白頭翁の成分研究

菊池 徹, 有本昌弘, 豊田達郎

京都大学薬学部¹⁾

A Study on the Constituents of Crude Drug "Hakutooh"

TOHRU KIKUCHI, MASAHIRO ARIMOTO, and TATSUO TOYODA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾

(Received January 26, 1968)

Ether and methanol extracts of the crude drug, (*Pulsatilla cernua* SPRENG.), were examined, and stigmasterol and β -sitosterol were obtained as the neutral substance from the ether extract. The methanol extract was submitted to hydrolysis and hederagenin, oleanolic acid, and a minute quantity of acetyloleanolic acid were obtained as the acid substance.

白頭翁は漢方で熱性下痢に対して消炎, 収斂, 止瀉薬として利用される生薬であるが, わが国では各地の山野に自生するキンポウゲ科植物 (Ranunculaceae) のオキナグサ *Pulsatilla cernua* SPRENG. (= *Anemone cernua* THUNB.) の根を乾燥して用い, また中国ではヒロハオキナグサ *Pulsatilla chinensis* REGEL. (= *Anemone chinensis* BUNGE.) および近縁の植物の根が当てられている。

本生薬の成分については Huang 等²⁾ によって中国産白頭翁のサポニン成分が研究され, 希硫酸で加水分解後 mp 300—302°, $C_{30}H_{48}O_4$ のトリテルペンカルボン酸が単離されているが, その構造は未解決に残されている。ま

た一方ソ連において数種の同属植物の成分に関する研究報告がみられ, たとえば *P. ucrainica*,³⁾ *P. montana*,³⁾

1) Location: Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

2) W.-Y. Huang, W.-K. Chen, Y.-L. Chou, J.-H. Chu, *Hua Hsueh Pao.*, **28**, No. 3, 126 (1962) [*C.A.*, **59**, 1692b (1963)].

3) U.G. Fil, *Farmatsevt. Zh.*, **19** (1), 59 (1964) [*C.A.*, **61**, 8624 h (1964)].

P. pratensis^{4,5)} および *P. nigricans*⁶⁾ などから ranunculin (I) やその類似化合物が単離され、また *P. nemorosa*⁷⁾ からはそのサポニン成分を加水分解後 mp 317° のトリテルペンカルボン酸が得られることが報告されているが、確実な構造証明は行なわれていない。

われわれは今回市販の白頭翁⁸⁾ についての成分を検索し若干の知見を得たので報告する。

まず少量で予試験を行なったところ、本生薬はアルカロイド成分を含まず、サポニンと考えられる物質を多量に含有することが判明した。そこで白頭翁を最初エーテルで室温抽出し、ついでさらにメタノールで温時抽出し、

Chart 1

それぞれのエキスを Chart 1 に示すように分別を行なった。このうちエーテルエキスの中性部から sterol の混合物を得、これを実験の部に詳述するごとく bromide を経由して stigmasterol (II, R=H) と β -sitosterol (III, R=H) とをそれぞれ acetate として単離確認した。

一方メタノールエキスをベンゼンで数回温浸して少量の可溶物を除いたのちメタノール中塩酸で加水分解を行ない、多量の酸性物質を捕捉した。これをジアゾメタンでメチル化し、ついでアルミナクロマトグラフィーで分別を行なえば methyl hederagenate (IVa), $C_{31}H_{50}O_4$, mp 241—242°, $[\alpha]_D^{25} + 72^\circ$ ($CHCl_3$), および少量の methyl oleanolate (IVb), $C_{31}H_{50}O_3$, mp 200—201°, $[\alpha]_D^{25} + 75^\circ$ ($CHCl_3$) が得られる。両者はそれぞれ標品と直接比較して同定確認した。

なお同時に微量の methyl acetyloleanolate (IVc), mp 217—220°, および mp 243—246° の methyl ester も捕捉されたが、後者については微量のためその化学構造を確認することができなかった。

実験の部⁹⁾

白頭翁（細切生薬）2.5 kg を ether 5 liter で室温 1 週間浸出。これを 3 回繰返し、ether 溶液を合わせて溶媒留去し ether エキス約 24 g を得る。その後さらに約 5 liter ずつの MeOH を用いて 4 回加温抽出を行ない、MeOH 溶液は減圧で濃縮すれば MeOH エキス約 1 kg を得る。

エーテルエキスの処理 上記の ether エキスを再び ether に溶解し 3% HCl で洗ったのち 10% NaOH で抽出。アルカリ性水層は HCl 酸性に変え ether 抽出を行なえば褐色油状の酸性物質約 4 g が得られる（本物質は精査せず）。一方 ether 層は無水 K_2CO_3 で乾燥したのち溶媒留去。残渣 (7.4 g) を Al_2O_3 150 g でクロマトを行ない hexane, benzene-hexane 混液, benzene, $CHCl_3$ -benzene 混液, $CHCl_3$, MeOH- $CHCl_3$ 混液で順次溶出。

4) U.G. Fil, *Farmatsevt. Zh.*, **17** (5), 47 (1962) [*C.A.*, **59**, 5493 h (1963)].

5) S. Rolski, L. Przyborowski, *Dissertations Pharm.*, **13**, 349 (1961) [*C.A.*, **56**, 8839 a (1962)].

6) M.I. Kurilenko, *Issledovaniya v Oblasti Farm. Zaporozh. Gosudarst. Farm. Inst.*, **178** (1959) [*C.A.*, **55**, 10597 i].

7) A. Bienfait, *Bull. Ordre Pharmaciens*, **15** (42), 167 (1960) [*C.A.*, **61**, 4699 b (1964)].

8) 大阪市三国商店より購入したが、長野県産のオキナグサから調製したものであることを確認した。

9) 融点は柳本微量融点測定器で測定し、すべて未補正。

CHCl_3 —benzene (2:8) 混液で溶出される部分から結晶を析出するので、これを集め MeOH から数回再結晶すれば sterol 混合物 77 mg が得られる。これを Ac_2O —pyridine (1 ml ずつ) と室温一夜放置し、常法で処理すれば acetate 混合物, mp 124—127°, 58 mg を得る。本 acetate は核磁気共鳴 (NMR) スペクトル¹⁰⁾により stigmasteryl acetate と β -sitosteryl acetate の混合物と考えられる。

上記のクロマトにおいて benzene—hexane 溶出以後の fraction では ester と考えられる赤外 (IR) 吸収を示すので、これを全部合し (4.1 g), 5% KOH—MeOH と 6 hr 還流し加水分解を行なう。減圧で MeOH 分を留去したのち水を加えて ether で抽出、無水 K_2CO_3 で乾燥、溶媒留去し残渣 1.5 g を得る。これを Al_2O_3 20 g を用いてクロマトグラフィーを行なう (hexane, benzene, ether—benzene 混液 (1:9, 2:8, 5:5), CHCl_3 および MeOH— CHCl_3 混液で順次溶出)。

Ether—benzene 混液で溶出される fraction は放置すれば結晶化するのでこれを合し (0.70 g), Ac_2O —pyridine で常法によりアセチル化を行ない、MeOH から再結晶すれば mp 134—138° を示す結晶 0.35 g を得る。本品は Liebermann—Burchard 反応で青色から汚緑色を示し、IR および NMR スペクトルで前記の sterol acetate 混合物とはほぼ同一と考えられる。これをつぎのように分別処理する。

Stigmasteryl Acetate および β -Sitosteryl Acetate の確認 上記 sterol acetate 混合物 0.30 g を ether 15 ml に溶かし、攪拌しつつ Br_2 0.18 g の AcOH 溶液 (3.5 ml) を滴下、さらに室温にて 1 hr 攪拌を続けたのち、析出した無色結晶 (stigmasterol tetrabromide), mp 201—203° を濾取し ether で洗浄。Ether 溶液部は水洗後 2% NaOH, 1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ および水で順次洗ったのち MgSO_4 で乾燥。Ether 溶液を濃縮すれば結晶を析出するので濾取して CHCl_3 —MeOH から再結晶。mp 205—206° の無色結晶 (stigmasterol tetrabromide) を得る。総得量 66 mg。本品は NMR で 5.15, 5.25 τ に約 3 個分の水素 ($\text{CH}-\text{Br}$) のシグナルを示す。ついでこの tetrabromide (66 mg) を AcOH 4 ml に溶かし、Zn 末 250 mg を加え攪拌下 2 hr 還流。Zn 末を除いたのち水を加えて ether で抽出し、ether 溶液は 1% NaOH で洗ったのち無水 K_2CO_3 で乾燥、溶媒留去。残渣を MeOH から数回再結晶すれば無色鱗片状晶 20 mg を得る。mp 141—143°, $[\alpha]_D^{25} -56^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3)。本品は stigmasteryl acetate (II, R=Ac) 標品と混融および IR (KBr), NMR スペクトルの比較によって同定。

つぎに上記の難溶性の tetrabromide を除いた易溶部 (約 280 mg) は silica gel 5 g を用いてクロマトを行ない、最初に benzene で流出される部分 (約 140 mg) を上記と同様に AcOH 中 Zn 末 (650 mg) で還元を行ない、ここに得られる成績体 (約 100 mg) を Al_2O_3 6 g を用いて hexane からクロマト。はじめに溶出される部分 (40 mg) は TLC¹¹⁾ では β -sitosteryl acetate と一致するので、これを集め MeOH から数回再結晶すれば mp 123—125° の結晶 25 mg を得る。 $[\alpha]_D^{25} -34^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3)。本品¹²⁾ は β -sitosteryl acetate (III, R=Ac) 標品と混融するも変化なく、また IR (KBr) もまったく一致した。

MeOH エキスの処理 前記 MeOH エキス (1 kg) は 1 liter ずつの benzene で数回加温浸出し可溶性物質 (約 10 g) を除いた後、7% HCl—MeOH (約 3 liter) を加えて水浴上 6 hr 還流。冷後析出せる沈殿を濾取し MeOH および AcOEt で洗浄。難溶性の黒褐色結晶性物質 105 g を得る。この内 5.8 g をとり MeOH— CHCl_3 (1:2) 160 ml に懸濁せしめ過剰の CH_2N_2 の ether 溶液を加えて一夜放置しメチル化を行なう。溶媒および過剰の CH_2N_2 を留去した後残渣を ether に溶かして少量の黒色不溶物を濾別し、ether 溶液は 2% NaOH で洗ったのち、無水 K_2CO_3 で乾燥、溶媒留去。残渣 (5.6 g) を MeOH で再結晶すれば、ほとんど無色の針状晶、2.3 g を得る。mp 235—238°。本品はいったん Al_2O_3 クロマトにかけて精製したのち、さらに含水 MeOH で再結晶すれば mp 241—242°, $[\alpha]_D^{25} +72^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3) を示す。Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4$: C, 76.50; H, 10.36. Found: C, 76.79; H, 10.49. 本物質は methyl hederagenate (IVa) 標品と混融および IR 比較の結果、完全に同定された。一方再結晶母液部はいったん減圧で溶媒を留去し、残渣 (3.2 g) を Al_2O_3 60 g でクロマトにかけると最初に benzene および ether—benzene (1:9) で溶出される部分 (160 mg) は含水 MeOH で数回再結晶すれば mp 200—201° の無色針状晶 80 mg を得る。 $[\alpha]_D^{25} +75^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3)。Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$: C, 79.10; H, 10.70. Found: C, 78.91; H, 10.89. 本品は methyl oleanolate (IVb) の標品と混融するも変化なく、また IR スペクトル (KBr), NMR スペクトルも完全に一致する。続いて ether—benzene (3:7) および ether で溶出される部分 (2.4 g) は同様に含水 MeOH から再結晶すれば mp 238—241° の無色針状晶として methyl hederagenate (IVa), 1.8 g が捕捉される。

つぎに最初の難溶性沈殿を濾別した HCl 酸性 MeOH 溶液部は減圧で溶媒を留去し、水を加えて ether で数回抽出。難溶性の沈殿がさらに残存するので、AcOEt を用いてさらに数回抽出を行なう。AcOEt 抽出液は水洗したのち無水 MgSO_4 で乾燥し溶媒留去。残渣を CHCl_3 —MeOH 混液に溶かし活性炭処理したのち再結晶すれば淡褐色結晶 9.4 g を得る。本結晶はその一部を CH_2N_2 で methyl ester となし上記と同様に Al_2O_3 クロマトで精製を行なうことによって、少量の oleanolic acid を含む hederagenin であることが判明した。

10) Varian Associate Recording Spectrometer A-60 により tetramethylsilane を内部基準として CDCl_3 中で測定。

11) TLC (薄層クロマトグラフィー): Merck, Aluminium oxide G acc. to Stahl および Merck, Kieselgel G acc. to Stahl を使用。 H_2SO_4 あるいは $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ で呈色。

12) 本品は NMR スペクトルでみると、約 5% 程度の stigmasteryl acetate が混合しているものと判定される。

一方 ether 抽出部は上記の AcOEt 抽出部の再結晶母液と合し、いったん多量の ether に溶かし 10% NaOH で抽出。この際 ether 層からは約 9 g の油状中性物質が得られるが精査せず、NaOH 抽出液は HCl 酸性に変えて再び ether で抽出。無水 MgSO_4 で乾燥、溶媒留去。残渣を CHCl_3 -MeOH (2:1) 300 ml に溶かし、過剰の CH_2N_2 -ether 溶液を加えて一夜放置後、溶媒および過剰の CH_2N_2 を留去し、残留物を ether に溶かし 2% NaOH で洗い、 K_2CO_3 乾燥して溶媒留去すれば結晶性残渣 13 g を得る。これを Al_2O_3 クロマト (150 g) に付し benzene で溶出し無色油状物 (5.3 g) を得る。続いて CHCl_3 -benzene (1:9—5:5) で褐色非結晶性物質を洗い出したのちに CHCl_3 で溶出する。 CHCl_3 溶出部 (1.4 g) は含水 MeOH から再結晶を行なえば methyl hederagenate (IVa), mp 241—242°, 0.9 g を得る。一方、上記の benzene 溶出部 (5.3 g) は Al_2O_3 130 g で再びクロマトを行ないつぎの fraction にわけける。

Fr. 1	hexane	0.47 g
Fr. 2	benzene-hexane (2:8—5:5)	0.4 g
Fr. 3	benzene	0.8 g
Fr. 4	CHCl_3 -benzene (1:9—5:5)	1.7 g

Fr. 2 はさらに Al_2O_3 クロマト (20 g) を行ない、hexane で展開。はじめに油状物質が溶出されるが、最後に溶出される fraction (35 mg) から少量の結晶を析出。これを MeOH-ether から再結晶すれば、mp 217—220° の結晶 3 mg が得られる。 $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$: 1720, 1260. MS^{13} : 512 (M^+). NMR signals τ : 9.27, 9.14, 9.07, 8.87 (seven tert. Me), 7.95 (3H, OAc), 6.38 (3H, OMe), 5.50 (1H, CH-OAc), 4.70 (1H, C=CH). 本品は混融および IR(KBr) スペクトル比較によって methyl acetyloleanolate (IVc) 標品と同定。

Fr. 3 も同様に Al_2O_3 45 g で再クロマトを行ない benzene-hexane (1:9) 混液で展開。流出物に MeOH を加え放置すると一部結晶を析出するので。これを集める (約 30 mg)。このものは TLC で 2 ケの spot を与えるので、preparative TLC にかけて分別を行なう。すなわち silicagel の薄層を用いて CHCl_3 -benzene (2:1) で展開したのち、吸着された物質はそれぞれ CH_2Cl_2 で溶出して回収する。上の spot に対応する物質 (9 mg) は IR で methyl acetyloleanolate (IVc) と合致。一方、下の spot に対応する部分 (13 mg) は MeOH から 2 回再結晶を行なえば無色鱗片状晶、mp 243—246°, 7 mg を与える。 $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$: 1720 ($-\text{COOCH}_3$). 本物質は微量のため化学構造を確認することができなかった。

Fr. 4 は TLC で大部分 methyl oleanolate であることが判明し、さらに Al_2O_3 クロマト (30 g) により精製したのち、含水 MeOH で再結晶を行ない mp 190—195° の methyl oleanolate, 1.14 g を得た。

謝辞 本研究に際し御指導いただいた京都薬大学長 富田 真雄先生に感謝致します。また methyl hederagenate 標品を分与された大阪大学 吉岡一郎教授、北川勲助教授、NMR スペクトルを測定された本学部 新宮徹朗博士および大河美都子嬢、マスペクトルを測定された本学部 加藤旭氏、元素分析を担当された本学微量分析センターの方々に深謝いたします。