

平成21年度労働厚生省科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬品リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題；アジアの薬用植物からの抗リーシュマニア活性物質の分離研究

研究分担者 関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

研究協力者 黒柳 正典 県立広島大学生命環境学部 名誉教授、徳島文理大学香川薬学部客員
研究員

代田 修 徳島文理大学香川薬学部 准教授

安元 加奈未 徳島文理大学香川薬学部 助教

研究要旨 ネパール産薬用植物 Tulsi の抗リーシュマニア成分について分離を継続して行い、化学構造の再解析を行った。

また、平成20年度の報告においてパキスタン産薬用植物 *Withania coagulans* から多くのウイザノライド誘導体を分離構造決定し報告したが、一部化合物の立体配置について誤りのあることが推定され、各種データを詳細に検討して、構造の訂正を行った。

A 研究目的

吸血昆虫であるサシチョウバエが媒介して起こるリーシュマニア症は、経済的に恵まれない途上国を中心に、世界中に1200万人の患者がいるといわれている。これらの地域で使用可能な、安価で確実に効果を表す治療薬が存在していない。そこで、リーシュマニア治療薬開発のためのリード化合物を開発するため、リーシュマニア症の感染地域で採集した薬用植物を中心に、抗リーシュマニア活性物質の探索研究を行い多くの植物から数多くの活性物質を分離報告している。

ネパール産薬用植物 Tulsi (*Ocimum sanctum*) が抗リーシュマニア活性を示すことを明らかにし、数種類の化合物を分離し報告している。その後、新たにいくつかの化合物を分離し、また、報告した化合物の構造に間違いのあったことが分かった。そこで、新規に得られた化合物の構造決定と、間違った構造の訂正のための構造決定を行う。

更に、平成20年度に報告した *Withania coagulans* の成分である Withanolide 誘導体の一部

の化合物の立体配置に間違いのあることが明らかとなったため、各種スペクトルデータを丹念に解析することによりその構造訂正を行う。

B 研究方法

Tulsi の一部の成分の分離構造決定に関しては既に報告していたが、分離が未完了であったフラクションについて、逆相系カラム (ODS, C-8 カラム) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により丹念な分離を行った。新たに分離した5つの化合物 OS-1 (1), OS-2 (2), OS-3 (3), OS-4 (4), OS-5 (5) に関しては、高分解質量スペクトル (HR-MS) の測定及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、赤外吸収 (IR) スペクトル、紫外吸収 (UV) スペクトル、旋光度の測定を行った。これらのデータと既に報告しているが、構造を訂正が必要な OS-6 (6) の分光データを詳細に解析した。特に、2次元 NMR (HMQC, HMBC, NOESY, COSY) を丹念に解析した。

W. coagulans の成分のうち WC-4 (7), WC-5 (8)

と仮称した化合物について、一部必要な2次元 NMR (特に NOESY) を再測定し、詳細な検討を加えた。

C 研究結果

1、Tulsi の新規分離成分の構造決定と、構造訂正について。

今回新たに得た化合物のうち、OS-1 (1) と仮称した化合物は FR-ESI-MS において、疑似分子イオンが m/z 511.2119 $[M+Na]^+$ (calcd. 511.2097) が認められたことから、分子式は $C_{30}H_{32}O_6$ と決定した。 1H -NMR スペクトルにおいて2つのアリルグループ [δ_H 3.32 (2H, d, $J=6.1$ Hz), 3.33 (2H, d, $J=5.4$ Hz), 5.92–5.98 (2H, overlap), 5.05–5.11 (4H, overlap)], 2つの 3,4-位に酸素の結合したフェニールグループ [δ_H 6.98 (1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.86 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 6.97 (1H, dd, $J=8.8, 2.2$ Hz), 6.71 (1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.80 (1H, d, $J=8.3$ Hz), 6.68 (1H, dd, $J=8.3, 2.2$ Hz)], 2つの m -カップルしたプロトン [δ_H 6.65 (1H, brs), 6.76 (1H, brs)], 1個のメチングループ [δ_H 3.93 (1H, m)], 酸素の結合したメチングループ [δ_H 5.65 (1H, d, $J=6.6$ Hz)], 酸素の結合したメチレングループ [δ_H 4.16 (1H, t, $J=8.6$ Hz), 4.27 (1H, dd, $J=9.5, 5.9$ Hz)] の存在が明らかとなった。 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて30個のシグナルピークの存在が明らかとなり、1は eugenol の3量体であることが明らかとなった。また、3つのメトキシ基 (δ_C 56.0, 55.9, 55.8), 二つのエキソメチレン基 (δ_C 115.7, 115.4), 酸素の結合したメチン炭素 (δ_C 88.3), 酸素の結合した1つのメチレン炭素 (δ_C 71.7), 2つのメチレン炭素 (δ_C 40.1, 39.8), 及び多数の芳香環と二重結合の炭素の存在が明らかになった。

化合物 1 の各置換基の位置関係を明らかにするために2次元 NMR の HMBC スペクトルを検討した。HMBC スペクトルにおいては、プロトンと2つ及び3つの結合を介した炭素の間の相関を検出し化学構造を確実に決定する方法で、HMBC スペクトルを丹念に解析することにより、化合物中のプロトンと炭素の位置関係を明らかにすることができ、化合物の構造を確実に決定することが可能である。1の HMBC を

丹念に検討した結果、図1に示すような相関が認められたことから、1の平面構造を明らかにすることができた。1の7'、8'の立体化学は、H-7とH-9の間にNOEが観察されたことから、相対配置はトランスと決定した。1の構造式と、各種2次元 NMR を詳細に検討して得られた 1H -NMRと ^{13}C -NMRの帰属を図2に示す。その他の新規化合物、2, 3, 4, 5についても、HR-MS, NMR スペクトルを中心とする分光データを詳細に検討することにより、図2に示すように構造を明らかにすることができた。

以前の報告で、OS-6の構造を6'のような構造と報告していたが、新規化合物2の構造決定を行った際、OS-6も共にエーテル環を部分構造として有する化合物であることが強く示唆された。そこで、6について、あらためてHMBCデータの丹念な再検討を行った。OS-7が6'の構造であれば、HR-MSの結果がこれらの構造に合わないことが疑問であった。ちょうど水分子分に相当する18マスユニット分小さく表れていたが、これは、6'が水酸基を持つため、脱水ピークが現れるためと考えていたが、この考えにも無理があると感じられた。6がエーテル環を巻いていると考えれば、MSの結果が矛盾なく説明することができると考えられた。そこで6のHMBCスペクトルを詳細に検討した。6のHMBCスペクトルにおいて7'-位のプロトンから4位、2'-位、6'-位、8'-位、9'-位の炭素への相関が、8'-位のプロトンから5位、1'-位の炭素への相関が観察されることから、6はbenzopyran環を持った興味あるネオリグナン誘導体であることとなり構造を訂正した。

Tulsi から得られ、以前に報告したOS-7 (7) も含めて、1–7までの化合物の構造を図3に示した。ここに示すように、これらの化合物はすべて eugenol ユニットが2から4個縮合したネオリグナン誘導体であることがわかる。これらの中には、ネオリグナン誘導体でありながら、本来は生合性的にまったく異なるフラボノイドのグループに属する flavan-3-ol 骨格をもつ興味ある化合物が得られている。これら1–7の化合物は文献未記載の新規化合物であった。

2、*W. coagulans* の成分の立体配置の訂正

昨年度の報告で、5種類の新規 withanolide を含む 12 種類の withanolide の分離構造決定と抗リーシュマニア活性を報告したが、新規化合物のうち2種類の化合物の構造の立体配置の一部に間違いのあることが明らかとなったので、その構造の検討を行った。

WS-4 (7), WS-5 (8) と仮称した化合物は HR-ESI-MS, NMR スペクトル, IR スペクトル, UV スペクトルから、図4に示すように 14位の水酸基が α , 17位の水酸基が β の立体配置を持った 7, 及び 8 のような構造と推定し報告していた。その後、立体配置に疑問が生じ、7 及び 8 の NOESY スペクトルを詳細に検討した結果、その立体配置を訂正するにいたった。7 及び 8 の NOESY スペクトルにおいて、Me-18 は 14 位の水酸基 OH, 20 位の水酸基と NOE 相関が、12 位の α -プロトンが 20 位の水酸基と NOE 相関が認められた。以上の結果、14 位の水酸基の立体配置は β 配置、17 位の水酸基の立体配置が α であることが明らかになり、7 及び 8 の構造を図3に示すような構造に訂正した。なお、7 及び 8 を含めて、*W. coagulans* から得られた5種類の withanolide 誘導体は文献未記載の新規化合物であることが明らかになった。

D 考察

Tulsi の成分に関しては、新たに5種類の成分 (1・5) を分離しその構造を決定した結果いずれも新規化合物であることが明らかになった。また、先に報告した構造に誤りのあった 6 の正しい構造式を明らかにすることができた。これら化合物はすべて、eugenol ユニットが2個から4個が縮合したネオリグナン誘導体であることが明らかになった。これらのうち 2 及び 6 はリグナン誘導体でありながら、その基本骨格がフラボノイドに属する flavan-3-ol 構造を有しており非常に興味を持たれる。また、4 は2つの eugenol ユニットが縮合したものと考えられるが、一方の eugenol ユニットでは、 C_6 -部分と C_3 -部分が解裂し、エノールエーテルの形で結合した部分構造を有しており、非常に珍しい構造を有している。

W. coagulans からえられた withanolide 誘導体のうち、7, 8 について正しい立体配置を決めることができた。ほとんどの場合、withanolide 誘導体では 14 位の立体は α 配置であるが、今回得られた 7, 8 では 14 位が β 立体配置を有することが明らかとなり、数少ない非常に興味ある例と考えられる。

E 結論

本事業における従来の報告の中で、分離が完了していなかった Tulsi の分離を完了し得られたすべての化合物について構造を明らかにするとともに、報告した構造に過ちのあった化合物について、正しい構造を決定した。

W. coagulans の成分についても、立体構造に誤りのあることが分かり、正しい立体配置に訂正することができた。

参考文献

1) 黒柳正典、関田節子：創薬等ヒューマンサイエンス財団総合研究事業・国際グラント研究平成17年度報告書

Akiko SUZUKI, Osamu SHIROTA, Kanami MORI, Setsuko SEKITA, Hiroyuki FUCHINO, Akihito TAKANO, and Masanori KUROYANAGI : Leishmanicidal Active Constituents from Nepalese medicinal Tulsi (*Ocimum sanctum* L.), *Chem. Pharm. Bull.*, **57**(3), 245-251 (2009)

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

1、論文発表

なし

2、学会発表

黒柳正典、村田美紀、代田修、安元加奈未、関田節子、瀧野裕之、中根孝久：パキスタン *Withania coagulans* の抗リーシュマニア活性ステロイド。第53回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、11月、奈良 (2009)、

H 知的所有権の取得情報

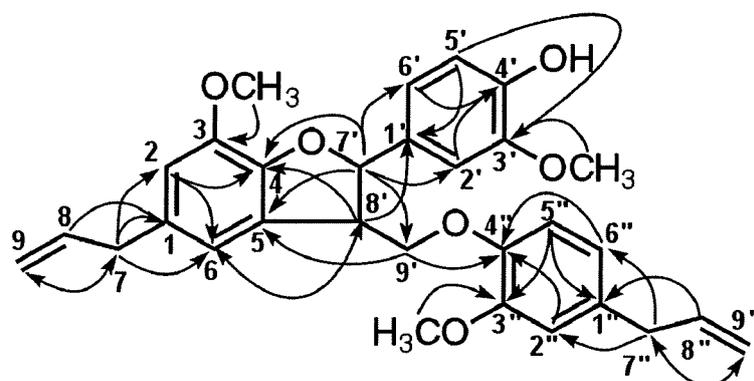
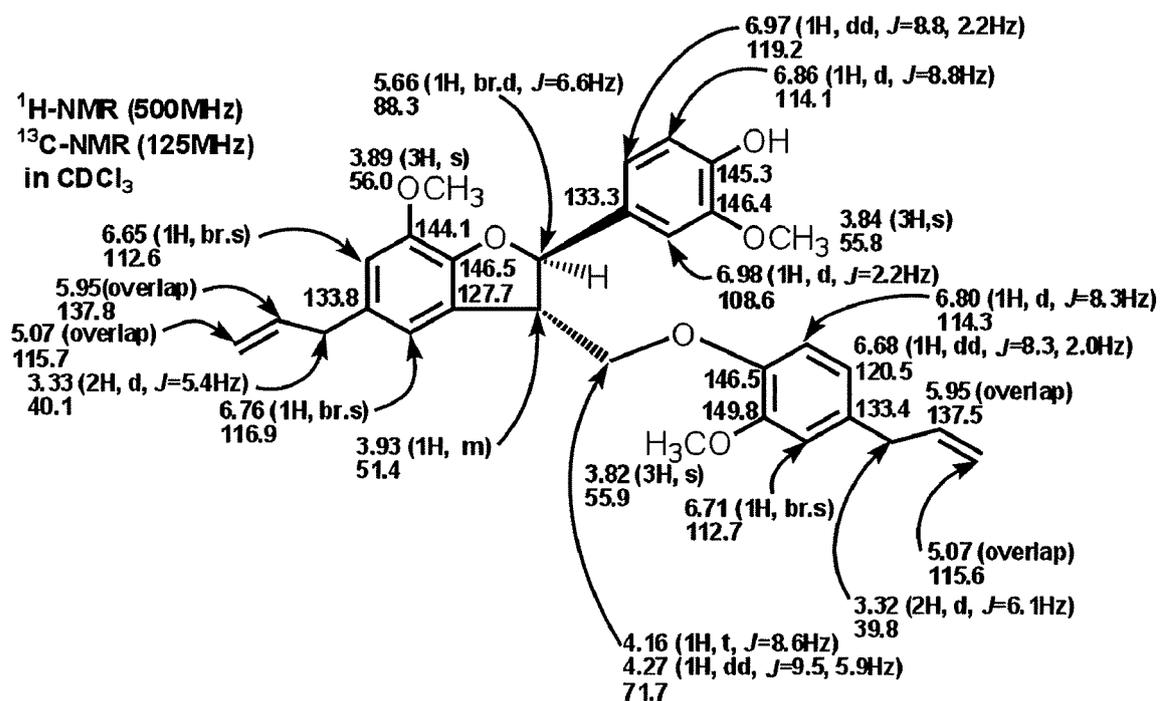


図1 化合物 1 の重要な HMBC 相関

図2 化合物 1 の ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR のアサイン

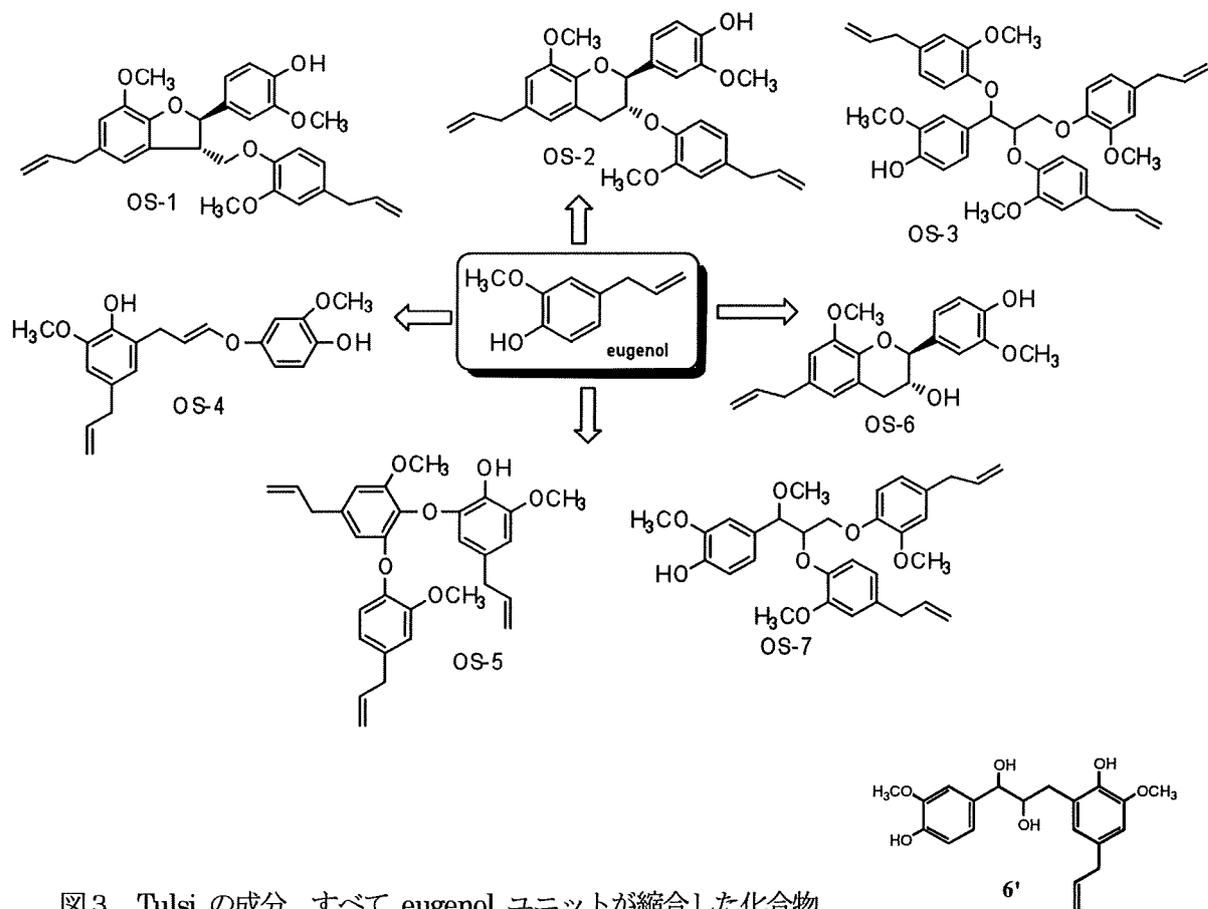


図3 Tulsi の成分。すべて eugenol ユニットが縮合した化合物。

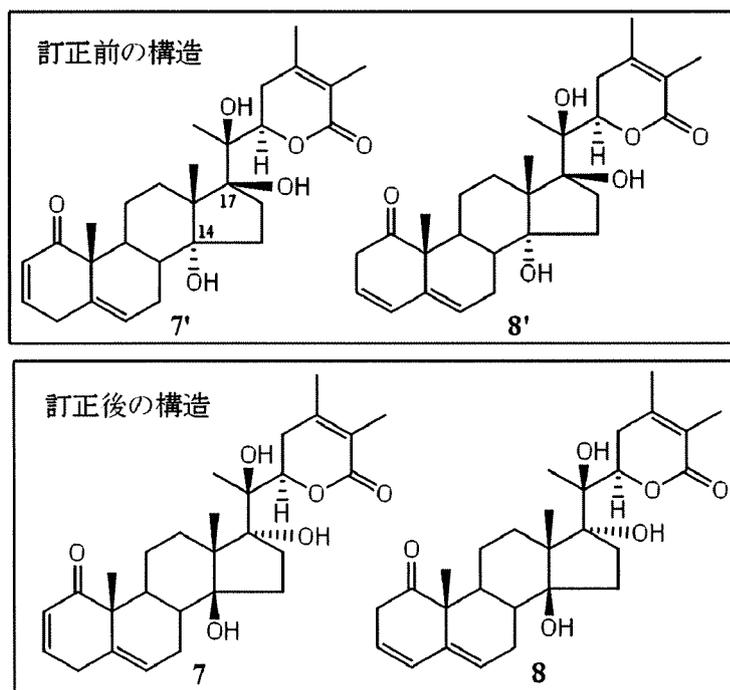


図4 *W. coagulans* の成分の立体配置の訂正。

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬品リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題；天然薬用資源植物から α -グルコシダーゼ阻害活性物質の探索

研究分担者 中根 孝久 昭和薬科大学 講師

研究要旨 昭和薬科大学に保管してあるブラジル産生薬の整理を行い、そのうちの 100 種類を無作為に選抜し、メタノールエキスを作製した。得られたエキスをを用い、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験を行い、エキスの一次スクリーニングを行った。その結果、*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (ニシキギ科)、*Naucleopsis amara* Ducke (クワ科)、*Astronium fraxinifolium* Schott (ウルシ科) に強い活性を見出した。また、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験は吸光光度計を用いた方法であり一度に大量のサンプルの測定が困難であったことから、マイクロプレートリーダーを用いた方法に改良した。

A 研究目的

糖尿病や高血圧、高脂血症などの生活習慣病と内臓脂肪型肥満と併せたメタボリックシンドロームが社会問題となっている。そのうち、糖尿病は厚生労働省糖尿病実態報告書（平成 16 年）によると、日本では生活習慣と社会環境の変化に伴い、糖尿病患者はその予備軍も含め増加の一途をたどっている。糖尿病は病状が進行すると心筋梗塞、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症などの合併症によって患者の QOL が著しく低下するなど問題点が多い。現在までに世界各国、特に薬用資源が豊富な途上国における伝統医薬、植生調査など薬用植物資源調査研究が行われている。近年、様々なアッセイ方法が開発され、既存の効能効果以外の効果が期待される。

本学では、南米ブラジル、ネパールなどの薬用

資源植物調査を行い、生薬を多数保存している。

平成 21 年度は本学で所有するブラジル産生薬のうち、100 種を選抜しエキスの作成を行った。得られたエキスをを用い、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験の一次スクリーニングを行った。また、 α -グルコシダーゼ阻害活性試験を行うために従来のムタローゼ・GOD 法に改良を加え、より簡便に多数のサンプル測定が行えるようにした。

B 研究方法

1. α -グルコシダーゼ阻害活性試験方法の改良

吸光光度計を用いた測定では、一度に大量のサンプルを測定することが困難であった。そのため多数のサンプルを一度に測定出来るマイクロプレートリーダーへ応用するために測定波長の設定およびサンプルの少量化など反応試薬のダウ

ンスケールを行い従来のもので同等の結果が得られるかを検討した。

1-1. 測定波長の設定

グルコース CII-テストワコーキット（ムタローゼ・GOD 法）を用いたことから、505 nm における測定が推奨されている。マイクロプレートリーダーにおいて測定可能な最も近い波長 492 nm で比較検討を行った。

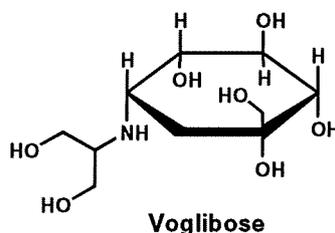
1-2. α -グルコシダーゼ阻害活性試験方法

0.5mL 遠心チューブに、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 150 μ L, 4% マルトース 50 μ L, 試料 (20 μ L; 最終濃度 50 μ g/mL), rat intestinal acetone powder (α -glucosidase) を加え、37 $^{\circ}$ C, 20 分間インキュベートを行った。反応終了後、100 $^{\circ}$ C, 3 分間加熱処理し酵素反応を停止した。5,000 rpm, 5 分間で遠心分離後、上清 5 μ L を 0.5 mL チューブにとり、グルコース測定キット用発色試薬[グルコース CII テストワコー(和光純薬)] 0.2 mL を加え、37 $^{\circ}$ C, 20 分間インキュベートした。終了後、マイクロプレートリーダー(492 nm) で吸光度を測定した。測定した吸光度値から正確な α -グルコシダーゼ阻害活性を次式によって求めた。

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{[\text{吸光度}_{100\% \text{マルトース}} - \text{吸光度}_{0\% \text{マルトース}}] - [\text{吸光度}_{\text{試料}} - \text{吸光度}_{\text{ブランク}}]}{\text{吸光度}_{100\% \text{マルトース}} - \text{吸光度}_{0\% \text{マルトース}}} \times 100$$

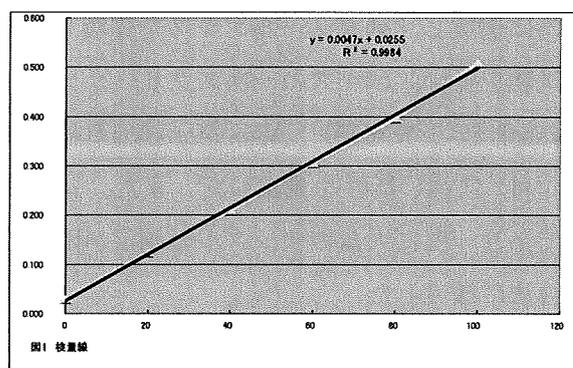
本実験にはポジティブコントロールとして、 α -グルコシダーゼ阻害薬 voglibose を用いた。

[IC₅₀ 1.5 \times 10⁻⁹ M]



1-3. 検量線の作製

各サンプルの最終濃度が 50 μ g/mL になるように調整を行った。従って、検量線は、20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 60 μ g/mL, 80 μ g/mL 及び 100 μ g/mL で作製した。(図 1)



2. エキスの調整

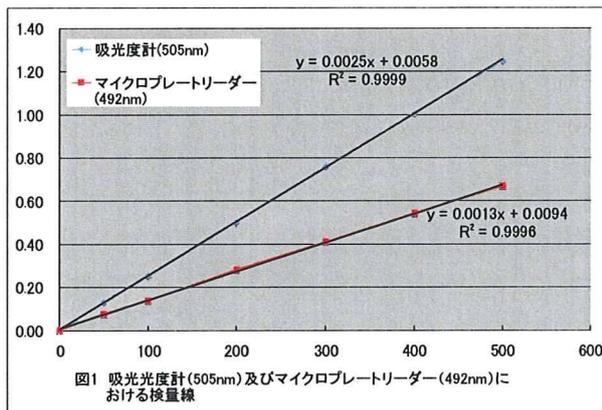
本学において所有するブラジル産生薬のうち、葉を用部とするものは 50 g 材を用部とするものは 100 g を量り、メタノール抽出を 3 回行い、エキスを作成した。

得られたエキスを用いて α -グルコシダーゼ阻害活性試験を行った。

C 研究結果

1. 測定波長の設定は、キットに含まれる検量線作成方法に従い、濃度 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL, 400 μ g/mL 及び 500 μ g/mL を調整し、吸光度計 (505nm) で測定した後、同一溶液を用いてマイクロプレートリー

ダー (492nm) で測定し、検量線を作製した。いずれも良好な検量線が得られ、マイクロプレートリーダーを用いた測定が可能であることが示唆された。(図2)



2. 今回行った1次スクリーニングにおいて、 α -グルコシダーゼ阻害活性を示した植物サンプルが数種類確認された。特に、以下に示した3種は強い活性を示しており、最も強い活性を示した *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (阻害率: 98.2, Celastraceae; ニシキギ科) は文献検索の結果、トリテルペノイド、セスキテルペノイドをはじめとした多くの化学構造が報告されている。次いで強い活性を示した *Naucleopsis amara* Ducke (阻害率: 94.2, Moraceae; クワ科) は化学成分に関する報告はなく、*Astronium fraxinifolium* Schott (阻害率: 78.0, Anacardiaceae; ウルシ科) についても同様であった。

D 考察

従来のムタローゼ・GOD法と比べると試料、試薬ともにスケールダウンして、少量のサンプルでの検討が行えるようになった。また、測定には

吸光度計を用いていたために、一度に多くの試料で測定を行うのは困難であった。しかし、マイクロプレートリーダーの導入で一度に多数の試料を迅速に測定できるようになった。

今回、ブラジル産生薬3種に強い α -グルコシダーゼ阻害活性が認められた。これら生薬の活性成分の単離・精製を行い、活性本体である化合物の構造決定をする必要があると考える。

E 結論

本研究事業最終年度からの参加であったが、アッセイ方法の改良を行い、マイクロプレートリーダーでの一斉測定を可能にした。

ブラジル産生薬のうち、3種類 (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, *Naucleopsis amara* Ducke, *Astronium fraxinifolium* Schott) に強い α -グルコシダーゼ阻害活性があることがわかった。

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H 知的所有権の取得情報

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Takahashi, K. 他	α -Glucosidase inhibitor from <i>Solanum torvum</i> .	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	74 巻 4 号	741-7 45	2010
以下投稿中					
H. Fuchino 他	<i>In Vitro</i> leishmanicidal activity of benzo- phenanthridine alkaloids from <i>Bocconia pearcei</i> and related compounds,	<i>Chem.Pharm.</i> <i>Bull.</i> ,		投稿中	2010

Methyl Caffeate as an α -Glucosidase Inhibitor from *Solanum torvum* Fruits and the Activity of Related Compounds

Keisuke TAKAHASHI,¹ Yasuyuki YOSHIOKA,¹ Eisuke KATO,¹ Shigeki KATSUKI,² Osamu IIDA,² Keizo HOSOKAWA,³ and Jun KAWABATA^{1,†}

¹Laboratory of Food Biochemistry, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

²Tanegashima Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Nakatane-cho, Kumage-gun, Kagoshima 891-3604, Japan

³Department of Nutritional Management, Faculty of Health Sciences, Hyogo University, Kakogawa 675-0195, Japan

Received October 27, 2009; Accepted December 29, 2009; Online Publication, April 7, 2010
[doi:10.1271/bbb.90789]

In screening experiments for rat intestinal α -glucosidase (sucrase and maltase) inhibitors in 325 plants cultivated in Japan's southern island, of Tanegashima, marked inhibition against both sucrase and maltase was found in the extract of the fruit of *Solanum torvum*. Enzyme-assay guided fractionation of the extract led to the isolation of methyl caffeate (**1**) as a rat intestinal sucrase and maltase inhibitor. We examined 13 caffeoyl derivatives for sucrase- and maltase-inhibitory activities. The results showed that methyl caffeate (**1**) had a most favorable structure for both sucrase and maltase inhibition, except for a higher activity of methyl 3,4,5-trihydroxycinnamate (**14**) against sucrase. Its moderate inhibitory action against α -glucosidase provides a prospect for antidiabetic usage of *S. torvum* fruit.

Key words: *Solanum torvum*; α -glucosidase inhibitor; methyl caffeate; Tanegashima

Diabetes mellitus is one of the most serious chronic diseases. It is caused by continual hyperglycemia and develops along with increases in obesity and aging in the general population.¹ One of the therapeutic approaches to decreasing postprandial hyperglycemia is to retard absorption of glucose by inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase in the digestive organs.² In recent years, many efforts have been made to search for effective α -glucosidase inhibitors from natural sources in order to develop a physiological functional food or to discover lead compounds for medicinal usage against diabetes.³ In the course of our search for rat intestinal α -glucosidase-inhibiting principles from various plants, we have isolated and identified several active compounds from plants grown in Asian regions, including Japan,^{4–7} Thailand,^{8,9} China,^{10,11} and Nepal.¹² In this paper, we present the results of a screening of plants cultivated in Tanegashima, a southern island of Japan, for rat intestinal α -glucosidase inhibition. In the screening experiments for rat intestinal sucrase and/or maltase inhibitors in 325 plants, potent sucrase and maltase inhibiting activity was found in extract of the fruit of *Solanum torvum* (Solanaceae), an edible herbaceous

perennial plant. There have been several reports on the chemical constituents of this plant, which include well-documented steroidal compounds^{13–15} and antiviral activities,¹⁶ but no other biologically active compounds from this plant have been reported to date. Hence, the promising screening result prompted us to isolate and elucidate the structures of active compounds in this plant. Separation of *S. torvum* fruit extract using various column chromatographic techniques lead to the isolation of methyl caffeate (**1**) as one of active principles. Some α -glucosidase inhibitors previously isolated from plants contain the caffeoyl moiety as the part of their structure and have been found to be important in exerting inhibitory activity,^{3,7} but the contribution of an ester part to the α -glucosidase-inhibitory activity of caffeic esters has not been studied. Hence we also present comparative results for α -glucosidase inhibition of various synthetic caffeic esters and related compounds.

Materials and Methods

Materials. Three hundred and twenty-five species of temperate Japanese plants were cultivated and collected in an experimental field in Tanegashima, Japan. All voucher specimens are deposited at the Tanegashima Division, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute for Biomedical Innovation, Tanegashima, Japan. All chemicals used were of reagent grade, and were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan), unless otherwise stated. All solvents were distilled before use.

Apparatus. NMR spectra were recorded on a Bruker AMX500 instrument (¹H, 500 MHz). Chemical shifts (ppm) were calculated from the residual solvent signals of δ_{H} 2.04 in acetone-*d*₆, δ_{H} 2.49 in dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆, δ_{H} 3.30 in methanol-*d*₄, or δ_{H} 7.24 in chloroform-*d*. Field desorption (FD), FD-high resolution (HR), and electron ionization (EI) mass spectra were obtained on a JMS-SX102A instrument (Jeol, Tokyo).

Intestinal α -glucosidase-inhibitory activity determination. Sucrase- and maltase-inhibitory activities indicating inhibition of sucrase- and maltase-hydrolyzing activities respectively in rat intestinal glucosidase complexes were measured as described previously.⁷ Briefly, a crude enzyme solution prepared from rat intestinal acetone powder (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) was used as the small intestinal α -glucosidase. A reaction mixture consisting of crude enzyme solution (0.05 ml of maltase or 0.2 ml of sucrase), substrate solution (0.35 ml of 3.5 mM

[†] To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +81-11-706-2496; E-mail: junk@chem.agr.hokudai.ac.jp

maltose or 0.2 ml of 56 mM sucrose) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.3), and the test sample in 50% aqueous DMSO (0.1 ml) was incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 0.75 ml of 2 M Tris-HCl buffer (pH 7.0), and then this was passed through a short column of basic alumina (Merck Japan, Tokyo) to remove phenolic compounds, which might have interfered with enzymatic glucose quantification at the following step. The amount of liberated glucose was measured by the glucose oxidase method using a commercial test kit (Glucose CII-test Wako, Wako, Osaka, Japan).

Screening experiments. Screening experiments for rat intestinal maltase and sucrase inhibition were carried out with extracts of 524 plant parts from 325 species. Dried plant parts were extracted with 50% aqueous methanol. The extracts were evaporated to dryness, redissolved in 50% aqueous DMSO, and used as test samples to assess rat intestinal α -glucosidase inhibitory activity. Extractable constituents obtained from 100 mg of plant material dissolved in 1 ml of test solution were used as the final concentration in the experiments.

Isolation of methyl caffeate (I) from *S. torvum* fruit. Dried fruits (50 g) of *S. torvum* were extracted with 50% aqueous methanol. The extracts were concentrated and charged onto a hydrophobic resin column (Diaion HP-20, Mitsubishi chemical, Tokyo). The column was washed with water to remove sugars that would have disturbed the α -glucosidase-inhibitory assay and then eluted with methanol. The methanol eluate was concentrated and partitioned between ethyl acetate and water. The ethyl acetate fraction showed activities for both sucrase (29%) and maltase (47%). In contrast, the water fraction showed higher inhibitory activity against maltase (62%), whereas the sucrase-inhibitory activity was low (13%). Hence further fractionation was carried out to isolate sucrase and maltase inhibitors from the ethyl acetate fraction. The ethyl acetate fraction was fractionated by silica gel column chromatography with gradient elution by chloroform and methanol. Sucrase inhibitory activity was eluted in chloroform-methanol (4:1) eluate, while maltase inhibitory activity was dispersed throughout the fractions. The chloroform-methanol (4:1) fraction was further purified by preparative HPLC (column, Inertsil PREP-ODS, ϕ 20 \times 250 mm, GL-Science, Tokyo; mobile phase, 15–30% MeCN in water (0–60 min), 30% MeCN in water (60–90 min); flow rate, 5.0 ml/min; detection, UV 254 nm). A peak eluted at t_R = 64.8 min showing the highest sucrase and maltase inhibitory activities was collected to give 1 (16 mg). The analytical data were closely consistent with those of the authentic specimen. 1: FD-MS m/z : 194 (M^+); 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 3.67 (3H, *s*, OCH₃), 6.25 (1H, *d*, J = 16.0 Hz, H-8), 6.74 (1H, *d*, J = 8.2 Hz, H-5), 6.99 (1H, *br d*, J = 8.2 Hz, H-6), 7.04 (1H, *br s*, H-2), 7.47 (1H, *d*, J = 16.0 Hz, H-7).

General procedure for the preparation of 2–7 and 10–14. Compounds 2–7,¹⁷ 10,¹⁸ 11,¹⁹ and 12²⁰ were prepared as described below and spectral properties were matched with the reported data. Compounds 8 and 9 are commercially available. Compounds 13 and 14 were prepared as described below.

Preparation of 2–5, and 12. To a stirred solution of the corresponding cinnamic or benzoic acid (10 mmol) in each alcohol (50 ml) was added dropwise conc. H₂SO₄ (2.5 ml). The reaction mixture was heated to reflux for 6–24 h. After cooling, the resulting mixture was concentrated, diluted with water, and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate) to give the desired esters.

Preparation of tert-butyl caffeate (6). To a stirred solution of triphenylphosphine (6.0 g, 23 mmol) in toluene (20 ml) was added tert-butyl bromoacetate (3.8 ml, 26 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was heated to reflux overnight. The mixture was cooled to room temperature and the resulting precipitate was filtered, washed successively with toluene and hexane, and dried to give a phosphonium salt (86%). The obtained phosphonium salt (2.35 g, 5 mmol) in chloroform (10 ml) was added to a stirred solution of 3,4-dihydroxybenzaldehyde (690 mg, 5 mmol) in dioxane (10 ml) and then KHCO₃

(2.5 g, 25 mmol, 5 eq) was added to the mixture. The mixture was refluxed for 6 h and cooled to room temperature, and the resulting insoluble salt was filtered off. The filtrate was concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate (3:2)) to give 6 (76%).

Preparation of phenyl caffeate (7). To a stirred solution of malonic acid (4.16 g, 40 mmol) in acetic anhydride (4.8 ml) was added conc. H₂SO₄ (0.16 ml). After 20 min, acetone (4 ml) was added to the solution and this was stirred for 6 h. The resulting precipitate was collected to give Meldrum's acid (66%). Meldrum's acid (268 mg, 1.86 mmol) was then dissolved in toluene (10 ml), and phenol (188 mg, 2 mmol, 1.1 eq) was added. The mixture was heated to reflux for 5 h. After cooling of the mixture to room temperature, 3,4-dihydroxybenzaldehyde (276 mg, 2 mmol, 1.1 eq), pyridine (0.5 ml), and piperidine (0.05 ml) were added. The mixture was stirred further 12 h at room temperature. After removal of the solvent, the mixture was diluted with 1 M HCl and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 3:2) to give 7 (10%).

Preparation of (E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-en-2-one (10). To a stirred solution of 3,4-dihydroxybenzaldehyde (1.38 g, 10 mmol) in DMF (50 ml) were added ethyldiisopropylamine (6.45 g, 50 mmol, 5 eq) and methoxymethyl chloride (1.9 ml, 25 mmol, 2.5 eq). The mixture was stirred for 6 h at room temperature, diluted with water and extracted with ethyl acetate. The extract was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 4:1) to give 3,4-bis(methoxymethoxy)benzaldehyde (10a, 48%). The obtained 10a (1.08 g, 4.8 mmol) was dissolved in methanol (25 ml) and acetone (1 ml), and KOH (2.8 g, 50 mmol, 10.4 eq) in water (5 ml) was added to the solution. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then the mixture was poured into ice water (50 ml), neutralized with 1 M HCl, and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 4:1) to give (E)-4-[3,4-bis(methoxymethoxy)phenyl]but-3-en-2-one (10b, 42%). To a stirred solution of 10b (50 mg, 0.19 mmol) in methanol (3 ml), 6 M HCl (3 ml) was added dropwise. The mixture was stirred for 1 h, then diluted with water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 3:2) to give 10 (65%).

Preparation of methyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoate (11). A stirred solution of 1 (1.94 g, 10 mmol) in methanol (30 ml) was hydrogenated using a balloon filled with H₂ for 24 h in the presence of 10% Pd-C (106 mg). After filtering of the catalyst, the solvent was removed and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 3:2) to give 11 (63%).

Preparation of methyl 2,3,4-trihydroxycinnamate (13). To a stirred solution of 2,3,4-tris(methoxymethoxy)benzaldehyde²¹ (1.43 g, 5 mmol) in dioxane (10 ml) were added (methoxycarbonylmethyl)triphenylphosphonium chloride (1.85 g, 5 mmol, 1 eq) in chloroform (10 ml) and KHCO₃ (2.5 g, 25 mmol, 5 eq). The mixture was refluxed for 6 h, and cooled to room temperature, and the resulting insoluble salt was filtered off. The filtrate was concentrated and purified by silica gel column chromatography (hexane-ethyl acetate 4:1) to give methyl 2,3,4-tris(methoxymethoxy)cinnamate (13a, 80%). 13a: FD-HR-MS m/z (M^+): Calcd. for C₁₆H₂₂O₈: 342.1315, Found: 342.1317; 1H NMR (chloroform-*d*) δ (ppm): 3.50 (3H, *s*, OCH₃), 3.60 (6H, *s*, 2 \times OCH₃), 3.79 (3H, *s*, OCH₃), 5.13, 5.18, and 5.23 (each 2H, *s*, 3 \times OCH₂), 6.38 (1H, *d*, J = 16.1 Hz, H-8), 6.96 (1H, *d*, J = 8.9 Hz, H-5), 7.28 (1H, *d*, J = 8.9 Hz, H-6), 8.02 (1H, *d*, J = 16.1 Hz, H-7). To a stirred solution of 13a (50 mg, 0.19 mmol) in methanol (3 ml), 6 M HCl (3 ml) was added dropwise. The mixture was stirred for 1 h, then diluted with water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water and dried over anhydrous sodium sulfate. After removal of the solvent, the residue was purified by silica gel column chromatog-

raphy (hexane-ethyl acetate 3:2) to give **13** (35%). **13**: FD-HR-MS m/z (M^+): Calcd. for $C_{10}H_{10}O_5$: 210.0528, Found: 210.0536; 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 3.66 (3H, s, OCH_3), 6.34 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.38 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-8), 6.93 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.77 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-7).

Preparation of methyl 3,4,5-trihydroxycinnamate (14). Following the method of preparing **13a**, 3,4,5-tris(methoxymethoxy)benzaldehyde²² and (methoxycarbonylmethyl)triphenylphosphonium chloride were reacted to give methyl 3,4,5-tris(methoxymethoxy)cinnamate (**14a**) (76%). **14a**: FD-HR-MS m/z (M^+): Calcd. for $C_{16}H_{22}O_8$: 342.1315, Found: 342.1308; 1H NMR (chloroform- d) δ (ppm): 3.51 (6H, s, $2 \times OCH_3$), 3.61 (3H, s, OCH_3), 3.80 (3H, s, OCH_3), 5.18, (2H, s, OCH_2), 5.21 (4H, s, $2 \times OCH_2$), 6.34 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 7.04 (2H, s, H-2, 6), 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7). Following the method of preparing **13**, **14a** was deprotected to give **14** (73%). **14**: FD-HR-MS m/z (M^+): Calcd. for $C_{10}H_{10}O_5$: 210.0528, Found: 210.0524; 1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 3.67 (3H, s, OCH_3), 6.16 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 6.58 (2H, s, H-2, 6), 7.38 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7).

Results and Discussion

In the screening experiment, 109 samples showed more than 50% sucrase inhibitory activity and 222 samples showed more than 50% maltase inhibitory activity out of 524 samples from 325 plant species (Supplemental Table 1; see *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Web site). Among these, notable inhibitory active species (>90%) against rat intestinal sucrase or maltase are shown in Table 1. Of these promising species, *Solanum torvum* fruit was chosen, as it had not been studied before as to glucosidase inhibitory activity and was available in large quantities. Also, *S. torvum* fruit is edible and might easily be applied in antidiabetic treatment. Therefore, we started an identification of the active principles of *S. torvum* fruit.

Table 1. Plant Species Showing Notable Inhibitory Activity against Rat Intestinal Sucrase or Maltase

Scientific name	Part	Inhibitory activity (%)	
		Sucrase	Maltase
<i>Aleurites fordii</i>	stem	33	100
<i>Averrhoa bilimbi</i>	leaf	30	100
<i>Averrhoa carambola</i>	leaf	30	96
<i>Camellia japonica</i>	stem	55	100
<i>Cassia angustifolia</i>	leaf	82	92
<i>Citrus aurantium</i>	fruit	100	100
<i>Citrus depressa</i>	fruit	99	89
<i>Citrus hanayu</i>	fruit	100	95
<i>Derris elliptica</i>	leaf	100	98
<i>Derris elliptica</i>	stem	100	97
<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	leaf	61	90
<i>Eugenia uniflora</i>	leaf	92	88
<i>Glochidion obovatum</i>	leaf	42	90
<i>Hibiscus acetosella</i>	leaf	99	86
<i>Ipomoea batatas (hanaimo)</i>	stem	100	100
<i>Ipomoea batatas (Shimon 1 gou)</i>	stem	98	100
<i>Liquidambar styraciflua</i>	leaf	61	100
<i>Morinda citrifolia</i>	fruit	99	109
<i>Morus australis</i>	leaf	98	100
<i>Morus australis</i>	branch	95	100
<i>Pittosporum tobira</i>	leaf	100	100
<i>Quassia amara</i>	leaf	62	99
<i>Solanum torvum</i>	fruit	100	100
<i>Styrax japonica</i>	leaf	100	92
<i>Swietenia macrophylla</i>	leaf	36	91
<i>Zanthoxylum schimifolium</i>	stem	100	100

Dried fruits of *S. torvum* were extracted with 50% aqueous methanol. After evaporation, the crude extract was fractionated successively by hydrophobic resin column chromatography, solvent partition, silica gel column chromatography, and preparative HPLC to yield methyl caffeate (**1**) as an inhibitor against rat intestinal sucrase and maltase.

Methyl caffeate (**1**) showed moderate inhibitory activity, with IC_{50} values of 1.5 mM and 2.0 mM, against rat intestinal sucrase and maltase respectively. These activities are comparable to or stronger than those of ordinary flavonoid inhibitors.²³ A number of caffeoyl esters have been isolated from plants as α -glucosidase inhibitors.^{3,7,24} Although caffeic acid is assumed to be the critical component in α -glucosidase inhibition, an ester moiety appeared to affect α -glucosidase inhibition also. Hence, to investigate the effects of the ester moiety together with the caffeoyl moiety against α -glucosidase inhibition, we synthesized or purchased a series of caffeoyl ester **2–8** and methyl caffeate analogs **9–14**, and tested for sucrase and maltase inhibitory activities. The compounds tested included four linear alkyl caffeates (**2–4**), two branched-chain alkyl caffeates (**5, 6**), phenyl caffeate (**7**), a ketone analog (**10**), methyl dihydrocaffeate (**11**), and two trihydroxycinnamates (**13, 14**), and chlorogenic acid (**8**), caffeic acid (**9**), and methyl protocatechuate (**12**) (Fig. 1).

The results are summarized in Table 2 and Supplemental Figs. 1–10 (see *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Web site). In contrast to the moderate activities of methyl caffeate (**1**) against sucrase and maltase, compounds **2, 3**, and **4**, possessing longer alkyl chains than **1**, showed slight decreases in sucrase inhibition. In branched-chain esters **5** and **6**, sterically hindered *tert*-butyl ester **6** showed less sucrase inhibitory activity than smaller isopropyl ester **5**. In contrast, the maltase inhibitory activity of compounds **2–6** remained unchanged compared to that of **1**. These data suggest that a larger alkyl group in the ester moiety was unfavorable to sucrase inhibition in caffeoyl esters regardless of linear or branched chains, and that maltase-inhibitory activity was not influenced by changes in the size or shape of the alkyl group. The sucrase inhibitory activity of phenyl ester **7** remained unchanged as compared to **1**. So the presence of an aromatic ring in the ester moiety is probably effective for sucrase inhibition even though it is sterically bulky. Maybe the electronic effect of the aromatic ring affects its conjugated caffeoyl moiety or interaction with the enzyme, but the details were not clear. A naturally abundant caffeic ester, chlorogenic acid (**8**), showed decreased inhibitory activity against both sucrase and maltase as compared to **1**. This result also confirms the disadvantage of a sterically hindered ester for sucrase inhibition. On the other hand, the decreased maltase inhibitory activity of **8** might have been due to the hydrophilicity of the quinic ester moiety, as the steric effect does not alter maltase inhibition, as suggested by results for compounds **2–6**. Caffeic acid (**9**) and (*E*)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-en-2-one (**10**) also showed decreases in the maltase inhibitory activity, but the decrease in the sucrase inhibitory activity was not very large. The presence of a hydrophobic ester group appeared to be important to maltase inhibition regardless of its size. These caffeoyl

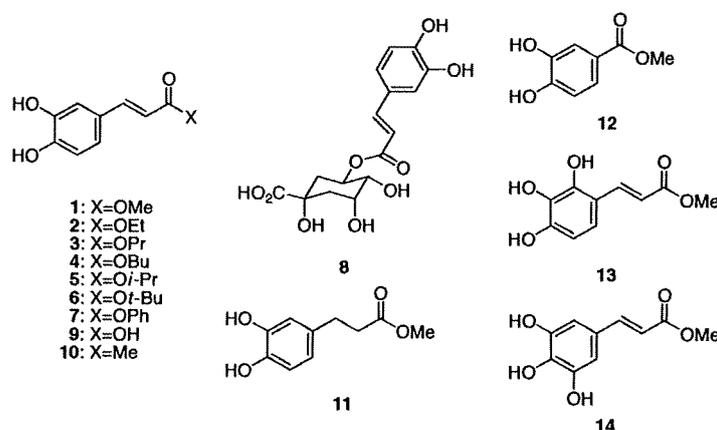


Fig. 1. Structures of Methyl Caffeate (1) and Related Compounds.

Table 2. Inhibitory Activity of 1–14 against Rat Intestinal Sucrase and Maltase

Compound	IC ₅₀ (mM)	
	Sucrase	Maltase
1	1.5	2.0
2	1.8	1.9
3	3.1	2.2
4	3.2	1.8
5	2.0	1.9
6	2.7	2.2
7	1.3	2.1
8	7.6	6.3
9	2.9	5.2
10	2.7	7.2
11	7.5	12.2
12	6.5	16.9
13	5.1	4.9
14	1.0	2.8

derivatives showed some variance in inhibitory activity, in spite of their low activity as compared to reported caffeoyl inhibitors having a multi caffeoyl or flavonol structure within the molecule.^{3,7,24} Therefore caffeoyl ester itself showed some inhibitory activity, while the number of inhibitory active structures within the molecule might be influential.

In view of the results for **11** and **12**, the omission of a double bond in **1** led to a decrease in activity. Finally, an effect of the additional hydroxyl group in **1** was examined. Although the addition of a hydroxyl group to the C-5 position did not alter inhibitory activity much, the addition of a hydroxyl group to the C-2 position decreased its activity, as seen in the results for methyl 2,3,4-trihydroxycinnamate (**13**) and methyl 3,4,5-trihydroxycinnamate (**14**). Methyl 3,4,5-trihydroxycinnamate (**14**) is a C₂ symmetrical compound, and hence 3-OH and 5-OH are equivalent. This might be the reason **14** retained inhibitory activity. In contrast, an additional hydroxyl group of 2-OH might be sterically unfavorable or might have a detrimental electron-donating effect against the neighboring double bond, which was found to contribute to the inhibitory effect, resulting in a decrease in inhibitory activity.

In conclusion, methyl caffeate (**1**) was isolated as the active component in the α -glucosidase inhibitory activi-

ty of *S. torvum*. Methyl caffeate (**1**) and several derivatives (**2**–**14**) were tested for α -glucosidase inhibitory activity, and it was determined that **1** had a favorable structure for both sucrase and maltase inhibition, except for the slightly higher activity of **14** against sucrase. Its moderate α -glucosidase inhibitory action provides a promising application of *Solanum torvum* fruit as an antidiabetic agent.

Acknowledgments

We are grateful to Mr. Kenji Watanabe and Dr. Eri Fukushi of the GC-MS and NMR Laboratory, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, for measuring mass spectra.

References

- King H, Aubert RE, and Herman WH, *Diabetes Care*, **21**, 1414–1431 (1998).
- Puls W, Keup U, Krause HP, Thomas G, and Hofmeister F, *Naturwissenschaften*, **64**, 536–537 (1977).
- Matsui T, Ogunwande IA, Abesundara KJM, and Matsumoto K, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **6**, 109–120 (2006).
- Nishioka T, Kawabata J, and Aoyama Y, *J. Nat. Prod.*, **61**, 1413–1415 (1998).
- Toda M, Kawabata J, and Kasai T, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 294–298 (2000).
- Kawabata J, Mizuhata K, Sato E, Nishioka T, Aoyama Y, and Kasai T, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 445–447 (2003).
- Yoshida K, Hishida A, Iida O, Hosokawa K, and Kawabata J, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4367–4371 (2008).
- Hansawasdi C, Kawabata J, and Kasai T, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1041–1043 (2000).
- Jong-Anurakkun N, Bhandari MR, and Kawabata J, *Food Chem.*, **103**, 1319–1323 (2007).
- Gao H, Huang Y-N, Gao B, Xu P-Y, Inagaki C, and Kawabata J, *Food Chem.*, **106**, 1195–1201 (2008).
- Gao H, Huang Y-N, Gao B, Li P, Inagaki C, and Kawabata J, *Food Chem.*, **108**, 965–972 (2008).
- Bhandari MR, Jong-Anurakkun N, Gao H, and Kawabata J, *Food Chem.*, **106**, 247–252 (2008).
- Mahmood U, Thakur RS, and Blunden G, *J. Nat. Prod.*, **46**, 427–428 (1983).
- Yahara S, Yamashita T, Nozawa N, and Nohara T, *Phytochemistry*, **43**, 1069–1074 (1996).
- Arthan D, Kittakoop P, Esen A, and Svasti J, *Phytochemistry*, **67**, 27–33 (2006).
- Arthan D, Svasti J, Kittakoop P, Pittayakhachonwut D,

- Tanticharoen M, and Thebtaranonth Y, *Phytochemistry*, **59**, 459–463 (2002).
- 17) Xia C-N, Li H-B, Liu F, and Hu W-X, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6553–6557 (2008).
- 18) Kuo P-C, Damu A-G, Cherng C-Y, Jeng J-F, Teng C-M, Lee E-J, and Wu T-S, *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 518–528 (2005).
- 19) Percec V, Peterca M, Sienkowska MJ, Ilies MA, Aqad E, Smidrkal J, and Heiney PA, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3324–3334 (2006).
- 20) Saito S, Okamoto Y, and Kawabata J, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1221–1227 (2004).
- 21) Lim S-S, Jung S-H, Ji J, Shin K-H, and Keum S-R, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 653–668 (2001).
- 22) Onda M, Li S, Li X, Harigaya Y, Takahashi H, Kawase H, and Kagawa H, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1100–1106 (1989).
- 23) Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, and Matsuoka T, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**, 149–153 (2006).
- 24) Matsui T, Ebuchi S, Fujise T, Abesundara JMK, Doi S, Yamada H, and Matsumoto K, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1797–1803 (2004).

