

生薬成分解析における高速液体クロマトグラフ-フーリエ変換型質量分析計の活用



大 月 興 春

1 はじめに

自然界から得られる草本木皮を主とする生薬は、非常に多くの二次代謝産物からなる多成分系を特徴とする。生薬成分の研究によりこれまで様々な生物活性物質が発見され、多くの医薬品の開発そして薬学の発展につながった。生薬を起源として開発された医薬品の多くは単一化合物で顕著な生物活性を示すものである一方、多くの生薬は複数の成分が相互作用（相加作用や相乗作用）して薬効を示すとされている。また、生薬は天産品であることから生育条件や自然環境により成分に違いが生じることがある。複数の生薬の組み合わせたである漢方薬の成分はさらに複雑で、使われる個々の生薬に含まれる成分の分析により品質を確保することは漢方薬の有効性・安全性を担保するために重要な役割を果たす。

薄層クロマトグラフィー (TLC) やフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を用いた三次元高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法は生薬成分の分析に広く利用されている。しかし、TLC や HPLC-PDA 分析では感度や特異性が十分でないことが多く、また検出したスポットやピークの化学構造に関する情報がほとんど得られない。近年では、高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS) が高感度かつ幅広い種類の化合物の分析に対応できるなどの利点から生薬成分の分析に用いられている。また、質量分析計の進歩は目覚ましく、高分解能質量分析計が登場したことでより複雑な試料を高精度に分析できるようになった。現在、高分解能質量分析計として呼ばれるものには、二重収束型、飛行時間 (TOF) 型、フーリエ変換 (FT) 型があるが、なかでも FT 型質量分析計は高い質量分解能を誇る。そこで本稿では、FT 型質量分析計に着目してその生薬成分解析における活用について紹介する。

2 フーリエ変換型質量分析計を活用した生薬成分解析の実例

生薬成分の解析では検出されたピークがどの化合物に由来するのかを突き止める化合物同定を行うために、高分解能精密質量データが非常に重要な要素となる。FT 型質量分析計は強磁場や電極に導入したイオンを周回運動させることで生じる周波数をフーリエ変換してマススペクトルを得ることで、高い質量分解能を実現している。ここで、汎用されている漢方薬の一つである大建中湯の構成生薬「乾姜 (カンキョウ)」を用いて、筆者が実際に FT 型質量分析計である Orbitrap 質量分析計にて分析したデータを例に成分の解析について説明する。

2-1 分子式の決定およびデータベース検索

図 1A に乾姜の熱水抽出物をスキャンモード (スキャン質量範囲: m/z 150~2000) にて分析したクロマトグラムを示した。前述の通り非常に多くのピークが検出されていることがわかるが、今回は保持時間 8.12 分に溶出されたピーク A に着目して解析を行う。最初のステップでは解析するピークの分子式を決定する。ピーク A のマススペクトルをみると、質量差よりポジティブモードの m/z 375.1797 に観察されるイオンはプロトン付加分子、ネガティブモードの m/z 373.1657 に観察されるイオンは脱プロトン分子であると推定できる (図 1B)。このとき低分解能の質量データの場合、解析するピークの「分子量が 374 である」ということしか推定することができない。また、モノアイソトピックイオンと同位体イオン間の質量差、同位体イオンピークの相対強度に着目し含有する元素の種類や個数を推定することで、信頼性の高い分子式の推定結果が得られる。ピーク A についてポジティブモードとネガティブモードで観察されるイオンピークの計算結果を合わせると分子式は $[C_{21}H_{26}O_6]$ と導き出された。

次に分子式の情報をもとに化学情報の総合データベース SciFinder[®] や生薬を中心とした天然物データベース KNApSack Family¹⁾ などを活用して、候補化合物を検索する。今回は KNApSack Family を使い、Core System にて $[C_{21}H_{26}O_6]$ について分子式検索を行った。その結果、47 件のヒットがあり、さらにヒットした化合物の中から乾姜の基原植物であるショウガ科ショウガ属ショウガ (*Zingiber officinale*) から報告された化合物を抽出したところ一つの化合物「hexahydrocurcumin」のみがヒットした。以上の解析により、乾姜より検出したピーク A は hexahydrocurcumin である可能性が高いことが示された。しかしながら、データベース検索によって基原植物と分子式が一致する化合物がヒットしただけでは化合物の同定としては不十分だと考えられる。同一分子式から考えうる化学構造は複数存在するため、化学構造の情報に基づく検証は同定結果の信頼性の向上に必要不可欠である。

2-2 MS/MS スペクトルの解析

未知化合物の同定において標準品との比較は最も信頼性の高い手法の一つであるが、すべての化合物について標準品を入手できるわけではない。そこで、マススペクトルライブラリーの活用や MS/MS フラグメンテーションの解析が高い信頼性で化合物を同定するために必要な情報を得るのに有用である。有償のスペクトルライブラリーとしては NIST20 が頻用されており、無償で利用できるものには MassBank²⁾ などがある。また、高分解能質量分析計では MS/MS スペクトルで観測されるプロダクトイオンも精密質量データとして取得できるため、分子式情報に基づいた MS/MS フラグメンテーションの解析により化合物の詳細な構造推定が可能となる。

今回ピーク A は data dependent MS² 測定にて Higher energy collisional dissociation (HCD) による MS/MS スペクトルを取得した (図 1B)。プロトン付加分子および脱プロトン分子をプリカーサーイオンとして取得された MS/MS スペクトルは MassBank に登録されている hexahydrocurcumin のスペクトルとよく一致した。また、プロダクトイオンの分子式より推定した MS/MS フラグメンテーション経路 (図 1C) は、hexahydrocurcumin の化学構造と矛盾していないことを確認することができ、ピーク A の同定結果の妥当性が確認された。

2-3 生薬成分解析における分子ネットワーク解析の有用性

一方、成分解析を行うなかで検出されたすべてのピークが上述のように運よく同定ができるわけではない。これまで天然物として報告されている化合物の数と、データベースに MS/MS スペクトルが登録されている化

Application of High-performance Liquid Chromatography-Fourier Transform Mass Spectrometer in the Analysis of Crude Drugs.

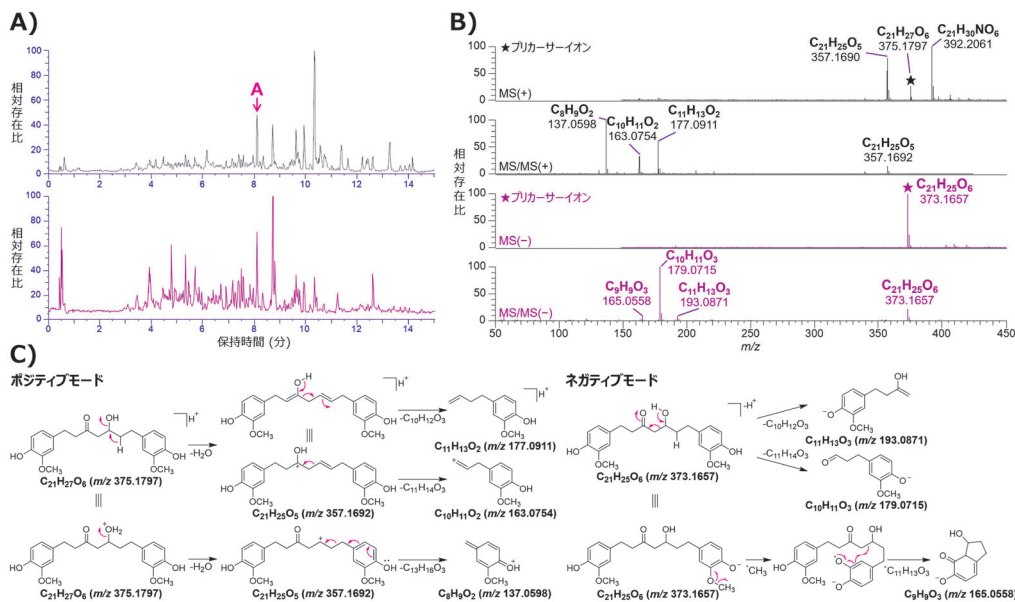


図1 乾姜の質量分析データの解析

A) 乾姜のトータルイオンクロマトグラム, B) ピークAのマスおよびMS/MSスペクトル, C) MS/MSフラグメンテーション経路

化合物の数には大きなギャップがある³⁾. そのため、生薬のような多成分系の分析では検出した多くのピークは高い信頼性の同定を行うことができないことが課題である。これに対して近年では分子ネットワーク解析 (Molecular Networking) が注目されており、質量分析データの分子ネットワーク解析ができるプラットフォームとして Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)⁴⁾ がよく知られている。分子ネットワーク解析は、MS/MS スペクトルの類似性によりクラスタリングしたネットワークを可視化することで、構造的に類似した化合物の検出や新規化合物の探索を容易にする。これを活用することで、データベースやMS/MSフラグメンテーション解析により同定したピークの情報から、同定できなかったピークの部分構造を推定することができ、成分解析のヒントを得ることができる。

3 おわりに

本稿では、生薬の成分分析における FT 型質量分析計の有用性について実際の解析手順とともに紹介した。質量分析計を用いた生薬成分解析には同じ質量をもつ異性体の解析の難易度が高いことがいまだ課題として残されている。構造異性体は MS/MS フラグメンテーションの違いを分析できる場合もあるが、立体異性体同士は保持時間が異なる以外に区別することは難しい。しかしながら、LC-MS による高感度・高分解能・高精度で網羅的な成分分析が可能になったことにより、生薬成分分析は大きく進歩したといえる。生薬・漢方薬の品質向上はもちろんのこと、これまで明らかにされていない生薬の有効成分の解明や生薬からの新たな生物活性物質の発見につながる事が期待される。

文 献

- 1) F. M. Afendi, T. Okada, M. Yamazaki, A. Hirai-Morita, Y. Nakamura, K. Nakamura, S. Ikeda, H. Takahashi, M. Altaf-Ul-Amin, L. K. Darusman, K. Saito, S. Kanaya : *Plant Cell Physiol.*, **53**, e1 (2012).
- 2) H. Horai, M. Arita, S. Kanaya, Y. Nihei, T. Ikeda, K. Suwa, Y. Ojima, K. Tanaka, S. Tanaka, K. Aoshima, Y. Oda, Y. Kakazu, M. Kusano, T. Tohge, F. Matsuda, Y. Sawada, M. Y. Hirai, H. Nakanishi, K. Ikeda, N. Akimoto, T. Maoka, H. Takahashi, T. Ara, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, S. Neumann, T. Iida, K. Tanaka, K. Funatsu, F. Matsuura, T. Soga, R. Taguchi,

- K. Saito, T. Nishioka : *J. Mass Spectrom.*, **45**, 703 (2010).
- 3) H. Tsugawa : *Curr. Opin. Biotechnol.*, **54**, 10 (2018).
- 4) M. Wang, J. J. Carver, V. V. Phelan, L. M. Sanchez, N. Garg, Y. Peng, D. D. Nguyen, J. Watrous, C. A. K. T. Luzzatto-Knaan, C. Porto, A. Bouslimani, A. V. Melnik, M. J. Mechan, W. T. Liu, M. Crüsemann, P. D. Boudreau, E. Esquenazi, M. Sandoval-Calderón, R. D. Kersten, L. A. Pace, R. A. Quinn, K. R. Duncan, C. C. Hsu., D. J. Floros, R. G. Gavilan, K. Kleigrew, T. Northen, R. J. Dutton, D. Parrot, E. E. Carlson, B. Aigle, C. F. Michelsen, L. Jelsbak, C. Sohlenkamp, P. Pevzner, A. Edlund, J. McLean, J. Piel, B. T. Murphy, L. Gerwick, C. C. Liaw, Y. L. Yang, H. U. Humpf, M. Maansson, R. A. Keyzers, A. C. Sims, A. R. Johnson, A. M. Sidebottom, B. E. Sedio, A. Klitgaard, C. B. Larson, C. A. Boya P., D. Torres-Mendoza, D. J. Gonzalez, D. B. Silva, L. M. Marques, D. P. Demarque, E. Pociute, E. C. O'Neill, E. Briand, E. J. N. Helfrich, E. A. Granatosky, E. Glukhov, F. Ryyffel, H. Houson, H. Mohimani, J. J. Kharbush, Y. Zeng, J. A. Vorholt, K. L. Kurita, P. Charusanti, K. L. McPhail, K. F. Nielsen, L. Vuong, M. Elfeki, M. F. Traxler, N. Engene, N. Koyama, O. B. Vining, R. Baric, R. R. Silva, S. J. Mascuch, S. Tomasi, S. Jenkins, V. Macherla, T. Hoffman, V. Agarwal, P. G. Williams, J. Dai, R. Neupane, J. Gurr, A. M. C. Rodríguez, A. Lamsa, C. Zhang, K. Dorrestein, B. M. Duggan, J. Almaliti, P. M. Allard, P. Phapale, L. F. Nothias, T. Alexandrov, M. Litaudon, J. L. Wolfender, J. E. Kyle, T. O. Metz, T. Peryea, D. T. Nguyen, D. VanLeer, P. Shinn, A. Jadhav, R. Müller, K. M. Waters, W. Shi, X. Liu, L. Zhang, R. Knight, P. R. Jensen, B. O. Palsson, K. Pogliano, R. G. Lington, M. Gutiérrez, N. P. Lopes, W. H. Gerwick, B. S. Moore, P. C. Dorrestein, N. Bandeira : *Nat. Biotechnol.*, **34**, 828 (2016).



大月興春 (Kouharu Otsuki)

東邦大学薬学部生薬学教室 (〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1)。東邦大学大学院薬学研究科博士課程中退。学士(薬学)、薬剤師免許。《現在の研究テーマ》ジンチョウゲ科植物由来の抗 HIV 活性ジテルペノイドに関する成分研究。《趣味》料理、DIY。

E-mail : kouharu.otsuki@phar.toho-u.ac.jp