竹節人参の成分研究 (第1報¹⁾) サポニンの分離精製 その1

近藤紀子, 庄司順三

昭和大学薬学部²⁾

Studies on the Constituents of *Panax Japonici* Rhizoma. I.¹⁾ Isolation and Purification of the Saponins. (1)

NORIKO KONDO and JUNZO SHOJI

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University²⁾

(Received September 4, 1967)

Three kinds of saponin, named chikusetsusaponin-III, -IV, and -V, were isolated in crystalline form from a Chinese crude drug, Chikusetsu-Ninjin (rhizome of *Panax japonicum* C.A. MEYER; Araliaceae), chikusetsusaponin-III, $C_{47}H_{80}O_{17} \cdot 2H_2O$, formed colorless prisms, mp 196—197°, and is protopanaxadiol or 20-epiprotopanaxadiol bonded with glucose and xylose. Chikusetsusaponin-IV, $C_{47}H_{74}O_{18} \cdot 4H_2O$, formed colorless prisms, mp 235° (decomp.), and is an oleanolic acid bonded with glucose, arabinose, and glucuronic acid, forming permethylated compound, $C_{57}H_{94}O_{18}$, of mp 141—142°. Chikusetsusaponin-V, mp 230° (decomp.), is an oleanolic acid bonded with glucose and glucuronic acid. Further elucidation of the total structure of these saponins is in progress.

竹節人参はトチバニンジン *Panax japonicum* C.A. MEYER (Araliaceae) の根茎を乾燥した生薬で薬用人参 *Panax ginseng* C.A. MEYER の代用生薬として健胃, 祛痰, 解熱などの薬効が知られている。本生薬のサポニンに関してはすでに村山,³⁾ 青山,⁴⁾ 小竹,⁵⁾ 北里,⁶⁾ 柴田および藤田,⁷⁾ 柴田および安藤⁸⁾ 等により多数の研究が報告されている。また吉岡等⁹⁾ は土壌菌を用いてサポニンを加水分解し真性ゲニンを得る目的で竹節人参のサポニンに関する研究を報告している。これら従来の研究は粗製総サポニンを用いた研究であり, サポゲニンである oleanolic acid の構造研究を主とし, サポニンの構成糖として arabinose, glucose, glucuronic acid などの記載はあるが, いずれも原料サポニンは純粋に精製されてはいない。柴田および藤田⁷⁾ は竹節人参より, サポゲニンとして oleanolic acid とともに panaxadiol を確認し, 柴田, 安藤等⁸⁾ は地上部より, これらのサポゲニンの他に panaxatriol の存在を報告している。著者等は薬用人参の代用生薬である竹節人参の薬効を検討する目的で本研究に着手し, まずサポニン成分の単離精製を行ない主サポニン3種の結晶化に成功し, その諸性質を明らかにした。

東京都下高水山付近で採集したトチバニンジンの根茎の冷メタノールエキスと, 市販竹節人参の冷メタノールエキスのサポニン成分を薄層クロマトグラフィー (TLC) (Kieselgel G, $CHCl_3$ — $MeOH$ — H_2O (65:35:10) 下層¹⁰⁾) により比較検討したところ, まったく同一のパターンを示すことを確認したので, 以下大量処理には市販品を用いて実験を行なった。

- 1) 本研究は日本薬学会第87年年会で発表した, 京都, 1967年4月。
- 2) Location: Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo.
- 3) 村山義温, 板垣武熹, 薬誌, **43**, 783 (1923); 村山義温, 田中振爾, *ibid.*, **47**, 526 (1927).
- 4) 青山新次郎, 薬誌, **49**, 678 (1929); *ibid.*, **50**, 1076 (1930); *ibid.*, **50**, 1163 (1930).
- 5) 小竹無二雄, 松原多摩喜, 木本頼三郎, 日化, **51**, 396 (1930); M. Kotake, Y. Kimoto, *Sci. P. Inst. Phys. Chim. Research*, **18**, 83 (1932).
- 6) Z. Kitazato, C. Sone, *Acta. Phito. Chem. (Japan)*, **6**, 218 (1932).
- 7) 藤田路一, 糸川秀治, 柴田承二, 薬誌, **82**, 1634 (1962).
- 8) 柴田承二, 安藤利夫, 他, 薬誌, **85**, 753 (1965).
- 9) I. Yoshioka, M. Fujio, M. Osamura, I. Kitagawa, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 6306.
- 10) T. Kawasaki, K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **11**, 1546 (1963).

Fig. 1. The Thin-Layer Chromatogram and *R_f* Values of Chikusetsusaponins on Kieselgel G

竹節人參の細切 1 kg を MeOH 2 liter を用い熱時 5 回抽出し、抽出液を合わせ減圧濃縮して得たエキスを水 800 ml に溶解し、水飽和 *n*-BuOH 500 ml で 7 回抽出後、抽出液を減圧下濃縮乾固し粗サポニン 236 g を得た。この粗サポニンをシリカゲルを担体とし、水飽和 AcOEt に順次 MeOH を 10—25% 加えた溶剤を用いカラムクロマトグラフィーを行ない、TLC¹⁰⁾ により *R_f* 0.36, 0.16, 0.10 を示す各フラクションに分離し、さらにシリカゲルを担体としたカラムクロマトグラフィーにより各フラクションの分離精製を行ない、chikusetsusaponin III 11.7 g, chikusetsusaponin IV 4.3 g, chikusetsusaponin V 53.5 g と命名した 3 種のサポニンを単離結晶化した。¹¹⁾

chikusetsusaponin III は MeOH-水飽和 AcOEt より再結晶すると無色柱状晶として得られ mp 196—197°¹²⁾, $[\alpha]_D^{25} +1.5^\circ$ (MeOH). C₄₇H₈₀O₁₇·2H₂O で示され IR スペクトルは 3300—3400 cm⁻¹ に OH の broad な吸

11) 村山, 田中⁹⁾ は竹節人參から得た粗サポニンをバナックスサポニンと命名している。

12) 記載融点はすべて柳本マイクロ融点測定装置で測定。

収を示し, 1160 cm^{-1} に C-O に基づく吸収がみられる.

chikusetsusaponin III を常法により無酢—ピリジンにより 2 昼夜室温でアセチル化すると無色の mp $126-129^\circ$ の粉末を得た. このアセテートの結晶化は成功していないが含水 MeOH より繰返し再沈殿を行なったところ $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$ で示される acetate を得た. この acetate は $[\alpha]_D^{25} -20.26^\circ$ (CHCl_3) を示し, IR (Nujol) は $3506, 1738\text{ cm}^{-1}$ に水酸基およびアセチル基の吸収を認めた. また蒸気圧法による分子量測定値は MeOH 中 1379 を示す ($\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$ の計算値 1336). chikusetsusaponin III を $\text{N HCl-dioxane:H}_2\text{O}$ (1:3) で 4 時間水浴上で加熱し加水分解後水を加えて析出する沈殿部を TLC で比較検討したところ panaxadiol に一致することを認めた. 母液は Amberlite IR-4B で中和し, 濃縮後 partition paper chromatography (PPC), および gas liquid chromatography (GLC) により糖部の検討を行ない glucose と xylose を確認した. chikustsaponin III のサポゲニンを確認する目的で, サポニンを EtOH—AcOH 中 PtO_2 で接触還元し, 還元成績体をアルコール性希塩酸で水浴上 4 時間加水分解し, 冷後水を加えて析出する沈殿物を濾取し, Kieselgel H と benzene:EtOH (85:15) でカラムクロマトグラフィーを行なった後, MeOH より再結晶すると無色針状晶, mp $249-251^\circ$ の dihydroprotopanaxadiol が得られ, 混融, IR, TLC により標品と比較同定した. 以上の結果 chikusetsusaponin III は protopanaxadiol または 20-*epi*-protopanaxadiol^{14,15)} に glucose と xylose の結合した saponin であることが明らかになった.

chikusetsusaponin IV は水飽和 *n*-BuOH と AcOEt から再結晶して得られる無色柱状晶で mp $>235^\circ$ (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -9.7^\circ$ (pyridine), IR スペクトル (Nujol) は $3200-3500$ (OH), 1740 (ester) cm^{-1} の吸収を示し, 分子式は $\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ で示される. chikusetsusaponin IV を Kuhn¹⁶⁾ の方法にしたがい dimethylformamide 中, Ag_2O および CH_3I により室温で 90 時間攪拌し, 反応成績体をシリカゲルを用い benzene:acetone (8:2) でカラムクロマトグラフィーにより精製後 MeOH で再結晶すると無色針状晶, mp $141-142^\circ$, $[\alpha]_D^{25} -12.44^\circ$ (CHCl_3) の $\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{18}$ に相当する permethylate が得られる. このものの分子量は CHCl_3 中蒸気圧法による測定で 1035 を示す ($\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{18}$ の計算値 1066). permethylate の IR (Nujol) は OH の吸収が認められず 1750 cm^{-1} に ester の吸収が認められる. chikusetsusaponin IV を $2\text{N HCl-50\% dioxane-H}_2\text{O}$ で 4 時間沸騰水浴上で加水分解後, 水を加えて析出する沈殿物を濾取し, EtOH より再結晶し mp $294-295^\circ$ の結晶を得た. 混融, IR スペクトル, TLC により oleanolic acid であることを同定した.

さらに CH_2N_2 により mp $201.5-202^\circ$ のメチルエステルに誘導し oleanolic acid methyl ester の標品と混融, IR スペクトル, TLC の比較により同定した. oleanolic acid を除去した濾液は Amberlite IR-4B を通し中和後濃縮乾固し PPC および GLC により糖の検索を行ない arabinose, glucose, glucuronic acid を確認した. 以上の結果 chikusetsusaponin IV は oleanolic acid に arabinose, glucose, glucuronic acid の結合した saponin であることが明らかになった.

chikusetsusaponin V は水飽和 *n*-BuOH より再結晶すると mp $>230^\circ$ (decomp.) の無色柱状晶として得られ, $[\alpha]_D^{25} +14.9^\circ$ (pyridine), IR スペクトル (Nujol) は $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ (OH), 1748 cm^{-1} (ester) の吸収がみられ, 分析値は C, 55.52, H, 8.35 を示す. chikusetsusaponin IV と同条件で加水分解を行なうと, ゲニン部として oleanolic acid が得られ, 混融, IR スペクトル, TLC により同定し, さらに CH_2N_2 により mp 202° のメチルエステルに誘導し, oleanolic acid methyl ester の標品と混融, IR スペクトル, TLC により確認した. oleanolic acid を除去した加水分解液は Amberlite IR-4B で中和し, 濃縮乾燥後 PPC および GLC により生成した糖の検索を行なったところ glucose と glucuronic acid が確認された. 以上の結果 chikusetsusaponin V は oleanolic acid に glucose, glucuronic acid の結合した saponin であることが明らかになった.

さきに Kochetokov 等¹⁷⁾ により報告された *Aralia manschurica* (Araliaceae) の強壯作用を有するサポニン

- 13) S. Shibata, O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima, T. Ohsawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **14**, 596 (1965).
- 14) M. Nagai, O. Tanaka, T. Ohsawa, N. Tanaka, S. Shibata, *Tetrahedron Letters*, **1967**, 391; *ibid.*, **1967**, 3579.
- 15) 東京大学 柴田 承二 教授からの私信によれば protopanaxadiol を R-protopanaxadiol, 20-*epi*-protopanaxadiol を S-protopanaxadiol と命名することを提案されている.
- 16) R. Kuhn, *Angew. Chem.*, **67**, 32 (1955).
- 17) N.K. Kochetokov, A. J. Khorlin, V. E. Vaskovsky, *Tetrahedron Letters*, **1962**, 713.

Chart 2.

araloside A および araloside B は、著者等が今回竹節人参より得た chikusetsusaponin IV とゲニン部および糖組成が同一なことは本生薬の薬効の点からも興味あることと考え、これらサポニンの構造解明の研究を続行中である。青山等⁹⁾により報告された竹節人参の粗サポニンは Mg-塩を形成していると報告されているが、今回著者等の単離した chikusetsusaponin V は IR スペクトルにおいて、カルボン酸が遊離して存在するとき期待しうる 1700 cm^{-1} 付近の吸収が認められず、 1610 cm^{-1} 付近に COO^- に相当する強い吸収がみられること、また元素分析において ash が存在することより真性サポニンは金属塩の形で単離されたと考えられるのでこの点についても目下検討を行ないつつある。

実験の部

竹節人参より Chikusetsusaponin III, IV, V の分離 竹節人参の細切 1 kg を MeOH 2 liter で熱時 5 回抽出、抽出液を合し減圧下 MeOH を留去して得た残渣を水 800 ml に溶解し水飽和 *n*-BuOH 500 ml で 7 回抽出、抽出液を減圧濃縮乾固すれば 236 g の粗サポニンを得る。粗サポニンをシリカゲルを担体とし、水飽和 AcOEt に順次 MeOH を 10—25% 加えカラムクロマトグラフィーを行ない、TLC (plate: Kieselgel G; solvent: CHCl_3 —MeOH— H_2O (65:35:10), 下層) で R_f 0.36 (chikusetsusaponin III), 0.16 (chikusetsusaponin IV), 0.10 (chikusetsusaponin V) を示す各サポニンフラクションに大別する。さらに各サポニンフラクションをシリカゲルを担体とし、 CHCl_3 —MeOH— H_2O (65:35:10) の下層を用いカラムクロマトグラフィーにより精製し、chikusetsusaponin III (11.7 g), chikusetsusaponin IV (4.3 g), chikusetsusaponin V (53.5 g) を単離した。

Chikusetsusaponin III 上記操作で単離したサポニンを MeOH と水飽和 AcOEt の混合溶媒より再結晶。mp $196\text{—}197^\circ$ 。無色柱状晶。 $[\alpha]_D^{25} +1.5^\circ$ ($c=1.69$, MeOH)。IR (Nujol) cm^{-1} : ν_{OH} 3300—3400, $\nu_{\text{C=O}}$ 1160. Anal. Calcd. $\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{17} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.24; H, 8.80. Found: C, 59.01; H, 9.04.

Chikusetsusaponin III のアセチル化 chikusetsusaponin III 1 g を Ac_2O 20 ml, pyridine 20 ml で室温で 48 hr 反応後常法により処理し、無色粉末 1.2 g を得た。結晶化に成功せず含水 MeOH より繰返し再沈殿を行ない mp $126\text{—}129^\circ$ の無色の粉末を得た。 $[\alpha]_D^{25} -20.26^\circ$ ($c=1.67$, CHCl_3)。IR (Nujol) cm^{-1} : ν_{OH} 3506, $\nu_{\text{C=O}}$ 1738, $\nu_{\text{C-O-C}}$ 1250—1200. Anal. Calcd. $\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$: C, 60.17; H, 7.47; mol. wt. 1336. Found: C, 60.42; H, 7.61; mol. wt. [Hitachi Perkin-Elmer Model 115, (蒸気圧方式分子量測定装置) MeOH 中測定] 1379.

Chikusetsusaponin III の加水分解 chikusetsusaponin III 210 mg を *N* HCl-dioxane— H_2O (1:3) 20 ml と水浴上 4 hr 加熱、冷後水を加えて析出する沈殿物を濾取 (109 mg), 乾燥後 TLC (plate: Kieselgel H; solvent: 1) benzene—acetone (3:1), R_f 0.24. 2) benzene—EtOH (85:15), R_f 0.51) により比較検討し主スポットは panaxadiol に一致することを認めた。濾液は Amberlite IR-4B を用い中和後濃縮乾固し PPC と GLC により glucose と xylose を確認した。PPC: Toyō Roshi No. 52, Color reag.: IO_4^- -benzidine. solv. 1. *n*-BuOH—

AcOH—H₂O (4:1:5) 上層, *R_f* 0.24 (glucose), 0.33 (xylose), solv. 2. 水飽和 PhOH, *R_f* 0.39 (glucose), 0.48 (xylose). GLC: Hitachi K-53, column, SE-52, column temp., 175°, injection temp., 220°, carrier gas N₂ 18 ml/min. 検体はいずれも常法により trimethylsilyl ether として測定. *R_t* (min): 4.6, 8.6 (xylose), 14.9, 22.1 (glucose).

Chikusetsusaponin III の接触還元および加水分解 chikusetsusaponin III 300 mg を PtO₂ 50 mg を用い少量の AcOH を加えた EtOH 20 ml 中で 1 hr 接触還元後濾過し、濾液を減圧乾固する。この還元体をただちに 2*N* HCl-50% EtOH で 44 hr 水浴上加水分解し、冷後水を加えて析出する沈殿物を濾取、乾燥後 Kieselgel H を用い、benzene—EtOH (85:15) でカラムクロマトグラフィーを行ない、単離された無色粉末を MeOH から再結晶. mp 249—251°. 無色針状晶。本物質は混融, IR, TLC により標品と比較した結果 dihydroproto-panaxadiol であることを確認。

Chikusetsusaponin IV 単離したサポニンを水飽和 *n*-BuOH と AcOEt から再結晶. mp >235°(decomp.). 無色柱状晶. $[\alpha]_D^{25} -9.7^\circ$ (*c*=0.92, pyridine). IR (Nujol) *cm*⁻¹: ν_{OH} 3200—3500, ν_{COOR} 1740. *Anal.* Calcd. C₄₇H₇₄O₁₈·4H₂O: C, 56.51; H, 8.19. Found: C, 56.21; H, 8.21.

Chikusetsusaponin IV の permethyl 化 chikusetsusaponin IV 500 mg を dimethylformamide 10 ml に溶かし, Ag₂O 2 g, CH₃I 2 ml を加え室温で 90 hr 攪拌, 析出する沈殿物を濾過, 濾液にさらに Ag₂O 2 g と CH₃I 2 ml を加え 90 hr 室温で攪拌, 濾過後濾液に水を加え銀塩を析出させ, これに KCN を加え沈殿を溶解し, CHCl₃ で数回抽出し, 抽出液を水洗後芒硝で乾燥, CHCl₃ を留去後残渣をシリカゲルを用い benzene—acetone (8:2) でカラムクロマトグラフィーにより精製, 単離物を MeOH より再結晶すると mp 140—141° $[\alpha]_D^{25} -12.44^\circ$ (*c*=0.82, CHCl₃), 無色針状晶の permethyl 化物が得られる. *Anal.* Calcd. C₅₇H₉₄O₁₈: C, 64.14; H, 8.88.; mol. wt., 1066. Found: C, 63.52; H, 9.20; mol. wt. [Hitachi Perkin-Elmer Model 115 (蒸気圧方式分子量測定装置) CHCl₃ 中測定] 1035. IR (Nujol) *cm*⁻¹: ν_{OH} なし, ν_{COOR} 1750.

Chikusetsusaponin IV の加水分解 chikusetsusaponin IV 320 mg を 2*N* HCl-dioxane—H₂O (1:3) 30 ml で 4 hr 沸騰水浴上加水分解後, 水を加えて析出する沈殿物を濾取, 乾燥後 EtOH より再結晶. mp 294—295°. 無色針状晶. IR (KBr) *cm*⁻¹: ν_{OH} 3400—3500, ν_{COOH} 2900—3000, 1700. 混融, IR, TLC (Kieselgel H, benzene—EtOH (85:15) *R_f* 0.56) により標品の oleanolic acid と一致, さらに常法により CH₂N₂ によりメチルエステルとし, MeOH より再結晶. mp 201.5—202°. 無色針状晶. 標品の oleanolic acid methyl ester と混融, IR, TLC (plate: Kieselgel G; solv., benzene—EtOH (85:15) *R_f* 0.58) の比較により同定. 濾液は Amberlite IR-4B を通し中和後濃縮乾固し, PPC, GLC により糖の確認を行なった. PPC (chikusetsusaponin III の糖の検出に用いた条件に同じ). solv. 1. *R_f* 0.32 (glucuronic acid), 0.37 (glucose), 0.42 (arabinose), 0.52 (glucuronolactone); solv. 2. *R_f* 0.17 (glucuronic acid), 0.39 (glucose), 0.59 (arabinose), 0.64 (glucuronolactone). GLC (chikusetsusaponin III の糖の検出に用いた条件に同じ). *R_t* (min): 4.8, 5.5, 6.2 (arabinose), 11.3, 11.7 (glucuronolactone), 15.2, 22.6 (α,β -glucose).

Chikusetsusaponin V 単離されたサポニンを水飽和 *n*-BuOH から再結晶. mp >230°(decomp.). 無色柱状晶. $[\alpha]_D^{25} +14.90^\circ$ (*c*=0.82, pyridine). IR (Nujol) *cm*⁻¹: ν_{OH} 3200—3500, ν_{COOR} 1748, ν_{COO-} 1616. *Anal.* Found: C, 55.52; H, 8.35; ash, 2.81%.

Chikusetsusaponin V の加水分解 chikusetsusaponin IV と同一条件により酸加水分解, ゲニン部を EtOH より再結晶. mp 294—295°. 無色針状晶, 常法により CH₂N₂ でメチル化し MeOH より再結晶. mp 201.5—202°. 無色針状晶. 両者それぞれ標品と混融, IR, TLC (chikusetsusaponin IV のゲニン部と同条件) の比較により oleanolic acid, oleanolic acid methyl ester と同定. 糖部は上述の chikusetsusaponin III, IV の検出法に準じて確認. PPC: solv. 1. *R_f* 0.26 (glucuronic acid), 0.31 (glucose), 0.46 (glucuronolactone); solv. 2. *R_f* 0.24 (glucuronic acid), 0.39 (glucose), 0.65 (glucuronolactone), GLC: *R_t* (min): 11.2, 11.7 (glucuronolactone), 15.2, 22.6 (α,β -glucose).

謝辞 終わりに, 本研究に当り, 御指導, 御鞭撻を賜わり, かつ貴重な標品を分与された東京大学薬学部, 柴田承二教授, 田中治助教授, 種々御助言を賜った九州大学薬学部, 川崎敏男教授に深謝致します. また IR スペクトルの測定および元素分析をして下さった東京大学薬学部中央分析室, 分子量測定をして下さった日製産業株式会社研究所に深謝致します.