

令和元年6月4日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08212

研究課題名(和文) 漢方薬中の新規薬理活性物質のスクリーニング法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of the screening method for new pharmacologically active compounds in hebal medicines

研究代表者

萩中 淳 (HAGINAKA, Jun)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：漢方薬中の親水性の薬理活性物質(配糖体)である、アルブチン、ルチンおよびナリンギンを予め親水性の溶媒であるメタノールに溶解し、修正沈殿重合法によりMIPの調製を行った。殊に、ルチンに対するMIPは、関連の化合物[ケルセチン、イソケルシトリン(ケルセチン3-グルコシド)、ケルシトリン(ケルセチン3-ラムノシド)、ケンフェロール、ケンフェロール 3-ルチノシドおよびケンフェロール 3-グルコシド]に比し、ルチンに対して高い分子認識能を与えた。これらのMIPにおける保持および分子認識には、水素結合などの静電力が重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、調製が難しいとされていた、漢方薬中の親水性の薬理活性物質(配糖体)に対するMIPの調製が修正沈殿重合法により可能となった。調製したMIPを漢方薬中の新規薬理活性物質のスクリーニングおよび同定に適用できる可能性が示唆された。新たに開発した修正沈殿重合法によるMIPの調製法は、親水性の薬理活性物質のみならず、水溶性の生体関連物質、生体高分子化合物の分子認識への適用も期待されるため、ライフサイエンス分野での広範な応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We prepared molecularly imprinted polymers (MIPs) for arbutin, rutin and naringin, which are pharmacologically active compounds (glycosides) in herbal medicines. These template molecules were first dissolved in a hydrophilic solvent such as methanol and then the MIPs for those compounds were prepared by modified precipitation polymerization. Especially, the MIP for rutin [quercetin 3-rutinoside (rhamnosyl-glucoside)] recognized rutin among structurally related compounds such as quercetin, quercitrin (quercetin 3-rhamnoside), isoquercitrin (quercetin 3-glucoside), kaempferol, kaempferol 3-rutinoside and kaempferol 3-glycoside. The results indicate that in addition to shape recognition, hydrophilic interactions (the attractive electrostatic interactions) work for the retention and molecular recognition of glycosides on the MIPs.

研究分野：分析科学

キーワード：分子インプリントポリマー 分子認識 分析科学 薬学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子インプリント法は、テンプレート分子の存在下、それと相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、テンプレート分子に対する特異的認識部位あるいは群特異的認識部位を得る方法である。従来の分子インプリント法では、漢方薬中の親水性の薬理活性化合物（配糖体、グリコン）に対する分子インプリントポリマー（MIP）の調製は、配糖体を誘導体化後、MIPを調製する、配糖体の認識のための新たな機能性モノマーを合成する、配糖体の認識のための新たな架橋剤を合成するなどの方法で行われていたが、分子認識能の優れたMIPは得られていなかった。そこで、粒子径が均一である、

水系で優れた分子認識能をもつ、配糖体の特異的あるいは群特異的な認識が可能である、などの特徴を有しているMIPの新規調製法の開発は、広範な応用が期待できる。従来は、疎水性の高い薬理活性物質（アグリコン）に注目して、薬理活性化合物の探索が行われていたが、配糖体に注目して探索を行うことは行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、漢方薬中の親水性の薬理活性物質（配糖体）に対する新規分子インプリント法を開発し、配糖体の認識への適用を検討するとともに、MIPの群特異的認識能を利用した漢方薬中の新規薬理活性物質のスクリーニングおよび新規薬理活性物質の同定を検討する。具体的には、従来、調製が難しいとされていた、漢方薬中の親水性の薬理活性物質（配糖体）に対するMIPの調製を目指し、漢方薬中の新規薬理活性物質のスクリーニングおよび同定を検討し、親水性の薬理活性物質のみならず、生体関連物質、生体高分子化合物の分子認識に適用し、ライフサイエンス分野での広範なMIPの応用を目指す。

3. 研究の方法

親水性化合物に対するMIPの調製過程で、水と混ざり合う有機溶媒（アセトニトリル）と水と混ざり合わない有機溶媒（トルエン）を用いる混合溶媒系で、水、メタノール等の親水性溶媒に予め溶解したテンプレート分子を用いて重合を行う新規分子インプリント法（修正沈殿重合法、modified precipitation polymerization）により、親水性化合物に対して優れた分子認識能をもつ、MIPの調製を行う。本法により、粒子径単分散のMIPを調製し、漢方薬中の親水性の薬理活性物質（配糖体）の特異的認識への適用を検討する。配糖体としてアルブチン、ルチンおよびナリンギンの特異的認識およびその応用を検討した。

(1) アルブチンに対するMIPの調製と評価

MIPは修正沈殿重合法により調製した。テンプレート分子に8 mLのメタノールに溶解したアルブチン（1.5 mmol）、架橋剤にジビニルベンゼン（28.8 mmol）、重合開始剤に2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）を用い、これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解し、60 °Cで16時間重合した。MIP調製時の機能性モノマーの仕込量（mmol）は、それぞれMIP_{Arbutin1}（メタクリルアミド（MAM）/4-ビニルピリジン（4-VPY）= 3/6）、MIP_{Arbutin2}（MAM/4-VPY = 3/9）、MIP_{Arbutin3}（MAM/4-VPY = 6/9）、MIP_{Arbutin4}（MAM/4-VPY = 6/12）とした。比較のためにテンプレート分子を用いないで、同一条件下で重合したノンインプリントポリマー（NIP）も調製した。MIPあるいはNIPを含む溶液から溶媒を一旦除去し、得られたMIPあるいはNIPをテトラヒドロフランに分散し、沈降法により微粒子を除去する操作を3回行った。その後、この操作を水を用いて1回行い、メタノールを用いて2回行った。これらの操作の後、メンブレンフィルターでろ過し、乾燥してMIPあるいはNIPを得た。得られたMIPまたはNIPをステンレス製カラムに充填し、アルブチンに対する保持能および分子認識能を、移動相に酢酸を含むアセトニトリルを用いて、HPLCにより評価した。なお、アルブチンおよびその関連化合物に対するMIPの分子認識能の評価には、保持係数（ k ）の比で定義したインプリント係数（ $IF = k_{MIP}/k_{NIP}$ ）を用いた。

(2) ルチンに対するMIPの調製と評価

MIPは修正沈殿重合法により調製した。テンプレート分子に16 mLのメタノールに溶解したルチン（1.5 mmol）、架橋剤にジビニルベンゼン（28.8 mmol）、重合開始剤に2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）を用い、これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解し、60 °Cで16時間重合した。MIP調製時の機能性モノマーの仕込量（mmol）は、それぞれMIP_{Rutin1}（メタクリルアミド（MAM）/4-ビニルピリジン（4-VPY）= 3/6）、MIP_{Rutin2}（MAM/4-VPY = 3/9）、MIP_{Rutin3}（MAM/4-VPY = 6/9）、MIP_{Rutin4}（MAM/4-VPY = 9/9）、MIP_{Rutin5}（MAM/4-VPY = 6/12）とした。比較のためにテンプレート分子を用いないで、同一条件下で重合したノンインプリントポリマー（NIP）も調製した。MIPおよびNIPの洗浄は、アルブチンに対するMIPの調製と同様に行った。得られたMIPまたはNIPをステンレス製カラムに充填し、ルチンおよびその関連化合物に対する保持能および分子認識能を、移動相に酢酸を含むアセトニトリルと水の混液を用いて、HPLCにより評価した。なお、ルチンに対するMIPの分子認識能の評価には、IFを用いた。

(3) ナリンギンに対するMIPの調製と評価

MIPは修正沈殿重合法により調製した。テンプレート分子に0.5 mLのメタノールに溶解

したナリンギン (1.5 mmol)、架橋剤にジビニルベンゼン (28.8 mmol)、重合開始剤に 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) を用い、これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解し、60 °C で 16 時間重合した。MIP 調製時の機能性モノマーの仕込量 (mmol) は、MIP_{Naringin} (MAM/4-VPY = 6/9)とした。比較のためにテンプレート分子を用いないで、同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。MIP および NIP の洗浄は、アルブチンの調製と同様に行った。得られた MIP または NIP をステンレス製カラムに充填し、ナリンギンおよびその関連化合物に対する保持能および分子認識能を、移動相に酢酸を含むアセトニトリルと水の混液を用いて、HPLC により評価した。なお、ナリンギンに対する MIP の分子認識能の評価には、IF を用いた。

4. 研究成果

(1) アルブチンに対する MIP

調製したアルブチンに対する MIP のうち、MIP_{Arbutin4} が、アルブチンに対して最も高い IF=3.65 を与え、関連化合物である、フェノール、ゲニピン、ゲニポシド (ゲニピン 1-グルコシド) に対する IF は、それぞれ 1.03、1.79 および 1.13 であり、MIP_{Arbutin4} は特異的にアルブチンを認識できることが分かった。保持に対するアセトニトリル含量 および酢酸の濃度の影響を検討したところ、アセトニトリル含量の増加とともに、アルブチンの保持は増加し、酢酸濃度の増加とともに、保持は減少した。これらの結果は、アルブチンの保持および分子認識には、水素結合などの静電相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) ルチンに対する MIP

調製したルチンに対する MIP のうち、MIP_{Rutin3} が、ルチン (ケルセチン 3-ルチノシド) に対して最も高い IF=66.5 を与え、関連化合物である、イソケルシトリン (ケルセチン 3-グルコシド)、ケルシトリン (ケルセチン 3-ラムノシド)、ケルセチン、ケンフェロール、ケンフェロール 3-ルチノシドおよびケンフェロール 3-グルコシドに対する IF は、それぞれ 9.36、4.44、2.11、1.72、25.22 および 4.40 であり、MIP_{Rutin3} はルチンの糖鎖部分 (3-ルチノシド) を特異的に認識できることが分かった。アセトニトリル含量の増加とともに、ルチンおよび関連化合物の保持は増加し、酢酸濃度の増加とともに、保持は減少した。これらの結果は、ルチンの保持および分子認識には、水素結合などの静電相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆している。

(3) ナリンギンに対する MIP

調製したナリンギンに対する MIP_{Naringin} が、ナリンギン (ナリンゲニン 7-O-ネオヘスペリドシド) (ただし、ネオヘスペリドシドはラムノシル-(1-2)-グルコース) に対して IF=5.30 を与え、関連化合物である、ナリンゲニン、ヘスペリジン (ヘスペレチン 7-O-ルチノシド) (ただし、ルチノースはラムノシル-(1-6)-グルコース) およびヘスペレチンに対する IF は、それぞれ 0.876、4.04、および 0.917 であり、MIP_{Naringin} はナリンギンとヘスペリジンを特異的に認識しているように思われた。アセトニトリル含量の増加とともに、ナリンギンおよび関連化合物の保持は増加し、酢酸濃度の増加とともに、保持は減少した。これらの結果は、ナリンギンとヘスペリジンの保持および分子認識には、水素結合などの静電相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kanae Nishimura and Jun Haginaka, Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymers for promazine and chlorpromazine by multi-step swelling and polymerization: The application for the determination of promazine in rat serum by column-switching LC, Anal. Sci., 査読有, in press.
DOI: 10.2116/analsci.19P011

Yukari Nakamura, Shizuka Masumoto, Arisa Kubo, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for warfarin and coumachlor by multi-step swelling and polymerization method and their imprinting effects, 査読有, J. Chromatogr. A, 1516, 71-78 (2017).
DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.016

Yukari Nakamura, Shizuka Masumoto, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymer for glutathione by modified precipitation polymerization and its application to assays of glutathione in supplements, 査読有, J. Pharm. Biomed. Anal., 2017, 144, 230-235.

Chitose Miura, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymer for caffeic acid by precipitation polymerization and its application to extraction of caffeic acid and chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves, J. Pharm. Biomed. Anal., 査読有, 127, 2016, 32-38.
DOI: 10.1016/j.jpba.2015.12.052

DOI: 10.1016/j.jpba.2016.12.006

Yukari Nakamura, Hisami Matsunaga and Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for strychnine by precipitation polymerization and multi-step swelling and polymerization and their application for selective extraction of strychnine from *nux-vomica* extract powder, J. Sep. Sci., 査読有, 39, 2016, 1542-1550.
DOI: 10.1002/jssc.201600027

[学会発表](計 22 件)

丹下 優菜、萩中 淳、穠山 浩、井之上 浩一、分子認識ポリマー蛍光検出法を用いた食品中の多環芳香族炭化水素類の簡易スクリーニング法の確立、日本薬学会第 139 年会、2019 年

久保 有沙、萩中 淳、ワルファリン誘導体に対する分子インプリントポリマーの調製と光学分割への応用、日本薬学会第 139 年会、2019 年

神路 浩美、萩中 淳、フェノールおよびそのハロゲン置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 139 年会、2019 年

西村奏咲、來海徹太郎、岡村 昇、萩中 淳、分子インプリントポリマーを前処理カラムに用いるラット血清中のクロルプロマジンおよびその代謝物の LC 分析、日本薬学会第 139 年会、2019 年

久保有沙、萩中 淳、ワルファリンおよびその置換体に対する分子鑄型ポリマーにおける保持および分子認識機構、第 29 回クロマトグラフィー科学会議、2018 年

西村奏咲、萩中 淳、プロマジンおよびその誘導体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、第 31 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2018)、2018 年

Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers for warfarin, chlorowarfarin and bromowarfarin and their imprinting effects, 2018 Sino-Japanese Symposium on Separation Science (招待講演)(国際学会)、2018 年

Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers for a target compound and its halogenated derivatives and their imprinting effects, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS12) (招待講演)(国際学会)、2018 年

萩中 淳、医薬品分析のための高選択的検出法および高機能分離法の開発と応用、日本薬学会第 138 年会 (招待講演)(受賞講演)、2018 年

神路浩美、升本志津香、松永久美、萩中 淳、修正沈殿重合法によるルチンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本薬学会第 138 年会、2018 年

久保有沙、松永久美、萩中 淳、ワルファリンおよびそのハロゲン置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 138 年会、2018 年

中野 梨乃、松永 久美、萩中 淳、安息香酸およびその置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価：分子認識能に及ぼす置換基の影響、日本薬学会第 138 年会、2018 年

Jun Haginaka, Preparation and application of monodisperse molecularly imprinted polymers for hydrophilic pharmaceuticals, Advances in Pharmaceutical Analysis (APA 2017) (招待講演)(国際学会)、2017 年

Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for hydrophilic compounds by modified precipitation polymerization, 3rd International Forum on Pharmaceutical Analysis (招待講演)(国際学会)、2017 年

西村奏咲、萩中 淳、プロマジンおよびクロルプロマジンに対する分子インプリントポリマーの調製と血清中のプロマジンの分析への応用、日本分析化学会 第 66 年会、2017 年

Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers for recognition of glycosides, 28th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2017) (招待講演)(国際学会)、2017 年

萩中 淳、アフィニティーを利用した高機能分離分析システムの開発と応用 (招待講演)、第 77 回分析化学討論会、2017 年

Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers for separations and extractions, The International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS2017) (招待講演)(国際学会)、2017 年

久保 有沙、升本 志津香、松永 久美、萩中 淳、レボフロキサシンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 137 年会、2017 年

升本 志津香、松永 久美、萩中 淳、アルブチンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本薬学会第 137 年会、2017 年

②1 Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers as affinity media for separations and extractions, 27th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2016) (招待講演)(国際学会)、2016 年

②2 中野梨乃、中村有加里、升本志津香、松永久美、萩中 淳、安息香酸およびその臭素置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本分析化学会第 65 年会、2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。