

白色とする。合計風乾収量 6g. MeOH その他の有機溶媒に難溶, ピリジンに易溶, ソクスレー抽出器に入れ MeOH 抽出, 熱時白色針晶析出, m.p. 288°(decomp.), FeCl₃ 紫褐色, Mg-HCl 赤色, $[\alpha]_D^{25}$ -263.3° (c=1.00, C₆H₅N), C₂₁H₂₂O₁₀ (isoengelitin) Anal. Calcd.: C, 58.06; H, 5.07. Found: C, 58.00; H, 5.11. 富永の isoengelitin 標品と混融, IR 一致。

Isoengelitin の加水分解 試料 2.2 g., 10% H₂SO₄ 100 ml., EtOH 100 ml. 水浴上に 11 hr. 還流, 黄色透明に溶解, 減圧下で EtOH 除去, 放冷, 淡黄色物を含む無色針晶析出, 濾別, 濾液をエーテル抽出. エーテル残留物と結晶を合わせて 20% EtOH から再結晶, 無色針状晶, m.p. 229~230°. C₁₅H₁₂O₆ (dihydrokaempferol) Anal. Calcd.: C, 62.50; H, 4.20. Found: C, 62.48; H, 4.23. エーテル抽出残液は, BaCO₃ で中和後 AcOH 酸性として減圧シロップ状とする. PPC Rf (rhamnose, 試料) 0.37, 0.38 (BuOH-AcOH-H₂O (4:1:1)) 0.64, 0.63 (水飽和フェノール). 発色剤フタル酸水素アニリン, 残りの液に C₆H₅NHNH₂·HCl 2 g., NaOAc 3H₂O 3 g., 水 20 ml. の液を加え, 1 hr. 煮沸, 黄色結晶析出, 希 MeOH から脱色再結晶, m.p. 180.5°. 市販の rhamnose から同様にして作った rhamnosazone と混融, IR において一致。

粗製 flavonoid 配糖体混合物から加熱による isoengelitin の生成 85 g. の配糖体混合物に MeOH 400 ml. を加えたとただちに溶解する. 水 400 ml. 加え (沈殿多量に析出) 水浴上に 18 hr. 沸騰, 冷後析出するものなし. 減圧で MeOH 除去, 黄色沈殿析出, 62 g., MeOH 200 ml. と処理, 白粉が残る. 3.5 g., 62 g. の回収混合物をさらに同様処理白粉 0.7 g. 白粉を合わせて MeOH から再結晶, 無色針状晶, m.p. 288° isoengelitin と混融, IR において一致. 水母液を減圧乾固すると泡立ったまま固化, 粉末となり, 吸水性強し, 20 g., 水, MeOH に易溶, エーテルに不溶。

本研究において元素分析は本学 栗田美恵子氏, 京都大学有機微量元素分析施設にお願いした. isoengelitin の標品は鳥取大学 富永敏夫博士に分与された. また各地産ネジキ葉はつぎの諸氏の御世話になった. 仙台, 東北大学 竹本常松教授, 京都, 武田薬品工業株式会社京都農園, 兵庫県本山, 同社研究所 富樫 誠氏, 同県篠山, 県立農科大学 佐々木豊作博士, 徳島, 徳島大学 東 丈夫, 棚瀬弥一郎両教授, 熊本, 熊本大学 野々村 進教授, 静岡, 静岡薬科大学 上野 明氏, 以上の諸氏に厚く感謝致します。

名古屋市立大学薬学部

薬 学 雜 誌
YAKUGAKU ZASSHI
85 (12) 1092 ~ 1094 (1965)

UDC 615.771.9-011 : 582.282.192.3.04

岡田正志, 蓮沼美恵子, 斎藤行生: *Gibberella saubinetti* による
Bufalin, Resibufogenin の 12β-水酸化

Masashi Okada, Mieko Hasunuma, and Yukio Saito: 12β-Hydroxylation
of Bufalin and Resibufogenin by *Gibberella saubinetti*.

(Tokyo Biochemical Research Institute*1)

Incubation of bufalin and resibufogenin with cultures of *Gibberella saubinetti* (MONT.)
Sacc. yielded 12β-hydroxybufalin and 12β-hydroxyresibufogenin, respectively.

(Received April 2, 1965)

Cardenolide に属する digitoxigenin, gitoxigenin などが *Gibberella saubinetti* (MONT.) Sacc. により 12β-水酸化をうけることはすでに報告した.¹⁾ bufadienolide に属する bufalin (I) および resibufogenin (III) についても *G. saubinetti* による変換を行なったのでその結果を報告する。

bufalin (I) の *G. saubinetti* による変換生成物はペーパークロマトグラフィー (以下 PC と略) により一種であることが示され, このものはアルミナクロマトグラフィーで結晶として分離された. 本物質 (IIa) の元素分析値は monohydroxybufalin に合致し, アセチル化によりジアセタート (IIb) を与えた. (IIa) および (IIb) の諸性状は, Tamm 等²⁾ が bufalin の *Fusarium lini* (BOLLEY) による変換で得, その構造を決定した 12β-hydroxy-

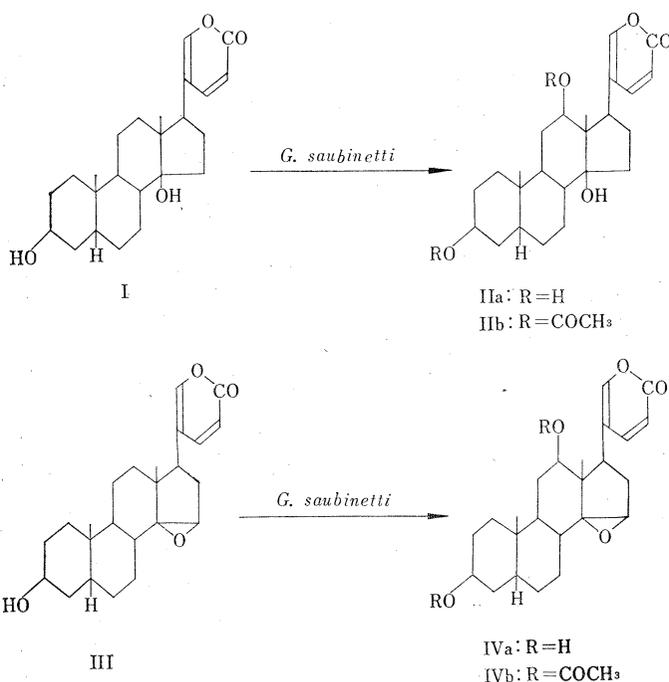
*1 2-593, Takadaminami-cho, Toshima-ku, Tokyo.

1) M. Okada, A. Yamada, M. Ishidate: Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 8, 530 (1960).

2) Ch. Tamm, A. Gubler: Helv. Chim. Acta, 42, 473 (1959).

bufalin (IIa) およびそのアセタート (IIb) に一致するので, Tamm 教授より IIa の標品の分与をうけ, 薄層クロマトグラフィー (以下 TL と略), 混融, IR スペクトルにより比較し, 著者等が bufalin の *G. saubinetti* による変換で得た物質は 12 β -hydroxybufalin であることを確認した.

resibufogenin (III) の *G. saubinetti* による変換では, PC により数種の変換生成物が認められたが, アルミナクロマトグラフィーによる分離で, いずれも結晶として単離することはできなかった. そこで, アルミナクロマトグラフィーにより分離した無晶形の主要変換生成物をアセタートとして結晶化させた. このアセタートの元素分析値は monohydroxyresibufogenin のジアセタートに一致し, その性状は, 最近 Schüpach と Tamm³⁾ が resibufogenin の *Fusarium lini* による変換で得, その構造を決定した 12 β -hydroxyresibufogenin (IVa) のアセタート (IVb) に一致するので, Tamm 教授より分与をうけた (IVb) の標品と TL, 混融, IR スペクトルにより比較し, 上記アセタートが (IVb) に合致することを確認した. したがって resibufogenin の *G. saubinetti* による主要変換生成物は 12 β -hydroxyresibufogenin (IVa) であることが明らかになった.



以上の結果から, *G. saubinetti* は C/D *cis* で 14 β -水酸基および 17 位に α,β -不飽和 5 員環ラク톤をもつある種の cardenolide について 12 β -水酸化を行なうと同様に, C/D *cis* で 14 β -水酸基または 14 $\beta,15\beta$ -エポキシンドおよび 17 位にクマリン環をもつある種の bufadienolide についても 12 β -水酸化を行なうことが判明した.

なお, 著者等は, *G. saubinetti* は dehydroepiandrosterone については 7 α -水酸化, progesterone, desoxycorticosterone, testosterone などについては 15 α -水酸化を行なうことを認めている.⁴⁾

実 験 の 部

ペーパークロマトグラフィー (PC) 東洋汙紙 No. 51 を使用. ギ酸アミドを固定相とする. 溶媒 I: CHCl₃, 溶媒 II: ベンゼン-CHCl₃ (7:3). 検出剤: SbCl₅ の 25% CHCl₃ 溶液.

薄層クロマトグラフィー (TL) Aluminiumoxid G nach Stahl (Merck) 使用. 溶媒 III: 4% MeOH 含有 CHCl₃, 溶媒 IV: 1% MeOH 含有 CHCl₃. 検出剤: 濃硫酸.

3) M. Schüpach, Ch. Tamm: Helv. Chim. Acta, **47**, 2217 (1964).

4) 岡田, 山田, 石館: 本誌, **85**, 816 (1965).

G. saubinetti による bufalin (I) の変換 *G. saubinetti* を Czapek-Dox 培養基で 27°, 48 hr. 培養した後, (I) 60 mg. を加え (培養基 100 ml. に対し (I) 20 mg. を 2 ml. の MeOH に溶解して加える) 96 hr. 振盪培養する. 菌体を浮取し, これを AcOEt で抽出, 浮液はやはり AcOEt で抽出し, 両抽出液を合してこれを 2% NaHCO₃, ついで水で洗浄し, 脱水 Na₂SO₄ で乾燥後溶媒を留去し, 残留エキス 280 mg. を得た. これをベンゼンに溶解し, 5 g. の中性アルミナをつめたカラムに流しこむ. ベンゼン, ベンゼン-CHCl₃ 混液, CHCl₃ で順次溶出する. ベンゼン-CHCl₃ (4:1, 3:1) 混液で溶出するフラクションより (I) 8 mg. を回収. ベンゼン-CHCl₃ (2:1, 1:1, 1:2, 1:3) で溶出し, 溶媒 I を用いる PC で Rf 0.31 のスポット (bufalin の Rf は 0.93) を与えるフラクションを合し, アセトン-エーテルから再結晶すると m.p. 227~234° の 12β-hydroxybufalin (IIa) 24 mg. を得る. MeOH-エーテルからさらに再結晶すれば m.p. 237~243°. $[\alpha]_D^{25} -13^\circ$ (MeOH), UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 301 (3.72), IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ μ : 3.26, 5.84, 6.12. C₂₄H₃₄O₅ Anal. Calcd.: C, 71.61; H, 8.51. Found: C, 71.27; H, 8.25. 本物質は標品の (IIa) と混融により融点降下を認めず, 溶媒 III を用いる TL で同一の Rf 値 (0.33) を示し, 両者の IR スペクトルは完全に一致した.

上述の IIa の MeOH-エーテル再結母液残渣約 8 mg. を常法によりピリジン中 Ac₂O でアセチル化し, アセタートをアセトン-エーテル-石油エーテルから再結晶. m.p. 243~248°. C₂₈H₃₈O₇ Anal. Calcd.: C, 69.11; H, 7.87. Found: C, 68.95; H, 7.62.

G. saubinetti による resibufogenin (III) の変換 III 400 mg. を I の場合とまったく同様の条件下に *G. saubinetti* を用いて変換を行ない, 変換生成物を AcOEt で抽出してエキス約 1.2 g. を得た. このエキスは溶媒 II を用いる PC において少量の未変化 (III) (Rf 0.96) 以外に 5 個のスポット (Rf: 0.0, 0.16, 0.34, 0.41, 0.65) を示し, Rf 0.34 を示すものが主変換生成物であった. エキスをベンゼンに溶解し, 50 g. の中性アルミナをつめたカラムに流しこみ, ベンゼン, ベンゼン-CHCl₃ 混液, CHCl₃ で順次溶出する. ベンゼン-CHCl₃ (2:3, 3:7, 1:4) で溶出し, 溶媒 II を用いる PC で Rf 0.34 のスポットを与えるフラクションにつき結晶化を試みたが成功しなかったため, これらのフラクションを合し (約 150 mg.), 常法によりピリジン中 Ac₂O を用いてアセチル化し, アセタートをアセトン-石油エーテルから再結晶し, m.p. 157~164°/190~200° の結晶 95 mg. を得た. $[\alpha]_D^{25} +49^\circ$ (MeOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 300 (3.71), IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ μ : 5.78 (broad), 6.10, 8.07. C₂₈H₃₆O₇ Anal. Calcd.: C, 69.40; H, 7.48. Found: C, 69.27; H, 7.55.

本物質は標品の di-acetyl-12β-hydroxyresibufogenin (IVb) と混融により融点降下を認めず, 溶媒 IV を用いる TL で同一の Rf 値 (0.79) を示し, 両者の IR スペクトルは完全に一致した.

本研究に当たり, bufalin, resibufogenin をご分与下さった東邦大学薬学部 大野節郎教授 (現大正製薬研究部長), 比較のための標品をご分与下さったバーゼル大学 Tamm 教授に深謝します. また, 菌の培養につきご協力を得た中外製薬総合研究所 小川春樹氏, 元素分析を施行された同研究所分析研究室の方々に謝意を表します.

東京生化学研究会