

## 令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 LC/MS メタボロームを用いたバクモンドウの品質多様性評価\*2

吉富 太一\*1, 丸山 卓郎\*1, #

Quality Evaluation of Ophiopogon Root Based on LC/MS Metabolome

Taichi YOSHITOMI \*1 and Takuro MARUYAMA \*1, #

### Summary

JP18 stipulates *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler as the botanical origin for Ophiopogon Root. Although *O. japonicus* sensu lato (s.l.) includes *O. japonicus* s.s., *O. ohwii* (Nagaba-janohige) and *O. chekiangensis* (Sekko-ryunohige), the quality variation of the crude drugs derived from the different species is unclear. In this study, we analyzed the chemical profiles of the crude drugs derived from each species by using LC/MS and applied multivariate analysis to the obtained data to estimate the chemical diversity of Ophiopogon Root.

Principle components analysis (PCA) of the LC/MS data revealed that the crude drugs derived from each species have distinct chemical compositions. However, the profiles of the marketed products originated from *O. japonicus* s.s. were similar to those of *O. chekiangensis*. These results suggest environmental factors such as cultivation method and cultivation area have more influence on the chemical profile of the crude drug than genetic factors.

A PCA loading plot indicated that each species contains characteristic steroidal saponins. Although homoisoflavones are also major secondary metabolites in Ophiopogon Root, only two compounds were detected in *O. ohwii*. There appear to be differences among the plant species in the relative contents of steroidal saponins and homoisoflavones.

Next, in order to focus on homoisoflavones, we removed signals with  $m/z$  450 and more from the data matrix to exclude steroidal saponins, which have a larger molecular weight. In the PCA score plot, each species formed a distinct group, similarly to the result in the case of PCA of all data. However, in this analysis many homoisoflavones were observed as characteristic compounds in each group.

In conclusion, Ophiopogon Root from *O. japonicus* s.l. could have various chemical profiles in terms of steroidal saponin and homoisoflavone compositions due to intraspecies variation. However, the chemical diversity is not large, and environmental factors have more influence than genetic factors.

### Key words

Ophiopogon Root, *Ophiopogon japonicus* sensu lato, LC/MS metabolome, Steroidal saponin, homoisoflavone

\*1 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan

\*2 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

# 責任著者 Corresponding author

## 1 緒言

バクモンドウは、日本薬局方収載生薬の一つであり、鎮咳目的に汎用される麦門冬湯など、多数の漢方処方用に使われる重要生薬である。第十八改正日本薬局方では、バクモンドウの基原をジャノヒゲ *Ophiopogon japonicus* の根の膨大部と規定しているが、原植物であるジャノヒゲには、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲなど、分類学者によっては、ジャノヒゲとは、別種あるいは変種として扱われる植物がある。

これらの植物は、狭義のジャノヒゲとは、葉身の形状や地下茎の有無などに違いがあるが、薬用部位である根の膨大部の成分とこれらの狭義の分類との相関関係については、明らかにされていない。そこで本研究では、バクモンドウの品質標準化を最終目的に、同一条件で栽培されたジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲからバクモンドウを調製し、LC/MSメタボロームによる成分組成解析を行った。

## 2 研究方法

### 2.1 実験材料

北里大学薬学部附属薬用植物園で栽培されたジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲ（基原不明4検体含む）の地下部を収穫し、水洗した後、根の膨大部のみを切り出し、実験材料とした。別に日本及び台湾の市場で購入した市場品11検体を加え、計36検体を用いた。試料の詳細は、Table 1に示した。

### 2.2 LC/MS分析

#### 2.2.1 試料溶液の調製

各検体50mgにメタノール1mLを加えて30分間、振とう抽出し、遠心分離後、上清を回収した。このものをメンブランフィルター（PALL Japan, Acrodisc MS, 0.2 $\mu$ m）でろ過し、試料溶液とした。

#### 2.2.2 分析条件

装置はLC部に Ultimate 3000 HPLC system（Thermo Fisher Scientific）を、MS検出器に Orbitrap Q-Exactive（Thermo Fisher Scientific）を用

Table 1 Details of Ophiopogon Root Used in This Study

Sample no.	種名（狭義）/品名	採集地/購入地	Sample no.	種名（狭義）/品名	採集地/購入地
OJ-1		あきる野市	OJ-124	セッコウリュウノヒゲ	山科植物資料館
OJ-3		横須賀市	OJ-125	セッコウリュウノヒゲ	山科植物資料館
OJ-5		東京都薬用植物園	OJ-126	セッコウリュウノヒゲ	北里大薬用植物園
OJ-6		北里大学薬用植物園	OJ-128	セッコウリュウノヒゲ	北里大薬用植物園
OJ-11	ナガバジャノヒゲ	秦野市	OJ-131	セッコウリュウノヒゲ	都薬用植物園
OJ-16	ナガバジャノヒゲ	秦野市	OJ-132	セッコウジャノヒゲ	都薬用植物園
OJ-28	ナガバジャノヒゲ	あきる野市	OJ-138	セッコウリュウノヒゲ	岡山大薬用植物園
OJ-29	ナガバジャノヒゲ	あきる野市	OJ-NIHS-001	バクモンドウ	国内市場
OJ-32	ナガバジャノヒゲ	あきる野市	OJ-NIHS-002	バクモンドウ	国内市場
OJ-33	ナガバジャノヒゲ	あきる野市	OJ-NIHS-004	バクモンドウ	国内市場
OJ-118	ナガバジャノヒゲ	相模原市	OJ-NIHS-005	バクモンドウ	国内市場
OJ-119	ナガバジャノヒゲ	相模原市	OJ-NIHS-006	バクモンドウ	国内市場
OJ-43	ジャノヒゲ	さいたま市	OJ-NIHS-007	バクモンドウ	国内市場
OJ-44	ジャノヒゲ	さいたま市	OJ-NIHS-008	バクモンドウ	国内市場
OJ-77	ジャノヒゲ	横須賀市	OJ-NIHS-009	バクモンドウ	韓国市場
OJ-79	ジャノヒゲ	横須賀市	OJ-M-4	バクモンドウ	台湾市場
OJ-114	ジャノヒゲ	相模原市	OJ-M-7	バクモンドウ	国内市場
OJ-117	ジャノヒゲ	相模原市	OJ-M-8	バクモンドウ	国内市場

い、測定条件は下記の通りとした。カラム, Acquity UPLC BEH (100 mm × 2.1 mm ID, 1.8 μm; Waters); 移動相, 0.1% HCOOH in water (A) - 0.1% HCOOH in acetonitrile (B) in a gradient mode: 15% B (0-3 min) → 65 % B (12.5 min) → 95% B (20 min) → 100% B (20.01 min) → 100% B (24 min); 注入量, 2 μL; 流速, 0.45 mL/min; カラムオープン, 40°C; 検出器, PDA (200-400 nm); MS, interface, ESI positive/negative; spray voltage, scan range,  $m/z$  100-1500; mass resolution.

### 2.3 多変量解析

クロマトグラムのアライメントとピーク抽出は progenesis QI (Waters) を用いて行った。アライメントは、全検体の試料溶液を等量混合した溶液のデータをリファレンスに指定して行った。得られたデータは EZinfo (Umetrics) により、データマトリクスに変換した。データマトリクスは、全データのもの  $m/z$  450 以下のピークに限定したものの 2 種類を作成し、それぞれについて主成分分析 (PCA) を行った。

PCA は、SIMCA-14 (Umetrics) にて行い、pretreatment として pareto scaling を用い、transformation を特に設定せず実施した。寄与成分の探索はローディングプロットにより行った。

### 2.4 分類に寄与する成分の検索

Combined Chemical Dictionary (化学情報協会) を用いて *Ophiopogon* 属植物から報告されている成分を抽出し、成分名、組成式、精密質量からなる in-house library を作成した。次に、progenesis QI の identify compounds 機能を用いて、loading plot から推定された分類寄与成分に一致する質量値を持つ library 内の化合物を検索した。検索の際には、mass tolerance を 5 ppm に設定した。

## 3 結果と考察

バクモンドウ市場品、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲの代表的なクロマトグラムを Fig. 1, 2 に示した。Negative ion mode での測定データを PCA 解析した際のスコアプロット及びローディングプロットを Fig. 3 に示した。ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲは、それぞれ、独自のグループを形成した。また、市場品は、セッコウリュウノヒゲと同じグループに分類された。

同様に、Positive ion mode での測定データを PCA 解析した際のスコアプロット及びローディングプロットを Fig. 4 に示した。Positive ion mode の

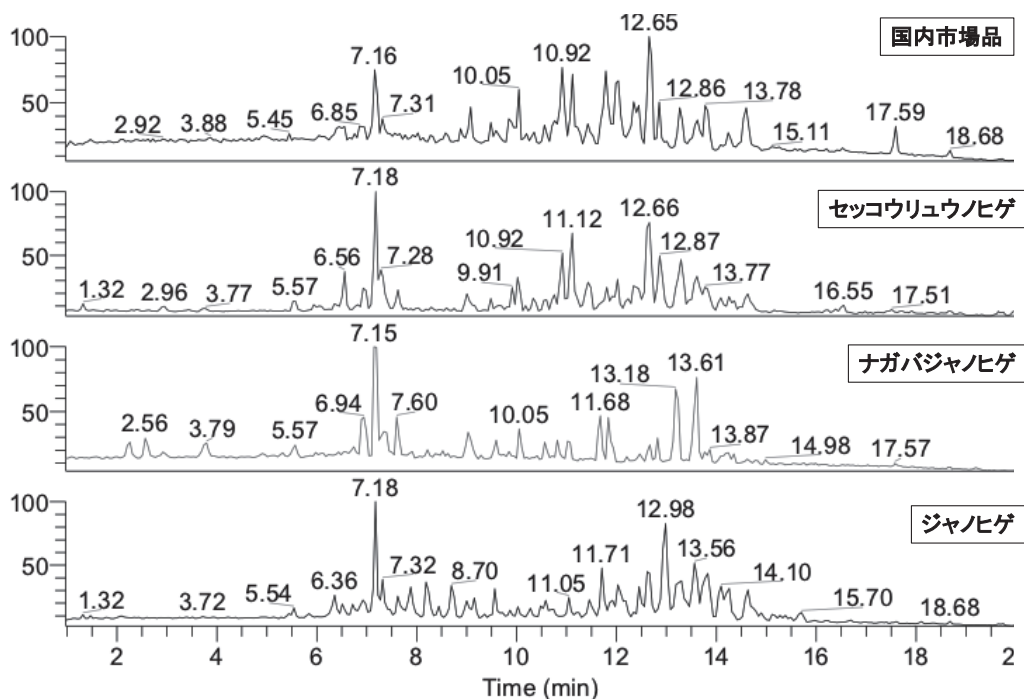


Fig. 1 Representative TIC Chromatograms on LC/MS Analysis (negative ion mode)

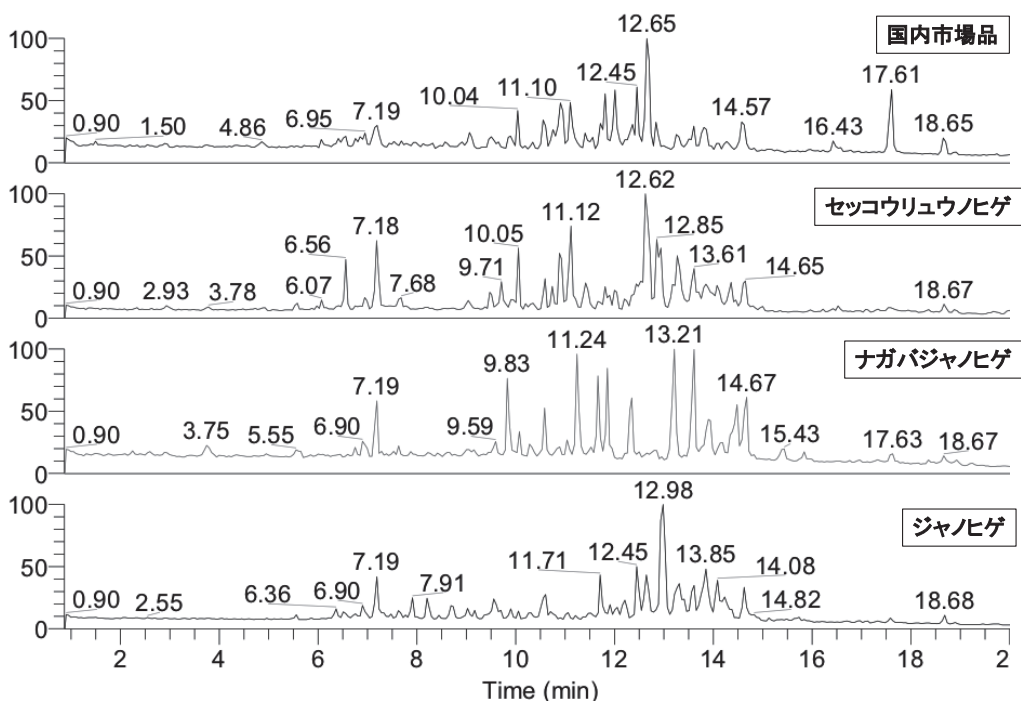


Fig. 2 Representative TIC Chromatograms on LC/MS Analysis (positive ion mode)

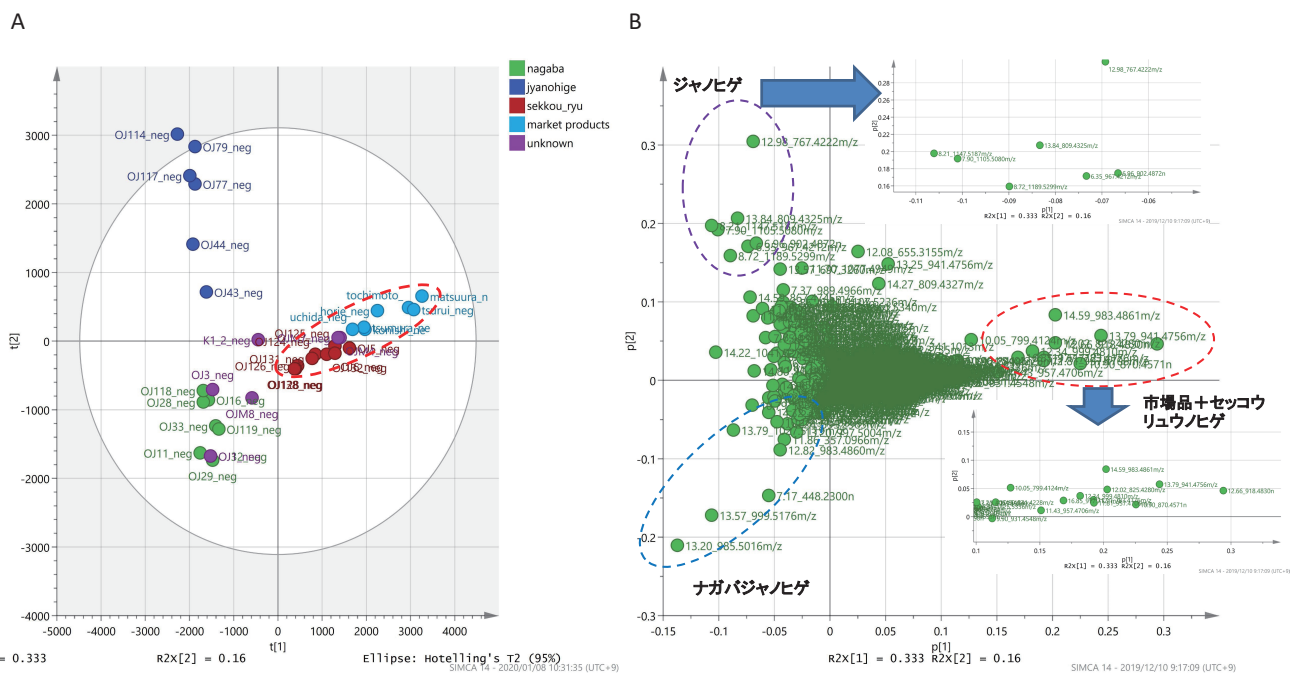


Fig. 3 Score Plot (A) and Loading Plot (B) in PCA on All Data of LC/MS Analysis (negative ion mode) for Ophiopogon Root

データを用いた場合も、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲは、独自のグループを形成し、市場品は、セッコウリュウノヒゲと同じグループに分類された。

また、基原種不明の4検体は、positive ion mode,

negative ion mode の双方において、2検体がナガバジャノヒゲと同じグループに分類され、残りの2検体は、三つのグループの中間に配置された。

これらの結果から、同じ条件で栽培されたジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲ

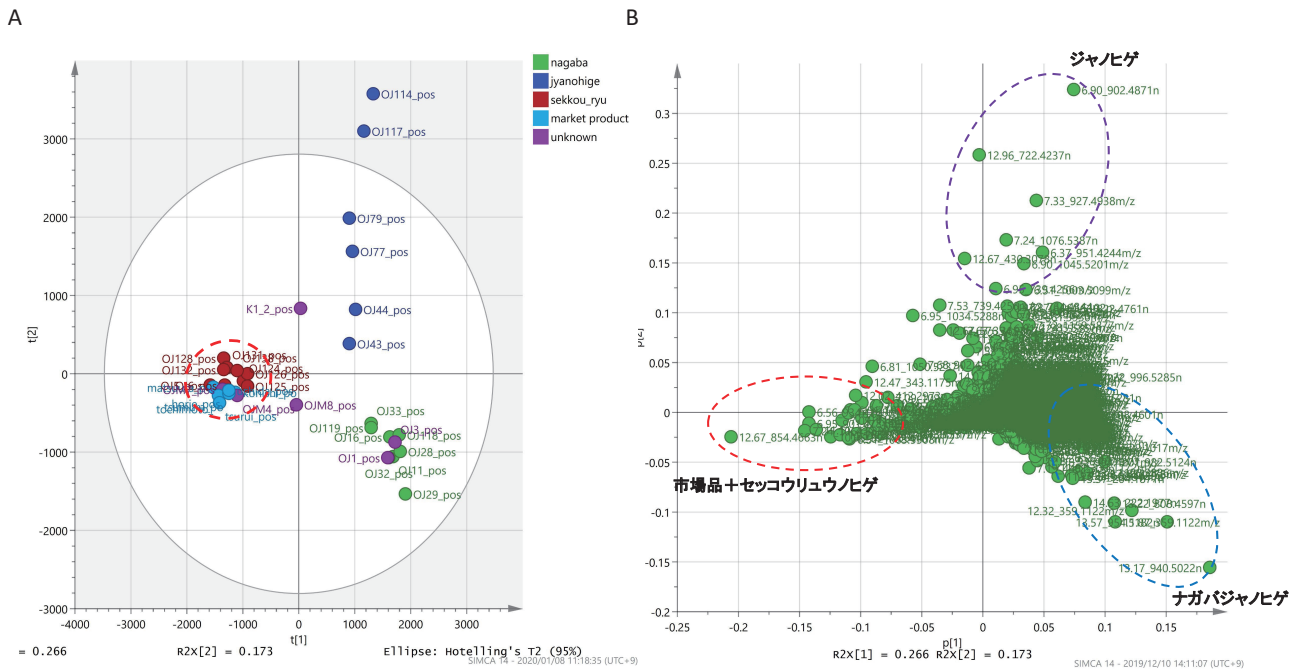


Fig. 4 Score Plot (A) and Loading Plot (B) in PCA on All Data of LC/MS Analysis (positive ion mode) for Ophiopogon Root

は、それぞれ、独自の成分組成を持つことが明らかになった。一方、現在の市場品のほとんどは、ジャノヒゲを基原とした四川省産の栽培品であり、市場品が、セッコウリュウノヒゲと同じ成分組成を示したのは意外な結果であった。一般に、生薬の品質に影響を与える因子として、遺伝的背景（基原種や品種など）、産地や栽培条件などの環境要因、加工調製法の違いが上げられる。今回、市場品を除く検体は、同一の条件で洗浄、乾燥を行っており、加工調製法の違いが原因とは考えにくい。今回の結果からは、バクモンドウの成分組成に影響を与える因子としては、栽培条件の方が、遺伝的要素の違いよりも大きいものと推定される。この点は、今後、慎重に検証が必要である。

次に、各グループの成分組成を特徴付ける成分の推定を行った。Negative ion mode, positive ion mode のデータのPCA解析におけるローディングプロットにおいて、各グループの分離に寄与していると推定された変数の推定化合物及び化合物タイプをTable 2, 3に、それぞれまとめた。また、主な推定化合物の構造をFig. 5に示した。いずれのグループも *Ophiopogon* 属植物の主二次代謝産物の一つであるステロイドサポニン類と推定される化合物群が認められた他、ナガバジャノヒゲでは、モノテルペ

ン配糖体やホモイソフラボン類と推定される化合物が認められた。

*Ophiopogon* 属植物の主二次代謝成分には、前述のステロイドサポニン類の他に、ホモイソフラボン類があるが、今回のPCA解析では、成分パターンの違いに寄与する化合物として、主にステロイドサポニン類が検出され、ホモイソフラボン類については、ナガバジャノヒゲにおいて、2化合物が検出されるのみであった。その背景として、ステロイドサポニン類とホモイソフラボン類の含量差があることが疑われた。そこで、今回の研究に使用した試料のメタノールエキスを調製し、混合物のまま<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定した結果、ステロイドサポニン類に由来するメチレン水素のシグナルに比べて、ホモイソフラボン類に由来する芳香族水素のシグナルはわずかであった(データ示さず)。このことから、全データを用いたPCAでは、量的に多いステロイドサポニンの寄与が大きく見積もられたため、各グループの特徴成分として優位に検出されたものと推定された。

次に、上記の推定を検証するため、全データのデータマトリクスから、*m/z* 450以上を持つ変数を削除し、ステロイドサポニン類の影響を排除したデータマトリクスを作成し、再度、PCAを行った。

Table 2 Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (negative mode)

No	Group*	RT	<i>m/z</i>	Putative compound	Compound type
1	J	8.21	1147.5187		
2	J	7.90	1105.5080	OJV-X	steroidal saponin
3	J	8.72	1189.5299	OJV-IX	steroidal saponin
4	J	12.98	767.4226	ophiopogonins, B, C' など	steroidal saponin
5	J	13.84	809.4325	ophiopogonin A	steroidal saponin
6	N	7.17	448.2300	borneol 7- <i>O</i> -glycoside など	monoterpene
7	N	13.20	985.5016		
8	N	13.57	999.5176	spirost-5-ene-1,3-diol glycoside など	steroidal saponin
9	N	13.79	1027.5119	ophiojaponin E	steroidal saponin
10	N	14.22	1041.5278		
11	SR	10.90	870.4571		
12	SR	11.11	783.4176		
13	SR	11.81	957.4706	ophiopo japonin A など	steroidal saponin
14	SR	12.02	825.4280		
15	SR	12.66	918.4830	ophiopo japonin B	steroidal saponin
16	SR	13.79	941.4756	ophiopogonin P, Q など	steroidal saponin
17	SR	14.59	983.4861		

\*: J, Janohige; N, Nagaba-janohige; SR, Sekko-ryunohige

Table 3 Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (positive mode)

No	Group*	RT	<i>m/z</i>	Putative compound	Compound type
1	J	6.90	902.4871		
2	J	7.24	1076.5387		
3	J	7.33	927.4938		
4	J	12.96	722.4238	ophiopogonins, B, C' など	steroidal saponin
5	N	11.87	359.1122	ophiopogonone E など	homoisoflavone
6	N	12.32	359.1122	ophiopogonone E など	homoisoflavone
7	N	13.17	940.5022		
8	N	13.57	954.5182	ophiojaponin E	steroidal saponin
9	SR	6.56	934.4768	ophiofurospiside F	steroidal saponin
10	SR	6.95	901.4784		
11	SR	7.24	1064.5388	ophiopogonin H	steroidal saponin
12	SR	10.95	394.2866		
13	SR	11.11	430.3078		
14	SR	12.67	854.4663	ophiopogonin D など	steroidal saponin

\*: J, Janohige; N, Nagaba-janohige; SR, Sekko-ryunohige

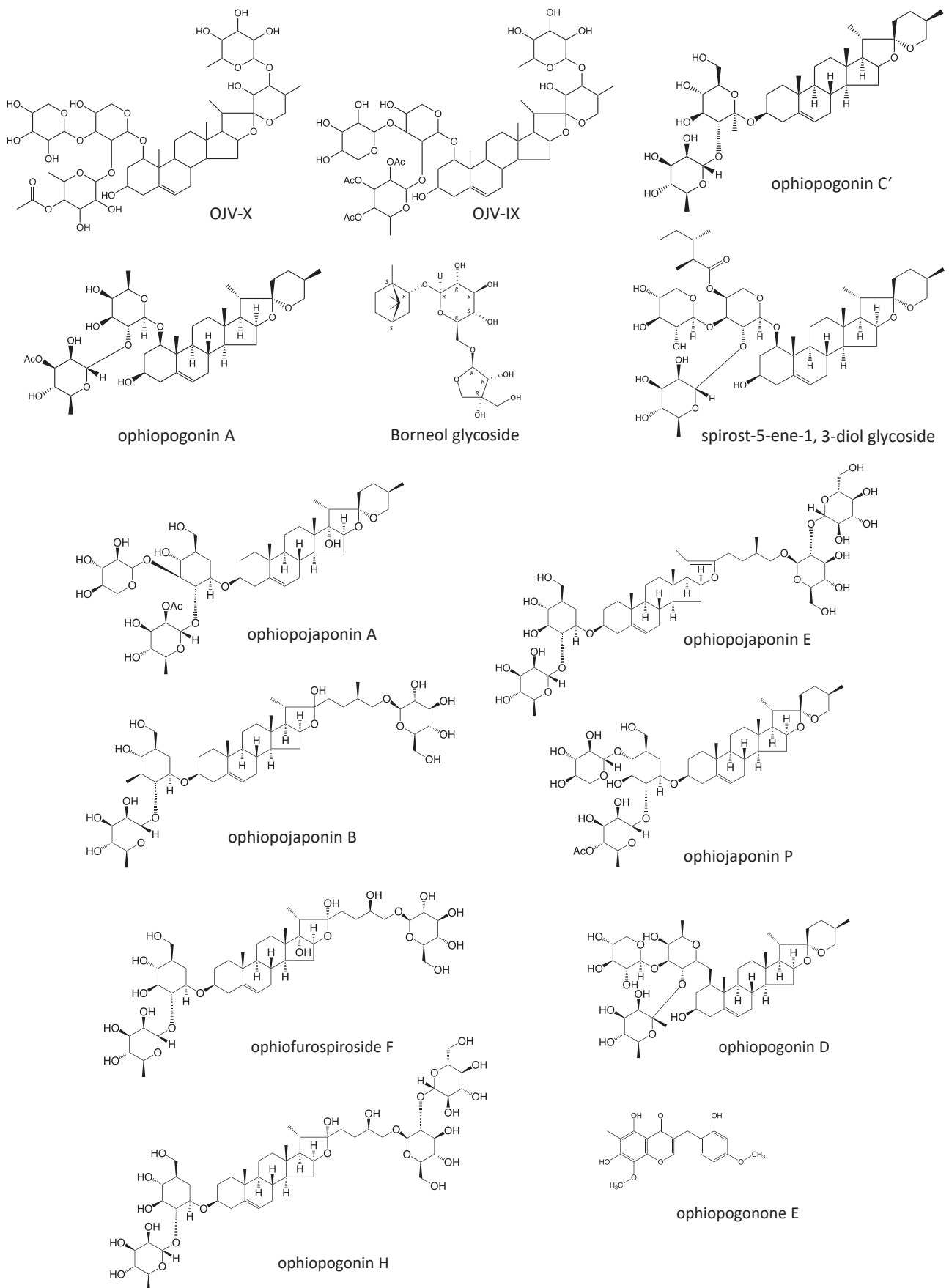


Fig. 5 Chemical Structures of Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (1)

その結果をFig. 6, 7に示した. Negative ion mode, positive ion modeのどちらも, ジャノヒゲ, ナガバジャノヒゲ, セッコウリュウノヒゲの各グループに分離する点は, 全データのPCAと変わらなかったが, ステロイドサポニン類の影響を排除した解析で

は, 市場品も独立のグループを形成した. それぞれのグループの分離に寄与している成分をローディングプロットから推定した結果を, Table 4, 5に示した. また, 主な推定化合物の構造をFig. 8に示した. 全データによる解析と異なり, ステロイドサポ

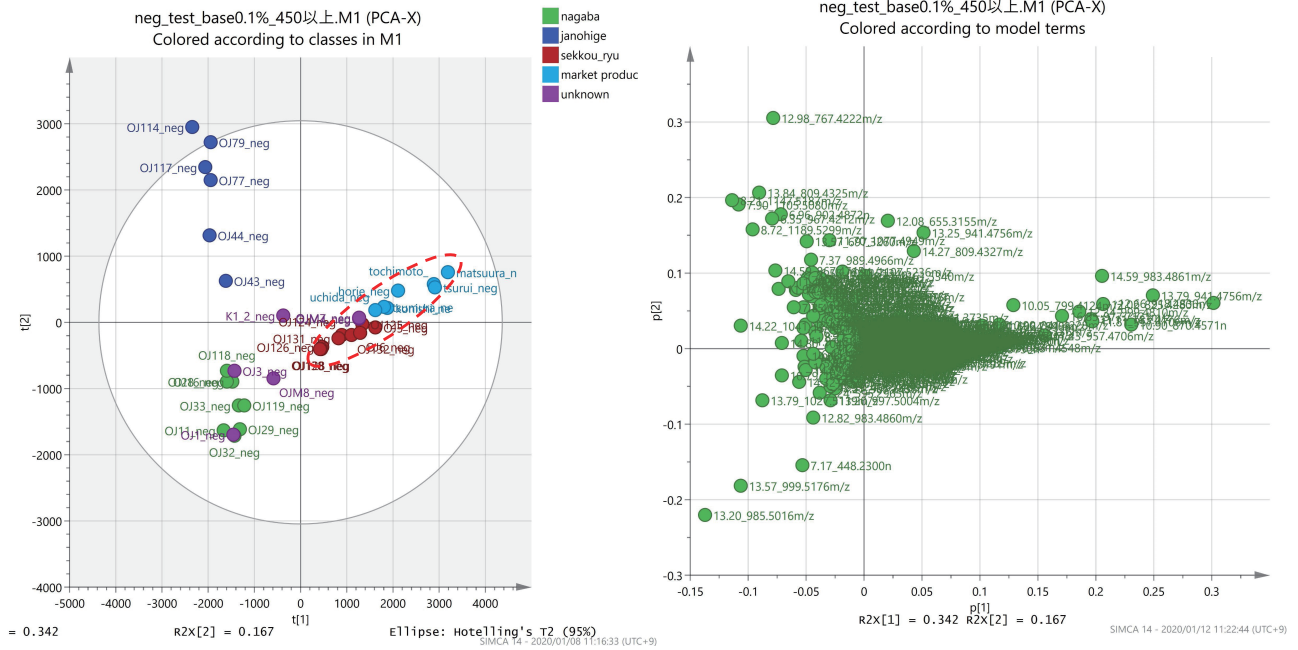


Fig. 6 Score plot (A) and loading plot (B) in PCA on the data with  $m/z$  450 and more of LC/MS analysis (negative ion mode) for Ophiopogon Root

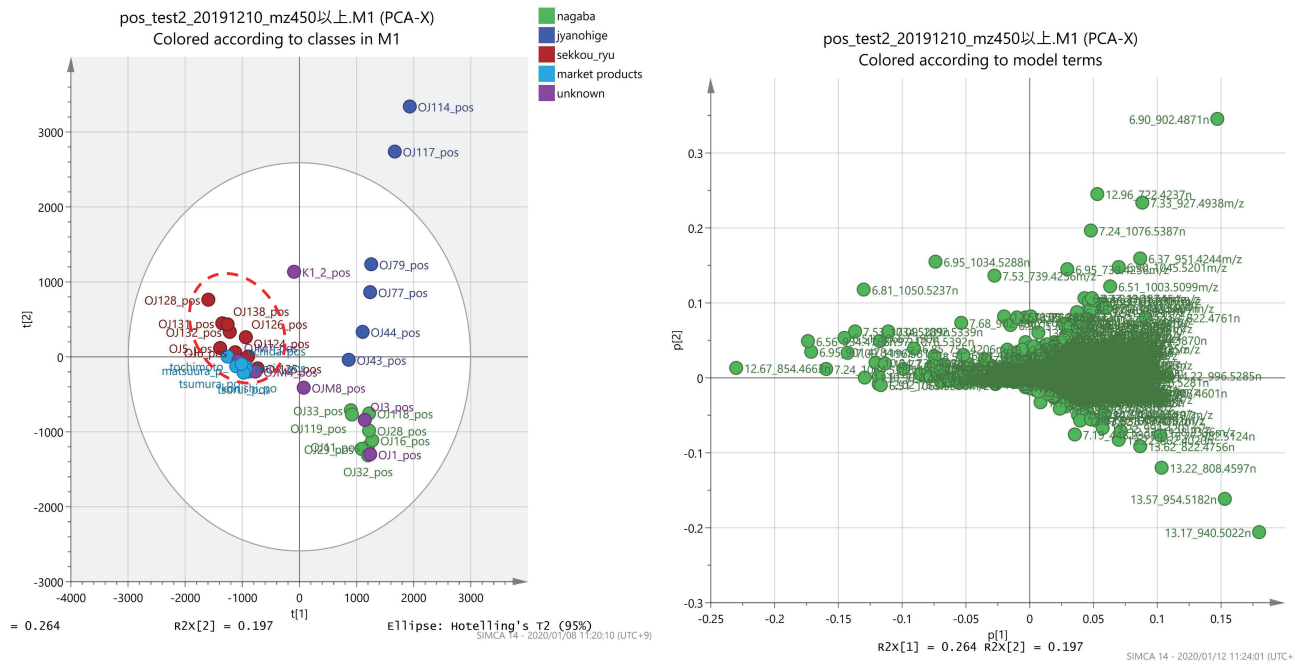


Fig. 7 Score Plot (A) and Loading Plot (B) in PCA on the Data with  $m/z$  450 and More of LC/MS Analysis (positive ion mode) for Ophiopogon Root



Table 4 Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (negative mode)

No	Group*	RT	<i>m/z</i>	Putative compound	Compound type
1	N	9.03	329.2314	3,5,7-trihydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)-6-methyl-4-chromanone など	homoisoflavone
2	N	11.86	357.0966	ophiogonone E など	homoisoflavone
3	N	10.1	343.0805	2,5,7-trihydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-6,8-dimethyl-4-chromanone など	homoisoflavone
4	N	11.7	327.0856	ophiogonone A など	homoisoflavone
5	N	9.64	329.2312	3,5,7-trihydroxy-3-(4-hydroxybenzyl)-6-methyl-4-chromanone など	homoisoflavone
6	N	7.64	361.1849		
7	SR+J	7.32	233.0835		
8	SR+J	10.58	343.1168		
9	SR+J	9.49	373.1276	ophiogonone F など	homoisoflavone
10	SR+J	14.06	355.0802	ophiogonanone C など	homoisoflavone
11	M	11.75	294.1016		
12	M	10.15	283.1352		
13	M	9.49	375.1827	ophiopogonanone G	homoisoflavone
14	M	11.91	367.1307		
15	M	12.45	341.1013	5, 8-dimethylphiopogonanone B など	homoisoflavone
16	M	10.74	359.1117	ophiogonanone E	homoisoflavone

\*: J, Janohige; N, Nagaba-janohige; SR, Sekko-ryunohige; M, market product

Table 5 Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (positive mode)

No	Group*	RT	<i>m/z</i>	Putative compound	Compound type
1	N	11.26	238.1927		
2	N	11.87	165.0542		
3	N	11.66	359.1485	ophiogonone E など	homoisoflavone
4	N	10.08	345.0965	2,5,7-trihydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-6,8-dimethyl-4-chromanone など	homoisoflavone
5	N	13.57	278.2239		
6	N	11.61	314.2685		
7	M	10.75	355.1172	ophiogonone C など	homoisoflavone
8	M	12.52	440.2061		
9	M	10.04	428.2922		
10	SR	12.22	357.1327	ophiogonanone C など	homoisoflavone
11	SR	9.89	341.1014	8-methylphiopogonanone A など	homoisoflavone
12	SR	12.96	417.3358		
13	J	12.67	394.2867		

\*: J, Janohige; N, Nagaba-janohige; SR, Sekko-ryunohige; M, market product

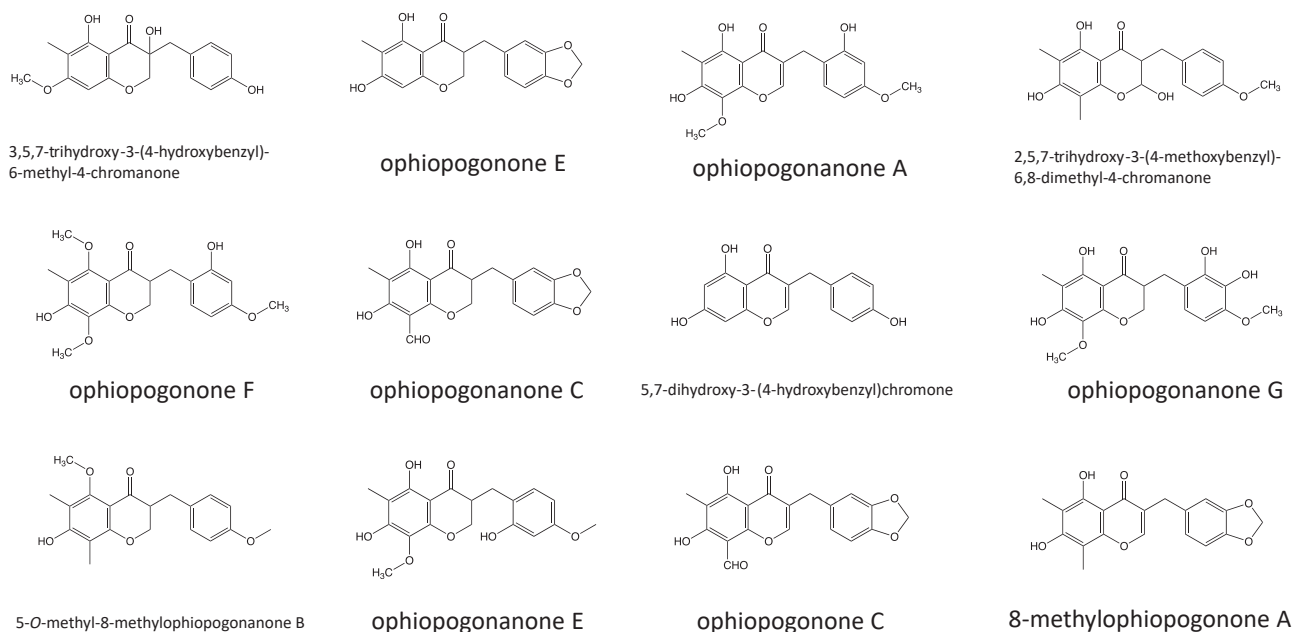


Fig. 8 Chemical Structures of Putative Compounds Responsible for the Classification of Each Group (2)

ニン類の影響が排除されたことから、主な寄与成分として、ホモイソフラボン類が検出された。このことから、ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲは、ステロイドサポニン類だけでなく、ホモイソフラボン類の組成も異なっていることが明らかになった。

一方で、市場品の成分パターンとの比較から、種（品種）の違いによる成分変化は大きいものではなく、環境要因など、他の因子によって、容易に別の種（品種）型の成分パターンを取りうる事が明らかとなった。このことから、バクモンドウの基原植物は、従来通り、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲを含む、広義のジャノヒゲとして捉えることで、特に問題はないと考えられた。

## 4 結論

ジャノヒゲ、ナガバジャノヒゲ、セッコウリュウノヒゲを基原とするバクモンドウを調製し、LC/MSメタボロームによる品質評価を行った結果、主二次代謝成分であるステロイドサポニン類やホモイソフラボン類の組成の違いに基づく、独自の成分パターンを示した。一方、ジャノヒゲを基原とする市場品の成分パターンが、セッコウリュウノヒゲと近似の成分パターンを示したことから、成分組成の決定因子としては、遺伝子型の違いよりも栽培方法などの環境因子が強いことが示唆された。