川蜀七根の成分研究 (第 1 報¹⁾)
スピロスタン系サポゲニンの単離と構造研究

高平正行, 近藤嘉和, 草野源次郎, 野副重男
東北大学薬学部²⁾

Studies on the Constituents of "Senshokushichikon." I.¹⁾ Isolation
and Structural Elucidation of Spirostane Sapogenins

MASAYUKI TAKAHIRA, YOSHIKAZU KONDO, GENJIRO KUSANO and SHIGEO NOZOE
Pharmaceutical Institute, Tohoku University²⁾

(Received September 4, 1978)

Five new spirostane steroids were isolated from a kind of crude drug, "Senshokushichikon." They were characterized as 3-epi-diosgenin 3- β -D-glucopyranoside (I), 3-epi-sceptrumgenin 3- β -D-glucopyranoside (II), 3-epi-ruscogenin (III), 3-epi-neoruscogenin (IV), and 3-epi-diosgenin (V). They are the first examples of naturally occurring 3 α -hydroxy-spirost-5-enes derivatives.

Keywords—*Rohdea* sp.; spirostane derivative; 3-epi-diosgenin 3- β -D-glucopyranoside; 3-epi-sceptrumgenin 3- β -D-glucopyranoside; 3-epi-ruscogenin; 3-epi-neoruscogenin; 3-epi-diosgenin

生薬三七は中国の中南部に自生または栽培されるキク科の多年生草本 *Gynura pinnatifida* DC.³⁾ あるいはサンシチソウ *G. japonica* JUEL⁴⁾ の根であるといわれている。また, *Panax pseudoginseng* WALICH あるいは *P. notoginseng* BURKILL の根の貯蔵根を蒸乾したものを三七, 田三七, 人参三七などと呼んでいる。⁵⁾ 著者らは生薬三七根の基原植物に不明の点が残っているもののその止血効果⁶⁾ に興味を抱き, 三七根として市販されているものを入手し本研究に着手した。なお, 本生薬は後述する如く, その後の追跡調査の結果, 香港市場では川蜀七根の名で流通していることが判明した。本生薬は蒸乾されたもので生薬原料からは, かなり変形していると思われるが, 径 0.5—1.5 cm, 長さ 5—15 cm で茶褐色を呈していて外皮に多数の側根の跡が認められる。本学薬草園で栽培したサンシチソウ *G. japonica* の根を採集し蒸乾し, 調製したものと比べると大きな違いが認められる。さらに人参三七とも違っている。また本生薬の抽出エキスを薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記) で, サンシチソウの根および人参三七の根と比べると明らかに異なる。さらに本生薬はデンプン反応が陽性でキク科の植物に由来するものとは考え難い。そこで種々検討した結果, 本生薬は香港市場より川蜀七根の名で入手したものと外観が酷似し, 抽出エキスの TLC においても全く同一のスポットを与えることを知った。そこで市場での追跡調査を行い著者らが三七根として入手したものは川蜀七根であることを確認した。⁷⁾ その後, 本生薬の外部形態や含有成分などから日本産オモト (*Rohdea japonica* ROTH⁸⁾) との類似性が認められたので, 両者のエキスを TLC で比較したところきわめて類似したスポットを与えることを知った (Chart 1)。さらに日本産オモトの根茎を蒸乾調製すると, 著者らの入手した川蜀七根の外部形態ときわめて類似の形態を呈した。

1) M. Takahira, Y. Kondo, G. Kusano, S. Nozoe, *Tetrahedron Lett.*, 1977, 3647. Erratum; M. Takahira, Y. Kondo, G. Kusano, S. Nozoe, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 2964.

2) Location: Aobayama, Aramaki-aza, Sendai.

3) 木村康一, 木島正夫, "薬用植物学各論改稿版," 廣川, 東京, 1974, p. 279.

4) "上海常用中草药," 上海市出版革命組編, 1970, p. 174.

5) 刈米達夫, 木村雄四郎, "最新和漢薬用植物," 廣川, 東京, 1971, p. 19.

6) 重浦靖治, 田口静雄, 鳥飼 肇, 清水玄熊, 福本 博, 高木 昂, 山岸章二, 阿左見 工, 総合医学, 10 (7), 382 (1953).

7) 市場追跡調査は武田薬品工業 KK. 中央研究所, 生薬研究所.

8) 川崎敏男, Proc. Symp. Wakan-Yaku 10. "Steroid Saponin Chemistry," 1977, p. 12.

Chart 1

植物分類学上オモトと近縁のハラン *Aspidistra elatior* BLUME およびドイツスズラン *Convallaria majalis* L. の根茎とオモトの根茎および川蜀七根のエキスを TLC で比較すると後二者の間ではよく以ているのに、前二者との間では明らかに異なっていることを知った。このことは、オモト近縁の植物の区別にそれらのエキスの TLC による比較が有効であることを示すと共に川蜀七根はオモトそのもの、あるいはオモトにごく近い植物に由来するものであることを強く示唆している。そこで入手した本生薬が数多くのスピロスタンサポニンおよびサボゲニンを含むことを知ったのでそれらの成分について検索し、含有成分も参考にして基原植物の同定を行うことにした。

川蜀七根を 70% エタノールで熱時抽出し得られたエキスをさらに *n*-ブタノールで抽出してブタノールエキスを得た。ブタノールエキスはシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム-メタノール (100—20: 1) 溶出画分を実験の部に記載するごとく処理し、4 種の化合物 (I, II, III, IV) および β -sitosteryl glucoside を単離した。また β -sitosterol を主とする phytosterol の混合物を得た。一方、ブタノールに次いで得られるクロロホルム-メタノール (5—4: 1) 溶出画分からは数多くの配糖体得られるが、個々の単離が困難であったので、混合物のまま配糖体画分を hespidinase で処理してゲニンとして先に得た 4 種の化合物 (I—IV) と共に新たに化合物 (V) を得た。これらの化合物はその諸性質から文献未記載の化合物と考えられたので、構造研究を行い、その結果は先に報告したが、⁹⁾ 今回その詳細について報告する。

化合物 (I) は mp 218—221°, $[\alpha]_D -122^\circ$, $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_8$ (M^+ : m/e 576) の無色鱗片状晶で、シリカゲルクロマトグラフィーのクロロホルム-メタノール (20: 1) 溶出画分に化合物 (II) と共に得られるが、両者の混合物をアセチル化後硝酸銀処理したシリカゲルクロマトグラフィーに付し、そのアセテート (Ia) mp 212—215°, $[\alpha]_D -180^\circ$, $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{12}$ (M^+ : m/e 744) として単離した。このアセテートを 1% 苛性カリで加水分解して I を得、emulsin で酵素加水分解すると、glucose と無色板状晶 (V) が得られる。V は mp 244—246°, $[\alpha]_D -145^\circ$, $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ (M^+ : m/e 414) を有し、I のゲニンと考えられる。その mass スペクトルは m/e 342, 300, 282, 271, 253, 139 にフラグメントイオンピークを示し、ゲニン (V) がスピロスタン系ステロイドの一種であることを示唆している。⁹⁾ その核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは 2 個の三級メチル (0.81: 13-Me), (1.04: 10-Me) と 2 個の二級メチル (0.97: 20-Me), (0.79: 25-Me) の存在を示している。さらに 4.06 ppm (1H, $W_{1/2}$: 8 Hz) の 1H 相当のシグナルは、cordyl-

9) H. Budzikiewicz, J.M. Wikon, C. Djerassi, *Mh. Chem.*, 93, 1033 (1962).

agenin¹⁰⁾ の 3 位のエカトリアルカルビニル水素に酷似し V の 3 α 位に水酸基の存在することが示唆される。これらの諸性質より、V は 25*R*-spirost-5-ene-3 α -ol(3-*epi*-diosgenin) であると推定される。

化合物 (II) は mp 236—238°, $[\alpha]_D -109^\circ$, $C_{33}H_{50}O_8$ (M^+ : m/e 574) の無色鱗片状晶で、I との混合物としてシリカゲルクロマトグラムから溶出されるが、そのアセテート (IIa) mp 174—177°, $[\alpha]_D -168^\circ$, $C_{41}H_{58}O_{12}$ (M^+ : m/e 742) として単離した。このアセテートをアルカリで加水分解して II を得た後、emulsin で加水分解すると、glucose と無色板状晶 (VI) が得られる。VI は mp 197—198°, $[\alpha]_D -136^\circ$, $C_{27}H_{40}O_3$ (M^+ : m/e 412) を示し、その IR スペクトルの 1655 と 880 cm^{-1} の吸収と、NMR スペクトルの 4.82 ppm (2H, $W_{1/2}=6$ Hz) の幅広い一重線からゲニン (VI) に 1 個の末端メチレン基があり、それがスピロスタン系ステロイド骨格の F 環に存在すると推定される。¹¹⁾ この推定はこの化合物の NMR スペクトルを検討することによっても支持される。すなわち I と V の NMR スペクトルでは、25 位の二級メチル基に帰属される二重線が認められるが、化合物 (VI) ではそれに相当する二重線がなく、代りに先に述べた末端メチレンによるシグナルが認められ、さらに 26 位の 2 個の水素に帰属される一対の二重線 (3.90, $J=12$ Hz), (4.37, $J=12$ Hz) が認められる。これらの諸性状より、VI は V の 25 位に二級メチル基の代りに末端メチレン基を有する化合物と思われる。また、4.07 ppm に 3 β 水素に帰属されるシグナルが V と同様に認められる。従って、化合物 (II) のゲニン (VI) は spirosta-5,25-dien-3 α -ol(3-*epi*-sceptrumgenin¹²⁾) であると推定される。以上の如くして推定したゲニン (V) と (VI) の構造は次のようにして化学的に確認された。

Diosgenin を Jones 酸化に付し、得られる 3-keto 体を $NaBH_4$ 還元すると diosgenin と共に、その 3 α -hydroxy 誘導体、mp 240—242°, $C_{27}H_{42}O_3$ (M^+ : m/e 414) が副生成物として得られる。これは NMR スペクトル等でゲニン (V) と一致した。一方ゲニン (VI) を 5% Pd-C で接触還元すると 2 種の異性体を与え、そのうち一方は V と IR, NMR スペクトルで一致し、他の一方は yamogenin を Jones 酸化後、 $NaBH_4$ 還元して得られる 3-*epi*-yamogenin と TLC 上 R_f 値が一致した (Chart 2)。

Chart 2

10) K. Jemes, A.H. Manchada, J. Dougan, M.J. Nagler, *Tetrahedron Lett.*, 1974, 1475.

11) B. Hampel, J.M. Kramer, *Tetrahedron.*, 22, 1601 (1966).

12) R. Freire, A.G. Gonzalez, E. Suarez, *Tetrahedron*, 26, 3233 (1970).

このように配糖体 (I) のゲニン (V) は 3-epi-diosgenin, 配糖体 (II) のゲニン (VI) は 3-epi-sceptrumgenin と同定されたので, 次に I と II の糖の結合様式について検討した. 配糖体 (I) のアセテート (Ia) の NMR スペクトルでは, アノメリック水素に帰属される二重線 (4.58 ppm, 1H, $J=7$ Hz), アセトキシル基のつけ根の水素に帰属される一対の三重線 [5.01 ppm (1H, 3'-H), 5.16 ppm (1H, 2'-H)], アセトキシル基のつけ根のメチレン水素に帰属される一対の四重線 [4.30 ppm (1H, 6'-H₁), 3.92 ppm (1H, 6'-H₂)], 2H 相当の多重線 [5.20 ppm (1H, 4'-H), 3.72 ppm (1H, 5'-H)] が認められる. また配糖体 (I) とそのゲニン (V) との $[M]_D$ の差は -45° であった.¹³⁾ これらの諸性質から I は 3-epi-diosgenin 3- β -D-glucopyranoside であると結論された. 配糖体 (II) についても同様な検討を行い IIa の NMR スペクトル, および II と VI の $[M]_D$ の差が -70° から, II は 3-epi-sceptrumgenin 3- β -D-glucopyranoside であると結論される.

化合物 (III) は mp 196—197°, $[\alpha]_D -119^\circ$, C₂₇H₄₂O₄ (M⁺: m/e 430) の無色板状晶で, シリカゲルクロマトグラフィーで IV と共に溶出された. そこで両者の混合物をアセチル化後, 硝酸銀処理したシリカゲルクロマトグラフィーに付し, そのアセテート (IIIa), mp 195—196°, $[\alpha]_D -74^\circ$, C₃₁H₄₆O₆ (M⁺: m/e 514) として単離される. III の IR スペクトルでは, 980, 960, 910, 895 に 25R-spiroketal に特有の吸収が,¹⁴⁾ 3450 cm⁻¹ に水酸基の吸収が認められる. その NMR スペクトルでは, エカトリアルカルビニル水素に帰属される多重線が 4.08 ppm (1H, m, $W_{1/2}=8$ Hz), に, アクシャルカルビニル水素に帰属される四重線が 3.84 ppm (1H, q, $J_1=10.5$, $J_2=5.5$ Hz) にそれぞれ認められる. これらのシグナルはそれぞれ cordylagenin の 3 β -水素, 1 α -水素に帰属されたものと酷似している.¹⁰⁾ 一方, III および IIIa の mass スペクトルでは m/e 139, 280 のフラグメントイオンピークが認められ, 水酸基が E および F 環に存在しないことを示している.¹¹⁾ これらの諸性状を rusco-genin およびその誘導体と比較することにより III を 25R-spirost-5-ene-1 β ,3 α -diol(3-epi-ruscogenin¹⁵⁾) と推定した.

化合物 (IV) は mp 167—169°, $[\alpha]_D -121^\circ$, C₂₇H₄₀O₄ (M⁺: m/e 428) の無色板状晶で, そのアセテート (IVa), mp 188—190°, $[\alpha]_D -70^\circ$, C₃₁H₄₄O₆ (M⁺: m/e 512) として単離される. IVa の IR スペクトルでは 1651 と 880 cm⁻¹ に二重結合に由来する吸収が, その NMR スペクトルで 4.80 (2H, m, $W_{1/2}=7$ Hz) に幅広い一重線がそれぞれ認められることから, IVa に 1 個の末端メチレン基の存在が示唆された. その Mass スペクトルでは m/e 512 親イオンピークを示し, 先の分子組成式を支持すると共に, m/e 137, 280 のフラグメントイオンピークが認められ, 末端メチレン基が 25 位についていることを示している.¹¹⁾ このことは化合物 (IV) の NMR スペクトルの解析からも支持される. すなわち, IV の NMR スペクトルでは, 化合物 (III) の NMR スペクトルで認められた 25 位の二級メチル基の二重線がなく, 代りに末端メチレンの水素に帰属されるシグナルが認められ, さらに 26 位の 2 個の水素に帰属される一対の二重線 (3.88 ppm, $J=12$ Hz), (4.34 ppm $J=12$ Hz) が認められ, 先の結論とよく一致する. これらの諸性状より, IV は spirosta-5, 25(27)-diene-1 β ,3 α -diol(3-epi-neoruscogenin¹⁵⁾) と推定される.

以上 III および IV の構造は化学的に次のように確認された. アセテート (IIIa) を 0.1% 苛性カリで緩和にケン化すると III のモノアセテート体 (IIIb) が得られる. IIIb は mp 218—221°, $[\alpha]_D -106^\circ$, C₂₉H₄₄O₅ (M⁺: m/e 472) の無色板状晶で, その NMR スペクトルでは, 5.05 ppm (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=5.5$ Hz) に 1 位のアクシャルカルビニル水素, 4.10 ppm (1H, m, $W_{1/2}=8$ Hz) に 3 位のエカトリアル水素に帰属されるピークが認められる. IIIb を Jones 酸化後, 直ちに生成物をアルミナを懸濁した MeOH 中で還流すると, ジエノン体 (IIIc) mp 199—202°, UV λ_{max}^{MeOH} nm: 245, C₂₇H₃₈O₃ (M⁺: m/e 410), IR (KBr) cm⁻¹: 1665, が無色針状晶として得られる. この生成物は, diosgenin を Jones 酸化後, 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone 酸化して得られる 25R-spirost-1,4-dien-3-one¹⁶⁾ とその物理化学的性状が一致した. 一方アセテート (IVa) を 5% Pd-C で接触還元すると 2 種の異性体 that 得られ, そのうち一方は IIIa とその物理化学的性状が一致した. 一方の成積体 (IIId) は mp 162—163°, $[\alpha]_D -43^\circ$, C₃₁H₄₆O₆ (M⁺: m/e 514) の無色板状晶で, その NMR スペクトルでは 26

13) W. Klyne, *Biochem.*, **J.** 47, XLI (1950).

14) R.N. Jones, K. Katzenellenbogen, K. Dohriner, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 158 (1953).

15) A.G. Gonzalez, R. Freire, M.G. Garcica-Estrada, J.A. Salazar, E. Suarez, *Tetrahedron*, **28**, 1289 (1971).

16) K. Takeda, T. Okanishi, K. Igarashi, A. Shimaoka, *Tetrahedron*, **15**, 183 (1961).

Chart 3

位の 2 個の水素に帰属されるシグナルがそれぞれ 3.34 ppm (1H, d, $J=12$ Hz), 3.99 ppm (1H, dd, $J_1=12$, $J_2=3.5$ Hz) に認められる. これらの化学シフトおよび分裂様式は 25S-spirostane 骨格の特性シグナルと一致する.¹⁵⁾ したがって IIIId は IIIa の 25 位メチルの異性体である 25S-spirost-5-ene-1 β ,3 α -di-*o*-acetate であると結論される. 同様の結果は, neoruscogenin の接触還元の際にも得られている¹⁵⁾ (Chart 3).

以上今回我々が本生薬から単離構造決定した I—VI はすべて 3 α -hydroxy-spirost-5-ene 誘導体で, ステロイドサポゲニンでこの系の誘導体が天然に見出されたのは最初である.¹⁶⁾ また日本産オモト (*Rohdea japonica* Roth) の成分については那波¹⁷⁾ がその葉から rhodeasapogenin および 3 種の強心配糖体を, 川崎¹⁸⁾ らが根茎より 10 数種のステロイド成分を単離しているが, いずれも rhodeasapogenin 関連配糖体および 1 種の新スピロスタノールとその配糖体で, 今回我々が本生薬から単離したいずれとも異なっている.

中国には少なくとも 3 種のオモト属植物が分布しているといわれ, 川蜀七根はそのうち一種であると考えられる. 目下基原植物の同定および rhodeasapogenin との関連化合物の単離同定, 修治の成分への影響などについて検討中である.

実験の部

NMR スペクトルは検体の $CDCl_3$ 溶液を用い, 日本電子 PS-100 スペクトロメーターにて測定し, TMS を内部標準とした. 略号: S; 一重線, d; 二重線, t; 三重線, q; 四重線, m; 多重線, b; 幅広い IR スペクトルは Shimadzu IR-27G 型, 旋光度は Hitachi NO, 053-4 型を使用した. 融点はすべて未補正, 微量融点測定器 (柳本製作所) により測定, 薄層クロマトは Kiesel Gel G. nach stahl (Merck) と発色に 50% H_2SO_4 (噴霧後

17) 那波速男, 薬誌, 72, 404 (1952); 那波速男, 薬誌, 72, 507 (1952); 那波速男, 薬誌, 73, 1192, 1195, 1197 (1953).

18) 宮原一元, 熊本史生, 川崎敏男, “日本薬学会講演要旨集,” 東京, 1973, p. 171; 工藤恵子, 宮原一元, 川崎敏男, “日本薬学会講演要旨集,” 岡大, 1978, p. 307.

加熱)を使用。カラムクロマトは Wakogel C-200 (particle size 74—149 μ) を用い、いずれの場合も溶媒の混合比は v/v である。無水クロム酸-硫酸溶液は CrO_3 (2.67 g) を水 (10 ml) に溶解, 95% H_2SO_4 (2.3 ml) を加え調製。10% 硝酸銀カラムは重量比で、硝酸銀 1 に対してシリカゲル 9 の割合で混合したものを用いた。

生薬 使用した生薬は中国産を香港甘雨街、永大行、大阪三国 KK を経て東京紀国屋より入手した。その後剖見および MeOH エキスの TLC の比較、および市場での追跡調査により本生薬は川蜀七根と判明した。

抽出と単離 上記川蜀七根 2 kg をこまかく粉碎後、70% EtOH で熱時抽出 (24 hr) を 3 回繰り返し、抽出後は減圧濃縮して EtOH エキス 940 g を得た。このエキスを過剰の水を加え BuOH で 3 回抽出を繰り返し BuOH エキス 250 g を得た。このエキスについてまず Chart 4 に示す分画操作を行い CHCl_3 -MeOH (100—50:1) 溶出部より fr. A (5 g), CHCl_3 -MeOH (30—20:1) 溶出部より fr. B (9.1 g), CHCl_3 -MeOH (5—4:1) 溶出部より fr. C (90 g) を得た。

Fr. A は TLC (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 10:1, 1:1) で 2 つのスポット (R_f 値 0.20, 0.59) を与えるので、シリカゲル (50 g) カラムクロマトグラフィーに付し、まず hexane-acetone (100:1) 溶出画分を得、MeOH から再結して無色鱗片状晶 (110 mg) を得た。TLC: R_f 0.20 (*n*-hexane-acetone, 10:1) IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400 (OH). MS m/e (%) 414 ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}^+$, 100) 412 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}^+$, 31), 400 ($\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}^+$, 24). β -Sitosterol の標品と TLC, IR スペクトルを比較することにより一致をみた。さらに R_f 値 0.59 に相当するものを *n*-hexane-acetone (10:1) 溶出画分から得、MeOH から再結して無色粉末 (18 mg) を得た。本品は TLC 上では単一のスポットを与えるが、その粗結晶を常法によりアセチル化した成績体は、硝酸銀を噴霧した TLC 上では 2 つのスポットを与える。Fr. B は TLC (展開溶媒: CHCl_3 -MeOH, 10:1) で 3 つのスポット (R_f 値 0.58, 0.44, 0.42) を与えるので、シリカゲル (150 g) カラムクロマトグラフィーに付し単離を試みた。まず R_f 値 0.58 に相当するものは CHCl_3 -MeOH (50—30:1) で溶出され、MeOH で再結することにより無色の粉末 (71 mg) として得られる。これは TLC 上で先の fr. A より得た R_f 0.59 (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 1:1) に相当するものと一致したので、合せて (89 mg) 常法により無水酢酸-ピリジンによりアセチル化した。生成物を 10% の硝酸銀カラムクロマトに付し、benzene-AcOEt (15:1) で溶出し、前半の画分を MeOH から再結して IIIa (20 mg), 後半の画分を MeOH から再結して IVa (38 mg) を得た。

次に fr. B のシリカゲルカラムクロマトグラムより CHCl_3 -MeOH (20:1) で溶出する画分 (約 9 g) を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し分画して、 CHCl_3 -MeOH (10:1) で溶出される画分を MeOH から再結晶すると R_f 値 0.44 に相当するものが無色の粉末として得られた。この粉末は TLC 上では単一のスポットを与えるが、そのアセテートは硝酸銀を付した TLC 上では 2 つのスポットを与えるので、この混合物を常温中無水酢酸-ピリジンによりアセチル化後、成績体を 10% 硝酸銀カラムクロマトグラフィーに付し、benzene-AcOEt (10:1) で溶出、前半の画分を MeOH で再結して Ia (40 mg), 後半の画分を MeOH より再結して IIa (38 mg) を得た。さらに fr. B のシリカゲルカラムクロマトグラムより CHCl_3 -MeOH (10:1) で溶出する画分を MeOH で再結して、無色の粉末 (750 mg) を得た。これは TLC 上 R_f 値 0.42, 0.18 のスポットを与えるのでこの混合物 (500 mg) を常法により室温中無水酢酸-ピリジンによりアセチル化後、成績体をシリカゲル (120 g) カラムクロマトグラフィーに付し、 CHCl_3 のみで溶出される画分を MeOH で再結することにより β -sitosteryl D-glucoside tetraacetate (200 mg) を得た。これは標品の β -sitosteryl D-glucoside tetraacetate と NMR スペ

Chart 4

クトルを比較し、同定した。さらに定法により加水分解後、TLC, IR スペクトルを標品と比較することにより、 β -sitosteryl D-glucoside と同定した。

他方, fr. C は Chart 5 に示すごとく, その一部 (80 g) を EtOH (1.5 l) に溶かし, これに水 (2.0 l) に hespidinase (400 g) を混合したものに加え, 振盪培養器で 7 日間室温で振盪した。これに水を加え, AcOEt で 3 回抽出を繰り返し, 抽出液は脱水後減圧下溶媒を留去し AcOEt エキスを得, これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した。

まず CHCl_3 -MeOH (100—50:1) 溶出部より fr. 1 と fr. 2 を得た。fr. 1 は TLC 上で R_f 値 0.47 (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 5:1) のスポットを与え MeOH から再結晶して V (6 mg) を得た。fr. 2 は TLC 上で R_f 値 0.58 (展開溶媒: CHCl_3 -MeOH, 10:1) のスポットを与え, MeOH から再結して無色の粉末 (10.5 g) を得た。これは先に fr. A, fr. B より得た III と IV の混合物と TLC 上一致したので, その一部を前述した方法でアセチル化後, 成績体を 10% 硝酸銀カラムクロマトグラフィーに付し, CHCl_3 で溶出し, 2 つの画分に分け, それぞれ MeOH より再結して IIIa, IVa を得た。

次に CHCl_3 -MeOH (30—20:1) 溶出画分を MeOH から再結晶して無色の粉末 (8.5 g) を得た。これは先の fr. B より得た R_f 値 0.44 (展開溶媒: CHCl_3 -MeOH, 10:1) に相当するものと TLC 上一致したので, その一部 (350 mg) を前述した方法でアセチル化後, 成績体 (338 mg) を 10% 硝酸銀カラム (45 g) クロマトグラフィーに付し, benzene-AcOEt (10:1) で溶出し, 2 つの画分に分け, それぞれ MeOH より再結して Ia (75 mg), IIa (132 mg) を得た。

Chart 5

Ia の性状 MeOH から再結晶して無色針状晶, mp 212—215°, $[\alpha]_D^{20}$ —180° ($c=0.42$, CHCl_3), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 840 (Δ^5), 1740, 1235 (OAc), 988, 960, 911, 890 (spirostane ring). NMR δ : 0.79 (3H, s, 13- CH_3), 1.01 (3H, s, 10- CH_3), 2.03 (6H, s, OAc $\times 2$), 2.06 (3H, s, OAc), 2.11 (3H, s, OAc), 4.58 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H), 4.92—5.40 [(4H, m, AcOCH-), (1H, m, C=CH-)], 5.01 (1H, t, $J=8$ Hz, 3'-H), 5.16 (1H, t, $J=8$ Hz, 2'-H), 4.30 (1H, q, $J_1=15$, $J_2=4$ Hz, 6'-H₁), 3.92 (1H, q, $J_1=15$, $J_2=2$ Hz, 6'-H₂), 5.20 (1H, m, 4'-H), 3.72 (1H, m, 5'-H). MS m/e : 744 (M^+). Anal. Calcd. $\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{12}$: C, 66.18; H, 8.12. Found: C, 66.23; H, 8.33.

IIa の性状 MeOH から再結晶して無色針状晶, mp 174—177°, $[\alpha]_D^{20}$ —168° ($c=0.38$, CHCl_3), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1650, 875 (C=CH₂), 840 (Δ^5), 980, 960, 918, 897 (spirostane ring), 1740, 1235 (OAc). NMR δ : 0.81 (3H, s, 13- CH_3), 1.03 (3H, s, 10- CH_3), 2.04 (3H $\times 2$, s, OAc $\times 2$), 2.06 (3H, s, OAc), 2.12 (3H, s, OAc), 4.57 (1H, d, $J=7$ Hz, anomeric H), 4.80 (2H, bs, $W_{1/2}=6$ Hz, C=CH₂), 4.92—5.40 [(4H, m, AcOCH-), (1H, m, C=CH-)]. MS m/e : 742 (M^+). Anal. Calcd. $\text{C}_{41}\text{H}_{58}\text{O}_{12}$: C, 66.28; H, 7.87. Found: C, 65.86; H, 8.06.

Ia のケン化 Ia (30 mg) を 1% EtOH 性 KOH (20 ml) に溶かし, 0.5 hr 水浴上加温後, 約 1 hr 室温で放置する。水を加え, AcOEt で抽出後 AcOEt 層を水洗, 乾燥後, 溶媒を留去, 残留物を MeOH で再結晶, 無色鱗片状晶 I (22 mg) を得。mp 218—221°, $[\alpha]_D^{20}$ —122° ($c=0.26$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3380 (OH), 840 (Δ^5), 980, 960, 920, 895 (spirostane ring). MS m/e (%): 576 (M^+ , 4.3), 414 (M^+ -glucose- H_2O , 12), 342 (4), 300 (12), 282 (80), 271 (12), 253 (16), 139 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$, 100).

I の Emulsin 加水分解 I (18 mg) を EtOH (18 ml) に溶かし, emulsin (100 mg) を水 (20 ml) に溶かし

たものを加え、25—35° で 4 日間振盪後、水を加え AcOEt で抽出。AcOEt 層は水洗、乾燥後、AcOEt を留去し、残留物をシリカゲル (5 g) を用いてクロマトし V (10 mg) を得。V は MeOH より再結晶、無色板状晶、mp 244—246°, $[\alpha]_D^{25} -145^\circ$ ($c=0.15$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} 2830, 835 (Δ^5), 980, 960, 920, 895 (spirostane ring)。NMR δ : 0.81 (3H, s, 13-CH₃), 1.04 (3H, s, 10-CH₃), 0.97 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20-CH₃), 0.79 (3H, d, $J=7$ Hz, 25-CH₃), 3.36—3.64 (2H, m, C₂₆-H), 4.06 (1H, $W_{1/2}=8$ Hz, C₃-H), 5.46 (1H, m, $W_{1/2}=10$ Hz, C=CH-). MS m/e (%): 414 (M^+ , 4.4), 342 (11.3), 300 (28.6), 282 (11.1), 271 (21.1), 253 (7.8), 139 ($C_9H_{15}O^+$, 100). Anal. Calcd. $C_{27}H_{42}O_3$: C, 78.21; H, 10.21. Found: C, 78.15; H, 10.33. 一方水層はセロファン膜を用いて蒸留水中、室温で一晩透析後、透過部分を減圧濃縮し、TLC (R_f 値 0.71, 展開溶媒: BuOH-AcOH-H₂O, 1: 1: 1) で glucose を検出。また濃部を減圧下乾燥し、TMS 化後、ガスクロマトグラフィーにより glucose を検出した (t_R ; 10.5 min, カラム; 4 mm (ID) $\times$ 1.5 m ガラスカラム, 1.5% OV-17 on 80/100 chromosorb w, 温度 140°, キャリヤー; 窒素, 流速 45 ml/min)。

IIa のケン化 IIa (38 mg) を 1% EtOH 性 KOH (20 ml) に溶かし、前述のごとく処理して、無色鱗片状晶 II (25 mg) を得。mp 236—238°, $[\alpha]_D^{25} -109^\circ$ ($c=0.11$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1655, 880 (C=CH₂), 840 (Δ^5), 980, 960, 918, 900 (spirostane ring), 3350 (OH)。MS m/e (%): 574 (M^+ , 3.2), 412 (M^+ -glucose-H₂O, 8), 342 (4), 300 (12), 282 (80), 271 (12), 137 ($C_9H_{13}O^+$, 100)。

II の Emulsin 加水分解 II (15 mg) を EtOH (20 ml) に溶かし、emulsin (180 mg) を水 (20 ml) に溶かしたものを加え、25—35° で 2 日間振盪後、水を加え、AcOEt で抽出。前述のごとく処理して AcOEt 可溶部をシリカゲル (5 g) カラムクロマトし VI を得。VI は MeOH より再結晶して無色板状晶、mp 197—198°, $[\alpha]_D^{25} -136^\circ$ ($c=0.36$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1655, 880 (C=CH₂), 840 (Δ^5), 980, 960, 920, 900 (spirostane ring)。NMR δ : 0.82 (3H, s, 13-CH₃), 1.05 (3H, s, 10-CH₃), 0.98 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20-CH₃), 3.90 (1H, d, $J=12$ Hz, C₂₆-H₁), 4.37 (1H, d, $J=12$ Hz, C₂₆-H₂), 4.07 (1H, $W_{1/2}=8$ Hz, C₃-H), 4.82 (2H, bs, $W_{1/2}=6$ Hz), 5.48 (2H, m, $W_{1/2}=10$ Hz, C=CH-). MS m/e (%): 412 (M^+ , 6.1), 342 (7.4), 300 (78.4), 282 (58.8), 271 (28.4), 253 (8.1), 137 ($C_9H_{13}O^+$, 100). Anal. Calcd. $C_{27}H_{40}O_3$: C, 78.59; H, 9.77. Found: C, 78.58; H, 10.03.

一方水層は室温中一夜透析後、透過部分を減圧濃縮し TLC (R_f 値 0.71, 展開溶媒: BuOH-AcOH-H₂O, 1: 1: 1) で glucose を検出した。また濃縮物を減圧下乾燥し、TMS 化後、ガスクロマトグラフィーにより glucose を検出した。

Diosgenin から V への変換 Diosgenin (50 mg) のエーテル (20 ml) 溶液に、CrO₃-H₂SO₄ 水溶液 (0.3 ml) を加え、30 分室温攪拌後、水 (20 ml) を加え、エーテル (50 ml) で抽出。エーテル層を乾燥。エーテルを留去、残留物 (18 mg) を得。精製することなく、MeOH (2 ml) に溶解し、NaBH₄ (3 mg) を加え、5 分間室温攪拌後、水を加え AcOEt で抽出。常法処理後残留物を分取用 TLC に付し、*n*-hexane-acetone (5: 1) で 3 回反復展開することにより分画し、各画分を MeOH から再結晶し、diosgenin と共に、3-epi-diosgenin (5 mg) をそれぞれ無色板状晶として得た。3-epi-diosgenin は mp 244—246° で、V との混融試験で融点降下を示さず、IR スペクトル、NMR スペクトルで V と一致した。

VI の接触還元 VI (1 mg) の EtOH (1 ml) 溶液に、5% Pd-C (4 mg) を加え、H₂ 気流中室温で 1 hr 攪拌する。Pd-C を除去後、溶媒を留去し、TLC (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 5: 1) で 3 回反復展開の後 2 つの生成物を認めた。一方は V と、他方は 3-epi-yamogenin と一致した。3-epi-yamogenin は yamogenin (3 mg) のエーテル (2 ml) 溶液に、CrO₃-H₂SO₄ 水溶液 (0.2 ml) を加え 0.5 hr 攪拌後、前述の方法に従って、最後に NaBH₄ 還元を行うことによって調製した。

IIIa の性状 AcOEt から再結晶して無色針状晶 mp 195—196°, $[\alpha]_D^{25} -74^\circ$ ($c=0.29$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 840 (Δ^5), 1750, 1235 (OAc), 978, 970, 910, 890 (spirostane ring)。NMR δ : 0.80 (3H, s, 13-CH₃), 1.13 (3H, s, 10-CH₃), 0.95 (3H, d, $J=6$ Hz, 20-CH₃), 2.03 (3H, s, OAc), 2.05 (3H, s, OAc), 4.98—5.12 (2H, m, AcOCH $\times$ 2), 5.50 (1H, m, $W_{1/2}=10$ Hz, C=CH-). MS m/e (%): 514 (M^+ , 1.1), 394 (M^+ -AcOH, 5.0), 280 (31.8), 139 ($C_9H_{15}O^+$, 100). Anal. Calcd. $C_{31}H_{46}O_6$: C, 72.34; H, 9.01. Found: C, 72.34; H, 9.07.

IIIa のケン化 IIIa (12 mg) を 1% EtOH 性 KOH (10 ml) に溶かし、0.5 hr 水浴上加温後、約 1 hr 室温で放置する。水を加え、AcOEt で抽出後 AcOEt 層を水洗、乾燥後、溶媒を留去、残留物を MeOH で再結晶、無色板状晶 III (10 mg) を得。mp 196—197°, $[\alpha]_D^{25} -119^\circ$ ($c=0.37$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450 (OH), 980, 960, 910, 895 (spirostane ring)。NMR δ : 0.82 (3H, s, 13-CH₃), 1.06 (3H, s, 10-CH₃), 0.98 (3H, d, $J=7$ Hz, 20-CH₃), 0.84 (3H, d, $J=7$ Hz, 25-CH₃), 3.84 (1H, q, $J_1=10.5$, $J_2=5.5$ Hz, 1 α -H), 4.08 (1H, m, $W_{1/2}=8$ Hz, 3 β -H)。MS m/e : 430 (M^+), 412 (M^+ -H₂O), 298, 280, 139 ($C_9H_{15}O^+$)。Anal. Calcd. $C_{27}H_{42}O_4$: C, 73.31; H, 9.83. Found: C, 75.32; H, 9.83.

IVa の性状 AcOEt から再結晶して無色板状晶、mp 188—190°, $[\alpha]_D^{25} -70^\circ$ ($c=0.13$, CHCl_3)。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1651, 880 (C=CH₂), 840 (Δ^5), 1750, 1240 (OAc), 980, 960, 920, 895 (spirostane ring)。NMR δ : 0.81 (3H, s, 13-CH₃), 1.14 (3H, s, 10-CH₃), 0.96 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20-CH₃), 2.04 (3H, s, OAc), 2.06 (3H, s, OAc), 3.88 (1H, d, $J=12$ Hz, C₂₆-H₁), 4.34 (1H, d, $J=12$ Hz, C₂₆-H₂), 4.80 (2H, m, $W_{1/2}=7$ Hz), 4.88—5.12 (2H, m, AcOCH $\times$ 2), 5.51 (1H, m, $W_{1/2}=10$ Hz, C=CH-). MS m/e : 512 (M^+), 392, 280, 137 ($C_9H_{13}O^+$)。Anal. Calcd. $C_{31}H_{44}O_6$: C, 72.62; H, 8.65. Found: C, 72.46; H, 8.80.

IVa のケン化 IVa (20 mg) を 1% EtOH 性 KOH (15 ml) に溶かし, 0.5 hr 水浴上加温後, 約 1 hr 室温で放置する. 前述のごとく処理して, 無色板状晶 (IV (14 mg)) を得. mp 167—169°, $[\alpha]_D^{20} -121^\circ$ ($c=0.24$, CHCl_3), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 980, 960, 920, 900 (spirostane ring), 875 ($\text{C}=\text{CH}_2$). NMR δ : 0.81 (3H, s, 13- CH_3), 1.04 (3H, s, 10- CH_3), 0.97 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20- CH_3), 3.88 (1H, d, $J=12$ Hz, $\text{C}_{26}\text{-H}_1$), 4.34 (1H, d, $J=12$ Hz, $\text{C}_{26}\text{-H}_2$), 4.80 (2H, bs, $W_{1/2}=8$ Hz, $\text{C}=\text{CH}_2$), 3.84 (1H, m, 1 α -H), 4.08 (1H, m, $W_{1/2}=8.5$ Hz, 3 β -H). MS m/e : 428 (M^+), 410 ($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$), 298, 137 ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}^+$). Anal. Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_4$: C, 75.66; H, 9.41. Found: C, 75.66; H, 9.53.

IIIa の緩和な加水分解 IIIa (36 mg) を 0.1% EtOH 性 KOH (10 ml) に溶かし, 約 1 hr 室温で放置する. 水を加え, AcOEt で抽出. AcOEt 層を水で洗い, 乾燥. AcOEt を留去し, 残留物を分取用 TLC に付し, TLC (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 5:1) で R_f 値 0.16 に相当する主生成物を分取し, AcOEt から再結晶して無色針状晶としてモノアセテート体 IIIb (15 mg) を得. IIIb: mp 218—221°, $[\alpha]_D^{25} -106^\circ$ ($c=0.6$, CHCl_3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 1715, 1250 (OAc), 975, 960, 920, 900 (spirostane ring). NMR δ : 5.05 (1H, dd, $J_1=11$ Hz, $J_2=5.5$ Hz: 1 α -H), 4.10 (1H, m, 3 β -H), 2.05 (3H, s, OAc), 1.16 (3H, s, 10- CH_3). MS m/e (%): 472 (M^+ , 30), 412 (M^+-AcOH , 3), 298 (84.2), 139 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$, 100). Anal. Calcd. $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$: C, 73.69; H, 9.38. Found: C, 73.55; H, 9.63.

IIIb から Dienone 体 (IIIc) への変換 IIIb (10 mg) の acetone (5 ml) 溶液に $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ 水溶液 0.5 ml を加え 1 hr 攪拌後, 水を加え AcOEt で抽出, 5% NaHCO_3 溶液, 次いで水で洗い, 乾燥. 常法のように処理し, 得られた残留物を精製することなく, MeOH (5 ml) に溶解し, Al_2O_3 (5 mg) を加え, 48 hr 水浴上還流. Al_2O_3 を除去後, 溶媒を留去し, 分取用 TLC に付し, TLC (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 5:1) で R_f 値 0.70 に相当する生成物を分取し, MeOH から再結晶, 無色針状晶 IIIc (3 mg) を得. IIIc: mp 199—202°, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1665 ($\text{C}=\text{O}$), 1621, 1601 ($\text{C}=\text{C}$), 978, 912, 891, 861 (spirostane ring). NMR δ : 7.03 (1H, d, $J=10$ Hz, $\text{C}_1\text{-H}$), 6.21 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, $\text{C}_2\text{-H}$), 6.06 (1H, bs, $\text{C}_4\text{-H}$), 1.25 (3H, s, 10- CH_3), 0.95 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20- CH_3), 0.78 (1H, d, $J=5.5$ Hz, 25- CH_3). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 245 (2.23). MS m/e (%): 410 (M^+ , 35.3), 351 (20.6), 296 (23.5), 139 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$, 100).

Diosgenin から 25R-spirosta-1,4-dien-3-one への変換 Diosgenin から調製した diosgenone¹⁶⁾ [30 mg; mp 185—186°, $[\alpha]_D^{20} +4^\circ$ ($c=0.21$, CHCl_3), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 242 (3.67), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1671 ($\text{C}=\text{O}$), 1660 ($\text{C}=\text{C}$), 973, 960, 914, 890 (spirostane ring).] を benzene (6 ml) に溶かし, 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (18 mg) を加え, 水浴上 48 hr 還流. 冷後水を加え, エーテル抽出, エーテル層を 5% NaHCO_3 で, 次いで数回水で洗い, 常法処理後, 残渣を分取用 TLC (展開溶媒: *n*-hexane-acetone, 5:1) に付し, MeOH より再結晶して無色針状晶 (18 mg) を得. mp 197—200°, $[\alpha]_D^{20} -80^\circ$ ($c=0.23$, CHCl_3), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 245 (2.15). これらの物理化学データ, および IR, NMR, mass スペクトルなどから本生成物は IIIc (25R-spirosta-1,4-dien-3-one) と一致した.

IVa の接触還元 IVa (147 mg) の EtOH (24 ml) 溶液に 5% Pd-C (90 mg) を加え, H_2 気流中室温で約 1 hr 攪拌する. Pd-C 除去後溶媒を留去し, 残渣を分取用 TLC に付し, benzene-AcOEt (98:3) で 5 回反復展開の後, AcOEt から再結晶して無色針状晶, mp 218—221° の IIIa (25 mg) および AcOEt から再結晶して無色板状晶 IIId (47 mg) を得. IIId は mp 162—163°, $[\alpha]_D^{20} -43^\circ$ ($c=0.12$, CHCl_3), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1750, 1230 (OAc), 982, 918, 895, 850 (spirostane ring). NMR δ : 0.80 (3H, s, 13- CH_3), 1.13 (3H, s, 10- CH_3), 0.99 (3H, d, $J=6.5$ Hz, 20- CH_3), 1.07 (3H, d, $J=7$ Hz, 25- CH_3), 3.34 (1H, d, $J=12$ Hz, $\text{C}_{26}\text{-H}_1$), 3.99 (1H, dd, $J_1=12$ Hz, $J_2=3.5$ Hz, $\text{C}_{26}\text{-H}_2$). MS m/e : 514 (M^+), 394, 280, 139 ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$). Anal. Calcd. $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_6$: C, 72.34; H, 9.01. Found: C, 72.17; H, 9.11.

謝辞 本研究にあたり, ステロイドサボゲニンの貴重な標品 (yamogenin) の分与された, アメリカ NIH の David Johnson 博士, 川蜀七根の同定にお世話いただいた武田薬工. 京都試験農園, 後藤 実博士, 松岡敏郎博士に深謝いたします. また有益な御助言をいただいた九州大学薬学部 川崎敏男教授に深謝致します.