

# イメージング質量分析による生薬の新規品質評価技術の開発

申請代表者 平 修 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 助教  
 (現 福井県立大学生物資源学部 准教授)

所外共同研究者 谷保 朋子 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 研究補助員

所内共同研究者 朱 妹 資源開発部門生薬資源科学分野 助教

## 【報告セミナー要旨】

本研究は、生薬とその基原植物について、薬効成分の組織内分布を視覚的に解明する技術を応用し、複合成分からなる生薬の品質評価法に基盤技術を提供することを目的とする。

イメージング質量分析 (MS) (図 1) は、二次元的に MS を行うことにより種々の化合物の分布状態を明らかにできる。これまで生薬の品質保証は高価で時間を要していたが、イメージング MS は、その分析技術の特性から少量のサンプルで多成分の解析が可能であり、例えば、有効成分群リッチな部位を視覚的に選択することができる。また、生薬では通常、加工時に不必要な部分が削除される (修治) が、この加工法が適しているかは不明であった。イメージング MS を行い、修治の際に削除される部位の成分分布像を取得することで、現加工法に科学的根拠を与え、かつ、最適な生薬加工法が提案できる。

結果として、三七人參に含有されるギンセノシド類や、大黃含有のジアントロン類 (センノシド)、アントラキノン類 (エモジンなど) の局在を明らかにできた。液体クロマトグラフィーによる定量実験とも相関が得られている。詳細は報告会で述べさせて頂く。

今後、本研究をさらに進めることで、視覚的に生薬のグルーピング (基原植物、産地、収穫年など) が可能になれば、迅速な生薬の品質保証技術となる。また、最適な使用部位の選択並びに加工方法の提案に繋がる。生薬のブランド化を推し進める原動力としたい。

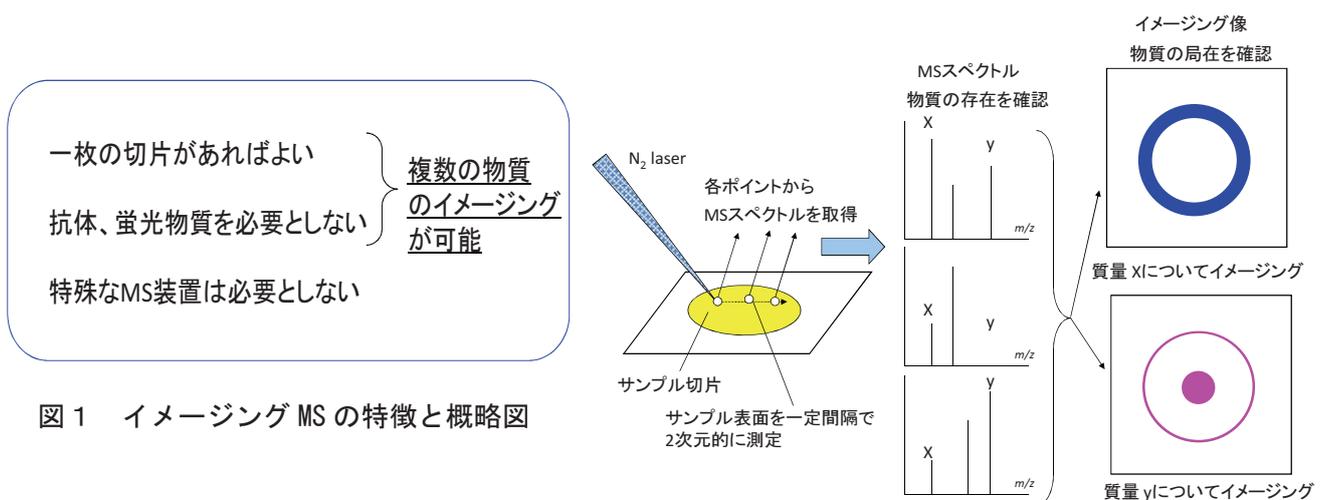


図 1 イメージング MS の特徴と概略図

(謝辞)

本研究を助成して下さった富山大学・和漢医薬学総合研究所と、研究のご助言をくださった同研究所・教授、小松かつ子先生に深く感謝いたします。

## ■背景・目的

二次元的に質量分析（MS）を行うことにより種々の化合物の分布状態を明らかにできるイメージング質量分析（図1）を用いて、多成分からなる漢方処方原料生薬の、成分分布を視覚的に明らかにし、新規品質評価技術を開発する。

近年、漢方医学は西洋医学を相補する医学として承認され、漢方処方には感冒から難治性疾患に至るまで様々な疾病に応用されるようになった。漢方処方には複数の生薬が配合されており、主要なものに大黄（*Rheum palmatum*等の根茎）、薬用人参（*Panax ginseng*の根）、甘草などがある。生薬は天然物由来であるため、生薬の品質が漢方薬の薬効を左右することになる。その為、漢方薬の品質保証には、広範囲な成分の複合体の網羅的解析と、それらと薬効との関係を把握する手法の開発が求められている。従来、多成分の化合物の分析にはLC（液体クロマトグラフィ）/MSなどが用いられてきたが、サンプル量、前処理方法や感度の面で問題がある。また、生薬の供給量の不足から市場には低品質のものや偽品も出回っており、生薬の簡便、迅速な品質評価技術の開発が急務である。

申請者らは、多成分からなる試料を感度良く分析できる質量分析を応用した新技術であるイメージングMS法（図1）により種々の生薬の成分分布状態を明らかにできることを見出した[1, 2]。本手法は、免疫染色と異なり、抗体、蛍光物質を用いることなく標的成分群を可視化することができる。一枚の切片（数十マイクロン）から複数成分の局在を明らかにすることも他の可視化技術と一線を画す。

本研究では、人参類生薬の三七人参について、主成分であるギンセノシド類、また、瀉下薬とされる大黄を対象に、その主要成分であるジアントロン類（センノシド）、アントラキノン類（エモジンなど）等の可視化を行う。視覚的に生薬のグルーピング（基原植物、産地、収穫年など）が可能になれば、迅速な生薬の品質保証技術となる。また、最適な使用部位の選択並びに加工方法の提案に繋がる。

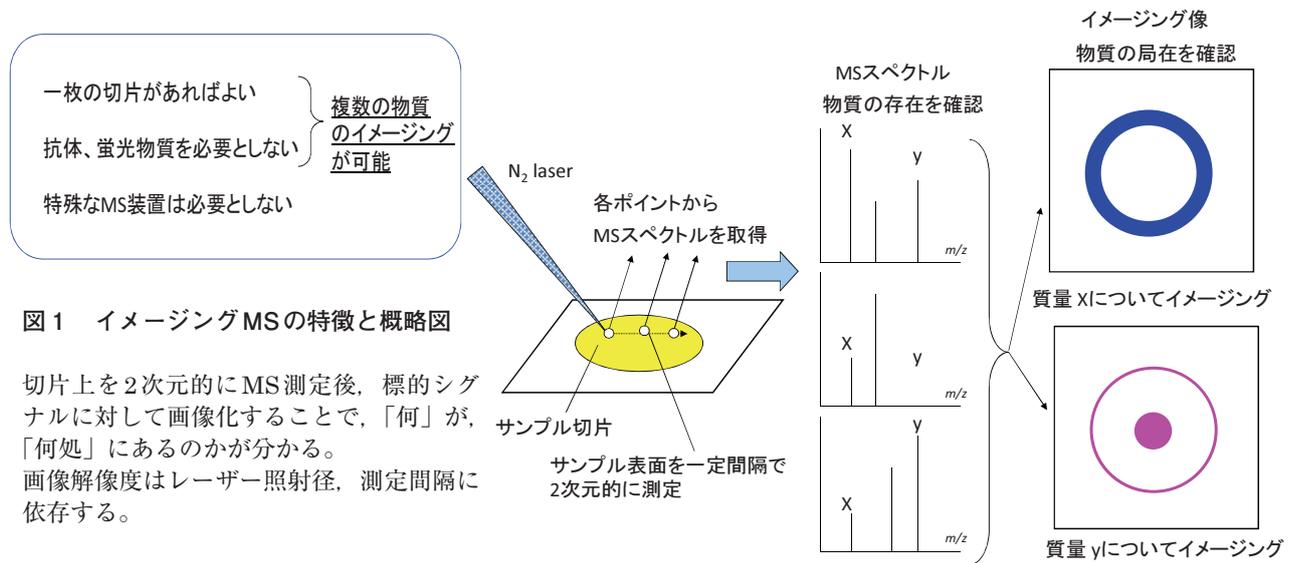


図1 イメージングMSの特徴と概略図

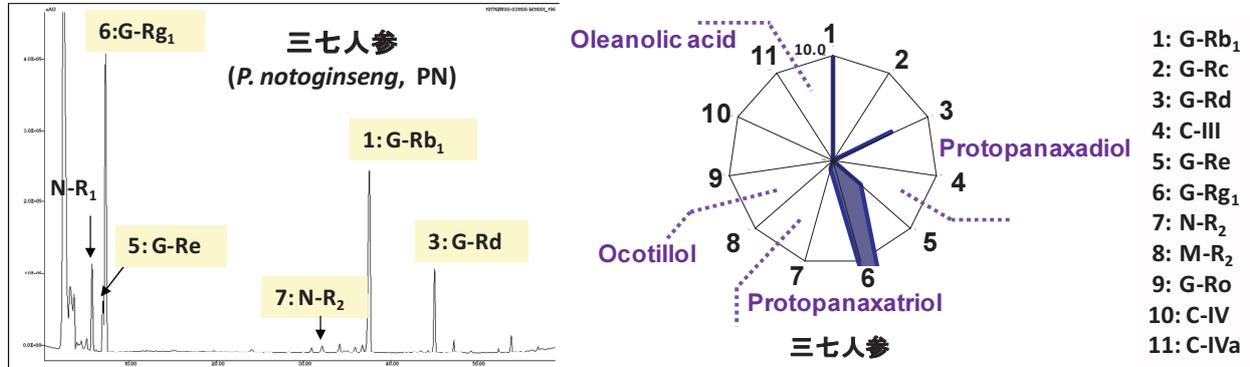
切片上を2次元的にMS測定後、標的シグナルに対して画像化することで、「何」が、「何処」にあるのかが分かる。画像解像度はレーザー照射径、測定間隔に依存する。

## ■結果・考察

### 1 三七人参（二年根）の解析

これまでに人参類生薬について異なる母核を持つ11サポニン成分を定量分析し、*Panax*属各種

に由来する人参類生薬の成分パターンを比較した。Fig. 2に示したように、三七人参は五員環性のOleanolic acid系サポニンがほとんど含まれず、Dammarane系サポニンのginsenoside Rb<sub>1</sub> (G-Rb<sub>1</sub>), G-Rd, G-Rg<sub>1</sub>などが高含量である特徴的な成分パターンを有していることを明らかにした[3]。今回三七人参の2年根を用い、イメージング質量分析 (MS) による主要なサポニン成分の分布を解析した。



G: ginsenoside; C: chikusetsusaponin; N: notoginsenoside; M: majonoside

図2 三七人参のHPLCクロマトグラム(左)と11成分のレーダーチャート(右)

・イメージング質量分析 (MS) による局在解析

三七人参の主根と茎を対象として、イメージングMSを行った。凍結マイクロームで、厚さ50 μmの切片を作製し、イオン化支援剤として飽和α-シアノヒドロキシケイ酸(CHCA)(50%アセトニトリル:50%水)をエアブラシで8ml塗布した。初めの1mlは、切片から25cm距離をとりスプレーし、残りの7mlは切片から20cm距離を取り、切片が濡れすぎないように慎重に塗布した。その後、MALDI-MS装置にて、レーザー照射間隔100 μmで切片上をMS測定し、ギンセノシド類に対応する質量でイメージングを行った。図3Aに切片上のMSスペクトルを示す。N-R<sub>2</sub> ( $m/z$  755 [M+Na]<sup>+</sup>), N-R<sub>1</sub> ( $m/z$  793 [M+Na]<sup>+</sup>), G-Rg<sub>1</sub> ( $m/z$  823 [M+Na]<sup>+</sup>), G-Re ( $m/z$  823 [M+Na]<sup>+</sup>), G-Rd ( $m/z$  985 [M+K]<sup>+</sup>)と、G-Rb<sub>1</sub> ( $m/z$  1147 [M+K]<sup>+</sup>), G-Rg<sub>1</sub> ( $m/z$  823 [M+Na]<sup>+</sup>)に対応するシグナルを検出している。

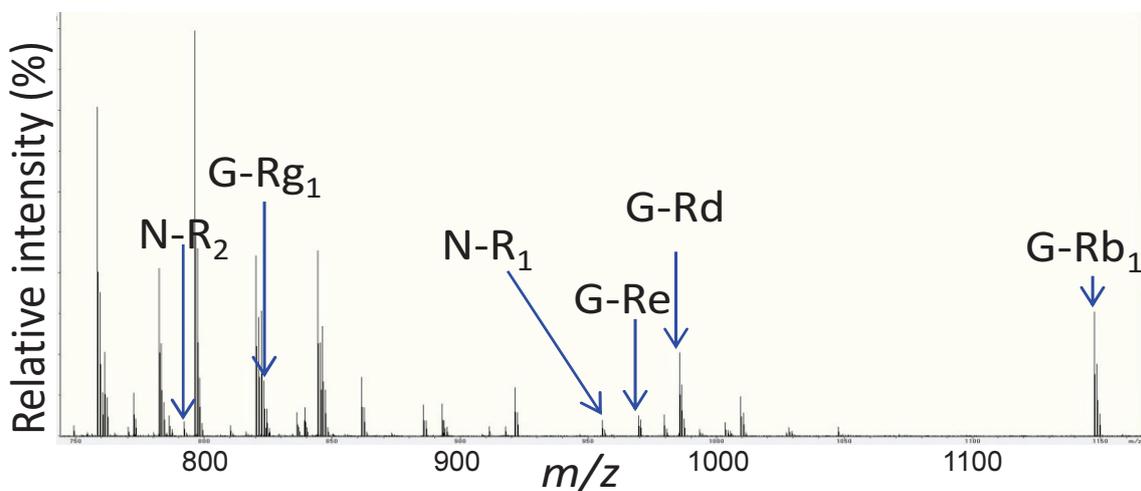
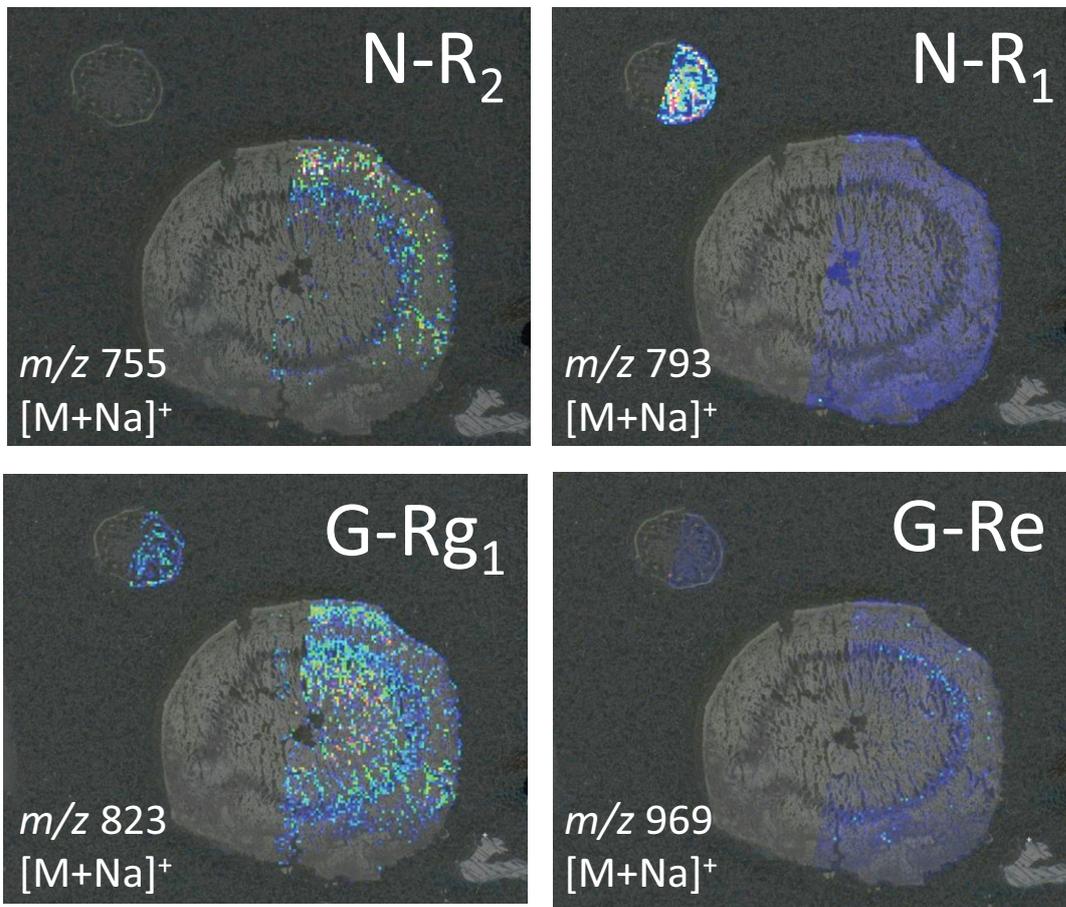


図3 A 三七人参切片上のMSスペクトル

これらについてイメージングした結果を図3Bに示す。

### Protopanaxatriol



### Protopanaxadiol

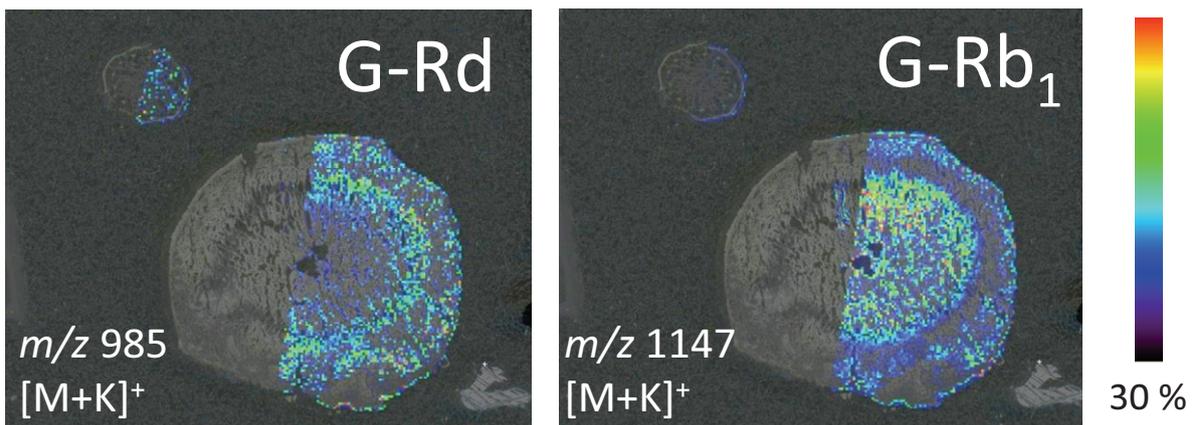


図3B 三七人參の主根（中下）および茎部（左上）のイメージング質量分析像と切片光学像との重ね合わせ像

N-R<sub>2</sub>について、根の周皮、師部付近に多く局在し、茎部には存在していない。N-R<sub>1</sub>について、主根部には、全体的に存在しているが、茎部からは根に比べ、強いシグナルが検出され、茎部に多く局在していることが明らかになった。G-Rg<sub>1</sub>について、根部、茎部共に、全体的に分布していることが見られた。G-Reについては、シグナル強度は低いものの、形成層の辺りに比較的多く局在している。

イメージングMSに定量性はないが、HPLCの結果からも、G-Rg1に比べ、G-Reは含量が少ないこととイメージ解析は一致している。Protopanaxadiol型のG-Rd及びG-Rb<sub>1</sub>については、根において、前者が周皮、師部及び形成層に比較的多く局在しており、後者が周皮及び木部に比較的多く局在している。一方、茎部では、G-Rdは全体的に分布しているが、G-Rb<sub>1</sub>は表皮に存在している程度であった。

また、結果を見ると、protopanaxatriol型4成分(N-R<sub>2</sub>, N-R<sub>1</sub>, G-Rg<sub>1</sub>, G-Re)はNa付加体、protipanaxadiol型2成分(G-Rd, G-Rb<sub>1</sub>)はK付加体として検出されている。このようなイオン化の際のギンセノシドの構造特異的な付加体形成についてはこれまで議論がない。ギンセノシド検出の際の新しい知見となる結果である。

## 2. 大黃の解析

### ・HPLCによる定量

大黃について、山梨県富士吉田市昭和大学薬用植物園より入手した*Rheum palmatum*の根茎をHPLCで各成分の定量測定を行った。HPLCの測定条件は既報[5]に従った。図4に根茎のHPLCクロマトグラムを示す。各成分の含量をTable 1に示す。

Table 1 根茎中各成分の含量

	含量(mg/g)
Sennoside A+B	2.37
Aloe-emodin+Emodin	5.35
Catechin	15.34
Epicatechin gallate	1.10

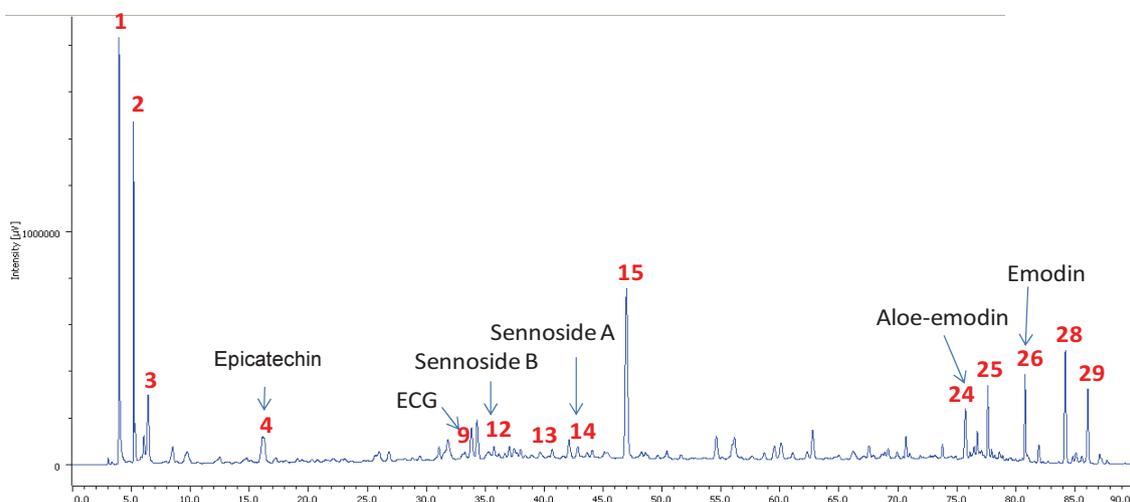


図4 大黃のHPLCクロマトグラム

Peak 1: 1-O-Galloyl-β-D-glucose, 2: 6-O-Galloyl-β-D-glucose, 3: gallic acid, 4: epicatechin, 9: epicatechin gallate, 12: sennoside B, 13: resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside, 14: sennoside A, 15: unknown, 24: aloe-emodin, 25: rhein, 26: emodin, 28: chrysophanol, 29: physcion.

### ・イメージング質量分析 (MS) による局在解析

人參と同様の処理で大黃の根茎の切片を作製した。センノシド類は、CHCAを、低分子であるエモジン、カテキン類はナノ微粒子[4]をイオン化支援剤として切片表面に塗布した。センノシドにつ

いては、negativeモード、その他については、positiveモードで測定を行った。図5に、大黄切片上のMSスペクトル（negativeモード）を示す。切片表面から、センノシドA、Bに対応する質量（ $m/z$  861）について、シグナルが検出された。

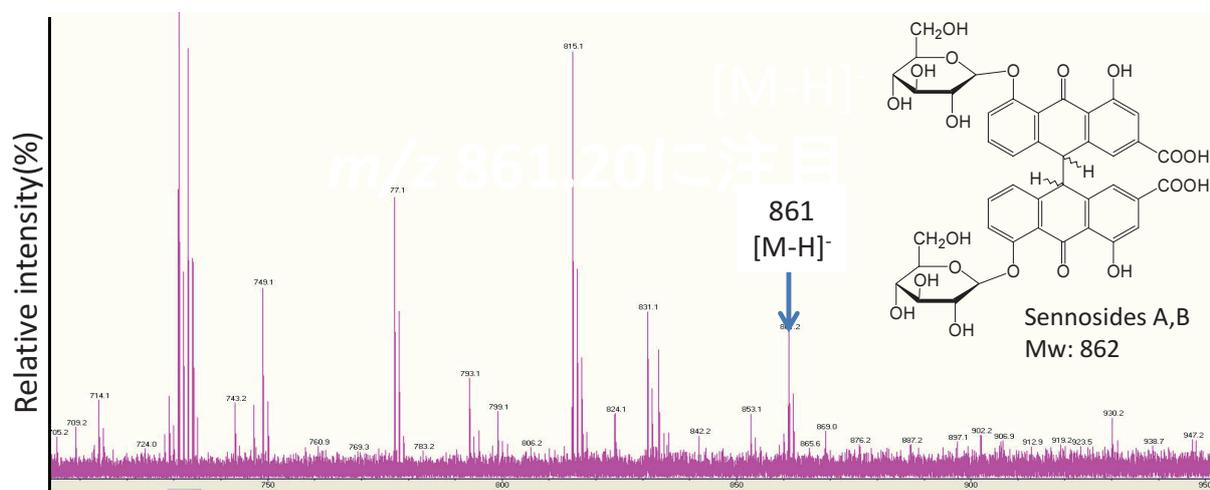


図5 大黄根茎切片上のMSスペクトル

図6に根茎の横切片におけるセンノシドA、BのイメージングMSの解析結果を示す。センノシドA、Bは、木部および髄部に多く局在していること、特に、異常維管束周辺に多いことが分かった。

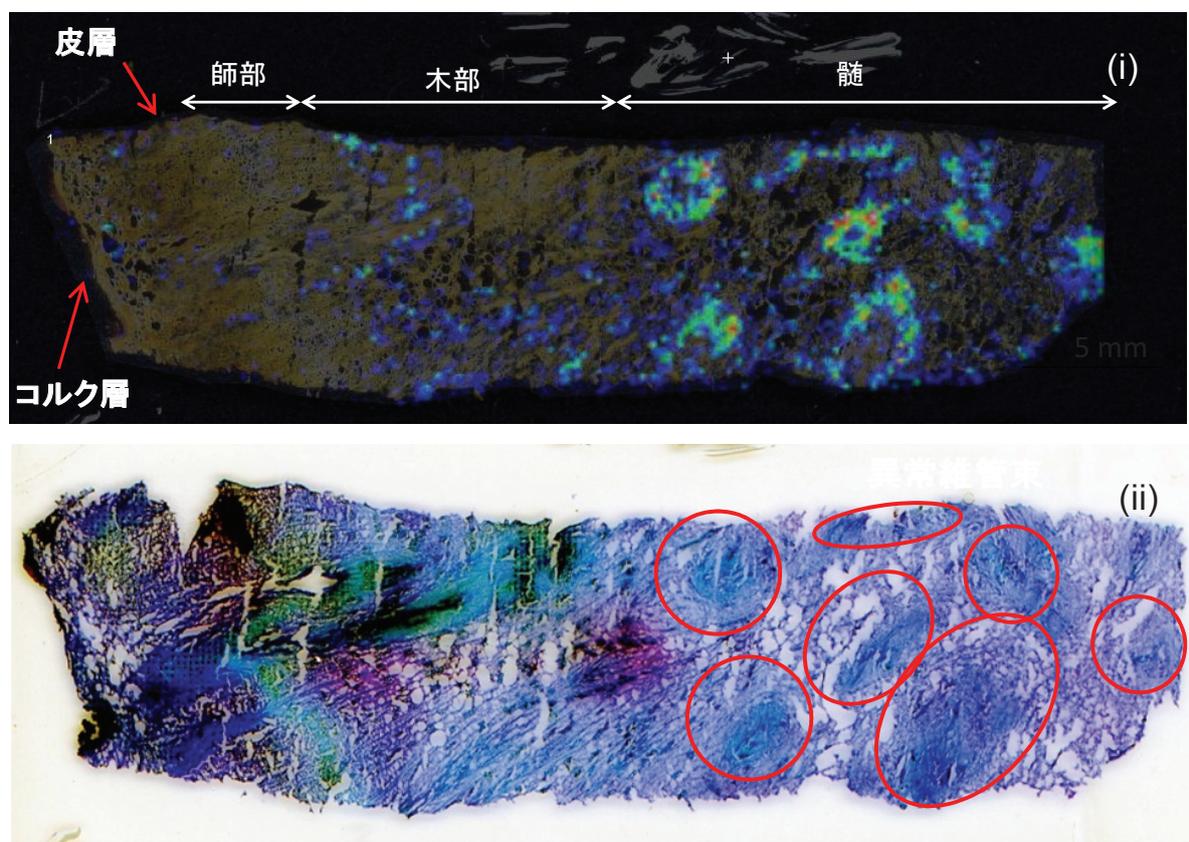


図6  $m/z$  861 のイメージングMS と切片光学像との重ね合わせ像 (i) と、切片のトルイジンブルー染色像 (ii) : ○は、異常維管束部位を示す。

図7に、大黄根茎部の Emodin（または Aloe emodin）、Epicatechin、Epicatechingallate のイメージング MS 像を示す。Emodin は、木部に多く見られ、カテキン類は、全体的に存在していることが分かった。カテキン類のような抗菌作用を示す 2 次代謝物は、その役割として外敵（菌）から身を守るために存在しているといわれている。大黄の場合も同様であることが視覚的に示されている。

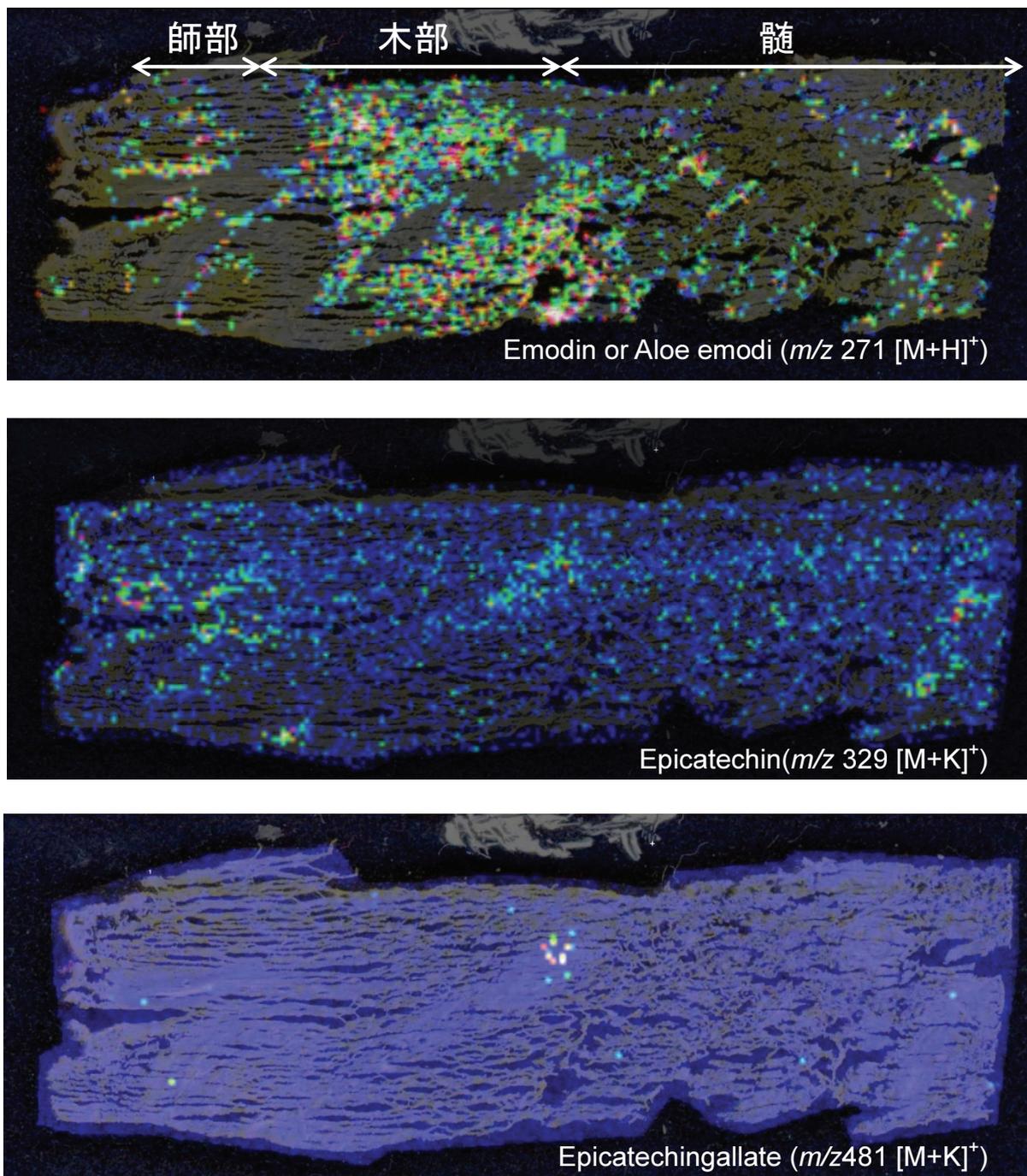


図7 大黄根茎部のイメージング MS と光学像との重ね合わせ像

イメージング MS に定量性はないが、HPLC (Table 1) との結果は互いを支持するものである。元々、青海省や甘粛省に産する「錦紋大黄」は、髓部のみを残すように修治されていることが知られている。今回の結果は、センノシドが異常維管束周辺に局在していることを視覚的に示したことで、

これまで実施されてきた大黃の経験的加工法について、科学的に理解しやすい情報を提供することができた。加えて、その他の成分の局在も示したことで、将来的に、薬効と、成分バランスの関係が明らかにする手がかりとなり得る。

## ■結論

今回、生薬の三七人參及び大黃について、イメージングMSを行った。結論として、各生薬に含まれている成分群局在を一度の測定で、抗体、蛍光物質を使用せずに表すことができた。本法は、既知物質だけでなく、得られたシグナル全ての局在を解析できるため、新たな成分の発見、局在の決定なども見込まれる。今後、本研究をさらに進めることで、視覚的に生薬のグルーピング（基原植物、産地、収穫年など）が可能になれば、迅速な生薬の品質保証技術となる。また、最適な使用部位の選択並びに加工方法の提案に繋がる。生薬のブランド化を推し進める原動力としたい。

## ■参考文献

1. Taira, S., Zhu, S., et al., Mass Spectrometry Imaging of the Capsaicin Localization in the Capsicum Fruits. *Int. J. Biotech. Wellness Industries*, 2012, **1**: 61-65.
2. Taira, S., et al., Mass Spectrometric Imaging of Ginsenosides localization in *Panax ginseng* Root. *Am. J. Chin. Med.*, 2010, **38**: 485-93.
3. Zhu S., Zou K., Fushimi H., Cai S. Q., Komatsu K. Comparative Study on Triterpene Saponins of Ginseng Drugs. *Planta Med.*, 2004, **70**: 666-677.
4. Taira S., Sugiura Y., Moritake S., et al. Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Anal Chem.*, 2008, **80**: 4761-4766
5. Komatsu K., Nagayama Y., Tanaka K., Ling Y., Cai S. Q., Meselhy M. R. Comparative Study on Chemical Constituents of Rhubarb from Different Origin. *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, **54**: 1491-1499.