

## 植物二次代謝物理論マスペクトルライブラリの構築

申請代表者 田中 謙 (立命館大学薬学部・教授)

所外共同研究者 有田正規 (国立遺伝学研究所生命ネットワーク研究室・教授)

所内共同研究者

### ■背景・目的

化合物を同定するには、標準物質と対照して検出されるスペクトルの一致を確認せねばならない。そのため、重要な天然物に対してライブラリを作成することが極めて重要である。本研究の目的は、天然物のフラグメンテーションの基本を明らかにし、天然物の理論スペクトルライブラリを作成することである。具体的には、種々の生薬エキス及び方剤エキスのLC-MS及びMS/MS測定を行い、かずさDNA研究所のFlavonoidSearchに収録されているフラボノイド類のマスペクトルデータやMassBankに収録されているサポニン類のマスペクトルデータをもとに、生薬・方剤エキスに含まれるフラボノイド類及びサポニン類を網羅的に帰属する。その後、フラグメンテーションの詳細を統計処理し、見出された開裂パターンに基づいた理論スペクトルを構築する。

### ■結果・考察

富山大学和漢医薬学研究所から供与された生薬エキス120試料のLC-MS分析を行った。

分析条件は、以下のとおり。

装置：Shimadzu LC-IT-TOF mass spectrometer

ESI parameters: source voltage, +4.5 kV (positive ion mode) or -3.5kV (negative ion mode);

capillary temperature, 200 °C; nebulizer gas flow rate, 1.5 l/min.

カラム：Waters Atlantis T3 column (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

カラム温度：40°C.

移動相：(A) 5 mM (NH<sub>4</sub>)OAc solution and (B) CH<sub>3</sub>CN

Gradient conditions: 0-30 min, linear gradient from 10% to 100% B, 30-40 min, isocratic at 100% B.

Flow rate: 0.2 ml/min.

分析した120試料について、2010年にLC-MS分析を行った結果と比較したところ、成分プロファイルに大きく変化のない試料がある一方、ピークがほとんど検出されない試料が確認された(図1、2)。ピークが検出されなかった試料は、不溶物が多く粘性が高い傾向が認められたため、遠心・ろ過処理を繰り返し、試料を希釈して再度分析した。その結果、成分プロファイルを改善させることが可能となったが以前の成分プロファイルと違いが認められた。(図2)。さらに、精油含量が高いことが知られている生薬エキスについては、2010年に分析した試料と比較して低極性化合物の含有量が低いことが明らかとなった(図3)。

現在、これらのLC-MS及びLC-MS/MSデータから検出されたピークの帰属とデータベース化作業を進めている。

さらに、別途単離したサポニン成分19種(desapioplatycodin D, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb2, astragaloside I, hupehenine, saikosaponin b2, liriopesides B, hosenkoside L, deapi-platycodin D3, zingibroside R1, ophiopogonin D, ginsenoside Re, glycyrrhizin acid, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rd, ginsenoside Rh1, pachymic acid, ilexosaponin b1, ilexosaponin b2)についてLC-MSデータ及びLC-MS/MSデータを測定し、データベース化する作業を進めている(図4)。

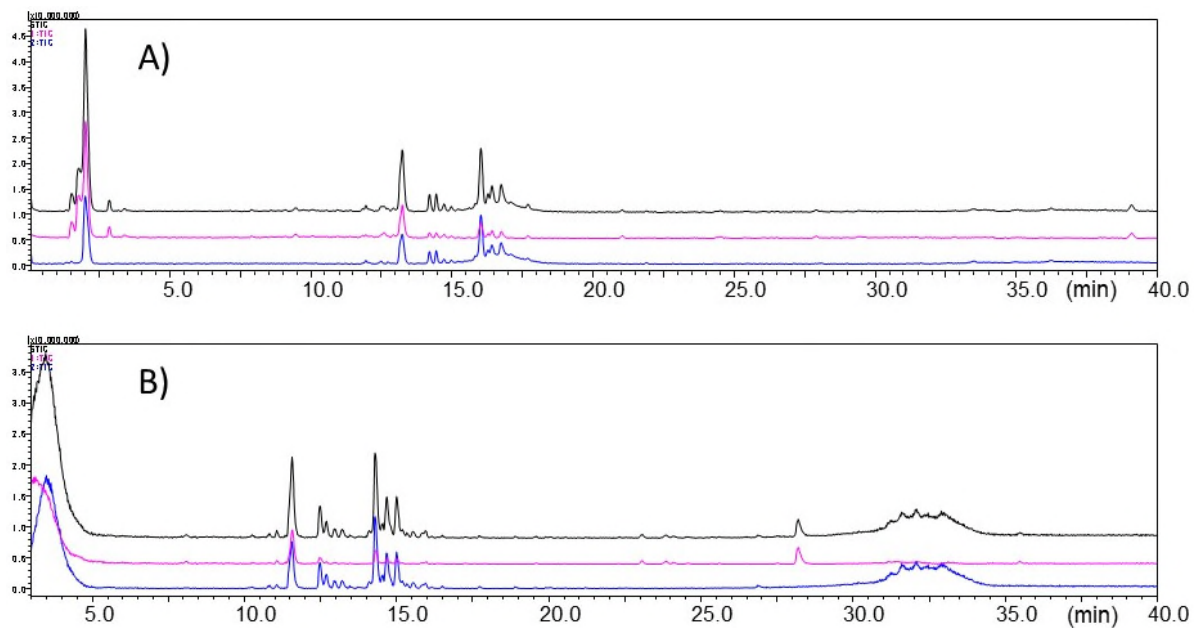


図1 ニンジン抽出エキスのLC-MS トータルイオンクロマトグラム  
A) 2010年分析データ B) 今回の試料の分析結果

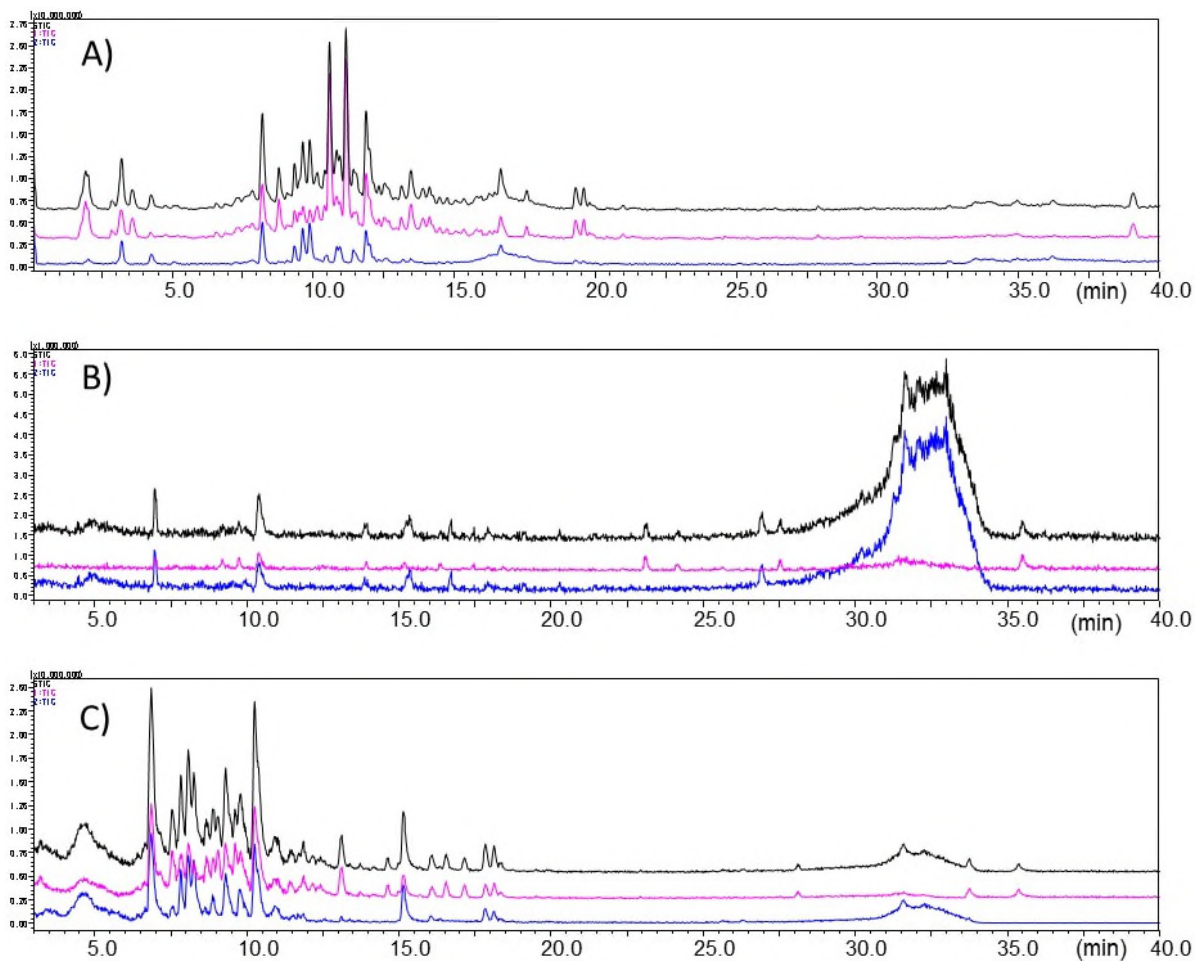


図2 インチンコウ抽出エキスのLC-MS トータルイオンクロマトグラム  
A) 2010年分析データ B) 今回の試料の分析結果 C) 今回の試料を遠心・ろ過処理した試料の分析結果

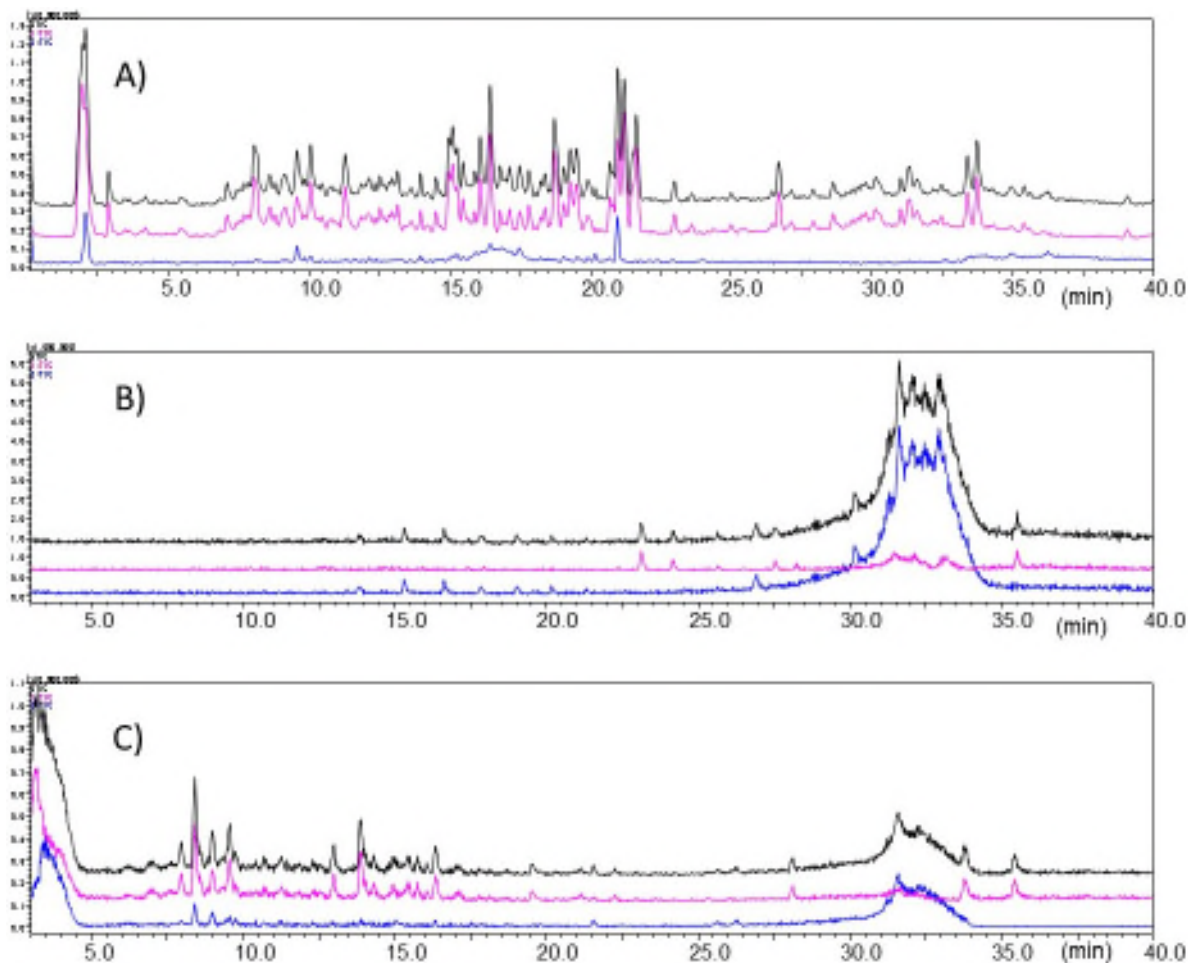


図3 カンキョウの抽出エキスのLC-MS トータルイオンクロマトグラム

A) 2010年分析データ B) 今回の試料の分析結果 C) 今回の試料を遠心・ろ過処理した試料の分析結果

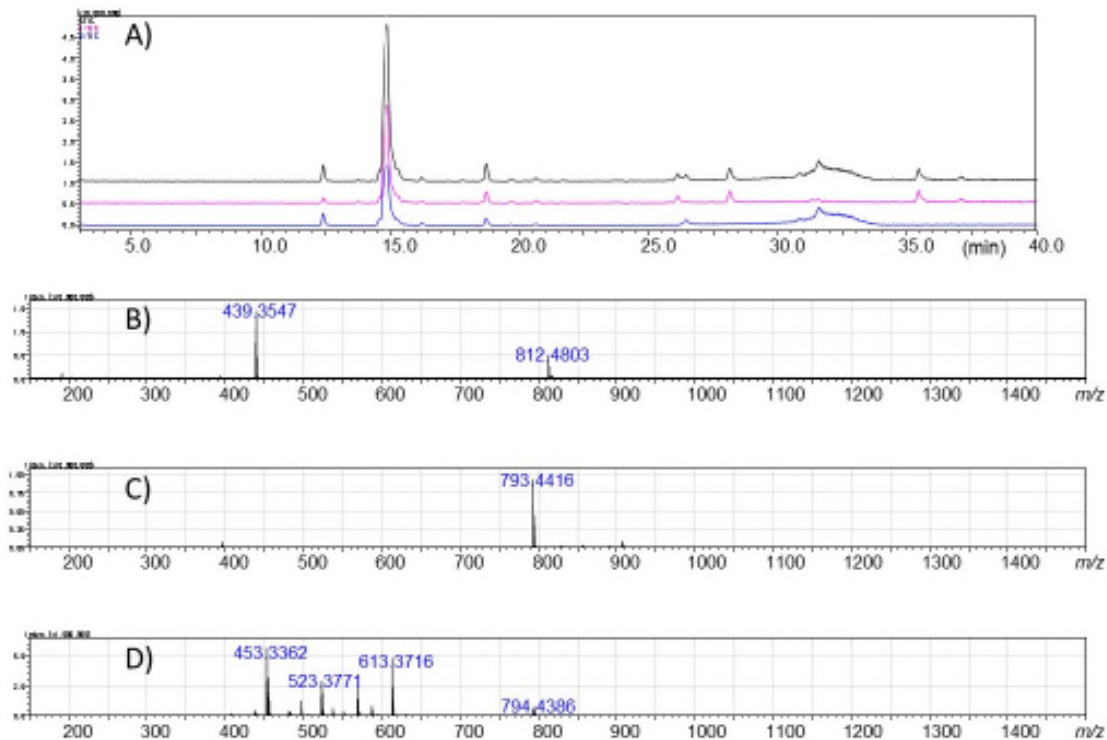


図4 zingibroside R1 のマススペクトルデータ

A) LC-MS トータルイオンクロマトグラム B) ポジティブイオンMS スペクトル  
 C) ネガティブイオンMS スペクトル D) ネガティブイオンMS<sup>2</sup> スペクトル( $m/z$  793.43→)

## ■結論

天然物のフラグメンテーションの基本を明らかにし、天然物の理論スペクトルライブラリを作成することを目的として、生薬エキス 120 試料及び別途単離したサポニン成分 19 種 (desapioplatycodin D, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb2, astragaloside I, hupehenine, saikosaponin b2, liriopesides B, hosenkoside L, deapi-platycodin D3, zingibroside R1, ophiopogonin D, ginsenoside Re, glycyrrhizin acid, ginsenoside Rg1, ginsenoside Rd, ginsenoside Rh1, pachymic acid, ilexosaponin b1, ilexosaponin b2) について LC-MS 及び LC-MS/MS データを収集した。現在、検出されたピークの帰属とデータベース化作業を進めている。

今回分析した生薬エキス 120 試料のデータを 2010 年に LC-MS 分析を行った結果と比較したところ、成分プロファイルに大きく変化のない試料がある一方、ピークがほとんど検出されない試料が確認された。ピークが検出されなかった試料は、不溶物が多く粘性が高い傾向が認められたため、遠心・ろ過処理を繰り返し、試料を希釈して再度分析した。その結果、成分プロファイルを改善させることが可能となったが以前の成分プロファイルと違いが認められた。さらに、精油含量が高いことが知られている生薬エキスについては、2010 年に分析した試料と比較して低極性化合物の含有量が著しく低いことが明らかとなった。

これらの結果から、生薬エキス 120 試料中にはロット間で含有成分量のばらつきが大きいものが存在することが明らかとなり、薬理試験結果の評価には注意が必要であることが示唆された。