



マツ材線虫病誘導抵抗性の 物質的解明

14560120

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金

基盤研究費(C)(2)研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 深宮齊彦
(広島大学総合科学部)
教授



マツ材線虫病誘導抵抗性の 物質的解明

14560120

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金
基盤研究費 (C) (2) 研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者
(広島大学総合科学部)
教授



は し が き

材線虫病はマツの伝染病であり、マツノザイセンチュウによって引き起こされる。その被害は日本から東アジア、ヨーロッパにもおよんでいる。本病には弱毒性の線虫を寄主に接種した後、強毒性線虫を接種しても枯死しない現象（誘導抵抗性）が見いだされている。しかし、弱毒性線虫の接種による宿主体内の成分変化と誘導抵抗性の関係および宿主1個体の誘導抵抗性の程度は不明であった。

材線虫病における誘導抵抗性に関わる物質とその作用機構を明らかにするために

- (1) 誘導抵抗性を生じたマツと生じていないマツ（対照木）の樹体内成分比較
- (2) 誘導抵抗性に関与する物質の単離と構造決定
- (3) 各種ピノシルビン誘導体についての構造活性相関
- (4) 樹体内における線虫の移動の定式化
- (5) 線虫の移動力の季節的变化と線虫アイソレイトによる違い
- (6) 誘導抵抗性を生じた宿主における線虫移動の変化の解明を行った。

研究組織

研究代表者：深宮 齊彦 (広島大学総合科学部)教授

研究分担者：富樫 一巳 (広島大学総合科学部)教授

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1,800	0	1,800
平成15年度	600	0	600
平成16年度	500	0	500
総計	2,900	0	2,900

研究発表

(1) 学会誌等

1) Katsumi, Togashi Between-isolate difference in dispersal ability *Nematology* 5, 559-564, 2003

2) Koji, Matsunaga Among-tree difference in the inhibition of systemic to dispersal *Appl. Entomol. Zool.* 39, 271-277, 2004

(2) 口頭発表

1) 河野 司 生物活性スチルベン化合物 日本化学会西日本大会

平成16年10月31日

第一部

成分検索

目次

- I 要旨
- II 緒論
- III 実験
- IV 結果・考察
- V 謝辞
- VI 参考文献
- VII 図表

I 要旨

植物には外的から身を守る為には様々な防御機能（抵抗性）が備わっている。この抵抗性は大きく分けて動的抵抗性と静的抵抗性の 2 種類がある。このうち、動的抵抗性はさらに形態学的な防御反応と化学的な防御反応に分けられる。そして化学的な防御反応で代表的なものがファイトアレキシンである。ファイトアレキシンは、病原菌の侵入により、生成されるものであるが、元から存在していて侵入により増大する物質の場合にもそう呼ばれている。マツの場合、pinocylvin と pinocylvin monomethylether がファイトアレキシンでその殺線虫活性は強い事が知られている。

松枯れの原因の一つとして、マツノマダラカミキリにより媒介されるマツノザイセンチュウ（以下センチュウ）の侵入がある。センチュウの侵入によってマツに通水障害が起こりマツは枯れる。しかし、弱毒センチュウを接種したマツは、その後一定期間は強毒センチュウが侵入しても、松枯れは起こらない。これは、弱毒センチュウの侵入によってマツに抵抗性が誘導されてマツ枯れを阻止しているからと考えられている。

ザイセンチュウ病に感染したマツにおいて安息香酸とそのグルコースエステル及びカテコールとサリチル酸が生成される。安息香酸とカテコールはザイセンチュウ病に感染したマツから単離された二次代謝物質でマツの細胞に対する毒性を持つ。またサリチル酸は病原体感染の情報を全身に知らせ、二次感染に向けての抵抗性を誘導する情報伝達物質である。

本実験では弱毒センチュウを摂取したアカマツ（以下処理木）と、無処理のアカマツ（以下コントロール）を MeOH で抽出したのち分配抽出しそれぞれの層を HPLC によってコントロールと処理木を比較した。また、pinocylvin と pinocylvin monomethylether を合成してその存在と量的関係を検索した。安息香酸、サリチル酸及びカテコールについても同様に比較検索を行った。

II 緒論

II-1 松枯れについて

マツノザイセンチュウによる大規模な松枯れは明治時代にはすでに起きており、長崎県や兵庫県から、被害が広がったと考えられている。戦後、GHQによりBHCなどが大量散布され枯損木が償却された。1950年代に被害は下火になるが、1960年代に入ると被害は再び拡大し始めた。被害は日本列島を東進して行くが、大面積の松林が1~2年で消滅する被害は1980年前後をピークに減少傾向にある。しかし、現在の被害量は1970年代前半よりも大きい。

材線虫を運搬して材線虫病をばらまく原因はマツノマダラカミキリであり、このカミキリを防除するために多くの殺虫剤が使用されてきた。しかし、農薬による食物や環境の汚染は、深刻な社会問題として認識され始めた。その後、松枯れ防除のための特別措置法が発行され、殺虫剤によるカミキリ駆除を主体とした松枯れ防除が進められ、空中散布が行われたが、多くの批判を浴びることとなり、新しい松枯れ防除技術の開発が望まれている。

II-2 植物の抵抗性とファイトアレキシン

宿主細胞が寄生菌と接触するときだけ宿主植物によって形成され、あるいは活性化される抗菌性物質が存在し、ファイトアレキシンとよぶ。現在では、植物が感染を受けた後、その組織内あるいは組織表面に浸出する抗菌性物質で健全植物には検出できないものをファイトアレキシンと呼んでいる。研究者によっては健全植物に見出されるものでもそれが感染によって顕著に増加する場合には、ファイトアレキシンとみなす人もいる。

北米産アカマツの辺材(sap wood)が病原菌の感染を受けると2種のスチルベン化合物、ピノシルピンとそのモノメチルエーテルを生産する。これらの物質はマツ科の植物の心材(heart wood)に広く分布するが、辺材にはない。タエダマツの辺材が病菌の感染を受けると、その感染部位を囲んで抵抗組織が形成され、その感染部位にピノシルピンが蓄積する。一般にファイトアレキシンは感染によって壊死を起こした部位に蓄積することが知られている。

II-3 マツノザイセンチュウと誘導抵抗性

マツノザイセンチュウの中には、本主の病原力に著しい種内変異のあることが知られ、松類に対してほとんど病原性を示さないいくつかの個体群、すなわち弱毒線虫が検出されている。清原らによれば、弱・強毒線虫を同時に接種しても、マツの生存率は高まっていない。一方前接種5日後からマツに抵抗性が発現し始め、30日後に最も高い生存率を示した。抵抗性は、時間とともに減少するものの、4ヶ月は持続している。

また、抵抗性は生きた線虫を前摂取したときのみ誘導され、マツに傷をつけるなどでは、誘導されない。

誘導された抵抗性は、前接種の部位を問わず全身的に誘導され、その樹体内では強毒線虫の増殖が著しく抑制されている。

一方、強毒線虫を接種した場合、強毒線虫はマツに対する作用が強くて早いために宿主は抵抗性を構築する時間がないと考えられている。

以上のように、弱毒線虫の接種により、クロマツに抵抗性を誘導することがわかっているが、マツの生育条件によっては弱毒線虫が枯死を引き起こすこともある。また、弱・強毒線虫の形態的識別は容易ではなく、両者間には自由に交配が起こるため、同一木における両線虫の個体数推移の把握はほとんど不可能である。そのため、同胞交配の反復により個体群を純系に近づけいっそう弱毒化させ弱毒性を安定させる方法や、ザイセンチュウとは形態が異なり、抵抗性誘導能力があるほかの線虫の探索が必要とされている。

弱毒線虫だけではなく抵抗性を誘導できる微生物の存在も確認されている。微生物は、クロマツよりもアカマツにおいて強い抵抗性を誘導している。

III・4 マツノザイセンチュウ感染による安息香酸の生成

マツザイセンチュウ病の発病機構は、当初ザイセンチュウによる組織の物理的な破壊が原因であると考えられていたが、その後病原毒素の存在が提唱され、自然状態で罹病し完全に枯死したマツより安息香酸、カテコールなどの毒性物質が異常代謝産物として単離同定された。そして罹病木と健全木との差を説明する化合物は、この2つのみであることが明らかになった。

線虫接種による樹体成分の変化を調べたところマツの樹体内に新たに安息香酸のグルコースエステルが生産されていることがわかった。また安息香酸はマツに対して有毒であるのに対し、そのグルコースエステルは無毒であることがアカマツ実生試験により明らかになっている。

線虫侵入直後から完全枯死までのマツ樹体内における安息香酸とグルコースエステルの動態を追跡すると、接種部位に近い部分では、安息香酸が生成し速やかにグルコースエステル化している。グルコースエステルは急速に増加するが、その後突然減少しそれと同時に安息香酸が急増する。それにつれて線虫も増加する。

以上の事からマツノザイセンチュウの侵入により、安息香酸が生成するが、直ちにグルコースエステルに解毒されること、しかもその代謝能力を上回って安息香酸が蓄積することにより松は枯死にいたるものと推定されている。

本研究では、弱毒線虫の接種による罹病アカマツと健全木との違いを化学的手法により明らかにすることを目的として行った。

III 実験・結果

III-1 実験に用いた器具

HPLC 分析は、東ソー製高速液体クロマトグラフ (ポンプ ; CCPE、UV monitor ; 8011 型) により、カラムに TSK-gel ODS-80Ts (4.6mm×150mm)、溶媒は基本的に MeOH-H₂O 系で行った。

NMR は JEOL 製 JNM-A400 型核磁気共鳴装置 (¹H-NMR : 400MHz、¹³C-NMR : 100MHz) を用い、CDCl₃ 溶液で測定した。内部基準物質は TMS(tetramethylsilane) を用いた。

TLC 分析は MERCK 製シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 0.25mm) により、溶媒は CHCl₃-MeOH-H₂O(50:14:3v/v)[クロメタ水]、C₆H₆-EtOH-C₆H₁₄(14:5:6v/v)[BEH]、EtOH-EtOEt(1:1v/v)[酢エチエーテル]で行った。

TLC 分取は MERCK 製シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 2mm) により、溶媒は C₆H₁₄-EtOAc(1:1v/v)で行った。

TLC 分析、分取ともにスポットの検出には UV ランプ (254nm) を用いた。

III-2-1 アカマツの MeOH エキスの準備

6本のアカマツ (大学構内) (#2,#3,#4,#6,#7,#10) に弱毒センチュウ OKD-1 を各 4 万頭 (1ml) を接種した。接種は径 6mm のドリルで地上 20cm の幹に斜めに孔を掘り、懸濁液を注入後、その入り口を脱脂綿で塞ぎ、ビニールテープで覆った。線虫を 5℃ に冷やしながら接種した。接種後残りの線虫は元気であった。

対照のアカマツ(#7) 1本を伐倒し、幹の当年生と 1年生の部分は材料として用いなかった。1 2年生の幹(ring)を用いて、含水率を測定するために、乾燥させた。

処理木 # 3 を伐倒し、地上 30cm から上方の幹で、1年生の一部までを抽出に用いた。処理木 # 2 を伐倒し、地上 30cm から上方の幹で、2年生の一部までを抽出に用いた。処理木 # 4 を伐倒し、地上 26cm から上方の幹で、4年生の一部までを抽出に用いた。

処理木 # 6 を伐倒し、地上 30cm から上方の幹で、3年生の一部までを抽出に用いた。(5℃ 保存は行わず) 当年枝を除く生枝も抽出に用いた。

対照アカマツ # 10 を伐倒し地際から、3年生の一部までの幹抽出に用いた。

III-2-2 強毒センチュウの接種

先に接種したアカマツ 2本に強毒センチュウ T-4 を接種したがマツ枯れは起こっていない。

(以上は、本学部富樫研究室において行われた。)

III-3 MeOH エキスの抽出及び分配

本学部富樫教授より提供されたアカマツを材の部分 (以下、材) と内樹皮の部分 (以下、皮) に分けた。推定乾重量は、コントロール材 4.0kg、処理材 7.2kg、コントロール皮 334.46g、処理皮 492.45g であった。これらを MeOH により抽出し、コントロール材 MeOH

extract(130.6g)、コントロール皮 MeOH extract(118.51g)、処理材 MeOH extract(197.48g)、処理皮 MeOH extract(204.14g)、処理枝 MeOH extract(103.72g)を得た。処理木とコントロールを比較するために、皮の MeOH エキスの一部を hexane、CHCl₃、BuOH の順に分離抽出した。コントロール皮 MeOH extract(10.97g)から hexane extract(0.29g)、CHCl₃ extract(0.2g)、BuOH extract(18.46g)、H₂O extract(2.67g)を得た。処理皮 MeOH extract(19.34 g)から hexane extract(0.54g)、CHCl₃ extract、BuOH extract(20.43g)、H₂O extract(4.89g)を得た。同様に、材の MeOH エキスの一部を hexane、CHCl₃ の順に分離抽出した。コントロール材 MeOH extract(6.49g)から hexane extract(2.94g)、CHCl₃ extract(2.08g)を得た。処理材 MeOH extract(14.2g)から hexane extract(4.15g)、CHCl₃ extract(5.53g)を得た。処理枝 MeOH extract(7.65g)から hexane extract(1.08g)を得た。

Fig. 1 重量

Schem 1 コントロール材の分配スキーム

Schem 2 処理材の分配スキーム

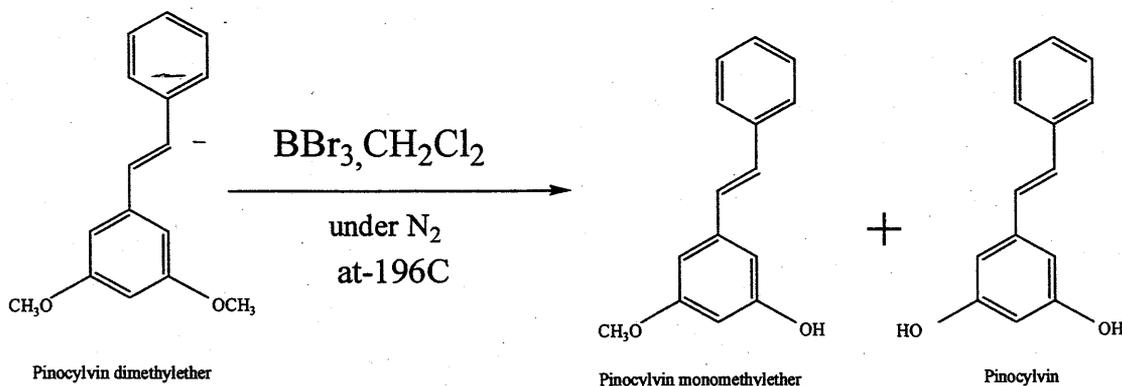
Schem 3 コントロール皮の分配スキーム

Schem 4 処理皮の分配スキーム

III - 4 生物活性試験

hexane 抽出後の MeOH エキスから 100 μg/ml と 10mg/ml の DMSO 溶液を作成した。現在富樫研究室に生物活性試験を依頼している。

III - 5 pinocylvin の合成



窒素気流下、-196℃ (液体窒素) のもとで BBr₃ (0.039ml) を CHCl₃ (0.91ml) に加えた。pinocylvin dimethylether 100mg を CHCl₃ 0.91ml に溶かし攪拌しながら溶媒に加えた後、混合物を室温に保った。10%KOH を加え濃塩酸 20 μl で酸性にし CH₂Cl₂ で抽出した。混合物を少量の Na₂SO₄ 飽和水溶液で洗い、無水 Na₂SO₄ で脱水し濃縮した。混合物を CH₂Cl₂ で溶かしシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分取した。展開溶媒は初め CHCl₃ を使い、途中で CHCl₃:MeOH=4:1 を用いた。

pinocylvin、monomethylether、dimethylether がそれぞれ 15.7mg、51.5mg、29.0mg が得られた。

- Fig. 2 pinocylvin の¹H NMR スペクトル
 Fig. 3 pinocylvin の¹³C NMR スペクトル
 Fig. 4 pinocylvin monomethylether の¹H NMR スペクトル
 Fig. 5 pinocylvin monomethylether の¹³C NMR スペクトル

III - 6 HPLC による成分比較

線虫の接種前後の成分変化を検索するために HPLC によって比較した。

- Fig. 6 材 MeOH extract の比較
 Fig. 7 材 MeOH extract の比較
 Fig. 8 皮 MeOH extract の比較
 Fig. 9 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 10 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 11 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 12 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 13 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 14 皮 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 15 皮 BuOH extract の比較
 Fig. 16 皮 BuOH extract の比較
 Fig. 17 皮 BuOH extract の比較
 Fig. 18 皮 H₂O extract の比較
 Fig. 19 材 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 20 材 CHCl₃ extract の比較
 Fig. 21 材 CHCl₃ extract の比較

III - 7 pinocylvin 及び pinocylvin monomethylether の分取・同定

コントロール材の CHCl₃ 層を分取した。カラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=1:1) により 17 のフラクションに分けた。そのうち、Fr. 1 (247.5mg) と Fr. 3 (67.7mg) をさらにプレパラティブ TLC により分取して、Fr. 1-1、Fr. 1-2、Fr. 3-1、Fr. 3-2 を得た。HPLC 分析後¹H NMR により構造を解析した。その結果 pinocylvin と pinocylvin monomethylether であると同定した。

- Fig. 22 Fr. 1-2 の HPLC 分析の結果
 Fig. 23 Fr. 1-2 の¹H NMR スペクトル
 Fig. 24 Fr. 3-1 の HPLC 分析の結果
 Fig. 25 Fr. 3-1¹H NMR スペクトル

III - 8 pinocylvin の定量

CHCl₃ extract から 10mg/ml 溶液を作成し 10 μl を抽出し HPLC 分析を行った。Pinocylvin を定量してその HPLC 分析結果より、検量線を作成しそれをもとに pinocylvin

の量を推定した。その結果皮では 2.7×10^{-4} % から 11×10^{-4} % に増加し、材では 3.8×10^{-2} % から 1.3×10^{-2} % に減少した。

Ⅲ - 9 pinocylvin monomethylether の定量

CHCl₃ extract から 10mg/ml 溶液を作成し 10 μl を抽入し HPLC 分析を行った。pinocylvin の検量線を用いて材の pinocylvin の量を推定した。その結果皮では 1.3×10^{-3} % から 2.3×10^{-3} % に増加し、材では 7.6×10^{-2} % から 1.6×10^{-2} % に減少した。

Ⅲ - 10 安息香酸・サリチル酸の検索

HPLC により皮の CHCl₃ extract を検索し、安息香酸とサリチル酸と比較した。その結果、同じ Rt を持つピークが存在することを確認した。

Ⅲ - 11 安息香酸の定量

安息香酸を定量して、検量線を作成した。皮の安息香酸の量を推定し、その結果皮では 7.2×10^{-4} % から 19×10^{-4} % に増加し、材では 4.5×10^{-2} % から 3.0×10^{-2} % に減少した。

Ⅲ - 12 catechol の検索

HPLC により CHCl₃ extract を検索して、catechol と比較したが、Rt が等しいピークは見られなかった。

IV 考察

IV-1 pinocylvin と pinocylvin monomethylether

合成した pinocylvin と pinocylvin monomethylether は実験を進めていくにつれて新しいピークが現れた。そこで pinocylvin dimethylether を MeOH に溶かして放置するとやはり新しいピークが見られた。単離した 2 種類の化合物についても同様であった。これは、トランス体の化合物が光によってシス体に変異していると推定できる。

Fig. cis 体への異性化

IV-2 処理木とコントロールの比較

材、皮ともに CHCl_3 extract の極性部分では、量的に変化しているピークがいくつか見られることから、成分に変動が起こっていることが推察される。また、他の層についてもさらに極性部分を調べると変動が起こっている可能性はある。

本研究においては、弱毒センチュウの接種がアカマツに影響を与えて、その結果成分に変動が起こっていると思われる。

今後は、処理木のエキスを単離構造決定し生物活性試験を検討する必要がある。

IV-3 各化合物の量的変動

定量分析の結果より、3 種類の化合物について材での減少と皮での増加が見られた。この結果だけでは、単に材・皮でそれぞれに変化がおきたのか、材にあった物が皮に移動したのかは判断できないが、いずれにしても弱毒センチュウの接種によって、3 種の化合物が量的に変化していると推察できる。

今後は、皮から pinocylvin と pinocylvin monomethylether を実際に単離して重量を測定して確認する必要がある。

IV-4 安息香酸の同定

単離されたコントロール材より、安息香酸と思われるフラクション (Fr.9) を IR 及び ^1H NMR により構造を検討した結果、安息香酸ではないことがわかった。

第二部

スチルベン化合物の合成と生物活性

目次

第1章 序論	1
第2章 スチルベン誘導体の合成	2
2-1 実験に用いた器具	
2-2 Pinosylvin、Pinosylvin monomethylether の合成	
2-3 Pinosylvin と Pinosylvin monomethylether の還元	
2-4 Wittig 反応による Stilbene の合成	
2-5 マクマリーカップリングによるスチルベンの合成	
2-6 脱メチル化によるヒドロキシスチルベンの合成	
第3章 生物活性試験	11
3-1 マツノザイセンチュウに対する生物活性試験	
3-1-1 マツ枯れの背景について	
3-1-2 マツノザイセンチュウに対する生物活性試験の方法	
3-1-3 結果	
3-2 NO 産生抑制活性試験	
3-2-1 NO と NOR に産生抑制活性について	
3-2-2 NO 産生抑制活性試験の方法	
3-2-3 NO 産生抑制活性試験の結果	
第4章 考察	19

謝辞

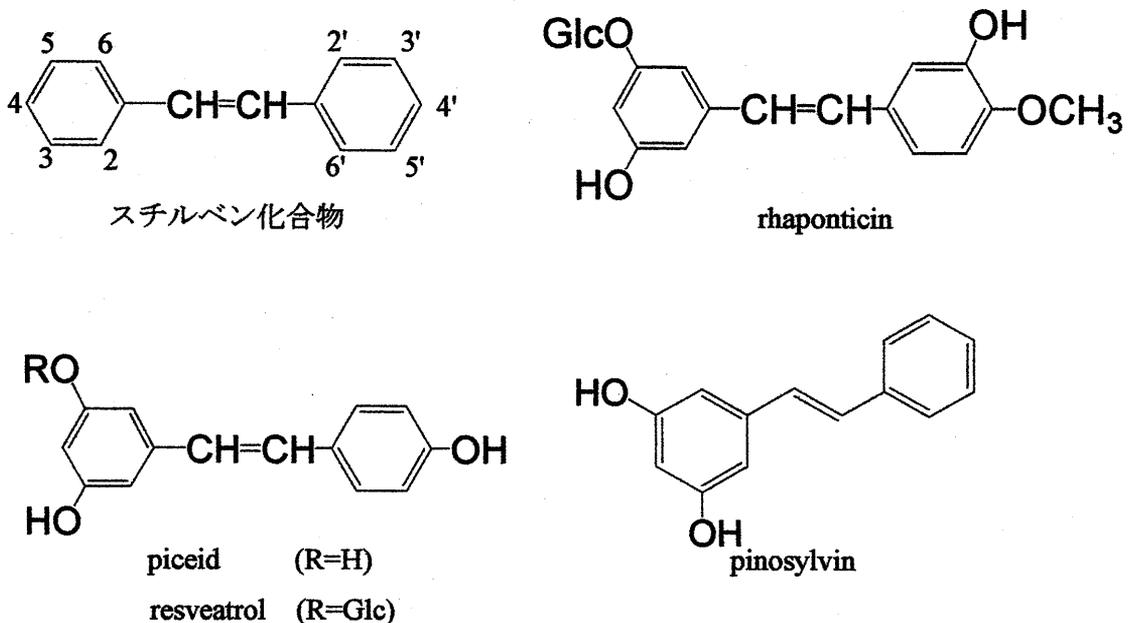
参考文献

図表

第1章 序論

スチルベン化合物は、植物に広く分布し、様々な生物活性を示す。例えば、タデ科のマルバダイオウ *Rheum rhaponticum* やカラダイオウ *R. undulatum* に含まれる *rhaponticin* は、漢方薬である大黄の成分であり誘導体が、NO 産生抑制活性を示す。ブドウ果実などに含まれる *resveratrol* は、抗発ガン作用が報告され注目されている。虎杖根および何首烏に含まれる *piceid* は、ラットにおける過酸化脂質による肝障害に対して、過酸化脂質の肝臓中の蓄積を阻害することが明らかとなった。また、これらの化合物はラット肝のミクロソーム中で ADP や NADPH によって引き起こされている脂質の過酸化をも阻害した。マツに含まれる *pinosylvin* はマツ枯れに対する、誘導抵抗性成分である。

本研究の目的は、まだ報告の少ないハロゲンを含むスチルベン誘導体を合成する。そして、生物活性試験を行い、スチルベン化合物の構造活性相関を調べ、活性の向上を図り、新たな技術発展を目的とする。今回は、主にマツ枯れにおける殺虫活性について研究を行った。また、一部合成した化合物は NO 産生抑制活性について試験した。

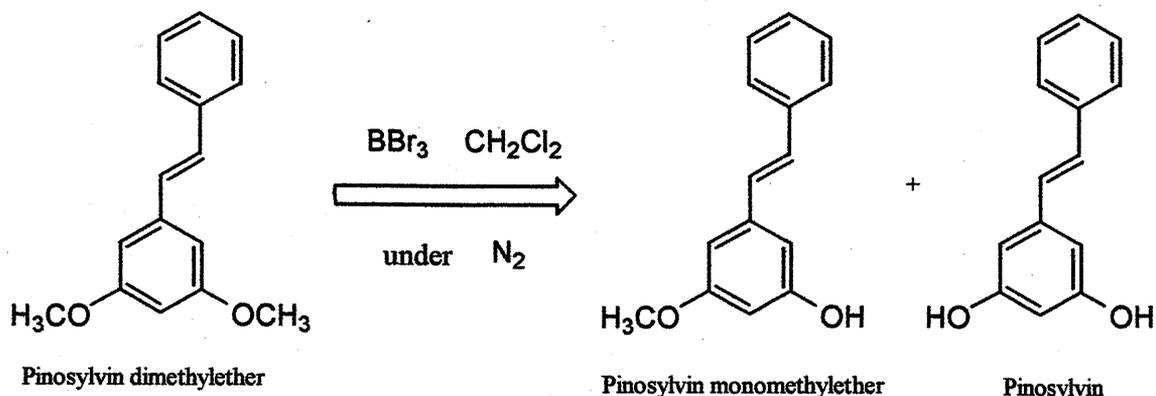


第2章 スチルベン誘導体の合成

2-1 実験に用いた器具

- NMR は JEOL (日本電子) 製 JNM- α 400 型核磁気共鳴装置 ($^1\text{H-NMR}$:400 MHz、 $^{13}\text{C-NMR}$:100 MHz) を用い、 CDCl_3 溶液で測定した。内部基準物質は TMS (Tetramethylsilane) を用いた。
- IR (赤外線吸収分光法) は JASCO (日本分光) 製 IR-810 型赤外分光光度計を使用した。
- MS の測定には、広島大学自然科学研究支援開発センター (N-BARD) の JEOL (日本電子) 製 SX-102A 型二重収束質量分析計を用い、同センターに測定を依頼した。
- HPLC 分析は、東ソー製高速液体クロマトグラフ (ポンプ; CCPE、UVmonitor; 8011 型) で、カラムは TSK-gel ODS-80Ts (4.6 mm \times 150 mm)、溶媒は MeOH:H₂O=7:3 の混合溶媒で行った。
- TLC (Thin-Layer Chromatography) 分析は MERCK 製シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 0.25 mm) により、溶媒は CHCl_3 又は CHCl_3 と MeOH の混合溶媒で行った。
- TLC 分取は MERCK 製シリカゲル 60F₂₅₄ (厚さ 2 mm) により、溶媒は CHCl_3 で行った。
- TLC 分析、分取ともにスポットの検出には UV ランプ (254 nm) を用いた。
- 融点測定は NRK 製空気浴法微量融点測定装置を使用し、温度補正は行わなかった。

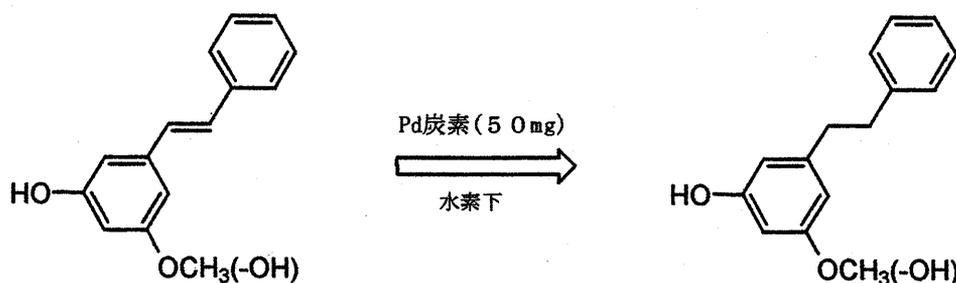
2-2 Pinosylvin、Pinosylvin monomethylether の合成



窒素気流下、 -78°C のドライアイス冷却のもとで Pinosylvin dimethylether 1.01 g を CH_2Cl_2 10 ml に溶かし、 BBr_3 0.4 ml を攪拌しながら加えた。2時間30分反応させたのち、混合物を室温に保った。10%の NaOH を 1.7 ml 加え、次に10%の塩酸を酸性になるまで加え、 CH_2CH_2 で抽出し、無水 Na_2SO_4 を加えて脱水し濃縮した。混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分取した。展開溶媒は初め CHCl_3 を用い、途中で $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=4:1$ を用いた。結果、Pinosylvin 609 mg (収率 68%)、Pinosylvin monomethylether 13 mg (収率 1.3%) 得られた。

次に、Pinosylvin monomethylether の収率を上げるため、 BBr_3 量を前の実験の 60% に減らし、同様に合成を行った。結果 Pinosylvin dimethylether 713 mg から Pinosylvin monomethylether 199 mg (収率 30%) 得られた。

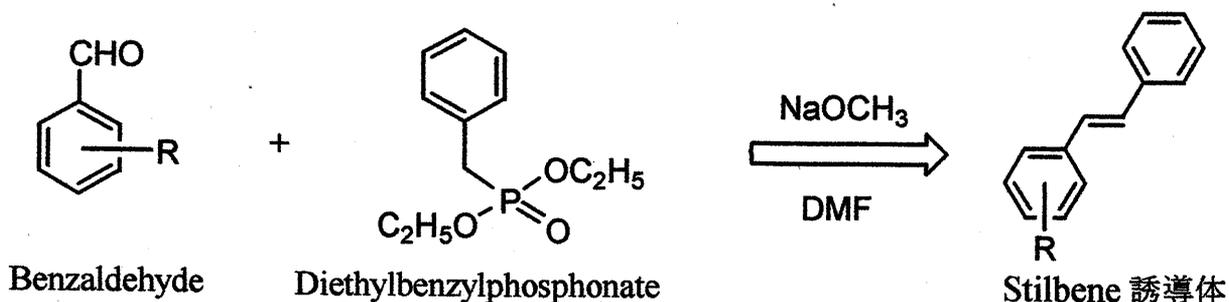
2-3 Pinosylvin と Pinosylvin monomethylether の還元



水素下で、水素を吸着させた Pd 炭素 50 mg に Pinosylvin 50.8 mg を加え、12時間攪拌して反応させた。結果 38.4 mg の還元物質を得た。(収率 75%)

同様に、Pinosylvin monomethylether 43.2 mg から 25.2 mg の還元物質を得た。(収率 57%)

2-4 Wittig 反応による Stilbene の合成



NO.	product stilbene	yield	NO.	product stilbene	yield
1	4-Hydroxy-3-methoxy	4%	6	2-Fluoro-3-methoxy	45%
2	3-Hydroxy-4-methoxy	10%	7	3-Bromo-4-methoxy	18%
3	4-Hydroxy	11%	8	5-Bromo-2-methoxy	52%
4	4-Fluoro-3-methoxy	86%	9	2-Methoxy-3-nitro	48%
5	3-Fluoro-4-methoxy	52%			

<1> (E)-4-Hydroxy-3-methoxystilbene の合成

窒素気流下、4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (Vanillin) 913 mg を DMF 8 ml に溶かし、NaOMe 672 mg を加えたのち、60 °C に温めながら 3 時間攪拌して反応させた。次に、Diethylbenzylphosphonate 1.52 g を DMF 8 ml に溶かしてから加えて、100 °C で温めながら一晩中反応させた。常温になるまで待ったのち 10 % の塩酸を酸性になるまで加え、エーテルで抽出した。原料の Benzaldehyde 除去のため NaHSO₄ 2.0 g を加えてよく振り、エーテルで抽出した。この混合物を TLC 分取により精製し 53.7 mg の (E)-4-Hydroxy-3-methoxystilbene を得た。

MS m/z : 226 (M⁺) . HRMS m/z : 226.0994 (calcd. for C₁₅H₁₄O₂: 226.0994) .

mp : 129-130 °C . yield : 4 % .

<2> (E)-3-Hydroxy-4-methoxystilbene の合成

<1>と同様にして 3-Hydroxy 4-methoxybenzaldehyde 1.52 g、DMF 14 ml、NaOCH₃ 1.12 g、Diethylbenzylphosphonate 2.51 g を用いて行った。NaHSO₄ 処理後、1.13 g の混合物を得て、そのうち 364 mg を TLC 分取により精製し、72.7 mg の (E)-3-Hydroxy-4-methoxystilbene を得た。

MS m/z : 226 (M⁺) . HRMS m/z : 226.0994 (calcd. for C₁₅H₁₄O₂: 226.0994) .

mp : 153-154 °C . yield : 10 % .

<3> (E)-4-Hydroxystilbene の合成

<1>と同様にして 4-Hydroxybenzaldehyde 977 mg、 DMF 11.2 ml、 NaOCH₃ 896 mg、 Diethylbenzylphosphonate 2.00 g を用いて行った。37.3 mg の(E)-4-Hydroxystilbene を得た。
MS m/z : 196 (M⁺) . HRMS m/z : 196.0891 (calcd. for C₁₄H₁₂O: 196.0888) .
mp : 170-171 °C . yield : 11 % .

<4> (E)-4-Fluoro-3-methoxystilbene の合成

窒素気流下、室温で、Diethylbenzylphosphonate 2.51 g を DMF 7 ml に溶かし、NaOMe 560 mg に加えて、30 分間攪拌し、反応させた。次に、4-Fluoro-3-methoxybenzaldehyde 1.54 g を DMF 7 ml に溶かしてから加えて、100°C で温めながら一晩中反応させた。常温になるまで待ったのち 10 % の塩酸を酸性になるまで加え、エーテルで抽出した。原料の benzaldehyde 除去のため NaHSO₄ 2.0 g を加えてよく振り、エーテルで抽出した。

(E)-4-Fluoro-3-methoxystilbene 1.96 g を得た。

MS m/z : 228 (M⁺) . HRMS m/z : 228.0952 (calcd. for C₁₅H₁₃OF: 228.0951) .
mp : 69-70 °C . yield : 86 % .

<5> (E)-3-Fluoro-4-methoxystilbene の合成

<4>と同様にして、3-Fluoro-4-methoxybenzaldehyde 923 mg、 DMF 8.4 ml、 NaOCH₃ 336 mg、 Diethylbenzylphosphonate 1.52 g を用いて行った。(E)-3-Fluoro-4-methoxystilbene 718.2 mg を得た。

MS m/z : 228 (M⁺) . HRMS m/z : 228.0959 (calcd. for C₁₅H₁₃OF: 228.0951) .
mp : 116-117 °C . yield : 52 % .

<6> (E)-2-Fluoro-3-methoxystilbene の合成

<4>と同様にして、2-Fluoro-3-methoxybenzaldehyde 923 mg、 DMF 8.4 ml、 NaOCH₃ 336 mg、 Diethylbenzylphosphonate 1.52 g を用いて行った。(E)-2-Fluoro-3-methoxystilbene 609 mg を得た。

MS m/z : 228 (M⁺) . HRMS m/z : 228.0950 (calcd. for C₁₅H₁₃OF: 228.0951) .
mp : 67 °C . yield : 45 % .

<7> (E)-3-Bromo-4-methoxystilbene の合成

<4>と同様にして、3-Bromo-4-methoxybenzaldehyde 2.15 g、DMF 14 ml、NaOCH₃ 560 mg、Diethylbenzylphosphonate 2.28 g を用いて行った。(E)-3-Bromo-4-methoxystilbene 502mg を得た。

MS m/z : 288 (M⁺-1) . HRMS m/z : 288.0152 (calcd. for C₁₅H₁₃O⁷⁹Br: 288.0150) .

mp : 138 °C . yield : 18 % .

<8> (E)-5-Bromo-2-methoxystilbene の合成

<4>と同様にして、5-Bromo-2-methoxybenzaldehyde 680 mg、DMF 5 ml、NaOCH₃ 265 mg、Diethylbenzylphosphonate 272 mg を用いて行った。(E)-5-Bromo-2-methoxystilbene 470mg を得た。

MS m/z : 288 (M⁺-1) . HRMS m/z : 288.0147 (calcd. for C₁₅H₁₃O⁷⁹Br: 288.0150) .

yield : 52 % .

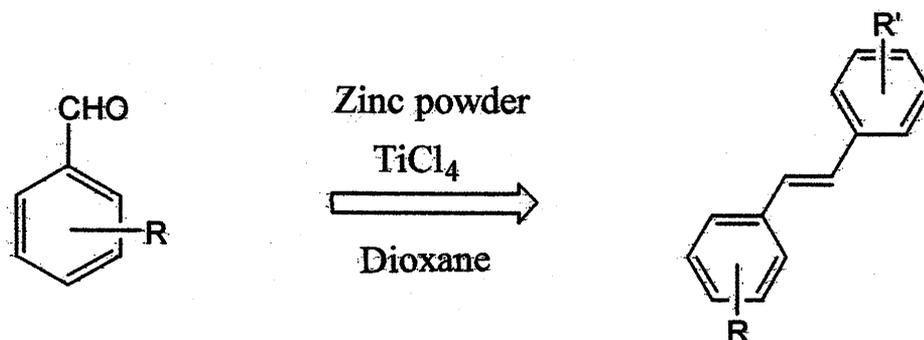
<9> (E)-3-Methoxy-2-nitrostilbene の合成

<4>と同様にして、3-Methoxy-2-nitrobenzaldehyde 906 mg、DMF 10 ml、NaOCH₃ 280 mg、Diethylbenzylphosphonate 1.14 g を用いて行った。(E)-3-Methoxy-2-nitrostilbene 606 mg を得た。

MS m/z : 255 (M⁺) . HRMS m/z : 255.0897 (calcd. for C₁₅H₁₃NO₃ 255.0896) .

mp : 108 °C . yield : 48 % .

2-5 マクマリーカップリングによるスチルベンの合成



NO.	product stilbene	yield
10	4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxy	5%
11	3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxy	11%

<10> (E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene の合成

窒素気流下、粉末亜鉛 1.96 g に 4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxybenzaldehyde 1.54 g をジオキサン溶媒にて加えた。-15 °C条件下で(氷に塩化カルシウムを加える)、四塩化チタン 2.85 g を加え、24 時間還流した。エーテルで抽出した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィにて精製し、溶媒は CHCl_3 を用いた。(E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene を 311 mg を得た。

MS m/z : 276 (M^+) . HRMS m/z : 276.0963 (calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{F}_2$: 276.0962) .

mp : 139 °C . yield : 5 % .

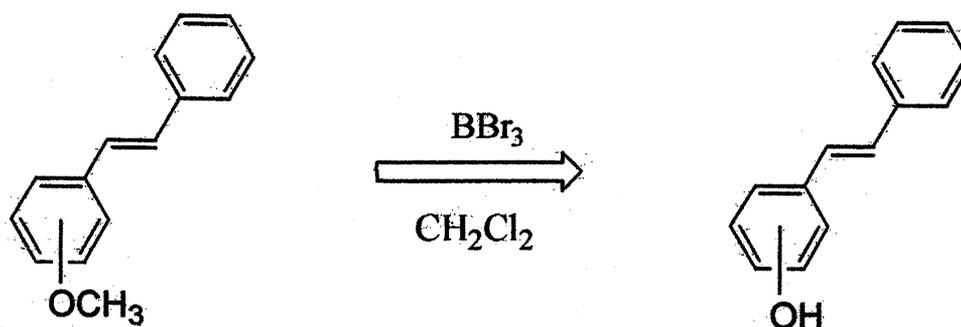
<11> (E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene の合成

<10>と同様に粉末亜鉛 1.40 g、3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxybenzaldehyde 1.10 g、四塩化チタン 2.03 g を用いて行った。(E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene を 95.5 mg を得た。

MS m/z : 276 (M^+) . HRMS m/z : 276.0964 (calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{F}_2$: 276.0962) .

mp : 158 °C . yield : 11 % .

2-6 脱メチル化によるヒドロキシスチルベンの合成



NO.	product stilbene	yield	NO.	product stilbene	yield(%)
12	3-Hydroxy	57%	16	3-Bromo-4-hydroxy	4%
13	4-Fluoro-3-hydroxy	43%	17	3-Hydroxy-2-nitro	52%
14	3-Fluoro-4-hydroxy	36%	18	4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxy	66%
15	2-Fluoro-3-hydroxy	5%	19	3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxy	28%

<12> (E)-3-Hydroxystilbene の合成

Pinosylvin の合成と同様に、 BBr_3 を用いてエーテルをアルコールに変換させた。

(E)-3-Methoxystilbene 30 mg を窒素気流下、氷冷却のもとで CH_2Cl_2 3.0 ml に溶かした溶液に、 BBr_3 (1.0 M solution in hexanes) 1.0 ml を攪拌しながら加えた。2 時間 30 分反応させた後、混合物を室温に保った。10 % の水酸化ナトリウム水溶液を 1.0 ml 加え、次に 10 % 塩酸を酸性になるまで加えたのち抽出し、無水 Na_2SO_4 を加えて脱水し濃縮した。TLC 分取により精製し、(E)-3-Hydroxystilbene 16.0 mg を得た。

MS m/z : 196 (M^+). HRMS m/z : 196.0887 (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}$: 196.0888).

mp: 120-121 °C . yield: 57 % .

<13> (E)-4-Fluoro-3-hydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-4-Fluoro-3-methoxystilbene 262 mg、 BBr_3 2.8 ml、 CHCl_3 3 ml を用いて行った。(E)-4-Fluoro-3-hydroxystilbene を 106 mg を得た。

MS m/z : 214 (M^+). HRMS m/z : 214.0790 (calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{OF}$: 214.0794).

mp: 83-84 °C . yield: 43 % .

<14> (E)-3-Fluoro-4-hydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-3-Fluoro-4-methoxystilbene 230 mg、 BBr_3 2.8 ml、 CHCl_3 3 ml を用いて

行った。(E)-3-Fluoro-4-hydroxystilbene を 78.6 mg を得た。

MS m/z : 214 (M^+). HRMS m/z : 214.0800 (calcd. for $C_{14}H_{11}OF$: 214.0794).

mp : 129-130 °C . yield : 36 % .

<15> (E)-2-Fluoro-3-hydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-2-Fluoro-3-methoxystilbene 468 mg、 BBr_3 4 ml、 $CHCl_3$ 5 ml を用いて行った。(E)-2-Fluoro-3-hydroxystilbene を 20.0 mg を得た。

MS m/z : 214 (M^+). HRMS m/z : 214.0795 (calcd. for $C_{14}H_{11}OF$: 214.0794).

mp : 96 °C . yield : 5 % .

<16> (E)-3-Bromo-4-hydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-3-Bromo-4-methoxystilbene 289 mg、 BBr_3 3.0 ml、 $CHCl_3$ 5 ml を用いて行った。(E)-3-Bromo-4-hydroxystilbene を 12 mg を得た。

MS m/z : 274 ($M^+ - 1$). HRMS m/z : 273.9989 (calcd. for $C_{14}H_{11}O^{79}Br$: 273.9993).

mp : 120 °C . yield : 4 % .

<17> (E)-3-Hydroxy-2-nitrostilbene の合成

<12>と同様に、(E)-3-Methoxy-2-nitrostilbene 546 mg、 BBr_3 4.3 ml、 $CHCl_3$ 5 ml を用いて行った。(E)-3-Hydroxy-2-nitrostilbene を 273 mg を得た。

MS m/z : 241 (M^+). HRMS m/z : 241.0738 (calcd. for $C_{14}H_{11}NO_3$: 241.0739).

yield : 52 % .

<18> (E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene 200 mg、 BBr_3 2.2 ml、 $CHCl_3$ 4 ml を用いて行った。(E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxystilbene を 124 mg を得た。

MS m/z : 248 (M^+). HRMS m/z : 248.0647 (calcd. for $C_{14}H_{10}O_2F_2$: 248.0649).

mp : 161 °C . yield : 66 % .

<19> (E)-3,3'-Difluoro-4,4'-hydroxystilbene の合成

<12>と同様に、(E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene 70 mg、 BBr_3 0.8 ml、 $CHCl_3$ 2.5 ml を用いて行った。(E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxystilbene を 18.4 mg を得た。

MS m/z : 248 (M^+) . HRMS m/z : 248.0651 (calcd. for $C_{14}H_{10}O_2F_2$: 248.0649) .
mp : 189 °C . yield : 28 % .

第3章 生物活性試験

3-1 マツノザイセンチュウに対する生物活性試験

3-1-1 マツ枯れの背景について

マツノザイセンチュウに由来すると考えられる大規模なマツ枯れは明治時代にすでに記述があり長崎県や兵庫県の湾岸近辺から被害が広がったと考えられている。第二次大戦中はマツ林の管理が手薄となり被害が拡大した。戦後、連合国総司令部の主導でマツ枯れ対策としてBHCなどが大量散布され、人と組織を動因して枯損木が、徹底的に焼かれた。1950年代には一旦マツ枯れは下火になるが、1960年代になると被害は拡大し始めた。マツ枯れは1970年代前半には九州北部の海岸線のクロマツ防砂林に壊滅的被害をもたらした。被害は除々に日本列島を東進し、1970年代後半には中国地方のマツタケ山が被害を受け壊滅状態のアカマツ林が多く存在した。大面積の松林が1~2年で消滅する被害は、1980年代前後をピークに減少傾向にあるが、現在の被害量は1970年代よりも依然として大きくマツ枯れ防除体制が解ける状態でない。

国や自治体は、公園・名勝地の松林や防風林としての海岸線のクロマツ林などを維持・管理しなければならない。民間では、マツタケ山のアカマツ林やゴルフ場のマツ林などを維持する必然性がある。防除努力はなされたが一時期はマツ枯れの勢いが勝り、放置されたマツ枯れ跡地が西日本各地に見られた。禿げ山のまま放置されているマツ枯れ激害地の多くは、乾燥した貧栄養地である。このようなマツ林は生態学的に極相で、他の樹木が生育しにくい環境にある。この極相地では次世代のマツ林が育っても再びマツ枯れが繰り返されやすい。古い枯れ木はシロアリの巣窟となり、家屋への二次被害も一部では問題化している。海岸に生育可能なマツはマツ枯れが無ければ景観を兼ね備えた優秀な防砂林となる。またマツ以外の樹木が生育しにくい禿げ山などでは、緑を回復させるためのマツの植林は有効である。現状ではマツを植林しても投資に見合う経済効果は得にくい上に、材線虫によるマツ枯れも心配しなければならない。したがって、マツの植林は敬遠されることとなる。適切なマツ枯れ防止戦略がこのような問題解決の鍵となっていることは明白である。

材線虫を運搬して材線虫病をばらまく原因はマツノマダラカミキリである。このカミキリを防除するために多くの殺虫剤が使用されてきた。BHC、DDT、ディルドリン、有機水銀剤などの殺虫効果は絶大なもので、戦後の農薬使用量は激増した。しかし、これ

ら農薬による食物及び環境の汚染は、深刻な社会問題として認識されはじめ、我が国では1971年以降「農薬取締法」の改正等によりBHC、DDTの販売は禁止された。このため代替のマツ枯れ防止農薬として毒性および残留性の低いMEP（有機リン系殺虫剤）やNAC（カルバメート系殺虫剤）などの使用が検討されてきた。これらをふまえて、マツ枯れ防除のための特別措置法が1977年に発行され、これら殺虫剤によるカミキリ駆除を主体としたマツ枯れ防除が進められるように成ってきた。

殺虫剤散布によって材線虫の媒介者であるマツノマダラカミキリの発生を制御できれば、材線虫の伝搬を防ぎマツ枯れを防ぐことができる。この点で殺虫剤散布は即効性があり、有効なマツ枯れ防除手段となる。枯れたマツを切り倒して薬剤処理でカミキリの幼虫を殺すことも重要な防除手段として位置づけられている。枯損木を春先に伐倒して、球切りにした後、殺虫剤散布や燻蒸処理が行われる。しかし、立ち枯れたマツの処理には多大な労力を必要とするため、マツ山全体のように広い範囲でマツ林が枯れたり、険しい立地、私有林では実行しにくい方法である。現状では、立ち枯れのまま放置されたマツを多くみることができ、新たに枯れたマツには材線虫とカミキリの幼虫が生息するために、材線虫病の病巣が温存されることになる。殺虫剤を多量にばらまかないという観点から、立ち枯れのまま放置することは悪くないが材線虫病も病巣は放置されるままとなる。このことが殺虫剤散布にもかかわらずマツ枯れがくすぶり続けている原因の一つとなっている。

マツ枯れ防除のための特別措置法は期限付きで5年毎に3回延長され、1996年まで20年間続いた。この法律は1997年3月に廃止され、実質的な内容が森林病虫害等防除法に取り込まれ恒久法となった。法律と国庫補助金に支えられてMEP剤およびNAC剤等による防除努力は約20年続いた。戦後松林の維持につき込まれてきた労力費用は決して小さいものでないし、それぞれの時代で適当だと判断されたマツ枯れ防除政策が実施されてきたものと想像できる。しかし、法律によって可能となったこれらの殺虫剤の空中散布は、神経毒性や環境ホルモンとの関連性を問題とする日弁連、自然保護団体、マスコミほかの強い批判を浴びることとなった。時代は移り環境問題が問い直されている今、新しいマツ枯れ防除技術が模索されている。

植物には外的から身を守るために様々な防御機能が備わっている。このうち化学的な防御反応で代表的なものがファイトアレキシンである。ファイトアレキシンは病原菌の

侵入により生成されるものであるが、元から存在していて病原菌の侵入により増大する物質の場合でもそう呼ばれる。一般にファイトアレキシンは感染によって懐死を起こした部位に蓄積することが知られている。マツの場合、ファイトアレキシンとして、2種のスチルベン化合物、Pinosylvin と Pinosylvin monomethylether が存在し、強い殺虫活性がある。マツに弱毒性センチュウを接種するか、低密度の強毒性センチュウを接種すると、マツ内の Pinosylvin と Pinosylvin monomethylether 濃度が増し、マツ枯れに対する抵抗性が誘導される。しかし、弱毒性センチュウは、接種後マツを枯らすこともあり毒性の強さを制御することは難しい。センチュウの毒性は共存するバクテリアに由来すると推察されている。一方、マツはある種のバクテリア、カビに対しても類似の抵抗性を示す。これらの微生物はクロマツよりもアカマツに強いマツ枯れ抵抗性を誘導すると言われている。

本研究では、新たにスチルベン化合物を合成し、生物活性試験を行い、この結果より、マツノザイセンチュウに対する活性のメカニズムを探るとともに、強い活性を持つ化合物を作りだし、新たなマツ枯れ防除技術に発展することを目的とした。

3-1-2 マツノザイセンチュウに対する生物活性試験の方法

合成したスチルベン化合物のマツノザイセンチュウ（以下、センチュウ）に対する殺虫活性を試験した。

1日目 センチュウ（T-4）を、麦に接種し、繁殖させた。

24日目 センチュウを麦から水で抽出した。

25日目 水中のセンチュウを1分間1500回転で遠心分離し、センチュウを沈めた後、上澄みの水を取り除き、水を加えた。この作業を3度行ない、センチュウを洗浄した。その後、1 mlあたり約5000匹になるように調整した。

26日目 各々のスチルベン化合物を10 ppmと100 ppmの2種の濃度で測定した。一部の化合物は250 ppmでも測定した。10 ppmはスチルベン化合物1 mg/1 ml（溶媒はDMSO）を1 μ lとDMSOを9 μ l、水490 μ lとセンチュウの懸濁液500 μ lを混ぜ、10 ppm溶液とした。100 ppmはスチルベン化合物1 mg/1 ml（溶媒はDMSO）を10 μ lと水490 μ lとセンチュウの懸濁液500 μ lを混ぜ、100 ppm溶液とした。24時間ごとにセンチュウの死亡率をカウントした。活性が強い化合物はLD₅₀（センチュウの死亡率が50%になる濃度）を測定した。また、サリチル酸とサリチル酸フェニルも測定を行った。以上、生物活性試験は本学部の富樫研究室にて行った。

3-1-3 結果

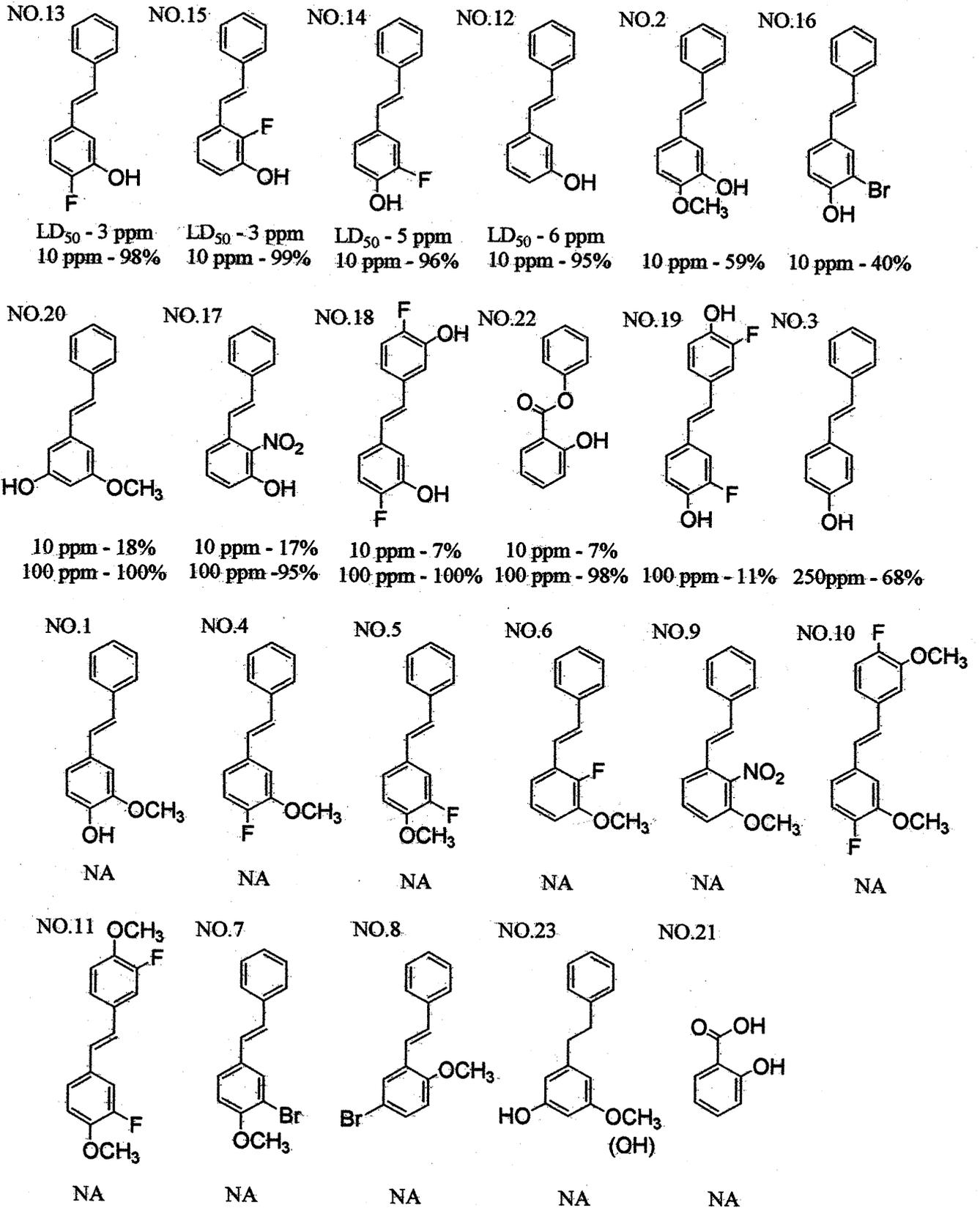
生物活性試験の結果を以下の表に示す。

Table. Nematicidal Activity of Stilbene

NO.	Treated compound	Lethality			LD ₅₀
		250 ppm	100 ppm	10 ppm	
1	4-Hydroxy-3-methoxystilbene	8%	—	—	
2	3-Hydroxy-4-methoxystilbene	100%	98%	59%	
3	4-Hydroxystilbene	68%	—	—	
4	4-Fluoro-3-methoxystilbene	13%	—	—	
5	3-Fluoro-4-methoxystilbene	NA	—	—	
6	2-Fluoro-3-methoxystilbene	—	NA	—	
7	3-Bromo-4-methoxystilbene	—	NA	—	
8	5-Bromo-2-methoxy stilbene	—	NA	—	
9	3-Methoxy-2-nitrostilbene	—	NA	—	
10	4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene	—	NA	—	
11	3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene	—	NA	—	
12	3-Hydroxystilbene	100%	100%	95%	6 ppm
13	4-Fluoro-3-hydroxystilbene	100%	100%	96%	3 ppm
14	3-Fluoro-4-hydroxystilbene	100%	100%	98%	5 ppm
15	2-Fluoro-3-hydroxystilbene	—	100%	99%	3 ppm
16	3-Bromo-4-hydroxystilbene	—	100%	40%	
17	3-Hydroxy-2-nitrostilbene	—	95%	17%	
18	4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxystilbene	—	100%	7%	
19	3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxystilbene	—	98%	7%	
20	Pinosylvin monomethylether	100%	100%	18%	
21	Salicylic acid	—	NA	—	
22	Phenyl salicylate	—	98%	7%	
23	Pinosylvin reductant	50%	—	—	
24	Control (solution of DMSO in water)	3%	—	—	

NA= not active

構造と活性相関



3-2 NO 産生抑制活性試験

3-2-1 NO と NOR による産生抑制活性について

世界規模で起こる環境問題、特に大気汚染などにより、一酸化窒素 (NO) とヒトのがん発生の関連が強く指摘されている。NO はガス状であるが $\cdot\text{NO}$ というラジカル状態にあり、いわゆる「活性酸素」種の一つと考え議論されることも多い。今ではほとんどの疾患の発症と進展についても NO 抜きでは考えられないほどのなっており、NO の作用だけでなく、生成系、代謝系、測定法など様々な研究が盛んに行われている。

炎症には、サイトカイン、プロスタノイド、活性酸素、一酸化窒素 (NO) などの炎症性メディエーターが関与している。特に炎症部位における誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を介して産生される過剰な NO は、各種臓器障害やエンドトキシンショックの原因のひとつであり、炎症疾患を悪化させることが知られている。

今回はヒト由来正常肝細胞株に対する NO ドナー作用について検討した。NO ドナーとして、NOR1 ; $(\pm)\text{-}(E)\text{-}4\text{-methyl-}2\text{-}[(E)\text{-hydroxyimino}]\text{-}5\text{-nitro-}6\text{-methoxy-}3\text{-hexenamid}$ (Figure 参照) を用いた。NOR は新しいタイプの NO ドナーであり、既存の NO ドナーの様な硝酸や亜硝酸部分あるいは NO 部分を有しないにも関わらず、系中に純粋な NO を自発的に発生できる。NO 放出は完全に自発的で、いかなる代謝系や co-factor も関係しない。また、NO 放出後の副生成物に生理活性がないことも分かっており、系中に規定量の純粋な NO を加えることのできる試薬として安心して使用できる。NO 発生量は 1 モルの NOR から 1-1.5 モルの NO が放出される。

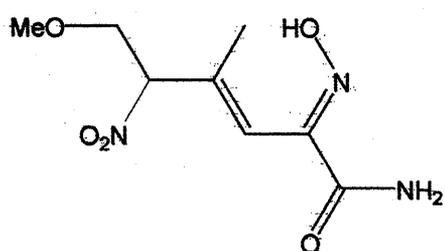
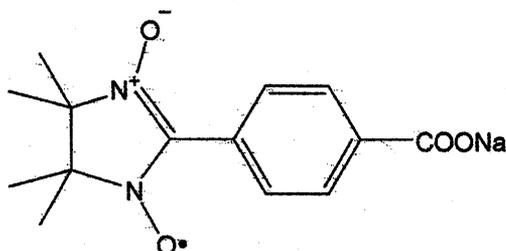


Figure NOR1 の構造式



carboxy-PTIO の構造式

3-2-2 NO 産生抑制活性試験の方法

ヒト由来正常肝細胞は濃度 5×10^5 /ml でイーグル MEM 培地にて培養した。陽性コントロールとして NOR1 を培地に加え CO_2 下、1 時間培養した。スクリーニングは、NOR1 を加える 1 分前に NO 消去剤である carboxy-PTIO (Figure 参照) を培地に加えた。

スクリーニングの NO 阻害効果は次の式によって算出した。

$$\text{阻害率} = \frac{\text{NOR1 のみを加えた場合に变形した細胞の割合 (\%)}}{\text{NOR1 と試験化合物を加えた場合に变形した細胞の割合 (\%)}}$$

3-2-3 NO 産生抑制活性試験の結果

いくつか合成したスチルベンについて、NOR1 による発がん抑制活性試験を行った。その結果を下記の表に示す。

Table. Screening for inhibitor against NOR1 action

Treated compound	Concentration	Ratio of Inhibitory
Positive control NOR1	350 nmol	1.0
carboxy-PTIO	350 nmol	8.0
	35 nmol	2.7
pinosylvin	350 nmol	2.9
Stilbene		
4-Hydroxy-3-methoxy	350 nmol	3.1
3-Hydroxy-4-methoxy	350 nmol	3.0
3-Hydroxy-2-nitro	350 nmol	2.6
3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxy	350 nmol	1.9
4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxy	350 nmol	1.8
4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxy	350 nmol	1.6
3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxy	350 nmol	1.5
4-Fluoro-3-hydroxy	350 nmol	1.2

第4章 考察

本研究では、報告例の少ないハロゲンを含むスチルベンを合成し、センチュウに対する殺虫活性と NO 産生抑制活性の試験を行った。

合成の Wittig 反応は、ヒドロキシル基を持つ原料で、特に収率が悪かった。また、Wittig 反応でヒドロキシル基がメトキシル基に変化した副生成物を生じたのは興味深い。収率を向上するための新たな方法として、ヒドロキシル基を保護するためにアセテート化して合成を試みたが、反応は進まなかった。結局、メトキシル基を含むベンズアルデヒドからスチルベンを合成したのち、脱メチル化する方法を用いた。全体を通し、スチルベン化合物は光にとっても不安定であり、すぐに E 体から Z 体に変換してしまうので、収率に影響したと考えられる。

スチルベン化合物の殺虫活性にはヒドロキシル基が必須であった。ヒドロキシル基の置換位置は 3 位の化合物が 4 位より強かった。2 重結合部位は殺虫活性に大きく影響を与え、還元物質に活性は見られなかった。しかし、スチルベン骨格ではないサリチル酸フェニルにも活性があったことは興味深く、さらなる検討が必要である。ヒドロキシル基に加え、フッ素や臭素を置換すると活性は向上した。対称的な置換基を導入すると、活性は減少した。濃度 10 ppm において、天然物である Pinosyivin monomethylether は死亡率 18% であるのに対し、2-Fluoro-3-hydroxystilbene は 99%、4-Fluoro-3-hydroxystilbene は 98% と高い死亡率を示した。4-Fluoro-3-hydroxystilbene と 2-Fluoro-3-hydroxystilbene の LD₅₀ が、3 ppm と最も活性が強かった。以上のことから、センチュウに対するスチルベンの生物活性は、ヒドロキシル基の有無や分子サイズによる立体障害の影響が大きいと推測される。

carboxy-PTIO は、NO と選択的に反応して、NO₂ に変換する NO 消去剤である。スチルベン化合物の NO 抑制活性は水酸基を多く含むと活性が強くなることが知られている。今回の結果で活性が最も強かった化合物は、4-Hydroxy-3-methoxystilbene で阻害率は 3.1 だった。フッ素が置換された化合物は活性が減少する傾向にあった。また、水酸基の置換位置では 4 位のほうが 3 位より、少し活性が強いことが示唆される。

謝辞

本研究を行うにあたって、終始多大なるご指導を賜りました本学総合科学部の深宮齋彦教授、小南思郎教授、本田計一教授、根平達夫助手に厚く御礼を申し上げます。

センチュウの殺虫活性試験を行って下さった東京大学の富樫教授、ならびに富樫研究室の方々に感謝いたします。

NO 産生抑制活性を行っていただいた、京都府立医科大学の徳田春邦助手に感謝します。

MS を測定して頂いた広島大学自然科学研究支援開発センター (N-BARD) の楊井美穂子氏に感謝します。

実験及び論文作成に当たり貴重な助言・励ましをいただきました当研究室の先輩方ならびに近隣研究室の友人に感謝いたします。

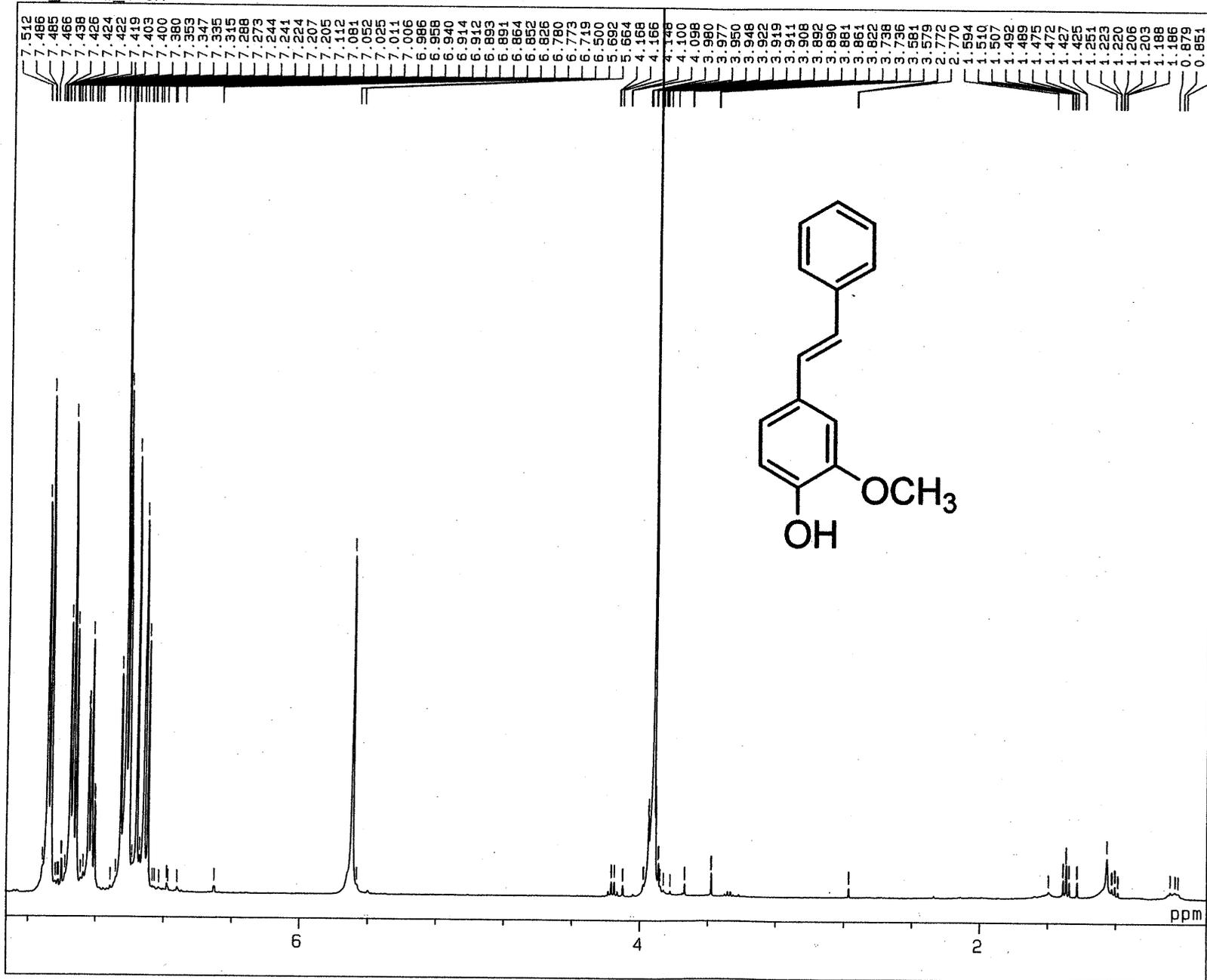
最後に、学生生活を暖かく見守り、物心両面において常に支援してくれた両親に心から感謝します。

参考文献

- Suga, T., Ohta, S., Munesada, K. Ide, N., Kurokawa, M., Shimizu, M., Ohta, E. (1993)
Endogenous pine wood nematocidal substances in pine, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. *Phytochemistry*, 33, 1395-1401.
- Kai, X., Lijiang, X., Yaming, X., Donglu, B. (2000) Stilbene Glycoside Sulfate from *Polygonum cuspidatum*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1373-1376.
- Fukuda, K. (1997) Physiological Process of the Symptom Development and Resistance Mechanism in Pine Wilt Disease. *J. For. Res.*, 2, 171-181.
- Mohammad, A. A., Kondo, K., Tsuda, Y. (1992) Synthesis and Nematocidal Activity of Hydroxystilbenes. *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 1130-1136.
- Hanawa, F., Yamada, T., Nakanisi, T. (2001) Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry*, 57, 223-228.
- Orita, A., Ye, F., Doumoto, A., Otera, J. (2003) Double Elimination Protocol for Access to Unsymmetrical Di (phenylethynyl) benzenes. *Chemistry Letters*, 32, 104-105.
- 河津一義：化学と生物 36, 120-124 (1998)
- 河津一義：日本農芸化学会誌 64, 1241-1242 (1990)
“マツノザイセンチュウによるマツ枯れについて”
- 真宮靖治：日本農芸化学会誌 64, 1243-1246 (1990)
“マツノザイセンチュウの樹体内動態とマツの発病経過”
- 清原友也：日本農芸化学会誌 64, 1251-1253 (1990)
“マツ材線虫病における誘導抵抗性”
- 河津一義：日本農芸化学会誌 64, 1262-1264 (1990)
“マツノザイセンチュウ感染による樹体内成分の変動”
- 黒田宏之、「木材研究・資料」第35号 別冊 p.32-46
- 田中治、野副重男、相見則郎、長居正博編集 “天然物化学(改訂第5版)”, 南江堂(1998)
- 小柴恭一、神谷勇治編集 “新しい植物ホルモンの科学”, 講談社 (2002)
- 山田哲治、島本功、渡辺雄一郎監修 “分子レベルからみた植物の耐病性”, 秀潤社 (2000)
- 大柳善彦 “NO と医学”, 共立出版 (1993)
- 大柳善彦 “NO と病気”, 化学同人 (1994)

图表

TKA 3-OME 4-OH



20-JAN-2003 17: 03: 06.02

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_3-OME_4-OHCOMNT : TKA_3-OME_4-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 13

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFREQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 HzIRNUC : 1H
IRFREQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0ADBIT : 16
CTEMP : 20.6 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2824.89 Hz
XS : 300.78 Hz
operator¹H-NMR spectrum of (E)-4-Hydroxy-3-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E12

Date : 20-Jan-05 13:49

Sample: 3-OMe 4-OH

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.86 min

Scan# : (7,9)

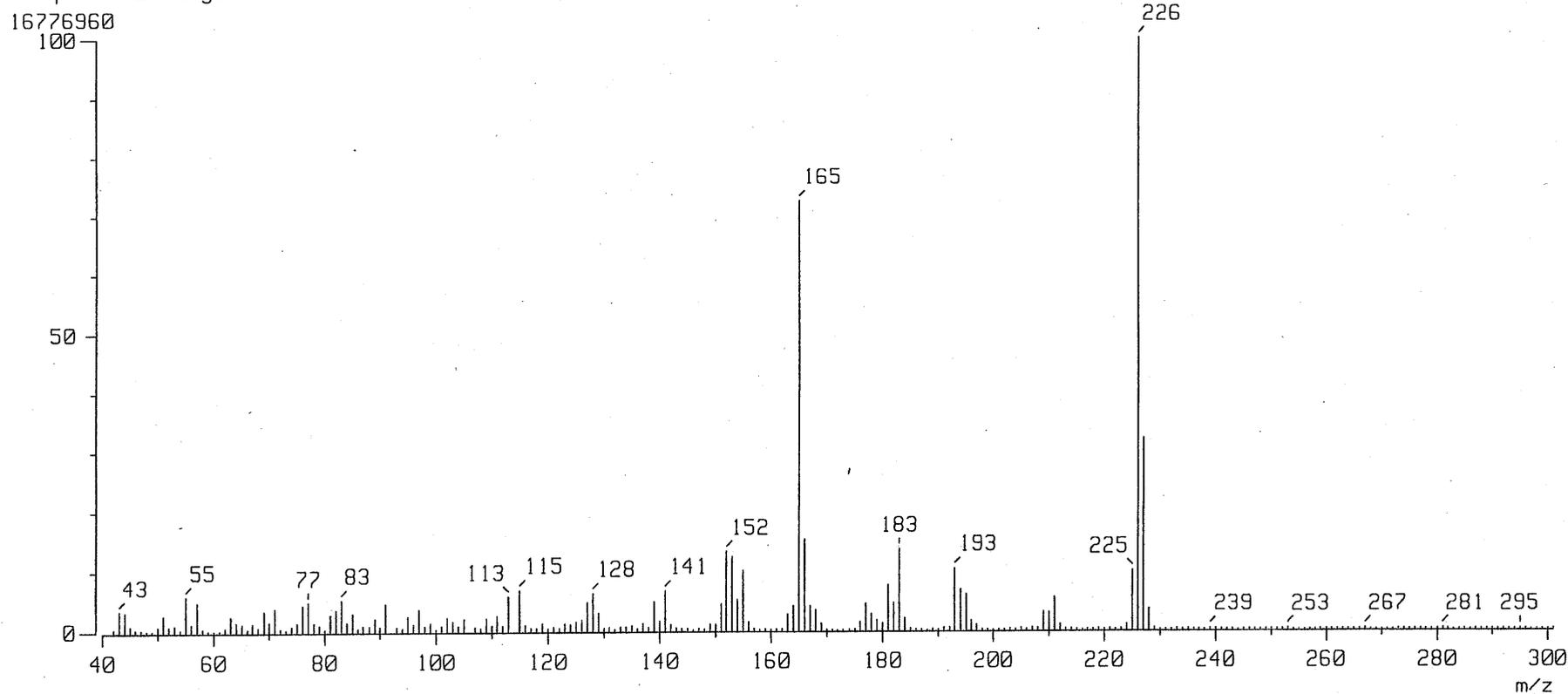
Temp : 105.5 deg.C

BP : m/z 226.0000

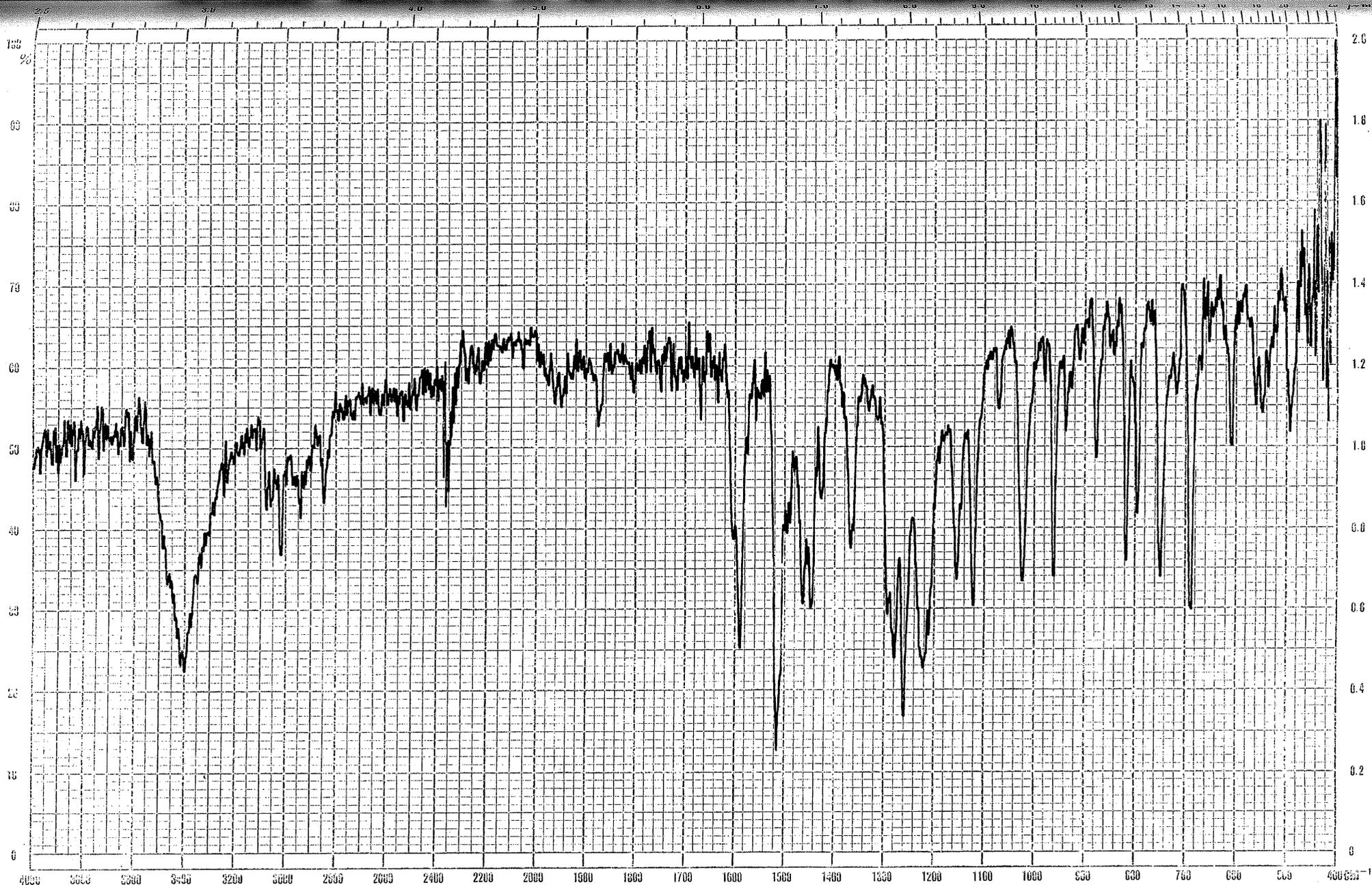
Int. : 1599.98

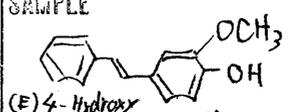
Output m/z range : 40.0000 to 301.0660

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-4-Hydroxy-3-methoxystilbene

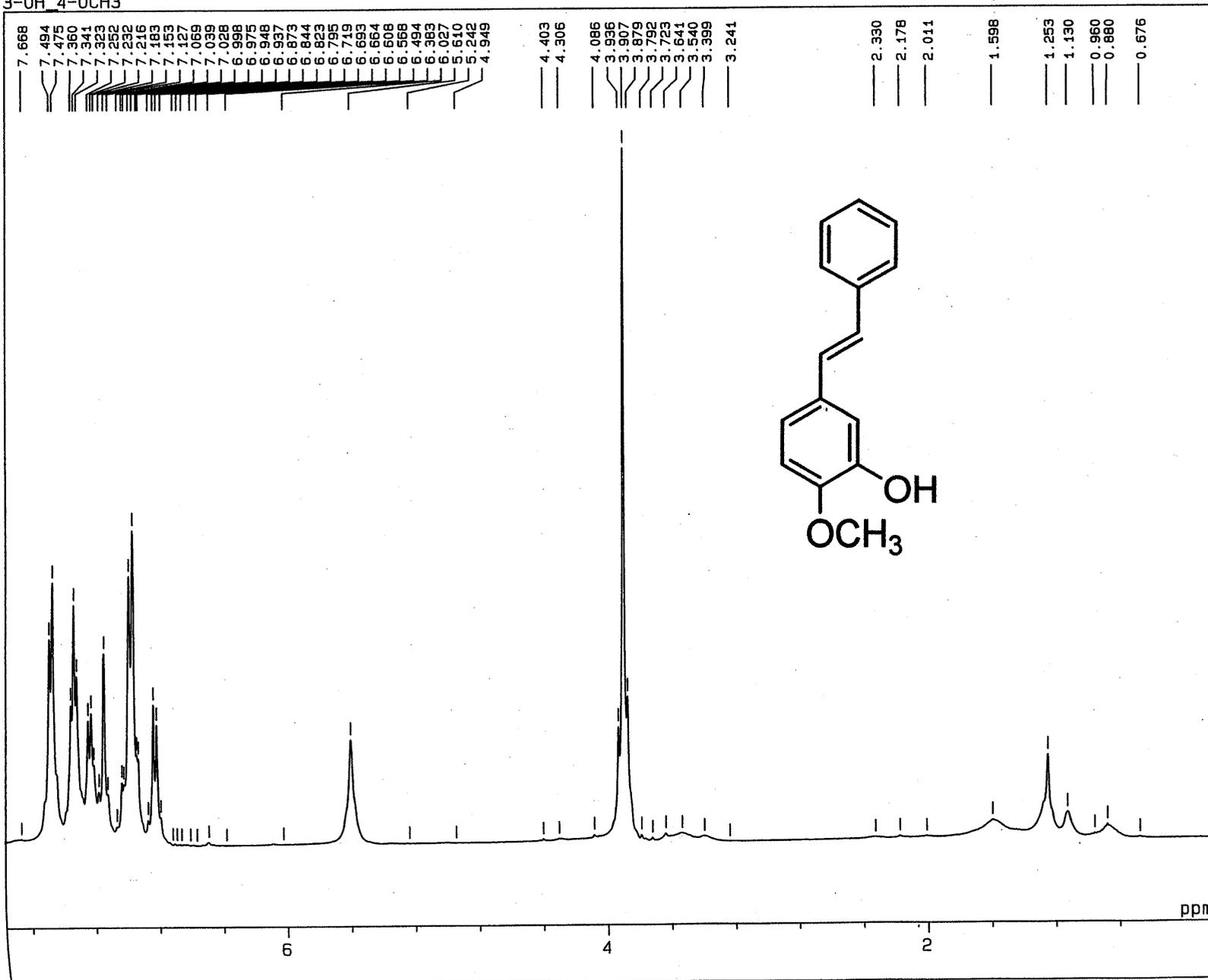


DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-4-hydroxy 3-methoxy stilbene.	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0068

3-OH_4-OCH3



2-FEB-2005 16:05:27.07

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_CDCL3_3-OH_4-OME

COMNT : 3-OH_4-OCH3
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 18
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.6 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3026.63 Hz
XS : 398.24 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (E)-3-Hydroxy-4-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E13

Date : 20-Jan-105 14:54

Sample: 3-OH 4-OMe

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 1.11 min

Scan# : (8,12)

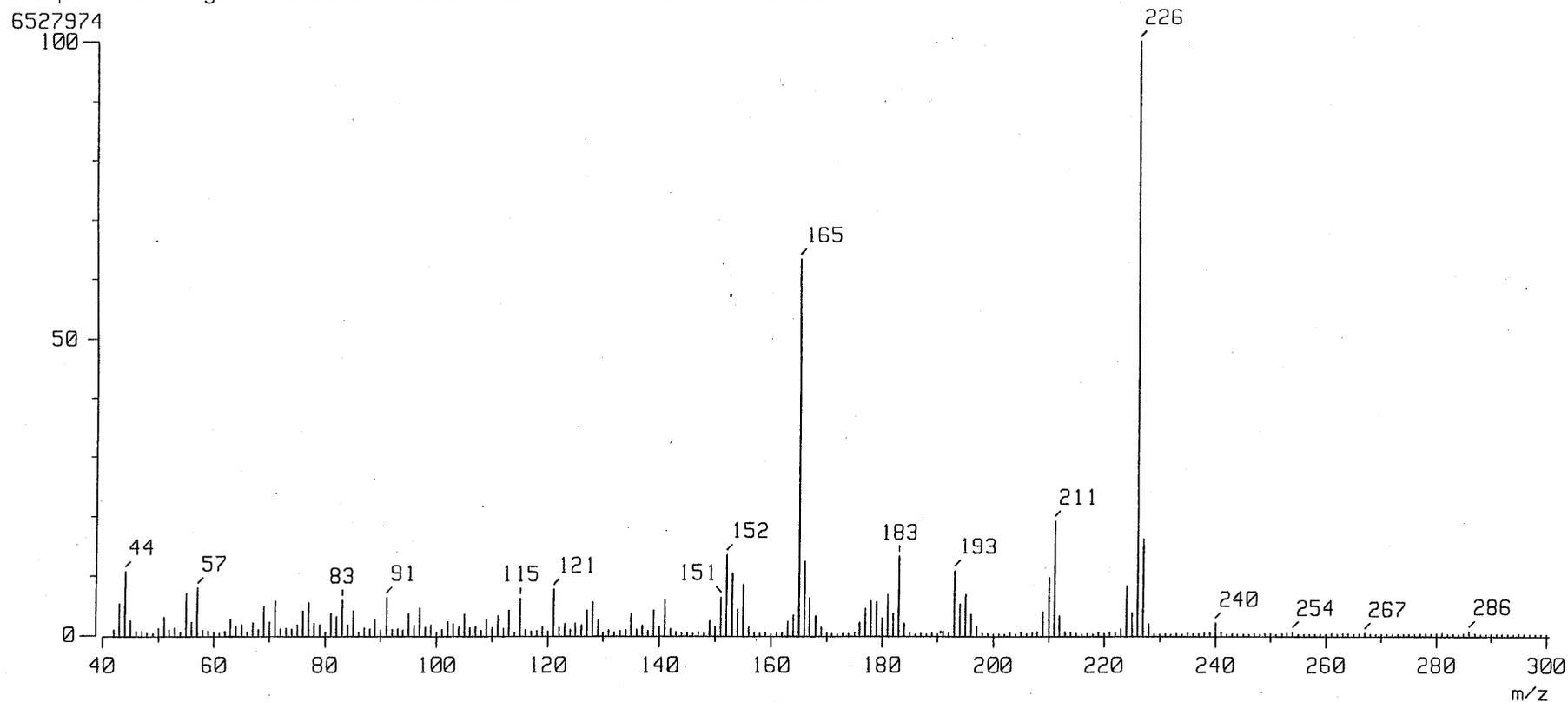
Temp : 117.7 deg:C

BP : m/z 226.0000

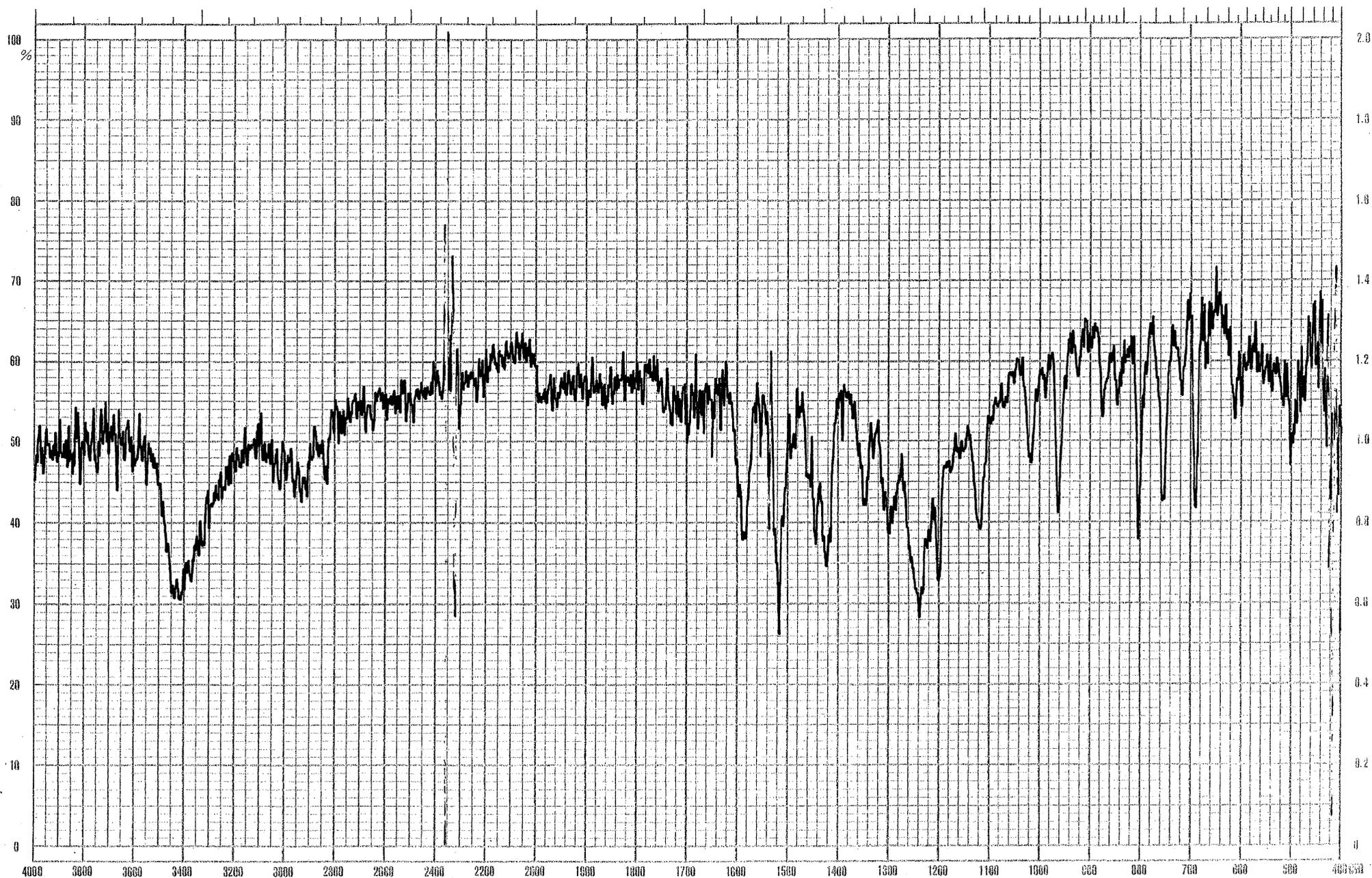
Int. : 622.56

Output m/z range : 40.0000 to 300.4980

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3-Hydroxy-4-methoxystilbene



—39—

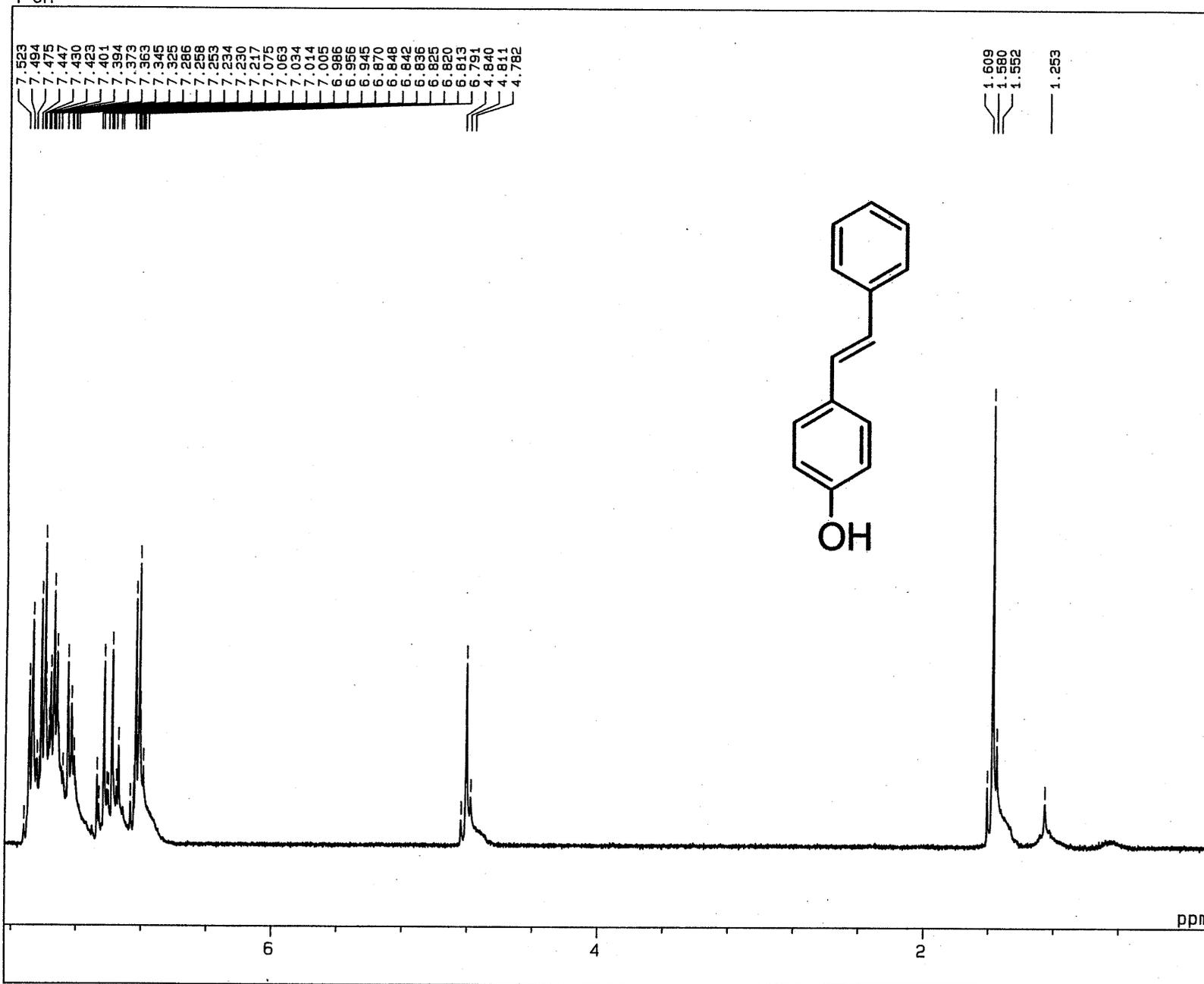
DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT	(E)-3-Hydroxy-4-methoxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	



Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0066

4-OH



20-JAN-2005 16: 22: 43.27
DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_4-OH_050120

COMNT : 4-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 19
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.6 c
CSPED : 11 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2970.77 Hz
XS : 423.00 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-4-Hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E16

Date : 20-Jan-105 15:47

Sample: 4-OH

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.50 min

Scan# : (2,9)

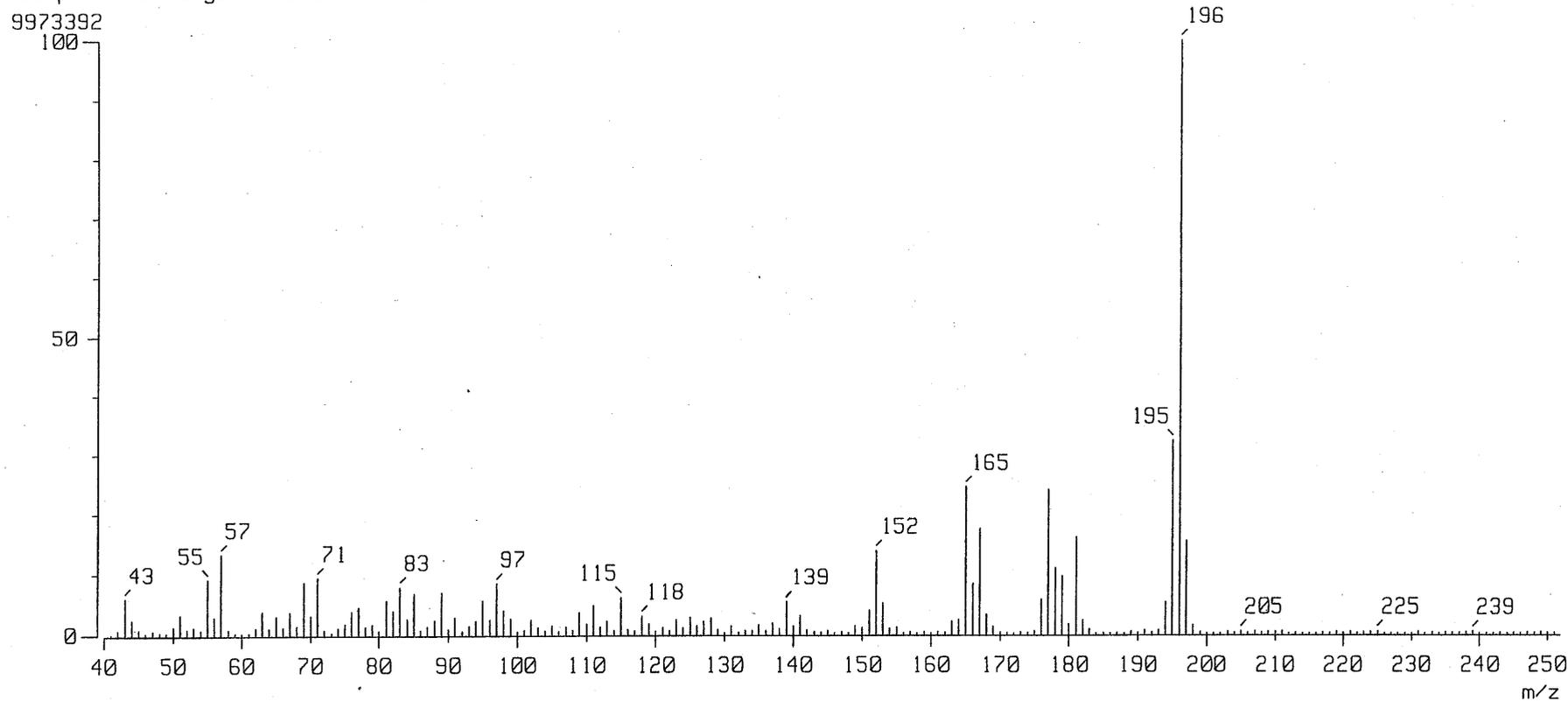
Temp : 35.4 deg.C

BP : m/z 196.0000

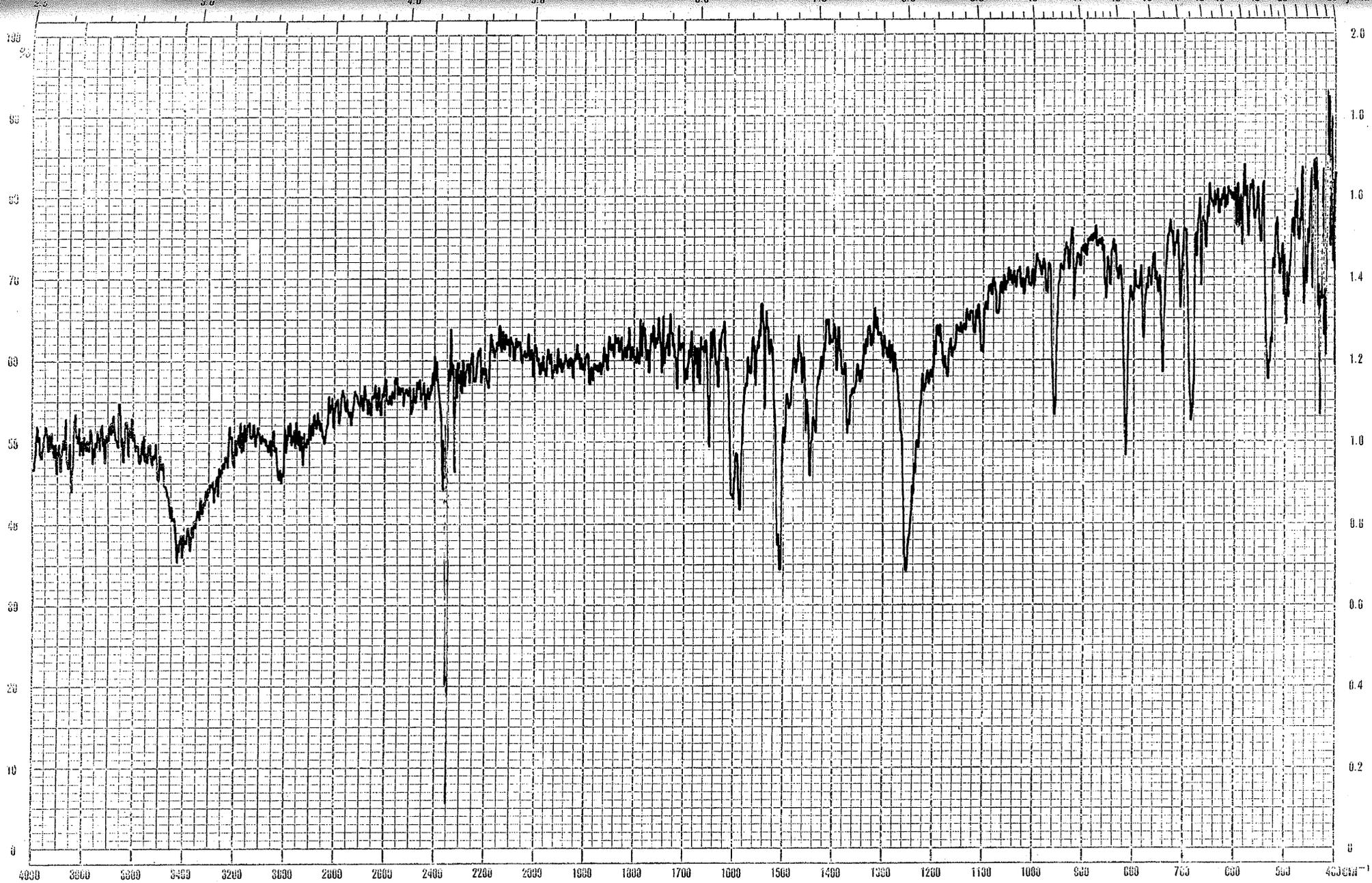
Int. : 951.14

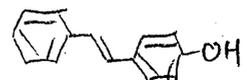
Output m/z range : 40.0000 to 251.7880

Cut Level : 0.00 %



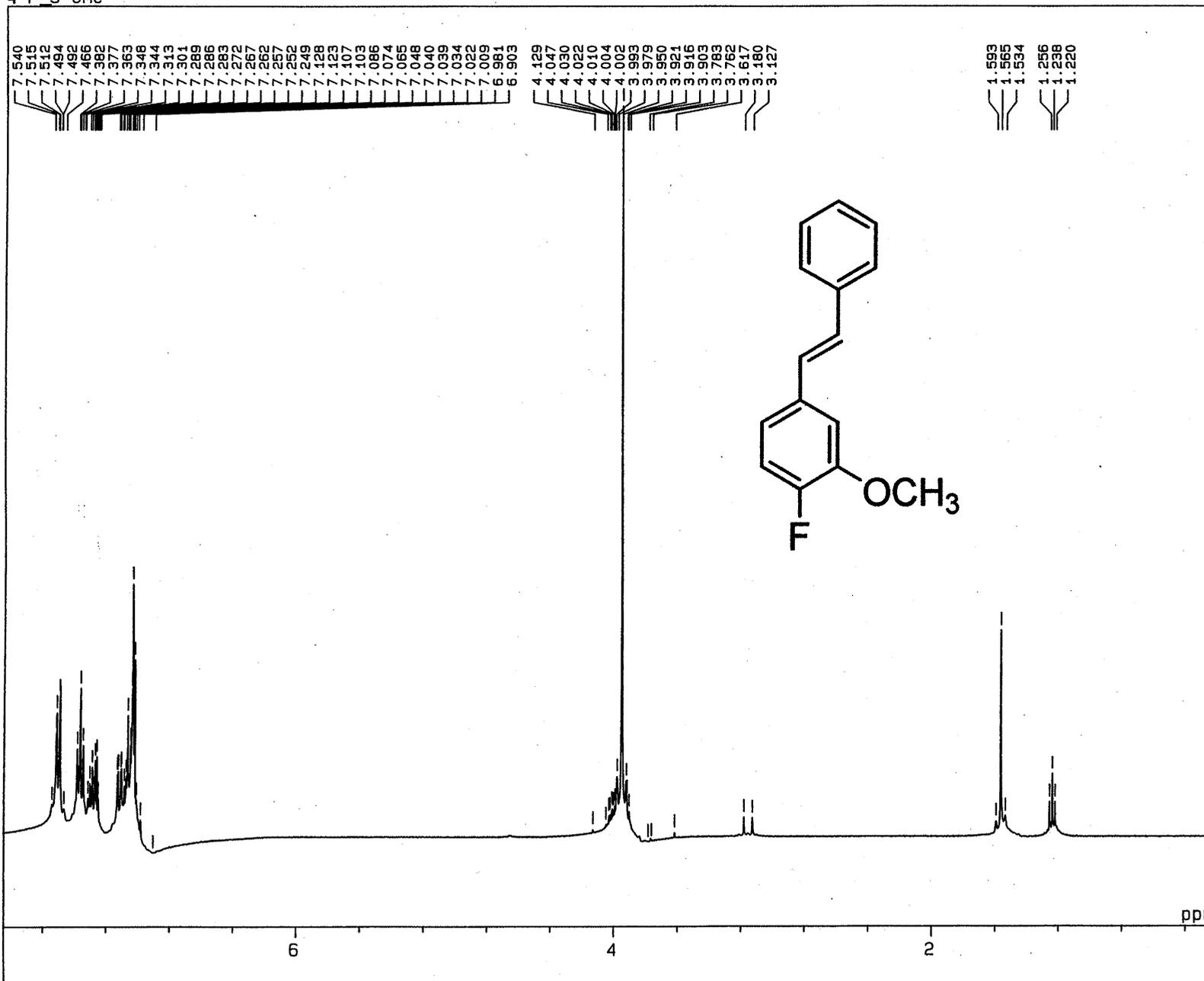
MS spectrum of (*E*)-4-Hydroxystilbene



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN		 (E)-4-Hydroxy stilbene.			
OPERATOR	% EXPANDER	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN J-0060

4-F_3-OMe



21-JAN-2005 15: 46: 43.01

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_4-F_3-OMe_05012:

COMNT : 4-F_3-OMe
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 20
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.4 c
CSPED : 14 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3061.27 Hz
XS : 385.56 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-4-Fluoro-3-methoxystilbene

Start ; 40°C
rate : 16°C/min.

[Mass Spectrum]

Data : 0204E

Date : 04-Feb-103 10:30

Sample: 3-OCH3/4-F

Note : chamber200

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : (1,5)

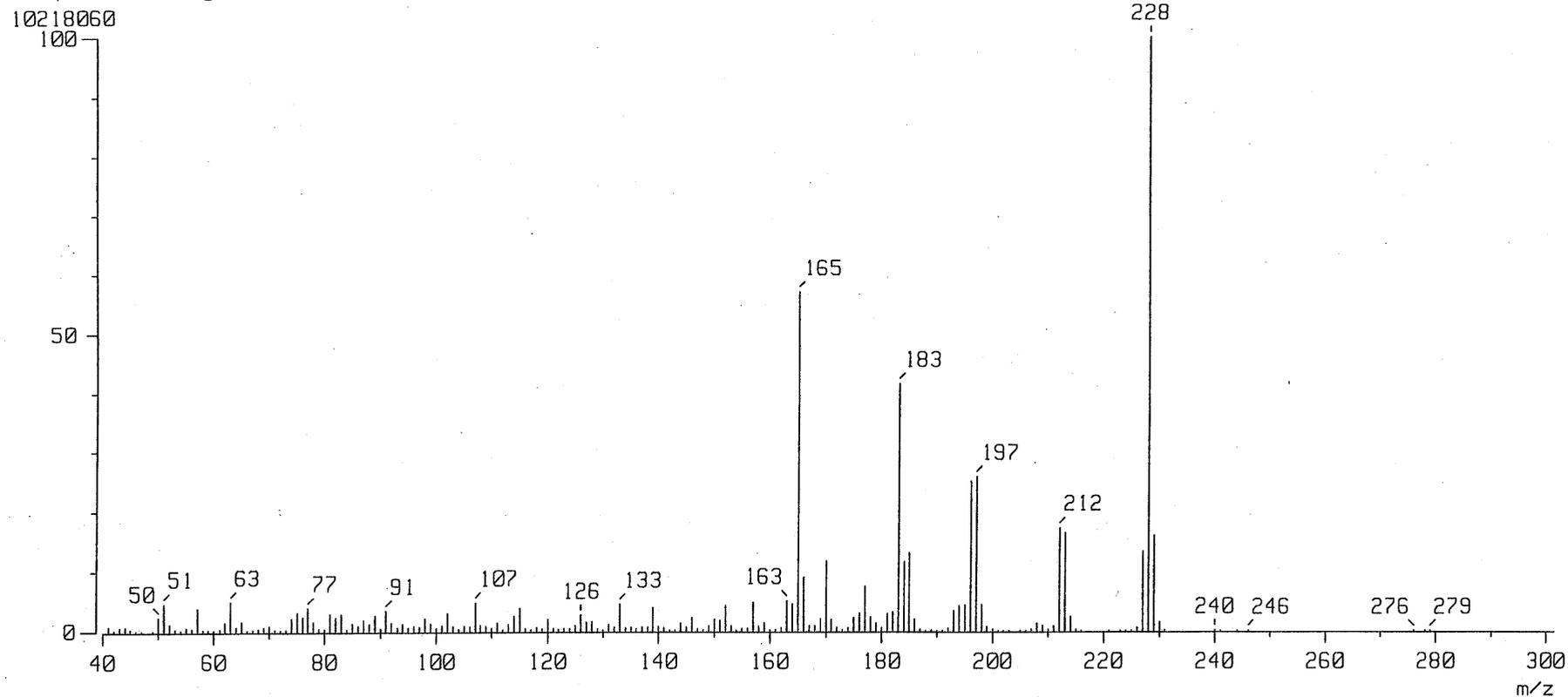
Temp : 31.9 deg.C

BP : m/z 228.0000

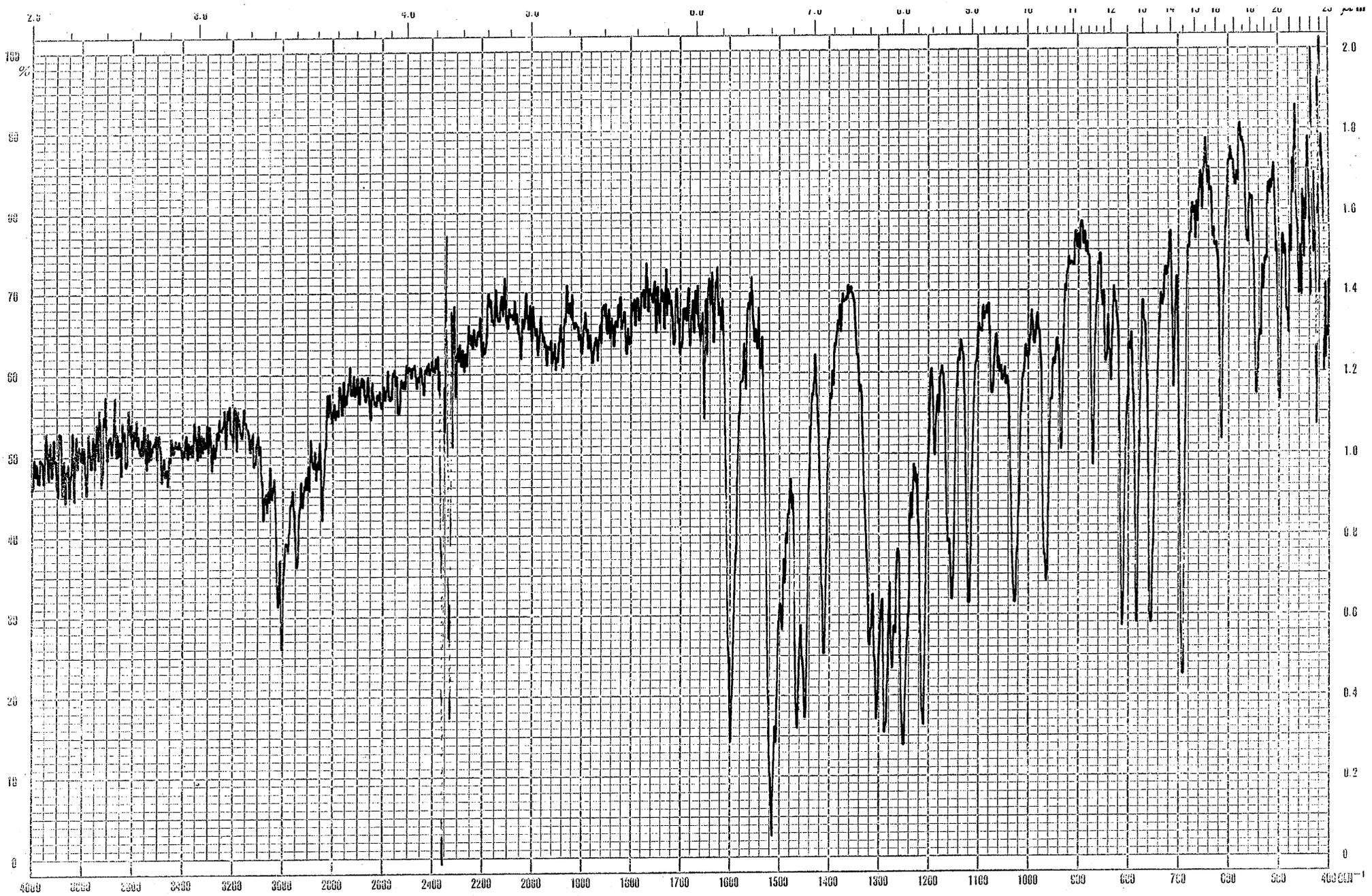
Int. : 974.47

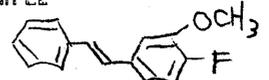
Output m/z range : 40.0000 to 301.5140

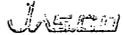
Cut Level : 0.00 %



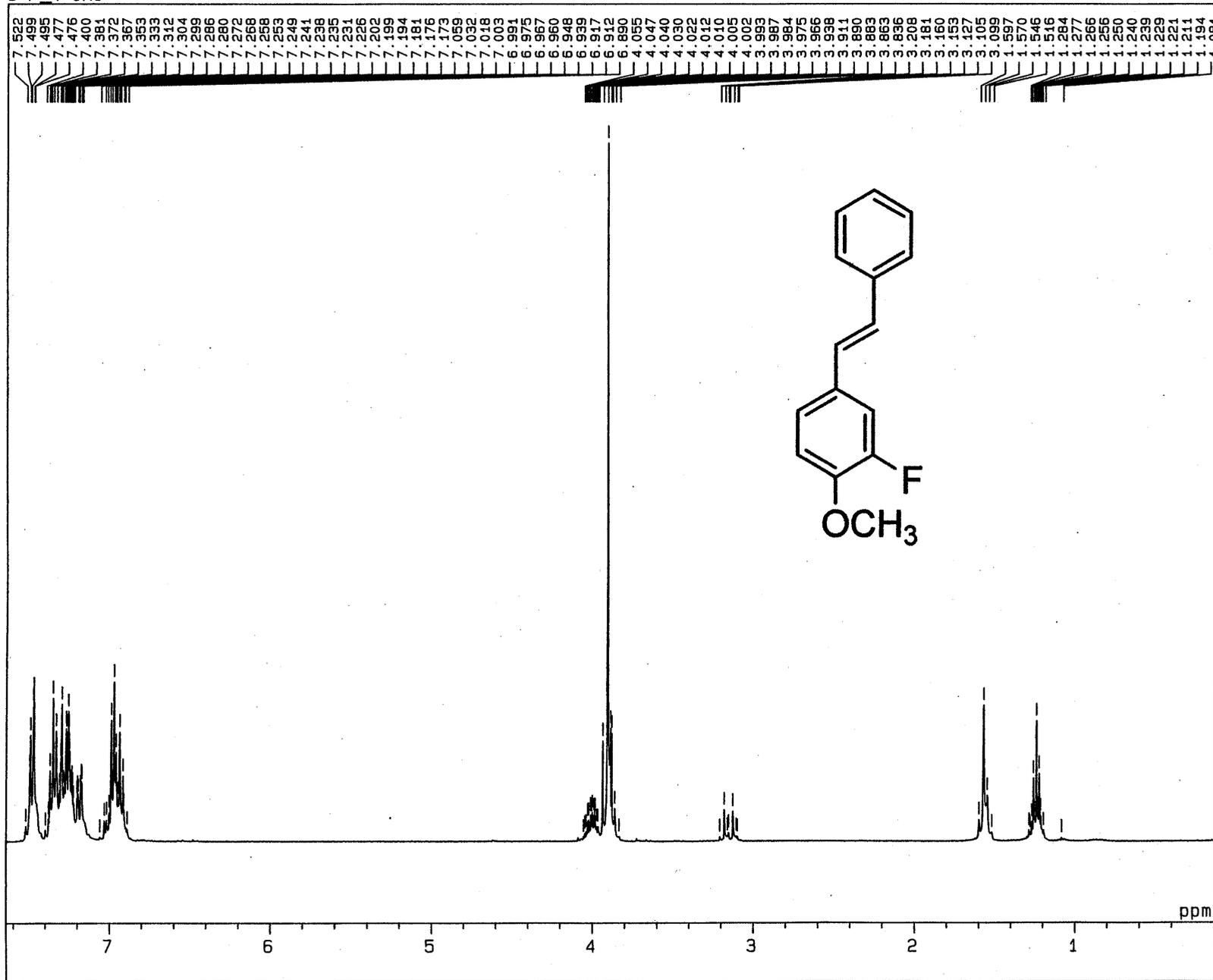
MS spectrum of (*E*)-4-Fluoro-3-methoxystilbene



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-4-Fluoro-3-methoxy-2-vinylbenzene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN J-0068

3-F 4-OMe



21-JAN-2005 16:16:24.03

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_3-F_4-OMe_05012:

COMNT : 3-F_4-OMe
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 20

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.8 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3008.58 Hz
XS : 439.96 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-3-Fluoro-4-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : 3

Date : 04-Feb-103 15:24

Sample: 3-F/4-OCH3

Note : chamber 200; start 40 (64/min)

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.50 min

Scan# : (2,8)

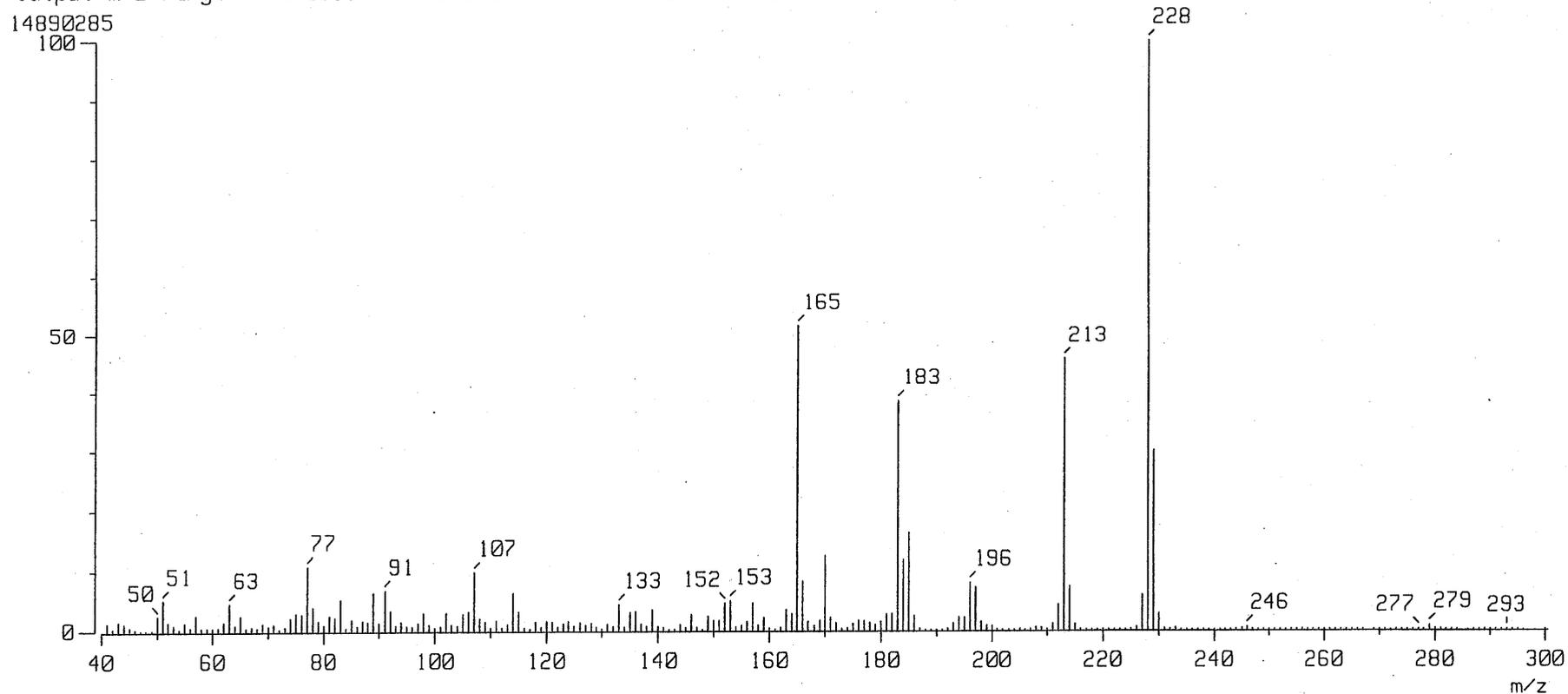
Temp : 33.0 deg.C

BP : m/z 228.0000

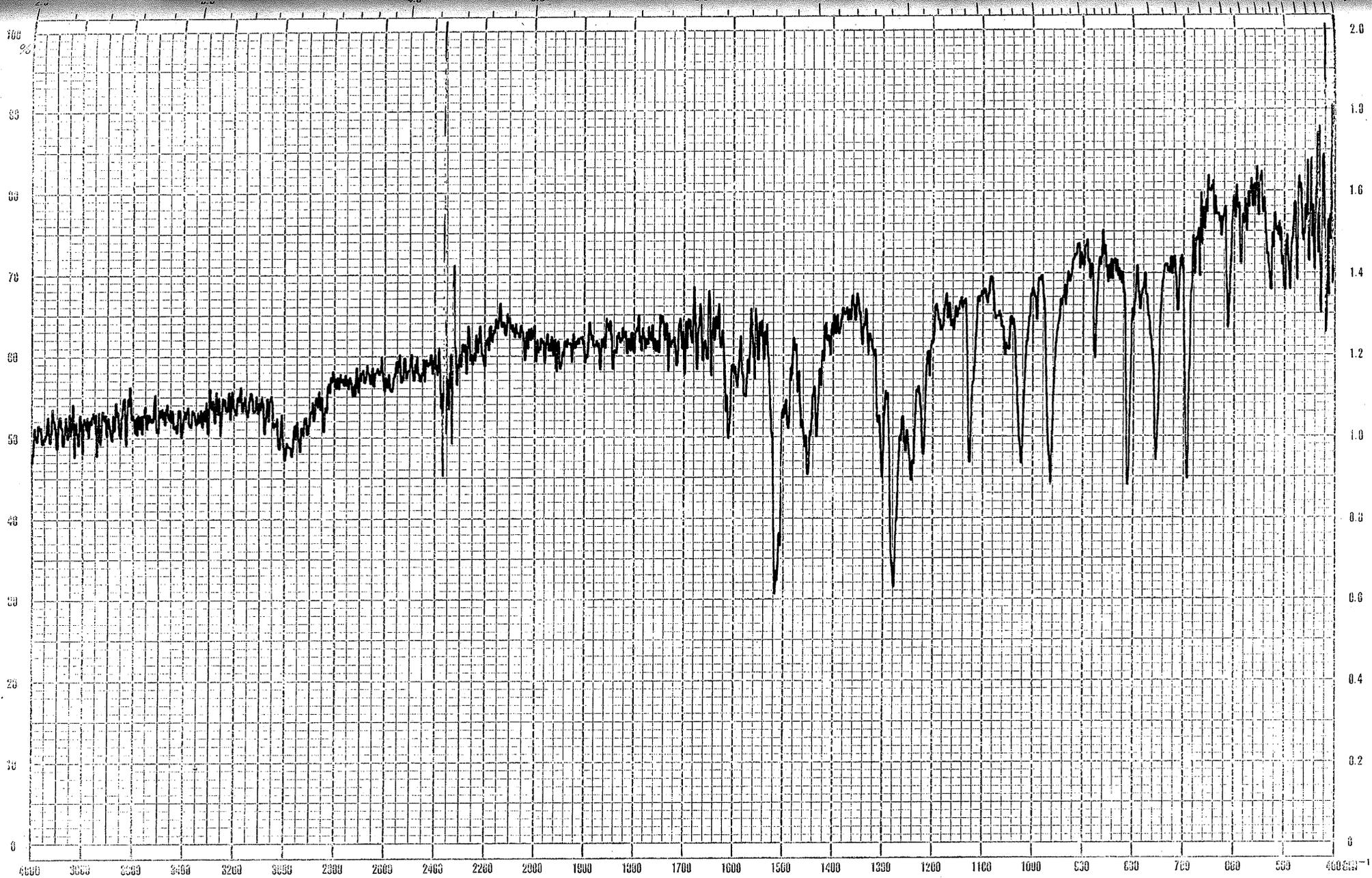
Int. : 1420.05

Output m/z range : 40.0000 to 300.5180

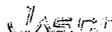
Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3-Fluoro-4-methoxystilbene

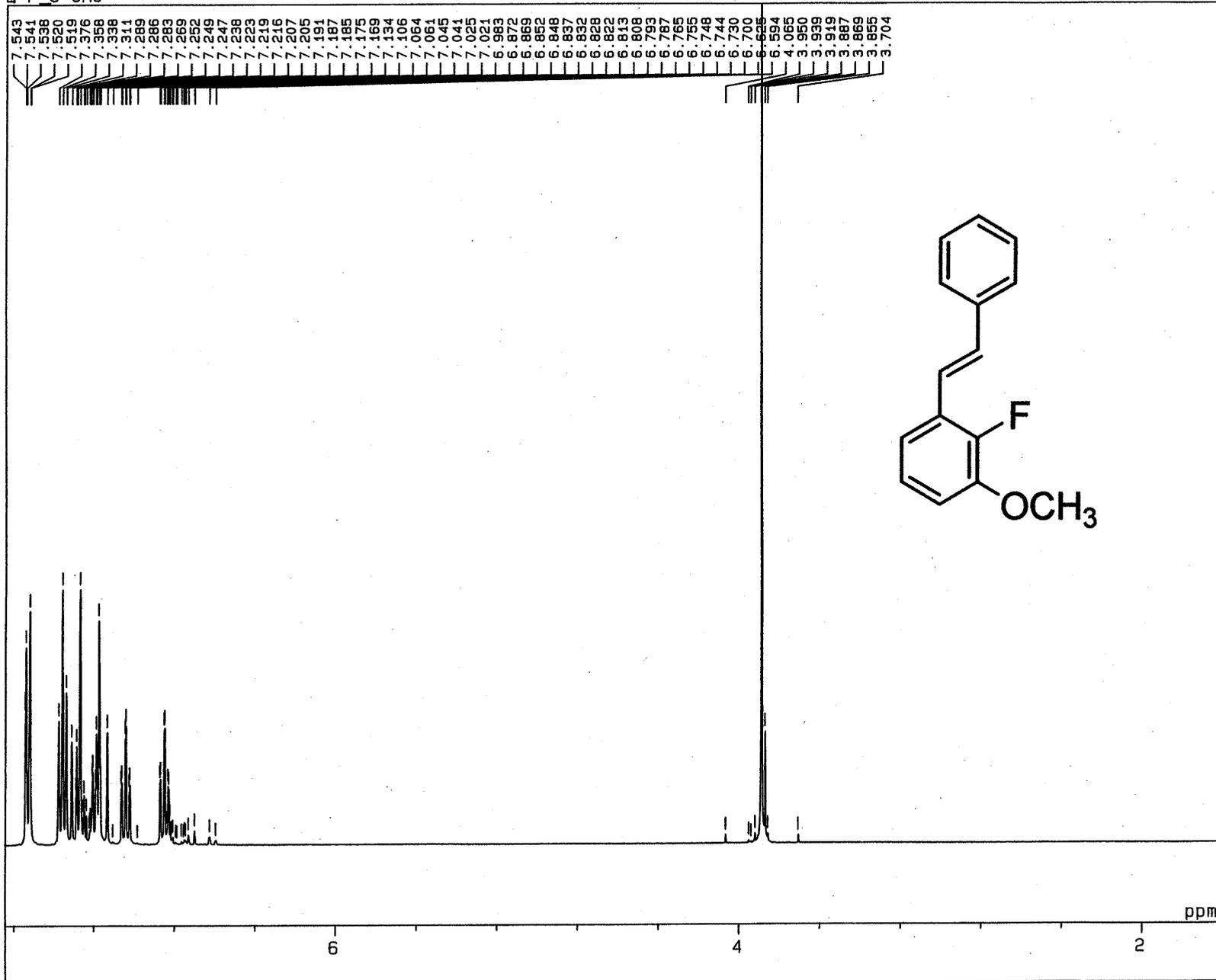


DATE	WAVE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN					
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	<chem>COC1=CC=C(C=C1)/C=C/C2=CC=CC=C2</chem> (E)-3-(4-methoxyphenyl)styrene	CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0068

2-F_3-OMe



20-JAN-2005 18:09:45.53
DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_2-F_3-OME

COMNT : 2-F_3-OMe
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 16
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRAPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRANS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 24.2 c
CSPED : 13 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2414.57 Hz
XS : 135.63 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (E)-2-Fluoro-3-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E11

Date : 20-Jan-105 13:43

Sample: 2-F 3-OMe

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : (2,4)

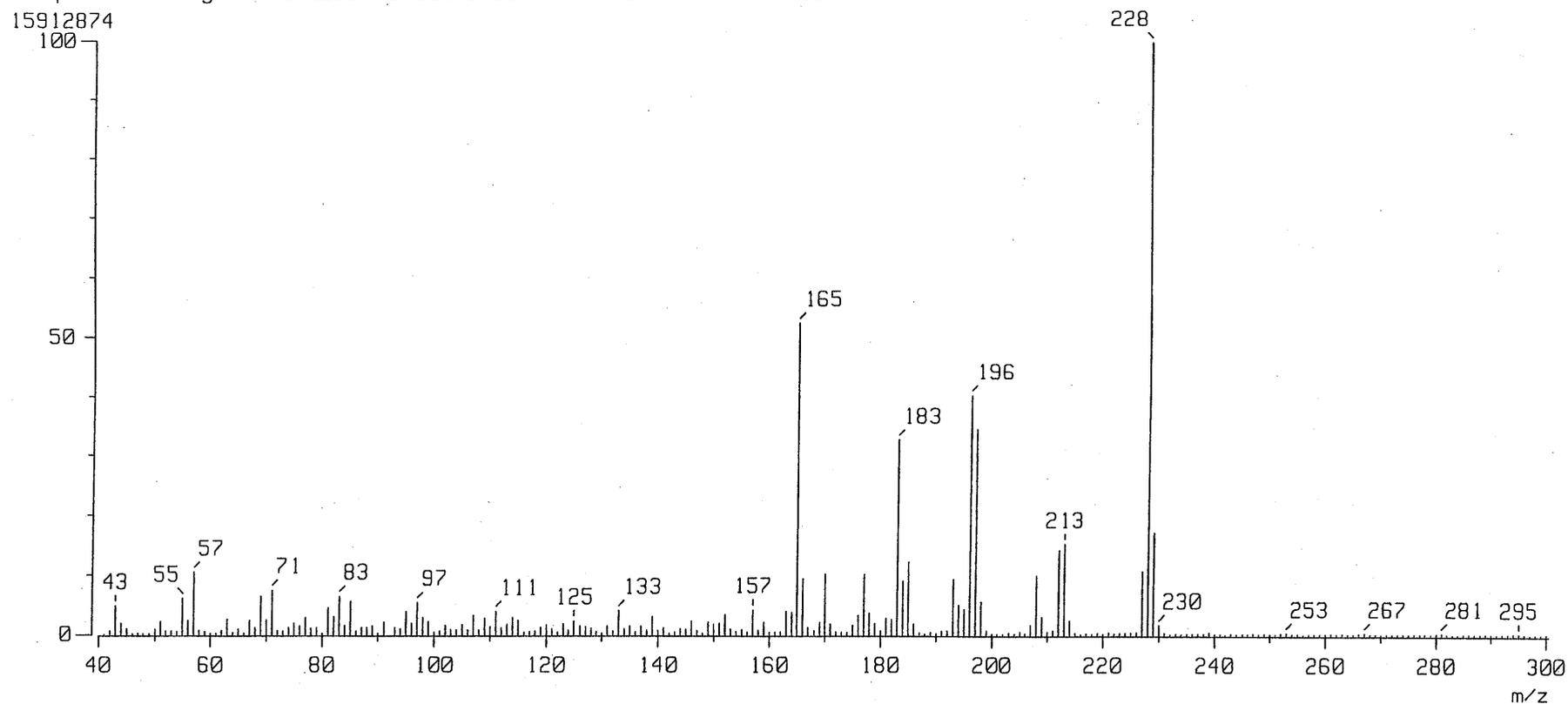
Temp : 41.0 deg.C

BP : m/z 228.0000

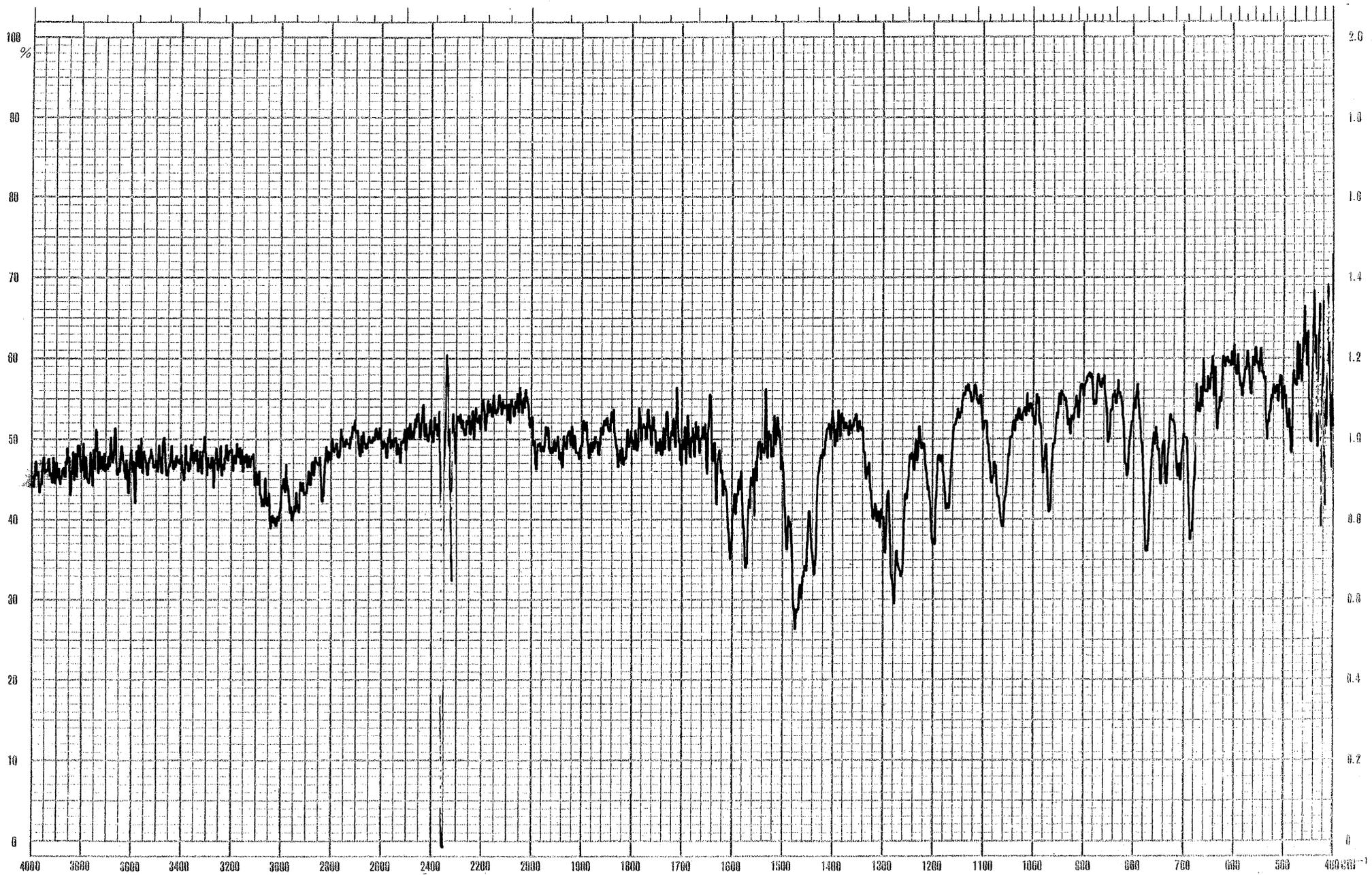
Int. : 1517.57

Output m/z range : 40.0000 to 300.5180

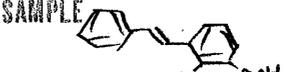
Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-2-Fluoro-3-methoxystilbene

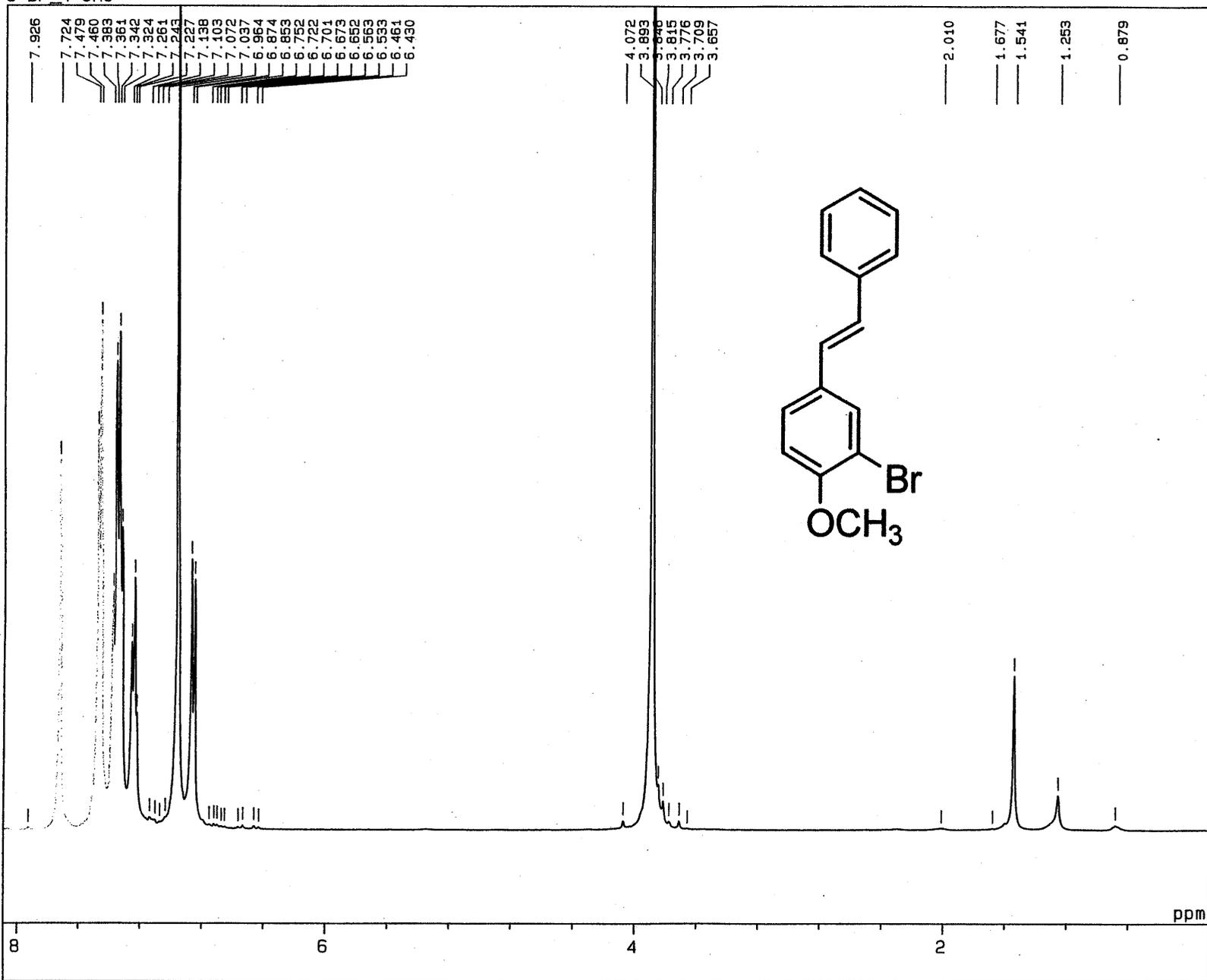


-51-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT	 (E)-2-Fluoro-3-methoxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	
	EXPANDER					

Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN
 J-0061

3-Br_4-OMe



2-JUL-2004 15:24:16.03

DFILE : ALPHA
 SFILE : TKA_1HNON_3-Br_4-OMe_04070

COMNT : 3-Br_4-OMe
 EXMOD : SINGL
 IRMOD : NON
 POINT : 32768
 FREQU : 7993.61 Hz
 SCANS : 16
 DUMMY : 4
 ACQTM : 4.0993 sec
 PD : 3.0000 sec
 RGAIN : 16

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
 OBFRQ : 399.65 MHz
 OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
 IRFRQ : 399.65 MHz
 IRSET : 134500.00 Hz
 IRATN : 511
 IRRPW : 50.0 usec
 IRBP1 : 25
 IRBP2 : 6
 IRRNS : 0

ADBIT : 16
 CTEMP : 24.2 c
 CSPED : 12 Hz
 SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
 BF : 2.50 Hz
 T1 : 0.00 %
 T2 : 0.00 %
 T3 : 90.00 %
 T4 : 100.00 %
 REFVL : 0.00 ppm
 XE : 3128.11 Hz
 XS : 315.06 Hz
 operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-3-Bromo-4-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : 0118E1

Date : 18-Jan-105 10:50

Sample: 3-Br 4-OMe

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.37 min

Scan# : (1,7)

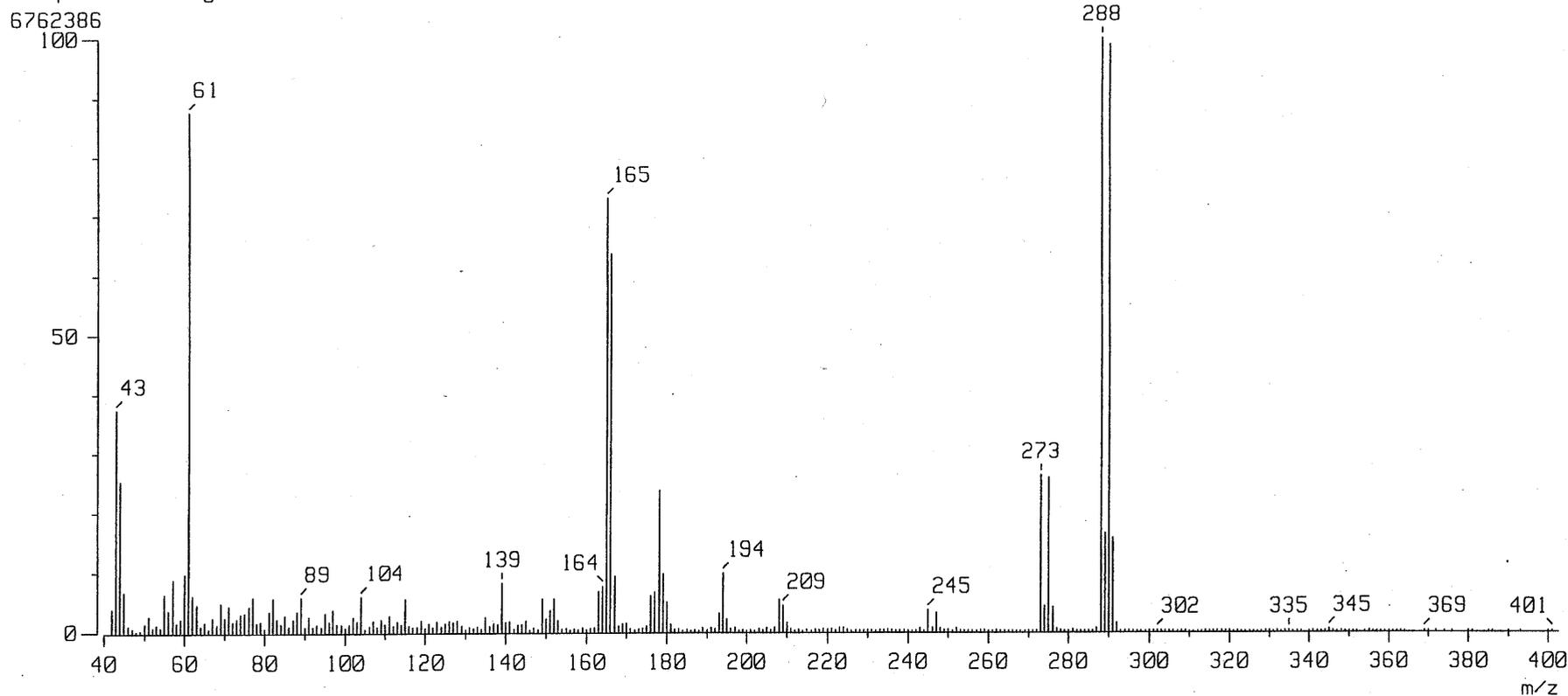
Temp : 31.9 deg.C

BP : m/z 288.0000

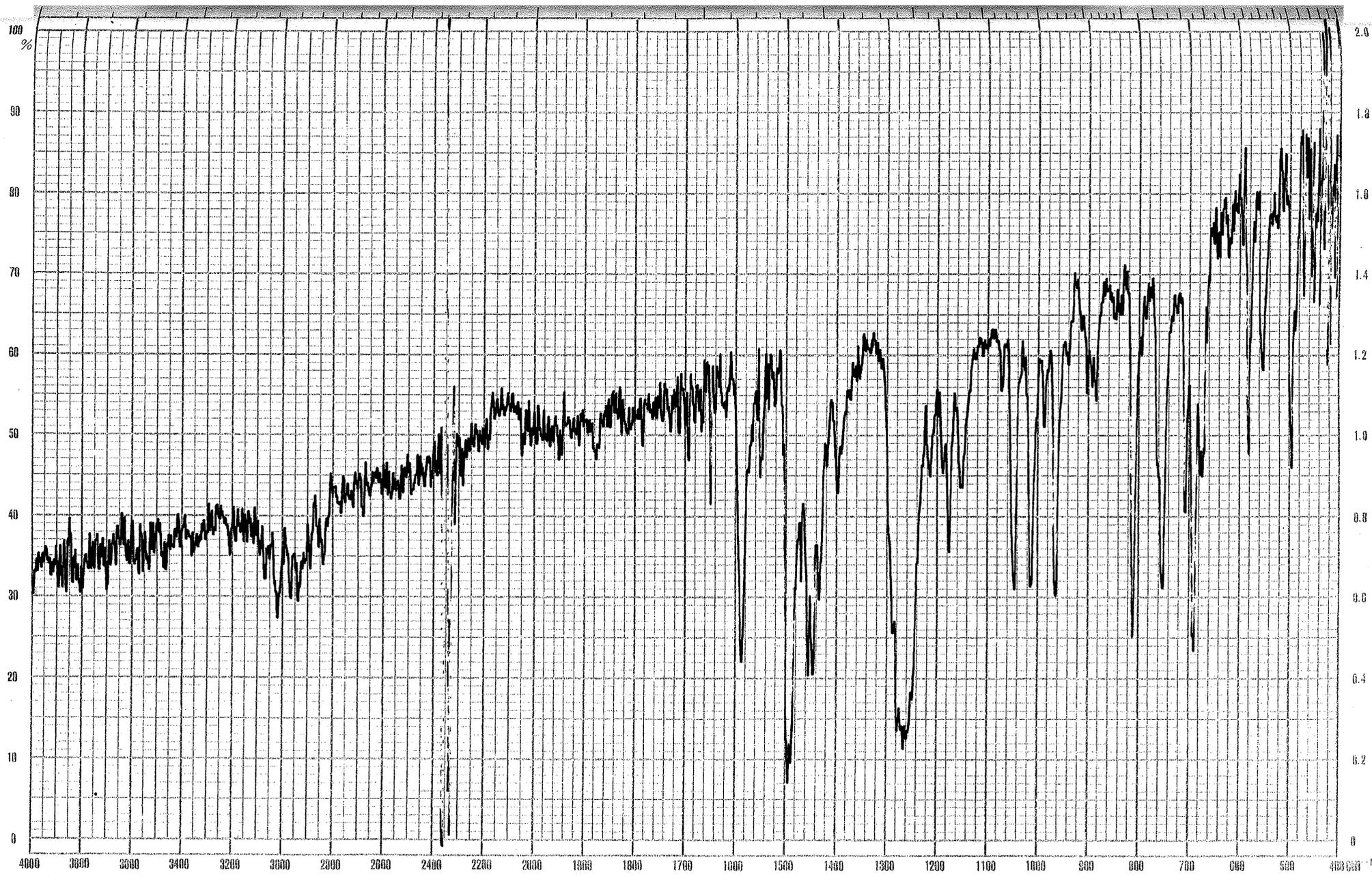
Int. : 644.91

Output m/z range : 40.0000 to 402.6630

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3-Bromo-4-methoxystilbene



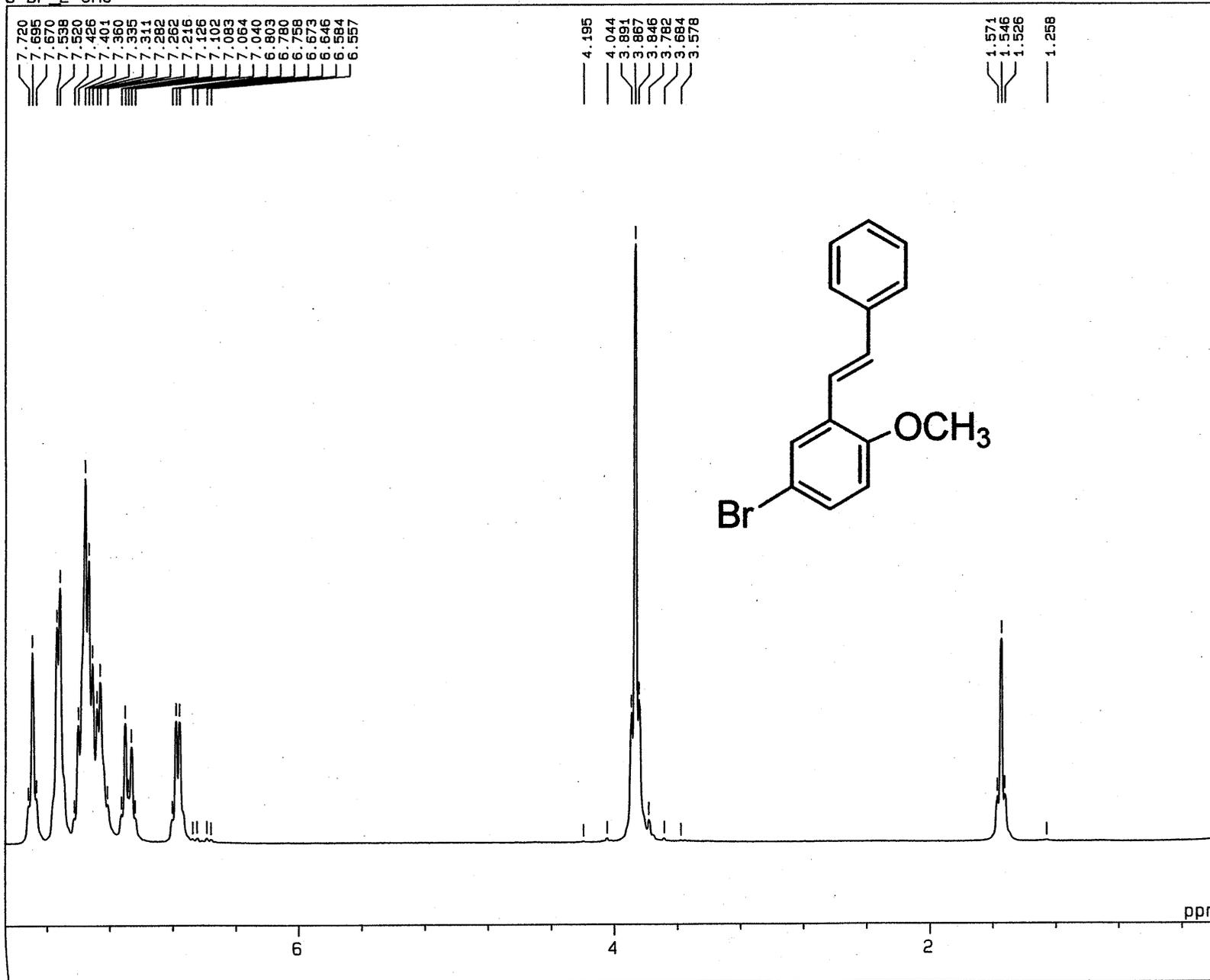
-54-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE <chem>COC1=CC=C(C=C1)/C=C/C2=CC=CC=C2</chem> (E)-3-Bromo-4-methoxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	

JASCO
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-006E

5-Br_2-Ome



22-JAN-2005 17: 37: 27.84

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_5-Br_2-Ome_0501z

COMNT : 5-Br_2-Ome
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 65536
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 19

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 30
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.8 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.12 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3084.69 Hz
XS : 391.04 Hz

operator

—55—

¹H-NMR spectrum of (E)-5-Bromo-2-methoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E2

Date : 18-Jan-105 11:26

Sample: 2-OMe 5-Br

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : (1,5)

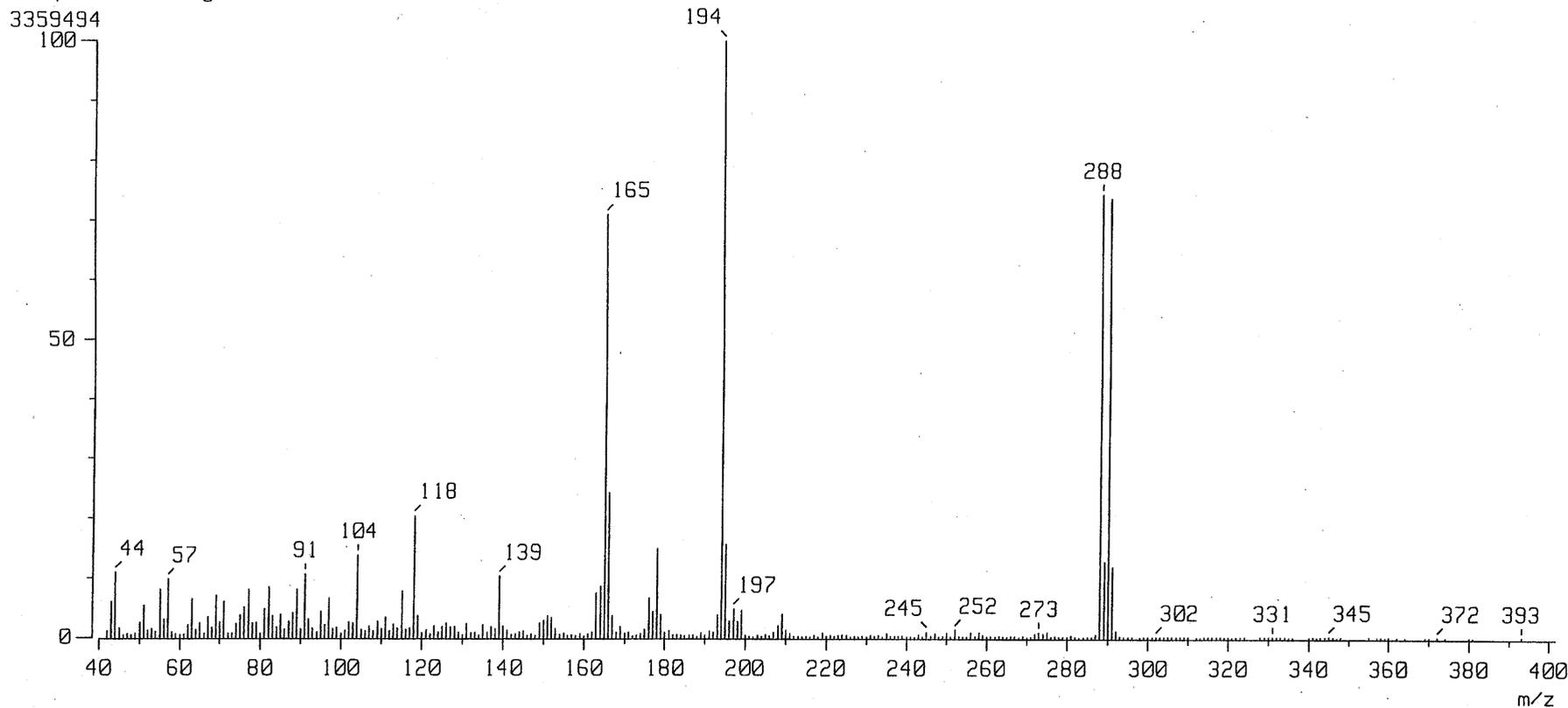
Temp : 31.9 deg.C

BP : m/z 194.0000

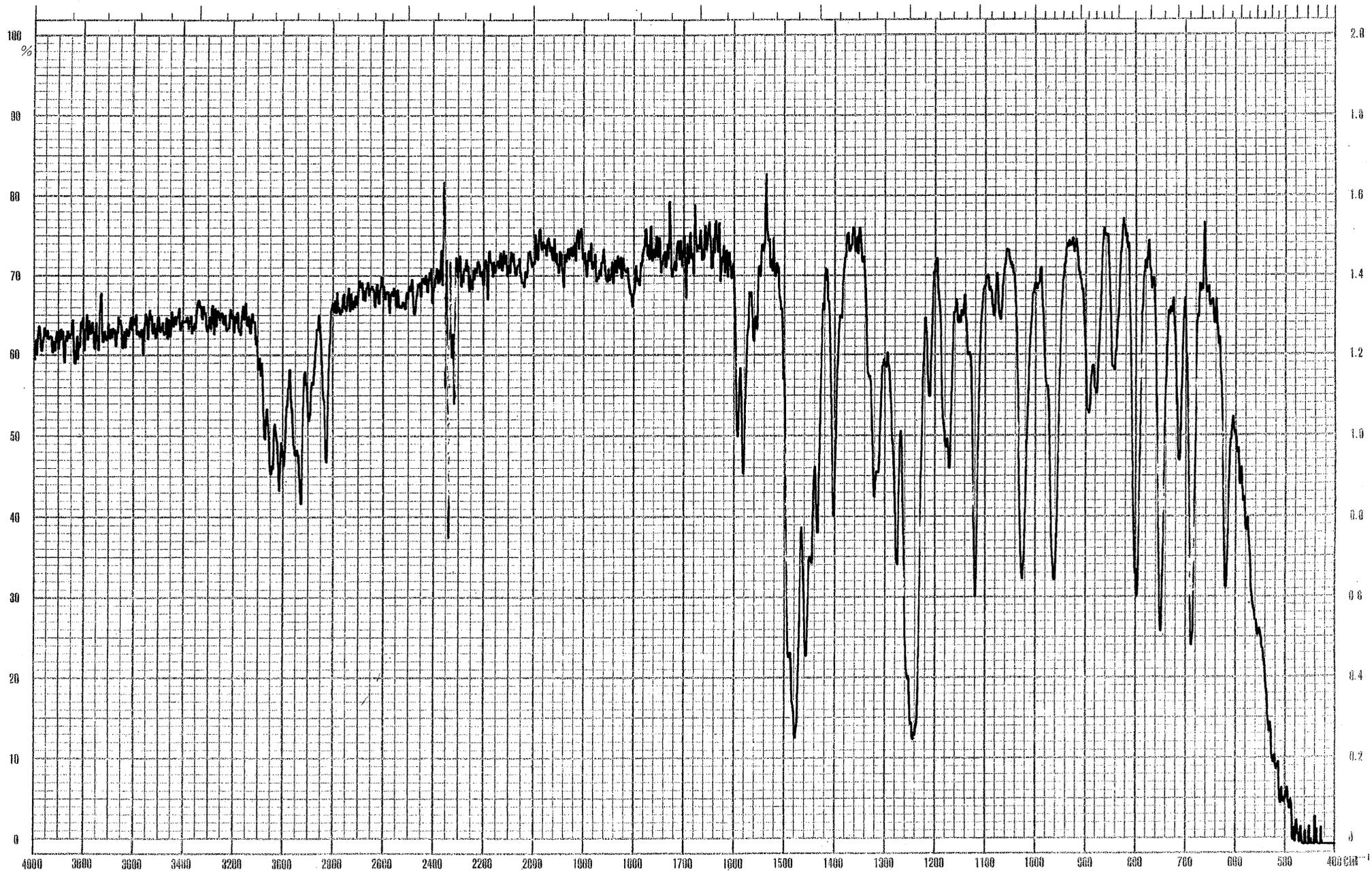
Int. : 320.39

Output m/z range : 40.0000 to 401.7260

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-5-Bromo-2-methoxystilbene



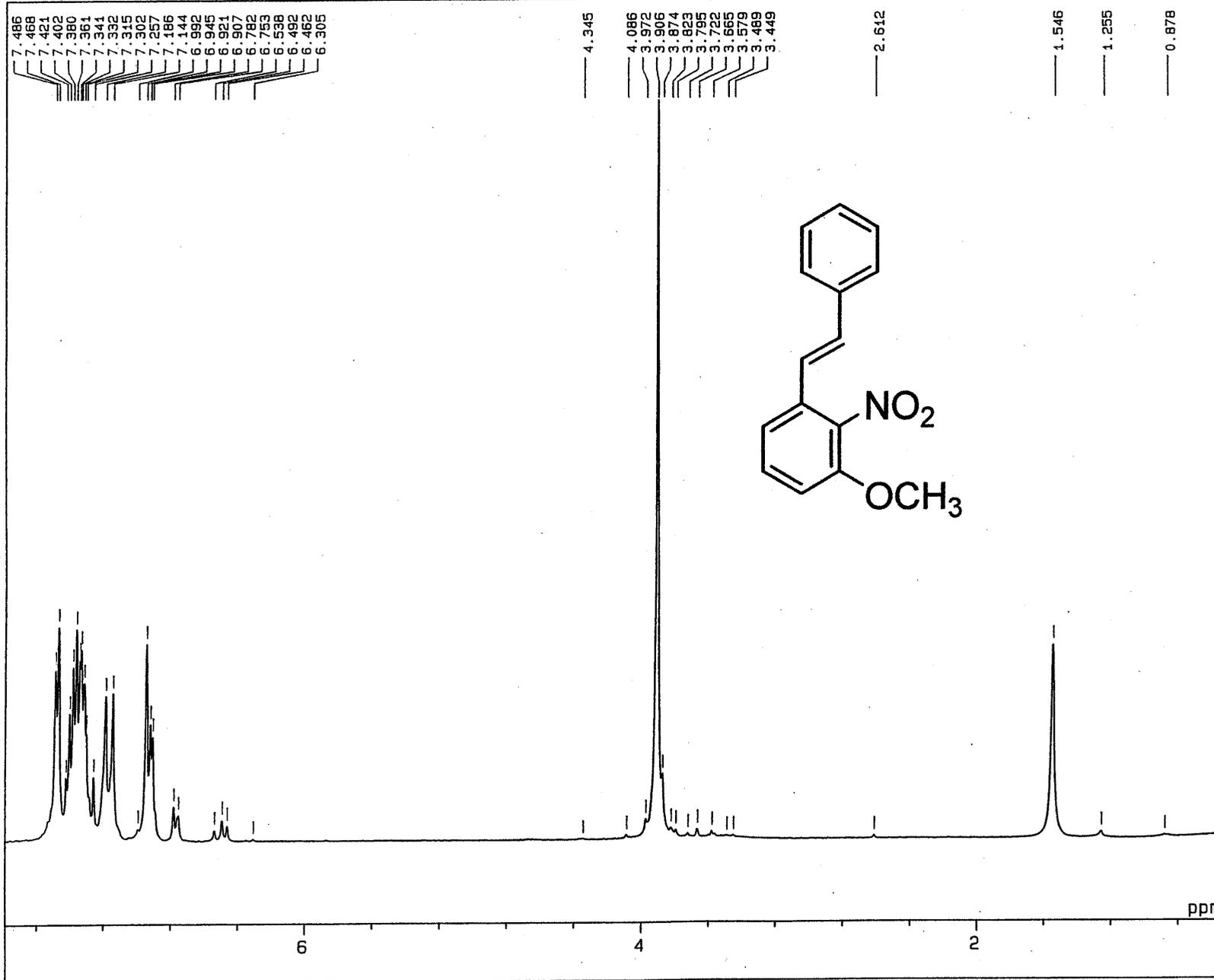
-57-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN		<chem>COC1=CC=C(C=C1)/C=C/C2=CC=CC=C2Br</chem>			
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	(E)-5-bromo-2-methoxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	

JASCO
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0061

2-N02, 3-OMe stilbene



19-JUN-2004 16:07:01.95

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_2-N02, 3-OME_040

COMNT : 2-N02, 3-OME stilbene
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 16

PW1 : 5.10 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRAPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRANS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 23.2 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2907.34 Hz
XS : 330.55 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-3-Methoxy-2-nitrostilbene

[Mass Spectrum]

Data : E7

Date : 19-Jan-105 10:07

Sample: 2-NO2 3-OMe

Note : probe temp. 40-400(128/min), chamber temp. 250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.99 min

Scan# : (8,10)

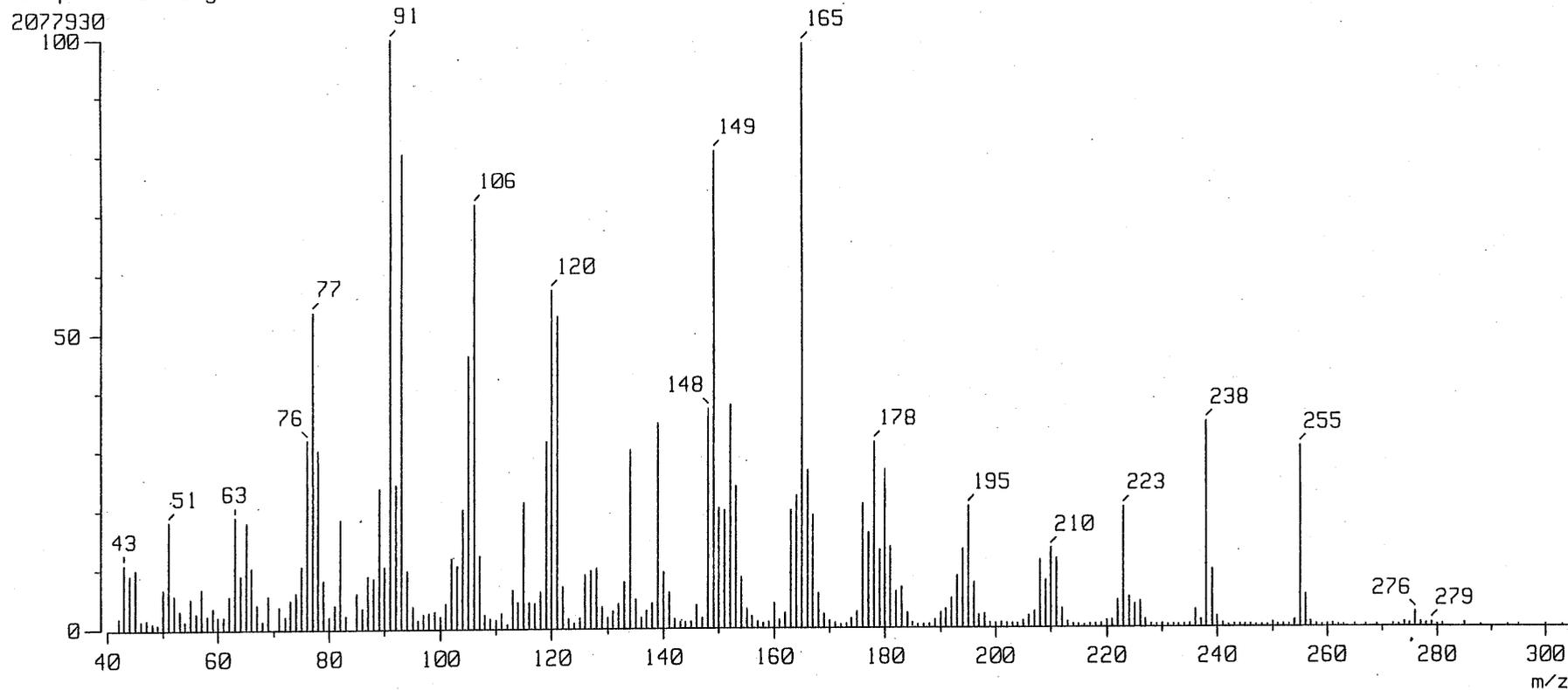
Temp : 117.7 deg.C

BP : m/z 91.0000

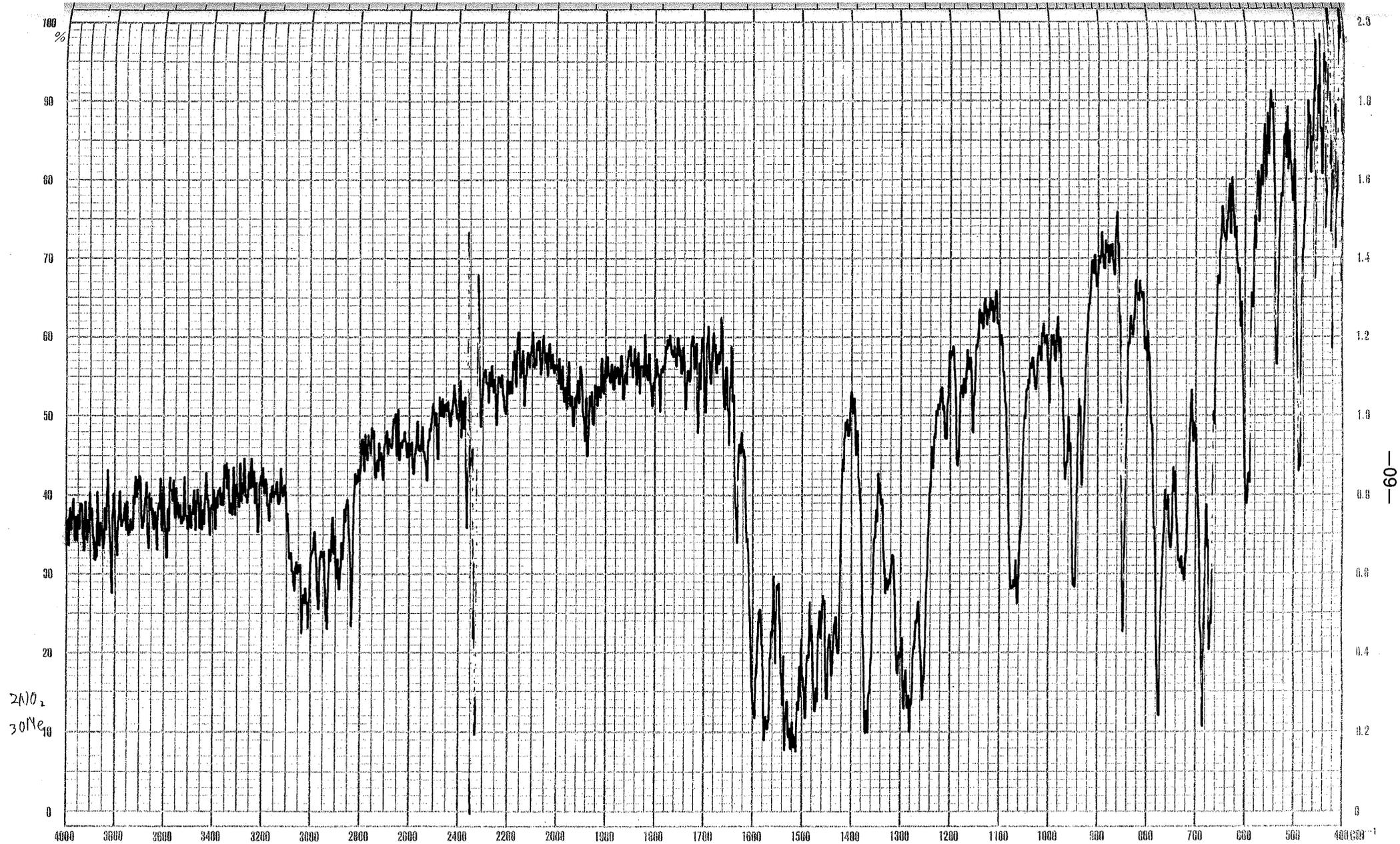
Int. : 198.17

Output m/z range : 40.0000 to 304.2660

Cut Level : 0.00 %

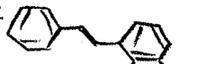


MS spectrum of (*E*)-3-Methoxy-2-nitrostilbene



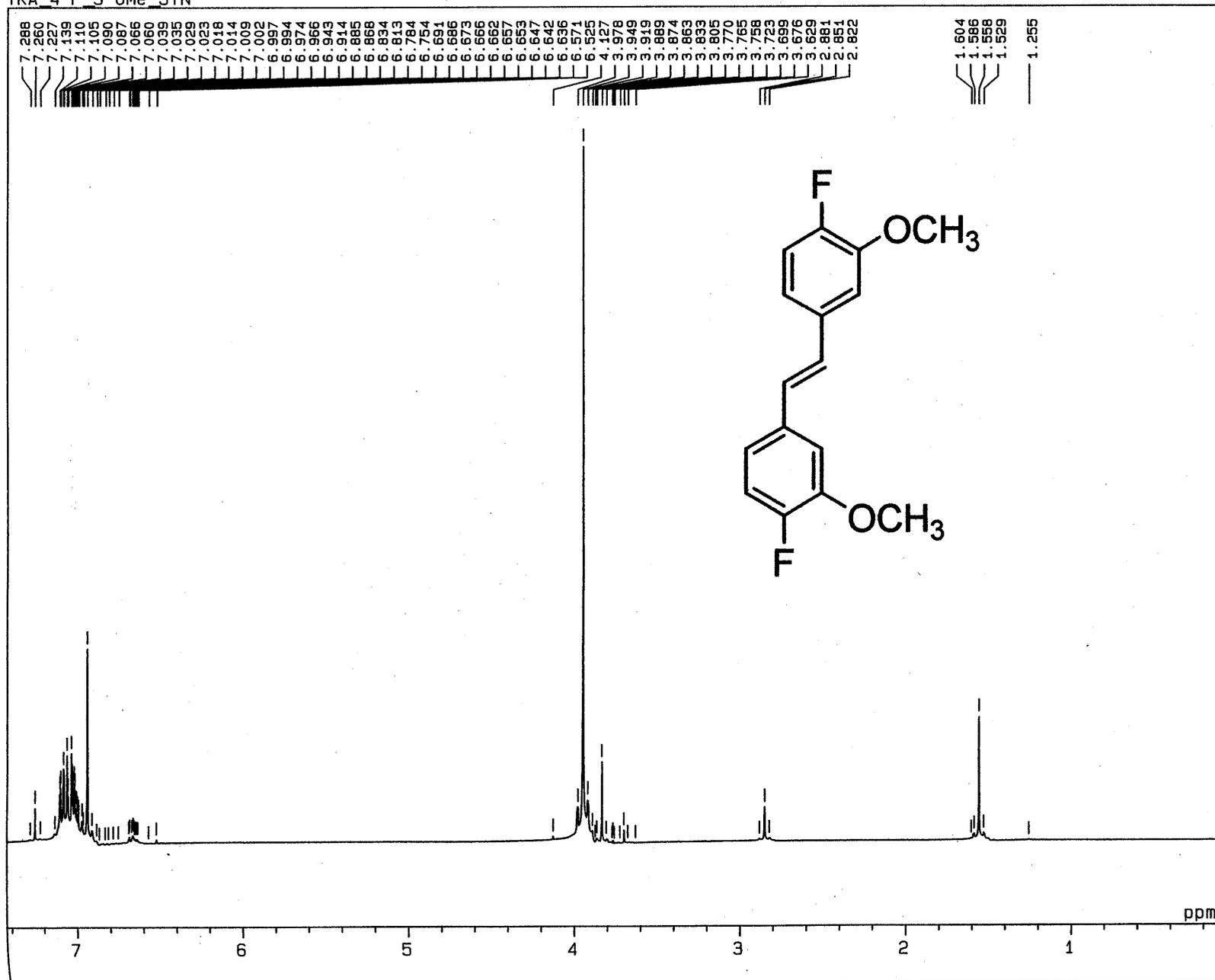
2ND
30Mg

—60—

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT	 (E) 3-Methoxy-2-nitro stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	
	EXPANDER					

JASCO
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN
 J-006E

TKA 4-F 3-OMe SYN



21-JAN-2005 16:32:54.58

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_4-F_3-OMe_SYN_0!

COMNT : TKA_4-F_3-OMe_SYN
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 20
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRAPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.8 c
CSPED : 9 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2932.71 Hz
XS : 488.87 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (E)-4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E3

Date : 18-Jan-105 11:51

Sample: 3-OMe 4-F Sy

Note : probe40-400(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.86 min

Scan# : (3,14)

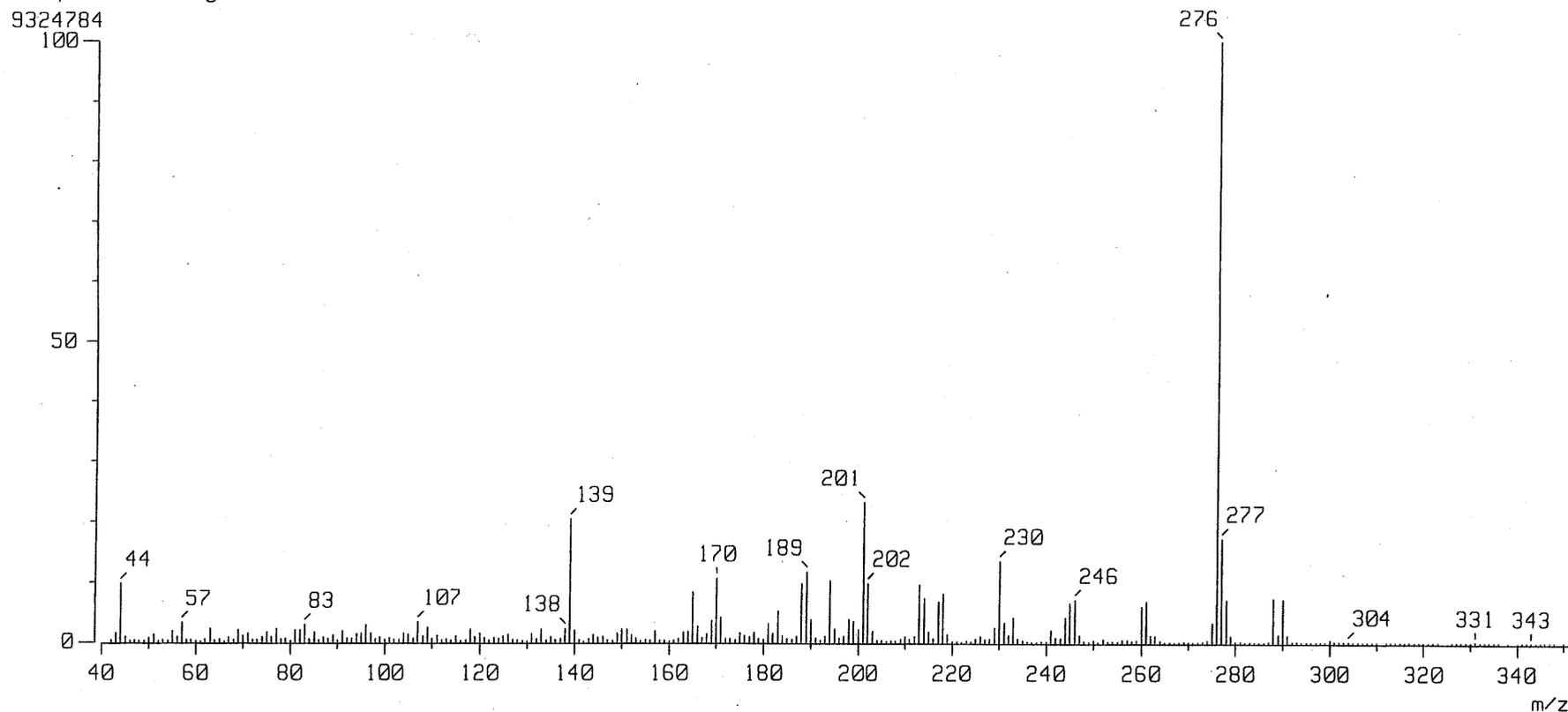
Temp : 50.6 deg.C

BP : m/z 276.0000

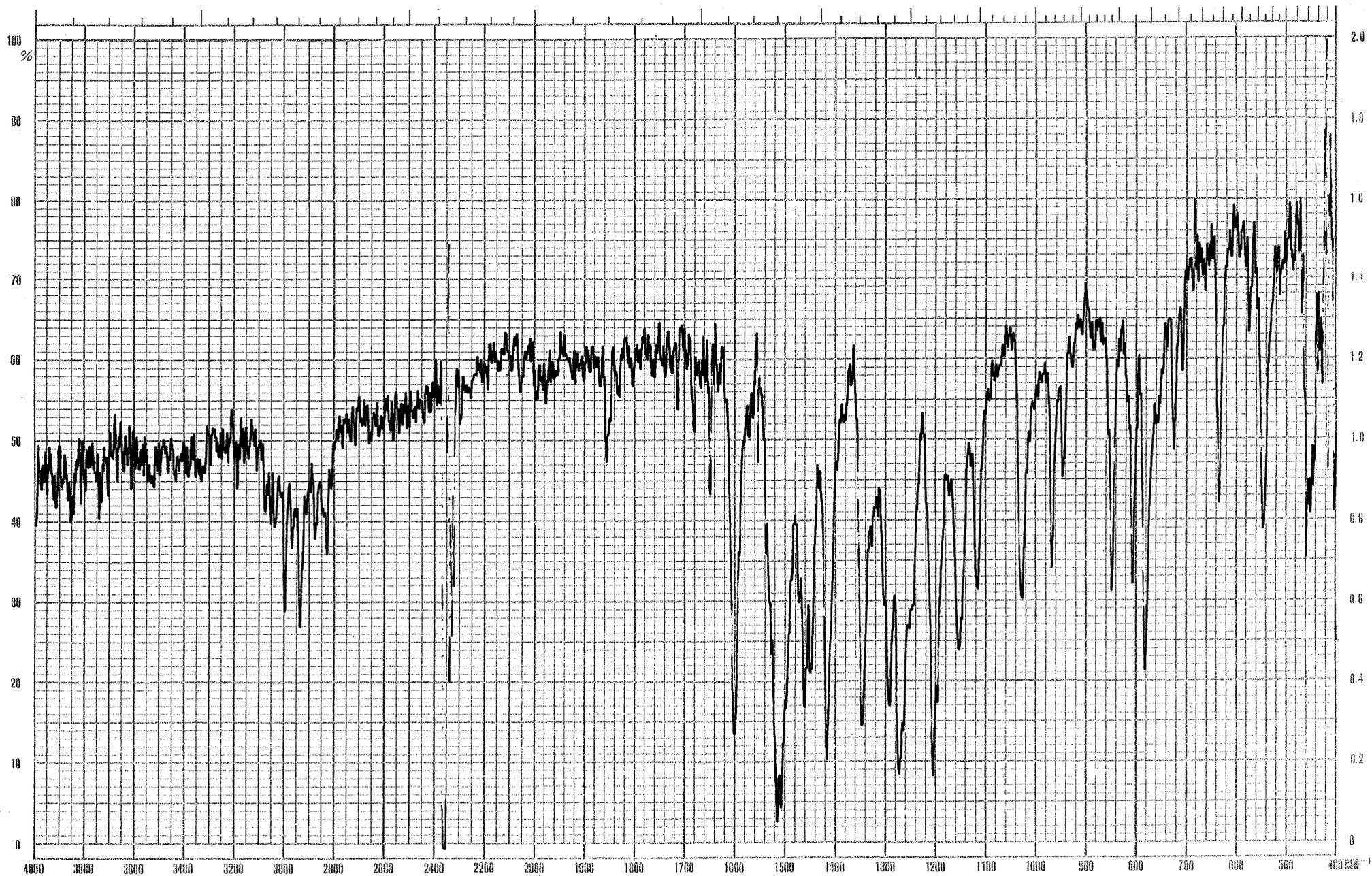
Int. : 889.28

Output m/z range : 40.0000 to 351.2230

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-4,4'-Difluoro-3,3'-dimethoxystilbene



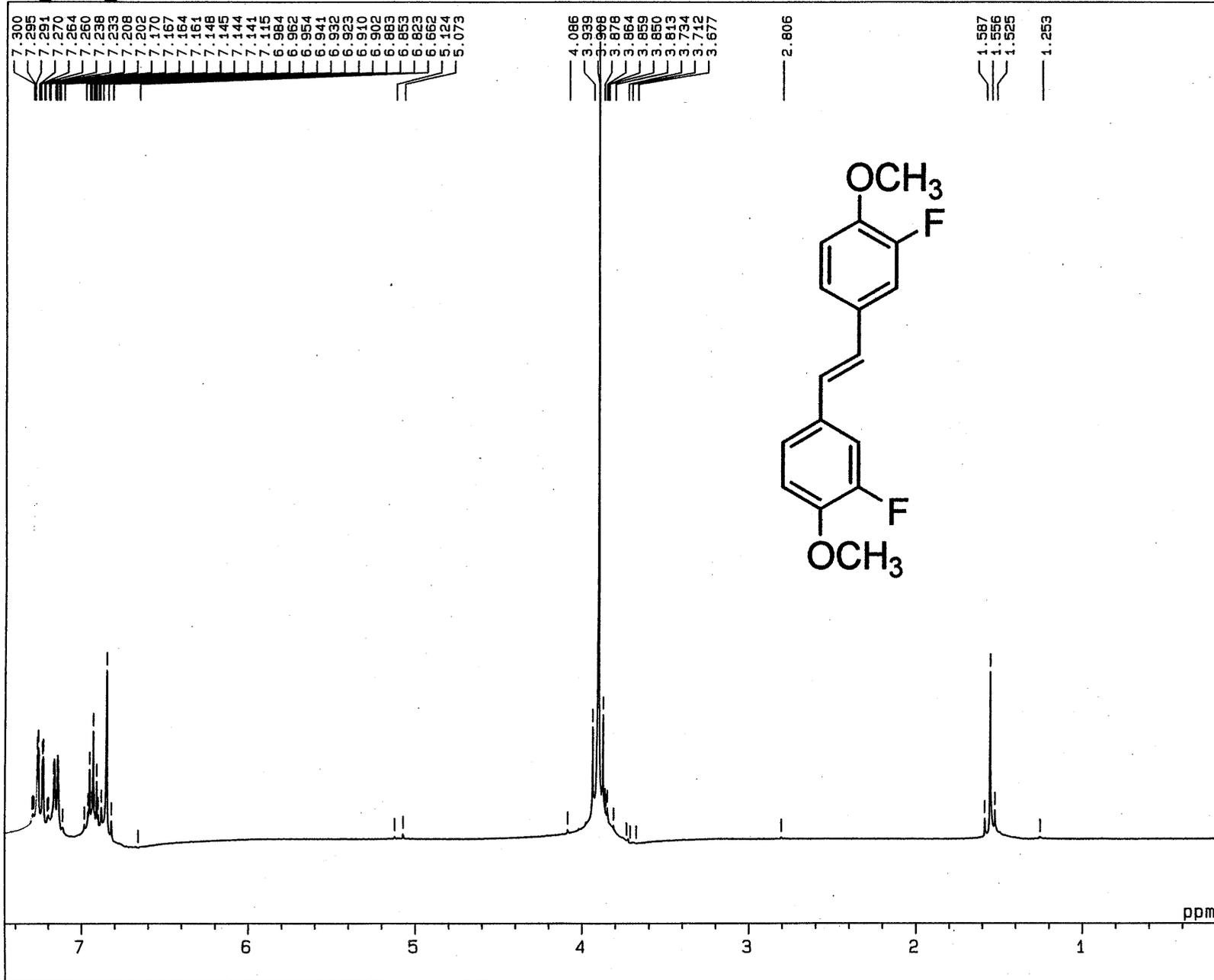
—63—

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN					
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	<chem>COc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(F)cc2</chem> (E)-4,4'-difluoro 3,3'-dimethoxy stilbene.	CELL-LENGTH	SOLVENT	

Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-8061

3-F_4-Ome SYN



21-JAN-2005 16: 01: 03.24

DFILE : ALPHA
 SFILE : TKA_1HNON_3-F_4-OME_05012:

COMNT : 3-F_4-Ome_SYN
 EXMOD : SINGL
 IRMOD : NON
 POINT : 32768
 FREQU : 7993.61 Hz
 SCANS : 32
 DUMMY : 4
 ACQTM : 4.0993 sec
 PD : 3.0000 sec
 RGAIN : 19

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
 OBFREQ : 399.65 MHz
 OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
 IRFREQ : 399.65 MHz
 IRSET : 134500.00 Hz
 IRATN : 511
 IRRPW : 50.0 usec
 IRBP1 : 25
 IRBP2 : 6
 IRRNS : 0

ADBIT : 16
 CTEMP : 21.8 c
 CSPED : 12 Hz
 SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
 BF : 0.10 Hz
 T1 : 0.00 %
 T2 : 0.00 %
 T3 : 90.00 %
 T4 : 100.00 %
 REFVL : 0.00 ppm
 XE : 2914.90 Hz
 XS : 466.06 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E4

Date : 18-Jan-105 13:31

Sample: 3-F 4-OMe Sy

Note : probe40-400(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.74 min

Scan# : (2,12)

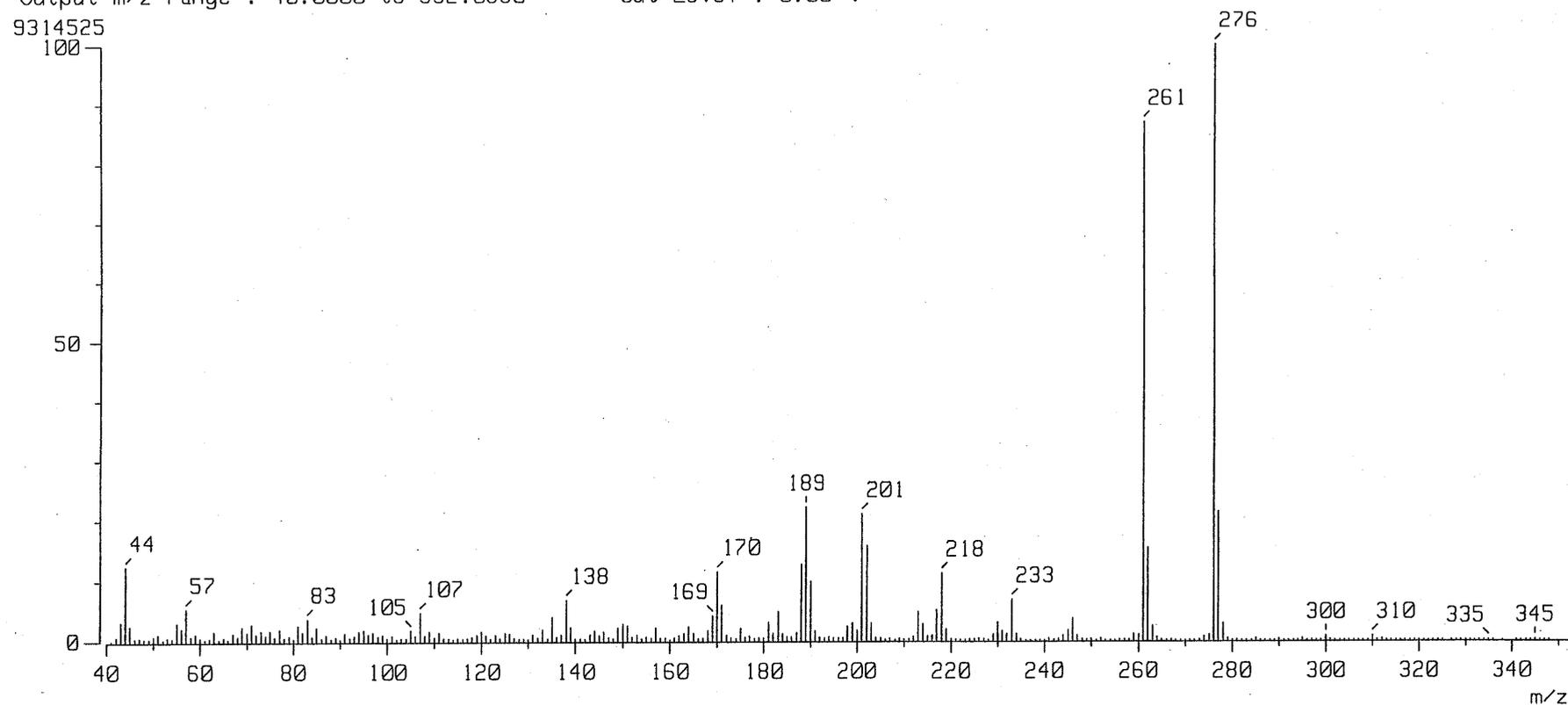
Temp : 35.5 deg.C

BP : m/z 276.0000

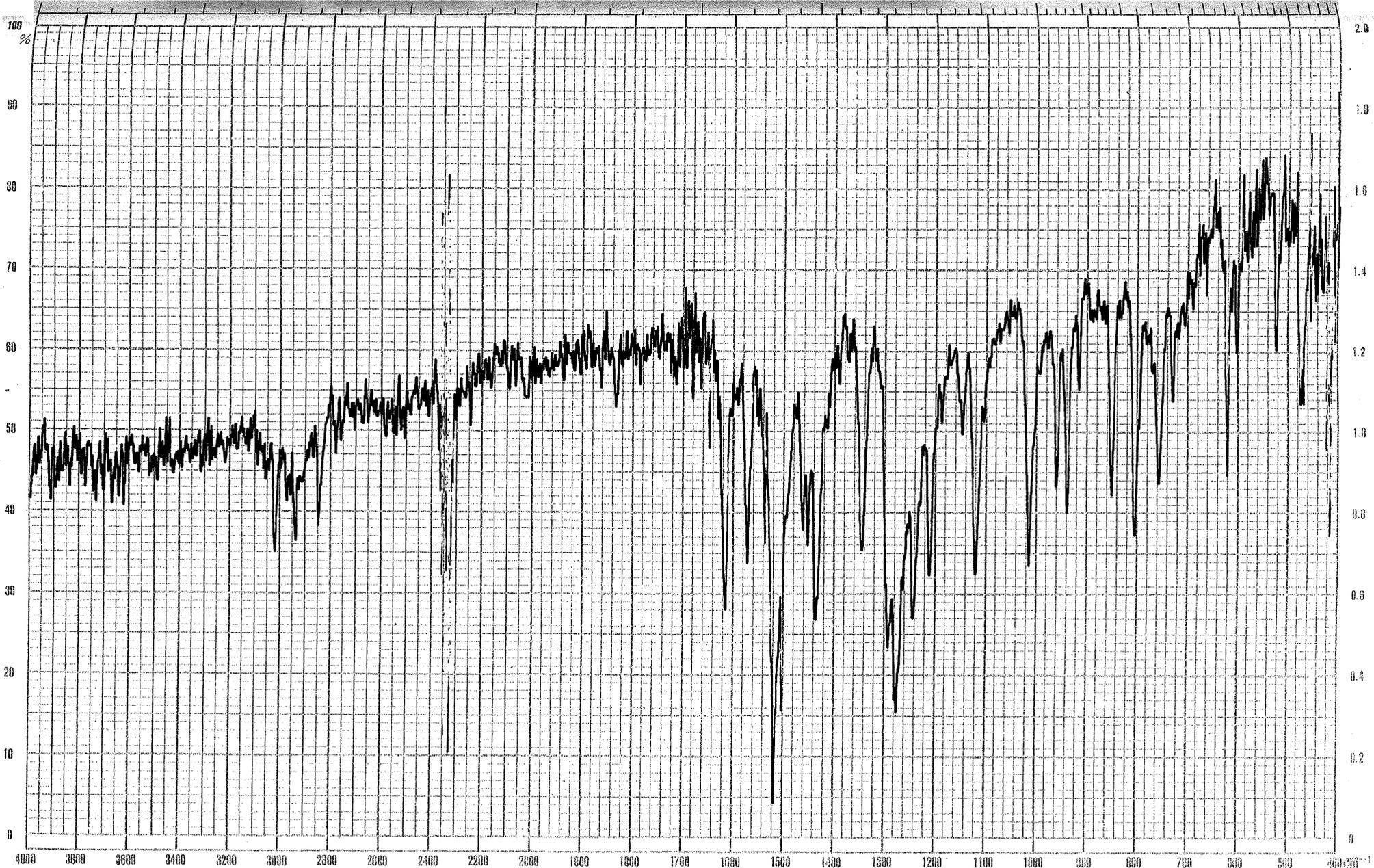
Int. : 888.30

Output m/z range : 40.0000 to 352.0590

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3,3'-Difluoro-4,4'-dimethoxystilbene



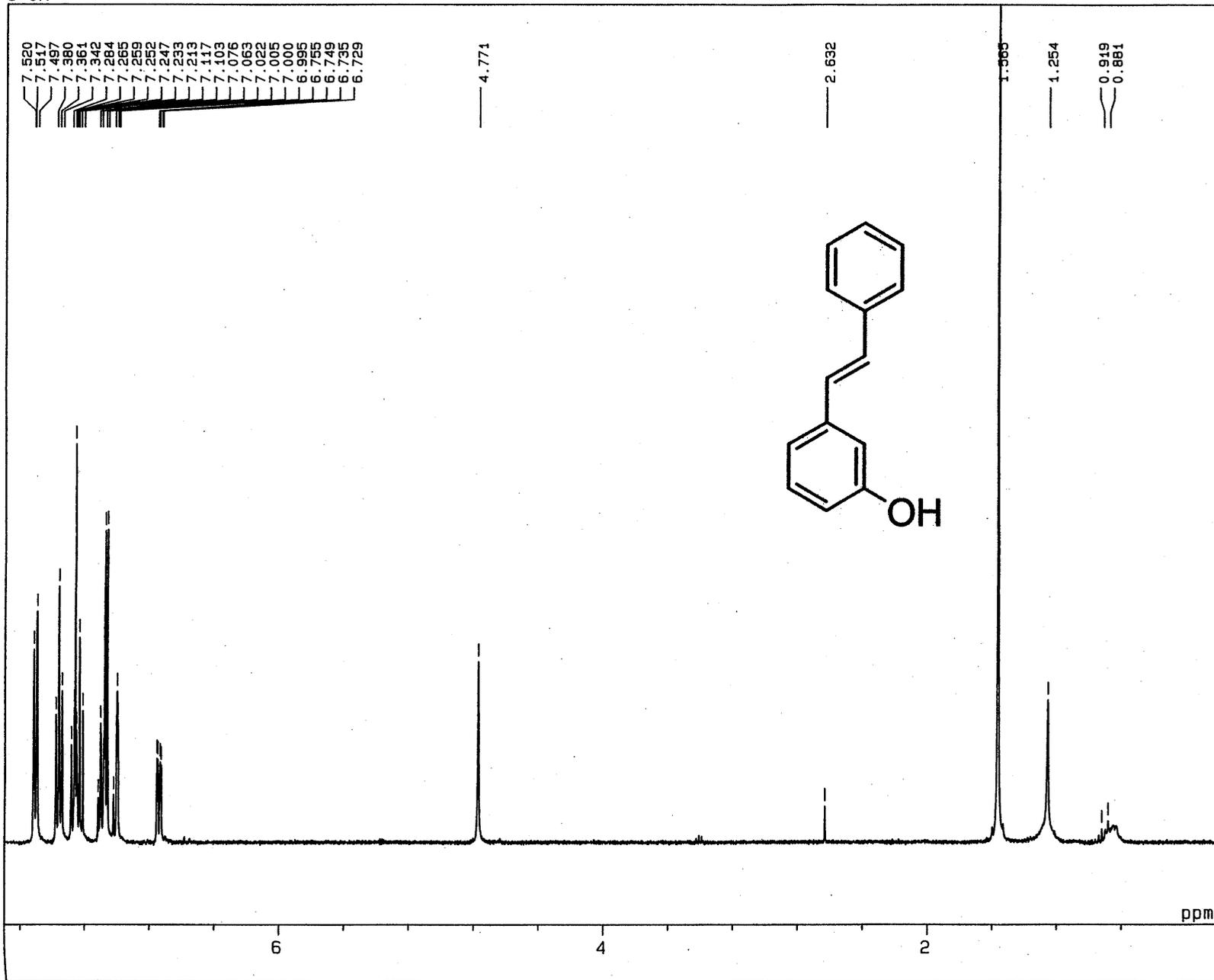
-66-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN		<chem>Cc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(F)c(F)c2</chem>			
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	(E)-3,3'-Difluoro 4,4'-dimethoxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	

Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0060

3-OH



19-JAN-2005 14:51:50.04

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_3-OH_050119

COMNT : 3-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 18

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 22.3 c
CSPED : 14 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2998.09 Hz
XS : 413.49 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (E)-3-Hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E15

Date : 20-Jan-105 15:22

Sample: 3-OH

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.62 min

Scan# : (5,8)

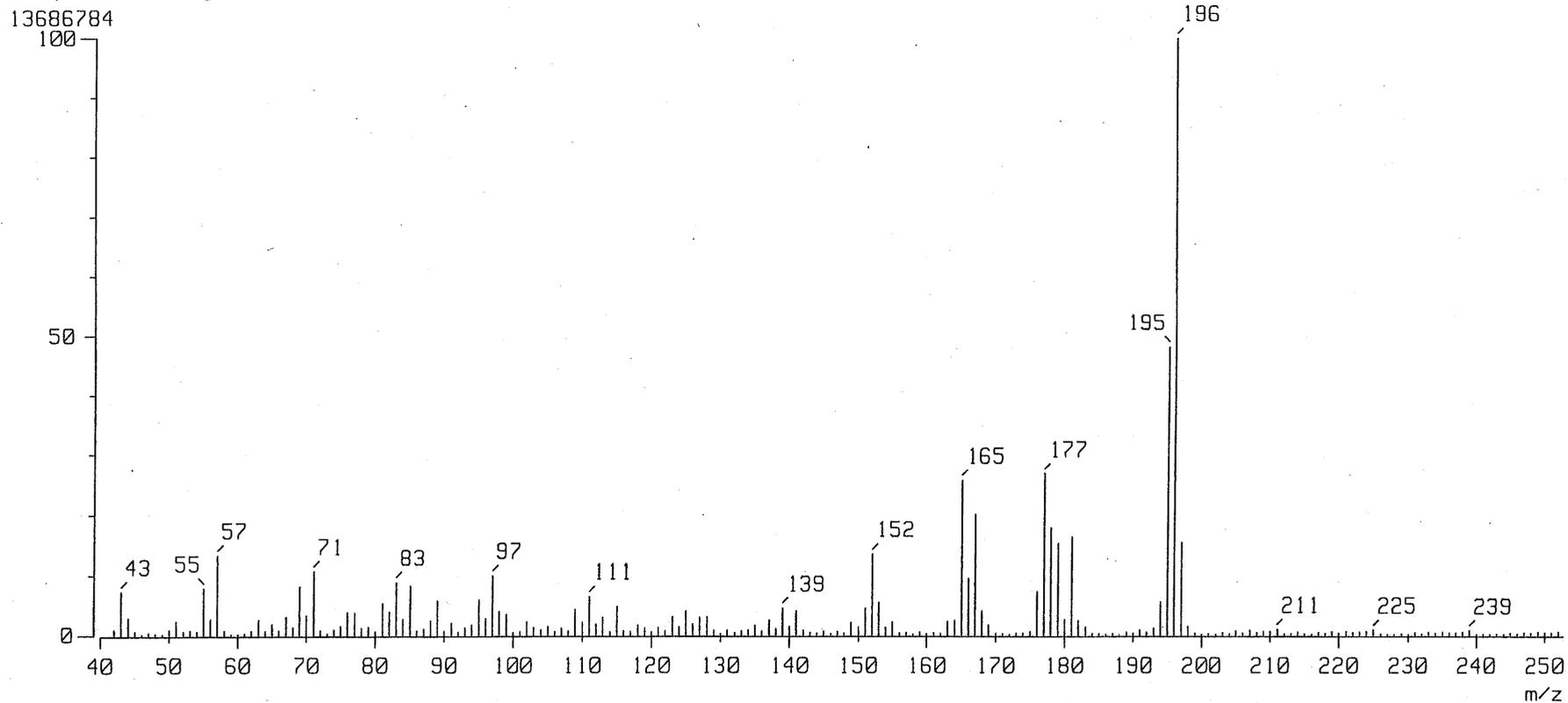
Temp : 80.7 deg.C

BP : m/z 196.0000

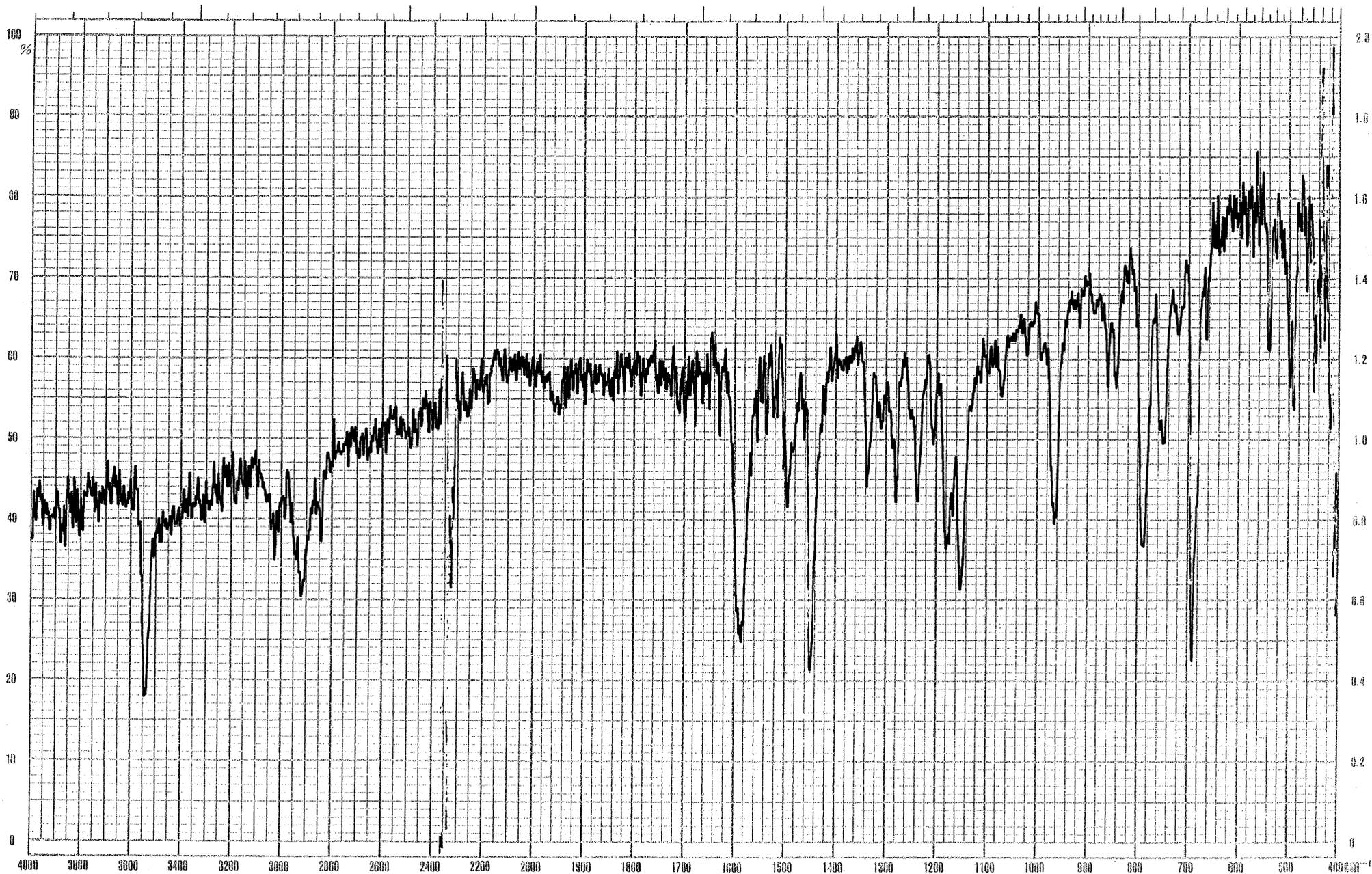
Int. : 1305.27

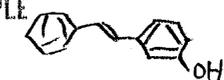
Output m/z range : 40.0000 to 252.7250

Cut Level : 0.00 %



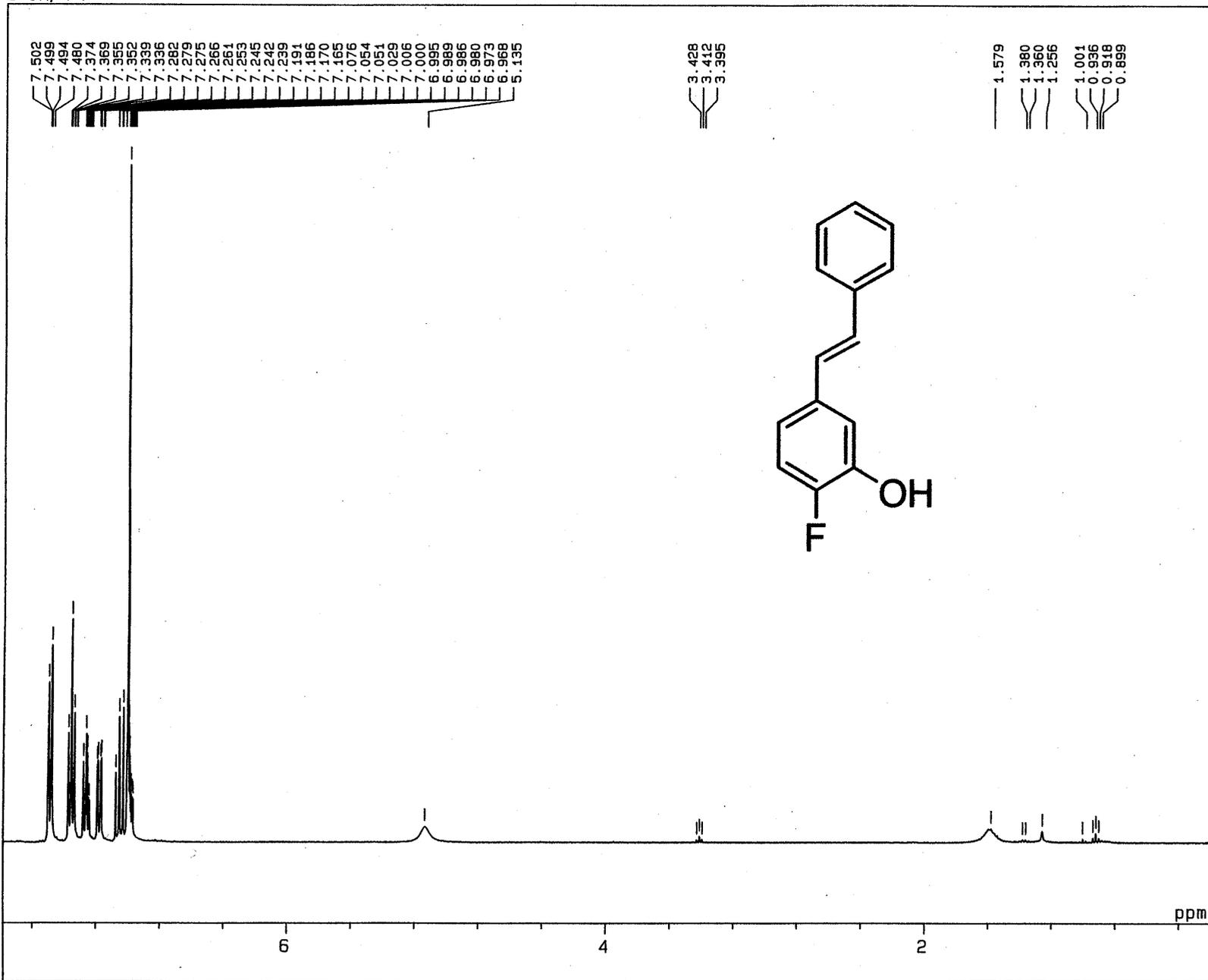
MS spectrum of (E)-3-Hydroxystilbene



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-3-Hydroxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPE CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

3-OH, 4-F



19-JAN-2005 14: 41: 28.34

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_3-OH, 4-F_050119

COMNT : 3-OH, 4-F
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 14

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 22.3 c
CSPED : 13 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3035.90 Hz
XS : 395.56 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-4-Fluoro-3-hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : 2

Date : 04-Feb-103 11:02

Sample: 3-OH/4-F-F

Note : chamber 200; start 40 (32/min)

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : (1,5)

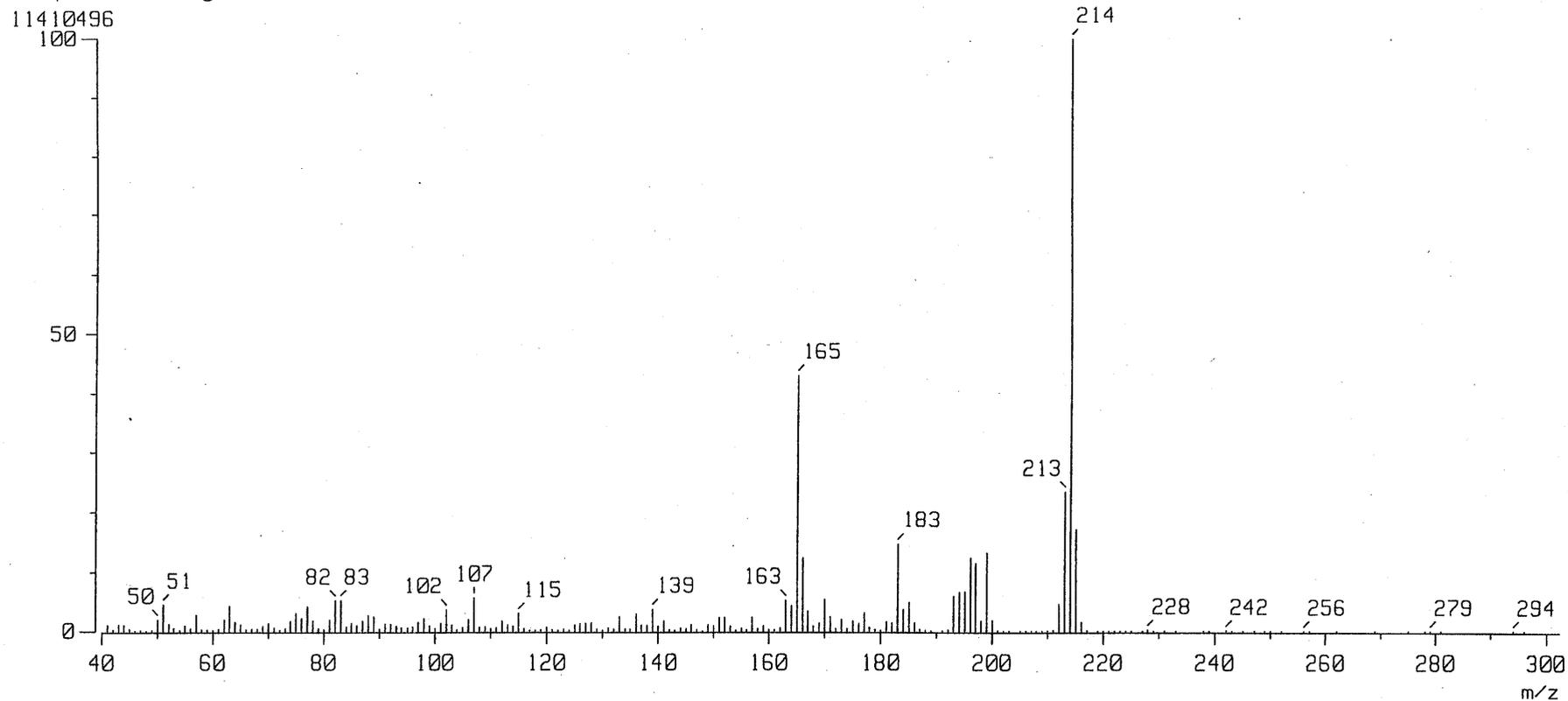
Temp : 31.5 deg.C

BP : m/z 214.0000

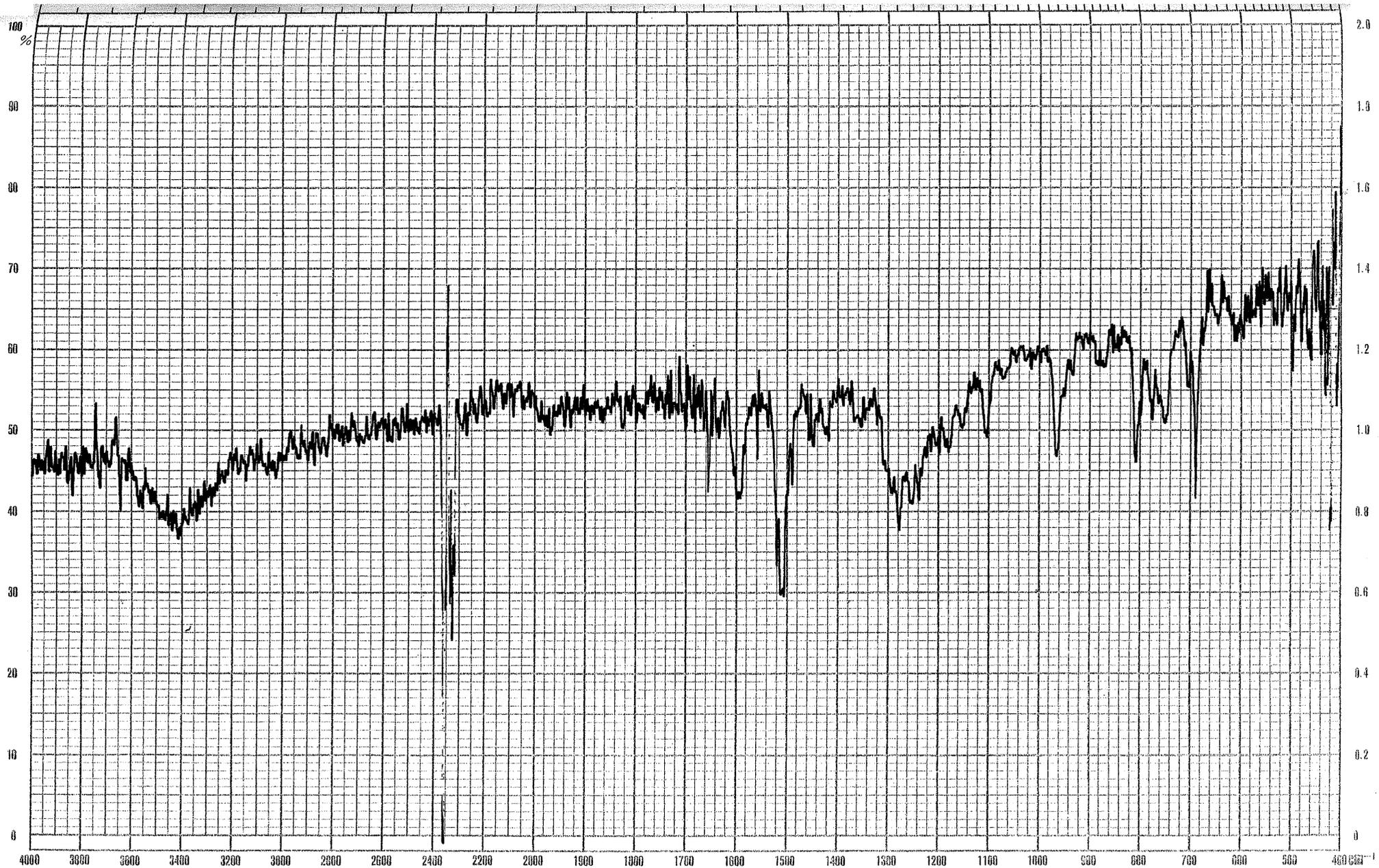
Int. : 1088.19

Output m/z range : 40.0000 to 302.3920

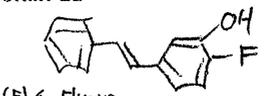
Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-4-Fluoro-3-hydroxystilbene

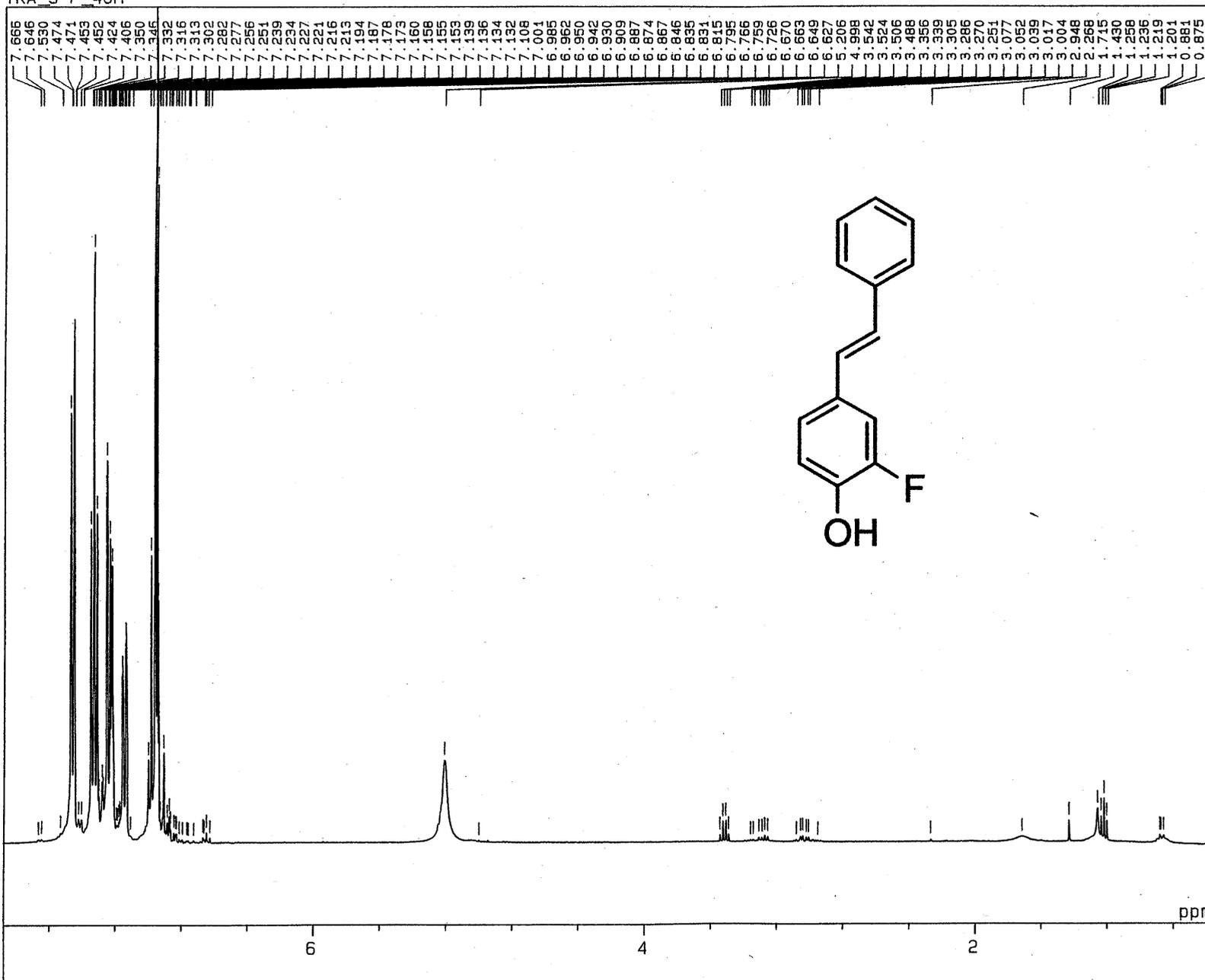


-72-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-4-Fluoro 3-hydroxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN EXPANDER	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN J-006E

TKA_3-F_40H



20-JAN-2003 12:59:20.93

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_3-F_4-OHCOMNT : TKA_3-F_40H
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 8

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 HzIRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0ADBIT : 16
CTEMP : 20.2 c
CSPED : 13 Hz
SLVNT : CDCL3RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2932.71 Hz
XS : 293.47 Hz
operator¹H-NMR spectrum of (E)-3-Fluoro-4-hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : 4

Date : 04-Feb-103 16:10

Sample: 3-F/4-OH

Note : chamber 200; start 40 (128/min)

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.25 min

Scan# : (1,6)

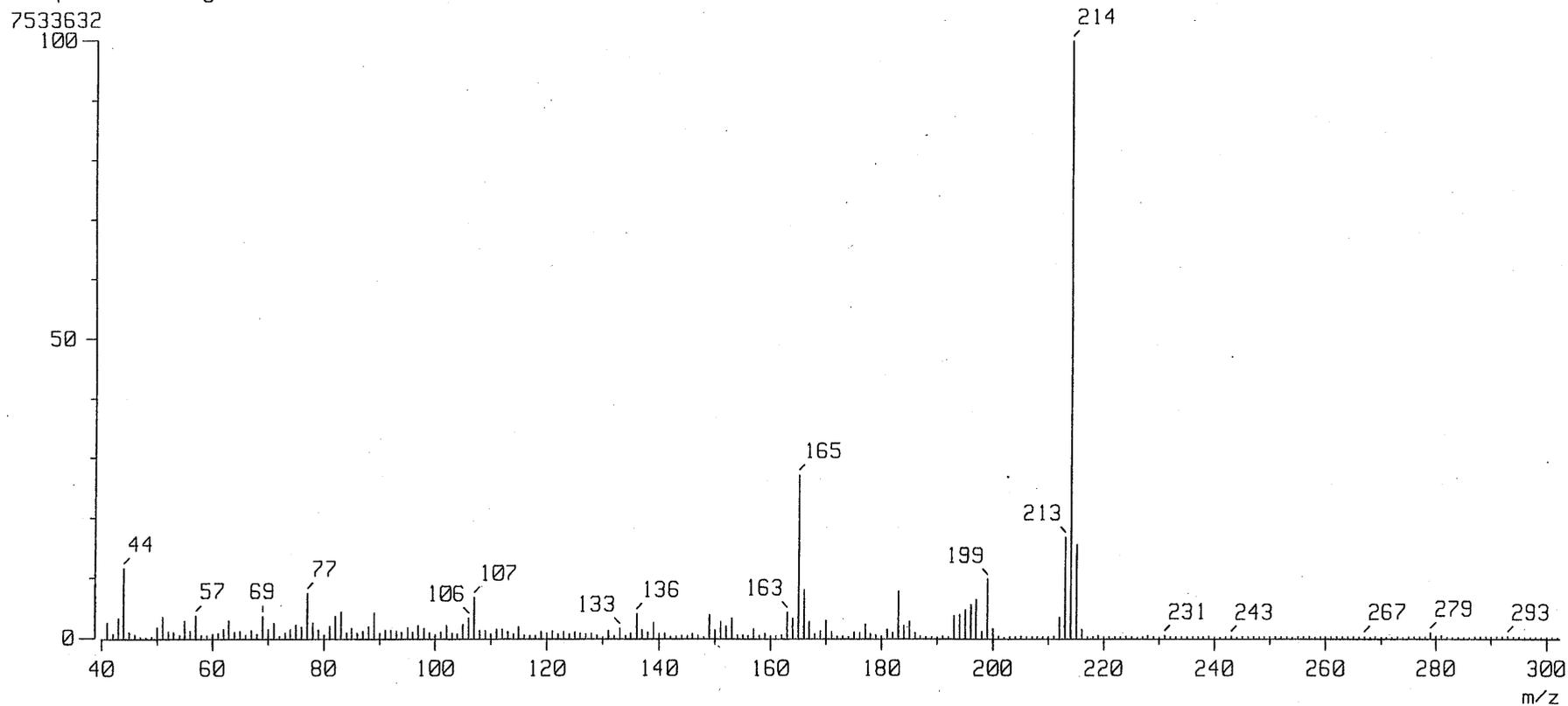
Temp : 30.7 deg.C

BP : m/z 214.0000

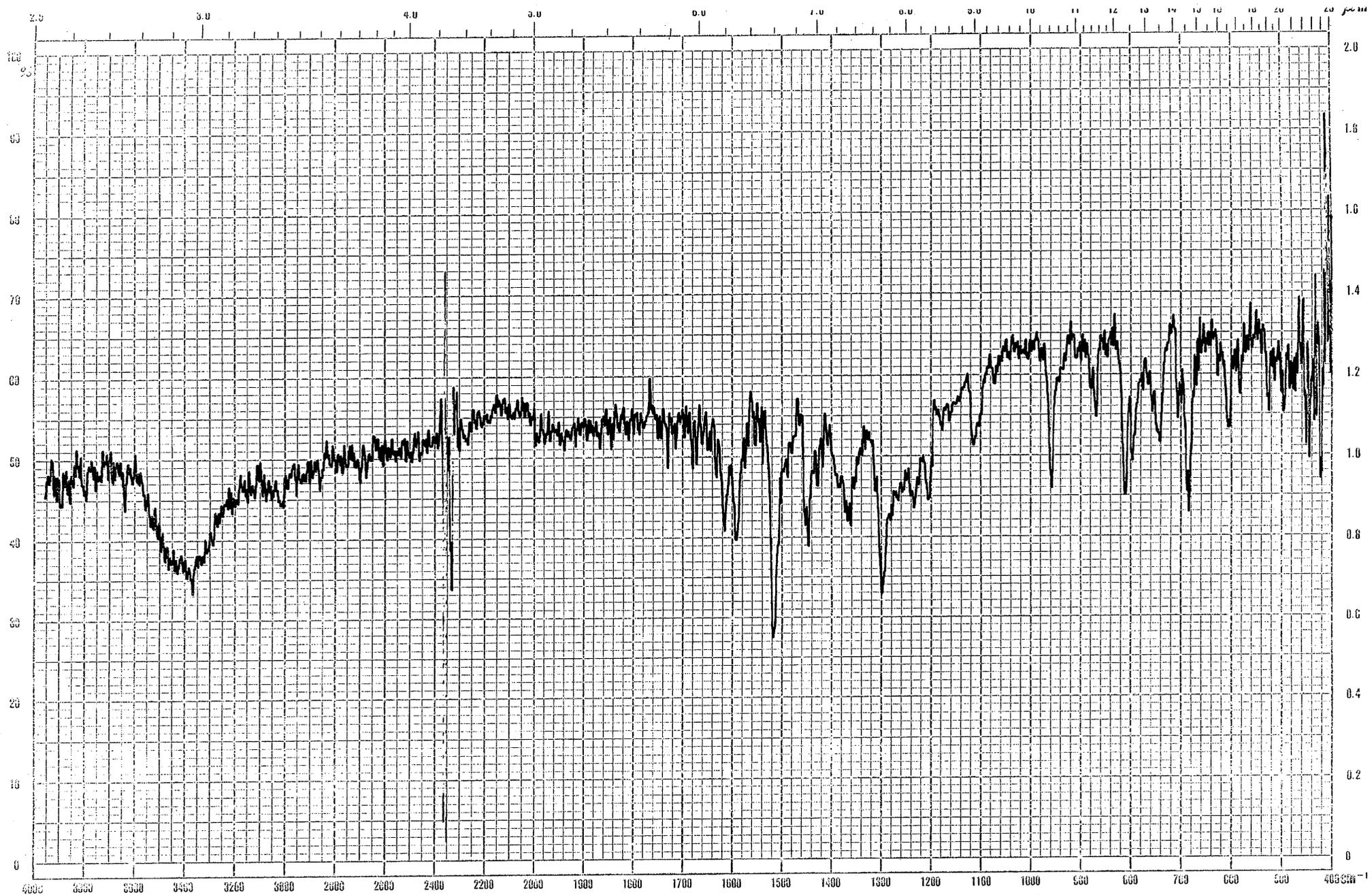
Int. : 718.46

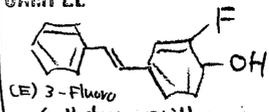
Output m/z range : 40.0000 to 302.3920

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3-Fluoro-4-hydroxystilbene

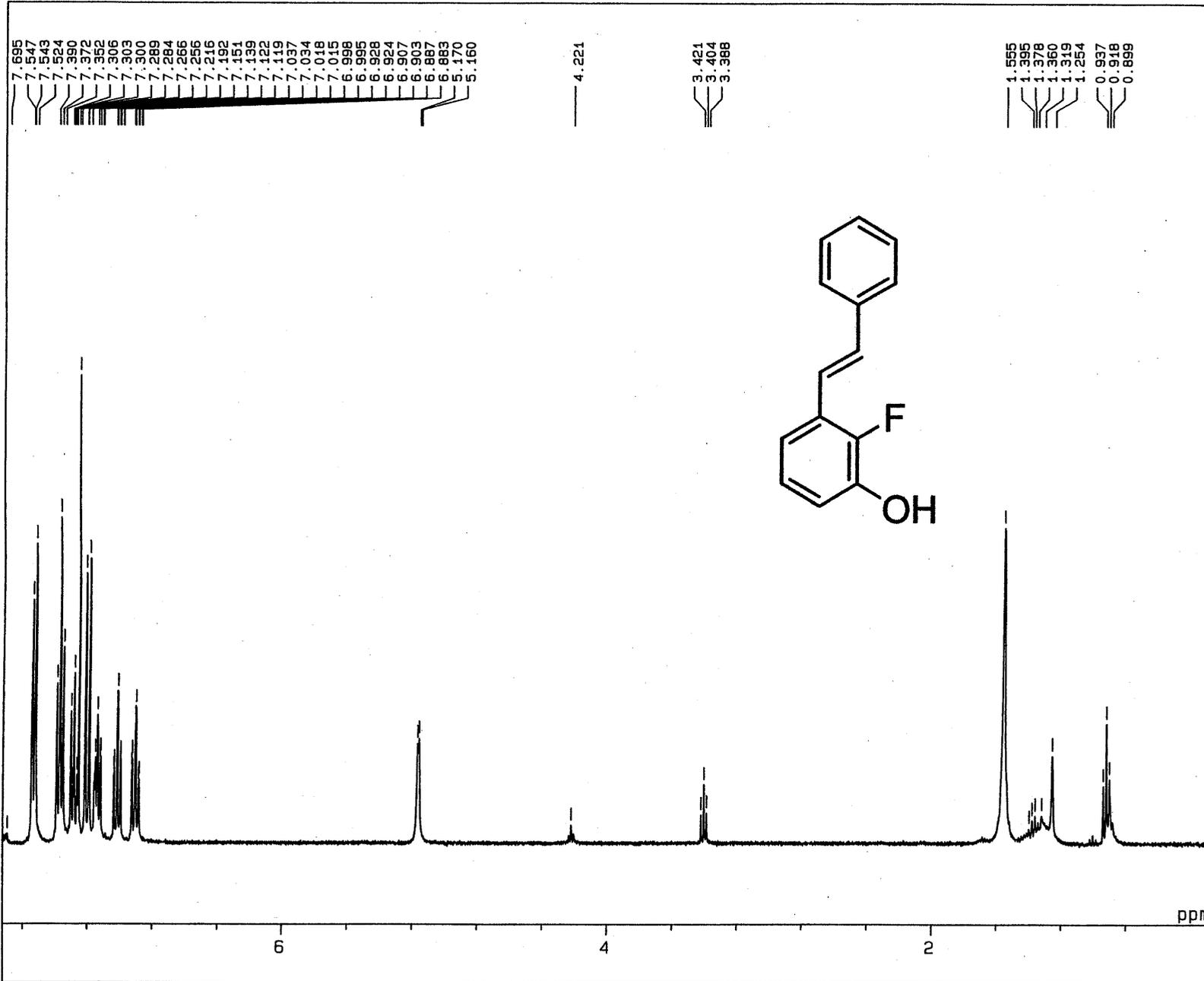


DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-3-Fluoro 5-Hydroxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	EXPANDER	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0068

2-F, 3-OH



19-JAN-2005 14:24:05.34

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_2-F_3-OH_050119

COMNT : 2-F, 3-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 14

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFREQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFREQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 22.3 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 2987.11 Hz
XS : 396.53 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (E)-2-Fluoro-3-hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E14

Date : 20-Jan-105 15:04

Sample: 2-F 3-OH

Note : probe40-200(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.37 min

Scan# : (3,5)

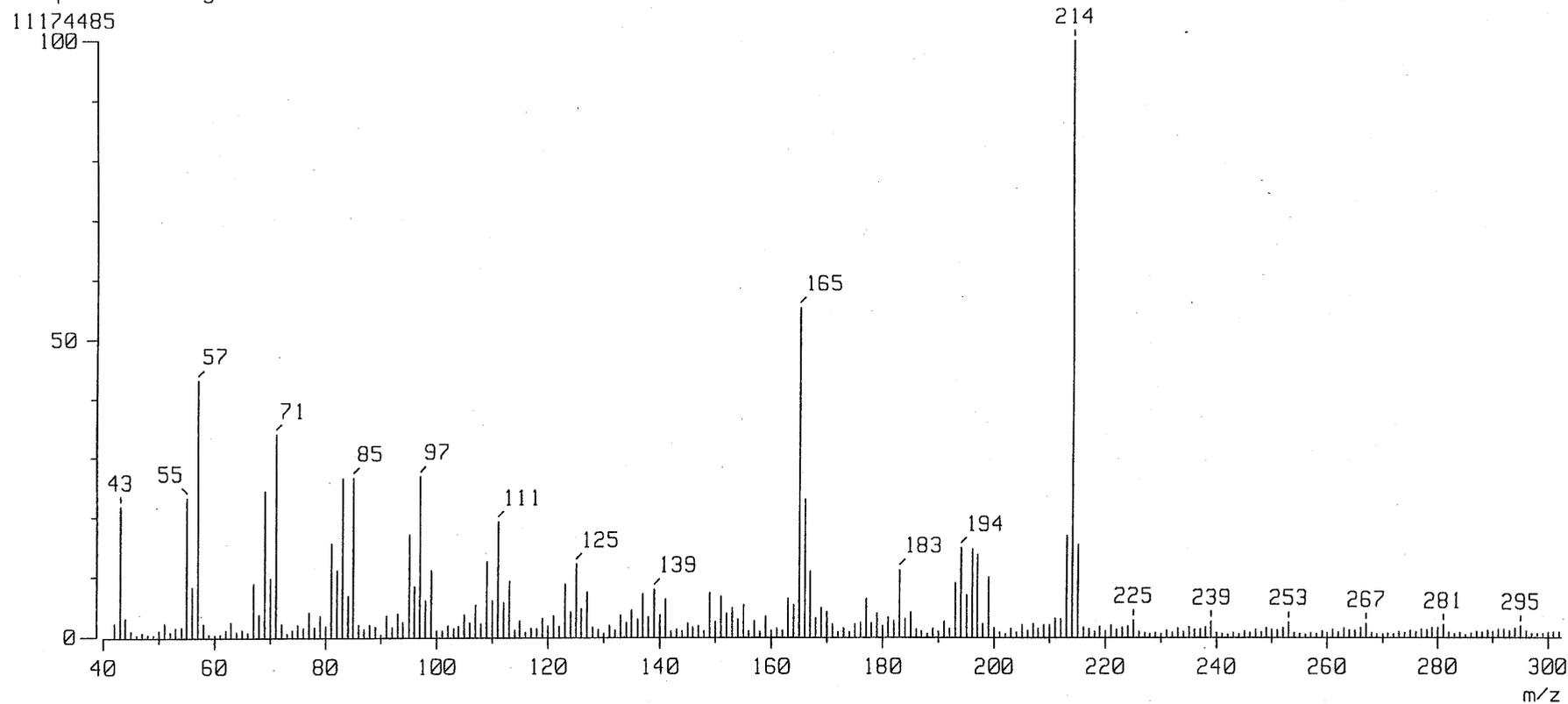
Temp : 45.6 deg.C

BP : m/z 214.0000

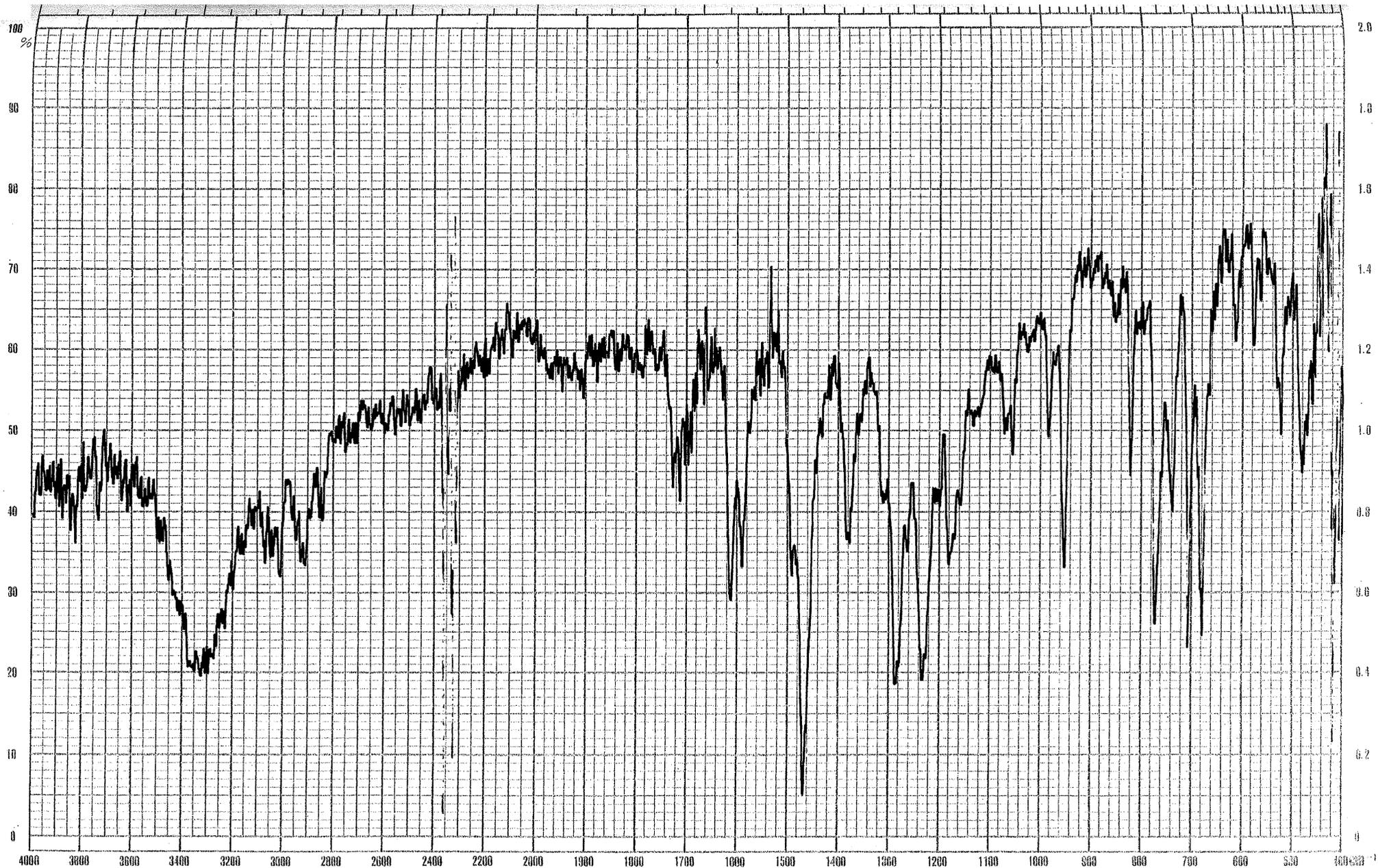
Int. : 1065.68

Output m/z range : 40.0000 to 302.3920

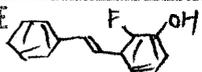
Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-2-Fluoro-3-hydroxystilbene



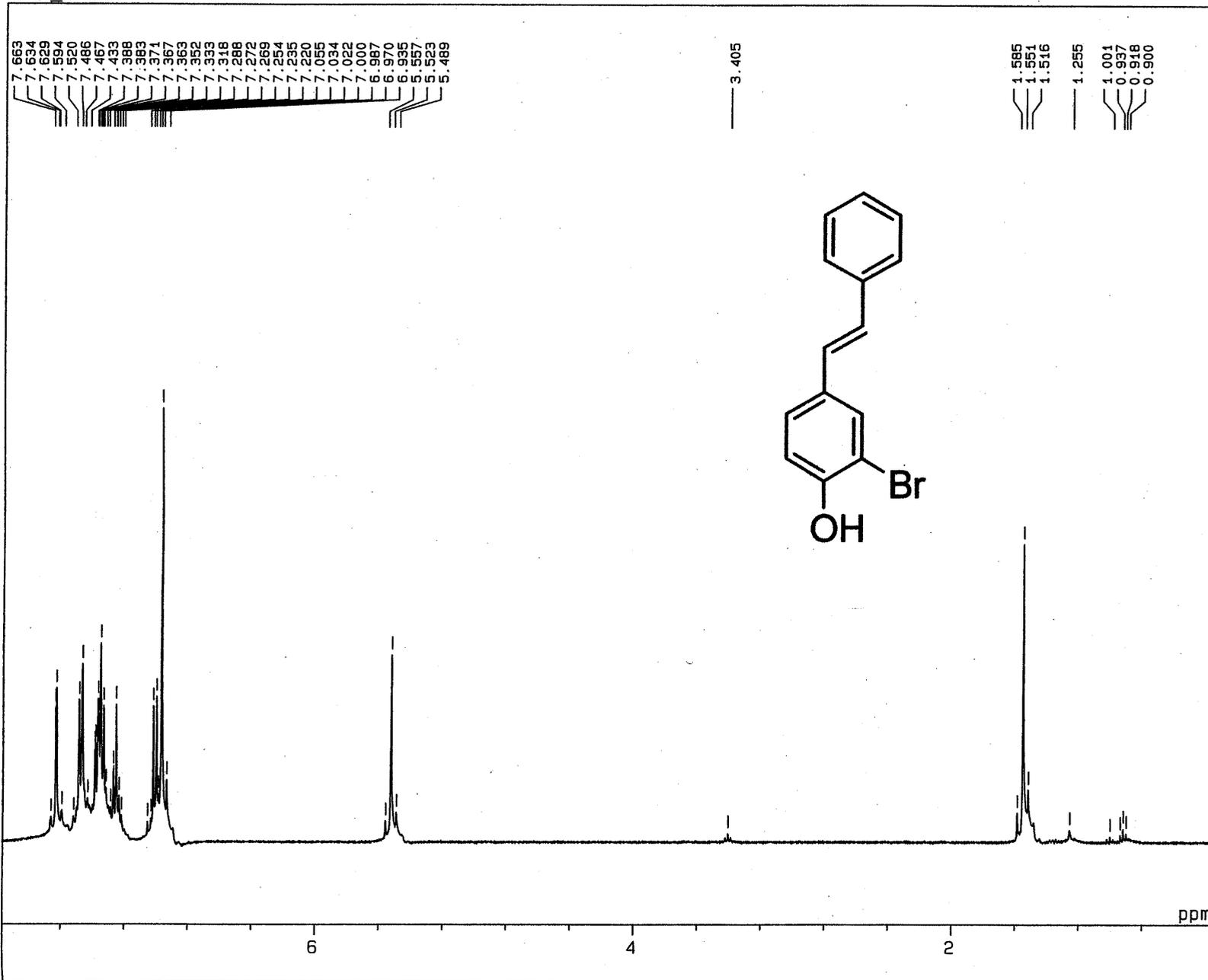
-78-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-2-Fluoro-3-hydroxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	

JASCO
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-006E

3-Br_4-OH



20-JAN-2005 16:35:19.27

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_3-Br_4-OH_050120

COMNT : 3-Br_4-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 16
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 14

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 21.1 c
CSPED : 13 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.24 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3052.00 Hz
XS : 331.40 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (E)-3-Bromo-4-hydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E5

Date : 18-Jan-105 13:57

Sample: 3-Br 4-OH

Note : probe40-400(128/min), chamber250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

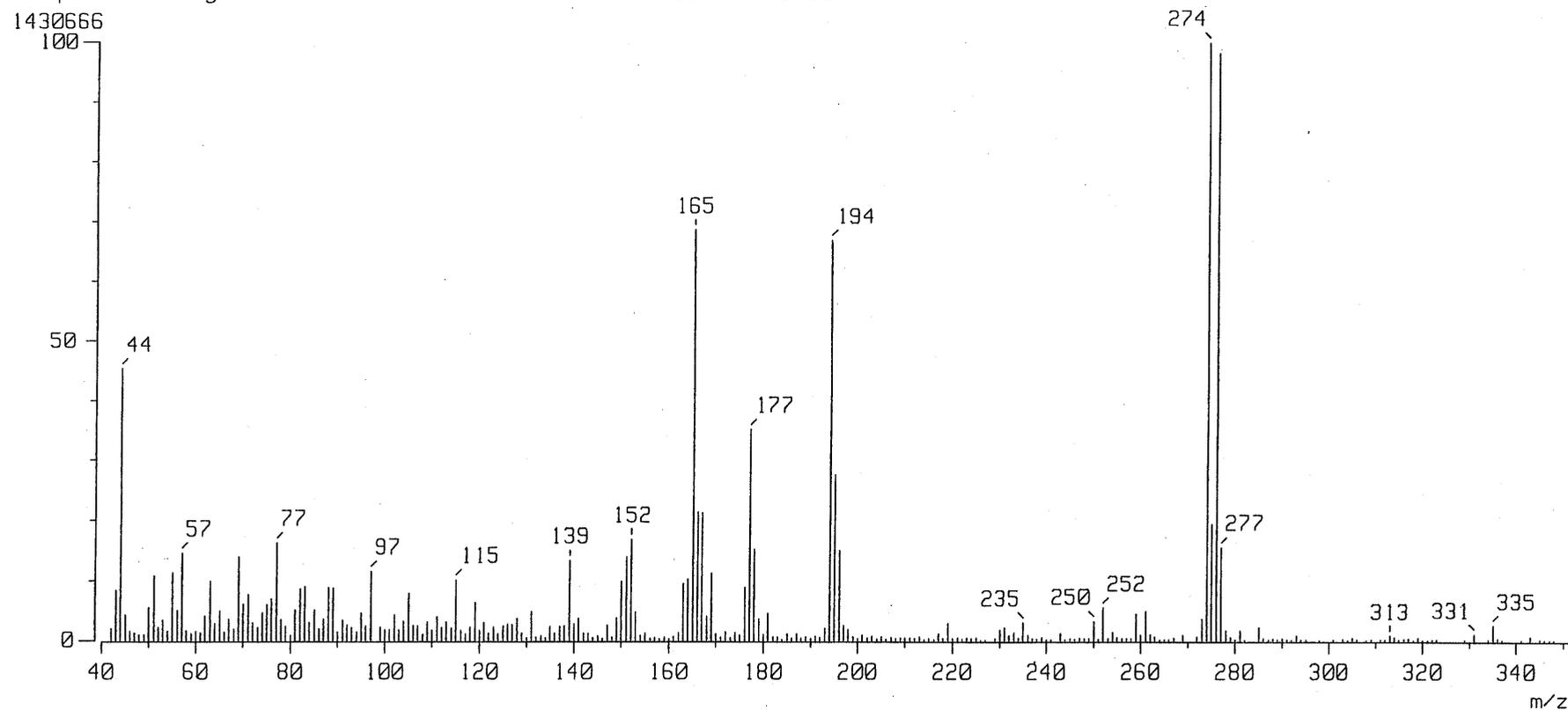
RT : 1.48 min Scan# : (11,16)

Temp : 154.5 deg.C

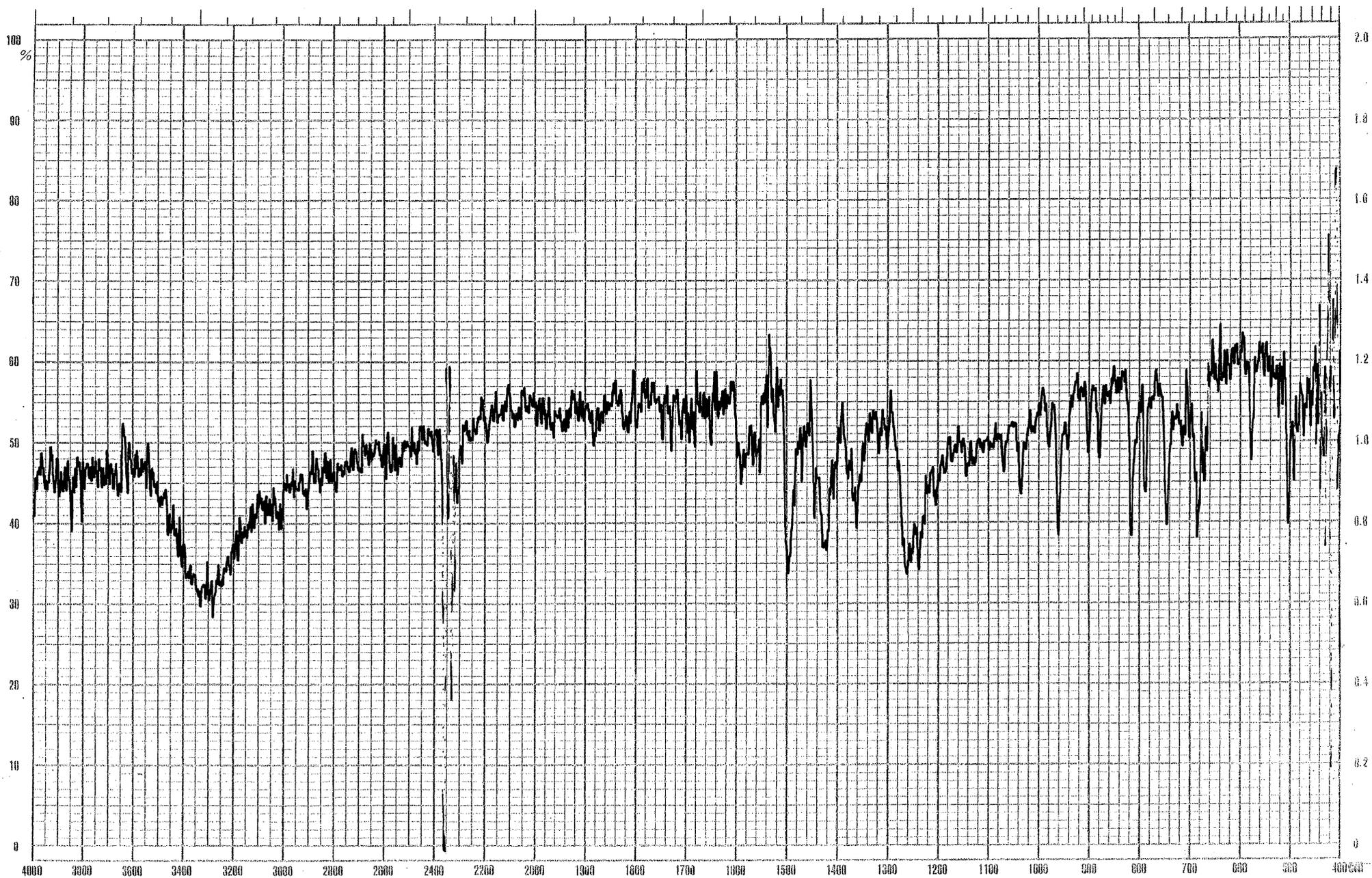
BP : m/z 274.0000 Int. : 136.44

Output m/z range : 40.0000 to 351.1220

Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-3-Bromo-4-hydroxystilbene



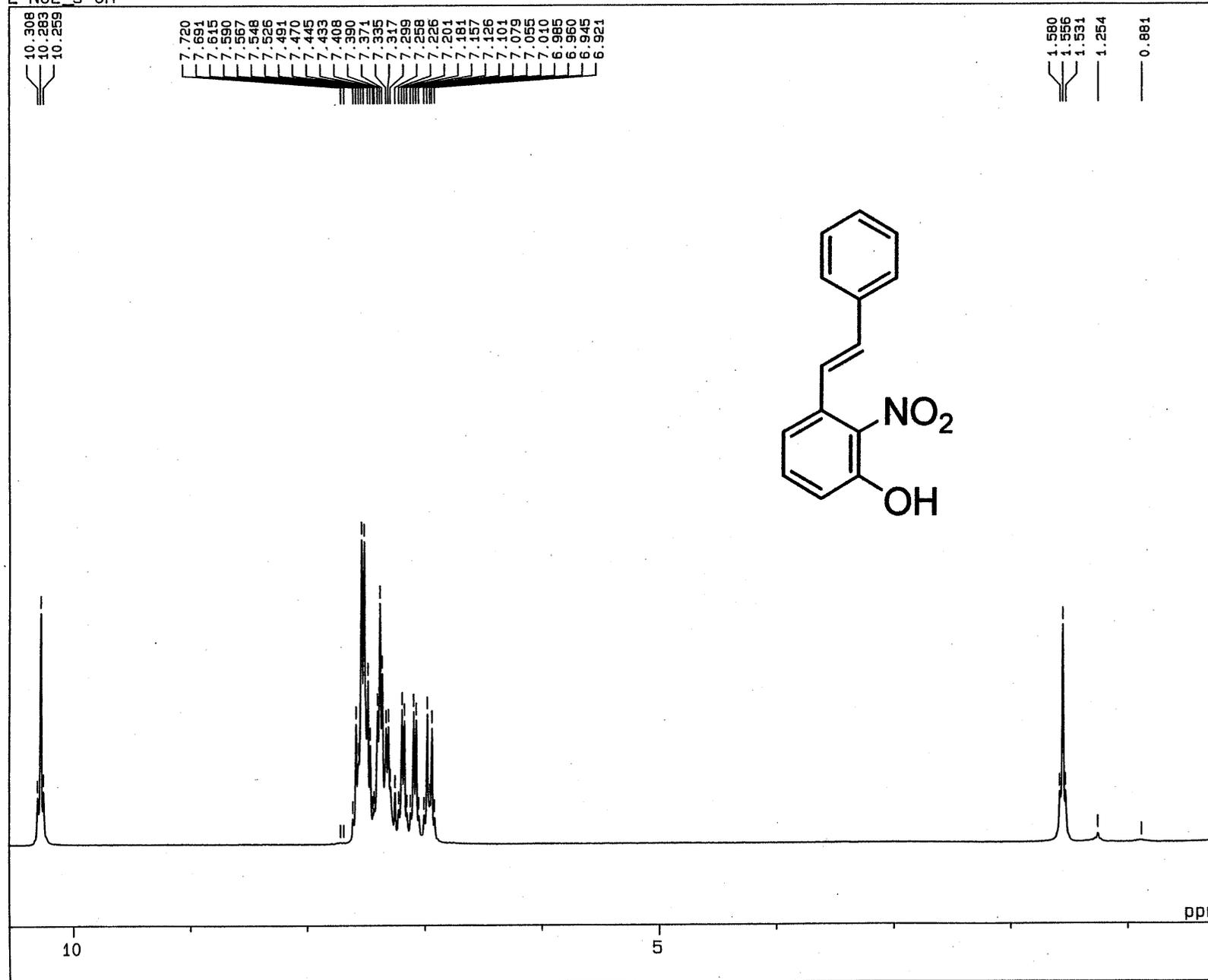
-81-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN		<chem>Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccccc2</chem>			
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	(E)-3-Bromo-4-hydroxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	

Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0081

2-N02_3-OH



22-JAN-2005 17:25:54.59

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_2-N02_3-OH_0501:

COMNT : 2-N02_3-OH
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 65536
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 19

PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 30
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 22.3 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : CDCL3

RESOL : 0.12 Hz
BF : 2.50 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 4138.17 Hz
XS : -157.41 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-3-Hydroxy-2-nitrostilbene

[Mass Spectrum]

Data : E10

Date : 19-Jan-105 11:43

Sample: 2-N02 3-OH

Note : probe temp. 40-400(128/min), chamber temp. 250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 0.74 min

Scan# : (7,8)

Temp : 105.4 deg.C

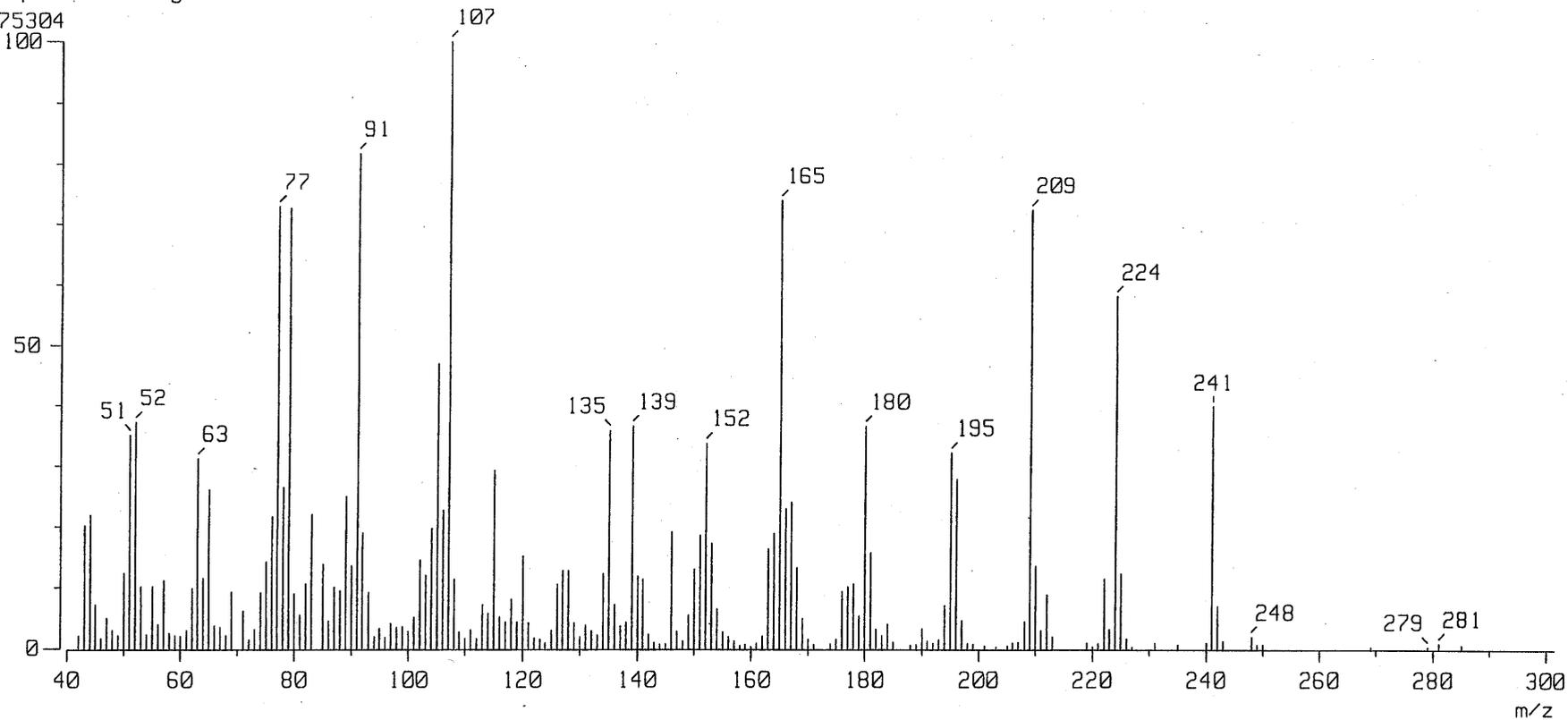
BP : m/z 107.0000

Int. : 83.48

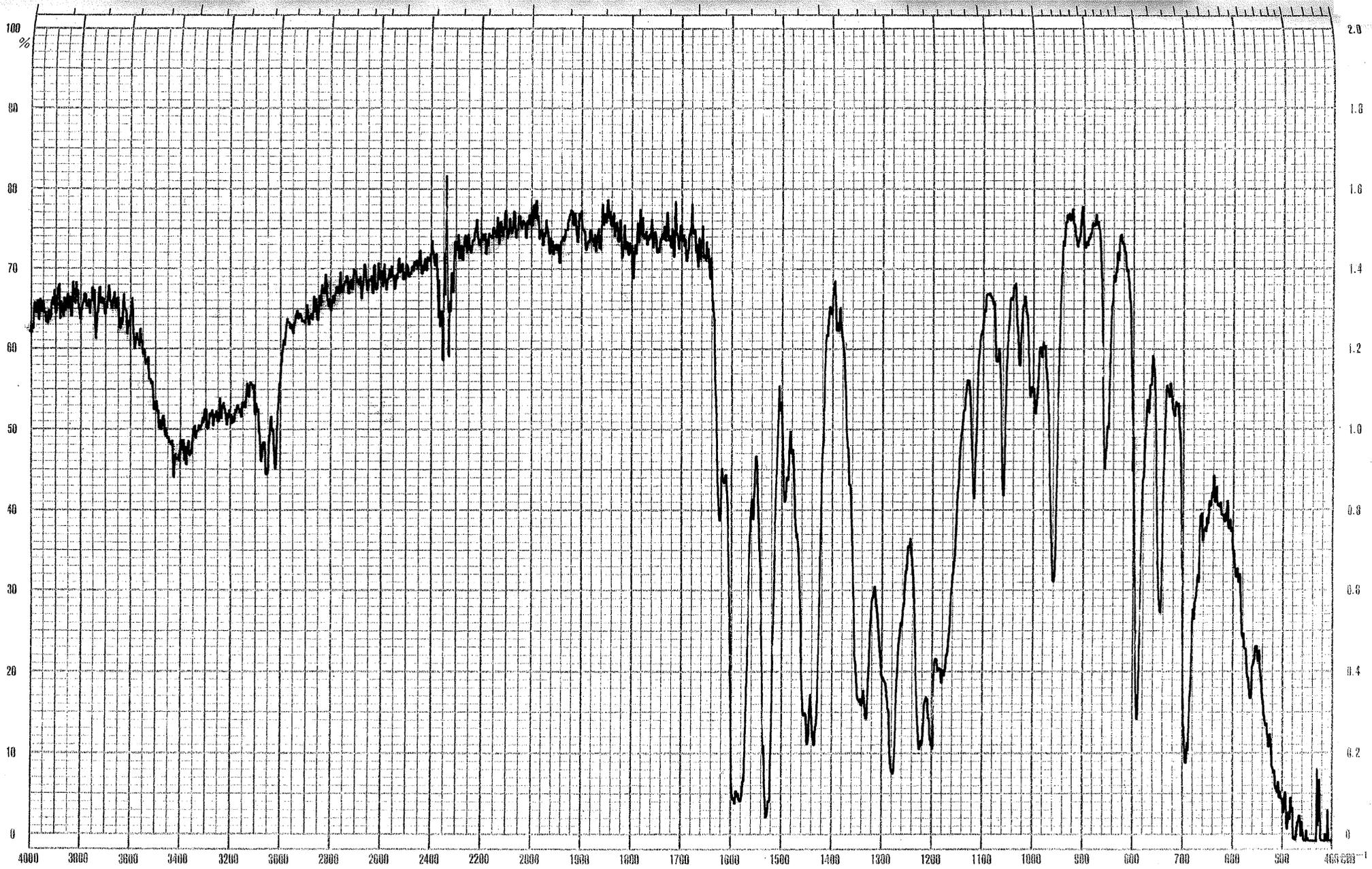
Output m/z range : 40.0000 to 301.4550

Cut Level : 0.00 %

875304



MS spectrum of (*E*)-3-Hydroxy-2-nitrostilbene

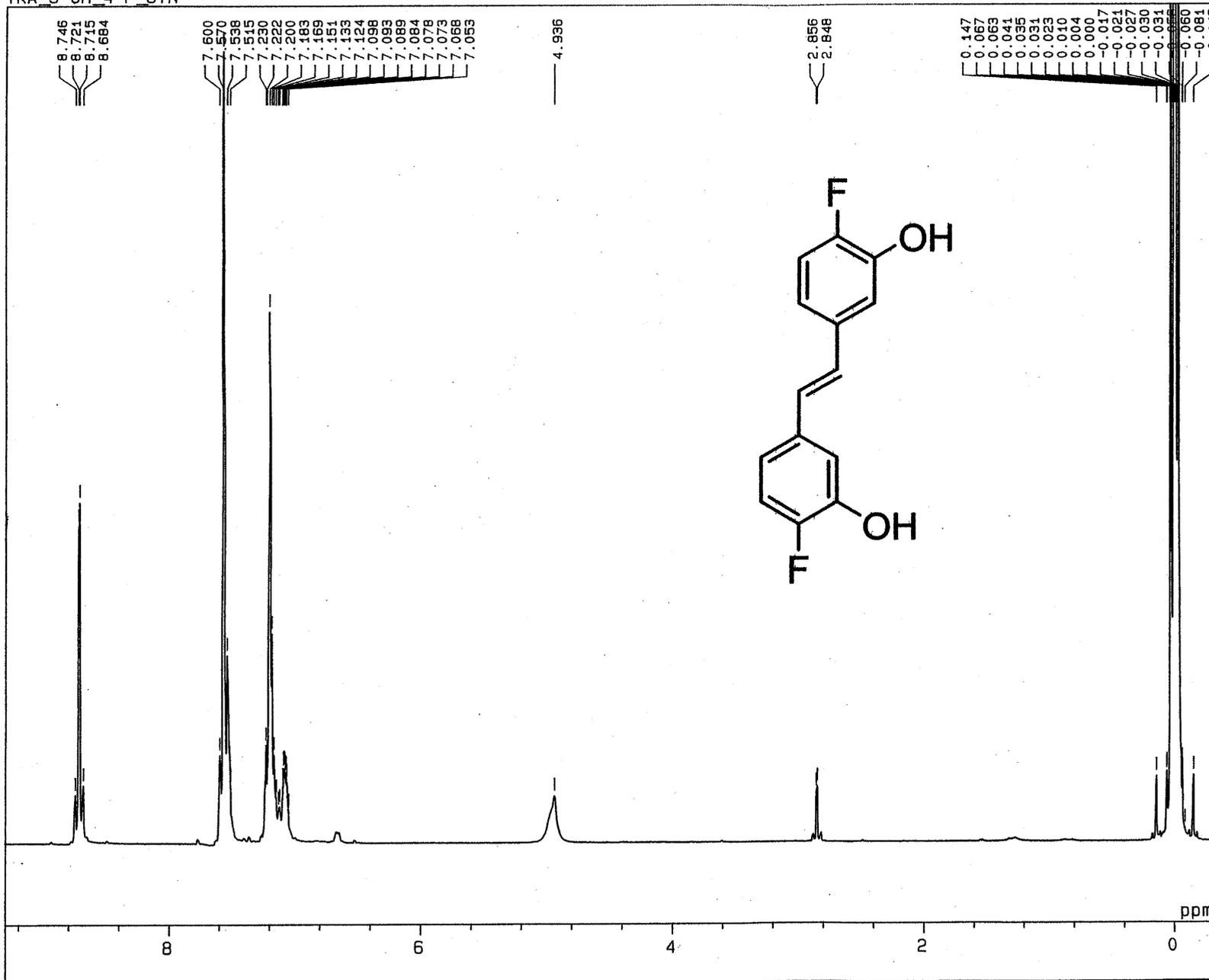


-84-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN					
OPERATOR	EXPANDER	SLIT	<chem>Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccccc2</chem> (E)-3-Hydroxy-2-nitro-stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	

Jasco
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD.
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN J-006E

TKA 3-OH 4-F SYN



11-JUN-2003 15:16:29.33

DFILE : ALPHA
SFILE : TKA_1HNON_C5D5N_3-OH_4-F_3

COMNT : TKA_3-OH_4-F_SYN
EXMOD : SINGL
IRMOD : NON
POINT : 32768
FREQU : 7993.61 Hz
SCANS : 32
DUMMY : 4
ACQTM : 4.0993 sec
PD : 3.0000 sec
RGAIN : 13
PW1 : 5.25 usec

OBNUC : 1H
OBFRQ : 399.65 MHz
OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
IRFRQ : 399.65 MHz
IRSET : 134500.00 Hz
IRATN : 511
IRRPW : 50.0 usec
IRBP1 : 25
IRBP2 : 6
IRRNS : 0

ADBIT : 16
CTEMP : 22.7 c
CSPED : 12 Hz
SLVNT : C5D5N

RESOL : 0.24 Hz
BF : 0.10 Hz
T1 : 0.00 %
T2 : 0.00 %
T3 : 90.00 %
T4 : 100.00 %
REFVL : 0.00 ppm
XE : 3855.80 Hz
XS : 222.72 Hz
operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E9

Date : 19-Jan-105 11:12

Sample: 3-OH 4-F syn

Note : probe temp. 40-400(128/min), chamber temp. 250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 1.11 min

Scan# : (9,11)

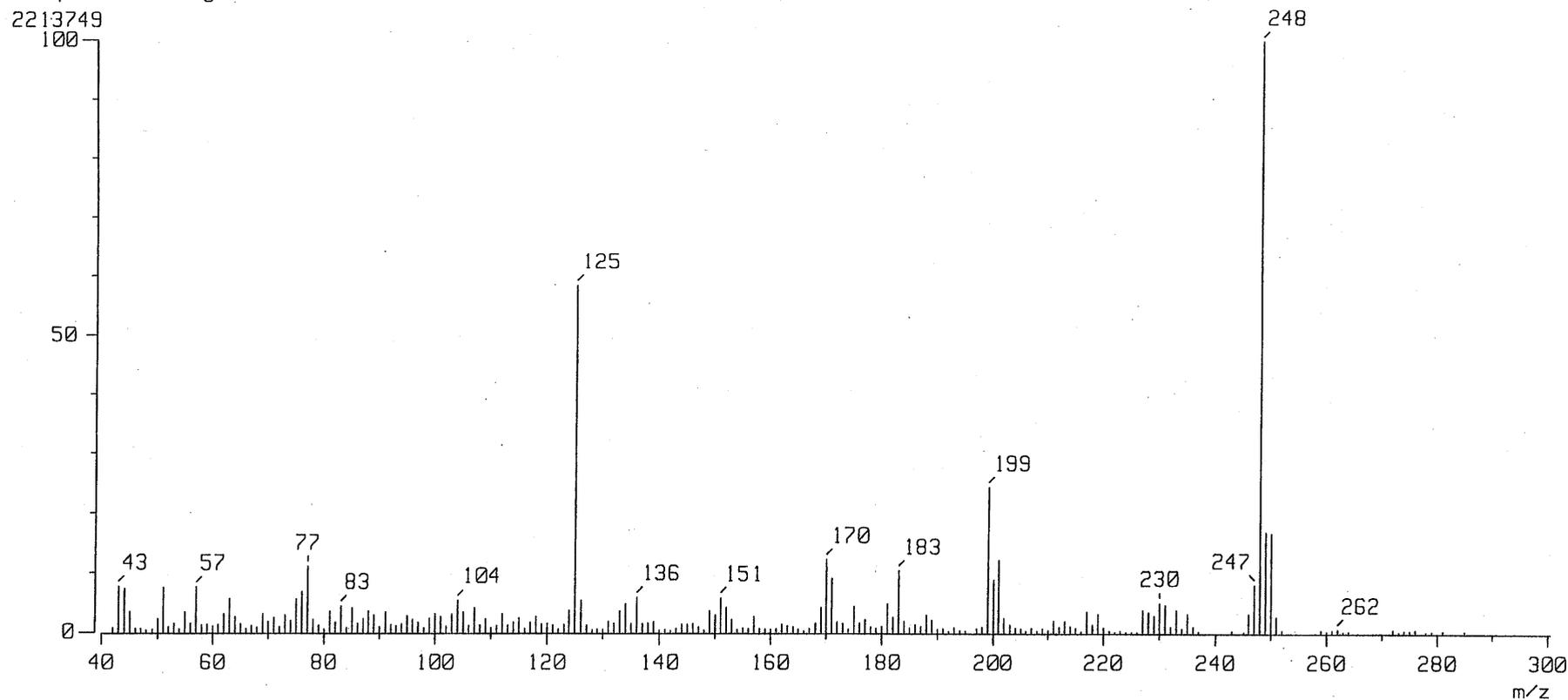
Temp : 129.8 deg.C

BP : m/z 248.0000

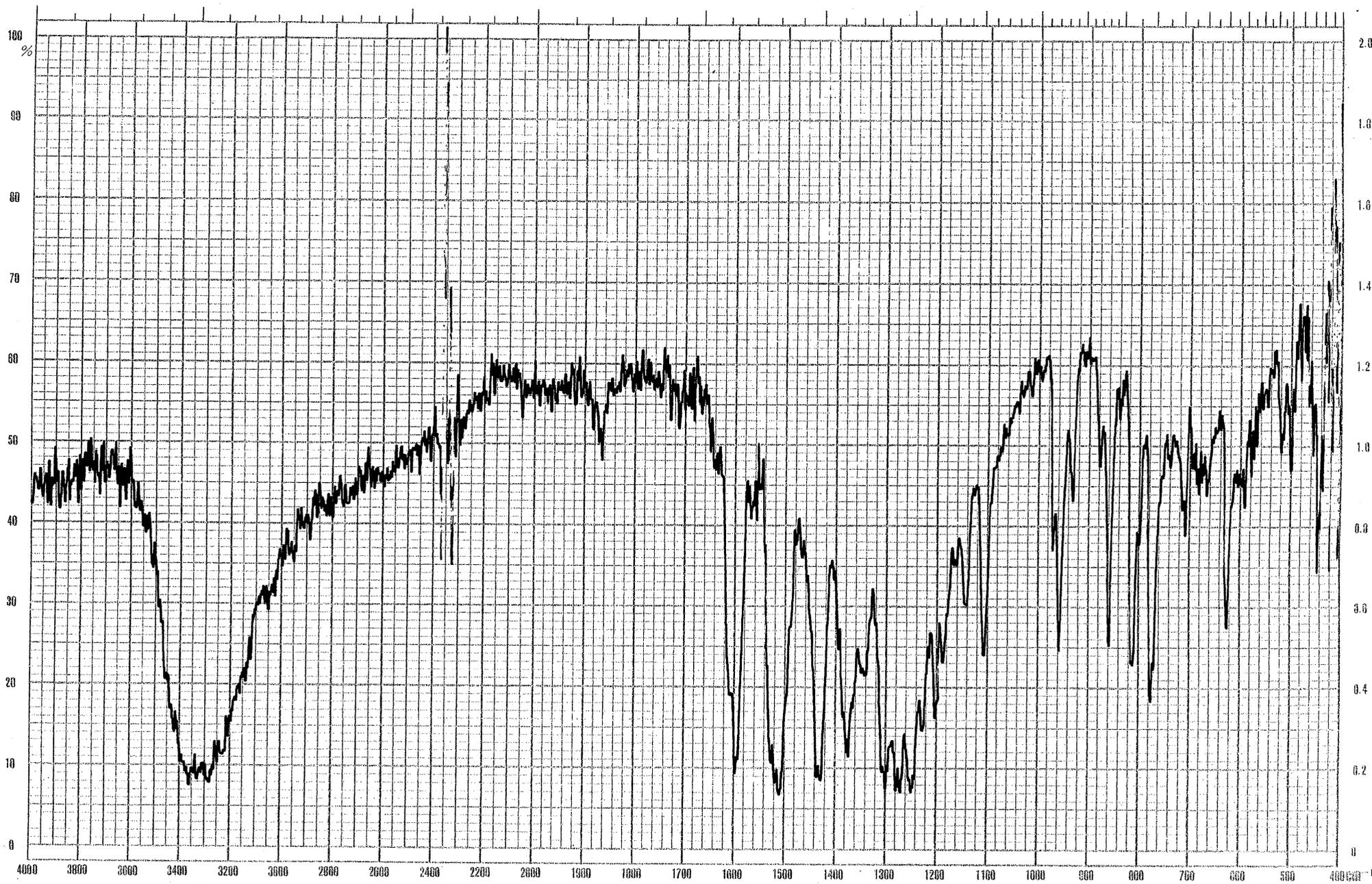
Int. : 211.12

Output m/z range : 40.0000 to 300.5180

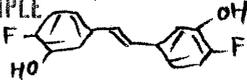
Cut Level : 0.00 %



MS spectrum of (*E*)-4,4'-Difluoro-3,3'-dihydroxystilbene



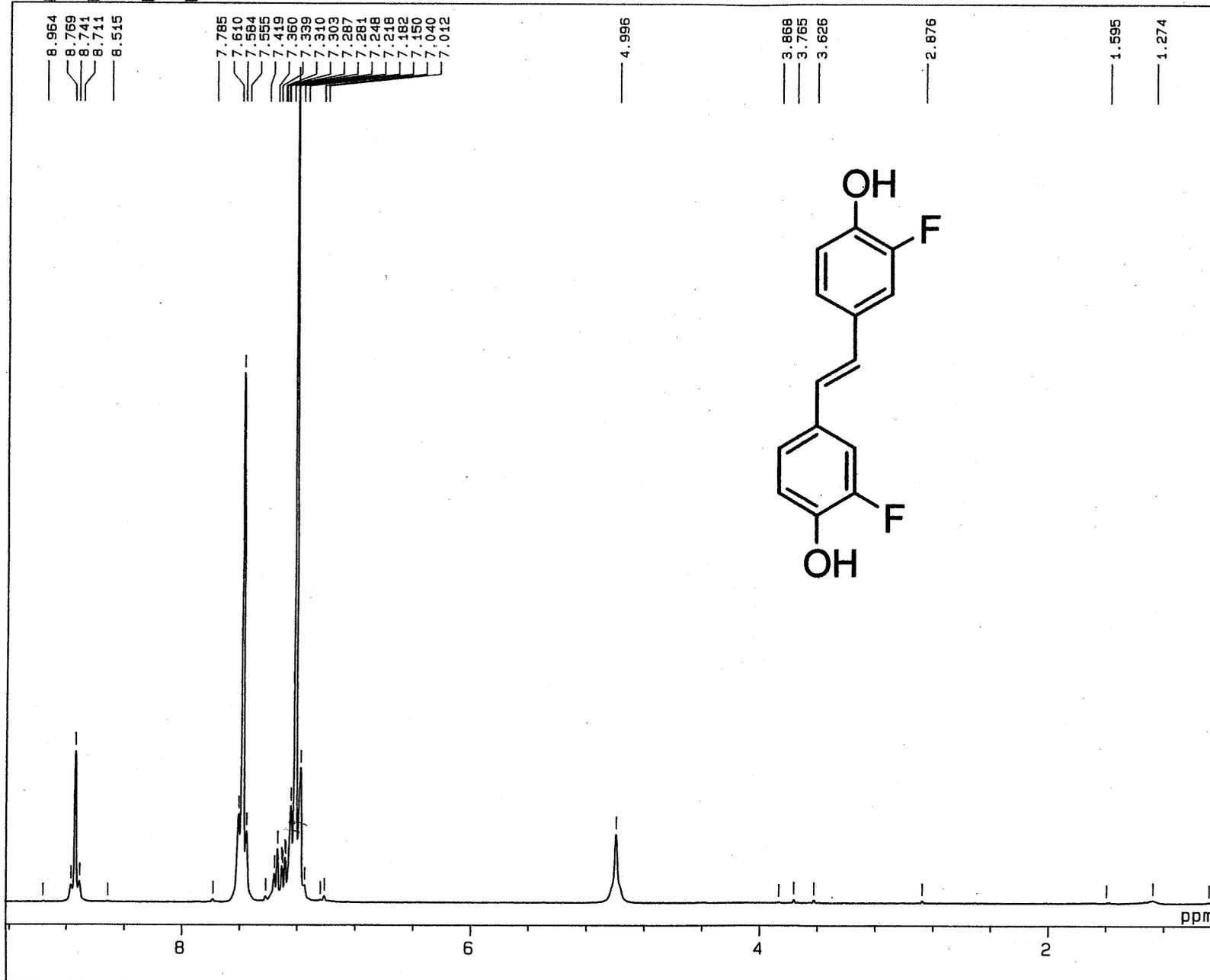
-87-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE  (E)-4,4'-difluoro- -2,3'-dihydroxy stilbene	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
OPERATOR	SPAN	SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	


 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0061

TKA_3-F_4-OH_SYN_C5D5N



11-JUN-2003 14:31:16.32

DFILE : ALPHA
 SFILE : TKA_3-F_4-OH_SYN_C5D5N

COMNT : TKA_3-F_4-OH_SYN_C5D5N
 EXMOD : SINGL
 IRMOD : NON
 POINT : 32768
 FREQU : 7993.61 Hz
 SCANS : 32
 DUMMY : 4
 ACQTM : 4.0993 sec
 PD : 3.0000 sec
 RGAIN : 17

PW1 : 5.10 usec

OBNUC : 1H
 OBFRQ : 399.65 MHz
 OBSET : 134500.00 Hz

IRNUC : 1H
 IRFRQ : 399.65 MHz
 IRSET : 134500.00 Hz
 IRATN : 511
 IRRPW : 50.0 usec
 IRBP1 : 25
 IRBP2 : 6
 IRRNS : 0

ADBIT : 16
 CTEMP : 22.7 c
 CSPED : 12 Hz
 SLVNT : C5D5N

RESOL : 0.24 Hz
 BF : 0.10 Hz
 T1 : 0.00 %
 T2 : 0.00 %
 T3 : 90.00 %
 T4 : 100.00 %
 REFVL : 0.00 ppm
 XE : 3358.40 Hz
 XS : 13.05 Hz

operator

¹H-NMR spectrum of (*E*)-3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxystilbene

[Mass Spectrum]

Data : E8

Date : 19-Jan-105 10:44

Sample: 3-F 4-OH syn

Note : probe temp. 40-400(128/min), chamber temp. 250

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular [MF-Linear]

RT : 1.36 min

Scan# : (11,13)

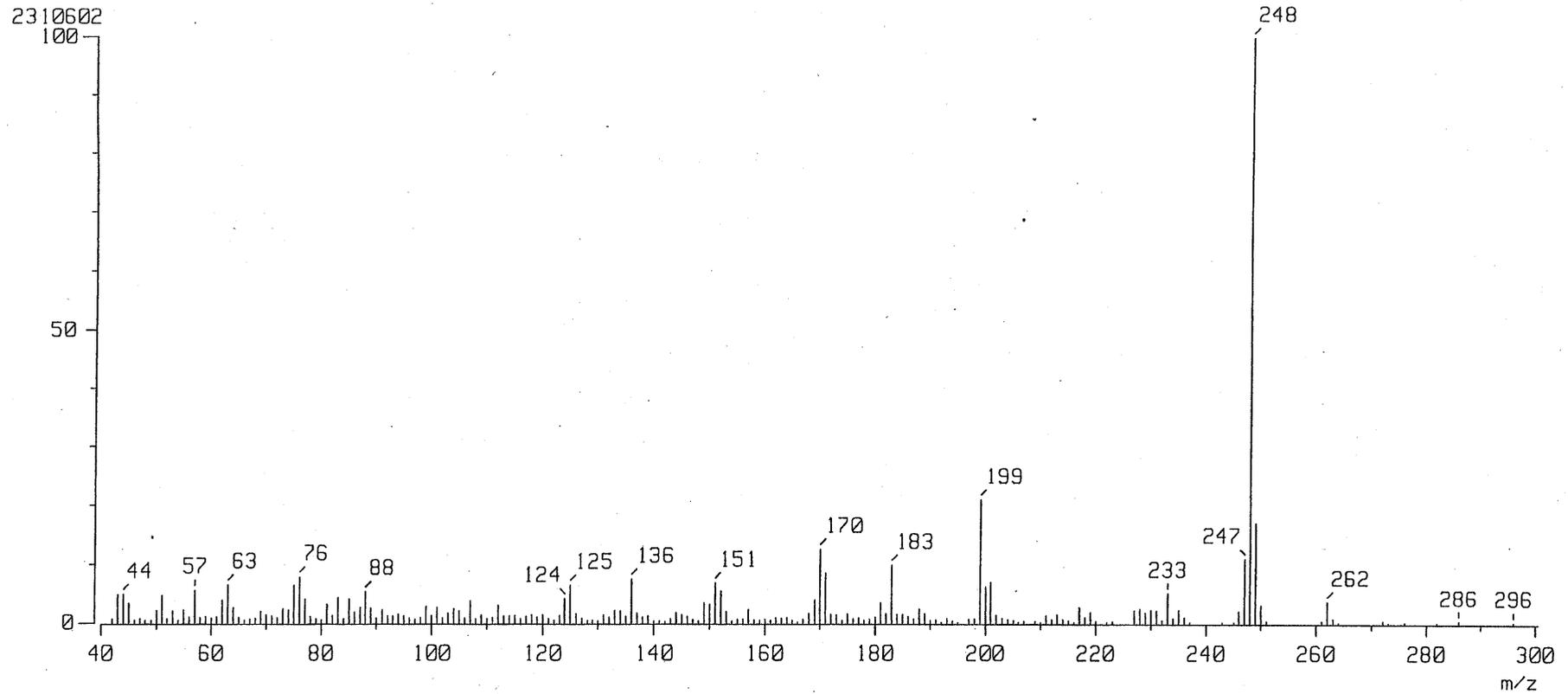
Temp : 154.6 deg.C

BP : m/z 248.0000

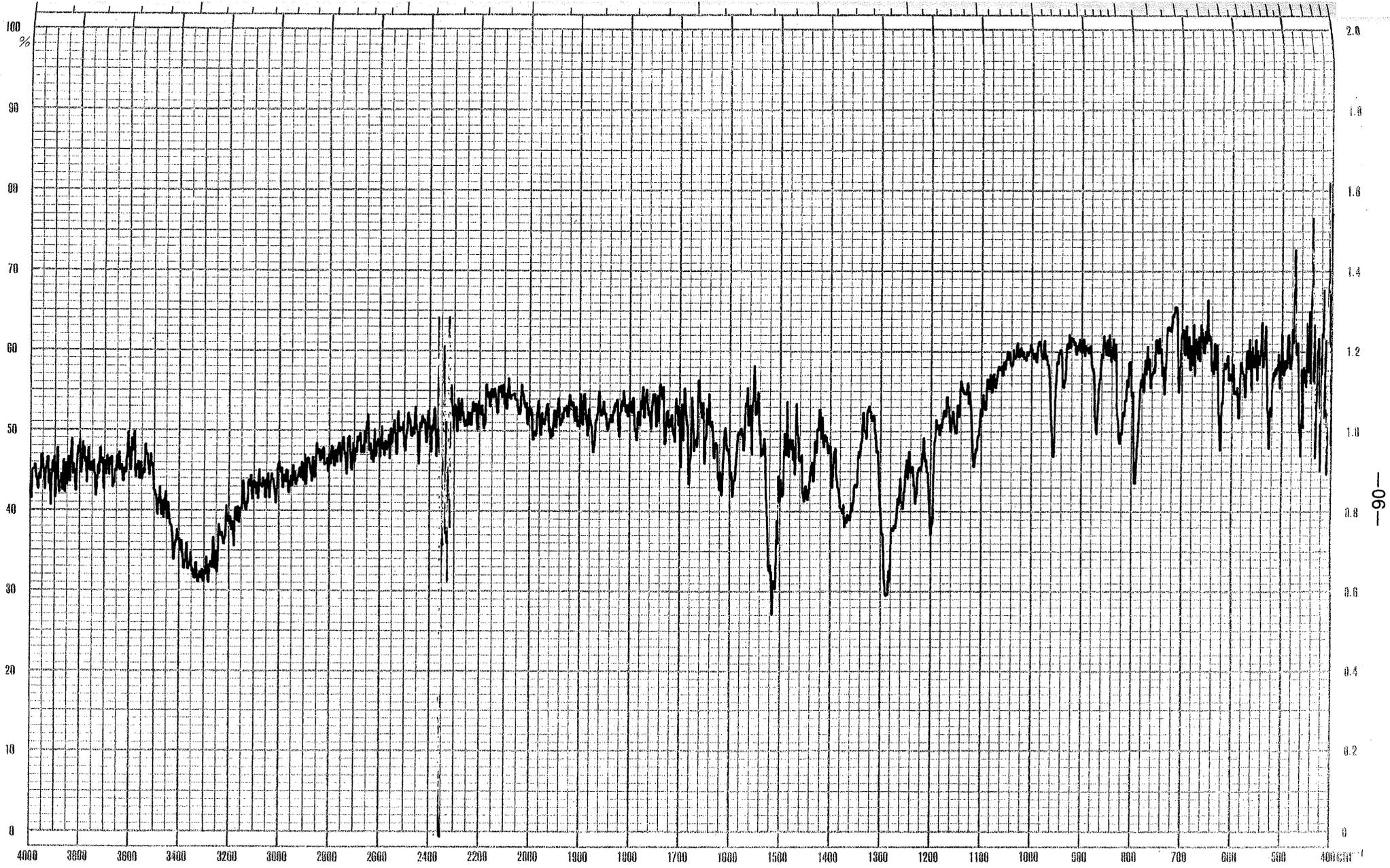
Int. : 220.36

Output m/z range : 40.0000 to 300.5180

Cut Level : 0.00 %

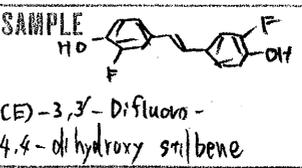


MS spectrum of (*E*)-3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxystilbene



-96-

DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN					
OPERATOR	✓ EXPANDER	SLIT	(E)-3,3'-Difluoro-4,4'-dihydroxy stilbene	CELL-LENGTH	SOLVENT	



JASCO
 JAPAN SPECTROSCOPIC CO., LTD
 日本分光工業株式会社
 MADE IN JAPAN

J-0001