

分担研究課題 無承認無許可医薬品の調査・分析に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長 丸山卓郎

3次元蛍光スペクトルを用いた *Pueraria mirifica* 含有健康食品の品質評価について

研究要旨 3次元蛍光スペクトルを用いた健康食品製品の品質評価法の基礎検討として、タイ産生薬である *Pueraria mirifica* (PM) の含有が表示されている健康食品に対して、同分析を行った。その結果、スペクトルデータを主成分分析することにより、正しく PM を含有する製品とそれ以外の偽品及び「専ら医薬品」に分類される同属植物、カッコンとを区別可能であった。

協力研究者

後藤佑斗 国立医薬品食品衛生研究所生薬部
派遣研究員

佐藤直子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 研究員

A. 研究目的

Pueraria mirifica (*P. candollei* var. *mirifica*; PM) は、タイ国、主にチェンマイ周辺に自生するマメ科の植物であり、その肥大した塊根は、kwao keur (ガウクルア) と呼ばれる回春薬として古くより当地で用いられている。その成分には、daidzein, genistein, kwakhurin, puerarin などのイソフラボン類や coumestrol, mirificoumestan などのプレロカルパン誘導体, miroestrol (1), deoxymiroestrol (2)(Fig. 1) などが知られ、後者 2 成分のエストロゲン作用が、薬理活性の本体であると考えられている^{1),2)}。近年、国内では、美容、豊胸効果などを謳い、本植物を原料とした「いわゆる健康食品」が、数多く販売されている。しかし、以前、我々が、PM 含有を謳った

健康食品に対して行った、DNA 配列解析による基原種鑑別では、正しく PM を含有するのは約半数に留まることが確認されている³⁾。

PM の含有が確認できなかった製品からは、ムラサキウマゴヤシ (アルファルファ) やスペインカンゾウ、ハスの遺伝子が検出され、「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト」に区分されるものは見出されなかったが、中には、サツマイモとコムギの遺伝子が検出され、明らかにデンプンを主原料とするもの (このものは、カプセル剤であり、賦形剤の表示はなかった) や、クズイモ (*Pachyrhizus erosus*) のように、PM を誤同定したものと思われるものもあった。

PM と同属植物の *P. lobata* (*P. montana* var. *lobata*) の根は、「専ら医薬品」に区分される、生薬カッコンの原料であり、上記のクズイモの例のように、PM 製品に誤使用された場合、健康被害の恐れがある。

健康食品の原料植物の鑑定に、DNA 配列解析は有用な手段であるが、時間及びコストがか

かるという欠点がある。一方、近年、3次元蛍光スペクトル測定と主成分分析を組み合わせた解析が食品分野に応用され、マンゴーの産地判別や小麦粉とそば粉の混合割合の推定などが報告されている^{4,5)}。本手法は、操作が簡便であり、測定に要する時間もごく僅かであることから、PM製品を始めとして、偽品が多く流通する健康食品分野の分析手法としては、有用性が高いと思われる。

そこで昨年度、以前の調査で用いたPM製品を用いて、3次元蛍光スペクトルによる健康食品製品の品質評価法の基礎検討を行った。その結果、正しくPMを含有する正品とそれ以外の偽品との区別、およびカッコンとの区別が可能であることが明らかになった。しかしその際、一部の製品で短波長域の励起光が吸収されており、3次元蛍光スペクトルの取得データが不完全であった。また、試料数についても、予備検討から数を追加して検討を行う必要があった。

従って、本研究ではよりよいデータを取得するための実験方法の検討と、PM製品数を増やした解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用されたPM含有表示健康食品の詳細をTable 1に示した。このうち、Pu-1~29は、以前の研究で遺伝子解析を行ったものである。Pu-31~36は、新たに購入した市場に流通する製品であり、遺伝子解析を行っていない。今回は、添加物等が含まれているものについても検討を行った。また、参照試料として用いた

粉カッコン、カッコン、各種デンプンの詳細をTable 2に示した。

2. 実験方法

2-1. 試料調製

各試料のうち、粉末試料については、未処理で、カプセル剤については、中の粉末試料を取り出し、使用した。刻みの試料(Pu-21~24)については、Wonder Crush/Mill D3V-100(大阪ケミカル)により粉砕した後、50号の篩(300 μm)にかけてのものを用いた。

各試料粉末100 mgにメタノール5 mLを加え、15分間振とう抽出後、1000 G x 5分間遠心して、上清をとり、これを試料溶液とした。

2-2. 3次元分光蛍光スペクトル(蛍光指紋)測定

測定は分光蛍光光度計F-7100(日立ハイテクサイエンス)で行った。曲底標準セル(GL Sciences, 光路長5 mm)に試料溶液1 mLを入れて、以下の条件で測定した:

測定モード, 3次元; データモード, 励起波長範囲, 200.0~500.0 nm; 励起側サンプリング間隔, 10.0 nm; 蛍光波長範囲, 200.0~600.0 nm; 蛍光側サンプリング間隔, 2.0 nm; スキャンスピード, 60000 nm/min; 励起側スリット幅, 5.0 nm; 蛍光側スリット幅, 5.0 nm; ホトマル電圧, 400 V; レスポンス, 自動; スペクトル補正, On; シャッタ制御, Off; 自動フィルタ制御, On(自動1)。

測定は各試料につき3回行った。各回の測定を開始する前に、10 ppm 硫酸キニーネ溶液の測定を行い、励起波長(Ex)/蛍光波長(Em)

=340/450 nm の値をもとに、測定値の標準化を行った。

2-3. 主成分分析

得られた3次元蛍光スペクトルのデータの中から、励起波長未満の蛍光波長、励起波長と等しい蛍光波長、励起波長+2, 4, 6, 8 及び 10 nm の蛍光波長、そして励起波長 200, 210, 220 nm に対する蛍光波長を除いた部分を用いてデータマトリクスを作成し、多変量解析ソフトウェア SIMCA-14 (インフォコム) により、主成分分析を行った。データの前処理については、行わなかった。

2-4. LC/MS 分析

2-1. の試料粉末 200 μ L に、酢酸エチル 2 mL とエチルパラベン (50 μ g/mL) 4 μ L を加えて 3 時間超音抽出後、1000 G x 5 分間遠心して、上清を回収した。残渣にメタノール 2 mL を加えて 3 時間超音抽出後、1000G x 5 分間遠心して、上清を回収した。2 つの上清を合わせたものをエバポレーションした抽出物に、メタノール 200 μ L を加えて再溶解させて、0.45 μ m フィルターろ過したものを、以下の条件で分析した：

装置, LCMS-2020 (Shimadzu); 分析カラム, Inertsil®ODS-3 (150 x 2.1 mm ID, 5 μ L, GL Sciences); 移動相, 0.1%酢酸 (A) とアセトニトリル (B) でグラジエント, 5% B (0 min) \rightarrow 20% B (25 min) \rightarrow 100% B (35 min); 流速, 0.300 mL/min; イオン化, ESI ネガティブモード; キャピラリー電圧, 1.45 kV; ネブライザーガス流量, 1.50 L/min; ドライイングガス流量,

15 L/min; ヒートブロック温度, 200°C; データ取得, SIM モード; 設定値, $m/z=165.00, 367.00$.

得られたクロマトグラムから、PM に特徴的な成分である Kuwakhurin ([M-H]⁻ $m/z=367$) のピーク面積値を、内部標準物質として加えたエチルパラベン ([M-H]⁻ $m/z=165$) のピーク面積値で標準化した数値を求めて、主成分得点との相関を調べた。

C. 研究結果

各検体よりメタノールエキスを調製し、3次元蛍光スペクトルを測定した。各検体のスペクトル (3 回の測定のうちの 1 回) を Fig. 2 に示した。

すべての検体で、低波長領域の励起光が吸収されることなく、蛍光が出力されていた。

健康食品製品群 (Table 1) のうち、PM を含有する 6 検体 (Pu-2, 10, 14, 15, 18, 29) については、Pu-14 を除く 5 検体において 3 つのピーク波長 (Ex/Em=220/320, 230/425, 310~320/410~420 nm) が一致したが、Pu-15, 29 に関しては、他の 2 検体では見られない、さらに 1 つのピーク波長 (Ex/Em=280/340 nm) が認められた。Pu-14 に関しては、他とは励起波長のやや異なる 3 つのピーク波長 (Ex/Em=230/316, 250/410, 350/416 nm) を示した。

PM を含有しない健康食品製品, 7 検体のうち, 6 検体 (Pu-1, 3, 4, 8, 11, 13) に関しては, 4 点のピーク波長 (Ex/Em=220/330~345, 230/400, 280~290/335~345, 330~340/410 nm) を持ち, その他の形状についてもよく似たスペクトルが得られた。さらに Pu-1 では, 420/530 nm に小さなピークを認めた。一方, Pu-17 について

は、4つのピーク波長 (Ex/Em=220/332, 240/422, 280/328, 340/418 nm) を示すスペクトルを与えた。これらのピークは他の6検体で示したピークと近い波長を示していたが、340/418 nm をピークとする蛍光スペクトル強度が他の検体に比べて大きく、その影響で全体図も視覚的に他の検体と異なっていた。

次に、新規に購入追加したPM含有未解析の6検体 (Pu-31, 32, 33, 34, 35, 36) のうち、Pu-31, 32, 35 の3検体では、4つのピーク波長 (Ex/Em=220/340~344, 230/414~424, 290/358~360, 310/418~420 nm) が一致した。Pu-34では、4つのピーク波長 (Ex/Em=210/424, 220/354, 310/374, 320/418 nm) を示した。310/374 nm 以外のピークについては、上記の3検体と一致した。Pu-33, 36 の2検体では、4つのピーク波長 (Ex/Em=220/364~366, 230~240/402~412, 320/376~380, 340/412 nm) が一致した。低波長側の2つのピーク波長については、他の4検体と一致した。

参照試料として測定した粉カッコン (*Pueraria montana* var. *thomsonii*), カッコン (*Pueraria montana* var. *lobata*), デンプンのうち、粉カッコンの2検体 (Pu-19, 20) については、4つのピーク波長 (Ex/Em=220/324~326, 210~230/400~402, 280/328~332, 320/396~400 nm) を特徴とするほぼ同一のスペクトルが得られた。このスペクトル形状は、上述したPMを含まなかった健康食品製品4検体のものと類似していた。

また、カッコンの4検体 (Pu-21, 22, 23, 24) については、2つのピーク (Ex/Em=210/388~402, 360/408~412 nm) が一致した、ほぼ同一の

スペクトルが得られた。

原料植物の異なる4種のデンプン (Pu-25, 26, 27, 28) では、ごく弱い強度であったが、3つのピーク (Ex/Em=210~220/326~338, 250/436~442, 280/306~308 nm) が一致した。Pu-25ではさらに、310/392 nm にピークが認められた。

取得したスペクトルデータから作成したデータマトリクスを用いて、主成分分析を行った。この際、励起波長200~220 nmの範囲については、蛍光強度が0もしくは負の値を示した検体が多く見られたため、データマトリクス作成前に除外した。結果、第一主成分と第二主成分により全データの約96%を表現することができた (Fig. 3)。

まず、カッコンの4検体は第一、第二主成分ともに正方向にクラスター (Fig. 3-A) 分離しており、PM含有、非含有製品群と区別された。また、デンプンの4検体も原点付近でクラスター (Fig. 3-B) 分離した。

製品群および粉カッコンに関しては、第一主成分が正方向、第二主成分が負方向に分布した。このうち、PMを含有する6検体のうちのPu-14と、PMを含有しない7検体のうちのPu-17は、それぞれ他の検体群と離れた位置に (Fig. 3-C, D) プロットされた。この2検体について、第一主成分と第三主成分 (Fig. 5), 第二主成分と第三主成分 (Fig. 7) で分布を確認したところ、Fig. 3同様、他の検体群とは離れた位置 (Fig. 5-C, D および Fig. 7-C, D) に分布した。

このデータマトリクス作成に用いたスペクトルデータから、カッコン4検体、デンプン4検体、PM含有品Pu-14、PM非含有品Pu-17の10検体のデータを除外したデータマトリクス

を新たに作成して、主成分分析を行った。その結果、第一主成分と第二主成分により全データの約 98%を表現することができた (Fig. 9)。

PM を含有する 5 検体のうち、Pu-2, 10, 18 は、第一主成分軸において、最も正の方向にクラスター分離していた (Fig. 9-A)。Loading plot の結果から、このクラスターの分離に大きく寄与している成分は、310~330 nm の光で励起され、410~420 nm の蛍光を発する成分であると推定された (Fig. 10)。一方、Pu-15, 29 については、上記の検体群と次に述べるクラスターC の中間に分布した (Fig. 9-B)。

PM を含有しない 5 検体 Pu-1, 3, 4, 8, 11, 13 は、粉カッコンの 2 検体と近い点に分布し、これらは主成分分析による分離が不可能であった (Fig. 9-C)。

PM 含有未解析の Pu-31~36 については、クラスターA の近くに 1 検体 (Pu-34)、クラスターB の近くに 3 検体 (Pu-31, 32, 35)、クラスターA の位置から、第二主成分が負の方向にある位置に 2 検体 (Pu-33, 36) がそれぞれ分布した。

この主成分分析における第一主成分得点と、PM に特徴的な成分である kuwakhurin を示す MS スペクトルのピーク面積値との相関を調べたところ、ピーク面積値の常用対数と第一主成分得点との間で正の相関を示した (Fig. 11)。

Fig. 9 のクラスターA, B, C に属する検体は同じようにクラスターを形成した (Fig. 11-A, B, C)。未解析の 6 検体については、これらのクラスターに沿うように直線的に分布した。

D. 考察

PM 含有表示健康食品及び参照試料の 3 次

元蛍光スペクトルデータを主成分分析した結果、短波長域の蛍光が出力できたことにより、健康食品群と「専ら医薬品」であるカッコンが明瞭に区別された (Fig. 3-A)。遺伝子解析の結果、PM の含有が確認された 6 検体のうち、Pu-14 は、他の検体と異なる 3 次元蛍光スペクトルを示し、主成分分析においても、他の検体とは離れた位置にプロットされた (Fig. 3-C)。これは、Pu-14 に含まれる PM 以外の鑑別種不明の成分の影響によるものと推察される。また、偽品の 7 検体のうち、Pu-17 は他の 6 検体とは異なる 3 次元蛍光スペクトルを示し、主成分分析においても、他の偽品検体とは離れた位置にプロットされた (Fig. 3-D)。これは先行研究により明らかとなっている Pu-17 の基原種であるクズイモの成分が示す蛍光が、他に比べてその強度が大きいためであると推察される。デンプン 4 検体はほとんど蛍光を示さず、主成分分析でも得点がほぼないため原点付近に分布して、他の検体とは明瞭に区別された (Fig. 3-B)。これは、デンプンに蛍光を発する成分が少ないのか、もしくはメタノールによる抽出では成分が得られないのか判断できないが、少なくとも偽品に見られる蛍光ピークがデンプン由来のものである可能性は低いと考えられる。

この主成分分析では、カッコンの分離に大きく寄与している Ex/Em=360/412 nm などの成分が全体に与える影響が大きいため、これらの検体のデータを除くことで、PM に特徴的な成分がより発見し易くなるのではないかと考え、新たにデータマトリクスを作成した。その結果、第一主成分のみで全データのほとんどを表現できることが明らかとなった (Fig. 9)。

この図において、クラスターAに分離された3検体は、PM非含有群であるクラスターCと明瞭に区別された。しかし、クラスターBに分離された2検体は、クラスターCと明瞭に区別することはできなかった。この原因として、クラスターAの検体は混合物が少なくPM原料に近い組成であるのに対し、クラスターBの検体は別種との混合物であることから、PM成分の含有が低いことが可能性として挙げられる。このことは、次に記述したkuwakhurin含有量について調べたLC/MS分析の結果とも一致している。

この図における第一主成分方向の検体の分布を見ると、得点の低い方に偽品が、高い方に正品が集中して分布しており、さらに正品の中でも別種との混合物である場合は、PM成分の含有量が少ないために、偽品寄りの位置に分布しているのではないかと予想した。そこで、第一主成分とPM含有成分の相関を見るために、PMに特徴的な既知の成分であるkuwakhurinの含有量について、MSスペクトルの該当ピーク面積値を調べることで、簡易的にkuwakhurin含有量との相関を調べた。その結果、ピーク面積値と第一主成分得点の間には正の相関が見られ、この第一主成分得点が、検体中のPM含有量を反映していることが示唆された。

PM含有未解析の6検体に関しては、3次元蛍光スペクトルの特徴、主成分分析の分布及びkuwakhurin含有量から、いずれの検体もPMを含み、その含有量は大きい方から、Pu-33, 36の2検体、Pu-34, Pu-31, 32 35の3検体の順になっていることが推察された。

PM成分の分離に最も寄与していると考えられる、Ex/Em= 310~330/410~420 nmの成分が、今回、分析に供した試料を区別するための指標成分を反映していると考えられることから、現在、蛍光検出器を備えたHPLC分析等を行うことにより、これらの成分の同定を行っている。

E. 結論

タイ産生薬である*Pueraria mirifica* (PM)の含有が表示されている健康食品に対する、3次元蛍光スペクトルを用いた品質評価法において、未同定検体を含む追加検討及び励起光の短波長領域の吸収を防ぐ改善策について検討を行った。その結果、短波長領域の吸収を起こさない条件を決定した。また、この条件において追加試料を含めた検討を行った結果、正しくPMを含有する製品とそれ以外の偽品及び「専ら医薬品」に分類される同属植物、カッコンとを区別可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

後藤佑斗, 佐藤直子, 河村麻衣子, 花尻瑠理, 袴塚高志, 丸山卓郎, 3次元蛍光スペクトルデータの多変量解析による*P. mirifica*含有健康食品の品質評価法の検討, 日本生薬学会第63回年会, 2016年9月, 富山。

参考文献

- 1) Chansakaow S., Ishikawa T., Seki H., Sekine K., Okada M., Chaichantipyuth C., Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “kwao keur” *Pueraria mirifica*: a known miroestrol may be an artifact. *J. Nat. Prod.*, **63**, 173-175 (2000).
- 2) Ingham J. L., Tahara S., Pope G. S., Chemical components and pharmacology of the rejuvenating plant *Pueraria mirifica*. In Keung W. M. ed., *Pueraria-The genus Pueraria*, Taylor and Francis Inc., New York (2002).
- 3) Maruyama T., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y., Botanical origin of dietary supplements labeled as “kwao keur”, a folk medicine from Thailand, *J. Nat. Med.*, **68**, 220-224 (2014).
- 4) Sugiyama T., Fujita K., Tsuta M., Sugiyama J., Shibata M., Kokawa M., Araki T., Nabetani H., Sagara Y., Prediction for mixture rate of buckwheat flour against wheat flour using excitation-emission matrix (EEM), *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **57**, 238-242 (2010).
- 5) Nakamura Y., Fujita K., Sugiyama J., Tsuta M., Shibata M., Yoshimura M., Kokawa M., Nabetani H., Araki T., Discrimination of the geographic origin of mangoes using fluorescence fingerprint, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **59**, 387-393 (2012).

Table 1 Details of commercial *Pueraria mirifica* products used in this study.

Sample #	製品形態	色	表示成分等	先行研究による鑑別種
Pu-1	カプセル	灰黄白色	プエラリア・ミリフィカ (カウクルア) 100%	ムラサキウマゴヤシ + ?
Pu-2	カプセル	灰黄白色 (有色の破片含有)	プエラリア・ミリフィカ シヨ糖脂肪酸エステル プエラリアミリフィカパウダー	<i>Pueraria mirifica</i>
Pu-3	カプセル	灰黄白色	海洋性フィッシュコラーゲンペプチド パールパウダー	不明
Pu-4	カプセル	うすい黄みの赤	プエラリア100%	不明
Pu-8	カプセル	灰黄白色 (有色の破片含有)	1カプセル中 中身約260 mg プエラリアミリフィカ末約252 mg	スペインカンゾウ
Pu-10	粉末	灰黄白色 (有色の破片含有)	プエラリア粉末100%	<i>Pueraria mirifica</i>
Pu-11	カプセル	灰黄白色	タイ産のピュアプエラリアを100%	サツマイモ+パンコムギ
Pu-13	カプセル	灰黄白色	プエラリア・ミリフィカを100%	ハス + ?
Pu-14	カプセル	黄土色	ガウクルア (プエラリア) 配合	<i>Pueraria mirifica</i> + ?
Pu-15	カプセル	乳白色	ガウクルア100%濃縮カプセル	<i>Pueraria mirifica</i> + ?
Pu-17	カプセル	茶褐色	プエラリアミリフィカ	クズイモ
Pu-18	粉末	灰黄白色	プエラリア・ミリフィカ 100%	<i>Pueraria mirifica</i>
Pu-29	粉末		プエラリア, マカ	<i>Pueraria mirifica</i> + マカ
Pu-31	カプセル		プエラリアミリフィカ末 被包材 (豚由来ゼラチン使用)	(新規購入製品のため未鑑別)
Pu-32	カプセル		プエラリア・ミリフィカ (白いも根槐部) 被包材 (豚由来ゼラチン)	(新規購入製品のため未鑑別)
Pu-33	カプセル		プエラリア・ミリフィカ粉末 ゼラチン (被包剤)	(新規購入製品のため未鑑別)
Pu-34	カプセル		プエラリア・ミリフィカ末	(新規購入製品のため未鑑別)
Pu-35	錠剤		プエラリア・ミリフィカ 326.7 mg (99%) タピオカスターチ 3.3 mg (1%)	(新規購入製品のため未鑑別)
Pu-36	錠剤		プエラリアミリフィカ 植物精製加工油脂	(新規購入製品のため未鑑別)

Table 2 Details of *Pueraria thomsonii* roots, *Pueraria* roots and starches used in this study.

Sample #	製品形態	表示成分等
Pu-19	粉末	粉カッコン
Pu-20	粉末	粉カッコン : 中国雲南省□富寧)
Pu-21	刻	カッコン
Pu-22	刻	カッコン□(<i>Pueraria lobata Ohwi</i>)
Pu-23	刻	カッコン
Pu-24	刻	カッコン
Pu-25	粉末	コムギデンプン
Pu-26	粉末	サツマイモデンプン
Pu-27	粉末	バレイショデンプン
Pu-28	粉末	トウモロコシデンプン

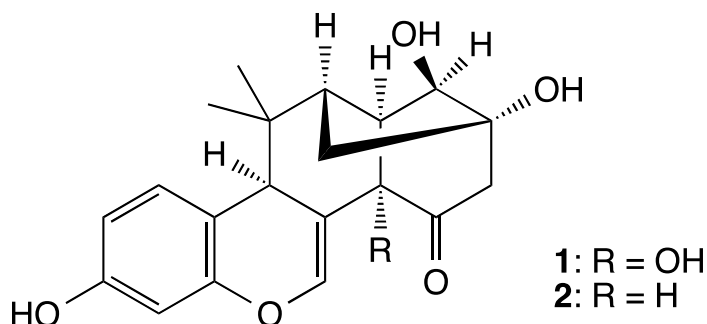


Fig. 1 Structures of miroestrol and deoxymiroestrol

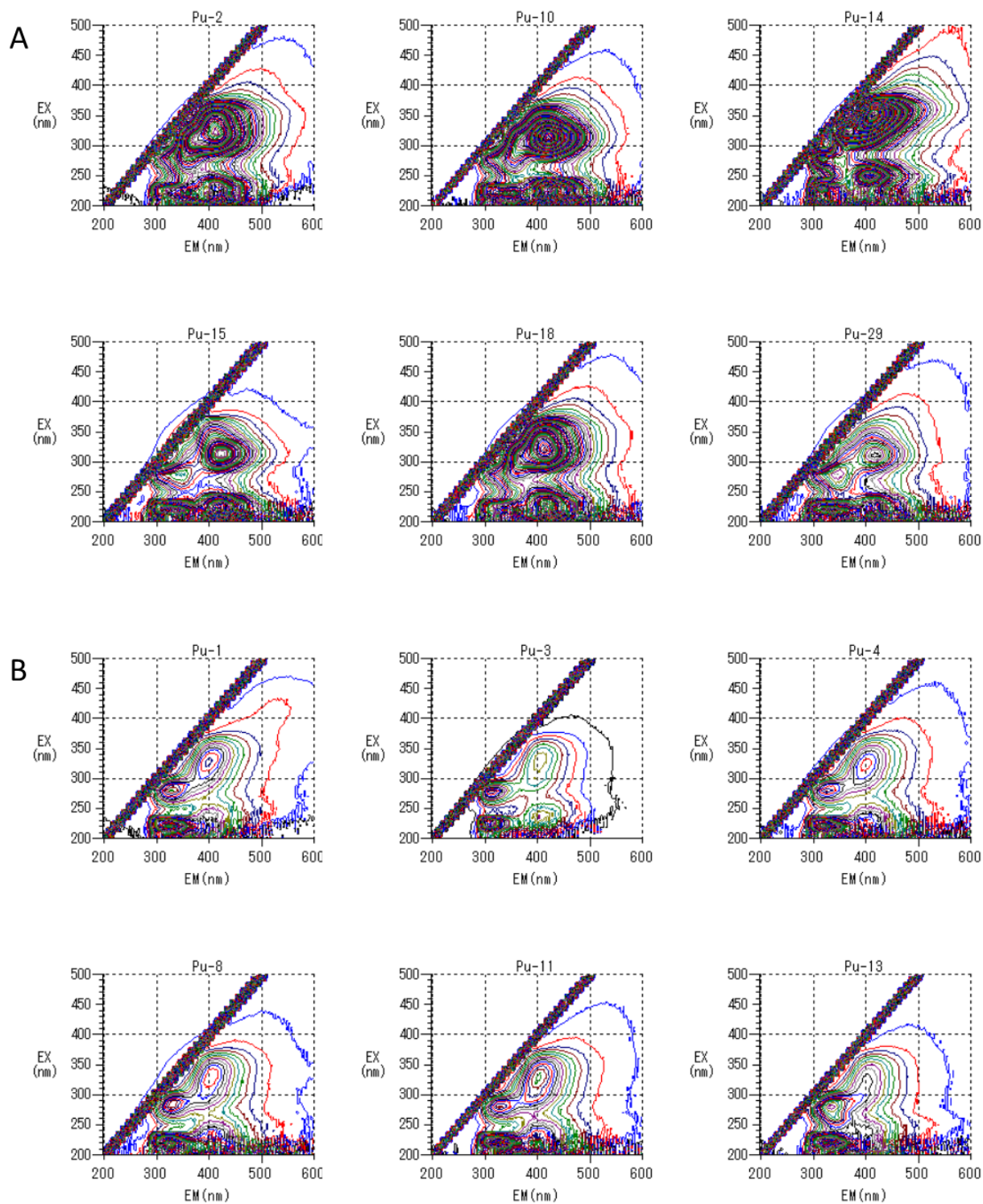


Fig. 2 3D fluorescence spectra

Scale, -1.0 to 10000; contour line span, 2.0

A, PM-containing products; B, PM-unobserved products

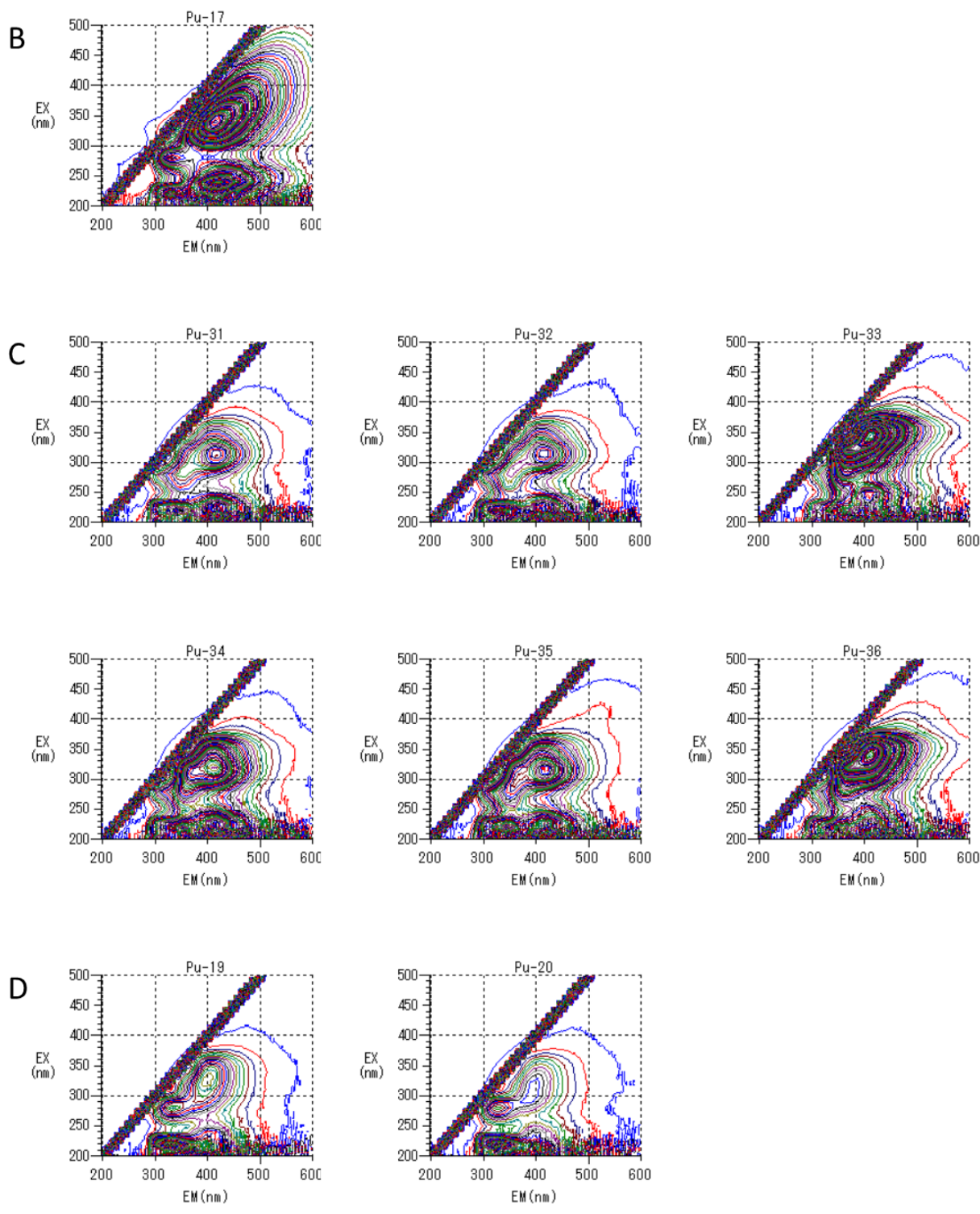


Fig. 2 Continued
 B, PM-unobserved products; C, PM-unknown products; D, *Pueraria thomsonii* roots

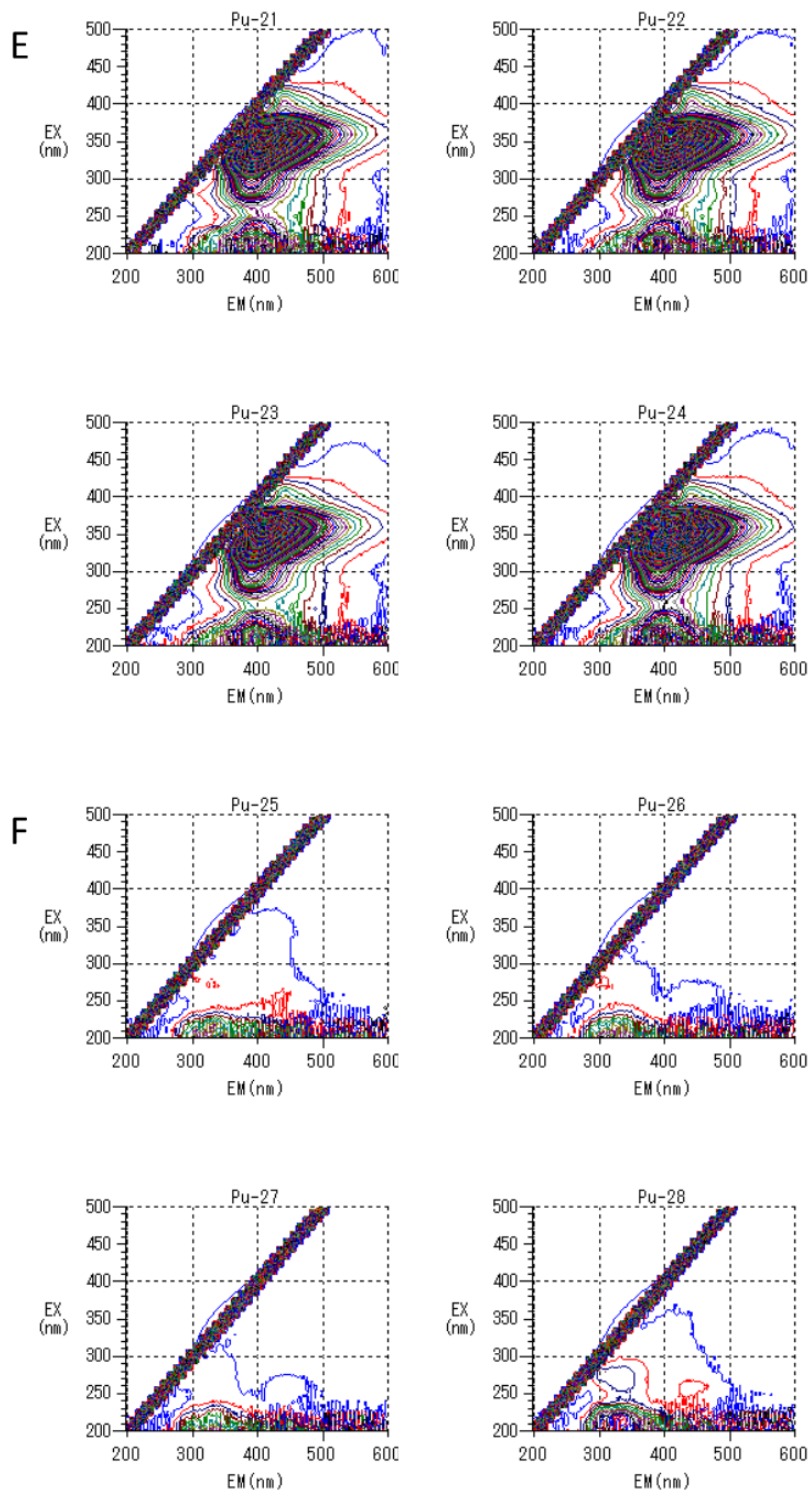


Fig. 2 Continued
E, Pueraria roots; F, starches

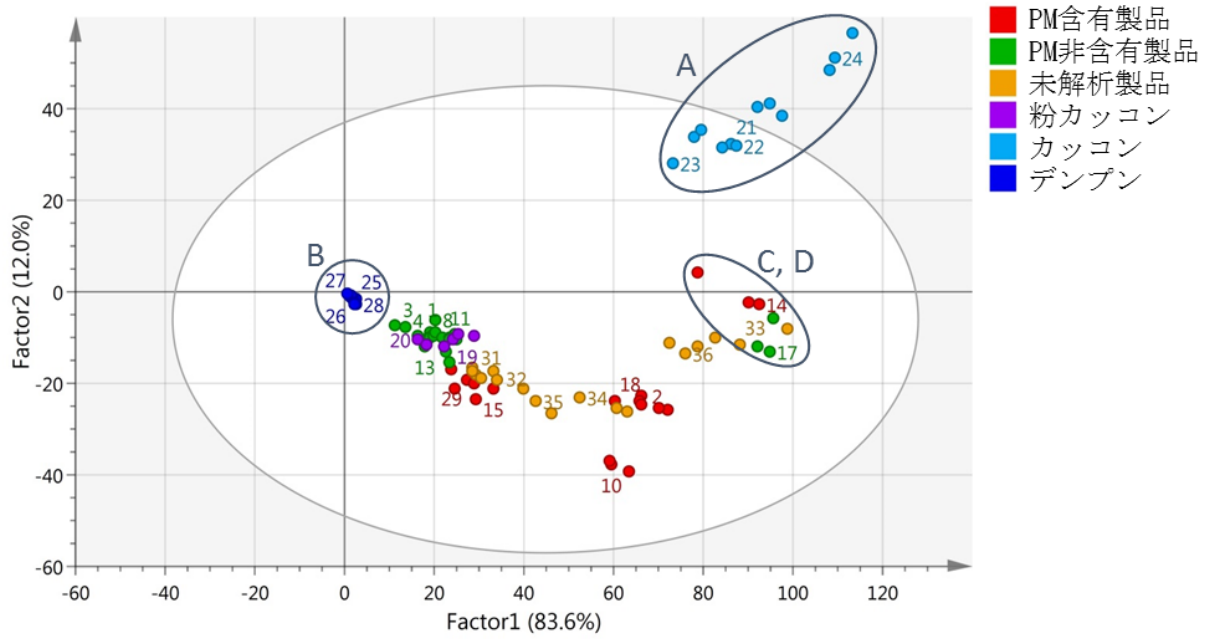


Fig. 3 Score plot on PCA-1 (Factor 1 vs Factor 2)

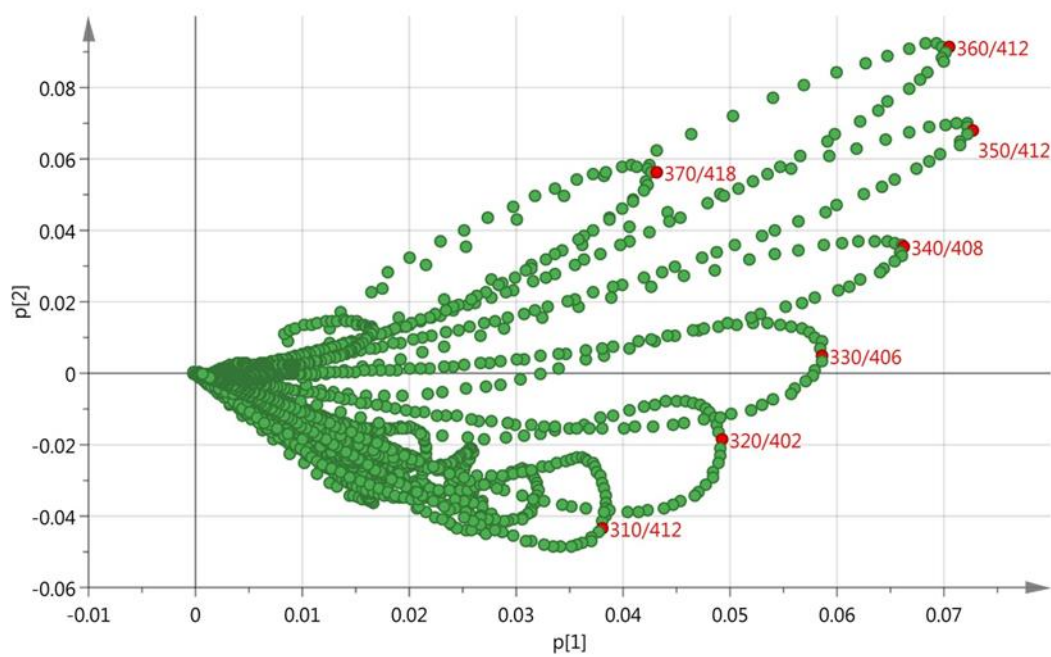


Fig. 4 Loading plot on PCA-1 (Factor 1 vs Factor 2)

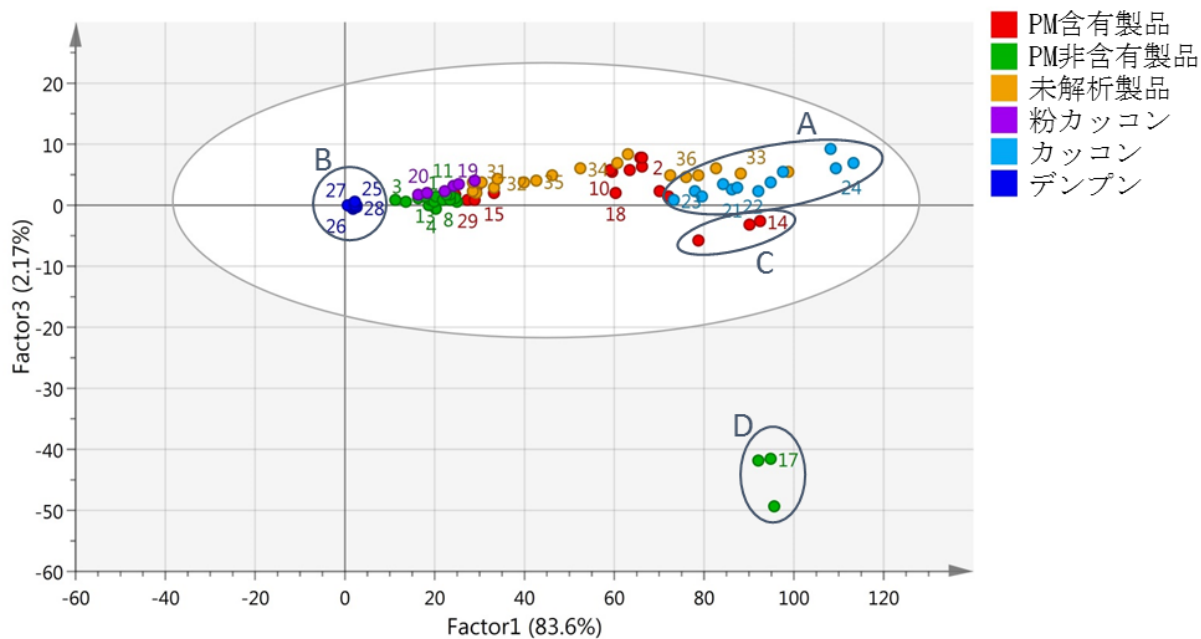


Fig. 5 Score plot on PCA-1 (Factor 1 vs Factor 3)

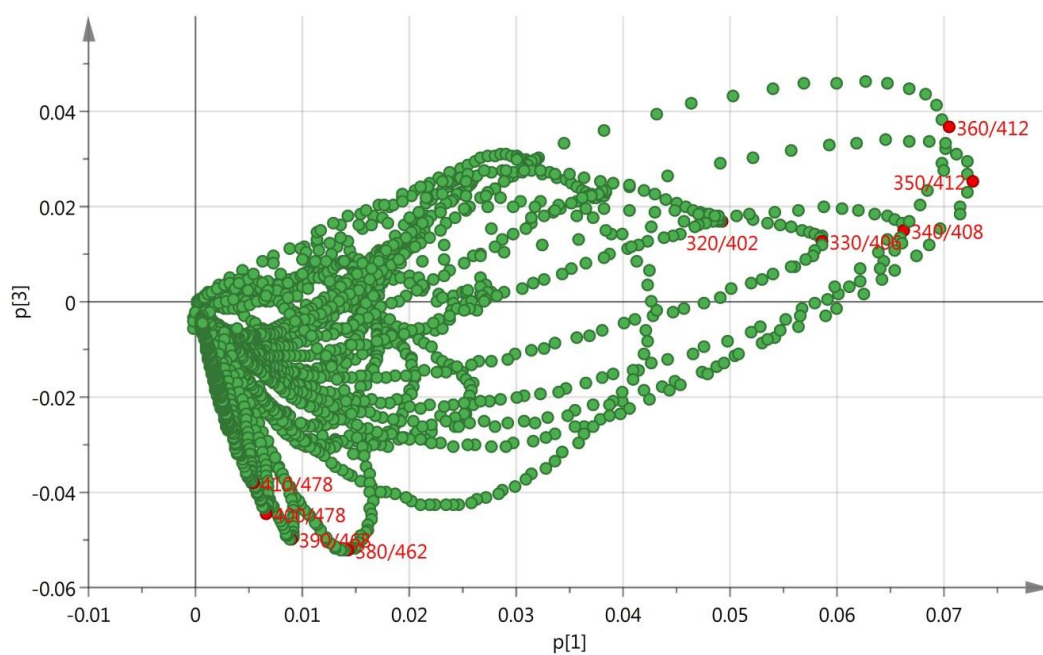


Fig. 6 Loading plot on PCA-1 (Factor 1 vs Factor 3)

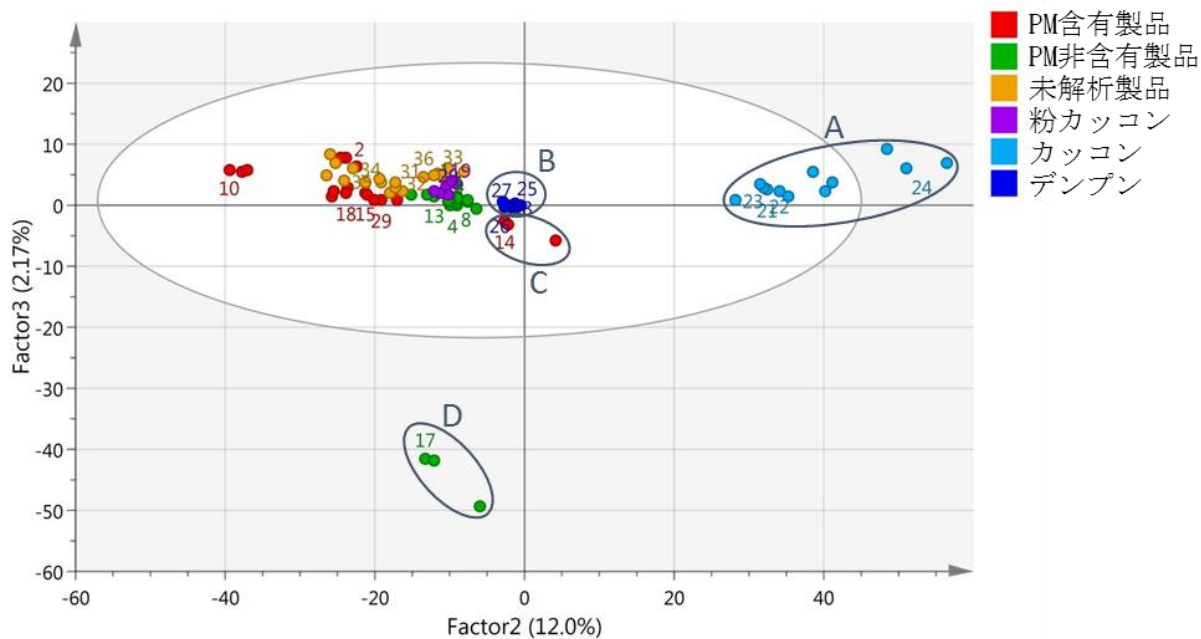


Fig. 7 Score plot on PCA-1 (Factor 2 vs Factor 3)

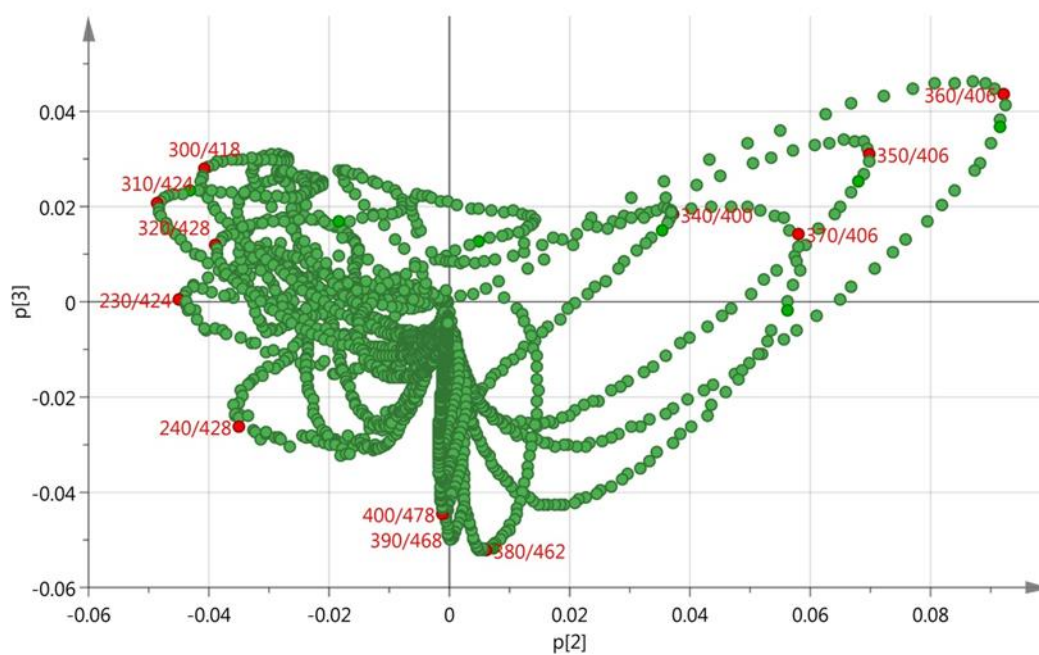


Fig. 8 Loading plot on PCA-1 (Factor 2 vs Factor 3)

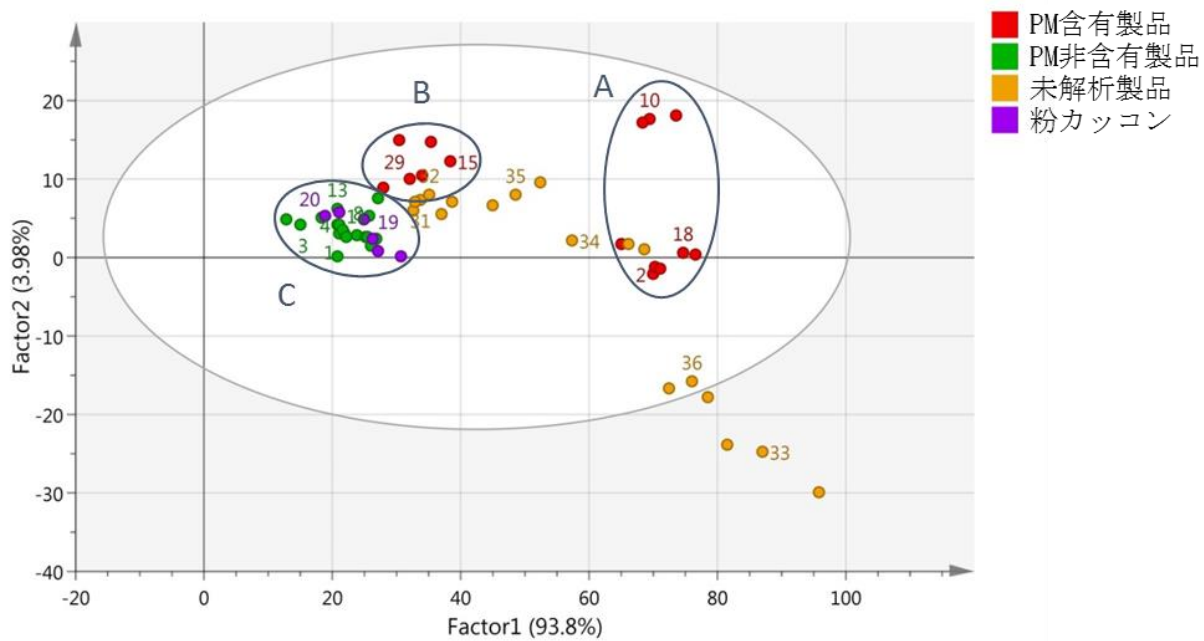


Fig. 9 Score plot on PCA-2 (exclude Pu-14, 17, 21~24, 25~28)

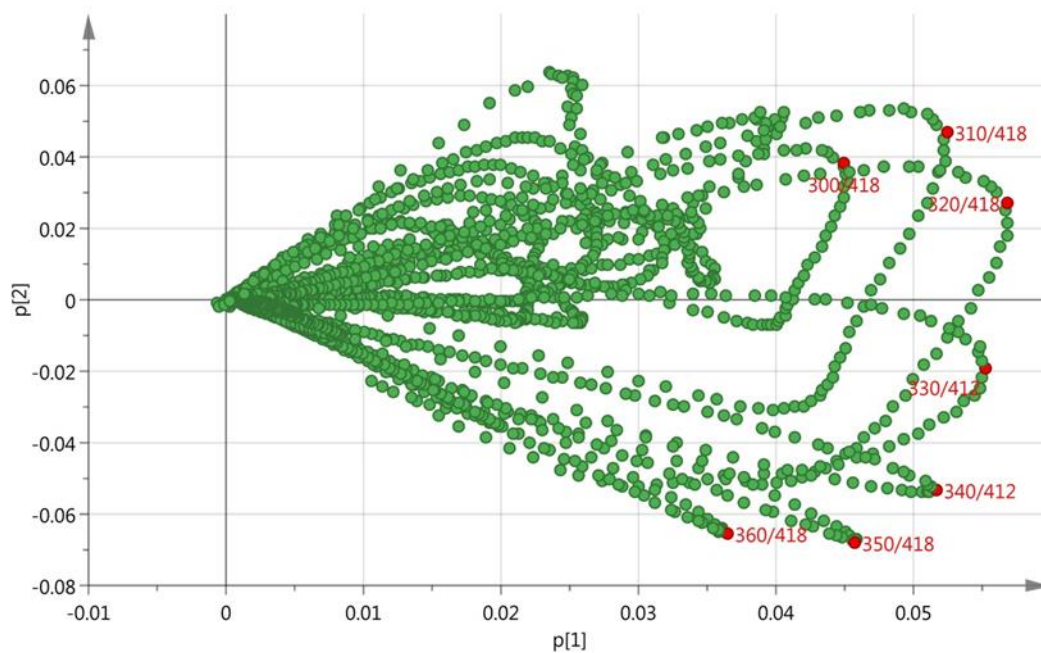


Fig. 10 Loading plot on PCA-2 (exclude Pu-14, 17, 21~24, 25~28)

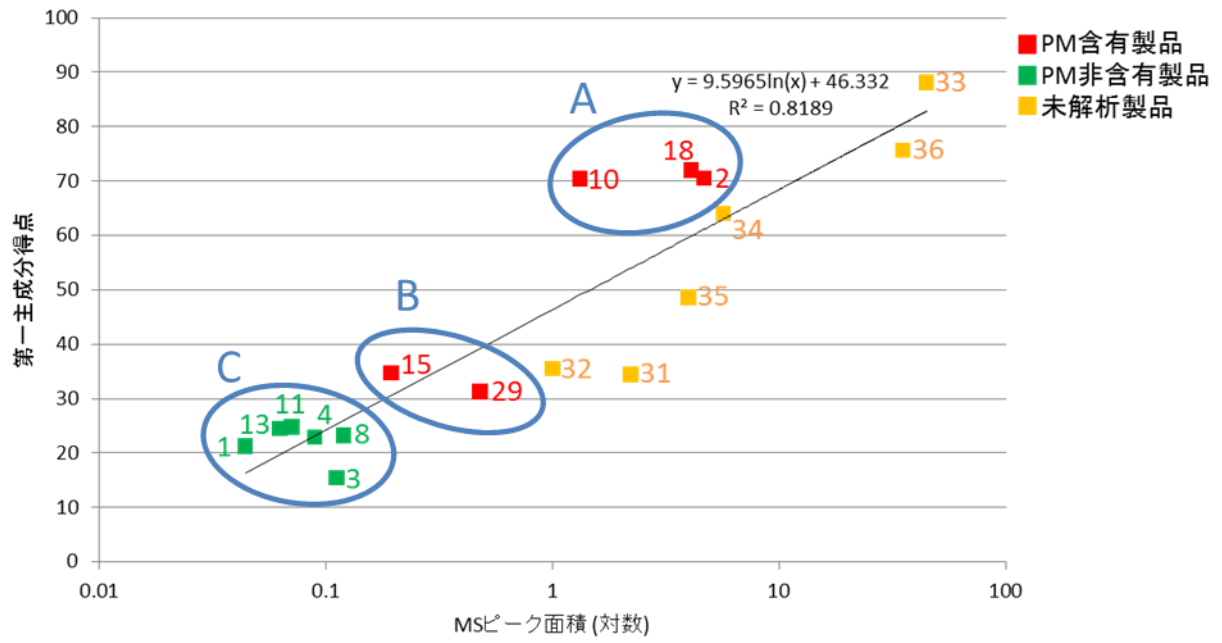


Fig. 11 The correlation between PCA Score (Factor 1) and [Kuwakhurin MS ピーク面積値]