茯苓のトリテルペノイド (第1報¹⁾)

兼松明子, 名取信策

国立衛生試験所²⁾

Triterpenoids of Hoelen (fuling), Sclerotia
of *Poria cocos* (Schw.) Wolf. I.

AKIKO KANEMATSU and SHINSAKU NATORI

National Institute of Hygienic Sciences²⁾

(Received December 3, 1969)

The triterpenoid fraction of Hoelen (茯苓), sclerotium of *Poria cocos* (Schw.) Wolf., was found to contain pachymic acid (IIIa), tumulosic acid (IVa), and a new triterpene carboxylic acid, 3 β -hydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid (Va). Hoelens from various districts were comparatively examined by thin-layer and gas-liquid chromatography. The culture of the fungus was also analysed.

茯苓は主にマツ属の根に寄生するマツホド *Poria cocos* (Schw.) Wolf. (syn. *Pachyma hoelen* RUNPH.) (サルノコシカケ科) の菌核³⁾ で、効用として「治小便不利、水腫脹満、泄瀉、停飲、淋濁、惊悸等症」と記され^{4,5)} 漢方処方では常用される生薬である。

茯苓の成分の化学的研究は古くから行なわれているが、多糖体として、pachyman が分離され⁶⁾ またステロイド・4環トリテルペノイド成分として、ergosterol⁷⁾ (I), eburicoic acid⁸⁾ (IIa), pachymic acid⁹⁾ (IIIa) の分離と、IIIa が tumulosic acid (IVa) の 3 β -O-acetate であることの証明¹⁰⁾ が報告されている。また *Poria cocos* の培養菌体は、その菌株により IIa と IVa を産生するものがあることが報告されている。¹¹⁾ しかしながら当時の分離技術によっては、そのステロイド・トリテルペノイド成分の全般について検討が行なわれたわけではなく、精製が容易なものについて研究が行なわれていると考えられるので、改めて検索を行なった結果について報告する。

著者らは、市場品韓国産茯苓を用い、エキス量、各エキスの性状を薄層クロマトグラフィー (以下 TLC), ガスクロマトグラフィー (以下 GLC) を用いて検索し、トリテルペノイド成分を明らかにするとともに、各地に産する茯苓のトリテルペノイド成分の比較を行なった。また *Poria cocos* の2菌株を培養し、そのトリテルペノイド成分をあわせて検索した。

まず現在わが国の市場の大部分をしめる韓国産茯苓をヘキサン、エーテル、アセトン、メタノールを用いて順次抽出し、各エキスを H₁—M₂ を得、TLC (Fig. 1) により性状を調べた。各エキス量は Table I に掲げる通りである。

1) 日本生薬学会岐阜大会, 岐阜, 1967年10月; 同福岡大会, 福岡, 1968年8月で発表。

2) Location: Kamiyoga-1-chome, Setagaya-ku, Tokyo.

3) 日野 巖, 植研, 13, 672 (1927); 橋本 亮, 植研, 13, 824 (1927).

4) 中国医学科学院薬物研究所等編, “中薬志,” III, 人民衛生出版社, 北京, 1961.

5) 南京薬学院薬材学教研組編, “薬材学,” 人民衛生出版社, 北京, 1961.

6) 武田憲治, 農化, 10, 679 (1934); H. Saito, A. Misaki, T. Harada, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1261 (1968).

7) 桜井善次郎, 日本薬報, 第11年, 第8号, 25 (昭和11). 同年日本薬学会総会講演.

8) 伊勢田 駿, 柳下一愛, 薬誌, 76, 970 (1956).

9) 中西莊吉, 山本道子, 池田富久子, 薬誌, 59, 725 (1939).

10) S. Shibata, S. Natori, K. Fujita, I. Kitagawa, K. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 6, 608 (1958).

11) L.A. Cort, R.M. Gascoigne, J.S.E. Holker, B.J. Ralph, A. Robertson, J.J.H. Simes, *J. Chem. Soc.*, 1954, 3713.

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Extracts of Hoelen

plate: silica-gel H, solvent: *n*-hexane-AcOEt (7:3)
color reagent: 20% H_2SO_4

H_1, H_2 に TLC, GLC より主として ergosterol (I) からなるステロイド成分, E_1, E_2 から TLC における挙動および Na と塩を作ること, また従来のトリテルペノイドの報告から, 酸性トリテルペノイドと考えられる結晶を得た. A_1-M_2 は赤褐色飴状物質で, M_1, M_2 を酸およびアルカリによる加水分解を行なったが, いずれもフェーリング試薬陽性の物質を認めただけで, 糖類の存在するほかに, ステロイド・トリテルペノイド類が配糖体として含有されていることは考えられない結果を得た.

E_1, E_2 に認められた結晶を同定する目的で, 茯苓をエーテルで抽出し, エーテルエキスをジアゾメタンでメチル化し, アルミナによるカラムクロマトグラフィーを行なうと, 3 種の結晶が単離され, 流出順に結晶 a, b, c とした.

TABLE I. Extraction of Hoelen

	Solvent		Yield
H_1	<i>n</i> -hexane	a	0.05%
H_2	<i>n</i> -hexane	b	0.10
E_1	ether	a	0.50
E_2	ether	b	0.05
A_1	acetone	a	0.05
A_2	acetone	b	0.03
M_1	MeOH	a	0.30
M_2	MeOH	b	0.40

a : standing at room temperature for ca. 20 hr
b : reflux for ca. 5 hr

結晶 a は mp 182—183°, $[\alpha]_D +38.9^\circ$ ($CHCl_3$) を示す無色針状晶として収率 0.102% で得られ, 赤外線吸収スペクトル (以下 IR), 核磁気共鳴スペクトル (以下 NMR) より, $>C=CH_2$ をもつ monohydroxytriterpene carboxylic acid の methyl ester monoacetate であることがわかったので, 常法によりアセチル化すると mp 159.5—160°, $[\alpha]_D +7.7^\circ$ ($CHCl_3$) の無色針状晶を与えることから, methyl pachymate (IIIb) であると推定し, 標品との混融, TLC, GLC, IR の比較で同定した.

結晶 c は mp 162—163°, $[\alpha]_D +24.1^\circ$ ($CHCl_3$) を示す無色針状晶として収率 0.004% で得られ, IR, NMR から methyl pachymate (IIIb) の C-3 位の脱アセチル体である methyl tumulosate (IVb) であると推定し, 標品との混融, TLC, GLC, IR の比較で同定した. また常法によりアセチル化したところ, mp 159.5—160°, $[\alpha]_D +8.3^\circ$ ($CHCl_3$) の無色針状晶を与え, 結晶 a-acetate すなわち, methyl acetylpachymate (IIIc) と比較して, 混融して融点降下なく, TLC, GLC, IR も一致した. なお tumulosic acid (IVa) が天然の *Poria cocos* の菌核から得られたことは, はじめてである.

Methyl pachymate (IIIb), methyl tumulosate (IVb) とともに紫外線吸収スペクトル (以下 UV) を測定すると λ_{max} 236, 244, 252 m μ に lanostane type の $\Delta^7,9(11)$ -diene にみられる特性吸収を示し, それぞれ対応する dehydro 体との混合物であり, 吸収強度から IIIb は約 10%, IVb は約 30% の dehydro 体を含むものと考えられる.¹²⁾

結晶 b は mp 142—142.5°, $[\alpha]_D +42^\circ$ ($CHCl_3$) を示す無色針状晶として 0.008% の収率で得られ, methyl

12) G. Ourisson, P. Crabbé, O.R. Rodig, "Tetracyclic Triterpenes," Hermann, Yorkshire, 1964.

3 β -hydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oate (Vb) と決定されたが、詳細は第 2 報で報告する.¹³⁾

以上茯苓のステロイド・トリテルペノイド成分としては、既報の ergosterol⁷⁾ (I), pachymic acid⁹⁾ (IIIa) のほか、tumulosic acid (IVa), 3 β -hydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid (Va) がその大部分を占め、今回材料として用いた韓国産については、eburicoic acid (IIa) は GLC のレベルでも存在が認められ難いという結果を得た。

次に本邦各地に産する茯苓（千葉県産、静岡県産、香川県産、種子島産）、台湾市場品、中国産茯苓 4 種および今回材料とした韓国産茯苓を使用し、それぞれエーテルで抽出し、エーテルエキスをヘキサン可溶部と不溶部に分画し、不溶部をジアゾメタンで処理後、TLC (Fig. 2), GLC (Fig. 3) を行ない比較した。また同時に熊本産茯苓のトリテルペノイド画分⁸⁾を伊勢田博士よりいただき、ジアゾメタンで同様に処理し、TLC (Fig. 2), GLC (Fig. 3) を行なった。

GLC (Fig. 3) において熊本産茯苓をのぞき、いずれも methyl pachymate (IIIb) の含有が認められたが、台湾市場品、中国産、韓国産では、その他に主に methyl tumulosate (IVb) および methyl 3 β -hydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oate (Vb) に相当する *t_R* をもつピークしか認められないのに比較して、本邦各地茯苓は複雑なガスクロマトグラムを与え、そのトリテルペノイド成分組成に違いがあることが示された。しかし methyl eburicoate (IIb) は熊本産茯苓以外は存在が認め難い。なお種子島産茯苓から methyl pachymate (IIIb), methyl tumulosate (IVb) が単離された。また *Poria cocos* の 2 菌株 Pa36a, Pa36d を培養し、トリテルペノイド成分をメチルエステルとして検索を試みたところ、Pa36a からは methyl eburicoate (IIb) (収率 7.94%) を得、また Pa36d からは methyl pachymate (IIIb) (収率 0.25%), methyl tumulosate (IVb) (収率 0.65%) が得られた。Robertson ら¹¹⁾ は *Poria cocos* を培養し strain によって、eburicoic acid (IIa) を産生する菌と tumulosic acid (IVa) を産生する菌があると報告しているが、培養菌体から pachymic acid (IIIa) が得られたのは今回がはじめてである。

菌類の下等なものにおいては、菌株によってその代謝産物に違いがあるといわれているが、担子菌類である

13) A. Kanematsu, S. Natori, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 18, 779 (1970).

Fig. 2. Thin-Layer Chromatogram of the Mixture of Triterpene Methyl Esters from Hoelen

plate: silica-gel H, solvent: *n*-hexane-AcOEt (7:3), color reagent: vanillin-phosphoric acid

Poria cocos において, Robertson らの指摘のごとく, あるいは産地別茯苓, 培養菌体のトリテルペノイド成分の検索の結果から, strain によって産生するトリテルペノイドに相違が認められたが, このことはさらに宿主, 季節などの検討が必要と考えられる。

実験の部¹⁴⁾

茯苓エキス量の測定 茯苓(市場品) 200 g を粉末にし, *n*-hexane 1 liter で 17 hr 冷浸後, 濾過。溶媒留去。 *n*-Hexane ext. (H₁) 0.1 g を得, 抽出残渣をさらに *n*-hexane 1 liter で 5 hr 還流後, 濾過。溶媒留去。 *n*-Hexane ext. (H₂) 0.2 g を得る。抽出残渣をさらに溶媒を順次, ether, acetone, MeOH にかえて同様に ca. 20 hr 冷浸し, ついで ca. 5 hr 還流。各々, ether ext. (E₁) 1 g, ether ext. (E₂) 0.1 g, acetone ext. (A₁) 0.05 g, acetone ext. (A₂) 0.05 g, MeOH ext. (M₁) 0.6 g, MeOH (M₂) 0.8 g を得る。

抽出 茯苓(市場品) 5 kg を ether 18 liters 3 hr, さらに 18 liters, 2 hr 還流。減圧下濃縮。ca. 1 liter に濃縮すると結晶析出。濾取。3.5 g。CH₂N₂ でメチル化後, TLC, GLC で結晶 a (methyl pachymate) と一致を確認。濾液をさらに減圧下濃縮。茶褐色鉛状物 29 g を得, *n*-hexane 1 liter で抽出, *n*-hexane ext. 2.65 g を得る。 *n*-Hexane 不溶部に CH₂N₂-ether 溶液を加えメチル化後, 不溶物を濾去し, ether ext. 15.25 g を得る。

Ergosterol (I) の単離 *n*-Hexane ext. 2.65 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Mallinckrodt, Silicic acid: 200 g) で分画。Benzene 画分より結晶を得, MeOH-*n*-hexane から再結晶。無色鱗片状晶 83.55 mg, mp 160° (文献値¹⁵⁾ mp 165°)。UV λ_{max} mμ (log ε): 263 (3.71), 272 (3.72), 282 (3.74), 294 (3.65)。TLC, GLC で ergosterol と一致を確認。

結晶 a, b, c の単離 Ether ext. 15.25 g をアルミナカラムクロマトグラフィー (和光純薬製活性アルミナ, 500 g) で分画。Benzene, 5% ether-benzene, ether, MeOH で順次溶出し, 5% ether-benzene 画分より結晶 a (methyl pachymate) 1.6 g, 結晶 b¹³⁾ (methyl 3β-hydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oate) 0.4 g, mp 142—142.5°, 結晶 c (methyl tumulosate) 0.2 g を単離。

結晶 a と Methyl Pachymate (IIIb) の一致 MeOH から再結晶。無色針状晶。mp 182—183°, [α]_D²⁵ +38.9° (c=0.88, CHCl₃)。UV λ_{max} mμ (log ε): 236 (3.20), 244 (3.25), 252 (3.06)。IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3480 (OH), 1725, 1700 (C=O), 1268 (CH₃COO-), 895 (>C=CH₂)。NMR: 9.28 (3H s), 9.11 (6H, s), 9.02 (3H, s), 8.99 (6H, d, J=7 cps), 8.88 (3H, s), 7.98 (3H, s), 6.34 (3H, s), 6.05 (1H, m), 5.52 (1H, m), 5.32, 5.26 (各 1H, s)。Methyl

Fig. 3. Gas Chromatogram of the Mixture of Triterpene Methyl Esters from Hoelen

1.8% SE-30 on Chromosorb W, column temp.: 255°; N₂ flow: 40 ml/min; a: methyl 3β-hydroxylanosta 7,9(11), 24-trien-21-oate; b: methyl eburicoate; c: methyl tumulosate; d: methyl pachymate

14) 融点未補正。微量融点装置(柳本)で測定。UV: EtOH 溶液中, 日立分光光度計 EPU-2A 使用。IR: 日本分光 DS 301 赤外線分光光度計使用。NMR: Varian A-60 を用い, CDCl₃ 溶液を TMS を内部基準として τ 値で表示した。GLC: Hitachi F6-D 使用。Column: 1.8% SE 30 on chromosorb W, 4 mm×1.5 m, column temp.: 250°, carrier gas N₂ (40 ml/min), chart speed 5 mm/min。TLC: plate silicagel H, HF₂₅₄, solvent: *n*-hexane-AcOEt (7:3), 呈色: 20% H₂SO₄ またはワニリン-燐酸噴霧後加熱発色。

15) L.F. Fieser, M. Fieser, "Steroids," Reinhold, New York, 1959.

pachymate (IIIb) (文献値¹⁰⁾ mp 185—187°, $[\alpha]_D^{25} + 41.5^\circ$) と混融, TLC, GLC, IR で一致を確認. 本結晶 8.35 mg を Ac_2O -pyridine で常法によりアセチル化. MeOH から再結晶, 無色針状晶, 6 mg, mp 159.5—160°, $[\alpha]_D^{25} + 7.7^\circ$ ($c=0.52$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1723 (C=O), 1248, 1242 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 880 ($>\text{C}=\text{CH}_2$). NMR: 7.98, 7.96 (各 3H, s), 5.52 (1H, m), 5.07 (1H, m). Methyl acetylpachymate (IIIc) (文献値¹⁰⁾ mp 157.5—159.5°, $[\alpha]_D^{25} + 5.3^\circ$) と混融, TLC, GLC, IR で一致を確認.

結晶 c と Methyl Tumulosate (IVb) の一致 MeOH から再結晶. 無色針状晶. mp 162—163°, $[\alpha]_D^{25} + 24.1^\circ$ ($c=0.79$, CHCl_3). UV λ_{max} $m\mu$ ($\log \epsilon$): 236 (3.61), 244 (3.67), 252 (3.49). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (OH), 1715, 1700 (C=O), 890 ($>\text{C}=\text{CH}_2$). NMR: 9.28 (3H, s), 9.19 (3H, s), 9.04 (3H, s), 8.99 (3H, s), 8.99 (6H, d, $J=7$ cps), 8.88 (3H, s), 6.32 (3H, s), 6.73 (1H, m), 6.10 (1H, m), 5.28, 5.21 (各 1H, s). Methyl tumulosate (IVb) (文献値¹¹⁾ mp 164—164.5°, $[\alpha]_D^{25} + 26.6^\circ$) と混融, TLC, GLC, IR で一致を確認. 本結晶 41.4 mg を Ac_2O -pyridine で常法によりアセチル化. MeOH から再結晶. 無色針状晶. 30.8 mg, mp 159.5—160°, $[\alpha]_D^{25} + 8.3^\circ$ ($c=0.97$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1725 (C=O), 1250, 1245 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 883 ($>\text{C}=\text{CH}_2$). Methyl acetylpachymate (IIIc) と混融, TLC, GLC, IR で一致を確認.

産地別茯苓のトリテルペノイド成分の抽出 千葉県産, 静岡県産, 香川県産, 種子島産 (以上, 菌核の褐色の外皮を除き細碎), 韓国産 (市場品) 茯苓は各々 50 g を Soxhlet 装置を用い ether 500 ml で 3 hr, さらに 500 ml, 2 hr 抽出. 台湾市場品 (茯苓平片), 中国産茯苓 1 (茯苓碎), 2 (茯苓碎), 3 (茯苓平片), 4 (皮茯苓) は各々 5 g を同様に ether 100 ml で 3 hr, さらに 100 ml で 1 hr 抽出. 各々の ether ext. を得, n -hexane 可溶部を除き, 不溶部を CH_2N_2 でメチル化後, TLC, GLC の試料とした.

種子島産茯苓のトリテルペノイド成分 種子島産茯苓 ether ext. 100 mg を n -hexane で洗い, 不溶部 83.3 mg を CH_2N_2 でメチル化後, preparative TLC (silicagel HF₂₅₄, n -hexane-AcOEt (7:3)) を行ない, 2 種の結晶, T-1, T-2 を得, MeOH から再結晶. T-1: mp 178—180°, 13.65 mg. T-2: mp 158—161°, 7.3 mg. 混融, TLC, GLC, IR で T-1 は methyl pachymate (IIIb) と, T-2 は methyl tumulosate (IVb) と一致を確認.

Poria cocos の培養とトリテルペノイド成分の単離 (1) Pa36a—PD 培地 (potato-dextrose) 2.8 liters を 200 ml づつルーフラスコに分ち, 菌体を接種. 25°, 44 日間静置培養. 菌体収量 8.2 g. Soxhlet 装置を用い ether 100 ml で 2 hr, さらに同様に 3 回抽出. Ether ext. 0.95 g を得, n -hexane 可溶部を除き, 不溶部を CH_2N_2 でメチル化後, アルミナカラムクロマトグラフィー (Woelm neutral 50 g) を行ない 5% ether-benzene 溶出部より結晶を得, MeOH から再結晶. 無色針状晶, 0.65 g, mp 145—146°, $[\alpha]_D^{25} + 45.5^\circ$ ($c=0.71$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3370 (OH), 1720 (C=O), 887 ($>\text{C}=\text{CH}_2$). 混融, TLC, GLC, IR で methyl eburicoate (IIb) (文献値¹⁶⁾ mp 146—147°, $[\alpha]_D^{25} + 45^\circ$) と一致を確認. 本結晶 50 mg を Ac_2O -pyridine で常法によりアセチル化. MeOH から再結晶. 無色針状晶, 42.35 mg, mp 156—157°, $[\alpha]_D^{25} + 50.8^\circ$ ($c=0.65$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1718 (C=O), 1248 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 883 ($>\text{C}=\text{CH}_2$). 混融, TLC, GLC, IR で methyl acetyl eburicoate (IIc) (文献値¹⁶⁾ mp 157—158°, $[\alpha]_D^{25} + 49^\circ$) と一致を確認.

(2) Pa36d—PD 培地 2.6 liters を用い, (1) と同様に 42 日間静置培養. 菌体収量 26.1 g. Soxhlet 装置を用い ether 800 ml で 10 hr, さらに同様に 5 回抽出. Ether ext. 1.6 g を得, n -hexane 可溶部を除き, 不溶部を CH_2N_2 でメチル化後, アルミナカラムクロマトグラフィー (Woelm neutral 50 g) を行ない, ether 溶出部 0.47 g をさらに preparative TLC (silicagel HF₂₅₄, n -hexane-AcOEt (7:3)) を行ない 2 種の結晶, P 31, P 32 を得, MeOH から再結晶. P 31: mp 182—183°, 64.2 mg. P 32: mp 165—166°, 169.2 mg. 混融, TLC, GLC, IR で P 31 は methyl pachymate (IIIb) と, P 32 は methyl tumulosate (IVb) と一致を確認.

謝辞 本研究にあたり試料の収集に際し御世話になった静岡県大 齋木博士, 種子島薬用植物栽培試験場 高城場長, 津村研究所 岡田氏, 内田商店 内田氏, 三国商店 永井氏, 永大行 翁偉年氏, 熊本産茯苓抽出物を御恵与下さいました熊本女子大 伊勢田教授に深謝致します, また菌を御分与下さいました林業試験場 青島博士, 培養に際し御指導いただきました当所衛生微生物部真菌室の皆様にお礼申し上げます.

16) F.N. Lahey, P.H.A. Strasser, *J. Chem. Soc.*, 1951, 873.