

## 荊芥の $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase 阻害活性を示すフラボノイド及びフェニルプロパノイドについて

松 田 宗 人\*, 蟹 田 理 英, 齋 藤 雄 二, 山 下 明

鐘紡株式会社漢方研究所

### The $3\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibitory Active Flavonoids and Phenylpropanoids from *Schizonepeta* Spikes

MUNETO MATSUTA,\* RIE KANITA, YUJI SAITO and AKIRA YAMASHITA

Kampo Research Laboratory, Kanebo Ltd., Tomobuchi-cho, Miyakojima-ku, Osaka 534, Japan

(Received October 19, 1995)

Dry spikes of *Schizonepeta tenuifolia* BRIQUET (Labiatae) exhibited an inhibitory activity on  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. From schizonepeta spikes, five flavonoids (hesperidin, hesperetin, apigenin, luteolin and ladanein), five phenylpropanoids (caffeic acid, rosmarinic acid, cinnamic acid, *p*-coumaric acid and 2,3-di-*O*-cinnamoyltartaric acid) and eight new caffeic acid derivatives (schizotenuins A-F) were isolated and their structures were elucidated on the basis of NMR, IR, UV, MS and other physicochemical evidences. The inhibitory activities of all of these compounds on  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase were stronger than that of aspirin. The pharmaceutical effect of schizonepeta spikes was considered to be mainly due to luteolin, rosmarinic acid, schizotenuins A and C1, because they have strong inhibitory activities on  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and their contents were high.

**Keywords**—*Schizonepeta tenuifolia*; anti-inflammatory effect; schizotenuins A-F;  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase; caffeic acid; flavonoid

荊芥 *Schizonepeta tenuifolia* BRIQUET はシソ科 Labiatae に属する中国北部原産の一年生草本である。日本薬局方荊芥は9局から収載され、茎をできるだけ取り除いた花穂である荊芥穂 (schizonepeta spike) が規定されている<sup>1)</sup>。神農本草経中品に収載され、消炎、発汗、解熱、鎮痙および解毒等を目的とする生薬であり、皮膚疾患用薬、消炎排膿薬等として使われる十味敗毒湯、荊防敗毒散などの処方に配合されている<sup>2)</sup>。その成分としては、(−)-pulegone, (+)-menthone等の精油、モノテルペン配糖体である schizonepetoside A~E, フラボノイド配糖体である hesperidin, apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin-7-*O*-glucosideの報告<sup>3)</sup>がある。荊芥の酢酸エチルエキスをマウスに経口投与すると、Whittle法で writhing を抑制するが、その主要活性成分は (+)-menthone であると報告<sup>4)</sup>されている。また、このエキスは腹腔内への色素の漏出を抑制するが、その主活性成分は (−)-pulegone であると報告<sup>4)</sup>されている。

$3\alpha$ -Hydroxysteroid dehydrogenase (以下  $3\alpha$ -HSD) は、 $5\alpha$ -dihydrotestosterone や  $5\beta$ -dihydrocortisone などの3-ケトステロイド還元を行う酵素であり、ステロイド代謝に重要な役割を果たしている。Penning<sup>5)</sup>は、ラット肝 cytosol から精製した  $3\alpha$ -HSD の活性が、既存の抗炎症薬

によって強力に阻害され、各薬物の IC<sub>50</sub> 値とヒトでの常用量との間に高い相関性を認めたと報告している。またこの相関性は、cyclooxygenase 阻害活性の場合よりも優れていると報告している。

著者らは、抗炎症作用を持つ生薬の  $3\alpha$ -HSD 阻害活性を指標とするスクリーニングにおいて、荊芥熱水抽出エキ스가強い阻害活性を持つこと、および腹腔内投与でカラゲニン浮腫の抑制作用を有することを見いだした<sup>6)</sup>。

本研究では、 $3\alpha$ -HSD 阻害活性を有する荊芥に含まれるフラボノイド類およびフェニルプロパノイド類に阻害活性を認めたので報告する。

### 結果および考察

市販の韓国産荊芥を70%水性アセトン抽出し、濃縮後クロロホルム、酢酸エチルで順次抽出した。

クロロホルム転溶部より ladanein (I), cinnamic acid (II) および *p*-coumaric acid (III), 酢酸エチル転溶部より hesperidin (IV), hesperetin (V), apigenin (VI), luteolin (VII), caffeic acid (VIII), rosmarinic acid (IX), 2,3-di-*O*-cinnamoyl-D-tartaric acid (X) および schizotenuin A, B1, B2, C1, C2, D, E, F (XI~XVIII) と命名

した新規物質を単離し (Chart 1), その構造を比旋光度 ( $[\alpha]_D$ ), 紫外吸収スペクトル (UV), 赤外吸収スペクトル (IR), マススペクトル (MS),  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル (NMR) 等の検討により明らかにした。

II~IX は, 諸スペクトルデータを検討した結果, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, hesperidin<sup>7)</sup>, hesperetin<sup>8)</sup>, apigenin<sup>7)</sup>, luteolin<sup>8)</sup>, caffeic acid, および rosmarinic acid<sup>9)</sup> と同定した。

I は UV, IR 等よりフラボノイドであると考えられた。二次イオンマススペクトル (SIMS) の親イオンピーク  $m/z$  315 ( $M+1$ )<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR のシグナル数より 2 個のメトキシ基, 2 個の水酸基を有するフラボンであることが判った。そこで MeOH 中での UV スペクトルの  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  添加によるシフトを文献値<sup>10)</sup>と比較し, ladanein と同定した。

X は, UV および IR スペクトルが cinnamic acid と非常に近似していた。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR においては cinnamic acid のシグナル以外に, メチン炭素 1 個, カルボニル炭素 1 個の存在が示唆された。しかし SIMS において  $m/z$  411 に親イオンピーク ( $M+1$ )<sup>+</sup>を示すことから, 炭素 11 個が点対称に 2 量化した構造 (X) と決定した。また比旋光度が  $-158^\circ$  であることから, tartaric acid は D 体であると考えられた。

XI~XVIII の UV スペクトルは, いずれも 290 および 320~330 nm 付近に吸収極大の存在する類似のパターンを示した。これは, caffeic acid 2 量体の rosmarinic acid と共通のパターンであり, これらは caffeic acid オリゴマーと推定した。

SIMS において, XI~XVIII はそれぞれ 717, 731, 731, 537, 537, 357, 539, 553 に  $[M+1]^+$  イオンピークを与えた。caffeic acid の分子量は 180 だから, XI~XIII は caffeic acid の 4 量体, XIV, XV, XVII および XVIII は 3 量体, XVI は 2 量体であると推定した。XI と XII あるいは XIII との質量数の差は, XVII と XVIII の質量差と同様 14 で水酸基 1 個がメトキシ基に置換したことを示すと考えられた。

XVI は, 3 置換ベンゼン環, 4 置換ベンゾフラン環, *trans*-propenoic acid に基づくシグナルが  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR で観察され, その結合位置は  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY (correlation spectroscopy) 測定, および COLOC (correlation of long-range coupling) において, H-6'' と C-8'' の間に long-range coupling が認められること等より Chart 2 の構造であると結論した。

XIV, XV は NMR におけるメチン炭素, メチレン炭素の存在より rosmarinic acid と同様の phenyllactic acid が XVI に 1 分子結合した構造を有すると推定した。その結合位置については XIV では C-9'', XV では C-9 のシグナ

ルが約 2 ppm 高磁場シフトしていること, および XI と比較して XIV では 5.31 ppm に, XV では 5.09 ppm に現れている H-8' が区別できること, COLOC において, XIV の H-8' と C-9'' の間に long-range coupling が観察されること等より, 明らかにした。

XI は, XIV あるいは XV にさらに phenyllactic acid が 1 分子結合した構造と決定した。

XII, XIII は XI の遊離カルボン酸がメチルエステルになった構造と判明した。メチルエステルの位置については XII, XIII の  $^1\text{H}$ -NMR において, それぞれ 9'' 位あるいは 9 位側に結合している H-8' のシグナルが低磁場シフトしていること, メチル基のプロトンとその付け根の H-8' の間に long-range coupling が現れていること等より明らかにした。

XVII および XVIII の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR において, 4 置換ベンゾフラン環の代わりに, もう 1 組の 3 置換ベンゼン環および二重結合由来のシグナルが観察された。XVIII にはさらにカルボン酸のメチルエステル由来のシグナルが観察された。これらの結合位置については,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY の結果および COLOC 測定において H-7'' と C-4, およびメチル基のプロトンと C-9'' との間に long-range coupling が観察されること等より Chart 2 の構造であると結論した。

XI~XVIII はいずれも新規物質であったので, それぞれ schizotenuin A (caffeic acid 四量体), B1, B2 (以上, A のメチルエステル), C1, C2 (以上, 三量体), D (二量体), E (四量体) および F (E のメチルエステル) と命名した。

荊芥のフラボノイドおよびフェニルプロパノイド成分の 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性は, いずれも代表的抗炎症鎮痛薬であるアスピリンよりも強いことが判った。フラボノイドの中でも V と VII の IC<sub>50</sub> 値は 6.5 および 5.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となり, 特に VII は収率も高かった。caffeic acid の誘導体の中では高収率の VIII は IC<sub>50</sub> 値が 139.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と弱い活性であったが, 二量体の IX は 48  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と活性が増大した。

さらに, XI~XVI 6 成分の 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性は, caffeic acid の重合度が増すに従って強くなった。また直線的に連なる (XV) よりも分枝した方 (XIV) が活性は強い傾向を示した。そして, 分枝した側の遊離カルボン酸がメチルエステルになるとさらに活性が増した (XI, XII および XIII)。XII の 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性は, 2.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と今回単離した成分中一番強いものであった。

XVII, XVIII の 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性は, それぞれ 20.3, 29.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。同じ直線的につながった caffeic acid 3 量体である XV と同程度の活性であった。

荊芥 10 kg から VII, IX, XI および XIV がそれぞれ 1.84, 2.40, 1.73 および 0.62 g 単離できた。これらのフ



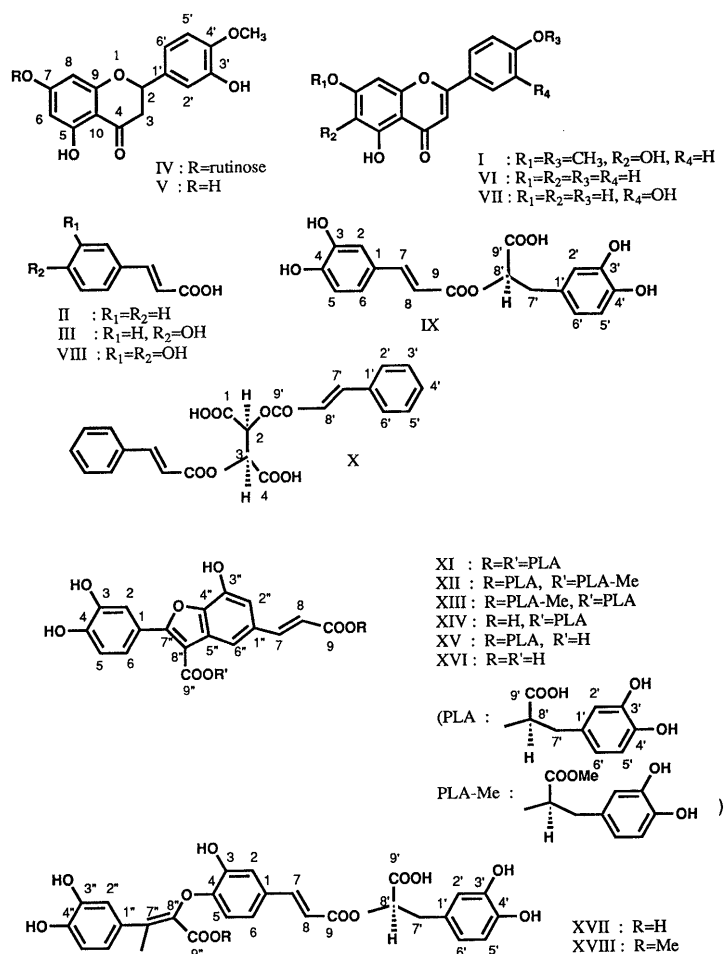


Chart 2.

dz LC-6AD, カラムには YMC-Pack A312, A343, D-ODS-5 または  $\mu$ Bondasphere を用い, 検出は UV<sub>280nm</sub> で行った.

**分離** 大阪市内にて入手した韓国産荊芥 (才野木由より購入) 10 kg を, 70% (v/v) 水性アセトン 100 l で 3 回に分けて冷浸抽出し, 抽出液を 10 l に濃縮した. この濃縮液を同量の CHCl<sub>3</sub> で 5 回, ついで AcOEt で 5 回抽出し, CHCl<sub>3</sub> エキス 233 g, AcOEt エキス 80 g を得た. エキス 40  $\mu$ g/ml で 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性を測定すると, CHCl<sub>3</sub> エキスが 27.4% の阻害, AcOEt エキスが 57.1% の阻害を示したが, 残りの水層は 10% 以下の阻害率であった.

(1) CHCl<sub>3</sub> エキスの精製: CHCl<sub>3</sub> エキスを 50% 水性 MeOH 500 ml で 3 回抽出し, 可溶部および不溶部をそれぞれ 19.5 g, 186.2 g 得た. 50% MeOH 可溶部を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi$ =4 cm,  $l$ =32 cm) に付し, 50% MeOH で溶出し 100 ml ずつ分取し 4 分画した. 画分 3 (1.27 g) を Kieselgel C.C. ( $\phi$ =3.7 cm,  $l$ =23 cm) に付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (30:10:1~10:10:1) で溶出し 4 分画した. fr. 3 (90 mg) を分取 HPLC (D-ODS-5, 1% ギ酸-CH<sub>3</sub>CN 1:3) に付し, 保持時間 13.2 分の III (14 mg) を得た.

50% MeOH 不溶部を, Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi$ =12 cm,  $l$ =38 cm) に付し, HPLC でモニターしながら, 50% MeOH, 70% MeOH, 70% acetone で溶出して 11 分画した. 画分 3 (11.97 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi$ =4 cm,  $l$ =47 cm) に付し, 50% MeOH で溶出し, 4 分画した. fr. 2 (2.73 g) を Lobar C.C. (LiChroprep RP-18 40~63  $\mu$ m, Merck) に付し 60% MeOH で溶出し, II (152 mg) を得た. 画分 4 (22.7 g) に MeOH を加え生じた沈澱を遠心分離し, MeOH で再結晶して I (877 mg) を得た. 画分 7 (22.7 g) を, Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi$ =8 cm,  $l$ =20 cm) に付し 60% MeOH で溶出し, 5 分画した. このうち, fr. 2 (22.0 g) を Toyopearl C.C. ( $\phi$ =4 cm,  $l$ =30 cm) に付し 50~70% MeOH で溶出し 5 分画した. 再度 Toyopearl C.C. ( $\phi$ =4 cm,  $l$ =30 cm) に付し, 4 分画した. 分取 HPLC (D-ODS-5, 条件 1:1% ギ酸-CH<sub>3</sub>CN 5:3, 11 ml/min) で保持時間 21.4 分のピークを分取し, さらに Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi$ =1.6 cm,  $l$ =16 cm) に付し, 50% MeOH で溶出し, V (199 mg) を得た. fr. 4 (5.05 g) を Toyopearl C.C. ( $\phi$ =2.2 cm,  $l$ =40 cm) に付し 50% MeOH で溶出し, さらに Toyopearl C.C. ( $\phi$ =1.1 cm,

$l=30$  cm) に付し, 30% MeOH, 50% MeOH で溶出し, 4 分画した. つづいて主要画分を MeOH に溶解し HPLC 条件 1 で 12 分, 18.6 分のピークを分取し, VII (158 mg), VI (63 mg) を得た.

(2) AcOEt エキスの精製: AcOEt エキス (80 g) を Diaion HP-20 C.C. に付し, MeOH 濃度を段階的に上げ 20% MeOH, 40% MeOH, 50% MeOH, 70% MeOH および MeOH で溶出し, 35 分画した.

20% MeOH 溶出部 (5.57 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=2.2$  cm,  $l=30$  cm, 50% MeOH, 15 ml/fr.) に付し, fr. 20~55 を精製し VIII (2.12 g) を得た.

40% MeOH 溶出部 (15.99 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=4$  cm,  $l=25$  cm) に付し, 50% MeOH, 15 ml/fr. で溶出し fr. 16~23 を精製し IV (1.00 g) を, fr. 75~140 を精製して IX (2.40 g) を得た.

50% MeOH 溶出部の Fr. 10~13 (10.82 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=4$  cm,  $l=50$  cm, 50% MeOH 溶出) に付し, 9 分画した. 画分 8 (2.13 g) について, 分取 HPLC (D-ODS-5, 条件 2: 1% ギ酸-CH<sub>3</sub>CN 2:1, 11 ml/min) を行い, 保持時間 6.4 分の XVI (24 mg) と 7.5 分の XIV (620 mg) を得た. 画分 9 (3.56 g) について条件 2 で分取 HPLC を行い保持時間 8.8 分の XV (34 mg) と 10.6 分の XI (1.73 g) を得た.

50% MeOH 溶出部 Fr. 14~23 (7.16 g) を LH-20 C.C. ( $\phi=4.2$  cm,  $l=15$  cm, 50% MeOH, ついで 70% MeOH, 最後に MeOH 溶出) に付し 4 分画した. 画分 2 (1.35 g) を LH-20 C.C. ( $\phi=2.6$  cm,  $l=16$  cm, 50% MeOH 溶出), Toyopearl C.C. ( $\phi=3.5$  cm,  $l=7$  cm, 50% MeOH 溶出) に付した画分 (241 mg) について分取 HPLC (S-343, 条件 2) を行い, 保持時間 8.6 分の XVII (80 mg) を得た. 画分 3 (2.21 g) を Toyopearl C.C. ( $\phi=3.5$  cm,  $l=9$  cm, 50% MeOH 溶出) に付し, 5 分画 (fr. 1~5) した. fr. 4 (1.29 g) について, 分取 HPLC (D-ODS-5, 条件 2) を行い, 保持時間 16.4 分の XII (82 mg) と 18.2 分の XIII (29 mg) を得た. 画分 4 (3.96 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=3.5$  cm,  $l=17$  cm) に付し 50% MeOH で溶出し 7 分画した. fr. 3 (2.59 g) について再度 LH-20 C.C. (同上) を行い VII (1.84 g) を得た.

70% MeOH 溶出部 Fr. 24~29 (8.82 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=2.2$  cm,  $l=43$  cm, 50% MeOH, ついで 70% MeOH, 最後に MeOH 溶出) に付し, 4 分画した. 70% MeOH 溶出部画分 2 (1.14 g) について再度 LH-20 C.C. ( $\phi=2.2$  cm,  $l=16$  cm) を行い 3 分画した. この画分 2 (450 mg) について Toyopearl HW-40 (F) C.C. ( $\phi=2.2$  cm,  $l=14$  cm, 50% MeOH 溶出) を行い, 3 分画し画分 2 (200 mg) について分取 HPLC (S 343, 1% ギ酸-CH<sub>3</sub>CN 3:2, 13.5 ml/min) を行い, 保持時間 9.2 分の

XVIII (80 mg) を得た.

MeOH 溶出部 (11.84 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=4$  cm,  $l=43$  cm, 70% MeOH 溶出) に付し, 5 分画した. 画分 1 (3.55 g) を LH-20 C.C. ( $\phi=2.2$  cm,  $l=30$  cm, 水-MeOH) で精製した画分 (450 mg) を分取 HPLC ( $\mu$ -Bondasphere  $\phi=19$  cm,  $l=15$  cm, 条件 1) に付し, 保持時間 34 分の X (70 mg) を得た. 画分 2 (2.46 g) を Sephadex LH-20 C.C. ( $\phi=2.6$  cm,  $l=19$  cm, 30~50% MeOH) に付し, 4 分画した. fr. 2 (166 mg) について分取 HPLC (D-ODS-5, 条件 1) を行い保持時間 23.4 分の V (42 mg) を得た. fr. 4 (1.71 g) を LH-20 C.C. ( $\phi=2.6$  cm,  $l=19.5$  cm, 70% MeOH) 処理した画分 (293 mg) について, 同上条件で分取 HPLC を行い保持時間 24.6 分の VI (67 mg) を得た.

### 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性の測定

(1) 酵素 (3 $\alpha$ -HSD) 液の調製: SD 系雄性ラット (日本 SLC, 体重 180~200 g) の肝臓を摘出し, 3 倍量の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0, 250 mM ショ糖, 1 mM ジチオスレイトールおよび 1 mM EDTA を添加, 以下 PBS という) を加えてホモジナイズ後, 10,000 $\times g$ , 4 $^{\circ}$ C の条件下, 30 分間遠心分離し上清を取り, さらに 100,000 $\times g$ , 4 $^{\circ}$ C の条件下で 60 分間遠心しその上清を取りサイトゾル分画を得た. これを, PBS で 2.5 倍に希釈して検定用酵素液とした.

(2) 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性の測定: 3 $\alpha$ -HSD 阻害活性は Penning<sup>5)</sup>の変法<sup>6)</sup>に従って測定した. 検体を 2.0 ml の PBS に溶解し, 検定用酵素液 0.2 ml を加え 10 分間プレインキュベートし, 9 mM NADPH 溶液 0.2 ml を加え, さらに 10 分間インキュベートした. 25 mM 4-ニトロアセトフェノン<sup>11)</sup>のアセトニトリル溶液 0.1 ml を加え 30 秒後と 10 分後に 340 nm での吸光度を測定し, 吸光度の減少を測定した. 被検薬の酵素阻害率は, 吸光度の減少値 ( $S_1$ ), 基質が存在していないときの吸光度の減少値 ( $S_2$ ), 検体を加えないときの吸光度の減少値 ( $C_1$ ), 検体と基質を加えないときの吸光度の減少値 ( $C_2$ ) を求め, 下式に従って算出した.

$$\text{酵素阻害率 (\%)} = (1 - (S_1 - S_2) / (C_1 - C_2)) \times 100$$

結果を TABLE I に示す.

**Ladanein (I)** 黄色結晶 (水-MeOH), SIMS  $m/z$ : 315 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Anal. calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>·1/5H<sub>2</sub>O: C, 64.23%; H, 4.57%, found: C, 64.13%; H, 4.60%. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 285.3 (4.31), 331.7 (4.38), UV shifts (ratio to highest peak): 285.5 (0.87), 330.1 (1.00), +AlCl<sub>3</sub>: 263.9 (0.21), 291 i (0.72), 303.1 (0.85), 361.9 (1.00), +AlCl<sub>3</sub>+HCl: 264 sh (0.24), 293 i (0.80), 302.5 (0.88), 358.7 (1.00). IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3395, 1668, 1608, 1584. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3.86 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.95 (3H, s,

TABLE I. Inhibitory Effects of Flavonoids and Phenylpropanoids from *Schizonepeta* Spike on 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase

| Compounds                                       | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| Hesperidin (IV)                                 | >200                           |
| Hesperetin (V)                                  | 6.5                            |
| Apigenin (VI)                                   | 17.1                           |
| Luteolin (VII)                                  | 5.4                            |
| Ladanein (I)                                    | >200                           |
| Caffeic acid (VIII)                             | 139.8                          |
| Cinnamic acid (II)                              | 152.3                          |
| <i>p</i> -Coumaric acid (III)                   | 73.3                           |
| Rosmarinic acid (IX)                            | 48.0                           |
| 2,3-Di- <i>O</i> -cinnamoyl-D-tartaric acid (X) | 127.5                          |
| Schizotenuin D (XVI)                            | 33.7                           |
| Schizotenuin C1 (XIV)                           | 8.1                            |
| Schizotenuin C2 (XV)                            | 26.9                           |
| Schizotenuin A (XI)                             | 10.2                           |
| Schizotenuin B1 (XII)                           | 2.4                            |
| Schizotenuin B2 (XIII)                          | 8.5                            |
| Schizotenuin E (XVII)                           | 20.3                           |
| Schizotenuin F (XVIII)                          | 29.8                           |
| Aspirin                                         | 1150.0                         |

CH<sub>3</sub>), 6.82 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, s, H-8), 7.07 (2H, d,  $J=8.9$  Hz, H-3' and 5'), 7.99 (2H, d,  $J=8.9$  Hz, H-2' and 6'). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  55.41, 56.16 (–OMe $\times 2$ ), 91.02 (C-8), 103.01 (C-3), 105.05 (C-10), 114.38 (C-3' and 5'), 122.89 (C-1'), 128.01 (C-2' and 6'), 146.17 (C-5), 149.59 (C-6 and 9), 154.30 (C-7), 162.14 (C-4'), 163.17 (C-2), 182.09 (C-4).

以上のデータより I は ladanein<sup>10)</sup> と同定した。

**Cinnamic acid (II)** 無色粉末, EI-MS  $m/z$ : 148 (M<sup>+</sup>). II は cinnamic acid (和光純薬) との UV, IR, MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HPLC の保持時間 ( $t_R$ ), TLC の  $R_f$  値の比較により同定した。

***p*-Coumaric acid (III)** 無色粉末, III は *p*-coumaric acid (ナカライテスク) との <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HPLC の  $t_R$ , TLC の  $R_f$  値の比較により同定した。

**Hesperidin (IV)** 無色結晶 (水–MeOH), mp 257°C (decomp.),  $[\alpha]_D^{20} -64.0^\circ$  ( $c=0.13$ , pyridine). IV は, hesperidin<sup>7)</sup> との mp,  $[\alpha]_D$ , IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR の比較により同定した。

**Hesperetin (V)** 黄色粉末,  $[\alpha]_D^{20} -36^\circ$  ( $c=0.5$ , pyridine), SIMS  $m/z$ : 341 (M+K)<sup>+</sup>. V は hesperetin<sup>8)</sup> の  $[\alpha]_D$ , SIMS, IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR の文献値との比較により同定した。

**Apigenin (VI)** 黄色粉末, SIMS  $m/z$ : 271 (M+H)<sup>+</sup>, 309 (M+K)<sup>+</sup>. VI は apigenin<sup>7)</sup> との SIMS, UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR の比較により同定した。

**Luteolin (VII)** 黄色粉末, VII は luteolin<sup>8)</sup> との UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR の比較により同定した。

**Caffeic acid (VIII)** 無色粉末, caffeic acid (半井化

学薬品) との UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR の比較により同定した。

**Rosmarinic acid (IX)** 無色粉末,  $[\alpha]_D^{20} +113^\circ$  ( $c=0.52$ , EtOH). IX は rosmarinic acid<sup>9)</sup> との  $[\alpha]_D$ , UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR の比較により同定した。

**2,3-Di-*O*-cinnamoyl-D-tartaric acid (X)** 無色粉末,  $[\alpha]_D^{20} -158^\circ$  ( $c=0.51$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 411 (M+1)<sup>+</sup>, 433 (M+Na)<sup>+</sup>, 449 (M+K)<sup>+</sup>. *Anal.* calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>·4/3H<sub>2</sub>O: C, 60.83%; H, 4.80%, found: C, 60.84%; H, 4.86%. UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 275.7 (4.66). IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>–1</sup>: 3458, 1726, 1636. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  5.76 (2H, s, H-2 and 3), 6.76 (2H, d,  $J=16.0$  Hz, H-8' $\times 2$ ), 7.46 (6H, br. s, H-3' $\times 2$ , 4' $\times 2$ , 5' $\times 2$ ), 7.75 (2H, d,  $J=16.0$  Hz, H-7' $\times 2$ ), 7.78 (4H, br. s, H-2' $\times 2$  and 6' $\times 2$ ). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  71.04 (C-2 and 3), 116.74 (C-8' $\times 2$ ), 128.54 (C-2' $\times 2$  and 6' $\times 2$ ), 128.90 (C-3' $\times 2$  and 5' $\times 2$ ), 130.76 (C-4' $\times 2$ ), 133.65 (C-1' $\times 2$ ), 146.13 (C-7' $\times 2$ ), 165.16 (C-9' $\times 2$ ), 167.40 (C-1 and 4). 以上のデータより, X は 2,3-di-*O*-cinnamoyl-D-tartaric acid と同定した。

**Schizotenuin A (XI)** 無色結晶 (水), mp 156–157°C,  $[\alpha]_D^{20} +63.2^\circ$  ( $c=0.59$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 739 (M+Na)<sup>+</sup>, 717 (M+H)<sup>+</sup>, 519, 322, 321, 197. *Anal.* calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>·2H<sub>2</sub>O: C, 57.45%; H, 4.29%, found: C, 57.48%; H, 4.15%. IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>–1</sup>: 3407, 1699, 1616. UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 203 (4.94), 230 sh (4.55), 292 (4.50), 318 (4.56). <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す。

**Schizotenuin B1 (XII)** 無色結晶 (水), mp 194–196°C,  $[\alpha]_D^{20} +61^\circ$  ( $c=0.51$ , pyridine). SIMS  $m/z$ : 769 (M+K)<sup>+</sup>, 753 (M+Na)<sup>+</sup>, 731 (M+H)<sup>+</sup>. *Anal.* calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>·4H<sub>2</sub>O: C, 55.36%; H, 4.77%, found: C, 55.56%; H, 4.58%. IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>–1</sup>: 3443, 1701, 1626. UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 203.5 (4.89), 220 sh (4.59), 230 sh (4.56), 292 (4.53), 317 (4.59). <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す。

**Schizotenuin B2 (XIII)** 無色粉末,  $[\alpha]_D^{20} +57^\circ$  ( $c=0.51$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 769 (M+K)<sup>+</sup>, 731 (M+H)<sup>+</sup>. *Anal.* calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>·4.5 H<sub>2</sub>O: C, 54.75%; H, 4.84%, found: C, 54.91%; H, 4.65%. IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>–1</sup>: 3458, 1692, 1626. UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 203.5 (4.89), 220 sh (4.49), 292 sh (4.44), 320 (4.54). <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す。

**Schizotenuin C1 (XIV)** 無色結晶 (水), mp 160–162°C,  $[\alpha]_D^{20} +55.4^\circ$  ( $c=0.52$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 559 (M+Na)<sup>+</sup>, 537 (M+H)<sup>+</sup>, 339, 322, 197, 185. *Anal.* calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 58.49%; H, 4.00%, found: C, 58.15%; H, 4.14%. IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>–1</sup>: 3422, 1702,

TABLE II. <sup>1</sup>H-NMR Data for Compounds XI-XVI

| Proton            | XVI                | XIV                 | XV                  | XI                 | XII                | XIII          |
|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| H-2               | 7.53 d (1.8)       | 7.54 d (2.1)        | 7.53 br. s          | 7.53 d (2.2)       | 7.41 s             | 7.54 br. s    |
| 5                 | 6.88 d (8.3)       | 6.89 d (8.4)        | 6.89 d (8.2)        | 6.89 d (8.4)       | 6.89 d (8.3)       | 6.89 d (8.2)  |
| 6                 | 7.46 dd (1.8, 8.3) | 7.44 dd (2.1, 8.4)  | 7.46 d (8.2)        | 7.43 dd (2.2, 8.4) | 7.42 d (8.3)       | 7.43 d (8.2)  |
| 7                 | 7.63 d (15.9)      | 7.65 d (15.9)       | 7.71 d (15.9)       | 7.71 d (15.9)      | 7.61 d (15.9)      | 7.73 d (16.4) |
| 8                 | 6.34 d (15.9)      | 6.37 d (15.9)       | 6.41 d (15.9)       | 6.42 d (15.9)      | 6.25 d (15.9)      | 6.46 d (16.4) |
| H-2'              |                    | 6.69 d (1.7)        | 6.72 br. s          | 6.67 d (2.1)       | 6.61 br. s         | 6.68 s        |
|                   |                    |                     |                     | 6.73 d (1.9)       | 6.70 br. s         | 6.72 s        |
| 5'                |                    | 6.64 d (8.0)        | 6.67 d (8.0)        | 6.63 d (8.0)       | 6.64 d (8.3)       | 6.63 d (7.9)  |
|                   |                    |                     |                     | 6.67 d (7.9)       | 6.68 d (7.9)       | 6.70 m        |
| 6'                |                    | 6.52 dd (1.7, 8.0)  | 6.58 d (8.0)        | 6.50 dd (2.1, 8.0) | 6.47 d (8.3)       | 6.52-6.56 m   |
|                   |                    |                     |                     | 6.58 dd (1.9, 8.1) | 6.54 d (7.9)       | 6.52-6.56 m   |
| 7'                |                    | 3.07 dd (9.1, 14.4) | 2.96 dd (8.5, 14.5) | 2.94-3.11 m        | 2.89-3.13 m        | 3.02-3.20 m   |
|                   |                    | 3.18 m              | 3.04 dd (4.2, 14.5) |                    |                    |               |
| 8'                |                    | 5.31 dd (4.2, 9.1)  | 5.09 dd (4.2, 8.5)  | 5.12 dd (4.6, 8.1) | 5.06 dd (3.4, 8.8) | 5.19 m        |
|                   |                    |                     |                     | 5.31 dd (4.6, 8.6) | 5.48 dd (3.4, 9.2) | 5.31 m        |
| CH <sub>3</sub> - |                    |                     |                     |                    | 3.73 s             | 3.68 s        |
| H-2''             | 7.09 br. s         | 7.13 br. s          | 7.14 br. s          | 7.16 br. s         | 7.11 br. s         | 7.18 br. s    |
| 6''               | 7.64 br. s         | 7.62 br. s          | 7.68 br. s          | 7.63 br. s         | 7.52 br. s         | 7.71 br. s    |

The numbers in parentheses are *J* values in Hz.

TABLE III. <sup>13</sup>C-NMR Data for Compounds XI-XVI

| Carbon            | XVI   | XIV    | XV    | XI     |        | XII    |       | XIII   |        |
|-------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
| C-1               | 119.9 | 119.7  | 119.9 | 119.5  |        | 119.2  |       | 119.4  |        |
| 2                 | 116.5 | 116.7  | 116.6 | 116.58 |        | 116.5  |       | 116.3  |        |
| 3                 | 144.8 | 145.1  | 144.8 | 145.1  |        | 144.9  |       | 145.00 |        |
| 4                 | 148.0 | 148.6  | 148.1 | 148.6  |        | 148.5  |       | 148.4  |        |
| 5                 | 115.3 | 115.60 | 115.3 | 115.48 |        | 115.29 |       | 115.3  |        |
| 6                 | 121.4 | 122.0  | 121.5 | 121.9  |        | 121.5  |       | 121.7  |        |
| 7                 | 144.7 | 144.8  | 146.1 | 146.1  |        | 145.1  |       | 146.4  |        |
| 8                 | 117.9 | 118.4  | 116.1 | 116.4  |        | 116.3  |       | 116.0  |        |
| 9                 | 167.4 | 167.9  | 165.5 | 165.7  |        | 165.6  |       | 165.5  |        |
| C-1'              |       | 127.8  | 127.4 | 127.3  | 127.5  | 126.0  | 128.4 | 126.5  | 127.6  |
| 2'                |       | 116.3  | 116.7 | 116.2  | 116.6  | 116.2  | 117.0 | 115.8  | 116.7  |
| 3'                |       | 145.3  | 145.0 | 145.04 | 145.20 | 144.8  | 144.9 | 144.9  | 145.03 |
| 4'                |       | 144.2  | 144.0 | 144.15 | 144.17 | 143.7  | 144.4 | 143.9  | 144.2  |
| 5'                |       | 115.64 | 115.4 | 115.52 | 115.6  | 115.33 | 115.5 | 115.3  | 115.4  |
| 6'                |       | 120.4  | 120.1 | 120.29 | 120.34 | 119.9  | 120.0 | 120.0  | 120.1  |
| 7'                |       | 36.3   | 36.1  | 36.1   | 36.3   | 35.9   | 36.7  | 36.2   | 36.2   |
| 8'                |       | 74.3   | 73.2  | 73.4   | 73.8   | 73.1   | 74.6  | 73.0   | 74.2   |
| 9'                |       | 171.3  | 170.8 | 170.9  | 170.9  | 169.8  | 171.8 | 169.8  | 171.1  |
| C-1''             | 131.0 | 131.5  | 130.7 | 131.1  |        | 131.1  |       | 130.7  |        |
| 2''               | 110.0 | 110.2  | 110.0 | 110.2  |        | 110.4  |       | 110.1  |        |
| 3''               | 142.5 | 142.9  | 142.6 | 142.8  |        | 142.6  |       | 142.6  |        |
| 4''               | 143.0 | 143.2  | 143.3 | 143.4  |        | 143.0  |       | 143.3  |        |
| 5''               | 129.5 | 129.1  | 129.7 | 129.0  |        | 128.5  |       | 128.9  |        |
| 6''               | 113.6 | 114.1  | 114.1 | 114.4  |        | 113.5  |       | 114.5  |        |
| 7''               | 160.5 | 161.9  | 160.6 | 162.0  |        | 161.8  |       | 161.4  |        |
| 8''               | 107.7 | 106.6  | 107.9 | 106.4  |        | 106.0  |       | 106.5  |        |
| 9''               | 164.7 | 163.0  | 164.7 | 162.8  |        | 162.6  |       | 162.7  |        |
| CH <sub>3</sub> - |       |        |       |        |        | 52.1   |       | 52.0   |        |

1619. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 203 (4.70), 218 sh (4.37), 240 sh (2.31), 290 sh (4.37), 316 (4.41). <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す.

**Schizotenuin C2 (XV)** 無色粉末,  $[\alpha]_D^{20} +47^\circ$  (*c* = 0.5, MeOH). SIMS *m/z*: 559 (M+Na)<sup>+</sup>, 537 (M+H)<sup>+</sup>, 356, 339, 321. *Anal.* calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>·5/2H<sub>2</sub>O: C, 55.77%; H, 4.33%, found: C, 55.74%; H, 4.12%.

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3400, 1685, 1619. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 220 sh (4.45), 290 sh (4.51), 315.3 (4.58). <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す.

**Schizotenuin D (XVI)** 無色粉末, SIMS *m/z*: 357 (M+H)<sup>+</sup>, 339 (M-OH)<sup>+</sup>, 321. *Anal.* calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>·5/7 H<sub>2</sub>O: C, 58.56%; H, 3.67%, found: C, 58.61%; H, 3.96%. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3423, 3182, 1718,

TABLE IV.  $^1\text{H}$ -NMR Data for Compounds XVII and XVIII

| Proton          | XVII                 | XVIII               |
|-----------------|----------------------|---------------------|
| H-2             | 7.20 d (1.7)*        | 7.20-7.24 m         |
| 5               | 6.68 d (8.3)         | 6.68 d (8.2)        |
| 6               | 7.04 dd (1.7, 8.3)** | 7.03-7.09 m         |
| 7               | 7.51 d (15.9)        | 7.50 d (16.0)       |
| 8               | 6.37 d (15.9)        | 6.36 d (16.0)       |
| H-2'            | 6.70 s               | 6.69 br. s          |
| 5'              | 6.65 d (8.3)         | 6.65 d (8.2)        |
| 6'              | 6.54 dd (1.7, 8.3)   | 6.54 d (8.2)        |
| 7'              | 2.92 dd (8.3, 14.4)  | 2.91 dd (8.5, 14.2) |
|                 | 3.02 dd (4.4, 14.4)  | 3.01 dd (4.0, 14.2) |
| 8'              | 5.06 dd (4.4, 8.3)   | 5.04 dd (4.0, 8.5)  |
| H-2''           | 7.22 d (1.7)*        | 7.20-7.24 m         |
| 5''             | 6.73 d (8.3)         | 6.74 d (8.2)        |
| 6''             | 7.07 dd (1.7, 8.3)** | 7.03-7.09 m         |
| 7''             | 7.24 s               | 7.28 s              |
| $\text{CH}_3$ - |                      | 3.69 s (3H)         |

\*\*\* Assignments may be interchanged.

The numbers in parentheses are  $J$  values in Hz.

1679, 1618. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 201.3 (4.41), 220 sh (4.28), 240.9 (4.26), 290 sh (4.48), 312.5 (4.49).  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR のデータを TABLE II および TABLE III に示す.

**Schizotenuin E (XVII)** 淡黄色粉末,  $[\alpha]_D^{20} +44^\circ$  ( $c=0.5$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 539 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ . Anal. calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : C, 56.45%; H, 4.56%, found: C, 56.72%; H, 4.27%. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3409, 1703, 1609. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 287.9 (4.27), 332.1 (4.24).  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR のデータを TABLE IV および TABLE V に示す.

**Schizotenuin F (XVIII)** 淡褐色結晶 (水), mp 120~122°C,  $[\alpha]_D^{20} +46.9^\circ$  ( $c=0.55$ , MeOH). SIMS  $m/z$ : 575 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ , 553 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ . Anal. calcd. for  $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : C, 57.13%; H, 4.48%, found: C, 57.14%; H, 4.80%. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3413, 1701, 1633, 1609. UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 202 (4.72), 214 sh (4.47), 230 sh (4.34), 290 (4.40), 332 (4.47).  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR のデータを TABLE IV および TABLE V に示す.

**謝 辞**: Rosmarinic acid の標品を御恵与下さいました岡山大学名誉教授 奥田拓男博士, 同大学薬学部生薬学教室 波多野力助教授, 矢崎一史助手 (現: 京都大学薬学部生薬学教室助手) に深謝致します.

TABLE V.  $^{13}\text{C}$ -NMR Data for Compounds XVII and XVIII

| Carbon          | XVII   | XVIII |
|-----------------|--------|-------|
| C-1             | 128.5  | 128.8 |
| 2               | 115.9  | 115.9 |
| 3               | 147.04 | 147.0 |
| 4               | 146.99 | 146.7 |
| 5               | 114.3  | 114.2 |
| 6               | 120.6  | 120.6 |
| 7               | 145.0  | 145.0 |
| 8               | 115.5  | 115.6 |
| 9               | 165.7  | 165.8 |
| C-1'            | 126.9  | 127.6 |
| 2'              | 116.7  | 116.8 |
| 3'              | 145.2  | 145.0 |
| 4'              | 144.0  | 144.0 |
| 5'              | 115.3  | 115.5 |
| 6'              | 120.1  | 120.1 |
| 7'              | 36.1   | 36.3  |
| 8'              | 73.0   | 73.3  |
| 9'              | 170.8  | 171.0 |
| C-1''           | 123.1  | 123.4 |
| 2''             | 117.3  | 117.5 |
| 3''             | 145.3  | 145.3 |
| 4''             | 147.6  | 148.0 |
| 5''             | 115.7  | 115.7 |
| 6''             | 123.8  | 123.5 |
| 7''             | 127.3  | 127.8 |
| 8''             | 137.6  | 136.5 |
| 9''             | 164.3  | 163.4 |
| $\text{CH}_3$ - |        | 52.2  |

## 引用文献

- 1) 日本公定書協会編, “第十二改正日本薬局方解説書”, 廣川書店, 東京, 1991, p. D-264.
- 2) 北川 勳, 三川 潮, 庄司順三, 滝戸道夫, 友田正司, 西岡五夫, “生薬学”, 第2版, 廣川書店, 東京, 1982, p. 141.
- 3) 藤田眞一, 森下徳衛, 薬誌, **100**, 959 (1987); Y. Oshima, S. Takata, H. Hikino, *Planta Med.*, **55**, 179 (1989).
- 4) 山原條二, 松田久司, 渡辺温子, 沢田徳之助, 藤村 一, 薬誌, **100**, 713 (1980).
- 5) T. M. Penning, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 651 (1985).
- 6) 人見康子, 松村美幸, 蟹田理英, 齋藤雄二, 弓岡栄三郎, 日本生薬学会第34回年会 (大阪) 講演要旨集, p. 16 (1987).
- 7) K. R. Markham, *Tetrahedron*, **32**, 2607 (1976).
- 8) H. Wagner, V. M. Chari, J. Sonnenbichler, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 1799 (1976).
- 9) H. Fukui, K. Yazaki, M. Tabata, *Phytochemistry*, **23**, 2398 (1984).
- 10) B. Voirin, *Phytochemistry*, **22**, 2107 (1983).
- 11) T. M. Penning, I. Mukharji, S. Barrows, P. Talalay, *Biochem. J.*, **222**, 601 (1984).