

# 液体クロマトグラフを用いた分析と DNA 塩基配列解析を併用した 植物片試料中のマオウ同定法

三枝成美 喜名啓志 米田葵 大阪由香 大坂郁恵 大村厚子 今井浩一

Identification method of Ephedra in plant samples using a combination of liquid chromatography and DNA sequence analysis

Narumi Saegusa, Keishi Kina, Aoi Yoneda, Yuka Osaka, Ikue Osaka, Atsuko Omura, Koichi Imai

## はじめに

日本薬局方においてマオウは *Ephedra sinica* Stapf, *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Meyer 又は *Ephedra equisetina* Bunge の地上茎であり、定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、総アルカロイド(エフェドリン及びプソイドエフェドリン) 0.7%以上を含むとされている<sup>1)</sup>。

また、エフェドリンは医薬品として喘息時の気管支拡張薬、鎮咳薬、昇圧薬として用いられる。一方、その他の作用として食欲不振、心拍数増加、体温上昇、発汗などがあることから、これらの作用を得るために無承認無許可医薬品としてダイエットを目的とした食品に違法に含有されることがある。このような背景から、当所ではエフェドリンを瘦身目的で使用される医薬品成分としてスクリーニング検査項目としている。

今般、当所実施した買上製品のスクリーニング検査において、1製品からエフェドリンが検出された。当該製品が植物片混合試料であったことからマオウ含有が疑われた。

一般的に、植物種同定は顕微鏡を用いて観察を行うが、操作者の知識や習熟度によって判定結果が左右されるおそれがある。また、粉末状など試料中に主要な組織が残っていない場合には、形態学的に判定を行うことができない。

そこで、本研究では植物片試料中のマオウ同定を目的とし、エフェドリン類の液体クロマトグラフを用いた分析(高速液体クロマトグラフ-タンデム四重極質量分析計(LC-MS/MS)及び高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器(LC-PDA))とDNA塩基配列解析を併用した同定法を検討した。

## 方法

### 1 試料

当所実施した買上検査においてエフェドリンが検出された1製品を試料とした。試料の顕微鏡写真を図1に示す。LC-MS/MS及びLC-PDA分析では、試料を均一にしたものを秤量し、分析に供した。DNA塩基配列解析では、日本薬局

方に記載されているマオウの性状「茎の横切面をルーペ視するとき、円形～楕円形で、周辺部は灰緑色～黄緑色を呈し、中心部は赤紫色の物質を充満するか又は中空である。節間部を折るとき、切面の周辺部は繊維性で、縦に裂けやすい<sup>1)</sup>」を参考に、マオウの疑いのある植物片を疑マオウとして選別し、それ以外の植物片混合試料を植物Aとして分析に供した。



図1 試料の顕微鏡写真

### 2 LC-MS/MS 分析及び LC-PDA 分析

#### (1) 試薬

標準品: 塩酸エフェドリン, 塩酸プソイドエフェドリン, dl-塩酸メチルエフェドリン, ノルエフェドリン塩酸塩はアルプス薬品工業社製を用いた。ギ酸(特級), ギ酸アンモニウム(特級), リン酸(HPLC用), ラウリル硫酸ナトリウム(特級), メタノール(HPLC用), アセトニトリル(HPLC用)は関東化学社製を用いた。

#### (2) 装置

LC-MS/MS: AcquityUPLC-XevoTQD (Waters 社製)

LC-PDA: NexeraX2 (島津製作所社製)

#### (3) 試料溶液の調製

試料 200 mg を 15 mL 遠沈管に採取し、メタノール 10 mL を加え 10 分間振とう, 30 分間超音波抽出した後, 2,500 rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を 0.45 μm のフィルターでろ過した。このろ液を LC-PDA 分析に供した。さらに、メタノールで 10 倍希釈した溶液を LC-MS/MS 分析に供した。

(4) 標準溶液の調製

各標準品をメタノールで希釈し 0.01, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20 µg/mL とした. このうち 0.01~1 µg/mL の標準溶液を LC-MS/MS 分析に供し, 0.2~20 µg/mL の標準溶液を LC-PDA 分析に供した.

(5) 測定条件

LC-MS/MS 分析

カラム: Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1×100 mm (Waters 社製)  
 カラム温度: 50°C  
 移動相 A: 10 mM ギ酸アンモニウム溶液 (pH3.0)  
 移動相 B: アセトニトリル  
 グラジエント (A:B): 97:3 (0 min-6 min) → 60:40 (7 min) → 10:90 (8 min-10 min) → 97:3 (11 min-14 min)  
 流量: 0.4 mL/分  
 注入量: 2.0 µL  
 分析時間: 14 分  
 キャピラリー: +0.7 kV  
 ソース温度: 150°C  
 脱溶媒ガス: 1000 L/hr (350°C)  
 コーンガス: 50 L/hr  
 MS Scan モード: *m/z* 50-650, コーン電圧 (CV) +20, 35, 50, 65 V  
 SRM モード: モニターイオン, CV, コリジョンエネルギー (CE) は表 1 のとおりとした.

表 1 SRM 測定条件

| 化合物名       | モニターイオン<br>( <i>m/z</i> ) | CV<br>(V) | CE<br>(eV) |
|------------|---------------------------|-----------|------------|
| ノルエフェドリン   | +152.16 > 134.15          | 20        | 10         |
|            | +152.16 > 117.10          | 20        | 15         |
| エフェドリン     | +166.19 > 148.18          | 20        | 10         |
|            | +166.19 > 117.10          | 20        | 20         |
| ブソイドエフェドリン | +166.19 > 148.18          | 20        | 10         |
|            | +166.19 > 117.10          | 20        | 20         |
| メチルエフェドリン  | +180.20 > 162.22          | 20        | 10         |
|            | +180.20 > 117.08          | 20        | 20         |

LC-PDA 分析

日本薬局方<sup>1)</sup> 医薬品各条におけるマオウの定量法に準じ, 以下の試験条件とした.

測定波長: 190-400 nm  
 カラム: Mightysil RP-18 5 µm 4.6 mm×150 mm (関東化学社製)  
 カラム温度: 40°C  
 移動相: ラウリル硫酸ナトリウム溶液 5 g にアセトニトリル 350 mL を加えて振り混ぜた後, 水 650 mL 及びリン酸 1 mL を加えた.  
 流速: 1.2 mL/min  
 注入量: 10 µL  
 解析波長: 210 nm

3 DNA 塩基配列解析

(1) 試薬

日本薬局方マオウはウチダ和漢薬社製を用いた. DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いた. エタノール (分子生物学用) は富士フィルム和光純薬社製を用いた. DEPC 処理水はニッポンジーン社製を用いた.

PCR 反応には DNA ポリメラーゼ: Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製), プライマー: 植物異物同定用プライマー (FASMAC 社製), カスタムプライマー (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた. 以下, 植物異物同定用プライマーを P, カスタムプライマーを C1, C2 とする.

プライマー P は植物全体で塩基配列が高度に保存されている 18S rRNA 及び 5.8S rRNA を利用し ITS1 領域を増幅するユニバーサルプライマーであり<sup>2)</sup>, 多種の植物に対応するため, 未知の植物片を含む試料の PCR 反応を確認するために用いた.

プライマー C1, C2 の配列は既報<sup>3)</sup> をもとに設計した. 各プライマーの配列を表 2, 標的とする遺伝子配列を図 2 に示した. P は ITS1 全体を, C1 及び C2 は ITS1 の起始部からそれぞれ 360, 490 bp を標的とするものであった.

表 2 カスタムプライマーの塩基配列

| プライマー名 | 塩基配列                         |
|--------|------------------------------|
| C1     | F GAC GTC GCG AGA AGT TCA TT |
|        | R GTC AAA GAC CGT CCA CGT CC |
| C2     | F GAC GTC GCG AGA AGT TCA TT |
|        | R CTA TGA TGT GCC AGG CAT CC |

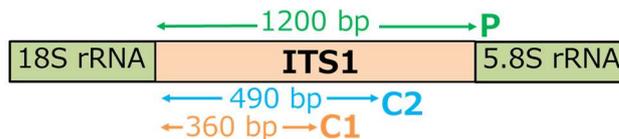


図 2 各プライマー標的の模式図

電気泳動用ゲル: Agarose S, 電気泳動用試薬: Gene Ladder Wide 1, ゲル染色液: CLEAR STAIN Blue (ニッポンジーン社製) を用いた.

PCR 産物精製には QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製), シーケンス反応には Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた.

(2) 装置

分光光度計: Biospec-nano (島津製作所社製), サーマルサイクラー: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製), 電気泳動装置: Mupid-2plus (タカラバイオ社製), 塩基配列解析装置: 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いた.

(3) DNA 抽出

日本薬局方マオウを検体 1 とした. 顕微鏡下で植物片試料から疑マオウと植物 A を選別し, それぞれ検体 2 及

び 3 とした。検体 4 は疑マオウを水中で洗浄し乾燥させた。検体 5 は日本薬局方マオウ 18 mg に植物 A 2 mg を混合した。

各検体を乳鉢・乳棒を用いて粉碎し、約 20 mg を採取した。DNA 抽出を実施した後、分光光度計で 260、280 及び 320 nm の吸光度を測定し、以下の計算式で DNA 濃度及び純度を確認した。DNA 濃度が 20 ng/μL 程度となるよう DEPC 処理水で希釈した。

$$\text{DNA 濃度 (ng/μL)} = (\text{OD } 260 - \text{OD } 320) \times 50$$

$$\text{DNA 純度} = \text{OD } 260 / \text{OD } 280$$

(4) PCR 反応

PCR 反応に供した検体とプライマーの組合せを表 3 に示す。PCR 反応液を表 4 のとおり調製し、サーマルサイクラーで遺伝子増幅を行った。サーマルサイクラーの条件は 94°C 9 分の後、96°C 1 分、58°C 1 分、72°C 5 分を 35 回繰り返し、最後に 72°C 5 分を行い、4°C でホールドした。なお、Template DNA の代わりに DEPC 処理水を加えたものを陰性コントロールとした。

表 3 検体とプライマー

| 検体 No. | 試料                  | プライマー |    |    |
|--------|---------------------|-------|----|----|
|        |                     | P     | C1 | C2 |
| 1      | 日本薬局方マオウ            | ●     | ●  | ●  |
| 2      | 疑マオウ                | ●     | ●  | ●  |
| 3      | 植物 A                | ●     | —  | —  |
| 4      | 疑マオウ (洗浄)           | ●     | —  | —  |
| 5      | 日本薬局方マオウ:植物 A (9:1) | ●     | —  | —  |

表 4 PCR 反応液組成

| 試薬                           | 最終濃度      | 添加量 (μL) |
|------------------------------|-----------|----------|
| Amplitaq Gold 360 Master Mix | 1×        | 12.5     |
| F-Primer (25 μM)             | 0.5 μM    | 0.5      |
| R-Primer (25 μM)             | 0.5 μM    | 0.5      |
| Template DNA (20 ng/mL)      | 2.0 ng/mL | 2.5      |
| DEPC 処理水                     | —         | 9.0      |

(5) 塩基配列解析

精製した PCR 産物を用いて反応液を調製し、シーケンス反応を実施した。その後、未反応蛍光色素を除去し、塩基配列解析を行った。得られた塩基配列について DNA データベースである National Center for Biotechnology Information で BLAST 検索を実施した。

結果及び考察

1 LC-MS/MS 及び LC-PDA 分析

(1) 定性分析結果

MS Scan 分析における各標準溶液の保持時間はノルエフェドリン 3.2 分、エフェドリン 4.8 分、プソイドエフェドリン 5.4 分、メチルエフェドリン 5.9 分であった。試料溶液の MS Scan 分析の結果、エフェドリン類 4 成分が検出され、各ピークの保持時間はノルエフェドリン 3.2 分、エフェドリン 4.8 分、プソイドエフェドリン 5.3 分、メチルエフェドリン 6.0 分であり、いずれも標準溶液の保持時間に近似していた。

標準溶液及び試料溶液から得られた MS スペクトルを図 3-6 に示す。

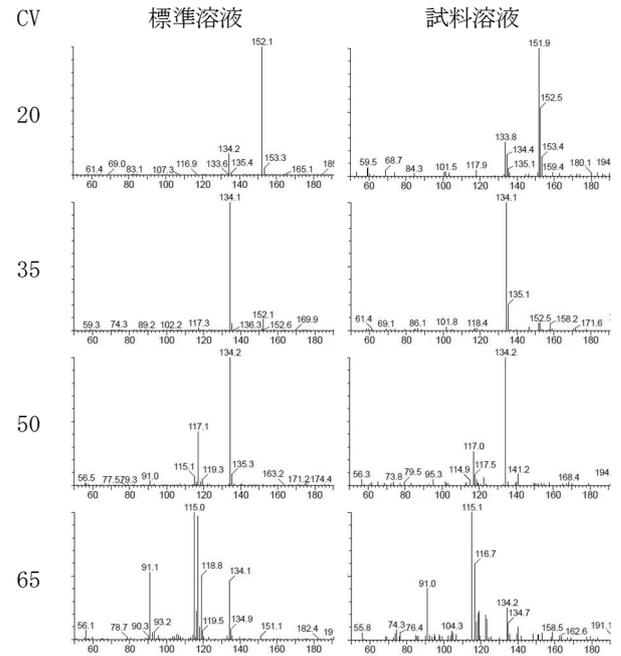


図 3 ノルエフェドリンの MS スペクトル

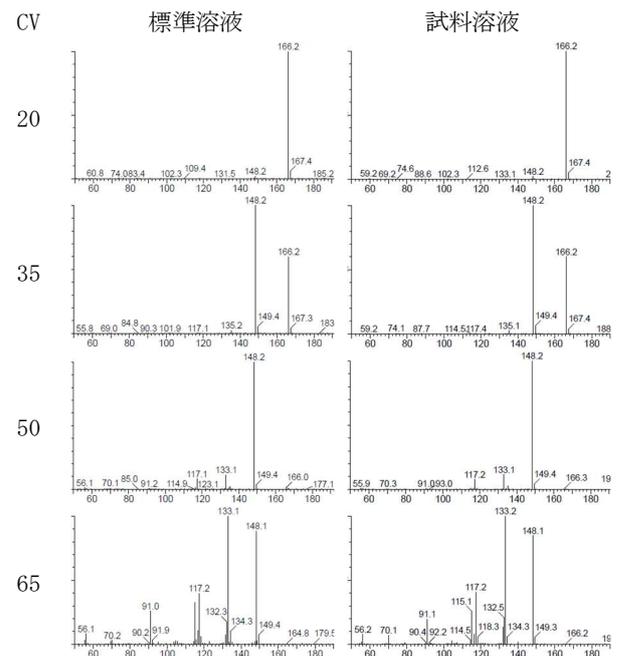


図 4 エフェドリンの MS スペクトル



表 5 定量試験結果

|            | 定量結果 (w/w%) |          |
|------------|-------------|----------|
|            | LC-PDA      | LC-MS/MS |
| ノルエフェドリン   | 0.004       | 0.004    |
| エフェドリン     | 0.13        | 0.12     |
| プソイドエフェドリン | 0.04        | 0.04     |
| メチルエフェドリン  | 0.01        | 0.01     |

LC-PDA 及び LC-MS/MS を用いた定量結果は、ほぼ等しいものとなった。また、総アルカロイド (エフェドリン及びプソイドエフェドリン) 含有量は LC-PDA を用いた定量結果では 0.17%, LC-MS/MS を用いた定量結果では 0.16% となり、日本薬局方マオウの総アルカロイドの値 (0.7%以上) を満たさなかった。これは試料が複数種の植物が混合されたものであることによると考えられる。

しかしながら、プソイドエフェドリン、ノルエフェドリン、メチルエフェドリンといったエフェドリン以外の類似成分も検出していることから、本検体で検出したエフェドリン類は加工時に添加されたものではなく、試料中にマオウが混入していたことによると推察された。

2 DNA 塩基配列解析法

(1) DNA 抽出

各検体の DNA 濃度及び純度を表 6 に示す。DNA 濃度は 17.04~66.01 ng/μL であった。DNA 純度は 1.75~1.83 で良好な結果であった。

表 6 各試料の DNA 濃度及び純度

|                | 検体 No. |       |       |       |       |
|----------------|--------|-------|-------|-------|-------|
|                | 1      | 2     | 3     | 4     | 5     |
| DNA 濃度 (ng/μL) | 66.01  | 27.77 | 36.87 | 25.84 | 17.04 |
| DNA 純度         | 1.78   | 1.83  | 1.75  | 1.76  | 1.75  |

(2) PCR 反応

各検体の PCR 産物の電気泳動結果を図 8 に示す。

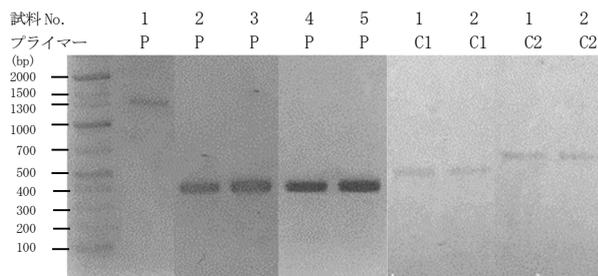


図 8 アガロースゲル電気泳動結果

プライマー C1, C2 では検体 1 及び 2 において同等の塩基長のバンドを検出したことから、両者が同一の植物種

であることが示唆された。

プライマー P を用いた PCR 産物は検体 1 で 1300 bp, 検体 2~5 では 400 bp であった。検体 2 では検体 1 と同等の長さの PCR 産物が得られると予想していたが、実際に得られた PCR 産物の塩基長は異なっていた。

検体 5 は日本薬局方マオウに植物 A を少量添加したものであり、400 bp のバンドを検出した。この結果から、試料中にマオウが単独で存在している場合には 1300 bp のバンドを検出したが、植物 A が混入した場合には、1300 bp よりも 400 bp の方が優先的に増幅されると考えられた。

検体 2 では選別した際に植物 A が混入していたことにより、同様の現象が生じたと考えられる。さらに、検体 4 では水中で洗浄をしても植物 A の混入を取り除くことができず、植物 A 由来の 400 bp のバンドが増幅したと推察された。

(3) 塩基配列解析

検体 1~3 の塩基配列解析結果を表 7 に示す。

表 7 塩基配列の相同性検索結果

| 検体 No.                | プライマー | BLAST 検索結果            | Identities                  |                             |
|-----------------------|-------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1                     | P     | <i>Ephedra sinica</i> | 880/882 (99%) (AY755749.1)  |                             |
|                       |       | <i>Ephedra sinica</i> | 276/276 (100%) (AY755749.1) |                             |
|                       | C1    | <i>Ephedra sinica</i> | 503/503 (100%) (AY755749.1) |                             |
|                       |       | <i>Ephedra sinica</i> | 504/504 (100%) (AY755749.1) |                             |
|                       | 2     | P                     | <i>Urtica dioica</i>        | 331/331 (100%) (OM892806.1) |
|                       |       | C1                    | <i>Ephedra sinica</i>       | 275/275 (100%) (AY755749.1) |
| <i>Ephedra sinica</i> |       |                       | 504/504 (100%) (AY755749.1) |                             |
| 3                     | P     | <i>Urtica dioica</i>  | 320/320 (100%) (OM892806.1) |                             |

検体 1 は全てのプライマーで *Ephedra sinica* と相同性が高かった。一方、検体 2 はプライマー C1, C2 を用いた場合には *Ephedra sinica*, プライマー P を用いた場合には *Urtica dioica* と相同性が高かった。

検体 3 も *Urtica dioica* と相同性が高かったことから、植物 A 中に *Urtica dioica* が含有されることが確認された。

*Urtica dioica* は和名ではセイヨウイラクサと呼ばれ、「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断し

ない成分本質（原材料）リスト」に分類されている<sup>4)</sup>。

ITS1 領域の塩基長は植物によって異なることから、プライマーPを用いた場合、複数種の植物が混在する検体では、ITS1 領域の短い植物の遺伝子増幅が優先し、主な PCR 産物となることが考えられる。実際に *Ephedra sinica* の ITS1 領域は約 1200 bp<sup>3)</sup>、*Urtica dioica* は約 300 bp であった。検体 2 では検体中に混入した植物種のうち、*Urtica dioica* の ITS1 領域が最も短いために、優先的に増幅が進み、主な PCR 産物となったことが推察された。

プライマーC1、C2を用いた PCR 産物の BLAST 検索結果は検体 1、2 いずれも *Ephedra sinica* と相同性が高かったことから、日局マオウと疑マオウは同一の植物種であることが示唆された。

これまでに、植物片試料からエフェドリン類を検出した事例はいくつか報告<sup>5)-7)</sup>されているが、我々の知る限り、DNA 塩基配列解析を用いてマオウを同定した報告は初めてである。

ユニバーサルプライマーは多種の植物に対応したものであり、検体中の植物種同定において有用である。しかしながら、本研究で用いた検体のように複数種の植物片が混合されている場合、得られた PCR 産物が選別した植物片に由来するものか、意図せず混入したものかを判別することは難しい。そのため、ユニバーサルプライマーとカスタムプライマーを併用して用いることにより、正確な同定が可能となると考えられる。

## まとめ

LC-MS/MS 及び LC-PDA 分析によるエフェドリン類の定性・定量分析と DNA 塩基配列解析の結果を総合的に判断することによって、試料中にマオウが含まれていることを同定することが出来た。

## 文献

- 1) 令和 3 年 6 月 7 日厚生労働省告示第 220 号，第十八改正日本薬局方
- 2) 正村典也，他：ITS1 塩基配列による植物異物同定方法の開発。分析学，Vol. 63, No. 3, 245-253, 2014
- 3) Emi Hamanaka et al: Molecular Genetic Characteristics of Nepalese Ephedra Plants (Ephedraceae) . *Journal of Japan Botany*, 86, 303-313, 2011
- 4) 昭和 46 年 6 月 1 日付 薬発第 476 号，無承認無許可医薬品の指導取締りについて
- 5) 吉村裕紀，他：指定薬物検査目的で試買した植物片製品における医薬品成分の検出事例。第 58 回全国衛生化学技術協議会年会，242-243, 2021
- 6) 富田浩嗣，他：乾燥植物片からのエフェドリンの検出事例と構成植物の推定。愛知県衛生研究所報，第 72 号，27-34, 2022

- 7) 丸山祐可，他：マオウに由来するエフェドリン類の抽出法及び LC/MS/MS 一斉分析の検討。第 60 回全国衛生化学技術協議会年会，232-233, 2023