

中国新疆産シソ科 薬用植物の成分研究

古川 めぐみ

2013

略語

本論文中に用いた略語は以下の通りである。

CD	Circular dichroism
COSY	Correlation spectroscopy
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNP	Dinitrophenyl
FBS	Fetal bovine serum
GC	Gas chromatography
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy
HMQC	Hetero-nuclear multiple quantum coherence
HPLC	High-performance liquid chromatography
HR-EI-MS	High-resolution-electron impact ionization mass spectrometry
HR-FAB-MS	High-resolution-fast atomic bombardment mass spectrometry
IgE	Immunoglobulin E
INF- γ	Interferon- γ
IR	Infrared
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
MS	Mass spectrometry
MTPA	α -Methoxy- α -trifluoromethyl-phenylacetic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PBS	Phosphate buffer saline
PIPES	Piperazine diethanesulfoic acid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RBL	Rat basophilic leukemia
TMS	Tetramethylsilane
TMS-HT	Hexamethyldisilazane and trimethylchlorosilane in anhydrous pyridine
t_R	Retention time
UV	Ultraviolet

目次

序論		1
本論		
第1章	スクリーニングについて	
第1節	新疆産薬用植物のスクリーニング	5
第2章	神香草 <i>Hyssopus cuspidatus</i> の成分研究	
第1節	化合物の分離・精製	6
第2節	化合物 1 の化学構造	8
第3節	化合物 2 の化学構造	12
第4節	化合物 3 の化学構造	14
第5節	化合物 4 の化学構造	16
第6節	化合物 5 の化学構造	18
第7節	化合物 6 の化学構造	10
第8節	化合物 7 の化学構造	22
第9節	化合物 8 の化学構造	23
第10節	ラット肺胞細胞を用いた LTC ₄ 遊離抑制活性	25
第3章	光刺兔唇花 <i>Lagochilus leiacanthus</i> の成分研究	
第1節	化合物の分離・精製	26
第2節	化合物 23 の化学構造	29
第3節	化合物 24 の化学構造	31
第4節	化合物 25 の化学構造	32
第5節	化合物 26 の化学構造	34
第6節	化合物 27 の化学構造	37
第7節	β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性	39
第4章	唇香草 <i>Ziziphora clinopodioides</i> の成分研究	
第1節	化合物の分離・精製	40
第2節	化合物 56 の化学構造	42
第3節	化合物 57 の化学構造	44
第4節	化合物 58 の化学構造	46
第5節	NO 産生抑制活性	48
結論		49
実験の部		51
謝辞		74
引用文献		75
主要論文目録		80

序論

中国新疆ウイグル自治区の薬用植物については、詳細な成分研究がなされていないものが多い。そこで新疆ウイグル自治区に自生する薬用植物を採集し、成分探索を行うとともに生理活性成分特に抗アレルギー、抗炎症に着目した活性試験を行ってきた。

本邦におけるアレルギー性疾患の患者数は増加傾向にあり今や2人に1人が花粉症、食物アレルギー、蕁麻疹、アレルギー性鼻炎、喘息などのアレルギー疾患を持つとさえ言われている。

アレルギーの成因は、以前に暴露された環境中の通常は無害な抗原の侵入が原因となり新たに産生された抗体や T 細胞が、再度同じ抗原の侵入を排除する免疫反応として様々な症状を呈する反応¹⁾であり、アレルギーの発症機序により Gel と Coombs は、I からIV型の4つのタイプに分類している。蕁麻疹、食物アレルギー、花粉症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシーショックは I 型アレルギーの代表的な疾患¹⁾であり、IgE を介した即時型のアレルギー反応が主体となっている。

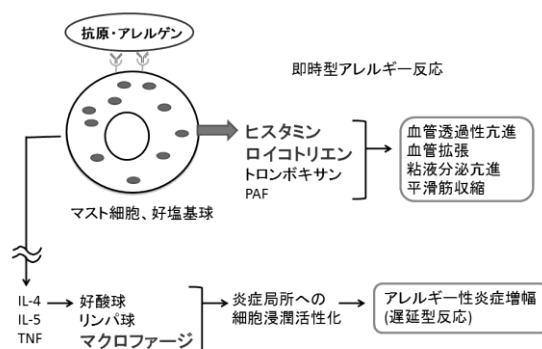


Fig. 1. I型アレルギー反応²⁾

I 型アレルギー反応では、特定の抗原が体内に侵入するとマクロファージのような抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示し、T 細胞は B 細胞に情報伝達して抗原に対応した IgE 抗体を産生する。この血中の IgE 抗体はマスト細胞や好塩基球の細胞膜上に存在する IgE 高親和性 Fcε 受容体と結合して感作が成立する。再度同じ抗原が侵入すると 2 個以上の受容体が架橋されてチロシンキナーゼにより種々のタンパクがリン酸化され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。チロシンキナーゼの一種が活性化することから始まり、最終的に小胞体からの Ca^{2+} の放出や細胞の脱顆粒反応を生じ、更にプロスタグランジン類をはじめとするエイコサノイドや炎症性サイトカインの産生亢進などを引き起こす。脱顆粒によりあらかじめ貯蔵されていたさまざまな炎症性化学伝達物質が放出される。その中にヒスタミンや細胞キナーゼ、トリプターゼ、 β -ヘキソサミニダーゼといった酵素がある。特にトリプターゼは痛覚やかゆみ感など生理学的、病態生理学的に深く関与している。活性化されたマスト細胞はさらにロイコトリエン、血小板活性化因子 (Platelet activating factor, PAF) などの脂質メディエーター、インターロイキン (Interleukin, IL) -3, IL-4, IL-5, IL-6, 腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis

factor, TNF) α などの炎症性サイトカインを産生し、放出する。これらの化学伝達物質は血管透過性亢進、血管拡張、粘液分泌亢進、平滑筋収縮など多様な生理活性を有しており、(Fig. 1) 鼻、肺、末梢血管などに作用して局所の反応性亢進とアレルギーや炎症特有の症状を引き起こす。アレルギー性鼻炎、喘息などのアレルギー疾患において重要な役割を演じているが、慢性化したアレルギー性鼻炎や気管支喘息などの疾患はこのI型だけでは説明がつかないといわれている。

慢性アレルギー性鼻炎や慢性気管支喘息などの慢性疾患では、脂質メディエーターが白血球の動員と活性化を促進して遅延性反応を起こす。脂質メディエーターは細胞膜リン脂質より由来し、アラキドン酸を前駆体として生成され遊離がなされる。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジンやトロンボキサンに、一方 5-リポキシゲナーゼによってロイコトリエン類に代謝される。特にロイコトリエン C_4 は組織で持続的な炎症反応に重要な役割を演じている。さらに、マスト細胞や好塩基球から放出された TNF- α などの炎症性サイトカイン類はマクロファージや好酸球、リンパ球を活性化する。特に TNF- α と INF- γ によって相乗的に活性化されたマクロファージは、酸素ラジカル ($O_2^{\cdot -}$) や誘導型 NO 合成酵素 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) によって NO の産生を誘導し、また IL-1 β , IL-6, IL-10 及び TNF- α などのサイトカインやケモカインが放出されることにより、炎症部位で活性化され、アレルギー性炎症を増幅することが知られている。(Fig. 2) ¹⁻⁶⁾

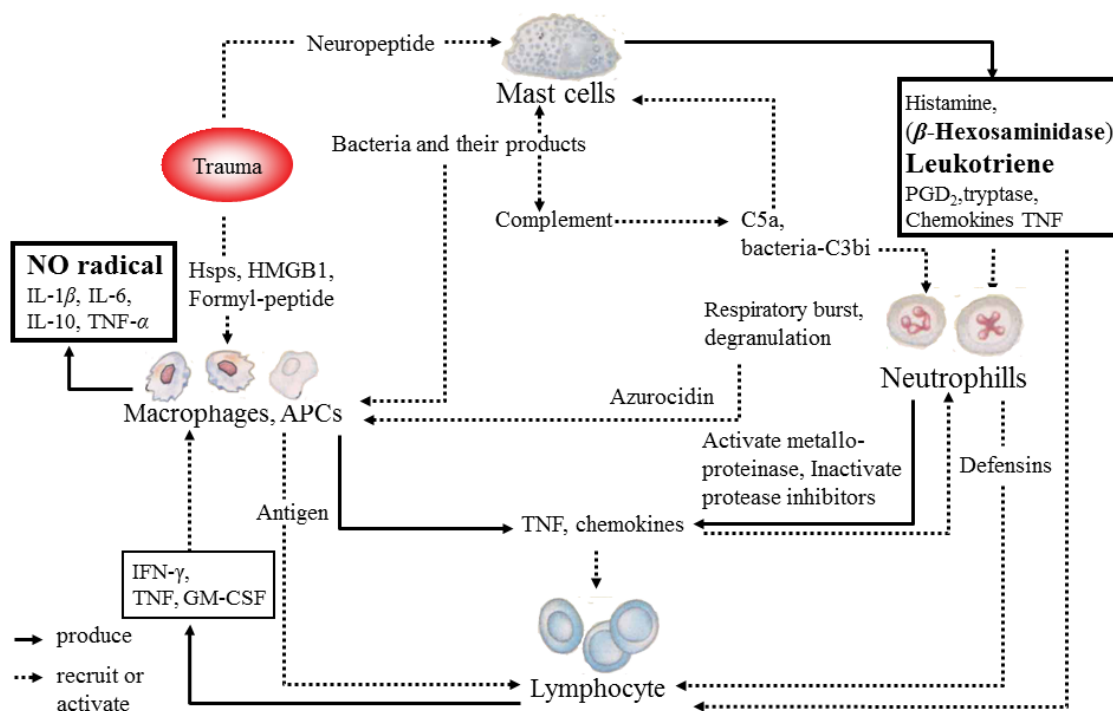


Fig. 2. Pathogenic Networks in Inflammation⁶⁾

本研究では新疆ウイグル自治区に自生する薬用植物について、RBL-2H3 細胞からの LTC₄

遊離抑制及び脱顆粒抑制を指標とした抗アレルギー活性, 及びマクロファージ様細胞からのNO産生抑制を指標にした抗炎症活性を指標としたスクリーニングを行い, 活性の認められた3種のシソ科薬用植物について成分探索を進めた.

第1章では新疆ウイグル自治区に自生する10種の薬用植物を用いて抗アレルギー及び抗炎症に関するスクリーニングを行った. 評価試験としてはロイコトリエン類の遊離の指標としてLTC₄遊離抑制試験を,⁷⁻⁹⁾好塩基球からの脱顆粒の指標として β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制試験を,¹⁰⁻¹⁴⁾及びマクロファージの活性化抑制の指標としてNO産生抑制試験¹⁵⁻¹⁷⁾を行った. この検討において良好な結果を示した伝承的に炎症性疾患などに使用されているシソ科植物について, 化学成分の探索と活性成分の評価を行い第2章から第4章に記述した.



Fig. 3. *Hyssopus cuspidatus*

第2章では神香草 *Hyssopus cuspidatus* (シソ科, Fig 3) について研究を行った. 神香草は, 中国新疆自治区アルタイ山脈に分布し石質の山斜面, 河原に生育している. 高さ30~60cmの低亜木で茎は基部が太く, 木質は, 褐色でねじれて多分枝している4稜形の植物である. 薬性は辛, 涼, 鎮痛・去痰・消炎作用を有し, 感冒時の発熱, 気管支喘息に用いられている.¹⁸⁾

神香草の成分として精油成分が知られており主成分は *myrcene*, *demethyleugenol*, *pinocamphone* と報告されている.^{19, 20)} そこで本植物の成分探索を行い, 新規アビエタン型ジテルペン, 新規エレモフィラン型セスキテルペン, 2種の新規モノテルペン, 4種のフェニルエタノイド配糖体の構造を明らかにし, これらの化合物についてLTC₄遊離抑制活性の検討を行った.

第3章では光刺兔唇花 *Lagochilus leiacanthus* (シソ科, Fig 4) について研究を行った. 光刺兔唇花は, 中国新疆自治区アルタイ山脈に分布し石質の山斜面, 河原に生育している. 高さ15~25cmの多年生草本で, 薬性は甘, 涼, 狭心症・冠状動脈性心臓病の兆候が見られたときや潰瘍に用いられている.²¹⁾



Fig. 4. *Lagochilus leiacanthus*

遊離抑制活性試験を行った.



Fig. 5. *Ziziphora clinopodioides*

第4章では唇香草 *Ziziphora clinopodioides* (シソ科, Fig 5) について研究を行った。唇香草は、中国新疆自治区アルタイ山脈に分布し石質の山斜面、河原に生育している。高さ15~30 cm の多年生草本で根は木質、茎は基部が束生の植物である。薬性は辛、涼、消炎作用を有し、感冒時の発熱や動悸の際に用いられている。²²⁾

唇香草の成分として luteolin, linarin, 7-methylsudachitin, chrysin-7-*O*-rutinoside, caffeic acid, oleanolic acid, 精油成分の α -pinene や pulegone が含まれているとの報告がある。²³⁻²⁷⁾

本植物からは3種の新規 menthane 型モノテルペン配糖体を含む18種の化合物を単離し、それらの化学構造を明らかにした。なおこれらの化合物について、RAW 264.7細胞を用いたNO遊離抑制活性試験を行った。

第1章 スクリーニングについて

第1節 新疆産薬用植物のスクリーニング

新疆ウイグル自治区アルタイ山脈に自生する薬用植物 10 種について、エタノールを用いて抽出した粗エキスを得た。それらの粗エキスについてロイコトリエンの遊離の指標として LTC₄ 遊離抑制活性試験、脱顆粒の指標として β -hexosaminidase 遊離抑制活性試験、マクロファージの NO 産生抑制活性試験を行った。その結果、Table 1 に示した様に唇香草、光刺兔唇花、神香草に LTC₄ 遊離抑制活性、 β -hexosaminidase 遊離抑制、マクロファージの NO 産生抑制活性が認められたので、これら 3 種のシソ科薬用植物について研究を進めた。

尚、植物の収集と同定は中国科学院上海薬物研究所、沈金貴氏によるものである。

Table 1. Screening Data of Xinjiang Plants (sample concentration: 100 μ g/mL)

	植物名	現地名	科名	LTC ₄	β -Hexosaminidase	NO
				Inhibitor (%)	Inhibitor (%)	Inhibitor (%)
1	<i>Salvia deserta</i>	新疆鼠尾草	シソ	92.3	–	20.7
2	<i>Chaondrilla piptocoma</i>	粉苞苣	キク	16.9	–	22.9
3	<i>Reaumuria soongorica</i>	枇杷柴	ギョリュウ	-7.7	–	51.7
4	<i>Ziziphora clinopodioides</i>	唇香草	シソ	74.2	44.7	41.9
5	<i>Chenopodium urbicum</i>	市藜	アカザ	98.5	–	26.8
6	<i>Lagochilus leiocanthus</i>	光刺兔唇花	シソ	99.3	56.8	29.1
7	<i>Hyssopus cuspidatus</i>	神香草	シソ	98.7	40.1	23.1
8	<i>Lythrum virgatum</i>	千屈菜	ミソハギ	-1.9	–	28.4
9	<i>peganum harmala</i>	駱駝蓬	ハマビシ	50.6	–	26.8
10	<i>Dodartia orientalis</i>	牛含水	ゴマノハグサ	40.6	26.9	20.6

– not tested

第2章 神香草 *Hyssopus cuspidatus* の成分研究

第1節 化合物の分離・精製

神香草 *Hyssopus cuspidatus* の乾燥した全草 1.5 kg を粉砕後、超音波条件下エタノール (6 L × 4) にて抽出し、EtOH 抽出物を得た。これを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーで分画後、シリカゲルカラム、HPLC より分離・精製する (Chart 1) ことにより、新規アビエタン型ジテルペン (**1**)、エレモフィラン型セスキテルペン (**2**)、ピナン型モノテルペン (**3**)、メントン型モノテルペン (**4**)、フェニルエタノイド配糖体 (**5—8**) と共に 19,20-epoxy-12-methoxy-11,14,19-trihydroxy-7-oxo-8,11,13-abietatriene (**9**),²⁸⁾ 11,14-dihydroxy-12-methoxy-7-oxo-8,11,13-abietatrien-19-20 β -olide (**10**),²⁸⁾ 10-hydroxycarvone (**11**),²⁹⁾ pinonic acid (**12**), loliolide (**13**),³⁰⁾ desacetylmatricarin (**14**),³¹⁾ rosmarinic acid (**15**),³²⁾ coulterone (**16**),³³⁾ salvigenin (**17**),³⁴⁾ 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone (**18**),^{34, 35)} ursolic acid (**19**),³⁶⁾ 2 α -hydroxyursolic acid (**20**),³⁷⁾ 2 α -hydroxyoleanolic acid (**21**),³⁷⁾ 及び hyptadienic acid (**22**)³⁸⁾ を単離した。(Fig. 6)

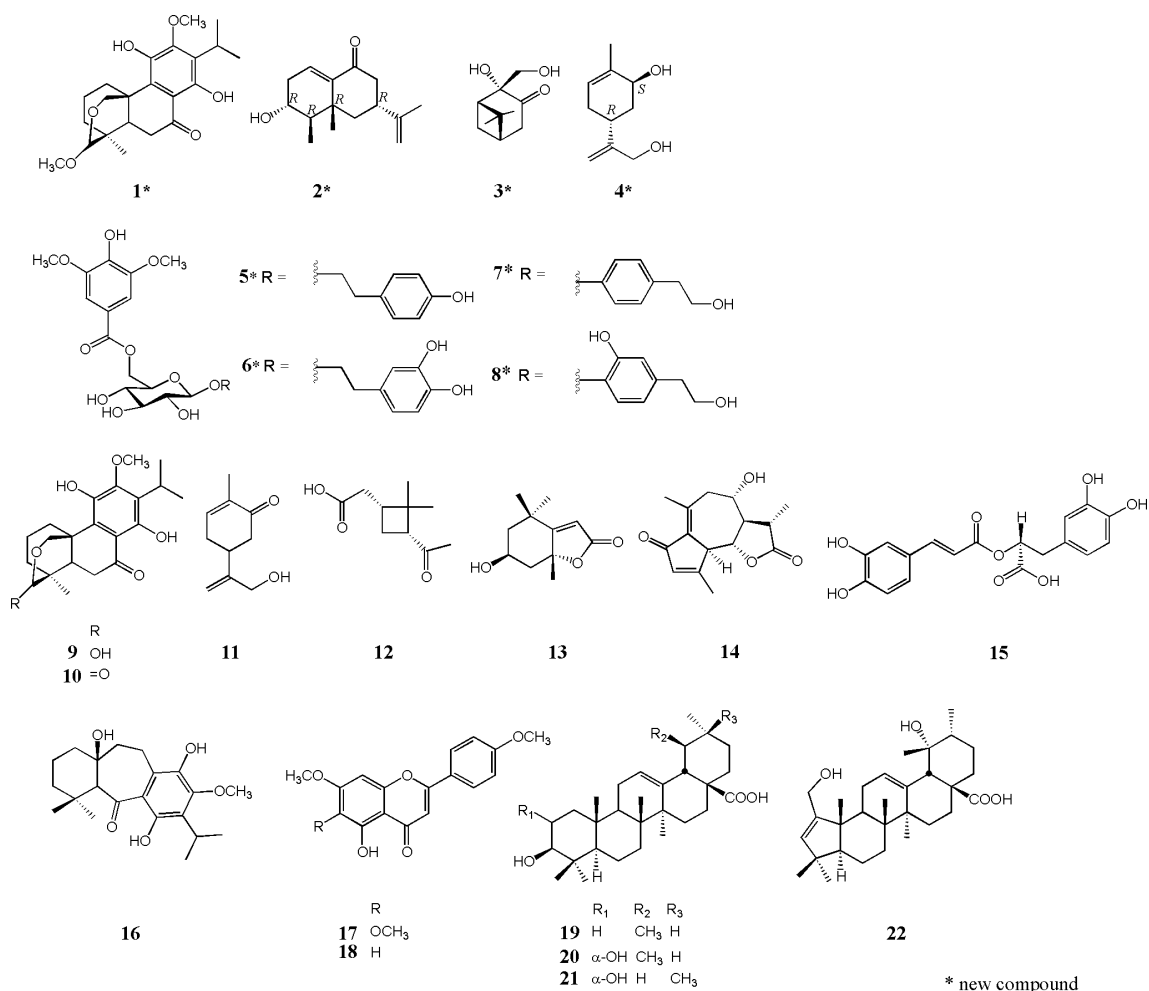


Fig. 6. Structures of Compounds 1—22

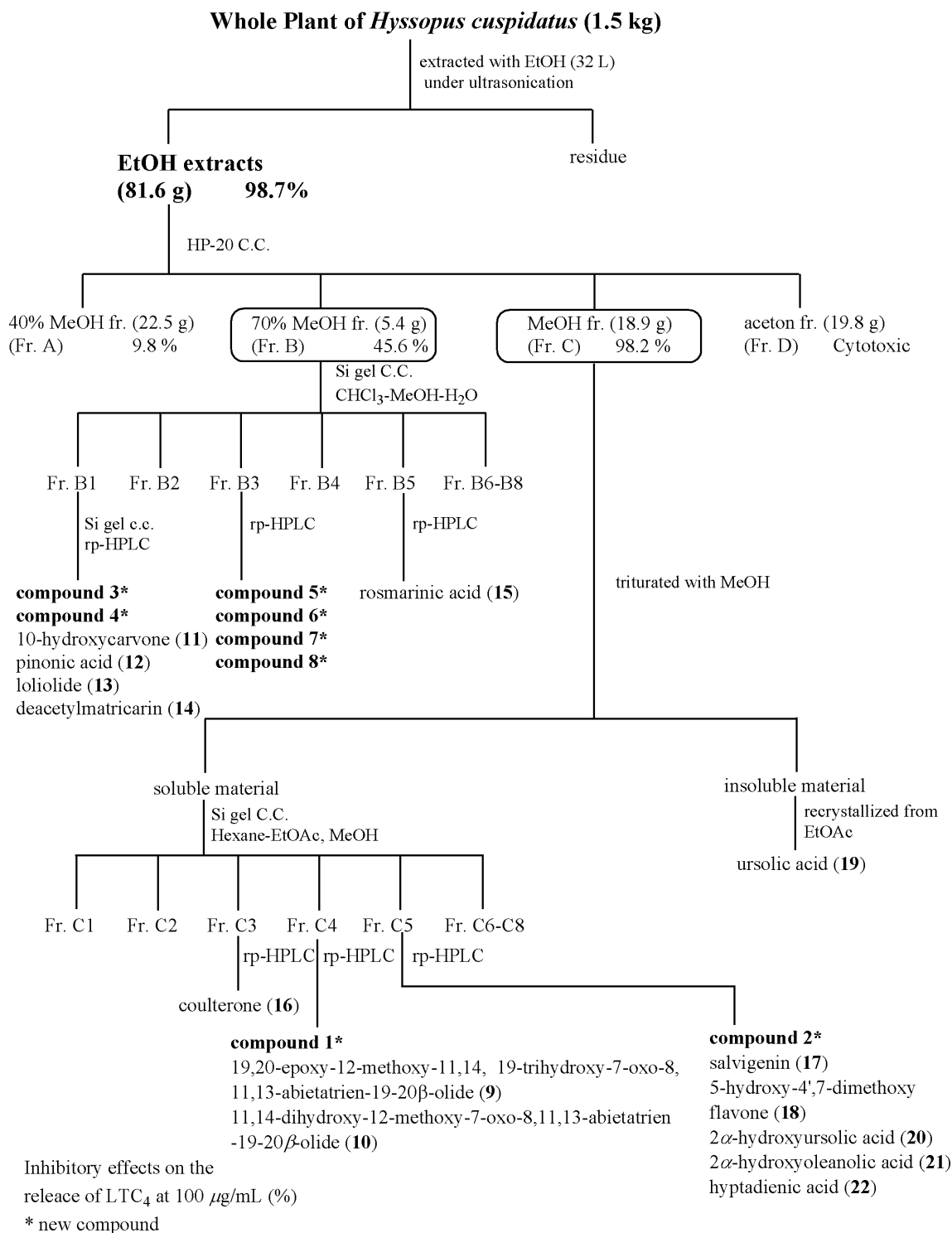


Chart 1

第2節 化合物 1 の化学構造

化合物 1 は黄色非晶質, $[\alpha]_D +95.2$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルは, 216 nm, 240 nm, 277 nm及び368 nmに極大吸収が認められ, ベンゼン環の存在が推定された. また, EI-MSから m/z 390 $[M]^+$ が, HR-EI-MSは m/z 390.2035 (calcd 390.2042 for $C_{22}H_{30}O_6$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{22}H_{30}O_6$ と推定した.

1H -NMR 及び COSY スペクトルから, 三級メチル基 δ 0.97 (3H, s, H-18), イソプロピル基 [δ 1.38 (6H, d, $J = 6.9$ Hz, H-16, H-17), δ 3.31 (1H, sep, $J = 6.9$ Hz, H-15)] 2個のメトキシ基 δ 3.30, δ 3.78 (each 3H, s), 非等価なメチレン基 [δ 1.33 (ddd, $J = 13.8, 3.4, 2.1$ Hz, H-1 α), δ 3.42 (dd, $J = 13.8, 6.2$ Hz, H-1 β)] と接続する2個のメチレン基 [δ 1.62, δ 2.50 (m), H-2] – [δ 1.40 (m), δ 1.62, H-3], 接続したメチン-メチレン基 [δ 1.88 (dd, $J = 15.8, 2.7$ Hz), H-5] – [δ 2.67 (dd, $J = 15.8, 2.7$ Hz), δ 3.27, H-6] 及び2個の水酸基に基づくと推定されるシグナル δ 5.76 (1H, s) と δ 13.03 (1H, s) が観測された.

^{13}C -NMR 及び HMQC スペクトルから, 3個のメチル基 δ 20.3 (C-16), δ 20.3 (C-17), δ 23.3 (C-18), 2個のメトキシ基 (δ 54.8, δ 62.1), 1個の非等価なオキシメチレン [δ_H 3.94 (1H, dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz), δ_H 4.36 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), δ_C 59.6, C-20], 及びプロトンとカーボンシグナルが低磁場に現れていることからアセタール [δ_H 4.28 (1H, s), δ_C 105.4 C-19] の存在を推定した. さらに6本の sp^2 炭素シグナル δ 113.2 (C-8), δ 127.0 (C-13), δ 128.3 (C-9), δ 139.8 (C-11), δ 152.0 (C-12), δ 157.0 (C-14) 及びカルボニル基 δ 205.4 (C-7) の存在を推測した.

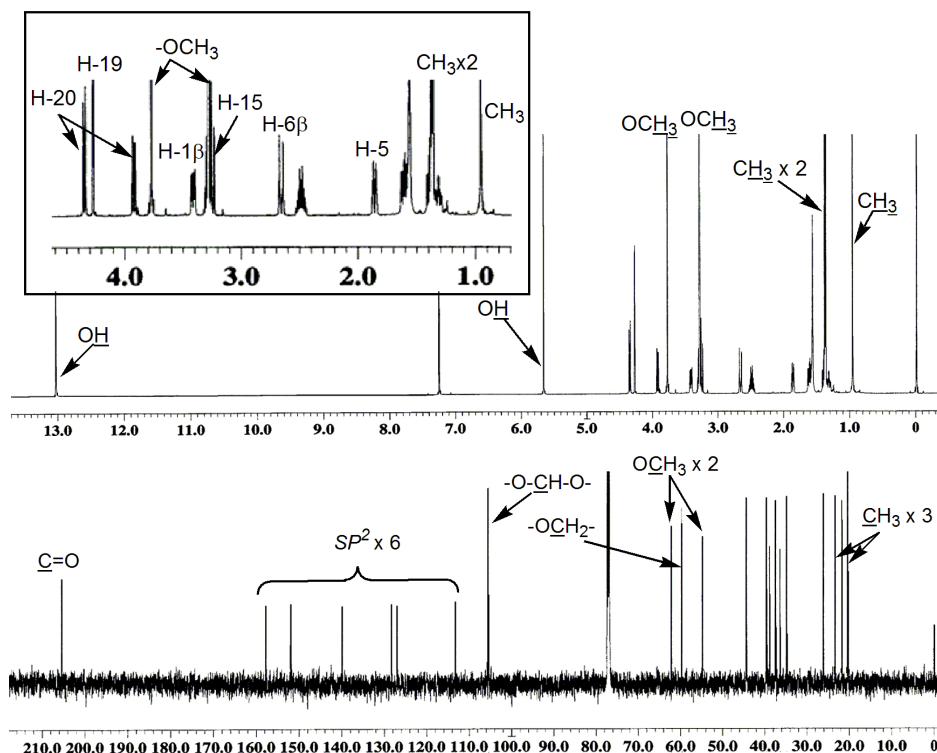


Fig. 7. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of 1 (in $CDCl_3$)

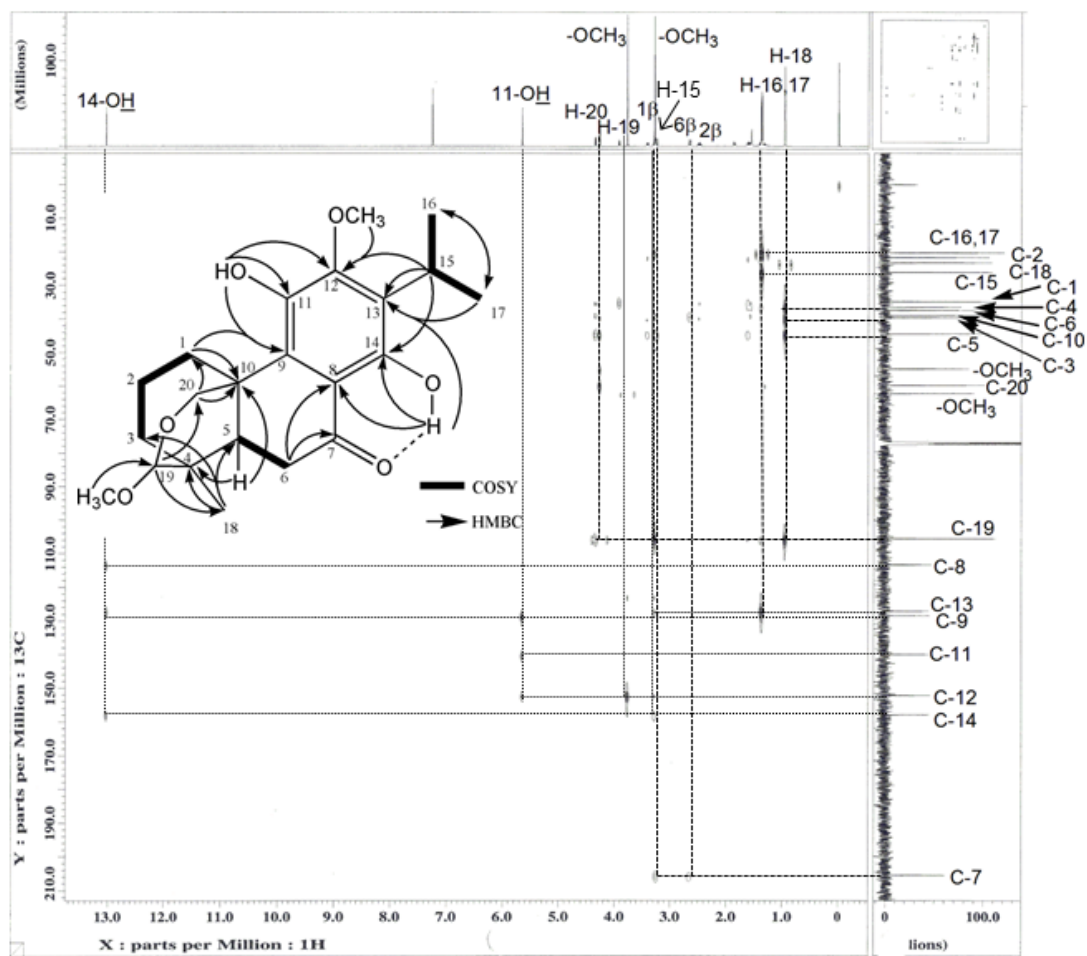


Fig. 8. HMBC spectrum of **1**

次に、HMBC スペクトルを測定し、判明した部分構造や官能基の接続性について検討しながら構造解析を進めた。**1** の HMBC スペクトルにおいて、H-15 のイソプロピル基のメチンプロトンから C-12, C-13 及び C-14 に、 δ 3.78 のメトキシプロトンから C-12 に、 δ 5.76 の水酸基のプロトンから C-9, C-11 及び C-12 に遠隔スピンカップリングが認められた。また、キレート水酸基 δ 13.03 (14-OH) から C-8, C-13 及び C-14 に相関が認められたことから、ベンゼン環上の置換様式を Fig. 8 に示すように決定した。さらに CH₃-18 から δ 39.5 (C-3), δ 36.4 (C-4) 及び δ 44.3 (C-5) に、H-19 のアセタールプロトンから C-18 及び C-20 に、H-20 から δ 34.8 (C-1) 及び δ 38.8 (C-10) に、H-5 から C-4 及び C-10 に、 δ 2.67 (H-6 β) から C-7 及び C-8 に、11-OH から C-9, C-11 及び C-12 に、H-15 から C-12, C-13 及び C-14 に、H-1 から C-9 及び C-10 に相関が認められた。これらを整理し Fig. 8 に示すようなアビエタン型ジテルペンの平面構造を推定した。また立体化学を検討するため、化合物 **1** について NOESY スペクトルを測定したところ、H-5 と H-1 α , H-3 α , 及び CH₃-18 との間に NOESY が認められたことから、A 環はイス型配座をとっていると考えられる。また、H-6 β と H-19 及び H-20 との間に NOESY が認めら

れたことから、これらのリガンドは Fig. 9 に示すようにアキシャル配置をとっていると考えられる。以上より **1** は、スギ科セコイアの葉に含まれる ferruginol や、シソ科ローズマリーに含まれる rosmanol のようなアビエタン型ジテルペンで、19 位と 20 位の間で環状のアセタールを形成している (Fig. 10) と結論した。本化合物は文献未記載な化合物である。

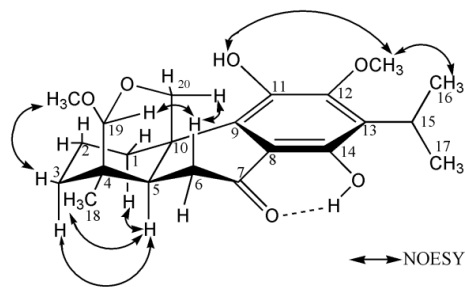


Fig. 9. Key NOESY Correlations of **1**

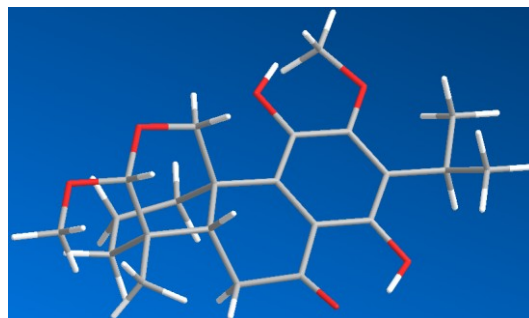


Fig. 10. Structure of **1**

Table 2. ¹H- and ¹³C-NMR Spectral Data for **1** (600 MHz, in CDCl₃)

Position	¹ H	¹³ C	Position	¹ H	¹³ C
1 α	1.33 (ddd, 13.8, 3.4, 2.1)	34.8	12		152.0
1 β	3.42 (dd, 13.8, 6.2)		13		127.0
2 α	1.62 ^a	21.7	14		157.0
2 β	2.50 (m)		15	3.31 (sep, 6.9) ^b	26.1
3 α	1.40 (m)	39.5	16	1.38 (3H, d, 6.9)	20.3
3 β	1.62 ^a		17	1.38 (3H, d, 6.9)	20.3
4		36.4	18	0.97 (3H, s)	23.3
5	1.88 (dd, 15.8, 2.7)	44.3	19	4.28 (s)	105.4
6 α	3.27 ^b	37.4	20	3.94 (dd, 11.7, 2.1)	59.6
6 β	2.67 (dd, 15.8, 2.7)			4.36 (d, 11.7)	
7		205.4	OCH ₃	3.30 (3H, s)	54.8
8		113.2	OCH ₃	3.78 (3H, s)	62.1
9		128.3	11-OH	5.76 (s)	
10		38.8	14-OH	13.03 (s)	
11		139.8			

The values in parentheses represent the coupling constants in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

^a and ^b show overlapping of the signals.

第3節 化合物 2 の化学構造

化合物 **2** は無色油状物質, $[\alpha]_D +21.5$ (MeOH) として得られた. EI-MSでは m/z 234 $[M]^+$, HR-EI-MSは m/z 234.1616 (calcd 234.1620 for $C_{15}H_{22}O_2$) に分子イオンピークが認められることから, 分子式を $C_{15}H_{22}O_2$ と推定した.

1H -NMR スペクトルでは, シングレットメチル基 δ 0.98 (3H, s, H-14), ダブルレットメチル基 δ 1.08 (3H, d, $J = 6.5$, H-15), ビニルメチル基 δ 1.76 (3H, s, H-12), オキシメチン基 δ 3.61 (m, H-3), エキソメチレン基 δ 4.76, δ 4.78 (1H each, brs, H-13), ビニルプロトンに由来するシグナル δ 6.45 (s, H-1) が観測され, ^{13}C -NMR スペクトルにおいて 3 個のメチル基 δ 11.5 (C-15), δ 20.8 (C-12), δ 26.1 (C-14), オキシメチン基 δ 69.2 (C-3), 4 個の sp^2 四級炭素 δ 110.7 (C-13), δ 134.0 (C-1), δ 145.3 (C-10), δ 148.9 (C-11), カルボニル基に由来するシグナル δ 205.4 (C-9) が観測された. これらのデータ及び不飽和度が 5 であることから二環性のセスキテルペンを推定した.

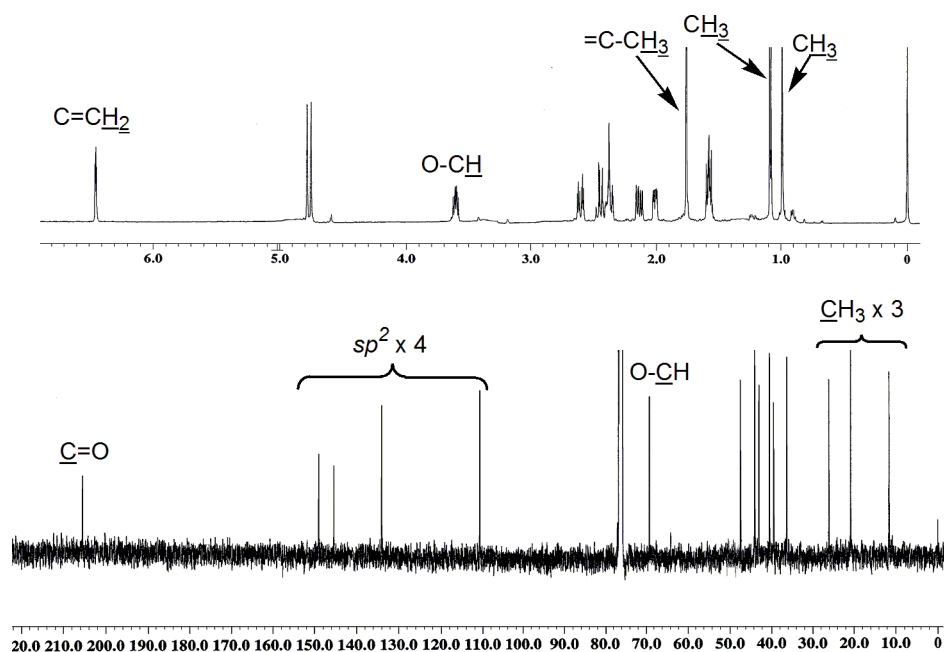


Fig. 11. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **2** (in $CDCl_3$)

COSY スペクトルにて H-1 から非等価のメチレン H-2, H-2, H-4 及び CH_3 -15, また H-6 から H-7 及び H-8 の相関がみられた. (Fig. 12) HMBC スペクトルにおいて CH_3 -15 から C-4 及び C-5 に, CH_3 -14 から C-4, C-5 及び C-6, C-10 に, H-1 から C-5 及び C-9 に, H-8 から C-9 に, CH_3 -12 から C-7, C-11 及び C-13 に, H-13 から C-7, C-11 及び CH_3 -12 に相関がみられたことから, **2** の構造は Fig. 12 に示すようなエレモフィラン型セスキテルペンであると決定した.

NOESY スペクトルにおいて H-3_{ax} と H-2_{eq}, CH_3 -14 及び CH_3 -15 に相関が, CH_3 -15 と CH_3 -14, CH_3 -14 と H-7 に, H-6 α と H-4 及び H-12 に相関がみられたことから, **2** の相対配置を Fig. 13

に示すように決定した。次に H-3 の絶対配置を決定するため新 Mosher 法^{39,40)} により検討した。2 の *R*-及び *S*-MTPA エステルを調製し、¹H-NMR を解析したところ, Fig. 14 に示すシフト差が見られたことから 3*R* と決定し、絶対構造を Fig. 14 に示す様に決定した。

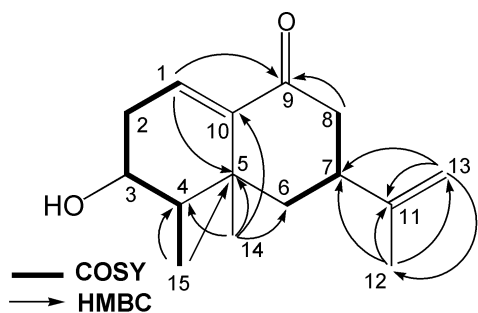


Fig. 12. Key COSY and HMBC Correlations of **2**

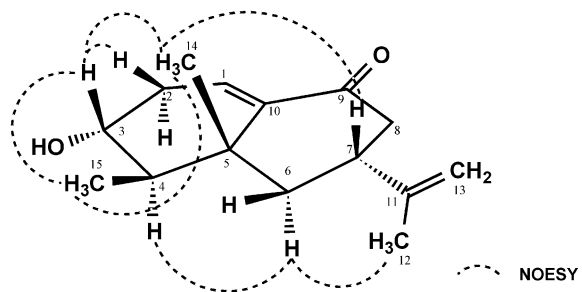


Fig. 13. NOESY Correlations of **2**

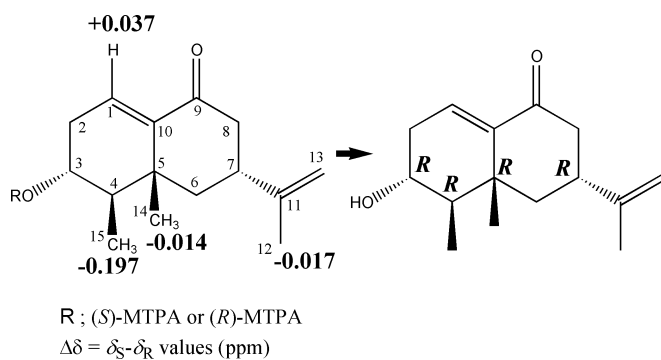


Fig. 14. Absolute Configuration of **2**

第4節 化合物 3 の化学構造

化合物 **3** は無色油状物質, $[\alpha]_D +21.5$ (MeOH) として得られた. また, EI-MSでは m/z 184 $[M]^+$, HR-EI-MSは m/z 184.1099 (calcd 184.1099 for $C_{10}H_{16}O_3$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{10}H_{16}O_3$ と推定した.

1H -NMR スペクトルでは, 2 個のシングレットメチル基 δ 0.90 (3H, s, H-8), δ 1.38 (3H, s, H-9), δ 2.60 (2H, s, H-4), 非等価なメチレン基 δ 3.37, δ 4.07 (each 1H, d, $J = 12$ Hz, H-10) のシグナルが観測された.

^{13}C -NMR スペクトルにおいて, 2 個のメチル基 δ 22.6 (C-8), δ 26.8 (C-9), 2 個のメチレン基 δ 27.8 (C-7) 及び δ 43.5 (C-4), 2 個のメチン基 δ 38.1 (C-5) 及び δ 46.7 (C-1), 四級炭素に由来するシグナル δ 39.3 (C-6), オキシメチレン基 δ 67.7 (C-10), 酸素が結合している四級炭素 δ 77.1 (C-2) 及びカルボニル炭素 δ 216.2 (C-3) の合計 10 本のシグナルが観測されたことから, 二環性のモノテルペンを推定した.

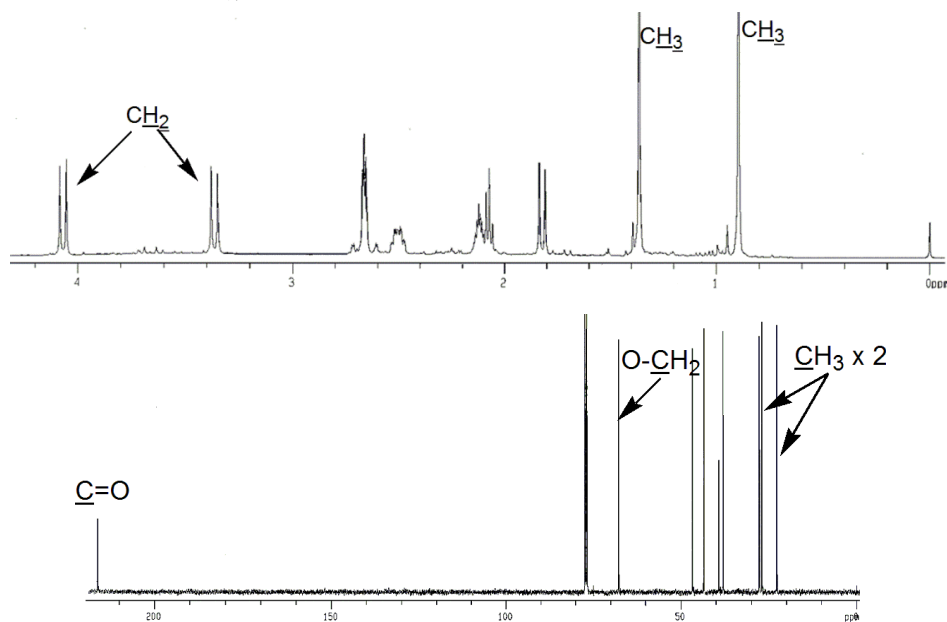


Fig. 15. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **3** (in $CDCl_3$)

COSY スペクトルにおいて, H-1 から非等価のメチレン H-7, メチン H-5 及び等価のメチレン H-4 の相関がみられた. (Fig. 16)

HMBC スペクトルにおいて, H-10 から C-2 及び C-3, H-4 から C-3 に, H-8 から C-1 及び C-6 に, H-9 から C-5 及び C-6 に相関が認められたことから, **3** の構造を Fig. 16 に示したように決定した. また NOESY スペクトルより CH_3 -8 と H-10 に NOESY 相関が認められたことから, 相対配置を Fig. 17 に示す様に決定した.

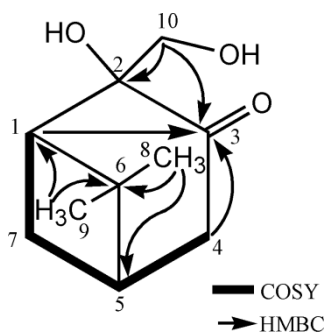


Fig. 16. Key COSY and HMBC Correlations of **3**

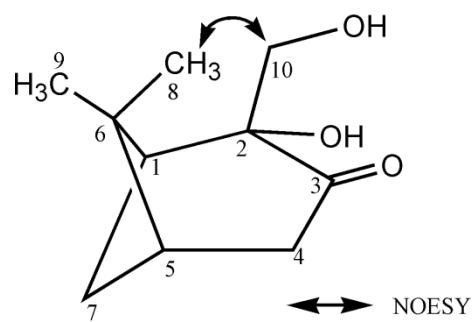


Fig. 17. Key NOESY Correlations of **3**

第5節 化合物 4 の化学構造

化合物 **4** は無色油状物質, $[\alpha]_D +7.7$ (MeOH) として得られた. また, EI-MSでは m/z 168 $[M]^+$, HR-EI-MSは m/z $C_{10}H_{16}O_3$ (calcd 168.1150 for $C_{10}H_{16}O_2$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{10}H_{16}O_2$ と推定した.

1H -NMR スペクトルでは, メチル基 δ 1.81 (3H, brs, H-7), 非等価のメチレン基 δ 4.92 (1H, brs), δ 5.09 (1H, s), H-9, ビニルプロトン δ 5.59 (1H, m, H-6), に基づくと推測されるシグナルが観測された.

^{13}C -NMR スペクトルにおいてメチル基 δ 20.8 (C-7), 2個のメチレン基 δ 31.5 (C-3), 37.0 (C-5), メチン基 δ 31.2 (C-4), オキシメチレン基 δ 65.2 (C-10) オキシメチン基 δ 68.5 (C-2), sp^2 メチレン炭素 δ 108.7 (C-9), 2本の sp^2 四級炭素 δ 134.4 (C-1), δ 152.7 (C-8) 及びメチン炭素 δ 125.2 (C-6) を含む計10本のシグナルが観測されたこと及び不飽和度が3であることを考慮すると, **4** は単環性のモノテルペンであると推定した.

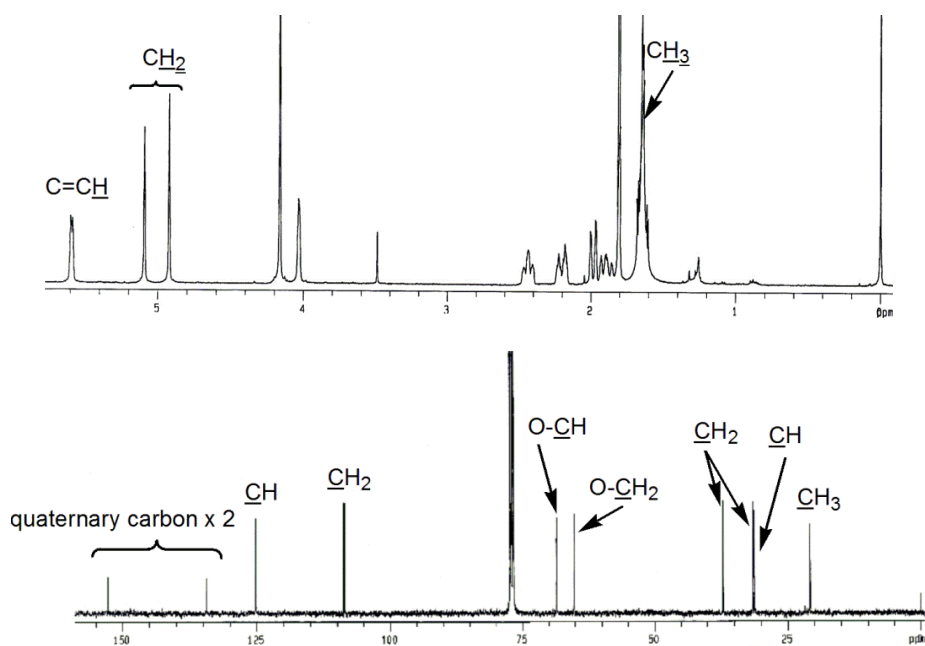


Fig. 18. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **4** (in $CDCl_3$)

さらに, COSY, HMBC スペクトルにおいて, Fig. 19 に示すような相関がみられたことから, **4** の構造を決定した. 相対立体配置は, 差NOEスペクトルを測定した結果, H-2 と H-10 の間に NOE が認められたことから Fig. 18 に示すように決定した. また, 絶対配置は **2** と同様, 新 Mosher 法の適用^{39, 40} により 2 位が *S*, 4 位が *R* と決定した. (Fig. 20)

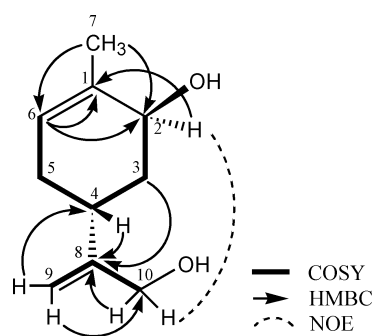


Fig. 19. Key HMBC and NOE Correlations of **4**

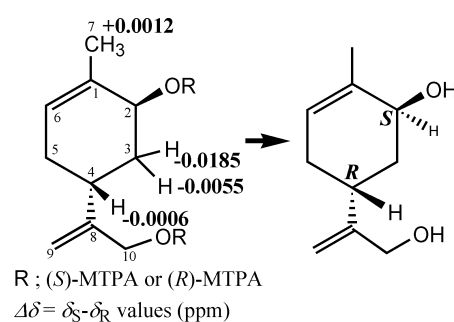


Fig. 20. Absolute Configuration of **4**

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectral Data for Compounds **2**–**4** (400 MHz, in CDCl_3)

Position	2		3		4	
	^1H (J , Hz)	^{13}C	^1H (J , Hz)	^{13}C	^1H (J , Hz)	^{13}C
1	6.45 (m)	134.0	2.07 (m) ^b	46.7		134.4
2	2.59 (m)	36.3		77.1	4.03 (m)	68.5
	2.14 (m)					
3	3.61 (m)	69.2		216.2	1.63 (m)	31.5
					1.96 (m)	
4	1.57 (m) ^a	47.5	2.60 (2H, s)	43.5	2.43 (m)	31.2
5		39.4	2.08 (m) ^b	38.1	2.18 (m)	37.0
					1.89 (m)	
6	2.00 (m)	43.0		39.3	5.59 (m)	125.2
	1.57 (m) ^a					
7	2.36 (m)	40.4	1.82 (m)	27.8	1.81 (3H, brs)	20.8
			2.49 (m)			
8	2.34 (m)	44.1	0.90 (3H, m)	22.6		152.7
	2.43 (m)					
9		205.4	1.38 (3H, s)	26.8	4.92 (brs)	108.7
					5.09 (s)	
10		145.3	3.37 (d, 12.0)	67.7	4.16 (2H, s)	65.2
			4.07 (d, 12.0)			
11		148.9				
12	1.76 (3H, s)	20.8				
13	4.76 (brs)	110.7				
	4.78 (brs)					
14	0.98 (3H, s)	26.1				
15	1.08 (3H, d, 6.5)	11.5				

The values in parentheses represent the coupling constants in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

^a and ^b show overlapping of signals.

第6節 化合物 5 の化学構造

化合物 **5** は淡黄色油状物質, $[\alpha]_D -9.3$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいて 220 nm及び278 nmに極大吸収が認められた. FAB-MSでは m/z 479 $[M-H]^-$, HR-FAB-MSは m/z 479.1553 (calcd 479.1553 for $C_{23}H_{27}O_{11}$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{23}H_{27}O_{11}$ と推定した.

1H -NMR スペクトルでは, 四置換ベンゼン環上のプロトンであると推定されるシグナル δ 7.32 (2H, s, H-2''', 6''') 及びパラ置換ベンゼン環由来と推定されるシグナル δ 6.65 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), δ 6.95 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6') が観測された. さらに六炭糖 6 位由来のメチレンプロトン [δ 4.38 (1H, dd, $J=11.7, 6.8$ Hz), δ 4.67 (1H, dd, $J=11.7, 2.2$ Hz), H-6''] 及び糖の 1 位由来のメチンプロトン δ 4.35 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'') と推測されるシグナルが観測された.

^{13}C -NMR スペクトルにおいては, δ 168.0 にカルボニル炭素, δ 108.3 から δ 156.8 にベンゼン環由来と思われる 12 本の炭素シグナル, また δ 104.6 に六炭糖 1 位由来と推測されるシグナルが観測された.

HMBC スペクトルにおいて, Fig. 22 に示すような相関がみられたことから, **5** の構造は Fig. 22 に示した *p*-ヒドロキシフェネチルアルコールの誘導体であると決定した.

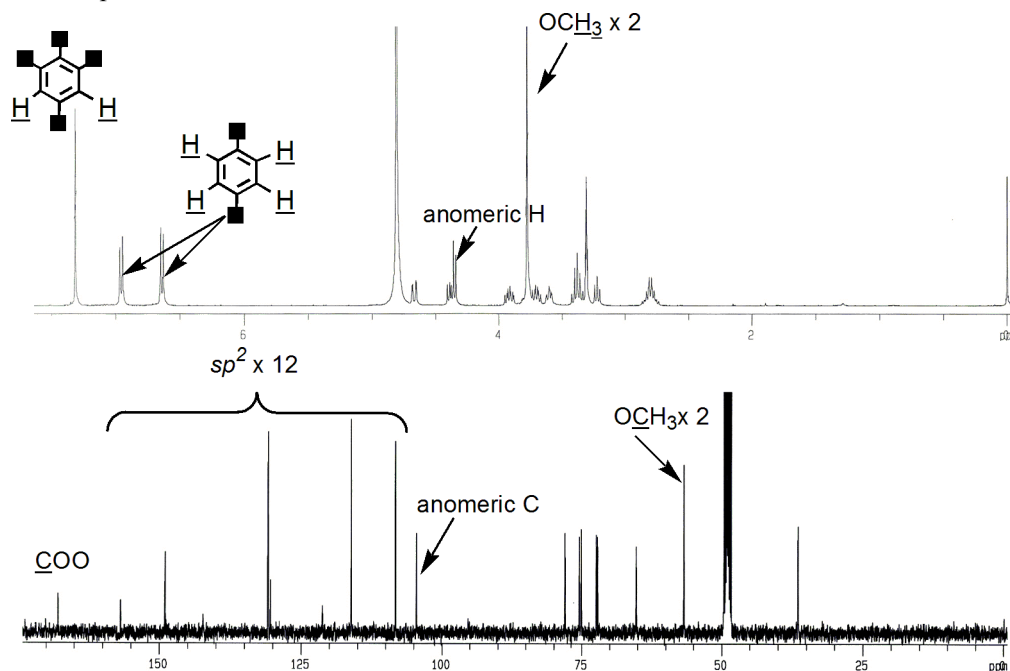


Fig. 21. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **5** (in MeOH- d_4)

次に, 糖の構造を決定するために, 酸及びアルカリ加水分解し, Hara らの方法⁴¹⁾ により誘導体化した後ガスクロマトグラフィー法にて標品と比較したところ, **5** の糖は β -D-glucose と同定した.

以上の結果から **5** は Fig. 22 に示す構造であると決定した.

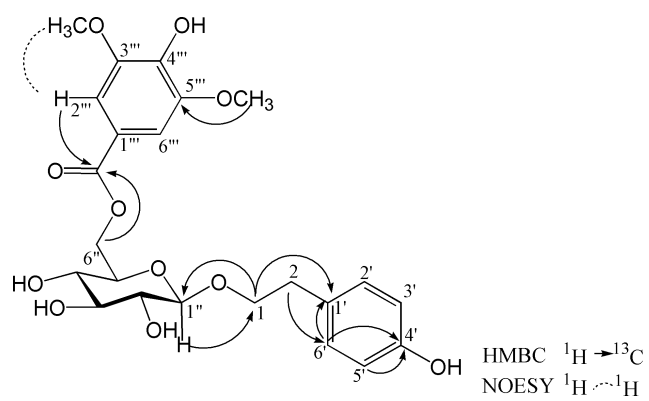


Fig. 22. Key HMBC and NOESY Correlations of **5**

第7節 化合物 6 の化学構造

化合物 6 は淡黄色油状物質, $[\alpha]_D -56.2$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいて 220 nm 及び 278 nm に極大吸収が認められた. FAB-MSでは m/z 495 $[M-H]^-$, HR-FAB-MSは m/z 495.1500 (calcd 495.1502 for $C_{23}H_{27}O_{12}$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{23}H_{27}O_{12}$ と推定した.

1H -NMRスペクトルでは, 1,3,4,5-四置換ベンゼン δ 7.34 (2H, s, H-2''', 6''') 及び1,3,4-三置換ベンゼン [δ 6.92 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), δ 6.74 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), δ 6.75 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6')] のシグナルが観測され, 六炭糖6位 [δ 4.43 (1H, dd, $J=12.0, 6.0$ Hz), δ 4.72 (2H, dd, $J=12.0, 2.2$ Hz), H-6''] 及び糖の1位由来のメチンプロトン δ 4.77 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'') と推測されるシグナルが観測された.

^{13}C -NMR スペクトルにおいては δ 167.9 にカルボニル炭素, δ 108.3 から δ 148.9 にベンゼン環由来と思われる 12 本の炭素シグナル, また δ 104.5 に六炭糖 1 位由来と推測されるシグナルが観測された.

6 のスペクトルを 5 のそれと比較するとフェネチル部分以外は非常に類似していたが, 分子式において酸素が 1 個多かったこと及び HMBC スペクトルにおいて Fig. 23 に示す相関がみられたことから, 6 は Fig. 23 に示す構造であろうと推定した.

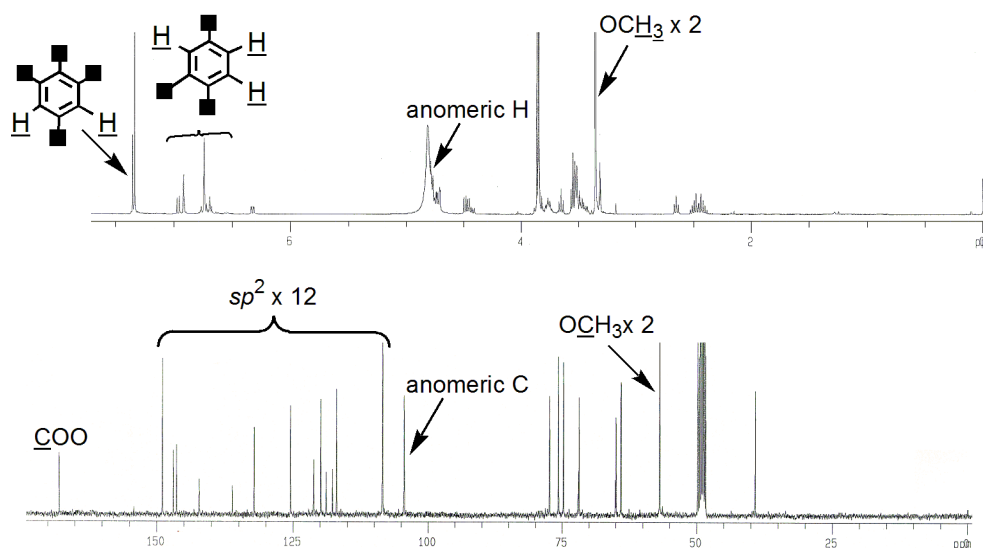


Fig. 23. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of 6 (in MeOH- d_4)

次に糖の構造を決定するために 5 と同様の方法⁴¹⁾を用いて検討した結果, 6 の糖は β -D-glucose であることが明らかになった.

以上の結果から 6 は Fig. 24 に示す構造であると決定した.

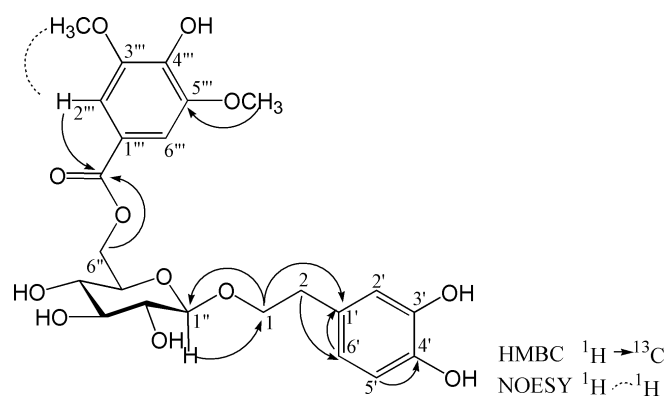


Fig. 24. Key HMBC and NOESY Correlations of **6**

第8節 化合物 7 の化学構造

化合物 7 は淡黄色油状物質, $[\alpha]_D -38.1$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中 221 nm 及び 275 nm に極大吸収が認められた. FAB-MSでは m/z 479 [M-H], HR-FAB-MSは m/z 479.1554 (calcd 479.1553 for $C_{23}H_{27}O_{11}$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{23}H_{27}O_{11}$ と推定した.

1H -NMR 及び ^{13}C -NMR スペクトルは 5 に非常によく似ており, 7 は 5 と同様にフェネチルアルコールの誘導体であると推定した.

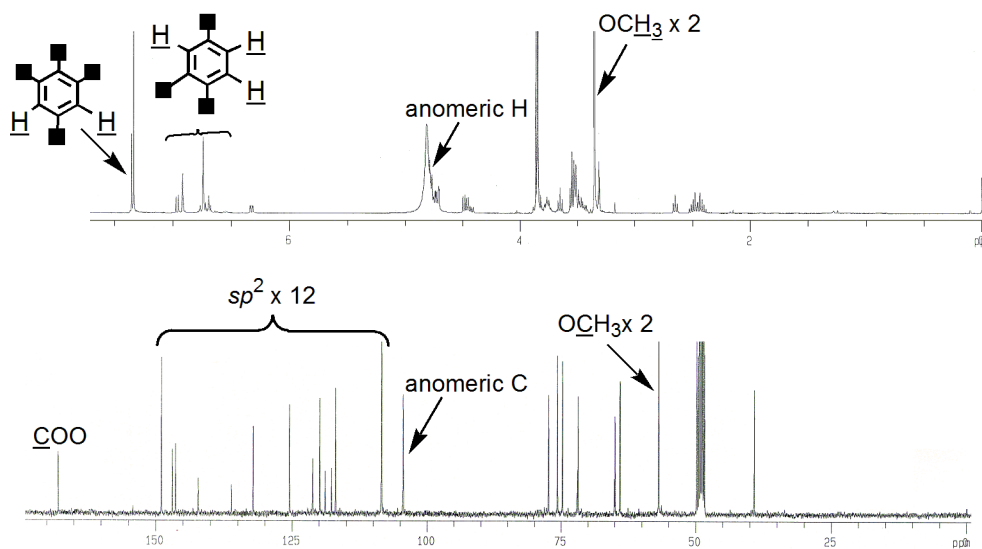


Fig. 25. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of 7 (in MeOH- d_4)

しかし, HMBC スペクトルにおいて Fig. 26 に示すように, 糖のアノメリックプロトンと芳香環の 4'位の炭素に相関がみられたことから, 7 の構造は Fig. 26 に示す構造であると推定した.

さらに, 糖の構造を決定するために 5 と同様の方法⁴¹⁾を用いて検討した結果, 7 の糖は β -D-glucose であることが明らかになった.

以上の結果から 7 は Fig. 26 に示す構造であると決定した.

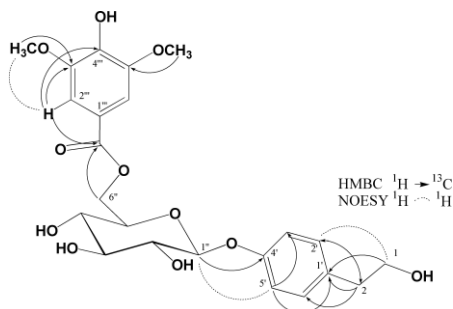


Fig. 26. Key HMBC and NOESY Correlations of 7

第9節 化合物 8 の化学構造

化合物 **8** は淡黄色の油状物質, $[\alpha]_D -33.8$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいて221 nm 及び 278 nm に極大吸収が認められた. FAB-MSでは m/z 495 $[M-H]^-$, HR-FAB-MSは m/z 495.1496 (calcd 495.1502 for $C_{23}H_{27}O_{12}$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{23}H_{27}O_{12}$ と推定した.

1H -及び ^{13}C -NMR スペクトルは **6** に非常によく似ており, 異性体であろうと推察された.

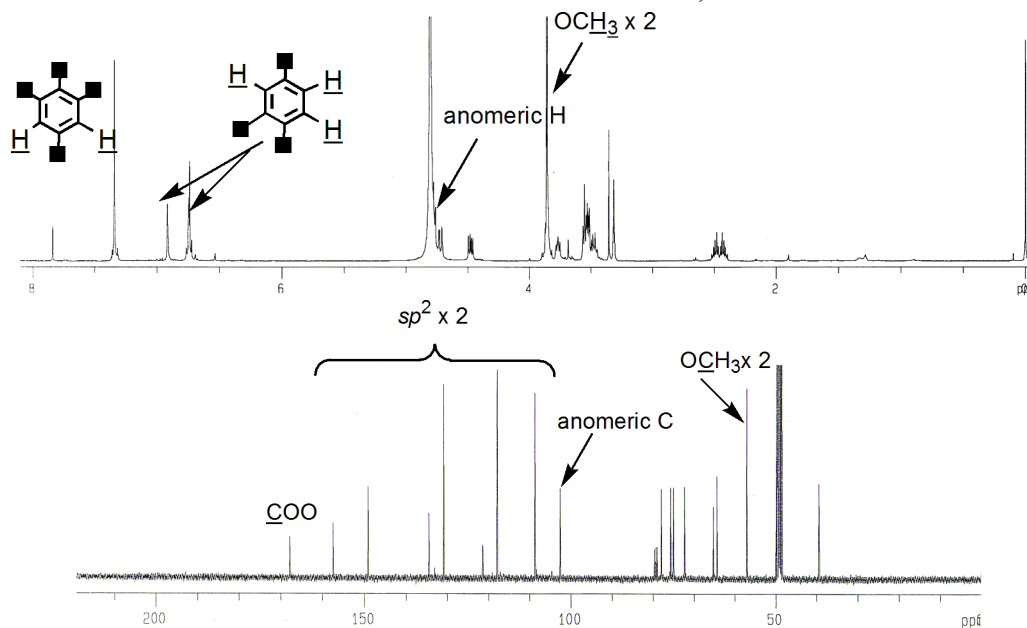


Fig. 27. 1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **8** (in MeOH- d_4)

さらに, HMBC スペクトルにおいて, 糖のアノメリックプロトンと芳香環の 4'位の炭素に相関がみられたことから, **8** の構造は Fig. 28 に示す構造であると推定した.

糖の構造は **5** と同様な方法⁴¹⁾により, **8** の糖は β -D-glucose であることが明らかになった.

以上の結果から **8** は Fig. 28 に示す構造であると決定した.

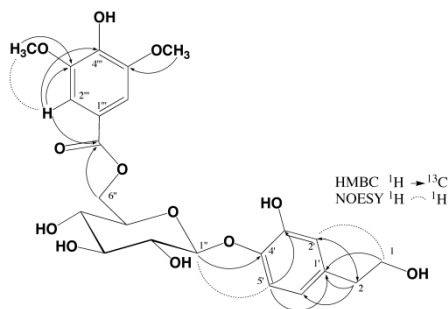


Fig. 28. Key HMBC and NOESY Correlations of **8**

Table 4. ¹H-NMR Spectral Data for Compounds **5**–**8** (in MeOH-*d*₄)

¹ H	5	6	7	8
aglycone				
1	3.69 (m) 3.91 (m)	3.53 (2H, m)	3.65 (2H, t, 7.1)	3.51 (2H, m)
2	2.80 (2H, m)	2.44 (2H, m)	2.69 (2H, t, 7.1)	2.74 (2H, m)
2'	6.95 (d, 8.5)	6.92 (d, 2.0)	6.93 (s)	
3'	6.65 (d, 8.5)		6.93 (s)	6.91 (d, 2.0)
5'	6.65 (d, 8.5)	6.74 (d, 8.0)	6.93 (s)	6.74 (dd, 8.0, 2.0)
6'	6.95 (d, 8.5)	6.75 (dd, 8.0, 2.0)	6.93 (s)	6.74 (d, 8.0)
glucosyl				
1''	4.35 (d, 8.0)	4.77 (d, 7.8)	4.84 (d, 7.3)	4.77 (d, 6.1)
2''	3.22 (t, 8.0)			
3''	3.34-3.42 (2H, m)	3.34-3.70 (4H, m)	3.35-3.56 (4H, m)	3.45-3.56 (4H, m)
4''				
5''	3.62 (m)			
6''	4.38 (dd, 11.7, 6.8)	4.43 (dd, 12.0, 6.0)	4.42 (dd, 12.0, 7.8)	4.48 (dd, 11.9, 6.7)
	4.67 (dd, 11.7, 2.2)	4.72 (dd, 12.0, 2.2)	4.71 (dd, 12.0, 2.2)	4.72 (dd, 11.9, 2.1)
galloyl				
2''', 6'''	7.32 (2H, brs)	7.34 (2H, brs)	7.34 (2H, brs)	7.34 (2H, brs)
OCH ₃	3.78 (6H, s)	3.86 (6H, s)	3.85 (6H, s)	3.86 (6H, s)

The values in parentheses represent the coupling constants in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

The spectral data for **5**–**7** were measured at 400 MHz and those for **8** were taken at 500 MHz.

Table 5. ¹³C-NMR Spectral Data for Compounds **5**–**8** (in MeOH-*d*₄)

¹³ C	5	6	7	8	¹³ C	5	6	7	8
aglycone					galloyl				
1	72.4	70.1	64.2	64.1	1'''	121.2	121.2	121.3	121.2
2	36.5	36.3	39.4	39.2	2''', 6'''	108.3	108.5	108.6	108.5
1'	130.5	132.2	157.4	132.1	3''', 5'''	150.0	148.9	149.0	148.9
2'	130.8	119.9	117.8	119.9	4'''	142.3	142.2	142.3	142.2
3'	116.1	146.4	130.7	146.3	OCH ₃	56.8	57.0	57.0	57.0
4'	156.8	146.9	157.4	146.8	COO	168.0	167.9	167.8	167.9
5'	116.1	118.0	130.7	117.0					
6'	130.8	125.8	117.8	125.5					
glucosyl									
1''	104.6	104.5	102.5	104.5					
2''	75.1	75.8	75.5	75.8					
3''	78.0	77.4	77.9	77.4					
4''	72.2	71.9	72.2	71.9					
5''	75.4	74.8	74.9	74.8					
6''	65.3	65.1	65.2	65.1					

The δ values are in ppm downfield from TMS.

The spectral data for **5**–**7** were measured at 100 MHz and those for **8** were taken at 125 MHz

第 10 節 ラット肺胞細胞を用いた LTC₄遊離抑制活性⁷⁻⁹⁾

得られた化合物について、ラット肺の細胞を用いた LTC₄ 遊離抑制活性試験を行った。その結果アビエタン型ジテルペン **1**, **9**, **10** 及び **15** (rosmarinic acid), フラボン類 (**17**, **18**) にポジティブコントロールとして用いたケトチフェン (Fig. 29) より高い活性が認められた。(Table 6)

Table 6. Inhibitory Effects of the Isolated Compounds on the Release of LTC₄

Compound	IC ₅₀ (μM)	Compound	IC ₅₀ (μM)
1	42.9	13	>100
2	>100	14	92.5
3	>100	15	13.6
4	>100	16	^a
5	>100	17	39.9
6	>100	18	76.0
7	>100	19	^b
8	>100	20	^b
9	39.9	21	^b
10	23.3	22	^a
11	>100	ketotifen	46.8
12	>100		

^a not tested

^b cytotoxicity at 50 μM

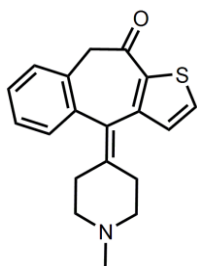


Fig. 29. Structure of ketotifen

第2章 光刺兔唇花 *Lagochilus leiacanthus* (Labiatae) の成分研究

第1節 化合物の分離・精製

光刺兔唇花 *Lagochilus leiacanthus* の乾燥した全草 1.0 kg を粉碎後、超音波条件下エタノール (32 L) にて抽出し、EtOH 抽出物を得た。それを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーで分画後、シリカゲルカラム、HPLC 等により分離・精製 (Chart 2) することにより、新規フラバノン (23, 24)、フラバノン配糖体 (25, 26)、ネオクロロダン型ジテルペン (27) と共に scupolin I (28),⁴²⁾ 2',5-dihydroxy-6',7,8-trimethoxyflavanone (29),⁴³⁾ 2',5-dihydroxy-6,6',7,8-tetramethoxyflavanone (30),⁴⁴⁾ pinocembrin (31),⁴⁵⁾ oroxylin A (32),⁴⁶⁾ chrysin (33),⁴⁷⁾ 5,6-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone (34),⁴⁸⁾ 4',5,6-trihydroxy-7-methoxyflavone (35),⁴⁹⁾ apigenin (36), hispidulin (37),⁵⁰⁾ 2',5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (38),⁵¹⁾ skullcapflavone I (39),⁵²⁾ 5,8-dihydroxy-2',7-dimethoxyflavone (40),⁵³⁾ 2',5,6'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (41),⁵⁴⁾ 2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone (42),⁵⁵⁾ 2',5,6-trihydroxy-6',7,8-trimethoxyflavone (43),⁵⁶⁾ neobaicalein (44),⁵⁷⁾ rivularin (45),⁵⁸⁾ oleanolic acid (46), ursolic acid (47), vanillin (48), *p*-hydroxyacetophenone (49), acetovanillone (50), dihydroxyskullcapflavanone I (51),⁵⁹⁾ wogonin (52),⁶⁰⁾ liquiritin (53),⁶¹⁾ viscidulin II 2'-*O*-glucoside (54),⁶²⁾ 及び 2',5,6'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone 2'-*O*-glucoside (55)⁶³⁾ を単離した。(Fig. 30)

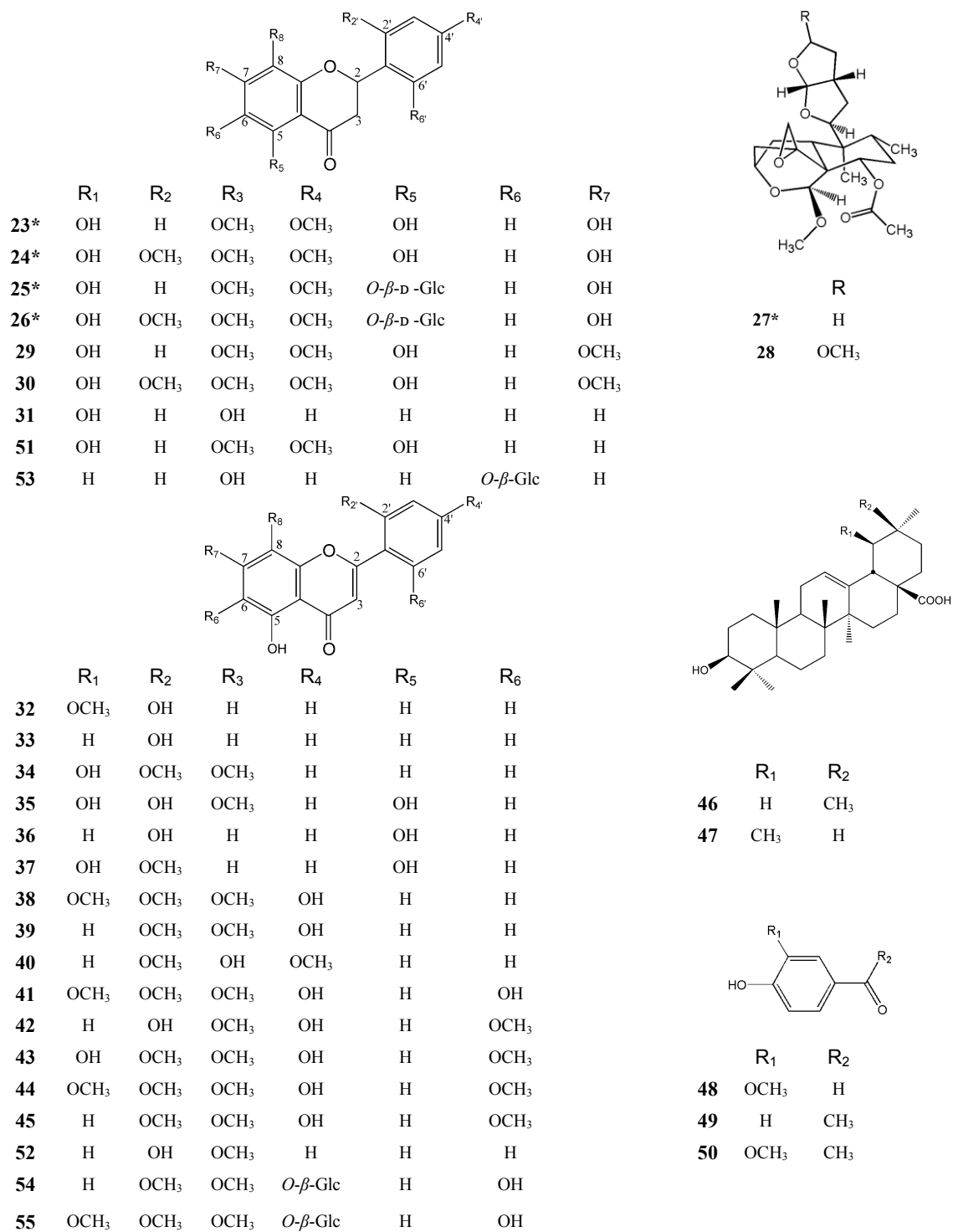


Fig. 27. Structures of Compounds 23—55

Glc. glucosyl, * new compound

Whole Plant of *Lagochilus leiocanthus* (1.0 kg)

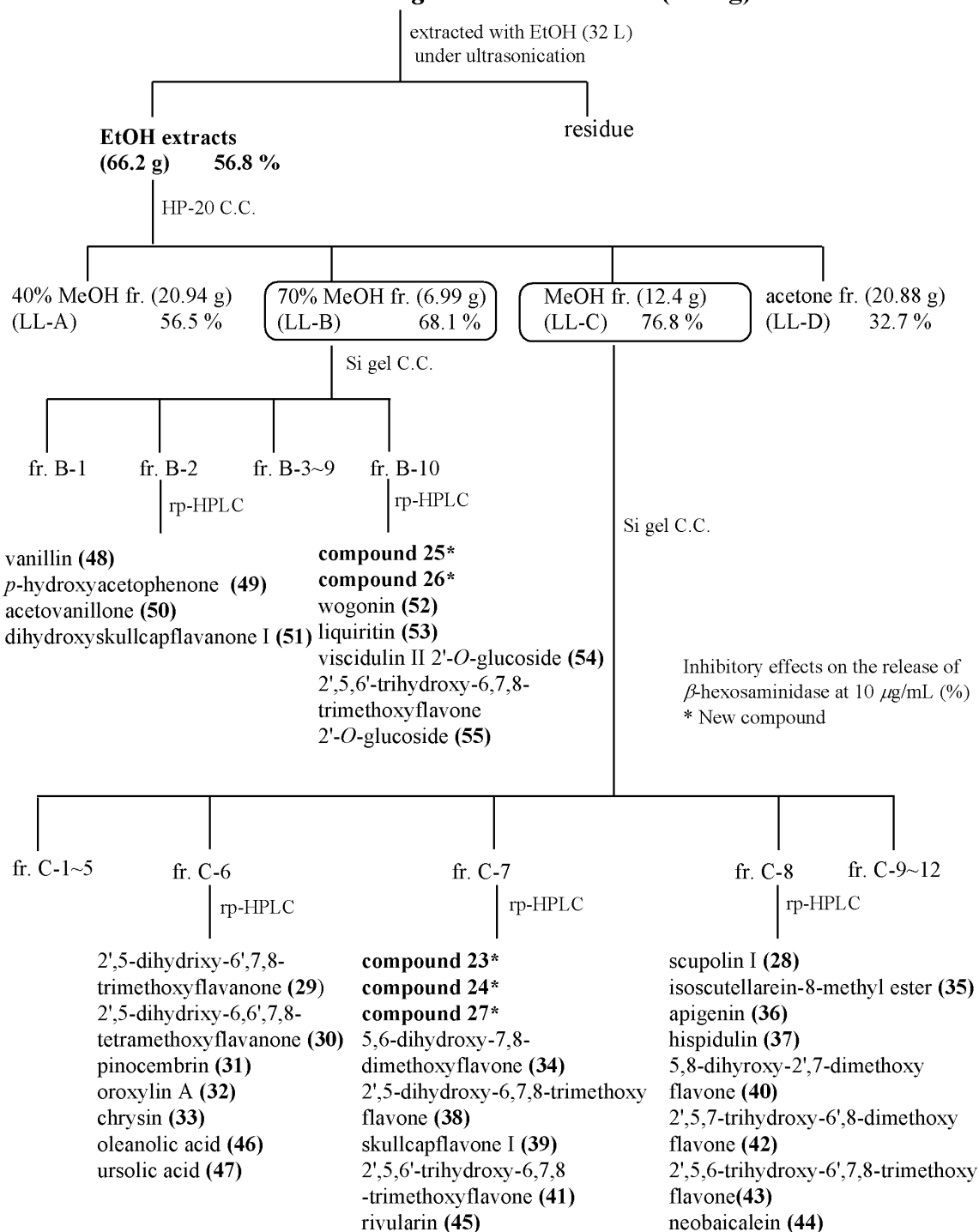


Chart 2

第2節 化合物 23 の化学構造

化合物 **23** は黄色非晶質物質, $[\alpha]_D^{25}$ 0 (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいて 224 nm, 288 nm 及び 346 nm に極大吸収が, IRスペクトルにおいて 3186, 1641, 1603 cm^{-1} に極大吸収が認められたことからベンゼン環とカルボニルの存在を推定した. EI-MSでは m/z 332 $[\text{M}]^+$, HR-EI-MSは m/z 332.0899 (calcd 332.0896 for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$ と推定した.

$^1\text{H-NMR}$ 及び COSY スペクトルからオキシメチン δ 5.91 (1H, dd, $J=10.5, 3.1$ Hz, H-2)–メチレン [δ 2.55 (1H, dd, $J=13.2, 10.5$ Hz), δ 3.99 (1H, dd, $J=13.2, 3.1$ Hz), H-3] の部分構造の他に, 2個のメトキシプロトン δ 3.56 (3H, s), δ 3.85 (3H, s), 芳香環に由来するプロトン δ 6.21 (1H, s, H-6), 1,2,3-三置換ベンゼン δ 6.38 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3', H-5'), δ 7.01 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-4'), キレート水酸基 δ 12.15 (1H, s, 5-OH), 等価の2個の水酸基 δ 9.74 (2H, s, H-2', H-6') の存在が推察された. $^{13}\text{C-NMR}$ から2個のメトキシ δ 56.3, δ 60.4, メチレン δ 39.4 (C-3), オキシメチン δ 72.0 (C-2), カルボニル δ 198.3 (C-4) 及び2個のベンゼン環を含む12個の sp^2 四級炭素 δ 92.6, (C-6), δ 102.3 (C-10), δ 107.0 (C-1'), δ 110.4 \times 2 (C-3', C-5'), δ 129.0 (C-8), δ 130.2 (C-4'), δ 157.5 \times 3 (C-9, C-2', C-6'), δ 159.2 \times 2 (C-5, C-7) の存在が推察された. これらのスペクトルデータより **23** はフラバノンと推察した.

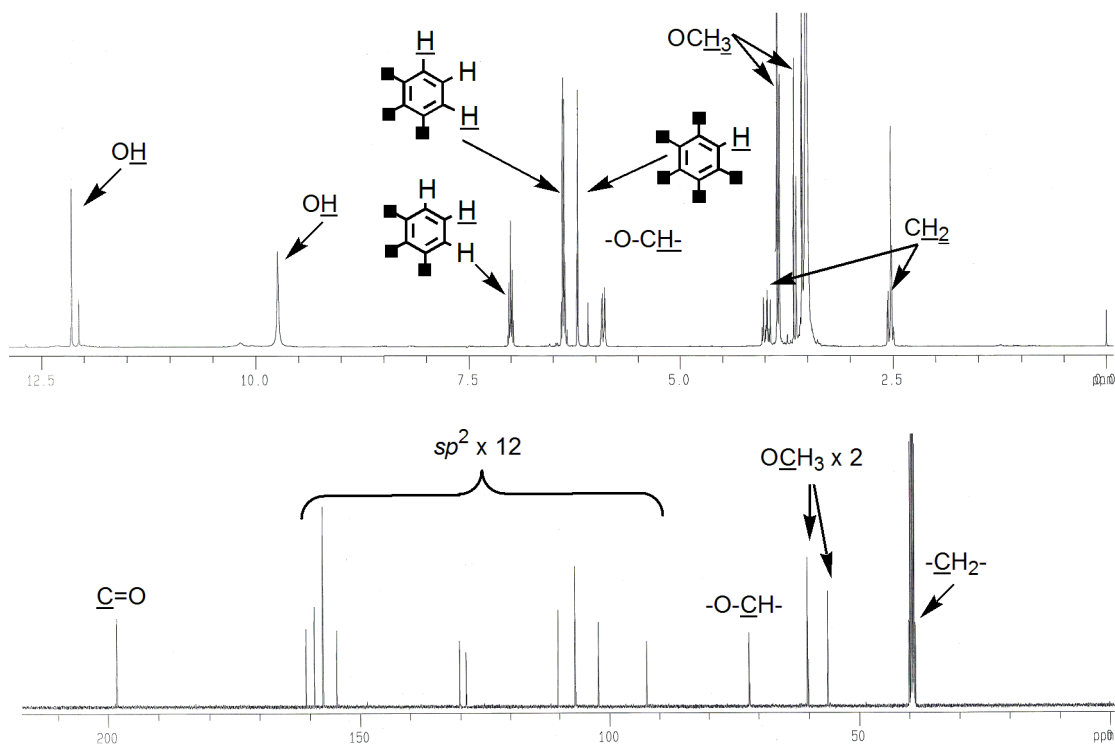


Fig. 31. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **23** ($\text{DMSO-}d_6$)

フラバノンの置換様式を検討するため, HMBC スペクトルを測定したところ, Fig.32 に示

すようにオキシメチンプロトン H-2 から C-4, C-1', C-2'及び C-6'に相関が認められたことから, 三置換ベンゼンが C-2 に結合していることが判明した. 低磁場にシフトした水酸基のプロトンシグナル δ 12.15 は, カルボニル基と水素結合していると考えられたことから C-5 の水酸基であると決定した. さらに, この水酸基のプロトンシグナルは, C-6, C-10 と相関が認められた. また, C-7 と C-8 のメトキシ基については HMBC 及び NOESY の相関により決定した. したがって, **23** は 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone であると決定した.

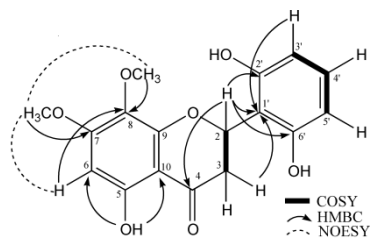


Fig. 32. Key COSY, HMBC and NOESY Correlations of **23**

第3節 化合物 24 の化学構造

化合物 **24** は黄色非晶質物質, $[\alpha]_D^{25}$ 0 (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中215 nm, 288 nm及び362 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3168, 1643 cm^{-1} に極大吸収が認められたことからフラバノン系を推定した. EI-MSでは m/z 362 $[\text{M}]^+$, HR-EI-MSは m/z 362.1003 (calcd 362.1002 for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$ と推定した.

^1H -及び ^{13}C -NMR スペクトルを **23** のスペクトルと比較すると非常に良く似ており, 芳香環上のプロトンの代わりにメトキシ基が導入された化合物であることが判った.

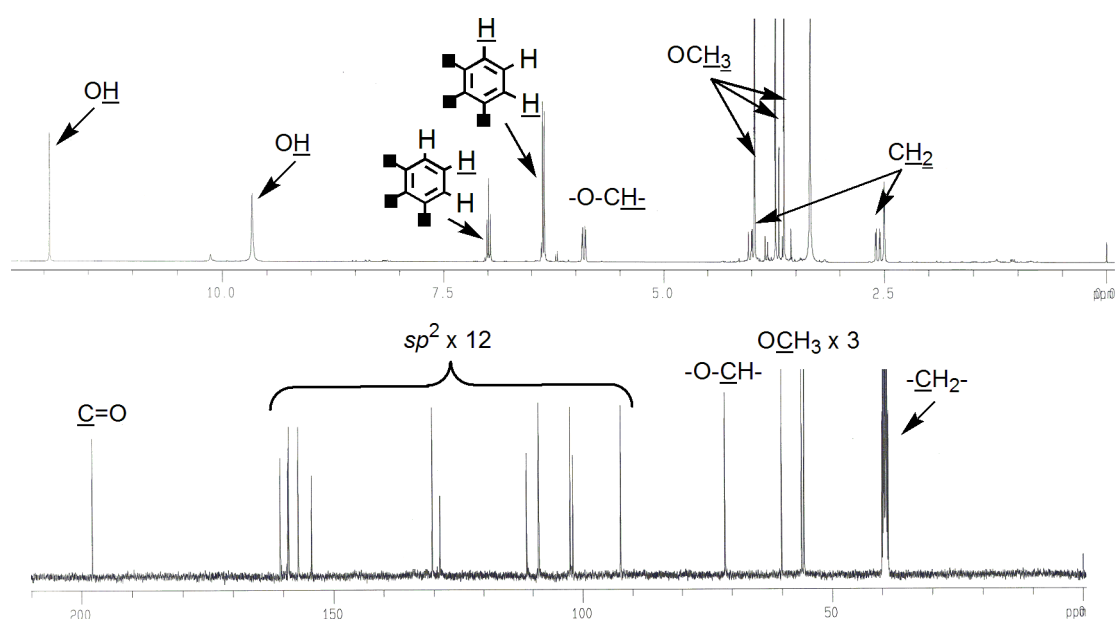


Fig. 33. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **24** ($\text{DMSO}-d_6$)

そこでHMBCスペクトルを測定したところ, C-6シグナルとメトキシプロトンシグナルとの間に相関が認められたこと及びNOESYスペクトルにおいて3個のメトキシプロトンシグナルと相互にNOESY相関がみられたことから, **24** を 2',5,6'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavanone と決定した. (Fig. 34)

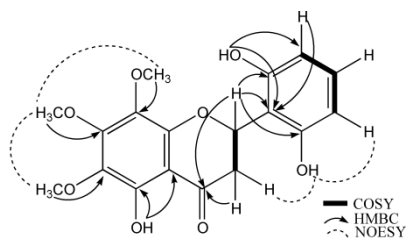


Fig. 34. Key COSY, HMBC and NOESY Correlations of **24**

第4節 化合物 25 の化学構造

化合物 **25** は淡黄色非晶質物質, $[\alpha]_D^{25} +4.8$ (MeOH) として得られた。として得られ,を示した。UVスペクトルにおいてメタノール中286 nm及び344 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3405, 1636 cm^{-1} に極大吸収が認められたことからフラバノンと推定した。FAB-MSでは m/z 493 [M-H]⁻, HR-FAB-MSは m/z 493.1349 (calcd 493.1345 for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$ と推定した。

^1H -及び ^{13}C -NMR スペクトルから, **25** は **23** の配糖体であると推察した。(Fig. 35)

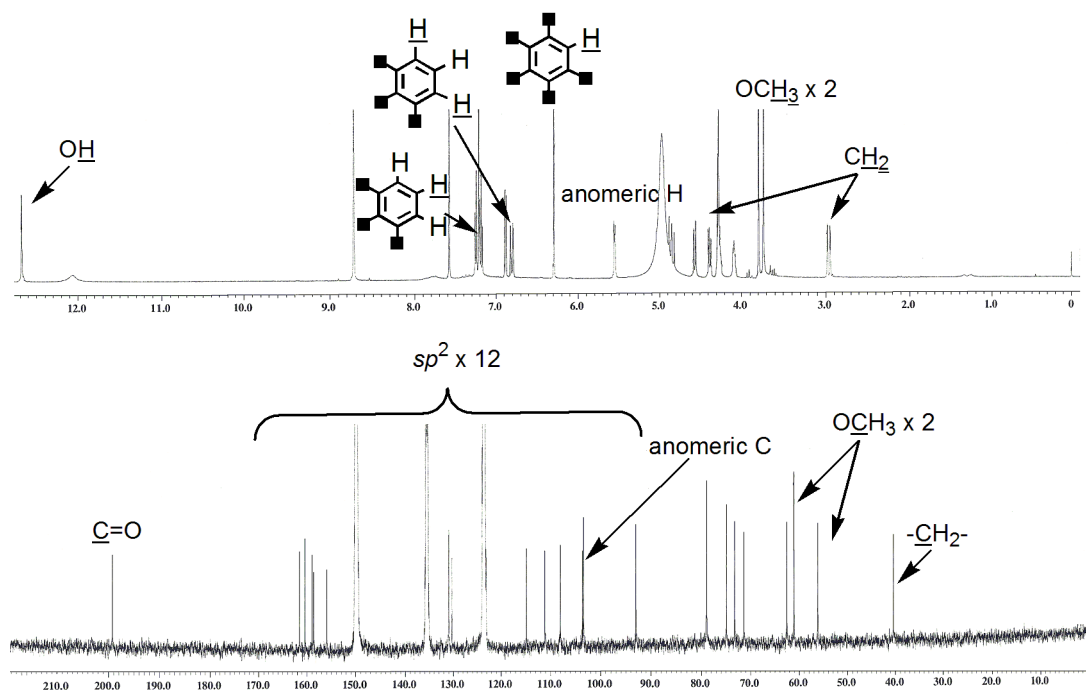


Fig. 35. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **25** (pyridine- d_5)

25 の糖絶対配置を決定するため, 酸加水分解を行い TLC 及び GC 法⁴¹⁾ を用いて β -D-glucose であると決定した。糖の結合位置を決定するため, 各種二次元 NMR スペクトルを解析した結果, アノメリックプロトン H-1' から C-2' に HMBC 相関が認められたこと, 及びアノメリックプロトンと H-3' に NOESY 相関が認められたことから **25** は Fig. 36 に示す 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone 2'-O- β -D-glucoside であると決定した。

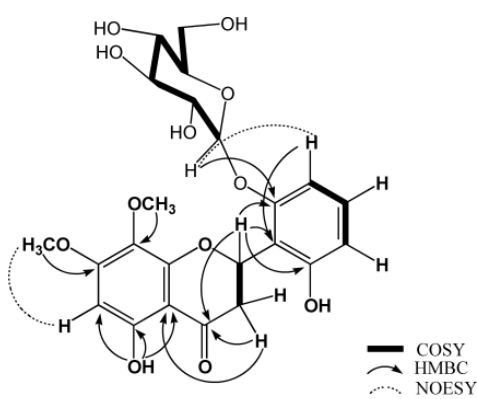


Fig. 36. Key COSY, HMBC and NOESY Correlations of **25**

第5節 化合物 26 の化学構造

化合物 **26** は淡黄色非晶質物質, $[\alpha]_D^{25} +2.4$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中284 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3366, 1630 cm^{-1} に極大吸収が認められたことからフラバノンと推定した. FAB-MSでは m/z 523 $[\text{M}-\text{H}]^-$, HR-FAB-MSは m/z 523.1450 (calcd 523.1451 for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{13}$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{13}$ と推定した.

^1H - 及び ^{13}C -NMR スペクトルから **26** は **24** の配糖体であると推察した. (Fig. 37)

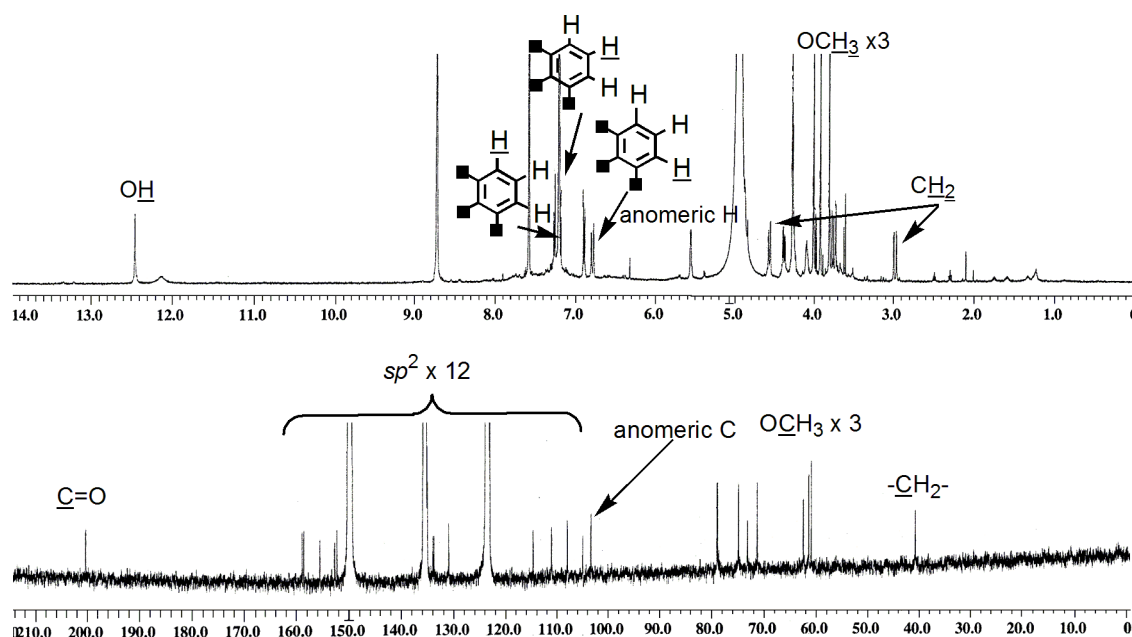


Fig. 37. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **26** (pyridine- d_5)

そこでHMBC及びNOESYスペクトルを測定したところ, Fig. 38に示す相関が認められた. また, 糖の絶対配置を決定するために, **25** と同様の方法⁴¹⁾で検討した結果, β -D-glucoseであった.

以上の結果から, **26** は 2',5,6'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavanone 2'-O- β -D-glucoside であると決定した.

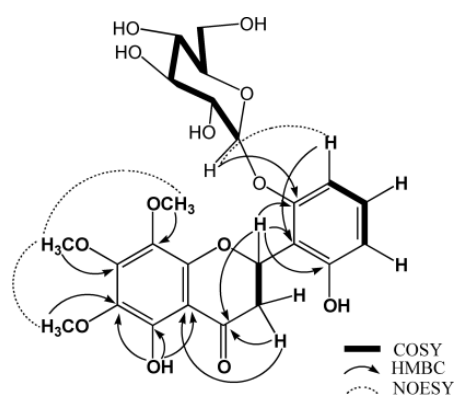


Fig. 38. Key COSY, HMBC and NOESY Correlations of **26**

Table 7. ¹H- and ¹³C-NMR Spectral Data for Compounds 23–26

position	23		24		25		26	
	(DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)		(DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)		(pyridine- <i>d</i> ₅ , 500 MHz)		(pyridine- <i>d</i> ₅ , 500 MHz)	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
2	5.91 (dd, 10.5, 3.1)	72.0	5.90 (dd, 10.5, 3.1)	71.9	6.80 (dd, 14.1, 3.0)	73.2	6.79 (dd, 14.2, 2.7)	73.2
3	2.55 (dd, 13.2, 10.5)	39.4	2.58 (dd, 13.2, 10.5)	39.6	2.96 (dd, 17.2, 3.0)	40.4	2.98 (dd, 17.0, 2.7)	40.4
	3.99 (dd, 13.2, 3.1)		4.00 (dd, 13.2, 3.1)		4.85 (dd, 17.2, 14.1)		4.88 (dd, 17.0, 14.2)	
4		198.3		199.3		199.2		200.2
5		159.2		150.9		160.4		152.3
6	6.21 (s)	92.6		133.0	6.30 (s)	93.0		134.0
7		159.2		154.6		161.6		161.6
8		129.0		132.5		130.3		130.3
9		157.5		151.5		155.9		152.7
10		102.3		103.8		103.6		105.0
1'		107.0		110.1		114.8		114.7
2'		157.5		157.4		158.6		158.6
3'	6.38 (d, 8.0)	110.4	6.36 (d, 8.0)	106.9	7.25 (d, 8.0)	108.0	7.26 (d, 8.0)	108.0
4'	7.01 (t, 8.0)	130.2	6.99 (t, 8.0)	130.1	7.18 (t, 8.0)	130.9	7.19 (t, 8.0)	131.0
5'	6.38 (d, 8.0)	110.4	6.36 (d, 8.0)	106.9	6.88 (d, 8.0)	111.1	6.89 (d, 8.0)	111.1
6'		157.5		157.4		158.9		159.0
5-OH	12.15 (s)		11.93 (s)		12.68 (s)		12.45 (s)	
2'-OH	9.74 (s)		9.68 (s)					
6'-OH	9.74 (s)		9.68 (s)					
OCH ₃	3.85 (3H, s)	56.3	3.73 (3H, s)	60.8	3.73 (3H, s)	56.1	3.29 (3H, s)	61.0
	3.56 (3H, s)	60.4	3.96 (3H, s)	61.1	3.79 (3H, s)	61.0	4.01 (3H, s)	61.4
			3.63 (3H, s)	60.0			3.81 (3H,s)	61.5
glucosyl								
1''					5.55 (d, 7)	103.4	5.56 (d, 7)	103.4
2''					} 4.10 – 4.27 (4H, m)	74.8	} 4.10 – 4.26 (4H, m)	74.8
3''				78.8		78.8		
4''				71.3		71.3		
5''						78.8		78.9
6''					4.37 (dd, 11.9, 5.4)	62.5	4.39 (dd, 11.9, 5.4)	62.5
					4.56 (dd, 11.9, 2.3)		4.56 (dd, 11.9, 2.3)	

The values in parentheses represent the coupling constants (*J*) in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

第6節 化合物 27 の化学構造

化合物 **27** は無色非晶質物質, $[\alpha]_D^{25} +95.2$ (MeOH) として得られた. IRスペクトルにおいて 1730 cm^{-1} に極大吸収が認められた. EI-MSでは $m/z\ 390\ [M]^+$, HR-EI MSは $m/z\ 390.2035$ (calcd 390.2042 for $C_{22}H_{30}O_6$) に分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $C_{22}H_{30}O_6$ と推定した.

各種スペクトルデータから2個の四級のメチル, 三級のメチル, 7個のメチレン, 8個のメチン, メトキシ基, アセトキシ基, 3個の四級炭素の存在が明らかになった. (Fig. 38)

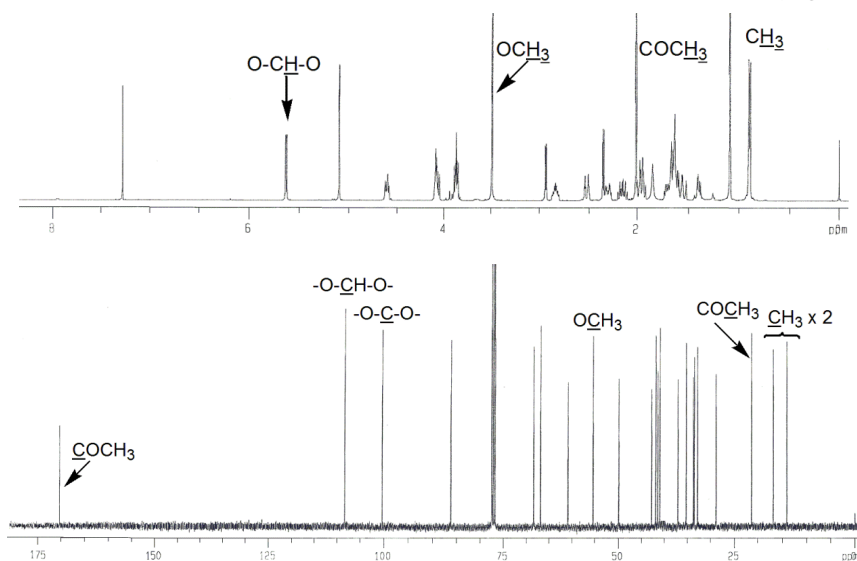


Fig. 39. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **27** (in CDCl_3)

HMQC 及び HMBC スペクトルから, **5** はネオクロロダン型のジテルペンであると推定した. Fig. 40 に示すような COSY と HMBC の相関が認められた. **27** のスペクトルデータを既知ネオクロロダン型ジテルペン化合物 scupolin I (**28**) のそれらと比較すると C-15 のメトキシ基がないことを除き, 非常によく似ていた. (Table 8) NOESY スペクトルより相対配置を Fig. 41 に示す配置であると決定した. 以上より, **27** を Fig. 40 に示す構造であると決定した.

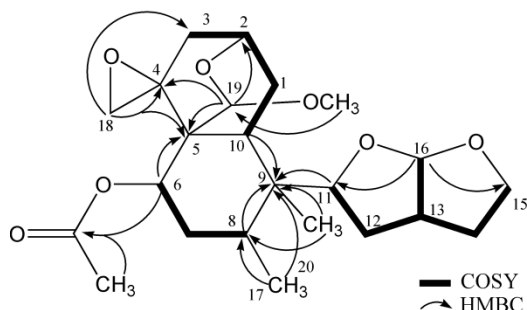


Fig. 40. Key COSY and HMBC Correlations of **27**

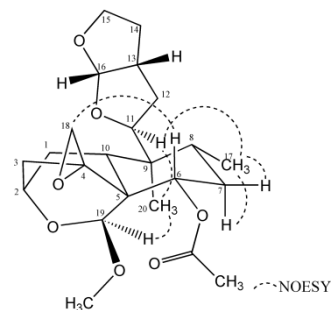


Fig. 41. Key NOESY Correlations of **27**

Table 8. ¹H- and ¹³C-NMR Spectral Data for Compounds **27** (600 MHz, in CDCl₃) and **28**

Position	27		28 (scupolin I)	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	1.52–1.66 ^a	28.8	1.52–1.66 ^c	28.9
	1.93–2.00 ^b		1.90–2.00 ^d	
2	4.08 (m)	66.8	4.10 (m)	66.7
3	1.52–1.66 ^a	37.0	1.52–1.66 ^c	37.0
	2.30 (m)		2.29 (m)	
4		60.8		60.7
5		42.7		42.6
6	4.60 (dd, 10.9, 4.1)	68.3	4.62 (dd, 11.0, 4.4)	68.3
7	1.40 (m)	33.6	1.40 (m)	33.5
	1.52–1.66 ^a		1.52–1.66 ^c	
8	1.52–1.66 ^a	35.2	1.52–1.66 ^c	35.3
9		41.5		41.0
10	2.53 (dd, 14.0, 2.7)	40.9	2.53 (dd, 14.1, 2.8)	40.9
11	4.06 (dd, 10.1, 5.3)	86.1	4.29 (dd, 10.7, 5.9)	84.2
12	1.52–1.66 ^a	33.4	1.52–1.66 ^c	33.5
	1.93–2.00 ^b		1.90–2.00 ^d	
13	2.84 (m)	41.9	2.77 (m)	42.0
14	1.52–1.66 ^a	32.7	1.52–1.66 ^c	39.5
15	3.86 (2H, m)	68.2	4.97 (d, 5.6)	104.4
16	5.63 (d, 5.1)	108.3	5.67 (d, 5.4)	109.7
17	0.90 (3H, d, 6.0)	16.8	0.84 (3H, d, 6.4)	16.7
18	2.35 (d, 4.6)	49.9	2.37 (d, 4.4)	49.8
	2.93 (d, 4.6)		2.95 (d, 4.4)	
19	5.10 (s)	100.3	5.11 (s)	100.3
20	1.09 (3H, s)	14.0	1.07 (3H, s)	13.9
<u>COCH</u> ₃		170.4		170.4
<u>COCH</u> ₃	2.01 (3H, s)	21.3	2.02 (3H, s)	21.2
<u>OCH</u> ₃ -15			3.33 (3H, s)	54.5
<u>OCH</u> ₃ -19	3.49 (3H, s)	55.3	3.49 (3H, s)	55.2

The values in parentheses represent the coupling constants (*J*) in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

a, b, c, d were overlapped in each column.

第7節 *L.leiakanthus* から得られた化合物の β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性⁹⁻¹³⁾

得られた化合物について, RBL-2H3 細胞を用いた β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験を行った. その結果新規フラバノン **23, 24, 30** 及びフラボン **32, 37, 41, 42, 43** はケトチフェンより高い活性を示した. (Table 9)

Table 9. Inhibitory Effects of Isolated Compounds on the Release of β -hexosaminidase

No.	DNP-BSA		A23187+PMA		No.	DNP-BSA		A23187+PMA	
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
23	37.7	41.1	40	>50	>50				
24	44.5	33.8	41	28.8	16.8				
25	>50	>50	42	50.1	32.1				
26	>50	>50	43	26.5	24.3				
27	>50	>50	44	>50	>50				
28	>50	>50	45	>50	>50				
29	>50	>50	46	>50	>50				
30	42.3	35.3	47	>50	>50				
31	>50	>50	48	>50	>50				
32	25.6	48.9	49	>50	>50				
33	>50	>50	50	>50	>50				
34	>50	>50	51	>50	>50				
35	>50	>50	52	>50	>50				
36	>50	>50	53	>50	>50				
37	15.7	13.5	54	>50	>50				
38	>50	>50	55	>50	>50				
39	>50	>50	ketotifen	70	68				

All of the test samples did not exhibit the inhibition of β -hexosaminidase activity at 50 μ M.

第4章 唇香草 *Ziziphora clinopodioides* の成分研究

第1節 分離・精製

唇香草 *Ziziphora clinopodioides* の乾燥した全草 0.7 kg を粉砕後、超音波条件下 70% エタノール (2.5 L × 2) にて抽出し、70% EtOH 抽出物を得た。それを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーで分画後、シリカゲルカラム、HPLC 等により分離・精製することにより、新規モノテルペン配糖体 ziziphoroside A (**56**), ziziphoroside B (**57**), ziziphoroside C (**58**) と共に benzylalcohol glucoside (**59**),⁶⁴⁾ phenethylalcohol glucoside (**60**),⁶⁵⁾ shizonepetoside C (**61**),⁶⁵⁾ erigeside B (**62**),⁶⁶⁾ shizonepetoside A (**63**),⁶⁷⁾ piceine (**64**),⁶⁸⁾ 9-*O*-glucopyranosyl-*p*-menthan-3-one (**65**),⁶⁷⁾ apigenin (**66**), luteolin (**67**), diosmetin (**68**),⁶⁹⁾ ursolic acid (**69**), oleanolic acid (**70**), maslinic acid (**71**),⁷⁰⁾ ethyl caffeate (**72**), 及び benzoic acid (**73**) を単離した。(Chart 3)

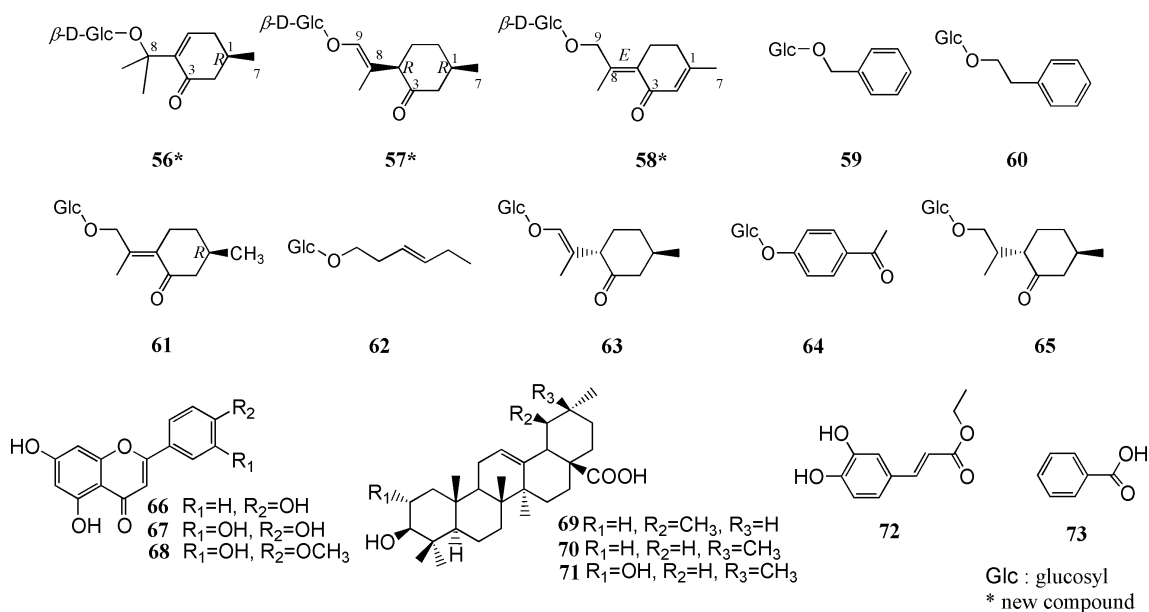


Fig. 42. Structures of Compounds 56—73

Whole Plant of *Ziziphora clinopodioides* (0.7 kg)

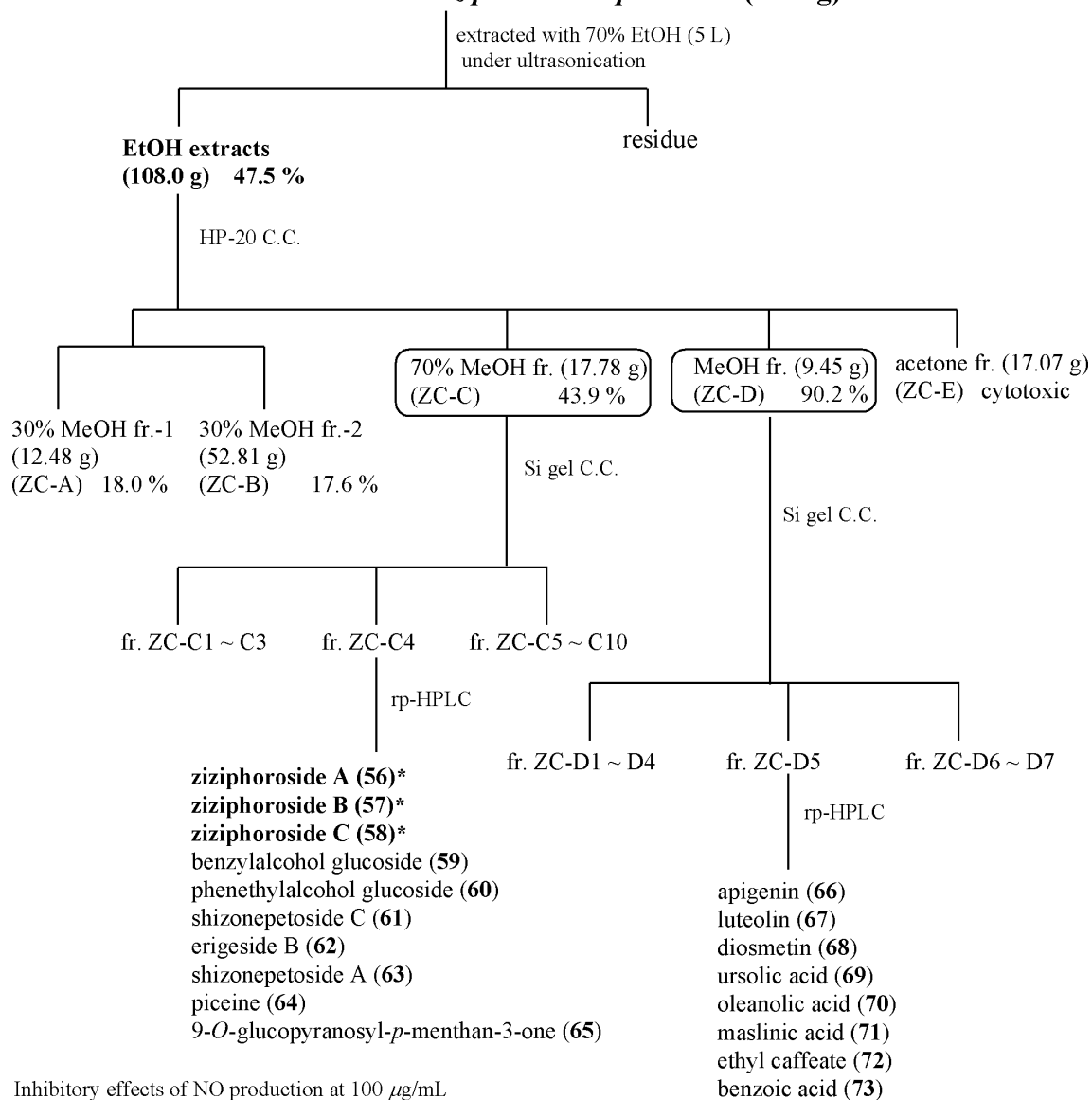


Chart 3

第2節 化合物 56 の化学構造

化合物 **56** は無色粉末, $[\alpha]_D^{25} -60.3$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中232 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3418, 1669 cm^{-1} に極大吸収が認められたことから, 水酸基とカルボニルの存在を推察した. FAB-MSでは m/z 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$, HR-FAB-MSは m/z 331.1757 (calcd for 331.1757 for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_7$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_7$ と推定した.

^1H -NMR 及び COSY スペクトルから2個の四級メチル基 δ 1.41 (H-10), δ 1.44 (each 3H, s, H-9), 三級メチル基 δ 0.98 (3H, d, $J = 5.7$ Hz, H-7), メチン-メチレン-メチン-メチレン [δ 7.39 (dd, $J = 5.7, 2.2$ Hz, H-5) – δ 2.03–2.19 (H-6 α), δ 2.46 (ddd, $J = 15.0, 5.7, 1.8$ Hz, H-6 β) – δ 2.03– δ 2.19 (H-1) – δ 2.33 (dd, $J = 12.0, 1.8$ Hz, H-2 α), δ 2.03–2.19 (H-2 β)] の部分構造, そしてアノメリックプロトン δ 4.31 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1') の存在が示唆された. ^{13}C -NMR 及び DEPT, HMQC から六単糖 δ 61.7 (C-6'), δ 70.5 (C-4'), δ 74.1 (C-2'), δ 76.7 (C-5'), δ 77.0 (C-3'), δ 97.6 (C-1'), ビニルメチン基 δ_{H} 7.29 (1H, dd, $J = 5.7, 2.2$ Hz, H-5), δ_{C} 147.1, (C-5) 及びカルボニル基 δ 200.1 (C-3) の存在を推定した.

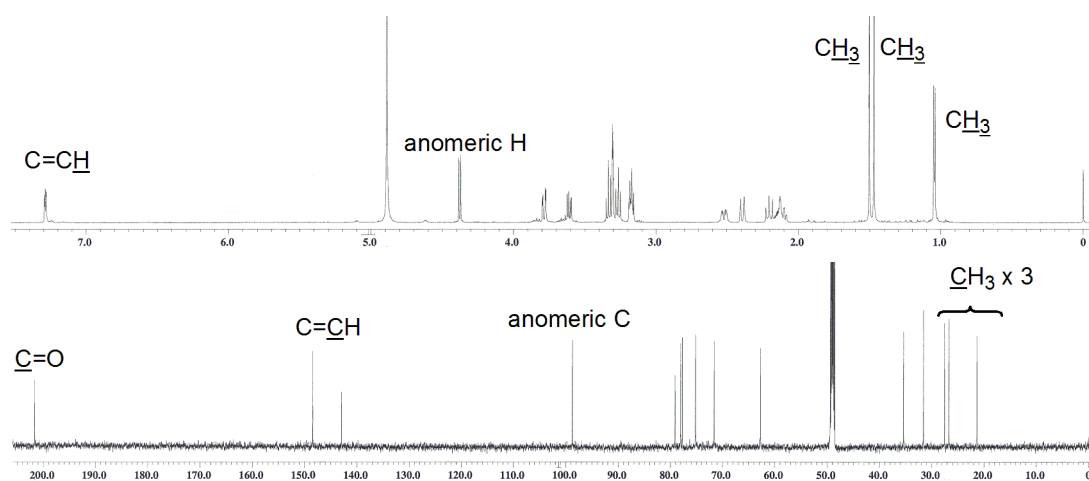


Fig. 43. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **56** (in $\text{MeOH}-d_4$)

HMBC スペクトルを解析した結果, Fig. 44 に示すように, CH_3 -7 から C-1, C-2 及び C-6 に, H-2 α, β から C-3 に, H-5 から C-3, C-4, C-8 に, CH_3 -9 から C-4 及び C-8 に, CH_3 -10 から C-4 及び C-8 に, そして H-1' から C-8 に相関がみられた. 結合する糖は酸加水分解して TLC 及び GC 法⁴¹⁾により, β -D-glucose であると決定した.

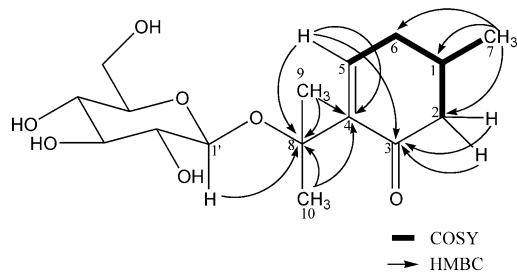


Fig. 44. Key COSY and HMBC Correlations of **56**

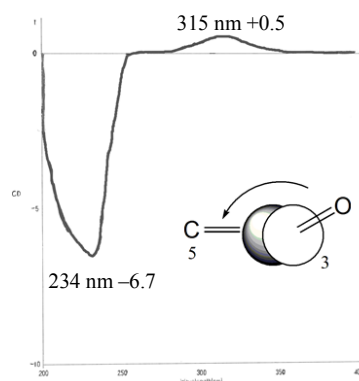


Fig. 45. CD Spectrum and Helicity of **56**

56 は構造中に共役するシクロヘキサンノン環を有することから、CD スペクトルによるエノンのヘリシティについて解析を試みた。**56** の CD スペクトル (Fig. 46) は $\Delta\epsilon_{315}$ にケトンの R 帯に基づく正のコットン効果、 $\Delta\epsilon_{234}$ に負のコットン効果を示した。トランソイドの α, β -不飽和ケトンのヘリシティ—則⁷¹⁾ において、Fig. 45 に示すようにカルボニル基と二重結合が左回りにねじれていることを示す。すなわち Fig. 46 に示す 1R 配置を取る構造と決定した。本化合物は、文献未記載の新規化合物であることから **56** を zizophoroside A と命名した。

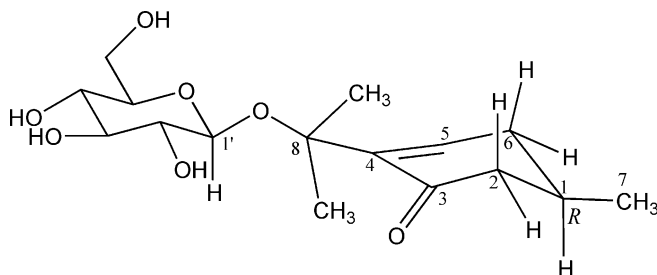


Fig. 46. Absolute structure of **56**

第3節 化合物 57 の化学構造

化合物 **57** は無色粉末, $[\alpha]_D^{25} +5.5$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中216 nm及び246 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3446, 1634 cm^{-1} に極大吸収が認められたことから, 水酸基とカルボニル基の存在を推察した. FAB-MSでは m/z 353 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MSは m/z 353.1577 (calcd for 353.1577 for $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{Na}$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$ と推定した.

^1H -, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC スペクトルは, **63** に非常によく似ていたがH-2 α のケミカルシフト δ 2.52 (dd, $J=13.5, 5.3$ Hz) が, **63** のそれは δ 2.11 (t, $J=13.5$ Hz) と異なっていた. このことから **57** は, ケトン, 二重結合を有するモノテルペン配糖体 **63** の C-1 の立体異性体であると推定した.

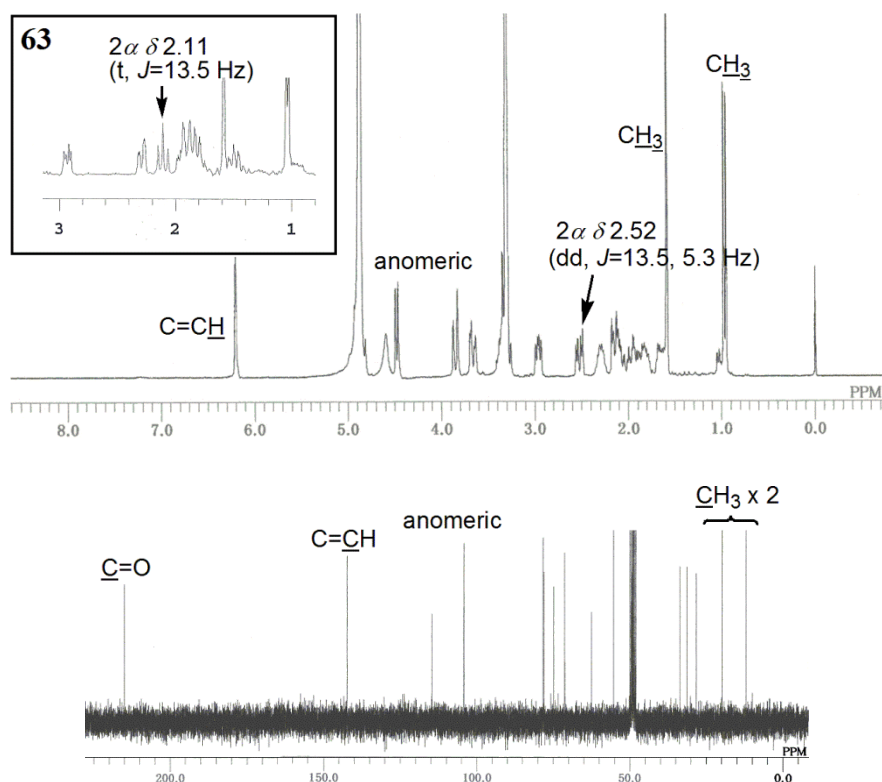


Fig. 47. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **57** (in MeOH- d_4)

そこで差 NOE スペクトルを測定した結果, δ 0.97 (H-7) を照射すると δ 2.15 (H-2 β), δ 2.08 (H-5 β), δ 1.67 (H-6 β) のシグナルに NOE が見られたことから **57** のシクロヘキサノン環は Fig. 49 に示すようにイス型配座をとった相対配置を決定した.

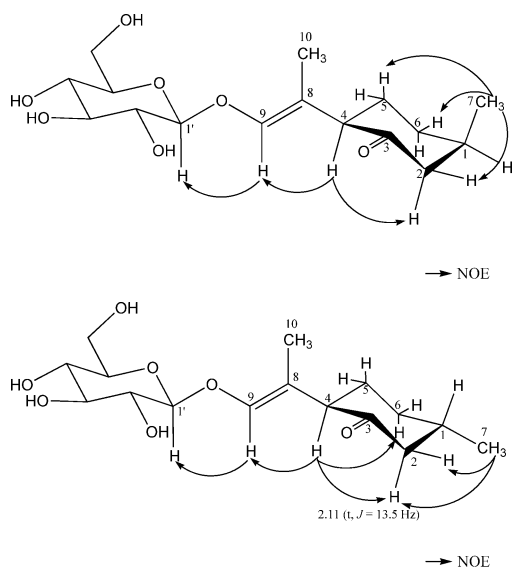


Fig. 48. NOEs of **57** and **63**

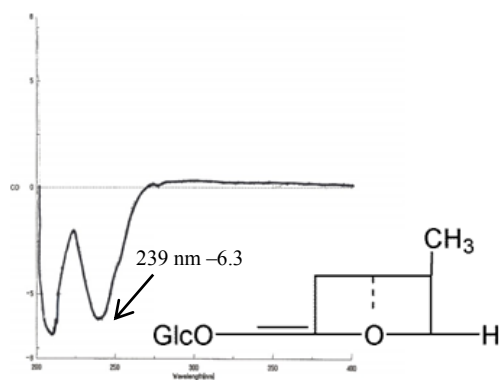


Fig. 49. CD Spectrum and Octant Projection of **57**

また、**57** は CD スペクトルのオクタント則の適用によりシクロヘキサノン環の絶対構造を決定できると考えた。**57** は、239 nm に負のコットン効果が認められ、この結果は 7-CH₃ は後方オクタントの右上に存在すると考えられる。(Fig. 49) 以上のことより、**57** のシクロヘキサノン環の配置を 1*R*, 4*R* と決定した。また、同様の方法で **63** の絶対構造を検討した結果 239 nm に負のコットン効果が認められたことから、**63** のシクロヘキサノン環の配置を 1*R*, 4*S* と決定した。

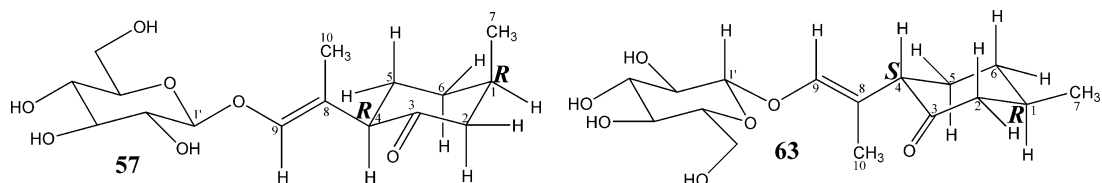


Fig. 50. Absolute structures of **57** and **63**

また、糖部については **56** と同様の方法⁴¹⁾ により β -D-glucose であると同一した。以上のことより **57** は Fig. 50 に表す構造であると決定し ziziphoroside B と命名した。

第4節 化合物 58 の化学構造

化合物 **58** は無色粉末, $[\alpha]_D^{25} -5.3$ (MeOH) として得られた. UVスペクトルにおいてメタノール中205 nm及び246 nmに極大吸収が認められ, IRスペクトルにおいて3429, 1652 cm^{-1} に極大吸収が認められた. FAB-MSでは m/z 329 $[\text{M}+\text{H}]^+$, HR-FAB-MSは m/z 329.1605 (calcd for 329.1600 for $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_7$) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式を $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_7$ と推定した.

^1H -NMR及びCOSYスペクトルから2個のビニルメチル基 δ 1.98 (3H, s, H-7), δ 2.08 (3H, s, H-10), 連続したメチレン-メチレン基 δ 2.40 (2H, t, $J=6.2$ Hz, H-6) – δ 2.77 (2H, m, H-5), オキシメチレン基 [δ 4.38 (d, $J=11.7$ Hz), δ 4.41 (d, $J=11.7$ Hz), H-9], ビニルプロトン δ 5.88 (1H, s, H-2) そしてアノメリックプロトン δ 4.24 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1') の存在が推定された. ^{13}C -NMRスペクトル及びDEPTでは2個のメチル炭素 δ 19.2 (C-10), δ 24.0 (C-7), 2個のメチレン炭素 δ 29.0 (C-5), δ 33.5 (C-6), オキシメチレン炭素 δ 70.0 (C-9), ビニル炭素 δ 129.1 (C-2), 3個の四級炭素 δ 134.4 (C-4), δ 141.7 (C-8), δ 164.8 (C-1), カルボニル炭素 δ 194.5 (C-3) 及び六単糖からなる16本のシグナルが観測された. これらのスペクトルデータと不飽和度から **58** はモノテルペン配糖体であると推定した.

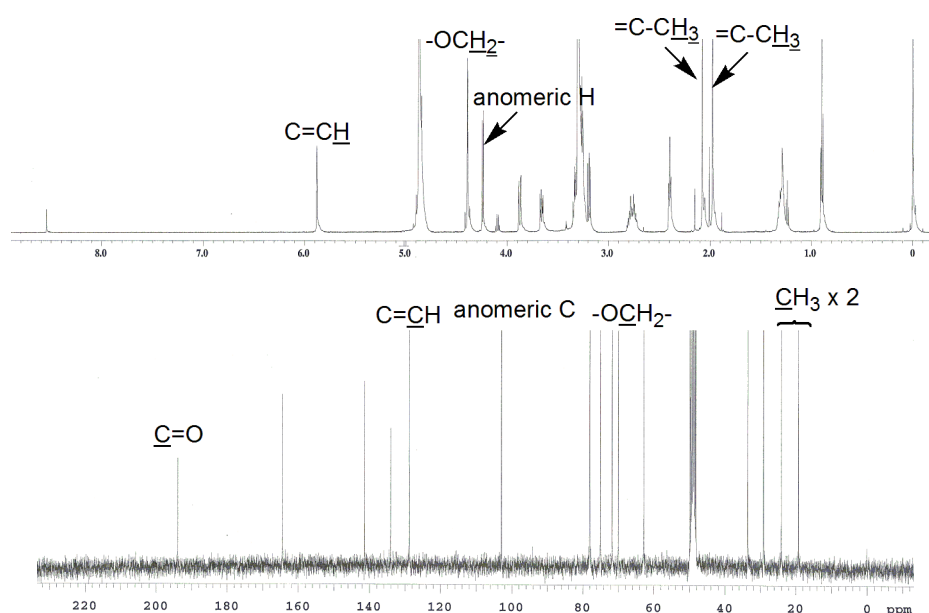


Fig. 51. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectra of **58** (in $\text{MeOH}-d_4$)

Fig. 52 に示すように, HMBC スペクトルにおいて, H-5 から C-1, C-3 及び C-4 に, H-6 から C-2 に, CH_3 -7 から C-1, C-2 及び C-6 に, CH_3 -10 から C-4, C-8 及び C-9 に, H-9 から C-1' に, H-1' から C-9 に相関が認められた. また差 NOE スペクトルでは δ 4.39 (H-9) を照射すると δ 2.77 (H-5) に NOE がみられたことから C-4—C-8 の二重結合は *E* 配置であると決定

した. 糖は **56** と同様の方法⁴¹⁾ を用いることにより, β -D-glucose であると同定した. 以上のことより **58** は Fig. 52 に示すメンタン型モノテルペン配糖体であると決定し ziziphoside C と命名した.

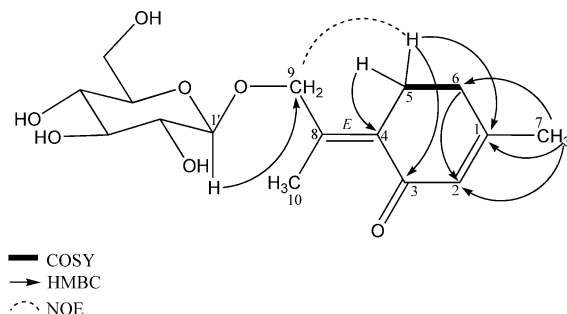


Fig. 52. Key COSY, HMBC and NOE Correlations of **58**

Table 10. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) and $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) Data for **56**, **57** and **58** (MeOH- d_4)

position	56		57		58	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	2.03—2.19 ^a	30.7	2.29 (m)	33.6		164.8
2	α 2.33 (dd, 12.0, 1.8) β 2.03—2.19 ^a	48.9	α 2.52 (dd, 13.5, 5.3) β 2.15 (d, 13.5)	49.1	5.88 (s)	129.1
3		200.1		214.4		194.5
4		141.6	2.96 (dd, 13.5, 5.3)	55.3		134.4
5	7.29 (dd, 5.7, 2.2)	147.1	α 1.83 (m) β 2.08 (m)	28.3	2.77 (2H, m)	29.0
6	α 2.03—2.19 ^a β 2.46 (ddd, 15.0, 5.7, 1.8)	34.5	α 1.93 (m) β 1.67 (m)	31.4	2.40 (2H, t, 6.2)	33.5
7	0.98 (3H, d, 5.7)	20.5	0.97 (3H, d, 6.9)	19.4	1.98 (3H, s)	24.0
8		78.1		114.5		141.7
9	1.44 (3H, s)	25.8	6.20 (s)	142.0	4.38 (1H, d, 11.7) 4.41 (1H, d, 11.7)	70.0
10	1.41 (3H, s)	26.7	1.59 (3H, s)	12.2	2.08 (3H, s)	19.2
Sugar moiety						
1'	4.31 (d, 7.5)	97.6	4.48 (d, 7.3)	104.0	4.24 (d, 7.8)	103.1
2'	} 3.08 - 3.28 (4H)	74.1	} 3.26-3.41 (4H)	74.7	} 3.30-3.89 (4H)	74.0
3'		77.0		77.8		77.0
4'		70.5		71.2		70.7
5'		76.7		78.1		77.1
6'	3.54 (dd, 12.0, 5.4) 3.72 (dd, 12.0, 2.1)	61.7	3.66 (dd, 12.0, 4.6) 3.85 (dd, 12.0, 2.1)	62.5	3.66 (dd, 12.0, 5.8) 3.89 (dd, 12.0, 1.7)	62.9

The values in parentheses represent the coupling constants in Hz. The δ values are in ppm downfield from TMS.

^a was overlapped.

第5節 *Z. clinopodioides* より得られた化合物の NO 産生抑制活性¹⁵⁻¹⁷⁾

得られた化合物 **56-73** について, RAW 264.7細胞をLPS及びIFN- γ を用いて刺激し, NO産生に対する抑制活性を検討した. その結果モノテルペン配糖体 **63** (IC₅₀ 26.6 μ M) 及びフラボン類 **66** (29.4 μ M), **67** (37.9 μ M), **68** (31.8 μ M) に活性がみとめられた. しかしその活性はポジティブコントロールとして用いたaminoguanidine (17.5 μ M) より低いものであった. (Fig. 54, 55)

63 が比較的高い活性を示したのに対して, その異性体である **57** はほとんど活性を示さなかったことから, C-4位の立体配置が活性発現に重要な役割を果たしているものと思われる.

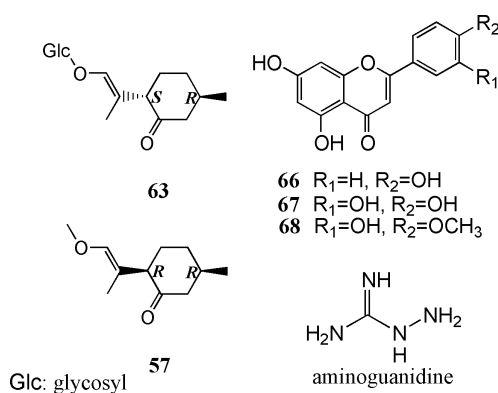


Fig. 54. Structures of Compound **57**, **63**, **66**, **67**, **68** and aminoguanidine

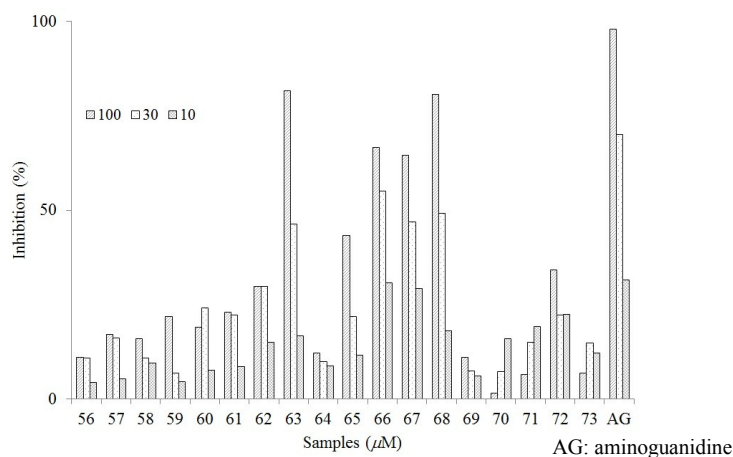


Fig. 55. Inhibitory Effects of Compounds on NO Production

結論

新疆産の薬用植物について抗アレルギー・抗炎症活性を指標としたスクリーニングを行った結果、3種のシソ科薬用植物に活性が認められたためこれらの植物について成分探索を進めた。

その結果、神香草 *H. cuspidatus* からは新規アビエタン型ジテルペン (1), エレモフィラン型セスキテルペン (2), ピナン型モノテルペン (3), メンタン型モノテルペン (4), フェニルエタノイド配糖体 (5—8) と共に既知化合物を含め 22 種の化合物を単離し、構造を明らかにした。2, 4 については新 Mosher 法を適用することにより、絶対構造を決定することができた。今回構造を明らかにした 22 種の化合物は *H. cuspidatus* より初めて単離された化合物である。

単離した化合物について Wistar 系ラット肺胞細胞を用いて LTC₄ 遊離抑制活性を検討した結果、アビエタン型ジテルペン 1, 9 及び 10 に活性が認められたことから、これらの化合物は I 型アレルギー反応を抑制すると考えられる。また本植物の主要成分である ursolic acid (19, 6.1 g, 7.5 %) については、*in vitro* 及び *in vivo* での抗炎症作用⁷²⁻⁷⁴⁾ などの薬理効果がすでに報告されていることから、本植物の抗炎症作用に大きく寄与しているものと推察される。

光刺兔唇花 *L. leiacanthus* からは新規フラバノン (23, 24), 及びそれらの配糖体 (25, 26), 新規アビエタン型ジテルペン (27) と共に既知化合物を含め 33 種の化合物を単離し、構造決定した。今回報告した 33 種の化合物は *L. leiacanthus* より初めて単離された化合物である。また、これらの化合物について β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性を検討した結果、フラバノン 23, 24, 30 よびフラボン 32, 37, 41, 42, 43 高い活性が認められた事から、肥満細胞の脱顆粒を抑制することが推定された。一方、活性が認められたフラバノン 23, 24 の配糖体 25, 26 は活性が見られなかった。活性を示した化合物は、DNP-BSA あるいは、A23187 と PMA 刺激のどちらの試験においても抑制が認められたことから、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇に対して抑制に働くか、抗原抗体反応の抑制と細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇の両方を抑制することで脱顆粒を抑制していると考えられ、今後さらなる検討が必要である。

唇香草 *Z. clinopodioides* の成分研究では、新規モノテルペン配糖体 ziziphoroside A (56), ziziphoroside B (57), ziziphoroside C (58) を含む 18 種の化合物を単離・同定した。新規化合物 56, 57 については CD スペクトルを利用して絶対構造を決定した。59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 68, 71, 72, 73 は唇香草より初めて単離された化合物である。

唇香草より化合物について NO 産生抑制活性を検討した結果、モノテルペン配糖体 63 とフラボン 66, 67 及び 68 に高い活性が認められた。これらの化合物の IC₅₀ 値はポジティブコントロールとして用いた aminoguanidine と比較すると低い活性であった。

本研究は、新疆ウイグル自治区の薬用植物について成分研究を行い、新規化合物の構造決定を行うとともに、多数の化合物を単離同定した。*H. cuspidatus* と *L. leiacanthus* からは、ロイ

コトリエンやヒスタミンの遊離抑制作用を有する化合物, また, *Z. clinopodioides* からはNO産生抑制作用を有する化合物を得られたことから, 炎症疾患などに伝承的に使用されている薬用植物の有効性を *in vitro* の試験において裏付けできたと考えられる. 新疆の民間薬の中には, 十分な成分研究がなされていないものが多数あり, 今後さらに研究を進める必要がある.

実験の部

試薬・装置

化学材料

溶媒	Yoneyama	<i>n</i> -hexane, EtOAc, MeOH, CHCl ₃ , EtOH, acetone
	Dojindo	CH ₃ CN
	Wako	toluene
試薬	Wako	Acetic Acid Anhydride, DMSO, MeOH, CHCl ₃ , H ₂ SO ₄ , Thymol, D(+)-Glucose, 1 mol/l Hydrochloric acid, Pyridine, Sodium Methoxide, Na ₂ SO ₄ , 1-propanol
	東京化成	L-Cysteine Methyl Ester, TMS-HT
	ORGANO	AMBERLITE IRA-400Cl
	DOJINDO	スペクトロゾール Methyl Alcohol, スペクトロゾール Chloroform
	Fluka	<i>S</i> (+)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl-phenylacetic acid chloride, <i>R</i> (-)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl-phenylacetic acid chloride
クロマトグラフィー		
CC	MERCK	Silica gel 60 (0.063-0.200 mm)
	三菱化成	Diaion HP-20
TLC	MERCK	Silica gel 60 F ₂₅₄ , RP-18 F ₂₅₄ S, (検出はUVランプ照射及び5% H ₂ SO ₄ の MeOH 溶液を噴霧, 加熱し発色させて行った.)
Cartridge	Waters	Sep-Pack Plus C18
HPLC カラム	東京化成	Kaseisorb ODS PH super, 20 × 250 mm, 5 μ m Kaseisorb ODS PH super, 10 × 250 mm, 5 μ m
	センシュウ化学	Senshu Pak Pegasil ODS, 10 × 250 mm, 5 μ m
	資生堂	CAPCELL PAK C18, 20 × 250 mm, 5 μ m CAPCELL PAK MG, 10 × 250 mm, 5 μ m
GC カラム	Shimadzu	OV-1701, 50 m×0.25 mm, 0.25 μ m
	信和化工	ULBON HR-1, 25 m×0.25 mm, 0.25 μ m
装置		
NMR	JEOL	NMLA400 JNMLA500 ECA-600

	Varian	Mercury-300BB 内部標準 : TMS (tetramethylsilane) 溶媒 : CDCl ₃ , DMSO- <i>d</i> ₆ , D ₂ O, MeOH- <i>d</i> ₄ , pyridine- <i>d</i> ₅ , ケミカルシフトは δ (ppm)値で表示. 多重度の singlet, doublet, triplet, septet 及び multiplet はそ れぞれ s, d, t, sep 及び m と略記.
MS	JEOL	JMS-GCMATE
HPLC pump	HITACHI	pressure pump 635-5002 SSCL-7100 SSC-3160 SSC-3100
HPLC detector	HITACHI	SP-8800, 635-5004 (UV), 655A-21 (UV), ERMAL-4000H (UV), ERC-7520 (RI), ERC-7522 (RI), SEKONICERC-7512 (RI)
HPLC recorder	Shodex	SSC-5410 (UV, VIS), RI-71, RI-72
[α] _D	LINSEIS	L120E
UV	JASCO	JASCO P-1020
Micro Plate Reader	島津製作所	UV-160
IR	BIO-RAD	Model 3550 MICROPLATE READER
CD	JASCO	FT/IR-4100
GC	JASCO	Spectropolamimeter JASCO J-600
	Shimadzu	14B
活性試験材料		
動物		Rat wistar 系 (♀)
細胞	Health Science Research Resources Bank	RBL-2H3
	American Type Culture Collection	RAW264.7
培地	Cellgro	Penicillin -streptomycin
	GIBCO	F12 HAM Fetal Bovine Serum, Certified
	SAFC Biosciences	Fetal Bovine Serum, Certified
	SIGMA	DMEM
試薬	Aldrich	0.1M Citrate Buffer Solution pH4.8
	BIOSORCE	Alamar Blue

	Dojindo	HEPES
	Genzyme/Techne	Recombinant Mouse IFN- γ
	GIBCO	Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1mM EDTA \cdot 4Na) (1 \times), liquid
	ICN	Sodium Carbonate Anhydrous
	Invitrogen	Bovine Serum Albumin
	Nissui	Dulbecco's PBS (-) " <i>Nissui</i> "
	SIGMA	D-(+)-Glucose solution (45%), Calcium Chloride, DNP-Albumin Conjugate, Bovine, LPS, Magnesium Chloride, Monoclonal Anti-DNP, <i>p</i> -Nitrophenyl- <i>N</i> -Acetyl- β -D-Glucosaminide, PIPES, PMA, Potassium Chloride, Sodium Bicarbonate, Sodium Chloride 5M Solution, Sodium Hydroxide 1.0 N Solution, Triton X-100, Aminoguanidine Hydrochloride, DNP-Albumin Conjugate, Bovine, Carbonate pH Standard Solution (pH 10), Glucose, NaHPO ₄ , NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ \cdot 6H ₂ O, Ketotifen fumarate, Sodium Nitrite, Sulfanilamide, <i>N</i> -1-Naphthylethylenediamine Dihydrochloride, Phosphoric acid
	WAKO	
Kit	Cayman	Leukotriene C ₄ EIA Kit

第 1 章の実験

1. 植物

各植物は中国新疆にて 2001 年に採取され、中国科学院上海薬物研究所の沈金貴氏によって同定されたものを用いた。

2. 抽出

各植物 (10 g) を超音波条件下エタノールにて抽出し、吸引濾過により得られた抽出液を減圧下濃縮することで粗エキスを得た。

3. スクリーニング試験

得られた粗エキスをDMSOに溶解させ試験を行った。(DMSO final concentration; 0.1 %)

RBL-2H3 細胞を用いた LTC₄ 遊離抑制活性試験⁷⁻¹⁰⁾

RBL-2H3 細胞は 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸ストレプトマイシン, 100 units/ mL ペニシリン G カリウムを添加した培地 (DMEM) にて培養した. 試験の前日に 24 穴プレートに濾過滅菌し 0.45 mg/mL に調製した anti-DNP IgE を含む細胞懸濁液 2×10^5 cells/well を入れ 37 °C, 5% CO₂ の条件下で一晩培養し感作させた.

インキュベートしたプレートの培地を除き, PBS 1 mL で洗浄した. 洗浄後 20 mM HEPES/DMEM で調製した 1/100 濃度のサンプル溶液 180 μL を加え 30 分インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) し, DNP-BSA 20 μL (終濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えさらに 30 分インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した. 上清を採取し PBS で 3 倍に希釈したものを試験溶液とした. LTC₄ EIA kit の説明書に従い吸光度 (415 nm) を測定して Leukotriene C₄ の検量線を作成し, そこから試験溶液中の LTC₄ 量を求めた.

RBL-2H3 細胞を用いた β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験¹⁰⁻¹⁴⁾

RBL-2H3 細胞は 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸ストレプトマイシン, 100 units/ mL ペニシリン G カリウムを添加した培地 (DMEM) にて培養した. 試験の前日に 24 穴プレートに 2×10^5 cells/well を入れ 37 °C, 5% CO₂ の条件下で一晩培養した.

Siraganian Buffer (-) (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH), Siraganian Buffer (+) (Siraganian Buffer (-) に 5.6 mM D-glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA を加えたもの), substrate solution (2.5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide/Citrate buffer) を調製した. また, DNP-BSA, A23187+PMA は, Siraganian Buffer (-) で調製し, サンプル溶液は DMSO に溶解させたサンプルを, Siraganian Buffer (-) で調製した.

インキュベートした 24 穴プレートの培地を除き, Siraganian Buffer (-) 1 mL で, 2 回洗浄した. 洗浄後, Siraganian Buffer (+) 160 μL を加え, 10 分間インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した後, サンプル溶液 20 μL を添加し, 更に 10 分間インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) を行い, DNP-BSA 20 μL (終濃度 : 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) により細胞を刺激し, さらに 10 分間インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した後, 24 穴プレートを氷上に乗せ, 10 分間放置し, 反応を停止させた. 上清を採取し, これを試験液 (T) とした. また, この時, サンプル溶液の調製時には化合物の溶解していない DMSO を用い抗原刺激だけを行った well の上清を (C), 抗原を添加しなかった well の上清を (N) として抑制率を算出した.

コントロールとして Siraganian Buffer (+) 180 μL にサンプル溶液 20 μL を加えたもの (S), Siraganian Buffer (+) 180 μL に DMSO 溶液 20 μL を加えたもの (A) (終濃度 : 0.1 %) を調製し, 96 穴プレートに $n = 3$ で 50 μL ずつ播いた. 96 穴プレートに, (T), (C), (N), を $n = 3$ で 50 μL ずつ播き, これらと (S), (A) に, Substrate Solution 50 μL を添加した後, インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した. 60 分後, Stop Solution 200 μL を加え, マイクロプレートリーダーにて波長 405 nm で吸光度を測定した.

β -ヘキソサミニダーゼの Inhibition % は, 次式に従って算出した.

まず, (S)-(A) より, 化合物そのものが持つ吸光度を求め, この値を (B) とした.

$$\text{Inhibition \%} = ((1 - (T - B - N)) / (C - N)) \times 100$$

RAW264.7 細胞を用いた NO 産生抑制活性の検討¹⁵⁻¹⁷⁾

RAW264.7 細胞は 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸ストレプトマイシン, 100 units/ mL ペニシリン G カリウムを添加した培地 (Ham's F12) にて培養した. 96 穴プレートに 1.2×10^6 cells/mL に調製した細胞懸濁液を入れ 37 °C, 5% CO₂ の条件下で 2 時間培養した. その後サンプルと刺激剤として LPS (終濃度 100 ng/mL) とリコンビナントマウス IFN- γ (終濃度 0.33 ng/mL) を加え 16 時間培養した.

インキュベートした 96 穴プレートの培養上清 100 μL を別の 96 穴プレートに採取し, 0.1% *N*-ナフチルエチレンジアミン溶液 50 μL と 1% スルファニルアミド溶液 50 μL を加え遮光し室温で 10 分間反応させた. 反応後マイクロプレートリーダーで 520 nm (対照 655 nm) で吸光度を測定した. また, 細胞の生存率は細胞の入った 96 穴プレートに Alamar Blue 10 μL を入れ 4 時間後の生存率を吸光度 (570 nm, reference 655 nm) より求めた.

第 2 章の実験

1. 植物

植物 *Hyssopus cuspidatus* は中国新疆にて 2001 年に採取され, 中国科学院上海薬物研究所の沈金貴氏によって同定された.

2. 抽出と分離

H. cuspidatus の乾燥した全草 1.5 kg を粉碎後, 超音波条件下エタノール (6 L \times 4, 30 min, 20-30°C) にて抽出し, 吸引濾過により得られた抽出液を減圧下濃縮し, EtOH 抽出物 (81.6 g) を得た. 得られた EtOH 抽出物を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, 40% MeOH, 70% MeOH, MeOH, acetone で順次溶出し, それぞれ, 40% MeOH 分画 (22.5 g, Fr. A), 70% MeOH 分画 (5.4 g, Fr. B), MeOH 分画 (28.9 g, Fr. C), acetone 分画 (18.9 g, Fr. D) を得た. MeOH 分画 (28.9 g) を MeOH に溶解後, 沈澱と上澄みに分け, 沈澱物として **19** (6.1 g) を得た. 上澄みを濃縮後, シリカゲルカラムクロマトグラフィー [n-hexane : EtOAc (5 : 1, 3.6 l, Fr. C1-C3; 3 : 1, 2.0 l, Fr. C4; 2 : 1, 1.0 l, Fr. C5; 1 : 1, 2.4 l, Fr. C6), EtOAc (2.0 l, Fr. C7), MeOH (2.0 l, Fr. C8)] にて計 8 個のフラクションに分画した. Fr. C3 について HPLC (75% MeOH, Kaseisorb LC ODS ODS PH SUPER, 20 \times 250 mm, (column A) flow rate; 8 mL/min) を用いて計 4 つのフラクション (Fr. C3-1—C3-4) に分画した. Fr. C3-3 を HPLC (90% MeOH, Kaseisorb LC ODS PH SUPER, 10 \times 250 mm, (column B) flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **16** (38 mg) を得た. 次に Fr. C4 を HPLC (80% MeOH, column A, flow rate; 8 mL/min) にて計 4 個のフラクション (Fr. C4-1—C4-4) に分画した. Fr. C4-1 について HPLC (85% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **1** (12 mg), **10** (12 mg) を得た. Fr. C4-2 を HPLC (85% MeOH, column B, flow

rate; 3 mL/min) を用いて精製し **9** (75 mg) を得た. Fr. C5 をHPLC (80% MeOH, column A, flow rate; 8 mL/min) にて 14 分画 (Fr. C5-1—C5-14) した. Fr. C5-3をHPLC (75% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **2** (15 mg) を得た. Fr. C5-4をHPLC (75% MeOH, column B flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **18** (14 mg) を得た. Fr. C5-6をHPLC (80% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **17** (7 mg) を得た. Fr. C5-10をHPLC (90% MeOH, Senshu Pak PEGASIL ODS, 10 × 250 mm, (column C), flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **22** (16 mg) を得た. Fr. C5-11をHPLC (90% MeOH, column C, 10 × 250 mm, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **21** (29 mg) を得た. Fr. C5-12をHPLC (90% MeOH, column C, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **20** (47 mg) を得た. Fr. B (5.4 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [CHCl₃ : MeOH : H₂O (100 : 1 : 0, 0.3 l, Fr. B1; 10 : 1 : 0.05, 1.65 l, Fr. B2; 8 : 2 : 0.2, 2.5 l, Fr. B3; 7 : 3 : 0.3, 1.0 l, Fr. B4-B5; 6 : 4 : 0.5, 1.0 l, Fr. B6; 6 : 4 : 1, 1.0 l, Fr. B7), acetone (1.0 l, Fr. B8)] にて計8つのフラクションに分画した. Fr. B1についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー [toluene : acetone (20 : 1, 0.5 l, Fr. B1-1; 10 : 1, 0.55 l, Fr. B1-2; 5 : 1, 1.02 l, Fr. B1-3; 3 : 1, 0.6 l, Fr. B1-4; 2 : 1, 0.6 l, 1 : 1, 0.6 l, 0 : 1, 0.8 l, Fr. B1-5), MeOH (1.0 l, Fr. B1-6)] にて計6個のフラクションに分画した. Fr. B1-4をHPLC (40% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて12分画 (Fr. B1-4-1—B1-4-12) した. Fr. B1-4-5を濃縮することで **3** (37 mg) を得た. Fr. B1-4-6をHPLC (30% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **13** (7 mg) を得た. Fr. B1-4-7をHPLC (32% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **11** (5 mg) を得た. Fr. B1-4-8をHPLC (30% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **12** (17 mg) を得た. Fr. B1-4-9をHPLC (25% MeCN, column B; 3 mL/min) を用いて精製し **14** (9 mg) を得た.

Fr. B1-4-11をHPLC (30% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **4** (6 mg) を得た. Fr. B3をHPLC (45% MeOH, CAPCELL PAK UG, 20 × 250 mm, flow rate; 8 mL/min) にて計4個のフラクション (Fr. B3-1—B3-4) に分画した. Fr. B3-2についてHPLC (15% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **7** (10 mg), **8** (3 mg) を得た. Fr. B3-3をHPLC (50% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **5** (50 mg), **6** (30 mg) を得た. Fr. B5を HPLC (40% MeOH, C column A, flow rate; 8 mL/min) にて計5個のフラクション (Fr. B5-1—B5-5) に分画した. Fr. B5-1をHPLC (10% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **15** (15 mg) を得た.

化合物 **1**: Yellow amorphous. ¹H- and ¹³C-NMR sdata, see Table 1. UV λ_{max}(MeOH) nm (ε): 216 (4900), 240 (3800), 277 (3600), 368 (2200). HR-EI-MS [M]⁺ m/z: 390.2035(calcd 390.2042 for C₂₂H₃₀O₆). [α]_D +95.2 (c = 0.25, MeOH).

化合物 **2**: Colorless oil. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data, see Table 2. UV λ_{max} (MeOH) nm (ε): 241 (3800). HR-EI-MS [M]⁺ m/z: 234.1616 (calcd 234.1620 for C₁₅H₂₂O₂). [α]_D +21.5 (c = 1.0, MeOH).

化合物 **3**: Colorless oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 2. HR-EI-MS $[\text{M}]^+$ m/z : 184.1099 (calcd 184.1099 for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$). $[\alpha]_{\text{D}} +21.5$ ($c = 2.0$, MeOH)

化合物 **4**: Colorless oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 2. HR-EI-MS $[\text{M}]^+$ m/z : 168.1157 (calcd 168.1150 for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$). $[\alpha]_{\text{D}} -7.7$ ($c = 0.5$, MeOH)

化合物 **5**: Pale yellow oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 3 and 4. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 220 (11100), 278 (7100). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 479.1552 (calcd 479.1553 for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_{11}$). $[\alpha]_{\text{D}} -9.3$ ($c = 1.0$, MeOH)

化合物 **6**: Pale yellow oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 3 and 4. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 278 (8000), 379 (7700). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 495.1500 (calcd 495.1502 for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_{12}$). $[\alpha]_{\text{D}} -56.2$ ($c = 1.0$, MeOH)

化合物 **7**: Pale yellow oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 3 and 4. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 278 (8000), 379 (7700). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 479.1554 (calcd 479.1553 for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_{11}$). $[\alpha]_{\text{D}} -38.1$ ($c = 1.4$, MeOH)

化合物 **8**: Pale yellow oil. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 3 and 4. UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 278 (8000), 379 (7700). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 495.1496 (calcd 495.1502 for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_{12}$). $[\alpha]_{\text{D}} -3.8$ ($c = 0.12$, MeOH)

19,20-Epoxy-12-methoxy-11,14,19-trihydroxy-7-oxo-8,11,13-abietatriene (**9**) : Yellow crystals. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.03 (3H, s, H-18), 1.29 (1H, m, H-1), 1.37 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-17), 1.38 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-16), 1.41 (1H, m, H-3), 1.60 (1H, m, H-2), 1.63 (1H, m, H-3), 1.90 (1H, dd, $J = 15.3$, 3.0 Hz, H-5), 2.45 (1H, m, H-2), 2.75 (1H, dd, $J = 6.3$, 3.0 Hz, H-6), 3.31 (1H, sep, $J = 7.1$ Hz, C-15), 3.36 (1H, m, H-6), 3.43 (1H, m, H-1), 3.79 (3H, s, 12-OCH₃), 4.17 (1H, dd, $J = 12.0$, 2.0 Hz, H-20), 4.37 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-20), 4.88 (2H, s, H-19), 5.74 (1H, brs, 11-OH), 13.03 (1H, s, 14-OH). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 20.7 (q, C-16), 20.7 (q, C-17), 22.0 (t, C-2), 23.9 (q, C-18), 26.5 (d, C-15), 35.1 (t, C-1), 36.6 (t, C-4), 37.8 (t, C-6), 39.3 (s, C-10), 39.6 (t, C-3), 44.4 (d, C-5), 60.1 (d, C-20), 62.5 (q, 12-OCH₃), 99.2 (d, C-19), 113.5 (s, C-8), 127.5 (s, C-13), 128.6 (s, C-9), 140.3 (s, C-11), 152.4 (s, C-12), 158.2 (s, C-14), 205.7 (s, C-7). IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3366 (OH), 1737 (COO), 1618 (C=O), UV λ_{max} (CHCl_3) nm (ϵ): 277.5 (8000), 378.5 (7700). HR-EI-MS m/z : 374.1732 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_6$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +67.1$ ($c = 1.9$, CHCl_3).

11,14-Dihydroxy-12-methoxy-7-oxo-8,11,13-abietatrien-19-20 β -olide (**10**) : Yellow solid. ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 1.27 (3H, s, H-18), 1.39 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17), 1.41 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-16), 1.48 (1H, ddd, $J = 13.6$, 4.7, 2.0 Hz, H-1), 1.95 (1H, m, H-2), 1.86 (1H, m, H-2), 2.02 (1H, m, H-3), 1.63 (ddd, $J = 21.0$, 13.7, 4.3 Hz, H-3), 2.22 (1H, dd, $J = 16.0$, 3.4 Hz, H-5), 2.54 (1H, t, $J = 16.0$ Hz, H-6), 2.84 (1H, dd, $J = 16.0$, 3.4 Hz, H-6), 3.33 (1H, sep, $J = 7.0$ Hz, H-15), 3.61 (1H, dt, $J = 13.6$ Hz, H-1), 3.82 (3H, s, 12-OCH₃), 4.59 (1H, dd, $J = 11.6$, 2.4 Hz, H-20), 5.03 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-20), 5.81 (brs, 11-OH), 12.96 (s, 14-OH). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 20.6 (q, C-16), 20.6 (q, C-17), 21.4 (t, C-2), 23.4 (q, C-18), 26.6 (d, C-15), 33.8 (s, C-10), 35.1 (t, C-1), 37.1 (t, C-6), 40.6 (t, C-3),

43.1 (s, C-4), 46.7 (d, C-5), 62.7 (q, 12-OCH₃), 72.8 (t, C-20), 112.4 (s, C-8), 126.5 (s, C-9), 128.6 (s, C-13), 140.4 (s, C-11), 153.0 (s, C-12), 158.9 (s, C-14), 175.6 (s, C-19), 202.4 (s, C-7). [α]_D²⁵ +177.1 (*c* = 1.4, CHCl₃).

10-Hydroxycarvone (**11**) : Colorless oil. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.79 (3H, brs, H-7), 2.32 (1H, m, H-5), 2.40 (1H, m, H-3), 2.49 (1H, m, H-5), 2.62 (1H, dd, *J* = 15.0, 12.0 Hz), 2.83 (1H, m, H-4), 4.16 (2H, s, H-10), 4.97 (1H, s, H-9), 5.16 (1H, s, H-8), 6.76 (1H, m, H-6). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 15.7 (q, C-7), 31.6 (t, C-5), 38.3 (d, C-4), 43.3 (t, C-3), 64.9 (t, C-10), 110.4 (t, C-9), 135.5 (s, C-1), 144.4 (d, C-6), 150.3 (s, C-8), 199.5 (s, C-2). EI-MS *m/z*: 166 [M]⁺ C₁₀H₁₄O₂. [α]_D²⁵ -5.2 (*c* = 0.5, MeOH).

Pinonic acid (**12**) : Colorless oil. ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 17.3 (t, C-4), 23.0 (q, C-10), 30.2 (q, C-7, C-8), 34.9 (s, C-2), 37.7 (d, C-5), 43.2 (d, C-1), 54.2 (d, C-3), 178.0 (s, C-6), 207.6 (s, C-9). EI-MS *m/z*: 184 [M]⁺, 166 [M-H₂O]⁺, C₁₀H₁₄O₃. [α]_D²⁵ -99.2 (*c* = 1.0, CHCl₃).

Loliolide (**13**) : Colorless oil, ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ : 1.27 (3H, s, H-10), 1.47 (3H, s, H-11), 1.53 (1H, dd, *J* = 15.0, 3.7 Hz, H-1a), 1.78 (3H, s, H-9), 1.78 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.0 Hz, H-4), 1.98 (1H, dt, *J* = 15.0, 3.0, H-2b), 2.46 (1H, dt, *J* = 14.0, 3.0 Hz, H-4), 4.32 (1H, m, H-3), 5.69 (1H, s, H-7). ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄) δ : 26.5 (q, C-11), 27.0 (q, C-9), 30.7 (q, C-10), 36.0 (s, C-1), 45.7 (t, C-2), 47.3 (t, C-4), 66.8 (d, C-3), 86.7 (s, C-5), 112.9 (d, C-7), 171.9 (s, C-8), 182.5 (d, C-6). EI-MS *m/z*: 196 [M]⁺, C₁₁H₁₆O₃. [α]_D²⁵ -76.8 (*c* = 1.0, MeOH).

Desacetylmatricarin (**14**) : Colorless amorphous. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.46 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H-11), 1.46 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, H-13), 2.30 (3H, s, H-15), 2.37 (1H, dd, *J* = 13.8, 2.2 Hz, H-9), 2.43 (3H, s, H-14), 2.55 (1H, m, H-7), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.8, 10.7 Hz, H-9), 3.38 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-5), 3.65 (1H, t, *J* = 10.0 Hz, H-6), 3.74 (1H, brt, H-8), 6.17 (1H, brs, H-3). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 15.5 (q, C-13), 21.7 (q, C-14), 19.9 (q, C-15), 41.4 (d, C-11), 49.1 (t, C-9), 51.7 (d, C-5), 61.5 (d, C-7), 69.8 (d, C-8), 81.1 (d, C-6), 133.0 (s, C-1), 135.7 (d, C-3), 145.5 (s, C-10), 170.1 (s, C-4), 177.7 (s, C-12), 195.6 (s, C-2). EI-MS *m/z*: 262 [M]⁺, C₁₅H₁₈O₄. [α]_D²⁵ -3.8 (*c* = 0.7, MeOH).

Rosmarinic acid (**15**) : Brownish powder. ¹H-NMR (MeOH-*d*₄) δ : 2.97 (1H, H-7a), 3.08 (1H, H-7b), 5.13 (1H, H-8), 6.25 (1H, H-8'), 6.59 (1H, H-6), 6.68 (1H, H-5), 6.76 (1H, H-2), 6.76 (1H, H-5'), 6.93 (1H, H-6'), 7.02 (1H, H-2'), 7.53 (1H, H-7'). ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄) δ : 37.8 (t, C-7), 74.5 (d, C-8), 115.1 (d, C-8'), 116.2 (d, C-5), 114.3 (d, C-2'), 116.4 (d, C-5'), 117.5 (d, C-2), 121.8 (d, C-6), 123.2 (d, C-6'), 127.6 (s, C-1'), 129.2 (s, C-1), 145.2 (s, C-4), 146.1 (s, C-3), 146.7 (s, C-3'), 147.7 (d, C-7'), 149.7 (s, C-4'), 168.4 (s, C-9'), 173.5 (s, C-9). FAB-MS *m/z*: 381 [M-H]⁻, C₁₈H₁₆O₇. [α]_D²⁵ -110 (*c* = 1.0, MeOH).

Coulterone (**16**) : Yellow crystals. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.82 (3H, s, H-18), 0.97 (3H, s, H-19), 1.19 (1H, td, *J* = 14.7, 4.2, H-1 α), 1.38 (1H, d, *J* = 10.2, H-5), 1.38 (1H, d, *J* = 6.8, H-17), 1.41 (1H, d, *J* = 6.8, H-16), 1.87 (1H, dt, *J* = 14.7, 4.2, H-1 β), 1.38 (1H, d, *J* = 6.8, H-17), 2.62 (1H, d, *J* = 14.0, H-20 α), 2.63 (1H, d, *J* = 18.4, H-6 α), 3.01 (1H, dd, *J* = 18.4, 10.2, H-6 β), 3.35 (1H, sep, *J* = 6.8,

H-15), 3.36 (1H, d $J = 14.0$, H-20 β), 3.79 (3H, s, 14-OCH₃), 5.35 (1H, s, 11-OH), 12.27 (1H, s, 14-OH). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 18.6 (t, C-2), 20.3 (q, C-17), 20.5 (q, C-16), 21.4 (q, C-19), 26.0 (d, C-15), 32.0 (q, C-18), 33.8 (s, C-4), 38.4 (t, C-1), 40.4 (t, C-20), 40.5 (t, C-6), 40.6 (t, C-3), 48.8 (d, C-5), 61.9 (q, 14-OCH₃) 73.7 (s, C-10), 116.7 (s, C-8) 121.1 (s, C-9), 127.4 (s, C-13), 139.5 (s, C-11), 150.1 (s, C-12), 157.1 (s, C-14), 210.6 (s, C-7). EI-MS m/z : 362 [M]⁺, 344 [M-H₂O]⁺, C₂₁H₃₀O₅.

Salvigenin (**17**) : Pale yellow amorphous. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 55.5 (q, 4'-OCH₃), 56.3 (q, 7-OCH₃), 59.9 (q, 6-OCH₃), 91.5 (d, C-8), 103.2 (d, C-3), 105.0 (s, C-10), 114.5 (d, C-3', 5'), 122.6 (s, C-1'), 128.2 (d, C-2', 6'), 131.8 (s, C-6), 152.0 (s, C-5), 152.5 (s, C-9), 158.6 (s, C-7), 162.3 (s, C-4'), 163.5 (s, C-2), 182.1 (s, C-4). EI-MS m/z : 328 [M]⁺, C₁₈H₁₆O₆.

5-Hydroxy-4',7-dimethoxyflavone (**18**) : Pale yellow amorphous. ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 55.4 (q, 4'-OCH₃), 55.7 (q, 7-OCH₃), 92.5 (d, C-8), 98.0 (d, C-6), 104.2 (d, C-3), 105.5 (s, C-10), 114.4 (d, C-3', 5'), 123.4 (s, C-1'), 127.9 (d, C-2', 6'), 162.1 (s, C-5), 157.7 (s, C-9), 162.5 (s, C-4'), 163.9 (s, C-2), 165.4 (s, C-7), 182.3 (s, C-4). EI-MS m/z : 298 [M]⁺, C₁₇H₁₄O₅.

Ursolic acid (**19**) : Colorless amorphous. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 16.0 (q, C-24), 16.9 (q, C-29), 17.8 (q, C-25), 17.9 (q, C-26), 19.1 (t, C-6), 21.7 (q, C-30), 23.9 (t, C-11), 24.2 (q, C-27), 25.2 (t, C-16), 28.4 (t, C-2), 29.0 (t, C-15), 29.1 (q, C-23), 31.4 (t, C-21), 33.4 (t, C-7), 37.5 (t, C-1), 37.7 (s, C-10), 39.3 (t, C-22), 39.6 (s, C-4), 39.7 (d, C-20), 40.2 (d, C-19), 40.2 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 48.2 (d, C-17), 48.3 (d, C-9), 53.7 (d, C-18), 56.0 (d, C-5), 78.2 (d, C-3), 125.6 (d, C-12), 139.1 (s, C-13), 179.3 (s, C-28). EI-MS m/z : 456 [M]⁺, C₃₀H₄₈O₃.

2 α -Hydroxyursolic acid (**20**) : Colorless amorphous. ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 17.3 (q, C-24), 17.8 (q, C-25), 17.8 (q, C-26), 18.0 (q, C-29), 19.1 (t, C-6), 21.7 (q, C-30), 24.0 (t, C-11), 24.2 (q, C-27), 25.2 (t, C-16), 28.9 (t, C-15), 29.7 (q, C-23), 31.3 (t, C-21), 33.8 (t, C-7), 37.7 (t, C-22), 38.7 (s, C-10), 39.6 (s, C-4), 39.7 (d, C-19), 40.1 (d, C-20), 40.3 (s, C-8), 42.8 (s, C-14), 48.2 (t, C-1), 48.2 (d, C-9), 48.3 (s, C-17), 53.7 (d, C-18), 56.1 (d, C-5), 68.7 (d, C-2), 83.9 (d, C-3), 125.5 (d, C-12), 139.2 (s, C-13), 179.6 (s, C-28). EI-MS m/z : 472 [M]⁺, C₃₀H₄₈O₃.

2 α -Hydroxyoleanolic acid (**21**) : Colorless amorphous. ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 16.9 (q, C-25), 17.5 (q, C-24), 17.7 (q, C-26), 18.9 (t, C-6), 23.7 (t, C-11), 23.8 (q, C-30), 23.9 (t, C-16), 26.1 (q, C-27), 28.3 (t, C-15), 29.3 (q, C-23), 30.9 (s, C-20), 33.2 (q, C-29), 33.2 (t, C-22), 33.2 (t, C-7), 34.2 (t, C-21), 38.5 (s, C-10), 39.7 (s, C-4), 39.8 (s, C-8), 41.9 (d, C-18), 42.1 (s, C-14), 46.4 (t, C-19), 46.6 (s, C-17), 47.6 (d, C-7), 48.1 (t, C-1), 55.8 (d, C-5), 68.4 (d, C-2), 83.6 (d, C-3), 122.1 (d, C-12), 144.4 (s, C-13), 179.6 (s, C-28). EI-MS m/z : 472 [M]⁺, C₃₀H₄₈O₃.

Hyptadienic acid (**22**) : Colorless powder. ¹H-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 0.96, 1.06, 1.13, 1.15, 1.39, 1.68 (each 3H, s, H-23 to H-29), 1.08 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-30), 3.02 (1H, s, H-18), 4.42, 4.55 (each 1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-1), 5.58 (1H, t, $J = 3.5$ Hz, H-12), 5.72 (1H, s, H-3). ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 16.7 (q, C-30), 17.7 (q, C-6), 18.9 (q, C-26), 19.0 (q, C-25), 21.8 (q, C-24), 25.4 (q, C-27), 26.4 (t,

C-21), 27.0 (t, C-11), 27.1 (t, C-16), 27.2 (q, C-29), 29.7 (q, C-25), 30.1 (q, C-23), 34.6 (t, C-7), 38.5 (t, C-22), 42.0 (s, C-17), 50.9 (s, C-10), 54.8 (d, C-18), 60.8 (t, C-1), 63.7 (d, C-5), 72.7 (s, C-19), 128.2 (d, C-12), 133.6 (d, C-3), 140.2 (s, C-13), 156.8 (s, C-2), 180.7 (s, C-28). EI-MS m/z : 470 $[M]^+$, $C_{30}H_{46}O_4$.

化合物 2 の新 Mosher 法をによる絶対配置の決定^{39, 40)}

化合物 2 (1 mg) をピリジン 5 滴に溶解し, *R*-(-)-MTPA Cl 及び *S*-(+)-MTPA Cl 各 1 滴を入れ一晩室温放置した. 反応混合物に 1 M 塩酸を加えた後, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧下濃縮し *S*-(-)-MTPA ester または *R*-(+)-MTPA ester を得た.

S-(-)-MTPA ester of 2: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): Hz 410.55 (H-15), 476.40 (H-14), 756.70 (H-4), 857.75 (H-12), 2417.20 (H-13), 3283.25 (H-1).

R-(+)-MTPA ester of 2: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): Hz 420.40 (H-15), 483.40 (H-14), 759.60 (H-4), 866.10 (H-12), 2424.40 (H-13), 3264.70 (H-1).

化合物 4 の新 Mosher 法による絶対配置の決定^{39, 40)}

化合物 4 (1 mg) をピリジン 5 滴に溶解し, *R*-(-)-MTPA Cl 及び *S*-(+)-MTPA Cl 各 1 滴を入れ一晩室温放置した. 反応混合物に 1 M 塩酸を加えた後, 酢酸エチルで抽出した. 抽出液を飽和炭酸水素ナトリウムで洗浄後, 硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧下濃縮し *S*-(-)-MTPA ester または *R*-(+)-MTPA ester を得た.

S-(-)-MTPA ester of 4: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): Hz 855.45 (H-7), 902.75 (H-3), 961.60 (H-5) 1021.70 (H-3), 1029.35 (H-5), 1160.20 (H-4), 2818.30 (H-6).

R-(+)-MTPA ester of 4: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz): Hz 854.85 (H-7), 911.90 (H-3), 959.15 (H-5) 1024.45 (H-3), 1029.05 (H-5), 1160.50 (H-4), 2818.30 (H-6).

化合物 6 の糖の同定⁴¹⁾

化合物 6 (13 mg) のエステル結合を加水分解するために 2% MeONa/MeOH (5 mL) を加え, 室温にて 1 時間放置した. 反応液を AMBERLITE IRA-400 で中和した. 次にエーテル結合を分解するために 1M HCl 10 mL を加え, 90°Cにて 2 時間加水分解し, 放冷後, AMBERLITE IRA-400 で中和した後, Sep-Pak C-18 cartridge を用いて, ろ過して糖分画を得た. この分画を濃縮乾固後, L-methyl cysteine · HCl 4 mg と Pyridine 0.4 mL を加え, 60°Cにて 1 時間反応させた. この反応混合物 100 μL に TMS-HT 150 μL を加え, 40°Cにて 10 分反応させ, ガスクロマトグラフィー法にて標品のリテンションタイムと比較を行しところ, *D*-glucose に一致したので, 6 の糖は *D*-glucose であると同定した.

GLC conditions : column, ULBON HR-1, 25 m \times 0.25 mm (i.d.), capillary column ; injector temperature, 250 °C; detector temperature, 280 °C; column temperature, 180 °C for 2 min 5 °C /min

up to 280 °C; He flow rate, 27.0 cm/sec ; t_R , D -glucose 19.3 min,

化合物 7, 8 及び 9 の糖の同定⁴¹⁾

化合物 6 と同様に処理し, ガスクロマトグラフによる保持時間を比較した結果上, D -glucose であると同定した.

GLC conditions : column, ULBON HR-1, 25 m × 0.25 mm (i.d.), capillary column ; injector temperature, 250 °C; detector temperature, 280 °C; column temperature, 180 °C for 2 min 5 °C /min up to 280 °C; He flow rate, 27.3 cm/sec; t_R , D -glucose 18.7 min.

活性試験

ラット肺胞細胞を用いた LTC₄ 遊離抑制活性試験⁷⁻¹⁰⁾

各サンプルは DMSO に溶解させ試験を行った. (DMSO final concentration; 0.1 %)

Tyrode 液は glucose 200mg, NaHCO₃ 200mg, NaH₂PO₄·H₂O 2mL に H₂O を加え全量 200 mL 調製したものをを用いた. 6-10 週齢の Wistar ラット (180g-300g, ♀) を断頭後脱血した. 次に腹部から開き, 肝大動脈と左心室に穴をあけた後, 右心房から右心室に向かって, 1 mL ヘパリンを加えた Tyrode 液 30 mL は注射器を用いて注入し, 心臓の拍動によって肺組織が脱血し白くなるまでさらに Tyrode 液を加えた. 得られた肺組織を, 金属メッシュを通過させることにより細胞を得た. 得られた細胞は DMEM 培地を用いて洗浄し, 2 × 10⁵ cells/mL に希釈した後, 24 穴プレートに 500 μL ずつ注入し, 2 時間インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した.

インキュベートした 24 穴プレートの培地を除き, PBS 1 mL で洗浄した. 洗浄後, 20 mM HEPES/DMEM でさらに希釈したサンプル溶液 180 μL を加え 30 分インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) し, カルシウムイオノフォア A23187 20 μL (終濃度 12.5 μM) を加え 30 分インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%) した. 上清を採取し PBS で 3 倍に希釈したものを試験溶液とした. LTC₄ EIA kit の説明書に従い吸光度 (415 nm) を測定して Leukotriene C₄ の検量線を作成し, そこから試験溶液中の LTC₄ 量を求めた.

第 3 章の実験

1. 植物

植物 *Lagochilus leiacanthus* は中国新疆にて 2001 年に採取され, 上海薬物研究所の沈金貴氏によって同定された.

2. 抽出と分離

L. leiacanthus の乾燥した全草 1.0 kg を粉碎後, 超音波条件下エタノール (8 L × 4) にて抽出し, 吸引濾過により得られた抽出液を減圧下濃縮し, EtOH 抽出物 (66.21 g) を得た. 得られた EtOH 抽出物を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し, 40% MeOH (6 L), 70%

MeOH (9 L), MeOH (7 L), acetone (7 L)で順次溶出し、それぞれ、40% MeOH 分画 (22.5 g, Fr. A), 70% MeOH 分画 (5.4 g, Fr. B), MeOH 分画 (28.9 g, Fr. C), acetone 分画 (18.9 g, Fr. D) を得た. Fr. C についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー [n-hexane : EtOAc (10 : 1, 2 L, Fr. C1-C3; 5 : 1, 2.0 L, Fr. C4; 3 : 1, 2.0 L, Fr. C5; 2 : 1, 1.0 L, Fr. C6; 1 : 1, 2.4 L, Fr. C7), EtOAc (2.0 L, Fr. C8-C9), MeOH (2.0 L, Fr. C10-12)] にて計 12 個のフラクションに分画した. Fr. C6 を MeOH に溶解後ろ過し、ろ液を HPLC (75% MeOH, Kaseisorb LC ODS PH SUPER, 20 × 250 mm (column A), flow rate; 6 mL/min) にて計 10 個のフラクション (Fr. C6-1—C6-10) に分画した. Fr. C6-3 を HPLC (65% MeOH, Kaseisorb LC ODS PH SUPER, 10 × 250 mm column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **29** (24 mg) を得た. Fr. C6-4 を HPLC (65% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **30** (74 mg) を得た. Fr. C6-5 を HPLC (70% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **32** (39 mg) を得た. Fr. C6-6 を HPLC (70% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **31** (4 mg), **33** (17 mg) を得た. Fr. C6 の MeOH 不溶物を、ピリジンに溶解させ HPLC (95% Capcell pak C18, 20 × 250 mm, (column C), flow rate; 6 mL/min) にて分画し 10 個のフラクション (Fr. C6-11—C6-20) に分画した. Fr. C6-12 を HPLC (90% MeOH, Capcell pak C18, 10 × 250 mm, (column D), flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **46** (277 mg) を得た. Fr. C6-13 はほぼ純粋なピークとして得られ、**47** (17 mg) と同定した. Fr. C7 について HPLC (70% MeOH, column A, flow rate; 6 mL/min) にて計 10 個のフラクション (Fr. C7-1—C7-10) に分画した. Fr. C7-3 について HPLC (33% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **41** (24 mg), **23** (107 mg), **24** (21 mg) を得た. Fr. C7-4 について HPLC (40% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **45** (89 mg) を得た. Fr. C7-7 は **39** (165 mg) と同定した. Fr. C7-8 について HPLC (70% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **38** (20 mg) を得た. Fr. C8 について HPLC (65% MeOH, column A, flow rate; 6 mL/min) にて計 9 個のフラクション (Fr. C8-1—C8-9) に分画した. Fr. C8-1 について HPLC (65% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **42** (228 mg) を得た. Fr. C8-3 について HPLC (75% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **43** (7 mg) を得た. Fr. C8-4 について HPLC (32% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **35** (9 mg), **36** (6 mg), **37** (11 mg) を得た. Fr. C8-5 について HPLC (34% MeCN, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **27** (109 mg) を得た. Fr. C8-6 について HPLC (72% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **44** (420 mg) を得た. Fr. C8-7 を HPLC (75% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **28** (7 mg), **34** (7 mg), **40** (33 mg) を得た. Fr. B をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [n-hexane : EtOAc (5 : 1, 2 l, Fr. B1; 3 : 1, 2.0 l, Fr. B2; 2 : 1, 2.1 l, Fr. B3; 1 : 1, 2.0 l, Fr. B4; 1 : 2, 2.0 l, Fr. B5; 1 : 3, 2.0 l, Fr. B6; 1 : 5, 2.0 l, Fr. B7), EtOAc (2.0 l, Fr. B8), MeOH (9.0 l, Fr. B9)] にて計 9 個のフラクションに分画した. Fr. B2 を HPLC (40% MeOH, column B, flow rate; 6 mL/min) にて計 5 個のフラクション (Fr. B2-1—B2-5) に分画した. Fr. B2-1 を HPLC (65% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **48** (2 mg), **49** (2 mg), **50** (9 mg) を得た. B2-5 を HPLC (65%

MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **51** (7 mg) を得た. Fr. B9 について HPLC [20% MeOH (A), 80% MeOH (B), gradient elution program; 0—10 min, A:B = 100:0, 10—20min, A:B = 9:1, 20—60 min, A:B = 1:1, 60—70 min, A:B = 0:100, column A, flow rate; 6 mL/min] にて計 12 個のフラクション (Fr. B9-1—B9-12) に分画した. B9-7 を HPLC (20% MeCN, column B, flow rate; 2 mL/min) を用いて精製し **52** (13 mg), **53** (3 mg) を得た. B9-8 を HPLC (20% MeCN, column B, flow rate; 2 mL/min) を用いて精製し **54** (12 mg) を得た. B9-9 を HPLC (40% MeOH, column B, flow rate; 2 mL/min) を用いて精製し **25** (3 mg) を得た. B9-10 を HPLC (23% MeCN, column B, flow rate; 2 mL/min) を用いて精製し **55** (5 mg), **26** (3 mg) を得た.

化合物 **23**: Yellow amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 6. IR (KBr) ν_{max} : 3186, 1641, 1603 cm^{-1} . UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 224 (24700), 288 (21400), 346 (6500). HR-EI-MS $[\text{M}]^+$ m/z : 332.0899 (calcd 332.0896 for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 0 ($c = 0.5$, MeOH).

化合物 **24**: Yellow amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 6. IR (KBr) ν_{max} : 3168, 1643 cm^{-1} . UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 215 (30400), 288 (15600), 362 (5400). HR-EI-MS $[\text{M}]^+$ m/z : 362.1003 (calcd 362.1002 for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 0 ($c = 0.5$, MeOH).

化合物 **25**: Pale yellow amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR data see Table 6. IR (KBr) ν_{max} : 3405, 1636 cm^{-1} . UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 286 (25000), 344 (12000). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 493.1349 (calcd 493.1345 for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_{12}$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +4.8 ($c = 0.15$, MeOH).

化合物 **26**: Pale yellow amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 6. IR (KBr) ν_{max} : 3366, 1630 cm^{-1} . UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 284 (7400). HR-FAB-MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z : 523.1450 (calcd 523.1451 for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{13}$). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +2.4 ($c = 0.12$, MeOH).

化合物 **27**: Colorless amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR data, see Table 7. IR (KBr) ν_{max} : 1730 cm^{-1} . HR-EI-MS $[\text{M}]^+$ m/z : 390.2035 (calcd 390.2042 for $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +95.2 ($c = 0.25$, MeOH).

scupolin I (**28**): Colorless amorphous. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic data, see Table 7. EI-MS m/z : 346 $[\text{M}]^+$. $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_8$.

2',5-Dihydroxy-6',7,8-trimethoxyflavanone (**29**): Pale yellow needles. ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.54, 3.76, 3.85 (each 3H, s, $-\text{OCH}_3 \times 3$), 2.55 (1H, dd, $J = 17.1, 3.2$ Hz, cis 3-H), 3.90 (1H, dd, $J = 17.1, 13.5$ Hz, trans 3-H), 5.94 (1H, dd, $J = 13.5, 3.2$ Hz, 2-H), 6.22 (1H, s, 6-H), 6.55 (2H, brd, $J = 8.3$ Hz, 3', 5'-H), 7.19 (1H, brt, $J = 8.3$ Hz, 4'-H), 9.87 (1H, s, 2'-OH), 12.14 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 39.3 (t, C-3), 55.8 (q, 6'- OCH_3), 56.2 (q, 7- OCH_3), 60.2 (q, 8- OCH_3), 71.5 (d, C-2), 92.6 (d, C-6), 102.2 (s, C-10), 102.8 (d, C-5'), 109.1 (d, C-3'), 111.5 (s, C-1'), 129.0 (s, C-8), 130.5 (d, C-4'), 154.6 (s, C-9), 159.2 (s, C-5), 159.4 (s, C-6'), 160.9 (s, C-7), 157.3 (s, C-2'), 198.1 (s, C-4). EI-MS m/z : 346 $[\text{M}]^+$.

2',5-Dihydroxy-6,6',7,8-tetramethoxyflavanone (**30**): Yellow powder. ^1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.75 (1H, dd, $J = 3.1, 17.5$, H-3_{eq}), 3.16, 3.30, 3.43, 3.55 (each 3H, s, $4 \times \text{OCH}_3$), 3.75 (1H, dd, $J =$

17.5, 3.1, H-3_{ax}), 5.95 (1H, dd, $J = 13.5, 3.1$, H-2), 6.52 (2H, br. d, $J = 8.5$, H-3', H-5'), 7.19 (1H, brt, $J = 8.5$, H-4'), 11.90 (1H, s, 5-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 39.6 (t, C-3), 60.6 (q, 8-OCH₃), 60.7 (q, 6'-OCH₃), 60.7 (q, 6-OCH₃), 61.1 (q, 7-OCH₃), 71.5 (d, C-2), 102.7 (d, C-5'), 103.7 (s, C-10), 108.9 (d, C-3'), 111.3 (s, C-1'), 130.5 (d, C-4'), 132.5 (s, C-8), 133.0 (s, C-6), 150.9 (s, C-5), 154.6 (C-7), 156.6 (s, C-9), 157.1 (s, C-2'), 159.2 (s, C-6'), 199.0 (s, C-4). EI-MS m/z : 376 [M]⁺, C₁₉H₂₀O₈.

Pinocembrin (**31**) : Colorless minute needles, $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.78 (1H, dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, H-3_{ax}), 3.24 (1H, dd, $J = 17.1, 12.5$ Hz, H-3_{eq}), 5.58 (1H, dd, $J = 12.5, 3.0$ Hz, H-2), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 7.30-7.50 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 7.52 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-2', H-6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 42.1 (t, C-3), 78.3 (d, C-2), 95.0 (d, C-8), 95.9 (d, C-6), 101.8 (s, C-10), 126.5 (d, C-2', C-6'), 128.5 (d, C-3', C-4', C-5'), 138.6 (s, C-1'), 162.7 (s, C-9), 163.2 (s, C-5), 166.5 (s, C-7), 195.7 (s, C-4). EI-MS m/z : 256 [M]⁺

Oroxylin A (**32**) : Yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.91 (3H, s), 6.94 (1H, s), 6.98 (1H, s), 7.59 (3H, m), 8.10 (2H, d, $J = 6.3$ Hz), 8.77 (1H, s), 12.49 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 99.4 (d, C-8), 103.9 (s, C-10), 104.0 (d, C-3), 126.5 (d, C-2', C-6'), 129.5 (d, C-3', C-5'), 131.1 (s, C-6), 132.3 (s, C-1'), 132.5 (d, C-4'), 154.8 (s, C-9), 156.4 (s, C-5), 157.8 (s, C-2), 163.2 (s, C-7), 199.0 (s, C-4). EI-MS m/z : 284 [M]⁺, C₁₆H₁₁₂O₅.

Chrysin (**33**) : Yellow powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 95.5 (d, C-8), 99.3 (d, C-6), 104.3 (s, C-10), 104.9 (s, C-3), 126.3 (d, C-2', 6'), 129.1 (d, C-3', 5'), 131.4 (s, C-1'), 131.9 (d, C-4'), 158.4 (s, C-9), 162.1 (s, C-5), 164.5 (s, C-2), 165.6 (s, C-7), 182.7 (s, C-4). EI-MS m/z : 254 [M]⁺, C₁₅H₁₀O₄.

5,6-Dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone (**34**) : Yellow powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 60.9 (q, 8-OCH₃), 61.8 (q, 7-OCH₃), 104.5 (d, C-3), 106.2 (s, C-10), 126.2 (d, C-2', 6'), 129.2 (d, C-3', 5'), 130.8 (C-1'), 132.0 (d, C-4'), 133.0 (s, C-8), 134.3 (s, C-6), 141.9 (s, C-9), 143.0 (s, C-5), 148.2 (s, C-7), 163.3 (s, C-2), 182.7 (q, C-4). EI-MS m/z : 314 [M]⁺, C₁₇H₁₄O₆.

5,6,4'-Trihydroxy-7-methoxyflavone (**35**) : Yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.85 (3H, s, 00-OCH₃), 3.87 (3H, s, 00-OCH₃), 6.29 (1H, s, H-6), 6.82 (1H, s, H-3), 6.97 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.94 (2H, s, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 12.64 (1H, s, 5-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : EI-MS m/z : 300 [M]⁺, C₁₆H₁₂O₆.

Apigenin (**36**) : Yellow powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 93.9 (d, C-8), 98.8 (d, C-6), 102.8 (d, C-3), 103.7 (d, C-10), 115.9 (d, C-3', C-5'), 121.1 (s, C-1'), 128.4 (d, C-2', C-6'), 157.3 (s, C-4'), 161.2 (s, C-9), 161.4 (s, C-5), 163.7 (s, C-7), 164.2 (s, C-2), 181.7 (s, C-4). EI-MS m/z : 270 [M]⁺, C₁₅H₁₀O₅.

Hispidulin (**37**) : Yellow solids. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.9 (s, 3H, 4'-OMe), 6.6 (s, 1H, H-3), 6.7 (s, 1H, H-8), 6.9 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3', 5'), 7.9 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-2', 6'), 13.1 (s, 1H, 5-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 59.9 (OMe), 94.2 (C-8), 102.4 (C-3), 104.1 (C-10), 115.9 (C-3', C-5'), 121.2 (C-1'), 128.4 (C-2', C-6'), 113.3 (C-6), 152.4 (C-9), 152.8 (C-5), 157.2 (C-7), 161.2 (C-4'),

163.8 (C-2), 182.1 (C-4). EI-MS m/z : 300 $[M]^+$, $C_{16}H_{12}O_6$.

2',5-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (**38**) : Yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.84 (3H, s, 8-OCH₃), 3.91 (3H, s, 6-OCH₃), 4.04 (3H, s, 7-OCH₃), 7.12 (1H, s, H-3), 7.87 (1H, s, $J = 8.1$, 1.7 Hz, H-6'), 6.96-7.12 (2H, m, H-3', 5'), 7.36-7.51 (1H, m, H-4'), 12.56 (1H, s, 5-H). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 60.6 (q, 6-OCH₃), 61.5 (q, 8-OCH₃), 61.9 (q, 7-OCH₃), 106.3 (s, C-10), 108.9 (d, C-3), 117.3 (s, C-1', C-3'), 119.7 (d, C-5'), 128.4 (d, C-6'), 132.9 (s, C-8), 133.3 (d, C-4'), 135.9 (s, C-6), 145.6 (s, C-5), 148.6 (s, C-9), 152.8 (s, C-7), 157.3 (s, C-2'), 162.1 (s, C-2), 183.0 (s, C-4). EI-MS m/z : 344 $[M]^+$.

Skullcapflavone I (**39**) : Pale yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.88 (3H, s, 8-OCH₃), 3.97 (3H, s, 7-OCH₃), 6.49 (1H, s, H-6), 7.11 (2H, m, H-3', 5'), 7.14 (1H, s, H-3), 7.43 (1H, ddd, $J = 8.0$, 7.3, 1.7 Hz, H-4'), 8.01 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.7 Hz, H-6'), 9.71 (1H, s, 2'-OH), 12.76 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 56.7 (q, 7-OCH₃), 61.1 (q, 8-OCH₃), 95.8 (d, C-6), 103.5 (s, C-10), 108.6 (d, C-3), 117.2 (s, C-1'), 117.3 (d, C-3'), 119.2 (d, C-5'), 128.2 (d, C-6'), 133.0 (d, C-4'), 149.5 (s, C-9), 156.6 (s, C-5), 157.5 (s, C-2'), 158.4 (s, C-7), 161.7 (s, C-2), 182.1 (s, C-4). EI-MS m/z : 314 $[M]^+$.

5,8-Dihydroxy-2',7-dimethoxyflavone (**40**) : Yellow powder. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.81 (3H, s, 2'-OCH₃), 3.92 (3H, s, 7-OCH₃), 6.58 (1H, s, H-6), 7.03 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.5 Hz, H-4'), 7.06 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.5 Hz, H-6'), 7.09 (1H, s, H-3), 7.41 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.5 Hz, H-6'), 7.86 (1H, dd, $J = 8.0$, 1.5 Hz, H-3'), 12.71 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 95.7 (d, C-6), 103.7 (s, C-10), 108.6 (d, C-3), 116.9 (d, C-6'), 117.0 (s, C-1'), 119.4 (d, C-4'), 127.5 (s, C-2'), 128.0 (d, C-3'), 132.8 (d, C-5'), 148.6 (s, C-8), 156.3 (s, C-9), 156.6 (s, C-5), 158.1 (s, C-7), 161.2 (s, C-2), 181.9 (s, C-4). EI-MS m/z : 314 $[M]^+$, $C_{17}H_{14}O_6$.

2',5,6'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (**41**) : Yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.84 (6H, s, 6-OCH₃, 8-OCH₃), 4.02 (3H, s, 7-OCH₃), 6.35 (1H, s, H-3), 6.46 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', H-5'), 7.16 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-4'), 9.99 (2H, s, 2'-OH, 6'-OH), 12.73 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 60.7 (q, 6-OCH₃), 61.5 (q, 8-OCH₃), 61.8 (7-OCH₃), 106.8 (d, C-3', C-5'), 106.5 (s, C-10), 108.2 (s, C-1'), 111.9 (d, C-3), 132.3 (d, C-4'), 132.8 (s, C-8), 135.9 (s, C-6), 146.5 (s, C-9), 148.7 (s, C-5), 152.7 (s, C-7), 157.0 (s, C-2', C-6'), 162.9 (s, C-2), 182.8 (s, C-4). EI-MS m/z : 360 $[M]^+$.

2',5,7-Trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone (**42**) : Yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.78 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.79 (3H, s, 8-OCH₃), 6.23 (1H, s, H-6), 6.38 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3'), 6.67 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 7.34 (1H, dd, $J = 8.3$, 7.8 Hz, H-4'), 12.61 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 56.0 (q, 6'-OCH₃), 61.0 (q, 8-OCH₃), 99.2 (d, C-6), 102.4 (d, C-5'), 103.9 (s, C-10), 109.3 (s, C-1'), 112.2 (d, C-3), 127.8 (s, C-8), 132.6 (d, C-4'), 150.8 (s, C-9), 156.5 (s, C-5), 157.3 (s, C-7), 158.6 (s, C-6'), 161.9 (s, C-2), 182.1 (s, C-4). EI-MS m/z : 330 $[M]^+$.

2',5,6-Trihydroxy-6',7,8-trimethoxyflavone (**43**) : Yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.75

(3H, s, 6'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 8-OCH₃), 3.95 (3H, s, 7-OCH₃), 6.28 (1H, s, H-3), 6.62 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3', H-5'), 7.32 (1H, t, *J* = 8.2 Hz, H-4'), 9.13 (1H, brs, 6-OH), 10.13 (1H, s, 2'-OH), 12.40 (1H, s-5-OH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 55.8 (q, 6'-OCH₃), 60.9 (q, 7-OCH₃), 61.6 (8-OCH₃), 102.2 (d, C-5'), 106.1 (s, C-10), 108.7 (d, C-3'), 109.0 (s, C-1'), 111.4 (d, C-3), 132.3 (d, C-4'), 132.8 (s, C-8), 134.0 (s, C-6), 142.8 (s, C-9), 143.0 (s, C-5), 148.0 (s, C-7), 156.5 (s, C-2'), 158.2 (s, C-6'), 162.0 (d, C-2), 182.4 (s, C-4). EI-MS *m/z*: 360 [M]⁺, C₁₈H₁₆O₈.

Neobaicalein (**44**) : Yellow needles. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.80 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.91 (3H, s, 8-OCH₃), 3.92 (3H, s, 6-OCH₃), 4.10 (3H, s, 7-OCH₃), 6.51 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.62 (1H, s, H-3), 6.66 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3'), 7.28 (1H, t, *J* = 8.5 Hz, H-4'). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 55.6 (q, 6'-OCH₃), 60.2 (q, 6-OCH₃), 61.4 (q, 7-OCH₃), 61.4 (q, 8-OCH₃), 101.9 (d, C-5'), 106.1 (d, C-3'), 108.6 (s, C-1'), 111.7 (d, C-3), 118.9 (s, C-10), 132.2 (s, C-8), 132.2 (d, C-4'), 135.5 (s, C-6), 146.0 (s, C-5), 148.2 (s, C-9), 152.2 (s, C-7), 156.4 (s, C-2'), 158.1 (s, C-6'), 162.1 (s, C-2), 182.2 (s, C-4). EI-MS *m/z*: 374 [M]⁺, C₁₉H₁₈O₈.

Rivularin (**45**) : Yellow needles. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.73 (3H, s, 8-OCH₃), 3.76 (3H, s, 6'-OCH₃), 3.91 (3H, s, 7-OCH₃), 6.22 (1H, s, H-3), 6.53 (1H, s, H-6), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, H-5'), 6.62 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, H-3'), 7.28 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, H-4'), 12.53 (1H, s, 5-OH). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 56.2 (q, 7-OCH₃), 56.6 (q, 6'-OCH₃), 61.0 (q, 8-OCH₃), 96.3 (d, C-6), 102.9 (d, C-3'), 104.5 (s, C-10), 109.3 (d, C-5'), 109.8 (s, C-1'), 112.1 (d, C-3), 129.0 (s, C-8), 132.3 (d, C-4'), 150.0 (s, C-9), 158.4 (s, C-7), 158.7 (s, C-2'), 156.7 (s, C-6'), 156.8 (s, C-5), 162.2 (s, C-2), 182.2 (s, C-4). EI-MS *m/z*: 344 [M]⁺, C₁₈H₁₆O₇.

Oleanolic acid (**46**) : Colorless amorphous powder. ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 15.9 (q, C-25), 16.9 (q, C-24), 17.8 (q, C-26), 19.1 (t, C-6), 24.0 (t, C-11), 24.1 (q, C-30), 24.1 (t, C-16), 26.5 (q, C-27), 28.4 (t, C-2), 28.6 (t, C-15), 29.0 (q, C-23), 31.2 (d, C-20), 33.5 (t, C-22), 33.5 (s, C-29), 33.5 (t, C-7), 34.5 (t, C-21), 37.6 (s, C-10), 39.6 (s, C-4), 40.0 (s, C-8), 42.3 (s, C-14), 42.4 (d, C-18), 46.7 (t, C-19), 46.9 (s, C-17), 48.3 (d, C-9), 56.0 (d, C-5), 78.2 (d, C-3), 122.5 (d, C-12), 144.7 (s, C-13), 180.0 (s, C-28). EI-MS *m/z*: 456 [M]⁺, C₃₀H₄₈O₃.

Ursolic acid (**47**) : Colorless amorphous powder. ¹³C-NMR (pyridine-*d*₅) δ : 16.0 (q, C-24), 16.9 (q, C-29), 17.7 (q, C-25), 17.8 (q, C-26), 19.1 (t, C-6), 21.7 (q, C-30), 23.9 (t, C-11), 24.2 (q, C-27), 25.2 (t, C-16), 28.4 (t, C-2), 29.0 (t, C-15), 29.1 (q, C-23), 31.4 (t, C-21), 33.4 (t, C-7), 37.5 (t, C-1), 37.7 (s, C-10), 39.3 (t, C-22), 39.6 (s, C-4), 39.7 (d, C-20), 40.2 (d, C-19), 40.2 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 48.2 (s, C-17), 48.3 (d, C-9), 53.7 (d, C-18), 56.0 (d, C-5), 78.2 (d, C-3), 125.6 (d, C-12), 139.1 (s, C-13), 179.6 (s, C-28). EI-MS *m/z*: 456 [M]⁺, C₃₀H₄₈O₃.

Vanillin (**48**) : Colorless powder. ¹³C-NMR (MeOH-*d*₄) δ : 55.9 (3-OCH₃), 111.0 (d, C-5), 115.7 (d, C-6), 126.5 (s, C-3), 129.1 (d, C-2), 148.5 (s, C-1), 153.4 (s, C-4), 191.4 (d, C-7).

p-Hydroxyacetophenone (**49**) : Colorless powder. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 2.57 (3H, s, H-8), 6.91 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, H-5), 7.89 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, H-6). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 26.9 (q, C-8),

115.7 (d, C-3, C-5), 129.8 (s, C-1), 131.3 (d, C-2, C-6), 161.2 (C-4). EI-MS m/z : 136 $[M]^+$, $C_8H_8O_2$.

Acetovanillone (**50**) : Colorless powder. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 2.56 (3H, s, H-8), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃), 6.93 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 7.52 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 7.52 (1H, dd, J = 8.8, 2.1 Hz, H-6). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 26.8 (q, C-8), 56.3 (q, 3-OCH₃), 109.9 (d, C-6), 113.9 (d, C-5), 124.2 (d, C-2), 130.4 (s, C-1), 146.7 (s, C-3), 150.5 (s, C-4), 196.8 (s, C-7). EI-MS m/z : 166 $[M]^+$, $C_9H_{10}O_3$.

Dihydroxyskullcapflavanone I (**51**) : Colorless needles. 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 3.07 (1H, dd, J = 17.3, 3.1 Hz, H-3_{eq}), 3.12 (1H, dd, J = 17.3, 13.5 Hz, H-3_{ax}), 3.78 (3H, s, 8-OCH₃), 3.88 (3H, s, 7-OCH₃), 5.73 (1H, dd, J = 13.5, 3.1 Hz, H-2), 6.11 (1H, s, H-6), 6.94 (1H, ddd, J = 7.7, 7.7, 1.1 Hz, H-5'), 6.85 (1H, s, 2'-OH), 6.86 (1H, dd, J = 8.1, 1.1 Hz, H-3'), 7.22 (1H, ddd, J = 7.7, 7.7, 1.7 Hz, H-4'), 7.33 (1H, dd, J = 7.7, 1.7 Hz, H-6'), 11.90 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 41.3 (t, C-3), 56.3 (7-OCH₃), 61.5 (8-OCH₃), 76.6 (d, C-2), 93.5 (d, C-6), 102.9 (s, C-10), 116.7 (d, C-3'), 120.7 (d, C-5'), 124.1 (s, C-1'), 126.4 (d, C-6'), 129.8 (s, C-8), 129.9 (d, C-4'), 153.0 (s, C-9), 153.9 (s, C-2'), 160.0 (s, C-5), 161.6 (s, C-7), 196.5 (s, C-4). EI-MS m/z : 316 $[M]^+$, $C_{17}H_{16}O_6$.

Wogonin (**52**) : Yellow needles. 1H -NMR(DMSO- d_6) δ : 3.79 (3H, s, 8-OCH₃), 6.30 (1H, s, H-6), 6.93 (1H, s, H-3), 7.55(2H, m, H-3', 5'), 7.56 (1H, m, H-4'), 8.01 (2H, dd, J = 7.9, 1.8 Hz, H-2', 6'), 12.4 (1H, brs, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 61.00 (8-OCH₃), 99.17 (C-6), 103.63 (C-10), 105.03 (C-3), 126.25 (C-2', 6'), 127.79 (C-8), 129.24 (C-3', 5'), 130.85 (C-1'), 132.04 (C-4'), 149.58 (C-5), 156.21 (C-7, 9), 162.93 (C-2), 181.97 (C-4). EI-MS m/z : 284.0692 $[M]^+$, $C_{16}H_{12}O_5$

Liquiritin (**53**) : Colorless crystals. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.73 (1H, dd, J = 17.0, 2.9 Hz, H-3), 3.04 (1H, dd, J = 17.0, 12.9 Hz, C-3), 3.35-3.50 (4H, m, H-2''-H-5''), 3.70 (1H, dd, J = 12.0, 5.4 Hz, H-6''), 3.90 (1H, dd, J = 12.0, 2.2 Hz, H-6''), 4.94 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 5.45 (1H, dd, J = 12.9, 2.9 Hz, H-2), 6.36 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.50 (1H, dd, J = 8.6, 2.2 Hz, H-6), 7.11 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', H-5'), 7.44 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', H-6'), 7.72 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 43.1 (t, C-3), 60.7 (t, C-6''), 69.8 (C-4''), 73.2 (d, C-2''), 76.6 (d, C-3''), 77.0 (d, C-5''), 78.6 (d, C-2), 102.6 (d, C-8), 100.5 (d, C-1''), 110.5 (d, C-6), 113.6 (s, C-10), 116.3 (d, C-3'), 116.3 (d, C-5'), 127.8 (d, C-2'), 127.8 (d, C-6'), 128.3 (d, C-5), 132.4 (s, C-1'), 157.4 (s, C-4'), 163.0 (s, C-9), 164.6 (s, C-7), 189.7 (s, C-4). FAB-MS m/z : 417 $[M-H]^-$, $C_{21}H_{22}O_9$.

Viscidulin II 2'-*O*-glucoside (**54**) : Yellow needles. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.06 (1H, m H-2''), 3.08 (1H, m, H-4''), 3.19 (1H, m, H-3''), 3.23 (1H, m H-5''), 3.48 (1H, dd, J = 12.0, 3.0 Hz, H-6''), 3.68 (1H, dd, J = 12.0, 5.8 Hz, H-6''), 3.71 (3H, s, 8-OCH₃), 3.91 (3H, s, 7-OCH₃), 4.91 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1''), 6.31 (1H, s, H-3), 6.60 (1H, s, H-6), 6.65 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.72 (1H, J = 8.4 Hz, H-3'), 7.29 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-4'), 10.14 (1H, s, 6'-OH), 12.75 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 56.4 (q, 7-OCH₃), 60.7 (t, C-6''), 61.1 (q, 8-OCH₃), 69.6 (d, C-4''), 73.1 (d, C-2''), 76.5 (d, C-3''), 77.1 (d, C-5''), 95.8 (d, C-6), 100.2 (d, C-1''), 104.2 (s, C-10), 105.4 (d, C-3'), 109.5 (d, C-5'), 110.1 (s, C-1'), 112.2 (d, C-3), 128.4 (s, C-8), 132.2 (d, C-4'), 149.9 (s, C-9), 156.2 (s, C-6'), 156.7 (s, C-5), 156.6 (s, C-2'), 158.2 (s, C-7), 161.7 (s, C-2), 182.2 (s, C-4). FAB-MS m/z : 491 $[M-$

H]⁻, C₂₃H₂₄O₁₂.

2',5,6'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone 2'-*O*-glucoside (**55**) : Pale yellow amorphous. ¹H-NMR (acetone-*d*₆+D₂O) δ: 3.20-3.50 (4H, m, H-2-H-5), 3.62 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, H-6''), 3.75 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-6''), 3.81 (3H, s, 8-OCH₃), 3.82 (3H, s, 6-OCH₃), 4.00 (3H, s, 7-OCH₃), 5.00 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1''), 6.35 (1H, s, H-3), 6.69 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 7.25 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 12.70 (1H, s, 5-OH). ¹³C-NMR (acetone-*d*₆+D₂O) δ: 62.0 (t, C-6''), 70.5 (d, C-4''), 73.9 (s, C-2''), 77.2 (d, C-3''), 77.4 (d, C-5''), 101.3 (d, C-5'), 106.7 (s, C-1''), 107.5 (s, C-10), 110.6 (d, C-3'), 111.0 (s, C-1'), 113.0 (d, C-3), 133.3 (s, C-8), 133.8 (d, C-4'), 136.8 (s, C-6), 147.9 (s, C-9), 149.4 (s, C-5), 153.6 (s, C-7), 157.1 (s, C-2'), 157.5 (s, C-6'), 163.2 (s, C-2), 184.0 (s, C-4). FAB-MS *m/z*: 521 [M-H]⁻, C₂₄H₂₆O₁₃.

化合物 25, 26 の糖の同定⁴¹⁾

化合物 25, 26 各 0.5 mg に, 1 M HCl 1 mL 及び 1,4-dioxane 0.2 mL を加え 100 °C にて 3 時間加熱して加水分解した. 室温に冷ました後 AMBERLITE IRA-400 で中和した. 中和した液を Sep-Pak C-18 cartridge を用いて, ろ過して糖分画を得た. この分画を濃縮乾固後, L-methyl cysteine•HCl 4 mg と Pyridine 0.2 mL を加え, 60 °C にて 1 時間反応させた. この反応物 100 μL に TMS-HT 150 μL を加え, 40 °C にて 10 分反応させ, ガスクロマトグラフィー法にて標品とリテンションタイムの比較を行ったところ, D-glucose であると同定した.

GLC conditions : column, ULBON HR-1, 25 m x 0.25 mm (i.d.), 0.25 μm layer thickness; detector, FID; injector temperature, 250 °C; detector temperature, 280 °C; column temperature, 150 °C for 2 min and then 5 °C/min up to 250 °C; He flow rate, 28.6 cm/sec; D-glucose *t_R*, 17.7 min, respectively.

RBL-2H3 細胞を用いた β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性試験¹⁰⁻¹⁴⁾

RBL-2H3 細胞は 10% FBS, 100 μg/mL 硫酸ストレプトマイシン, 100 units/mL ペニシリン G カリウムを添加した培地 (DMEM) にて培養した. 試験の前日に 24 穴プレートに濾過滅菌し 0.45 mg/mL に調製した anti-DNP IgE を含む細胞懸濁液 2 × 10⁵ cells/well を入れ 37 °C, 5% CO₂ の条件下で一晩培養し感作させた. A23187+PMA で刺激したものに関しては, anti-DNP IgE を除いた同条件で培養した.

各サンプルは DMSO に溶解させ試験を行った. (DMSO final concentration; 0.1 %)

Siraganian Buffer (-) (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH), Siraganian Buffer (+) (Siraganian Buffer (-) に 5.6 mM D-glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA を加えたもの), substrate solution (2.5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide/Citrate buffer) を調製した. また, DNP-BSA, A23187+PMA は, Siraganian Buffer (-) で調製し, サンプル溶液は DMSO に溶解させたサンプルを, Siraganian Buffer (-) で調製した.

インキュベートした 24 穴プレートの培地を除き, Siraganian Buffer (-) 1 mL で, 2 回洗浄した. 洗浄後, Siraganian Buffer (+) 160 μL を加え, 10 分間インキュベート (37 °C, CO₂ 濃度 5%)

した後、サンプル溶液 20 μL を添加し、更に 10 分間インキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5%) を行い、DNP-BSA 20 μL (終濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または A23187 と PMA の混合液 (終濃度: 10 μM , 20 nM) により細胞を刺激し、さらに 10 分間インキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5%) した後、24 穴プレート を氷上に乗せ、10 分間放置し、反応を停止させた。上清を採取し、これを試験液 (T) とした。また、この時、サンプル溶液の調製時には化合物の溶解していない DMSO を用い抗原刺激だけを行った well の上清を (C)、抗原を添加しなかった well の上清を (N) として抑制率を算出した。

コントロールとして Siraganian Buffer (+) 180 μL にサンプル溶液 20 μL を加えたもの (S)、Siraganian Buffer (+) 180 μL に DMSO 溶液 20 μL を加えたもの (A) (終濃度: 0.1%) を調製し、96 穴プレートに $n=3$ で 50 μL ずつ播いた。96 穴プレートに、(T), (C), (N), を $n=3$ で 50 μL ずつ播き、これらと (S), (A) に、Substrate Solution 50 μL を添加した後、インキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5%) した。60 分後、Stop Solution 200 μL を加え、マイクロプレートリーダーにて波長 405 nm で吸光度を測定した。

β -ヘキソサミニダーゼの Inhibition % は、次式に従って算出した。

まず、(S)-(A) より、化合物そのものが持つ吸光度を求め、この値を (B) とした。

$$\text{Inhibition \%} = ((1 - (T - B - N) / (C - N)) \times 100$$

β -ヘキソサミニダーゼ酵素阻害活性試験¹¹⁾

RBL-2H3 細胞 1×10^7 cells を、1 mL 0.05% Triton X-100/PBS で溶解し、遠心 (KUBOTA 1920, 12000 rpm, 5 min) した。これを PBS で 50 倍に希釈したものを、粗酵素液とした。粗酵素液 45 μL に β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制試験で調製したサンプル溶液 5 μL を加え、ここに Substrate Solution 50 μL を添加し、インキュベート (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) した。60 分後 Stop Solution 200 μL を加え、マイクロプレートリーダーにて波長 405 nm で吸光度を測定した。

第 4 章の実験

1. 植物

植物 *Ziziphora clinopodioides* は中国新疆にて 2001 年に採取され、上海薬物研究所の沈金貴氏によって同定された。

2. 抽出と分離

Z. clinopodioides の乾燥した全草 0.7 kg を粉碎後、超音波条件下エタノール (2.5 L \times 2) にて抽出し、吸引濾過により得られた抽出液を減圧下濃縮し、EtOH 抽出物 (108 g) を得た。得られた EtOH 抽出物を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、30% MeOH (6.5 L), 70% MeOH (8 L), MeOH (7 L), acetone (5.5 L) で順次溶出し、30% MeOH 分画-1 (12.84 g, Fr. A), 30% MeOH 分画-1 (52.81 g, Fr. B), 70% MeOH 分画 (17.78 g, Fr. C), MeOH 分画 (9.45 g, Fr. D), acetone 分画 (17.07 g, Fr. E) を得た。Fr. C についてシリカゲルカラムクロマトグラフ

ー [CHCl₃ : MeOH : H₂O (100 : 1 : 0, 300 mL, Fr. C1-C3; 10 : 1 : 0.1, 2220 mL, Fr. C4; 8 : 2 : 0.2, 2040 mL, Fr. C5; 7 : 3 : 0.3, 2700 mL, Fr. C6; 6 : 4 : 0.5, 2100 mL, Fr. C7; 6 : 4 : 1, 2200 mL, Fr. C8-9), MeOH (2000 mL, Fr. C10)] にて計 10 個のフラクションに分画した. Fr. C4 (1.54 g) を HPLC (40% MeOH, Kaseisorb LC ODS PH SUPER, 20 × 250 mm, (column A), flow rate; 8 mL/min) にて計 8 個のフラクション (Fr. C4-1—C4-8) に分画した. Fr. C4-2 を HPLC (30% MeOH, Kaseisorb LC ODS PH SUPER, 10 × 250 mm, (column B), flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **64** (26 mg) を得た. Fr. C4-3 を HPLC (40% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて 2 個のフラクション (Fr. C4-3-1—C4-3-2) に分画した. Fr. C4-3-1 を HPLC (30% MeOH, Capcell pak MG, (column C), 10 × 250 mm, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **59** (39 mg), **58** (22 mg) を得た. Fr. C4-4 を HPLC (30% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて 5 個のフラクションに分画した (Fr. C4-5-1—C4-5-5). Fr. C4-5-2 を HPLC (30% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **56** (26 mg), **62** (4 mg) を得た. Fr. C4-5-3 を HPLC (30% MeOH, column C, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **65** (6 mg), **57** (7 mg) を得た. Fr. C4-6 を HPLC (30% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **63** (24 mg) を得た. Fr. D についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー [n-hexane : EtOAc (10 : 1, 1000 mL, Fr. D1; 4 : 1, 2220 mL, Fr. D2; 2 : 1, 900 mL, Fr. D3; 1 : 1, 1000 mL, Fr. D4; 0 : 100, 1000 mL, Fr. D5), EtOAc : MeOH (1 : 1, 1000 mL, Fr. D6), 1-propanol (2000 mL, Fr. D7)] にて計 7 個のフラクションに分画した. Fr. D5 (1.8 g) について HPLC (70% MeOH, column A, flow rate; 8 mL/min; 90% MeOH, column A, flow rate; 8 mL/min) にて計 23 個のフラクション (Fr. D5-1—D5-23) に分画した. Fr. D5-3 を HPLC (55% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **72** (13 mg) 及び **73** (20 mg) を得た. Fr. D5-4 を HPLC (55% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **67** (25 mg) を得た. Fr. D5-5 を HPLC (60% MeOH, column B, flow rate; 3 mL/min) を用いて精製し **66** (42 mg), **68** (40 mg) を得た. Fr. D5-10, 16, 17 はそれぞれ **71** (18 mg), **69** (304 mg), **70** (20 mg) であると同定した.

Ziziphoroside A (**56**): Colorless powder. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data, see Table 9. IR (KBr) ν_{\max} : 3418, 1669 cm⁻¹. UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 232 (3600). HR-FAB-MS [M + H]⁺ m/z : 331.1757 (calcd for 331.1757 for C₁₆H₂₇O₇). [α]_D²⁵ -60.3 ($c = 0.69$, MeOH). CD λ_{\max} (MeOH): $\Delta\epsilon_{234} -6.7$, $\Delta\epsilon_{315} +0.5$.

Ziziphoroside B (**57**): Colorless powder. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data, see Table 9. IR (KBr) ν_{\max} : 3446, 1634 cm⁻¹. UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 216 (4100), 246 (5400). HR-FAB-MS [M + Na]⁺ m/z : 353.1577 (calcd for 353.1577 for C₁₆H₂₆O₇Na). [α]_D²⁵ +5.5 ($c = 0.31$, MeOH). CD λ_{\max} (MeOH): $\Delta\epsilon_{239} -6.3$.

Ziziphoroside C (**58**): Colorless powder; ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data, see Table 9. IR (KBr) ν_{\max} : 3429, 1652 cm⁻¹. UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 246 (5400), 205 (4100). HR-FAB-MS [M+H]⁺ m/z : 329.1605 (calcd for 329.1600 for C₁₆H₂₅O₇). [α]_D²⁵ -5.3 ($c = 0.68$, MeOH).

Benzylalcohol glucoside (**59**) : Colorless crystals. $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 62.8 (t, C-6'), 71.7 (t, C-7), 71.7 (d, C-4'), 75.1 (d, C-2'), 78.0 (d, C-3'), 78.1 (d, C-5'), 103.2 (d, C-1'), 128.7 (d, C-4), 129.2 (d, C-2, C-6), 129.3 (d, C-3, C-5), 139.0 (s, C-1). FAB-MS m/z : 269 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

phenethylalcohol glucoside (**60**) : $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 32.2 (t, C-7), 62.7 (t, C-6'), 71.6 (d, C-4'), 71.7 (t, C-8), 75.1 (d, C-2'), 77.9 (d, C-5'), 78.1 (d, C-3'), 104.4 (d, C-1'), 127.2 (d, C-4), 129.3 (d, C-2, C-6), 130.0 (d, C-3, C-5), 140.0 (s, C-1), 129.3 (d, C-6). FAB-MS m/z : 283 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_6$.

Shizonepetoside C (**61**) : Colorless amorphous. $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 0.82 (3H, d, $J = 5.0$ Hz, H-7), 2.23 (3H, brs, H-10), 4.48 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1'). $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 18.7 (q, C-10), 21.7 (q, C-7), 28.8 (t, C-5), 32.3 (d, C-1), 33.5 (t, C-6), 51.5 (t, C-2), 62.9 (t, C-62), 68.6 (t, C-9), 71.8 (d, C-4'), 75.1 (d, C-2'), 78.6 (d, C-5'), 78.8 (d, C-3'), 103.3 (d, C-1'), 136.5 (s, C-4), 137.8 (s, C-8), 204.0 (s, C-3). UV max (MeOH) nm (ϵ): 246 (4400), 206 (3000). FAB-MS m/z : 329 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$. $[\alpha]_{\text{D}} -17.7$ ($c = 1.0$, MeOH). CD max (MeOH): $\Delta\epsilon_{316} +4.5$, $\Delta\epsilon_{240} -23.3$.

Erigeside B (**62**) : Colorless powder. $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 0.97 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-6), 3.52 (1H, dd, $J = 12.1, 5.8$ Hz, H-6'), 3.67 (1H, dd, $J = 12.1, 2.1$ Hz, H-6'), 3.89 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1), 4.26 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 5.36 (1H, dt, $J = 17.5, 7.3$ Hz, H-3), 5.44 (1H, dt, $J = 17.5, 7.6$ Hz, H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4) δ : 14.6 (q, C-7), 21.5 (t, C-5), 28.7 (d, C-4), 62.7 (t, C-6'), 70.4 (t, C-1), 71.6 (d, C-4), 75.0 (d, C-2'), 77.6 (d, C-5'), 78.0 (d, C-3'), 104.1 (d, C-1'), 126.6 (d, C-3), 134.2 (t, C-2). FAB-MS m/z : 261 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6$.

Shizonepetoside A (**63**) : Colorless amorphous. $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 12.2 (q, C-10), 22.8 (q, C-7), 32.6 (t, C-5), 34.9 (t, C-6), 36.5 (d, C-1), 49.8 (t, C-2), 55.2 (d, C-4), 62.5 (t, C-6'), 71.2 (d, C-4'), 76.6 (d, C-2'), 77.8 (d, C-3'), 78.2 (d, C-5'), 103.9 (d, C-1'), 114.9 (s, C-8), 141.7 (d, C-9), 212.9 (s, C-3). FAB-MS m/z : 329 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_7$. CD λ_{max} (MeOH): $\Delta\epsilon_{239} -6.9$.

Piceine (**64**) : Colorless solid. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 26.4 (q, C-8), 60.6 (t, C-6'), 69.6 (d, C-4'), 73.1 (d, C-2'), 76.5 (d, C-5'), 77.1 (d, C-3'), 99.8 (d, C-1'), 115.8 (d, C-2, C-6), 130.2 (d, C-3, C-5), 130.8 (s, C-4), 161.0 (s, C-1), 196.4 (s, C-7). FAB-MS m/z : 297 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_7$.

9-*O*-Glucopyranosyl-*p*-menthan-3-one (**65**) : Colorless amorphous powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5) δ : 13.2 (q, C-10), 22.3 (q, C-7), 26.6 (t, C-5), 31.6 (d, C-8), 33.7 (t, C-6), 35.0 (d, C-1), 49.8 (d, C-4), 50.5 (t, C-2), 62.7 (t, C-6'), 71.5 (d, C-4'), 72.9 (t, C-9), 75.0 (d, C-2'), 78.2 (d, C-5'), 78.3 (d, C-3'), 104.9 (d, C-1'), 211.2 (s, C-3). FAB-MS m/z : 331 $[\text{M-H}]^-$, $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_7$.

Apigenin (**66**) : Yellow powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 93.9 (d, C-8), 98.8 (d, C-6), 102.8 (d, C-3), 103.7 (d, C-10), 115.9 (d, C-3', C-5'), 121.1 (s, C-1'), 128.4 (d, C-2', C-6'), 157.3 (s, C-9), 161.2 (s, C-5), 161.4 (s, C-4'), 163.7 (s, C-2), 164.2 (s, C-7), 181.7 (s, C-4). EI-MS m/z : 270 $[\text{M}]^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

Luteolin (**67**) : Yellow powder. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 93.6 (d, C-8), 98.7 (d, C-6), 102.5 (d,

C-3), 103.9 (s, C-10), 112.8 (d, C-2'), 115.4 (d, C-5'), 118.9 (d, C-6'), 122.3 (s, C-1'), 145.6 (s, C-3'), 149.6 (s, C-4'), 158.0 (s, C-9), 163.9 (s, C-2), 164.8 (s, C-7), 182.5 (s, C-4). EI-MS m/z : 286 $[M]^+$, $C_{15}H_{10}O_6$.

Diosmetin (**68**) : Yellow powder. 1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 3.85 (3H, s, 4'-OCH₃), 6.19 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.46 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.73 (1H, s, H-3), 7.06 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5'), 7.41 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-2'), 7.52 (1H, dd, J = 8.6, 2.3 Hz, H-6'), 9.50 (1H, s, 3'-OH), 10.89 (1H, s, 8-OH), 12.92 (1H, s, 5-OH). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ : 93.9 (d, C-8), 98.9 (d, C-6), 103.5 (d, C-3), 103.8 (s, C-10), 112.1 (d, C-5'), 113.0 (d, C-2'), 118.7 (d, C-6'), 123.0 (s, C-1'), 146.8 (s, C-3'), 151.1 (s, C-4'), 157.3 (s, C-9), 161.5 (s, C-5), 163.5 (q, C-2), 164.2 (s, C-7), 181.7 (s, C-4). EI-MS m/z : 300 $[M]^+$, $C_{16}H_{12}O_6$.

Ursolic acid (**69**) : Colorless amorphous. ^{13}C -NMR (pyridine- d_5) δ : 16.0 (q, C-24), 16.9 (q, C-29), 17.7 (q, C-25), 17.8 (q, C-26), 19.1 (t, C-6), 21.7 (q, C-30), 23.9 (t, C-11), 24.2 (q, C-27), 25.2 (t, C-16), 28.4 (t, C-2), 29.0 (t, C-15), 29.1 (q, C-23), 31.4 (t, C-21), 33.4 (t, C-7), 37.5 (t, C-1), 37.7 (s, C-10), 39.3 (t, C-22), 39.6 (s, C-4), 39.7 (d, C-20), 40.2 (d, C-19), 40.2 (s, C-8), 42.7 (s, C-14), 48.2 (s, C-17), 48.3 (d, C-9), 53.7 (d, C-18), 56.0 (d, C-5), 78.2 (d, C-3), 125.6 (d, C-12), 139.1 (s, C-13), 179.6 (s, C-28). EI-MS m/z : 456 $[M]^+$, $C_{30}H_{48}O_3$.

Oleanolic acid (**70**) : Colorless amorphous. ^{13}C -NMR (pyridine- d_5) δ : 15.9 (q, C-25), 16.9 (q, C-24), 17.8 (q, C-26), 19.1 (t, C-6), 24.0 (t, C-11), 24.1 (q, C-30), 24.1 (t, C-16), 26.5 (q, C-27), 28.4 (t, C-2), 28.6 (t, C-15), 29.0 (q, C-23), 31.2 (d, C-20), 33.5 (t, C-22), 33.5 (s, C-29), 33.5 (t, C-7), 34.5 (t, C-21), 37.6 (s, C-10), 39.6 (s, C-4), 40.0 (s, C-8), 42.3 (s, C-14), 42.4 (d, C-18), 46.7 (t, C-19), 46.9 (s, C-17), 48.3 (d, C-9), 56.0 (d, C-5), 78.2 (d, C-3), 122.5 (d, C-12), 144.7 (s, C-13), 180.0 (s, C-28). EI-MS m/z : 456 $[M]^+$, $C_{30}H_{48}O_3$.

Maslinic acid (**71**) : Colorless amorphous. ^{13}C -NMR (pyridine- d_5) δ : 16.9 (q, C-25), 17.5 (q, C-24), 17.7 (q, C-26), 18.9 (t, C-6), 23.7 (t, C-11), 23.8 (q, C-30), 23.9 (t, C-16), 26.1 (q, C-27), 28.3 (t, C-15), 29.3 (q, C-23), 30.9 (s, C-20), 33.2 (q, C-29), 33.2 (t, C-22), 33.2 (t, C-7), 34.2 (t, C-21), 38.5 (s, C-10), 39.7 (s, C-4), 39.8 (s, C-8), 41.9 (d, C-18), 42.1 (s, C-14), 46.4 (t, C-19), 46.6 (s, C-17), 47.6 (d, C-7), 48.1 (t, C-1), 55.8 (d, C-5), 68.4 (d, C-2), 83.6 (d, C-3), 122.1 (d, C-12), 144.4 (s, C-13), 179.6 (s, C-28). EI-MS m/z : 472 $[M]^+$, $C_{30}H_{48}O_3$.

Ethyl caffeate (**72**) : Yellow powder. 1H -NMR (MeOH- d_4) δ : 1.32 (3H, t, J = 7.0 Hz, H-11), 4.20 (2H, q, J = 7.0 Hz, H-10), 6.23 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-7), 6.75 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.92 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 7.01 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 7.51 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8). ^{13}C -NMR (MeOH- d_4) δ : 13.8 (q, C-11), 60.4 (t, C-10), 113.9 (d, C-2), 114.1 (d, C-7), 115.3 (d, C-5), 121.7 (d, C-6), 126.5 (s, C-1), 145.4 (d, C-8), 145.5 (s, C-3), 148.2 (s, C-4), 167.9 (s, C-9). EI-MS m/z : 208 $[M]^+$, $C_{11}H_{12}O_4$.

Benzoic acid (**73**) : Colorless amorphous. 1H -NMR (MeOH- d_4) δ : 7.51 (2H, dd, J = 7.8, 1.3 Hz, H-3, 5), 7.62 (1H, dd, J = 7.8, 1.3 Hz), 8.08 (2H, dd, J = 7.8, 1.3 Hz). EI-MS m/z : 122 $[M]^+$, $C_7H_6O_2$.

56, 57, 58 の糖の同定⁴¹⁾

化合物 56, 57, 58 各 0.5 mg に, 1M HCl 1mL 及び 1,4-dioxane 0.2 mL を加え 100 °C にて 3 時間加熱した. 室温に冷ました後 AMBERLITE IRA-400 で中和した. 中和した液を Sep-Pak C-18 cartridge を用いて, ろ過して糖分画を得た. この分画を濃縮乾固後, L-methyl cysteine · HCl 4 mg と pyridine 0.2 mL を加え, 60 °C にて 1 時間反応させた. この反応物 100 μ L に TMS-HT 150 μ L を加え, 40 °C にて 10 分反応させ, ガスクロマトグラフィー法にて標品とリテンションタイムの比較を行ったところ, D-glucose であると同定した.

GLC conditions: column, OV 1701, 50 m \times 0.25 mm (i.d.), 0.25 μ m; detector, FID; injector temperature, 250°C; detector temperature, 280°C; column temperature, 200°C for 2 min and then 5°C/min up to 260°C; He carrier, 26.7 cm/sec; D-glucose t_R , 20.8 min, respectively.

RAW264.7 細胞を用いた NO 産生抑制活性の検討¹⁵⁻¹⁷⁾

各サンプルは DMSO に溶解させ試験を行った. (DMSO final concentration; 0.1 %)

RAW264.7 細胞は 10% FBS, 100 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン, 100 units/mL ペニシリン G カリウムを添加した培地 (Ham's F12) にて培養した. 96 穴プレートに 1.2×10^6 cells/mL に調製した細胞懸濁液を入れ 37 °C, 5% CO₂ の条件下で 2 時間培養した. その後サンプルと刺激剤として LPS (終濃度 100 ng/mL) とリコンビナントマウス IFN- γ (終濃度 0.33 ng/mL) を加え 16 時間培養した.

インキュベートした 96 穴プレートの培養上清 100 μ L を別の 96 穴プレートに採取し, 0.1% N-ナフチルエチレンジアミン溶液 50 μ L と 1% スルファニルアミド溶液 50 μ L を加え遮光し室温で 10 分間反応させた. 反応後マイクロプレートリーダーで 520 nm (対照 655 nm) で吸光度を測定した. また, 細胞の生存率は細胞の入った 96 穴プレートに Alamar Blue 10 μ L を入れ 4 時間後の生存率を吸光度 (570 nm, refrence 655 nm) より求めた.

謝辞

本研究は、第1章から第4章の構造決定までを日本大学文理学部 藤本康雄教授、第4章の新規化合物の絶対構造の決定と活性試験を日本大学薬学部 北中 進教授のもとで行いました。博士論文作成に際し、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北中 進教授に心から感謝申し上げます。本研究のテーマ決定、直接のご指導を頂き、終始ご鞭撻を賜りました藤本康雄教授に深謝致します。

本論文を作製するにあたり、種々の有益なご助言とご高閲をいただきました日本大学薬学部 安川 憲教授、宮入伸一教授、飯島 洋教授に深く感謝致します。

研究にご協力いただいた日本大学文理学部化学科生体分子化学研究室 飯田 隆教授、鈴木秀弥氏、芋畑 亨氏、日本大学薬学部 及川直毅氏、東京理科大学薬学部 小川祥二郎助教に感謝いたします。

御助言を賜りました日本大学薬学部 内山武人准教授、牧野三津子博士、明海大学歯学部 大越絵実加博士、日本大学薬学部 旧薬品化学研究室の皆様、日本大学薬学部 松崎桂一准教授、石内勘一郎助教、昭和大学薬学部 高松 智准教授、日本大学薬学部生薬学研究室の皆様、また、MSスペクトルを測定して頂きました日本大学薬学部分析センターの目鳥幸一博士に感謝いたします。

最後に、私の我儘を許し、支えてくれた家族に感謝します。

参考文献

- 1) 笹月健彦, 免疫生物学 –免疫系の正常と病理– 原書第5版, 南江堂 (2005).
- 2) 山本一彦, アレルギー病学 普及版, 朝倉書店 (2012).
- 3) Han E. H., Park J. H., Kima J. Y., Chung Y. C., Jeong H. G., *Food. Chem. Toxicol.*, **47**, 1069–1075 (2009). Inhibitory Mechanism of Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Anaphylactic Reaction and IgE-Mediated Allergic Response in Mast Cells.
- 4) Pierini L, Harris NT, Holowka D, Baird B. *Biochemistry*, **36**, 7447–7756 (1997). Evidence Supporting a Role for Microfilaments in Regulating the Coupling between Poorly Dissociable IgE–FcεRI Aggregates and Downstream Signaling Pathways.
- 5) Olszewski, M. B, Trzaska, D., Knol, E. F., Adamczewska, V., Dastyh, J., *Eur. J. Immunol.*, **36**, 977–1008, (2006). Efficient Sorting of TNF-alpha to Rodent Mast Cell Granules is Dependent on N-linked Glycosylation
- 6) Nathan, C., *Nature*, **420**, 846–852 (2002). Points of Control in Inflammation.
- 7) Gonzalez-Juarrero M., Shimi T. S., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A. P., Orme I. M., *J. Immunol.*, **171**, 3128–3135 (2003). Dynamics of Macrophage Cell Populations During Murine Pulmonary Tuberculosis.
- 8) Uchiyama T., Furukawa M., Isobe S., Makino M., Akiyama T., Koyama T., Fujimoto Y., *Heterocycles*, **60**, 655–661 (2003). New Oleanane-Type Triterpene Saponins from *Millettia speciosa*
- 9) Suzuki Y., Yoshimura T., Yamashita K., Matsui T., Yamaki M., Shimizu K., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **283**, 707–714 (2001). Exposure of RBL-2H3 Mast Cells to Ag(+) Induces Cell Degranulation and Mediator Release.
- 10) Choi O. H., Kim J. H., Kinet J. P., *Nature*, **380**, 634–636 (1996). Calcium Mobilization via Sphingosine Kinase in Signalling by the FcεRI Antigen Receptor.
- 11) Matsuda H., Morikawa T., Managi H., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 3197–3202 (2003). Inhibitors of Nitric Oxide Production from the Rhizomes of *Alpinia galanga* : Structures of New 8-9' Linked Neolignans and Sesquieneolignan. And the references cited therein.
- 12) Park S. H., Park E. K., Kim D. H., *Planta Med.*, **71**, 24–27 (2005). Passive cutaneous anaphylaxis-inhibitory activity of flavanones from *Citrus unshiu* and *Poncirus trifoliata*.
- 13) Watanabe J., Shinmoto H., Tsushida T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1–6 (2005). Glucan-Binding Activity of Silkworm 30-kDa Apolipoprotein and Its Involvement in Defense against Fungal Infection.
- 14) Ho C., Choi E. J., Yoo G. S., Kim K. M., Ryu Y., *Planta Med.*, **64**, 577–578 (1998). Desacetylmaticarin, an Anti-Allergic Component from *Taraxacum platycarpum*.
- 15) Bogdan C., *Nat. Immunol.*, **2**, 907–916 (2001). Nitric Oxide and the Immune Response.

- 16) Ishii, R., Horie, M., Saito, K., Arisawa, M., Kitanaka, S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1568**, 74–82 (2001). Inhibitory Effects of Phloroglucinol Derivatives from *Mallotus japonicus* on Nitric Oxide Production by a Murine Macrophage-like Cell Line, RAW 264.7, Activated by Lipopolysaccharide and Interferon-gamma.
- 17) Yang Z. G., Matsuzaki K., Takamatsu S., Kitanaka S., *Molecules*, **16**, 6010–6022 (2011). Inhibitory Effects of Constituents from *Morus alba* var. *multicaulis* on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cells
- 18) 中華本草, vol.7, pp52.
- 19) Ablizl, P., Cong, Y., Musa, M., Zhu, Y., Kasimu, R., *Chem. Nat. Compd*, **45**, 445 (2009). Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyssopus cuspidatus* from Xinjiang, China
- 20) Xue, D., Chen, N., Pan, X., Liu, Y., *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, **11**, 90–92 (1990). Chemical Constituents of the Essential Oil of *Hyssopus cuspidatus* Boriss.
- 21) 中華本草, vol.7, pp55.
- 22) 中華本草, vol.7, pp237.
- 23) Oganessian, G. B., Mnatsakanyan, V. A., *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **6**, 719–720 (1992). Flavonoids of *Dracocephalum multicaule*.
- 24) Oganessian, G. B., Galstyan, A. M., *Armyanskii Khimicheskii Zhurnal*, **43**, 210–211 (1990). Oleanolic Acid and Flavonoid Glycosides from *Ziziphora clinopodioides* Lam.
- 25) Rutovskii, B. N., Vinogradova, I. V., *Trudy Nauchnogo Khimiko-Farmatsevticheskogo Instituta* **17**, 7–14 (1927). *The Oil from Ziziphora clinopodioides* L.
- 26) Ozturk S., Ercisli S., *Food Control*, **18**, 535–540 (2007). Antibacterial Activity and Chemical Constitutions of *Ziziphora clinopodioides*.
- 27) Sonboli A., Atri M., Shafiei S., *Chem. Biodiversity*, **7**, 1784–1789 (2010). Intraspecific Variability of the Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. *rigida* from Iran.
- 28) Araújo, E. C. C., Lima, M. A. S., Nunes, E. P., Silveira, E. R., *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**, 1336–1341 (2005). Abietane Diterpenes from *Hyptis platanifolia*.
- 29) Hamada H., Yasumune H., Fuchikami Y., Hirata T., Sattler I., H. Williams J., Scott A. I., *Phytochemistry*, **44**, 615–621 (1997). Biotransformation of Geraniol, Nerol and (+)- and (–)-Carvone by Suspension Cultured Cells of *Catharanthus roseus*.
- 30) Fernández I., Pedro J. R., Vidal R., *Phytochemistry*, **34**, 733–736 (1993). Norisoprenoids from *Centaurea aspera* and *C. salmantica*
- 31) Wong H., Brown GD., *J. Nat. Prod.*, **65**, 481–486 (2002). Dimeric Guaianolides and a Fulvenoguaianolide from *Artemisia myriantha*.
- 32) Dapkevicius A., van Beek T. A., Lelyveld G. P., van Veldhuizen A., de Groot A., Linssen J. P. H., Venskutonis R., *J. Nat. Prod.*, **65**, 892–896 (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* leaves.

- 33) Frontana B., Cárdenas J., Rodríguez-Hahn L., *Phytochemistry*, **36**, 739–741 (1994). Diterpenoids from *Salvia coulteri*.
- 34) Hòrie T., Ohtsuru Y., Shibata K., Yamashita K., Tsukayama M., Kawamura Y., *Phytochemistry*, **47**, 865–874 (1998). ¹³C NMR Spectral Assignment of the A-ring of Polyoxygenated Flavones.
- 35) Zahir, A., Hossang, A., Bodo, B., *J. Nat. Prod.*, **59**, 701–701 (1996). DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*.
- 36) Tundis R., Deguinb B., Menichinia F., Tillequin F., *Biochem. System. Ecol.*, **30**, 689–691 (2002). Iridoids from *Putoria calabrica*.
- 37) Murakami C., Myoga K., Kasai R., Ohtani K., Kurokawa T., Ishibashi S., Darit F., Padolna W. G., Yamasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2129–2131 (1993). Screening of Plant Constituents for Effect on Glucose Transport Activity in Ehrlich Ascites Tumour Cells.
- 38) Taniguchi S., Imayoshi Y., Kobayashi E., Takamatsu Y., Ito H., Hatano T., Sakagami H., Tokuda H., Nishino H., Sugita D., Shimura S., Yoshida T., *Phytochemistry*, **59**, 315–323 (2002). Production of Bioactive Triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli.
- 39) Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092–4096 (1991) High-field FT NMR Application of Mosher's method. The Absolute Configurations of Marine Terpenoids.
- 40) Satoh M., Ishii M., Watanabe M., Isobe K., Uchiyama T., Fujimoto Y., 2002. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 126–128 (2002). Absolute Structure of Panaxytriol.
- 41) Hara S., Okabe H., Mihashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 501–506 (1987) Gas-liquid Chromatographic Separation of Aldose Enantiomers as Trimethylsilyl Ethers of Methyl 2-(Polyhydroxyalkyl)-Thiazolidine-4(R)-Carboxylates.
- 42) de la Torre M. C., Rodriguez B., Bruno M., Vassallo N., Bondi ML., Piozzi F., Servettaz O., *J. Nat. Prod.*, **60**, 1229–1235 (1997). Neoclerodane Diterpenoids from *Scutellaria polyodon*.
- 43) Tomimori T., Miyaichi Y., Imoto Y., Kizu H., Namba T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4457–4463 (1985). Studies of Nepalese Crude Drugs. V. On the Flavonoid Constituents of the Root of *Scutellaria discolor* Colebr. (1).
- 44) Siddikov G. U., Yuldashev M. P., Batirov E. Kh., Abdullaev Sh, V., *Chem. Nat. Compd.*, **42**, 356–357 (2006). Flavonoids from *Scutellaria cordifrons* and *S. phyllostachya* Roots
- 45) Komada Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3128–3130 (1989). Isolation of Ilavonoids from *Populw nigra* as. 6-4-3-Ketosteroid (5- α) Reductase Inhibitors.
- 46) Huang W. H., Chien P. Y., Yang C. H., Lee A. R., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 339–340 (2003). Novel Synthesis of Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* GEORGI.
- 47) Chen L. J., Games D. E., Jones J., *J. Chromatogr. A*, **988**, 95–105 (2003). Isolation and Identification of Four Flavonoid Constituents from the Seeds of *Oroxylum indicum* by High-speed Counter-current Chromatography.

- 48) Horie T., Otsuru Y., Shibata K., Yamashita K., Tsukayama M., Kawamura Y., *Phytochemistry*, **47**, 865–874 (1998). ¹³C NMR Spectral Assignment of the A-ring of Polyoxygenated Flavones.
- 49) Stevens J. F., Wollenweber E., Ivancic M., Hsu V. L., Sundberg S., Deinzer ML., *Phytochemistry*, **51**, 771–780 (1999). Leaf Surface Flavonoids of *Chrysothamnus*.
- 50) Silva M., Wiesenfeld A., Sammes P. G., Tyler T. W., *Phytochemistry*, **16**, 379–385 (1977). New Sesquiterpenes from *Pleocarphus revolutus*.
- 51) Tomimori T., Miyaichi Y., Imoto Y., Kizu H., Tanabe Y., *Yakugaku Zasshi*, **103**, 607–611 (1983). Studies on the Constituents of *Scutellaria* species. II. On the Flavonoid Constituents of the Root of *Scutellaria baicalensis* Georgi. 2.
- 52) Reddy M. K., Bhaskar Reddy M. V., Jayakrishna G., Gunasekar D., Caux C., Bodo B., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 191–193 (2003). Two New Flavonoids from *Andrographis rothii*.
- 53) Gupta S. R., Seshadri T. R., *Proc. Indian. Acad. Sci, Section A*, **37A**, 611–619 (1953). Nuclear Oxidation in Flavones and Related Compounds. XLIII. The Preparation and *p*-Oxidation of Flavones Analogous to Datisctetin and Morin
- 54) Kikuchi Y., Miyaichi Y., Yamakuchi Y., Kizu H., Tomimori T., Vetschera K., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 199–201 (1991). Studies on the Constituents of *Scutellaria* species. XIV. On the Constituents of the Roots and the Leaves of *Scutellaria alpina* L.
- 55) Tomimori T., Miyaichi Y., Imoto Y., Kizu H., Tanabe Y., *Yakugaku Zasshi*, **104**, 524–528 (1984). Studies on the constituents of *Scutellaria* species. III. On the Flavonoid Constituents of the Root of *Scutellaria baicalensis* Georgi (3)
- 56) Kikuchi Y., Miyaichi Y., Yamaguchi Y., Kizu H., Tomimori Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1047–1050 (1991). Studies on the Nepalese Crude Drugs. XII. On the Phenolic Compounds from the Root of *Scutellaria prostrata* Jacq. ex Benth
- 57) Iinuma M., Matsuura S., Kusuda K., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 708–716 (1980). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (nmr) Spectral Studies on Polysubstituted Flavonoids. I. Carbon-13-nmr Spectra of Flavones.
- 58) Zhang Y. Y., Guo Y. Z., Onda M., Hashimoto K., Ikeya Y., Okada M., Maruno M., *Phytochemistry*, **35**, 511–514 (1994). Four Flavonoids from *Scutellaria baicalensis*.
- 59) Kishore P. H., Bhaskar Reddy M. V., Reddy M. K., Gunasekar D., Caux C., Bodo B., *Phytochemistry*, **63**, 457–461 (2003). Flavonoids from *Andrographis lineata*.
- 60) Isobe T., Ohsaki A., Nagata K., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 291–294 (2002). Antibacterial Constituents Against *Helicobacter pylori* of Brazilian Medicinal Plant, Pariparoba.
- 61) Nakanishi T., Inada A., Kambayashi K., Yoneda K., *Phytochemistry*, **24**, 339–341 (1985). Flavonoid Glycosides of the Roots of *Glycyrrhiza uralensis*.
- 62) Miyaichi Y., Tomimori T., *Natural Medicines*, **49**, 350–353 (1995). Studies on the Constituents of *Scutellaria* Species XVII.

- 63) Ishimaru K., Nishikawa K., Omoto T., Asai I., Yoshihira K., Shimomura K., *Phytochemistry*, **40**, 279–281 (1995). Two Flavone 2'-Glucosides from *Scutellaria baicalensis*.
- 64) Kurashima K., Fujii M., Ida Y., Akita H., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 270–275 (2004). Simple Synthesis of β -D -Glycopyranosides Using β -Glycosidase from Almonds.
- 65) Kubo M., Sasaki H., Endo T., Taguchi H., Yosioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3097–3101 (1986). The Constituents of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. II. Structure of a New Monoterpene Glucoside, Schizonepetoside C.
- 66) Yue J., Lin Z., Wang D., Sun H., *Phytochemistry*, **36**, 717–719 (1994). A Sesquiterpene and other Constituents from *Erigeron breviscapus*.
- 67) Sasaki H., Taguchi H., Endo T., Yosioka I., Iitaka Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1636–1643 (1981). The constituents of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. I. Structures of Two New Monoterpene Glucosides, Schizonepetosides A and B.
- 68) Dommissie R. A., Hoof L. V., Vlietinck A.J., *Phytochemistry*, **25**, 1201–1204 (1986). Structural Analysis of Phenolic Glucosides from *Salicaceae* by NMR Spectroscopy.
- 69) Park Y., Moon B. H., Yang H., Lee Y., Lee E., Lim Y., *Magn. Reson. Chem.*, **45**, 1072–1075 (2007). Complete Assignments of NMR data of 13 Hydroxymethoxyflavones.
- 70) Murakami C., Myoga K., Kasai R., Ohtani K., Kurakawa T., Ishibashi S., Dayrit F., Padolina W. G., Yamasaki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2129–2131 (1993). Screening of Plant Constituents for Effect on Glucose Transport Activity on Ehrlich Ascites Tumor Cells.
- 71) Wang N. L., Wang J., Yao X, S., Kitanaka S., *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, **9**, 449–455 (2005) Two New Monoterpene Glycosides and a New (+)-Jasmololone Glucoside from *Bidens parviflora* Willd. And the references cited therein.
- 72) Checker R., Sandur S. K., Sharma D., Patwrdhan R. S., Jayakumar S., Kohli V., Sethi G., Aggarwal B. B., Sainis K. B., *Plos One*, **7**, e31318, (2012). Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT.
- 73) Ryu S. Y., Oak M. H., Yoon S. K., Cho D. I., Yoo G. S., Kim T. S., Kim K. M., *Planta Med.*, **66**, 358–360 (2000). Anti-allergic and Anti-inflammatory Triterpenes from the Herb of *Prunella vulgaris*.
- 74) Tapondjou L. A., Lontsi D., Sondengam B. L., Choi J., Lee K. T., Jung H. J., Park H. J., *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 143–146 (2003). *In vivo* Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Two Triterpenes, Ursolic acid and 23-Hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*.

主論文目録

1. Megumi Furukawa, Mitsuko Makino, Emika Ohkoshi, Taketo Uchiyama, Yasuo Fujimoto. Terpenoids and phenethyl glucosides from *Hyssopus cuspidatus* (Labiatae). *Phytochemistry*, **72** (17), 2244–2252, 2011.
2. Megumi Furukawa, Hideya Suzuki, Mitsuko Makino, Shoujiro Ogawa, Takashi Iida, Yasuo Fujimoto. Studies on the constituents of *Lagochilus leiacanthus* (Labiatae). *Chem. Pharm. Bull.*, **59** (12), 1535–1540, 2011.
3. Megumi Furukawa, Naoki Oikawa, Toru Imohata, Mitsuko Makino, Shoujiro Ogawa, Takashi Iida, Yasuo Fujimoto, Susumu Kitanaka. Monoterpene glucosides from *Ziziphora clinopodioides* (Labiatae). *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (3), 397–401, 2012.

副論文

1. Megumi Furukawa, Go Sudo, Mitsuko Makino, Taketo Uchiyama, Susumu Kitanaka. Chemical Constituents of Whole Plants of *Dodartia orientalis* L. and Their Inhibitory Effects on the Release of β -Hexosaminidase. *Shoyakugaku zasshi*, **67** (2), 67–68, 2013.