

図3 PCR-RFLPによるGuTS71-08IV2とGu2-3-2の識別

71-08IV2: GuTS71-08IV2, 2-3-2: Gu2-3-2, M: DNAサイズマーカー, 矢印: 制限酵素 *Hinc* II 処理による PCR 産物の断片.

GenBank 上の *CYP88D6* 遺伝子の cDNA 配列 (AB 433179.1) を基に、イントロン 6 および 7 を含む領域を増幅するプライマーを設計し、ウラルカンゾウ優良株 GuTS71-08IV2 および Gu2-3-2 について、*CYP88D6* のイントロン 6 および 7 を含む領域を PCR 増幅し、塩基配列解析を行った。その結果、イントロン 7 は大きく 2 つの配列タイプに分かれ、このうち一方は GuTS71-08IV2 に特異的であり、もう一方との共通配列には認められない *Hinc* II サイトを含んでいた。そこで、PCR 増幅産物の *Hinc* II 処理を行ったところ、GuTS71-08IV2 由来の PCR 増幅産物のみ、約 600 bp および 500 bp の制限酵素断片が得られ (図 3)、PCR-RFLP 法により、簡便に GuTS71-08IV2 と Gu2-3-2 の識別が可能であった。さらに、イントロン 7 の配列情報を精査した結果、GuTS71-08IV2 と他のウラルカンゾウ株およびスペインカンゾウ等の他のカンゾウ属植物とも識別可能であることが判明した。^{16), *1)}

市場流通「甘草」について、同様に *CYP88D6* のゲノム DNA イントロン領域の多型を精査した結果、前述のウラルカンゾウ優良株に高頻度で認められる配列タイプが、グリチルリチン酸含有量の高い「甘草」試料に有意に高い頻度で存在することが判明している。^{16), *1)} これは本領域が、グリチルリチン酸の高含有量を目標とした育種において、グリチルリチン酸含有量の予測が可能なマーカーとして利用できることを示唆するものであり、更なるデータの集積を進めている。

8 おわりに

はじめに紹介した 3 者共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」は、産官学の高次元での連携の好例として第 9 回産学官連携功労者表彰において、厚生労働大臣賞を受賞した (本誌 48 巻 12 号 (2012 年)、表紙の水耕甘草写真を参照)。

植物工場で生産された生薬が医薬品として製品化された事例は未だない。また生薬・漢方製剤業界内では、野生品を栽培品より良品と見なす傾向がある。しかし、生薬の安心・安全で持続的な安定供給のため、また生薬資源および自然環境の保全のため、さらには天災や人災による生薬資源枯渇防止のためにも、植物工場での生薬の生産や薬用植物の保存栽培および効率的増殖は不可欠な技術である。今後、植物工場における生薬の実生産を行うためには、生産された生薬が高品質であることを検証するとともに、生産コストの削減やコストに見合う製品開発など、経済性を考慮した戦略が必須であろう。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 第十六改正日本薬局方, 2011, pp. 1474-1475.
- 2) 厚生労働省医薬食品局, 一般用漢方製剤承認基準 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知, 2010年, pp. 1-51.
- 3) “日本医薬品集 医療薬 2007年版,” じほう, 東京, 2007, pp. 2651-2733.
- 4) Hayashi H. *et al.* *Plant Biotechnology*, 26, 101-104 (2009).
- 5) Yamamoto Y. *et al.* *J. Trad. Med.*, 22, 86-97 (2005).
- 6) 尾崎和男ほか, 生薬学雑誌, 61, 89-92 (2007).
- 7) 尾崎和男ほか, 生薬学雑誌, 64, 76-82 (2010).
- 8) Kojoma M. *et al.* *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1334-1337 (2011).
- 9) 芝野真喜雄ほか, *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, 5, 59-68 (2011).
- 10) 戸田則明ほか, 生薬学雑誌, 66, 65-70 (2012).
- 11) 吉松嘉代, 特願 2009-131442 「栽培装置, 及び, 栽培方法」, 2009年.
- 12) Chen Z. *et al.* *Cytotechnology*, 60, 125-132 (2009).
- 13) Sato Y. *et al.* *Journal of Ethnopharmacol.*, 105, 409-414 (2006).
- 14) 吉松嘉代ほか, 特願 2011-245757, 「カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法」, 2011年.
- 15) Seki H. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 14204-14209 (2008).
- 16) 乾 貴幸ほか, 日本生薬学会第58回年会, 2011年9月講演要旨集, p. 249
- 17) 澤井 学ほか, 第27回日本植物細胞分子生物学会, 2009年7月講演要旨集, p. 167.
- 18) 澤田裕樹ほか, 特願 2010-250701, 「養液栽培システム及び養液栽培方法」, 2010年.

新刊紹介

Book Review

毒草・薬草事典

命にかかわるものから和漢・西洋薬, 園芸植物として使われているものまで

船山信次 著

ソフトバンククリエイティブ/新書判・240頁・1,000円

人間に対する活性成分を有する植物のうち, 有害な影響があれば「毒草」, 有益な影響があれば「薬草」である。しかしながら, 実際はそれほど単純ではない。同じ植物が, 使い方(投与量)によっては毒にも薬にもなるからである。また, ある植物が医薬として利用されるためには, その植物が手軽に入手できなくてはならない。つまり, 我々の身の回りにある様々な植物が実

は生薬として用いることができ, それを誤って摂取すると有害なことが多いのだ。

本書は, このようなちょっとややこしい毒草や薬草の実情を, 我が国で見ることが出来る自生種や帰化種, あるいは園芸種を中心に解説するものである。タイトルには「事典」とあり巻末には索引も付いているが, 内容は多彩で一通り読んでみることをお勧めする。

本文は5つの章で構成されており, 順に「命にかかわる毒草・薬草」「意外な毒草・薬草」「和漢薬, 西洋薬と毒草・薬草」「食物と毒草・薬草」「園芸食物と毒草・薬草」, というタイトルである。様々な切り口から解説されており, 同じ植物が異なる章で取り上げられることもある。興味を覚

えた草から読み進めてもいいだろう。

ワラビには, 動物実験で100%発がんさせる活性を持つ化学物質が含まれているそうだが, ただ我々は巧みにこの物質を避けて, 山菜として楽しんでいる。また道路沿いに植栽されるキョウチクトウや, 花がきれいでよく栽培されるチョウセンアサガオには有害な成分が含まれており, 刈り取りなど園芸作業の際は十分注意する必要がある。こんなびっくりするようなトピックが種々収められている上に, 大半の活性成分は構造式を記載, 写真はすべてカラーと, 作りも充実している。一般の人が読んで十分楽しめるが, 薬学にかかわる皆様なら, より堪能できるに違いない。

佐藤康夫 Yasuo SATO

表 1. 2008 年の使用量上位 20 生薬の使用量及び生産国（原料生薬使用量等調査報告書-平成 20 年度の使用量-平成 23 年 7 月 15 日 日本漢方生薬製剤協会生薬委員会より）

順位	生薬名	使用量 ton	生産国			使用量に対する中国産の割合(%)	備考
			日本	中国	その他の国		
1	カンゾウ	1,267	0	1,267	0	100.0%	
2	シャクヤク	1,164	41	1,123	0	96.5%	
3	ケイヒ	1,034	0	837	197	80.9%	
4	ブクリョウ	996	0	962	35	96.5%	菌類生薬
5	タイソウ	676	0	676	0	100.0%	
6	ハンゲ	629	0	629	0	100.0%	
7	ニンジン	610	0	609	1	99.8%	
8	トウキ	581	204	376	0	64.8%	
9	マオウ	569	0	569	0	100.0%	
10	コウイ	556	556	0	0	0.0%	水飴(原料:もち米)
11	カッコン	554	0	546	8	98.6%	
12	ソウジュツ	502	0	502	0	100.0%	
13	ヨクイニン	449	1	374	75	83.1%	
14	サイコ	444	23	399	21	90.0%	
15	ダイオウ	440	95	344	0	78.3%	
16	ビャクジュツ	427	0	420	8	98.2%	
17	センナ	426	0	0	426	0.0%	漢方製剤には不使用
18	ジオウ	398	3	395	0	99.3%	
19	オウゴン	384	0	384	0	100.0%	
20	セッコウ	380	0	380	0	100.0%	鉱物生薬

その一方、漢方薬の原料となる生薬（ほとんどは植物生薬）の供給は、約 90%（2008 年の日本漢方生薬製剤協会の調査では 87.8%、震災後はさらに上昇）を海外からの輸入に依存しており、そのほとんどが中国産（同調査において 83.0%）である（表 1）。

漢方薬は通常複数の生薬より構成されており、一生薬でも欠けると製造できなくなるため、多品目の生薬が必要である。例えば、国内で製造される漢方製剤生産金額上位 30 位（全漢方製剤生産金額の約 6 割）に使用される生薬は 64 品目である。しかし、個々の生薬の使用量は、日々の食糧となる農作物と比べてはるかに少ないことから栽培化が進んでおらず、生薬の供給のほとんどは、野生植物の採取に依存している。従って、輸出国の気象や経済・政治状況などによって影響を受け、恒常的な需要を満たすには不安定な状態であり、現に麻黄（表 1：9 位）や甘草（同：1 位）の輸入は制限されている。

一般に薬用植物は、栽培年数が長い上、栽培が難しく費やす労力が大きいため、農業労働者の高齢化が進む中では栽培が敬遠される傾向が強い [厚生労働省 薬用植物の利用開発等に関する検討について（中間まとめ）平成 14 年 3 月]。また、その含有する薬用成分組成および含量は、生育環境により大きく左右され、収穫時期や乾燥・保管および加工条件も収穫物の薬用成分含量に影響を与える。

このような背景の中、植物工場における薬用植物の栽培（植物生薬の生産）は、表 2 に示すような優れた点を持ち、生薬の安心・安全な安定供給に有効である。

本講演では、生薬「甘草」の基原植物であるウラルカンゾウを中心に、植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産について紹介したい。

表 2 植物工場での水耕栽培による薬用植物生産の利点

- ・ 自然環境（気温、日照量、降水量、湿度、土質等）の影響を受けずに安定的な生産が可能
- ・ 植物種が明確で品質が安定した薬用植物の供給が可能
- ・ 農薬、土壌汚染や人為的環境攪乱を回避できる
- ・ 連作障害がなく、計画栽培・多角栽培が可能
- ・ 人手がかからない（耕うん、土壌改良、除草等が不要で収穫が容易）
- ・ 短期間で収穫可能
- ・ 野外・水耕栽培に適した優良苗の選抜・育成が短期間で可能

2. 「甘草」とウラルカンゾウについて

日本薬局方（医薬品の性状及び品質の適正を図るため、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて定めた医薬品の規格基準書）¹⁾において「甘草」は、「本品は *Glycyrrhiza uralensis* Fischer 又は *Glycyrrhiza glabra* Linné (*Leguminosae*) の根及びストロンで、ときには周皮を除いたもの（皮去りカンゾウ）である。本品は定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、グリチルリチン酸 ($C_{42}H_{62}O_{16}$: 822.93) 2.5% 以上を含む」と規定されており、日本国内で漢方・生薬製剤等の原料となっているのは *Glycyrrhiza uralensis* Fischer (ウラルカンゾウ) より製造された「甘草」である。「甘草」は、医療用漢方製剤 148 処方中 109 処方 (73.6%) に、また、一般用漢方製剤 236 処方中 168 処方 (71.2%) に配合されており^{2, 3)}、漢方薬としての使用頻度及び使用量が最も多い (表 1)。その主成分であるグリチルリチン酸 (図 2) は、抗炎症、肝臓保護、抗アレルギー作用等の薬理活性を有し、また、砂糖の 200 倍とされる強い甘み⁴⁾を有することから、医薬品、化粧品、甘味料としても汎用される⁴⁾。しかし、「甘草」の供給のほとんどは中国からの輸入品 (主に野生植物より製造) である (表 1)⁵⁾。近年、「甘草」資源の枯渇化が顕在化し、中国では資源保護のための政策 (採取制限、輸出規制等) が強化されている⁵⁾。さらに、中国国内や欧米でも「甘草」の需要が増加し、また、最近の中国の著しい経済成長に伴う物価・人件費上昇も相まって供給価格が高騰し、「甘草」資源の持続的確保が困難になっており、第二のレアアースとも呼ばれるようになってきている。

「甘草」の安定確保あるいは国内商業生産を目的に、これまでに多くの圃場栽培研究が行われ、最近ではいくつかの成功例が報告されている⁵⁻¹⁰⁾。しかし多くの報告例では、「甘草」の栽培品は概して野生品よりもグリチルリチン酸含量が低く、規定値 2.5% 以上¹⁾を満たすためには、少なくとも 3 年以上の栽培期間が必要とされている^{5, 8)}。また、野外栽培は異常気象や、2011 年の大地震のような自然災害及び原発事故のような人為的な環境かく乱等の影響を受けやすい。

我々は、2006 年頃より植物工場での「甘草」生産に関する研究を開始し、2008 年下半期

からは、医薬基盤研究所、鹿島建設、千葉大学の三者の共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」として実施した（但し、2009 年は豊田通商を加えた四者）。本研究において医薬基盤研究所は、水耕栽培に適した優良株の選抜・育成と増殖法の開発及び水耕「甘草」の品質評価を担当した。以下にその詳細を示す。

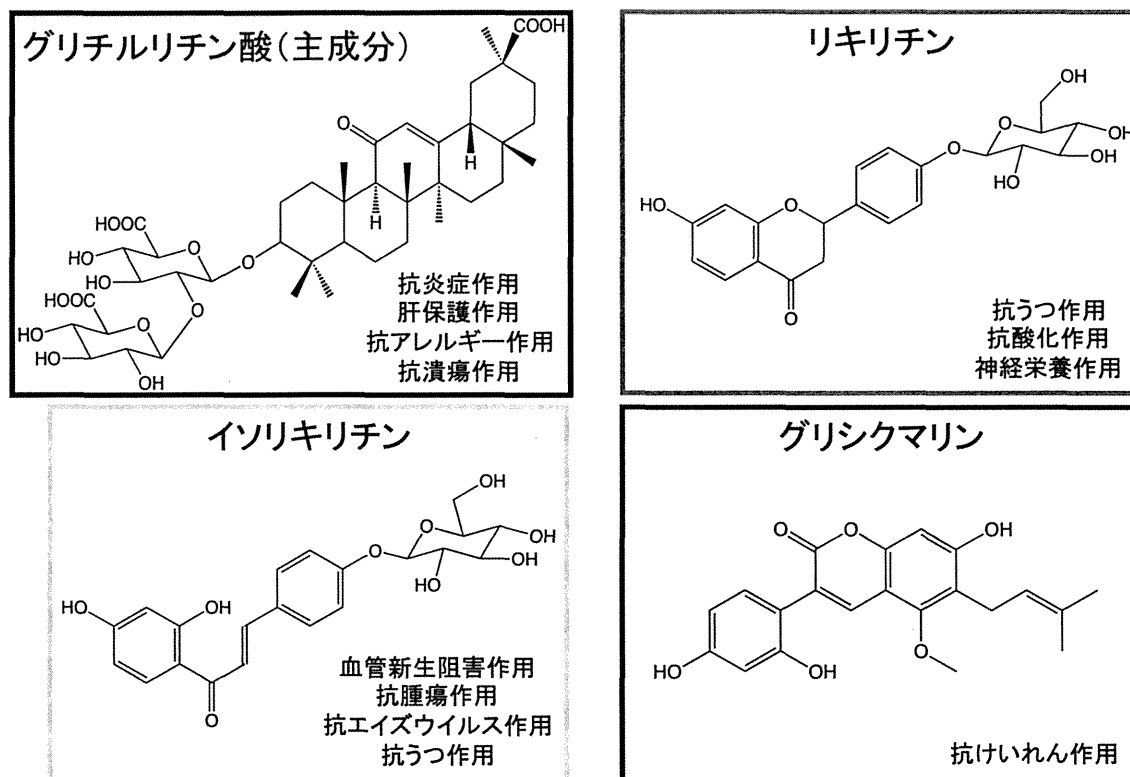


図 2. ウラルカンゾウに含まれる薬用成分

3. 植物工場におけるウラルカンゾウの水耕栽培

一般に水耕法で栽培した植物の根は分枝根が多くなり、根部が肥大しないことから、特に肥大した根を使用する薬用植物の生産において、水耕栽培の実用化は困難であるとされている。我々は、1990 年頃より、循環型湛液水耕法による薬用植物の生産に関する研究を実施し、地上部を使用部位とする薬用植物（ケシ、キダチコミカンソウ、ジギタリス、ハッカ、クソニンジン等）については、生育期間、薬用成分含量と収量において良好な結果が得られた。しかし、地下部を使用部位とする生薬の生産には不向きであった。

そこで、植物工場内でのウラルカンゾウの水耕栽培のため、根が水耕液中に浸されない水耕栽培装置（植物体の根部は hidroボール、パミスサンド等の支持体中で生育し、下方から毛細管現象により肥料養液が供給される）¹¹⁾を考案し、閉鎖温室内（温度 20-25℃、相対湿度 50-60%、明期 14-16 時間/日）でウラルカンゾウ培養苗の水耕栽培を行った。植物材料は、我々の薬用植物の組織培養物コレクションの中のウラルカンゾウ 2 系統のうち、

予備的に実施した閉鎖温室内での土耕栽培で、根の収量及びグリチルリチン酸含量がより高かった系統を選択し、さらに、本系統の培養シュートより、植物組織培養での増殖効率の高いサブクローンを得、水耕栽培装置へ植付けた。閉鎖温室内において、前述の土耕栽培では、根のグリチルリチン酸含量が 2.5%以上になるまでに 1000 日以上を要したが、水耕栽培で得た根 (Gu2-3-2) のグリチルリチン酸含量は、約 1 年後に 2.95%、約 2 年後に 5.22%となり、同生育環境の土耕栽培に比べてグリチルリチン酸の生産効率が高かった。また水耕「甘草」は、日本薬局方の他の規格：確認試験 (TLC 法)、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量 (希エタノールエキス) においても規定値を満たすことが確認された。

芝野らの野外筒栽培のグリチルリチン酸含量 2.5%以上を満たす「甘草 (2 年生根)」は、市場品に比べて、フラボノイドであるリキリチン含量が低いと報告されている⁹⁾。リキリチン (図 2) は、「甘草」の主要成分の一つで、抗うつ、抗酸化や神経栄養作用 (アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性の疾患の治療に効果的とされている) が報告されており¹²⁾、「甘草」が有する多様な薬理活性の一端を担っている成分の一つである。我々が約 2 年間の水耕栽培で得た根は 1.0%以上のリキリチンを含有していたことから、植物工場での水耕栽培は甘草が含有するフラボノイド類の生産方法としても優れている。

4. 植物工場での水耕栽培に適したウラルカンゾウ優良株の選抜と育成

医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターは、北海道、筑波及び種子島の 3 研究部より構成され、それぞれの環境に適応した国内外の薬用植物が野外圃場と温室で保存栽培されている。筑波研究部の野外圃場で栽培されているウラルカンゾウは開花・結実に至らないため、種子の採取は北海道研究部で行っている。

栽培環境に適した薬用植物優良系統の選抜は、生薬生産効率をより高めるために重要であり、種々 (導入元や形質が異なる) 系統の種子は選抜材料として好適である。そこで、北海道研究部で採取した 3 系統のウラルカンゾウ種子を材料に水耕栽培に適した優良系統の選抜及び優良株の選抜を行った。なお、ウラルカンゾウの原産地は中国北部、モンゴルである。1993 年の生物多様性条約 (CBD) 発行以降、各国で「遺伝子資源へのアクセスと利益配分 (ABS)」のルールづくりが行われ、資源保有国が自国の天然資源に対しての主権的権利を主張するようになっていたため、供試種子は 1993 年以前から国内に保有されていたことが確認できた植物の種子を用いた。1993 年以前に国内に保有していた薬用植物であれば ABS 上の問題がないかどうかは、今後の資源保有国の動向次第であり、もし可能であれば、古くから国内に植生のある植物を材料とする方が望ましい。

まず系統間の形質の差を確認するため、3 系統それぞれの種子より育成した植物体 (1 系統 3 個体) を、前述の水耕栽培装置に植付けて閉鎖温室内で半年及び 1 年間水耕栽培して根の収量と二次代謝物含量を調査し、いずれの形質も最高値を示した 1 系統を選抜した。

次に、優良株選抜のため、グロースチャンバー室内 (温度 25℃、相対湿度 60%、明期 18 時間/日) で前述の選抜系統の種子より育成した植物体 (20 個体) を水耕栽培して根の

収量と二次代謝物含量を調査し、グリチルリチン酸含量が高く根の収量が良好な優良株 2 クロウンを選抜した。本株は、植物組織培養での増殖効率が低いものの、水耕栽培で得たストロンを挿し穂とする挿木増殖が可能であり、本優良株の苗 (GuTS71-08IV2) を同様に 200 日間水耕栽培した結果、二次代謝物高生産性が維持されていることを確認した (根中の含量: グリチルリチン酸 2.5%、リキリチン 0.7%、グリシクマリニン 0.3%)。グリシクマリニン (図 2) もウラルカンゾウの主要成分の一つで、抗けいれん作用を有することが報告され¹³⁾、こむら返りに対し著効を示す漢方製剤「芍薬甘草湯」の薬理活性の一端を担うと考えられている。これらの優良株及び増殖法については特許を出願した¹⁴⁾。

5. 植物工場におけるベラドンナの水耕栽培

ベラドンナ (*Atropa belladonna* L.) は、ヨーロッパから西アジア自生のナス科の多年草で、その根は、生薬「ベラドンナコン」として日本薬局方¹⁾に収載され、その葉は、生薬「ベラドンナヨウ」として英国・米国薬局方に収載されている。また、ベラドンナは、日本薬局方収載医薬品「アトロピン硫酸塩」(自律神経の一つである副交感神経の作用を抑制する)の製造原料であり、ベラドンナから得られる「ベラドンナ総アルカロイド」は、咳、風邪、鼻水、鼻づまり症状を抑える市販薬に配合されている。しかし、国内野外圃場での栽培が可能であることが確認されているもの (筑波研究部野外圃場での生育は良好)、日本では商業栽培されていない。

当センターでシュート培養として継代維持中のベラドンナの培養植物体を材料に、閉鎖温室内での水耕栽培¹¹⁾を行った。水耕栽培装置及び養液肥料は、前述のウラルカンゾウと同様で、環境条件は、室温 20℃、相対湿度 50%、明期は補光照明を用い 14 時間/明とした。

その結果、わずか半年間で日本薬局方規格値のヒヨスチアミン含量 0.4%以上を示す根 (生薬名: ベラドンナコン) が得られ、本培養クロウン苗が植物工場でのベラドンナコン生産に適していること、および、ウラルカンゾウと同じ水耕栽培方法がベラドンナに適用できることが確認された。

6. 植物工場におけるセリバオウレンの水耕栽培

セリバオウレン [*Coptis japonica* Makino var. *dissecta* (Yatabe) Nakai] は、北海道から本州、四国のやや湿り気のある針葉樹林の林床に分布するキンポウゲ科の多年草で、その根茎は生薬「黄連」として日本薬局方¹⁾に収載されている。生薬「黄連」は、止瀉薬および健胃薬として胃腸薬に配合される他、のぼせ、精神不安、充血の治療を目的とする漢方処方に配合されており、繁用される重要な生薬の一つである。「黄連」の主成分のベルベリンは、抗菌・抗ウイルス作用、血圧降下作用、抗炎症作用、鎮痙作用、鎮痛作用、胆汁分泌促進作用等の様々な生理活性を有し、「塩化ベルベリン」も日本薬局方収載の医薬品である。さらに最近では、ベルベリンの新しい薬理作用として、血中コレステロール低下作用が報告されており¹⁵⁾、メタボリックシンドローム治療薬として有望視され、今後も需

要が伸びていくと考えられる植物である。従来、オウレンは兵庫県、福井県、鳥取県、石川県や日本各地で栽培されてきた。しかし、収穫までには5-10年の年月を要すること、生薬の調製に手間を要すること、農村部の高齢化、中国からの安価な輸入品の増加などにより国内生産は減少し続けており、2001年においては輸入量100トンに対し、国内生産量は約6トンである。2007年においては静岡県、富山県、福井県の3県でわずか1.8トン、さらに2009年においては同県でわずか0.4トンが生産されているのみである¹⁶⁾。

当センターで不定胚（受精卵由来である通常の胚と同様な機能および形態形成上の特徴をもつが、受精卵由来ではなく、植物の体細胞由来の「胚様体」）培養として継代維持中のセリバオウレン不定胚より再生した培養苗を水耕栽培装置¹¹⁾に植付け、環境条件は、室温20℃、相対湿度50-60%、明期は補光照明を用いて14-16時間/明又はグロースチャンバー室内で14時間/明とし、水耕栽培を行った。

その結果、わずか半年間で日本薬局方規格値のベルベリン含量3.8%（ベルベリン塩化物として4.2%）以上を示す根茎（生薬「黄連」）が得られ、さらに1年間の水耕栽培で生産した「黄連」のベルベリン含量は、かつての一大生産地であった丹波地方の圃場栽培5年生「黄連」に匹敵し、水耕「甘草」と同様に、日本薬局方の他の規格：生薬の性状、確認試験（TLC法）、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分の全ての規格を満たした¹⁷⁾。

オウレンの種子は貯蔵が困難で、発芽するまでに長い期間を要し、また、種子を得るまでには3年以上の栽培期間が必要であることが知られている¹⁸⁾。一方、我々が育成したセリバオウレン不定胚は、短期間に多数の培養苗を得ることができ、また、本培養苗の水耕栽培は植物工場における生薬「黄連」の効率的生産およびベルベリン生産方法として優れていることが確認された。

7. これからの展望

以上のように、植物工場での水耕栽培に適した薬用植物優良苗とそれぞれの薬用植物に好適な装置及び栽培環境の組合せにより、生薬あるいは薬用成分の効率的生産が短期間で可能であることが確認できた。植物工場におけるウラルカンゾウの水耕栽培の項で紹介した医薬基盤研究所、鹿島建設、千葉大学の3者共同研究「甘草の人工水耕栽培システムの開発」は、産官学の高次元での連携の好例として第9回産学官連携功労者表彰において、厚生労働大臣賞を受賞した（2011年9月22日）。

植物工場で生産された生薬が医薬品として製品化された事例は未だない。また、生薬・漢方製剤業界内では、野生品を栽培品より良品とみなす傾向がある。そこで、2012年度から、医薬基盤研究所を中心に、厚生労働科学研究「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」を開始し、上記2者に加え複数の企業・大学の協力のもと、「甘草」をはじめとした漢方薬原料生薬の安心・安全な安定供給を目指し、水耕栽培による生薬生産の実用化を進めるとともに、生産された生薬の安全性・有効性の検証を進めている。

植物工場における生薬生産を実用化する上で、課題となるのが生産コストである。植物工場におけるセリバオウレンの水耕栽培の項で紹介したように、国内栽培が可能な薬用植物であるにもかかわらず、国内栽培（生薬の国内生産）が衰退してしまった主な原因は、安価な中国からの輸入品に対抗できる価格での国内生産ができなかったことである。国内の漢方製剤等生産金額の約 8 割（2010 年は 78.9%、図 1）を占める医療用漢方製剤は、薬価が定められているため（図 3）、中国産に比べて高価な国産生薬を、漢方製剤等の製造・販売企業が利用し難い事情がある。野外圃場での栽培に比べ、高価な設備が必要で、光熱水料等のランニングコストが割高である植物工場で生産された生薬の状況はさらに厳しい。

しかし、生薬の安心・安全で持続的な安定供給のため、また、生薬資源及び自然環境の保全のため、さらには天災や人災による生薬資源枯渇防止のためにも、植物工場での生薬の生産や薬用植物の保存栽培及び効率的増殖は不可欠な技術である。

今後、植物工場における生薬の実生産を行うためには、生産された生薬が高品質であることを検証するとともに、生産コストの削減やコストに見合う製品開発など、経済性を考慮した戦略が必須であろう。

なお、本研究は、育種生理研究室の河野徳昭主任研究員、乾貴幸特任研究員、千田浩隆元リサーチレジデントらとともに実施し、川原信夫センター長、木内文之前センター長、柴田敏郎前北海道研究リーダー、飯田修種子島研究リーダー、北澤尚主任技術専門員他、多くの薬用植物資源研究センター職員に支援して頂いた。この場を借りてお礼申し上げる。

薬事法

（製造販売業の許可）

第12条 次の表の上欄に掲げる医薬品、医薬部外品、化粧品又は医療機器の種類に応じ、それぞれ同表の下欄に定める厚生労働大臣の許可を受けた者でなければ、それぞれ、業として、医薬品、医薬部外品、化粧品又は医療機器の製造販売をしてはならない。

医薬品、医薬部外品、化粧品又は医療機器の種類	許可の種類	備考
第49条第1項に規定する厚生労働大臣の指定する医薬品	第1種医薬品製造販売業許可	医療用医薬品
前項に該当する医薬品以外の医薬品	第2種医薬品製造販売業許可	一般用医薬品
医薬部外品	医薬部外品製造販売業許可	いわゆる薬用化粧品
化粧品	化粧品製造販売業許可	

薬価

保険医療機関及び保険薬局（以下「保険医療機関等」という。）が薬剤の支給に要する単位（以下「薬価算定単位」という。）あたりの平均的な費用の額として銘柄毎に定める額（厚生労働大臣が告示） 医療用医薬品の公的価格

新規性に乏しい医薬品は低い薬価→医療用漢方製剤の薬価は抗生剤・抗がん剤等と比べるとはるかに低い

一般用医薬品（医師の処方箋がなくても薬局で購入できる薬）、化粧品の価格はメーカーが設定

図 3. 医薬品等の種類と薬価について

引用文献

- 1) 第十六改正日本薬局方, 厚生労働省, 1474-1475 (2011)
- 2) 厚生労働省医薬食品局、一般用漢方製剤承認基準、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知、1-51(2010)
- 3) 日本医薬品集、医療薬、2007年版、じほう、2651-2733 (2007)
- 4) Hayashi H., et al., *Plant Biotechnology*, 26, 101-104 (2009)
- 5) Yamamoto Y., et al., *J. Trad. Med.*, 22 (Suppl. 1), 86-97 (2005)
- 6) 尾崎和男ら、生薬学雑誌、61(2)、89-92 (2007)
- 7) 尾崎和男ら、生薬学雑誌、64(2)、76-82 (2010)
- 8) Kojoma M., et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 34(8), 1334-1337 (2011)
- 9) 芝野真喜雄ら、*Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences*, 5, 59-68 (2011)
- 10) 戸田則明ら、生薬学雑誌、66(2)、65-70 (2012)
- 11) 吉松嘉代、特願 2009-131442「栽培装置、及び、栽培方法」(2009)
- 12) Chen, Z. et al., *Cytotechnology*, 60, 125-132 (2009)
- 13) Sato, Y. et al., *Journal of Ethnopharmacology*, 105(3), 409-414 (2006)
- 14) 吉松嘉代ら、特願 2011-245757、「カンゾウ属植物株及びカンゾウ属植物増殖方法」(2011)
- 15) W. Kong et al., *Nat. Med.* 10, 1344-1351 (2004)
- 16) 薬用作物(生薬)関係資料, 平成 23 年 12 月, 財団法人 日本特産農産物協会, p13 (2009)
- 17) 乾貴幸ら、日本生薬学会第 59 回年会講演要旨集、p. 151 (2012)
- 18) 薬用植物、栽培と品質評価、Part 1、監修 厚生省薬務局、薬事日報社、p. 3-14 (1992)

Effects of UV Irradiation on Plant Growth and Concentrations of Four Medicinal Ingredients in Chinese Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*)

R. Sun, S. Hikosaka,
and E. Goto
Graduate School of
Horticulture
Chiba University
Chiba
Japan

H. Sawada, T. Saito,
T. Kudo and T. Ohno
Kajima Corporation
Tokyo
Japan

T. Shibata and K. Yoshimatsu
Research Center for Medicinal
Plant Resources
National Institute of
Biomedical Innovation
Ibaraki
Japan

Keywords: fluorescent lamp, glycyrrhizic acid, UV light stress, medicinal herb, secondary metabolites

Abstract

The main root of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) is used worldwide as a medicinal material and flavoring agent. This study aimed to determine UV light stress conditions effective for increasing the concentrations of four medicinal ingredients – glycyrrhizic acid (GL), liquiritin (LQ), liquiritigenin (LG), and isoliquiritigenin (ISLG) – and the main root dry weight of Chinese licorice. All UV treatments were compared to exposure to a white fluorescent lamp as a control. For UV treatments, the white fluorescent lamp was supplemented with either UV-A or UV-B fluorescent lamp or a combination of both. Low intensities of UV-A and UV-B were applied for longer treatment periods, while high intensities of UV-A and UV-B were applied for shorter periods. The control was set in each UV treatment for a same period. The dry weights of the main roots as the medicinal part in each UV treatment were not significantly different from the weights of the controls. The concentrations of the four medicinal ingredients in the high intensity UV-B irradiation treatments (BH and AHBH) over 5 or 6 days were 50-70% higher than those in their respective controls. LG and ISLG concentrations in the medium intensity combined UV irradiation treatments (AHBL and ALBH) over 10 days were 140 and 350%, respectively, greater than the levels in their respective controls. These results suggest that UV-B or combined UV-A and UV-B irradiation with white light over 5 to 10 days is more effective than irradiation of white light alone in increasing the contents of GL, LQ, LG, and ISLG in dried main roots without inhibiting the growth of the main root.

INTRODUCTION

Licorice (*Glycyrrhiza* sp.) is a perennial herb in the plant family *Leguminosae*. Its main root is considered an important crude pharmaceutical material as well as a flavoring agent (Wang and Nixon, 2001). The principal pharmacologically active ingredient in licorice root is glycyrrhizic acid or glycyrrhizin (GL), a triterpenoid that shows high levels of activity in inhibiting replication of the HIV-1 virus (Hattori et al., 1989) and of a SARS-associated virus (Cinatl et al., 2003). Some flavonoids in licorice are also active components, such as liquiritin (LQ) and liquiritigenin (LG) showing immunomodulating activity (Lee et al., 2009), and isoliquiritigenin (ISLG) showing anticancer, antioxidant, and antithrombin activities (Saxena, 2005). In Japan, licorice does not grow in the wild; therefore, most of the market demand for licorice must be met through importation from China. However, because the exportation of wild licorice has been limited due to increasing desertification, cultivated licorice is expected to increase as the principal source for medicinal licorice. The main root of wild licorice, when used for medicinal purposes, requires long-term cultivation to develop fully, around 3-5 years; however, even after 3-7 years of growth, the content of the medicinal ingredient in the main root of the cultivated licorice is lower than that in the wild root. Therefore, it is necessary to develop a short-term cultivation method to increase the contents of the four compounds.

Although supplemental UV irradiation generally inhibits the growth of plants, it also increases secondary metabolite production, a change that may both enhance plant defenses and provide protection against UV light. Afreen et al. (2005) has previously published results for the effect of UV-B irradiation on GL concentration in *G. uralensis*. However, the effects of UV-B irradiation on the concentrations of LQ, LG, and ISLG were not included in that study and the effects of combining UV-A and UV-B irradiation have not been previously investigated. Therefore, this study fills that gap in knowledge by investigating the effects of UV-A, UV-B, and a combination of UV-A and UV-B irradiation on plant growth and on the concentrations of the four medicinal ingredients in the main root of *G. uralensis*.

MATERIALS AND METHODS

Chinese licorice (*G. uralensis*, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Japan) plants were grown in a hydroponic system. The available number of plants of the same age was not sufficient for all experiments. Therefore, 3-month-old plants were subjected to single UV irradiation treatment (UV-A or UV-B), and 8-month-old plants were subjected to a combination of UV-A and UV-B treatments. The plant height, main root, and lateral root were trimmed to equal lengths in each experiment before 4 weeks of the start of UV treatment. Control plants not subject to UV treatment were trimmed similarly. All plants exposed to different UV irradiation or non-UV irradiation were under controlled environmental conditions. White fluorescent lamps (FHF32-EX-N-H; Panasonic Co., Ltd., Japan) were supplemented with either UV-A fluorescent lamps (TL20W/08RS; Philips, Holland), UV-B fluorescent lamps (TL20W/12RS; Philips, Holland), or a combination of the two UV types for the UV treatment (Fig. 1). White fluorescent lights were used alone for the controls. Low intensities of UV-A (3 W m^{-2}) (AL) and UV-B (0.4 W m^{-2}) (BL) were applied for long treatment periods, while high intensities of UV-A (6 W m^{-2}) (AH) and UV-B (0.8 W m^{-2}) (BH) were applied for short periods. The controls were designated as W1, W2, W3, W4, and W5 for each UV treatment. Plants were subjected to (I) single UV irradiation (AL, BL, W1 for 12 days or AH, BH, W2 for 6 days) and (II) combined UV irradiation (ALBL, W3 for 20 days; ALBH, AHBL, W4 for 10 days; or AHBH, W5 for 5 days) (Table 1). Three or four plants were put in each UV treatment or control.

At the end of each treatment, the fresh and dry weights were measured for above-ground part and below-ground part (main root and lateral root). The four medicinal ingredients were extracted from dried main root sections with similar diameters, and the concentrations of the ingredients in the main root extract were determined with an HPLC system (Shimadzu Co., Ltd., Japan). The HPLC system consisted of an SCL-10A system controller and a SPD-M10AV photodiode array detector set at 254 nm for GL, 276 nm for LQ and LG, and 372 nm for ISLG. The four ingredients were separated on a TSK-Gel ODS-100V reversed-phase column (4.6 mm diameter \times 250 mm length) (Shimadzu Co., Ltd., Japan), with a mobile phase consisting of acetonitrile and 1% acetic acid. Baseline separation of GL, LQ, LG, and ISLG was achieved with a gradient elution program. The flow rate was 0.9 ml min^{-1} , and the injection volume was 20 μl .

The effects of UV irradiation on the concentrations of four medicinal ingredients were shown by percent change in ingredient concentration with respect to control (P_{Inc} , %), which was calculated according to the following equation, $P_{\text{Inc}} = (C_T - C_C) / C_C \times 100\%$. C_T is the mean concentration of ingredient in each UV treatment (% DW) and C_C is the mean concentration of ingredient in each control (% DW).

All data presented are mean values except for P_{Inc} . Significant differences in above-ground part and below-ground part dry weights among UV treatments and control for the same time period were calculated by Tukey-Kramer's test ($P < 0.05$) and between UV treatment and control for the same time period by t-test ($P < 0.05$) in Excel statistical analysis ver. 5.0 (ESUMI Co., Ltd., Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

A few leaves turned yellow and withered on plants in all UV treatments except in the AL treatment. Fresh (data not shown) and dry weights of the above-ground parts of plants in all UV treatments were lower except in the AL treatment, than those in their respective controls (Table 2). This agrees with a previous study reporting that a 21-day supplemental UV-B treatment (0.29 W m^{-2}) decreased stem height, leaf area, and dry matter of canola seedlings (Sangtarash et al., 2009). Afreen et al. (2005) also showed that 0.43 and 1.13 W m^{-2} of UV-B for 15 days and 3 days, respectively, decreased the fresh weight of above-ground part of Chinese licorice. By contrast, the dry weights of the main roots in all UV treatments did not decrease significantly compared with their respective controls. However, the dry weights of the lateral roots in the AL, BL, and ALBL treatments were significantly lower than those in W1 and W5 treatments ($P < 0.05$). In our study, UV treatments (UV-A and/or UV-B) inhibited the growth of above-ground parts and/or the lateral roots of Chinese licorice; however, the growth of the main root was not inhibited by any UV treatment.

Many plants avoid UV irradiation by accumulating UV-filtering flavonoids and other secondary metabolites. Hikosaka et al. (2010) reported that the essential oil in Japanese mint increased under 0.5 mW m^{-2} of UV-A irradiation over 7 days. Afreen et al. (2005) reported that both the low and high intensity UV-B treatments increased the concentration (mg/g, FW) of GL in the root tissues, the values being nearly 1.5-fold those of control. In our study, the concentrations of the four medicinal ingredients increased in the main root samples from Chinese licorice that was exposed to either 0.8 W m^{-2} of UV-B (BH) or the combination of UV-A (6 W m^{-2}) and UV-B (0.8 W m^{-2}) (AHBH) for a short period (5 or 6 days). GL concentrations were about 70% higher in treated plants than those in their respective controls, and the concentrations of LQ, LG, and ISLG in treated plants were nearly 50% greater than those in their respective controls (Fig. 2). These results indicate that high intensity UV-B (BH and AHBH) applied over a short period (5 or 6 days) stimulates Chinese licorice to increase production of GL, LQ, LG, and ISLG. However, the concentrations of the four ingredients in the main root exposed to low intensity UV-A (AL and ALBL) over a longer period (12 or 20 days) tended to decrease. GL and LQ concentrations tended to increase in the main root samples from AH and BL treatments but decreased in the samples from that ALBH and AHBL treatments, while LG and ISLG concentrations were 140 and 350%, respectively, higher in the main root samples from the ALBH and AHBL treatments than those in their respective controls. Some flavonoids, when combined with glucoses as glucosides, decomposed to free flavonoids, when exposed to certain enzymes or stimulation (Fu et al., 2008). It is possible that the flavonoids LQ and isoliquiritigenin (ISLQ) combined with glucoses and subsequently decomposed to LG and ISLG after UV irradiation. This would explain the decrease in LQ concentration and the increase in LG and ISLG concentrations in the ALBH and AHBL treatments. However, plant biosyntheses are very complex, and this mechanism needs to be studied further.

CONCLUSION

The concentrations of the secondary metabolites GL, LQ, LG, and ISLG in the main root of 3- or 8-month-old Chinese licorice plants were 50-350% higher under UV-B treatment or combined UV-A and UV-B treatment over 5 to 10 days than the levels in their respective controls, without inhibiting growth of the main root.

Literature Cited

- Afreen, F., Zobayed, S.M.A. and Kozai, T. 2005. Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration of *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. *Plant Physiol. Bioch.* 43:1074-1081.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. and Doerr, H.W. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *The Lancet* 361:2045-2046.

- Fu, Y.J., Liu, W., Zu, Y.G., Tong, M.H., Li, S.M., Yan, M.M., Efferth, T. and Luo, H. 2008. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. Food Chem. 111:508-512.
- Hattori, T., Ikematsu, S., Koito, A., Matsushita, S., Maeda, Y., Hada, M., Fujimaki, M. and Takatsuki, K. 1989. Preliminary evidence for inhibitory effect of glycyrrhizin on HIV replication in patients with AIDS. Antivir. Res. 11:255-262.
- Hikosaka, S., Ito, K. and Goto, E. 2010. Effects of ultraviolet light on growth, essential oil concentration, and total antioxidant capacity of Japanese mint. Environ. Control Biol. 48:185-190.
- Lee, J.Y., Lee, J.H., Park, J.H., Kim, S.Y., Choi, J.Y., Lee, S.H., Kim, Y.S., Kang, S.S., Jang, E.C. and Han, Y. 2009. Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. Int. Immunopharmacol. 9:632-638.
- Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C. and Reid, D.M. 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. Environ. Exp. Bot. 66:212-219.
- Saxena, S. 2005. *Glycyrrhiza glabra*: medicine over the millennium. Natural Product Radiance 4:358-367.
- Wang, Z.Y. and Nixon, D.W. 2001. Licorice and cancer. Nutr. Cancer. 39:1-11.

Tables

Table 1. UV irradiation treatment conditions.

Treatment code	Intensity ($W\ m^{-2}$)		Period (days)
	UV-A	UV-B	
I	W1	0.3	0.1
	AL	3.0	-
	BL	-	0.4
	W2	0.3	0.1
	AH	6.0	-
	BH	-	0.8
II	W3	0.3	0.1
	ALBL	3.0	0.4
	W4	0.3	0.1
	ALBH	3.0	0.8
	AHBL	6.0	0.4
	W5	0.3	0.1
	AHBH	6.0	0.8

I, single irradiation exposed to 3-month-old Chinese licorice plants; II, combined irradiation exposed to 8-month-old Chinese licorice plants. A and B in the treatment code column indicate UV-A and UV-B irradiation, respectively. L and H in the treatment code column indicate low and high intensity of UV irradiation, respectively. W1-W5 are the controls for the different treatment periods.

Table 2. Effects of UV irradiation on the dry weights of above-ground part and below-ground part (main root and lateral root) of Chinese licorice.

Treatment code	Above-ground part dry weight (g)	Below-ground part dry weight (g)		
		Main root	Lateral root	
I	W1	14.8 ^a	0.9	2.4 ^a
	AL	15.1 ^a	0.7	2.0 ^{ab}
	BL	10.6 ^b	0.8	1.2 ^b
	W2	13.0	0.7	1.3
	AH	11.0	0.4	0.9
	BH	10.5	0.7	1.5
	W3	7.0	0.9	1.4*
II	ALBL	5.9	0.8	0.7
	W4	8.1	0.9	1.0
	ALBH	4.1	1.0	1.1
	AHBL	5.8	1.2	1.2
	W5	7.2	2.0	1.8
	AHBH	6.1	1.8	1.5

Treatment code column are the same as in Table 1. Different letters indicate significant differences among UV treatments and their respective control at P<0.05 by Tukey-Kramer's test.

* indicates significant differences between UV treatment and its respective control at P<0.05 by t-test.

Table 3. Concentrations of four main medicinal ingredients in dried main root samples of Chinese licorice in all controls (W1–W5).

Treatment code	Concentration (% DW)			
	GL	LQ	LG ($\times 10^{-2}$)	ISLG ($\times 10^{-2}$)
W1	1.2	0.4	3.18	1.25
W2	0.6	0.2	1.98	0.60
W3	1.2	0.4	2.48	1.23
W4	1.0	0.3	0.34	0.11
W5	0.6	0.3	1.52	0.66

W1-W5 are controls for different treatment periods.

Figures

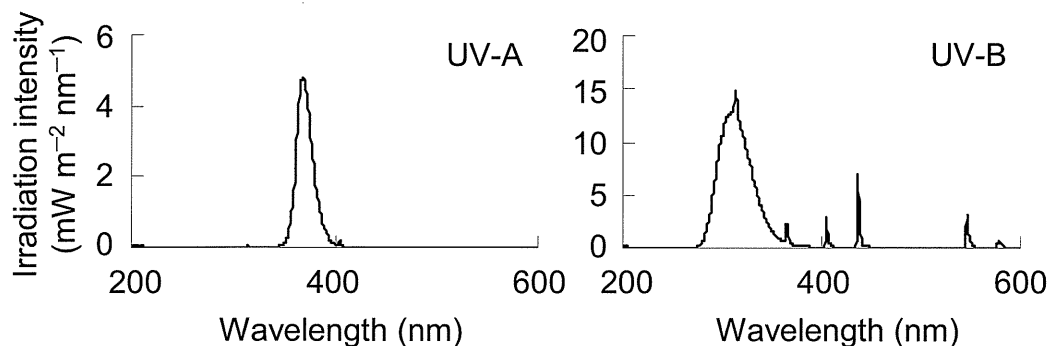


Fig. 1. Spectral irradiance of UV-A and UV-B lamps.

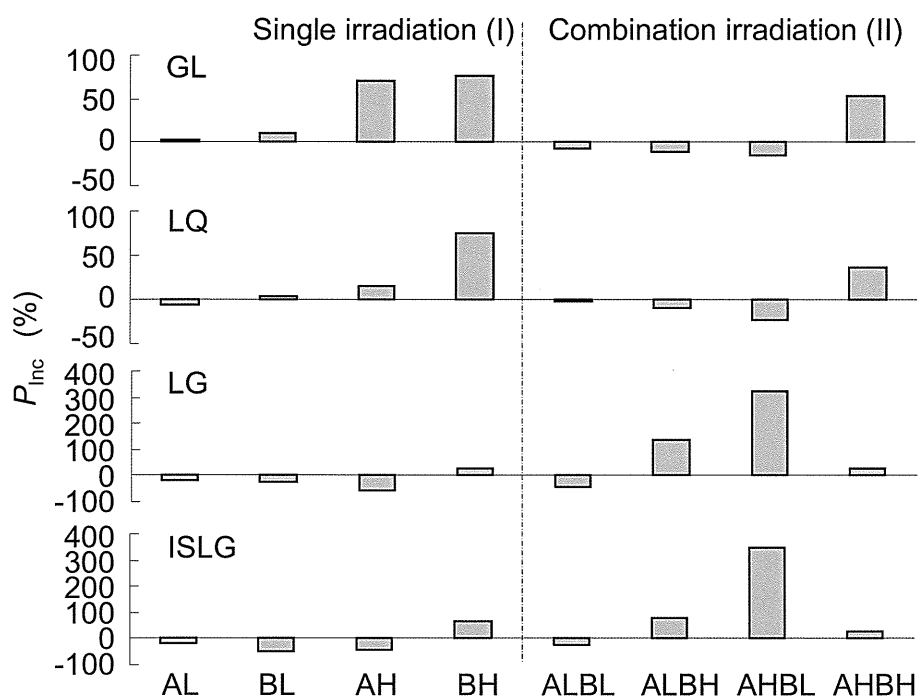


Fig. 2. The effects of UV irradiation on the percent change (P_{Inc}) of four medicinal ingredients concentrations with respect to the control in dried main roots of Chinese licorice plants. The concentrations in all controls are shown in Table 3.

Determination of cyanogenic glycoside linamarin in cassava flour using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received September 14, 2011)

(Accepted January 27, 2012)

Asako Watanabe-Ishitsuka^{a)}, Hiroshi Akiyama^{a)}, Kazunari Kondo^{a)},
Saemi Obitsu^{a)}, Nobuo Kawahara^{b)}, Reiko Teshima^{a)}, Yukihiko Goda^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) Research Center for Medical Plant Resources

Abstract

A specific and reliable method was developed for determining the presence of linamarin, a cyanogenic glucoside in cassava flour and cassava starch, using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Linamarin was extracted with acetonitrile and then purified by solid-phase clean-up using an NH₂ cartridge column. Isocratic HPLC was used to introduce samples for electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. The multiple reaction monitoring (MRM) was performed using a characteristic fragmentation (m/z 246.1 \rightarrow m/z 161.0) for linamarin. Calibration with a standard solution was linear over a working range of 0.001-0.1 ppm ($r^2=0.995-0.999$), which is equivalent to 0.18-18 $\mu\text{g/g}$ in food samples. The mean recovery of linamarin from cassava flour was approximately 92-100%. The detection limits of the proposed method of linamarin in cassava flour and tapioca samples were 0.75 $\mu\text{g/g}$ and 0.84 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Keywords : cyanogenic glycoside, linamarin, cassava, tapiok, liquid chromatography-tandem mass spectrometry

I Introduction

Linamarin (phaseolunatin or acetone cyanohydrin- β -D-glucoside) (Fig 1.) is one of the major cyanogenic glucosides and toxic components found in many plants and is especially present in *Manihot utilissima*, also called cassava.^{1, 2)} The starch of cassava is consumed as a foodstuff worldwide. Owing to the toxic nature of linamarin, analytical methods have been developed for specifically monitoring linamarin as a means of regulation worldwide. Conventional analytical methods for linamarin detection based on its cyanide structure have used spectrophotometry, following endogenous enzymatic hydrolysis by β -glucosidase.³⁻⁷⁾ However, these methods involve time-consuming clean-up steps, making them inapplicable for processed foods such as cassava flour, as endogenous β -glucosidase could be removed or denatured during processing. Some studies have also analyzed linamarin as a cyanogenic glycoside using the post column high-performance liquid chromatography⁸⁾

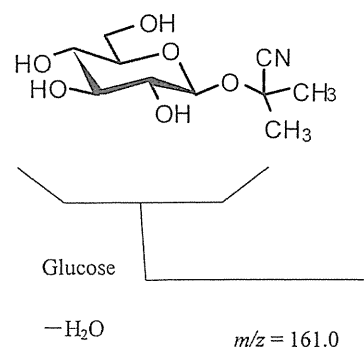


Fig. 1. Chemical structure and product ion of linamarin

and gas chromatography-flame ionization detector.^{9, 10)} However, as pretreatment for these methods is complicated, a simpler method is needed. In fact, quantitative and qualitative confirmation of linamarin contamination using reliable methods is necessary for regulation by governmental

ordinances to ensure food safety.¹¹⁾ In this study, we developed a method for the determination of linamarin as a cyanogenic glycoside based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), and examined its applicability in determining the presence of linamarin in cassava flour and cassava starch. This study shows the development of a rapid and specific method for linamarin determination.

II Materials and methods

1. Plant Samples

Cassava flour and cassava starch were obtained through the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. All of the cassava flour samples were freeze-dried powder for 2 days using a freeze dryer (FD-81; Eyela, Tokyo, Japan).

2. Chemicals

Linamarin (Toronto Research Chemicals, Inc., Ontario, Canada) and all other chemicals and solvents were of high-performance liquid chromatography reagent grade (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan).

3. Instrumentation

The LC system consisted of an Agilent Technologies HP 1100 series with a degasser, binary pump column oven, and autosampler (Agilent Technologies, Waldbroom, Germany). The MS detection system comprised an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems-MDS Sciex, Concord, Canada) equipped with a TurboIonSpray interface. The analytical data were processed by ANALYST software (version 1.4.1, Applied Biosystems-MDS Sciex).

4. LC/MS/MS conditions

Chromatographic separation of samples was performed in isocratic mode with a CAPCELL PAK AQ column (2.1 × 250 mm, Shiseido, Yokohama, Japan). The mobile phase consisted of 0.01% acetic acid : methanol (70:30 by vol.). The flow-rate was set at 0.2 ml/min. The injection volume was 10 µl and the run time was 40 min. Linamarin was eluted in approximately 5.5 min and then the column was washed completely using 0.01% acetic acid:methanol (10:90 by vol.) for approximately 15 min and equilibrated with the mobile phase for the rest of time. The turbo ion spray interface was operated in the negative ion mode at 5.4 kV and 400°C and supplied by an auxiliary gas flow of 4.0 l/min. The nebulizer gas flow was set at 1.49 l/min, the curtain gas flow at 1.25 l/min, and the collision gas at 5.2×10^{-5} hPa. Nitrogen gas was used in all cases. Samples were quantified by multiple reaction monitoring (MRM) of the deprotonated precursor ion and the related product ion.

5. Sample preparation

Cassava and tapioca samples (0.25 g) were shaken with 15 ml acetonitrile for 20 min at room temperature in a reciprocal shaker. The extracts were then centrifuged at $470 \times g$ for 5 min and the supernatant was dried by evaporation at 40°C. The resulting residue was dissolved in 3 ml of acetonitrile-methanol (4:1, v:v) as a solvent and filtrated through a 0.45 µm filter (SYRINGE FILTER, 0.45 µm, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) to make a sample solution. Bond Elut NH₂ cartridges (500 mg/3 ml; Varian, Palo Alto, CA, USA) were conditioned with the same solvent described above, loaded with the sample solution (1 ml), and then eluted with additional solvent. The first 3 ml elution was discarded, and the following 6 ml elution was collected. The collected elution was diluted tenfold with 0.01% acetic acid-methanol (9:1 by vol.). The final solutions (10 µl) were injected into the LC/MS/MS system. Linamarin was quantified using a linear calibration function that was established using the linamarin standard at concentrations of 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, and 0.1 µg/ml ($r^2=0.995-0.999$) as standard solution, which is equivalent to 0.18-18 µg/g in food samples, because of 180-fold dilution during sample preparation.

III Results

1. LC/MS/MS optimization

Mass spectrometry data were acquired in negative full-scan mode using the linamarin standard in continuous infusion. The deprotonated ion was m/z 246.1 [M-H]⁻. The major product ions, m/z 161.0 [glucose-H₂O]⁻ and m/z 187.6 [not determined] were monitored by successive MRM analysis. The product ion mass spectrum of the [M-H]⁻ precursor ion is shown in Fig. 2. We considered that m/z 161.0, which was thought to correspond to glucose lacking H₂O, would be better than m/z 187.9 in terms of sensitivity. Acquisition in positive mode was also attempted, but a tenfold less sensitivity for the MS signal of the [M-H]⁻ ion was observed compared to that obtained for the [M-H]⁻ ion (data not shown). For optimization of chromatographic conditions, to achieve symmetrical peaks and a short analysis time, the mobile phase consisting of methanol and aqueous solution was used with the CAPCELL PAK AQ column. Although we also examined with normal phase columns, such as amide-type column and amino-type column, the reversed phase column (CAPCELL PAK AQ column) gave the best results in terms of the retention time and the separation.

2. Specificity

Generally, the LC/MS/MS method has high specificity since only ions derived from analytes are monitored. MRM

chromatograms of linamarin for a linamarin-free cassava flour sample and cassava flour samples spiked with 10 $\mu\text{g/g}$ linamarin are shown in Fig. 3. No significant peaks interfering with the peak for linamarin were observed in the linamarin-free cassava flour and tapioca. The samples were diluted 180-fold during preparation as described previously, and it enabled to minimize the effect of contamination of foods, and to be the composition of the solvent almost same as the mobile phase.

3. Recovery and validation

The calibration curve of the linamarin standard solution was shown in Fig. 4. The correlation coefficients for the standard

curves in standard solution ranged from 0.995 to 0.999. Recovery of linamarin from cassava flour spiked at 10 and 100 $\mu\text{g/g}$ linamarin, which was equivalent to approximately 0.056 and 0.56 $\mu\text{g/g}$ in standard solution, was examined. The mean recovery ranged from 92% to 100% for cassava flour and 100% to 105% for tapioca samples (Table 1).

Intra- and inter-day accuracy and precision for 10 and 100 $\mu\text{g/g}$ linamarin determination in cassava flour (Table 2 A) and tapioca (Table 2 B) samples were also determined. Intra-day precision was obtained by measuring three replicate samples, which were fortified with 10 or 100 $\mu\text{g/g}$ of the linamarin standard, on the same day. Inter-day precision was estimated by measuring three replicate samples on

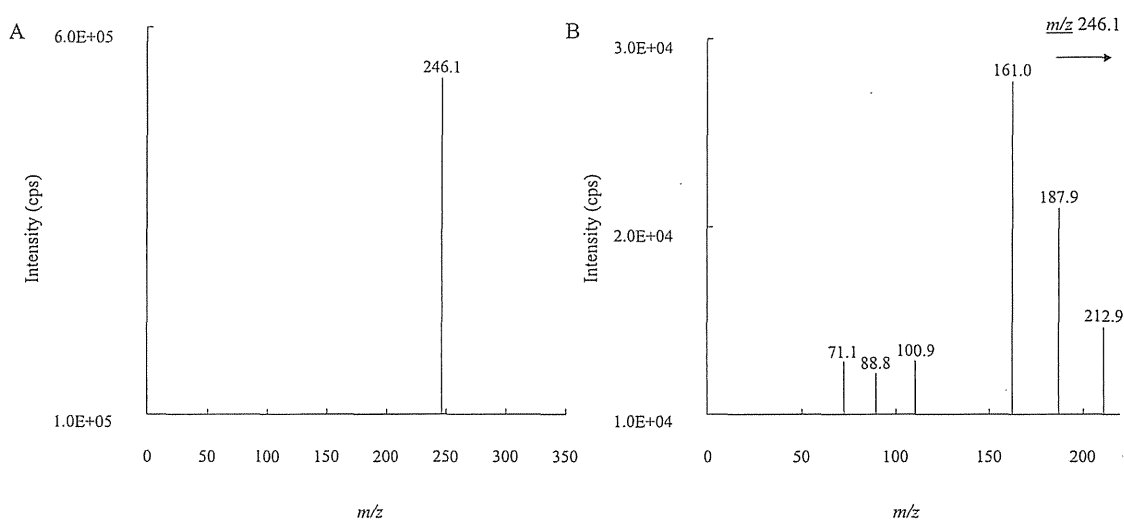


Fig. 2. Full-scan spectrum (A) and product ion mass spectra (B) of linamarin

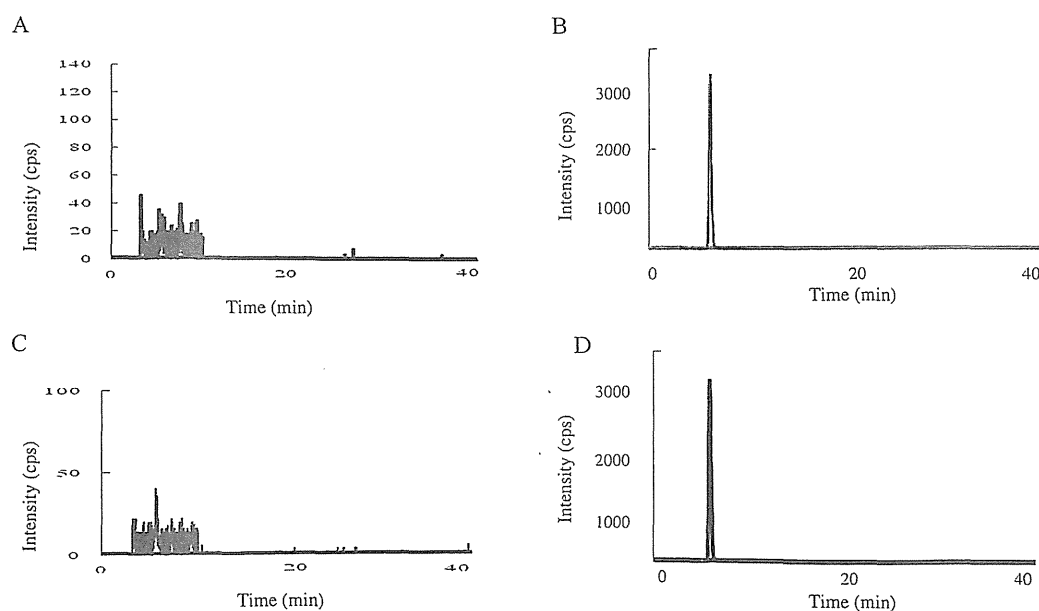


Fig. 3. Representative MRM chromatograms for (A) control cassava flour, (B) cassava flour spiked with 10 $\mu\text{g/g}$ linamarin, (C) control tapioca, and (D) tapioca spiked with 10 $\mu\text{g/g}$ linamarin