

図 2. 各種オウレンサンプルの LC/MS 分析

パルマチンが 6.8 min に溶出ピークとして現れることが分かった。その他のピークとして、全ての分析試料においてベルベリン溶出直前の 5.5 min にピークが現れた。また、ミャンマーにて入手した現地栽培品とされる (2) と日本薬局方オウレン (5) には、コプチシン溶出直後の 4.8 min にピークが現れ、さらにコプチシン溶出直前の 3.9 min にも小さなピークが確認できた。これらの未同定化合物の分子量情報を得る目的で、LC/MS 分析を行った (図 2)。これによると、4.8 min に溶出されるピークは、ベルベリンと同じ  $m/z$  336 を示すことからエピベルベリンであることが推測された。また、5.5 min のピークは、ベルベリンよりもイオン価が 2 大きい  $m/z$  338 を示すことから、ベルベリン若しくはエピベルベリンのメチレンジオキシ基が開裂してヒドロキシ基とメトキシ基になった、コロンバミン若しくはジャトロロジンなどではないかと考えられた。さらに、3.9 min の小さなピークは、コプチシンよりもイオン価が 2 大きい  $m/z$  322 を示すことから、コプチシン構造中に二つあるメチレンジオキシ基の片方が開裂した化合物であることが示唆された。

## 2. 未同定化合物の単離

LC/PDA 及び LC/MS 分析で確認された未同定ピークのうち、比較的存在比が大きかった 4.8 min と 5.5 min に溶出される化合物を同定するために、化合物の単離を試みた。材料にはこれらの化合物の存在が確認できた局方オウレンを用いた。目的とする化合物が比較的に水溶性であるため、メタノール抽出物をジエチルエーテルにて洗浄し、次に HP20 カラムにて水溶性画分を得た。TLC 条件にも用いた酢酸エチル/メタノール/酢酸系によるシリカゲルカラムにて荒分けし、未同定化合物が多く存在するフラクションを ODS-HPLC にて分取することで二つの未同定化合物 (化合物 1 : LC 4.8 min、化合物 2 : LC 5.5 min) を得た。

## 3. 未同定化合物の構造解析

化合物 1 は、MS 及び NMR よりその分子式に  $C_{20}H_{18}NO_4^+$  が推定された。 $^1H$ -NMR において二つのメトキシ基 (3.93, 3.99 ppm)、三つのメチレン基 (3.28, 4.91, 6.46 ppm)、6 つの芳香族メチン基 (7.03, 7.62, 7.86 x 2, 8.79, 9.71 ppm) のシグナルが現れた。 $^{13}C$ -NMR においても、二つのメトキシ基 (56.7, 57.0 ppm)、三つのメチレン基 (27.7, 57.4, 106.1 ppm)、6 つの芳香族メチン基 (109.8, 112.2, 122.2, 122.2,

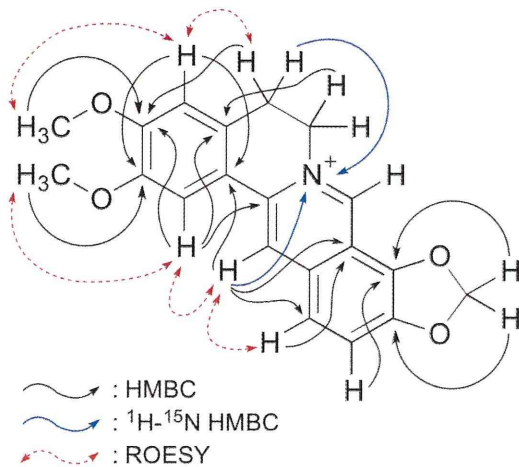


図3. 化合物1 (エピベルベリン) の構造解析

123.0, 145.3 ppm) に帰属される炭素の他に、9個の芳香族四級炭素 (113.6, 120.4, 130.0, 134.5, 139.1, 145.7, 149.1, 150.9, 153.7 ppm) のシグナルが現れた。これらの内、1つのメチレン基 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : 6.46/106.1 ppm) はメチレンジオキシ基と考えられた。また、非常に低磁場シフトした芳香族メチン基 ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : 9.71/145.3 ppm) は、プロトベルベリンアルカロイドに特徴的な第四級窒素カチオンに隣接するものと考えられた。これらのシグナルの帰属は、H-H COSY、HSQC、HMBC、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HMBC 及び ROESY スペクトルの解析により図3に示すように明らかとなった。すなわち、メチレンジオキシ基プロトン (6.46 ppm) から 145.7, 149.1 ppm の芳香族四級炭素に HMBC 相関が見られ、3.93 ppm のメトキシ基プロトンから 153.7 ppm の芳香族四級炭素に、3.99 ppm のメトキシ基プロトンから 150.9 ppm の芳香族四級炭素にそれぞれ HMBC 相関が見られた。また、3.23 ppm のメチレン基及び 8.79 ppm の芳香族メチンプロトンから第四級窒素 (-185 ppm) に  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HMBC 相関が見られた。そして、7.03 ppm の芳香族メチンプロトンと 3.93 ppm のメトキシ基プロトン及び 3.23 ppm のメチレン基プロトンとの間、7.62 ppm の芳香族メチンプロトンと 3.99 ppm のメトキシ基プロトン及び 8.79 ppm の芳香族メチレン基プロトンとの間、そしてこの 8.79 ppm の芳香族メチレン基プロトンと 7.86 ppm の芳香族メチレン基プロトンとの間に ROE 相関が見られた。これらのことなどより化合物1の全シグナルを帰属することができ、化合物1はエピベルベリンであることが判明した。

化合物2は、MS 及び NMR よりその分子式が  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$  が推定された。その  $^1\text{H}$ -NMR において三

つのメトキシ基 (4.01, 4.09, 4.20 ppm)、二つのメチレン基 (3.20, 4.90 ppm)、6つの芳香族メチン基 (6.85, 7.64, 7.99, 8.09, 8.74, 9.72 ppm) のシグナルが現れた。 $^{13}\text{C}$ -NMR においても、三つのメトキシ基 (56.9, 57.6, 62.5 ppm)、二つのメチレン基 (27.7, 57.4 ppm)、6つの芳香族メチン基 (110.0, 115.9, 120.9, 124.3, 128.1, 145.6 ppm) に帰属される炭素の他に、9個の芳香族四級炭素 (119.4, 123.2, 130.3, 135.4, 140.2, 145.6, 149.6, 151.7, 151.9 ppm) のシグナルが現れた。これらより、メチレンジオキシ基が無いことが推測された。これらのシグナルの帰属は、化合物1同様に、H-H COSY、HSQC、HMBC、 $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HMBC 及び ROESY スペクトルの解析により図4に示すように明らかとなった。すなわち、三つのメトキシ基はそれぞれ、4.01 ppm が 149.6 ppm に、4.09 ppm が 151.7 ppm に、4.20 ppm が 145.6 ppm に HMBC 相関が見られた。また、3.20 ppm のメチレン及び 8.74 ppm の芳香族メチンプロトンから第四級窒素 (-195 ppm) に  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HMBC 相関が見られた。ROESY スペクトルにおいて、4.01 ppm のメトキシ基プロトンと 7.64 ppm の芳香族メチンプロトンとの間、この 7.64 ppm の芳香族メチンプロトンと 8.74 ppm の芳香族メチンプロトンとの間、この 8.74 ppm の芳香族メチンプロトンと 7.99 ppm の芳香族メチンプロトンとの間にそれぞれ ROE 相関が観測され、さらにこの 7.99 ppm の芳香族メチンプロトンとカップリングしている 8.09 ppm の芳香族メチンプロトンと 4.09 ppm のメトキシ基プロトンとの間に ROE 相関が確認された。また同様に、6.85 ppm 芳香族メチンプロトンと 3.20 ppm メチレンプロトンとの間、3.20 ppm メチレンプロトンとカップリングしている 4.90 ppm メチレンプロトンと

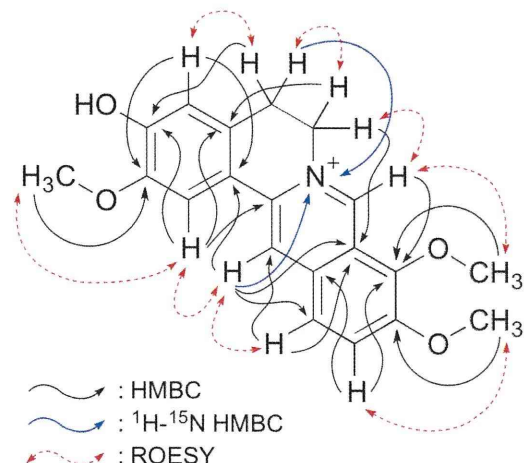


図4. 化合物2 (ジャトロリジン) の構造解析

第四級窒素カチオンに隣接する 9.72 ppm 芳香族メチンプロトンとの間、そしてこの 9.72 ppm 芳香族メチンプロトンと 4.20 ppm メトキシ基プロトンとの間に ROE 相関が確認できた。以上のことなどより全てのシグナルが帰属され、化合物 2 はジャトロリジンであると判明した。

#### D. 考察

今回、クロマトグラム上に現れた二つの未同定化合物を単離しその構造を確認したところエピベルベリンとジャトロリジンであることが判明した。これにより、分析した全てのオウレンにはベルベリン、コプチシン、パルマチン以外にジャトロリジンが含まれていることが分かった。また、ミャンマー現地栽培品とされるサンプル (2) と局方品のオウレンであるサンプル (5) においては、これら以外にエピベルベリンが含まれていることが判明した。現地購入品である (3) と (4) のサンプルは地域住民が野生品を採集してきたものとも考えられ、そうであれば現地野生品であるサンプル (1) とこれらの成分組成が同じであることはその裏付けとなる。しかしながら、なぜ同じ種の野生品 (1) と栽培品 (2) とが異なる成分組成を示すのか、なぜ栽培品 (2) と局方品 (5) とが同様の成分組成を示すのか、謎である。一

つの仮定として、現地栽培品とされる (2) が中国からの輸入品であれば、多くの場合に中国からの輸入品である局方品 (5) と同様であってもおかしくはない。今後、他の地域のサンプルや種が明らかであるサンプルの分析を検討していきたい。

#### E. 参考文献

- 1) Zhi Li and Irmgard Merfort, High-Performance Thin Layer Chromatography for Quality Control of Multicomponent Herbal Drugs: Example of Cangzhu Xianglian San, *J. AOAC Int.*, 93(5), 1390-1398 (2010)

#### F. 研究発表

論文発表等

なし

学会発表

- 1) 代田 修、豊田佳奈、我妻 豊、関田節子、数馬恒平、佐竹元吉. ミャンマー産オウレンの現地調査および成分分析、日本生薬学会第 58 年会、平成 23 年 9 月 24-25 日、東京.

生薬の種子収集及び関係機関との種子交換状況について

分担研究者 濱野 裕之（独）医薬基盤研薬用植物資源研究センター栽培研究室長

研究要旨 （独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターにおいては国立衛生試験所時代より外国植物園機関と国際学術交流としての種子交換業務を行ってきている。例年当センターの各研究部が各地域の野生種子を採取し、Index Seminumを作成し、それを海外の研究機関に送付し請求に応じて種子を送付している。2011年度は外国からの種子請求では、種子請求総数1430点、種子送付総数1351点、種子請求機関数90機関であった。また種子リスト交換国数は62カ国、種子リスト交換機関数397機関であった。また当センターから請求し導入した種子は請求機関数94機関、種子等導入数217点であった。さらに22年度に種子島研究部にて採取した野生種子193点を研究・保存用として資源保存棟の-1℃（長期保存室）に貯蔵した。

協力研究者 熊谷 健夫（独）医薬基盤研薬用植物資源研究センター主任研究員

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター 各研究部

A. 研究目的

近年の世界的な環境の変化に伴い、生物資源の急激な減少は大きな問題となっており、とりわけ植物資源は乱獲や環境破壊などが原因となり指数関数的に減少していると推測されている。薬用植物資源研究センターは、その長い歴史の中で、いち早く植物遺伝資源である種子の交換業務を全世界の植物園と行ってきた。種子交換はこのような状況下、減少しつづける植物種の保護や危険分散などを目的とする側面があり、営利目的ではない国際的な学術協力である。

薬用植物資源研究センターにおいては全国にある研究部で野生種や栽培種の種子を極力採取し、毎年 Index Seminum を作成しそれを海外の植物園などと交換し、外国からの請求に対し日本産

の植物種子を送付している。また外国機関から送付されてきた Index Seminum においては同様に当センターで請求し、積極的に多くの外国産植物種子を導入し、栽培あるいは保存してきた。このような種子交換業務は近年の生物多様性条約などの進展のいかんにより、より一層の事務的な障壁が生じることも考えられるが、絶滅危惧種の種子を各機関が分散して持合い保存することにより危険分散し、将来的にそれらの植物種を再生させたり、あるいは有用植物種を将来的に創薬原料として利用可能な体制を整えるために大変重要な手段である。

B. 研究方法

昨年度に引き続き当センターの各研究部にお



いて、2010年末に各研究部周辺で収集した野生植物種子、あるいは圃場や標本園などで栽培した栽培植物種子を採取し調整後、筑波研究部に収集した。その後リストを作成しIndex Seminum 2011を作成した。送付機関は62か国397機関であり、その後の種子請求に応じ種子を郵送した。また外国機関から送付されてきたIndex Seminumを当センターの請求希望種子品目に沿って請求し、種子を導入した。それらのほぼすべてをスチロール瓶に封入後、資源保存棟で-1℃条件（長期保存室）にて保存を行った。

### C. 研究結果

2010年度は外国からの種子請求では、種子請求総数1184点、種子送付総数1147点、種子請求機関数81機関であった。また種子リスト交換国数は62カ国、種子リスト交換機関数 397機関であった。また当センターから請求し導入した種子は請求機関数 124機関、種子等導入数1573点であった。導入した種子類の内訳は、オトギリソウ (Hypericum) 属315点、ケシ (Papaver) 属199点、ゲンゲ (Astragalus) 属 87 点、ミシマサイコ (Bupleurum) 属65点などを含む合計1573を導入した。そのうち種子は1534点、種子以外（栄養体など）は37点であった。さらに2009年度に採取した野生種子55点を研究・保存用として資源保存棟の-1℃（長期保存室）に貯蔵した。

2012度においては、外国からの種子請求では、種子請求総数1430点（昨年度1184件）、種子送付総数1351点（昨年度1147件）、種子請求機関数90機関（昨年度81機関）であった。また種子リスト交換国数は62カ国、種子リスト交換機関数397機関（昨年度397機関）であった。

当センターからの外国機関に対する種子請求では、種子導入機関数 94機関、種子等導入数217点（昨年度1573点）であった。各研究部毎の導入種子点数は、北海道研究部 35点、筑波研究部 133点、種子島研究部 33点、全量保存用 16

点、合計217点であった。導入した種子類の内訳は、*Alisma plantago-aquatica* L. (Alismataceae)（サジオモダカ）15点、*Coix lacryma-jobi* L. (Geramineae)（ジュズダマ）16点、*Scutellaria baicalensis* Georgi (Labiatae)（コガネバナ）10点などであり、種子は214点、種子以外の苗1点、シダ植物2点であった。

さらに今年度は、22年度に種子島研究部が採取した野生種子193点を研究・保存用として資源保存棟の-1℃（長期保存室）に貯蔵した。野生種子の保存は毎年各研究部の採種した野生種子をローテーションを組んで行なっている。昨年度は筑波研究部だったため、今年度は種子島研究部の野生種子を保存した。

### D. 考察

今年度の外国への種子送付件数を国別にまとめたグラフを示した。もっとも送付件数が多いのは今年度はドイツであった。昨年度はロシアであったが今年度はロシアは2番目であった。全体の8割以上をヨーロッパが占めており、ヨーロッパ各国がハーブなどの薬用植物に関する先進国であり積極的に導入を図っていることが伺える。

導入種子に関しては、今年度は昨年度に比べ極端に導入数が減ってしまった。これには原因があり、種子交換業務環境が大幅に変わってしまい、種子請求を各国に送付するのが大幅に遅れてしまったことが原因と考えられる。各機関請求のデッドラインを設けているところが多いが、設けていない機関でも請求が送れば在庫種子がなくなり請求に応じられないものと考えられる。そのため請求が遅れたのが導入点数の大幅な減少につながったと考えられた。

### E. 結論

今年度は種子交換業務の作業環境が変わって

しまったために事務手続き上の問題が生じ、導入点数の大幅な減少につながった。また、昨年度から「量よりも質」への転換が行われているため、業界から保存要望が多い種を重点的に請求するようにしている。特に局方収載品目に着目しているが、種子交換を行なっている外国機関はヨーロッパが主体であるため、中国を除けばなかなか局方品を探すのは難しかった。

現在植物種は環境の変化に伴い急激に減少しているが、生薬の今後の安定供給を目指すためには植物種子を保存し定期的に生産し種子を更新していく必要がある。その基盤整備のための種子保存の体制構築が重要であることは言うまでもないことである。

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

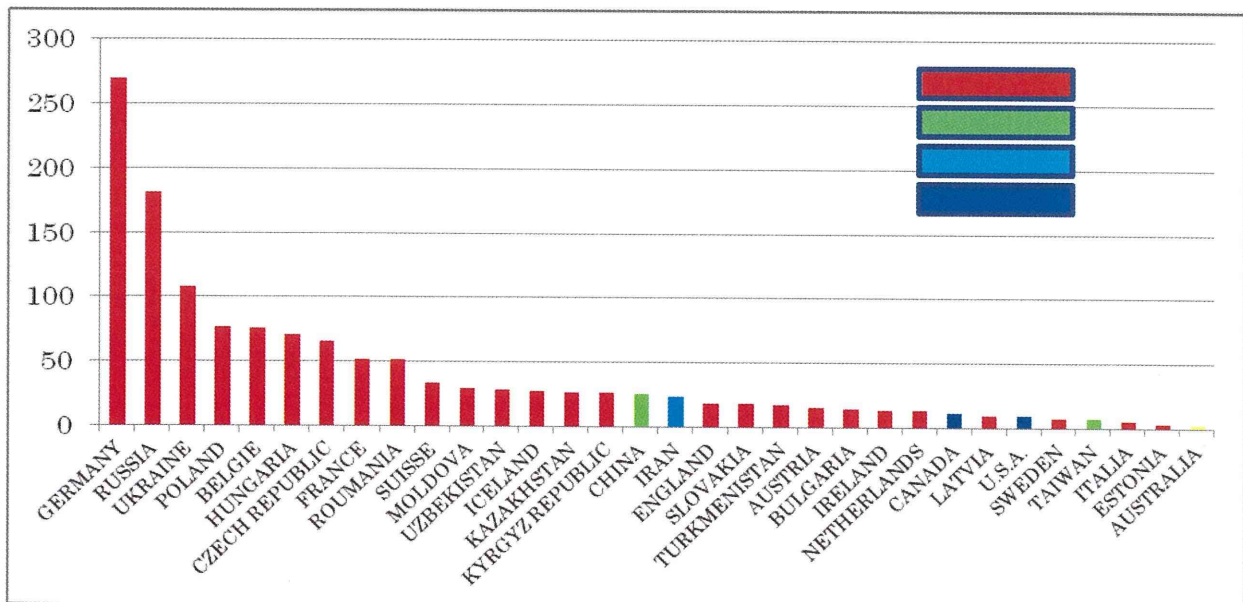
G. 研究発表

- 1. 論文発表
  - 2. 学会発表
- なし

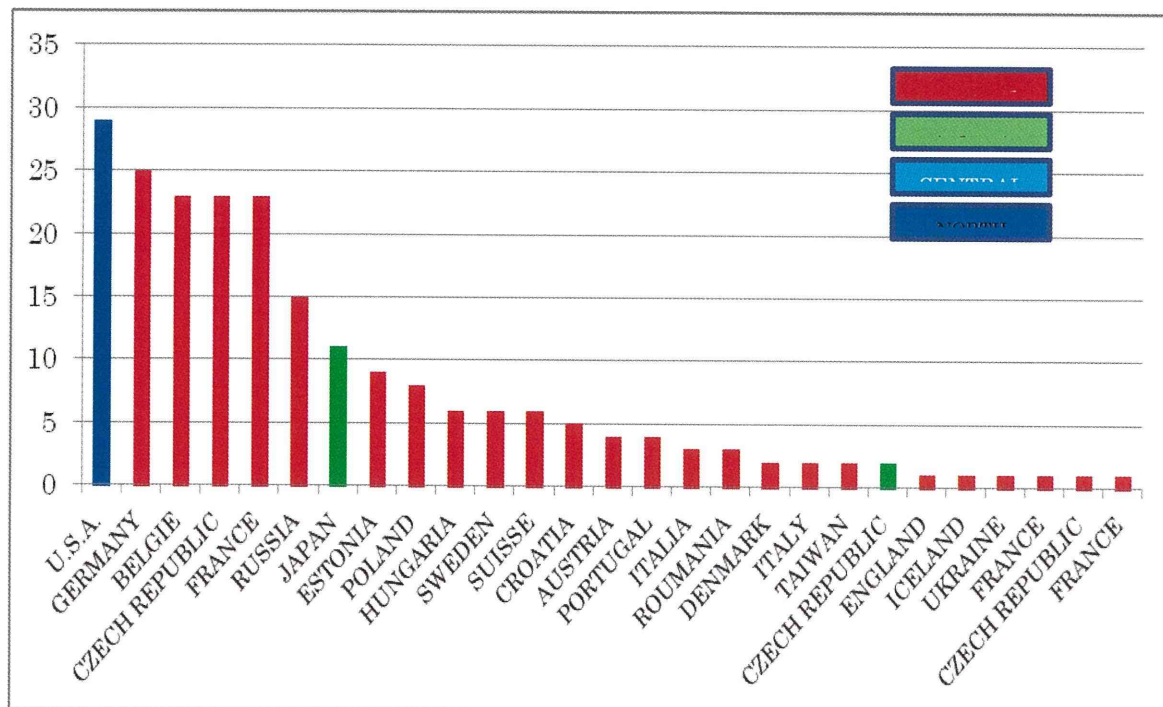
H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許
  - 2. 実用新案登録
  - 3. その他
- なし

### 新入付別国協交の種



## 種子交換国別導入点数



## 2012年種子交換業務にむけた2011年の各研究部の採種状況

➤ 北海道研究部	190 点 (野生 66
、 栽培 124)	
➤ 筑波研究部	427 点 (野生 241
栽培 186 点)	



合計 868 点  
野生: 340 点  
栽培: 516

24年度は種子島研究部の野生植物 193 点は資源保存棟にて長期保存す

## 2011 種子交換実績に

種子請求総数 1184 件)	1,430 点(昨年度 1184 件)
種子送付総数 1147 件)	1,351 点(昨年度 1147 件)
種子請求機関数 機関)	90 機関(昨年度 81 機関)
種子リスト交換国数	62 力国

### 研究部別導入植物資

北海道研究部	3 点
筑波研究部	133 点
種子島研究部	3 点
全量保存用	16 点



分担研究報告書

漢方処方配合生薬の安定供給及び持続的品質保持における国際標準化に関する研究

生薬「ボウコン」の成分に関する研究

研究分担者 中根 孝久 昭和薬科大学 講師

研究要旨 生薬「ボウコン」は日本薬局方第15改正に記載され、トリテルペノイド及びフィトステロールに基づく Lieberman-Burchard 反応が確認試験に用いられている適用されている。近年、日本市場に多くの中国産ボウコンが流通するようになり、確認試験の対象として考えられていた *cylindrin*, *arundoin* などトリテルペノイドメチルエーテルが検出されない場合があり、その基原に疑問が持たれた。そこで、入手可能な中国産ボウコンと日本産ボウコンについて成分検討を行った。

A 研究目的

チガヤ, *Imperata cylindrica* Beauv. はイネ科 (Gramineae) に属する多年生草本でアジア亜熱帯に分布している。根茎の細根及び鱗片葉をほとんど除いたものを「ボウコン」と呼び、第15改正日本薬局方に記載されている。本生薬の成分として、*cCylindrin* (1), *aArundoin* (2), *simiarenol* (3), *isoarborinol* (4), *fernenol* (5) などのトリテルペノイドが報告されており、これらトリテルペノイド及びフィトステロールに基づく Lieberman-Burchard 反応がボウコンの確認試験に用いられている適用されている。トリテルペノイド以外の成分としては、*cylindrene*, *cylindol A, B*, *graminone A, B*, *imperanene* などが報告されている。近年、日本市場に出回るボウコンでは中国産ボウコンに取って代わられた。中国産ボウコンは白茅根とされ、*I. cylindrica* var. *major* を基原とし、1, 2 を含むとされる。しかし、日本に流通するボウコンは薄層クロマトグラフィー (TLC) で 1, 2 のスポットが検出されない場合があり、その基原に疑問が生じた。中国産ボウコン生薬として輸入されるため、と日本産ボウコンの内部形態を検討した結果には明確な差異は

認められなかった。中国産ボウコンの原植物を入手することができないため、トリテルペノイドそこで、成分をを日本産ボウコンと比較することにより、日本市場に出回る生薬ウコンを化学的に検証することを目的に研究を行う。前述のようにトリテルペノイド、特にメチルエーテル体で含有される 1 や 2 に注目し、産地の判明している中国産の様々な産地のボウコンと原植物の入手可能な日本産ボウコンについて成分の検討を行う。

B 研究方法

中国産ボウコンは既に生薬として調整されたものを産地別に四川省産、雲南省産、広西省産の3種類を入手し、試料とした。

日本のチガヤは、花期が早く(4~5月)、開花稈に節毛の無いケナシチガヤ *I. cylindrical* var. *koenigii* f. *pallida* と花期が遅く(5~6月)、開花稈に節毛のあるフシゲチガヤ *I. cylindrical* var. *koenigii* の2変種が自生していることが最近報告された。そこで両者を区別して採集し、生薬ボウコンを調整し、試料とした。

中国四川省産ボウコン (A; 2.0 kg), 中国雲南省産ボ

ウコン (B; 800 g), 中国広西省産ボウコン (C; 5.0 kg) 及び日本産ケナシ型ボウコン (D; 1.0 kg, E; 5.8 kg), フシゲ型ボウコン (F; 1.8 kg) を *n*-hexane で抽出してそれぞれのエキス A (8.3 g), B (4.6 g), C (30.6 g), D (2.7 g), E (11.9 g) 及び F (3.0 g) を得た. 得られたエキスはそれぞれシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel CC) に付し, *n*-hexane — benzene — ether — methanol の溶媒系で順次極性をあげながら分離を行った. さらに硝酸銀シリカゲル CC, アルミナ CC, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの各種クロマトグラムを繰り返し行い, 単離精製を行った. 得られた化合物は, 質量分析 (LR-MS, HR-MS) や核磁気共鳴 (NMR) スペクトル, 赤外吸収 (IR) スペクトルなどの分光機器の詳細な解析を行った. 既知化合物は <sup>1</sup>H-NMR のデータを標品と比較することにより同定した. 新規化合物については, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LR-MS で構造を推定した後, 構造を確定するために HSQC, HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 及び NOESY など 2次元 NMR の詳細な解析を行った.

### C 研究結果

中国産ボウコン 3種 (A, B, C) 及び日本産ボウコン 3種 (D, E, F) より 14-epiarborane 骨格 3種, 14-epiarbor-7-en-3 $\beta$ -ol (**16**), 14-epiarbor-7-en-3-one (**17**), 14-epiarbor-7-en-3 $\beta$ -yl formate (**18**), impallidane 骨格 6種, impallidin (**19**), impallidin ozonide A, B (**20a**, **20b**), impallidol (**21**), trisnorimpallidin aldehyde (**22**), tetranorimpallidin aldehyde (**23**), adiantane 骨格 2種, simiarenyl formate (**24**), 3-episimiarenyl formate (**25**), 計 11 種の新規トリテルペノイド(図 1) 及び既知化合物 16 種(図 2) の構造決定または同定した.

新規化合物 **20a**, **20b** は **19** の ozonide であることを証明するために **19** をオゾンで処理したところ低収率ではあるが **20a**, **20b** を得たことで, 構造を確

定した.

### D 考察

生薬ボウコンはチガヤの根茎から製せられるが, トリテルペノイド成分を本研究した結果, 材料により含有トリテルペノイドに際が認められた. このことはボウコンの基原植物が単一ではないことを示している. そこでトリテルペノイド成分に注目して, チガヤのケモタキソノミー的考察を行なった. 産地別に含まれるトリテルペノイドを Table 1 にまとめた.

Table 1 に示したように中国産ボウコン (A, B, C) は全て 14-epiarborane 骨格のトリテルペノイドを含んでいた事が分かる. 日本産ケナシ型ボウコン E においても痕跡量単離されたが, 中国産ボウコン茅根においては, 14-epiarborane 骨格のトリテルペノイドがトリテルペノイドアルコール体, ケトン体として多量含まれており, 分画において主トリテルペノイドである事から考えるとこの骨格のこれらのトリテルペノイドが中国産ボウコン茅根の特徴成分であると言える.

一方, 日本産ケナシ型ボウコン (D, E) においては, 両者ともに impallidane 骨格のトリテルペノイドを含んでいる事が分かる. Impallidane 骨格のトリテルペノイドは中国産および日本産フシゲ型ボウコンから検出されない事から, ケナシ型ボウコンの特徴成分であると考えられる. また, arborane 骨格はケナシ型ボウコンから検出されなかった. 日本産フシゲ型ボウコンからは glutinane 骨格, lupane 骨格のトリテルペノイドが検出された. 日本産フシゲ型ボウコンからは, 本研究で構造決定された新規骨格 14-epiarborane および impallidane 骨格のトリテルペノイドは認められなかったが, 成分的に中国産ボウコン, 日本産ケナシ型ボウコンと異なっており, 全体としてかつてチガヤから製したボウコンから報告されているトリテルペノイドと殆ど同一であったので, 従来日本の基原植物はフシゲチガヤと結論できる.良

く類似している。以上まとめると、

1. 中国産ボウコン茅根は 14-epiarborane 骨格のトリテルペノイド成分を有し、その基原は中国産の茅根である白茅根の起原植物 *I. cylindrica* var. *major* である。
2. 日本産ケナシ型ボウコンは impallidane 骨格のトリテルペノイド成分を有するが、arborane 骨格のトリテルペノイド成分は有さない。基原植物はケナシチガヤ *I. cylindrica* var. *koenigii* f. *pallida* である。
3. 日本産フシゲ型ボウコンは arborane 骨格、fernane 骨格のトリテルペノイドを有するが、14-epiarborane, impallidane 骨格のトリテルペノイドは有さない。基原植物はフシゲチガヤ *I. cylindrica* var. *koenigii* である。

## E 結論

本研究の結果、以下に示す事を明らかにした。

1. 中国産ボウコンより、新規骨格 14-epiarborane 骨格誘導体 14-epiarbor-7-en-3 $\beta$ -ol (**16**), 14-epi-arbor-7-en-3-one (**17**), 14-epiarbor-7-en-3 $\beta$ -yl formate (**18**) を単離し、その構造を決定した。
2. 日本産ケナシ型ボウコンから、新規骨格 impallidane 骨格誘導体 impallidin (**19**), impallidin ozonide A, B (**20a, 20b**), impallidol

(**21**), trisnorimpallidin aldehyde (**22**), tetra-norimpallidin aldehyde (**23**) を得て単離し、その構造を決定した。また、同ボウコンより新規化合物 simiarenyl formate (**24**), 3-episimiarenyl formate (**25**) を単離し、その構造を決定した。

中国産ボウコン (A, B, C), 日本産ケナシ型ボウコン (D, E), 日本産フシゲ型ボウコン (F) のトリテルペノイド成分の違いを明らかにし、その基原植物との関係を明らかにした。その結果、生薬ボウコンは少なくとも3種あるいは変種の *Imperata* 属植物を基原としていることを明らかにした。

1、

F 健康危機情報  
なし

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H 知的所有権の取得情報

なし

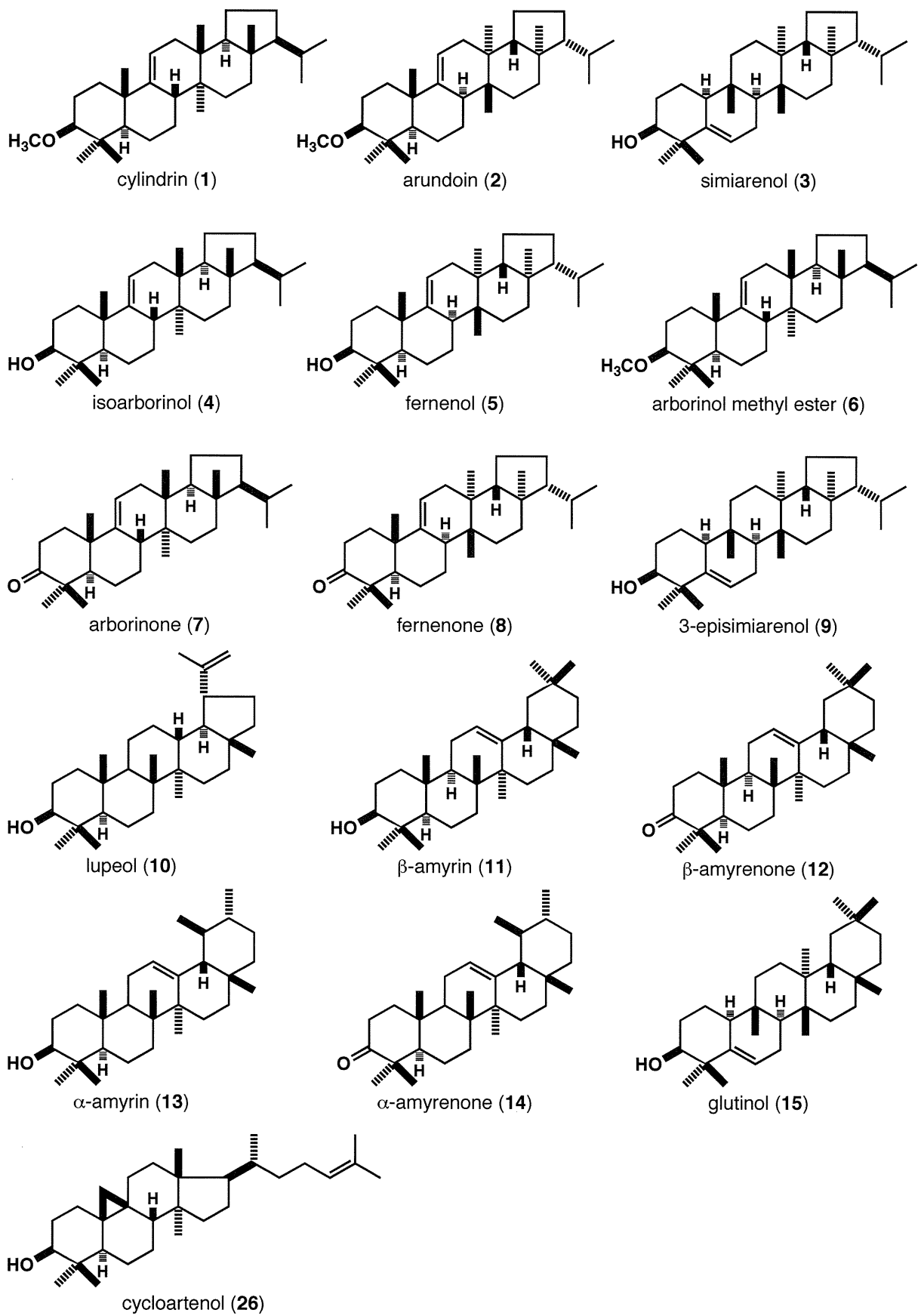


図1 ボウコンから単離された既知トリテルペノイド



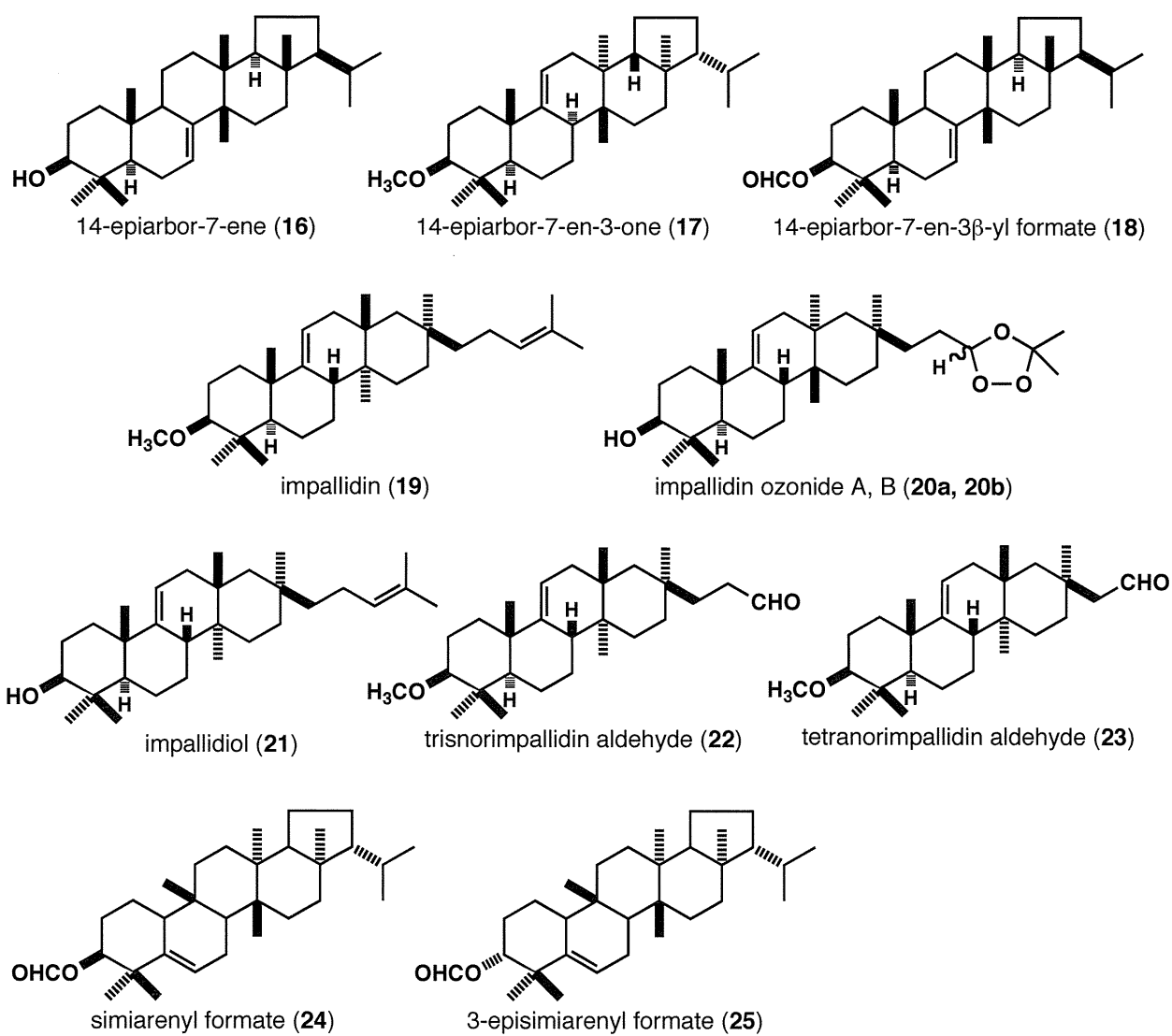


図2 ボウコンから単離された新規トリテルペノイド

Table 1. Triterpenoids detected in *Imperata* rhizome

	A	B	C	D	E	F
fernane <b>(2, 5, 8)</b>	×	○	○	○	○	○
arborane <b>(1, 4, 6, 7)</b>	○	○	○	×	×	○
14-epiareborane <b>(16, 17, 18)</b>	×	×	×	○	△	×
impallidine <b>(19, 20a, 20b, 21, 22, 23)</b>	×	×	○	×	○	×
oleanane <b>(1, 4, 6, 7)</b>	×	×	○	×	○	×
ursane <b>(13, 14)</b>	×	×	○	×	○	×
glutinane <b>(15)</b>	×	×	×	×	×	○
lupane <b>(10)</b>	×	×	×	×	×	○
adianane <b>(3, 9, 24, 25)</b>	×	○	×	×	○	×
cycloartane <b>(26)</b>	×	×	×	×	○	×

○ : Detect, △ : Trace (&lt;0.1 mg), × : Not Detect

チレッタソウ (*Swertia chirata*) のトリテルペノイド成分に関する研究

研究分担者 中根 孝久 昭和薬科大学 准教授

研究要旨 チレッタソウ *S. chirata* (リンドウ科) は、ネパール伝統医学における重要な生薬である。リンドウ科植物は swertiamarin や amarogentin などの苦味配糖体（セコイリド配糖体）や多量の xanthone 類が含まれる事が知られている。本研究では、以前に多量に含まれる xanthone 類を除くためにアルミナ CC を用いた結果、共に除去されてしまったトリテルペノイド酸の存在が示唆されたため、新たに材料を入手し、分離方法を工夫することでトリテルペノイド酸の分離を行い、構造決定を行った。

#### A 研究目的

リンドウ科 *Swertia* 属植物には、swertiamarin, gentiopicroside などのセコイリド配糖体が含まれ、強い苦味を示すことが知られている。日本では、同属のセンブリ (*S. japonica*) が、特に、日本における三大民間薬の一つとして、古くから用いられてきた。

チレッタソウは、チレッタセンブリとも称し、ネパール伝統医学（ネパールアーユルベータ医学）では Chirato, チベット医学では Tig-ta と呼ばれ、全草を鎮咳、頭痛、黄疸、マラリアや糖尿病などに用いられている。

成分は amarogentin や amaroswerin などの苦味成分のほか、多量の xanthone 類や lignan 類が報告されている。これら成分のほかに当研究室において、swertanone, chiratenol や kairatenol 等生合成的に特異な骨格を有するトリテルペノイドが含まれることを既に報告している。当時、多量に含まれる xanthone 類を除く目的で、アルミナカラムクロマトグラフィー（アルミナ CC）を用いた結果、同時にトリテルペノイド酸も除去された可能性があった。そこで、新たに材料を入手し、薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認したところ、多数のトリテルペノイド酸様スポットが確認された。これまでの研究で、これらトリテルペノイド酸には chiratane 型トリテルペノイドの C-24 位のメチル基が酸化さ

れた化合物が含まれることを明らかにした。一方で、これらと異なる骨格のトリテルペノイドの存在が示唆され、構造を明らかにする目的で研究を行った。

#### B 研究方法

ネパール、イラム地方で採集したチレッタソウの根茎 660 g をメタノールで抽出し、80.6 g のエキスを得た。得られたエキスを *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノール及び水で順次分配を行った。それぞれの溶出溶媒で得られたエキスを TLC で確認したところ、*n*-ヘキサン溶出エキスに多数のトリテルペノイド酸様スポットが確認された。

そこで、*n*-ヘキサン溶出分画の検討を行った。*n*-ヘキサンエキス (12.2 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel CC) に付し、*n*-ヘキサン—ベンゼン—エーテル—メタノールの溶媒系で順次極性を上げながら分離を行い、TLC で確認しながら 30 分画に分離した。それぞれの分画を注意深く観察しながら、さらに、silica gel CC, セファデックス LH-20 や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの各種クロマトグラフィーを繰り返し行い、単離精製を行った。

得られた化合物は、質量分析 (LR-MS, HR-MS) や核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、赤外吸収 (IR) スペ

クトルなど各種分光機器による実験を行い、得られたデータの詳細な解析を行った。既知化合物は  $^1\text{H-NMR}$  のデータを標品と比較することにより同定した。新規化合物については、 $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  及び LR-MS で構造を推定した後、構造を確定するために HSQC, HMBC,  $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$  及び NOESY など 2D NMR の詳細な解析を行い、構造決定した。

### C 研究結果

TLC でトリテルペノイドの存在を確認しながら、分離精製を行った結果、ベンゼン溶出分画に目的とするスポットを確認した。さらに silica gel CC, HPLC を繰り返し行い、新規 chiratane 型トリテルペノイド **1**, **2** 及び、新規 hopane 型トリテルペノイド **3**~**5** を単離し、構造決定した。

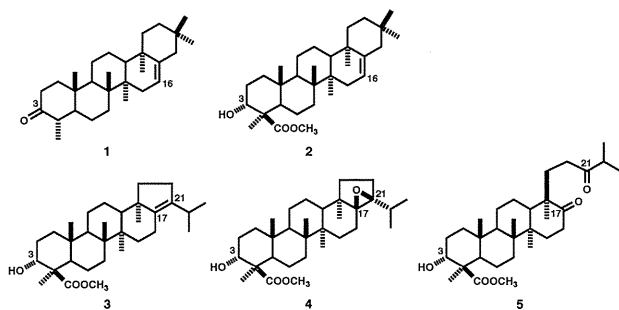


Chart 1

#### 1. 新規 chiratane 型トリテルペノイドの構造

##### 24-norchirat-16-en-3-one (**1**)の構造

化合物 **1** は、IR でカルボニル基 ( $1712\text{ cm}^{-1}$ ) の吸収が認められ、HR-MS で、 $\text{M}^+ m/z$  410.3549 であることから分子式は  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$  である。LR-MS では、chiratenol [chirat-16-en-3 $\beta$ -ol] の CDE 環に由来するフラグメントイオン b, c, d が観測された。

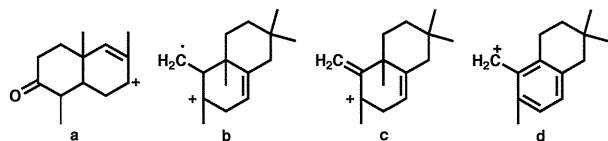


Chart 2

$^1\text{H NMR}$  で、6 個の 3 級メチル基、1 個の 2 級メチル基及び 3 置換 2 重結合上のプロトン  $\delta$  5.222ddd

( $J=5.1, 1.8, 1.8\text{ Hz}$ ) が認められた。3 置換 2 重結合上のプロトンの示す分裂パターンとケミカルシフト値は chiratenol とよく一致しており、メチルケミカルシフト値を比較すると、CDE 環の値がほぼ一致した。従って、2 級メチル基は、A 環のジメチルのうち、どちらかが脱離した nor 体と推定された。

$^{13}\text{C NMR}$  では、DEPT 法で、7 個のメチル基炭素、10 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素及び 7 個の 4 級炭素、計 29 個の炭素が認められた。2 重結合の炭素が  $\delta$  119.84, 139.15 に、カルボニル炭素が  $\delta$  214.00 に観測された。これらケミカルシフト値を 8 と比較したところ、CDE 環に基づく炭素ケミカルシフト値がほぼ一致した。従って、本化合物は  $\text{H}_3$ -23 から  $\text{H}_3$ -24 のメチル基の何れかが脱離した norchirat-16-en-3-one であると推定した。

この構造を確定するために、2D NMR の詳細な解析を行い、Fig. 1 に示した  $^{13}\text{C-}^1\text{H}$  相関及び HMBC 相関を得られ、太字で示した部分構造 (**1a**) を得た。その他破線で示した C-C 結合は HSQC, H-H COSY から特定した。

次に立体構造を決定するために NOESY スペクトルを検討した。その結果、Fig. 1 に示すように **1** は  $\alpha$  側で、 $\text{H-5-H}_3$ -7  $\alpha$ - $\text{H}_3$ -27,  $\text{H}_3$ -28- $\text{H-22}$   $\alpha$ - $\text{H}_3$ -29,  $\beta$  側で  $\text{H-4}$   $\beta$ - $\text{H}_3$ -25,  $\text{H}_3$ -26- $\text{H-13}$  にそれぞれ NOE 相関を認めた。

従って、化合物 **1** は 24-norchirat-16-en-3-one であると決定した。

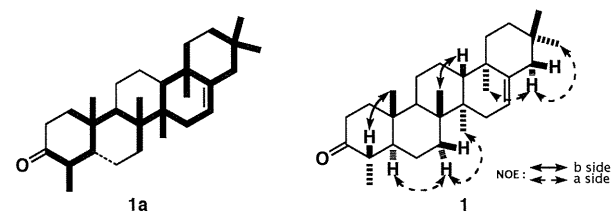


Fig. 1. HMBC (heavy line) and NOE interactions.

##### methyl 3 $\alpha$ -hydroxychirat-16-en-24-oate (**2**) の構造

**2** は、IR で、カルボニル基 ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ) 及び水酸基



(3240  $\text{cm}^{-1}$ ) の吸収が認められた。HR-MS で、 $M^+ m/z$  470.3771 であることから分子式は  $C_{31}H_{50}O_3$  である。LR-MS で、chiratenol の CDE 環に基づくフラグメントイオン **c** ~ **f** が認められた。また、AB 環に由来すると考えられるフラグメントイオン **a** 及び **b** も確認された。(Chart 3)

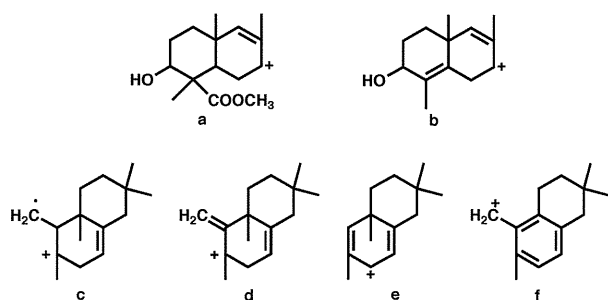


Chart 3

$^1\text{H}$  NMR で、7 個の 3 級メチル基と水酸基の付け根のプロトン  $\delta$  3.451dd ( $J=2.4, 2.4$  Hz), 3 置換 2 重結合のプロトン  $\delta$  5.217ddd ( $J=5.4, 1.8, 1.8$  Hz) 及びメトキシ基に基づくシグナルが  $\delta$  3.331 に認められた。水酸基付け根のプロトンは、分裂パターンから  $\alpha$ -水酸基である。また、3 置換重結合上のプロトンは chiratenol とよく類似した分裂パターンを示した。また、本植物から 24 位のメチルがカルボン酸に酸化された 1 連の化合物が得られていることから 3 $\alpha$ -hydroxychirat-16-en-24-oic acid とプロトンケミカルシフト値と比較した。その結果、CDE 環のメチル基及びオレフィンプロトンの値がよく一致した。

$^{13}\text{C}$  NMR では、DEPT 法で、8 個のメチル基炭素、10 個のメチレン炭素、5 個のメチン炭素及び 8 個の 4 級炭素、計 31 個の炭素が認められた。水酸基付け根の炭素が  $\delta$  80.14 に、2 重結合の炭素が  $\delta$  120.04, 139.06 にカルボニル炭素が  $\delta$  183.20 及びメトキシ炭素が  $\delta$  57.16 にそれぞれ観測された。各炭素ケミカルシフト値を 3 $\alpha$ -hydroxychirat-16-en-24-oic acid と比較すると、C2, C3, C-23 及び C-24 のカルボニルとメトキシ炭素を除いて、よく一致した。

そこで、**2** の構造決定と  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  のシグナルの完全

な帰属を行うために各種 2D NMR を詳細に検討した。その結果、Fig. 2 に示したような相関がそれぞれ観察され、部分構造 **2a** (太線:HMBC 相関, 破線: $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  相関) を確定した。次に、立体は位置を確定するために NOESY スペクトルの解析を行い、 $\alpha$  側, H-9—H<sub>3</sub>-27, H<sub>3</sub>-28—H-22 $\alpha$ —H<sub>3</sub>-29,  $\beta$  側, H<sub>3</sub>-25—H<sub>3</sub>-26 の NOE 相関がそれぞれ認められた。

従って、化合物 **2** は methyl 3 $\alpha$ -hydroxy-chirat-16-en-24-oate であると決定した。

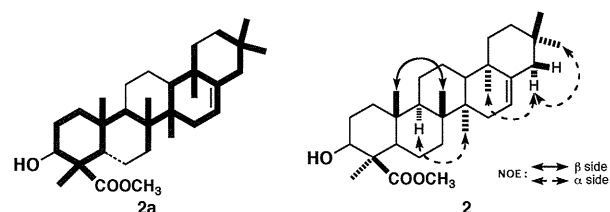


Fig. 2. HMBC (heavy line) and NOE interactions.

## 2. 新規 hopane 型トリテルペノイドの構造

methyl 3 $\alpha$ -hydroxyhop-17(21)-en-24-oate (**3**) 及び methyl 17 $\beta$ ,21 $\beta$ -epoxy-3 $\alpha$ -hydroxyhopan-24-oate (**4**) の構造

化合物 **3** 及び **4** は、何れも、IR でカルボニル基、水酸基の吸収が認められ、HR-MS では、**3** は  $M^+ m/z$  470.3751, **4** は  $M^+ m/z$  486.3701 で分子式はそれぞれ  $C_{31}H_{48}O_3$ ,  $C_{31}H_{48}O_3$  である。LR-MS では、AB 環に水酸基とカルボキシメチルを含むフラグメントイオン **a**, **b** が、**3** の CDE 環に基づくと考えられる **c**, **d** 及び **4** の CDE 環に基づくと考えられる **e**, **f** がそれぞれ認められた。(Chart 4)

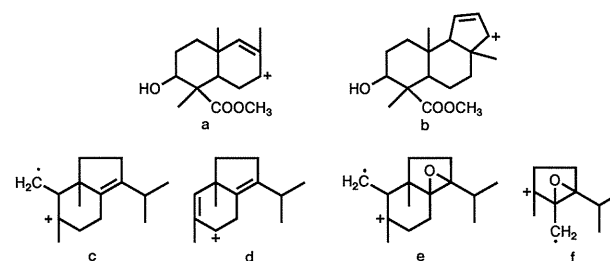


Chart 4

$^1\text{H}$  NMR では、**3** は、6 個の 3 級メチル基、イソプロピル基、水酸基の付け根のプロトン  $\delta$  3.451dd

( $J=2.4, 2.4$  Hz) メトキシメチル  $\delta 3.336$  に, **4** は, 3 級メチル基が 6 個, イソプロピル基, 水酸基の付け根のプロトン  $\delta 3.450$ dd ( $J=2.4, 2.4$  Hz) メトキシメチル  $\delta 3.33$  にそれぞれ認められた. いずれも水酸基は, 分裂パターンから  $\alpha$ -水酸基である. 以上, MS データとあわせて考えると AB 環に水酸基とカルボン酸メチルの存在が示唆され, CDE 環部分を **3** は hop-17(21)-ene と **4** は 17 $\beta$ ,21 $\beta$ -epoxyhopane とそれぞれのケミカルシフト値を比較した. その結果, **3,4** の CDE 環に基づくケミカルシフト値はそれぞれ既知化合物と H<sub>3</sub>-26~H<sub>3</sub>-30 までほぼ一致した.

<sup>13</sup>C NMR では, DEPT 法から, いずれも 6 個のメチル基炭素, 10 個のメチレン炭素, 5 個のメチン炭素, 8 個の 4 級炭素, 計 31 個の炭素シグナルが観測された. **3** には, 水酸基付け根の炭素  $\delta 80.23$  に, 2 重結合の炭素  $\delta 139.92, 136.1$  に, カルボニル炭素  $\delta 181.73$ , メトキシ基  $\delta 57.15$  に, **4** には水酸基付け根の炭素  $\delta 75.86, 76.55$  と  $80.26$ , カルボニル炭素  $\delta 181.32$ , メトキシ基  $\delta 57.16$  にそれぞれ認められた. CDE 環の各炭素ケミカルシフト値を, **3** は hop-17(21)-ene と, **4** は 17 $\beta$ ,21 $\beta$ -epoxyhopane と比較するとそれぞれの比較対象化合物とよく一致した値を示した. 従って, **3** は methyl 3 $\alpha$ -hydroxyhop-17(21)-en-24-oate, **4** は, methyl 17 $\beta$ ,21 $\beta$ -epoxy-3 $\alpha$ -hydroxy-hopan-24-oate であると推定した.

これらの構造を確定するために各種 2D NMR に付き, 詳細な解析を行った. その結果, Fig. 3 に示した HMBC(太線), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H(破線) と <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 相関から **3a, 4a** に示す部分構造を解明した.

次に, **3,4** の立体位置は NOESY スペクトルから考察した. 化合物 **3** では,  $\beta$  側の H<sub>3</sub>-25—H<sub>3</sub>-26,  $\alpha$  側の H<sub>3</sub>-27—H<sub>3</sub>-28 に, 化合物 **4** では,  $\beta$  側の

H<sub>3</sub>-25—H<sub>3</sub>-26—H13,  $\alpha$  側の H-5—H-9, H<sub>3</sub>-27—H<sub>3</sub>-28 にそれぞれ NOE 相関が観測された.

Fig. 3. HMBC (heavy line) and NOE interactions.

従って, **3** は methyl 3 $\alpha$ -hydroxyhop-17(21)-en-24-oate, **4** は, methyl 17 $\beta$ ,21 $\beta$ - epoxy-3 $\alpha$ -hydroxyhopan-24-oate であると決定した.

methyl 3 $\alpha$ -hydroxy-17,21-dioxo-17(21)-secohopan-24-oate (**5**) の構造

化合物 **5** は HR-MS で M<sup>+</sup>  $m/z$  502.3658 であることから分子式 C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub> であることから, 不飽和度は 7 である. LR-MS で, ベースピークとして得られた b 及び a は, ABC 環に水酸基及びカルボキシメチルを有する化合物に特徴的なフラグメントイオンであり, その関連イオンと考えられる c, d も強いイオン強度で観察された. M/z 404 (99) はベースピークに次ぐイオン強度を示した. (Chart 5, 6)

Chart 5

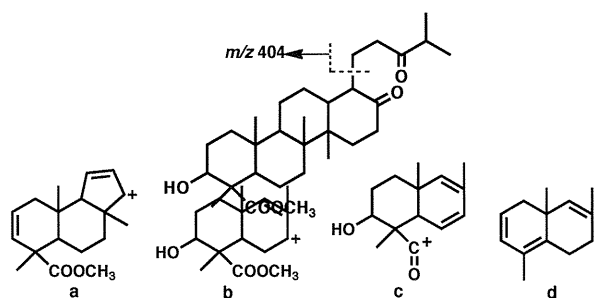
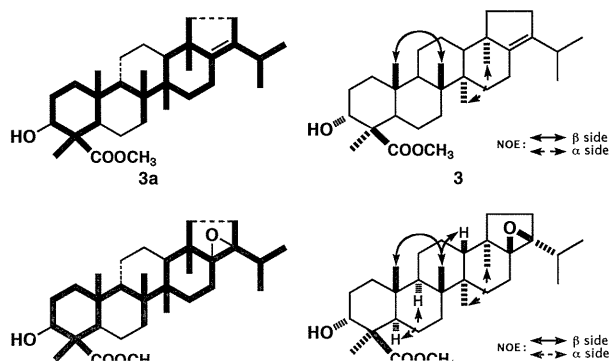


Chart 6

<sup>1</sup>H NMR で, 5 個の 3 級メチル基, 2 個の 2 級メチル基, 水酸基の付け根のプロトン  $\delta 3.459$ dd ( $J=2.4, 2.4$  Hz) 及びメトキシ基  $\delta 3.333$  が認められた. 水酸基付け根のプロトンは分裂パターンから  $\alpha$ -水酸基である. <sup>13</sup>C NMR で, DEPT 法から 8 個のメチル基炭素, 10 個のメチレン炭素, 5 個のメチン炭素に 8 個の 4



級炭素，計 31 個の炭素が確認された。水酸基付け根の炭素  $\delta$  80.11，カルボニル炭素が  $\delta$  181.10, 214.86, 217.69, カルボキシメチル  $\delta$  57.18 がそれぞれ観測された。不飽和度から勘案すると **5** は 4 環性化合物であると考えられる。また，MS から開裂したのは E 環であると推定した。本植物からは 17–21 結合が開裂し，24 位がカルボン酸に酸化された 3 $\beta$ -hydroxy-17,21-dioxo-17,21-secohopan-24-oic acid が得られている。水酸基の配置，カルボキシメチルの存在が異なるが，両者のケミカルシフト値を比較したところ，H<sub>3</sub>-26~H<sub>3</sub>-30 の各メチル基がよく類似した値を示した。同様に <sup>13</sup>C ケミカルシフト値を比較したところ，A 環，C-1~5 及び C-23,25 を除いてほぼ一致した。従って，**6** は 3 $\alpha$ -hydroxy-17,21-dioxo-17,21-secohopan-24-oate であると推定した。

構造を確定するために 2D NMR の解析を行った結果，HMBC 相関（太線），<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H 相関（破線）Fig. 4 に示すような部分構造（**5a**）を解明し，図示した NOE 相関が認められた。

従って，**5** は 3 $\alpha$ -Hydroxy-17,21-dioxo-17(21)-secohopan-24-oate であると決定された。

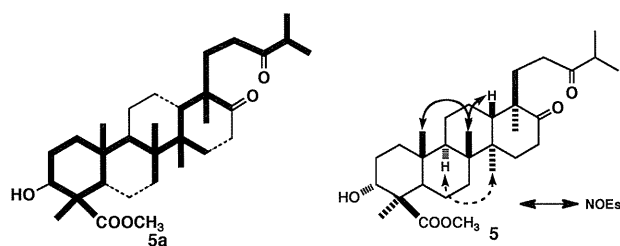


Fig. 4. HMBC (heavy line) and NOE interactions.

#### D 考察

チレッタソウに含まれるトリテルペノイドは，chiratane 骨格や kairatane 骨格など特異な骨格のトリテルペノイドが含まれ，そのうちトリテルペノイド酸は，得られた化合物すべて C-24 位のメチル基がカル

ボン酸に酸化された化合物及びそのメチルエステル体であった。そのほか，hopane や isohopane 骨格のトリテルペノイド，トリテルペノイド酸及びその誘導体も得られており，chiratane 及び kairatane 型トリテルペノイドの生合成経路が isohopane を経由するという考察の裏付ける結果も得られた。

#### E 結論

本研究の結果，チレッタソウに含まれる chiratane 骨格及び hopane 骨格のトリテルペノイド酸及びメチルエステル体の構造を明らかにした。また，トリテルペノイドを指標とした本植物の特徴として，特異な chiratane 骨格や kairatane 骨格の化合物が含まれること，得られたトリテルペノイド酸のすべてが C-24 位が酸化された化合物であることを明らかにした。

#### F 健康危機情報

なし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

中根孝久，上田達也，埴田明彦，高野昭人，増田和夫，関田節子：Swertia chirata のトリテルペノイド（4），生薬学会第 58 回年会，9 月，東京（2011）

#### H 知的所有権の取得情報

なし

分担研究報告書

漢方処方配合生薬の安定供給及び持続的品質保持における国際標準化に関する研究

分担研究課題：キク科タンポポ亜科植物のトリテルペノイドの探索

研究分担者 篠崎 淳一 昭和薬科大学 助教

研究要旨 アキノノゲシ新鮮根のヘキサンエキスから分離したトリテルペノイドアセテート分画の成分を精査し、新規転位型ルパン系トリテルペノイド 1 種 (lactucenyl acetate), 既知化合物 6 種の計 7 種を単離同定あるいは構造決定した。

A 研究目的

特定の植物成分の生合成を明らかにするには含有される成分の詳細について認識することが前提とされる。

キク科タンポポ亜科植物の植物化学的研究から、本植物群が構造多様性に富むトリテルペノイド化合物群を生産することが明らかとなっている。タンポポ亜科植物にはルパン、オレアナン、ウルサン系トリテルペノイドが共通に含まれているが、カンサイタンポポの転位型ルパン、コウゾリナのガンマセラン骨格など種特異的なトリテルペノイドも多く報告されている。

新規骨格を含む多様なトリテルペノイドを含有するタンポポ亜科植物はトリテルペノイドライブラリーを構築する上で有用な植物群であり、その後の生理活性スクリーニングの基盤研究に位置づけられる。また、これまで成分研究が行われてきたタンポポ

亜科植物はフィールドから採集されたものであり、栽培、育種が確立していない状況を鑑みると現在の生育場所を現状のまま維持することが重要である。植物化学的研究により、研究対象植物が医薬品シード化合物としての可能性を有する二次代謝産物の供給源であることを示すことは、これら植物を取り巻く環境の保全を喚起するためのアプローチのひとつであると思われる。

今年度はキク科タンポポ亜科植物トリテルペノイド成分探索の一環として、アキノノゲシ *Lactuca indica* L. のトリテルペノイド成分の精査を行った。

B 研究方法

アキノノゲシの新鮮根 (2.0 kg) から調製したヘキサンエキス (8.0 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。ヘキサン、ヘキサン-ベンゼン (8:2)、ベンゼン、