

よる分析方法の検討については、HPLC 定量値と分光測色計による結果の間に非常に良い相関が得られたことから、シコン中のシコニン色素の含量評価は、条件設定や操作が煩雑な HPLC に代わり操作が簡便な分光測色計によって行うことができると考えられ、新しい生薬シコンの評価法になるものと思われた。

メハジキの葉から高温で消失する成分を見出し、抽出液を放置すると当該成分の明確な減少が認められた。当該成分の Labdane 系ジテルペンは揮発ではなく溶液中で容易に化学変化を起こすことが明らかとなった。

【種苗の保存に関する基盤的研究】

薬用植物種子の発芽条件の規格化を図るため、コガネバナ、コエンドロ、キササゲ、キバナオウギ、ダイオウ、ウイキョウ、カミツレなど 33 種 2 系統の植物の発根、出葉に及ぼす温度条件の影響を調査し、それぞれの植物について発芽試験法の規格化を行った。ムラサキの発芽は低温湿潤処理をすると発芽率が高くなることが明らかになった。

ベニバナおよびインドジャボク種子を用いて、テトラゾリウム塩による発芽力検定法を試みたところ、ベニバナでは種子の胚を含む部分を取り出して染色すると、30℃では20℃より短時間で濃く染色され、30℃、6時間ではほとんど濃赤色に染色された。インドジャボクでは、1% TTC 溶液により濃赤色に染色した胚の割合と実際の発芽率は異なり、染色率と発芽率に関連性は見られなかった。

2009年に保存を開始した種子島在来種ハトムギの種子は、貯蔵3年目を経過しても生育特性、外部形態特性、果実の収量性に大きな変化がなく、生産栽培可能な特性を十分に維持していると考えられる。

培養苗由来の再生植物体形質変異に関する実証試験においてセンキュウ、セリバオウレンおよびウラルカンゾウの培養苗は増殖効率が高くなる一方で、品質面での低下が認められ、これらは生薬生産用の苗ではなく、圃場における種苗生産用の苗としての適性が高いと考えられた。

ウコンおよびショウガの培養苗由来の根茎は高い増殖率を示し、再生植物体は外部形態的には問題は見られず、生薬生産用および種苗生産用双方の種苗としての適性が高いと判断した。

【種苗の効率的増殖法に関する研究】

7種類の生薬、蒼朮、白朮、黄芩、生姜、地黄、麻黄および遠志の基原植物である8種の植物、ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウ、アカヤジオウ、シナマオウおよびイトヒメハギについて、組織培養による効率的増殖法を検討し、5種の植物、ホソバオケラ、オケラ、コガネバナ、ショウガ、カイケイジオウについて、植物組織培養による効率的増殖法と優良クローンの育成に成功した。

カノコソウの圃場栽培における被覆処理による効率的増殖法を検討し、根収量は稲わら処理区で最も高く、黒マルチ区、裸地区で減収し、カノコソウ栽培において稲わらの被覆処理は有効であることを明らかにした。

チョウジの挿し木による発根率は極めて低く、増殖は困難であったが、取り木では発根率が高まり、有用な繁殖法であった。挿し木による増殖では、ゴシュユは3月処理が、カギカズラでは太い枝の先端部が、インドボダイジュは先端部が高い発根率を示した。

カノコソウの除草剤試験、シソの殺菌剤施用試験およびキバナオウギの種子消毒試験では薬害は認められず、カノコソウおよびシソにおいては薬剤の残留値は

基準値よりも十分に低い値を示した。

ケイリンサイシン、ゲンチアナの栽培で除草剤を使用すると、発芽不良やその後の生育に影響を与えた。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 林 茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎: 北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質へ及ぼす影響, 生薬学雑誌, **64(2)**, 68-75 (2010).
- 2) 林 茂樹, 菱田敦之, 熊谷健夫, 佐藤正幸, 青柳光敏, 林 隆章, 姉帯正樹, 柴田敏郎: 成分含量, 生薬の性状および農業形質からみた薬用シャクヤク品種の育成 (第1報) —低開花率により摘花および摘蕾作業の省力が可能になる新品種について—, 生薬学雑誌, **65(2)**, 129-133 (2011).
- 3) Kojoma, M., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto, Y. and Sekizaki, H.: Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions, *Biol. Pharm. Bull.*, **34(8)**, 1334-1337 (2011).
- 4) 吉松嘉代: 栽培技術の革新: 閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培, *Journal of Traditional Medicines*, **28**, Supplement, 44, The 28th Annual Meeting of Medicinal and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU, August 27-28, Toyama, p.44, S2-3(2011).
- 5) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸: ウラルカンゾウの養液栽培による高効率のグリチルリチン酸生産, *BIO INDUSTRY*, **28(12)**, 13-20 (2011).
- 6) 川原信夫: 薬用植物・生薬の栽培, 育種, 組織培養及び品質評価, 和漢薬, No.701(2011.10), 5-6(2011).
- 7) 吉松嘉代: 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部育種生理研究室の紹介-薬用植物の組織培養物コレクション-, 和漢薬, No.702(2011.11), 3-4(2011).
- 8) 河野徳昭: 薬用植物資源の高度利用化に向けて-ポストモデル植物時代の生薬ゲノミクス-, 和漢薬, No.703(2011.12), 5-6(2011).
- 9) 澁野裕之: 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室-薬用植物成分研究と生薬の品質評価法の研究, 種子の保存-, 和漢薬, No.704(2012.1), 7-9(2012).
- 10) 熊谷健夫: 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室-薬用植物の栽培研究と種子交換-, 和漢薬, No.705(2012.2), 4-6(2012).
- 11) 菱田敦之: 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部栽培研究室-日本における薬用植物栽培の普及とその課題-, 和漢薬, No.706(2012.3), 4-7(2012).
- 12) 林 茂樹: 薬用植物の品種育成について, 和漢薬, No.707(2012.4), 4-6(2012).
- 13) 飯田 修: (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部-熱帯, 亜熱帯性薬用, 有用植物の収集, 保存, 育成および利用-, 和漢薬, No.708(2012.5), 3-4(2012).
- 14) 杉村康司: 薬用植物資源研究センター種子島研究部におけるソロモン諸島未利用植物資源の探索研究と絶滅危惧種タカクマムラサキの保存育成研究, 和漢薬, No.709(2012.6), 6-9(2012).
- 15) Kawano, N. Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.: Genetic and Phenotypic Analyses of a *Papaver somniferum* T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition, *Pharmaceuticals*, **5**, 133-154 (2012).
- 16) Inui, T., Kawano, N., Shitan, N., Yazaki, K., Kiuchi, F., Kawahara, N., Sato, F., Yoshimatsu, K.: Improvement of

benzylisoquinoline alkaloid productivity by overexpression of

3'-Hydroxy-N-methylcoclaurine

4'-O-Methyltransferase in transgenic *Coptis japonica* plants, *Biol. Pharm. Bull.*, **35(5)**, 650-659 (2012).

17) 菱田敦之：アルテミシニンの生産を目的としたクソニンジンの栽培, 道薬誌, **29(2)**, 17-20 (2012).

18) 菱田敦之：生薬「吉草根」の生産とその課題, 道薬誌, **29(4)**, 25-28 (2012).

19) 菱田敦之：生薬「半夏」の生産とその課題, 道薬誌, **29(6)**, 23-26 (2012).

20) 菱田敦之：薬用植物の栽培と今後の展望, 農家の友, **64(12)**, 22-25 (2012).

21) Yoshimatsu, K.: Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities, *Journal of Traditional Medicines*, **29**, 30-34 (2012).

22) 吉松嘉代：薬用植物組織培養物コレクションについて, 日経バイオテクオンラインGreen Innovation, **219**, (2012).

23) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸：植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成, ブレインテクノニュース, **149**, 20-28 (2012).

24) 吉松嘉代：甘草の水耕栽培 薬用植物資源の保護と確保, ファルマシア, **49**, 141-146 (2013).

25) 吉松嘉代：植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産, SHITA REPORT No.30, 日本生物環境工学会, 京都, pp.13-21 (2013).

26) 林 茂樹：甘草の栽培について (前編), 道薬誌, **30(2)**, 17-19 (2013).

27) Fuchino, H., Daikonya, A., Kumagai, T., Goda, Y., Takahashi, Y. and Kawahara, N. : Two New Labdane Diterpenes from Fresh Leaves of *Leonurus japonicus* and Their Degradation during Drying. *Chem. Pharm. Bull.* (2013) accepted.

2. 学会発表

1) 林 茂樹, 菱田敦之, 熊谷健夫, 澤井

清道, 中西大樹, 佐藤正幸, 青柳光敏, 林 隆章, 姉帯正樹, 柴田敏郎：シャクヤク新品種「べにしずか」について, 日本生薬学会北海道支部第34回例会 (2010.5.8, 札幌).

2) Kayo Yoshimatsu, Hirotaka Chida, Noriaki Kawano, Takayuki Inui, Toshiro Shibata, Takashi Hagio, Nobuo Kawahara: Efficient glycyrrhizin production by non-transgenic and transgenic Chinese licorice; *Glycyrrhiza uralensis*, 12th World Congress of the IAPB (International Association for Plant Biotechnology) and 2010 In Vitro Biology Meeting of the SIVB (St. Louis, Missouri, 2010.6.6-11).

3) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 佐藤文彦, 土反伸和, 矢崎一史, 木内文之, 川原信夫：ガラス化法による薬用植物カールの超低温保存(2)、第28回日本植物細胞分子生物学会(仙台)大会・シンポジウム(仙台2010.9.2-3).

4) 熊谷健夫, 柴田敏郎, 澤井清道, 福田達男, 酒井英二, 磯田 進, 姉帯正樹, 川原信夫：シシウドの栽培に関する研究一採種地の異なる野生系統の生育, 収量および成分含量, 日本生薬学会第57回年会 (2010.9.24-26, 徳島).

5) 林 茂樹, 菱田敦之, 熊谷健夫, 柴田敏郎, 佐藤正幸, 青柳光敏, 林 隆章, 姉帯正樹：摘花作業の短縮が可能なシャクヤク新品種の育成, 日本生薬学会第57回年会 (2010.9.24-26, 徳島).

6) 吉松嘉代：閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産, 第18回天然物の開発と応用シンポジウム「薬学における生薬・漢方の未来を考える」(2010.11.11).

7) 林 茂樹, 柴田敏郎：カンゾウの国内生産を目指した栽培と育種に関する取り組み, 第5回甘草に関するシンポジウム (2011.2.18, 京都).

8) 飯田 修, 杉村康司, 吉松嘉代, 河野徳昭, 千田浩隆, 川原信夫：ケシ (*Papaver somniferum* L.) の早熟・矮性系統及び高コデイン含量系統の育成, 日本薬学会131

年会 (2011.3.28-31, 静岡).

9) 乾 貴幸, 河野徳昭, 柴田敏郎, 川原信夫, 吉松嘉代: 薬用植物優良品種育成を指向した遺伝子鑑別法の開発, 日本薬学会131年会 (2011.3.28-31, 静岡).

10) 高上馬希重, 関崎春雄, 林 茂樹, 柴田敏郎, 山本 豊: 甘草 (カンゾウ, *Glycyrrhiza uralensis*) の高品質系統の育成研究, リクイリチン含有率の個体間変異について, 日本薬学会第131年会 (2011.3.28-31, 静岡)

11) 高上馬希重, 林 茂樹, 柴田敏郎, 川原信夫, 山本 豊: 生薬「甘草 (カンゾウ)」の原植物 *Glycyrrhiza uralensis* におけるグリチルリチン高含有系統の選抜について, 日本生薬学会北海道支部第35回例会 (2011.5.21, 札幌)

12) 吉松嘉代: 栽培技術の革新: 閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培. 第28回和漢医薬学会学術大会 (2011.8.27, 富山) .

13) 菱田敦之, 林 茂樹, 川原信夫, 柴田敏郎: ハトムギ新品種「北のはと」の育成と道内普及, 第22回北海道東洋医学シンポジウム (2011.9.3-4, 札幌).

14) 乾 貴幸, 河野徳昭, 吉松嘉代, 柴田敏郎, 川原信夫, 飯田 修: 薬用植物優良系統品種育成を指向した遺伝子鑑別法の開発 (2), 日本生薬学会第58回年会 (2011.9.24-25, 東京).

15) 熊谷健夫, 北澤 尚, 渕野裕之, 川原信夫: ハマボウフウの直播栽培の生育, 収量に及ぼす栽植密度と施肥量の影響, 日本生薬学会第58回年会 (2011.9.24-25, 東京).

16) 高上馬希重, 林 茂樹, 柴田敏郎, 川原信夫, 山本 豊: 高品質甘草の開発研究: ウラルカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) のグリチルリチン酸高含有系統におけるリクイリチン特性, 日本生薬学会第58回年会 (2011.9.24-25, 東京).

17) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 千田浩隆, 柴田敏郎, 川原信夫: 閉鎖型植物生産施設における薬用植物の生産に関

する研究(2)ウラルカンゾウ優良株の作出と増殖. 日本生薬学会第58回年会 (2011.9.24-25, 東京).

18) 若菜大悟, 丸山卓郎, 内山奈保子, 合田幸広, 神谷 洋, 川崎武志, 山本 豊, 林 茂樹, 柴田敏郎: メタボローム解析によるシャクヤクの品質評価 (第2報), 日本生薬学会第58回年会 (2011.9.24-25, 東京).

19) 乾 貴幸, 河野徳昭, 萩尾高志, 吉松嘉代, 柴田敏郎, 川原信夫, 飯田 修: ナイモウオウギへの遺伝子導入法の開発, 日本薬学会第132年会 (2012.3.28-31, 札幌).

20) 熊谷健夫, 渕野裕之, 川原信夫: 薬用植物の種子発芽に関する研究—メハジキ, アマ, アイ, ジギタリス, カワラケツメイ, ケイガイ, トロロアオイの種子発芽に及ぼす温度の影響, 日本薬学会第132年会 (2012.3.28-31, 札幌).

21) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 川原信夫, 松本敏一, 岩本 嗣: 漢方薬に使用される薬用植物の組織培養及び効率的増殖法に関する情報整備 (1). 日本薬学会第132年会 (2012.3.28-31, 札幌).

22) 金 尚永, 高上馬希重, 林 茂樹, 菱田敦之, 柴田敏郎, 川原信夫, 山本 豊: 生薬「甘草 (カンゾウ)」の原植物 *Glycyrrhiza uralensis* におけるリクイリチン含有量の多様性について, 日本生薬学会北海道支部第36回例会 (2012.6.16, 札幌).

23) 林 茂樹, 菱田敦之, 高上馬希重, 山本 豊, 柴田敏郎, 川原信夫: 成分含量および収量性からみたカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) の品種育成. 栄養繁殖3年目株の形質再現性評価と第2次選抜, 日本生薬学会北海道支部第36回例会 (2012.6.16, 札幌).

24) 吉松嘉代: 植物工場に適した薬用植物の分子育種, 日本学術振興会植物バイオ第160委員会第4期第4回研究会「植物工場と植物バイオの接点」(2012.6.29, 大阪).

25) 乾 貴幸, 河野徳昭, 萩尾高志, 吉

松嘉代, 柴田敏郎, 川原信夫, 飯田 修 :
ナイモウオウギへの遺伝子導入法の開発
(2), 第30回日本植物細胞分子生物学会
(生駒)大会・シンポジウム(2012.8.3-5,
奈良).

26) 吉松嘉代, 松本敏一, 岩本 嗣, 乾
貴幸, 河野徳昭, 川原信夫: 漢方薬に使用
される薬用植物の組織培養及び効率的
増殖法に関する情報整備 (2), 第30回日
本植物細胞分子生物学会(生駒)大会・
シンポジウム(2012.8.3-5, 奈良).

27) 熊谷健夫, 北澤 尚, 瀧野裕之, 川
原信夫: ハマボウフウの直播栽培の生育,
収量に及ぼす播種期の影響, 日本生薬学
会第59回年会(2012.9.17-18, 千葉).

28) 高上馬希重, 金 尚永, 林 茂樹,
菱田敦之, 柴田敏郎, 川原信夫, 山本 豊
: 高品質カンゾウの開発研究. ウラルカ
ンゾウ(*Glycyrrhiza uralensis*)のグリチル
リチン酸高含有系統におけるクローン増
殖, 日本生薬学会第59回年会
(2012.9.17-18, 千葉).

29) 吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 川
原信夫: 種々栽培環境条件下で養液栽培
したウラルカンゾウ優良株の形質, 日本
生薬学会第59回年会(2012.9.17-18, 千葉).

30) 吉松嘉代: 植物工場における薬用植
物優良苗の育成と生産, 第23回SHITAシ
ンポジウム(2013.1.18, 東京).

31) 乾 貴幸, 河野徳昭, 吉松嘉代, 柴
田敏郎, 川原信夫, 飯田 修: 薬用植物
優良品種育成を指向した遺伝子鑑別法の
開発(3), 日本薬学会第133年会
(2013.3.28-30, 横浜).

32) 熊谷健夫, 瀧野裕之, 川原信夫: 薬
用植物の種子発芽に関する研究—コガネ
バナ, コエンドロ, キササゲ, ゴマ, ミ
シマサイコ, カワラヨモギの種子発芽に
及ぼす温度の影響, 日本薬学会第133年会
(2013.3.28-30, 横浜).

33) 吉松嘉代, 河野徳昭, 飯田 修, 根
岸直希, 中浜克彦, 河岡明義, 御影雅幸,

川原信夫: 人工環境制御下でのマオウ属
種苗の保存と効率的増殖に関する研究,
日本薬学会第133年会(2013.3.28-30, 横
浜).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 出願番号 特願2009-200179 発明者
林 茂樹, 柴田敏郎, 高上馬希重 発明
の名称 新規ウラルカンゾウ及びその栽
培用ストロン.

2) 出願番号 特願2010-107530 発明者
河野徳昭, 吉松嘉代, 千田浩隆 特許出
願人, 識別番号(団体名及び弁理士事務
所) 独立行政法人医薬基盤研究所
(505314022) 代理人: 木村満(100095407)
発明の名称 植物形質転換体の作出方法
及び植物形質転換体 出願日 平成22年
5月7日

3) 出願番号 特願2010-250700 発明者
吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 千田浩
隆 特許出願人, 識別番号(団体名及び
弁理士事務所) 鹿島建設株式会社
(000001373) 代理人: 丹羽俊輔
(100129300) 発明の名称 カンゾウ属
植物株及びカンゾウ属植物増殖方法 出
願日 平成22年11月9日

4) 出願番号 特願2011-245757 発明者
吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸, 千田浩
隆 特許出願人, 識別番号(団体名及び
弁理士事務所) 鹿島建設株式会社
(000001373) 代理人: 丹羽俊輔
(100129300) 発明の名称 カンゾウ属
植物株及びカンゾウ属植物増殖方法 提
出日 平成23年11月9日.

5) 品種登録出願 [登録番号] 第24217
号, [種類] *Paeonia lactiflora* Pall., [品種
名] べにしずか, [登録日] 平成21年10
月15日.

6) 品種登録 [登録番号] 第22470号, [種
類] *Coix ma-yuen* Roman, [品種名] は
とろまん, [登録日] 平成25年3月25日.

平成22～24年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

優良形質を持った薬用植物新品種の育成及びそれら種苗の安定供給体制構築のための

保存、増殖に関する基盤的研究

(H22-創薬総合-指定-015)

総合研究報告書

分担研究課題

生薬の品質評価における新しい定量法の開発に関する研究について

分担研究者 瀧野 裕之 独立行政法人医薬基盤薬用植物資源研究センター

要旨 生薬は天然品である故に、その栽培環境や調製方法によるときに著しく成分の変化を受ける。このような成分差異というのはその生薬を配合する漢方処方薬の薬効に影響するため、生薬の品質管理というのは大変重要である。生薬成分の評価法には様々な方法があるが、前処理や操作が煩雑であったり熟練さが要求されたりの問題がある。新しい品質評価方法および簡便な評価方法の開発を行なった結果、22年度はカンゾウの試料を使った新たな品質評価法構築の試みとして2次元展開法による薄層クロマトグラフィーによる展開後のスポットのTLCMSを行うことを試みた。2次元TLCを展開後にTLCMSインターフェースによるTLC上のスポットのMSの測定を行い、フラボノイド配糖体のほか、グリチルリチン酸の検出が可能であった。23年度はカンゾウの成分の一斉定量法の検討を行なった。HPLCにおける定量では一部の市場品を用いた定量において重なりが起るため、LCMSを用いた定量法を検討した。その結果、MRM法においては十分な分離が見られ、本方法を用いたカンゾウ成分の一斉定量が可能と考えられた。24年度は新しい生薬シコンのシコニン色素含量評価法として分光測色計を用いた方法を検討した。その結果、HPLC法によるシコニン類定量合計値と測色計測定値と非常に良い相関を示した。本方法は生薬シコンのシコニン系色素含量を測定する新しい測定法になると考えられた。

協力研究者

大根谷章浩（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部）

新井 玲子（東京理科大学薬学部）

竹脇 大気（東京理科大学薬学部）

高橋 豊（エム・エスソリューションズ）

菱田 敦之（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部）

林 茂樹（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部）

センター北海道研究部）

A. 研究目的

生薬は植物、鉱物、動物由来といずれも天然由来であるため、その生育環境により個体差を生じやすい。植物由来の生薬は最も多く、全体の9割を占めるが、植物は栽培方法、例えば野生品、栽培品の違いや、栽培地域の土壌の違いなどで成分が影響を受ける。また植物由来生薬は、多くの場合に生薬にする段階で乾燥などの加工調製を必ず受けることになるが、その段階での成分変化がおこることがあり、そのようなことから生薬の品質管理は重要であり、その評価方法としての成分分析方法の確立は重要である。本研究事業においては生薬の新しい品質評価法に関する検討を行った。

生薬の品質評価を行うためには成分系全体をみて評価する必要性があり、微量成分などの差異を総合的に検討することにより生合成系での比較を類推することも可能となる。2D-TLCは古くから知られるTLC手法であるが、1Dでは重なりあいがあるサンプルも分離させることが可能であり、かつ視覚的に成分全体を観察することが可能である。近年TLC-MSインターフェースが開発された。これは現在既存のDART法などのTLC-MSでは適用が困難な2DTLCにも適用できる画期的なTLCMSインターフェースであり、既存のLCMSに簡単に装着可能である。22年度はカンゾウの新規成分分析手法の開発を目的として、2DTLC-MSを用いた品質評価法を検討した。

23年度はカンゾウの成分をLCMSを用いて一斉定量を行うことを試みることにした。カンゾウには多くの成分の報告があるが、それらを一斉にHPLCで定量するには極性の問題などがあり非常に困難である。そのためにはカラムの選定など条件の検討を行う必要がある。カラム選定や測定条件の検討、ならびにLCMS法を用いた定量について

も検討を行なった。

24年度は生薬シコン中のシコニン類含量を一旦HPLCにて定量を行い、それらを分光色相計を用いて測定し、それらの相関関係を求めて色相値からシコン中シコニン含量を求める新たな簡易な方法を提案した。

B. 研究方法

22年度 カンゾウの TLCMS の検討

試験用試料の作成

検討用試料としては内モンゴル産カンゾウ（東北1号）を使用した。本生薬を粉碎し、その後その粉末70gに水300mlを加えて加熱還流を2時間行った。その後遠心分離を行い、上澄液を凍結乾燥を1週間行い、完全に乾燥し試験試料とした。

2D-TLC の検討

カンゾウ水抽出液を用いて2D-TLCの検討を行った。20cm x 20cmのTLCプレートの角の両端から約2cmの場所に検討試料のメタノール溶液をスポットし、各種展開溶媒にて展開をした。

展開溶媒

（検討1）

第1回目：BuOH-H₂O-AcOH（7:2:1）

第2回目：AcOEt-H₂O-HCOOH（5:1:1）

（検討2）

第1回目：AcOEt-MeOH（1:1）

第2回目：CHCl₃-MeOH-H₂O（6:4:0.8）

（検討3）

第1回目：CHCl₃-MeOH-H₂O（65:30:5）

第2回目：EtOAc-MeOH-AcOH（3:1:2）

検出はいずれも紫外線吸収（主波長254nm）、紫外線吸収（主波長366nm）、10%硫酸噴霧後加熱、10%硫酸噴霧加熱後紫外線吸収（主波長366nm）の4種類で行った。

TLC-MSの検討

上記のようにして展開されたTLCプレートを風乾後に、CAMAG社製TLCMSインターフェースにかけ、目的とするスポットをHPLCでの溶媒にて抽出し直接MS部に導入しLCMS測定を行った。MS条件はイオン源はESI (positive)で行った。

5	Licoricesaponin H2	822.4
6	Licoricesaponin G2	838.4
7	Glycyrrhetic acid 3-O-gluA	646.818
9	Lichocalcone A	338.403

表 今回用いた標準品

23年度 カンゾウの LCMS による定量法の検討について

1) HPLCによる検討

抽出条件の検討を最初に行なった。カンゾウ市場品を用いて、粉碎後に遠沈管に採取し、各種溶媒にて室温下15分間振り混ぜて抽出し、遠心分離後の上澄み液を試料溶液とし、HPLCにて分析を行なった。

(定量法) 本品の粉末約 0.5g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、70%エタノール70mLを加えて15分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は更に希エタノール25mLを加え、同様に操作する。全抽出液を合わせ、希エタノールを加えて正確に100mLとし、試料溶液とする。別にグリチルリチン酸標準品約25mgを精密に量り、70%エタノールに溶かして正確に100mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液20 μ Lずつを正確にとり、液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のグリチルリチン酸のピーク面積 A_1 及び A_5 を測定する。

No.	Compound name	Molecular weight
1	Glycyrrhizin	822.942
2	Glabridin	324.376
3	Liquiritin	418.398
4	18b-Glycyrrhetic acid	470.694

2) LCMSによる定量

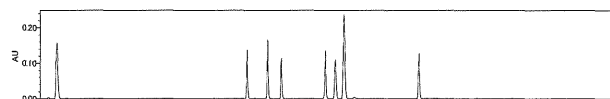
API3000(ABSciex社製)はイオン源としてESIおよびAPCIが用いることができ、さらにMS/MS測定を行うことが可能であり、これにより広範囲の成分におけるMRM(Multiple Reaction Monitoring: 多重反応モニタリング)定量を行うことができる。MRMは同じ保持時間に同一の分子量、プロダクトイオンを示すものがなければ原理的には分別定量が可能である。またHPLCに比較しLCMSは格段に感度が高くなるため、高感度で目的物の定量が行える利点がある。

(条件) 使用機器: API3000 (ABSciex)

イオン源: TIS (ESI)

カラム: Kinetex C18 100A

溶媒: 0.1%TFA/H₂O-CH₃CN グラジエント



9種類の標準品混合物のLCチャート

Q3, MS(2)に8種類のデータを入力し検討した。

24年度 シコン中のシコニン類含量の分光測色計による定量法の開発

試料溶液調製方法 粉碎して乾燥した試料0.5gを精密に遠沈管に測りとり、酢酸エチル/エタノール混液(1:1)20mLを加えて20分間振り混ぜた。その後遠心分離を行い、上澄液をとり50mLのメ

スフラスコに移す。残さにさらに酢酸エチル/エタノール混液(1:1)20 mLを加えて振り混ぜ、遠心分離後にメスフラスコに加え、さらに酢酸エチル/エタノール混液(1:1)を加えて正確に50mlとし試料溶液とした。

標準溶液調整方法 シコン標準品 Shikonin, β -Hydroxyisovaleryl shikonin,

Acetylshikonin,

Isobutyrylshikonin, β , β -Dimethyl

lacrylshikonin 各 5 mg 精密に秤量し 25ml メスフラスコに酢酸エチル/エタノール混液(1:1)でメスアップしそれを原液とした。原液を10倍、100倍希釈を行い、それぞれ標準溶液とした。

HPLC 分析条件

カラム: Waters Atlantis T3 5 μ m 4.6 \times 250 mm column

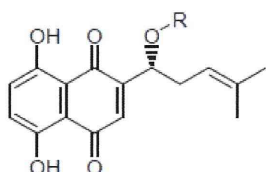
溶媒: 0.1%酢酸/CH₃CN=3:7,

温度: 30 $^{\circ}$ C,

流速: 1.0 mL/min 516nm

Injection volume 10 μ l

分光測色計による測定 上記調製試料をそのまま用いた。2 mm ガラスセルを用いた液体透過率測定により、L*a*b*の表色系にて数値を算出した。



Shikonin	R=H
Acetylshikonin	R=COCH ₃
Isobutyrylshikonin	R=COCH(CH ₃) ₂
β -Hydroxyisovalerylshikonin	R=COCH ₂ C(CH ₃) ₂ OH
Isovalerylshikonin	R=COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
α -Methyl-n-butyrylshikonin	R=COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
β , β -Dimethylacrylshikonin	R=COCH=C(CH ₃) ₂
Teracrylshikonin	R=COCH ₂ C(CH ₃)=C(CH ₃) ₂

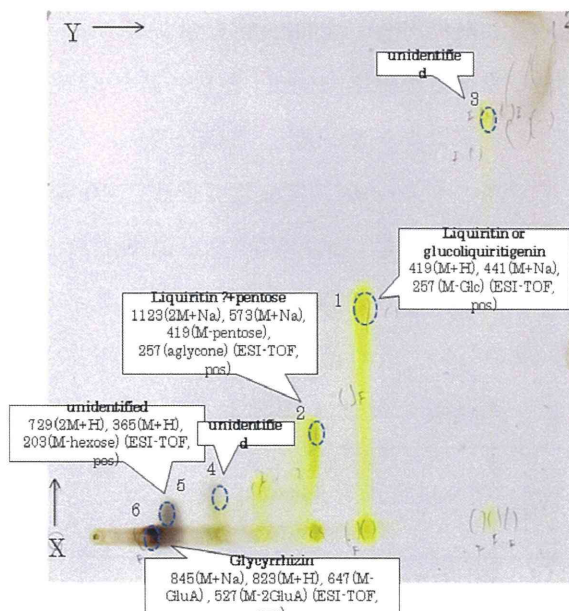
シコン中の shikonin 誘導體

C. 結果

22年度 カンゾウの TLCMS の検討

各種TLC展開条件にて二次元TLC展開を行ったが、X軸にブタノールを用いた展開溶媒では成分が良く分離した。しかしながら展開時間が長時間かかり(1展開に6時間以上、2展開に10時間以上)、複数枚の展開が困難である。

TLC-MSを行うためには、10%硫酸を噴霧してはシリカゲル上の成分は変化してしまうために使用することはできないという欠点がある。しかしながらカンゾウの指標成分であるグリチルリチン酸を含めて多くの成分は紫外線吸収を持たず、10%硫酸噴霧加熱などの方法を取らねば検出することができない。そこで、全く同じ条件で2枚2D-TLCを展開し、その後1枚のみを10%硫酸を噴霧し加熱して呈色させ、それをもう1枚に重ね合わせて目的とするスポットの場所を特定することにした。



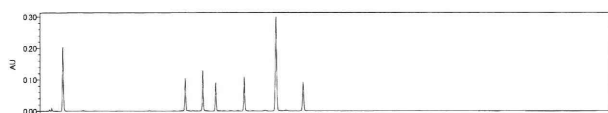
Spotは、いずれもUV吸収を示し、10%硫酸を噴霧後加熱することにより黄色に呈色する。このことからフラボノイドと推定されたが、spot1はその中でも最もスポットが多く、主要フラボノイドと

推定された。そのMSでは m/z 419[M+H]⁺、441[M+Na]⁺にそれぞれ擬似分子イオンピークが現れている他、257[M-hexose]⁺に脱六単糖に相当するピークが現れた。本分子量に相当するカンゾウフラボノイド成分としてはLiquiritinまたはglucoliquiritigeninがある。Spot2には m/z 1123 [2M+Na]⁺、573 [M+Na]⁺、419 [M-pentose]⁺、257 [aglycone]⁺に相当すると思われるピークが認められた。これらからspot2の化合物はその極性などからも考えてspot1のliquiritinにさらにもう一分子5単糖が結合した構造と推定された。Spot5は構造が確定できないが、 m/z 729 [2M+H]⁺、365 [M+H]⁺、203 [M-hexose]⁺と考えられ、6単糖の配糖体と考えられたが、MSのフラグメントからのみでは構造を特定できなかった。Spot6は m/z 845 [M+Na]⁺、823 [M+H]⁺、647 [M-GluA]⁺、527 [M-2GluA]⁺が認められ、グリチルリチン酸標準品のMSパターンと一致したことからグリチルリチン酸（グリチルリチン）と特定した。

23年度 カンゾウの LCMS による定量法の検討について

1) HPLCによる検討

HPLC 条件を検討した結果、0.1%TFA/H₂O と CH₃CN 混液のグラジエント条件がもっとも分離がよかった。またカラム種類も検討した結果、ODS系のカラムを用いることとした。



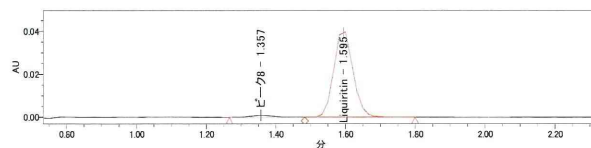
9種類標準品混合物のHPLCチャート

この条件においては Lichocalcone A と Glabridin が分離しないが、HPLC 定量においてはこの条件で行った。

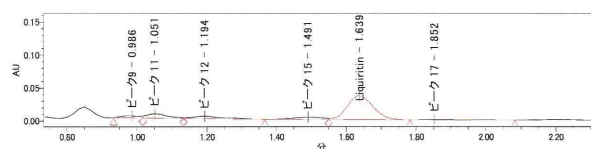
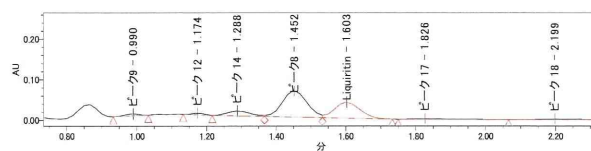
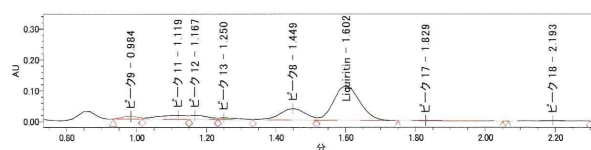
市場流通品の 70%エタノール抽出エキスの比較を行ったところ、Glycyrrhizin と

Liquiritin のピークは明瞭に現れたが、それ以外の7種類のピークは検出困難であった。よって、HPLC における定量においては Glycyrrhizin と Liquiritin の2種類において検討を行った。

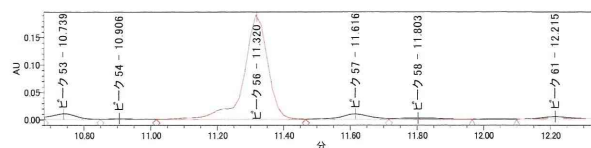
Liquiritin standard



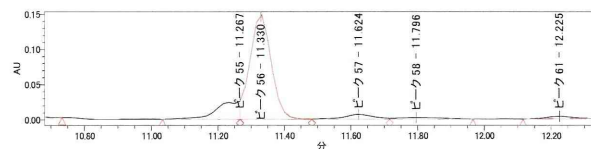
市場流通品の Liquiritin のピーク



No. 18 の Glycyrrhizin のピーク (shoulder)



No. 21 の Glycyrrhizin のピーク



この条件において、Liquiritin はどの試料においても重なりがみられずに定量は可能と考えられたが、Glycyrrhizin においては、一部の試料 (No. 18, No. 21 など) において分離が悪いピークとなったが、この二種類の成分に関しては十分

HPLCにおける同時定量は可能と考えられた。

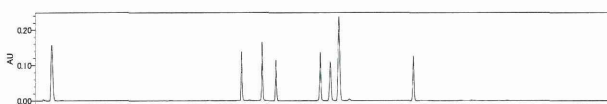
2) LCMSによる定量

四重極を用いた LCMS においては定量が可能であり、さらに MS/MS 測定を行うことにより、広範囲の成分における MRM (Multiple Reaction Monitoring : 多重反応モニタリング) 定量を行うことができる。MRM は、一度イオン化されたイオンに対して、そのプロダクトイオンをみて目的のフラグメントにあったものを選択的に検出することができるため、バックグラウンドに夾雑物があつたとしても目的のイオンを選択的に拾うことができ、感度のよい定量を行うことが可能である。同じ保持時間に同一の分子量、プロダクトイオンを示すものがなければ原理的には分別定量が可能である。また HPLC に比較し LCMS は格段に感度が高くなるため、高感度で目的物の定量が行える利点がある。

(条件) 使用機器 : API3000 (ABSciex) イオン源 : TIS (ESI)

カラム : Kinetex C18 100A

溶媒 : 0.1%TFA/H₂O-CH₃CN グラジエント



9種類の標準品混合物の LC チャート

Q3, MS(2)に8種類のデータを入力し検討した。

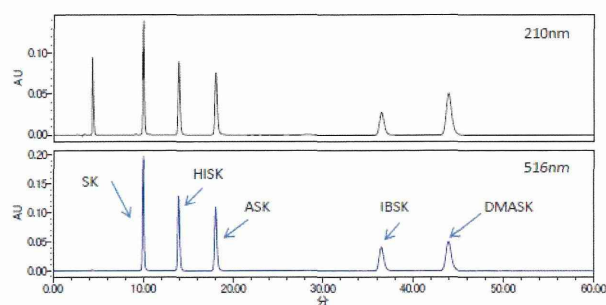
Glycyrrhizin と LiH2 は保持時間が近く分子量と MSMS が同じであるため、誤定量される傾向があつ

た。しかしそれ以外は分別定量が可能と考えられた。後ろに今回の MRM 定量における該当ピークの定量チャートを示した。

24年度 シコン中のシコンン類含量の分光測色計による定量法の開発

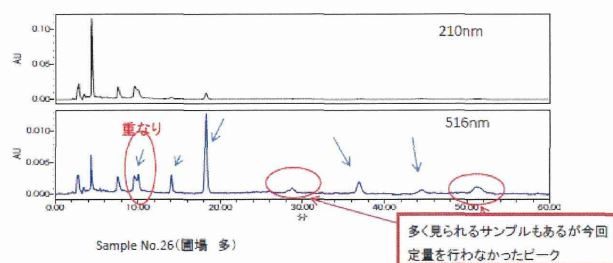
HPLCによるシコン中シコンン類の定量

上記分析条件にてすべてのシコンン類化合物は良好な分離チャートを与えた。シコン抽出試料溶液についても良好な分離であつた。



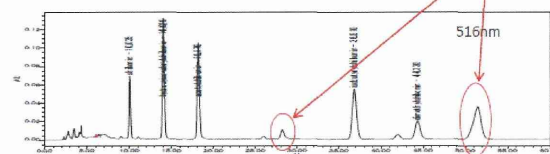
標準品 5種類のHPLCチャート

(上段 : 210nm, 下段 : 516nm)

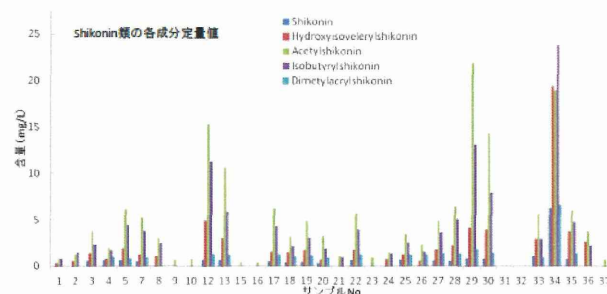


Sample No.26(園場 多)

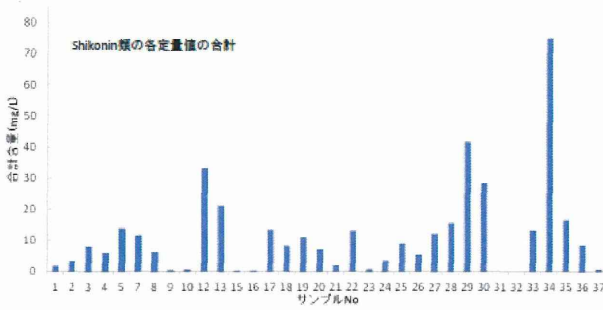
多く見られるサンプルもあるが今回定量を行わなかったピーク



Sample No.34(中国野生品 天藤)

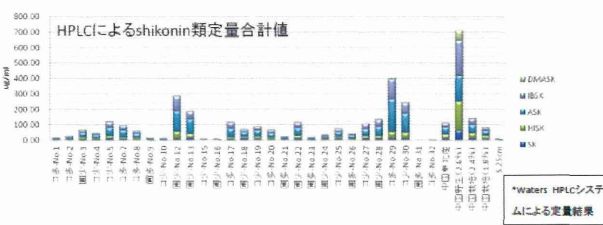
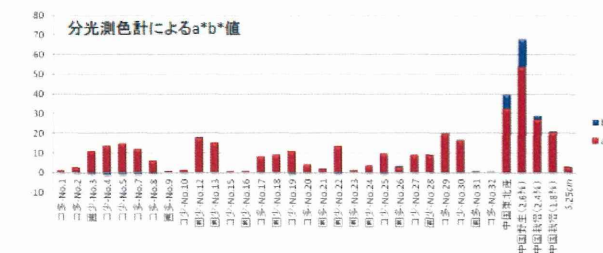


シコンン類の各成分定量値

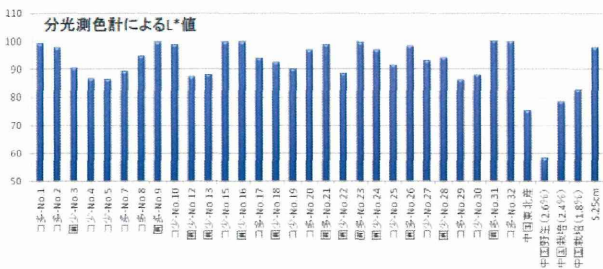


シコニン類の各定量値の合計

シコン試料溶液の分光測色計による表色測定について



HPLCによるshikonin類定量結果と分光測色計による測定結果の比較



分光測色計による L*値と HPLC によるシコニン類定量合計値の比較

D. 考察

22年度 2DTLCMS の各種条件検討を行った。展開の理想としては対角線上にのみスポットが並ぶのではなく、TLC 全体にスポットが広がることであり、かつスポットの重なり合いが見られないことである。今回の検討した溶媒系の中では全体にスポットが分布するパターンは得られなかった。また熱水抽出であったため配糖体が多く抽出されていると考えられ、特にフラボノイド配糖体が多く観察された。それらとグリチルリチン酸が特定できたものの、低極性成分の差異も比較する必要がある、抽出溶媒の再検討が必要である。しかしながらフラボノイド配糖体およびカンゾウの最重要成分であるグリチルリチンのスポットは今回の条件で定性が可能であることがわかり、今後高グリチルリチン含量カンゾウの同様な条件での展開を行った場合の可視的な比較が可能となった。

23年度 カンゾウの9種類の成分の一斉定量を HPLC および LCMS において検討した。抽出条件についてはまだ検討する余地がある。HPLC による定量においては、Liquiritin と Glycyrrhizin の同時定量は可能と考えられたが他成分については含量が低く、高感度の LCMS を用いる必要性があり、LCMS による定量を検討したが、一部の同一分子量の化合物の重なりが見られたもののほぼすべての成分の定量が可能と思われた。

24年度 Shikonin において一部 516nm における妨害ピークがみられたため解析処理を行った。また、5つの標準化合物について定量を行ったが、それ以外のピークについても試料により顕著なピークが見られた。これらの同定は標準品あるいは LCMS の検討が必要となる。

分光測色計を用いた検定においては、L*a*b*の

表色系によりデータを算出した。HPLC 定量における shikonin 類合計含量との間に良い相関がみられたため、今後分光測色計によるシコニン類含量の測定が可能になると考えられる。

E. 結論

今回の研究事業においては生薬の新しい品質評価法の開発の検討を行ったが、各年度においてそれぞれよい評価法を提案することができた。

TLCMS による分析法においては 2 次元 TLC の展開溶媒で

第 1 回目：CHCl₃-MeOH-H₂O (65:30:5)

第 2 回目：EtOAc-MeOH-AcOH (3:1:2)

の条件で展開した場合、数種類のフラボノイド配糖体とグリチルリチンの成分スポットが分離良く展開され、TLCMS の検討が可能であった。

TLCMS インターフェースの設定の不具合により対象となるスポットがうまく抽出されないという面もあったが、その点を改善すれば十分に本分析手法は新しい品質評価法につなげることが可能と考えられた。

またカンゾウ 9 成分の一斉定量法に関しては LCMS を用いて行うことが十分可能と考えられた。しかし問題点としては今後はさらに抽出溶媒の検討

が必要と考えられた。

シコン中のシコニン類の分光測色計による分析方法の検討については、HPLC 定量値と分光測色計による結果の間に非常に良い相関が得られたことから、シコン中のシコニン色素の含量評価は、条件設定や操作が煩雑な HPLC に代わり操作が簡便な分光測色計によって行うことができると考えられ、新しい生薬シコンの評価法になるものと思われた。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻, 号	ページ	出版年
林 茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎	北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質へ及ぼす影響	生薬学雑誌	64(2)	68-75	2010
林 茂樹, 菱田敦之, 熊谷健夫, 佐藤正幸, 青柳光敏, 林隆章, 姉帯正樹, 柴田敏郎	成分含量, 生薬の性状および農業形質からみた薬用シャクヤク品種の育成 (第1報) —低開花率により摘花および摘蓄作業の省力が可能になる新品种について—	生薬学雑誌	65(2)	129-133	2011
Kojoma, M., Hayashi, S., Shibata, T., Yamamoto, Y. and Sekizaki, H.	Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>) plants cultivated under the same conditions	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	34(8)	1334-1337	2011
吉松嘉代	栽培技術の革新：閉鎖系栽培施設における薬用植物の養液栽培	<i>Journal of Traditional Medicines</i>	28	44	2011
吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸	ウラルカンゾウの養液栽培による高効率的グリチルリチン酸生産	<i>BIO INDUSTRY</i>	28(12)	13-20	2011
川原信夫	薬用植物・生薬の栽培, 育種, 組織培養及び品質評価	和漢薬	701	5-6	2011
吉松嘉代	医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部育種生理研究室の紹介-薬用植物の組織培養物コレクション-	和漢薬	702	3-4	2011
河野徳昭	薬用植物資源の高度利用化に向けて-ポストモデル植物時代の生薬ゲノミクス-	和漢薬	703	5-6	2011
淵野裕之	独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室-薬用植物成分研究と生薬の品質評価法の研究, 種子の保存-	和漢薬	704	7-9	2012
熊谷健夫	医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室-薬用植物の栽培研究と種子交換-	和漢薬	705	4-6	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻, 号	ページ	出版年
菱田敦之	医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部栽培研究室-日本における薬用植物栽培の普及とその課題-	和漢薬	706	4-7	2012
林 茂樹	薬用植物の品種育成について	和漢薬	707	4-6	2012
飯田 修	(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部-熱帯, 亜熱帯性薬用, 有用植物の収集, 保存, 育成および利用-	和漢薬	708	3-4	2012
杉村康司	薬用植物資源研究センター種子島研究部におけるソロモン諸島未利用植物資源の探索研究と絶滅危惧種タカクマムラサキの保存育成研究	和漢薬	709	6-9	2012
Kawano, N. Kiuchi, F., Kawahara, N., Yoshimatsu, K.	Genetic and Phenotypic Analyses of a <i>Papaver somniferum</i> T-DNA Insertional Mutant with Altered Alkaloid Composition	<i>Pharmaceuticals</i>	5	133-154	2012
Inui, T., Kawano, N., Shitan, N., Yazaki, K., Kiuchi, F., Kawahara, N., Sato, F., Yoshimatsu, K.	Improvement of benzyloquinoline alkaloid productivity by overexpression of 3'-Hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-Methyltransferase in transgenic <i>Coptis japonica</i> plants	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	35(5)	650-659	2012
菱田敦之	アルテミシニンの生産を目的としたクソニンジンの栽培	道薬誌	29(2)	17-20	2012
菱田敦之	生薬「吉草根」の生産とその課題	道薬誌	29(4)	25-28	2012
菱田敦之	生薬「半夏」の生産とその課題	道薬誌	29(6)	23-26	2012
菱田敦之	薬用植物の栽培と今後の展望	農家の友	64(12)	22-25	2012
Yoshimatsu, K.	Innovative cultivation: Hydroponics of medicinal plants in the closed-type cultivation facilities	<i>Journal of Traditional Medicines</i>	29	30-34	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻, 号	ページ	出版年
吉松嘉代	薬用植物組織培養物コレクションについて	日経バイオテクノロジー オンライン Green Innovation	219		2012
吉松嘉代, 河野徳昭, 乾 貴幸	植物工場での甘草生産に適したウラルカンゾウの選抜と育成	ブレインテクノロジー ニュース	149	20-28	2012
吉松嘉代	甘草の水耕栽培 薬用植物資源の保護と確保	ファルマシア	49	141-146	2013
吉松嘉代	植物工場における薬用植物優良苗の育成と生産	SHITA REPORT	30	13-21	2013
林 茂樹	甘草の栽培について (前編)	道薬誌	30(2)	17-19	2013
Fuchino, H., Daikonya, A., Kumagai, T., Goda, Y., Takahashi, Y. and Kawahara, N.	Two New Labdane Diterpenes from Fresh Leaves of <i>Leonurus japonicus</i> and Their Degradation during Drying.	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	accepted		2013

北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が 生薬の品質へ及ぼす影響

林 茂樹^a, 姉帯 正樹^b, 佐藤 正幸^b, 柴田 敏郎^a

^a 独立行政法人 医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 北海道研究部

^b 北海道立衛生研究所

Effect of Post-Harvest Processing of *Paeonia lactiflora* Pallas on Quality of the Crude Drug in Northern Hokkaido

Shigeki Hayashi^a, Masaki Anetai^b, Masayuki Sato^b
and Toshiro Shibata^a

^a Hokkaido Laboratory, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of
Biomedical Innovation, 108-4 Ohashi, Nayoro, Hokkaido 096-0065, Japan

^b Hokkaido Institute of Public Health,
Kita-19, Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan

(Received August 31, 2009)

The peony root (*Paeonia lactiflora* Pallas) with a whitish internal root color, which is a crude drug frequently used in Kampo formulae, has been preferred in the crude drug market. However, it has been pointed out that the quality of peony roots produced in northern Hokkaido is inferior, because the internal color of the root turns dark brown and this change of internal color seems to be caused by hot-air drying during processing. In northern Hokkaido, the drying of fresh roots after harvest in autumn by natural means is impossible, because the land is usually covered with snow from November to March. Therefore, post-harvest processing methods suitable for this area were examined, and the results obtained were as follows:

1) L^* value measured by spectrophotometer in a cross-section of the root was closely related with the evaluation by the Japan Color Standard for Horticultural Plants, and the color of root having a high L^* value was shown to be more whitish. 2) Internal color of the root hardly changed, when fresh roots were dried after being stored under dark conditions at less than 20°C for more than 22 days after harvest and then having their periderm removed. This is because enzymatic browning seems to be suppressed. L^* value of a cross-section of the dried root prepared by the methods mentioned above was much higher than that of peony roots in the market. 3) Contents of paeoniflorin, oxypaeoniflorin and gallotannin in dried roots prepared by the methods mentioned above were higher than those prepared by removing the periderm and then drying just after harvest. Contents of those components also increased, when roots were harvested in late autumn.

From these findings, we concluded that peony roots having a whitish internal root color with high contents of paeoniflorin, oxypaeoniflorin and gallotannin could be produced by being stored under dark conditions at less than 20°C for more than 22 days after harvest, then having their periderm removed and being quickly dried.

Keywords: *Paeonia lactiflora* Pallas; Post-harvest processing; Root colors; L^* value

緒 論

生薬芍薬は、鎮痛薬、鎮痙薬、婦人病薬、冷え性用薬、消炎排膿薬等として葛根湯、当帰芍薬散等多くの漢方処方に高頻度で使用される他、胃腸鎮痛鎮痙薬および婦人用薬として配合剤の原料にも使用される。活性成分として paeoniflorin とその関連化合物や gallotannin 等が知られ、第十五改正日本薬局方 (JP15) において、基原植物としてボタン科の多年草シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pallas), 用部として根, paeoniflorin 含量 2.0% 以上と規定されている¹⁾。

芍薬は内部が粉状で充実し、白く仕上がった製品が上品とされる^{1~3)}。古くからの産地である奈良地方では、冬期の乾燥した低温の風による自然日陰乾燥という伝統的な方法により調製が行われてきた³⁾。一方、北海道北部地域では、冬期の降雪と気温の著しい低下が収穫根の凍結を引き起こすことから、屋外での自然乾燥が困難である。このため、多くの場合は温風で機械乾燥され、仕上がった製品の内部は暗褐色に変色し劣品となっている。

そこで、北海道北部地域の気候条件に即した調製方法を確立すべく、根の乾燥方法が横断面の色や各種成分含有率へ及ぼす影響を検討したので報告する。

材料および方法

1. 実験 1: 調製方法の検討

1.1 材 料

(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研

究部 (名寄市) にて 4 年間栽培したシャクヤク「北宰相」50 株の根を用いた。2003 年 9 月 18 日に収穫し、株から根を切り取った後、直径 15~20 mm 程度の根を選び、21 試験区に均等に分けた (生根重: 620~690 g/区)。

1.2 試験区

1.2.1 収穫後の根の貯蔵期間・条件の検討

2003 年 9 月 18 日 (収穫直後), 9 月 29 日 (11 日後), 10 月 10 日 (22 日後), 10 月 20 日 (32 日後), 10 月 30 日 (42 日後) まで乾燥しないようにビニール袋に入れ、日陰または低温 (冷蔵庫内, 4~7°C) で貯蔵した。その後、各々竹べらおよび水を用いて周皮を除去してから 12 月 3 日まで屋外で風乾し、12 月 24 日まで無加温の室内にて乾燥の後、重量の減少が認められなくなるまで 30°C で温風乾燥した。試験区の詳細を Table 1 に、この間の気温の推移を Fig. 1 に示す。

また、収穫時期の比較として、10 月 10 日、10 月 20 日に収穫し、直ちに周皮を除去して同様に乾燥した。

1.2.2 乾燥方法の検討

収穫後、乾燥しないように低温 (冷蔵庫内, 4~7°C) で 32 日間貯蔵後、10 月 20 日に竹べらおよび水を用いて周皮を除去した根を材料とした。屋外風乾場 (風乾区)、無加温の室内 (室内区) および加温した温室内 (温室区) の 3 条件で乾燥した。風乾区は、2003 年 11 月 13 日、12 月 12 日、2004 年 1 月 13 日、2 月 12 日まで屋外風乾場で、室内区および温室区は 11 月 13 日、12 月 12 日、2004 年 1 月 13 日まで無加温の室内または温室内で各々乾燥した後、重量の減少が認められなくなるまで温風乾燥 (30°C) した。試験区の詳細を

Table 1. Experimental design of No. 1 to 11 plots for examination of post-harvest processing methods in *Paeonia lactiflora* Pallas.

Experimental plots	Harvesting	Fresh weight of root	Storage duration and conditions until removing of periderm		Removing periderm	The end of natural drying outdoors	The end of natural drying in non-heated room	The end of hot-air drying in dry-heat oven at 30°C
			Days	Conditions				
No.	Date	g	Days	Conditions	Date	Date	Date	Date
1	18 Sep.	690	0	*****	18 Sep.	3 Dec.	24 Dec.	10 Feb.
10	10 Oct.	630	0	*****	10 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	10 Feb.
11	20 Oct.	658	0	*****	20 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	10 Feb.
2	18 Sep.	640	11	Shade	29 Sep.	3 Dec.	24 Dec.	10 Feb.
3	18 Sep.	685	11	4~7°C	29 Sep.	3 Dec.	24 Dec.	19 Mar.
4	18 Sep.	665	22	Shade	10 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	20 Feb.
5	18 Sep.	650	22	4~7°C	10 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	19 Mar.
6	18 Sep.	620	32	Shade	20 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	19 Mar.
7	18 Sep.	688	32	4~7°C	20 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	20 Feb.
8	18 Sep.	670	42	Shade	30 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	20 Feb.
9	18 Sep.	680	42	4~7°C	30 Oct.	3 Dec.	24 Dec.	20 Feb.

Four-year-old plants were used. Ca. 20 roots (total fresh weight of 620 to 690 g) in each plot were collected from harvested 50 stocks on Sept 18, 2003 for experimental plots of No. 1 to 9.

Ca. 20 roots were collected from harvested three stocks on Oct 10, 2003 (fresh weight of 630 g, No. 10) or Oct 20, 2003 (fresh weight of 660, No. 11) for experimental plots of No. 10 and 11.

Then their periderms were removed after storage for certain duration or immediate after harvest. Then all the roots were dried naturally outdoors until Dec 3, then dried in non-heated room until Dec 24 and then dried by hot-air until dry weight reached stable in the dry-heat oven at 30±1°C.

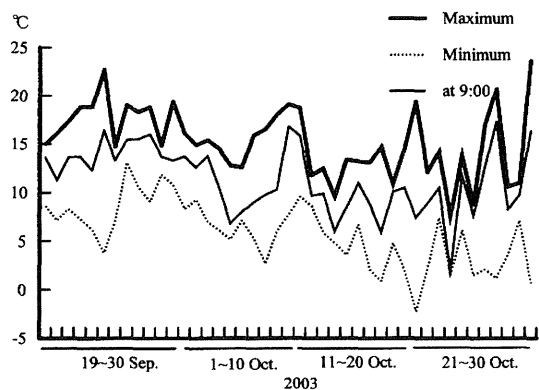


Fig. 1. Temperatures in the shade during the root storage processing.

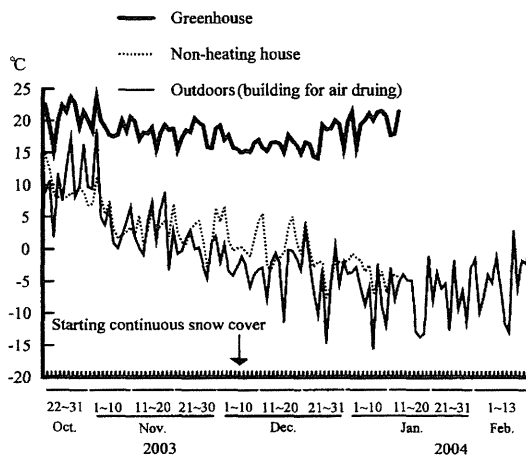


Fig. 2. Temperatures at 9:00 in the different drying places.

Table 2. Experimental design of No. 12 to 20 plots for examination of drying methods in *Paeonia lactiflora* Pallas.

Experimental plots	Harvesting	Fresh weight of root	Storage duration	Removing periderm	Conditions of Natural drying	End of natural drying	The end of hot-air drying in dry-heat oven at 30°C
12	18 Sep.	650	32	20 Oct.	Outdoors	13 Nov.	9 Jan.
13	18 Sep.	635	32	20 Oct.	Outdoors	12 Dec.	20 Feb.
14	18 Sep.	635	32	20 Oct.	Outdoors	13 Jan.	19 Mar.
21	18 Sep.	630	32	20 Oct.	Outdoors	13 Feb.	26 Mar.
15	18 Sep.	635	32	20 Oct.	Non-heating house	13 Nov.	9 Jan.
16	18 Sep.	630	32	20 Oct.	Non-heating house	12 Dec.	30 Jan.
17	18 Sep.	630	32	20 Oct.	Non-heating house	13 Jan.	9 Mar.
18	18 Sep.	642	32	20 Oct.	Greenhouse	13 Nov.	9 Jan.
19	18 Sep.	670	32	20 Oct.	Greenhouse	12 Dec.	16 Jan.
20	18 Sep.	670	32	20 Oct.	Greenhouse	13 Jan.	10 Feb.

Four-year-old plants were used. Ca. 20 roots (total fresh weight of 630 to 670 g) in each plot were collected from harvested 50 stocks on Sept 18, 2003. After being stored for 32 days at 4 to 7°C in the vinyl bag, their periderms were removed on Oct 20. Then each root was naturally dried under different conditions, and then dried by hot-air until reached stable dry weight in the dry-heat oven at 30±1°C.

Table 2 に、この間の気温の推移を Fig. 2 に示す。

1.3 調査の概要

1.3.1 仕上がり時における根の横断面色の評価

各試験区において、乾燥が終了した根を直径により3つに仕分けし(太い根: 20 mm 内外, 中間: 15 mm 内外, 細い根: 11 mm 内外), 各太さの根を1本ずつ(計3本)選定した。選定した各検体については、電動ノコギリなどを用いて根の断面をきれいに整形し、その色を日本園芸植物標準色票⁴⁾を用いた観察, または日本電色工業(株)携帯型分光色差計 NF-333 を用いた測定(2008年10月2日に実施)により評価した。なお、この3本の根の値を平均化したものを結果で用いている。また、色の表示方法については日本工業規格(JISZ8729)が規定するL*a*b*表色系を用いた。さらに、比較として、2001年に(株)福田商店から購入した以下に示す調製加工済みの市場品9検体(A~I: 基盤

研・薬植セ・北海道 標本 No., 花色, 産地)についても同様に調査を実施した。(A) 1336, 白花, 富山県, (B) 1337, 白花, 富山県, (C) 1338, 赤花, 北陸, (D) 1339, 白花, 三重県・福井県, (E) 1340, 赤花, 奈良県, (F) 1341, 花色不明, 北海道, (G) 1342, 花色不明, 青森県, (H) 1343, 白花, 奈良県, (I) 1344, 白花, 奈良県。

1.3.2 各種成分含量の調査

各試験区から平均的なサイズ15 mm 内外の根を10本選定し、混合・粉碎後、希エタノールエキス(EtOHエキス)の定量をJP15に準じて実施し、糖類⁵⁾, paeoniflorin⁶⁾, oxypaeoniflorin⁶⁾, albiflorin⁶⁾およびgallotannin⁷⁾の定量をHPLCを用いて行った。

2. 実験2: 実証試験

実験1から得られた結果をもとに、実用化が可能な調製方法による実証試験を行った。材料には、本研究部で4年

間栽培した「北宰相」50株を用いた。2007年9月19日に収穫した後、株から切り分けた根を2007年10月17日まで土の中(深さ約30~40cm; 気温, -0.6~25.0°C; 地温, 未測定)に貯蔵した。貯蔵後、掘り出した根を水および砂を用いて周皮を除去し、2007年11月28日まで屋外風乾場(-10.3~14.1°C)にて乾燥後、2008年3月14日まで温室(22±2°C)に広げて乾燥を行った。調製された根から10本(直径13.9±3.6mm)を選定し、実験1と同様の方法で根の横断面色を分光色差計により測定した。これとは別に、成分分析用サンプルとして直径15mm内外の根を5本選定し、混合・粉碎後、実験1と同様に paeoniflorin, oxypaeoniflorin, albiflorin および gallotannin の含量を測定した。

結 果

1. 実験1: 調製方法の検討

1.1 根の貯蔵期間が及ぼす影響

収穫後から根の周皮を除去するまでの貯蔵期間の長さは、根の変色程度に大きく関わっていた。すなわち、収穫直後に根を剥皮した1区では最も変色が著しく、根の横断面が黒紫色を呈し、明度(L*値)が56.0と最も低い値を示した(Table 3, Fig. 3)。これに対し、根を22~42日間貯蔵

してから剥皮した4~9区では根の変色が少なく、特に貯蔵期間が32日であった6, 7区では、根は黄白色を呈し、明度が79.4~82.3と最も高かった。また、日陰区では最高気温の平均値が15.4°C、最低気温が5.8°Cで推移し、冷蔵庫区(4~7°C)よりもはるかに高かったが(Fig. 1)、根の変色については両区で顕著な差が認められなかった(Table 3, Fig. 3)。

一方、根の貯蔵期間や貯蔵温度は各種成分含量へも影響を及ぼしていた。すなわち、paeoniflorin 含量についてみると、1区では2.6%であるのに対し、11日以上貯蔵した区では3.9%から最大5.3%となった(Table 3)。また、日陰区よりも5°C区で高く、低温保存でより高含量になる傾向にあった。oxypaeoniflorin や gallotannin についても、糖や希エタノールエキス含量と同様に、貯蔵期間を設けた根においては含量が高かった(Table 3)。

1.2 収穫時期が及ぼす影響

収穫時期は根の変色程度と深く関わっており、時期が遅くなるにつれて、根の変色は軽減した。すなわち、収穫日が9月18日であった1区では、根が黒紫色を呈し、L*値が56.0であったのに対し、収穫日が10月20日と最も遅かった11区では黄白または枯葉色でL*値が68.4であった(Table 3, Fig. 3)。

Table 3. Comparison of internal root color and chemical evaluation of the roots prepared by different post-harvest processing in four-year-old *Paeonia lactiflora*.

Plots No.	Colors*1	L* value		Pae % dw	Oxy % dw	Alb % dw	Gal % dw	Fru % dw	Glc % dw	Suc % dw	Total % dw	EtOH % dw
		Mean	±SD									
1	dark grayish purple (9218)	56.0	±2.3 ^a	2.6	0.4	0.1	0.20	2.1	2.7	12.6	17.4	32.3
10	light grayish brown (1918) and yellowish brown (1916)	63.5	±2.9 ^{ab}	3.9	0.6	nd	0.23	1.9	2.0	11.0	14.9	29.3
11	light grayish brown (1918) and yellowish white (2901)	68.4	±1.1 ^{bc}	5.5	0.7	nd	0.40	1.6	1.0	18.7	21.3	39.8
2	light grayish brown (1918) and pale brown (1917)	69.3	±1.7 ^{bc}	4.4	0.7	nd	0.26	1.9	1.9	17.7	21.5	38.7
3	light yellowish brown (1915) and pale brown (1917)	65.6	±2.0 ^b	4.4	0.7	nd	0.29	1.6	1.5	23.4	26.5	43.3
4	pale brown (1917) and yellowish white (2901)	73.4	±4.4 ^{cd}	4.2	0.6	nd	0.38	1.8	1.4	22.9	26.1	44.5
5	pale brown (1917) and yellowish white (2901)	75.9	±3.5 ^{cde}	5.3	0.8	nd	0.40	2.1	1.6	25.5	29.2	49.4
6	yellowish white (2501 and 2901)	82.3	±1.6 ^e	3.9	0.7	nd	0.36	2.0	1.5	31.1	34.6	49.5
7	yellowish white (2901 and 3301)	79.4	±3.0 ^{de}	5.0	0.7	nd	0.36	2.1	1.3	26.7	30.1	47.0
8	pale brown (1917) and yellowish white (2501)	73.7	±2.5 ^{cd}	4.4	0.7	nd	0.45	2.3	1.8	31.4	35.5	52.3
9	pale brown (1917)	73.3	±1.3 ^{cd}	4.6	0.7	nd	0.35	1.8	1.6	29.2	32.6	50.1

*1: The Japan color standard for horticultural plants.

L* value (lightness) was measured by Spectrophotometer; NF333, Nippon Denshoku Industries Co., Ltd.

Values with different small letters are significantly different from each other at the 5% level using the Tukey's multiple comparison test ($n=3$).

nd<0.1%.

Pae, paeoniflorin; Oxy, oxypaeoniflorin; Alb, albiflorin; Gal, gallotannin; Fru, fructose; Glc, glucose; Suc, sucrose; Total, total sugar; EtOH, dilute ethanol-soluble extract.

Detail of each plot was shown in Table 1.