

琉球大学学術リポジトリ

トキワギョリュウ(*Casuarina equisetifolia* J.R.& G.Forst)の成分研究(第2報)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学理学部 公開日: 2010-01-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 比嘉, 松武, 宮城, 聡, 荻原, 和仁, 与儀, 誠一, Higa, Matsutake, Miyagi, Satoshi, Ogihara, Kazuhito, Yogi, Seiichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/14948

トキワギヨリュウ (*Casuarina equisetifolia* J.R.& G.Forst) の成分研究 (第2報¹⁾)

比嘉松武*・宮城 聡*・荻原和仁*・与儀誠一*

*琉球大学理学部化学科

HIGA, Matsutake*, Satoshi MIYAGI*, Kazuhito OGIHARA* & Seiichi YOGI*: Studies on the Constituents of *Casuarina equisetifolia* J.R.& G.Forst. II

Abstract

From the leaves of *Casuarina equisetifolia* J.R.& G.Forst, betulin, glutinone, glutinyl acetate, β -sitosterol- β -D-glucoside, and gallicin were newly isolated. These compounds were identified by the comparison of their physical and spectral data with those of their respective authentic samples or with those described in the literature.

The compounds isolated from this plant were examined for the piscicidal, germination inhibitory, and antifungal activities.

琉球列島は日本で唯一亜熱帯圏域にあり、特有な陸上植物が分布している。著者らは亜熱帯の植物資源の有効利用を目的として琉球列島に自生する植物に含まれる生物活性物質の探索研究を行っている。

トキワギヨリュウ (*Casuarina equisetifolia* J.R.& G.Forst) は熱帯・亜熱帯地域に広く分布する常緑の高木で、インドでは樹皮、葉および種子がそれぞれ下痢止め^{2,3)}、腹痛薬²⁾ および頭痛薬²⁾ として用いられている。本植物の成分としては、フラボノイド^{2,4-9)}、ステロイド^{3,9,10)}、トリテルペノイド²⁾、ピロガロール誘導体^{4,6,8,9)}、ピロカテコール誘導体^{6,8)} 等が報告されているが¹⁾、生物活性成分の調査研究は行われていない。

著者らは先に本植物の成分研究を行い、葉から化合物 6-15 を、果実から化合物 12-16 を分離し報告した¹⁾。今回、再び本植物の葉の成分検索を行うとともに、これまでに葉および果実から分離した化合物について魚毒、発芽抑制および抗菌作用を調べた。

実験の部に記載するようにトキワギヨリュウの葉から化合物 1-15 を分離した。化合物 6-15 はそれぞれ lupeol, lupenone, glutinol, taraxeryl acetate, juglanin, afzelin, β -amyrin acetate, β -amyrin, β -sitosterol および gallic acid であり、これらの構造については前報で述べた¹⁾。

化合物 1-5 の構造は以下に述べるように呈色反応、スペクトルデータ (IR, MS, ¹H-NMR) の解析、誘導体の合成、標準サンプルとの比較等により同定した。

化合物 1, 無色針状晶, mp 215-218 °C, は Liebermann-Burchard 反応に陽性で、赤紫色を呈することからトリテルペノイドと推定される。IR スペクトルは 3300cm⁻¹ に水酸基, 3050, 1640 および 880cm⁻¹ に末端メチレン基による吸収を示す。¹H-NMR スペクトルは 1.64 ppm に SP² 炭素上のメチル基, 4.60 ppm に末端メチレン基による吸収を示す。MS スペクトルは

受理 : 1995年7月10日

*Department of chemistry, college of Science, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-01, Japan

m/z 442 に分子イオンピーク, m/z 411 に分子イオンからの脱ヒドロキシメチルイオンピークを示す。また m/z 234, 207, 203 および 189 に強いフラグメントピークを示す。以上の結果から **1** を betulin と推定し, IR スペクトルを標品と比較した結果一致した。

化合物 **2**, 無色板状晶, mp 138–140 °C, は Liebermann-Burchard 反応に陽性で, 赤紫色を呈することからトリテルペノイドと推定される。IR スペクトルは 1710cm^{-1} にカルボニル基による吸収を示し, 水酸基による吸収を示さない。また, 1660 および 835cm^{-1} に三置換オレフィンによる吸収を示す。MS スペクトルは m/z 424 に分子イオンピーク, m/z 274 と 259 に 5 位に二重結合を持つ五環性トリテルペノイドに特徴的な強いフラグメントイオンピークを示す。以上の結果から **2** を glutinone (alnusenone)^{11,12)} と推定し, IR スペクトルを glutinol (**8**) の三酸化クロム-硫酸による酸化で合成した標品と比較した結果一致した。

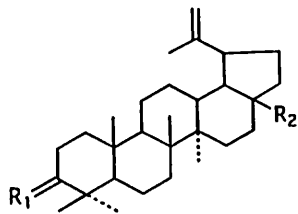
化合物 **3**, 無色板状晶, mp 181–183 °C, は Liebermann-Burchard 反応に陽性で, 赤紫色を呈することからトリテルペノイドと推定される。IR スペクトルは 1740 および 1240cm^{-1} に酢酸エステルに特有の吸収を示し, アセトキシル基の存在を示す。また $3060, 1655$ および 823cm^{-1} に三置換オレフィンの存在を示す吸収が観察される。¹H-NMR スペクトルは 1.99 ppm (3H, s) にアセトキシル基のメチルプロトン, 4.69 ppm (1H, m) にアセトキシル基の付け根のプロトン, 5.53 ppm (1H, m) にオレフィンプロトン 1 個に相当するシグナルを示す。MS スペクトルは m/z 468 に分子イオンピーク, m/z 408 に分子イオンからの脱酢酸イオンピーク, m/z 274 と 259 に 5 位に二重結合を持つ五環性トリテルペノイドに特徴的な強いフラグメントイオンピークを示す。以上の結果から **3** を glutinyl acetate と推定し, IR スペクトルを glutinol (**8**) のアセチル化によって合成した標品と比較した結果一致した。化合物 **3** は最近 *Euphorbia maculata* から初めて単離報告されている¹³⁾。

化合物 **4**, 無色針状晶, mp 289–292 °C, は Liebermann-Burchard 反応に陽性で, その色調変化からステロイドと推定される。IR スペクトルは $3600-3100\text{cm}^{-1}$ と $1150-990\text{cm}^{-1}$ に幅広く強い吸収を示し, **4** が配糖体であることを示唆する。化合物 **4** を加水分解してアグリコンとして β -sitosterol (**14**) を得た。また, 糖部は高速液体クロマトグラフィーにより D-glucose であることを確認した。化合物 **4** の MS スペクトルは m/z 396 に分子イオンから glucose 部分が脱離した強いフラグメントイオンピークを示す。以上の結果から **4** を β -sitosterol- β -D-glucoside と推定し, IR スペクトルを文献記載のスペクトル¹⁴⁾ と比較した結果一致した。

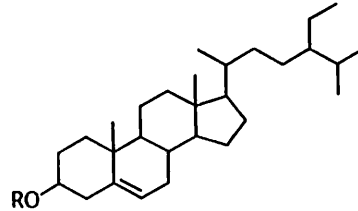
化合物 **5**, 無色板状晶, mp 200–201 °C, の IR スペクトルは 3475cm^{-1} に水酸基, 1695cm^{-1} にカルボニル基による吸収を示す。MS スペクトルは m/z 184 に分子イオンピーク, m/z 153 と 125 に分子イオンからの脱メトキシル, 続いて脱カルボニルによると考えられるフラグメントイオンピークを示す。¹H-NMR スペクトルは 3.85 ppm (3H, s) にメトキシカルボニル基のメチルプロトン, 7.09 ppm (2H, s) に芳香族プロトンによるシグナルを示す。以上の結果から **5** を gallicin (methyl gallate) と推定し, IR スペクトルを標品と比較した結果一致した。

以上のように, トキワギョリュウの葉から新たに 3 種のトリテルペノイド betulin (**1**), glutinone (**2**) および glutinyl acetate (**3**), 1 種のステロイド配糖体 β -sitosterol- β -D-glucoside (**4**), 1 種のピロガロール誘導体 gallicin (**5**) を分離したが, これらの化合物はすべて既知化合物である。

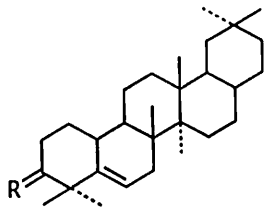
これまでにトキワギヨリユウの葉および果実から分離した化合物について魚毒、発芽抑制および抗菌試験を行った結果を Table 1 に示す。トキワギヨリユウから分離した化合物には魚毒、発芽抑制および抗菌試験に顕著な活性を示すものはなかった。



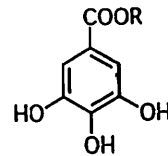
- 1 $R_1 = \text{H, OH}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
 6 $R_1 = \text{H, OH}$ $R_2 = \text{CH}_3$
 7 $R_1 = \text{O}$ $R_2 = \text{CH}_3$



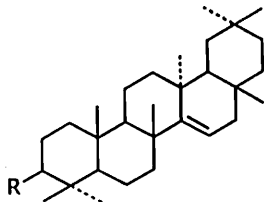
- 4 $R = \text{glucosyl}$
 14 $R = \text{H}$



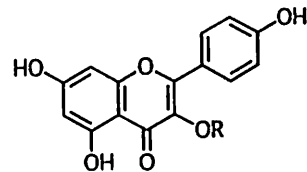
- 2 $R = \text{O}$
 3 $R = \text{H, OAc}$
 8 $R = \text{H, OH}$



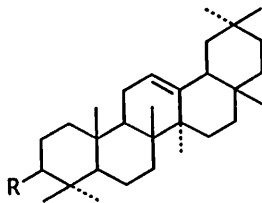
- 5 $R = \text{CH}_3$
 15 $R = \text{H}$



- 9 $R = \text{OAc}$
 16 $R = \text{OH}$



- 10 $R = \text{arabinosyl}$
 11 $R = \text{rhamnosyl}$



- 12 $R = \text{OAc}$
 13 $R = \text{OH}$

実験の部

融点は柳本微量融点測定装置 MP-S3 型で測定し、未補正である。IR スペクトルは日本分光 A-302 型、MS スペクトルは日立 RMU-6L 型、¹H-NMR スペクトルは日立 R-24 型 (60 MHz) で測定し、化学シフトは TMS を内部基準として δ (ppm) で表示した。カラムクロマトグラフィーは Wakogel C-300、薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ を用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は島津 LC-8 型を使用した。

抽出および分離

1990 年 3 月に沖縄県西原町で採集した新鮮な葉 10.0 kg を MeOH で抽出した。抽出液を減圧下で濃縮したのち水と EtOAc に分配し、水溶部と EtOAc 可溶部に分画した。EtOAc 可溶部についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (C₆H₆, C₆H₆-EtOAc(7:3), EtOAc) を行い、溶出順に C₆H₆ 溶出部から 12 (155 mg), 9 (55 mg), 3 (125 mg), 2 (30 mg), 7 (4.08 g) および 13 (370 mg) を、C₆H₆-EtOAc(7:3) 溶出部から 8 (750 mg), 6 (2.23 g), 14 (1.80 g), 1 (240 mg) および 5 (115 mg) を、EtOAc 溶出部から 15 (60 mg), 10 (315 mg), 11 (940 mg) および 4 (680 mg) を得た。

Betulin (1)

無色針状晶 (MeOH), mp 261 °C (lit.¹⁶), 256 - 257 °C). IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 3350, 3070, 2925, 2860, 1640, 1455, 1375, 1025, 880. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 0.65(3H, s, CH₃), 0.77(3H, s, CH₃), 0.88(3H, s, CH₃), 0.94(3H, s, CH₃), 0.99(3H, s, CH₃), 1.64(3H, s, =C(CH₃)-), 4.60(2H, m, >C=CH₂). MS m/z (%): 442(M⁺, 57), 427(11), 424(16), 411(72), 234(45), 220(30), 207(72), 203(82), 189(100).

Glutinone (2)

無色板状晶 (Me₂CO). mp 238 - 240 °C (lit.¹⁷), 245 °C). IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 1713(C=O), 1660, 835 (>C=CH-). MS m/z (%): 424(M⁺, 22), 409(5), 406(3), 274(C₂₀H₃₄, 100), 259(C₂₀H₃₄-CH₃, 42), 245(12), 205(28), 150(C₁₀H₁₄O, 16), 137(29). ¹H-NMR(CDCl₃): 0.83(3H, s, CH₃), 0.96(3H, s, CH₃), 1.00(3H, s, CH₃), 1.03(3H, s, CH₃), 1.09(3H, s, CH₃), 1.16(3H, s, CH₃), 1.22(6H, s, CH₃ × 2), 5.70(1H, m, H-6).

本品の IR, MS および ¹H-NMR スペクトルは glutinol (8) の酸化によって得られた glutinone のそれらと一致した。

Glutinol (8) の酸化

8 (50 mg) を Me₂CO (15 ml) に溶かし、8N CrO₃-H₂SO₄ (0.1ml) を加え、室温で 5 分間攪拌した。i-PrOH 3 滴を加えたのち反応液を水で希釈し、EtOAc で抽出した。Na₂SO₄ で乾燥したのち溶媒を留去し、TLC (SiO₂; hexane-C₆H₆(1:1)) で精製して glutinone を得た。21 mg. 無色板状晶 (Me₂CO), mp 246 - 247 °C.

Glutinylnyl acetate (3)

無色板状晶 (i-PrOH). mp 181 - 183 °C (lit.¹⁸), 190 - 191.5 °C). IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 1740, 1240 (OCOCH₃), 3060, 1655, 823 (>C=CH-), 1390, 1370. MS m/z (%): 468(M⁺, 7), 435(M⁺-CH₃, 1), 408(M⁺-HOAc, 39), 393(M⁺-CH₃-HOAc, 6), 274(C₂₀H₃₄, 100), 259(C₂₀H₃₄-CH₃, 54), 245(8), 205(27), 173(20). ¹H-NMR (CDCl₃): 0.85(3H, s, CH₃), 0.95(3H, s, CH₃), 0.98(3H, s, CH₃), 0.99(3H, s, CH₃), 1.04(3H, s, CH₃), 1.06(3H, s, CH₃), 1.09(3H, s, CH₃),

1.15(3H, s, CH₃), 1.99(3H, s, OAc), 4.69(1H, m, H-3), 5.53(1H, m, H-6).

本品の IR, MS および ¹H-NMR スペクトルは glutinol (8) のアセチル化によって得られた glutinyl acetate のそれらと一致した。

Glutinol (8) のアセチル化

Ac₂O-C₆H₅N でアセチル化して glutinyl acetate を得た。無色針状晶 (Me₂CO), mp 183 - 185 °C.

β-Sitosterol-β-D-glucoside (4)

無色針状晶 (EtOH), mp 289 - 292 °C (lit.¹⁴), 300 - 301 °C). IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 3400(OH), 1070, 1020(CO). MS m/z (%): 414(M⁺ - C₆H₁₀O₆, 10), 396(M⁺ - C₆H₁₂O₆, 100).

4 の加水分解

4 (50 mg) を n-BuOH (10 ml) に溶かし、これに 4N HCl (3 ml) を加え 2 時間加熱した。反応液に水を加えて CHCl₃ で抽出した。CHCl₃ 抽出液を濃縮して β-sitosterol を得た。収量 15 mg.

濾液は HPLC を行い D-glucose を確認した (Column: Hitachi custom ion-exchange resin # 2618. Eluent: H₂O. Detector: RI).

Gallicin (5)

無色板状晶 (190 °C で昇華精製), mp 200 - 201 °C. IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 3475(OH), 1695(C=O). MS m/z (%): 184(M⁺, 55), 153(M⁺ - OCH₃, 100), 125(M⁺ - OCH₃ - CO, 25). ¹H-NMR (CD₃OD): 3.85(3H, s, COOCH₃), 7.09(2H, s, Ar H).

lupeol (6), lupenone (7), glutinol (8), taraxeryl acetate (9), juglanin (10), afzelin (11), β-amyrin acetate (12), β-amyrin (13), β-sitosterol (14) および gallic acid (15) の性状は前報に記載した¹⁾.

発芽抑制試験¹⁶⁾

被験物質を MeOH (1 ml) に溶かし、濾紙を敷いたシャーレ (直径 9 cm) に入れた。減圧シケータ中で溶媒を完全に留去したあと蒸留水 (10 ml) を加え一晩放置した。別に蒸留水 (10 ml) を入れた対照区も用意する。これにレタス (*Lactuca sativa* L., cv. Great Lakes 336) 種子 50 粒をはん種し、濾紙が乾かないようにラップフィルム (ポリ塩化ビニリデン製) で蓋をして室温で暗所に置く。3 日後の幼根の出現数を百分率で表し発芽率とする。

魚毒試験¹⁷⁾

被験物質を MeOH (1 ml) に溶かして 200 ml ビーカーに入れる。別に MeOH (1 ml) を入れた対照区も用意する。これにあらかじめ 2 日間空気を通じておいた水道水 (150 ml) を加えてよくかき混ぜたあと、1 日間休止めをした体長 3 - 3.5 cm の雄のグッピー (*Poecilia (Lebites) reticulata* Peters) 5 尾を入れる。24 時間後 5 尾とも斃死した場合を活性とする。対照区に死魚が 2 尾以上でた場合のデータは採用しない。

抗菌試験¹⁸⁾

器具の滅菌: シャーレ (直径 10 cm), ピペット (10 ml), ピンセット, 濾紙ディスク (直径 8 mm, 厚手) をアルミニウム箔で包み, 150 °C の乾燥器中で 2 時間乾熱滅菌した。マイクロシリンジ, ヘアードライヤーはクリーンベンチ (日立 PCV 750 AP) 内でエタノールで殺菌した。

培地の調整: PDA (Potato Dextrose Agar, 栄研化学パールコア. 39 g) を 1000 ml 三角フラス

コに入れ、蒸留水 (1000 ml) を加え、90 °C の湯浴中で 20 分間加熱して溶かした。次に三角フラスコをアルミ箔で包み、オートクレーブ (平山製作所 HA-24) で 121 °C、15 分間蒸気滅菌した。滅菌した培地をクリーンベンチ内に移し、培地の温度が 50 °C まで冷めたときピペットで素早く 10 ml ずつシャーレに分注し放置した (平板培地)。斜面培地は試験管に入れてゴム管を枕にして固化させる。

抗菌プレートの作成: PDA 斜面培地に検定菌 (*Penicillium citrinum*) を生育させておく。検定菌を 1 白金耳かきとりサンプル瓶に入れ、これに滅菌蒸留水 (121 °C で 15 分間蒸気滅菌したもの、1 ml) を加え孢子懸濁液を作る。この懸濁液を予め 500 ml 三角フラスコに入れて 47 °C に保温しておいた PDA 培地 (300 ml) に加えよく攪拌する。これを用意しておいた平板培地に約 10 ml ずつ分注し放置する。

試料溶液の調整: 被験物質 (10 mg) をサンプル瓶に秤りとり、それに MeOH-CH₂Cl₂ (3:2) を 1000 mg になるまで加え 1.0% 溶液を作る。

培養: 各試料溶液をクリーンベンチ内で、マイクロシリンジで 25 μl とり、ピンセットでとった濾紙ディスクに染みこませる。別に MeOH-CH₂Cl₂ (3:2, 25 μl) を染み込ませた対照区を用意する。濾紙をヘアドライヤーで乾燥したあと検定プレート上に置き、培養室に移す。26 °C で 3 日間培養した後の菌の生育状況を調べ阻止円の直径 (mm) を測定する。

Table 1. Piscicidal, Germination Inhibitory, and Antifungal Tests of the Compounds Isolated from *Casuarina equisetifolia*.

Compound	MLC ^{a)} (ppm)	Germination ratio (%) ^{b)}	Growth inhibitory zone (mm) ^{c)}
betulin (1)	50	96	0
glutinone (2)	NT ^{d)}	96	0
glutinyil acetate (3)	>100	94	0
β-sitosterol-β-D-glucoside (4)	50	100	0
gallicin (5)	>100	82	0
lupeol (6)	>50	96	0
lupenone (7)	>20	98	0
glutanol (8)	>50	100	0
taraxeryil acetate (9)	>50	96	0
kaempferol-3-α-L-arabinoside (10)	NT ^{d)}	NT ^{d)}	NT ^{d)}
kaempferol-3-α-L-rhamnoside (11)	>200	98	0
β-amyryin acetate (12)	>20	96	0
β-amyryin (13)	>50	92	0
β-sitosterol (14)	>50	98	0
gallic acid (15)	>50	92	0
taraxerol (16)	>20	96	0

a) MLC: minimum lethal concentration. b) Concentration: 100 ppm.

c) Concentration: 250 μg/disc. d) NT: not tested.

謝 辞

本論文の原稿を査読して頂きました本学科の金城昭夫教授に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 第1報: 比嘉松武・伊波豊・阿波連本明・与儀誠一・外間宏三. 琉球大学理学部紀要, No.45: 147 (1987).
- 2) J. N. Usmani, N. U. Khan & W. Rahman, *J. Indian Chem. Soc.*, 47: 179 (1970).
- 3) M. M. Goyal & K. Kumar, *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 22: 68 (1987) [*Chem. Abstr.*, 110: 63568b (1989)].
- 4) S. Natarajan, V. V. S. Murti & T. R. Seshadri, *Phytochemistry*, 10: 1083 (1971).
- 5) M. A. El-Ansari, M. S. Ishak, A. A. Ahmed & N. A. M. Saleh, *Z. Naturforsch., C: Biosci*, 32 C: 444 (1977).
- 6) W. Madhusudanamma, K. N. S. Sastry, U. S. S. Rao & K. K. Reddy, *Leather Sci. (Madras)*, 26: 196 (1979).
- 7) N. A. M. Saleh & M. H. El-Lakany, *Biochemical Systematics and Ecology*, 7: 13 (1979).
- 8) W. Madhulatha, V. S. S. Rao, K. K. Reddy & K. N. S. Sastry, *Leather Sci. (Madras)*, 32: 38 (1985).
- 9) S. Neelakantan, V. Rajagopalan & P. V. Raman, *Fitoterapia*, 57: 120 (1986).
- 10) M. Behari & M. M. Goyal, *Acta Cienc. Indica, Chem.*, 12: 20 (1986) [*Chem. Abstr.*, 107: 151196X (1987)].
- 11) 田辺良久・篠田麗子・堀越洋子・高橋幸太郎. 薬学雑誌, 96: 248 (1976).
- 12) R. E. Ireland & S. C. Welch, *J. Am. Chem. Soc.*, 92: 7232 (1970).
- 13) S. Matsunaga, R. Tanaka & M. Akagi, *Phytochemistry*, 27: 535 (1988).
- 14) 尾関昭二. 薬学雑誌, 82: 766 (1962).
- 15) M. Tezuka, C. Takahashi, M. Kuroyanagi, M. Satake, K. Yoshihira & S. Natori, *Phytochemistry*, 12: 175 (1973).
- 16) 大東肇・小清水弘一. 生理活性物質のバイオアッセイ, 池川信夫・丸茂晋吾・星元紀編, 講談社, 東京, 147 (1984).
- 17) 河津一儀. 天然有機化合物実験法, 名取信策・池川信夫・鈴木信言編, 講談社, 東京, 290 (1977).
- 18) 山崎真狩・高月昭・馬替純二. 現代化学, No. 220: 24 (1989).