

LC-NMR/MS を用いた生薬の品質評価法に関する研究 (1) —生薬ゴシツの栽培および加工調製法について—

淵野 裕之^{a*}, 菱田 敦之^a, 赤木 謙一^b, 木内 文之^c, 川原 信夫^a

^a 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,

^b 独立行政法人医薬基盤研究所共用機器実験室, ^c 慶應義塾大学薬学部

Quality Evaluation of Crude Drugs Using LC-NMR/MS (1) in the Cultivation and Processing of Achyranthes Roots

Hiroyuki Fuchino^{a*}, Atsuyuki Hishida^a, Ken-ichi Akagi^b, Fumiuyuki Kiuchi^c
and Nobuo Kawahara^a

^a Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan; ^{bc} Section of Laboratory Equipment, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; ^c Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

(Received June 30, 2011)

The effects of growth stage, top-pinching, and drying temperature on the saponin constituents of *Achyranthes* roots were examined. No marked difference in saponin constituents was observed either between the two original plants, *Achyranthes fauriei* and *A. bidentata*, or with and without top-pinching in cultivated *Achyranthes* roots compared by the TLC method. Comparison of *Achyranthes* roots dried at various temperatures using TLC, HPLC and LC-NMR/MS techniques indicated that achyranthosides in the roots of *A. fauriei* changed to chikusetsusaponins IVa, V and related compounds in drying at higher temperatures, and this change was remarkable above 70°C.

Keywords: *Achyranthes fauriei*, *Achyranthes bidentata*, Amaranthaceae, LC-NMR/MS, quality evaluation

1. 緒 言

生薬は植物や動物、鉱物から製するものであり、天産品であるがゆえに成分の個体差がときに大きく、また製品になるまでの加工調製法の差で成分含量に差が生じてくる場合がある。生薬の品質の差は、その生薬を用いる漢方処方薬の薬効にも影響する可能性があるため、生薬の品質評価法の設定は漢方薬の薬効を保証するためにも大変重要である。

生薬ゴシツは、ヒユ科ヒナタイノコズチ *Achyranthes fauriei* Leveille et Vaniotto または *A. bidentata* Blume の根であると日本薬局方 (日局) に規定されており、牛車腎気丸、疎経活血湯などの漢方処方に配合される。中国から

輸入されるものは懷牛膝と呼ばれる *A. bidentata* を基原とするものであり、川牛膝と呼ばれる *Cyanthula officinalis* Kuan を基原とする生薬とは異なるものである。ゴシツはうるおいがあり胎色を帯びたものが好まれるといわれる一方¹⁾、淡黄色の太くて長い柔軟なものが良品であり暗色を帯びたものや短くて堅いものは良くないとされるが²⁾、本生薬の表面の色調は様々であり、弾力性があるものや全く弾力性のないものもある。また、加工調製の方法もさまざまであり、陰干しを行うだけの場合もあるが、漂白や湯通しの工程を伴う場合もあり、このような加工調製法の差が生薬の品質の差の原因になることも考えられる。

ゴシツの成分に関しては多くの報告があるが、古くから知られているイノコステロンなどのエクジステロイド類³⁾の他、糖部に特異なジカルボン酸を有する achyranthoside などのトリテルペンサポニンが報告されている。後者は *A. fauriei* から伊田らによってメチルエステルの形で初めて単離され、achyranthoside と命名されたが⁴⁾、吉川らは同じ化合物をサトウダイコン (*Beta vulgaris*) から遊離カルボン酸の形で単離し、betavulgaroside と命名している⁵⁾。更にフランス⁶⁾並びに中国のグループ⁷⁾が *A. bidentata* から同様なサポニンを遊離カルボン酸型で単離しているが、同一の化合物に複数の名前が与えられる結果となっている⁸⁾。これらのサポニン類は、オレアナン骨格3位の水酸基に結合した糖部に特異なジカルボン酸がアセタールを介して結合した構造を有しており、比較的不安定であると考えられる。

ゴシツの基原植物であるイノコズチは、夏季に急激に成長して花穂を付ける。ゴシツの収穫時期は一般に秋以降とされているが、ゴシツなどの根類生薬の栽培においては、根重量を増やすことを目的として、開花前に花穂を刈り取る摘心処理を行うことが多い。本研究では、ゴシツの基原植物とされその外観がきわめて近似している *A. fauriei* と *A. bidentata* について、生育期から収穫期にかけての根におけるサポニン成分の変動、摘心処理がサポニン成分に与える影響、さらに、収穫後の乾燥温度がサポニン成分に与える影響を、まず TLC を用いて検討した。

さて、HPLC に NMR を直接接続した LC-NMR では、HPLC で分離した化合物の NMR スペクトルを直接測定できるため、かなり不安定な化合物でも構造解析が可能となる。Loop storage 法を用いる場合、HPLC 部で分離した目的とする化合物のピークを流路から loop に一旦取り込んだ後その NMR を測定するが、糖類や一部のテルペン類など紫外線吸収のない化合物では、目的のピークをいかに検出するかが課題となる。LC-NMR に更に MS を組み合わせた LC-NMR/MS では、HPLC から溶出したピークの検出に質量分析計を用いることにより、紫外線吸収のない化合物の検出が可能となる他、分子量に関する情報が付加されることにより化合物の推定がより容易となる。また、LC-MS では判別できない構造異性体なども NMR を加えることにより構造決定が可能となる。このように LC-NMR/MS では、質量分析ならびに NMR スペクトルの利点を相補的に生かすことにより、通常の LC-MS または LC-NMR のみでは解析困難な試料の構造解析も可

能となる。生薬ゴシツには、前述のように不安定な部分構造を有するサポニン類が含まれているが、それらは HPLC 分析に用いることのできる領域で紫外線吸収を示さないため、その分析には LC-NMR/MS が有効な手段となると考えられる。そこで本研究では、*A. fauriei* の収穫後の根を数段階の温度条件にて乾燥させた時に起こるサポニン成分の構造変化を、HPLC および LC-NMR/MS を用いて検討した。

2. 材料および方法

2.1 試薬および機器

TLC はメルク社製シリカゲルガラスプレート (5715) を用いた。HPLC は島津製作所社製 LC-10ADvp HPLC システムを用い、softA 社製蒸発光散乱検出器 ELSD model 200 を接続して用いた。NMR は日本電子社製 JEOL alpha-500 を用いた。LC-NMR/MS は HPLC 部 Agilent 社製 1200、NMR 部 Bruker 社製 Avance II 800 MHz、MS 部 Bruker Daltonics 社製 Esquire 400 を接続して用いた。生薬の粉碎用には協立理工製 SK-M10 を、試料の乾燥には春日電機製大型通風乾燥機 (30℃)、ヤマト科学製送風低温恒温器 DK83 (50℃)、Espec 社製恒温器 (70℃)、アズワン製プログラム低温乾燥器 DO-600FPA (100℃) を用いた。

2.2 ゴシツ試料

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筑波研究部研究圃場にて 2007 年に栽培したヒナタイノコズチ *Achyranthes fauriei* Lév. et Vaniot (導入番号 1247-80、1980 年に常陸生薬組合より種子分譲されたもの) およびトウゴシツ *Achyranthes bidentata* Blume (導入番号 0607-79、1979 年に奈良県より導入したもの) を用いた。証拠さく薬標本は当センターに保管してある。当センターにてそれらの同定を行い、以下のように栽培を行った。

2.3 栽培方法

播種日：2007 年 4 月 23 日；栽植密度：畦幅 90 cm、株間 10 cm；栽培面積：5.3 x 20.5 m (約 1 a)；播種量：*A. fauriei*, 85.2 g/49.95 m；*A. bidentata*, 83.5 g/49.95 m。

施肥量 (1 a 当たり)：基肥 堆肥, 100 kg；苦土石灰, 10 kg；ようりん (20%), 2.5 kg；化成 (8-8-8), 5 kg；追肥 1 回目 (7 月), 化成 (8-8-8), 5 kg；追肥 2 回目 (9 月), 化成 (8-8-8), 5 kg。

摘心処理：2007 年 8 月。

収穫日：7月から毎月25日前後に3個体をサンプリングし、2007年11月9日にすべて収穫した。

2.4 試料調製

収穫した根部を水洗後、主根と側根に分け、それぞれ3個体を15、30、50、70、100℃で3日間乾燥した。

(No.1-3 (15℃), No.4-6 (30℃), No.7-9 (50℃), No.10-12 (70℃), No.13-15 (100℃))。15℃での乾燥は、15℃の貯蔵室に除湿機を設置して行った。その他の温度での乾燥は、通風恒温乾燥機を用いて行った。15℃と30℃での3日間の乾燥では、試料中に水分が残っていたが、そのまま分析に用いた。試料の粉碎はミルを用いて行ったが、低温乾燥試料(15℃, 30℃)は、試料中に水分を含み粉碎が困難であったため、液体窒素で凍結させてから粉碎した。

2.5 試験溶液調製法

粉碎した試料2gを遠沈管にとり、水10mlを加えて10分間振り混ぜた後、ブタノール5mlを加えて10分間振りまぜ、遠心分離後の上澄み液を試料溶液とした。

2.6 薄層クロマトグラフィーによる分析

2.6.1 *A. fauriei*, *A. bidentata* の収穫月ごとの成分比較

摘心処理を行っていない個体の主根を70℃で3日間乾燥したものをを用い、試料溶液は2.5と同様に調製した。スポット量は20μl、展開溶媒は酢酸エチル/水/ギ酸混液(5:1:1)、検出は10%硫酸噴霧後加熱(105℃, 10分間)にて行った。

2.6.2 摘心処理と乾燥温度がサポニン成分に与える影響

摘心処理区と非処理区のそれぞれの主根を15、30、50、70、100℃の各温度で3日間乾燥したものをを用いた。各温度に3個体の試料を用い、試料溶液は2.5と同様に調製した。スポット量は20μl(乾燥温度15、30℃の試料)および10μl(乾燥温度50、70、100℃の試料)、展開溶媒は(1)酢酸エチル/水/ギ酸混液(5:1:1)、(2)1-プロパノール/酢酸エチル/水混液(4:4:3)、検出は10%硫酸噴霧後加熱(105℃, 10分間)にて行った。

2.7 高速液体クロマトグラフィーによる分析

2.5で調製したブタノール層を試料として用いた。

HPLC条件：カラム, Imtakt UK C-18 (分析用: I.D. 4.6 x 150 mm, 分取用: I.D. 10 mm x 250 mm); カラム温度, 40℃; 流速, 0.5 ml/min (分析時), 3.0 ml/min (分取時); 溶媒, A (0.1%ギ酸/水), B (0.1%ギ酸/アセトニトリル); 送液条件, 0→10 min 10% B, 10→30 min 10%→30% B, 30→55 min 30%→70% B, 55→75 min 70%

B; 検出, ELSD model 200 (softA社製), PDA (190-400 nm)。ただし分取時はELSDとPDAを約1:9でsplitし、PDA側で分取を行った。

2.8 LC-NMR/MSによる分析

LC条件：カラム, カラム温度, 流速は2.7 HPLC分析時と同条件; 溶媒, A (0.1%重水素化ギ酸(DCOOD)/重水), B (0.1%重水素化ギ酸(DCOOH)/アセトニトリル); タイムプログラム, 2.7 HPLCと同条件; 検出, 質量分析機, 紫外線吸収検出器(210 nm)。

MS条件：イオン源, ESI (negative mode); Nebulizer, 350 psi; Dry Gas, 8.0 l/min; Dry Temp., 310℃。

NMRサンプリング法：Loop Storage法。

3. 結果

3.1 *A. fauriei*, *A. bidentata* の収穫月ごとの成分比較

7月から10月までの4ヶ月にわたってサンプリングした試料を70℃で3日間乾燥し、その主根についてTLCによりサポニン成分を比較した(Fig. 1)。薬用植物資源研究センターで保存している2種の基原植物間には、成分の著しい差は認められなかった。この2種の間の相違についてはあまり詳細な報告がなく、両者の地上部の外観にはほとんど差が認められないが、*A. bidentata* は実際の根の一次分枝が多いという特徴を有している⁹⁾。また、収穫時期による成分の差もほとんど認められなかったが、7月収穫の試料において、*R_f*値0.5付近の赤紫色を呈するスポットの量がやや多いのが確認された。この成分はchikusetsusaponin IVaであり、70℃以上で乾燥すると多く生じる(後述)。

3.2 摘心処理と乾燥温度がサポニン成分に与える影響

A. fauriei について、摘心処理並びに非処理の各3個体を用い、主根と側根をそれぞれ、15、30、50、70、100℃の5段階に分けて3日間乾燥して、そのサポニン成分をTLCで比較した(Fig. 2, Fig. 3)。

根類生薬の栽培においては、根の収穫量を増やすために摘心処理を行うことが多い。*A. fauriei* を摘心処理すると、大きな差ではないものの、エクジステロン類とsucroseの含量が低下し、glucoseとfructoseの含量が高くなるが、総サポニン量(酸加水分解後のオレアノール酸を定量)には差が見られないことが報告されている¹⁰⁾。今回のTLCによる比較でも、摘心処理した個体と非処理の個体

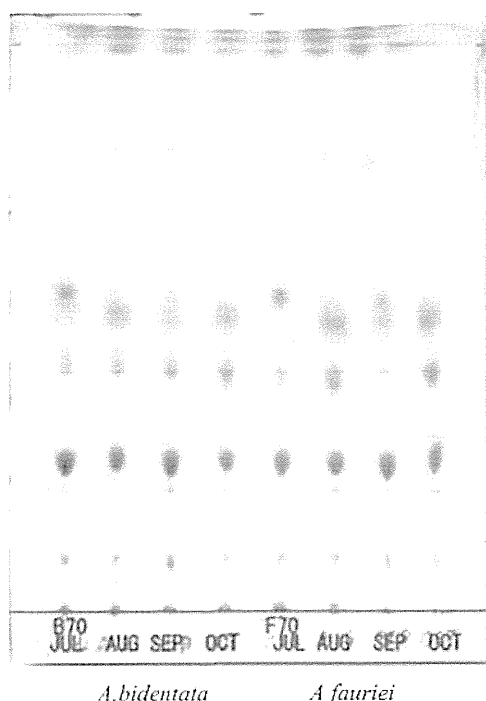


Fig.1 TLC Comparison for taproot of *A. bidentata* and *A. fauriei*.

drying condition: 70°C for 3 days, solvent system; ethyl acetate/water/formic acid (5:1:1), detection; spraying 10% sulfuric acid then heated at 105°C

の間では、TLCのパターンに顕著な差異は見られなかった。

一方、乾燥温度の影響についてみると、酢酸エチル/水/ギ酸混液 (5:1:1) で展開した場合の TLC (Fig. 2) では、15°C の乾燥で見られる R_f 値 0.25 付近の赤紫色のスポット (E) が、30~50°C で薄くなるが、乾燥温度が上がるにつれて再び増加した。また、低温 (15~50°C) 乾燥で見られる R_f 値 0.4 付近の赤紫色のスポット (F) は、70°C で薄くなるが、100°C において再び出現した。更に、 R_f 値 0.52, 0.75 付近には高温条件においてのみ見られる赤紫色のスポット (B, A) が確認された。しかし、1-プロパノール/酢酸エチル/水混液 (4:4:3) を展開溶媒とする TLC (Fig. 3) から、これらのスポットは低温条件と高温条件では異なる成分であるものと思われた。実際に異なるものであることは一部の分取 HPLC フラクションと TLC を比較することにより確認された。後述するように、蒸発光散乱検出器 (Evaporative light scattering detector: ELSD) を用いた HPLC により当該成分を一部分取した結果、高温乾燥で出現する成分は chikusetsusaponin 類であった。

乾燥温度がサポニン成分に与える影響を更に詳しく調べるために、*A. fauriei* の主根を 5 段階の温度で乾燥したサンプルを HPLC にて分析した。TLC 上 10% 硫酸を噴霧後加熱することによって検出される赤紫色のスポットは、ほとんどが紫外線ランプ照射下で吸収を示さないため、ELSD を用いて検出を行った (Fig. 4)。低温で乾燥した試料中には水分が多く残存しているために、この検討結果に定量性はないが、低温乾燥と高温乾燥の試料とでは成分パターンが明らかに異なっていた。すなわち、低温乾燥試料では全く見られない保持時間 45 分前後のピークが、100°C で乾燥した試料において比較的大きなピークとして現れた (Fig. 2, 3 におけるスポット D に相当)。また、15°C での乾燥では明確にみられる 47 分付近のピークが 30°C, 50°C では一旦消失し、70°C 以上の乾燥では大きなピークとして再び現れた。そこで、100°C で乾燥したサンプルについて split 法を用いて主要ピークを分取し、TLC で比較した結果、このピークは 15°C 乾燥の場合と高温 (70, 100°C) 乾燥では異なる化合物であった (高温乾燥条件で現れるピークは Fig. 2, 3 におけるスポット B に相当。15°C 乾燥試料でのピークは Fig. 2 の R_f 値 0.25 付近のスポット E)。同様に高温乾燥条件では 55 分と 60 分付近にもピークが現れる (それぞれ Fig. 2, 3 のスポット C と A に相当) が、低温乾燥条件の試料でこの付近に見られるピークはこれらとは別の化合物であった。高温乾燥条件で現れるこれらのピーク A~D を分取し、それらの NMR を測定した結果、いずれも *A. fauriei* から単離されている oleanolic acid 3-glucuronide¹¹⁾, chikusetsusaponin IVa¹²⁾, 28-deglucosyl chikusetsusaponin V¹³⁾, chikusetsusaponin V¹⁴⁾ であった (Fig. 5)¹⁵⁾。しかし、低温乾燥条件で見られる上述のピークは不安定で濃縮過程で分解が起こり、NMR の測定が困難であった。

3.3 乾燥温度による成分変化の LC-NMR/MS による解析

乾燥温度による成分の変化をさらに詳しく調べるために LC-NMR/MS を測定した。LC-NMR/MS においては NMR を測定するため、溶媒として重水素化溶媒を用いる必要がある。今回は 0.1% 重水素化ギ酸 (DCOOD)/重水混液と 0.1% 重水素化ギ酸 (DCOOH)/アセトニトリル混液のグラジエントを用いた。検出部には質量分析計を用い、溶出液の一部を split し、付加イオンが生じにくい negative mode で検出を行った。上記 3.2 と同一の HPLC 条件で分析を行ったが、低温乾燥のエキスでは水分比が多いために感度良い ¹H-NMR 測定ができなかったため、

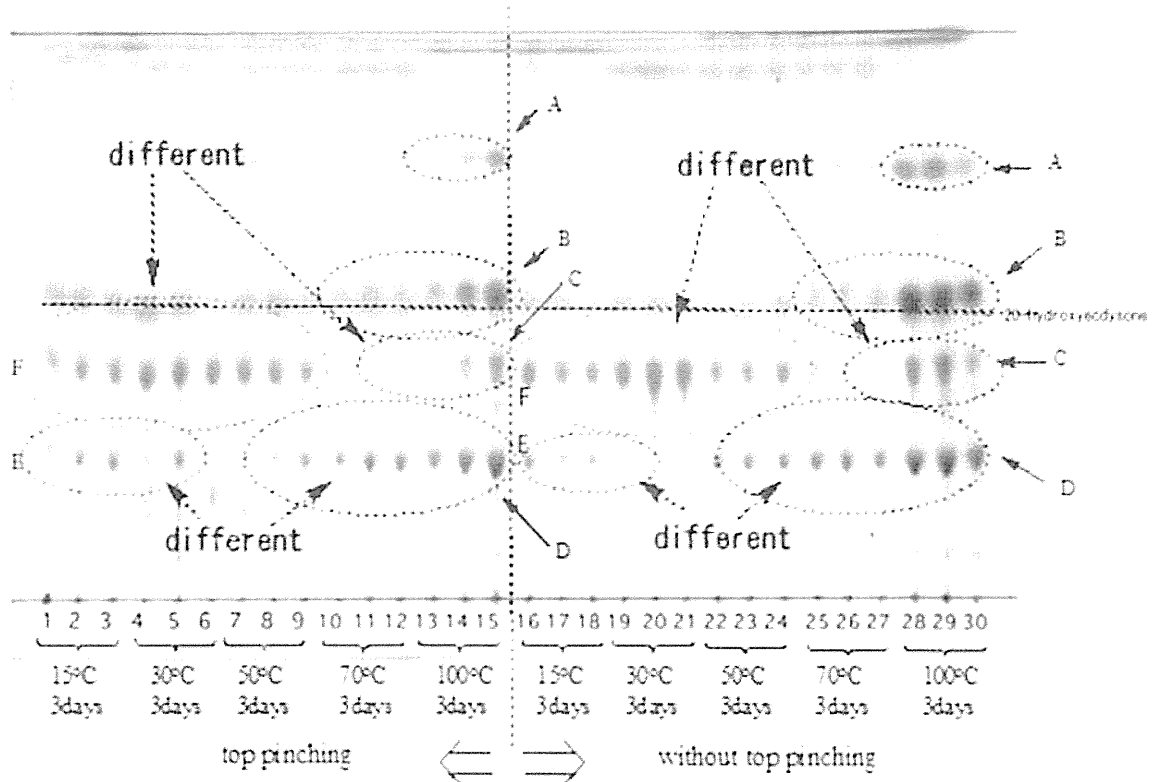


Fig.2 TLC Comparison for taproot of *A. fauriei* in various drying temperatures.

left half: with top pinching process, right half: without top pinching process

solvent system; ethyl acetate/water/formic acid (5:1:1), detection; spraying 10% sulfuric acid then heated at 105°C

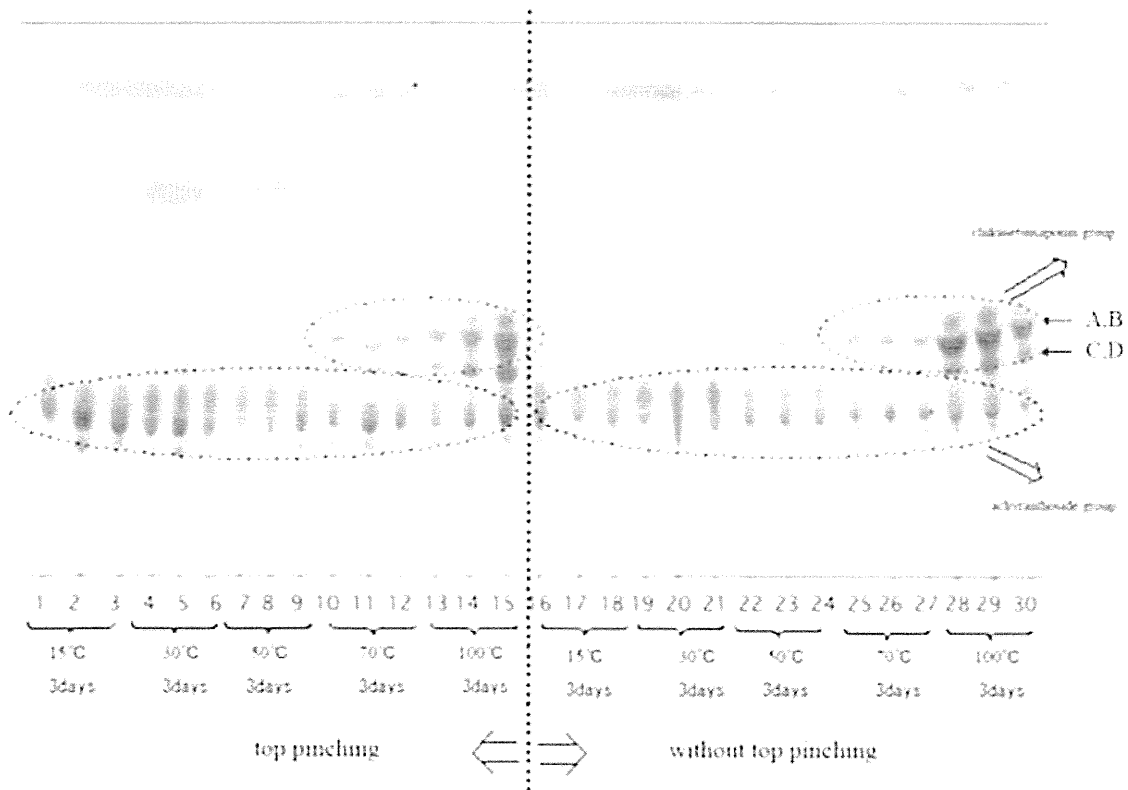


Fig. 3 TLC Comparison for taproot of *A. fauriei* in various drying conditions.

left half: with top pinching process, right half: without top pinching process

solvent system; 1-propanol/ethyl acetate/formic acid (4:4:3), detection; spraying 10% sulfuric acid then heated at 105°C

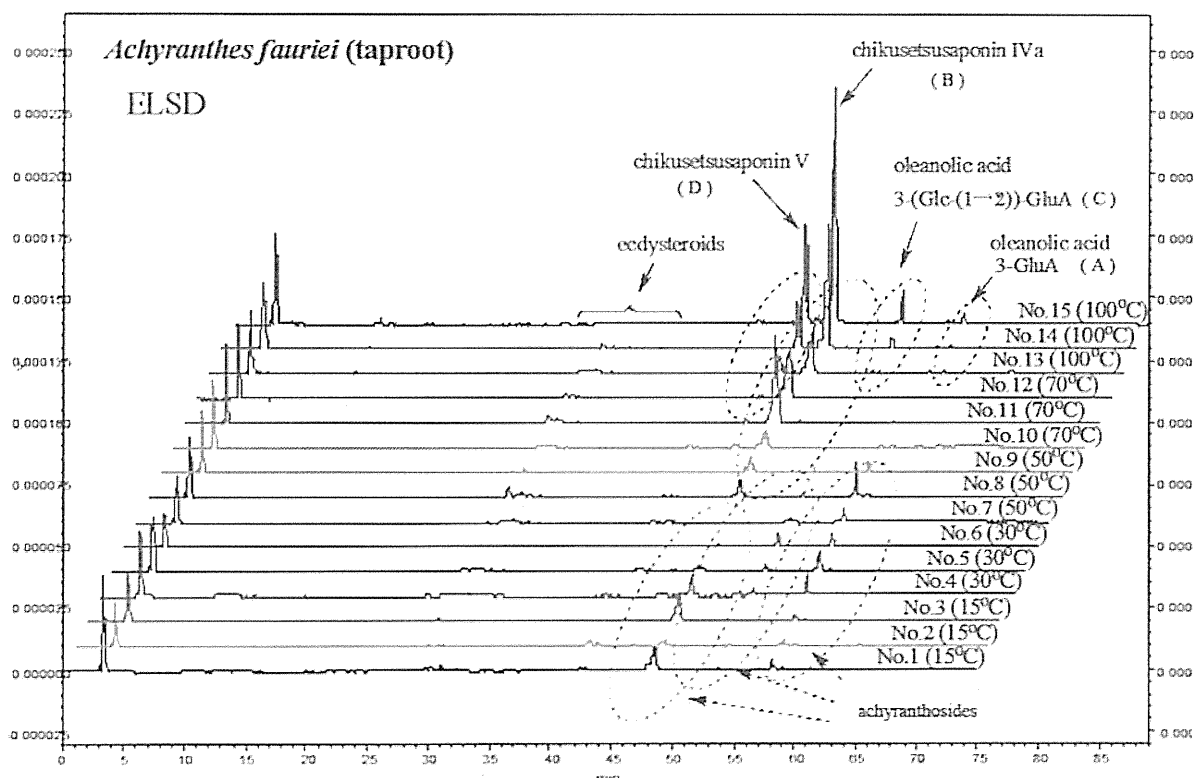


Fig. 4 HPLC Chromatogram of the butanolic extracts of *A. fauriei* taproot with various drying temperature.
Detection: Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)

70°Cと100°Cで乾燥した試料について解析を行った。

まず100°Cで乾燥した試料(No.14)について、保持時間40分から60分の間を11分割して、各々をloopに保存し、順次 ESIMS および NMR を測定した。その結果得られた Total Ion Chromatogram (TIC)と、これに対応する HPLC クロマトグラム (上記 3.2 の ELSD 検出) を Fig. 6 に示す。また、下段に示す LC-NMR/MS の TIC における各ピークの loop に対応する NMR を Fig. 7 に、MS を Fig. 8 に示す。ここでは重水を用いているために、分子中の交換可能な水素原子が重水素で置換された MS が観測されている。MS と ¹H-NMR スペクトルから loop 5, 8, 13, 16 はそれぞれ化合物 D (chikusetsusaponin V), B (chikusetsusaponin IVa), C (28-deglucosyl chikusetsusaponin V), A (oleanolic acid 3-glycuronide) に相当することが明らかとなった (Table 1)。70°Cで乾燥した試料の LC-NMR/MS は、100°C乾燥試料とは多少異なったクロマトグラムを与えた (Fig. 9)。保持時間40分以降のピークの MS では100°C乾燥の試料同様化合物 A-D のシグナルも観測されたが、いくつかの loop にさらに高い *m/z* 領域に疑似分子イオンと思わ

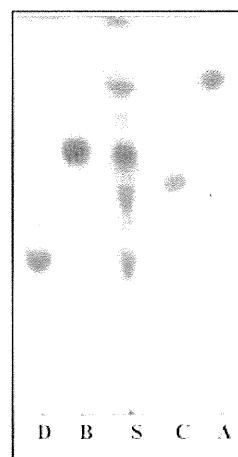


Fig.5 TLC Chromatogram of Isolated Compounds by Preparative HPLC
S: butanolic extract of *A. fauriei* taproot (100°C, 3 days)
A: oleanolic acid 3-glycuronide, B: chikusetsusaponin IVa,
C: 28-deglucosyl chikusetsusaponin V,
D: chikusetsusaponin V

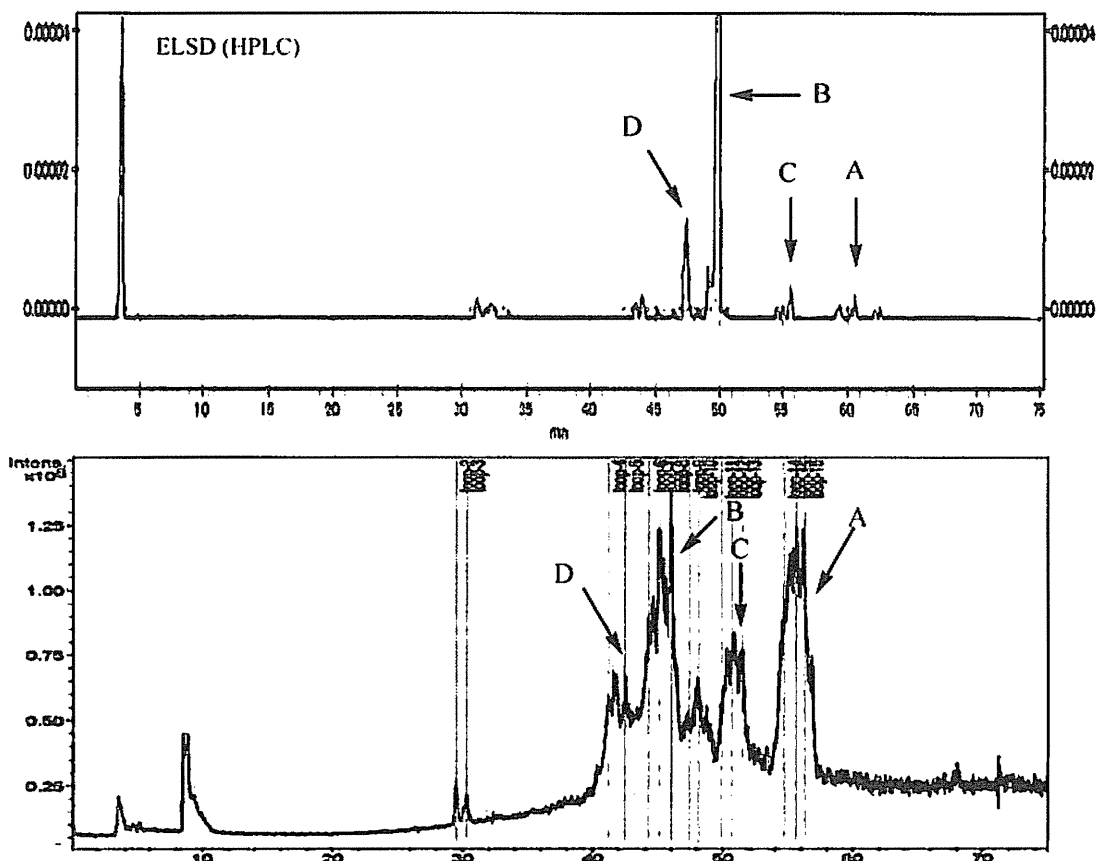


Fig. 6 Comparison of LC chromatograms for *A. fauriei* (drying condition: 100°C, 3 days).
Upper: ELSD detector on HPLC; Lower: TIC on LC-NMR/MS

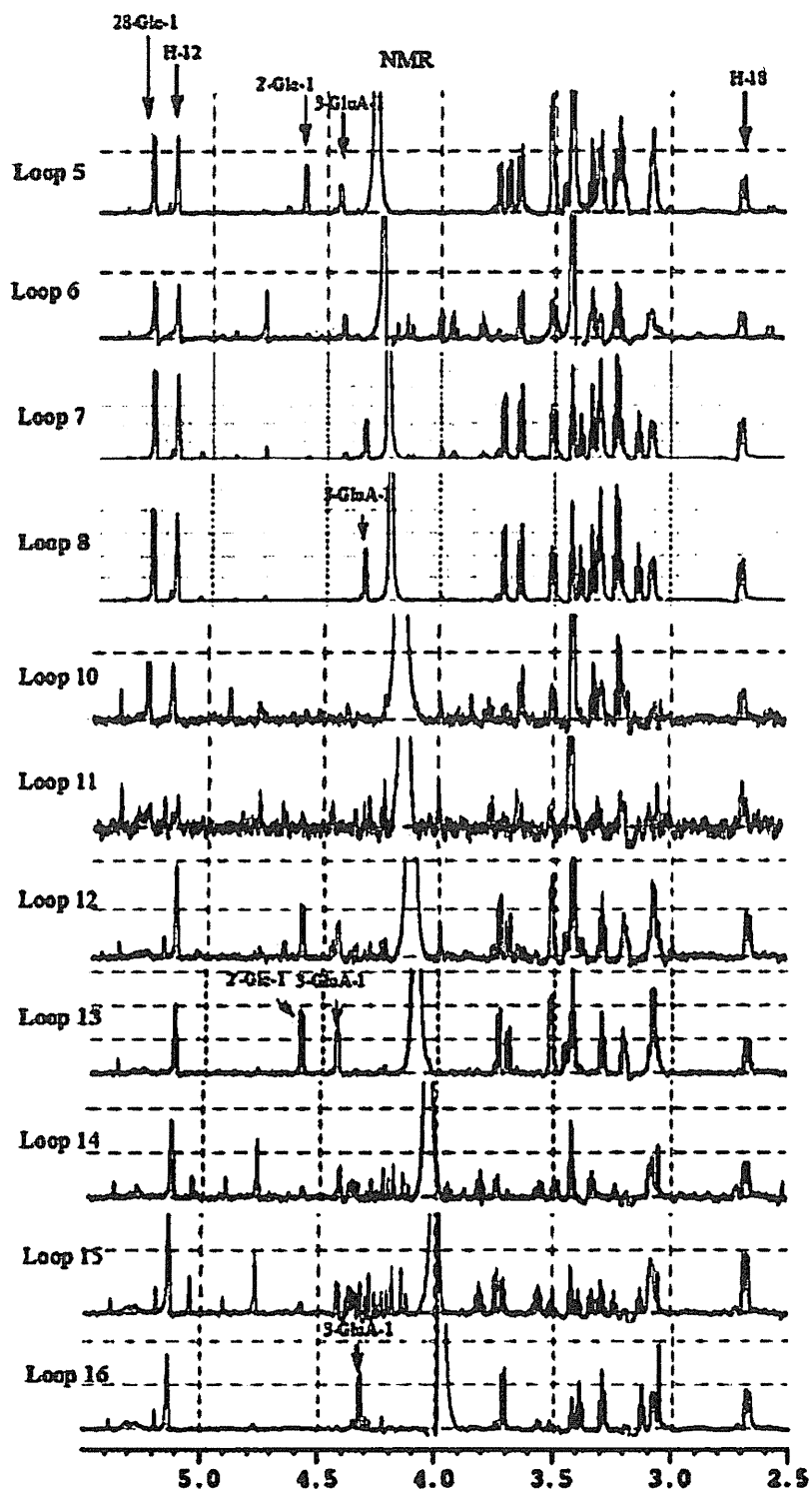


Fig. 7 $^1\text{H-NMR}$ Chart for Loop 5-16 on LC-NMR/MS

drying condition: 100°C , 3 days

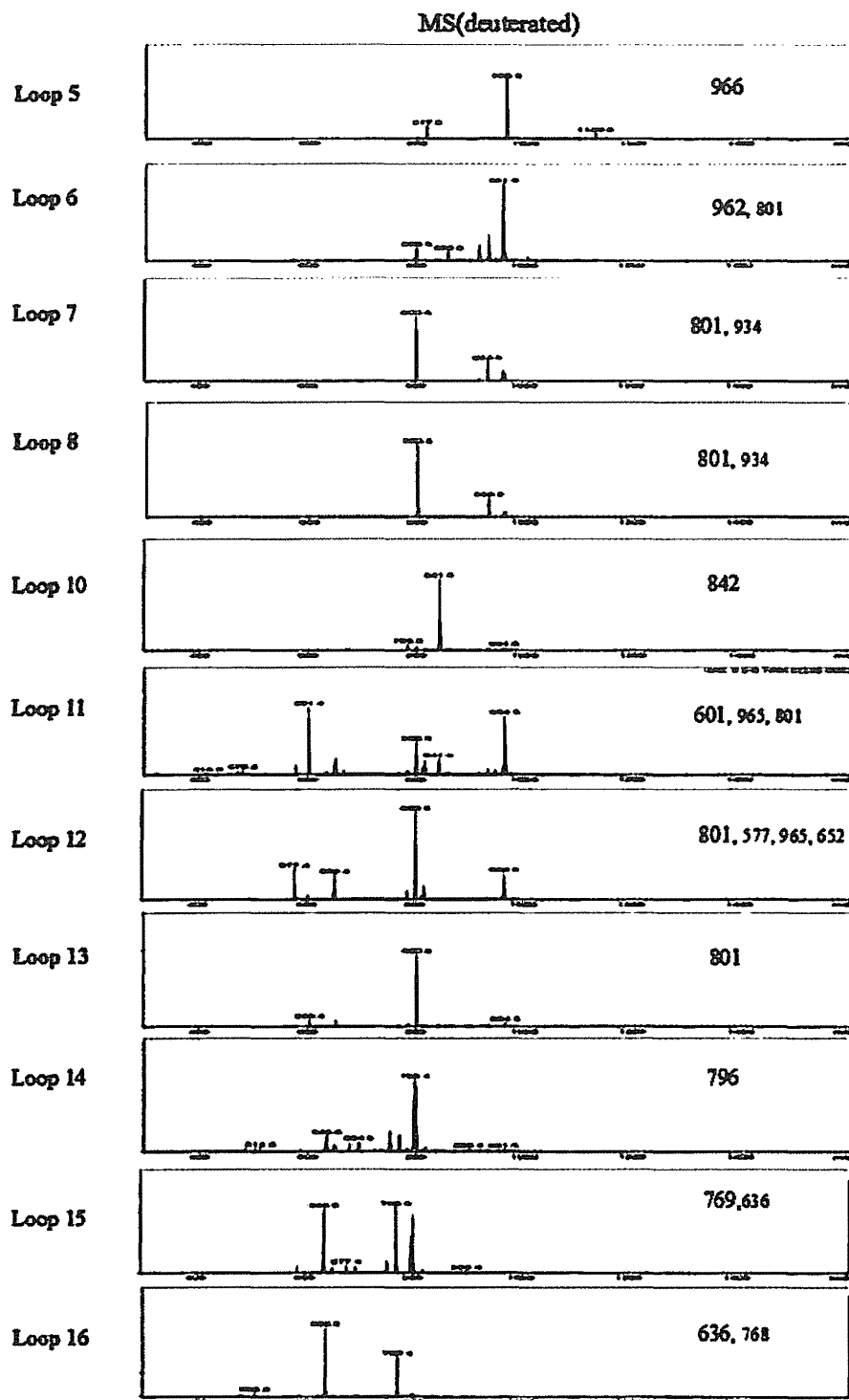


Fig.8 ESI-MS (negative mode) Chart for Loop 5 -16 on LC-NMR/MS
drying condition: 100°C, 3 days

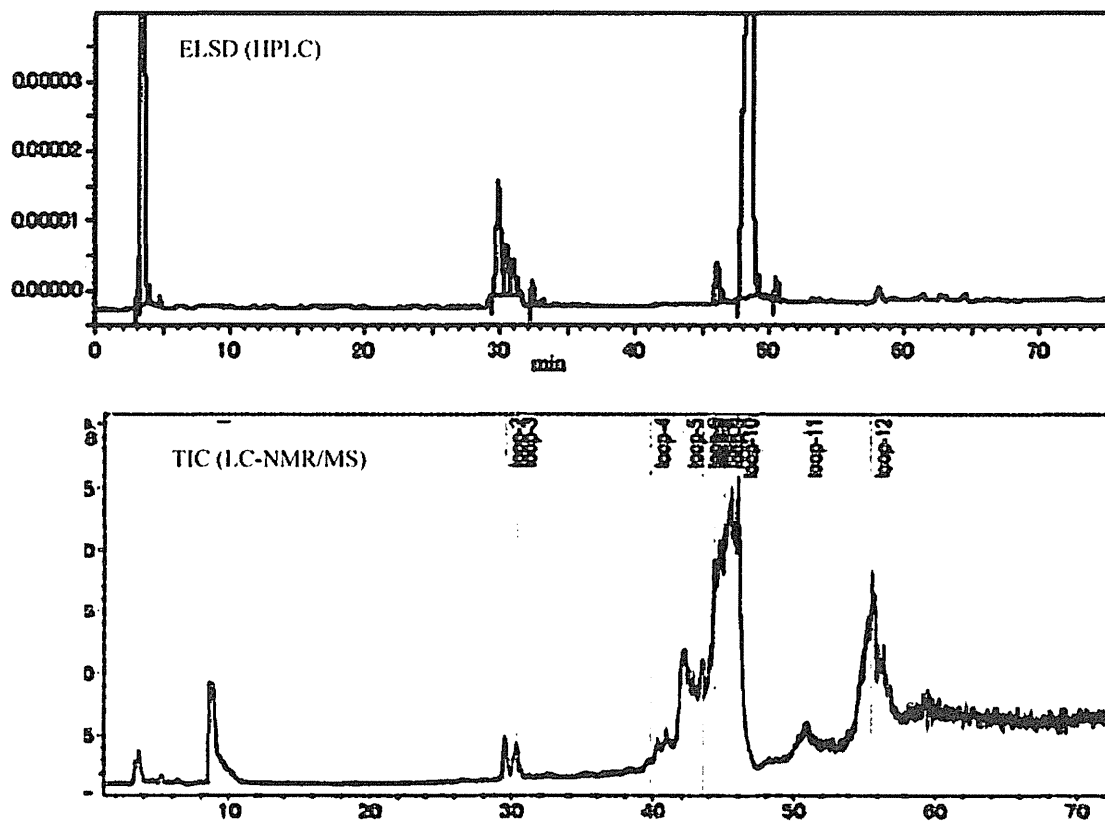


Fig. 9 Comparison of LC chromatograms for *A. fauriei* (drying condition: 100°C, 3 days).
upper: ELSD detector on HPLC; lower: TIC on LC-NMR/MS

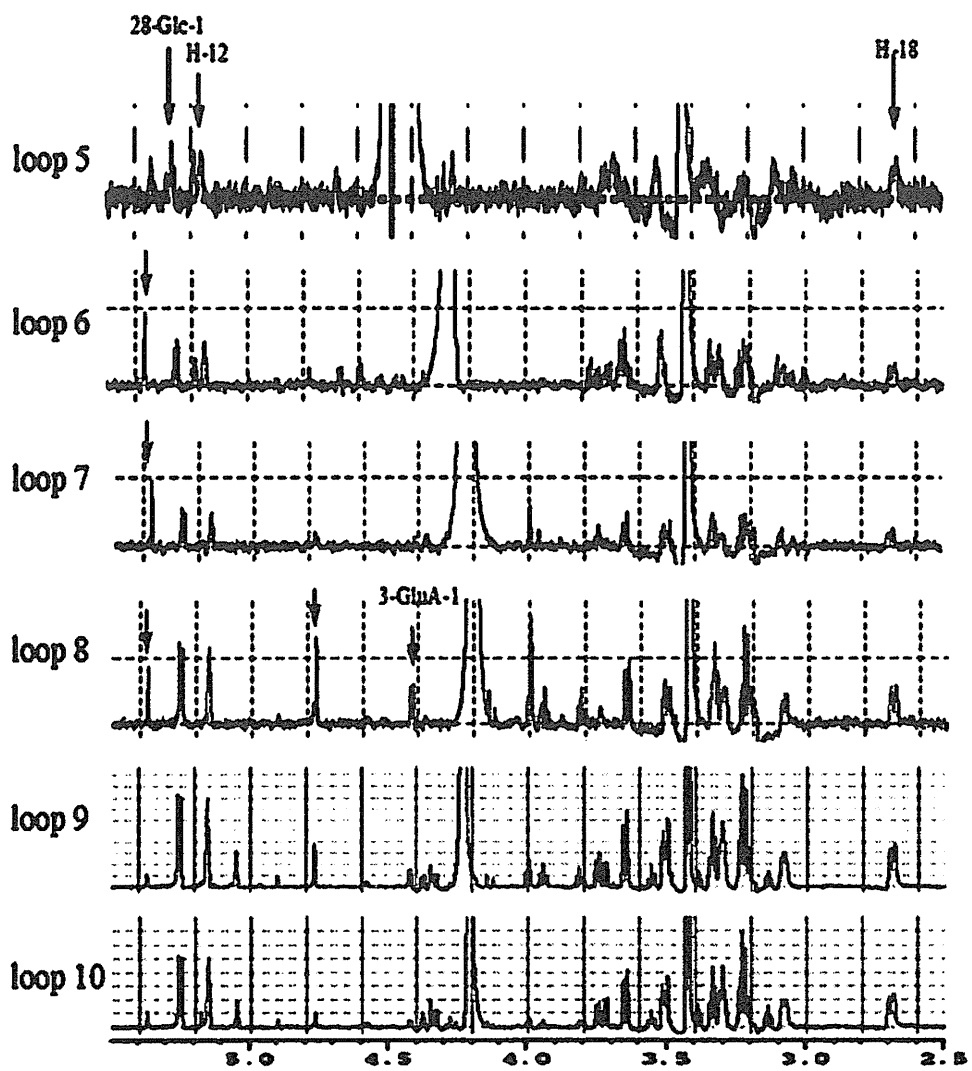


Fig. 10 $^1\text{H-NMR}$ Chart for Loop 5 -10 on LC-NMR/MS
 drying condition: 70°C, 3 days

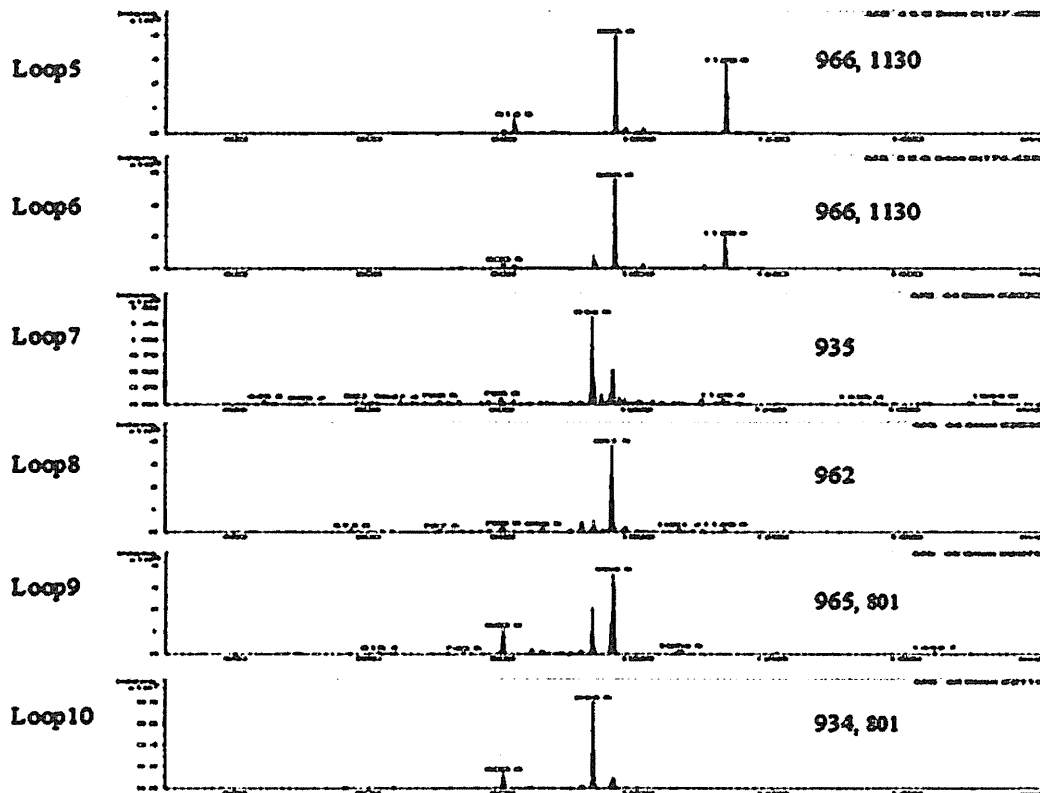
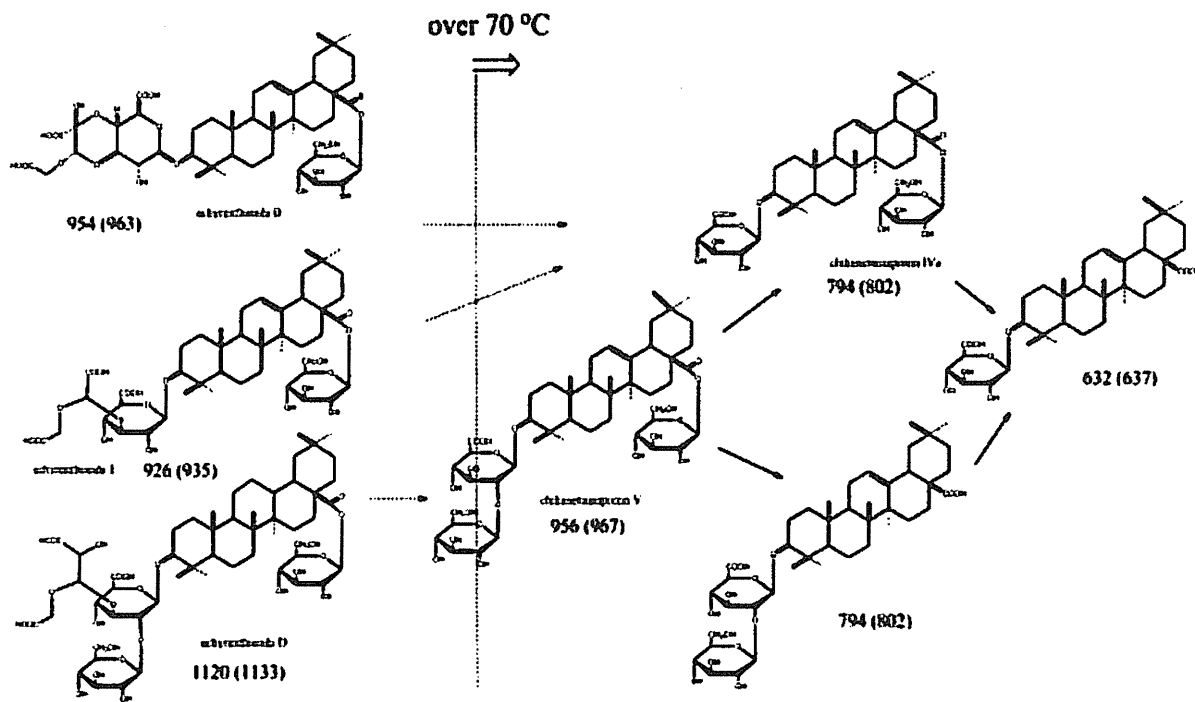


Fig.11 ESI-MS Chart for Loop 5 -10 on LC-NMR/MS
drying condition: 70°C, 3 days



MS (determined)

Fig.12 Presumable Chemical Transformation of Saponins in
A. fauriei during drying process

Table 1 ¹H-NMR Spectral Data for Loop 5, 8, 13 and 16 (drying condition: 100°C, 3days) of LC-NMR/MS (800 MHz)

Experiment.						
No.	OA 28-GluA ^a	CS IV ^b	Loop 5 (CS V)	Loop 8 (CS IVa)	Loop13 (28- deGlc CS V)	Loop16 (OA 3-GluA)
3		--	3.08 m	3.08 dd (12, 4)	3.09 dd (12, 4)	3.08 dd (12, 4)
12		5.16 br s	5.15 br s	5.15 br s	5.13 br s	5.14 br s
18	2.69 d (14)	2.71 dd (13, 3)	2.69 d (14)	2.69 d (14)	2.68 dd (13, 3)	2.69 dd (13, 4)
23		0.9 s	0.9 s	0.89 s	0.91 s	0.9 s
24		0.71 s	0.71 s	0.7 s	0.72 s	0.72 s
25		0.81* s	0.78* s	0.80* s	0.80* s	0.80* s
26		0.63 s	0.61 s	0.61 s	0.66 s	0.66 s
27		1.04 s	1.03 s	1.03 s	1.04 s	1.05 s
29		0.82* s	0.80* s	0.81* s	0.82* s	0.82* s
30		0.83* s	0.81* s	0.82* s	0.83* s	0.83* s
28-Glc						
1	5.31 d (8)	5.27 d (8)	5.26 d (8)	5.25 d (8)		
2	3.33 m		3.22 t (9)**	3.22 t (10)**		
3	3.3 m		3.24 t (9)**	3.23 t (9)**		
4	3.3 m		3.35 t (9)**	3.34 t (9)**		
5	3.3 m		3.31 br t (7)	3.30 br t (9)		
6	3.67 dd (12, 4)	3.61 dd (12, 3)	3.51 dd (11, 5)	3.51 dd (12, 5)		
	3.8 dd (12, 2)	3.66 dd (12, 2)	3.66 d (11)	3.65 d (12)		
3-GluA						
1		4.29 d (8)	4.44 d (7)	4.33 d (8)	4.44 d (7)	4.33 d (8)
2			--	3.14 t (9)***	--	3.13 t (9)**
3			3.52 t (6)	3.39 t (10)***	3.51 t (9)**	3.39 t (10)**
4			3.30 t (10)	3.30 t (9)***	3.30 t (9)**	3.30 t (9)**
5			3.75 d (10)	3.72 d (10)	3.74 d (10)	3.72 d (10)
2'-Glc						
1			4.59 d (8)		4.59 d (8)	
2			3.08 t (8)		3.07 t (10)	
3			3.52 t (7)		3.52 t (9)	
4			3.09 t (9)		3.08 t (10)	
5			3.20 t (8)		3.21 br t (9)	
6			3.45 dd (12, 7)		3.45 dd (12, 7)	
			3.71 d (12)		3.70 d (12)	

a: in CD₃OD, b: commercially available from Matsuura Yakugyo Co. Ltd., measured in 500 MHz (in D₂O-CD₃CN).

OA 28-GluA: Oleanolic acid 28-glucuronide, CS IV:Chikusetsusaponin IV, CS V:Chikusetsusaponin V, CS IVa: Chikusetsusaponin IVa,

28-deGlc CS V: 28-deglucosyl chikusetsusaponin V, OA 3-GluA: Oleanolic acid 3-O-glucuronide.

*, **, ***: Assignments may be interchanged in each column.

れるピークが観測されており、それらの loop を中心に $^1\text{H-NMR}$ を測定した (Fig. 10, 11). Loop 5 から 10 までの $^1\text{H-NMR}$ ではいずれも 100°C 試料と同様に oleanolic acid 由来の 12 位 (δ 5.15 付近) と 18 位 (δ 2.69 付近) のプロトンシグナルが観測されたことから、これらの loop の主成分は oleanolic acid をゲニンとするサポニンと推定された。また、いずれの loop にも 28 位にエステル結合したグルコースのアノマー水素 (δ 5.26 付近) が存在し、loop 8 にのみ 3 位に結合したグルクロン酸に由来すると思われるアノマー水素 (δ 4.4) が観測された。さらに MS データを比較すると、loop 6 については m/z 1130 と大きな分子イオンピークがみられ、 $^1\text{H-NMR}$ においては 5.18, 5.37 ppm 付近に 100°C 乾燥試料ではほとんど観測されないシグナルが観測された。MS ではさらに m/z 966 が観測されることから chikusetsusaponin V を母体とする achyranthoside 類と推定された。achyranthoside D は chikusetsusaponin V の 3 位に結合した glucuronic acid 部分の 3'位に 3-(carboxymethyloxy)-2,3-dihydroxypropanoic acid (DHPA) が結合した特異な構造を有するが、その場合予想される重水素化された分子イオンピークは $\text{C}_{33}\text{H}_{69}\text{D}_{13}\text{O}_{25}$ (MW 1131.6) となり、観測された m/z 1130 を [M-H] とすると一致する。 $^1\text{H-NMR}$ の 5.18, 5.37 ppm 付近のシグナルは、カルボキシル基と水酸基に挟まれた水素、アセタール水素であると推定される。同様に loop 7, 8 においても 5.37 ppm 付近のシグナルは観測された。MS はそれぞれ m/z 935, 962 にピークがみられることから、それぞれ重水素交換された achyranthoside E, B に一致する。以上の結果から 70°C 乾燥試料で検出された化合物は achyranthoside 類であると結論した。

4. 考察および結論

ゴシツの二つの基原植物である *A. fauriei* と *A. bidentata* は、地上部の外観が近似しており、成分にも大きな差異は見られなかった。また、初夏から秋までの 4 か月間の成分の変動を検討したが、生育期である初夏において chikusetsusaponin IVa の含量が少し高めであり、その後減少していく傾向がみられた他は、大きな変動は見られなかった。これは chikusetsusaponin 類がまず生合成され、その後糖部が修飾を受けて根部に蓄積されるためと考えられた。

摘心処理は生薬の栽培において、主に根類生薬の収量を増加させるために行われる。イノコズチの栽培においては摘心処理することにより明らかな根重増加が見込めることが報告されているが¹⁰⁾、今回の検討ではイノコズチの二次代謝産物であるサポニン含量に対する顕著な影響は見られなかった。イノコズチ類は、摘心処理を行わないと種子が飛散し周辺の耕作地に野生化してしまうこと、さらに生育盛期に風害によって地上部の倒折が起こりやすく根が病害にかかりやすいことなどから、摘心処理は重要であると考えられる。

ゴシツのサポニン成分としては achyranthoside 類が報告されている。今回の LC-NMR/MS 分析では、 70°C 乾燥試料で achyranthoside 類の存在が確認されたが、 100°C 乾燥の試料ではほとんど検出できなかった。イノコズチの根の本来のトリテルペンサポニンは、achyranthoside 類のように糖部分に不安定な修飾基を有しているが、高温での乾燥によって Fig. 9 に示すような過程で修飾基や糖鎖が段階的に脱離するものと考えられる。

第 15 改正日本薬局方第 2 追加から医薬品各条に収載された牛車腎気丸エキスの項目では、ゴシツの確認試験で薄層クロマトグラフィー用ゴシツを標準品として用いている¹⁶⁾。これはシャゼンシと並び初めて日局に取り入れられた試薬としての生薬であり、このゴシツには高温加熱条件 (70°C , 3 日間) で乾燥したものが用いられている。表 2 に日局に掲載されている薄層クロマトグラフィー用ゴシツのスポットの R_f 値およびスポットの色および形状 (展開条件等は 2.6.1 と同一) と今回の検討結果から推定される該当する化合物名を示す。

最近、伊田らはメチル化された achyranthoside H に MCF-7 や MDA-MB-453 細胞に対する強い細胞毒性があることを報告している¹⁷⁾。また Yoo らは、高温で加熱処理したゴシツに SK-Hep-1 細胞に対する強い細胞毒性を見出し、その毒性本体を chikusetsusaponin IVa であると結論づけている¹⁸⁾。これは加熱段階で生物活性が大きく変化することを意味しており、ゴシツの加工調製法が漢方処方薬の薬効に大きく影響する可能性を示唆している。今回我々は、低温処理と高温処理ではサポニン組成が大きく異なってくることを明らかにした。漢方処方薬は一般的に煎じ液の形で服用することが多く、また近年多く用いられているエキス製剤の場合、その調製の過程で抽出物は高温条件に曝されるため、例えば前述の牛車腎気丸エキス製剤中には、ゴシツのサポニン成分が achyranthoside

の状態で残存する割合は少ないと考えられる。しかし、散剤のように生薬の粉末をそのまま服用する場合には薬効に影響を生じる可能性がある。

今回の LC-NMR/MS を用いた検討は分析用 ODS カラムを用いて行ったが、質量分並びに split により得られた高温乾燥条件の試料の ¹H-NMR スペクトルについては十分な測定が可能であった。しかし、低温乾燥条件の試料についての ¹H-NMR スペクトルは十分なものではなかった。これは achyranthoside 類が今回の HPLC 条件においては結果的に最適な分離条件ではないことにも起因すると考えられる。近年 NMR は急速に進化し、800MHz といった高磁場 NMR やクライオプローブで超微量試料の測定も可能となっており、LC-NMR/MS においては ¹H-NMR の測定は十分に行えるが、loop storage 法では ¹³C-NMR、あるいは 2 次元 NMR の測定にはかなり長時間を必要とするのが現状である。また、高価な重水素化溶媒を用いる必要があり、質量分析計を検出器として利用した場合、ヘテロ原子に結合したプロトンの重水素への交換が容易に起きてしまうために、本来の質量分析スペクトルとはかなり異なった分子イオンピークを与えてしまう。これらの欠点がある程度補うことができる固層抽出を組み合わせた LC-SPE-NMR などの応用が今後期待される。今回の結果から不安定成分を含有する植物成分や明確な紫外線吸収帯を有さない化合物を含有する植物や生薬には適用する利点は多く、新しい品質評価の手法に応用発展する可能性は十分にあると考えられた。

Table 2 日局に掲載されている薄層クロマトグラフィ一用ゴシツの R_f 値、スポットの色及び形状と推定される化合物

R _f 値	スポットの色及び形状	該当する化合物
0 付近	黒の弱いスポット	
0.1 付近	つよい紫みの赤の弱いスポット	
0.2 付近	つよい紫みの赤のリーディングした弱いスポット	
0.25 付近	こい紫みの赤の強いスポット	chikusetsusaponin V (D)
0.35 付近	こい紫みの赤のリーディングしたスポット	28-deglucosyl chikusetsusaponin V (C)
0.45 付近	くすんだ黄の弱いスポット	

0.5 付近	灰みの紫みを帯びた赤の弱いスポット	chikusetsusaponin IVa (B)
0.75 付近	灰みの赤の弱いスポット	oleanolic acid 3-glucuronide (A)
0.9 付近	くすんだ赤の弱いスポット	

5. 謝 辞

本研究は厚生労働科学研究補助金事業により行われた。また試料調製において協力をいただいた、薬用植物資源研究センター筑波研究部山田みどり氏、西村吉子氏、ならびに本センター筑波研究部の技術専門員の方々に感謝いたします。

6. 参考文献

- Satake M., Iida O., Kawahara N., "Atarashii Yakuyo Shokubutu Saibaihou - Saishu Shouyaku Chousei," Hirokawa Shoten, Tokyo, 2002, pp.24-28.
- Isshiki N., "Wakanyaku No Ryouhi Kanbetuhou Oyobi Chouseihou" Tohodo Shoten, Tokyo, 1916, pp. 180-181.
- J. Li, H. Qi, L. W. Qi, L. Yi, P. Li, *Anal. Chim. Acta*, 596, 264-272 (2007).
- Ida Y., Satoh Y., Katoh M., Katsumata M., Nagasao M., Yamagushi K., Kamci H., Shoji J., *Tetrahedron Lett.*, 35, 6887-6890 (1994); Ando H., Fukuyama M., Hori Y., Hirai Y., Toriizuka K., Kuchino Y., Ida Y., *J. Nat. Med.*, 62, 57-62 (2008); Ida Y., Satoh Y., Katsumata M., Nagasao M., Shoji J., *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 896-898 (1995); Ida Y., Satoh Y., Katsumata M., Nagasao M., Hirai Y., Kajimoto T., Katada N., Yasuda M., Yamamoto T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 2555-2558 (1998).
- Yoshikawa M., Murakami T., Kadoyama M., Matsuda H., Yamahara J., Muraoka O., Murakami N., *Heterocycles*, 41, 1621-1626 (1995); Yoshikawa M., Murakami T., Kadoya M., Matsuda H., Muraoka O., Yamahara J., Murakami N., *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1212-1217 (1996); Yoshikawa M., Murakami T., Kadoya M., Yamahara J., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 1758-1763 (1998).

6. Mitaine-Offer A.-C., Marouf A., Pizza C., Khanh T. C., Chauffert B., Lacaille-Dubois M.-A., *J. Nat. Prod.*, **64**, 243—245 (2001); Mitaine-Offer A.-C., Marouf A., Hanquet B., Birlirakis N., Lacaille-Dubois M.-A., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1492—1494 (2001).
7. Wang G.-S., Zhou X.-p., Yang X.-H., Xu J.-D., *Chinese J. Med. Chem*, **14**, 40-43 (2004); Wang G.-S., Cong D.-L., Yang J.-Z., Yang X.-H., *Chinese J. Med. Chem*, **15**, 224-226 (2005).
8. For example: achyranthoside B²⁾ = betavulgaroside I³⁾ = achyranthoside III⁵⁾; achyranthoside D²⁾ = betavulgaroside V³⁾ = achyranthoside I⁵⁾
9. Medicinal Plant "Cultivation and Quality Control" Part 10, Yakuji Nippo-sya, Tokyo, 2002, pp. 79-90.
10. Hishida A., Anetai M., Hayashi T., Aoyagi M., Sekita S., Hosokawa K., Abstract papers of the 78th Annual Meeting of The Japanese Society of Pharmacognosy, p. 123 (Sep. 2001, Kanazawa).
11. Vidal-Ollivier E., Balansard G., Faure R., Babadjamian A., *J. Nat. Prod.*, **52**, pp 1156—1159 (1989).
12. Lin T.D., Kondo N., Shoji J., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 253-261 (1976)
13. Paphassarang, S.; Raynaud, J.; Lussignol, M.; Becchi, M., *J. Nat. Prod.*, **52**, 239-242 (1982).
14. Dovgii, I. I., *Chem. Nat. Comp.*, **42**, 182-185 (2006), Kondo N., Marumoto Y., Shoji J., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1103-1107 (1971)
15. Ida, Y., Katsumata M., Satoh Y., Shoji J., *Planta Med.*, **60**, 286-287 (1994).
16. The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, "The Japanese Pharmacopoeia 16th Edition" (2011), p. 182, 1492.; 15th Edition supplement II (2009), p.164.
17. Fukumura M., Ando H., Hirai Y., Toriizuka K., Ida Y., Kuchino Y., *J. Nat. Med.*, **63**, 181-188 (2009).
18. Yoo H.H., Kwon S.W., Park J.H., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1053-1055 (2006).

Article

Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition

Noriaki Kawano ^{1,*}, Fumiyuki Kiuchi ², Nobuo Kawahara ¹ and Kayo Yoshimatsu ¹

¹ Division of Tsukuba, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan; E-Mails: kawahara@nibio.go.jp (N.K.); yoshimat@nibio.go.jp (K.Y.)

² Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan; E-Mail: kiuchi-fm@pha.keio.ac.jp

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nkawano@nibio.go.jp; Tel.: +81-29-838-0571; Fax: +81-29-838-0575.

Received: 29 November 2011; in revised form: 15 January 2012 / Accepted: 17 January 2012 / Published: 2 February 2012

Abstract: The *in vitro* shoot culture of a T-DNA insertional mutant of *Papaver somniferum* L. established by the infection of *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 accumulated thebaine instead of morphine as a major opium alkaloid. To develop a non-narcotic opium poppy and to gain insight into its genetic background, we have transplanted this mutant to soil, and analyzed its alkaloid content along with the manner of inheritance of T-DNA insertion loci among its selfed progenies. In the transplanted T₀ primary mutant, the opium (latex) was found to be rich in thebaine (16.3% of dried opium) by HPLC analysis. The analyses on T-DNA insertion loci by inverse PCR, adaptor-ligation PCR, and quantitative real-time PCR revealed that as many as 18 copies of T-DNAs were integrated into a poppy genome in a highly complicated manner. The number of copies of T-DNAs was decreased to seven in the selected T₃ progenies, in which the average thebaine content was 2.4-fold that of the wild type plant. This may indicate that the high thebaine phenotype was increasingly stabilized as the number of T-DNA copies was decreased. In addition, by reverse transcription PCR analysis on selected morphine biosynthetic genes, the expression of codeine 6-*O*-demethylase was clearly shown to be diminished in the T₀ *in vitro* shoot culture, which can be considered as one of the key factors of altered alkaloid composition.

Keywords: *Papaver somniferum* L.; opium alkaloid; *Agrobacterium rhizogenes*; T-DNA insertional mutant

1. Introduction

Many attempts have been made to use breeding or molecular biological methods to modify the ability to produce secondary metabolites in medicinal plants. Among the challenges being addressed, manipulations of the morphine biosynthesis in the opium poppy (*Papaver somniferum* L.), particularly the conversion of narcotic morphine to codeine, which is of high importance as an antitussive and a synthetic source of dihydrocodeine, or to thebaine, which is also an important starting material for the semi-synthesis of the analgesic oxycodone, will contribute to the control of narcotics, and to the supply of useful alkaloids for the production of pharmaceuticals.

The gradual elucidation of enzymology of the alkaloid biosynthesis in *P. somniferum* led to genetical engineering of alkaloid biosynthetic pathway using native genes. The first report was on the introduction of a gene encoding berberine bridge enzyme (BBE) to *P. somniferum* in antisense orientation [1]. To date, several reports on metabolic engineering of *P. somniferum* have appeared, such as RNAi-mediated gene silencing of codeinone reductase (COR) [2], overexpression of COR [3], overexpression and antisense co-suppression of (*S*)-*N*-methylcoclaurine-3'-hydroxylase (CYP80B3) [4], overexpression and RNAi-mediated gene silencing of salutaridinol-7-*O*-acetyltransferase (SalAT) [5], and RNAi-mediated gene silencing of SalAT [6]. Mutant poppy *top1* [7] which accumulates thebaine and oripavine as major alkaloids instead of morphine was also established by the treatment of mutagen (ethyl methanesulphonate) and screening of progeny plants.

The T-DNA insertional mutant clone of *P. somniferum* PsM1-2, which we developed by the infection of the *Agrobacterium rhizogenes* strain MAFF03-01724, regenerated shoots from embryogenic callus that lacked the ability to produce morphine. Codeine was detected as a major alkaloid in this *in vitro* shoot culture [8]. By the improvement of the alkaloid analysis and proceeding studies on this mutant, thebaine (*ca.* 55 µg/g dry weight) and codeine (*ca.* 20 µg/g dry weight) were found to be the major opium alkaloids in the *in vitro* regenerated shoots [9]. The information provided from this mutant, which shows an altered alkaloid composition, might make an important contribution to the further modification of alkaloid production in *P. somniferum*, and therefore we carried out genetic and phenotypic analyses on this mutant.

Recently, long unidentified enzymes involved in the two demethylation steps in the conversion of thebaine to morphine were successfully identified as non-heme dioxygenases [10]. These two enzymes, namely, thebaine 6-*O*-demethylase (T6ODM) and codeine *O*-demethylase (CODM), represent the first known 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases that catalyze *O*-demethylation. The altered alkaloid composition in the PsM1-2 mutant may be due to the genetic mutation in the conversion steps from thebaine to morphine. In the present study, an expression analysis of these two enzymes together with selected genes involved in the morphine biosynthesis was carried out to reveal the molecular mechanism of the mutation.

2. Results and Discussion

2.1. Morphological Characteristics of the PsM1-2 Mutants

The days to flowering, number of petals, appearance of split on the boundary of the petal, and height of the aerial part at the seed-filling stage of soil-cultivated T₀ mutant and selfed progenies are summarized in Table 1. The T₀ primary mutant showed delay of flowering and dwarfness. In addition, a deep split was observed on the boundary of the petal (Figure 1). Delay of flowering was consistently observed in the progenies. The number of petals, which was not altered at the T₀, varied in the T₁, T₂ and T₃ progenies. A deep split at the boundary of the petal was observed in 45% of T₁ plants, 33% to 83% of T₂ plants, and 8.3% and 10% of T₃ plants.

Table 1. Summary of the morphological characteristics of PsM1-2 T₀ mutant, selfed progenies, and WT plant.

Progenies	Lines	Number of Plants	Days to Flowering (Mean ± SD) (days)	Number of Petals: Percentage (%)	Split on Petal Boundary (%)	Plant Height (Aerial Part) (Mean ± SD) (cm)
T ₀	WT	1	47 * ¹	4: 100	0	60.0
	T ₀	1	71 * ¹	4: 100	100	38.0
T ₁	WT	6	53.5 ± 4.8	4: 100	0	42.4 ± 5.8
	T ₁	60	100.6 ± 14.6 #####	3: 1.7, 4: 41.7, 5: 35.0, 6: 16.7, 7: 3.3, 8: 1.7	45.0	52.1 ± 8.5 ###
T ₂	WT	12	53.3 ± 4.0	3: 25.0, 4: 75.0	8.3	36.0 ± 7.6
	#1-27(HT)	15	90.8 ± 12.6 #####	5: 60.0, 6: 33.3, 10: 6.7	60.0	44.7 ± 5.4 ##
	#2-17(HT)	6	79.8 ± 2.5 #####	5: 50.0, 6: 33.3, 8: 16.7	83.3	45.1 ± 3.4 #
	#2-1(LT)	12	83.3 ± 6.8 #####	5: 66.7, 6: 16.7, 7: 8.3, 8: 8.3	33.3	35.6 ± 7.8
	#2-6(LT)	10	76.4 ± 3.6 #####	5: 10.0, 6: 40.0, 7: 30.0, 8: 10.0, 12: 10.0	80.0	39.4 ± 3.1
T ₃	WT	6	109.4 ± 0.9 * ²	4: 100	0	80.3 ± 5.8
	#1-27(HT) L#2	10	129.2 ± 11.9 * ³ ,###	4: 40.0, 5: 50.0, 6: 10.0	10.0	45.8 ± 7.9 #####
	#2-17(HT)	12	131.1 ± 7.3 * ⁴ ,####	3: 8.3, 4: 75.0, 5: 16.7	8.3	47.0 ± 13.4 #####
	#2-1					

*¹: Days after transplanting; *²: n = 5; *³: n = 9; *⁴: n = 11; # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.005; and #### p < 0.001 vs. WT.

2.2. Alkaloid Composition in the PsM1-2 Mutants

The soil-cultivated PsM1-2 T₀ primary mutant accumulated 16.3% (% dry weight) of thebaine as a major opium alkaloid in the latex, which was not detected in the WT (Figure 2; Table 2). The

morphine content in the mutant was 1.3%, which was *ca.* one tenth of that in the WT, and the codeine content was 4.2% in the mutant, *vs.* 1.3% in the WT.

Figure 1. Appearances of the PsM1-2 T₀ primary mutant and WT *P. somniferum* soil-cultivated in the phytotron. (A) WT, (B) PsM1-2 T₀. Upper left: flower; right: grown plant; bottom left: petals with deep splits (PsM1-2 T₀ only).

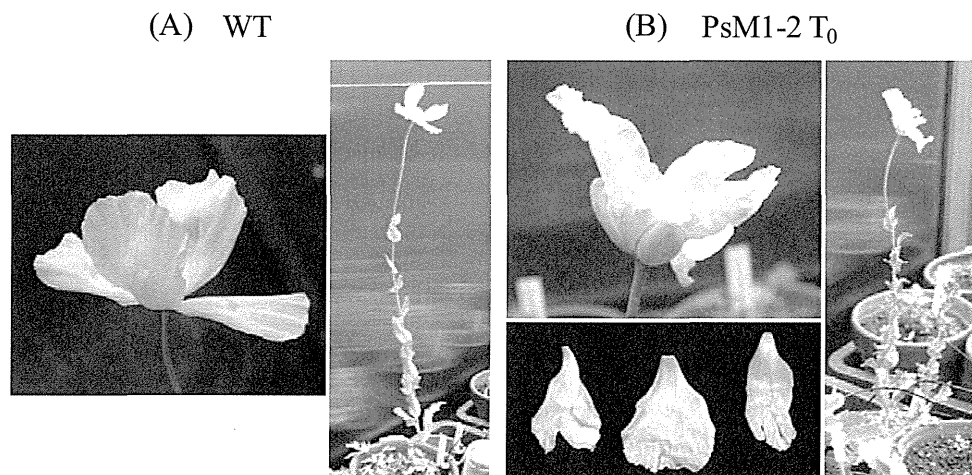
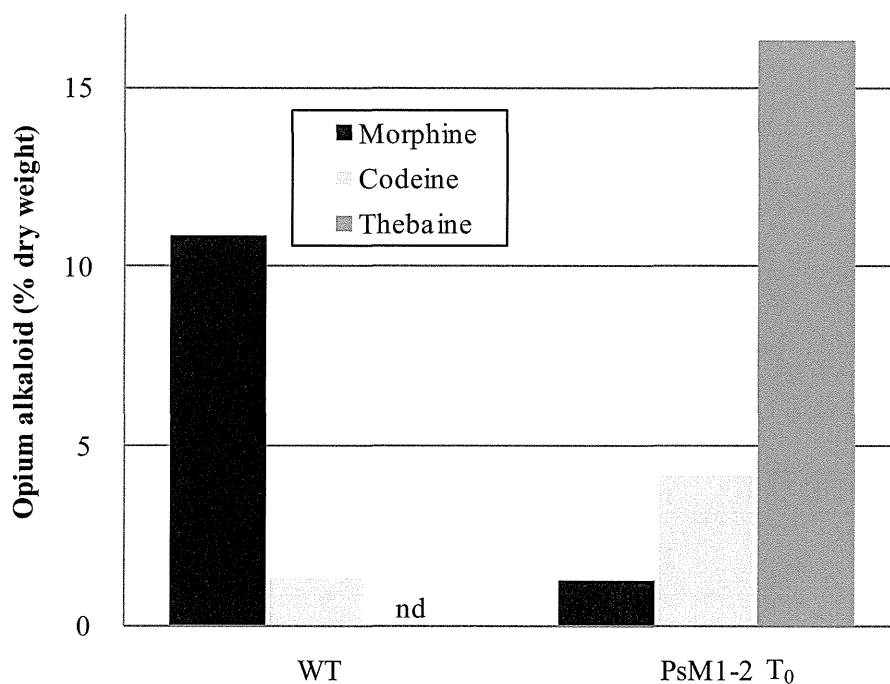


Figure 2. Alkaloid content in the latex from the soil-cultivated WT and PsM1-2 T₀ mutant. nd: Not detected.



The alkaloid compositions in the dried opium of selected progenies are summarized in Table 2, and the morphine and thebaine contents of the T₁, T₂ and T₃ plants are plotted on a scatter diagram (Figure 3). The HPLC chromatograms of the representative lines of the T₁ plants, WT plant, and authentic standards are shown in the Supplementary Figure 1.