

日本財団補助金による

1999年度日中医学協力事業報告書

－調査・共同研究に対する助成－

2000年3月31日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 北中 進   
所属機関名 日本大学薬学部  
職 名 教授 年齢 50 才  
所 在 地 〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1  
電話 047-465-5356 内線 \_\_\_\_\_

1. 研究課題

中国東北部植物からのI型アレルギー抑制物質の探索

2. 研究期間 自 1999 年 4 月 1 日 ~ 至 2000 年 3 月 15 日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 北中 進 (50 才)  
所属機関 日本大学薬学部 職名 教授

中国側研究者氏名 姚 新生 (64 才)  
所属機関 瀋陽薬科大学 職名 教授

4. 研究報告

別添書式を参考に、報告本文4000字以上で作成して下さい(枚数自由・ワープロ使用)

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

# 中国東北部植物からの I 型アレルギー抑制物質の探索

研究代表者氏名 北中 進

所 属 日本大学薬学部

役 職 教授

## 要 旨

中国東北部の植物 60 種についてラット腹腔由来のマスト細胞を用いて抗原抗体反応によるヒスタミン遊離抑制試験を行い、*Bidens parviflora* Willd. に強い抑制活性が認められた。本植物のエタノール抽出エキス中のブタノール画分について活性成分を探索し、5 種の化合物を単離して、NMR、MS などのスペクトル解析及び酵素加水分解等により、5 種の新規ポリアセチレン配糖体の構造を決定した。また、C-3 位に二級水酸基を持つ 4 種のポリアセチレン配糖体の C-3 位の絶対配置決定には、それらのアグリコンに改良 Mosher 法を適用していずれの化合物も *R*-配置と決定した。これらのポリアセチレン配糖体は *in vitro* において強いヒスタミン遊離抑制作用を示し、更に 4 種のポリアセチレン配糖体はマウスマクロファージ様株化細胞、RAW264.7 細胞活性化による NO 産生を濃度依存的に抑制することが分かった。

## KEY WORD

*Bidens parviflora* Willd.; Antiallergic reagent; polyacetylene glycoside; mast cell; macrophage

## 研究報告

### 目的

中国東北部は、高麗ニンジンの野生する長白山脈や内モンゴルの草原地帯まで様々な環境に適応した植物の分化がみられ、多くの種類と大きな群落が認められる。しかしながら、漢方医療に使用されている植物はその一部にすぎない。そこで多様な植物相を持つ中国東北部の瀋陽薬科大学の姚教授との共同研究で、今まで利用されていない植物や民間薬を収集し、I 型アレルギー抑制物質の探索を行った。

アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、花粉症などの I 型アレルギー疾患は、近年急速に増加しているが、これらの疾患に対して有効な治療法がない状態である。これらの疾患は主に I 型アレルギー反応が関与していると考えられており、この I 型アレルギー反応は反応の初期段階に、マスト細胞や抗塩基球に結合した IgE 抗体と対応するアレルゲン分子が反応してこれらの細胞を刺激し、ヒスタミンやロイコトリエン類などの化学伝達物質が遊離され、他の炎症細胞なども動員されて炎症を生じておこるものである。そこでマスト細胞からヒスタミンおよびロイコトリエン類の放出を抑制する新たな物質が望まれている。さらにアレルギー性炎症にも深く関与していると考えられるマクロファージの活性化機能について影響を及ぼす天然物質について医薬品開発の観点から興味をもたれる。

マクロファージは生体内において、食細胞、抗原提示細胞、あるいは免疫学的機序のエフェクター細胞として、生体防御反応である炎症や免疫系への橋渡しに関与している。また活性化されることにより、活性酸素や NO の他、各種のインターロイキンや腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカインを分泌する。これらの生理活性成分は、腫瘍細胞を傷害したり、微生物による感染を防ぐなど、生体を守る上で大きな役割を果たしている。しかし、過剰に産生された NO やサイトカインは逆に生体に傷害を与え炎症を起こし、種々の疾病のもととなる。従って、マクロファージの活性化機能を検討することは、アレルギーや癌など、各種の疾病予防又は治療に大きな意義があると考えられる。

これまで我々は、中国東北部地域の植物を採取した中で *Bidens parviflora* Willd. にヒスタミン遊離抑制活性とマクロファージの NO 産生抑制活性が認められた。*Bidens parviflora* Willd. は中国名小花鬼針草といい、感冒による発熱、咽頭痛、腸炎による下痢、盲腸炎、打撲症中国の東北、内モンゴル、河北、河南及び西南部に分布する。<sup>1,2)</sup> 成分に関しては、astragalín、isoquercetin、sulfurein、maritimein、<sup>3)</sup> jujubasterol 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-1-(1-3)-[ $\alpha$ -L-deoxytalosyl-(1-2)]- $\alpha$ -L-arabinosyl]、6-hydroxycoumarin、7-hydroxy-6-methoxycoumarin、oleanolic acid、ursolic acid、narirutin、rutin、5,7,2',5'-tetrahydroxyflavone<sup>4)</sup> の報告がある。

そこでこれらの活性を指標として、マスト細胞からのヒスタミン遊離を抑制し、更にマクロファージの活性化機能を制御する化合物を探索してその構造決定と阻害活性を検討した。

## 方法

### (1) スクリーニング試料の作製

中国東北部植物 60 種 (Table 1) をそれぞれ 60% エタノールにより抽出し、エキスを作製して生物活性試験の試料とした。

### (2) スクリーニング

#### ヒスタミン遊離抑制試験

7~8 週齢の Wister 系 ラットを断頭後放血させ、腹腔内に冷タイロッド液を腹腔内に注入し、公知の方法により肥満細胞を単離し、 $1\sim 2\times 10^6$  cells/mL となるように 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) を含むタイロッド液に懸濁し、細胞浮遊液を調整した。各抽出物を各濃度に調整した試料溶液に上記細胞浮遊液を加えて 37 $^{\circ}$ C、5 分間 インキュベートを行い、脱顆粒誘発剤に compound 48/80 をもちた場合はこれに加え、37 $^{\circ}$ C、10 分間 インキュベートを行う。また、抗原抗体反応によるヒスタミン遊離抑制試験には脱顆粒誘発剤に抗ジニトロフェニル (DNP)-mouse monoclonal IgE を加えて 37 $^{\circ}$ C、1 時間 インキュベートを行った後、細胞はタイロッド液で洗浄する。この感作した肥満細胞は試料溶液に加え、37 $^{\circ}$ C、5 分間 インキュベートを行い、抗原として DNP-BSA とフォスファチジルセリンを加え、37 $^{\circ}$ C、10 分間 インキュベートを行う。これらの反応液は氷冷して反応を停止、遠心分離した上澄に 0.1N 塩酸を加えた後、ヒスタミン量を前法に準じて高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

この結果から、阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left( 1 - \frac{A - B}{C - B} \right) \times 100$$

A：薬物存在下で compound 48/80 あるいは IgE 及び DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量

B：自発的に遊離されるヒスタミン量

C：compound 48/80 あるいは IgE 及び DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量

### マクロファージの NO 産生抑制試験

活性作用を有する植物のスクリーニングは、マクロファージの NO 産生能に対する効果を指標とした。マクロファージはマウスマクロファージ様株化細胞、RAW264.7 細胞を用い、植物抽出エキスを単独に添加した時の NO 産生効果と植物抽出エキスと既知活性化物質である IFN- $\gamma$  (10 U/ml) 及び LPS (100 ng/ml) を同時に添加したときの NO 産生抑制作用を検討した。16 時間培養した後の培養上清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>量をグリース法で測定した。また、細胞毒性を MTT 法及びトリパンブルー色素排除法及び鏡検による形態観察で確認した。

### (3) 研究材料及び抽出

*Bidens parviflora* Willd. は中国遼寧省大黒山にて 1999 年 7 月に全草を採集し乾燥生薬を得た。*Bidens parviflora* の全草 (5.5 kg) は 60%エタノールで還流抽出した。抽出液は減圧下濃縮し、エキス (674.2 g) を得た。このエキスを水に懸濁後、ヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールで抽出し、それぞれの画分のエキスを作成した。1-ブタノールエキス (176 g) はシリカゲル、Sephadex LH-20、逆相型 HPLC を繰り返し、活性成分 1-5 を単離した。

## 結果

中国東北部に産する植物 60 種 (Table 1) についてヒスタミン遊離抑制試験及びマクロファージの NO 産生能に対する効果を検討した結果、*Bidens parviflora* にヒスタミン遊離抑制活性及びマクロファージの NO 産生能に対する抑制活性が認められた。そこで *Bidens parviflora* の 60%エタノールエキスについて、ヘキサン、酢酸エチル及び 1-ブタノールで順次抽出し、それらの画分について活性試験を行ったところ、ヒスタミン遊離抑制活性及びマクロファージの NO 産生能に対する抑制活性が共に 1-ブタノール画分に比較的強い活性が認められた。そこで 1-ブタノール画分についてバイオアッセイにより検討しながら各種クロマトグラフィを適用し、化合物 1-5 の 5 種の化合物を単離した。

化合物 1 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D^{25}$  -146.4° で、HR-MS より分子式は C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub> が、また EIMS より  $m/z$  164 [M-hexose]<sup>+</sup> にアグリコン相当するフラグメントイオンが観測された。

(Table 2) UV スペクトルは 241 ( $\epsilon$ =1597)、253 (2282)、268 (3064)、284 (2324) に 4 つの特徴的な極大吸収が認められた。IR スペクトルでは、水酸基 (3396cm<sup>-1</sup>)、アセチレン (2231, 2138 cm<sup>-1</sup>) 及びエチレン基 (1675 cm<sup>-1</sup>) の存在が認められた。1 の  $\beta$ -グルコシダーゼによる酵素加水分解では、相当するアグリコン (1a) とグルコースが

得られた。1 の UV スペクトルにおいて、241、253、268 及び 284 nm に 4 つの特徴的な吸収が認められアセチレンによる吸収であることが示唆された。また、HMQC スペクトルによる測定を含めた  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Table 3) 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (Table 4) の解析において、1 は 1 モルのグルコース、3 個のメチレン、2 個のメチン、1 組のトランス二重結合のプロトン及び 4 つの 4 級炭素の存在が認められた。アグリコン部の構造には、 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  スペクトルにより、 $\delta 1.80$  (dd,  $J=7.1, 1.8$  Hz, Me-10) のメチル基と連結する 2 個のトランス二重結合  $\delta 6.32$  (dd,  $J=15.9, 7.1$  Hz, H-9) と  $\delta 5.58$  (H-8, dq,  $J=15.9, 7.1$  Hz) の存在が認められた。 $\delta 3.72$  (dd,  $J=10.4, 6.4$  Hz, H-1a) と  $3.99$  (dd,  $J=10.4, 5.8$  Hz, H-1b) の非等価のメチレンプロトン、 $\delta 1.97$  (m) のメチレン及び  $\delta 4.64$  (t,  $J=6.7$  Hz) のメチンの接続性が認められた。そこで HMBC スペクトルを測定し更に構造解析を行った。(Fig. 1) その結果、アグリコン部の構造は共役した 2 個のアセチレンにメチル基が結合したトランスオレフィン及び 1,3-ジヒドロキシプロパンが結合した炭素 10 個の直鎖構造と決定した。D-グルコースの結合位置は  $\delta 4.26$  のアノメリックプロトン (d,  $J=7.7$  Hz) が  $\delta 66.9$  (C-1) のオキシメチレンと遠隔カップリングが認められたことから、C-1 に結合していることが判明した。これらのスペクトルデータより、1 の構造は Fig. 1 のように決定した。次に、2 級水酸基が結合する C-3 位の絶対配置を決定するため、1a について改良 Mosher 法を適用し検討した。その結果、1 位及び 2 位のメチレンプロトンはいずれもプラスの値をとり、また、プロペン部分のメチル基及びオレフィンプロトンはいずれもマイナスの値をとることから、C-3 位は R-配置と決定した。(Fig. 2)

以上の結果より、1 の構造は Fig. 1 のように決定した。本化合物及びアグリコン 1a は新規化合物である。

化合物 2 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -157.5^\circ$  で、HR-MS より分子式は 1 と同じ  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7$  が示された。その UV、IR、 $^1\text{H-}$ 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは 1 のそれらとほとんど類似しているが、 $^1\text{H-}$ 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル中のオレフィンに結合するメチル基の化学シフト値はわずかに 1 と異なっている。すなわち、1 と比較してメチルプロトン ( $\delta 1.89$ ) は 0.09 ppm 低磁場へ、メチル炭素 ( $\delta 16.5$ ) は 2.3 ppm 高磁場へシフトが認められた。 $\delta 5.53$  (H-8) と  $6.20$  (H-9) の 2 個のオレフィンプロトンの  $J$  値 (10.5 Hz) から cis-配置が推定された。また、差 NOE 実験において、 $\delta 1.89$  (Me-10) と  $\delta 5.53$  (H-8) の間に NOE が観測されたことから、二重結合の配置は Z と決定した。更に 2 の HMBC スペクトルから、2 の構造は 1 の幾何学異性体が推定された。C-3 の絶対配置の決定は、2 を  $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解して得たアグリコン (2a) に Mosher 法を適用した結果、R-配置と決定した。(Fig. 2) 以上のことから、2 の構造は 1 の幾何学的異性体である Fig. 1 に示す構造と決定した。

化合物 3 は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -52.2^\circ$  で、HR-MS より分子式は  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_7$  が示された。その UV スペクトル、284 ( $\epsilon=284$ )、267 (162)、253 (119)、239 (40) は 1 及び 2 と類似したスペクトルを示すが、その吸収はたいへん弱い。一方、IR スペクトルにおいて、 $2221\text{ cm}^{-1}$  及び  $2138\text{ cm}^{-1}$  にアセチレンの吸収が認められ、1 より強い吸収強度が認められた。3 の  $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは 1 と部分的に類似するが、3

ではオレフィンが消失し、アセチレンが1つ増えた3つのアセチレンの存在が認められた。更に<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSEY、HMBCスペクトルから、**3**の平面構造はFig. 1のように決定した。C-3の絶対配置については、**3**のアグリコン (**3a**)について Mosher 法を適用したところ *R*-配置と決定した。(Fig. 2)

化合物**4**は淡褐色粉末、 $[\alpha]_D -71.6^\circ$ で、HR-MSより分子式はC<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>が示された。そのUVスペクトル、284 ( $\epsilon=284$ )、267 (162)、253 (119)、239 (40)は化合物**1**及び**2**とよく類似したスペクトルを示すが、その吸収はたいへん弱い。一方、IRスペクトルにおいて、2221cm<sup>-1</sup>及び2138cm<sup>-1</sup>にアセチレンの吸収が認められ、その強度は1の吸収より強く認められた。**4**のUV、IR、<sup>1</sup>H-及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは**1**とほとんどよく類似するが、**1**にあるメチル基が認められなく、そのかわりヒドロキシメチレン ( $\delta_H 4.13$ , dd,  $J=4.9, 1.9$  Hz;  $\delta_C 62.6$ , t)の存在が認められた。更に<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSEY、HMBCスペクトルから、**3**の平面構造はFig. 1のように決定した。C-3の絶対配置は、化合物**3**のアグリコン (**3a**)について Mosher 法を適用し *R*-配置と決定した。(Fig. 2)

化合物**5**はmp 164.0°Cの無色針状晶、 $[\alpha]_D -67.4^\circ$ で、HR-MSより分子式はC<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>が示された。そのUV及びIRスペクトルは**4**とよく類似するが、**5**の<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルでは**4**で見られるヒドロキシメチンが消失し、かわりに1個のメチレン基が認められ、C-4からC-10の構造及び糖部は**4**と同一であることが判明した。更に**5**のHMBGスペクトルからFig.1の構造と決定した。

化合物**1-5**についてヒスタミン遊離抑制試験及びマクロファージの一酸化窒素(NO)産性能におよぼす効果について検討した。

ヒスタミン遊離抑制活性はラット腹腔由来のマスト細胞に試験薬物を添加した後、IgEを感作させた、更に抗原刺激により遊離するヒスタミン量を測定し、抑制率を算出した。化合物**1-5**のいずれの化合物においても活性が認められた。(Table 5) また、マクロファージのNO産性能におよぼす効果についてLPSのみ及びIFN- $\gamma$ とLPSで活性化した時の試験薬物の作用について検討した結果、**2**を除く**1**、**3**、**4**及び**5**に強い活性が認められた。(Table 6, 7)

## 考察

*Bidens parviflora* Willd. は中国東北部に自生するキク科の植物で、その全草は古来、解熱、抗炎症、リウマチ治療に民間薬として使用されてきた。<sup>1,2)</sup>しかし、この植物の抗炎症作用や生理学的あるいは病理学的機能については十分に明らかとなっていない。本研究において、*Bidens parviflora*にはマスト細胞におけるヒスタミン遊離抑制作用やマクロファージの産生するNOを調節する作用が明らかとなった。そこで活性成分の分離を行ったところ、強い活性を示す画分の一つから5種の化合物を単離した。これら5種の化合物の構造は各種スペクトル解析、化学反応からいずれも炭素10個の直鎖状のポリアセチレンアルコールのグルコース配糖体と決定した。また、化合物**1-4**は2級水酸基が結合するC-3位の絶対配置をそれらのアグリコンについて Mosher 法を適用することにより、いずれも *R* 配置と決定することができた。化合物**1-5**のアグリコンも新規化合物であった。今回単離したポリアセチレン配糖体は天然では非常に珍しいものであり、植物

からは *Bidens pilosa*<sup>5)</sup> に続き 2 例目と考えられる。

化合物 1-5 のポリアセチレン配糖体に強いヒスタミン遊離抑制作用が認められた。ポリアセチレン類にヒスタミン遊離抑制作用が認められた初めての例と考えられる。また、*Bidens parviflora* は抗炎症を目的に用いられていることから、これらの成分が関与している事が推察される。次に、化合物 1、3、4、5 はリポポリサッカライド (LPS) 刺激のマクロファージが産生する NO について、 $IC_{50}$  0.116~0.225  $\mu$ M で抑制を示し、LPS 及び IFN-g 刺激によるマクロファージが産生する NO では  $IC_{50}$  0.077~0.116  $\mu$ M で強い抑制がみとめられ、これらの抑制は LPS のみの刺激より、LPS と IFN-g の両者による刺激でより強い抑制が認められた。これらの NO 産生の機構については今後検討していきたい。そしてこれらのポリアセチレン配糖体はマクロファージの活性化を抑制し、TNF- $\alpha$  等のサイトカイン類の遊離をも抑制することが推察され、生体に対し過剰な炎症性サイトカインが自己組織に傷害を与える働きを防御する効果を持つことが期待される。また、LPS と IFN- $\gamma$  による免疫応答に対しても強く抑制することから、本植物がリウマチ治療に用いられていることを考え合わせ、これらの化合物が新たな治療薬と成りうる可能性が示唆され、また、医薬品開発のリード化合物として注目したい。今後、更にサイトカイン類の産生に対する作用についても検討していかなければならない。

#### 参考文献

- 1) 中薬大辞典、上海科学技術出版社 小学館編 第四卷 pp 2806.
- 2) 中国長白山薬用植物彩色図誌、人民衛生出版社、pp 423、1997.
- 3) Chinese Traditional and Herbal Drugs, **22**, 531-533 (1991).
- 4) De Tommasi, N., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C., Zhou, Z. L., Fitoterapia , **63**, 470 (1992).
- 5) Alvarez, L., Mrquina S., Villarreal, M. L., Alonso D., Aranda, E., Delgado, G., Planta Med., **62**, 355-357 (1996).

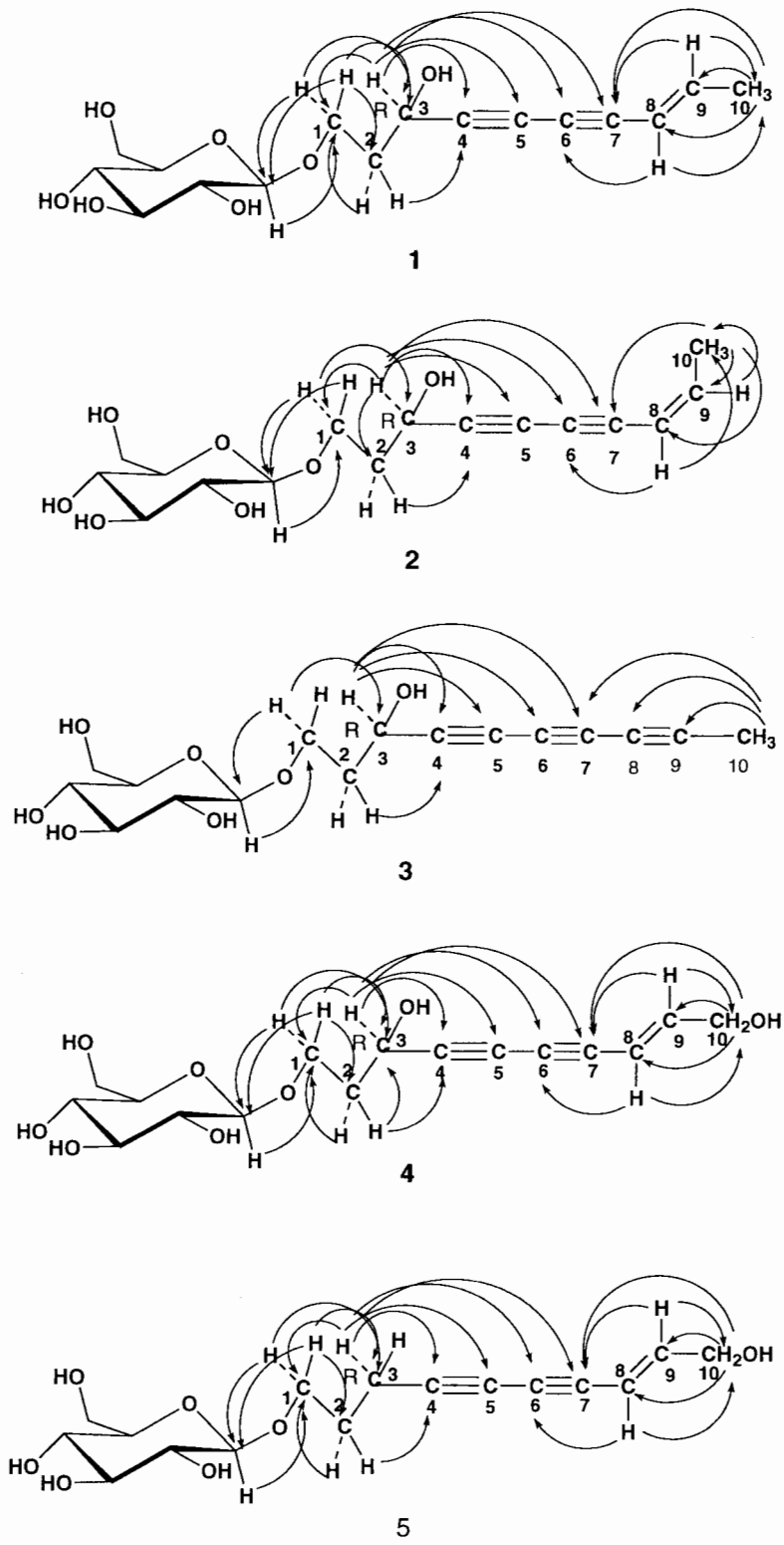


Fig. 1. HMBC correlations of compounds 1-5 (H  $\rightarrow$  C)



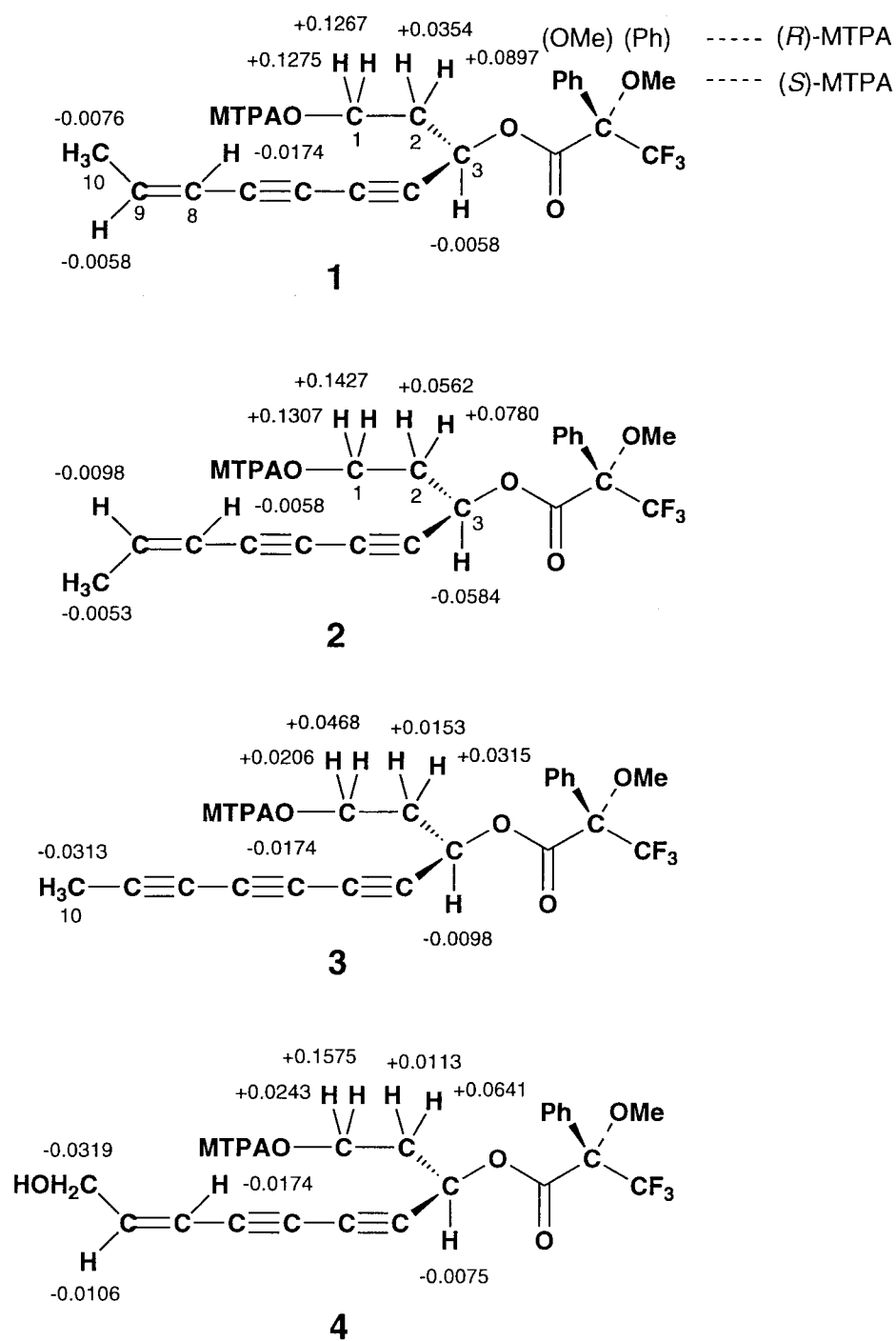


Fig. 2.  $\Delta\delta$  ( $\delta_S - \delta_R$ ) values (ppm) obtained from the MTPA esters of the aglycones of polyacetylene glucosides 1-4 in  $\text{CHCl}_3$  at 25 °C.

Table 1. Screening

No.	Plants	No.	Plants
1	<i>Melastoma dodecandrum</i> Lour.	31	<i>Chrysanthemum boreale</i> Mak.
2	<i>Aster tataricus</i> L.	32	<i>Ainsliaea acerifolia</i> Sch.-Bip.
3	<i>Achillea millefolium</i> L.	33	<i>Aralia continentalis</i> Ktag.
4	<i>Gnaphalium tranzschelii</i> Kriep.	34	<i>Ligulara</i> sp.
5	<i>Aster scaber</i> Thunb.	35	<i>Dryopteris crassrhizoma</i> Nakai
6	<i>Adenocaulon himalaicum</i> Bdgew.	36	<i>Porphyroscias decursiva</i> f. <i>albiflora</i> N.
7	<i>Synurus deltoides</i> (Ait.) Nakai	37	<i>Aconitum koreanum</i> (Levl.) Raipaics
8	<i>Eupatorium japonicum</i> Thunb.	38	<i>Inula japonica</i> Thunb.
9	<i>Siegesbeckia pubescens</i> Makino	39	<i>Galium verum</i> L.
10	<i>Cirsium vlassoniahum</i> Fisch	40	<i>Leontopodium leontopodioides</i> (Will.) Beauv.
11	<i>Carpesium macrocephalum</i> Franch et Sar	41	<i>Dioscorea nipponica</i> Makino
12	<i>Ligularia fischri</i> (Ledeb.) Turce.	42	<i>Cynura segetum</i> (Lour.) Merr.
13	<i>Senecio argunensis</i> Turce.	43	<i>Lactuca sativa</i> L.
14	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch.	44	<i>Maericaria chamomilla</i> L.
15	<i>Hypericum ascyon</i> L.	45	<i>Centaurea monanthus</i> Ge.
16	<i>Equisetum hiemale</i> L.	46	<i>Ageratum conyzoides</i> L.
17	<i>Bidens tripartita</i> L.	47	<i>Rumex crispus</i> L.
18	<i>Veronica sibirica</i> L.	48	<i>Polygonum tinctorium</i> Lour.
19	<i>Allium senescens</i> L.	49	<i>Isatis indigotica</i> Fort.
20	<i>Tribulus terrestris</i> L.	50	<i>Juglans mandshrica</i> Maxim.
21	<i>Lactuca indica</i> L.	51	<i>Aristolochia contorta</i> Bge.
22	<i>Senecio flammeus</i> Thrcz.	52	<i>Helianthus decapetalus</i> Hort.
23	<i>Echinops gmelini</i> Turcz.	53	<i>Mentha spicata</i> L.
24	<i>Delphinium grandiflorum</i> L.	54	<i>Cardiospermum halicacabum</i> L.
25	<i>Datura stramonium</i> L.	55	<i>Euphorbia pekinnensis</i> Rupr.
26	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.	56	<i>Ruta graveoles</i> L.
27	<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) MB.	57	<i>Isodon glaucocalyx</i> (Maxim.) Kodo
28	<i>Saussurea glomerata</i> Poiret.	58	<i>Bidens parviflora</i> Willd.
29	<i>Aster naackii</i> Regel	59	<i>Galatella dahurica</i> DC.
30	<i>Aster integrifolias</i> Franch.	60	<i>Periploca sepium</i> Bge.

Table 2. Physicochemical Properties of Polyacetylene Glucosides 1-5

	1	2	3	4	5
Appearance	brown powder	brown powder	brown powder	brown powder	needles
mp					164
$[\alpha]_D^{25}$	-146.4° (c=0.6, CH <sub>3</sub> OH)	-157.5° (c=0.4, CH <sub>3</sub> OH)	-52.2° (c=0.6, CH <sub>3</sub> OH)	-71.6° (c=0.5, CH <sub>3</sub> OH)	-67.7° (c=0.5, CH <sub>3</sub> OH)
EI-MS <i>m/z</i>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>	324 (M) <sup>+</sup> 162 (M-glc) <sup>+</sup>	342 (M) <sup>+</sup> 163 (M-Oglc) <sup>+</sup>	326 (M) <sup>+</sup> 164 (M-glc) <sup>+</sup>
HR-MS <i>m/z</i> found.	326.13690	326.13633	324.12116	342.13145	326.13658
calcd.	326.13655	326.13655	324.12090	342.13145	326.13655
Molecular formula	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>
UV $\lambda_{\max}^{\text{KBr}}$ nm ( $\epsilon$ )	283.5 (2,324) 267.5 (3,064) 253.0 (2,282) 240.5 (1,597)	283.0 (2,287) 267.0 (3,250) 253.0 (2,328) 239.5 (1,630)	283.5 (136) 267.0 (162) 253.0 (119) 238.5 (40)	283.0 (25,650) 267.0 (33,242) 253.0 (23,392) 240.5 (12,209)	328.5 (17,537) 283.0 (24,963) 266.5 (23,725) 252.0 (21,854) 239.0 (20,857)
IR $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup>	3394 s (OH) 2923 s (CH) 2231 m (C=C) 1675 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)	3382 s (OH) 2921 s (CH) 2231 m (C=C) 1635 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)	3386 s (OH) 2924 s (CH) 2221 s (C=C) 1643 m 1161 s (C-O) 1074 s (C-O)	3381 s (OH) 2886 s (CH) 2231 m (C=C) 1641 m (C=C) 1160 s (C-O) 1076 s (C-O)	3230 s (OH) 2927 s (CH) 2233 m (C=C) 1627 m (C=C) 1160 s (C-O) 1074 s (C-O)

Table 3. <sup>1</sup>H-NMR data of polyacetylene glucosides 1-5 (δ (ppm) in MeOH-d<sub>4</sub>, 500 MHz)

Position	1	2	3	4	5
1	3.99 1H dt(10.4,5.8)	4.00 1H dt(10.8,5.4)	3.98 1H dt(10.1,5.6)	3.99 1H dt (9.8,5.8)	3.96 1H dt(9.8,5.8)
	3.72 1H dt(10.4,6.4)	3.74 1H dt(10.8,6.8)	3.70 1H dt(10.1,6.8)	3.73 1H dt (9.8,6.7)	3.63 1H dt(9.8,6.6)
2	1.97 2H m	1.97 2H m	1.96 2H m	1.97 2H m	1.83 2H m
3	4.64 1H t (6.7)	4.67 1H t (8.2)	4.62 1H t (7.1)	4.65 1H t (6.7)	2.47 2H t (7.3)
8	5.58 1H dq(15.9,1.8)	5.53 1H dq(10.5,2.1)		5.81 1H dt (15.9,1.9)	5.76 1H dt(15.9,1.9)
9	6.32 1H dq(15.9,7.1)	6.20 1H dq(10.5,6.8)		6.39 1H dt(15.9,4.9)	6.34 1H dt (15.9,4.6)
10	1.80 3H dd (7.1;1.8)	1.89 3Hdd(6.8;2.1)	1.96 3H s	4.13 2H dd(4.9;,1.9)	4.13 2H dd(4.6,1.9)
glc-1'	4.26 1H d (7.7)	4.26 1H d (7.8)	4.25 1H d (7.6)	4.26 1H d (8.0)	4.24 1H d (8.0)

Table 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of polyacetylene glucosides **1-5** ( $\delta$  (ppm) in MeOH- $d_4$ , 125 MHz)

Position	1	2	3	4	5
1	66.9 t	66.8 t	66.7 t	66.8 t	69.2t
2	39.1 t	38.9 t	38.9 t	39.0 t	29.8 t
3	60.3 d	60.2 d	60.0 d	60.2 t	16.9 t
4	83.1 s	85.2 s	79.4 s	84.4 s	84.3 s
5	69.8 s	69.5 s	69.7 s	69.6 s	66.2 s
6	72.5 s	76.0 s	64.6 s	74.2 s	74.1 s
7	78.2 s	78.5 s	59.1 s	77.6 s	75.3 s
8	110.6 d	109.7 d	64.9 s	108.6 d	109.2d
9	145.1 d	144.0 d	78.0 s	148.1 d	147.1d
10	18.8 q	16.5 q	3.8 q	62.6 t	62.7 t
glc-1'	104.6 d	104.6 d	104.6 d	104.6 d	104.5 d
2'	75.2 d	75.1 d	75.1 d	75.1 d	75.2 d
3'	78.1 d	78.5 d	78.1 d	78.1 d	78.1 d
4'	71.7 d	71.6 d	71.6 d	71.6 d	71.7 d
5'	78.0 d	78.0 d	77.9 d	77.9 d	77.9 d
6'	62.8 t	62.7 t	62.7 t	62.7 t	62.8 t

Table 5. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** on Histamine Release from Mast Cells Induced by Antigen-Antibody Reaction (Inhibition rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 $\mu\text{g/ml}$	64.49	60.95	53.76	80.00	49.90
30 $\mu\text{g/ml}$	60.79	41.64	46.70	39.93	42.88
10 $\mu\text{g/ml}$	43.24	37.08	37.26	32.08	35.56
3 $\mu\text{g/ml}$	37.16	34.08	29.88	22.60	10.27

Indomethacine 625  $\mu\text{M}$  ; Inhibition rate 44.86%

Table 6. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** toward NO Production by Macrophages pretreated with LPS (Inhibitory rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 µg/ml	74.7	13.5	75.0	81.7	82.1
30 µg/ml	41.1		60.3	38.2	40.9
10 µg/ml	32.2		15.6	3.8	17.8
3 µg/ml			3.3	0.0	3.3

Assay : Cells were treated with compounds in the presence of 100 ng LPS at 37 °C for 18 h. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the culture supernatant was determined.

Table 7. Inhibitory Effect of Polyacetylene Glucosides **1-5** toward NO Production by Macrophages pretreated with LPS and IFN-γ (Inhibitory rate (%))

Concentration	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
100 µg/ml	57.2	4.4	74.5	71.0	71.2
30 µg/ml	14.2		19.3	16.6	21.1
10 µg/ml	5.3		9.3	13.2	4.3
3 µg/ml			8.2	6.3	2.0

Assay : Cells were treated with compounds in the presence of 100 ng LPS + 10 U/ml IFN-γ at 37 °C for 18 h. The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in the culture supernatant was determined.