理後, 標準偏差の平方根で除したもので, 平均化処理とオートスケール処理の中間にあたる計算方法である. この方法を用いるとベースラインの影響を抑え, かつ積分値の小さい範囲の影響を大きくする事が可能になる (Fig. 1, D1). 最後に平均化後, 全データを対数処理した場

合を検討した。この方法もベースラインの影響が他の方法と比べ強く出るが (Fig. 1, E1), ローディングプロットから、オートスケール処理時のようにピークのない部分の影響が強く見られる事はなかった (Fig. 1, E3)。

2. 全サンプルの分析

入手した全サンプルについて PCA を行った。PCA を行う事で、含有化学成分をまとめて各サンプルの性状を表す主成分スコアが得られる。この主成分スコアを複数組み合わせグラフとして表現する事で、サンプル間の類似性を視覚的に表現することができる。つまり、グラフ上で近い位置に存在するサンプルは化学成分的に類似していることがわかる。このグラフをスコアプロットと呼ぶ。今回得られたスコアプロット上で同一個体由来のサンプルはそれぞれまとまって観測された事から、同一個体内では化学成分のバラツキは少なく、かつ、この実験方法により得られるデータにヒューマンエラーが介在していないことが確認された。次に全体的なバラツキを観測した結果、ファクター 1 がマイナス、ファクター 2 がプラスの値を示すグループ A、主にファクター 1 がプラスの値を示すグループ B、そしてファクター 1, 2 共にマイナスの値を示すグループ C の 3 グループに分類可能だった (Fig. 2)。続いて、グループ分けがされた要因を検討した。これには PCA を行った際、スコアプロットと同時に得られるローディングプロットから検討を行った。主成分スコアは、パケット積分して得られた各範囲の積分値データについてそれぞれ重み付けし、足し合わせたもので、この時

の重みをローディングベクトルと言う。ローディングスコアはこれをグラフで表現したもので、スコアプロットと同じ軸を用いる事ができる。つまり、スコアプロットで各サンプルの分類を行い、ローディングプロットでその分類の要因となる化合物を調べる事が可能になる。今回のローディングプロット (Fig. 3) からは、ファクター 1 に対して正の影響を与える物質としてスクロースが、ファクター 2 に正の影響を与える物質としてグルコースが確認された。以上のことから、グループ A はグルコースが多くスクロースが少ない、グループ B はスクロースが多い、グループ C は両者とも少ない事が判明した。

3. ビヤクシャクの分析

上記の分析の結果、全検体は、3 グループに分類可能だったが、ビヤクシャクの大部分はグループ B に含まれていた。そのため、次いでビヤクシャクのみサンプルを限定し PCA を行った。スコアプロットからは産地毎に分類される傾向が確認された (Fig. 4)。すなわち、ファクター 1, 2 共にプラスの値を示す北海道産、ファクター 1 がプラス、ファクター 2 がマイナス側に偏る傾向を示す新潟県産、ファクター 1 がマイナス、ファクター 2 がプラスの中国産、ファクター 1, 2 共にマイナスを示す奈良県産に分類された。長野県産は今回用いたサンプル数が少なく明確なグループが確認できなかった。

この分類に影響を与えている物質をローディングプロット (Fig. 5) から確認した所、糖やアミノ酸などの一次代謝産物だけではなく、二次代謝産物も影響を与えてい

る事が分かった。一次代謝物に関しては NMR スペクトルのデータベースは充実しつつあるが、二次代謝物に関しては十分なものは存在しないため、ローディングプロットのみから化合物同定を行うことは難しかった。そこで、実際に市販のシャクヤクから含有成分の単離を行い、各化合物 (Fig. 6) のスペクトルデータと測定試料のものとを比較することで、ローディングプロットで見出された特徴的なピークの化合物同定を試みた。その結果、ファクター 1 に正の影響を与えている物質はアルビフロリン、ペオニフロリン及びカテキンであり、負の影響を与えている物はアルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースと決定した。ファクター 2 に対してはアルビフロリン、ペオニフロリン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコースが正の影響を、グルコース、カテキン類が負の影響を与えていた。すなわち、中国産は 没食子酸、アルギニン、ペンタガロイルグルコース、安息香酸が、北海道産はペオニフロリン、アルギニンが、奈良県産はグルコース及び安息香酸が、新潟県産はアルビフロリン、ペオニフロリン及びカテキンが多く含まれる事が分かった。

D. 考察

今回の実験結果から、¹H-NMR スペクトルを用いた多変量解析の前処理法は平均化処理、パレートスケール、平均化処理+対数処理を使い分ける必要が考えられた。すなわち、含有化学分量の差を多変量解析の結果に反映したい時は平均化処理、微量成分まで検討したい時には平均化処理+対数処理、パレートスケールはその中間の性

質を持つため、第一選択として用いることが望ましい。

シャクヤクの全サンプルを用いた多変量解析の結果、グルコースとスクロースの含量により 3 つのグループに分類可能だった。糖の含量は加工・調製法や貯蔵期間により変化する事がすでに報告されており^{1,2)}、今回の分類もこれらの点による影響が考えられる。次に、シャクヤクの大部分がグループ B に含まれていたため、シャクヤクサンプルのみで解析を行った。その結果、産地毎に分類される傾向が見られた。この分類に関与する化合物としてアルビフロリン、ペオニフロリン、カテキン、アルギニン、没食子酸、ペンタガロイルグルコース、安息香酸、グルコースなどが確認された。中国で白芍として用いられる *P. lactiflora* と *P. veitchii* の HPLC profile を用いた分類が Xu らにより報告されている³⁾。Xu らも同様の化合物により種の判別が可能だとしており、種の判別及び産地の判別が同じ化合物で判断できる可能性が示唆された。

今後はさらにサンプル数を増やして検討を行い、さらに遺伝子型と化学成分パターンの相関を確認する必要がある。

E. 結論

今回、シャクヤクのメタボローム解析を行い、糖の分布による分類及び産地による分類が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表
特に無し

2. 学会発表

若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈穂子, 神谷洋, 川崎武志, 山本豊, 林茂樹, 柴田敏郎, 合田幸広, メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価 (第 2 報), 日本生薬学会第 58 回年会 (2011. 09, 東京)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

参考文献

1) 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎, シャク

ヤク・キバナオウギ・モッコウ生根の低温処理による糖及び希エタノールエキス含量の経時変化, *医薬品研究*, **40**(8), 497-504 (2009)

2) 林茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎, 北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質へ及ぼす影響, *生薬学雑誌*, **64**(2), 68-75 (2010)

3) S. Xu., L. Yang, R. Tian, Z. Wang, Z. Liu, P. Xie, O. Feng, Species differentiation and quality assessment of radix Paeoniae Rubra (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint, *J. Chromatography A*, **1216**, 2163-2168 (2009)

Table 1 Details of Paeony roots using in this study

サンプル	産地	入荷年	グループ	備考	サンプル	産地	入荷年	グループ	備考
SY-Y1	奈良県	H20年	B		SYA-10	日本・長野	H19年	B	切り花
SY-Y2	奈良県	H19年	B		SYA-11	日本・長野	H19年	B	薬用
SY-Y3	奈良県	H18年	B		SYA-12	日本・奈良	H20年	B	薬用
SY-N1	新潟県	H21年	B	春の粧	SYA-13	日本・奈良	H17年	B	薬用
SY-N2	新潟県	H21年	B	滝の粧	SYA-14	日本・新潟	H20年	B	薬用
SY-N3	新潟県	H21年	B	和芍	SYA-16	日本・北海道	H21年	B	薬用
SY-N4	新潟県	H21年	B	花籠	SYA-17	日本・北海道	H20年	A	薬用
SY-N5	新潟県	H21年	B	氷点	SEKI-01	香港市場品	H3年	B	皮付き
SY-N6	新潟県	H21年	B	夕映	SEKI-02	香港市場品	H3年	A	皮付き
SY-N7	新潟県	H20年	B	春の粧	SEKI-03	中国・吉林	H4年	A	皮付き
SY-T1	安徽省	H21年	B		SEKI-04	中国・吉林	H5年	A	皮付き
SY-T2	安徽省	H21年	B		SEKI-05	香港市場品	H6年	A	皮付き
SY-T3	安徽省	H20年	B		SEKI-06	中国・河北	H7年	A	皮付き
SY-H1	北海道	H20年	B	べにしずか	SEKI-07	中国・河北	H7年	A	皮付き
SY-H2	北海道	H20年	B	北宰相	SEKI-08	中国・河北	H9年	A	皮付き
SYA-01	中国・安徽	H16年	A	皮付き	SEKI-09	中国・内蒙古	H10年	A	皮付き
SYA-02	中国・山東	H13年	A	皮付き	SEKI-10	中国・内蒙古	H12年	C	皮付き
SYA-03	中国・四川	H21年	B		SEKI-11	中国・内蒙古	H15年	B	皮付き
SYA-04	中国・四川	H21年	B		SEKI-12	中国・内蒙古	H16年	B	皮付き
SYA-05	中国・四川	H14年	A	皮付き	SEKI-13	中国・内蒙古	H17年	B	皮付き
SYA-06	中国・浙江	H20年	C		SEKI-14	中国・内蒙古	H18年	C	皮付き
SYA-07	中国	H12年	B	皮付き	SEKI-15	中国・内蒙古	H20年	B	皮付き
SYA-09	日本・長野	H20年	B	春の粧	SEKI-16	中国・内蒙古	H20年	B	皮付き

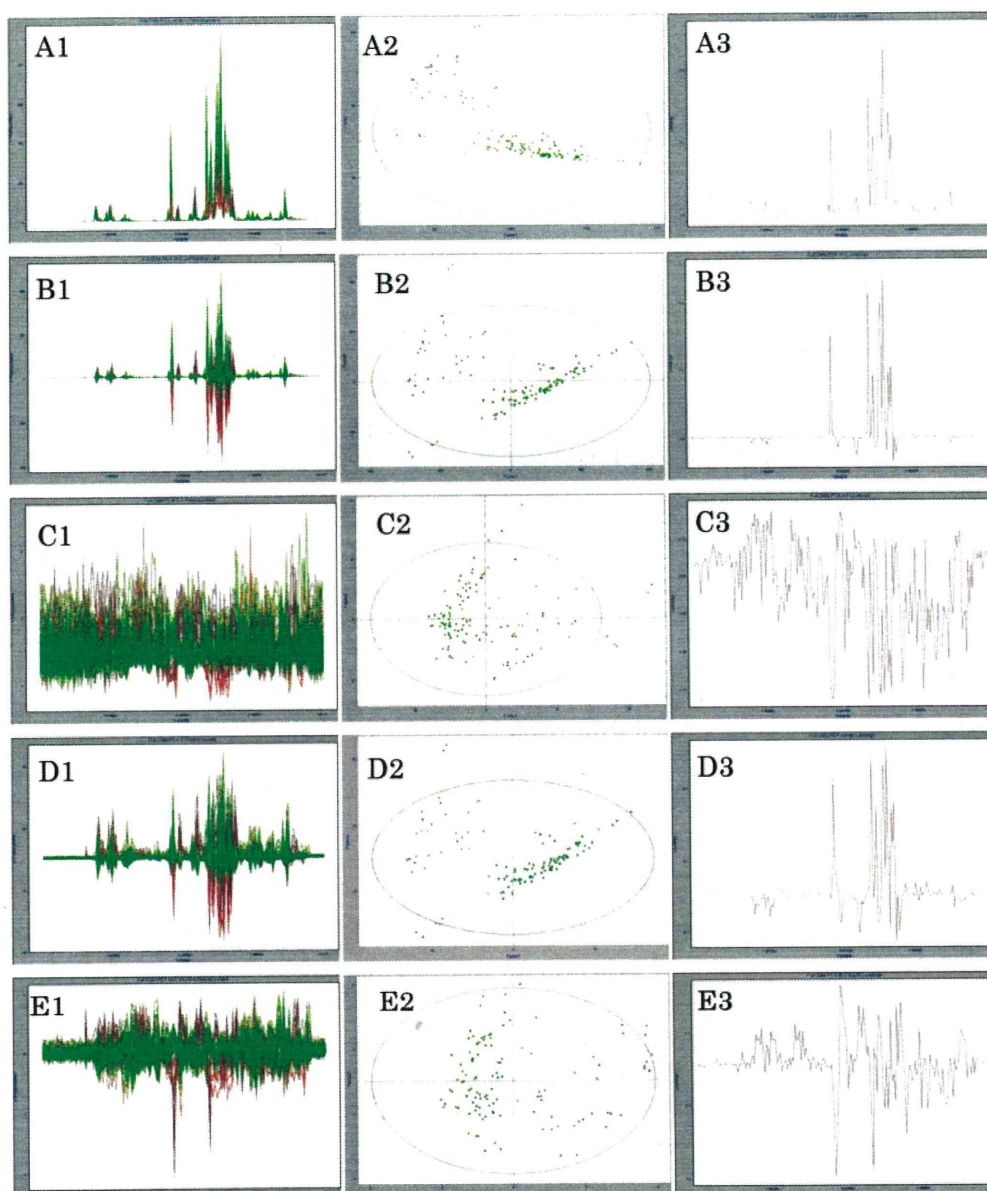


Fig.1 Influence of preprocessing and transformation of data matrix for PCA

A: non preprocess

B: mean center

C: auto scale

D: pareto scale

E: mean center + log10

1: processed data

2: PCA score plot

3: loading vector of first principle component

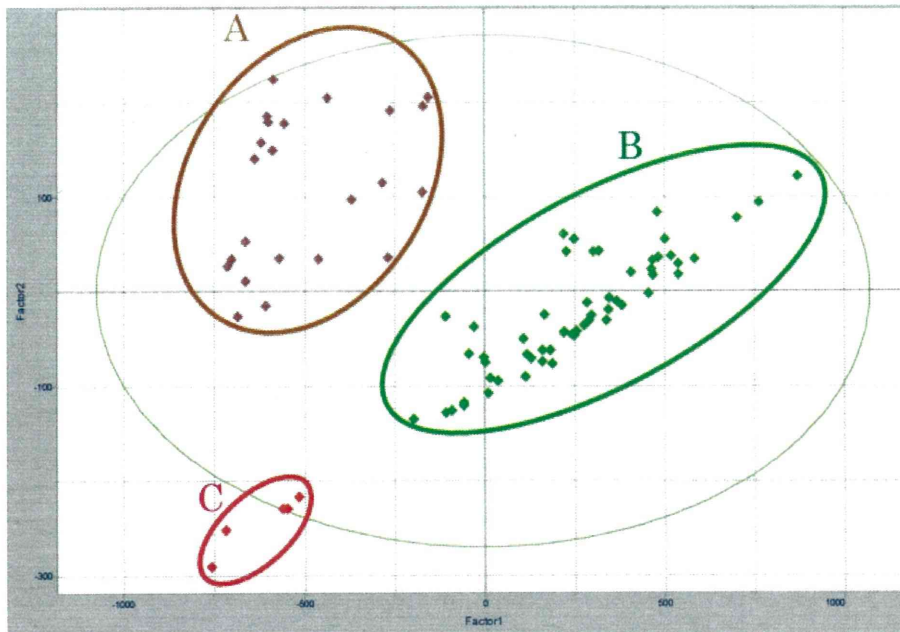


Fig.2 PCA Score plot from analysis of $^1\text{H-NMR}$ spectra for Paeony roots
 Brown symbols, group A; green symbols, group B; red symbols, group C

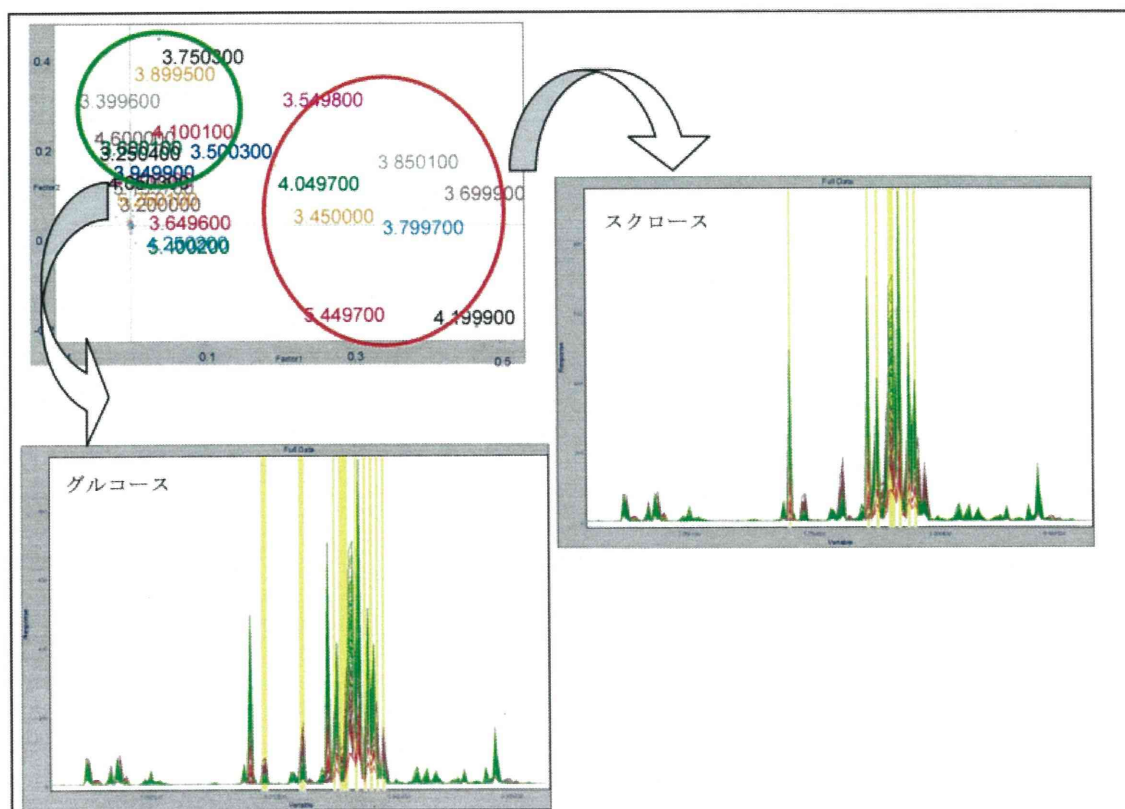


Fig.3 PCA loading plot from analysis of $^1\text{H-NMR}$ spectra for Paeony roots

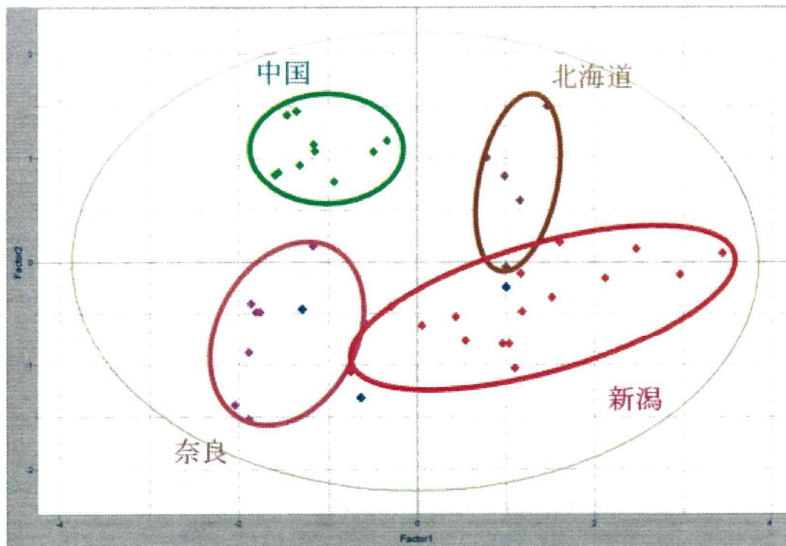


Fig. 4 PCA score plot from analysis of $^1\text{H-NMR}$ spectra for the samples without outliers in group B
 Green symbols, China; brown symbols, Hokkaido in Japan; pink symbols, Nara in Japan; red symbols, Niigata in Japan; blue symbols, Nagano in Japan

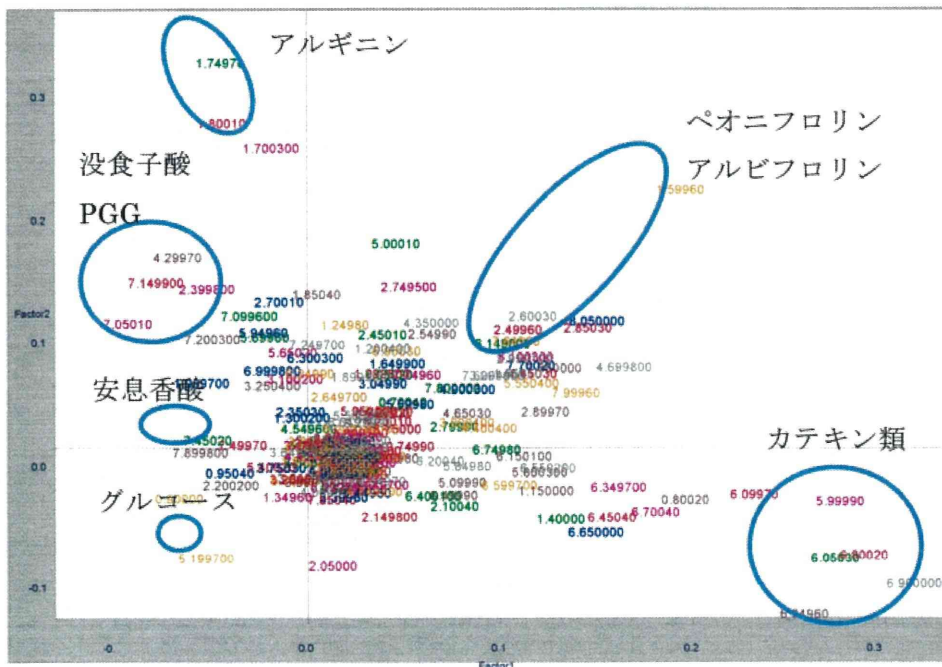


Fig. 5 PCA loading plot from analysis of $^1\text{H-NMR}$ spectra for the samples without outliers in group B

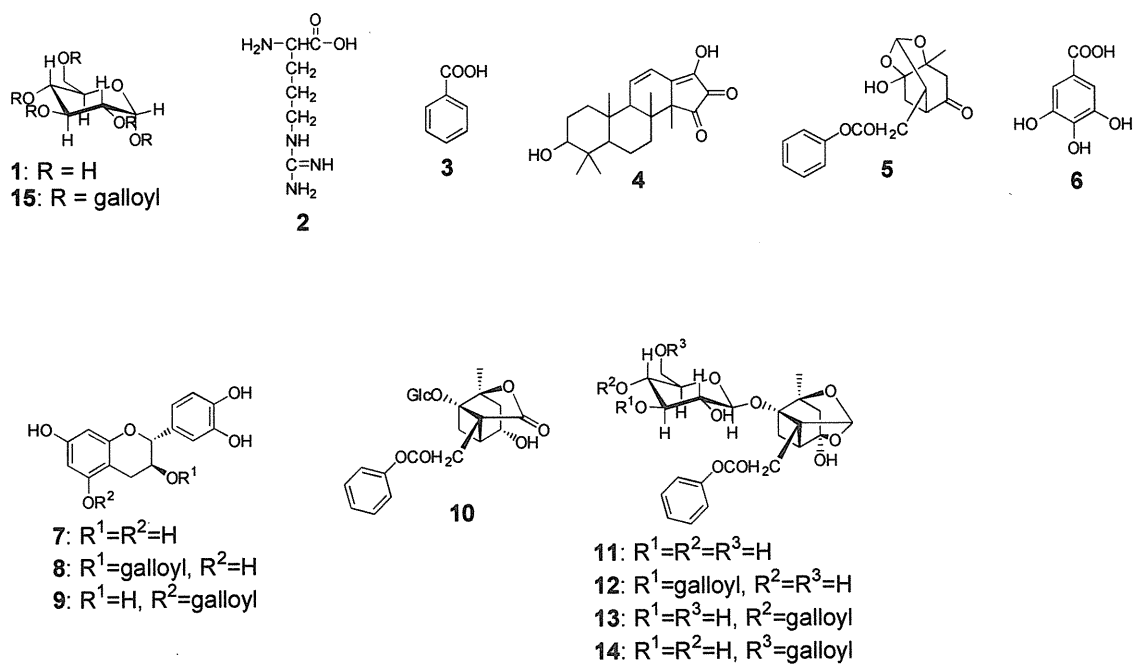


Fig.6 Isolated compounds from the commercial Paeony root

研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし

