

バナバ *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. の α -アミラーゼ阻害活性成分の単離, 及び定量分析

細山広和,* 杉本明夫, 鈴木裕子, 坂根 巖, 角田隆巳

Isolation and Quantitative Analysis of the α -Amylase Inhibitor in *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. (Banaba)

Hirokazu HOSOYAMA,* Akio SUGIMOTO, Yuko SUZUKI,
Iwao SAKANE, and Takami KAKUDA

Central Research Institute, ITO EN, Ltd., 21 Mekami, Sagara-cho, Haibara-gun,
Shizuoka 421-0516, Japan

(Received January 14, 2003; Accepted March 31, 2003; published online May 1, 2003)

Banaba [*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.] has been used as a folk medicine for diabetes in the Philippines. Using bioassay-guided separation, valoneaic acid dilactone (**1**) was isolated from the leaves as a potent α -amylase inhibitor. A simple and efficient method for the quantitative determination of valoneaic acid and its derivatives in Banaba extract was established. Valoneaic acid exists as the structural part of the polyphenols, which like flosin A, reginin A, and lagerstroemin, are characteristic constituents of Banaba. These derivatives were hydrolyzed to valoneaic acid by HCl and extracted with 2-butanone. This extract was subjected to HPLC analysis, and the contents of valoneaic acid determined as the whole valoneaic acid contents. Using this method, the whole valoneaic acid contents were measured in eight Banaba leaf decoctions. The α -amylase-inhibiting activities of the decoctions were dependent on the whole valoneaic acid contents. In addition, a strong linear correlation was observed between the whole valoneaic acid contents and total polyphenol contents. This analytical procedure is applicable to the chemical evaluation of Banaba.

Key words—*Lagerstroemia*; Banaba; α -amylase; valoneaic acid; quantitative analysis

バナバ [*Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers., 和名オオバナサルズベリ] は、熱帯地方に広く分布するミソハギ科の落葉広葉樹で、フィリピンでは糖尿病に有効とされ、その葉を煎じた茶が民間療法的に用いられている。¹⁾ 現在、血糖降下作用,^{2,3)} 抗肥満作用,⁴⁾ 抗酸化作用⁵⁾などの薬理活性が確認されており、特に血糖降下作用については、ヒト試験^{6,7)}を含めて多くの研究報告がなされている。また、これまで行われた成分研究では、corosoric acid^{8,9)}等のトリテルペンや、lagerstroemin¹⁰⁾などの加水分解型タンニン、^{10,11)} エラジタンニン類^{12–14)}等が報告されている。血糖降下作用に関連する化合物として、ブドウ糖輸送増強活性を有する corosoric acid が関与成分の1つと考えられているが、含量が少ないため、他の活性成分の存在及び関与、並びに複合的な作用も考えられている。^{8,9)} また最近、Hayashi ら¹⁵⁾により、*L. speciosa* に含まれる reginin A,¹⁰⁾ lager-

stroemin,¹⁰⁾ flosin B¹¹⁾等の加水分解型タンニンに、ラット脂肪細胞へのブドウ糖の取込み増強作用が報告されたことから、これらの加水分解型タンニンも血糖降下作用の関与成分の1つと考えられる。

我々はこれまで、食後血糖値の急激な上昇を抑制する *L. speciosa* の作用に着目し、 α -アミラーゼ阻害活性を指標に、*L. speciosa* 葉の熱水抽出物中の成分を調べ、polyphenol 画分に強い活性が認められたことを報告した。³⁾ 本研究では、polyphenol 画分の更なる成分探索を行い、顕著な阻害活性を有する化合物として既知化合物 valoneaic acid dilactone (**1**)¹⁶⁾を得た (Fig. 1)。さらに、*L. speciosa* の品質

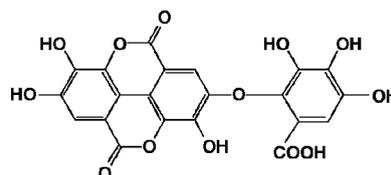


Fig. 1. Structure of Valoneaic Acid Dilactone (**1**)

評価法の確立を目的として、*L. speciosa*に含まれる **1** の定量法の検討を行った。また、本定量法を用いて *L. speciosa* 葉の熱水抽出液に含まれる **1** の定量を行い、同時に α -アミラーゼ阻害活性及びポリフェノール含量を測定し、相関性を調べることにより、本定量法の品質評価法としての有用性・信頼性を検討した。

実験の部

1. α -アミラーゼ阻害活性試験 既報³⁾に基づき分析した。粗抽出物並びに HPLC 分画については、200 μ g/ml での活性値を記した。

2. *L. speciosa* の α -アミラーゼ阻害活性成分の単離

2-1. 装置及び器具 カラムクロマトグラフィーの充填剤は、Sephadex LH-20 (アマシャムファルマシア)、MCI gel (三菱化学) を用いた。HPLC 装置は、Waters 600E システムコントローラー及び Waters U6k (Waters) を使い、検出器に Waters 486 UV Detector (Waters)、記録に Unicorder U-228 (日本電子工業) を用いた。

2-2. 分離及び精製 フィリピン産 *L. speciosa* 葉部の乾燥物 660 g を 1—3 mm 角に裁断し、80% acetone (5 l) で室温にて 24 時間抽出した。抽出液を濾別し、残渣に 80% acetone (5 l) を加えて再抽

出した。抽出液を併せて減圧下濃縮し、固形物 (86.91 g, 13.2%) を得た。固形物を蒸留水 (1 l) に転溶して酢酸エチル (1 l) で 2 回分配し、酢酸エチル抽出物 (14.38 g, 2.17%) を得た。さらに、水層を *n*-BuOH で分配し、ブタノール抽出物 (21.76 g, 3.30%) を得た。酢酸エチル抽出物を MCI gel カラム (300×30 mm *i. d.*, 75% EtOH) を通した後 (6.51 g, 0.986%), 中圧カラム Waters AP-2 (300×25 mm *i. d.*) に充填した Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、Fr. 1 (40—120 ml, 2670 mg, 0.40%), Fr. 2 (120—160 ml, 911.2 mg, 0.14%), Fr. 3 (160—200 ml, 419.2 mg, 0.064%), Fr. 4 (200—320 ml, 740.0 mg, 0.11%), Fr. 5 (320—400 ml, 124.7 mg, 0.019%), Fr. 6 (400—520 ml, 74.8 mg, 0.011%), 及び Fr. 7 (520—640 ml, 185.7 mg, 0.028%) を得た。なお溶出条件は次の通り: solvent A: EtOH, solvent B: MeOH, グラジエント溶出法; A : B = 100 : 0 \rightarrow 0 : 100, 流速: 1 ml/min, 測定波長: 254 nm)。

Fr. 4 をさらに逆相 HPLC [Capcell pak C18 (300×20 mm *i. d.*, 5 μ m, 資生堂), MeOH-H₂O-AcOH (30 : 70 : 0.1), 流速: 8 ml/min, 測定波長: 254 nm] で分離し, valoneic acid dilactone (**1**, 181.2 mg, 0.027%) を得た (Fig. 2)。

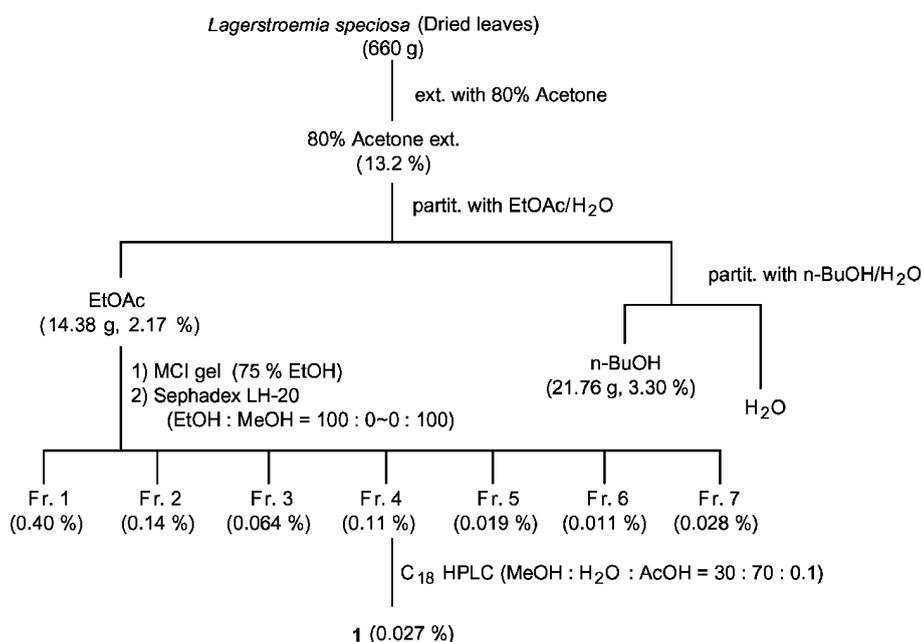


Fig. 2. Isolation Scheme of *L. Speciosa*

3. Valoneic Acid Dilactone (1)の定量分析

3-1. 装置及び器具 HPLCは、Waters社製 in line degasser と Waters社製 Module-1 及び Waters 996 フォトダイオードアレイ検出器を接続して用いた。データの処理、解析は、Millennium (Waters) を用いた。HPLC 溶媒はすべて $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを通してろ過したものを用いた。

3-2. 検量線作成 Valoneic acid dilactone (1) を精密に秤量し、500 ppm メタノール溶液を調製した。これを適宜希釈して 100, 50, 25, 5 及び 1 ppm 各溶液を調製し、検量線を作成した。

3-3. 試料の調製 *L. speciosa* 葉部を乾燥し 1—3 mm 角に裁断して、 170°C で焙煎した後、10 倍量のイオン交換水で加温抽出 (85°C , 5 min.) し抽出液を調製した。この抽出液をろ過後、 170°C にて噴霧乾燥し、*L. speciosa* 焙煎葉抽出エキスを調製した。

3-4-1. 加水分解及び抽出 焙煎葉抽出エキス 160 mg を 60°C の温水 100 ml に溶解し、常温に冷却したものを加水分解用試料とした。捻口試験管 (テフロンシール加工) に、加水分解用試料 4 ml と塩酸 (36%) 1 ml を入れて閉栓し、試験管をゆるやかに振って内容を混和した。これを 115°C の油浴に静置し、4 時間反応させた。反応後、NaCl 1 g を添加し振盪した後、氷浴で 20 分冷却した。冷却後、2-butanone を 4 ml 添加して激しく振盪し、ついで 2500 rpm で 5 分間遠心分離した。パスツールピペットを用いて有機層を注意深く採取し、直ちに減圧下濃縮した。採取の際、褐色の不溶物が界面に生成しているが、これらは採取しないようにした (3-4-2 参照)。濃縮後の残渣は直ちにメタノールに溶解し、25 ml に定容して定量分析用試料-1 とした。有機層採取後の水層は、再び氷浴で最低 5 分間冷却した後、同様に分液抽出操作を行い、定量分析用試料-2 を得た。定量分析用試料-1 及び-2 を各々 HPLC 分析し、得られた結果を合算し、1 検体あたりの 1 の含量 (総 valoneic acid 量) を求めた。

3-4-2. 褐色不溶物の生成による定量値への影響の確認試験 加水分解用試料 4 ml に、精密に秤量 (0.5 mg) した 1 を混和した。これに塩酸 (36%) 1 ml を添加して、3-4-1 に記載の条件で加水分解、抽出及び定量し、回収率を算出した。

3-5. HPLC 条件 カラム : Wakopak 5C18 HG (和光純薬工業, $250 \times 4.6\ \text{mm i.d.}$, $5\ \mu\text{m}$) にプレカラム (和光純薬工業 Wakopak 5C18HG, $30 \times 4.6\ \text{mm i.d.}$, $5\ \mu\text{m}$) を接続。溶媒 : A: 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 0.05\% \text{H}_3\text{PO}_4\text{aq-CH}_3\text{CN}$ (92 : 8), B: $\text{H}_2\text{O-CH}_3\text{CN}$ (50 : 50), A : B = 100 : 0 (0—38 min.) → 0 : 100 (40—55 min.) → 100 : 0 (57—72 min.), カラム温度 : 40°C , 流速 : 1 ml/min, 注入量 : 10 μl , 測定波長 : 254 nm,

3-6. 精度試験

3-6-1. 繰り返し注入精度試験 3-4-1 記載の方法に基づき調製した定量分析用試料を 5 回繰り返し注入して定量分析し、ピーク面積より変動係数 (C. V.) を算出した。

3-6-2. 添加回収試験 加水分解用試料 20 ml に塩酸 (36%) 5 ml を添加して、3-4-1 に記載の条件で加水分解を行った。反応後の試料を 5 ml ずつ分注し、それぞれにメタノールに溶解した 1 (0.425, 0.85 及び 1.275 mg) を添加した。3-4-1 に記載の分液抽出操作に基づき定量分析用試料を調製、定量し、回収率を算出した。

4. 総 Valoneic Acid 量と α -アミラーゼ阻害活性及び polyphenol 量との相関性

4-1. 試料の調製 フィリピン産 *L. speciosa* の乾燥葉から任意に 8 枚 (長さ 16—24 cm, 幅 7.5—10 cm) を選び、各々 1—3 mm 角に裁断して 50°C で 2 時間乾燥した。各葉 500 mg を計量し、 80°C の蒸留水 70 ml で 30 分間抽出した。室温に冷却後、蒸留水で各々 100 ml に定容し、ろ紙でろ過した。最初のろ液約 20 ml は廃棄し、続いてろ過されるろ液を試料とした。

4-2. 加水分解及び総 Valoneic Acid 量の分析 捻口試験管に、4-1 で得た試料各 4 ml 及び塩酸 (36%) 1 ml を加えて閉栓し、試験管をゆるやかに振って内容を混和した。これを 115°C に加温した油浴中 4 時間反応させ、3-4-1 記載の方法に基づき分析用試料を調製し、成分分析に供した。

4-3. α -アミラーゼ阻害活性 4-1 で得た試料を各 20 ml 採取し、減圧下で体積比約 1/4 になるまで濃縮後、蒸留水で 5 ml に定容し、4 倍濃縮抽出液を調製した。本品を用いて α -アミラーゼ阻害活性を検討した。³⁾

4-4. ポリフェノール含量 4-1 で得た試料を

用い、AOAC法に準じ、Folin-Denis法により定量した。¹⁷⁾

結果及び考察

1. *L. speciosa* の α -アミラーゼ阻害活性成分の探索 α -アミラーゼ阻害活性を指標に、*L. speciosa* 葉部の成分探索を行った (Fig. 2)。 *L. speciosa* の 80% acetone 抽出物を、酢酸エチル及び *n*-ブタノールで分配して各層を得た。得られた各分画について α -アミラーゼ阻害活性を調べたところ (Fig. 3)、酢酸エチル層の阻害作用が比較的強かったことから、これをさらに Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分離し、分画 Fr. 1—7 を得た。Fr. 1—7 の α -アミラーゼ阻害活性を調べた結果 (Fig. 4)、Fr. 4 に最も強い阻害活性が認められたので、逆相 HPLC による精製を行ったところ、化合物 **1** が得られた。**1** は、¹H-NMR において DMSO-*d*₆ 中 δ_{H} 7.19 (2H, s) 及び 7.60 (1H, s) のシグナルを与え、FABMS では *m/z* 471 (MH⁺)

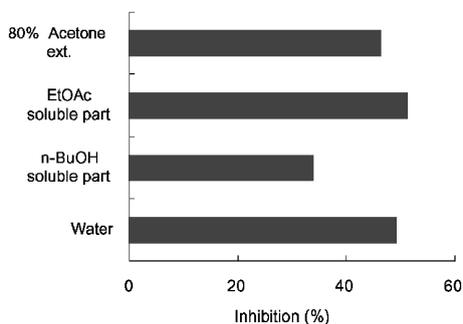


Fig. 3. Inhibitory Effects of 80% Acetone Extract and Partitioned Fractions of *L. speciosa* on α -Amylase Activity at 200 $\mu\text{g/ml}$

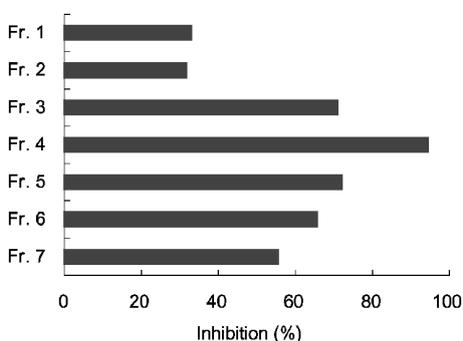


Fig. 4. Inhibitory Effects of Fractions 1—7 on α -Amylase Activity at 200 $\mu\text{g/ml}$

に分子イオンピークが観察された。これらの結果を文献値¹⁸⁾と比較し、**1**を valoneic acid dilactone¹⁶⁾と同定した。 α -アミラーゼ阻害活性 (IC₅₀) は、80% acetone 抽出物が 244 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、**1**は 21.9 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2. *L. speciosa* 抽出物中の Valoneic Acid Dilactone の定量試験 *L. speciosa* 葉に含まれる **1** の含量を調べるため、葉から抽出液を調製し、¹⁹⁾ HPLC 法で直接定量を行った。その結果、焙煎工程の有無による含量差が認められた (Table 1)。これは、**1**を valoneic acid ester として構造式中に含む lagerstroemin 等の加水分解型タンニンが、焙煎時の強熱により分解し、**1**の含量が見掛け上増加したためと考えられた。一般に加水分解型タンニンは、熱や酸、酵素などにより、分解反応等が容易に進行する。そのため、原料葉の保存及び加工条件によっては、これらの反応が誘発、促進される可能性があり、直接定量による **1**の含量の測定値に大きな影響を及ぼすと考えられる。また *L. speciosa* 葉を飲料へ加工する際に、乾燥・殺菌等の目的で加熱処理²⁰⁾した場合、**1**の定量値に変動が生じるため、品質評価の際に支障となることが予想される。したがって、**1**の定量法には、これらの変動要因による影響が少ない処理や操作が必要と考えられた。

そこで我々は、加水分解型タンニンが容易に酸加水分解されることに着目し、valoneic acid ester を有する加水分解型タンニンの分解で得られる **1**を、総 valoneic acid 量として定量する手法を考案した。本分析法を確立するため、*L. speciosa* 葉の熱水抽出物を用い、加水分解条件及び **1**の抽出条件、定量分析条件について検討した。また、本分析法の品質評価法としての信頼性を検討するために、本分析法により求められる総 valoneic acid 量と、 α -アミラーゼ阻害活性及び polyphenol 量との相関性を

Table 1. Valoneic Acid Contents in Banaba Leaves

Hydrolysis procedure	Valoneic acid (%) [*]	
	Not treated ^{**}	Treated
Not roasted	0.057	2.05
Roasted ^{***}	0.184	2.10

^{*} %: percent by leaf

^{**} analyzed the decoction without hydrolysis procedure.

^{***} roasted for 15 min at 170°C.

調べた。

2-1. HPLC 条件の検討 種々の溶媒条件を検討した結果、Amakura らの条件²¹⁾を改良した、溶媒 A: 100 mM NaH₂PO₄・0.05% H₃PO₄aq-CH₃CN (92 : 8) 及び溶媒 B: H₂O-CH₃CN (50 : 50) の 2 液を用いたグラジエント溶出条件で、最も良好な分離が得られた (Fig. 5)。

2-2. 検量線の直線性 1 の検量線は、1—100 ppm の範囲でピーク面積 y と濃度 x の間に良好な直線性が認められた (Fig. 6)。最小二乗法により求められた回帰直線式は $y = 7.62 \times 10^4 x - 26800$ であり、相関係数 $r = 0.999$ が得られた。

2-3. 加水分解反応の最適化 *L. speciosa* 焙煎葉抽出エキスの水溶液を用い、加水分解反応の条件検討を行った。当該溶液を塩酸で加水分解後、2-butanone で抽出して得られる有機層を濃縮、定容

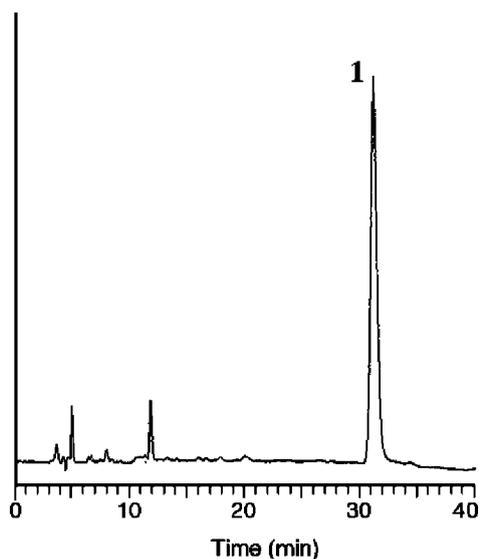


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Hydrolysate of Banaba Extract
Valoneic acid dilactone (1) t_R : 31.2 min

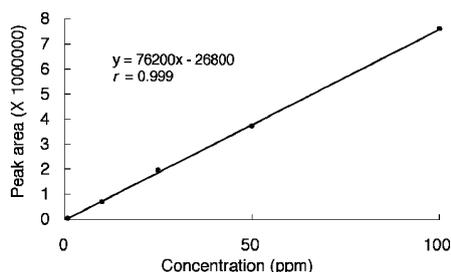


Fig. 6. Standard Plot of Valoneic Acid Dilactone (1)

し、HPLC 分析することにより 1 の定量値を求めた。この一連の操作において、加水分解に要する時間を調べた (Fig. 7)。測定値は反応時間に伴い経時的に増加し、4 時間で最大となった後、経時的に減少した。反応時間 4 時間までは、加水分解型タンニン中の valoneic acid ester 等の加水分解が進行した結果、反応液中の 1 が増えたために測定値が増加したものと考えられるが、4 時間以降の測定値が減少する原因は不明である。同様の現象は、oak 抽出物中の ellagic acid の定量試験において、酸加水分解の過程で起きることが、Lei らにより報告されている。²²⁾ 以上の結果から、総 valoneic acid 量の定量における分解反応時間は 4 時間に設定した。

一方、加水分解及び抽出時に、水層、有機層双方に不溶性褐色の固形物の生成が確認された。これらの生成物が、1 の定量に及ぼす影響を、以下の手順で調べた。*L. speciosa* 焙煎葉抽出エキスの水溶液に、1 の標品をあらかじめ添加し、同様に酸加水分解、抽出及び分析を行った。抽出時、褐色不溶性物の生成が確認されたが、これらは採取せず、有機層のみを注意深く分取して、以降の分析操作に供した。その結果、1 の回収率は 106%であったことから、これらの不溶物は、1 の定量に影響を及ぼさないと判断した。

2-4. 精度試験 2-3 で検討した条件に基づき調製した定量分析用試料について、計 5 回繰り返し注入を行って定量分析した。得られたクロマトグラムのピーク面積値から C.V. 値を算出した結果、1.75%であった。抽出操作の添加回収試験における 1 の回収率は、100.2—104.1%であった。

2-5. 総 Valoneic Acid 量と α -アミラーゼ阻害活性及び Polyphenol 量との相関性 任意の *L.*

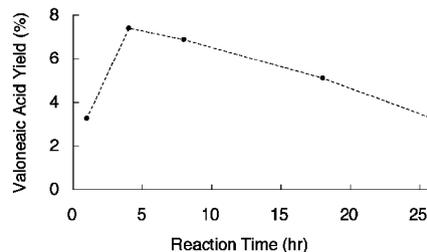


Fig. 7. Effect of Time on the Yield of Valoneic Acid from Banaba Extract by Hydrolysis
%: percent by extract.

speciosa 葉 8 枚を選び、各々の葉から得た熱水抽出液について、総 valoneic acid 量および α -アミラーゼ阻害活性 (IC_{50}) を調べた (Table 2)。総 valoneic acid 量は、先述の定量分析法により求めた。 α -アミラーゼ阻害活性は既報³⁾に基づき調べたが、用いた熱水抽出液は原液のままでは希薄であったため、減圧下濃縮を行い 4 倍濃縮液として活性を検討し、得られた結果を原液量に換算した値 ($\mu\text{l}/\text{ml}$) として求めた。その結果、両測定値ともばらつきがみられたが、総 valoneic acid 量の増加に伴い α -アミラーゼ阻害活性も増強する傾向がみられた。

また、各抽出液の polyphenol 量を Folin—Denis 法¹⁷⁾を用いて求め、総 valoneic acid 量との関係を調べたところ、高い相関性が認められた (Fig. 8)。

これらの結果を踏まえて、本法の品質評価法としての信頼性を検討するため、Table 1 にて直接定量分析に用いた *L. speciosa* 抽出液について、本法を適用し再分析を行った。¹⁹⁾ その結果、本法により求めた総 valoneic acid 量は、一定の含量値 (焙煎前: 2.05%, 焙煎後: 2.10%) として得られ、焙煎工程の影響を受けないことが確認された。

今回研究を行った *L. speciosa* の他、polyphenol を主成分とする機能性食品やハーブ類、天然物では、活性成分が糖や acyl 基などと結合して化合物群を形成している場合が多く、単一成分の定量分析が困難である。そのため、polyphenol の品質評価法には、便宜的に Folin—Denis 法や酒石酸—鉄比色法²³⁾などの比色定量法が用いられることが多い。しかし、これらの方法で得られる polyphenol 量は、各々の方法に定める標準物質、すなわち、タンニン酸や没食子酸エチルの換算値として表され、かつ各分析法の測定原理も異なっているため、同じ検体であっても、分析法毎に異なる定量値となる場合が多い。また、これらの比色定量法は、フェノール性水酸基の反応性を利用するため、定量目的の成分以外にフェノール性水酸基を有する化合物も、同様に反応して定量される場合がある。以上のように、比色定量法は polyphenol 量を簡便に測定できる長所を持つ反面、成分を特定して行う定量分析には適さない場合がある。

本報で検討した定量法は、比色定量法とは異なり、valoneic acid ester を構造中に含む polyphenol 類

Table 2. Inhibitory Effects of Banaba Leaf Decoctions on α -Amylase Activity

Banaba decoctions	Valoneic acid (% by each leaf)	IC_{50} ($\mu\text{l}_{\text{decoctions}}/\text{ml}$)
Leaf A	1.47	333
Leaf B	1.95	266
Leaf C	2.01	239
Leaf D	2.13	258
Leaf E	2.32	269
Leaf F	2.76	248
Leaf G	3.00	186
Leaf H	3.07	219

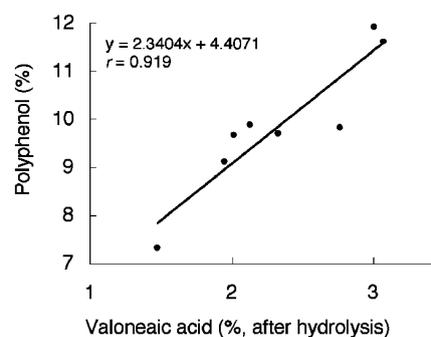


Fig. 8. Correlation of Whole Valoneic Acid and Polyphenol Contents
%: percent by leaf.

を塩酸で加水分解して **1** とし、有機溶媒で抽出後、HPLC 分析により **1** の絶対量 (総 valoneic acid 量) を測定するものである。同様に加水分解操作を伴う定量法の例としては、ギムネマ (*Gymnema sylvestre* R. Br.) 葉中の deacylgymnemic acid²⁴⁾ や紫雲膏 (ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. を原料とした軟膏製剤) 中の shikonin²⁵⁾ の定量が報告されている。これらの方法は、polyphenol 類のような混合物を主成分とする検体の品質評価において、活性物質、又は活性物質の共通構造の絶対量を HPLC で定量するため、活性値をより正確に反映した分析値が得られるものと考えられる。

L. speciosa の抽出物において、本分析法で得られた **1** の定量値、すなわち総 valoneic acid 量と α -アミラーゼ阻害活性強度の関係から、**1** が *L. speciosa* の α -アミラーゼ阻害活性物質の 1 つであり、 α -アミラーゼ阻害活性評価の基準物質として利用できることが示唆された。また、同じ葉を原料

とした場合、焙煎工程前後で一定の定量値が得られたことや、繰り返し注入試験、添加回収試験の結果から、**1**が *L. speciosa* の品質評価の基準物質としても利用可能であることが認められた。以上の理由により、本分析法は活性成分の含量と生理活性強度の両面から *L. speciosa* の品質評価を行うための分析法として、有効な一手段であると考えられる。

謝辞 本研究にあたり、御助言・御教示を頂きました広島県立大学生物資源学部・黒柳正典教授、機器分析を行っていただきました静岡県立大学薬学部・梅原薫博士に深謝いたします。

REFERENCES AND NOTES

- Garcia F., *J. Phil. Med. Assoc.*, **20**, 395–402 (1940).
- Kakuda T., Sakane I., Takihara T., Ozaki Y., Takeuchi H., Kuroyanagi M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 204–208 (1996).
- Suzuki Y., Hayashi K., Sakane I., Kakuda T., *J. Jpn. Nutr. Food Sci. Vitaminol.*, **54**, 131–137 (2001).
- Suzuki Y., Unno T., Ushitani M., Hayashi K., Kakuda T., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **45**, 791–795 (1999).
- Unno T., Sakane I., Masumizu T., Kohno M., Kakuda T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1772–1774 (1997).
- Ikeda Y., Noguchi M., Kishi S., Masuda K., Kusumoto A., Zeida M., Abe K., Kiso Y., *J. Nutritional Food*, **5**, 41–53 (2002).
- Ikeda Y., Chen Jui-Tung, Matsuda T., *Jpn. Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 829–835 (1999).
- Murakami C., Myoga K., Kasai R., Ohtani K., Kurokawa T., Ishibashi S., Dayrit F., Padolina W. G., Yamasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2129–2131 (1993).
- Yamasaki K., *Shokuhin To Kaihatsu*, **34**, 11–13 (1999).
- Xu Y. M., Sakai T., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 639–646 (1991).
- Xu Y. M., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 647–650 (1991).
- Takahashi M., Osawa K., Ueda J., Yamamoto F., Tsai T.C., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 984–987 (1976).
- Takahashi M., Ueda J., Sasaki J., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 880–882 (1977).
- Tanaka T., Tong H. H., Xu Y. M., Ishimaru K., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2975–2980 (1992).
- Hayashi T., Maruyama H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaki K., Tanaka T., *Planta Med.*, **68**, 173–175 (2002).
- Schmidt O. Th., Komarek E., *Liebigs Ann. Chem.*, 156–176 (1955).
- AOAC Official Methods of Analysis 14th edn., 187 (1984).
- Mayer W., Bilzer W., Shilling G., *Liebigs Ann. Chem.*, 876–881 (1976).
- Dried leaves of *L. speciosa* were cut into small pieces (1–3 mm square) and roasted for 15 min at 170 °C. Roasted and not-roasted leaves were further dried at 50°C for 2 hr. These leaves were weighed (1 g). Seventy ml of hot water (80°C) was added to these samples and stood at 80°C for 30 min. The decoctions were cooled to room temperature and filled up to 100 ml with distilled water and filtered. After the first filtrate (approx. 20 ml) was discarded, following filtrates were subjected to quantitative analysis described in this paper.
- ex.; JP Patent, 1998, 2818458.
- Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y., *J. Chromatogr. A*, **891**, 183–188 (2000).
- Lei Z., Jervis J., Helm R. F., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1165–1168 (2001).
- Ikegaya K., Takayanagi H., Anan T., *Tea Research Journal.*, **71**, 43–74 (1990).
- Suzuki K., Ishihara S., Uchida M., Komoda Y., *Yakugaku Zasshi*, **113**, 316–320 (1993).
- Arai T., Zhao C., Mizukami H., Kojima K., Yasui T., Furuhashi S., Sekita S., Satake M., Ogihara Y., *Natural Medicines*, **54**, 81–85 (2000).