

について、薬効に關与する30成分（Anthraquinone類、Anthraquinone配糖体、Dianthrone類、Phenylbutanone類、Stilbene類、Fravan-3-ol類、Procyanidin類、Galloylglucose類、Acylglucose類、Gallic acid、Tannin類）の定量を行い、各種各系統の特徴的な成分組成を明らかにした^{2,3)}。同時に、*R. palmatum*のRPI型（青海省東南部～四川省西北部に産する）は、局方規定のsenoside Aの含量（0.25%以上）を満足し、さらにgallic acidとacylglucose類以外の成分を満遍なく含む優良な系統であることを明らかにした（図1）。また、遺伝子型が判れば、間接的に成分組成を推定できることを示した。

日本漢方生薬製剤協会による平成20年度の原料生薬使用量等調査報告書によると、国内の大黃の使用量は439,590 kgで15番目に多く、その内訳は日本産が95,418 kg、中国産が344,172 kgである。ただし、日本産大黃の大多数は特定企業で漢方処方エキス用に使用され、市場流通品は中国産大黃である。近年、品質良好な大黃の産地である青海省では、野生ダイオウの採取を制限するようになった。また、生薬の価格が高騰しており、今後、生薬を安定的に確保するためには、我が国で栽培可能である植物は栽培すべきである。ダイオウについては、かつて長野県で信州ダイオウが作出された実績がある。また、上記企業では北海道で信州ダイオウを栽培している。

そこで、ダイオウの国内栽培を拡充するという目標を立て、先ず、日本で栽培可能でかつ付加価値のある系統を見出す目的で、5年前からこれまで10数系統のダイオウを長野県菅平等4箇所栽培してきた（地域イノベーションクラスタープログラム「ほくりく健康創造クラスター」）。今年度が栽培5年目に

あたるため、今回、全株を掘り起こし、根茎及び根の成分含量を検討した。この結果から、今後の栽培系統を選択する。また、この定量値を、栽培3年目または4年目の株のものと比較することにより、各系統の栽培年数を決定する。

B. 研究方法

1. 栽培試験

富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学分野で保有するダイオウの種子を、富山県薬用植物指導センターで育苗した。

定植：2008年6月19日に、長野県上田市菅平の菅平薬草栽培試験地（長野県健康福祉部薬事管理課）に、18系統（*matK* 遺伝子の塩基配列において5遺伝子型7タイプ）のダイオウの種苗を定植した（図2）。

生育状況の調査：2009年6月17日、2010年6月22日、2011年6月8日、2012年6月28日に調査した。2011年の気候条件を表1に示す。

収穫：2009年11月6日、2010年11月13日、2011年11月3日、2012年10月22日に行った。2009年、2010年及び2011年は栽培中の一部の株のみ、2012年はほとんど全株を収穫した。

乾燥方法：収穫した地下部を水洗し、根茎と根に分けた。さらに乾燥し易いように縦切または横切した。約1ヶ月間、室内で自然乾燥したのち、2～3日間乾燥機で通風乾燥した（2009年&2010年：35℃、2011年：50℃、2012年30℃）。

2. 品質評価

2-1. 実験材料

長野県菅平薬草栽培試験地で栽培された5年目の株（2012年収穫）11系統（4、14、15、17、18、27、29、41、42、43、45）；4年目の株（2011年収穫）6系統（4、15、17、18、42、43）；2年目及び3年目の株（2009年及び2010年収穫）11系統（4、6、14、15、

17、18、27、29、37、42、43)。各系統の *matK* 配列に基づく遺伝子型とタイプを表 2 に示す。

2-2. 実験方法

測定条件

装置: Jasco HPLC system (Pump: PU-1580, Gradient unit: LC1580-02 ternary unit, Auto sampler: AS-2057 Plus, Detector: MD-1510 Multiwavelength Detector); カラム: YMC Hydrosphere C-18 (250 x 4.6 mm i.d., s-5 μ m, 12nm); 移動相: A: アセトニトリル、B: 0.1%リン酸水溶液。

HPLC 条件: 0-50 min, 8-27% A、50-62 min, 27-33% A、62-70 min, 33-45% A、70-75 min, 45-84% A、75-89 min, 84% A、89-90 min 84-8% A、90-103 min, 8% A, for initial stabilization。

注入量: 20 μ L; 流速: 0.8 ml/min; カラム温度: 45°C; 検出波長: 270 nm; データ処理プログラム: ChromNAV。

検量線の作成

11 化合物の標準品〔Gallic Acid、(+)-Catechin、Sennoside A、Sennoside B、Aloe-emodin、Rhein、Emodin、Physcion、Chrysophanol、(-)-Epicatechin Gallate、Resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside〕を各々正確に量り取り、分析用メタノールに溶解して 0.2 mg/ml の標準溶液を調製した。この溶液を 10、100 倍と希釈して調製した溶液を HPLC 法で分析し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

試料溶液の調製

各材料を粉碎し、300 μ m の篩を通した。得られた粉末 200 mg を正確に量り取り、遠

心チューブに入れ、80%アセトン 10 ml を加えて、15 分間超音波抽出を行った。遠心分離 (5 min, 3500 rpm) した後、上澄み液を分取した。以上の抽出操作をさらに 2 回 (10 ml, 10 ml) 繰り返した後、全上澄み液を合わせてから、溶媒を減圧除去した。乾燥したエキスを MeOH-H₂O (9:1) に溶解し、10 ml にメスアップした。そのうち約 2 ml を DISMIC-13HP disposable syringe filter 0.2 μ m でろ過して HPLC 用バイアルに入れ、前述した HPLC 条件で定量を行った。

C. 研究結果

1. 栽培試験

1-1. 生育状況

2008年に定植した18系統の生育状況を表3に示す。

5年目までの生存率が高い系統は、41 (62.5%)、43 (51.2%)、17 (47.7%)、18 (45.1%) であった。これらの遺伝子型はすべて RPII 型, Rp5タイプであった。

2年目に花茎が上り、開花した系統は7、11、14、15、17、27、45であった。3年目に12系統、4年目に9系統で開花が見られ、5年目に開花した系統は4、5、7、11、14、15、17、18、27、42、43、45であった。これらのうち下線をつけた5系統は2年目以降通年して開花し、環境に適応していることが示唆された。開花時の色は、4、5が赤色、7、11が白色、14、15、17、18、27が赤色 (18にはピンク色、27には白色のものもあり)、29は白色、42は赤色、43は白色、45はピンク色であった。系統29、41、42、43、45で開花時期が遅かった。

定植当初の本数によらず、5年目に1株のみとなった系統は、6、7、8、37で、6は *R. tanguticum*、7、8は *R. laciniatum*、37は *R.*

*palmatum*のRPI型であった。系統37は生存率が年々低くなり5年目には3.3%、収穫時には地下部がほとんどなかった。

1-2. 根茎及び根の形態、収量等

栽培5年目に収穫した11系統について、根茎及び根の形態、収量等を調べた（表4はその一部で、成分研究を行った材料）。11系統は*matK*遺伝子の塩基配列により5遺伝子型7タイプに分けられるが、収穫物の形態は塩基配列タイプに共通して特徴が認められた。系統14と15（RPIV型, Rp21タイプ）は、長さ4～10 cmの根茎に多数の細根が付く。系統17と18（RPII型, Rp5タイプ）は根茎と根の区別が難しいが、太い根が数本以上認められる。同じ遺伝子タイプの系統29、43、45も種子の産地は異なるものの、系統18と類似した形態を示し、さらに根の横断面がオレンジ色を呈した。ただし、系統42（RPI型, Rp4タイプ）は同一産地である系統43に類似した（図3）。

1-3. 交配実験

2011年6月12日に系統4、7、11、17、18、42について、同じ系統の別株どうしを交配し、種子を得ている。そこで、2012年は別系統どうしの交配を試みた。♂系統4×♀系統15（6/11）、♂系統45×♀系統18及び♂系統45×♀系統43（6/28）について受粉を行い、8月中旬に種子を得た。それらの交配が予定どおりであるかどうかは、今後発芽させて検討する予定である。

2. 品質評価

2-1. 栽培2～4年目の地下部

既報²⁾に若干の変更を加えてHPLCクロマトグラム法を行ったところ、図4に示すよう

に、各成分のピークは比較的良好に分離できた。主だった29成分のピークのうち19成分については、標準化合物との保持時間及びUVスペクトルの比較により推定した。これらのうち、定量分析に十分な量が得られた12化合物について、栽培2年目、3年目及び4年目の各系統のダイオウの地下部を根茎と根に分けた後、定量した。その結果の一部を図5に示す。

系統14、15、17、18、29、37、43は、栽培2年目または3年目に根茎またはかつ根が日局の規定のSennoside A含量0.25%以上を示した。系統14、15（RPIV型、Rp21タイプ）ではCatechin含量が高く、系統17、18、29（RPII型、Rp5タイプ）ではそれに加えてResveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranosideの含量も高く、さらにLindleyin, Rhein 8-O-glucopyranosideも比較的高かった。系統37（RPI型、Rp4タイプ）ではResveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside、次いでCatechinの含量が高かった。以上は栽培3年目の地下部で明らかであったが、2年目から高い値を示すものもあった。Sennoside Aは、通常3年目で高く、CatechineとLindleyinは2年目から高く、Resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranosideでは、系統17と37で3年目と2年目が同等であった。栽培4年目が特に高含量になる系統・化合物は見出せなかった。根茎が短く、根との境界が不明瞭な検体（RPII型、Rp5タイプなど）があったため、根茎と根との成分的な差異は明瞭に言及できない。

2-2. 栽培5年目の地下部

11系統につき代表的な検体を抜き取って11成分を定量した。日局の規定のSennoside A

含量を満足したものは、系統17、29、43 (RPII型、Rp5タイプ) のすべて根であった(図6)。系統17、29において、Catechin及びResveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranosideの含量が高いという特徴は、2~4年目のものと同様であった。系統29では2成分ともに根茎の方が高かった。系統43 (RPI型、Rp4タイプ) においても Resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranosideに特徴があった。

D. 考察

これまで我々が行った大黄の遺伝的・成分的多様性に関する研究では、*matK* 遺伝子の塩基配列が RPI 型を示す検体が、薬効に関与する成分を満遍なく含むという点で高品質であると結論づけてきた。今回、長野県菅平で栽培研究を行った材料では系統 37 がこれに属する。本系統では当初 30 本であった種苗が栽培 5 年目には 1 本となり、収穫時には地下部を見つけることができなかった。栽培 3 年目の成分定量値において品質がよいことがうかがわれたが、中国での採集時に確認した円筒形の太い根茎ができることはなかった。したがって、中国における優良系統であっても、土地を変えて栽培することにより、たとえ高山地帯の長野県菅平においても、中国の野生品の状況を実現できないことがわかった。栽培では高品質を適える前に、我が国で栽培できるか否かが重要である。今回、RPII 型の Rp5 タイプが長野県菅平において栽培可能で、かつ品質も良好であることがわかった。ただし、この系統は根茎が明瞭ではなく、太い根に特徴があった。この遺伝子型を示す系統のうちでは、特に系統 29 がよいものと考えられた。系統 29 は花茎が上ることがまれで、開花時期も遅かった。花茎が上

らないことも品質を高める原因であるかもしれない。本系統について、さらなる栽培研究及び成分的な検討を予定している。

E. 結論

日本で栽培可能でかつ品質良好なダイオウの系統として、*R. palmatum* に由来し、*matK* 遺伝子の塩基配列が RPII 型 Rp5 タイプの、系統 17、18、29 及び 43 を見出した。これらは共通して 1 株あたり太い根を数本以上有しており、収量も高かった。系統 29 は栽培 5 年目の生存率が 33.3%であったが、それ以外は 45%以上であり、長野県菅平の環境に適していた。成分的に Senoside A の含量は 0.25%以上で、かつ Catechin 及び Resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside の含量が高かった。地下部の採取時期は、系統 17 と 18 では栽培 3 年目、系統 29 と 43 では 5 年目が適当であるという結果が得られた。両者では、花茎の上る栽培年数、開花時期、花の色が異なっていた。

F. 参考文献

- 1) Yang, D. Y., Fushimi, H., Cai, S. Q., and Komatsu, K.: Molecular analysis of *Rheum* species used as Rhei Rhizoma based on chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 375-383 (2004).
- 2) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Basnet, P., and Meselhy, M. R.: Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in rhubarb, *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 941-947 (2006).

3) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Cai, S. Q., and Meselhy, M. R.: Comparative study on chemical constituents of rhubarb from different origin, Chem. Pharm. Bull., 54, 1491-1499 (2006).

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

大黃(青海省班瑪産)
Rheum palmatum
RPI Rp1

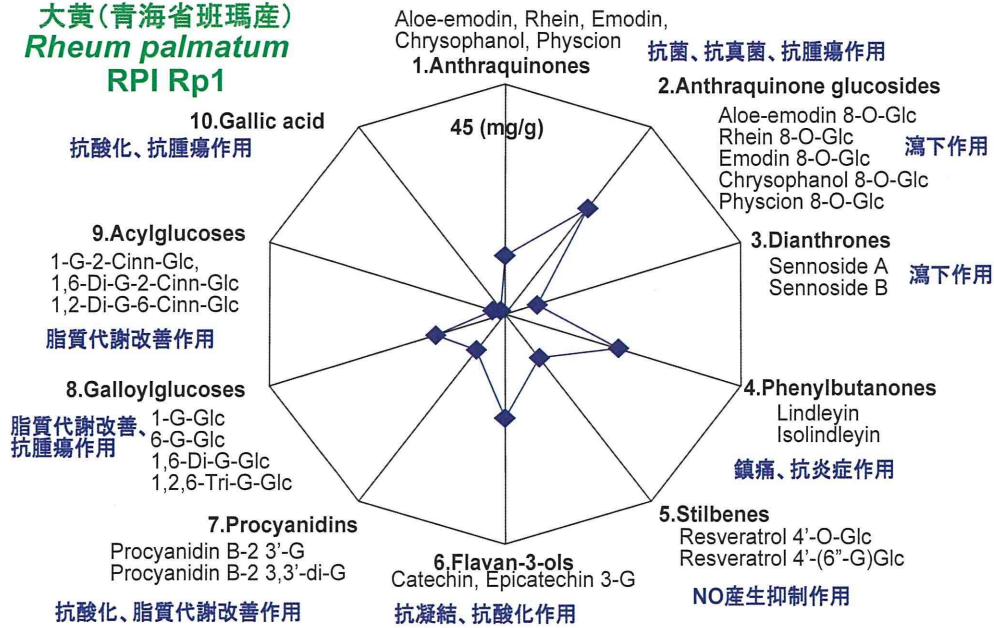


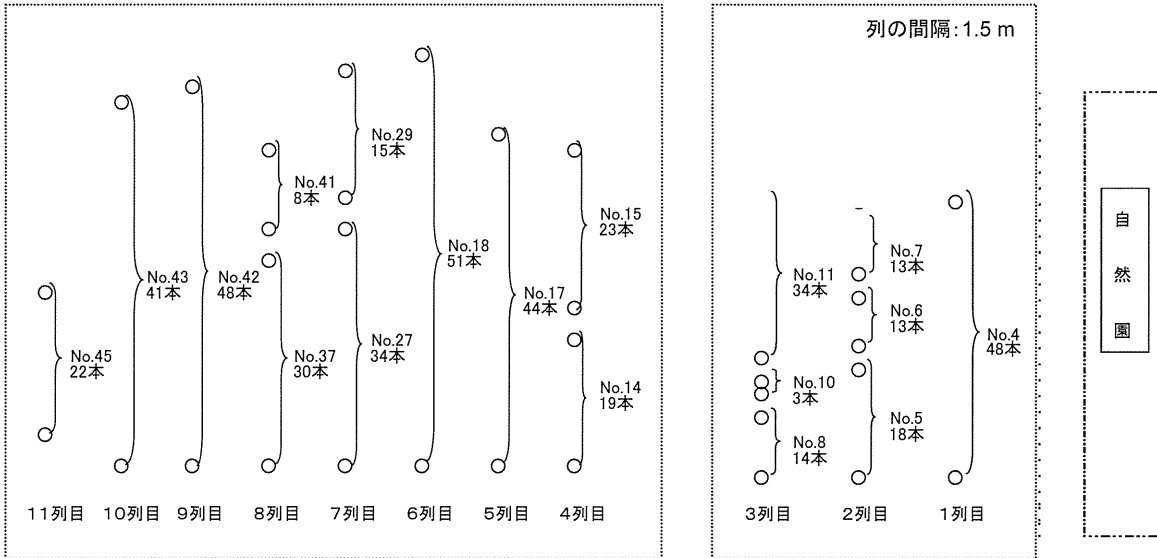
図1 青海省班瑪県産大黃 (RPI型Rp1タイプ) の28成分の含量に基づくレーダーチャート

表1 菅平における気候データ

菅平 気象庁菅平測候所(1,253m)のデータ								
2011 年								
月	気温(°C) 平均			日照時間 (h)	降水量(mm)		雪(cm)	
	日平均	日最高	日最低		合計	日最大	降雪の 合計	最深 積雪
1	-9.5	-4.4	-18.2	125.0	73.0	20.5	246	93
2	-4.9	1.3	-13.3	154.1	79.5	26.5	153	102
3	-4.2	1.3	-10.3	173.6	81.0	15.0	167	89
4	3.1	9.3	-3.1	202.5	94.5	22.0	60	65
5	10.1	15.8	4.1	193.1	191.0	69.0	0	0
6	15.5	20.5	10.9	131.5	58.5	14.0	0	0
7	19.3	24.4	15.2	161.8	149.5	33.0	0	0
8	19.3	24.0	15.6	175.0	121.0	19.0	0	0
9	15.6)	20.7)	11.3)	166.2)	162.0)	47.5)	0)	0)
10	8.6	14.0	3.3	171.8	45.5	9.0	0	0
11	4.5	9.7	-0.4	132.3	82.0	21.5	0	0
12	-4.1	0.1	-9.2	129.1	35.0	6.5	101	27

気象庁ホームページから抜粋

A. 定植位置



B. 定植した植物の由来

系統	基原		入手地
	遺伝子型	塩基配列タイプ	
4	RP III	Rp17	甘肅省天祝県
5	RP III	Rp17	甘肅省天祝県
6	RT	Rt1	甘肅省天祝県
7	RL	Rl	甘肅省夏河県
8	RL	Rl	甘肅省夏河県
10	RL	Rl	甘肅省夏河県
11	RL	Rl	甘肅省夏河県
14	RP IV	Rp21	甘肅省碌曲県
15	RP IV	Rp21	甘肅省碌曲県
17	RP II	Rp5	甘肅省瑪曲県
18	RP II	Rp5	甘肅省瑪曲県
27	RP II	Rp8	四川省若爾蓋県
29	RP II	Rp5	四川省若爾蓋県
37	RP I	Rp4	四川省阿坝州阿坝県
41	RP II	Rp5	四川省甘孜州色達県
42	RP I	Rp4	四川省甘孜州色達県
43	RP II	Rp5	四川省甘孜州色達県
45	RP II	Rp5	四川省甘孜州色達県

図2 長野県菅平薬草栽培試験地における定植記録 (2008年6月19日、478本定植)

Aで示されるNoは、Bの表の系統。植物の基原には*matK*遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子型とタイプを示す。

RPI~IV: *Rheum palmatum*の遺伝子型

RT: *R. tanguticum*の遺伝子型

RL: *R. laciniatum*の遺伝子型

表2 ダイオウの品質評価を行った実験材料の由来

系統	基原 遺伝子型	塩基配列 タイプ	入手地
4	RP III	Rp17	甘肅省天祝県
6	RT	Rt1	甘肅省天祝県
14	RP IV	Rp21	甘肅省碌曲県
15	RP IV	Rp21	甘肅省碌曲県
17	RP II	Rp5	甘肅省瑪曲県
18	RP II	Rp5	甘肅省瑪曲県
27	RP II	Rp8	四川省若爾蓋県
29	RP II	Rp5	四川省若爾蓋県
37	RP I	Rp4	四川省阿坝州阿坝県
41	RP II	Rp5	四川省甘孜州色達県
42	RP I	Rp4	四川省甘孜州色達県
43	RP II	Rp5	四川省甘孜州色達県

表3 栽培ダイオウの生育状況（2008年～2012年）

系統	種苗数 H20. 6.19	H21.6.17					H22.6.22					H23.6.8					H24.6.28				
		本数	生存率	葉たて (cm)	草丈 (cm)	花茎	本数	生存率	葉たて (cm)	草丈 (cm)	花茎	本数	生存率	葉たて (cm)	草丈 (cm)	花茎	本数	生存率	葉たて (cm)	草丈 (cm)	花茎
4	48	20	41.7%	9	95		15	31.3%	39	180	○	13	27.1%	57	210	○	10	20.8%	57	210	○
5	18	5	27.8%	53	65		3	16.7%	62	220	○	3	16.7%	45	67		2	11.1%	45	67	○
6	13	5	38.5%	40	45		3	23.1%	46	185	○	2	15.4%	12	24		1	7.7%	12	24	
7	13	5	38.5%	28	120	○	4	30.8%	42	96	○	2	15.4%	31	63	○	1	7.7%	31	63	○
8	14	4	28.6%	16	30		3	21.4%	27	130	○	1	7.1%	14	28		1	7.1%	14	28	
10	3	1	33.3%	13	23		1	33.3%	27	45		1	33.3%	9	19		1	33.3%	9	19	
11	34	6	17.6%	12	120	○	3	8.8%	38	142	○	2	5.9%	29	133	○	3	8.8%	29	133	○
14	19	7	36.8%	30	150	○	5	26.3%	44	128	○	3	15.8%	26	37		3	15.8%	26	37	○
15	23	9	39.1%	34	190	○	8	34.8%	42	159	○	8	34.8%	44	158	○	8	34.8%	44	158	○
17	44	32	72.7%	56	55	○	26	59.1%	43	155	○	22	50.0%	53	115	○	21	47.7%	53	115	○
18	51	36	70.6%	50	37		22	43.1%	52	94	○	19	37.3%	45	168	○	23	45.1%	45	168	○
27	34	21	61.8%	44	210	○	18	52.9%	54	270	○	12	35.3%	40	175	○	7	20.6%	40	175	○
29	15	6	40.0%	60	35		7	46.7%	58	200	○	5	33.3%	44	48		5	33.3%	44	48	
37	30	16	53.3%	34	28		8	26.7%	35	34		5	16.7%	21	18		1	3.3%	21	18	
41	8	6	75.0%	27	38		7	87.5%	37	49		6	75.0%	14	86	○	5	62.5%	14	86	
42	48	23	47.9%	33	37		17	35.4%	53	65		13	27.1%	33	122	○	9	18.8%	33	122	○
43	41	28	68.3%	34	50		25	61.0%	62	70		22	53.7%	43	47		21	51.2%	43	47	○
45	22	10	45.5%	50	55	○	9	40.9%	54	96		8	36.4%	47	45		8	36.4%	47	45	○
合計	478	240	50.2%				184	38.5%				147	30.8%				130	27.2%			

表4 栽培5年目に収穫したダイオウの根茎及び根の生育度（2012年10月22日収穫）

系統	基原*1		サンプル No.	根茎		根			重量 x(g)	乾燥後 (g)	歩留まり (%)	コメント 主に根について
	遺伝子型	塩基配列タイプ		直径 (cm)	長さ (cm)	直径 (cm)	長さ (cm)	本数				
4	RPIII	Rp17	2	—	—	—	—	—	—	—	—	細根～やや太い根 断面は淡黄色
14	RPIV	Rp21	1	4-7	6-7	2-4	23-30	6	850	300	35.29	細根
15	RPIV	Rp21	3	4-6	8-10	3-4	30-40	11	1450	500	34.48	細根
17	RPII	Rp5	15	8-12	6-8	3-5	35-46	13	4910	1400	28.51	比較的太い根
18	RPII	Rp5	4	7-10	5-7	3-6	30-40	4	2790	860	30.82	太い根
27	RPII	Rp8	2	9-11	4-6	4-6	30-45	16	3300	—	—	細根
29	RPII	Rp5	2	3-9	4-8	3-6	26-37	10	3100	1000	32.26	比較的太い根 断面はオレンジ色
41	RPII	Rp5	4	7-9	9	2-4	28-50	5	1080	300	27.78	細根
42	RPI	Rp4	4	6	5	4-6	40-50	8	3900	1050	26.92	やや太い根
43	RPII	Rp5	13	4-12	5-9	4-6	30-50	7	3100	800	25.81	比較的太い根 断面はオレンジ色
45	RPII	Rp5	5	7-13	6-7	3-8	17-34	10	3100	850	27.42	やや太い根 断面はオレンジ色
4*2	RPIII	Rp17	2011	14-18	8	3-5	30-50	8	4647	1124	24.19	根茎が発達するが、 断面は黄色みが少ない

*1: *matK*遺伝子の塩基配列に基づく遺伝子型とタイプ

*2: 系統4については栽培5年目のデータを取得しなかったため、4年目のデータも付した。

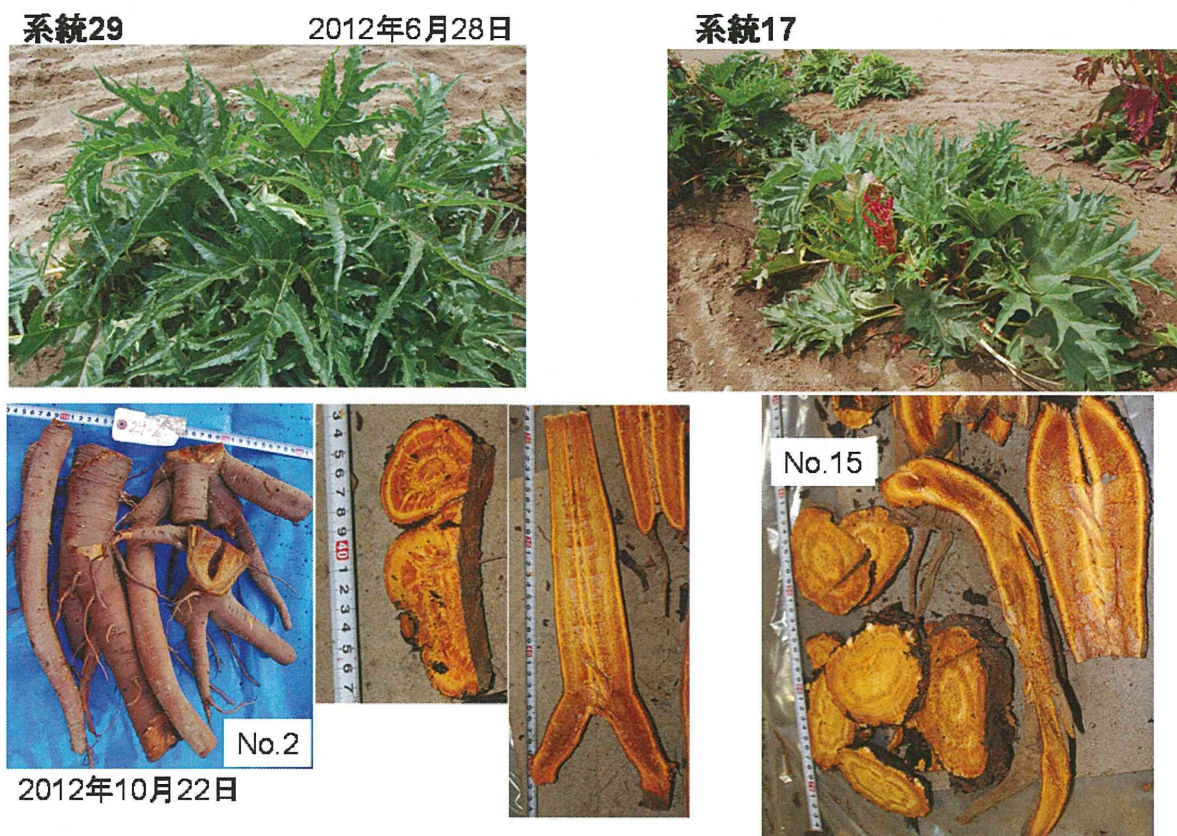


図3 ダイオウの系統29及び系統17地上部（6月28日）、根茎及び根（10月22日）

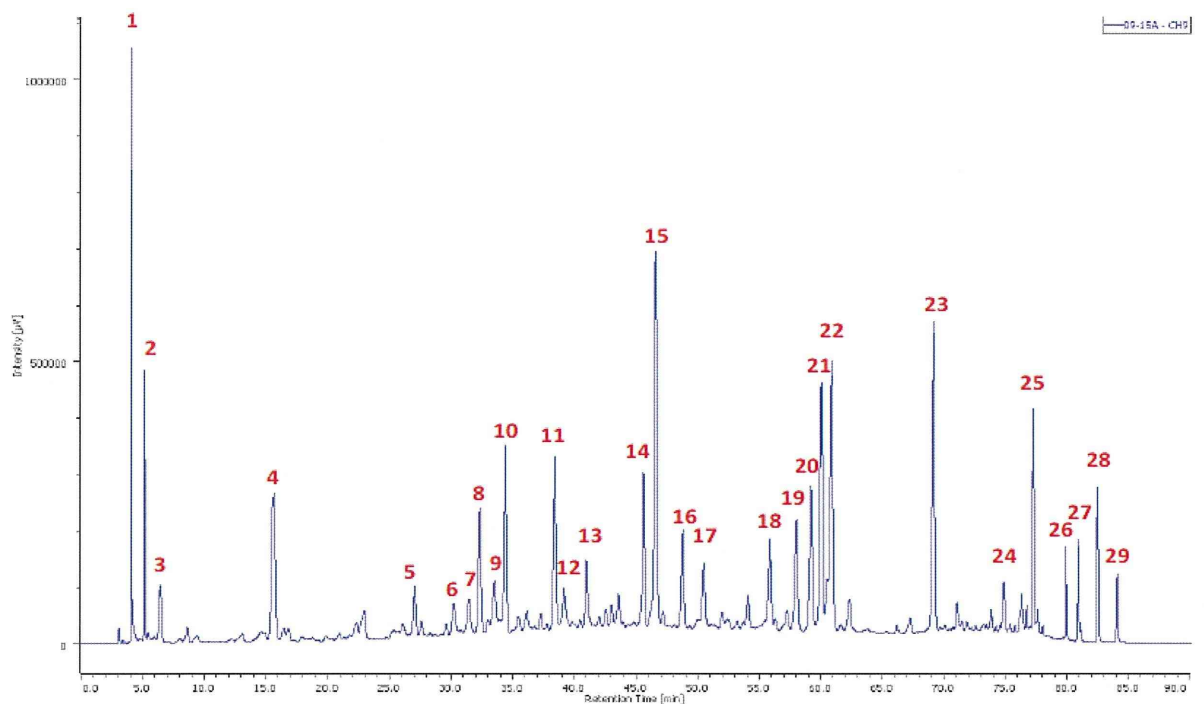


図4 ダイオウの根茎（2009年収穫、系統15）のHPLCクロマトグラム

1: 1-*O*-Galloyl- β -D-glucose, 2: 6-*O*-Galloyl- β -D-glucose, 3: gallic acid, 4: catechin, 8: lindleyin, 9: epicatechin gallate, 10: aloe-emodin 8-*O*-glucopyranoside, 11: rhein 8-*O*-glucopyranoside, 12: sennoside B, 13: resveratrol-4'-*O*-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside, 14: sennoside A, 20: chrysophanol 8-*O*-glucopyranoside, 22: emodin 8-*O*-glucopyranoside, 23: physcion 8-*O*-glucopyranoside, 24: aloe-emodin, 25: rhein, 26: emodin, 28: chrysophanol, 29: physcion.

なお、ピーク5、6、7、15、16、17、18、19、21、27については未同定

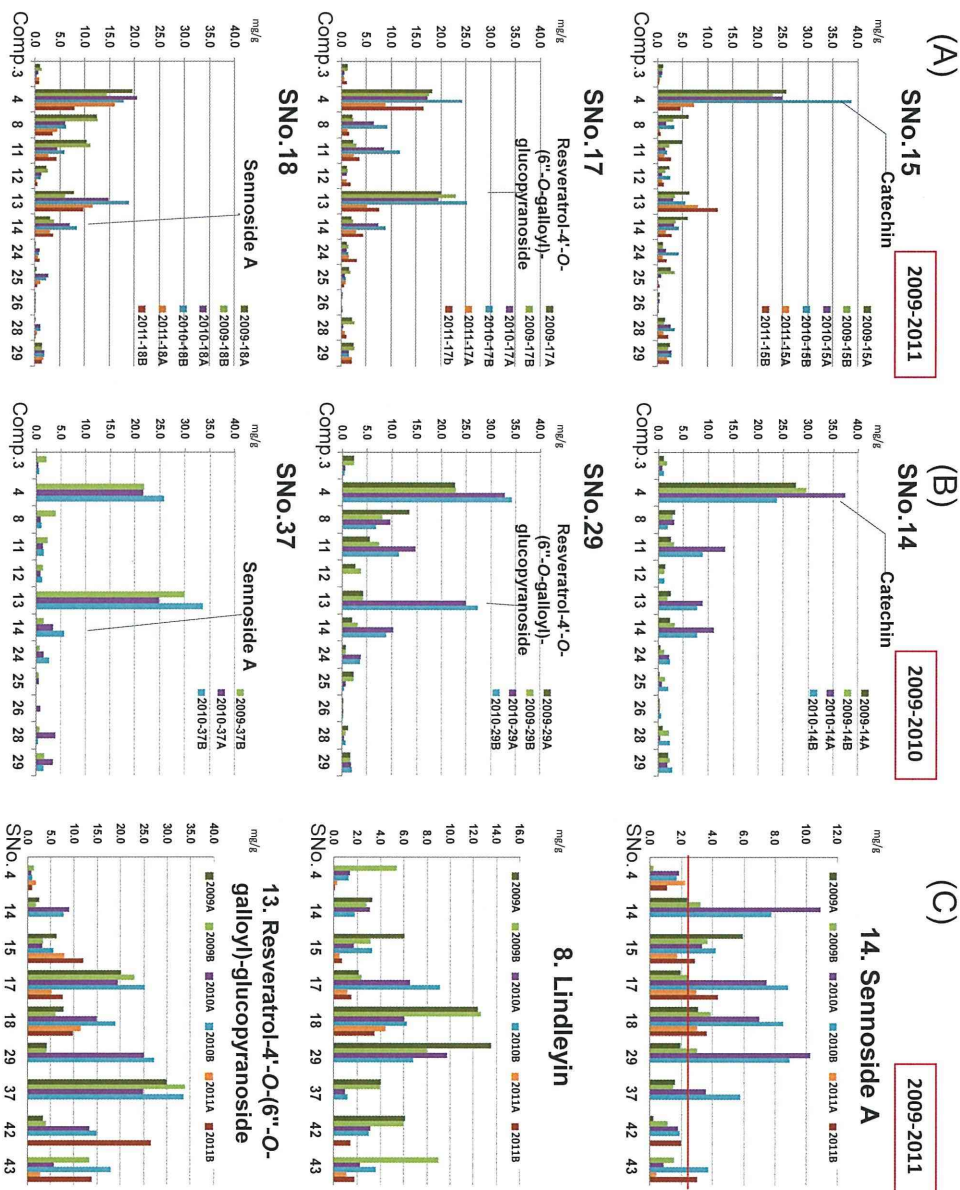


図5 栽培2年目（2009年）、3年目（2010年）及び4年目（2011年）のダイオウの根茎及び根の成分含量

- (A) 系統15、17、18における栽培2年目～4年目の根茎(A)及び根(B)の成分含量；
 (B) 系統14、29、37における栽培2年目と3年目の根茎(A)及び根(B)の成分含量；
 Comp.: 3: gallic acid, 4: catechin, 8: lindleyin, 11: rhein 8-O-glucopyranoside, 12: sennoside B, 13: resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside, 14: sennoside A, 24: aloe-emodin, 25: rhein, 26: emodin, 28: chrysophanol, 29: physcion
 (C) 栽培2年目～4年目の根茎(A)及び根(B)の sennoside A (14)、lindleyin (8) 及び resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside (13)の含量の系統間差異: SNo.は系統(4、14、15、17、18、29、37、42、43)を示す。

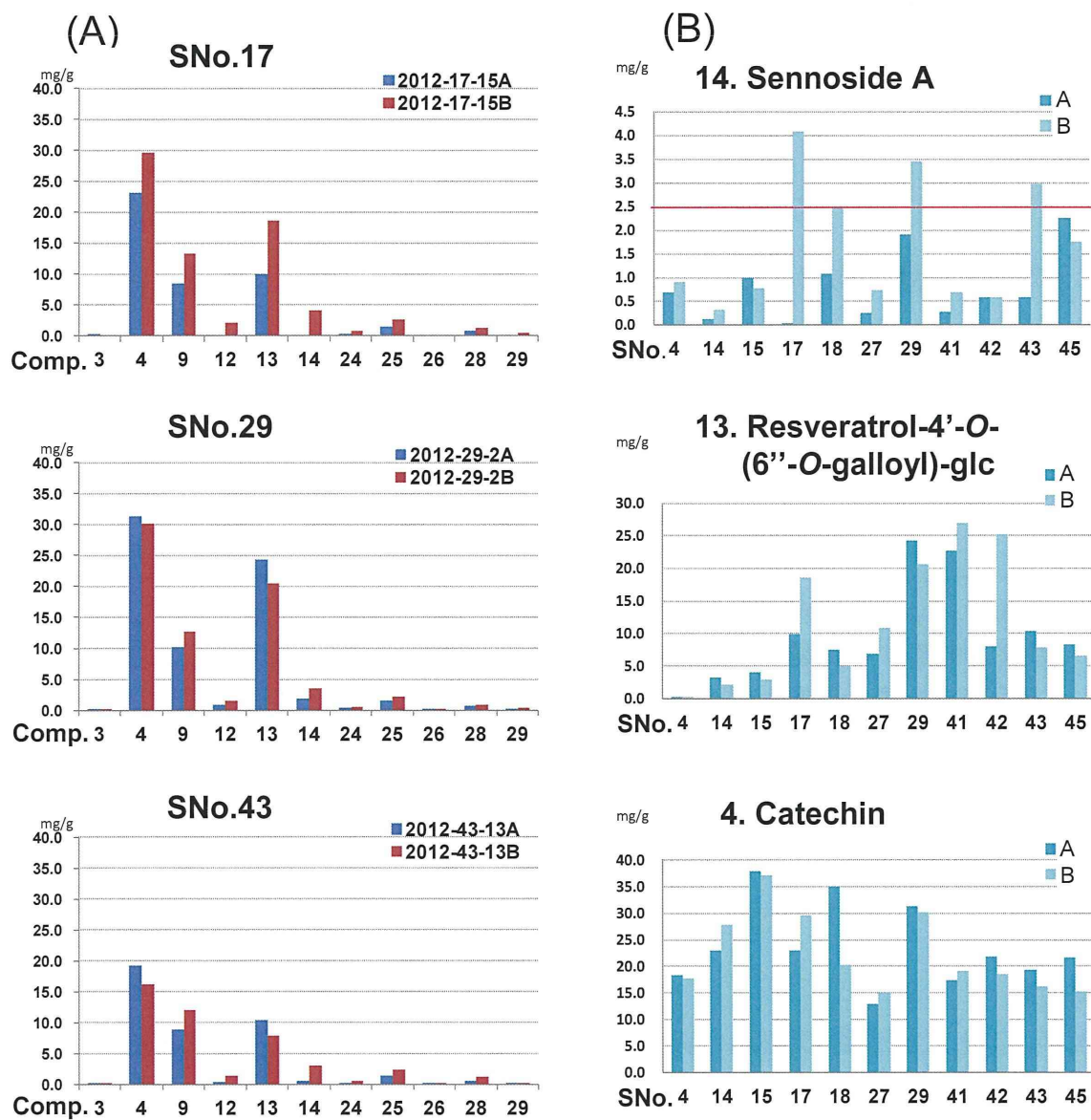


図6 栽培5年目（2012年）のダイオウの根茎及び根の成分含量

(A) 系統17、29、43における根茎(A)及び根(B)の成分含量;

Comp.: 3: gallic acid, 4: catechin, 9: epicatechin gallate, 12: sennoside B,

13: resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside, 14: sennoside A,

24: aloe-emodin, 25: rhein, 26: emodin, 28: chrysophanol, 29: physcion

(B) 根茎(A)及び根(B)のsennoside A (14)、resveratrol-4'-O-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside (13) 及びcatechin (4)の含量の系統間差異:

SNo.は系統 (4、14、15、17、18、27、29、41、42、43、45) を示す。

平成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）
人工水耕栽培システムにより生産した甘草等漢方薬原料生薬の実用化に向けた
実証的研究（H24-創薬総合-一般-007）
分担研究報告書

分担研究課題：地域企業との連携によるブランド生薬の開発に関する研究

—LC/MSによるダイオウの網羅的成分分析—

研究分担者 小松かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

要旨 生薬ダイオウの国内生産に適した系統を選抜する指標を広い視点で明らかにするため、栽培5年目の11系統44株について根茎と根の網羅的成分分析を行った。複数のクロマトグラフシステムと種々の溶媒系、イオン化法を検討した。その結果、ダイオウで知られていないと考えられる化合物を複数検出した。一方アントラキノン類のMSによる検出感度が悪く、クロマトグラフィー条件とあわせて、今後条件の最適化が求められる。また、ダイオウに特徴的なタンニン類の網羅的分析の手がかりとして、重合度の小さいタンニン類を複数検出することに成功した。

研究協力者

数馬恒平 富山大学和漢医薬学総合研究所
助教

から化学成分分析が行われており、総じて栽培面、成分面からの優良株の選定が進みつつある。

本年度は栽培年数5年目の各系統の株について、既知成分の主にLC/MSによる定性および定量を行った。同時に、選抜指標を広い視点で明らかにするため、網羅的にLC/MS分析し未同定成分も含めてダイオウの成分について検討した。

A. 研究目的

生薬ダイオウは、*Rheum palmatum* L.、*R. tanguticum* Maxim.、*R. officinale* Baillon、*R. coreanum* Nakai 又はそれらの種間雑種の通例根茎である。主な薬効は、sennosides A、B による緩下、駆瘀血作用であり、その他 anthraquinone 類による抗菌作用、lindreyin (galloylglucoside 類) による抗炎症作用が知られている。これまでに、小松かつ子博士(富山大和漢医薬学総合研究所)らにより、中国で収集されたダイオウの系統について、富山県、長野県、北海道で栽培試験が行われてきた。同時に栽培品について、品質評価の視点

B. 研究方法

1. 植物材料

分析に用いた植物材料は、長野県菅平薬草栽培試験地(長野県上田市)で栽培中の植物のうち、甘粛省由来系統14から3株(14-1、-2、-3)、系統15から4株(15-1、-2、-3、-5)、系統17から7株(15-4、-5、

-7、-13、-15、-18、-19)、系統 18 から 7 株 (18-1、-4、-9、-11、-12、-17、-22)、系統 4 から 1 株 (4-2)、四川省由来系統 27 より 3 株 (27-1、-2、-3)、系統 29 より 3 株 (29-1、-2、-4)、系統 41 より 3 株 (41-1、-2、-4)、系統 42 より 3 株 (41-4、-5、-6)、系統 43 より 7 株 (43-1、-7、-11、-13、-14、-16、-18)、系統 45 より 3 株 (45-2、-3、-5) である。

これらは、地下部を掘り上げた後、水洗し、根茎および根に分別し、それぞれ厚さ 1-1.5 cm で輪切りにして、低湿度低温条件で完全に乾燥させた。

2. 方法

2. 1. 試薬

水はMilli-Q水、有機溶媒は断りが無ければ和光純薬社製特級溶媒、リン酸は和光純薬社製特級を用いた。LC/MS用の有機溶媒は和光純薬社製LC/MSグレード、LC/MS用の水は和光純薬社製の純水を用いた。

標準物質は、センノシドA標準品 (和光純薬)、センノシドB標準品 (和光純薬)、Rhein (和光純薬)、(-)-Epicatechin gallate (ナカライテスク)、Physcion (LKT Laboratories)、Aloe-emodin (Sigma)、Emodin (Sigma)、Chrysophanol (LKT Laboratories)、Gallic acid (ナカライテスク)、(+)-Catechin (ナカライテスク) を用いた。これらは、1 mg/mLの50% DMSO含有メタノール溶液として標準溶液を調製し、適宜メタノールで希釈して用いた。

2. 2. 試料溶液の調整

根茎および根の乾燥品それぞれにつき、粉碎機で粉碎し、150 μm のふるいにかけて細

粒とした。このものの各 200 mg につき、80% アセトン 10 mL で超音波照射下 15 分間抽出し、遠心分離 (2000 回転 10 分) 後、上清を回収した。同じ操作をさらに 2 回繰り返して、回収した上清を一つにまとめて減圧乾固した。このものを 10 mL の 90%(v/v)メタノール水溶液に溶解し、0.45 μm のフィルターを通して LC/MS 用試料溶液とした。

2. 3. フォトダイオードアレイ検出高速液体クロマトグラフィー分析

高速液体クロマトグラフは、Waters717オートサンプラー、600ポンプおよび996フォトダイオードアレイ検出器、カラムオープンを用いて構築し、試料溶液の10 μL を注入して分析した。

条件1: 溶媒A, 0.1% phosphoric acid in H_2O ; 溶媒 B, MeCN; flow, 0.5 mL/min; 8-27% gradient of B in A for 25 min, then 27-33% gradient of B in A for 6 min, then 33-45% gradient of B in A for 4 min, then 45-84% gradient of B in A for 2.5 min, then keep 84% B for 7.5 min; column, Capcell Pak C18 UG120 (3.0 x 150 mm); temp., 35°C; PDA波長範囲, 200-600 nm

条件2: 溶媒A, 0.05M TFA in H_2O ; 溶媒B, 0.05M TFA in MeCN; flow, 0.5 mL/min; 5-85% gradient of solvent B in solvent A for 20 min; column, Capcell Pak C18 UG120 (3.0 x 150 mm); temp., 35°C; PDA波長範囲, 200-600 nm

2. 4. MS検出高速液体クロマトグラフィー分析

条件3: MS検出高速液体クロマトグラフは、ThermoScientific社製 Accela高速液体クロマトグラフ (Accela 600 pump, photodiode array

検出器)とThermoScientific社製 LTQ Orbitrap XL質量分析計で構成した。溶媒A, 0.1% formic acid in H₂O; 溶媒B, 0.1% formic acid in MeCN; flow, 0.2 mL/min; 5-27% gradient of B in A for 25 min, then 27-33% gradient of B in A for 6 min, then 33-45% gradient of B in A for 4 min, then 45-85% gradient of B in A for 2.5 min, then keep 85% B for 7.5 min; column, Capcell Pak C18 UG120 (1.5 x 150 mm); temp., 35°C; イオン化法, ESI (positive); 質量観測範囲, m/z 50-2000; 検出器, Orbitrap (分解能60,000に設定); フルスキャンとオートMS/MSモードによるMS/MS分析データを同時取得。

条件4: MS検出高速液体クロマトグラフは、Agilent社製1100HPLCシステム (photodiode array 検出器付き)とBlucker社製Esquire3000 plus質量分析計で構成した。溶媒A, 0.1% TFA in H₂O; 溶媒B, 0.1% TFA in MeCN; flow, 0.2 mL/min; 5-27% gradient of B in A for 25 min, then 27-33% gradient of B in A for 6 min, then 33-45% gradient of B in A for 4 min, then 45-85% gradient of B in A for 2.5 min, then keep 85% B for 7.5 min; column, Capcell Pak C18 UG120 (1.5 x 150 mm); temp., 35°C; イオン化法, ESI (positive-negative交互測定); 質量観測範囲, m/z 50-1500; 検出器, イオントラップ; フルスキャンとオートMS/MSモードによるMS/MS分析データを同時取得。

条件5: MS検出高速液体クロマトグラフは、Agilent社製1100HPLCシステム (photodiode array 検出器付き)とBlucker社製Esquire3000 plus質量分析計で構成した。溶媒A, 0.1% formic acid in H₂O; 溶媒B, 0.1% formic acid in MeCN; flow, 0.2 mL/min; 5-27% gradient of B in A for 25 min, then 27-33% gradient of B in A for 6 min, then 33-45% gradient of B in A for 4

min, then 45-85% gradient of B in A for 2.5 min, then keep 85% B for 7.5 min; column, Capcell Pak C18 UG120 (1.5 x 150 mm); temp., 35°C; イオン化法, ESI (positive); 質量観測範囲, m/z 50-1500; 検出器, イオントラップ; フルスキャンとオートMS/MSモードによるMS/MS分析データを同時取得。

2. 5. 定量

標準溶液につき、10倍、20倍、100倍、200倍、1000倍、2000倍にメタノールで希釈し、アントラキノン類 (rhein、physcion、aloe-emodin、emodin、chrysophanol) については分析条件2による分析で430 nmの抽出クロマトグラムピーク面積を、その他の標品 (sennoside A、sennoside B、epicatechin gallate、catechin) については分析条件3による分析でそれぞれの化合物の精密質量数のextracted ion chromatogramピーク面積を用いて、絶対検量線を作成した。

C. 研究結果

1. 条件1による分析

高速液体クロマトグラフによるダイオウの成分分析条件としては、0.1%リン酸水溶液・アセトニトリルのグラジエント分析が良い分離を実現している^{1,2)}。しかし、これらの条件ではいずれも分析時間が90分で、多数のサンプルの処理には多くの時間を費やす必要があること、リン酸を用いた場合にはマスマスペクトロメーターとの結合が容易でないなど改善できる点があった。そこで、分析時間の短縮とLC/MS分析への適用を念頭に分析条件を種々検討した。

条件1では、まず時間の短縮を狙ってカラムを短くすることを考えた。Waters600 シス

テムは、低圧グラジェントシステムであることを考慮し、カラムサイズは直径 3 mm 長さ 150 mm とし、Komatsu ら^{1,2)}と同様に逆層系のカラムを使用した。カラム容積と線流速を考慮して、分析時間は半分の 45 分とした。

結果として、ピーク形状も分離も粗抽出物の分離としては良いクロマトグラムが得られた (Fig. 1 と 2)。標品の分析では gallic acid は 2.78 分、catechin は 7.14 分、epicatechin gallate は 17.75 分、sennoside B は 19.69 分、sennoside A は 22.90 分、aloe-emodin は 34.62 分、rhein は 34.96 分、emodin は 36.50 分、chrysophanol は 38.47 分、physcion は 39.20 分に溶出した。Komatsu ら^{1,2)}との分離パターンの細部は、使用したカラムの異なりによると思われる。

ピーク溶出時間が 20 分過ぎまで定まらない傾向が見られたが、HPLC システムの老朽化により正確なグラジェントが再現性良くなされていない可能性がある。分析中にアセトニトリルを供給している流路のバルブが開かなくなり、別の流路につながかえるというトラブルもあった。

ピーク時間が定まらないため、特徴的な UV/Vis 吸収帯が共雑物と十分に区別できない gallic acid、catechin、epicatechin gallate、sennoside B、sennoside A については、この条件での定量は断念した。anthraquinone 類は、430 nm の抽出クロマトグラムで明瞭に区別できるため定量した (Table 1)。クロマトグラフの修理・調整後改めて分析する。

2. 条件 2、3 による分析

条件 2 のような単純なりニアグラジェント分析では、ピークの分離が十分なところと密になって未分離なところがあり、グラジェ

ント条件としては時間ごとに丁寧に設定する必要があった。LC/MS 分析条件を検討する際は、この点を考慮して Komatsu ら^{1,2)}の報告を参考にグラジェント条件を設定した。0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液の系によるグラジェント分析を行ったところ (条件 3)、比較的良好に分離した (Fig. 3 と 4)。加えて、正イオンモードの ESI イオン化法にて Orbitrap による高分解能 (分解能 60000) フルスキャン測定と高分解能 (分解能 30000) による自動 MS/MS 分析により、各ピーク成分の良質なマススペクトルが得られたことから、標品の挙動と文献を参考に化合物の同定を行った。本条件による分析では、最も注目する 22 サンプル (4-2、14-1、15-3、17-15、18-4、27-2、29-2、41-4、42-4、43-13、45-5 の根茎および根) について行った。

アントラキノン類以外で標品に対応するピークはいずれも未分離であったため、対応するマスクロマトグラム (5 mmu 幅) のピーク面積を用いて定量した (Table 2)。定量値を考察するとき、sennoside 類などで明らかに含有量が少なすぎると考えられる。溶出時間における夾雑物の影響でイオンサプレッションがおきていると推測される。本条件における定量は、今後の課題としたい。

次に、高分解能マススペクトルの解析によりピーク成分の同定を行ったところ、既知化合物のフラグメンテーションで生じたとは考えられない m/z 値で、Komatsu ら^{1,2)}の報告で同定されていない化合物が多数検出された (Table 3)。特に、アントラキノン類と考えられる 400-430 nm に幅広い吸収帯を持つ化合物のピークが 20 程度検出されており、アントラキノン類の構造の多様性は、知られ

ているよりも多いと考えられる。ただ、本条件では、いずれのアントラキノン類のイオン強度も十分に大きくないうえ、aloe-emodin、emodin、chrysophanol、rhein、physcion のもの以外では、フラグメントイオンでこれらのアグリコンの質量数に一致するものが少なく、酸素一つ分や、水素2つ分など少しずつ質量が大なり小なり異なっていた。新規アグリコンか、イオン化などの際に酸化還元を受けたか、フラグメンテーション過程によるものなのかなど、検証が必要である。アントラキノン類のイオン化については、APCI 法も試したが良好な結果は得られなかった。

Orbitrap 検出では、化合物によっては C-trap で化合物が受けるエネルギーで望まないフラグメンテーションが起りやすいことを経験しており、本条件でも sennoside 類は糖が 2 つ切れたアグリコンとして検出されている。今回 Table 3 に示した結果についても、分子イオンが検出されているかどうかなどさらに検討が必要である。

3. 条件4および5による分析

次に、イオントラップ型マススペクトロメーターを用いて LC/MS 条件を検討した。TFA を加えた溶媒系とギ酸を加えた溶媒系を比較したが、ほとんど相違が見られなかった (Fig. 5 と 6)。条件 3 と条件 5 は同一溶媒条件、同一カラムでの分析であるが、これらを比較したとき epicatechin 3-*O*-gallate (**18**) の溶出がかなり遅れておりピーク形状もよくない。他のピークについても分離が後半に偏っている。これは、HPLC 配管のデッドボリュームの影響などもあると考えられるので今後両条件で同じクロマトグラムが得られるよう検討する。今回は条件 5 で 90 サンプ

ルの LC/MS 分析を行ったので、一部を示す (Fig. 7)。

4. カテキン類およびその重合体の分析

ダイオウは、rhatannin や RG-tannin などのカテキン類の重合体を含む。これらはカテキン単位が 8 から 10 縮合したものであるが、これらより重合度の少ない、あるいは多いオリゴマーが含まれるかどうかは、タンニン類の生合成やダイオウの品質を考える上で興味深い。そこで、条件 5 における分析データを解析した (Fig. 8)。

各オリゴマーに対応するマスクロマトグラムを抽出したところ、テトラマーくらいまでは明瞭なピークが検出された。各ピーク成分のマススペクトルは、重合単位に相当するフラグメントイオンを伴って検出されていた。

カテキン単位の繰り返しによるオリゴマー (I) は、テトラマーくらいまでは溶媒先端近くに重なって溶出していると推測される。

Rhatannin 系列 (II) は、epicatechin 3-*O*-gallate が単位である。ダイマーでピークが少なくとも 2 つ検出されており、4 種類ある procyanidin B di-gallate のうちの 2 つに相当すると考えられる。ダイオウ中には procyanidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate が知られている。

RG-tannin 系列の最小の構造は、procyanidin B-2 3'-*O*-gallate と構造異性体であり、ピークが 2 つ検出されている。その次もピークが 2 つあり、単純に RG-tannin 系列だけが検出されているのではないのかもしれない。タンニン類については、より大きなものも含めて今後詳細な分析および解析を進めていく。

D. 考察

HPLC による粗抽出物などの複雑な混合物の分析には、カラムの理論段数の高さが要求される。このため 250 mm や場合によってカラムを 2 本タンデムにつなぐなど、長いカラムで時間をかけて溶出することが歴史的には行われてきた。本研究ではカラム長を 150 mm とした。リン酸含有溶離液を用いた条件以外では、分離は必ずしもよいとはいえないものであった。このことはカラム長を短くしたことによる理論段数の低下から考えて自然なことであるが、LC/MS 分析では MS 軸での分離が可能であり、必ずしも LC による完全な分離を期待しなくてもよいという考え方もある。今回使用したいずれの HPLC システムのも、特性上、カラム長 150 mm での分離についてはこれ以上の劇的な解決は望めないと考えられるため、今後、大量分析を考えない場合には 250 mm 長カラムも検討する。

分析時間の短縮と分離の向上の解決法としては、より高圧で分離を行う超高速クロマトグラフの使用で実現できる可能性がある。超高速クロマトグラフで 250 -300 mm のカラムを用いて、Komatsu ら^{1,2)} の分析条件を最適化すれば、分離を大きく損なわずに分析時間 20 分から 30 分のメソッドに落としこめると考えられ、複雑な混合物の短時間大量分析が可能になると考えられる。

アントラキノン類のマスマスペクトロメトリーについては、イオン化法やその条件について、更なる検討が必要である。

今回の分析から、我々が未同定の化合物が

多数含まれていることが推測され、今後これらの構造が明らかにされることが望まれる。

E. 結論

生薬ダイオウの国内生産に適した系統を選抜する指標を広い視点で明らかにするため、栽培 5 年目の 11 系統 44 株について根茎と根の網羅的成分分析を行った。複数のクロマトグラフシステムと種々の溶媒系、イオン化法を検討した結果、ダイオウで知られていないと考えられる化合物を複数検出した。一方アントラキノン類の MS による検出感度が悪く、クロマトグラフィー条件とあわせて、今後条件の最適化が求められる。また、ダイオウに特徴的なタンニン類の網羅的分析の手がかりとして、重合度の小さいタンニン類を複数検出することに成功した。

F. 参考文献

- 1) Komatsu, K., *et al.* (2006) Chem. Pharm. Bull. **54**, 941-947.
- 2) Komatsu, K., *et al.* (2006) Chem. Pharm. Bull. **54**, 1491-1499.

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

なし

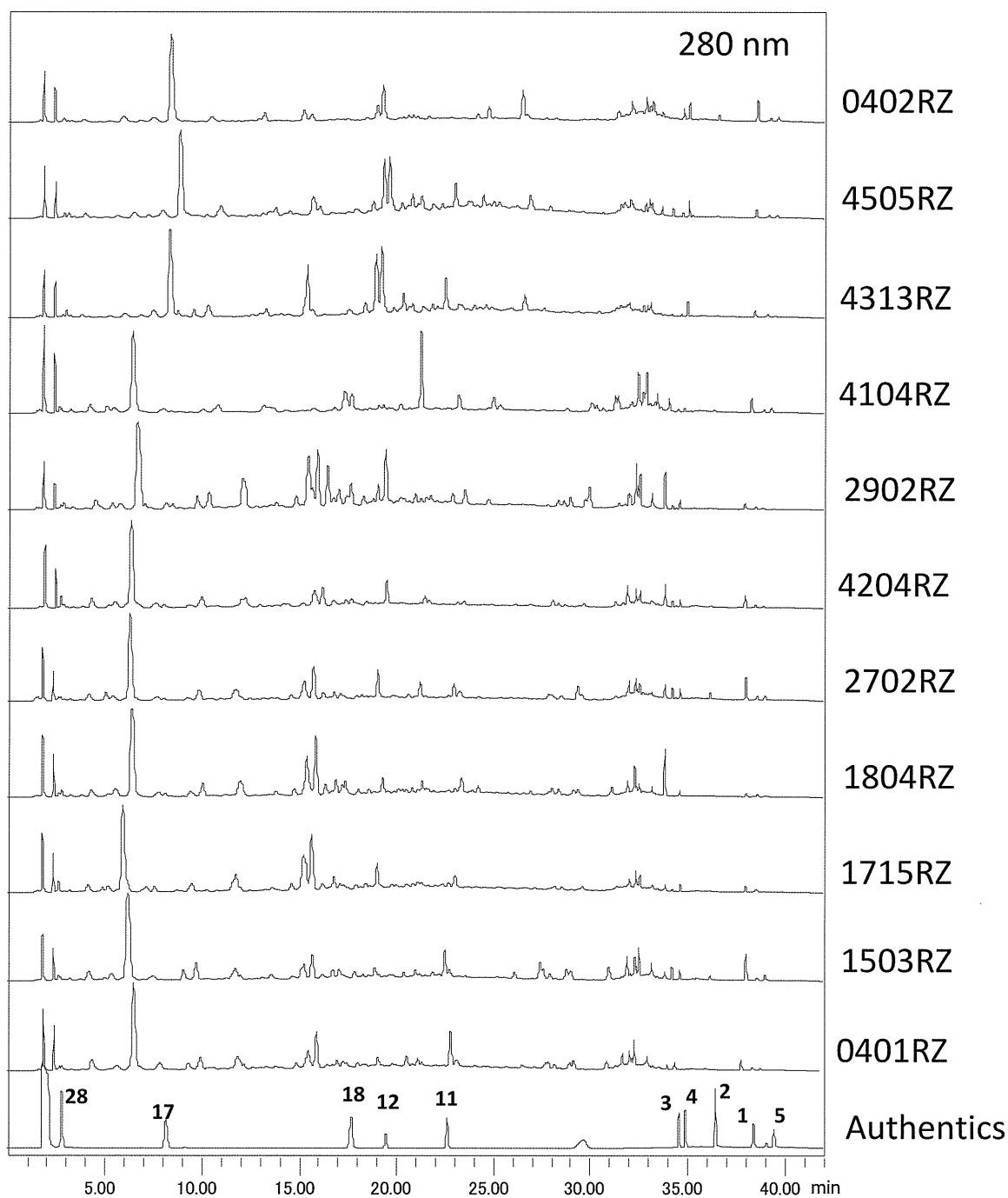


Fig. 1. ダイオウ根茎のフォトダイオードアレイ検出による HPLC 分析
 0.1%リン酸水溶液に対してアセトニトリル濃度を変化させるグラジエント分析（実験、条件
 1 参照）。1, chrysophanol; 2, emodin; 3, aloe-emodin; 4, rhein; 5, physcion; 11, sennoside A; 12,
 sennoside B; 17, catechin; 18, epicatechin 3-*O*-gallate; 28, gallic acid.

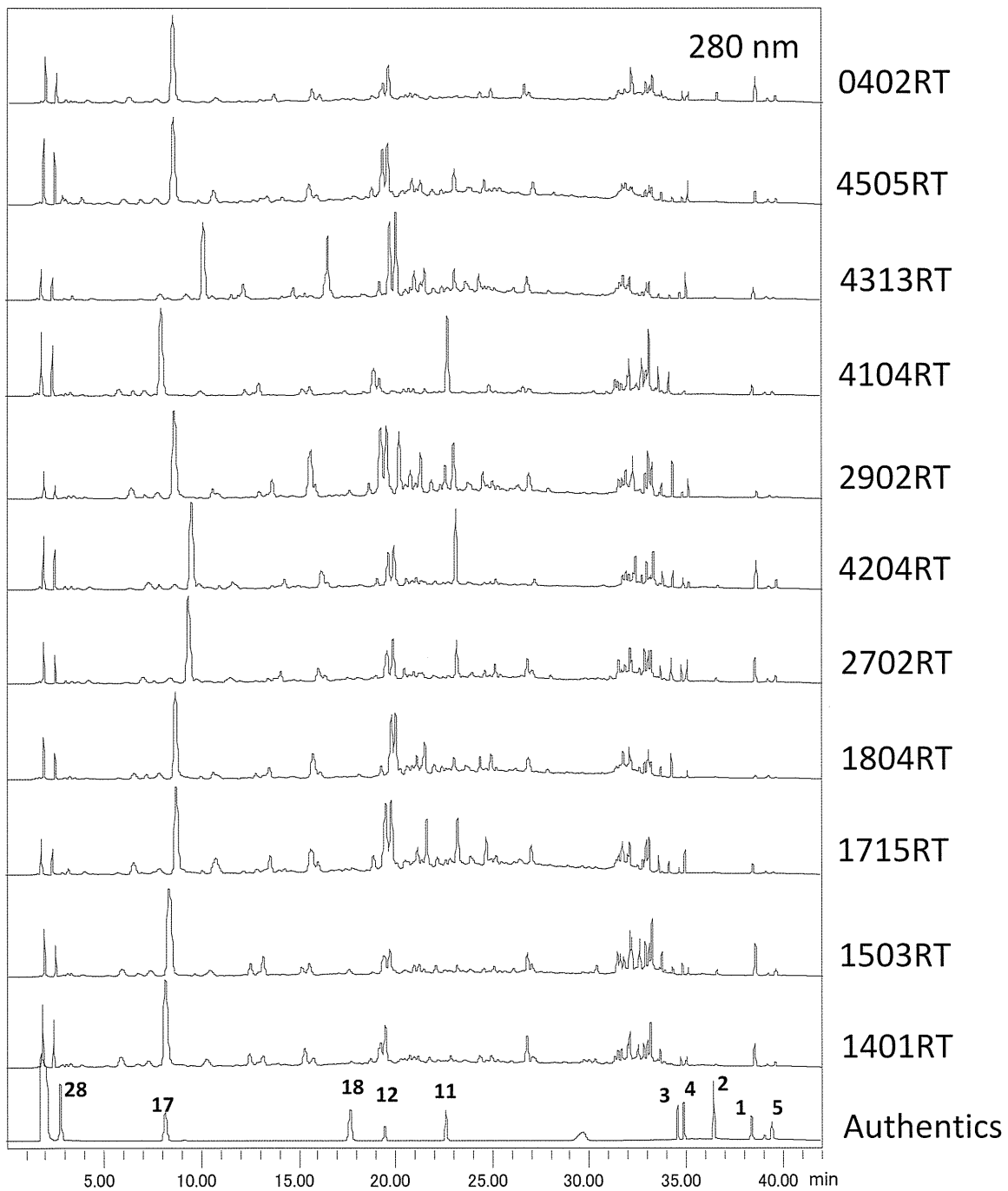


Fig. 2. ダイオウ根のフォトダイオードアレイ検出による HPLC 分析

0.1%リン酸水溶液に対してアセトニトリル濃度を変化させるグラジエント分析（実験、条件 1 参照）。1, chrysophanol; 2, emodin; 3, aloe-emodin; 4, rhein; 5, physcion; 11, sennoside A; 12, sennoside B; 17, catechin; 18, epicatechin 3-*O*-gallate; 28, gallic acid.