

309	サイシン	11.8	95.9	中国遼寧省	刻み	2004	48-2555
310	サイシン	9.1	116.4	中国遼寧省	刻み	2003	48-2357
311	サイシン	12.8	99.2	中国遼寧省	刻み	2006	48-2926
312	サイシン	13.0	119.9	中国遼寧省	刻髭	2002	48-2282
313	サイシン	6.2	99.3	北鮮産	生	2002	48-2155
314	サイシン	12.1	111.2	北鮮産	生	2002	野生①
315	サイシン	9.4	115.2	北鮮産	生	2002	野生②
316	サイシン	9.5	108.6	中国遼寧省	生	2002	栽培①
317	サイシン	11.7	113.4	中国遼寧省	生	2002	栽培②
318	サイシン	13.3	107.7	北鮮産	生	1983	葉付
319	サイシン	4.9	101.0	北鮮産	生	1980	葉付
320	サイシン	10.0	100.6	北鮮産	生	1980	葉付(古いです)
424	サイシン	11.0	105.1	中国遼寧省	刻み	2010	林間栽培、09年産
441	サイシン	8.4	100.0	中国陝西省	生	2011	
733	サイシン	10.0	104.5	中国吉林省	原形		
271	トウニン	19.4	95.7	中国山西省	原形		
289	トウニン	11.7	91.1	中国四川省	生	2011	山
290	トウニン	23.8	80.0	中国四川省	生	2010	山 88-4056
291	トウニン	12.8	86.8	中国四川省	生	2010	山 88-3999
292	トウニン	17.7	102.2	中国四川省	生	2009	山 88-3899
293	トウニン	20.1	103.7	中国貴州省	生	2009	扁 88-3871
294	トウニン	17.7	105.0	中国四川省	生	2008	山 88-3546
295	トウニン	15.4	101.4	中国四川省	生	2003	山 88-2427
296	トウニン	12.4	112.0	中国貴州省	生	2003	扁 88-2362
297	トウニン	11.6	95.0	中国四川省	生	2000	山-88-1876
427	トウニン	15.2	114.1	中国山西省	原形	2010	皮去
428	トウニン	17.7	110.7	中国山西省	原形	2011	山
439	トウニン	12.2	110.8	中国陝西省	生	2009	
642	トウニン	10.2	97.1	中国山東省	刻み	2011	
731	トウニン	13.0	106.0	中国貴州省	原形		

試料濃度：100  $\mu$ g/mL

平成24年度厚生労働科学研究補助金（創薬基盤研究推進事業）  
漢方薬に使用される薬用植物の総合情報データベース構築のための  
基盤整備に関する研究（H22-創薬総合-一般-013）  
分担研究報告書

研究分担課題 成分分析データ、遺伝子鑑別情報及び漢方処方関連情報に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

LC-MS/MSを用いた成分分析プロファイルに基づく生薬の化学成分情報の  
データベース化に関する研究

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

第16改正日本薬局方において漢方処方エキスの新規品目が追加収載され、合計22処方となった。その品質を規定するために概ね3種の指標成分とその含量が定められているが、多数の天然化合物を含む漢方製剤の品質を保証するには質的に不十分と考えられる。漢方処方では、複数の生薬の組み合わせから成るため、その品質は、個々の構成生薬の品質に依存する。異なった品質の生薬を使用した場合、漢方製剤の品質も異なってくる。そこで生薬の化学成分に着目し、LC-MS/MSを用いた分析プロファイルから、生薬の化学成分情報のデータベース化を行い、品質の情報化を試みることにした。今回、繁用漢方処方であるダイオウ、サイコ及びソヨウについて、品質の情報化のために、HPLCの移動相の種類やグラジエント条件の検討、MS条件やMS/MS条件の検討及び分析時間の検討等のLC-MS/MS分析条件検討を行った。その結果、ダイオウ、サイコ及びソヨウに含まれる成分についての化学情報の集積が可能となった。

#### A. 研究目的

第15改正日本薬局方において、初めて漢方処方エキスが収載された。第16改正日本薬局方において、新規品目が追加され合計22処方となった。また、その品質を規定するために概ね3種の指標成分とその含量が定められている。しかし、多数の天然化合物を含む漢方製剤の品質を保証するには質的に不十分と考えられる。近年、漢方製剤や生薬の薬理的あるいは臨床的な研究では、試験に使用した薬剤や被験薬物の品質が厳しく問われるようになってきている。例えば生薬抽出エキスの薬理研究の場合、使用した生薬の標本の保管や生薬

エキスについての分析評価が必須条件になりつつある<sup>1)</sup>。

漢方処方では、複数の生薬の組み合わせから成るため、その品質は、個々の構成生薬の品質に依存する。異なった品質の生薬を使用した場合、漢方製剤の品質も異なってくる。そこで生薬の化学成分に着目し、LC-MS/MSを用いた分析プロファイルから、生薬の化学成分情報のデータベース化を行い、品質の情報化を試みることにした。

今回は、ダイオウ、サイコ及びソヨウを対象として試験を行った。

【ダイオウ】<sup>1-16)</sup>

日本薬局方においては、sennnoside A 含量が規定されている。その他同じdianthrone glucoside として、sennnoside B, C, D, E, F を含む。また、anthraquinone 誘導体として、rhein, aloe-emodin, emodin, physcion, chrysophanol などとそれらの配糖体を含む。さらに、stilben 配糖体、naphthalene 配糖体、chromone 類、phenylbutanone 配糖体、縮合型タンニン rhatannun 及び加水分解型タンニンとその関連成分 (gallic acid や catechin 類など) などを含む。そこで、これらの成分を含め、HPLC の移動相の種類やグラジエント条件の検討、MS 条件やMS/MS条件の検討及び分析時間の検討等を行い、データ採取条件の検討を行った。

#### 【サイコ】<sup>1,17-26)</sup>

日本薬局方においては、saikosaponin a 及び saikosaponin d 含量が規定されている。これらを含め特徴的なサイコサポニン類を含有する。そこで、これらの成分を含め、HPLCの移動相の種類やグラジエント条件の検討、MS条件やMS/MS条件の検討及び分析時間の検討等を行い、データ採取条件の検討を行った。

#### 【ソヨウ】<sup>1,27-33)</sup>

日本薬局方においては、perillaldehyde 含量が規定されている。それを含め、精油成分としてモノテルペン類を含有する。また、アントシアニン配糖体 (shisonin など)、フラボン類 (apigenin, luteorin 及びそれらの配糖体)、caffeic acid や rosmarinic acid などを含む。そこで、これらの成分を含め、HPLC の移動相の種類やグラジエント条件の検討、MS 条件や MS/MS 条件の検討及び分析時間の検討等を行い、データ採取条件の検討を行った。

## B. 研究方法

試薬・試液：アセトニトリル、メタノールは高速液体クロマトグラフィー用（関東化学）を、sennnoside A 及び sennnoside B は、EXTRASYNTHESSE S.A.製を、saikosaponin a 及び saikosaponin d は、和光純薬製を、その他の試薬は特級品を用いた。

## 1. 試験液の調製

各凍結乾燥水抽出エキスに50% (v/v) メタノール溶液を加え、1 mg/mL に調製しこれを試験液とした。

## 2. LC-PDA-MS/MS 測定

LC部にShimadzu Prominence UFLC システム（島津製作所）を配したLTQ Orbitrap 質量分析計（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

### 測定条件

#### カラム

Hypersil Gold (1.9  $\mu$ m), 2.1 x 100 mm  
(Thermo Fisher Scientific), 40°C

#### 移動相

A 液 (0.1% 酢酸溶液)

B 液 (0.1% 酢酸アセトニトリル溶液)

#### グラジエント条件

ダイオウ;

init. (% B = 0) - 30 min (% B = 70)

- 35 min (% B = 100)

サイコ;

init. (% B = 5) - 30 min (% B = 70)

- 35 min (% B = 100)

- 38 min (% B = 100)

ソヨウ;

init. (% B = 0) - 30 min (% B = 50)

- 35 min (% B = 100)

- 38 min (% B = 100)

#### 流速

0.2 mL/min

スキャン  $m/z$  範囲 : 100~2,000

質量分解能 : 30,000

プリカーサー  $m/z$  範囲 : 3.5

CID 電圧 : 35 V

キャピラリー温度 : 300°C

ESI スプレー電圧 : 4.0 kV

## C. 研究結果

図 1 にダイオウ (NIB-223) の全イオンクロマ

トグラム(TIC)を示した。日本薬局方で含量が規定される *sennoside A* は、保持時間 13.1 分付近に検出された。また、*sennoside B* は、12.2 分付近に検出された。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分を表 1 (ポジティブ) 及び表 2 (ネガティブ) に示した。また、測定データの例として、10 のピークについてのマススペクトルを図 2~11 に示した。

図 12 にサイコ (NIB-191) の TIC を示した。日本薬局方で含量が規定される *saikosaponin a* 及び *saikosaponin d* は、それぞれ保持時間 21.1 分付近及び 24.2 分付近にそれぞれ検出された。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分を表 3 に示した。また、これらのうちのピーク 5 及びピーク 9 を測定データの例として、マススペクトルを図 13 及び図 14 にそれぞれ示した。

図 16 にソヨウ (NIB-200) の TIC を示した。ソヨウの特徴的な成分である *perillaldehyde* は主なピークとしては検出されなかった。これらのクロマトグラムにおいて高い強度を示した成分を表 4 に示した。また、測定データの例として、4 ピークについてのマススペクトルを図 17~20 に示した。

## D. 考察

### 1. 分析条件

ダイオウ、サイコ及びソヨウの HPLC 条件は、グラジエント条件以外は、昨年度と同様の 0.1% 酢酸を含む水/アセトニトリル系のグラジエント条件とした。MS 条件は、昨年度と同様の条件とした。

### 2. ダイオウの分析結果

ピーク 1 のマススペクトル (図 2) は、 $m/z$  289 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、 $m/z$  245 の脱炭酸ピークを主とするスペクトルが得られた。推定組成式等から、ピーク 1 は *catechin* と推定された。ピーク 2 のマススペクトル (図 3) は、 $m/z$  289 を主とした、ピーク 1 と類似したスペクトルを示し、さらに  $m/z$  635 [M-H] が観測された。推定組成式等から、ピーク 2 は 1,2,6-trigalloylglucose と推定された。ピーク 3 のマススペクトル (図 4) は、 $m/z$  385 [M-H+CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、ベースピークとして  $m/z$  325 [M-H] のピークが観測されたほか、 $m/z$  163 の *coumaric acid* と推定されるピークが観測された。推定組成式等から、ピーク 3 は *coumaroyl glucose* と推定された。ピーク 4 のマススペクトル (図 5) は、 $m/z$  449 [M-H+CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H] を主とし、[M-H]  $m/z$  389 のピーク等が観測された。 $m/z$  449 をプリカーサーイオンとした MS/MS は、CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H と C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) とが解離した  $m/z$  227 のピークが観測された。推定組成式等から、 $m/z$  227 のピークは *resveratrol* のフラグメントピークと考えられ、ピーク 4 は *resveratrol 4'-O-Glucoside* と推定された。ピーク 5 のマススペクトル (図 6) は  $m/z$  445 [M-H] を主とするスペクトルであった。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) が脱離した  $m/z$  283 のフラグメントピークが観測された。推定組成式等からピーク 5 は *rhein-8-O-Glucoside* と推定された。ピーク 6 のマススペクトル (図 7) は  $m/z$  441 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は  $m/z$  289 の C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> の galloyl 基が脱離したと推定される *catechin* または *epicatechin* のピークを主とし、推定組成式等からピーク 6 は *epicatechin gallate* と推定された。ピーク 7 のマススペクトル (図 8) は  $m/z$  477 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は galloylglucose の脱水ピーク  $m/z$  313 を主とし、また、 $m/z$  169 の *gallic acid* のピークが観測された。推定組成式等からピーク 7 は *lindleyin* と推定された。ピーク 8 のマススペクトル (図 9) は  $m/z$  541 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS はピーク 7 と同様に galloylglucose の脱水ピーク  $m/z$  313 を主とし、また、 $m/z$  169 の *gallic acid* のピークが観測された。推定組成式等からピーク 8 は *resveratrol galloylglucose* と推定された。ピーク 9 のマススペクトル (図 10) は [M-H] として  $m/z$  407 が観測され、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) が脱離した

ピーク 2 は 1,2,6-trigalloylglucose と推定された。ピーク 3 のマススペクトル (図 4) は、 $m/z$  385 [M-H+CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は、ベースピークとして  $m/z$  325 [M-H] のピークが観測されたほか、 $m/z$  163 の *coumaric acid* と推定されるピークが観測された。推定組成式等から、ピーク 3 は *coumaroyl glucose* と推定された。ピーク 4 のマススペクトル (図 5) は、 $m/z$  449 [M-H+CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H] を主とし、[M-H]  $m/z$  389 のピーク等が観測された。 $m/z$  449 をプリカーサーイオンとした MS/MS は、CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H と C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) とが解離した  $m/z$  227 のピークが観測された。推定組成式等から、 $m/z$  227 のピークは *resveratrol* のフラグメントピークと考えられ、ピーク 4 は *resveratrol 4'-O-Glucoside* と推定された。ピーク 5 のマススペクトル (図 6) は  $m/z$  445 [M-H] を主とするスペクトルであった。これをプリカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) が脱離した  $m/z$  283 のフラグメントピークが観測された。推定組成式等からピーク 5 は *rhein-8-O-Glucoside* と推定された。ピーク 6 のマススペクトル (図 7) は  $m/z$  441 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は  $m/z$  289 の C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> の galloyl 基が脱離したと推定される *catechin* または *epicatechin* のピークを主とし、推定組成式等からピーク 6 は *epicatechin gallate* と推定された。ピーク 7 のマススペクトル (図 8) は  $m/z$  477 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は galloylglucose の脱水ピーク  $m/z$  313 を主とし、また、 $m/z$  169 の *gallic acid* のピークが観測された。推定組成式等からピーク 7 は *lindleyin* と推定された。ピーク 8 のマススペクトル (図 9) は  $m/z$  541 [M-H] を主とし、これをプリカーサーイオンとした MS/MS はピーク 7 と同様に galloylglucose の脱水ピーク  $m/z$  313 を主とし、また、 $m/z$  169 の *gallic acid* のピークが観測された。推定組成式等からピーク 8 は *resveratrol galloylglucose* と推定された。ピーク 9 のマススペクトル (図 10) は [M-H] として  $m/z$  407 が観測され、これをプリカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (Glc) が脱離した

$m/z$  245 のフラグメントピークが観測された。推定組成式等からピーク 9 は trachrysone- 8- *O*-glucoside と推定された。ピーク 10 のマススペクトル (図 11) は  $m/z$  283 [M-H]<sup>-</sup> を主とし、 $m/z$  567 の [2M-H]<sup>-</sup> のピークも観測された。推定組成式等からピーク 10 は rhein と推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータ (表 1 及び表 2) には、ダイオウに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

### 3. サイコの分析結果

ピーク 5 (図 13) のポジティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  1107 [M+H]<sup>+</sup> を主とし、これをプレカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> が脱離した  $m/z$  927 やさらに C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> が脱離した  $m/z$  781 等のピークが観測された。また、ネガティブモードでのピーク 5 のマススペクトルは、 $m/z$  612 [M+2CH<sub>3</sub>COO]<sup>2-</sup> を主とし、 $m/z$  1165 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> が観測された。推定組成式等からピーク 5 は、saikosaponin V (図 15) と推定された。ピーク 9 (図 14) のポジティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  927 [M+H]<sup>+</sup> を主とし、これをプレカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub> 及び H<sub>2</sub>O が脱離した  $m/z$  421 等のピークが観測された。ネガティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  985 [M+CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> を主としたものであった。推定組成式等からピーク 9 は、saikosaponin c または saikosaponin f と推定された。また、ピーク 10 は、ピーク 9 と同様のマススペクトルを示し、同様に推定された。その他、ピーク 6、ピーク 11、ピーク 12、及びピーク 14 は、ポジティブモードで  $m/z$  781 [M+H]<sup>+</sup> が、ネガティブモードで  $m/z$  839 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物と考えられた。標品との比較から、ピーク 11 が saikosaponin a、ピーク 14 が saikosaponin d とそれぞれ同定された。ピーク 7 は、ネガティブモードでピーク 6 等の  $m/z$  839 より [H<sub>2</sub>O] 分大きい値の  $m/z$  857 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物

の hydroxyl 体、ピーク 13 は [CH<sub>2</sub>CO] 分大きい値の  $m/z$  881 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup> が観測され、saikosaponin a や saikosaponin d 等の化合物の acetyl 体と推定された。また、ピーク 8 は、ポジティブモードで  $m/z$  348 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> が、ネガティブモードで  $m/z$  329 [M-H]<sup>-</sup> が観測され、図 15 に示した直鎖のトリオキシ脂肪酸と推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータ (表 3) には、サイコに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、特徴的なデータの集積が可能となった。

### 4. ソヨウの分析結果

ピーク 1 (図 17) のポジティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  639 [M+H]<sup>+</sup> を主とし、これをプレカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (GlcUA) が 2 つ脱離した  $m/z$  287 の luteolin と推定されるフラグメントピークを主に C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (GlcUA) が 1 つ脱離した  $m/z$  463 が観測され、ピーク 1 は luteolin の diglucuronide と推定された。ピーク 2 (図 18) のポジティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  623 [M+H]<sup>+</sup> を主とし、これをプレカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (GlcUA) が 2 つ脱離した  $m/z$  271 の apigenin と推定されるフラグメントピークを主に C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (GlcUA) が 1 つ脱離した  $m/z$  447 が観測され、ピーク 2 は apigenin の diglucuronide と推定された。ピーク 3 (図 19) のポジティブモードでのマススペクトルは、 $m/z$  463 [M+H]<sup>+</sup> を主とし、これをプレカーサーイオンとした MS/MS は C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> (GlcUA) が脱離した  $m/z$  287 の luteolin と推定されるフラグメントピークが観測され、ピーク 3 は luteolin の glucuronide と推定された。ピーク 4 (図 20) のポジティブモードでのマススペクトルは、[M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  361 や [2M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  721 が観察され、 $m/z$  361 をプレカーサーイオンとした MS/MS は  $m/z$  163 の caffeic acid と推定されるフラグメントピークが観測され、ピーク 4 は rosmarinic acid と推定された。これらのスペクトル解析の結果から、本分析条件によって測定されたデータ (表 4) には、ソヨウに含まれる成分についての化学情報が含まれることが明らかとなり、

特徴的なデータの集積が可能となった。

#### E. 結論

ダイオウ、サイコ及びソヨウについて、LC-MS/MS を用いた分析プロファイルから、生薬の化学成分情報のデータベース化を行い、品質の情報化を試みることにした。昨年度検討を行った測定条件を元に、HPLC の条件の検討、MS 条件や MS/MS 条件の検討等を行い、データ採取条件の検討を行った。その結果、ダイオウ、サイコ及びソヨウに含まれる成分についての化学情報の集積が可能となった。

#### 文献

- 1) 第十六改正日本薬局方解説書、広川書店、東京
- 2) Sagara, K., Oshima, T., Yoshida, T.: Rapid and simple determination of sennoside A and B in rhei rhizoma by ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **403**, 253-261 (1987)
- 3) 宮本 益雄、今井 俊司、篠原 正和、藤岡 章二、後藤 実、松岡 敏郎、藤村 一: 瀉下作用物質の研究(第1報): 大黃の主要成分、Sennoside A の単離、*YAKUGAKU ZASSHI*, **87**, 1040-1043 (1967)
- 4) Oshio, H., Imai, S., Fujioka, S., Sugawara, T., Miyamoto, M., Tsukui, M.: Investigation of Rhubarbs. III. New Purgative Constituents, Sennosides E and F, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 823-831 (1974)
- 5) Oshio H., Naruse, Y., Tsukui, M.: Quantitative Analysis of the Purgative Components of Rhubarb and Senna, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2458-2464 (1978)
- 6) 大塩春治: 大黃の研究 (IV) Sennoside D, Citreosein および Laqccaic acid D の単離, *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 19-23 (1978)
- 7) Okabe, H., Matsuo, K., Nishioka, I.: Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). II. Anthraquinone Glycosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1254-1260 (1973)
- 8) 村上 孝夫、田中 克己: 大黃の新フェノール配糖体について、*YAKUGAKU ZASSHI*, **93**, 733-736 (1973)
- 9) Kashiwada, Y., Nonaga, G., Nishioka, I.: Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). VI. Isolation and Characterization of Stilbenes, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3501-3517 (1984)
- 10) Kubo, I., Murai, Y., Soediro, I., Soetarno, S., Sastrodihardjo, S.: Efficient Isolation of Glycosidase Inhibitory Stilbene Glycosides from *Rheum palmatum*, *J. Nat. Prod.*, **54**, 1115-1118 (1991)
- 11) Tuboi, M., Minami, M., Nonaka, G., Nishioka, I.: Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). IV. Naphthalene Glycosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2708-2712 (1977)
- 12) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I.: Studies on Rhubarb (Rhei Rhizoma). V. Isolation and Characterization of Chromone and Chromanone Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3493-3500 (1984)
- 13) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I.: Chromone glucosides from rhubarb, *Phytochemistry*, **29**, 1007-1009 (1990)
- 14) Nonaka, G., Nishioka, I.: Tannins and Related Compounds. X. Rhubarb (2): Isolation and Structures of a Glycerol Gallate, Gallic Acid Glucoside Gallates, Galloylglucoses and Isolindleyin, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1652-1658 (1983)
- 14) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I.: Tannins and Related Compounds. XLV. Rhubarb. (5): Isolation and Characterization of Flavan-3-ol and Procyanidin Glucosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3208-3222 (1986)
- 15) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I.: Tannins and Related Compounds. XLVIII.: Rhubarb. (7). Isolation and Characterization of New Dimeric and Trimeric Procyanidins, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4083-4091 (1986)
- 16) Yamagishi, T., Nishizawa, M., Ikura, M., Hikichi, K., Nonaka, G., Nishioka, I.: New Laxative Constituents of Rhubarb. Isolation and Characterization of Rheinoides A, B, C and D, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3132-3138 (1987)
- 17) 武田健一: サイコの化学成分、*代謝* **10**(臨時増刊号)、676-686 (1973)
- 18) Shibata, S., Kitagawa, I., Fujimoto, H.: The

- Chemical Studies on Oriental Plant Drugs. XV. On the Constituents of *Bupleurum* spp. (2). The Structure of Saikogenin A, a Sapogenin of *Bupleurum falcatum* L., *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 1023-1033 (1966)
- 19) Aimi, N., Fujimoto, H., Shibata, S.: The Chemical Studies on Oriental Plant Drugs. XVIII. The Constituents of *Bupleurum* spp. (3). Saikogenins E and G, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 641-646 (1968)
- 20) Kubota, T., Hinoh, H.: The constitution of saponins isolated from *Bupleurum falcatum* L., *Tetrahedron Letters* **9**, 303-306 (1968)
- 21) Tori, K., Seo, S., Yoshimura, Y., Nakamura, M., Tomita, Y., Ishii, H.: Carbon-13 nmr spectra of saikosaponins A, C, D and F isolated from *Bupleurum falcatum* L., *Tetrahedron Letters* **17**, 4167-4170 (1976)
- 22) Ishii H., Seo, S., Tori, K., Tozyo, T., Yoshimura, Y.: The structures of saikosaponin-E and acetylsaikosaponins, minor components isolated from *Bupleurum falcatum* L., determined by C-13 NMR spectroscopy, *Tetrahedron Letters* **18**, 1227-1230 (1977)
- 23) Ebata, N., Nakajima, K., Taguchi, H., Mitsuhashi, H.: Isolation of nes saponins from the root of *Bupuleurum falcatum* L., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1432-1434 (1990)
- 24) Ebata, N., Nakajima, K., Hayashi, N., Okada, M., Maruno, M.: Saponins from the root of *Bupleurum falcatum*, *Phytochemistry*, **41**, 895-901 (1996)
- 25) Morita, M., Nakajima, K., Ikeya, Y., Mitsuhashi, H.: Polyacetylenes from roots of *Bupleurum falcatum*, *Phytochemistry*, **30**, 1543-1545 (1991)
- 26) Kobayashi, M., Tawara, T., Tsuchida, T., Mitsuhashi, H.: Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XVIII. : Minor Constituents of *Bupleuri Radix* : Occurrence of Saikogenins, Polyhydroxysterols, a Trihydroxy C18 Fatty Acid, a Lignan and a New Chromone, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3169-3171 (1990)
- 27) 伊東 宏: 蘇葉の研究(第6報): *Perilla*属植物の精油成分と品質について、*YAKUGAKU ZASSHI*, **90**, 883-892 (1970)
- 28) 肥塚 靖彦、本多 義昭、田端 守: シソの在来種ならびにF\_1雑種の精油型 *Shoyakugaku Zasshi*, **38**, 238-242 (1984)
- 29) Koezuka, T., Honda, G., Tabata, M.: Genetic control of the chemical composition of volatile oils in *Perilla frutescens*, *Phytochemistry*, **25**, 859-863 (1986)
- 30) Ishikura, N: Anthocyanins and Flavones in Leaves and Seeds of *Perilla* Plant, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1855-1860 (1981)
- 31) Tamura, H., Fujiwara, M., Sugisawa, H.: Production of Phenyl-propanoids from Cultured Callus Tissue of the Leaves of Akachirimem-shiso (*Perilla* sp.), *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1971-1973 (1989)
- 32) Koezuka, Y., Honda, G., Sakamoto, S., Tabata, M.: Genetic Control of Anthocyanin Production in *Perilla frutescens*, *Shoyakugaku Zasshi*, **39**, 228-231 (1985)
- 33) Aritomi, M., Kumori, T., Kawasaki, T.: Cyanogenic glycosides in leaves of *Perilla frutescens* var. *acuta* *Phytochemistry*, **24**, 2438-2439 (1985)
- F. 健康危険情報  
なし
- G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし  
2. 学会発表等  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

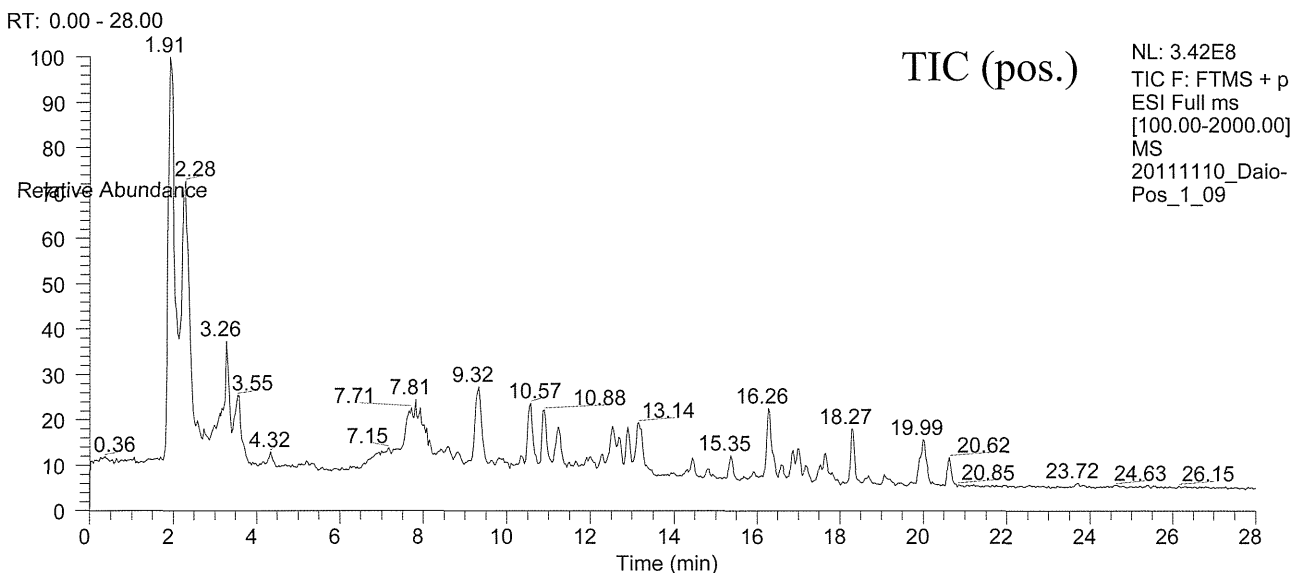
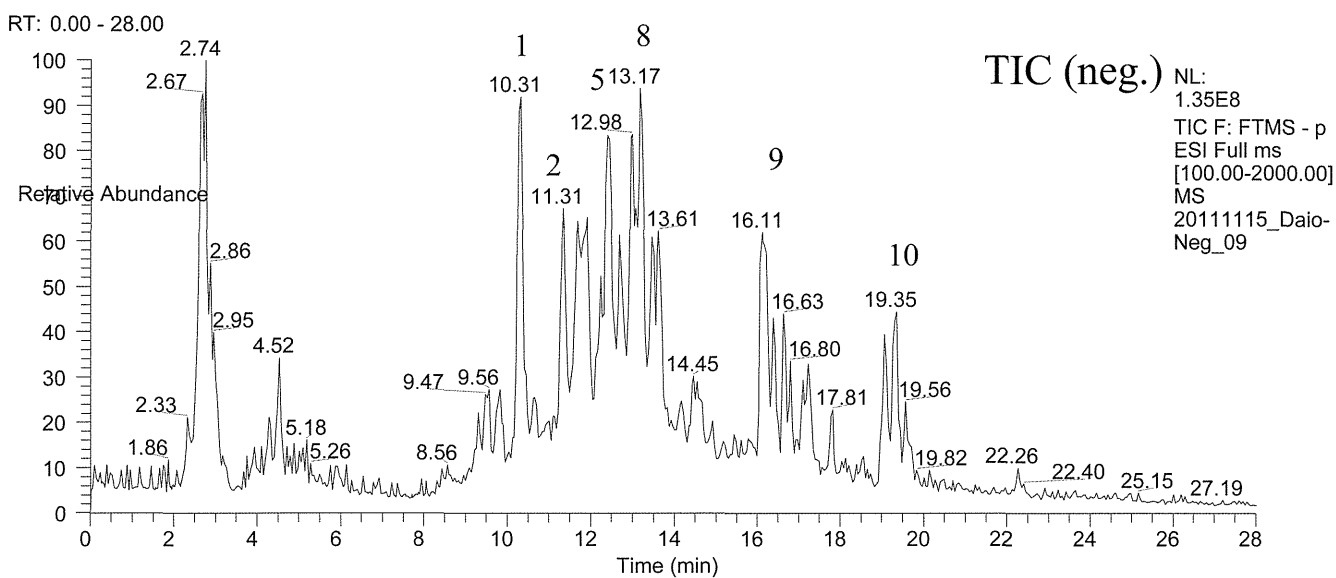
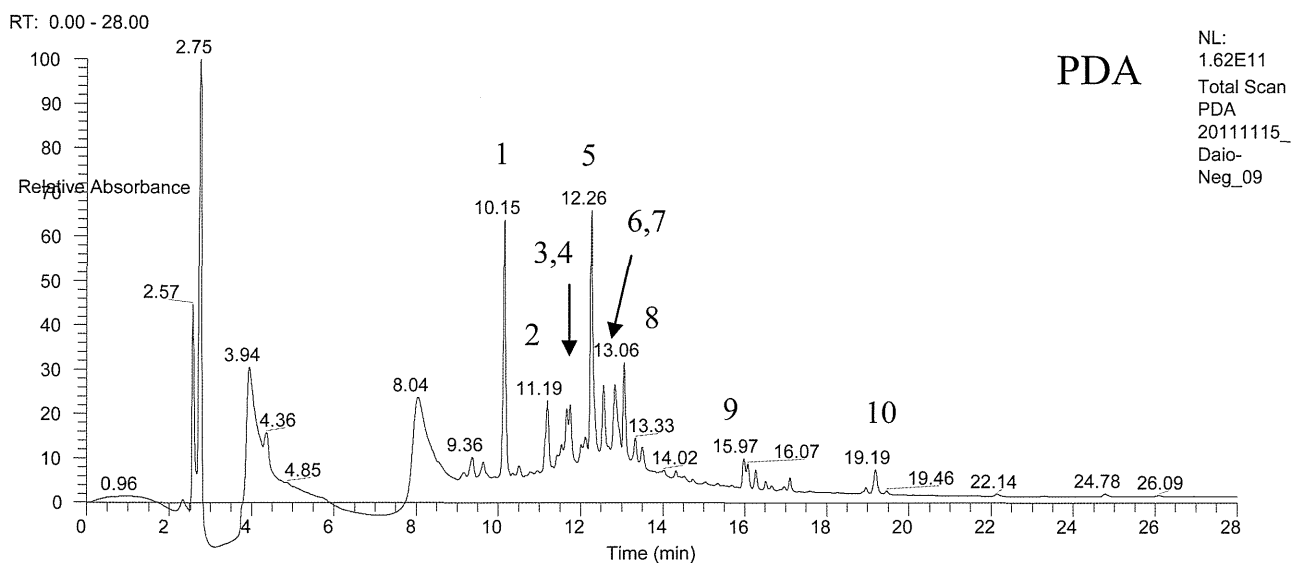
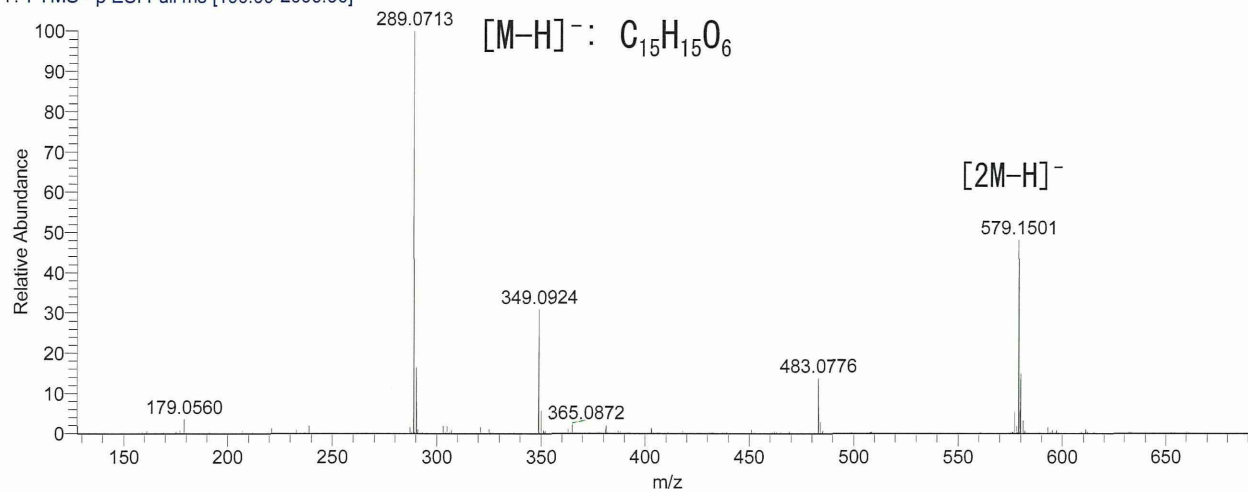


図1 ダイオウ (NIB-223) の PDA 全吸収強度クロマトグラム (上段), ネガティブモードでの TIC (中段) 及びポジティブモードでの TIC (下段)



20111115\_Daio-Neg\_09 #493 RT: 10.39 AV: 1 NL: 1.09E7  
T: FTMS -p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_Daio-Neg\_09 #484 RT: 10.22 AV: 1 NL: 5.38E6  
T: FTMS -p ESI d Full ms2 289.07@cid35.00 [65.00-300.00]

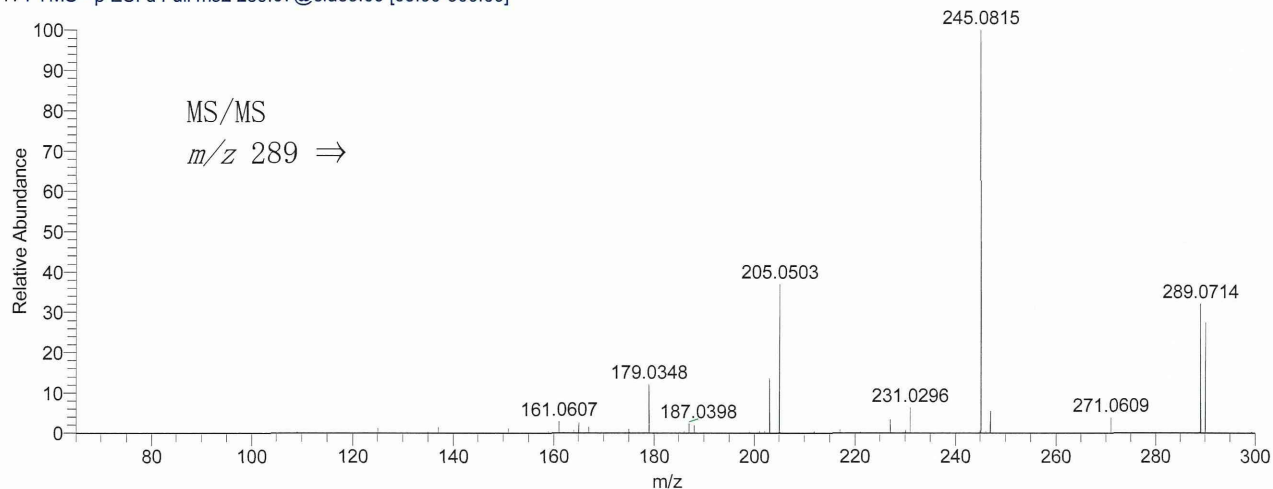


図2 Peak 1 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

## Peak 2

20111115\_Daio-Neg\_09 #541 RT: 11.39 AV: 1 NL: 1.04E7  
T: FTMS -p ESI Full ms [100.00-2000.00]

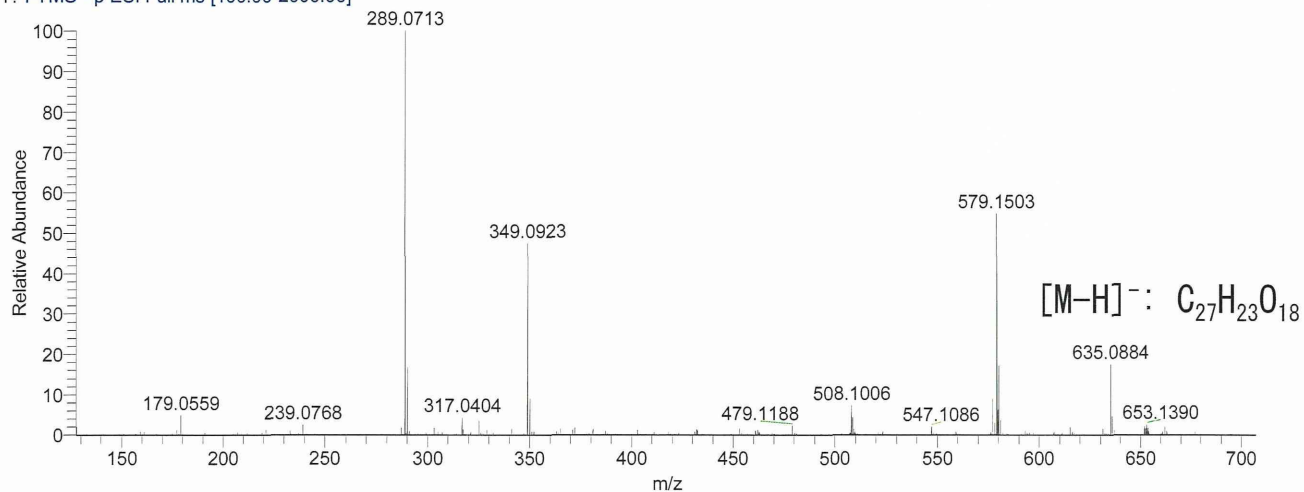
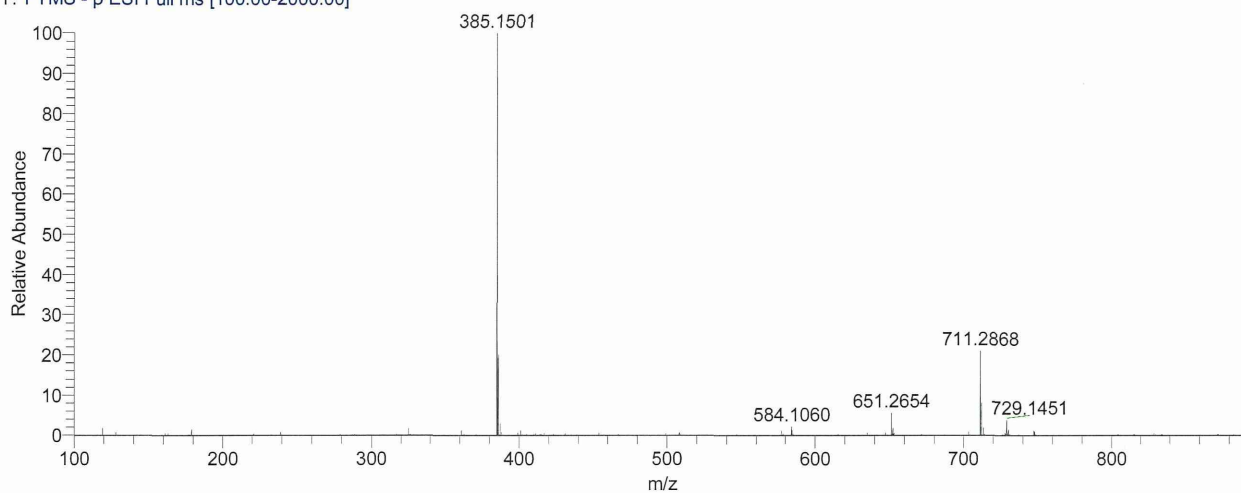


図3 Peak 2 の MS

20111115\_daio-neg\_09 #555 RT: 11.67 AV: 1 NL: 3.41E7 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>9</sub>  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_Daio-Neg\_09 #552 RT: 11.61 AV: 1 NL: 3.48E6  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 385.15@cid35.00 [95.00-400.00]

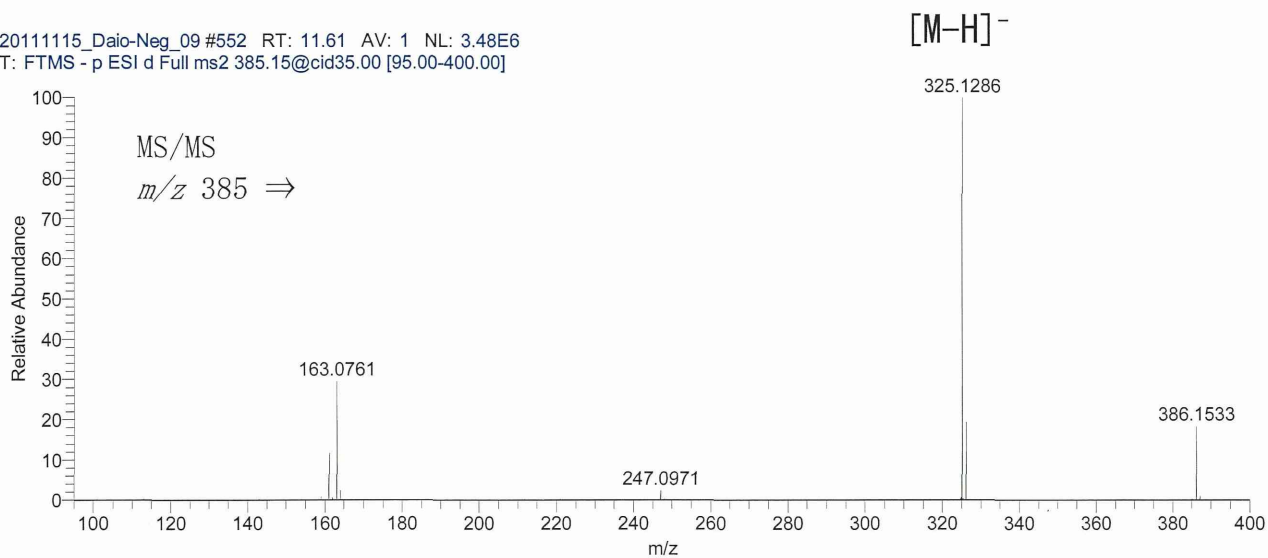
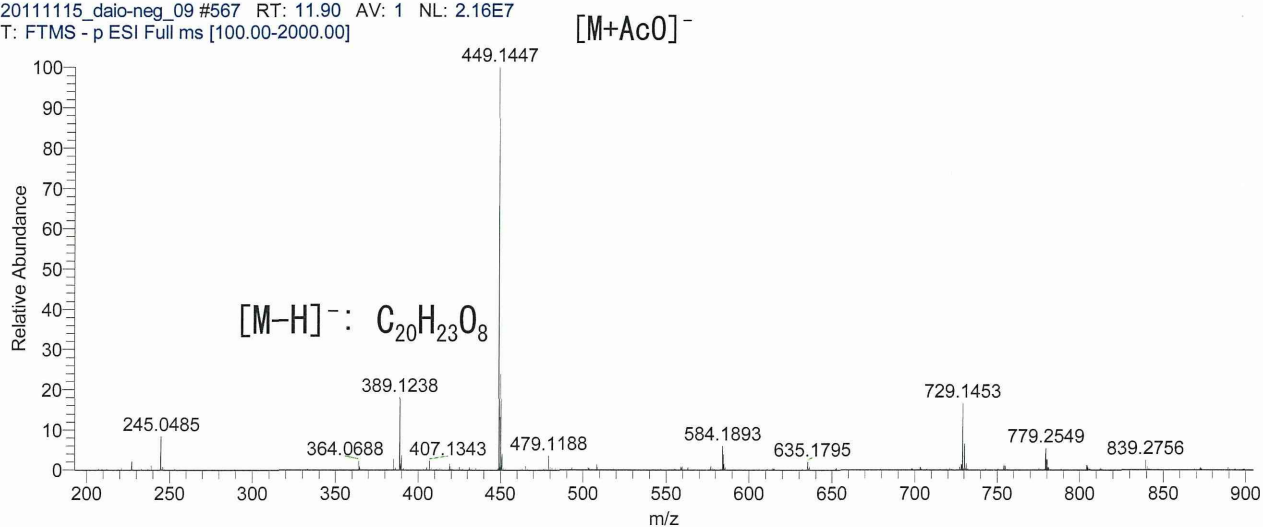


図4 Peak 3 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_daio-neg\_09 #567 RT: 11.90 AV: 1 NL: 2.16E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_daio-neg\_09 #564 RT: 11.84 AV: 1 NL: 2.71E6  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 449.15@cid35.00 [110.00-460.00]

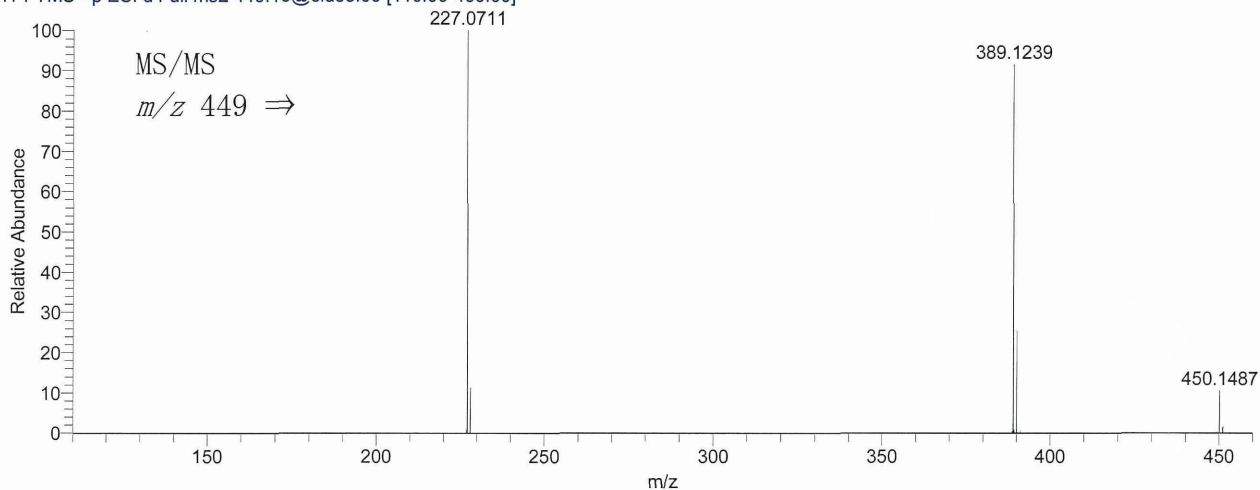
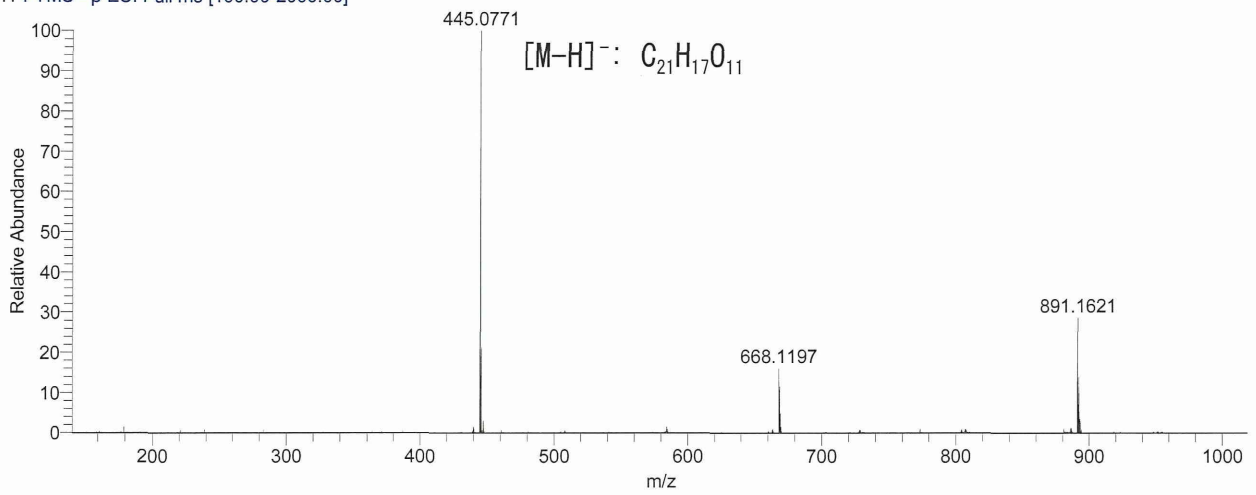


図5 Peak 4 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_daio-neg\_09 #588-593 RT: 12.34-12.43 AV: 3 NL: 2.87E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_daio-neg\_09 #588 RT: 12.33 AV: 1 NL: 4.99E6  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 445.08@cid35.00 [110.00-460.00]

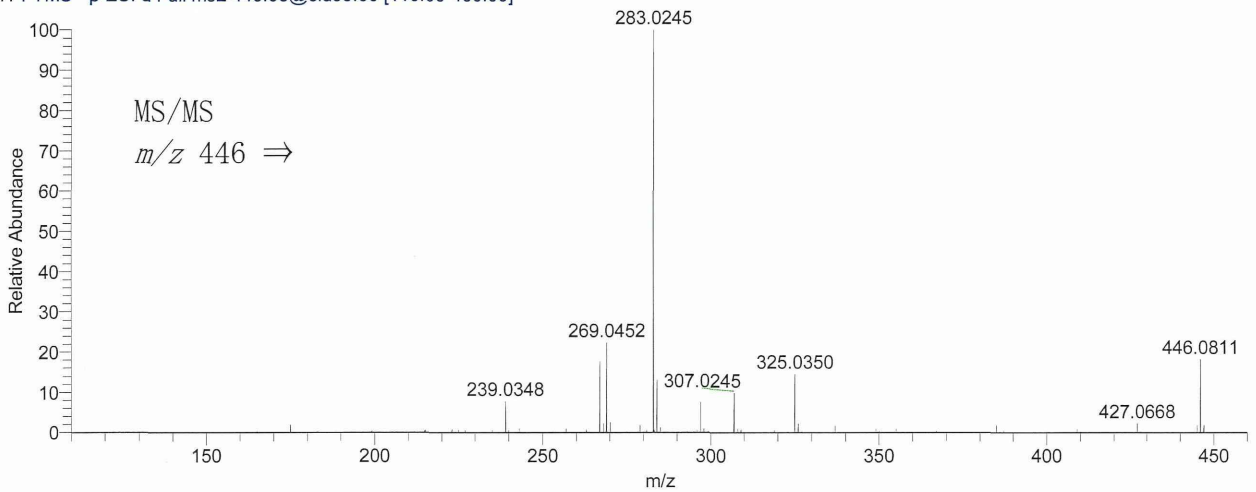
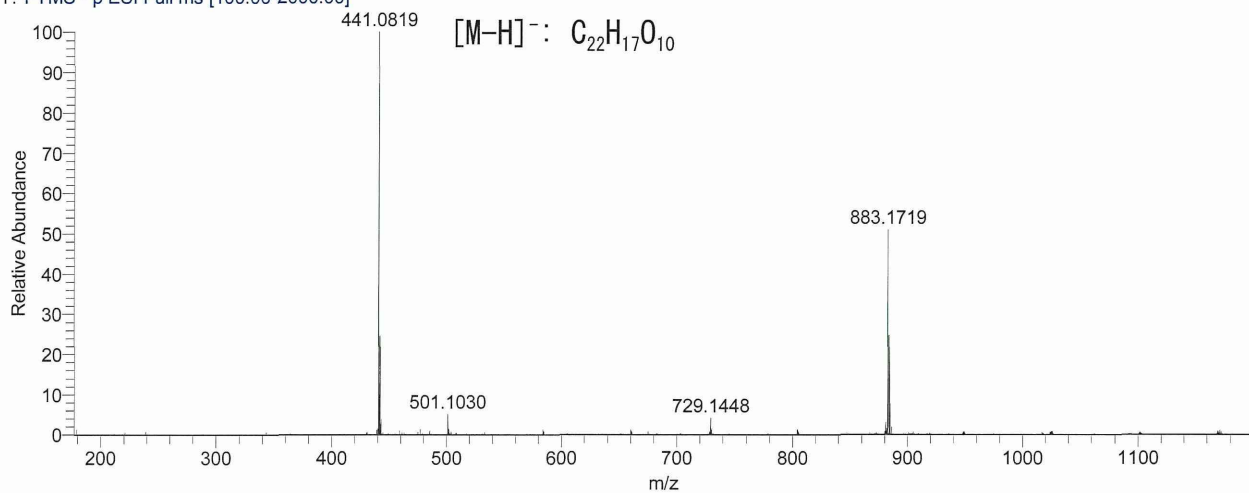


図6 Peak 5 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_daio-neg\_09 #619 RT: 12.95 AV: 1 NL: 3.22E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_daio-neg\_09 #618 RT: 12.94 AV: 1 NL: 8.07E6  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 441.08@cid35.00 [110.00-455.00]

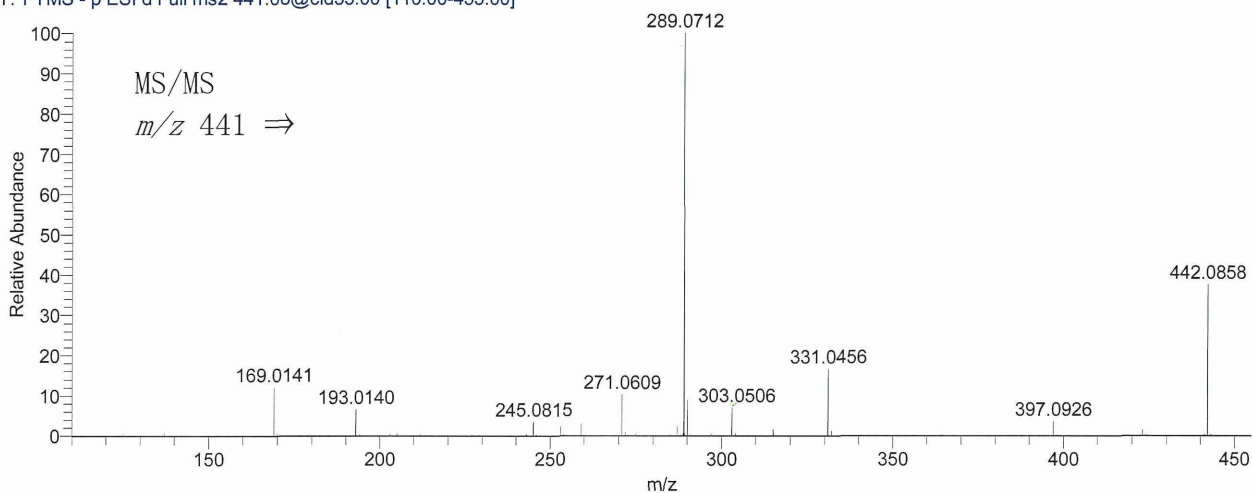
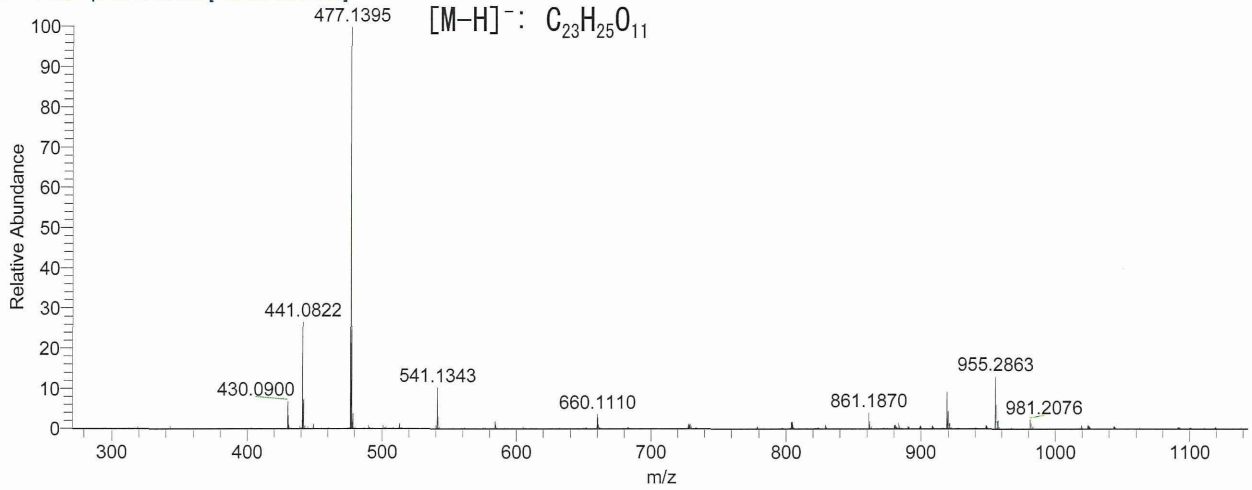


図 7 Peak 6 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_daio-neg\_09 #627 RT: 13.10 AV: 1 NL: 2.20E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_daio-neg\_09 #624 RT: 13.04 AV: 1 NL: 2.33E6  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 477.14@cid35.00 [120.00-490.00]

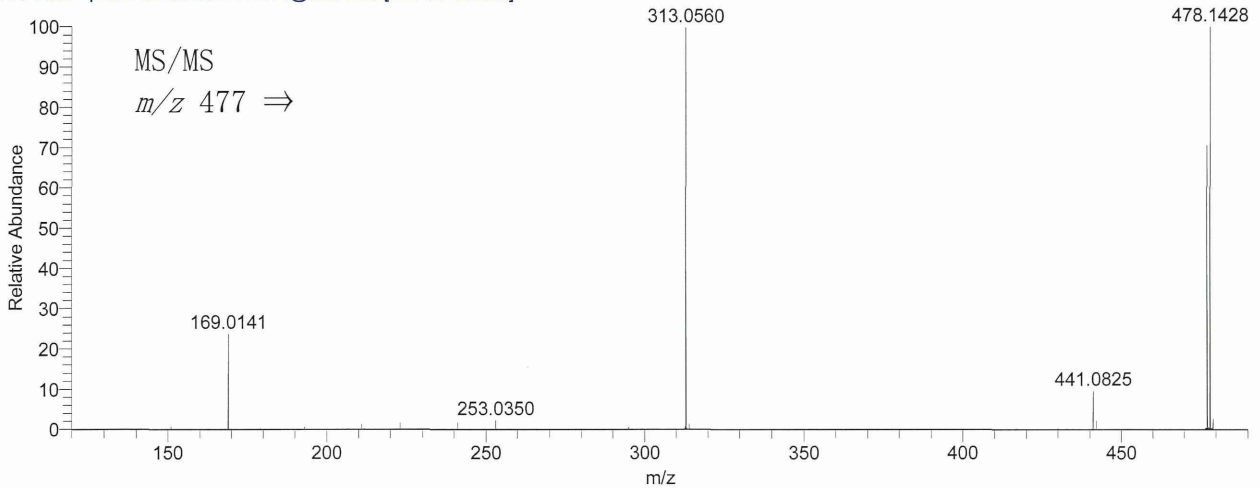
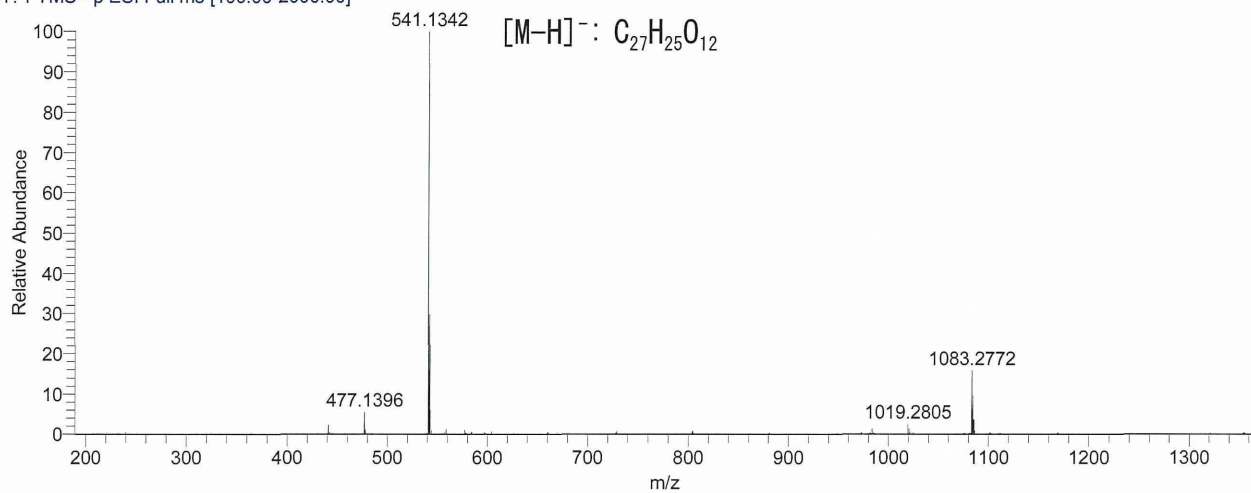


図 8 Peak 7 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_daio-neg\_09 #630-634 RT: 13.17-13.21 AV: 2 NL: 4.60E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20111115\_daio-neg\_09 #630 RT: 13.16 AV: 1 NL: 1.32E7  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 541.13@cid35.00 [135.00-555.00]

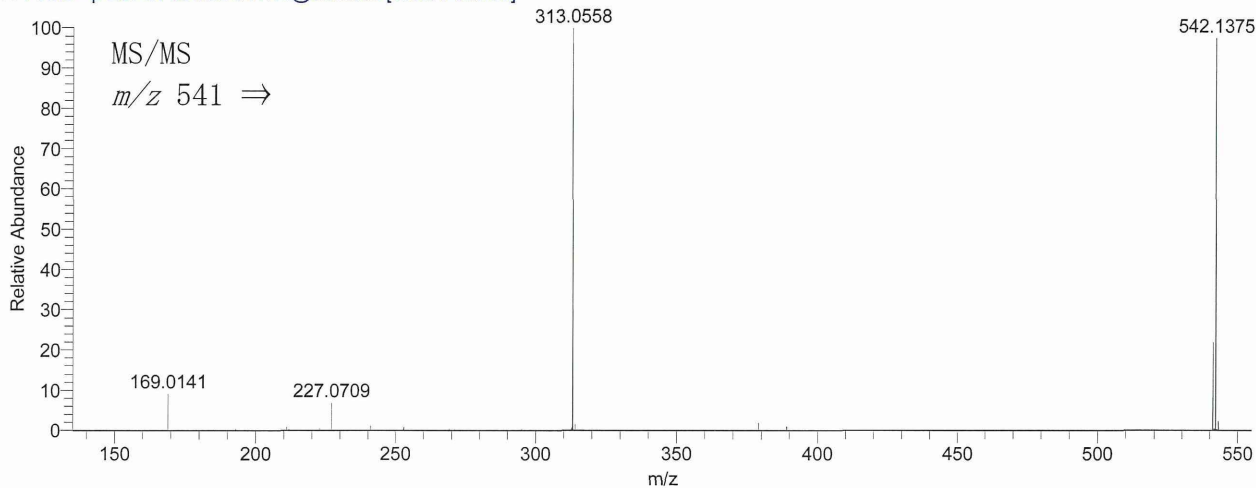
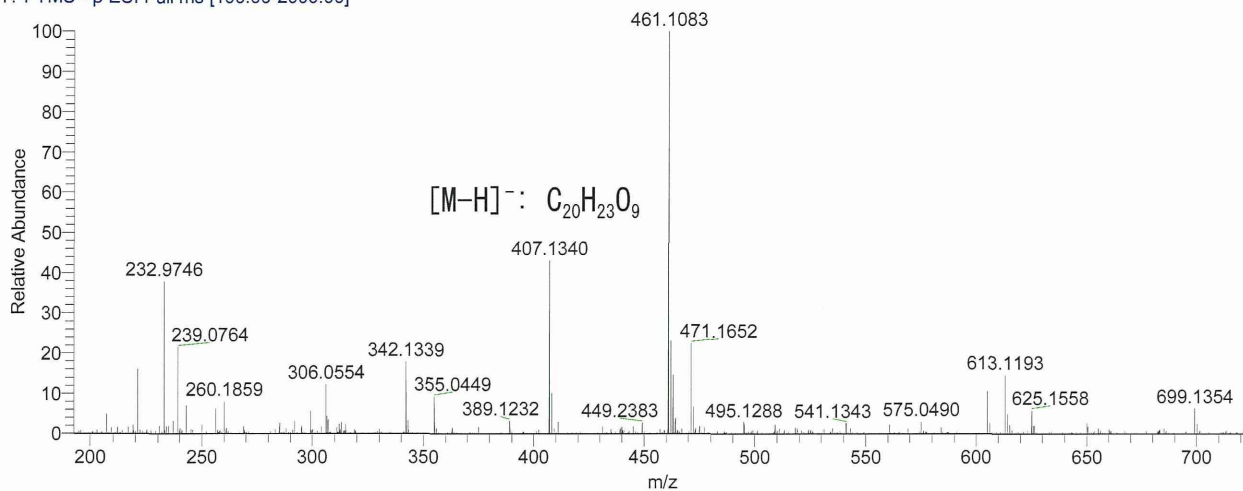
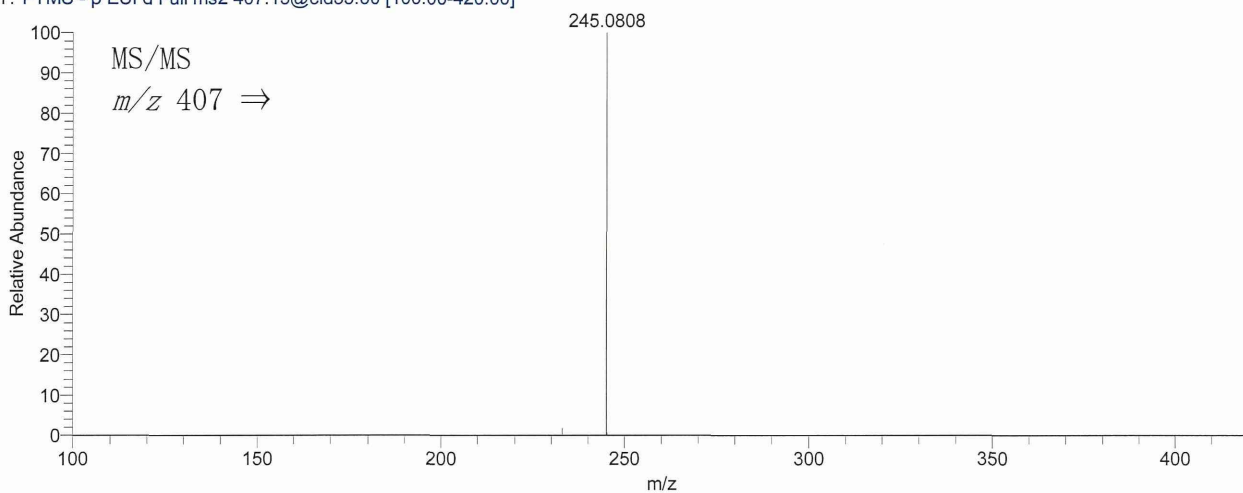


図9 Peak 8 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

20111115\_Daio-Neg\_09 #753 RT: 15.73 AV: 1 NL: 1.71E6  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

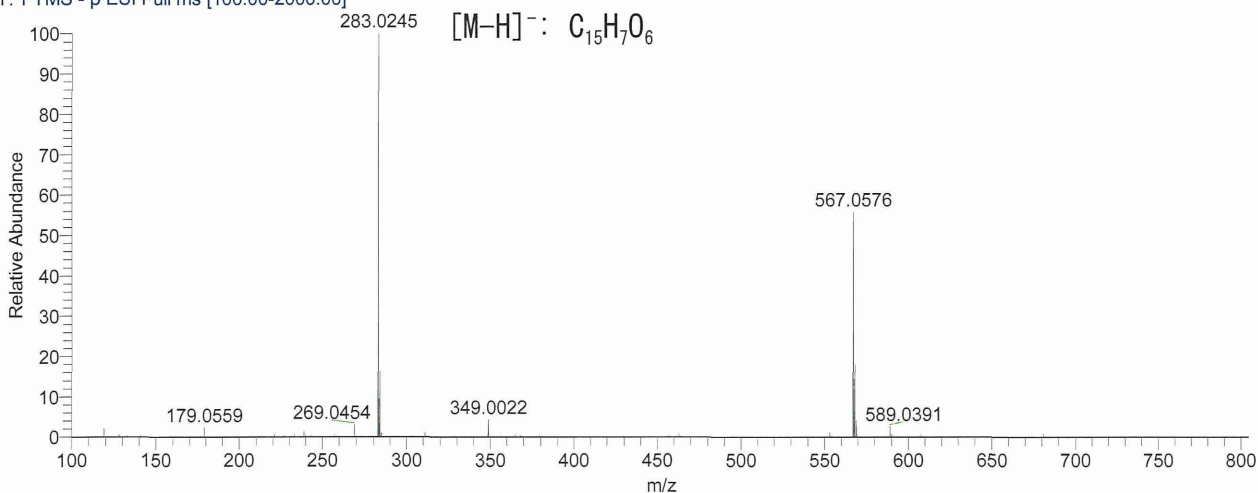


20111115\_Daio-Neg\_09 #754 RT: 15.75 AV: 1 NL: 9.49E5  
T: FTMS - p ESI d Full ms2 407.13@cid35.00 [100.00-420.00]



☒ 10 Peak 9 の MS (上段) 及び MS/MS (下段)

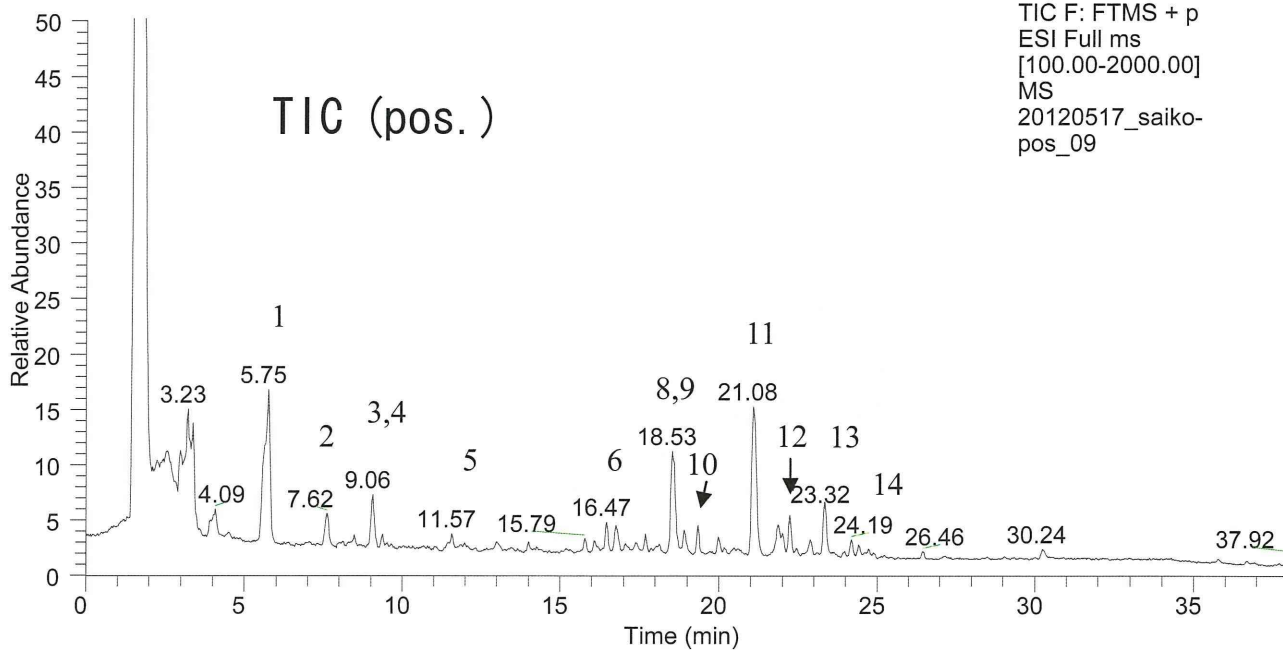
20111115\_Daio-Neg\_09 #925 RT: 19.35 AV: 1 NL: 2.24E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]



☒ 11 Peak 10 の MS

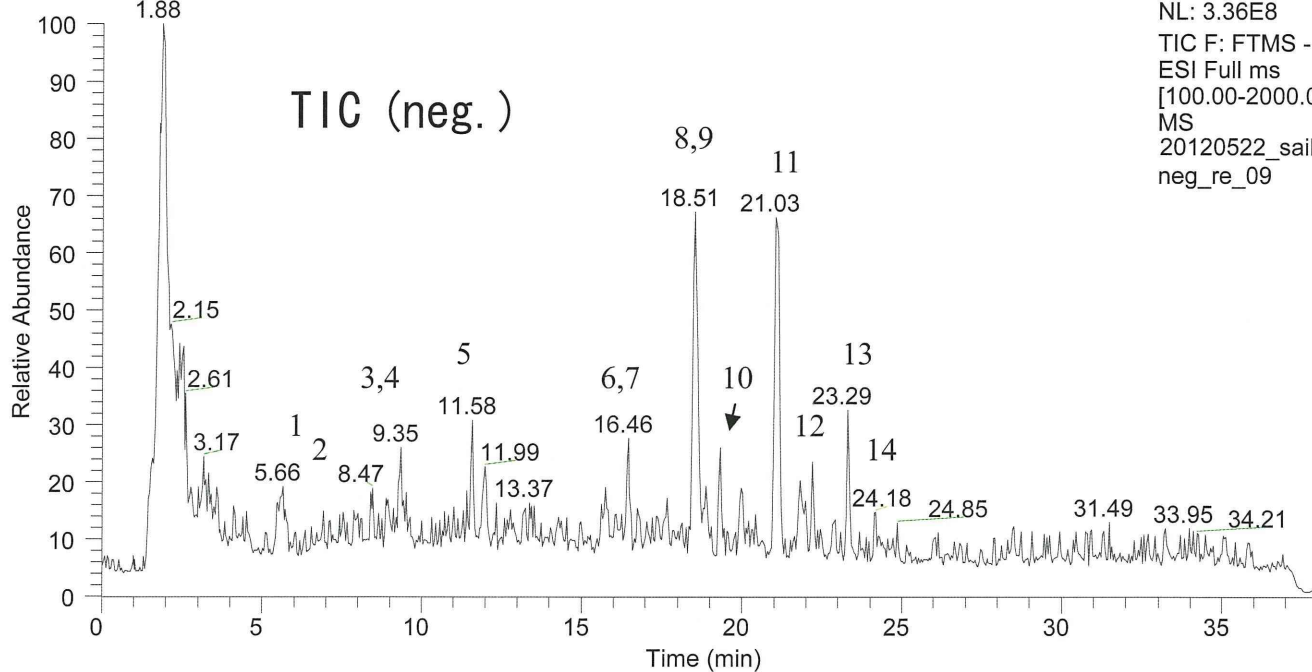


RT: 0.00 - 38.00



NL:  
8.14E8  
TIC F: FTMS + p  
ESI Full ms  
[100.00-2000.00]  
MS  
20120517\_saiko-  
pos\_09

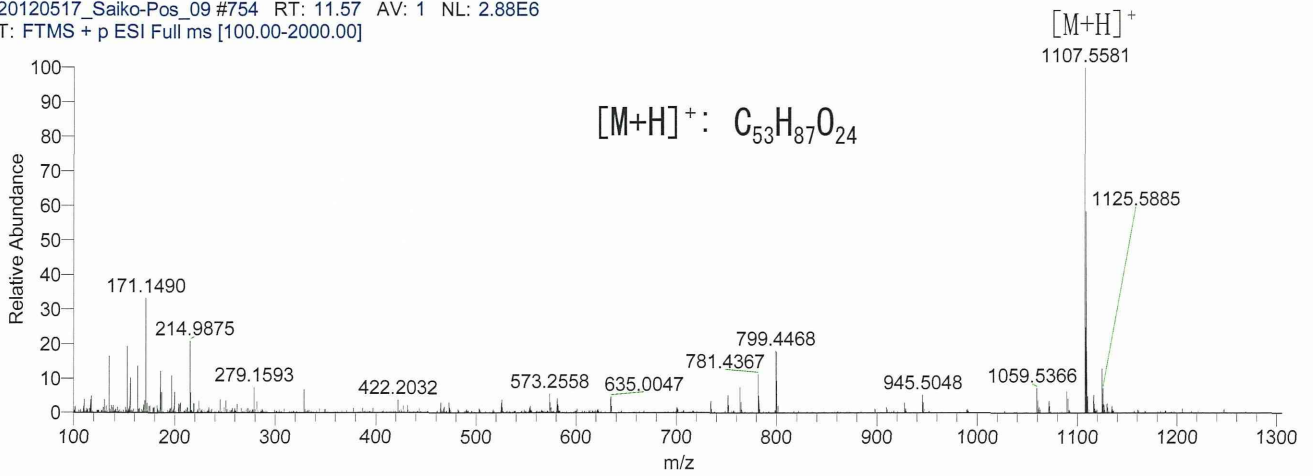
RT: 0.00 - 37.98



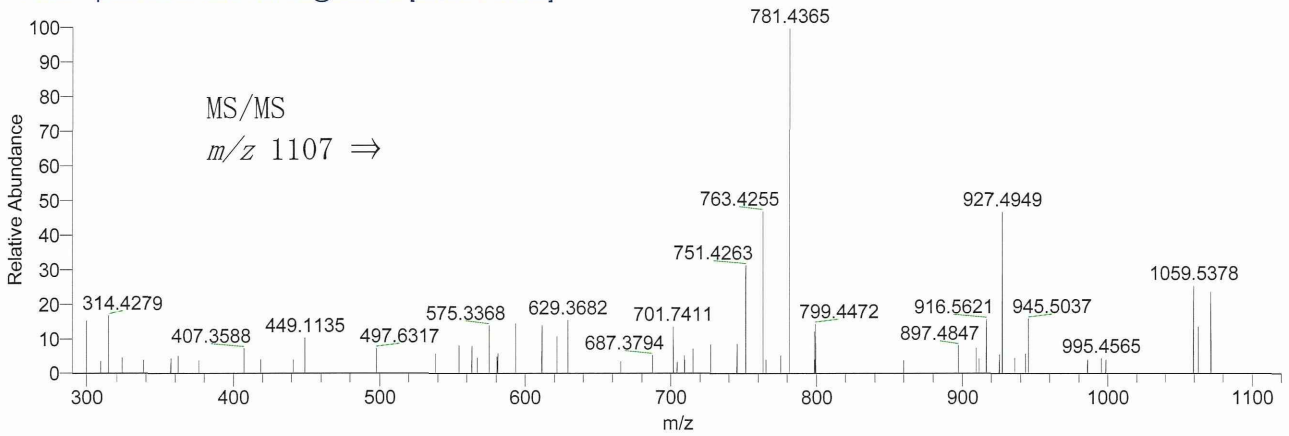
NL: 3.36E8  
TIC F: FTMS - p  
ESI Full ms  
[100.00-2000.00]  
MS  
20120522\_saiko-  
neg\_re\_09

図 12 サイコ (NIB-191) のポジティブイオンモードにおける TIC (上段) 及びネガティブモードにおける TIC (下段)

20120517\_Saiko-Pos\_09 #754 RT: 11.57 AV: 1 NL: 2.88E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



20120517\_saiko-pos\_09 #761 RT: 11.68 AV: 1 NL: 1.43E4  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 1107.56@cid35.00 [290.00-1120.00]



20120522\_Saiko-Neg\_Re\_09 #582 RT: 11.58 AV: 1 NL: 2.21E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

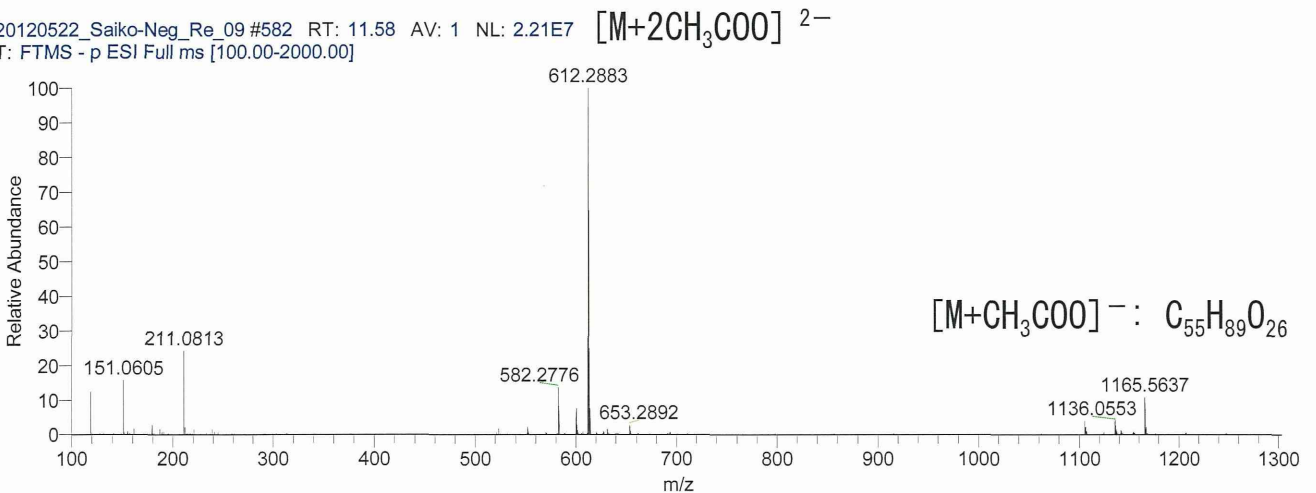
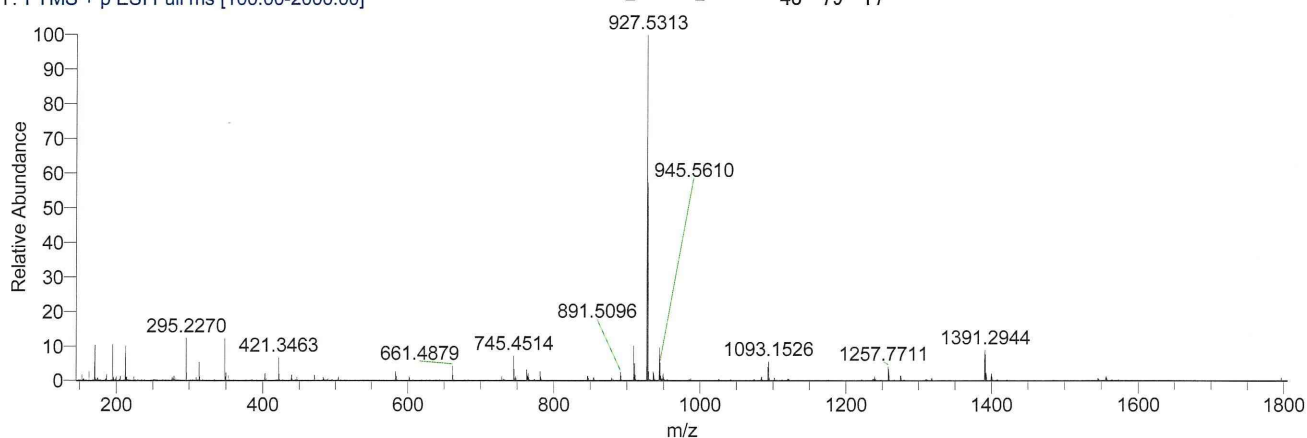


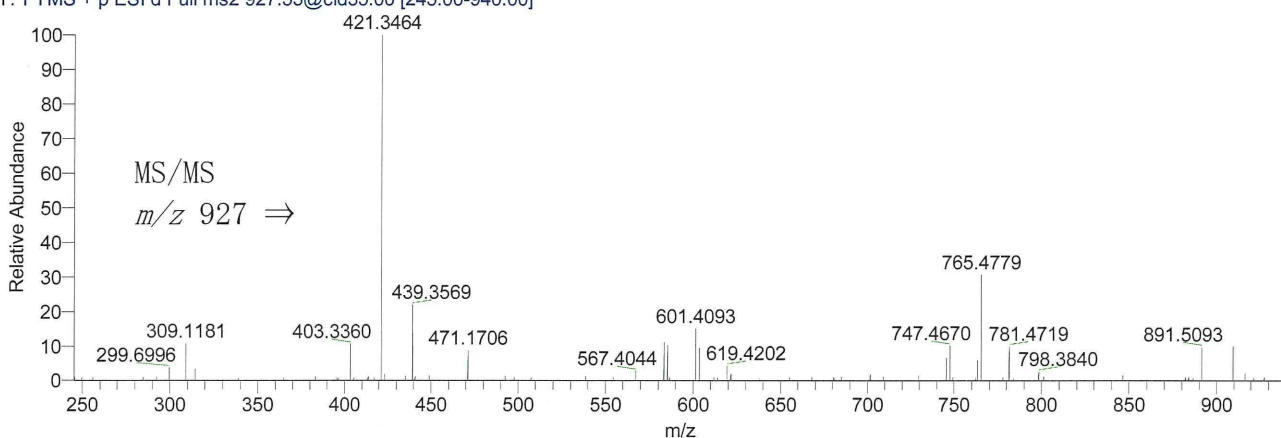
図 13 Peak 5 のポジティブモードでの MS (上段), MS/MS (中段) 及びネガティブモードでの MS (下段)

20120517\_Saiko-Pos\_09 #1204 RT: 18.60 AV: 1 NL: 1.32E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

$[M+H]^+$ :  $C_{48}H_{79}O_{17}$



20120517\_Saiko-Pos\_09 #1211 RT: 18.70 AV: 1 NL: 6.72E4  
T: FTMS + p ESI d Full ms2 927.53@cid35.00 [245.00-940.00]



20120522\_Saiko-Neg\_Re\_09 #920 RT: 18.57 AV: 1 NL: 4.09E7  
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

$[M+CH_3COO]^-$ :  $C_{50}H_{81}O_{19}$

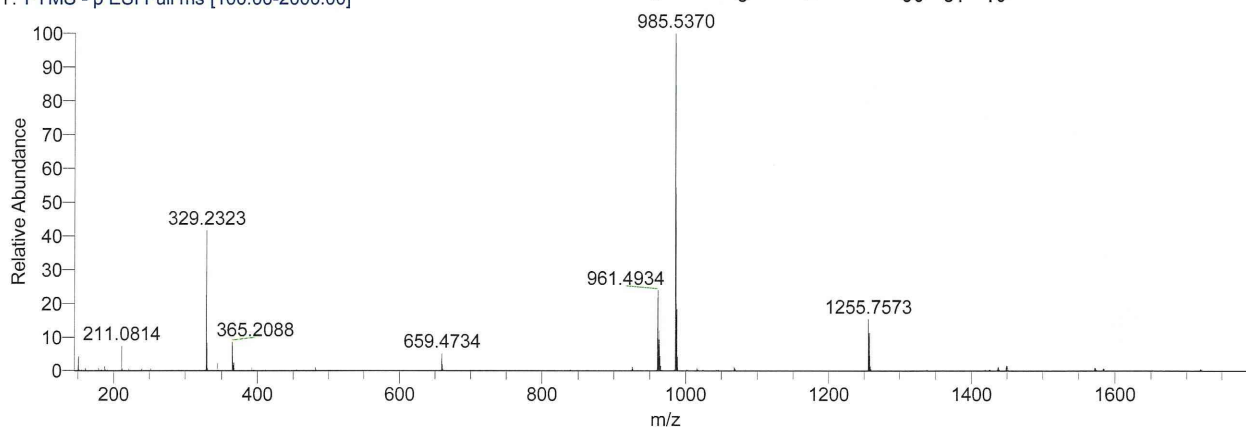


図 14 Peak 9 のポジティブモードでの MS (上段), MS/MS (中段) 及びネガティブモードでの MS (下段)

Peak 6: m/z 781.4734 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>O<sub>13</sub>, m/z 839.4787 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>15</sub>

Peak 7: m/z 857.4886 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>73</sub>O<sub>16</sub>

Peak 8: m/z 348.2748 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>N, m/z 329.2324 [M-H]<sup>-</sup>: C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>O<sub>5</sub>

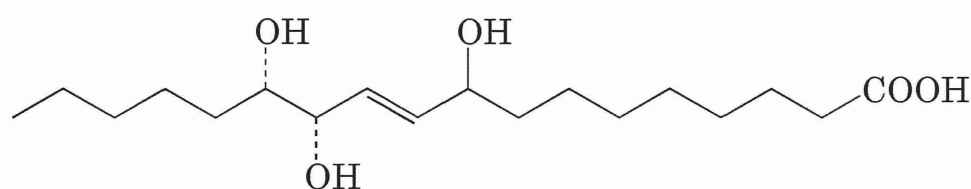
Peak 10: m/z 927.5317 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>48</sub>H<sub>79</sub>O<sub>17</sub>, m/z 985.5371 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>15</sub>

Peak 11: m/z 781.4706 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>O<sub>13</sub>, m/z 839.4792 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>15</sub>

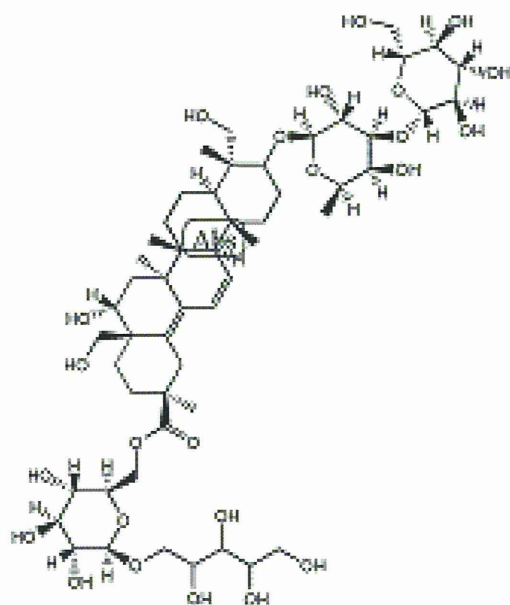
Peak 12: m/z 781.4707 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>O<sub>13</sub>, m/z 839.4792 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>15</sub>

Peak 13: m/z 823.4814 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>14</sub>, m/z 881.4897 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>46</sub>H<sub>73</sub>O<sub>16</sub>

Peak 14: m/z 781.4703 [M+H]<sup>+</sup>: C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>O<sub>13</sub>, m/z 839.4778 [M+CH<sub>3</sub>COO]<sup>-</sup>: C<sub>44</sub>H<sub>71</sub>O<sub>15</sub>



Peak 9



Peak 5 saikosaponin V (3-[(3-O-β-D-Glucopyranosyl)- β-D-fucopyranosyl]oxy)-16α,23,28-trihydroxyoleana- 11,13(18)-diene-30-oic acid 1-O-(2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)-6-deoxy-β-D-glucopyranose-6-yl ester)

図 15 Peak 5 及び Peak 8 の構造式