

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

分担研究課題 生薬の試験法及び各条規格の改正に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

ミャンマー産サンソウニン(酸棗仁)の特異的成分の同定について

研究要旨 酸棗仁は、クロウメモドキ科サネブトナツメ *Ziziphus jujuba* の種子を基原とする生薬である。酸棗仁には、正品を基原とする中国産の他に、インドナツメ *Ziziphus mauritiana* を基原とするミャンマー産があり、類似の外観を有するこれらの生薬を鑑別することは重要である。そこで、本研究では、これらの生薬の基原種を塩基配列解析で同定した後、酸棗仁の確認試験及びミャンマー産に対する純度試験のための指標成分の探索を行った。その結果、LC-MS 分析において、中国産の特異的成分を、標品との比較により jujuboside A (1)と同定した。第十六改正日本薬局方(JP16)収載の指標成分である spinosin (3)は両者に含まれていたことから、酸棗仁の確認試験の指標成分は 1の方が適当と思われる。また、ミャンマー産に対する純度試験の指標成分を探索する目的で、ミャンマー産の特異的ピークを指標とした成分分画を行い、frangufoline (2)を得た。しかし、TLC において、エキス中の 2を検出することは困難であった。そこで、これらの生薬エキスを TLC で分析した結果、ミャンマー産に特徴的なスポットが認められたため、その成分を明らかにするため、同スポットを指標に成分分画を行い、oleanolic acid (4)を得た。4がミャンマー産に特異的な成分なのかを確かめるため、各生薬エキスを GC-MS で分析した結果、中国産には 4が含まれず、検出限界以下だったことから、4はミャンマー産に特異的な成分であることが明らかになった。従って、酸棗仁のインドナツメに対する純度試験の指標成分は 4が妥当と思われる。

協力研究者

大嶋直浩 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
派遣研究員

鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
主任研究官

山本 豊 株式会社 栃本天海堂

横倉胤夫 日本粉末薬品株式会社

A. 研究目的

サンソウニン(酸棗仁)は、クロウメモドキ科サネブトナツメ *Ziziphus jujuba* の種子を基原とする生薬である。本品は鎮静作用を有するサポニンやフラボノイド等を含むことから、主に不眠症、神経症等の治療を目的とした漢方処方に用いられている [1, 2]。市場に流通するサンソウニンは、国産のものは無く、そのほとんどが、中国からの

輸入品であるが、2009 年には、第 3 国からのものも少数見られた [3]。しかしながら、ミャンマー産のサンソウニンは、正品であるサネブトナツメではなく、インドナツメ *Ziziphus mauritiana* を基原とすることから [4]、品質管理の観点でこれらを鑑別することは必要不可欠である。一方で、どちらとも類似の外観を有し、特に、刻みや粉末状態では、両者の鑑別は困難である。

そこで本研究では、酸棗仁の確認試験の新たな指標成分の探索及びインドナツメに対する純度試験のための指標成分の探索を目的に、中国産及びミャンマー産のサンソウニンについて、塩基配列解析により基原種を同定した上で、両者の抽出液を LC-MS 及び TLC で分析し、各々の特異的成分の同定を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

1-1. 生薬

中国産サンソウニン: 1995~2012 年に入手した 11 検体を使用した。ミャンマー産サンソウニン: 1993 及び 2011 年に入手した 5 検体を使用した。それぞれの詳細を Table 1 に示す。

1-2. 試薬

Jujuboside A (Lot. 00010525-723) は、ChromaDex 社より購入した。Oleanolic acid (Lot. TLL2332) は、和光純薬工業株式会社より購入した。Spinosin (Lot. 213104) は、Apin Chemicals 社より購入した。LC-MS, TLC 及び成分分画に使用した各種溶媒類は、研究用グレードのものを使用した。

2. 一般操作

LC-MS 分析は、LC-20A HPLC system (ポンプ, LC-20AD; デガッサ, DGU-20A₃; オートサンプラ, SIL-20AC_{HT}; カラムオープン, CTO-20A; PDA 検出器, SPD-M20A; Shimadzu, Japan) に、MS 検出器, LCMS-2020 (Shimadzu, Japan) を接続して使用した。GC-MS 分析は、GC-2010 system (Shimadzu, Japan) に、MS 検出器, GC-MS-QP 2010 (Shimadzu, Japan) を接続して使用した。¹H, ¹³C-NMR は、JEOL ECA-800 (Jeol, Japan) で測定し、ケミカルシフトは、TMS からの δ (ppm) 値で表した。高分解能質量分析は、LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Japan) を用いて行った。粉砕機は、MM-300 (Qiagen, Germany) あるいは、TI-200 (Irie-Shokai, Japan) を、振盪機は、SR-2w (Taitec, Japan) を、遠心分離機は、KUBOTA 6900 (Kubota, Japan) を用いた。

3 塩基配列解析

各検体、1 粒 (約 30-50 mg) を液体窒素により凍結させ、MM-300 を用いて、粉砕した後、Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega, USA) を用いて、genomic DNA を調製した。このものを鋳型に用いて、植物の rDNA 領域に保存性の高い配列に設計したプライマー対により PCR を行い、目的の遺伝子領域 (5.8S rDNA-ITS2-26S rDNA) を含む DNA 断片を増幅した。PCR 産物を精製した後、ダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。塩基配列解析は、Fasmac 社 (Japan) の受託解析により行われた。

4. LC-MS による分析

4-1. 試料の調製

中国産試料 (C-1~C-11) 及びミャンマー産試料 (B-1~B-4) を、ボールミル、MM-300 を用い 20 Hz, 1 min の条件で粉砕した。その粉末 1 g を正

確に量り取り,メタノール 30 mL を加え,20 分間振盪抽出し,8,000 × g で 10 分間遠心分離し,上澄み液を分取した.残渣にメタノール 15 mL を加え,同様の操作を行い,上澄み液を分取した.全上澄み液を合わせ,メタノールで正確に 50 mL に調整し,それを試料溶液とした.

4-2. LC-MS の分析条件

4-2-1. 中国産サンソウニン特異的成分の分析 (条件 A)

以下に示す条件で LC-MS 分析した.分析中,試料溶液を 4°C で保存した.

カラム: reversed-phase Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, GL Sciences, Japan)

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 65/35

流速: 0.2 mL/min

カラム温度: 40°C

注入量: 1 μL

分析時間: 20 min

PDA 検出器 (190~800 nm; モニター波長 190 nm)

MS 検出器

イオン化法: ESI positive/negative mode

ネブライザーガス流量: 1.5 L/min

ドライイングガス流量: 10 L/min

DL 温度: 250 °C

ヒートブロック温度: 200 °C

検出器電圧: 120 kV

インターフェイス電圧: 4.5 kV/-4.5 kV

インターフェイス電流: 0.6 μA

DL 電圧: 0 V

4-2-2. ミャンマー産サンソウニン特異的成分の分析 (条件 B)

以下に示す条件を除き,条件 4-2-1 と同様に行った.

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 77/23

4-2-3. Spinosin (3) の分析(条件 C)

以下に示す条件を除き,条件 4-2-1 と同様に行った.

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 85/15

PDA 検出器 (190~800 nm; モニター波長 254 nm)

5. 抽出分離

5-1. Franguloline (2) の単離

ミャンマー産生薬 (B-5; 100 g) を,ボールミル, TI-200 を用い, 20 Hz, 1 min の条件で粉碎した. その粉末に MeOH (3 L) を加え室温下 24 時間抽出し,それを 2 回繰り返した.得られたエキスを減圧下濃縮乾固し,抽出物 (Myn31; 9.7 g) を得た. それに酢酸エチル (300 mL)を加えて濾過し,可溶部 (Myn31-S; 3.7 g) 及び不溶部 (Myn31-IS; 4.4 g) に分画した.可溶部の一部 (0.4 g) を酢酸エチル (5 mL) に溶解させ SNAP KP-Sil Samplet (3 g) (Biotage; Sweden) に付して SNAP Ultra カラム(25 g) に装着後, Isolera Dalton (Biotage) を用いて *n*-hexane - EtOAc (4:1 0:1) で溶出し,4 つの画分 [fr. S(1)-1; 314 mg, fr. S(1)-2; 25.6 mg, fr. S(1)-3; 7.5 mg, fr. S(1)-4; 5.2 mg] を得た. Fr. S(1)-4 (5.2 mg) に *n*-hexane/EtOAc=2:1 (3 mL) を加え,その懸濁物をシリカゲルカラム (φ 1×4 cm) に付し, *n*-hexane - EtOAc (2:1 0:1) で溶出し,2 つの画分 [fr. S(1)-4-1; 2.4 mg, fr. S(2)-4-3; 2.5 mg] とともに, franguloline (2) (fr. S(1)-4-2; 0.4 mg) を得た.

Franguloline (2) [5, 6]: White amorphous. HRTOFMS m/z 535.3279 [M+H]⁺ (calcd for C₃₁H₄₂N₄O₄, 535.3297) ¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): see Table 2. ¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): see Table 2.

5-2. Oleanolic acid (4)の単離

5-1 で得た酢酸エチル可溶部 (Myn31-S; 3.7 g) の一部 (1.4 g) を酢酸エチル (15 mL) に溶解させ, SNAP KP-Sil Samplet (10 g) に付し, SNAP Ultra カラム (50 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane - EtOAc (2:1 0:1) で溶出し, 2 つの画分 [fr. S(2)-1; 1.3 g, fr. S(2)-2; 63.4 mg] を得た. Fr. S(2)-2 (63.4 mg) を酢酸エチル (3 mL) に溶解させ, KP-SIL (1 g) に付し, SNAP Ultra カラム(10 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane - EtOAc (1:1 0:1) で溶出し, 4 つの画分 [fr. S(2)-2-1; 37.2 mg, fr. S(2)-2-2; 2.7 mg, fr. S(2)-2-3; 6.2 mg, fr. S(2)-2-4; 4.7 mg] を得た.

一方, 残りの酢酸エチル可溶部 (Myn31-S; 1.6 g) を酢酸エチル (20 mL) に溶解させ, KP-SIL (10 g) に付し, SNAP Ultra カラム(30 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane - EtOAc (2:1 0:1) で溶出し, 3 つの画分 [fr. S(3)-1; 1.4 g, fr. S(3)-A; 12.5 mg, fr. S(3)-B; 34.6 mg] を得た.

類似の TLC パターンを示した fr. S(2)-2-2 (2.7 mg) と fr. S(3)-A (12.6 mg) を合わせて fr. C (15.3 mg) とした. これを CHCl₃ (4 mL) に溶解させ, シリカゲルカラム (φ 2.5 × 5 cm) に付し, CHCl₃ で溶出させて, 4 つの画分 [fr. C-1; 1.5 mg, fr. C-2; 1.9 mg, C-3; 5.7 mg, C-4; 2.0 mg] とともに oleanolic acid (3) (fr. C-5; 2.5 mg) を得た.

Oleanolic acid (4) [7]: White amorphous. ¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): δ_H 5.27 (1H, *dd*, *J*=4.0, 3.2 Hz,

H-12), 3.21 (1H, *dd*, *J*=11.2, 4.0 Hz, H-3), 1.12, 1.07, 0.97, 0.92, 0.90, 0.76, 0.74 (3H, *s*, CH₃ × 7). ¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_C 182.9 (C-28), 143.7 (C-13), 122.7 (C-12), 79.1 (C-3), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.6 (C-17), 45.9 (C-19), 41.7 (C-14), 41.1 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (C-7), 32.7 (C-22), 32.5 (C-29), 30.8 (C-20), 28.2 (C-2), 27.8 (C-23), 27.3 (C-15), 26.0 (C-27), 23.7 (C-16), 23.5 (C-30), 23.0 (C-11), 18.4 (C-6), 17.2 (C-26), 15.6 (C-24), 15.4 (C-25).

6. GC-MS による分析

Razborssek MI *et al* (2008)の方法を改変して行った [8].

6-1. TMS 誘導体化

4-1 で調製した試料溶液を 500 μL 取り, 溶媒を除去した後に *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA, 100 μL), ピリジン(50 μL)を加え, 70°C で 30 分間反応させた. 反応後 tetrahydrofuran (THF)で 1 mL に調整し, これを分析用試料とした.

6-2. GC-MS 分析

カラム: DB-5 (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness)

キャリアガス: ヘリウム

流速: 0.9 mL/min

昇温条件: 105 °C (0.8 min), 12 °C/min to 200 °C (0.1 min), 7 °C/min to 290 °C (6 min), 25 °C/min to 320 °C (10 min).

インジェクション温度: 290 °C

注入モード: スプリットレス

注入量: 2 μL

インターフェース温度: 290 °C

イオン化電圧: 70 eV

C. 結果及び考察

中国産及びミャンマー産のサンソウニンの基原種を特定するため, Table 1 に示した各試料より, genomic DNA を調製し, PCR により, 核 rDNA の ITS 領域を含む DNA 断片を増幅した後, 塩基配列解析を行った. その結果, 中国産 11 検体は, ほぼ同じ配列を示し, いずれの検体も全長 184 bp だった. ただし, 2 箇所 (Aligned positions: 88, 94) で, 2 種の塩基が重なっている部位を認めた. Blast search program による相同性検索の結果, 国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) 中の *Z. jujuba* の配列 (Acc. nos.: GQ434736, DQ146572, JF421556, GQ434737 etc.) と上述の多形部位を除き, 完全に一致した. ミャンマー産の 4 検体も, 互いにほぼ同じ配列を示し, いずれの検体も全長 181 bp だった. ただし, 3 箇所 (Aligned positions: 69, 75, 109) で, 2 種の塩基が重なっている部位を認めた. 相同性検索の結果, *Z. mauritiana* の配列 (Acc. nos.: KC155274, JQ627047-50, DQ146589 etc.) と多形部位を除き, 完全に一致した. 上記の結果から, 中国産は, サネブトナツメ, ミャンマー産は, インドナツメを基原としていることが確認された.

サネブトナツメ及びインドナツメに各々の特異的成分が含まれているかを確認するため, Table 1 に示した生薬計 8 検体 (C-5, 7, 10, 11; B-1, 2, 3, 4) のメタノールエキスをそれぞれ調製し, 条件 A~C で LC-MS 分析した (Figs. 1~3). その結果, Fig. 1 において, サネブトナツメに保持時間 8.5 分付近のピークが認められ, インドナツメにはそのピークが認められなかったことから, これがサ

ネブトナツメに特異的なピークであることが明らかとなった. また, 保持時間 15 分付近のピークは, インドナツメにも若干認められたため, これは非特異的な成分であった. Fig. 2 において, インドナツメに保持時間 11 分付近のピークが認められ, そのピークがサネブトナツメには認められなかったことから, これがインドナツメに特異的なものであることが明らかとなった. 一方, Fig. 3 の LC-MS 分析より, 第十六改正日本薬局方 (JP16) 収載の指標成分である spinosin (3) は, 両者に含まれていた. そのため, 3 よりも, サネブトナツメに特異的な 1 の方が確認試験の新たな指標成分として適当と思われる.

そこで, まずサネブトナツメに特異的なピークを同定するため, 高分解能質量分析を検討した. その結果, m/z 1251.5957 を与え, これは既知化合物である jujuboside A (1) のギ酸付加体と推定された. そこで, 1 の標品を LC-MS で分析した結果, 試料由来のピークと保持時間及びマススペクトルが一致した (Figs. 4~5) ことから, サネブトナツメに特異的な成分を, jujuboside A と同定した.

次に, インドナツメに対する純度試験のための指標成分の探索を目的に, 特異ピークを指標とした成分分画を行った. インドナツメの種子 (100 g) をメタノールで室温抽出し, 得られたエキスの酢酸エチル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで繰り返し分離し, m/z 535 $[M+H]^+$ の疑似分子イオンピークを示す化合物 2 を得た. 高分解能質量分析より, 2 は m/z 535.3279 $[M+H]^+$ を示したことから, $C_{31}H_{42}N_4O_4$ の分子式を持つ化合物であることが推定された. 既に, インドナツメからシクロペプチドアルカロイドの単離が報告されており [9], 高分解能質量分析で得た分子量から, 本化合物も類似の構造をもつものと推測した.

NMR において、2 は、酸棗仁より単離の報告がある frangufoline (2) と同じスペクトルを示したが、C-1, -16 のケミカルシフトはそれぞれ 123.1 ppm, 115.5 ppm と帰属されていた (Fig. 4, Table 2) [5, 6]. ^1H - ^1H COSY より、6.35 (H-1) は 6.67 (H-2) と、7.12 (H-16) は 7.03 (H-15) と相関が認められ、HMBC より、6.35 (H-1) は 131.9 (C-13) 及び 130.4 (C-15) と相関が認められたことから (Fig. 6)、2 の C-1, -16 のケミカルシフトをそれぞれ 115.6 ppm, 123.2 ppm と帰属した。同定した 2 が酸棗仁のインドナツメに対する純度試験の指標成分として適しているかどうかを確かめるため、インドナツメのエキスに含まれる 2 を TLC で検出できるか試みた。しかし、2 の含量は低く、また、鋭敏な検出試薬が見出されなかったため、TLC 上での検出は困難だった。

そこで、サネブトナツメ及びインドナツメをより簡便に鑑別するため、TLC 上で各エキスに特徴的なスポットがあるのか検討した。その結果、展開溶媒を *n*-hexane:EtOAc:HCOOH = 10:5:1 とし、順相の TLC で分析したところ、インドナツメにおいて、*R_f* 値 0.43 付近に赤紫色から黒紫色に変わるスポットを確認した (Fig. 7)。そこで、この成分を同定するため、同スポットを指標に、上記と同様の操作で成分分画を行った。単離した化合物の NMR を測定した結果、 ^1H -NMR において、 δ 5.27 ppm にオレフィンプロトンが、 δ 3.21 ppm にヒドロキシメチンプロトンが、 δ 1.12, 1.07, 0.97, 0.92, 0.90, 0.76, 0.74 ppm に 7 本のメチルプロトンが認められた。 ^{13}C -NMR において、30 本のシグナルが認められ、 δ 182.9 ppm にカルボン酸由来のカルボニル炭素が認められたことから、このものを oleanolic acid と推定し、その NMR が文献値と一致し、標品の TLC 及び NMR も一致したことから、同成分を oleanolic acid (4) と同定した [7] (Fig. 4)。

同定した 4 がインドナツメに特異的なのかを確かめるため、それぞれのメタノールエキスを GC-MS で分析した (Fig. 8)。その結果、インドナツメのエキスより、4 の標品と保持時間及びマススペクトルが一致するピークを検出した。一方、同じ分析において、サネブトナツメのエキスからは、4 は、検出されなかった (LOD, 2.8 μg ; Fig. 9)。以上のことから、4 はインドナツメに特異的であることが明らかとなった。

D. 結論

酸棗仁の確認試験の指標成分及びインドナツメに対する純度試験の指標成分を探索した。その結果、サネブトナツメに特異的な成分として、jujuboside A (1) を、インドナツメに特異的な成分として、frangufoline (2) 及び oleanolic acid (4) を同定した。4 は、種固有の成分ではないものの、2 と異なり、エキスの TLC 分析で検出可能、且つサネブトナツメに対して特徴的なスポット並びに GC-MS において特異的なピークを有することから、サネブトナツメ及びインドナツメの 2 種類の生薬を比較する場合に限り、4 をインドナツメに対する純度試験の指標成分とすることが妥当と考える。

E. 参考文献

1. Jiang JG, Huang XJ, Chen J, Lin QS (2007) Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Ziziphus jujube*. *Nat Prod, Res* 21(4):310 - 320
2. Wang LE, Bai YJ, Shi XR, Cui XY, Cui SY, Zhang F, Zhang QY, Zhao YY, Zhang YH (2008) Spinosin, a C-glycosides flavonoid from semen

- Ziziphi Spinozae, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 90(3):399 - 403
3. Crude Drugs committee of Japan Kampo Medicines Manufacturers Association ed., "The 2nd report on consumption of raw materials for crude drug in 2009 and 2010 fiscal years", Tokyo, p. 4 (2013).
 4. Personal communication from Dr. H. Yamaji in Tsumura Co. and Dr. Y. Yamamoto.
 5. Tschesche R, Last F (1968) Rhamnaceae alkaloids. V. Franganine and frangufoline, two additional peptide alkaloids from *Rhamnus frangula*. *Tetrahedron Lett* 25: 2993 - 2998
 6. Han BH, Han YN, Park MH, Park JI, Park MK (1990) Cyclopeptide alkaloid from Sanjoin. *Saenghwahak Nyusu* 10 (4): 239 - 245
 7. Liu HB, Zheng XD, Jian YF, Liu JX, Zhu JH (2011) Constituents of the root of *Anemone tomentosa*. *Arch Pharm Res* 34(7):1097 - 1105
 8. Razborsek MI, Voncina DB, Dolecek V, Voncina E (2008) Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in *Lamiaceae* and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia* 67: 433 - 440
 9. Panseeta P, Lomchoey K, Prabpai S, Kongsaree P, Suksamrarn A, Ruchirawat S, Suksamrarn (2011) Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Ziziphus mauritiana*. *Phytochemistry* 72:909 - 915
- F. 研究発表
1. 学会発表
大嶋直浩, 在間一将, 鎌倉浩之, 丸山卓郎, 合田幸広, 濱戸茜, 山本豊, 姜東孝, 横倉胤夫, ミャンマー産サンソウニン (酸棗仁) の特異的成分の同定について, 日本薬学会第 134 回年会(2014 年 3 月, 熊本)
 2. 論文発表
Kumeta Y., Maruyama T. Asama H., Yamamoto Y., Hakamatsuka T., Goda Y., Species identification of *Asini Corii Collas* (donkey glue) by PCR amplification of cytochrome b gene, *J. Nat. Med.*, **68**, 181-185 (2014).
- G. 知的所有権の取得状況
特になし

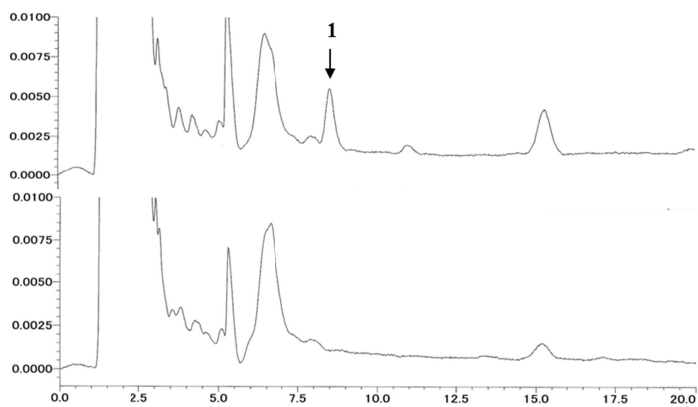


Fig. 1 中国産酸棗仁(左)及びミャンマー産酸棗仁(右)の LC-MS 分析(条件 A).

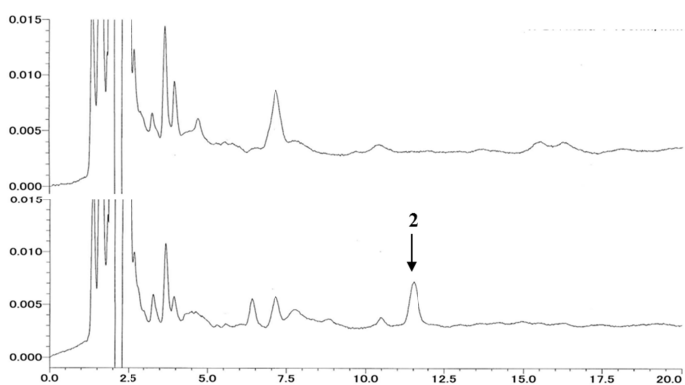


Fig. 2 中国産酸棗仁(左)及びミャンマー産酸棗仁(右)の LC-MS 分析(条件 B).

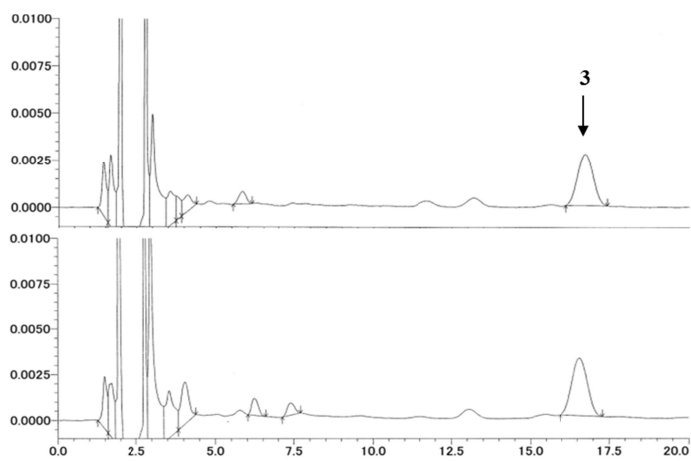


Fig. 3 中国産酸棗仁(上)及びミャンマー産酸棗仁(下)の LC-MS 分析(条件 C).

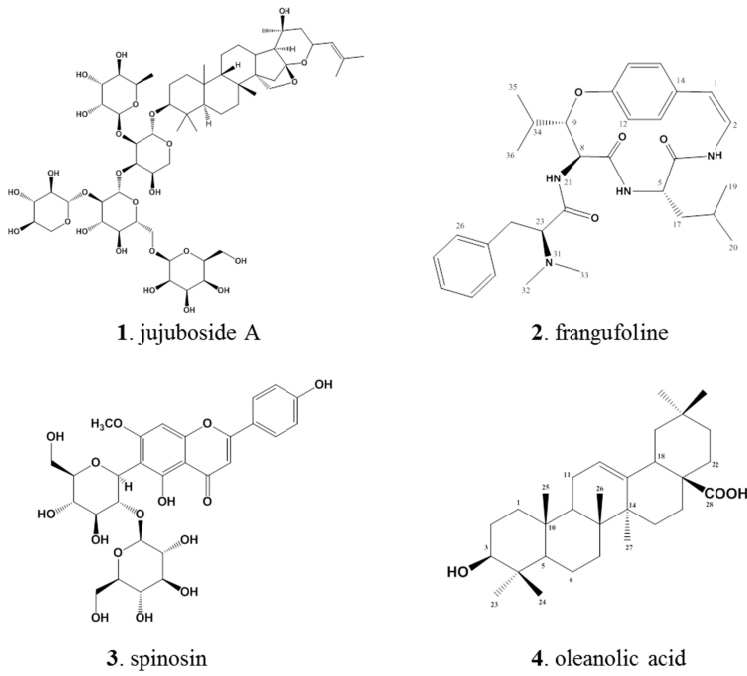


Fig. 4 化合物 1~4 の構造式.

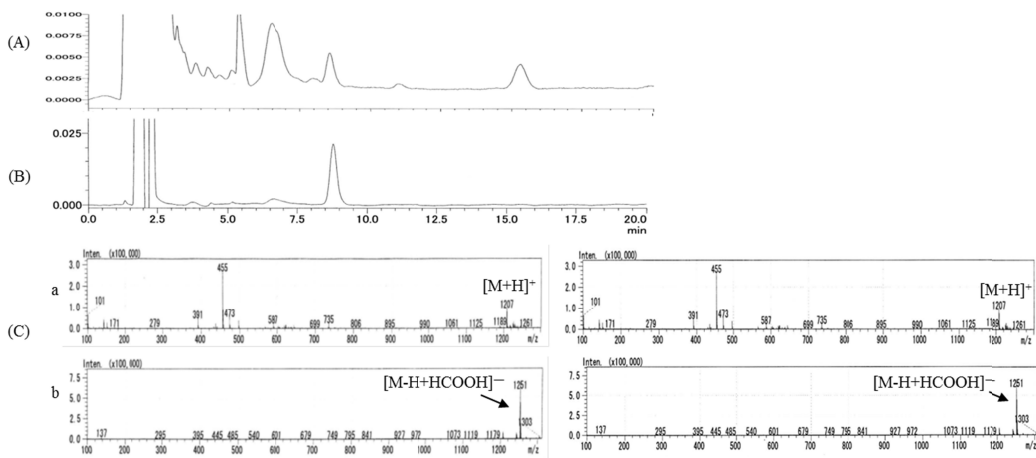


Fig. 5 中国産酸棗仁メタノールエキス(A)及び jujuboside A (標品) (B)の LC-MS 分析(条件 A) 並びにそのマスペクトル(C) (left; MeOH extract, right; standard sample)

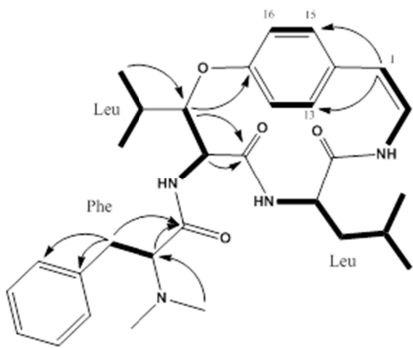


Fig. 6 Frangufoline (2)の COSY 相関(bold), key HMBC 相関(arrows)

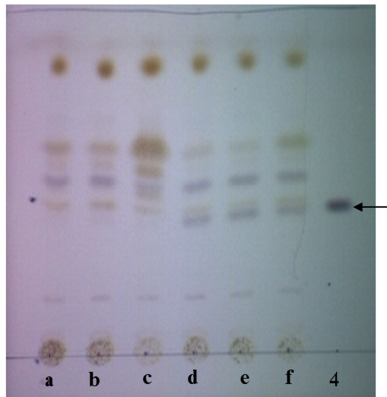


Fig. 7 サネブトナツメ(a~c), インドナツメ(d~f)及び化合物 4 の TLC

展開溶媒: *n*-hexane:EtOAc:HCOOH=10:5:1

Lanes a to f are C-5, -7, -11, B-2, -3, -4, respectively.

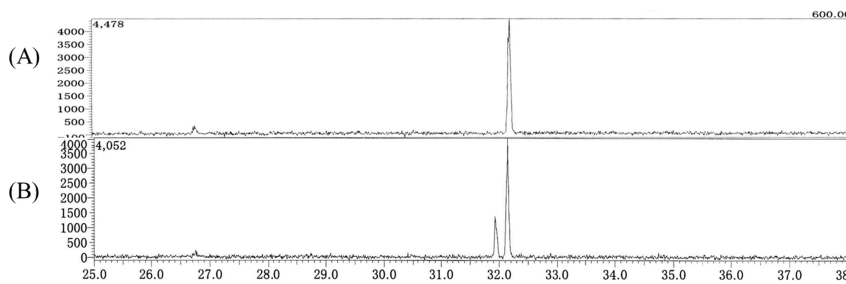


Fig. 8 Mass chromatograms at m/z 600 of methanol extracts from *Z. jujuba* (A) and *Z. mauritiana* (B) on GC-MS analysis.

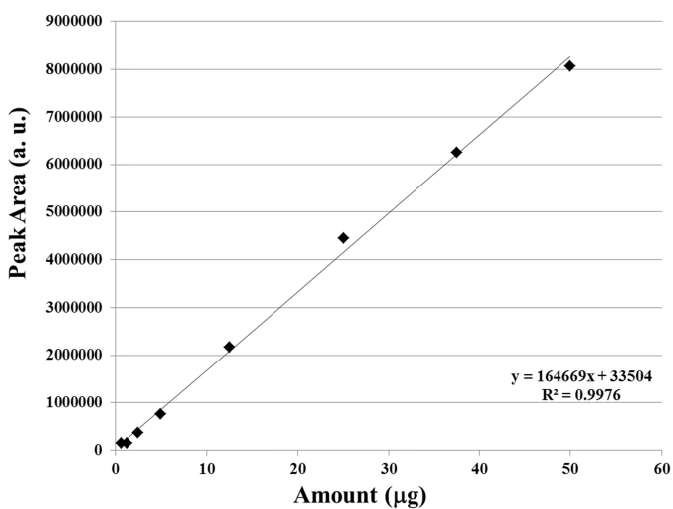


Fig. 9 Calibration curve for quantitative determination of 4 on GC-MS analysis

Table 1 酸棗仁及びその類似生薬の入手年月日及び産地

検体 No.	入手年月	産地
C-1	2012年12月	中国河北
C-2	2011年12月	中国河北
C-3	2010年11月	中国河北
C-4	2009年12月	中国河北
C-5	2009年8月	中国陝西
C-6	2008年12月	中国河北
C-7	2007年12月	中国河北
C-8	2006年11月	中国河北
C-9	1999年9月	中国河北
C-10	1997年9月	中国河北
C-11	1995年6月	中国河北
B-1	1993年3月	ミャンマー
B-2	2011年1月	ミャンマー
B-3	2011年3月	ミャンマー
B-4	2011年1月	ミャンマー
B-5	2011年3月	ミャンマー

Table 2. NMR data for **2** (CDCl₃)

position	δ_{H}		δ_{C}	
	2 (800 MHz)	ref. [6] (80 MHz)	2 (200 MHz)	ref. [6] (200 MHz)
1	6.35 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	6.35 (7.6)	115.6 ^f	123.1
2	6.66 (1H, <i>dd-like</i> , <i>J</i> =9.6, 8.0 Hz)	6.67 (10.2, 7.6)	125.7	125.9
3-NH	6.45 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.6 Hz)	6.46 (10.2)		
4			167.5	167.8
5	4.02 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =7.2, 4.0, 3.2 Hz)	4.03 (7.6, 3.6)	52.7	52.7
6-NH	5.67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	5.67 (7.6)		
7			171.8	171.5
8	4.49 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =9.6, 6.4 Hz)	4.50 (10.3, 7.2)	55.3	55.4
9	5.00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	5.01 (7.2, 1.7)	81.7	81.9
11			156	156.2
12	7.19 ^a (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 2.0 Hz)	7.06, 7.12	123	122.8
13	7.06 ^b (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	7.06, 7.12	131.9 ^e	131.8
14			132.0 ^e	132
15	7.03 ^b (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	7.06, 7.12	130.4	130.3
16	7.12 ^a (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 2.0 Hz)	7.06, 7.12	123.2 ^f	115.5
17 α	1.32-1.14 (overlapped)	1.20 (11.4, 3.6)	39.1	39.4
17 β	1.68 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =11.2, 4.0, 3.2 Hz)	1.69 (11.4)	39.1	39.4
18	1.08 (1H, <i>m</i>)	1.11 (6.6)	24.5	24.5
19	0.64 ^c (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	0.61 (6.5)	23.3	23.1
20	0.59 ^c (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	0.65 (6.6)	20.5	20.6
21-NH	7.89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.6 Hz)	7.88 (10.3)		
22			172.7	172.7
23	3.20-3.18 (overlapped)	3.2 (8.2)	70.5	70.6
24 α	2.84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =16.0, 8.8 Hz)	2.85 (15.8, 8.2)	30.6	30.9
24 β	3.20-3.18 (overlapped)	3.2 (15.8)	30.6	30.9
25			140.5	140.4
26	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	129.1	128.8
27	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	128.6	129
28	7.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.2, 6.6 Hz)	7.2	126.3	126.2
29	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	128.6	129
30	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	129.1	128.8
32	2.24 (6H, <i>s</i>)	2.25	42.0	41.9
33	2.24 (6H, <i>s</i>)	2.25	42.0	41.9
34	1.92 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =7.2, 6.4, 1.6 Hz)	1.9 (6.8, 6.7, 1.7)	29.4	29.4
35	1.00 ^d (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	1.02 (6.7)	20.5	20.4
36	1.28 ^d (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	1.29 (6.8)	15.1	15.1

^{a-e}: interchangeable, ^f: 2D-NMR により決定した.