ヒメドコロ *Dioscorea tenuipes* FRANCH. et SAVAT. 地上部の成分研究 (第2報¹⁾)
Diotigenin 4-Acetate ならびに対応する Furostanol 型配糖体

清沢 脩,^{2a)} 川崎敏男^{2b)}
京都薬科大学,^{2a)} 九州大学薬学部^{2b)}

Studies on the Constituents of the Aerial Parts of *Dioscorea tenuipes* FRANCH.
et SAVAT. II.¹⁾ Diotigenin 4-Acetate and the Corresponding Furostanol Glycoside

SHIU KIYOSAWA^{2a)} and TOSHIO KAWASAKI^{2b)}

Kyoto College of Pharmacy^{2a)} and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University^{2b)}

(Received July 1, 1974)

The structures of two steroidal substances, G_1 and SE_1 , isolated from the fresh aerial parts of *Dioscorea tenuipes* FRANCH. et SAVAT. (Dioscoreaceae), were investigated. G_1 (mp 221—222°, $[\alpha]_D -10.0^\circ$, $C_{29}H_{46}O_6$) and SE_1 (mp 172—174° (decomp.), $[\alpha]_D +134.4^\circ$, $C_{36}H_{60}O_{12} \cdot 2H_2O$, Ehrlich reaction +) were characterized as diotigenin 4-acetate (I) and the corresponding furostanol 26-O-glucoside, 4 β -acetoxy-22-methoxy-5 β -furostane-2 β ,3 α ,26-triol 26-O- β -D-glucopyranoside (VIII), respectively. VIII is the first reported furostanol glucoside corresponding to spirostanol acetate and is most likely to have been formed secondarily from the 22-hydroxy analog (IX), mp 165—166° (decomp.). IX is regarded as the prototype compound of I. The mass spectrum of VIII and compositions of the major fragment ions are presented.

前報¹⁾で、ヒメドコロ地上部から単離された新物質7種 (G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , S_1 , S_4 , SE_1) の中、 G_2 は diotigenin 2-acetate, G_3 は diotigenin 2,4-diacetate であることを明らかにした。今回 G_1 , SE_1 の構造について報告する。

G_1 (I) は mp 221—222°, $[\alpha]_D -10.0^\circ$, $C_{29}H_{46}O_6$ (M^+ 490) の無色の針状晶、赤外線吸収 (IR) スペクトルで、水酸基、アセトキシル基、25L-spiroketal による吸収³⁾ があり、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルで、1 個のアセトキシル基のシグナルが認められる。ケン化により diotigenin (II) を、アセチル化により、diotigenin triacetate (III) を与える。したがって I は前報¹⁾ の diotigenin 2-acetate の異性体で、3- または 4-acetate と考えられる。NMR スペクトルでアセトキシル基の付け根の H は 5.47 ppm に triplet ($J=9.0$ Hz) としてあらわれ、両 α 位の 2 個の H とは *trans* diaxial の関係にあり、前記の推定を支持する。I を室温で 3 分間 CrO_3 酸化すると主成績体として IV を、また 10 分間酸化後 CH_2N_2 -ether 溶液でメチル化すれば、IV とともに 3 種の物質 V, VI, VII を与える。IV は mp 210—212°, $[\alpha]_D +51.8^\circ$, 分子式 $C_{29}H_{44}O_6$ (M^+ 488) で、IR スペクトルは 25L-spiroketal, 水酸基, アセトキシル基の吸収の他に、あらたにケトンの吸収を示す。NMR スペクトルでアセトキシル基の付け根の H は 5.07 ppm に quartet ($J=9.8, 6.0$ Hz) として見られる。もし I を 3-acetate とすれば、IV は 2- または 4-ketone となり、I を 4-acetate, IV をその 3-ketone とした場合と同様、いずれもアセトキシルの付け根の H は doublet になるはずである。したがって I は 4-acetate, IV はその 2-ketone と考えられ、IV が Leagal 反応陽性で、活性メチレンの存在を示すこともこれを支持する。以上の結果 IV は 2-dehydrodiotigenin 4-acetate である。10 分間酸化後メチル化による成績体の 1 つ V は、mp 164—165°,

1) 第1報: 清沢 脩, 川崎敏男, 薬誌, 95, (1975).

2) Location: a) Nakauchi-cho Misasagi, Yamashina Higashiyama-ku, Kyoto; b) Katakasu, Higashi-ku, Fukuoka.

3) E.S. Rothman, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4013 (1952); J.E. Page, *J. Chem. Soc.*, 1955, 2017; R.N. Jones, F. Herling, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1152 (1956).

Chart 1

$C_{31}H_{48}O_8$ の針状晶, IR スペクトルで 25L-spiroketal の吸収, エステルの $\nu_{C=O}$ による強い吸収と, ν_{C-O-R} の複雑な吸収帯がみられ, マススペクトルで分子イオン (M^+) は 548 を示し, spiroketal 環の開裂によるフラグメントは比較的弱く, M^+-CO_2 (504), M^+-CO_2-AcO (445) の両イオンは強いピークを示す。したがって V はアセトキシル基をもち, I と C 数同一の二塩基酸のジメチルエステル, すなわち前報¹⁾で 2-acetoxyspirostane-3,4-dioic acid dimethyl ester の異性体で, 4-acetoxyspirostane-2,3-dioic acid dimethylester と考えられる。また VI はアセチル化により V を与えることから, V の deacyl 体であり, VII は前報¹⁾の nor-2,4-secospirostane-2,4-dioic acid dimethyl ester と一致する。

以上の結果 I は 2 β ,3 α -dihydroxy-4 β -acetoxy-5 β , 25L-spirostane, すなわち diotigenin 4-acetate と決定した。

SE₁ (VIII) は, 水溶性フラクションから単離された物質で, MeOH から再結して mp 172—174° (decomp.), $[\alpha]_D^{25} +134.4^\circ$ の無色板状晶となり, Ehrlich

Chart 2

試薬⁴⁾ に対し赤色を示す。IR スペクトルで水酸基, アセトキシ基の吸収を示し, spiroketal の吸収は認められない。³⁾ NMR スペクトルで 2.07 ppm に 1 個のアセトキシ基, 3.26 ppm に 1 個のメトキシ基のシグナルが見られ, 4.81 ppm の 1H 分の doublet ($J=7$ Hz)⁵⁾ は, 糖部の anomeric proton に帰属される。VIII は酸加水分解により diotigenin (II) と glucose を, almond emulsin で diotigenin 4-acetate (I) と glucose を生じる。マスペクトルは, m/e 652 に M^+-MeOH と考えられるピークを示し, 元素分析値とあいまって VIII の分子式は $C_{36}H_{60}O_{12} \cdot 2H_2O$ となる。以上の結果, VIII は I に対応する 22-methoxyfurostanol mono- β -D-glucopyranoside である。VIII を水と煮沸して得られる物質 IX mp 165—166° (decomp.), は薄層クロマトグラフィー (TLC) 上 VIII に比し R_f 値は小さく, NMR スペクトルでメトキシ基のシグナルを欠き, MeOH により VIII に戻る。このことは IX が VIII の 22-OH 体であることを示し, VIII および IX において glucose は 26 位水酸基と結合して, spiroketal への閉環を妨げていると考えることが出来る。したがって VIII は 4 β -acetoxy-22-methoxy-furostane-2 β ,3 α ,26-triol 26-O- β -D-glucopyranoside である。

IX から VIII への変換の容易さと, 抽出, 分離精製操作中 MeOH を使用していることを考慮すると, VIII は二次生成物であり本来植物中では, IX として存在するものと思われる。Spirostanol glycoside に対応する furostanol bisglycoside は, peracetate, permethylate として低イオン化電圧で良好なマスペクトルを与えることはすべて知られているが,⁶⁾ VIII は free のままでしかも通常の条件下で, Fig. 1-A, Fig. 1-B のようなマスペクトルを与えた。主要ピークのイオン組成と, それらのもっとも probable な構造は, Chart 3-A, 3-B に示すとうりである。Hirshman ら⁷⁾ によれば, 22-alkoxy (または hydroxy) furostanol は, $C_{22}-OR$ が容易に脱離

Chart 3-A

- 4) S. Kiyosawa, M. Hutoh, T. Komori, T. Nohara, I. Hosokawa, T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 1162 (1968).
- 5) J.M. van der Veen, *J. Org. Chem.*, **28**, 564 (1963).
- 6) T. Komori, Y. Ida, Y. Muto, K. Miyahara, T. Nohara, T. Kawasaki, *Biomedical Mass Spectrometry*, submitted.
- 7) H. Hirschman, F.B. Hirschman, *Tetrahedron*, **3**, 243 (1968).

Chart 3-B

Chart 3-C

して Δ^{22} 体になり, さらに $\Delta^{20(22)}$ 体, すなわち pseudo 体に変化するといわれる (Chart 3-C). 一方 Faul および Djerassi⁸⁾ は, spirostanol ならびに対応する $\Delta^{20(22)}$ -furostanol (pseudo 体) のマススペクトルを比較し, D—F 環あるいは側鎖にもとずく m/e 181, 139, 115 の各フラグメント (Chart 3-C) の相対強度は, spirostanol では m/e 139 が最も強く, m/e 181 が最も弱いのにに対し, pseudo 体では逆に m/e 181 が強いといわれる. VIII

Fig. 1-A. Mass Spectrum of VIII

Fig. 1-B. Mass Spectrum of VIII

8) W.H. Faul, C. Djerassi, *Org. Mass. Spec.*, 3, 1187 (1970).

Fig. 1-C. Mass Spectrum of I

のマススペクトルは、I (Fig. 1-C) のそれとは逆に、明らかに m/e 181 が強く m/e 139 は弱く、Faul らの pseudo 体の pattern と一致し、VIII の構造を裏書きする。なお m/e 652 は $M^+ - \text{MeOH}$, すなわち pseudo 型 glucoside に相当し、Chart 3-A に示すフラグメントは糖部の開裂にもとづくものであり、Chart 3-B は、糖脱離後のアグリコン部のフラグメンテーションで、 m/e 490 は I の分子量に相当し、 m/e 489 はその oxonium イオン型フラグメントと考える。

ヒメドコロ地上部に遊離の形で含まれるとされている diotigenin (II) が、前報¹⁾ の 2-acetate, 2,4-diacetate に加え、4-acetate としても存在することになった。これらのアセトキシルの位置は、いずれも β 配位の水酸基であることは興味深く、 $3\alpha\text{-OH}$ のアセテートについても探索したが検出出来なかった。

これまで jurubine すなわち $3\beta\text{-amino-5}\alpha\text{-furostane-22,26-diol 26-O-}\beta\text{-D-glucopyranoside}$ の発見⁹⁾ にはじまり、parillin, dioscin など spirostanol 型サポニンに対応する furostanol 3,26-O-bisglycoside は sarsaparilloside, proto-dioscin など¹⁰⁾ いくつか知られているが、VIII は spirostanol acetate に対応する furostanol 26-O-monoglucoside として、はじめて見出されたものである。¹¹⁾ Dioscin に対する proto-dioscin¹⁰⁾ 同様、VIII の 22-OH 体 IX は、I の proto 型と考える。2-Acetate, 2,4-diacetate についても、また同様の glucoside の存在が推定される。

実験の部¹²⁾

G₁ (Diotigenin 4-Acetate) (I) の性状 mp 221—222°, 無色針状晶 (MeOH より再結), $[\alpha]_D^{25} -10.0^\circ$ ($c=0.55$, pyridine). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3420 (OH), 1738, 1275 (CH_3COO), 989, 923 > 898, 852 (25L-spiroketal). NMR (pyridine- d_5): 0.83 (3H, singlet, 18- CH_3), 1.02 (3H, singlet, 19- CH_3), 2.05 (3H, singlet, CH_3COO), 4.75 (2H, 2,3-OH), 5.47 (1H, triplet, $J=9.0$ Hz, $\text{AcO}\cdot\text{CH}$). Mass Spectrum m/e : 490 (M^+). Anal. Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_6$: C, 70.99; H, 9.45. Found: C, 71.10; H, 9.62.

I のケン化 I (22 mg) の MeOH (5 ml) 溶液に 5% KOH (1 ml) を加え、水浴上加温後水 (10 ml), ether (10 ml) と振盪。Ether 層を分取、水洗、脱水し ether 留去後の残留物を MeOH から再結、無色針状晶の diotigenin (II) (15 mg) を得。mp 280—281°, 標品との混融試験、IR スペクトルで同定。

I の Acetyl 化 I (10 mg) に pyridine (1 ml), 無水酢酸 (1 ml) を加え、室温で一昼夜放置。MeOH (20 ml) を加え、溶媒を減圧留去、残留物を MeOH から再結し、無色針状晶の diotigenin triacetate (III) (9 mg) を得。mp 217—218°, 標品との混融試験、IR スペクトルで同定。

I の CrO_3 酸化 (a) I (90 mg) の acetone (20 ml) 溶液に、 $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ 水溶液 (3 ml) を加え、室温で 3 分間放置。2 倍量の水を加え、ether (40 ml) と振盪、ether 層を分取し、2N Na_2CO_3 で洗浄、さらに水洗、芒硝で脱水後、ether を留去。残留物 (63 mg) をシリカゲルカラムクロマト (展開溶媒、 $n\text{-hexane-AcOEt}$, 3:1) にかき、主フラクションを MeOH から再結、無色針状晶 (IV) (30 mg) を得。mp 210—212°, $[\alpha]_D^{25} +51.8^\circ$ ($c=0.51$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3480 (OH), 1753, 1241 (CH_3COO), 1718 (CO), 989, 924 > 890, 848 (25L-spiroketal). NMR (CDCl_3): 0.72 (3H, singlet, 18- CH_3), 1.16 (3H, singlet, 19- CH_3), 2.19 (3H, singlet, CH_3COO), 5.07 (1H, quartet, $J=9.8, 6.0$ Hz, $\text{AcO}\cdot\text{CH}$). Leagal 反応: 陽性。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 268.5 (461), 262 (528). Anal. Calcd. $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_6$: C, 71.27; H, 9.12. Found: C, 71.28; H, 9.08.

I の CrO_3 酸化 (b) I (86 mg) の acetone (20 ml) 溶液に、 $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ 水溶液 (3 ml) を加え、室温で 10 分間放置。氷水を加え ether (40 ml) と振盪、ether 層分取後水洗、脱水し、溶媒留去、残留物は ether (10

9) K. Schreiber, H. Ripberger, *Tetrahedron Letters*, 1966, 5997.

10) R. Tschesche, G. Lüdke, G. Wulff, *Tetrahedron Letters*, 1967, 2785; *idem*, *Chem. Ber.*, 102, 1253 (1969); T. Kawasaki, T. Komori, K. Miyahara, T. Nohara, I. Hosokawa, K. Mihashi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 22, 2164 (1974).

11) Diosgenin に対応する proto 型, すなわち furostanol 26-O-glucoside も古森, 宮原, 川崎により単離されている (未発表).

12) 使用機器, 一般操作については, 前報¹⁾ 参照.

ml) に溶解, 過剰の CH_2N_2 -ether 溶液を加え, 1 時間室温放置. 溶媒留去後の残留物は, シリカゲルカラムクロマト (展開溶媒, *n*-hexane-AcOEt, 3.5:1) により 4 つのフラクション (Fr_1 — Fr_4) に分画, Fr_1 は溶媒留去後の残留物 (41 mg) を MeOH から再結, 無色板状晶 (VII) (21 mg) を得. mp 180—181°, nor-2,4-secospirostane-2,4-dioic acid dimethyl ester の標品との混融試験, IR スペクトルで同定. Fr_2 は溶媒留去後の残留物 (15 mg) を MeOH から再結. 無色針状晶 (V) (6 mg) を得. mp 164—165°, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1740 (ester, C=O), 1275, 1209, 1196, 1170 (ester, C—O—R), 989, 920 > 896, 850 (25L-spiroketal). Mass Spectrum m/e : 548 (M^+), 504 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$), 445 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2 - \text{AcO}$). Fr_3 の溶媒留去後の残留物 (VI) (10 mg) は, pyridine, 無水酢酸各 1 滴を加え acetyl 化すれば, TLC 上 V と同一 R_f 値を示す. Fr_4 は溶媒留去後の残留物 (10 mg) を *n*-hexane から結晶, 無色針状晶 (5 mg) を得. mp 210—212°, IV との混融試験, IR スペクトルで同定.

Se_1 (VIII) の性状 mp 172—174° (decomp.), 無色板状晶 (MeOH から再結), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 134.4^\circ$ ($c = 0.51$, EtOH). Ehrlich 反応: 陽性 (赤色). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (OH), 1735, 1270, 1255 (CH_3COO), spiroketal の吸収なし. NMR (pyridine- d_5): 0.81 (3H, singlet, 18- CH_3), 1.00 (3H, singlet, 19- CH_3), 2.07 (3H, singlet, CH_3COO), 3.26 (3H, singlet, CH_3O), 4.81 (1H, doublet, $J = 7$ Hz, sugar anomeric proton). Mass Spectrum (条件: 直接導入法, Ionizing volt 70 eV, Ionizing current 70 μA , Source temperature 200°) m/e : 652 ($\text{M}^+ - \text{MeOH}$), 634, 616, 574, 532, 490, 489, 448, 447, 430, 429, 412, 411, 394, 393, 181, 139, 163, 145, 127, 109 (Fig. 1-A, 1-B, Chart 3-A, 3-B). Anal. Calcd. $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{12} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.98; H, 8.95. Found: C, 60.18; H, 9.18.

VIII の酸加水分解 VIII (22 mg) の MeOH (2 ml) 溶液に, 2N HCl (1 ml) を加え, 水浴上 1 時間加熱還流. 冷後水 (10 ml), CHCl_3 (20 ml) と振盪. CHCl_3 層を分取, 水洗して溶媒留去. 残留物を MeOH から再結, 無色針状晶, mp 279—281° の diotigenin (II) (7 mg) を得. 標品との混融試験, IR スペクトルで同定. 水層は減圧濃縮, 薄層クロマト (展開溶媒, CHCl_3 -MeOH- H_2O , 7:3:0.5) で, glucose (R_f 0.38) と一致するただ 1 個のスポットを検出.

VIII の Emulsin 水解 VIII (33 mg) を水 (10 ml) に懸濁, almond emulsin (Sigma) (15 mg) を加え, 40° に保ち 5 時間攪拌後 CHCl_3 (10 ml) と振盪, CHCl_3 層を分取, 溶媒留去後の残留物を MeOH から結晶. 無色針状晶の diotigenin 4-acetate (I), mp 221—222° (8 mg) を得. 標品との混融試験で同定. 水層は減圧, 濃縮して薄層クロマトで, 前記同様 glucose を検出.

22-Hydroxyfurostanol Glucoside (IX) VIII (23.0 mg) に水 (3 ml) を加え, 水浴上 30 分間加熱還流, 水を減圧留去して, 残留物 (IX) (22.1 mg) を得. 水から再結すると無色結晶, mp 165—166° (decomp.) となり, NMR (pyridine- d_5) で, VIII の 3.26 ppm (3H, singlet, CH_3O) のシグナルは消失する. 薄層クロマト (展開溶媒, CHCl_3 -MeOH- H_2O , 8:2:0.2) で, VIII, IX の R_f 値は, それぞれ 0.45, 0.37. IX を再び無水 MeOH (3 ml) と 30 分間水浴上で加熱還流, 溶媒留去後乾燥すると, 無色ガラス状物質 (22.8 mg) を与える. TLC 上 VIII と一致.

謝辞 本研究にあたり, 深い御配慮をいただいた京都薬科大学 富田真雄学長, 沢田徳之助教授, 故 布藤昌一助教授, さらに数々の助言, 協力をいただいた九州大学薬学部 古森徹哉助教授, 宮原一元博士, 野原稔弘博士, ステロイドサボゲニンの貴重な標品 (diotigenin, isodiotigenin, kogagenin, tokorogenin) を分与された塩野義製薬研究所 赤堀 昭博士に深謝いたします. なお NMR スペクトルは京都薬科大学 藤原靖弘氏, マススペクトルは九州大学薬学部 武藤淑子, 川村美鈴の両氏, 京都薬科大学 橋本圭二博士, 藤岡美千代氏に測定していただき, 元素分析は京都薬科大学 梅本光一郎博士, 九州大学中央分析センター, 京都大学元素分析センターの方々にわづらわした. これら諸氏に感謝の意を表します.