

# 博士論文

沖縄県産モクビャッコウ *Crossostephium chinense*、  
ビシンジュズネノキ *Damnacanthus indicus* var. *intermedius*  
および中国産フサスギナ *Equisetum sylvaticum*  
を中心とした新規機能性化合物探索

2024

広島大学大学院

医系科学研究科 総合健康科学専攻

生薬学教室

令和4年度入学

王 志超

主指導教員

松浪 勝義

序論	2
第1部 モクビャッコウ ( <i>Crossostephium chinense</i> ) の成分研究と活性探索	
第1章 モクビャッコウについて	4
第2章 抽出分離	6
第3章 EtOAc 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定	8
第一節 単離精製	8
第二節 新規化合物について	8
第一項 新規化合物 <b>1</b> の化学構造	10
第二項 新規化合物 <b>2</b> の化学構造	14
第三項 新規化合物 <b>3</b> の化学構造	17
第3節 既知化合物について	20
第一項 既知クマリン誘導体の化学構造	21
第二項 既知フラボノイド誘導体の化学構造	23
第三項 既知カフェー酸誘導体の化学構造	29
第四項 既知芳香環誘導体の化学構造	35
第五項 既知リグナン誘導体の化学構造	39
第六項 既知脂肪酸誘導体の化学構造	40
第4章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定	42
第一節 単離精製	42
第二節 新規化合物について	42
第一項 新規化合物 <b>22</b> の化学構造	45
第二項 新規化合物 <b>23</b> の化学構造	48
第三項 新規化合物 <b>24</b> の化学構造	51
第四項 新規化合物 <b>25</b> の化学構造	54
第五項 新規化合物 <b>26</b> の化学構造	57
第六項 新規化合物 <b>27</b> の化学構造	60
第七項 新規化合物 <b>28, 29</b> の化学構造	63
第三節 既知化合物について	67
第一項 既知メガスティグマン誘導体の化学構造	68
第二項 既知芳香環誘導体の化学構造	70
第三項 既知フラボノイド誘導体の化学構造	73
第5章 抗 <i>Leishmania major</i> 活性試験	76
第6章 A549 細胞増殖抑制実験	78
第7章 Vero 細胞に対する毒性評価	79
第8章 小括	81

第9章 考察	82
第10章 実験の部	84
第2部 ビシンジュズネノキ ( <i>Damnacanthus indicus</i> var. <i>intermedius</i> ) の成分探索	
第1章 ビシンジュズネノキについて	91
第2章 抽出分離	92
第3章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定	93
第一節 単離精製	93
第二節 新規化合物について	93
第一項 新規化合物 <b>38-41</b> の化学構造	95
第二項 新規化合物 <b>42-44</b> の化学構造	101
第三項 新規化合物 <b>45</b> の化学構造	106
第三節 既知化合物について	108
第一項 既知イリドイドグルコシド誘導体の化学構造	109
第二項 既知リグナン誘導体の化学構造	114
第三項 既知キノングルコシド誘導体の化学構造	116
第四項 その他既知化合物の化学構造	117
第4章 小括	119
第5章 考察	120
第6章 実験の部	121
第3部 フサスギナ ( <i>Equisetum sylvaticum</i> ) の成分探索	
第1章 フサスギナについて	125
第2章 抽出分離	126
第3章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定	127
第一節 単離精製	127
第二節 新規化合物について	127
第一項 新規化合物 <b>56-57</b> の化学構造	129
第二項 新規化合物 <b>58</b> の化学構造	133
第三項 新規化合物 <b>59</b> の化学構造	135
第三節 既知化合物について	138
第一項 既知メガスティグマン誘導体の化学構造	139
第二項 既知フラボノイド誘導体の化学構造	148
第三項 既知ステロイド誘導体の化学構造	166
第四項 既知リグナン誘導体の化学構造	169
第五項 その他既知化合物の化学構造	172

第4章 小括	175
第5章 考察	176
第6章 実験の部	178
参考文献	183
謝辞	188

本文中で使用した主な略号

$^1\text{H}$ NMR:	Proton Nuclear Magnetic Resonance
$^{13}\text{C}$ NMR:	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
HR-ESI-MS:	High Resolution Electro Spray Ionization Mass Spectroscopy
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY:	HH Correlation Spectroscopy
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IR:	Infrared Spectroscopy
UV:	UV-visible Spectroscopy
CD:	Circular Dichroism
HPLC:	High-Performance Liquid Chromatography
CC:	Column Chromatography
TLC:	Thin Layer Chromatography
ODS:	Octadecylsilanized Silica gel
Cpd:	Compound
fr.:	Fraction
s :	Singlet
d:	Doublet
t:	Triplet
q:	Quartet
quint:	Quintet
sext:	Sextet
sept:	Septet
m:	Multiplet or overlapped
br:	Broad
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinm bromide

沖縄県産モクビャッコウ *Crossostephium chinense*、  
ビシンジュズネノキ *Damnacanthus indicus* var. *intermedius*  
および中国産フサスギナ *Equisetum sylvaticum*  
を中心とした新規機能性化合物探索

---

---

## 序論

---

---

天然物化学は自然界から医薬品の種を探す専門領域であり、漢方薬や民間療法に対する科学的なメカニズム解明につながる研究領域でもある。人類は遥か昔から多種多様な天然物由来の物質を利用してきた。現在も、生薬や漢方のみならず、医薬品、健康食品や化粧品など様々な形として人類社会に貢献している。よって、天然資源から有用成分を探索し、その化学構造を明らかにすることは、医薬品リード化合物の発見という実用的な面はもちろんのこと、植物や微生物などの2次代謝系を理解する基礎科学的な観点からも重要である。

本研究では、沖縄県産の植物モクビャッコウ (*Crossostephium chinense*) とビシンジュズネノキ (*Damnacanthus indicus* var. *intermedius*) および中国産植物フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) を対象に新規低分子化合物の単離を目指した成分研究を行った。希少かつ未開拓な植物資源から有用な機能性分子を探索し、その有用性を検討する事が薬学の発展に寄与できると考えている。

## 第一部

# モクビャッコウ (*Crossostephium chinense*) の 成分研究と活性探索



---

## 第1章 モクビャッコウについて

---

モクビャッコウは、キク科 (Asteraceae)、モクビャッコウ属 (*Crossostephium*) の植物で、学名を *Crossostephium chinense* という。中国、フィリピン、日本などアジア圏に分布している常緑性低木であり、日本では鹿児島県のトカラ列島以南から琉球列島にかけて分布しており、海岸沿いの岩場、隆起したサンゴ礁の上などに自生している。葉はへら状、先端が深く2~4裂することもあり、枝の上部に集まって互生している。また、細かい毛が密生しているため、葉色は美しい灰白色となり、独特な香りがあるという。枝はよく分枝し、樹高30~50cmまで成長出来る。

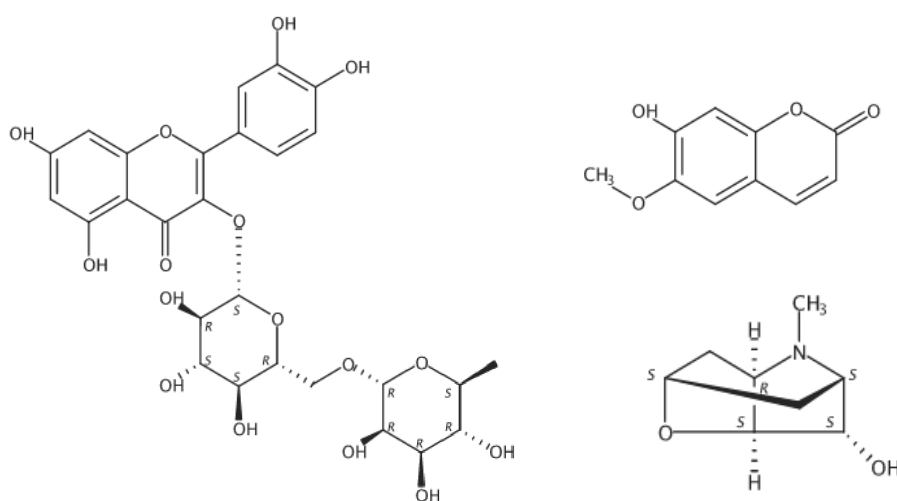
キク科は双子葉植物の中で最も進化し、最も分化した植物であり、地球上のあらゆる場所に生育し、世界では約950属2万種、日本国内でも約70属360種存在するといわれている。キク科の植物は古くから人々に栽培され、様々な分野で利用されてきた。例えば、キク科の植物ヨモギ (*Artemisia maritima*) から日本産として初の回虫薬 *santonin* が単離され、クソニンジン (*Artemisia annua*) から強い抗マラリア化合物 *artemisinin* が発見され、多くの命が助けられ、ノーベル医学賞の受賞につながった。その他、殺虫成分 *pyrethrin* はキク科の植物シロバナムシヨケギク (*Tanacetum cinerariifolium*) から単離されたものであり、現在はその類縁体が殺虫スプレーなどの日用品に多用されている。



モクビャッコウ

<https://shiny-garden.com/post-26646/>より引用

モクビャッコウ(木白虹)は、中国、日本など熱帯・亜熱帯地域を中心に、幅広く分布している低木で、また現地では、殺虫剤、痛風および風邪治療の民間薬として広く用いられている植物である。これまでの研究報告によると、モクビャッコウは rutin などのフラボノイドおよびフラボノイドの配糖体成分を含有しており、抗酸化、がん細胞増殖抑制効果を有していることが明らかになっている [1]。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼを指標とした成分研究では、フラボノイドだけでなく、クマリン、アルカロイドなど多種の化合物を含有していることが報告されている [2]。その一方で、モクビャッコウは駆虫剤として利用されているが [3]、その中の活性成分はまだ明らかになっていない。このことから、本研究では熱帯、亜熱帯地域で問題視されているリーシュマニア症を疾患ターゲットとし、モクビャッコウから新規の機能性分子を単離することを目標とした。



Reported compounds from *C. chinense*

---

---

## 第 2 章 抽出分離

---

---

乾燥したモクビャッコウ(地上部) 3.50 kg のメタノール抽出物を、常法に従い *n*-Hexane、EtOAc、1-BuOH、H<sub>2</sub>O で順次分配し、*n*-Hexane 層 27.7 g、EtOAc 層 67.3 g、1-BuOH 層 30.5 g、H<sub>2</sub>O 層 171.2 g を得た (Fig. 1)。

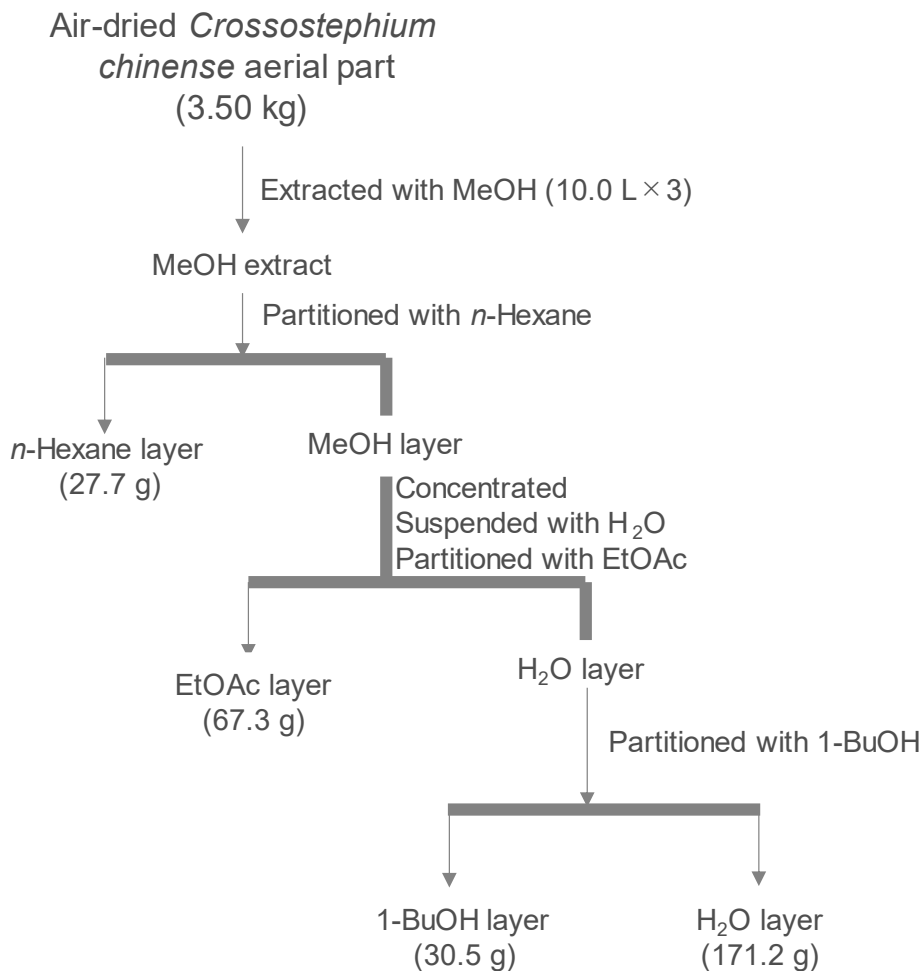


Fig. 1 Extraction and fractionation of *Crossostephium chinense*

より効率的に活性化合物を探索するため、抽出・分液して得られた *n*-Hexane 層, EtOAc 層, 1-BuOH 層および H<sub>2</sub>O 層を用いて、皮膚型リーシュマニア症の病原体の 1 種である *Leishmania major* 原虫に対する増殖抑制活性スクリーニングを行った (Fig. 2)。

### *L. major* inhibition assay

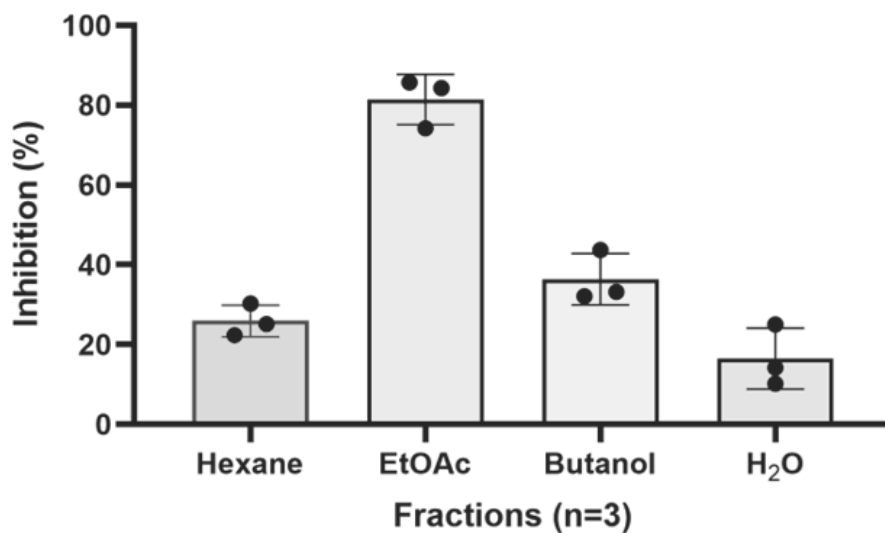


Fig. 2 Screening results of fractions from *C. chinense* against *L. major*

その結果、EtOAc 層において最も強い抗 *L. major* 活性が見られたことから、EtOAc 層に含まれる活性成分の探索を行った。

## 第3章 EtOAc 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定

### 第一節 単離精製

乾燥した EtOAc 可溶画分 67.3 g を Diaion HP-20、Silica gel、ODS の各種クロマトグラフィー、HPLC を用いて単離、精製を行い、21 種の化合物 (1-21) を単離した。(Chart 1)

### 第二節 新規化合物について

沖縄県産植物モクビヤッコウ (*Crossostephium chinense*) 地上部の EtOAc 可溶画分より、3 種の新規化合物 (1-3) (Fig. 3) を単離し、その化学構造を NMR、MS、ECD など様々な分析手法を駆使して明らかにした。

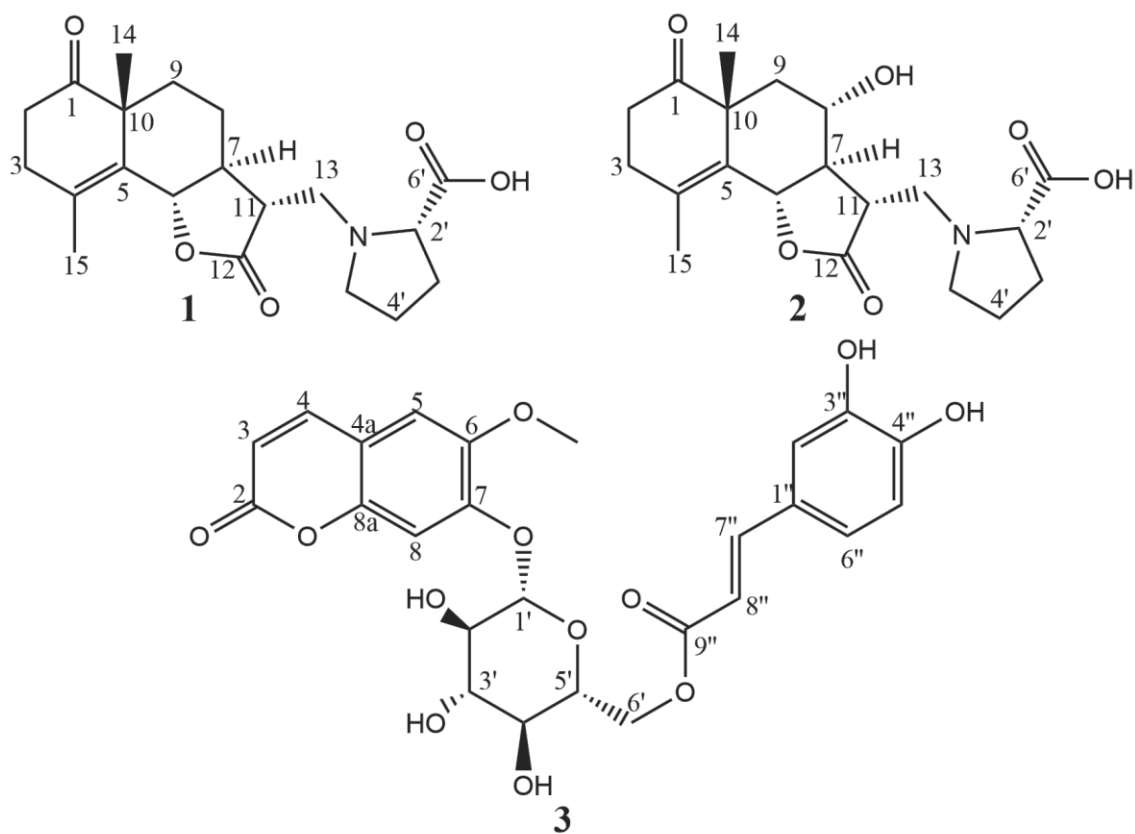


Fig. 3 New compounds 1-3 from EtOAc fraction of *C. chinense*

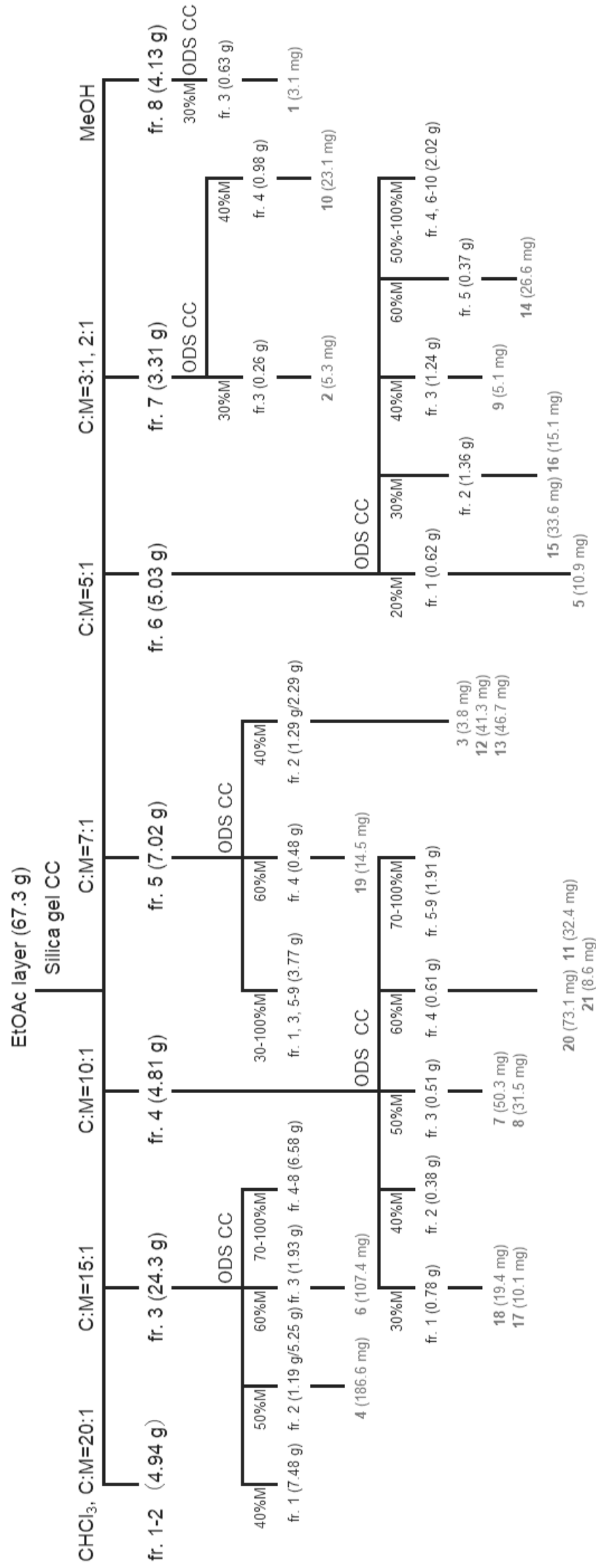


Chart 1 Isolation of Compounds 1-21 from EtOAc layer

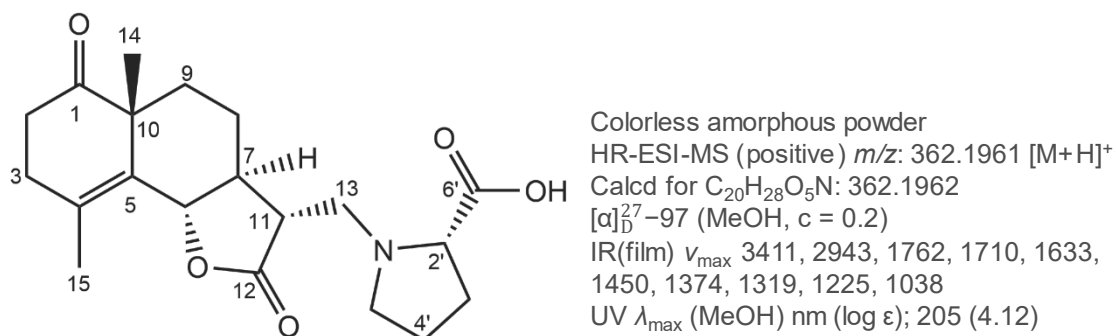


Fig. 4 Structure and Physical data of Compound 1

Table 1  $^{13}C$  and  $^1H$  NMR (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$	$^1H$
1	212.9	
2	35.5	2.43, <i>ddd</i> , (14.2, 7.8, 6.6), $\alpha$ 2.55, <i>ddd</i> , (13.6, 7.0, 6.2), $\beta$
3	32.3	2.27, <i>br dt</i> , (17.0, 6.2), $\alpha$ 2.35, <i>br dt</i> , (17.0, 6.9), $\beta$
4	125.2	
5	130.0	
6	80.8	4.80, <i>d-quint</i> , (11.2, 1.3)
7	48.5	2.02, <i>m</i>
8	23.1	1.95, <i>m</i> , $\alpha$ 1.67, <i>m</i> , $\beta$
9	34.6	1.44, <i>dt</i> , (14.0, 5.1), $\alpha$ 1.63, <i>m</i> , $\beta$
10	48.4	
11	44.4	2.73, <i>dt-like</i> , (12.1, 5.4)
12	177.0	
13	51.2	2.86, <i>dd</i> , (13.2, 5.1) 3.08, <i>dd</i> , (13.2, 5.7)
14	23.0	1.25, <i>s</i>
15	19.4	1.86, <i>br s</i>
2'	66.6	3.31, <i>dd</i> , (8.7, 4.6)
3'	28.6	1.81, <i>m</i> 2.03, <i>m</i>
4'	23.4	1.68-1.79, <i>m</i>
5'	53.2	2.58, <i>dd-like</i> , (9.0, 7.8) 2.99, <i>ddd</i> , (9.0, 7.5, 3.9)
6'	173.4	

化合物 1 の分子式は HR-ESI-MS より、 $C_{20}H_{27}O_5N$  に決定され、8 つの不飽和度が示唆された。ドラーゲンドルフ試薬 (Dragendorff's reagent) による呈色反応を行い、陽性であることから、第三級の窒素を有する事を推測した。

$^{13}C$  NMR (Table 1) において、212.9, 177.0 と 173.4 ppm にカルボニル基に由来するシグナル 3 本と 125.2, 130.0 ppm に二重結合に由来する四級炭素のピークが 2 本観測された。この事から、残りの 4 つの不飽和度は環状構造に由来するものと推測した。さらに、173.4, 66.6, 53.2, 28.6 と 23.4 ppm に特徴的な化学シフトを持つシグナルが見られ、proline 部分 [4] の存在が容易に推測できた。以上に述べた  $^{13}C$  NMR ピークを除くシグナルは 11 本であり、そのうち 2 本はメチル炭素、5 本はメチレン炭素、3 本はメチン炭素、1 本は水素が結合していない四級炭素を示すシグナルであった。proline 部分の環に由来する不飽和度や残りの  $^{13}C$  NMR データを考慮した結果、化合物 1 は三つの環構造を持つセスキテルペン類化合物であると推測し、文献を検索したところ、 $\psi$ -santonin 系の化合物である gracilin (Fig. 5) と類似する骨格を有する事が示唆された。

より詳細な構造決定を行うために、2D-NMR (H-H COSY, HSQC と HMBC) (Fig. 6) と ESI-MS/MS (Fig. 7) を測定した。まず、COSY スペクトルにおいて、2'位、3'位、4'位、5'位の水素の相関が見られ、proline 部分の存在が確認できた。さらに、HMBC スペクトルにおいて、5'位の水素 ( $\delta_H$  2.58, dd-like,  $J = 9.0, 7.8$  Hz;  $\delta_C$  2,99, ddd,  $J = 9.0, 7.5, 3.9$  Hz) から 13 位の炭素 ( $\delta_C$  51.2 ppm)、2'位の水素 ( $\delta_H$  3.31, dd,  $J = 8.7, 4.6$  Hz) から 13 位の炭素、13 位水素 ( $\delta_H$  2.86, dd,  $J = 13.2, 5.1$  Hz;  $\delta_C$  3.08, dd,  $J = 13.2, 5.7$  Hz) から 11 位炭素 ( $\delta_C$  44.4 ppm) と 12 位炭素 ( $\delta_C$  177.0 ppm) の相関が観測され、proline 部分は 13 位に結合している事が明らかになった。一方、セスキテルペン部分については、6 位水素 ( $\delta_H$  4.80, d-quint,  $J = 11.2, 1.3$  Hz) から 9 位水素 ( $\delta_H$  1.44, dt,  $J = 14.0, 5.1$  Hz;  $\delta_C$  1.63, m) と 13 位水素に至る COSY スピンネットワークが見られ、gracilin と同様なセスキテルペン骨格を持つ事が示唆された。一方で、ESI-MS/MS において、proline 部分のフラグメント ( $m/z$  128,  $[M - C_{14}H_{17}O_3]^+$  (100))、proline 部分が離脱したフラグメント ( $m/z$  247,  $[M - C_5H_8O_2N]^+$  (15)) とカルボン酸が離脱したフラグメント ( $m/z$  316,  $[M - CHO_2]^+$  (12))が観測され、化合物 1 の骨格構造を裏付けた。以上の事から、化合物 1 は gracilin 骨格の 13 位に proline が結合しているものと決定した。

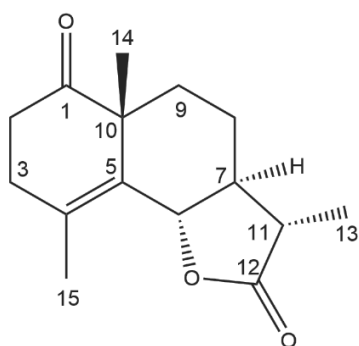


Fig. 5 Structure of gracilin

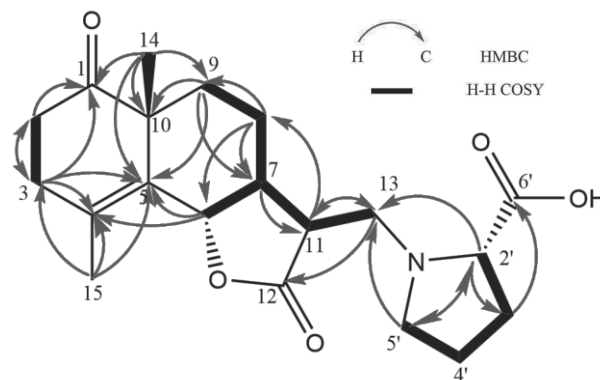


Fig. 6 COSY and HMBC correlations of 1



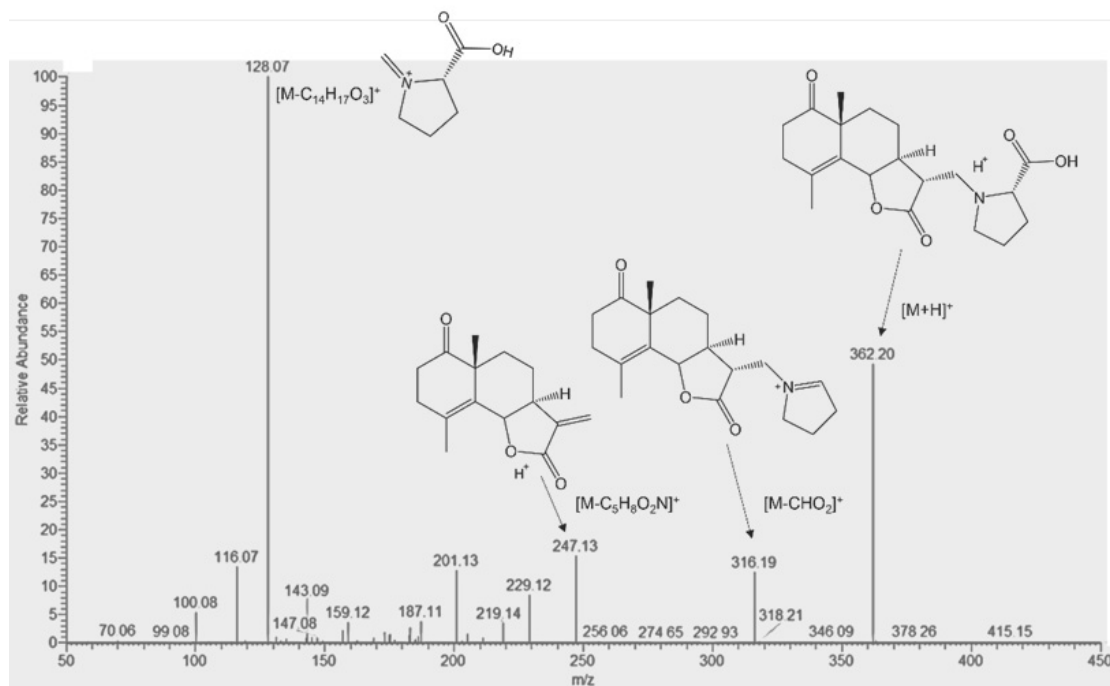


Fig. 7 ESI-MS/MS spectrum (in-source CID fragmentation) of Compound 1

化合物 1 の立体配置を検討するために、NOESY (Fig. 8) や ECD スペクトル (Fig. 9) 測定と加水分解反応による proline の立体化学の検討を行った。NOESY スペクトルにおいては、6 位水素、8 $\beta$  位水素 ( $\delta_{\text{H}}$  1.67, m)、11 位水素 ( $\delta_{\text{H}}$  2.73, dt-like,  $J = 12.1, 5.4$  Hz) と 14 位メチル基水素の相関がそれぞれ観測され、 $\beta$  配置であることが示唆された。一方で、反対側の 7 位水素 ( $\delta_{\text{H}}$  2.02, m) と 9 $\alpha$  位水素 ( $\delta_{\text{H}}$  1.44, dt,  $J = 14.0, 5.1$  Hz) の NOESY 相関も同時に観測され、 $\alpha$  配置であることが明らかになった。このことから、化合物 1 は gracilin と同様な相対立体配置を持つ事が判明した。さらに、化合物 1 の絶対立体配置を決定するために、ECD スペクトルの解析を行った。化合物 1 の ECD スペクトルでは、218 nm の positive のコットン効果と 295 nm の negative のコットン効果が観測され ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 218 (+4.62), 295 (-4.70), MeOH)、gracilin の ECD スペクトル ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 223 (+1.13), 294 (-1.70)) とよく一致した [5]。また、proline 部分の立体は 1% HCl を用いて、12 時間室温で加水分解後、旋光度検出器付きの HPLC を用いて分析を行った結果、L-proline であると決定した。以上のことから、化合物 1 の絶対立体配置を 6S、7S、10R、11R、2'S に決定した。

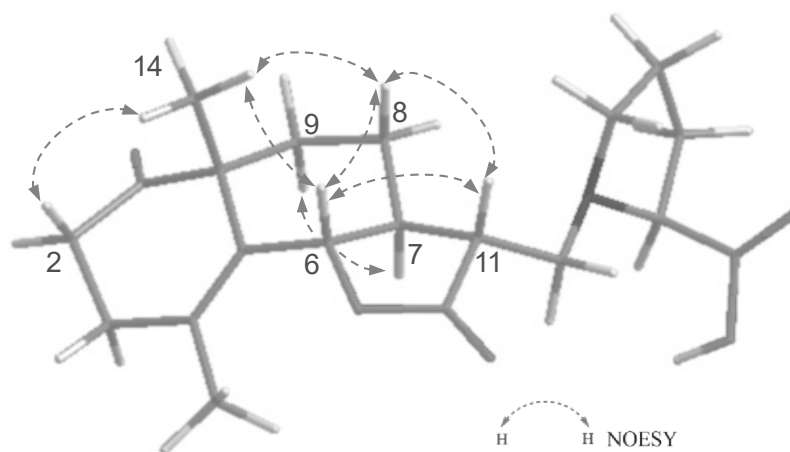


Fig. 8 Key PS-NOESY correlations of Compound 1

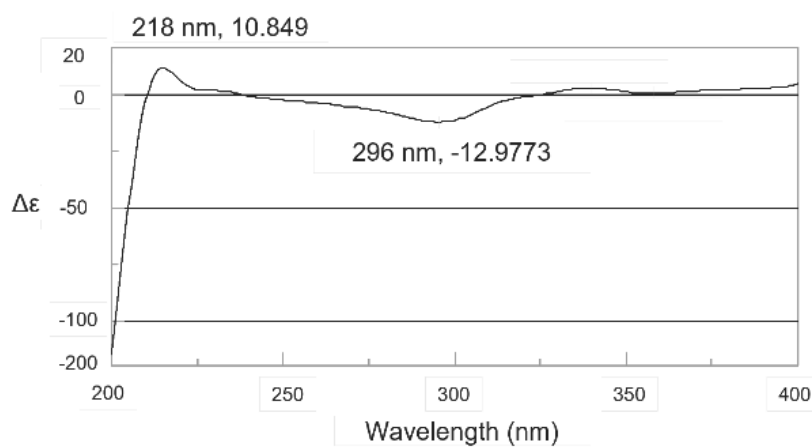
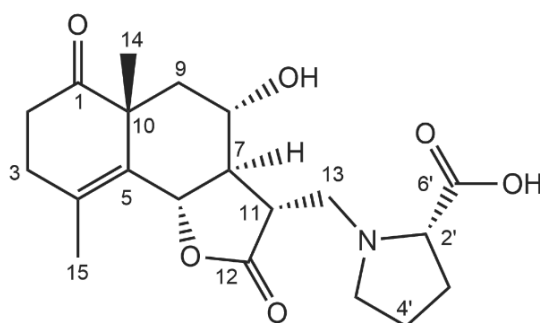


Fig. 9 Experimental ECD spectrum of Compound 1 in MeOH

第二項 新規化合物 2 の化学構造



Colorless needles  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 378.1912  $[M+H]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{28}O_6N$ : 378.1911  
 $[\alpha]_D^{27}$  -47 (MeOH,  $c = 0.46$ )  
 Mp: 210-214 °C  
 IR(film)  $\nu_{max}$  3248, 2980, 1758, 1711, 1625,  
 1450, 1379, 1310, 1033  
 UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ); 204 (4.13)

Fig. 10 Structure and Physical data of Compound 2

Table 2  $^{13}C$  and  $^1H$  NMR (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$	$^1H$
1	212.2	
2	35.2	2.40, <i>m</i> , $\alpha$ 2.58, <i>m</i> , $\beta$
3	32.4	2.37, <i>m</i> , $\alpha$ 2.27, <i>m</i> , $\beta$
4	126.1	
5	128.6	
6	77.9	4.87, <i>dquint</i> -like, (11.4, 1.1)
7	57.6	1.88, <i>m</i>
8	66.0	3.89, <i>td</i> , (10.8, 4.5)
9	43.1	1.25, <i>br t</i> , (11.8), $\alpha$ 1.87, <i>m</i> , $\beta$
10	47.4	
11	44.3	3.01, <i>m</i>
12	175.8	
13	52.8	2.92, <i>m</i> 3.15, <i>m</i>
14	24.1	1.24, <i>s</i>
15	19.3	1.87, <i>br s</i>
2'	66.3	3.45, <i>dd</i> , (9.0, 3.4) 1.90, <i>m</i>
3'	28.9	2.07, <i>dq</i> -like, (12.8, 8.8)
4'	23.1	1.74, <i>m</i> 1.80, <i>m</i>
5'	52.8	2.84, <i>dt</i> , (9.5, 7.5) 3.00, <i>m</i>
6'	173.6	

化合物 2 の分子式は HR-ESI-MS スペクトルにより、 $C_{20}H_{27}O_6N$  に決定され、8 つの不飽和度が示唆された。MS から窒素原子の存在が示唆されたこと、また、ドラージェンドルフ試薬による呈色反応で、化合物 1 と同様に陽性の結果が見られたため、三級窒素の存在が明らかとなった。

化合物 2 の ESI-MS/MS 分析 (Fig. 11) を行った結果、脱水したフラグメント ( $m/z$  360,  $[M + H - H_2O]^+$  (34))、カルボン酸が離脱したフラグメント ( $m/z$  332,  $[M - COOH]^+$  (19)) と proline 部分のフラグメント ( $m/z$  128,  $[M - C_{14}H_{17}O_4]^+$  (100)) が観測され、化合物 1 と類似する骨格を有する事が示唆された。化合物 2 と化合物 1 の  $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR スペクトル (Table 2) を比較し、メチレン炭素シグナルが一本少なくなり、一方で酸素結合しているメチン炭素のシグナル ( $\delta_C$  66.0 ppm) が一本多く観測された。この事から、化合物 2 は化合物 1 の骨格上に水酸基が付加したものであると推測した。

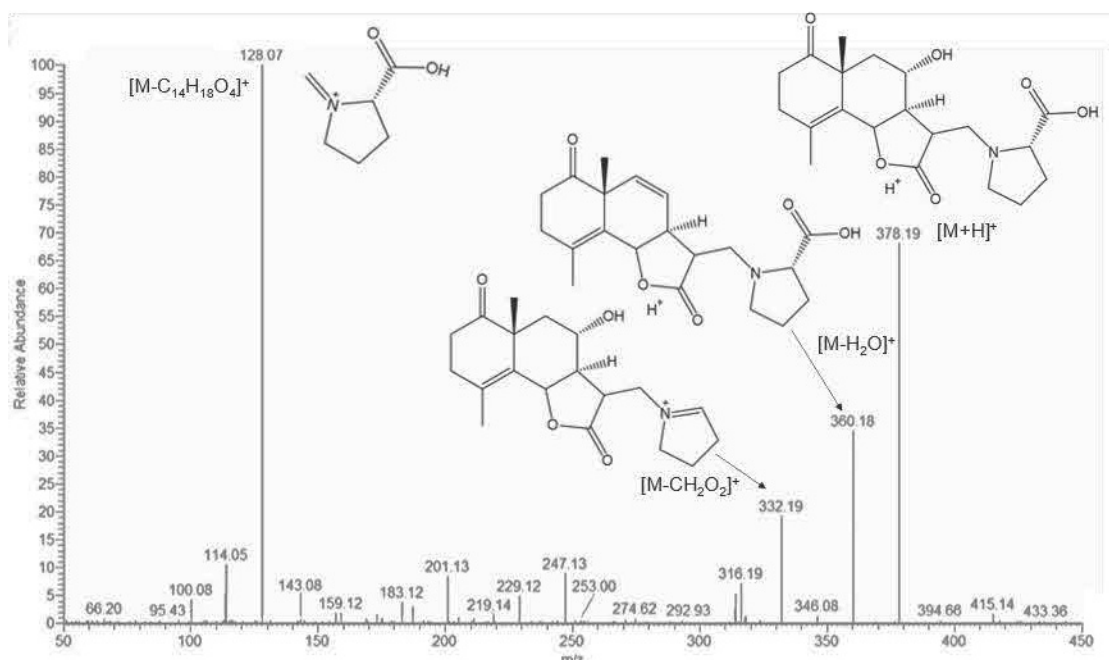


Fig. 11 ESI-MS/MS spectrum (in-source CID fragmentation) of Compound 2

より詳細な解析のために、2D NMR ( $H-H$  COSY, HSQC と HMBC) スペクトル測定 (Fig. 12) を行った。HMBC スペクトルにおいて、7 位水素 ( $\delta_H$  1.88, m) から 8 位炭素 ( $\delta_C$  66.0 ppm) と 6 位炭素 ( $\delta_C$  77.9 ppm) の相関、8 位水素 ( $\delta_H$  3.89, td,  $J = 10.8, 4.5$  Hz) から 6 位炭素と 11 位炭素の相関が見られ、付加した水酸基の結合位置は 8 位であると決定した。

化合物 2 の立体配置を決定するために、NOESY (Fig. 13) や ECD スペクトル (Fig. 14) 測定と加水分解反応を行った。NOESY スペクトルにおいて、14 位の水素 ( $\delta_H$  1.24, s) と 6 位水素 ( $\delta_H$  4.87, quint-like,  $J = 11.4, 1.1$  Hz)、6 位水素と 11 位水素 ( $\delta_H$  3.01, m)、6 位水素と 8 位水素、14 位水素と 8 位水素の相関が観測され、化合物 1 と同様な相対立体配置を持っている事が示唆された。ECD スペクトルにおいては、化合物 1 と類似するコットン効果が見られ、同様な絶

対立体配置を有する事が明らかになった。最後に、加水分解を行い、遊離した proline を旋光度検出器付きのHPLCで分析し、negativeのシグナルが観測され、L-prolineの存在が確認できた。

以上の事から、化合物 2 の絶対立体配置を 6*S*, 7*R*, 8*S*, 10*R*, 11*R*, 2'*S* と決定した。

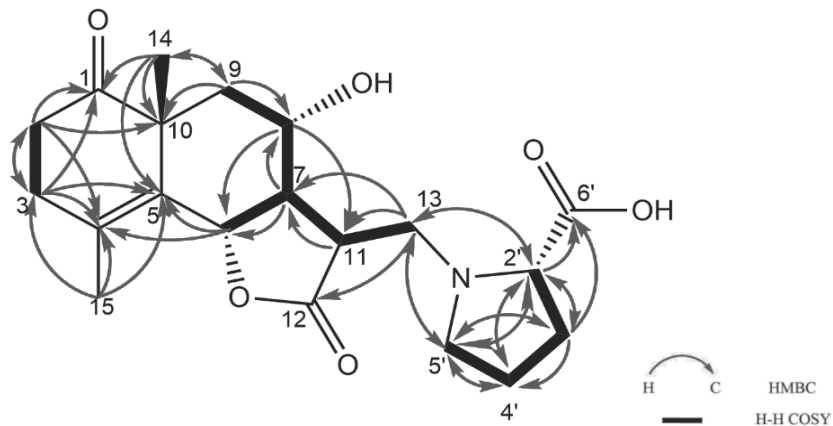


Fig. 12 Key COSY and HMBC correlations of Compound 2

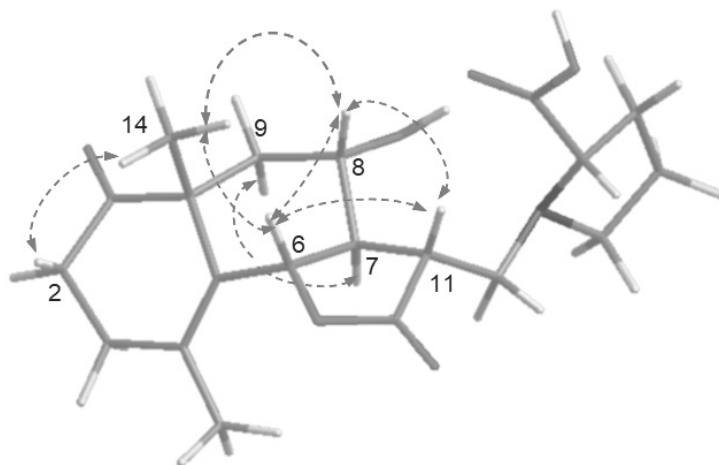


Fig. 13 Key PS-NOESY correlations of Compound 2

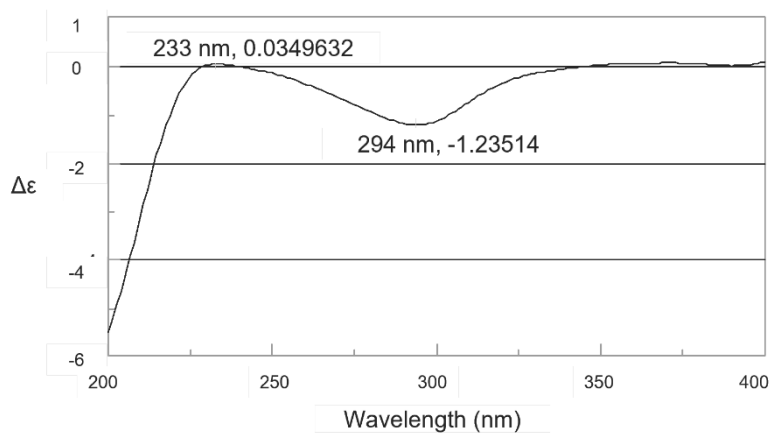
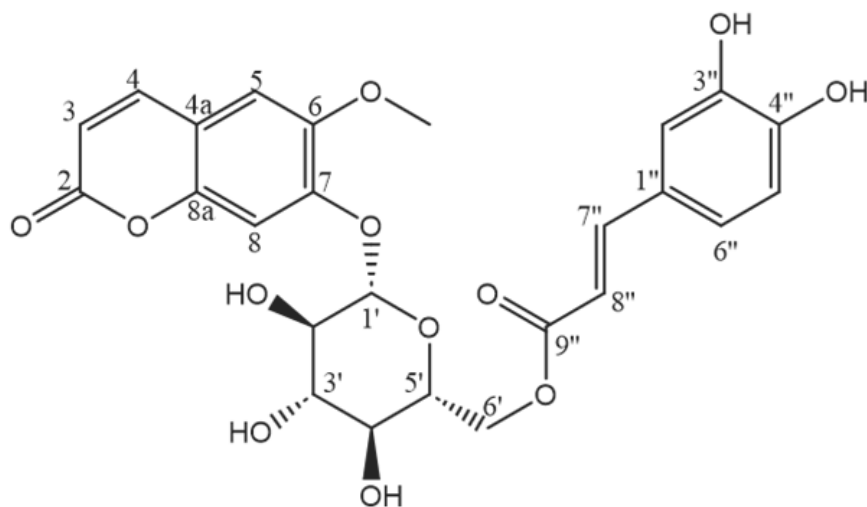


Fig. 14 Experimental ECD spectrum of Compound 2



White amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$  : 539.1160  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{25}H_{24}O_{12}Na$  : 539.1163)

$[\alpha]_D^{25}$  -76.5 (MeOH,  $c = 0.2$ )

IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$  : 3393, 2952, 2849, 1689, 1639, 1511, 1389, 1278, 1164, 1019, 465

UV  $\lambda_{max}$  ( $CH_3OH$ ) nm ( $\log \epsilon$ ) : 225 sh (3.92), 250 sh (3.62), 292 (3.66), 331 (3.75)

Fig. 15 Structure and physical data of Compound 3

Table 3  $^{13}C$  and  $^1H$  NMR (125 MHz and 500 MHz, pyridine- $d_5$ )

Position	$^{13}C$	$^1H$	Position	$^{13}C$	$^1H$
2	161.6		4'	71.6	4.25, <i>t</i> , (8.7)
3	114.5	6.33, <i>d</i> , (9.5)	5'	76.1	4.25, <i>m</i>
4	144.0	7.65, <i>d</i> , (9.5)	6'	64.6	4.91, <i>dd</i> , (12.5, 6.5)
4a	113.5				5.11, <i>dd</i> , (12.5, 2.0)
5	110.2	7.01, <i>s</i>	1''	127.1	
6	147.4		2''	116.5	7.57, <i>d</i> , (2.1)
7	151.5		3''	147.8	
8	104.6	7.57, <i>s</i>	4''	149.8	
8a	150.8		5''	117.3	7.32, <i>d</i> , (8.3)
7-OCH <sub>3</sub>	56.5	3.69, <i>s</i>	6''	122.5	7.27, <i>dd</i> , (8.3, 2.1)
1'	102.3	5.79, <i>d</i> , (7.3)	7''	146.6	7.92, <i>d</i> , (15.9)
2'	74.9	4.45, <i>m</i>	8''	114.9	6.68, <i>d</i> , (15.9)
3'	78.7	4.43, <i>t</i> , (8.7)	9''	167.9	

化合物 **3** は、HR-ESI-MS により分子式を  $C_{25}H_{24}O_{12}$  と決定した。 $^{13}C$  NMR (Table 3) において、カルボニル基に由来するシグナル 2 本を観測した ( $\delta_C$  167.9, 161.6 ppm)。さらに、 $\delta_C$  110.2 ppm から  $\delta_C$  151.5 ppm まで複数の低磁場領域のピークが観測されたことからベンゼン環および二重結合の存在が示唆された。 $^1H$  NMR (Table 3) からカップリング定数が 9.5 Hz または 15.9 Hz を有するプロトンシグナルが四本観察されたことから、トランスとシス二重結合の存在が推測できた。また、 $\delta_C$  102.3 ppm のアノマー炭素、 $\delta_C$  64.6 ppm のメチレン炭素と  $\delta_C$  70 から 80 ppm のシグナル四本から推測し、グルコースを有することが明らかになった。

H-H COSY スペクトル (Fig. 16) では、グルコースの 1'位から 6'位に至る水素、また二重結合水素に相関が観測された。グルコースのアノマー水素のカップリング定数が 7.3 Hz から  $\beta$ 配置であるのが明らかとなった。また、加水分解反応を行い、旋光度検出器付き HPLC の符号より絶対配置を決定した。その結果、有しているのは  $\beta$ -D-glucose である事が明らかになった。

HMBC スペクトル (Fig. 16) では、3, 4 位のシス二重結合水素から 2 位  $\delta_C$  161.6 ppm のカルボニル基に相関がみられ、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボン酸構造の存在が明らかとなった。さらにシス二重結合と低磁場付近  $\delta_C$  110.2, 113.5 および 150.8 ppm の相関また 8 位水素から  $\delta_C$  113.5 および 151.5 ppm への相関が観測された。以上の事を勘案し、クマリン骨格の存在が明らかになった。最後に、7'', 8''位のトランス二重結合から  $\delta_C$  167.9 ppm のカルボニル基への相関および多数のベンゼン環をとりまく相関が観測された、 $^1H$  NMR のカップリングパターンを解析したところ、ケイ皮酸の 3,4-二置換体を有することが示唆された。カフェー酸、フェルラ酸またはイソフェルラ酸の文献データを比べたところ、カフェー酸であることが分かった (Fig. 17) [6, 7]。最後に、グルコース 1'位の水素からクマリンの 7 位、6'位からフェルラ酸の 9''位に HMBC 相関が確認され、以上のことを勘案した結果、化合物 **3** の構造を Fig. 15 に示すものであると決定した。

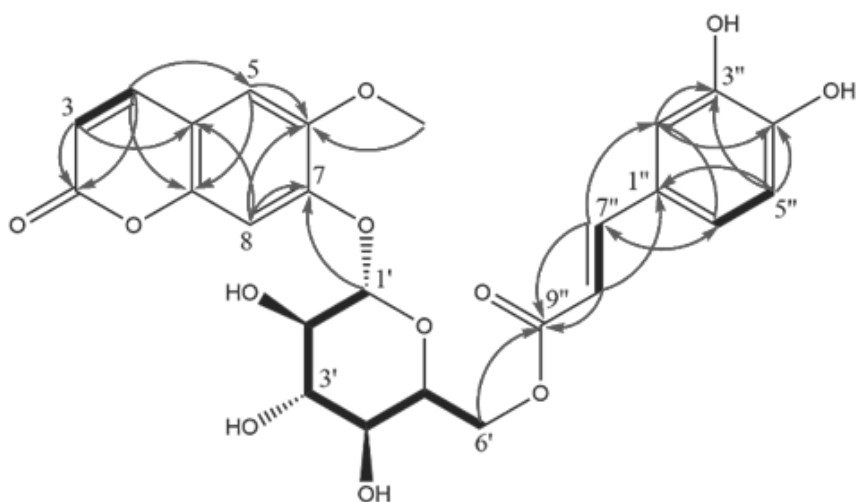


Fig. 16 Key COSY and HMBC correlations of Compound **3**

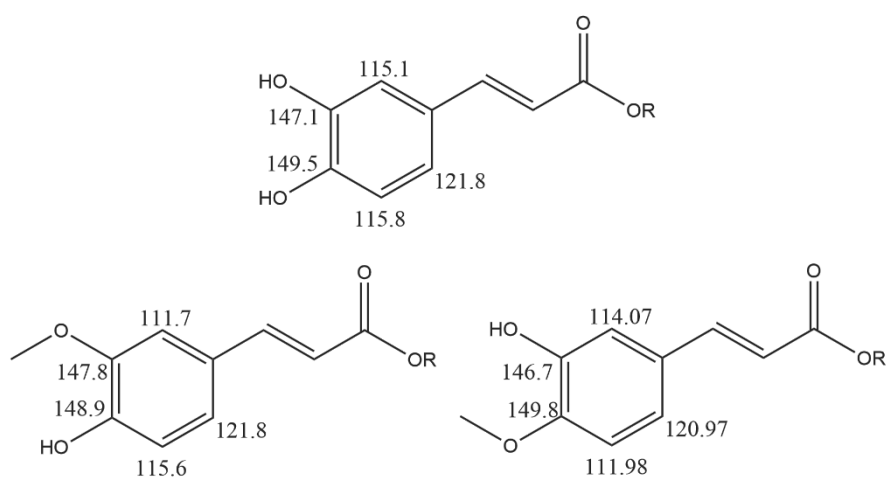


Fig. 17  $^{13}\text{C}$  NMR data of caffeic acid (Upper), ferulic acid (Left) and isoferulic acid (Right)



### 第三節 既知化合物について

モクビヤッコウの EtOAc 可溶画分より、18 種 (4–21) の既知化合物を単離した (Fig. 18)。そのうち、クマリン類 2 種: scopoletin (4) [8] と scopolin (5) [9, 10]、フラボノイド類 5 種: chrysofenolol D (6) [11]、3-methyl quercetin (7) [12]、luteolin (8) [13]、cosmosin (9) [14] と quercetin-3-O-(6''-O- $\alpha$ -rhamnosyl)- $\beta$ -D-glucoside (10) [15]、カフェー酸誘導体 5 種: 4,5-di-O-caffeoylquinic acid butyl ester (11) [16]、4,5-di-O-caffeoylquinic acid methyl ester (12) [17]、3,5-di-O-caffeoylquinic acid methyl ester (13) [18]、3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid methyl ester (14) [19] と chlorogenic acid methyl ester (15) [20]、その他の芳香族化合物 3 種: 2,6-dimethoxy-4-hydroxymethyl-phenol 1-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (16) [21]、caffeic acid (17) [22] と 3,4-dihydroxy benzoic acid (18) [23]、リグナン類 1 種: tetracentronside B (19) [24]、脂肪酸類 2 種: tianshichic acid (20) [25] と tianshichic methyl ether (21) [25] であった。また、化合物 9~14, 17~20 計 10 種の既知化合物は初めてモクビヤッコウから単離された。

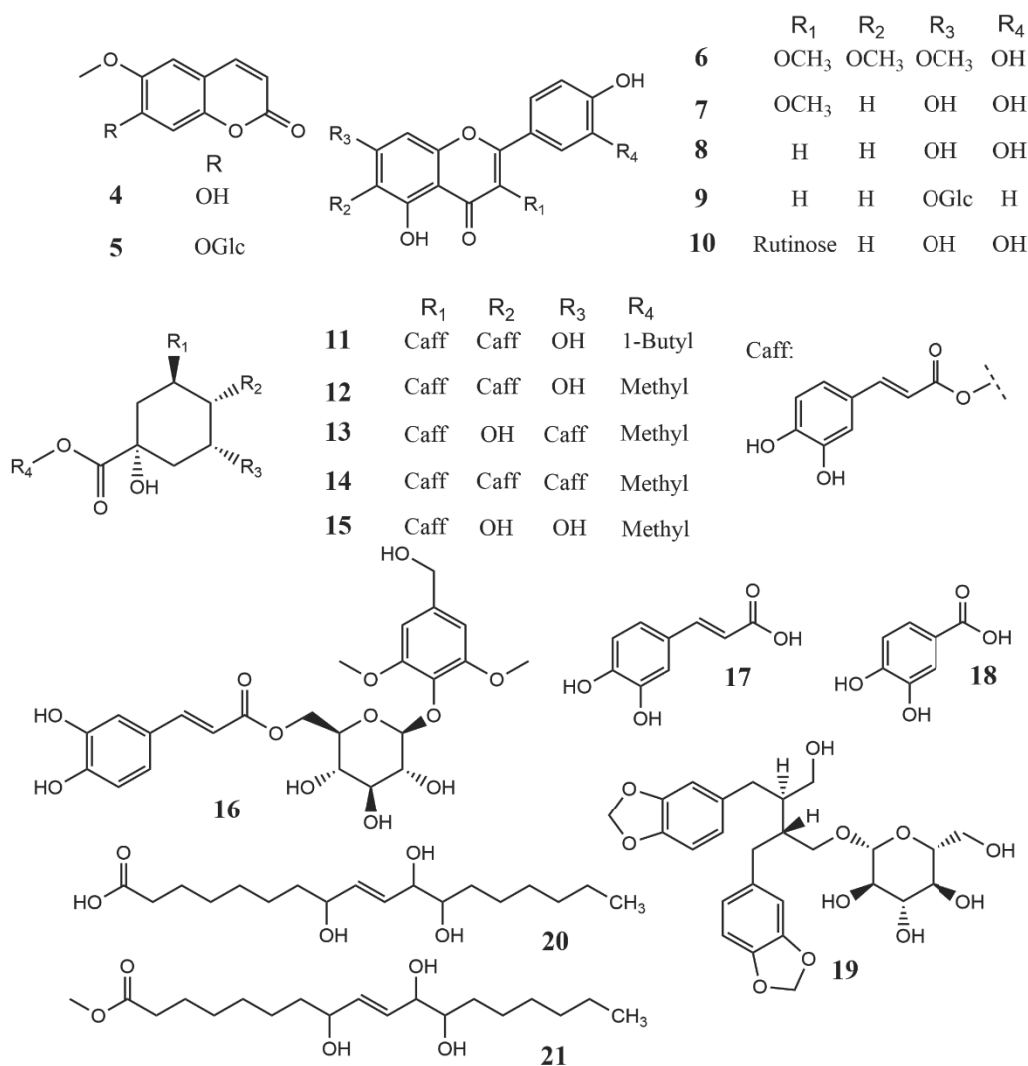
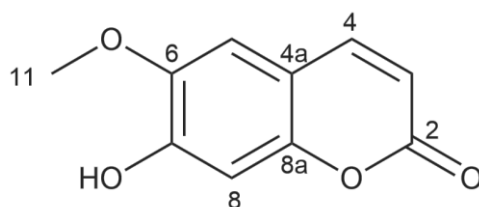


Fig. 18 Known compounds from EtOAc layer of *C. chinense*

第一項 既知クマリン誘導体の化学構造

NMR データ (Table 4 and 5) を文献値と比較することにより、化合物 4 を scopoletin [8]、化合物 5 を scopolin [9, 10] に同定した (Fig. 19-20)。

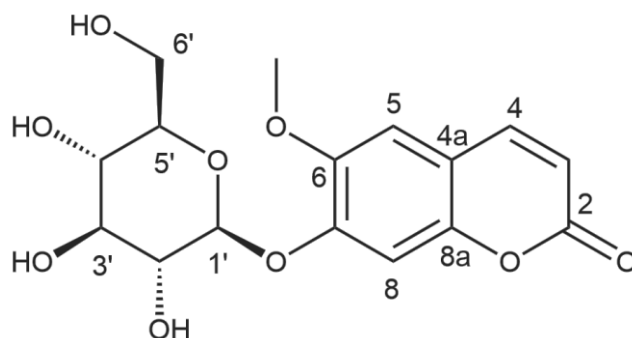


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 193.0490 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>: 193.0495

Fig. 19 Structure and physical data of Compound 4

Table 4 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	161.8	<i>s</i>	
3	112.8	<i>d</i>	6.32, <i>d</i> , (9.4)
4	144.5	<i>d</i>	7.70, <i>d</i> , (9.4)
5	109.9	<i>d</i>	7.06, <i>s</i>
6	146.6	<i>s</i>	
7	151.5	<i>s</i>	
8	104.5	<i>d</i>	7.14, <i>s</i>
4a	111.5	<i>s</i>	
8a	153.4	<i>s</i>	
11	56.6	<i>q</i>	3.78, <i>s</i>



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 377.0844  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{16}H_{18}O_9Na$ : 377.0843

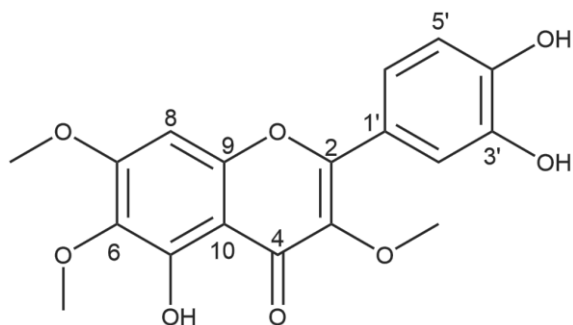
Fig. 20 Structure and Physical data of Compound 5

Table 5  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	160.6	<i>s</i>	
3	113.3	<i>d</i>	6.33, <i>d</i> , (9.4)
4	144.2	<i>d</i>	7.97, <i>d</i> , (9.4)
5	109.6	<i>d</i>	7.30, <i>s</i>
6	145.9	<i>s</i>	
7	149.9	<i>s</i>	
8	103.0	<i>d</i>	7.16, <i>s</i>
4a	112.3	<i>s</i>	
8a	148.9	<i>s</i>	
1'	99.6	<i>d</i>	5.08, <i>d</i> , (5.7)
2'	73.0	<i>d</i>	} 3.15-3.80, <i>m</i>
3'	77.1	<i>d</i>	
4'	69.6	<i>d</i>	
5'	76.7	<i>d</i>	
6'	60.6	<i>t</i>	4.58, <i>m</i> overlapped with solvent
-OCH <sub>3</sub>	56.0	<i>q</i>	3.81, <i>s</i>

第二項 既知フラボノイド誘導体の化学構造

NMR データ (Table 6-10) を文献値と比較することにより、化合物 **6** を chryso-splenol D [11]、化合物 **7** を 3-methyl quercetin [12]、化合物 **8** を luteolin [13]、化合物 **9** を cosmosin [14]、化合物 **10** を quercetin-3-O-(6''-O- $\alpha$ -rhamnosyl)- $\beta$ -D-glucoside [15] に同定し、5 種類のフラボノイド誘導体を得た (Fig. 21-25)。

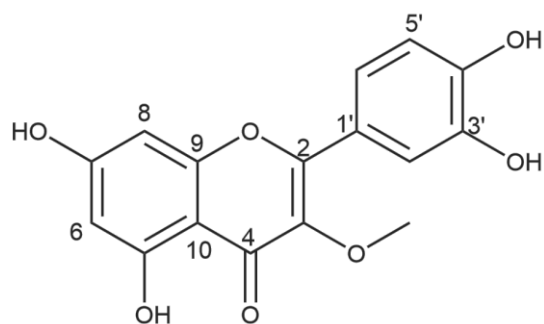


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 361.0916 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>: 361.0918

Fig. 21 Structure and Physical data of Compound **6**

Table 6 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	157.7	<i>s</i>	
3	139.2	<i>s</i>	
4	179.7	<i>s</i>	
5	153.8	<i>s</i>	
6	133.3	<i>s</i>	
7	159.8	<i>s</i>	
8	91.7	<i>d</i>	6.70, <i>s</i>
9	153.1	<i>s</i>	
10	107.3	<i>s</i>	
1'	122.1	<i>s</i>	
2'	117.2	<i>d</i>	8.24, <i>d</i> , (2.1)
3'	147.8	<i>s</i>	
4'	151.4	<i>s</i>	
5'	117.3	<i>d</i>	7.42, <i>d</i> , (8.5)
6'	122.6	<i>d</i>	7.85, <i>dd</i> , (8.5, 2.1)
3-OCH <sub>3</sub>	60.3	<i>q</i>	3.91, <i>s</i>
6-OCH <sub>3</sub>	61.1	<i>q</i>	3.90, <i>s</i>
7-OCH <sub>3</sub>	56.9	<i>q</i>	4.02, <i>s</i>

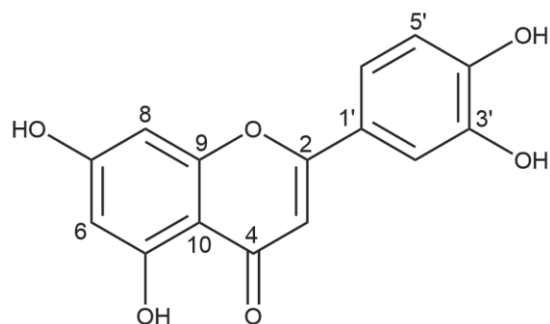


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 339.0474 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>Na: 339.0475

Fig. 22 Structure and Physical data of Compound 7

Table 7 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	158.4	<i>s</i>	
3	139.6	<i>s</i>	
4	180.1	<i>s</i>	
5	163.1	<i>s</i>	
6	99.9	<i>d</i>	6.18, <i>d</i> , (1.8)
7	165.7	<i>s</i>	
8	94.9	<i>d</i>	6.36, <i>d</i> , (1.8)
9	158.0	<i>s</i>	
10	106.0	<i>s</i>	
1'	122.5	<i>s</i>	
2'	116.5	<i>d</i>	7.62, <i>d</i> , (2.3)
3'	146.5	<i>s</i>	
4'	150.0	<i>s</i>	
5'	116.8	<i>d</i>	6.90, <i>d</i> , (8.7)
6'	123.1	<i>d</i>	7.51, <i>dd</i> , (8.7, 2.3)
3-OCH <sub>3</sub>	60.6	<i>q</i>	3.78, <i>s</i>

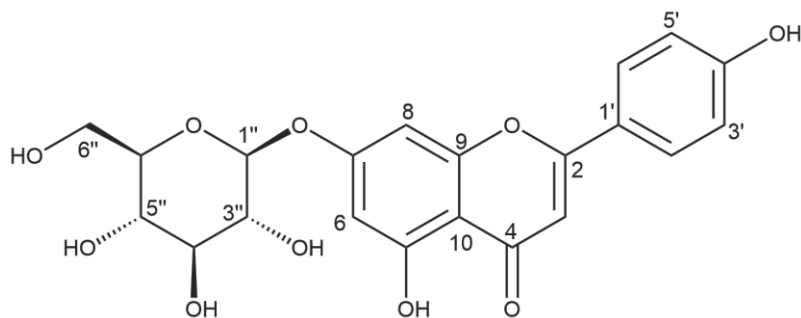


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 287.0549 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub>: 287.0550

Fig. 23 Structure and Physical data of Compound 8

Table 8 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	166.1	<i>s</i>	
3	104.3	<i>d</i>	6.68, <i>s</i>
4	183.1	<i>s</i>	
5	163.5	<i>s</i>	
6	100.3	<i>d</i>	6.49, overlapped
7	165.2	<i>s</i>	
8	95.1	<i>d</i>	7.67, <i>d</i> , (2.0)
9	158.9	<i>s</i>	
10	105.4	<i>s</i>	
1'	119.9	<i>s</i>	
2'	115.0	<i>d</i>	6.49, overlapped
3'	148.1	<i>s</i>	
4'	152.0	<i>s</i>	
5'	117.2	<i>d</i>	7.05, <i>d</i> , (8.3)
6'	123.3	<i>d</i>	7.30, <i>dd</i> , (8.3, 2.3)

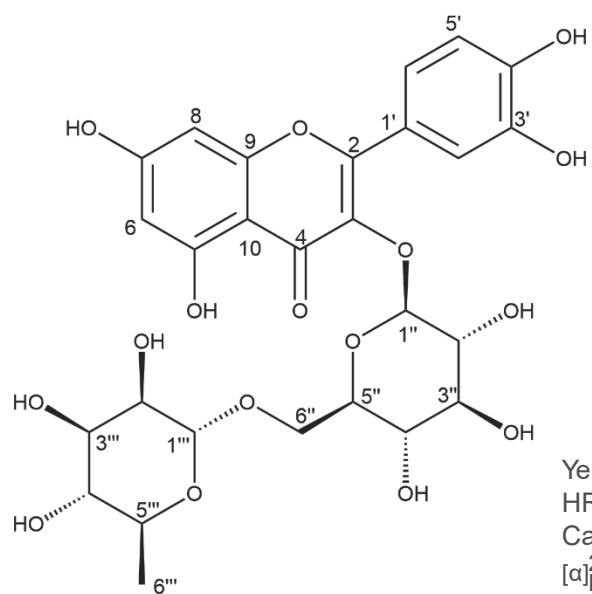


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (negative)  $m/z$ : 431.0983 [M-H]<sup>-</sup>  
 Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10</sub>: 431.0973  
 $[\alpha]_D^{28}$  - 53.7 (c = 0.51, MeOH)

Fig. 24 Structure and Physical data of Compound 9

Table 9 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	165.3	<i>s</i>	
3	104.4	<i>d</i>	6.93, <i>s</i>
4	183.2	<i>s</i>	
5	163.2	<i>s</i>	
6	101.0	<i>d</i>	6.88, <i>d</i> , (2.2)
7	164.4	<i>s</i>	
8	95.7	<i>d</i>	7.13, <i>d</i> , (2.2)
9	158.3	<i>s</i>	
10	106.9	<i>s</i>	
1'	122.4	<i>s</i>	
2'	129.4	<i>d</i>	7.92, <i>d</i> , (8.8)
3'	117.3	<i>d</i>	7.22, <i>d</i> , (8.8)
4'	162.9	<i>s</i>	
5'	117.3	<i>d</i>	7.22, <i>d</i> , (8.8)
6'	129.4	<i>d</i>	7.92, <i>d</i> , (8.8)
1''	102.1	<i>d</i>	5.87, <i>d</i> , (7.4)
2''	75.2	<i>d</i>	4.26, <i>m</i>
3''	79.1	<i>d</i>	} 4.36- 4.46, <i>m</i>
4''	71.5	<i>d</i>	
5''	78.8	<i>d</i>	
6''	62.7	<i>t</i>	4.61, <i>dd</i> , (2.0, 12.0) 4.36- 4.46, <i>m</i>



Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 633.1429  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{27}H_{30}O_{16}Na$ : 633.1426  
 $[\alpha]_D^{28} - 16.5$  ( $c = 0.2$ , MeOH)

Fig. 25 Structure and Physical data of Compound 10



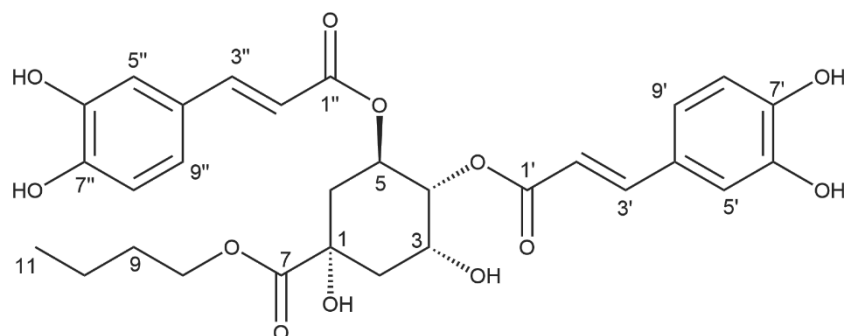
Table 10 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, Pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	157.8	<i>s</i>	
3	135.4	<i>s</i>	
4	178.7	<i>s</i>	
5	162.9	<i>s</i>	
6	99.9	<i>d</i>	6.70, <i>d</i> , (1.8)
7	166.0	<i>s</i>	
8	94.7	<i>d</i>	6.75, <i>d</i> , (1.8)
9	158.3	<i>s</i>	
10	105.3	<i>s</i>	
1'	122.5	<i>s</i>	
2'	117.9	<i>d</i>	8.36, <i>d</i> , (2.1)
3'	146.8	<i>s</i>	
4'	149.4	<i>s</i>	
5'	116.4	<i>d</i>	7.43, <i>d</i> , (8.5)
6'	123.1	<i>d</i>	8.15, <i>dd</i> , (2.1, 8.5)
1''	104.7	<i>d</i>	6.03, <i>d</i> , (7.7)
2''	76.1	<i>d</i>	
3''	78.7	<i>d</i>	
4''	71.4	<i>d</i>	3.63-4.45, <i>m</i>
5''	76.1	<i>d</i>	
6''	68.6	<i>t</i>	4.54, <i>d</i> , (10.9) 3.63-4.45, <i>m</i>
1'''	102.6	<i>d</i>	5.36, <i>d</i> , (1.1)
2'''	72.2	<i>d</i>	} 3.63-4.45, <i>m</i>
3'''	72.6	<i>d</i>	
4'''	74.0	<i>d</i>	
5'''	69.7	<i>d</i>	
6'''	18.6	<i>q</i>	1.54, <i>d</i> , (5.5)

### 第三項 既知カフェー酸誘導体の化学構造

---

NMR データ (Table 11-15) を文献値と比較することにより、化合物 **11** を 4,5-di-O-caffeoylquinic acid butyl ester [16]、化合物 **12** を 4,5-di-O-caffeoylquinic acid methyl ester [17]、化合物 **13** を 3,5-di-O-caffeoylquinic acid methyl ester [18]、化合物 **14** を 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid methyl ester [19]、化合物 **15** を chlorogenic acid methyl ester [20] に同定し、5 種のカフェー酸誘導体を得た (Fig. 26-30)。

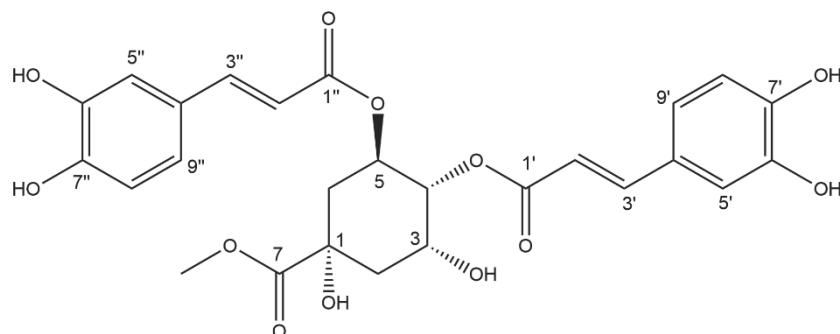


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 573.1966 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>O<sub>12</sub>: 573.1967  
 $[\alpha]_D^{26}$  - 115 (c = 0.1, MeOH)

Fig. 26 Structure and Physical data of Compound 11

Table 11 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	75.8	<i>s</i>	
2	38.4	<i>t</i>	2.09-2.37, <i>m</i>
3	68.6	<i>d</i>	4.39, <i>m</i>
4	74.9	<i>d</i>	5.15, <i>dd</i> , (7.9, 2.8)
5	69.2	<i>d</i>	5.57, <i>m</i>
6	38.5	<i>t</i>	2.09-2.37, <i>m</i>
7	174.8	<i>s</i>	
8	66.6	<i>t</i>	4.14, <i>m</i>
9	31.7	<i>t</i>	1.65, <i>m</i>
10	20.1	<i>t</i>	1.39, <i>m</i>
11	14.1	<i>q</i>	0.94, <i>t</i> , (7.6)
1', 1''	168.5, 167.9	<i>s</i>	
2', 2''	114.8, 114.6	<i>d</i>	6.33, <i>d</i> , (16.0) 6.21, <i>d</i> , (16.0)
3', 3''	147.8, 147.7	<i>d</i>	7.64, <i>d</i> , (16.0) 7.54, <i>d</i> , (16.0)
4', 4''	127.8, 127.6	<i>s</i>	
5', 5''	115.8, 115.2	<i>d</i>	7.06, <i>d</i> , (1.8) 7.04, <i>d</i> , (1.8)
6', 6''	146.9, 146.8	<i>s</i>	
7', 7''	149.8, 149.7	<i>s</i>	
8', 8''	116.6, 116.5	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (8.3) 6.79, <i>d</i> , (8.3)
9', 9''	123.2, 123.2	<i>d</i>	6.96, <i>dd</i> , (8.3, 1.8) 6.94, <i>dd</i> , (8.3, 1.8)

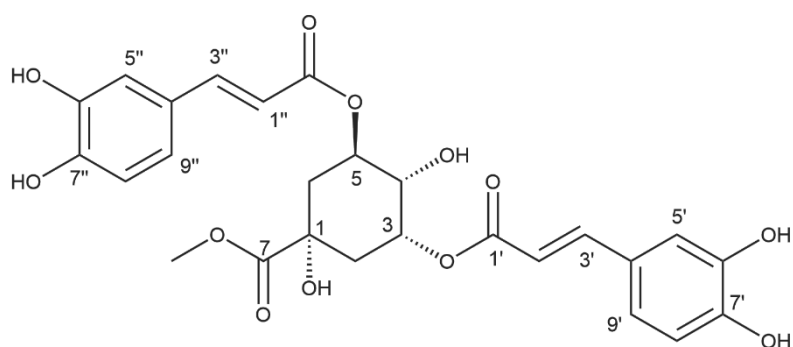


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 553.1312  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{26}H_{26}O_{12}Na$ : 553.1316  
 $[\alpha]_D^{28} - 174.1$  ( $c = 0.94$ , MeOH)

Fig. 27 Structure and Physical data of Compound **12**

Table 12  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	75.8	<i>s</i>	
2	38.4	<i>t</i>	2.27, <i>m</i> , $\alpha$ 2.11, <i>m</i> , $\beta$
3	69.2	<i>d</i>	5.59, <i>m</i>
4	74.9	<i>d</i>	5.15, <i>dd</i> , (8.2, 3.0)
5	68.6	<i>d</i>	4.38, <i>m</i>
6	38.5	<i>t</i>	2.32, <i>dd</i> , (13.8, 3.0), $\alpha$ 2.11, <i>m</i> , $\beta$
7	174.8	<i>s</i>	
8	56.6	<i>q</i>	3.74, <i>s</i>
1', 1''	168.5, 167.9	<i>s</i>	
2', 2''	114.8, 114.6	<i>d</i>	6.33, <i>d</i> , (16.3) 6.20, <i>d</i> , (16.3)
3', 3''	147.8, 147.7	<i>d</i>	7.63, <i>d</i> , (16.3) 7.53, <i>d</i> , (16.3)
4', 4''	127.8, 127.6	<i>s</i>	
5', 5''	115.8, 115.2	<i>d</i>	7.06, <i>d</i> , (1.9) 7.04, <i>d</i> , (1.9)
6', 6''	146.9, 146.8	<i>s</i>	
7', 7''	149.8, 149.7	<i>s</i>	
8', 8''	116.6, 116.5	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (8.3) 6.79, <i>d</i> , (8.3)
9', 9''	123.2, 123.2	<i>d</i>	6.96, <i>dd</i> , (8.3, 1.9) 6.94, <i>dd</i> , (8.3, 1.9)

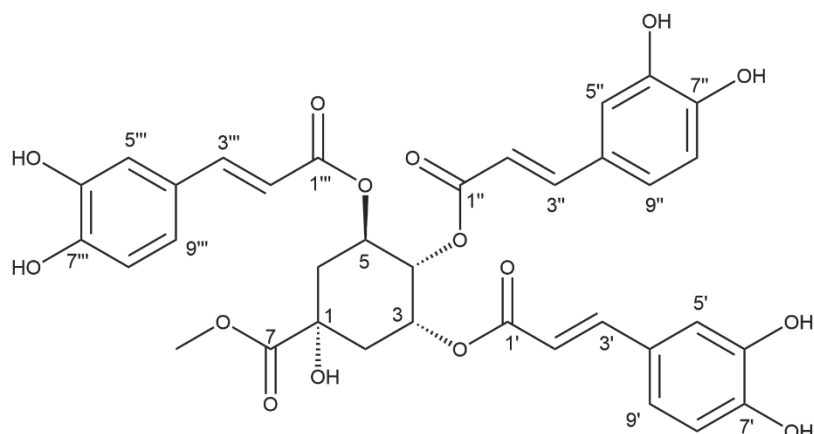


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 553.1317  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{26}H_{26}O_{12}Na$ : 553.1316  
 $[\alpha]_D^{28} - 94$  ( $c = 0.89$ , MeOH)

Fig. 28 Structure and Physical data of Compound 13

Table 13  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	74.8	<i>s</i>	
2	35.8	<i>t</i>	2.17-2.38, <i>m</i>
3	72.3	<i>d</i>	5.34, <i>m</i>
4	disappear	<i>d</i>	4.01, <i>q</i> -like, (3.4)
5	72.1	<i>d</i>	5.43, <i>m</i>
6	35.8	<i>t</i>	2.17-2.38, <i>m</i>
7	175.8	<i>s</i>	
8	53.2	<i>q</i>	3.72, <i>s</i>
1', 1''	168.9, 168.1	<i>s</i>	
2', 2''	115.6, 115.3	<i>d</i>	6.37, <i>d</i> , (15.9) 6.25, <i>d</i> , (15.9)
3', 3''	147.6, 147.3	<i>d</i>	7.65, <i>d</i> , (15.9) 7.58, <i>d</i> , (15.9)
4', 4''	128.0, 127.7	<i>s</i>	
5', 5''	115.3, 115.0	<i>d</i>	7.09, <i>d</i> , (1.9) 7.09, <i>d</i> , (1.9)
6', 6''	147.0, 146.9	<i>s</i>	
7', 7''	149.8, 149.6	<i>s</i>	
8', 8''	116.7, 116.6	<i>d</i>	6.81, <i>d</i> , (8.3) 6.81, <i>d</i> , (8.3)
9', 9''	123.2, 123.1	<i>d</i>	6.99, <i>dd</i> , (8.3, 1.9) 6.99, <i>dd</i> , (8.3, 1.9)

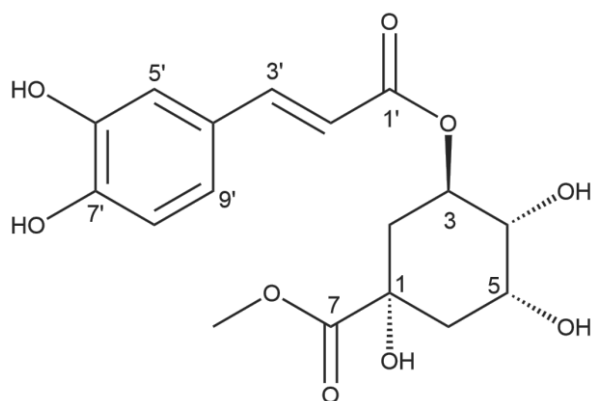


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 715.1638 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>Na: 715.1633  
 $[\alpha]_D^{28}$  - 196.6 (c = 0.73, MeOH)

Fig. 29 Structure and Physical data of Compound 14

Table 14 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1', 1'', 1'''	168.5, 168.1, 167.9	s	
2', 2'', 2'''	115.1, 114.5, 114.4	d	6.26, 6.20, 6.16, d, (15.8)
3', 3'', 3'''	148.1, 148.0, 147.8	d	7.55, 7.50, 7.50, d, (15.8)
4', 4'', 4'''	127.8, 127.6, 127.6	s	
5', 5'', 5'''	115.3, 115.2, 115.2	d	7.02, 7.00, 6.97, d, (2.0)
6', 6'', 6'''	146.9, 146.9, 146.9	s	
7', 7'', 7'''	149.9, 149.9, 149.8	s	
8', 8'', 8'''	116.6, 116.6, 116.6	d	6.73, 6.73, 6.68, d, (8.0)
9', 9'', 9'''	123.6, 123.4, 123.4	d	6.90, 6.89, 6.83, dd, (8.0, 2.0)
1	74.8	s	
2	36.6	t	2.36, m, α 2.23, dd, (3.4, 13.9), β
3	69.8	d	5.54, m
4	74.8	d	5.31, dd, (3.4, 7.5)
5	69.4	d	5.60, m
6	36.6	t	2.42, dd, (3.8, 13.4), α 2.14, dd, (7.5, 13.4), β
7	175.7	s	
8	53.3	q	3.31, s



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 391.1002  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{17}H_{20}O_9Na$ : 391.1000  
 $[\alpha]_D^{28} - 51.8$  ( $c = 0.33$ , MeOH)

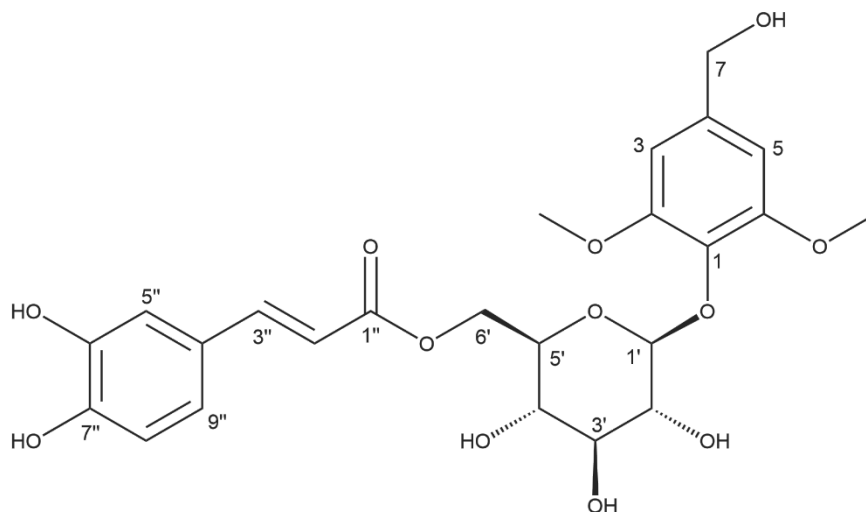
Fig. 30 Structure and Physical data of Compound **15**

Table 15  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	76.0	<i>s</i>	
2	37.9	<i>t</i>	2.01-2.37, <i>m</i>
3	70.4	<i>d</i>	5.28, <i>m</i>
4	72.7	<i>d</i>	3.72, <i>m</i>
5	72.2	<i>d</i>	4.15, <i>m</i>
6	38.1	<i>t</i>	2.01-2.37, <i>m</i>
7	175.6	<i>s</i>	
-OCH <sub>3</sub>	53.1	<i>q</i>	3.70, <i>s</i>
1'	168.5	<i>s</i>	
2'	115.2	<i>d</i>	6.22, <i>d</i> , (16.0)
3'	147.3	<i>d</i>	7.53, <i>d</i> , (16.0)
4'	127.8	<i>s</i>	
5'	115.3	<i>d</i>	7.05, <i>m</i>
6'	146.9	<i>s</i>	
7'	149.8	<i>s</i>	
8'	116.7	<i>d</i>	6.78, <i>d</i> , (7.8)
9'	123.1	<i>d</i>	6.95, <i>dd</i> , (7.8, 1.8)

#### 第四項 既知芳香環誘導体の化学構造

NMR データ (Table 16-18) を文献値と比較することにより、化合物 **16** を 2,6-dimethoxy-4-hydroxymethyl-phenol 1-O-(6-O-caffeoyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside [21]、化合物 **17** を caffeic acid [22]、化合物 **18** を 3,4-dihydroxyl benzoic acid [23] に同定し、3 種の芳香族誘導体を得た (Fig. 31-33)。



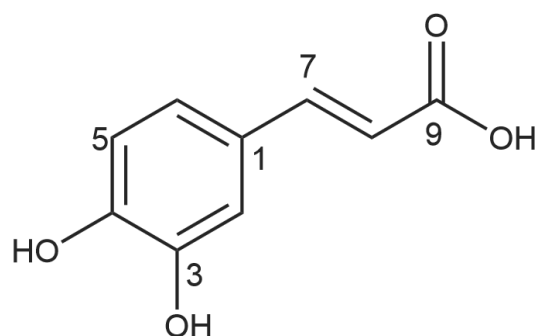
Colorless amorphous powder  
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 531.1473  $[M+Na]^+$   
Calcd for  $C_{24}H_{28}O_{12}Na$ : 531.1473  
 $[\alpha]_D^{28} - 90.2$  ( $c = 0.76$ , MeOH)

Fig. 31 Structure and Physical data of Compound **16**



Table 16 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	135.1	<i>s</i>	
2	154.6	<i>s</i>	
3	105.6	<i>d</i>	6.66, <i>s</i>
4	139.9	<i>s</i>	
5	105.6	<i>d</i>	6.66, <i>s</i>
6	154.6	<i>s</i>	
7	65.3	<i>t</i>	4.48, <i>s</i>
1'	105.4	<i>d</i>	overlapped with solvent
2'	75.7	<i>d</i>	} 3.33-3.58, <i>m</i>
3'	75.8	<i>d</i>	
4'	71.9	<i>d</i>	
5'	77.9	<i>d</i>	
6'	64.7	<i>t</i>	4.42, <i>dd</i> , (1.6, 11.7) 4.32, <i>dd</i> , (6.1, 11.7)
1''	127.8	<i>s</i>	
2''	115.1	<i>d</i>	7.05, <i>d</i> , (1.7)
3''	147.0	<i>s</i>	
4''	149.8	<i>s</i>	
5''	116.7	<i>d</i>	6.81, <i>d</i> , (8.0)
6''	123.1	<i>d</i>	6.93, <i>dd</i> , (1.7, 8.0)
7''	147.1	<i>d</i>	7.48, <i>d</i> , (15.9)
8''	115.3	<i>d</i>	6.19, <i>d</i> , (15.9)
9''	169.1	<i>s</i>	
2-OCH <sub>3</sub>	57.0	<i>q</i>	3.83, <i>s</i>
6-OCH <sub>3</sub>	57.0	<i>q</i>	3.83, <i>s</i>

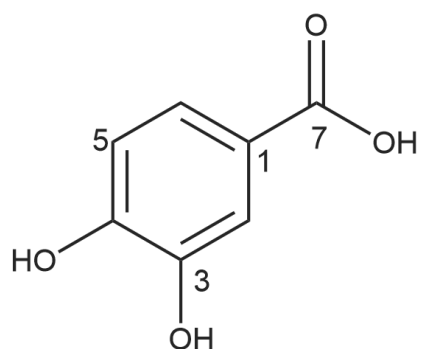


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 180.0422 [M]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>: 180.0422

Fig. 32 Structure and Physical data of Compound 17

Table 17 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	127.9	<i>s</i>	
2	115.1	<i>d</i>	7.04, <i>d</i> , (1.9)
3	147.1	<i>s</i>	
4	149.5	<i>s</i>	
5	115.8	<i>d</i>	6.78, <i>d</i> , (8.1)
6	122.8	<i>d</i>	6.93, <i>dd</i> , (8.1, 1.9)
7	146.8	<i>d</i>	7.54, <i>d</i> , (15.3)
8	116.1	<i>d</i>	6.23, <i>d</i> , (15.3)
9	171.1	<i>s</i>	



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 177.0157 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>Na: 177.0158

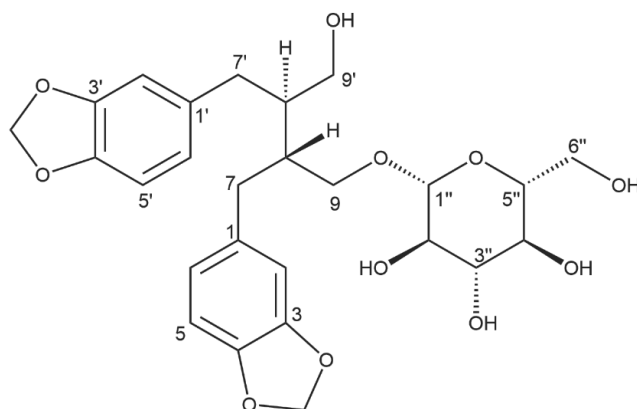
Fig. 33 Structure and Physical data of Compound 18

Table 18 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	123.3	s	
2	117.9	d	7.45, d, (1.6)
3	146.2	s	
4	151.7	s	
5	115.9	d	6.81, d, (8.2)
6	124.1	d	7.44, dd, (8.2, 1.6)
-COOH	170.4	s	

第五項 既知リグナン誘導体の化学構造

NMR データ (Table 19) を文献値と比較することにより、化合物 **19** を tetrecentronside B [24] に同定し、1 種のリグナン誘導体を得た (Fig. 34)。



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 543.1836  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{26}H_{32}O_{11}Na$ : 543.1837  
 $[\alpha]_D^{28} - 16.1$  ( $c = 0.73$ , MeOH)

Fig. 34 Structure and Physical data of Compound **19**

Table 19  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1, 1'	136.36, 136.44	<i>s</i>	
2, 2'	108.9	<i>d</i>	6.61, <i>m</i>
3, 3'	149.1	<i>s</i>	
4, 4'	147.20, 147.21	<i>s</i>	
5, 5'	110.5, 110.4	<i>d</i>	6.66, <i>d</i> , (7.7) 6.67, <i>d</i> , (8.1)
6, 6'	123.35, 123.28	<i>d</i>	6.59, <i>dd</i> , (7.7, 1.5)
7, 7'	35.69, 35.66	<i>t</i>	2.54-2.69, <i>m</i>
8, 8'	44.4, 41.92	<i>d</i>	2.05, <i>m</i> 1.98, <i>m</i>
9, 9'	70.4, 62.95	<i>t</i>	3.87, <i>m</i> 3.50-3.70, <i>m</i>
O-CH <sub>2</sub> -O	102.1	<i>t</i>	5.87, <i>s</i>
1''	104.7	<i>d</i>	4.17, <i>d</i> , (7.6)
2''	71.8	<i>d</i>	} 3.17-3.37, <i>m</i>
3''	78.3	<i>d</i>	
4''	75.4	<i>d</i>	
5''	78.1	<i>d</i>	
6''	62.7	<i>t</i>	3.86, <i>m</i> overlapped with solvent

第六項 既知脂肪酸誘導体の化学構造

NMR データ (Table 20 and 21) を文献値と比較することにより、化合物 **20** を tianshic acid [25]、化合物 **21** を tianshic methyl ether [25] に同定し、2 種の脂肪酸化合物を得た (Fig. 35 and 36)。

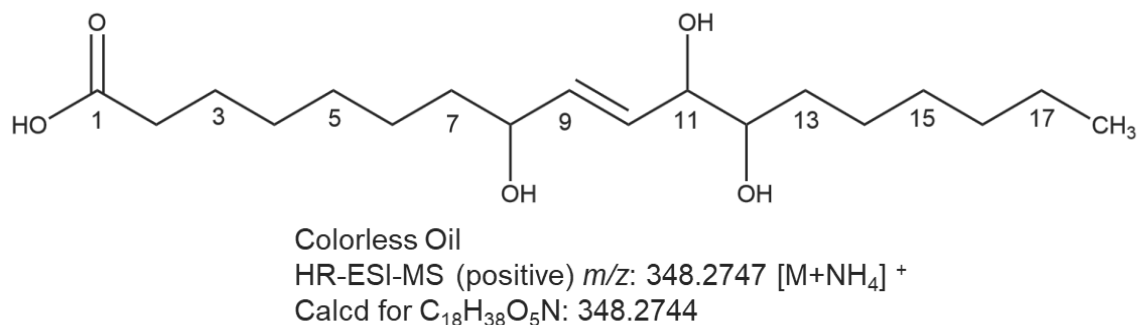
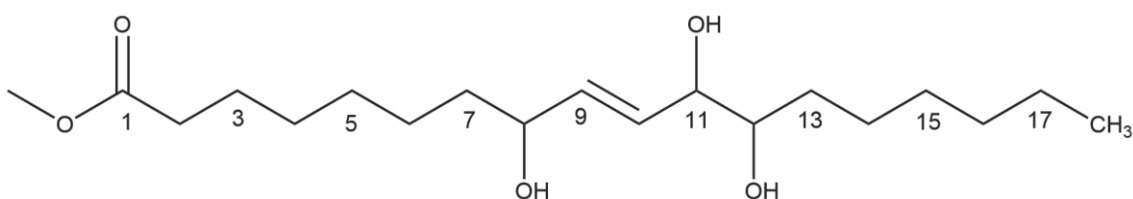


Fig. 35 Structure and Physical data of Compound **20**

Table 20  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	177.7	<i>s</i>	
2	35.1	<i>t</i>	2.29, <i>t</i> , (7.4)
3	26.2	<i>t</i>	1.61, <i>m</i>
4	30.2	<i>t</i>	1.35, <i>m</i>
5	30.5	<i>t</i>	1.35, <i>m</i>
6	26.5	<i>t</i>	1.33, <i>m</i>
7	38.4	<i>t</i>	1.53, <i>m</i>
8	73.1	<i>d</i>	4.07, <i>dd</i> , (12.4, 6.4)
9	136.6	<i>d</i>	5.73, <i>m</i>
10	131.1	<i>d</i>	5.71, <i>m</i>
11	76.6	<i>d</i>	3.94, <i>m</i> , (6.5)
12	75.9	<i>d</i>	3.44, <i>m</i> , (6.3)
13	33.6	<i>t</i>	1.35, <i>m</i>
14	26.7	<i>t</i>	1.53, <i>m</i>
15	30.6	<i>t</i>	1.53, <i>m</i>
16	33.2	<i>t</i>	1.35, <i>m</i>
17	23.8	<i>t</i>	1.35, <i>m</i>
18	14.6	<i>q</i>	0.93, <i>t</i> , (7.2)



Colorless Oil

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 362.2901  $[M+NH_4]^+$

Calcd for  $C_{19}H_{40}O_5N$ : 362.2901

Fig. 36 Structure and Physical data of Compound 21

Table 21  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (150 MHz and 600 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	176.2	<i>s</i>	
2	34.9	<i>t</i>	2.35, <i>t</i> , (7.1)
3	26.2	<i>t</i>	1.64, <i>m</i>
4	30.3	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
5	30.5	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
6	26.6	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
7	38.5	<i>t</i>	1.56, <i>m</i>
8	73.2	<i>d</i>	4.08, <i>m</i>
9	136.7	<i>d</i>	5.70-5.77, <i>d</i> , (5.4)
10	131.2	<i>d</i>	5.70-5.77, <i>d</i> , (5.4)
11	76.7	<i>d</i>	3.94, <i>m</i>
12	75.9	<i>d</i>	3.45, <i>m</i>
13	33.7	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
14	26.8	<i>t</i>	1.56, <i>m</i>
15	30.7	<i>t</i>	1.56, <i>m</i>
16	33.3	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
17	23.8	<i>t</i>	1.36, <i>m</i>
18	14.6	<i>q</i>	0.93, <i>t</i> , (6.7)
-OCH <sub>3</sub>	52.1	<i>q</i>	3.69, <i>s</i>

---

---

## 第 4 章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定

---

---

### 第一節 単離精製

モクビャッコウ (*C. chinense*) の地上部 EtOAc 可溶画分から 3 種の新規化合物が得られ、そのうち、化合物 1 と化合物 2 は希少なセスキテルペン骨格を有する  $\psi$ -santonin 系の化合物であった。 $\psi$ -santonin 系の化合物の単離報告が極めて少ないことから、類似化合物の単離は有力なリード化合物の発見だけでなく、セスキテルペン類代謝物の生合成経路の解明にも重要な意味を持つと考えられる。そのため、本章は同植物の 1-BuOH 可溶画分に注目し、新規  $\psi$ -santonin 系類縁体の単離を目標とした。

乾燥した 1-BuOH 可溶画分 30.5 g を Diaion HP-20、Silica gel、ODS 各種カラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて単離、精製を行い、16 種の化合物 (22 - 37) を括弧内の収量で単離した。(Chart 2)

### 第二節 新規化合物について

モクビャッコウ (*C. chinense*) の地上部 1-BuOH 可溶画分から新規の  $\psi$ -santonin 系類縁体 8 種 (22-29) を単離し (Fig. 37)、1D NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )、2D NMR (COSY, HSQC, HMBC, PS-NOESY)、MS、ECD、DFT 計算などの技術を駆使し、その化学構造を詳細に検討することにした。

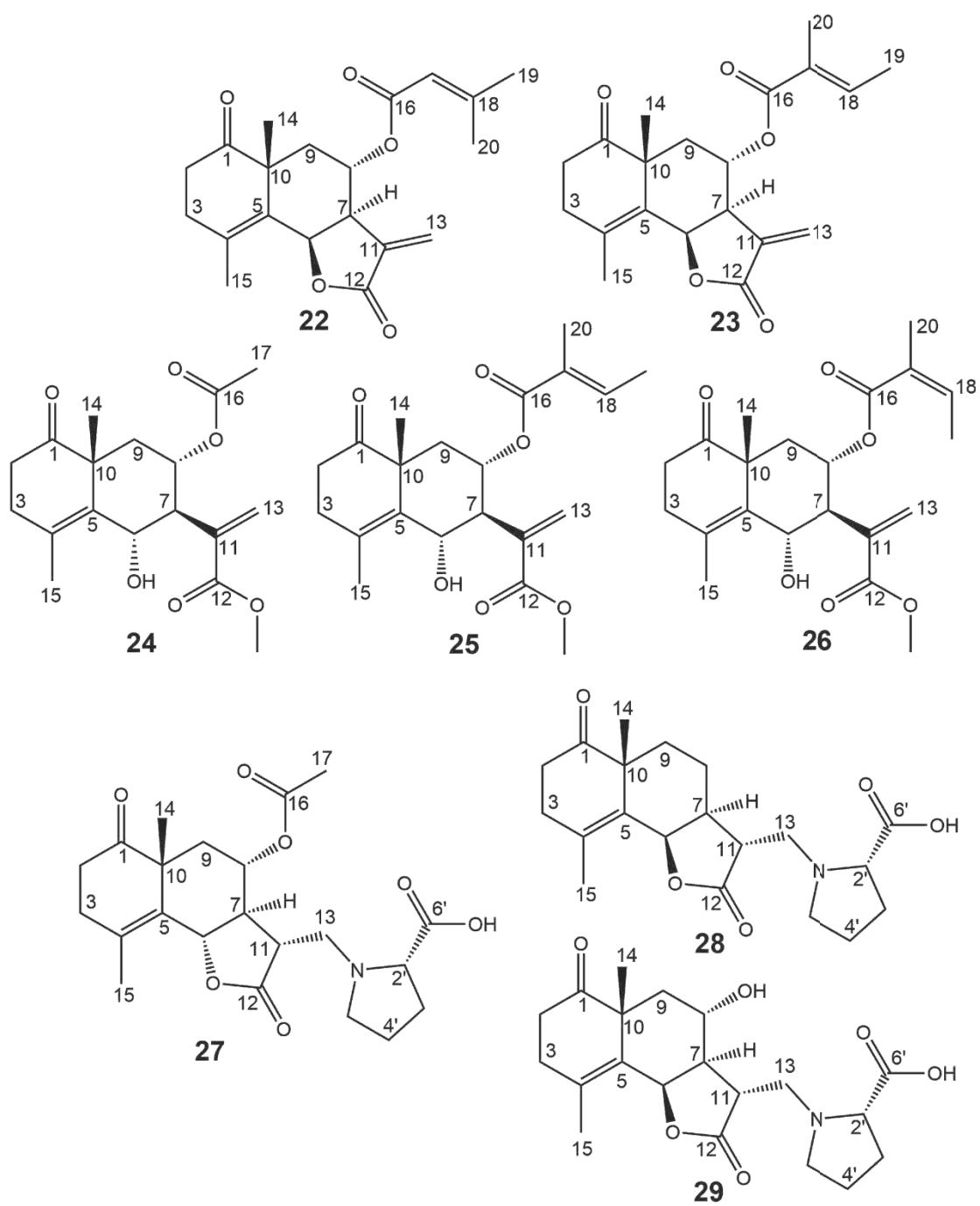


Fig. 37 New compounds **22-29** from 1-BuOH layer of *C. chinense*



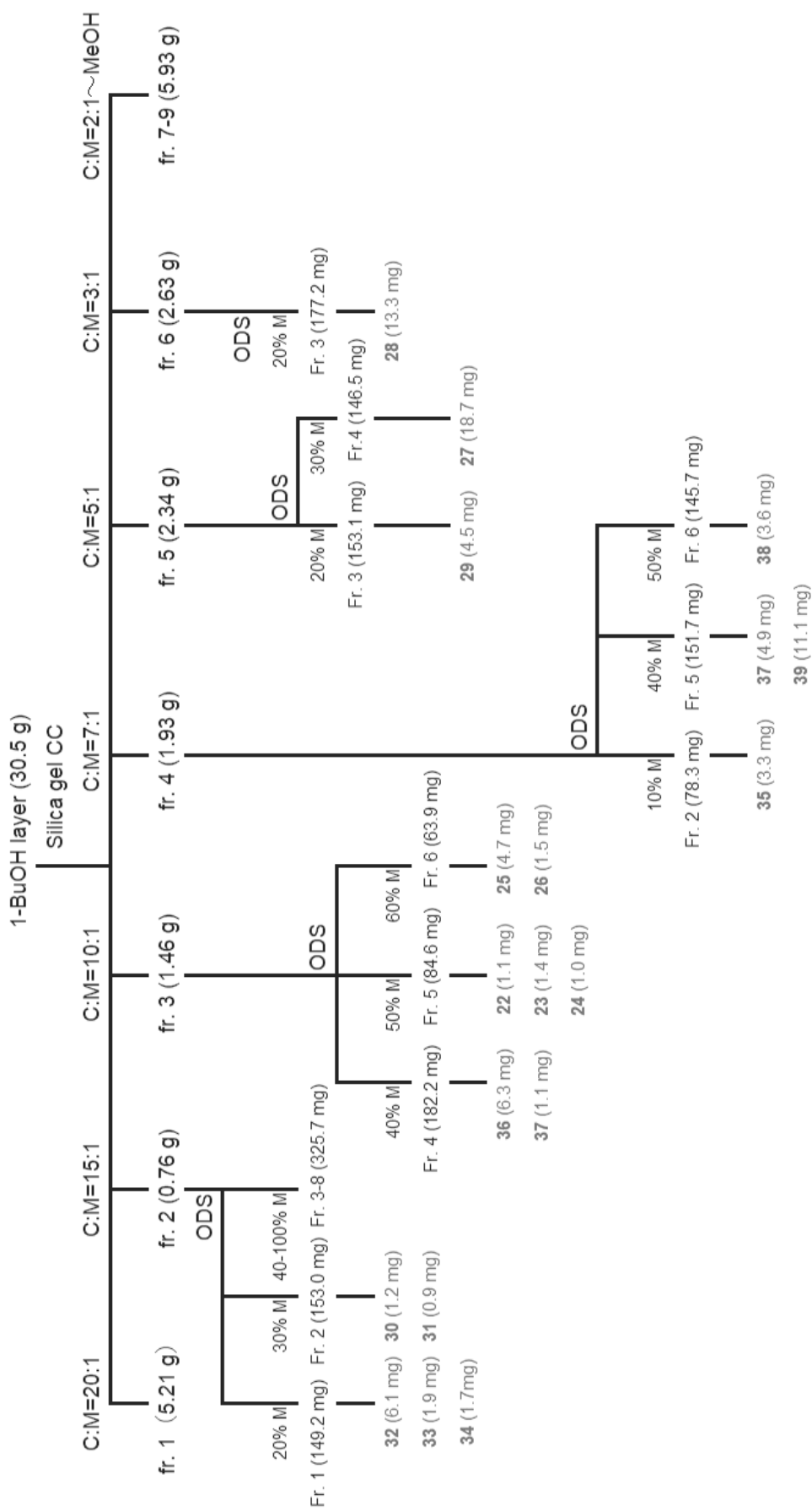
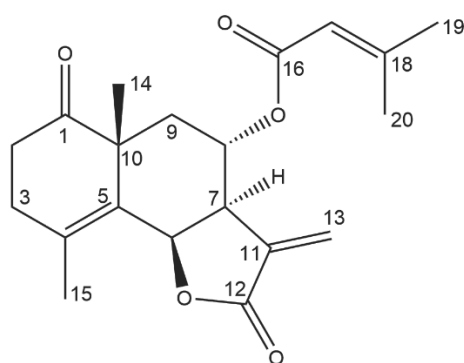


Chart 2 Isolation of Compounds 22-39 from 1-BuOH layer



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 367.1515  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{24}O_5Na$ : 367.1516  
 $[\alpha]_D^{25}$  -31.8 (MeOH,  $c = 0.11$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3132, 1765, 1710, 1644, 1267, 1225, 1144  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 192 (4.38), 216.5 sh (3.84)

Fig. 38 Structure and physical data of Compound **22**

Table 22  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	216.4	<i>s</i>	
2	35.9	<i>t</i>	2.34, <i>m</i> , $\alpha$ 2.60, <i>dd</i> , (14.5, 1.6), $\beta$
3	30.3	<i>t</i>	2.37, <i>m</i> , $\alpha$ 2.75, <i>m</i> , $\beta$
4	128.1	<i>s</i>	
5	141.1	<i>s</i>	
6	77.5	<i>d</i>	5.68, <i>d</i> , (7.1)
7	45.6	<i>d</i>	3.29, overlapped
8	72.7	<i>d</i>	4.81, <i>m</i>
9	33.8	<i>t</i>	1.49, <i>dd</i> , (14.5, 2.1), $\beta$ 2.52, <i>ddd</i> , (14.5, 6.6, 1.8), $\alpha$
10	46.8	<i>s</i>	
11	139.1	<i>s</i>	
12	171.9	<i>s</i>	
13	125.8	<i>t</i>	6.34, <i>d</i> , (2.0) 5.90, <i>d</i> , (2.0)
14	26.2	<i>q</i>	1.21, <i>s</i>
15	20.0	<i>q</i>	1.99, <i>d</i> , (1.0)
16	166.9	<i>s</i>	
17	116.2	<i>d</i>	5.49, <i>sept</i> , (1.4)
18	160.1	<i>s</i>	
19	27.6	<i>q</i>	1.88, <i>d</i> , (1.4)
20	20.5	<i>q</i>	2.12, <i>d</i> , (1.4)

化合物 **22** は無色の不定形粉末として得られ、HR-ESI-MS より分子式を  $C_{20}H_{24}O_5$  に決定し、9つの不飽和度が示唆された。

$^{13}C$  NMR スペクトル (Table 22) において、 $\delta_C$  166.9, 171.9 と 216.4 ppm にカルボニル基と考えられるシグナルが3本、 $\delta_C$  116.2, 125.8, 128.1, 139.1, 141.1 と 160.1 ppm に3つの二重結合に由来する低磁場シグナルが6本観測された。さらに、4本のメチン炭素 (そのうち、 $\delta_C$  72.7 と 77.5 ppm に酸素が結合している炭素が2つ、 $\delta_C$  116.2 ppm に二重結合に由来する炭素が1つ)、4本のメチレン炭素 (そのうち1つは  $\delta_C$  125.8 ppm の二重結合に由来するもの) と4つのメチル炭素 ( $\delta_C$  20.0, 20.5, 26.2 と 27.6 ppm) が見られたため、残りの3つの不飽和度は環状構造に由来するものと推測し、EtOAc 可溶画分から得られた化合物 **2** と類似する骨格を有する事が明らかになった。 $^1H$  NMR スペクトル (Table 22) においては、特徴的な低磁場プロトンシグナル ( $\delta_H$  5.49, sept,  $J = 1.4$  Hz) が観測された。また、7重に分裂している事から、2つのメチル基水素 ( $\delta_H$  1.88, d,  $J = 1.4$  Hz;  $\delta_H$  2.13, d,  $J = 1.4$  Hz) とカップリングしていることが示唆されたため、senecioic acid 部分の存在を推測した [26]。最後に、化合物 **2** の8位水素 ( $\delta_H$  3.89, td,  $J = 10.5, 4.8$  Hz) と比べ、化合物 **22** の8位水素 ( $\delta_H$  4.81, m) がより低磁場にシフトしており、senecioic acid のエステル結合による反遮蔽効果による影響と考えられ、senecioic acid の結合位置を8位に決定した。

より詳細な検討をするために、2D NMR スペクトル測定を行った (Fig. 39)。HMBC スペクトルにおいて、14位水素 ( $\delta_H$  1.21, s) から10位炭素 ( $\delta_C$  46.8 ppm) と1位炭素 ( $\delta_C$  216.4 ppm) の相関、2位水素 ( $\delta_H$  2.34, m;  $\delta_H$  2.60, dd,  $J = 14.5, 1.6$  Hz) から1位炭素と3位炭素 ( $\delta_C$  30.3 ppm) の相関、3位水素 ( $\delta_H$  2.37, m;  $\delta_H$  2.75, m) から1位炭素、4位炭素 ( $\delta_C$  128.1 ppm) と5位炭素 ( $\delta_C$  141.1 ppm) など一連の相関が観測され、1位のカルボニル基の存在が確認できた。また、化合物 **22** の平面構造を検証するために、COSY スペクトルを用いた検討を行い、6位水素 ( $\delta_H$  5.68, d,  $J = 7.1$  Hz) から9位水素へと連続したスピнкаップリングネットワークが見られ、最終的に化合物 **22** の平面構造を Fig. 38 のように決定した。

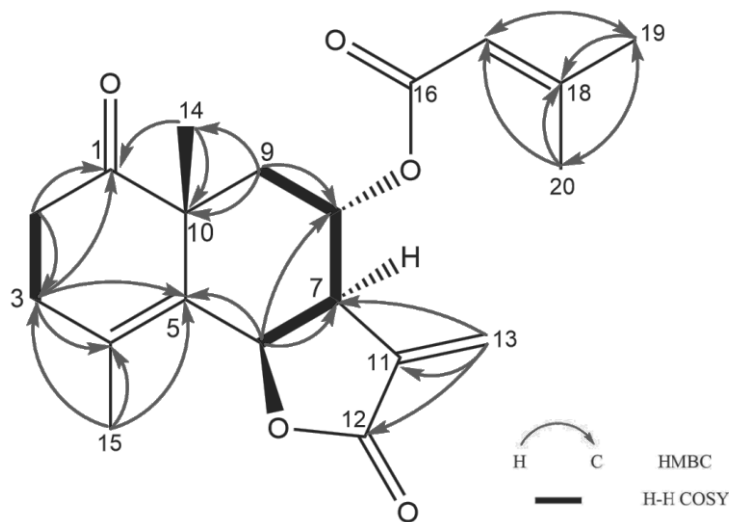


Fig. 39 Key COSY and HMBC correlations of Compound **22**

化合物 **22** の相対立体配置を決定するために、カップリング定数や化学シフトの変化、NOESY スペクトルなどを用いて全面的に検討を行った。まず、化合物 **22** と化合物 **2** の NMR スペクトルデータを比較した。化合物 **2** の6位水素と7位水素のカップリング定数は 11.4 Hz であることに對して、化合物 **22** は小さめの 7.1 Hz であった。さらに、化合物 **2** の4位炭素 ( $\delta_C$  126.1 ppm) と5位炭素 ( $\delta_C$  128.6 ppm) の化学シフトの差が僅か 2.5 ppm である事に対して、化合物 **22** の4位炭素 ( $\delta_C$  128.1 ppm) と5位炭素 ( $\delta_C$  141.1 ppm) の化学シフトの差は 13 ppm であり、大き

く異なっていた。また、化合物 **2** に観測された 6 位水素と 15 メチル水素の遠隔カップリングは化合物 **22** のスペクトルでは見られなかった。以上の情報から、化合物 **22** は化合物 **2** と異なる立体化学を 6 位に有していると推測した。NOESY スペクトル (Fig. 40) の解析を行った結果、6 位水素から 15 水素と 7 位水素の相関、14 位水素から 3 $\beta$  位、9 $\beta$  位と 8 位水素の相関が観測され、前述した相対立体配置を立証することができた。

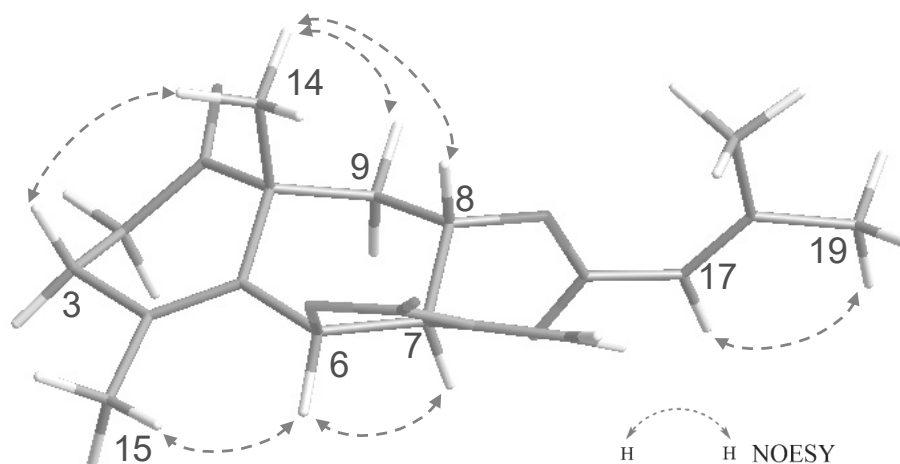


Fig. 40 Key PS-NOESY correlations of Compound **22**

さらに、化合物 **22** の絶対立体配置を決定するために、DFT 計算による計算 ECD スペクトルと実測値とを比較した。化合物 **22** の senecioic acid 側鎖部分は自由度が高く ECD スペクトル計算において安定配座の絞り込みを困難化する可能性があり、一方、自由回転により ECD スペクトルに大きな影響を与えないと推定されるため、化合物 **22** の 8 位脱アシル化体 **22a** (Fig. 41) の ECD スペクトルを計算し、化合物 **22** の実測値と比較する事にした (Fig. 41)。その結果、230 nm や 300 nm など特徴的なコットン効果がよく一致しており、化合物 **22** の絶対立体配置を 6*R*, 7*R*, 8*S*, 10*R* に決定した。

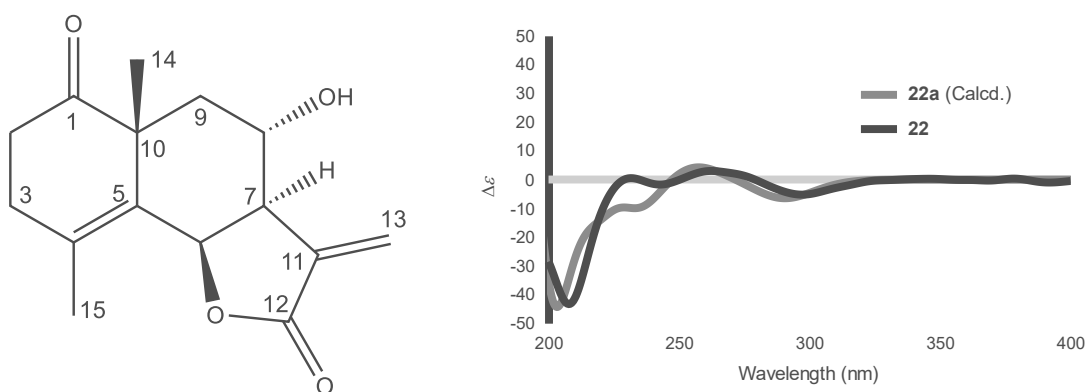
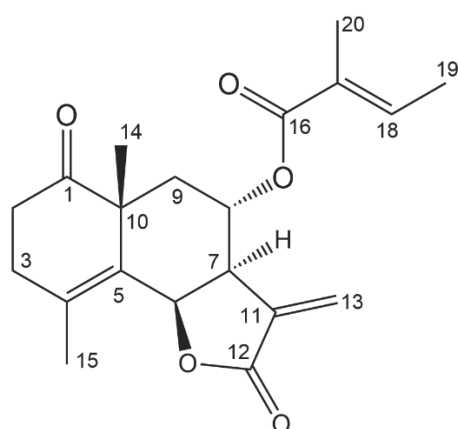


Fig. 41 Structure of Compound **22a** (Left); Experimental and calculated ECD spectrum of **22** and **22a** in CH<sub>3</sub>CN (Right).



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 367.1517  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{24}O_5Na$ : 367.1516  
 $[\alpha]_D^{25}$  -66.4 (MeOH,  $c = 0.14$ )  
 IR (film)  $\nu_{max}$ : 3367, 1767, 1709, 1510, 1267  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 191.5 (4.30), 211.5 sh (4.01)

Fig. 42 Structure and physical data of Compound 23

Table 23  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	214.9	<i>s</i>	
2	35.7	<i>t</i>	2.31, <i>dd</i> , (16.6, 2.2), $\alpha$ 2.64, <i>dd</i> , (16.6, 1.6), $\beta$
3	30.5	<i>t</i>	2.39, <i>ddd</i> , (16.1, 7.5, 2.2), $\alpha$ 2.79, <i>m</i> , $\beta$
4	129.7	<i>s</i>	
5	141.1	<i>s</i>	
6	77.5	<i>d</i>	5.70, <i>d</i> , (7.2)
7	45.5	<i>d</i>	3.34, overlapped
8	73.9	<i>d</i>	4.83, <i>m</i>
9	33.2	<i>t</i>	1.49, <i>dd</i> , (14.5, 2.2), $\beta$ 2.61, <i>ddd</i> , (14.5, 6.4, 1.6), $\alpha$
10	46.6	<i>s</i>	
11	139.2	<i>s</i>	
12	171.9	<i>s</i>	
13	125.8	<i>t</i>	6.35, <i>d</i> , (2.0) 5.91, <i>d</i> , (2.0)
14	26.3	<i>q</i>	1.23, <i>s</i>
15	19.9	<i>q</i>	2.00, <i>d</i> , (0.9)
16	168.6	<i>s</i>	
17	127.8	<i>s</i>	
18	139.5	<i>d</i>	6.67, <i>qq</i> , (7.0, 1.4)
19	14.5	<i>q</i>	1.77, <i>dq</i> , (7.0, 1.4)
20	12.2	<i>q</i>	1.74, <i>quint-like</i> , (1.4)

化合物 **23** は無色な非晶質粉末として単離され、HR-ESI-MS より化合物 **22** と同様の分子式  $C_{20}H_{24}O_5$  に決定した。

$^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、化合物 **22** と類似する NMR シグナルが観測されたが、senecioic acid 部分のシグナルが消失していた。一方で、 $\delta_C$  168.6, 127.8, 139.5, 14.5 と 12.2 ppm の一連のピークが見られ、文献を検索したところ、tiglic acid に由来するものと決定した [27]。このことから、化合物 **23** は化合物 **22** の senecioic acid 部分が tiglic acid に変換されたものであると推測した。

HMBC および COSY スペクトル (Fig. 43) を解析した結果も、この平面構造を支持した。しかし、8 位水素から 16 位炭素への HMBC 相関は 500 MHz の NMR では観測できず、tiglic acid 部分の結合位置は **22** と同様に、8 位水素 ( $\delta_H$  4.83, m) のアシル化低磁場シフトより決定した。

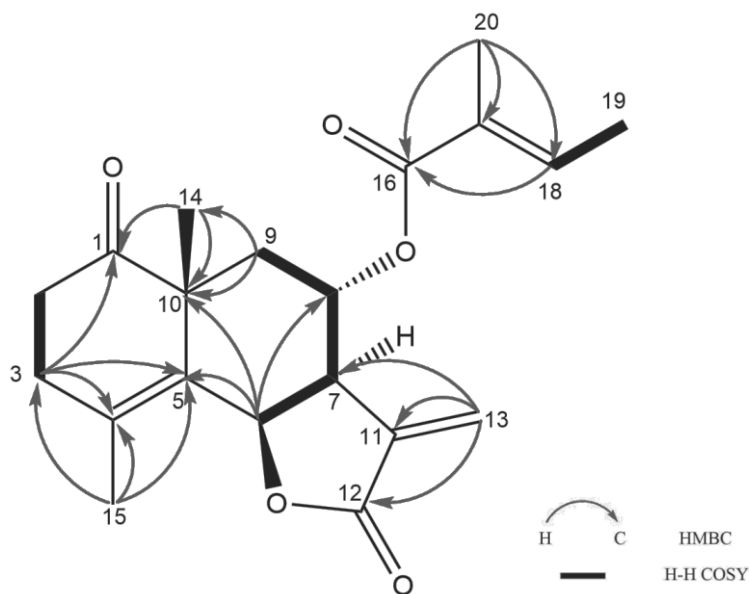


Fig. 43 Key COSY and HMBC correlations of Compound **23**

化合物 **23** の相対立体配置も同様に、特徴的なカップリング定数や化学シフトの変化と NOESY スペクトルより決定した。NOESY スペクトル (Fig. 44) において、6 位水素 ( $\delta_H$  5.70, d,  $J = 7.2$  Hz) から 7 位水素 ( $\delta_H$  3.34, overlapped) と 15 位メチル水素 ( $\delta_H$  2.00, d,  $J = 0.9$  Hz) の相関や 8 位水素から 14 位 ( $\delta_H$  1.23, s) と  $9\beta$  位水素 ( $\delta_H$  1.49, dd,  $J = 14.5, 2.2$  Hz) の相関が観測され、化合物 **22** と同様な相対立体配置を持っていることが示唆された。また、18 位水素 ( $\delta_H$  6.67, qq,  $J = 7.0, 1.4$  Hz) と 19 位水素 ( $\delta_H$  1.77, dq,  $J = 7.0, 1.4$  Hz) の相関は観測されたが 18 位と 20 位には観測されなかったことから、tiglic acid の構造であると決定した。

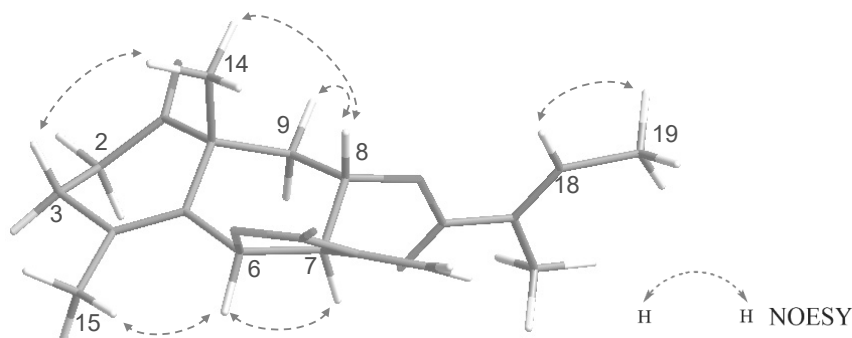


Fig. 44 Key PS-NOESY correlations of Compound **23**

最後に、化合物 **23** の ECD スペクトルを測定し (Fig. 45)、化合物 **22** とよく一致するコットン効果が見られたため、化合物 **23** の構造を Fig. 42 のように決定した。

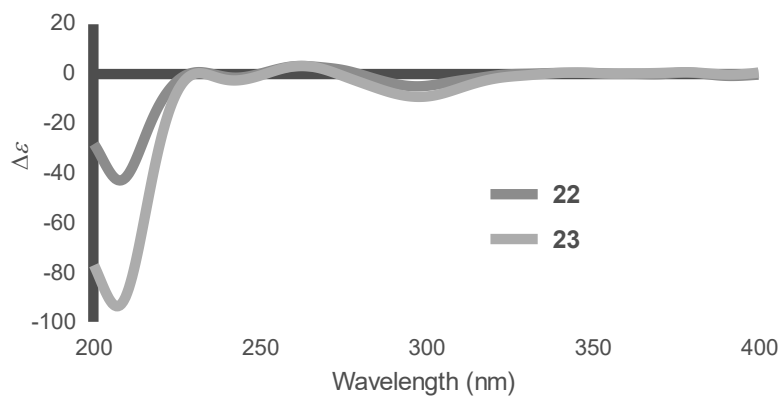
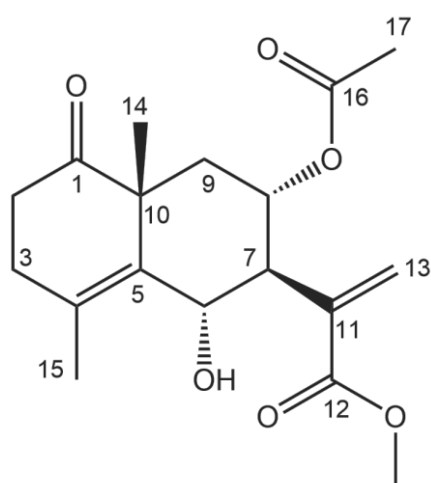


Fig. 45 Experimental ECD spectra of **22** and **23**



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 359.1466  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{18}H_{24}O_6Na$ : 359.1465  
 $[\alpha]_D^{25}$  -26.0 (MeOH,  $c = 0.11$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3026, 2929, 1715, 1652, 1446, 1244, 1144  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 192 (4.48)

Fig. 46 Structure and physical data of Compound **24**

Table 24  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	216.1	<i>s</i>	
2	36.6	<i>t</i>	2.44, <i>m</i> , $\alpha$ 2.66, <i>m</i> , $\beta$
3	34.3	<i>t</i>	2.34, <i>m</i> , $\alpha$ 2.48, <i>m</i> , $\beta$
4	131.3	<i>s</i>	
5	134.9	<i>s</i>	
6	71.4	<i>d</i>	4.90, overlapped
7	58.2	<i>d</i>	2.64, <i>t</i> , (10.1)
8	71.5	<i>d</i>	5.44, <i>ddd</i> , (11.1, 10.1, 4.7)
9	39.7	<i>t</i>	1.53, <i>dd</i> , (12.9, 10.1), $\alpha$ 2.09, <i>dd</i> , (12.9, 4.7), $\beta$
10	50.0	<i>s</i>	
11	140.0	<i>s</i>	
12	168.4	<i>s</i>	
12-OCH <sub>3</sub>	52.4	<i>q</i>	3.77, <i>s</i>
13	129.5	<i>t</i>	6.29, <i>d</i> , (1.3) 5.71, <i>d</i> , (1.3)
14	23.8	<i>q</i>	1.36, <i>s</i>
15	20.8	<i>q</i>	2.05, <i>br s</i>
16	172.2	<i>s</i>	
17	21.1	<i>q</i>	1.95, <i>s</i>



化合物 **24** は無色な非晶質粉末として得られ、HR-ESI-MS より分子式を  $C_{18}H_{24}O_6$  に決定し、7 つの不飽和度が示唆された。

$^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、 $\delta_C$  216.1, 168.4 と 172.2 ppm にカルボニル基に由来するシグナルが 3 本、 $\delta_C$  131.3, 134.9, 140.0 と 129.5 ppm に二重結合に由来するピークが 4 本観測された。残りの不飽和度を考慮し、化合物 **24** は 2 つの環を有していると推測した。さらに、 $\delta_C$  129.5 ppm の二重結合に由来する 2 級炭素など特徴的な  $^{13}C$  NMR シグナルが見られ、今まで単離された化合物 **22**, **23** と比較した結果、類似する骨格を有する事が明らかとなった。また、 $\delta_C$  172.2 ppm のカルボニル基と  $\delta_C$  21.1 ppm のメチル基が観測され、酢酸側鎖の存在を推測した。最後に、 $\delta_C$  52.4 ppm のメキシ基の存在や二環性骨格の情報を考慮し、化合物 **24** は酢酸側鎖を持ち、ラクトン環が開環した  $\psi$ -santonin 系類縁体であると推測した。

化合物 **24** の平面構造を検証するために、2D NMR スペクトル分析を行った (Fig. 47)。HMBC スペクトルにおいて、メキシ基水素 ( $\delta_H$  3.77, s) から 12 位カルボニル基炭素の相関が観測され、開環したラクトン環構造を立証した。また、酢酸側鎖の結合部位を示唆する 8 位水素から 16 位炭素の HMBC 相関は観測できなかったが、8 位水素 ( $\delta_H$  5.44, ddd,  $J = 11.1, 10.1, 4.7$  Hz) の化学シフトが低磁場シフトしていることから結合位置を決定した。また、COSY スペクトルにおいても、6 位水素 ( $\delta_H$  4.90) から 9 位水素 ( $\delta_H$  1.53, dd,  $J = 12.9, 11.1$  Hz;  $\delta_H$  2.09, dd,  $J = 12.9, 4.7$  Hz) の連続した相関が観測され、化合物 **24** の平面構造を Fig. 46 のように決定した。

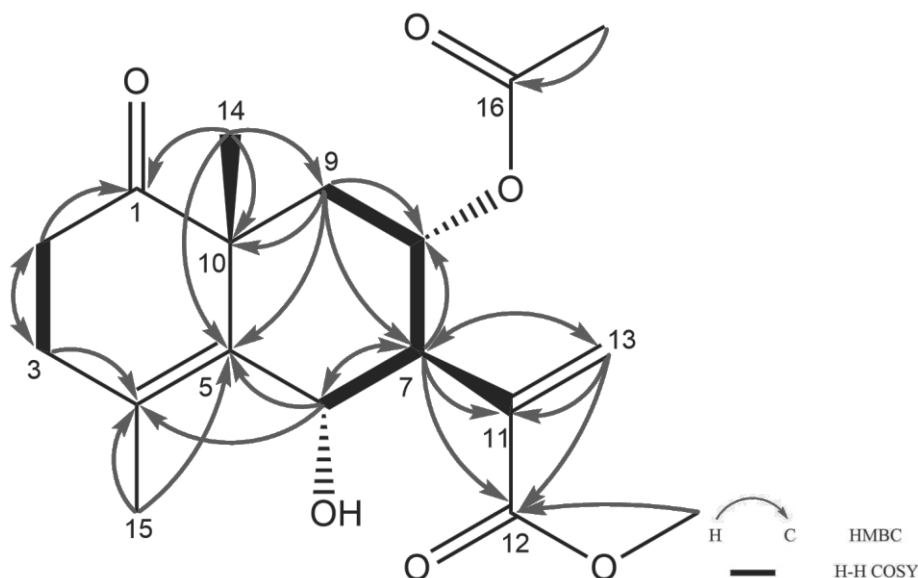


Fig. 47 Key COSY and HMBC correlations of Compound **24**

化合物 **24** の相対立体配置はカップリング定数と NOESY スペクトルにより決定された (Fig. 48)。具体的には、6 位水素と 7 位水素 ( $\delta_H$  2.64, t,  $J = 10.1$  Hz) において 10.1 Hz の大きなカップリング定数が観測され、化合物 **22**, **23** と異なる立体を示唆していた。また、NOESY スペクトルにおいても、6 位水素から 14 位水素と 8 位水素の相関、8 位水素から 9 $\beta$  位水素と 14 位水素の相関、7 位水素と 9 $\alpha$  位水素の相関が見られ、Fig. 46 のような相対立体配置に決定した。

化合物 **24** の絶対立体配置を決定するために octant 則 (Fig. 49) を応用した解析と ECD 計算 (Fig. 50) を行った。化合物 **24** の A 環のカルボニル基を中心に配置し、Fig. 49 のように投影図を作成し、ECD スペクトルの 300 nm 付近に表れるカルボニル基の  $n \rightarrow \pi^*$  遷移に由来するコットン効果を octant 則で予想した。その結果、B 環を含め、多くの骨格が後方 octant のマイナス域に配置されており、300 nm のネガティブのコットン効果が予想できる。化合物 **24** の計算 ECD または実測 ECD スペクトルを測定した結果も、300 nm 付近のネガティブのコットン効果が確認され、化合物 **24** の絶対立体配置を 6S, 7S, 8S, 10R に決定した。

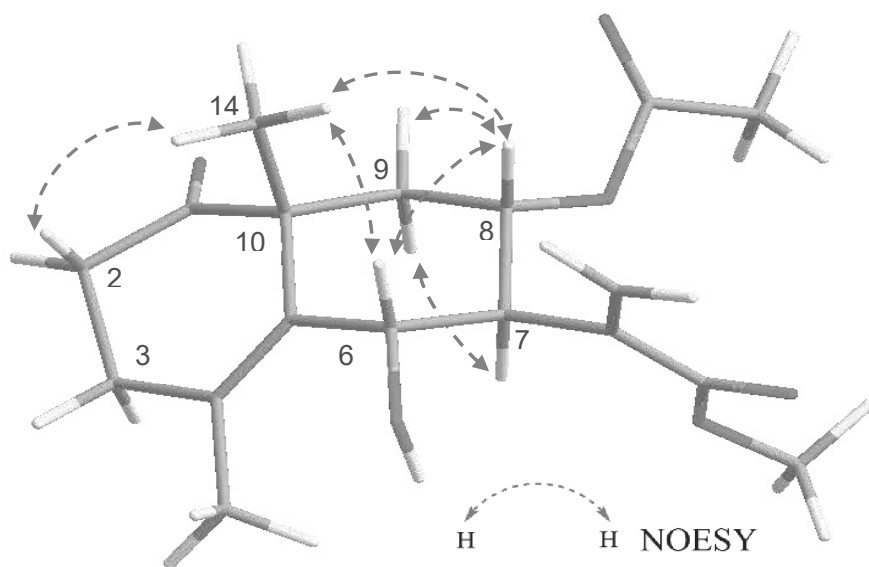


Fig. 48 Key PS-NOESY correlations of Compound 24

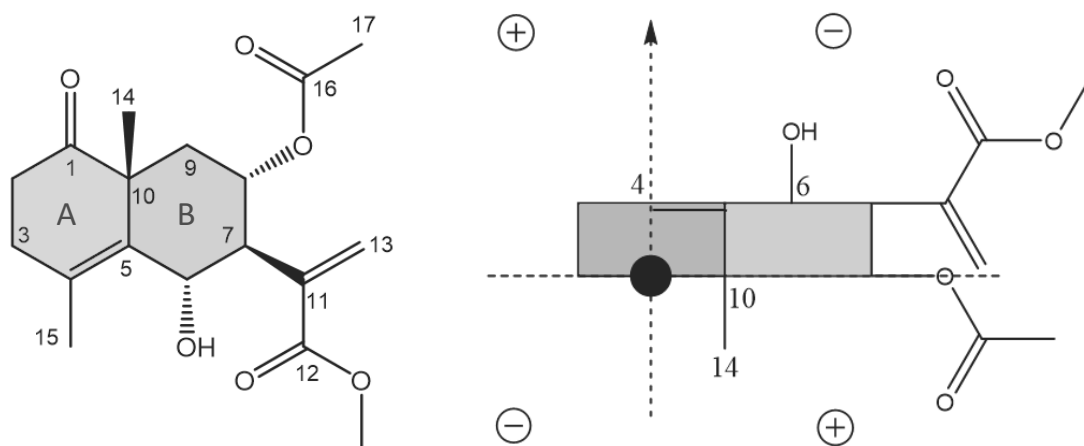


Fig. 49 Application of rear octant rule to Compound 24

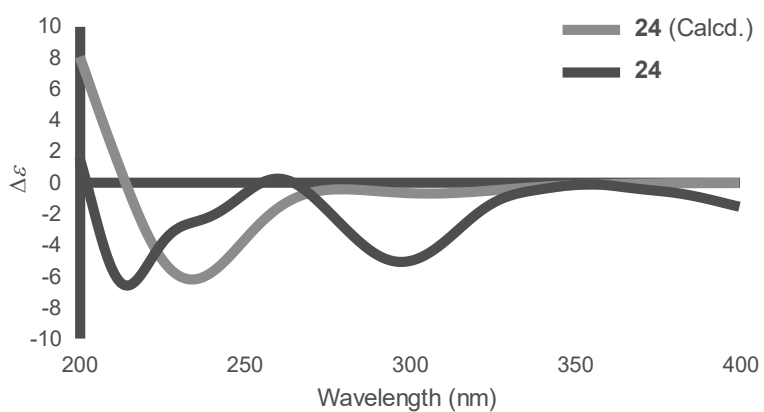
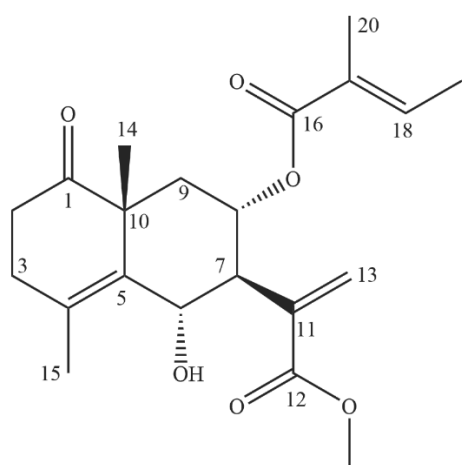


Fig. 50 Experimental and calculated ECD spectrum of Compound 24

第四項 新規化合物 25 の化学構造



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 399.1782  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{21}H_{28}O_6Na$ : 399.1778  
 $[\alpha]_D^{25}$  -24.1 (MeOH,  $c = 0.34$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3014, 2928, 1711, 1650, 1441, 1258, 1143  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 210 sh (4.20)

Fig. 51 Structure and physical data of Compound 25

Table 25 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	216.0	<i>s</i>	
2	36.7	<i>t</i>	2.43, <i>m</i> , $\alpha$ 2.64, <i>ddd</i> , (12.8, 6.3, 5.5), $\beta$
3	34.4	<i>t</i>	2.35, <i>m</i> , $\alpha$ 2.51, <i>m</i> , $\beta$
4	131.2	<i>s</i>	
5	135.0	<i>s</i>	
6	71.5	<i>d</i>	4.90, <i>br d</i> , (10.1)
7	57.9	<i>d</i>	2.72, <i>t</i> , (10.1)
8	71.8	<i>d</i>	5.44, <i>ddd</i> , (11.0, 10.1, 4.6)
9	39.9	<i>t</i>	1.51, <i>dd</i> , (12.7, 10.1), $\alpha$ 2.15, <i>dd</i> , (12.7, 4.6), $\beta$
10	49.8	<i>s</i>	
11	140.1	<i>s</i>	
12	168.5	<i>s</i>	
12-OCH <sub>3</sub>	52.4	<i>q</i>	3.75, <i>s</i>
13	129.3	<i>t</i>	6.26, <i>d</i> , (1.1) 5.70, <i>d</i> , (1.1)
14	23.9	<i>q</i>	1.40, <i>s</i>
15	20.9	<i>q</i>	2.0, <i>br s</i>
16	168.8	<i>s</i>	
17	129.8	<i>s</i>	
18	138.9	<i>d</i>	6.77, <i>qq</i> , (1.3, 7.1)
19	14.5	<i>q</i>	1.77, <i>dq</i> , (7.1, 1.1)
20	12.2	<i>q</i>	1.75, <i>dq</i> , (1.3, 1.1)

化合物 **25** の分子式は HR-ESI-MS より、 $C_{21}H_{28}O_6$  に決定し、8 つの不飽和度が示唆された。 $^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、 $\delta_C$  216.0, 168.8 と 168.5 ppm にカルボニル基に由来するシグナル 3 本と  $\delta_C$  129.3, 129.8, 131.2, 135.0, 138.9 と 140.1 ppm に 3 つの二重結合に由来するピーク 6 本が観測された。また、化合物 **24** と類似する  $\delta_C$  129.3 ppm に二重結合に由来する 2 級炭素や  $\delta_C$  52.4 ppm のメキシ基炭素シグナルが見られ、同様な骨格を有する事が明らかになった。さらに、 $\delta_C$  168.8, 129.8, 138.9, 14.5 と 12.2 ppm に特徴的な tiglic acid のシグナルが観測されたことから、化合物 **25** は化合物 **24** の酢酸側鎖を tiglic acid に置換されたものと推測した。化合物 **25** の化学構造を検証するために、2D NMR スペクトル解析 (Fig. 52) を行った。特に HMBC スペクトルは 500 MHz と 700 MHz (Cryoprobe) の NMR 装置を用いて測定を行った。700 MHz の HMBC スペクトルにおいて、今まで観測されなかった 8 位水素 ( $\delta_H$  5.44, ddd,  $J = 11.0, 10.1, 4.6$  Hz) から 16 位炭素 ( $\delta_C$  168.8 ppm) の相関が確認され、tiglic acid 部分の結合位置を裏付ける結果となった。

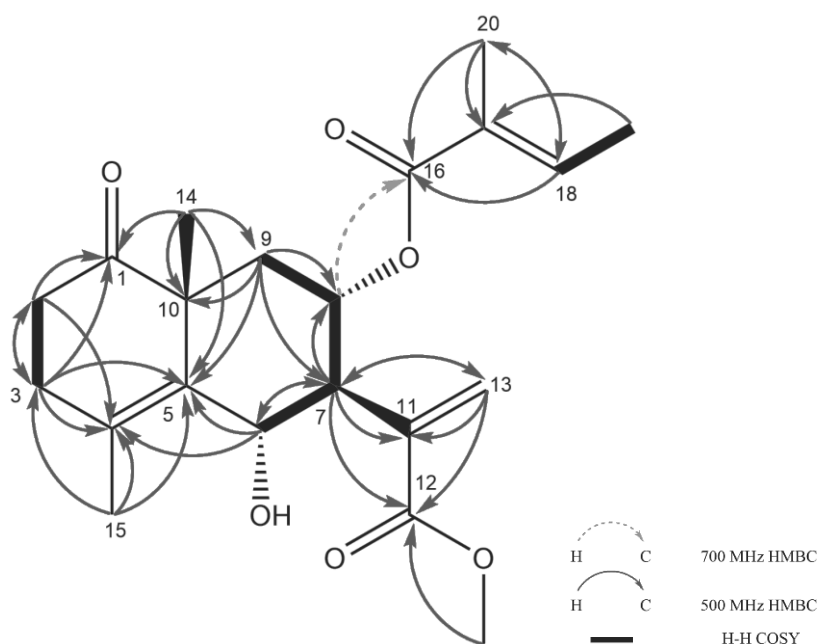


Fig. 52 Key COSY and HMBC correlations of Compound **25**

化合物 **25** の相対立体配置はカップリング定数および NOESY 分析により、決定された (Fig. 53)。NOESY スペクトルにおいて、6 位水素 ( $\delta_H$  4.90, br d,  $J = 10.1$  Hz) から 14 位水素 ( $\delta_H$  1.40, s) と 8 位水素の相関、8 位水素から 9 $\beta$  位水素 ( $\delta_H$  2.15, dd,  $J = 12.7, 4.6$  Hz) と 14 位メチル水素の相関、または 7 位水素 ( $\delta_H$  2.72, t,  $J = 10.1$  Hz) と 9 $\alpha$  位水素 ( $\delta_H$  1.51, dd,  $J = 12.7, 10.1$  Hz) の相関が観測され、化合物 **24** と同様な相対立体配置であった。

最後に、ECD 計算を行い (Fig. 54)、220 nm と 300 nm のコットン効果がよく一致しており、化合物 **25** の絶対立体配置を 6S, 7S, 8S, 10R に決定した。

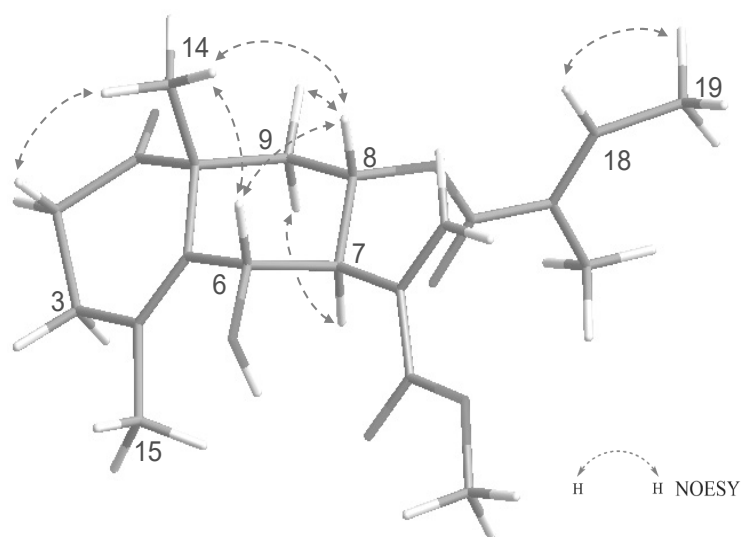


Fig. 53 Key PS-NOESY correlations of Compound **25**

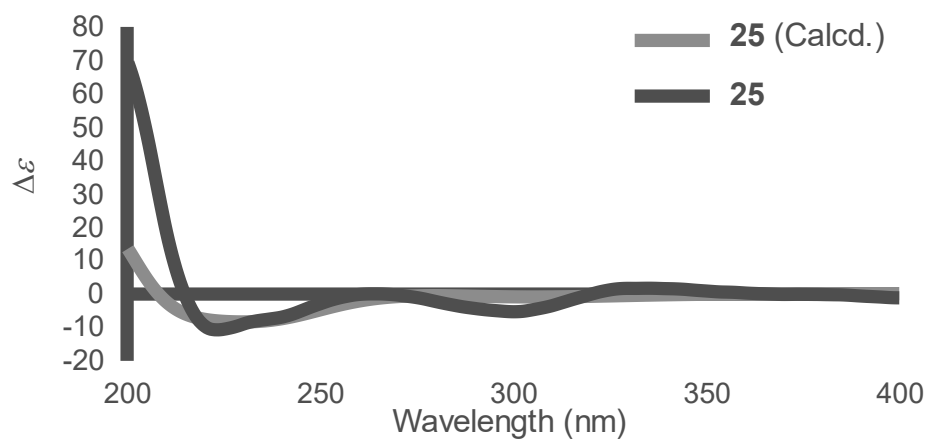
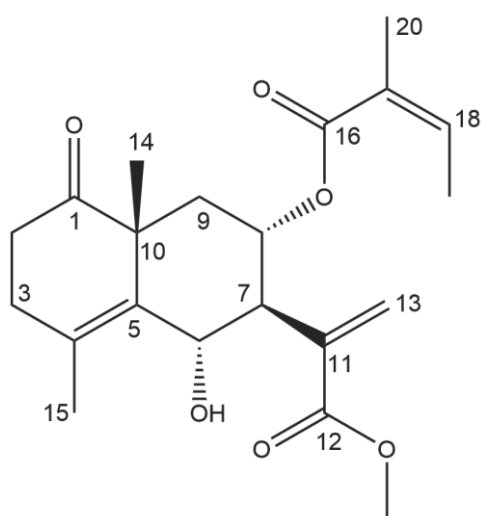


Fig. 54 Experimental and calculated ECD spectrum of Compound **25**



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 399.1778  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{21}H_{28}O_6Na$ : 399.1778  
 $[\alpha]_D^{25}$  -5.3 (MeOH,  $c = 0.15$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3022, 2929, 1714, 1658, 1446, 1160  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 213 sh (3.87); 192 (4.35)

Fig. 55 Structure and physical data of Compound 26

Table 26  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	216.0	<i>s</i>	
2	36.7	<i>t</i>	2.43, <i>ddd</i> , (13.4, 7.1, 6.1), $\alpha$ 2.65, <i>ddd</i> , (13.4, 8.0, 6.1), $\beta$
3	34.4	<i>t</i>	2.34, <i>br dd</i> , (13.1, 8.0), $\alpha$ 2.45, <i>br d</i> , (13.1), $\beta$
4	131.3	<i>s</i>	
5	135.0	<i>s</i>	
6	71.6	<i>d</i>	4.90, overlapped
7	58.1	<i>d</i>	2.69, <i>t</i> , (10.2)
8	71.4	<i>d</i>	5.49, <i>ddd</i> , (11.1, 10.2, 4.7)
9	40.0	<i>t</i>	1.52, <i>dd</i> , (12.7, 10.2), $\alpha$ 2.13, <i>dd</i> , (12.7, 4.5), $\beta$
10	49.8	<i>s</i>	
11	140.1	<i>s</i>	
12	168.4	<i>s</i>	
12-OCH <sub>3</sub>	52.4	<i>q</i>	3.74, <i>s</i>
13	129.5	<i>t</i>	6.27, <i>d</i> , (1.1) 5.69, <i>d</i> , (1.1)
14	23.9	<i>q</i>	1.36, <i>s</i>
15	20.9	<i>q</i>	2.03, <i>br s</i>
16	168.8	<i>s</i>	
17	129.3	<i>s</i>	
18	138.8	<i>d</i>	6.04, <i>qq</i> , (1.6, 7.2)
19	16.1	<i>q</i>	1.88, <i>dq</i> , (7.2, 1.6)
20	20.8	<i>q</i>	1.78, <i>dq</i> , (1.6, 1.6)

化合物 **26** の分子式は HR-ESI-MS より、 $C_{21}H_{28}O_6$  に決定し、化合物 **25** と同様であった。

$^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、168.8, 129.3, 138.8, 16.1 と 20.8 ppm に tiglic acid とは異なるシグナル群が観測され、文献を検索したところ、angelic acid である事が判明した。この事から、化合物 **26** は化合物 **25** の tiglic acid 部分が angelic acid に置換されたものであると推測した。

続いて、HMBC および COSY スペクトル (Fig. 56) による平面構造の確認、NOESY スペクトル (Fig. 57) から相対立体配置、ECD スペクトル (Fig. 58) から絶対立体配置の決定を行った。その結果、化合物 **26** の構造を Fig. 55 のように決定した。

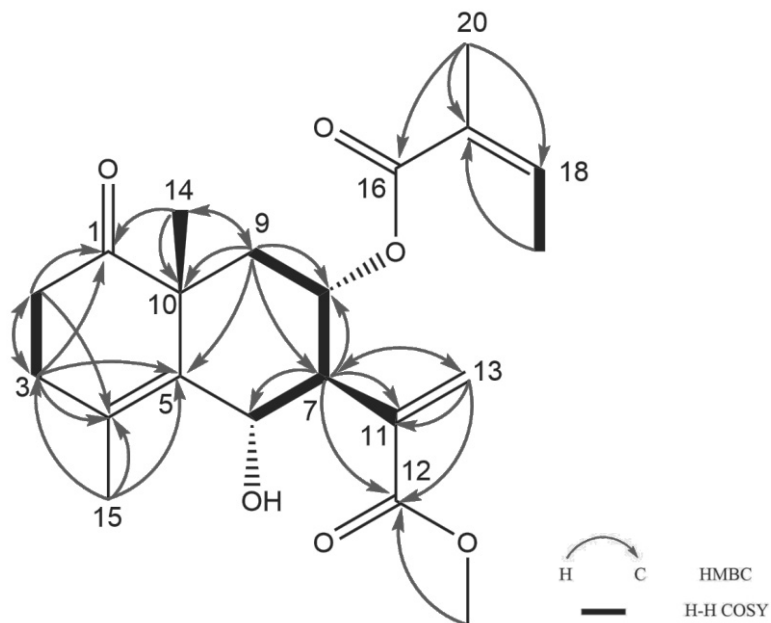


Fig. 56 Key COSY and HMBC correlations of Compound **26**

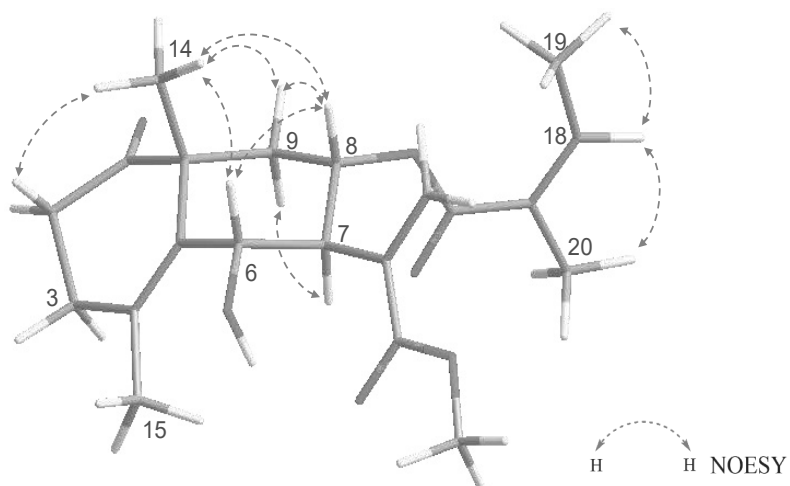


Fig. 57 Key PS-NOESY correlations of Compound **26**

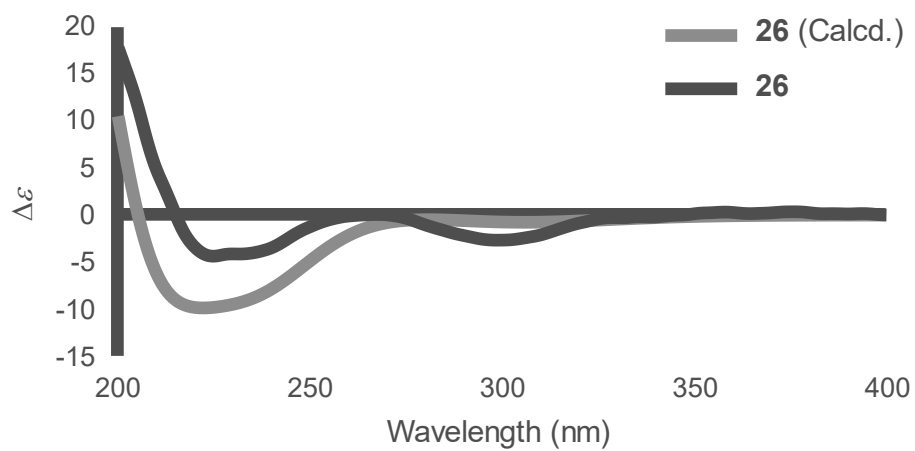


Fig. 58 Experimental and calculated ECD spectrum of Compound **26**



第六項 新規化合物 27 の化学構造

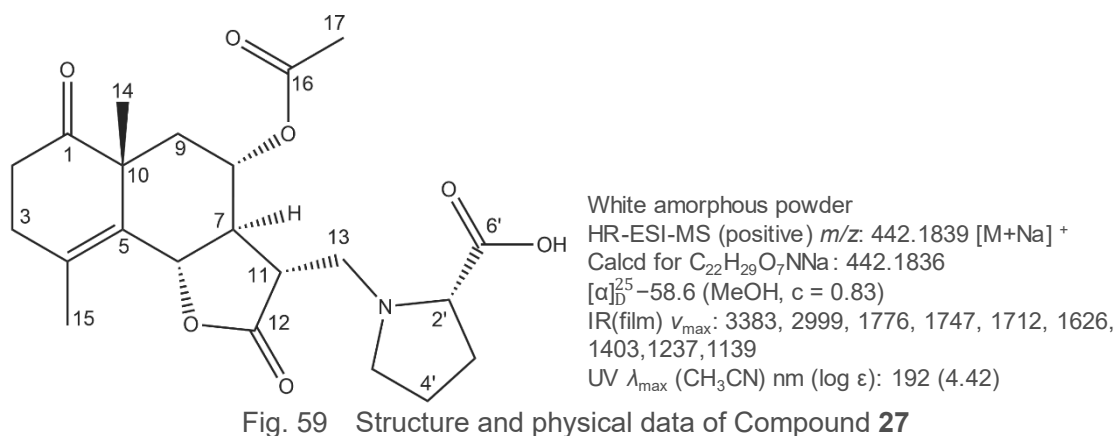


Fig. 59 Structure and physical data of Compound 27

Table 27  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	211.7	<i>s</i>	
2	34.9	<i>t</i>	2.35-2.44, <i>m</i> , $\alpha$ 2.67, <i>m</i> , $\beta$
3	32.5	<i>t</i>	2.35-2.44, <i>m</i>
4	126.6	<i>s</i>	
5	127.9	<i>s</i>	
6	77.5	<i>d</i>	4.97, <i>dq</i> , (11.2, 1.3)
7	49.9	<i>d</i>	2.42, <i>t</i> , (11.2)
8	70.4	<i>d</i>	5.12, <i>td</i> , (11.2, 4.4)
9	40.0	<i>t</i>	1.38, <i>dd</i> , (12.9, 11.2), $\alpha$ 1.99, <i>dd</i> , (12.9, 4.4), $\beta$
10	46.9	<i>s</i>	
11	44.0	<i>d</i>	2.95, <i>ddd</i> , (11.2, 5.9, 3.3)
12	176.7	<i>s</i>	
13	53.8	<i>t</i>	2.64, <i>m</i> 3.05, <i>m</i>
14	24.4	<i>q</i>	1.31, <i>s</i>
15	19.2	<i>q</i>	1.89, <i>s</i>
16	169.9	<i>s</i>	
17	20.9	<i>q</i>	2.02, <i>s</i>
2'	66.9	<i>d</i>	3.38, <i>dd</i> , (9.1, 3.8)
3'	29.2	<i>t</i>	1.83, <i>m</i> 2.05, <i>m</i>
4'	23.7	<i>t</i>	1.70, <i>m</i> 1.77, <i>m</i>
5'	51.7	<i>t</i>	3.02, <i>m</i>
6'	174.1	<i>s</i>	

化合物 **27** は無色の非晶質粉末として精製され、HR-ESI-MS より、分子式を  $C_{22}H_{29}O_7N$  に決定し、9 つの不飽和度が示唆された。また、窒素原子が含まれている可能性があることから、Dragendorff's 試薬による呈色反応を行った。TLC を展開し、試薬を噴霧したところ橙黄色のスポットが観測されたことから、化合物 **27** に窒素が存在することが明らかになった。

$^{13}C$  NMR スペクトル (Table 27) において、 $\delta_c$  211.7, 176.7, 174.1 と 169.9 ppm にカルボニル基由来するシグナルが 4 本、 $\delta_c$  126.6 と 127.9 ppm に二重結合に由来する低磁場ピーク 2 本が観測された。このことから、残りの 4 つの不飽和度が全て環状骨格に由来するものと推測した。さらに、 $^{13}C$  NMR から 5 本のメチン炭素シグナル ( $\delta_c$  77.5, 70.4, 66.9, 49.9 と 44.0 ppm)、3 本のメチル基シグナル ( $\delta_c$  24.4, 20.9 と 19.2 ppm) が観測され、EtOAc 可溶画分から単離された化合物 **2** と類似するスペクトルデータであった。また、proline 部分の特徴的なシグナル ( $\delta_c$  174.1, 66.9, 29.2, 23.7 と 51.7 ppm) と酢酸側鎖を示唆するピーク ( $\delta_c$  169.9 と 20.9 ppm) が見られ、化合物 **27** は化合物 **2** の 8 位水酸基が酢酸とエステル結合したものと推測した。

HMBC スペクトルから、13 位水素 ( $\delta_H$  2.64, m;  $\delta_H$  3.05, m) から 2' 位炭素 ( $\delta_c$  66.9 ppm)、11 位炭素 ( $\delta_c$  44.0 ppm) と 12 位炭素 ( $\delta_c$  176.7 ppm) の相関、5' 位水素 ( $\delta_H$  3.02, m) から 13 位炭素 ( $\delta_c$  53.8 ppm) と 3' 位炭素 ( $\delta_c$  29.2 ppm) の相関が観測され、proline 部分の結合位置は化合物 **2** と同様であることが明らかになった。さらに、8 位水素 ( $\delta_H$  5.12, td,  $J = 11.2, 4.4$  Hz) から 16 位炭素の HMBC 相関が見られ、酢酸側鎖は 8 位に結合している事が示唆された (Fig. 60)。

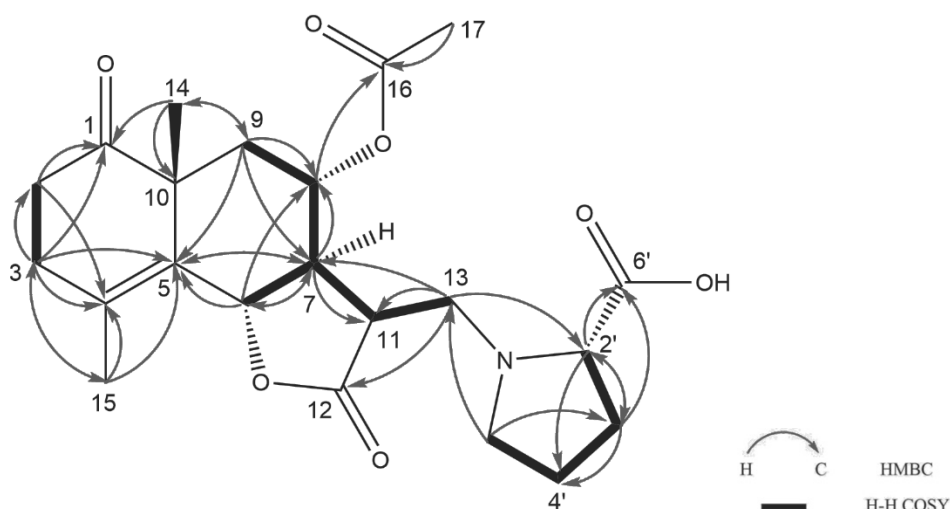


Fig. 60 Key COSY and HMBC correlations of Compound **27**

化合物 **27** の立体配置を決定するために、NOESY (Fig. 61) と ECD スペクトル (Fig. 62) の分析や加水分解反応を行った。まず、化合物 **27** を 1% HCl 溶液で加水分解し、遊離された proline を旋光度検出器付きの HPLC で分析し、ネガティブのシグナルが観測されたことから L-proline であることが判明した。一方で、NOESY スペクトルにおいて、14 位水素 ( $\delta_H$  1.31, s) から 6 位水素 ( $\delta_H$  4.97, dq,  $J = 11.2, 1.3$  Hz) と 8 位水素の相関、6 位水素から 8 位水素と 11 位水素 ( $\delta_H$  2.95, ddd,  $J = 11.2, 5.9, 3.3$  Hz) の相関、8 位水素から 9 $\beta$  位と 11 位水素の相関、7 位水素から 9 $\alpha$  位水素の相関が観測され、化合物 **2** と同様な相対立体配置を有することが示唆された。最後に、化合物 **27** の ECD スペクトルを測定し、化合物 **2** と比較した結果、類似するコットン効果が見られ、化合物 **27** の絶対立体配置を 6*S*, 7*S*, 10*R*, 11*R*, 2'*S* に決定した。

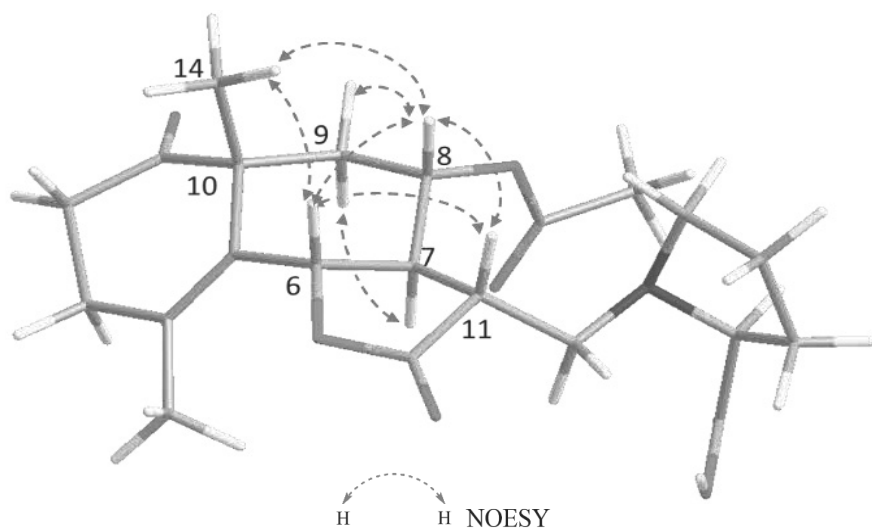


Fig. 61 Key PS-NOESY correlations of Compound **27**

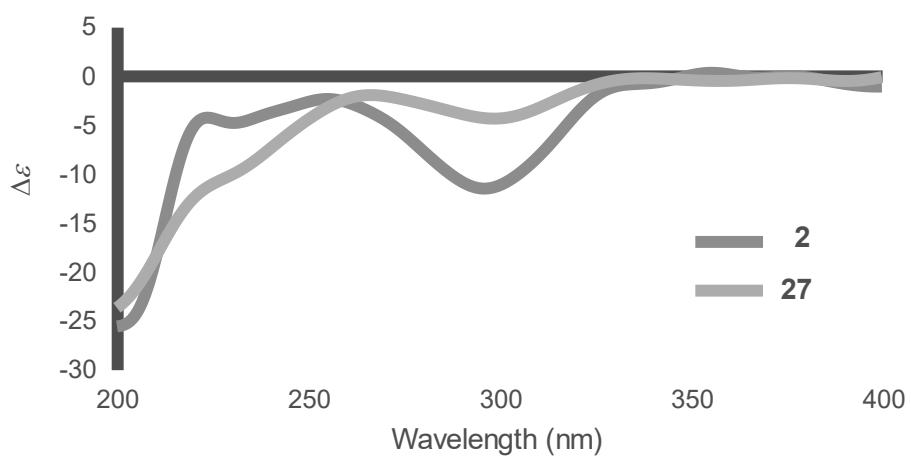
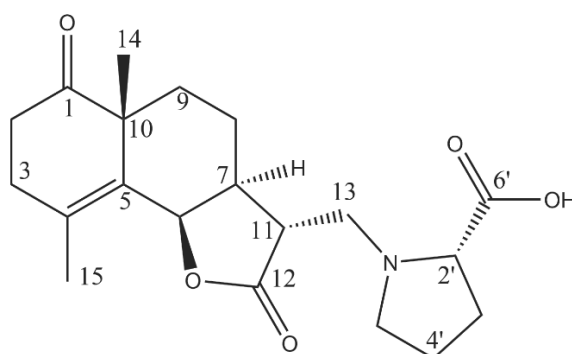


Fig. 62 Experimental ECD spectra of Compound **2** and **27** in  $\text{CH}_3\text{CN}$

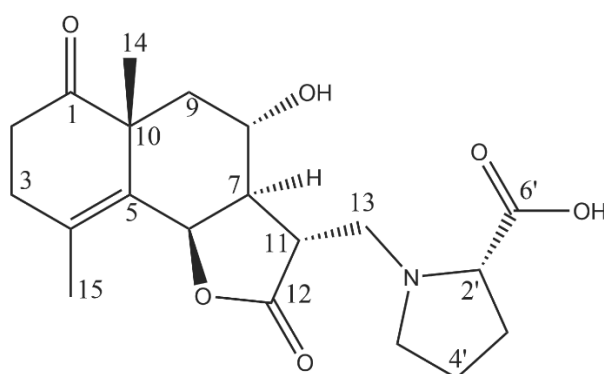


White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 384.1780  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{27}O_5NNa$ : 384.1781  
 $[\alpha]_D^{25}$  -56.1 (MeOH,  $c = 0.83$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3383, 2929, 1760, 1706, 1639,  
 1406, 1178  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 192 (4.23)

Fig. 63 Structure and physical data of Compound 28

Table 28  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	213.6	s	
2	34.9	t	2.27-2.35, m, $\alpha$ 2.57-2.66, m, $\beta$
3	30.0	t	2.27-2.35, m, $\alpha$ 2.57-2.66, m, $\beta$
4	127.2	s	
5	139.1	s	
6	76.9	d	5.56, d, (5.6)
7	49.2	d	2.47, dd-like, (8.8, 5.6)
8	22.8	t	1.35, m, $\alpha$ 1.56, m, $\beta$
9	30.4	t	1.47-1.55, m
10	45.3	s	
11	38.5	d	2.43, br t, (6.6)
12	177.9	s	
13	53.3	t	2.98, dd, (12.9, 6.6) 3.08, dd, (12.9, 6.6)
14	23.9	q	1.12, s
15	19.2	q	1.87, s
2'	66.1	d	3.30, dd, (8.9, 4.5)
3'	29.0	t	1.82, m 2.06, m
4'	22.5	t	1.74, m
5'	53.7	t	2.57-2.66, m 3.13, ddd, (11.0, 7.4, 3.4)
6'	174.3	s	



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 378.1912 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>N: 378.1911  
 $[\alpha]_D^{25}$  -131.3 (MeOH, c = 0.45)  
 IR(film)  $\nu_{\max}$ : 3383, 2957, 1760, 1706, 1628,  
 1446, 1196  
 UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>CN) nm (log  $\epsilon$ ): 192 (4.31)

Fig. 64 Structure and physical data of Compound 29

Table 29 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	213.1	<i>s</i>	
2	34.6	<i>t</i>	2.27-2.36, <i>m</i> , $\alpha$ 2.57-2.62, <i>m</i> , $\beta$
3	29.7	<i>t</i>	2.27-2.36, <i>m</i> , $\alpha$ 2.57-2.62, <i>m</i> , $\beta$
4	126.8	<i>s</i>	
5	138.7	<i>s</i>	
6	78.2	<i>d</i>	5.67, <i>d</i> , (5.8)
7	47.6	<i>d</i>	2.15, <i>dd</i> , (8.9, 5.8)
8	65.2	<i>d</i>	3.54, <i>ddd</i> , (10.8, 8.9, 3.3)
9	39.4	<i>t</i>	1.46, <i>dd</i> , (13.2, 10.8), $\alpha$ 1.75, <i>m</i> , $\beta$
10	45.8	<i>s</i>	
11	46.5	<i>d</i>	2.79, <i>br t</i> , (6.4)
12	177.9	<i>s</i>	
13	53.3	<i>t</i>	3.08, <i>dd</i> , (12.7, 6.4) 3.02, <i>dd</i> , (12.7, 6.4)
14	24.6	<i>q</i>	1.12, <i>s</i>
15	19.4	<i>q</i>	1.86, <i>s</i>
2'	66.1	<i>d</i>	3.35, <i>dd</i> , (8.7, 4.4)
3'	28.6	<i>t</i>	1.76, <i>m</i> 2.03, <i>m</i>
4'	23.4	<i>t</i>	1.74, <i>m</i>
5'	52.5	<i>t</i>	2.57-2.62, <i>m</i> 3.06, <i>m</i>
6'	174.3	<i>s</i>	

化合物 **28** は無色な非晶質粉末として得られ、HR-ESI-MS より、分子式を化合物 **1** と同じ  $C_{20}H_{27}O_5N$  に決定した。

$^{13}C$  NMR スペクトルにおいて (Table 28)、 $\delta_C$  213.6, 177.9 と 174.3 ppm にカルボニル基由来するシグナルが 3 本、 $\delta_C$  127.2 と 139.1 ppm に二重結合に由来する 4 級炭素シグナルが 2 本、 $\delta_C$  23.9 と 19.2 ppm にメチル基と考えられるピークが 2 本観測され、化合物 **1** と同様な骨格を有することが明らかとなった。両者の NMR データを比較し、化合物 **1** の二重結合シグナル ( $\delta_C$  125.2 と 130.0 ppm) や 6 位水素 ( $\delta_H$  4.80, d-quint,  $J = 11.8, 1.3$  Hz) と化合物 **28** の二重結合 ( $\delta_C$  126.8 と 138.7 ppm) や 6 位水素 ( $\delta_H$  5.67, d,  $J = 5.8$  Hz) において、異なる化学シフトとカップリング定数が観測された。このことから、化合物 **28** は化合物 **1** の 6 位の立体が反転したものであると推測した。

この推定構造を検証するために、COSY や HMBC スペクトル解析を行い (Fig. 65)、いずれにおいてもこの平面構造を支持する相関が観測された。さらに、立体配置を決定するために、NOESY と ECD スペクトル解析を行った。NOESY スペクトルにおいて (Fig. 66)、6 位水素 ( $\delta_H$  5.56, d,  $J = 5.6$  Hz) から 15 位水素 ( $\delta_H$  1.87, s)、7 位水素 ( $\delta_H$  2.47, dd-like,  $J = 8.8, 5.6$  Hz) と 13 位水素 ( $\delta_H$  2.98, dd,  $J = 12.9, 6.6$  Hz; 3.08, dd,  $J = 12.9, 6.6$  Hz) の相関、7 位水素から  $9\alpha$  位水素の相関、 $8\beta$  位水素 ( $\delta_H$  1.56, m) から 14 位メチル基水素 ( $\delta_H$  1.12, s)、 $9\beta$  位と 11 位水素 ( $\delta_H$  2.43, br t,  $J = 6.6$  Hz) の相関が観測され、6 位の立体が反転していることが示された。ECD スペクトルでは (Fig. 67)、300 nm 付近のカルボニル基の  $n \rightarrow \pi^*$  遷移に由来するコットン効果が見られ、10 位の立体は *R* であることが示唆された。また、今まで単離された化合物 **1**, **2**, **27** の ECD スペクトルと比較した結果、 $6S$  を持つ化合物 **1**, **2**, **27** は 230 nm 付近にネガティブのコットン効果が観測されることに対して、 $6R$  を持つ化合物 **28** はポジティブなコットン効果が見られたことから、化合物 **28** の絶対立体配置を  $6R, 7S, 10R, 11R, 2'S$  に決定した。

化合物 **29** も同様に HR-ESI-MS より、分子式を  $C_{20}H_{27}O_6N$  に決定され、これは化合物 **2** と同じであった。

$^{13}C$  NMR スペクトルにおいて、化合物 **28** と同様のスペクトルデータのズレが観測され、化合物 **2** の 6 位の立体が反転したものであると推測した。

NOESY スペクトル (Fig. 66) では、8 位水素 ( $\delta_H$  3.54, ddd,  $J = 10.8, 8.9, 3.3$  Hz) から  $9\beta$  位水素 ( $\delta_H$  1.75, m)、14 位水素 ( $\delta_H$  1.12, s) と 11 位水素 ( $\delta_H$  2.79, br t,  $J = 6.4$  Hz) の相関、7 位水素 ( $\delta_H$  2.15, dd,  $J = 8.9, 5.8$  Hz) から 6 位水素 ( $\delta_H$  5.67, d,  $J = 5.8$  Hz) と  $9\alpha$  位 ( $\delta_H$  1.46, dd,  $J = 13.2, 10.8$  Hz) の相関が観測され、相対立体配置を Fig. 64 のように決定した。ECD スペクトル (Fig. 67) においては 300 nm のネガティブと 230 nm のポジティブのコットン効果が見られたため、化合物 **29** の絶対立体配置を  $6R, 7R, 10R, 11R, 2'S$  と決定した。

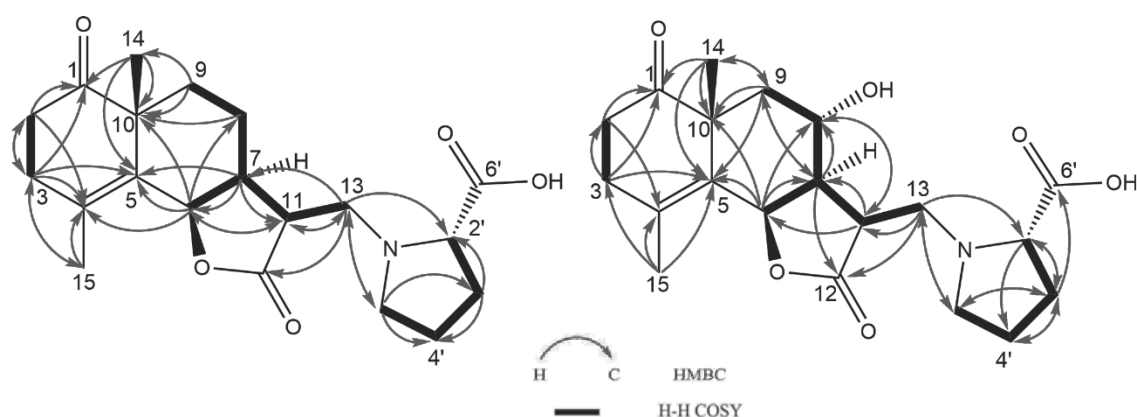


Fig. 65 Key COSY and HMBC correlations of Compounds **28** and **29**

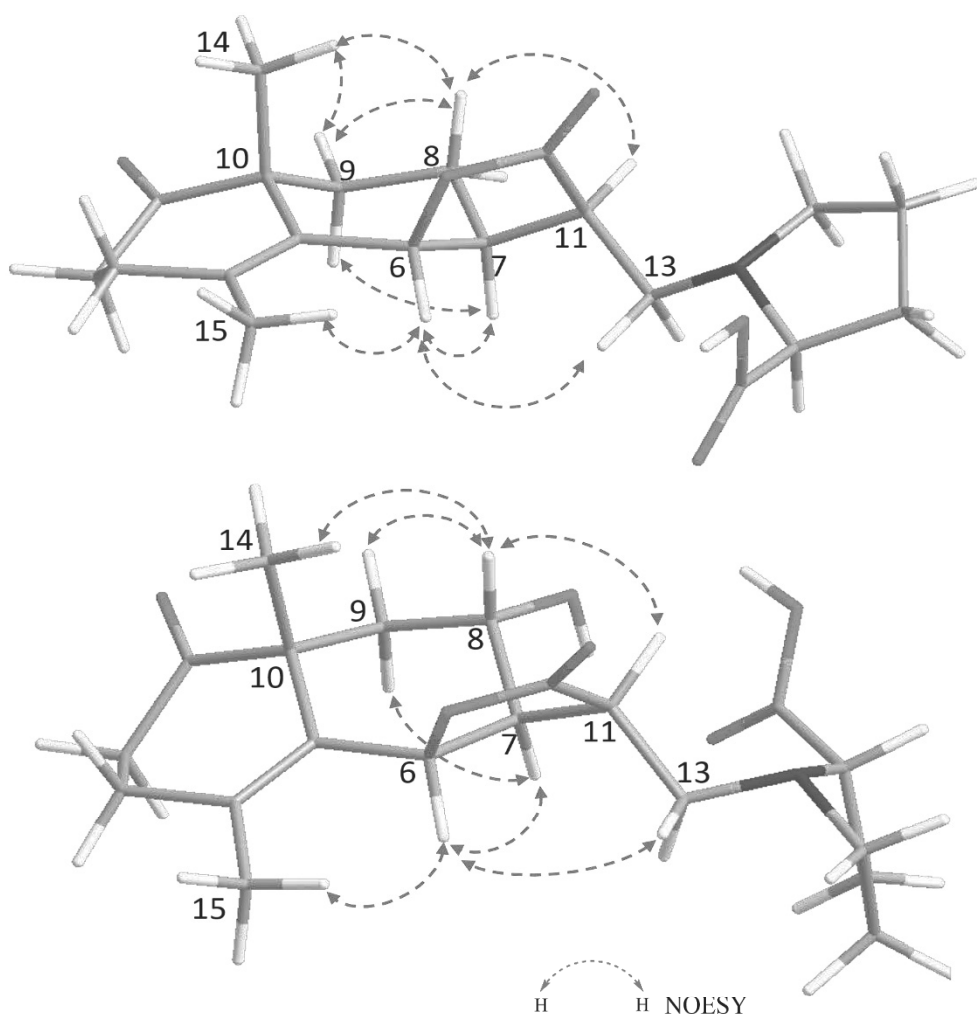


Fig. 66 Key PS-NOESY correlations of Compounds **28** and **29**

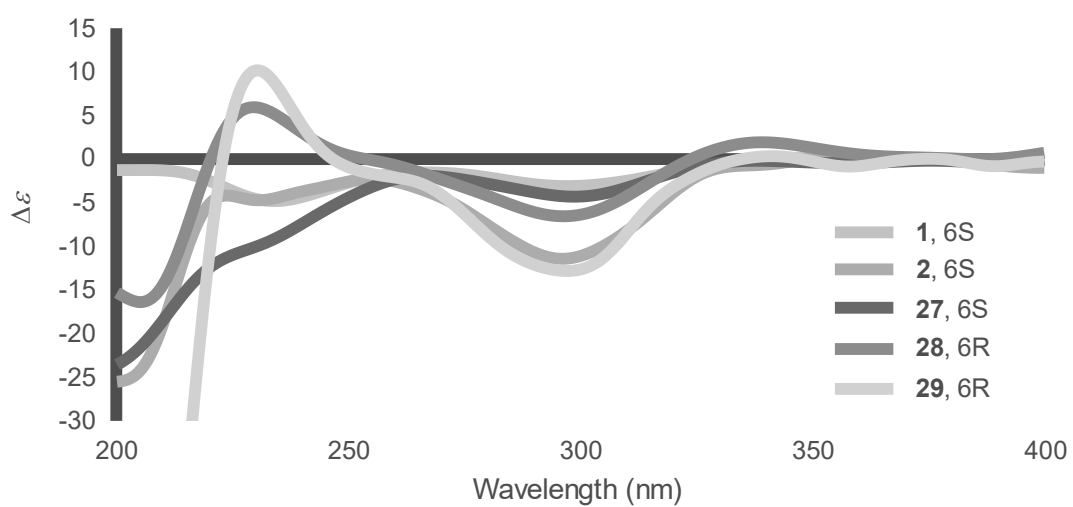


Fig. 67 Experimental ECD spectra of Compound **1-2**, **27-29** in  $\text{CH}_3\text{CN}$

### 第三節 既知化合物について

モクビヤッコウの 1-BuOH 可溶画分から 8 種の既知化合物 (30-37) を得た (Fig. 68)。そのうち、メガスティグマン誘導体 2 種: boscialin 4'-O-glucoside (30) [28] と turpinionoside A (31) [29]。芳香環誘導体 3 種: benzyl glucoside (32) [30], picein (33) [31] と  $\beta$ -adenosine (34) [32]。フラボノイド誘導体 3 種: Apigenin 7-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] (35) [33], Apigenin 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] (36) [15] と Narcissin (37) [12] であった。

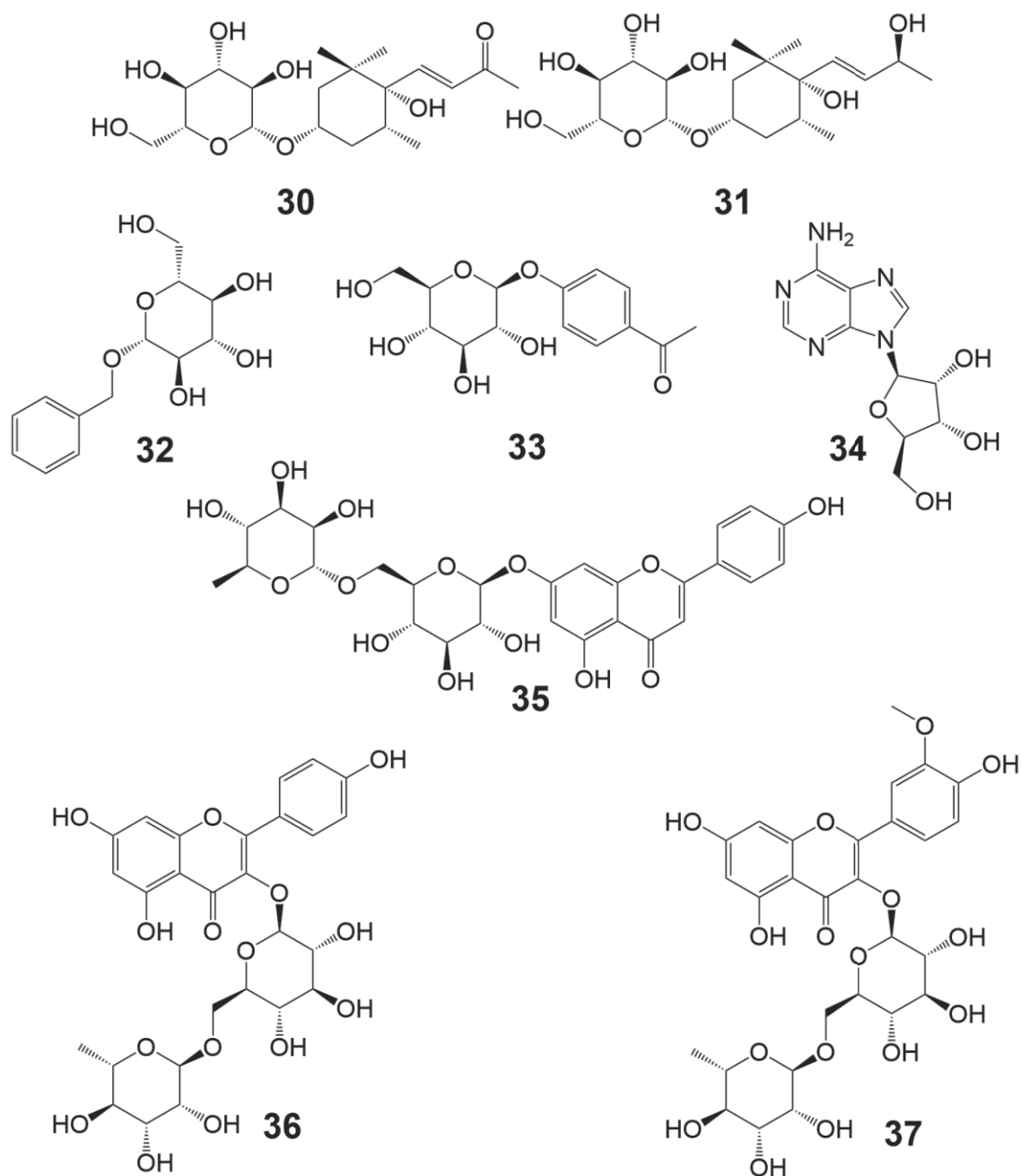
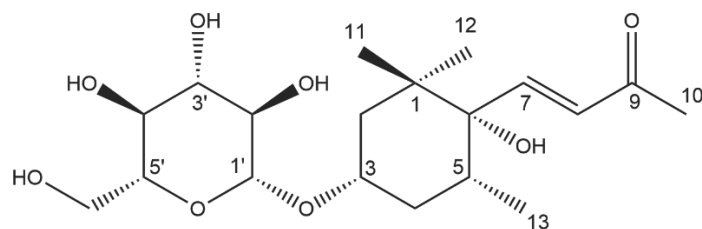


Fig. 68 Known compounds from 1-BuOH layer of *C. chinense*



第一項 既知メガスティグマン誘導体の化学構造

NMR データ (Table 30 and 31) を文献値と比較することにより、化合物 **30** を boscialin 4'-O-glucoside [28]、化合物 **31** を turpinionoside A [29] に同定した。

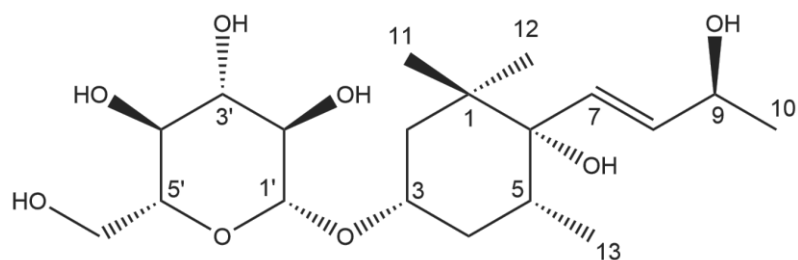


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 411.1991  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{32}O_8Na$ : 411.1989  
 $[\alpha]_D^{25}$  -40 (MeOH,  $c = 0.12$ )

Fig. 69 Structure and physical data of Compound **30**

Table 30  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	41.1	<i>s</i>	
2	42.6	<i>t</i>	1.70, <i>t</i> , (12.7)
3	75.6	<i>d</i>	1.59, <i>ddd</i> , (12.7, 3.8)
4	38.0	<i>t</i>	3.98, <i>m</i>
5	35.5	<i>d</i>	1.88, <i>br d</i> , (12.7)
6	79.2	<i>s</i>	1.50, <i>q</i> , (12.7)
7	154.4	<i>d</i>	2.12, <i>m</i>
8	131.7	<i>d</i>	6.89, <i>d</i> , (16.1)
9	201.0	<i>s</i>	6.34, <i>d</i> , (16.1)
10	27.5	<i>q</i>	2.27, <i>s</i>
11	25.2	<i>q</i>	1.04, <i>s</i>
12	26.1	<i>q</i>	0.87, <i>s</i>
13	16.6	<i>q</i>	0.81, <i>d</i> , (6.3)
1'	102.9	<i>d</i>	4.36, <i>d</i> , (7.4)
2'	75.3	<i>d</i>	3.13, <i>t</i> , (8.8)
3'	78.3	<i>d</i>	} 3.26-3.34, <i>m</i>
4'	71.9	<i>d</i>	
5'	78.1	<i>d</i>	
6'	63.0	<i>t</i>	3.65, <i>dd</i> , (3.9, 12.2)
			3.86, <i>br d</i> , (12.2)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 413.2150  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{34}O_8Na$ : 413.2146  
 $[\alpha]_D^{25} -15.6$  (MeOH,  $c = 0.09$ )

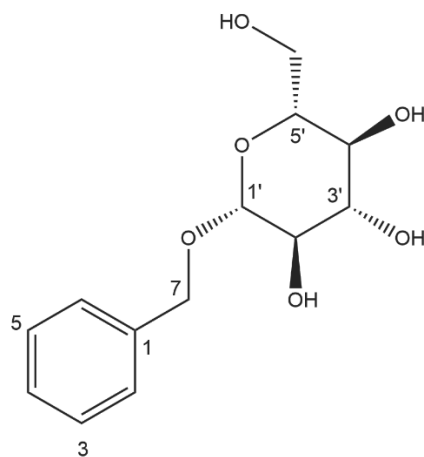
Fig. 70 Structure and physical data of Compound **31**

Table 31  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	40.6	<i>s</i>	
2	42.7	<i>t</i>	1.57, <i>ddd</i> , (12.2, 4.4, 2.0) 1.67, <i>t</i> , (12.2)
3	75.8	<i>d</i>	3.91, <i>m</i>
4	38.3	<i>t</i>	1.49, <i>q</i> -like, (12.9) 1.81, <i>m</i>
5	35.7	<i>d</i>	2.18, <i>dqd</i> , (12.9, 6.7, 2.1)
6	78.4	<i>s</i>	
7	133.9	<i>d</i>	5.54, <i>dd</i> , (15.7, 1.0)
8	135.7	<i>d</i>	5.72, <i>dd</i> , (15.7, 5.7)
9	69.4	<i>d</i>	4.29, <i>dqd</i> , (6.6, 6.4, 1.1)
10	24.3	<i>q</i>	1.24, <i>d</i> , (6.6)
11	26.0	<i>q</i>	0.98, <i>s</i>
12	25.3	<i>q</i>	0.90, <i>s</i>
13	16.6	<i>q</i>	0.81, <i>d</i> , (6.7)
1'	102.8	<i>d</i>	4.35, <i>d</i> , (7.6)
2'	75.3	<i>d</i>	3.13, <i>dd</i> , (9.2, 8.1)
3'	78.2	<i>d</i>	} 3.26-3.36, <i>m</i>
4'	71.9	<i>d</i>	
5'	78.0	<i>d</i>	
6'	63.0	<i>t</i>	3.65, <i>dd</i> , (5.5, 11.2) 3.86, <i>dd</i> , (1.7, 11.5)

第二項 既知芳香環誘導体の化学構造

NMR データ (Table 32-34) を文献値と比較することにより、化合物 **32** を benzyl glucoside [30]、化合物 **33** を picein [31]、化合物 **34** を  $\beta$ -adenosine [32] に同定した。

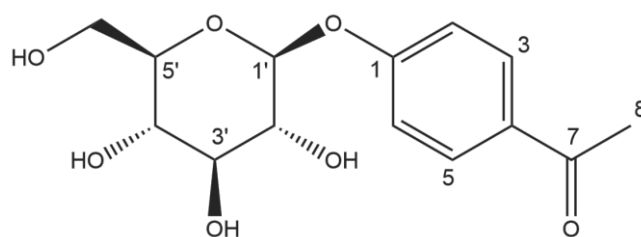


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 293.0995  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{13}H_{18}O_6Na$ : 293.0996

Fig. 71 Structure and physical data of Compound **32**

Table 32  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	139.2	<i>s</i>	
2	129.3	<i>d</i>	} 7.26-7.42, <i>m</i>
3	129.4	<i>d</i>	
4	128.9	<i>d</i>	
5	129.4	<i>d</i>	
6	129.3	<i>d</i>	
7	71.85	<i>t</i>	4.66, <i>d</i> , (11.5) 4.93, <i>d</i> , (11.5)
1'	103.4	<i>d</i>	4.35, <i>d</i> , (7.9)
2'	75.3	<i>d</i>	3.24, <i>t</i> , (7.8)
3'	78.19	<i>d</i>	} 3.27-3.34, <i>m</i>
4'	71.89	<i>d</i>	
5'	78.25	<i>d</i>	
6'	63.0	<i>t</i>	3.68, <i>dd</i> , (5.8, 12.0) 3.89, <i>dd</i> , (2.3, 12.0)

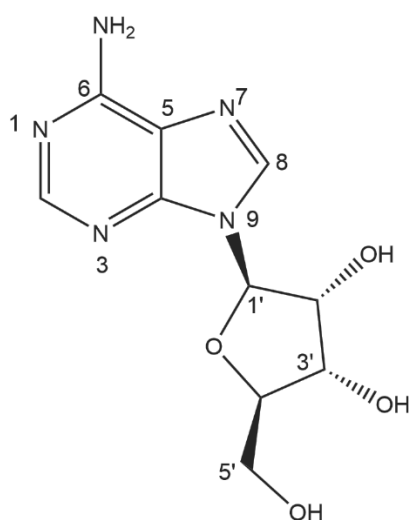


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 321.0944  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{14}H_{18}O_7Na$ : 321.0945

Fig. 72 Structure and physical data of Compound **33**

Table 33  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	131.8	<i>s</i>	
2	131.8	<i>d</i>	8.01, <i>d</i> , (8.7)
3	117.4	<i>d</i>	7.19, <i>d</i> , (8.7)
4	163.2	<i>s</i>	
5	117.4	<i>d</i>	7.19, <i>d</i> , (8.7)
6	131.8	<i>d</i>	8.01, <i>d</i> , (8.7)
7	198.3	<i>s</i>	
8	26.6	<i>q</i>	2.58, <i>s</i>
1'	101.7	<i>d</i>	5.05, <i>d</i> , (8.0)
2'	74.9	<i>d</i>	} 3.37-3.51, <i>m</i>
3'	78.5	<i>d</i>	
4'	71.4	<i>d</i>	
5'	78.1	<i>d</i>	
6'	62.6	<i>t</i>	3.73, <i>dd</i> , (5.8, 12.1)
			3.92, <i>dd</i> , (2.3, 12.1)



White solid

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 290.0860  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{10}H_{13}O_4N_5Na$ : 290.0860

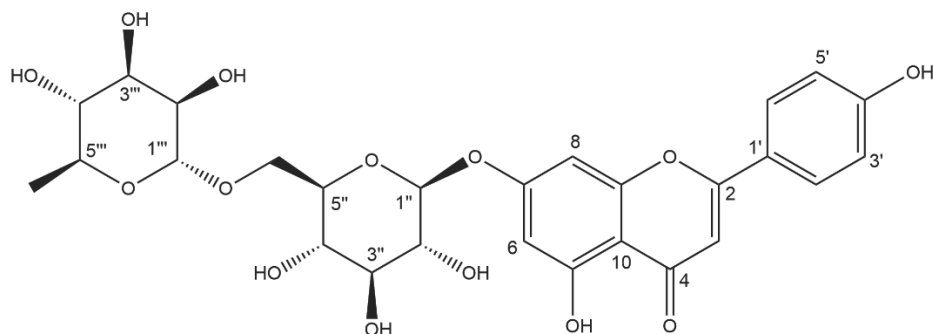
Fig. 73 Structure and physical data of Compound **34**

Table 34  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	152.4	<i>d</i>	8.13, <i>s</i>
4	149.1	<i>s</i>	
5	119.4	<i>s</i>	
6	156.2	<i>s</i>	
8	139.9	<i>d</i>	8.34, <i>s</i>
1'	87.9	<i>d</i>	5.87, <i>d</i> , (6.2)
2'	73.4	<i>d</i>	4.62, <i>dd</i> , (5.4, 6.2)
3'	70.7	<i>d</i>	4.14, <i>dd</i> , (3.3, 5.4)
4'	85.9	<i>d</i>	3.96, <i>q</i> , (3.3)
5'	61.7	<i>t</i>	3.66, <i>m</i>
			3.55, <i>m</i>

第三項 既知フラボノイド誘導体の化学構造

NMR データ (Table 35-37) を文献値と比較することにより、化合物 **35** を apigenin 7-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] [33]、化合物 **36** を apigenin 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] [15]、化合物 **37** を narcissin [12] に同定した。



Yellow amorphous powder

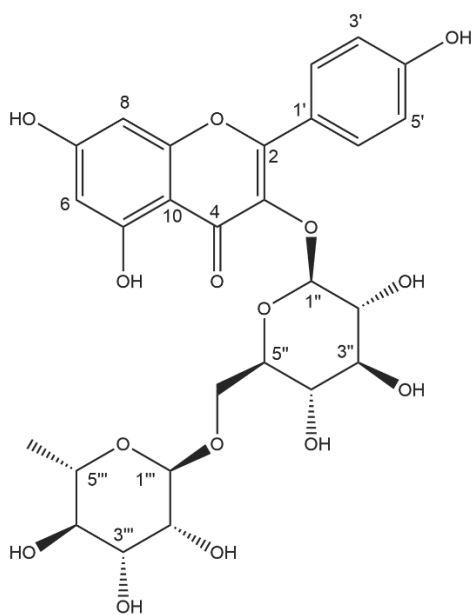
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 601.1528 [M+Na]<sup>+</sup>

Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>Na: 601.1528

Fig. 74 Structure and physical data of Compound **35**

Table 35 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	167.0	<i>s</i>	
3	104.4	<i>d</i>	6.64, <i>s</i>
4	184.2	<i>s</i>	
5	163.1	<i>s</i>	
6	101.7	<i>d</i>	6.51, <i>d</i> , (2.3)
7	164.8	<i>s</i>	
8	96.4	<i>d</i>	6.75, <i>d</i> , (2.3)
9	159.0	<i>s</i>	
10	107.2	<i>s</i>	
1'	123.2	<i>s</i>	
2', 6'	129.8	<i>d</i>	7.87, <i>d</i> , (8.6)
3', 5'	117.3	<i>d</i>	6.94, <i>d</i> , (8.6)
4'	163.1	<i>s</i>	
1''	101.2	<i>d</i>	5.04, <i>d</i> , (7.1)
2''	74.2	<i>d</i>	} 3.40-3.65, <i>m</i>
3''	78.0	<i>d</i>	
4''	72.5	<i>d</i>	
5''	77.3	<i>d</i>	
6''	67.6	<i>t</i>	
1'''	102.3	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (1.4)
2'''	72.2	<i>d</i>	} 3.40-3.65, <i>m</i>
3'''	71.4	<i>d</i>	
4'''	74.9	<i>d</i>	
5'''	69.9	<i>d</i>	
6'''	18.0	<i>q</i>	

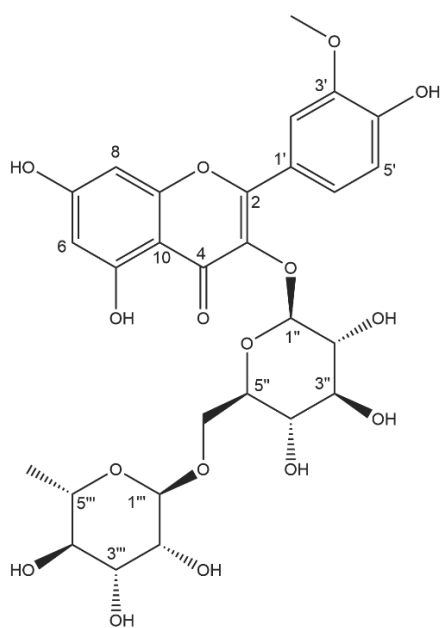


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 617.1475  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{27}H_{30}O_{15}Na$ : 617.1477

Fig. 75 Structure and physical data of Compound 36

Table 36  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO- $d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	161.7	<i>s</i>	
3	135.7	<i>s</i>	
4	179.5	<i>s</i>	
5	163.4	<i>s</i>	
6	100.2	<i>d</i>	6.18, <i>d</i> , (1.6)
7	166.1	<i>s</i>	
8	95.2	<i>d</i>	6.36, <i>brs</i>
9	158.9	<i>s</i>	
10	105.8	<i>s</i>	
1'	122.95	<i>s</i>	
2', 6'	132.5	<i>d</i>	8.06, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	116.3	<i>d</i>	6.88, <i>d</i> , (8.9)
4'	159.1	<i>s</i>	
1''	104.8	<i>d</i>	5.10, <i>d</i> , (7.5)
2''	75.9	<i>d</i>	} 3.24-3.46, <i>m</i>
3''	78.3	<i>d</i>	
4''	71.6	<i>d</i>	
5''	77.4	<i>d</i>	
6''	68.7	<i>t</i>	
1'''	102.6	<i>d</i>	4.50, <i>d</i> , (1.8)
2'''	72.3	<i>d</i>	} 3.24-3.46, <i>m</i>
3'''	72.4	<i>d</i>	
4'''	74.1	<i>d</i>	
5'''	69.9	<i>d</i>	
6'''	18.1	<i>q</i>	



Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 647.1588 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub>Na: 647.1583

Fig. 76 Structure and physical data of Compound **37**

Table 37 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	159.0	<i>s</i>	
3	135.7	<i>s</i>	
4	179.5	<i>s</i>	
5	163.2	<i>s</i>	
6	100.2	<i>d</i>	6.21, <i>d</i> , (2.2)
7	166.2	<i>s</i>	
8	95.1	<i>d</i>	6.41, <i>d</i> , (2.2)
9	158.4	<i>s</i>	
10	105.8	<i>s</i>	
1'	123.2	<i>s</i>	
2'	114.7	<i>d</i>	7.95, <i>d</i> , (2.0)
3'	148.5	<i>s</i>	
4'	150.8	<i>s</i>	
5'	116.3	<i>d</i>	6.91, <i>d</i> , (8.5)
6'	124.1	<i>d</i>	7.63, <i>dd</i> , (2.0, 8.5)
3'-OCH <sub>3</sub>	56.9	<i>q</i>	3.95, <i>s</i>
1''	104.6	<i>d</i>	5.24, <i>d</i> , (7.5)
2''	76.1	<i>d</i>	} 3.22-3.49, <i>m</i>
3''	77.5	<i>d</i>	
4''	71.8	<i>d</i>	
5''	78.3	<i>d</i>	
6''	68.7	<i>t</i>	3.81, <i>dd</i> , (1.5, 11.2)
			3.49, <i>dd</i> , (3.6, 11.2)
1'''	102.7	<i>d</i>	4.53, <i>d</i> , (1.5)
2'''	72.2	<i>d</i>	} 3.22-3.49, <i>m</i>
3'''	72.4	<i>d</i>	
4'''	74.0	<i>d</i>	
5'''	70.0	<i>d</i>	
6'''	18.0	<i>q</i>	1.10, <i>d</i> , (6.2)



---

---

## 第 5 章 抗 *Leishmania major* 活性試験

---

---

### 第一節 リーシュマニア症

リーシュマニア症 (Leishmaniasis) はサシチヨウバエによって感染される熱帯伝染病である。WHO の報告によると、全世界では 3 億 5 千万の人に感染のリスクがあり、現在の感染者は約 400-1200 万人、さらに毎年約 100 万人の新規感染者が生じると予想されている。このことから、WHO はリーシュマニア症を顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases, NTDs) の一つに指定し、2021-2030 のロードマップを設定した [34]。リーシュマニア症は臨床上の症状によって、皮膚型リーシュマニア症、粘膜型リーシュマニア症と内臓型リーシュマニアに分類されている [35, 36]。*Leishmania major* (*L. major*) は主に皮膚型リーシュマニア症の病原体であり、致命的ではないが外観を損なう病変と社会的偏見の原因となっている [37]。皮膚型リーシュマニア症は小さな浮腫から始まり、後に丘疹などを引き起こし、さらに結節が形成し、最終的に組織的な壊死と潰瘍に発展する [38]。全世界では、毎年 60 万から 100 万の新規皮膚型リーシュマニア症が予想され、75%の発症はアフガニスタン、ブラジル、イラン、イラクやシリアに集中している [39]。

本研究では、*Leishmania major* を用いて活性評価を行った。

### 第二節 MTT assay

MTT assay とは、培養細胞の生存率、増殖率を確認する試験方法で、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole) を用いた比色定量法である。本手法で用いられる MTT のテトラゾリウム塩がミトコンドリアに存在する succinate-tetrazolium reductase (コハク酸テトラゾリウム還元酵素) によりホルマゼンに還元される。生細胞中ではこの酵素活性が高いために呈色反応が認められるが、細胞死が起こるとこの活性が低下するために呈色反応がなくなる。すなわち代謝活性のある生細胞数とホルマゼン色素の濃度は正の相関を示すために、このホルマゼン色素の吸光度測定を行うことにより細胞の生存率や増殖抑制率を評価することができる。

本研究では、単離した化合物に皮膚型感染症を引き起こすトリパノソーマ科の原虫である *Leishmania major* を添加し、その生存率を MTT assay により評価することで、生物活性成分についての検討を行った。

### 第三節 試験方法

反応、および測定には 96 well plate を使用した。各画分と単離した化合物について triplicate で活性評価を行った。Control は化合物を含まない DMSO 溶液を用い、positive control として miltefosine を用いた。

サンプルは DMSO 溶液で各種濃度となるように溶解した。各 well にサンプル溶液を 1  $\mu$ l 加え、これらに  $2.0 \times 10^5$  cells/99  $\mu$ l となるように調製した *Leishmania major* を含む M199 培地 99  $\mu$ l を加えた。その後、25  $^{\circ}$ C 条件下で 72 時間インキュベートした。96 well plate 中の培地を吸引後、MTT (0.5 mg/ml) を含む M199 培地 100  $\mu$ l を加えた後、さらに over night でインキュベートを行った。MTT を含む培地を吸引後、DMSO 溶液 100  $\mu$ l を加えて plate mixer にて溶解。その後、plate reader で 540 nm の吸光度を測定した。

増殖抑制率は下記の式を用いて算出し、サンプルの抗 *Leishmania major* 活性を評価した。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

A<sub>sample</sub> : サンプル添加時の吸光度

A<sub>blank</sub> : 細胞を加えていない DMSO 培地の吸光度

A<sub>control</sub> : サンプルを添加していない DMSO 培地の吸光度

#### 第四節 実験結果

各単離化合物をスクリーニングし、活性が認められたサンプルをさらに段階的に希釈し (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 µg/ml)、IC<sub>50</sub> を求めた (Table 38)。

Table 38 IC<sub>50</sub> of active compounds against *L. major* from *C. chinense*

Compounds	<i>L. major</i> (µM)	Compounds	<i>L. major</i> (µM)
<b>1</b>	19.1 ± 1.8	<b>24</b>	6.25 ± 1.1
<b>2</b>	66.1 ± 5.9	<b>25</b>	3.75 ± 1.0
<b>6</b>	14.9 ± 2.2	<b>26</b>	7.66 ± 2.3
<b>7</b>	51.7 ± 3.5	<b>27</b>	4.72 ± 1.3
<b>8</b>	90.2 ± 9.8	<b>28</b>	52.6 ± 11.6
<b>22</b>	0.81 ± 0.3	<b>29</b>	30.8 ± 5.8
<b>23</b>	0.96 ± 0.3	<b>Miltefosine</b>	18.1 ± 1.7

新規化合物として単離された **1–2**, **22–29** において、強い抗 *L. major* 原虫活性が見られた。特に化合物 **22** と **23** において非常に強い増殖抑制活性を示した。この結果から、 $\psi$ -santonin 系化合物の強い増殖抑制活性が初めて明らかになった。

## 第 6 章 A549 細胞増殖抑制実験

新規の  $\psi$ -santonin 系化合物 (1-2, 22-29) は強い抗 *L. major* 原虫活性を示したことから、ヒト由来の肺胞基底上皮腺癌 A549 細胞に対する増殖抑制活性を同時評価する事にした。

### 第一節 試験方法

反応、および測定には 96 well plate を使用した。各単離した化合物については triplicate で活性を評価した。Control は sample を含まない DMSO 溶液を用い、positive control として doxorubicin を用いた。

サンプルは DMSO 溶液で各種濃度となるように溶解した。各 well にサンプル溶液を 1  $\mu$ l 加え、これらに  $5.0 \times 10^3$  cells/99  $\mu$ l となるように調製した A549 細胞を含む DMEM 培地 99  $\mu$ l を加えた。その後、37  $^{\circ}$ C 条件下で 72 時間インキュベートした。96 well plate 中の培地を吸引後、MTT (0.5 mg/ml) を含む培地 100  $\mu$ l を加えた後、さらに 1.5 時間インキュベートを行った。MTT を含む培地を廃棄し、DMSO 溶液 100  $\mu$ l を加えて plate mixer にて溶解。その後、plate reader で 540 nm の吸光度を測定した。

増殖抑制率は下記の式を用いて算出し、sample の A549 細胞増殖抑制活性を評価した。  
増殖抑制率 (%) =  $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$

$A_{\text{sample}}$  : サンプル添加時の吸光度

$A_{\text{blank}}$  : 細胞を加えていない DMSO 培地の吸光度

$A_{\text{control}}$  : サンプルを添加していない DMSO 培地の吸光度

### 第二節 試験結果

単離化合物をスクリーニングし、活性の見られたサンプルに対してさらに段階希釈し (同上)、 $IC_{50}$  を求めた。その結果、新規の  $\psi$ -santonin 系化合物 (1-2, 22-29) およびフラボノイド類化合物 (6-8) から強い増殖抑制効果を見出した。しかし、doxorubicin より強い活性を示す化合物は見られなかった。

Table 39  $IC_{50}$  of active compounds against A549 from *C. chinense*

Compounds	A549 ( $\mu$ M)	Compounds	A549 ( $\mu$ M)
1	9.1 $\pm$ 0.7	24	11.8 $\pm$ 2.53
2	32.5 $\pm$ 2.6	25	5.59 $\pm$ 0.72
6	12.3 $\pm$ 4.2	26	17.1 $\pm$ 1.86
7	52.3 $\pm$ 13.0	27	17.4 $\pm$ 1.86
8	69.6 $\pm$ 19.2	28	83.9 $\pm$ 12.1
22	2.97 $\pm$ 0.58	29	58.9 $\pm$ 13.6
23	2.30 $\pm$ 0.26	Doxorubicin	0.45 $\pm$ 0.10

## 第 7 章 Vero 細胞に対する毒性評価

新規  $\psi$ -santonin 系化合物 (1–2, 22–29) から強い抗 *L. major* 原虫および抗 A549 ガン細胞活性が見られ、リード化合物としてのポテンシャルが示唆された。また、単離化合物の有用性をさらに評価するために、本章は Vero 細胞を用いて、新規化合物の毒性を調べた。

### 第一節 Vero 細胞

Vero 細胞は 1962 年アフリカミドリザル (*Cercopithecus aethiops*) の腎臓上皮細胞から分離・樹立された細胞株である [40]。Vero 細胞は不死化細胞であり、実験やワクチン製造に使われる世代数ではヌードマウスへの腫瘍形成能を持たないなどの理由から癌性でないとされ、ウイルスや毒素の研究、さらにはワクチンの開発に最も使用されている [41, 42]。

### 第二節 試験方法

A549 細胞と同条件で行った。

### 第三節 試験結果

Table 40 IC<sub>50</sub> of isolated compounds against Vero cell from *C. chinense*

Cpds	Vero cell ( $\mu$ M)	Cpds	Vero cell ( $\mu$ M)
<b>1</b>	8.32 $\pm$ 1.4	<b>24</b>	20.4 $\pm$ 2.3
<b>2</b>	15.4 $\pm$ 1.4	<b>25</b>	6.20 $\pm$ 1.4
<b>6</b>	11.9 $\pm$ 1.4	<b>26</b>	17.2 $\pm$ 1.4
<b>7</b>	37.6 $\pm$ 1.3	<b>27</b>	11.4 $\pm$ 1.0
<b>8</b>	72.7 $\pm$ 7.3	<b>28</b>	48.5 $\pm$ 4.1
<b>22</b>	5.99 $\pm$ 0.8	<b>29</b>	23.8 $\pm$ 2.5
<b>23</b>	7.84 $\pm$ 0.6	<b>Doxorubicin</b>	3.82 $\pm$ 0.8

ほとんどの単離化合物において強い毒性が見られたが、化合物 **22** と **23** は *L. major* に高い増殖阻害選択性が確認された (Table 41)。

Table 41 Selective Index of active compounds against *L. major*

<b>Cpds</b>	<b><i>L. major</i> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Vero cell (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>SI</b>
<b>1</b>	19.1 $\pm$ 1.8	8.32 $\pm$ 1.4	0.4
<b>2</b>	66.1 $\pm$ 5.9	15.4 $\pm$ 1.4	0.2
<b>6</b>	14.9 $\pm$ 2.2	11.9 $\pm$ 1.4	0.8
<b>7</b>	51.7 $\pm$ 3.5	37.6 $\pm$ 1.3	0.7
<b>8</b>	90.2 $\pm$ 9.8	72.7 $\pm$ 7.3	0.8
<b>22</b>	0.81 $\pm$ 0.3	5.99 $\pm$ 0.8	7.4
<b>23</b>	0.96 $\pm$ 0.3	7.84 $\pm$ 0.6	8.2
<b>24</b>	6.25 $\pm$ 1.1	20.4 $\pm$ 2.3	3.3
<b>25</b>	3.75 $\pm$ 1.0	6.20 $\pm$ 1.4	1.7
<b>26</b>	7.66 $\pm$ 2.3	17.2 $\pm$ 1.4	2.2
<b>27</b>	4.72 $\pm$ 1.3	11.4 $\pm$ 1.0	2.4
<b>28</b>	52.6 $\pm$ 11.6	48.5 $\pm$ 4.1	0.9
<b>29</b>	30.8 $\pm$ 5.8	23.8 $\pm$ 2.5	0.8

SI: Selective index, SI = IC<sub>50</sub> (Vero cell)/ IC<sub>50</sub> (*L. major*)

---

---

## 第 8 章 小括

---

---

沖縄県産植物モクビャッコウ (*Crossostephium chinense*) 地上部の成分研究を行い、EtOAc 可溶画分から 3 種の新規化合物 (1-3)、18 種の既知化合物、1-BuOH 可溶画分から 8 種の新規化合物 (22-29) と 8 種の既知化合物を単離した。単離化合物の生物活性を調べたところ、新規  $\psi$ -santonin 系化合物 (1-2, 22-29) において、強い抗 *L. major* 原虫と A549 がん細胞増殖活性が見られた。また、Vero 細胞を用いた正常細胞に対する毒性評価を行った結果、多くの  $\psi$ -santonin (1-2, 24-29) 系化合物において強い毒性が確認された。その一方で、化合物 22 および 23 は *L. major* 原虫に対してそれぞれ 7.4、8.2 倍の選択性因子を示し、比較的に高い選択性を有しており、シード化合物としての可能性が示唆された。

## 第9章 考察

### 第一節 生合成

本研究で発見された新規  $\psi$ -santonin 系誘導体は極めて希少なセスキテルペン構造を有し、今までの報告例がほとんどなかったため、セスキテルペン類代謝物の生合成経路の解明にも寄与できると考えられる。 $\psi$ -santonin 系の化合物は今まで報告された  $\alpha$ -santonin,  $\beta$ -santonin 化合物と類似する骨格を有することから、同一生合成経路によるものと推測した。 $\alpha$ -santonin の生合成経路はまだ全て解明されていないが、今まで単離された代謝物から、経路が推定されている。また、我々はこの経路を元に、 $\psi$ -santonin 系類縁体の生合成経路を考察した (Fig. 77)。

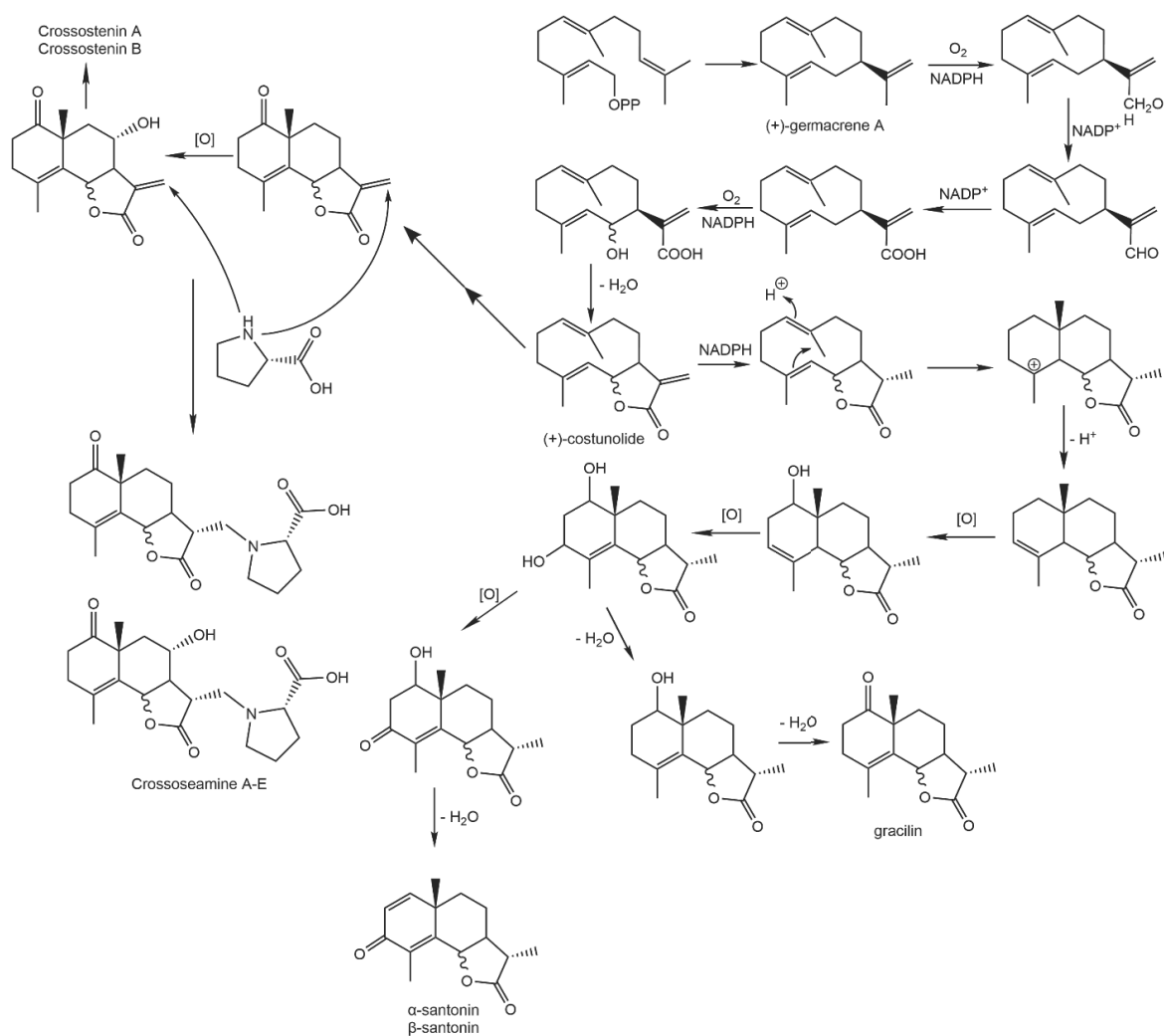


Fig. 77 plausible biosynthesis of  $\psi$ -santonin derivatives

## 第二節 活性構造相関

本研究から、初めて  $\psi$ -santonin 系化合物の強い抗 *L. major* 活性を明らかにした。その中で、化合物 **22** と **23** は最も強い増殖抑制活性と比較的に高い選択性を有しており、リード化合物としての利用が期待できる。我々は化合物の構造と活性の関連性を解明することが創薬研究において重要な過程であり、リード化合物として開発する第一歩と考えている。そのため、今回単離された  $\psi$ -santonin 系化合物から、類似化合物の構造活性相関を考察した (Fig. 78)。

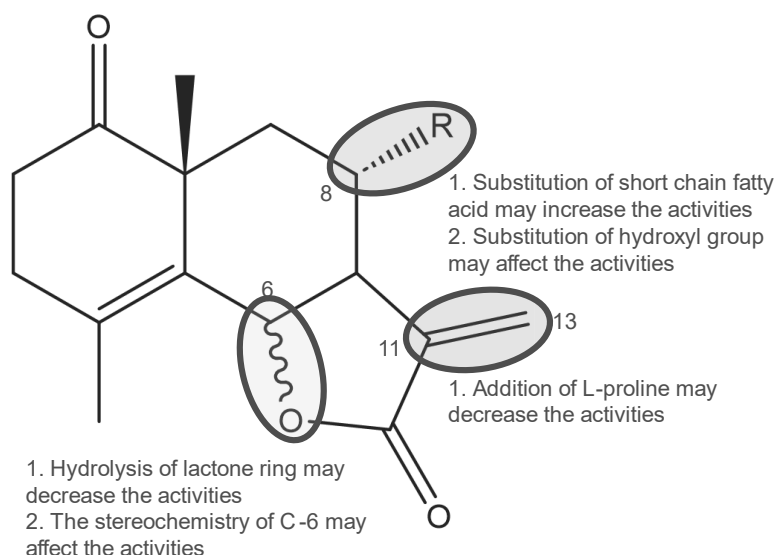


Fig. 78 structure-activity relationship of  $\psi$ -santonin

### 8 位置換基に対して

1. 化合物 **27** の抗 *L. major* 活性 ( $4.72 \pm 1.3 \mu\text{M}$ ) が化合物 **2** ( $66.1 \pm 5.9 \mu\text{M}$ ) より強いことから、酢酸側鎖の置換が化合物の活性向上に寄与している可能性が示唆された。
2. 化合物 **1** と **2**、化合物 **28** と **29** を比較し、8 位水酸基の存在は活性に影響する可能性が示唆された。

### 11, 13 位の二重結合に対して

1. Crossoseamines (**1**, **2**, **28**, **29**) の活性は crossostenins (**22-26**) より強いことから、L-proline の付加は活性を低下させる可能性が示唆された。

### 6 位の立体とラクトン環

1. 化合物 **22** と **23** の活性は化合物 **24-26** より高いことから、ラクトン環の形成は活性の増強に寄与することが示唆された。
2. ラクトン環を有する  $\psi$ -santonin 系化合物において、6 位の立体の変化は化合物全体の 3D conformation に影響する。また、安定した 3D conformation の変化によって、異なる活性の結果をもたらした可能性がある。



---

---

## 第 10 章 実験の部

---

---

### 植物材料

モクビヤッコウ (*Crossostephium chinense*) 地上部は 2008 年、沖縄県 中頭郡中城村にて採集した。

### 一般法

#### 1. 旋光度

旋光度は JASCO P-1030 (日本分光) デジタル旋光度計を用いて測定した。測定溶媒および温度は各測定値に付記した。

#### 2. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

Bruker AVANCE 600 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 600 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 150 MHz)、Bruker AVANCE 500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) もしくは JEOL JNM-ECP500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) を使用して測定した。いずれも溶媒中の D シグナルを internal lock signal とした。ケミカルシフト値の表示は内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) からの  $\delta$  値 (ppm) で示し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおける結合定数は括弧内に Hz 単位で記した。

#### 3. 質量分析 (MS)

HR-ESI-MS は高性能ハイブリッド型質量分析システム (Thermo Fisher Scientific 製 LTQ Orbitrap XL) を使用した。

#### 4. 赤外吸収 (IR) スペクトル

赤外吸収スペクトルは JASCO FT/IR-4600 (日本分光) 分光光度計を使用し、フィルム法にて試料を調製し測定した。

#### 5. 紫外吸収 (UV) スペクトル

層長 1 cm の石英セルを用いて、JASCO V-630 (日本分光) 分光光度計を使用して測定した。測定溶媒は各測定値に付記した。

#### 6. 円二色性 (ECD) スペクトル

層長 1 cm の丸形セルを用いて、JASCO J-720 (日本分光) もしくは JASCO J-1500 (日本分光) 円二色性分散計を使用して測定した。測定溶媒は各測定値に付記した。

#### 7. 円二色性 (ECD) スペクトルの DFT 計算

化合物 **22a** のコンフォメーション分析は Spartan'20 V1.1.2 のデフォルトプログラム (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, U.S.A.) を用いて行った。Merck molecular force field (MMFF) 法を用いて、コンフォメーションエネルギーが 40 kcal/mol を超えるコンフォメーションの絞り込みを行った。選定されたコンフォメーションをさらに Hartree-Fock (HF)/3-21G and  $\omega$ B97XD/6-31G\*プログラムを用いて最適化した後、Gaussian 16 (Revision A.03 by Gaussian)

の CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ レベル (bandwidth sigma = 0.5 ev) を用いて ECD 計算を行った。最後に、得られた各コンフォメーションの ECD スペクトルを各コンフォメーションの Boltzmann 分布によって統合し、最終の ECD スペクトルを算出した。

化合物 **24**, **25**, **26** の ECD スペクトルは B3LYP/6-31G (d,p) の最適化方法と M06-2X/6-31G (d,p) の ECD 計算法を用いて算出し、最終的に Boltzmann 分布によって統合することで得られた。

#### カラムクロマトグラフィー

##### 1. Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー

Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーには逆相系多孔性樹脂 Diaion HP-20 を使用した。

##### 2. シリカゲルクロマトグラフィー

順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには 70-230 mesh の silica gel 60 (spherical) (関東化学) を使用した。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Cosmosil 75C18-OPN (Nacalai Tesque) を使用した。

##### 3. 高速液体クロマトグラフィー

分取用カラムに Inertsil ODS-3 (10×250 mm、ジーエルサイエンス)、COSMOSIL πNAP (10×250 mm、Nacalai Tesque)、COSMOSIL HILIC (10×250 mm、Nacalai Tesque)、Mightysil RP-18 Aqua 250-10 (5 μm) (KANTO CHEMICAL CO. INC) を使用し、検出に RID-10A (Shimadzu)、溶媒にアセトノー水系、メタノール水系またはアセトニトリル水系を用いて、流速は 2.5 ml/min または 2.0 ml/min で行った。

##### 4. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC プレートとして厚さ 0.25 mm の silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) を使用し、クロロホルムとメタノールの混合溶媒を展開溶媒とした。プレート上のスポットは UV (254 nm) 照射および 10 % 硫酸へ浸漬後、加熱し呈色させて検出した。

##### 5. 糖分析

分析用カラムに Shodex NH2P-50 (昭和電工) を使用し、検出に OR-2090 (日本分光工業) 旋光度検出計を用い、溶媒はアセトニトリル水系を用いて、流速 1 ml/min で行った。

#### 抽出、単離、精製

自然風乾させたモクビヤッコウ地上部 (3.5 kg) をメタノールで 3 回 (10.0 L × 3) 抽出し、1.5 L まで濃縮後、水を 75 ml 加え、95%の MeOH 溶液にし、Hexane を 1.5 L 加えて分配して Hexane 可溶画分を得た。残りの MeOH 層を乾燥し、水 1.5 L を加え懸濁し、EtOAc、1-BuOH をそれぞれ 1.5 L で連続的に抽出、濃縮し、Hexane 可溶画分 (27.7 g)、EtOAc 可溶画分 (67.3 g)、1-BuOH 可溶画分 (30.5 g) と水層 (171.2 g) を得た。

このうち、EtOAc 可溶画分 (74.3 g) を、CHCl<sub>3</sub> と CHCl<sub>3</sub> および MeOH の混合溶媒 [CHCl<sub>3</sub> (2 L)、CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1, 2 L)、(15 : 1, 2 L)、(10 : 1, 2 L)、(7 : 1, 2 L)、(5 : 1, 2 L)、(3 : 1, 2 L)、(2 : 1, 2 L)、MeOH (2 L)] を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 6 cm×高さ 35 cm) に付し、フラクション 1-9 を得た。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-9 を、MeOH と水の混合溶媒 [MeOH-水 (10 : 90, 600 ml)、(20 : 80, 600 ml)、(30 : 70, 600 ml)、(40 : 60, 600 ml)、(50 : 50, 600 ml)、(60 : 40, 600ml)、(70 : 30, 600ml)、(80 : 20, 600ml)、(90 : 10, 600ml)、MeOH (600 ml)、Acetone (600ml)] を用いた逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 3.6 cm×高さ 18 cm) に付した。

#### 化合物 4, 6

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-2 (1.19 g/5.25g) を高速液体クロマトグラフィー [Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、30%アセトン、流速 2.5 mL/min] で精製し、化合物 4 (186.6 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-3 (1.93 g) を高速液体クロマトグラフィー [Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、45%アセトン+0.1% TFA、流速 2.5 mL/min] で精製し、化合物 6 (107.4 mg) を得た。

#### 化合物 7, 8, 11, 17, 18, 20, 21

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-1 (782 mg) を高速液体クロマトグラフィー [COSMOSIL π NAP (10×250 mm)、35%アセトン、流速 2.5 mL/min] で精製し、化合物 18 (19.4 mg)、化合物 17 (10.1 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-3 (611 mg) を高速液体クロマトグラフィー [Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、40%アセトン、流速 2.5 mL/min] で精製し、化合物 7 (50.3 mg)、化合物 8 (31.5 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-4 (510 mg) を高速液体クロマトグラフィー [Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、50%アセトン、流速 2.5 mL/min] で精製し、化合物 11 (32.4 mg)、化合物 20 (73.1 mg)、化合物 21 (5.2 mg) を得た。

#### 化合物 3, 12, 13, 19

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-2 (1.29 g/2.29 g) を高速液体ク

ロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、35%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **12** (41.3 mg)、化合物 **13** (46.7 mg)、化合物 **3** (3.8 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-4 (481 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、38%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **19** (14.5 mg) を得た。

#### 化合物 5, 9, 14, 15, 16

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-1 (626 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **5** (10.9 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-2 (1.36 g) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **16** (15.1 mg)、化合物 **15** (33.6 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-3 (1.24 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、40%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **9** (5.1 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-5 (370 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、40%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **14** (26.6 mg) を得た。

#### 化合物 2, 10

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 7-3 (260 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、15%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **2** (20.6 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 7-4 (983 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、50%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **10** (23.1 mg) を得た。

#### 化合物 1

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 9-3 (630 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、18%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **1** (20.1 mg) を得た。

#### 化合物 1, 2 の酸加水分解および proline 分析

化合物 **1** と **2** (各 0.2 mg) を 1% HCl 水溶液に溶解し、室温で 12 時間放置した後、EtOAc 溶液を用いて抽出分液した。得られた水層をイオン交換樹脂で中和し、旋光度検出器付きの高速液体

クロマトグラフィー (Cosmosil HILIC, 10 × 250 mm, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (4:1, v/v), 流速: 0.7 ml/min) で分析をした。その結果、リテンションタイム 30 分の下向きのピーク (negative) が見られ、標品と比較し、遊離した L-proline であると決定した。

#### 化合物 3 の酸加水分解および糖分析

化合物 3 (0.5 mg) に 1M HCl 水溶液を 0.2 ml 加え、sonication して懸濁し、80 °C で 2 時間反応させた。その後室温に戻し、EtOAc を 0.2 ml 加えて抽出し、残った水相を HPLC (Asahipak NH2P-50 4E, 4.6 × 250 mm, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:1, v/v), 流速: 1 ml/min) にて糖分析を行った。標品の glucose と同様な保持時間 (7.3 分) において正の旋光性を示したため、D-glucose であると決定した。

一方、1-BuOH 可溶画分 (30.5 g) のうち 27.3 g を CHCl<sub>3</sub> と MeOH の混合溶媒【CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1, 2 L)、(10 : 1, 2 L)、(7 : 1, 2 L)、(5 : 1, 2 L)、(3 : 1, 2 L)、(2 : 1, 2 L)、(1 : 1, 2 L)、MeOH (2 L)】を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 6 cm×高さ 33 cm) に付し、フラクション 1-8 を得た。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-8 を、MeOH と水の混合溶媒【MeOH-水 (10 : 90, 500 ml)、(20 : 80, 500 ml)、(30 : 70, 500 ml)、(40 : 60, 500 ml)、(50 : 50, 500 ml)、(60 : 40, 500ml)、(70 : 30, 500ml)、(80 : 20, 500ml)、(90 : 10, 500ml)、MeOH (500 ml)】を用いた逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 3.6 cm×高さ 15 cm) に付した。

#### 化合物 30, 31, 32, 33

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-1 (149 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Cosmosil HILIC (10×250 mm)、95%アセトンニトリル、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 32 (1.9 mg)、化合物 33 (1.7 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-2 (154 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、15%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 30 (1.2 mg)、化合物 31 (0.9 mg) を得た。

#### 化合物 22, 23, 24, 25, 26, 35, 36

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-4 (182 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、25%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 35 (6.3 mg)、化合物 36 (1.1 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-5 (85 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、50%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 22 (1.1 mg)、化合物 23 (1.4 mg)、化合物 24 (1.0 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-6 (64 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、53%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 25 (4.7 mg)、化合物 26 (1.5 mg) を得た。

#### 化合物 34, 37

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-2 (78 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、5%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **34** (3.3 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-6 (146 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、30%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **37** (3.6 mg) を得た。

#### 化合物 27, 28, 29

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-3 (153 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSI πNAP (10×250 mm)、15%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **28** (5.4 mg)、化合物 **29** (4.5 mg) を得た。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-4 (147 mg) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSI πNAP (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **27** (18.7 mg) を得た。

#### 化合物 27, 28, 29 の酸加水分解および proline 分析

化合物 **1**, **2** と同様の方法で、化合物 **27**, **28**, **29** (各 0.2 mg) を 1% HCl の水溶液に溶解し、室温で 12 時間反応させ、EtOAc で分液した後、水相をイオン交換樹脂で中和し、HPLC で分析した。その結果、30 分のリテンションタイムでネガティブのピークが観測され、L-proline と決定した。

## 第二部

### ビシンジュズネノキ (*Damnacanthus indicus* var. *intermedius*) の成分探索

---

---

## 第1章 ビシンジュズネノキについて

---

---

ビシンジュズネノキ (*Damnacanthus indicus* var. *intermedius*) はアカネ科 (Rubiaceae)、アリドオシ属 (*Damnacanthus*) の常緑低木で、日本の南西諸島に分布する固有種であり、アリドオシ (*Damnacanthus indicus* var. *indicus*) の一つの変種でもある。ビシンジュズネノキの樹高は 1 ~ 1.5 m であり、枝はよく分岐し、葉質は厚く、短い葉柄があり、対生する。葉は長楕円形で長さは 5~8 cm、先が鋭く尖り、縁は全縁、両面とも毛はなく、上面は艶がある。花は白色で、葉腋から出る短い枝に 1~3 個の花が咲く。果実は直径 2~4 mm の球形で赤色に熟する。棘はほとんどなく、アリドオシより小さいのが特徴である。

アリドオシ属の植物は昔から、活血する生薬として利用されてきた。梵天花 (ポンテンカ) や五味子 (ゴミシ) の材部などの生薬と同時に服用する事で、四肢の腫れやむくみが改善できると言われている。実際にアリドオシの抽出物を足浮腫のモデルマウスに投与しマウスの足のむくみが改善され、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症因子の分泌が抑制された報告がある [43]。しかしながら、アリドオシ属植物が有する成分についての報告が極めて少なく、主にキノン類 [44, 45] が報告されている。以上の事から、本研究ではビシンジュズネノキを対象とした新規化合物の探索研究を行った。



ビシンジュズネノキ

<https://makiron39.blog.fc2.com/blog-entry-989.html>より引用



## 第2章 抽出分離

乾燥させたビシンジユズネノキの地上部を MeOH で抽出し、*n*-Hexane と MeOH で分配した後、MeOH 可溶画分を濃縮し、その残渣を水に懸濁させ、EtOAc で分配し、水層をさらに 1-BuOH で分配した。本研究では、比較的に新規化合物が多く含まれている 1-BuOH 可溶画分に対して成分探索を行った (Fig. 79)。

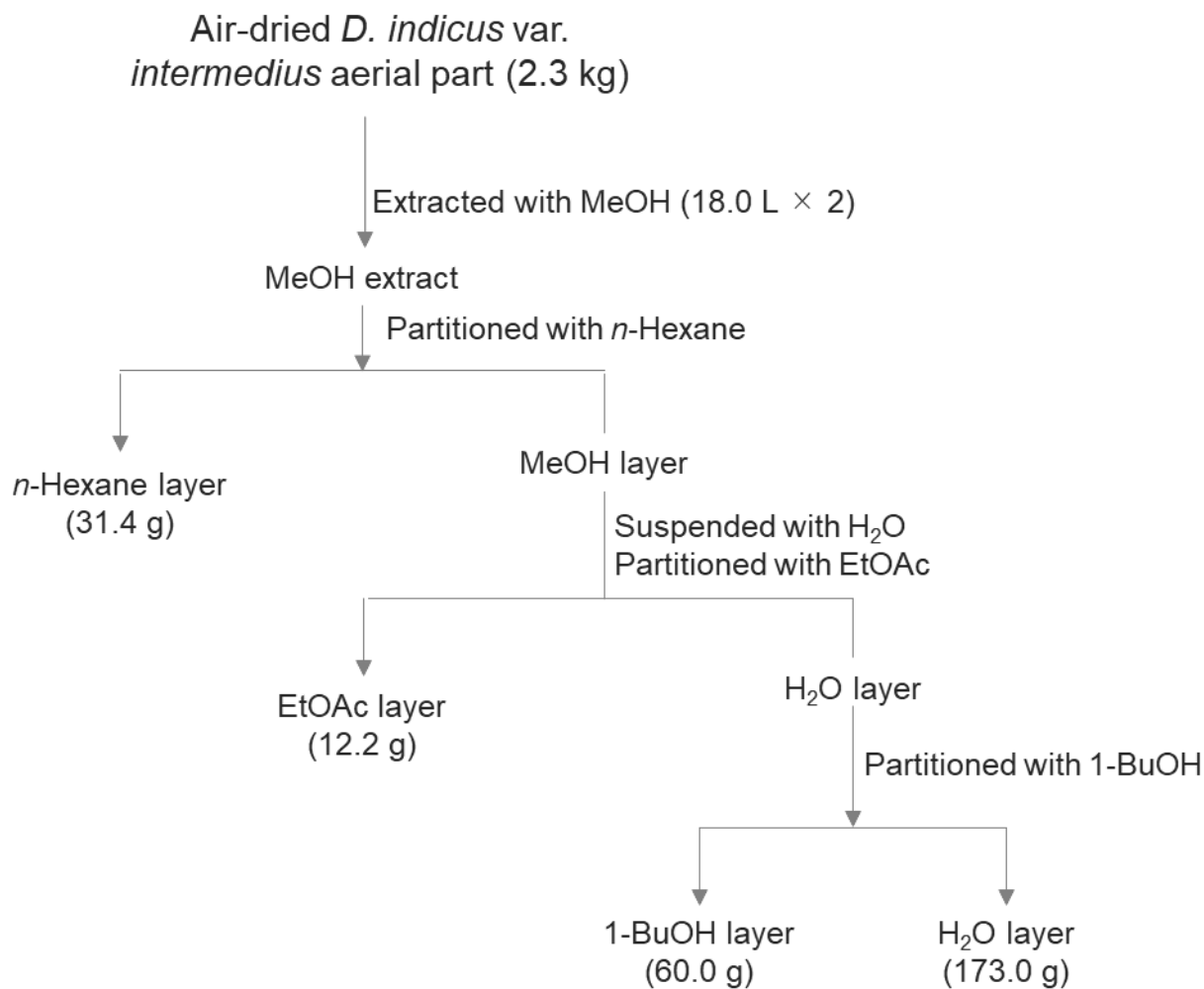


Fig. 79 Extraction and fractionation of *D. indicus* var. *intermedius*

## 第3章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定

### 第一節 単離精製

1-BuOH 可溶画分 30.1 g を、Diaion HP-20、Silica gel、ODS の各種オープンカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分離、精製を行い、18 種の化合物 (38–55) を単離した (Chart 3)。

### 第二節 新規化合物について

沖縄県産植物ビシンジュズネノキ地上部の 1-BuOH 可溶画分から新規のイリドイドグルコシドを 8 種 (38–45) (Fig. 80) 単離し、その化学構造を明らかにした。

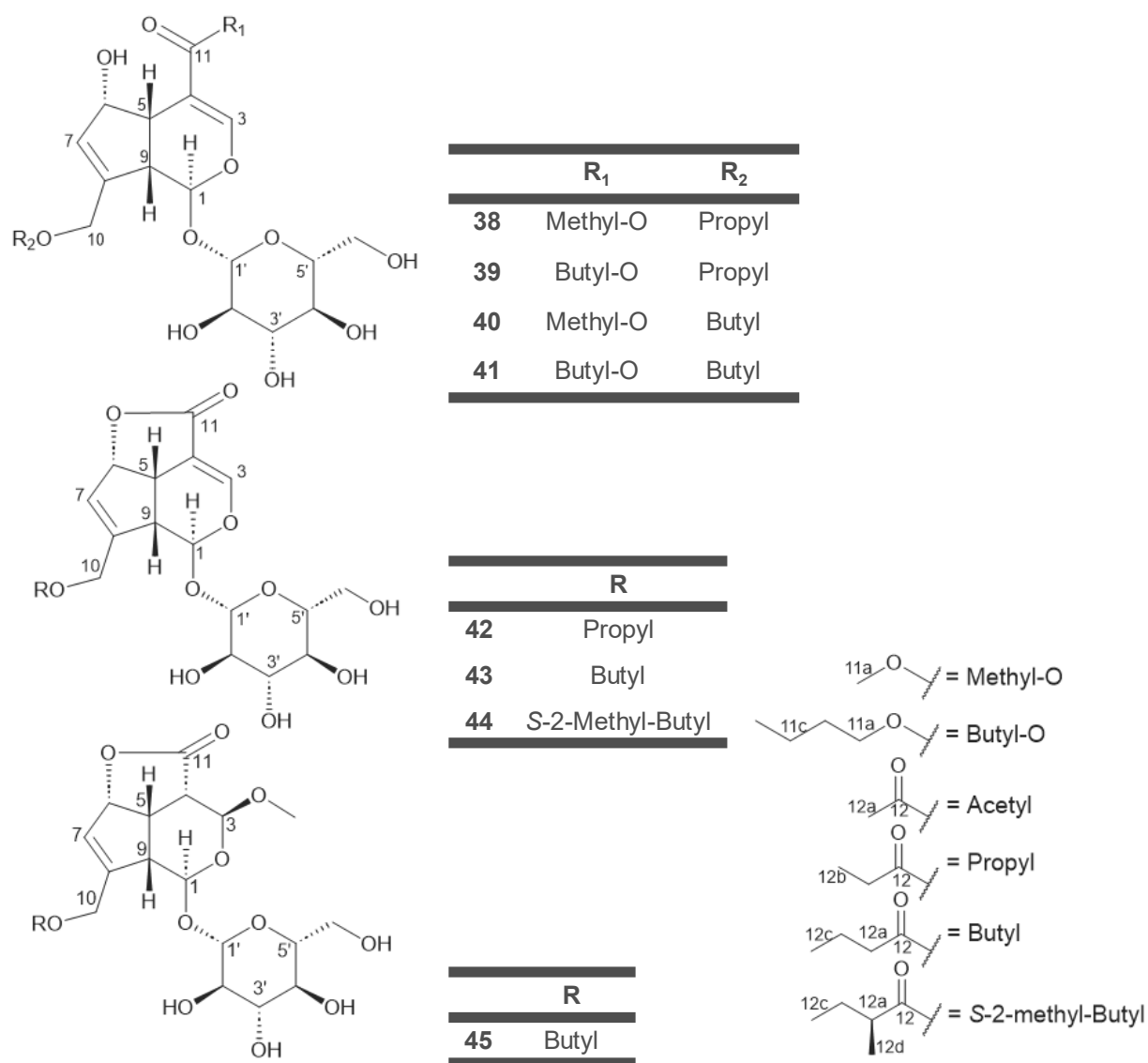


Fig. 80 New Iridoid glucosides (38–45) from the aerial parts of *D. indicus* var. *intermedius*

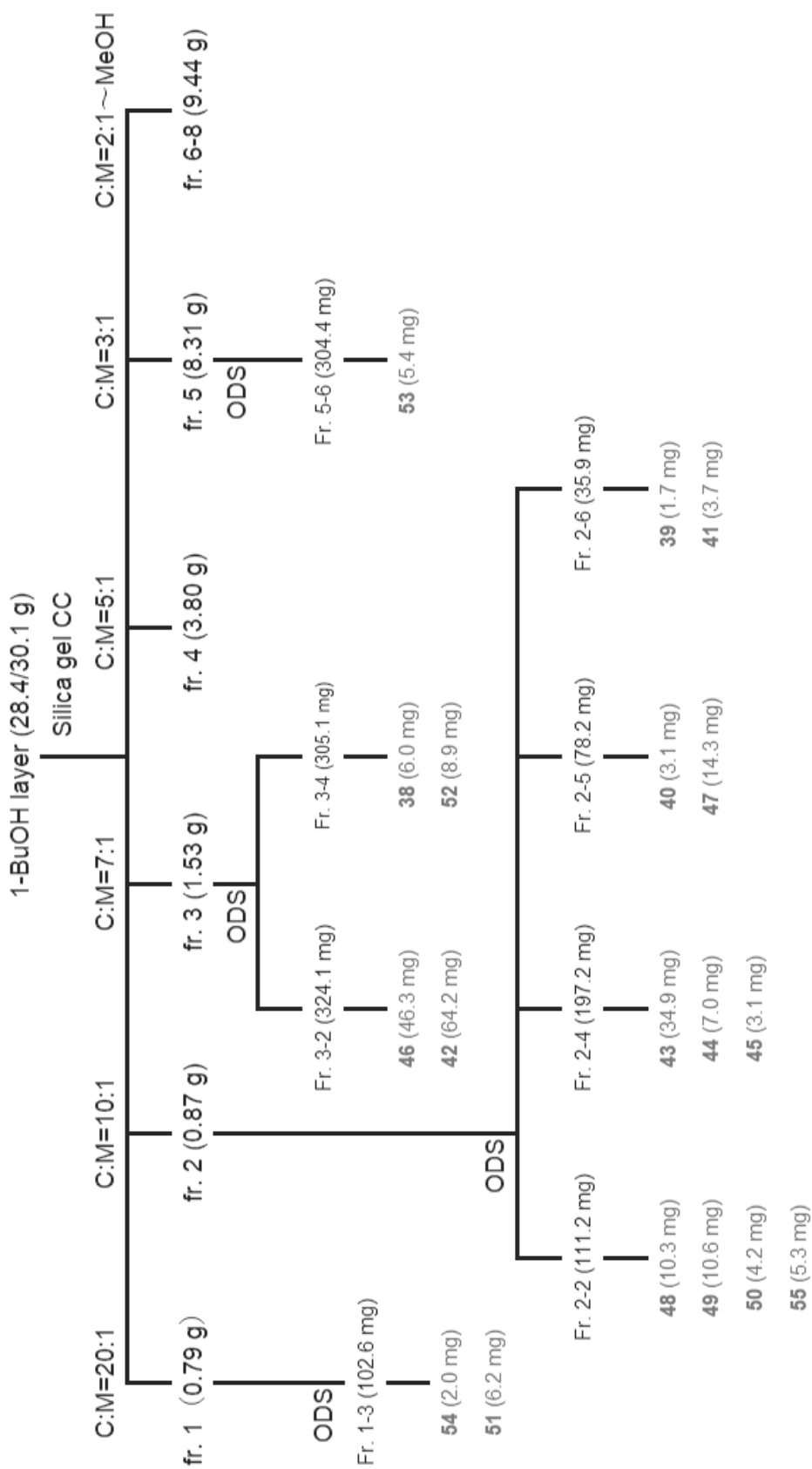
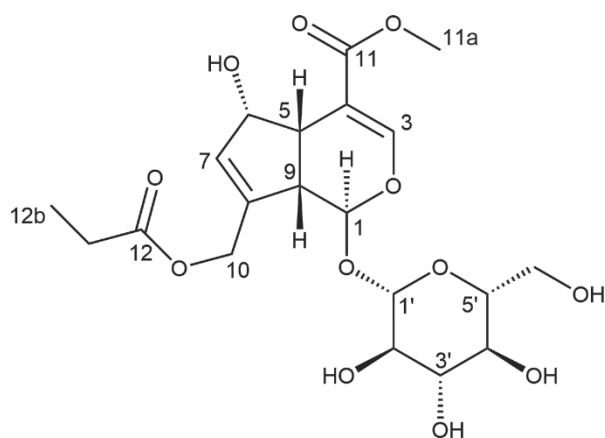


Chart 3 Isolation of Compounds **38—55** from 1-BuOH layer of *D. indicus* var. *intermedius*

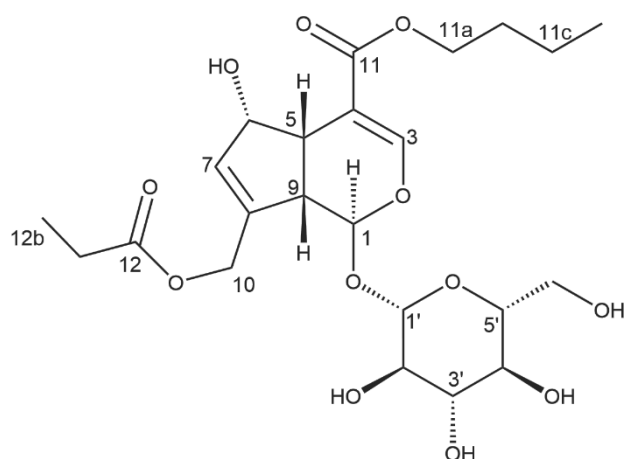


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 483.1473  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{28}O_{12}Na$ : 483.1473  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -14.7 (MeOH,  $c = 0.6$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3391, 2942, 2360, 1707, 1633, 1051  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm ( $\log \epsilon$ ): 202 sh(4.22), 231 (4.01)

Fig. 81 Structure and Physical data of Compound 38

Table 42  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	101.5	<i>d</i>	5.07, <i>d</i> , (9.0)
3	155.5	<i>d</i>	7.66, <i>d</i> , (1.1)
4	108.3	<i>s</i>	
5	42.6	<i>d</i>	3.04, <i>td</i> , (7.1, 1.6)
6	75.1	<i>d</i>	4.81, <i>m</i>
7	131.8	<i>d</i>	6.02, <i>d</i> , (1.5)
8	146.3	<i>s</i>	
9	46.4	<i>d</i>	2.64, <i>t</i> , (7.9)
10	63.8	<i>t</i>	4.81, <i>m</i> 4.94, <i>br d</i> , (14.5)
11	169.5	<i>s</i>	
11a	52.0	<i>q</i>	3.75, <i>s</i>
12	176.0	<i>s</i>	
12a	28.4	<i>t</i>	2.42, <i>q</i> , (7.5)
12b	9.6	<i>q</i>	1.15, <i>t</i> , (7.5)
1'	100.8	<i>d</i>	4.73, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.6	<i>d</i>	} 3.23-3.40, <i>m</i>
3'	78.1	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.7	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	3.63, <i>dd</i> , (6.0, 11.8) 3.86, <i>dd</i> , (2.0, 11.8)

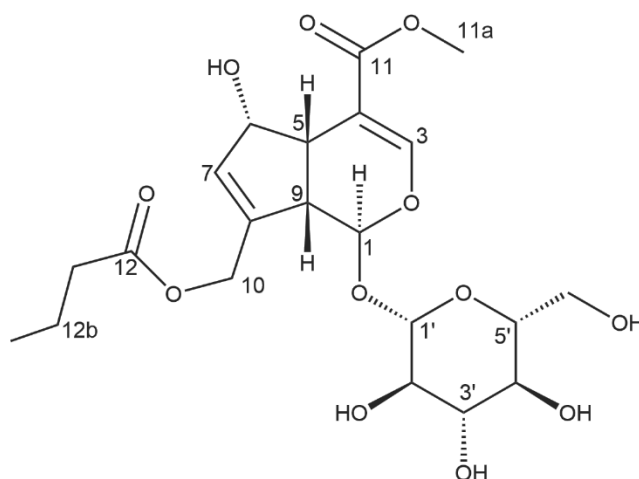


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 525.1942  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{23}H_{34}O_{12}Na$ : 525.1942  
 $[\alpha]_D^{28}$ :  $-18.3$  (MeOH,  $c = 0.18$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3380, 2959, 2360, 1705, 1630, 1051  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 202 sh(4.03), 233 (3.93)

Fig. 82 Structure and Physical data of Compound **39**

Table 43  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	101.5	<i>d</i>	5.05, <i>d</i> , (9.0)
3	155.4	<i>d</i>	7.63, <i>d</i> , (1.2)
4	108.5	<i>s</i>	
5	42.6	<i>d</i>	3.02, <i>td</i> , (7.5, 1.6)
6	75.1	<i>d</i>	4.79, <i>m</i>
7	131.8	<i>d</i>	6.00, <i>d</i> , (1.6)
8	146.3	<i>s</i>	
9	46.4	<i>d</i>	2.62, <i>t</i> , (7.8)
10	63.8	<i>t</i>	4.79, <i>m</i> 4.94, <i>br d</i> , (14.9)
11	169.1	<i>s</i>	
11a	65.3	<i>t</i>	4.14, <i>ddd</i> , (13.2, 6.7, 2.2)
11b	32.1	<i>t</i>	1.66, <i>quint</i> , (7.5)
11c	20.5	<i>t</i>	1.43, <i>sext</i> , (7.5)
11d	14.2	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.5)
12	176.0	<i>s</i>	
12a	28.4	<i>t</i>	2.40, <i>q</i> , (7.6)
12b	9.6	<i>q</i>	1.13, <i>t</i> , (7.6)
1'	100.8	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (7.9)
2'	75.6	<i>d</i>	} 3.20-3.38, <i>m</i>
3'	78.1	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.8	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	

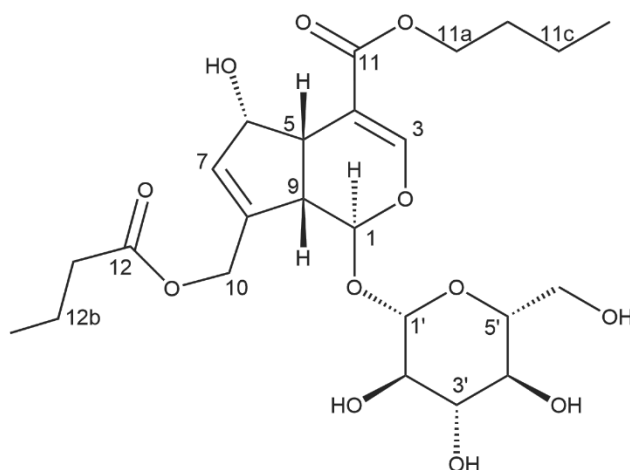


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 497.1629  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{21}H_{30}O_{12}Na$ : 497.1629  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -7.1 (MeOH,  $c = 0.31$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3396, 2934, 2360, 1702, 1633, 1077  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 205 sh(4.22), 232 (3.95)

Fig. 83 Structure and Physical data of Compound 40

Table 44  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	101.4	<i>d</i>	5.05, <i>d</i> , (8.9)
3	155.5	<i>d</i>	7.64, <i>d</i> , (1.2)
4	108.2	<i>s</i>	
5	42.6	<i>d</i>	3.01, <i>td</i> , (7.5, 1.2)
6	75.1	<i>d</i>	4.78, <i>m</i>
7	131.8	<i>d</i>	5.99, <i>d</i> , (1.7)
8	146.3	<i>s</i>	
9	46.4	<i>d</i>	2.62, <i>t</i> , (8.1)
10	63.7	<i>t</i>	4.78, <i>m</i> 4.95, <i>br d</i> , (15.1)
11	167.2	<i>s</i>	
11a	52.0	<i>q</i>	3.72, <i>s</i>
12	175.1	<i>s</i>	
12a	37.0	<i>t</i>	2.35, <i>t</i> , (7.0)
12b	19.6	<i>t</i>	1.65, <i>sext</i> , (7.0)
12c	14.1	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.0)
1'	100.8	<i>d</i>	4.70, <i>d</i> , (8.0)
2'	75.5	<i>d</i>	} 3.20-3.38, <i>m</i>
3'	78.0	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.7	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	3.83, <i>dd</i> , (1.5, 12.0) 3.60, <i>dd</i> , (6.2, 12.0)



Colorless amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 539.2100  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{24}H_{36}O_{12}Na$ : 539.2099

$[\alpha]_D^{28}$ : -5.9 (MeOH,  $c = 0.37$ )

IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3396, 2962, 2360, 1692, 1632, 1076

UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 200 sh(3.88), 234 (3.92)

Fig. 84 Structure and Physical data of Compound 41

Table 45  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	101.5	<i>d</i>	5.05, <i>d</i> , (8.8)
3	155.4	<i>d</i>	7.63, <i>d</i> , (1.3)
4	108.5	<i>s</i>	
5	42.5	<i>d</i>	3.02, <i>td</i> , (7.8, 1.8)
6	75.1	<i>d</i>	4.78, <i>m</i>
7	131.9	<i>d</i>	6.00, <i>d</i> , (1.7)
8	146.2	<i>s</i>	
9	46.5	<i>d</i>	2.62, <i>t</i> , (8.2)
10	63.7	<i>t</i>	4.78, <i>m</i> 4.96, <i>br d</i> , (14.2)
11	169.1	<i>s</i>	
11a	65.3	<i>t</i>	4.14, <i>ddd</i> , (2.4, 6.6, 13.2)
11b	32.1	<i>t</i>	1.66, <i>m</i>
11c	20.5	<i>t</i>	1.43, <i>sext</i> , (7.4)
11d	14.2	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.5)
12	175.1	<i>s</i>	
12a	37.0	<i>t</i>	2.35, <i>t</i> , (7.0)
12b	19.6	<i>t</i>	1.66, <i>m</i>
12c	14.2	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.5)
1'	100.8	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (7.4)
2'	75.6	<i>d</i>	} 3.21-3.38, <i>m</i>
3'	78.1	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.8	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	

化合物 **38** は無色の固体として単離され、HR-ESI-MS より分子式を  $C_{20}H_{28}O_{12}$  に決定し、7 つの不飽和度が示唆された。

$^1H$  NMR スペクトル (Table 42) において、olefinic プロトンに由来する 2 つのシグナル ( $\delta_H$  6.02, d,  $J = 1.5$  Hz;  $\delta_H$  7.66, d,  $J = 1.1$  Hz)、メチル基に由来する 2 つのピーク ( $\delta_H$  3.75, s;  $\delta_H$  1.15, t,  $J = 7.5$  Hz) およびグルコースのアノマー水素に由来するシグナル ( $\delta_H$  4.73, d,  $J = 7.8$  Hz) が観測された。化合物 **38** の平面構造を推測するために、 $^{13}C$  NMR と HSQC スペクトル解析を行った。具体的には、 $^{13}C$  NMR においてカルボニル基に帰属すべきピークが 2 つ ( $\delta_C$  169.5, 176.0 ppm)、二重結合に由来するシグナルが 4 つ ( $\delta_C$  155.5, 146.3, 131.8, 108.3 ppm) と酸素結合している三級炭素シグナルが 2 つ ( $\delta_C$  101.5, 100.8 ppm) が観測された。以上の情報から、化合物 **38** の骨格は 2 つの環構造を有したグルコシドであり、イソプレン経由の代謝物であるイリドイド類化合物に類似していると推測した。文献を検索したところ、既知化合物 daphylloside (**46**) [46] と同様な骨格を有することが明らかとなった。

化合物 **38** の平面構造を検証するために、2D NMR スペクトル (Fig. 85) 測定を行い、COSY スペクトルにおいては、1 位水素から 7 位水素までの連続したスピネットワークが観測された。一方で、HMBC スペクトルにおいても、イリドイド骨格を取り巻く一連の相関が見られ、化合物 **38** の平面構造を Fig. 81 のように決定した。

立体配置は NOESY スペクトルによって検討を行った (Fig. 86)。5 位、6 位と 9 位水素の相関シグナルが観測され、化合物 **46** と同様な立体配置 ( $\beta$  配置) であることが示唆された。また、1 位の立体は 1 位水素と 9 位水素の大きなカップリング定数 ( $J = 8.5$  Hz) によって、反対側の  $\alpha$  配置に帰属した。絶対立体配置については、イリドイド類は共通の生合成経路を有しているためか、これまで報告されている既知化合物のほとんどは同様な絶対立体配置を持つことから、Fig. 81 のように記載した場合 5, 9 位が  $\beta$  であらわされる絶対立体配置である可能性が高いと考えられる。今後、ECD 計算などの手法により確認する予定である。

化合物 **39** の分子式は HR-ESI-MS によって、 $C_{23}H_{34}O_{12}$  に決定した。化合物 **38** の NMR スペクトルと比較したところ、1-BuOH 側鎖とプロピオン酸側鎖の存在が確認できた。平面構造の検証や立体配置の決定は化合物 **38** と同様に行った。

また、化合物 **40** と **41** も同様に、それぞれメキシ基、酪酸側鎖と 1-BuOH 側鎖、酪酸側鎖を有することが明らかになった。



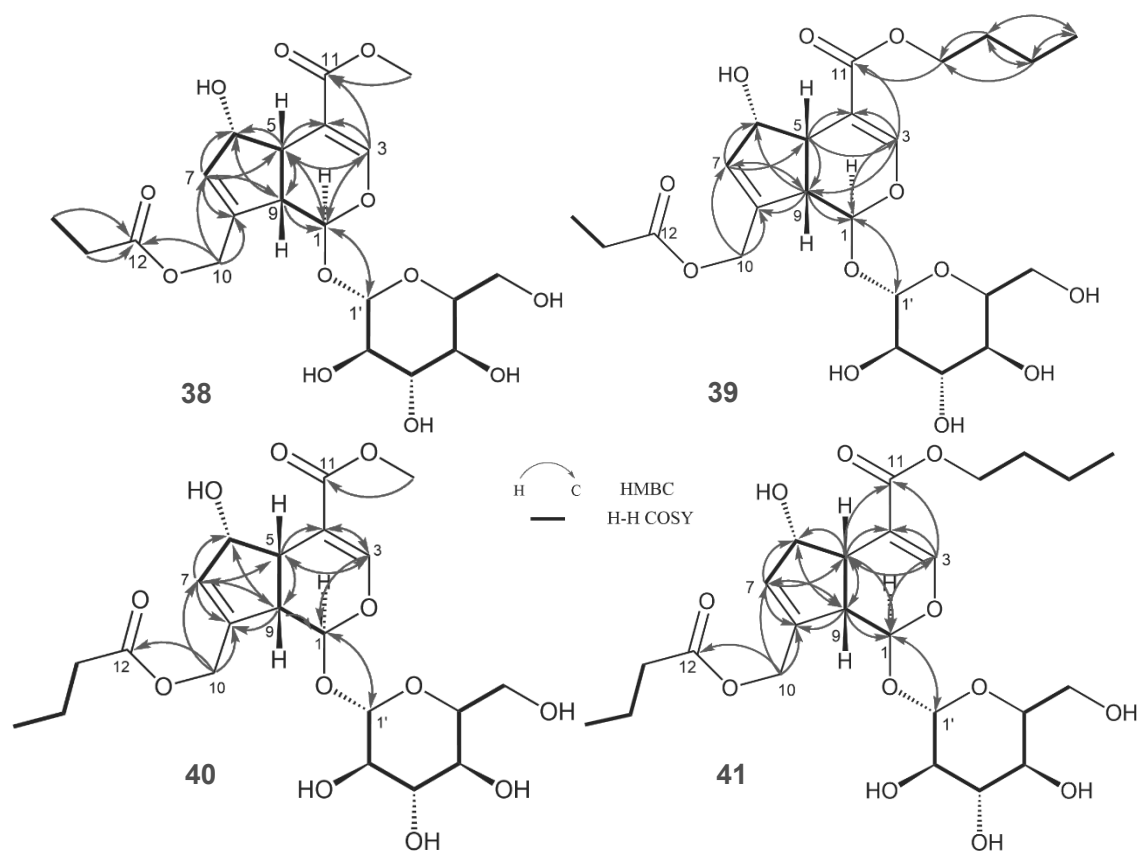


Fig. 85 Key COSY and HMBC correlations of Compounds **38**–**41**

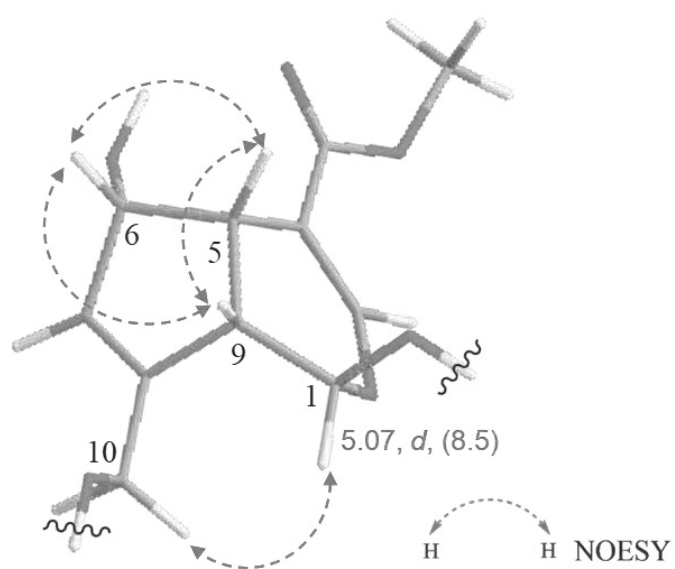
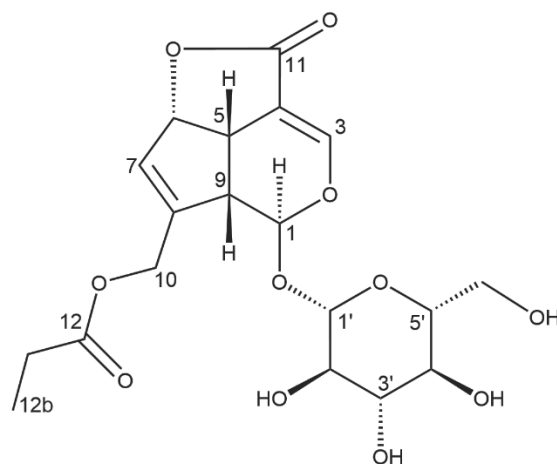


Fig. 86 Key PS-NOESY correlations of Compound **38**

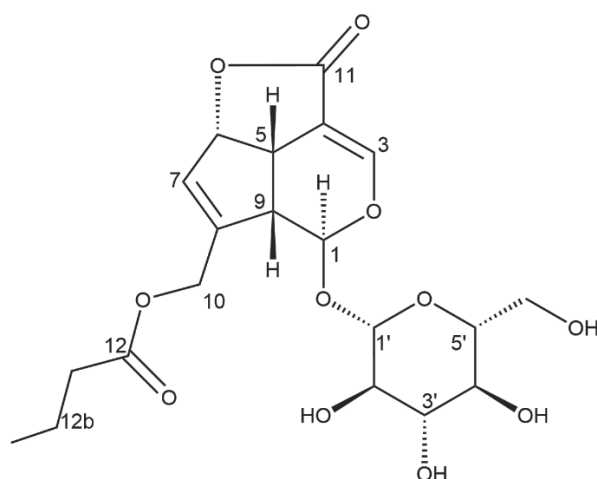


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 451.1211  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{24}O_{11}Na$ : 451.1211  
 $[\alpha]_D^{28}$ :  $-120.5$  (MeOH,  $c = 1.07$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3389, 2942, 2361, 1739, 1658, 1058  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm ( $\log \epsilon$ ): 201 (3.85), 233 (3.67)

Fig. 87 Structure and Physical data of Compound 42

Table 46  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	93.4	<i>d</i>	5.98, <i>d</i> , (1.4)
3	150.4	<i>d</i>	7.33, <i>d</i> , (2.1)
4	106.3	<i>s</i>	
5	37.5	<i>d</i>	3.70, <i>t</i> , (6.3)
6	86.4	<i>d</i>	5.59, <i>d</i> - <i>quint</i> , (6.7, 1.6)
7	129.0	<i>d</i>	5.75, <i>quint</i> , (1.6)
8	144.5	<i>s</i>	
9	45.4	<i>d</i>	3.20-3.42, <i>m</i>
10	62.9	<i>t</i>	4.82, <i>dq</i> , (14.4, 1.2) 4.70, <i>dq</i> , (14.4, 0.9)
11	172.7	<i>s</i>	
12	175.7	<i>s</i>	
12a	28.3	<i>t</i>	2.42, <i>q</i> , (7.5)
12b	9.5	<i>q</i>	1.15, <i>t</i> , (7.5)
1'	100.1	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (7.4)
2'	74.7	<i>d</i>	} 3.20-3.42, <i>m</i>
3'	78.5	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.0	<i>d</i>	
6'	62.0	<i>t</i>	

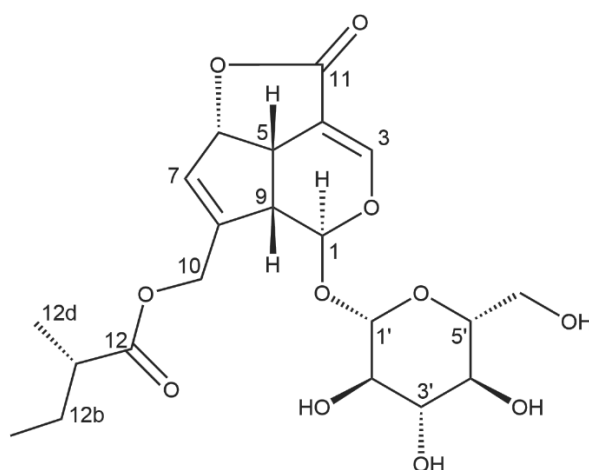


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 465.1366  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{20}H_{26}O_{11}Na$ : 465.1367  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -134.8 (MeOH,  $c = 0.7$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3396, 2966, 2361, 1739, 1658, 1072  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm ( $\log \epsilon$ ): 201 (3.77), 234 (3.67)

Fig. 88 Structure and Physical data of Compound **43**

Table 47  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	93.4	<i>d</i>	5.97, <i>br s</i>
3	150.5	<i>d</i>	7.32, <i>d</i> , (1.7)
4	106.3	<i>s</i>	
5	37.6	<i>d</i>	3.66, <i>t</i> , (6.3)
6	86.5	<i>d</i>	5.58, <i>br d</i> , (6.5)
7	129.1	<i>d</i>	5.74, <i>br s</i>
8	144.5	<i>s</i>	
9	45.4	<i>d</i>	3.18-3.36, <i>m</i>
10	62.9	<i>t</i>	4.78, <i>br d</i> , (14.3) 4.62, <i>br d</i> , (14.3)
11	172.8	<i>s</i>	
12	174.9	<i>s</i>	
12a	36.9	<i>t</i>	2.34, <i>t</i> , (7.2)
12b	19.5	<i>t</i>	1.66, <i>sext</i> , (7.5)
12c	14.1	<i>q</i>	0.96, <i>t</i> , (7.2)
1'	100.1	<i>d</i>	4.67, <i>d</i> , (7.9)
2'	74.8	<i>d</i>	} 3.18-3.36, <i>m</i>
3'	78.5	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.0	<i>d</i>	
6'	61.9	<i>t</i>	



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 479.1531 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>Na: 479.1524  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -110.6 (MeOH,  $c = 0.7$ )  
 IR  $\nu_{\max}$  (film) cm<sup>-1</sup>: 3396, 2968, 2360, 1742, 1658, 1055  
 UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 202 (3.85), 233 (3.72)

Fig. 89 Structure and Physical data of Compound 44

Table 48 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	93.4	<i>d</i>	5.95, <i>d</i> , (1.1)
3	150.4	<i>d</i>	7.30, <i>d</i> , (2.0)
4	106.3	<i>s</i>	
5	37.6	<i>d</i>	3.66, <i>t</i> , (6.0)
6	86.5	<i>d</i>	5.56, <i>d</i> -quint, (6.5, 1.6)
7	129.2	<i>d</i>	5.72, <i>m</i>
8	144.6	<i>s</i>	
9	45.5	<i>d</i>	3.18-3.36, <i>m</i>
10	62.9	<i>t</i>	4.79, <i>dq</i> , (14.4, 1.2) 4.66, <i>dq</i> , (14.4, 1.0)
11	172.7	<i>s</i>	
12	177.8	<i>s</i>	
12a	42.4	<i>d</i>	2.42, <i>sext</i> , (6.7)
12b	27.9	<i>t</i>	1.66, <i>d</i> -quint, (13.4, 7.4) 1.49, <i>d</i> -quint, (13.4, 7.4)
12c	12.1	<i>q</i>	0.90, <i>t</i> , (7.6)
12d	17.1	<i>q</i>	1.15, <i>d</i> , (7.0)
1''	100.1	<i>d</i>	4.67, <i>d</i> , (7.9)
2''	74.8	<i>d</i>	3.16, <i>dd</i> , (7.9, 9.1)
3''	78.5	<i>d</i>	} 3.24-3.38, <i>m</i>
4''	71.7	<i>d</i>	
5''	78.0	<i>d</i>	
6''	61.9	<i>t</i>	3.67, <i>dd</i> , (6.4, 12.1) 3.90, <i>dd</i> , (2.4, 12.1)

化合物 **42** は無色の固体として得られ、その分子式は HR-ESI-MS より  $C_{19}H_{24}O_{11}$  に決定し、8 つの不飽和度が示唆された。

$^{13}C$  NMR スペクトル (Table 46) から、カルボニル基に由来するシグナルが 2 つ ( $\delta_C$  172.7, 175.7 ppm)、二重結合に由来するピークが 4 つ ( $\delta_C$  150.4, 144.5, 129.0, 106.3 ppm) 観測された。さらに、アノマー炭素 ( $\delta_C$  100.1 ppm) の存在から、化合物 **42** もグルコース配糖体であることが示された。以上の構造情報から、残りの 3 つの不飽和度は全て環構造に由来するものと推測し、文献を検索したところ、既知化合物 asperuloside (**48**) [47] と類似する骨格を持っていると推測した。最後に、 $^1H$  と  $^{13}C$  NMR スペクトルからプロピオン酸側鎖の特徴的なシグナルが観測され、化合物 **42** は asperuloside の酢酸部分をプロピオン酸に置換したものと決定した。

相対立体配置は NOESY スペクトル (Fig. 91) とカップリング定数によって決定した。NOESY スペクトルにおいては 5 位、6 位と 9 位の相互に相関シグナルが観測され、asperuloside と同様な  $\beta$  配置に決定した。さらに、1 位プロトンと 9 位のカップリング定数 ( $J = 1.4$  Hz) も asperuloside ( $J = 1.5$  Hz) と一致していることから、1 位プロトンは  $\alpha$  位に帰属した。

化合物 **43** の分子式は MS スペクトルから  $C_{20}H_{26}O_{11}$  に決定された。1D NMR (Table 47) を測定したところ、化合物 **42** とほぼ一致するデータが観測され、同様な基本骨格を持つことが示唆された。さらに、酪酸に由来する  $^{13}C$  NMR シグナル ( $\delta_C$  174.9, 36.9, 19.5, 14.1 ppm) が見られ、化合物 **42** と比べて、増えた分子量は酪酸側鎖の置換によるものと判明し、化合物 **43** の構造を Fig. 88 のように決定した。

化合物 **44** の分子式は化合物 **43** よりさらに大きくなり、MS スペクトルから  $C_{21}H_{28}O_{11}$  に決定した。 $^1H$  NMR スペクトル (Table 48) において、6 つに分裂するシグナル ( $\delta_H$  2.42, sext,  $J = 6.7$  Hz) とダブルレットの高磁場シグナル ( $\delta_H$  1.15, d,  $J = 7.0$  Hz) が観測され、メチル基が付加した酪酸側鎖の存在が示唆された。さらに、HMBC スペクトル (Fig. 90) から前述したダブルレットプロトン ( $\delta_H$  1.15, d,  $J = 7.0$  Hz) から 12 位のカルボニル基への相関が観測されたことから、2-メチル酪酸の存在が明らかになった。最後に、2-メチル酪酸の絶対立体配置はアルカリ性加水分解と HPLC による分析を行い、S 体と決定し、化合物 **44** の構造を Fig. 89 のように決定した。

尚、化合物 **42** - **44** の絶対立体配置は、イリドイド類であることや、同植物から asperuloside (**48**) が単離されたことから、同様な絶対立体配置を有していると考えている。

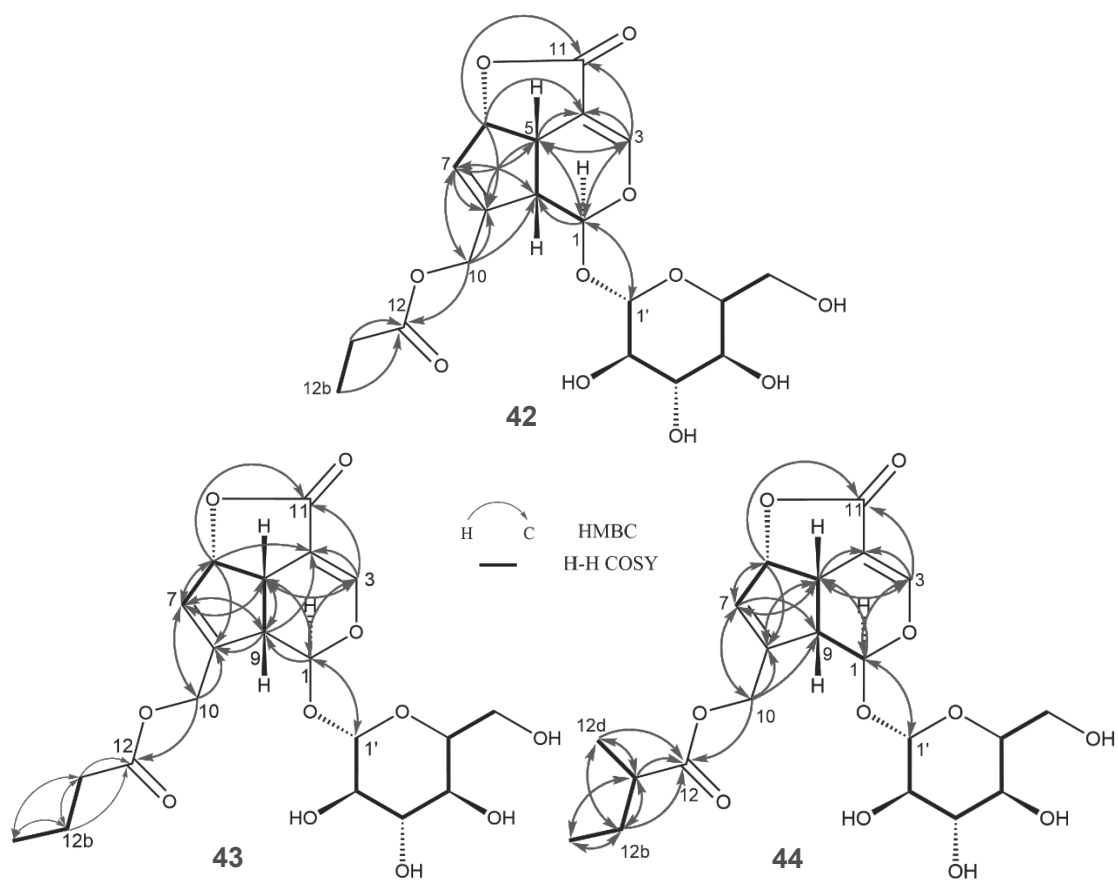


Fig. 90 Key COSY and HMBC correlations of Compounds 42–44

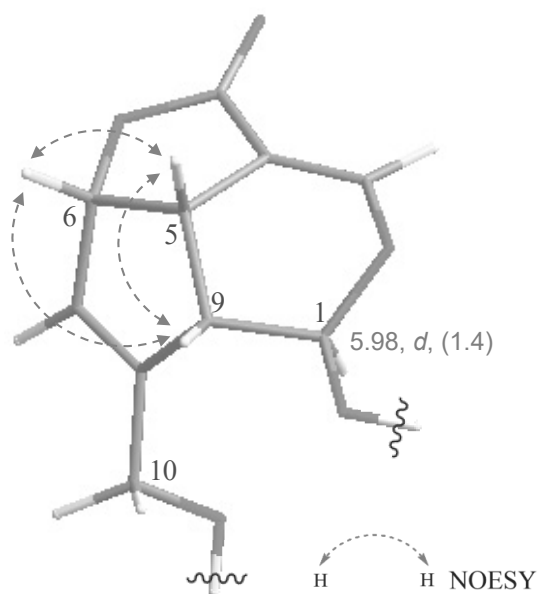
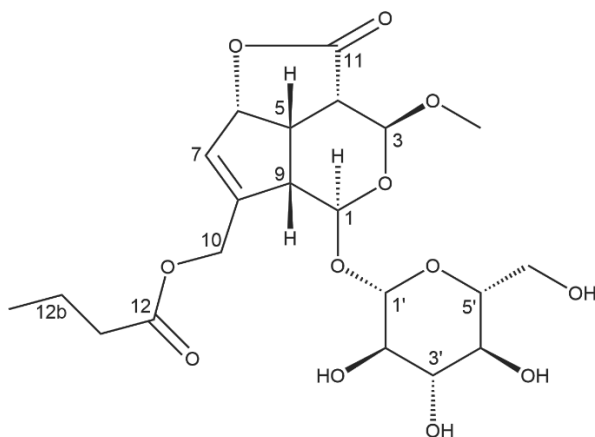


Fig. 91 Key PS-NOESY correlations of Compound 42



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 497.1635  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{21}H_{30}O_{12}Na$ : 497.1629  
 $[\alpha]_D^{28}$ :  $-32.3$  (MeOH,  $c = 0.31$ )  
 IR  $\nu_{max}$  (film)  $cm^{-1}$ : 3396, 2967, 2361, 1747, 1627, 1056  
 UV  $\lambda_{max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 205 (4.03), 231sh (3.53)

Fig. 92 Structure and Physical data of Compound 45

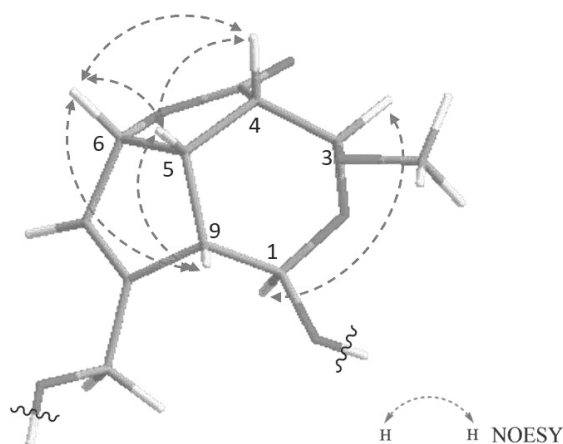
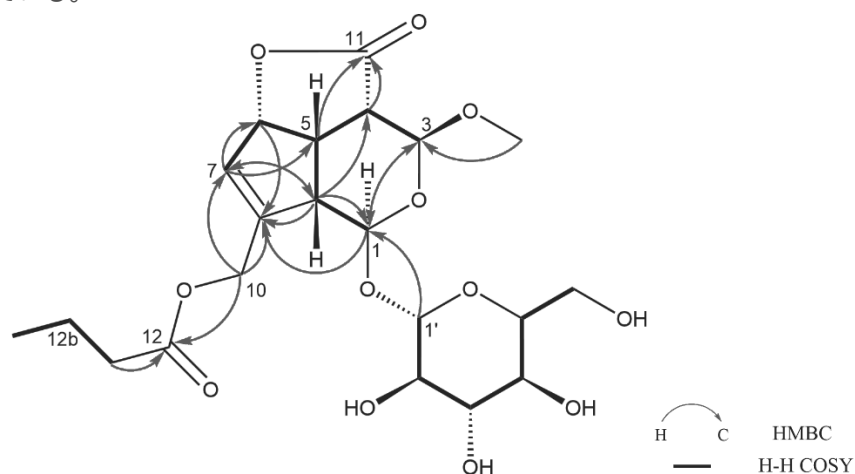
 Table 49  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	96.9	<i>d</i>	5.10, <i>d</i> , (6.1)
3	98.7	<i>d</i>	4.99, <i>d</i> , (3.6)
4	44.6	<i>d</i>	3.23, <i>dd</i> , (3.7, 10.6)
5	37.8	<i>d</i>	3.34-3.40, <i>m</i>
6	88.0	<i>d</i>	5.37, <i>d</i> -like, (6.7)
7	126.4	<i>d</i>	5.95, <i>quint</i> , (1.6)
8	152.4	<i>s</i>	
9	46.5	<i>d</i>	3.01, <i>dd</i> , (6.2, 9.1)
10	62.7	<i>t</i>	4.96, <i>br d</i> , (15.6) 4.73, <i>dq</i> , (15.6, 0.9)
11	177.3	<i>s</i>	
12	175.2	<i>s</i>	
12a	36.9	<i>t</i>	2.37, <i>t</i> , (7.3)
12b	19.6	<i>t</i>	1.66, <i>sext</i> , (7.3)
12c	14.1	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.4)
3-OCH <sub>3</sub>	56.6	<i>q</i>	3.51, <i>s</i>
1'	99.8	<i>d</i>	4.67, <i>d</i> , (7.7)
2'	75.1	<i>d</i>	3.18, <i>dd</i> , (7.8, 9.1)
3'	78.4	<i>d</i>	} 3.25-3.40, <i>m</i>
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.2	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.84, <i>dd</i> , (1.0, 12.5) 3.63, <i>dd</i> , (5.7, 11.9)

化合物 **45** の分子式は HR-ESI-MS より  $C_{21}H_{30}O_{12}$  に決定し、7 つの不飽和度が示唆された。 $^{13}C$  NMR スペクトル (Table 49) において、2 つのカルボニル基 ( $\delta_C$  177.3, 175.2 ppm) と 1 つの二重結合 ( $\delta_C$  152.4, 126.4 ppm) に由来するシグナルが観測され、化合物 **42**–**44** より二重結合が 1 つ減少した化合物であることが判明した。また、残る不飽和度から、化合物 **45** は化合物 **42** のようなラクトン環構造を有するイリドイドグルコシドであると推測した。さらに、二重結合のシグナルが減少した一方で、新たに三級炭素を示唆するシグナル ( $\delta_C$  98.7, 44.6 ppm) 2 本が観測された。そのうち、片方 ( $\delta_C$  98.7 ppm) は通常より低磁場シフトしていることから、アセタール炭素のように酸素が二つ結合している三級炭素と推定し、化合物 **42** とのケミカルシフトの比較により、還元された二重結合は 3, 4 位であると推測した。

続いて、COSY および HMBC による推定化学構造の検証 (Fig. 93) を行った。COSY スペクトルでは 3 位プロトンから 7 位や 1 位への連続した相関が観測され、還元された二重結合の位置が明らかになった。一方で、HMBC スペクトルにおいては、メキシ基水素 ( $\delta_H$  3.51, s) から 3 位炭素 ( $\delta_C$  98.7 ppm) の相関が見られ、メキシ基の結合位置を決定した。

本化合物の相対立体配置を決定するために、NOESY スペクトル (Fig. 94) 分析を行った。具体的には、4 位、5 位、6 位および 9 位の相互に相関が観測され、同様に  $\beta$  配置であると推測した。一方で、3 位プロトンから 5 位の相関が観測されず、1 位との相関が強く見られたことから、3 位と 1 位水素は反対側の  $\alpha$  配置であると帰属した。また、化合物 **45** の絶対立体配置については、イリドイド類であること、また、実際に、同様な骨格を持つ既知化合物 V3 iridoid (**49**) [48] が同植物から単離されたことを考慮し、化合物 **45** の絶対立体構造も同様に Fig. 92 に示すものであると考えている。





### 第三節 既知化合物について

ビシンジュズネノキ (*D. indicus* var. *intermedius*) 地上部 1-BuOH 可溶画分から 10 種の既知化合物 (46–55) を単離し、文献の NMR データと比較することで、化学構造を決定した。そのうち、イリドイドグルコシド類 5 種: daphylloside (46) [46], officinaloside G (47) [49], asperuloside (48) [47],  $V_3$  iridoid (49) [48] と eucomoside A (50) [50]; リグナングルコシド 2 種: syringaresinol mono- $\beta$ -D-glucoside (51) [51] と (7*S*,8*R*,8'*R*)-4,4',9-trihydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-one 4- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside (52) [52]; キノングルコシド類 1 種: hedanthroside B (53) [53]; その他の化合物 2 種: (*S*)-butyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (54) [54] と *n*-Butyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside (55) [55] であった。

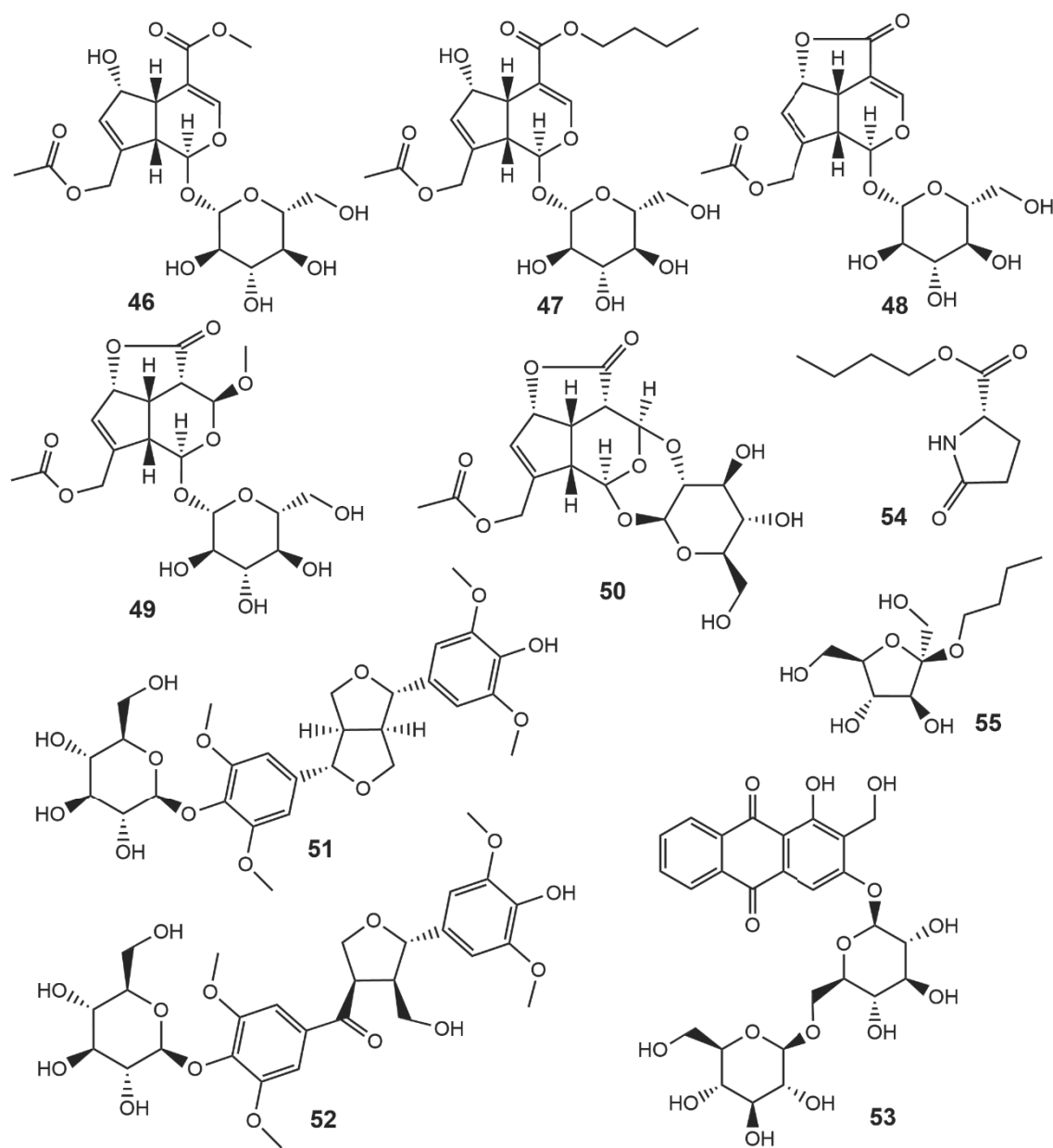
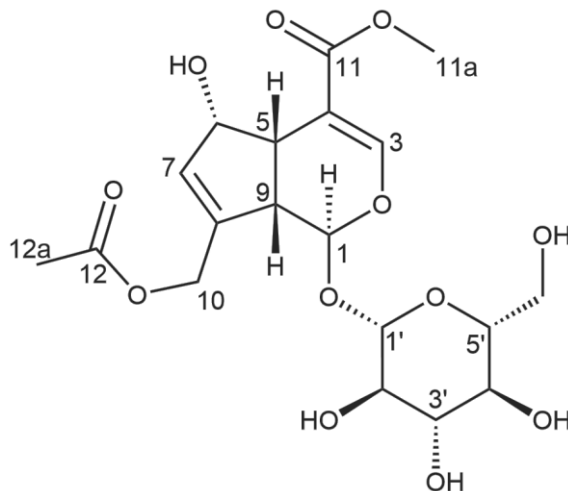


Fig. 95 Known compounds from the 1-BuOH layer of *D. indicus* var. *intermedius*

第一項 既知イリドイドグルコシド誘導体の化学構造

先行文献の NMR スペクトルデータとの比較によって、化合物 **46** を daphylloside、化合物 **47** を officinaloside G、化合物 **48** を asperuloside、化合物 **49** を V<sub>3</sub> iridoid、化合物 **50** を eucomoside A に同定した。

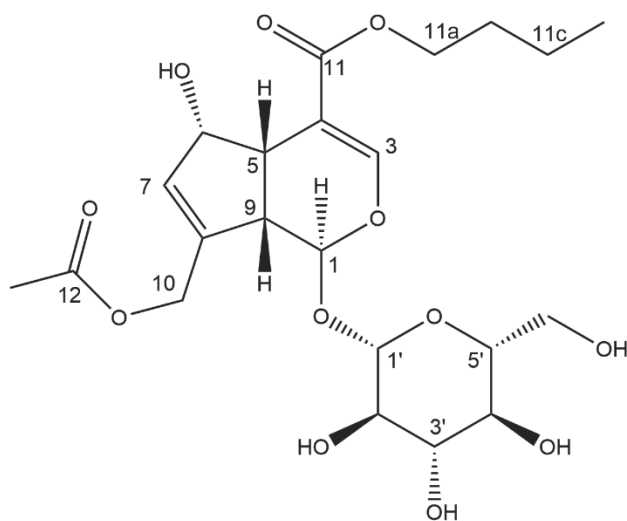


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 469.1312 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>Na: 469.1316

Fig. 96 Structure and physical data of Compound **46**

Table 50 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	101.4	<i>d</i>	5.06, <i>d</i> , (8.9)
3	155.5	<i>d</i>	7.66, <i>d</i> , (1.3)
4	108.2	<i>s</i>	
5	42.5	<i>d</i>	3.03, <i>td</i> , (7.3, 1.3)
6	75.0	<i>d</i>	4.80, <i>m</i>
7	132.0	<i>d</i>	6.02, <i>d</i> , (1.2)
8	146.1	<i>s</i>	
9	46.4	<i>d</i>	2.62, <i>t</i> , (8.9)
10	63.8	<i>t</i>	4.80, <i>m</i> 4.94, <i>d</i> , (15.3)
11	169.5	<i>s</i>	
11a	52.0	<i>q</i>	3.74, <i>s</i>
12	172.7	<i>s</i>	
12a	20.9	<i>q</i>	2.09, <i>s</i>
1'	100.7	<i>d</i>	4.73, <i>d</i> , (8.0)
2'	75.5	<i>d</i>	} 3.22-3.40, <i>m</i>
3'	78.0	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.7	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	3.61, <i>dd</i> , (6.1, 12.0) 3.86, <i>dd</i> , (2.0, 11.9)

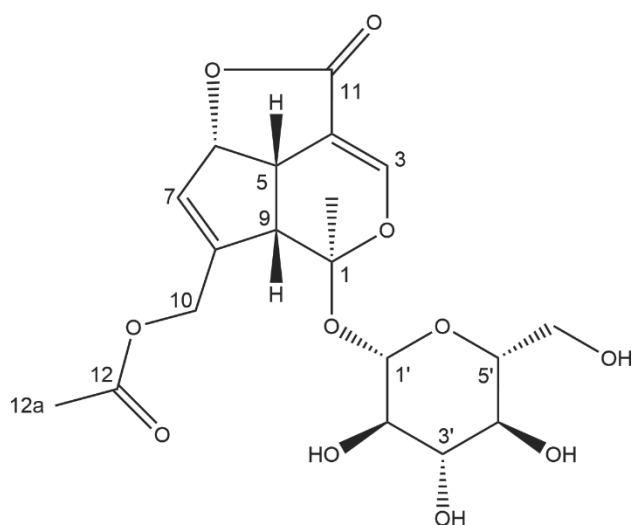


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 511.1787 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>12</sub>Na: 511.1786

Fig. 97 Structure and physical data of Compound 47

Table 51 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	101.4	<i>d</i>	5.04, <i>d</i> , (9.0)
3	155.4	<i>d</i>	7.63, <i>d</i> , (1.4)
4	108.5	<i>s</i>	
5	42.6	<i>d</i>	3.01, <i>td</i> , (7.2, 1.4)
6	75.1	<i>d</i>	4.80, <i>m</i>
7	132.0	<i>d</i>	6.01, <i>d</i> , (1.6)
8	146.1	<i>s</i>	
9	46.4	<i>d</i>	2.62, <i>t</i> , (8.0)
10	63.9	<i>t</i>	4.80, <i>m</i> 4.93, <i>d</i> , (14.4)
11	169.1	<i>s</i>	
11a	65.3	<i>t</i>	4.14, <i>ddd</i> , (2.4, 6.7, 13.2)
11b	32.1	<i>t</i>	1.67, <i>quint</i> , (7.2)
11c	20.5	<i>t</i>	1.47, <i>sext</i> , (7.4)
11d	14.3	<i>q</i>	0.95, <i>t</i> , (7.4)
12	172.7	<i>s</i>	
12a	20.9	<i>q</i>	2.07, <i>s</i>
1'	100.7	<i>d</i>	4.70, <i>d</i> , (8.0)
2'	75.6	<i>d</i>	} 3.20-3.38, <i>m</i>
3'	78.0	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.7	<i>d</i>	
6'	63.1	<i>t</i>	3.84, <i>dd</i> , (1.6, 12.0) 3.60, <i>dd</i> , (5.9, 12.0)

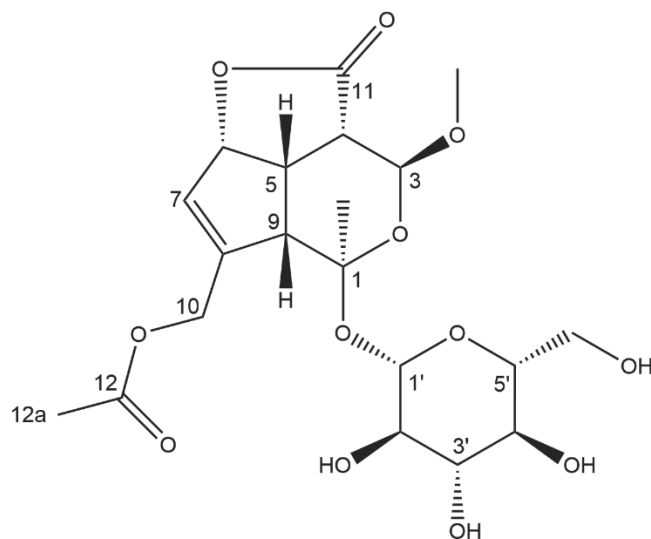


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 437.1057  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{18}H_{22}O_{11}Na$ : 437.1054

Fig. 98 Structure and physical data of Compound 48

Table 52  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	93.4	<i>d</i>	5.98, <i>d</i> , (1.5)
3	150.4	<i>d</i>	7.33, <i>d</i> , (1.2)
4	106.3	<i>s</i>	
5	37.6	<i>d</i>	3.70, <i>t</i> , (6.4)
6	86.5	<i>d</i>	5.59, <i>d</i> - <i>quint</i> , (6.7, 1.5)
7	129.1	<i>d</i>	5.75, <i>quint</i> , (1.5)
8	144.4	<i>s</i>	
9	45.4	<i>d</i>	3.20- 3.42, <i>m</i>
10	62.9	<i>t</i>	4.80, <i>dq</i> , (14.3, 1.3) 4.69, <i>dq</i> , (14.3, 1.3)
11	172.4	<i>s</i>	
12	172.7	<i>s</i>	
12a	20.8	<i>q</i>	2.10, <i>s</i>
1'	100.1	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (7.9)
2'	74.2	<i>d</i>	} 3.20- 3.42, <i>m</i>
3'	78.5	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.0	<i>d</i>	
6'	62.1	<i>t</i>	3.94, <i>dd</i> , (2.1, 12.1) 3.69, <i>dd</i> , (6.7, 12.1)

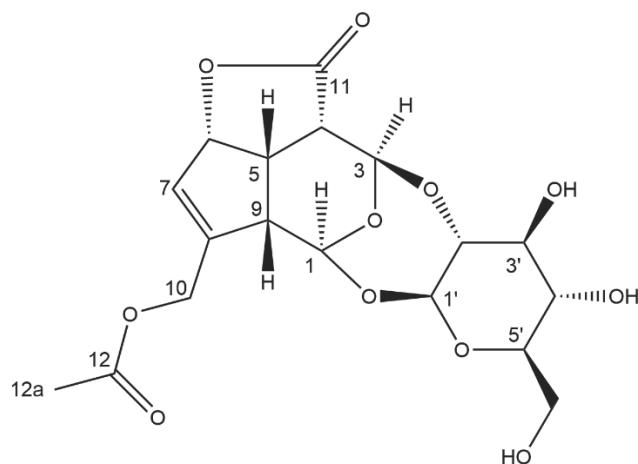


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 469.1318  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{26}O_{12}Na$ : 469.1316

Fig. 99 Structure and physical data of Compound **49**

Table 53  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	96.9	<i>d</i>	5.11, <i>d</i> , (6.1)
3	98.7	<i>d</i>	4.99, <i>d</i> , (3.5)
3-OCH <sub>3</sub>	56.6	<i>q</i>	3.51, <i>s</i>
4	44.6	<i>d</i>	3.24, <i>dd</i> , (3.5, 10.5)
5	37.8	<i>d</i>	3.35-3.41, <i>m</i>
6	88.0	<i>d</i>	5.37, <i>d</i> -like, (6.6)
7	126.4	<i>d</i>	5.98, <i>quint</i> , (1.4)
8	152.2	<i>s</i>	
9	46.5	<i>d</i>	3.02, <i>dd</i> , (6.1, 8.1)
10	62.9	<i>t</i>	4.95, <i>br d</i> , (15.6) 4.73, <i>br d</i> , (15.6)
11	177.3	<i>s</i>	
12	172.7	<i>s</i>	
12a	20.9	<i>q</i>	2.10, <i>s</i>
1'	99.7	<i>d</i>	4.68, <i>d</i> , (7.9)
2'	75.0	<i>d</i>	3.18, <i>dd</i> , (7.9, 9.3)
3'	78.4	<i>d</i>	} 3.26-3.41, <i>m</i>
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.2	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.85, <i>dd</i> , (1.2, 11.9) 3.64, <i>dd</i> , (5.2, 11.9)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 437.1063 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>Na: 437.1054

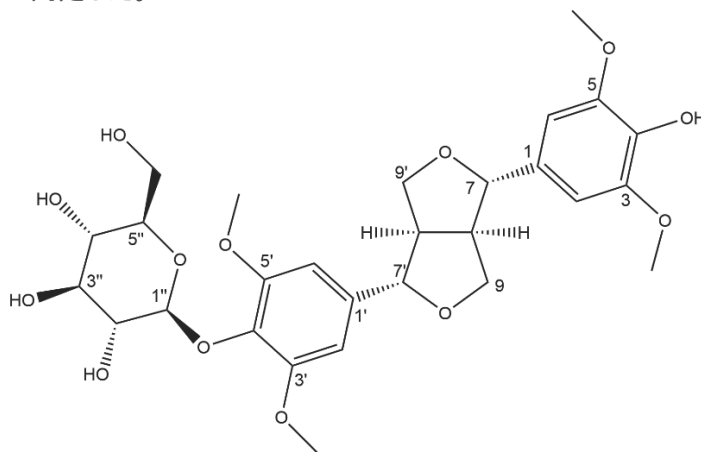
Fig. 100 Structure and physical data of Compound 50

Table 54 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	93.0	<i>d</i>	5.54, <i>d</i> , (1.9)
3	96.7	<i>d</i>	5.32, <i>d</i> , (2.5)
4	39.1	<i>d</i>	3.18, <i>dd</i> , (2.5, 12.4)
5	36.2	<i>d</i>	3.61, <i>m</i>
6	88.4	<i>d</i>	5.58, <i>d</i> -like, (8.0)
7	130.1	<i>d</i>	5.88, <i>quint</i> , (1.7)
8	144.9	<i>s</i>	
9	46.3	<i>d</i>	3.17, <i>m</i>
10	62.0	<i>t</i>	4.73, <i>dq</i> , (14.7, 1.4) 4.66, <i>dq</i> , (14.7, 0.9)
11	180.5	<i>s</i>	
12	172.3	<i>s</i>	
12a	20.7	<i>q</i>	2.07, <i>s</i>
1'	99.4	<i>d</i>	4.92, <i>d</i> , (7.4)
2'	80.1	<i>d</i>	3.41, <i>dd</i> , (7.5, 9.4)
3'	76.0	<i>d</i>	3.56, <i>t</i> , (9.0)
4'	71.2	<i>d</i>	3.37, <i>m</i>
5'	79.5	<i>d</i>	3.37, <i>m</i>
6'	62.7	<i>t</i>	3.67, <i>dd</i> , (4.3, 11.5) 3.87, <i>dd</i> , (1.0, 11.5)

第二項 既知リグナン誘導体の化学構造

文献の NMR データと比較し、化合物 **51** を syringaresinol mono- $\beta$ -D-glucoside、化合物 **52** を (7*S*,8*R*,8'*R*)-4,4',9-trihydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxy-7,9'-epoxylignan-7'-one 4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside に同定した。

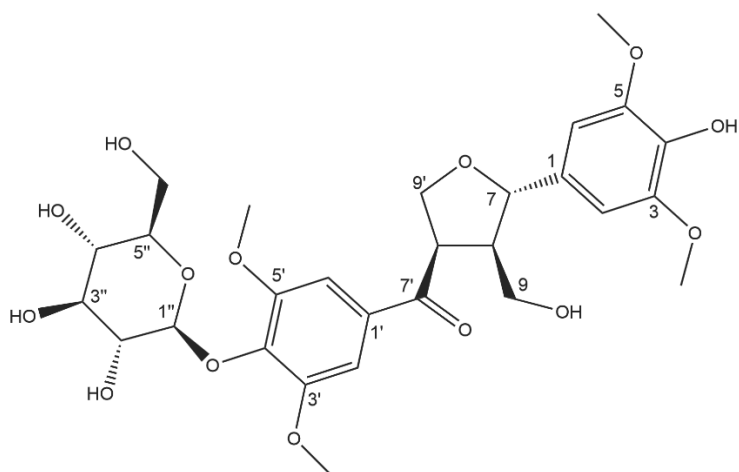


White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 603.2053 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>13</sub>Na: 603.2048

Fig. 101 Structure and physical data of Compound **51**

Table 55 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	133.2	<i>s</i>	
2, 6	104.9	<i>d</i>	6.65, <i>s</i>
3, 5	149.5	<i>s</i>	
4	136.3	<i>s</i>	
7	85.7	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (4.5)
8	55.6	<i>d</i>	3.12, <i>m</i>
9	73.0	<i>t</i>	4.28, <i>m</i> 3.90, <i>m</i>
1'	139.7	<i>s</i>	
2', 6'	105.4	<i>d</i>	6.71, <i>s</i>
3', 5'	154.5	<i>s</i>	
4'	135.7	<i>s</i>	
7'	87.3	<i>d</i>	4.76, <i>d</i> , (4.1)
8'	55.9	<i>d</i>	3.19, <i>m</i>
9'	73.0	<i>t</i>	4.28, <i>m</i> 3.90, <i>m</i>
3, 5-OCH <sub>3</sub>	57.0	<i>q</i>	
3', 5'-OCH <sub>3</sub>	57.2	<i>q</i>	
1''	104.6	<i>d</i>	4.85, <i>m</i>
2''	75.8	<i>d</i>	3.47, <i>m</i>
3''	77.9	<i>d</i>	3.47, <i>m</i>
4''	71.4	<i>d</i>	3.42, <i>m</i>
5''	78.5	<i>d</i>	3.12, <i>m</i>
6''	62.7	<i>t</i>	3.77, <i>dd</i> , (2.0, 11.8) 3.66, <i>dd</i> , (5.0, 11.8)



White amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 603.2053  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{28}H_{36}O_{13}Na$ : 603.2048

Fig. 102 Structure and physical data of Compound **52**

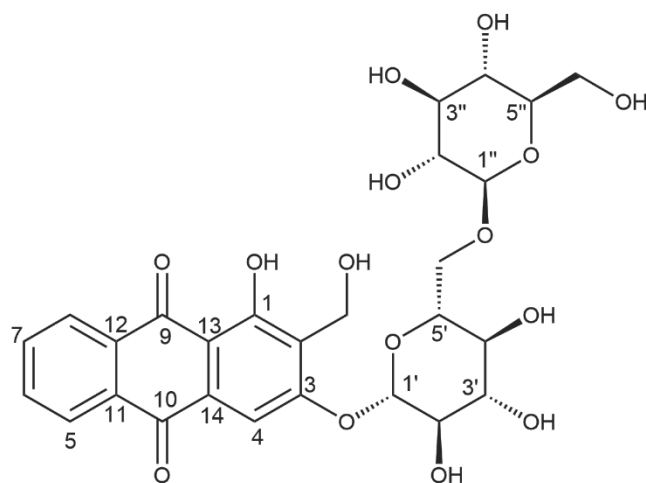
Table 56  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	133.2	<i>s</i>	
2, 6	104.9	<i>d</i>	6.65, <i>s</i>
3, 5	149.5	<i>s</i>	
4	136.3	<i>s</i>	
7	85.7	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (4.5)
8	55.6	<i>d</i>	3.12, <i>m</i>
9	73.0	<i>t</i>	4.28, <i>m</i> 3.90, <i>m</i>
1'	139.7	<i>s</i>	
2', 6'	105.4	<i>d</i>	6.71, <i>s</i>
3', 5'	154.5	<i>s</i>	
4'	135.7	<i>s</i>	
7'	87.3	<i>d</i>	4.76, <i>d</i> , (4.1)
8'	55.9	<i>d</i>	3.19, <i>m</i>
9'	73.0	<i>t</i>	4.28, <i>m</i> 3.90, <i>m</i>
3, 5-OCH <sub>3</sub>	57.0	<i>q</i>	
3', 5'-OCH <sub>3</sub>	57.2	<i>q</i>	
1''	104.6	<i>d</i>	4.85, <i>m</i>
2''	75.8	<i>d</i>	3.47, <i>m</i>
3''	77.9	<i>d</i>	3.47, <i>m</i>
4''	71.4	<i>d</i>	3.42, <i>m</i>
5''	78.5	<i>d</i>	3.12, <i>m</i>
6''	62.7	<i>t</i>	3.77, <i>dd</i> , (2.0, 11.8) 3.66, <i>dd</i> , (5.0, 11.8)



第三項 既知キノングルコシド誘導体の化学構造

文献の NMR データと比較し、化合物 **53** を hedanthroside B に同定した。



Yellow amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 617.1482 [M+Na]<sup>+</sup>

Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>Na: 617.1482

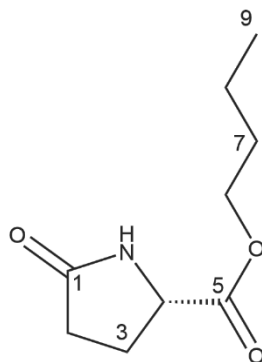
Fig. 103 Structure and physical data of Compound **53**

Table 57 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	162.0	<i>s</i>	
2	123.7	<i>s</i>	
3	162.1	<i>s</i>	
4	106.4	<i>d</i>	7.48, <i>s</i>
5	127.0	<i>d</i>	8.25, <i>dd</i> , (7.1, 1.8)
6	134.8	<i>d</i>	7.94, <i>m</i>
7	135.0	<i>d</i>	7.94, <i>m</i>
8	126.6	<i>d</i>	8.20, <i>dd</i> , (7.1, 2.1)
9	187.2	<i>s</i>	
10	181.6	<i>s</i>	
11	133.0	<i>s</i>	
12	132.9	<i>s</i>	
13	111.5	<i>s</i>	
14	133.9	<i>s</i>	
2-CH <sub>2</sub> OH	51.0	<i>t</i>	4.64, <i>d</i> , (10.4) 4.57, <i>d</i> , (10.4)
1', 1''	100.8, 104.2	<i>d</i>	5.13, <i>d</i> , (6.3)/4.15, <i>d</i> , (7.2)
2', 2''	75.7, 76.5	<i>d</i>	3.62-3.77, <i>m</i> /2.98-3.09, <i>m</i>
3', 3''	69.5, 73.3	<i>d</i>	3.27-3.36, <i>m</i> /2.98-3.09, <i>m</i>
4', 4''	73.3, 75.9	<i>d</i>	2.98-3.09, <i>m</i> /2.98-3.09, <i>m</i>
5', 5''	69.2, 73.2	<i>d</i>	3.27-3.36, <i>m</i> /3.27-3.36, <i>m</i>
6', 6''	68.1, 65.7	<i>t</i>	3.95, <i>d</i> , (9.8)/3.65, <i>m</i> 3.71, <i>m</i> /3.17, <i>d</i> , (11.6)

第四項 その他既知化合物の化学構造

報告された NMR データと比較することで、化合物 **54** を (S)-butyl 5-oxopyrrolidine-2-carboxylate、化合物 **55** を *n*-butyl- $\alpha$ -D-fructofuranoside に同定した。

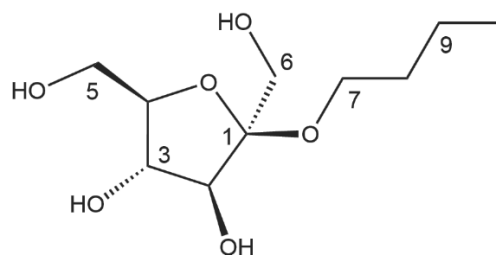


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 186.1122 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N: 186.1125  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -23.0 (MeOH, c = 0.2)

Fig. 104 Structure and physical data of Compound **54**

Table 58 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	178.4	<i>s</i>	
2	30.5	<i>t</i>	2.43- 2.51, <i>m</i> 2.26- 2.39, <i>m</i>
3	26.1	<i>t</i>	2.26- 2.39, <i>m</i> 2.10- 2.16, <i>m</i>
4	57.3	<i>d</i>	4.27, <i>dd</i> , (4.3, 9.0)
5	174.3	<i>s</i>	
6	66.5	<i>t</i>	4.16, <i>t</i> , (6.6)
7	31.9	<i>t</i>	1.64, <i>m</i>
8	20.3	<i>t</i>	1.40, <i>sext</i> , (7.3)
9	14.1	<i>q</i>	0.94, <i>t</i> , (7.3)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 259.1159  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{10}H_{20}O_6Na$ : 259.1152

Fig. 105 Structure and physical data of Compound **55**

Table 59  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	108.9	<i>s</i>	
2	83.4	<i>d</i>	4.04, <i>d</i> , (5.0)
3	78.7	<i>d</i>	3.74, <i>dd</i> , (2.9, 11.8)
4	84.0	<i>d</i>	3.84, <i>m</i>
5	62.8	<i>t</i>	3.50-3.63, <i>m</i>
6	62.1	<i>t</i>	3.50-3.63, <i>m</i>
7	61.8	<i>d</i>	1.64, <i>m</i>
8	33.5	<i>d</i>	1.53, <i>m</i>
9	20.6	<i>d</i>	1.39, <i>m</i>
10	14.4	<i>q</i>	0.92, <i>t</i> , (7.5)

---

---

## 第4章 小括

---

---

沖縄県産植物ビシンジュズネノキ (*D. indicus* var. *intermedius*) の地上部に対して成分探索を行い、既知イリドイドグルコシド類化合物 5 種 (46–50)、既知リゲナングルコシド 2 種 (51–52)、既知キノングルコシド 1 種 (53)、その他化合物 2 種 (54–55) と共に、新規イリドイドグルコシド類 8 種 (38–45) を単離し、その化学構造を明らかにした。

## 第5章 考察

本研究では、沖縄県産植物ビシンジュズネノキ (*D. indicus* var. *intermedius*) から8種の新規イリドイドグルコシド類を単離し、その化学構造を明らかにした。イリドイド類化合物はイソプレンより合成されたモノテルペンで、irido-alkaloidと呼ばれる一群のアルカロイドを合成する中間体でもある。また、イリドイドグルコシド類の強い苦味から、植物の自己防衛手段の一つとも考えられている。

既に提唱されているイリドイド類の基本的な生合成経路と本研究で新たに単離された化合物の化学構造をもとに、想定されるイリドイドグルコシド類生合成経路を考察した (Fig. 106) [56]。

また、1-BuOH 側鎖については、butyryl-CoAなどがコニンなどの植物二次代謝物生合成研究で知られていることから、本研究で見出された化合物も生合成によるものと考えているが、抽出分離操作で 1-BuOH を用いていることから、実験操作過程で生じた artifact の可能性もある。

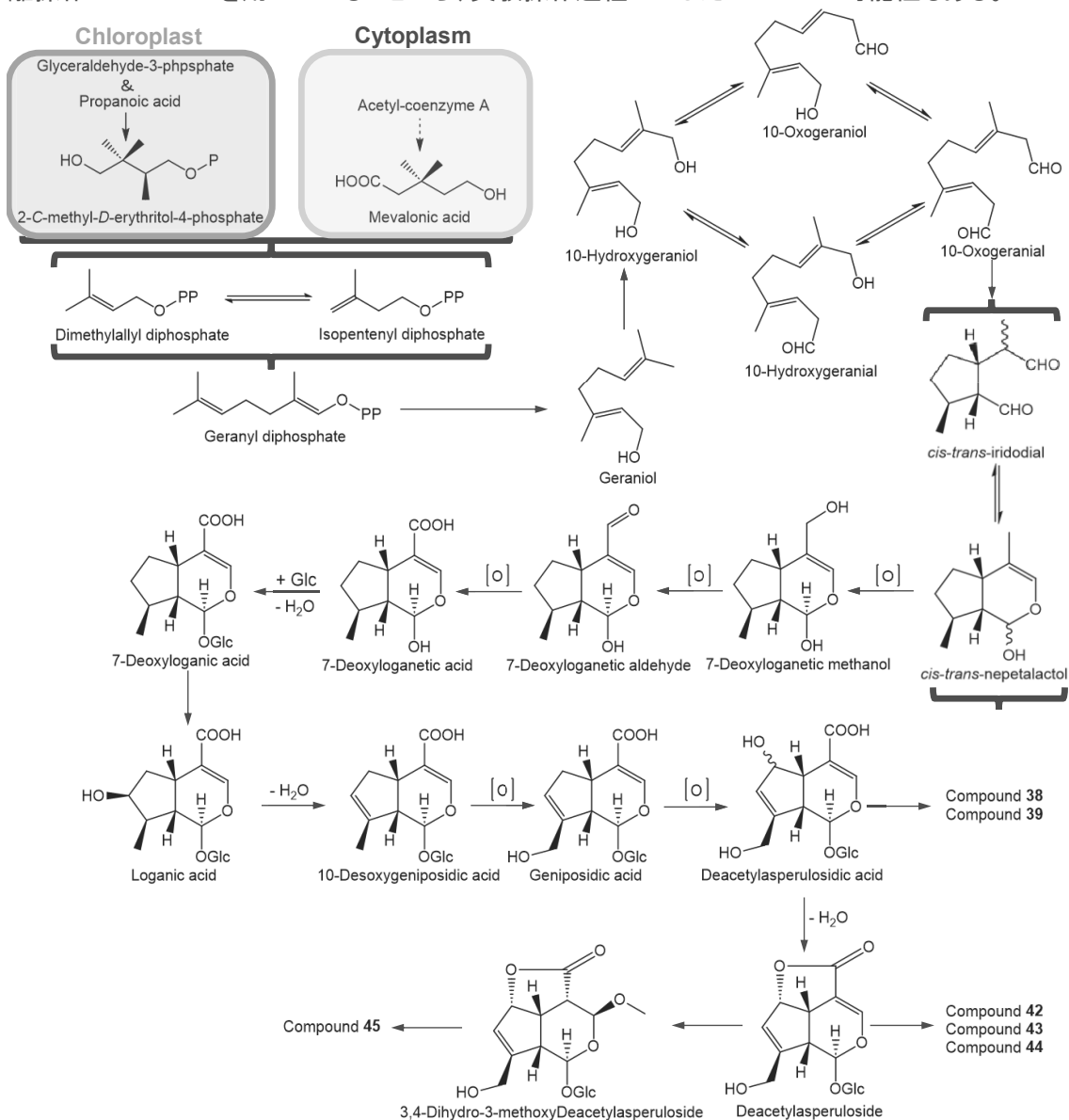


Fig. 106 The plausible biosynthesis of iridoid glucosides

---

---

## 第6章 実験の部

---

---

### 植物材料

ビシンジュズネノキ (*Damnacanthus indicus* var. *intermedius*) 地上部は2007年7月、沖縄県国頭郡国頭村にて採取した。

### 一般法

#### 1. 旋光度

旋光度は JASCO P-1030 (日本分光) デジタル旋光度計を用いて測定した。測定溶媒および温度は各測定値に付記した。

#### 2. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

Bruker AVANCE 600 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 600 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 150 MHz)、Bruker AVANCE 500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) もしくは JEOL JNM-ECP500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) を使用して測定した。いずれも溶媒中の D シグナルを internal lock signal とした。ケミカルシフト値の表示は内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) からの  $\delta$  値 (ppm) で示し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおける結合定数は括弧内に Hz 単位で記した。

#### 3. 質量分析 (MS)

HR-ESI-MS は高性能ハイブリッド型質量分析システム (Thermo Fisher Scientific 製 LTQ Orbitrap XL) を使用した。

#### 4. 赤外吸収 (IR) スペクトル

赤外吸収スペクトルは JASCO FT/IR-4600 (日本分光) 分光光度計を使用し、フィルム法にて試料を調製し測定した。

#### 5. 紫外吸収 (UV) スペクトル

層長 1 cm の石英セルを用いて、JASCO V-630 (日本分光) 分光光度計を使用して測定した。測定溶媒は各測定値に付記した。

### カラムクロマトグラフィー

#### 1. Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー

Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーには逆相系多孔性樹脂 Diaion HP-20 を使用した。

#### 2. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには 70-230 mesh の silica gel 60 (spherical) (関東化学) を使用した。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Cosmosil 75C18-OPN (Nacalai Tesque) を使用した。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー

分取用カラムに Inertsil ODS-3 (10×250 mm、ジーエルサイエンス)、COSMOSIL πNAP (10×250 mm、Nacalai Tesque)、COSMOSIL HILIC (10×250 mm、Nacalai Tesque) を使用し、検出に RID-10A (Shimadzu)、溶媒にアセトン-水系、メタノール-水系またはアセトニトリル-水系を用いて、流速は 2.5 ml/min もしくは 2.0 ml/min で行った。

### 4. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC プレートとして厚さ 0.25 mm の silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) を使用し、クロロホルムとメタノール混合溶媒を展開溶媒とした。プレート上のスポットは UV (254 nm) 照射および 10 %硫酸へ浸漬後、加熱し呈色させて検出した。

### 5. 糖分析

分析用カラムに Shodex NH2P-50 (昭和電工) を使用し、検出に OR-2090 (日本分光工業) 旋光度検出計を用い、溶媒はアセトニトリル-水系を用いて、流速 1 ml/min で行った。

### 抽出、単離、精製

自然風乾させたビシンジュズネノキ (*Damnacanthus indicus* var. *intermedius*) 地上部 2.3 kg に MeOH (18 L×2) を加え、室温で 3 週間抽出した。抽出液を乾燥し、得られた残渣 277 g を 90% MeOH (1 L) で懸濁した後 *n*-Hexane を加え、*n*-Hexane 可溶画分 (31.4 g) を得た。残りの MeOH 可溶画分はさらに乾燥した後、H<sub>2</sub>O (1 L) を添加し懸濁させ、EtOAc (1 L) で抽出することで EtOAc 層 (12.2 g) を得た。最後に H<sub>2</sub>O 層に 1-BuOH (1 L) を加え、1-BuOH 層 (60.0 g) と H<sub>2</sub>O 層 (173.0 g) を得た。

このうち、1-BuOH 可溶画分 (30.1 g) を CHCl<sub>3</sub> および MeOH の混合溶媒【CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1, 2 L)、(10 : 1, 2 L)、(7 : 1, 2 L)、(5 : 1, 2 L)、(3 : 1, 2 L)、(2 : 1, 2 L)、(1 : 1, 2 L)、MeOH (2 L)】を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 6 cm×高さ 33 cm) に付し、フラクション 1-8 を得た。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-8 を、MeOH と水の混合溶媒【MeOH-水 (10 : 90, 600 ml)、(20 : 80, 600 ml)、(30 : 70, 600 ml)、(40 : 60, 600 ml)、(50 : 50, 600 ml)、(60 : 40, 600ml)、(70 : 30, 600ml)、(80 : 20, 600ml)、(90 : 10, 600ml)、MeOH (600 ml)、Acetone (600ml)】を用いた逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 3.6 cm×高さ 15 cm) に付した。

### 化合物 51, 54

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-3 (95.9 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、35%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 51 (6.2 mg) と化合物 54 (2.0 mg) を得た。

### 化合物 48, 49, 50, 55

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-2 (111.0 mg) を高速液体クロマ

トグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、10%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **48** (10.3 mg)、化合物 **49** (10.6 mg)、化合物 **50** (4.2 mg) と化合物 **55** (5.3 mg) を得た。

#### 化合物 43, 43, 45

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-4 (197.2 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、25%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **43** (34.9 mg)、化合物 **44** (7.0 mg) と化合物 **45** (3.1 mg) を得た。

#### 化合物 40, 47

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-5 (78.2 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、40%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **40** (3.1 mg) と化合物 **47** (14.3 mg) を得た。

#### 化合物 39, 41

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 2-6 (35.9 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、40%アセトン、流速 2.5 mL/min】で精製し、化合物 **39** (1.7 mg) と化合物 **41** (3.7 mg) を得た。

#### 化合物 42, 46

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-2 (324.1 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **42** (64.2 mg) と化合物 **46** (46.3 mg) を得た。

#### 化合物 38, 52

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-4 (305.1 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **38** (6.0 mg) と化合物 **52** (8.9 mg) を得た。

#### 化合物 53

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-6 (304.4 mg) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **53** (5.4 mg) を得た。

#### 化合物 38-45 の酸加水分解および糖分析

前述した方法通りに分解反応を行い、旋光度検出器付きの HPLC による分析をし、標品のシグナルと比較することで、D-glucose に決定した。



## 第三部

### フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) の 成分探索

---

---

## 第1章 フサスギナについて

---

---

フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) はトクサ科 (Equisetaceae)、トクサ属 (*Equisetum*) の植物で、主に北半球の湿気のある沼地、森林や草地などに分布している。高さは 30–60 cm になり、茎はまっすぐで中空である。10–18 個の棘のある縦稜があり、シリカのような針状体が含まれている。トクサ属の植物はトクサ綱トクサ目トクサ科に分類されている唯一の属であり、種ではなく孢子によって繁殖する [57]。フサスギナは古くから民間薬として使用されており、中国の東北地方では、生薬の‘林間荊’と呼ばれており、血流の改善や血栓の治療に用いられている。フサスギナをターゲットとした成分研究から、フラボノイド類 [58]、フェノール酸 [59] とアルカロイド類 [60] など多種多様な化合物が単離されているが、高極性フラクションをターゲットとした成分探索はまだ行われていないため、本研究では中国産フサスギナの 1-BuOH 層の成分研究を行った。



<https://www.botanic.jp/plants-ha/fusugi.htm>

## 第2章 抽出分離

乾燥させたフサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) の地上部 10.0 kg を MeOH (30.0 L) で抽出し、6 L まで濃縮した後 *n*-Hexane (6 L) を加え、分配した。その後、MeOH 可溶画分を濃縮し、その残渣を水に懸濁させ、EtOAc (6 L) で抽出し、水層をさらに 1-BuOH (6 L) で抽出した。本研究では、親水性の高い 1-BuOH 可溶画分に対して成分探索を行った (Fig. 107)。

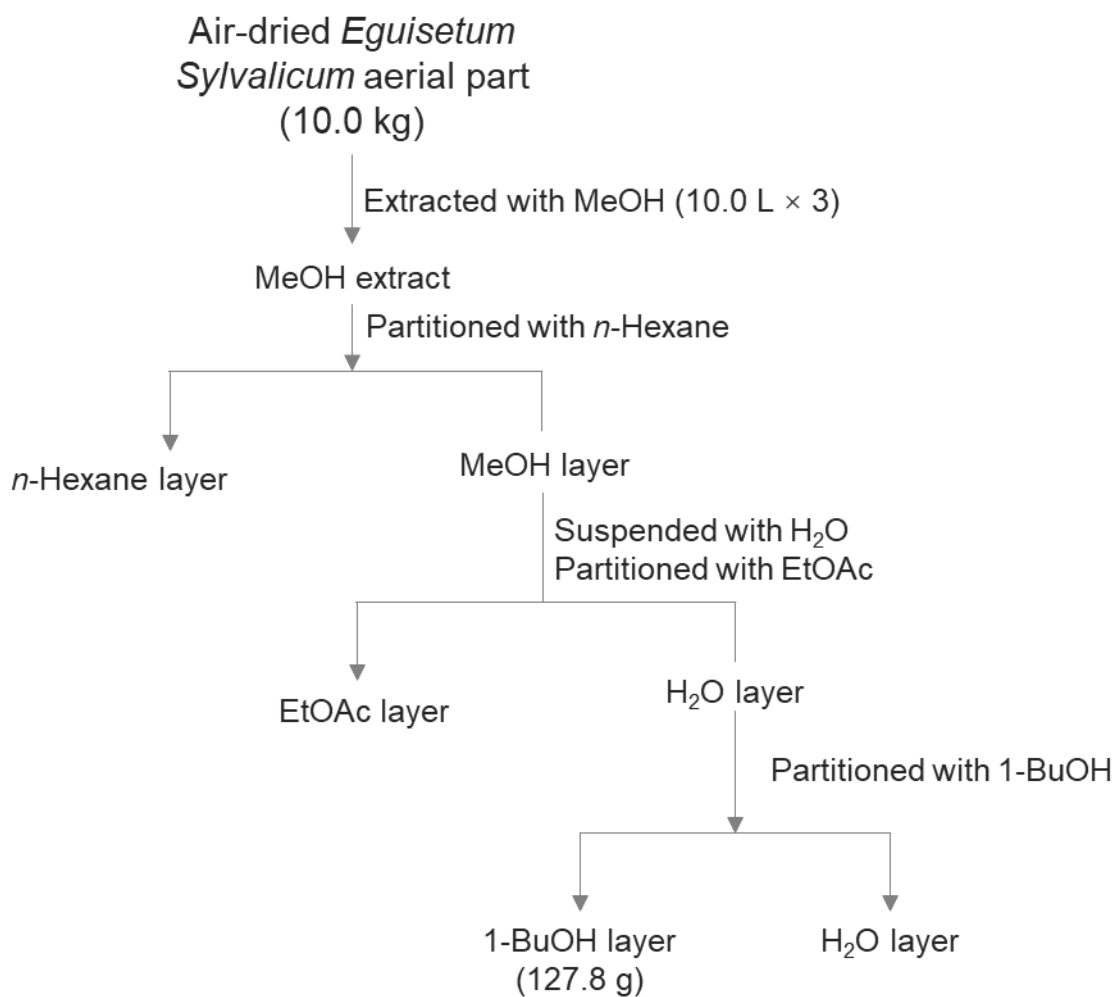


Fig. 107 Extraction and fractionation of *Equisetum sylvaticum*

## 第3章 1-BuOH 可溶画分の単離精製および化合物の構造決定

### 第一節 単離精製

1-BuOH 可溶画分 127.8 g を、Diaion HP-20、Silica gel、ODS の各種オープンカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分離、精製を行い、37 種の化合物 (56–92) を単離した (Chart 4)。

### 第二節 新規化合物について

中国産フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) 地上部 1-BuOH 可溶画分から、新規の配糖体化合物 4 種類 56–59 (Fig. 108) を単離し、その化学構造を詳細に検討することとした。

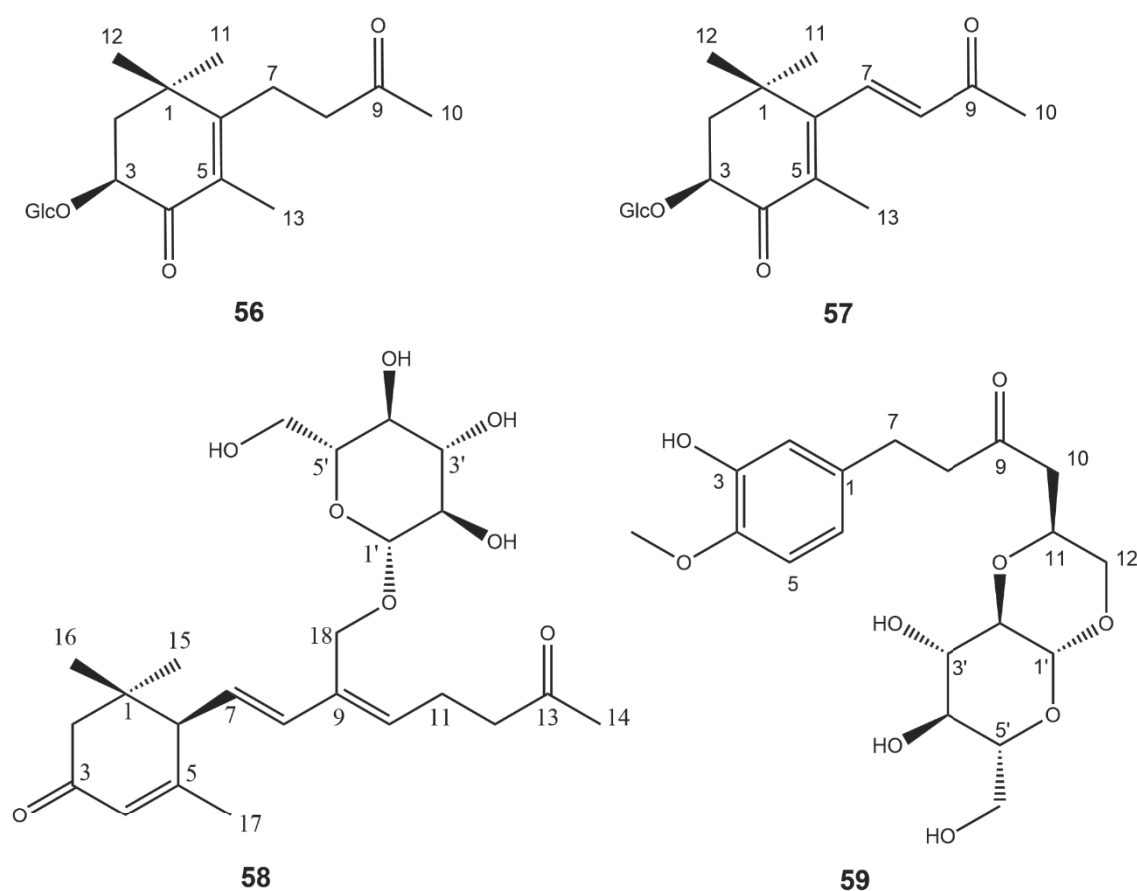


Fig. 108 New compounds from 1-BuOH layer of *E. sylvaticum*

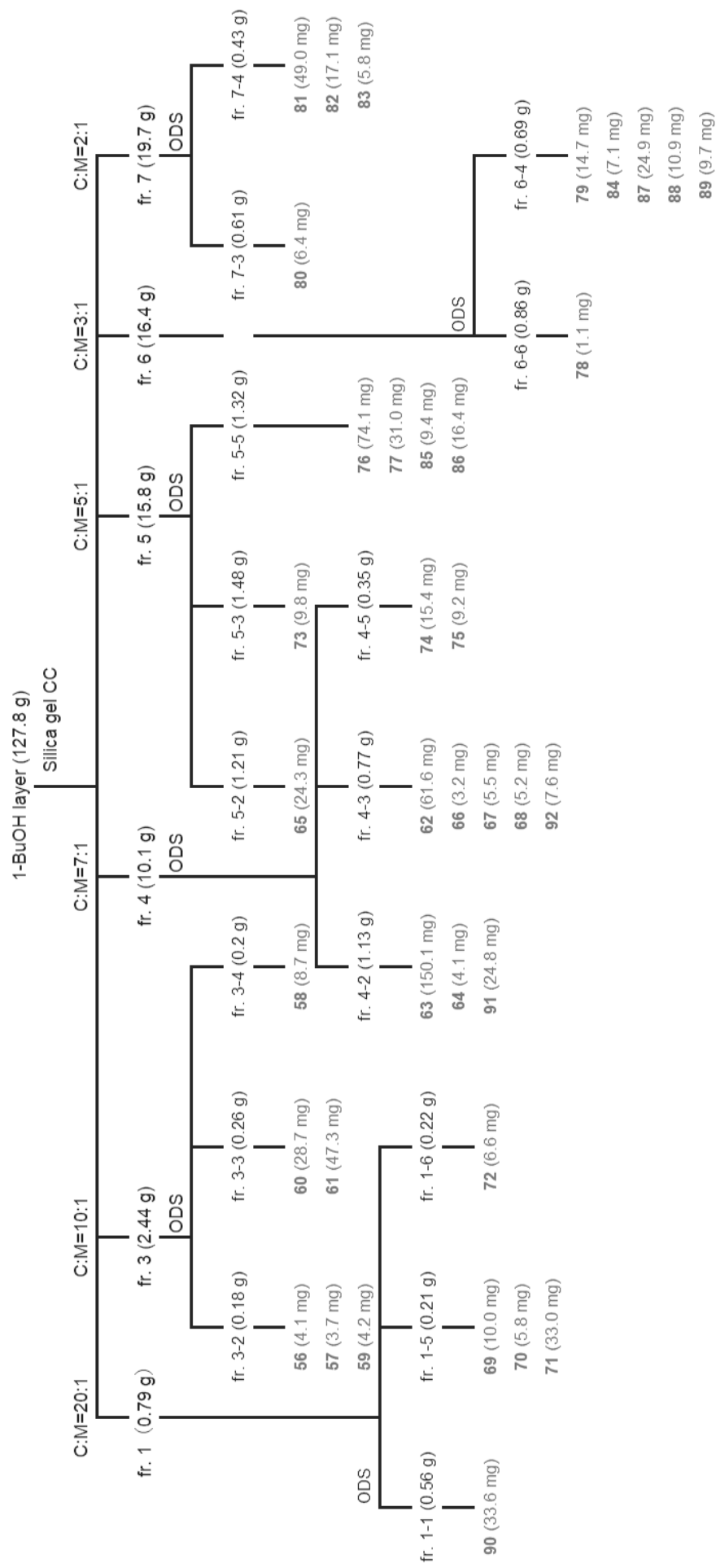
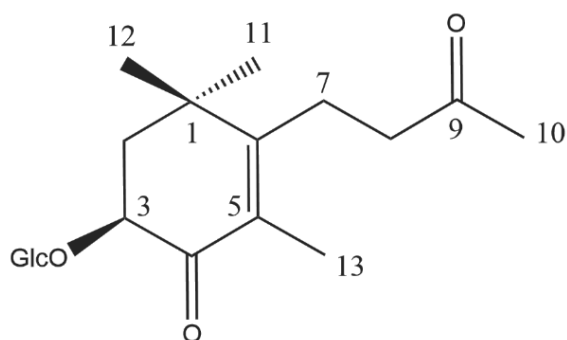


Chart 4 Isolation of Compounds **56-92** from 1-BuOH layer of *E. sylvaticum*

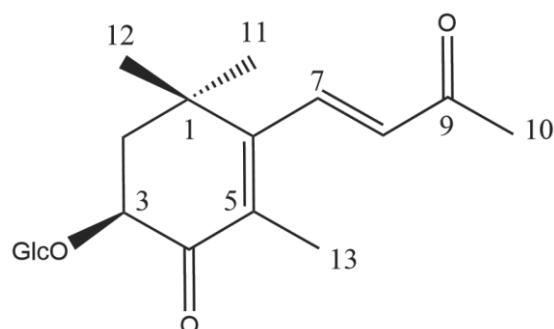


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 409.1832  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{30}O_8Na$ : 409.1833  
 $[\alpha]_D^{26}$ : -28.4 (EtOH,  $c = 0.37$ )  
 IR  $\nu_{max}$ (film)  $cm^{-1}$ : 3351, 2958, 2931, 1710, 1667, 1368, 1075  
 UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm ( $\log \epsilon$ ): 202 (4.13), 243 (3.95)

Fig. 109 Structure and physical data of Compound 56

Table 60  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	39.4	s	
2	46.1	t	1.89, <i>dd</i> , (13.8, 12.8), <i>ax</i> 2.21, <i>dd</i> , (12.8, 5.3), <i>eq</i>
3	78.1	<i>d</i>	4.59, <i>dd</i> , (5.3, 13.8)
4	200.9	s	
5	130.8	s	
6	166.7	s	
7	25.1	<i>t</i>	2.47, 2.54, <i>m</i>
8	42.9	<i>t</i>	2.62, <i>t</i> , (7.9)
9	209.0	s	
10	29.8	<i>q</i>	2.17, <i>s</i>
11	29.7	<i>q</i>	1.29, <i>s</i>
12	25.8	<i>q</i>	1.19, <i>s</i>
13	12.0	<i>q</i>	1.75, <i>s</i>
1'	105.5	<i>d</i>	4.57, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.8	<i>d</i>	} 3.26- 3.41, <i>m</i>
3'	78.26	<i>d</i>	
4'	71.6	<i>d</i>	
5'	78.31	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.88, <i>dd</i> , (11.7, 1.4) 3.68, <i>dd</i> , (11.7, 4.6)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 407.1679  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{28}O_8Na$ : 407.1676  
 $[\alpha]_D^{26}$ : -29.2 (EtOH,  $c = 0.25$ )  
 IR  $\nu_{max}$ (film)  $cm^{-1}$ : 3366, 2932, 2879, 1709, 1679, 1076  
 UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm ( $\log \epsilon$ ): 202 (4.08), 264 sh (3.67)

Fig. 110 Structure and physical data of Compound **57**

Table 61  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	38.3	<i>s</i>	
2	46.1	<i>t</i>	2.00, <i>dd</i> , (13.7, 12.8), <i>ax</i> 2.28, <i>dd</i> , (12.8, 5.3), <i>eq</i>
3	77.6	<i>d</i>	4.71, <i>dd</i> , (5.3, 13.7)
4	200.8	<i>s</i>	
5	131.0	<i>s</i>	
6	160.1	<i>s</i>	
7	141.7	<i>d</i>	7.34, <i>d</i> , (16.7)
8	135.7	<i>d</i>	6.26, <i>d</i> , (16.7)
9	200.1	<i>s</i>	
10	27.8	<i>q</i>	2.37, <i>s</i>
11	30.6	<i>q</i>	1.38, <i>s</i>
12	26.3	<i>q</i>	1.19, <i>s</i>
13	13.9	<i>q</i>	1.83, <i>s</i>
1'	105.3	<i>d</i>	4.62, <i>d</i> , (7.7)
2'	75.8	<i>d</i>	} 3.26- 3.41, <i>m</i>
3'	78.2	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	78.3	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.90, <i>br d</i> , (12.9) 3.68, <i>dd</i> , (12.7, 7.2)

化合物 **56** は無色の非晶質粉末として得られ、その分子式は HR-ESI-MS によって  $C_{19}H_{30}O_8$  に決定し、5 つの不飽和度が示唆された。また、赤外分光スペクトル (IR) のシグナル ( $3351$ 、 $1710$  と  $1667\text{ cm}^{-1}$ ) によって、複数の水酸基と 2 つのカルボニル基の存在が示唆された。

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Table 60) において、4 つのメチル基水素 ( $\delta_{\text{H}} 1.19$ 、 $1.29$ 、 $1.75$  と  $2.17$ )、3 つのメチレン基水素 ( $\delta_{\text{H}} 1.89$ , dd,  $J = 13.8$ ,  $12.8\text{ Hz}$ , H-2ax;  $\delta_{\text{H}} 2.21$ , dd,  $J = 12.8$ ,  $5.3\text{ Hz}$ , H-2 eq;  $\delta_{\text{H}} 2.47$ , m, H-7a;  $\delta_{\text{H}} 2.54$ , m, H-7b;  $\delta_{\text{H}} 2.62$ , t,  $J = 7.9\text{ Hz}$ , H-8) と 1 つの酸素結合しているメチン水素 ( $\delta_{\text{H}} 4.59$ , dd,  $J = 13.8$ ,  $5.3\text{ Hz}$ , H-3) が観測された。また、糖部分を示唆するアノマー水素 ( $\delta_{\text{H}} 4.57$ , d,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , H-1') と複数の高磁場シグナル ( $\delta_{\text{H}} 3.26$ – $3.41$ , m) が見られた。

$^{13}\text{C NMR}$  スペクトル (Table 60) からは 19 本のピークが観測され、DEPT と HSQC などのデータから、2 つのカルボニル基 ( $\delta_{\text{C}} 200.9$  と  $209.0\text{ ppm}$ ) と 1 つの二重結合 ( $\delta_{\text{C}} 130.8$  と  $166.7\text{ ppm}$ ) のシグナルが観測された。以上の情報から推測し、化合物 **56** は 1 つの環構造を有し、その基本構造は megastigmane 配糖体であることが示唆された。報告されている文献データと比較をし、既知化合物である化合物 **61** [61] と類似している事が判明した。

化合物 **56** の平面構造を検証するために、2D NMR 分析を行った (Fig. 111)。HMBC スペクトルにおいて、3 位水素 ( $\delta_{\text{H}} 4.59$ ) から糖部分のアノマー炭素 ( $\delta_{\text{C}} 105.5$ ) への相関が観測され、糖部分と megastigmane 骨格の結合部位が明らかになった。さらに、2 位水素 ( $\delta_{\text{H}} 1.89$  and  $2.21$ ) と 13 位メチル基水素 ( $\delta_{\text{H}} 1.75$ ) から 4 位炭素 ( $\delta_{\text{C}} 200.9$ ) の相関によって、4 位にカルボニル基が存在することが確認できた。

続いて、化合物 **56** の立体配置の決定を行った。化合物 **56** の不斉炭素が 1 つだけであり、3 位の立体によって、アグリコン部分の旋光度が変化することが知られている。そのために、 $\beta$ -glucosidase を用いた酵素分解を行い、アグリコン部分の旋光度を測定した。その結果、アグリコン部分のマイナスの旋光度が検出され、既に報告された既知化合物 (3S)-3-hydroxy-4-oxo- $\beta$ -ionone [62] と同様な立体配置を有することが示唆された。

化合物 **57** も無色の非晶質粉末として単離され、HR-ESI-MS によって分子式を  $C_{19}H_{28}O_8$  に決定し、化合物 **56** より不飽和度が 1 つ増えたことが示唆された。

1D NMR スペクトル (Table 61) を分析した結果、化合物 **56** とほぼ一致しており、さらにもう 1 つの *trans* 二重結合に由来する proton シグナル ( $\delta_{\text{H}} 6.26$ , d,  $J = 16.7\text{ Hz}$ , H-8;  $\delta_{\text{H}} 7.34$ , d,  $J = 16.7\text{ Hz}$ , H-7) と carbon シグナル ( $\delta_{\text{C}} 141.7$  と  $135.7$ ) が観測された。HMBC スペクトル (Fig. 111) においては 7 位水素 ( $\delta_{\text{H}} 7.34$ ) から 5 位炭素 ( $\delta_{\text{C}} 131.0$ )、8 位炭素 ( $\delta_{\text{C}} 135.7$ ) と 9 位炭素 ( $\delta_{\text{C}} 200.1$ ) の相関、さらに 8 位水素 ( $\delta_{\text{H}} 6.26$ ) から 6 位炭素 ( $\delta_{\text{C}} 160.1$ ) の相関が見られたことから、増えた二重結合は 7、8 位に存在していることが確認できた。最後に、化合物 **56** と同様に  $\beta$ -glucosidase による酵素分解を行い、D-glucose の存在とアグリコン部分 3 位の立体を決定した。



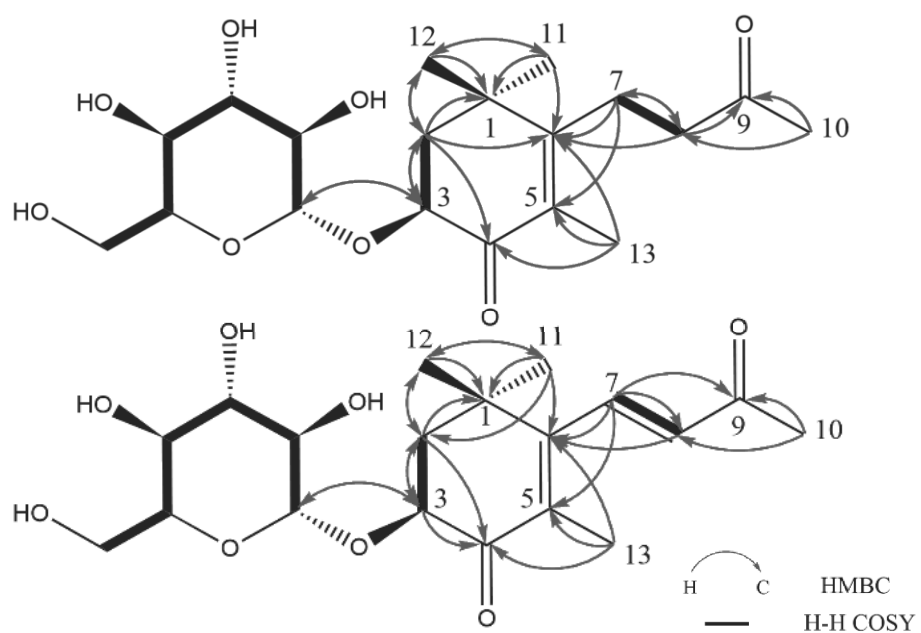
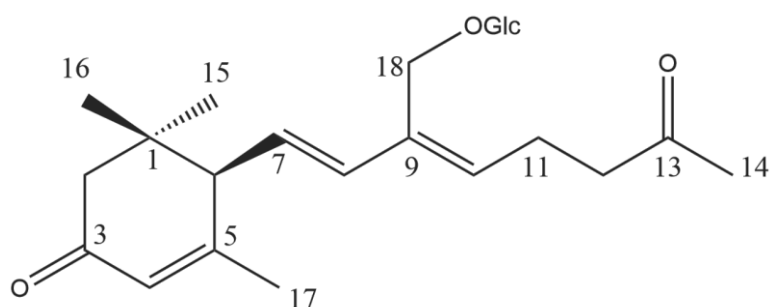


Fig. 111 Key COSY and HMBC correlations of Compound **56** and **57**



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 475.2300  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{24}H_{36}O_8Na$ : 475.2302  
 $[\alpha]_D^{27}$ : +33.8 (EtOH,  $c = 0.87$ )  
 IR(film)  $\nu_{max}$ : 3366, 2938, 2868, 1709, 1658, 1373, 1053, 1076  
 UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm ( $\log \epsilon$ ): 201 (4.09), 233 (3.95)

Fig. 112 Structure and physical data of Compound 58

 Table 62  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	37.6	<i>s</i>	
2	48.6	<i>d</i>	2.52, <i>d</i> , (16.9) 2.03, <i>d</i> , (16.9)
3	202.6	<i>s</i>	
4	126.0	<i>d</i>	5.87, <i>s</i>
5	166.5	<i>s</i>	
6	58.0	<i>d</i>	2.65, <i>d</i> , (9.6)
7	127.7	<i>d</i>	5.85, <i>dd</i> , (15.4, 9.6)
8	137.1	<i>d</i>	6.14, <i>d</i> , (15.4)
9	135.6	<i>s</i>	
10	136.9	<i>d</i>	5.71, <i>t</i> , (7.6)
11	23.6	<i>t</i>	2.49, <i>q</i> -like, (7.4)
12	44.0	<i>t</i>	2.63, <i>t</i> , (7.4)
13	211.2	<i>s</i>	
14	30.0	<i>q</i>	2.14, <i>s</i>
15	28.2	<i>q</i>	1.02, <i>s</i>
16	27.9	<i>q</i>	0.99, <i>s</i>
17	24.0	<i>q</i>	1.93, <i>s</i>
18	63.6	<i>t</i>	4.48, <i>d</i> , (11.2) 4.52, <i>d</i> , (11.2)
1'	102.6	<i>d</i>	4.28, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.2	<i>d</i>	3.15, <i>dd</i> , (8.8, 7.8)
3'	78.1	<i>d</i>	3.25, <i>m</i>
4'	72.0	<i>d</i>	3.26, <i>t</i> , (9.7)
5'	78.3	<i>d</i>	3.34, <i>m</i>
6'	63.1	<i>t</i>	3.86, <i>dd</i> , (11.9, 1.8) 3.65, <i>dd</i> , (11.9, 5.4)

化合物 **58** は無色な非晶質粉末として得られ、その分子式を HR-ESI-MS によって  $C_{24}H_{36}O_8$  に決定し、7つの不飽和度が示唆された。

$^1H$  NMR スペクトル (Table 62) を分析した結果、二重結合に由来する低磁場シグナルが観測された。そのうち、2つのピーク ( $\delta_H$  5.85, dd,  $J = 15.4, 9.6$  Hz, H-7;  $\delta_H$  6.14, d,  $J = 15.4$  Hz, H-8) は大きなカップリング定数を有しており、*trans* 二重結合の存在が示唆された。また、その分裂パターンから、*trans* 二重結合の両端はそれぞれ3級炭素と4級炭素に結合していることが推測された。さらに、singletとtripletに分裂している低磁場protonが1つずつ見られ、それぞれ4級と2級炭素に結合していることが示唆された。

$^{13}C$  NMR (Table 62) および HSQC スペクトルから、カルボニル基に由来するシグナル ( $\delta_C$  202.6, 211.2) が2つ、二重結合に由来するピーク ( $\delta_C$  166.5, 126.0, 127.7, 137.1, 135.6, 136.9) が6つと酸素が結合しているメチレン炭素シグナル ( $\delta_C$  63.6, 63.1) が2つ観測された。また、糖を示唆するアノマー炭素や一連のメチン炭素が観測され、本化合物は1つの環を巻いていることが明らかとなった。以上のことから、化合物 **58** は  $\alpha$ -carotenoid 骨格を有する配糖体であると推測した。

本化合物の平面構造を決定するために、HMBCとCOSYスペクトルによる構造検討を行った (Fig. 113)。その結果、HMBCスペクトルにおいて4位水素 ( $\delta_H$  5.87) から6位炭素 ( $\delta_C$  58.0)、2位炭素 ( $\delta_C$  48.6) と17位炭素 ( $\delta_C$  24.0) の相関に加え、7位水素 ( $\delta_H$  5.85) から6位炭素 ( $\delta_C$  58.0) と5位炭素 ( $\delta_C$  166.5) などの相関が観測され、 $\alpha$ -ionone 骨格を有することが確認できた。さらに、*trans* 二重結合に属する8位水素 ( $\delta_H$  6.14)、18位に酸素が結合したメチレン水素 ( $\delta_H$  4.48と4.52) と10位のtripletに分裂した二重結合水素 ( $\delta_H$  5.71) において相互に相関が観測され、二重結合の位置が Fig. 112 のように推定された。さらに、10位水素、11位水素 ( $\delta_H$  2.49) と12位水素 ( $\delta_H$  2.63) の連続するCOSY相関や14位水素 ( $\delta_H$  2.14) から13位炭素 ( $\delta_C$  211.2) と12位炭素 ( $\delta_C$  44.0) へのHMBC相関が観測され、 $\alpha$ -apo-13-carotenoid 骨格を有することが明らかになった。最後に、18位水素から1'位水素のHMBC相関が見られたことから糖部分の結合部位を決定した。

化合物 **58** の立体構造を決定するために、6位不斉炭素の絶対立体配置と9位二重結合の幾何異性を決定する必要がある。まず、9位二重結合の立体はNOESYスペクトル分析による決定を行った (Fig. 113)。具体的には、11位水素と18位水素、または8位水素と10位水素の間にNOE相関が観測され、9位二重結合はZ体であることが示唆された。続いて、6位炭素の立体を決定するために、ECDスペクトル測定を行った。その結果、244 nmにおいて正のコットン効果が見られ ( $(\lambda_{max}(\Delta\epsilon): 244(+5.49), 214(+4.76))$ )、先行文献のデータと比較し [63]、6位炭素はR体であると決定した。

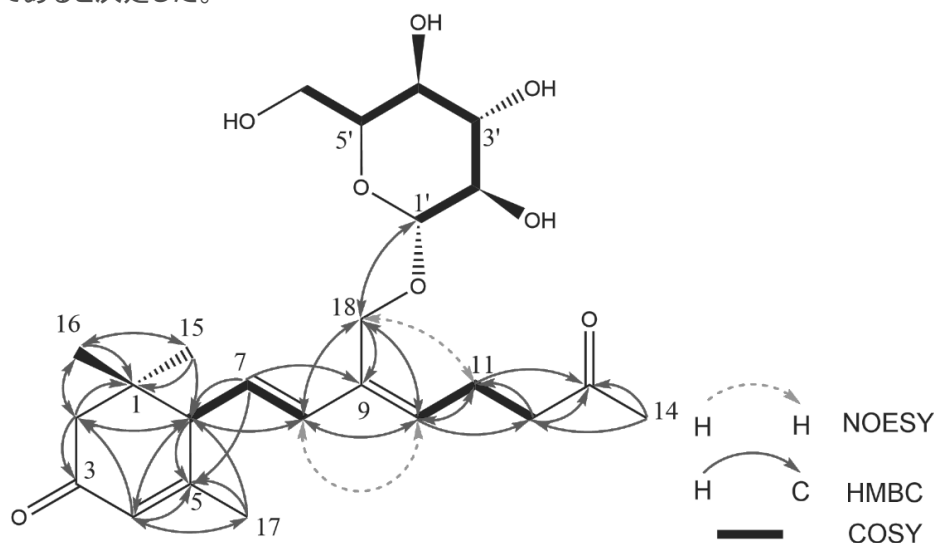
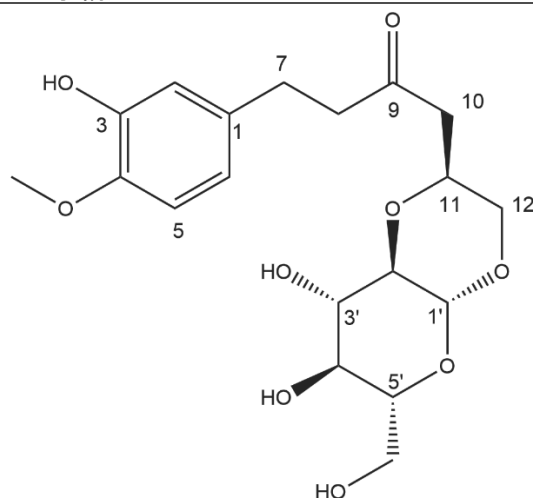


Fig. 113 Key COSY, HMBC and NOESY correlations of compound **58**

第三項 新規化合物 59 の化学構造



Colorless amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 421.1467  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{19}H_{26}O_9Na$ : 421.1469

$[\alpha]_D^{27}$ : -1.43 (EtOH,  $c = 0.41$ )

IR (film)  $\nu_{max}$ : 3346, 2931, 2875, 1709, 1511, 1129, 1029

UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) nm ( $\log \epsilon$ ): 202 (4.13), 228 sh (3.70), 283 (3.38)

Fig. 114 Structure and physical data of Compound 59

Table 63  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	135.6	s	
2	116.6	d	6.66, d, (2.2)
3	147.62	s	
4	147.55	s	
5	113.1	d	6.80, d, (8.2)
6	120.6	d	6.62, dd, (8.2, 2.2)
7	30.1	t	2.76, m
8	45.9	t	2.78, m
9	209.8	s	
10	45.1	t	2.66, dd, (16.8, 6.7) 2.48, dd, (16.8, 5.6)
11	72.8	d	4.02, dddd, (10.2, 6.7, 5.6, 2.7)
12	71.2	t	3.92, dd, (11.8, 2.7), eq 3.436, dd, (11.8, 10.2), ax
3-OCH <sub>3</sub>	56.7	q	3.81, s
1'	99.6	d	4.24, d, (7,7)
2'	81.0	d	3.01, dd, (9.6, 7.7)
3'	75.2	d	3.440, t-like, (9.3)
4'	72.0	d	3.34, t-like, (9.1)
5'	79.9	d	3.39, ddd, (9.7, 5.4, 2.1)
6'	62.7	t	3.86, dd, (12.0, 2.1) 3.68, dd, (12.0, 5.4)

化合物 **59** は無色な非晶質粉末として単離され、HR-ESI-MSによってその分子式を  $C_{19}H_{26}O_9$  に決定し、7つの不飽和度が示唆された。

$^1H$  NMR スペクトル (Table 63) においては、低磁場領域に典型的な ABX 型 coupling system シグナル ( $\delta_H$  6.80, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5;  $\delta_H$  6.66, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2 and  $\delta_H$  6.62, dd,  $J = 8.2, 2.2$  Hz, H-6) が観測され、1,3,4-三置換ベンゼン環の存在が示唆された。

$^{13}C$  NMR スペクトル (Table 63) および HSQC スペクトルを分析し、1つのカルボニル基 ( $\delta_C$  209.8)、6つの芳香環炭素 ( $\delta_C$  113.1, 116.6, 120.6, 135.6, 147.62, 147.55)、3つのメチレン炭素 ( $\delta_C$  30.1, 45.1, 45.9)、1つの酸素が結合したメチン炭素 ( $\delta_C$  72.8) と1つの酸素が結合したメチレン炭素 ( $\delta_C$  71.2) のシグナルが観測された。また、未帰属の酸素が結合したメチン炭素シグナル ( $\delta_C$  62.7, 72.0, 75.2, 79.9, 81.0, 99.6) は修飾されたグルコースであると推測した。さらに、 $^{13}C$  NMR において、1つのメキシ基 ( $\delta_C$  56.7) の存在が確認され、その水素 ( $\delta_H$  3.81) から芳香環炭素 ( $\delta_C$  147.55 と 147.62) への HMBC 相関が観測されたことから、ベンゼン環に結合していることが示唆された。しかしながら、HMBC 相関からメキシ基の正確な置換位置を特定することが困難であるため、2通りの置換パターンの化学シフトの変化から決定を試みることにした (Fig. 115)。その結果、3-hydroxy-4-methoxy-phenylethanol の3位 ( $\delta_C$  147.6)、4位炭素 ( $\delta_C$  147.4) の差は僅か 0.2 ppm である一方で [64]、3-methoxy-4-hydroxy-phenylethanol の3位 ( $\delta_C$  148.8)、4位炭素 ( $\delta_C$  145.9) の間に大きな 2.9 ppm の差が報告されている [33] ことから、化合物 **59** のメキシ基は4位に結合していることを決定した。

HMBC スペクトル (Fig. 116) において、7位水素から1位炭素、2位炭素、8位炭素と9位炭素の相関や8位水素から1位、7位と9位炭素の相関に加え、10位水素から9位炭素、11位炭素と12位炭素の相関が観測されたことから化合物 **59** のアグリコン部分は 11,12-dihydroxy-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-9-hexanon の構造であると決定した。さらに、本化合物の不飽和度を考慮し、もう1つの環状構造を持っていると推測した。HMBC スペクトルをさらに精査したところ、12位水素 ( $\delta_H$  3.92) と1'位アノマー炭素の HMBC 相関が観測され、糖部分の結合位置が示唆された。また、11位水素 ( $\delta_H$  4.02, dddd,  $J = 10.2, 6.7, 5.6, 2.7$  Hz) と12位アキシアル位水素 ( $\delta_H$  3.436, dd,  $J = 11.8, 10.2$  Hz) の大きなカップリング定数が見られ、11位と12位の *axial-axial* coupling を示唆し、糖の一部と環を巻いていることが明らかとなった。その他、2'位炭素の化学シフト ( $\delta_C$  81.0) も11位水素の  $\beta$ -axial を示唆しており、報告された cuneataside A と cycloclinacoside A2 の NMR データと一致している ( $\delta_C$  80.6 for 11 $\beta$ -H and  $\delta_C$  73.5 for 11 $\alpha$ -H) [65, 66]。以上のことから、化合物 **59** は希少な二環状骨格を持つ新規なフェノール化合物であり、その平面構造を Fig. 114 のように決定した。

最後に、化合物 **59** の立体化学について検討を行った。まず、NOESY スペクトル (Fig. 117) から、11位水素から2'位と12-*eq*位水素、2'位水素から4'位水素、12-*ax*位から1'位、1'位から5'位と3'位水素の相関が見られ、相対立体配置を決定した。最後に、酸加水分解を行い、糖部分が D-glucose であることが判明し、化合物 **59** の絶対立体配置を 11*S*,1'*R*,2'*R*, 3'*R*,4'*S*,5'*S* に決定した。

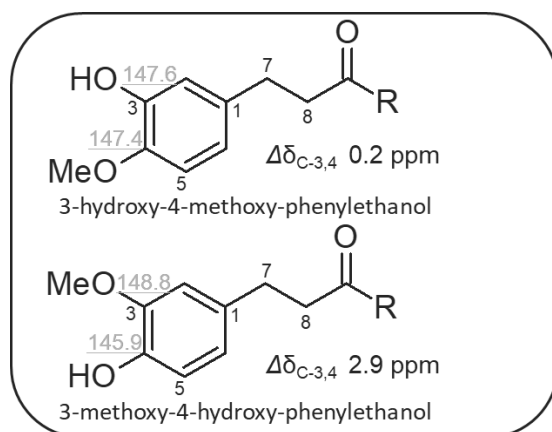


Fig. 115 Comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR data of related compounds

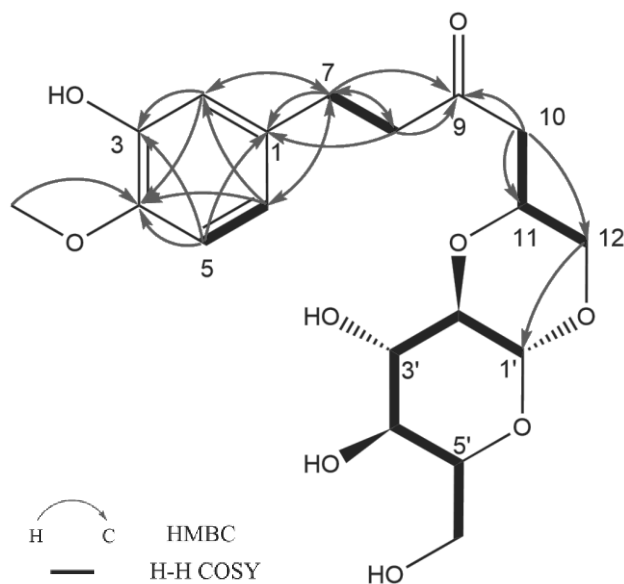


Fig. 116 Key COSY and HMBC correlations of Compound **59**

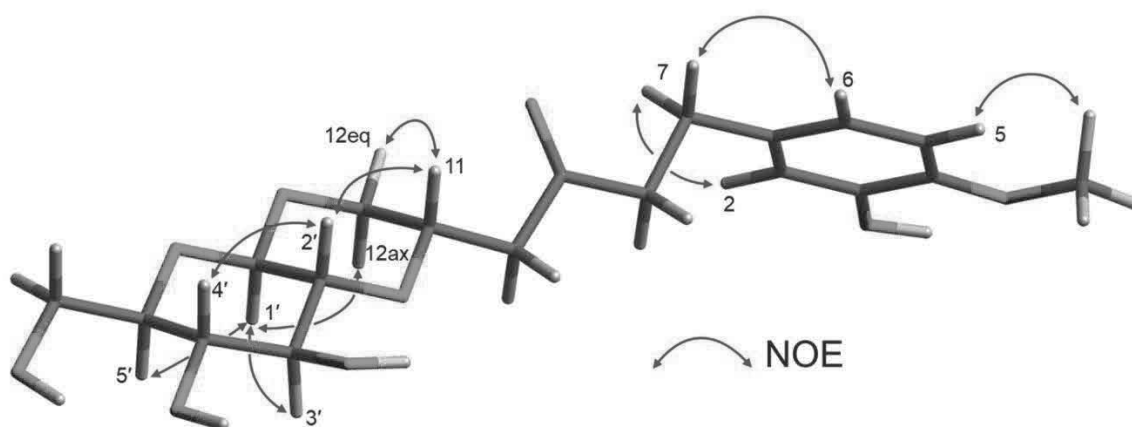


Fig. 117 Key PS-NOESY correlations of Compound **59**

### 第三節 既知化合物について

中国産フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) 地上部 1-BuOH 可溶画分から 33 種の既知化合物 (60–92) を単離し、文献の NMR データと照合することで同定した (Fig. 118)。そのうち、メガスティグマン類化合物 9 種:  $\beta$ -ionone-3-O- $\beta$ -D-glucoside (60) [67], icariside B6 (61) [61], (6*R*,9*S*)-3-oxo- $\alpha$ -ionol-9-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (62) [68], 5 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihydroxy-3 $\beta$ -( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-7-megastigmen-9-one (63) [69], pisumionoside (64) [70], actinidioionoside (65) [71], icariside B2 (66) [72], (9*S*)-4-oxo- $\beta$ -ionol  $\beta$ -D-glucopyranoside (67) [73, 74], (9*R*)-4-oxo- $\beta$ -ionol  $\beta$ -D-glucopyranoside (68) [74]; フラボノイド類 16 種: diosmetin (69) [75], chrysoeriol (70) [76], apigenin (71) [77, 78], acacetin (72) [79], quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside (73) [15], 7-O- $\beta$ -D-glucoside-5-O-methylapigenin (74) [80], 5-O-methyl-thermopsoside (75) [80, 81], apigenin 5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (76) [82], kaempferol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (77) [83], apigenin 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (78) [84], kaempferol-7-O-glucose-3-O-acetylglucoside (79) [85], kaempferol-7-O-glucosyl-3-O-glucopyranoside (80) [85], luteolin-5-O-glucopyranoside (81) [85], kaempferol 3-O- $\beta$ -sophoroside (82) [86], isoorientin (83) [87], 2*S*-eriodictyol-5-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (84) [88]; ステロイド類 2 種: 24-*epi*-makisterone A (85) [89], 5-dehydroxy palytholones A (86) [90]; リグナン類 3 種: 7*S*,8*R*-*erythro*-7,9,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neoliganan-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (87) [91], 7*S*,8*R*-4,7,9'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neoliganan-9'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (88) [91], 7*S*,8*R*-urolignoside (89) [92]; その他化合物 3 種: methyl-*R*-2-pyrrolidinone-5-carboxylate (90) [93], 2-ethyl-3-methyl-maleimide *N*- $\beta$ -D-glucoside (91) [94], onitin-15-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (92) [95]。

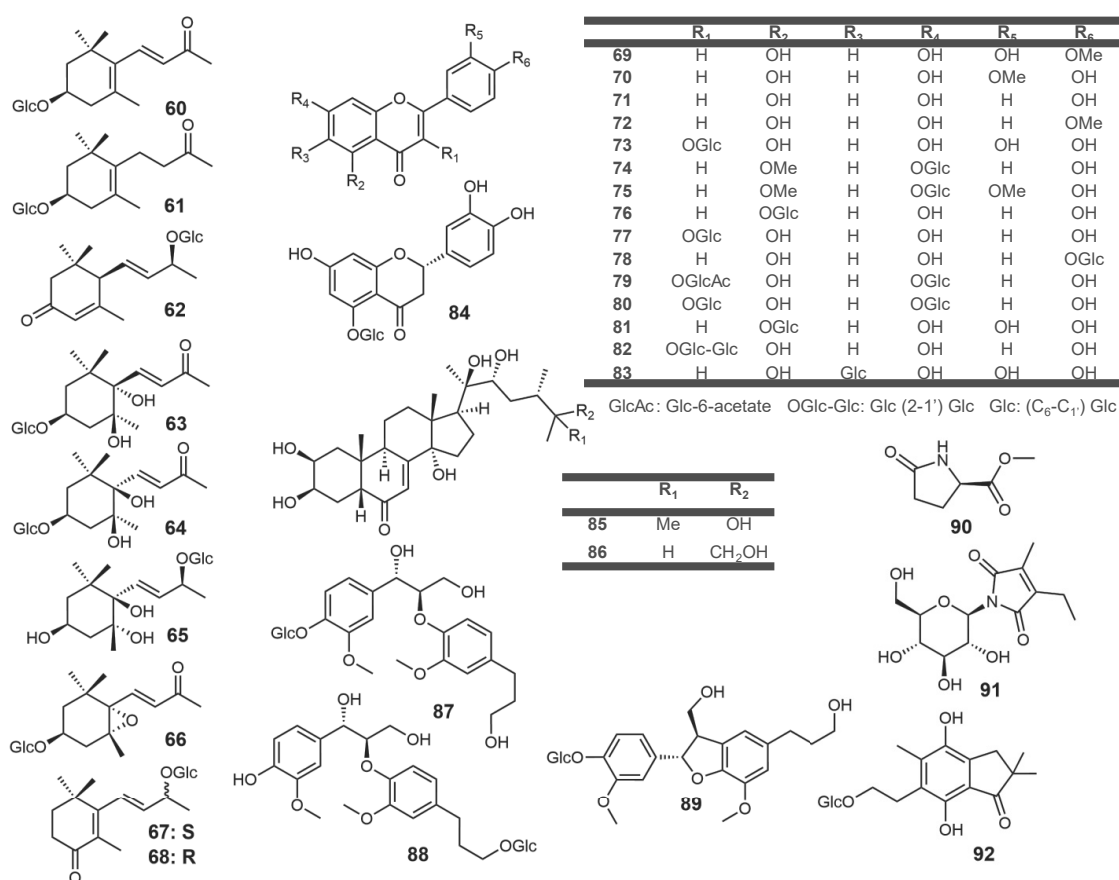
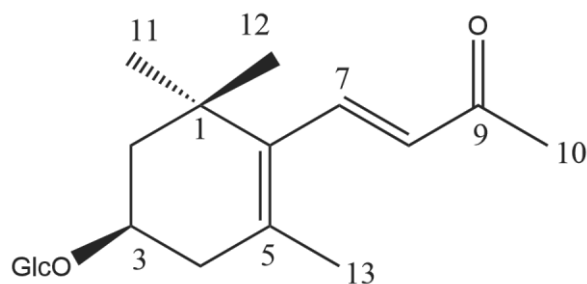


Fig. 118 Known compounds (60–92) isolated from *E. sylvaticum*

第一項 既知メガスティグマン誘導体の化学構造

フサスギナ地上部 1-BuOH 層から既知の megastigmane 誘導体 9 種 (60-68) を単離した。その化学構造は先行文献のデータと比較することで決定した。



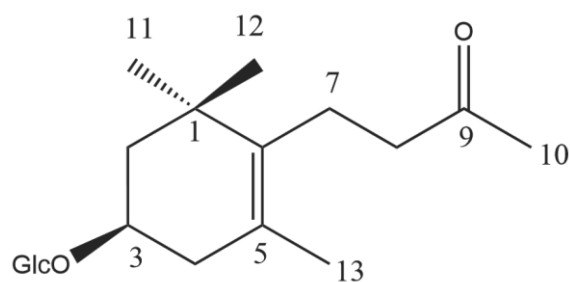
Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 393.1884  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{30}O_7Na$ : 393.1884

Fig. 119 Structure and physical data of Compound 60

Table 64  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	37.9	<i>s</i>	
2	47.5	<i>t</i>	1.57, <i>t</i> , (12.2), <i>ax</i> 1.6, <i>m</i> , <i>eq</i>
3	75.6	<i>d</i>	4.14, <i>m</i>
4	40.6	<i>t</i>	2.18, <i>dd</i> , (17.9, 9.0), <i>ax</i> 2.57, <i>dd</i> , (17.9, 5.7), <i>eq</i>
5	133.3	<i>s</i>	
6	137.2	<i>s</i>	
7	144.6	<i>d</i>	7.33, <i>d</i> , (16.3)
8	134.2	<i>d</i>	6.14, <i>d</i> , (16.3)
9	201.4	<i>s</i>	
10	27.4	<i>q</i>	2.31, <i>s</i>
11	30.7	<i>q</i>	1.12, <i>s</i>
12	28.9	<i>q</i>	1.15, <i>s</i>
13	21.9	<i>q</i>	1.81, <i>s</i>
1'	102.6	<i>d</i>	4.45, <i>d</i> , (7.8)
2'	72.6	<i>d</i>	} 3.15- 3.37, <i>m</i>
3'	78.0	<i>d</i>	
4'	71.8	<i>d</i>	
5'	78.2	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.88, <i>dd</i> , (11.7, 1.7) 3.68, <i>dd</i> , (11.7, 4.5)



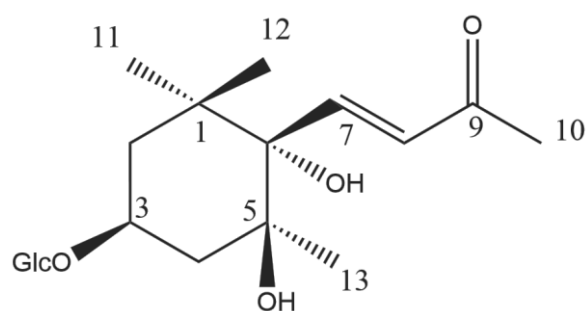


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 395.2036  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{32}O_7Na$ : 395.2036

Fig. 120 Structure and physical data of Compound **61**

Table 65  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	38.8	<i>s</i>	
2	47.5	<i>t</i>	1.52, <i>t</i> , (12.1), <i>ax</i> 1.85, <i>m</i> , <i>eq</i>
3	73.2	<i>d</i>	4.08, <i>m</i>
4	39.8	<i>t</i>	2.05, <i>dd</i> , (16.2, 9.8), <i>ax</i> 2.39, <i>dd</i> , (16.2, 4.2), <i>eq</i>
5	126.2	<i>s</i>	
6	137.6	<i>s</i>	
7	22.9	<i>t</i>	2.19-2.34, <i>m</i>
8	45.1	<i>t</i>	2.56, <i>t</i> , (7.9)
9	211.6	<i>s</i>	
10	30.1	<i>q</i>	2.16, <i>s</i>
11	29.9	<i>q</i>	1.06, <i>s</i>
12	28.8	<i>q</i>	1.06, <i>s</i>
13	20.0	<i>q</i>	1.63, <i>s</i>
1'	102.4	<i>d</i>	4.45, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.3	<i>d</i>	} 3.15- 3.37, <i>m</i>
3'	78.2	<i>d</i>	
4'	71.7	<i>d</i>	
5'	77.9	<i>d</i>	
6'	62.8	<i>t</i>	3.88, <i>dd</i> , (12.0, 1.8) 3.68, <i>dd</i> , (12.0, 5.1)

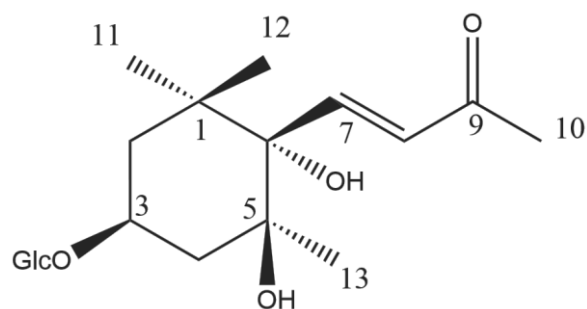


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 393.1880 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>Na: 393.1884

Fig. 121 Structure and physical data of Compound **62**

Table 66 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	37.3	<i>s</i>	
2	48.6	<i>t</i>	2.53, <i>d</i> , (16.8) 2.13, <i>d</i> , (16.8)
3	202.1	<i>s</i>	
4	126.3	<i>d</i>	5.95, <i>br s</i>
5	165.7	<i>s</i>	
6	57.0	<i>d</i>	2.75, <i>d</i> , (9.4)
7	131.2	<i>d</i>	5.81, <i>dd</i> , (15.4, 9.5)
8	137.1	<i>d</i>	5.65, <i>dd</i> , (15.4, 7.7)
9	75.0	<i>d</i>	4.54, <i>quint</i> , (6.6)
10	22.4	<i>q</i>	1.35, <i>d</i> , (6.6)
11	28.2	<i>q</i>	1.09, <i>s</i>
12	27.5	<i>q</i>	1.04, <i>s</i>
13	24.1	<i>q</i>	2.04, <i>d</i> , (1.1)
1'	101.3	<i>d</i>	4.35, <i>d</i> , (7.9)
2'	74.9	<i>d</i>	} 3.20- 3.37, <i>m</i>
3'	78.2	<i>d</i>	
4'	71.8	<i>d</i>	
5'	78.4	<i>d</i>	
6'	62.9	<i>t</i>	3.70, <i>dd</i> , (11.8, 6.1) 3.91, <i>dd</i> , (11.8, 1.8)

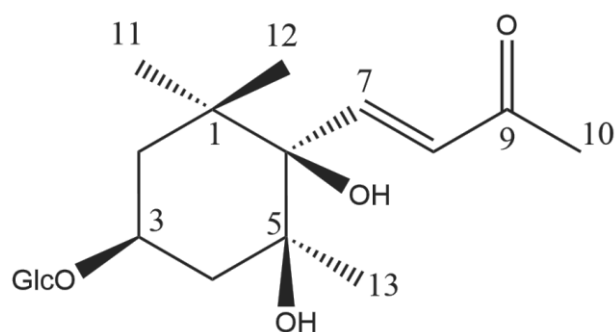


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 427.1941  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{32}O_9Na$ : 427.1939

Fig. 122 Structure and physical data of Compound **63**

Table 67  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	36.0	<i>s</i>	
2	45.2	<i>t</i>	1.84, <i>ddd</i> , (13.1, 3.1, 1.4) 1.51, <i>dd</i> , (13.1, 10.2)
3	72.8	<i>d</i>	4.01, <i>m</i>
4	38.2	<i>t</i>	2.50, <i>ddd</i> , (15.0, 5.0, 1.3) 1.90, <i>dd</i> , (15.0, 8.2)
5	68.4	<i>s</i>	
6	71.1	<i>s</i>	
7	145.3	<i>d</i>	7.27, <i>d</i> , (15.7)
8	133.8	<i>d</i>	6.29, <i>d</i> , (15.6)
9	200.3	<i>s</i>	
10	27.6	<i>q</i>	2.39, <i>s</i>
11	25.6	<i>q</i>	1.05, <i>s</i>
12	29.6	<i>q</i>	1.30, <i>s</i>
13	20.3	<i>q</i>	1.29, <i>s</i>
1'	102.8	<i>d</i>	4.46, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.1	<i>d</i>	3.25, <i>d</i> , (7.8, 8.9)
3'	77.7	<i>d</i>	3.48, <i>m</i>
4'	71.5	<i>d</i>	3.42, <i>m</i>
5'	78.0	<i>d</i>	3.40, <i>m</i>
6'	62.7	<i>t</i>	3.95, <i>dd</i> , (12.0, 1.8) 3.78, <i>dd</i> , (12.0, 5.0)

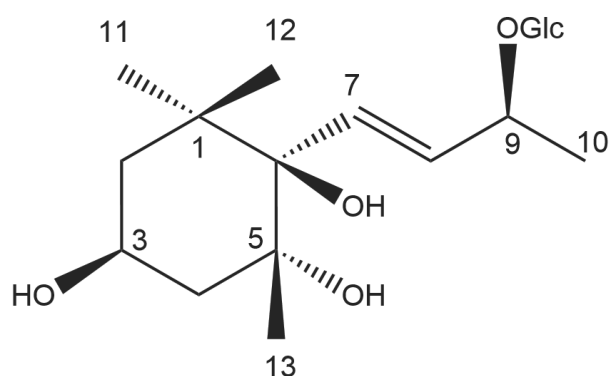


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 427.1938 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>9</sub>Na: 427.1939

Fig. 123 Structure and physical data of Compound **64**

Table 68 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	39.7	s	
2	42.0	t	1.99, <i>ddd</i> , (13.3, 3.6, 1.9) 1.75, <i>dd-like</i> , (13.3, 1.9)
3	75.4	d	4.25, <i>quint</i> , (3.6)
4	37.6	t	2.01, <i>m</i> 1.95, <i>dd</i> , (14.4, 3.6)
5	76.4	s	
6	81.1	s	
7	132.1	d	7.51, <i>d</i> , (16.4)
8	152.9	d	6.39, <i>d</i> , (16.4)
9	201.3	s	
10	27.1	q	2.35, <i>s</i>
11	28.3	q	0.90, <i>s</i>
12	28.1	q	1.34, <i>s</i>
13	27.3	q	1.15, <i>s</i>
1'	102.0	d	4.46, <i>d</i> , (7.7)
2'	75.4	d	} 3.21-3.42, <i>m</i>
3'	78.4	d	
4'	71.8	d	
5'	78.3	d	
6'	62.9	t	3.90, <i>dd</i> , (11.2, 1.2) 3.70, <i>dd</i> , (11.2, 5.4)

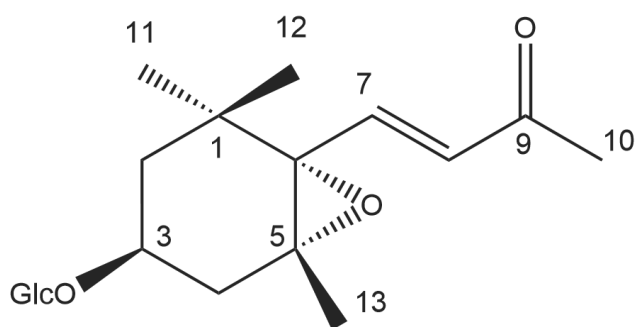


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 429.2093  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{34}O_9Na$ : 429.2095

Fig. 124 Structure and physical data of Compound **65**

Table 69  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	40.9	<i>s</i>	
2	46.6	<i>t</i>	1.42, <i>m</i> 1.61-1.77, <i>m</i>
3	65.4	<i>d</i>	4.03, <i>m</i>
4	45.7	<i>t</i>	1.61-1.77, <i>m</i> 1.61-1.77, <i>m</i>
5	77.9	<i>s</i>	
6	78.3	<i>s</i>	
7	133.2	<i>d</i>	6.15, <i>d</i> , (15.8)
8	135.8	<i>d</i>	5.62, <i>dd</i> , (15.8, 8.2)
9	79.3	<i>d</i>	4.52, <i>quint</i> , (8.2)
10	22.5	<i>q</i>	1.29, <i>d</i> , (8.2)
11	26.6	<i>q</i>	1.09, <i>s</i>
12	28.2	<i>q</i>	0.89, <i>s</i>
13	27.5	<i>q</i>	1.22, <i>s</i>
1'	102.7	<i>d</i>	4.38, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.5	<i>d</i>	} 3.15-3.35, <i>m</i>
3'	77.9	<i>d</i>	
4'	71.8	<i>d</i>	
5'	78.4	<i>d</i>	
6'	62.8	<i>t</i>	3.65, <i>dd</i> , (11.9, 5.7) 3.83, <i>dd</i> , (11.9, 2.2)

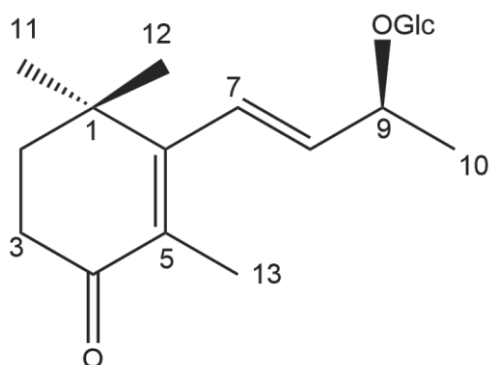


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 409.1832  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{30}O_8Na$ : 409.1833  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $-28.7$  (EtOH,  $c=0.32$ )

Fig. 125 Structure and physical data of Compound **66**

Table 70  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	36.1	<i>s</i>	
2	45.4	<i>t</i>	1.66, <i>dd</i> , (14.5, 8.4) 1.38, <i>dd</i> , (14.5, 9.9)
3	72.9	<i>d</i>	3.89, <i>m</i>
4	38.3	<i>t</i>	2.43, <i>ddd</i> , (14.6, 5.1, 1.5) 1.73, <i>ddd</i> , (14.6, 3.7, 1.5)
5	68.5	<i>s</i>	
6	71.3	<i>s</i>	
7	145.5	<i>d</i>	7.16, <i>d</i> , (15.7)
8	134.0	<i>d</i>	6.17, <i>d</i> , (15.7)
9	200.4	<i>s</i>	
10	25.6	<i>q</i>	2.27, <i>s</i>
11	27.6	<i>q</i>	0.94, <i>s</i>
12	29.3	<i>q</i>	1.18, <i>s</i>
13	20.3	<i>q</i>	1.25, <i>s</i>
1'	103.1	<i>d</i>	4.33, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.3	<i>d</i>	} 3.09-3.31, <i>m</i>
3'	78.3	<i>d</i>	
4'	71.8	<i>d</i>	
5'	78.2	<i>d</i>	
6'	62.8	<i>t</i>	3.83, <i>dd</i> , (12.1, 2.0) 3.66, <i>dd</i> , (12.1, 5.3)

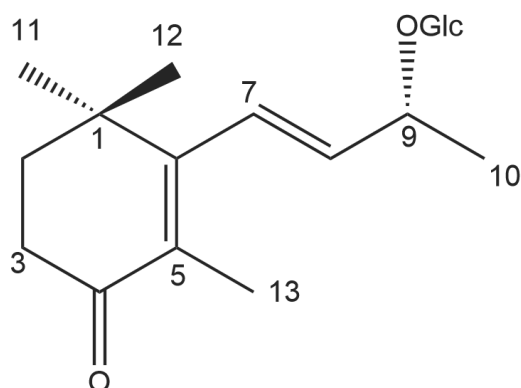


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 393.1882  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{30}O_7Na$ : 393.1884  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $-77.6$  (MeOH,  $c=0.55$ )

Fig. 126 Structure and physical data of Compound **67**

Table 71  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	36.7	<i>s</i>	
2	38.4	<i>t</i>	1.91, <i>t</i> , (6.5)
3	35.3	<i>t</i>	2.53, <i>t</i> , (6.5)
4	201.8	<i>s</i>	
5	130.9	<i>s</i>	
6	163.7	<i>s</i>	
7	129.8	<i>d</i>	6.44, <i>d</i> , (16.2)
8	139.4	<i>d</i>	5.64, <i>dd</i> , (16.2, 7.4)
9	75.3	<i>d</i>	4.63, <i>dq</i> , (7.4, 6.4)
10	22.3	<i>q</i>	1.38, <i>d</i> , (6.4)
11	27.8	<i>q</i>	1.23, <i>s</i>
12	27.9	<i>q</i>	1.24, <i>s</i>
13	13.8	<i>q</i>	1.83, <i>s</i>
1'	101.6	<i>d</i>	4.41, <i>d</i> , (7.7)
2'	75.2	<i>d</i>	} 3.24- 3.38, <i>m</i>
3'	78.3	<i>d</i>	
4'	71.9	<i>d</i>	
5'	78.4	<i>d</i>	
6'	63.0	<i>t</i>	3.70, <i>dd</i> , (11.9, 5.9)
			3.92, <i>dd</i> , (11.9, 2.1)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 393.1881  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{19}H_{30}O_7Na$ : 393.1884  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $-2.9$  (MeOH,  $c=0.52$ )

Fig. 127 Structure and physical data of Compound **68**

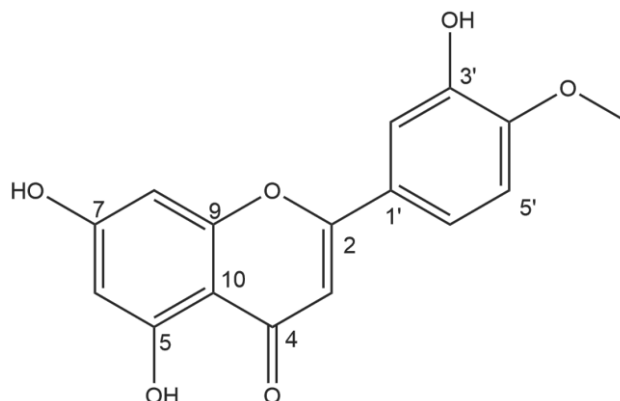
Table 72  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	36.8	<i>s</i>	
2	38.4	<i>t</i>	1.89, <i>t</i> , (6.8)
3	35.3	<i>t</i>	2.52, <i>t</i> , (6.8)
4	201.9	<i>s</i>	
5	130.9	<i>s</i>	
6	163.9	<i>s</i>	
7	127.7	<i>d</i>	6.35, <i>d</i> , (16.3)
8	140.6	<i>d</i>	5.64, <i>dd</i> , (16.3, 6.3)
9	77.4	<i>d</i>	4.55, <i>m</i>
10	21.1	<i>q</i>	1.40, <i>d</i> , (6.4)
11	27.8	<i>q</i>	1.21, <i>s</i>
12	27.8	<i>q</i>	1.22, <i>s</i>
13	13.8	<i>q</i>	1.83, <i>s</i>
1'	102.9	<i>d</i>	4.44, <i>d</i> , (7.9)
2'	75.5	<i>d</i>	} 3.20- 3.42, <i>m</i>
3'	78.1	<i>d</i>	
4'	71.6	<i>d</i>	
5'	78.3	<i>d</i>	
6'	62.8	<i>t</i>	3.71, <i>dd</i> , (12.0, 5.2) 3.85, <i>dd</i> , (12.0, 2.5)



第二項 既知フラボノイド誘導体の化学構造

フサスギナ地上部 1-BuOH 層から既知の flavonoid 誘導体 16 種 (69–84) を単離した。その化学構造は先行文献のデータと比較することで決定した。



Yellow amorphous powder

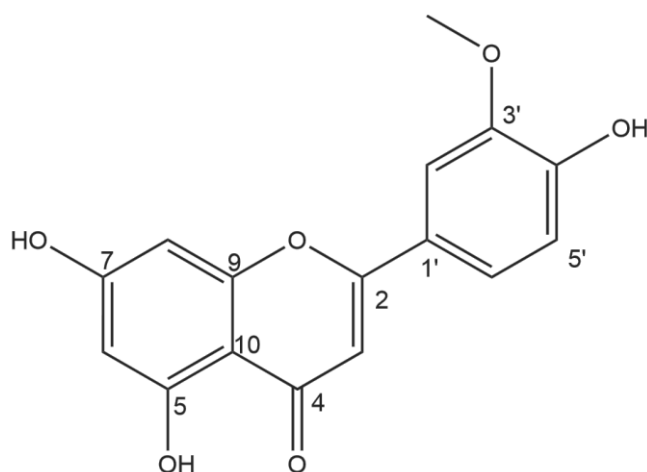
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 301.0706 [M+H]<sup>+</sup>

Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>: 301.0707

Fig. 128 Structure and physical data of Compound 69

Table 73 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	166.1	<i>s</i>	
3	106.3	<i>d</i>	6.97, <i>s</i>
4	183.2	<i>s</i>	
5	158.5	<i>s</i>	
6	98.9	<i>d</i>	6.61, <i>d</i> , (2.1)
7	165.5	<i>s</i>	
8	93.1	<i>d</i>	6.62, <i>d</i> , (2.1)
9	163.1	<i>s</i>	
10	104.5	<i>s</i>	
1'	124.3	<i>s</i>	
2'	115.1	<i>d</i>	7.95, <i>d</i> , (1.9)
3'	148.2	<i>s</i>	
4'	152.2	<i>s</i>	
5'	117.2	<i>d</i>	7.36, <i>d</i> , (8.3)
6'	120.0	<i>d</i>	7.58, <i>dd</i> , (1.9, 8.3)
4'-OCH <sub>3</sub>	56.3	<i>q</i>	3.77, <i>s</i>



Yellow amorphous powder

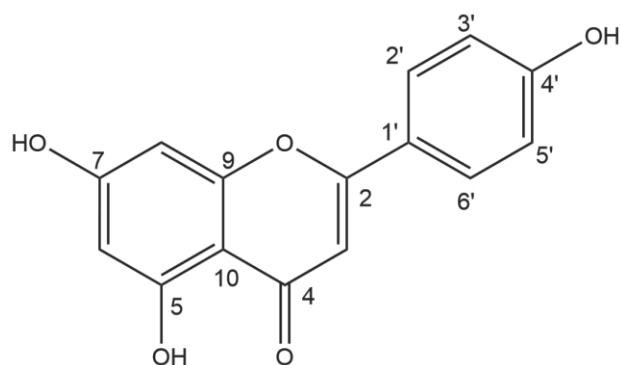
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 301.0705 [M+H]<sup>+</sup>

Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>: 301.0707

Fig. 129 Structure and physical data of Compound 70

Table 74 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	165.0	<i>s</i>	
3	104.6	<i>d</i>	6.99, <i>s</i>
4	183.2	<i>s</i>	
5	163.6	<i>s</i>	
6	100.4	<i>d</i>	6.78, <i>d</i> , (1.9)
7	166.3	<i>s</i>	
8	95.4	<i>d</i>	6.87, <i>d</i> , (1.9)
9	159.0	<i>s</i>	
10	105.4	<i>s</i>	
1'	122.9	<i>s</i>	
2'	110.7	<i>d</i>	7.63, <i>d</i> , (2.1)
3'	152.8	<i>s</i>	
4'	149.4	<i>s</i>	
5'	117.4	<i>d</i>	7.30, <i>d</i> , (8.6)
6'	121.7	<i>d</i>	7.66, <i>dd</i> , (2.1, 8.6)
3'-OCH <sub>3</sub>	56.4	<i>q</i>	3.83, <i>s</i>

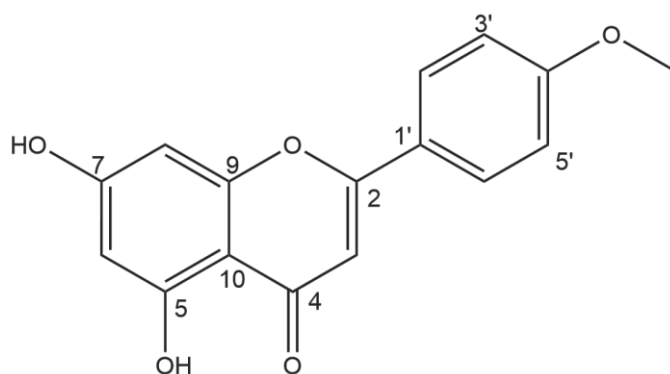


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 271.0600 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>: 271.0601

Fig. 130 Structure and physical data of Compound 71

Table 75 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	164.8	<i>s</i>	
3	104.2	<i>d</i>	6.94, <i>s</i>
4	183.1	<i>s</i>	
5	163.0	<i>s</i>	
6	100.3	<i>d</i>	6.77, <i>d</i> , (1.9)
7	166.2	<i>s</i>	
8	95.2	<i>d</i>	6.84, <i>d</i> , (1.9)
9	158.8	<i>s</i>	
10	105.3	<i>s</i>	
1'	122.6	<i>s</i>	
2', 6'	129.2	<i>d</i>	7.95, <i>d</i> , (8.4)
3', 5'	117.2	<i>d</i>	7.24, <i>d</i> , (8.4)
4'	163.5	<i>s</i>	



Yellow amorphous powder

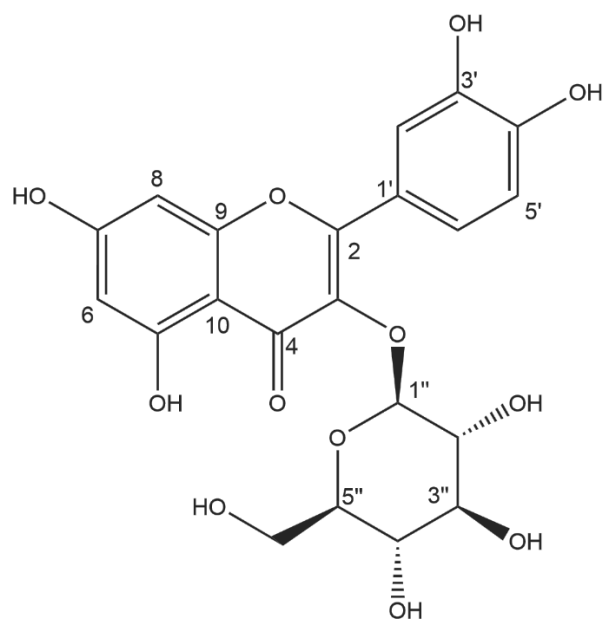
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 285.0757  $[M+H]^+$

Calcd for  $C_{16}H_{13}O_5$ : 285.0757

Fig. 131 Structure and physical data of Compound 72

Table 76  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine- $d_5$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	166.4	<i>s</i>	
3	104.5	<i>d</i>	6.96, <i>s</i>
4	183.4	<i>s</i>	
5	163.2	<i>s</i>	
6	99.2	<i>d</i>	6.65, <i>d</i> , (2.4)
7	165.5	<i>s</i>	
8	93.5	<i>d</i>	6.74, <i>d</i> , (2.4)
9	158.7	<i>s</i>	
10	106.4	<i>s</i>	
1'	122.2	<i>s</i>	
2', 6'	129.8	<i>d</i>	7.98, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	117.9	<i>d</i>	7.31, <i>d</i> , (8.9)
4'	163.5	<i>s</i>	
4'-OCH <sub>3</sub>	56.6	<i>q</i>	3.77, <i>s</i>



Yellow amorphous powder

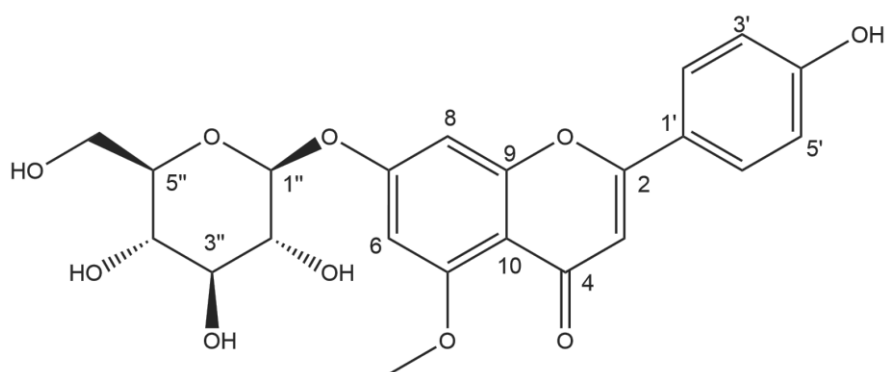
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 465.1027 [M+H]<sup>+</sup>

Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>12</sub>: 465.1028

Fig. 132 Structure and physical data of Compound 73

Table 77 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	157.8	<i>s</i>	
3	136.2	<i>s</i>	
4	179.0	<i>s</i>	
5	163.0	<i>s</i>	
6	100.1	<i>d</i>	6.65, <i>d</i> , (2.2)
7	166.2	<i>s</i>	
8	94.9	<i>d</i>	6.71, <i>d</i> , (2.2)
9	158.0	<i>s</i>	
10	105.5	<i>s</i>	
1'	122.9	<i>s</i>	
2'	116.5	<i>d</i>	8.46, <i>d</i> , (2.1)
3'	150.9	<i>s</i>	
4'	147.0	<i>s</i>	
5'	118.2	<i>d</i>	7.29, <i>d</i> , (8.5)
6'	122.6	<i>d</i>	8.05, <i>dd</i> , (2.1, 8.5)
1''	104.7	<i>d</i>	6.21, <i>d</i> , (7.7)
2''	76.4	<i>d</i>	} 3.60-4.42, <i>m</i>
3''	79.2	<i>d</i>	
4''	71.6	<i>d</i>	
5''	78.7	<i>d</i>	
6''	62.9	<i>t</i>	



Yellow amorphous powder

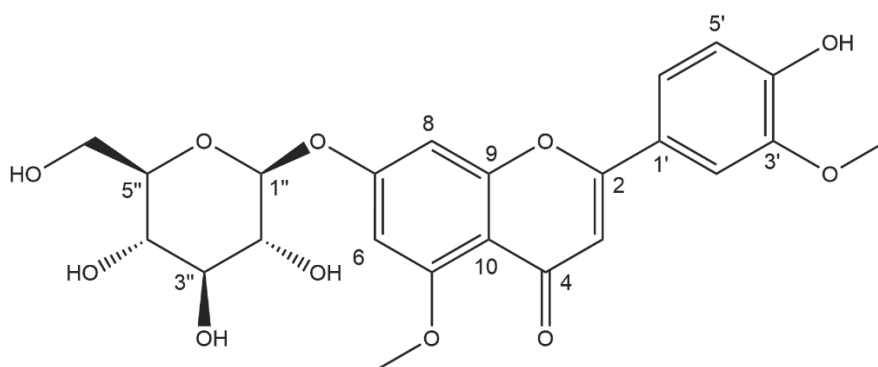
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 447.1285  $[M+H]^+$

Calcd for  $C_{22}H_{23}O_{10}$ : 447.1286

Fig. 133 Structure and physical data of Compound 74

Table 78  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine- $d_5$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	162.9	<i>s</i>	
3	107.4	<i>d</i>	6.80, <i>s</i>
4	178.4	<i>s</i>	
5	164.7	<i>s</i>	
6	104.8	<i>d</i>	6.92, <i>d</i> , (2.3)
7	159.7	<i>s</i>	
8	97.6	<i>d</i>	7.27, <i>d</i> , (2.3)
9	160.1	<i>s</i>	
10	111.0	<i>s</i>	
5-OCH <sub>3</sub>	56.3	<i>q</i>	3.81, <i>s</i>
1'	122.6	<i>s</i>	
2', 6'	129.0	<i>d</i>	7.92, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	117.2	<i>d</i>	6.95, <i>d</i> , (8.9)
4'	162.7	<i>s</i>	
1''	106.9	<i>d</i>	5.42, <i>d</i> , (7.4)
2''	72.8	<i>d</i>	} 4.17-4.66, <i>m</i>
3''	78.1	<i>d</i>	
4''	71.8	<i>d</i>	
5''	79.9	<i>d</i>	
6''	63.0	<i>t</i>	

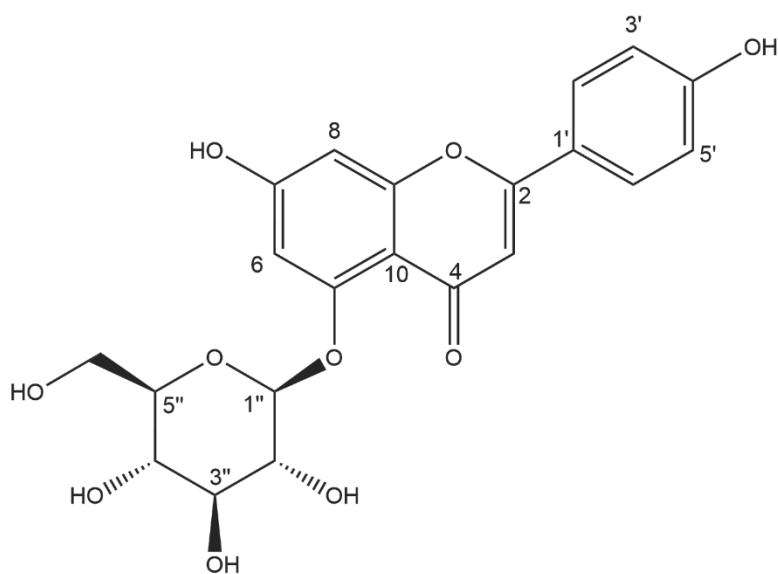


Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 477.1394 [M+H]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>11</sub>: 477.1391

Fig. 134 Structure and physical data of Compound **75**

Table 79 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	162.7	<i>s</i>	
3	107.7	<i>d</i>	6.96, <i>s</i>
4	178.4	<i>s</i>	
5	163.6	<i>s</i>	
6	104.6	<i>d</i>	7.00, <i>d</i> , (2.5)
7	159.5	<i>s</i>	
8	97.5	<i>d</i>	7.41, <i>d</i> , (2.5)
9	160.0	<i>s</i>	
10	110.6	<i>s</i>	
1'	122.8	<i>s</i>	
2'	111.0	<i>d</i>	7.62, <i>d</i> , (2.0)
3'	149.3	<i>s</i>	
4'	152.5	<i>s</i>	
5'	117.3	<i>d</i>	7.31, <i>d</i> , (8.8)
6'	121.4	<i>d</i>	7.63, <i>dd</i> , (2.0, 8.8)
1''	106.7	<i>d</i>	5.42, <i>d</i> , (7.7)
2''	75.6	<i>d</i>	} 4.16- 5.33, <i>m</i>
3''	79.9	<i>d</i>	
4''	71.7	<i>d</i>	
5''	78.0	<i>d</i>	
6''	62.9	<i>t</i>	
5-OCH <sub>3</sub>	56.3	<i>q</i>	3.76, <i>s</i>
3'-OCH <sub>3</sub>	56.4	<i>q</i>	3.83, <i>s</i>



Yellow amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 455.0948  $[M+Na]^+$

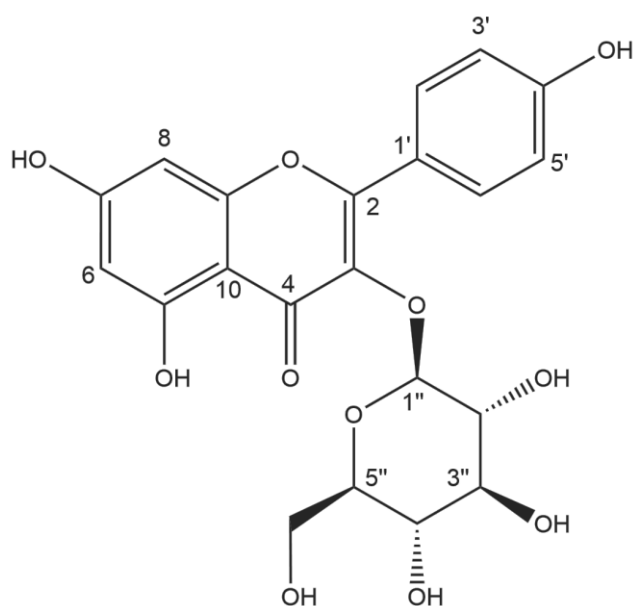
Calcd for  $C_{21}H_{20}O_{10}Na$ : 455.0949

Fig. 135 Structure and physical data of Compound **76**

Table 80  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz,  $DMSO-d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	162.6	<i>s</i>	
3	105.7	<i>d</i>	6.67, <i>s</i>
4	177.1	<i>s</i>	
5	158.7	<i>s</i>	
6	104.4	<i>d</i>	6.74, <i>d</i> , (2.3)
7	161.2	<i>s</i>	
8	98.3	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (2.3)
9	158.4	<i>s</i>	
10	108.3	<i>s</i>	
1'	121.2	<i>s</i>	
2', 6'	128.2	<i>d</i>	7.89, <i>d</i> , (9.0)
3', 5'	115.9	<i>d</i>	6.91, <i>d</i> , (9.0)
4'	160.8	<i>s</i>	
1''	104.6	<i>d</i>	4.71, <i>d</i> , (7.4)
2''	73.7	<i>d</i>	} 3.20-3.90, <i>m</i>
3''	75.6	<i>d</i>	
4''	69.7	<i>d</i>	
5''	77.6	<i>d</i>	
6''	60.8	<i>t</i>	





Yellow amorphous powder

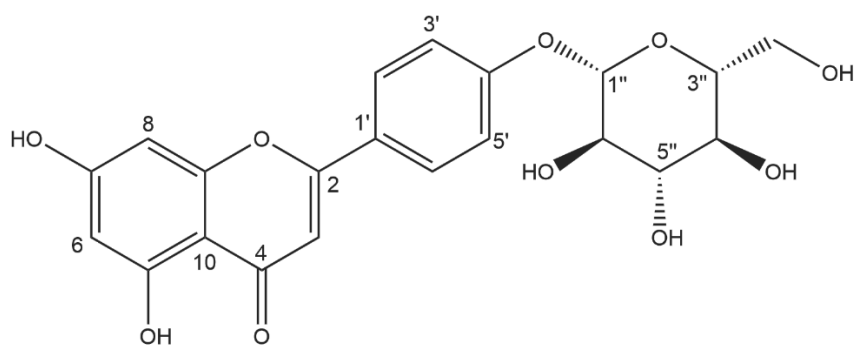
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 471.0894  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{21}H_{20}O_{11}Na$ : 471.0898

Fig. 136 Structure and physical data of Compound 77

Table 81  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz,  $DMSO-d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	156.5	<i>s</i>	
3	133.2	<i>s</i>	
4	177.5	<i>s</i>	
5	161.3	<i>s</i>	
6	98.8	<i>d</i>	6.21, <i>d</i> , (2.1)
7	164.3	<i>s</i>	
8	93.7	<i>d</i>	6.44, <i>d</i> , (2.1)
9	156.3	<i>s</i>	
10	104.0	<i>s</i>	
1'	120.9	<i>s</i>	
2', 6'	131.0	<i>d</i>	8.04, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	115.2	<i>d</i>	6.88, <i>d</i> , (8.9)
4'	160.0	<i>s</i>	
1''	100.9	<i>d</i>	5.47, <i>d</i> , (7.5)
2''	74.3	<i>d</i>	} 3.08-3.57, <i>m</i>
3''	76.5	<i>d</i>	
4''	69.9	<i>d</i>	
5''	77.6	<i>d</i>	
6''	60.9	<i>t</i>	



Yellow amorphous powder

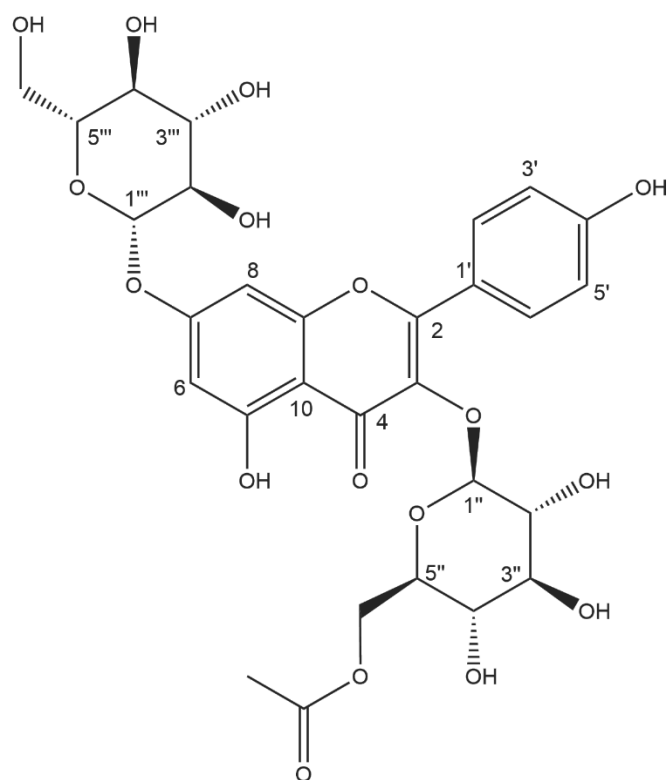
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 455.0947  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{21}H_{20}O_{10}Na$ : 455.0949

Fig. 137 Structure and physical data of Compound 78

Table 82  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	165.7	<i>s</i>	
3	105.0	<i>d</i>	6.55, <i>s</i>
4	184.0	<i>s</i>	
5	159.6	<i>s</i>	
6	100.4	<i>d</i>	6.12, <i>br s</i>
7	166.3	<i>s</i>	
8	95.3	<i>d</i>	6.36, <i>br s</i>
9	163.4	<i>s</i>	
10	105.6	<i>s</i>	
1'	126.3	<i>s</i>	
2', 6'	129.3	<i>d</i>	7.84, <i>d</i> , (8.4)
3', 5'	118.2	<i>d</i>	7.15, <i>d</i> , (8.4)
4'	162.2	<i>s</i>	
1''	101.9	<i>d</i>	4.95, <i>d</i> , (7.2)
2''	74.9	<i>d</i>	} 3.32-3.46, <i>m</i>
3''	78.5	<i>d</i>	
4''	71.5	<i>d</i>	
5''	78.1	<i>d</i>	
6''	62.6	<i>t</i>	3.83, <i>dd</i> , (12.2, 2.0)
			3.63, <i>dd</i> , (12.2, 5.7)



Yellow amorphous powder

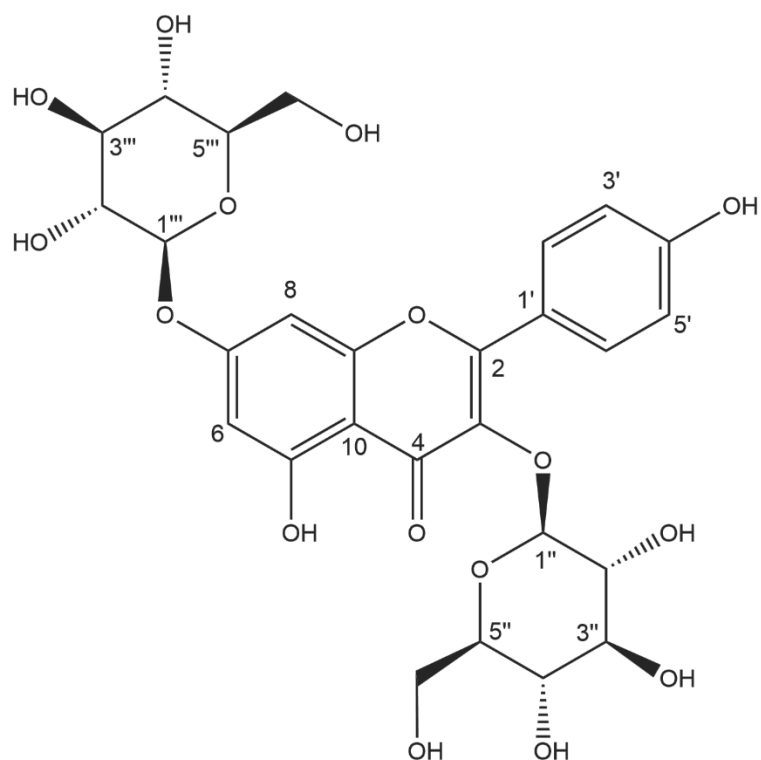
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 675.1536  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{29}H_{32}O_{17}Na$ : 675.1572

Fig. 138 Structure and physical data of Compound **79**

Table 83  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR data (125 MHz and 500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

Position	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$
2	156.0	<i>s</i>	
3	133.4	<i>s</i>	
4	177.6	<i>s</i>	
5	160.8	<i>s</i>	
6	99.4	<i>d</i>	6.46, <i>d</i> , (2.2)
7	163.0	<i>s</i>	
8	94.6	<i>d</i>	6.80, <i>d</i> , (2.2)
9	157.2	<i>s</i>	
10	105.5	<i>s</i>	
1'	120.6	<i>s</i>	
2', 6'	130.9	<i>d</i>	8.02, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	115.1	<i>d</i>	6.89, <i>d</i> , (8.9)
4'	160.2	<i>s</i>	
1''	101.0	<i>d</i>	5.38, <i>d</i> , (7.5)
2''	74.1	<i>d</i>	
3''	76.1	<i>d</i>	
4''	69.8	<i>d</i>	3.12-3.34, <i>m</i>
5''	74.0	<i>d</i>	
6''	62.7	<i>t</i>	4.11, <i>dd</i> , (2.1, 12.0) 3.95, <i>dd</i> , (6.0, 12.0)
-COO	169.8	<i>s</i>	
-CH <sub>3</sub>	20.2	<i>q</i>	1.74, <i>s</i>
1'''	99.8	<i>d</i>	5.08, <i>d</i> , (7.5)
2'''	73.1	<i>d</i>	} 3.12-3.34, <i>m</i>
3'''	76.4	<i>d</i>	
4'''	69.6	<i>d</i>	
5'''	77.2	<i>d</i>	
6'''	60.6	<i>t</i>	3.70, <i>m</i> 3.46, <i>m</i>



Yellow amorphous powder

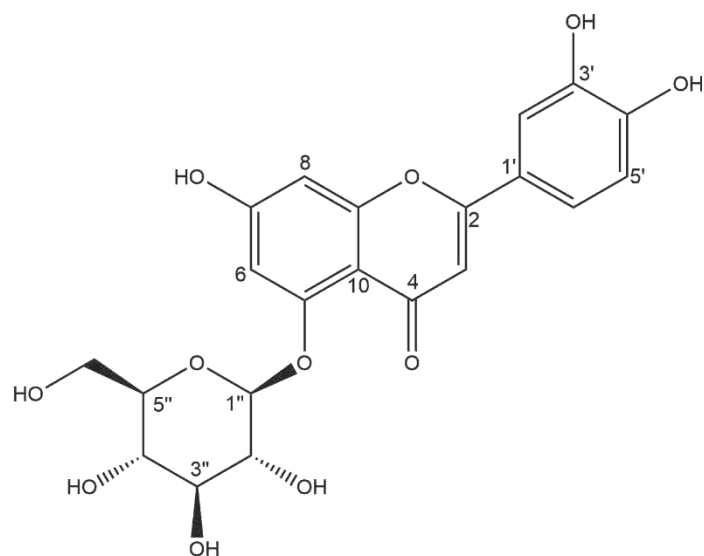
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 633.1426  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{27}H_{30}O_{16}Na$ : 633.1426

Fig. 139 Structure and physical data of Compound **80**

Table 84 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	156.0	<i>s</i>	
3	133.5	<i>s</i>	
4	177.6	<i>s</i>	
5	160.8	<i>s</i>	
6	99.4	<i>d</i>	6.44, <i>d</i> , (2.1)
7	162.8	<i>s</i>	
8	94.5	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (2.1)
9	156.8	<i>s</i>	
10	105.7	<i>s</i>	
1'	120.8	<i>s</i>	
2', 6'	131.0	<i>d</i>	8.06, <i>d</i> , (9.0)
3', 5'	115.2	<i>d</i>	6.90, <i>d</i> , (9.0)
4'	160.1	<i>s</i>	
1''	100.7	<i>d</i>	5.48, <i>d</i> , (7.6)
2''	74.2	<i>d</i>	} 3.35-3.97, <i>m</i>
3''	76.4	<i>d</i>	
4''	69.9	<i>d</i>	
5''	77.6	<i>d</i>	
6''	60.8	<i>t</i>	
1'''	99.7	<i>d</i>	5.07, <i>d</i> , (5.1)
2'''	73.1	<i>d</i>	} 3.35-3.97, <i>m</i>
3'''	76.4	<i>d</i>	
4'''	69.6	<i>d</i>	
5'''	77.2	<i>d</i>	
6'''	60.6	<i>t</i>	



Yellow amorphous powder

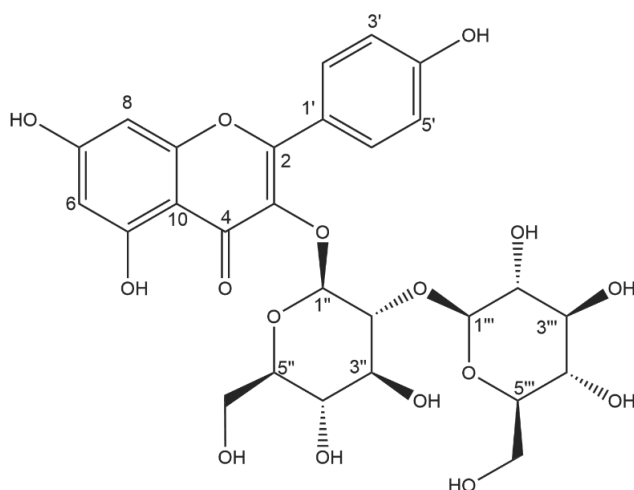
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 471.0897  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{21}H_{20}O_{11}Na$ : 471.0898

Fig. 140 Structure and physical data of Compound 81

Table 85  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz,  $DMSO-d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	162.7	<i>s</i>	
3	105.8	<i>d</i>	6.55, <i>s</i>
4	177.1	<i>s</i>	
5	158.7	<i>s</i>	
6	104.5	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (1.9)
7	161.4	<i>s</i>	
8	98.3	<i>d</i>	6.70, <i>br s</i>
9	158.4	<i>s</i>	
10	108.3	<i>s</i>	
1'	121.6	<i>s</i>	
2'	113.2	<i>d</i>	7.36, <i>br s</i>
3'	145.8	<i>d</i>	
4'	149.4	<i>s</i>	
5'	116.1	<i>d</i>	6.88, <i>d</i> , (8.1)
6'	118.6	<i>d</i>	7.38, <i>dd</i> , (8.1, 1.9)
1''	104.3	<i>d</i>	4.72, <i>d</i> , (7.6)
2''	73.7	<i>d</i>	} 3.21-3.36, <i>m</i>
3''	75.7	<i>d</i>	
4''	69.8	<i>d</i>	
5''	77.6	<i>d</i>	
6''	60.9	<i>t</i>	3.76, <i>br d</i> , (11.6)
			3.56, <i>dd</i> , (11.6, 5.6)



Yellow amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 633.1425  $[M+Na]^+$

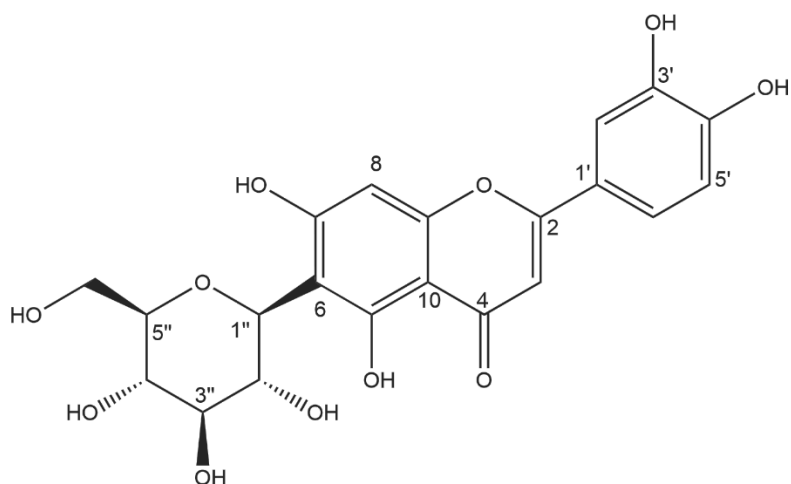
Calcd for  $C_{27}H_{30}O_{16}Na$ : 633.1423

Fig. 141 Structure and physical data of Compound **82**

Table 86  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	159.0	<i>s</i>	
3	135.1	<i>s</i>	
4	179.8	<i>s</i>	
5	163.3	<i>s</i>	
6	100.0	<i>d</i>	6.18, <i>d</i> , (2.0)
7	166.0	<i>s</i>	
8	94.9	<i>d</i>	6.38, <i>d</i> , (2.0)
9	158.6	<i>s</i>	
10	105.9	<i>s</i>	
1'	123.0	<i>s</i>	
2', 6'	132.5	<i>d</i>	8.03, <i>d</i> , (8.9)
3', 5'	116.4	<i>d</i>	6.90, <i>d</i> , (8.9)
4'	161.7	<i>s</i>	
1''	101.2	<i>d</i>	5.43, <i>d</i> , (7.7)
2''	82.6	<i>d</i>	3.74, <i>dd</i> , (7.8, 9.0)
3''	78.4	<i>d</i>	3.60, <i>t</i> , (8.9)
4''	71.4	<i>d</i>	3.33-3.42, <i>m</i>
5''	78.0	<i>d</i>	3.20, <i>ddd</i> , (9.0, 5.3, 2.2)
6''	62.7	<i>t</i>	3.69, <i>m</i>
			3.49, <i>dd</i> , (12.1, 5.4)
1'''	104.8	<i>d</i>	4.76, <i>d</i> , (7.7)
2'''	75.7	<i>d</i>	} 3.33-3.42, <i>m</i>
3'''	78.3	<i>d</i>	
4'''	71.2	<i>d</i>	
5'''	78.0	<i>d</i>	
6'''	62.6	<i>t</i>	
			3.79, <i>dd</i> , (12.0, 2.4)
			3.68, <i>m</i>





Yellow amorphous powder

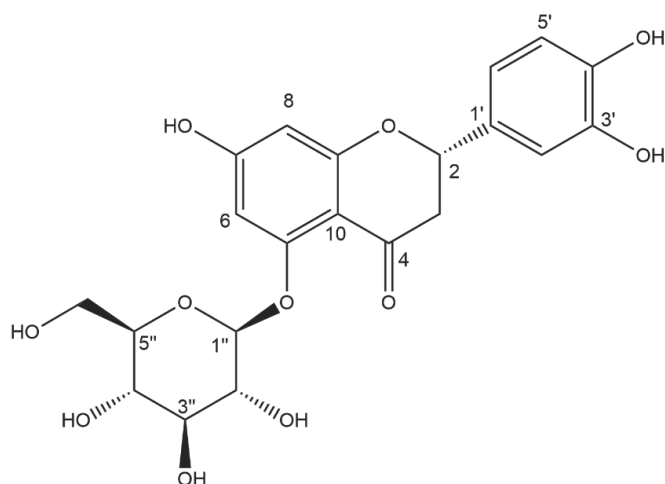
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 471.0895  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{21}H_{20}O_{11}Na$ : 471.0898

Fig. 142 Structure and physical data of Compound **83**

Table 87  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz,  $DMSO-d_6$ )

Position	$^{13}C$		$^1H$
2	166.4	<i>s</i>	
3	104.1	<i>d</i>	6.54, <i>s</i>
4	184.2	<i>s</i>	
5	162.2	<i>s</i>	
6	109.3	<i>s</i>	
7	165.0	<i>s</i>	
8	95.3	<i>d</i>	6.48, <i>s</i>
9	158.9	<i>s</i>	
10	105.4	<i>s</i>	
1'	123.7	<i>s</i>	
2'	114.3	<i>d</i>	7.36, <i>br s</i>
3'	147.2	<i>s</i>	
4'	151.2	<i>s</i>	
5'	116.9	<i>d</i>	6.89, <i>d</i> , (8.2)
6'	120.5	<i>d</i>	7.37, <i>dd</i> , (8.2, 1.9)
1''	75.4	<i>d</i>	Overlapped with solvent
2''	72.7	<i>d</i>	} 3.39-3.49, <i>m</i>
3''	80.3	<i>d</i>	
4''	71.9	<i>d</i>	
5''	82.8	<i>d</i>	
6''	63.0	<i>t</i>	3.87, <i>dd</i> , (12.1, 2.2)
			3.73, <i>dd</i> , (12.1, 5.3)



Yellow amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 473.1053 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>Na: 473.1054  
 $[\alpha]_D^{28}$ : -54.5 (MeOH, c=0.71)  
 CD  $\lambda_{max}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 300 (-5.19)

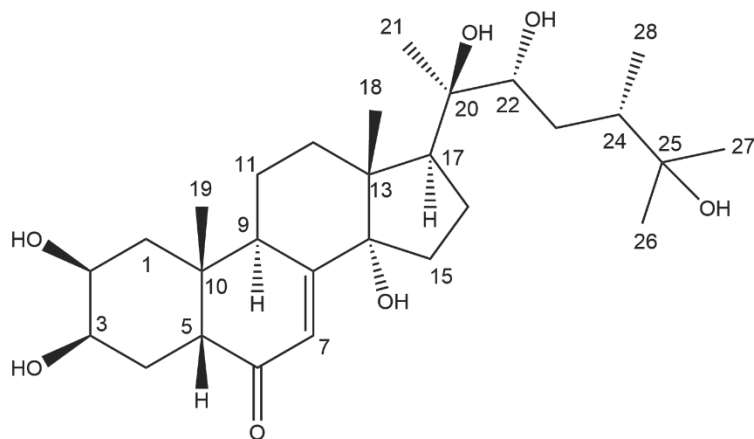
Fig. 143 Structure and physical data of Compound **84**

Table 88 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
2	80.4	<i>d</i>	5.24, <i>dd</i> , (12.8, 2.8)
3	46.5	<i>t</i>	2.97, <i>dd</i> , (12.8, 17.1) 2.72, <i>dd</i> , (17.1, 2.8)
4	193.2	<i>s</i>	
5	162.5	<i>s</i>	
6	100.5	<i>d</i>	6.49, <i>d</i> , (2.2)
7	167.2	<i>s</i>	
8	99.6	<i>d</i>	6.15, <i>d</i> , (2.2)
9	166.7	<i>s</i>	
10	107.2	<i>s</i>	
1'	131.8	<i>s</i>	
2'	114.8	<i>d</i>	6.91, <i>br s</i>
3'	147.0	<i>d</i>	
4'	146.7	<i>s</i>	
5'	116.4	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (8.2)
6'	119.4	<i>d</i>	6.79, <i>d</i> , (8.2)
1''	105.1	<i>d</i>	4.78, <i>d</i> , (7.6)
2''	74.8	<i>d</i>	} 3.41-3.56, <i>m</i>
3''	78.8	<i>d</i>	
4''	71.4	<i>d</i>	
5''	77.3	<i>d</i>	
6''	62.7	<i>t</i>	

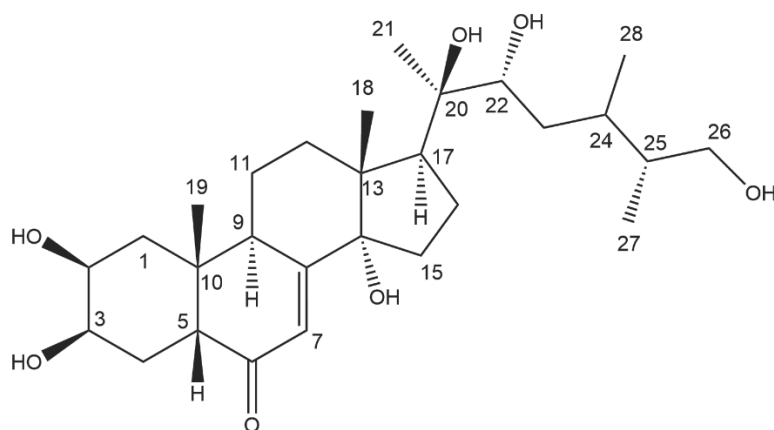
### 第三項 既知ステロイド誘導体の化学構造

フサスギナ地上部 1-BuOH 層から既知の steroid 誘導体 2 種 (85-86) を単離した。その化学構造は先行文献のデータと比較することで決定した。



Colorless amorphous powder  
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 517.3132  $[M+Na]^+$   
Calcd for  $C_{28}H_{46}O_7Na$ : 517.3136  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $-2.3$  (MeOH,  $c=0.53$ )

Fig. 144 Structure and physical data of Compound 85



Colorless amorphous powder  
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 517.3130  $[M+Na]^+$   
Calcd for  $C_{28}H_{46}O_7Na$ : 517.3136  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $36.9$  (MeOH,  $c=0.94$ )

Fig. 145 Structure and physical data of Compound 86

Table 89 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

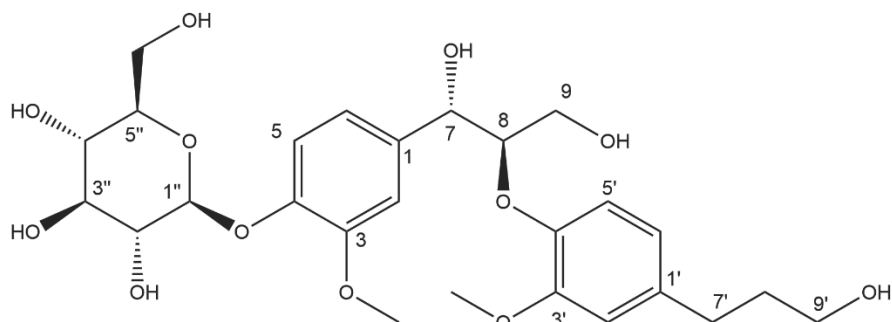
Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	37.5	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
2	68.7	<i>d</i>	3.92, <i>br s</i>
3	68.9	<i>d</i>	3.90, <i>m</i>
4	33.0	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
5	51.9	<i>d</i>	3.14, <i>m</i>
6	206.6	<i>s</i>	
7	122.3	<i>d</i>	5.79, <i>d</i> , (2.4)
8	168.1	<i>s</i>	
9	35.2	<i>d</i>	3.58, <i>t</i> , (9.2)
10	39.4	<i>s</i>	
11	21.1	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
12	32.7	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
13	50.0	<i>s</i>	
14	85.4	<i>s</i>	
15	31.9	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
16	21.5	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
17	50.5	<i>d</i>	3.13, <i>t</i> , (9.2)
18	18.2	<i>q</i>	0.94, <i>s</i>
19	24.6	<i>q</i>	0.87, <i>s</i>
20	78.2	<i>s</i>	
21	21.7	<i>q</i>	1.17, <i>s</i>
22	75.5	<i>d</i>	3.74, <i>dd</i> , (5.2, 12.2)
23	34.6	<i>t</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
24	41.8	<i>d</i>	1.41-2.53, <i>m</i>
25	73.9	<i>s</i>	
26	27.6	<i>q</i>	1.14, <i>s</i>
27	26.3	<i>q</i>	1.12, <i>s</i>
28	15.0	<i>q</i>	0.92, <i>d</i> , (6.7)

Table 90 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	37.5	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
2	68.7	<i>d</i>	3.93, <i>br s</i>
3	68.9	<i>d</i>	3.81, <i>d</i> -like, (11.5)
4	33.0	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
5	51.9	<i>d</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
6	206.6	<i>s</i>	
7	122.3	<i>d</i>	5.79, <i>d</i> , (2.3)
8	168.1	<i>s</i>	
9	35.3	<i>d</i>	3.34, <i>m</i>
10	39.4	<i>s</i>	
11	21.5	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
12	32.7	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
13	49.3	<i>s</i>	
14	85.4	<i>s</i>	
15	31.9	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
16	21.7	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
17	50.5	<i>d</i>	2.93, <i>t</i> -like, (8.0)
18	18.2	<i>q</i>	0.94, <i>s</i>
19	24.6	<i>q</i>	0.87, <i>s</i>
20	78.1	<i>s</i>	
21	21.1	<i>q</i>	1.15, <i>s</i>
22	75.3	<i>d</i>	3.81, <i>d</i> -like, (11.5)
23	35.3	<i>t</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
24	32.1	<i>d</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
25	42.7	<i>d</i>	1.38-2.37, <i>m</i>
26	66.3	<i>t</i>	3.53, <i>dd</i> , (6.3, 11.0) 3.44, <i>dd</i> , (1.4, 11.0)
27	13.6	<i>q</i>	0.92, <i>d</i> , (7.1)
28	17.2	<i>q</i>	0.86, <i>d</i> , (6.9)

第四項 既知リグナン誘導体の化学構造

フサスギナ地上部 1-BuOH 層から既知の lignan 誘導体 3 種 (87-89) を単離した。その化学構造は先行文献のデータと比較することで決定した。



White amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 563.2098  $[M+Na]^+$

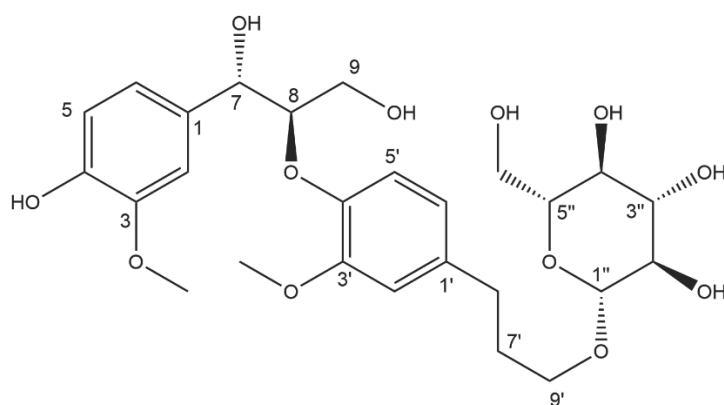
Calcd for  $C_{26}H_{36}O_{12}Na$ : 563.2098

$[\alpha]_D^{27}$ :  $-18.9$  (MeOH,  $c=2.49$ )

Fig. 146 Structure and physical data of Compound 87

Table 91  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	138.3	<i>s</i>	
2	112.6	<i>d</i>	7.10, <i>d</i> , (1.8)
3	150.7	<i>s</i>	
4	147.6	<i>s</i>	
5	117.7	<i>d</i>	7.13, <i>d</i> , (8.2)
6	120.8	<i>d</i>	6.98, <i>dd</i> , (8.2, 1.8)
7	73.8	<i>d</i>	4.94, <i>d</i> , (5.4)
8	87.3	<i>d</i>	4.29, <i>q</i> , (4.7)
9	62.3	<i>t</i>	3.68, <i>d-like</i> , (12.0)
1'	137.5	<i>s</i>	
2'	114.1	<i>d</i>	6.84, <i>d</i> , (1.8)
3'	151.8	<i>s</i>	
4'	147.5	<i>s</i>	
5'	119.4	<i>d</i>	6.94, <i>d</i> , (8.2)
6'	122.1	<i>d</i>	6.68, <i>dd</i> , (8.2, 1.8)
7'	32.8	<i>t</i>	2.62, <i>t</i> , (7.3)
8'	35.7	<i>t</i>	1.80, <i>m</i>
9'	61.9	<i>t</i>	3.55, <i>t</i> , (6.5)
-OCH <sub>3</sub>	56.7	<i>q</i>	3.83, <i>s</i>
	56.8	<i>q</i>	3.84, <i>s</i>
1''	102.9	<i>d</i>	4.68, <i>d</i> , (7.5)
2''	75.0	<i>d</i>	} 3.39-3.51, <i>m</i>
3''	77.9	<i>d</i>	
4''	71.5	<i>d</i>	
5''	78.3	<i>d</i>	
6''	62.6	<i>t</i>	

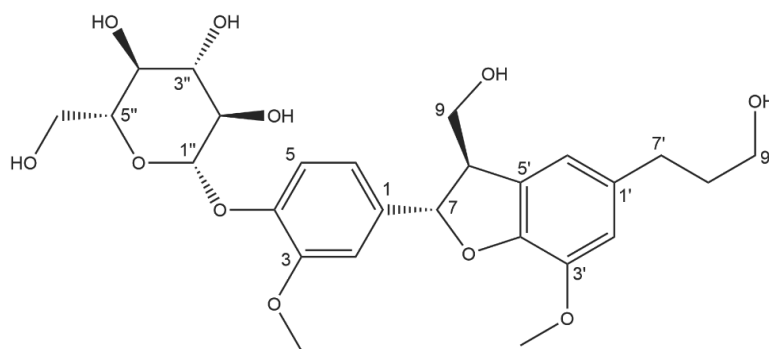


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 563.2103  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{26}H_{36}O_{12}Na$ : 563.2098  
 $[\alpha]_D^{27}$ :  $-28.2$  (MeOH,  $c=1.09$ )

Fig. 147 Structure and physical data of Compound **88**

Table 92  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	138.2	<i>s</i>	
2	112.2	<i>d</i>	7.09, <i>d</i> , (1.8)
3	148.9	<i>s</i>	
4	147.5	<i>s</i>	
5	116.0	<i>d</i>	6.98, <i>d</i> , (8.3)
6	120.9	<i>d</i>	6.92, <i>dd</i> , (8.3, 1.8)
7	73.9	<i>d</i>	5.00, <i>d</i> , (5.6)
8	85.5	<i>d</i>	4.42, <i>q</i> , (5.1)
9	62.4	<i>t</i>	3.84, <i>m</i>
1'	138.2	<i>s</i>	
2'	114.2	<i>d</i>	6.85, <i>d</i> , (1.8)
3'	151.7	<i>s</i>	
4'	147.2	<i>s</i>	
5'	119.4	<i>d</i>	6.77, <i>d</i> , (8.2)
6'	122.1	<i>d</i>	6.71, <i>dd</i> , (8.2, 1.8)
7'	32.8	<i>t</i>	2.62, <i>t</i> , (7.6)
8'	35.7	<i>t</i>	1.82, <i>m</i>
9'	69.3	<i>t</i>	3.58, <i>t</i> , (6.3)
-OCH <sub>3</sub>	56.6	<i>q</i>	3.84, <i>s</i>
	56.7	<i>q</i>	3.85, <i>s</i>
1''	104.9	<i>d</i>	overlapped
2''	75.3	<i>d</i>	} 3.21-3.36, <i>m</i>
3''	78.1	<i>d</i>	
4''	71.8	<i>d</i>	
5''	78.1	<i>d</i>	
6''	62.6	<i>t</i>	



Colorless amorphous powder

HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 545.1993  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{26}H_{34}O_{11}Na$ : 545.1993

Fig. 148 Structure and physical data of Compound **89**

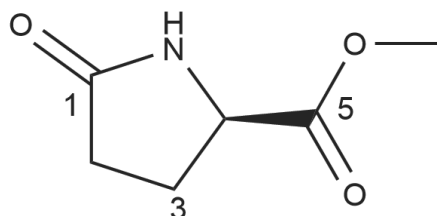
Table 93  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	138.5	<i>s</i>	
2	111.3	<i>d</i>	7.04, <i>d</i> , (1.8)
3	151.1	<i>s</i>	
4	147.8	<i>s</i>	
5	119.5	<i>d</i>	7.15, <i>d</i> , (8.4)
6	118.1	<i>d</i>	6.94, <i>dd</i> , (8.4, 1.8)
7	88.6	<i>d</i>	5.56, <i>d</i> , (5.9)
8	55.8	<i>d</i>	3.50, <i>m</i>
9	65.2	<i>t</i>	3.76, <i>dd</i> , (11.1, 7.6)
			3.51, <i>m</i>
-OCH <sub>3</sub>	56.8	<i>q</i>	3.87, <i>s</i>
1'	137.2	<i>s</i>	
2'	114.3	<i>d</i>	6.72, <i>br s</i>
3'	145.4	<i>s</i>	
4'	147.6	<i>s</i>	
5'	129.7	<i>s</i>	
6'	118.1	<i>d</i>	6.74, <i>d</i> , (1.1)
7'	36.0	<i>t</i>	2.63, <i>t</i> , (7.7)
8'	33.0	<i>t</i>	1.82, <i>m</i>
9'	62.4	<i>t</i>	3.57, <i>t</i> , (6.4)
-OCH <sub>3</sub>	56.9	<i>q</i>	3.84, <i>s</i>
1''	102.9	<i>d</i>	4.90, <i>d</i> , (7.3)
2''	75.1	<i>d</i>	} 3.39-3.50, <i>m</i>
3''	78.3	<i>d</i>	
4''	71.5	<i>d</i>	
5''	77.9	<i>d</i>	
6''	62.6	<i>t</i>	3.69, <i>m</i>
			3.40, <i>m</i>



第五項 その他既知化合物化学構造

フサスギナ地上部 1-BuOH 層からその他の既知誘導体 3 種 (90-92) を単離した。その化学構造は先行文献のデータと比較することで決定した。

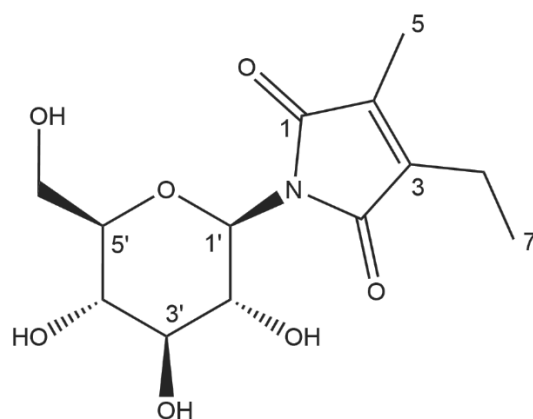


Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 166.0471 [M+Na]<sup>+</sup>  
 Calcd for C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>NNa: 166.0475  
 $[\alpha]_D^{27}$ : 8.4 (MeOH, c=0.64)

Fig. 149 Structure and physical data of Compound 90

Table 94 <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
1	181.21	s	
2	30.43	t	2.16- 2.48, <i>m</i>
3	25.94	t	2.16- 2.48, <i>m</i>
4	57.13	<i>d</i>	4.30, <i>dd</i> , (4.3, 8.9)
5	174.61	s	
-OCH <sub>3</sub>	53.05	<i>q</i>	3.75, <i>s</i>



Colorless amorphous powder

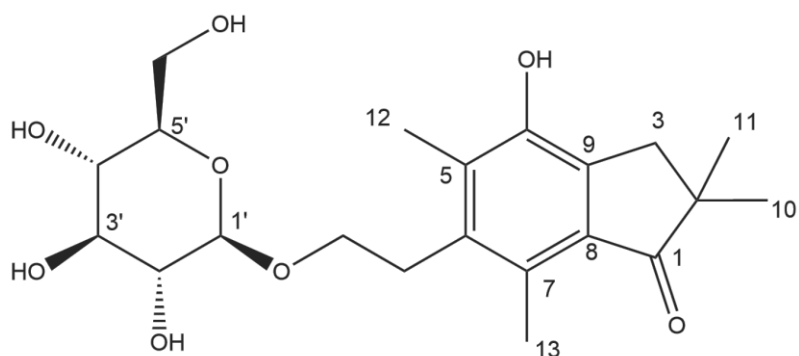
HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 324.1055  $[M+Na]^+$

Calcd for  $C_{13}H_{19}O_7NNa$ : 324.1054

Fig. 150 Structure and physical data of Compound **91**

Table 95  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	172.8	<i>s</i>	
2	143.9	<i>s</i>	
3	138.6	<i>s</i>	
4	172.4	<i>s</i>	
5	8.5	<i>q</i>	2.01, <i>s</i>
6	17.9	<i>t</i>	2.48, <i>q</i> , (7.5)
7	12.9	<i>q</i>	1.17, <i>t</i> , (7.5)
1'	81.6	<i>d</i>	4.95, <i>d</i> , (9.5)
2'	70.2	<i>d</i>	4.35, <i>t</i> , (9.5)
3'	79.4	<i>d</i>	3.42, <i>m</i>
4'	71.6	<i>d</i>	3.39, <i>m</i>
5'	80.9	<i>d</i>	3.38, <i>m</i>
6'	63.0	<i>t</i>	3.66, <i>dd</i> , (12.1, 5.3) 3.88, <i>dd</i> , (12.1, 1.2)



Colorless amorphous powder  
 HR-ESI-MS (positive)  $m/z$ : 433.1832  $[M+Na]^+$   
 Calcd for  $C_{21}H_{30}O_8Na$ : 433.1833

Fig. 151 Structure and physical data of Compound **92**

Table 96  $^{13}C$  NMR and  $^1H$  NMR data (125 MHz and 500 MHz, MeOD)

Position	$^{13}C$		$^1H$
1	214.9	<i>s</i>	
2	46.7	<i>s</i>	
3	39.7	<i>t</i>	2.83, <i>s</i>
4	151.6	<i>s</i>	
5	132.4	<i>s</i>	
6	138.8	<i>s</i>	
7	132.8	<i>s</i>	
8	137.7	<i>s</i>	
9	130.4	<i>s</i>	
10	13.5	<i>q</i>	1.19, <i>s</i>
11	13.2	<i>q</i>	1.19, <i>s</i>
12	26.1	<i>q</i>	2.36, <i>s</i>
13	26.1	<i>q</i>	2.61, <i>s</i>
14	30.8	<i>t</i>	3.12-3.41, <i>m</i> 3.65-3.72, <i>m</i>
15	69.5	<i>t</i>	3.65-3.72, <i>m</i> 3.87-3.92, <i>m</i>
1'	104.6	<i>d</i>	4.20, <i>d</i> , (7.8)
2'	75.3	<i>d</i>	} 3.12-3.41, <i>m</i>
3'	78.2	<i>d</i>	
4'	71.8	<i>d</i>	
5'	78.3	<i>d</i>	
6'	62.8	<i>t</i>	

---

---

## 第 4 章 小括

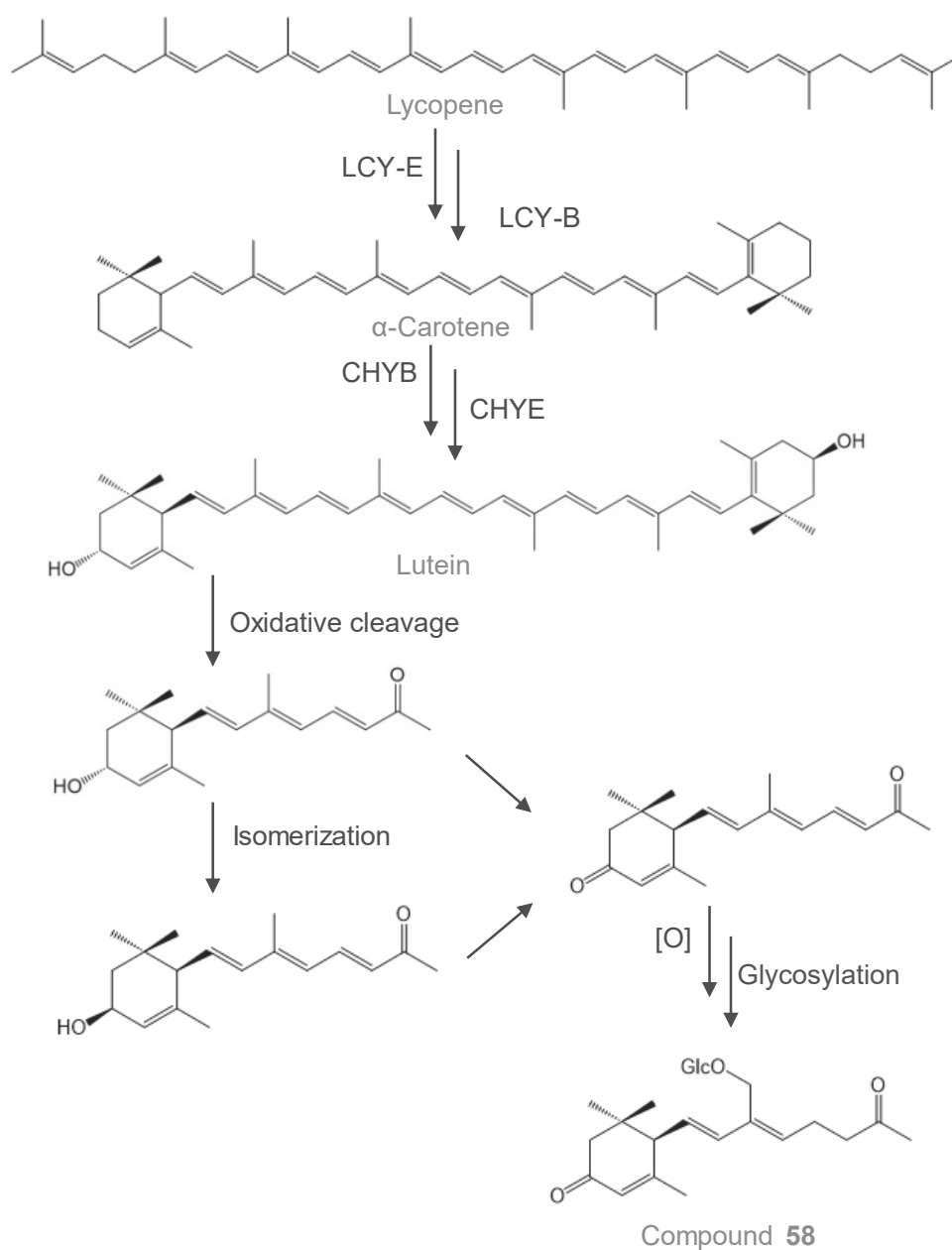
---

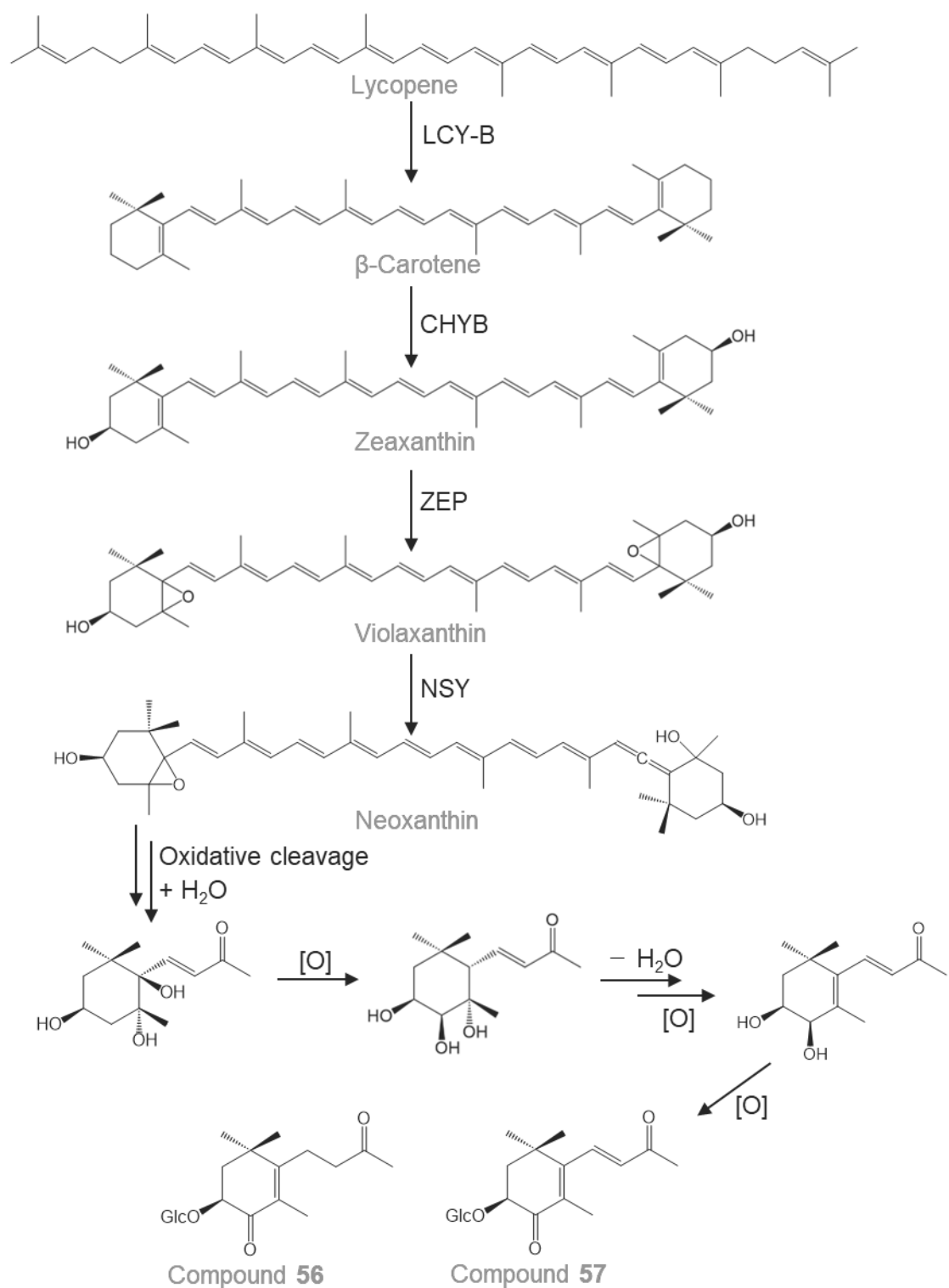
---

中国産植物フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) の地上部に対して新規成分の探索研究を行い、新規の配糖体 4 種 (56–59)、既知のメガスティグマン類縁体 9 種 (60–68)、フラボノイド誘導体 16 種 (69–84)、ステロイド誘導体 2 種 (85–86)、リグナン誘導体 3 種 (87–89) とその他の既知化合物 3 種 (90–92) を単離し、構造を明らかにした。

## 第 5 章 考察

本研究では、中国産フサスギナからカロテノイドに由来する megastigmane 配糖体 3 種を単離し、構造を明らかにした。カロテノイドは 2 つのゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) が tail-to-tail で結合したフィトエンを生成前駆体とする、炭素数が 40 個のテトラテルペノイドの総称である。カロテノイドは長い共役系を持つことから、黄色、オレンジ色、赤色などの天然色素として、植物のみならず菌類などの微生物や魚介類にも分布している。また、カロテノイドの長い共役系は光エネルギーを吸収し、植物や菌類において光合成の補助作用を果たしている。カロテノイド類に由来する二次代謝産物は数多く報告されており、今まで提唱されている生合成経路に基づき [96]、本研究から得られた 3 種の megastigmane 誘導体の推定される生合成経路を考察した (Fig. 152)。





LCY-E, lycopene  $\epsilon$ -cyclase; LCY-B, lycopene  $\beta$ -cyclase; CHYB, carotenoid  $\beta$ -hydroxylase; CHYE, carotene  $\epsilon$ -hydroxylase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NSY, neoxanthin synthase.

Fig. 152 Plausible biosynthesis of Compounds **56**–**58**

---

---

## 第 6 章 実験の部

---

---

### 植物材料

フサスギナ (*Equisetum sylvaticum*) 地上部は 2019 年 12 月、Anguo Jufu Zhongxue Material Co., Ltd (中国、成都) より購入した。

### 一般法

#### 1. 旋光度

旋光度は JASCO P-1030 (日本分光) デジタル旋光度計を用いて測定した。測定溶媒および温度は各測定値に付記した。

#### 2. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

Bruker AVANCE 600 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 600 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 150 MHz)、Bruker AVANCE 500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) もしくは JEOL JNM-ECP500 核磁気共鳴装置 (日本電子 共鳴周波数  $^1\text{H}$  NMR: 500 MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR: 125 MHz) を使用して測定した。いずれも溶媒中の D シグナルを internal lock signal とした。ケミカルシフト値の表示は内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) からの  $\delta$  値 (ppm) で示し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおける結合定数は括弧内に Hz 単位で記した。

#### 3. 質量分析 (MS)

HR-ESI-MS は高性能ハイブリッド型質量分析システム (Thermo Fisher Scientific 製 LTQ Orbitrap XL) を使用した。

#### 4. 赤外吸収 (IR) スペクトル

赤外吸収スペクトルは JASCO FT/IR-4600 (日本分光) 分光光度計を使用し、フィルム法にて試料を調製し測定した。

#### 5. 紫外吸収 (UV) スペクトル

層長 1 cm の石英セルを用いて、JASCO V-630 (日本分光) 分光光度計を使用して測定した。測定溶媒は各測定値に付記した。

### カラムクロマトグラフィー

#### 1. Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー

Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーには逆相系多孔性樹脂 Diaion HP-20 を使用した。

#### 2. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには 70-230 mesh の silica gel 60 (spherical) (関東化学) を使用した。

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Cosmosil 75C18-OPN (Nacalai Tesque) を使用した。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー

分取用カラムに Inertsil ODS-3 (10×250 mm、ジーエルサイエンス)、COSMOSIL πNAP (10×250 mm、Nacalai Tesque)、COSMOSIL HILIC (10×250 mm、Nacalai Tesque) を使用し、検出に RID-10A (Shimadzu)、溶媒にアセトン-水系、メタノール-水系またはアセトリル-水系を用いて、流速は 2.5 ml/min もしくは 2.0 ml/min で行った。

### 4. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC プレートとして厚さ 0.25 mm の silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) を使用し、クロロホルムとメタノール混合溶媒を展開溶媒とした。プレート上のスポットは UV (254 nm) 照射および 10 %硫酸へ浸漬後、加熱し呈色させて検出した。

### 5. 糖分析

分析用カラムに Shodex NH2P-50 (昭和電工) を使用し、検出に OR-2090 (日本分光工業) 旋光度検出計を用い、溶媒はアセトリル-水系を用いて、流速 1 ml/min で行った。

### 抽出、単離、精製

自然風乾させたフサスギナ地上部 10.0 kg を MeOH (15 L × 3) で抽出し、*n*-Hexane (6 L)、1-BuOH (6 L)、EtOAc (6 L) と H<sub>2</sub>O (6 L) で順次分配を行った。このうち、1-BuOH 可溶画分 (127.8 g) を CHCl<sub>3</sub> および MeOH の混合溶媒【CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20 : 1, 2 L)、(15 : 1, 2 L)、(1 : 1, 2 L)、(7 : 1, 2 L)、(5 : 1, 2 L)、(3 : 1, 2 L)、(2 : 1, 2 L)、(1 : 1, 2 L)、MeOH (2 L)】を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 8 cm×高さ 50 cm) に付し、フラクション 1-9 を得た。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-9 を、MeOH と水の混合溶媒【MeOH-水 (10 : 90, 600 ml)、(20 : 80, 600 ml)、(30 : 70, 600 ml)、(40 : 60, 600 ml)、(50 : 50, 600 ml)、(60 : 40, 600ml)、(70 : 30, 600ml)、(80 : 20, 600ml)、(90 : 10, 600ml)、MeOH (600 ml)、Acetone (600ml)】を用いた逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (内径 3.6 cm×高さ 15 cm) にかけて。

### 化合物 90

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-1 (0.56 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、6%メタノール、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 90 (33.6 mg) を得た。

### 化合物 69, 70, 71

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-5 (0.21 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、50%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 69 (10.0 mg)、化合物 70 (5.8 mg) と化合物 71 (33.0 mg) を得た。

### 化合物 72

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 1-6 (0.22 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、60%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物



72 (6.6 mg) を得た。

#### 化合物 56, 57, 59

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-2 (0.18 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 56 (4.1 mg)、化合物 57 (3.7 mg) と化合物 59 (4.2 mg) を得た。

#### 化合物 59 の酸加水分解および糖分析

化合物 59 (0.2 mg) を 1M HCl 水溶液 (200 ml) に溶解し、90 °C で 2 時間加熱分解させた。その後、イオン交換樹脂で反応液を中和し、EtOAc を添加して分液した。水層の糖質を旋光度検出器の HPLC に injection し、標品のリテンションタイムや旋光度と比較することで、D-glucose と決定した。

#### 化合物 56 - 57 の酵素分解およびアグリコン分析

化合物 56 (3.1 mg) を 100 mM の acetate buffer (pH 5.0) に溶解した後、10 mg の  $\beta$ -glucosidase を添加し、37 °C の条件で 4 時間、酵素分解させた。反応後、アグリコン (化合物 56a) は PTLC によって回収し、旋光度、NMR および MS スペクトルデータを測定した。化合物 57 (2.2 mg) も同様な方法により、アグリコンを分析した。

#### 化合物 56a

(3S)-3-hydroxy-4-oxo-7,8-dihydro- $\beta$ -ionone (**56a**): colorless amorphous powder;  $[\alpha]_D^{26}$  -27.2° (c=0.18, EtOH);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 1.19 (3H, s, H-11), 1.28 (3H, s, H-12), 1.77 (3H, s, H-13), 1.77 (1H, br t,  $J=13.2$  Hz, H-2ax), 2.04 (1H, dd,  $J=12.6, 5.5$  Hz, H-2eq), 2.17 (3H, s, H-10), 2.45 (1H, br dt,  $J=13.3, 8.2$  Hz, H-7a), 2.55 (br dt,  $J=13.3, 8.2$  Hz, H-7b), 2.66 (2H, dd,  $J=8.5, 7.7$  Hz, H<sub>2</sub>-8), 4.29 (1H, dd,  $J=14.0, 5.5$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 11.9 (C-13), 25.1 (C-7), 25.7 (C-12), 29.79 and 29.82 (C-10 and 11), 39.0 (C-1), 43.0 (C-8), 47.1 (C-2), 70.5 (C-3), 130.3 (C-5), 165.9 (C-6), 201.4 (C-4), 209.7 (C-9); HR-ESI-MS (positive-ion mode)  $m/z$ : 247.1307  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}$ : 247.1305).

#### 化合物 57a

(3S)-3-hydroxy-4-oxo- $\beta$ -ionone (**57a**): colorless amorphous powder;  $[\alpha]_D^{26}$  -27.3° (c=0.02, EtOH);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 1.18 (3H, s, H-11), 1.36 (3H, s, H-12), 1.83 (3H, d,  $J=1.1$  Hz, H-13), 1.88 (1H, t-like,  $J=13.2$  Hz, H-2ax), 2.10 (1H, dd,  $J=12.7, 5.5$  Hz, H-2eq), 2.36 (3H, s, H-10), 4.39 (1H, dd,  $J=13.9, 5.5$  Hz, H-3), 6.25 (1H, d,  $J=16.6$  Hz, H-8), 7.33 (1H, dq,  $J=16.6, 1.1$  Hz, H-7); HR-ESI-MS (positive-ion mode)  $m/z$ : 245.1150  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ : 245.1148).

#### 化合物 60, 61

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-3 (0.26 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、30%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 60 (28.7 mg) と化合物 61 (47.3 mg) を得た。

#### 化合物 58

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 3-4 (0.20 g) を高速液体クロマト

グラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、45%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **58** (8.7 mg) を得た。

#### 化合物 63, 64, 91

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-2 (1.13 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、15%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **63** (150.1 mg)、化合物 **64** (4.1 mg) と化合物 **91** (24.8 mg) を得た。

#### 化合物 62, 66, 67, 68, 92

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-3 (0.77 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、25%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **62** (61.6 mg)、化合物 **66** (3.2 mg)、化合物 **67** (5.5 mg)、化合物 **68** (5.2 mg) と化合物 **92** (7.6 mg) を得た。

#### 化合物 74, 75

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-5 (0.35 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、35%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **74** (15.4 mg) と化合物 **75** (9.2 mg) を得た。

#### 化合物 65

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-2 (1.21 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、45%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **65** (24.3 mg) を得た。

#### 化合物 73

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-3 (1.48 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、25%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **73** (9.8 mg) を得た。

#### 化合物 76, 77, 85, 86

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 5-5 (1.32 g) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、25%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **76** (74.1 mg)、化合物 **77** (31.0 mg)、化合物 **85** (9.4 mg) と化合物 **86** (16.4 mg) を得た。

#### 化合物 79, 84, 87, 88, 89

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-4 (0.69 g) を高速液体クロマトグラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **79** (14.7 mg)、化合物 **84** (7.1 mg)、化合物 **87** (24.9 mg)、化合物 **88** (10.9 mg) と化合物 **89** (9.7 mg) を得た。

#### 化合物 78

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 6-6 (0.86 g) を高速液体クロマト

グラフィー【Inertsil ODS-3 (10×250 mm)、50%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **78** (1.1 mg) を得た。

#### 化合物 80

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 7-3 (0.61 g) から黄色結晶として析出し、化合物 **80** (6.4 mg) を得た

#### 化合物 81, 82, 83

逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られたフラクション 4-2 (1.13 g) を高速液体クロマトグラフィー【COSMOSIL πNAP (10×250 mm)、20%アセトン、流速 2.0 mL/min】で精製し、化合物 **81** (49.0 mg)、化合物 **82** (17.1 mg) と化合物 **83** (5.8 mg) を得た。

#### 化合物 56–59 の酸加水分解および糖分析

前述した方法通りに分解反応を行い、旋光度検出器付きの HPLC による分析をし、標品のシグナルと比較することで、D-glucose に決定した。

---

---

## 参考文献

---

---

1. Chang, T.-N., G.-J. Huang, Y.-L. Ho, S.-S. Huang, H.-Y. Chang, and Y.-S. Chang, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Crossostephium chinensis* (L.) Makino. *The American Journal of Chinese Medicine*, **2009**. 37(04), 797-814.
2. Qi Wu, X.Y., Lei Zou, Dexian Fu, Bioactivity guided isolation of alpha-glucosidase inhibitor from whole herbs of *Crossostephium chinense*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **2009**. 34(17), 2206-2211.
3. Zhong, J., Y. Guo, J. Chen, H. Cao, M. Liu, Z. Guo, Q. Zhang, and M. Sun, Volatiles inheriting from *Crossostephium chinense* act as repellent weapons against aphids in *Chrysanthemum lavandulifolium* cultivars. *Industrial Crops and Products*, **2021**. 166, 113467.
4. Matsuda, H., T. Kageura, Y. Inoue, T. Morikawa, and M. Yoshikawa, Absolute Stereostructures and Syntheses of Saussureamines A, B, C, D and E, Amino Acid–Sesquiterpene Conjugates with Gastroprotective Effect, from the Roots of *Saussurea lappa*. *Tetrahedron*, **2000**. 56(39), 7763-7777.
5. Moiseeva, G.P., S.Z. Kasymov, M.R. Yagudaev, and G.P. Sidyakin, Determination of the absolute configuration of the asymmetric center at C11 in the eudesmanolides. *Chem. Nat. Compd.*, **1980**. 16(3), 254-256.
6. Xiang, L., D. Xing, W. Wang, R. Wang, Y. Ding, and L. Du, Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry*, **2005**. 66(21), 2595-2601.
7. Dilshara, M.G., K.-T. Lee, R.G.P.T. Jayasooriya, C.-H. Kang, S.R. Park, Y.H. Choi, I.-W. Choi, J.-W. Hyun, W.-Y. Chang, Y.-S. Kim, et al., Downregulation of NO and PGE2 in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF- $\kappa$ B and activation of Nrf2-mediated HO-1. *Int. Immunopharmacol.*, **2014**. 18(1), 203-211.
8. Vasconcelos, J.M.J., A.M.S. Silva, and J.A.S. Cavaleiro, Chromones and flavanones from *artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry*, **1998**. 49(5), 1421-1424.
9. Tsukamoto, H., S. Hisada, and S. Nishibe, Coumarin and Secoiridoid Glucosides from Bark of *Olea africana* and *Olea capensis*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1985**. 33(1), 396-399.
10. Zhu, Y., L.-X. Zhang, Y. Zhao, and G.-D. Huang, Unusual sesquiterpene lactones with a new carbon skeleton and new acetylenes from *Ajania przewalskii*. *Food Chem.*, **2010**. 118(2), 228-238.
11. Marco, J.A., O. Barberá, S. Rodríguez, C. Domingo, and J. Adell, Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry*, **1988**. 27(10), 3155-3159.
12. Lee, E.H., H.J. Kim, Y.S. Song, C. Jin, K.-T. Lee, J. Cho, and Y.S. Lee, Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Archives of Pharmacal Research*, **2003**. 26(12), 1018-1023.
13. Jung, M.J., S.S. Kang, H.A. Jung, G.J. Kim, and J.S. Choi, Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrissin*. *Archives of Pharmacal Research*, **2004**. 27(6), 593.
14. Redaelli, C., L. Formentini, and E. Santaniello, Apigenin 7-glucoside diacetates in ligulate flowers of *Matricaria chamomilla*. *Phytochemistry*, **1982**. 21(7), 1828-1830.
15. Kazuma, K., N. Noda, and M. Suzuki, Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **2003**. 62(2), 229-237.
16. Xiao-Li, M.A. and W.B. Lin, Chemical Constituents of *Osmanthus yunnanensis*. *Natural Product Research and Development*, **2009**. 21, 593-599.
17. Nugroho, A., K.R. Lee, M.B. Alam, J.S. Choi, and H.-J. Park, Isolation and quantitative analysis of peroxynitrite scavengers from *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Archives of Pharmacal Research*, **2010**. 33(5), 703-708.
18. Kim, J.Y., J.-Y. Cho, Y.-K. Ma, K.Y. Park, S.-H. Lee, K.-S. Ham, H.J. Lee, K.-H. Park, and J.-H. Moon, Dicafeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity. *Food Chem.*, **2011**. 125(1), 55-62.
19. Merfort, I., Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*.

- Phytochemistry*, **1992**. 31(6), 2111-2113.
20. Zhu, X., X. Dong, Y. Wang, P. Ju, and S. Luo, Phenolic 化合物 s from *Viburnum cylindricum*. *Helv. Chim. Acta*, **2005**. 88(2), 339-342.
  21. Yang, P.-F., Y.-N. Yang, Z.-M. Feng, J.-S. Jiang, and P.-C. Zhang, Six new compounds from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* and their biological activities. *Bioorg. Chem.*, **2019**. 82, 139-144.
  22. Nakazawa, T. and K. Ohsawa, Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. *J. Nat. Prod.*, **1998**. 61(8), 993-996.
  23. Zhang, H.L., A. Nagatsu, H. Okuyama, H. Mizukami, and J. Sakakibara, Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry*, **1998**. 48(4), 665-668.
  24. Yi, J.-h., G.-l. Zhang, B.-g. Li, and Y.-z. Chen, Two glycosides from the stem bark of *Tetracentron sinense*. *Phytochemistry*, **2000**. 53(8), 1001-1003.
  25. Yang, X., M. Wong, N. Wang, A.S.C. Chan, and X. Yao, A New Eudesmane Derivative and a New Fatty Acid Ester from *Sambucus williamsii*. *ChemInform*, **2006**. 37(45), 676-678.
  26. Zhao, X., H. Alper, and Z. Yu, Stereoselective Hydroxycarbonylation of Vinyl Bromides to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carboxylic Acids in the Ionic Liquid [BMIM]PF<sub>6</sub>. *The Journal of Organic Chemistry*, **2006**. 71(10), 3988-3990.
  27. P. Joseph-Nathan, J.R.W.a.H.G., A Two-Dimensional NMR study of Angelic and Tiglic Acid. *ORGANIC MAGNETIC RESONANCE*, **1984**. 22(3), 190-191.
  28. Pauli, N., U. Séquin, and A. Walter, Boscialin and Boscialin 4'-O-Glucoside, Two New Compounds Isolated from the Leaves of *Boscia salicifolia* OLIV. *Helv. Chim. Acta*, **1990**. 73(3), 578-582.
  29. Yu, Q., H. Otsuka, E. Hirata, T. Shinzato, and Y. Takeda, Turpinionosides A-E: Megastigmane Glucosides from Leaves of *Turpinia ternata* Nakai. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2002**. 50(5), 640-644.
  30. Miyase, T., A. Ueno, N. Takizawa, H. Kobayashi, and H. Karasawa, Studies on the Glycoside of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1987**. 35(3), 1109-1117.
  31. Jeon, S.H., W. Chun, Y.J. Choi, and Y.S. Kwon, Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. *Archives of Pharmacal Research*, **2008**. 31(8), 978-982.
  32. Domondon, D.L., W. He, N. De Kimpe, M. Höfte, and J. Poppe,  $\beta$ -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. *Phytochemistry*, **2004**. 65(2), 181-187.
  33. Fan, C.-Q. and J.-M. Yue, Biologically active phenols from *Saussurea medusa*. *Biorg. Med. Chem.*, **2003**. 11(5), 703-708.
  34. Abirami, M., B. Karan Kumar, Faheem, S. Dey, S. Johri, R.M. Reguera, R. Balaña-Fouce, K.V. Gowri Chandra Sekhar, and M. Sankaranarayanan, Molecular-level strategic goals and repressors in Leishmaniasis – Integrated data to accelerate target-based heterocyclic scaffolds. *Eur. J. Med. Chem.*, **2023**. 257, 115471.
  35. Burza, S., S.L. Croft, and M. Boelaert, Leishmaniasis. *The Lancet*, **2018**. 392(10151), 951-970.
  36. Sasidharan, S. and P. Saudagar, Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitol. Res.*, **2021**. 120(5), 1541-1554.
  37. Abadías-Granado, I., A. Diago, P.A. Cerro, A.M. Palma-Ruiz, and Y. Gilaberte, Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermosifiliogr.*, **2021**. 112(7), 601-618.
  38. Falcão, G., L. Lins-Kusterer, P. Leite-Ribeiro, and V. Sarmiento, Orofacial manifestations of mucocutaneous leishmaniasis: a case series from Brazil [version 4; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, **2020**. 8, 756.
  39. Torres-Guerrero, E., M. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud, and R. Arenas, Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, **2017**. 6, 750.
  40. Yasumura, Y., Kawakita, Y., The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*, **1963**. 21, 1201-1219.
  41. Barrett, P.N., W. Mundt, O. Kistner, and M.K. Howard, Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*, **2009**. 8(5), 607-618.

42. Ammerman, N.C., M. Beier-Sexton, and A.F. Azad, Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr. Protoc. Microbiol.*, **2008**. 11(1), A.4E.1-A.4E.7.
43. Wu Zengyan, M.Z., Xie Chenqiong, Dong Jingjing and Zhu Kaihua, Preliminary study on anti-inflammatory effects of Huci (*Damnacanthus indicus*) Extracts. *Zhongguo Zhongyiyao Keji*, **2019**. 26(1), 36-39.
44. Koyama, J., T. Okatani, K. Tagahara, I. Kouno, and H. Iris, Anthraquinones of *Damnacanthus indicus*. *Phytochemistry*, **1992**. 31(2), 709-710.
45. Lee, S.-W., S.-C. Kuo, Z.-T. Chen, and Z.-S. Liu, Novel Anthraquinones from *Damnacanthus indicus*. *J. Nat. Prod.*, **1994**. 57(9), 1313-1315.
46. Zuhail GUVENALP, N.K., Cavit KAZAZ, Yusuf KAYA, L. Omur DEM'IREZER, Chemical Constituents of *Galium tortumense*. *Turk. J. Chem*, **2006**. 30, 515-523.
47. Bailleul, F., P. Delaveau, A. Rabaron, M. Plat, and M. Koch, Feretoside et gardenoside du *Feretia apodanthera*: rmn du carbone 13 en série iridoide. *Phytochemistry*, **1977**. 16(6), 723-726.
48. Bőjthe-Horváth, K., F. Hetényi, Á. Kocsis, L. Szabó, M. Varga-Balázs, I. Máthé, and P. Tétényi, Iridoid glycosides from *Galium verum*. *Phytochemistry*, **1980**. 21(12), 2917-2919.
49. Cai, M., M. Liu, P. Chen, H. Liu, Y. Wang, D. Yang, Z. Zhao, and P. Ding, Iridoids with anti-inflammatory effect from the aerial parts of *Morinda officinalis* How. *Fitoterapia*, **2021**. 153, 104991.
50. Takamura, C., T. Hirata, T. Ueda, M. Ono, H. Miyashita, T. Ikeda, and T. Nohara, Iridoids from the Green Leaves of *Eucommia ulmoides*. *J. Nat. Prod.*, **2007**. 70(8), 1312-1316.
51. Lami, N., S. Kadota, Y. Tezuka, and T. Kikuchi, Constituents of the Roots of *Boerhaavia diffusa* L. II. : Structure and Stereochemistry of a New Rotenoid, Boeravinone C. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1990**. 38(6), 1558-1562.
52. Shu, J., F. Liang, G. Zhu, X. Liu, J. Yu, and H. Huang, Lignan glycosides from the Rhizomes of *Smilax trinervula* and their Biological activities. *Phytochemistry Letters*, **2017**. 20, 1-8.
53. Hu, X.-P., S.-W. Zhang, S.-S. Liu, and L.-J. Xuan, New Anthraquinone and Iridoid Glycosides from the Stems of *Hedyotis hedyotidea*. *Helv. Chim. Acta*, **2011**. 94(4), 675-685.
54. Gang, F.-I., F. Zhu, X.-t. Li, J.-I. Wei, W.-j. Wu, and J.-w. Zhang, Synthesis and bioactivities evaluation of l-pyroglutamic acid analogues from natural product lead. *Biorg. Med. Chem.*, **2018**. 26(16), 4644-4649.
55. Zhang, C.-Z., X.-Z. Xu, and C. Li, Fructosides from *Cynomorium songaricum*. *Phytochemistry*, **1996**. 41(3), 975-976.
56. Wu, M., H. Lai, W. Peng, X. Zhou, L. Zhu, H. Tu, K. Yuan, and Z. Yang, Monotropein: A comprehensive review of biosynthesis, physicochemical properties, pharmacokinetics, and pharmacology. *Front. Pharmacol.*, **2023**. 14.
57. Christenhusz, M.J.M., L. Bangiolo, M.W. Chase, M.F. Fay, C. Husby, M. Witkus, and J. Viruel, Phylogenetics, classification and typification of extant horsetails (*Equisetum*, *Equisetaceae*). *Bot. J. Linn. Soc.*, **2019**. 189(4), 311-352.
58. Aly, H.-F., H. Geiger, U. Schücker, H. Waldrum, G.V. Velde, and T.J. Mabry, Die flavonolglykoside von *Equisetum silvaticum*. *Phytochemistry*, **1975**. 14(7), 1613-1615.
59. Mimica-Dukic, N., N. Simin, J. Cvejic, E. Jovin, D. Orcic, and B. Bozin, Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*, **2008**. 13(7), 1455-1464.
60. Batir-Marin, D., M. Boev, O. Cioanca, C. Mircea, A.F. Burlec, G.J. Beppe, A. Spac, A. Corciova, L. Hritcu, and M. Hancianu, Neuroprotective and Antioxidant Enhancing Properties of Selective *Equisetum* Extracts. *Molecules*, **2021**. 26(9), 2595.
61. Miyase, T., A. Ueno, N. Takizawa, H. Kobayashi, and H. Oguchi, Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. var. *thunbergianum* (Miq.) NAKAI.. III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1988**. 36(7), 2475-2484.
62. Becher, E., R. Albrecht, K. Bernhard, H.G.W. Leuenberger, H. Mayer, R.K. Müller, W. Schüep, and H.P. Wagner, Synthese von Astaxanthin aus  $\beta$ -Jonon. I. Erschliessung der enantiomeren C15-Wittigsalze durch chemische und mikrobiologische Racematspaltung von ( $\pm$ )-3-Acetoxy-4-oxo- $\beta$ -jonon. *Helv. Chim. Acta*, **1981**. 64(7), 2419-2435.
63. Pabst, A., D. Barron, E. Sémon, and P. Schreier, Two diastereomeric 3-oxo- $\alpha$ -ionol  $\beta$ -d-

- glucosides from raspberry fruit. *Phytochemistry*, **1992**. 31(5), 1649-1652.
64. Calis, I., M.F. Lahloub, E. Rogenmoser, and O. Sticher, Isomartynoside, a phenylpropanoid glycoside from *Galeopsis pubescens*. *Phytochemistry*, **1984**. 23(10), 2313-2315.
  65. Teshima, K.-I., T. Kaneko, K. Ohtani, R. Kasai, S. Lhieochaiphant, C. Picheansoonthon, and K. Yamasaki, Sulfur-containing glucosides from *Clinacanthus nutans*. *Phytochemistry*, **1998**. 48(5), 831-835.
  66. Chang, J. and R. Case, Phenolic glycosides and ionone glycoside from the stem of *Sargentodoxa cuneata*. *Phytochemistry*, **2005**. 66(23), 2752-2758.
  67. Fiorentino, A., B. D'Abrosca, S. Pacifico, C. Mastellone, V. Piscopo, and P. Monaco, Spectroscopic Identification and Antioxidant Activity of Glucosylated Carotenoid Metabolites from *Cydonia vulgaris* Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(25), 9592-9597.
  68. Kuang, H.X., B.Y. Yang, Y.G. Xia, and W.S. Feng, Chemical constituents from the flower of *Datura metel* L. *Arch. Pharm. Res.*, **2008**. 31(9), 1094-1097.
  69. Zhang, F., Z.J. Wu, L.N. Sun, J. Wang, X. Tao, and W.S. Chen, Iridoid glucosides and a C(1)(3)-norisoprenoid from *Lamiophlomis rotata* and their effects on NF-kappaB activation. *Bioorg Med Chem Lett*, **2012**. 22(13), 4447-4452.
  70. Murakami, T., K. Kohno, K. Ninomiya, H. Matsuda, and M. Yoshikawa, Medicinal foodstuffs. XXV. Hepatoprotective principle and structures of ionone glucoside, phenethyl glycoside, and flavonol oligoglycosides from young seedpods of garden peas, *Pisum sativum* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **2001**. 49(8), 1003-1008.
  71. Sueyoshi, E., H. Liu, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, M. Aramoto, and Y. Takeda, Bridelionosides A-F: Megastigmene glucosides from *Bridelia glauca* f. *balansae*. *Phytochemistry*, **2006**. 67(22), 2483-2493.
  72. Zhou, Y., M. Jin, C.S. Jin, C. Ye, J.M. Wang, R.S. Wang, C.X. Wei, W. Zhou, and G. Li, Megastigmene derivatives from *Corispermum mongolicum* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry Letters*, **2019**. 30, 186-189.
  73. Kang, U., S.M. Ryu, D. Lee, and E.K. Seo, CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE LEAVES OF *Brassica oleracea* var. *acephala*. *Chem. Nat. Compd.*, **2018**. 54(5), 1023-1026.
  74. Matsumoto, T., S. Nakamura, S. Nakashima, T. Ohta, K. Ogawa, M. Fukaya, J. Tsukioka, T. Hasei, T. Watanabe, and H. Matsuda, Neolignan and megastigmene glucosides from the aerial parts of *Isodon japonicus* with cell protective effects on BaP-induced cytotoxicity. *Phytochemistry*, **2017**. 137, 101-108.
  75. Hu, J., W. Ma, N. Li, and K.J. Wang, Antioxidant and Anti-Inflammatory Flavonoids from the Flowers of Chuju, a Medical Cultivar of *Chrysanthemum Morifolium* Ramat. *Journal of the Mexican Chemical Society*, **2017**. 61(4), 282-289.
  76. Liu, Y.L., D.K. Ho, J.M. Cassidy, V.M. Cook, and W.M. Baird, Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*. *J. Nat. Prod.*, **1992**. 55(3), 357-363.
  77. Liu, R., H. Zhang, M. Yuan, J. Zhou, Q. Tu, J.J. Liu, and J. Wang, Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. *Molecules*, **2013**. 18(9), 11496-11511.
  78. Wada, H., T. Satake, T. Murakami, T. Kojima, Y. Saiki, and C. Chen, Chemische und Chemotaxonomische Untersuchungen der Pterophyten. LIX. Chemische Untersuchungen der Inhaltsstoffe von *Alsophila spinulosa* TRYON. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1985**. 33(10), 4182-4187.
  79. Yim, S.H., H.J. Kim, and I.S. Lee, A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.*, **2003**. 26(2), 128-131.
  80. Qi, J., J.J. Lu, J.H. Liu, and B.Y. Yu, Flavonoid and a rare benzophenone glycoside from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **2009**. 57(2), 134-137.
  81. Panyadee, A., P. Sahakitpichan, S. Ruchirawat, and T. Kanchanapoom, 5-Methyl ether flavone glucosides from the leaves of *Bruguiera gymnorrhiza*. *Phytochemistry Letters*, **2015**. 11, 215-219.
  82. Veit, M., H. Geiger, F.-C. Czygan, and K.R. Markham, Malonylated flavone 5-O-glucosides in the barren sprouts of *Equisetum arvense*. *Phytochemistry*, **1990**. 29(8),

- 2555-2560.
83. Ibrahim, A., S.I. Khalifa, I. Khafagi, D.T. Youssef, S. Khan, M. Mesbah, and I. Khan, Microbial Metabolism of Biologically Active Secondary Metabolites from *Nerium oleander* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2008**. 56(9), 1253-1258.
  84. Oyama, K.-i. and T. Kondo, Total synthesis of apigenin 7,4'-di-O- $\beta$ -glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogues. *Tetrahedron*, **2004**. 60(9), 2025-2034.
  85. Markham, K.R., B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger, and T.J. Mabry, Carbon-13 NMR studies of flavonoids—III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron*, **1978**. 34(9), 1389-1397.
  86. Wolfram, K., J. Schmidt, V. Wray, C. Milkowski, W. Schliemann, and D. Strack, Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry*, **2010**. 71(10), 1076-1084.
  87. Kato, T. and Y. Morita, C-glycosylflavones with acetyl substitution from *Rumex acetosa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1990**. 38(8), 2277-2280.
  88. Pan, J., S. Zhang, L. Yan, J. Tai, Q. Xiao, K. Zou, Y. Zhou, and J. Wu, Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucreta* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. *Journal of Chromatography A*, **2008**. 1185(1), 117-129.
  89. Saleem, M., S. Musaddiq, N. Riaz, M. Zubair, M. Ashraf, R. Nasar, and A. Jabbar, Ecdysteroids from the flowers of *Aerva javanica*. *Steroids*, **2013**. 78(11), 1098-1102.
  90. Shigemori, H., Y. Sato, T. Kagata, and J.i. Kobayashi, Palythoalones A and B, New Ecdysteroids from the Marine Zoanthid *Palythoa australiae*. *J. Nat. Prod.*, **1999**. 62(2), 372-374.
  91. Matsuda, N. and M. Kikuchi, Studies on the Constituents of *Lonicera* Species. X. Neolignan Glycosides from the Leaves of *Lonicera gracilipes* var. *glandulosa* MAXIM. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1996**. 44(9), 1676-1679.
  92. Kuang, H.-x., Y.-g. Xia, B.-y. Yang, Q.-h. Wang, and S.-w. Lü, Lignan constituents from *Chloranthus japonicus* Sieb. *Archives of Pharmacal Research*, **2009**. 32(3), 329-334.
  93. Bateman, L., S.W. Breeden, and P. O'Leary, New chiral diamide ligands: synthesis and application in allylic alkylation. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**. 19(3), 391-396.
  94. Krajewski, D., G. Tóth, and P. Schreier, 2-Ethyl-3-methylmaleimide N- $\beta$ -d-glucopyranoside from the leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Phytochemistry*, **1996**. 43(1), 141-143.
  95. Wu, Q. and X.W. Yang, The constituents of *Cibotium barometz* and their permeability in the human Caco-2 monolayer cell model. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**. 125(3), 417-422.
  96. Wang, X., X. Liu, X. Wang, H. Wang, L.-H. Zhang, H. Yu, W. Yang, and H.-H. Wu, Carotenoid-derived norsesquiterpenoids and sesquiterpenoids from *Tagetes erecta* L. *Phytochemistry*, **2023**. 215, 113860.



---

---

## 謝辞

---

---

本研究を遂行するにあたり、また本論文の作成に関し、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、広島大学 大塚英昭 名誉教授、並びに広島大学大学院医系科学研究科生薬学研究室 松浪勝義 教授に深謝いたします。本実験を行い、並びに本論文を作成するに際し、的確なご教示、ご助言を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科神経生物学研究室 相澤秀紀 教授、広島大学大学院医系科学研究科創薬合成化学研究室 熊本卓哉 教授、広島大学大学院医系科学研究科薬用植物園 山野幸子 准教授に深謝すると共に深く御礼申し上げます。本論文の作成にあたり、ご助言を賜りました、広島大学大学院医系科学研究科生体機能分子動態学研究室 古武弥一郎 教授、広島大学大学院医系科学研究科治療薬効学研究室 柳瀬雄輝 准教授に御礼申し上げます。博士研究を行うにあたり、実験方法などにつきましてご助言、ご指導を賜りました、本研究室 山野喜 助教、安田女子大学薬学部 川上晋 助教に御礼申し上げます。さらに、本研究を推進するにあたり、共同研究をして頂き、ご助言、ご指導を賜りました長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科原虫学 金子修 教授、北海道大学理学部生物科学科高分子機能学化学生物学研究室 谷口透 准教授および帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター 菅沼啓輔 助教に御礼申し上げます。また、研究室配属から大変お世話になりました先輩、同級生、後輩たちをはじめとする本研究室の皆様にご感謝の意を表します。

最後に、研究活動に打ち込めるように支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。