薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (12) 1113-1117 (1981)

抗炎症剤に関する研究 (第 4 報¹⁾) 人参の抗炎症活性成分²⁾

大塚紘司,^{*,a} 小宮威彌,^a 藤岡章二,^a 後藤 實,^a 平松保造,^b 藤村 一^b
武田薬品工業株式会社中央研究所生薬研究所,^a 岐阜大学医学部^b

Studies on Anti-inflammatory Agents. IV.¹⁾ Anti-inflammatory Constituents from Roots of *Panax ginseng* C.A. MEYER²⁾

HIROSHI OTSUKA,^{*,a} TAKEYA KOMIYA,^a SHOJI FUJIOKA,^a MINORU GOTO,^a
YASUZO HIRAMATSU,^b and HAJIME FUJIMURA^b

Pharmacognostic Research Laboratories, Central Research Division,^a Takeda Chemical Industries, Ltd.,^a 11, Ichijoji-Takenouchi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan, and
Gifu University, School of Medicine,^b 40, Tsukasamachi, Gifu, 500, Japan

(Received March 16, 1981)

The Ginseng Radix (ginseng root) is prescribed in many Chinese medicines as a stomachic and for the purpose of antidiarrhoic effect, metabolic promotion, and hematic effects, and has been well known as one of the representative drugs of nutritious tonics.

In a continuing scientific search for Chinese medicines, we tried systematic extraction of some Chinese medicines, and checked activity of each fraction by means of the fertile egg method, and found a strong inhibitory activity against the formation of granulation tissue in the chloroform extract. The detailed investigation of this extract resulted in the isolation of panaxynol (1) and linoleic acid (2), which were proved to be major active components.

Keywords—anti-inflammatory constituents; crude drug; Ginseng Radix (ginseng root); panaxynol; linoleic acid; fertile egg method; cotton pellet method

人参 *Panax ginseng* C.A. MEYER (Araliaceae) は神農本草経に収載されて以来、漢方では健胃整腸、新陳代謝の促進、補血などを目標として人参湯・四君子湯類、補中益気湯、十全大補湯など多くの漢方薬に配合されるほか古来、滋養強壯の代表生薬として賞用される。したがって、人参の成分、³⁾ 薬理⁴⁾ に関しては汎世界的に広く研究され、成分としては ginsenoside 類など、薬理的には中枢神経系、循環器系などに作用のあることが知られている。

著者らは漢薬、漢方薬の科学的検索の一環として頻用されるいくつかの漢薬については詳細に検討したところ人参の脂溶性画分に強い肉芽形成抑制作用を認めた。そこで人参の肉芽抑制効果を明らかにするため受精卵法⁵⁾ を指標として検討した結果、本活性成分を明らかにすることができたので報告する。

人参をクロロホルム、エタノール、水で順次抽出し、得られた各抽出エキスについて受精卵法により抗炎症活性を検討したところ、クロロホルム抽出エキスを強い肉芽形成抑制作用を認めた。ついで、クロロホルム抽出エキスを繰り返してシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ベンゼンで溶出、精製して淡黄色の粘稠物質を得た (Fig. 1)。

本品は薄層クロマトグラフィー (TLC) 上、1 スポットを示し、10% 硫酸噴霧後加熱により黒褐色を呈するが、塩化第二鉄反応、ドレーゲンドルフ反応ともに陰性である。

分子式は質量スペクトル (MS)、元素分析値、および分子量測定の結果から $C_{17}H_{24}O$ と決定された。

紫外線吸収 (UV) スペクトル (EtOH) では 230, 242, 255, 269, および 285 nm にそれぞれ極大吸収がみられ、⁶⁾ 赤外線吸収 (IR) スペクトル (CCl_4) では 3550 cm^{-1} に水酸基、 $2900, 2850\text{ cm}^{-1}$ にメチレン基、 2240 cm^{-1} に三重結合、および 1635 cm^{-1} に二重結合に基づく吸収が、それぞれ認められる。核磁気共鳴 (NMR) スペクトル ($CDCl_3$)⁷⁾ では $\delta 2.35$ (1H, br s) に重水素置換により消失する水酸基 1 個分のほか、 $\delta 0.89$ (3H, t, $J=6\text{ Hz}$) に 1 個のメチル基、 $\delta 1.28$ (2H, m) に $-CH_2-CH_2-CH=CH-$ に基づく 1 個のメチレン基、 $\delta 3.0$ (2H, d,

Fig. 1. Isolation of Anti-inflammatory Constituents from Root of *Panax ginseng*

^{a)} Inhibition ratio (%) of granulation tissue formation by fertile egg method.

$J=6$ Hz) に $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-$ に基づく 1 個のメチレン基に相当するプロトンシグナル, δ 4.85 (1H, d, $J=6$ Hz) にメチン基プロトン 1 個分, および δ 5.0—6.1 (m) に $-\text{CH}=\text{CH}-$ と $-\text{CH}=\text{CH}_2$ に基づく 5 個のプロトンシグナルが認められる。また, 本品は室温下に長時間放置すると褐変し, TLC 上数種のスポット^{3a)}を与える。これらの理化学データは, すでに高橋ら^{3a)}が人参 (*Panax ginseng* C.A. MEYER の根) のエーテル抽出エキスから単離した panaxynol (1) のそれらと一致することから, 本品を 1 と同定した。

ついで, 人参クロロホルム抽出エキスのシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて, 酢酸エチルで溶出した画分にも強い肉芽形成抑制作用が認められた (Fig. 1) ことから, 本画分を活性炭カラムクロマトグラフィー, ついでケイ酸カラムクロマトグラフィーに付し, 精製して淡黄色油状物質を得た。

本品は TLC 上 1 スポットを与え, 10% 硫酸噴霧後加熱により褐色または紫褐色を呈するが, 塩化第二鉄反応, ドラゲンドルフ反応ともに陰性で, 紫外線照射 (2537 Å) により UV 吸収を示さない。

IR スペクトル (liquid) では 2925, および 2850 cm^{-1} にメチレン基, 2600—2500 cm^{-1} (shoulder) に水酸基, 1730, および 1710 cm^{-1} にカルボニル基に基づく吸収が認められる。NMR スペクトル (CDCl_3) では δ 9.05 (1H, br s) に重水素置換により消失する水素結合性のプロトンシグナル 1 個分, δ 5.3 (4H, m) にオレフィンプロトン 4 個分, δ 2.7 (2H, m, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) に二重結合にはさまれたメチレンプロトン 2 個分, δ 2.3 (2H, t, $J=7$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$) にカルボキシル基に隣接するメチレンプロトン 2 個分, δ 2.05 (4H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) に二重結合に隣接する 2 個のメチレン基に由来するプロトン 4 個分, δ 1.10—1.80 (16—18H, m) に多数のメチレンプロトン, および δ 0.85 (3H, t, $J=6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) に 1 個のメチル基に由来するプロトンシグナルが認められた。

これらの理化学的性質から, 本品は二重結合 2 個を有する不飽和脂肪酸と推定される。そこで本品と既知成分の 1 つ^{3b)}である linoleic acid (2) を IR スペクトル, NMR スペクトルにより比較し, 同定した。さらに, 本品のメチルエステルは標品のリノール酸メチルエステルとガスクロマトグラフィーの保持時間 (t_R), および質量スペクトル (MS) において一致する [m/e 294 (M^+)] ことから, 両者は同一物質であることを確認した。

受精卵法により 1 および 2 はディスク当たり 25 μg の用量でそれぞれ約 50%, 40% の肉芽形成抑制作用がみられ (Table I), cotton pellet 法においてもキログラム当たりそれぞれ 100 mg, 50 mg の用量で有意に抗炎症活性が認められた (Table II)。なお, 人参のサポニン画分 ginsenoside 類 (crude saponin fraction) はディスク当たり 800 μg の用量でも作用はみられなかった (Table III)。

TABLE I. Anti-inflammatory Activity of Panaxynol (1) and Linoleic Acid (2) obtained from Ginseng Root by Means of Fertile Egg Method

Test material	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Granulation tissue		Chick embryo	
		Dry wt. (mg)	Inhibition (%)	Wet wt. (g)	Survival ratio
Control		6.9 $\pm$ 1.4		4.7	19/20
Berberine chloride	25	2.9 $\pm$ 0.4 ^{a)}	58	4.6	18/20
CHCl ₃ ext.	400	3.5 $\pm$ 0.5 ^{a)}	49	4.9	20/20
Panaxynol	100	2.2 $\pm$ 0.3 ^{a)}	68	5.0	18/20
	50	2.8 $\pm$ 0.4 ^{a)}	59	5.2	19/20
	25	3.3 $\pm$ 0.5 ^{a)}	52	4.9	18/20
Linoleic acid	100	3.5 $\pm$ 0.5 ^{a)}	49	4.8	20/20
	50	3.7 $\pm$ 0.4 ^{a)}	46	4.9	19/20
	25	4.2 $\pm$ 0.5 ^{a)}	39	4.9	17/20

a) Significant at the 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE II. Anti-inflammatory Activity of Panaxynol (1) and Linoleic Acid (2) by Means of Cotton-Pellet Method

Test material	Daily dose ^{a)} (mg/kg)	Mean body wt. gained (g)	Granulation tissue ^{b)}	
			Dry wt. (mg) $\pm$ S.E.	Inhibition (%)
Control		39	36.1 $\pm$ 1.8	
Berberine chloride	100	29	26.0 $\pm$ 2.1 ^{c)}	28.0
	25	40	31.8 $\pm$ 2.7	11.9
Prednisolone	2.5	23	19.9 $\pm$ 2.2 ^{c)}	44.9
Panaxynol	100	26	27.4 $\pm$ 2.3 ^{c)}	24.1
	50	30	36.3 $\pm$ 3.8	
Linoleic acid	100	29	30.1 $\pm$ 1.3 ^{c)}	16.6
	50	25	29.3 $\pm$ 3.4 ^{c)}	18.8

a) Administration: *per os*.

b) Average of 12 pellets.

c) Significant at the 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

TABLE III. Effect of Aqueous Methanolic (1:1) Extract and Saponin Fraction obtained from Ginseng Root by Means of Fertile Egg Method

Test material	Dose ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Granulation tissue		Chick embryo	
		Dry wt. (mg)	Inhibition (%)	Wet wt. (g)	Survival ratio
Control		6.7 $\pm$ 1.3		5.1	20/20
Berberine chloride	25	3.4 $\pm$ 0.6 ^{a)}	49	4.9	18/20
MeOH H ₂ O (1:1) ext.	800	6.1 $\pm$ 1.2	9	5.2	19/20
	400	6.4 $\pm$ 1.3	5	5.4	20/20
Crude saponin frac.	800	6.3 $\pm$ 1.4	6	5.1	19/20
	400	6.2 $\pm$ 1.3	7	5.2	18/20

a) Significant at the 5% level in comparison with the control ($p < 0.05$).

従来、2 には adjuvant edema に対する抗浮腫作用のあることが報告⁸⁾ されているが、人参の既知成分である 1 および 2 に肉芽形成抑制作用のあることを見出したのは本報が最初である。

実験の部⁹⁾

人參 *Panax ginseng* C.A. MEYER の抽出 ヒゲ人參 (市販品) の細切品 100 g を CHCl_3 500 ml で 3 回温時抽出し, CHCl_3 ext. 2.3 g (収率 2.3%) を得た. ついで EtOH 500 ml で 3 回温時抽出し, EtOH ext. 7.8 g (収率 7.8%) を得た. 以下同様にして H_2O ext. 21 g (収率 21%) を得た. CHCl_3 ext. の受精卵法による抗炎症活性は Fig. 1 に示した.

人參サポニン画分 前記人參の抽出により得られた EtOH ext. 2.0 g を 200 ml の水に溶かし, エーテル 50 ml で 3 回洗ったのち, 水飽和 $n\text{-BuOH}$ で 3 回抽出, $n\text{-BuOH}$ 層を合わせ, 約半量の水で 3 回洗い, $n\text{-BuOH}$ 層より溶媒を留去してサポニン画分 0.4 g を得た.

人參 CHCl_3 Ext. から Panaxynol (1), および Linoleic Acid (2) の単離 ヒゲ人參 (細切品) 5.0 kg を室温抽出して得た CHCl_3 ext. 81 g (収率 1.62%) を可及的少量の CHCl_3 に温時溶かし, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル, 2.5 kg) に付し, ベンゼンで溶出して 8 画分 (P-1—P-8 画分) を得た. 収量 (収率): P-1; 4.2 g (0.084%), P-2; 4.6 g (0.092%), P-3; 2.3 g (0.046%), P-4; 2.4 g (0.048%), P-5; 3.1 g (0.062%), P-6; 5.2 g (0.104%), P-7; 3.4 g (0.068%), P-8; 3.6 g (0.072%). 本法により活性がみられた P-3—P-5 画分を合わせ (計 7.8 g), 再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, 4 画分 (Pg-1—Pg-4) を得た. 収量 (収率): Pg-1; 2.1 g (0.042%), Pg-2; 1.4 g (0.028%), Pg-3; 2.4 g (0.048%), および Pg-4; 1.3 g (0.026%). これら画分の受精卵法による活性は Fig. 1 に示した. 抗炎症活性がみられた Pg-3, および Pg-4 画分には主成分より R_f 値がやや高い微量成分が混在しているため再クロマトグラフィーに付し, TLC 上 1 スポットを与える淡黄色の粘稠物質 (1) 1.4 g (収率 0.028%) を得た. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 230, 242, 255, 269, および 285. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{COI}}$ cm^{-1} : 3550 (OH), 2900 (CH_2), 2850 (CH_2), 2240 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1635 ($\text{C}=\text{C}$). NMR (CDCl_3): 本文を参照. MS m/e : 244 (M^+). Anal. Calcd $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}$: C, 83.55; H, 9.90. Found: C, 83.63; H, 10.28. これらの理化学データは, さきに高橋ら^{3a)} が同じく人參から単離し, 合成により確認した panaxynol (1) のそれらと一致する.

つぎに最初のカラムクロマトグラフィーにおいて panaxynol (1) を溶出後は順次 AcOEt , AcOEt -アセトン (1:1), アセトンを用いて溶出し, AcOEt 画分 5.2 g (収率 0.104%), AcOEt -アセトン画分 9.2 g (収率 0.184%) を得た. 受精卵法により活性の認められた AcOEt 画分 3.0 g を MeOH に溶かし, その可溶画分を予め水洗, ついで MeOH で洗った活性炭カラムクロマトグラフィーに付し, MeOH (500 ml), アセトン (300 ml), および CHCl_3 (300 ml) で順次溶出した. 最初の MeOH 溶出画分 1.2 g のみに活性がみられ, アセトン溶出画分 (0.9 g), および CHCl_3 溶出画分 (0.4 g) には肉芽形成抑制作用はみられなかった (Fig. 1). 活性のみられた MeOH 溶出画分 (淡黄色泥状物質) を活性炭を用いる再クロマトグラフィーに付し, 淡黄色油状物質 0.7 g を得た. 本物質をさらに精製するためケイ酸 (100 mesh, 100 g) カラムクロマトグラフィーに付し, CHCl_3 -アセトン- MeOH (99:1:1) で溶出し, TLC 上 1 スポットを与える淡黄色油状物質 (2) を得た. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{liquid}}$ cm^{-1} : 2925, 2850 (CH_2), 2600—2500 (shoulder, OH), 1730, 1710 ($\text{C}=\text{O}$). NMR (CDCl_3): 本文参照. 本品は標品 linoleic acid (2) の理化学データと一致する. また, 本品を CH_2N_2 -エーテル溶液でメチル化したメチル体は m/e 294 (M^+) を示し, ガスクロマトグラフィー (column: 10% EGSS-x, Gaschrom Q 80/100, 0.9 mm ϕ $\times$ 1.12 m, column temp. 160°C, inject temp. 170°C, carrier gas He: 40 ml/min, H_2 : 35 ml/min, air: 0.75 l/min, chart speed: 5 mm/min) において標品の methyl linoleate と同一の保持時間 (t_R) 14.6 min を示す.

生物試験法 受精卵法⁵⁾ および cotton pellet¹⁰⁾ は既報に準じた.

謝辞 本研究に当たり, 有益な御助言をいただいた京都大学化学研究所藤田栄一教授に深謝します. また, panaxynol の同定に関し御助言をいただいた東北薬科大学高橋三雄教授に感謝します.

引用文献および注

- 1) 第3報: 大塚紘司, 小宮威彌, 藤岡章二, 後藤 實, 平松保造, 藤村 一, 薬誌, **101**, 1108 (1981).
- 2) 本報の1部は第11回和漢薬シンポジウム, 岐阜, 1977年9月, で発表.
- 3) a) 高橋三雄, 磯井広一郎, 木村嘉孝, 吉倉正博, 薬誌, **84**, 771 (1961); b) 近藤平三郎, 田中 治, 薬誌, **35**, 779 (1915); M. Nagai, T. Ando, N. Tanaka, O. Tanaka, S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1212 (1972); 藤田路一, 糸川秀治, 柴田承二, 薬誌, **82**, 1638 (1962); 後藤 實, 薬誌, **77**, 471 (1957); F. Gstirner, H.J. Vogt, *Arch. Pharm.*, **299**, 936 (1966); 滝浦 潔, 中川一郎, 薬誌, **83**, 305 (1963); 高橋三雄, 磯井広一郎, 吉倉正博, 大杉利章, 薬誌, **81**, 771 (1961).
- 4) I.I. Brekhman, I.V. Dardymov, *Lloydia*, **32**, 46 (1969); I.I. Brekhman, I.V. Dardymov, *Ann. Rev.*

- Pharmacol.*, **9**, 419 (1969); W. Petkov, *Pharm. Zeit.*, **31**, 1281 (1968); K. Takagi, H. Saito, M. Tsuchiya, *Japan J. Pharmacol.*, **24**, 41 (1974); H. Saito, M. Tsuchiya, S. Naka, K. Takagi, *Japan J. Pharmacol.*, **27**, 509 (1977); H. Oura, S. Hiai, Y. Okada, T. Yokozawa, *J. Biochem.*, **77**, 1057 (1975).
- 5) 大塚紘司, 津久井 誠, 松岡敏郎, 後藤 實, 平松保造, 藤村 一, 沢田徳之助, 薬誌, **94**, 796 (1974).
- 6) D.G. Grosby, N. Aharonson, *Tetrahedron*, **23**, 465 (1967).
- 7) F. Bohlmann, U. Niedballa, K.M. Rode, *Chem. Ber.*, **99**, 3552 (1966).
- 8) V.W. Stuyvesant, W.B. Jolley, *Nature*, **216**, 585 (1967).
- 9) 紫外線吸収スペクトルは EPS-3 T (日立社製), 赤外線吸収スペクトルは EPI-G 2 型 (日立社製), 核磁気共鳴スペクトルは tetramethylsilane を内部標準物質として HA-100 型 (Varian 社製) を用いて測定した. TLC はシリカゲル HF₂₅₄ (E. Merck 社製), および D-O (CAMAG 社製) の等量混合物を用い, 検出は紫外線ランプ (2537 Å) 下での吸収, ドラージェンドルフ反応, 塩化第二鉄反応, および 10% 硫酸噴霧後加熱による呈色によった. カラムクロマトグラフィーにはシリカゲル (0.05—0.2 mm, E. Merck 社製), ケイ酸 (100 mesh, Mallinckrodt 社製), および活性炭 (武田薬品社製, 精製白鷺クロマト用) を用いた.
- 10) R. Meier, W. Schuler, P. Desaulles, *Experientia*, **6**, 469 (1950); C.A. Winter, E.A. Risley, G.W. Nuss, *J. Pharm. Exptl. Therap.*, **41**, 369 (1963).