

ブラジル産生薬 Pariparoba の抗 *Helicobacter pylori* 成分磯部孝彦,^{*a} 大崎愛弓,^b 長田久美子^cAntibacterial Constituents against *Helicobacter pylori*
of Brazilian Medicinal Plant, PariparobaTakahiko ISOBE,^{*a} Ayumi OHSAKI,^b and Kumiko NAGATA^c

Department of Chemistry^a and Department of Bacteriology,^c Hyogo College of Medicine, 1-1,
Mukogawa-cho, Nishinomiya City, Hyogo 663-8501, Japan, and Institute of
Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,^b
2-3-10, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

(Received November 22, 2001; Accepted January 23, 2002)

Four known compounds have been isolated from the aerial parts of the Brazilian medicinal plant Pariparoba (*Pothomorphe umbellata*). They were an alkaloid, a flavone, a dihydrocalcone, and a steroid. The chemical structures were established to be *N*-benzoylemesalinaline, wogonin, uvangoletin, and β -sitosterol glucoside using spectral methods. Among these compounds, the main component *N*-benzoylemesalinaline showed significant antibacterial activity against *Helicobacter pylori*.

Key words—*Helicobacter pylori*; *N*-benzoylemesalinaline; *Pothomorphe umbellata*; Pariparoba; Piperaceae; wogonin; uvangoletin

はじめに

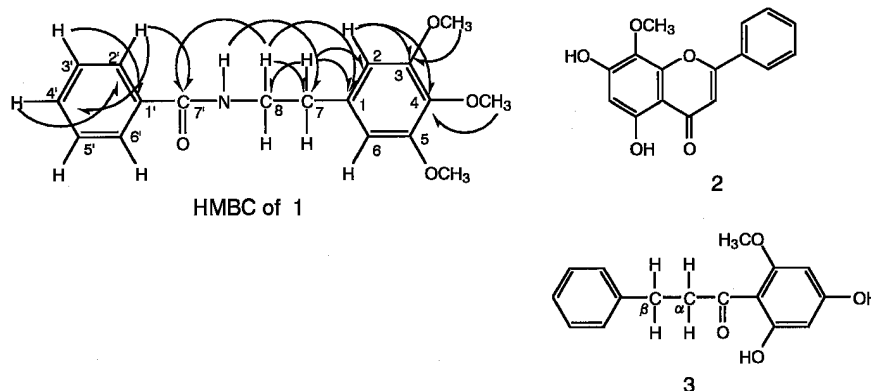
胃腸病の原因細菌として注目されている *Helicobacter pylori* 菌に対する抗菌活性をもつ物質を探索する目的で研究を行った。Pariparoba はブラジルの生薬で原植物はコショウ科 (Piperaceae) の *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. で、利尿、リユーマチ、胆汁分泌、肝臓の疾患、健胃、駆風、発汗、便秘、水腫病、子宮病に効果があるとされている。また、葉は傷薬にすると記されている。成分についても葉や根からアルカロイド、ポリフェノール、ステロイドなどの成分が報告されている。^{1,2)} 今回、この薬草から4種の化合物を得、主成分である *N*-benzoylemesalinaline に *Helicobacter pylori* 菌に対する抗菌活性があることが判明したので報告する。

化合物の構造 この薬草をヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノールと順次抽出を行い、濃縮後、ベンゼン、クロロホルムの各

抽出部について、遠心液々分配クロマトグラフィー (centrifugal liquid-liquid partition chromatography)、ゲルろ過、HPLC の各種クロマトグラフィーによって、ベンゼン抽出部からは3種の化合物 **1**, **2**, **3**、クロロホルム抽出部からは化合物 **4** を単離した。

化合物 **1** はこの生薬の主成分であり、高分解能 MS スペクトルと元素分析から、分子式は $C_{18}H_{21}NO_4$ であることが分かった。IR スペクトルにおける、3360, 1634, 1534 cm^{-1} 、UV スペクトルの 225 nm からアミド結合が存在することが示唆された。化合物 **1** の ^{13}C -NMR スペクトルの δ 153.30, 128.51, 126.72, 105.66, 56.03 の炭素はそれぞれ2個分であることが MS スペクトルからの情報と合わせ明らかとなった。また、3個のメトキシル基が存在していることも 1H -NMR スペクトルより明らかとなった。H-H COSY スペクトルにおいて δ 7.40 と 7.71, 3.71 と 2.88, 3.71 と 6.31 の間でそれぞれカップリングしていること、さらに、C-H COSY, HMBC の二次元 NMR スペクトルより本化合物は、mesalinaline に安息香酸が縮合した *N*-benzoylemesalinaline と推定された。特に δ 3.71 の水素から 167.42

^{a)} 兵庫医科大学化学研究室, ^{b)} 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所, ^{c)} 兵庫医科大学細菌学講座
e-mail: isobekh@hyo-med.ac.jp



の炭素への HMBC スペクトルはアミド結合の関係をよく示している. この化合物 **1** は mescaline の誘導体として既に記載されている.³⁾

化合物 **2** は MS スペクトルから分子式は $C_{16}H_{12}O_5$ であり, IR スペクトルからヒドロキシル基 (3060 cm^{-1}), カルボニル基 (1655 cm^{-1}) の存在が示唆された. また, UV スペクトルで 275 nm に吸収が認められ, 種々の試薬を添加すると UV 吸収はほぼ 285 nm に深色シフトした. この結果, 化合物 **2** はフラボンであると考えられる. 化合物 **2** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定すると 1 個のメトキシル基の存在が, H-H COSY スペクトルでは $\delta 8.01$ と $7.55, 8.01$ と 7.56 の間でそれぞれカップリングしていることが判明した. さらに, HMBC, NOESY スペクトルの測定結果から, 8 位にメトキシル基が置換していることが明らかとなり, 既知物質の wogonin と推定されたので,⁴⁾ 標品の NMR スペクトルと比較したところ, 完全に一致した.

HPLC によって単離した化合物 **3** の分子式は MS スペクトルから $C_{16}H_{16}O_4$ であり, IR スペクトルからヒドロキシル基 (3287 cm^{-1}), カルボニル基 (1654 cm^{-1}) の存在が示唆された. また, 化合物 **3** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから, 1 個のメトキシル基の存在が, H-H COSY スペクトルから $\delta 6.53$ と $6.27, 3.39$ と 3.08 の間でそれぞれカップリングしていることが判明し, さらに, HMBC スペクトルから化合物 **3** はジヒドロカルコンであると考えられた. NOESY スペクトルによってメトキシル基と 3 位のプロトンの間に相関があることが分かったので, メトキシル基は 2 位についていると考えられる. したがって, 化合物 **3** は既知物質の uvangoletin と推定されたので, 文献の NMR スペクトルの値と比較し

Table 1. Inhibition by Compound **1** and **2** and Rotenone of *Helicobacter pylori*

	MIC ($\mu\text{g/ml}$) in	
	8% O_2	20% O_2
Compound 1	2.5	2.5
Compound 2	10<	10<
Rotenone	2.5	1.25

MICs were defined as the inhibitor concentrations which produced 90% growth inhibition.

たところ, よく一致した.⁵⁾

化合物 **4** の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは, 他の多くの植物から単離されている β -sitosterol glucoside のそれらと非常に類似していたので, スペクトルを比較したところ一致した.⁶⁾

抗菌活性 *Helicobacter pylori* による抗菌活性試験は単離された化合物 **1, 2** について行った.^{7,8)} Table 1 に示すように化合物 **1** は rotenone と同程度の MIC (minimum inhibitory concentration) $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ で菌増殖阻害活性をもつことが判明した. また, 化合物 **2** も MIC $12.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ と弱いながらも活性があった. Rotenone は酸素濃度が 8% に比べ, 20% の場合 (大気中の酸素濃度) で活性は上がるが,⁷⁾ 化合物 **1, 2** においては変化は認められなかった. この事実は rotenone と化合物 **1** において *Helicobacter pylori* に対する作用機構が異なっている可能性がある. しかしながら, 本植物から単離された化合物において *Helicobacter pylori* に対して抗菌活性が認められたことは意義深いことである.

大腸菌 (*Escherichia coli*) に対して, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ においては, 菌の増殖阻害がみられなかった. また, アトピー性皮膚炎の患者から単離された黄色ブ

ドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対しても抗菌活性は認められなかった。

実験の部

融点は柳本微量融点測定装置 (未補正), IR スペクトルは Perkin Elmer 1640 型, UV スペクトルは島津自己分光光度計 UV2200 型, EI-MS スペクトルは日本電子 HX-110 型 (20 eV), NMR スペクトルは日本電子 d-500 型 (500 MHz, tetramethylsilane を内部標準, ^1H は 500 MHz, ^{13}C は 125 MHz で測定) を用いて測定した. 遠心液々分配クロマトグラフィー (CPC) はセンシュウ科学 LLB-M 型, HPLC は日本分光 PU-2000Plus 型を用いた. 標品の wogonin は和光純薬の製品を用いた.

抽出及び単離 1998 年サンパウロ市内にて購入した *Pariparoba* (*Pothomorphe umbellata*) 950 g を粉碎後, ヘキサン, ベンゼン, クロロホルム, 酢酸エチル, メタノールで 1 回当たりおよそ 1.5 l を使用して順次 3 回ずつ冷浸した後, 溶媒を濃縮, 除去した. 各抽出部は 34.9, 14.3, 10.8, 2.9, 76.9 g であった. ベンゼン, クロロホルム, 酢酸エチルの各抽出部について C_6H_6 - CHCl_3 - MeOH - H_2O (5 : 5 : 7 : 2) の溶媒系で 800 rpm の回転速度, 3.2 ml/min の流速で上昇法によって CPC を行い, ベンゼン抽出部のフラクションからは化合物 **1**, **2**, クロロホルム抽出部のフラクションからは化合物 **4** を得, それぞれ再結晶した. ベンゼン抽出部のクロロフィルなどの混合物を含む部分を Sephadex LH-20 によるゲルろ過クロマトグラフィー (CHCl_3 - MeOH (1 : 1)) によって精製し, 化合物 **1** 及び微量成分を含む混合物を得た. 微量成分を分離するために HPLC (MeCN - H_2O (50 : 50 から 80 : 20 のグラジエント), 流速 3 ml/min) を用いて, 新たに化合物 **3** を得た. 得られた化合物 **1**, **2**, **3** の収量はそれぞれ, 1.61 g (収率 0.17%), 15 mg, 9.5 mg であった.

化合物 1 無色針状晶 (MeOH). mp 123—125 °C. EI-MS m/z : 315.1458 (M^+ , Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: 315.1471), 194, 181, 179, 105, 77. IR (KBr) cm^{-1} : 3360, 1634, 1590, 1534, 1468, 1424, 1245, 1132, 996, 832, 716, 693. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 213 (23,000), 225 (sh, 20,000). ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 7.71 (2H, d , $J=7.6$ Hz, H-2', 6'), 7.48 (1H, t , $J=7.3$ Hz, H-4'), 7.40 (1H, t , $J=7.6$ Hz, H-3', 5'),

6.44 (2H, s , H-2, 6), 6.31 (1H, $br.s$, NH), 3.83 (3H, s , 4-OMe), 3.81 (6H, s , 3, 5-OMe), 3.71 (2H, dd , $J=12.8, 7.0$ Hz, H-8), 2.88 (2H, t , $J=7.0$ Hz, H-7). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 167.42 (C-7'), 153.30 (C-3, 5), 136.60 (C-4), 134.58 (C-1'), 134.55 (C-1), 131.42 (C-4'), 128.51 (C-3', 5'), 126.72 (C-2', 6'), 105.66 (C-2, 6), 60.78 (4-OMe), 56.03 (3, 5-OMe), 41.12 (C-8), 35.94 (C-7). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C, 68.55; H, 6.71; N, 4.44; O, 20.29. Found: C, 68.49; H, 6.79; N, 4.41; O, 20.31.

化合物 2 黄色針状晶 (MeOH). mp 199—200 °C. EI-MS m/z : 284.0692 (M^+ , Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$: 284.0685), 269, 241, 139, 103, 69. IR (KBr) cm^{-1} : 3060, 1655, 1611, 1578, 1508, 1350, 1166, 1024. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 275 (32,000); +NaOMe 285; + AlCl_3 285, 375; + AlCl_3 + HCl 284, 375; +NaOAc 285, 375; +NaOAc+ H_3BO_3 285, 375. ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.4 (1H, $br.s$, 5-OH), 8.01 (2H, dd , $J=7.9, 1.8$ Hz, H-2', 6'), 7.56 (1H, m , H-4'), 7.55 (2H, m , H-3', 5'), 6.93 (1H, s , H-3), 6.30 (1H, s , H-6), 3.79 (3H, s , 8-OMe). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 181.97 (C-4), 162.93 (C-2), 156.21 (C-7, 9), 149.58 (C-5), 132.04 (C-4'), 130.85 (C-1'), 129.24 (C-3', 5'), 127.79 (C-8), 126.25 (C-2', 6'), 105.03 (C-3), 103.63 (C-10), 99.17 (C-6), 61.00 (8-OMe).

化合物 3 無色板状晶 ($\text{MeCN}-\text{H}_2\text{O}$). mp 193—194 °C. EI-MS m/z : 272.1059 (M^+ , Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$: 272.1049), 167.0311 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4$), 140, 91, 69. IR (KBr) cm^{-1} : 3287, 1654, 1618, 1567, 1297, 1196, 1160, 1114, 508. ^1H -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 14.56 (1H, $br.s$, 6'-OH), 7.35 (4H, m , H-2, 3, 5, 6), 7.21 (1H, m , H-4), 6.53 (1H, d , $J=2.4$ Hz, H-5'), 6.27 (1H, d , $J=2.4$ Hz, H-3'), 3.60 (3H, s , 2'-OMe), 3.39 (2H, t , $J=4.3$ Hz, H- α), 3.08 (2H, t , $J=4.3$ Hz, H- β). ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 204.31 (C=O), 168.18 (C-6'), 166.70 (C-4'), 164.00 (C-2'), 142.42 (C-1), 128.90, 128.83 (C-2, 3, 5, 6), 126.26 (C-4), 105.39 (C-1'), 97.06 (C-5'), 92.21 (C-3'), 55.51 (2'-OMe), 45.92 (C- α), 31.08 (C- β).

化合物 4 無色結晶 ($\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$). mp 295—297 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3388, 1464, 1368, 1074, 1024. ^{13}C -NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 140.89 (C-5), 121.90 (C-6), 102.56 (C-1'), 78.59 (C-3), 78.47 (C-5'), 78.08 (C-

3'), 75.31 (C-2'), 71.66 (C-4'), 62.81 (C-6'), 56.81 (C-14), 56.23 (C-17), 50.33 (C-9), 46.02 (C-24), 42.46 (C-13), 39.93 (C-12), 39.32 (C-4), 37.46 (C-1), 36.92 (C-10), 36.38 (C-20), 34.19 (C-22), 32.16 (C-7), 32.03 (C-8), 30.24 (C-2), 29.45 (C-25), 28.53 (C-16), 26.36 (C-23), 24.50 (C-15), 23.38 (C-28), 21.27 (C-11), 19.97 (C-26), 19.41 (C-27), 19.20 (C-19), 19.00 (C-21), 12.16 (C-29), 11.96 (C-18).

抗菌試験 *Helicobacter pylori* に対する抗菌試験の培地, 菌の培養, 酸素濃度の調整など, 詳細については文献記載の方法で行った.^{7,8)} *Helicobacter pylori* 菌株は文献と同じ NCTC11637 株を用いた. 化合物 **1**, **2** 及び, 標準物質として rotenone を用い, 秤量した試料は DMSO に溶解し, 次いで PBS (リン酸緩衝化生理食塩水, phosphate buffered saline) で希釈して 10 µg/ml より活性試験を行った. 菌の増殖を阻害する最小濃度である MIC は 90% 以上の菌の増殖阻害でもって決定した.

謝辞 元素分析, 及び大腸菌, 黄色ブドウ球菌の抗菌試験においてお世話になりました近畿大学薬学部, 松尾圭造教授に深謝いたします.

REFERENCES

- 1) Hashimoto G., "Brazil-san Yakuyo Shokubutsu Jiten," Abokku-sha, Kamakura, 1996, pp. 965-966.
- 2) Desmarchelier C., Barros S., Repetto M., Latorre L. R., Kato M., Coussio J., Ciccio G., *Planta Med.*, **63**, 561-563 (1997).
- 3) "The Merk Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 12th Edition," ed. by Budavari S. et al, Merk & Co., Inc., New Jersey, 1996, No. 5965.
- 4) Devon T. K., Scott A. I., "Handbook of Naturally Occurring Compounds," Academic Press, London, 1975, Vol. 1, No. 1101-017.
- 5) Hufford C. D., Oguntimein B. O., *Phytochemistry*, **19**, 2036-2038 (1980).
- 6) Isobe T., Noda Y., Kubota T., *Nippon Kagaku Kaishi*, **1985**, 799-801.
- 7) Nagata K., Sone N., Tamura T., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1522-1527 (2001).
- 8) Nagata K., Wada Y., Tamura T., Koyama J., Hirai K., *Nippon Kagaku Ryoho-gakkai Zasshi*, **47**, 9-14 (1999).