

トウキ成分の多変量解析

平成28年2月18日製薬薬剤師セミナー

奈良県薬事研究センター
抜井 啓二

経緯

漢方推進プロジェクト事業により

H26年7月末

GCMS, LCMS/MS導入

研究課題

ヤマトトウキのブランド化のための
成分調査

→北海トウキ等との成分の比較調査

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

経緯

文献検索

ヤマトトウキと北海トウキのリグステリド等の比較については、かなり以前から研究されており、ヤマトトウキの優位性は認められない。

局方解説書にもトウキに含有される成分がリグステリドを含め十数種記載がある。

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

経緯

十数種の成分すべて測定する。

(これでいいか?)

問題点①

試験方法を設定するのに時間がかかる。

GCMS, LCMS/MSは、魔法の機器ではなく、通常のGC, HPLC同様分離や前処理の検討が必要。標準品がないものはどうするか。(分取, 精製, 確認できる?)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

経緯

十数種の成分すべて測定する。
(これでいいか?)

問題点②

結果が出るのか。

個体差もあるなかで、ヤマトトウキと北海
トウキ等で差が出るのか?



時間がかかる上に望む結果
がでなさそう。×××

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

経緯

視点を変えて

ヤマトトウキと北海トウキの**差**

○におい

○味

○形状

においや味に関わる成分を調べては
どうか。(湯揉みにより糖類, アルキル
ピラジン類が増えるという報告^{1),2)}あり)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

経緯

報告は検体数が少なく, 試験操作が煩雑で
有機溶媒を大量に使うなど, 多量の試料の
試験は難しい方法

試験法の開発と多くの検体数を試験するこ
とによって, ヤマトトウキと北海トウキ等
を分ける基準が作れる可能性がある!

これでよいか? (他の成分はどうなん?)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

機器紹介 (LC/MS/MS)

○ACQUITY UPLC I-Class (フロント部)

○Xevo TQD (MS)

○ACQUITY UPLCフォトダイオードアレイ
(PDA) eλ 検出器 (直列で接続)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

機器紹介 (LCMS/MS)



○タンデム四重極型
仕様では
レセルピン1pgオンカラムでS/N比が
10,000:1(高感度)

一般的に四重極型は、
他の方式に比べ、定量
性がよい。質量分解能は
整数桁→定量に用いる

一方飛行時間型(TOF)
は定量性は劣るが、質量
分解能が小数点以下3
桁→定性に用いる

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

機器紹介 (GCMS)

- GCMS-QP2010 Ultra
- ヘッドスペース用試料注入装置
- 検出器 (FID)、(ECD)、
(FTD、(NPD))

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

機器紹介 (GCMS)



○シングルMS
ONISTライブラリー(24万種の化合物のマススペクトル情報)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

GCMSとLCMS/MS

- LCMS/MSでは、一つ目の四重極では
フラグメントイオンは発生しない。
コリジョンセルでフラグメントイオンを発生
させるが定量のため、物質特異なイオンが
発生できるように電圧を調整できる。
物質ごとに電圧を調整する必要がある。
LCの差で保持時間も変わり、電圧の条件が
異なるため
ライブラリーは存在せず自身で標準品で作成

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

GCMSとLCMS/MS

- GCMSでは最初のイオン化で、分子イオンとフラグメントイオンになる。
電圧は70 eVで使用
(どのメーカーでも)
どのメーカーのGCMSでも同じ分子は同じマススペクトルになる
ライブラリーが充実!

NISTライブラリー (24万種の化合物のマススペクトル情報)

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

GCMSを使えば

- 標準品がなくても
ある程度同定はできる。(カラムで分離できない場合等, 誤同定される可能性あり)
(試験した結果, 有用なデータを得た成分のみ標準品と比較して最終的に同定すればよい)
GCMSで実験しよう!

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

目的

奈良、和歌山両県境で生産されるトウキは、大和当帰(大深当帰)として流通しており、他と比較し、高価で品質がよいといわれている。奈良県では、漢方のメッカ推進プロジェクトにおいて、大和当帰のブランド認証を検討している。

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

目的

トウキの判別や等級分けについては、熟練した技術をもつ職人が生薬の形状や匂い及び味等、五感による判定を行っている。

認証には、科学的な評価指標及び評価基準の設定が求められている。

● Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

目的

そこで今回はGCMSを用いて水溶性成分を測定し、多変量解析を行うことにより植物種間、産地間及び、修治加工の有無の比較に有用な成分を探索した。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

試験検体

大深当帰（6産地、47個体）、北海当帰（2産地、12個体）、修治加工の行われていない大深当帰（1産地、12個体）を個体別に粉碎し試料として用いた。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

試験検体

サンプル番号	植物種	産地	選採みの有無	採取年月日	栽培指導	規格	入手検体数	試験検体数	
YTU2013NS	大深当帰	奈良県宇陀市	有	2013年秋	農研	小	3検体	3検体	
YTH2013HB				2013年秋	福田商店	大	10検体	9検体	
YTH2013HS		富貴地方	無	2013年秋	福田商店	小	10検体	9検体	
YTH2013HBN					2013年秋	福田商店	大	10検体	9検体
YTH2013HSN				2013年秋	福田商店	小	10検体	9検体	
YTH2013MB			奈良県十津川村	有	2013年秋	前忠	大	10検体	9検体
YTT2013MS					2013年秋	前忠	小	10検体	9検体
YTG2013MS			奈良県五條市		2013年秋	前忠	小	10検体	9検体
YTI2013MB			茨城県	有	2013年秋	前忠	大	10検体	9検体
YTI2013MS					2013年秋	前忠	小	10検体	9検体
YTCs2013A			中国・四川省	有	2013年秋	前忠	刻み	1検体	1検体
YTCs2013B					2013年秋	前忠	刻み	1検体	1検体
HTT2013MMN		北海当帰	北海道十勝茅室	無	2013年秋	前忠	中	10検体	9検体
HTM2013MSN			北海道女満別		2013年秋	前忠	小	10検体	9検体

表1 検体リスト

※1 農研：奈良県農業研究開発センター 福田商店：(奈良県桜井市、生薬卸) 前忠(奈良県吉野郡下市町、生薬卸)
 ※2 入手先が、見た目の大きさのみで判定したもの。概ねの重量は、小：30g前後、中：50g前後、大：100g前後、大きいものが等級が高いと判定される。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

試験方法

- 試料は、図1前処理方法により、前処理（TMS誘導体化）を行い、図2試験条件により、GC-MSを用いて測定した。GC-MSから得られたデータについて、試験条件1では、小林ら³⁾の方法を参考にし、ピークアライメントを「metAlign」により、化合物同定を「Alouput 2」により行った。試験条件2では、ピークアライメント及び化合物同定を「GCMSsolution」及び「GC/MS代謝成分データベースVer. 2」により行った。
- 試験条件1で得た、化合物の内標準物質に対するピーク面積比について「SIMCA13」により多変量解析を行った。また試験条件2では、標準物質を用いて定量を行った。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

試験方法

シラネ粉試料(10 20)	GC-MS GCMS-QP2010 Ultra (島津製作所)	
メタノール/クロロホルム溶液 (5:2) 1mL 内部標準溶液 (0.4 mg/mL, リトール-6-ホド酸) 60 μL かく拌 (37°C, 30分) 遠心分離 (12000rpm, 3分, 4°C)	試験条件 1 カラム: CP-SIL 8 CB low bleed (30m × 0.25mm, I.D. φ=0.25 mm) インジェクション温度: 230°C カラム温度: 80°C (2min) → 115°C (min) → 230°C (6min) インジェクションモード: Split スプリット比: 25:1 キャリアーガス: He カラム流量: 1.12 mL/min パージ流量: 6 mL/min インジェクション量: 1 μL イオン源: 200°C インターフェース温度: 280°C イオン化電圧: 70 eV 検出器電圧: Auto (約 1.0 kV) スキャンレンジ: m/z 45-500	試験条件 2 カラム: DB-5 (30m × 0.25mm, I.D. φ=0.25 mm) インジェクション温度: 280°C カラム温度: 100°C (4min) → 110°C (min) → 220°C (11min) インジェクションモード: Split スプリット比: 10:1 キャリアーガス: He カラム流量: 39.0 mL/min (流速一定) パージ流量: 6 mL/min インジェクション量: 1 μL イオン源: 200°C インターフェース温度: 280°C イオン化電圧: 70 eV 検出器電圧: Auto (約 1.0 kV) スキャンレンジ: m/z 45-500
抽出液 (上澄み液) 800 μL 一水 400 μL 遠心分離 (12000rpm, 3分, 4°C) 比重 400 = 1 遠心減圧濃縮 凍結真空乾燥	抽出液 (上澄み液) 800 μL 一水 400 μL 遠心分離 (12000rpm, 3分, 4°C) 比重 400 = 1 遠心減圧濃縮 凍結真空乾燥	
試料 10 mg/mL, メトキシミンピリジジ溶液 50 μL かく拌 (37°C, 30分) MS TFA 100 μL かく拌 (37°C, 30分) 標準化試料	抽出液 (上澄み液) 800 μL 一水 400 μL 遠心分離 (12000rpm, 3分, 4°C) 比重 400 = 1 遠心減圧濃縮 凍結真空乾燥	

図1 前処理方法

図2 試験条件

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

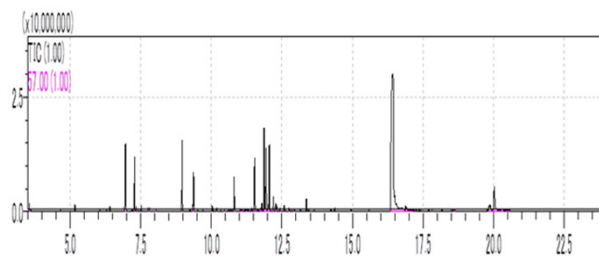
分析結果

試験条件1では、糖類、アミノ酸類及び有機酸類等について、141成分、試験条件2では、227成分のデータを得た※1。

※1 試験条件1、試験条件2とも、ライブラリー (MSスペクトルと保持指標) との比較による成分の同定であり、標準物質との比較による同定は行っていない。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

分析結果



トータルイオンクロマトグラム (試験条件1)

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

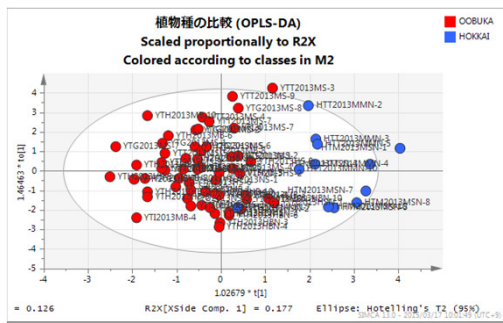
多変量解析

試料のグループ分けを行い、それぞれの成分のピーク面積比についてOPLS-DA法により解析し、S-Plotで寄与成分を選抜した。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

①植物種の比較

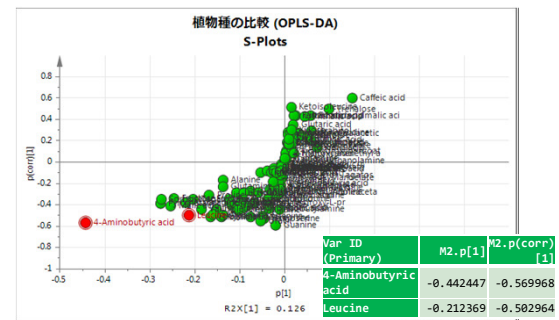
大深当帰59個体及び北海当帰12個体



Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

①植物種の比較

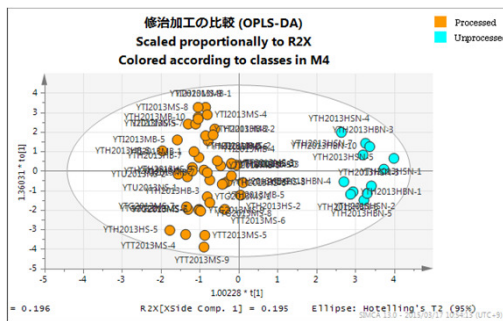
大深当帰59個体及び北海当帰12個体



Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

修治加工の比較

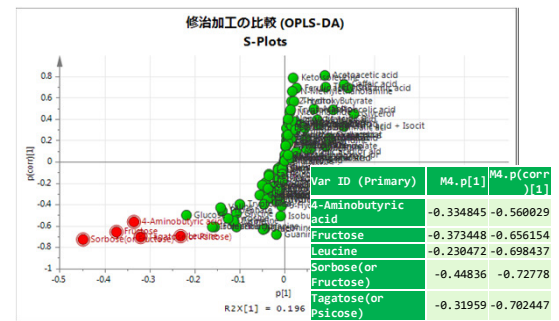
修治加工あり(国産大深当帰)45個体及び修治加工なし(国産大深当帰)12個体



Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

修治加工の比較

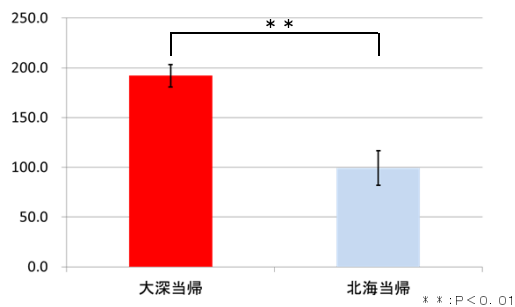
修治加工あり(国産大深当帰)45個体及び修治加工なし(国産大深当帰)12個体



Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

4-AminoButyric acid (GABA) の定量

大深当帰と北海当帰



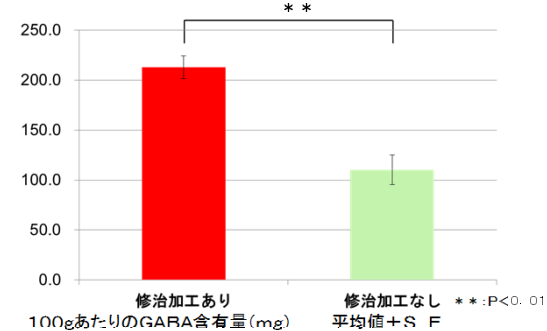
平均値±S. E

** : P < 0.01

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

4-AminoButyric acid (GABA) の定量

修治加工ありと修治加工なし



平均値±S. E

** : P < 0.01

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

考察

OPLS-DA法により解析した結果、①植物種の比較、②修治加工の比較において、各グループの判別が可能であった。

①植物種の比較で大深当帰と判別される寄与成分及び②修治加工の比較で修治加工ありと判別されるのに寄与する成分として、4-AminoButyric acid (GABA) および Leucineが選抜された。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

考察

北海当帰と大深当帰及び、修治加工の有無を判別する成分として同じ物質が選抜された。

北海当帰と大深当帰は、修治加工の方法が異なることから、植物種による差ではなく修治加工の差による可能性がある。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

現在の研究内容

「トウキ」に含有されている特徴的な成分はリグスチリド等の揮発性物質である。

揮発性成分については、植物により大きく異なるため一般化された測定方法がなく、データベースがない。

さらなる指標成分の探索のため、測定法を構築しデータベースを作成し、試験を行った。(3月の薬学会で発表予定)

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

今後の研究内容

- 評価指標及び評価基準の設定について
 - 多変量解析で選抜された成分の定量法の確立及び定量
 - さらに、検体数を追加し定量
- その他
 - 修治加工の各段階のアミノ酸、糖類等の含有量の変化の調査

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

引用文献

1. 浅尾浩史・小村啓. 2012. 調製過程の違いがヤマトトウキの機能性と品質に及ぼす影響. 奈良県農総セ研報, 43:65-67
2. 小村啓・浅尾浩史. 2011. 当帰の等級指標となりうる揮発性成分の探索. 奈良県農総セ研報, 42:28-30
3. 小林志寿・馬場健史・福岡英一郎・山本豊・姜東孝. 2011. 当帰のGC/MSプロファイリングによる種と産地の判別マーカー探索. 日本生薬学会第58年会要旨集, 356

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center

謝辞

多種類のトウキの入手にご協力いただいた
福田商店 福田浩三氏、株式会社前忠 前
忠吾氏に深く感謝します。

Nara Prefectural Pharmaceutical Research Center