

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871154

研究課題名(和文)イオンモビリティ質量分析装置を用いた生薬成分分析と品質評価法の確立

研究課題名(英文)Studies on Structural and Positional Identification of Isomeric Constituents in Crude Drugs using Ion Mobility Spectrometry

研究代表者

政田 さやか(Masada, Sayaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・主任研究官

研究者番号：50647097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イオンモビリティ質量分析装置を用いて、生薬中の異性体成分、特に配糖体の位置異性体の分離と、ドリフトタイムから算出した衝突断面積の実測値と、分子シミュレーションから得られた衝突断面積の理論値の比較によって構造推定を行う手法を確立した。化合物のサイズや構造についての検討によって、アントラキノン配糖体や五員環アルカロイド、イリドイド配糖体が比較的高精度で構造推定可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We focused on the isomeric glucosides in crude drugs to establish a new strategy for the identification of isomeric constituents using liquid chromatography ion mobility spectrometry mass spectrometry (LC-IMS-MS). We performed LC/IMS/MS analysis of crude drugs and detected some isomeric glucosides with drift times obtained from IMS. Then, actual collision cross sections (CCS) calculated by drift times were compared to theoretical CCS simulated by molecular models to presumptively identify the peaks. Anthraquinone glucosides, iridoid glucosides and tetracyclic alkaloids were successfully matched the presumptive identification with referencial compounds with little difference of actual vs theoretical CCS.

研究分野：生薬学

キーワード：構造異性体 質量分析 生薬 配糖体

### 1. 研究開始当初の背景

生薬・漢方薬の有効性、安全性を確保するためには、科学的根拠に基づく品質評価と品質管理が不可欠であるが、天然資源に由来する多成分系の生薬においては特定の成分による一元的な評価が難しく、総合的な評価が必要であるため、その制限がエビデンス研究や規格化の障壁になってきた。他方、メタボロミクス研究が急速に発展し、生薬中の薬効成分や指標成分の候補化合物が続々と報告されるようになったが、候補化合物の同定に単離及びNMR測定による構造決定が必要となる場合、含有量や安定性の問題から同定に至らないケースも少なくない。そのため、試料から目的成分を単離することなく、分離工程中に構造情報が得られる分析機器としてLC-NMR(-MS)の開発が進められているが、現段階では、測定時間やコスト、分析の精度に課題を残し、汎用機器としての普及は難しい状況にある。

一方、オミクス研究における新たなツールとしてイオンモビリティ分離技術が注目を集めている。Ion Mobility Spectrometry (IMS) は比較的高圧のガスセル内をイオンが移動する際の移動度に応じて分離を行う技術であり、目的イオンを選択的に測定できる高感度検出タイプと、移動度から衝突断面積を算出し理論値との比較によって構造推定を行うタイプの装置が実用化されている。中でも、後者とLC/MSを組み合わせたLC/IMS/MS分析では構造類縁体の分離と立体構造推定が可能になるため、タンパク質発現や薬物代謝解析を目的とした利用が急速に広がっている。

このような背景の下、本研究では、イオンの嵩高さの違いから化合物の分離と識別を行うイオンモビリティ分離技術に着目し、生薬中の成分を単離することなく構造推定し、かつ、異性体成分、特に配糖体の位置異性体を識別する方法論としてイオンモビリティ (IMS) の有用性を検討した。

### 2. 研究の目的

LC/MSを用いた生薬の成分分析において、LCの保持時間とMSスペクトルの情報のみから化合物を同定することは困難である。LC/MSにIMS分離技術を組み合わせたLC/IMS/MSでは、イオンの移動度から化合物の衝突断面積が算出でき、分子シミュレーションによる候補化合物の衝突断面積の理論値と比較することで、化合物の立体構造推定が可能になるため、天然由来の多成分系からなる生薬の成分分析の強力なツールとなることが期待される。そこで本研究では、生薬中の異性体成分、特に配糖体の位置異性体に着目し、生薬の品質評価におけるLC/IMS/MS分析の有用性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### 材料

熱水抽出エキスは、国内市場に流通する生薬を粉碎後、2時間加熱還流して凍結乾燥したものを使用した。これを50%MeOHで1mg/mLの

濃度に溶解し、遠心分離して得た上清を孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過してLC/IMS/MS分析に供した。アントラキノン配糖体は配糖化酵素を用いて酵素的に合成し、精製後、NMRによって構造を確認した。五員環アルカロイドはキャットクローを含有する健康食品から単離、同定したものをを用いた。Glycyrrhizic acid, saikosaponin A, saikosaponin dは試薬会社から化合物を購入した。

#### LC-IMS-MS測定

以下の分析機器を用い、適宜条件を最適化して測定した。

LC部: ACQUITY UPLC (Waters)

➤ カラム ACQUITY UPLC BEH C18,  
2.1×100, 1.7 μm

MS部: Synapt G2-Si (Waters)

➤ イオン化モード ESI+ and ESI-

➤ 測定モード Resolution Mode

➤ スキャン  $m/z$  範囲 50 – 1200

測定データをMassLynx v4.1 及びDriftScope v2.4 (Waters) を用いて分析し、ピークの保持時間、 $m/z$  およびドリフトタイムを得た。

#### 衝突断面積の測定

Poly-alanineの測定値から算出したドリフトタイム - 衝突断面積の検量線を用いて、生薬エキス中の標的ピークのドリフトタイムから衝突断面積の実測値を算出した。

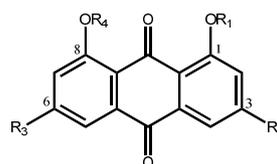
#### 衝突断面積の理論値の算出

分子描画ソフト Avogadro v 1.1.0 (Avogadro.openmolecules.net) を用い、標的化合物の立体構造の描画と構造最適化を行った。構造最適化には Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94) の分子力場を用いた。得られた安定構造の原子座標を基に、MOBCAL (www.indiana.edu/~nano) を用いて標的化合物の衝突断面積の理論値を算出した。

### 4. 研究成果

#### アントラキノン配糖体の合成

センナ由来 UGT73B11、シロイヌナズナ由来 UGT71C1、ニチニチソウ由来 UGT73A15 の3種類の配糖化酵素を用い、UDP-glucose存在下でemodinあるいはaloe-emodinに対する糖付加反応を行うことにより、それぞれ emodin 6-*O*-glucoside (**E6G**)、emodin 1-*O*-glucoside (**E1G**) 及び emodin 8-*O*-glucoside (**E8G**)、aloe-emodin  $\omega$ -*O*-glucoside (**AE $\omega$ G**) を得た (図1)。



| 化合物    | R1      | R2  | R3        | R4      |
|--------|---------|-----|-----------|---------|
| emodin | H       | CH3 | OH        | H       |
| E1G    | glucose | CH3 | OH        | H       |
| E6G    | H       | CH3 | O-glucose | H       |
| E8G    | H       | CH3 | OH        | glucose |

| 化合物         | R1 | R2           | R3 | R4 |
|-------------|----|--------------|----|----|
| aloe-emodin | H  | CH2OH        | H  | H  |
| AEωG        | H  | CH2O-glucose | H  | H  |

図1 アントラキノン配糖体の構造式

### アントラキノン配糖体の衝突断面積の理論値と実測値の比較

ダイオウ熱水抽出エキス中の推定組成  $C_{21}H_{20}O_{10}$  を有するピークについて、標品との比較により 4 化合物を同定した (図 2)。さらに、これらのピークの衝突断面積の実測値と、分子シミュレーションにより算出した標的化合物の衝突断面積の理論値とを比較した結果、E8G、E6G、AEωG は 0.06 ~ 0.48% の誤差で極めて高精度な構造推定が可能だった。一方、E1G は実測値と理論値の誤差が 2.37% と、やや精度が低いものの糖鎖や脂質、タンパク質の衝突断面積を比較した文献値と比べて同程度であった (表 1)。また、ダイオウ熱水抽出エキス 8 サンプルから検出されたこれらのピークの衝突断面積の実測値は、標準偏差 0.25 ~ 0.35、変動係数 0.11 ~ 0.16%、標準誤差 0.08 ~ 0.15 と高い測定精度を示したことから、標品を使わなくても実際の生薬を対象に衝突断面積からピークの構造推定が可能であることが示唆された。

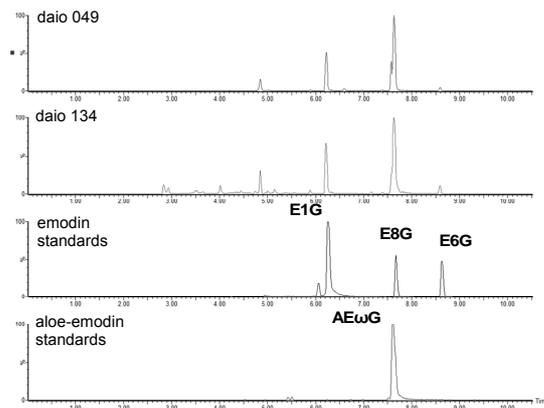


図2 ダイオウ熱水抽出エキス及び標品のマスプロトグラム (ESI ネガティブモード,  $m/z$  431.1)

表1 アントラキノン配糖体の衝突断面積の比較

| 化合物  | 保持時間 (min) | 実測値 (Å) | 理論値 (Å) | 誤差 (%) |
|------|------------|---------|---------|--------|
| E1G  | 6.23       | 130.9   | 127.9   | 2.37   |
| E8G  | 7.67       | 130.8   | 130.2   | 0.48   |
| E6G  | 8.60       | 136.5   | 136.6   | 0.06   |
| AEωG | 7.60       | 133.4   | 133.0   | 0.28   |

### グリチルリチン酸異性体の IMS 分離

カンゾウ熱水抽出エキスを LC/IMS/MS 測定し、グリチルリチン酸とガラクトツログリチルリチン酸 (図 3) の IMS による分離を試みた。各種パラメ

ーターを検討したが、両者のピークのドリフトタイムはほぼ同値であり、分離は不可能だった。

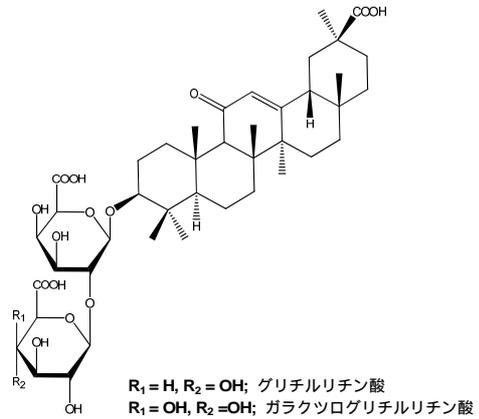


図3 グリチルリチン酸及びガラクトツログリチルリチン酸の構造式

### サイコサポニンの IMS 分離

$C_{42}H_{68}O_{13}$  の組成式を有する saikosaponin A と saikosaponin d の IMS による分離を試みた (図 4)。その結果、両者のドリフトタイムの差はほとんどなく、分離は極めて困難だった。

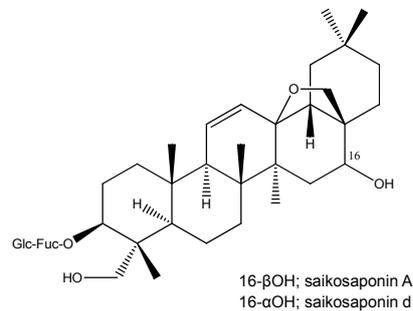
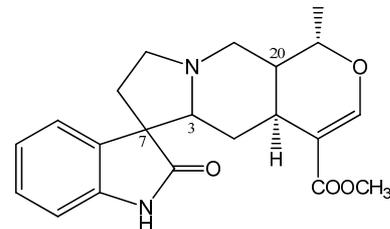


図4 サイコサポニンの構造式

### 五員環アルカロイドの衝突断面積の理論値と実測値の比較

キャットクロー由来の同一組成式  $C_{21}H_{24}N_2O_4$  を有する五員環アルカロイド 6 化合物について、IMS 分離と衝突断面積の照合を試みた (図 5)。



| 化合物              | Configuration of chiral center |     |      |
|------------------|--------------------------------|-----|------|
|                  | C-3                            | C-7 | C-20 |
| Speciophylline   | R                              | S   | S    |
| Mitraphylline    | S                              | R   | R    |
| Uncarine F       | R                              | R   | S    |
| Pterodoline      | S                              | R   | S    |
| Isomitraphylline | S                              | S   | R    |
| Isopterodoline   | S                              | S   | S    |

図5 五員環アルカロイドの構造式

LC/IMS/MS 分析の結果、6 化合物のうち mitraphylline と isoptero-doline、ptero-doline と speciophylline は、保持時間、ドリフトタイム共にほぼ同値を示し、分離が困難だった。一方、isomitraphylline と uncarine F の衝突断面積の実測値と理論値は 3.2~4.7 % の誤差を示し、一定の精度で構造推定が可能であると考えられた(表 2)。

表 2 五員環アルカロイドの衝突断面積の比較

| 化合物              | 保持時間 (min) | 実測値 (Å) | 理論値 (Å) | 誤差 (%) |
|------------------|------------|---------|---------|--------|
| Isomitraphylline | 5.44       | 130.5   | 124.4   | 4.70   |
| Uncarine F       | 5.94       | 132.5   | 128.3   | 3.24   |
| Mitraphylline    | 6.20       | 131.9   | 131.6   | 0.287  |
| Isoptero-doline  | 6.21       | 131.9   | 126.4   | 4.24   |
| Ptero-doline     | 8.73       | 131.3   | 124.2   | 5.43   |
| Speciophylline   | 8.73       | 131.3   | 123.5   | 5.99   |

一方、IMS 分離によるドリフトタイムが同値だった mitraphylline と isoptero-doline、ptero-doline と speciophylline について、分子シミュレーションでは異なる値の衝突断面積が算出されていたことから、これらの五員環アルカロイドに対しては、測定、シミュレーション方法共に、更なる検討が必要であると考えられた。

#### イリド配糖体の IMS 分離

サンシシ熱水抽出エキスを LC/IMS/MS 測定した結果、負イオンモードの  $m/z$  493.178 と  $m/z$  651.274 の抽出クロマトグラムにおいて、異なるドリフトタイムを有する複数のピークが得られ、異性体の IMS 分離が示唆された(図 6)。今後、ピークの同定を含め、更なる検討が必要である。

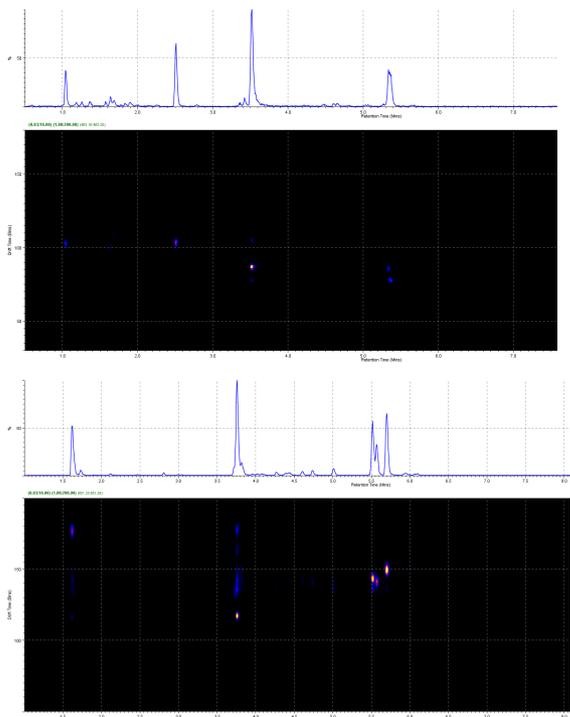


図 6 LC/IMS/MS 測定によるサンシシ抽出エキスの抽出クロマトグラムとドリフトグラム  
(上)  $m/z$  493.178、(下)  $m/z$  651.274

#### まとめ

以上の結果から、糖鎖やタンパク質等の高分子と同様に、低分子化合物であってもある程度の精度で IMS による分離と簡易構造推定が可能であることが強く示唆された。天然物に由来する生薬には異性体成分が多く含まれるため、成分分析や品質評価の上で、異性体の構造推定を行う IMS 分離は強力な分析ツールになることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 0 件)

(学会発表) (計 1 件)

渥美さやか, 寺坂和祥, 淵野裕之, 高橋 豊, 橋井則貴, 川崎ナナ, 水上 元, 川原信夫, 袴塚高志, 合田幸広, “イオンモビリティ分離技術を利用した生薬中の異性体成分の構造推定法に関する研究(2): 大黃中のアントラキノン配糖体について,” 第 55 回天然有機化合物討論会, 京都, 2013 年 9 月 18~20 日

(図書) (計 0 件)

(産業財産権) (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

政田 さやか (MASADA, Sayaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・主任  
研究官

研究者番号: 50647097

##### (2) 研究協力者

寺坂和祥 (TERASAKA, Kazuyoshi)

名古屋市立大学大学院薬学研究科・生薬学  
分野・講師

研究者番号: 60405214