

オトギリソウ属植物の成分研究 (第2報)¹⁾ オトギリソウの メガスティグマン配糖体について

松岡 絵理香, 町田 浩一, 菊地 正雄

Studies on the Constituents of *Hypericum* Species. II. Megastigmane Glucosides from *Hypericum erectum* THUNB.

Erika MATSUOKA, Koichi MACHIDA, and Masao KIKUCHI

(Received November 22, 2005)

Two rare megastigmane glucosides, 3- and 9-*O*- β -D-glucopyranosides of (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**1** and **2**), were isolated from *Hypericum erectum* THUNB. Their structures were established on the basis of chemical and spectral data. This is the first report of the isolation of each megastigmane derivative from Guttiferae plant.

Key words — *Hypericum erectum*; Guttiferae; megastigmane glucoside

近年, セイヨウオトギリソウの抗うつ作用に注目が集まり, その作用物質や抗ウイルス, 抗腫瘍活性等の化学成分が報告されている.²⁻⁹⁾ 一方, 同属のオトギリソウもセイヨウオトギリソウと同様に古くから止血, 収れん, 含そう薬として用いられているが, その成分研究は詳細には行われていない.¹⁰⁻¹⁵⁾ 先に著者らは, 薬用資源としての利用が期待されるオトギリソウの成分研究を行い, そのクロロホルム可溶部から11種の化合物を単離し, これらの化学構造について報告した.¹⁾ 今回, オトギリソウの配糖体成分を検索したところ, 2種のメガスティグマン配糖体を単離し, それらの化学構造を各種スペクトル解析並びに化学的分析法により決定することができたので報告する.

化合物**1**および**2**は, 比旋光度 -59.6° および -63.2° の無晶形粉末として得られ, 高分解能(HR)-FAB-MSより分子式は共に $C_{19}H_{34}O_9$ と決定された. 化合物**1**および**2**の¹H-NMRスペクトルは非常によく類似しており, 共にトランス二置換オレフィンプロトン[**1**: δ 5.79 (1H, dd, $J=15.9, 6.3$ Hz, H-8), 6.06 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7). **2**: δ 5.65 (1H, dd, $J=15.9, 8.1$ Hz, H-8), 6.17

(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7)], 2個のオキシメチンプロトン[**1**: δ 4.20 (1H, ddt, $J=14.4, 12.7, 4.3$ Hz, H-3), 4.34 (1H, br q, $J=6.3$ Hz, H-9). **2**: δ 4.05 (1H, ddt, $J=13.0, 11.5, 4.9$ Hz, H-3), 4.55 (1H, dq, $J=8.1, 6.3$ Hz, H-9)], 1個のアノメリックプロトン[**1**: δ 4.40 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'). **2**: δ 4.40 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1')], 2個のメチレンプロトン[**1**: δ 1.58 (1H, ddd, $J=12.7, 4.3, 2.0$ Hz, H-2eq), 1.75 (1H, t, $J=12.7$ Hz, H-2ax), 1.78 (1H, dd, $J=14.4, 12.9$ Hz, H-4ax), 1.84 (1H, ddd, $J=12.9, 4.3, 2.0$ Hz, H-4eq). **2**: δ 1.46 (1H, ddd, $J=11.5, 4.9, 1.7$ Hz, H-2eq), 1.65 (1H, t, $J=11.5$ Hz, H-2ax), 1.74 (1H, t, $J=13.0$ Hz, H-4ax), 1.78 (1H, ddd, $J=13.0, 4.9, 1.7$ Hz, H-4eq)], 1個の2級メチルプロトン[**1**: δ 1.27 (3H, d, $J=6.3$ Hz, H₃-10). **2**: δ 1.32 (3H, d, $J=6.3$ Hz, H₃-10)], および3個の3級メチルプロトン[**1**: δ 0.88 (3H, s, H₃-11), 1.11 (3H, s, H₃-13), 1.22 (3H, s, H₃-12). **2**: δ 0.91 (3H, s, H₃-11), 1.11 (3H, s, H₃-13), 1.24 (3H, s, H₃-12)]のシグナルが確認された. ¹³C-NMRスペクトルでは, その化学シフト値より β -グルコピラノースの存在の他に, distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT)

スペクトルとも併せ2個の4級オキシカーボン (**1**: δ 77.8, 79.2. **2**: δ 78.4, 79.2) と1個の4級カーボン (**1**: δ 40.8. **2**: δ 40.8) が確認された. ^1H - ^1H correlation spectroscopy (^1H - ^1H COSY) によりプロトン並びに ^1H -detected heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) によりプロトンとカーボンの連結性を検討したところ, Fig. 1 に示す相関が観測された. また, 化合物**1**および**2**をそれぞれセルラーゼにより酵素加水分解したところ, 得られたアグリコン (**1a**, **2a**) は旋光度を含む全てのスペクトルデータが完全に一致した. 更に, **1a**(=**2a**) の nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy (NOESY) を測定したところ, シクロヘキサン環はイス形配座であり, 3位水酸基は β -エクアトリアル, 5位水酸基は α -アキシャル, 6位水酸基は β -アキシャル結合していることが確認された (Fig. 2). 糖部

は旋光度検出器による HPLC 分析で D-グルコースであると結論した. 以上のことから, 化合物**1**および**2**はアグリコン部の絶対配置が同一であり, β -D-グルコピラノースの結合位置が異なるメガスティグマン配糖体であることが確認された. 化合物**1**および**2**の9位の絶対配置については, 化合物**2**の9位カーボンシグナルの化学シフト値 (δ 74.9) から *S* 配置と推定されるが, ¹⁶⁻²²⁾ より確実にアグリコン部のキラル中心の絶対配置を証明するために, 改良 Mosher 法²³⁾ により検討した. その結果, Fig. 3 に示す結果が得られたことから, 3位および9位はそれぞれ *S* 配置であることが確認された. 以上のことから, 化合物**1**および**2**は (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3-*O*- β -D-glucopyranoside および (3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 9-*O*- β -D-glucopyranoside と決定した. 化合

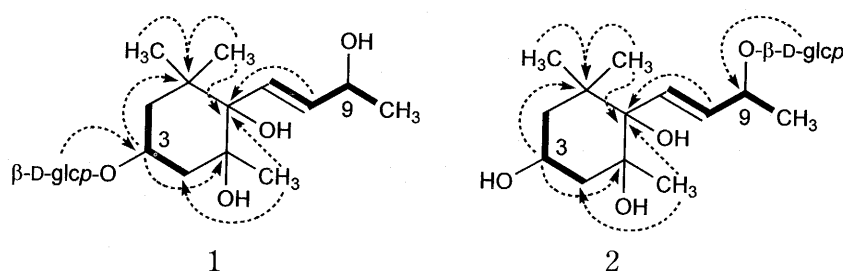


Fig. 1. The Main HMBC Correlations of **1** and **2**

Heavy lines indicate partial structures inferred from ^1H - ^1H COSY.

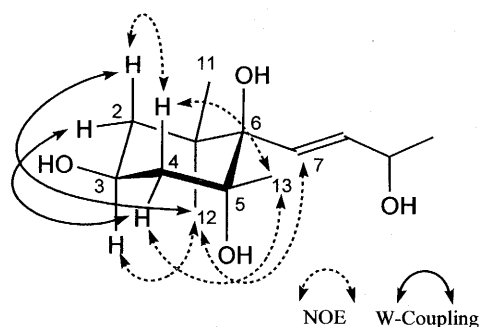


Fig. 2. NOE Correlations and W-Couplings of **1a** (=2a)

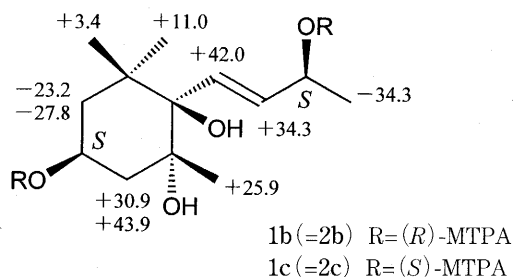


Fig. 3. Result with the modified Mosher's method for **1b** (=2b) and **1c** (=2c)

The δ values are in Hz ($\delta_S - \delta_R$ at 400 MHz)

物**1**および**2**の天然からの単離報告例は極めて少なく (**1**は2例目²⁴⁾, **2**は3例目^{24,25)}), 更にメガスティグマン誘導体がオトギリソウ科 (Guttiferae) から確認されたのは, 今回が初めてである.

実験の部

旋光度は日本分光DIP-360型, MSは日本電子JMS-DX 303型を使用し測定した. ¹H-及び¹³C-NMRスペクトルは日本電子JNM-LA 400型 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz)を使用し, 内部標準物質にtetramethylsilaneを用いて測定した. 化学シフトは δ 値 (ppm)で示し, 結合定数 (J)はHzで表した (略語: s=singlet, d=doublet, t=triplet, dd=double doublet, dq=double quartet, ddd=double double doublet, ddt=double double triplet, m=multiplet, br=broad). カラムクロマトグラフィーにはKieselgel 60 (Merck, 230-400 mesh), Sephadex LH-20 (Pharmacia)を使用した. 分取高速液体クロマトグラフィー (prep. HPLC)はTosoh HPLC system (pump, CCPS; detector, UV-8020; column oven, CO-8020)を使用した. HPLCによる糖分析には旋光度検出器にOR-2090 (JASCO)を用いた.

分離 市販オトギリソウ (ウチダ和漢薬, 日本産) 2.0 kgをMeOHで室温抽出し, 得られたMeOHエキス (327 g)を*n*-hexane, CHCl₃, Et₂O, AcOEt, *n*-BuOH, H₂O可溶部に分画した. H₂O可溶部 (38.6 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH-H₂O混液)に付して, 6分画し (frs. 1-6), 更にそのfr. 5をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィー (50% MeOH)に付し, 6分画した (frs. 5-1-5-6). Fr. 5-2を分取HPLC [Condition 1: column, TSKgel Amide-80 (Tosoh, 7.8 mm i.d.×30 cm); solvent, CH₃CN-H₂O (8:1); col. temp., 40°C; flow rate, 1.5 mL/min. Condition 2: column, TSKgel Amide-80 (Tosoh, 7.8 mm i.d.×30 cm); solvent, CH₃CN-H₂O (11:1); col. temp., 40°C; flow rate, 1.5 mL/min. Condition 3: column, TSKgel ODS-80TM (Tosoh, 6.0 mm i.d.×15 cm); solvent, MeOH-H₂O (1:12); col. temp.,

40°C; flow rate, 1.0 mL/min]で精製, 化合物**1** (4.0 mg)および**2** (90.0 mg)を得た.

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**1**) 無晶形粉末, $[\alpha]_D^{27} - 59.6^\circ$ ($c=0.3$, MeOH). FAB-MS m/z : 427 $[M+Na]^+$. HR-FAB-MS m/z : 429.2106 (Calcd for C₁₉H₃₄O₉Na; 429.2101). ¹H-NMR: Table 1. ¹³C-NMR: Table 2.

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 9-*O*- β -D-glucopyranoside (**2**) 無晶形粉末, $[\alpha]_D^{27} - 63.2^\circ$ ($c=0.3$, MeOH). FAB-MS m/z : 407 $[M+H]^+$. HR-FAB-MS m/z : 407.2276 (Calcd for C₁₉H₃₅O₉; 407.2282). ¹H-NMR: Table 1. ¹³C-NMR: Table 2.

化合物1の酵素加水分解 1 (4.0 mg)を精製水 5 mLに溶かし, cellulase (10 mg, Sigma)を加え, 38°Cで3日間攪拌. その反応液を減圧下濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した. CHCl₃-MeOH (9:1) 溶出画分を減圧濃縮後, HPLC [column, TSKgel ODS-80TM (Tosoh, 6.0 mm i.d.×15 cm); solvent, MeOH-H₂O (1:12); col. temp., 40°C; flow rate, 1.0 mL/min]により精製し, アグリコン**1a** (2.0 mg)を得た.

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol (**1a**): 無晶形粉末, $[\alpha]_D^{27} - 38.5^\circ$ ($c=0.1$, MeOH). FAB-MS m/z : 267 $[M+Na]^+$. HR-FAB-MS m/z : 267.1577 (Calcd for C₁₃H₂₄O₄Na; 267.1572). ¹H-NMR: Table 1. ¹³C-NMR: Table 2. MeOH溶出画分を減圧濃縮後, 旋光度検出器を用いたHPLC [column, TSKgel Amide-80 (Tosoh, 7.8 mm i.d.×30 cm); solvent, CH₃CN-H₂O (4:1); col. temp., 45°C; flow rate, 1.0 mL/min]で分析したところ, 標品のD-glucoseと保持時間 (t_R 38.4 min)並びに旋光性 (+)が一致した.

1aの (R)-および (S)-MTPAエステル化 1a (1.0 mg)をピリジン (30 μ L)に溶かし, (S)-(+)-MTPA chloride (10 μ L)を加え室温で1日放置した. 3-[(dimethylamino)propyl] amine (1.0 μ L)を加え, 10分間放置後, 反応液を減圧濃縮しCHCl₃で抽出した. CHCl₃可溶部を減圧濃縮し, 残査をHPLC [column, TSKgel 80TM (Tosoh, 6.0 mm i.d.×15 cm); solvent, MeOH-H₂O (3:1);

col. temp., 40 °C; flow rate, 0.8 mL / min]により精製し, (*R*)-MTPA エステル (**1b**, 1.2 mg)を得た. (*R*)-(-)-MTPA chloride を用い同様の操作により, **1a** (1.0 mg) から (*S*)-MTPA エステル (**1c**, 1.0 mg) を得た.

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3,9-di(*R*)-MTPA ester (**1b**) 無晶形粉末, FAB-MS m/z : 637 [M - 2OCH₃ + Na]⁺. HR-FAB-MS m/z : 637.4521 (Calcd for C₃₁H₃₂O₆F₆Na; 637.4534). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.52 - 7.54 (4H, m), 7.37 - 7.41 (6H, m), 6.17 (1H, d, J =15.0 Hz, H-7), 5.70 (1H, dd, J =15.0, 6.4 Hz, H-8), 5.67 (1H, br q, J =6.1 Hz, H-9), 5.47 (1H, ddt, J =12.2, 5.1, 4.4 Hz, H-3), 3.56, 3.57 (each 3H, s, OCH₃), 1.91 (1H, br t, J =12.2 Hz, H-4ax), 1.87 (1H, ddd, J =12.2, 5.1, 2.0 Hz, H-4eq), 1.80 (1H, br t, J =12.2 Hz, H-2ax), 1.68 (1H, ddd, J =12.2, 4.4, 2.0 Hz, H-2eq), 1.46 (3H, d, J =6.1 Hz, H₃-10), 1.25 (3H, s, H₃-12), 1.09 (3H, s, H₃-13), 0.80 (3H, s, H₃-11).

(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-Megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3,9-di(*S*)-MTPA ester (**1c**) 無晶形粉末,

FAB-MS m/z : 637 [M - 2OCH₃ + Na]⁺. HR-FAB-MS m/z : 637.4533 (Calcd for C₃₁H₃₂O₆F₆Na; 637.4534). ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.52 - 7.54 (4H, m), 7.37 - 7.41 (6H, m), 6.28 (1H, d, J =15.9 Hz, H-7), 5.79 (1H, dd, J =15.9, 7.1 Hz, H-8), 5.66 (1H, br q, J =6.3 Hz, H-9), 5.48 (1H, ddt, J =12.4, 4.9, 4.4 Hz, H-3), 3.54, 3.55 (each 3H, s, OCH₃), 2.02 (1H, br t, J =12.4 Hz, H-4ax), 1.95 (1H, ddd, J =12.4, 4.9, 2.0 Hz, H-4eq), 1.73 (1H, br t, J =12.4 Hz, H-2ax), 1.62 (1H, ddd, J =12.4, 4.4, 2.0 Hz, H-2eq), 1.42 (3H, d, J =6.3 Hz, H₃-10), 1.28 (3H, s, H₃-12), 1.15 (3H, s, H₃-13), 0.81 (3H, s, H₃-11).

化合物2の酵素加水分解 **2** (30 mg) を精製水 5 mL に溶かし, cellulase (20 mg, Sigma) を加え, 38 °C で3日間攪拌. その反応液を化合物**1**と同様の操作を行うことにより, アグリコン**2a** (15 mg) を得た. **2a** は**1a** と旋光度とNMRスペクトルデータが一致し, またMeOH 溶出画分から同様の操作により D-glucose を確認した.

2aの(R)-および(S)-MTPAエステル化: **2a** (each 3.0 mg) をピリジン (50 μL) に溶かし,

Table 1. ¹H-NMR data (400 MHz, CD₃OD) of **1,2** and their common aglycone (**1a=2a**)

	1	2	1a (=2a)
2eq	1.58 ddd (12.7, 4.3, 2.0)	1.46 ddd (11.5, 4.9, 1.7)	1.45 ddd (12.2, 4.4, 1.7)
2 ax	1.75 t (12.7)	1.65 t (11.5)	1.65 t (12.2)
3	4.20 ddt (14.4, 12.7, 4.3)	4.05 ddt (13.0, 11.5, 4.9)	4.05 dddd (12.7, 12.2, 5.6, 4.4)
4 eq	1.84 ddd (12.9, 4.3, 2.0)	1.78 ddd (13.0, 4.9, 1.7)	1.77 ddd (12.7, 5.6, 1.7)
4 ax	1.78 dd (14.4, 12.9)	1.74 t (13.0)	1.73 t (12.7)
7	6.06 d (15.9)	6.17 d (15.9)	6.07 d (15.9)
8	5.79 dd (15.9, 6.3)	5.65 dd (15.9, 8.1)	5.78 dd (15.9, 6.3)
9	4.34 br q (6.3)	4.55 dq (8.1, 6.3)	4.34 br q (6.3)
10	1.27 d (6.3)	1.32 d (6.3)	1.27 d (6.3)
11	0.88 s	0.91 s	0.87 s
12	1.22 s	1.24 s	1.22 s
13	1.11 s	1.11 s	1.10 s
1'	4.40 d (7.8)	4.40 d (7.8)	—
6'	3.68 dd (12.0, 5.1)	3.67 dd (12.0, 5.6)	—
	3.86 dd (12.0, 2.0)	3.86 dd (12.0, 2.2)	

Coupling constants (J in Hz) are given in parentheses.

(S)-(+)-および (R)-(-)-MTPA chloride (20 μ L) を加え室温で1日放置後, **1a**と同様の操作により (R)-MTPAエステル (**2b**, 2.9 mg) および (S)-MTPAエステル (**2c**, 3.2 mg) を得た. **2b** および **2c** はそれぞれ **1b** および **1c** と NMR スペクトルデータが完全に一致した.

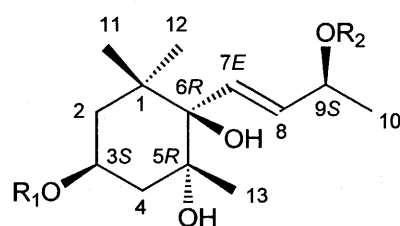
謝辞 本研究にあたり, NMR および Mass スペクトルを測定していただいた本学中央機器室 佐藤 真一, 松木 智之 両氏に深謝いたします.

Table 2. ^{13}C -NMR data (100 MHz, CD_3OD) of **1,2** and their common aglycone (**1a=2a**)

C	1	2	1a (=2a)
1	40.8	40.8	40.8
2	44.6	46.4	46.6
3	73.2	65.2	65.3
4	42.4	45.5	45.7
5	77.8	78.4	77.8
6	79.2	79.2	79.0
7	131.0	135.7	131.2
8	136.2	133.0	136.1
9	69.6	74.9	69.6
10	24.1	22.4	24.1
11	27.6	28.1	27.6
12	26.3	26.5	26.2
13	27.2	27.1	27.1
1'	102.3	100.6	—
2'	75.2	75.4	—
3'	78.2	78.1	—
4'	71.7	71.6	—
5'	77.9	77.8	—
6'	62.8	62.7	—

REFERENCES

- 1) Matsuoka E., Machida K., Kikuchi M., *J. Tohoku Pharmaceutical University*, **51**, 41 – 48 (2004).
- 2) Lopez. B. I., *Photochem. Photobiol.*, **54**, 95 – 98 (1991).
- 3) Sommer H., Harrer G., *J. Geriatric Psychiatry and Neuropharmacology*, **7**, S9 – S11 (1994).
- 4) Baureithel K. H., Berger B. K., Engesser A., Burkard W., Schaffner W., *Pharmaceutical Acta Helv.*, **72**, 153 – 157 (1997).
- 5) Hippus H., *Curr. Med. Res. Opin.*, **14**, 171 – 184 (1998).
- 6) Shan M. D., Hu L. H., Chen Z. L. *J. Nat. Prod.*, **64**, 127 – 130 (2001).
- 7) Barnes J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 583 – 600 (2001).
- 8) Verotta L., Lovagilo E., Sterner O., *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 1193 – 1197.
- 9) Vollmer J. J., Rosenson J., *J. Chem. Education*, **81**, 1450 – 1455 (2004).
- 10) Okuda M., Mitsuhashi H., “Newly Revised Illustrated Medicinal Plants of the World,” Hokuryukan, Tokyo, 2002, p. 313.
- 11) Nanba T., “The Encyclopedia of Medicinal Plant,” Shinkosha, Tokyo, 2000, p. 104.
- 12) Tada M., Chiba K., Yamada H., Maruyama H., *Phytochemistry*, **30**, 2556 – 2562 (1991).
- 13) An T. Y., Shan M. D., Hu L. H., Liu S. J., Chen Z. L., *Phytochemistry*, **59**, 395 – 398 (2002).
- 14) An T. Y., Hu L. H., Chen Z. L., Sim K. Y.,



	R ₁	R ₂
1	β -D-Glcp	H
1a (=2a)	H	H
1b (=2b)	(R)-MTPA	(R)-MTPA
1c (=2c)	(S)-MTPA	(S)-MTPA
2	H	β -D-Glcp

Chart 1

- Tetrahedron Lett.*, **43**, 163 – 165 (2002).
- 15) Kosuge T., Ishida H., Satoh T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 202 – 205 (1985).
- 16) Kasai R., Suzuno M., Asakawa I., Tanaka O., *Tetrahedron Lett.*, **18**, 175 – 178 (1977).
- 17) Pabst A., Barron D., Semon E., Schreier P., *Phytochemistry*, **31**, 1649 – 1652 (1992).
- 18) Otsuka H., Yao M., Kamada K., Takeda Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 754 – 759 (1995).
- 19) Takeda Y., Zhang H., Matsumoto T., Otsuka H., Oiso Y., Honda G., Tabata M., Fujita T., Sun H., Sezik E., Yesilada E., *Phytochemistry*, **44**, 117 – 120 (1997).
- 20) Kanchanapoom T., Kasai R., Yamazaki K., *Phytochemistry*, **58**, 337 – 341 (2001).
- 21) Kanchanapoom T., Kasai R., Picheansoonthon C., Yamazaki K., *Phytochemistry*, **58**, 811 – 817 (2001).
- 22) Otsuka H., Tamaki A., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 390 – 394 (2002).
- 23) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092 – 4096 (1991).
- 24) Otsuka H., Hirata E., Shinzato T., Takeda Y., *Phytochemistry*, **62**, 763 – 768 (2003).
- 25) Kanchanapoom T., Noiarsa P., Tiengtham P., Otsuka H., Ruchirawai S., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 579 – 581 (2005).