インドネシア産生薬の薬理活性成分に関する研究 (第3報¹⁾)

Brucea javanica (L.) MERR. の毒性成分

奥山恵美, 高麗 宏, 山崎幹夫*

千葉大学薬学部

Studies on Pharmacologically Active Principles from Indonesian Crude Drugs. III.¹⁾ Toxic Components from *Brucea javanica* (L.) MERR.

Emi OKUYAMA, Li-Hong GAO and Mikio YAMAZAKI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33

Yayoi-cho, Chiba 260, Japan

(Received June 25, 1990)

During our screening of pharmacologically active principles from Indonesian medicinal plants by a hypothermic effect the methanol-extract of *Brucea javanica* (L.) MERR. has been found to exhibit a lethal toxicity to mice. The toxic components were isolated and identified with bruceoside A and B and yadanzioside F. Correction of ¹³C-nuclear magnetic resonance assignment was also mentioned.

Keywords—*Brucea javanica*; toxic component; hypothermic effect; quassinoid; bruceoside A; bruceoside B; yadanzioside F

我々はインドネシア産薬用植物の薬理活性成分, 特に向神経作用成分の探索の指標の1つとしてマウス正常体温下降活性を用いてのスクリーニングを行っている。¹⁾ その結果, ニガキ科の *Brucea javanica* (L.) MERR のメタノール抽出エキスに強い体温下降活性が観察された。その体温低下は回復せずマウスを死に至らしめ, 開腹により脂肪肝が観察された。 *B. javanica* はインドネシアのみならず熱帯アフリカ, 東南アジアに広く分布しており, 中国でも Ya-dan-zi として抗アメーバ赤痢, 抗マラリア, 抗腫瘍等に用いられている。本生薬に関する毒性については, 1951年に中国でエキスをを用いた実験の結果が報告されているのみであり, 毒性本体については精査されていない。²⁾ そこで, 今回, *B. javanica* の毒性本体について探索するため本研究を行い, 知見を得たので報告する。

1989年3月にインドネシアから入手した *B. javanica* 乾燥果実 (1.8 kg) より作成したメタノール・エキス (96.8 g) をマウスに 2.0 g/kg 経口投与したところ, 8時間までに正常体温を -3.4°C 低下させ, 翌日までにマウスを全匹死亡させた (Fig. 1)。そこで, マウス正常体温下降及び致死毒性を指標として Chart 1 に示すように分離を行った。

溶媒分配, ゲル濾過により分画した結果, 活性は分散する方向にあったので, 毒性発現には複数の活性物質が関与している可能性があると考え, 活性画分のうち比較的量の多い画分の1つをさらにカラムクロマトグラフィー, 中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) で分離し, compd. 1—3 と仮称した化合物をそれぞれに単離した。

Fig. 1. Effect of MeOH Ext. of *Brucea javanica* on Rectal Temperature in Mice

Data are presented at the dose of 2.0 g (p.o.) as the mean $\pm$ S.E. from 5 mice.

a) 5/5 death in 21 h, b) $p < 0.05$, c) $p < 0.01$, d) $p < 0.001$. —○—, control; ---●---, MeOH ext.

Chart 1

[LT(7–8 h), death (21 h)] a) 2.0 g/kg, b) 0.5 g/kg, c) 0.25 g/kg, d) $p < 0.05$, e) $p < 0.01$, f) $p < 0.001$.

Fig. 2

Compd. 1–3 は ^1H - 及び ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル (^1H - 及び ^{13}C -NMR) がよく類似しており、同種の化合物と思われた。Compd. 1–3 は苦味を有し、またそれぞれの ^{13}C -NMR において糖の存在が示唆されたことから、*B. javanica* より苦味成分としてすでに得られている quassinoid glycoside のいくつかの文献値と ^{13}C -NMR を比較したところ、compd. 2 は yadanzioside F と類似し、⁸⁾ 融点 (mp) 及びその他のスペクトルにおいても良く一致したため、yadanzioside F と推定した (Fig. 2)。Compd. 1 は ^1H -NMR において、compd. 2 で観察された 2.06 ppm (3H, s) の acetyl methyl の signal が見られず、代わりに 1.68 (3H, d, 1.1), 2.13 (3H, s), 5.83

TABLE I. ^{13}C -NMR Data for Compd. 1—3 (pry- d_5 , 50°C)

	Compd. 1	Compd. 2	Compd. 3		Compd. 1	Compd. 2	Compd. 3
C-1	129.8	129.7	51.1	C-1'	165.3	169.7	165.3
C-2	148.9	148.9	193.6	C-2'	116.1	20.6	116.0
C-3	194.7	194.6	147.8 ^{a)}	C-3'	158.1		158.3
C-4	41.6	41.4	146.7 ^{a)}	C-4'	20.2		20.2
C-5	43.9	43.9	43.4	C-5'	27.0		27.0
C-6	30.1	30.1	29.4	C-1''	102.2	102.1	104.9
C-7	83.4	83.5	83.3	C-2''	74.8	74.7	75.9
C-8	46.7	46.7	46.0	C-3''	78.5 ^{a)}	78.5 ^{b)}	78.3 ^{d)}
C-9	40.6	40.6	42.1	C-4''	71.5	71.5	71.6
C-10	39.7	39.7	40.9	C-5''	78.9 ^{a)}	78.8 ^{b)}	78.5 ^{d)}
C-11	73.5	73.4	73.0	C-6''	62.5	62.5	62.9
C-12	76.2	76.2	75.9				
C-13	82.7	82.7	82.7				
C-14	50.6	50.5	50.6				
C-15	68.3	68.8	68.1				
C-16	168.2	167.9	168.1				
C-18	12.6	12.5	15.2				
C-19	18.0	18.0	15.9				
C-20	73.8	73.8	73.6				
C-21	171.2	171.3	171.2				
C-22	52.3	52.3	52.3				

a—d) Assignments may be interchanged.

(1H, t-like, 1.3) ppm に isopentenoyl 基由来と思われる signal が観察された. このことは yadanzioside E の 15 位の置換基との ^{13}C -NMR データ比較⁴⁾によっても確かめられた. 15 位の置換基以外の signal は compd. 2 (yadanzioside F) と良く類似しており, したがって compd. 1 は bruceoside A⁵⁾と推定され, この推定は赤外吸収スペクトル (IR), 旋光度 ($[\alpha]_D$) 等の比較においても文献値⁶⁾との類似により支持された. Compd. 3 の構造に関しては, 15 位の置換基は ^1H -及び ^{13}C -NMR の比較より, やはり isopentenoyl 基と思われたが, A 環及び糖部分に相当する signal は compd. 1 (bruceoside A) や compd. 2 (yadanzioside F) のそれとは一致せず yadanzioside B⁴⁾ と良く類似していることから compd. 3 は bruceoside B⁶⁾ の構造を有すると判断された.⁷⁾

構造研究の過程において, 文献に報告されている bruceoside A 型 quassinoid 類の ^{13}C -NMR の帰属^{3,4)}に一部疑問が生じたことから, bruceoside A の二次元 NMR を用いて詳細に検討した. ^1H - ^1H COSY で, 1.15 ppm (3H, d, 6.8) の 18 位 methyl 基と cross peak の観察された 2.41 ppm (1H, m) の proton は 18 位 methyl の付け根の 4 位 methine proton と推定された. この 4 位 methine 2.41 ppm と 2.11 ppm (1H)⁸⁾との cross peak も観察されており, 2.11 ppm の proton は 5 位の methine proton と推定された. ^{13}C - ^1H COSY で 2.41 ppm の 4 位 methine proton と cross peak の観察された

Fig. 3. Effects of Compd. 1—3 on Rectal Temperature in Mice

Data are presented at the dose of 250 mg (p.o.) as the mean $\pm$ S.E. from 4 mice.

a) 2/4 and b) 4/4 death in 21 h, c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$, e) $p < 0.001$. —○—, control; ---●---, compd. 1; ---□---, compd. 2, ---▲---, compd. 3.

41.6 ppm (CH) はしたがって文献 3,4) で報告された 9 位ではなく, 4 位の炭素の signal であると推定され, また 5 位 methine proton 2.11 ppm と 43.9 ppm (CH) の cross peak が観察されたことより, 43.9 ppm (CH) は文献記載の 4 位ではなく, 5 位の炭素に相当すると推定された. そこで, 5 位と帰属された 40.6 ppm (CH) の signal は 9 位の炭素に帰属されるが, このことは ^{13}C - ^1H COSY において 40.6 ppm の signal と cross peak の観察された 2.49 ppm (1H, d, 4.4) の signal は 9 位 methine と帰属して問題がなく, また, この 2.49 ppm の proton と ^1H - ^1H COSY において cross peak の観察された 5.13 ppm (1H, br s) は 11 位に帰属できる. よって, 4 位, 5 位, 9 位炭素の帰属はそれぞれ Table I に示すように訂正されるべきであると考えられる.

Compd. 1-3 のマウス正常体温下降活性 (Fig. 3) 及び致死毒性は, compd. 3 が最も強く, 250 mg/kg 経口投与において, 8 時間後までに体温を -5°C 下降させ, 翌日までに供試マウスのすべてを死亡させたが, 脂肪肝はこれらすべての化合物に見られた. Compd. 1-3 で観察された毒性発現の状況は *B. javanica* エキスで認められた症状と良く一致したことから, *B. javanica* の毒性はいくつかの quassinoid 類の寄与により生じたものと思われた.

実 験 の 部

実験材料 生薬は 1989 年インドネシアで市販されていたものを入手した.

使用機器 融点は柳本 Micro Melting Point Apparatus で測定した. UV: 日立 U-3400 型, IR: 日立 IR 260-10 型, ^1H 及び ^{13}C -NMR: 日本電子 GSX 400 FT-NMR を使用した.

実験動物 使用動物は静岡実験動物農業共同組合より購入した ddy 系雄性マウスを室温 $22-25^\circ\text{C}$ でオリエンタル固形飼料を与え, 水を自由に摂取させ, 体重 20-30 g (5 週齢) の状態で使用した.

正常体温下降作用 サンプルは 5% アラビアゴムあるいは Tween-80 を加え, 生理食塩水に懸濁して経口投与した. サンプルを投与するまでの間, マウスは絶食した. 直腸体温はサーミスター温度計 (芝浦電子) 及びサーモメーター (夏目製作所) で測定した. なお, 得られた各値の実験群と対照群間の比較には Student の *t* 検定を行った (*a*) $p < 0.05$, (*b*) $p < 0.01$, (*c*) $p < 0.001$).

活性成分の単離 *Brucea javanica* 乾燥果実 1.8 kg をメタノール ($2.5\text{ l} \times 3$) で室温下抽出し, エキス 96.8 g を得た (2 g/kg, -3.4°C^a , 5/5 死亡). 溶媒分配により, ヘキサン層 47.4 g (0.5 g/kg, -0.4°C , 0/4), 酢酸エチル層 6.4 g (0.5 g/kg, -2.1°C^b , 4/4), *n*-ブタノール層 24.2 g (0.5 g/kg, -3.3°C^c , 4/4), 水層 21.8 g (0.5 g/kg, -1.5°C^a , 2/4) の 4 画分に分画した. *n*-ブタノール層を Sephadex LH-20 (メタノール) でカラムクロマトグラフィーを行い, 活性画分 9.41 g (0.25 g/kg, -4.5°C^b , 3/4) を得た. 活性画分を再度カラムクロマトグラフィーで分画し, fr. A 2.84 g (0.25 g/kg, -2.4°C^a , 4/4), fr. B 0.74 g (0.25 g/kg, -1.7°C^b , 2/4), fr. C 2.88 g (0.25 g/kg, -2.2°C^b , 4/4), fr. D 0.93 g (0.25 g/kg, -2.5°C^b , 4/4), 及び fr. E 0.48 g (0.25 g/kg, -1.1°C , 1/4) を得た. Fr. A は更にフラッシュカラムクロマトグラフィー (Fuji gel CQ-3) により, 溶出溶媒としてクロロホルム-メタノール-水 (25/4/1 $\Rightarrow$ 20/4/1 $\Rightarrow$ 16/4/1) (下層) を用い, fr. A 375 mg, fr. B 642 mg, fr. C 186 mg を得, メタノール溶出で fr. D 670 mg を得た. Fr. A-C をそれぞれ MPLC (草野 CPO-HS-221-20) で分離し, メタノール-水 1/2 溶出画分より compd. 1 (132 mg), 1/2.2 溶出画分より, compd. 2 (77 mg) 及び compd. 3 (48 mg) と仮称した化合物を得た. Compd. 1 (bruceoside A) 白色粉末 (MeOH-benzene) mp $194.0-199^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25}$: $+10.0^\circ$ ($c=1.4$, MeOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 220 (1.65×10^4), 254 (7.71×10^3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3420, 1740, 1680, 1642. ^1H -NMR (pyr- d_5 , 50°C) δ : 1.15 (18- H_3 , d, 6.8), 1.63 (19- H_3 , s), 1.68 (4'- H_3 , d, 1.1), 1.68 (6-H),⁸⁾ 2.03 (6-H, d-like, 14.9), 2.13 (5'- H_3 , s), 2.11 (5-H),⁸⁾ 2.41 (4-H, m), 2.49 (9-H, d, 4.4), 3.74 (22- H_3 , s), 3.84-3.92 (14, 20, glc-H, m), 4.13-4.21 (glc- H_4 , m), 4.42 (glc-H, d, 11.4), 4.95 (7-H, br s), 5.04 (20-H, d, 7.3), 5.07 (12-H, br s), 5.13 (11-H, br s), 5.27 (glc-H, d, 7.3), 5.83 (2'-H, t-like, 1.3), 6.18 $\ddagger$ (11-OH, d, 4.0), 6.43 $\ddagger$ (glc-H, br s), 6.80 (15-H, br s), 6.89 $\ddagger$ (glc- H_2 , br s), 7.25 (1-H, s), 7.47 $\ddagger$ (glc-H, br s), 7.57 $\ddagger$ (12-OH, br s), $\ddagger$, 重水添加により消失. Compd. 2 (yadanzioside F) 白色粉末 (MeOH) mp $200-205^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{25}$: $+8.2^\circ$ ($c=1.1$, MeOH). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 255 (6.12×10^3). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450, 1740, 1680, 1630. ^1H -NMR (pyr- d_5 , 50°C) δ : 1.15 (18- H_3 , d, 6.7), 1.61 (19- H_3 , s), 1.67 (6-H, br t, 15.3), 2.01 (6-H, br d, 14.5), 2.04 (5-H),⁸⁾ 2.06 (2'- H_3 , s), 2.40 (4-H, dq, 12.9, 6.7), 2.45 (9-H, d, 4.8), 3.77 (22- H_3 , s), 3.82-3.86 (14, 20, glc-H, m), 4.11-4.19 (glc- H_4 , m), 4.41 (glc-H, br d, 11.6), 4.91 (7-H, br s), 5.02 (20-H, d, 7.3), 5.03 (12-H, br s), 5.09 (11-H, br s), 5.23 (glc-H, d, 7.4), 6.16 $\ddagger$ (11-OH, d, 4.4), 6.41 $\ddagger$ (glc-H, br s), 6.78 (15-H, br), 6.87 $\ddagger$ (glc- H_2 , br s), 7.21 (1-H, s), 7.46 $\ddagger$ (glc-H, br s), 7.59 $\ddagger$ (12-OH, br s), $\ddagger$, 重水添加により消失. Compd. 3 (bruceoside B) 白色粉

末 (MeOH), mp 220—223.5°C (dec). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 220, 254. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3400, 1730, 1650. $^1\text{H-NMR}$ (pyr- d_5 , 50°C) δ : 1.66 (19- H_3 , s), 1.68 (4'- H_3 , d, 1.0), 1.72 (6-H),⁸⁾ 2.01 (18- H_3 , d, 1.3), 2.13 (5'- H_3 , s), 2.25 (6-H, d, 14.6), 2.47 (9-H, d, 4.6), 2.47 (1-H, d, 16.2), 3.04 (5-H, br d, 12.8), 3.20 (1-H, d, 16.2), 3.74 (22- H_3 , s), 3.78 (glc-H, m), 3.86 (20-H, d, 7.2), 3.88 (14-H, br d, 10.8), 4.12—4.18 (glc- H_3 , m), 4.26 (glc-H, m), 4.36 (glc-H, br d, 11.8), 4.67 (11-H, br s), 4.96 (12-H),⁸⁾ 4.98 (7-H),⁸⁾ 5.02 (20-H, d, 7.3), 5.31 (glc-H, d, 7.2), 5.58 (glc-H, br s), 5.82 (2'-H, q-like, 1.0), 6.18 (11-OH, d, 5.0), 6.55 (glc-H, br s), 6.78 (15, glc-H, br s), 6.94 (glc-H, br s), 7.56 (12-OH, br s).

謝辞 生薬を提供して戴いた(株)インドネシア・エーザイ, 各種スペクトルを測定して戴いた千葉大学分析センターに感謝します.

引用文献及び注

- 1) 山崎幹夫, 奥山恵美, 松戸隆直, 高丸 健, 金子俊之, 薬誌, **107**, 914 (1987); M. Yamazaki, Y. Maebayashi, N. Iwase, T. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2070 (1988); *idem, ibid.*, **36**, 2075 (1988).
- 2) 張 耀徳, 中華医学雑誌, **37**, 480 (1951).
- 3) S. Yoshimura, T. Sakaki, M. Ishibashi, T. Tsuyuki, T. Takahashi, T. Honda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 2673 (1985).
- 4) T. Sakaki, S. Yoshimura, M. Ishibashi, T. Tsuyuki, T. Takahashi, T. Honda, T. Nakanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 2680 (1985).
- 5) これまで $^{13}\text{C-NMR}$ のデータの報告はないと思われる.
- 6) K. Lee, Y. Imakura, Y. Sumida, R.-Y. Wu, I. H. Hall, H.-C. Huang, *J. Org. Chem.*, **44**, 2180 (1979); 文献値の融点 (mp 175—180°C) より若干高いが, それぞれ amorphous powder のためかと思われる.
- 7) 動物実験に必要な量を確保するため, 完全な精製に至らないまま, 構造研究を行ったが, NMR において yadanzioside E によると思われる不純物の signal が一部に観察された.
- 8) 一部重複したため, 結合定数は明確でない.