

とう いくたく
氏 名 董 昱卓

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 434 号

学位授与年月日 令和 5 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目
NMR メタボローム法の確立と応用：
芍薬と骨碎補の品質標準化を目指した成分分析
(Establishment and application of NMR Metabolome method:
Component analysis for quality standardization of Peony Root and
Drynariae Rhizoma)

論文審査委員
(主査) 教授 森田 洋行
(副査) 教授 矢倉 隆之
(副査) 教授 庄司 翼 (指導教員)

学位論文題目 NMR メタボローム法の確立と応用：芍薬と骨碎補の品質標準化を目指した成分分析
課程・専攻名 博士後期課程 薬科学専攻 氏 名：董 昱卓

生薬の品質は、基原、産地、野生・栽培、生育環境、加工・調製法などの違いにより、含有成分の組成や含量が変化する。従って、成分化学的な見地から生薬の品質評価を行うためには、含有成分を客観的、網羅的に評価することが重要である。しかし、これまでの HPLC 法や LC-MS 法は測定対象の化合物を限定したターゲット分析法であり、それらの分析データと多変量解析を組み合わせたメタボローム解析は、複数の要因による成分の変動を網羅的に捉えることは困難なことがある。近年、ノンターゲット分析である ^1H NMR 法によるメタボローム解析が、分析時間を短縮でき、有機溶媒が少量ですむ分析法として注目されている。しかし、これまでの ^1H NMR 法を用いたメタボローム解析は、用いるデータの取扱に統一性がなく、同一の基準のもとで行われていない。そのため、最適な方法論の確立が必要である。

本研究では、NMR データによるメタボローム法の確立と芍薬及び骨碎補の品質標準化を目的として、各生薬の市場流通品とそれらの基原植物を材料に、 ^1H NMR による成分プロファイリングと多変量解析に用いるデータの処理法の最適化を検討した。

1) NMR メタボローム法の確立：芍薬の成分プロファイリングと多変量解析^[1]

芍薬は鎮痙薬とされ、その基原としてボタン科の *Paenonia lactiflora* Pallas の根が第十八改正日本薬局方に規定されている。日本では、加工方法の異なる 3 種類（真芍、生干芍薬、皮付き芍薬）の芍薬が市場に流通している。一方、中国では、芍薬は鎮痙薬とされる白芍と活血薬とされる赤芍に区別され、中華人民共和国薬典では白芍は *P. lactiflora* の根を湯通した後、皮取り加工したもの、赤芍は *P. lactiflora* 又は *P. veitchii* Lynch の乾燥した根と規定されている。当研究室では、芍薬の標準化を目的とした従来法による二次代謝産物の定量分析とブランド芍薬の開発研究を行ってきたが、 ^1H NMR メタボローム分析は行われていない。

中国と日本で収集した *P. lactiflora* を基原とする白芍 10 検体、日本産芍薬 9 検体、中国産芍薬 5 検体、赤芍 7 検体、及び *P. veitchii* を基原とする赤芍 5 検体の計 36 検体の 75% EtOH エキスを調製した。次いで、内標準物質である DSS- d_6 を加えた DMSO- d_6 に溶解した各エキスの NMR スペクトルを測定し、先行研究において芍薬に含まれていることが確認されている 27 種類の標準化合物についてスペクトルを比較することで成分プロファイリングを行った。その結果、albiflorin (4)、paeoniflorin (6)、benzoylpaeoniflorin (9)、galloylpaeoniflorin (11)、oxypaeoniflorin (13)、1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (18)、catechin (19)、benzoic acid (21)、gallic acid (22)、sulfonated paeoniflorin (25)、sucrose (26)、及び D-glucose (27) が芍薬エキスを検出できることを確認した (Figs. 1, 2)。また、本方法を用いることで、多くの中国産白芍エキスを、硫黄燻蒸加工で生じる特徴的な 25 を検出することができた。 ^1H NMR を用いた成分プロファイリング法は、硫黄燻蒸した白芍の効率的

な識別方法となり得るものと考えられた。

次に、**4**、**6**、**18**、**25**、**26** に特徴的なプロトンシグナルと benzoyl 基に由来するプロトンシグナルの積分値をもとに、各化合物と総 monoterpene 類の含量を qHNMR 法で定量した (Fig. 3a)。その結果、白芍については **26** の含量が低かったことから、加工法の影響が示唆された。そこで、*P. lactiflora* の栽培品種「梵天」の根の加工調製品 12 検体について qHNMR 法により **26** を定量した結果 (Fig. 3b)、白芍と同様に根を収穫後、湯通し加工処理を行うと **26** の含量が低くなることになり、加工法によって **26** の含量が変化することを明らかにした。また、1 ヶ月間の低温処理で **26** の含量が増加すること、及び **26** の含量と 75% EtOH エキス含量に正の相関があることが判明した。

多変量解析を行うにあたり、測定法の違い (¹H NMR と qHNMR)、前処理法 (規格化方法、糖由来のシグナル除外の有無) の違いが解析結果へ及ぼす影響を比較検討した。その結果、qHNMR 法により測定したスペクトルを用い、内標準物質のシグナルの積分値をもとに各シグナルのバケット積分値を規格化する方法が解析に適していることを見いだした。また、微量に含まれる化合物の違いを検討する場合は、多量に含まれる **26** などの糖由来のシグナルを除外した方が良いと考えられた。この最適化した方法で得たデータを用いて多変量解析を行った結果、*P. lactiflora* を基原とする日本産芍薬と中国産芍薬の区別には **18**、**22**、**26** の蓄積が寄与することがわかった (Fig. 4)。また、**6** を含む monoterpeneoid 類の蓄積は *P. lactiflora* を基原とする赤芍の区別の、**18** と **22** の蓄積は *P. veitchii* を基原とするものの区別の指標になることを見いだした (Fig. 5)。この結果は、qHNMR 法や HPLC 法による定量結果と矛盾がなく、本研究で確立した NMR 法を用いたメタボローム解析法の妥当性を確認できた。

2) NMR メタボローム法の応用：骨碎補の成分プロファイリングと多変量解析^[2]

骨碎補は接骨、止痛、強壮薬などとして使用される。近年では、その水エキスに記憶障害改善作用が報告されるに至り、骨碎補はさらに注目されるようになってきている。その基原は *Drynaria roosii* Nakaike (= *D. fortunei* J. Smith) の根茎とされ、局外生規 2022 に記載されている。一方、中国では、本種だけでなく、*Araiostegia divaricata* Blume var. *formosana* M. Kato (= *Davallia formosana* Hayata) などの根茎も骨碎補として流通しており、さらには、未修治品のほかにも、砂炒り加工が施された修治品も市場に流通している。骨碎補はすべてが中国からの輸入品であり、日本で使用する際には混乱が予想される。本章では、遺伝子解析により同定した骨碎補市場品について、qHNMR 法と HPLC 法による定量分析、及び前章において最適化した NMR メタボローム解析を行った。

D. roosii、*A. divaricata* var. *formosana*、*Araiostegiella perdurans* M. Kato et Tsutsumi などを基原とする中国及び日本市場品 39 検体、*D. roosii* 4 検体の根茎を用いて 50% MeOH エキスを調製し、DSS-*d*₆ を内標準物質として加えた CD₃OD 溶媒中で NMR スペクトルを測定した。市販の naringin (**28**)、protocatechuic acid (**32**)、5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (**38**)、**26**、**27**、と *D. roosii* に由来する市場品より単離した化合物 neoeriocitrin (**29**)、5,7-dihydroxychromone-7-O-neohesperidoside (**30**)、caffeic acid 4-O-β-D-glucoside (**31**)、trans-*p*-coumaric acid 4-O-β-D-glucoside (**33**)、ferulic acid

4-O-β-D-glucopyranoside (34)、kaempferol 3-O-α-L-rhamnoside 7-O-β-D-glucoside (35)、及び *A. divaricata* var. *formosana* に由来する市場品より単離した(-)-epicatechin 3-O-β-D-allopyranoside (37) (Fig. 6) のスペクトルとの比較を行った。さらに、検出した化合物の一部について、qHNMR 法で 28、29、26、27 を、また HPLC 法で 28–33、35、37 を定量した (Fig. 7)。その結果、*D. roosii* を基原とする骨碎補には、二次代謝産物の 28、29、30、31、32、33、35 が検出され、主要化合物の 28 (0.93–9.86mg/g) と 29 (0.74–7.59mg/g)、その他 30 (0.05–2.48mg/g)、31 (0.27–2.51mg/g)、33 (0.14–1.26mg/g)、35 (0.04–0.52mg/g) の含量が高いことが確認された。また、*D. roosii* を基原とする骨碎補の修治品の多くに、38 が検出された。これらの修治品は、未修治品と同様の成分組成をもつ Type I と、32 以外の上記成分を含まない Type II に分けることができ、修治品の Type II では 32 (0.84–1.32mg/g) の含量が高いことがわかった。一方、*A. divaricata* var. *formosana* を基原とする骨碎補では、28 と 29 は検出されないが、37 (1.44–11.49 mg/g) の含量は高いことがわかった。次に、前章で確立した最適な方法を用いて、各骨碎補の NMR スペクトルに基づく主成分分析を行った (Fig. 8)。その結果、骨碎補市場品は基原植物と修治法の違いにより、正しく区別された。植物材料の *D. roosii* とこれを基原とする市場品は、28、29、及び 26 の蓄積により区別された。また *A. divaricata* var. *formosana* を基原とする市場品の区別には 37 の蓄積が寄与した。これらの結果は、HPLC データを用いた多変量解析とも矛盾しなかった。以上の結果から、*D. roosii* 以外を基原とする骨碎補及び *D. roosii* 基原であっても修治品の Type II は正品の骨碎補の代替になり得ないことが示唆された。

まとめ

本研究は、生薬成分の網羅的な解析と同時に、定量が可能な NMR 法を導入し、品質評価、標準化に応用することを目的として研究を進めた。芍薬の研究では、NMR データを多変量解析に用いる際に、スペクトルデータの取扱法の最適化を行った。さらに、この最適化した方法を用いて、芍薬及び骨碎補の多変量解析を行うことで、基原、産地、加工（修治）方法の異なる各種生薬の成分的な特徴を明らかにするとともに、HPLC 法との比較検討を行い、NMR 法を用いたメタボローム法の妥当性を確認した。本手法は、二次代謝産物だけでなく、従来法の HPLC 法では同時分析が困難な一次代謝産物をも同時に解析することが可能であった。本研究で確立した手法は他の生薬にも応用可能であり、生薬の品質評価・標準化研究への展開が期待される。

References

1. Dong YZ, Toume K, Zhu S, Shi YH, Tamura T, Yoshimatsu K, Komatsu K (2023) Metabolomics analysis of peony root using NMR spectroscopy and impact of the preprocessing method for NMR data in multivariate analysis. *J Nat Med.* <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01721-x>
2. Dong YZ, Toume K, Kimijima S, Zhang HP, Zhu S, He YM, Cai SQ, Maruyama T, Komatsu K (2023) Metabolite profiling of *Drynariae Rhizoma* using ¹H NMR and HPLC coupled with multivariate statistical analysis. *J Nat Med.* <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01726-6>

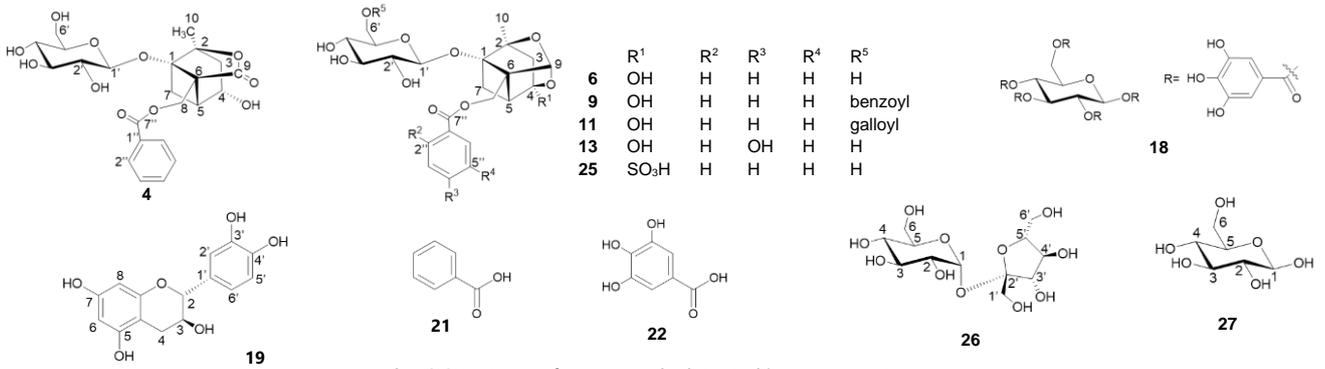


Fig. 1 Structures of compounds detected in peony root

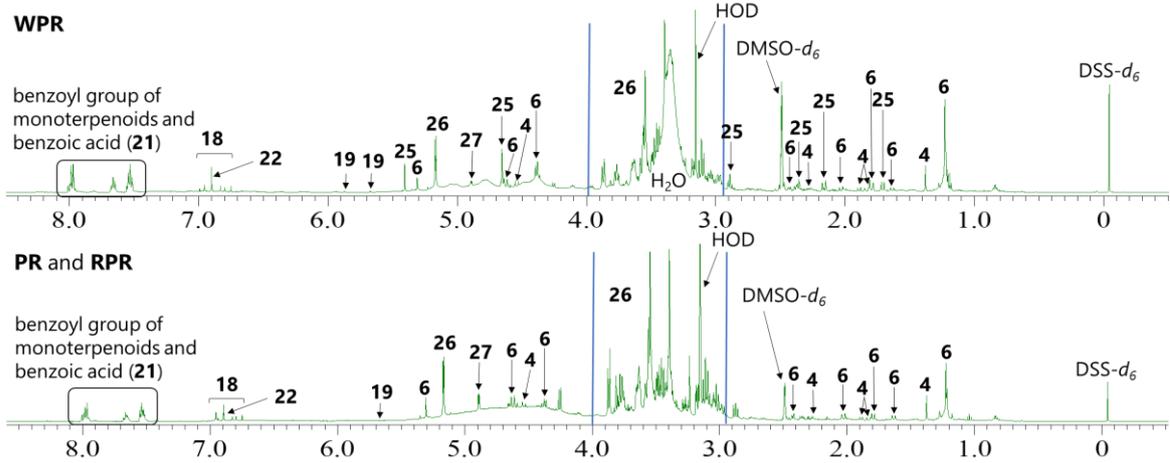


Fig. 2 Representative ¹H NMR spectra of peony root samples. WPR, PR, and RPR indicates white peony root, peony root, and red peony root, respectively.

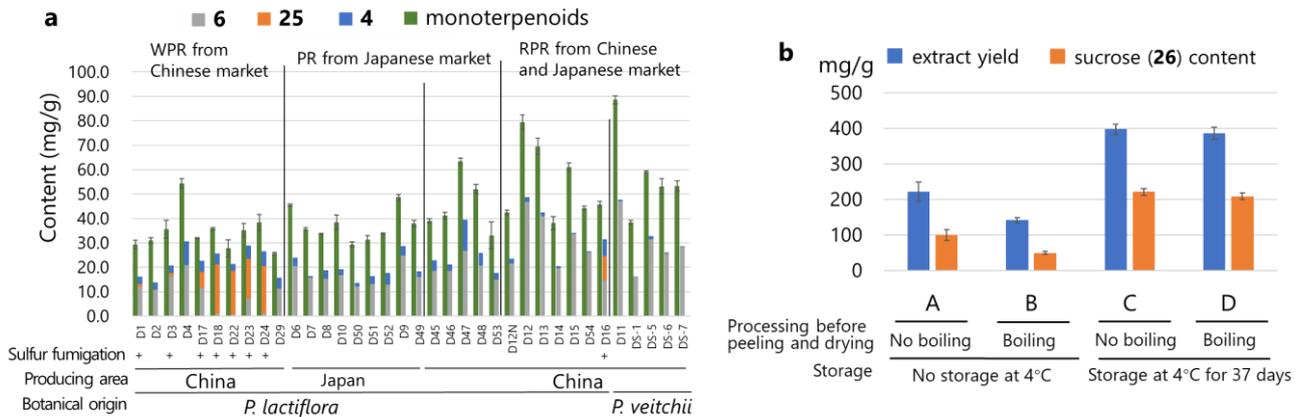


Fig. 3 Quantitative results of peony root using qHNMR. **a**: The contents of paeoniflorin (**6**), sulfonated paeoniflorin (**25**), and albilflorin (**4**), and total content of monoterpenoids (signals: δ_H 7.59 to 7.40 ppm) in different types of peony root samples; and **b**: 75% Ethanol extract yields and sucrose (**26**) contents of plant samples treated with four different processing methods.

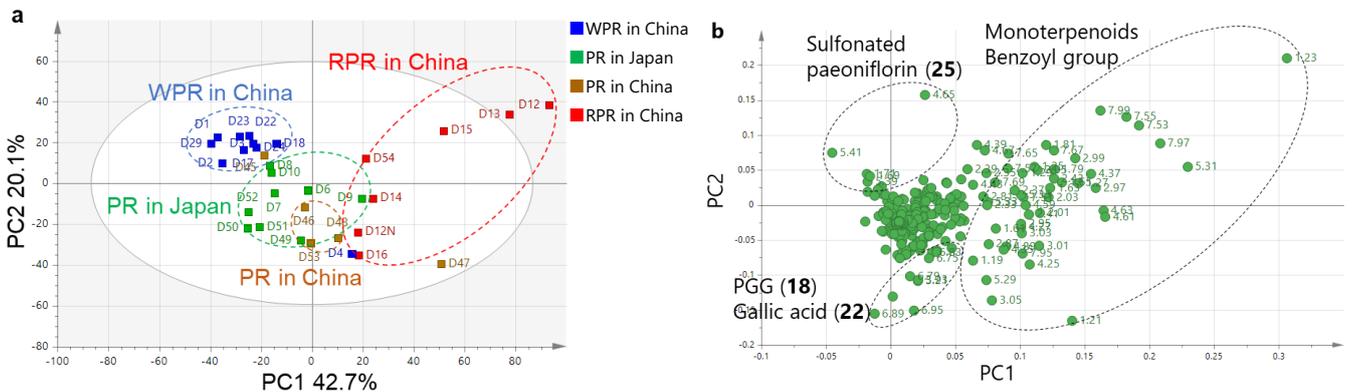


Fig. 4 PCA result of 31 peony root samples derived from *P. lactiflora* using data matrix created by optimum method. **a**, score plot: the numbers indicate code no. of samples; and **b**, loading plot: the numerals indicate chemical shift (δ_H in ppm).

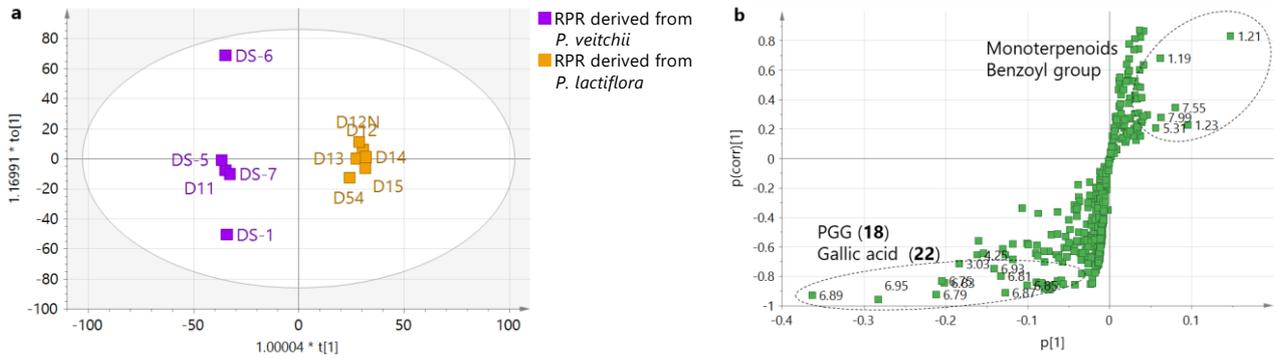


Fig. 5 OPLS-DA result of 11 RPR samples derived from *P. lactiflora* and *P. veitchii* using data matrix created by optimum method. **a**, score plot: the numbers indicate code no. of samples; and **b** s-plot: the numerals indicate chemical shift (δ_H in ppm).

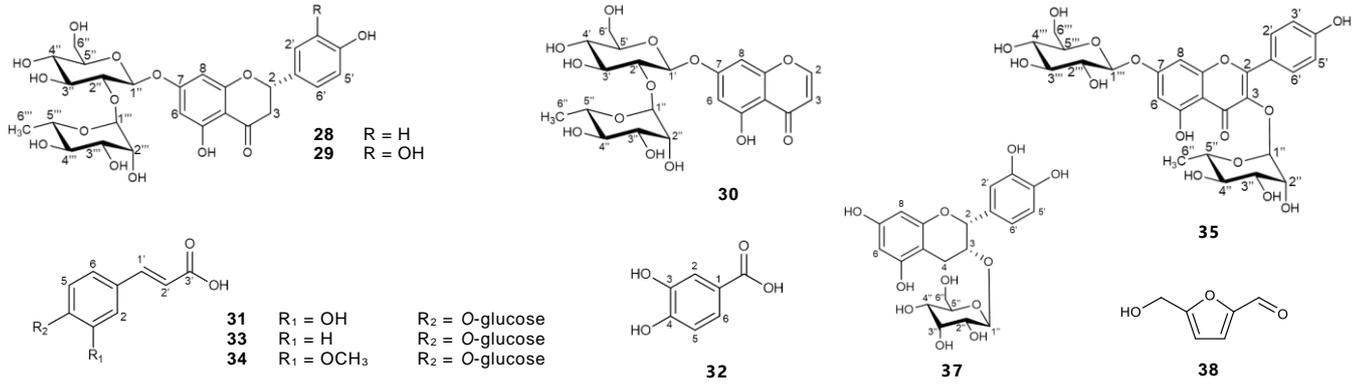


Fig. 6 Structures of compounds detected in *Drynariae Rhizoma*

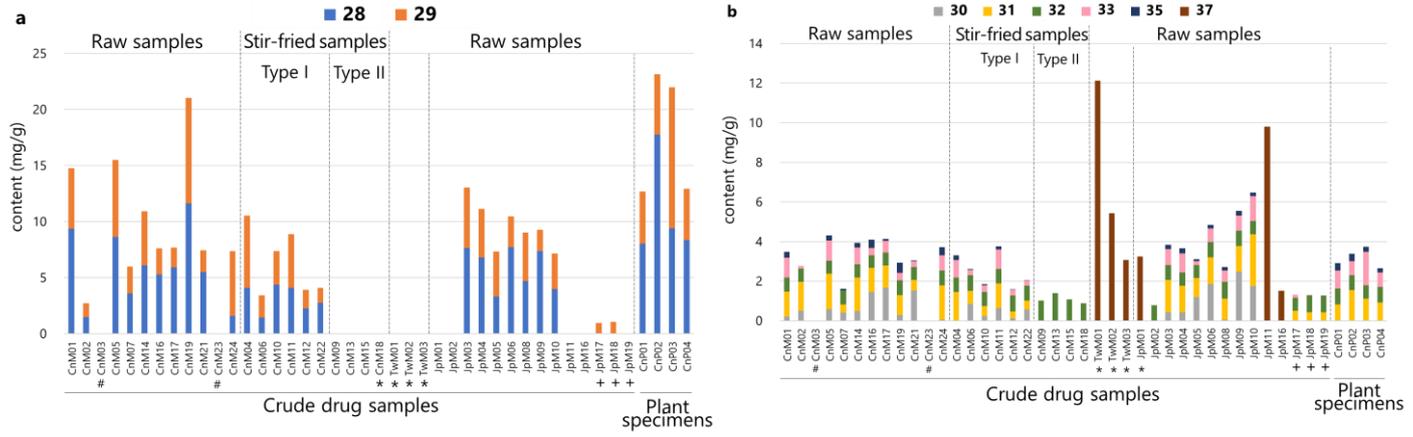


Fig. 7 Quantitative results of *Drynariae Rhizoma* samples derived from different origins or plants. Unmarked samples derived from *D. roosii*; #, samples derived from *Araiostegiella perdurans* or mixture containing *Araiostegiella perdurans*; *, samples derived from *A. divaricata* var. *formosana* or mixture of *D. roosii* and *A. divaricata* var. *formosana*; +, samples derived from *Drynaria* sp. **a**, contents of **28** and **29** quantified by qHNMR; and **b**, contents of compounds **30–33**, **35**, and **37** quantified by HPLC.

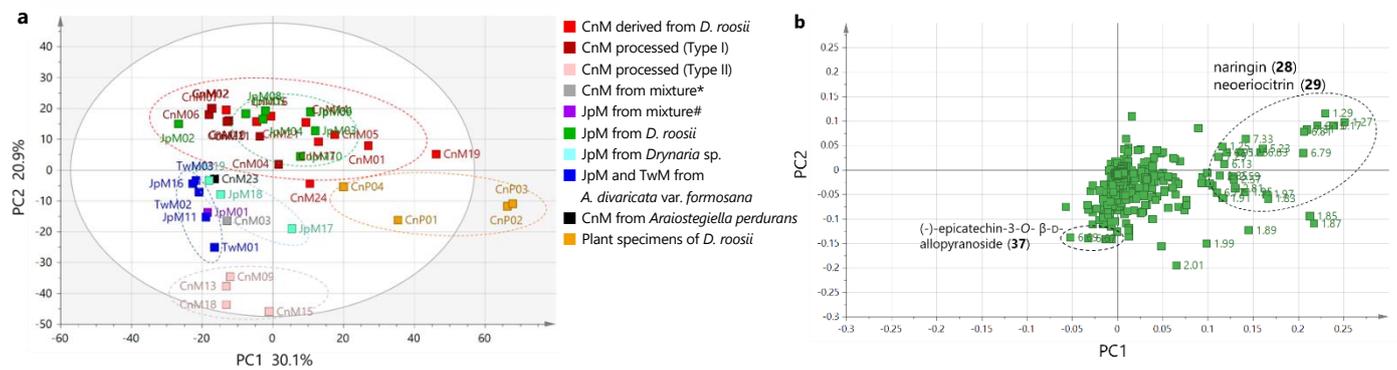


Fig. 8 PCA result of *Drynariae Rhizoma* samples using qHNMR spectra, and data matrix was created by optimum method. **a**, score plot: code no. of samples; and **b**, loading plot: numerals indicate chemical shift (δ_H in ppm). *, mixture of *Araiostegiella perdurans* and *Selliguea* sp.; and #, mixture of *D. roosii* and *A. divaricata* var. *formosana*. ($R^2X = 0.668$, $Q^2 = 0.490$)

学位論文審査の要旨

【学位申請者氏名】 董 昱卓

【学位論文題目】

NMRメタボローム法の確立と応用：芍薬と骨碎補の品質標準化を目指した成分分析
(Establishment and application of NMR Metabolome method: Component analysis for quality standardization of Peony Root and Drynariae Rhizoma)

【学位論文審査委員】	職名	氏名
(主査)	教授	森田 洋行
(副査)	教授	矢倉 隆之
(副査)	教授	庄司 翼

【判定】 合格

【審査の要旨 (2 ページ以内)】

生薬は、その基原、産地、生育環境、加工・調製法などにより成分組成や含量が変化するため、品質が一定ではない。よって、生薬の品質を評価するためには、含有成分を客観的かつ網羅的に分析することが必要である。生薬の品質評価法として、最近では、¹H NMR法を用いたメタボローム解析が注目されている。これは分析時間が他と比較して短く、少量の有機溶媒でも分析可能なことに由来する。しかし、¹H NMR法を用いたメタボローム解析においては、多変量解析に至るまでの手法が統一化されていない。董氏は、芍薬と骨碎補の市場流通品とそれらの基原植物について、¹H NMRによる成分プロファイリングと多変量解析に用いるデータの処理法を検討することで、その手法を最適化し、両生薬の品質標準化に資する評価法を確立した。本研究に関する内容の骨子と審査結果は、下記に示すとおりである。

1) NMRメタボローム法の確立：芍薬の成分プロファイリングと多変量解析

芍薬は鎮痙薬として用いられる生薬である。日本薬局方においてその基原はボタン科の *Paeonia lactiflora* Pallasの根と規定され、市場には加工方法の異なる3種類（真芍、生干芍薬、皮付き芍薬）が流通している。一方、中国では芍薬は鎮痙薬とされる白芍と活血薬とされる赤芍に区別され、中華人民共和国薬典では白芍は *P. lactiflora* の根を湯通し後に皮去り加工したもの、赤芍は *P. lactiflora* 又は *P. veitchii* Lynchの乾燥した根と規定されている。これまでに、従来法による芍薬の二次代謝産物の定量分析とブランド芍薬の開発研究は行われているが、¹H NMRメタボローム分析は行われていない。

学位申請者は、中国と日本で収集した *P. lactiflora* を基原とする白芍、日本産芍薬、中国産芍薬、赤芍、及び *P. veitchii* を基原とする赤芍の計36検体の75% EtOHエキスを調製し、各エキスをDSS-*d*₆入りDMSO-*d*₆に溶解させNMRスペクトルを測定することで、成分プロファイリングを行った。その結果、albiflorin (4), paeoniflorin (6), 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose (18), gallic acid (22), sulfonated paeoniflorin (25), sucrose (26), 及びD-glucose (27)などを検出できた。また、本手法を用いることで、硫黄燻蒸加工で生じる特徴的な25が多く中国産白芍エキスに含有されていることを明らかにした。これにより、¹H NMRを用いた成分プロファイリング法は、硫黄燻蒸した白芍の効率的な識別方法となり得ることを示した。

学位申請者は、次に、定量¹H NMR (qHNMR)法で主要成分を定量した。その結果、白芍では26の含量が低く、加工法の影響が示唆された。そこで、*P. lactiflora*の栽培品種「梵天」の根の加工品について検討したところ、収穫後に湯通しし、皮去り加工した検体は、白芍と同様に、26の含量が低いことが観測された。これにより、白芍は、加工法によって、26の含量が変化することを見いだした。さ

らに、多変量解析を行う際のNMR測定法や前処理法などを検討した結果、qHNMR法で測定したスペクトルを用い、かつ内標準物質のシグナルの積分値をもとに各シグナルのバケット積分値を規格化する方法が解析に適していることを明らかにした。また、微量に含まれる化合物の違いを検討する場合は、多量に含まれる**26**などの糖由来のシグナルを除外した方が良いことを明らかにした。そこで、この最適化した方法で多変量解析を行った結果、*P. lactiflora*を基原とする日本産芍薬と中国産芍薬の区別には、**18**, **22**, **26**の蓄積を指標として用いることが妥当であることを示した。また、赤芍においては、**6**を含むmonoterpenoid類の蓄積が*P. lactiflora*を基原とするものの判別の、一方、**18**, **22**の蓄積は*P. veitchii*を基原とするものの判別の指標になり得ることを明らかにした。この結果は、qHNMR法やHPLC法による定量結果と矛盾がなく、本研究で確立したNMR法を用いたメタボローム解析が芍薬の成分プロファイリングに有用であることを示した。

2) NMRメタボローム法の応用：骨碎補の成分プロファイリングと多変量解析

骨碎補は接骨、止痛、強壯薬などとして使用され、近年ではその水エキスの記憶障害改善作用にも注目が集まっている。その基原は*Drynaria roosii* Nakaike (= *D. fortunei* J. Smith) の根茎とされ、局外生規2022に記載されている。一方、中国では、本種以外の同属植物などの根茎も骨碎補として流通しており、さらには砂炒り加工が施された修治品も流通している。骨碎補はすべて中国からの輸入品であるため、日本で使用するには混乱が予想される。そこで、学位申請者は、遺伝子解析により同定した*D. roosii*, *Araiostegia divaricata* Blume var. *formosana* M. Kato (= *Davallia formosana* Hayata), *Araiostegiella perdurans* M. Kato et Tsutsumiなどを基原とする中国及び日本市場品、*D. roosii*の根茎の50% MeOHエキスを調製し、それらについて、qHNMR法とHPLC法による定量分析、及び前章において最適化したNMRメタボローム解析を行った。まず、DSS-*d*₆入りCD₃OD溶媒中で各試料のNMRスペクトルを測定した結果、*D. roosii*を基原とする骨碎補の修治品の多くに5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF, **38**)が検出されること、また、これらの修治品は、未修治品と同様の成分組成をもつType Iとprotocatechuic acid (**32**)以外の成分を含まないType IIに分けられ、Type IIでは**32**の含量が高いことを明らかにした。一方、*A. divaricata* var. *formosana*を基原とする骨碎補では、naringin (**28**)とneoeriocitrin (**29**)は検出されず、(-)-epicatechin 3-*O*-β-D-allopyranoside (**37**)の含量が高いことを示した。次に、前章で確立した最適な方法を用いて各骨碎補のNMRスペクトルに基づく主成分分析を行った結果、本手法により骨碎補の基原植物と修治法の違いを正しく区別できることを明らかにした。植物材料の*D. roosii*とこれを基原とする市場品は、**28**, **29**, 及び**26**の蓄積により区別できた。また*A. divaricata* var. *formosana*を基原とする市場品の区別には**37**の蓄積が最も有効な指標であることを見出した。これらの結果はHPLCデータを用いた多変量解析とも矛盾しなかった。以上の結果は、*D. roosii*以外を基原とする骨碎補、また*D. roosii*基原であっても修治品のType IIが正品の骨碎補の代替になり得ないことを示唆するものであり、骨碎補の適正使用に対して科学的知見を与えたと言える。

以上のように、董昱卓氏は、多変量解析に用いるNMRデータの取得・処理法の最適化を行い、その最適化した方法を用いることで、基原、産地、加工（修治）方法の異なる芍薬と骨碎補の成分的な特徴を明らかにした。董氏が新たに確立した本手法は、二次代謝産物だけでなく、従来のHPLC法では同時分析が困難であった一次代謝産物をも同時に解析することができる利点を併せもつ。また、本研究で確立した手法は生薬全般の成分プロファイリングにも応用可能であり、これまで困難であった生薬の品質評価及び標準化を容易にすることが期待され、生薬学領域における貢献度は極めて高いと言える。

主査及び副査は、学位論文内容と面接試験を通して、学位申請者 董昱卓氏に、博士（薬科学）の学位を授与するに十分に値すると判定した。

【学位論文のもとになる論文 著者名, 論文題目, 掲載誌名, 巻, 最初の頁と最後の頁, 年を記載】

1. Dong YZ, Toume K, Zhu S, Shi YH, Tamura T, Yoshimatsu K, Komatsu K (2023) Metabolomics analysis of peony root using NMR spectroscopy and impact of the preprocessing method for NMR data in multivariate analysis. J Nat Med. <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01721-x>
2. Dong YZ, Toume K, Kimijima S, Zhang HP, Zhu S, He YM, Cai SQ, Maruyama T, Komatsu K (2023) Metabolite profiling of *Drynariae Rhizoma* using ¹H NMR and HPLC coupled with multivariate statistical analysis. J Nat Med. <https://doi.org/10.1007/s11418-023-01726-6>