



Isolation and identification of the metabolites of Sudanese medicinal plants and synthesis of flavonoid glycosides

HANAA HASSAB ELRASOUL ABDELKAREEM MOHMED

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Date of Publication)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8374号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008374>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 HANAA HASSAB ELRASOUL ABDELKAREEM MOHMED

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Isolation and identification of the metabolites of Sudanese medicinal plants

and synthesis of flavonoid glycosides

(スーダン産業用植物の代謝物の単離と同定およびフラボノイド配糖体の合成)

指導教員 久世雅樹

The study aims to isolate and identify the metabolites that possess pharmacological and biological properties that have therapeutic benefits in treating diseases from important medicinal plants in Sudan namely *Striga hermonthica* and *Solenostemma argel* that used as a resource of pharmaceutical manufacture to provide useful medicine. The synthesis of complex molecules identical to the naturally occurring compounds, particularly synthesis of flavonoid glycosides (kaempferol 3-*O*-neohesperidoside) is the second purpose.

Chapter 2: Extraction, purification, isolation and identification of flavonoids of the ethyl acetate extract of the whole plant of the *Striga hermonthica*

S. hermonthica, commonly known as purple witchweed, is a hemi-parasitic plant, which is devastating to major crops such as rice (*Oryza sativa* L.), millet (*Pennisetum glaucum* (L.) Leeke), maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Beside its parasitic effect *S. hermonthica* is known as a medicinal plant in some parts of Africa, and it has been used in folk medicine for years to treat many ailments such as leprosy, leprosy ulcers and pneumonia. In this chapter, it was identified the major flavonoids in the *S. hermonthica* plant. The whole plant has been dried at room temperature, coarsely grinded, and extracted with two extraction techniques. Firstly, the dried plant has been extracted with hot continuous extraction using Soxhlet extractor and MeOH at 50 °C, yielded 20% of the crude extract. Then separation of the crude extract with liquid-liquid separation in acidic and basic conditions followed by purification with preparative TLC led to isolate two flavonoids, which were analyzed with ¹H NMR spectroscopy and characterized as flavones and identified based on the comparison to reported data as chrysoeriol (0.01%) and apigenin (0.003%). Secondly, the dried plant was soaking with 80% aqueous methanol at room temperature for seven days furnishing 20% of the crude extract. By the comparison, it was observed that the hot and cold extraction techniques afforded the same yield of the extractable matter. The dried extract was separated with liquid-liquid partitioning using neutral conditions by dissolving the crude extract with 20% aqueous ethanol. The flavonoids of ethyl acetate extract have been purified and isolated with silica gel column chromatography and plate coated silica gel and identified with NMR spectroscopy as chrysoeriol, apigenin, luteolin, and apigenin 7-*O*-β-glucoside, and their yield % in the dried plant were 0.0004, 0.026, 0.004, and 0.003%, respectively. As a result, we observed that the liquid-liquid partitioning in neutral conditions enhanced the isolation of the flavonoids.

Chapter 3: isolation and characterization of the metabolites of the ethyl acetate extract of the *Solenostemma argel* leaves

S. argel is well-known as a medicinal plant in some parts of Sudan, where it is used as an anti-spasmodic, anti-diabetic and anti-inflammatory because of its many useful secondary metabolites. In this chapter, it was identified and quantified the major metabolites of ethyl acetate extracts of *S. argel* leaves. Dried leaves of *S. argel* were macerated, extracted and subjected to liquid-liquid partitioning. The metabolites of the ethyl acetate extract were purified and isolated using a combination of chromatographic techniques (silica gel column chromatography and preparative thin layer chromatography). The structures of the isolated compounds were identified using infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results showed that the three major metabolites of the ethyl acetate extract of *S. argel* leaves were kaempferol with 0.1% yield, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (astragalin) with 6.0% yield and kaempferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl (Kaempferol 3-O-neohesperidoside) with 16% yield.

Chapter 4: Synthetic study of Kaempferol 3-O-neohesperidoside

Kaempferol 3-O-neohesperidoside has been isolated from *S. argel*. Synthesis of such compounds was achieved by synthesis of the disaccharide bromide **30** then aglycone flavonol. Disaccharide bromide **30** would be synthesized from the glucosyl acceptor **27** and rhamnosyl donor **28** promoting by the Lewis acid TMSOTf. In this chapter, rhamnosyl donor **28** was synthesized from the known rhamnose in excellent yield (95 %) as a pure α anomer. Glucosyl acceptor synthesized by the epoxidation of the commercial 3,4,6-Tri-O-benzyl-D-glucal **26** by *m*CPBA-KF forming a mixture of pure sugar epoxide **48** in good yield 80% and high stereoselectivity (α/β = 6/1) when using 1:5 molar ratio of **26**: *m*CPBA-KF. In addition, the reaction conditions of the preparation of *m*CPBA-KF were optimized and good results were achieved when using 1:4 molar ratio *m*CPBA:KF in anhydrous CH_2Cl_2 . Thereafter, **48** ring opening with acetic acid led to form glycosyl acceptor **27** which is successfully glycosylated with the rhamnose donor **28** in the presence of TMSOTf furnishing a mixture of the disaccharide **29** in 60% (α/β = 1/2) which is easily transformed to pure α anomer of disaccharide bromide **30** in 12% using HBr/AcOH (25%). Also, **30** was successfully synthesized for the first time from disaccharide *m*-chlorobenzoate **47** in 16%. **47** is also synthesized for the first time in this study by the glycosylation reaction of 1-O-*m*-chlorobenzoyl-3,4,6-tri-O-benzyl-D-glucopyranose **43** and rhamnosyl TCA donor **28** using TMSOTf as glycosidic agent at -20 °C for 30 min yielded 32% (α/β = 1/4) of **47**.

氏名	HANAA HASSAB ELRASOUL ABDELKAREEM MOHMED		
論文 題目	Isolation and identification of the metabolites of Sudanese medicinal plants and synthesis of flavonoid glycosides (スーダン産薬用植物の代謝物の単離と同定およびフラボノイド配糖体の合成)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	久 世 雅 樹
	副 査	教 授	杉 本 幸 裕
	副 査	教 授	宇 野 知 秀
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
<p>本研究では、スーダンに自生し、古来より薬用および有用植物として利用されてきた二つの植物 (<i>Striga hermonthica</i> および <i>Solenostemma argel</i>) に着目した。<i>S. hermonthica</i> は根寄生植物ストライガとして知られ、スーダンの穀物収量を減らし、大きな農業被害を引き起こしている。ストライガの有用物質を見出し、ストライガに市場価値を付与することができれば、除草によるストライガ防除が期待できる。そこで、ストライガの有用物質を天然物化学的手法により抽出し、精製、単離、構造決定することを本研究の目的とした。また、同じ研究手法を <i>S. argel</i> の有効成分の特定へと展開することも目的とした。さらに、得られた活性物質の化学合成による標品の合成にも取り組んだ。</p> <p>第1章では、<i>Striga hermonthica</i> および <i>Solenostemma argel</i> について概説している。</p> <p>第2章では、<i>Striga hermonthica</i> の酢酸エチル抽出物から、主要な二次代謝産物を精製・単離し、分光機器による解析の結果、その構造がフラボノイドであったことが述べられている。紫色の花を咲かせる魔女の雑草として知られる <i>S. hermonthica</i> は根寄生植物であり、イネ (<i>Oryza sativa</i> L.)、モロコシ (<i>Pennisetum glaucum</i> L. leeke)、トウモロコシ (<i>Zea mays</i> L.) とソルガム (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) に寄生する。穀物生産の収量を妨げる雑草ではあるが、<i>S. hermonthica</i> はアフリカの一部の地域において薬用植物として知られている。ハンセン病、消化性潰瘍、肺炎などの多くの病気を治療するために何年もの間、民間療法で使用されてきた。この章では、<i>S. hermonthica</i> に含まれる主要なフラボノイドの化学構造を決定した。スーダンで収集した <i>S. hermonthica</i> を室温で乾燥させた後、粉碎して得られた乾燥粉末を2つの抽出技術で抽出した。まず、MeOH 溶液を濃縮し20%の収率で粗抽出物を得た。次に酸性および塩基性条件で、液-液分離による粗抽出物の分離、続いて分取薄層クロマトグラフィー (TLC) による精製により、二種のフラボノイドを単離した。これらを核磁気共鳴装置 (NMR) で分析し、フラボン誘導体である、chrysoeriol (総収率 0.01%) と apigenin (総収率 0.003%) であることが判明した。次に、加熱しない条件下における抽出について検討した。乾燥粉末を70%の水性メタノールに室温で7日間浸し、濃縮したところ20%の収率で粗抽出物を得た。収量を比較した結果、加熱抽出 (50℃) と非加熱抽出 (室温) では同じ収量の抽出物を与えることがわかった。得られた非加熱抽出物を20%の水性エタノールで溶解し、中性条件下で液-液分配により、疎水性画分 (酢酸エチル抽出物) を得た。酢酸エチル抽出物中のフラボノイドは、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと TLC によって精製および単離した。NMR による解析の結果、chrysoeriol (総収率 0.003%)、apigenin (総収率 0.025%)、luteolin (総収率 0.004%)、および apigenin 7-O-β-glucoside (総収率 0.003%) として同定された。これらの物質はファインケミカルの原料として需要もあることから、ストライガの利用も期待できる結果となった。また、非加熱条件での抽出、中性条件下での液-液分配がフラボノイドの分離を促進することを見出したことから、化合物を安定にかつ簡便に抽出する技術を確立することができた。</p>			

氏名	HANAA HASSAB ELRASOUL ABDELKAREEM MOHMED
<p>第3章では、<i>Solenostemma argel</i> の酢酸エチル抽出物における二次代謝産物の単離・精製について述べられている。<i>S. argel</i> は、スーダンの一部の地域で薬用植物としてよく知られており、多くの有用な二次代謝産物が含まれているため、鎮痙薬、抗糖尿病薬、抗炎症薬として使用されている。この章では、<i>S. argel</i> 葉の酢酸エチル抽出物における主要な二次代謝産物を特定および定量した。<i>S. argel</i> の乾燥した葉を浸軟させて抽出し、液-液分配によって抽出をさらに進めた。得られた酢酸エチル抽出物は、クロマトグラフィー技術（シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取 TLC）の組み合わせを使用して精製および単離された。単離された化合物の構造は、赤外吸収スペクトルおよび NMR を使用して解析し、その化学構造を同定した。その結果、<i>S. argel</i> の葉から得られた酢酸エチル抽出物の三つの二次代謝産物が、kaempferol（総収率 0.1%）、kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside（astragalin）（総収率 6.0%）、および kaempferol-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-glucopyranosyl（総収率 16%）であった。<i>S. argel</i> には Kaempferol 配糖体が多く含まれており、kaempferol 類はがん、心血管疾患などの発生のリスクを低減させる効果があり、さらにその抗酸化作用により様々な生物活性を示すことが知られている。こうした kaempferol 類が多く含まれていることが、<i>S. argel</i> が薬草として利用されてきた理由であることが明らかになった。</p> <p>第4章では kaempferol 3-O-neohesperidoside の合成研究について述べられている。Kaempferol 3-O-neohesperidoside は <i>S. argel</i> から単離された化合物である。この化学合成は、臭素化された二糖とアグリコンであるフラボノールとを結合させることで一般に合成される。臭素化された二糖は、グルコシルアクセプターとラムノシルドナーとから合成され、ルイス酸であるトリメチルシリルトリフラート（TMSOTf）によって活性化することができる。この章では、この合成手法に基づいた化学合成研究を展開した。ラムノシルドナーは、既知のラムノースから純粋な α-アノマー体として優れた収率（95%）で合成できた。市販の 3,4,6-トリ-O-ベンジル-D-グルカルを m-クロロ安息香酸（mCPBA）-KF（5 等量）でエポキシ化したところ、グルコシルアクセプターである糖エポキシドを 80% の高収率と高い立体選択性（α/β = 6/1）で得ることができた。さらに、mCPBA-KF の調製の反応条件についても精査した。無水のジクロロメタン中で 1 : 4 のモル比で mCPBA : KF を使用すると良好な結果が得られことが判明した。その後、糖エポキシドを酢酸で開環するとグリコシルドナーが生成し、TMSOTf の存在下で、ラムノースドナーとのグリコシル化反応が進行し、目的とする二糖を 60%（α/β = 1/2）の収率で得ることに成功した。HBr / AcOH（25%）で処理すると、12% の収率で臭素化二糖の純粋な α-アノマー体を得ることができた。また、臭素化二糖は、二糖の mCPBA 付加体から 16% の収率で合成することにも成功した。この二糖の mCPBA 付加体は、3,4,6-トリ-O-ベンジル-D-グルコピラノースの mCPBA 付加体と、ラムノースドナーとを、TMSOTf の存在下でのグリコシル化反応によって合成でき、-20℃で 30 分間の反応により、32%（α/β = 1/4）の収率で得ることができた。以上の結果により、<i>S. argel</i> に含まれる kaempferol 類の標品を化学合成するルートを mCPBA-KF を新たに採用することで効率的な経路へと改善することができた。</p>	
<p>本研究では、スーダンで古来より薬用・有用植物として利用されてきた二つの植物（<i>Striga hermonthica</i> および <i>Solenostemma argel</i>）に着目し、これらに含まれる二次代謝産物について天然物化学的研究を展開してきた。抽出・精製条件について最適化し、フラボノイド誘導体の構造を決定することに成功している。また、kaempferol 類の化学合成について検討した結果、mCPBA-KF を用いたエポキシ化により安定にグルコシルアクセプターを得る手法を見出し、kaempferol 類の標品を化学合成するルートをより効率的に改善することに成功している。これらの成果は、根寄生植物であるストライガに市場価値を与え、除草による防除を実現するために重要であり、スーダンにおける有用植物の研究にも大きく貢献できるものであり、化学合成の研究内容も含めて、価値のある知見の集積であることが認められる。よって、学位申請者の HANAA HASSAB ELRASOUL ABDELKAREEM MOHMED 氏は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。</p>	