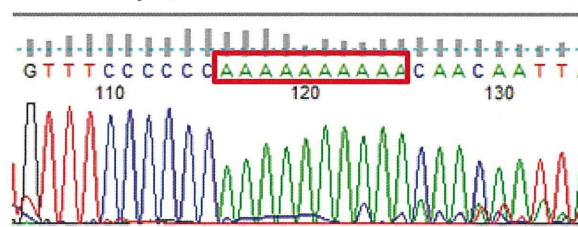


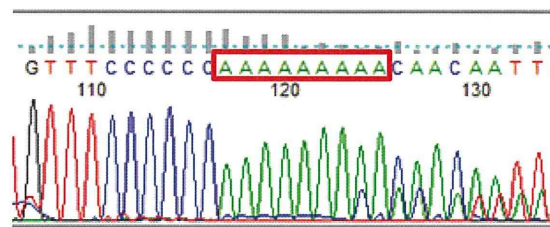
表4. ゴシツ及び*Achyranthes*属植物試料葉緑体DNA 2遺伝子領域の変異点 (まとめ)

管理番号	生葉・検体名	検体ID	<i>rpl16-rpl14</i>					<i>atpF-atpA</i>					
			281	317	411	432	460	498	124	125	126	127	167
NIB-0016	ゴシツ	#1	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#2	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0079	ゴシツ	#1	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#2	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0096	ゴシツ	#5(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#6-2(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0120	ゴシツ	#1	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#2	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0152	ゴシツ	#1(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#2(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0189	ゴシツ	#1	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#2	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
NIB-0212	ゴシツ	#4(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
		#5(gt)	A	A	C	A	-	-	A	A	-	-	C
Aa-V	<i>Achyranthes aspera</i> (葉)ベトナム	#1	T	G	A	G	A	A	-	-	-	-	T
		#2	T	G	A	G	A	A	-	-	-	-	T
Ab-Std	局方試験用 トウゴシツ	#1	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	C
		#2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	C
Af-Std	局方試験用 ヒナタイノコズチ	#1	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
		#2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
Af-T	ヒナタイノコズチ 70°C、6日間乾燥	#1	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
		#2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
Af	標本園ヒナタイノコズチ	#1	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
		#2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	-	C
Ab	標本園トウゴシツ	#1	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	C
		#2	A	A	A	A	-	-	A	A	A	A	C

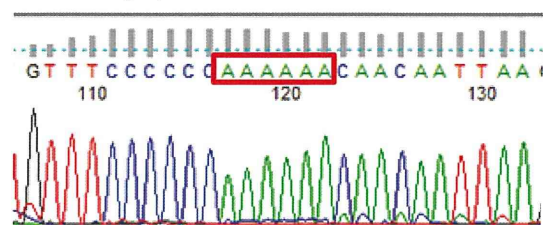
(a) Ab-std 局方試験用トウゴシツ
10A major, 7A minor



(b) Af-std 局方試験用ヒナタイノコズチ
9A major, 7A minor



(c) *A. aspera* ベトナム(葉)
6A major, 7A minor



(d) NIB-0189
8A major, 7A minor

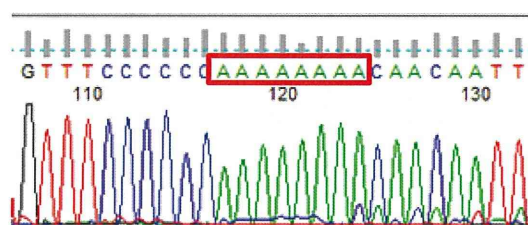


図1. *Achyranthes*属由来葉緑体DNA *atpF-atpA*領域のpoly (A)領域の変異 (波形)

(図表) ゴシュユの部

表1. 生薬ゴシュユ 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	モデル試料提供時形態	産地	等級等	導入年月日	モデル試料入手年
NIB-0423	原形	中国江西省			2011
NIB-0451	生	中国広西省			2011
NIB-0494	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2010
NIB-0495	生	中国広西省	大花	13-Jan-12	2009
NIB-0496	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2007
NIB-0497	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2005
NIB-0498	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2005
NIB-0499	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2004
NIB-0500	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2003
NIB-0501	生	中国広西省	中花	13-Jan-12	2003
NIB-0743	原形	中国安徽省		27-Feb-12	

表2. NCBI GenBankに登録されているゴシュユ属植物関連遺伝子の登録件数

Latin name	Other name	Hits	ITS	trnL-trnF	trnL	rpl16	matK	rbcL	psbA	atpB	other DNA	mRNA
<i>Tetradium ruticarpum</i>	ゴシュユ、ホンゴシュユ	74	32	8	6		1	2	1	1	2	21
<i>Tetradium daniellii</i>	シュユ	17	8	3	5						1	
<i>Tetradium glabrifolium</i>	ハマセンダン	15	6	1	4		1	1	1			1
<i>Tetradium trichotomum</i>	牛糺樹、茶棘	10	4	3	3							
<i>Euodia pubifolia</i>		7	2	2	1				1		1	
<i>Euodia hortensis</i>		6	2	2	2							
<i>Tetradium austrosinense</i>	華南呉茱萸	4	2	1	1							
<i>Euodia hupehensis</i>	Bee Tree	4			1	1	1	1				
<i>Melicope pteleifolia</i>	三椏苦, Thin Evodia	4					1	2			1	
<i>Tetradium melifolium</i>		3		1				1		1		
<i>Euodia simplicifolia</i>	單葉呉茱萸	3		1		1	1					
<i>Euodia hylandii</i>		2	1		1							

図1. ゴシユ属植物のITS1領域の分子系統樹

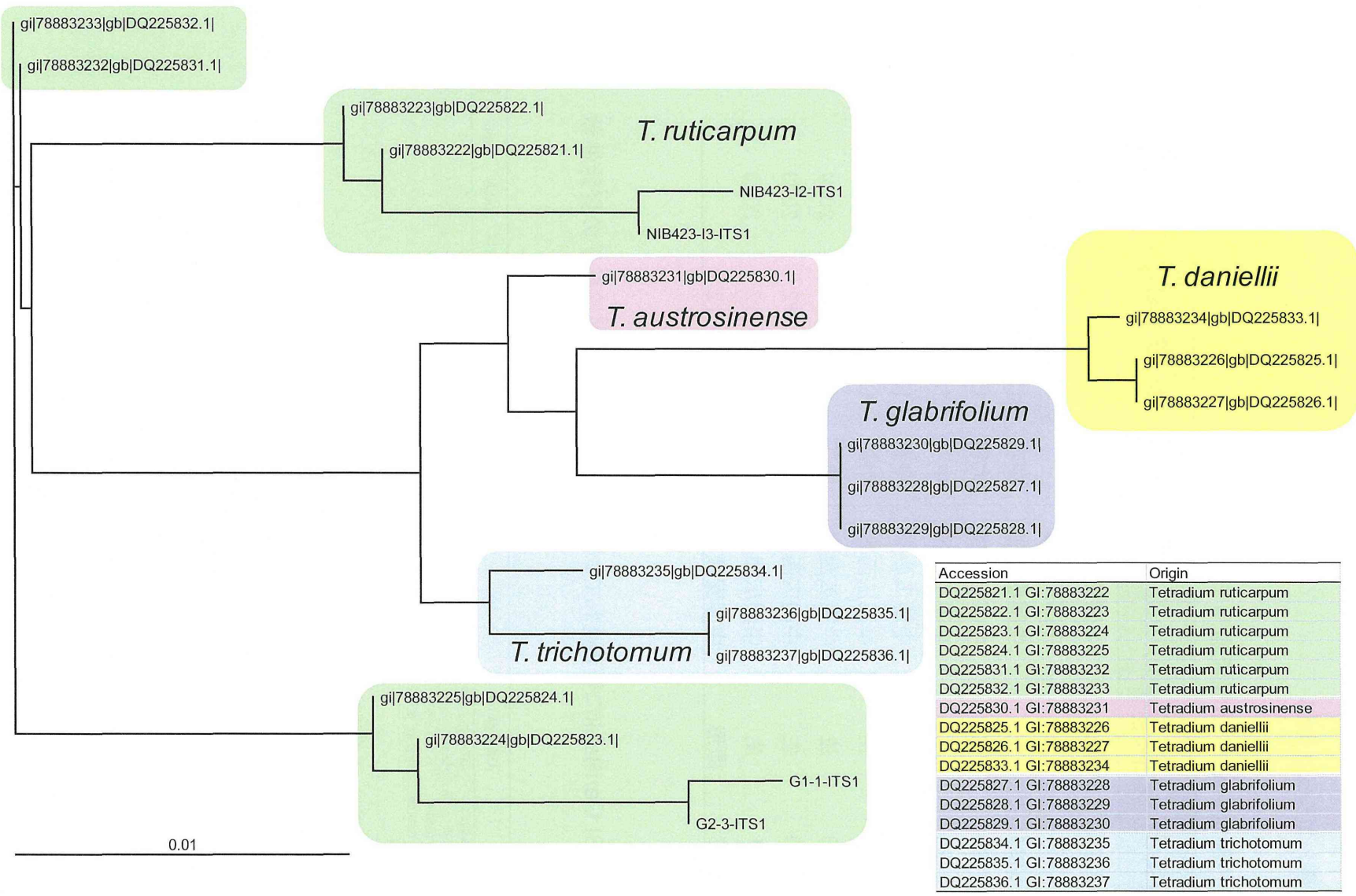


図2. ゴシユ属植物のITS2領域の分子系統樹

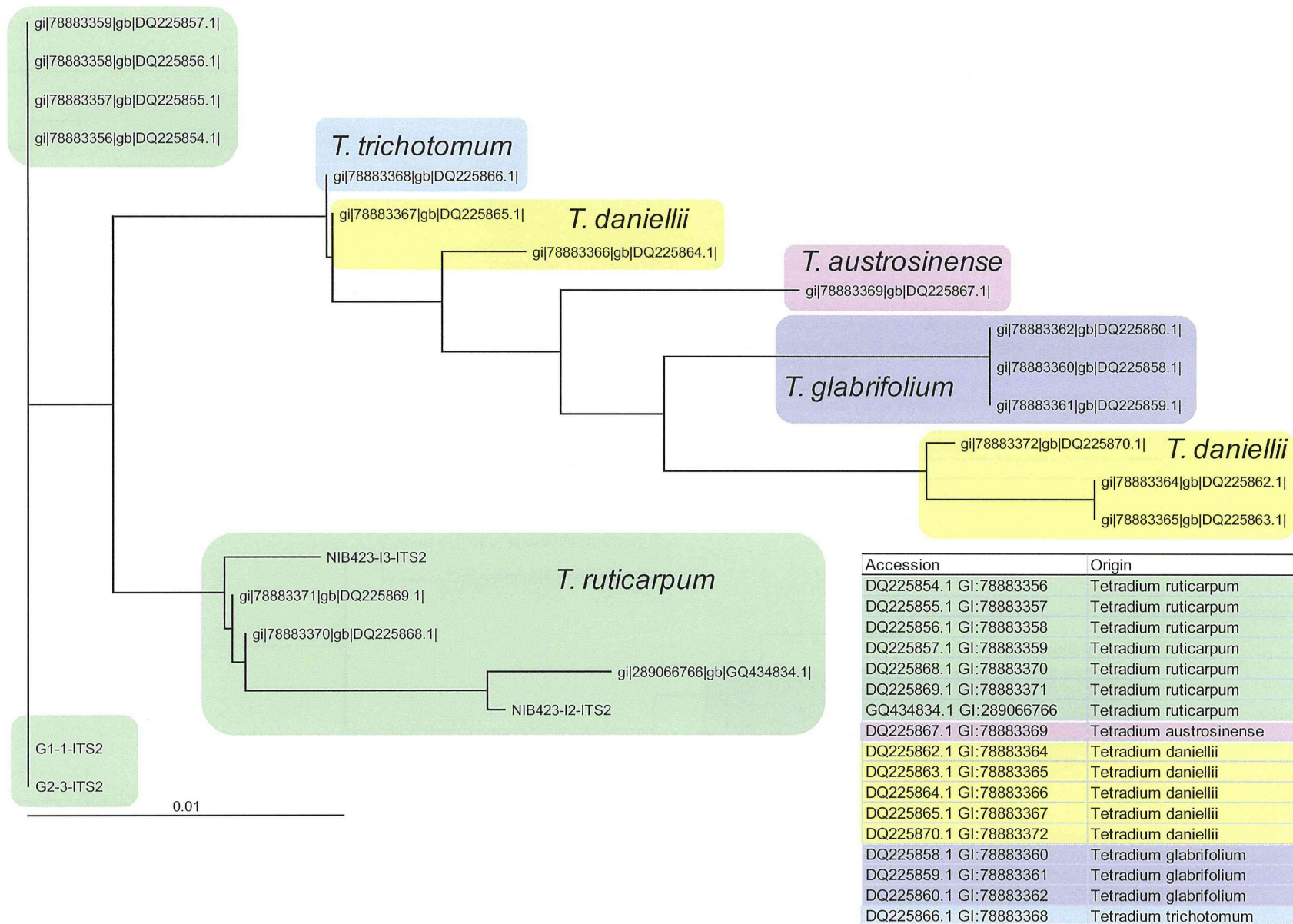
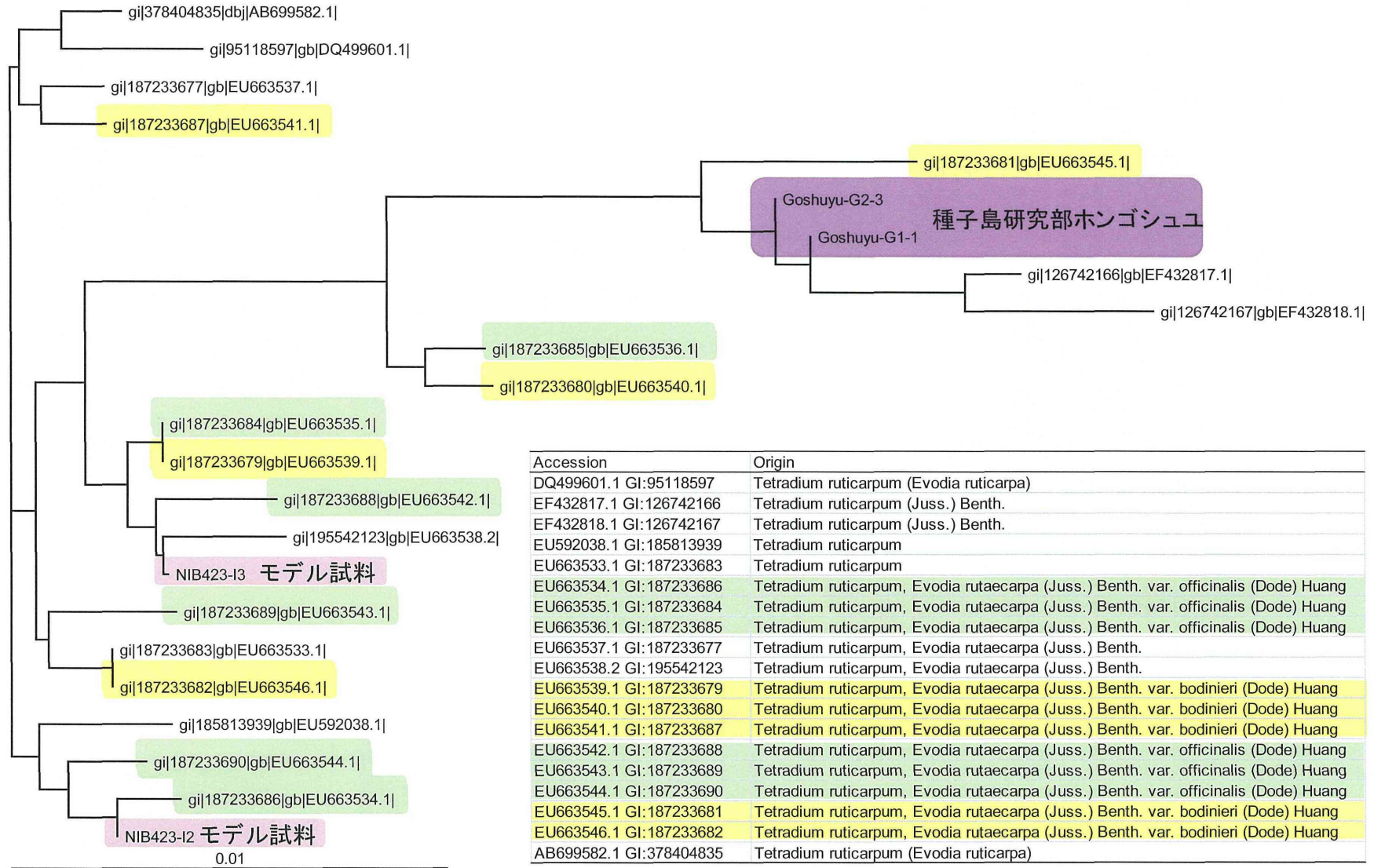


図3. ゴシユク属植物のITS1-ITS2領域の分子系統樹



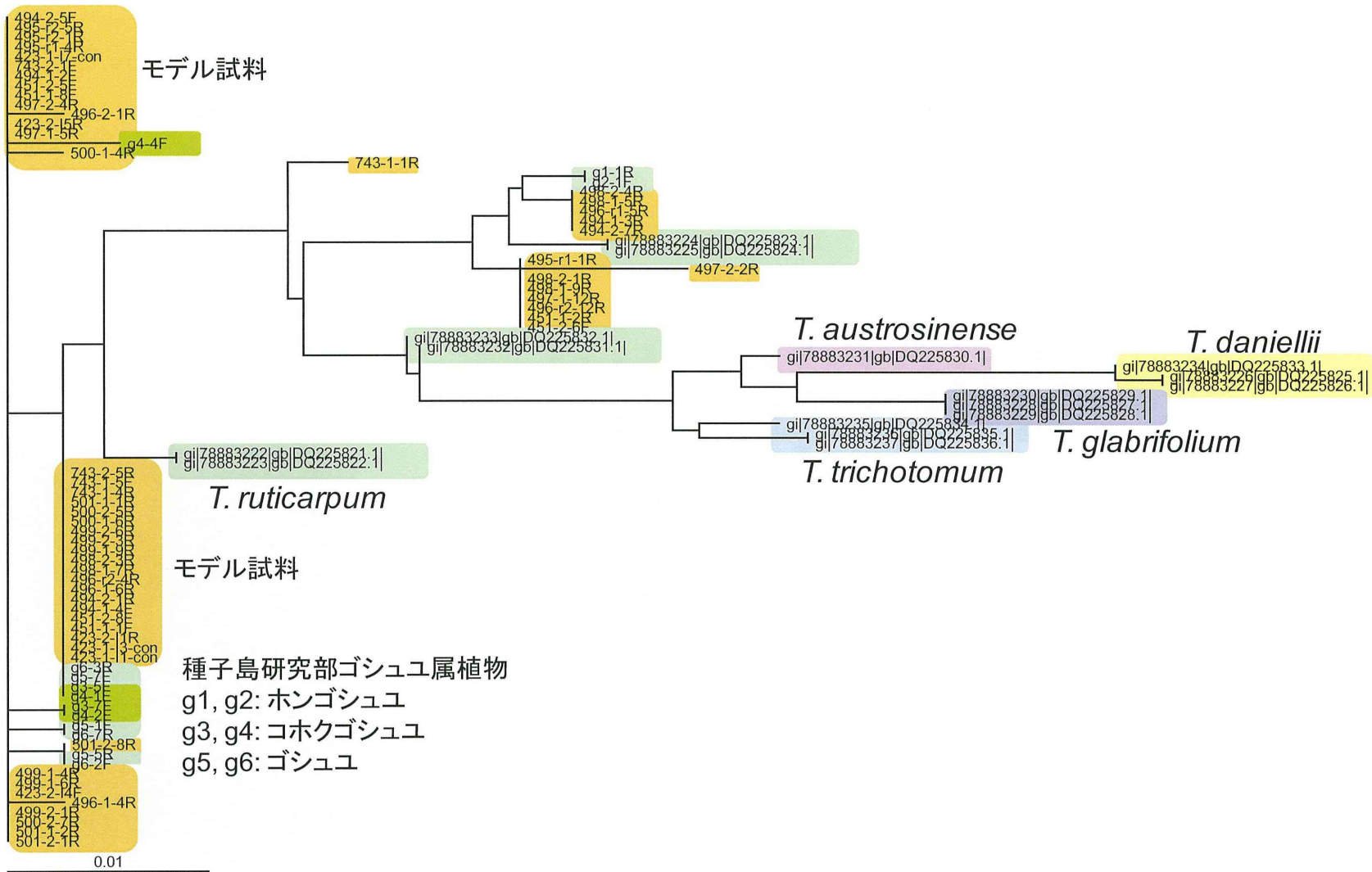


図4. モデル生葉及び種子島研究部試料を加えた
ゴシュユ属植物のITS1領域の分子系統樹

(図表) チンピの部

表1. 生薬チンピ 市場流通品モデル試料一覧

管理番号	生薬名	モデル試料提供時形態	産地	等級等	モデル試料入手年
NIB-0253	チンピ	刻み	中国湖北省		
NIB-0399	チンピ	生	中国浙江省		
NIB-0422	チンピ	刻み	中国湖北省	09年産	2011
NIB-0459	チンピ	生	中国陝西省		2011
NIB-0638	チンピ	刻み	中国浙江省		2011
NIB-0663	チンピ	生	中国浙江省		2011
NIB-0664	チンピ	刻	中国浙江省		2011
NIB-0665	チンピ	生	日本和歌山県		2011
NIB-0666	チンピ	刻	中国浙江省		2011
NIB-0667	チンピ	刻	中国浙江省		2010
NIB-0668	チンピ	刻	日本和歌山県		2009
NIB-0669	チンピ	刻	日本和歌山県		2009
NIB-0670	チンピ	刻	日本和歌山県		2008
NIB-0671	チンピ	刻	日本愛媛県		2009
NIB-0672	チンピ	生	中国浙江省		2006
NIB-0673	チンピ	生	中国広東新会産	4年物	1999
NIB-0674	チンピ	生	中国広東新会産	旧陳皮	1994
NIB-0752	チンピ	原形	日本		

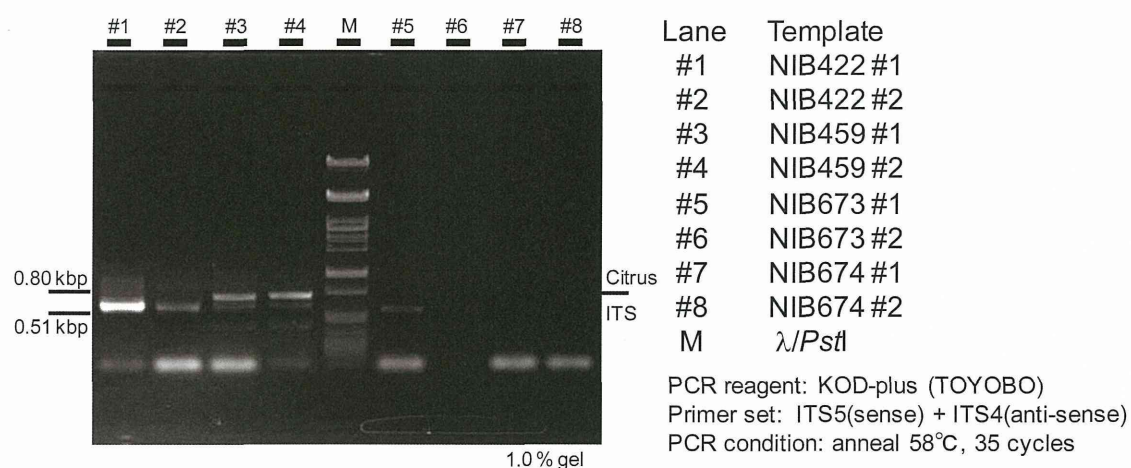


図1. チンピモデル生薬ITS領域の増幅結果 (例)

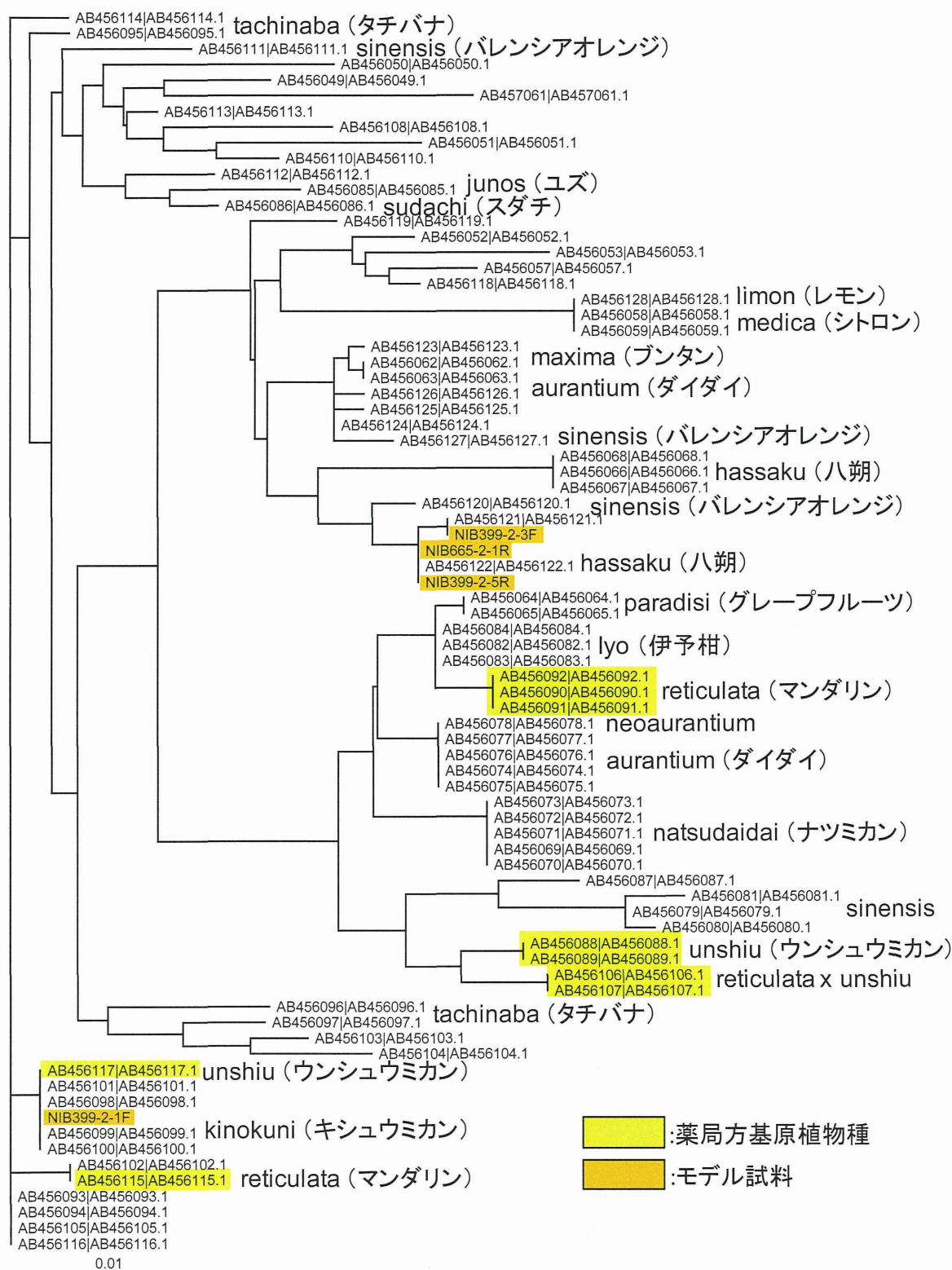


図2. ツムラグループの取得した*Citrus*属植物ITS領域（75配列）の分子系統樹

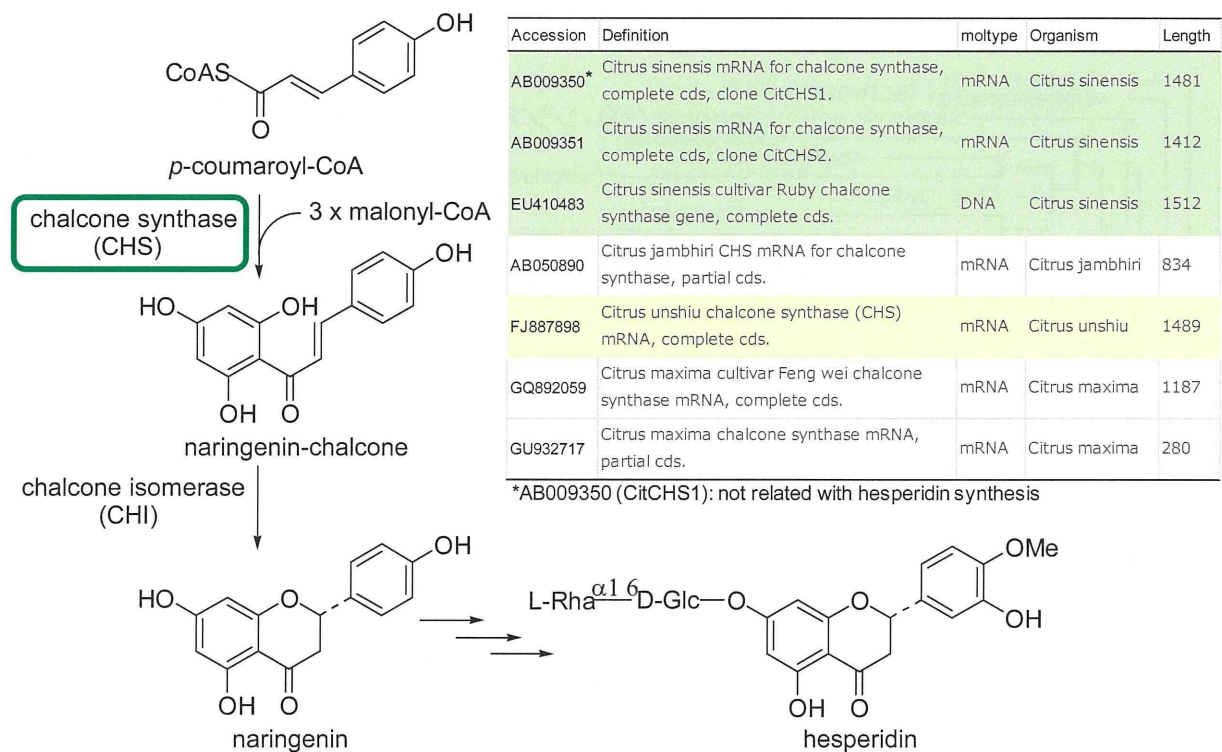


図3. ヘスペリジン合成経路とデータベース登録Citrus属CHS遺伝子

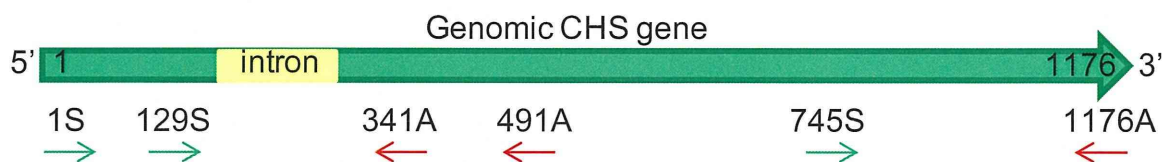
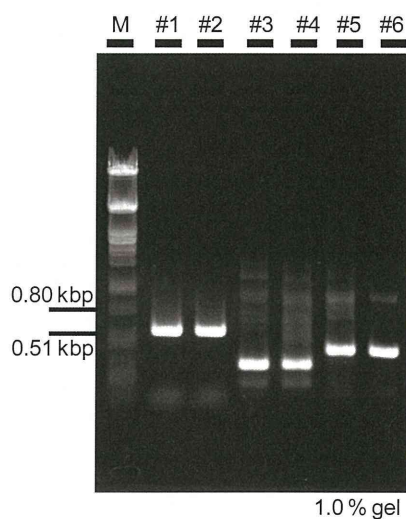


図4. CHSゲノムの遺伝子構造とプライマーの位置の概要



Lane Templates
 #1, 3, 5 ウンシュウミカン(圃場) #1
 #2, 4, 6 ウンシュウミカン(圃場) #2

Lane Primer sets
 #1, 2 CHS-1S + CHS-491A
 #3, 4 CHS-129S + CHS-341A
 #5, 6 CHS-745S + CHS-1176A

M λ PstI

PCR reagent: KOD-plus (TOYOBO)
 PCR condition: anneal 62°C, 30 cycles

図5. CHSゲノム（部分）の増幅結果

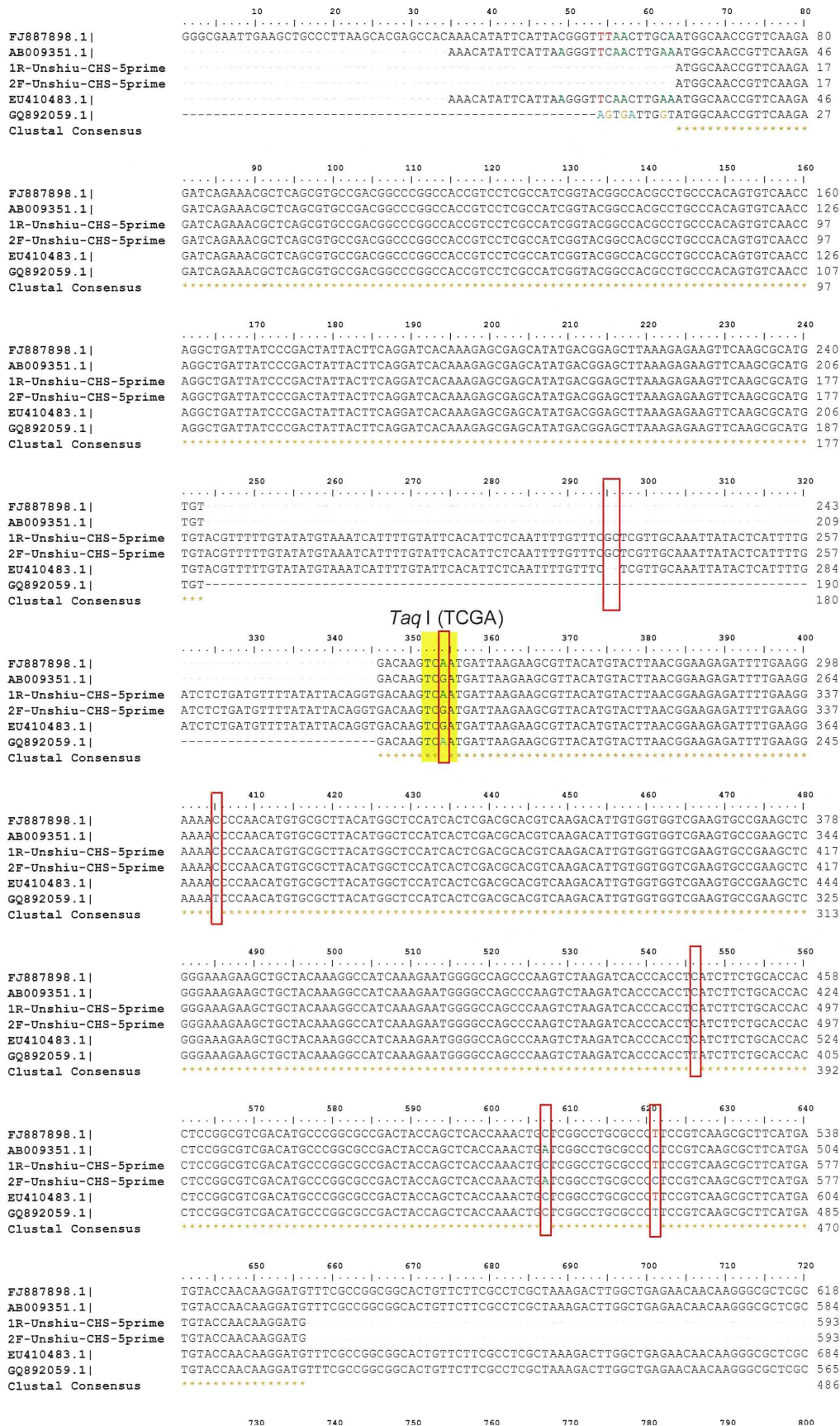


図6. Citrus属由来CHSとウンシュウミカン由来CHS2種のアラインメント

1R: CHS-A type (TaqI uncut), 2F: CHS-B type (TaqI cut)

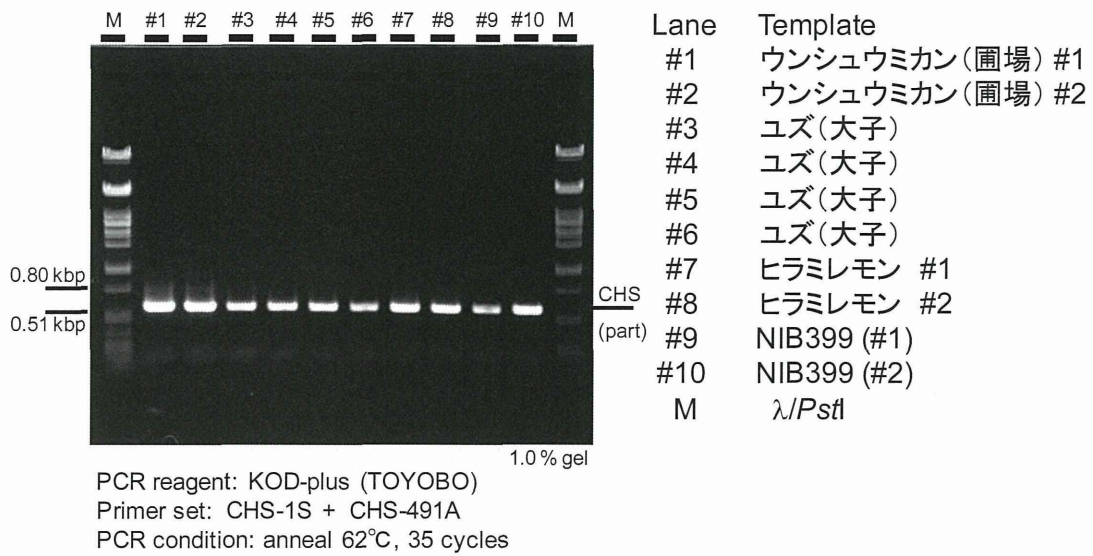


図7. CHSゲノム(N末側部分配列) 増幅の結果

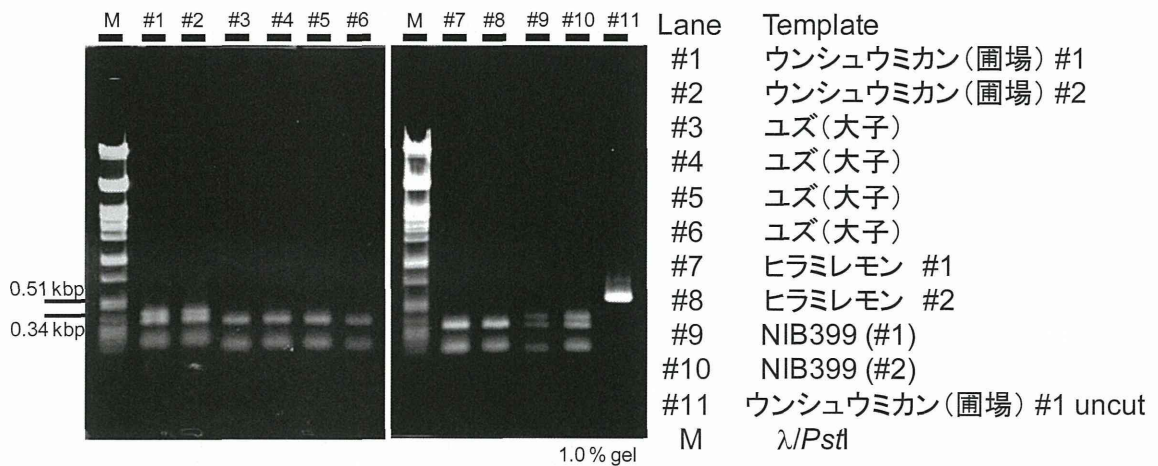


図8. PCR増幅産物のTaq I消化の結果

平成24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

研究分担課題 成分分析データ情報及びさく葉標本に関する研究
—生薬の成分分析データの収集と成分データベースフォーマットの構築に関する検討—

研究分担者 渕野 裕之 独立行政法人医薬基盤研薬用植物資源研究センター

薬用植物総合データベース構築の一環として、その中心情報となる成分分析情報集積のための生薬の抽出エキス作成、ならびに LCMS 測定を行った。生薬については関連業界団体の協力により国内市場品について収集を行った。昨年度に引き続き、提供された市場品生薬の熱水エキス作成を行い、作成したエキスについて LCMS の測定を行った。

産地、基原の異なる生薬の LCMS データを収集し、データベースの成分情報とした。今年度はオウギ、ボタンピ、チンピ、トウニン、タクシャ、カクコン、ハンゲ、ゴシュユ、バクモンドウ、キョウニン、ボウイ、サイシンの12品目、247種類の生薬エキスを作成した。LCMS は薬用植物資源研究センターにおける QSTAR XL を用いて ESI または APCI-TOFMS によるデータを測定した。集積した LCMS データはソフトウェア上でアライメントを行なった後、多変量解析により解析を行なった。産地、調製法、基原植物等で多変量解析を行なったところ、ビャクジュツ、チンピにおいて、明瞭な判別が出来ることが分かった。ビャクジュツに関してはほとんど生物活性が知られていない *Atractysucose* 類が熱水抽出エキスにおいて主要な成分として LCMS では検出され、今後の生物活性との相関が興味を持たれた。チンピに関しては実際に化合物を単離しその構造を確定した。結果的に基原植物を成分面から推定可能な重要なマーカー化合物を見出すに至った。

研究協力者

高橋 豊（エムエスソリューションズ株式会社）
大根谷章浩（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）
蓮沼 タミ（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）
樋口 かな（山梨県工業技術センター）

A. 研究目的

薬用植物総合データベースは、薬用植物に関わ

るあらゆる分野に対してその生産や利用に関して有益な情報を提供する日本で初めての薬用植物の総合情報データベースであり、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが中心となり、多くの大学や企業の協力のもと現在構築が進められている。このデータベースは、既に薬用植物資源研究センターが先立って公開を始めている薬用植物データベースを基盤とし、さらに成分情報や薬理活性情報、遺伝子情報、栽培情報、培養情報などあらゆる薬用植物のニーズに応える内容

を構築している。これらのデータベースに集積される予定の情報は、最終的には研究者や薬用植物栽培農家のみならず、生薬関連業界振興にも大いに役立つものとなると考えられる。

薬用植物の成分情報は今回の総合情報データベースの最も重要な部分を占めており、生薬の薬効や品質評価にも絡み、この分野の情報の充実がデータベースの根幹をなすものと考えられる。今回この薬用植物総合データベース構築に関する基盤整備の一環として、昨年度同様、成分情報に関して現在日本において流通している多くの生薬のLCMSを用いた検討を行い、基原や産地などのバラエティ比較を行うことを試みた。また生物活性結果とLCMSデータで多変量解析をかけることで活性化化合物を予測することも試みた。

B. 研究方法

まず昨年度に引き続き生薬関連業界に協力のもと収集された、現在市場に流通している生薬について、昨年度と同様に粉碎後に熱水抽出を2時間行い、凍結乾燥1週間により、最終的に熱水抽出エキス（いずれもアモルファス状）を得た。表1に、それらの生薬名、産地、等級などを示した。また表2には、作成した熱水抽出エキスの作成条件（使用生薬量、使用溶媒量、加熱条件、凍結乾燥日数、エキス収量）を示した。

これら熱水抽出エキスについて、我々はLCMSによる質量分析スペクトルを測定した。今年度は昨年抽出エキスを作成したビャクジュツのLCMS測定による多変量解析と今年度抽出を行ったチンピについてのLCMS測定と多変量解析を行った。チンピに関しては実際に化合物を単離してピークを特定して各産地別の検証を行った。

【抽出方法】熱水抽出2時間、熱時吸引濾過または遠心分離、凍結乾燥1週間で行なった。

LCMSの検討

【条件検討内容】

ビャクジュツ

試料: 1mg/mLの濃度になるように水/メタノール (1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分離、上澄を注入。ESI+: 20 μ L, ESI-: 10 μ L。

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

ESIニードル電圧 +5,000 V, -4,000 V

脱溶媒温度 450 $^{\circ}$ C

測定m/z範囲 100~2,000

CID電圧 \pm 30V

Declustering Potential 65 V

HPLC : Agilent 1100

カラム PhenomenexODS, 2.0 \times 100

移動相 A=0.1% 酢酸/超純水、B=0.1% 酢酸/アセトニトリル

B=5-70% (30min)-100% (38min)

移動相流量 0.2 mL/min

チンピ

試料: 1mg/mLの濃度になるように水/メタノール

(1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分離、上澄を注入。注入量10 μ L

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

APCIコロナ電流4~5 μ A

脱溶媒温度500 $^{\circ}$ C

測定m/z範囲100~2,000

CID電圧 \pm 30V

Declustering Potential 65 V

HPLC : Agilent 1100

カラムPhenomenexODS, 2.0 \times 100mm

移動相A=0.1% 酢酸/超純水、B=0.1% 酢酸/アセトニトリル

B=5-70% (30min)-100% (35 min)-100% (38min)

移動相流量0.2 mL/min

シャゼンシ

試料: 1mg/mLの濃度になるように水/メタノール

(1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分離、上澄を希釈して0.2 mg/mLとし、10 μ Lを注入。

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

ESIニードル電圧+5,000 V, -4,000 V

脱溶媒温度450 $^{\circ}$ C

測定m/z範囲100~2,000

CID電圧 \pm 30V

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=5-70% (30min)-100% (38min)
移動相流量0.2 mL/min

ブクリョウ

試料:2mg/mLの濃度になるように水/メタノール
(1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分
離、上澄を注入。注入量: 正イオン検出40 μL、負
イオン検出20 μL

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

APCIコロナ電流4~5 μA
脱溶媒温度500°C
測定m/z範囲100~2,000
CID電圧±40V
Declustering Potential 65 V

HPLC : Agilent 1100

カラム東ソーTSK-gel ODS, 4.6×150 mm
移動相A=0.1% 酢酸/超純水、B=0.1% 酢酸
/アセトニトリル
B=5-65% (30min)-95% (35 min) -95% (38min)
移動相流量0.8 mL/min

ボタンビ

試料:1mg/mLの濃度になるように水/メタノール
(1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分
離、上澄を注入。注入量10 μL。

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

ESIニードル電圧+5,000 V, -4,000 V
脱溶媒温度450 °C
測定m/z範囲100~2,000
CID電圧±30V
Declustering Potential 65 V

HPLC : Agilent 1100

カラムPhenomenexODS, 2.0×100 mm
移動相A=0.1% 酢酸/超純水、B=0.1% 酢酸
/アセトニトリル
B=5-70% (30min)-100% (35 min) -100% (38min)
移動相流量0.2 mL/min

カッコン

試料:1mg/mLの濃度になるように水/メタノール
(1/1) 溶液を加え、1分間超音波照射の後遠心分
離、上澄を150 μg/mL濃度になるように希釈して注
入。注入量: 正イオン検出6 μL、負イオン検出10 μL。

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

ESIニードル電圧+5,000 V, -4,000 V
脱溶媒温度450 °C
測定m/z範囲100~2,000
CID電圧±30V
Declustering Potential 65 V

HPLC : Agilent 1100

カラムインタクトCadenza CD-C18, 2.0×150 mm,
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=5-60% (30min)-100% (35 min) -100% (38min)
移動相流量0.2 mL/min
カラム温度40°C
UV検出波長230 nm

マオウ

MS : AB Sciex, QSTAR-XL

測定 m/z 範囲 150 - 2000
スプレー電圧: 4000 V (正イオン) 、 -3000 V
(負イオン)
CID 電圧 35 V

HPLC: Agilent 1100

カラム関東化学 Mightysil ODS 2.0×150 mm
移動相: A=0.1%酢酸/H₂O, =0.1%酢酸/MeCN
B=5% - 70% (30 min)-100% (35 min)-100% (38
min)
流量: 0.2 mL/min

多変量解析

上記測定条件において測定した LCMS データ
をABSciex社製MerkerViewにてアライメントを
行なった。そのデータをテキストファイル (タブ
形式) に落とし、SIMCA P+ (インフォコム社製)
にて解析を行なった。

D. 考察

ビャクジュツ

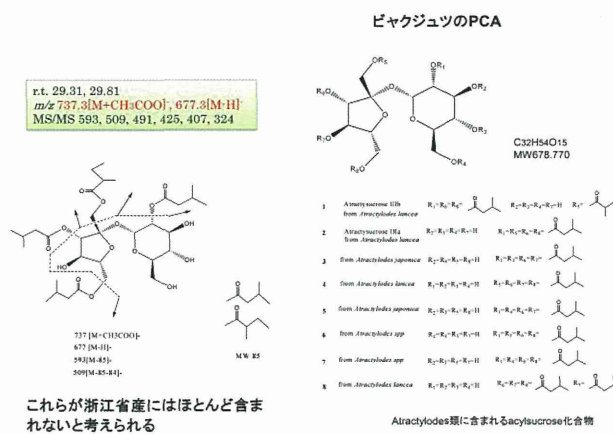
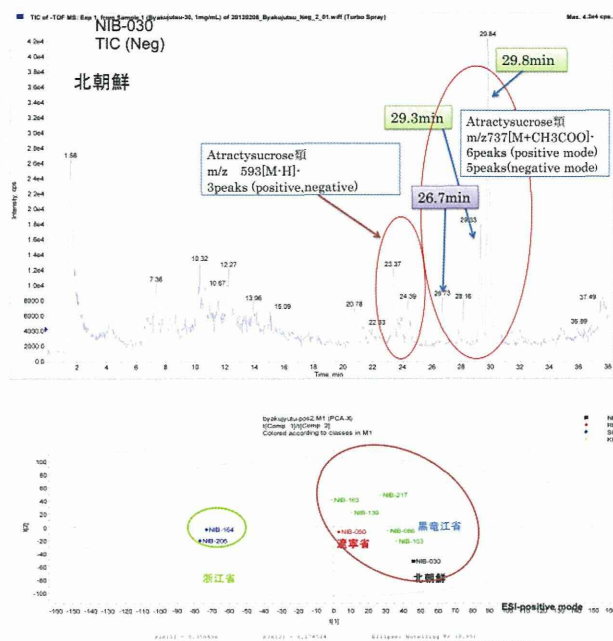
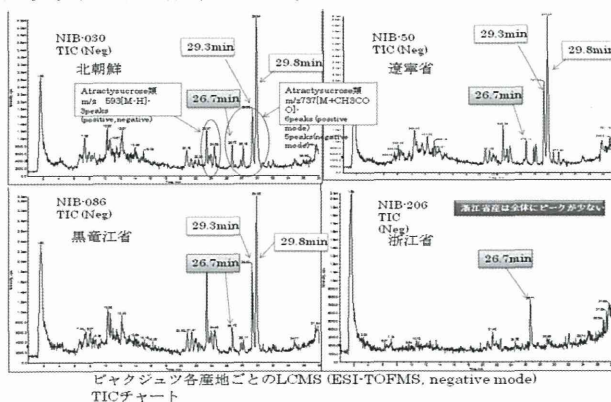
収集されたモデル試料は中国産、北朝鮮産があるがそのTICにおいては浙江省産のみが異なるパターンを示し、それ以外はまったく同じパターンであった。

保持時間27.9~31.5分と同じ分子質量をもつ成分のピークが、正イオン検出では6本、負イオン検出では5本観測されるが、それら成分の正イオン検出によるマススペクトルでは、アンモニウム付加イオンが検出される。そのイオンからのプロダクトイオンスペクトルでは、全ての成分において類似のプロダクトイオンが確認でき、これら6ピークは、全て異性体の関係にあると考えられた。

23.4~24.4分には、整数分子質量594の成分が3ピーク観測される。これらの正のプロダクトイオンスペクトルにおいても、前述成分においても確認されている m/z 331イオンが観測されているため、これらは共通の骨格をもつ化合物であることが推測された。

これらの構造についてはビャクジュツ、ソウジュツの成分文献検索においては対応する分子量に *atractysucrose* が存在する。これは *sucrose* に有機酸が結合したものであり、その結合位置が異なる異性体群であると推測された。

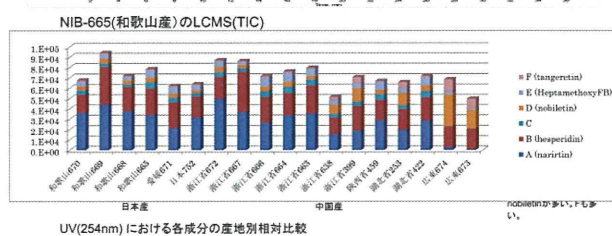
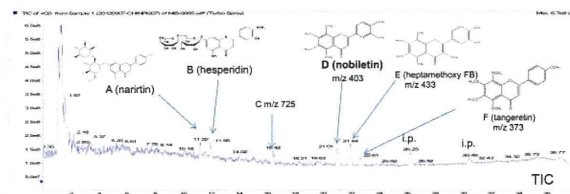
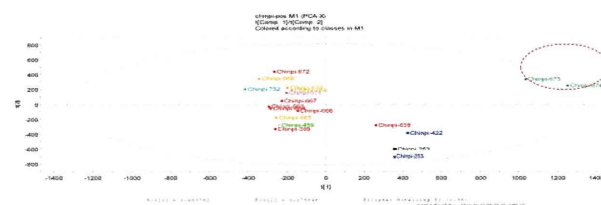
熱水抽出エキスにおいてはビャクジュツの特徴的成分でもある精油成分は APCI においてもほとんど検出されなかったが、漢方薬の煎じ方法である熱水抽出では *atractysucrose* がメインで検出されるという事実は今後のこれらの生物活性にからめ大変興味深い結果である。



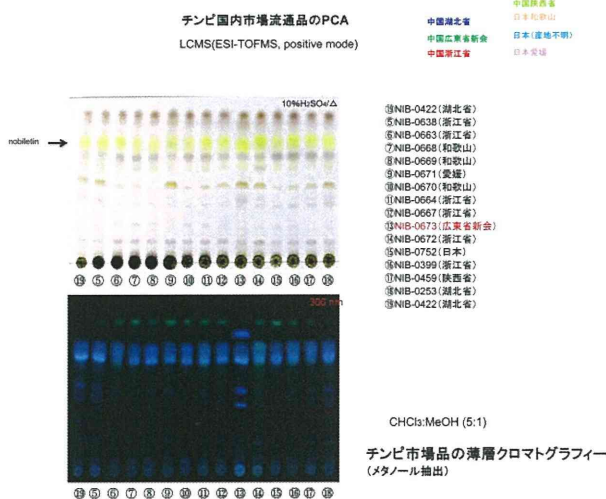
チンピ

チンピは市場流通品 18 種類 (浙江省 7、陝西省 1、吉林省 1、湖北省 1、広東省新会 2、和歌山 4、愛媛 1、日本産地不明 1) が収集された。中国産のもの以外に日本産が 6 種類ある。それらの外観は中国広東省新会産がかなり黒くまた入手年度も古いものとなっている。チンピはいわゆる古いものほど良質とされる「六陳」のひとつに数えられており、一般にはこの新会産のチンピは良いものとして知られている。これら収集したチンピの LCMS からは精油成分が失われておりフラボノイド類が主に検出された。主成分分析を行うと広東省新会産のみが全く異なるグループを形成した。TLC においても新会産は他とは違う成分パターンを示した。これらの主要フラボノイド類に関しては実際にウチダ和漢薬製チンピ (500 g) を用いて分離精製を行い、単離して構造を確定した。

検出されたフラボノイド類の含量を比較すると例えば浙江省産の中でもかなりの幅があることが分かった。新会産チンピは最も良質とされているが、他産地と比較して Nobiletin 含量が突出して多く、逆に Narirtin が少なかった。遺伝子鑑定の結果を待たねばならないが、新会産は *Citrus leucocarpa* と推定される。



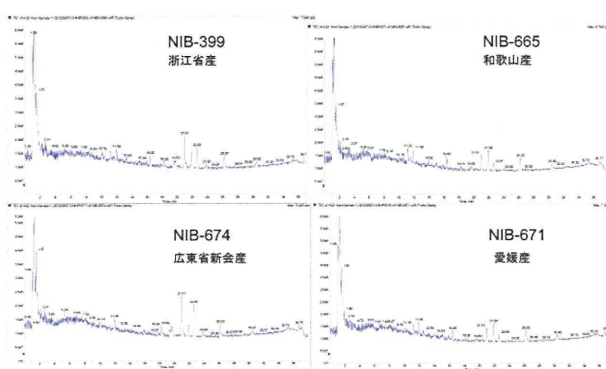
UV(254nm)における各成分の産地別相対比較



テンピ国内市場流通品のPCA
LCMS(ESI-TOFMS, positive mode)

- ③ NIB-0422 (湖北省)
- ⑤ NIB-0638 (浙江省)
- ⑥ NIB-0663 (浙江省)
- ⑦ NIB-0668 (和歌山)
- ⑧ NIB-0669 (和歌山)
- ⑨ NIB-0671 (安徽)
- ⑩ NIB-0670 (和歌山)
- ⑪ NIB-0664 (浙江省)
- ⑫ NIB-0667 (浙江省)
- ⑬ NIB-0673 (広東省新会)
- ⑭ NIB-0672 (浙江省)
- ⑮ NIB-0752 (日本)
- ⑯ NIB-0399 (浙江省)
- ⑰ NIB-0459 (陝西省)
- ⑱ NIB-0253 (湖北省)
- ⑲ NIB-0422 (湖北省)

CHCl₃:MeOH (5:1)
テンピ市場品の薄層クロマトグラフィー
(メタノール抽出)



テンピ各産地ごとのLCMS (ESI-TOFMS, positive mode) TICチャート

シャゼンシ

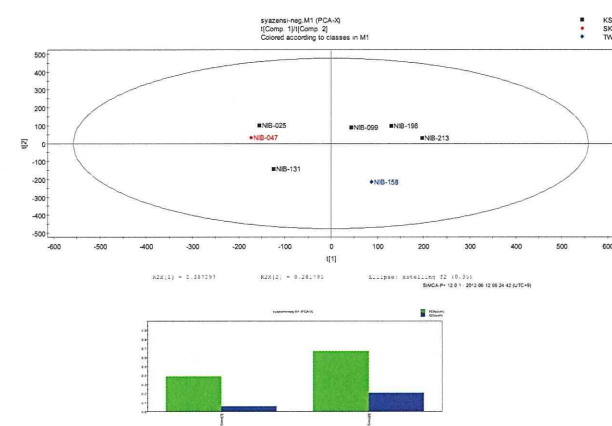


図 PCA (negative mode)信頼度が低い

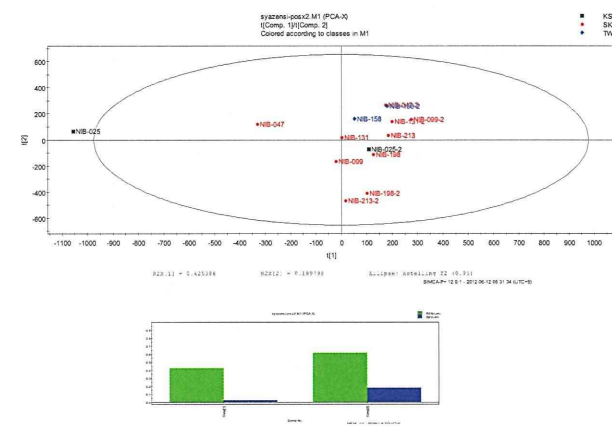


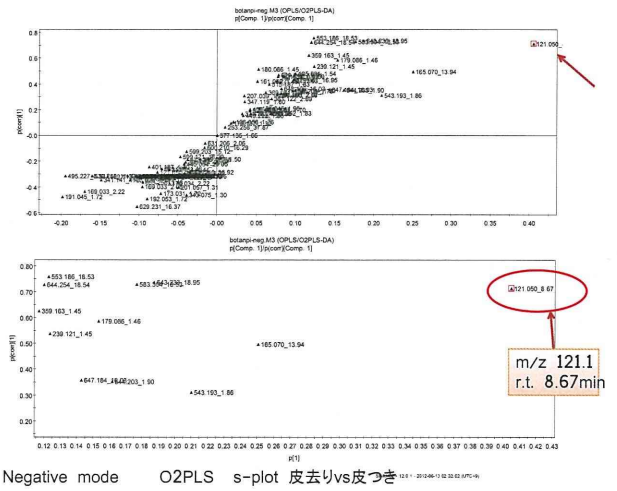
図 PCA (positive mode)信頼度が低い

シャゼンシは中国江西省が5種類、広西省が1種類、浙江省1種類の計7種類の市場流通品が有るが、それらの主成分分析では negative mode, positive mode 両方において信頼性の低いデータとなった。これらは成分的な産地による差はあまりないと考えられた。

ボタンピ

ボタンピは市場品において皮付きと皮去りがある。産地はほとんどが安徽省であり、浙江省、山

東省がそれぞれ1種類づつある。PCAにおいては明確なグループ分けはなされなかった。そこで皮付きと皮取りについてOPLS半判別分析を行なった結果、明確に判別することが可能であったが、このことは皮の成分が半判別することにはほかならない。S-plotの検討においてはそれらのマーカーとなる成分が特定されたがpositive modeとnegative modeでは異なる成分が特定された。positiveではm/z 603と比較的大きな分子量の成分がマーカー成分として推定された。これらの成分の特定に関しては今後検討する。



Negative mode O2PLS s-plot 皮取りvs皮つき

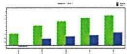
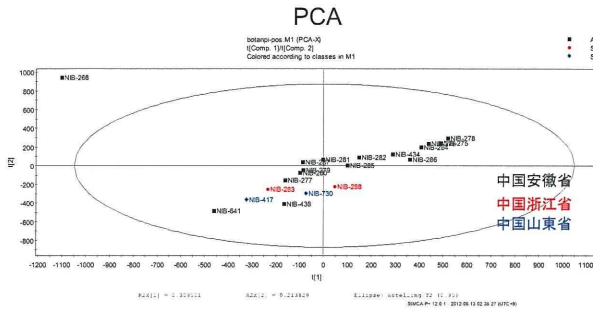


図 ボタンピの主成分分析

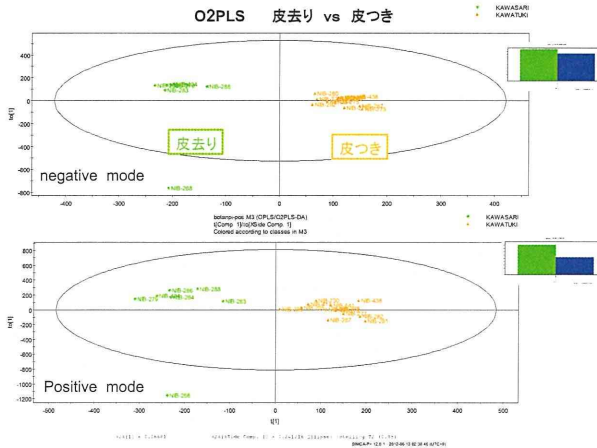
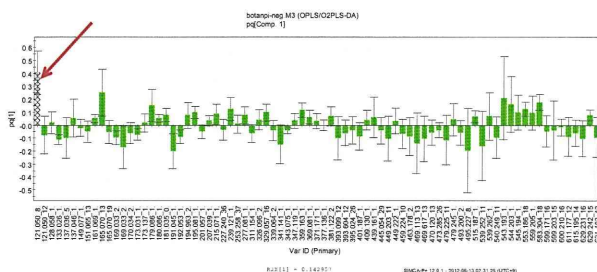
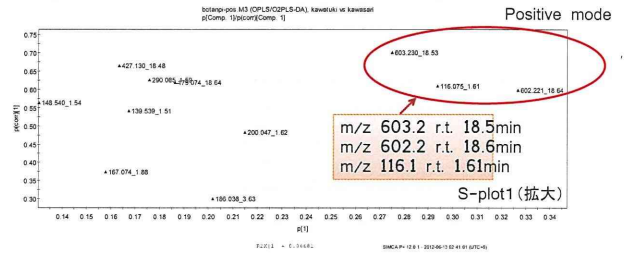
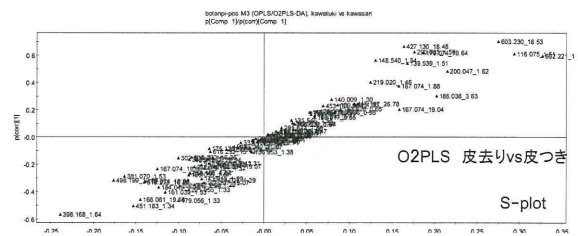


図 皮取り、皮付きのO2PLS



Negative mode O2PLS 皮取りvs皮つき



マオウ

マオウは収集された市場品はすべて中国産であり、内9種類は内モンゴル産、1種類は甘粛産、1種類が新疆産である。UVクロマトグラムにおいて、NIB-0034(新疆産)とNIB-0210(甘粛省産)の2エキスは保持時間17.4分のピークが極端に大きく、その他のエキスと明らかに異なるクロマトグラムを示した。それらの主成分分析においてはn=2において明確なグループが形成されるもののほとんどが内モンゴル産のものであることから信頼性はなく、今後他の産地の試料をさらに収集して再度検討を行う必要がある。

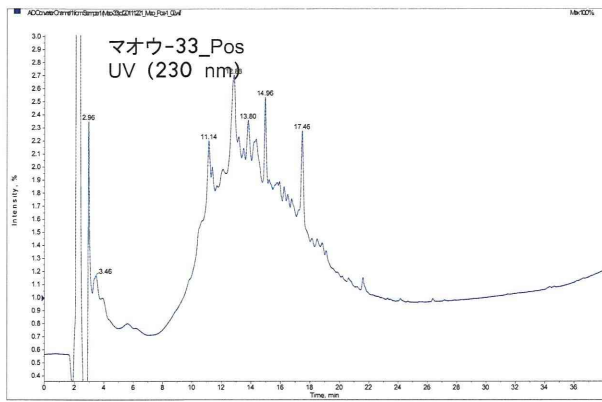


図 NIB-0033 (内モンゴ産) のUV

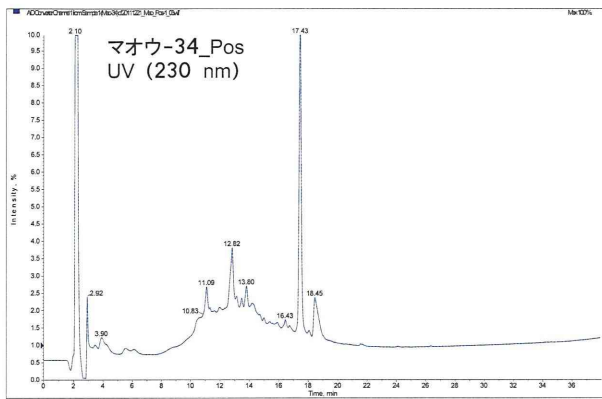


図 NIB-0034 (新疆産) のUV

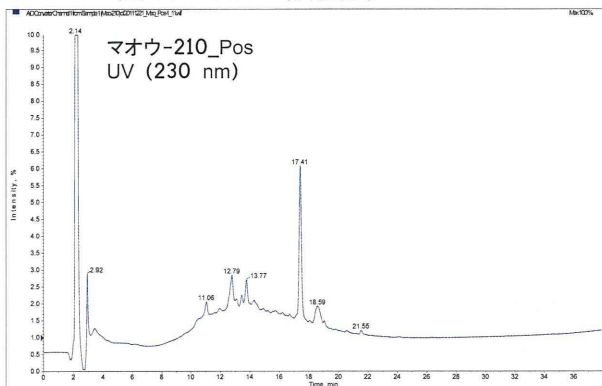
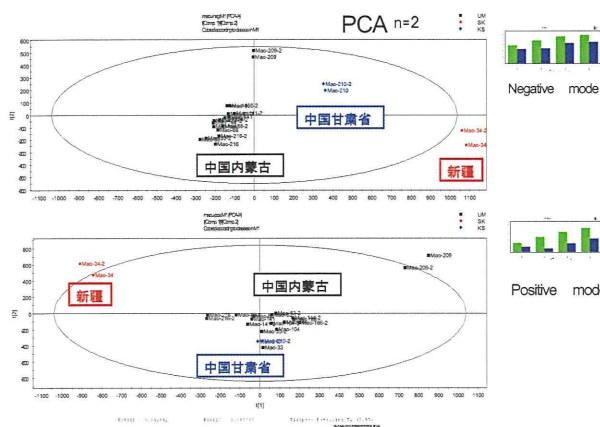


図 NIB-0210 (甘粛省産) のUV



ブクリョウ

ブクリョウエキス9試料の正負両イオン検出によるLC-APCI-MS/MSのデータについて検討した。正イオン検出データにおけるTICクロマトグラムでは、バックグラウンドスペクトルの強度が高く、ピークは余り観測されなかった。正負両イオン検出とも、UVクロマトグラムおよびTICクロマトグラムでは、エキス(産地)による大きな違いは見られなかった。観測された正負のイオンデータを表3に示した。正イオン検出データ中、 m/z 471および m/z 469は、それぞれEburioic acidおよびDehydroeburioic acidの $[M+H]^+$ に相当する。保持時間35.34分に正イオン検出で観測されている m/z 469イオンは、スペクトル上に18 Da大きな m/z 487イオンが観測されており、負イオンデータのほぼ同じ保持時間に m/z 485イオンが観測されていることから、 m/z 487イオンの脱水ピークである可能性が高いと思われた。

カッコン

カッコンの収集した市場品は25種類と多いが、ほとんどが中国産(21種類)と韓国産(4種類)である。表4にその検出された正負イオンピークならびにプロダクトイオンピークを示した。既知成分に相当する m/z 値のイオンが観測されたものについては、化合物名を示したが標準品を当てていないため推定である。Daidzin, Puerarinなど質量416の化合物については、正イオン検出で m/z 417、負イオン検出で m/z 415でトレースした抽出イオンクロマトグラム(XIC)において、 m/z 417のXICで5本、 m/z 415のXICでは6本のピークが観測された。このDaidzin, やPuerarinおよびそれらの異性体と考えられる複数の成分について、 m/z 417($[M+H]^+$)イオンからのプロダクトイオンスペクトルでは二つのパターンがあり、16.23分と17.52分のスペクトルでは、 $[M+H]^+$ からのグルコースの脱離に相当する m/z 255イオンが顕著に観測されている。他の3成分のプロダクトイオンスペクトルについては、グルコース脱離に相当するイオンは観測されず、16.23分と17.52分に観測されている m/z 417イオンは、Daidzeinの配糖体であるDaizinおよびその異性体 $[M+H]^+$ と推定される。

正イオン検出で m/z 579、負イオン検出で m/z 577でトレースしたXICにおいて、それぞれ7本のピーク

クが観測され、Daidzin, や Puerarin の $[M+H]^+$ (m/z 417) との質量差が 162 であることから、Daidzin, や Puerarin の構造に対してグルコースが一つ付いた構造であると考えられた。これらについては今後標準品を用いた検証を行っていく予定である。

E. 結論

ビャクジュツに関しては産地により大きく異なる LCMS パターンを与えるに至ったが、今回の熱水抽出エキスにおいて検出されるメインのピークは *atractysucrose* 類のみであった。一般にビャクジュツやソウジュツは精油成分が注目されているが、それら精油成分は今回の熱水抽出エキスからは APCI を用いても検出ができなかった。漢方薬は熱水で抽出するものであり、そのエキスから *atractysucrose* 類のみが明瞭に検出されるとの結果は、これらの生物活性がほとんど知られていないことから今後これらの活性との相関に大いに興味が持たれるところである。

またチンピにおいては一般には広東省新会産のものが良質といわれているが、LCMS におけるパターンは明瞭に差が見られた。精油成分は熱水抽出エキスにおいてはほとんど失われていたが、今回主要フラボノイドに関しては実際に分離精製を行い完全に構造を確定するに至った。それらのフラボノイド類はほとんどが高度にメチル化されたものであったが、産地ごとの含量を比較したところ、新会産のみが明確にパターンが異なっていた。これは新旧の差というよりは一般に言われているように基原植物が新会産は *Citrus unshiu* ではなく *C. leucocarpa* と考えるのが妥当と思われるが、正確なところは遺伝子での鑑別結果が待たれるところである。

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

- 1). 湊野裕之: 薬用植物総合情報データベースの成分分析情報について. 第41回生薬分析シンポジウム (2012, 11. 29, 大阪)
- 2). 湊野裕之: LCMS、LC-NMR/MS を用いた生薬の品質評価について. 第 258 回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (2012. 12. 27, 東京)
- 3). 湊野裕之、大根谷章浩、川原信夫、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—ビャクジュツ、チンピ市場流通品の成分比較について—. 日本生薬学会第 59 回年会 (2012. 9. 17-18, 千葉)
- 4). 大根谷章浩、湊野裕之、高橋豊、川原信夫: 国内流通生薬の NO 産生抑制活性と LC/MS メタボローム解析 (その 4). 日本薬学会第 133 年会 (2013, 3/28-30, 横浜)
- 5). 田内伽奈、和田浩志、湊野裕之、大根谷章浩、飯田修、川原信夫: ショウキョウの NO 産生抑制活性成分に関する研究. 日本薬学会第 133 年会 (2013, 3/28-30, 横浜)

H. 知的所有権の取得状況

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 今年度の研究事業で用いた生薬市場品（50音順）

管理番号	生薬名	初期(エキス)導入量(g)	モデル試料提供時形態	産地	等級等	モデル試料入手年
NIB-0267	オウギ	1000	刻み	中国河北省		
NIB-0415	オウギ	1000	原形	中国陝西省	5等	2011
NIB-0643	オウギ	1000	刻み	中国河北省		2011
NIB-0732	オウギ	1000	輪切り	中国内蒙古自治区	1~2cm輪切り	
NIB-0440	オウギ	506	刻み	中国四川省		2011
NIB-0299	オウギ	191	刻み	中国甘肅省	9-4071	2010
NIB-0300	オウギ	187	刻み	中国河北省	9-4069	2010
NIB-0298	オウギ	171	小口切	中国甘肅省	9-4258	2011
NIB-0302	オウギ	141	小口切	中国河北省	9-3602	2008
NIB-0301	オウギ	138	小口切	中国陝西省	9-3638	2008
NIB-0303	オウギ	98	生	中国甘肅省 晋耆	-	1998
NIB-0257	カッコン	1000	刻み	韓国		
NIB-0413	カッコン	1000	角切	中国河北省		2010
NIB-0414	カッコン	1000	角切	中国四川省		2010
NIB-0634	カッコン	1000	角	中国四川省		2011
NIB-0746	カッコン	1000	刻	中国湖北省		
NIB-0454	カッコン	511	角切	中国安徽省		2011
NIB-0542	カッコン	348	角	中国四川省		2005
NIB-0540	カッコン	258	角	中国四川省		2007
NIB-0543	カッコン	257	角	中国四川省		2005
NIB-0544	カッコン	256	角	中国四川省		2005
NIB-0541	カッコン	240	角	韓国	大角	2006
NIB-0552	カッコン	239	角	中国湖北省		2011
NIB-0546	カッコン	225	角	中国四川省		2002
NIB-0539	カッコン	222	角	中国四川省		2008
NIB-0536	カッコン	183	角	中国湖北省	大角	2011
NIB-0534	カッコン	180	角	中国湖北省		2011
NIB-0538	カッコン	159	角	中国湖北省		2010
NIB-0537	カッコン	145	角	中国湖北省		2010
NIB-0547	カッコン	105	角	中国四川省		2002
NIB-0535	カッコン	93	角	韓国		2011
NIB-0545	カッコン	76	角	中国四川省		2004
NIB-0548	カッコン	59	角	中国安徽省		2000
NIB-0549	カッコン	47	角	中国四川省		1998
NIB-0551	カッコン	23	角	韓国		1986
NIB-0550	カッコン	17	角	中国四川省		1996
NIB-0272	キョウニン	1000	原形	中国河北省		
NIB-0425	キョウニン	1000	原形	中国陝西省	苦	2009
NIB-0426	キョウニン	1000	原形	中国河北省	苦	2009
NIB-0633	キョウニン	1000	刻み	中国山東省		2011
NIB-0744	キョウニン	1000	原形	中国四川省		
NIB-0452	キョウニン	516	生	中国河北省		2010
NIB-0505	キョウニン	458	生	中国河北省		2010
NIB-0508	キョウニン	444	生	中国河北省		2009