薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (10) 951-955 (1981)

日本栽培種タマサキツツラフジのアルカロイド (ii)¹⁾

國友順一,*^a 押方 恵,^a 赤須通範^b

武庫川女子大学薬学部,^a 化研生薬株式会社^b

The Alkaloids of *Stephania cepharantha* HAYATA cultivated in Japan (ii)¹⁾

JUN-ICHI KUNITOMO,*^a MEGUMI OSHIKATA,^a and MICHINORI AKASU^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University, 4-16,
Edagawa-cho, Nishinomiya-city,^a and Kaken drug Co., Ltd.,
3-37-10, Shimorenjaku, Mitaka-city, Tokyo^b

(Received April 22, 1981)

From the alkaloids of the seeds of *Stephania cepharantha* HAYATA (Japanese name "tamasaki-tsuzurafuji") cultivated in Japan, a new dehydroaporphine type alkaloid, dehydrostephanine was isolated together with dehydrocrebanine (2), stephanine (3), crebanine (4), isotetrandrine (5), O-nornuciferine (6), stesakine (7) and berbamine (8).

The structure of dehydrostephanine was established as **1** from various spectral data and identified to be a compound derived from stephanine (3) by iodine-oxidation.

The 1,2,8,9-substituted [(7), (4), (2)] and the 1,2,8-substituted [(3), (1)] aporphine type alkaloids in this plant were assumed to be formed from dienone-phenol rearrangement of orientalinone (9) and dienol-benzene rearrangement of orientalinol (10), respectively.

Keywords—*Stephania cepharantha* HAYATA; menispermaceae; dehydroaporphine; dehydrostephanine; biosynthesis of 8-substituted aporphine

原産地が台湾である防己科植物タマサキツツラフジ *Stephania cepharantha* HAYATA には, その塊根部に cepharanthine (11) が主塩基として含まれ, この塩基が医薬品として用いられていることから, わが国にも移植栽培されるようになった. 日本栽培種の本植物の塊根部のアルカロイド成分の研究結果は, bisbenzylisoquinoline 型塩基に属する cepharanthine (11) をはじめとして, isotetrandrine (5), cycleanine (13), berbamine (8) ならびに cepharanoline (12) が単離・証明されている.²⁾

一方, 日本栽培種の本植物の種子成分については脂肪油の存在の報告があるのみで, アルカロイド成分についてはいまだ検索されていない.³⁾ 今回, 本植物の種子に含まれるアルカロイド成分について検索を行なった結果, 下記の知見を得ることができた.

すなわち, 種子をヘキサン, ついでメタノールで抽出し, 各抽出エキ스는常法により非フェノール性塩基部とフェノール性塩基部に分け, さらに各フラクションは薄層クロマトグラフィー (TLC) で検討しながらカラムクロマトグラフィーを繰返し精製し Table に示す 8 種の塩基を結晶状に単離した. このうち, dehydrostephanine は新塩基であり, 後述の各種スペクトルデータおよび stephanine (3) からの合成によってその構造を式 **1** と決定した. 残る 7 種の塩基は既知塩基で, このうち bisbenzylisoquinoline 型塩基に属する isotetrandrine (5)²⁾ ならびに berbamine (8)²⁾ は本植物の塊根部にも含まれているが, aporphine 型あるいは dehydroaporphine 型塩基に属する stephanine (3),⁴⁾ crebanine (4),⁵⁾ stesakine (7),⁶⁾ O-nornuciferine (6)⁷⁾ ならびに dehydrocrebanine (2)⁶⁾ は塊根部には含まれず, 今回種子よりはじめて単離・証明された塩基である. また, 塊根部に含まれている bisbenzylisoquinoline 型塩基 cepharanthine (11), cycleanine (13) ならびに cepharanoline (12) は種子より単離することができなかった. これら既知塩基の各種スペクトルデータは文献^{2,4-7)} 記載のデータとよく一致し, また, 元素分析値もそれらの組成に一致し, それぞれの標品と混融試験ならびに TLC で同定した.

新塩基 dehydrostephanine (1) は mp 161—163°C を示す淡黄色柱状晶で、質量スペクトル (MS) ならびに元素分析値よりその分子式は $C_{19}H_{17}NO_3$ と決定した。紫外吸収スペクトル (UV) [$\lambda_{\max}$ nm (log ϵ): 224 (4.43), 253 sh. (4.55), 262 (4.59), 336 (4.16), 4.00 sh. (3.58)] より dehydroaporphine 型塩基と推定され、また、プロトン核磁気共鳴スペクトル (1H -NMR) よりメトキシ基 1 個、メチレンジオキシ基 1 個ならびに低磁場側にシフトした N-メチル基 (δ 3.08) 以外に 5 個の aromatic プロトンの存在が確認される。5 個の aromatic プロトンのうち、dehydroaporphine 型塩基に特異的な低磁場側にシフトした C11 位のプロトン (δ 8.56, dd, $J=1.5$, 8.5 Hz) が認められ、⁸⁾ しかも、double doublet で現われていることより本塩基は stephanine (3) の dehydro 体と推定できる。これを積極的に証明するため Cava ら⁹⁾ の方法にしたがって stephanine (3) を I_2 により脱水素反応し、対応する dehydro 体を得た。本物質の UV, 1H -NMR ならびに赤外部吸収スペクトル (IR) は天然の

Chart 1

TABLE I. The Alkaloids of *Stephania cepharantha* HAYATA cultivated in Japan

	Seed	Tuber
Non-phenolic bases		
Dehydrostephanine (1)	+	—
Dehydrocrebanine (2)	+	—
Stephanine (3)	+	—
Crebanine (4)	+	—
Isotetrandrine (5)	+	+
Cepharanthine (11)	—	+
Cycleanine (13)	—	+
Phenolic bases		
O-Nornuciferine (6)	+	—
Stesakine (7)	+	—
Berbamine (8)	+	+
Cepharanoline (12)	—	+

dehydrostephanine に完全に一致し、さらに両者は TLC ならびに混融試験で同一物質であることを確認した。したがって dehydrostephanine は式 1 と決定した。

Battersby¹⁰⁾ は 1,2,8,9-置換 aporphine 型塩基は orientalinone (9) の dienone-phenol 転位により生合成される仮説を提出しており、著者ら⁶⁾ もさきにこれを支持することを報告した。今回、本植物より単離した 1,2,8,9-置換 aporphine 型塩基 (7), (4), (2) および 1,2,8-置換 aporphine 型塩基 (3), (1) はそれぞれ (9) の dienone-phenol 転位および (9) の還元成績体である orientalinol (10) の dienol-benzene 転位により生成したものと考えられる。これらのことを支持する研究として、最近 Shamma ら¹¹⁾ の proaporphine 型塩基の光化学反応により 1,2,8,9-置換 aporphine 型塩基が得られる実験結果がある。

また、上述のように本植物の塊根部のアルカロイドは bisbenzylisoquinoline 型塩基が主成分である²⁾ のに対して種子のそれは aporphine 型塩基が主成分であることも極めて興味深い。

実験の部

融点はすべて未補正。[α]_D は Jasco DIP-4 Digital polarimeter で測定。¹H-NMR は Varian Associates recording spectrometer (A-60) により測定し、Chemical shifts は Tetramethylsilane を内部基準とした。また、MS は Hitachi RMU-6M により測定し、Ion accel voltage 3.2 kV, chamber voltage 20 eV。TLC は kieselgel G (Type 60) を、カラムクロマトグラフィーは kieselgel 60 を使用した。

塩基の分離・精製 1980 年 9 月茨城県で採集した日本栽培種タマサキツヅラフジの種子 10 kg をヘキサンで 3 回冷浸、ついでメタノールで 4 回温浸し、それぞれのエキスを得る。ヘキサンエキスは 10% クエン酸水溶液、ついで 10% 塩酸で、メタノールエキスは 10% クエン酸水溶液で十分に塩基部を抽出（各フラクションをそれぞれ fraction A, B ならびに C とする）。各酸性水溶液は Et₂O で一回洗浄後、常法にしたがってそれぞれを非フェノール性塩基部とフェノール性塩基部に分離（非フェノール性塩基部を I, フェノール性塩基部を II とする）。このようにして分離した 6 種のフラクション（fraction A-I, A-II, B-I, B-II, C-I ならびに C-II）は TLC で検討しながらカラムクロマトグラフィーにより分離・精製する。なお、混合塩基の場合は再カラムクロマトグラフィーを行なった。その結果、各フラクションから下記の塩基を単離した。各フラクションの収量、カラムクロマトグラフィーに用いた溶媒ならびに塩基とその収量を示す。

Fraction A-I, 2.80 g. CH₂Cl₂, 構造未詳塩基, 10 mg. 5% Me₂CO·CH₂Cl₂, stephanine (3), 234.3 mg. 10% Me₂CO·CH₂Cl₂, crebanine (4), 35.0 mg.

Fraction A-II, 0.20 g. 20% Me₂CO·CH₂Cl₂, stesakine (7), 9.0 mg.

Fraction B-I, 2.57 g. CH₂Cl₂, dehydrostephanine (1), 190.0 mg ならびに dehydrocrebanine (2), 40 mg.

Fraction B-II, 80 mg. 微量のため精査せず。

Fraction C-I, 2.20 g. MeOH, isotetrandrine (5), 217.2 mg.

Fraction C-II, 0.62 g. 15% $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, O-nornuciferine (6), 16.0 mg. MeOH, berbamine (8), 52.6 mg.

塩基の性状 Stephanine (3) メタノールより再結晶. 無色柱状晶. mp 154—156°C, $[\alpha]_D^{25} -90.5^\circ$ ($c=0.21$, CHCl_3) [文献,^{4a)} mp 155—156°C, $[\alpha]_D -88.3^\circ$ (CHCl_3)]. *Anal.* Calcd $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3$: C, 73.76; H, 6.19; N, 4.53. Found: C, 73.90; H, 6.17; N, 4.47. これらのデータは stephanine (3) のそれら^{4b)} に一致し, 標品^{4a)} と IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験で同定した.

Crebanine (4) アセトン・エーテル混液より再結晶. 淡黄色柱状晶. mp 115—116°C, $[\alpha]_D^{25} -60.8^\circ$ ($c=3.62$, CHCl_3) [文献,^{5a)} mp 115—118°C, $[\alpha]_D -61^\circ$ (CHCl_3)]. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 218 (4.48), 245 (sh, 4.02), 280 (4.29), 290 (sh, 4.25), 320 (sh, 3.63). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.55 (3H, s, NCH_3), 3.82, 3.85 (3H $\times 2$, s, $\text{OCH}_3 \times 2$), 5.19 (2H, dd, $J=1.5, 9.0$ Hz, OCH_2O), 6.47 (1H, s, $\text{C}_8\text{-H}$), 6.84 (1H, d, $J=9.0$ Hz, $\text{C}_{10}\text{-H}$), 7.80 (1H, d, $J=9.0$ Hz, $\text{C}_{11}\text{-H}$). MS m/z (%): 339 (M^+ , 79.1), 338 (100.0), 324 (M^+-CH_3 , 10.4), 308 (338- OCH_2 , 22.0), 296 ($\text{M}^+-\text{CH}_2=\text{NCH}_3$, 35.9). *Anal.* Calcd $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ (m.w., 339.38): C, 70.78; H, 6.24; N, 4.13. Found: C, 70.66; H, 6.28; N, 4.09. これらのデータは crebanine (4) のそれらに一致し,⁵⁾ 標品^{5a)} と IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験で同定した.

Stesakine (7) メタノールより再結晶. 無色柱状晶. mp 150—151°C, $[\alpha]_D^{25} -76.9^\circ$ ($c=0.13$, CHCl_3) [文献,⁶⁾ mp 188—190°C, $[\alpha]_D -78.7^\circ$ (CHCl_3)]. *Anal.* Calcd $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$: C, 67.21; H, 6.49; N, 3.92. Found: C, 69.60; H, 7.07; N, 3.39. 本物質は極微量のため十分に精査できず, 融点ならびに元素分析値は文献⁶⁾ のそれらと異なるが, 他のデータはよく一致し, IR (CHCl_3) ならびに TLC で標品と同定した.

Dehydrostephanine (1) アセトンより再結晶. 淡黄色柱状晶, mp 161—163°C. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 224 (4.43), 253 (sh, 4.55), 262 (4.59), 336 (4.16), 400 (sh, 3.58). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.08 (3H, s, NCH_3), 3.20—3.35 (4H, m, $\text{CH}_2 \times 2$), 3.98 (3H, s, OCH_3), 6.15 (2H, s, OCH_2O), 6.90 (1H, s, $\text{C}_8\text{-H}$), 6.91 (1H, dd, $J=1.5, 8.5$ Hz, $\text{C}_9\text{-H}$), 7.00 (1H, s, $\text{C}_7\text{-H}$), 7.26 (1H, t, $J=8.5$ Hz, $\text{C}_{10}\text{-H}$), 8.56 (1H, dd, $J=1.5, 8.5$ Hz, $\text{C}_{11}\text{-H}$). MS, m/z (%): 307 (M^+ , 100), 292 (M^+-CH_3 , 66.7), 277 (M^+-OCH_2 , 6.0), 264 ($\text{M}^+-\text{CH}_2=\text{NCH}_3$, 2.5). *Anal.* Calcd $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (m.w., 307.33): C, 74.25; H, 5.58; N, 4.56. Found: C, 74.36; H, 5.60; N, 4.44. 本物質のデータは下記に述べる stephanine (3) の I_2 -酸化によって得られる dehydro 体のそれらによく一致し, IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験により同定した.

Stephanine (3) の I_2 -酸化反応による Dehydrostephanine (1) の生成 Stephanine 62 mg を anhyd. ジオキサン 6 ml に溶かし, さらに anhyd. AcONa 41 mg を加えて攪拌, 還流させる. これに I_2 56 mg を anhyd. ジオキサン 6 ml に溶かした溶液を 25 min で滴下. 滴下後, さらに 45 min 還流. 反応後, 冷時ろ過し, 不溶物は十分に CH_2Cl_2 で洗浄し, ろ液に合した後, 減圧下で溶媒を留去し, 残渣を 5% NaHSO_3 水溶液 10 ml で 5 min 攪拌. これに 10% NH_4OH を加えてアンモニアアルカリ性とし, CH_2Cl_2 で数回抽出. CH_2Cl_2 層は常法により処理. アセトンより再結晶. 淡黄色針状晶, mp 159—161°C. 種々のデータは天然より得られた dehydrostephanine のそれらに完全に一致する.

Dehydrocrebanine (2) エタノールより再結晶. 淡黄色針状晶. mp 151—152°C (文献,⁶⁾ mp 151—152°C). *Anal.* Calcd $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15. Found: C, 71.36; H, 5.66; N, 3.98. 本物質の種々のデータは dehydrocrebanine (2)⁶⁾ のそれらによく一致し, IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験により同定した.

Isotetrandrine (5) アセトンより再結晶. 無色骰子状晶. mp 181—182°C, $[\alpha]_D^{25} +135.2^\circ$ ($c=1.49$, CHCl_3) [文献,²⁾ mp 182.5—183.5°C, $[\alpha]_D +144^\circ$ (CHCl_3)]. *Anal.* Calcd $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 73.29; H, 6.80; N, 4.50. Found: C, 73.17; H, 6.70; N, 4.46. 本物質の種々のデータは isotetrandrine (5) のそれらに一致し, 標品と IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験により同定した.

O-Nornuciferine (6) エタノールより再結晶. 無色柱状晶. mp 196—198°C, $[\alpha]_D^{25} -253.3^\circ$ ($c=0.15$, CHCl_3) [文献,^{7a)} mp 195—196°C, $[\alpha]_D -265^\circ$ (CHCl_3)]. *Anal.* Calcd $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_2$: C, 76.84; H, 6.81; N, 4.98. Found: C, 76.73; H, 6.77; N, 5.10. 本物質の種々のデータは文献⁷⁾ の O-nornuciferine (6) のそれらによく一致し, IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験により同定した.

Berbamine (8) ベンゼンより再結晶. 無色柱状晶. mp 155—157°C (benzene adduct), $[\alpha]_D^{25} +112.7^\circ$ ($c=0.28$, CHCl_3) [文献,²⁾ mp 149—152°C, $[\alpha]_D +115^\circ$ (CHCl_3)]. *Anal.* Calcd $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 3/2\text{C}_6\text{H}_6$: C, 76.86; H, 6.59; N, 3.86. Found: C, 76.79; H, 6.87; N, 3.56. 本物質の種々のデータは berbamine (8)²⁾ のそれらによく一致し, 標品と IR (CHCl_3), TLC ならびに混融試験により同定した.

謝辞 本研究に際して種々の測定をされた本学分析センター諏訪紀代子氏に深謝致します.

引用文献および注

- 1) 本研究は防己科植物アルカロイド研究 (第 272 報) タマサキツヅラフジ *Stephania cepharantha* HAYATA のアルカロイド その 9 とする [第 271 報: J. Kunitomo, M. Oshikata, Y. Murakami, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, (1981). その 8 ならびに日本栽培タマサキツヅラフジのアルカロイド (i): 引用文献 2)].
- 2) 富田真雄, 澤田徳之助, 小塚睦夫, 竹内充子, 赤須通美, 薬誌, **89**, 1678 (1969).
- 3) 赤須通美, 宮崎利夫, 太田達男, 薬誌, **76**, 462 (1956).
- 4) a) 富田真雄, 井深俊郎, 薬誌, **83**, 996 (1963); b) Y. Watanabe, M. Matsui, M. Iibuchi, S. Hiroe, *Phytochemistry*, **14**, 2522 (1975).
- 5) a) 國友順一, 岡本靖子, 弓削税子, 永井嘉子, 薬誌, **89**, 1691 (1969); b) 富田真雄, 平井健太郎, 薬誌, **78**, 738 (1958).
- 6) J. Kunitomo, Y. Murakami, M. Oshikata, T. Shingu, M. Akasu, S-T. Lu, I-S. Chen, *Phytochemistry*, **19**, 2735 (1980).
- 7) a) 富田真雄, 渡辺恭男, 富田真次, 古川 宏, 薬誌, **81**, 469 (1961); b) H. Guinaudeau, M. Leboeuf, M. Debray, A. Cavé, R.R. Paris, *Planta Med.*, **27**, 304 (1975).
- 8) M. Shamma, "The Isoquinoline Alkaloids, Chemistry and Pharmacology," Academic Press, New York, 1972, p. 225.
- 9) M.P. Cava, A. Venkateswarlu, M. Srinivasan, D.L. Edie, *Tetrahedron*, **28**, 4299 (1972).
- 10) A.R. Battersby, "Oxidative Coupling of Phenols," W.I. Taylor, and A.R. Battersby eds., Marcel Dekker, New York, 1967, p. 124.
- 11) S.F. Hussain, M.T. Siddiqui, G. Manikumar, M. Shamma, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 723.

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
101 (10) 955-959 (1981)

高速液体クロマトグラフ法による体液中のテオフィリンの定量¹⁾

松田りえ子, 仁木喜治, 立沢政義, 江島 昭*

国立衛生試験所薬品部

Determination of Theophylline in Biological Fluids by
High-Performance Liquid Chromatography¹⁾

RIEKO MATSUDA, YOSHIHARU NIKKI, MASAYOSHI TATSUZAWA and AKIRA EJIMA*

National Institute of Hygienic Sciences, 18-1, 1-Chome, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo

(Received February 23, 1981)

High performance liquid chromatographic method for the determination of theophylline in biological fluids (serum, saliva and urine) was developed. Theophylline in biological fluids was adsorbed on a diatom earth column, followed by elution with a mixture of chloroform-isopropanol (95:5). After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in water, injected onto a HPLC column packed with an ODS stationary phase eluted at 40°C with a mixture of 0.1M phosphate buffer (pH 5.3)-acetonitrile (9:1) and detected at 273 nm. 8-Chlorotheophylline was used as an internal standard. The recovery of theophylline from serum by this method was 100.1%±1.76% (SD; n=5). Other xanthine derivatives (theobromine and caffeine) were separated under the same conditions.

Keywords—high performance liquid chromatography; theophylline; column extraction; serum; saliva; urine

テオフィリン (TP) は気管支喘息, 強心利尿薬として広く用いられているキサンチン系薬物の一つであるが,