

Fig. 5 PCA loading plot of diluted test solutions prepared from Glycyrrhizae Radix.

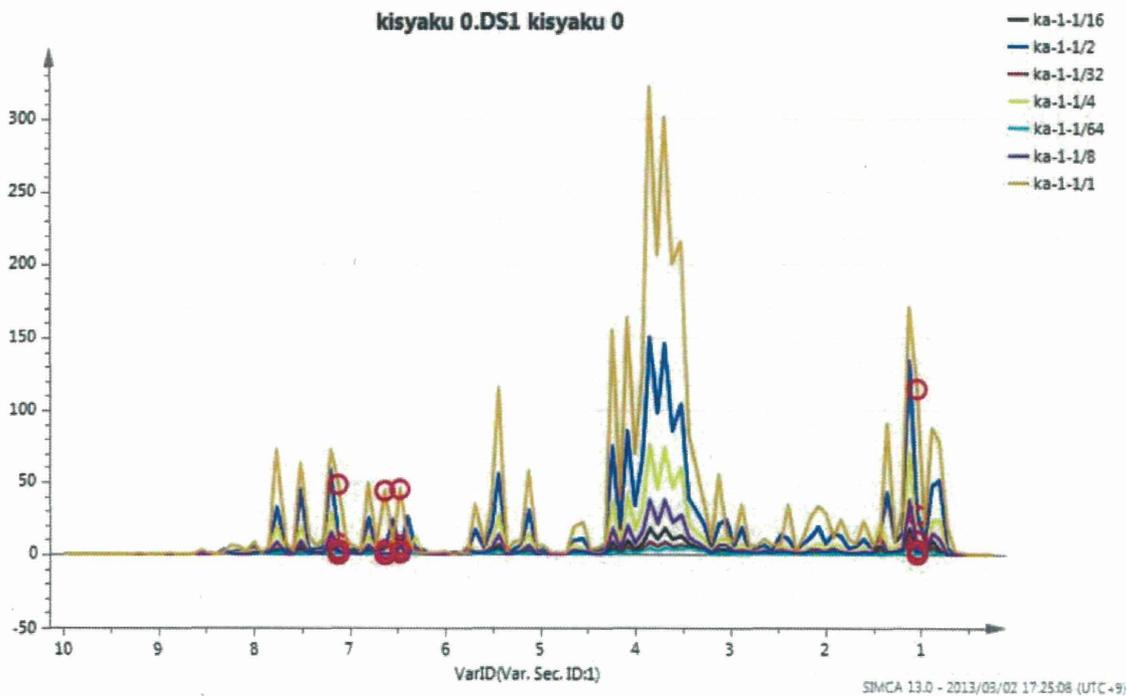


Fig. 6 Chemical shift values contributed to factor 2 in PCA for the diluted test solutions of Glycyrrhizae Radix in several rates.

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

¹H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析による カンゾウの産地と品質の相関について

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 化学成分情報のオミクス解析を用いた生薬の規格化及び標準化について検討するため、産地の異なるカンゾウ（西北カンゾウ及び東北カンゾウ）の ¹H-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（PCA）では、最も累積寄与率の大きくなるファクター 1 と 2 の組み合わせでは産地の違いを表現できなかったものの、より寄与率の小さいファクター 2 と 3 の組み合わせでは西北カンゾウと東北カンゾウが分類される傾向が観測された。これらの分類モデルを作成するため、西北カンゾウと東北カンゾウの違いをクラス変数とした PLS-DA 分析を行った結果、西北カンゾウと東北カンゾウを分類可能となった。また、この分類に関与する化合物としてグリチルリチン及びスクロースが確認された。

研究目的 近年の急速な国民の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、産地の異なるカンゾウを取

り上げた。日本薬局方において、カンゾウは *Glycyrrhiza uralensis* 及び *G. glabra* の根及びストロンと規定されている生薬であり、一般用漢方処方の承認審査基準に記載される漢方処方の約 7 割に使用される重要生薬である。カンゾウは産地により名称が異なり、黒龍江、吉林、遼寧、内モンゴル自治区の一部を産地とする東北カンゾウ、寧夏、陝西、甘肅の一部を産地とする西北カンゾウ、そして新疆ウイグル自治区を産地とする新疆カンゾウなどがある (Fig.1)。今回、東北カンゾウ及び西北カンゾウに着目し、メタボローム解析による産地と成分プロファイルの比較を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

カンゾウは株式会社栃本天海堂より、東北カンゾウ 13 ロット、西北カンゾウ 18 ロット譲り受けた (Table 1). 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。

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

カンゾウを 4 分割し、ボールミルを用い 30 Hz, 1 min の条件で粉碎した。その粉末 10 mg を正確に測り取り、抽出溶媒 1 mL を加え、5 Hz, 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% 添加したものを用いた。

2-2. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には ECA-800 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. データ解析

バケット積分は Alice2 for metabolome (Jeol) を用い、0.08 ppm 単位で行った。多変量解析は Pirouette (Infometrix) を用い、前処理方法としてパレートスケールを適用した。

<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. 研究結果

1. 東北カンゾウの主成分分析

同一ロット内におけるカンゾウのバラツキを確認するため ka-1 の 10 個体を用い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定及び PCA を行った。その PCA スコアプロットを Fig. 2A に示した。本図は横軸に PCA の第 1 主成分スコア、縦軸に第 2 主成分スコアを示している。その結果、青、緑、及び茶色で示した 3 群に分類された。また、東北カンゾウ由来の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを全て重ねて表示したものを Fig. 2B に示した。横軸が $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのケミカルシフト、縦軸にピーク強度を表示した。青で示した試料群は全体的にピーク強度が小さく、抽出率が悪い可能性が考えられた。また、茶色で示した試料群はリクイリチン類及びグリチルリチン類のピーク強度が大きく、緑で示した群はスクロース由来のピーク強度が大きい傾向が観測された。

2. 西北カンゾウの主成分分析

東北カンゾウと同様に西北カンゾウにおいても同一ロット内でのバラツキを観測するため、ka-21 の 10 個体について PCA を行った。PCA スコアプロットを Fig. 3A に示した。横軸に PCA の第 1 主成分スコア、縦軸に第 2 主成分スコアを示している。その結果、4 群に分類可能と示唆された。また、西北カンゾウ由来の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを全て重ねて表示したものを Fig. 3B に示した。横軸が $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのケミカルシフト、縦軸に

ピーク強度を表示した。紫で示した試料群は芳香族領域に他の試料には観測されないピークの存在が観測された。赤で示した群はスクロース由来のピーク強度が大きく、東北カンゾウの緑で示した群と同様のパターンを示していた。灰色で示した群はリクイリチン類及びグリチルリチン類由来のピーク強度が大きく、東北カンゾウの茶色で示した群と同様のパターンを示した。また、黄色で示した群は他の試料に比べ全体的にピーク強度が小さいものの、2.8 ppm 付近に特徴的なピークが観測された。以上の結果から、ka-1, ka-21 共に同一ロット内でのバラツキが大きかったが、それぞれのロット内において、共通する成分プロファイルを持つ群も確認された。

3. ka-1 及び ka-21 の主成分分析

ka-1, ka-21 共に同一ロット内でのバラツキが大きかったが、それぞれを東北カンゾウ、もしくは西北カンゾウの総体と考え、ka-1 と ka-21 の計 20 個体を用い、PCA を行った。その結果を Fig. 4 に示した。横軸に PCA の第 2 主成分スコア、縦軸に第 5 主成分スコアを示している。本条件では、赤で示した東北カンゾウと茶色で示した西北カンゾウは互いに重なり合わずに分布することが確認された。

4. カンゾウ全試料での PCA

以上の解析結果から東北カンゾウと西北カンゾウが化学成分の観点から分類可能な傾向が示唆された。そこで今回入手した全試料を用い PCA を行った。その PCA スコアプロットを Fig. 5 に示した。まず最も累積寄与率の高い第 1 主成分と第 2 主成分の組み合わせに着目した場合、産地を含め、何らかの要因

による分類は観測されなかった (Fig. 5A)。しかし、第 2 主成分と第 3 主成分の組み合わせに着目した場合、東北カンゾウ由来の試料と西北カンゾウ由来の試料間にわずかに分布の偏在が観測された。

5. カンゾウの PLS-DA

PCA により東北カンゾウと西北カンゾウの偏在が確認されたため、より明確な分類を行う目的で、東北カンゾウと西北カンゾウという産地の違いをクラス変数とした PLS-DA 分析を行うこととした。まず、直交成分補正 (OSC) を適用せずに計算した。Fig. 6 は PLS-DA のスコアプロットであり、横軸に第 1 主成分、縦軸に第 2 主成分をプロットし、東北カンゾウ由来の試料を茶色、西北カンゾウ由来の試料を赤で示している。その結果、主に第 1 主成分が正の部分に東北カンゾウが、負の部分に西北カンゾウが分布することが確認されたものの、青で囲った部分に他方のもので混合している試料が観測された。これらの分布がなされた理由を検討したところ、カンゾウの遺伝子型の差異が表現されていることが判明した。カンゾウの遺伝子型は近藤らの方法¹⁾に順じ、測定した結果を平成 23 年度分担報告書にて報告した。結果として Table 2 に示すように葉緑体 DNA *trnH-psbA* 領域において T-4 型を示す試料が大部分を占めていたが、今回、分類できなかった試料は T-1 型もしくは T-2 型を示していた。そこで、T-4 型の遺伝子型を持つ試料に限定し、再度 PLS-DA 解析を行った。Fig. 7 はそのスコアプロットであり、横軸に第 1 主成分、縦軸に第 2 主成分をプロットし、東北カンゾウを茶色、西北カンゾウを赤で示している。結果として、他の群に分類される試料は観測さ

れなかったものの 2 群に分類はされなかった。そこで、妨害成分の影響を除き、より良い分類を行うため、前処理法として、OSC を適用した PLS-DA を行った。Fig. 8A はスコアプロットであり、横軸に第 1 主成分、縦軸に第 2 主成分をプロットし、東北カンゾウを茶色、西北カンゾウを赤で示している。結果として、西北カンゾウと東北カンゾウの 2 群に第 1 主成分側に分類可能だった。この分類に寄与する物質を同定するため、ローディングプロットの確認を行った。Fig. 8B は PLS-DA のローディングプロットであり、横軸に第 1 主成分、縦軸に第 2 主成分を示している。西北カンゾウにはグリチルリチン類の、東北カンゾウはスクロースの寄与が観測された。しかし、全試料の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較したところ、この 2 成分のみで東北カンゾウと西北カンゾウの分類を行うことは困難だった。

D. 考察

今回、カンゾウの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いた多変量解析を行った。

東北カンゾウ、西北カンゾウについてそれぞれ 1 ロットの PCA を行ったところ、両者ともロット内の成分プロファイルのバラツキが観測された。カンゾウはロット内のバラツキが大きいと報告されており²⁾、本研究でもそれを裏付ける結果となった。

続いて、東北カンゾウと西北カンゾウの分類を試みた。PCA ではわずかに試料のバラツキが観測されたのみで、両者の分類は困難だった。そこで、OSC を適用した PLS-DA 分析を行ったところ、両者を分類することが可能であった。また、両者の分類には、カンゾウ試料の遺伝子情報を加えることが、より確度の高い分類に繋がることが明らかになった。

さらに、本分類における因子負荷量を解析した結果、グリチルリチン類及びスクロースがこの分類に大きく寄与していることが明らかとなった。しかし、これら二成分のみでは東北カンゾウと西北カンゾウの分類を説明することはできず、今後より寄与率の低い物質の同定を試みる必要がある。

E. 結論

今回、カンゾウのメタボローム解析を行った結果、PLS-DA により西北カンゾウと東北カンゾウ分類可能となった。この分類に関与する化合物としてグリチルリチン及びスクロースが確認された。しかし、この二化合物のみの定量では両者の分類は困難であり、より寄与率の低い物質の同定が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

若菜大悟, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 山本 豊, 神谷 洋, 川崎武志, 林 茂樹, 菱田敦之, 川原信夫, 柴田敏郎, 合田幸広, シャクヤク及びカンゾウの多変量解析を用いた品質評価, 第 41 回生薬分析シンポジウム (2012. 11, 大阪)

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) K. Kondo, M. Shiba, H. Yamaji, T. Morota, C. Zhengmin, P. Huixia, Y. Shoyama: Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol, Pharm, Bull*, **30**(8), 1497-1502 (2007).

2) K. Tanaka, A. Ina, K. Hayashi, K. Komatsu: Comparison of chemical constituents in *Glycyrrhiza uralensis* from various sources using a multivariate statistical approach, *J. Trad. Med.*, **27**, 210-216 (2010).

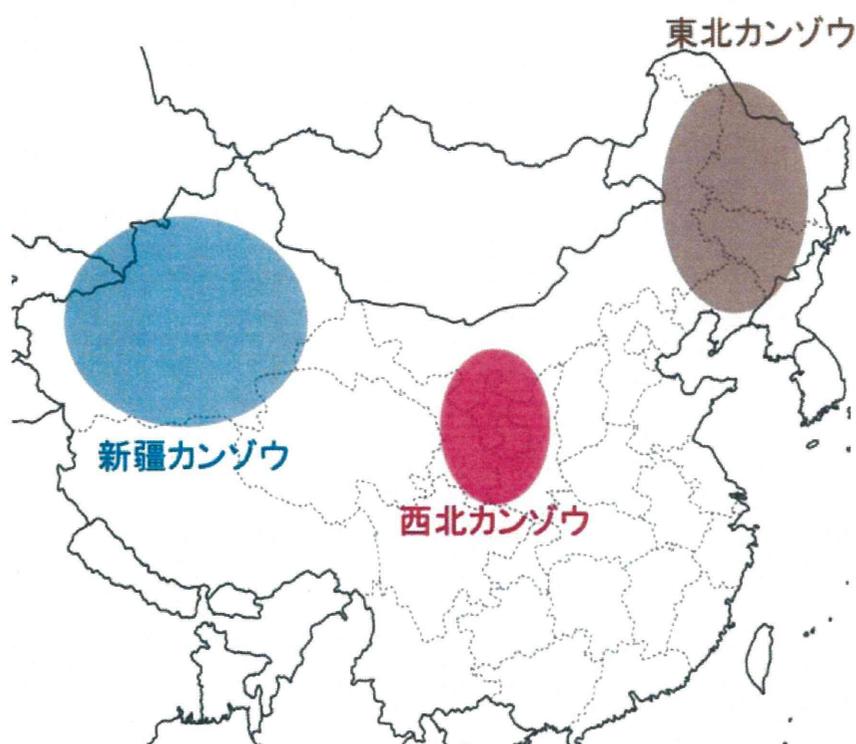


Fig. 1 Habitats of Glycyrrhizae Radix.

Table 1 Detail of Glycyrrhizae Radix using in this study.

東北カンゾウ					西北カンゾウ				
ロット	入手 年月	産地	数	Gly (%)	ロット	入手 年月	産地	数	Gly (%)
Ka-1	1994, 3	吉林	10	4.04	Ka-21	1994, 10	甘肅	10	6.77
Ka-2	1995, 5	内蒙古	3	5.41	Ka-22	1995, 9	陝西	3	3.53
Ka-3	1998, 11	内蒙古	3	4.88	Ka-23	2000, 8	寧夏	3	4.83
Ka-4	1999, 7	内蒙古	3	4.88	Ka-24	2003, 6	内蒙古	3	5.82
Ka-5	2002, 9	内蒙古	3	6.12	Ka-25	2003, 6	内蒙古	3	3.35
Ka-6	2004, 3	内蒙古	3	6.63	Ka-26	2007, 8	内蒙古	3	3.14
Ka-7	2005, 7	内蒙古	3	4.23	Ka-27	2009, 3	甘肅	3	6.82
Ka-8	2006, 12	内蒙古	3	4.65	Ka-28	2009, 12	内蒙古	3	3.00
Ka-9	2007, 2	内蒙古	3	4.20					
Ka-10	2008, 6	内蒙古	3	3.42					
Ka-11	2009, 1	内蒙古	3	4.12					
Ka-12	2010, 5	内蒙古	3	4.83					
Ka-13	2011, 3	内蒙古	3	3.43					

Table 2 Genotype of glycyrrhizae Radix using in this study.

東北カンゾウ				西北カンゾウ			
ロット	入手年月	産地	<i>trnH-psbA</i> ^a	ロット	入手年月	産地	<i>trnH-psbA</i> ^a
Ka-1	1994,3	吉林	T-4: 9,T-2: 1	Ka-21	1994,10	甘肅	T-4: 9,T-2: 1
Ka-2	1995,5	内モンゴ	T-4: 3	Ka-22	1995,9	陝西	T-4: 2,T-2: 1
Ka-3	1998,11	内モンゴ	T-4: 3	Ka-23	2000,8	寧夏	T-4: 1,T-1: 2
Ka-4	1999,7	内モンゴ	T-4: 2,T-2: 1	Ka-24	2003,6	内モンゴ	T-4: 3
Ka-5	2002,9	内モンゴ	T-4: 3	Ka-25	2003,6	内モンゴ	T-4: 2,T-2: 1
Ka-6	2004,3	内モンゴ	T-4: 3	Ka-26	2007,8	内モンゴ	T-2: 2,T-1: 1
Ka-7	2005,7	内モンゴ	T-4: 3	Ka-27	2009,3	甘肅	T-4: 1,T-1: 2
Ka-8	2006,12	内モンゴ	T-4: 3	Ka-28	2009,12	内モンゴ	T-4: 1,T-1: 2
Ka-9	2007,2	内モンゴ	T-4: 3				
Ka-10	2008,6	内モンゴ	T-4: 3				
Ka-11	2009,1	内モンゴ	T-4: 3				
Ka-12	2010,5	内モンゴ	T-4: 3				
Ka-13	2011,3	内モンゴ	T-4: 2,T-1: 1				

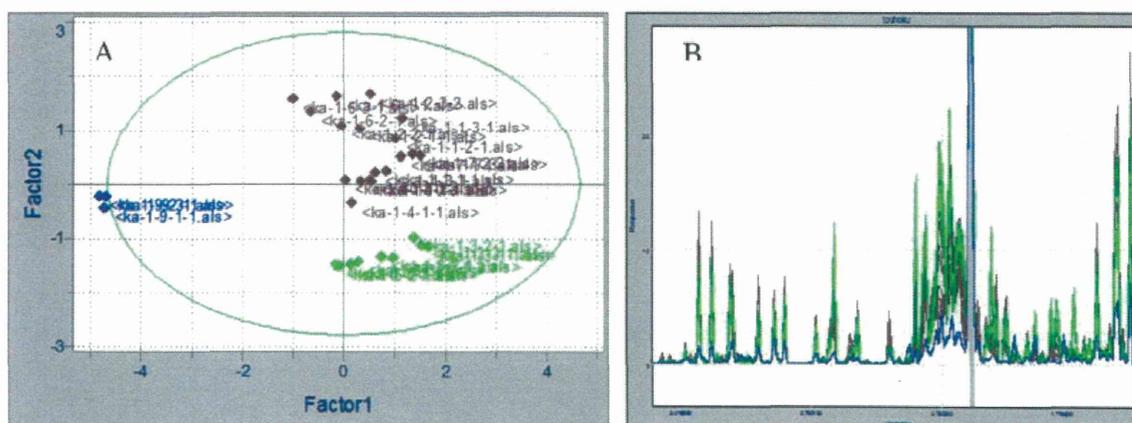


Fig.2 The results of PCA for the samples belonging to Ka-1

A: score plot, B: spectral form of data matrix

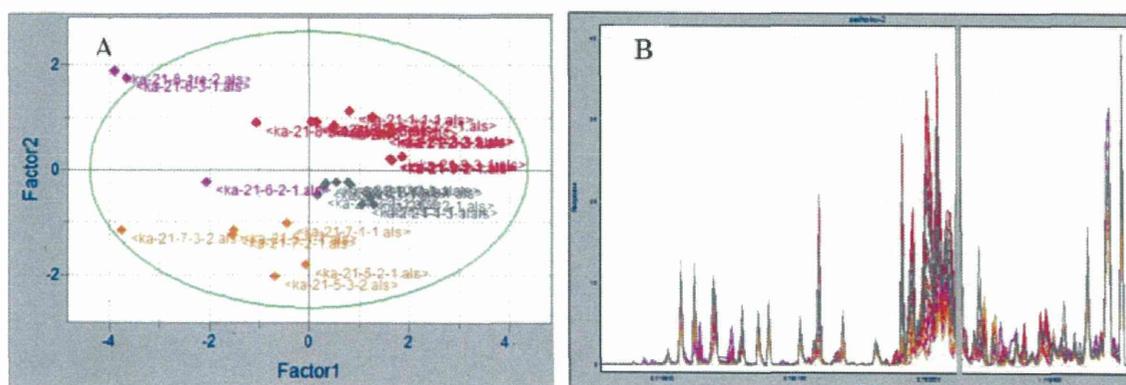


Fig.3 The results of PCA for the samples belonging to Ka-21

A: score plot, B: spectral form of data matrix

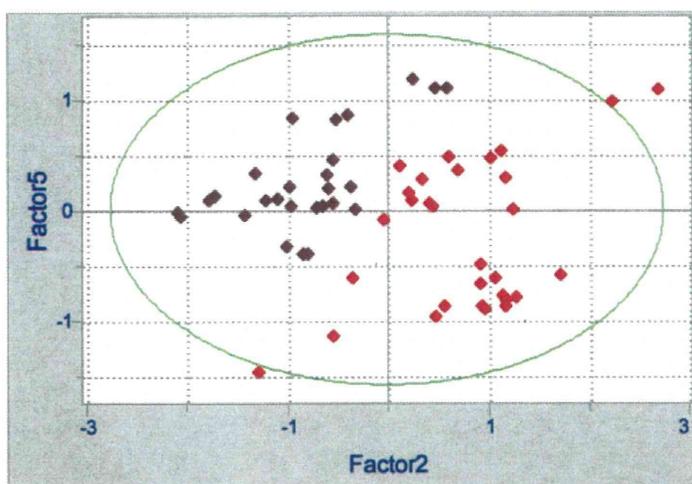


Fig.4 PCA score plot for the samples belonging to Ka-1 and Ka-21

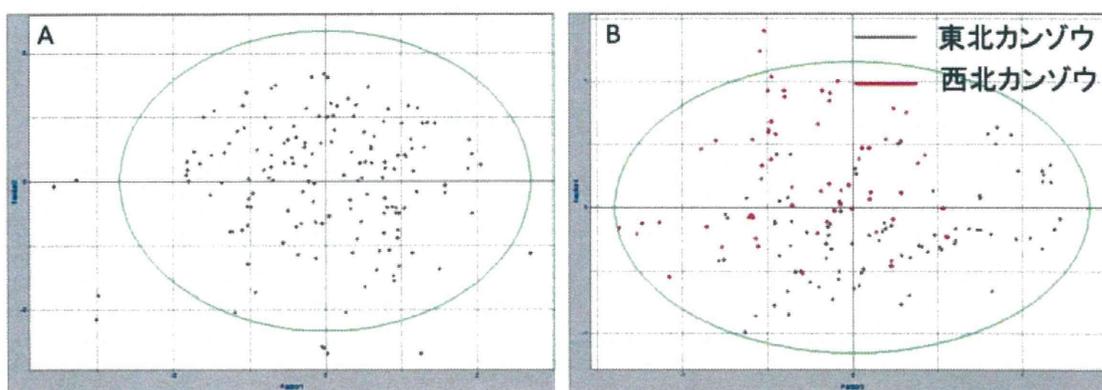


Fig.5 PCA score plots for all samples of Glycyrrhizae Radix

A: factor 1 vs. factor 2, B: factor 2 vs. factor 3

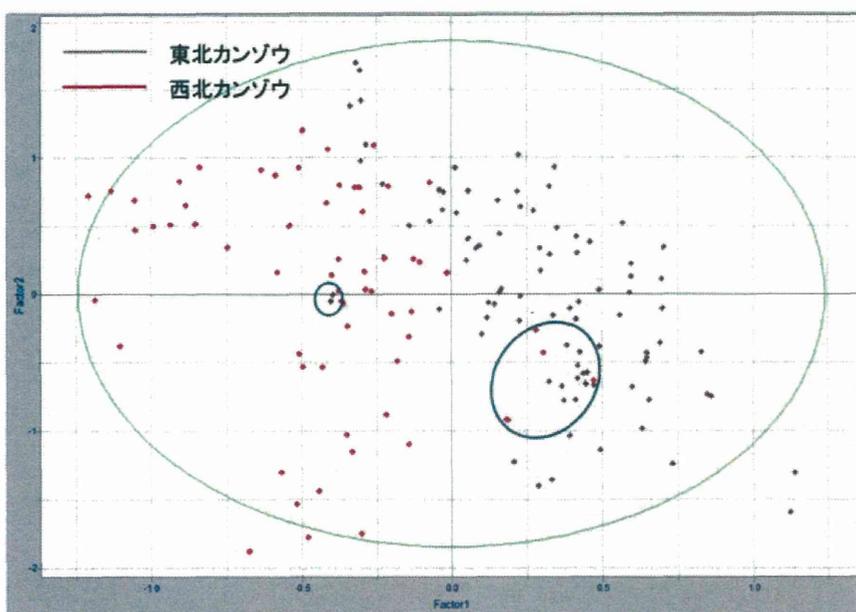


Fig.6 PLS-DA score plot for Glycyrrhizae Radix
 Circles indicate the samples possessing T-1 or T-2 genotypes in *trnH-psbA* IGS sequence of cpDNA

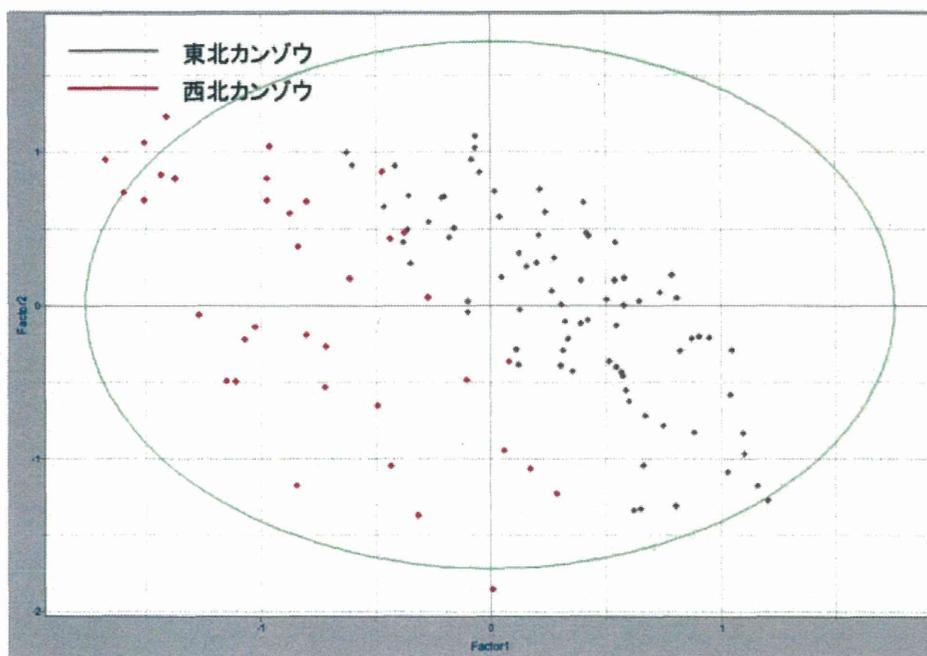
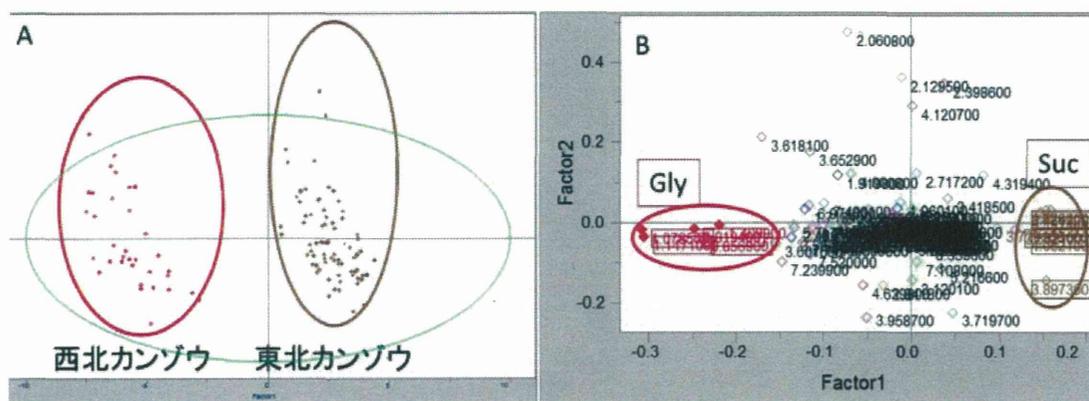


Fig.7 PLS-DA score plot for Glycyrrhizae Radix excluding the samples possessing the genotypes T-1 and T-2



3.8 The results of PLS-DA preprocessed by OSC for Glycyrrhizae Radix
 A: score plot, B: loading plot

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

¹H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析による カンゾウの遺伝子型と品質の相関について

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 化学成分情報のオミクス解析を用いた生薬の規格化及び標準化を検討するため、遺伝子型の異なるカンゾウ試料の ¹H-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。PLS-DA 分析を行った結果、それぞれの遺伝子型と成分プロファイルの相関が確認された。この時、寄与の大きい化合物としてグリチルリチン類、リクイリチン類、グルタミン、グルコース及びスクロースが確認された。

研究目的 カンゾウの規格化、標準化を検討する目的で産地の異なるカンゾウ間の PLS-DA 分析を行った際、遺伝子型の異なる個体を除くことにより、両者の良い分離が確認された。このことから、遺伝子型が異なる個体間では成分プロファイルに差異が存在することが示唆されたため、遺伝子型の違いに着目した多変量解析を行うこととした。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

カンゾウは栃本天海堂株式会社より、東北カンゾウ 13 ロット、西北カンゾウ 18 ロット譲り受けた (Table 1)。

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。

2. 実験方法

2-1. 試験溶液の調製

カンゾウを 4 分割し、ボールミルを用い 30 Hz, 1 min の条件で粉碎した。その粉末 100 mg を正確に測り取り、抽出溶媒 1 mL を加え、5 Hz, 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. ¹H-NMR スペクトルの測定

¹H-NMR スペクトルの測定には ECA-800 型核磁気共鳴装置 (Jeol) を用いた。¹H-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. データ解析

パケット積分は Alice2 for metabolome (Jeol) を用い、0.08 ppm 単位で行った。PLS-DA は Pirouette (Infometrix) を用い、前処理方法としてパレートスケールを適用した。

<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. 研究結果

カンゾウの各個体の遺伝子型は近藤らの方法¹⁾に準じ解析した。その結果を Table 2 に示した。東北カンゾウでは全 46 個体中 T-1 型の遺伝子型を持つものが 1 個体、T-2 型が 2 個体、T-4 型が 43 個体存在した。西北カンゾウでは全 31 個体中 T-1 型を示したものが 7 個体、T-2 型が 5 個体、T-4 型が 19 個体存在した。この遺伝子型の違いをクラス変数とした PLS-DA を行った。Fig. 1 は T-1 型に着目し PLS-DA を行った結果であり、Fig. 1A はスコアプロット、Fig. 1B はローディングプロットを示している。Fig. 1A から T-1 型と T-2 型及び T-4 型の 2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、Fig. 1B を確認した。その結果、T-1 型に特徴的な化学成分として、スクロース、グルコース及びグルタミンが、T-2 型及び T-4 型に特徴的な成分としてグリチルリチン類が観測された。

次に T-2 型に着目し PLS-DA を行った。Fig. 2 はその結果を示しており、Fig. 2A はス

コアプロット、Fig. 2B はローディングプロットを示している。Fig. 2A では T-1 型に着目した時と同様に、T-2 型と T-1 型及び T-4 型の 2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、Fig. 2B を確認した。その結果、T-2 型に特徴的な化学成分は発見できなかったが、T-1 型及び T-4 型に特徴的な成分としてグリチルリチン類、リクイリチン類及びグルコースが観測された。

さらに T-4 型に着目し PLS-DA を行った。Fig. 3 は、その結果を示しており、Fig. 3A はスコアプロット、Fig. 3B はローディングプロットを示している。Fig. 3A では上記と同様に、2 群が観測された。この分類に寄与する物質を同定するため、Fig. 3B を確認した。その結果、T-4 型に特徴的な化学成分として、グリチルリチン類、リクイリチン類及びグルコースが、T-1 型及び T-2 型に特徴的な成分としてグルタミン及びスクロースが観測された。以上の結果から、T-4 型は T-1 型及び T-2 型に対し、グリチルリチン類の含量が高い傾向が示唆された。そのため、カンゾウの各個体が含有するグリチルリチン含量を ¹H-NMR スペクトルの積分値から簡易的に定量した。その結果を Table 3 に示した。T-4 型は他の遺伝子型のものに比べグリチルリチン含量が高いことが判明した。

D. 考察

カンゾウの ¹H-NMR スペクトルを用いた多変量解析を行った。

各遺伝子型をクラス変数とした PLS-DA 解析の結果、各遺伝子型の成分プロファイルに特徴が観測された。T-1 型はスクロースやグルコース、グルタミンなどの一次代謝産物の含量が多く、T-2 型はグリチルリチン類やリ

クイリチン類が少なく、T-4 型は逆にグリチルリチン類やリクイリチン類、グルコースの含量が多い結果となった。

Kojoma らは、同一条件下で栽培した実生苗由来 5 年生のカンゾウ、100 個体のグリチルリチン及びリクイリチン含量を測定し、これらの化合物の含量の個体差が非常に大きいことを報告している²⁾。このことは、カンゾウのグリチルリチン及びリクイリチン含量のパラッキには、生育環境要因ばかりでなく、遺伝的形質の違いも大きく関与していることを示唆しており、本研究で得られた結果は、上記の報告と良く一致する。また、日本薬局方では、カンゾウの規格基準の一つとして、グリチルリチン 2.5% 以上の含有を定めている。今回、栃本天海堂より提供を受けた試料、全 77 個体中 62 個体を T-4 型の遺伝子型を持つ試料が占めた。今回の研究結果から、T-4 型の遺伝子型を持つ試料が、グリチルリチン含量の高いことが示されており、局方の規格基準により、自ずとグリチルリチン含量の高い遺伝子型を持つものが市場で選択されていることがうかがえた。

E. 結論

カンゾウの遺伝子型と ¹H-NMR スペクトルデータを用いた多変量解析を行った結果、各遺伝子型に特徴的な成分パターンが見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

1) 若菜大悟, 内山奈穂子, 丸山卓郎, 山本 豊, 神谷 洋, 川崎武志, 林 茂樹, 菱田敦之, 川原信夫, 柴田敏郎, 合田幸広, シャクヤク及びカンゾウの多変量解析を用いた品質評価, 第 41 回生薬分析シンポジウム (2012. 11, 大阪)

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) K. Kondo, M. Shiba, H. Yamaji, T. Morota, C. Zhengmin, P. Huixia, Y. Shoyama, Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**(8), 1497-1502 (2007).

2) M. Kojoma, S. Hayashi, T. Shibata, Y. Yamamoto, H. Sekizaki, Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, **34** (8), 1334-1337 (2011).

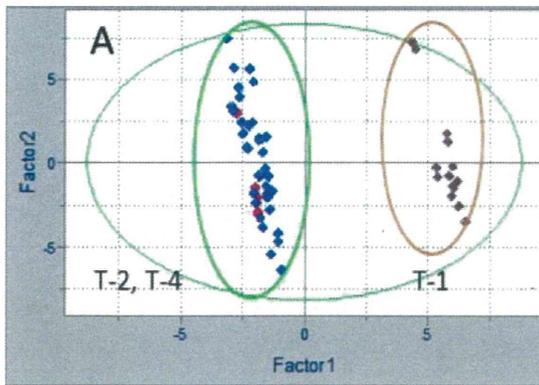
Table 1 Detail of Glycyrrhizae Radix using in this study

東北カンゾウ					西北カンゾウ				
ロット	入手 年月	産地	数	Gly (%)	ロット	入手 年月	産地	数	Gly (%)
Ka-1	1994, 3	吉林	10	4.04	Ka-21	1994, 10	甘肅	10	6.77
Ka-2	1995, 5	内蒙古	3	5.41	Ka-22	1995, 9	陝西	3	3.53
Ka-3	1998, 11	内蒙古	3	4.88	Ka-23	2000, 8	寧夏	3	4.83
Ka-4	1999, 7	内蒙古	3	4.88	Ka-24	2003, 6	内蒙古	3	5.82
Ka-5	2002, 9	内蒙古	3	6.12	Ka-25	2003, 6	内蒙古	3	3.35
Ka-6	2004, 3	内蒙古	3	6.63	Ka-26	2007, 8	内蒙古	3	3.14
Ka-7	2005, 7	内蒙古	3	4.23	Ka-27	2009, 3	甘肅	3	6.82
Ka-8	2006, 12	内蒙古	3	4.65	Ka-28	2009, 12	内蒙古	3	3.00
Ka-9	2007, 2	内蒙古	3	4.20					
Ka-10	2008, 6	内蒙古	3	3.42					
Ka-11	2009, 1	内蒙古	3	4.12					
Ka-12	2010, 5	内蒙古	3	4.83					
Ka-13	2011, 3	内蒙古	3	3.43					

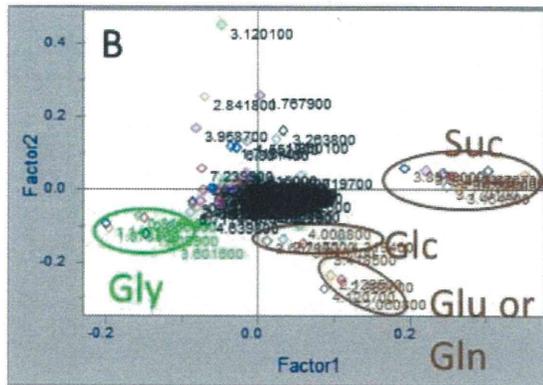
Table 2 Genotypes of Glycyrrhizae Radix used in this study.

東北カンゾウ				西北カンゾウ			
ロット	入手年月	産地	<i>trnH-psbA</i> *	ロット	入手年月	産地	<i>trnH-psbA</i> *
Ka-1	1994,3	吉林	T-4: 9, T-2: 1	Ka-21	1994,10	甘肅	T-4: 9, T-2: 1
Ka-2	1995,5	内蒙古	T-4: 3	Ka-22	1995,9	陝西	T-4: 2, T-2: 1
Ka-3	1998,11	内蒙古	T-4: 3	Ka-23	2000,8	寧夏	T-4: 1, T-1: 2
Ka-4	1999,7	内蒙古	T-4: 2, T-2: 1	Ka-24	2003,6	内蒙古	T-4: 3
Ka-5	2002,9	内蒙古	T-4: 3	Ka-25	2003,6	内蒙古	T-4: 2, T-2: 1
Ka-6	2004,3	内蒙古	T-4: 3	Ka-26	2007,8	内蒙古	T-2: 2, T-1: 1
Ka-7	2005,7	内蒙古	T-4: 3	Ka-27	2009,3	甘肅	T-4: 1, T-1: 2
Ka-8	2006,12	内蒙古	T-4: 3	Ka-28	2009,12	内蒙古	T-4: 1, T-1: 2
Ka-9	2007,2	内蒙古	T-4: 3				
Ka-10	2008,6	内蒙古	T-4: 3				
Ka-11	2009,1	内蒙古	T-4: 3				
Ka-12	2010,5	内蒙古	T-4: 3				
Ka-13	2011,3	内蒙古	T-4: 2, T-1: 1				

*:K. Kondo, M. Shiba, H. Yamaji, T. Morota, C. Zhengmin, P. Huixia, Y. Shoyama: Species identification of Licorice using nrDNA and cpDNA genetic markers, *Biol, Pharm, Bull*, **30**(8), 1497-1502 (2007).

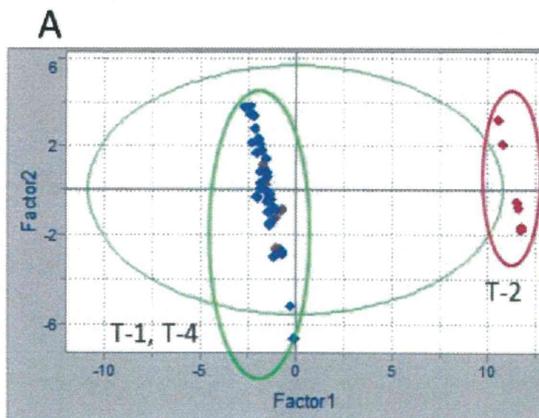


T-1 vs. T-2, T-4

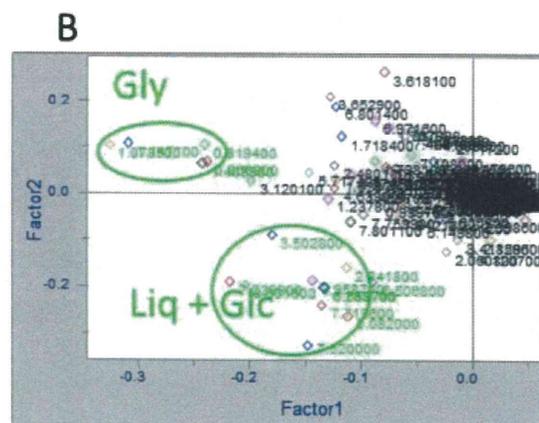


T-1 vs. T-2, T-4

Fig.1 PLS-DA of genotype T-1 vs. T-2 and T-4
A: score plot, B: loading plot

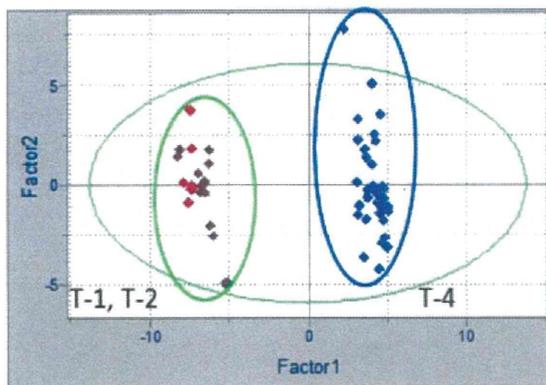


T-2 vs. T-1, T-4

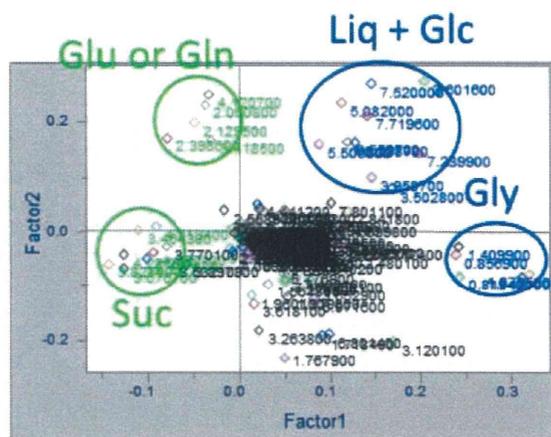


T-2 vs. T-1, T-4

Fig.1 PLS-DA of genotype T-2 vs. T-1 and T-4
A: score plot, B: loading plot



T-4 vs. T-1, T-2



T-4 vs. T-1, T-2

Fig.1 PLS-DA of genotype T-4 vs. T-1 and T-2

A: score plot, B: loading plot

Table 3 Glycyrrhizin content of Glycyrrhizae Radix in each genotype.

	T-1	T-2	T-4
平均 (μg) ± 標準誤差 *	0.253 ± 0.026	0.157 ± 0.010	0.374 ± 0.017
最小値	0.065	0.102	0.184
最大値	0.399	0.185	0.575
標本数	16	8	38

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

メタボローム解析におけるピーク同定を目的とした カンゾウ成分の単離，構造決定について

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 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルデータを用いたメタボローム解析の評価を行う際の標品を得るため，カンゾウを実験材料に用い，メタノール抽出エキスの化学成分分離を行った。その結果，flavanone 類 2 種，chalcone 類 3 種，isoflavone 類 4 種，isoflavanone 類 4 種，benzofuran 類 1 種，そして coumarin 類 4 種を単離，同定した。

研究目的

本研究課題では，生薬の $^1\text{H-NMR}$ を用いたメタボローム解析として，芍薬甘草湯をモデル処方に選定し，その構成生薬であるシャクヤクとカンゾウのメタボローム解析を行っている。 $^1\text{H-NMR}$ によるメタボローム解析では，直接，構造情報に結び付くデータが，ケミカルシフト値という形で得られるのが利点であるが，植物成分は構造多様性が大きいので，因子負荷量解析で得られたケミカルシフト値のみから化合物を同定することには，しばしば困難を伴う。そこで本研究では，上記の化合物同定を行う際の標品を得ることを目的に，カンゾウの成分分画を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料及び試薬

カンゾウは株式会社栃本天海堂より購入した。

重溶媒は太陽日酸から購入し，重メタノー

ル及び重ジメチルスルホキシドは 100% のものを用いた。その他の試薬は，HPLC グレードあるいは，研究グレードのものを使用した。

2. 実験方法

2-1. 装置及び測定条件

分取 HPLC は島津製作所製 Shimadzu LC-8A system (ポンプ: LC-8A, 紫外可視検出器: SPD6AV) にインテグレーターとして Shimadzu CR-7A plus を接続したものを用いた。溶媒は HPLC グレードのものを用い，カラムは GLscience 社製 Inertsil ODS-3 (10 i. d. x 250 mm) を使用した。

NMR スペクトルは JEOL ECA-800 を用いた。 $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ の化学シフト値はテトラメチルシランに対する δ 値 (ppm) で示した。

化合物の分画

カンゾウ 400 g をメタノールで冷浸した

後、溶媒を留去し、メタノール抽出エキス 77.1 g を得た。このエキスに水を加え、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、及びブタノールで順次分配し、濃縮、乾固することで、各有機溶媒画分を得た (Chart 1)。ブタノール画分 (10.3 g) を、ODS を担体としたカラムクロマトグラフィーに負荷し、4 画分を得た。この時、移動相として 20% メタノールから 100% メタノールを用いた。第 2 画分を、シリカゲルを担体としたカラムクロマトグラフィーに、移動相としてクロロホルム-メタノール (3:1) を用いて負荷し、3 画分を得た。この第 2 画分をメタノールで再結晶し、liquiritin (1: 250 mg)¹⁾ を得た。続いて、第 3 画分を ODS を担体としたカラムクロマトグラフィーで、10% メタノールから 40% メタノールを移動相として用いる条件で分画し、3 画分を得た。第 1 画分を、40%メタノールを移動相とした HPLC で精製し、liquiritin apioside (2: 293 mg)²⁾ を得た。次に、第 2 画分を 25% アセトニトリルを用いた HPLC で精製し、isoliquiritin apioside (3: 10 mg)³⁾ を得た。続いて、第 3 画分を 30% アセトニトリルを移動相とした HPLC で精製し isoliquiritin (4: 18 mg)⁴⁾ を得た (Chart 2)。

酢酸エチル画分 (10.9 g) を、シリカゲルを用いたクロマトグラフィーに負荷し、10 分画を得た。その第 4 画分 (674 mg) を 70% メタノールを用いた HPLC で分画し、6 画分を得た。その第 2 画分を 65% メタノールを用いた HPLC で精製し、3,4,3',4'-tetrahydroxy-2-methoxychalcone (5: 18 mg)⁵⁾ 及び ononin (6: 1 mg)⁶⁾ を得た。酢酸エチル画分をカラムクロマトグラフィーで分画して得られた第 6 画分をシリ

カゲルを用いた LPLC に負荷し、5 画分を得た。この時移動相としてクロロホルム-酢酸エチル (4:1) を用いた。この第 3 画分を 70% メタノールを用いた HPLC で分画し、5 画分を得た。この第 2 画分は 65% メタノールを移動相とした HPLC で精製し、licoricone (7: 7 mg)⁷⁾ および licoricidin (8: 1 mg)⁸⁾ を得た。第 3 画分は 50% アセトニトリルを用いた HPLC で精製し、glycyrol (9: 7 mg)⁹⁾, glycyrin (10: 14 mg)¹⁰⁾, 及び glyasperin D (11: 4 mg)¹¹⁾ を得た。第 4 画分は dehydroglyasperin D (12: 51 mg)¹²⁾, 第 5 画分は gancaonin I (13: 42 mg)¹³⁾ と同定された。第 1 画分は 65% メタノールを用いた HPLC で分画し、5 画分を得た。この第 1 画分を 50% アセトニトリルを用いた HPLC で精製し、vestitol (14: 4 mg)¹⁴⁾ を得た。第 2 画分は 50% アセトニトリルを用いた HPLC に負荷され、formononetin (15: 3 mg)¹⁵⁾ 及び licoarylcoumarin (16: 1 mg)¹⁶⁾ を得た。第 3 画分を 60% アセトニトリルを用いた HPLC で精製し、isoglycycoumarin (17: 4 mg)¹⁷⁾ 及び isosoporonol (18: 1 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. 結果及び考察

カンゾウの成分研究の結果、flavanone 類として liquiritin (1) 及び liquiritin apioside (2), chalcone 類として isoliquiritin apioside (3), isoliquiritin (4) 及び 2-methoxy-3,4,3',4'-tetra-

hydroxychalcone (5), isoflavone 類として licoricidin (8), glyasperin D (11), dehydroglyasperin D (12) 及び vestitol (14), isoflavanone 類として ononin (6), licoricone (7), formononetin (15), 及び isosophonol (18), benzofuran 類として gancaonin I (13), そして coumarin 類として glycyrol (9), glycyrin (10), licoaryl coumarin (16), 及び isoglycy coumarin (17) を単離した。

各物質の同定は各種二次元 NMR スペクトル及び文献値との比較により決定した。

D. 結論

カンゾウの成分研究の結果、リクイリチン類、フラボン類およびグリチクマリン類が単離された。特に、グリチクマリンは PDE 阻害活性を示し¹⁸⁾、カンゾウを構成生薬とする芍薬甘草湯の作用機序の一つを担う物質と考えられている。今後、これらの物質を標品として用い、メタボローム解析行う際の化合物同定を行う予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

特に無し

2. 学会発表

特になし

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) H. -N. Lyu, H. -Y. Kwak, D. -Y. Lee, K. -T. Kim, S. -Y. Kim, N. -I Baek: Isolation of flavonoids from processed Aconiti Tuber, *J. Appl. Biol. Chem.*, **51**, 165-168 (2008).
- 2) P. Montoro, M. Maldini, M. Russo, S. Postorino, S. Piacente, C. Pizza: Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI-MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **54**, 535-544 (2011).
- 3) P. Kaur, S. Kaur, N. Kumar, B. Singh, S. Kumar: Evaluation of antigenotoxic activity of isoliquiritin apioside from *Glycyrrhiza glabra* L., *Toxic. in Vitro*, **23**, 680-686 (2009).
- 4) S. Khamsan, S. Liawruangrath, A. Teerawutkulrag, S. G. Pyne, M. J. Garson, B. Liawruangrath: The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. ssp. *rhombofolia* (G. F. W. Meijer) Gentry, *Acta Pharm.*, **62**, 181-190 (2012).
- 5) T. Hatano, M. Takagi, H. Ito, T. Yoshida: Phenolic constituents of Liquorice. VII. A new chalcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenolics from Liquorice, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1485-1492 (1997).
- 6) S. A. Fedoreyev, V. P. Bulgakov, O. V. Grishchenko, M. V. Veselova, O. E. Krivoschekova, N. I. Kulesh, V. A.