薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (12) 962-965 (1989)

補骨脂の細胞毒作用 (第2報¹⁾) Bakuchiol 及びその関連化合物の細胞毒作用

岩村淳一,^{*,a} 土肥玉枝,^b 田中裕幸,^a 小谷 功,^b 久保道德^b

近畿大学産業科学研究室,^a 近畿大学薬学部^b

Cytotoxicity of Corylifoliae Fructus. II.¹⁾ Cytotoxicity of Bakuchiol and the Analogues

Jun-ichi IWAMURA,^{*,a} Tamae DOHI,^b Hiroyuki TANAKA,^a
Tsutomu ODANI^b and Michinori KUBO^b

The Laboratory of Scientific and Industrial Research Kinki University,^a

4-70-3 Misono-cho, Yao-shi, 581, Japan and Faculty of

Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^b 3-4-1

Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577, Japan

(Received May 31, 1989)

Bakuchiol is a major component of Corylifoliae Fructus (*Psoralea corylifolia* L.) and has been clarified to have cytotoxic activity. The chemical structure-cytotoxic activity relationship of bakuchiol was investigated by means of cytotoxic activity of synthesized analogues of bakuchiol and phenol. It was proved that an alkyl group was necessary for cytotoxic activity. But the double bonds in the unsaturated hydro-carbon group exerted but little influence on the cytotoxic activity. The cytotoxic activity of bakuchiol was the strongest as compared with that of the analogues examined.

Keywords—*Psoralea corylifolia*; bakuchiol; bakuchiol analogue; cytotoxicity

第1報¹⁾において、補骨脂の細胞毒活性成分の単離と同定及びその細胞毒活性作用の検討を行い、その有効成分の1つは本生薬の主要成分の bakuchiol²⁾であることを明らかにした。また、その作用機序の1つは細胞膜の破壊であることも述べた。今回、bakuchiol (1) の活性部位の検索を目的として 1 の酢酸エステル (2)、1 のメチルエーテル (3) 及び 1、2 の各アルキル側鎖の還元体 hexahydroacetylbakuchiol (4)、7,8,16,17-tetrahydroacetylbakuchiol (5)、hexahydrobakuchiol (6)、7,8,16,17-tetrahydrobakuchiol (7)、また 1 のアルキル側鎖炭素数を異にするモデル化合物 phenol (8)、*p*-cresol (9)、*p*-propylphenol (10)、*p*-allylphenol (11) を用い、それら化合物の細胞毒活性を指標として 1 の活性部位を検討した。

結果 及 び 考 察

1 の細胞毒活性と構造との関係を明らかにするため、Fig. 1 に示すような 1 の誘導体及びフェノールの誘導体

bacuchiol (1): X=H

acetylbakuchiol (2): X=CH₃CO

bacuchiol methyl ether (3): X=CH₃

hexahydroacetylbakuchiol (4)

7,8,16,17-tetrahydroacetylbakuchiol (5)

hexahydrobakuchiol (6)

7,8,16,17-tetrahydrobakuchiol (7)

phenol (8): R=H, X=H

p-cresol (9): R=CH₃, X=H

p-propylphenol (10): R=CH₃CH₂CH₂, X=H

p-allylphenol (11): R=CH₂=CHCH₂, X=H

Fig. 1. Bakuchiol, Phenol and Their Derivatives

TABLE I. ^{13}C -NMR Spectrum Data of Compounds

Carbon No.	Compound (δ)						
	1	2	3	4	5	6	7
1	17.7	17.6	17.7	22.7	17.6	22.6	17.6
2	131.0	131.0	130.7	27.9	130.9	27.9	130.8
3	124.9	124.7	124.9	40.1	125.1	40.0	125.2
4	25.7	25.6	25.7	24.5	25.7	24.5	25.7
5	41.3	41.2	41.3	41.3	41.2	41.5	41.5
6	42.6	42.6	42.6	35.2	35.2	35.1	35.1
7	131.0	135.5	131.2	29.8	29.6	29.3	29.3
8	126.5	126.3	121.6	31.5	31.4	31.5	31.4
9	146.0	145.5	146.0	141.2	141.1	136.0	135.9
10	127.4	126.8	127.1	129.1	129.1	129.3	129.3
11	115.4	121.5	113.9	121.3	121.2	115.1	115.1
12	154.6	149.6	150.2	148.6	148.5	153.4	153.3
13	115.4	121.5	113.9	121.3	121.2	115.1	115.1
14	127.4	126.8	127.1	129.1	129.1	129.3	129.3
15	23.3	23.3	23.3	21.2	22.3	21.1	22.3
16	135.9	138.0	135.8	39.1	38.8	39.1	38.8
17	111.9	112.0	111.8	8.0	8.0	8.0	8.0
18	23.3	23.3	23.3	22.7	24.4	22.6	24.0
19	—	169.0	55.2	169.6	169.6	—	—
20	—	20.9	—	21.2	21.1	—	—

を合成し、一部市販の化合物も含めて L929 に対する細胞毒活性を第 1 報と同様の方法で検討した。なお、これら合成化合物は ^{13}C -核磁気共鳴スペクトラム (^{13}C -NMR) のデータ (Table I) 及び各種スペクトルデータによって同定を行った。

まずフェノール性水酸基の細胞毒活性に及ぼす効果を検討するため、1 の活性と 2 及び 3 の活性を比較した。その結果、2 は 20 nmol/ml の濃度ではほぼ同様の活性であった。しかし、3 は 40 nmol/ml 以下の濃度ではほとんど活性が認められず、50 nmol/ml の濃度でも極めて弱い活性であった。

3 に活性が認められず、2 に活性が認められたのは、2 が培養液中で加水分解され、1 を生じている可能性が考えられた。そこで、2 を添加し L929 細胞の培養を行った後、培養液に 3 培量のエタノールを添加し、その液をメンブランフィルター (pore size 0.45 μm) でろ過した。ろ液を濃縮し、そのエーテル可溶部を濃縮したあと、エタノール溶液として gas chromatography (GC) 分析した結果、2 は 93.5% が 1 に変化していた。したがって、2 が細胞毒活性を示したのは培養液中でほとんど 1 に変化していたためであると思われる。このことから、1 の細胞毒活性にはフェノール性水酸基の存在が必要であると考えられる。

次に 1 のアルキル側鎖の細胞毒活性に及ぼす作用を検討するため、炭素数の少ない側鎖の結合したフェノール誘導体 (8—11) の細胞毒活性を検討した。

その結果、いずれのフェノール誘導体もほとんど活性が認められなかった。このことから、アルキル側鎖は細胞毒活性発現に必要であることが明らかとなった。

次にアルキル側鎖の二重結合の細胞毒活性に対する効果について検討するため、2 の還元体 4, 5 を合成し、それらを脱アセチル化して 6, 7 を得、それらの細胞毒活性を検討した。Fig. 3 に示したように、 $1 > 7 \geq 6$ となり、二重結合の細胞毒活性に及ぼす効果は小さいが、二重結合の数が多いほど若干活性が増強される傾向が認められた。このことは、2 とその還元体 4, 5 の活性を比較すると、これらの活性の関係が $2 > 5 > 4$ であることからより明らかである (Table II)。

1 の細胞毒活性発現にアルキル側鎖が必要であることが明らかとなったが、炭素数の少ないアルキル側鎖の化合物 (8—11) で効果が認められなかったことより、1 のアルキル側鎖の構造が特異的に細胞毒活性に寄与しているのか、1 のアルキル側鎖と同数の炭素直鎖のアルキル基でも活性を示すのか、あるいはその単素数の変動に

TABLE II. Cytotoxic Activity of Bakuchiol, Phenol and Their Derivatives on L929 Cells

Compound number	Cytotoxic activity (%)				
	Concentration of samples (nmol/ml)				
	10	20	30	40	50
1	7.99±3.12	88.80±0.84	88.88±0.43	89.41±0.25	90.60±0.67
2	-4.73±2.18	59.41±1.84	87.37±0.33	91.18±0.12	92.48±0.44
3	6.17±7.02	4.20±1.31	0.18±0.18	-2.17±1.23	13.34±1.29
4	-6.10±2.19	-7.60±1.10	64.31±0.66	80.52±0.36	86.84±1.12
5	-5.93±2.21	34.20±1.36	77.34±1.15	89.10±0.47	90.31±0.29
6	-7.55±4.17	51.39±1.60	82.92±2.36	80.22±0.79	81.97±0.64
7	-6.01±1.48	59.45±2.53	80.50±0.50	81.10±0.41	82.07±0.20
8	6.26±2.43	9.95±1.37	7.08±2.97	4.77±0.78	7.59±2.33
9	4.26±1.46	8.45±1.40	5.06±1.94	7.74±0.70	4.74±1.58
10	7.94±2.85	10.07±0.81	4.86±1.85	8.18±2.76	8.10±1.92
11	4.13±3.35	5.71±0.99	5.75±1.53	8.43±1.33	7.72±2.64

Cells (3.3×10^4 /well) were incubated with various concentrations of the compounds in a well of multiwell plate at 37°C for 24 h.

よって、活性がどのように変動するかは興味ある問題であるが、それは今後の課題である。

実 験 の 部

赤外線吸収スペクトル (IR) は島津製 IR-435, GC は島津 GC-4CM (PF) FID-4C [3% Silicone OV-17 60—80 mesh (Gas chrom Q), column: ガラス製 2 m, i.d. 3 mm, column temp. 240°C, injection temp. 270°C, carrier gas N₂ 50 ml/min], 紫外線吸収スペクトル (UV) は島津 UV-240, 質量分析 (MS) は日立 M60, ¹³C-NMR は日本電子 JNM-FX60Q (内部標準テトラメチルシラン) を用いて測定した。

2 の合成 1 の 10.0 g を薄層クロマトグラフィー (TLC) でモニターしながら常法によりアセチル化し, SiO₂ カラムクロマトグラフィーにより該当画分を分取し, 濃縮後, 減圧蒸留 (150°C, 2 mmHg, 以下同条件) し, GC での純度 96.7% の 2 を得た (収率 79.9%)。

IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 1 の 3580, 3400 (O-H) の吸収消失, 1730, 1240, 1160 (R-COCH₃), 2920 (芳香環の O-C-) の吸収の出現. UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 256 (log ϵ =4.51). MS m/z : (M⁺) C₂₀H₂₆O₂=298.

3 の合成 Mehta²⁾ らが行った方法に準拠し 10.0 g の 1 に dimethyl sulfoxide 30 ml, ヨウ化メチル 13 ml, 酸化カルシウム 5 g を加え, TLC でモニターしながら加温 (30°C) 攪拌 (12 時間) した後飽和食塩水溶液 (150 ml ×2) で洗浄し, *n*-ヘキサンに転溶させた. *n*-ヘキサン溶液を濃縮し粗 3 を得た (収率 98.0%). 粗 3 の SiO₂ カラム (C-200 mesh, i.d., 3 cm, 135.0 g, 展開溶媒: *n*-ヘキサン: 酢酸エチル=99:1, ベンゼン, *n*-ヘキサン: ベンゼン=1:1, *n*-ヘキサン) クロマトグラフィーを 4 回行い, 最終的に減圧蒸留によって GC 純度 98% の 3 を得た (収率 23.3%)。

IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 1 の 3580, 3400 (O-H) の吸収の消失, 2850, 1440, 1455 (芳香環の -OMe) の吸収の出現. UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 260 (log ϵ =4.39). MS m/z : (M⁺) C₁₉H₂₆O=270.

4 の合成 2 の 5.09 g にエタノール 30 ml を加え, 3% Pd-C 60 mg を触媒として攪拌, 常圧下, H₂ 20 ml/min を導入し (還元反応, 以下同条件), 反応の進行度合は GC でモニターした. 21 時間反応後, 触媒をろ別し, ろ液を濃縮・減圧蒸留によって粗 4 を得た. 粗 4 を SiO₂ カラム (C-200 mesh, i.d., 1.5 cm, 18.0 g) で展開溶媒 *n*-ヘキサン: 酢酸エチル=97:3 を用いて精製し, GC での純度 97.5% の 4 を得た。

IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 2 の 1600, 1650 (共役ジエン), 910, 990 (末端 CH=CH₂), 1670 (三置換二重結合) の吸収の消失. UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 215 (log ϵ =4.73), $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 263 (log ϵ =3.69). MS m/z : (M⁺) C₂₀H₃₂O₂=304.

5 の合成 2 の 20.0 g にエタノール 50 ml を加え, 3% Pd-C 100 mg を触媒として, 還元反応を行った. 16 時間反応後, 触媒をろ別し, ろ液を濃縮した. 濃縮物を SiO₂ カラム (C-200 mesh, i.d., 3 cm, 160.0 g, 展開溶媒 *n*-ヘキサン: 酢酸エチル=98:2) クロマトグラフィーにより分画し, GC での純度 74.0% (2.45 g) の 5 を得た. これを再度 SiO₂ カラム (C-200 mesh, i.d., 2.5 cm, 50.0 g, 展開溶媒 *n*-ヘキサン) クロマトを行い, GC での純度 95.5% の 5 を得た。

IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 2 の 1600, 1650 (共役ジエン) と 910, 990 (末端 CH=CH₂) の吸収の消失.

UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 215 ($\log \epsilon=3.78$), $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 270 ($\log \epsilon=2.79$). MS m/z : (M^+) $C_{20}H_{30}O_2=302$.

6 の合成 4 の 3.12 g に乾燥エーテルを加え, $LiAlH_4$ を用いて脱アセチル化し, 反応終了後, エーテル層を濃縮し, 減圧蒸留によって GC での純度 99.9% の 6 (収量 70.1%) を得た.

IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 1 の 1600, 1650 (共役ジエン) と 910, 990 (末端 $CH=CH_2$), 1670 (三置換結合) の吸収の消失.
UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 223 ($\log \epsilon=4.06$), $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 277 ($\log \epsilon=3.69$). MS m/z : (M^+) $C_{18}H_{30}O=262$.

7 の合成 5 の 1.414 g を脱アセチル化し減圧蒸留して 7 を得た.

IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 1 の 1600, 1650 (共役ジエン) と 910, 990 (末端 $CH=CH_2$ の吸収の消失).

UV (nm): $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 225 ($\log \epsilon=3.17$), $\lambda_{\max}^{\text{ethanol}}$ 278 ($\log \epsilon=2.68$). MS m/z : (M^+) $C_{18}H_{28}O=260$.

11 の単離 Betel leaf oil (300 g) に 1.5 倍の 50% NaOH 水溶液を加え攪拌後, クロロホルム (300 ml $\times$ 5) で中性部を除去し, その水層を希 HCl で中和, n -ヘキサン (300 ml $\times$ 3) 抽出し, n -ヘキサン層を水洗 (300 ml $\times$ 6) 後, 濃縮し 280.4 g の酸性油分を得, それに少量の 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol を加え蒸留 (105°C 10 mmHg) を行い GC 純度 11 22.0%, オイゲノール 77.8% の組成の留分 109.8 g を得た. 次にこれを SiO_2 カラム (C-200 mesh, i.d., 5 cm, 485.0 g) でベンゼン: 酢酸=98:2 で展開し GC 純度 11 31.25% とオイゲノール 68.75% を得, 再度 SiO_2 カラム (C-200 mesh, i.d., 7.5 cm, 1.5 kg) ベンゼン: 酢酸=98:2 で展開した. 得られた 11 純度 72.3% 19.25 g を, 今一度, SiO_2 カラム (C-200 mesh, i.d., 4.2 cm, 415.0 g) でクロロホルムを用い展開, 11 (GC 純度 99.9%) を 11.18 g を得た.

IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 3350 (O-H), 2950 (芳香環の C-H), 1510 (芳香環), 990, 910 (末端 $CH=CH_2$). MS m/z : (M^+) $C_9H_{10}O=134$. ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 39.33, 115.25, 115.25, 117.75, 129.68, 129.68, 132.18, 137.84, 153.79.

10 の合成 11 2.0 g にエタノール 30 ml を加え Pd-C 100 mg を加え攪拌し, 常圧下 H_2 25 ml/min を導入, 反応の観察には GC を用い, 1.5 時間後触媒をろ別し, ろ液を濃縮し, 2.09 g の油分を得, 次に減圧蒸留 (100°C 2 mmHg) し, 10 1.40 g (GC 純度 99.9%) を得た.

IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 11 の 990 と 910 (末端 $CH=CH_2$) の吸収の消失, 2920, 1380, 1460 (CH_3) の吸収の出現.

なお, 1 は, 第 1 報で単離したものを用いた. また 8, 9 は, それぞれ, 関東化学株式会社, 東京化成株式会社より購入した特級試薬を用いた.

Bakuchiol 及びその関連化合物の細胞毒性 L929 cells (1×10^5 cells/ml) を用い検体作用時間を 24 時間とし, 検体はエタノールに溶解し, メンブランフィルター (pore size=0.45 μm) を通し, 第 1 報に準拠し実施した.

引用文献

- 1) 第 1 報: 久保道徳, 土肥玉枝, 小谷 功, 田中裕幸, 岩村淳一, 薬誌, 109, 926 (1989).
- 2) G. Mehta, U. R. Nayak, S. Dev, *Tetrahedron*, 29, 1119 (1973).