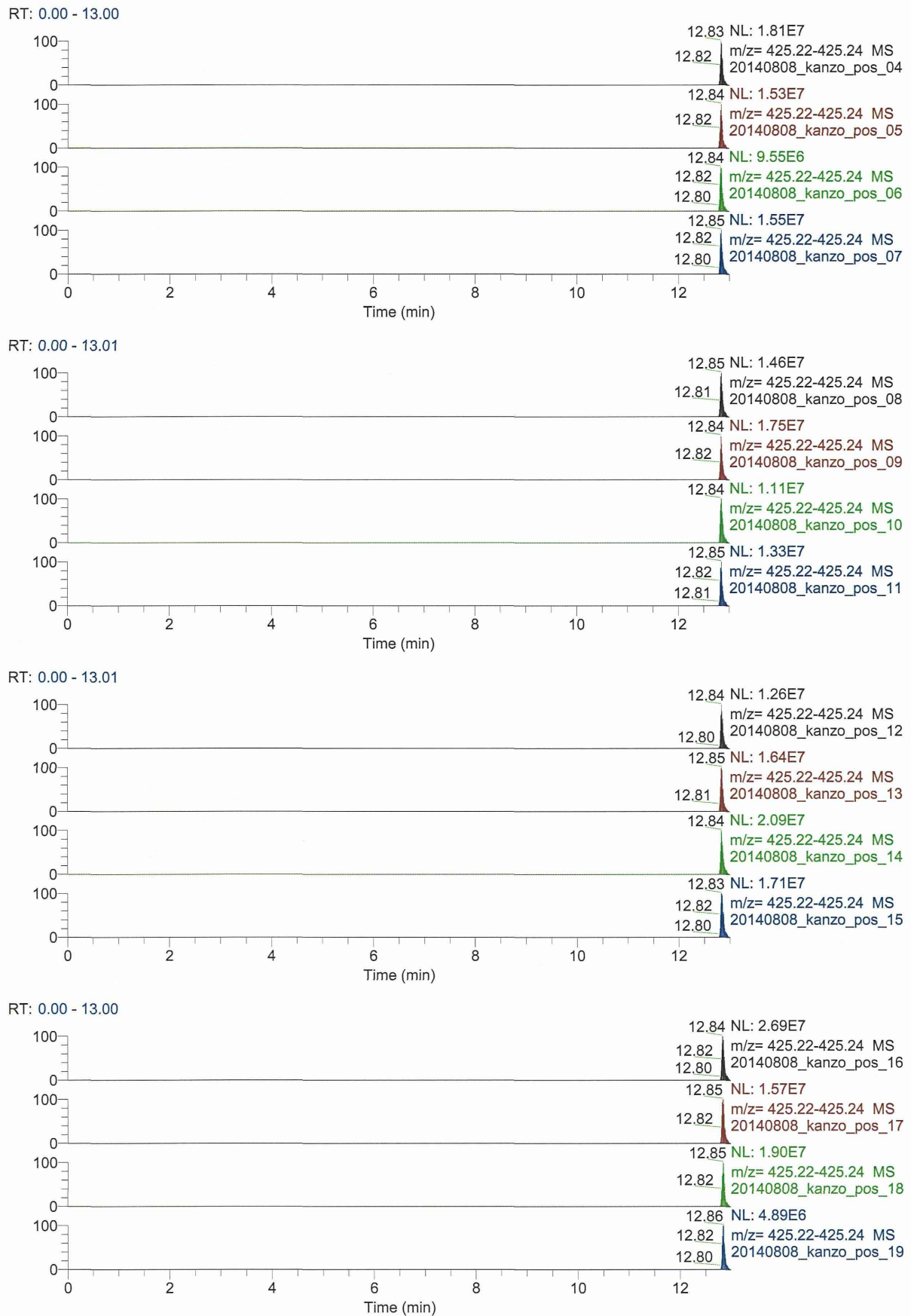
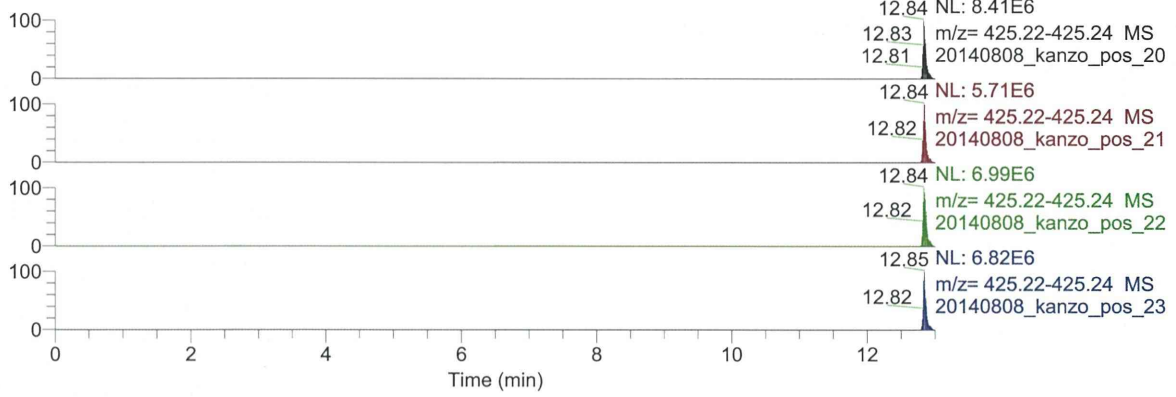


図 7 25 年度および 26 年度測定試料の正イオン検出データにおける m/z 425.22 - 425.24 の XIC (*G. Uralensis* 群試料)



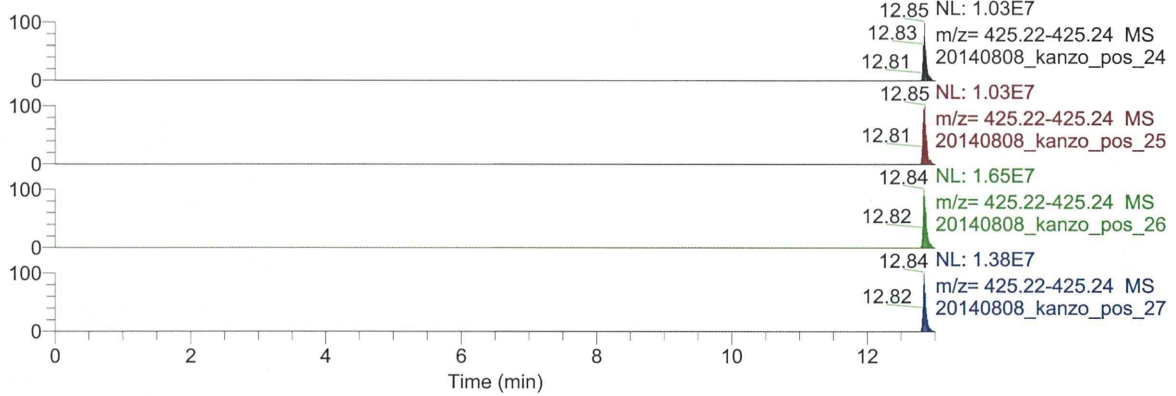
GUVI-1A ~ GUVI2-9B

RT: 0.00 - 13.00



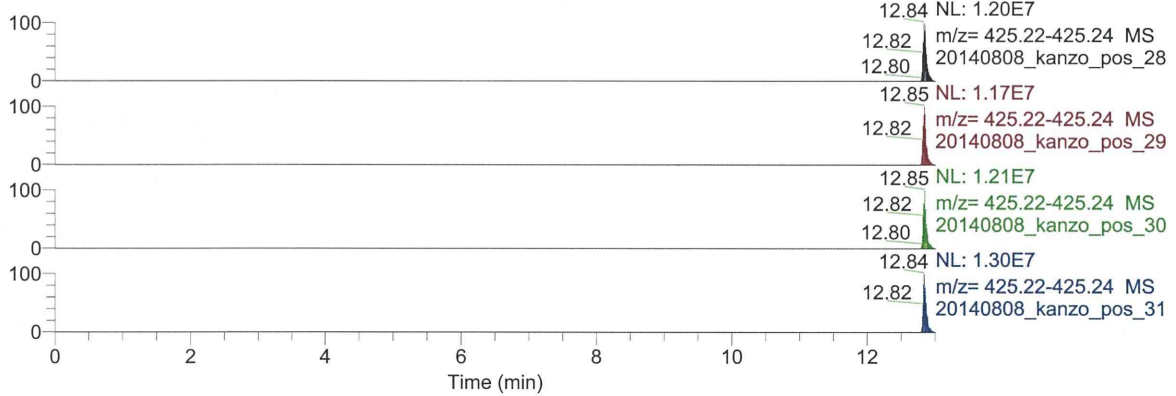
IAIV1-HK1
SBIV2-HK2

RT: 0.00 - 13.01

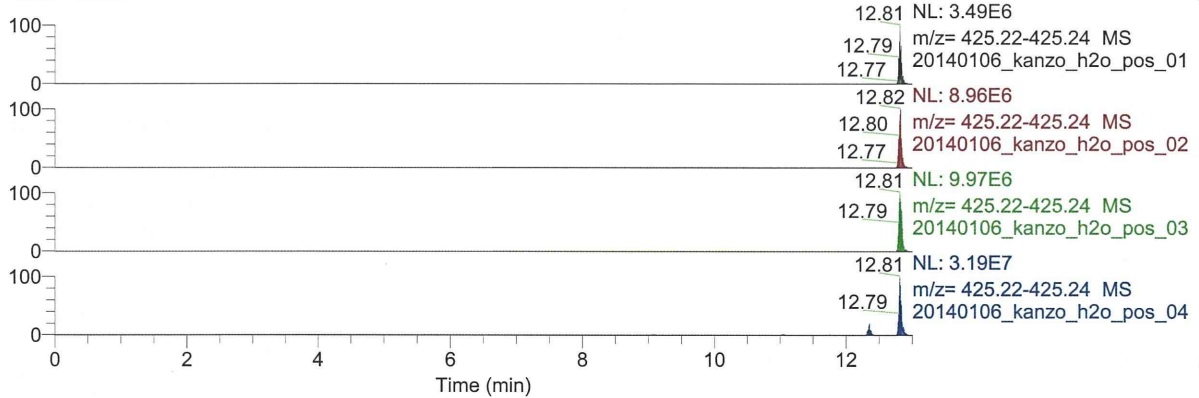


GUIV1#5
GUIV1#10

RT: 0.00 - 13.01

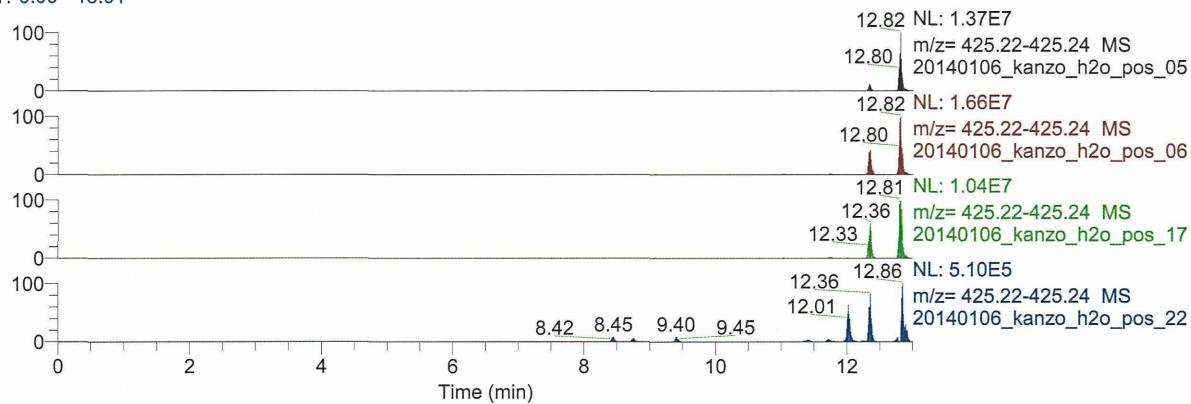


RT: 0.00 - 13.00

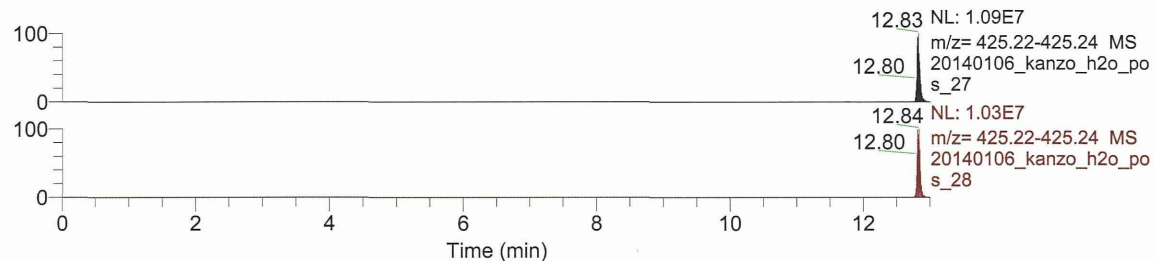
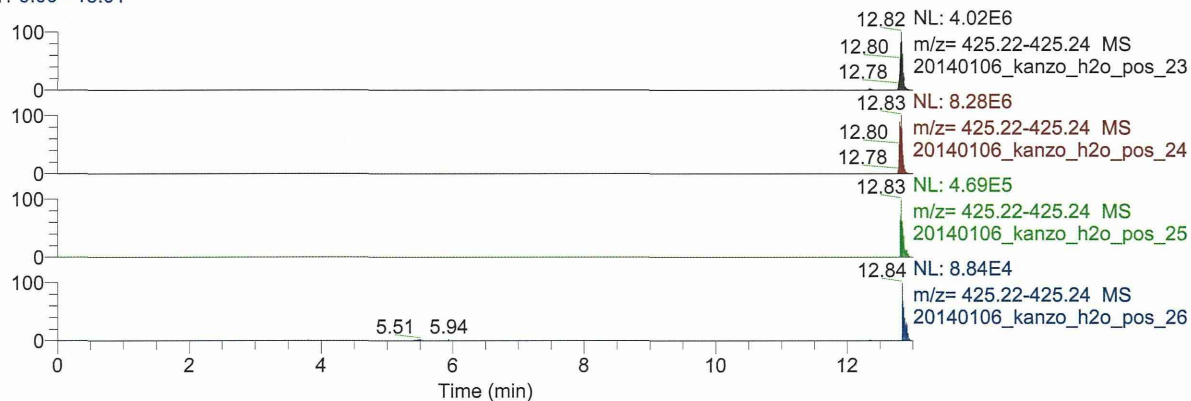


昨年度測定分の

RT: 0.00 - 13.01



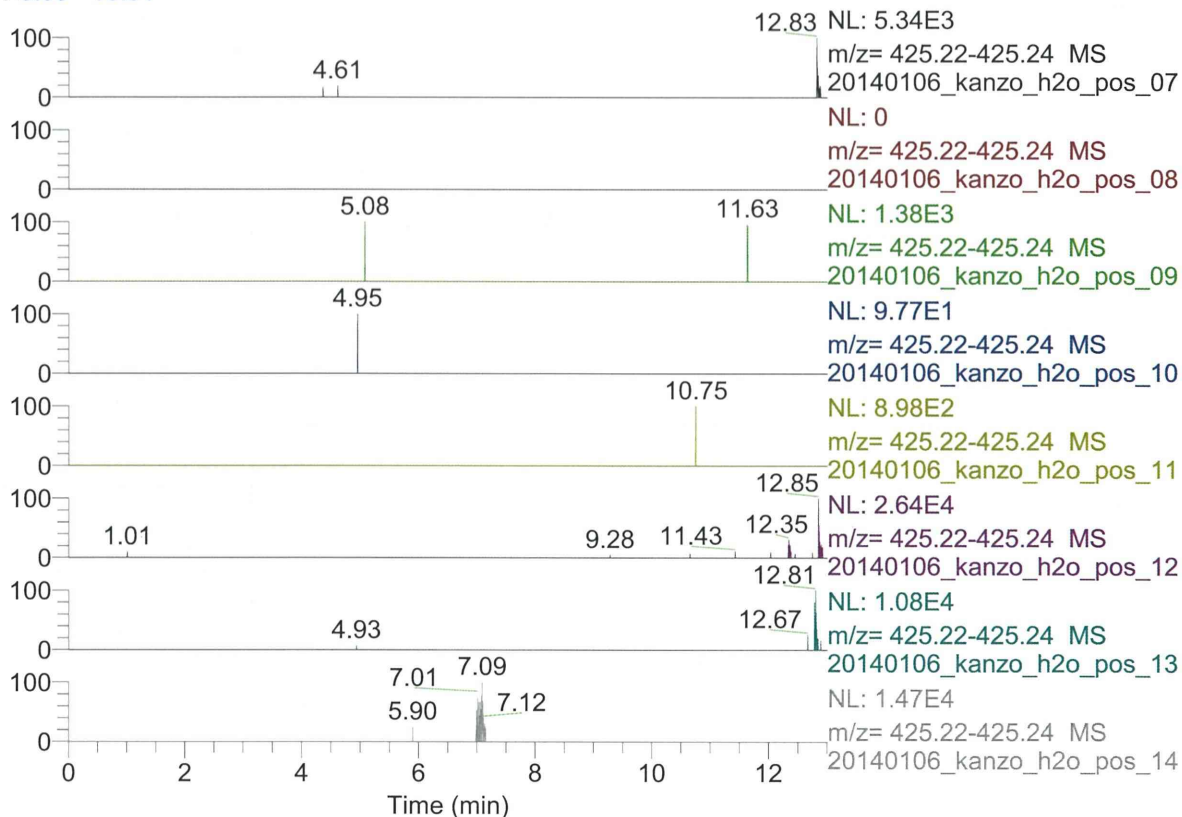
RT: 0.00 - 13.01



G. wralensis 糖結晶

図 8 25 年度および 26 年度測定試料の正イオン検出データにおける m/z 425.22 - 425.24 の XIC (*G. glabra* および *G. inflata* 群試料)

RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.01

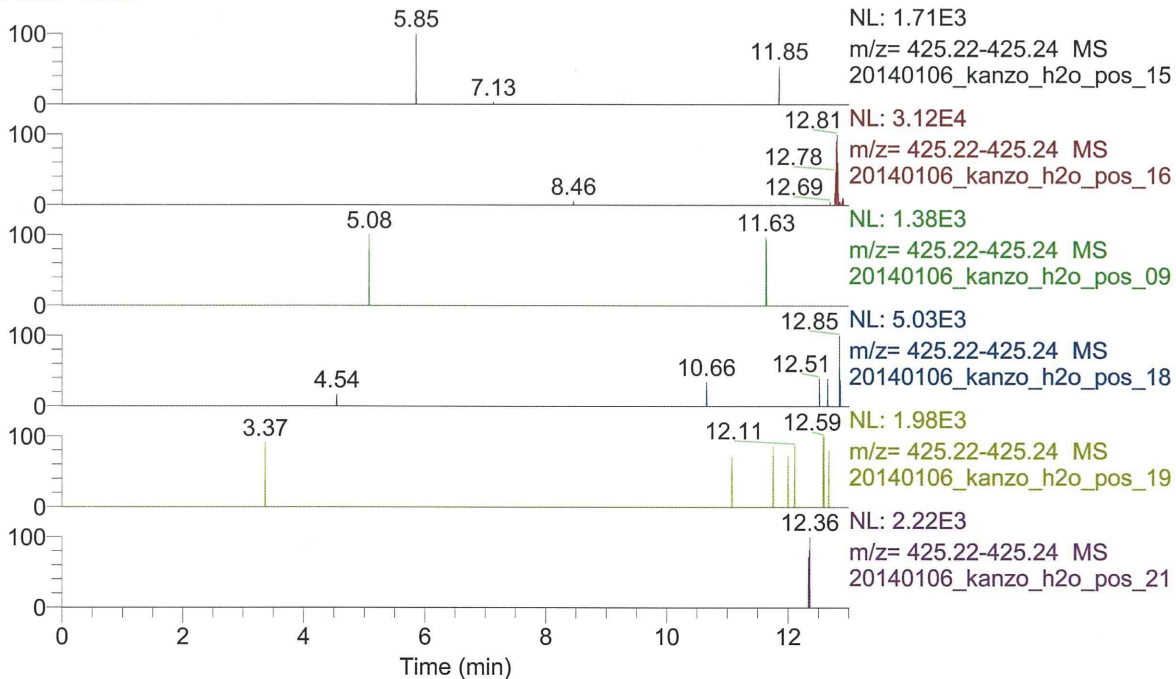


図9 26年度新規測定試料の負イオン検出データを用いた多変量解析によるスコアプロット

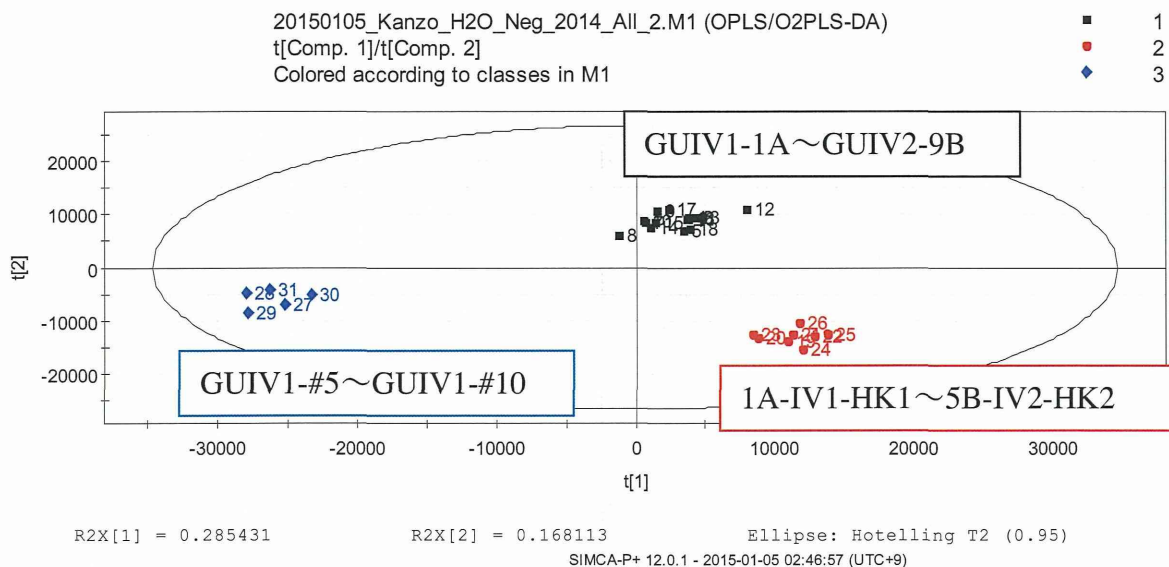


図10 26年度新規測定試料の負イオン検出データを用いた多変量解析によるローディングプロット

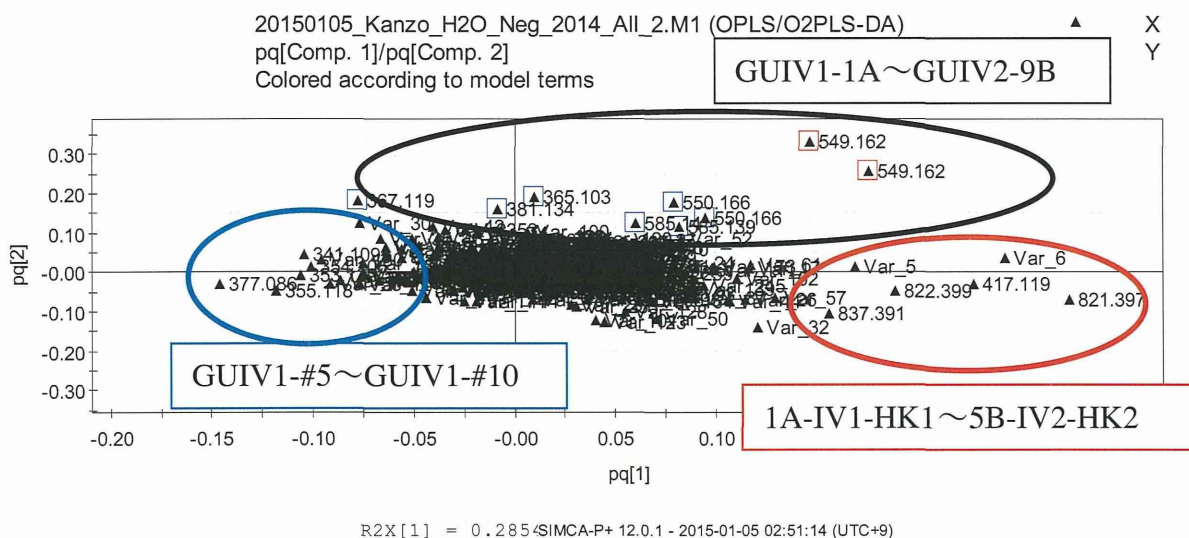
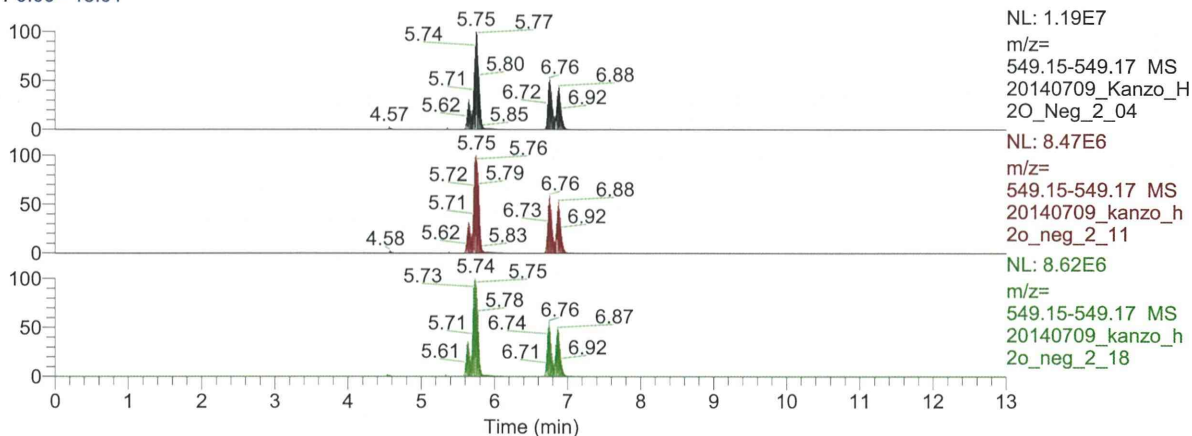


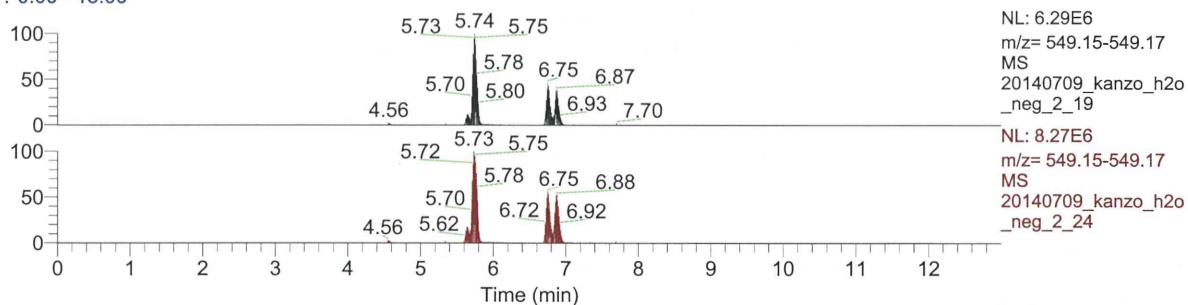
図 11 26 年度測定試料の負イオン検出データにおける m/z 549.15-549.17 の XIC

RT: 0.00 - 13.01



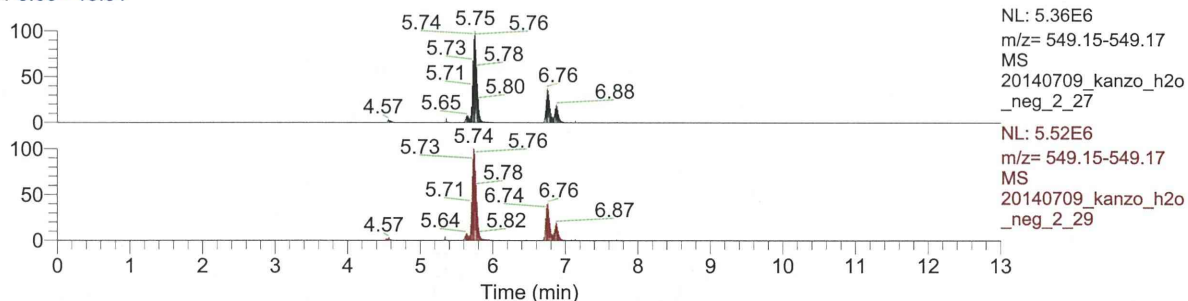
グループ

RT: 0.00 - 13.00



グループ

RT: 0.00 - 13.01



グループ

図 12 図 11 における保持時間 5.65 分と 5.75 分のピークのマスペクトル

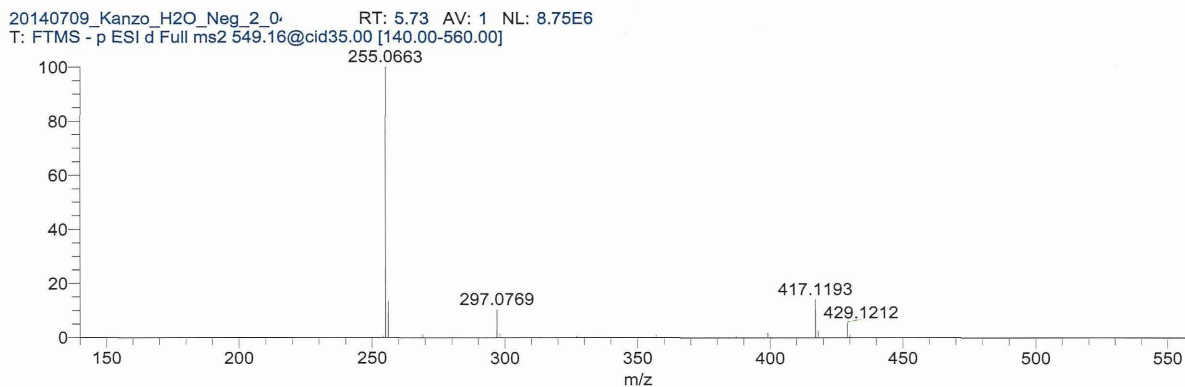
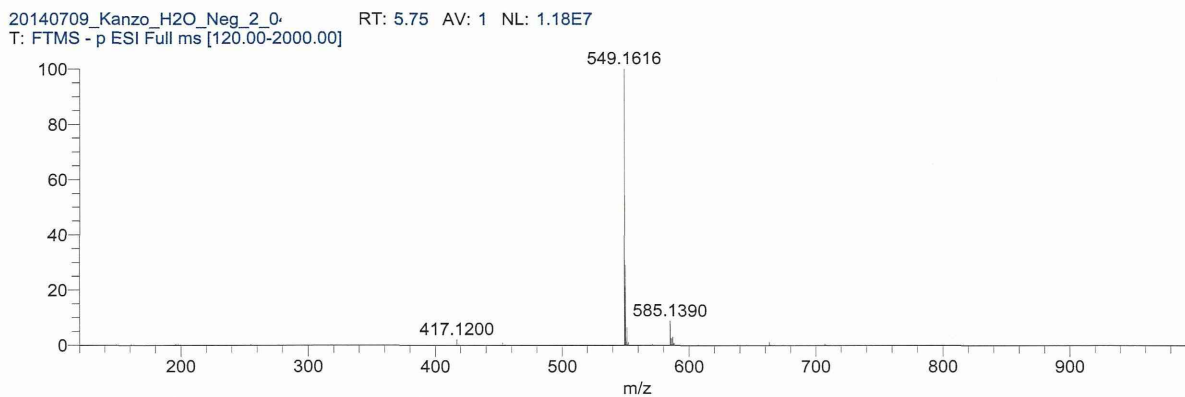
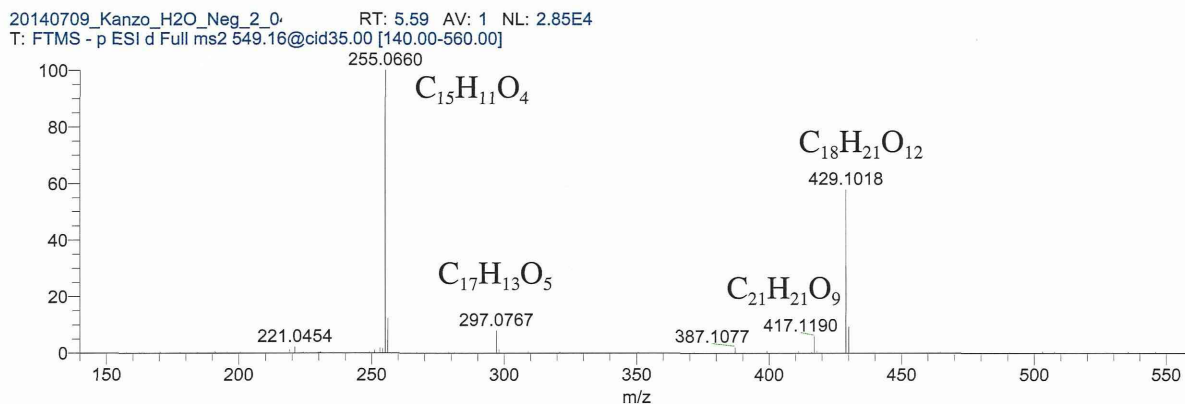
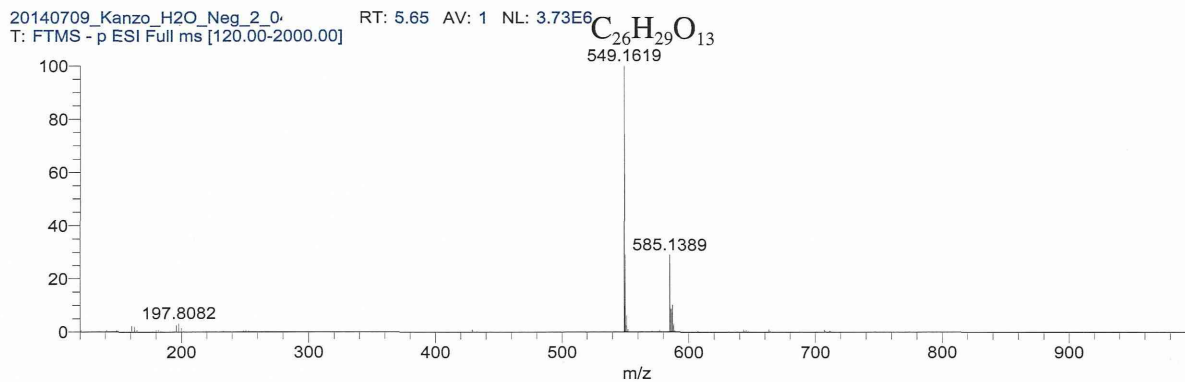
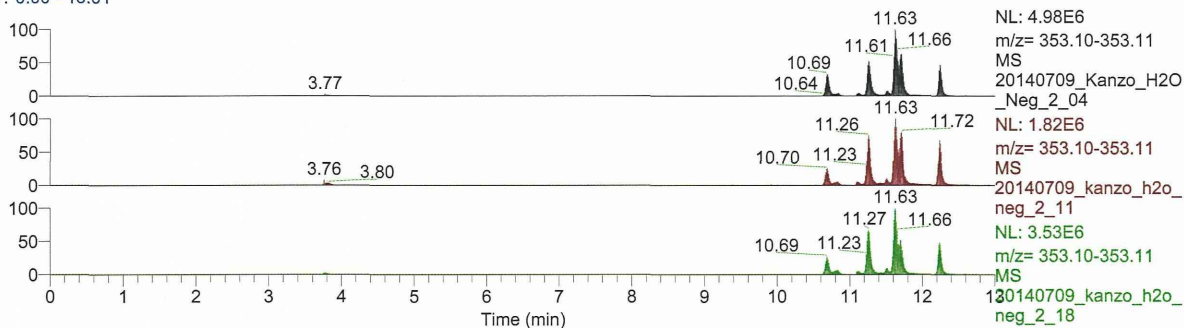
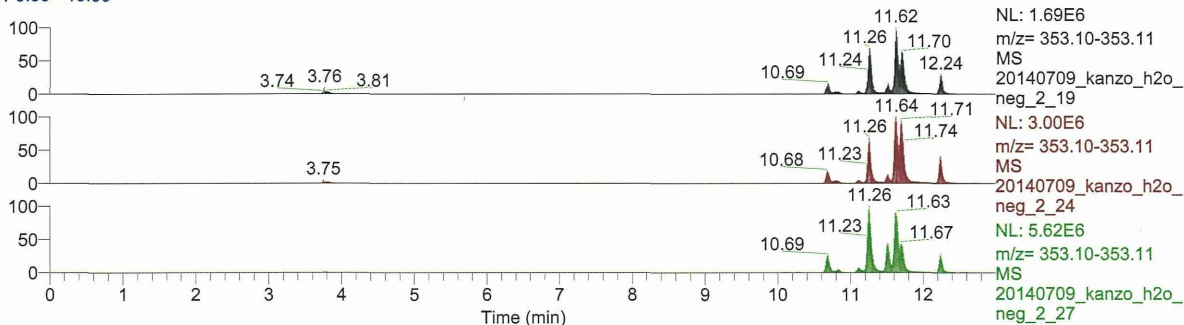


図 15 25 年度および 26 年度測定試料の負イオン検出データにおける m/z 353.10-353.11 の XIC

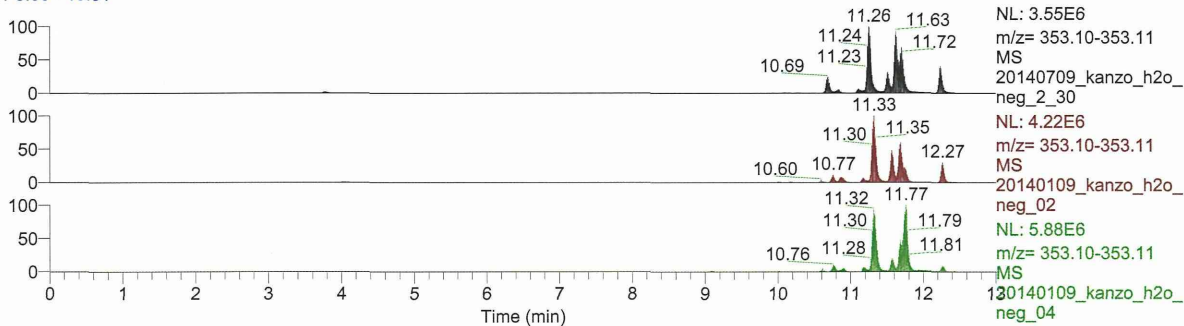
RT: 0.00 - 13.01



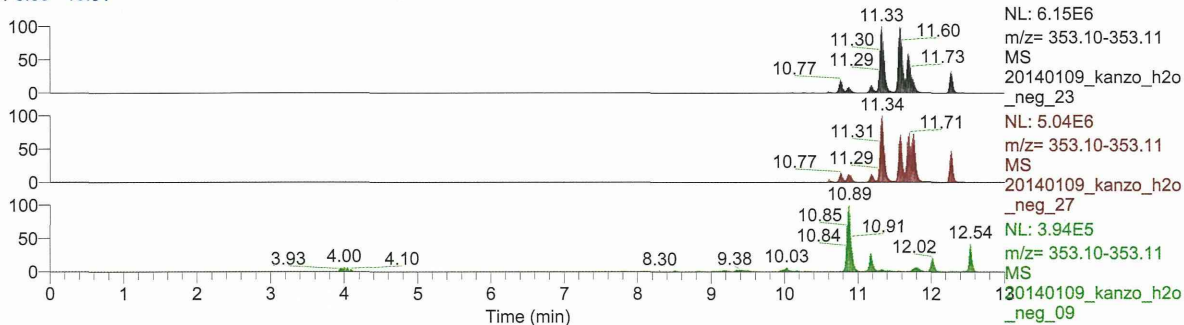
RT: 0.00 - 13.00



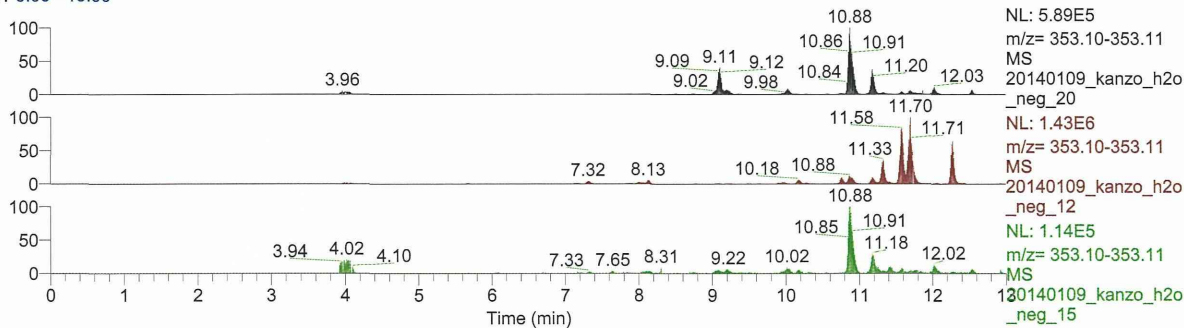
RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.00



今年度試料群

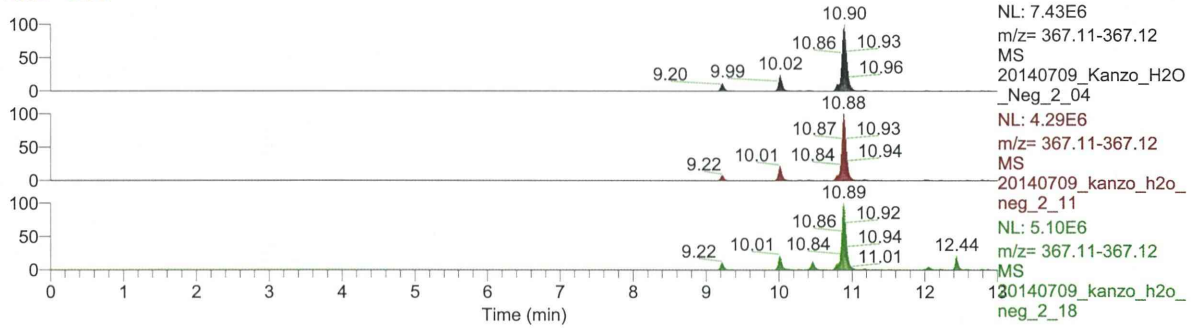
昨年度の *G. uralensis* 試料群

G. plabra

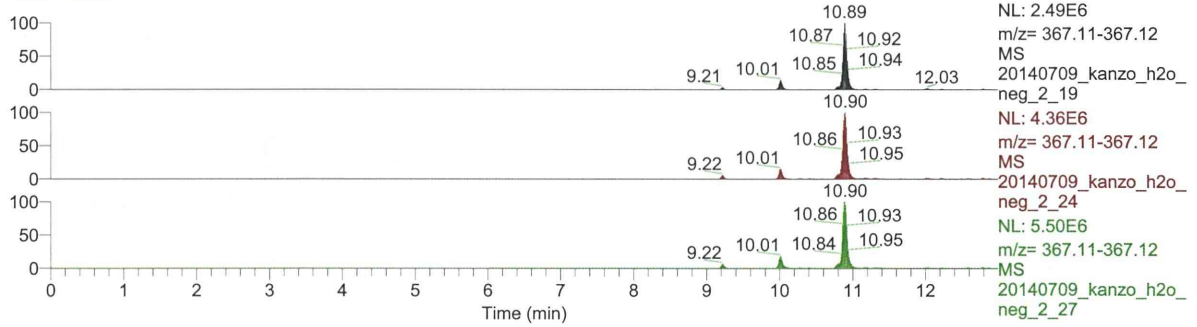
G. inflara

図 16 25 年度および 26 年度測定試料の負イオン検出データにおける m/z 367.11-367.12 の XIC

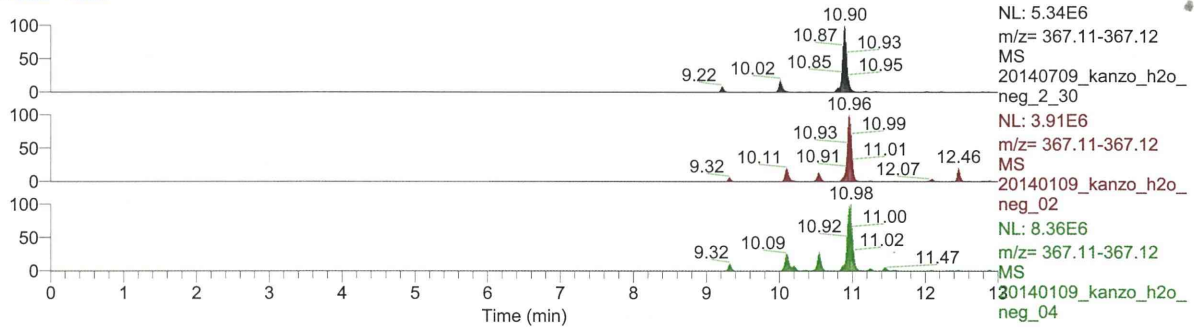
RT: 0.00 - 13.01



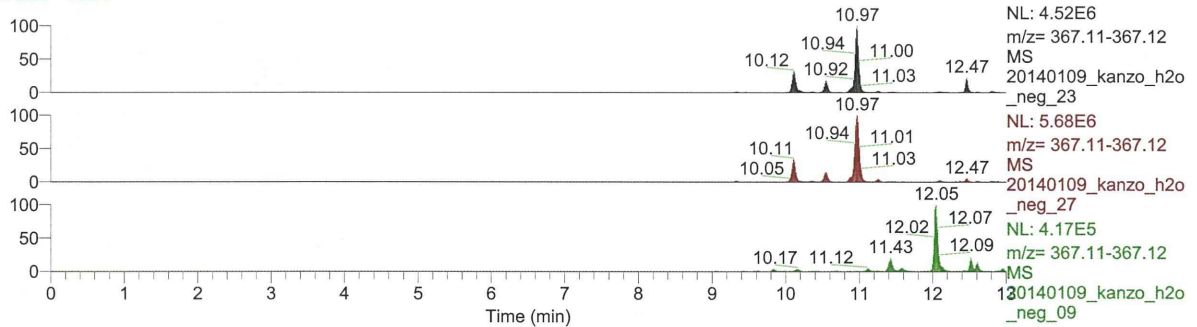
RT: 0.00 - 13.00



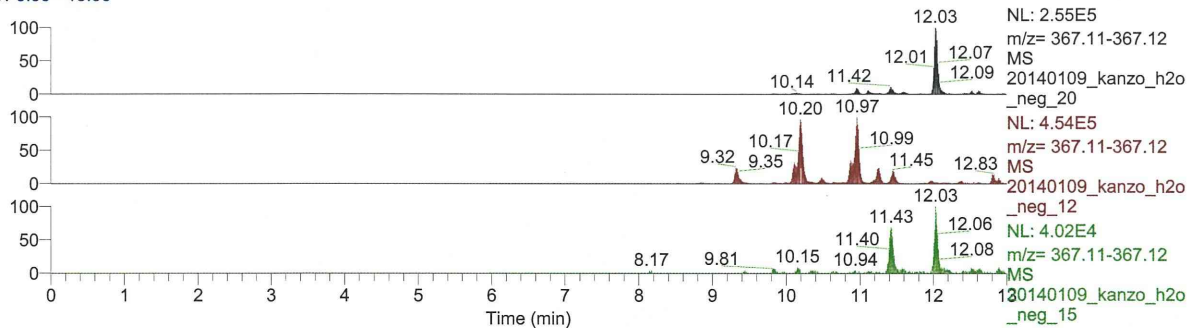
RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.01



RT: 0.00 - 13.00



今年度試料群

昨年度の *G. uraliensis* 試料群

G. plabra

G. inflara

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：人工水耕栽培システムで生産した生薬の化学的評価に関する研究

－黄連について－

研究分担者 川原信夫（独）医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター
センター長

要旨 我々は“人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」の有効成分、有効性、安全性における同等性を市場流通「甘草」との比較の中で評価する研究”の一環として、人工水耕栽培環境下で生産した「甘草」と市場流通「甘草」を、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）により分析しそのデータを多変量解析することで、含有成分の観点から両甘草の同等性と差異を評価し、各種水耕栽培品は国内市場流通品と同様、日本薬局方甘草の基原植物である *G. uralensis* と同一のグループに分類されことを明らかにした。

今回甘草以外の生薬に関しても化学的同等性評価を行う目的で、重要生薬「黄連」について、日本産「黄連」より人工水耕栽培された「黄連」と市場流通生薬「黄連」の LC-MS/MS 分析と多変量解析を行った。その結果、人工水耕栽培「黄連」は日本産の市場流通「黄連」と同等性が認められ、中国産の市場流通「黄連」と明確に区別されることが明らかとなった。

研究協力者

高橋 豊 エムエス・ソリューションズ
株式会社 代表取締役

淵野裕之（独）医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター
筑波研究部 栽培研究室長

吉松嘉代 同 筑波研究部
育種生理研究室長

乾 貴幸 同 筑波研究部 特任研究員

工藤 善 鹿島建設株式会社
上席研究員

生薬の使用に対して漢方・生薬業界、医師、薬剤師、患者等の潜在的な不安が存在することは否定できない状況である。

現在までの研究において、我々は、本法により生産された生薬「甘草」の有効成分、有効性、安全性を担保し、漢方・生薬関連企業及び一般の方々の理解を深め、その普及を促進することを目的として、人工水耕栽培環境下で生産された「甘草」と市場流通生薬「甘草」さらには「人工水耕-圃場ハイブリッド栽培甘草」について液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いた化学的同等性評価を行った。この結果、各種水耕栽培品は国内市場流通品と同様、日本薬局方カンゾウの基原植物である *G. uralensis* と同一のグループに分類されことを明らかにした。

A. 研究目的

現在までに、日本において人工水耕栽培環境下で栽培された生薬が製品化された事例は見出されていない。従って、上記のような

本研究ではカンゾウ以外の生薬に関しても化学的同等性評価を行う目的で、重要生薬「黄連」について、人工水耕栽培された「黄連」と市場流通生薬「黄連」のLC-MS/MS分析を行ったので報告する。

B. 研究方法

人工水耕栽培環境下で生産した「黄連」と市場流通生薬「黄連」をLC-MS/MSにより分析し、そのデータを多変量解析することで、両黄連の同等性や差異に関する検討を行った。

各種機器の測定条件を以下に記載する。測定結果の解析は、黄連の既知化合物の構造を考慮し、正イオン検出を中心に行った。

【測定条件】

- MS : ThermoFisher Scientific, LTQ Orbitrap Elite
 - ESI ニードル電圧 ±3,500 V
 - キャピラリー温度 275 °C
 - ヒーター温度 450 °C
 - 測定 m/z 範囲 100~2,000
 - スペクトル記録スピード 0.1 秒 / スペクトル
 - 設定質量分解能30,000
 - CID 電圧 35 V
 - プリカーサー m/z 範囲 3.5
- HPLC : ThermoFisher Scientific, Ultimate 3000
 - カラム
Thermo Scientific Acclaim RSLC 120 C18, 2.1×100, 2.2 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 = 2 - 60 % (10 min) - 100 % (12 min) - 100 % (13 min)
 - 移動相流量 0.3 mL/min
 - カラム温度 40°C
 - DAD 波長範囲 190 - 400 nm
- 試料 : 今回の分析に用いた全黄連類のリストを表1および表2に示す。

C. 研究結果

1. 人工水耕栽培黄連と市場流通黄連の熱水抽出エキスの正イオン検出LC/MS/MS分析、多変量解析

今回正イオン ESI/LC/MS/MS により測定した全黄連の全イオン電流クロマトグラム (TICC) を図1に示す。なお、NIB-42Nのように、末尾にNを付記しているのは、以前より貯蔵しているエキスと同じ管理番号で、今回人工水耕栽培黄連と同時に処理したエキスであることを示している。

図1に示した黄連類のTICCにおいて、市場流通品のデータを見ると、そのパターンより2つのグループに大別できることが示唆される。特徴的なのは、保持時間9~10分と、約11分のピークである。すなわち、9~10分に3本のピークが顕著に観測され且つ11分に2本のピークが観測されるグループ(グループA)と、グループAでは3本のピークが観測されている9~10分のピーク群の、3本のうちの1ないし2本のピーク強度が低く且つ11分に1本のピークが観測されているグループ(グループB)である。4種類の人工水耕栽培黄連は、TICクロマトグラムより、グループBに分類されることが推測された。

多変量解析により得られたスコアプロットを図2に、S-プロットを図3に示す。解析にあたっては、グループ情報を入力せず、PCA-Xにより行った。TICクロマトグラムのパターンから推測した通り、スコアプロットで左右二つのグループに分かれた。S-プロットから、それぞれのグループを特徴づける成分を解析した。

A、B各グループから6試料をピックアップし、グループを特徴付ける成分のデータを作成した。

m/z 336.12 - 336.13の抽出イオンクロマトグラム(XIC)、保持時間9.4分と10.9分のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルを図4に示す。XICより、保持時間9.4分のピークはAグループに顕著に観測されていることが分かる。多変量解析に用いた“保持時間・ m/z 値・XICピーク強度”のデータセットより、この成分のXICピーク強度

の各グループの平均値の比[A] / [B] は約 342 となり、A グループに圧倒的に多く含まれていることが分かる。同成分のマスペクトルにおいて、メインピークは m/z 336. 1228 であり、オウレンの主成分である Berberine の理論的なモノアイソトピック質量とほぼ同一である（保持時間 10.9 分のピークが Berberine であることは確認済み）。 m/z 336 イオンからのプロダクトイオンスペクトルは、Berberine とは若干異なるため、保持時間 9.4 分の成分は、ベルベリンの異性体であると考えられる。

m/z 322. 10 - 322. 11のXIC保持時間7.9分のマスペクトルを図5に示す。また、比較のための参考データとして、Coptisineの分子イオンに相当する m/z 320. 08 - 320. 10のXICと保持時間9.2分のマスペクトルを図6に示す。保持時間・ m/z 値・XICピーク強度”のデータセットより、この成分のXICピーク強度のAグループの平均値は、Bグループの平均値より約25倍高い値を示しており、Aグループに多く含まれることが分かる。組成推定結果より、この成分は、Coptisineの二重結合が一つ還元された構造であると推測される。参考として、Coptisineに相当する成分データを図6に示す。保持時間の関係も妥当である。

m/z 338. 13 - 338. 14のXICおよび保持時間9.4分と9.6分のマスペクトルを図7に示す。両ピークの強度比が、各グループで大きく異なっている。保持時間・ m/z 値・XICピーク強度”のデータセットにおいて、Bグループを人工水耕栽培品（B1）とそれ以外（B2）に分け、全体を3グループとし、9.4分と9.6分のピーク強度比 $[9.6]/[9.4]$ を計算すると、Aグループ平均は1.27、B1グループ平均13.29、B2グループ平均5.26となり、各グループでの標準偏差も小さい値を示している。この数値は、各グループを識別できるマーカーになることが示唆される。

全試料における、主成分であるBerberineのXICピーク強度は $2.5\sim 6.0E8$ の範囲であり、各グループの平均値も近い値を示した。水耕栽培品は点数が少ないが、バラつきが少なく、

高いピーク強度を示している。

2. 人工水耕栽培黄連と市場流通黄連の熱水抽出エキスの負イオン検出LC/MS/MS分析、多変量解析

負イオン検出データを用いた多変量解析によるスコアプロットを図8に、ローディングプロットを図9に示す。また、ローディングプロットにより抽出された代表的な成分のXICを図10～13に示す。

m/z 338. 13 - 338. 14のXICは保持時間9.3分と9.5分にピークを示し、その強度比はグループによって異なっている。これは、正イオン検出データと同じ結果である。

m/z 611. 23 - 611. 24のXICは、NIB-115とNIB-185のみ他の試料と異なるパターンを示した。

その他の成分は、グループによって多少のXICピーク強度の違いはあるが、有意な差ではないと考えられる。

D. 考察

人工水耕栽培黄連と市場流通黄連の熱水抽出エキスの正負イオン検出 LC/MS/MS 分析およびそれらデータを用いた多変量解析結果において、黄連類は中国産市場流通品及び日本産市場流通品の2つのグループに分類され、4種の人工水耕栽培黄連は全て日本産市場流通品の同じグループに属した。

今回、人工水耕栽培に使用した黄連はすべて日本産黄連由来であり、人工水耕栽培においても日本産黄連の成分的特徴を有していると考えられた。

また、両グループを識別できるマーカー成分が幾つか見出されると共に人工水耕栽培黄連を含むグループを更に二分できる可能性のあるマーカーも見出された。

主成分である Berberine の XIC ピーク強度は、いずれの試料においても優位な差はなかった。

E. 結論

今回、人工水耕栽培黄連と国内試料流通黄連の同等性や差異を評価する方法として、

LC-MS/MS を行い、正負両検出データを用いた多変量解析を行った。

正負イオン検出データを用いた多変量解析において、人工水耕栽培黄連を含む全黄連類は中国産市場流通品及び日本産市場流通品の2グループに分類され、水耕栽培黄連は日本産市場流通品と同等であることが確認された。また、正イオン検出データにおいて、主成分である Berberine の XIC ピーク強度は、いずれの試料においても優位な差はなかった。今回の結果より、水耕栽培「黄連」は、日本産の市場流通「黄連」と同等性が認めら

れ、中国産の市場流通「黄連」と明確に区別されることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

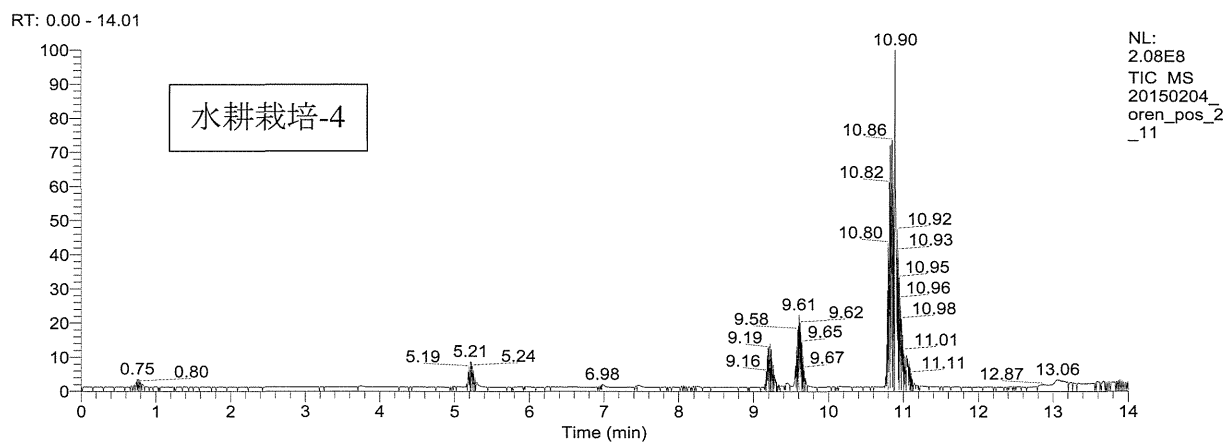
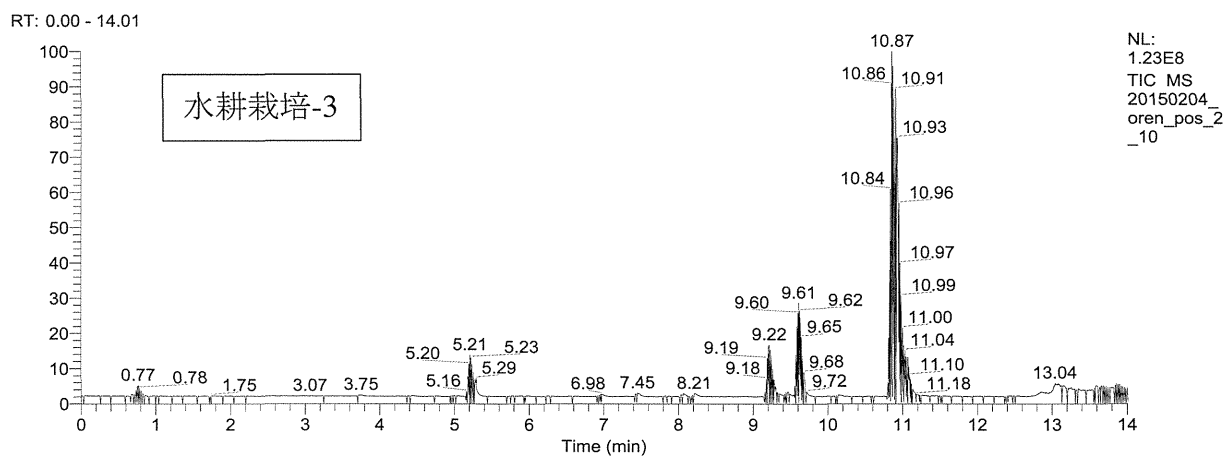
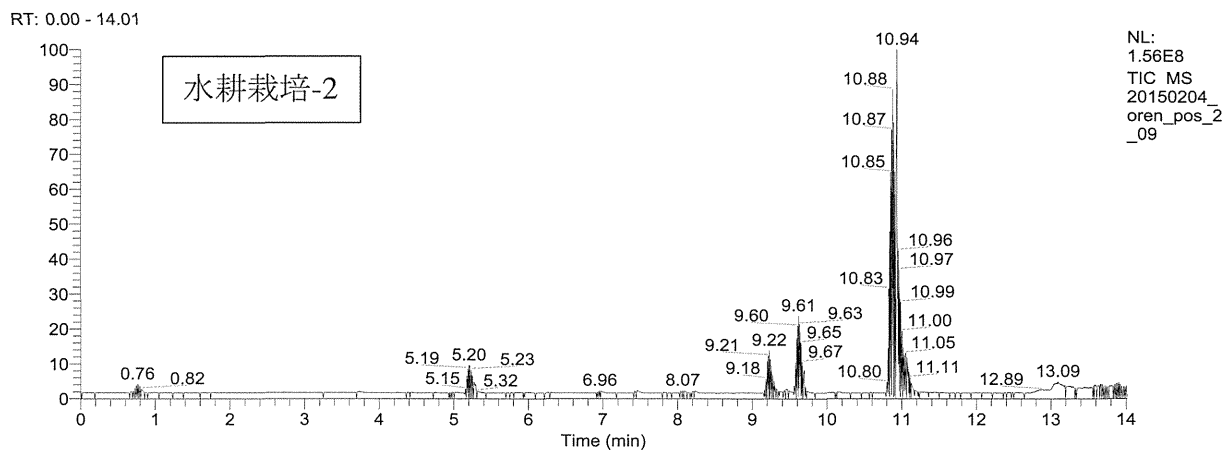
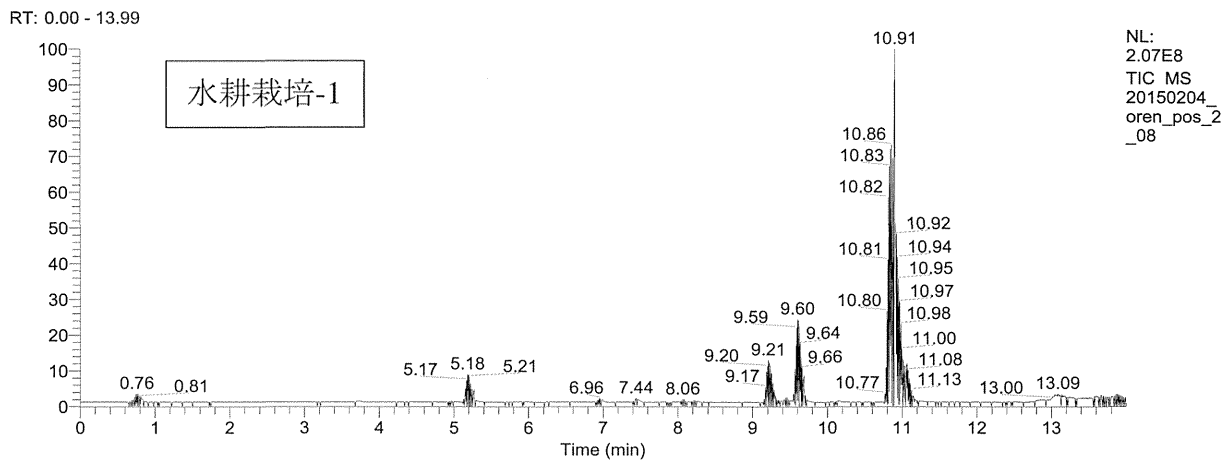
表1 水耕栽培黄連およびモデル黄連の試料リスト

試料ラベル	水耕液等	袋ラベル	備考	Ber 含 量%	補正 Ber %	試験区
水耕黄連 1	1/4 濃度	ours-3 3+4 mix	混合済 *1	7.26 7.38	7.38	Ames 試験・多変量解析
水耕黄連 2	1/6 濃度	ours-5 ours-6 ours-7 ours-8 8+9 mix	混合済 *1	6.39 7.26 8.11 6.56 6.73	7.02	有効性評価・多変量解析
水耕黄連 3	1/8 濃度	ours-10 ours-11 ours-12 ours-13 14+15 mix	混合済 *1	7.16 8.29 7.54 6.98 7.66	7.60	多変量解析・有効性評価
水耕黄連 4	1/8 濃度	ours-16	未分析 (左は推定 値)	7.57		Ames・有効性評価・多変量 解析
NIB-0042	モデル試料	NIB-0042	四川	6.76		多変量解析・有効性評価
NIB-0150		NIB-0150	重慶	6.24		多変量解析・有効性評価
THS-88830		THS-88830	静岡	6.66		多変量解析・有効性評価
NIB-0185		NIB-0185	福井	4.46		多変量解析・Ames 試験
THS-88835		THS-88835	湖北	6.62		多変量解析・Ames 試験

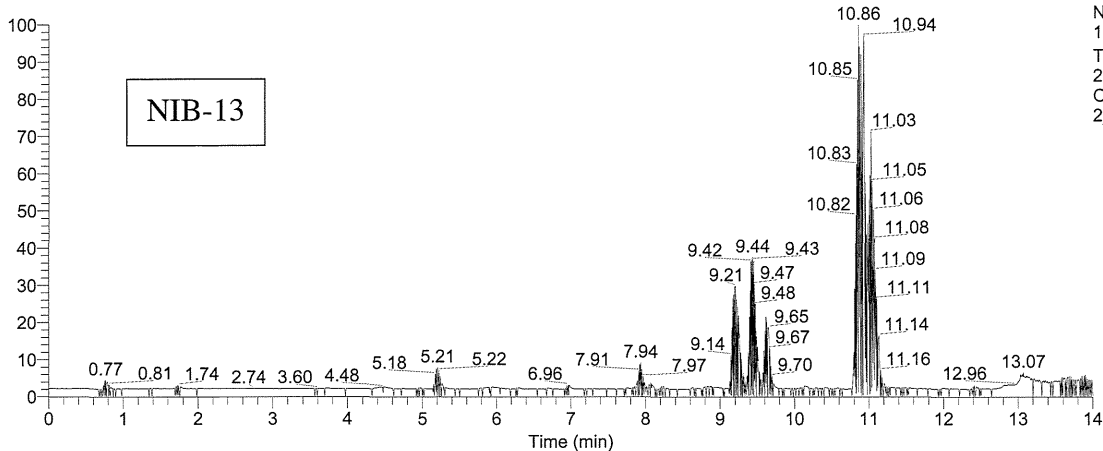
表2 市場流通黄連の試料リスト

管理No	産地	形態	入手年	備考
NIB-0013	中国四川省	原形	2010	3級級
NIB-0041	中国雲南省	原形	2009	
NIB-0042	中国重慶市	原形	2008	3等
NIB-0094	中国四川省	原形	2008	
NIB-0115	日本	原形	2010	栽培品 岐阜県産
NIB-0116	中国重慶市	刻み	2010	栽培品(主に使用)
NIB-0150	中国四川省	原形	2009	栽培品
NIB-0185	日本福井県	原形	2010	越前
NIB-0186	中国四川省	原形	2010	1等
NIB-0215	中国四川省	原形		

図1 分析に用いた黄連類のTICクロマトグラム（正イオンESI）

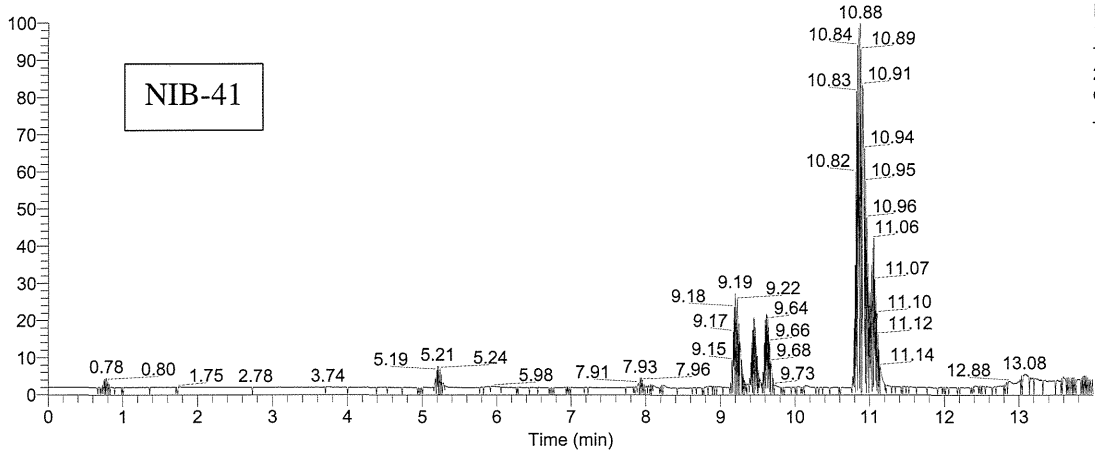


RT: 0.00 - 14.00



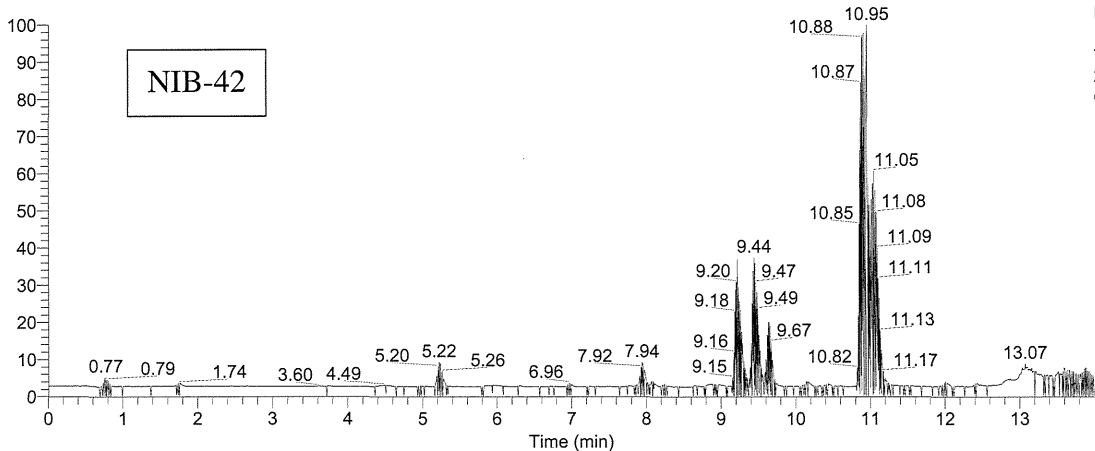
NL:
1.33E8
TIC MS
20150204_
Oren_Pos_
2_01

RT: 0.00 - 13.99



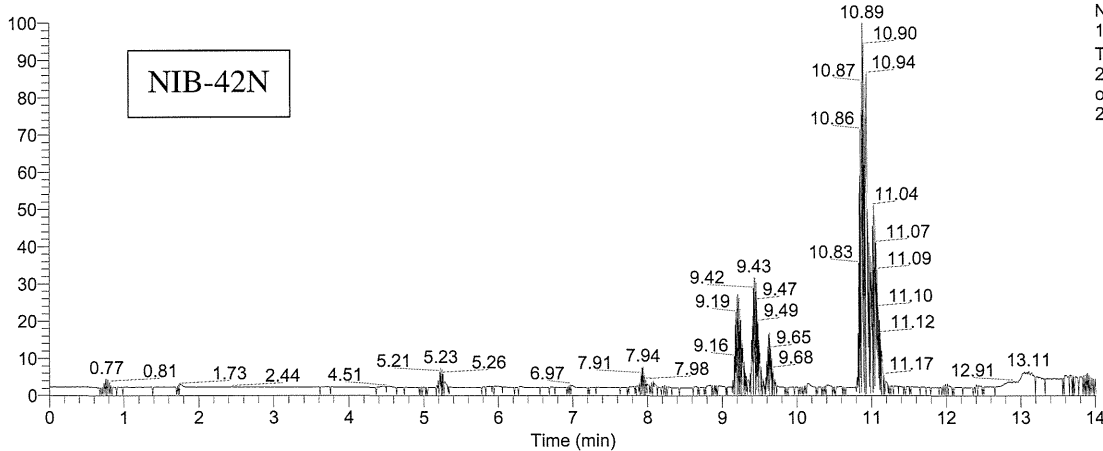
NL:
1.43E8
TIC MS
20150204_
oren_pos_2
_02

RT: 0.00 - 14.00



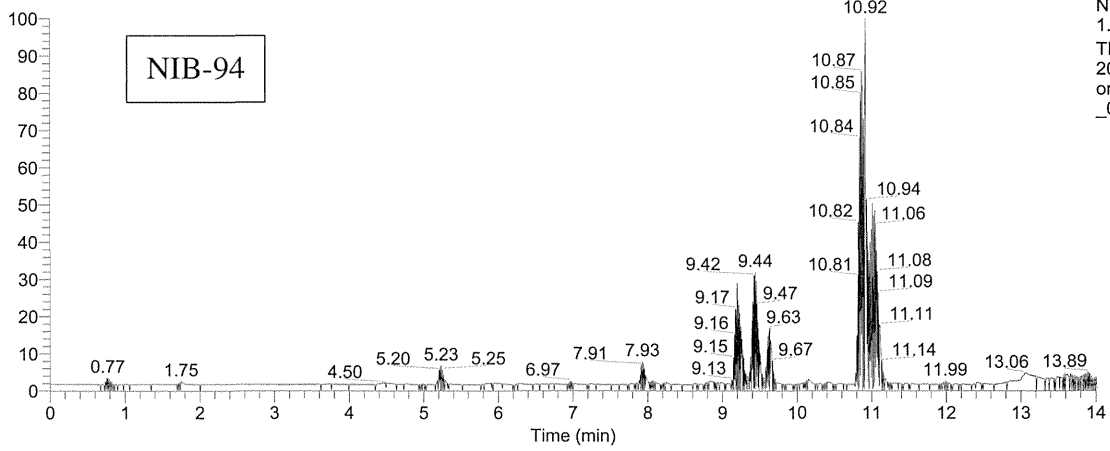
NL:
1.11E8
TIC MS
20150204_
oren_pos_0
1

RT: 0.00 - 14.01



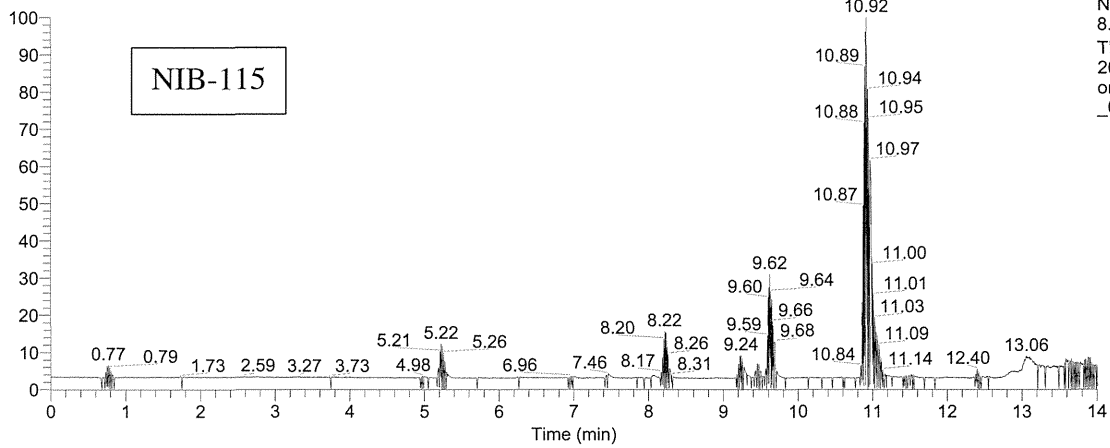
NL:
1.34E8
TIC MS
20150204_
oren_pos_0
2

RT: 0.00 - 14.01



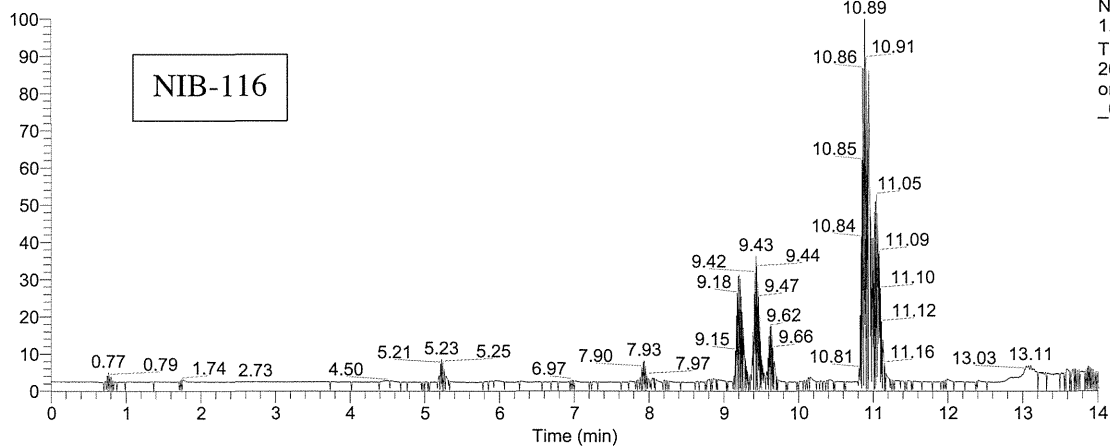
NL:
1.63E8
TIC MS
20150204_oren_pos_2_03

RT: 0.00 - 14.01



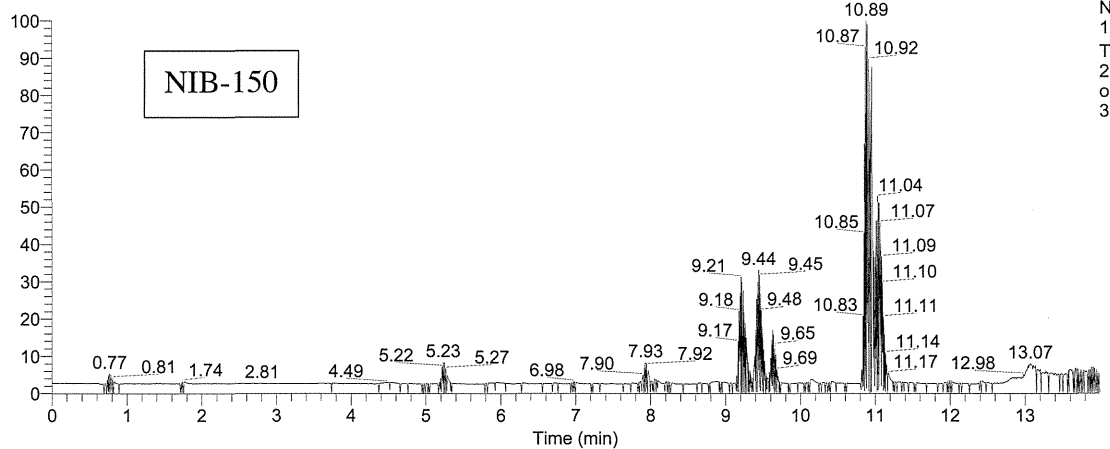
NL:
8.56E7
TIC MS
20150204_oren_pos_2_04

RT: 0.00 - 14.01



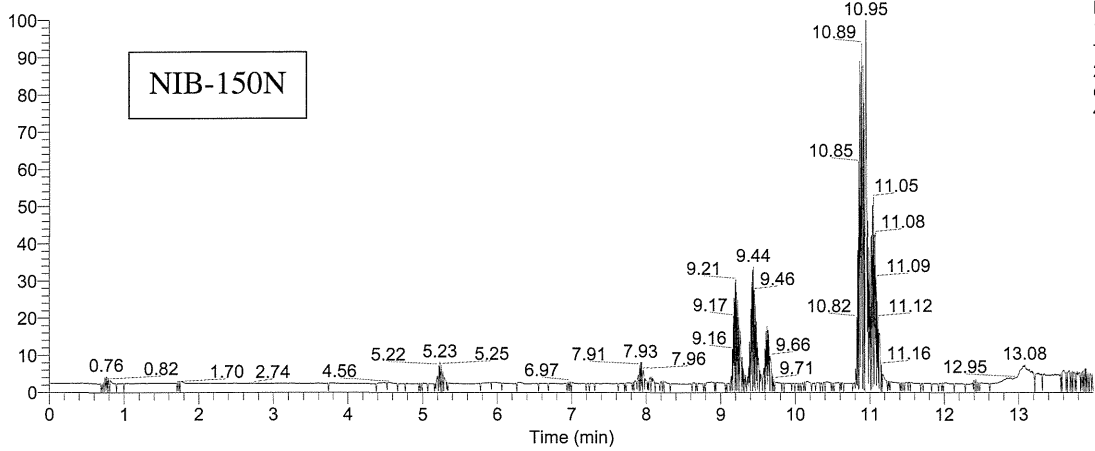
NL:
1.12E8
TIC MS
20150204_oren_pos_2_05

RT: 0.00 - 13.99



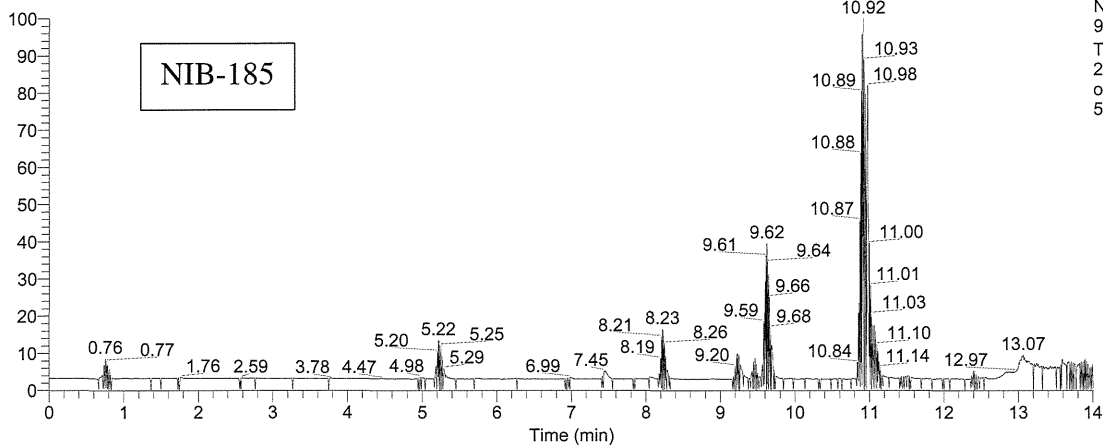
NL:
1.10E8
TIC MS
20150204_oren_pos_03

RT: 0.00 - 14.00



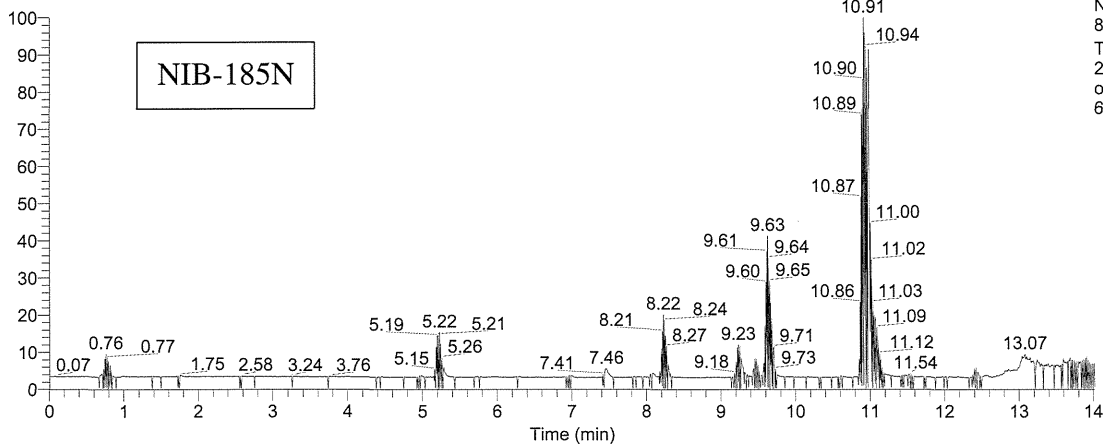
NL:
1.21E8
TIC MS
20150204_
oren_pos_0
4

RT: 0.00 - 14.01



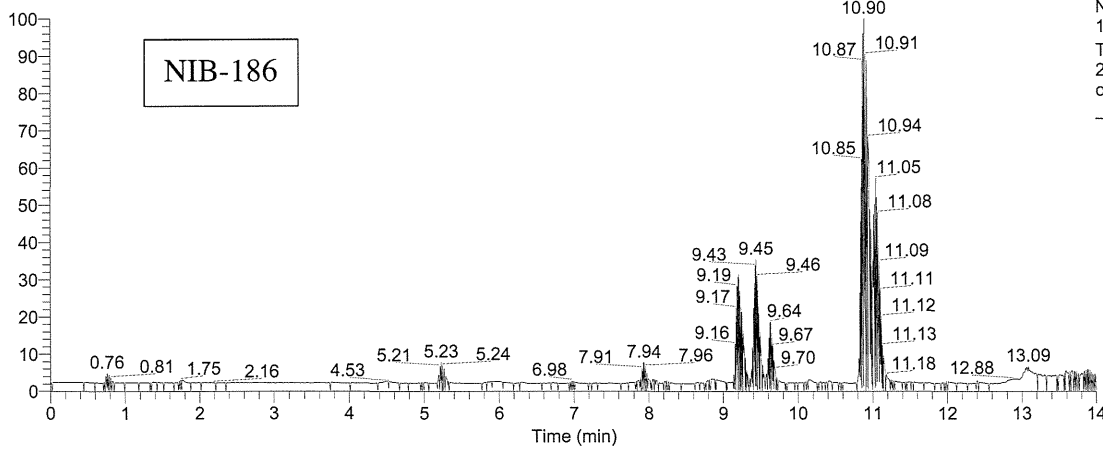
NL:
9.00E7
TIC MS
20150204_
oren_pos_0
5

RT: 0.00 - 14.01



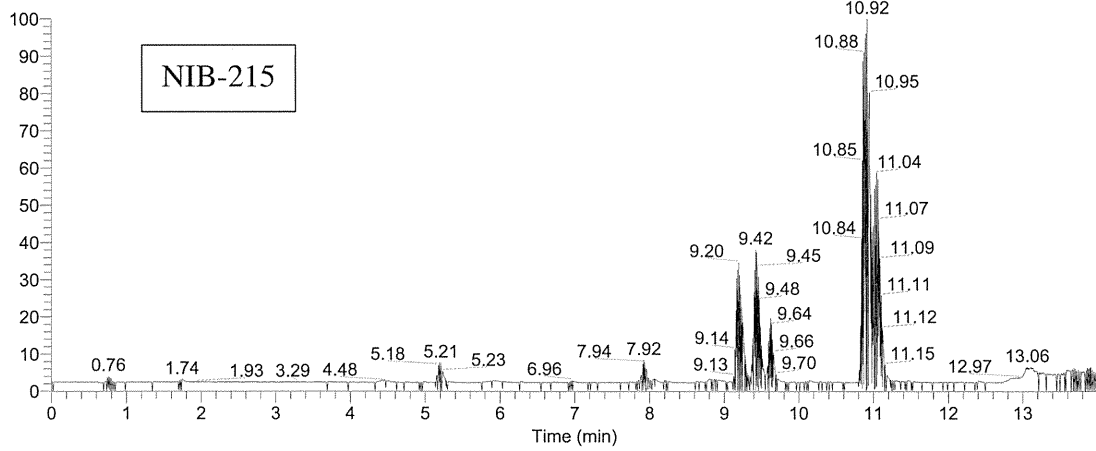
NL:
8.55E7
TIC MS
20150204_
oren_pos_0
6

RT: 0.00 - 14.00



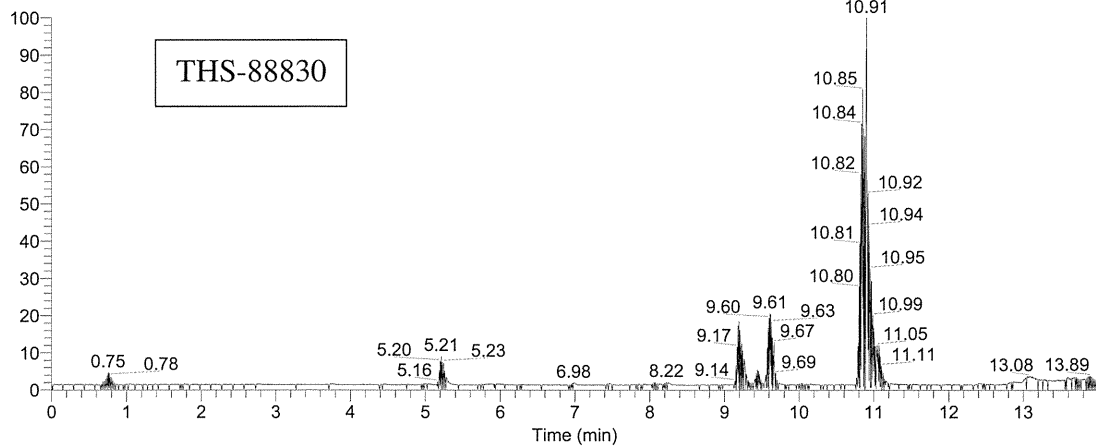
NL:
1.16E8
TIC MS
20150204_
oren_pos_2
_06

RT: 0.00 - 13.99



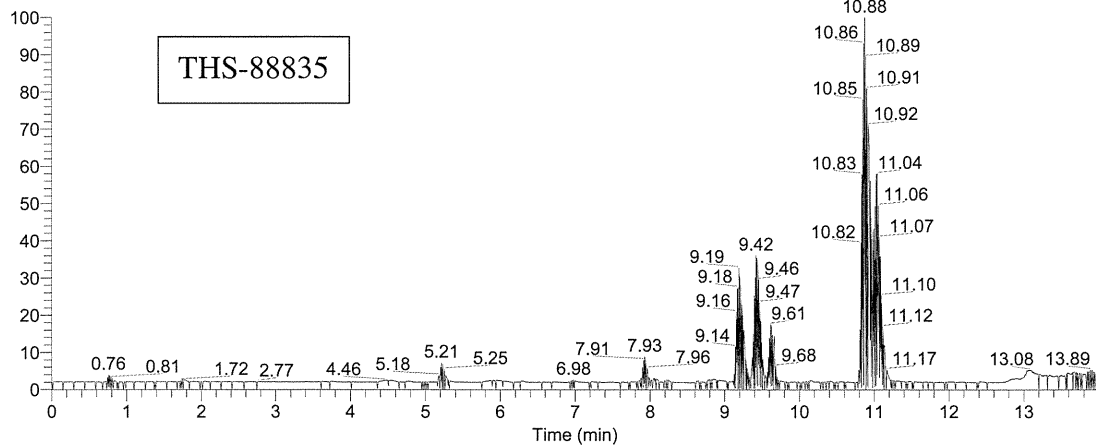
NL:
1.09E8
TIC MS
20150204_oren_pos_2_07

RT: 0.00 - 13.99



NL:
1.87E8
TIC MS
20150204_oren_pos_2_12

RT: 0.00 - 14.00



NL:
1.29E8
TIC MS
20150204_oren_pos_2_13