

最小有効 IC50		国	現地名	学名	抽出部位
赤血球法	DPPH 法				
mg/mL	mg/mL				
10	0.05	Bolivia	Plant B	Plant B	leaves
30	0.5	Bolivia			leaves
100	10	Nepal	Pan ko jya	Piper betel Blanco	rhizome
100	0.5	Nepal	Sahajira	Carum carvi L.	seed
100		Brazil	Pata-de-vaca	Bauhinia forficata Link	leaves
100(30)		Peru	Guanabana	Annona muricata	leaves, stem
100	0.794	Myanmar	M-294-1	Phyllanthus emblica	leaves, stem
100	0.1	Myanmar	M-180	Phyllanthus emblica	bark
30	0.1	種子島	ネジトウガラシ	Helicteres isora L.	branch
10	0.16	種子島			branch
10	0.16	種子島			leaves
(0.3) <1	0.1	Nepal			
		Myanmar	PYNMA	Lagerstroemia speciosa (L.) Pers.	heart wood
30 (10)	0.32~	Peru	Kepishiri	Matsigenka word meaning "bitter" Shepard 1998	
>100		Peru	altamisa, Marco	Ambrosia peruviana	
		Peru	Yarina	Phytelephas sp.	seed
100	0.4	Peru	Ajo sacha	Mansoa alliacea	root
-100	3.2	Peru	Ajo sacha	Mansoa alliacea	leaves
10	0.079	Bolivia			(aerial roots)
100(30)	2	Arzentin		Capparis atamisquea	
>100	3.2~	種子島	ヒメキランソウ	Ajuga pygmaea A.Gray	whole plant
30 (10)		種子島	オニグルミ	Juglans ailantifolia Carriere	leaves
100		種子島	オニグルミ	Juglans ailantifolia Carriere	fruits
10*DMSO		種子島	オニグルミ	Juglans ailantifolia Carriere	wood (branch)

30		種子島	オイランアザミ	<i>Cirsium spinosum</i> Kitam.	leaves
>30	2	Myanmar		<i>Dendrobium</i>	
±30	0.14	Peru	OJE	<i>Ficus insipida</i> Willd.	leaves
±100	3.2	Peru	MITO	<i>Carica candicans</i> A. Gray	leaves
30	0.063	Peru	CHUCHUASI	<i>Maytenus ebenifolia</i>	bark
100	1	Peru	Tahuari	<i>Tebebuia serratifolia</i>	root
10		Peru	Tahuari	<i>Tebebuia serratifolia</i>	leaves
100(30)		Peru	Tahuari	<i>Tebebuia serratifolia</i>	branch

表1 赤血球法による外国産生薬の抗酸化活性

分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題；パキスタン産薬用植物からの抗リーシュマニア活性物質の分離研究

研究分担者 黒柳 正典 県立広島大学生命環境学部 教授  
研究協力者 渕野 裕之 医薬基盤研究所薬用植物資源センター栽培研究室長  
関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授  
代田 修 徳島文理大学香川薬学部 准教授  
安元（森）加奈未 徳島文理大学香川薬学部 助教

研究要旨 スクリーニングの結果、抗リーシュマニア活性が認められたパキスタン産の薬用植物 *Withania coagulans*, *Artemisia scoparia*, *Cousinia stoksii* から成分の分離精製を行い、それぞれの材料から多くの化合物を分離した。核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを中心とする各種スペクトルデータの詳細な解析を行い、その構造を決定した。その結果、その多くが新規化合物と推定された。特に *W. coagulans* から得られた新規ウイザノライド誘導体に強い活性が認められた。*A. scoparia* 及び *C. stoksii* から抗リーシュマニア活性を有する新規化合物を分離し、その構造を明らかにした。

#### A 研究目的

リーシュマニア症はアフリカ、南アメリカ、中東、アジア等の途上国を中心に感染が分布する深刻な疾病であり、世界中で1200万人の患者がいるといわれている。用いられている治療薬は効果が低く副作用があり、しかも高価なため、本疾病が広まっている途上国の貧しい人々が十分な治療を受けることが困難である。そこで、途上国の人々が利用可能な安価で有効な抗リーシュマニア治療薬開発の必要性が問われている。このような背景のもと、リーシュマニア治療薬のリード化合物供給を目的として、リーシュマニア感染地域で採取された植物素材から抗リーシュマニア活性物質の探索研究を行う事を目的として研究が始まった。そこで、リーシュマニア症流行地域で採集した植物から抗リーシ

ュマニア活性物質の分離構造決定を行った。活性を示したパキスタン産の薬用植物ナス科 *Withania coagulans*, キク科 *Artemisia scoparia*, キク科 *Cousinia stoksii* から成分分離を行い、得られた化合物については、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、質量分析 (MS) 等の分光学的手法を用いて構造解析を行い、分離化合物について抗リーシュマニア活性の測定を行った。

#### B 研究方法

##### 1 抽出と分離；

抗リーシュマニア活性物質の抽出分離は、図1に示すようにパキスタン産 *W. coagulans* の分離を例として示す。材料植物を粉末とし、メタノール (MeOH) を用いて還流抽出し、得られたメタノールエキスは、酢酸エチル

(AcOEt), ブタノール (*n*-BuOH) による分配操作により AcOEt 相、*n*-BuOH 相、水相の 3 つのフラクションに分けた。このうち AcOEt 相および *n*-BuOH 相に活性が認められた。特に AcOEt 相に強い活性が認められたことと、薄層クロマトグラフィー (TLC) による検討の結果、AcOEt 相に多数の成分の存在が示唆されたため、AcOEt 相の分離から始めた。AcOEt 相はクロロホルム (CHCl<sub>3</sub>)-MeOH 系溶媒を用い、順次極性を上げることにより、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、TLC の結果に従いまとめて、8 つのフラクション (Fr. 1 - Fr. 8) を得た。これらフラクションのうち、Fr. 6 に最も強い活性が認められ、しかもフラクションの量も最も多かったため、Fr. 6 について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相系 (ODS 及び C-8) カラムを用い、溶媒系としてアセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN)-水 (H<sub>2</sub>O) 系を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および分取 TLC (PLC) を丹念に繰り返すことにより成分の分離を行った。 *A. scopalia* についても、活性の高かった AcOEt 可溶フラクションについて同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC 等を繰り返すことよりの分離を行った。 *C. stoksii* についても同様の方法で成分分離を行った。

## 2、分離化合物の構造決定；

得られた化合物については質量分析 (HR-EI-MS、HR-FAB-MS、HR-ESI-MS) による分子式の決定を行った。核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR) スペクトル、二次元-NMR (H-H COSY、HMQC、HMBC) スペクトル、旋光度、紫外吸収 (UV) スペクトル、赤外 (IR) スペクトルの測定を行い、それらのデータを丹念に解析することにより構造を決定した。

## 3、得られた化合物の抗リーシュマニア活性の測定；

得られた化合物のうち、量的に十分な化合物については、リーシュマニア原虫 *Leishmania major* に対して抗リーシュマニア活性を測定した。

## C. 研究結果

### 1、抽出と分離；

パキスタン産薬用植物 *W. coagulans* の AcOEt 相をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl<sub>3</sub>-MeOH 系の溶媒を用い、MeOH の割合を増やすことにより極性を挙げて分離を行った。その結果 WC-1 ~ WC-8 の 8 のフラクションに分離を得た。このうち、特に活性が高くしかもフラクションの量が多い Fr. 6 (22.5 g) を逆相系カラムを用いた HPLC、分取 TLC を丹念に繰り返すことにより WC-1 ~ WC-12 と仮称した 12 種類の化合物純度の高い状態で得ることが出来た。

同様に分離を行い *A. scopalia* から AS-1 ~ AS-6 と仮称する 6 つの化合物を得た。また、同様に分離を行い、*C. stoksii* から CS-1 ~ CS-8 と仮称する 8 つの化合物を得た。

### 2、分離化合物の構造決定；

WC-1 ~ WC-12 の化合物のうち新規化合物である WC-3 は HR-ESI-MS において、*m/z* 486.2636 に分子イオン [M]<sup>+</sup> [Calcd. 486.2598 for C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>] が認められることから分子式を C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> と決定した。<sup>1</sup>H-NMR において、5 つのシングレットメチル基 [δ 1.29 (3H, s), 1.75 (3H, s), 1.86 (3H, s), 1.98 (3H, s), 2.00 (3H, s)] の存在、3 つのオレフィンプロトン [δ 5.61 (1H, d, J = 6.0 Hz), 5.99 (1H, dd, J = 10.2,

2.4 Hz), 6.67 (1H, dt,  $J = 10.2, 2.7$  Hz)], の存在が明らかになった。以上の結果と分子式から、高度に水酸化されたウィザノライド誘導体であることが推察された。 $^{13}\text{C-NMR}$  においても、28個の炭素の存在と、6つの二重結合炭素、5つのカービニール炭素、ラク톤のカルボニール基、二重結合に共役したカルボニール基の存在が明らかになった。このことから、WC-3が高度に水酸化されたウィザノライド誘導体であることを示している。WC-6のHMBCスペクトルを詳細に検討した結果図2に示すような相関が明らかになり構造を決定した。15位の水酸基の立体化学については、18位メチル基が異常に低磁場シフトしていること、D-環付近のNOE相関を丹念に検討することにより、15位の水酸基は $\beta$ -配置であることを明らかにした。以上に結果WC-3は14, 15, 17, 20位に水酸基を有する新規化合物であることを明らかにした。

同様に、新規化合物と考えられるWC-5はHR-FAB-MSにおいて、 $m/z$  487.2693に疑似分子イオン $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Calcd. 487.2699 for  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_7$ ) が認められることから、分子式は $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$ と決定した。 $^1\text{H-NMR}$  においては、シングレットメチル基が4本認められ、3に比べメチル基が1つ少なくなっている代わりに、ハイドロキシメチル基と考えられる低磁場シフトしたメチレン [ $\delta$  4.82 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 4.70 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz)] が認められることから、27位あるいは28位のどちらかのメチル基がハイドロキシメチル基に変化し、15位の水酸基がなくなった構造と推測された。 $^{13}\text{C-NMR}$  のデータもこのことを指示しており、最終的には図2に示したように、 $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, HMBC相関の丹念な検討により構造を決定した。*W. coagulans* から得られたそのほかの化合物についても

同様に各種スペクトルデータを詳細に解析することにより、図3に示すような構造と決定した。これらの化合物は、ナス科 *Withania* 属植物に特徴的な成分で、今回得られた化合物は1位にカルボニール基を有し、D-環部分及び20位に水酸基を有するウィザノライド誘導体で、その多くが新規化合物と考えられる。これら化合物について抗リーシュマニア活性を検討した結果、表1に示すような結果が得られ、WC-6, WC-9, WC-10, WC-11に一桁代の $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を示す強い活性が認められた。そのほかの化合物にも中程度の活性が認められた。

*Artemisia scopalia* から得られた化合物AS-1~AS-6についても同様に、各種スペクトルデータを詳細に解析することにより、それぞれ図4に示すような構造と決定した。特にAS-5は $^1\text{H-NMR}$  において3本のシングレットメチル [ $\delta$  1.32 (6H, s), 1.20 (3H, s)] と、1本のダブルットメチル [ $\delta$  0.98 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz)], ビニール基 [4.90 (1H, dd,  $J = 10.7, 1.7$  Hz), 5.11 (1H,  $J = 17.3, 1.7$  Hz), 5.83 (dd,  $J = 17.3, 10.7$  Hz)] の存在が明らかになり、分子式からセスキテルペンと考えられ、環状のセスキテルペンとは考え難いことから、各種スペクトルデータ、特に二次元NMR (HMQC, HMBC) スペクトルを詳細に検討した。その結果、図4に示すような比較的珍しい鎖状の構造を有するセスキテルペンであることが明らかになり、新規化合物と考えられる。AS-1は駆虫薬として知られている $\alpha$ -santoninであることが明らかになった。

得られた化合物について抗リーシュマニア活性を検討した結果、表2に示すような活性が得られた。駆虫薬として用いられているAS-1に活性を期待したが、残念ながらAS-1には活性が認められなかった。しかしながら鎖状のセス

キテルペン AS-5, オイデスマノライド誘導体と推定される AS-2, メトキシ化されたフラボン誘導体である AS-6 に強い活性が認められた。

*Cousinia stoksii* から得られた化合物についても同様に各種スペクトルデータを詳細に解析して構造を明らかにした。特に CS-4 は EI-MS から分子式が  $C_{21}H_{34}O_6$  と推定され、 $^1H$ -NMR スペクトルにおいて、三つのシングレットメチル基 [ $\delta$  1.22 (3H, s), 1.25 (3H, s), 2.06 (3H, s)], 2つのダブルレットメチル基 [ $\delta$  0.97 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz), 1.29 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz)], 二重結合上のホルミル基 [ $\delta$  9.96 (1H, s)] の存在が明らかになった。この他に糖のカルビニールプロトンと考えられるシグナルとアノメリックプロトンと思われるシグナル [ $\delta$  4.38 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz)] が認められることから、CS-4 はセスキテルペン誘導体の配糖体で、デオキシ糖が結合した構造と考えられ、アノメリックプロトンのカップリングコンスタントが大きいことから糖部分は *fuco*se であることが推測された。 $^{13}C$ -NMR スペクトルに於いても、CS-6 がセスキテルペンの *fuco*se 配糖体であることが支持された。二次元 NMR のデータを詳細に検討することにより、CS-4 はベチスピラン骨格の6員環部分が5員環となり、C1ユニットが環外に移動しホルミル基となった、2つの5員環がスピロ結合したユニークな構造であること、*fuco*se が11位の3級水酸基に結合した非常に興味ある構造であることが明らかとなった。CS-4 は新規化合物と考えられる。そのほかの化合物についても図5に示すような構造と決定した。CS-1, CS-2, CS-3 も新規化合物と推測される。本植物材料も  $\alpha$ -santinin が比較的主成分として得られた。

これら化合物について抗リーシュマニア活性を測定した結果。構造未決定の

二種類の化合物 (CS-7, CS-8) と CS-1 に強い抗リーシュマニア活性が認められた。

#### D 考察

*Withania coagulans* から20種あまりの化合物を分離したが、そのうち12の化合物について構造解析を行うことが出来た。その大部分が新規化合物であり、学問的にも価値のある成果と考えられる。更にその内のいくつかに比較的強い抗リーシュマニア活性が得られたことは大きな成果と考えられる。

*Artemisia scopalia* から得られた化合物の中にもいくつか新規と考えられるものが得られており、抗リーシュマニア活性の強いものが見つかっている。同様に *Cousinia stoksii* から構造上非常に珍しい新規化合物を含めいくつかの抗リーシュマニア活性物質が得られた。

#### E 結論

以上パキスタン産 *Withania coagulans*, *Artemisia scopalia*, *Cousinia stoksii* の抗リーシュマニア活性物質分離構造研究成果は多くの新規化合物と活性物質の分離構造決定に至り、非常に満足のいく結果であり、今年度の研究活動に於いて大きな成果が得られたものと考えられる。

#### F 健康危機情報

無し

#### G 研究発表

##### 1, 論文発表

A. Suzuki, O. Shirota, K. Mori, S. Sekita, H. Fuchino, A. Takano, M. Kuroyanagi; Leishmanicidal Active Constituents from Nepalese Medicinal Plant Tulsi (*Ocimum sanctum* L.), *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 245-251 (2009).

##### 2, 学会発表

無し

H 知的所有権の取得情報  
無し





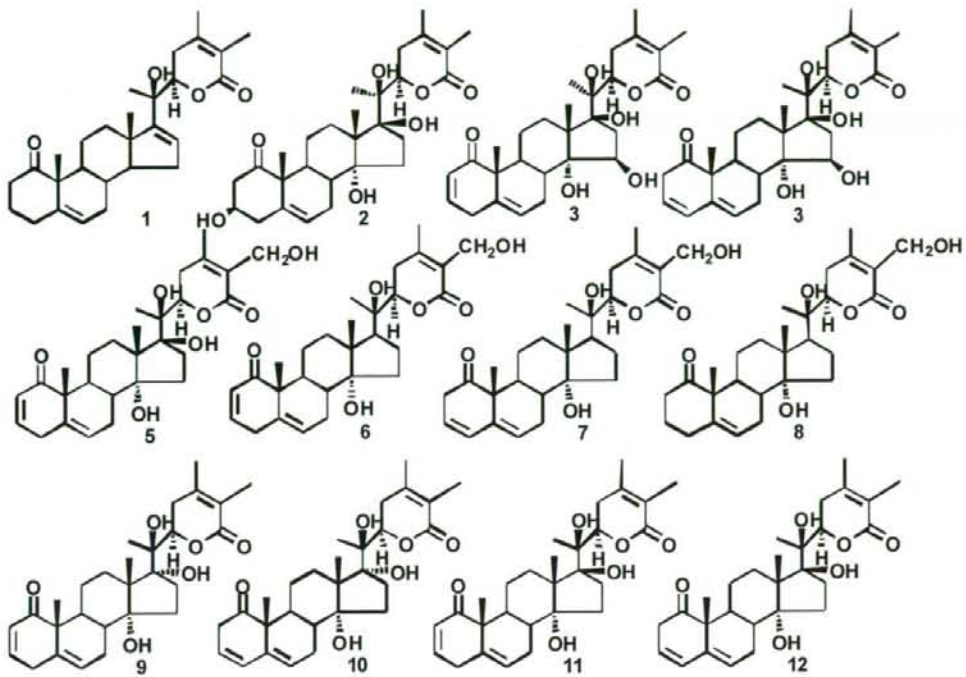


図3 *W. coagulans* から分離した化合物 (1 ~ 12)

表1 *W. coagulans* から分離した化合物の抗リーシュマニア活性

化合物名	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
WC-1	58.3
WC-2	33.2
WC-3	15.9
WC-4	ca50.0
WC-5	10.7
WC-6	4.7
WC-7	ca50
WC-8	19.9
WC-9	2.7
WC-10	9.4
WC-11	5.1
WC-12	35.0
Amphotericin B	0.04

活性は *Leishmania major* に対して行った。

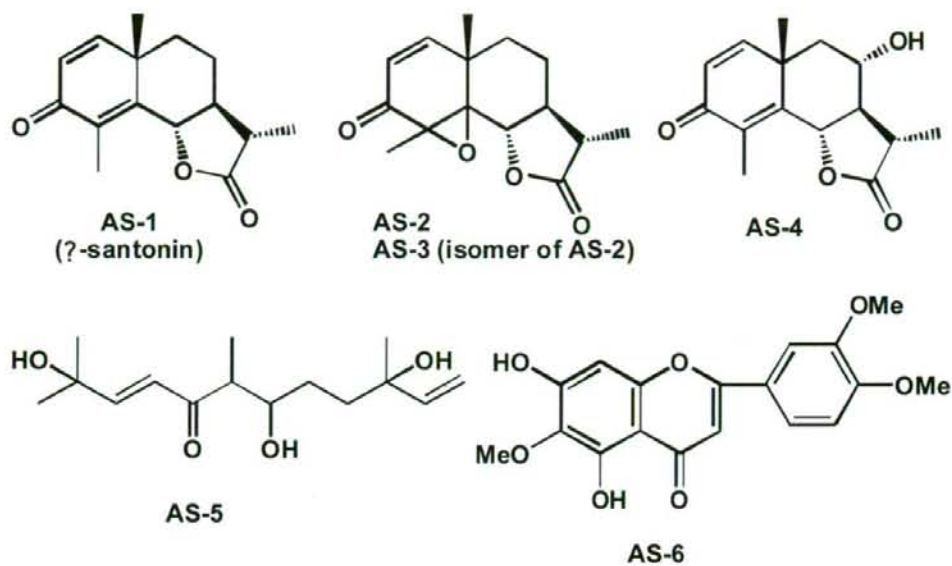


図4 *A. scopalia* から分離された化合物

表2 *A. scopalia* から分離した化合物の抗リーシュマニア活性

化合物名	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
AS-1	70.9
AS-2	4.1
AS-3	9.0
AS-4	55.2
AS-5	4.2
AS-6	2.5
Amphotericin B	0.04

活性は *Leishmania major* に対して行った。

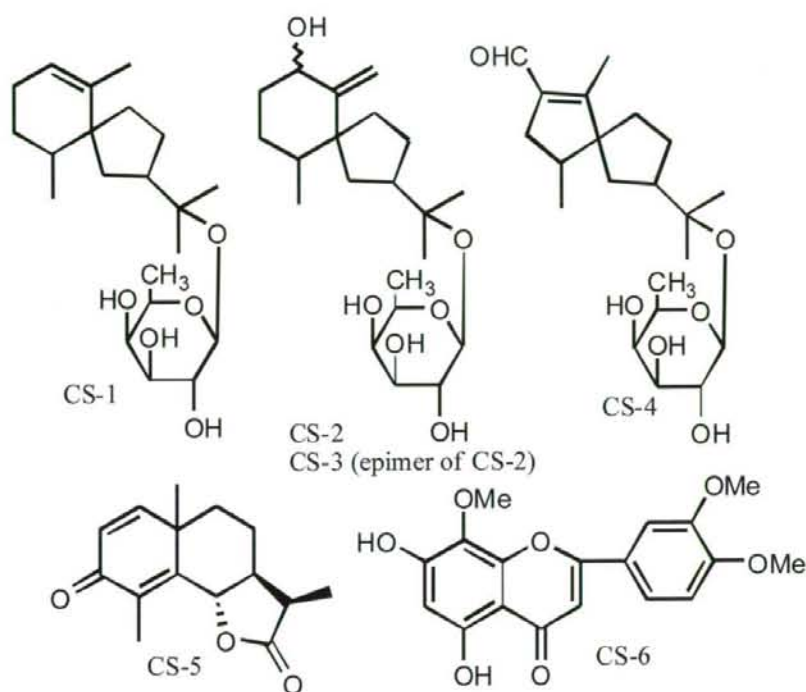


図5

表3 *C. stoksii* から分離した化合物の抗リーシュマニア活性

化合物名	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
CS-1	5.0
CS-2	48.3
CS-4	>100
CS-5	82.6
CS-7	3.6
CS-8	4.4
Amphotericin B	0.04

活性は *Leishmania major* に対して行った。

厚生労働省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告

天然植物資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題：国内産薬用植物における生物活性化合物の探索

研究分担者 細川 敬三 兵庫大学健康科学部教授

研究要旨

昨年度は、北海道（48科109種206サンプル）、関東（74科225種525サンプル）、種子島（112科327種557サンプル）の各地から植物計1,288サンプルを収集し、各種活性（グルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシン活性）を *in vitro* でスクリーニングを実施し、それぞれの活性について高活性を示す植物種を見出すことができた。本年度は、この中からメタボリックシンドロームのなかでも小腸からのデンプンの吸収に関係する $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示したコデマリ（花）に含まれる活性成分の単離・同定を実施した。コデマリの乾燥した花100gを50%メタノール水溶液で抽出後濃縮した。これを分配クロマトグラフィーにより得た酢酸エチル画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより活性画分を得た。この画分を更に分取 HPLC を2回行い活性成分として3成分を単離した。これら3成分は、NMR と MS による構造解析の結果、quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside, kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside, kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -glucoside であり、マルターゼ阻害活性の  $IC_{50}$  値は、それぞれ 0.085 mM、0.35 mM、0.47 mM で quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside が最も高い阻害活性を示した。

A. 研究目的

創薬資源としての薬用植物類の新規利用法の開発を目的とし、昨年度は、1,288種類の植物サンプルを収集し、各種活性（グルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシン活性）を *in vitro* でスクリーニングを実施してきた。特に、生活習慣病の予防に関係するグルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性などの活性については、活性成分を特定することにより、それら疾病の予防・治療薬等を目指したリード化合物を見出すことを目的に本申請課題に取り組んでいる。本年度は、昨年度実施した各種活性のスクリーニング結果に基づき、先ず、コデマリの花に含まれる $\alpha$ -

グルコシダーゼ阻害活性成分について単離・同定を実施した。

B. 研究方法

1) 抽出・単離方法

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で栽培されたコデマリの花を55-60℃で乾燥し、100gの乾燥花を調製した。これを50%メタノール水溶液で抽出後濃縮した。この粗抽出物を水-酢酸エチルで分配クロマトグラフィーを行い、水層と酢酸エチル層に分けた。活性の高かった酢酸エチル層を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム-メタノール系を使用）によりクロロホルム-メタノール(6:1(v/v))の移動層で最も高い活性画分を得た。この画分を更に分取

HPLC(Inertsil PREP-ODS, 20x 250 mm, 移動層アセトニトリル-水系を使用)を2回繰り返し、活性成分3成分を単離した。

## 2) $\alpha$ -グルコシダーゼ活性測定方法

$\alpha$ -グルコシダーゼは、市販のラット小腸 $\alpha$ -グルコシダーゼ (Sigma-Aldrich Japan) を用い、マルターゼ活性は 0.7 u/mL、スクラーゼ活性は 0.34 u/mL の酵素液を調製し使用した。この際、マルターゼ阻害活性の測定には基質としてマルトースを、スクラーゼ阻害活性の測定には基質としてショ糖を用いた。両者の活性測定は、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.3) に溶解した酵素液 (マルターゼでは 50  $\mu$ l、スクラーゼでは 200  $\mu$ l) と基質 (マルターゼでは 3.5mM マルトース 350  $\mu$ l、スクラーゼでは 56mM ショ糖 200  $\mu$ l) に活性測定用試料を 50%濃度のジメチルスルフォキシド水溶液に溶解したものを 100  $\mu$ l 加え全量を 500  $\mu$ l とし、37°C、15 分間反応させ、750  $\mu$ l の 2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を加え反応を停止した。この反応液をアルミナカラムを通してフェノール性成分を除去し、生成したブドウ糖量を Glucose B-test (和光純薬工業 (株)) を用いて測定した。

なお、単離過程における阻害活性の測定は、植物試料 0.1g を 1 mL に溶解させたのに相当する量を反応液に加えて測定を行った。

## 3) 機器分析

単離した成分の化学構造の決定は、機器分析(主に NMR と MS)により行った。NMR の測定には Bruker AMX ( $^1\text{H}$ , 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz) を、MS の測定には JEOL SX102A により測定を行った。NMR では、単離成分を methanol- $d_4$  に溶解して、 $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) と  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) の測定を行った。MS は FAB-MS により解析を行った。

## C. 研究結果

コデマリの花では、マルターゼ阻害活性が 91% と高い活性を示したので、コデマリの花から活性成分を単離・同定することとした。

コデマリの花から各種クロマトグラフィーによりマルターゼ阻害活性を持つ3成分 (1; 33 mg, 2; 26 mg, 3; 29 mg) を単離することができた。これらの成分は、NMR と MS による解析により化学構造を決定し

た。そのスペクトルデータは以下の通りである。

### *Quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside (1)*

FD-MS  $m/z$  626 ( $[\text{M}]^+$ ), 464 (M-162), 302 (M-162 x 2); FAB-HR-MS (negative)  $m/z$  625.1185 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ),  $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{15}$  の分子量計算値は 625.1193;  $^1\text{H}$ -NMR と  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルデータは Table 1 に示した。

### *Kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside (2)*

FD-MS  $m/z$  611 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 448 (M-162), 286 (M-162 x 2); FAB-HR-MS  $m/z$  611.1423,  $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{O}_{14}$  の分子量計算値は 611.1400;  $^1\text{H}$ -NMR と  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルデータは Table 1 に示した。

### *Kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -glucoside (3)*

FD-MS  $m/z$  611 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 448 (M-162), 286 (M-162 x 2); FAB-HR-MS  $m/z$  611.1397,  $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{O}_{14}$  の分子量計算値は 611.1400;  $^1\text{H}$ -NMR と  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルデータは Table 1 に示した。

これら3成分のマルターゼ阻害活性の  $\text{IC}_{50}$  値

は、それぞれ 0.085 mM, 0.35 mM, 0.47 mM で化合物 1 が最も高い阻害活性を示した。

## D. 考察

今回単離した3種類のフラボノールの中で化合物 1 が最も高い阻害活性を示したのは、化合物 1 が分子内にカフェイル基(糖に結合したコーヒー酸と B/C 環)が2個存在するためであると考えられる。これまでに caffeoylquinic acid 類においてコーヒー酸残基の数が1から3個のものの $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性はコーヒー酸残基の数が多いほど活性が強いことが知られており、この構造活性相関と同じ傾向を示した。

## E. 結論

コデマリの花からマルターゼ阻害活性成分としてアシル基としてコーヒー酸を持つ

フラボノイド3成分 quercetin 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside、kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -galactoside と kaempferol 3-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -glucoside を見出した。これらのマルターゼ阻害活性の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 0.085 mM、0.35 mM、0.47 mM でアグリコンとして quercetin を含む成分が最も高い阻害活性を示した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

Yosida, K., A. Hishida, O. Iida, K. Hosokawa, J. Kawabata (2008) Flavonol caffeoylglycosides as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Spiraea cantoniensis* flower. Journal of Agricultural FOOD Chemistry, 56(12), 4367-4371.

##### 2) 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権

##### 1) 特許取得

該当なし

##### 2) 実用新案登録

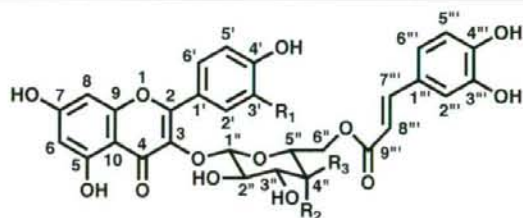
該当なし

##### 3) その他

該当なし

表 1. 化合物 **1-3** の NMR スペクトルの帰属

	$\delta_c$ , ppm			$\delta_H$ , ppm (mult, J in Hz)		
	1	2	3	1	2	3
2	158.4	159.2	159.4			
3	135.6	135.6	135.2			
4	179.1	179.6	179.4			
5	162.6	162.9	162.9			
6	99.7	100.1	100.1	6.26(d, 2.1)	6.14(d, 1.7)	6.14(d, 2.0)
7	165.2	166.2	166.0			
8	94.7	94.9	94.9	6.51(d, 2.1)	6.32(d, 1.7)	6.31(d, 2.0)
9	157.9	158.5	158.4			
10	105.3	105.5	105.6			
1'	122.7	122.6	122.7			
2'	117.4	132.3	132.2	7.87(d, 2.2)	8.05(d, 9.0)	7.98(d, 8.9)
3'	145.3	116.2	116.1		6.84(d, 9.0)	6.81(d, 8.9)
4'	149.3	161.6	161.5			
5'	115.7	116.2	116.1	6.92(d, 8.5)	6.84(d, 9.0)	6.81(d, 8.9)
6'	123.2	132.3	132.2	7.70(dd, 8.5, 2.2)	8.05(d, 9.0)	7.98(d, 8.9)
1''	105.3	105.2	104.1	5.22(d, 7.9)	5.07(d, 7.9)	5.20(d, 7.4)
2''	72.5	72.9	75.8	3.83(dd, 9.6, 7.9)	3.80(dd, 9.9, 7.9)	3.47(m)
3''	74.6	74.9	78.0	3.66(dd, 9.6, 3.3)	3.56(dd, 9.9, 3.3)	3.47(m)
4''	69.5	70.2	71.7	3.90(dd, 3.3, 1.2)	3.80(dd, 3.3, 1.5)	3.34(m)
5''	74.2	74.8	75.7	3.81(ddd, 7.1, 4.9, 1.2)	3.73(ddd, 8.0, 4.4, 1.5)	3.44(m)
6''	63.8	64.3	64.3	4.21(dd, 11.9, 7.1)	4.12(dd, 11.3, 8.0)	4.18(dd, 11.9, 6.7)
				4.26(dd, 11.9, 4.9)	4.32(dd, 11.3, 4.4)	4.28(dd, 11.9, 2.2)
1'''	127.5	127.7	127.7			
2'''	115.1	115.2	115.2	7.10(d, 2.0)	6.92(d, 1.6)	6.95(d, 1.7)
3'''	146.2	147.0	147.0			
4'''	148.7	149.5	149.5			
5'''	116.3	116.5	116.5	6.85(d, 8.1)	6.76(d, 8.1)	6.76(d, 8.4)
6'''	122.7	123.0	123.1	6.88(dd, 8.1, 2.0)	6.76(dd, 8.1, 1.6)	6.79(dd, 8.4, 1.7)
7'''	145.9	146.7	146.7	7.37(d, 16.0)	7.32(d, 16.0)	7.34(d, 15.8)
8'''	115.1	114.6	114.7	6.08(d, 16.0)	6.00(d, 16.0)	6.03(d, 15.8)
9'''	167.2	168.8	168.9			



- 1: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H**  
**2: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H**  
**3: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH**

Antileishmanial Compounds from *Cordia fragrantissima* Collected in Burma (Myanmar)

Kanami Mori,<sup>†</sup> Marii Kawano,<sup>‡</sup> Hiroyuki Fuchino,<sup>§</sup> Takashi Ooi,<sup>⊥</sup> Motoyoshi Satake,<sup>||</sup> Yutaka Agatsuma,<sup>||</sup> Takenori Kusumi,<sup>⊥</sup> and Setsuko Sekita<sup>\*†</sup>

Faculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University, Sanuki, Kagawa 769-2193, Japan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai International University, Togane, Chiba 283-8555, Japan, Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaragi 305-0843, Japan, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8505, Japan, and Institute of Environmental Science and Life, Ochanomizu University, Bunkyo, Tokyo 112-8610, Japan

Received May 7, 2007

A methanol extract of the wood of *Cordia fragrantissima*, collected in Burma (Myanmar), was found to exhibit significant activity against *Leishmania major*. Bioassay-guided fractionation of this extract using several chromatographic techniques afforded three new compounds (1–3) and five known compounds (4–8). The structures of the new compounds were revealed on the basis of spectroscopic data interpretation and by X-ray crystallographic analysis. Interestingly, the new compounds, despite the presence of asymmetric carbons, were found to be racemates. The activities of the isolates from *C. fragrantissima* and several derivatives were evaluated against the promastigote forms of *Leishmania major*, *L. panamensis*, and *L. guyanensis*.

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoal species of the genus *Leishmania*, of which over 20 are known to be pathogenic to humans.<sup>1</sup> *Leishmania* spp. are all transmitted by small biting sandflies (*Phlebotomus* spp.). Twelve million people in 88 countries are afflicted by this disease.<sup>2</sup> *Leishmania major*, the causative agent of cutaneous leishmaniasis, is a digenetic parasite that exists as an extracellular promastigote within the insect vector, and as a nonmotile intracellular amastigote within the phagolysosome of macrophages and other cells of the reticuloendothelial system of the mammalian host.<sup>3</sup> Pentavalent antimonials are currently used for basic treatment of the disease, but these drugs are extremely toxic and generally expensive.<sup>4</sup> More economical and less toxic drugs seem to be necessary.

As part of a search for plant compounds that are active against *Leishmania* spp., it was found that a methanol extract of the wood of *Cordia fragrantissima* Kurz. (Boraginaceae), a plant from Burma (Myanmar), exhibited significant *in vitro* antileishmanial activity. This report deals with the isolation and structural determination of the active antileishmanial components of this plant and the activity of their derivatives of these naturally occurring compounds.

## Results and Discussion

In a preliminary screening, a methanol extract of the wood of *C. fragrantissima* (local name "Sandawa"), used in Burma (Myanmar) for making furniture, was found to exhibit potent activity against *Leishmania major* [MLC (minimum lethal concentration): 25 µg/mL; MIC (minimum inhibitory concentration): 12.5 µg/mL].<sup>5</sup> Although secondary metabolites of other *Cordia* species such as *C. alliodora* and *C. multispicata* have been investigated previously,<sup>6–12</sup> the chemical composition of *C. fragrantissima* has not yet been reported.

Timber from *C. fragrantissima* was shaved, and the collected flakes were extracted with methanol. Bioassay-guided (*in vitro* leishmanicidal assay using *L. major*) fractionation of the methanol extract was performed by reversed-phase flash column chromatography, medium-pressure liquid chromatography (MPLC), and

\* Corresponding author. Tel: +81-87-894-5111. Fax: +81-87-894-0181. E-mail: sekita@kph.bunri-u.ac.jp.

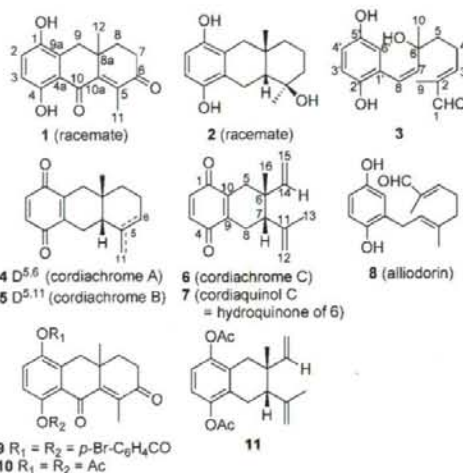
<sup>†</sup> Tokushima Bunri University.

<sup>‡</sup> Josai International University.

<sup>§</sup> National Institute of Biomedical Innovation.

<sup>⊥</sup> The University of Tokushima Graduate School.

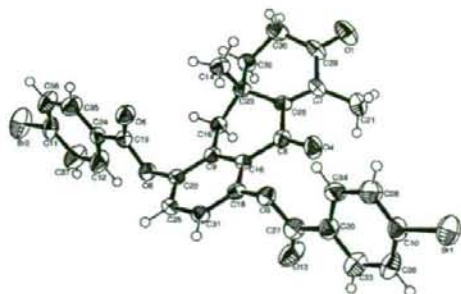
<sup>||</sup> Ochanomizu University.



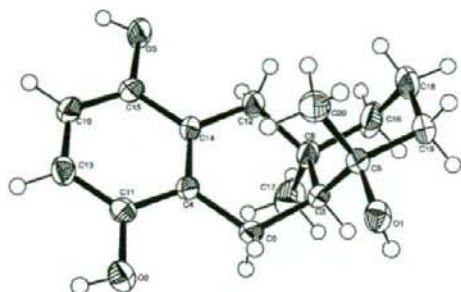
HPLC, yielding three new compounds, 1–3, and five known compounds, cordiachromes A (4),<sup>13,14</sup> B (5),<sup>13,14</sup> and C (6),<sup>11</sup> cordiaquinol C (7),<sup>8</sup> and alliodorin (8).<sup>7</sup>

Compound 1 was obtained as a yellow, amorphous solid. Its molecular formula was established as C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> by ESITOFMS (observed *m/z* 271.0952, calculated 271.0970, [M – H]<sup>–</sup>). The 16 carbon signals present in the <sup>13</sup>C NMR spectrum were characterized by DEPT-90 and 135 spectra as two carbonyls [δ 195.8 (C-10), 199.6 (C-6)], two olefinic carbons [δ 138.8 (C-5), 150.1 (C-10a)], and four aromatic quaternary carbons [δ 117.3 (C-9a), 125.8 (C-4a), 144.8 (C-1), 157.6 (C-4)], as well as two aromatic methines [δ 116.1 (C-2), 125.2 (C-3)], three methylenes [δ 33.7 (C-7), 36.2 (C-8), 37.6 (C-9)], an sp<sup>3</sup>-quaternary carbon [δ 37.8 (C-8a)], and two methyl carbons [δ 13.5 (C-11), 23.9 (C-12)]. The <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of all hydrogenated carbons were assigned unambiguously using the HSQC spectrum. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of 1 (CDCl<sub>3</sub>) showed signals for two methyl groups at δ 1.25 (3H, s, H-12) and 2.12 (3H, s, H-11), two aromatic proton signals at δ 6.77 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-3) and 7.01 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-2), and four signals due to methylene protons at δ 2.08 (2H, t, *J* = 5.6 Hz, H-8), 2.61 (2H, t, *J* = 5.6 Hz, H-7), 2.82 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-9b), and 3.06 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-9a). Complete elucidation





**Figure 1.** ORTEP drawing of **9**, the di-*p*-bromobenzoate derivative of **1**, as determined by X-ray analysis. Only one form of the racemate is shown.



**Figure 2.** ORTEP drawing of **2** as determined by X-ray analysis. Only one form of the racemate is shown.

of the structure of **1** was achieved on the basis of HMBC correlations.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : Me-11/C-5, C-6, and C-10a; Me-12/C-8, C-9, and C-10a; H-7/C-8; H-8/C-7 and C-8a; H-9/C-1, C-4a, C-9a, and C-10a; H-2/C-1, C-4, and C-9a; H-3/C-4 and C-4a. In this way, a tricyclic structure including a hydroquinone moiety was established.

Compound **1** has an asymmetric carbon at position C-8a. In an attempt to elucidate its absolute configuration, **1** was converted to the di-*p*-bromobenzoate (**9**, obtained as yellow crystals) by addition of *p*-bromobenzoyl chloride in pyridine. An X-ray crystallographic analysis of **9** (Figure 1) confirmed the structure of **1**. Surprisingly, this work revealed that **9** exists as a racemate (space group  $P\bar{1}$ ), which explained its optical sign:  $[\alpha]_D -0.25$  ( $c$  0.13,  $\text{CHCl}_3$ ). On acetylation under the usual conditions, compound **1** formed a diacetate derivative (**10**).

Compound **2**,  $[\alpha]_D -0.84$  ( $c$  0.31, MeOH), was obtained as pale pink crystals. Its molecular formula,  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , determined by ESITOFMS (observed  $m/z$  285.1439, calculated 285.1467,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ), implied that this compound might be an analogue of **1**. This turned out to be the case; compound **2** was found to contain a *p*-hydroquinone moiety [ $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  112.3 (d), 112.5 (d), 125.0 (s), 125.2 (s), 148.7 (s), 149.1 (s)] and two methyl groups [ $^1\text{H}$ :  $\delta$  0.92 (3H, s), 1.02 (3H, s)]. Although no carbonyls ( $^{13}\text{C}$ ) were evident in **2**, a quaternary oxygenated carbon ( $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  74.0) was present. The planar structure of **2** was elucidated by integrated analysis of the 1D and 2D NMR spectra. The following HMBC correlations were observed: Me-11 ( $\delta$  0.92)/C-5, C-6, and C-10a; Me-12 ( $\delta$  1.02)/C-8, C-9, C-8a, and C-10a; H-6 ( $\delta$  1.51)/C-5 and C-10a; H-7 ( $\delta$  1.69)/C-5 and C-8a; H-9 ( $\delta$  1.42)/C-12 and C-8a; H-8 ( $\delta$  2.27)/C-12, C-8a, and C-10a; H-10 ( $\delta$  3.18)/C-5, C-8a, and C-10a; H-10a ( $\delta$  1.65)/C-5, C-9, C-10, C-11, C-12, and C-8a; H-2 and H-3 ( $\delta$  6.47; overlapped)/C-1 and C-4, C-4a, and C-9a. The structure and relative configuration of **2** were eventually established by X-ray crystallography (Figure 2). Again the X-ray analysis indicated that compound **2** exists as a racemate (space group  $Cc$ ), which is consistent with its small optical rotation value. The structures of

compounds **1** and **2** are closely related to those of **4** and **5**, containing a benzocejejerene skeleton (terpenoid benzoquinone), which have been isolated from other *Cordia* plants.<sup>14</sup> The present results represent the first examples of X-ray analysis of benzocejejerene-type compounds. The monomethyl ether of **2** at the C-4 hydroxy group was obtained previously by acid treatment of a mushroom component.<sup>15</sup>

Compound **3**,  $[\alpha]_D -1.80$  ( $c$  0.11,  $\text{CHCl}_3$ ),  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_4$  (observed  $m/z$  281.1151, calculated 281.1154,  $[\text{M} + \text{Na} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ) (ESITOFMS), was obtained as a pale yellow, amorphous solid. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **3** ( $\text{CDCl}_3$ ) showed signals similar to those of compounds **1** and **2**, with two aromatic proton signals at  $\delta$  6.53 (2H, overlapped), together with a new aromatic proton signal at  $\delta$  6.47 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), suggesting the presence of a monosubstituted *p*-hydroquinone moiety. The presence of the *p*-hydroquinone moiety was evident from the carbon signals at  $\delta$  113.8 (d), 116.2 (d), 116.5 (d), 122.9 (s), 147.2 (s), and 150.9 (s), which confirmed that the *p*-hydroquinone group is monosubstituted.

Together with this moiety, the presence of the following groups was deduced from the NMR data ( $^1\text{H}$ ;  $^{13}\text{C}$ ): an aldehyde [ $\delta$  9.30 (1H, s);  $\delta$  197.2 (d) (C-1)], an olefin [ $\delta$  6.61 (1H, tq,  $J = 7.8, 1.3$  Hz);  $\delta$  140.3 (C-2) and 157.0 (C-3)] conjugated with the aldehyde, another olefin [ $\delta$  5.64 and 6.33 (AB pattern,  $J_{AB} = 10.0$  Hz);  $\delta$  124.5 (C-8) and 131.0 (C-7)], a methylene [ $\delta$  2.51 (2H, q,  $J = 8.0$  Hz);  $\delta$  25.2 (C-4)], another methylene [ $\delta$  1.48 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz);  $\delta$  40.3 (C-5)], two quaternary methyls [ $\delta$  1.36 (3H, s) and 1.64 (3H, d,  $J = 1.3$  Hz);  $\delta$  9.0 (C-9) and 26.5 (C-10)], and a quaternary carbon bearing an oxygen ( $\delta$  78.9). COSY correlations between the proton signals at H-3 ( $\delta$  6.61), H-4 (2H,  $\delta$  2.51), and H-5 (2H,  $\delta$  1.48) and between H-7 ( $\delta$  5.64) and H-8 ( $\delta$  6.33) allowed partial elucidation of the structure. Complete elucidation of this structure was achieved by an HMBC experiment.  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ : H-1/C-2; H-3/C-9; H-4/C-3; H-5/C-4 and C-6; H-7/C-1'; H-8/C-6, C-2', and C-6'; Me-9/C-2 and C-3; Me-10/C-6 and C-7; H-3'/C-5'; H-4'/C-5'. The structure of **3** is related to that of alliodorin (**8**). The small  $[\alpha]_D$  value of **3** suggests that this compound may also exist as a racemate.

Of the known compounds isolated in the present investigation, **4–7** have asymmetric carbons. These compounds have been obtained previously from other *Cordia* species.<sup>7,8,11,13,14</sup> Since the  $[\alpha]_D$  values of **4–7** (>99% pure by HPLC), which were obtained in this study, are all small ( $-0.26$ ,  $-1.06$ ,  $-1.06$ , and  $+0.02$ , respectively), they may be racemates, as in the case of compounds **1–3**. The  $[\alpha]_D$  value reported for **6** is  $-1.11$ ,<sup>11</sup> although the values of **4**, **5**, and **7** have not been reported.

The possible biosynthetic pathway<sup>16</sup> of the compounds obtained by this work is outlined in Figure S1, Supporting Information. Geranylhydroquinone (**a**) is oxidized to **b**, a precursor of **3** and **8**, the cyclization of which gives rise to a bicyclic diene (**c**). Cope rearrangement of **c** [**Cope**] gives rise to a diene (**d**), which produces **6** and **7**. On the other hand, an ene-reaction of **c** [**e**(**Ene**)] would result in a tricyclic compound (**e**), a precursor of **1**, **2**, **4**, and **5**. The fact that an achiral precursor (**e**) is an intermediate in these reactions explains why compounds **1**, **2**, and **4–7** were obtained as racemates.

The activities of the new compounds (**1–3**) and the known compounds (**4–8**), together with some synthetic derivatives (**9–11**), were tested against the promastigote form of *Leishmania major*, *L. panamensis*, and *L. guyanensis*. All the tested samples exhibited leishmanicidal activity with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 1.4 to 81.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Table 1). *Leishmania guyanensis* and *L. panamensis* seem to be more sensitive to these compounds than *L. major*, which is the easiest to handle (giving rapid and stable growth) and was used in the bioassay-guided isolation. In the *L. major* assay, **2**, **4**, **5**, **7**, **8**, and **11** showed good activity (1.4–7.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The presence of a tricyclic framework or benzoquinone or hydroquinone functionality does not seem essential for leishmanicidal activity. No significant difference of the activities between natural (**1–8**) and synthetic

**Table 1.** In Vitro Leishmanicidal Activity and Cytotoxicity of Compounds 1–11

compd	IC <sub>50</sub> (μg/mL)			IC <sub>50</sub> ± SD (μg/mL; μM) <sup>d</sup>	
	L major	L guyanensis	L panamensis	COS-7	HuH-7
1	81.4	7.0	13.0	51.7 ± 0.8	71.8 ± 1.7
2	2.7	3.0	1.8	>100	41.7 ± 1.2
3	>25	NT <sup>a</sup>	NT	>100	>100
4	4.1	NT	NT	22.5 ± 0.3	61.1 ± 3.2
5	2.5	NT	NT	14.6 ± 0.3	71.5 ± 0.3
6	21.1	6.0	5.5	NT	NT
7	4.5	NT	NT	NT	NT
8	7.0	2.0	1.8	31.9 ± 7.2	44.8 ± 1.2
9	23.5	NT	NT	>100	>100
10	80.4	NT	NT	50.7 ± 0.7	65.5 ± 1.7
11	1.4	NT	NT	20.1 ± 0.3	69.9 ± 1.9
AmB <sup>b</sup>	<0.1	<0.1	<0.1		
MG132 <sup>c</sup>				<10	<10

<sup>a</sup> NT = not tested. <sup>b</sup> AmB = amphotericin B. Positive control for antileishmanial assay. <sup>c</sup> Positive control for cytotoxicity assay. <sup>d</sup> Concentration in μg/mL for compounds 1–11 and AmB, and μM for MG132.

(9–11) compounds was found. The cytotoxicities of 1–5 and 8–11 were tested against COS-7 (African green monkey kidney cells, epithelial-like) and HuH-7 (human liver cancer cells, epithelial-like) cells (Table 1). None of these compounds was cytotoxic.

### Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Optical rotations were taken on a JASCO 1010 polarimeter. IR spectra were measured on a JASCO FT/IR-6300 spectrophotometer. UV spectra were taken on a JASCO International V-530 spectrophotometer. The 1D and 2D NMR spectra were obtained on Bruker AVANCE 400 MHz, 700 MHz, and Varian Unity INOVA 500 MHz spectrometers. ESITOFMS were measured on a JASCO International Q-TOF Micro mass spectrometer. For MPLC, reversed-phase material (Ultrapak, Yamazen Co., Ltd.) was used. ODS-flash column chromatography was carried out on Cosmosil C<sub>18</sub> (Nakalai Tesque Co., Ltd.). For high-performance liquid chromatography (HPLC), columns of Shisecid Capcell pak C<sub>18</sub> MG 5 μm, 20 × 250 mm, and C<sub>18</sub> UG120 5 μm, 10 × 250 mm, Waters XTerra MS C<sub>18</sub> 5 μm, 20 × 150 mm, Atlantis dC<sub>18</sub> 5 μm, 20 × 100 mm, and Intact Unison UK-C<sub>18</sub> 3 μm, 10 × 250 mm, and the HPLC system of JASCO Co., Ltd., were used. TLC was conducted on precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) and/or RP-18 F<sub>254</sub> (Merck), and the spots were detected by heating after spraying with *p*-methoxybenzaldehyde–H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent.

**Plant Material.** The wood of *Cordia fragrantissima* was produced and kindly donated by the Ministry of Forestry of Myanmar in November 2004 and identified by Dr. Nyan Tun, taxonomist at the Institute of Forestry, Forest Department, Ministry of Forestry, Union Myanmar, where voucher specimens are deposited (accession number: 2.17-1b/cu. ft. 50).

**Extraction and Isolation.** The shaved timber of *C. fragrantissima* (850 g) was soaked in MeOH and extracted at 40 °C for 4 h three times. The MeOH extract was concentrated under reduced pressure to give a residue (70 g). The residue was treated with H<sub>2</sub>O. The resultant aqueous suspension was partitioned with ethyl acetate. The EtOAc extract (64 g) was partitioned between hexane (18 g) and 90% MeOH (36 g). A part of the hexane extract (4.7 g) was subjected to silica gel column chromatography eluting with hexane–EtOAc (98:2 to 6:4) to give 10 fractions (Frs. 1–10). One third of fraction 4 (42 mg) was purified by recycle-HPLC [MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (95:5)] to afford cordiachrome A (4) (3 mg), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –0.26 (c 0.16, MeOH), cordiachrome B (5) (7 mg), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –1.06 (c 0.16, MeOH), and cordiachrome C (6) (5 mg), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –1.06 (c 0.19, MeOH) [lit. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –1.11 (c 0.27, CHCl<sub>3</sub>)].<sup>11</sup> One third of the 90% MeOH extract (26 g) was subjected to ODS-flash column chromatography, eluting with MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (3:7 to 9:1), to give five fractions (Frs. 1–1–1–5). Fraction 1-2 (1.0 g) was applied to ODS-flash column chromatography with MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (1:1) to give five fractions (Frs. 2-1–2–5). One third of fraction 2-2 (100 mg) was purified by HPLC [MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (1:1)] to afford a new hydroquinone, cordiaquinol J (2, 3 mg). One third of the fraction 2-4 (55 mg) was purified by HPLC

[MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (1:1)] to afford alliodorin (8) (3 mg). Fraction 2-5 (115 mg), mainly consisting of 8, was also purified in a similar manner. Fraction 1-3 (2.1 g) was purified by MPLC with MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (7:3) to give three fractions (Frs. 3-1–3-3). Fraction 3-2 (467 mg) was purified by preparative HPLC with MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (1:1) to give eight fractions (Frs. 4-1–4-8). Fractions 4-4 and 4-6 constituted a new hydroquinone, cordiaquinol I (1, 60 mg), and cordiaquinol C (7) (648 mg), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +0.02 (c 0.19, MeOH), respectively, in pure states. One third of fraction 4-2 (11 mg) was purified by preparative HPLC with MeOH–distilled H<sub>2</sub>O (6:4) to afford a new hydroquinone aldehyde, cordiaquinol K (3, 2 mg).

**Cordiaquinol I (1):** yellow, amorphous solid; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +0.82 (c 0.36, CHCl<sub>3</sub>); IR ν<sub>max</sub> (NaCl) 1683, 1670 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 294 (3.86 nm); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.13 (1H, s, OH-4, hydrogen-bonded with C=O-10), 7.01 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-2), 6.77 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-3), 3.06 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9a), 2.82 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9b), 2.61 (2H, t, J = 5.6 Hz, H-7), 2.12 (3H, s, Me-11), 2.08 (2H, t, J = 5.6 Hz, H-8), 1.25 (3H, s, Me-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.6 (C-6), 195.8 (C-10), 157.6 (C-4), 150.1 (C-10a), 144.8 (C-1), 138.8 (C-5), 125.8 (C-4a), 125.2 (C-3), 117.3 (C-9a), 116.1 (C-2), 37.8 (C-8a), 37.6 (C-9), 36.2 (C-8), 33.7 (C-7), 23.9 (C-12), 13.5 (C-11); HRESITOFMS (negative) *m/z* 271.0952 [M – H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>, 271.0970).

**Cordiaquinol J (2):** pale pink crystals; mp 205–208 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –0.84 (c 0.31, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 294 (4.02 nm); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.47 (2H, ABq, J = 9.2 Hz, H-2, H-3), 3.18 (1H, d, J = 19.1 Hz, H-10eq), 2.68 (1H, d, J = 17.6 Hz, H-9eq), 2.63 (1H, dd, J = 7.8, 19.1 Hz, H-10ax), 2.27 (1H, d, J = 19.1 Hz, H-9ax), 1.74 (1H, m, H-6), 1.69 (2H, m, H-7), 1.65 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-10a), 1.62 (1H, m, H-8), 1.51 (1H, dt, J = 4.5 and 12.0 Hz, H-6), 1.42 (1H, dt, J = 5.2 and 12.6 Hz, H-8), 1.02 (3H, s, Me-12), 0.92 (3H, s, Me-11); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 149.1 (C-1), 148.7 (C-4), 125.2 (C-9a), 125.0 (C-4a), 112.5 (C-2), 112.3 (C-3), 74.0 (C-5), 50.1 (C-10a), 43.5 (C-6), 40.7 (C-8), 33.4 (C-8a), 32.6 (C-9), 31.6 (C-12), 22.8 (C-11), 21.7 (C-10), 21.2 (C-7); HRESITOFMS (positive) *m/z* 285.1439 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>Na, 285.1467).

**X-ray Crystallographic Analysis Data of 2.** Crystal size, 0.30 × 0.30 × 0.10 mm; molecular formula, C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>; molecular formula moiety, C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O; crystal system, monoclinic; space group, C<sub>2</sub>; unit cell dimensions (a, b, c), 11.474(3) Å, 13.935(3) Å, 10.813(2) Å; α = 90°, β = 104.93(2)°, γ = 90°, volume, 1670.5(7) Å<sup>3</sup>; Z = 4; density, 1.226 mg m<sup>-3</sup>; absorption coefficient, 0.085 mm<sup>-1</sup>; F(000) = 672.0; diffractometer used, Rigaku RAXIS-RAPID; radiation (λ) Mo Kα (0.71073 Å); θ range 54.9°; reflections collected, 8225; independent reflections, 1911; observed reflections, 1612 [R(int) = 0.022]; final R indices, R = 0.0430 (obsd data), wR2 = 0.1080 (in-depth data); goodness of fit, 0.995; T = 173(1) K. The structure was solved by direct methods and refined by full matrix least-squares on F<sup>2</sup>.<sup>17</sup>

**Cordiaquinol K (3):** dark yellow oil; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –1.80 (c 0.11, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 264 (3.67 nm); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.30 (1H, s, H-1), 6.61 (1H, tq, J = 7.8, 1.3 Hz, H-3), 6.53 (2H, overlapped, H-3' and 4'), 6.47 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 6.33 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-8), 5.64 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-7), 2.51 (2H, q, J = 8.0 Hz, H-4), 1.84 (2H, t, J = 8.0 Hz, H-5), 1.64 (3H, d, J = 1.3 Hz, Me-9), 1.36 (3H, s, Me-10); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 197.2 (C-1), 157.0 (C-3), 150.9 (C-5'), 147.2 (C-2'), 140.3 (C-2), 131.0 (C-7), 124.5 (C-8), 122.9 (C-1'), 116.5, 116.2 (C-3', C-4'), 113.8 (C-6), 78.9 (C-6), 40.3 (C-5), 26.5 (C-10), 25.2 (C-4), 9.0 (C-9); HRESITOFMS (positive) *m/z* 281.1151 [M + Na – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>3</sub>Na, 285.1154).

**1,4-*p*-Dibromobenzoylcordiaquinol I (9).** To a solution of compound 1 (14 mg, 0.05 mmol) in pyridine (4.0 mL) was added *p*-bromobenzoyl chloride (58 mg, 0.26 mmol), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Workup as usual gave a residue, which was purified by silica gel column chromatography (hexane–EtOAc, 4:1) to give 9 (25 mg) as yellow crystals in hexane–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: mp 172–180 °C; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –0.25 (c 0.13, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10 (4H, d, J = 8.4 Hz, benzoyl), 7.72, 7.69 (each 2H, d, J = 8.4 Hz, benzoyl), 7.46 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 7.21 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 3.01 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9eq), 2.83 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-9ax), 2.55 (2H, t, J = 5.6 Hz, H-7), 2.01 (2H, m, H-8), 1.94 (3H, s, Me-11), 1.28 (3H, s, Me-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.3 (C-6), 188.9 (C-10), 164.7 (benzoyl) 163.8 (benzoyl), 150.5 (C-10a), 148.1 (C-4), 146.4 (C-1), 137.5 (C-5), 134.7 (C-4a), 132.3 (benzoyl), 132.0 (benzoyl), 131.9 (benzoyl), 131.8

(benzoyl), 129.6 (benzoyl), 128.8 (benzoyl), 128.5 (benzoyl), 128.2 (C-3), 127.4 (benzoyl), 126.4 (C-9a), 123.1 (C-2), 37.6 (C-8a), 37.3 (C-9), 35.7 (C-8), 33.7 (C-7), 24.5 (C-12), 13.1 (C-11); HRESIMS (positive)  $m/z$  660.9672 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>79</sup>Br<sup>81</sup>Br, 660.9660).

**X-ray Crystallographic Analysis Data of 9.** Crystal size, 0.25 × 0.10 × 0.08 mm; molecular formula, C<sub>30</sub>H<sub>22</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; crystal system, triclinic; space group, P1; unit cell dimensions (*a*, *b*, *c*), 8.889(3) Å, 11.238(2) Å, 14.179(4) Å; α = 94.10(3)°, β = 100.838(5)°, γ = 109.55(3)°, volume, 1297.0(7) Å<sup>3</sup>; Z = 2; density, 1.634 mg m<sup>-3</sup>; absorption coefficient, 3.169 mm<sup>-1</sup>; F(000) = 640.0; diffractometer used, Rigaku RAXIS-RAPID; radiation (λ) Mo Kα (0.71073 Å); 2θ max 55.0°; reflections collected, 12 761; independent reflections, 5919; observed reflections, 2778 [R(int) = 0.050]; final R indices, R = 0.0480 (obsd data), wR2 = 0.0730 (indep data); goodness of fit, 1.070; T = 173(1) K. The structure was solved by direct methods and refined by full matrix least-squares on F<sup>2</sup>.<sup>17</sup>

**Acetylcordiaquinol I (10).** Compound 1 (8 mg, 0.03 mmol) was treated with pyridine (0.5 mL) and acetic anhydride (0.5 mL), and the mixture was allowed to stand overnight. The reagents were evaporated off, and the residue was purified by passage over an ODS cartridge (Waters Sep-Pak, C<sub>18</sub>, MeOH-distilled H<sub>2</sub>O), giving 10 (6 mg) as an oil; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -5.55 (c 0.18, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-2), 7.03 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-3), 2.93 (1H, d, J = 16.5 Hz, H-9a), 2.78 (1H, d, J = 16.5 Hz, H-9b), 2.59 (2H, m, H-7), 2.41 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 2.37 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 2.05 (2H, m, H-8), 2.02 (3H, s, Me-11), 1.23 (3H, s, Me-12); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.3 (C-6), 189.1 (C-10), 168.7 (OCOCH<sub>3</sub>), 168.1 (OCOCH<sub>3</sub>), 150.6 (C-10a), 148.0 (C-4), 146.2 (C-1), 137.4 (C-5), 134.4 (C-4a), 128.1 (C-2), 126.0 (C-9a), 122.9 (C-3), 37.6 (C-9), 37.3 (C-8a), 35.7 (C-8), 33.7 (C-7), 24.3 (C-12), 21.1 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.8 (OCOCH<sub>3</sub>), 13.1 (C-11); HRESIMS (positive)  $m/z$  379.1133 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Na, 379.1158).

**Acetylcordiaquinol C (11).** Cordiaquinol C (7) (83 mg, 0.34 mmol) was treated with pyridine (2.0 mL) and acetic anhydride (2.0 mL), and the mixture was allowed to stand overnight. The reagents were evaporated off, and the residue was purified by passage over an ODS cartridge (Waters Sep-Pak, C<sub>18</sub>, MeOH-distilled H<sub>2</sub>O), giving 11 (58 mg); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -1.59 (c 0.73, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.89 (2H, brs, H-2, H-3), 5.94 (1H, dd, J = 10.8 and 17.6 Hz, H-14), 4.98 (1H, d, J = 17.6 Hz, H-15a), 4.91 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-15b), 4.89 (1H, s, H-12a), 4.78 (1H, s, H-12b), 2.66 (1H, d, J = 17.2, H-5β), 2.63 (2H, d, J = 6.8 Hz, H-8), 2.46 (1H, d, J = 17.2 Hz, H-5α), 2.45 (2H, m, H-7), 2.30 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 2.29 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 1.77 (3H, s, Me-13), 1.14 (3H, s, Me-16); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.0 (OCOCH<sub>3</sub>), 166.2 (OCOCH<sub>3</sub>), 146.3 (C-4), 146.2 (C-1), 141.6 (C-14), 146.0 (C-11), 130.3 (C-9), 130.0 (C-10), 119.7 (C-15), 119.5 (C-12), 113.5, 113.2 (C-2, C-3), 49.8 (C-7), 37.7 (C-5), 37.7 (C-6), 27.2 (C-8), 26.0 (C-16), 23.1 (C-13), 20.7 (OCOCH<sub>3</sub>), 20.7 (OCOCH<sub>3</sub>); HRESITOFMS (positive)  $m/z$  351.1563 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Na, 351.1572).

**Cultivation of Leishmania Promastigotes.** Medium 199 was used for cultivation of promastigotes of *Leishmania major*, *L. guyanensis*, and *L. panamensis*. Promastigotes were cultured in medium [supplemented with heat-inactivated (56 °C for 30 min) fetal bovine serum (10%)] at 27 °C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in an incubator.

**Leishmanicidal Assay.** The leishmanicidal effects of the samples were assessed by an improved [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide] (MTT) method as follows. Cultured promastigotes were seeded at 4 × 10<sup>5</sup> per 50 μL of medium per well in 96-well microplates, and then 50 μL samples of the test compounds at different concentrations, dissolved in a mixture of DMSO and medium, were added to each well. Each concentration was tested in triplicate. The microplate was incubated at 27 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. Tetra Color One (10 μL) [a mixture of WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfonylphenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) and 1-methoxy-PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate)] was added to each well, and the plates were incubated at 27 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 6 h. Optical density values (test wavelength 450 nm, reference wavelength 630 nm) were measured using a Viento XS multispectrophotometer (Dainippon Pharmaceutical). Leishmanicidal activities were expressed as a minimum lethal concentration (MLC)

and a minimum inhibitory concentration (MIC). The IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) values for compounds were estimated from graphs. As positive control, amphotericin B was used.

**Cytotoxicity Assay.** Compounds were assayed for cytotoxicity against COS-7 and HuH-7 cells using the XTT method.<sup>18-21</sup> The IC<sub>50</sub> is the concentration of agent that reduced cell growth by 50% under the experimental conditions. MG132 (carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) was used as positive control.

**Acknowledgment.** The authors are grateful to Dr. Y. Hashiguchi (University of Kochi, Japan) for provision of the leishmania promastigotes (*L. major*, *L. panamensis*, and *L. guyanensis*). We thank Dr. T. Ohshima, Tokushima Bunri University, for cytotoxicity testing. This work was supported by a grant from the International Research Grant Program, Japan Health Sciences Foundation (grant no. 24404). Our grateful thanks are extended to the Ministry of Forestry of Myanmar for providing the plant sample.

**Supporting Information Available:** Figure S1, showing the principal HMBC correlations observed in compounds 1–3. Figure S2, showing a biogenetic pathway of compounds obtained in the present study. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References and Notes

- Ashford, R. W.; Desjeux, P.; deRaadt, P. *Parasitol. Today* **1992**, *8*, 104–105.
- United Nations Development Programme/World Bank/World Health Organization, Tropical Disease Research Progress, 1995–96. *Thirteenth Programme Report*; UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, WHO: Geneva, 1997; pp 100–111.
- Araújo, C. A. C.; Alegria, L. V.; Leon, L. L. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 751–754.
- Balaña-Fouce, R.; Reguera, R. M.; Cubría, J. C.; Ordóñez, D. *Gen. Pharmacol.* **1998**, *30*, 435–443.
- Takahashi, M.; Fuchino, H.; Satake, M.; Agatsuma, Y.; Sekita, S. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 921–925.
- Bieber, L. W.; Messana, I.; Lins, S. C. N.; Filho, A. A. S.; Chiappeta, A. A.; Mello, J. F. D. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1955–1959.
- Stevens, K. L.; Jurd, L.; Manners, G. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 2955–2958.
- Manners, G. D.; Jurd, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, *40*, 5–410.
- Isoet, J. R.; Marston, A.; Gupta, M. P.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 729–734.
- Isoet, J. R.; Marston, A.; Gupta, M. P.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 613–617.
- Menezes, J. E. S. A.; Lemos, T. L. G.; Silveira, E. R.; Braz-Filho, R.; Pessoa, O. D. L. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 787–790.
- Kuroyanagi, M.; Kawahara, N.; Sekita, S.; Satake, M.; Hayashi, T.; Takase, Y.; Masuda, K. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1307–1312.
- Moir, M.; Thomson, R. H.; Hauson, B. M.; Simatupang, M. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 363–364.
- Moir, M.; Thomson, R. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 1352–1357.
- Fujimoto, H.; Nakayama, Y.; Yamazaki, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 654–658.
- Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*; Birkhäuser Verlag: Basel, 1989; Band 8, pp 150–156.
- CCDC 637951 contains the supplementary crystallographic data for compound 9 and CCDC 637952 for compound 2. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).
- Paull, K. D.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R.; Parsons, J. L.; Risbood, P. A.; Barbera, W. A.; Sharma, M. N.; Baker, D. C.; Hand, E.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Grote, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 911–914.
- Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827–4833.
- Weislow, O. S.; Kiser, R.; Fine, D. L.; Bader, J.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 577–586.
- Roehm, N. W.; Rodgers, G. H.; Hatfield, S. M.; Glasebrook, A. L. *J. Immunol. Methods* **1991**, *142*, 257–265.

NP070211

## A New Leishmanicidal Saponin from *Brunfelsia grandiflora*

Hiroyuki FUCHINO,<sup>\*a</sup> Setsuko SEKITA,<sup>b</sup> Kanami MORI,<sup>b</sup> Nobuo KAWAHARA,<sup>c</sup> Motoyoshi SATAKE,<sup>d</sup> and Fumiyouki KIUCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center for Medicinal Plant Resources, National Institute of Biomedical Innovation; 1–2 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305–0843, Japan; <sup>b</sup>Pharmaceutical Science at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University; 1314–1 Shido, Sanuki, Kagawa 769–2193, Japan; <sup>c</sup>National Institute of Health Sciences; 1–18–1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan; and <sup>d</sup>Institute of Environmental Science for Human Life, Ochanomizu University; 2–1–1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112–8610, Japan. Received July 20, 2007; accepted October 16, 2007

A new furostan-type saponin (**1**) was isolated from the methanolic extract of *Brunfelsia grandiflora* leaves, together with four known compounds. The chemical structure of **1** was determined by spectroscopic analysis and chemical reaction to be 26-O-β-D-glucopyranosyl 22α-methoxyfurost-3β,26-diol 3-O-β-D-xylopyranosyl(1→3)-{β-D-glucopyranosyl(1→2)}-β-D-glucopyranosyl(1→4)-β-D-glucopyranoside. Compound **1** showed potent leishmanicidal activity *in vitro* against *Leishmania major*.

**Key words** *Leishmania*; *Brunfelsia grandiflora*; Solanaceae; chiricsanango; furostan

*Brunfelsia grandiflora* D. DON (Solanaceae), local name “chiricsanango”, is widely cultivated in South America as an ornamental plant, and is also used in medicine. Its root is used against rheumatism and syphilis, and also has febrifuge activity. The leaf decoction is taken orally against arthritis and rheumatism in the Peruvian Amazon.<sup>1)</sup> In the Amazon region, this plant is also used as an additive in the preparation of “ayahuasca”. Although a few constituents of *B. grandiflora* have been reported,<sup>2,3)</sup> the chemical details of this plant have not yet been investigated thoroughly.

Leishmaniasis is endemic in tropical regions, and currently affects 12 million people in 88 countries.<sup>4)</sup> This disease is transmitted by small biting sandflies (*Phlebotomus* sp.). The first-line drugs for the treatment of leishmaniasis are pentavalent antimonials such as *N*-methylglucamine antimonate (Glucantime) and sodium stibogluconate (Pentostam). However, these drugs are toxic and generally expensive.

In a screening of South American medicinal plants for leishmanicidal activity, we found that *B. grandiflora* showed potent activity. In this report, we describe the chemical constituents of *B. grandiflora* and their leishmanicidal activities.

### Results and Discussion

A new furostan-type saponin, **1**, was isolated from the methanolic extract of *B. grandiflora* leaves, together with three known compounds: chlorogenic acid, scopoletin and 3-O-β-D-glucopyranosyl, 28-O-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl betulinate (cirensenoside P).

Compound **1** was determined to have the chemical formula C<sub>57</sub>H<sub>96</sub>O<sub>28</sub> by high-resolution FAB-MS. The IR spectrum revealed the presence of hydroxyl groups (3407 cm<sup>-1</sup>). In the <sup>13</sup>C-NMR spectrum, 57 signals were observed, 26 of which were derived from oxygenated methines. Furthermore, five anomeric proton signals were observed in the <sup>1</sup>H-NMR spectrum at δ 4.83 (d, 7.8), 4.87 (d, 7.6), 5.17 (d, 7.8), 5.22 (d, 7.8), and 5.55 (d, 7.3). Thus **1** was thought to be a pentasaccharide. The <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectra revealed the presence of a methoxyl group (δ<sub>C</sub>=47.3 ppm, δ<sub>H</sub>=3.23 ppm). Acid hydrolysis of **1** with 3% hydrochloric acid gave an aglycone (**1-a**) and a mixture of sugars, D-glucose and D-xylose. The <sup>13</sup>C-NMR data of **1-a** were identical to those of neotigenin,<sup>5)</sup> which has a spirostanol structure.

Based on a comparison of the <sup>13</sup>C-NMR data of **1** and **1-a**, the genuine aglycone was deduced to be furostanol-type because of large differences in the chemical shifts from C-22 to 27, and this was confirmed by 2D-NMR (DQF-COSY, HMQC, and HMBC). Furthermore, enzymatic hydrolysis by β-glucosidase (from almond) gave **1-b**. Since **1-b** lacked 1 mol of glucose compared with **1** in the <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Table 1), the latter molecule was surmised to possess a terminal glucose. A furostanol-type saponin bearing a sugar moiety at C-26 can release the sugar upon hydrolysis to form a spirostanol-type compound, and therefore a terminal glucose was determined to be located at C-26 by the correlation between C-26 (δ<sub>C</sub>=74.9 ppm) and H'-1 (δ<sub>H</sub>=4.82 ppm) in the HMBC spectrum. The anomeric configurations were deduced from the *J* values of the anomeric protons, and these values suggested the presence of four β-D-glucose units and one β-D-xylose unit. However, attempts to determine the glycosyl linkage of the sugar moiety at C-3 of **1** or **1-b** based on the 2D-NMR spectra did not succeed because of hard overlapping signals in key correlations. To determine the glycosyl linkage, the method reported by Jansson *et al.*<sup>6)</sup> was applied. Compound **1** was converted to a permethylated compound (**1-c**) by Hakomori's method.<sup>7)</sup> Compound **1-c** was subjected to acid hydrolysis and reduction with sodium borohydride followed by acetylation *in situ*, and the final reaction mixture was analyzed by GC-MS. In the GC-MS analysis, acetates of 2,3,4-trimethyl xylitol, 2,3,4,6-tetramethyl glucitol, 2,3,6-trimethyl glucitol, and 4,6-dimethyl glucitol were detected (see Experimental). Based on the results of GC-MS analysis, 1,4-disubstituted, 1,2,3-trisubstituted, and 1-monosubstituted glucoses and 1-monosubstituted xylose were deduced to be part of the sugar component of **1**. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI) MS analysis of **1** and **1-b** using product ion scan experiments with various collision energies were examined. The results revealed the presence of a terminal xylose (Xyl-) (M-132), a terminal glucose (Glc-) (M-162), an inner glucose combined with a glucose, and a xylose [(Glc)Xyl-Glc-] (M-456) and an inner glucose combined with two glucoses and a xylose [Xyl-(Glc)Glc-Glc] (M-618), however, a terminal diglucosyl fragment (Glc-Glc-) (M-324) was not found in **1-b**. In addition, electron impact (EI)-MS analysis of acety-

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: fuchino@nibio.go.jp