

トリカブト属ジテルペンアルカロイドの LC-APCI-MS による
構造解析と末梢血流量増加作用について

和田 浩二

Studies on Structural Elucidation of *Aconitum* Diterpenoid Alkaloid
by LC-APCI-MS and Effects of *Aconitum* Diterpenoid
Alkaloid on Cutaneous Blood Flow

Koji WADA

Hokkaido College of Pharmacy, 7-1, Katsuraoka-cho, Otaru 047-0264, Japan

(Received August 1, 2002)

The chemical constituents of *Aconitum yesoense* var. *macroyesoense* and *Aconitum japonicum* were examined using high-resolution spectral analysis. Twelve novel alkaloids were isolated from *A. yesoense* var. *macroyesoense* together with 20 known alkaloids. Eight novel alkaloids were isolated from *A. japonicum* together with 15 known alkaloids. An HPLC-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (HPLC-APCI-MS) method was useful for the simultaneous determination of 21 *Aconitum* alkaloids found in *A. yesoense* var. *macroyesoense* and *A. japonicum*. These compounds were fairly stable under the conditions used, and the protonated molecules or fragment ions characteristic of the molecule appeared as base peaks in the mass spectra and were used for selected ion monitoring. HPLC-APCI-MS is a very promising approach for structural investigations of positional isomers and stereoisomers. This method was applied successfully to stereoisomeric *Aconitum* alkaloids differing in configuration at C-1, -6, or -12. Comparison of the APCI spectra showed that the abundance of fragment ions was significantly higher for the C-1, -6, or -12 β -form alkaloid than for C-1, -6, or -12 α -form alkaloid. The main alkaloid constituents in the root of *A. yesoense* var. *macroyesoense*, *Aconitum* alkaloids of the C₂₀-diterpenoid type, kobusine and pseudokobusine, and their acyl derivatives were examined for their peripheral vasoactivities by measuring laser-flowmetrically the cutaneous blood flow in the hind foot of mice after intravenous administration. It is thought that the hydroxyl groups of alkaloids, especially a free OH group of pseudokobusine at C-6, were important for action on the peripheral vasculature leading to dilatation, and the results indicated that esterification of the hydroxyl group at C-15 with either anisoate, veratroate, or *p*-nitrobenzoate may contribute to enhancement of the activity of the parent alkaloids.

Key words—*Aconitum* alkaloids; LC-APCI-MS; cutaneous blood flow; *Aconitum yesoense* var. *macroyesoense*; *Aconitum japonicum*

1. はじめに

トリカブト属植物 (*Aconitum* spp.) の塊根は附子として漢薬において重要な位置を占め、傷寒論、金匱要略の処方中に多く配剤されており、虚寒症の患者の衰えた新陳代謝機能を亢進させる効力を持つとされ、疼痛、厥冷、麻痺などの症候に用いられ、漢方の湯液療法に欠くことのできない薬物である。一方、トリカブトは強い毒性を有しており、北海道でアイヌ民族が狩猟のために矢毒として用いたこと

は有名である。

トリカブト属植物に含有されるジテルペンアルカロイドは C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド (aconitine 系及び lycoctonine 系) 及び C₂₀-ジテルペンアルカロイド (atisine 系及び veatchine 系) に分類される (Chart 1).¹⁻³⁾ ジテルペンアルカロイドの研究に関する歴史は古く、1819 年、*Delphinium staphisagria* L. よりアルカロイドが単離され、delphinine (1) と命名された⁴⁾のが始まりで、次いで猛毒性の aconitine (2)⁵⁾が *Aconitum napellus* L. より単離されている (Chart 1)。本邦産トリカブトに関する研究は真島・杉野目を中心に精力的な研究が展開され、マンシュウトリカブト (*A. manschuri-*

北海道薬科大学 (〒047-0262 小樽市桂岡町 7-1)

e-mail: kowada@hokuyakudai.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会北海道支部奨励講演の受賞を記念して記述したものである。

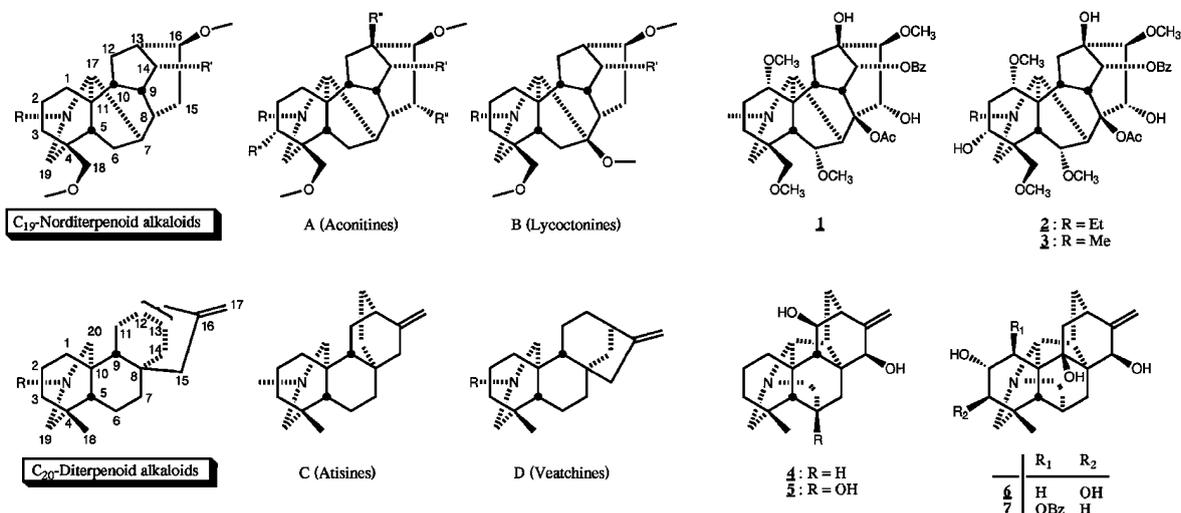


Chart 1

cum NAKAI) から猛毒性の mesaconitine (3) が単離され (Chart 1),⁶⁾ その後の成分研究で本邦産トリカブトは猛毒性の aconitine (2) 類を主要成分として含まれることが報告されている。⁷⁾ トリカブト根は原植物の種類, 産地及び採集時期などにより, aconitine 系 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド含量の変化が著しく,⁸⁾ 生薬の薬理活性や毒性に大きな影響を与えるので, トリカブトの成分的特徴を検討するためにガスクロマトグラフィー⁸⁾による総アルカロイドの定量及び高速液体クロマトグラフィー (UV 検出)⁹⁻¹⁵⁾を用いた aconitine 系 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイドの定量法が報告されている。

トリカブトのアルカロイド成分の薬理作用に関しては aconitine 系 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイドについて詳細に検討され,¹⁶⁾ 鎮痛活性及び毒性に関する構造活性相関の報告があり,¹⁷⁾ C-8 位アセチルオキシ基が毒性及び鎮痛活性発現に対して大きく関わっていることが示された。これより, 附子の鎮痛作用の活性成分が aconitine 系 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイドであると考えられる。さらに, 附子が配合されている漢方薬の牛車腎気丸及び桂枝加朮附湯に皮膚温上昇作用を認め,¹⁸⁾ 血管拡張作用が末梢循環の改善に有効であると考えられる。Aconitine 系 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド以外では, C₂₀-ジテルペンアルカロイド: kobusine (4), pseudokobusine (5), ignavine (6), hypognavine (7: Chart 1) の鎮痛作用の報告がある。¹⁹⁾

これまでにトリカブト属植物の主要成分と考えら

れている aconitine 系アルカロイドを中心に成分・定量, 薬理作用の報告がされているが, その他の lycotoxine 系 C₁₉-及び C₂₀-アルカロイドの成分定量や薬理作用に関する報告は少ない。本稿では, 北海道に自生するトリカブト属植物である定山溪産テリハブシ [*Aconitum yesoense* var. *macroyesoense* (NAKAI) TAMURA] 及び銭函産オクトリカブト [*Aconitum japonicum* THUNB.] より得られたアルカロイド成分の構造解析, 定量法及び構造と薬理活性との関係について検討した著者の知見を紹介する。

2. 定山溪産テリハブシ及び銭函産オクトリカブトのアルカロイド成分

北海道に自生する札幌市定山溪産テリハブシ及び小樽市銭函産オクトリカブトの成分検索を行った。テリハブシの成分研究については真島と森尾,²⁰⁾ 杉野目ら²¹⁻²³⁾の報告が, またオクトリカブトについては真島ら²⁴⁾の報告があるにすぎない。

札幌市定山溪で採集したテリハブシの塊根をエタノール冷浸により抽出し, 得られた粗アルカロイドからシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び HPLC を併用することにより 32 種の化合物を単離した (Chart 1, 2)。そのうち, 20 種は既知アルカロイドであり, kobusine (4),^{21-23,25)} pseudokobusine (5),^{21-23,25)} karakoline (8),²⁶⁾ subcusine (9),²⁷⁾ delcosine (10),²⁸⁻³³⁾ 14-acetyldelcosine (11),³³⁾ lucidusculine (12)^{20-23,25)} 及び luciculine (13)^{20-23,25)} は標品との混融試験及びスペクトルデータを比較することにより同定した。1-Acetylluciduline (14),³⁴⁾

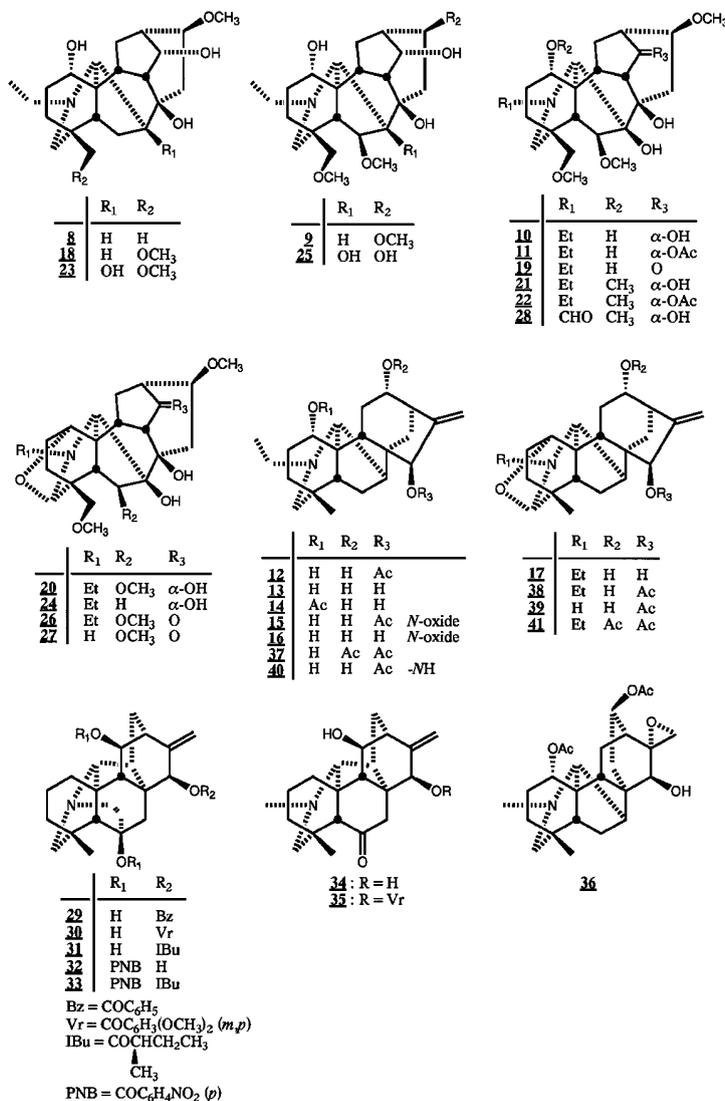


Chart 2

flavidine (**15**),³⁵ flavamine (**16**)³⁵及び dehydro-luciline (**17**)³⁶は合成標品との比較により同定した。Isotalatizidine (**18**),²⁶ 14-dehydrodelcosine (**19**),²⁶ 18-methoxygadesine (**20**),³⁷ browniine (**21**),²⁶ 14-acetylbrowniine (**22**),^{26,33} viresceniine (**23**),²⁶ nevadensine (**24**)³⁸及び macrocentridine (**25**)³⁹は文献記載スペクトルデータと比較により同定した。

新規 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイドである ye-soensine (**26**)⁴⁰は分子式 C₂₄H₃₅NO₇を与え、¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び MS から **19**の C-1-C-19位が分子内エーテル結合した anhydrohydroxy-14-dehydrodelcosineと推定され (Chart 2), **19**をアセトン-水 (5 : 1, v/v) 中過マンガン酸カリウムと反応

させることにより,^{41,42} 化合物 **26** (収率 52%) 及び *N*-deethylanhdrohydroxy 体 (**27**; 収率 18%) が得られ、ここで得られた化合物 **26** とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した。新規 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド α-oxobrowniine (**28**)⁴³は分子式 C₂₃H₃₅NO₇を与え、¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び MS から **21**の *N*-CHO 体である α-oxo-browniineと推定され (Chart 2), **21**を無水アセトン中過マンガン酸カリウムと反応させると、α-oxo 体 (**28**; 収率 19%) 及び 19-oxo 体⁴¹ (収率 20%) が得られ、ここで得られた化合物 **28** とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した。

新規 C₂₀-ジテルペンアルカロイド 15-benzoylpseudokobusine (**29**)⁴⁴ 及び 15-veratroypseudoko-

busine (30)⁴⁴はそれぞれ分子式 $C_{27}H_{31}NO_4$ 及び $C_{29}H_{35}NO_6$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS からそれぞれ 5 の 15-benzoate 及び 15-veratroate と推定された (Chart 2). 5 をピリジン中塩化ベンゾイル又は塩化ベラトロイルと反応させたところ、それぞれ 15-benzoate (29; 収率 1%) と 4 種の benzoate が得られ、また、15-veratroate (30; 収率 8%) と 4 種の veratroate が得られ、ここで得られた化合物 29 及び 30 とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した。

新規 C_{20} -ジテルペンアルカロイド yesodine (31)⁴⁰は $[\alpha]_D -9.4^\circ$, 分子式 $C_{25}H_{35}NO_4$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から 15-(2-methylbutyryl) pseudokobusine と推定された (Chart 2). 5 をピリジン中塩化 *p*-ニトロベンゾイルと反応させると、6,11-di-*p*-nitrobenzoate (32; 収率 1%) と 6 種の *p*-nitrobenzoate が得られ (Chart 2), 32 をジクロロメタン中、*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide 及び 4-(dimethylamino)pyridine の存在化 *S*-(+)-2-methylbutyric acid と反応させると、15-[(*S*)-2-methylbutyryl]-6,11-di-*p*-nitrobenzoylpseudokobusine (33; 収率 29%) が得られた (Chart 2). 33 を triethylamine-MeOH-水 (1:5:1, v/v) の混合溶液で部分加水分解すると、15-[(*S*)-2-methylbutyryl] pseudokobusine (31; 収率 54%) が得られ、スペクトルデータ及び旋光度 ($[\alpha]_D -9.1^\circ$) が一致

したことにより構造を決定した。

新規 C_{20} -ジテルペンアルカロイド yesonine (34)⁴³は分子式 $C_{21}H_{29}NO_3$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から *N*-methyl-*N*, 6-*seco*-6-dehydropseudokobusine と推定され (Chart 2), 5 を CH_3I 塩⁴⁵とし、50%メタノール溶液中、酸化銀と反応させる⁴⁶と化合物 34 (収率 97%) が得られ、スペクトルデータが一致したことにより構造を決定した。新規 C_{20} -ジテルペンアルカロイド yesoline (35)⁴⁷は分子式 $C_{30}H_{37}NO_6$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR, UV 及び MS から 15-veratrolylesonine と推定され (Chart 2), 化合物 35 を加水分解により化合物 34 (収率 64%) とし、yesonine とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した。

新規アルカロイド yesoxine (36)⁴⁴は融点 $184^\circ C$ (dec.), 分子式 $C_{25}H_{35}NO_6$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS からアセチル基が 2 個、*N*-メチル基を有する C_{20} -ジテルペンアルカロイドと推定し、さらに特徴的な環外二重結合がエポキシ基に変換された構造と推定された (Chart 2). 化合物 36 は X 線結晶解析により立体構造を Fig. 1 のように決定した。

新規 C_{20} -ジテルペンアルカロイド 12-acetylucidusculine (37)⁴⁴は融点 $144-147^\circ C$, 分子式 $C_{26}H_{37}NO_5$ を与え、 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から 12-acetylucidusculine (12,15-diacetylucidusculine)

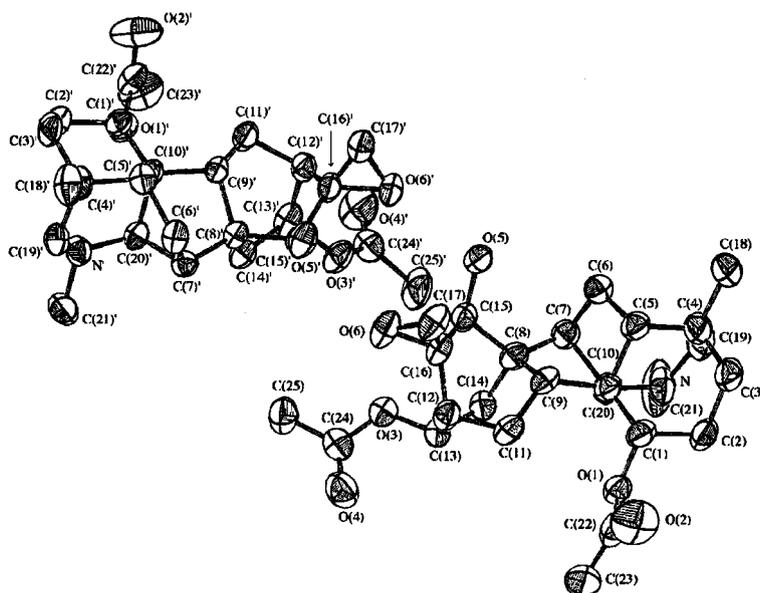


Fig. 1. Perspective View of Yesoxine (36)

と推定された (Chart 2). **13** をピリジン中無水酢酸と反応させると, **12,15-diacetate (37)** (収率 15%) と 2 種の acetate が得られ (Chart 2), ここで得られた化合物 **37** と mp 及びスペクトルデータが一致したことより構造を決定した.

新規 C₂₀-ジテルペンアルカロイド dehydrolucidusculine (**38**)⁴⁸⁾ は融点 186–189 °C, 分子式 C₂₄H₃₃NO₄ を与え, また *N*-deethyldehydrolucidusculine (**39**)⁴⁸⁾ は分子式 C₂₂H₂₉NO₄ を与え, それぞれ ¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び MS から **12** の C-1–C-19 位が分子内エーテル結合した dehydrolucidusculine 及び *N*-deethyldehydrolucidusculine と推定された (Chart 2). **12** を 50% エタノール溶液中酸化銀と反応させると,⁴⁹⁾ **38** (収率 74%), **39** (収率 8%) 及び *N*-deethylucidusculine (**40**; 収率 5%) が得られた (Chart 2). ここで得られた化合物 **38** 及び **39** とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

新規 C₂₀-ジテルペンアルカロイド 12-acetyldehydrolucidusculine (**41**)⁴⁴⁾ は分子式 C₂₆H₃₅NO₅ を与え, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び MS から 12-acetyldehydrolucidusculine と推定され (Chart 2), **38** をピリジン中室温にて無水酢酸と反応させると, 12-acetate (**41**; 収率 85%) が得られ, スペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

小樽市銭函町で採集したオクトリカブトの塊根をメタノール冷浸により抽出し, 得られた粗アルカロイドからアルミナ, シリカゲルカラムクロマトグラフィー, prep. TLC 及び HPLC を併用することにより 23 種の化合物を単離した (Chart 1–3). そのうち, 15 種は既知アルカロイドであり, aconitine (**2**),^{1,50)} delcosine (**10**),^{28–33)} 14-acetyldecosine (**11**)³³⁾ 及び jesaconitine (**42**)^{1,50)} は標品との混融試験及びスペクトルデータを比較することにより同定した. Dehydrolucidusculine (**17**),³⁶⁾ deoxyaconitine (**43**),¹⁾ hypaconitine (**44**),¹⁾ penduline (**45**)⁵¹⁾ 及び hokbusine A (**46**)⁵²⁾ は合成標品との比較により同定した. Mesaconitine (**3**),¹⁾ karakoline (**8**),²⁶⁾ aconifine (**47**),⁵³⁾ anisoezochasmaconitine (**48**),³⁴⁾ ezochasmaconitine (**49**)³⁴⁾ 及び neoline (**50**)¹⁾ は文献記載スペクトルデータと比較により同定した.

新規 C₁₉-ノルジテルペンアルカロイドである deoxyjesaconitine (**51**)^{54,55)} は融点 174–176 °C, 分子式 C₃₅H₄₉NO₁₁ を与え, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 及び MS から 3-deoxyjesaconitine と推定され (Chart 3), **42** をチオニルクロライドと反応させると, anhydrojesaconitine (**52**; 収率 56%) が得られ, **52** を酸化白金触媒化接触還元により 3-deoxy 体 (**51**; 収率 45%) が得られた. この化合物とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

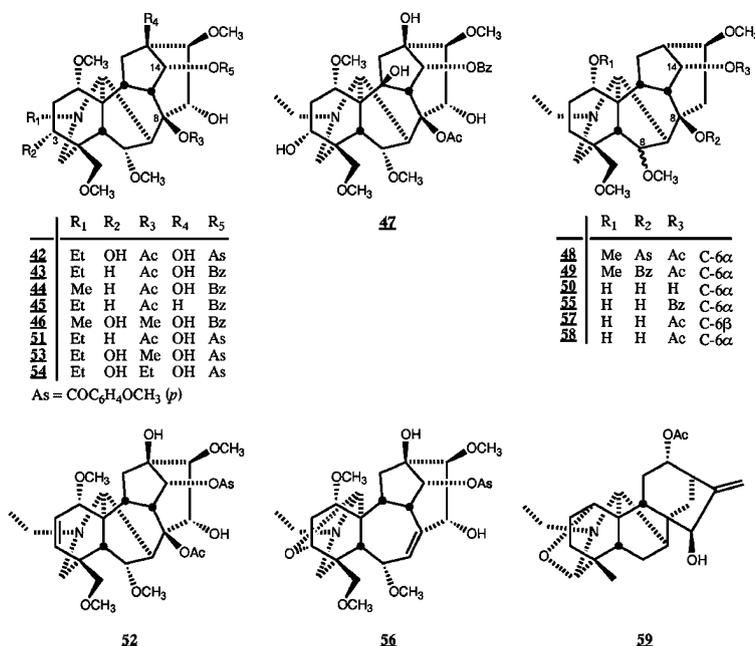


Chart 3

新規 C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド aljesaconitine A (**53**)⁹⁾ 及び aljesaconitine B (**54**)⁹⁾ はそれぞれ分子式 $C_{34}H_{49}NO_{11}$ 及び $C_{35}H_{51}NO_{11}$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から 8-alkoxy 体 (それぞれ 8-OCH₃ 及び 8-OCH₂CH₃) と推定され (Chart 3), **42** をそれぞれメタノール又はエタノール中で攪拌すると 8-alkoxy 体 (**53**; 収率 82% 及び **54**; 収率 72%) が得られ, これらの化合物とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

新規 C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド 14-benzoylneoline (**55**)⁵⁶⁾ は分子式 $C_{31}H_{43}NO_7$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から neoline の 14-benzoate と推定され (Chart 3), **50** をベンゾイル化すると 14-benzoate (**55**; 収率 21%) と 2 種の benzoate が得られ, この化合物とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

新規アルカロイド secojesaconitine (**56**)⁵⁷⁾ は融点 175–180°C, 分子式 $C_{31}H_{43}NO_7$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS からメトキシル基が 4 個, アニソイル基, *N*-エチル基を有する C_{19} -ノルジテルペンアルカロイドと推定し, さらに **42** の C-3-C-17 位が分子内エーテル結合した構造と推定された (Chart 3). 化合物 **56** は X 線結晶解析により立体構造を Fig. 2 のように決定した.

新規アルカロイド subcumine (**57**)⁵⁸⁾ は融点 200–202°C, 分子式 $C_{26}H_{41}NO_7$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS からメトキシル基が 3 個, アセチル基, *N*-エチル基を有する C_{19} -ノルジテルペンアルカロイドと推定し, さらに **50**²⁶⁾ 及び 14-acetylneoline (**58**)²⁶⁾ とスペクトルデータが類似しており,

14-acetylneoline の 6 β -体と推定された (Chart 3).

化合物 **57** は X 線結晶解析により立体構造を Fig. 3 のように決定した. 新規 C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド subcumine (**9**)⁵⁸⁾ は融点 194–196°C, 分子式 $C_{24}H_{39}NO_6$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から 14-deacetylsubcumine と推定され (Chart 3), **57** の加水分解により化合物 **9** が得られ, この化合物とスペクトルデータが一致したことにより構造を決定した.

新規 C_{20} -ジテルペンアルカロイドである subdesculine (**59**)⁵⁷⁾ は分子式 $C_{24}H_{33}NO_4$ を与え, 1H -NMR, ^{13}C -NMR 及び MS から 12-acetyldehydrocuculine と推定され (Chart 3), **38**⁴⁸⁾ 及び **41**⁴⁴⁾ とスペクトルデータを比較することにより構造を決定した.

3. アルカロイドの HPLC-APCI-MS による分析及び定量

ジテルペンアルカロイドの定量法は HPLC (UV 検出) 法による aconitine 系アルカロイドの報告^{9–15)} があるが, lycocotnine 系 C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド: delcosine (**10**), 14-acetyldelcosine (**11**) 及び C_{20} -ジテルペンアルカロイド: kobusine (**4**), pseudokobusine (**5**), lucidusculine (**12**) はアロイル基を有しないために HPLC (UV 検出) 法で検出できない. 近年, 様々なアルカロイドの分析に LC-大気圧化学イオン化マスペクトロメトリー (APCI-MS) の利用が報告^{59–68)} されている. LC-APCI-MS^{69–77)} は分子内に親水性基 ($-NH_2$, $-NHR$, $-NR_1R_2$, $-CO$, $-OH$ など) を有する化合物を感度良く検出することができ, マスペクト

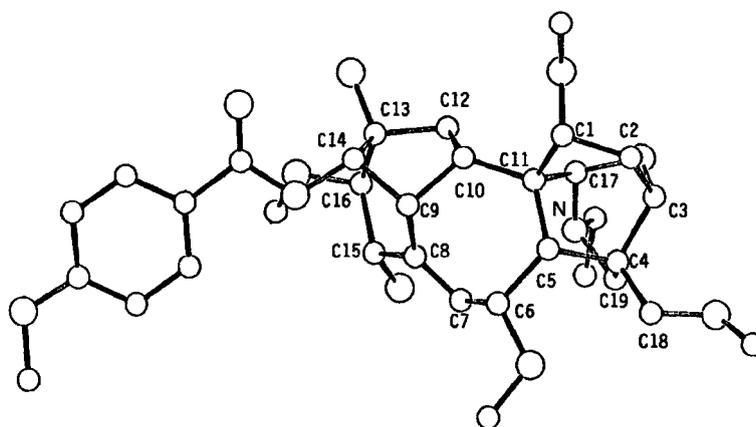


Fig. 2. Perspective View of Secojesaconitine (**56**)

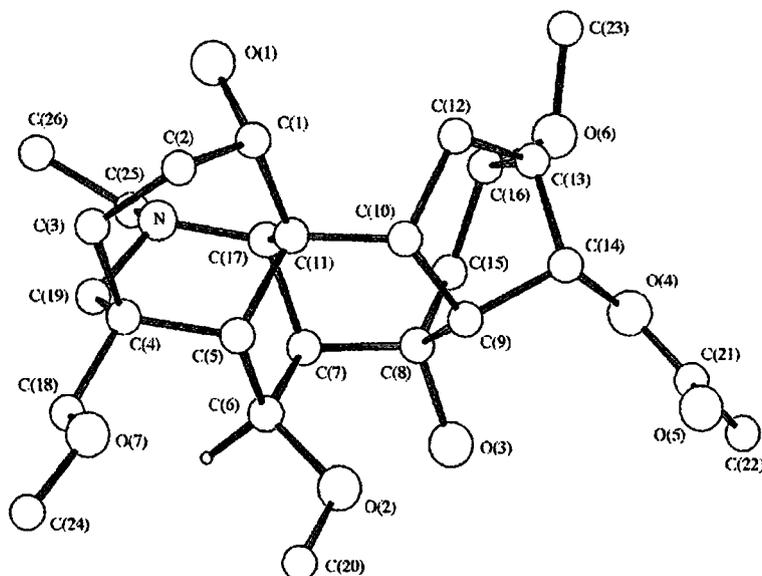


Fig. 3. Perspective View of Subcumine (57)

ルに擬分子 ($[M+H]^+$) イオンやフラグメントイオンがみられる。また、選択イオン検出 (SIM) 法⁷⁸⁾により高選択的、高感度に化合物を検出できることから、LC-APCI-MS/SIM 法は HPLC (UV 検出) 法で検出できないジテルペンアルカロイドの定量に有用な方法であり、ジテルペンアルカロイドの定量法を開発した。^{79,80)}

C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド: aconitine (2), mesaconitine (3), delcosine (10), 14-acetyldelcosine (11), jesaconitine (42), deoxyaconitine (43), hypaconitine (44), hokbusine A (46), neoline (50), deoxyjesaconitine (51), aljesaconitine A (53), aljesaconitine B (54), 14-benzoylaconine (60), 14-benzoylmesaconine (61), 14-anisoylaconine (62), 3-acetylmesaconitine (63) 及び C₂₀-ジテルペンアルカロイド: kobusine (4), pseudokobusine (5), lucidusculine (12), dehydrolucidusculine (38), 11,15-diacetylkobusine (64) (Chart 1-4) を LC-APCI-MS により測定したところ、各アルカロイドのマススペクトルは $[M+H]^+$ イオン及びフラグメントイオンがみられた (Table 1)。C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド 10, 11, 46, 50, 53, 54, 60-62 のマススペクトルは高い強度の $[M+H]^+$ イオンがみられた。2, 3, 42-44, 51 及び 63 のマススペクトルはフラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ が高い強度でみられた。C₂₀-ジテルペンアルカロイド 4, 5, 12, 38

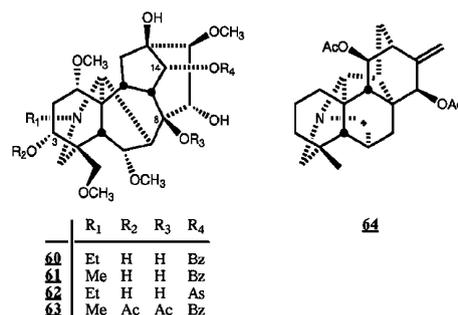


Chart 4

及び 64 のマススペクトルは高い強度の $[M+H]^+$ イオンがみられた。

LC-APCI-MS/SIM 法による C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド 2, 3, 42-44, 46, 51, 53, 54, 60-62, 63 (内部標準) の検出は、各アルカロイドの最も高い強度を示した $[M+H]^+$ イオンあるいはフラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ を選択して行った。HPLC の移動相に 0.05 M CH₃COONH₄-CH₃CN-THF (70 : 15 : 15→20 : 65 : 15, v/v) を用い、流速 1.0 ml/min で 11 分以内によりクロマトグラムが得られ (Fig. 4), 各アルカロイドのイオン化は 2 ng から 20 ng で安定して得られた。各アルカロイドの検量線 (10 ng-10 µg/injection, 42; 50 ng-10 µg/injection) は良い直線性を示し、各アルカロイドの既知量 (10 ng 及び 100 ng, 42; 50 ng 及

Table 1. Protonated Molecular Ions and Characteristic Fragment Ions of *Aconitum* Alkaloids, Obtained by Using LC-APCI-MS^{a)}

Compounds	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Major fragment ion (<i>m/z</i>)
2	646	<u>586</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
3	632	<u>572</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
42	<u>676</u>	616 ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
43	630	<u>570</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
44	616	<u>556</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺), 574 ([M+H-COCH ₂] ⁺)
51	660	<u>600</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺), 630 ([M+H-OCH ₂] ⁺)
46	<u>604</u>	—
53	<u>648</u>	—
54	<u>662</u>	616 ([M+H-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺)
50	<u>438</u>	420 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
60	<u>604</u>	—
61	<u>590</u>	—
62	<u>634</u>	—
63	674	<u>614</u> ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
10	<u>454</u>	436 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
11	<u>496</u>	478 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
4	<u>314</u>	296 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
5	<u>330</u>	312 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
12	<u>402</u>	384 ([M+H-H ₂ O] ⁺), 342 ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺)
38	<u>400</u>	382 ([M+H-H ₂ O] ⁺)
64	<u>398</u>	338 ([M+H-CH ₃ COOH] ⁺), 356 ([M+H-COCH ₂] ⁺)

a) Mass number underlined were used for SIM.

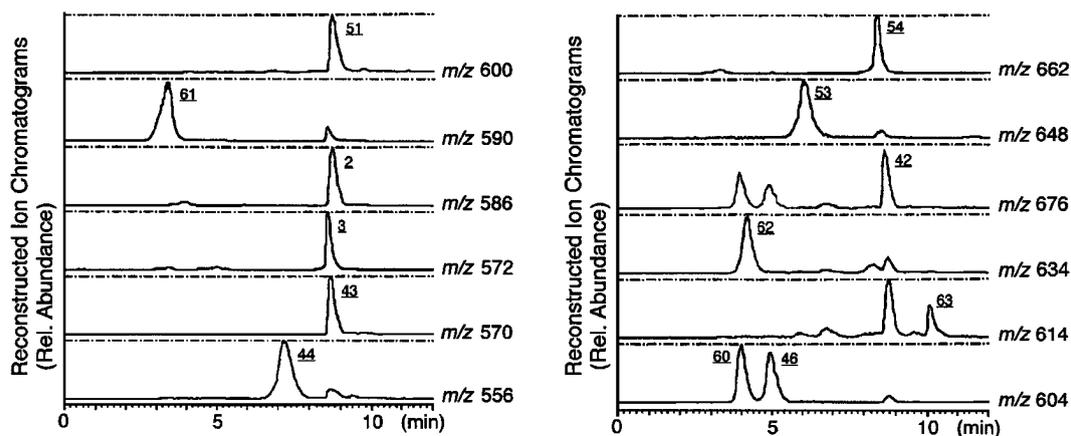


Fig. 4. SIM Chromatograms of Aconitine (2), Mesaconitine (3), Jesaconitine (42), Deoxyaconitine (43), Hypaconitine (44), Hokusbusine A (46), Deoxyjesaconitine (51), Aljesaconitine A (53), Aljesaconitine B (54), 14-Benzoylaconine (60), 14-Benzoylmesaconine (61), 14-Anisoylaconine (62) and 3-Acetylmesaconitine (63; Internal Standard)

び 100 ng) の測定で、良い再現性が得られた (Table 2).

C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド **10**, **11**, **50** 及び C₂₀-ジテルペンアルカロイド **4**, **5**, **12**, **38**, **64** (内部標準) の LC-APCI-MS/SIM 法による検出は [M

+H]⁺ イオンで行い、HPLC の移動相に 0.05 M CH₃COONH₄-CH₃CN-THF (60 : 25 : 15, v/v), 流速 0.8 ml/min で 10 分以内に良好なクロマトグラムが得られ (Fig. 5), 各アルカロイドのイオン化は 1 ng から 5 ng (50; 20 ng) で安定して得られた。

Table 2. Quality Parameters of the LC-APCI-MS Assay of *Aconitum* Alkaloids

Compounds	Curve equation	<i>r</i>	R.S.D. (% , <i>n</i> =7)	
			10 ng	100 ng
2	$y = 2.921 \times 10^{-3}x - 7.057 \times 10^{-4}$	0.9985	11.1	8.8
3	$y = 3.076 \times 10^{-3}x - 3.303 \times 10^{-3}$	0.9950	12.5	13.3
42	$y = 3.760 \times 10^{-4}x - 1.298 \times 10^{-2}$	0.9969	8.2(50 ng)	7.4
43	$y = 2.398 \times 10^{-3}x + 7.320 \times 10^{-3}$	0.9995	11.0	13.1
44	$y = 1.815 \times 10^{-3}x + 3.585 \times 10^{-4}$	0.9917	7.9	7.4
51	$y = 1.092 \times 10^{-3}x + 1.071 \times 10^{-3}$	0.9889	7.1	6.2
46	$y = 2.231 \times 10^{-3}x + 2.593 \times 10^{-3}$	0.9941	12.0	3.7
53	$y = 1.203 \times 10^{-3}x - 3.629 \times 10^{-3}$	0.9956	10.5	4.2
54	$y = 1.359 \times 10^{-3}x + 6.187 \times 10^{-3}$	0.9990	16.8	4.9
60	$y = 2.566 \times 10^{-3}x - 5.645 \times 10^{-4}$	0.9973	9.3	4.8
61	$y = 4.132 \times 10^{-3}x - 6.225 \times 10^{-3}$	0.9995	8.0	8.3
62	$y = 9.357 \times 10^{-4}x - 1.377 \times 10^{-3}$	0.9923	10.3	6.1

r = coefficient of correlation; R.S.D. = relative standard deviation; *x* = amount of analyte in ng; *y* = peak-area ratio of analyte and internal standard

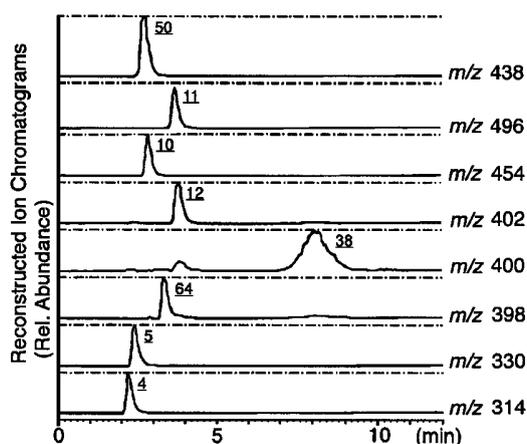


Fig. 5. SIM Chromatograms of Kobusine (4), Pseudokobusine (5), Delcosine (10), 14-Acetyldelcosine (11), Lucidusculine (12), Neoline (50), Dehydrolicidusculine (38) and 11,15-Diacetylkobusine (64; Internal Standard)

各アルカロイドの検量線は 10 ng–10 µg/injection (50; 50 ng–10 µg/injection) で良い直線性を示し、各アルカロイドの既知量 (10 ng 及び 100 ng, 50; 50 ng 及び 100 ng) の測定で、よい再現性が得られた (Table 3).

テリハブシの粉末凍結乾燥根を Chart 5 に示すように処理し、得られた抽出物について LC-APCI-MS/SIM 法によりアルカロイドの定量を行い、また、4, 10 及び 12 を用いた添加回収実験は 90% 以上と良好な回収率が得られた (Table 4). テリハブシのアルカロイドの含有量は 14-acetyldelcosine

(11) が最も多く、次いで lucidusculine (12), delcosine (10), kobusine (4), pseudokobusine (5), dehydrolicidusculine (38) の順であった.⁷⁹⁾

また、オクトリカブトの粉末凍結乾燥根を Chart 5 のように処理し、得られた抽出物について LC-APCI-MS/SIM 法によりアルカロイドを定量し、また、2, 3 及び 42 を用いた添加回収実験は 90% 以上と良好な回収率が得られた (Table 5).

オクトリカブトのアルカロイド 18 種の定量結果は jesaconitine (42) が最も多く含有され、次いで aconitine (2), mesaconitine (3), neoline (50), delcosine (10), lucidusculine (12), aljesaconitine B (54), 14-anisoylaconine (62), pseudokobusine (5), deoxyjesaconitine (51), deoxyaconitine (43), 14-benzoylaconine (60), 14-benzoylmesaconine (61), kobusine (4), 14-acetyldelcosine (11), hypaconitine (44), aljesaconitine A (53), hokbusine A (46) の順であり、4, 5, 12, 60, 61, 62 はこの方法によりオクトリカブトから初めて検出された.⁸⁰⁾

テリハブシはオクトリカブトと比較し、1) aconitine 系アルカロイドを含まない、2) lycocotnine 系 C₁₉-アルカロイド (10, 11), atisine 系 C₂₀-アルカロイド (4, 5) 及び veatchine 系 C₂₀-アルカロイド (12, 38) の含量が高いという成分的特徴が示された。

Table 3. Quality Parameters of the LC-APCI-MS Assay of *Aconitum* Alkaloids

Compounds	Curve equation	<i>r</i>	R.S.D. (% , <i>n</i> =7)	
			10 ng	100 ng
10	$y = 1.906 \times 10^{-4}x + 8.192 \times 10^{-4}$	0.9976	17.3	6.4
11	$y = 1.681 \times 10^{-4}x - 4.458 \times 10^{-5}$	0.9972	9.1	11.7
50	$y = 6.607 \times 10^{-3}x + 9.462 \times 10^{-4}$	0.9973	9.3 (50 ng)	8.7
4	$y = 6.607 \times 10^{-3}x + 9.462 \times 10^{-4}$	0.9967	10.1	11.1
5	$y = 6.487 \times 10^{-3}x - 1.678 \times 10^{-4}$	0.9990	9.1	11.7
12	$y = 6.532 \times 10^{-4}x + 6.715 \times 10^{-3}$	0.9994	10.6	2.9
31	$y = 1.511 \times 10^{-3}x + 2.641 \times 10^{-3}$	0.9962	13.3	10.4

r = coefficient of correlation; R.S.D. = relative standard deviation; *x* = amount of analyte in ng; *y* = peak-area ratio of analyte and internal standard

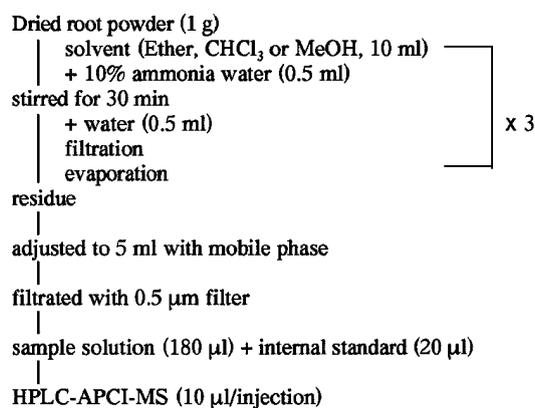


Chart 5. Preparation of Sample for LC-APCI-MS

4. ジテルペンアルカロイドの LC-APCI-MS による構造解析

ジテルペンアルカロイドは LC-APCI-MS により微量で高感度に検出でき、マススペクトルに安定した $[M+H]^+$ イオンとフラグメントイオン ($[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-CH_3COOH]^+$ 等) がみられた。

近年、質量分析計の新しい測定法や装置により、有機化合物のマススペクトルのフラグメンテーションの解析は有機化合物の構造解析の重要な手段となり、また、有機化合物の立体化学の解析にも有効な手段であり、電子衝撃イオン化 (EI) 法によるインドールアルカロイド^{81,82)} やキノリチジンアルカロイド⁸³⁾ エレクトロスプレー法によるインドールアルカロイド^{84,85)} の立体化学に関する報告がある。EI 法は多くの場合親イオン (M^+) を観測するが、親イオンとともに多くのフラグメントイオン (M^+

R) が観測される。また、ジテルペンアルカロイドの構造解析⁸⁶⁻⁹²⁾ や立体化学の分析⁹³⁾ の EI 法による報告がある。

ジテルペンアルカロイドの構造解析に LC-APCI-MS を応用する目的で、 C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド及び C_{20} -ジテルペンアルカロイドの立体異性体について検討した。⁹⁴⁻⁹⁶⁾

C_{19} -ノルジテルペンアルカロイド subcusine (9), subcumine (57) 及び 6-*epi*-chasmanine (65)⁹⁷⁾ はそれぞれ neoline (50), 14-acetylneoline (58)⁹⁸⁾ 及び chasmanine (66)¹⁾ の C-6 位立体異性体であり (Chart 2, 3, 6), LC-APCI-MS のマススペクトルはそれぞれ $[M+H]^+$ イオンと脱水によるフラグメントイオン ($[M+H-H_2O]^+$) がみられた (Table 6)。

これらのフラグメンテーションのメカニズムを明らかにするために 1,14-diacetylneoline (67),⁹⁹⁾ 1,8,14-triacetylneoline (68), 14-acetyl-6-*epi*-chasmanine (69), 8,14-diacetyl-6-*epi*-chasmanine (70), 14-benzoyl-1-propionylneoline (71) 及び 8-acetyl-14-benzoyl-1-propionylneoline (72) のマススペクトルを検討した (Chart 6)。C-8 位水酸基を有する 67, 69 及び 71 のマススペクトルはフラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ がみられ、一方、C-8 位にアセチルオキシ基を有する 68, 70 及び 72 のマススペクトルはフラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ がみられた。また、9, 50, 57, 58, 65-70 のマススペクトルを重水素化溶媒で測定すると、マススペクトルは水酸基の水素が重水素に置換され、重水素が付加した $[M-d_n+D]^+$ イオンやフラグメントイオン $[M-d_n+D-D_2O]^+$, $[M-d_n+D-CH_3COOD]^+$ がみ

Table 4. Contents of Alkaloids in *A. yesoense* var. *macroyesoense*

Compounds	Extracting solvents ($\mu\text{g/g} \pm \text{S.D.}, n=5$)			Recovery (%)		
	Ether	Chloroform	Methanol	Ether	Chloroform	Methanol
10	632 \pm 30.0	778 \pm 58.8	723 \pm 59.7	94.6	94.3	94.3
11	$7.07 \times 10^3 \pm 632$	$6.06 \times 10^3 \pm 742$	$5.87 \times 10^3 \pm 364$	—	—	—
4	409 \pm 27.7	443 \pm 41.0	449 \pm 17.9	39.5	95.4	79.8
5	263 \pm 9.85	384 \pm 21.2	344 \pm 18.5	—	—	—
12	$1.28 \times 10^3 \pm 51.6$	$1.53 \times 10^3 \pm 108$	$1.35 \times 10^3 \pm 76.9$	97.2	97.4	98.3
31	186 \pm 12.9	44.8 \pm 1.77	71.5 \pm 0.699	—	—	—

Table 5. Contents of Alkaloids in *A. japonicum*

Compounds	Extracting solvents ($\mu\text{g/g} \pm \text{S.D.}, n=5$)			Recovery (%)		
	Ether	Chloroform	Methanol	Ether	Chloroform	Methanol
2	$2.78 \times 10^3 \pm 299$	$2.45 \times 10^3 \pm 128$	$2.59 \times 10^3 \pm 43.9$	106	101	92.5
3	$2.50 \times 10^3 \pm 223$	$1.73 \times 10^3 \pm 99.7$	$1.95 \times 10^3 \pm 65.6$	104	108	93.4
42	$5.23 \times 10^3 \pm 512$	$4.79 \times 10^3 \pm 496$	$5.70 \times 10^3 \pm 263$	99.2	104	100
43	140 \pm 11.1	96.4 \pm 9.89	106 \pm 7.30			
44	29.8 \pm 2.73	15.1 \pm 1.48	14.6 \pm 0.898			
51	155 \pm 16.9	105 \pm 9.70	116 \pm 4.71			
46	1.49 \pm 0.159	1.20 \pm 0.330	12.3 \pm 1.28			
53	29.4 \pm 33.3	25.5 \pm 2.51	43.3 \pm 2.53			
54	279 \pm 23.7	243 \pm 23.1	248 \pm 23.5			
50	$2.17 \times 10^3 \pm 238$	$1.88 \times 10^3 \pm 213$	$1.58 \times 10^3 \pm 191$			
60	138 \pm 13.0	86.8 \pm 3.81	75.7 \pm 0.938			
61	108 \pm 17.7	65.9 \pm 2.76	53.4 \pm 1.50			
62	273 \pm 23.3	165 \pm 4.69	150 \pm 6.72			
10	886 \pm 55.5	930 \pm 49.5	733 \pm 31.1			
11	76.1 \pm 12.6	70.9 \pm 6.42	56.1 \pm 5.71			
4	102 \pm 8.36	131 \pm 15.6	123 \pm 11.6			
5	195 \pm 11.0	483 \pm 33.4	521 \pm 53.8			
12	513 \pm 41.4	465 \pm 30.8	374 \pm 43.4			

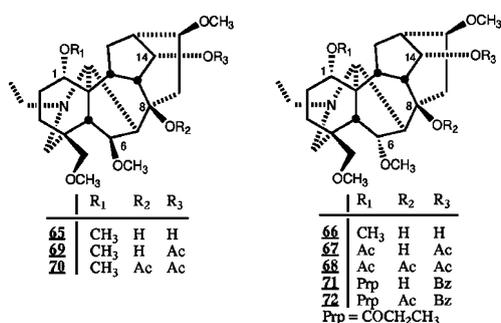


Chart 6

られたことより、C-6位の立体配置に関係なく付加した水素は脱離する水分子又は酢酸分子に含まれることが示された。これらのことより、フラグメントイオンは主にC-8位置換基の脱離により生じると考えられる (Chart 7)。

C-6 α 位メトキシル基を有する**50**及びC-6 β 位メトキシル基を有する**9**のフラグメントイオンの生成を比較するために、イオン強度の変化を検討した。これはドリフト電圧15V毎に3回測定し、イオン強度の平均値を算出し、[M+H]⁺イオン *m/z* 438及びフラグメントイオン [M+H-H₂O]⁺ *m/z* 420の結果をFig. 6に示した。[M+H]⁺イオンは2つ

Table 6. m/z and Relative Abundances (%) of the Mass Spectral Fragments of Norditerpenoid Alkaloids

	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-RCOOH]^+$	$[M-d_n+D]^+$	$[M-d_n+D-D_2O]^+$	$[M-d_n+D-CH_3COOD]^+$
9	438 (59%)	420 (100%)	—	442 (91%)	422 (100%)	—
57	480 (100%)	462 (89%)	—	483 (100%)	463 (51%)	—
65	452 (22%)	434 (100%)	—	455 (49%)	435 (100%)	—
50	438 (100%)	420 (10%)	—	442 (100%)	422 (12%)	—
58	480 (100%)	462 (6%)	—	483 (100%)	463 (8%)	—
66	452 (100%)	434 (20%)	—	455 (100%)	435 (11%)	—
69	494 (22%)	476 (100%)	—	496 (50%)	476 (100%)	—
70	536 (100%)	—	476 (31%)	537 (100%)	—	476 (54%)
67	522 (100%)	504 (17%)	462 (8%)	524 (100%)	504 (10%)	463 (18%)
68	564 (100%)	—	504 (16%)	565 (100%)	—	504 (19%)
71	598 (100%)	580 (11%)	524 (11%)	—	—	—
72	640 (100%)	—	580 (52%), 566 (8%)	—	—	—

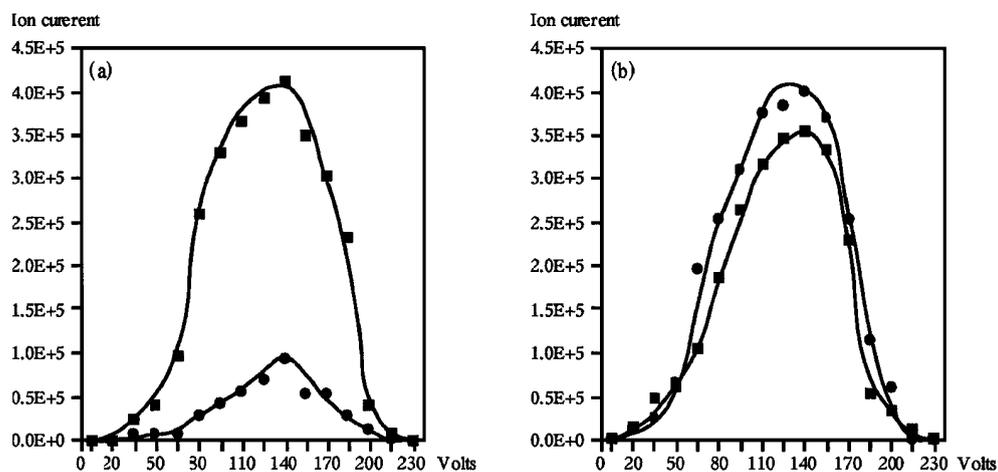
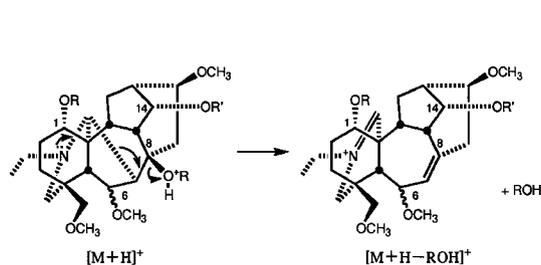
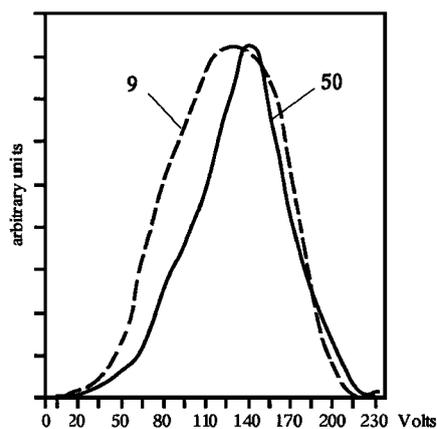
Fig. 6. Ion Currents of the Protonated Molecule at m/z 438 (■) and the Fragment Ion m/z 420 (●) Arising from Alkaloids (a) Neoline (**50**) and (b) Subcusine (**9**) as a Function of the Drift Voltage between the First and the Second Electrodes of the APCI Ion Source

Chart 7

の異性体が同様のイオン強度を示したのに対し、フラグメントイオンはイオン強度が全く異なっており、フラグメントイオンの生成は**9**より**50**の方が大きなエネルギーを必要とし (Fig. 7), $[M+H]^+$ イオンは C-6 β 体より C-6 α 体が安定であると考え

Fig. 7. Ion Currents of the Fragment Ion m/z 420 Arising from Alkaloids Neoline (**50**, Solid Line) and Subcusine (**9**, Dashed Line) as a Function of the Drift Voltage between the First and the Second Electrodes of the APCI Ion Source

For a better comparison, the tops of the curves were equalized in the figure.

Table 7. *R* Ratio Calculated from Relative Intensity Values

	OH at C-1 and C-14 (+C-8)	OH at C-1 (+C-8)	OH at C-14 (+C-8)	OH at C-8 only
C-6 α form	<i>R</i> 50 = 10.0	<i>R</i> 58 = 16.7	<i>R</i> 66 = 5.0	<i>R</i> 67 = 5.8
C-6 β form	<i>R</i> 9 = 0.6	<i>R</i> 57 = 1.1	<i>R</i> 65 = 0.2	<i>R</i> 69 = 0.2

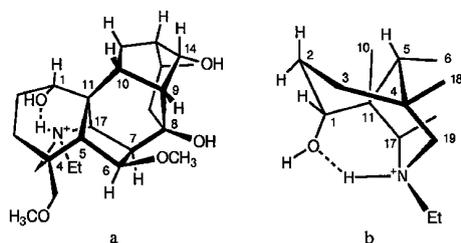


Chart 8

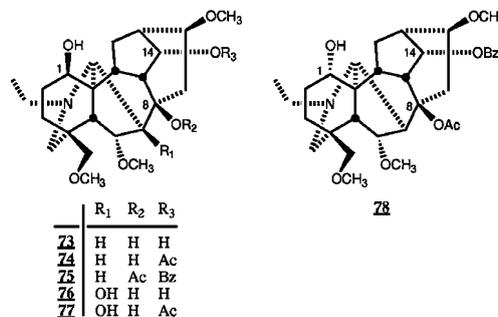


Chart 9

られる。

このように立体配置の違いによりフラグメントイオンのイオン強度が異なることより、イオン強度比 $R = [M+H]^+ / [M+H-H_2O]^+$ を検討した (Table 7). C-6 α 位メトキシル基を有する **50**, **58**, **66** 及び **67** のイオン強度比は $R = 5-17$ で、それに対して C-6 β 位メトキシル基を有する **9**, **57**, **65** 及び **69** のイオン強度比は $R = 0.2-1.1$ であり、イオン強度比 R はアルカロイドの C-6 位メトキシル基の立体配置の違いにより大きく異なった。これらアルカロイドのフラグメントイオンのイオン強度の違いは、**9**, **57**, **65** 及び **69** の C-8 位水酸基が C-6 β 位メトキシル基と立体的に近接しており、脱離しやすいためと考えられる (Chart 8a)。

C-1 位に水酸基を有する **9**, **50**, **57** 及び **58** において、**50** 及び **58** のイオン強度比が **66** 及び **67** より大きく、また、**9** 及び **57** が **65** 及び **69** より大きいことより、C-1 位の水酸基はフラグメンテーションに強く影響していると考えられる。すなわち、これらアルカロイドのイオン化は N 原子にプロトン化が起こり、C-1 位水酸基との間に分子内水素結合が生じ (Chart 8b), $[M+H]^+$ イオンは安定化していると考えられる。

C₁₉-ノルジテルペンアルカロイド 1-*epi*-neoline (**73**),¹⁰⁰ 14-acetyl-1-*epi*-neoline (**74**),¹⁰¹ 8-acetyl-14-benzoyl-1-*epi*-neoline (**75**), 1-*epi*-delcosine (**76**) 及び 14-acetyl-1-*epi*-delcosine (**77**) は C-1 β 位水酸基を有しており、それぞれ neoline (**50**), 14-acetylneo-

line (**58**), 8-acetyl-14-benzoylneoline (**78**), delcosine (**10**) 及び 14-acetyldelcosine (**11**) の C-1 位立体異性体である (Chart 2, 3, 9). これらアルカロイドの LC-APCI-MS のマススペクトルはそれぞれ高い強度の $[M+H]^+$ イオンがみられ、**10**, **11**, **50**, **58**, **73**, **74**, **76** 及び **77** では脱水によるフラグメントイオン ($[M+H-H_2O]^+$) がみられ、**75** 及び **78** では脱酢酸によるフラグメントイオン ($[M+H-CH_3COOH]^+$) がみられた (Table 8).

10, **50**, **58**, **73**, **76** 及び **78** のマススペクトルを重水素化溶媒で測定すると (Table 8), 水酸基の水素が重水素に置換され、重水素が付加した $[M-d_n+D]^+$ イオンがみられ、また、 $[M-d_n+D]^+$ イオンから重水又は重酢酸が脱離したフラグメントイオンがみられたことより、C-1 位の立体配置に関係なく付加した水素は脱離する水又は酢酸分子に含まれることが示され、先に述べたように水酸基又はアセチル基の脱離は主に C-8 位で起きると考えられる (Chart 7).

C-1 α 位水酸基を有する **50** 及び C-1 β 位水酸基を有する **73** のフラグメントイオンのイオン強度の変化を検討すると (Fig. 8), 2 つの異性体で異なっており、フラグメントイオンの生成は **73** より **50** の方が明らかに大きなエネルギーを必要とし、C-1 α 体の $[M+H]^+$ イオンは C-1 β 体より安定であると考えられる。

Table 8. m/z and Relative Abundances (%) of the Mass Spectral Fragments of Norditerpenoid Alkaloids

	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-RCOOH]^+$	$[M-d_n+D]^+$	$[M-d_n+D-D_2O]^+$	$[M-d_n+D-CH_3COOD]^+$
73	438(100%)	420(18%)	—	442(100%)	422(28%)	—
74	480(100%)	462(14%)	—	—	—	—
75	584(100%)	—	524(72%)	—	—	—
76	454(100%)	436(29%)	—	459(100%)	439(16%)	—
77	496(100%)	478(26%)	—	—	—	—
50	438(100%)	420(10%)	—	442(100%)	422(12%)	—
58	480(100%)	462(6%)	—	483(100%)	463(8%)	—
78	584(100%)	—	524(23%)	586(100%)	—	525(7%)
10	454(100%)	436(9%)	—	459(100%)	439(11%)	—
11	496(100%)	436(9%)	—	—	—	—

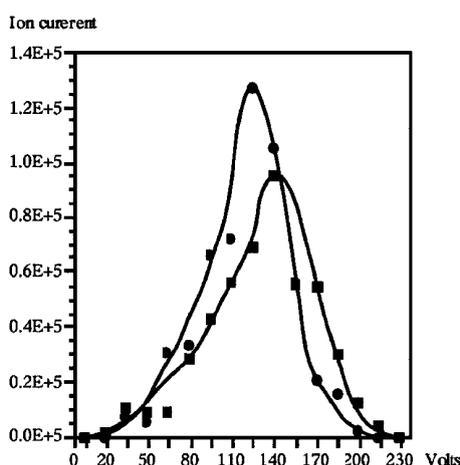


Fig. 8. Ion Currents of the Fragment Ion m/z 420 Arising from Alkaloids Neoline (50, ■) and 1-Epi-neoline (73, ●) as a Function of the Drift Voltage between the First and the Second Electrodes of the APCI Ion Source. The Results of Alkaloid 50 was cited from Fig. 6

C-1 α 位水酸基を有する 10, 11, 50, 58 及び 78 は N 原子にプロトン化した水素と C-1 α 位水酸基との間に分子内水素結合を形成し (Chart 10a), $[M+H]^+$ イオンは安定であり, 一方, C-1 β 位水酸基を有する 73-77 は分子内水素結合が形成されず (Chart 10b), フラグメントイオンは生成しやすと考えられる.

立体配置の違いによりフラグメントイオンのイオン強度が異なることより, イオン強度比 $R = [M+H]^+ / [M+H-H_2O]^+$ 又は $R' = [M+H]^+ / [M+H-CH_3COOH]^+$ を検討した. C-1 α 位水酸基を有する 10, 11, 50 及び 58 のイオン強度比は $R = 10-17$ で, それに対して C-1 β 位水酸基を有する 73, 74, 76 及び 77 のイオン強度比は $R = 3.5-7.1$ であった. C-1 α 位水酸基を有する 78 のイオン強度比は $R' =$

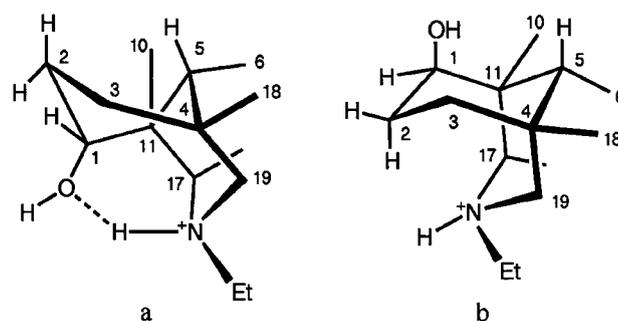


Chart 10

4.4 であり, それに対して C-1 β 位水酸基を有する 77 のイオン強度比は $R' = 1.4$ であった. これらのイオン強度比 R 及び R' はアルカロイドの C-1 位の立体配置の違いをよく示した.

C₂₀-ジテルペンアルカロイド 12,15-diacetyl-1-*epi*-luciculine (79) 及び 1,12,15-triacetyl-1-*epi*-luciculine (80) は C-1 β 位置換基 (OR) を有しており, それぞれ 12-acetyl-lucidusculine (37) 及び 1,12,15-triacetyl-luciculine (81)³⁴⁾ の C-1 位立体異性体である (Chart 2, 11). 37, 79-81 のマススペクトルは高い強度の $[M+H]^+$ イオンがみられ, フラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ 及び $[M+H-CH_3COOH]^+$ がみられた (Table 9). 37, 79-81 のマススペクトルを比較すると, C-1 β 位水酸基を有する 79 及び 80 のフラグメントイオンのイオン強度はそれぞれ C-1 α 位水酸基を有する 37 及び 81 より明らかに大きい.

C-1 α 位水酸基を有する 37 及び C-1 β 位水酸基を有する 79 のマススペクトルを重水素化溶媒で測定すると, 水酸基の水素が重水素で置換され, 重水素

が付加した $[M-d+D]^+$ イオンがみられた (Table 9). さらに, $[M-d+D]^+$ イオンから重水及び重酢酸が脱離したフラグメントイオン $[M-d+D-D_2O]^+$ 及び $[M-d+D-CH_3COOD]^+$ がそれぞれみられたことより, C-1 位の立体配置に関係なく付加した水素は脱離する水及び酢酸分子に含まれることが示された.

C-1 α 位水酸基を有する **37** 及び C-1 β 位水酸基を

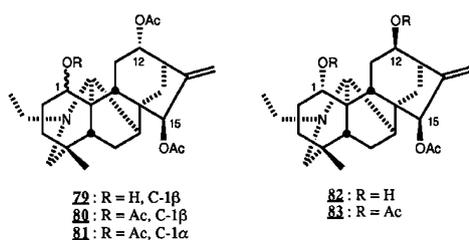


Chart 11

有する **79** のフラグメントイオンの生成を比較するために, イオン強度の変化を検討した (Fig. 9). **37** はフラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ が 140 V 付近で最大強度を示し, フラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ より多く生成しており, 脱酢酸が主要なフラグメント機構と考えられる. 一方, **79** はフラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ が 140 V 付近で最大強度を示し, フラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ より多く生成しており, 脱水が主要なフラグメント機構と考えられる.

これら C₂₀-ジテルペンアルカロイドのイオン化は C₁₉-ジテルペンアルカロイドのように N 原子にプロトン化が起こり, C-1 α 位の水酸基との間に分子内水素結合が生じ (Chart 12a), $[M+H]^+$ イオンは安定であると考えられる. 一方, C-1 β 位水酸基を有する **79** は分子内水素結合が形成されず, また, C-1 β 位水酸基は C-3, C-5 及び C-9 位のアキシ

Table 9. m/z and Relative Abundances (%) of the Mass Spectral Fragments of C₂₀-Diterpenoid Alkaloids

	$[M+H]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-RCOOH]^+$	$[M-d_n+D]^+$	$[M-d_n+D-D_2O]^+$	$[M-d_n+D-CH_3COOD]^+$
79	444 (100%)	426 (22%)	384 (12%)	446 (100%)	426 (14%)	385 (4%)
80	486 (100%)	—	426 (32%)			
37	444 (100%)	426 (3%)	384 (6%)	446 (100%)	426 (6%)	385 (1%)
81	486 (100%)	—	426 (15%)	487 (100%)	—	426 (32%)
82	402 (100%)	384 (12%)	342 (24%)	405 (100%)	385 (8%)	344 (13%)
83	486 (100%)	—	426 (28%)			
12	402 (100%)	384 (10%)	342 (7%)	405 (100%)	385 (2%)	344 (4%)

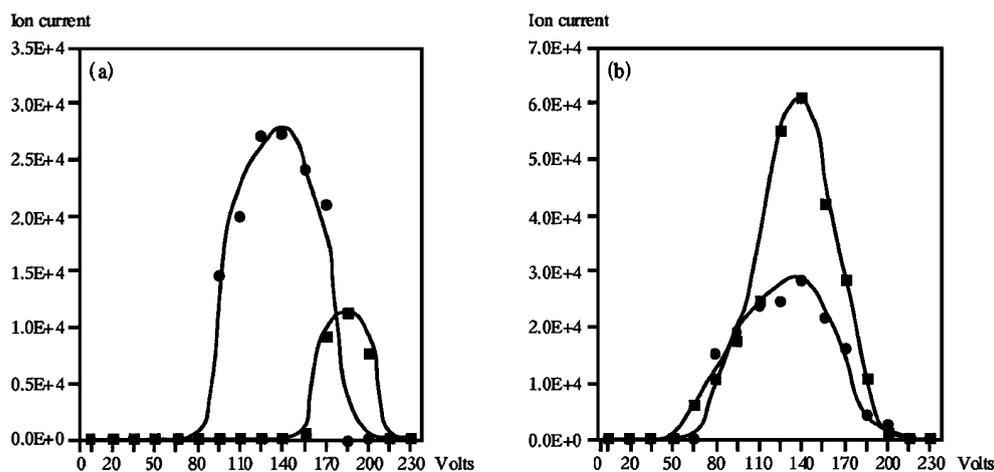


Fig. 9. Ion Currents of the Fragment Ion at m/z 426 (■) and m/z 384 (●) Arising from Alkaloids (a) 12-Acetyllycudusculine (**37**) and (b) 12,15-Diacetyl-1-*epi*-luciculine (**79**) as a Function of the Drift Voltage between the First and the Second Electrodes of the APCI Ion Source

ャル水素により脱離しやすいと考えられる (Chart 12b).

立体配置の違いによりフラグメントイオンのイオン強度が異なることより, イオン強度比 $R'' = [M+H]^+ / [M+H-H_2O]^+ + [M+H-CH_3COOH]^+$ を検討した. C-1 α 位水酸基を有する **37** 及び **81** のイオン強度比は $R'' = 6.7-11.1$ で, それに対して C-1 β 位水酸基を有する **79** 及び **80** のイオン強度比は $R'' = 2.9-3.1$ であった. これらのイオン強度比 R'' はアルカロイドの C-1 位の立体配置の違いをよく示した.

C₂₀-ジテルペンアルカロイド 12-*epi*-lucidusculine (**82**)¹⁰² 及び 1,12,15-triacetyl-12-*epi*-luciculine (**83**) は C-12 β 位置換基 (OR) を有しており, それぞれ lucidusculine (**12**) 及び 1,12,15-triacetyl-luciculine (**81**) の C-12 位立体異性体である (Chart 2, 11). **12**, **81-83** のマススペクトルは高い強度の $[M+H]^+$ イオンがみられ, フラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ 及び $[M+H-CH_3COOH]^+$ がみられ

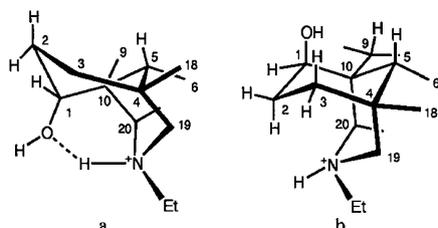


Chart 12

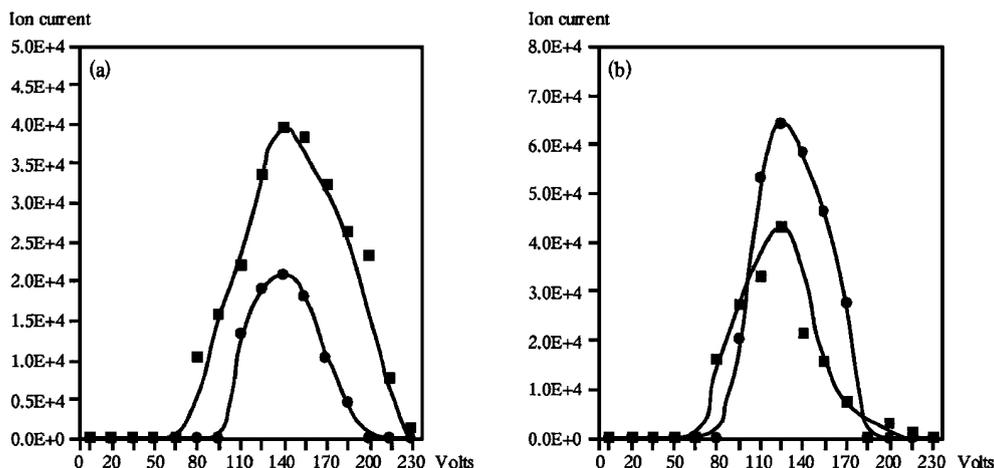


Fig. 10. Ion Currents of the Fragment Ion at m/z 384 (■) and m/z 342 (●) Arising from Alkaloids (a) Lucidusculine (**12**) and (b) 12-*Epi*-lucidusculine (**82**) as a Function of the Drift Voltage between the First and the Second Electrodes of the APCI Ion Source

た (Table 9).

C-12 α 位水酸基を有する **12** 及び C-12 β 位水酸基を有する **82** のマススペクトルを重水素化溶媒で測定すると, これらのマススペクトルは水酸基の水素が重水素で置換され, 重水素が付加した $[M-d_2+D]^+$ イオンがみられた (Table 9). さらに, $[M-d_2+D]^+$ イオンから重水及び重酢酸が脱離したフラグメントイオン $[M-d_2+D-D_2O]^+$ 及び $[M-d_2+D-CH_3COOD]^+$ がみられたことより, C-12 位の立体配置に関係なく付加した水素は脱離する水及び酢酸分子に含まれることが示された.

C-12 α 位水酸基を有する **12** 及び C-12 β 位水酸基を有する **82** のフラグメントイオンの生成を比較するために, イオン強度の変化を検討した (Fig. 10). **12** はフラグメントイオン $[M+H-H_2O]^+$ が 140 V 付近で最大強度を示し, 脱水が主要なフラグメント機構と考えられる. それに対して **82** はフラグメントイオン $[M+H-CH_3COOH]^+$ が 125 V 付近で最大強度を示し, 脱酢酸が主要なフラグメント機構と考えられる. フラグメントイオンの生成は **12** が **82** より大きなエネルギーを必要としており, これは C-12 β 位置換基が C-9 位のアクシャル水素と, また, 同時に C-15 β 位アセチルオキシ基と立体的に近接していることにより, フラグメントイオンが生成しやすいと考えられる (Chart 13).

立体配置の違いによりフラグメントイオンのイオン強度が異なることより, イオン強度比 $R'' = [M+H]^+ / [M+H-H_2O]^+ + [M+H-CH_3COOH]^+$ を

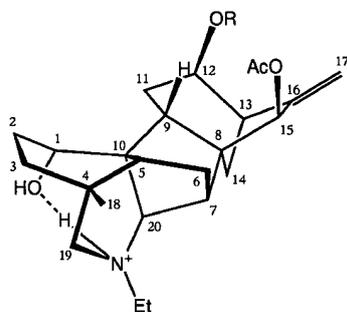


Chart 13

検討した。C-12 α 位水酸基を有する **12** 及び **81** のイオン強度比は $R''=5.9-6.7$ で、それに対して C-12 β 位水酸基を有する **82** 及び **83** のイオン強度比は $R''=2.8-3.6$ であった。これらのイオン強度比 R'' はアルカロイドの C-12 位の立体配置の違いをよく示した。

ジテルペンアルカロイドの LC-APCI-MS のマススペクトルはイオン化においてアルカロイドの N 原子にプロトン化が起こり、C-1 α 位水酸基との間に分子内水素結合が生じ、 $[M+H]^+$ イオンは安定化するため高い強度の $[M+H]^+$ イオンが観測されると考えられる。C-1 位、C-6 位又は C-12 位に置換基を有するアルカロイドの立体異性体間において、LC-APCI-MS のマススペクトルはフラグメントイオンのイオン強度に明らかな差異が認められ、それらは立体配位の違いに対応していることが明らかとなった。

5. 定山溪産テリハブシの生物活性

テリハブシのマウスにおける鎮痛活性と急性毒性を検討した。¹⁰³⁾ テリハブシの水及びメタノールエキスは 100–200 mg/kg (s.c.) の範囲で用量依存的に酢酸ライジングを抑制した (Table 10)。水及びメタノールエキスは 200 mg/kg でそれぞれ 61.6% 及び 81.6% の抑制率を示し、対照薬物 aminopyrine (50 mg/kg) より強いライジング抑制を示した。テリハブシの主要アルカロイド成分 (**4**, **5**, **10**, **11**, **12**; Chart 2, 4) では 50–100 mg/kg (s.c.) の範囲で用量依存的に酢酸ライジングを抑制した (Table 10)。14-Acetyldelcosine (**11**) 及び lucidusculine (**12**) は 100 mg/kg でそれぞれ 60.3% 及び 57.0% の抑制率を示した。その他の kobusine (**4**), pseudokobusine (**5**) 及び delcosine (**10**) は約 20–40% と弱いライジング抑制を示した。テリハブシエキスの鎮痛作用は

成分的に **11** 及び **12** によるところが大きいと考えられる。

テリハブシの水及びメタノールエキスの急性毒性はそれぞれ LD₅₀ 値が 990 及び 652 mg/kg (s.c.) であり (Table 11), 銭函産オクトリカプト⁹⁾や国内他地域自生のトリカプト¹¹⁾に比べ、非常に低い毒性を示した。

6. 定山溪産テリハブシの末梢血流量に対する作用

テリハブシの主要アルカロイド成分である lucidusculine (**12**) は末梢血管及び冠状血管拡張作用を有し、用量によっては降圧作用が認められるという報告がある。^{104–106)} また、附子配合処方に皮膚温上昇作用が認められ、¹⁸⁾ 血管拡張作用による末梢循環の改善が考えられる。血管拡張作用を有する各種対照薬物をマウスに尾静脈投与し、後足の皮膚血流量をレーザー血流量計^{107–109)}により測定すると持続的な血流量の増加が認められた (Fig. 11)。¹¹⁰⁾ テリハブシの抽出エキス及び主要アルカロイド成分の末梢血流量に対する作用を同様の方法で検討した。¹¹⁰⁾

テリハブシのメタノールエキス 333 mg/kg 経口投与 20 分後頃より血流量の増加がみられ、40 分後に最も増加し、その後徐々に減少し、投与後 50–80 分において約 4–5 ml/min/100 g で持続した血流量がみられた (Fig. 12)。メタノールエキスを分画し、クロロホルム画分は経口投与 20 分後頃より徐々に血流量の増加がみられ、60 分後に最も血流量が増加した。ヘキササン及び水画分は経口投与後の血流量を変化させなかった (Fig. 13)。クロロホルム画分に血流量増加作用がみられたことより、テリハブシのメタノールエキスの有効成分はアルカロイドに由来するものと考えられる。

テリハブシの主要アルカロイド成分をマウスに尾静脈投与し、末梢血流量に対する作用を同様の方法で検討したところ、特に、kobusine (**4**) 及び pseudokobusine (**5**) は lucidusculine (**12**) や他のアルカロイドに比べ、強い皮膚血流量の増加作用が認められた (Fig. 14A)。また、14-acetyldelcosine (**11**) は delcosine (**10**) より血流量を増加し (Fig. 14B)、C-14 位水酸基のアシル化が注目されるが、しかし、luciculine (**13**) の場合、C-1 位 (**14**)、C-12 位 (**84**) 又は C-15 位 (**12**) を acetyl 化した化合物は血流量の増加が認められず (Fig. 14C)、活性発現はむしろ

Table 10. Analgesic Effects of Extract of *Aconitum yesoense* var. *macroyesoense* and Main Components on Writhing Induced by 0.6% Acetic Acid

Compounds	Dose		Number of writhing/10 min	
	mg/kg, s.c.	n	mean ± S.E.	inhibition (%)
H ₂ O extract	0	8	41.9 ± 2.7	
	100	8	25.1 ± 4.7**	40.1
	200	8	16.1 ± 5.4**	61.6
MeOH extract	0	8	41.9 ± 2.7	
	100	8	31.5 ± 6.2**	24.8
	200	7	7.7 ± 2.3**	81.6
Aminopyrine	50	8	17.8 ± 3.7**	57.5
Lucidusculine (12)	0	8	36.3 ± 5.8	
	50	8	22.9 ± 6.6	36.9
	100	8	15.6 ± 3.1**	57.0
Aminopyrine	50	7	10.7 ± 3.3**	70.5
Kobusine (4)	0	8	40.9 ± 3.7	
	50	8	30.3 ± 3.9	25.9
	100	8	26.8 ± 6.9	34.5
Aminopyrine	50	8	10.0 ± 3.9**	75.6
Pseudokobusine (5)	0	8	29.3 ± 5.1	
	50	8	19.8 ± 4.9	32.4
	100	8	17.4 ± 5.0	40.6
Aminopyrine	50	8	12.0 ± 3.8*	59.0
Delcosine (10)	0	8	36.3 ± 5.8	
	50	8	28.1 ± 4.8	22.6
	100	8	24.0 ± 4.0	33.9
Aminopyrine	50	7	10.7 ± 3.3**	70.5
14-Acetyldelcosine (11)	0	8	36.3 ± 5.8	
	50	8	30.3 ± 5.8	16.5
	100	8	14.4 ± 4.1**	60.3
Aminopyrine	50	7	10.7 ± 3.3**	70.5

Significantly different from each control (Student's *t*-test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). *n*: Number of mice.

Table 11. Acute Toxicity of the Crude Extract in Mice

<i>Aconitum</i> spp.	extract	s.c. (mg/kg)
<i>A. yesoense</i> var. <i>macroyesoense</i>	H ₂ O	990
	MeOH	652
<i>A. japonicum</i> (Zenibako) ⁹⁾	H ₂ O	20.5
	MeOH	9.1
<i>A. japonicum</i> (Niigata) ¹¹⁾	MeOH	120
<i>A. carmichaeli</i> (Hokkaido) ¹¹⁾	MeOH	200

ろ水酸基の重要性が考えられる。これらのことより、水酸基やアシルオキシ基などの置換基が活性発現に影響を及ぼすと考えられる。

7. Atisine 系 C₂₀-ジテルペンアルカロイドの末梢血流量に対する作用と構造との関係

テリハブシの主要アルカロイド成分の中で、末梢血流量の増加作用が大きい atisine 系 C₂₀-ジテルペンアルカロイドの kobusine (4) 及び pseudokobusine (5) の構造的特徴として、C-16 位に環外二重結合を有し、4 は C-11 位及び C-15 位に、5 は C-6 位、C-11 位及び C-15 位に水酸基を有している。これらの環外二重結合及び水酸基が末梢血流量増加作用発現にどのような影響を及ぼすか検討した。¹¹¹⁻¹¹²⁾

Figures 15 及び 16 に各化合物 (Chart 1, 2, 4, 14)

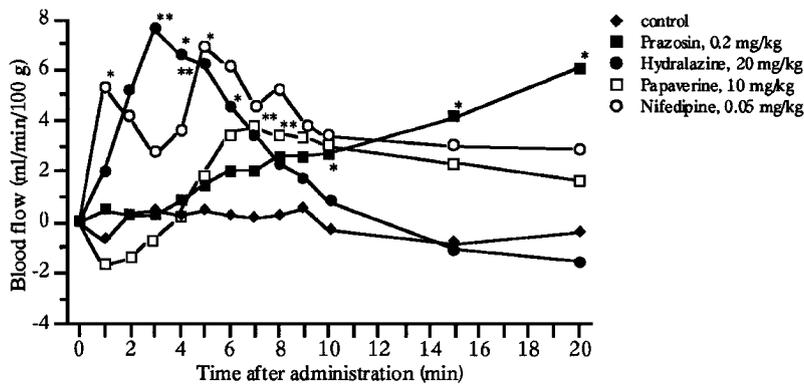


Fig. 11. Time Courses of Cutaneous Blood Flow in Anesthetized Mice after Intravenous Administration of References Drugs with Vaso-Activity

Blood flow was measured by laser blood flowmeter. Each point is presented as a mean of 3-5 experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significant different from the basal value determined before administration (Student's paired t test).

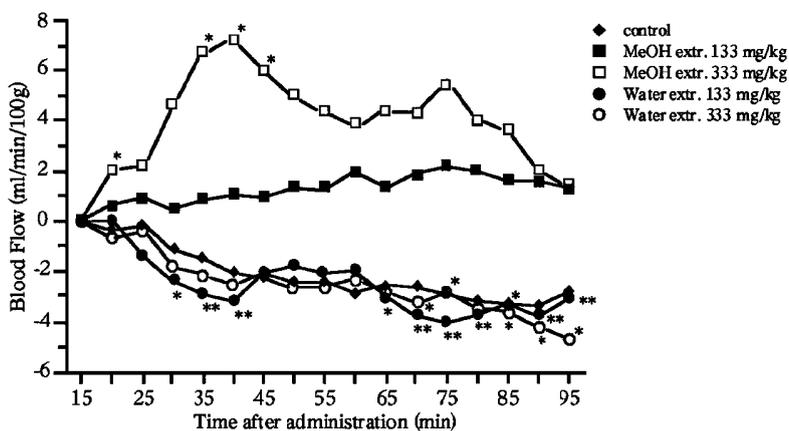


Fig. 12. Time Courses of Cutaneous Blood Flow in Anesthetized Mice after Peroral Administration of Extracts of *A. yesoense* var. *macroysoense* with Vaso-Activity

Blood flow was measured by laser blood flowmeter. Each point is presented as a mean of 5 experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significant different from the basal value determined before administration (Student's paired t test).

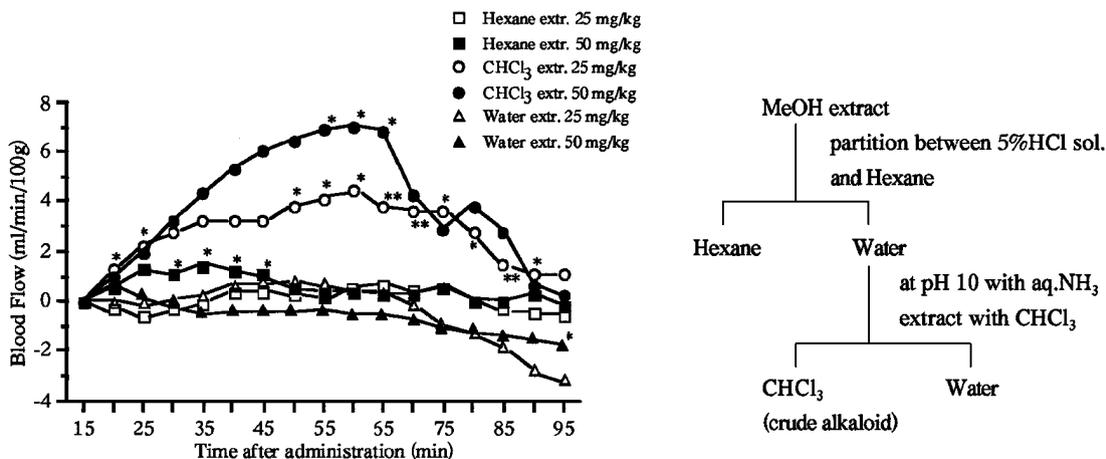


Fig. 13. Time Courses of Cutaneous Blood Flow in Anesthetized Mice after Peroral Administration of Fractional Extract of Methanol Extract with Vaso-Activity

Blood flow was measured by laser blood flowmeter. Each point is presented as a mean of 5 experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significant different from the basal value determined before administration (Student's paired t test).

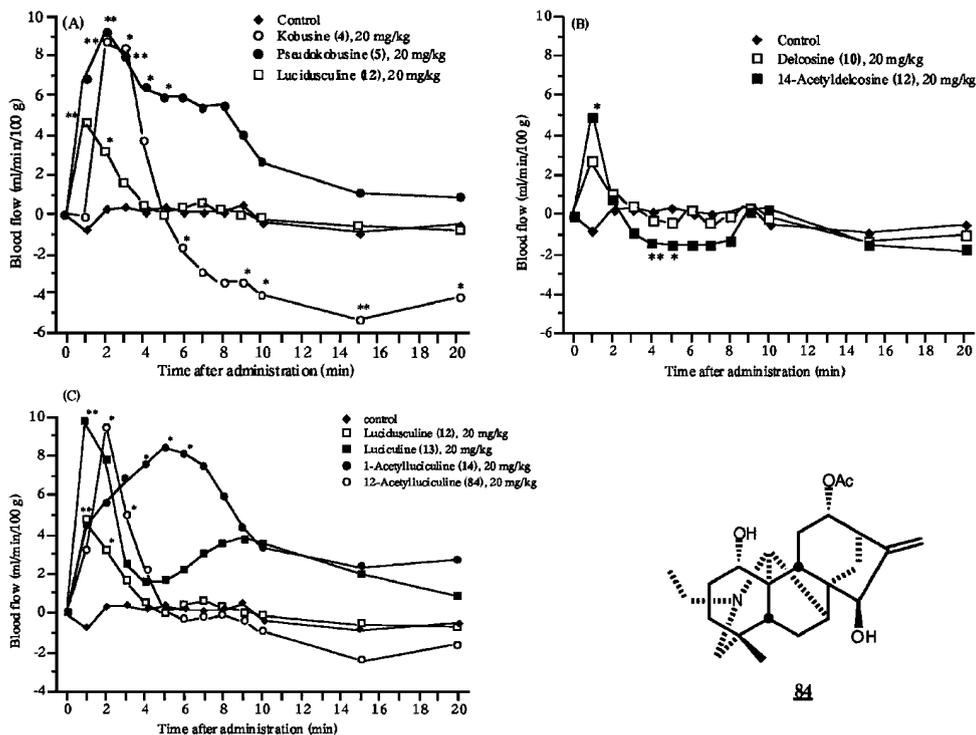


Fig. 14. Time Courses of Cutaneous Blood Flow in Anesthetized Mice after Intravenous Administration of (A) Kobusine (4), Pseudokobusine (5) and Lucidusculine (12), (B) Delcosine (10) and 14-Acetyldelcosine (11), (C) Lucidusculine (12), Luciculine (13), 1-Acetyllicuciline (14) and 12-Acetyllicuciline (84)

Blood flow was measured by laser blood flowmeter. Each point is presented as a mean of 3-5 experiments. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significant different from the basal value determined before administration (Student's paired t test).

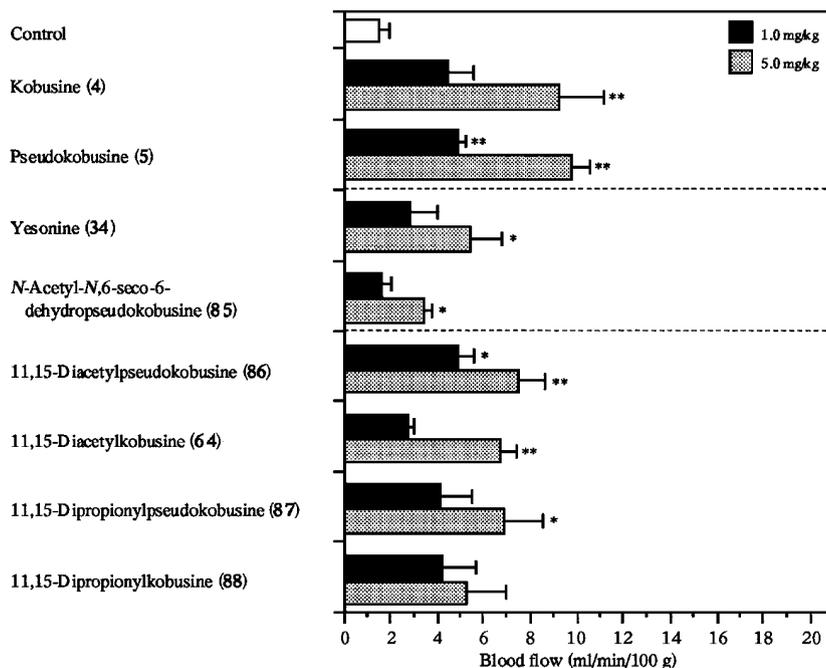


Fig. 15. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 4, 5, 34, 64, 85-88
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

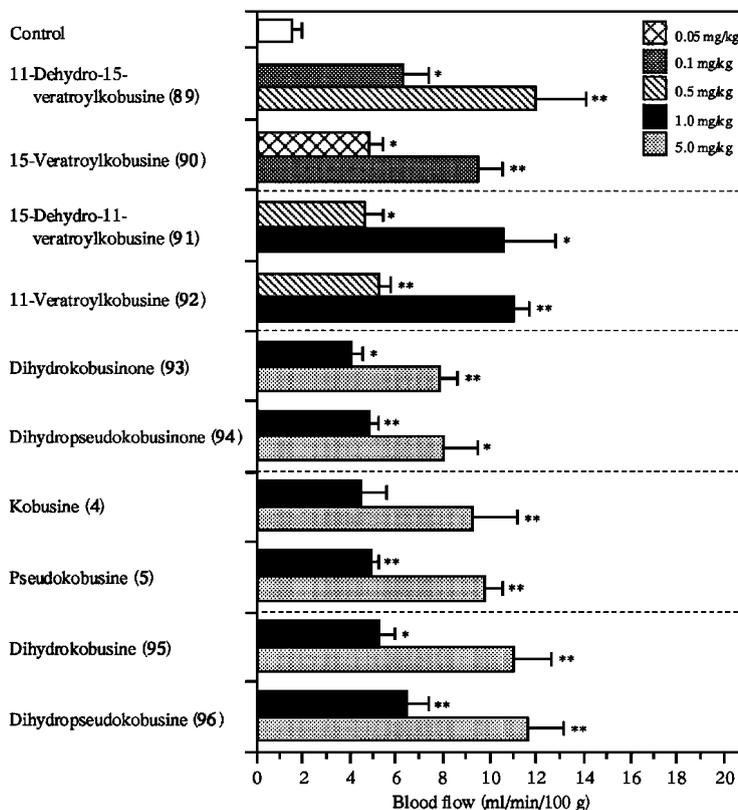


Fig. 16. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 4, 5, 89-96. The Results of Control and Alkaloids 4 and 5 were cited from Fig. 15
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

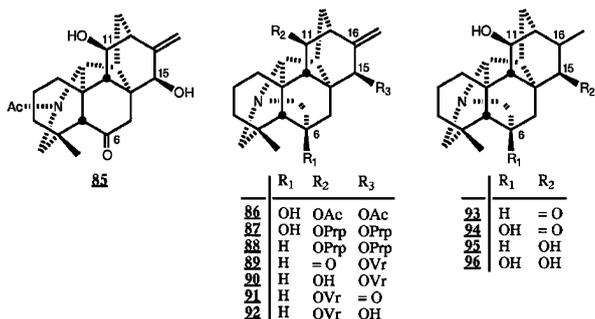


Chart 14

の末梢血流量増加の最大値を示した。各化合物はいずれも用量依存的に末梢血流量を増加した。5は4よりわずかに末梢血流量を増加した。6-ケト体の yesonine (34) 及び N-acetyl-N,6-seco-6-dehydropseudokobusine (85) の末梢血流量は5よりおよそ1/2—1/3以下に低下した (Fig. 15)。つぎに6-OH体の11,15-diacetylpseudokobusine (86) 及び11,15-dipropionylpseudokobusine (87) の末梢血流量はそれぞれ6-H体の11,15-diacetylkobusine (64) 及び

11,15-dipropionylkobusine (88) よりも増加した (Fig. 15)。

11-ケト体の11-dehydro-15-veratroylkobusine (89) の末梢血流量は11β-OH体の15-veratroylkobusine (90) より低下した (Fig. 16)。15-ケト体の15-dehydro-11-veratroylkobusine (91) の末梢血流量は15β-OH体の11-veratroylkobusine (92) よりわずかに低下し、また、15-ケト体の dihydrokobusinone (93)¹¹³ 及び dihydropseudokobusinone (94)¹¹⁴ はそれぞれ15β-OH体の4及び5より低下した (Fig. 16)。これらのことより4及び5のC-6位、C-11位又はC-15位の水酸基をケト体又はH体に変換するといずれの場合も末梢血流量は低下したことより、4及び5のC-6位、C-11位又はC-15位の水酸基は活性発現に必要であることが明らかとなった。

次いで、二重結合について検討し (Fig. 16)、二重結合をメチル体に変換した dihydrokobusine (95)¹¹⁵ 及び dihydropseudokobusine (96)¹¹⁶ の末梢血流量はそれぞれ4及び5より増加傾向にあった。

N-置換体である **34** 及び **85** の末梢血流量は **5** より低下し (Fig. 15), *N*-置換基は活性発現に寄与していないと考えられる.

6-アシル誘導体 (Chart 15) はいずれも用量依存的に末梢血流量を増加した (Fig. 17). Pseudo-

kobusine の 6-アシル誘導体 (**97-104**) の末梢血流量はいずれも **5** より低下した. また, 6-OH 体の 11,15-diacetate (**86**) の末梢血流量は 6-OAc 体の 6,11,15-triacetate (**105**) よりも増加した.

11-アシル誘導体 (Chart 14, 15) はいずれも用

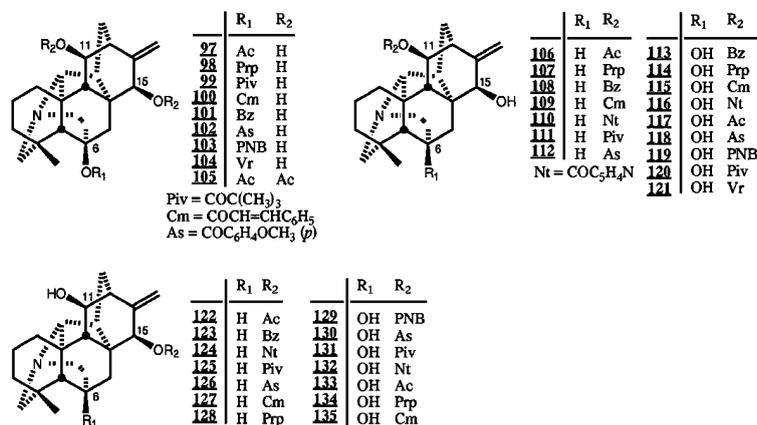


Chart 15

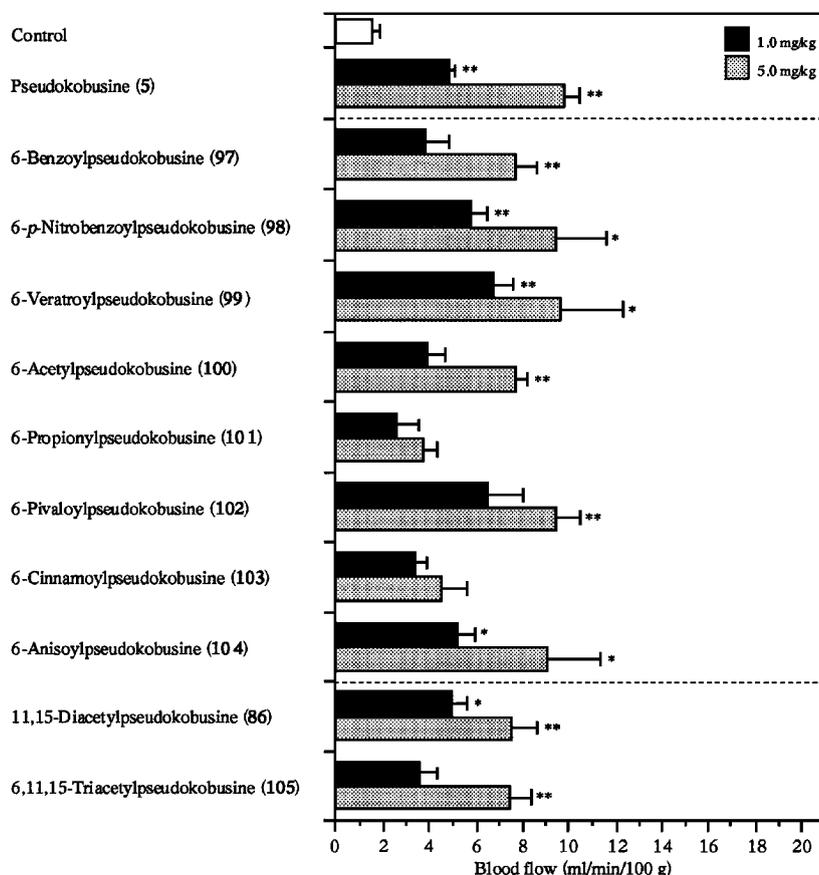


Fig. 17. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids **5**, **86**, **97-105**. The Results of Control and Alkaloids **5** and **86** were cited from Fig. 15

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

量依存的に末梢血流量を増加した. Kobusine の 11-アシル誘導体について検討し (Fig. 18), 11-acetate (106), 11-propionate (107), 11-benzoate (108) 及び 11-cinnamoate (109) の末梢血流量は 4 より低下した. しかし, 11-veratroate (92), 11-nicotinoate (110), 11-pivaloate (111) 及び 11-anisoate (112) の末梢血流量は 4 に比べ, 約 1.3-2.4 倍増大し, 特に 92 は有効であった.

続いて, pseudokobusine の 11-アシル誘導体について検討した (Fig. 19). 11-Benzoate (113), 11-propionate (114) 及び 11-cinnamoate (115) の末梢血流量は 5 より低下した. しかし, 11-nicotinoate (116), 11-acetate (117), 11-anisoate (118), 11-*p*-nitrobenzoate (119), 11-pivaloate (120) 及び 11-veratroate (121) の末梢血流量は 5 に比べ, 約 1.2-2.6 倍増大し, 特に 121 は有効であった. Kobusine 及び pseudokobusine の 11-アシル誘導体の中で, 特に anisoyl, *p*-nitrobenzoyl, pivaloyl 又は veratroyl 誘導体が末梢血流量増加作用の効果がみられた.

15-アシル誘導体 (Chart 2, 14, 15) はいずれも用量依存的に末梢血流量を増加した. Kobusine の

15-アシル誘導体について検討し (Fig. 20), 15-veratroate (90), 15-acetate (122), 15-benzoate (123), 15-nicotinoate (124), 15-pivaloate (125) 及び 15-anisoate (126) の末梢血流量は 4 に比べ, 約 1.2-21 倍増大し, 特に 90 は有効であった. 15-Cinnamoate (127) は 4 と同程度の末梢血流量の増加を示し, 15-propionate (128) の末梢血流量は 4 より低下した.

続いて, pseudokobusine の 15-アシル誘導体について検討した (Fig. 21). 15-Veratroate (30), 15-*p*-nitrobenzoate (129), 15-anisoate (130), 15-pivaloate (131), 15-nicotinoate (132) 及び 15-acetate (133) の末梢血流量は 5 に比べ, 約 1.6-23 倍増大し, 特に 30 は有効であった. 15-Propionate (134) 及び 15-cinnamoate (135) は 5 と同程度の末梢血流量の増加を示し, 15-benzoate (29) の末梢血流量は 5 に比べ低下した. Kobusine 及び pseudokobusine の 15-アシル誘導体の中で, 特に anisoyl, *p*-nitrobenzoyl 及び veratroyl 誘導体が末梢血流量増加作用の効果がみられた.

Kobusine (4) 及び pseudokobusine (5) の環外二

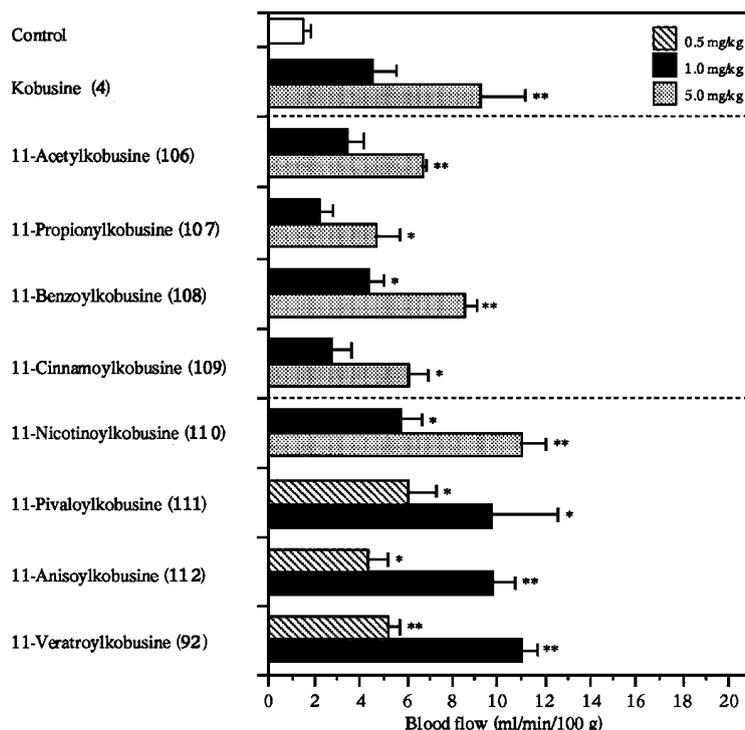


Fig. 18. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 4, 92, 106-112. The Results of Control, Alkaloids 4 and 92 were cited from Fig. 15 and 16

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

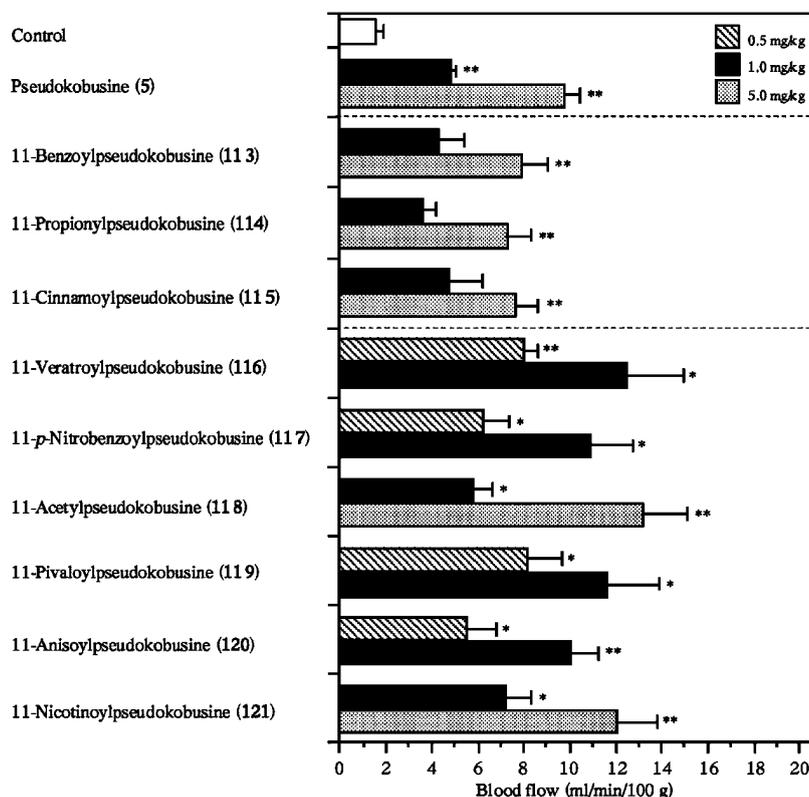


Fig. 19. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 5, 113–121. The Results of Control and Pseudokobusine (5) were cited from Fig. 15

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

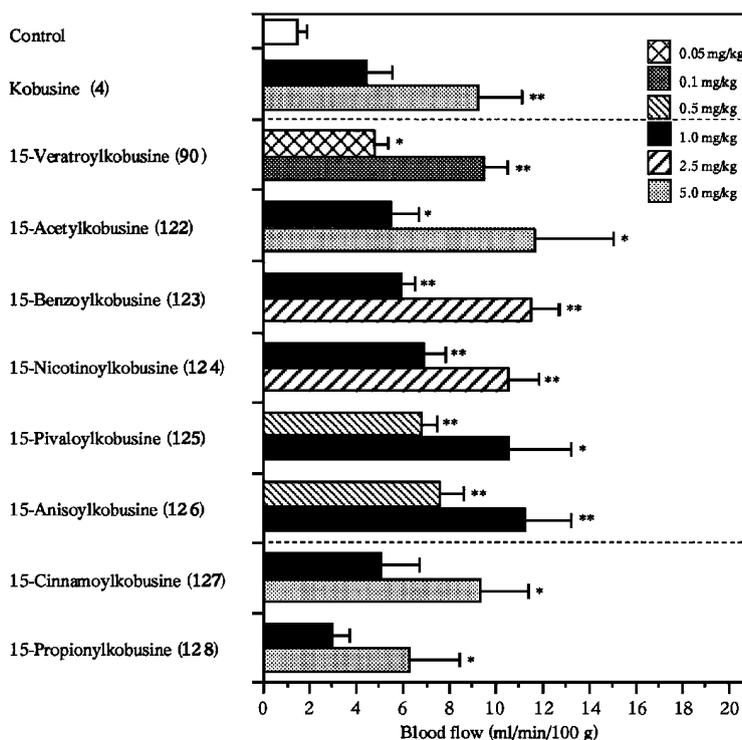


Fig. 20. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 4, 90, 122–128. The Results of Control, Alkaloids 4 and 90 were cited from Fig. 15 and 16

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

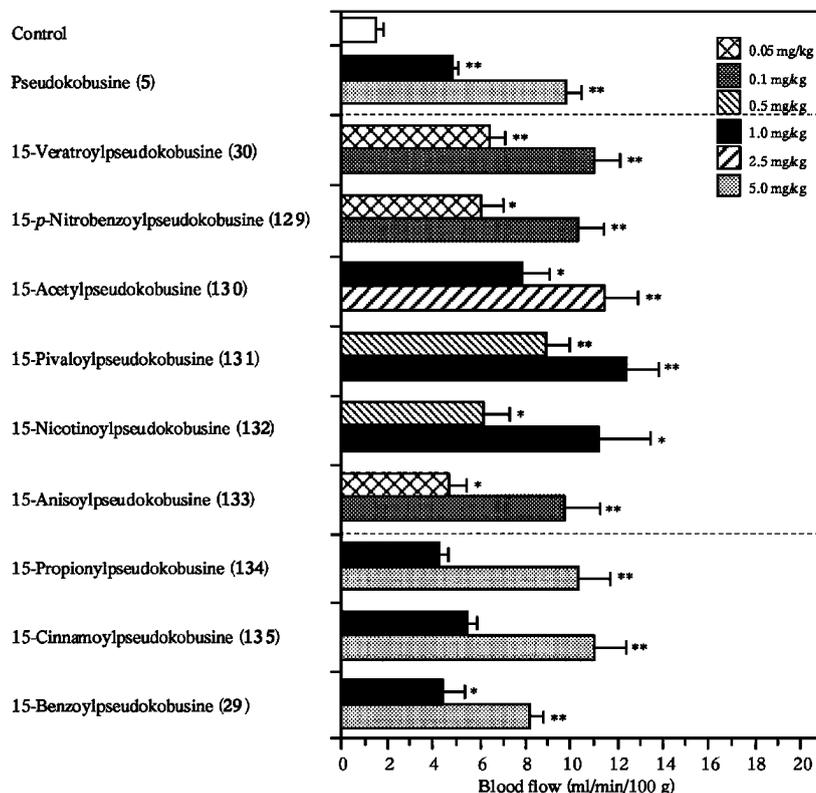


Fig. 21. Maxima of Increased Cutaneous Blood Flow in Mice after Intravenous Administration of Alkaloids 5, 29, 30, 129-135. The Results of Control and Pseudokobusine (5) were cited from Fig. 15

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: Significantly different from the basal value determined before administration.

重結合，水酸基及びアシルオキシ基と末梢血流量との関係を検討した結果，C-6位，C-11位及びC-15位に水酸基の存在が活性発現に必須であり，環外二重結合も活性発現に寄与していることが明らかとなった。さらに，C-11位，C-15位に，特に，C-15位水酸基にアシル基を導入することは血流量増加作用発現に重要な影響を与えることが明らかとなり，そのアシル基として，anisoyl，*p*-nitrobenzoyl及びveratroyl基が活性発現に最も有効であった。

謝辞 本研究を進めるにあたり御指導御鞭撻を賜りました北海道薬科大学・薬化学研究室 川原徳夫教授に心から感謝申し上げます。本研究に対し，御助言御指導を賜りました元北海道薬科大学 藤平栄一教授，元北海道薬科大学（故）網谷 孝教授に感謝申し上げます。本研究に対し，種々有益な御指導御討論をいただきました北海道薬科大学 坂東英雄教授，石突 諭講師，金田 繁講師，株式会社サンセイ調剤薬局 盛 孝男博士並びに三和生薬株式会社 村山光雄博士に感謝申し上げます。本研究に

御協力いただいた北海道薬科大学・薬化学研究室ならびに卒業生の皆様に感謝致します。

X線結晶構造解析を行っていただいた日本大学薬学部 藤本康雄教授，元理化学研究所（故）桜井敏雄博士，理化学研究所 小林公子氏，2D-NMR及びMSスペクトルの一部を測定していただいた北海道薬科大学 渡部智希助手，元素分析及びMSスペクトルの一部を測定していただいた北海道大学・機器分析センターの皆様には感謝致します。なお，本研究の一部は北海道科学研究費補助金及び北海道科学・産業技術振興財団科学研究費補助金によって行われたものであり，併せて感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Pelletier S. W., Keith L. H., "The Alkaloids," ed. by Manske R. H. F., Vol. XII, Chap.1, Academic Press, New York, 1970, pp. 1-134.
- 2) Ichinohe Y., Kagaku no Ryoiki, **32**, 111-126 (1978).

- 3) Wang F., Liang X., "The Alkaloids," ed. by Brossi A., Vol. 42, Chap.3, Academic Press, San Diego, 1992, pp. 151–247.
- 4) For a summarizing reference see; Jacobs W. A., Craig L. C., *J. Biol. Chem.*, **127**, 361 (1939).
- 5) Geiger (with Heese) P. L., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **7**, 269 (1833).
- 6) Majima R., Morio S., *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **476**, 210 (1929).
- 7) Sakai S., *Modern Oriental Medicine*, **2**, 50–58 (1981).
- 8) Hikino H., Shiota S., Takahashi M., Murakami M., *Shoyakugaku Zasshi*, **37**, 68–72 (1983).
- 9) Bando H., Wada K., Watanabe M., Mori T., Amiya T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4717–4722 (1985).
- 10) Nakano M., Yamagishi T., *Doei Institute Report*, **32**, 21–26 (1982).
- 11) Hikino H., Yamada C., Nakamura K., Sato H., Ohizumi Y., Endo K., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 359–369 (1977).
- 12) Hikino H., Konno C., Watanabe H., Ishikawa O., *J. Chromatogr.*, **211**, 123–128 (1981).
- 13) Hikino H., Murakami M., Konno C., Watanabe H., *Planta Med.*, **48**, 67–71 (1983).
- 14) Kitagawa I., Chen Z. L., Yoshihara M., Yoshikawa M., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 867–872 (1984).
- 15) Kulanthaivel P., Pelletier S. W., *J. Chromatogr.*, **402**, 366–370 (1987).
- 16) Hikino H., *Modern Oriental Medicine*, **2**, 44–49 (1981).
- 17) Murayama M., Mori T., Bando H., Amiya T., *J. Ethnopharmacol.*, **35**, 159–164 (1991).
- 18) Kano M., Oki Y., Aoki T., *Wakan Iyaku J.*, **7**, 442–443 (1990).
- 19) Saito H., Ueyama T., Naka N., Yagi J., Okamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1844–1850 (1982).
- 20) Majima R., Morio S., *Chem. Ber.*, **65**, 599–602 (1932).
- 21) Suginome H., Kakimoto S., Sonoda J., *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. III. Chem.*, **4**, 25–32 (1950).
- 22) Suginome H., Kakimoto S., Sonoda J., Noguchi S., *Proc. Jpn. Acad.*, **22**, 122 (1946).
- 23) Suginome H., Furusawa S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **32**, 354–355 (1959).
- 24) Majima R., Morio S., *Chem. Ber.*, **65**, 1472 (1932).
- 25) Pelletier S. W., Mody N. V., "The Alkaloids," ed. by Manske R. H. F., Rodrigo R. G. A., Vol. XVIII, Chap. 2, Academic Press, New York, 1981, pp. 99–216.
- 26) Pelletier S. W., Mody N. V., Joshi B. S., Schramm L. C., "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives," ed. by Pelletier S. W., Vol. 2, Wiley-Interscience, New York, 1984, pp. 205–462.
- 27) Bando H., Wada K., Amiya T., Fujimoto Y., Kobayashi K., *Heterocycles*, **27**, 2167–2174 (1988).
- 28) Amiya T., Shima T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 1083–1084 (1958).
- 29) Furusawa S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **32**, 399–403 (1959).
- 30) Amiya T., Shima T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **35**, 740–744 (1962).
- 31) Amiya T., Shima T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 1957–1960 (1967).
- 32) Amiya T., Shima T., *J. Org. Chem.*, **26**, 2616 (1961).
- 33) Pelletier S. W., Mody N. V., "The Alkaloids," ed. by Manske R. H. F., Rodrigo R. G. A., Vol. XVII, Chap. 1, Academic Press, New York, 1979, pp. 1–103.
- 34) Takayama H., Tokita A., Ito M., Sakai S., Kurosaki F., Okamoto T., *Yakugaku Zasshi*, **102**, 245–257 (1982).
- 35) Chen Z., Lao A., Wang H., Hong S., *Planta Medica*, **54**, 318–320 (1988).
- 36) Chen Z., Lao A., Wang H., Hong S., *Heterocycles*, **26**, 1455–1460 (1987).
- 37) Gonzalez A. G., de la Fuente G., Munguia O., *Heterocycles*, **20**, 409–411 (1983).
- 38) Gonzalez A. G., de la Fuente G., Orribo T., Acosta R. D., *Heterocycles*, **23**, 2979–2982 (1985).
- 39) Benn M. H., Okanga F. I., Manavu R. H., *Phytochemistry*, **28**, 919–922 (1989).
- 40) Wada K., Bando H., Kawahara N., *Heterocycles*, **31**, 1081–1088 (1990).
- 41) Achmatowitz, Jr. O., Tsuda Y., Marion L., *Can. J. Chem.*, **43**, 2336–2344 (1965).
- 42) Pelletier S. W., Badawi M. M., *J. Nat. Prod.*, **50**, 381–385 (1987).

- 43) Wada K., Bando H., Amiya T., Kawahara N., *Heterocycles*, **29**, 2141–2148 (1989).
- 44) Wada K., Bando H., Amiya T., Kobayashi K., Fujimoto Y., Sakurai T., *Heterocycles*, **26**, 2623–2637 (1989).
- 45) Suginome H., Kohyama T., Kunimatsu, *Proc. Jpn. Acad.*, **22**, 120–121 (1946).
- 46) G. Goto, K. Sasaki, N. Sakabe, Y. Hirata Y., *Tetrahedron Lett.*, 1369–1373 (1968).
- 47) Wada K., Bando H., Amiya T., *Heterocycles*, **27**, 1249–1252 (1988).
- 48) Wada K., Bando H., Amiya T., *Heterocycles*, **23**, 2473–2477 (1985).
- 49) Sultankhodzhaev M. N., Beshitaishvil L. V.i, Yunusov M. S., Yunusov S. Yu., *Khim. Prir. Soedin.*, 479–482 (1978).
- 50) Majima R., Suginome H., *Ber.*, **57**, 1472 (1924).
- 51) Limin L., Hongcheng W., Yuanlong Z., *Yaouxue Xuebao*, **18**, 39–44 (1983).
- 52) Hikino H., Kuroiwa Y., Konno C., *J. Nat. Prod.*, **46**, 178–182 (1983).
- 53) Beshitashvill L. V., Yunusoav M. S., Yagudov M. R., Yunusov S. Y., *Khim. Prir. Soedin.*, 665–672 (1980).
- 54) Bando H., Kanaiwa Y., Wada K., Mori T., Amiya T., *Heterocycles*, **16**, 1723–1725 (1981).
- 55) Mori T., Bando H., Kanaiwa Y., Wada K., Amiya T., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2884–2886 (1983).
- 56) Wada K., Bando H., Mori T., Wada R., Kanaiwa Y., Amiya T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3658–3661 (1985).
- 57) Bando H., Wada K., Amiya T., Fujimoto Y., Kobayashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1604–1606 (1988).
- 58) Bando H., Wada K., Amiya T., Fujimoto Y., Kobayashi K., *Heterocycles*, **27**, 2167–2174 (1988).
- 59) Henion J. D., *Anal. Chem.*, **50**, 1687–1693 (1978).
- 60) Schellenberg K. H., Linder M., Groeppelin A., Erni F., *J. Chromatogr.*, **394**, 239–251 (1987).
- 61) Auriola S., Ranta V. P., Naaranlahti T., Lapinjoki S. P., *J. Chromatogr.*, **474**, 181–185 (1989).
- 62) McManus K. T., de Bethizy J. D., Garteiz D. A., Kyerematen G. A., Vesell E. S., *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 510–516 (1990).
- 63) Auriola S., Naaranlahti T., Kostainen R., Lapinjoki S. P., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **19**, 609–612 (1990).
- 64) Auriola S., Naaranlahti T., Lapinjoki S. P., *J. Chromatogr.*, **554**, 227–231 (1991).
- 65) Banno K., Horimoto S., *Chromatographia*, **31**, 50–54 (1991).
- 66) Auriola S., Martinsen A., Oksman-caldentey K., Naaranlahti T., *J. Chromatogr.*, **562**, 737–744 (1991).
- 67) Banno K., Horimoto S., Mabuchi M., *J. Chromatogr.*, **568**, 375–384 (1991).
- 68) Le Verge R., Le Corre P., Chevanne F., De Maindreville M. D., Royer D., Levy J., *J. Chromatogr.*, **574**, 283–292 (1992).
- 69) Horning E. C., Carroll D. I., Dzidic I., Haegele K. D., Horning M. G., Stillwell R. N., *J. Chromatogr.*, **99**, 13–21 (1974).
- 70) Carroll D. I., Dzidic I., Stillwell R. N., Haegele K. D., Horning E. C., *Anal. Chem.*, **47**, 2369–2373 (1975).
- 71) Kambara H., Kanomata I., *Anal. Chem.*, **49**, 270–275 (1977).
- 72) Kambara H., *Anal. Chem.*, **54**, 143–146 (1982).
- 73) Henion J. D., Thomson B. A., Dawson P. H., *Anal. Chem.*, **54**, 451–456 (1982).
- 74) Covey T. R., Lee D. L., Henion J. D., *Anal. Chem.*, **58**, 2453–2460 (1986).
- 75) Covey T. R., Lee E. D., Bruins A. P., Henion J. D., *Anal. Chem.*, **58**, 1451A (1986).
- 76) Sakairi M., Kambara H., *Anal. Chem.*, **60**, 774–780 (1988).
- 77) 現代化学・増刊 15 「質量分析法の新展開」, ed. by Tsuchiya M., Ohashi M., Ueno T., Tokyo Kagaku Dojin 1988, pp. 272–281.
- 78) Gendaikagaku (Zoukan 15) 「Shitsuryobun-sekiho no Shintenkai」, ed. by Tsuchiya M., Ohashi M., Ueno T., Tokyo Kagaku Dojin, 1988, pp. 67.
- 79) Wada K., Bando H., Kawahara N., *J. Chromatogr.*, **644**, 43–48 (1993).
- 80) Wada K., Bando H., Kawahara N., Mori T., Murayama M., *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 97–102 (1994).
- 81) Beckett A. H., Dwuuma-Badu D., Haddock R. E., *Tetrahedron*, **25**, 5961–5969 (1969).

- 82) Czira G., Tama's J., Kalaus G., *Org. Mass Spectrom.*, **19**, 555 (1984).
- 83) Fujisawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4136–4143 (1988).
- 84) Lapre'vote O., Ducrot P., Thal C., Serani L., Das B. C., *J. Mass Spectrom.*, **31**, 1149–1155 (1996).
- 85) Lapre'vote O., Serani L., Das B. C., *J. Mass Spectrom.*, **32**, 339–340 (1997).
- 86) Edwards O. E., "The Alkaloids," Vol. 1, ed. by Saxton J. E., The Chemical Society, London, 1971, pp. 343–375.
- 87) Pelletier S. W., Page S. W., "The Alkaloids," Vol. 3, ed. by Saxton J. E., The Chemical Society, London, 1973, pp. 232–257.
- 88) Pelletier S. W., Page S. W., "The Alkaloids," Vol. 8, ed. by Grudon M. F., The Chemical Society, London, 1978, pp. 219–243.
- 89) Pelletier S. W., Page S. W., "The Alkaloids," Vol. 10, ed. by Grudon M. F., The Chemical Society, London, 1981, pp. 211–226.
- 90) Yunusov M. S., Rashkes Ya. V., Salimov B. T., Ametova E. F., Yunusov S. Yu., *Khim. Priod. Soedin.*, 525–536 (1985).
- 91) Yunusov M. S., *Natural Product Reports*, **8**, 499–526 (1991).
- 92) Yunusov M. S., *Natural Product Reports*, **10**, 471–486 (1993).
- 93) Yunusov M. S., Rashkes Ya. V., Yunusov S. Yu., *Khim. Priod. Soedin.*, **8**, 85–87 (1972).
- 94) Wada K., Mori T., Kawahara N., *J. Mass Spectrom.*, **35**, 432–439 (2000).
- 95) Wada K., Mori T., Kawahara N., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 660–668 (2000).
- 96) Wada K., Mori T., Kawahara N., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1065–1074 (2000).
- 97) Li Z., Wang F., *Chin. Chem. Lett.*, **7**, 443–444 (1996).
- 98) Wang H. C., Zhu D. Z., Zhao Z. Y., Zhu R. H., *Acta Chimica Sinica*, **38**, 475–480 (1980).
- 99) de la Fuente G., Reina M., Valencia E., Rodriguez-Ojeda A., *Heterocycles*, **27**, 1109–1113 (1988).
- 100) Pelletier S. W., Djarmati Z., Lajsic S., De Camp W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2617–2625 (1976).
- 101) Pelletier S. W., Etse J. T., *J. Nat. Prod.*, **52**, 145–152 (1989).
- 102) Takayama H., Wu F. E., Eda H., Aimi N., Sakai S., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1644–1646 (1991).
- 103) Wada K., Bando H., Wada R., Amiya T., *Shoyaku Zasshi*, **43**, 50–54 (1989).
- 104) Sobu B., *Hokkaido Medical Journal*, **16**, 277–290 (1938).
- 105) Tanabe T., Ito S., *Hokkaido Medical Journal*, **17**, 327–334 (1939).
- 106) Tanabe T., Sakai S., *Hokkaido Medical Journal*, **21**, 601–611 (1943).
- 107) Kashima S., Hashizume T., Mitsui K., *Japanes Laser Medical Journal*, **9**, 3–7 (1988).
- 108) Kashima S., Oka S., Ishikawa J., Hiki Y., *Japanes Laser Medical Journal*, **12**, 3–9 (1991).
- 109) Murayama M., Miura C. Bando H., *Nihon Yakuri Zasshi*, **108**, 203–216 (1996).
- 110) Wada K., Ishizuki S., Mori T., Bando H., Murayama M., Kawahara N., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 978–982 (1997).
- 111) Wada K., Ishizuki S., Mori T., Fujihira E., Kawahara N., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 140–146 (1998).
- 112) Wada K., Ishizuki S., Mori T., Fujihira E., Kawahara N., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 607–615 (2000).
- 113) Okamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **7**, 44–49 (1959).
- 114) Natsume M., *Chem. Pharm. Bull.*, **8**, 374–375 (1960).
- 115) Suginome H., Furusawa S., Chiba Y., Kakimoto S., *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. III. Chem.*, **4**, 14–15 (1950).
- 116) Suginome H., Kohyama T., Kunimatsu Y., *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. III. Chem.*, **4**, 16–24 (1950).