

サラシナショウマ属植物の含有成分に関する研究

草野 源次郎

大阪薬科大学生薬学教室, 〒569-1094 高槻市奈佐原 4-20-1

Studies on the Constituents of *Cimicifuga* Species

Genjiro KUSANO

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received March 19, 2001)

The chemical constituents of *Cimicifuga simplex* and its related species were reexamined using HPLC and high resolution spectral analysis. From *C. simplex*, *C. acerina* and *C. japonica*, a new alkaloid, 59 new cycloartane triterpene glycosides and 11 new aromatic constituents were isolated with the previously reported compounds. The latter aromatic constituents were identified in HPLC analysis of the extracts from crude drugs due to *C. dahurica*, *C. heracleifolia* and *C. foetida*. Several interesting topics in this study are reviewed about separation of unstable and closely related compounds by HPLC, rearrangement reactions, chemical conversion for confirmation of absolute configuration, isomerism in NMR solutions, X-ray crystal analysis, spectral analysis of complicated structures, isolation of glycoside malonates, high yield of enzymatic hydrolysis, specific CD curve due to a cycloart-7-ene system, and so on. Biological activities of a major glycoside, cimicifugoside, a modified triterpene, acerinol, and benzytartaric acid derivatives such as fukinic acid and cimicifugic acids were also mentioned.

Key words—*Cimicifuga* species; chemical constituent; structural elucidation; biological activity

はじめに

サラシナショウマ属植物はキンポウゲ科 (*Ranunculaceae*) に属し、北半球温帯地域に約 10 種が分布する。¹⁾ 日本にはサラシナショウマ *Cimicifuga simplex* WORMSKJORD,¹⁾ イヌショウマ *C. japonica* (THUNB.) SPRENGEL, オオバショウマ *C. acerina* (SIEB. et ZUCC.) C. TANAKA,²⁾ 中国には興安升麻 (フブキショウマ) *C. dahurica* (TURCZ. MAXIMOWICZ, 大三葉升麻 (オオミツバショウマ) *C. heracleifolia* KOMAROV, 升麻 (コウライショウマ) *C. foetida* LINNE, 米国及びヨーロッパには *C. racemosa* (L.) NUTT などが自生している。³⁾

サラシナショウマ *C. simplex* の地上部は Photo. 1 のように成長し、地下部は Photo. 2 左のようにひげ根で被われている。そのひげ根を除いた根茎 (Photo. 2, 右) はショウマ (升麻, CIMICIFUGAE RHIZOMA) として薬用に供される。日本薬局方第 13 改正の第一追補では、本種と共に *C. dahurica*, *C. heracleifolia*, *C. foetida* の根茎が升麻として規定されている。市場での生薬名はそれぞれ単

穂升麻, 北升麻, 関升麻, 西升麻である。⁴⁾

現在の国内市場品の基原植物としては、サラシナショウマ *C. simplex* は認められず、主に *C. heracleifolia*, あるいは *C. heracleifolia* と *C. dahurica* の混合品で、希に *C. foetida* の混入品が確認されると報告されている。^{5,6)}

升麻は神農本草経に上薬として収載されている。



Photo. 1. Japanese Fairy-Candles (*Cimicifuga simplex*)



Photo. 2. Underground Part (left) and Rhizoma (right) of *C. simplex*

しかし、基原植物に混乱があり、現在のサラシナショウマ属(キンボウゲ科)の数種に由来する升麻は、主に金元時代以降に珍重された生薬であると思われる。乙字湯、升麻葛根湯、補中益気湯、辛夷清肺湯、立効散などの江戸時代あるいは金元時代に創製された漢方方剤に配合され、証を考慮しながら、痔疾、感冒の初期、食欲不振、胃下垂、子宮下垂、慢性鼻炎、歯痛などに解熱、消炎、発汗効果、あるいは脾や胃の機能回復及び鎮痛効果などを期待して使われる。⁷⁾ 民間療法としては煎液を口内炎、扁桃腺の時にうがい薬として、あせもに湿布薬として、また、強肝や解毒の目的で服用される。ヨーロッパでは *C. racemosa* が鎮痛、解熱、抗炎症薬としてリュマチ、神経痛、月経不順、耳炎、発熱などに用いられる。また、更年期のうつ症状を改善するとされ、Remifemin, Cimicifuga-Oligoplex, Cimicifuga Pentakran などの製剤が市販されている。⁸⁾

サラシナショウマ属植物の成分及びエキスに関する薬理学的研究

サラシナショウマ属植物の薬理作用に関する報告としては以下のものがある。1) *C. dahurica* のメタノールエキスによる、正常体温下降、解熱、鎮痛、浮腫抑制、肛門部酢酸潰瘍抑制等の作用。また、含まれる isoferulic acid による正常体温下降、解熱、鎮痛、浮腫抑制等の作用。⁹⁾ 2) *C. simplex* のメタノールエキスによる、正常体温下降、解熱、鎮痛、肛門部酢酸潰瘍抑制、運動抑制、睡眠延長、抗痙攣等の作用。^{10,11)} 3) *C. simplex* の cimifugin による中枢神経抑制作用。¹²⁾ 4) *C. dahurica* の visamminol 及び visnagin による鎮痙作用。¹³⁾ 5) *C. simplex* の

cimicifugoside による、ヒトリンパ球の幼若化反応でのチミジンなどのヌクレオシド取り込みを阻害。¹⁴⁾ 6) 升麻のメタノールエキスによる CCl₄ 肝障害の抑制、血清 GOT, GPT 値の低下。その活性成分の1つは cimigenol xyloside であった。¹⁵⁾ 7) *C. heracleifolia* は *C. dahurica* よりも強い抗炎症作用。また、isoferulic acid が高含量であった。¹⁶⁾ 8) *C. heracleifolia* の熱水抽出煎液により、LPS 刺激ラットでの好中球走化因子産生抑制。¹⁷⁾ 9) 数種の升麻の成分である isoferulic acid と ferulic acid がインターロイキン-8 産生の抑制作用。¹⁸⁾ 10) cycloartane 系 triterpenoid がパラチロイドホルモンにより引き起こされる骨の再吸収を抑制。¹⁹⁾

サラシナショウマ属植物の成分に関する化学的研究

サラシナショウマ属植物の成分又はその誘導体については多数の報告があり、主な化合物を以下に示す。

C. simplex: cimicifugenol,²⁰⁾ khellol, ammiol, caffeic acid dimethyl ether, cimifugin,¹²⁾ ferulic acid, caffeic acid,²¹⁾ cimigol,²²⁾ dahurinol, isodahurinol, dehydroxydahurinol,²³⁾ acerinol,²⁴⁾ β -sitosterol, β -sitosterol glucoside, cimigenol, cimigenol xyloside, 25-O-methylcimigenol, cimicifugoside, friedelin.²⁵⁾

C. acerina: β -sitosterol,²⁶⁾ cimigenol,²⁷⁾ acerinol,^{24,28)} methylcimigenol,²⁹⁾ 25-O-acetylcimigenol, dehydroxy-15-O-methylcimigenol, 15-O-methylcimigenol,³⁰⁾ 25-O-methylcimigenol xyloside, 25-O-acetylcimigenol xyloside,³¹⁾ cimicifugenol,²⁰⁾ cimigol,²²⁾ dahurinol, isodahurinol, 25-O-methyldahurinol,²³⁾ O-methylcimiacerol,³²⁾ acetylshengmanol xyloside, 24-O-acetylhydroshengmanol xyloside, shengmanol xyloside.³³⁾

C. japonica: 25-O-methylcimigenol xyloside,³¹⁾ cimicifugenol,²⁰⁾ cimigol,²²⁾ cimigenol xyloside, 25-O-acetylcimigenol xyloside, 25-anhydrocimigenol arabinoside,³⁴⁾ acetylshengmanol xyloside, isodahurinol,³⁵⁾ 22-hydroxycimigenol xyloside, 24-O-acetylhydroshengmanol xyloside,³⁶⁾ shengmanol xyloside.³⁷⁾

C. dahurica: ferulic acid, isoferulic acid, caffeic acid,²¹⁾ β -sitosterol, cimigenol, dahurinol, cimigenol xyloside,³⁸⁾ visamminol, visnagin,¹³⁾ acetylsheng-

manol xyloside,³⁵⁾ cimigenol 3-*O*- α -L-arabino-
pyranoside,³⁹⁾ 25-*O*-acetylcimigenol 3-*O*- α -L-arabino-
pyranoside,³⁹⁾ (*E*)- and (*Z*)-3-(3'-methyl-2'-bu-
tenylidene)-2-indolinone,⁴⁰⁾ 24-*O*-acetylhydrosheng-
manol diglycoside.⁴¹⁾

C. heracleifolia: β -sitosterol, isoferulic acid, (*E*)-3-
(3'-methyl-2'-butenylidene)-2-indolinone, 25-*O*-
acetylcimigenol, 24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol, 7,8-
didehydrocimigenol, 25-*O*-acetyl-7,8-didehydrocimi-
genol, 3-keto-24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol, 2',4'-
O-diacetyl-24-*epi*-7,8-di-dehydrocimigenol-3-xylo-
side, 3-*O*-acetyl-24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol-3-xylo-
side, 24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol-3-xyloside, 7,8-
didehydro-24-*O*-acetylhydroshengmanol-3-xyloside,
24-*epi*-acerinol, heracleifolinol.⁴²⁾

C. foetida: 25-*O*-acetylcimigenol xyloside, 27-deoxya-
cetylactol, norvisnagin, isoferulic acid, angelicain,
isoimperatorin, 25-anhydrocimigenol-3-*O*- β -xylo-
side, acetylactol-3-*O*-arabinoside, cimicinol, cimi-
cifol, cimicidanol-3-*O*- β -xyloside, 15 α -hydroxycimi-
cidol-3-*O*- β -xyloside, foetidinol, foetidinol-3-*O*- β -
xyloside, 15 α -hydroxyfoetidinol-3-*O*- β -xyloside,⁴³⁾
cimifugin.⁴⁴⁾

C. racemosa: cimigenol, cimigenol xyloside,⁴⁵⁾
actein,⁴⁶⁾ 27-deoxyactein,⁴⁷⁾ cimicifugoside,⁴⁴⁾ cimici-
fugoside M,⁴⁴⁾ cimiracemoside A-H.⁴⁸⁾

生薬升麻: cimicifugoside H-1, H-2, H-5,⁴⁹⁾ H-3,
H-4, H-6.⁵⁰⁾

サラシナショウマ属植物との関わり

著者は約40年前にTLCを使って、植物の含有成分の予備調査を行い、多数のスポットを与えたオオバショウマ *C. acerina* の含有成分に興味を抱き、サラシナショウマ属植物の成分研究を始めた。上に列記した成分のうち、国内サラシナショウマ属植物の一部含有成分の構造と生物活性について報告してきた。その後、その含有成分は不安定で、複雑な構造は類似しており、単離が困難であることを痛感したので、この研究への若い共同研究者の参画を躊躇した。

平成2年大阪薬科大学に赴任したのを機会に、進歩改良されたHPLCを使って再挑戦することにした。NMRとMSが高性能化した時期で、トリテルペンサポニンの構造解析を中心とする本研究が若者

達の訓練に適していると考えられたからである。

1. サラシナショウマ地上部の成分研究

この研究を再開した頃には、サラシナショウマの自生地が激減したと信じられた。種子での増殖を試みたが、成功しなかった。地下部を分株することで増殖できることは分かったが、1株を数個に分けると、植物は小形になり、成長するのに数年かかると思われた。そこで、翌年の芽の形成が完了する8月に地上部を採集し、実験に供することにした。地上部の含有成分に関する情報を蓄積してから、少量の地下部を使って、含有成分を調査することにした。Chart 1とTable 1に要約したように分画し、各成分を単離した。

1-1. アルカロイド 乾燥地上部(6.1 kg)を室温時MeOHで抽出し、活性炭でクロロフィルを除き、エキス(500 g)を得た。それを*n*-BuOH可溶部(270 g)と水可溶部に分け、前者をSiO₂クロマトグラフィーに付し、アルカロイド(**1**)を淡黄色粉末として得た。**1**及びそのアセテート(**1a**)のスペクトルデータを解析し、その構造を2-hydroxy-7-methyl-9*H*-carbazole(**1**)と決定した。⁵¹⁾このアルカロイドは先に馬場らが*C. dahurica*から単離し、構造を報告した(*E*)-及び(*Z*)-3-(3'-methyl-2'-butenylidene)-2-indolinone(**2, 3**)⁴⁰⁾と関係があると思われ、Fig. 1に示すように生合成されると推定した。サラシナショウマ属植物のアルカロイドとしては、上記indolinone類と共に、*C. europaea*からcytisineがTLCで検出されたという報告⁵²⁾が見られる。**1**は新規アルカロイドであると共に、サラシナショウマ属植物から単離された最初のカルバゾールアルカロイドとなった。9*H*-carbazoleアルカロイドはanthranilic acid, mevalonic acid, tryptophanを前駆体として生合成され、⁵³⁾isoprene単位がindoleの2位に縮合した3-methyl体(又は6-methyl体)が報告されている。⁵⁴⁾**1**はisatinの3位にisoprene単位が縮合し、indolinoneを経て生合成されたと推定され、新しい生合成経路の可能性が示唆された。

1-2. トリテルペン 著者らは先にサラシナショウマの地下部からcimicifuginol(**4**)と命名したトリテルペンを得、cycloarta-7,24-dien-3 β -olであると報告した。²⁰⁾その後、M. Bermannは、著者らが報告したcimicifugosideの9,19-cyclolanost-7-en-

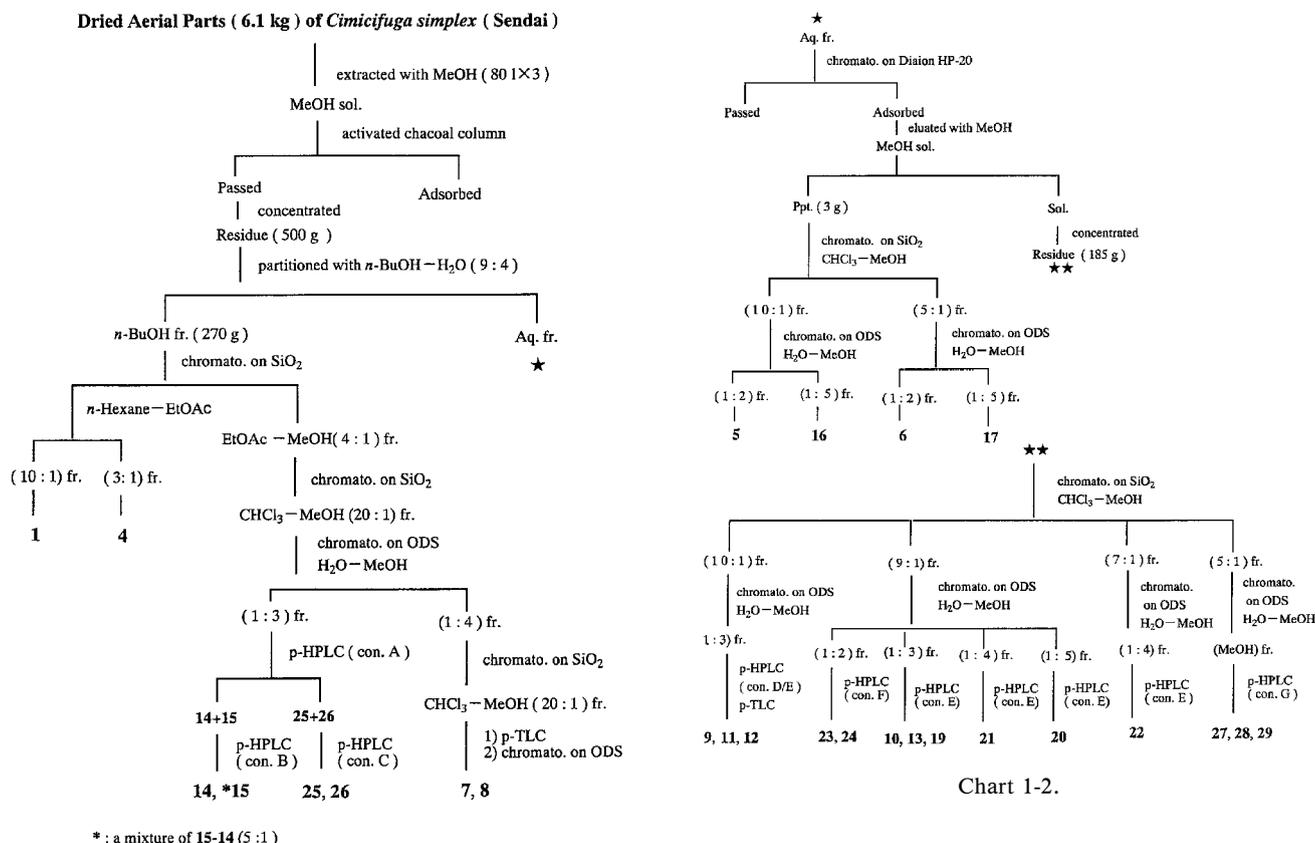


Chart 1-1. Isolation Procedure from Dried Aerial Parts of *Cimicifuga simplex*

Table 1. HPLC Conditions for Isolation of Triterpene Glycosides and Sugar Analysis

	Column mm	Solvent	Elution rate ml/min.	Column temp. °C
A	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 11 : 3)	1	40
D	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 7 : 4.5)	1	40
E	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 7 : 3)	1	40
F	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 13 : 3)	1	40
Q	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 7.15 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 7 : 3)	2	40
R	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 7.15 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (12 : 7 : 3)	2	40
S	Crest Pak C18T-5 (5 μ), i.d. 7.15 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (13 : 7 : 3)	2	40
B	YMC C8 (5 μ), i.d. 20 \times 250	MeOH-H ₂ O (70 : 30)	6.5	r.t.
C	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 20 \times 250	MeCN-H ₂ O (35 : 65), recycle	6.5	r.t.
J	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 7 : 3)	2	40
K	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 10 : 3)	2	40
M	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 12 : 3)	2	40
N	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 13 : 3)	2	40
T	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeCN-H ₂ O (32.5 : 67.5)	1	40
Y	Develosil PhA-T-5 (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeCN-H ₂ O (40 : 60)	2	40
G	Cosmosil 10 Ph (10 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 9 : 3)	1	40
O	Cosmosil 10 Ph (10 μ), i.d. 8 \times 250	MeCN-H ₂ O (30 : 70)	2	40
P	Cosmosil 10 Ph (10 μ), i.d. 8 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 10 : 3)	2	40
U	Cosmosil 10 Ph (10 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 7 : 6)	1	40
W	Cosmosil 10 Ph (10 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 10 : 3)	1	40
L	Cosmosil 5 Ph (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeCN-H ₂ O (35 : 65)	2	40
M	Cosmosil 5 Ph (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeOH-H ₂ O-MeCN (10 : 12 : 3)	1	40
X	Cosmosil 5 Ph (5 μ), i.d. 10 \times 250	MeCN-1% AcOH (40 : 35/35 : 65)	2	40
H	Lichrosorb NH ₂ (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeCN-H ₂ O (80 : 20)	1	40
I	Shodex RS-Pak DC-613 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeCN-H ₂ O (80 : 20)	1	70
V	Shodex NH ₂ P-50 (10 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeCN-H ₂ O (80 : 20)	1	45
Y	Shodex NH ₂ P-50 (5 μ), i.d. 4.6 \times 250	MeCN-H ₂ O-H ₃ PO ₄ (950 : 40 : 10)	1	47

3 β -oyl系が温和な酸性条件で3,10-epoxy-9,10-seco系に転位することに興味を抱き, cycloarta-7,24-dien-3 β -olを合成した. そこで, 著者らの4と直接比較を行い, NMRスペクトルが異なることを認め, 4はcycloarta-16,24-dien-3 β -olであると報告した.⁵⁵⁾ 今回, 地上部からcimicifugenol(4)を単離したのを機会に, スペクトルデータを解析し, M. Bermannの解析が正しいことを確認した. また, 先の報告で4を還元して得た4H体は17-*epi*-cycloartanol(4a), 4の2H-acetateを*tert*.butyl chromateで酸化して得たケト体は3 β -acetoxy-cycloarta-16(17)-en-15-one(4b)と訂正されることを確認した(Fig. 2).⁵⁶⁾

1-3. トリテルペン配糖体 アルカロイドとトリテルペンの検索後, SiO₂クロマトグラフィーの他の画分を, ODSクロマトグラフィー, 分取用HPLCをくり返すことにより分離精製した. その結果, 既知化合物(5, 9, 16)を単離し, *C. acerina*より報告^{31,35,36)}の標品と直接比較して同定すると共に, 24種の新規トリテルペン配糖体を得た. それらはcycloartane系化合物であり, D環と側鎖の構造を基に, Fig. 3に示すようにまとめられた. また, 新規配糖体はFig. 3に*印を付けると共に,

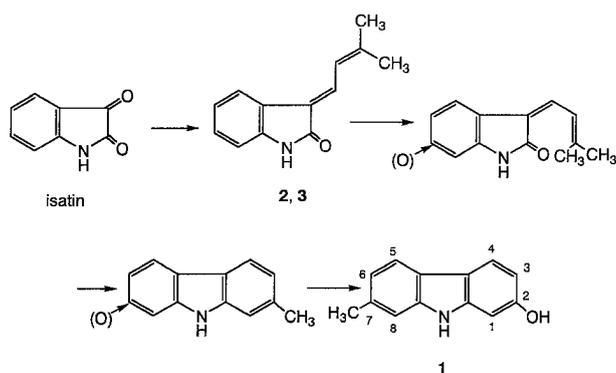


Fig. 1. Hypothetical Route to 1

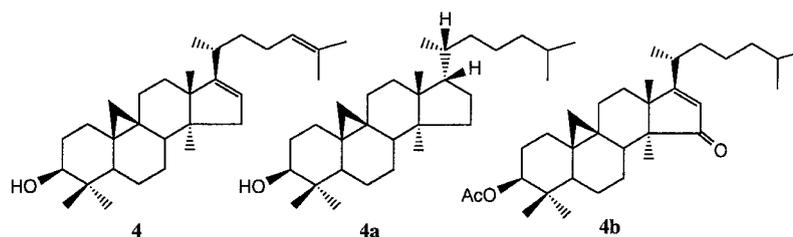


Fig. 2. Structures of 4 and Its Derivatives 4a, 4b

shengmanol系(5—8),^{57—60)} hydroshengmanol系(9—15),^{60,61)} cimigenol系(16—29),^{58,60,62)} D-seco系(30, 31)⁶³⁾に分類された. また, 地上部にはdiglycoside(6, 17, 18),^{58,63)} 1 α -hydroxy体(8, 13, 21, 22),^{59,61)} 7 β -hydroxy体(7, 10, 12, 19, 20),^{57,61)}あるいは12 β -hydroxyl体(23, 24)⁶²⁾が含まれていた.

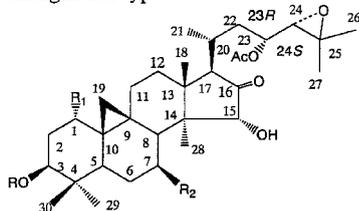
さらに, 酵素により加水分解し, 真正ゲニンを, あるいはdiglycosideからmonoglycosideを得ることができた. 得られた真正ゲニンのうち16種(7a, 8a, 10a—15a, 19a—23a)は新規化合物(*印)であった.^{57—62)}

2. サラシナショウマなどの地下部の成分

サラシナショウマの地下部のMeOHエキスをChart 2とTable 1に要約したように, ODS, SiO₂クロマトグラフィー, 分取用HPLCをくり返し分離精製し, 構造検索を行った(2-1). また, 別途, 調整したMeOHエキスをChart 3とTable 1に要約したように, ODSクロマトグラフィー, p-TLC続いてp-HPLCに付し, p-TLCの下層部より5種の新マロン酸エステル体を単離した. 地上部と同様, 地下部のトリテルペン配糖体のゲニンはcycloartane系を基本とした(2-2). これらの研究を通して, 多くの知見が得られた(2-3). さらに, MeOHエキスをChart 4に示すように, *n*-BuOH-EtOAc-水混液で振とうし, 水層を各種クロマトグラフィーに付し, 26種の水溶性芳香族成分を得た(2-4).

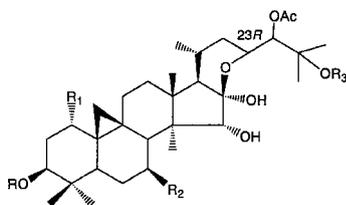
2-1. サラシナショウマ地下部のトリテルペン配糖体 今回, サラシナショウマ地下部から, 既知化合物として先に報告したcimicifugoside(51),^{25,64)} actein(52),⁶⁴⁾ 地上部より得られた化合物(14, 15, 25, 26)及び*C. heracleifolia*より単離報告された24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol 3-*O*- β -D-xylopyrano-

shengmanol type



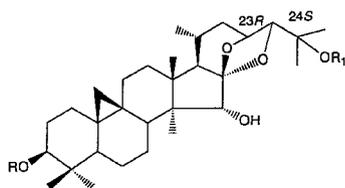
- 5 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = H
 5a : R = R₁ = R₂ = H
 *6 : R = β -D-glc(p)-(1→3)- β -D-xyl(p),
 R₁ = R₂ = H
 *7 : R = β -D-xyl(p), R₁ = H, R₂ = OH
 *7a : R = R₁ = H, R₂ = OH
 *8 : R = β -D-xyl(p), R₁ = OH, R₂ = H
 *8a : R = H, R₁ = OH, R₂ = H

hydroshengmanol type

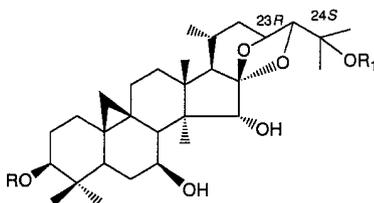


- 9 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, 24S
 9a : R = R₁ = R₂ = R₃ = H, 24S
 *10 : R = β -D-xyl(p), R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, 24R
 *10a : R = R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, 24R
 *11 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = H, R₃ = Me, 24S
 *11a : R = R₁ = R₂ = H, R₃ = Me, 24S
 *12 : R = β -D-xyl(p), R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = Me, 24S
 *12a : R = R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = Me, 24S
 *13 : R = β -D-xyl(p), R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Me, 24S
 *13a : R = H, R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Me, 24S
 *14 : R = β -D-gal(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24R
 *14a : R = R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24R
 *15 : R = β -D-gal(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, 24R
 *15a : R = R₁ = R₂ = R₃ = H, 24R

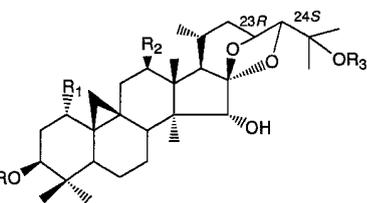
cimigenol type



- 16 : R = β -D-xyl(p), R₁ = Ac
 16a : R = H, R₁ = Ac
 *17 : R = β -D-glc(p)-(1→3)- β -D-xyl(p), R₁ = Ac
 *18 : R = β -D-glc(p)-(1→2)- β -D-xyl(p), R₁ = Ac
 *25 : R = β -D-gal(p), R₁ = H, Δ^7
 25a : R = R₁ = H, Δ^7
 *26 : R = β -D-gal(p), R₁ = H
 26a : R = R₁ = H
 *27 : R = β -D-gal(p), R₁ = Me
 11b : R = H, R₁ = Me
 *28 : R = β -D-gal(p), R₁ = Ac
 *29 : R = β -D-glc(p), R₁ = Ac

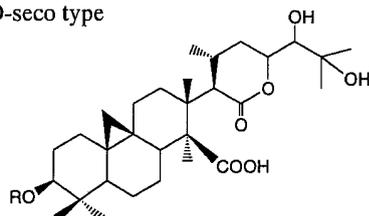


- *19 : R = β -D-xyl(p), R₁ = H
 *19a : R = R₁ = H,
 19b : R = H, R₁ = Me
 *20 : R = β -D-xyl(p), R₁ = Ac
 *20a : R = H, R₁ = Ac



- *21 : R = β -D-xyl(p), R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Ac
 *21a : R = H, R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Ac
 *22 : R = β -D-xyl(p), R₁ = OH, R₂ = R₃ = H
 *22a : R = H, R₁ = OH, R₂ = R₃ = H
 22b : R = H, R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = Me
 *23 : R = β -D-xyl(p), R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H
 *23a : R = R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H
 *24 : R = α -L-ara(p), R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H

D-seco type



- *30 : R = β -D-xyl(p)
 *31 : R = β -D-glc(p)

* : new compounds

Fig. 3. The Compounds Isolated from the Aerial Parts of *C. simplex* and Their Aglycones

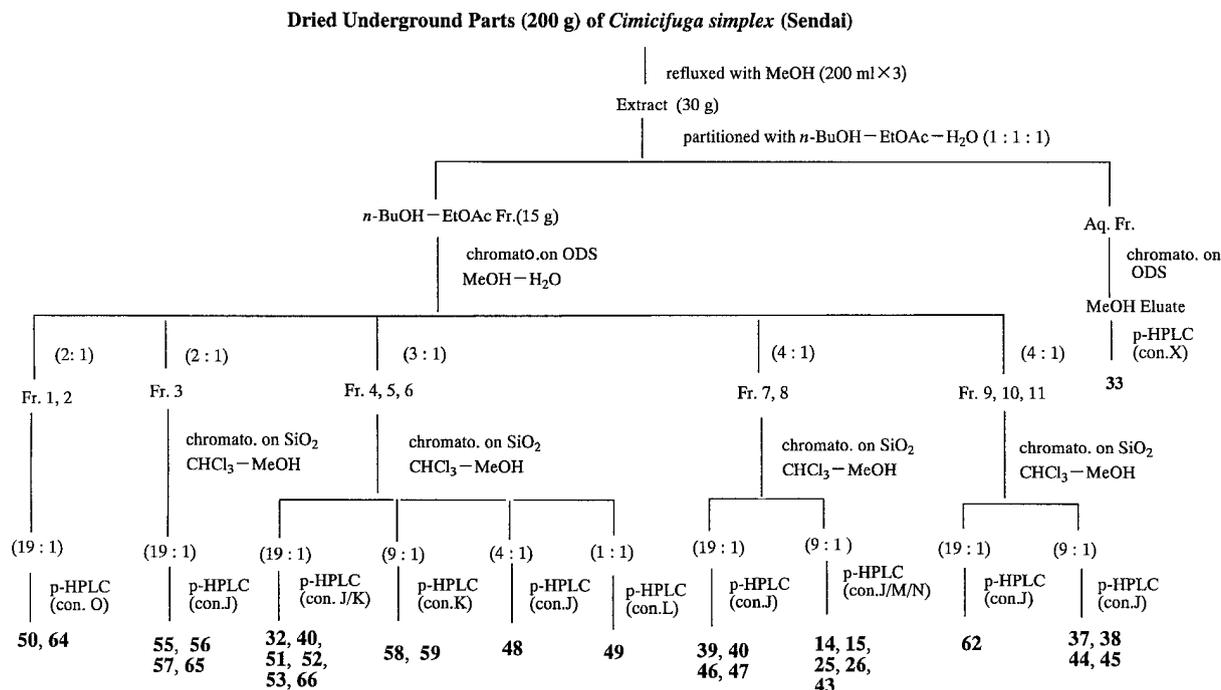
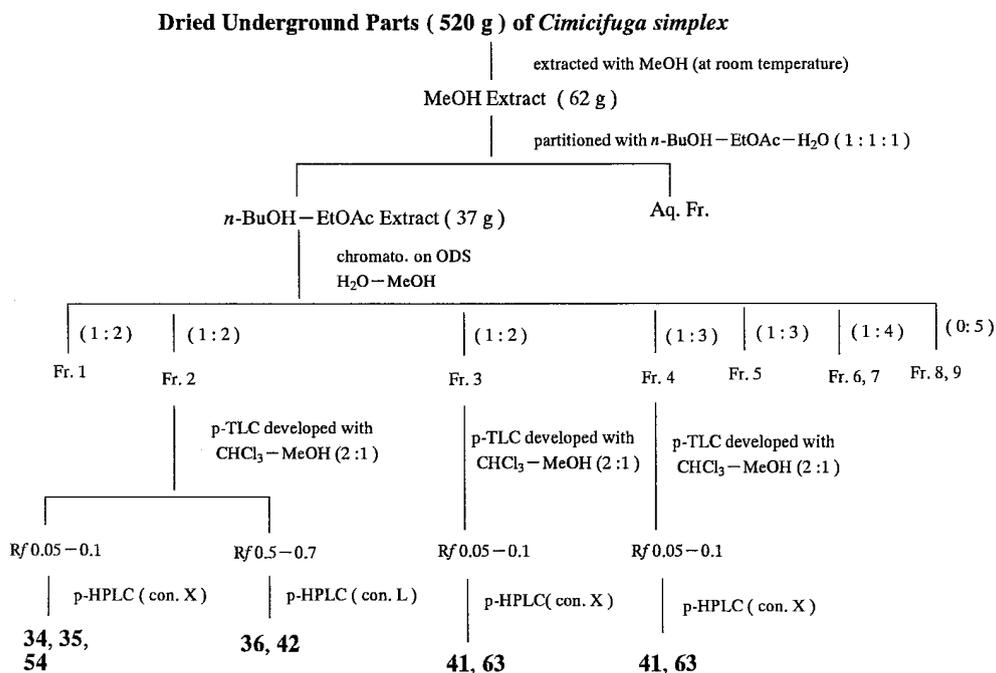
Chart 2. Isolation Procedure from Underground Parts of *Cimicifuga simplex*

Chart 3. Isolation Procedure of Malonyl Compounds (34, 35, 41, 54, 63) and Their Related Glycosides (36, 42)

side (43)⁴³と共に、30種の新しいトリテルペン配糖体 (*印)を得た。⁶⁵⁻⁶⁹単離したトリテルペン配糖体はゲニンの構造によって、shengmanol系 (32-36),^{67,68} hydroshengmanol系 (14, 15, 37-42),^{67,68} cimigenol系 (25, 26, 43-50),^{67,68} cimicifugenin系

(51-60),^{64,67,68} cimiacerogenin系 (61-63),^{66,68} 16,23-diketo系 (64-66)⁶⁹に分類された。また、構成糖部によって、 β -D-xyloside類、 α -L-arabino-
side類、 β -D-galactoside類、 β -D-glucoside類に分類された。さらに、マロン酸エステル体 34, 35, 41,

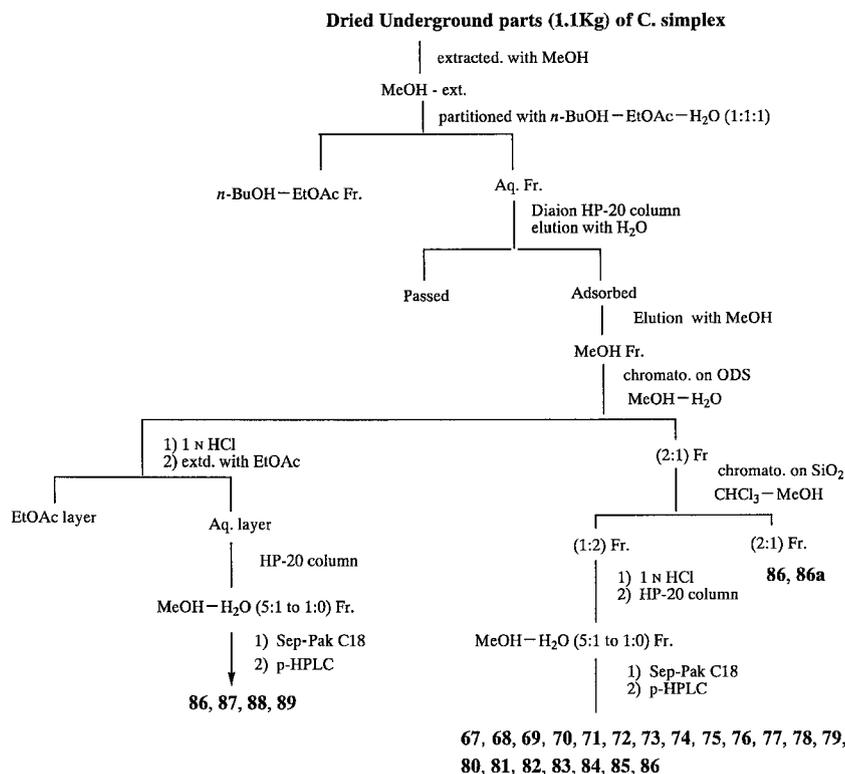


Chart 4. Isolation Procedure of Phenolic Compounds

54, 63 は D-xylosyl 部分の 2 位に malonyl 基のついた配糖体であった (Fig. 4-1, -2).⁶⁸⁾

2-2. 地上部と地下部のトリテルペン配糖体のまとめ サラシナショウマ地上部及び地下部のトリテルペン配糖体の検索を行い, 66 種の cycloartane 系トリテルペン配糖体とそのマロン酸エステル体 5 種を単離した. 地上部と地下部では含有成分に違いがあり, 地上部では $1\alpha/7\beta/12\beta$ -OH 体が単離されたが, 地下部では 7β -OH 体は単離されず, 代わりに 7,8-didehydro 体が単離された. 構成糖は D-xylose, L-arabinose, D-galactose, D-glucose で, 2'-malonyl-D-xylose, 及び D-glucosyl-(1→3)-D-xylose, D-glucosyl(1→2)-D-xylose のような二糖もあった.

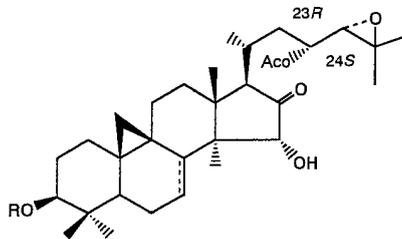
Hydroshengmanol 系と cimigenol 系配糖体はサラシナショウマ属植物に共通して含まれるが, 植物の乾燥, 抽出, 単離操作の過程で shengmanol 系から産生される可能性があると考えられた. また, ゲニンが shengmanol 系, 24-*epi*-hydroshengmanol 系, cimicifugenin 系, cimiacerogenin 系の 2'-malonyl xyloside が得られた. これらはサラシナショウマ属植物から得られた最初の配糖体マロン酸エステル体であった.

サラシナショウマの地上部と地下部から得られたトリテルペン配糖体のゲニンはすべて cycloartane 系の化合物であった. したがって, サラシナショウマは cycloartenol を経て多くの配糖体を生合成する植物として特徴づけることができた. それらは推定される生合成経路に従って, Fig. 5 に示すようにまとめることができた. 他のサラシナショウマ属植物のトリテルペン配糖体も同様な経路を経ると共に, 一部, 種特異的な経路を経て生合成されると考えられる.

2-3. トリテルペン配糖体の構造解析のまとめ 今回の研究を通して, 先に未解決のまま残した問題を解決することができた. また, 新発見も得た. それらの中から, いくつかの事柄を記述する.

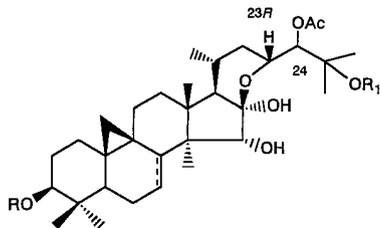
1) HPLC による単離 配糖体の単離には各種クロマトグラフィーと HPLC の組み合わせが効果的であった. HPLC では検出器に示差屈折計 (RI) を用い, カラムとしては CrestPak C18T-5, Develosil PhA-T-5, Cosmosil 10Ph, 5Ph, YMC C8 などを用い, MeOH-H₂O-MeCN の比をコントロールして単離した. 糖の分析には Lichrosorb NH₂, Shodex RS-Pak DC-613, Shodex NH₂ P-50 などを用い,

shengmanol type



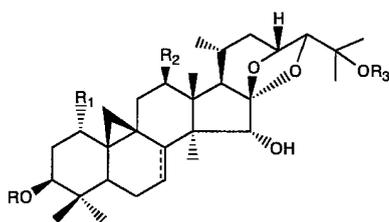
- *32 : R = α -L-ara (p), Δ^7
 *32a : R = H, Δ^7
 *33 : R = β -D-gal (p), Δ^7
 *34 : R = 2'-malonyl- β -D-xyl(p), Δ^7
 *35 : R = 2'-malonyl- β -D-xyl(p), 7,8 β -2H
 *36 : R = β -D-xyl(p), Δ^7

hydroshengmanol type



- 14 : R = β -D-gal (p), R₁ = H, Δ^7 , 24R
 14a : R = R₁ = H, Δ^7 , 24R
 15 : R = β -D-gal (p), R₁ = H, 7,8 β -2H, 24R
 *37 : R = β -D-xyl (p), R₁ = H, Δ^7 , 24R
 *38 : R = α -L-ara (p), R₁ = H, Δ^7 , 24R
 *39 : R = β -D-xyl (p), R₁ = H, Δ^7 , 24S
 *39a : R = R₁ = H, Δ^7 , 24S
 *40 : R = α -L-ara (p), R₁ = H, Δ^7 , 24S
 *41 : R = 2'-malonyl- β -D-xyl(p), R₁ = H, Δ^7 , 24R
 *42 : R = β -D-xyl (p), R₁ = H, Δ^7 , 24S
 *42a : R = H, R₁ = Me, Δ^7 , 24S

cimigenol type



- 25 : R = β -D-gal(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24S
 26 : R = β -D-gal(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, 7,8 β -2H, 24S
 43 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24R
 43a : R = R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24R
 *44 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24S
 44a : R = R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24S
 *45 : R = α -L-ara(p), R₁ = R₂ = R₃ = H, Δ^7 , 24S
 *46 : R = β -D-xyl(p), R₁ = R₂ = H, R₃ = Ac, Δ^7 , 24S
 *47 : R = α -L-ara(p), R₁ = R₂ = H, R₃ = Ac, Δ^7 , 24S
 *48 : R = α -L-ara(p), R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, 7,8 β -2H, 24S
 *49 : R = β -D-gal(p), R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, 7,8 β -2H, 24S
 *50 : R = α -L-ara(p), R₁ = R₃ = H, R₂ = OH, Δ^7 , 24S

Fig. 4-1. The Compounds Isolated from Underground Parts of *C. simplex* and Their Aglycones

MeCN-H₂O 混液で溶出した。これらの分離条件は Table 1 にまとめた。

2) 協奏的離脱転位反応 先にサラシナショウマのトリテルペン配糖体を、混合物のまま酸処理し、1,19-cyclolanost-9(11)-ene 誘導体を得た。その生成物の ¹H-NMR では、cyclopropane methylene の一方の H が異常に高磁場にシフトし、4重線であった [H-19 (δ_{H} 0.04, 1H, dd, $J=4.0, 7.0$ Hz)]. これは cyclopropane 環の組み替えと新生二重結合の磁気異方性によると解釈された。それは 1 α -hydroxy-9, 19-cyclolanostane glycoside の協奏的離脱転位反応 (concerted elimination rearrangement) の例と考えられ、1 α -OH 体の存在を推定した。今回、例えば、1 α -hydroxy 化合物 **21** を 1% HCl, 室温で処

理し、1, 19-cyclolanost-9(11)-ene 誘導体 **21b** を得た (Fig. 6)。この 1 α -hydroxy-9, 19-cyclolanostane glycoside の協奏的離脱転位反応の例は Pegel 及び Rogers ら⁶⁹⁾によっても報告されたが、今回、その推定が正しかったことを確認できた。

3) Shengmanol 系, Hydroshengmanol 系, Cimigenol 系の相関 側鎖の立体配位, 特に, shengmanol 系と hydroshengmanol 系の 23 位と 24 位は, cimigenol 系又は cimigol 系へ誘導して決定した。例えば, 化合物 **7** を 0.5 N HCl で処理し, 脱糖, エポキシ環開裂, 脱アセチル, 分子内アセタール形成を経て, **19a** と **19b** を得た (Fig. 7)。また, 化合物 **9a** と **10a** をそれぞれ 1% 炭酸ナトリウムで処理後, 1 N HCl で処理して, 化合物 **26a** と **10b** を得た

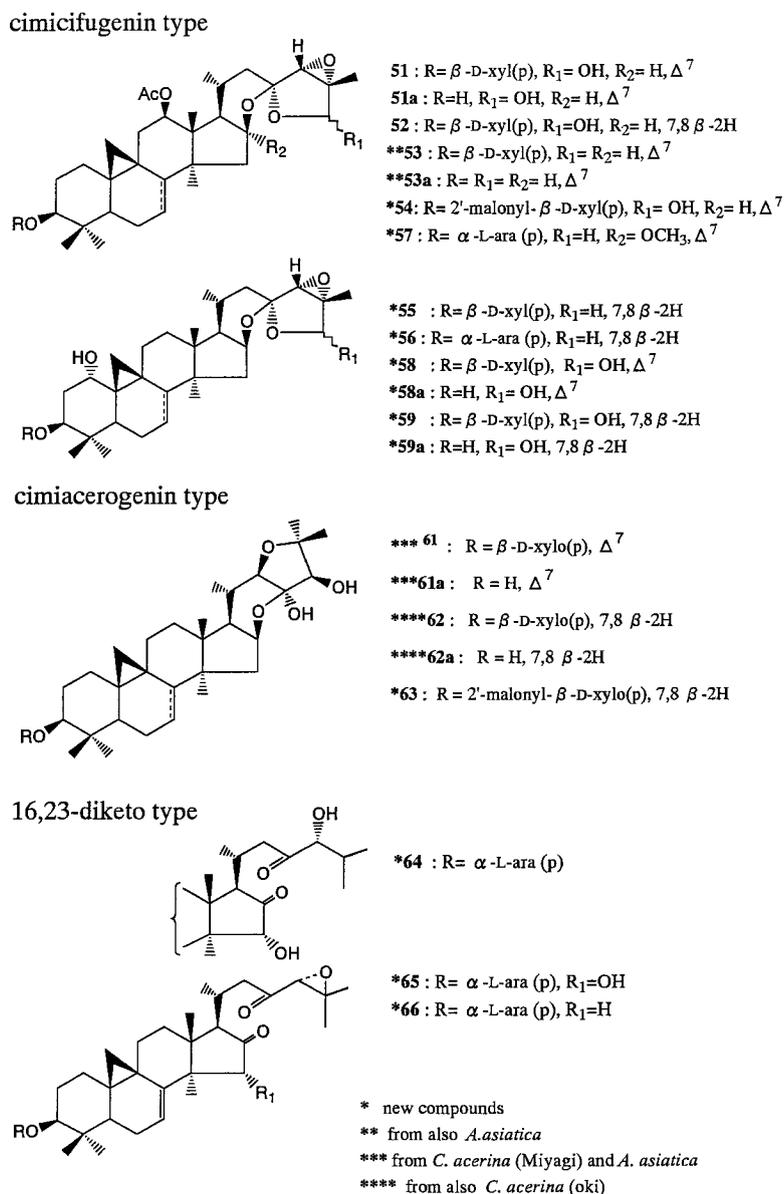


Fig. 4-2.

(Fig. 8). それらの $^1\text{H-NMR}$ から、H-24 が singlet, H-23 が double doublet ($J=2, 9$ Hz) を示した **19a**, **19b**, **26a** は, (23*R*, 24*S*)-16, 23: 16, 24- diepoxy 部分構造の cimigenol 誘導体であると結論した。一方, H-24 が doublet ($J=4.0$ Hz), H-23 が ddd ($J=2.0, 4.0, 9.0$ Hz) の **10b** は, (23*R*, 24*R*)-16, 23: 16, 24- diepoxy 部分構造の cimigol 誘導体であると結論した。

(23*S*, 24*S*) 又は (23*S*, 24*R*)-16, 23: 16, 24- diepoxy 部分構造を持っている化合物は未だ知られていないが, 16,23-diketo 体 **64**, **65**, **66**, あるいは cimicifugosides H-1-H-5 などの構造から考えて,

23- ケト体は含有されたので, 23*S* 体の存在の可能性が示唆された。モデルからは, (23*S*, 24*S*) 体では H-24 は doublet ($J=4$ Hz), H-23 は double doublet ($J=4, 4, 4$ Hz) を, (23*S*, 24*R*) 体では H-24 は singlet, H-23 は double doublet ($J=4, 4$ Hz) を示すと考えられる。これらのことから **19a**, **19b**, **26a** は cimigenol 誘導体, **10b** は cimigol 誘導体であると結論した (Fig. 9)。

4) Δ^7 (8)-cycloartan-3-olyl 系化合物の転位反応以前にオオバショウマの配糖体混合物を酸処理し, 24-*epi*-acerinol (**43b**) と acerinol (**44b**) と名付けた化合物を得た。その構造から, 真性配糖体は Δ^7 (8)-

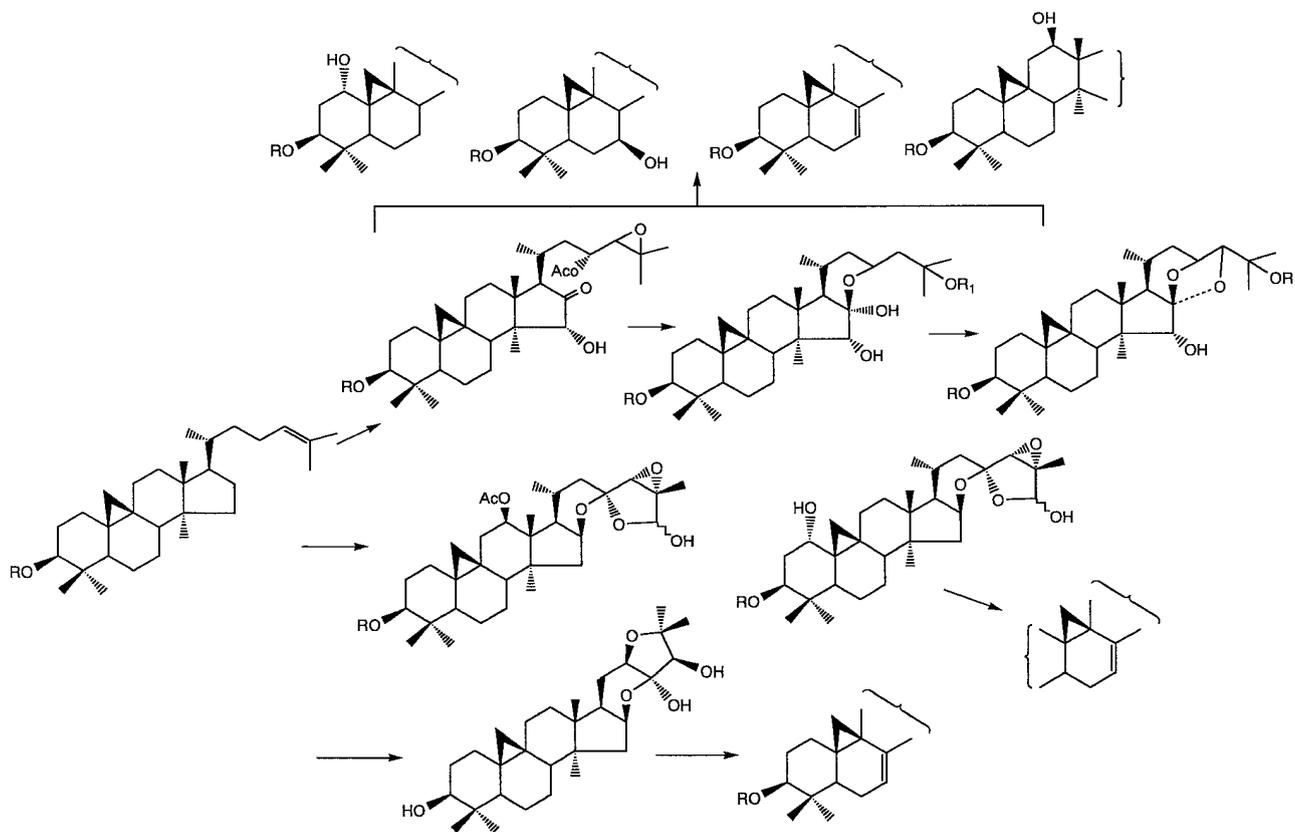


Fig. 5. Hypothetic Scheme of Triterpenic Glycoside Biosyntheses in *Cimicifuga simplex*

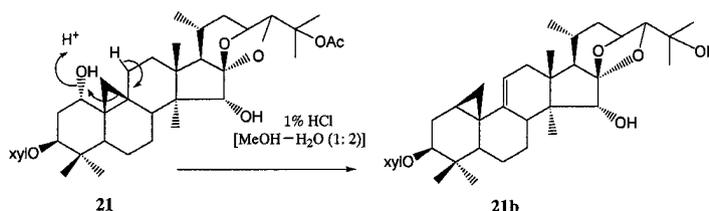


Fig. 6. Chemical Conversion of **21** into **21b**

cycloartan-3-olyl 系配糖体であろうと推定した。今回、単離した配糖体 **14** と **44** は $\Delta^{7(8)}$ -cycloartan-3-olyl 系配糖体で、酵素分解でゲニン **14a** と **44a** を得た。**14a** は 1% Na_2CO_3 で脱アセチル後、50% AcOH 中、 40°C で処理し、**43a** を得た。**43a** と **44a** は共に、50% AcOH 中、熱水浴上加熱処理により、それぞれ 24-*epi*-acerinol (**43b**) と acerinol (**44b**) を得 (Fig. 10)、先の推定が正しかったことを確認した。この転位反応は温和な条件で起こり、0.1% HCl でも部分的に進行し、50% 酢酸 (ジオキサン溶液) で定量的に進行した。

多くの植物から cycloartane 系トリテルペン及び

配糖体が報告されているが、今回、サラシナショウマから、 7β -hydroxy 系配糖体と共に、 $\Delta^{7(8)}$ -cycloartan-3-olyl 系配糖体が得られたことから以下のように考えた。すなわち、cycloartanol 系化合物の 7 位が水酸化され、 7β -hydroxyl 体はそのまま地上部に留まり、 7α -hydroxy 体は 8β -H と容易に trans-離脱を受けて、 $\Delta^{7(8)}$ -cycloartane 体になる。後者は温和な条件で一部転位体となり、植物体からも得られる。この経路の一般性は確立されていないが、ダイズのスイトセンチュウのふ化促進物質グリシノエクレピン (glycinoeclepin) A, B はこの道筋を通じて合成されたと推定された (Fig. 11).⁷⁰⁾

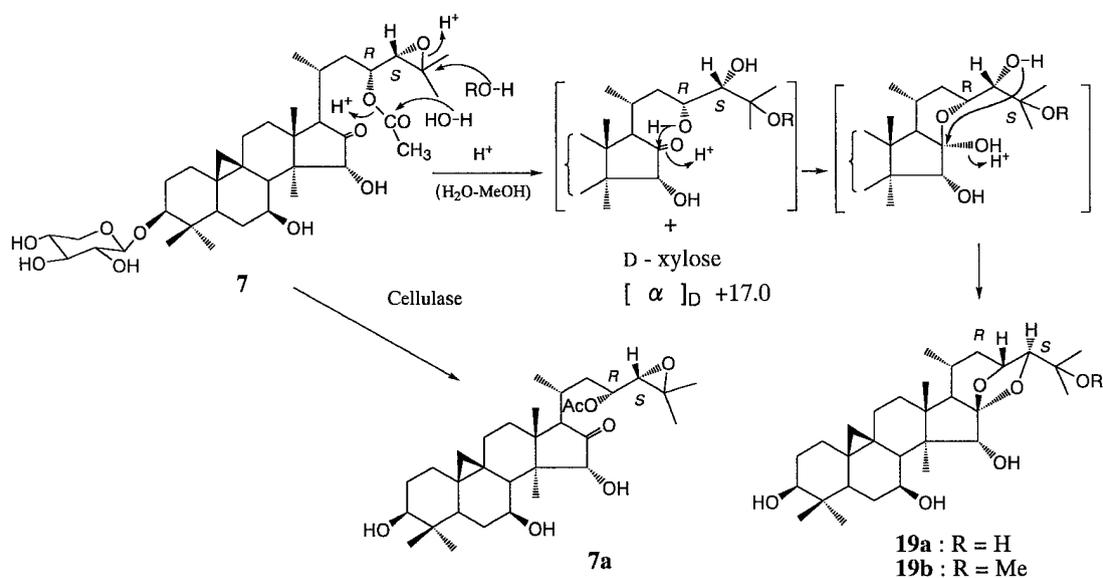


Fig. 7. Conversion of 7 to 7a, 19a and 19b

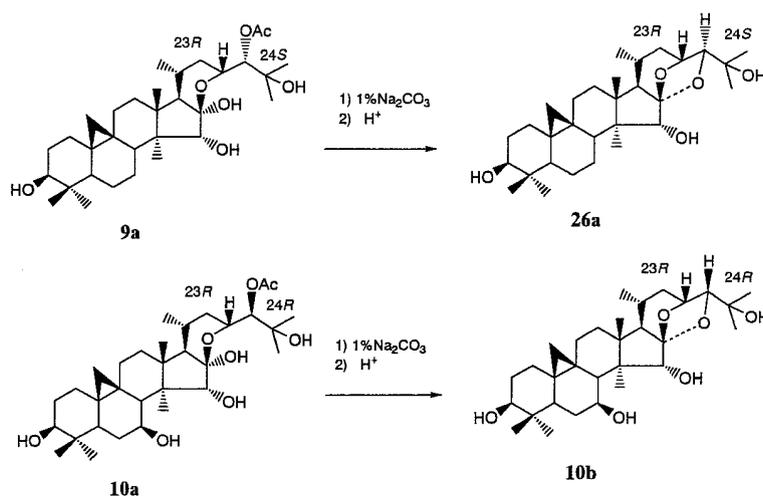


Fig. 8. Conversion of 9a, 10a into 26a, 10b

先にオオバショウマから cimigol を単離し、それが cimigenol と 15 位と 24 位の立体配位の異性体であると報告した。今回、ゲニン又は変換体として cimigol を得、標品と比較した。その結果、標品に約 20% の $\Delta^{7(8)}$ -cimigol が混在していることを知った。そこで、NOE 相関を解析し、cimigol は 24-*epi*-cimigenol であると訂正した。⁶⁶⁾ この混入が cimigenol と cimigol から誘導した 3,15-*O*-diacetyl-24(25)-dehydrate が一致しなかった理由であった。

5) 側鎖にヘミアセタール構造を有する化合物の構造解析 側鎖にヘミアセタール構造を有する cimicifugoside (51), 真正ゲニン cimicifugenin

(51a), actein (52), bugbanoside A, B (58, 59) は溶液中では主に C-26 の 2 種の立体異性体の混合物として存在した。^{64,65)} Fig. 12 に例示したように、H-7, H-19, H-24, H-26, H-27 ははっきり識別のできる主シグナルとそれに附随する高さ約 3 分の 1 の副シグナルを示した。これは C-26 を中心とする部分が互変異性するヘミアセタールのためであると推定した。さらに、溶媒効果, NOE 相関などを考えて、高い方の主シグナルを 26*S* 体に、低い方の副シグナルを 26*R* 体に帰属した。

¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) もまた数組の主シグナルと副シグナルを示した。¹H-NMR (DMSO-*d*₆) も、

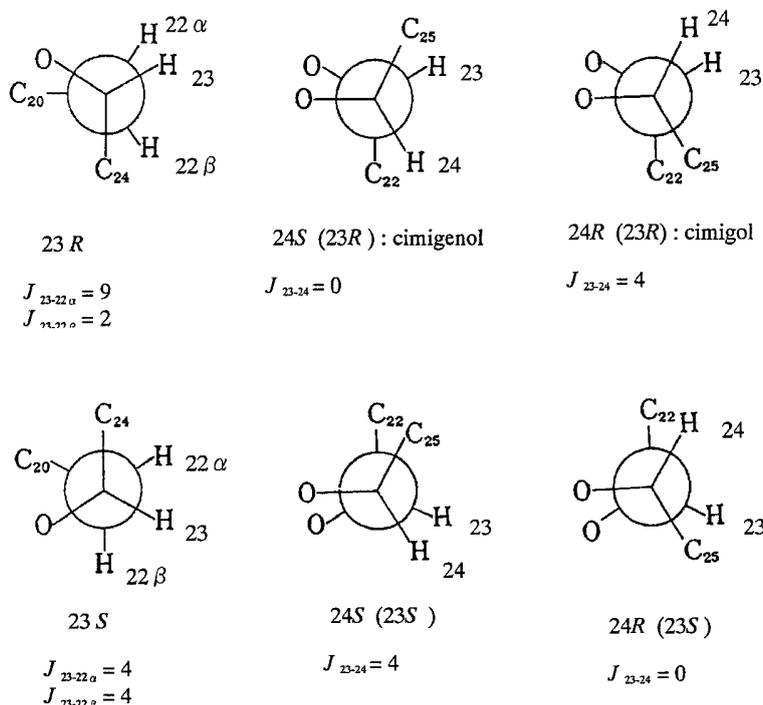


Fig. 9. Newman Projections of Possible Side Chain Moieties

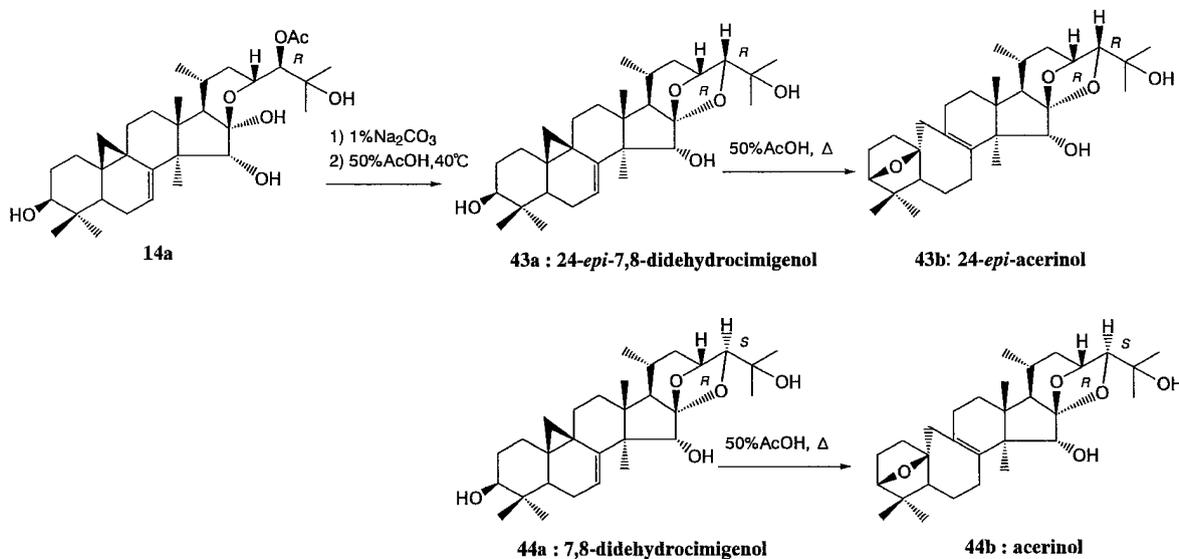


Fig. 10. Chemical Conversion of 14a, 44a

H-24, H-26 及び H-27 ははっきりした 2 組のシグナルを示し、この溶媒中でも異性化することを示した。これらの現象は以前の低分解能のスペクトルでは認められなかった。^{25,64} また、他のグループによっても報告されていない。^{43,49} これはヘミアセタール化合物においては起こりうる現象で、高分解能のスペクトルではじめて認められた。

51 の異性体 51*S* 体と 51*R* 体は HPLC (Table 1 の条件 O で t_R ; 22' と 30') で分離可能であったが、各ピーク相当部分は、再び分離前と同じ 51*S* 体と 51*R* 体の混合物 (混合比; 約 3 : 1) となった。そこで ¹H- 及び ¹³C-NMR スペクトルの解析は異性体の混合物のまま行った。

ヘミアセタールの混合物は 2 種の methyl ether の

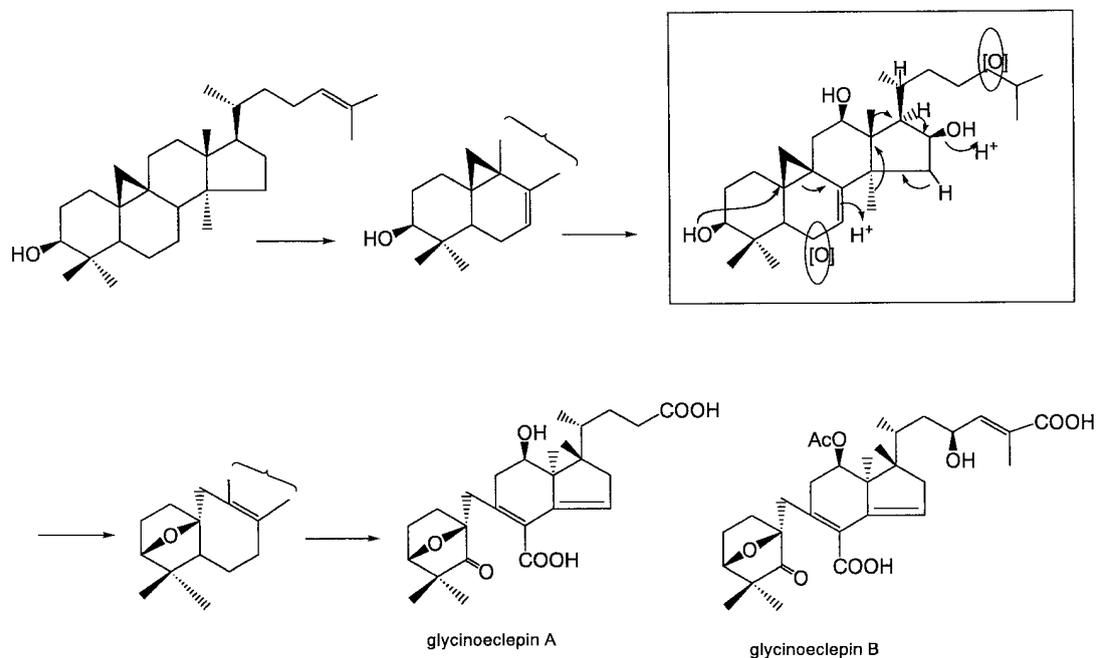
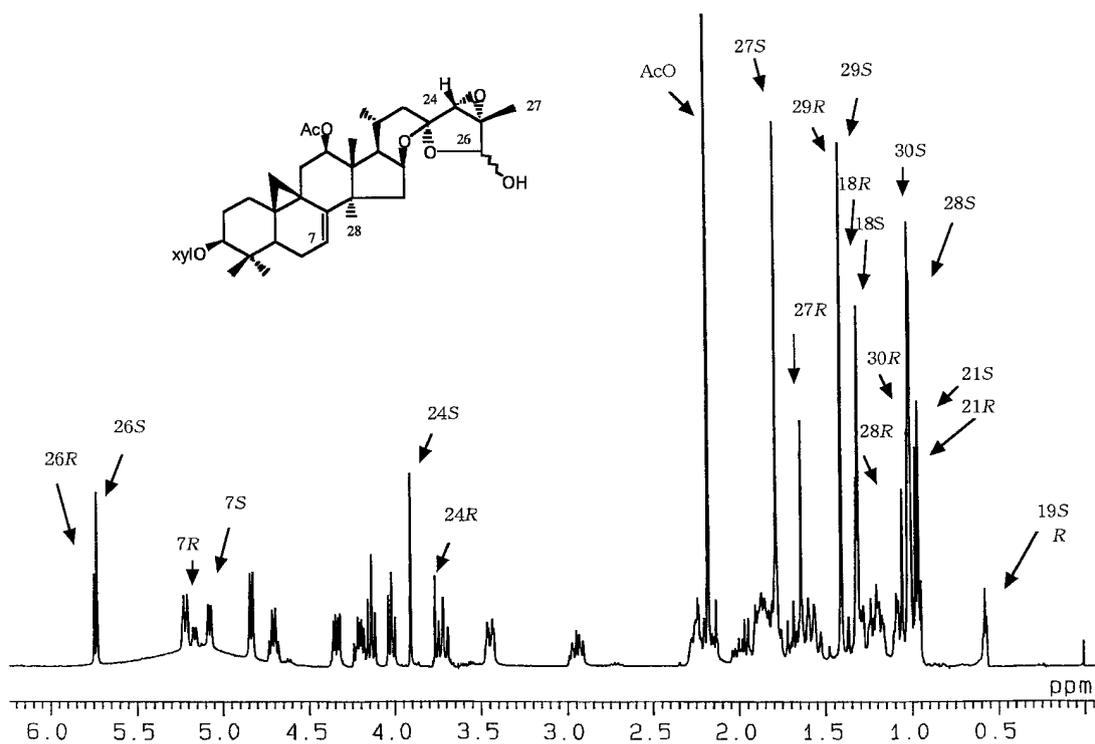


Fig. 11. Hypothetic Route of Glycinoeclepins from Cycloartenol

Fig. 12. $^1\text{H-NMR}$ of Cicicifugoside (**51**)

異性体を生成し、側鎖の立体構造解明に利用された。例えば、**51**を *p*-TsOH を含む MeOH で処理し、2種の methyl ether の異性体 26 (*S*)-*O*-methyl cicicifugoside (**51bS**), 26 (*R*)-*O*-methylcicicifugo-

side (**51bR**) 及び副生成物 26 (*S*)-*O*-methylcicicifugenin A (**51cS**) を (3 : 1 : 3) の割合で得た。**51bS** と **51bR** における C-26 の methoxy 基の相対立体配位は、Fig. 13 に示したように、H-24,

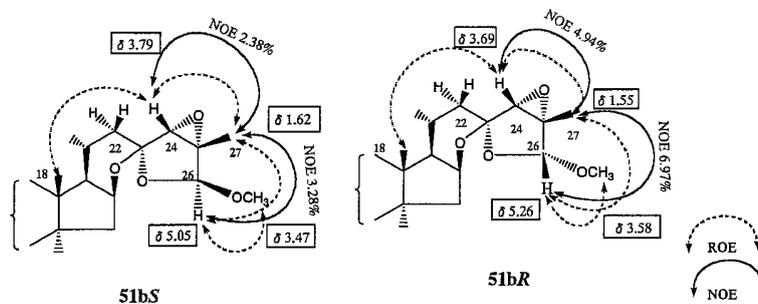


Fig. 13. ROEs and NOEs in the D-Ring and Side-Chain Moieties of **25bS** and **25bR**

H-26, H-27 の chemical shift 及び NOE に着目して、X 線結晶解析で構造決定した **51cS** のそれらと比較することにより決定した。 **51bS**, **51bR** の NOE 実験では H-24 と H-27, H-26 と H-27, H-24 と H-18, H-17 と H-21, H-21 と H-16 α の間に相関が認められ、C-26 のどちらの異性体でも H-27 と H-26 の間に NOE が認められた。

副生成物 26(S)-*O*-methylcimicifugenin A (**51cS**) を MeOH-EtOAc 混液から再結晶して得たプリズム状晶を X 線結晶解析に付し、Fig. 14 に示すような ORTEP 図を得た。特に、2 面角 O2-C23-C24-O4 (171.1 $^\circ$), O2-C23-C24-C25 (107.0 $^\circ$) 及び O3-C23-C24-O4 (53.2 $^\circ$) より C24, C25 の α -epoxy 配位が明らかになった。この結果は acetylacteol の NOE data を基に決められた β 配位⁴³⁾ とは反対であった。さらに、以下のような平面方程式に従って最適平面からの E, F, G 環の各原子のずれを計算し、その結果を Fig. 15 に示した。

$$\begin{aligned} \text{E 環} : & (0.52995X) + (0.62810Y) + (0.56978Z) \\ & + (6.66323) = 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{F 環} : & (0.30795X) + (0.49178Y) + (0.81444Z) \\ & + (5.07898) = 0 \end{aligned}$$

このようにして得られた半経験的エネルギー計算値から E 環はねじれたボート型をとり、F 環は C24, 25 に α -epoxy 環、C-25 に β -methyl 基 (C-27), C26 に β -methoxy 基をもった puckered 型をとっていることが明らかになった。⁶⁴⁾

配糖体 actein (**52**) を **51** と同様に *p*-TsOH を含む MeOH で処理し、2 種の methyl ether の異性体を得た。化合物 **51** をエタノール中 10% パラジウム炭の存在下 H₂ ガスで接触還元して、**52** を得、標品と直接比較し同定した。⁶⁴⁾ **52** は *C. racemosa*⁴⁵⁾ と生薬升麻⁴⁹⁾ から得られ、側鎖の立体構造は未定のま

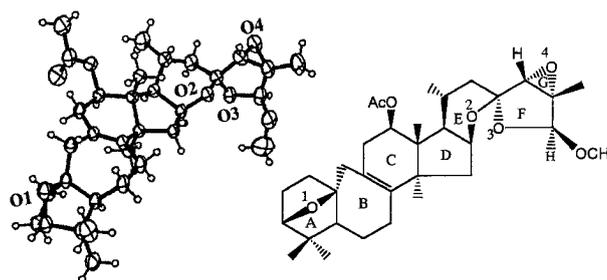


Fig. 14. ORTEP Drawing and Absolute Stereostructure of **51cS**

ま報告された。また、**52** とは糖の部分が異なる異性体が *C. foetida*⁴³⁾ から得られ、(23*R*, 24*S*, 25*R*, 27*S*)-acetylacteol 3-*O*-arabinside であると報告された。著者らが得た結果は 24, 25-epoxy 部分は α 配位で、(24*R*, 25*S*) であること、及び溶液中ではヘミアセタール部分の互変異性体で存在することを示していた。

6) MTPA 法を利用した絶対構造の決定 ゲニン cimiacerogenin (**61a**) の相対立体構造は *O*-methylcimiacerol (**61b**) の X-線結晶解析 (間接法) で決定したが、絶対構造の決定には MTPA 法⁷¹⁾ を利用した。Fig. 16 に示した $\Delta\delta$ -値を得、24*R* の絶対立体構造を決定した。化合物 **64** の 24 位の絶対立体配置の決定も MTPA 法に依った。Fig. 17 に示した $\Delta\delta$ -値を得、24*R* を結論した。

7) 酵素による加水分解 配糖体の真性ゲニンを得るために、先に各種酵素による配糖体の加水分解を度々試みたが、収率が低く断念してきた。今回、天野製薬から酵素の供与を受け、定量的な加水分解を実現できた。酵素 Cellulase A [Amano] 3 (*Aspergillus niger* 由来、主にエンド 1,4- β -グルカナナーゼ、Cx 酵素で内部結合に作用する) は糖間の結合、Cellulase T [Amano] 4 (*Trichoderma viride*

脱マロン酸分子イオン (M-87) を認め、HR-SIMS, $^{13}\text{C-NMR}$ より分子式を $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$ と決定した。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは $\delta 167.23, 169.53, 42.40$ ppm に malonyl 基の COOR, COOH, $-\text{CH}_2-$ に相当するシグナルを示した。化合物 **34** を 1% Na_2CO_3 で室温処理し、相当する配糖体 **36** を得た。また、diazomethane 溶液を加え、メチルエステル体 **34a** と配糖体 **36** を得た。化合物 **34** の MeOH 溶液を室温で放置すると、malonyl 基が離脱し、トリテルペン配糖体 **36** 及び **42** に変化した。

34 と **36** の NMR を比較し、H-2' ($\Delta\delta$: 1.55 ppm), C-1' ($\Delta\delta$: 3.17 ppm), C-2' ($\Delta\delta$: 1.22 ppm), C-3' ($\Delta\delta$: 2.08 ppm) の acylation shift^{57,60} を認めたこと、**34, 34a** の H-2' と C-1' の間に HMBC 相関を認めたことから、malonyl 基は 2'-O に結合していると結論した。したがって、**34** は 23-O-acetyl-7,8-didehydroshengmanol 3-O-(2'-O-malonyl)- β -D-xylopyranoside と結論した。他の malonyl 化合物 **35, 41, 54, 63** についても同様に構造を解析した。

薬用人参,⁷² 赤つめ草,⁷³ 大豆,⁷⁴ キク科植物,⁷⁵ ガーベラ,⁷⁶ モモの果実と葉,⁷⁷ スギナ,⁷⁸ ダリア⁷⁹ などから ginsenoside, isoflavone, anthocyanin, flavonol, flavone, chalcone などの 6'-malonylglucoside 類が単離報告されている。今回、サラシナショウマ属植物から初めて malonyl エステルを単離した。著者らが単離した化合物は 2'-malonylxyloside 類の初めての例であった。

10) アグリコン部分の $^1\text{H-NMR}$ と $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル解析 3級メチル基の帰属には NOE (NOESY, ROE, 差スペクトル) が有効であった。19位メチレンシグナルは特徴的で、多くの化合物では、その cyclopropane methylene を手がかりに周辺の構造由来のシグナルを帰属した。D環が開裂した化合物 **30, 31** では、その cyclopropane methylene のシグナルが高磁場にシフトしたのが印象的であった。

他のメチレンシグナルの帰属は DEPT や $^1\text{H-}^{13}\text{C-COSY}$ スペクトルが有用であったが、1位、7位、11位、12位、22位の帰属では、しばしば困難を経験した。6位の一方の H は cyclopropane 環の磁気異方性の影響を受けて、高磁場にシフトし、メチル・メチレンシグナル群から離れ、帰属を容易にした。1 α , 7 β , 12 β 位への水酸基の導入はメチレンシ

グナルの帰属を容易にした。4級炭素の帰属には蓄積したデータが参考になったが、cyclopropane 環内の C-9, 10位の C は 19位メチレン H との HMBC 相関、13位 C は 17位 H との HMBC 相関、14位 C は 15位メチレン基及び 28位メチル基との NMBC 相関が根拠になった。その 28位メチル基は 17位 H との間に NOE 相関が認められた。

12) CD による絶対立体構造の決定 ヘミアセタール系配糖体 hydroshengmanol 類 **9—15, 37—42** の CD は弱い負のコットン効果を示した。これは溶液中においてヘミアセタール型 (16, 23-epoxy-16-ol) (major) がケト型 (16-keto-23-ol) (minor) とゆっくりした化学平衡を起しているためと推定した。それらの絶対立体構造については、例えば、化合物 **14** では、シフト試薬、Eu (fod)₃ 付加体の CD が正の第一、負の第二コットン効果 ($\Delta\epsilon_{313} + 2.6, \Delta\epsilon_{285} - 2.2$) を示し、右回りの絶対立体構造、すなわち、基本骨格は cycloartane 系で、15 α , 16 α -dihydroxyl 基の存在を証明した。⁸⁰

51 の絶対立体構造は 3-keto 体 **51dS** と **51dR** の CD が共に、負の極大を与え ($\Delta\epsilon_{295}$: $-0.44, \Delta\epsilon_{285}$: -0.33)、天然型トリテルペンの 3-ケト体のそれらに一致し、オクタント則にも適合した。^{81,82} したがって、**51** 及びその誘導体は cycloart-7-ene 系化合物に属すると決定した。⁵⁵ また、**51** は負の極大を与え ($\Delta\epsilon_{215}$: -10.67)、cycloart-7-ene 系化合物に属するもう一つの証拠となった。以上のことより、cimicifugoside (**51**) の絶対立体構造は (3 β , 12 β , 16 β , 20R, 23R, 24R, 25S, 26R/S)-12-acetoxy-16,23:23,26:24,25-triepoxy-3,26-dihydroxy-9,19-cycloartanost-7-ene 3-O- β -D-xylopyranoside と結論した。

また、 $\Delta^{7(8)}$ -cycloartane 系化合物 **32, 39, 44, 51, 55, 61** は 215—217 nm に負の CD 極大を示した。さらに、そのことは配糖体 **50, 64, 65, 66** などの絶対立体構造の根拠になった (Fig. 17)。

13) 同属植物の成分 比較の目的でオオバシヨウマ (*C. acerina* C. TANAKA) (宮城県で栽培したもの) の地下部 (100 g) を抽出分画し、**61** を、また、オオバシヨウマ (*C. acerina*) (隠岐で採取したもの) の地下部 (150 g) を抽出分画し、**62** を単離した。

さらに、レイヨウシヨウマ (*A. asiatica* HARA) の地下部 (60 g) を抽出分画し、**53** と **61** を単離し

た.

サラシナショウマから得られた cimiaceroside B (62) が *C. acerina* (隠岐) から, その 7(8)-didehydro 体である cimiaceroside A (61) が *C. acerina* (宮城) から単離されたことは植物化学的観点から興味深いことである.

2-4. 芳香族成分 サラシナショウマ地下部のメタノールエキスを Chart 4 に示すように, *n*-BuOH-EtOAc-水混液で振とうし, 水層を各種クロマトグラフィーに付し, 26 種の水可溶性芳香族成分 67—92 を得た (Fig. 18). そのうち 11 種が新規化合物 (Fig. 10 *印) で, 主にスペクトルを解析し構造を決定した.^{83—85} ベンジル酒石酸誘導體 fukinolic acid (67) は先にフキから単離, 構造決定された化合物で, サラシナショウマには 67 と共に, 関連化合物が含まれることが分かった. サラシナショウマの HPLC 分析では標品と比較し, eucomic acid (90), hydroxyeucomic acid (91), chlogenic acid (92) など含まれることが分かったので, これらの関連成分は 90, 91 を経て生合成されると推定した.⁸⁶ これらの酸性成分は無機イオンまたは塩基性アミノ酸と塩を作り, HPLC での分離を困

難にした. Chart 4 に示したように, 弱酸性化, HP-20 カラムに通導後, HPLC で分離した.^{83—85}

サラシナショウマと共に, オオバショウマとイヌショウマの根茎, 生薬の北升麻 (*C. dahurica*), 西升麻 (*C. foetida*), 関升麻 (*C. heracleifolia*) を入手し, 芳香族成分画分を調整した. それらは HPLC 分析に付し, それぞれ, Fig. 19 のような HPLC クロマトグラムを得た. 各植物間には類似点と相違とがあり, 生薬の鑑別に有用であることが分かった.⁸⁷

3. 成分の生物学的活性

著者らは成分の構造を決定してから, 蓄積された関連情報などを参考にして, 生物学的活性を調査した. 類例の少ない化合物については, それらに巡り合った縁を大切にした.

1) Cimicifugoside のチミジン取り込み阻害活性 ヒトリンパ球に対する cimicifugoside (51) の細胞毒性 IC₅₀ は 5 μM であるのに対し, チミジンの取り込み阻害率 IC₅₀ は 6 nM であった. このことは数種の癌細胞でも認められ, 51 は DNA の *de-novo* 生合成を阻害しないが, チミジンなどの取り込みを阻害すると結論した. その後, 北条らは種々検討し,

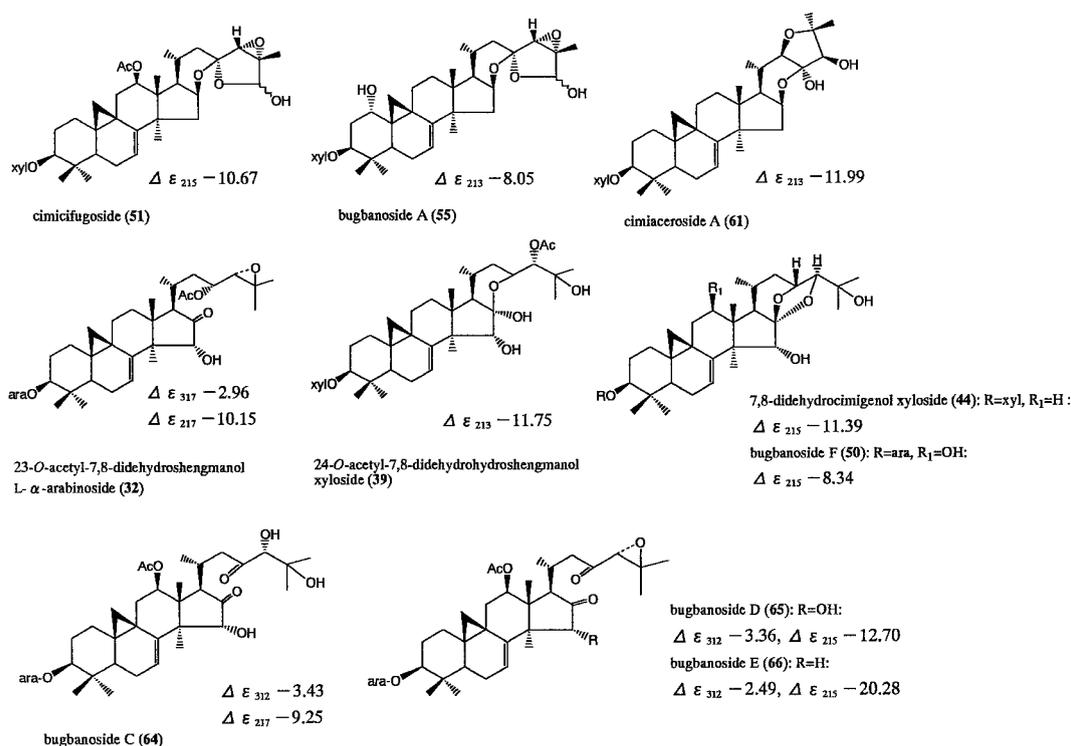
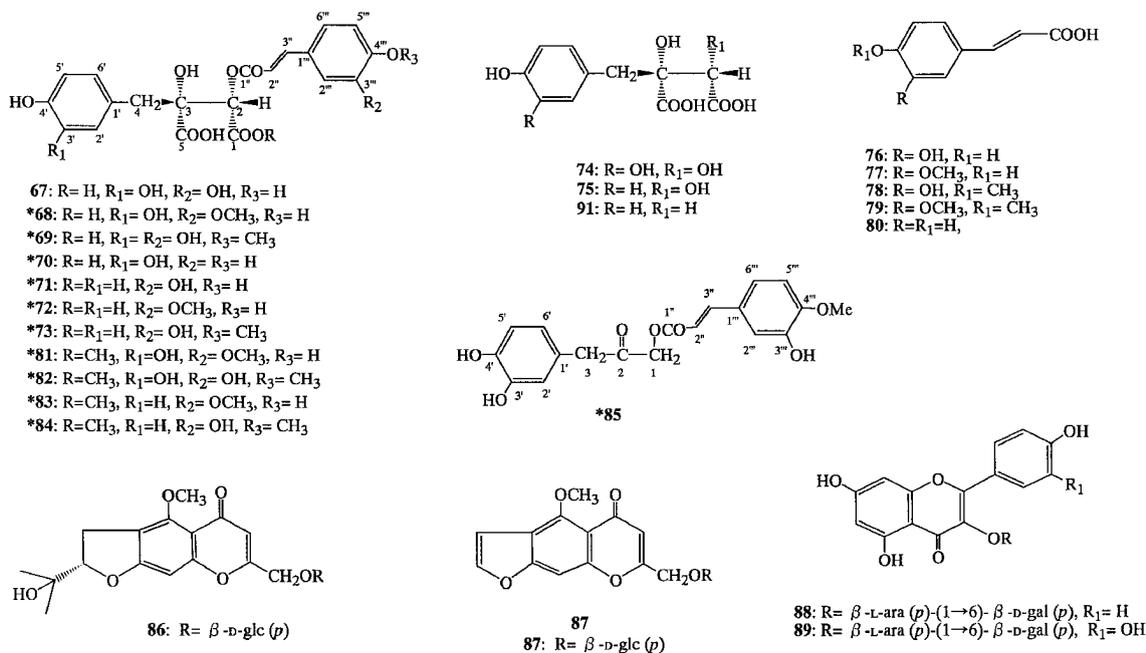


Fig. 17. CD Data of Cycloart-7-enol Glycosides from the Underground Parts of *Cimicifuga simplex*

Fig. 18. Structures of 23 Phenolic Constituents from *C. simplex*

51 は pyrimidine 骨格のヌクレオシド (thymidine, uridine) 取り込みを選択的に阻害することを明らかにした。また、**51** は葉酸拮抗薬の MTX (methotrexate) と併用すると、がん細胞種に選択的に、あるいは相乗的にある種細胞の生育を抑制することを明らかにした。⁸⁸⁾

原虫類は核酸の *de-novo* 生合成経路を欠き、ヌクレオシドを取り込む経路で核酸を生合成することが知られている。そこで、**51** 及び関連化合物のマラリア原虫に対する阻害効果を調査した。その結果、*in vitro* で **51** は 5 μM で抗マラリア活性を示すことを認めた。また、側鎖のアセタール構造を有する化合物が他の化合物群より、強い活性を示すことを明らかにした。しかし、その阻害濃度は positive control に比し、強いものではなかった。⁸⁹⁾ ヌクレオシド取り込み阻害剤は、他の薬剤と併用することにより、寄生虫への毒性を高め、宿主への毒性を減ずることが報告されているので、⁹⁰⁾ **51** と他の薬剤の併用を *in vivo* で調査したいところである。

51 について、数種のがん細胞の成長に対する効果を調査したが、数～数十 μM で阻害活性を示した。数種の関連配糖体より少し強い活性のように思われ、結論として、**51** 及び関連化合物は数 μM で細胞毒性を示し、その 1000 の 1 の濃度で、チミジンなどのヌクレオシドの取り込みを阻害するとまと

めることができた。これらの結果を要約すると、Fig. 20 のようになる。

2) 変形トリテルペン **Acerinol** の抗高脂血症作用
 変形トリテルペン **acerinol** (**44b**) は高度に酸化されたトリテルペンであり、その特異な構造のため薬理作用に興味を持たれた。Pan. Lab. (台湾) において 61 項目の生物活性試験を行った結果、唯一、triton WR-1339 誘発高脂血症マウスに対して、強い抗高脂血症作用を示した。そこで、類似の実験を行った。すなわち、ICR マウス (雄, 6 週, 1 グループ 10 匹) に triton WR-1339 (62.5 mg/ml, 0.15 M-NaCl 溶液) を 450 mg/kg 静注した後、**44b** と比較のための clofibrate を 0.25% CMC 溶液に懸濁して経口投与した。投与総量は 20 ml/kg で 10 ml/kg ずつ 20 h の間隔で与えた。23 h 後に採血し、コレステロール (Chol) と triglyceride (TG) を測定した。その結果 clofibrate (300 mg/kg) 投与では血清 TG がコントロールに比べて 57%, Chol が 77% に低下していたのに対して、**44b** (100 mg/kg, 200 mg/kg) では血清 TG がコントロールに比べて 1.4%, 1.5%, Chol が 31%, 37% に低下していた (Table 2)。しかし、**44b** は正常マウス、糖尿病マウスに対しては脂質低下作用を示さなかった。

また、**44b** の脂質低下作用を WHHL ウサギ (雄, 6 カ月, 各 1 匹) を用いて調べた。0.5% CMC に

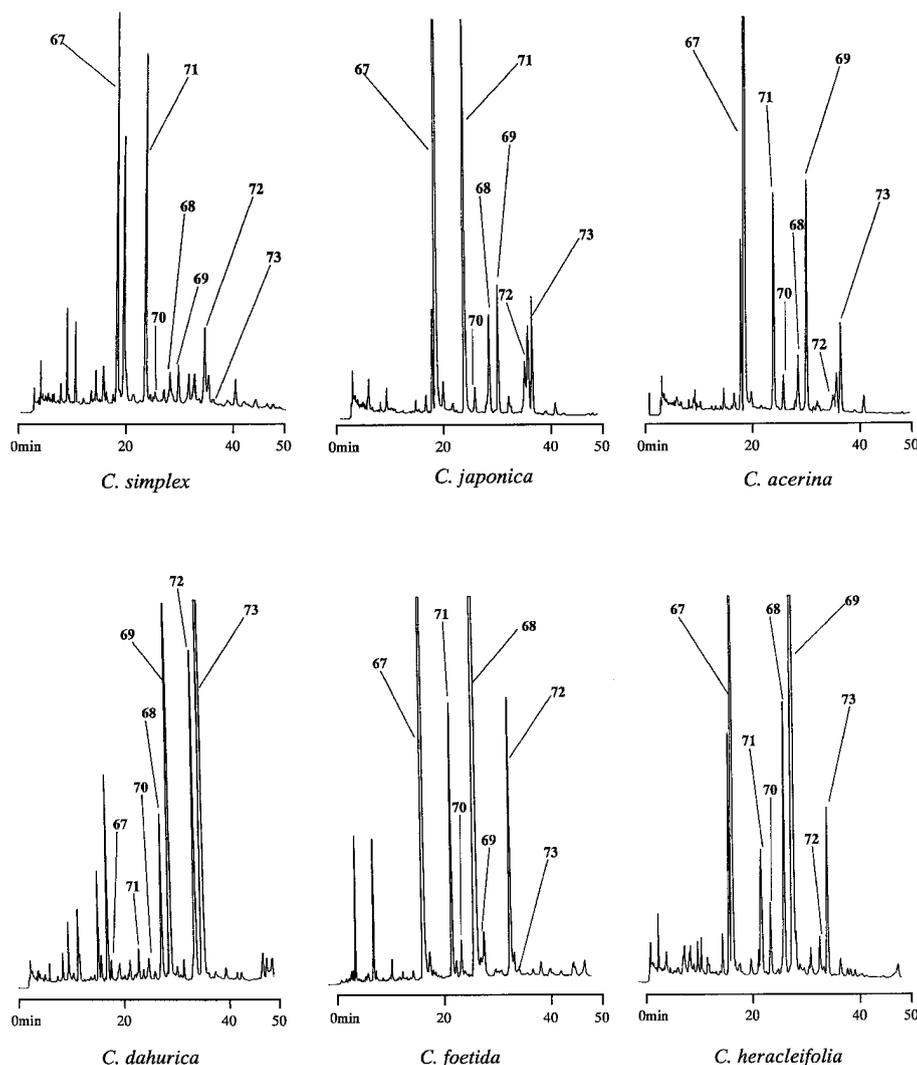


Fig. 19. HPLC Profiles of Compounds 67–73 from H₂O-MeOH (4 : 1) Extracts of Dried Rhizomes of *Cimicifuga* Species

HPLC Condition: column, Cosmosil 5PE-MS (5 μ m, 4.6 \times 150 mm); mobile phase, MeCN-1% AcOH (10.5–24% 50 min, liner gradient); flow rate: 1.0 ml/min; column temperature: 40 $^{\circ}$; detection: UV 330 nm

懸濁した **44b** を 10 mg/kg あるいは 30 mg/kg の用量で 7 日間連続経口投与した。薬剤投与, 0 日, 7 日, 投与終了 7 日後, 12 時間絶食後に採血し, TG, Chol, リン脂質を酵素法で測定した。その結果, いずれの脂質に対しても脂質低下作用は認められなかった。

現在のところ, triton WR-1339 による誘発高脂血症は, その lipoprotein lipase 阻害に由来すること⁹¹⁾が明らかにされているので, **44b** の強い抗高脂血症作用は lipoprotein lipase が関与する系での相互作用の結果であると推定している。

芳香族成分の生物活性

ラットの動脈ストリップは norepinephrine (NE) 10⁻⁷ M で, 持続的な収縮を起こす。その収縮は

acetylcholine (Ach) で, NE 投与前のレベルまで弛緩する。そこに再度 NE 10⁻⁷ M を投与すると, 持続的な収縮が起こる。永井らは fukinolic acid (**67**) と cimicifugic acid D (**71**) のそれぞれ 10⁻⁴~10⁻⁵ M を前投与し, 収縮開始期 (phasic) よりは持続期 (tonic) の収縮が強く阻害されることを明らかにした。また, cimicifugic acid C (**70**) 10⁻⁴~10⁻⁵ M は NE 10⁻⁷ M と同様の収縮を起こし, **67** と **70** とは対照的であることを示した。さらに, そのメカニズムを調査し, **67** と **70** は Ca²⁺ のチャネルを阻害すると結論した。⁹²⁾

単子葉植物のニラとヒエの種子の発芽を fukinolic acid (**67**) と cimicifugic acid A (**68**) は 1.0 \times 10⁻⁴ M で強く抑制した。**67** と **68** は双子葉植物のゴマの

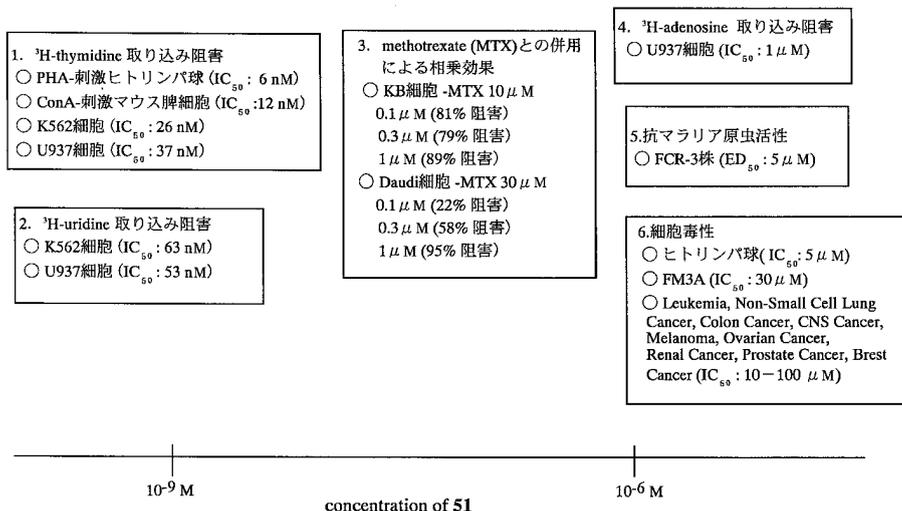


Fig. 20. Biological Activities of Cimicifugoside (51)

Table 2. Results of Antilipidemic Experiments

Schedule

Result

	Dose mg/kg	BW-gain g	Plasma lipid (mg/100 ml)	
			TG	Chol
Control	—	-7.4 ± 0.5	1980 ± 1007 100%	561 ± 180 100%
Clofibrate	300	-7.3 ± 0.6	1130 ± 578 57%	434 ± 142 77%
Acerinol	100	-7.8 ± 1.1	27 ± 12 1.40%	174 ± 34 31%
	200	-7.4 ± 1.0	29 ± 8 1.50%	205 ± 46 37%

種子を 3.0×10^{-3} M で強く阻害した。67 と 68 は α -amylase を阻害し、その IC₅₀ は $2.5 - 4.0 \times 10^{-5}$ M であった。また、それらは carboxypeptidase A を阻害し、その IC₅₀ は $1.7 - 2.0 \times 10^{-4}$ M であった。これらの酵素阻害は発芽阻害のメカニズムに部分的に関与していると推定した。⁹³⁾

67 と 68 は collagenase (Wako), 又は trypsin, pronase E, あるいは、それらの併用による collagen の分解を阻害した。collagen の分解は創傷の初

期と傷の治癒の過程で起こることが知られている。67 と 68 などが collagen 分解を阻害したことから、これらの化合物は升麻が痔や傷の治癒効果を示す本体である可能性を示唆している。⁹⁴⁾ フキ *Petasites japonicus* も民間では傷の治療に使われるが、著者の経験では、創傷の初期に使ったためか、癒着を認めない。サラシナショウマとフキに共に、67 が含まれ、collagen 分解を阻害することは興味もたれる。

著者らがサラシナショウマ属植物から 67 及び cimicifugic acid 類を報告したことが、ドイツの研究者達にインパクトを与えたと思われる。ヨーロッパ産の *C. racemosa* は長年女性の生理不順や更年期障害の治療に使われてきた。その本体が ferulic acid であるという報告があったが、その後はエキスが使われるものの、本体解明は進まなかった。著者らは無機イオンや塩基性アミノ酸と塩を形成していた 67 及び cimicifugic acid 類を遊離な形にして単離精製した。A. Nahrstedt らは著者らの方法を参考に 67 及び cimicifugic acid 類を得、それらが estrogen 様作用の本体であることを報告した。Estradiol は 10^{-10} M で活性 (estrogen 依存性 MCF-7 細胞の幼若化) を示すが、67 は 5×10^{-8} M でそれと同程度の活性を示したと報告した。⁹⁵⁾

また、彼らは好中球由来の elastase に対する阻害活性を調査し、caffeic acid の IC₅₀ は 93 μM であるのに対し、fukinolic acid (67) のそれは 0.23 μM, cimicifugic acid A (68) のそれは 2.2 μM, cimicifugic

acid B (69)のそれは11.4 μM , cimicifugic acid F (71)のそれは18.0 μM で, cimicifugic acid E (70)は非常に弱い活性を示したと報告した. 彼らは elastase が創傷時に活性化するので, それを強く阻害するこれらの化合物が *C. racemosa* の抗炎症性成分であると報告した.⁹⁶⁾

乙字湯が更年期の不定愁訴や痔の治療薬として利用され, 症例報告も多い.⁹⁷⁾ 乙字湯には当帰, 柴胡, 黄芩, 甘草, 大黄と共に, 升麻が配合される. 不定愁訴の改善や痔の治療に fukinolic acid や cimicifugic acid 類が関与していることが期待され, 興味を持たれる. 補中益気湯は補剤の代表的な漢方方剤で, 多岐にわたる症例報告が見られる.⁹⁸⁾ その方剤には人参, 白朮 (蒼朮), 黄耆, 当帰, 陳皮, 大棗, 柴胡, 甘草, 生姜と共に, 升麻が配合される. 消化器系の機能改善に升麻が関与すると思われる, さらなる研究が期待される.

謝辞 本研究を進めるにあたり御協力を賜りました大阪薬科大学第1生薬学教室 草野昭子, 客員研究員, 芝野真喜雄助手, 高平正行博士, 伊堂寺真弓元助手, 北川智修士, 塚本大介院生, 柳正和修士はじめ大阪薬科大学第1生薬学教室の皆様深く感謝いたします. また, 御助言と御協力を賜りました星薬科大学 永井正博教授, 瀬山義幸教授, ノースカロライナ大学研究員, 桜井信子博士, 東北大学野副重男教授, 伏谷眞二助教授, 明治薬科大学 奥山徹教授, 徳島文理大学 在原重信教授, 静岡薬科大学 宮瀬敏男助教授, 東洋大学 野本享資教授, 岡山大学薬学部 綿矢有佑教授, 神戸大学医学部塩見雅志助教授, 昭和薬科大学 北條博史教授, サントリー(株)岩下隆研究員, に心より御礼申し上げます.

また本研究を進めるにあたり X線結晶解析をして下さった大阪薬科大学 石田寿昌教授, 尹靖子助手, MSスペクトルを測定して下さった大阪薬科大学 藤嶽美穂代助手, NMRスペクトルを測定して下さった大阪薬科大学 箕浦克彦助手, 各種サラシナショウマ属植物を育成された東北大学薬学部薬用植物園 早坂英記文部技官, 大場慶司文部技官, 各種酵素を恵与された天野製薬株式会社 に心より御礼申し上げます.

REFERENCES

- 1) Tamura M., "Useful Plant of The World," ed. by Hotta M., Ogata K., Nitta A., Hoshikawa K., Yanagi M., Yamazaki K., Heibon Ltd., Tokyo, 1989, p. 268.
- 2) Ohwi J., "Flora of Japan", Shibundo, Tokyo, 1965, p. 632.
- 3) Mitsuhashi H., "Illustrated Medicinal Plants of The World in Colour," Hokuryukan Co., Ltd., Tokyo, 1988, pp. 87-90.
- 4) "The Interpretation of The Japanese Pharmacopeia XIII," 1st Addition, Hirokawa, Tokyo, 1998, D-11.
- 5) Komatsu K., Li X-B., Yamaji S., Namba T., *Nat. Med.*, **50**, 222-231 (1996).
- 6) Li X-B., Komatsu K., Yamaji S., Takano A., Namba T., *Nat. Med.*, **51**, 148-161 (1997).
- 7) Hanioka H., Tatsuno K., "Treatments with Yakkyoku Seizai, 212 Kampo Prescriptions," Yakuji-jihō Co., Tokyo, 1998.
- 8) Weiss R. F., "Lehrbuch der Phytotherapie", transd. by Yamagishi N., Yasaka Shobo, Tokyo, 1995, pp. 394-400.
- 9) Shibata M., Yamatake M., Amatani S., Fukushima M., *Yakugaku Zasshi*, **95**, 539-546 (1975).
- 10) Shibata M., Sakurai N., Onoda M., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 911-915 (1977).
- 11) Shibata M., Ikoma M., Onoda M., Sato H., Sakurai N., *Yakugaku Zasshi*, **100**, 1143-1150 (1980).
- 12) Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1940-1944 (1972).
- 13) Ito M., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 580-583 (1976).
- 14) a) Henmi H., Kitame H., Ishida N., Kusano G., *Proc. Symp. WAKANYAKU*, **11**, 61-66 (1978); b) *Idem.*, *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 339-349 (1979); c) **3**, 636-642 (1980); d) **3**, 643-648 (1980).
- 15) Yamahara J., Kobayashi M., Kimura H., Miki K., Kozuka M., Sawada T., Fujimura H., *Shyoyakugaku Zasshi*, **39**, 80-84 (1985).
- 16) Shiotani Y., Terasawa K., Miyashiro H., Hattori M., Komatsu K., Li X-B, Namba T., *J. Traditional Medicines*, **10**, 110-117 (1993).
- 17) Kato H., Mitamura M., Nitta J., Kachi M., O-

- hara M., Tanaka Y., Tsurufuji S., Hattori M., Nakagawa H., *Idem.*, **10**, 13–20 (1993).
- 18) Hirabayashi Y., Ochiai H., Sakai S., Nakajima K., Terasawa K., *Planta Med.*, **61**, 221–226 (1995).
- 19) Li J. X., Kadota S., Li H. Y., Miyahara T., Namba T., *J. Traditional Medicines*, **13**, 50–58 (1996).
- 20) Takemoto T., Kusano G., Yamamoto N., *Yakugaku Zasshi*, **90**, 68–72 (1970).
- 21) Inoue T., Tanaka T., Isawa K., *Shoyakugaku Zasshi*, **24**, 76–80 (1970).
- 22) Kusano G., Takemoto T., *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1133–1137 (1975).
- 23) Kusano G., Murakami Y., Sakurai N., Takemoto T., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 82–85 (1976).
- 24) Kusano G., Uchida H. Murakami Y., Sakurai N., Takemoto T., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 321–325 (1976).
- 25) Kusano G., Hojo S., Kondo Y., Takemoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3182–3189 (1977).
- 26) Takemoto T., Kusano G., Yamamoto N., *Yakugaku Zasshi*, **86**, 1006–1010 (1966).
- 27) Takemoto T., Kusano G., *Yakugaku Zasshi*, **87**, 1569–1572 (1967).
- 28) Takemoto T., Kusano G., Yamamoto N., *Yakugaku Zasshi*, **87**, 1489–1492 (1967).
- 29) Takemoto T., Kusano G., *Yakugaku Zasshi*, **88**, 623–626 (1968).
- 30) Takemoto T., Kusano G., *Yakugaku Zasshi*, **89**, 964–958 (1969).
- 31) Takemoto T., Kusano G., Kawahara I., *Yakugaku Zasshi*, **90**, 64–67 (1970).
- 32) Kusano G., Nozoe S., *Heterocycles*, **20**, 1951–1952 (1983).
- 33) Kimura O., Sakurai N., Inoue T., *Yakugaku Zasshi*, **103**, 293–299 (1983).
- 34) Sakurai N., Nagai M., Inoue T., *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1354–1360 (1975).
- 35) Sakurai N., Inoue T., Nagai M., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 158–165 (1979).
- 36) Sakurai N., Kimura O., Inoue T., Nagai M., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 955–960 (1981).
- 37) Kimura O., Sakurai N., Nagai M., Inoue T., *Yakugaku Zasshi*, **102**, 538–545 (1982).
- 38) Sakurai N., Nagai M., Inoue T., *Yakugaku Zasshi*, **92**, 724–728 (1972).
- 39) Ye W., Zhang J., Che C. T., Ye T., Zhao S., *Planta Med.*, **65**, 770–772 (1998).
- 40) Baba K., Kozawa M., Hata K., Ishida T., Inoue M., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2182–2187 (1981).
- 41) Sakurai N., Koeda M., Inoue T., Nagai M., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 48–51 (1995).
- 42) Li J. X., Kadota S., Hattori M., Yoshimachi S., Shiro M., Oogami N., Mizuno H., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 832–841 (1993).
- 43) Kadota S., Li J. X., Tanaka K., Namba T., *Tetrahedron*, **51**, 1143–1166 (1995).
- 44) a) Corsano S., Spano G., *Atti. Accad. Nazl. Lincei. Rend., Classe. Sci. Fis., Mat. Nat.*, **32**, 674–678 (1962); b) Linde H., *Arz.-Forsch.*, **14**, 1303–1039 (1964); c) Corsano S., Mellor J. M., Ourisson G., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 185–186; d) Corsano S., *Gazz. Chim. Ital.*, **95**, 117–126 (1965); e) Corsano S., Piancatelli G., *Ric., Sci.*, **37**, 366–369 (1967); f) Piancatelli G., Corsano S., *Ric., Sci.*, **38**, 532–536 (1968); g) Corsano S., Piancatelli G., *Gazz. Chim. Ital.*, **99**, 1140–1149 (1969).
- 45) a) Corsano S., Linde H., Piancatelli G., *Panizzi. Chemia.*, **21**, 130 (1967); b) Linde H., *Arch. Pharma.*, **300**, 885 (1967); c) Linde H., *Arch. Pharma.*, **300**, 982 (1967); d) Linde H., *Arch. Pharma.*, **301**, 120–138 (1968); e) Piancatelli G., Corsano S., Scettri A., *Gazz. Chim. Ital.*, **101**, 797–802 (1971); f) Radics L., Kajitar-Peredy M., Corsano S., Standoli L., *Tetrahedron, Lett.*, **1975**, 4287–4290.
- 46) a) Linde H., *Arch. Pharma.*, **301**, 335–341 (1968); b) Bergar S., Junior P., Kopanski L., Short Lectures and Posters of the 36th Annual Congress of the Society for Medical Plant Research. Frieberg, September (1988) (*Planta Med.*, **54**, 579 (1988)).
- 47) Bedir E, Khan K. A., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 425–427 (2000).
- 48) Shao Y., Harris A., Wang M., Zhang H., Cordell G. A., Bowman M., Lemmo E., *J. Nat. Prod.*, **63**, 905–910 (2000).
- 49) Koeda M., Aoki Y., Sakurai N., Nagai M., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 771–776 (1995).
- 50) Sakurai N., Koeda M., Aoki Y., Nagai M., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1475–1482 (1995).
- 51) Kusano G., Shibano M., Idoji M., Minoura K., *Heterocycles*, **36**, 2367–2371 (1993).
- 52) Gemeihardt K., Sadee H., Schenk G., *Pharm.*

- Ztg.*, **101**, 238 (1956).
- 53) Husson H. P., "The Alkaloids Chemistry and Pharmacology," ed. by Brossi A., Academic Press, Inc, Orland, Florida, U. S. A., 1985, Vol. 26, pp. 1-51.
- 54) Kapile R. S., "The Alkaloids Chemistry and Physiology," XIII, ed. by Manske R. H. F., Academic Press, Inc, Orland, Florida, U. S. A., 1971, pp. 273-302.
- 55) Bermann M., "Dissertation ETH Nr. 7523," (supervised, by Dr. D. Arigoni), 1984, pp. 139-142.
- 56) (unpublished)
- 57) Kusano G., Idoji M., Sogoh Y., Shibano M., Kusano A., Iwashita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1106-1110 (1994).
- 58) Kusano A., Shibano M., Kitagawa S., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1940-1943 (1994).
- 59) Kusano A., Shimizu K., Idoji M., Shibano M., Minoura K., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 279-283 (1995).
- 60) Kusano A., Shibano M., Kusano G., Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2078-2085 (1996).
- 61) Kusano A., Shibano M., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 167-172 (1996).
- 62) Kusano A., Shibano M., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1167-1170 (1995).
- 64) Kusano A., Takahira M., Shibano M., In Y., Ishida T., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 467-472 (1998).
- 65) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1001-1007 (1998).
- 66) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Okuyama T., Kusano G., *Heterocycles*, **48**, 1003-1013 (1998).
- 67) Kusano A., Takahira M., Shibano M., Miyase T., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 511-516 (1999).
- 68) Kusano A., Shibano M., Kusano G., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1175-1179 (1999).
- 69) Pegel K. H., Rogers C. B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1985**, 1711.
- 70) Anetai M., Masamune T., *Chemistry Today*, **1985**, Vol. 9, 16-24.
- 71) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991).
- 72) Kitagawa I., Taniyama T., Hayashi T., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3353-3356 (1983).
- 73) Beck A. B., Knox J. R., *Aust. J. Chem.*, **24**, 1509-1518 (1971).
- 74) Kudou S., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K., Okubo K., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2227-2233 (1991).
- 75) Takeda K., Harborne J. B., Self R., *Phytochemistry*, **25**, 1337-1342 (1986).
- 76) Asen S., *Phytochemistry*, **23**, 2523-2526 (1984).
- 77) Wald B., Wray V., Galensa R., Herrmann K., *Phytochemistry*, **28**, 663-664 (1989).
- 78) Veit M., Geiger H., Czygan F. C., Markham K. R., *Phytochemistry*, **29**, 2555-2560 (1990).
- 79) Harborne J. B., Greenham J., Eagles J., *Phytochemistry*, **29**, 2899-2900 (1990).
- 80) Dillon J., Nakanishi K., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 5417-5422 (1975).
- 81) Demarco P. V., Farkas E., Doddrell D., Mylari B., Wenkert E., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5480-5486 (1968).
- 82) Djerassi C., Klyne W., *J. Chem. Soc.*, **1963**, 2390-2402
- 83) Takahira M., Kusano A., Shibano M., Kusano G., Sakurai N., Nagai M., Miyase T., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 362-365 (1998).
- 84) Takahira M., Kusano A., Shibano M., Kusano G., Miyase T., *Phytochemistry*, **49**, 2115-2119 (1998).
- 85) Takahira M., Yanagi Y., Kusano A., Shibano M., Baba K., Kusano G., Sakurai N., Nagai M., *Nat. Med.*, **52**, 330-338 (1998).
- 86) Yanagi M., Shibano M., Kusano G., Abstracts of papers, The 45th Annual Meeting Japanese Soc. Pharmacognosy, 1998, Sendai, p. 206.
- 87) Yanagi M., Kusano G., Shibano M., Abstracts of papers 2, The 120th Annual Meeting Pharm. Soc. Japan, 2000, Gifu, p. 150.
- 88) Matuhashi Y., Kusano G., Kusano A., Yamaguchi M., Tikuma T., Hojyou H., Abstracts of papers 4, The 121st Annual Meeting Pharm. Soc. Japan, 2001, Sapporo, p. 54.
- 89) Takahira M., Kusano A., Shibano M., Kusano G., Koizumi K., Suzuki R., Kim H-S., Wataya Y., *Bio. Pharm. Bull.*, **21**, 823-828 (1998).

- 90) Mahmoud H. K., Djiby D., Sungman C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 6667–6670 (1983).
- 91) Sato K., Akiba Y., Kimura S., Horiguchi M., *Comp. Biochem. Physiol Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **112**, 315–319 (1995).
- 92) Noguchi M., Nagai M., Koeda M., Nakayama S., Sakurai N., Takahira M., Kusano G., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163–1168 (1998).
- 93) Kusano G., Takahira M., Shibano M., Kusano A., Okamoto Y., Tsujibo H., Numata A., Inamori Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 997–999 (1998).
- 94) Kusano A., Seyama Y., Shibano M., Kusano G., 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy, Abs. Papers, 2000, p. 130.
- 95) Kruse S. O., Lohning A., Pauli G. F., Win-
terhoff H., Nahrstedt A., *Planta Med.*, **65**, 763–764 (1999).
- 96) Loser B., Kruse S. O., Melzig M. F., Nahrstedt A., *Planta Med.*, **66**, 751–753 (2000).
- 97) a) Ishida K., *J. Clini. Exp. Med.*, **167**, 756–759 (1993). b) Gotou T., Ryomura K, Kawamura T., Shimizu K., Kodama H., Itinowatari N., *Prog. Med.*, **17**, 367–369 (1997). c) Endou T., *Prog. Med.*, **17**, 2154–2154 (1997).
- 98) a) Kobayashi H., Ishii M., *Kampo Kenkyu*, **2001**, No. 2, 14(54)–20(60). b) Mitani K., *J. Ther.*, **82**, 2951–2957 (2000). c) Igarashi T., Gonoi T., Hanada M., Sato H., Munakata G., Suzuki S., Kusano Y., Yoshinari T., *Therapeutic Res.*, **15**, 4526–4530 (1995).