薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (2) 140-149 (1987)

キチジョウソウ *Reineckia carnea* KUNTH 地上部の成分研究¹⁾

岩越 淳, 小西天二, 清沢 脩*

京都薬科大学

Studies on the Constituents of the Aerial Parts of *Reineckia carnea* KUNTH

KIYOSHI IWAGOE, TENJI KONISHI and SHIU KIYOSAWA*

Kyoto Pharmaceutical University, Nakauchi-cho, Misasagi,
Yamashina-ku, Kyoto, 607, Japan

(Received August 25, 1986)

Two steroidal sulfates, tentatively named Rs-1 and 2 which were detected with pinacryptol yellow reagent, were isolated from a methanol extract of the aerial parts of *Reineckia carnea* KUNTH (Liliaceae). Rs-1 and 2 were characterized as kitigenin 4-*O*-sulfate and its proto-type, 26-*O*- β -D-glucopyranosyl 22-methoxy-5 β -furostane-1 β ,3 β ,4 β ,5 β , 26-pentaol 4-*O*-sulfate, respectively. Further, three kinds of steroidal glycosides, named Rg-1, and compound I and II were separated from the MeOH extract. Rg-1 was established as pentologenin 5-*O*- β -D-glucopyranoside, and the others were elucidated as a mixture of convallamarogenin and isorhodeasapogenin carrying the sugar moieties of 1-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranosido-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside and 1-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranosido-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, respectively.

Keywords—steroidal sulfate; *Reineckia carnea*; Liliaceae; pinacryptol yellow reagent; TLC; Steroidal glycoside

著者らは先にハラン *Aspidistra elatior* Blume (Liliaceae) の成分について研究し, そのメタノールエキスを単離した glycoside F が, 植物から得たステロイドサポニン硫酸エステル類の最初の例であることを報告した.²⁾ また Watanabe らは, 同科の *Liriope* 及び *Ophiopogon* 各属から数種のステロイドサポニン硫酸エステル類を単離し, それらの構造を解明し報告している.³⁾ したがってユリ科植物には, 広くステロイドサポニン硫酸エステル類が分布している可能性が考えられる.

Borecky⁴⁾ は, pinacryptol yellow 試薬を用い, ペーパークロマトグラフィー (PPC) で sulfonyl 化合物を検出しているが, 著者らは本試薬を薄層クロマトグラフィー (TLC) に応用し, ユリ科植物の硫酸エステル類を検索の結果, ハラン近縁のキチジョウソウ *Reineckia carnea* KUNTH のメタノールエキスを, 本試薬黄色蛍光陽性物質, 2 種が検出された.¹⁾ キチジョウソウの成分研究については, 既に武田ら⁵⁾ の報告があり, 数種のステロイドサポゲニンの構造が明らかにされているが, 今回硫酸エステル類を含め 5 種の物質, Rs-1, Rs-2 及び Rg-1, compound I, II を分離, 構造を検討したので報告する.

これら物質の分離は, キチジョウソウ地上部のメタノールエキス (166 g) について行い, メタノール分配画分 (residue-4) から Rg-1, compound I, II 及び Rs-1 の 4 物質をカラムクロマトを繰り返すことにより分離し, 同様にして水層 (residue-2) からは, Rs-2 を得た.

Rg-1 (1), mp 292–295°C (dec.) $[\alpha]_D -46.1^\circ$ は, 赤外線吸収 (IR) スペクトルで, 水酸基に基づく吸収の他, 25(*R*)-spiroketal 環の特性吸収⁶⁾ を示す. 1 は酸加水分解により aglycone (2) と, glucose を与える. 2 及びその acetate (2a) の融点, 比旋光度は, それぞれ pentologenin 及び tetraacetoxypentologenin の文献値^{5b)} の恒数と近似する. 1 の ¹³C-核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは, 既知物質 glycoside A (3)²⁾ のスペクトルと極めて類似し C₁–C₁₉, C₂₁ 及び糖部の各炭素シグナルは, それぞれ対応したケミカルシフトを示すのに対し, C₂₀ 及び C₂₂–C₂₇ の各炭素シグナルは, 25(*R*), (*S*) isomer に伴うそれぞれの chemical shift の相異を示す.⁷⁾ したがって 1 は, pentologenin を aglycone とし, 3 と同様 5-OH に glucose を β 結合していることが推察される. 以上のことが

Chart 1

Chart 2

ら Rg-1 は, pentologenin 5-O- β -D-glucopyranoside と推定する。

Rs-1 (4), mp 332°C (dec.), $[\alpha]_D -38.0^\circ$ は, 水飽和ブタノール溶液から無色針状晶として得られ, pinacryptol yellow 試薬に対し黄色蛍光陽性である。その IR スペクトルは, 水酸基に基づく吸収の他, 1250 cm^{-1} に S-O 伸縮振動による極大吸収がみられる。4 を塩酸酸性で加温すると, aglycone として kitigenin (5) を与えるが, 糖は検出されない。また PPC により, 硫酸イオンを検出した。4 は各種溶媒に極めて難溶のため, benzoyl 誘導体 (6) とし, その ^{13}C -NMR スペクトルを測定した。それぞれの炭素は, 5 のスペクトルデータと比較して帰属された (Table I)。6 と 5 の A 環における対応する炭素の chemical shift をそれぞれ比較すると, 6 の C₂ の methylene 炭素は 1,3-dibenzoyl 化に伴う β 効果により, 4.5 ppm の高磁場シフトを示し, C₄ の 5.8 ppm の異常な低磁場シフトは, 水酸基の sulfonyl 化に伴う結果と考えられる。またその影響は vicinal 炭素の高磁場シフトにも現れ, 先に報告した sulfate の glycoside F の acetate (8) 及び 8 の脱 sulfate (9) の ^{13}C -NMR スペクトルにみられる関係とも矛盾しない。²⁾

したがって Rs-1 は kitigenin 4-O-sulfate, 4 と決定した。

Rs-2 (7), mp 243–247°C (dec.), $[\alpha]_D -32.6^\circ$ は IR スペクトルで spiroketal 環に基づく特性吸収を示さず Ehrlich 反応赤色陽性⁸⁾ であることから, furostanol 配糖体であることが推定され, 1H -NMR スペクトルにより δ 3.25 に 22-OCH₃ のシグナルが確認される。また一方では 4 と同様 1250 cm^{-1} に S-O 伸縮振動による吸収があり, pinacryptol yellow 試薬に対し黄色蛍光陽性であることから, sulfate の構造が示唆された。7 を almond emulsin を用い酵素分解すると, glucose 及び 4 を与える。したがって 7 は 4 の 26-O-glucoside furostanol 配糖体と推定され, また 1H -NMR スペクトルにより, δ 4.75 ppm に 1H 分の糖の anomeric proton シグナルが, $J=6$ Hz で確認されることから, 糖の結合配位は β と決定した。なお 7 の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて, C₂₂ のシグナルが δ 112.8 ppm に現れることから, furostanol 構造が支持される。¹⁰⁾

以上のことから 7 の構造は, 26-O- β -D-glucopyranosyl 22-methoxy-5 β -furostane-1 β ,3 β ,4 β ,5 β -26-pentaol 4-O-

TABLE I. ^{13}C -NMR Chemical Shifts for 1, 3, 5, 6 and 7

Carbon	1	3 ^{a)}	7	6	5 ⁷⁾
1	78.6 ^{c)}	78.6 ^{c)}	73.8	74.6	73.66
2	67.9 ^{b)}	68.0 ^{b)}	34.3	28.8	33.42
3	75.8	76.0	68.2	70.5	71.11
4	67.5 ^{b)}	67.5 ^{b)}	75.1 ^{b)}	73.8	67.97
5	87.2	87.3	78.2	76.8	78.25
6	24.8	24.9	30.6	27.2	30.40
7	28.4	28.4	28.3	28.8	28.47
8	34.6	34.6	35.0	34.5	35.00
9	46.2	46.3	45.8	45.0	45.67
10	46.4	46.6	46.0	46.5	45.36
11	21.7	21.6	21.5	21.7	21.45
12	39.9	39.9	40.5	39.4	40.10
13	40.5	40.5	40.8	40.4	40.63
14	55.9	56.0	55.7	55.5	56.23
15	32.1	32.1	32.3	31.9	32.21
16	81.1	81.1	81.1	80.7	81.00
17	62.9	62.8	64.2	62.3	62.95
18	16.5	16.3	16.3	16.3	16.62
19	13.6	13.6	13.7	13.1	13.88
20	42.1	42.5	40.8	41.7	41.98
21	14.9	14.8	16.4	14.6	15.00
22	109.2	109.7	112.8	109.1	109.09
23	31.9	26.3 ^{d)}	34.3	31.9	31.79
24	29.5	26.2 ^{d)}	28.3	29.7	29.23
25	30.6	27.5	31.2	30.4	30.56
26	67.0	65.2	72.0	67.0	66.80
27	17.3	16.5	17.2	17.2	17.32
OMe			47.3		
Glucose				Benzoyl	
1	97.3	97.4	104.8	121.7, 122.8	
2	75.5	75.6	75.4 ^{b)}	131.8, 132.2	
3	77.8	77.7	78.4	113.7, 113.8	
4	71.4	71.6	71.7	165.7 ^{b)} , 167.0 ^{b)}	
5	78.3 ^{c)}	78.4 ^{c)}	78.4	113.7, 113.8	
6	62.4	62.6	62.8	131.8, 132.2	
				CO	163.4 ^{b)} , 163.4 ^{b)}
				OMe	55.2, 55.5

a) Data quoted from reference 2. b—d) Assignments may be interchanged in each column.

sulfate と結論した。

なお 4 及び 7 の sulfonyl 基に結合する金属として Mg^{2+} を検出しているが、他の金属については精査していない。

Compound I (10), mp 223—225°C (dec.), $[\alpha]_{\text{D}} -81.9^\circ$ は、IR スペクトルで水酸基に由来する吸収、及び spiroketal 環に基づく特性吸収^{8,9)}を示す。10 は酸加水分解により、糖として rhamnose 及び fucose が検出される。またその aglycone 部 (11), mp 261—262°C (dec.), $[\alpha]_{\text{D}} -84.6^\circ$ は通常の無水酢酸-ピリジンによるアセチル化で acetate (11a), mp 219—220°C, $[\alpha]_{\text{D}} -83.3^\circ$ を与える。11a の IR スペクトルは水酸基の吸収を示さず、また ^1H -NMR スペクトルでは 2.01, 2.03 ppm に 2 個分のアセチル基のメチルプロトンシグナルが認められる。11, 11a の各恒数は既知物質, convallamarogenin 及びその acetate の文献値⁹⁾ (mp 259—261°C, $[\alpha]_{\text{D}} -79.1^\circ$ 及び mp 214—215°C, $[\alpha]_{\text{D}} -88.2^\circ$) とほぼ対応した値を示す。しかし 11a の electron impacting mass spectrometry

TABLE II. ^{13}C -NMR Chemical Shifts for 10, 11, 12, and 14

Carbon	10 25=	14 25=	11 ^(7,10) 25=	12 25=	10, 11, 12, 14 ⁽⁷⁾ 25 (R)
1	77.5	78.0	73.3	72.7	
2	29.7	30.2	32.9	31.8	
3	70.0	70.3	68.1	72.4	
4	33.9	34.4	34.4	28.9	
5	30.9	30.9	31.2	31.1	
6	26.9 ^{c)}	27.2 ^{c)}	26.7	26.4	
7	26.6 ^{c)}	26.3 ^{c)}	26.7	26.4	
8	34.6	34.4	35.9	35.7	
9	45.7	45.8	42.2	45.2	
10	39.6	39.5	40.0	40.3	
11	22.1	22.5	21.1	21.0	
12	40.3	40.4	40.4	40.3	
13	40.6	40.6	40.7	40.6	
14	56.9	57.0	56.5	56.3	
15	32.2	32.1	32.2	32.1	
16	81.4	81.4	81.4	81.4	81.1
17	63.1	63.1	63.2	63.1	
18	16.7	16.6	16.6	16.5	
19	17.0	17.2	19.3	18.9	
20	41.8	41.8	41.9	41.8	42.0
21	15.0	15.0	15.0	14.9	15.0
22	109.4	109.4	109.3	109.3	109.2
23	33.2 ^{d)}	33.2 ^{d)}	33.2 ^{d)}	33.2 ^{d)}	31.8—31.9
24	28.9 ^{d)}	28.9 ^{d)}	28.9 ^{d)}	28.9 ^{d)}	29.2—29.3
25	144.4	144.4	144.3	144.3	30.6
26	65.0	65.0	65.0	65.0	66.8
27	108.7	108.6	108.5	108.6	17.3
	Fucose	Xylose	Fucose ^{a)}		β -D-Xylopyranoside ^{b)}
1	99.1 ^{g)}	99.6 ^{g)}	100.4		106.0
2	77.0	79.1	76.8		74.6
3	74.6	77.0	74.9		78.1
4	73.4	71.3	73.4		70.1
5	71.4	66.8	71.2		67.0
6	17.0		17.1		MeO 56.6
Rhamnose (C-1)					
1	101.2 ^{g)}	101.5 ^{g)}	101.6		
2	72.1 ^{e)}	72.2 ^{e)}	72.6		
3	72.7 ^{e)}	72.6 ^{e)}	72.7		
4	74.0	74.0	74.5		
5	69.0	69.4	69.3		
6	18.8 ^{f)}	18.9 ^{f)}	19.0		
Rhamnose (C-3)					
1	99.3	99.3		98.7	
2	72.2	72.2		72.4	
3	72.2	72.2		72.4	
4	73.9	73.9		73.6	
5	69.9	69.8		70.2	
6	18.7 ^{f)}	18.6 ^{f)}		18.5	

a) and b) Data quoted from reference 3 and 13, respectively. c—g) Assignments may be interchanged in same column.

TABLE III. Comparison of the Molecular Optical Rotations of Compounds **11** and **12**

Compound	$[\alpha]_D$	$[M]_D$	$\Delta[M]_D$
12	-117.4°	-676°	-312°
11	-84.6°	-364°	
Me- α -L-rhamnopyranose		-111°	
Me- β -L-rhamnopyranose		+170°	

(EI-MS) は m/z 516, 514 に分子イオンピークを示し, また **11** の ^{13}C -NMR スペクトルは, $\Delta^{25(27)}$ エキソメチレンタイプに基づく各炭素シグナルの他, δ 109.2 に 25(*R*) 型の C_{22} のシグナルが認められる.^{7,10)} 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による両者の混合比は, 15 : 1 であった. したがって **10** は convallamarogenin,⁹⁾ isorhodeasapogenin¹¹⁾ を aglycone とする配糖体混合物であると推定される. **10** の完全アセチル化体 (**10a**) の EI-MS は m/z 1204 に分子イオンピーク (M^+), m/z 503 に methylpentosyl methylpentose pentaacetate, m/z 273 に methylpentose triacetate のそれぞれのフラグメントイオンピークが検出されることから, 3 単糖は単一直鎖結合でなく, aglycone の 1 及び 3 位の両水酸基に分かれて結合することが示唆される. 次に **10** を部分加水分解して, **12** を得た. **12** を更に加水分解すると, 糖として rhamnose が検出される. また **12** の ^1H -NMR スペクトルでは, 1 個分の anomeric proton シグナルが δ 5.03 ppm に現れ, ^{13}C -NMR スペクトルでは, L-rhamnopyranoside に由来する各炭素シグナルが確認される (Table II). また aglycone 部については, **11** のデータとの比較により各炭素が帰属された (Table II). C_2 , C_4 の各炭素シグナルが, **11** と比較して 1.1, 5.5 ppm の高磁場シフトを示すのは β , β' 炭素の glycosylation shift¹²⁾ によるものと考えられる. したがって rhamnose は **12** の 3 位に結合し, また通常の L 体とすればその配位は, **11** 及び **12** の分子旋光度差から α と決定される (Table III). **10** の ^{13}C -NMR スペクトルは δ 99.1, 99.3, 101.2 ppm に anomeric 炭素シグナルを示し, 末端 rhamnose に基づく各炭素シグナル C_2 — C_6 がそれぞれ 2 本ずつ現れることから, rhamnose は 2 個存在し, **12** の構造と考え合わせると **10** の aglycone 部の 1 位に結合する糖鎖は, rhamnosyl fucoside と推定される. このような糖鎖をもつ配糖体の例として, 1-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranoside の ophiopogogenin B (**13**)³⁾ があり, **10** 及び **13** の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて, 1 位に結合する糖鎖の各炭素の chemical shift は, 極めてよい一致を示した (Table II).

したがって **10** は, convallamarogenin 及び isorhodeasapogenin の 1-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopyranosido-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside であり, その混合比は 15 : 1 と推定した.

Compound II (**14**), mp 238—241°C (dec.), $[\alpha]_D$ -93.3° は, IR スペクトルで **10** と同様に spiroketal の特性吸収を示し, 酸加水分解により aglycone として mp 256—257°C の針状晶を与え, メタノールで再結を繰り返すと mp 260—261°C となり, **11** と混融して融点降下を示さない. また糖分画からは, rhamnose, xylose が検出される. **14** の peracetate (**14a**) の EI-MS は m/z 1192, 1190 に分子イオンピーク (M^+), m/z 489, 及び 273 にそれぞれ pentaacetoxyrhamnosylxyloside 及び triacetoxyrhamnoside に起因する糖のフラグメントイオンピークを示す. **14** を部分加水分解して **12'**, **15** の 2 物質を得た. **15** は ^1H -NMR スペクトル及び酸加水分解により, xyloside であることが推定された. **15** とその peracetate (**15a**) について両者の ^1H -NMR スペクトルを比較したところ, acetyl 化に伴う 19- CH_3 への影響はほとんどみられず,¹³⁾ また糖の anomeric proton は δ 4.55 に $J=7\text{ Hz}$ の doublet として現れることから, xylose は aglycone の C_1 -OH に β 結合していることが示唆された. ^{13}C -NMR スペクトルにおいて, **14** の 2 個の rhamnose シグナルは, **10** とほぼ同様の chemical shift を示し, ともに末端 rhamnose であることは明らかである. また糖部の xylose の各炭素のシグナルを Me- β -D-xylopyranoside¹⁴⁾ と比較すると, xylose の C_2 は 4.5 ppm の低磁場シフト, C_1 及び C_3 はそれぞれ 6.4, 1.1 ppm の高磁場シフトを示し, α -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranoside の糖鎖構造が支持される.

したがって **14** は convallamarogenin 及び isorhodeasapogenin の 1-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranosido-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside の配糖体混合物であり, その混合比は HPLC により, 1 : 1 と判定された.

Reineckia 属は *Aspidistra*, *Liriope*, *Ophiopogon* 各属と非常に近縁の植物群であり, これら各属同様ステロイ

ド化合物の硫酸エステル類が単離されたのは、成分分類学上興味がひかれる。また TLC 上 pinacryptol yellow 試薬を用い、硫酸エステル類を検出出来たのは、同類物質を検索する上に大変有意義と考える。

実験の部

融点は微量融点測定器 (柳本) で測定 (未補正)。旋光度は NEP-2 (REX), IR は IR-27G 型 (島津), NMR は CFT-20 型 (Varian) (^1H : 80 MHz, ^{13}C : 20 MHz, 内部標準: TMS, ケミカルシフト: δ 値 (ppm)), MS は M-80 型 (日立) (EI-MS: イオン化ポテンシャル (I.P.) 20 eV, イオン化電流 (I.C.) 70 μA , ソース温度 (S.T.) 180°C. FD-MS: ソース温度 (S.T.) 80°C, エミッター電流 (E.C.) 15—20 mA), ガスクロマトグラフィー (GLC) は GC-6A 型 (島津) (検出: 水素炎) で測定。PPC は東洋汙紙 No. 50, カラムクロマトグラフィーは担体としてシリカゲル (E. Merck), シラナイズドシリカゲル (E. Merck), Sephadex LH-20 (Pharmacia) を用いた。Sulfate の検出: pinacryptol yellow 試薬の調製; pinacryptol yellow 試薬 (50 mg) を EtOH (100 ml) に溶解, 上澄液を用いる。検出; 薄層板上に本試薬噴霧後 1, 2 分加温し, 直ちに UV ランプ (254 nm) 下で検出する。

材料植物 昭和 57 年 4 月, 京都市山科区安祥寺地籍で, 野生種を採集。

抽出と分離 キチジョウソウ地上部 (5.3 kg) を MeOH (9 l) に浸漬, 室温抽出 (10 日間) を 2 回繰り返す, 抽出液は 60°C 以下で減圧濃縮, MeOH エキス, 166 g を得た。このエキスについて Chart 1 に示す分画操作を進め, H_2O 及び MeOH 分画後の残留物 residue-2 及び residue-4 を, それぞれカラムクロマトにかけ, 各成分の分離を試みた。Residue-4 (46 g) はシリカゲルカラムクロマトにより Fr 1—Fr 5 に分画, Fr 3 については溶出後直ちに析出した沈澱物 (86 mg) を汙取し, 水飽和ブタノールより再結して, 無色針状晶の Rs-1 (80 mg) を得た。Fr 4 (6.27 g) は更にシリカゲルカラムクロマトを繰り返して Fr 11 (105 mg) を分画, MeOH から再結して無色針状晶, Rg-1 (66 mg) を得た。Fr 8 (622 mg) は無水酢酸-ピリジン (1:1, v/v) により室温で, 1 夜放置してアセチル化後, 減圧乾固し残渣をシリカゲルカラムクロマトにかけ Fr 13 (291 mg) 及び Fr 14 (217 mg) に分画, 前者より acetate-1 (10a, 250 mg) を白色粉末として, 後者から acetate-2 (14a, 149 mg) を MeOH で再結し, 無色針状晶として分離した。10a, 14a はそれぞれ MeOH 10 ml に溶解し 2 N KOH を 5 滴添加し, 3 時間室温放置後減圧乾固し, それぞれ Sephadex LH-20 カラムクロマトにかけ, compound I (205 mg) を希 MeOH より, また compound II (120 mg) を EtOH よりそれぞれ白色粉末として得た。水層 (118 g) はシラナイズドシリカゲルカラムクロマトにより糖部を除き, 更にシリカゲル, Sephadex LH-20 の各クロマトを繰り返して, MeOH から再結して無色針状晶の Rs-2 (120 mg) を得た。

Rg-1 (1) の性状 mp 292—295°C (dec.); $[\alpha]_D^{25} -46.1^\circ$ ($c=1.02$, pyridine), 無色針状晶 (MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 915 < 895, 850 (25(R)-spiroketal). ^1H -NMR (pyridine- d_5): 0.81 (3H, s, 18- CH_3), 1.07 (3H, d, $J=6$ Hz, 27- CH_3), 1.12 (3H, d, $J=6$ Hz, 21- CH_3), 1.66 (3H, s, 19- CH_3), 5.09 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H). ^{13}C -NMR: Table I. Anal. Calcd $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_{12} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 58.39; H, 8.11. Found: C, 58.10; H, 8.38.

1 の酸加水分解 1 (100 mg) を 2 N H_2SO_4 (10 ml) に懸濁し, 水浴上 1 時間加熱還流する。反応後析出沈澱物を汉取, CHCl_3 -MeOH 混合溶媒で再結, 無色針状晶 (2) (4 mg) を得た。mp 323°C (dec.), $[\alpha]_D^{25} -59.2^\circ$ ($c=0.84$, CHCl_3 -MeOH, 1:1 v/v). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 975, 910 < 890, 855 (25(R)-spiroketal).

2 のアセチル化 2 (7 mg) を無水酢酸-ピリジン (1:1 v/v) に溶解し, 加温 (70°C, 3 h) 後減圧乾固し, 残渣は MeOH より再結し無色針状晶 (2a) (7.3 mg) を得た。mp 170—173°C, $[\alpha]_D^{25} -39.7^\circ$ ($c=0.78$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3600 (OH), 1750 (COOR), 980, 920 < 898, 850 (25(R)-spiroketal).

Rs-1 (4) の性状 mp 332°C (dec.), $[\alpha]_D^{25} -38.0^\circ$ ($c=0.79$, dimethylsulfoxide), 無色針状晶 (水飽和ブタノール), pinacryptol yellow 試薬: 黄色蛍光陽性。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 1250, 860, (S-O), 980, 920 < 895, 845 (25(R)-spiroketal). Anal. Calcd $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_9 \cdot \text{S} \cdot \text{Mg} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 55.34; H, 7.74. Found: C, 55.65; H, 8.08.

4 の酸加水分解 4 (10 mg) を 2 N HCl-50% EtOH (3 ml) に溶解し, 水浴上 1 時間反応後水を加え, 析出沈澱物を汉取する。 CHCl_3 -MeOH より再結, 無色針状晶 (5) (3 mg) を得た。mp 320°C, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 920 < 900, 865 (25(R)-spiroketal). ^{13}C -NMR (Varian XL-300, 75 MHz, $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$, δ ppm): Table I. Kitigenin の文献値⁷⁾ とよく一致する。 C_9 及び C_{10} の帰属が, 文献と逆であるが, C_9 (d), C_{10} (s) の各シグナルは, 本スペクトルにおいて充分確認された。

汉液は減圧乾固, 水 1 滴に溶解後検液とし, Na_2SO_4 水溶液を標品として PPC (MeOH- H_2O , 1:1 v/v) を行い, 風乾後 BaCl_2 溶液 (BaCl_2 100 mg を 70% MeOH 5 ml に溶解) を噴霧, 乾燥後更にロジゾン酸カリウム溶液 (ロジゾン酸カリウム 10 mg を 50% MeOH 50 ml に溶解) を噴霧して検出, (R_f 値 0.64)。一方一部検液にキナリザ

リン試液 (A 液: 2 N NaOH, B 液: 10% HNO₃ 溶液, C 液: 0.02% quinalizarin-EtOH 溶液) を加え, 直ちに青紫色沈澱物を形成することにより Mg²⁺ を検出した。

4 のベンゾイル化 4 (140 mg) をピリジン (20 ml) に懸濁し, *p*-methoxybenzoyl chloride (5 ml) を加え, 5°C で 2 日間放置後氷水にあけ, 析出沈澱物を濾取する。沈澱物はシリカゲルカラムクロマト (CHCl₃-MeOH, 10:1 v/v) により Fr 1, 2 に分画, Fr 1 は MeOH より再結し無色針状晶 (6) (42.3 mg) を得, Fr 2 からは原料, 4 (74 mg) を回収した。

6 の性状 mp 234—240°C (dec.), $[\alpha]_D^{25} -40.6^\circ$ ($c=0.64$, CHCl₃). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3600—3400 (OH), 1610, 1515, 1380 (aromatic), 1230, 825 (S-O), 980, 910 < 895, 845 (25(*R*)-spiroketal). ¹H-NMR (CDCl₃): 0.77 (3H, s, 18-CH₃), 0.93 (3H, d, $J=5.3$ Hz, 21-CH₃), 1.24 (3H, s, 19-CH₃), 1.30 (3H, d, $J=6$ Hz, 27-CH₃), 3.59, 3.83 (each 3H, s, OCH₃), 4.36 (1H, br, OCH), 5.03 (1H, br, OCH), 5.34 (1H, br, OCH), 6.05 (1H, br, OCH), 6.30, 6.86, 7.55, 7.95 (each 2H, d, $J=8$ Hz, aromatic H). ¹³C-NMR: Table II. Anal. Calcd C₄₈H₅₆O₁₄·S·Mg: C, 60.53; H, 6.63. Found: C, 60.38; H, 6.41.

Rs-2 (7) の性状 mp 243—247°C (dec.), $[\alpha]_D^{30} -32.6^\circ$ ($c=0.95$, MeOH), 無色針状晶 (MeOH). Pinacryptol yellow 試薬: 黄色蛍光陽性。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3500—3300 (OH), 1250, 865 (S-O). ¹H-NMR (pyridine-*d*₅): 0.75 (3H, s, 18-CH₃), 1.02 (3H, d, $J=7$ Hz, 21-CH₃), 1.03 (3H, d, $J=7$ Hz, 27-CH₃), 1.50 (3H, s, 19-CH₃), 3.25 (3H, s, 22-OCH₃), 4.75 (1H, d, $J=6$ Hz, anomeric H). Anal. Calcd C₈₅H₈₇O₁₆S·Mg·3H₂O: C, 49.79; H, 7.52. Found: C, 49.97; H, 7.80.

7 の酵素分解 7 (25 mg) を水 (3 ml) に溶解, β-glucosidase (almond emulsin) (30 mg) を加えインキュベート (37°C, 5 h) 後沈澱物を濾取, 水飽和ブタノールから再結して無色針状晶 (4) (7 mg) を得た。このものは, さきの Rs-1 の標品と混融し, 同様の分解点 (332°C) を示し, IR (KBr) スペクトルも一致する。また濾液は減圧乾固し, PPC (展開溶媒: BuOH-pyridine-H₂O, 6:2:3 の上層液に, 更にその 1/11 量の pyridine を加える。検出: フタル酸アニリン) を行い, glucose を検出した ($R_f=0.34$)。

Compound I (10) の性状 白色粉末 (希 MeOH) (mp 223—225°C (dec.), $[\alpha]_D^{30} -81.9^\circ$ ($c=1.05$, MeOH)). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3500—3300 (OH), 980, 945, 915, 895, 875, 830 ($\Delta^{25(27)}$ -spiroketal). ¹H-NMR (pyridine-*d*₅): 0.84 (3H, s, 18-CH₃), 1.06 (3H, d, $J=7$ Hz, 21-CH₃), 1.25 (3H, s, 19-CH₃), 1.45 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 糖の CH₃), 1.58 (3H, d, $J=5.8$ Hz, 糖の CH₃), 1.66 (3H, d, $J=5.4$ Hz, 糖の CH₃), 5.32 (1H, s, anomeric H), 6.36 (2H, s, anomeric H). FD-MS m/z : 892 ($M^+ + H + Na$), 869 ($M^+ + H$), 147 (C₈H₁₀O₄). Anal. Calcd C₄₅H₇₂O₁₀·H₂O: C, 60.93; H, 8.41. Found: C, 60.70; H, 8.33.

Acetate-1 (10a) の性状 白色粉末 (希 MeOH) (mp 155—156°C, $[\alpha]_D^{34} -78.5^\circ$ ($c=2.0$, CHCl₃)). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1750 (COOR), 980, 940, 915, 895, 875, 840 ($\Delta^{25(27)}$ -spiroketal). ¹H-NMR (CDCl₃): 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.95 (3H, d, $J=7$ Hz, 21-CH₃), 1.06 (3H, s, 19-CH₃), 1.16, 1.23, 1.24 (each 3H, d, $J=6$ Hz, 糖の CH₃), 1.91, 1.94, 1.99 (each 3H, s, CH₃CO), 2.06, 2.11 (each 6H, s, CH₃CO×2), 2.14 (3H, s, CH₃CO), 4.75 (2H, s, 27-CH₂). EI-MS m/z : 1204 (M^+), 915 ($M^+ - C_{12}H_{17}O_8$), 503 (C₂₂H₃₁O₁₈), 273 (C₁₂H₁₇O₇), 137 (C₉H₁₃O). FD-MS m/z : 1243 ($M^+ + K$), 1227 ($M^+ + Na$), 1205 ($M^+ + H$). Anal. Calcd C₆₁H₈₈O₂₄: C, 60.78; H, 7.36. Found: C, 60.50; H, 7.47.

10 の酸加水分解 10 (30 mg) を 1 と同一条件で加熱還流 (8 h) 後, 析出沈澱物を濾取, 更にシリカゲルカラムクロマト (CHCl₃-MeOH, 25:1) にかける, 目的の分画を MeOH より再結, 無色針状晶 (11) (10 mg) を得た。mp 261—262°C (dec.), $[\alpha]_D^{23} -84.6^\circ$ ($c=1.23$, CHCl₃). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3500—3300 (OH), 980, 945, 918, 890, 875, 840 (spiroketal). ¹H-NMR (CDCl₃): 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.95 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 21-CH₃), 1.13 (3H, s, 19-CH₃), 3.83 (1H, d, $J=12$ Hz, 26-H), 4.37 (1H, d, $J=12$ Hz, 26-H), 4.40 (1H, m, 16-H), 4.76 (br s, 27-CH₂). ¹³C-NMR: Table II.

11 のアセチル化 11 (18 mg) を無酢-ピリジン (1:1 v/v, 3 ml) に溶解, 室温 (5 h) で放置後, MeOH を加え減圧乾固, 残留物をシリカゲルカラムクロマト (hexane-AcOEt, 5:1) にかける, 目的の分画を MeOH で再結, 無色針状晶 (11a) (10 mg) を得た。mp 219—220°C, $[\alpha]_D^{25} -83.3^\circ$ ($c=0.12$, CHCl₃). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1720 (COOR), 980, 950, 918, 895, 875, 840 (spiroketal). ¹H-NMR (CDCl₃): 0.78 (3H, s, 18-CH₃), 0.95 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 21-CH₃), 1.02 (3H, s, 19-CH₃), 2.01, 2.03 (each 3H, s, CH₃CO), 3.46 (m, 26-H, 25(*R*)), 3.84 (1H, dd, $J=2$, 12 Hz, 26-H), 4.32 (1H, d, $J=12$ Hz, 26-H), 4.41 (1H, m, 16-H), 4.76 (br s, 27-CH₂), 4.98 (1H, t, $J=3$ Hz), 5.07 (1H, m). EI-MS m/z : 516, 514 (M^+), 457 (C₂₈H₄₁O₆), 447 (C₂₆H₃₉O₆), 444 (C₂₇H₄₀O₆), 139 (C₉H₁₃O), 115 (C₈H₁₁O₂), 113 (C₈H₉O₂).

11 の混合物の判定について a) Convallamarogenin 及びその acetate の文献値⁹⁾: mp 259—261°C, $[\alpha]_D^{25}$ -79.1° 及び mp 214—215°C, $[\alpha]_D^{25}$ -88.2°. b) ^{13}C -NMR スペクトルの検討: δ 73.3 (73.4, C₁), 32.9 (32.9, C₂), 68.1 (68.2, C₃), 34.4 (34.4, C₄), 31.2 (31.2, C₅). 以上括弧内は isorhodeasapogenin の文献値.⁷⁾ δ 41.9 (42.0, C₂₀), 15.0 (15.0, C₂₁), 109.3 (109.4, C₂₂), 28.9 (29.0^a, C₂₃), 33.2 (33.3^a, C₂₄), 144.3 (144.5, C₂₅), 65.0 (65.1, C₂₆), 108.5 (108.7, C₂₇). 以上括弧内は, convallamarogenin の文献値.¹⁰⁾ δ 42.0 (42.0, C₂₀), 15.0 (15.0, C₂₁), 109.2 (109.2, C₂₂), 31.8 (31.9, C₂₃), 29.2 (29.3, C₂₄), 30.6 (30.6, C₂₅), 66.8 (66.9, C₂₆), 17.3 (17.3, C₂₇). 以上括弧内は, isorhodeasapogenin の文献値.⁷⁾ c) 11a の EI-MS m/z : 516, 514 (M^+).

以上の結果から, 11 は convallamarogenin と isorhodeasapogenin の混合物と判定した.

Compound II (14) 白色粉末 (EtOH), (mp 238—241°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -93.3° ($c=0.9$, MeOH)). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 945, 918, 895, 875, 830 (spiroketal). ^1H -NMR (pyridine- d_5): 0.86 (3H, s, 18-CH₃), 1.10 (3H, d, $J=6$ Hz, 21-CH₃), 1.33 (3H, s, 19-CH₃), 1.67 (3H, d, $J=5$ Hz, 糖の CH₃), 4.79 (1H, br s, 27-CH₂), 5.09 (1H, d, $J=6$ Hz, anomeric H), 5.41, 6.42 (each 1H, br s, anomeric H). Anal. Calcd C₄₄H₇₂O₁₆·2H₂O: C, 59.18; H, 8.58. Found: C, 59.48; H, 8.46. FD-MS m/z : 880 ($\text{M}^+ + \text{Na} + \text{H}$, 25(R)), 878 ($\text{M}^+ + \text{Na} + \text{H}$, $\Delta^{25(27)}$), 857 ($\text{M}^+ + \text{H}$, 25(R)).

14 の酸加水分解 14 (75 mg) を 10 と同様酸加水分解して, 析出物进行处理し, MeOH から再結し, 無色針状晶 (21 mg) を得た. mp 256—257°C. 本物質は更に再結を繰り返し, mp 260—261°C の無色針状晶 (9 mg) を得た. 11 と混融して, 融点降下を示さない.

1, 10, 14 の糖の種類について 検液の調製: 1, 10, 14 の酸加水分解液は, それぞれ Amberlite-410 を通して中性とし, 減圧乾固後少量の水に溶解, 糖の検索に用いた. TLC による検索: 担体; cellulose (No. 5552, Merck). 展開溶媒; BuOH-pyridine-H₂O, 6:2:3 の上層に, 更に pyridine (先の全量 11 に対し 1 の割合) を加える. 検出; フタル酸アニリン. 結果 (R_f 値); 1 から glucose (0.34), 10 から rhamnose (0.58), fucose (0.48), 14 から rhamnose (0.58), xylose (0.45) を検出した. GLC による検索: 各糖部は乾燥後, TMS 化剤, BSA (bis(trimethylsilyl)acetamide) を 0.5 ml 加え, 70°C 30 分間加熱し, TMS 化体とし GC に注入した. Column; 2(m)×3(mm), OV-17 on Chromosorb W. Column temp.; 175°C. Carrier gas; N₂, 20 ml/min. Injection temp.; 210°C. Detector; FID. 結果 (t_R min); 10 から rhamnose (6.3, 8.0), fucose (7.3, 9.1). 14 から rhamnose (6.3, 8.0), xylose (6.6, 9.2, 11.4).

10, 14 の部分加水分解 10 (92.1 mg) 及び 14 (60 mg) をそれぞれ 0.1 N H₂SO₄-50% dioxane の混液 (3 ml) に溶解し, 水浴上 70°C (8 h) に加温し, 析出沈澱物をそれぞれ濾取し 10 からは析出物 (12) (25.7 mg), 14 からは析出混合物 (12', 15) (31.1 mg) を得た. 各濾液は 10% NaHCO₃ 溶液で中和後, 水飽和ブタノールで振盪し, ブタノール層を分取, 減圧乾固する. 10 からのブタノール層の残留物 (51.9 mg) をカラムクロマト (CHCl₃-MeOH, 25:1 v/v) にかけて, 分画 (12) (34.3 mg) を得た. 先の析出物と合わせ MeOH から再結, 無色針状晶 (12) (42 mg) を得た. 14 からのブタノール層の残留物 (16.8 mg) は, 先の析出混合物と合わせシリカゲルカラムクロマト (CHCl₃-MeOH, 25:1 v/v) により, Fr₁, Fr₂ に分画, Fr₁ は MeOH から再結し, 無色板状晶 (15) (7.6 mg) を, Fr₂ も MeOH から再結し無色針状晶 (12') (7.3 mg) を得た.

12 の性状 mp 277—279°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -177.4° ($c=0.86$, MeOH), 無色針状晶 (MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 940, 915, 895, 875, 825 (spiroketal). ^1H -NMR (pyridine- d_5): 0.83 (3H, s, 18-CH₃), 1.08 (3H, d, $J=6$ Hz, 21-CH₃), 1.19 (3H, s, 19-CH₃), 1.60 (3H, d, $J=5$ Hz, rhamnose-CH₃), 4.79 (br s, 27-CH₂), 5.30 (1H, s, anomeric H). ^{13}C -NMR: Table II. Anal. Calcd C₃₃H₅₂O₈: C, 68.71; H, 9.09. Found: C, 68.83; H, 9.13.

12' の性状 mp 268—271°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -90° ($c=1.1$, pyridine), 無色針状晶 (MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 940, 915, 895, 875, 825 (spiroketal). ^1H -NMR (pyridine- d_5): 0.83 (3H, s, 18-CH₃), 1.09 (3H, d, $J=6$ Hz, 21-CH₃), 1.13 (d, $J=6$ Hz, 27-CH₃ (25(R))), 1.21 (3H, s, 19-CH₃), 1.65 (3H, d, $J=5$ Hz, rhamnose-CH₃), 4.81 (br s, 27-CH₂, $\Delta^{25(27)}$), 5.40 (1H, s, anomeric H). Anal. Calcd C₃₃H₅₂O₈: C, 68.71; H, 9.09. Found: C, 68.96; H, 9.09. (12, 12' は IR, ^1H -NMR スペクトルで, 同一パターンを示すが, 恒数などの相異は $\Delta^{25(27)}$ 及び 25(R) 体の混合比の相異によるものと考えられる).

15 の性状 mp 270—273°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -79.3° ($c=0.92$, pyridine), 無色針状晶 (MeOH). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500—3300 (OH), 980, 945, 918, 895, 875, 830 (spiroketal). ^1H -NMR (pyridine- d_5): 0.85 (3H, s, 18-CH₃), 1.08 (3H, d, $J=6$ Hz, 21-CH₃), 1.33 (3H, s, 19-CH₃), 4.55 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H), 4.81 (br s, 27-CH₂). Anal. Calcd C₃₂H₅₀O₈: C, 68.30; H, 8.96. Found: C, 68.17; H, 9.00. ($\Delta^{25(27)}$ と 25(R) 体混合比については,

検討していない).

15 のアセチル化 15 (7.5 mg) は 11 のアセチル化と同様に処理し、プレパラティブ TLC (No. 5637, Merck) (hexane-AcOEt, 1 : 1 v/v) により精製, 希メタノールから再結し, 無色針状晶 (15a) (2.5 mg) を得た. mp 208—210°C, $[\alpha]_D -131.2^\circ$ ($c=0.2$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1750 (COOR), 980, 945, 915, 898, 870, 835 (spiroketal). $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5): 0.82 (3H, s, 18- CH_3), 1.05 (3H, d, $J=7$ Hz, 21- CH_3), 1.32 (3H, s, 19- CH_3), 2.00 (6H, s, $\text{CH}_3\text{CO}\times 2$), 2.04, 2.08 (each 3H, s, CH_3CO), 4.65 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H), 4.79 (br s, 27- CH_2). Anal. Calcd $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_{12}$: C, 65.73; H, 8.00. Found: C, 65.58; H, 8.15. ($\Delta^{25(27)}$, 25(R) 体の混合比は, 検討していない).

10 及び 14 の $\Delta^{25(27)}$ 及び 25(R) 体の混合比について HPLC による確認: column; CLC-ODS, 6×150 (mm), solvent; 80% MeOH. Flow rate; 0.7 ml/min. Chart speed; 2.5 mm/min. detector; RI (Shimadzu RID-2A). Pump; Shimadzu LC-5A. 結果 (t_R , min); 10 は $\Delta^{25(27)}$ (56.8): 25(R) (66.8), 15 : 1. 14 は $\Delta^{25(27)}$ (53.2): 25(R) (62.0), 1 : 1.

謝辞 本研究に際し, ^1H -, ^{13}C -NMR スペクトルの測定は, 本学 藤原靖弘氏に, マススペクトルは同じく高橋睦子氏に, また元素分析は本学元素分析センターにそれぞれ依頼測定しました. 以上の方々に, 深謝いたします.

引用文献及び注

- 1) K. Iwagoe, T. Konishi, S. Kiyosawa, The 106th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Chiba, April, 1986.
- 2) T. Konishi, S. Kiyosawa, J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1451 (1984).
- 3) a) Y. Watanabe, S. Sanada, Y. Ida, J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1980 (1983); b) *Idem, ibid.*, **31**, 3486 (1983); c) *Idem, ibid.*, **32**, 3994 (1984).
- 4) J. Borecky, *J. Chromatogr.*, **2**, 612 (1950).
- 5) a) K. Takeda, T. Okanishi, A. Shimaoka, *Yakugaku Zasshi*, **75**, 560 (1955); b) K. Takeda, T. Okanishi, K. Sasaki, A. Shimaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 631 (1961), Pentologenin: mp 320°C (dec.) $[\alpha]_D -54.5^\circ$ ($c=0.49$, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$, 1 : 1 v/v), tetraacetoxypentologenin: mp 165—168°C.
- 6) M. E. Wall, C. R. Eddy, E. L. McClennan, M. E. Klumpp, *Anal. Chem.*, **24**, 1337 (1952); b) C. R. Eddy, M. E. Wall, M. K. Scott, *ibid.*, **25**, 266 (1953); c) R. N. Jones, K. Katzdellenbogen, K. Dobrner, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 158 (1953).
- 7) K. Tori, S. Seo, Y. Terui, J. Nishikawa, F. Yasuda, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2405 (1981).
- 8) S. Kiyosawa, M. Hutoh, T. Komori, T. Nohara, I. Hosokawa, T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1162 (1968).
- 9) R. Tscheshe, H. Schwartz, G. Snatzke, *Chem. Ber.*, **94**, 1699 (1961).
- 10) K. Miyahara, K. Kudo, T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 348 (1983).
- 11) H. Nawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **6**, 255 (1958).
- 12) O. Tanaka, *Yakugaku Zasshi*, **105**, 323 (1985).
- 13) K. Tori, K. Aono, *Ann. Rept. (Shionogi Research Lab.)*, **14**, 136 (1964).
- 14) I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, T. Matsuno, H. Akutsu, Y. Kyogoku, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1942 (1981).