

栽植密度：畝幅 100 cm、株間 50 cm

施肥方法：基肥は、堆肥 2.000 kg/10 a、炭カル 100 kg/10 a、化成(S121) 50 kg/10 a。追肥は 2 年目以降の萌芽期に化成(S121) 50 kg/10 a を施用した。

管理：適宜除草を行い、干ばつ時はスプリンクラーを用いて灌水した。

収穫：2014 年 10 月 8 日に根茎および根の地下部を収穫した。収穫した地下部は、水洗して根茎と根に切り分け、自然乾燥し、通風乾燥機(35℃)で 7 日間仕上げ乾燥した。仕上げ乾燥した後、付着する茎、皮及び腐れなどの異物を除去して評価用サンプルを調製した。

C. 研究結果

1) 10 月 8 日の調査では、4 年生ダイオウの生存率は、富 38 系統が 30.0%と比較的高く、富 45 系統が 20.0%、富 29 系統が 16.7%、富 18 系統および富 41 系統が 5.0%であった。一方、2013 年 10 月まで生存した富 15 系統、富 17 系統、富 27 系統、富 37 系統および富 43 系統は、本年度枯死が確認された(表 1)。

2) 地下部の 1 株当たりの収量を比較すると、富 29 系統(富山および名寄育苗)は根茎が 176.2~195.3 g、根が 144.7~194.5 g と最大であった。次に富 45 系統は根茎が 148.4 g、根が 290.2 g、富 38 系統は根茎が 140.2 g、根が 72.9 g であった(表 2)。

3) 乾燥、調製した後の地下部の歩留まりは、富 45 系統が 26.1~37.3%と比較的高く、次に富 29 系統が 19.6~29.6%、富 38 系統が 25.4%であった(表 2、図 1、2)。

D. 考察

本年度は、5 月下旬から 7 月まで干ばつ、さらに 8 月 5 日に豪雨が発生した。この結果、2013 年 10 月まで生存した 8 系統のうち、4 年生株として本年収穫できた系統は、富 18

系統、富 29 系統、富 38 系統、富 41 系統および富 45 系統の 5 系統であった。

ダイオウは、夏期に土壌の湿害が生じると、著しく生育が阻害もしくは枯死することが昨年(2013 年)確認されている。従って、2013 年および 2014 年の土壌湿害に対して生存した上記 5 系統、特に生存率が高い富 38 系統(生存率 30.0%)、富 45 系統(20.0%)および(富 29 系統(16.7%))の 3 系統は土壌湿害に適応性があると思われた。

根茎および根を合わせた地下部の収量に着目すると、富 29 系統が 340.0~370.7 g、富 45 系統が 113.2~290.2 g、富 38 系統が 201.0 g と高く、富 29 系統および富 38 系統は前年度(2013 年)に続く好成績であった。

以上の結果から、生存率および地下部の収量を総合的に判断すると、北海道北部の気候に適した栽培系統は、第一に富 29 系統および富 38 系統の 2 系統であり、次に富 45 系統であると思われた。

E. 結論

富山大学より供与されたダイオウ 19 系統について、2011 年に栽培試験を開始し、本年度はダイオウ 4 年生株の生存率、1 株当たりの収量を調査した。本年度の調査結果から、土壌湿害に対して適応性があり、北海道上川北部の気候に適した栽培系統は、生存率および地下部の収量の成績が良好であった富 29 系統および富 38 系統の 2 系統であり、次に富 45 系統であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願、登録状況
なし

表1 ダイオウ4年生株における各系統の生存率

富山大学番号	育苗地	定植株数	定植株数 合計	生存株数	生存株数	生存株数	生存株数	系統全体の 生存率(%)
				調査日 12/08/14	調査日 13/08/16	調査日 13/10/22	調査日 14/10/8	
富15	富山	-	40	-	-	-	-	0.0
	名寄	40		16	2	1	0	
富17	富山	-	20	-	-	-	-	0.0
	名寄	20		9	2	5	0	
富18	富山	-	20	-	-	-	-	5.0
	名寄	20		11	5	4	1	
富27	富山	15	35	11	1	0	0	0.0
	名寄	20		18	3	0	0	
富29	富山	10	30	8	3	2	1	16.7
	名寄	20		19	7	5	4	
富37	富山	10	10	7	2	2	0	0.0
	名寄	-		-	-	-	-	
富38	富山	-	20	-	-	-	-	30.0
	名寄	20		15	9	6	6	
富41	富山	10	20	8	0	0	0	5.0
	名寄	10		5	4	2	1	
富43	富山	-	4	-	-	-	-	0.0
	名寄	4		1	0	0	0	

表2 ダイオウ4年生株における根茎および根の収量

系統名	育苗地	収穫 個体数		新鮮重量 (g/株)		乾燥重 (g/株)		調整後の重量 (g/株)		地下部の 収量 (g/株)	歩留まり (%)
				根茎	根	根茎	根	根茎	根		
富18	名寄	1	平均 SD	753.2	0.0	109.2	0.0	90.6	0.0	90.6	12.0
富29	富山	1	平均 SD	1043.3	690.0	244.7	161.7	195.3	144.7	340.0	19.6
	名寄	4	平均 SD	667.4 730.9	673.5 982.2	219.1 267.1	200.5 290.4	176.2 217.7	194.5 281.0	370.7 493.0	25.6 4.1
富38	名寄	6	平均 SD	614.1 393.2	257.3 133.1	169.2 99.3	75.5 45.8	140.2 78.2	72.9 42.4	201.0 111.4	25.4 3.6
			平均 SD	474.9 SD	0.0	94.9	0.0	58.0	0.0	58.0	12.2
富45	富山	2	平均 SD	524.7 509.7	141.8 55.0	102.7 49.0	27.1 27.4	86.9 32.8	26.3 26.4	113.2 59.2	26.1 26.7
	名寄	2	平均 SD	415.2 61.7	305.7 187.9	165.3 166.9	154.0 149.1	142.2 146.1	148.0 142.0	290.2 288.0	37.3 33.4

収穫日 2014年10月8日



①ダイオウ富18系統 4年生・名寄育苗)



②ダイオウ富29系統 4年生・富山育苗)



③ダイオウ富29系統 4年生・名寄育苗)

図1 4年ダイオウの根茎部乾燥品



④ダイオウ富38系統 4年生・名寄育苗)



⑤ダイオウ富41系統 4年生・名寄育苗)



⑥ダイオウ富45系統 4年生・富山育苗)



⑦ダイオウ富45系統 4年生・名寄育苗)

図2 4年ダイオウの根茎部乾燥品

平成26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

—長野県菅平薬草栽培試験地で栽培されたダイオウの品質評価—

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 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 を見出してきたが、Lindleyin の含量からもこれらが優良であることを明らかにした。さらに、検証栽培で収穫した系統 29 の 3 年目の株において、前回の栽培とほぼ同様の成分組成であることが推測された。さらに、今回の栽培で成功した RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 は成分的に系統 29 に匹敵することが明らかになった。

研究協力者

葛 躍偉 富山大学和漢医薬学総合研究所
研究員

A. 研究目的

大黄は瀉下、駆瘀血、消炎、健胃薬などとして、様々な漢方方剤に配合される重要な漢薬である。その基原は、「第十六改正日本薬局方（日局）」にタデ科の *Rheum palmatum* L.、*R. tanguticum* Maxim.、*R. officinale* Baillon、*R. coreanum* Nakai. 又はそれらの種間雑種 (Polygonaceae) の、通例、根茎であると規定されている。

日本漢方生薬製剤協会による原料生薬使用量等調査報告書によると、国内の大黄の使用量は平成22年度433,567 kgで16番目に多く、その内訳は日本産が77,642 kg、中国産が355,925 kgであった。日本産大黄の大多数は特定企業で漢方処方エキス用に使用され、市場に流通する大黄はすべて中国産である。

近年、中国では品質良好な大黄の産地であ

る青海省で、野生ダイオウの採取を制限するようになった。中国市場では栽培品の大黄が多く出回るようになっており、その主産地は甘粛省である。これまでの研究により、甘粛省産大黄は *R. palmatum* に由来し、葉緑体 *matK* 遺伝子型は RPIV 型で塩基配列は Rp21 タイプを示し、成分的に Acylglucose 類は多いが、Dianthrone 類の含量は少なく、Sennoside A の含量は日局に規定されている 0.25% を満たさないことがわかっている。これ以外の遺伝子型を示すダイオウの栽培も徐々に広がっているが、その量は限られている。

このような状況下、日本においても品質良好なダイオウの栽培が必要な時期になっている。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、7年前から10数系統のダイオウを長野県菅平など4箇所栽培してきた。栽培5年目にあたる平成24年度に、菅平薬草栽培試験地で栽培したほとんどの株を掘り起こし、根茎と根に分けて、形態、乾燥重量、成分含量などを検

討した。その結果、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。特に系統29が成分的に優れていた。

今年度は、昨年度に引き続き系統29の根の成分研究を行い、未同定のピークを同定した。また、抗炎症作用を有するLindleyinを単離し、平成24年度に収穫した栽培5年目の11系統の根茎及び根における含量を測定した。

さらに、平成23年から新たに菅平薬草栽培試験地で実施している「検証のための栽培試験」で得られた栽培3年目のダイオウのうち、系統29と系統38についてもLindleyinを定量した。なお、系統38はRPI型・Rp4タイプに属するもので、これまで中国産大黃の成分研究の結果から、Anthraquinone類、Anthraquinone配糖体、Dianthrone類、Phenylbutanone類、Stilbene類、Fravan-3-ol類、Procyanidin類、Galloylglucose類、Tannin類を満遍なく含む優良な系統であることを報告している¹⁾。この遺伝系統に属する系統37はこれまで菅平での栽培に失敗してきたが、今回栽培条件を変えることにより系統38で成功したため、今回成分研究用の材料に加え、系統29と比較した。

B. 研究方法

1. 実験材料

1-1. 系統及び栽培年数の評価のための栽培試験(H20~24年、Ver.1)で得られた材料

菅平薬草栽培試験地で栽培された5年目の株(H24年収穫)11系統(4、14、15、17、18、27、29、41、42、43、45)。各系統の*matK*配列に基づく遺伝子型と配列タイプ、検体数については表1参照。

1-2. 検証のための栽培試験(H23~26年、Ver.2)で得られた材料

菅平薬草栽培試験地で栽培された3年目の株(H25年収穫)2系統(29、38)各1検体

2. 実験方法

2-1. UV検出高速液体クロマトグラフィー分析

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。

分析条件: グラジエント: 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: 1.0 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

Lindleyinを単離、同定した。これを正確に量り取り、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

各材料を粉砕し、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、3,500 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。

2-2. MS 検出高速液体クロマトグラフィー分析

測定条件

装置: Agilent 社製 HP1100 HPLC システム (photodiode array 検出器付き) と Bruker 社製 Esquire3000 plus 質量分析計で構成; カラム: YMC ODS-AQ (250 x 4.5 mm i.d., s-5 μ m); 移動相: A: 水/ギ酸(1000:1 v/v)、B: アセトニトリル/ギ酸(1000:1 v/v)。

分析条件

グラジエント: 0-50 min, 8-27% B、50-62 min, 27-33% B、62-70 min, 33-45% B、70-75 min, 45-84% B、75-85 min, 84% B、8% Bへ戻る; 流速, 0.8 ml/min; カラム温度, 45°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; MS 分析データを取得。

化合物の単離と HPLC ピークの同定

大黄 1.5 kg を 80%アセトンで抽出した後、各種溶媒で分画し、カラムクロマトグラフィー (シリカゲルカラム、ODS-A カラム、Sephadex LH20 カラムなど) 及び分取 HPLC 法を行い、化合物を単離した。単離した化合物について $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ 、UV による解析を行い、同定した。各々の化合物について試料溶液と同様に HPLC 分析を行い、保持時間及び UV スペクトルの比較により各ピークのアノテーションを行った。

C. 研究結果

1. Ver. 1 栽培 (H20~24 年) の材料を用いた実験

1.1. 系統 29 の根の含有成分

R. palmatum の系統 29 の検体 2 の根 (29-2B) の 80%アセトンエキスを MeOH-H₂O (9:1) に溶解し、HPLC 法で分析した。単離した化合物との比較等により、図 1 のようにアノテーションできた。

昨年度までに決定したピークに加えて、新たに 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (20)、Procyanidin B-2 3-*O*-gallate (21)、

Procyanidin B-5 3-*O*-gallate (22)、Resveratrol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (23)、Procyanidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate (24)、Resveratrol 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl) glucopyranoside (25)、1-*O*-galloyl-2-*O*-cinnamoyl-glucopyranoside (30) を同定した (昨年度報告した化合物名の訂正を含む)。

1.2. Lindleyin の定量

R. palmatum の 11 系統につき各 2~7 株を採取して (系統 4 のみ 1 株)、根と根茎それぞれについて Lindleyin (28) を定量した。その結果、系統 17、18、29、43、45 が比較的高含量であった (表 2、図 2)。これらの系統はすべて RPII 型、Rp5 タイプに属した。

2. Ver. 2 (H23~26 年) 栽培の材料を用いた

実験

栽培 3 年目の系統 29 の 1 株の根と系統 38 の 1 株の根茎と根について HPLC 分析を行い、図 3 に示すクロマトグラムを得た。これらと、Ver. 1 の栽培 5 年目の系統 29 (検体 2 の根) 及び系統 17 (検体 5 の根) で得たクロマトグラムを比較した。栽培 5 年目の系統 29 と 17 のクロマトグラムは類似するが、化合物 5 と 27 が系統 29 で多いようであった。栽培 3 年目の系統 29 と 38 は、栽培 5 年目の系統 29 に比べて検出される化合物が少なかった。系統 38 は 29 に類似するが、化合物 9、18、19 は系統 38 で、化合物 8 は系統 29 で多そうであった。

次に、Lindleyin を定量した結果、Ver. 2 の系統 29 の根には 17.6 mg/g、系統 38 の根茎と根にはそれぞれ 11.0 mg/g、14.2 mg/g 含まれていた。系統 29 の根は Ver. 1 栽培の系統 29 や 17 の含量を上回った。系統 38 の根と根茎については系統 17 と同程度であった (図 2)。

D. 考察

昨年度までの栽培 5 年目のダイオウの成

分研究で、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 が有望で、そのうち特に系統 29 が成分的に優れていると結論づけてきた。今回 Lindleyin を定量した結果では、系統 29 の優位性は特に示されなかった。多成分を含んでいるという点では系統 29 が、Sennoside A の含量からは系統 17 が推薦されるであろう。

今回新たに、菅平で栽培に成功した RPI 型 Rp4 タイプの系統 38 の栽培 3 年目の株の根茎及び根について HPLC 分析し、また Lindleyin を定量した。その結果、系統 29 に匹敵する品質であることがわかった。系統 38 については、現在 Lindleyin 以外の 17 成分を定量中である。

同じ系統のダイオウについて検証実験を行い、今回系統 29 の 3 年目の株について HPLC 分析を行ったところ、前回の栽培 5 年目の株とほぼ同様のクロマトグラムが得られた。定量分析は進行中であるが、これまでの結論は踏襲できるものと考えている。

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 を見出してきたが、Lindleyin の含量からもこれらが優良であることを示すことができた。さらに、検証試験として行った系統 29 の 3 年目の株の分析において、前回とほぼ同様の成分組成であることが類推された。さらに、これまで栽培が難

しかった RPI 型・Rp4 タイプの系統 38 においても成分的に系統 29 に匹敵することがわかった。

検証試験で栽培した各系統の栽培 3 年目及び 4 年目の株について定量分析を継続して行い、優良系統の確定、栽培年数の決定及び収穫前の処理方法（花茎を取り除く）を詳細に決めていく予定である。

F. 参考文献

- 1) 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).

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Ge, Y. W., Kazuma, K., Zhu, S., Yoshimatsu, K., Komatsu, K.: Comprehensive Analysis of Sequencing Proanthocyanidin Oligomers in Rhubarb by HPLC-ESI-MSⁿ. The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (2014.9.13, Fukuoka, Japan).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 実験材料

系 統	基 原		入 手 地	検 体 数	
	遺伝子型	塩基配列 タイプ		H.20-24	H.23-25
				栽培5年目	栽培3年目
4	RPIII	Rp17	甘肅省	1	0
14	RPIV	Rp21	甘肅省	3	0
15	RPIV	Rp21	甘肅省	4	0
17	RPII	Rp5	甘肅省	7	0
18	RPII	Rp5	甘肅省	6	0
27	RPII	Rp8	四川省	3	0
29	RPII	Rp5	四川省	3	1
38	RPI	Rp4	青海省	0	1
41	RPII	Rp5	四川省	2	0
42	RPI	Rp4	四川省	3	0
43	RPII	Rp5	四川省	7	0
45	RPII	Rp5	四川省	3	0

* 植物の基原には*matK*遺伝子の塩基配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

Strain 29-2

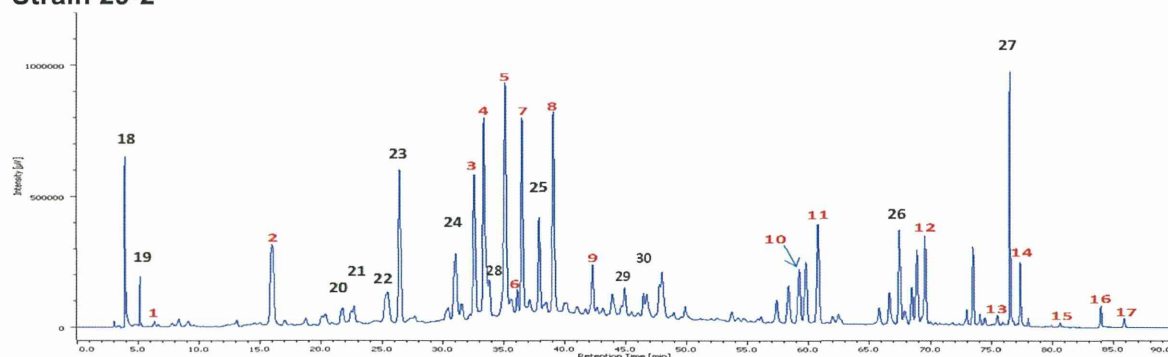


図1 ダイオウの根（栽培5年目の系統29、H24年収穫）のHPLCクロマトグラム

1: Galic acid, 2: (+)-Catechin, 3: (-)-Epicatechin gallate, 4: Aloe-emodin 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 5: Isolindleyin, 6: Sennoside B, 7: Rhein 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 8: Resveratrol 4'-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl) glucopyranoside, 9: Sennoside A, 10: Chrysophanol 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 11: Emodin 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 12: Physcion 8-*O*- β -D-glucopyranoside, 13: Aloe-emodin, 14: Rhein, 15: Emodin, 16: Chrysophanol, 17: Physcion, 18: 1-*O*-galloyl- β -D-glucose, 19: 6-*O*-galloyl- β -D-glucose, 20: 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose, 21: Procyanidin B-2 3-*O*-gallate, 22: Procyanidin B-5 3-*O*-gallate, 23: Resveratrol 4'-*O*- β -D-glucopyranoside, 24: Procyanidin B-2 3,3'-di-*O*-gallate, 25: Resveratrol 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl) glucopyranoside, 26: 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-*p*-coumaroyl)-glucopyranoside, 27: 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-cinnamoyl)-glucopyranoside, 28: Lindleyin, 29: Procyanidin B-5 3,3'-di-*O*-gallate, 30: 1-*O*-galloyl-2-*O*-cinnamoyl-glucopyranoside

表2 Lindleyinの含量 (mg/g)

Cult	Strain	Rhizome			Root		
		n	mean	SD	n	mean	SD
Ver.1	4	1	0.77	0	1	1.12	0
	14	3	2.44	0.83	3	3.03	0.76
	15	4	2.63	1.03	4	2.19	0.79
	17	7	11.08	3.17	7	11.09	4.10
	18	5	8.71	3.81	6	9.62	2.23
	27	3	2.02	0.6	3	2.32	0.67
	29	2	9.67	1.24	3	5.34	3.37
	41	1	2.71	0	2	3.77	0.78
	42	3	3.01	0.5	2	5.65	2.46
	43	7	7.23	4.63	7	7.90	3.66
	45	3	7.51	2.23	3	8.14	4.42
Ver.2	29	0			1	17.56	0
	38	1	10.99	0	1	14.18	0

Ver.1: 栽培期間 H20~24、栽培5年目の H24 に収穫

Ver.2: 栽培期間 H23~26、栽培3年目の H25 に収穫

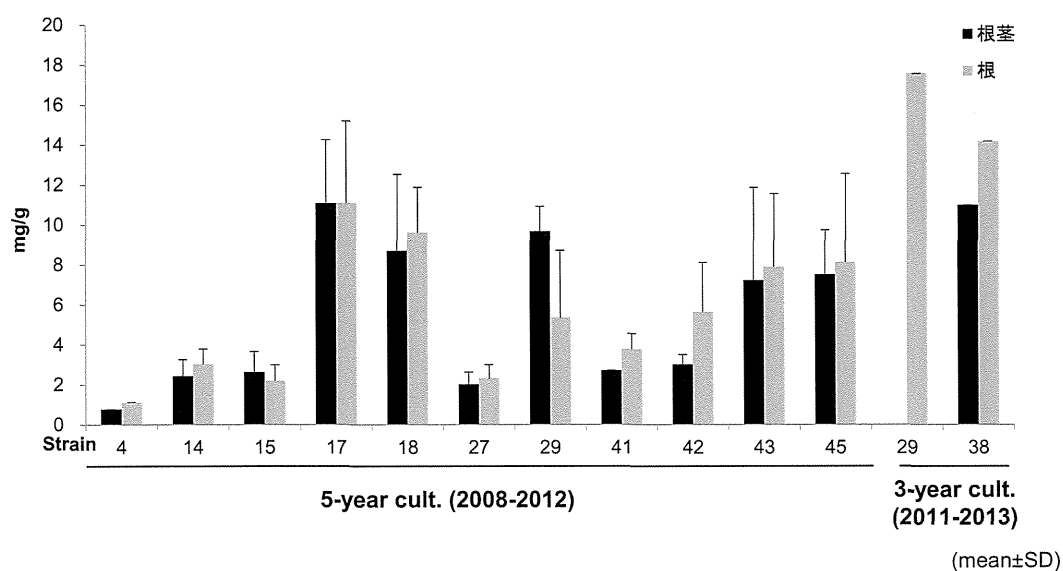
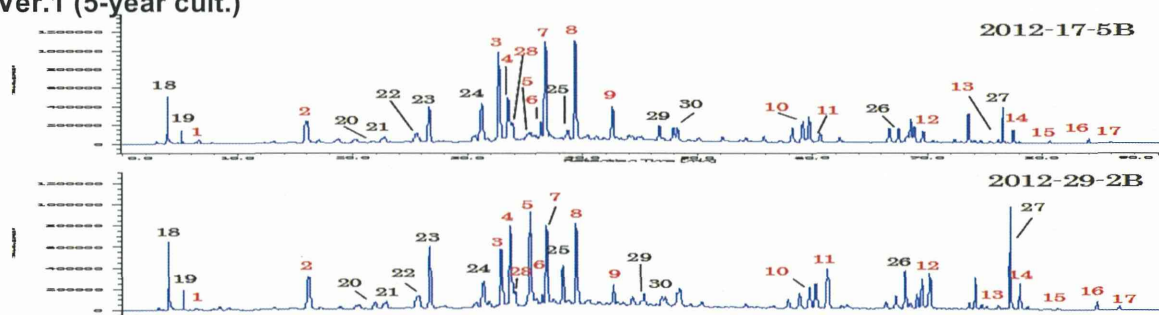


図2 栽培5年目 (Ver.1) 及び栽培3年目 (Ver.2) のダイオウの各系統における Lindleyin の含量

Ver.1 (5-year cult.)



Ver.2 (3-year cult.)

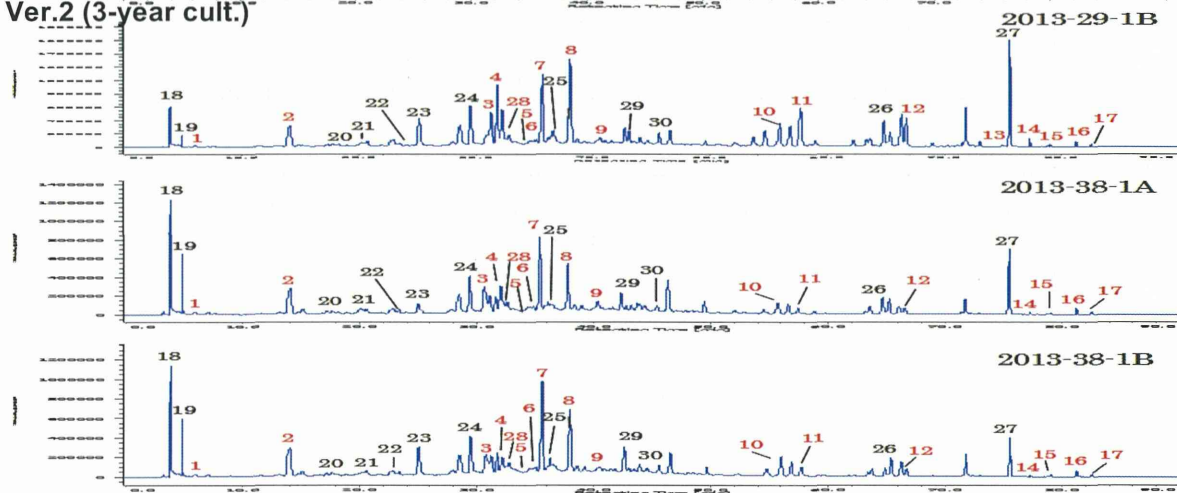


図3 Ver.1の栽培とVer.2の栽培における3系統のHPLCクロマトグラムの比較

2012-17-5B: 栽培5年目 (Ver.1) の系統17検体5の根

2012-29-2B: 栽培5年目 (Ver.1) の系統29検体2の根

2013-29-1B: 栽培3年目 (Ver.2) の系統29検体1の根

2013-38-1A: 栽培3年目 (Ver.2) の系統38検体1の根茎

2013-38-1B: 栽培3年目 (Ver.2) の系統38検体1の根

平成26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 タンニン高含有の大黄日本市場品と国内栽培品につき、80%アセトン抽出物中のタンニン類を遠心式限外ろ過フィルターで分離した。分画分子量がそれぞれ 30 kDa、10 kDa、5 kDa、2 kDa と異なるフィルターに逐次通過させたところ、タンニン類が濃縮される分画のパターンにサンプル間で差が見られた。これらの分画の LC-MS 分析では重合度が最大で 6 までのプロシアニジン類と考えられる質量数を観測した。しかし、この程度の検出重合度では 30 kDa、10 kDa 分画で検出される UV クロマトグラムを説明することができなかった。限外ろ過法による分離は、大黄のみならず生薬の高分子量成分の評価に有効であると考えられる。

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

A. 研究目的

日本薬局方（日局）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り、生薬の乾燥重量に対して sennoside A を 0.25% 以上含有することとなっている。主な薬効は、sennosides A、B による瀉下作用である。その他アントラキノン類による抗菌作用、lindleyin（フェニルブタノン類）や resveratrol 4'-O-glucopyranoside（スチルベン類）による抗炎症作用などが知られている。一般に生薬の基源植物はクローンではなく多様な遺伝的背景を持っており、遺伝的多様性を背景にした様々な成分組成の特徴をもつ系統に関して、それらの遺伝資源として

の重要性は日局規格に一義的に代表されるものではないといえる。ダイオウには RG-tannin や rhatannin などのタンニン類がアントラキノン類と共に主成分として含まれている（図 1）^{1, 2)}。タンニン類は植物由来ポリフェノールの総称であり、化学的特徴から a) 没食子酸と糖類から構成される加水分解型タンニン類と、b) 主に種々の flavan-3-ol が縮合した縮合型タンニン類に分類される。ダイオウに含まれる縮合型タンニン類は、主に catechin を単位として縮合したプロシアニジン類で、これまでに 40 種類ほど報告されている^{3, 4, 5)}。

近年ポリフェノールは、抗炎症、抗酸化、抗腫瘍形成、抗脂肪形成、抗肥満や慢性疾患リスクの低減などの健康増進作用が広く報告されており^{6, 7)}、ダイオウにおいてもタンニン類の生理作用への寄与に興味を持たれる。これまでに、RG-tannin の鎮静作用や rhatannin の血中尿素窒素の減少作用など

幾つかの生物活性が報告されている^{6, 7, 8)}。

このような生理的評価を行うためには、構成成分評価の基盤として縮合タンニン類の単離と構造決定およびクロマトグラフィー分析法の開発は必要不可欠である。大黃の縮合タンニン類の単離と構造決定は過去に西岡らにより精力的に行われ、種々の rhatannin を含む種々のオリゴマーの存在が明らかにされた⁹⁾。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による大黃成分の一斉分析法も開発されているが^{1, 2, 8)}、マスマススペクトロメーター (MS) を検出に用いた高速液体クロマトグラフィーマスマススペクトロメトリー (LC-MS) 法を適用した報告は著者の知る範囲では見られない。

本研究では大黃成分の HPLC 分析法について、特に縮合タンニン類の分離と MS 検出および同定法について検討を重ねてきた。1 年目は歴史的に用いられてきた逆層カラムを用い、MS 検出に適した溶媒条件を設定して成分を網羅的に検出して標準物質および文献情報から同定した (図 2)。2 年目は、縮合タンニン類の HPLC による分離条件について、逆層カラムとは異なる分子ふるい、親水性相互作用を分離機序とする充填材について分離を検討し、Amid-80 カラム (Tosoh) を用いた親水性相互作用による分離が、使用溶媒と MS 検出との組み合わせからも最適であることを明らかにし、重合度が 4 までの縮合タンニン類を検出した (図 3)。

最終年度である本年は、さらに高重合度のプロシアニジン類を検出するために、高タンニン含有の市場品を試料とした。次に、縮合タンニン類と低分子化合物を分離して、縮合タンニン類を濃縮する手法を構築した。さらに、これまでに構築した LC/MS 法や MALDI-TOF MS を用いて、濃縮分画の縮合タンニン類の組成を調べたので報告する。

B. 研究方法

1. 植物材料

タンニン高含有系統から 2010D1-3 および 2010D1-4 (2010 年中国採集品 GS158 のそれぞれ根茎および根、*R. palmatum*、遺伝子型

RPIV 型 Rp21)、2013D4 (2013 年収穫、菅平栽培 3 年目の株の根茎と根、*R. palmatum*、遺伝子型 RPIV 型 Rp21)、20580RC (北朝鮮産北鮮大黃、*R. coreanum*、日本市場品)、19929RPI (中国産箱黄、*R. palmatum*、遺伝子型 RPI 型 Rp4、日本市場品)、19927RPIV (中国産六成吉、*R. palmatum*、遺伝子型 RPIV 型 Rp21、日本市場品)。これらは、以後それぞれ、D1-3、D1-4、D4、RC、RPI、RPIV と略記する。

2. 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。

3. 標準物質および標準溶液の調製

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)、Physson (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。

4. 試料溶液の調整

根茎、根の乾燥品それぞれにつき、粉碎機で粉碎し、150 μ m 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、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 60% (v/v) エタノール水溶液に溶解した。一部を取り分けて (2.0 mL)、残りは限外ろ過用試料溶液とした。

残りの全量を分画分子量が各 30 kDa、10 kDa、5 kDa、2 kDa の遠心式限外ろ過フィルターユニットで順次処理した。遠心式限外ろ

過ユニットは、Amicon Ultra centrifugal filter units Ultra-15、MWC0 30 kDa (Millipore)、Amicon Ultra centrifugal filter units Ultra-15、MWC0 10 kDa (Millipore)、Vivacon 2 Ultrafiltration devices MWC0 5 kDa (Sartorius)、Vivacon 2 Ultrafiltration devices MWC0 2 kDa (Sartorius)を用いた。

遠心分離は15および50 mLチューブ使用時は3000×*g*で、2.0 mLチューブ使用時は2000×*g*で行った。液量が1/10になるまで濃縮したが、ごく短時間(例えば数分)でも全ての液体が通過してしまった場合には、濃縮されるべき成分はないとして、次に分画分子量が小さいフィルターで処理した(図4)。濃縮された分画は、それぞれ一部を取り分けて(0.5 mL) 試料溶液とした。

濃縮された分画を洗浄する場合には、60%EtOHで5倍に希釈しピペットでよく攪拌したのちに遠心濃縮する操作を5回繰り返した。

試料溶液は、LC/MS分析の前に0.45 μmのフィルターを通した。特に記載がない限り、分析の際は5 μLをオートサンプラーより分析装置へ導入した。

5. 分析装置と検出条件

5. 1. 装置 1

MS検出高速液体クロマトグラフは、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器付きAccela高速液体クロマトグラフ(ThermoScientific)とLTQ Orbitrap XL高分解能質量分析計(ThermoScientific)で構成した。PDA波長範囲は200-600 nm。MS検出条件は、electrospray ionization (ESI)正および負イオンモード、ion spray voltageは正イオンモード時4600 V、負イオンモード時3500 V、正/負イオンモードによるイオントラップ検出と負イオンモードによるOrbitrap検出の同時検出、高分解能測定時の分解能は60,000、測定範囲は*m/z* 50 - 2000、sheath gas flowは50 arbitrary unit、aux gas flowは30 arbitrary unit、capillary temp.は350°C、capillary voltageは19 V、tube lensは35 V、

他の条件はメーカーデフォルト値を設定。

5. 2. 装置 2

高速液体クロマトグラフは、AS-950-10オートサンプラー (JUSCO)、LC-20AポンプおよびSPD-M20Aフォトダイオードアレイ検出器 (Shimadzu)、860-C0カラムオープン (JUSCO)を用いて構成した高速液体クロマトグラフ。PDA波長範囲は200-600 nm。装置 2においては、試料10 μLをあらかじめMeCN/H₂O (2/1、*v/v*)で5倍に希釈して、5 μLをオートサンプラーより分析装置へ導入した。

5. 3. 装置 3

MALDI-TOF MSは、Autoflex (Bruker Daltonics)を用いた。レーザーの照射エネルギーは60-90%の間で適宜調整した。正および負イオンモードで測定した。測定質量範囲は適宜調整した。

5. 4. 限外ろ過分画の濃縮倍率の測定

UV/Visスペクトロメーターは日本分光のV-730を用いた。測定サンプルは分画液をメタノールで適宜50倍あるいは2500倍に希釈し、各分画の200-600 nmのUV/Visスペクトルを測定した。各分画の濃縮倍率は275 nmの吸光度につき希釈倍率をかけた上で、抽出液の吸光度に対する倍率を計算した。

6. 分析カラムおよび溶媒条件

6. 1. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラム

HILICカラム、Amide-80 (2.0 i.d. × 250 mm; Tosoh)を用いた。溶出は、5 mMギ酸アンモニウム水溶液 (溶媒A)、アセトニトリル (溶媒B)、溶媒Aに対して50分間で90-40%溶媒Bのリニアグラジェント、流速 0.5 mL/min、カラム温度35°C。

6. 2. 逆層クロマトグラフィーカラム 1

逆層クロマトグラフィーカラム、Capcell Pak C18 MGIII (2.0 i.d. × 150 mm; Shiseido)を用いた。溶媒は、0.1%ギ酸水溶液 (溶媒A)、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (溶

媒B)、溶媒Aに対して25分間で5-95% 溶媒Bのリニアグラジェント。流速0.20 mL/min、カラム温度 35°C。

6. 3. 逆層クロマトグラフィーカラム 2

逆層クロマトグラフィーカラム、Capcell Pak C8 S300 (2.0 i.d. × 150 mm; Shiseido) を用いた。溶媒は、0.1%ギ酸水溶液(溶媒A)、0.1%ギ酸アセトニトリル溶液(溶媒B)、溶媒Aに対して25分間で5-95% 溶媒Bのリニアグラジェント。流速0.20 mL/min、カラム温度 35°C。

7. 各分画のMALDI-TOF MS

マトリックスとして sinapinic acid、 α -hydroxycinnamic acid、2、5-dihydroxybenzoic acid (5 mg/mL in MeCN/0.1% trifluoroacetic acid (2/1)) を用いた。また、イオン化促進剤として0.1 M NaClを用いた。サンプル溶液(原液のまま)、マトリックス、イオン化促進剤の比を1:4:0(または、1:4:1)で混合し、1 μ LをMALDI-TOF MS用ステンレスプレートにのせた。

C. 研究結果および考察

1. 遠心式限外ろ過による縮合タンニン類の分画

限外ろ過は、分子が限外ろ過膜を通過するかしないかという分子サイズに依存した分離手法である。溶媒や溶質の膜通過のエネルギーを遠心力で与えるものが遠心式限外ろ過で、タンパク質や核酸の低分子化合物との分離や脱塩などに頻繁に用いられる。種々の分画分子量(2から100 kDa)のものが市販されている。一般に一桁以上異なる分子量をもつ分子を分ける場合には有効であるとされる。

巨視的には分子は様々な形をもつ。限外ろ過で言われる分画分子量は主に球状分子(タンパク質)を想定したものであり、核酸の様に棒状や線状の分子や膜と相互作用するものでは分画分子量は必ずしもあてにならないことがある。したがって、濃縮された分子や通過した分子の大きさの評価は重要な関

心事である。プロシアニジンへの適用は、食品分野で散見される^{10, 11, 12)}。

各系統の抽出液の色は、RCが濃褐色、D1-3と-4が淡褐色である他は、おおよそ黄褐色であり、直感的にはRCに縮合タンニンが多く含まれると考えられた(図5)。分画分子量を30 kDa、10 kDa、5 kD、2kDと順に下げながらろ過していくと、抽出液の色からは一概には想定できない分画の濃集パターン(275 nmの紫外領域に吸収を持つ成分の濃縮という意味で)が得られた(図5、表1)。RCでは高分子量分画30 kDa、10 kDaでは濃縮が確認できず、5 kDと2kDで強い濃縮が見られた。一方、RCよりも淡い褐色であったD1-3と-4では30 kDa分画に強い濃縮がみられ、より小さい分画分子量分画では顕著な濃縮は見られなかった。他のサンプルでは中程度の濃縮が所々みられたが、RPIでは10 kDa分画が素通りで濃縮が見られなかった。各分画のUVスペクトルでは、縮合タンニン類由来と考えられる275 nmの吸収が見られ、ろ過の各段階を経るごとにアントラキノン類などの350-400 nmの吸収が顕著になり抽出液からの縮合タンニン類の除去を表しているものと考えられる(図6)。

2. 各分画の逆層カラムによる分離とそのプロファイル

逆層クロマトグラフィーカラム1(Capcell Pak C18 MGIII)を用いたPDA検出HPLC分析では、縮合タンニン類の濃縮の様子と、濃縮された縮合タンニン類の性質の違いが明確になった(図7aとb)。すなわち、縮合タンニン類の濃縮されている分画にはクロマトグラム中央付近に大きなブロードニングしたピークがみられ、最も低分子分画であるU2K分画ではこのピークはほとんど見られない。加えて、D1-4以外のサンプルでは、このブロードピークの保持時間は各分画間でもほぼ一定の12分付近であるのに対し、D1-4では030K、010K分画で14分付近とやや遅れ、05Kと02Kでは11分付近に見られる。このような保持時間の差は、濃縮されたタンニン類の組成の異なりを反映し

たものと考えられる。実際、D1-4 のみで抽出液、05K および 02K 分画から褐色の沈殿が生じることが、他のサンプルとの大きな相違の一つである。D1-3、D1-4 は同一株のそれぞれ根茎と根である。ともに 030K 分画に強い濃縮があったが成分組成は異なることが、本実験から示唆された。

各分画で検出される鋭いピークは、分画を溶媒で繰り返し洗浄していないことによる前分画からのキャリーオーバーである。D1-3、D1-4 の洗浄後の 030K 分画について、その UV スペクトルと、逆層クロマトグラフィーカラム 1 による分析結果を示す (図 8)。

3. クロマトグラフィー担体の細孔径と分離

高速液体クロマトグラフィー用の担体は多孔質の微粒子であり、一般的な担体では細孔の大きさが 120 μm である。タンパク質や核酸などの高分子では、分離とピーク形状を改善するため細孔の大きさが 300 μm のものがよく使われる。そこで、細孔の大きさがブロードピークのピーク形状とピーク分離に寄与するかを調べるために逆層クロマトグラフィーカラム 2 (Capcell Pak C8 S300) を用いた PDA 検出 HPLC 分析を行った (図 9a と b)。結果として、ブロードピークの溶出時間帯はやや短くなってピーク形状は改善した感もあるが、担体が C8 で相互作用が C18 より小さいことを鑑みると、必ずしも細孔径の影響かどうか判断できない。実際低分子量成分の分離も全体として悪くなっている。

4. Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) カラムによる LCMS 分析

昨年度設定した HILIC 分析法により、抽出液を含むすべてに分画を分析した。クロマトグラムから、高分子量成分が溶出する分析時間後半で、巨大なブロードピークの割合が分画を進めるに従って減少していくことが明らかである (図 10)。

縮合タンニン類の種類ごとに (図 11-16) 高分解能データから重合度ごとの抽出マスキロマトグラム (EIC) を書かせると、重合度が最高で 6 まで検出されていた (例えば図

11 と 13)。昨年度は最大で重合度が 4 であったことから、サンプルの濃縮は検出に効果的だった。

しかし、検出された EIC ピークだけではブロードピーク領域を全く説明できないことから、この領域で溶出している縮合タンニンはさらに大きな重合度を持っていると考えられる。縮合タンニン類が必ずしも分画分子量通りに分画されるとは限らないが、I 型で仮に分子量が 30 kDa なら重合度は 103、10 kDa なら重合度は 34、5 kDa で重合度は 17 であり、2 kDa で重合度は 7 である。既存の LC-MS 法では重合度が 10 を越えると検出が格段に難しくなり、10 kDa、30 kDa の縮合タンニンを直接 MS 検出した例はないと思われる。

カシューアップル抽出液の粗プロシアニジン分画を遠心限外ろ過で分離した例では、チオールを用いた分解的な化学分析により各分画に濃縮されたプロシアニジンの平均重合度を求めたところ、100 kDa 以上で約 73、100-50 kDa で 54-60、50-30 kDa で 36-54、30-10 kDa で 25-37 であった¹²⁾。

5. 各分画の MALDI-TOF MS

今回得た各分画は、共存する低分子量成分のイオン化が優先して起こり、解析に十分なスペクトルを得ることができなかった。分画を洗浄して、低分子量成分を取り除く必要があると考えられる。洗浄した D1-3 および D1-4 分画の測定は今後行う。

D. 結論

生薬に含まれる高分子量成分はゲルろ過などで分離されてきたが、今回のように遠心式限外ろ過で分離する方法が行われたのはおそらく初めてか、ほとんどないかであると思われる。縮合タンニン類と考えられる成分の濃縮パターンがサンプル間で特徴的な差として観測されたことは、この方法が生薬の縮合タンニン類の評価を行うための一つの指標となりうることを示している。今後限外ろ過操作を標準化すれば、大黄のみならず他の生薬についても適応可能な評価方法とな

るだろう。

濃縮された成分の簡便で直接的な評価方法はマスマスペクトロメトリーが適していると考えられるが、現在のところ MALDI-TOF MSでも検出できる最重合度は最大 12 程度である¹³⁾。チオールによる分解法での評価が現在のところは一般的である。

今後、限外ろ過分画と生物活性に関して関連を明らかにすることが、生薬の分析という視点からは重要である。

E. 参考文献

- 1) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Basnet, P., 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).
- 2) Komatsu, K., Nagayama, Y., Tanaka, K., Ling, Y., Cai, S.-Q., Omote, T., Meselhy, M. R.: Comparative study of chemical constituents of Rhubarb from different origins, *Chem. Bull. Pharm.*, 54, 1491-1499 (2006).
- 3) Zheng, Q.-X., Wu, H.-F., Guo, J., Nan, H.-J., Chen, S.-l., Yang, J.-S., Xu, X.-D.: Review of Rhubarbs: chemistry and pharmacology, *Chinese Herbal Medicine*, 5, 9-32 (2013).
- 4) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., Nishioka, I.: Tannins and related compounds. XLV. Rhubarb. (5), Isolation and characterization of flavan-3-ol and procyanidin glycosides, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 3208-3222 (1986).
- 5) Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I., 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).
- 6) Starec, M., Rosina, J., Sovjak, R., Waitzova, D.: Neuroleptic properties of RG-tannin in mice and rats, *Acta Vet. Brno*, 65, 209-212 (1996).
- 7) Shibutani, S., Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G., Hishioka, I.: Mechanism of the Blood Urea Nitrogen-decreasing Activity of Rhatannin from Rhei Rhizoma in the Rat. I, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 2378-2385 (1983).
- 8) Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I.: Studies on rhubarb (Rhei Rhizoma). XV. Simultaneous detection of phenolic constituents by high-performance liquid chromatography, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 999-1004 (1989).
- 9) 西岡五夫: タンニンに関する最近の研究, *薬学雑誌*, 103, 125-142 (1983).
- 10) Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, P. G., Sefton, M., Hoj, P., Waters, E. J.: Quantitative analysis of polymeric procyanidins (Tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 26-31 (2001).
- 11) Bellesia, A., Tagliazucchi, D.: Cocoa brew inhibits in vitro α -glucosidase activity: The role of polyphenols and high molecular weight compounds, *Food Research International*, 63c, 439-445 (2014).
- 12) 永峰賢一: カシューアップルのプロアントシアニジン, プロアントシアニジン含有組成物, およびその用途, 再公表特許 PCT/JP2008/073843.
- 13) Monagas, M., Quintanilla-López, J. E., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Lebrón-Aguilar, R.: MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 358-372 (2010).

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 数馬恒平, 葛躍偉, 紺野勝弘, 小松かつ子. LC-MS による大黃の縮合タンニン類の分析. 日本薬学会第 135 回年会 (2015. 3. 27, 神戸)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 限外ろ過の諸条件と縮合タンニン類の濃縮倍率

Fraction	Initial volume (mL)	Centrifugation (x g)	SpinTime (min)	Rate (mL/min)	Rel. Conc. ^a (times)	Note
<i>Amicon Ultra 30K retentate (O30K fractions)</i>						
D1-3	8	3000	23	0.35	3.0	
D1-4	8	3000	23	0.35	4.2	
D4	8	3000	15	0.53	0.5	
20580RC	8	3000	15	0.53	NA ^b	
19927RPV	8	3000	25	0.32	1.4	
19929RPI	8	3000	15	0.53	NA	
<i>Amicon Ultra 10K retentate (O10K fractions)</i>						
D1-3	7	3000	29	0.24	1.6	
D1-4	7	3000	26	0.27	1.0	
D4	7	3000	29	0.24	2.5	
20580RC	7	3000	5	>1.4	NA	素通り
19927RPV	7	3000	40	0.18	0.9	
19929RPI	7	3000	5	>1.4	NA	素通り
<i>Vivacon 5K retentate (O5K fractions)</i>						
D1-3	5	2000	185	0.027	1.1	
D1-4	5	2000	190	0.026	1.8	
D4	5	2000	245	0.020	1.2	
20580RC	5	2000	286	0.017	9.7	
19927RPV	5	2000	166	0.030	1.0	
19929RPI	5	2000	396	0.013	0.1	
<i>Vivacon 2K retentate (O2K fractions)</i>						
D1-3	2	2000	495	0.004	1.2	
D1-4	2	2000	235	0.009	1.3	
D4	2	2000	530	0.004	2.2	
20580RC	2	2000	360	0.006	1.7	
19927RPV	2	2000	410	0.005	1.9	
19929RPI	2	2000	680	0.003	3.1	

^a Relative concentration against the initial extract.

^b Not available.

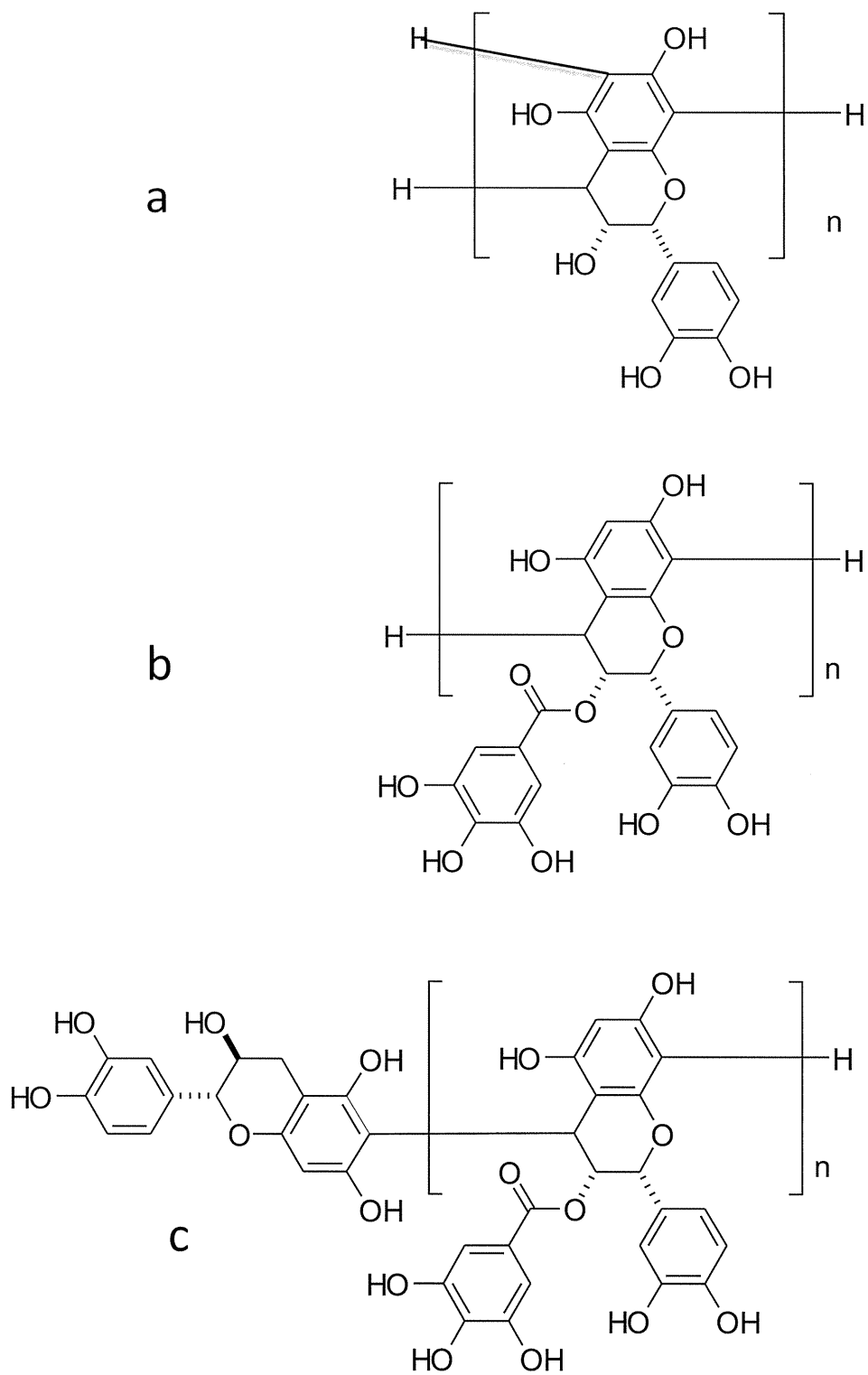


図1. ダイオウのプロアントシアニン類の化学構造
 a, type-I; b, type-II (rhatannin, $n = 9, 10$); c, type-III (RG-tannin, $n = 7$)

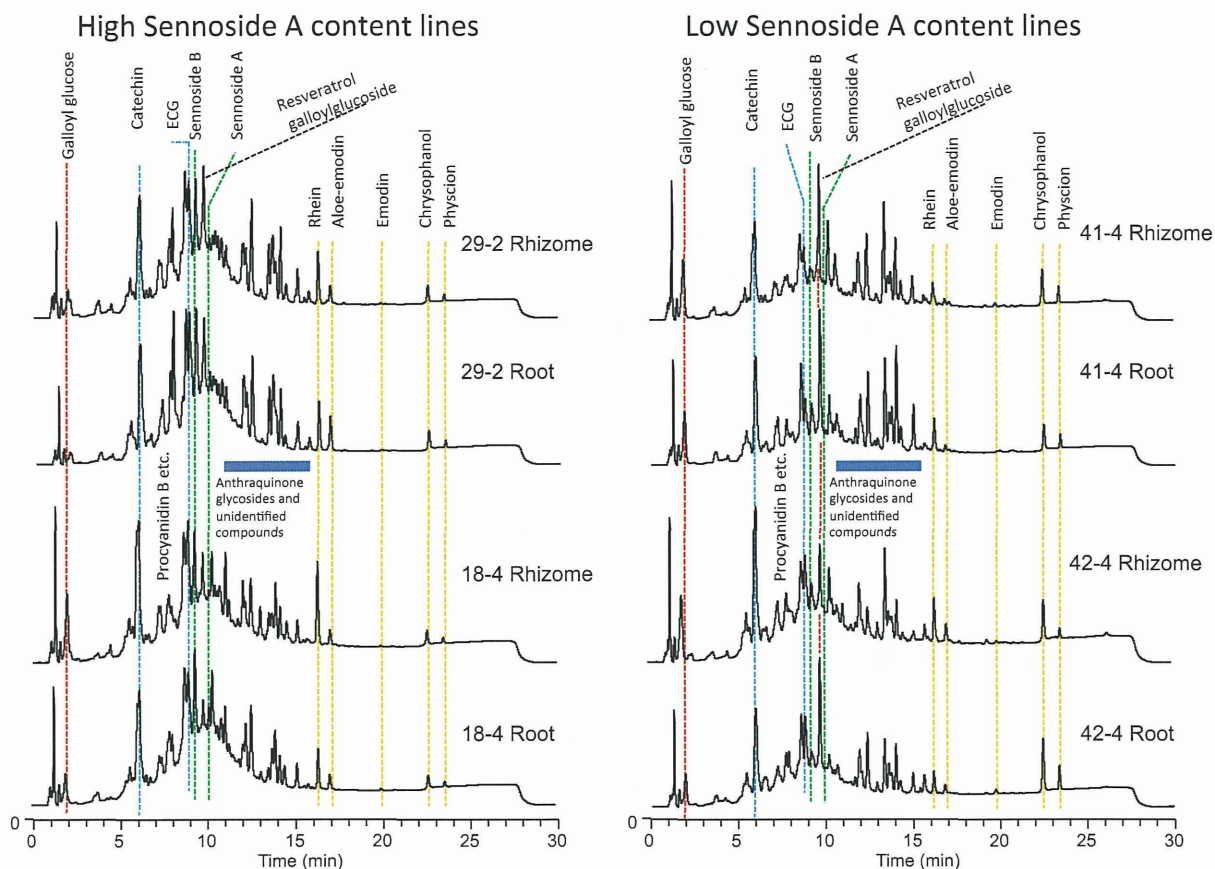


図2. LC/MS profiles of some rhubarb lines.

Conditions. Solvent, 5-80% gradient of B (MeCN-0.1% FA) in A (aq. 0.1% FA) for 25 min; column, Capcell pak C18-UG-120 (2.1 x 150), Shiseido; flow, 0.20 mL/min; column temp., 25C; MS, ESI-positive, Orbitrap detection (HR-MS and HR-MS/MS).

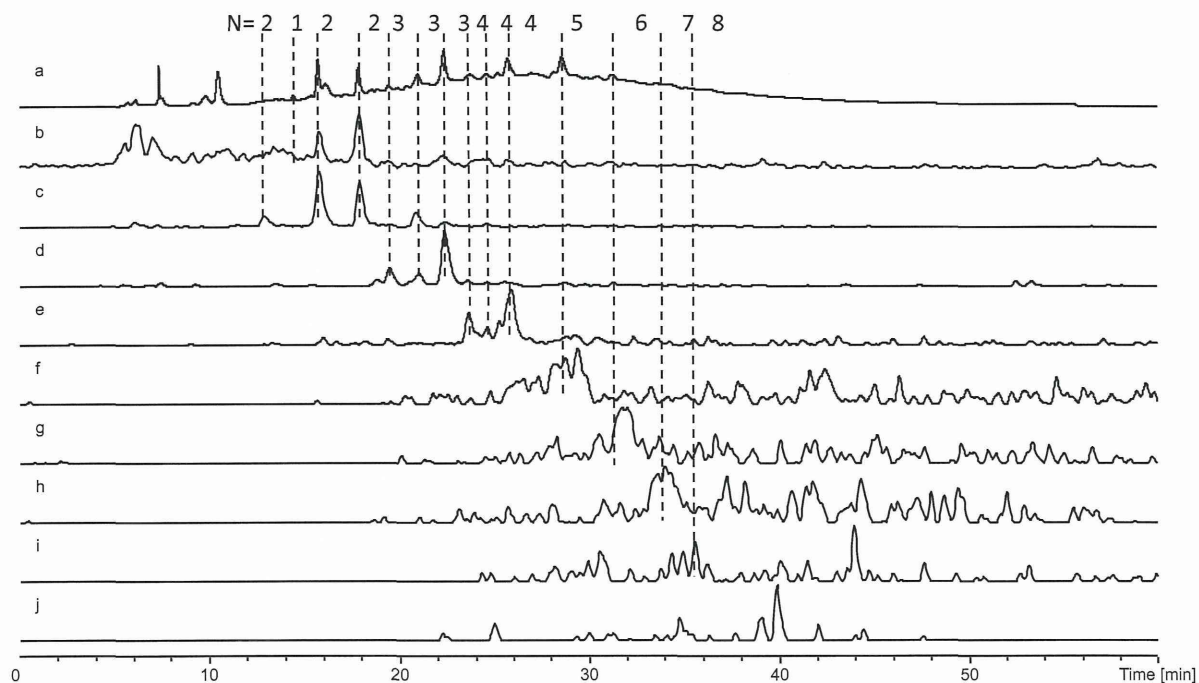


図3. Amide-80 (Tosoh)によるオオミサンザシ果実抽出液の分離

a, UV chromatogram at 230 nm; b, extracted mass chromatogram (EIC) at m/z 291.1; c) EIC at m/z 579.2; d) EIC at m/z 867.2; e) EIC at m/z 1155.3; f) EIC at m/z 1443.3; g) EIC at m/z 1731.4; h) EIC at m/z 2019.5; i) EIC at m/z 2307.5; j) EIC at m/z 2595.6.

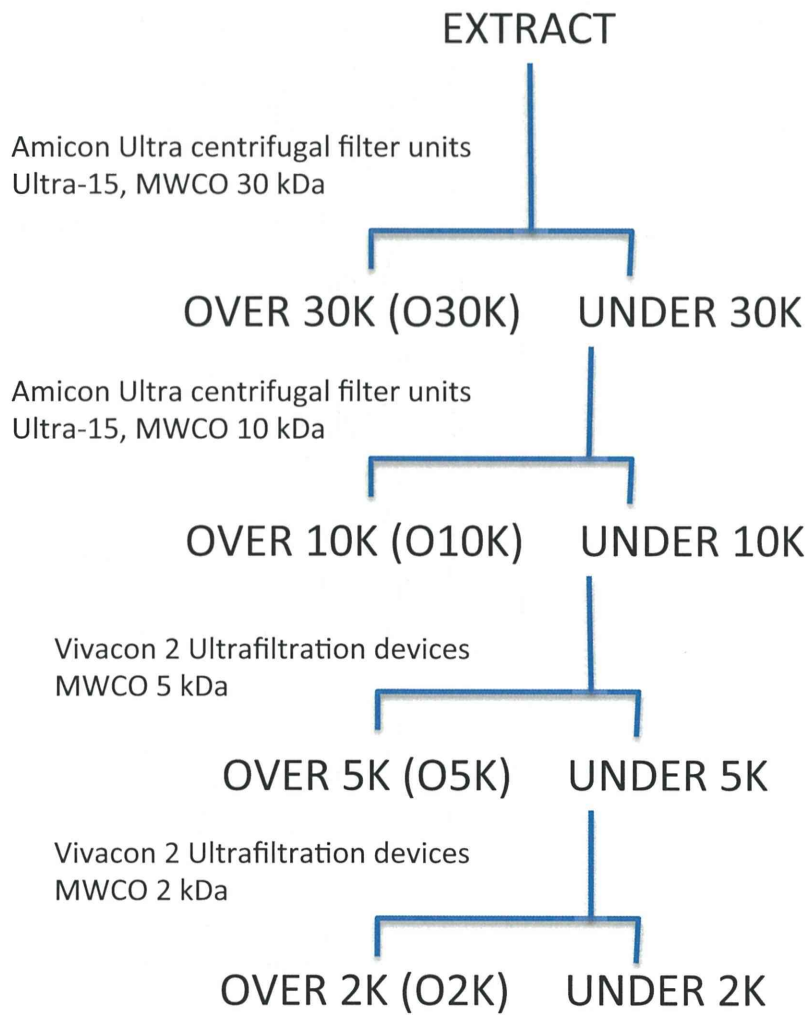


図4. 遠心式限外ろ過による分画