クロバナヒキオコシ *Isodon trichocarpus* KUDO の生長にともなう各主
ジテルペノイド成分の量的変化 その GC, GC-MS による検討¹⁾

藤田栄一, 長尾善光, 中野重利,^{2a)} 正田芳郎, 橋本圭二, 井上武久^{2b)}

京都大学化学研究所,^{2a)} 京都薬科大学^{2b)}

Change of Quantity of Each Major Diterpenoid During Growth of *Isodon trichocarpus* Kudo Its Exploration by GC and GC-MS¹⁾

ENICHI FUJITA, YOSHIMITSU NAGAO, SHIGETOSHI NAKANO,^{2a)} YOSHIRO MASADA,
KEIJI HASHIMOTO, and TAKEHISA INOUE^{2b)}

Institute for Chemical Research, Kyoto University,^{2a)} and Kyoto College of Pharmacy^{2b)}

(Received May, 20, 1972)

As a preliminary experiment of the biosynthesis, of changes in the quantity of major diterpenoids during growth of *Isodon trichocarpus* Kudo were examined gas chromatography and the combined gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A change in the quantity was found by plotting the area ratio of trimethylsilylated diterpenoids to that of internal standard in gas chromatography every 10 days. Enmein and oridonin showed a similar tendency of changes in their quantity. They were found to increase markedly in June and July.

これまでの研究からクロバナヒキオコシ *Isodon trichocarpus* Kudo にはカウレン型ジテルペン, たとえば trichokaurin (1),³⁾ oridonin (2)⁴⁾ など, B-セコカウレン型ジテルペン, たとえば enmein (3),⁵⁾ isodocarpin (4)⁶⁾ など, 多数のジテルペンの存在が知られている。B-セコカウレン型ジテルペンは, カウレン型ジテルペンの C-6, C-7 間が酸化的に開裂されて二次的に生じたものと予想される。これらジテルペンの生合成研究の予備実験として各含有成分の時期的変化の様子を検索し, 生合成実験に最適な時期を知るために本研究を行なった。

最近 MacMillan ら⁷⁾ はガスクロマトグラフィー (以下 GC と略する) や, ガスクロマトグラフと質量分析計の直結 (以下 GC-MS と略する) を利用して植物エキス中にきわめて微量含有されるジベレリン類の構造研究を

- 1) 本研究はテルペノイド研究, 第 22 報 (京都大学化学研究所) である。第 21 報: 藤田栄一, 藤多哲朗, 岡田泰守, 中村薫竹, 渋谷雅之, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **20**, 2377 (1972)。
- 2) Location: a) Uji, Kyoto; b) Yamashina-Misasagi, Higashiyama-ku, Kyoto.
- 3) 藤田栄一, 藤多哲朗, 渋谷雅之, 新宮徹朗, *Tetrahedron*, **25**, 2517 (1969)。
- 4) 藤田栄一, 藤多哲朗, 片山 肇, 渋谷雅之, 新宮徹朗, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 1674。
- 5) 藤田栄一, 化学の領域, 増刊 86 号 天然物化学, **68**, 南江堂, 1968, p. 173 および 引用文献。
- 6) 藤田栄一, 藤多哲朗, 渋谷雅之, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 1573 (1968)。

行ない好結果を得ている。著者らも上記のような植物中の含有成分の季節による変化の検索には、GC、および GC-MS がきわめて適切であると考えた。しかしながら、これらのジテルペノイドは、そのもの自身では水酸基が多く揮発性が小さいので、常法通りトリメチルシリル化誘導体として分析を試みることにした。植物エキス中には種々の成分が含まれているので、単に GC の保持時間の比較だけの同定では不確実なので、GC-MS を用い、標準品の MS パターンと比較同定することにより確認した。

実験の部

装置および操作 GC は日立 K-53 型、水素炎イオン化検出器を使用、カラムは 2% OV-17 (Chromosorb W 60—80 mesh), 長さ 2m, 内径 3 mm のガラスカラムを使用した。キャリアガス: N_2 60 ml/min.

GC-MS——日立 K-53 型ガスクロマトグラフを日立 RMU-6E 型全ガラス導入系付単収束質量分析計を直結し、キャリアガスセパレーターは Watson-Biemann 型を用いた。イオン加速電圧: 1200 V, イオン化電圧: 70 eV, 全放射電流: 80 μ A, マルチプライヤー電圧: 3 kV, イオン化室温度: 250°, He: 2 kg/cm², カラム温度: 1°/min

180°——→230°, カラム出口からキャリアガスセパレーターも含めてイオン源に至るまでの流路は GC の分析温度より 5—10° 高めに設定した。GC の分離成分は MS の磁場を高速走査 (質量範囲 m/e 2—700 を 3 秒) して、紫外線感光高速記録計 (三栄測器, ビジコーダー, チャート速度 30 cm/sec) で記録した。

標準サンプルおよび試薬 標準サンプルの oridonin (2), enmein (3), および isodocarpin (4) は、各々既報のごとくクロバナビキオコンから分離された。N-Trimethylsilylimidazole (TMSI), N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA), および trimethylchlorosilane (TMCS) は東京化成株式会社製を使用した。

植物抽出エキスの調製 京都大学化学研究所敷地内で一年間栽培した金沢産クロバナビキオコンの五大株を選択し、その葉茎を 5 月から 12 月まで、10 日間隔で各株より一本ずつ採取し、7 日間直射日光を避けて乾燥した。その約 3 g を細かくきざみ、メタノール 100 ml 中で水浴上 4 時間加熱還流した。濾過して得られるメタノール抽出液を減圧下蒸発し、残渣を常法により処理して酸性部塩基性部中性部に分離した。中性部エキスを減圧下に 100° で 6 時間乾燥し、約 500 mg の固形物を得た。

トリメチルシリル化 i) TMSI-BSTFA-TMCS 法——上記乾燥中性エキス 2 mg に、あらかじめ調製された 0.1% *n*-octacosane (内部標準物質) の TMSI 溶液 10 μ l, BSTFA 5 μ l, TMCS 2 μ l を加え、室温で密栓して放置する。

ii) TMSI-TMCS 法——乾燥中性エキス 2 mg に上記と同様の 0.1% *n*-octacosane の TMSI 溶液 20 μ l, TMCS 6 μ l を加え室温で密栓して放置する。

結果および考察

実験の部 i) 法により 1 時間トリメチルシリル化した試料につき GC 分析を行なったそのガスクロマトグラムは Fig. 1 に示される。

ピーク 1 はそのマスペクトル (Fig. 2) における分子イオンピーク (M^+ 652) から oridonin の 4 個の水酸

Fig. 1. Gas Chromatogram of Trimethylsilylated Sample Prepared from the Neutral Extract of *Isodon trichocarpus* by Method i) (1 hr)

condition: glass column 2 m $\times$ 3 mm coating Chromosorb W with OV-17 (2%); rate of temperature increase 19°→230° (1° per min); carrier gas N_2 60 ml per min

Fig. 2. Mass Spectrum of the Peak 1 Substance in Fig. 1

基がすべてトリメチルシリル化されたものに相当することが予想されたが、標品 oridonin を ii) の方法で完全にトリメチルシリル化したもののマススペクトル(後述)と比較した結果、完全に一致し同定確認することができた。

Fig. 1 のピーク 2 は, oridonin の 3 個の水酸基がトリメチルシリル化され, 1 個の水酸基がそのまま残っているもののピークであることが, Fig. 2 と比較することにより判明した。(Fig. 3 にそのマススペクトルを示す)。

Fig. 1 の GC ピーク 3 は, isodocarpin のトリメチルシリル化物のピークであることが, 標品の GC の保持時間および標品の MS との比較により判明した。Fig. 1 の GC ピーク 4 は enmein と dihydroenmein とのトリメチルシリル化混合物のピークであることがわかった。詳細については ii) 法の結果の部で述べる。

さらにこの方法について時間を追って検討したが, i) 法では oridonin のすべての水酸基をトリメチルシリル化させることは不可能であるので, 好ましくないとの結論に達した。

次に実験の部 ii) 法によるトリメチルシリル化を検討した。まず標品 oridonin を用いて ii) 法を時間を追って検討した結果, 6 時間後には, すべての水酸基がトリメチルシリル化されることが明らかとなった (Fig. 2)。

つづいて上記植物抽出エキス中性部の一検体に対し, ii) 法により 6 時間反応させた後得られた成績体の GC を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 のピーク 1 はその保持時間から oridonin の 4 個の水酸基がすべてトリメチルシリル化されたもののピークであろうと予想されたが, そのピークのごく初めの登りはじめの部分の MS (Fig. 5) は, Fig. 2 と非常に異なっている。一方このピークの保持時間は, dihydroenmein (5) を前記 ii) の方法で 6 時間反応させたときに得られる二成績体のうちの一方のものの保持時間とも一致する。この成績体の MS (Fig. 6) は $M^+ 580$ を示し, その構造は 5 の 2 個の水酸基以外に 5 員環ケトンがエノール化し, これもトリメチルシリル化された化合物 6 に帰属される。6 の構造は核磁気共鳴 (NMR) スペクトルからも支持される。すなわち dihydroenmein を ii) 法で 6 時間トリメチルシリル化したときの成績体の NMR スペクトル中に $\delta 1.53$ にシングレットの, 二重結合上のメチル基に由来するシグナルがあらわれる。

Fig. 3. Mass Spectrum of the Peak 2 Substance in Fig. 1

Fig. 4. Gas Chromatogram of Trime-thylsilylated Sample Prepared from the Neutral Extract of *Isodon tri-chocarpus* by Method ii) (for 6 hr)

condition: same as Fig. 1

Fig. 5. Mass Spectrum of Starting Portion of the Peak 1 in Fig. 4

Fig. 6. Mass Spectrum of Compound 6

ここにおいて Fig. 5 を詳しく観察すると, oridonin の 4 個の水酸基がすべてトリメチルシリル化されたものの MS すなわち Fig. 2 と, dihydroenmein のエノール化体のすべての水酸基がトリメチルシリル化された 6 の MS すなわち Fig. 6 とが重なったパターンを示していることが確認された. しかしながら, Fig. 4 のピーク 1 のうちのごく初めの部分をのぞいては, ほとんど oridonin tetra-trimethylsilyl ether のみの MS を示し, このピーク 1 中に dihydroenmein エノールエーテル体の混在は, ぎわめて微量であると予想されたが, 念のため dihydroenmein エノール体の混在について次のように再検討を加えた. すなわち縦軸にピーク 1 の頂点部の MS における oridonin tetra-trimethylsilyl ether の M^+ (ベースピーク) と内部標準物質 *n*-octacosane の M^+ の強度比をとり, 横軸に oridonin tetra-trimethylsilyl ether と *n*-octacosane の混合検体の GC のピーク面積比をとると, Fig. 7 のように直線関係を示し, 検量線として利用できる. そこで Fig. 4 のピーク 1 に相当する各時期にわたってのサンプルの GC ピークについて検討した結果, いずれもこの直線上にのり, したがって dihydroenmein エノールエーテルの混在はきわめて微量で無視でき, 問題にならないことが再確認された.

次に Fig. 4 のピーク 2 は, 標品との保持時間の比較, GC-MS の MS パターンの比較により, isodocarpin (4) の trimethylsilyl ether であることが確認された. ピーク 3 はかなりブロードなので混合ピークの可能性がある. そこでこのピークの昇りはじめから順次細かく MS を測定し検討した結果, ピークの昇りはじめにごく少量のエノール化していない dihydroenmein di(trimethylsilyl) ether (M^+ 508) が混在していることがわかった. しかしピークの頂上部では dihydroenmein の混在はみとめられず, enmein di(trimethylsilyl) ether の MS のみが観察された.

上記の実験から, クロバナヒキオコシの中性部エキスを直接トリメチルシリル化した試料を GC-MS で分析す

Fig. 7. Calibration Curve of Oridonin.

ることが可能になり, トリメチルシリル化の条件は, TMSI-TMCS 試薬を用いる ii) 法で 6 時間反応させればよいことが認められた.

そこで実験の部に記載したようにして調製したエキスにつき, クロバナヒキオコシの成長過程における enmein (3), oridonin (2) および isodocarpin (4) の変化を内部標準物質 *n*-octacosane との GC ピーク面積比より求めた. その結果, 5 月から 12 月までの各成分の変化は Fig. 8 のようにあらわされる.

これから明らかなように enmein (3), oridonin (2) は成長過程にともなう変化の傾向が非常に類似しており, 6—7 月頃に顕著な増加がみとめられる. 一方 isodocarpin (4) は enmein や oridonin に比べて, ごく微量の成分であるので, この図からははっきりした結論を導くのは危険である.

Fig. 8. Change of Quantity of Each Major Diterpenoid During Seven Months

以上のように多くの成分が混在している植物成分で、しかも幾通りかのトリメチルシリル化が可能となる化合物を含むときにはその得られる GC は複雑で単なる GC のみでは同定がほとんど不可能に近く、GC-MS の有効性が特筆されてよいであろう。このように著者らは GC-MS を利用することにより、主ジテルペノイドの生合成実験に最適の時期が 6 月初旬であることを実験的に証明することができ、所期の目的を達成した。

謝辞 本研究に多大の便宜を与えられ、また激励をいただいた京都薬科大学学長 富田真雄先生に深く感謝する。