オタネニンジン地上部の成分研究 (第2報¹⁾) フラボノイド成分について²⁾

小松曼著, 富森 毅, 牧口裕貴子

大正製薬株式会社研究所³⁾

Studies on the Constituents of the Herb of *Panax ginseng* C. A. MEYER. II.¹⁾ On the Flavonoid Constituents²⁾

MANKI KOMATSU, TSUYOSHI TOMIMORI, and YUKIKO MAKIGUCHI

Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.³⁾

(Received October 17, 1968)

The flavonoid constituents of *Panax ginseng* C.A. MEYER were studied. A new natural flavonoid, named panasenoside (III), $C_{27}H_{30}O_{16} \cdot H_2O$, mp 225—228° (decomp.), was isolated from this plant, together with kaempferol (I) and trifolin (II) (kaempferol-3-O-galactoside).

The hydrolysis of III with diluted acid produced one mole each of kaempferol, glucose and galactose. The position of the sugar binding was proved to be on 3, since complete methylation of III with diazomethane and subsequent hydrolysis afforded 4',5,7-tri-O-methylkaempferol. III was also partially hydrolysed with a glycosidase of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* TRR-18 ("Vernase"), and trifolin was obtained.

The panasenoside formula is therefore kaempferol-3-O-glucogalactoside.

前報¹⁾において著者等はオタネニンジン, *Panax ginseng* C.A. MEYER 地上部の非フラボノイド成分を検索し, エーテルエキスをより脂肪酸, nonacosane, 1-octacosanol および β -sitosterol を, またメタノールエキスをより得られるサボゲニンとして panaxadiol, panaxatriol および olenolic acid をそれぞれ単離, 証明した。今回, さらに同植物についてフラボノイド成分の検索を試み若干の知見を得たので報告する。

まず Chart 1 に示すように, 信州産オタネニンジンの乾燥茎, 葉部をメタノールエキスとなし, その水溶液をエーテルで脱脂した後ポリアミドカラムに通じると主としてフラボノイドが吸着される。吸着部をメタノールで溶出して得られる淡黄色粉末はなお若干のサボニンが混在しているため, これを再び少量のメタノールに溶解し, 酢酸鉛のメタノール溶液を加え, 生じる沈澱を常法により脱鉛すると約 0.2% の収率でフラボノイドの混合物が得られる。本品は薄層クロマトグラフィー (TLC) で3種のフラボノイドの存在が認められたため (Fig. 1), これをシリカゲルクロマトグラフィーにより分画し, フラボン I, II および III をそれぞれ単離した。

フラボン I は黄色針状晶, mp 278° で過クロール鉄反応, Mg-HCl 反応, ジルコン-クエン酸反応⁴⁾ はいずれも陽性, Zn-HCl 反応は陰性を示す。紫外線吸収 (UV) スペクトルは Kaempferol のそれ⁵⁾ に一致し, またアセチル化により tetraacetate, $C_{23}H_{18}O_{10}$, mp 187° を与える。以上の性状は kaempferol の性状に一致しているため, 標品と混融した結果融点降下を認めず, 赤外吸収 (IR) スペクトル, UV, TLC の結果もすべて一致したので本物質は kaempferol (I) と同定した。

フラボン II は 50% メタノールから再結晶すると mp 243° (decomp.), 組成 $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$ に一致する淡黄色結晶性粉末を与えるが, エタノールから再結晶すると mp 260° (decomp.) を示す。過クロール鉄反応, Mg-HCl 反応, Zn-HCl 反応はともに陽性でジルコン-クエン酸反応⁴⁾ は陰性を示す。本品を 5% 硫酸で加水分解すると mp 278° の黄色針状晶を与え, これは混融試験, IR, UV および TLC の結果 kaempferol と同定した。

1) 第1報: 小松曼著, 富森 毅, 生薬, 20, 21 (1966) を第1報とする。

2) 日本生薬学会福岡大会で発表, 福岡, 1968年9月。

3) Location: No. 34-1, Takata 3-chome, Toshima-ku, Tokyo.

4) L. Hörhammen, R. Hänsel, Arch. Pharm., 285, 426 (1953).

5) L. Jurd, "The Chemistry of Flavonoid Compounds," T.A. Geissman, Ed., Pergamon Press, London, 1962, p. 107.

Chart 1. Extraction and Isolation of Flavonoids

Fig. 1. Thin-Layer Chromatograms

plate: Silicagel G

solvent: AcOEt-MeCOEt-HCO₂H-H₂O (5:3:1:1)color reagent: 5% Na₂CO₃1. total flavonoids of *Panax ginseng* (leaves and stems)2. total flavonoids of *Panax ginseng* (buds)3. hydrolysate of pansenoside (III) with a glycosidase of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* TRR-18 ("Vernase")

え、本品は文献記載の 4',5,7-tri-O-methylkaempferol⁶⁾ に融点が一致する。またフラボン II はアセチル化により heptaacetate, C₃₅H₃₄O₁₈, mp 105—110° を与えその核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは τ 7.6—8.1 (21H) に 7 個のアセチル基の存在を示している。以上の結果からフラボン II は kaempferol-3-O-mono-galactoside (trifolin) と考えられたので標品⁷⁾ と混融したところ同一の分解点を示し、また TLC, PPC, IR および UV スペクトルの結果も完全に一致したので本物質は trifolin (II) と同定した。

フラボン III はオタネニンジン茎、葉部の主フラボノイドでエタノールから再結晶すると mp 225—228° (decomp.), 組成 C₂₇H₃₀O₁₆·H₂O に一致する黄色結晶性粉末を与える。過クロール鉄反応, Mg-HCl 反応, Zn-HCl 反応, Gibbs 反応はいずれも陽性, ジルコン-クエン酸反応⁴⁾ は陰性を示す。UV スペクトルは trifolin の

6) 中林敏郎, 農化, 26, 539 (1952).

7) 東京大学理学部名誉教授 服部静夫博士から恵与されたもので, C₂₁H₂₀O₁₁·3H₂O, mp 260° (decomp.). S. Hattori, M. Hasegawa, M. Shimokoriyama, *Acta Phytochim.*, 13, 99 (1943).

それに類似し、5% 硫酸で加水分解すると mp 278° の黄色針状晶を与え、これは混融試験、IR、UV および TLC の結果 kaempferol と同定した。また糖フラクションは PPC および TLC の結果 D-glucose と D-galactose を証明した。フラボン III はアセチル化により decaacetate, mp 115—119°, $C_{47}H_{50}O_{26}$ を与えその NMR スペクトルは τ 7.57—8.12 (30H) に 10 個のアセチル基, τ 4.2—6.1 (14H) に糖部の $-CH_2-$ および $>CH-$ と考えられるシグナルが認められる。また τ 2.79, 3.16 の一対の doublet (2H, $J=2.5$ cps) は kaempferol 核の 8 および 6 位のプロトンに, τ 1.95, 2.79 の一対の doublet (4H, $J=10$ cps) は kaempferol 核の 2',6' および 3',5' のプロトンにそれぞれ帰属される。以上のことからフラボン III は kaempferol に glucose と galactose がそれぞれ 1 モルずつ結合した配糖体であることが明らかとなった。また decaacetate の NMR スペクトルにおいて τ 7.57 (3H), τ 7.66 (6H) のシグナルはフェノール性水酸基のアセチル基が 3 個存在することを示唆し、これと上記の Mg-HCl 反応 (+), Zn-HCl 反応 (+)⁸⁾ およびジルコン-クエン酸反応 (-)⁴⁾ を示す点を考え合わせれば 2 個の糖は biose として kaempferol の 3 位に結合していると考えられる。このことはフラボン III をジアゾメタンで過クロール鉄反応陰性となるまでメチル化した後酸加水分解すると 4',5,7-tri-O-methylkaempferol を与えることから証明される。したがってフラボン III の構造は kaempferol-3-O-glucogalactoside あるいは kaempferol-3-O-galactoglucoside のいずれかとなる。つぎに糖の結合順序を決定するため酵素分解を行なった。すなわちフラボン III は市販の β -glucosidase (Almond emulsin) あるいは β -galactosidase (from liver) では加水分解されず, naringinase では kaempferol にまで水解されるが, *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* TRR-18 (IAM 2800, ATCC 14156) の産生する酵素 (Vernase)⁹⁾ を用い pH 5.9 Michaelis の緩衝液中一夜反応させると部分加水分解され, その分解物は Fig. 1 に示すようなクロマトグラムを与えた。主分解物をシリカゲルクロマトグラフィーにより単離し 50% メタノールから再結晶すると mp 243° (decomp.), 組成 $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$ に一致する淡黄色結晶性粉末を与え, 本品はフラボン II と混融して分解点降下を認めず, また PPC, TLC, UV および IR スペクトルの結果も完全に一致したので部分加水分解物は trifolin と同定した。以上の事実からフラボン III は trifolin にさらに glucose が 1 個結合した kaempferol-3-O-glucogalactoside (III) であることが明らかになった。本品はいまだ文献上記載のない新物質であるのでこれを panasenoside と命名する。

またオタネニンジンの蕾部についても, 茎, 葉部の場合と同様処理し, kaempferol, trifolin および panasenoside をそれぞれ単離, 証明した。またオタネニンジン地下部 (薬用人参) についても同様処理したが, フラボノイドは得られなかった。したがってこれら 3 種のフラボノイドはオタネニンジン地上部にのみ存在するものと考えられる。

実 験 の 部¹⁰⁾

PPC および TLC PPC は東洋汙紙 No. 50 を用い上昇法, 展開溶媒は 15% AcOH (solv. 1); 60% AcOH (solv. 2); *n*-BuOH-AcOH- H_2O (4:1:5, 上層) (Solv. 3); 85% PhOH (solv. 4); *n*-BuOH-pyridine- H_2O (10:3:3) (solv. 5) で行なった。

TLC は kieselgel G nach Stahl (Merck) を用い, 140°, 1.5 hr 加熱乾燥したプレートで, AcOEt-MeCOEt- HCO_2H-H_2O (5:3:1:1) を展開溶媒とするもの (TLC-1); ホウ酸含有シリカゲルプレート¹¹⁾ で benzene-AcOH-MeOH (1:1:3) を展開溶媒とするもの (TLC-2); アビセル SF を用い 100°, 30 min 加熱乾燥したプレートで AcOEt-iso-PrOH-pyridine- H_2O (7:3:2:2) を展開溶媒とするもの (TLC-3) および AcOEt-pyridine-AcOH- H_2O (30:11:1:6) を展開溶媒とするもの (TLC-4) で行なった。フラボノイドの発色は 5% Na_2CO_3 水溶液をスプレーして発色させた。糖の検出は PPC および TLC-3, 4 ではアニリンフタレートで, また TLC-2 ではアニスアルデヒド-硫酸により発色させた。

フラボノイドの分離 長野県信州人参農業協同組合より入手したオタネニンジン乾燥茎, 葉部および蕾部を細切し, それぞれ MeOH で 4 回冷浸しエキスを抽出。本エキスを水に溶解し, エーテルで振とうし, エーテル可溶部を除去する。水層はポリアミドカラムに通じ水洗, 次いで MeOH で溶出する。MeOH 溶出液を濃縮し, これに $Pb(OAc)_2/MeOH$ を加え, 生じる沈殿を濾取し, 常法により H_2S で脱鉛すると黄色粉末を与える。収率, 茎, 葉部に対し約 0.2%, 蕾部に対し約 0.1%。本品をそれぞれ約 100 倍量のシリカゲルを用い AcOEt-acetone-AcOH- H_2O (50:30:2:10) で展開, TLC-1 で check しながら分画。

8) 清水正夫, 薬誌, 72, 338 (1952)。

9) 野上 寿, 岩崎由雄, 波止 保, 田中一郎, 柳沢崇明, 沢田二郎, 薬誌, 80, 371 (1960)。

10) NMR スペクトルは Hitachi Perkin-Elmer Spectrometer (Model R-20) で測定。TMS を内部基準とする。

11) G. Pastuska, Z. Anal. Chem., 179, 427 (1961)。

フラボン I (kaempferol) EtOH より再結晶, 黄色針状晶, mp 278°. FeCl₃ (+), Mg-HCl (+), Zn-HCl (-), ジルコン-クエン酸⁴⁾ (+). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ : 268, 368; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{NaOAc}}$ m μ : 275, 384; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{H}_3\text{BO}_3-\text{NaOAc}}$ m μ : 272, 374; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ m μ : 273, 306, 356, 430. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3460—2600 (broad) (chelated OH); 1660 (conjugated CO); 1610, 1560 (aromatic C=C). PPC: R_f 0.04 (solv. 1), 0.50 (solv. 2), 0.88 (solv. 3). TLC-1: R_f 0.95. 本品は kaempferol の標品と混融, IR, UV, TLC, PPC において一致.

フラボン I のアセチル化: Ac₂O+pyridine で常法によりアセチル化. MeOH より再結晶, mp 187°. FeCl₃ (-). Anal. Calcd. C₂₃H₁₈O₁₀·1/2H₂O: C, 59.61; H, 4.13. Found: C, 59.61; H, 3.84. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3500 (weak, crystal water); 1780 (acetyl); 1650, 1630 (conjugated CO); 1603 (sh.); 1580 (aromatic C=C). NMR (τ): 7.69 (9H, singlet, 3×-OCOCH₃); 7.60 (3H, singlet, -OCOCH₃); 3.14, 2.68 (2H, doublet, J=2.5 cps, C-6-H および C-8-H); 2.77, 2.16 (4H, doublet, J=9 cps, C-3',5'-H および C-2',6'-H).

フラボン II (Trifolin) 50% MeOH より再結晶, 淡黄色結晶性粉末, mp 243° (decomp.). Anal. Calcd. C₂₁H₂₀O₁₁·H₂O: C, 54.08; H, 4.75. Found: C, 53.95; H, 4.80. EtOH より再結晶すると mp 260° (decomp.) の淡黄色結晶性粉末を与える. FeCl₃ (+), Mg-HCl (+), Zn-HCl (+), ジルコン-クエン酸⁴⁾ (-). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 268 (4.20), 353 (4.12); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{NaOAc}}$ m μ : 277, 376; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{H}_3\text{BO}_3-\text{NaOAc}}$ m μ : 272, 360; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ m μ : 276, 306, 352, 405. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3460, 3200—2600 (broad) (chelated OH); 1665 (conjugated CO); 1610, 1600, 1570 (aromatic C=C). PPC: R_f 0.41 (solv. 1), 0.70 (solv. 2), 0.63 (solv. 3). TLC-1: R_f 0.73. 本品 (mp 260°, decomp.) は trifolin の標品と混融, IR, UV, PPC, TLC-1 にて一致.

フラボン II の酸加水分解——フラボン II 200 mg に 5% H₂SO₄ 50 ml を加え, 油浴上 (120°) 2 hr 加熱. 冷時析出する黄色結晶を MeOH より再結晶, mp 278° の黄色針状晶. Kaempferol の標品と混融, IR, UV, PPC にて一致. Kaempferol を除去した母液は Ba(OH)₂ で中和, 母液を Amberlite IR-120 (H 型) および Amberlite IR-4B (OH 型) カラムに通じ, 通過部を減圧濃縮, シロップ状の糖フラクションを得. PPC: R_f 0.422 (solv. 4), 0.16 (solv. 5). TLC-2: R_f 0.57, TLC-3: R_f 0.2, TLC-4: R_f 0.07. いずれも D-galactose と比較一致.

フラボン II のアセチル化——Ac₂O+pyridine で常法によりアセチル化. n-Hexane-CHCl₃ 混液より再結晶, 無色微細針状晶, mp 105—110°. Anal. Calcd. C₃₅H₃₄O₁₈: C, 56.60; H, 4.61. Found: C, 56.97; H, 4.68. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1780, 1760 (acetyl); 1650, 1635 (conjugated CO); 1590 (sh.); 1510 (aromatic C=C). NMR (τ): 8.1 (3H, singlet, -OCOCH₃); 8.01 (3H, singlet, -OCOCH₃); 7.89 (6H, singlet, 2×-OCOCH₃); 7.68 (6H, singlet, 2×-OCOCH₃); 7.49 (3H, singlet, -OCOCH₃); 6.20 (2H, singlet, -CH₂-O-); 4.55—4.9 (5H, >CH-O-); 3.2, 2.72 (2H, doublet, J=2.5 cps, C-6-H および C-8-H); 2.8, 1.95 (4H, doublet, J=9 cps, C-3',5'-H および C-2',6'-H).

フラボン II より 4',5,7-tri-O-methylkaempferol の生成——フラボン II を MeOH に溶解し, CH₂N₂ のエーテル溶液を加え FeCl₃ (-) となるまで放置. 溶媒を留去し残渣を 5% H₂SO₄ で 1 hr 加水分解. 冷時析出する微黄色粉末を 50% EtOH より再結晶, mp 148—150°. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ : 259, 357; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ m μ : 268, 418.

フラボン III (Panasenocide) EtOH より再結晶, 黄色結晶性粉末, mp 225—228° (decomp.). Anal. Calcd. C₂₇H₃₀O₁₆·H₂O: C, 51.59; H, 5.13. Found: C, 51.38; H, 5.29. FeCl₃ (+), Mg-HCl (+), Zn-HCl (+), Gibbs (+), ジルコン-クエン酸⁴⁾ (-). PPC: R_f 0.63 (solv. 1), 0.77 (solv. 2), 0.38 (solv. 3). TLC-1: R_f 0.42. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 268 (4.33), 353 (4.26); $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{NaOAc}}$ m μ : 277, 376; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{H}_3\text{BO}_3-\text{NaOAc}}$ m μ : 272, 360; $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}-\text{AlCl}_3}$ m μ : 276, 306, 352, 405. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3300—2600 (broad) (OH); 1660 (conjugated CO); 1605, 1580 (sh.), 1500 (aromatic C=C).

フラボン III の酸加水分解 フラボン II と同様 5% H₂SO₄ で処理して kaempferol を単離, 標品と混融, IR, UV, TLC-1, PPC にて一致. 糖フラクション: PPC: R_f 0.422, 0.385 (solv. 4); 0.16, 0.187 (solv. 5). TLC-2: R_f 0.57, 0.62; TLC-3: R_f 0.2, 0.25; TLC-4: R_f 0.07, 0.1 いずれも D-galactose (前者の R_f 値) および D-glucose (後者の R_f 値) と比較一致.

フラボン III のアセチル化 Ac₂O+pyridine で常法によりアセチル化. n-Hexane-CHCl₃ 混液より再結晶, 無色微細針状晶, mp 115—119°. Anal. Calcd. C₄₇H₅₀O₂₆: C, 54.76; H, 4.89. Found: C, 54.60; H, 4.98. IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1780 (sh.), 1755 (acetyl); 1645 (sh.); 1630 (conjugated CO); 1590 (sh.); 1510 (aromatic C=C). NMR (τ): 8.12 (3H, singlet, -OCOCH₃); 8.01 (12H, singlet, 4×-OCOCH₃); 7.95 (3H, singlet, -OCOCH₃); 7.90 (3H, singlet, -OCOCH₃); 7.66 (6H, singlet, 2×-OCOCH₃); 7.57 (3H, singlet, -OCOCH₃); 4.2—6.1 (14H, -CH₂-O- および >CH-O-); 2.79, 3.16 (2H, doublet, J=2.5 cps, C-8-H および C-6-H); 1.95, 2.79 (4H, doublet, J=10 cps, C-2',6'-H および C-3',5'-H).

フラボン III より 4',5,7-Tri-O-methylkaempferol の生成 フラボン II と同様, CH₂N₂ で処理して得た FeCl₃ (-) のメチル化体を 5% H₂SO₄, 150°, 1 hr 加水分解. 冷時析出する微黄色粉末を 50% EtOH より再結晶, 微黄色針状晶, mp 150°. 本品はフラボン II (trifolin) を同様処理して得た 4',5,7-tri-O-methylkaempferol と混融, IR, UV にて一致.

フラボン III の酵素分解 フラボン III 100 mg, vernase (*Aspergillus oryzae* var. *microsporus* TRR-18 の産生する酵素⁹⁾) 50 mg を pH 5.9 の Michaelis 緩衝液 (AcOH-NaOAc) 20 ml に溶解し, 37°, 20 hr 放置. 反

応液をポリアミド 10 g のカラムに通じ水洗, 次いで MeOH で溶出, MeOH 留去. 残渣は TLC-1 で R_f 0.95 (A, trace), 0.73 (B, main), 0.42 (C, trace) にスポットを示す. シリカゲルクロマトグラフィーで分画. A は TLC-1, UV で kaempferol に一致. C は UV でフラボン III に一致. B は 50% MeOH より再結晶, 淡黄色結晶性粉末, mp 243° (decomp). *Anal.* Calcd. $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$; C, 54.08; H, 4.75. Found: C, 53.95; H, 4.76. 本品はフラボン II (trifolin) と混融, IR, UV, PPC にて一致. また naringinase を用いて同条件で酵素分解を行なうと反応液より黄色針状晶析出. IR, UV, TLC-1 で kaempferol に一致. β -Glucosidase (市販の emulsin) および β -galactosidase (市販品) では原料回収.

謝辞 本研究の機会を与えられた大正製薬株式会社 上原常務ならびに終始御鞭撻を賜った井川俊一常務, 田中一郎研究部長に厚く御礼申し上げます. また kaempferol および trifolin の標品を恵与された東京大学理学部名誉教授 服部静夫博士, 原料を斡旋された長野県技師 大隅敏夫氏, naringinase を恵与された大阪市立工業研究所 福本寿一郎博士, 岡田茂孝博士に深謝いたします. また酵素分解について御助言を与えられた当社微生物研究室の沢田二郎博士ならびに元素分析, IR, UV, NMR スペクトルの測定をされた当社分析研究室の諸氏に感謝いたします.