

コマクサ培養組織のアルカロイド成分について

小西天二^{a,*}, 小西一豪^b, 竹村照美^a,
松田明姫^a, 木島孝夫^a, 清澤 脩^a

^a 京都薬科大学 ^b 京都大学薬学部

Alkaloids from Tissue Culture of *Dicentra peregrina*

Tenji Konishi,^{a,*} Kazuhide Konishi,^b Terumi Takemura,^a
Meiki Matuda,^a Takao Konoshima,^a Shiu Kiyosawa^a

^a Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan

^b Faculty of Pharmaceutical Botany, Kyoto University, Yoshida, Sakyou-ku, Kyoto 650, Japan

(Received June 13, 1997)

Callus, adventitious embryos and regenerated plants were derived by tissue culture of the leaves of *Dicentra peregrina* with MS medium. The alkaloids at each stage of cultivation were analyzed by using high performance liquid chromatography (HPLC). The amounts of seven alkaloids in the cultured organs were the same as in the original plant, and the total alkaloid contents in both of the dry samples were about 4%, though the alkaloid components of the callus were different from those of the adventitious embryos, regenerated and original plants, and the total alkaloid contents in the callus was also less than 1%. The ratio of the protopine content to the dicentrine content was 2 : 1 in the adventitious embryos, and 1 : 2 in the regenerated plants. By HPLC, three new alkaloids were detected in the cultured organs, which were elucidated as (-)-*trans*-*N*-methylisocorypalmine, *N*-methyldicentrine and 7-hydroxy-nordicentrine.

Keywords: *Dicentra peregrina*; Fumariaceae; tissue culture; callus; protopine; dicentrine; (-)-*trans*-*N*-methylisocorypalmine; *N*-methyldicentrine; 7-hydroxynordicentrine

コマクサ (*Dicentra peregrina* (RUDOLPH) MAKINO)は本邦では北海道、本州北中部高山に産する多年生草本で夏期に美しい花を咲かせる。全草にアルカロイド成分を含有し、麻酔作用があるため、以前より民間で鎮痛薬り民間で鎮痛薬として使用していた¹⁾。しかし、現在は特別保護植物に指定されたため利用していない。アルカロイド成分として allocryptopine, protopine, bicuculline, lederine, reticuline, isocorydine, corydine, dicentrine, isoboldine, predicentrine, chelerythrine, dihydrosanguinarine, sanguinarine が知られている^{1,2)}。古谷らはコマクサの組織培養を行いカルスを作成し、そのアルカ

ロイド組成を TLC を用いて検討し、protopine が多量含有することを報告している³⁾。しかし、不定胚、再分化植物などの各培養段階におけるアルカロイド成分については検討していない。著者らはコマクサの培養カルス、不定胚及び再分化植物の葉におけるそれぞれのアルカロイド組成を HPLC を用いて定量し、更にコマクサ苗と比較検討した。また新規アルカロイド 3 種を単離し、構造解析を行った。

材料及び方法

1. 実験材料

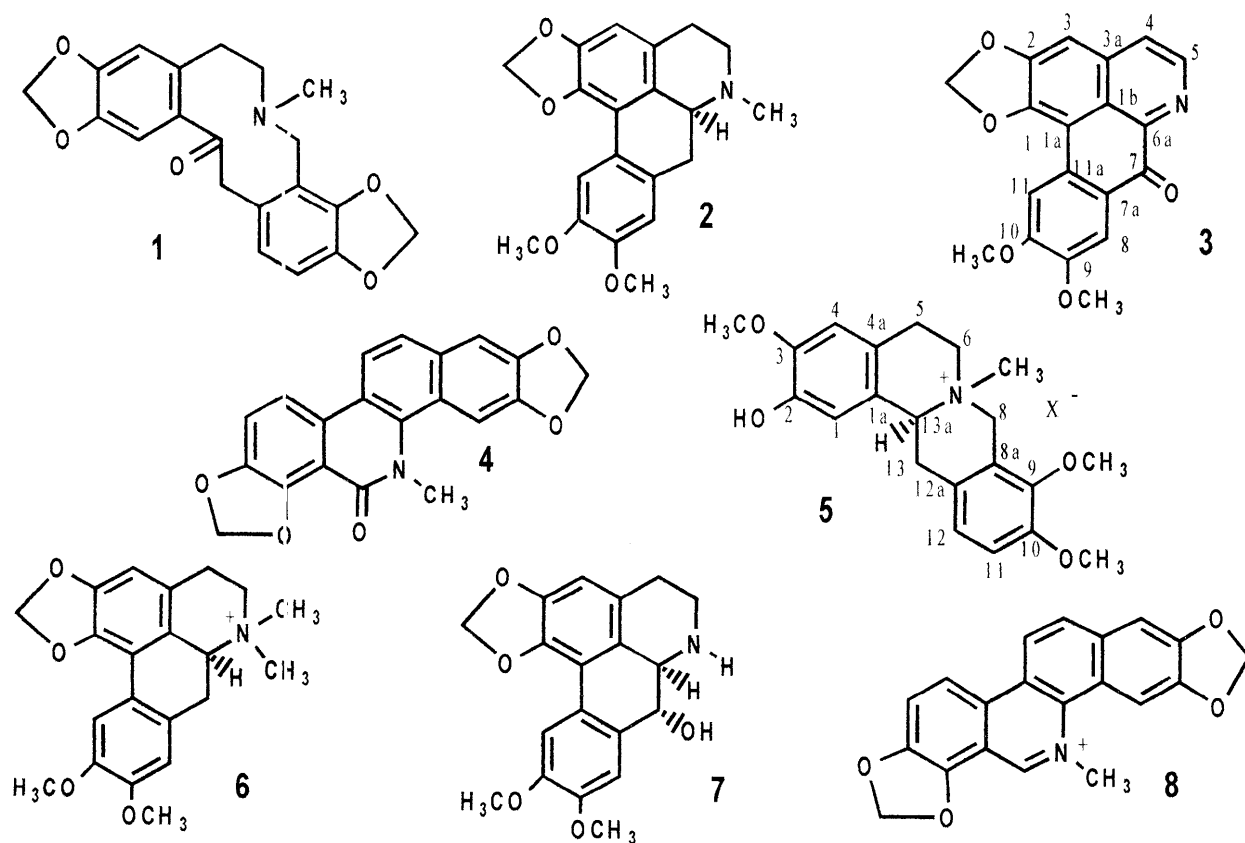


Fig. 1. Structure of Alkaloids

1) 培養材料 1994年3月京都タキイ種苗株式会社より購入したコマクサ苗を室内(平均気温20℃)で2か月育成させ、5 cm程度展開した葉を培養材料とした。また、しよ糖、寒天などの各試薬はナカライテスク社製を用いた。

2) カルス誘導 試料を0.1% Tween20を添加した1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液中10分間殺菌後滅菌水で洗浄して、1 cm四方に切断後、Murashige-Skoog (MS) 固形培地に置床しカルス誘導を行った。その誘導と増殖は、ナフトレン酢酸(NAA) 1.0 mg/lとカイネチン 0.1 mg/lを添加したMS固形培地(しよ糖 30 g/l, 寒天 0.8 g/l, pH = 5.75)を用いたときが良好であった。培養は24 ± 1℃の暗所で行い、5週間ごとに継代した。

3) 不定胚形成 カルスをNAA 0.01 mg/l-カイネチン 0.1 mg/l 添加MS固形培地に置床する事によりすべてのカルスにおいて不定胚形成が認められた。

4) 再生植物体の形成 不定胚を植物ホルモン無添加MS固形培地に置床し、明所(16時間照明, 3000 lux)で培養を行った。発根はIBM 0.5 mg/l 添加MS培地において促進された。

2. 抽出、分離

培養により得たカルス、不定胚および再分化植物体を用いてアルカロイド成分の単離を行った。カルス(生重量: 479.93 g, 乾燥重量: 40.69 g)、不定胚(生重量: 318.51 g, 乾燥重量: 34.50 g)及び再分化植物体の葉(生重量: 588.87 g, 乾燥重量: 22.54 g)はメタノールで冷浸し、それぞれメタノールエキスを作成した。得られたメタノールエキスは減圧濃縮後乾固し、残渣は2.5%酒石酸で酸性とし、エーテル抽出して脂溶性物質を除去した。水相は2.5% K₂CO₃を用いてアルカリ性とし3級アルカロイドをエーテル抽出した。弱アルカリ性の水相は塩酸酸性とし、0.5M NaClO₃を添加

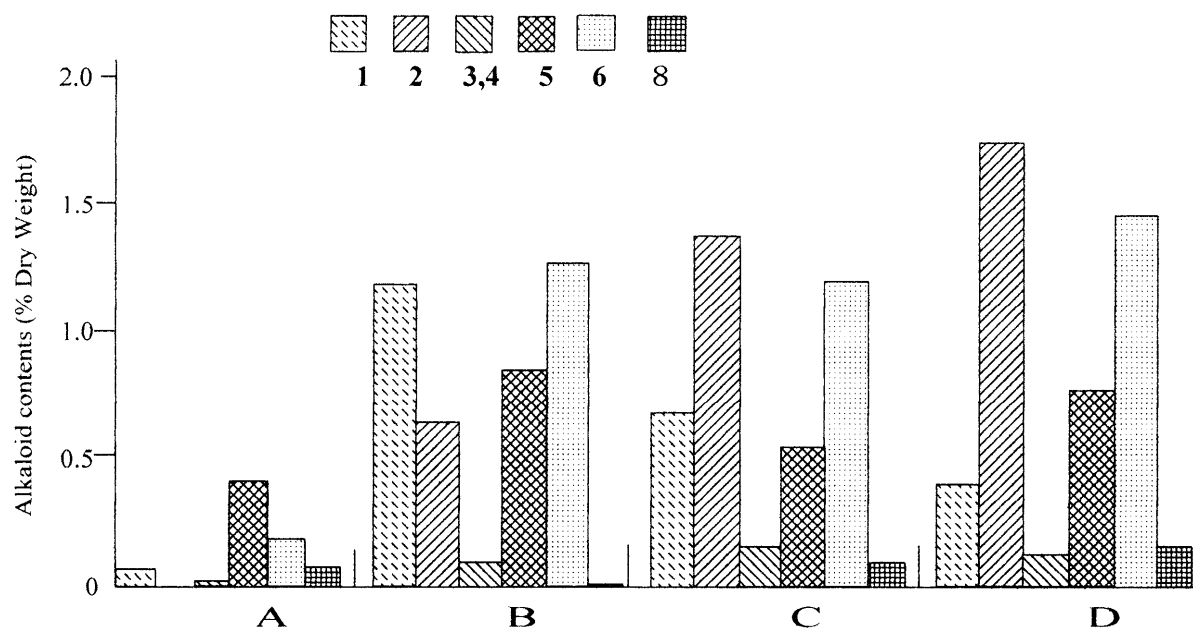


Fig. 2. Contents of Alkaloids on Tissue Culture Induced from *D. peregrina*

A : Callus, B : Adventitious Embryo, C : The Leaves of Regenerated Plant, D : The Leaves of *D. peregrina*

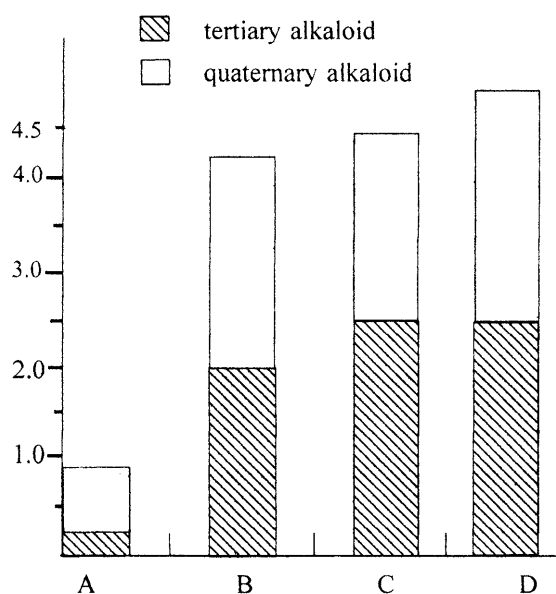


Fig. 3. Total Alkaloids on Tissue Culture Induced from *D. peregrina* (% Dry Weight)

A: Callus, B: Adventitious Embryo, C: The Leaves of Regenerated Plant, D: The Leaves of *D. peregrina*

後、クロロホルムで抽出し、4級アルカロイド分画を得た⁵⁾。各分画はシリカゲル（ナカライテスク社）カラム[CHCl₃-MeOH-NH₄OH系(9:2.5:0.5)または(8:2:0.1)]、および[CHCl₃-MeOH-H₂O系(8:2:0.2)または(9:1:0.1)]あるいはプレパラティブ TLC[CHCl₃-MeOH-NH₄OH系(8:3:1)]

により精製し8種のアルカロイドを単離した。各組織からの収量はカルスからは1:3.5 mg, 3:1.3 mg, 4:1.5 mg, 5:7.3 mg, 6:9.8 mg, 8:1.1 mg, 不定胚からは1:100.3 mg, 2:30.4 mg, 3:3.7 mg, 4:2.4 mg, 5:45.9 mg, 6:84.1 mg, また再生植物の葉からは1:94.7 mg, 2:41.2 mg, 3:2.8 mg, 4:3.1 mg, 5:47.3 mg, 6:20.6 mg, 7:2.0 mg, 8:1.2 mgであった。

Protopine (1): pale yellow needles, mp 212 ~ 213 °C, UV λ nm (log ε): 210 (4.54), 240 (sh, 4.07), 290(3.99). FAB-MS *m/z*: 354 (M+H)⁺. 文献値⁶⁾との比較により同定した。

Dicentrine (2): pale brown needles, mp 173 ~ 173.5 °C, UV λ nm (log ε): 220 (4.31), 230 (sh, 4.23), 272 (3.89), 281 (3.98), 304 (4.01), 314 (sh, 3.98). EI-MS. *m/z*: 339 (M⁺). 文献値^{7,8)}との比較により同定した。

Dicentrinone (3): yellow needles, mp 298 ~ 300 °C, UV λ nm (log ε): 209 (4.10), 247 (3.97), 270 (3.52), 317 (3.52), 346 (3.42), 385 (3.30), 430 (3.00). EI-MS *m/z*: 335 (M⁺). 文献値⁸⁾との比較により同定した。

Oxosanguinarine (4): pale gray needles, mp. 360 ~ 364 °C, UV λ nm (log ε): 210 (3.87), 240 (4.09),

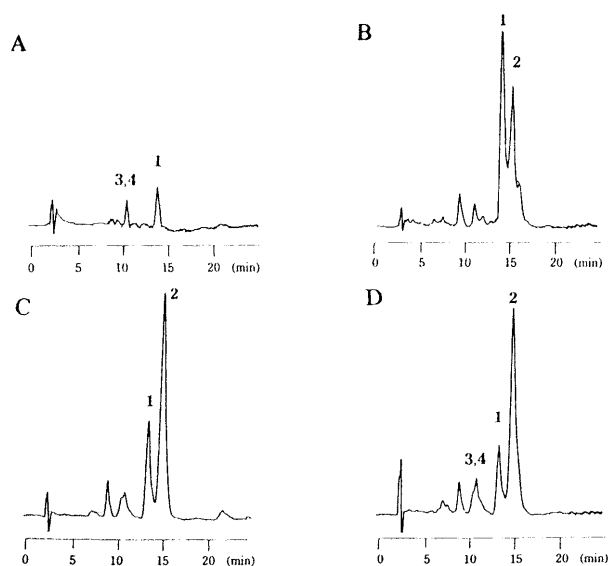


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Tertiary Alkaloids
A : Callus, B : Adventitious Embryo, C : The Leaves of Regenerated Plants, D : The Leaves of *D. peregrina*

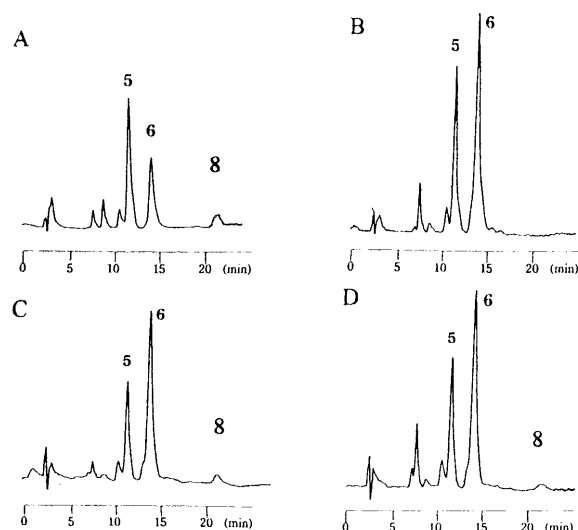


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Quaternary Alkaloids
A : Callus, B : Adventitious Embryo, C : The Leaves of Regenerated Plants, D : The Leaves of *D. peregrina*

289 (4.06), 308 (3.52), 332 (3.59), 346 (3.59), 370 (3.49). EI-MS m/z : 347 (M^+). 文献値⁹⁾との比較により同定した。

(-)-*trans*-*N*-Methylisocorypalmine (5) : colorless needles, mp 272 ~ 273 °C, $[\alpha]_D^{25} - 91.0^\circ$ ($c=0.4$, DMSO). UV λ nm ($\log \epsilon$) : 208.8 (4.69), 231 (4.10), (3.70). HR-FAB-MS (positive) m/z : 356.1853 (M^+). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.80 (3H, s, NCH₃), 2.95 ($J=12.0, 17.5$ Hz, Hax-13), 3.06 (1H, dd, $J=5.0, 12.0$ Hz, 3.24 (1H, ddd, $J=5.5, 12.0, 18.0$ Hz, Hax-5), 3.77 (1H, m, Hax-6), 3.80 (6H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.86 (1H, dd, $J=5.0, 17.5$ Hz, Heq-13), 4.03 (1H, dd, $J=5.5, 12.0$ Hz, Heq-6), 4.68, 4.83 (each 1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8), 4.95 (1H, dd, $J=5.0, 12.0$ Hz, H-13a), 6.84 (1H, s, H-1), 6.87 (1H, s, H-4), 7.12 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-11), 7.15 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-12), 9.15 (1H, s, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 22.6 (C-5), 27.6 (C-13), 38.4 (NCH₃), 55.6 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 60.1 (OCH₃), 60.4, 60.5 (C-8,6), 64.6 (C-13a), 111.8 (C-1), 112.5 (C-4), 113.2 (C-11), 120.5, 120.7 (C-1a, 4a), 121.8 (C-8a), 122.7 (C-12a), 124.5 (C-12), 144.7 (C-3), 145.8 (C-2), 147.8 (C-10), 150.1 (C-9).

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルから *N*-methyl-2,3,9,10-tetrahydroprotoberberine 系アルカロイドであると推定した。B, C 環の配位は (-)-isocorypalmine の *N*-メチル化体 (*cis*, *trans* 混合物)を合成し,その *N*-メチル基のケミカルシフト値¹⁰⁾ (δ 2.80 : *trans*, 3.23 : *cis*)から *trans* 配位であると決定した。また水酸基の位置は NOE 差スペクトルの測定により決定した。すなわち, 1 位プロトンを照射すると 2 位水酸基に 4.7%のシグナル増強が観測された。また, 4 位プロトンと 3 位 OCH₃, 11 位プロトンと 10 位 OCH₃ の間に NOE が観測された。従って, 5 は isocorypalmine¹¹⁾ 骨格を有する *N*-methyl 体であると結論した。

(-)-*N*-Methylisocorypalmine chloride の合成

標品の (-)-isocorypalmine 45 mg CHCl₃-Me₂CO (1 : 1) 10ml に溶解し, CH₃I 0.5 ml を加え, 密閉して室温で 40hr 放置する。反応液は減圧濃縮乾固し, 残渣を MeOH に溶解し AgCl を加え, 3hr 攪拌後濾過する。濾液は減圧下乾固し, (-)-*N*-methylisocorypalmine chloride を *cis* 体と *trans* (5) 体の混合物として 48 mg 得た。混合物のまま NMR スペクトルを

測定. *cis*, *trans* の生成比は ^1H -NMR の積分値から, *cis* : *trans* = 1 : 3 であった. 合成された (-)-*N*-methylisocorypalmine chloride の *trans* 体に相当するシグナルは **5** の NMR スペクトルと完全に一致した. 従って, 化合物 **5** は (-)-*trans*-*N*-methylisocorypalmine chloride であることを証明できた.

trans 体 : ^1H - 及び ^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆) δ : 化合物 **5** と同様. *cis* 体 : ^1H -NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.23 (3H, s, NCH₃), 3.05 (1H, dd, *J*=12.0, 18.0 Hz, Hax-13), 3.16 (1H, dd, *J*=5.0, 12.0 Hz, Heq-5), 3.24 (1H, ddd, *J*=5.5, 12.0, 18.0 Hz, Hax-5), 3.70 (1H, m, Hax-6), 3.80 (6H, s, OCH₃), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.90 (1H, dd, *J*=5.0, 18.0 Hz, Heq-13), 4.09 (1H, m, Heq-6), 4.79 (1H, m, H-13a), 4.84 (2H, q, *J*=16.0 Hz, H-8), 6.87 (1H, s, H-1), 6.90 (1H, s, H-4), 6.99 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-11), 7.09 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-12), 9.33 (1H, s, OH). ^{13}C -NMR (CDCl₃) : δ 22.6 (C-5), 30.6 (C-13), 52.0 (N-CH₃), 55.5 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 60.1 (OCH₃), 60.2, 60.3 (C-6, 8), 63.9 (C-13a), 111.8 (C-1), 112.4 (C-4), 113.2 (C-11), 118.7, 120.2 (C-1a, 4a), 121.2 (C-8a), 122.0 (C-12a), 123.6 (C-12), 144.5 (C-3), 145.4 (C-2), 147.7 (C-10), 150.6 (C-9).

***N*-Methyldicentrine (6)** : colorless needles, mp. 168 ~ 171 °C, UV λ nm (log ϵ) : 210 (4.63), 230 (sh, 4.23), 270 (sh, 3.74), 281 (3.87), 307 (3.93), 348 (2.47). EI-MS *m/z* : 353 (M-H)⁺, FAB-MS *m/z* : 354 (M⁺). HR-FAB-MS (positive) *m/z* : 354.1715 (M⁺). Calcd for C₂₁H₂₄O₄N : 354.1706. ^1H -NMR (CDCl₃) δ : 2.98 (1H, dd, *J*=13.5, 14.0 Hz, Hax-7), 2.99 (1H, dd, *J*=5.0, 18.0 Hz, Heq-4), 3.13 (3H, s, NCH₃), 3.31 (1H, ddd, *J*=5.5, 13.0, 18.0 Hz, Hax-4), 3.44 (1H, dd, *J*=4.0, 13.5 Hz, Heq-7), 3.52 (3H, s, NCH₃), 3.63 (1H, ddd, *J*=5.0, 13.0, 13.0 Hz, Hax-5), 3.89 (3H, s, 9-OCH₃), 3.92 (3H, s, 10-OCH₃), 4.00 (1H, dd, *J*=5.5, 13.0 Hz, Heq-5), 4.46 (1H, dd, *J*=4.0, 14.0 Hz, H-6a), 6.01, 6.18 (each 1H, d, *J*=1.5 Hz, -OCH₂O-), 6.59 (1H, s, H-3), 6.99 (1H, s, H-8), 7.59 (1H, s, H-11). ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 24.1 (C-4), 28.6 (C-7), 43.2 (NCH₃), 54.0 (NCH₃), 56.0 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 62.1 (C-5), 70.0 (C-6a), 101.5 (-OCH₂O-), 106.6 (C-3), 110.2 (C-8), 111.7 (C-11), 117.1 (C-1a), 118.1 (C-3a), 122.3 (C-11a), 121.8 (C-1b), 123.5 (C-7a), 143.4 (C-1), 148.4 (C-2), 148.9 (C-10), 149.1 (C-9). **2** との ^1H -

NMR スペクトル比較において δ 3.52 にあらたな *N*-メチル基に基づくシグナルが観測されること, 及び FAB-MS スペクトルで *m/z* 354 に M⁺イオンピークが見られることより **6** は *N*-methyldicentrine と結論した.

7-Hydroxynordicentrine (7) : pale yellow needles, mp 185 ~ 187 °C, [α]_D²⁵ - 105.1° (*c*=0.15, MeOH). UV λ nm (log ϵ) : 229 (4.16), 268(3.97), 280 (sh, 3.91), 302 (3.81). HR-FAB-MS (positive) *m/z* : 341.1258 (M⁺). Calcd for C₁₉H₁₉O₅N : 341.1262.

^1H -NMR (CDCl₃) δ : 3.00, 3.15 (each, 1H, m, H-4), 3.51 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-6a), 3.77 (3H, s, 9 or 10-OCH₃), 3.80 (2H, m, H-5), 3.82 (3H, s, 10 or 9-OCH₃), 4.67 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-7), 6.04, 6.22 (each 1H, d, *J*=1.0 Hz, -OCH₂O-), 6.78 (1H, s, H-3), 7.07 (1H, s, H-8), 7.61 (1H, s, H-11). ^{13}C -NMR (CDCl₃) δ : 26.3 (C-4), 48.0 (C-5), 55.5 (OCH₃), 55.6 (OCH₃), 62.7 (C-6a), 72.8 (C-7), 98.4 (-OCH₂O-), 106.6 (C-3), 112.0 (C-8), 115.0 (C-11), 116.0 (C-1a), 123.4 (C-11a), 125.9 (C-1b,3a), 129.3 (C-7a), 142.2 (C-1), 147.5 (C-2), 147.7 (C-10), 148.6 (C-9).

^1H -NMR スペクトルから aporphine 系アルカロイドの構造を推定した. **2** との ^{13}C -NMR スペクトル比較から *N*-メチル基の消失した nordicentrine 構造が推定され, 水酸基は ^1H -NMR スペクトルにおいて H-7 が δ 4.67 に 15Hz の doublet として観測されることから, α 配位と推定した. 以上より, **7** は 7-hydroxynordicentrine と結論した.

Sanguinarine (8) : orange needles, mp 263 ~ 265 °C. UV λ nm (log ϵ) : 236 (4.16), 285 (4.47), 328 (3.97), 350 (sh, 3.91), 400 (3.07), 470 (3.11). EI-MS *m/z* : 317 (M-15)⁺. 文献値⁹⁾ との比較により同定した.

3. HPLC によるアルカロイドの定量

1) 標品 : コマクサ培養組織より単離構造決定した化合物 **1** (protopine), **2** (dicentrine), **3** (dicentrinone), **5** (*N*-methylisocorypalmine), **6** (*N*-methyldicentrine) および **8** (sanguinarine) を用いた. それぞれ 1 mg を精密にはかり, メタノール 10 ml に溶解し, 0.45 μ メンブランフィルターで濾過し, この濾液を HPLC 分析の標準溶液とした. **7** (hydroxynordicentrine) は微量のため分析の対象から外した. また, **4** (oxosanguinarine) および **3** は今回の条件で

は同一保持時間を示したため 3 を用いて定量した。

2) 試料溶液の調整：カルス、不定胚、再分化植物およびコマクサ苗各 5 検体を乾燥し実験用試料とした。各乾燥試料約 300 mg にメタノール 30 ml を加え 15 分間超音波抽出した。濾過後の残渣に対しさらに同様な操作を 2 回行い、合計 3 回分の濾液をあわせて減圧乾固しエキスを得た。エキスを計量後、先に述べた方法により 3 級および 4 級アルカロイドに分け、それぞれ重量を測定した。測定後、それぞれメタノールに溶解し正確に 5 ml とした。これを 0.45 μ のメンブランフィルターで濾過し、この濾液を HPLC 用試料とした。

各ピークは標品との保持時間 (*R_t*) の比較および Co-injection 法により同定した。成分の定量は各標品とのピーク面積比による絶対検量線法により行った。

3) HPLC 装置および条件：ポンプ：JASCO 880-PU；検出器：Shimadzu SPD-2A；カラム：CAPCELPAC SG-120, 4.6×150mm；カラム温度：室温；記録計：SHIMADZU C-R6A；検出波長：280 nm；移動相：0.05M 酒石酸-アセトニトリル (55：45) 混合液に 0.5% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を添加¹²⁾。

結果及び考察

各培養段階の各器官における 7 種のアルカロイド含量を Fig. 2, 3 にまとめ、HPLC による分析例を Fig. 4, 5 に示した。

1. アルカロイド含量について

3 級アルカロイド含有率は再分化植物の葉では 2 が 1.41% ともっとも高く、次いで 1 が 0.69% を示した。また 3 級アルカロイド総計は 2.31% であった。不定胚は 1 が 1.22 % と高い含有率を示した。2 は 0.65% で再分化植物と比較して約半分の含有率であった。また不定胚の 3 級アルカロイド総計は 1.97% であった。

カルスにおける 3 級アルカロイド組成は 1 および 3, 4 のみで 2 は検出されなかった。また、含有量は微量で 0.1% 以下の値を示し、再分化植物、不定胚の 25 分の 1 程度であった。

一方、4 級アルカロイドについては、再分化植物の葉および不定胚では 6 の含有率が高く、ついで 5, 8 の順であるが、不定胚では 8 が 0.01% 以下

であった。4 級アルカロイドの総計は 2% 前後で、3 級アルカロイドとそれぞれ対応する値を示した。カルスでは低い含有率であったが、5 は 6 の倍量の 0.44 % を示し、8 は 0.15% であった。

また、再分化植物の葉および不定胚の総アルカロイド含量は両者はほぼ同程度の 4.0% 前後を示した。しかし、カルスでは低く 0.75% を示し、再分化植物の葉の約 6 分の 1 程度の含有率であった。元のコマクサ苗の葉は再分化植物と同様の傾向を示し、3 級アルカロイド組成では 2 が 1.82%、1 が 0.41% の含有率であった。4 級アルカロイドは 6 が 1.45% を示し、5 の約 2 倍の含有率であった。

2. アルカロイド組成比について

再分化植物の葉の 3 級アルカロイド組成比は 2 が 1 の約 2 倍であるのに対して不定胚では 2 分の 1 と逆転している。元のコマクサ苗の葉では 2 が 1 の 4 倍量を占めていた。4 級アルカロイドはカルス以外は 6 が 5 の約 2 倍の組成比であった。また古谷ら³⁾によるとカルスには 1 が多量存在するというが、我々の分析ではカルスには 5, 6 及び 8 の 4 級アルカロイドが約 90% の組成を示した。

結 論

①カルスのアルカロイド生産は極めて低いが、これはアルカロイドの生合成が細胞分裂の過程よりも、組織、器官の代謝過程において活発であることを示唆している。

②不定胚、再分化植物および原料植物の総アルカロイド量はほぼ同一であるが、aporphine 系 (2, 3, 4, 6) と berberine 系 (5) および protopine 系 (1) の生産比が不定胚で同率に近いのに対し、幼植物では aporphine 系が 2 ～ 3 倍となり優位であることも興味ある現象である。

③不定胚における protopine 生産量の増加については、細分化植物及び幼植物において protopine 含量は減少しているが、sanguinarine の生成及び oxo-sanguinarine の含量が増加しており、不定胚では protopine 代謝が遅い結果、高い含量を示したと考えられる¹³⁾。

④今回の研究中に新規アルカロイド 3 種 (5, 6, 7) を単離し、それらの構造をそれぞれ (-)-trans-N-methylisocorypalmine, N-methyldicentrine, 7-hydroxynordicentrine と結論した。

⑤本研究でのカススのアルカロイド組成比が古谷ら³⁾の結果と異なるのは原植物の個体差に基づくものか、分析手段 (HPLC 及び TLC) の差によるかは、さらに検討する必要がある。

謝辞：本研究を行うに当たり、貴重な標品をご恵与くださった神戸薬科大学 永倉直敬教授、ご助言をいただいた東京理科大学 生田安喜良助教授に深謝いたします。また NMR を測定して下さった本学 高崎みどり博士に感謝します。

引用文献

- 1) 三橋 博監修 "原色牧野和漢薬草大図鑑"北隆社, 東京, 1988, p.139.
- 2) Y. Asahina, *Arch. Pharm.*, **247**, 201-212 (1909); V. Preininger, in "The Alkaloids" Vol. 29, ed. by A. Brossi, Academic Press, London, 1986, pp. 1-98.
- 3) A. Ikuta, K. Syono, T. Furuya, *Phytochemistry*, **13**, 2175-2179 (1974).
- 4) T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962).
- 5) 守安正恭, 市丸百代, 西山由美, 加藤 篤, 分析化学, **42**, 659-665 (1993).
- 6) N. J. Leonard, R. R. Sauers, *J. Org. Chem.*, **22**, 63-65 (1957); O. E. Edwards, K. L. Handa, *Can. J. Chem.*, **39**, 1801-1804 (1961); M. Shamma, "The Isoquinoline Alkaloids, Chemistry and Pharmacology", Academic Press, New York, 1972, pp.343-358.
- 7) H. Guinaudeau, M. Leboeuf, A. Cave, *J. Nat. Prod.*, **42**, 325-360 (1979).
- 8) M. P. Cava, A. Venkateswarlu, *Tetrahedron*, **27**, 2639-2643 (1971); S.-T. Lu, S.-J. Wang, P.-H. Lai, C.-M. Lin, L.-C. Lin, *Yakugaku Zasshi*, **92**, 910-917 (1972); M. P. Cava, K. V. Rao, B. Douglas, J. A. Weisbach, *J. Org. Chem.*, **33**, 2443-2446 (1968).
- 9) V. B. Pandey, A. B. Ray, B. Dasgupta, *Phytochemistry*, **18**, 695-696 (1979); M. Shamma, H. H. Tomlinson, *J. Org. Chem.*, **43**, 2852-2855 (1978); B. D. Krane, M. O. Fagbule, M. Shamma, B. Gözler, *J. Nat. Prod.*, **47**, 1-43 (1984).
- 10) N. Takao, K. Iwasa, M. Kamigauchi, M. Sugiura, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2859-2868 (1976); K. Iwasa, M. Sugiura, N. Takao, *J. Org. Chem.*, **47**, 4275-4280 (1976).
- 11) M. Tomita, H. Furukawa, *J. Pharm. Soc. Japan*, **87**, 881-882 (1967).
- 12) M. Moriyasu, M. Ichimaru, Y. Sawada, K. Izutsu, Y. Nishiyama, A. Kato, *Shoyakugaku Zasshi*, **46**, 142-149 (1992).
- 13) K. Iwasa, in "The Alkaloids" Vol. 46, ed. by G. A. Cordell, Academic Press, London, 1995, pp.273-346.