

て *E. sinica* の発芽状況を調べ、15°Cを越した段階での発芽（発芽率 92%）と、発芽の光応答性の可能性を見いだした。

2014 年度は、以上の準備をもとに、①植物生長用に青色発光／赤色発光のチューブで構成された試作プラズマチューブアレイの生長用光源としての評価、②既存の植物生長用 LED、植物生長用蛍光灯を用いたマオウの人工光栽培の検討、③レーザー誘起蛍光を用いた活性／ストレスモニタリング系の立ち上げとマオウの生長モニタリングへの適用の検討を行った。

B. 研究方法

B-1 試作プラズマチューブアレイの生長用光源としての評価

植物生長は光合成を基にするため、光化学系間の電子移動時間にあわせた光照射が有効である。マオウの生長実験に適用する前に光源の性能を明らかにする検討を行った。2013 年度に試作した、図 1 のようなスペクトルを示す青色発光／赤色発光のチューブ(面積比 1 : 4)で構成されたパネルを用いて、パルス発光の時間間隔（駆動周波数）を 75kHz から 1kHz まで変化させて、生長効率（全長と葉面積と光合成有効光子密度：Photosynthetic Photon Flux Density：PPFD との比）を測定した。

B-2 既存の植物生長用 LED、植物生長用蛍光灯を用いたマオウの人工光栽培の検討

材料として昨年度発芽実験を行った *E. sinica* の苗を 30cm 角のポットに移植し、人工光源による栽培の成否、適正な光源を調べるために、青赤比（1 : 7.5、1 : 5、1 : 3）と照度が異なる 3 種類の LED 光源、深赤色発光を追加した蛍光灯、プラズマパネルを用いて外光を遮光した暗室内での栽培を試みた。多孔質顆粒（パーライト）を支持体／保湿体とした希釈液肥（>pH5.3）による養液栽培を行い、乾燥地の植物であることを考慮し、施肥・灌水量は 150ml/日とした。

暗室は建物内との外気流通がある状態で CO₂ 濃度

は通常 400ppm 前後、温度はエアコンで管理し、年間平均で 25°C（夏期：28°C、冬期：22°C）、湿度は年間平均で 50%（夏期最高 82%、冬期最低 23%）であった。

各光源のスペクトルは図 2 に、光源条件（照度、PPFD、照射時間、消費電力）は表 1 に示す。

評価は、毎日の施肥・灌水時に、茎毎に節間長、全長を測り、形態を観察、撮影した。

B-3 レーザー誘起蛍光を用いた活性／ストレスモニタリング系の立ち上げとマオウの生長モニタリングへの適用の検討

青色光 LED 励起でのクロロフィル赤色蛍光測定は測定器が市販され、簡便な光合成モニタに良く用いられている。一方近紫外光励起による、可視～近赤外での広範な蛍光スペクトルのスペクトル形状、蛍光強度の変化は、植物のストレスとよく対応している。これを用いて生育状況を調べることを目的に、本補助金により設備備品として購入した近紫外レーザー（レーザー波長 405nm、コヒーレント：OBIS-405LX）と徳島文理大学理工学部に既設の高感度ファイバー分光器（測定範囲 300-800nm、大塚電子：MCPD-7000）を用いた、レーザー誘起蛍光（Laser Induced Fluorescence：LIF）分光系を立ち上げた。

本手法をマオウに適用する前に、バジルを用いて測定系のチェックを行った。蛍光強度は励起レーザーの照射パワー密度に比例するため、パルス変調測定を念頭に、レンズによる集光照射を行ったところレーザーによる植物体の損傷が認められた。蛍光強度と励起レーザー強度の関係を調べた結果、分光器の検出感度を上げることで蛍光スペクトルの取得が可能であったため、損傷しきい値未満でマオウに対して蛍光スペクトル測定を行った。

C. 研究結果

C-1 試作プラズマチューブアレイの生長用光源としての評価

図 3 にプラズマチューブアレイパネルを用いて栽培

した水菜の生長曲線の駆動周波数依存性を示す。茎の生長速度は 2kHz のときが最も早く、高駆動周波数では伸長の飽和が見られる。一方葉の面積は駆動周波数に比例して増加している。このデータを入射した PPF D あたりで生長効率として換算した生長高率曲線を図 4 に示す。効率は駆動周波数が低いほど高くなっている。なお、低駆動周波数では PPF D が低くなりすぎるために枯死する個体が増えた。

C-2 既存の植物生長用 LED、植物生長用蛍光灯を用いたマオウの人工光栽培の検討

光源強度とスペクトルが異なる LED、蛍光灯について生長を観察した。図 5 に、新たな茎が現れてから節間毎に長さを測り伸長速度を調べた結果の一例を示す。青赤比 1 : 5 のハイパワーLED では節間は根に近い側 (10 節まで) では 3mm/日、根から遠い側 (10 節以降) で 2mm/日程度の速度で伸び、32~42mm 程度で飽和する様子が見られた。一方青赤比 1 : 3 のハイパワーLED では節間長の伸長速度は 10 節までで 1.8mm/日と遅く、節間長も 32mm 以下で飽和する様子が見られた。

青赤比 1 : 5 のハイパワーLED では茎の全長は 4mm/日~10mm/日の伸長速度で、最長 600mm まで伸びている (図 6)。一方青赤比 1 : 3 のハイパワーLED では茎の全長は最大でも 5mm/日の伸長速度で、最長 240mm に留まっている (図 7)。

蛍光灯では、最大 4.5mm/日の伸長速度で、茎の全長は 430mm に達したのもあった (図 8)。さらに青赤比 1 : 7.5 のローパワーLED では 24 日で枯死する個体が出た (図 9)。なお、光源の種類に関わらず照度が 1000 ルクス未満では時間に差はあるが最終的に枯死した。

図 10 に示すように青赤比 1 : 5 のハイパワーLED で生長させた株については基部が木質化し、その周辺でカルスの形成が見られている。青赤比 1 : 3 のハイパワーLED で生長させた株については形態的には青赤比 1 : 5 と同様である (図 11)。また蛍光灯では図 12 のように草質茎の状態のまま留まっている。全長は LED 光源と遜色ないが、茎径は三分の二程度しかない。プラズマについてはある程度生長した株

を入れているため現状では伸長効果が見られていない。

C-3 レーザー誘起蛍光を用いた活性モニタリング系の立ち上げとマオウの生長モニタリングへの適用の検討

図 13~図 17 に草質茎の体色が異なる部分と、鱗片状葉の LIF スペクトルを示す。緑色部分ではクロロフィル由来の蛍光スペクトルが観測され、他の植物の生葉でも見られるような長波長側のピークが優勢な発光を示している。

葉の部分については 470nm 付近をピークとする強い蛍光バンドが観測され、400nm 付近から 650nm 付近まで非常に幅広いスペクトルを示している。

黄色の部分では弱いクロロフィル蛍光以外に、葉の LIF スペクトルで見られた領域に、450nm および 520nm 付近にピークを持つ蛍光バンドが見られる。また赤色の部分では、460nm 付近にピークをもつ非対称な形状の蛍光バンドが見られている。また黄色および赤色部分ではクロロフィル蛍光の 2 つのバンドの強度比が変化している。

一方茎先端の変色部についてはクロロフィル蛍光を示さず、葉や黄色/赤色部分と同じ領域にのみ蛍光バンドが観測された。

D. 考察

D-1 試作プラズマチューブアレイの生長用光源としての評価

茎伸長の生長速度は低駆動周波数、特に 2kHz (パルス維持時間 250 μ s) で高いが、これはパルス光の維持時間が光化学系間の電子移動時間 200 μ s とほぼ同じオーダーになっていることに起因すると考えられる。しかしながら試作プラズマチューブアレイは低周波数駆動では PPF D が低くなっており、植物体全体を維持するだけの光合成が行われず枯死する。これは図 1 の発光スペクトルと光合成の問題を解決するには、パネルを駆動するパルス波形の変更、プラズマ放電効率のアップと、より PPF D を稼ぎだせる深赤色発光を示す蛍光材料が必要である。

蛍光材料は本研究事業外の我々の研究により有望な材料を見出しているが、現在本光源を作製する技術を保有するパネル製作会社が倒産し、2014年度中の再建が不調になっており、現在見いだされている課題を解決するパネルが作製できない状況にある。次年度は次善の策として現在保有するパネルと深赤色LEDとのハイブリッド照射を予定している。

D-2 既存の植物生長用LED、植物生長用蛍光灯を用いたマオウの人工光栽培の検討

茎の伸長速度は他の同時栽培している他の植物よりも著しく低く、また株毎の茎総長も4mほどに留まっており、生長は思わしくない。PPFDは蛍光灯では本数が少ないためおよそ $20\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ と低いが、ハイパワーLEDでは、 $220\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ と植物工場でも使用される光子密度と同等のレベルである。したがってマオウそのものの光の利用効率が低いことが示唆される。これはその形態によると推測される。光源数の増加、距離の調整、投入電力の増加によりPPFDを上げ、またリフレクタなどを用意して光の利用効率を上げて栽培を進める必要がある。

D-3 レーザー誘起蛍光を用いた活性モニタリング系の立ち上げとマオウの生長モニタリングへの適用の検討

部位によってクロロフィル蛍光の強さおよびスペクトル形状に変化が見られた。今後生長光の照射下で蛍光強度の変化を観測し活性を調べていく。また観測されたクロロフィル以外の蛍光は幅広くピーク構造も分離してみられるため、複数の化合物からの蛍光である。発光波長域からフラボノイド由来が推測されるが、現在のところこれらのオリジンとなる化合物は明らかになっていない。今後成分解析が必要である。化合物がアルカロイド形成に関わるようであれば、In-Vivo 蛍光測定をもとに非破壊で栽培条件が検討できる可能性がある。

E. 結論

条件の異なる各種の光源を用いた栽培により、マオウ

の光利用効率が他の植物の比べ低いことが明らかとなった。人工光源栽培ではこれを踏まえて通常よりも光強度を強くして高い光子密度で栽培を行う必要がある。クロロフィル以外のレーザー誘起蛍光を観測した。この蛍光スペクトルをもとに非破壊で栽培条件が検討できる可能性がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図および表

表 1. 生長用光源の条件 (*照度は植物近傍での平均値)

光源	照度(lx)*	PPFD($\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)	照射時間(h/day)	消費電力(W)
ハイパワーLED (スポットライト) 青：赤=1：5	5000	221	18	24
ハイパワーLED (スポットライト) 青：赤=1：3	1800	107	18	12
ローパワーLED (パネル) 青：赤=1：7.5	280	9	18	14
蛍光灯 (直管型) (植物用深赤色強化タイプ)	1180	19	18	20
プラズマチューブ アレイ 駆動 50kHz	1300	17	16	50

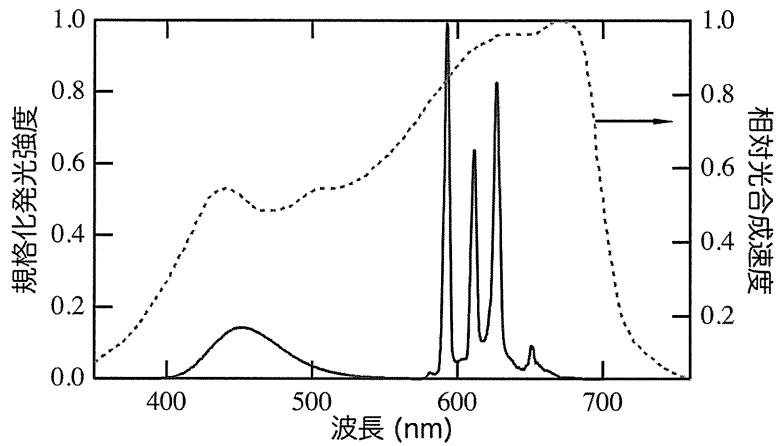


図1. 試作プラズマチューブアレイパネルの発光スペクトル（最大強度で規格化）、相対光合成速度（光合成作用スペクトル）を比較に示す。

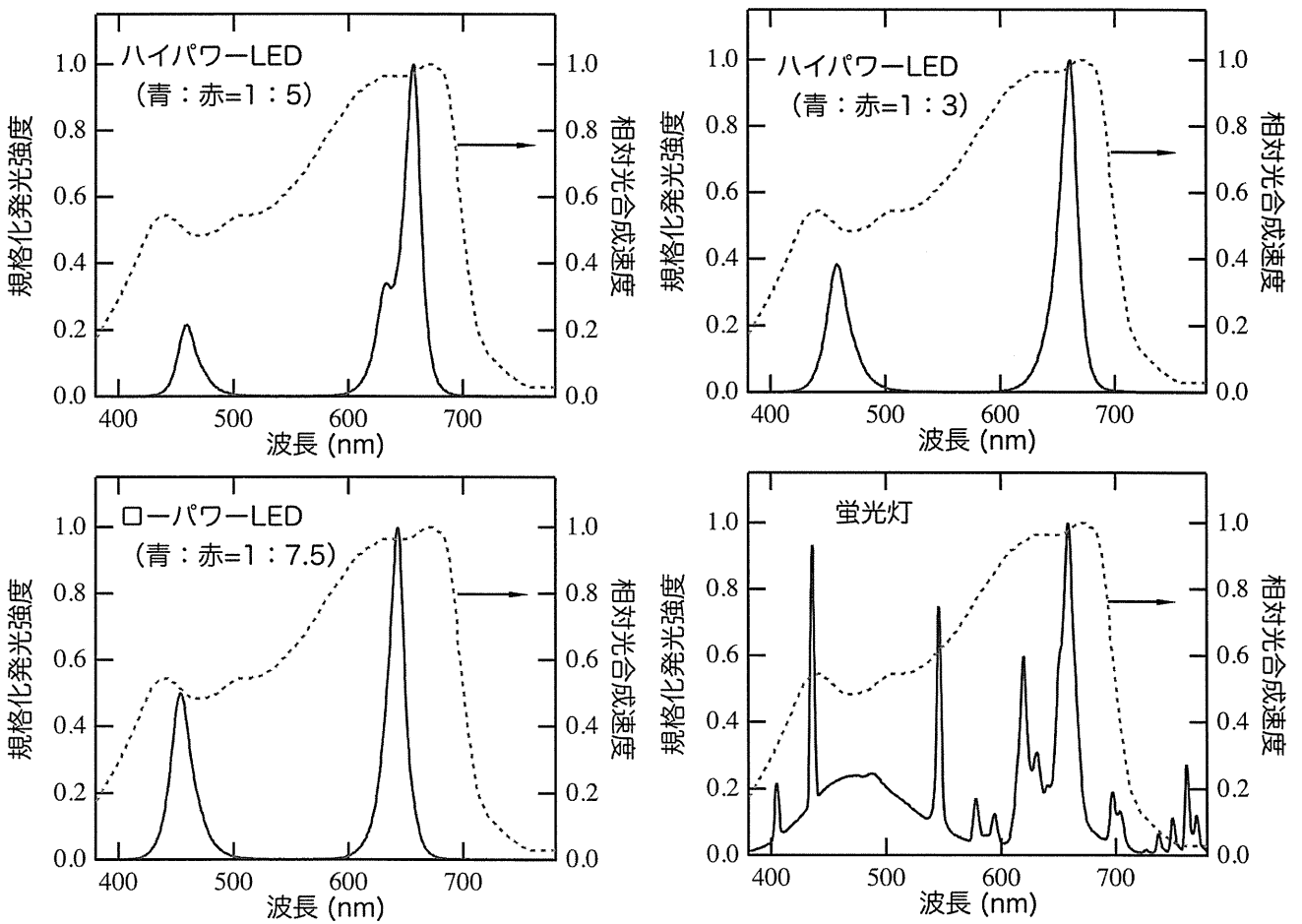


図2. 各栽培光源の発光スペクトル（最大強度で規格化）、相対光合成速度（光合成作用スペクトル）を比較に示す。

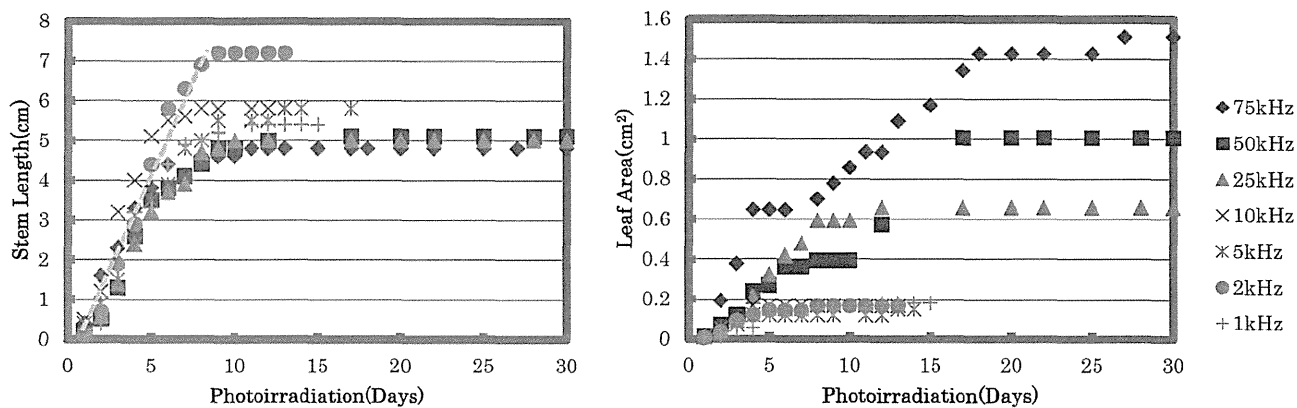


図 3. プラズマチューブアレイパネルを用いて栽培した水菜の生長曲線（駆動周波数依存性）左：莖長，右：葉面積

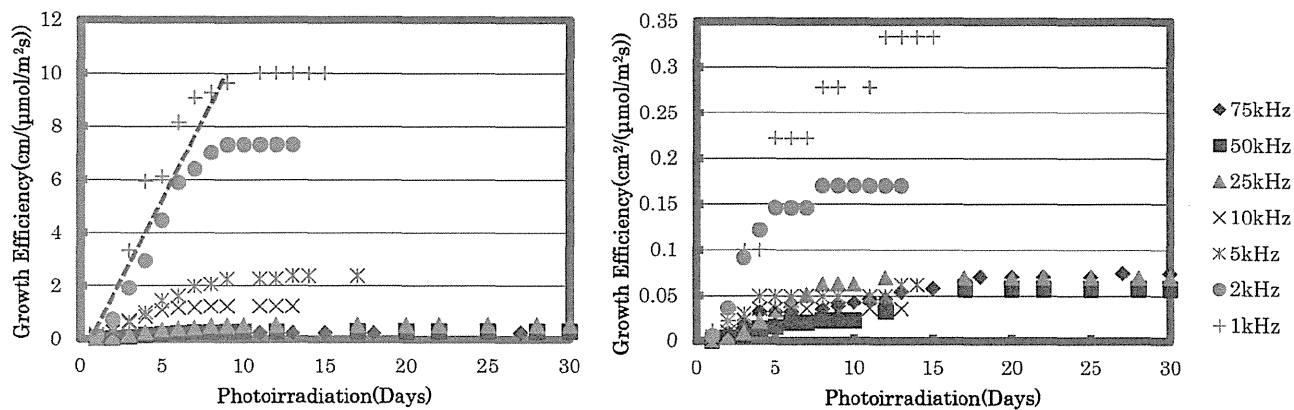


図 4 プラズマチューブアレイパネルを用いて栽培した水菜の生長効率曲線（駆動周波数依存性）左：莖長，右：葉面積

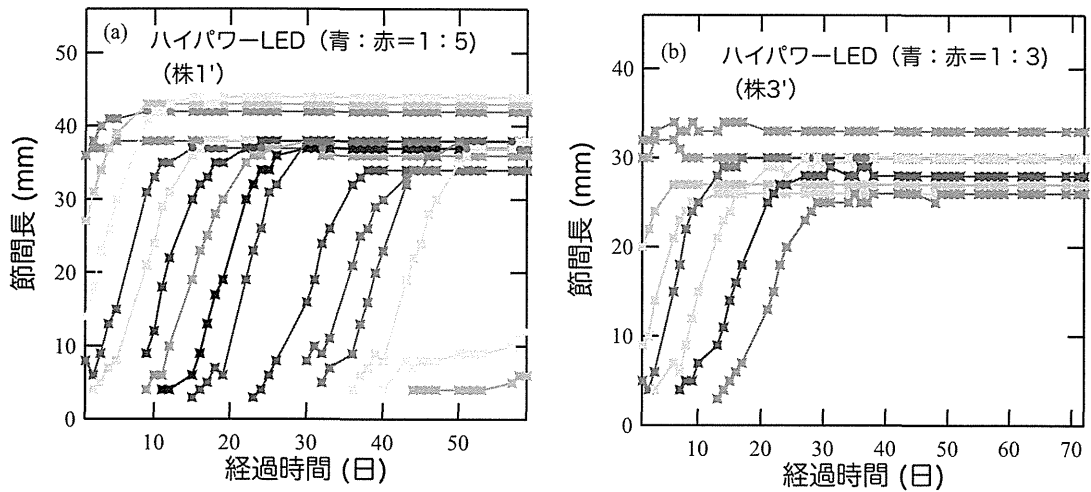


図5. 異なるハイパワーLEDで生長させた茎の生長曲線 (ある茎の節間毎)

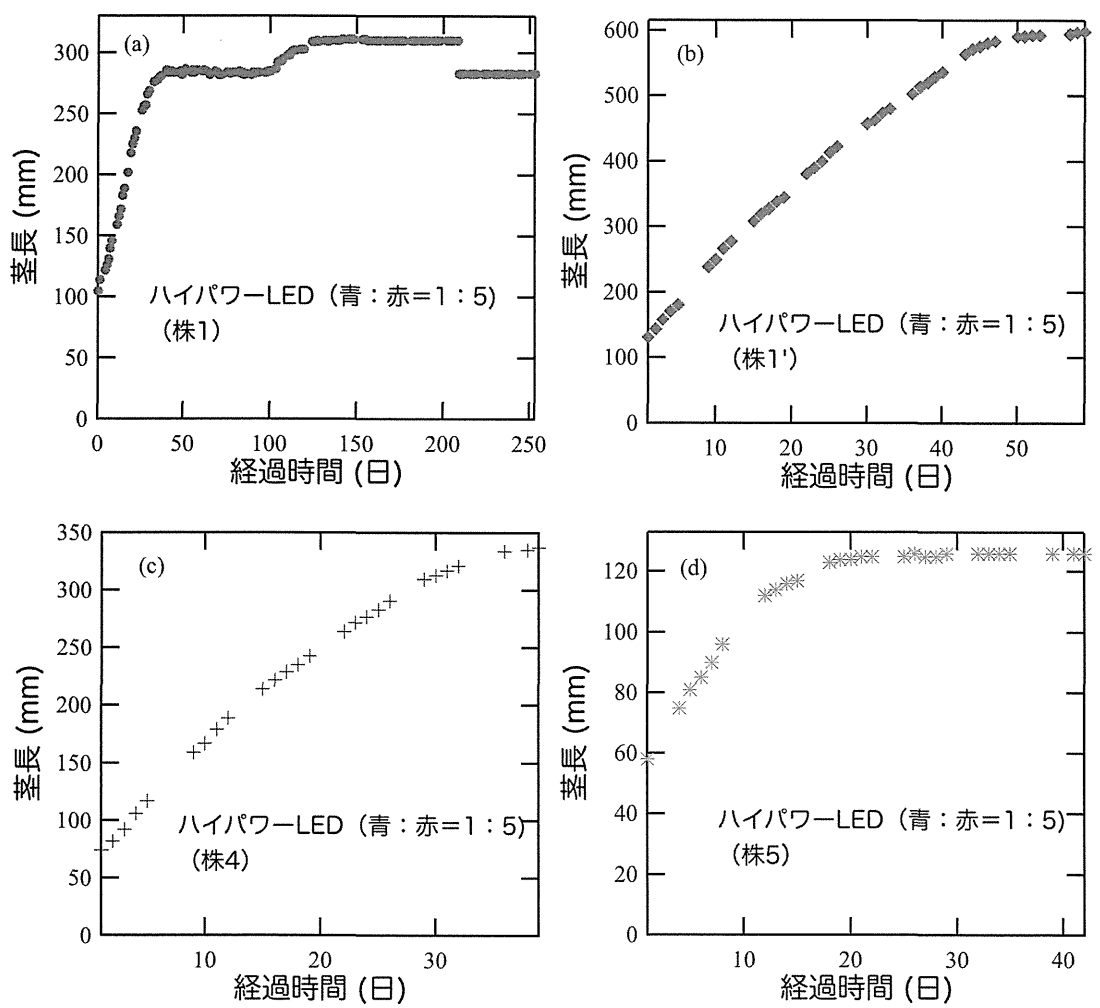


図6. ハイパワーLED (青：赤=1：5)で生長させた株の生長曲線
 (a) 株1中の茎1 (b) 株1中の茎2 (c) 株4 (d) 株5

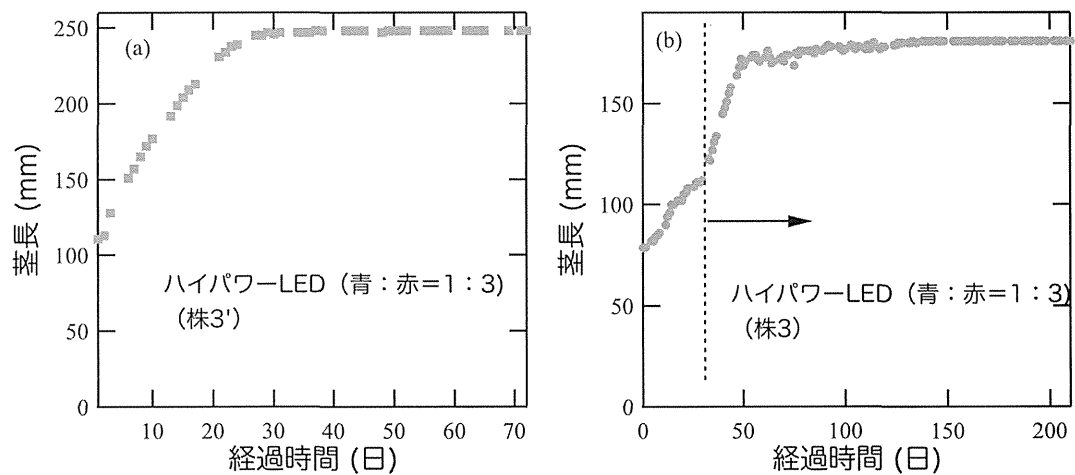


図 7. ハイパワーLED (青：赤=1：3) で生長させた株の生長曲線 (a) 株 3 中の茎 1 (b) 株 3 中の茎 2

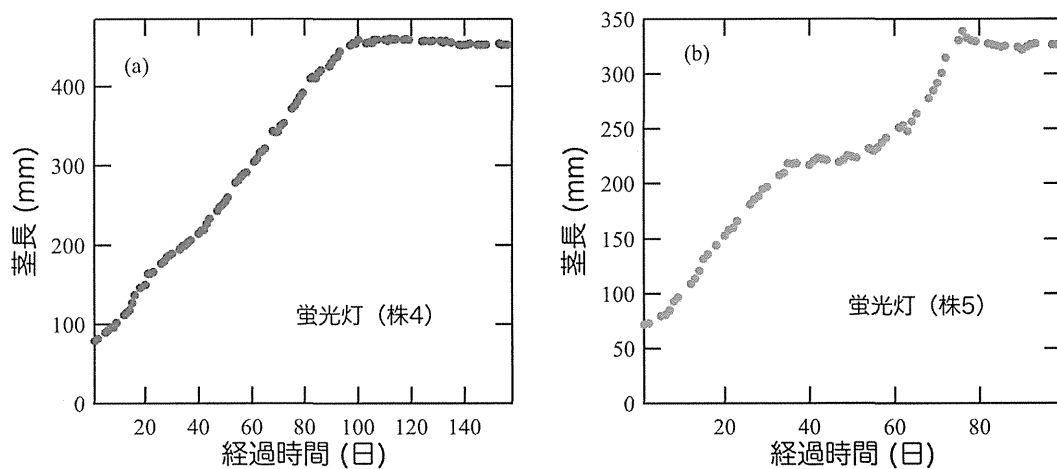


図 8. 蛍光灯で生長させた株の生長曲線 (a) 株 4 (b) 株 5

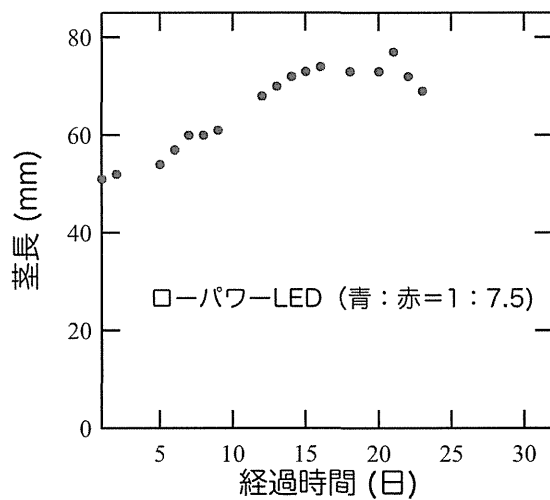


図 9. ローパワーLED で生長させた株の生長曲線 (24 日で枯死)

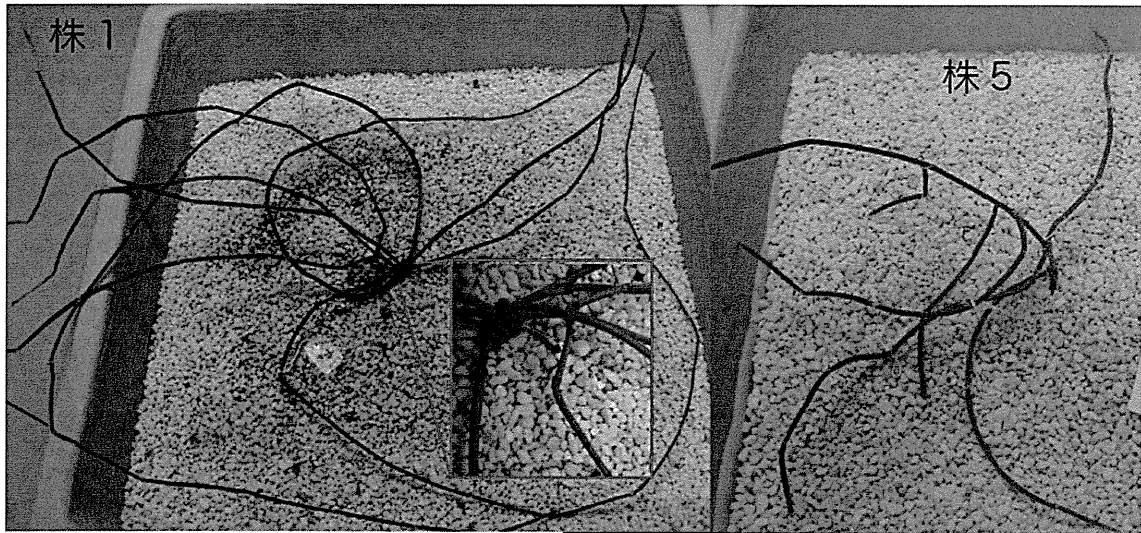


図 10. ハイパワーLED（青：赤=1：5）で生長させた株

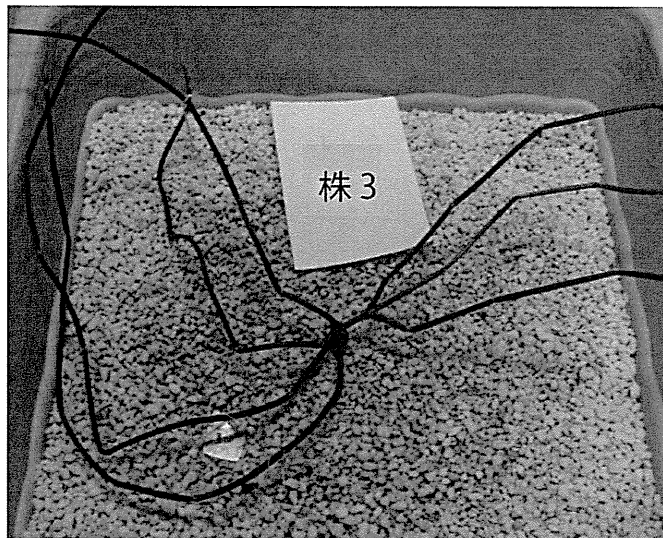


図 11. ハイパワーLED（青：赤=1：3）で生長させた株

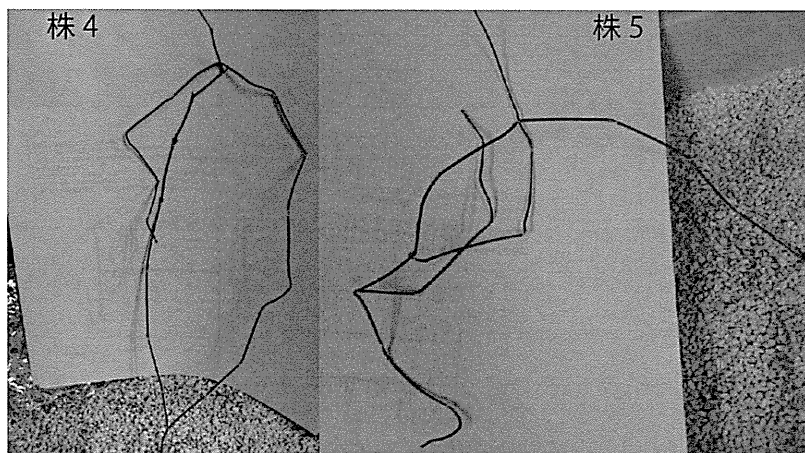


図 12. 蛍光灯で生長させた株

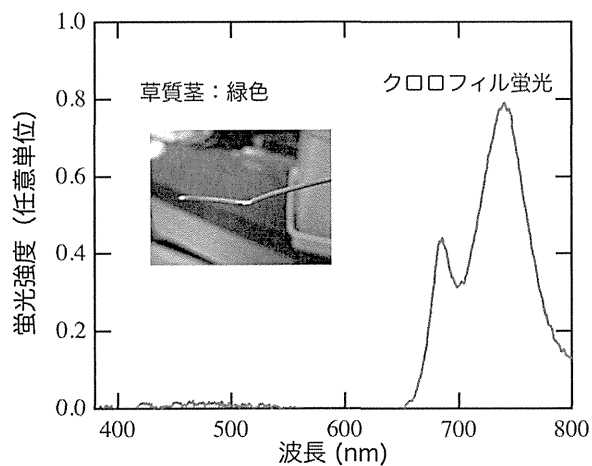


図 13. 緑色の茎の LIF スペクトル

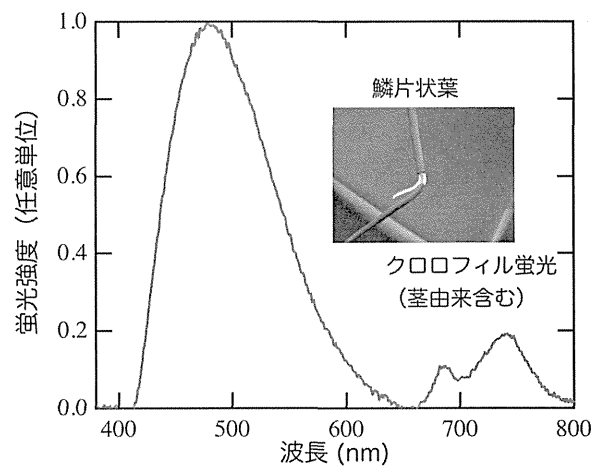


図 14. 鱗片状葉の LIF スペクトル

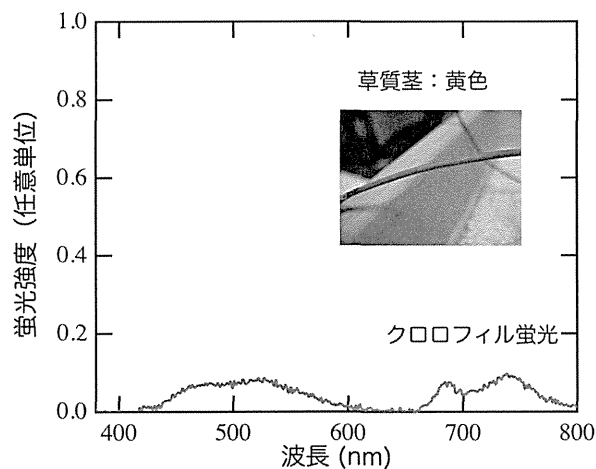


図 15. 黄色の茎の LIF スペクトル

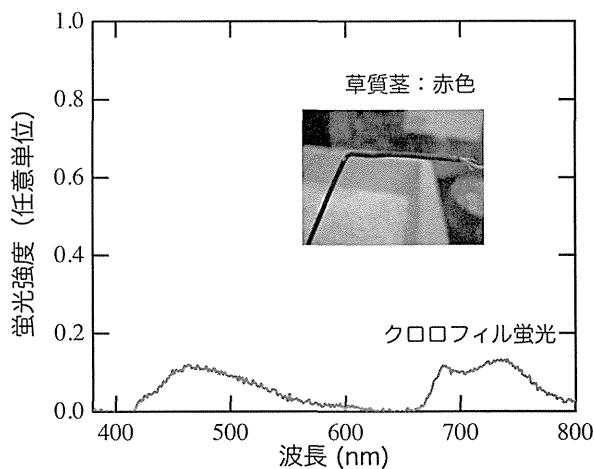


図 16. 赤紫色の茎の LIF スペクトル

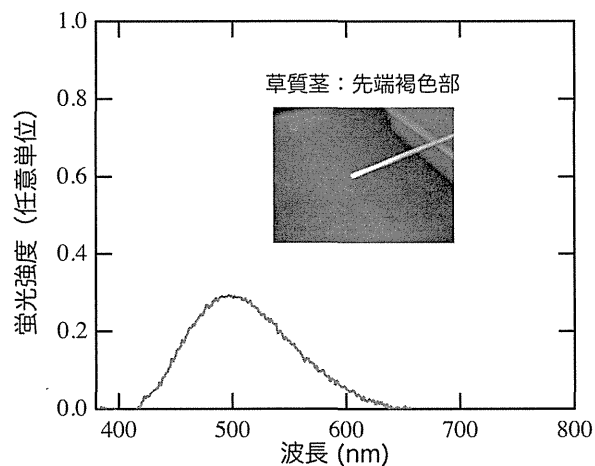


図 17. 茎先端の変色部の LIF スペクトル

平成26年度厚生労働省科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究報告書

定量NMRによる麻黄の総エフェドリン含量の簡便な測定法の開発

研究代表者 御影 雅幸 東京農業大学農学部バイオセラピー学科 教授
研究分担者 三宅 克典 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

研究要旨 日局マオウには総アルカロイド含量の規定があり、現在HPLC法により分析されている。麻黄栽培の大規模化に伴い供試検体数の増加が見込まれるため、総アルカロイド含量測定効率化もしくは代替法の開発が必要である。そこで、NMRによる分析法を検討した結果、定量に手法を用いることにより総アルカロイド含量の測定が可能であった。また、抽出プロセスを最適化することにより、低コスト・省溶媒化を実現した。現在、実用化に向けて測定諸条件を精査中である。

研究協力者 安藤 広和 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

A. 研究目的

第十六改正日本薬局方において、マオウは総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7%以上を含むと規定されており、現在HPLC法により分析されている。今後、国産麻黄生産拠点が構築され、麻黄の大規模栽培が実現すると、総アルカロイド含量の測定に供する検体の増加が見込まれる。そのため、HPLC法の効率化あるいは代替分析法の開発が必要である。本研究では、測定対象の標準品を用いる必要の無い定量NMR法に着目し、実用化を見据えて諸条件の最適化を行なった。

B. 研究計画

B-1. 過去の麻黄の定量NMR法の適否の検討

効率的かつ普遍的という観点から、過去の報告にある方法について、本研究に適用可能か検討した。

B-1-a. Verpoorteらの方法

50%メタノール水溶液、クロロホルム、アンモニアを混和した溶液で麻黄を抽出し、下層を濃縮後、NMRにより測定した。

B-1-b. Linらの方法

希硫酸で抽出した後に水酸化カリウム水溶液を用いてアルカリ化し、ジエチルエーテルにより抽出し濃縮したものをNMRにより測定した。

B-2. 本研究での手法の確立ならびに最適化

B-1の結果を踏まえ、本研究では下記の方法(※)を基準として適否の検討を行った。その後、標準物質の選定 (B-2-a)、操作の簡略化 (B-2-b)、試薬の低コスト化 (B-2-c)、ならびに手法の再現性の検討 (B-2-d) を行なった。

※麻黄を重塩酸重水溶液で抽出し、重水酸化ナトリウムの重水溶液でアルカリ化したものを重クロロホルムで抽出し、NMRを測定した。

C. 結果

C-1. 過去の麻黄の定量NMR法の適否の検討

C-1-a. Verpoorteらの方法

エフェドリン及びプソイドエフェドリンに由来するシグナルを認めたが、全体的に夾雑物に由来するシグナルを認めた(図1)。

C-1-b. Linらの方法

Linの報告にあるスペクトルから判断すると、全体的に夾雑物に由来するシグナルが少なく、明確にエフェドリン及びプソイドエフェドリンに由来するシグナルを認めた。

C-2. 本研究での手法の確立ならびに最適化

Linらの手法で十分測定可能であったが、将来的に濃縮を経ずに測定するために、ジエチルエーテルの代わりに重クロロホルムを採用した。また、重水素化した硫酸ならびに水酸化カリウムは入手困難であったため、それぞれ重塩酸、重水酸化ナトリウムを採用した。

C-2-a. 標準物質の選定

NMRに用いる内標準物質としては、測定対象と反応せず、シグナルが重複せず、かつ標的シグナルの近傍にシグナルがあることが重要である。本研究で採用した手法を用いてNMRを測定したところ、対象となるベンジル位のシグナルは4.0から5.0 ppm付近に、N-メチル基に由来するシグナルは2.3から2.5 ppmに観測された。一方で、3.0から4.0 ppm付近にシグナルのない領域を認めたため、このあたりにシングレットのシグナルを与える入手が容易な化合物を探したところ、1-メトキシベンゼン（アニソール）、1,4-ジメトキシベンゼン、1,3,5-トリメトキシベンゼンが該当した。このうち、1,4-ジメトキシベンゼンは購入した試薬の純度が低く、用いることができなかった（図2）。1,3,5-トリメトキシベンゼン（図3）及びアニソール（図4）は、それぞれ使用可能な純度であったが、後者は液体であるため扱いづらく、粉末である前者を採用することとした。

C-2-b. 操作の簡略化

Linらの方法では、ジエチルエーテル抽出後に濃縮を行っており、多数の検体について試験を行なう際にはボトルネックになることが予想される。濃縮を経ないサンプル調製を検討した結果、以下の通りの手法を考案した。

2.0mLプラスチックチューブに麻黄粉末をとり、1.0M重塩酸／重水を1.5 mL

を入れ、15分間攪拌後13000rpmで2分間遠心した。上清を0.75 mLとり、別の2.0 mLプラスチックチューブに入れた後、5.0M重水酸化ナトリウム／重水0.25 mL、重クロロホルム0.75 mLを加え、15分間攪拌後13000rpmで2分間遠心した。下層をパスツールピペットで分取し、Phase separatorに金属ニードルをつけたものを通じ直接NMR試料管へと取り、NMR測定を行なった。結果、Linらのスペクトルと同等の分離の良いシグナルを観測し（図5）、この手法は麻黄の定量NMR法に適用可能であった。

C-2-c. 試薬の低コスト化

C-2-bにおいて使用した試薬は高価なものを含むため、可能な限り安価なものを用いるため代替を検討した。多量の重水を用い、最終的には重クロロホルム画分のみを測定することから、重塩酸、重水酸化ナトリウムは軽水のもの（塩酸、水酸化ナトリウム）で代用可能であると考え、それらに代替し分析を行なった。結果、B-2-bに比して同程度の不純物に由来するシグナルしか認めず、上記試薬は十分置換可能であることが判明した（図6）。

C-2-d手法の再現性の検討

NMRの測定条件、エフェドリンの回収率、HPLC法との同等性を目下検討中である。

D. 考察

D-1. 過去の麻黄の定量NMR法の適否の検討

Verpoorteらの方法は麻黄の総アルカロイド含量の測定には適さなかったが、これはこの方法が網羅的解析のために行なわれたのであって、アルカロイド含量の分析を目的としていないことに因むと考えられる。Linらの方法は適していたが、操作に手間がかかるため、多数の検体を処理するには向かないと考えられる。

D-2. 本研究での手法の確立ならびに最適化

本研究で用いる手法は、アルカロイドの抽出法としては一般的なものである。濃縮を回避するために、水溶液と重クロロホルムを用いphase separatorにより分液操作を行なったが、結果として、スペクトルの質を下げる事が知られている水分が良く除去され、きれいなシグナルを得ることができた。また、高価な重水素試薬は安価な試薬に代替することができ、代替できない重水及び重クロロホルムも比較的安価である。溶媒使用量は1検体あたり2.5 mLであり、概算したHPLC法の溶媒使用量150 mL（抽出100 mL、移動相50 mL）に比べ、圧倒的に少量である。HPLC法との同等性しだいではあるが、今後の最適化によりHPLC法の代替法として用いることが可能だと考えられる。

3. その他
なし。

E. 結論

本研究においては、麻黄の総アルカロイド含量の簡便な測定法の開発を目指し、定量NMR法について諸要素を検討した。結果、操作を簡略化し、低コスト・省溶媒化を達成した。今後、HPLC法との同等性の評価、ならびに測定条件の最適化を経ることで、麻黄の総アルカロイド含量測定法の1つになることが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

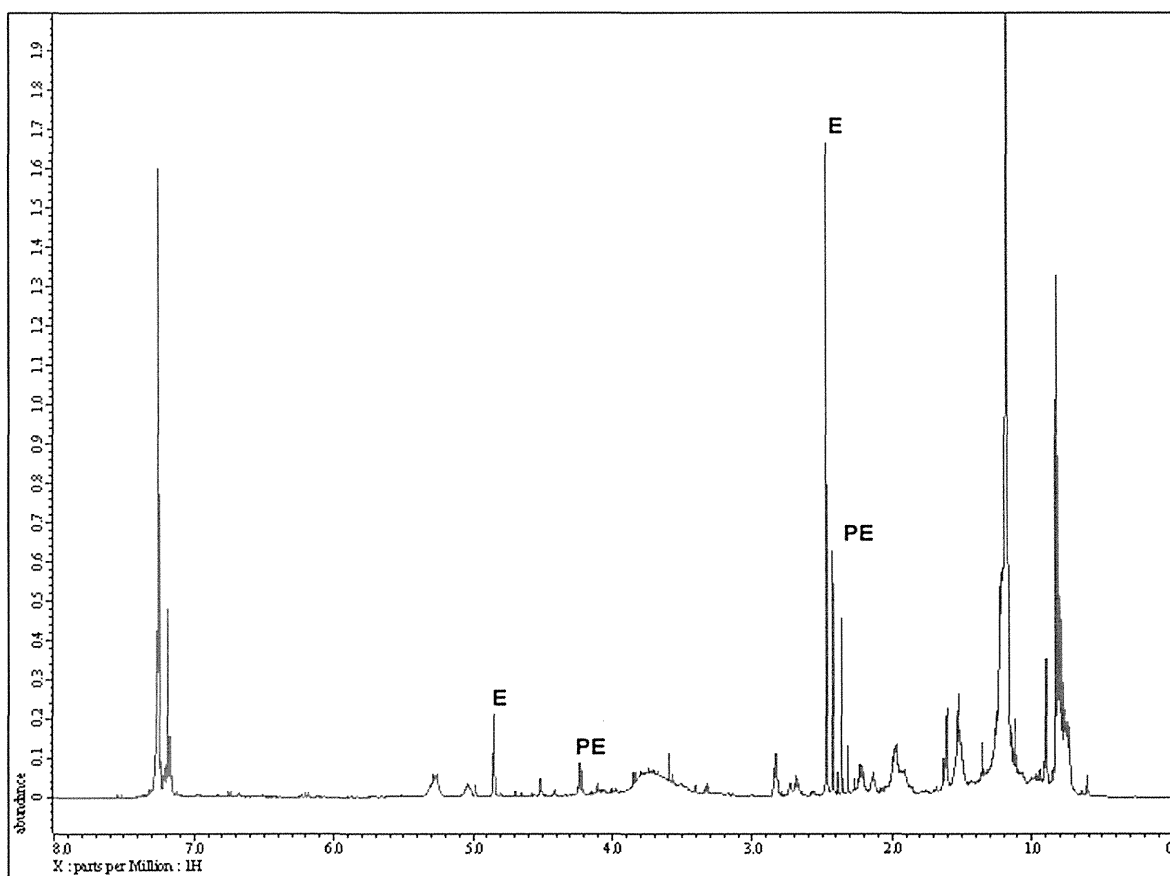


図1. Verpoorteらの方法によって得られたサンプルの¹H NMRスペクトル (E : エフェドリンに由来するシグナル、PE : プソイドエフェドリンに由来するシグナル)

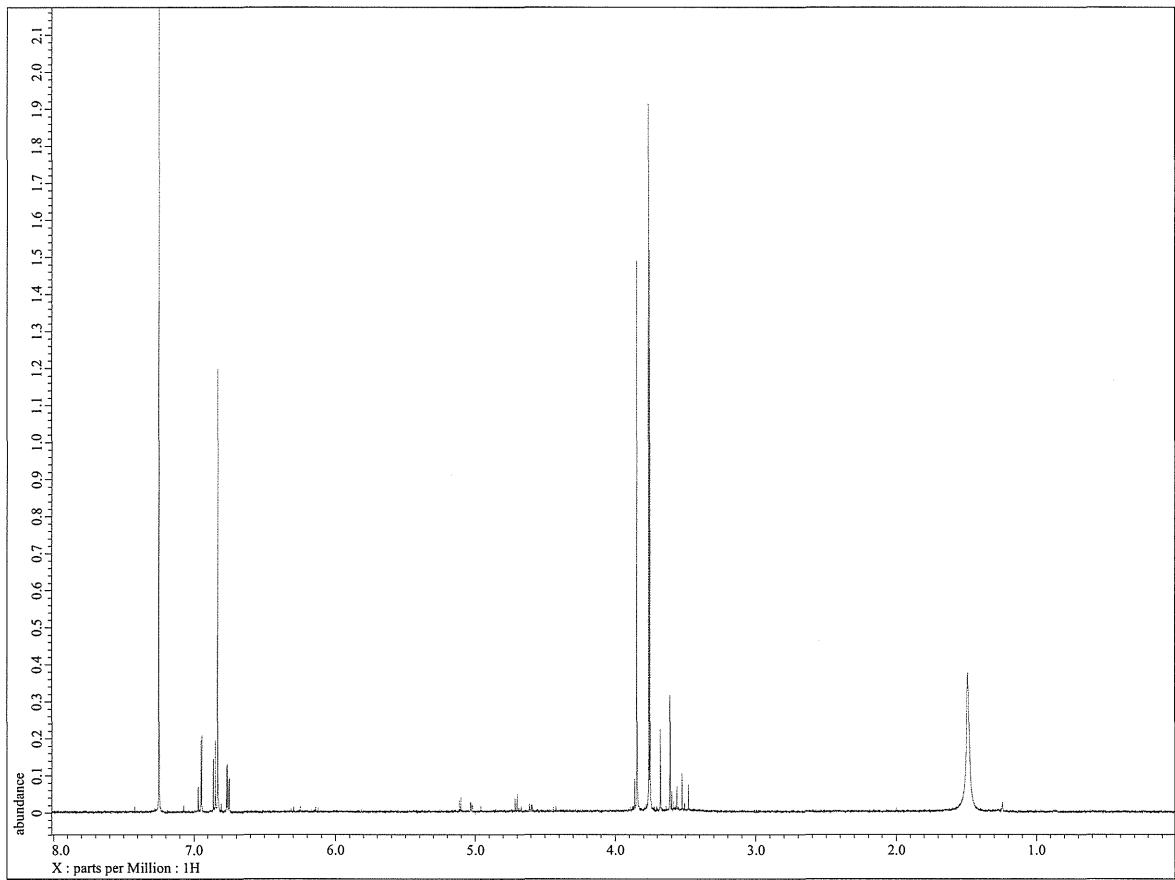


図2. 1,4-ジメトキシベンゼンという名で売られていた製品の重クロロホルム中における ^1H NMRスペクトル

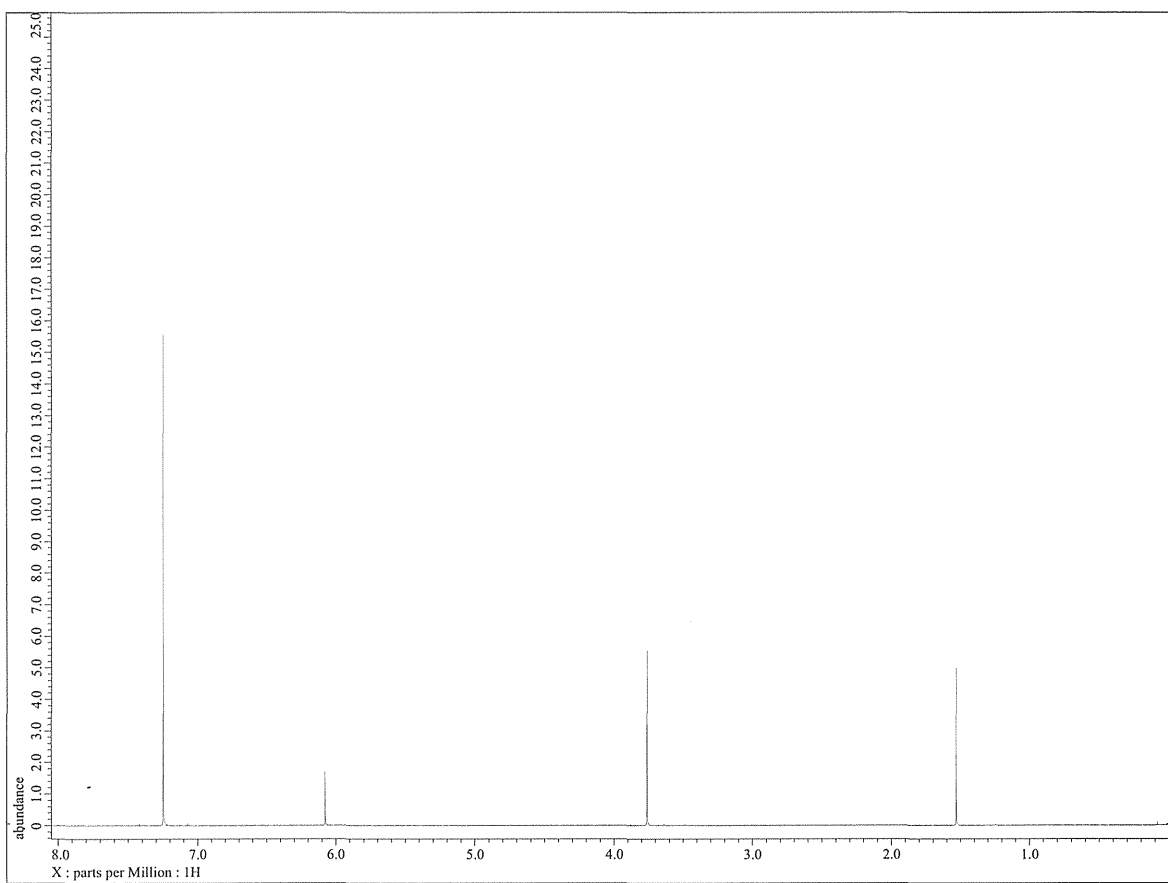


図 3. 1,3,5-トリメトキシベンゼンの重クロロホルム中¹H NMRスペクトル

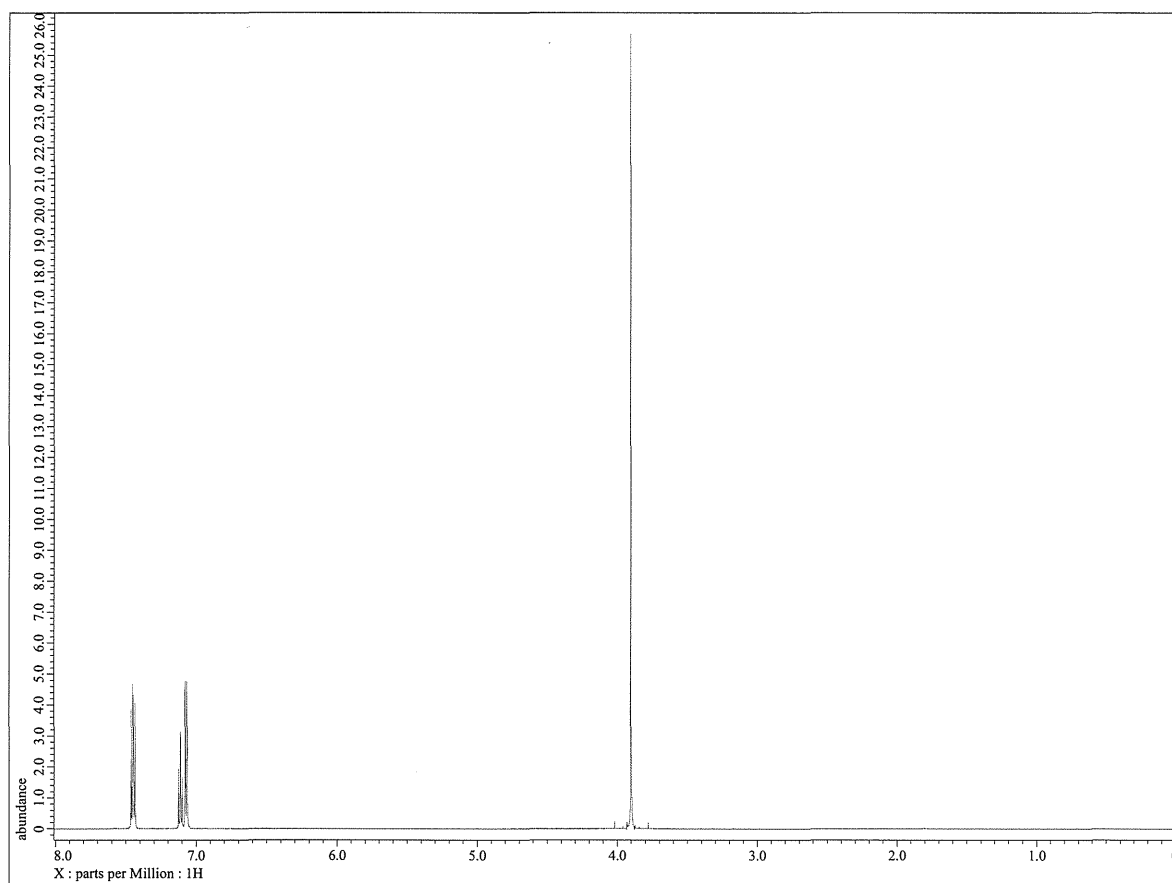


図4. 1-メトキシベンゼン (アニソール) の重クロロホルム中 ^1H NMRスペクトル

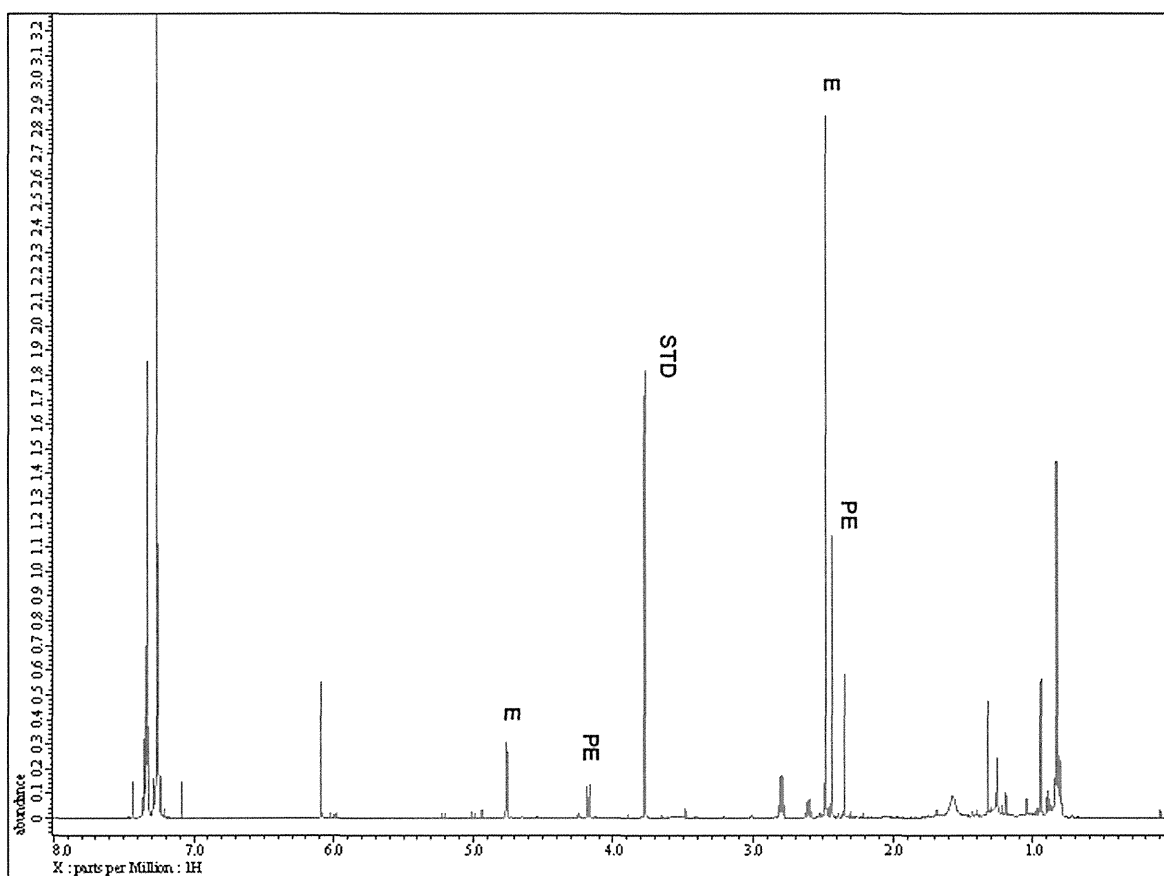


図5. 麻黄を重塩酸重水溶液で抽出し、重水酸化ナトリウムの重水溶液でアルカリ化後、重クロロホルムで抽出したものの¹H NMRスペクトル (E : エフェドリンに由来するシグナル、PE : プソイドエフェドリンに由来するシグナル、STD : 1,3,5-トリメトキシベンゼンに由来するシグナル)

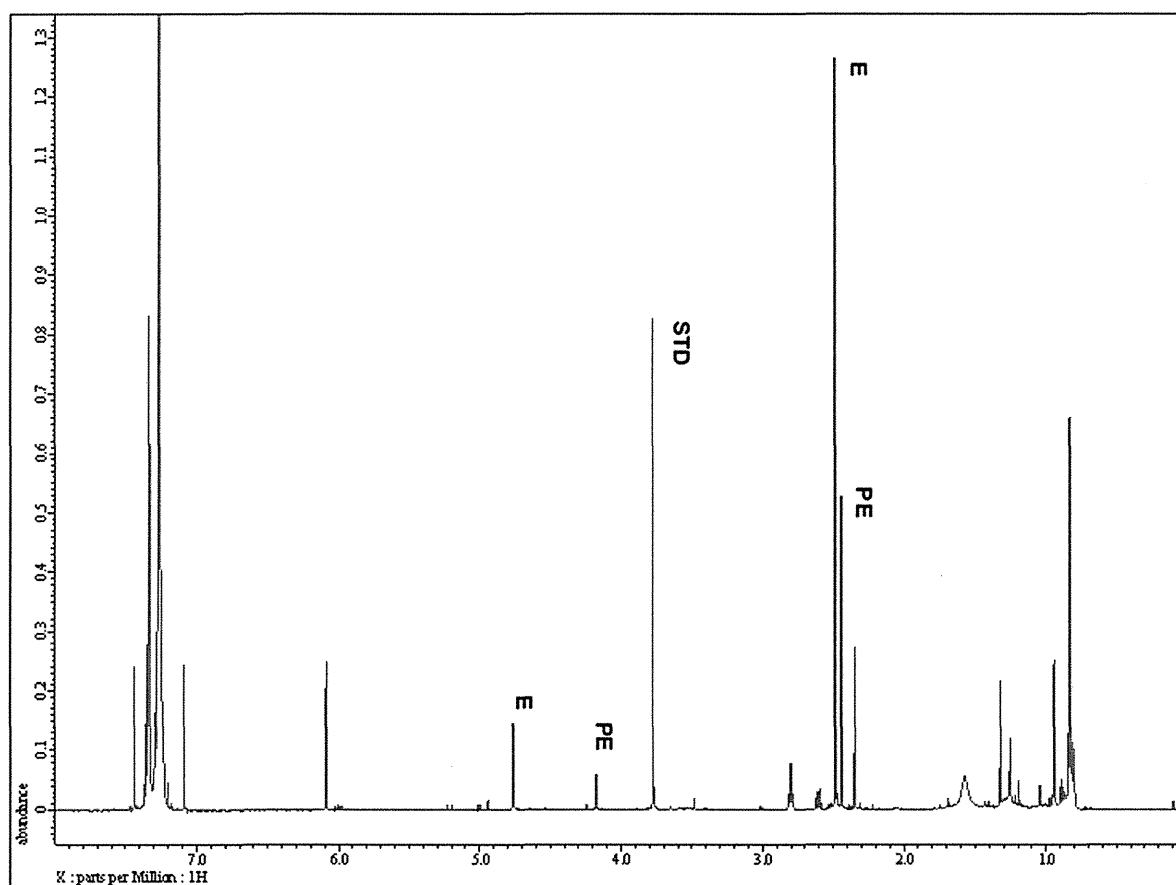


図6. 麻黄を塩酸重水溶液で抽出し、水酸化ナトリウムの重水溶液でアルカリ化後、重クロロホルムで抽出したものの ^1H NMR スペクトル (E : エフェドリンに由来するシグナル、PE : プソイドエフェドリンに由来するシグナル、STD : 1,3,5-トリメトキシベンゼンに由来するシグナル)

マオウのタンニン成分に関する研究

研究代表者 御影 雅幸 東京農業大学 教授
分担研究者 関田 節子 昭和薬科大学 特任教授
分担研究者 高野 昭人 昭和薬科大学 教授
協力研究者 黒柳 正典 静岡県立大学薬学部 客員教授

マオウの有効成分としてはエフェドリン等のアルカロイドが注目されているが、マオウからはタンニンなども分離報告されている。マオウの生理活性や使用法を考えたとき、アルカロイド以外の成分が生理活性に関わっている可能性も考えられる。そこで、アジアを起原とする *Ephedra distachya* からエフェドリン以外、特に、高極性成分の分離構造決定を行い、カテキン誘導体、C6-C3 フェノール化合物の配糖体、フラボンの C-グリコไซด์を明らかにした。

A. 研究目的

裸子植物、マオウ科のマオウ (*Ephedrae Herba*) は重要な生薬として漢方処方に用いられ、日本薬局方にも収載されている。わが国への最大の輸出国である中国における生薬資源の枯渇や、需要の増加により、中国からのマオウの供給は、今後限定的となり不足することが予想される。そこで、本研究では、石川県地域の砂丘を利用したマオウの栽培供給の可能性を確かめることが主要なテーマである。その研究の一旦として、マオウの成分に関する新たな探索と分析を行い、本研究の成果をより意義あるものとするのが目的である。マオウの活性成分としては、わが国の天然物化学の先駆者である、長井長義によりその化学構造が解明されたエフェドリンが知られている。マオウの種々の生理活性を考えたとき、エフェドリン以外の成分の寄与も考えられる。マオウの成分として、結合型タンニンの分離報告があるが、さらに、そのほかの成分を明らかにする必要があると考えられる。

E. distachya はアジアを起原とするマオウ植物の1つであり、その研究報告例は少なく、フェニルプロパノイドのアミノ酸誘導体である *p*coumaroyl-D-threonine, *p*coumaroyl-D-serine, *p*coumaroyl-D-valine および芳香族カルボン酸である distachic acid が報告されているに過ぎない。そこで、今年度の研究課題として *E. distachya* の高極性成分の探索研究を行うこととした。

B. 研究方法

昨年度の予試験で、各種マオウ(市場品マオウ、*Ephedra distachya*, *E. gerardiana*) を 70 % acetone 水で室温下抽出、得られた抽出液を三菱ダイアイオン HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、H₂O、30 % MeOH, 50 % MeOH, 70 % MeOH, 100 % MeOH の順に溶出することにより得られたフラクションが、いずれの材料でも良好な収量で得ることが可能であることを確認した。そこで、本実験で行う抽出法として、この方法を