

TBDMS 基で保護した求核体を用いたプロシアニジン-B3 アナログの
立体選択的合成研究
Stereoselective Synthesis of Procyanidin-B3 Analogues Using the TBDMS
Protected Nucleophile

岡本泰輔*, 石原沙也加*, 山本郷湖*, 植西譲二*, 土井翔馬*, 岡本修平*, 川崎崇**,
中島範行***, 齊藤安貴子*

Taisuke Okamoto*, Sayaka Ishihara*, Kyoko Yamamoto*, Joji Uenishi*,
Syoma Doi*, Syuhei Okamoto*, Takashi Kawasaki**, Noriyuki Nakajima***,
Akiko Saito*

Abstract

The proanthocyanidins are known as condensed tannins and/or oligomeric flavonoids, and their many biological activities, powerful antioxidant activity, free-radical-scavenging activity and an anti-tumor-promoting activities. Proanthocyanidins have been obtained from many kinds of plants, but because they are usually obtained as a complex mixture of structurally related compounds, it is very difficult to isolate them in a pure form. Consequently, we have developed efficient synthetic methods leading to proanthocyanidins with a high level of purity and stereoselectivity for biological assay.

We reported here the synthesis of procyanidin-B3 analogues using TBDMS protected nucleophile derived from (+)-catechin. Condensation of (2*R*,3*S*,4*S*)-5,7,3',4'-tetra-*tert*-butyldimethylsilyloxyflavan with (2*R*,3*S*,4*S*)-3-acetoxy-5,7,3',4'-tetrabenzoyloxy-4-(2''-ethoxyethoxy)flavan in the presence of TMSOTf at -40°C afforded procyanidin-B3 analogues as a single isomer.

1. はじめに

私たちは、呼吸により空気中の酸素を取り込んで有機物を酸化し、エネルギーを取り出して生命活動を維持している。すなわち、酸素は生物にとって不可欠な気体といえる。しかし一方で、その過程でわずかに生じる活性酸素やフリーラジカルは反応性に富み、細胞や遺伝子を傷つけ、癌・生活習慣病・老化などの原因の一つになることが指摘されてきた。このような背景から、強い抗酸化活性や優れたラジカル消去作用を持つ小分子化合物の探索が盛んにおこなわれている。特に、生体内活性酸素やフリーラジカルの消去能を持つ食品や、その成分が大きな注目を集めている¹⁾。

プロアントシアニジンは、お茶やカカオ等の嗜好品、大豆や小麦、古代米等の穀物、ブドウやリンゴ、柿等の果物類、さらには、スギなどの樹木の樹皮などにも含まれ、一般にはポ

*大阪電気通信大学工学部 応用化学科

**京都大学 生存圏研究所

***富山県立大学 生物工学科

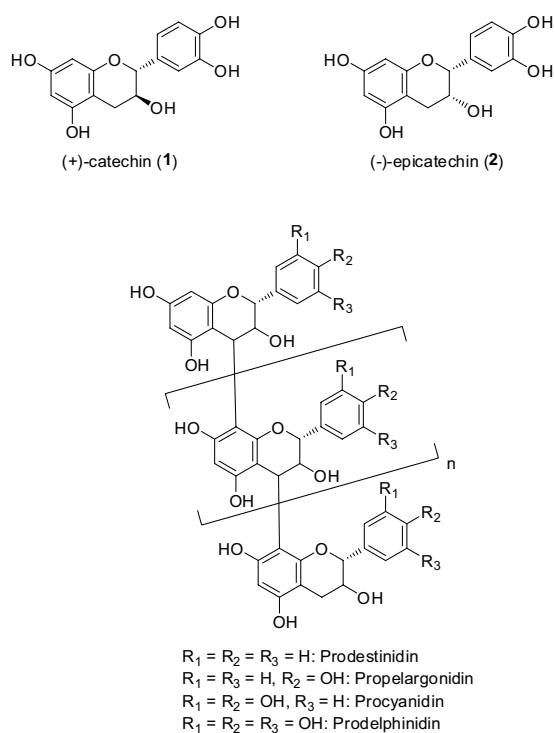


Figure 1. Structure of proanthocyanidins

いる⁵⁾。これまでに植物から様々なプロアントシアニジンが単離され、その構造が決定されている⁶⁾。プロアントシアニジンは生活の中で非常に身近な化合物であり、一般にも知られている化合物であるが、その生物活性、および、活性発現機構に関する研究はほとんど進んでいない。その主な理由として、①植物体内において様々な異性体が存在すること、②ガロイル基や糖、その他の官能基によって修飾を受けた化合物の混合物であり、それぞれを分離する事が困難なこと、③植物種によって含まれるプロアントシアニジンを構成する単位構造が異なるため、様々な構造を持つプロアントシアニジンを同時に入手する事が困難なこと、④同一の植物から得られるプロアントシアニジンでも、オリゴマーの長さが異なる化合物の混合物であること、等があげられる。もちろん、最近の分析機器の進歩や分離技術の向上により様々な化合物の単離が進んではいないが、植物によって得られる化合物が異なるうえ、含有量も異なることなどから、包括的な研究は進行していないと言ってもよい。合成研究も古くから行われているが、反応性や選択性の検討が不十分であるため、多くの生成物の中から目的化合物を分離・精製する必要が生じ生物活性試験に充分量の確保は非常に難しい。さらに、NMR測定における回転異性体の存在、ピークのブロードニング現象は構造決定を複雑にしてきた。このブロードニング現象は低温でのNMR測定によって解消する事が報告され、リンゴから単離された数種のプロアントシアニジンの低温NMR測定を用いた構造決定が報告されている⁷⁾。

このような理由からプロアントシアニジン類の詳細な構造 - 活性相関研究はほとんど行われてこなかった。そこで我々は、天然に存在するプロアントシアニジンの大部分を占めるプ

リフェノール化合物として良く知られている²⁾。³⁾ (+)-catechin (1)や(-)-epicatechin (2)のようなフラバン-3-オール類が縮合してオリゴマー化した構造を基本骨格に、様々な修飾や変換を受けて実に多くの類縁体を持ち、「プロアントシアニジン」という総称で呼ばれる。また、プロアントシアニジンは、縮合部分である炭素-炭素結合の開裂により、赤色系の色素であるアントシアニジンを生成する化合物群である⁴⁾。また、生成する色素の構造により、デスティニジン、ペラルゴニン、シアニジン、デルフィニジンを生成するものをそれぞれ、プロデスティニジン、プロペラルゴニン、プロシアニジン、プロデルフィニジンと呼ぶ (Fig. 1)。

プロアントシアニジンの抗酸化活性は有名であるが、それ以外にも、抗腫瘍活性、動脈硬化抑制活性、発がん抑制作用、育毛活性、美白効果等、様々な生物活性を持つことが確認されて

ロシアニジン類を標的化合物とし、その C4-C8 位間の結合体 ([4-8]結合型プロシアニジンオリゴマー) の系統的な構造 - 活性相関研究を行う事を目的とし、高収率・立体選択的な合成法の開発を進め、様々な生物活性試験による構造 - 活性相関研究を行ってきた⁸⁾。本論文では、縮合反応で用いる求核体の保護基を TBDMS (*tert*-butyldimethylsilyl)基にする事で、これまで行ってきた Bn (benzyl)保護体よりも高温の条件下において立体選択的に縮合反応を行う事が可能であることを見出したので報告する。

2. TBDMS 基を保護基として用いたプロシアニジン - B3 の立体選択的合成

2-1. Bn 基を保護基として用いたこれまでの合成研究

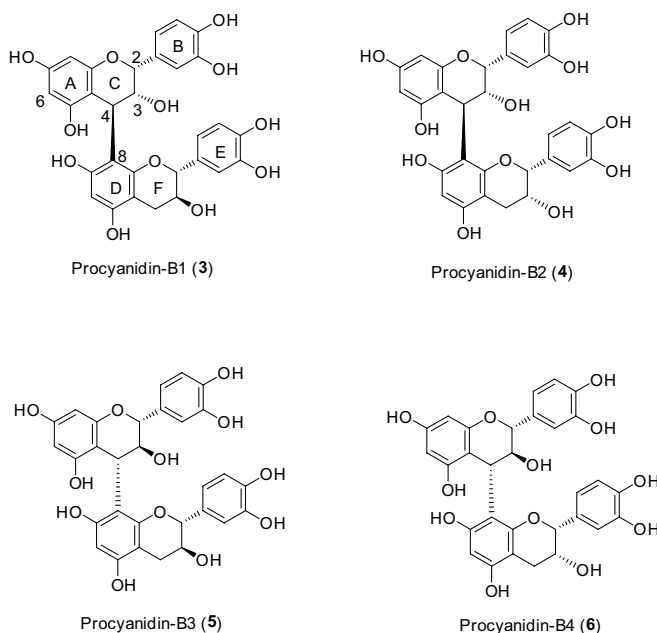
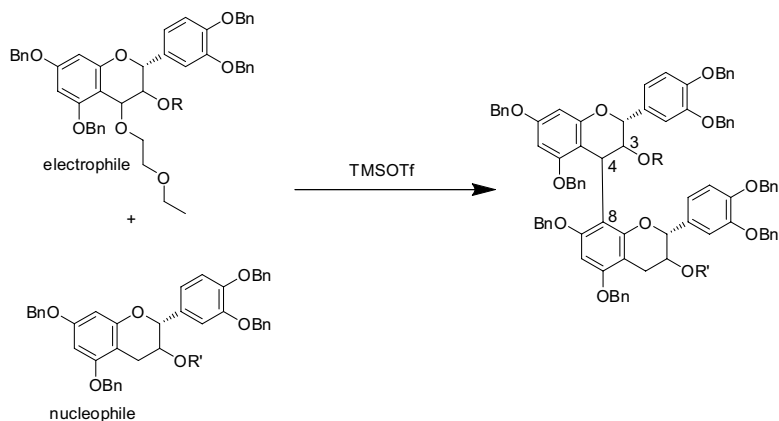


Figure 2. Structure of procyanidin-B series



Scheme 1. Stereoselective synthesis of procyanidin oligomers

プロシアニジンは単位構造によってシリーズ化されており、[4-8]結合型プロシアニジン 2 量体はプロシアニジン - BX (X は数字) と呼ばれる。なかでも B1~4 は、食品や漢方等に多く含まれている事でも知られている。

Figure 2 に示したように、プロシアニジン - B シリーズは(+)-catechin (1) と (-)-epicatechin (2) の組み合わせで構成されており、この 4 種類が基本骨格となり様々な修飾を受け植物体内で存在している。プロシアニジン - B1 (3) や B2 (4) はリンゴなどの果物中⁹⁾、B3 (5) はブドウやワインなど¹⁰⁾、B4 (6) はワレモコウ¹²⁾等に含まれるポリフェノール化合物として知られている。我々はこれまでに修飾化合物を含む B1 (3) から B4 (6) までの化合物について、1 と 2 を用い立体選択的な合成研究に成功してきた。

我々が開発した合成法の概略を Scheme 1 に示す。フェノール性水酸基を Bn 基で保護し、4 位にエトキシエチル基を導入した求電子体 (electrophile) と、同じくフェノール性水酸

基を Bn 基で保護した求核体 (nucleophile) を混合し, TMSOTf (Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate) をルイス酸として縮合反応させることで 2 量体が高収率で得られる. 求電子体と求核体をそれぞれ **1**, または, **2** から誘導する事でプロシアニジン - B1 (**3**) から B4 (**6**) が合成できる. 一方, 未だ問題も残っている. B1 (**3**) や B2 (**4**) の合成では 3,4-*trans* 体のみ得られるが, B3 (**5**) や B4 (**6**) の合成では 3 位の修飾にも影響されるが, わずかにジアステレオマーである 3,4-*cis* 体が生成する. この場合, カラム等の操作でジアステレオマーを除くことができないので, 再結晶や誘導體化によって 3,4-*trans* 体のみを純粋に取り出してきた. このジアステレオマーの生成を抑えることが可能であれば, さらに効率的な合成法となると考えられる.

なぜ, プロシアニジン - B3 と B4 だけジアステレオマーが生成するのか, 我々は Figure 3 のように考えている.

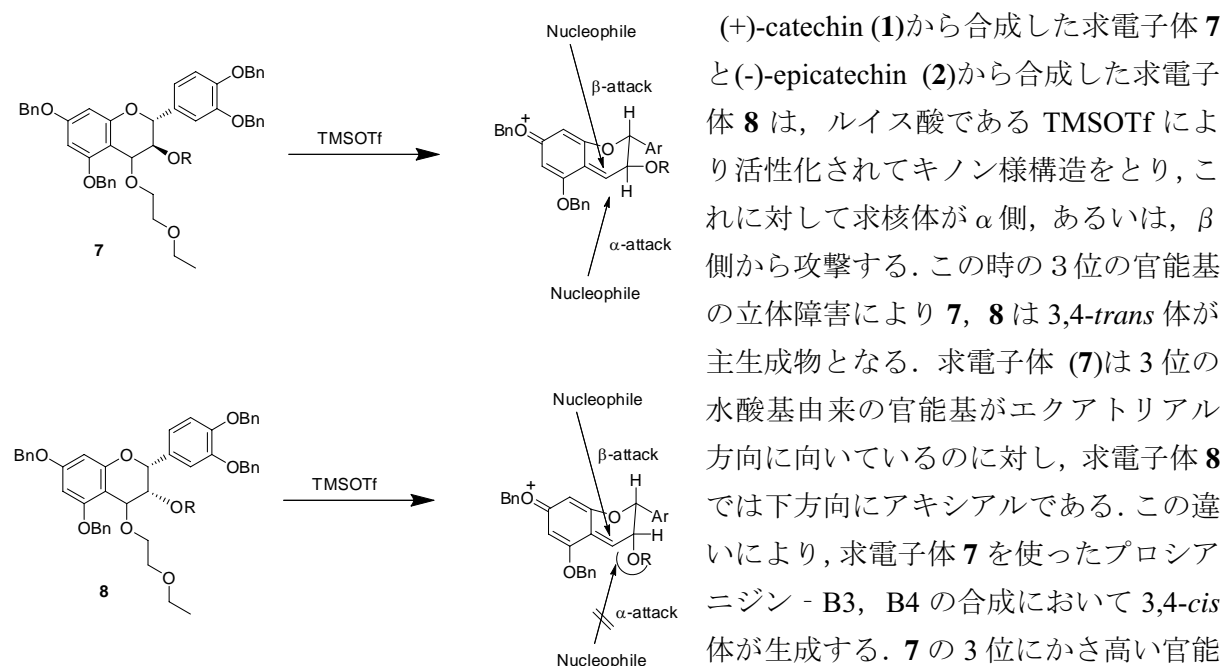


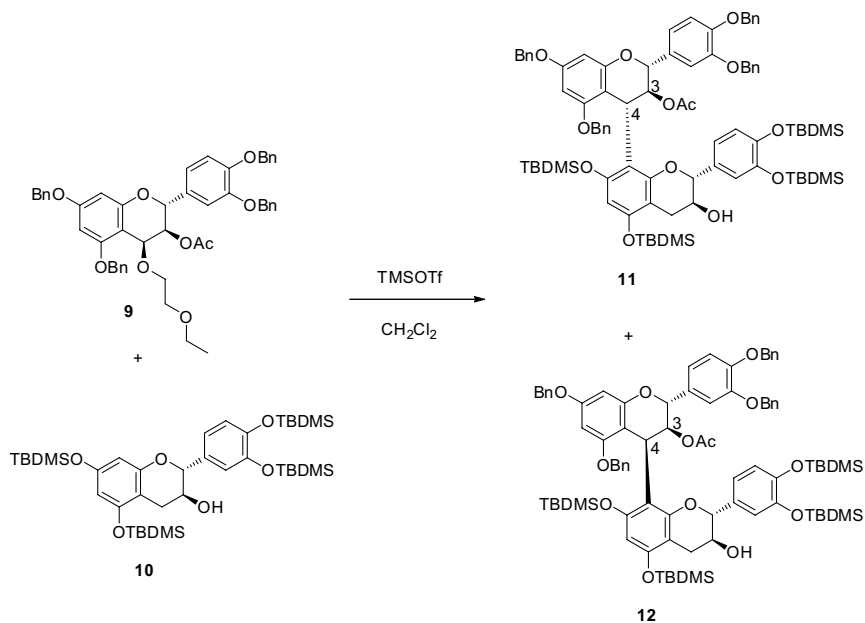
Figure 3. Stereoselective condensation process

(+)-catechin (**1**) から合成した求電子体 **7** と (-)-epicatechin (**2**) から合成した求電子体 **8** は, ルイス酸である TMSOTf により活性化されてキノン様構造をとり, これに対して求核体が α 側, あるいは, β 側から攻撃する. この時の 3 位の官能基の立体障害により **7**, **8** は 3,4-*trans* 体が主生成物となる. 求電子体 (**7**) は 3 位の水酸基由来の官能基がエクアトリアル方向に向いているのに対し, 求電子体 **8** では下方向にアキシアルである. この違いにより, 求電子体 **7** を使ったプロシアニジン - B3, B4 の合成において 3,4-*cis* 体が生成する. **7** の 3 位にかさ高い官能基を導入しておくと, 3,4-*cis* 体の生成が抑えられることも確認している.

2-2. TBDMS 基を保護基とした反応の試み

上述のように, 求電子体の 3 位にかさ高い官能基を導入する事でジアステレオマー生成が抑えられるが, 3 位に大きな官能基を導入すると縮合後に脱保護するのが困難であることもわかっている. 一般的に容易に脱保護できると考えられるアセチル基でさえ, 非常に反応条件を厳しくしなければ脱保護できない程である. そこで我々は, 求電子体の 3 位ではなく, 求核体のフェノール性水酸基にかさ高い保護基を導入する事で立体選択性を向上させる検討を進めた.

実際には, 求核体のフェノール性水酸基に Bn 基よりもかさ高い TBDMS 基を導入した. TBDMS 基はフッ素や酸で脱保護できる汎用性の高い保護基として知られている. これを用いて縮合反応を行った結果を Scheme 2 と Table 1 に示した.



Scheme 2. Condensation studies of electrophile **9** and TBDMS protected nucleophile **10** in the presence of TMSOTf

Table 1. Condensation studies of **9** and **10**

Entry	Temp. °C	Coupling Yield, %
1	-78	38
2	-40	71
3	-20	53

これまでの我々の研究により、Bn 基で保護した求核体を用いた場合 3,4-*trans* 体が優先的に得られ、そのジアステレオ選択性は-78°C において 96%*d.e.*である事を確認している。それをふまえ、まず-78°C で縮合反応を行った。フェノール性水酸基を TBDMS 基で保護した求核体 **10** と、3 位をアセチル基で保護した求電子体 **9** を混合し TMSOTf 存在下縮合反応を行った。まず、-78°C において縮合反応を行った。求電子体 **9** と求核体 **10** の反応により、得られた生成物は TLC 上で 2 種類確認できた。しかし、この 2 化合物は、カラムクロマト、分取 TLC 等でも分離できず、平衡関係にあると考えられた。そこで、分離せずに混合物のまま 1D-NMR、および、2D-NMR による構造解析を行った。Figure 4 に得られた生成物の 2D-NMR (COSY) スペクトルの一部を示した。2D-NMR より縮合反応が起こった 2 量体であることが確認でき、さらに C3 位が 5.90 ppm と 6.04 ppm に 2 種類存在し 2 化合物の混合物であることが確認された。2 種類の化合物の混合比率は、積分値から 0.52 : 0.48 であった。両化合物において、それぞれ 2-3 位、3-4 位のカップリング定数は 9.5 Hz であった。これは、2-3 位、3-4 位がそれぞれ

れ *trans* 配置であることを示している. また, その他のピークについても, これらの両方の化合物の構造が同じである事が示唆された. 混合している 2 化合物が平衡関係にある事, および, 2-3 位, 3-4 位がそれぞれ *trans* 配置である事から, 縮合反応による生成物は **11** であり, [4-8]結合間の回轉異性体が NMR において検出されていると結論付けられた. この場合の回轉異性体は TLC 上で一時分離し, 時間の経過とともに平衡状態となったと考えられる. この現象は Bn 基で保護していた場合は観察できなかった現象であり D7 位の TBDMS 基の影響だと考えている. 我々は, 回轉異性体と生物活性の関係にも興味を抱いており, この結果は D7 位の修飾で回轉異性体を分離できる可能性を示唆していると考えている.

Table 1 に示したように -78°C における収率は 38% と低収率であったが 3,4-*trans* 型が選択的に得られた事は非常に興味深い. そこで, 反応温度を -40°C, -20°C にし同様な実験を行った. その結果, -40°C において収率が 71% まで上昇し, 3,4-*trans* 型の化合物 **11** が選択的に得られた. 一方, -20°C においては, 複雑な混合物を与え, 収率も 51% まで低下した.

前述したように, Bn 基で保護した求核体を用いた場合 -78°C で 96% d.e. のジアステレオ選択性が得られるが, 一部 3,4-*cis* 体が生成する. 求核体に TBDMS 保護体を用いた場合, -40°C においてもジアステレオマーの生成は認められなかった. これにより, 求核体を TBDMS 基で保護して縮合反応を行う事が非常に有効であることが確認された. また, 上下ユニットの保護基が異なる事は, さらなるアナログ合成に様々な可能性をもたらすと考えられる. この結果は今後, 長鎖のオリゴマー合成や様々な類縁体の合成に応用していく予定であり, さらなる条件検討を進めている.

3. 実験方法

本実験に際し, ^1H -核磁気共鳴スペクトルは Varian Inova 500 NMR Spectrometer (500 MHz) を用いた. 測定は CDCl_3 で行い, 内部標準として TMS (tetramethylsilane) を用い, 化学シフトは δ 値 (ppm) で表し結合定数は J 値で表した. 分裂様式は s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet と略した. カラムクロマトグラフィーは, 関東化学 Silica Gel 60 N (spherical, neutral,

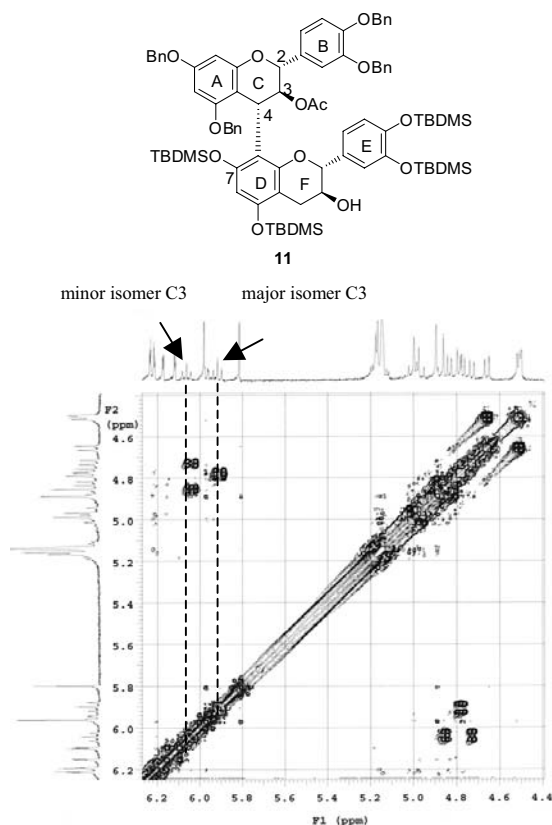


Figure 4. COSY NMR spectrum of the catechin dimer **11**

63-210 μm)を用いて flash 法によって行った。分取 TLC は、メルク PLC Silica Gel 60 F₂₅₄ (0.5 mm, 20 x 20 cm)を用いた。反応溶媒は、特に記載のない限り市販の特級溶媒を用いた。

[4,8]-2,3-*trans*-3,4-*trans*-2'',3''-*trans*-5,7,3',4'-tetra-*O*-benzyl-5'',7'',3''',4'''-tetra-*O*-TBDMS-(+)-catechin(-)-epicatechin (**11**)

アルゴン雰囲気下、求電子体 **9** (0.052 g, 0.067 mmol), 求核体 **10** (0.20 g, 0.27 mmol) を脱水ジクロロメタン (20 mL) 溶液に溶解し、 -40°C で TMSOTf (0.16 mL, 0.080 mmol) を滴下し、5 分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウムを加え反応を止め室温に戻した。CHCl₃ で抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。ろ過・濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : EtOAc = 10 : 1 \rightarrow 8 : 1 \rightarrow 7 : 1 \rightarrow 6 : 1 \rightarrow 5 : 1 \rightarrow 4 : 1 \rightarrow 3 : 1 \rightarrow 2 : 1 \rightarrow 1 : 1 \rightarrow 1 : 2) にて分離し、オリゴマー**11** (0.068 g, 0.047 mmol, 71%) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 0.52: 0.48 mixture of rotational isomers) major: 7.50-7.25 (13.0H, m), 6.66 (0.52H, dd, $J = 2.5, 8.5$ Hz), 6.21 (0.52H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.19 (0.52H, d, $J = 2.5$ Hz), 5.96 (0.52H, s), 5.90 (0.52H, t, $J = 9.5$ Hz), 5.19-4.85 (3.12H, m), 4.78 (0.52H, d, $J = 10.0$ Hz), 4.76 (0.52H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.65 (0.52H, d, $J = 10.5$ Hz), 4.50 (0.52H, d, $J = 10.5$ Hz), 3.56 (0.52H, dddd, $J = 2.5, 6.0, 9.0, 10.0$ Hz), 3.22 (0.52H, d, $J = 9.0$ Hz), 2.86 (0.52H, dd, $J = 6.0, 15.5$ Hz), 2.20 (0.52H, dd, $J = 10.0, 15.5$ Hz), 2.07 (1.56H, s), 1.35 (0.52H, d, $J = 2.5$ Hz), 1.02-0.87 (18.72H, m), 0.25-0.00 (12.48H, m); minor isomer: 7.50-7.25 (11.52H, m), 6.63 (0.48 H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.36 (0.48 H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.15 (0.48 H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.10 (0.48 H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.04 (0.48 H, t, $J = 9.5$ Hz), 5.95 (0.48 H, dd, $J = 2.5, 8.5$ Hz), 5.80 (0.48H, s), 5.19-4.85 (3.84 H, m), 4.82 (0.48 H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.72 (0.48 H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.10-3.98 (0.48H, m), 2.72-2.57 (0.96H, m), 2.07 (1.44H, s), 1.32-1.26 (0.48H, m), 1.02-0.87 (17.28H, m), 0.25-0.00 (11.52H, m).

4. まとめ

立体選択的合成が難しい(+)-catechin 2 量体：プロシアニジン - B3 の合成において、求核体のフェノール性水酸基を TBDMS 基で保護してかさ高くすることにより、縮合時に問題となっていた 3,4-*cis* のジアステレオマーの生成を抑える事が可能となった。これにより、さらに効率的なプロアントシアニジン化合物の合成研究が可能となった。さらに、TBDMS 基の導入により、回轉異性体を分離できる可能性が示唆された。この現象は求核体に Bn 基保護体を用いた時には見られなかった現象である。プロアントシアニジン化合物において、回轉異性体の比率と生物活性の関係についての研究例は未だ存在しない。本研究成果は、求核体にかさ高い官能基を導入することで回轉異性体を分離し、回轉異性体による活性への影響を研究可能なサンプルの合成を成功に導く成果と言える。現在、さらなる検討、および、合成研究を進めており、今後プロアントシアニジンの生物活性発現機構や構造 - 活性相関研究を行うための基礎となる技術の開発ができたと考えている。

謝辞

本研究は、大阪電気通信大学 2010 年度スタートアップ研究費、および、財団法人農芸化学研究奨励会第 38 回研究奨励金の助成を受けて実施いたしました。

参考文献

- [1] 田中隆, 化学と生物, **40**, 513 (2002)
- [2] J. B. Harbone, *The flavonoids: Advances in research from 1986*. Chapman and Hall: London, 1993.
- [3] J. B. Harbone FRS, H. Baxter, *The Handbook of Natural Flavonoids*, John Wiley & Sons, New York, 1999
- [4] L. J. Porter, *The Flavonoids*, ed. by J. B. Harbone *et al.*, Chapman and Hall Ltd., London, 1998, p21.
- [5] (a) 片岡茂博, 有賀敏明, *ファルマシア*, **34**, 998 (1998); (b) 有賀敏明, 細山浩, 徳武昌一, 山越純, *日本農芸化学会誌*, **74**, 3 (2000).
- [6] (a) R. S. Thompson, D. Jacques, E. Haslam, R. J. N. Tanner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1387 (1972); (b) R. Eastmond, *J. Inst. Brew.*, **80**, 188 (1974); (c) R. W. Hemingway, L. Y. Foo, L. J. Porter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1209 (1982); (d) W. R. Bergmann, M. D. Barkley, R. W. Hemingway, W. L. Mattice, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6614 (1987); (e) J. M. R. Solva, J. Rigard, V. Cheynier, A. Chemina, M. Mountounet, *Phytochemistry*, **30**, 1259 (1991); (f) T. R. W. Hatano, R. W. Hemingway, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1035 (1997).
- [7] T. Shoji, M. Mutsuga, T. Nakamura, T. Kanda, T. H. Akiyama, H. Y. Goda, *J. Agric. Food. Chem.*, **51**, 3806 (2003).
- [8] (a) A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 1764 (2002); (b) A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, *Tetrahedron*, **58**, 7829 (2002); (c) A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 5449 (2003); (d) A. Saito, N. Nakajima, A. Tanaka, M. Ubukata, *Heterocycles*, **61**, 287 (2003); (e) A. Saito, N. Nakajima, N. Matsuura, A. Tanaka, M. Ubukata, *Heterocycles*, **62**, 479 (2004); (f) A. Saito, A. Tanaka, M. Ubukata, N. Nakajima, *Synlett*, 1069 (2004); (g) A. Saito, A. Tanaka, M. Ubukata, N. Nakajima, *Synlett*, 2040 (2004); (h) A. Saito, Y. Doi, A. Tanaka, N. Matsuura, M. Ubukata, N. Nakajima, *Bioorganic Med. Chem.*, **12**, 4783 (2004); (i) A. Saito, M. Emoto, A. Tanaka, Y. Doi, K. Shoji, Y. Mizushina, H. Ikawa, H. Yoshida, N. Matsuura, N. Nakajima, *Tetrahedron*, **60**, 12043 (2004); (j) A. Saito, Y. Mizushina, H. Ikawa, H. Yoshida, Y. Doi, A. Tanaka, N. Nakajima, *Bioorganic Med. Chem.*, **13**, 2759 (2005); (k) 齊藤安貴子, 中島範行, *有機合成化学協会誌*, 63, 982 (2005); (l) H. Sakuda, A. Saito, Y. Mizushina, H. Yoshida, A. Tanaka, N. Nakajima, *Heterocycles*, **67**, 175 (2006); (m) Ki. Matsubara, A. Saito, A. Tanaka, N. Nakajima, R. Akagi, M. Mori, Y. Mizushina, *DNA & Cell Biol.*, **25**, 95 (2006); (n) K. Matsubara, A. Saito, A. Tanaka, N. Nakajima, R. Akagi, M. Mori, Y. Mizushina, *Life Sciences*, **80**, 1578 (2007); (o) S. Mitsuhashi, A. Saito, N. Nakajima, H. Shima, M.

Ubukata, *Molecules*, **13**, 2998 (2008); (p) A. Saito, Y. Mizushina, A. Tanaka, N. Nakajima, *Tetrahedron*, **65**, 7422 (2009); (q) A. Saito, N. Nakajima, *Heterocycles*, **80**, 1081 (2010); (r) Y. Mizushina, A. Saito, K. Horikawa, N. Nakajima, A. Tanaka, H. Yoshida, K. Matsubara, *Frontiers in Bioscience E3*, 1337-1348 (2011).

