

短 報

## 市場価格が異なる当帰生薬を配合した当帰芍薬散の GC/TOF-MS によるメタボロミクス解析

加藤 彰\*・二宮由佳\*・平 浩一郎

### Metabolomics Analysis on Tokishakuyakusan Formulations Containing Different Commercial-quality Grade of *Angelica Radix* by GC/TOF-MS

Akira KATOH\*, Yuka NINOMIYA\*, and Koichiro TAIRA

**Key Words:** metabolome, metabolic profiling, toki, *Angelica*, tokishakuyakusan, Kampo, GC/MS, GC-TOF/MS

当帰は、漢方医療において瘀血・水滞の症状に適応される生薬である。日本薬局方には、大和当帰 (*Angelica acutiloba* Kitagawa) と北海当帰 (*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino) が記載されている。日本国内の市場では、北海当帰より大和当帰に高価格が付けられる傾向がある。また、大和当帰は当帰商品を取り扱う専門業者によって、形状、色、味および匂いなどの項目に対する審査を施され、ほぼ 3 段階の価格が付けられる。大和当帰の中でも、奈良県産のものは、最高価格を付けられることが多い。

最高価格を付けられた大和当帰に対して、漢方医療の従事者は、臨床経験と伝統的な知見から良い評価を与えている。これをオミクス解析の視点から検証するために、Tianniamら<sup>3-5)</sup>、Tarachiwinら<sup>2)</sup>および小村<sup>1)</sup>は、当帰試料に対するメタボロミクス解析を行った。その結果、含有成分について、最高価格が他の価格のものと同様に識別できることが示された。

一方、漢方医療において、当帰は単独で用いられることはなく、必ず当帰芍薬散のような配合薬として使用される。そのために、当帰の価格による違いが配合薬中でも認められるかどうかを確かめる必要がある。

メタボロミクス解析に用いられる手法として、メタボリック・プロファイリングがある。メタボリック・プロファイリングは、生体由来試料の代謝産物を対象としてハイスループットな出力を得ることができる化学分析を行い、出力データの中に潜在する試料の特徴を見つけ出す分析方法である。

本研究はメタボリック・プロファイリングにより、当帰の価格による違いを、配合薬成分の分析データから抽出することを目的とした。そのために、市場

価格等級の異なる大和当帰を配合した当帰芍薬散を調製し、その熱水抽出物に対してメトキシ化とシリル化を行い、ガスクロマトグラフ/時間飛行型質量分析器 (GC/TOF-MS) による分析を行い、得られたデータから、当帰価格の違いを特徴付ける成分を主成分分析で抽出した。データ抽出された成分の中から、特に価格識別に寄与が高いピーク成分を同定し、提示した。

### 材料および方法

#### 供試材料

当帰芍薬散の調製に用いた大和当帰の由来を第 1 表に示す。試料コード番号が異なる生薬はロットが違うことを示す。本報告では、最高価格品を A 級品、次の価格品を B 級品、最低価格品を C 級品と呼称し、A 級品と C 級品を実験に供した。当帰芍薬散を調製するために、大和当帰 0.75 g、国内産芍薬 (*Paeonia lactiflora* Pallas) 1.0 g、韓国産茯苓 (*Poria cocos* Wolf) 1.0 g、中国産蒼朮 (*Atractylodes chinensis* Koidzmi) 1.0 g、中国産沢瀉 (*Alisma orientale* (Sam.) Juzepczuk) 1.0 g、国内産川芎 (*Cnidium officinale* Makino) 0.75 g を混合し、100 ml のミリ Q 水中で、1 時間煮沸して成分を抽出した。茶こしで残渣を取り除いた後、抽出液を 50 ml に定容した。定容した抽出液を遠心分離 (2000 × g, 10 分) して微細な不溶物を取り除き、一部を凍結乾燥して、乾燥物 10 mg を秤取りし、溶媒抽出を施した。

#### GC/TOF-MS による解析

抽出溶媒は、メタノール-クロロホルム-水 (5:2:2) を用いた。乾燥物を溶媒 1 ml に懸濁、溶解し

\* 財団法人奈良県中小企業支援センター

本研究は、JST、奈良県地域結集型研究開発プログラムの一環として実施した。

た後、分析用内部標準として1 mg/ml リピトール水溶液を60 µl加えた。遠心分離(15000×g, 5分)して、液層(有機溶媒層)を採取した。その900 µlに400 µl ミリQ水を加え、激しく振盪し、再び同じ遠心分離を行った。得られた上層400 µlを採取し、凍結乾燥した。乾燥試料に塩化メトキシアミン(20 mg/ml ピリジン溶液)50 µlを添加し、試料を溶解し、サーモミキサー(モデル5355, エッペンドルフ社, ハンブルク, ドイツ)を用いて、30°C, 1400 rpm, 90分の条件で、メトキシ化した。その後、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(MSTFA)100 µlを添加し、37°C, 1400 rpm, 30分の条件で、シリル化反応を行った。その反応物を、ガスクロマトグラフ/時間飛行型質量分析器(GC/TOF-MS)による分析に用いた。

GC/TOF-MS分析は第2表の条件で実施した。取得したデータのプロセッシングと検出質量スペクトル情報による成分同定は、ChromaTOFソフト(ver. 3.31, LECO社, MI, USA)を用いて行った。成分同定に際して、インハウス・ライブラリー、マックスプランクの植物生理学分子ライブラリー、ソフト付属のライブラリーを参照した。分析試料毎にカラムからの溶出時間、質量数および質量数毎の検出強度の情報で構成されているプロセッシング後のデータは、Pirotransソフト(ジーエルサイエンス社, 東京)を用いて、溶出時間と質量数毎の検出強度の総和で構成されている行列データに変換した。その行列デー

タをLineUpソフト(インフォメトリックス社, WA, USA)を用いて、分析試料間でベースラインと検出ピークの溶出時間が同調するように、データを標準化した。その後、リピトール以外の検出ピーク面積の総和に基づく、総和標準化を行った。そのデータに対して、ピロエットソフト(ver. 3.11, インフォメトリックス社)を用いて主成分分析(PCA)を行った。

## 結果および考察

第1表に示したA級品とC級品の大和当帰を用いて、当帰芍薬散を調製した。第1図に、A級品の代表

第1表 実験に使用した大和当帰の試料コード番号、  
価格等級、産地および入手年

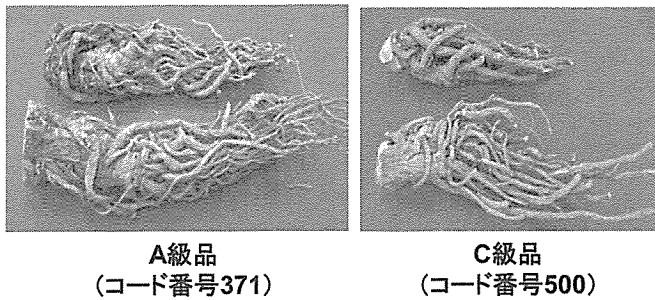
Table 1. Sample code no., price grade, production region  
and purchase year of *Angelica acutiloba* Kitagawa

試料 コード番号	価格等級	産地	入手年 (西暦)
10	A	奈良県	2006
40	A	奈良県	2006
131	A	奈良県	2007
351	A	奈良県	2007
371	A	奈良県	2007
600	A	奈良県	2008
610	A	奈良県	2008
20	C	中国, 四川省	2006
30	C	中国, 四川省	2006
160	C	中国, 四川省	2007
331	C	中国, 四川省	2007
340	C	新潟県	2007
500	C	中国	2008
700	C	中国	2008

第2表 GC/TOF-MS分析の実施条件

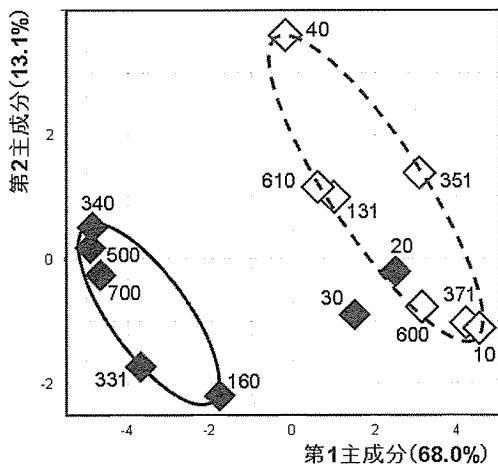
Table 2. Operating conditions of GC/TOF-MS

GC実施条件	
機器	Agilent 6890N Gas Chromatograph (アジレント社, GA, USA)
カラム	30 m×0.25 mm I.D. ×0.25 µm WCOT fused silica capillary column (バリアン社, CA, USA)
注入量	1 µl
スプリット比	1:25
注入口温度	250°C
トランスファーライン温度	230°C
温度条件 開始温度	80°C (2分保持)
昇温条件	15°C/分 → 330°C (6分保持)
時間飛行型質量分析器(TOF-MS)実施条件	
機器	Pegasus IV time-of-flight mass spectrometer (LECO社, MI, USA)
測定開始質量数	80 u
測定終了質量数	500 u
電子エネルギー	-70 eV
イオン源温度	200°C
データ取得比	50 spectra/sec
質量データの取得時間	試料注入後, 4分後から20分後まで



第1図 大和当帰のA級品 (コード番号371) とC級品 (コード番号500)。

Fig.1. A-grade (code no. 371) and C-grade (code no. 500) of *Angelica acutiloba* Kitagawa.



第2図 主成分分析 (PCA) のスコア・プロット  
x軸は第1主成分, y軸は第2主成分, 括弧内はそれぞれの成分における寄与率, 白抜きダイヤはA級品の当帰, 黒塗りダイヤはC級品, 数字は当帰芍薬散に含まれる当帰試料のコード番号, 破線円と実線円はそれぞれA級品群とC級品群の識別を示す。

Fig.2. Score plot of principal component analysis (PCA).

としてコード番号 371, C 級品の代表としてコード番号 500 の大和当帰の写真を示す。コード番号 371 は主根が太く, 側根は細く, 根数が多い形態を示している。一方, コード番号 500 は主根が細く, 側根は太く, 数が少ない形態を示している。これら 2 つの形態は, それぞれの等級品で一般的に認められる傾向である。

大和当帰の A 級品と C 級品をそれぞれ配合した当帰芍薬散を, GC/TOF-MS を用いて解析した。得られたデータをプロセッシングして PCA を行い, PCA スコア・プロットを第 2 図に示した。A 級品群 (白抜きダイヤ) と C 級品群 (黒塗りダイヤ) が, おおむね別々の 2 群を形成した。スコア値の分布から, 寄与率が全体の 68.0% を示す第 1 主成分で, 2 群形成が説明されたので, 第 1 主成分による各ピーク・データ

のローディング値を調べた。

ローディングの絶対値が上位 20 位までのピーク・データの同定を行った。GC 分析において, 化合物の立体構造や官能基絶対配置などの違いが溶出時間に影響するために, 同一成分でも溶出時間が異なって検出されることがある。また, MS 分析において, データの取得時間条件から大きな単一ピークが複数のピークに分割されてデータ化されることがある。そのため, この分析でも複数のピーク・データが重複して同じ成分として同定された。ローディング値が上位 20 位までのピークの重複を整理した結果, それらは 8 成分で構成されていることが判明した。第 3 表に, その 8 成分の第 1 主成分のローディング値, 溶出時間および検出フラグメント・イオンを示した。表中で, フラグメント・イオンの強度パターンに違いが認められる 2 つのフラクトースのピークは, フラクトース 1 とフラクトース 2 と記載した。また, グルコースも 2 つ同定されたが, 片方のピークは上位 20 位までに認められなかったため, 表中には示していない。

スクロースは, C 級品群より A 級品群に多く含まれている傾向があり, グリセロール, L-プロリン, クエン酸, フラクトースおよびグルコースは, A 級品群より C 級品群に多く含まれている傾向があった。

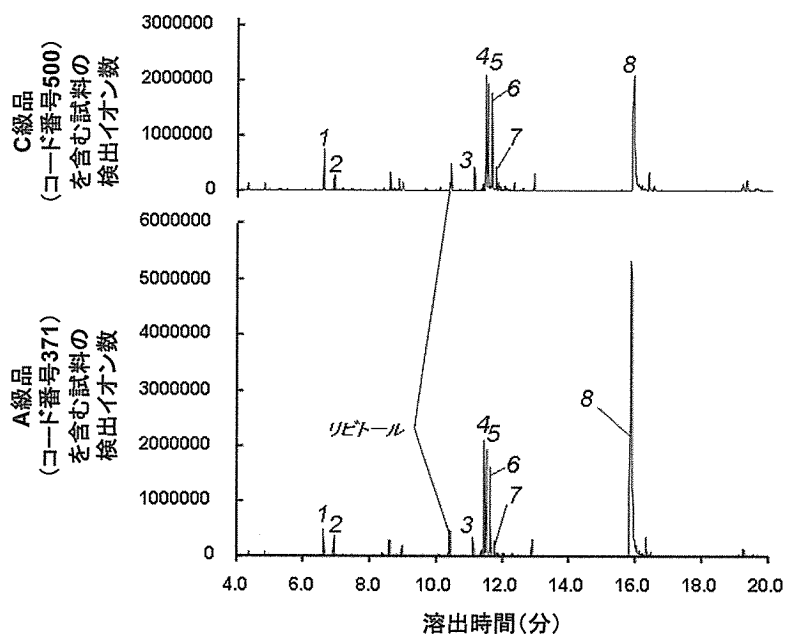
大和当帰 A 級品の代表としてコード番号 371, C 級品の代表としてコード番号 500 を配合した当帰芍薬散のトータルイオンクロマトグラフ (TIC) を第 3 図に示し, 第 3 表に記した 8 成分のピークを, クロマトグラフ中に示した。なお, 10.4 分付近のピークは内部標準物質として添加したリビトールである。

Tianniam らが, A 級品, B 級品および C 級品の当帰単品を, 本研究と同じ装置・計算システムで分析した結果, A 級品には, リン酸, プロリン, リンゴ酸およびクエン酸の含量が多く, フラクトースとグルコースは少ない傾向が示された<sup>5)</sup>。この報告と本研究を比較すると, プロリン, クエン酸, フラクトースおよびグルコースの傾向は同じであるが, スクロースが本研究で指摘されたこと, リン酸とリンゴ酸が本研究で指摘されないことが異なっている。違いの原因としては, 当帰成分の違いにより引き起こされる他の配合生薬成分の抽出状態の差などの影響が考えられる。また, 分析試料数の違い (Tianniam らの用いた供試材料は, A 級品, B 級品および C 級品の当帰を各 1 試料ずつ) も否定できない。分析結果の差異の原因を解明するためには, 更に詳細な解析が必

第3表 ローディングの絶対値が上位20位のピークにおいて、重複性を除いた同定成分名とその第1主成分のローディング値、溶出時間および検出フラグメント・イオン  
 Table 3. Nonredundant identified components and their loading value of PCA1 in top 20 absorbance loading value, retention time, and detected fragment ion

TIC中の ピーク番号	同定 成分名	第1主成分 の ローディング値	溶出 時間 (分)	フラグメント・イオン
1	グリセロール	-0.071	6.63	117, <u>147</u> , 299
2	レブリン	-0.074	6.93	<u>142</u> , 216
3	クエン酸	-0.078	11.11	<u>147</u> , 211, 273
4	フラクトース1	-0.149	11.45	<u>103</u> , 147, 217, 307
5	フラクトース2	-0.076	11.51	<u>103</u> , 147, 217, 307
6	グルコース1	-0.079	11.62	103, <u>147</u> , 160, 205, 319
7	グルコース1	-0.071	11.76	103, <u>147</u> , 160, 205, 319
8	スクロース	0.340	15.84	<u>103</u> , 129, 147, 169, 217, 361

フラグメント・イオン中の下線数字は、質量スペクトル中で最高強度を示したイオン



第3図 GC/TOF-MSによる当帰芍薬散試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) イタリックの数字はピーク番号を示す。

Fig.3. Total ion chromatograph (TIC) of tokishakuyakusan on GC/TOF-MS analysis.

要である。

本研究で指摘した成分は、当帰だけではなく他の配合生薬にも含まれる成分であり、複合成成分系の中で、これらの成分が指摘される結果になった。本研究では、複合成成分系における特定の成分の濃度の影響を議論することが難しい。この点についても、更に詳細な解析が必要である。

C級品であるコード番号20はA級品群に含まれ、コード番号30はA級品群に近接してプロットされた。この結果は、第3表で指摘した成分などの含量について、コード番号20と30がA級品群と似た傾向を示したことを示唆している。大和当帰の価格等級の決定因子には形状や色が含まれることから、コード番号20と30がC級品と判断されたのは、形状や色

などの特徴によるものであると推測される。

以上のように、GC/TOF-MSを用いたメタボリック・プロファイリング解析で、A級品とC級品の大和当帰がそれぞれ配合された当帰芍薬散群をおおむね識別することができ、その識別に寄与する成分の同定に成功した。

### 謝 辞

当帰生薬の品質鑑定と鑑定法の教授をして頂いた地域特産物マイスター（(財)日本特産農作物協会認定）、福田商店 福田真三氏、メタボローム解析のご指導を頂いた大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎教授、研究の全般に、ご指導とご理解、励ましを

頂いた奈良先端科学技術大学院大学副学長，兼，奈良県地域結集型事業研究代表 新名惇彦教授と奈良県地域結集型事業コア研究室室長 野本享資教授に，深く感謝いたします。

### 引用文献

1. Komura, H. 2008. Volatile Components Corresponding with the Quality of Toki. 32th International Symposium on Capillary Chromatography May. 26-30, 2008, Riva del Garda, Italy: 424.
2. Tarachiwin, L., A. Kato, K. Ute, and E. Fukusaki. 2008. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by <sup>1</sup>H NMR-based metabolic fingerprinting. J. Pharm. Biomed. Anal. 48: 42-48.
3. Tianniam, S., T. Bamba, and E. Fukusaki. 2009. Non-targeted metabolite fingerprinting of oriental folk medicine *Angelica acutiloba* roots by ultra performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. J. Sep. Sci. 32: 2233-2244.
4. Tianniam, S., T. Bamba, and E. Fukusaki. 2010. Pyrolysis GC-MS-based metabolite fingerprinting for quality evaluation of commercial *Angelica acutiloba* roots. J. Biosci. Bioeng. 109: 89-93.
5. Tianniam, S., L. Tarachiwin, T. Bamba, A. Kobayashi, and E. Fukusaki. 2008. Metabolic profiling of *Angelica acutiloba* roots utilizing gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for quality assessment based on cultivation area and cultivar via multivariate pattern recognition. J. Biosci. Bioeng. 105: 655-659.