

2016 年度 課程博士学位論文

アーユル・ヴェーダ伝承薬物を素材とした機能性小分子の探索研究

—オトメアゼナ, オオバゲツキツ, チャの含有成分—

太田 智絵

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Tomoe Ohta, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Takahiro Matsumoto, Masashi Fukaya, Mamiko Yano, Masayuki Yoshikawa, and Hisashi Matsuda : Chemical structures of constituents from the whole plant of *Bacopa monniera*. *J. Nat. Med.*, **70**, 404–411 (2016). [第一章 第一節, 第二章]
- 2) Tomoe Ohta, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Takahiro Matsumoto, Keiko Ogawa, Katsuyoshi Fujimoto, Masashi Fukaya, Masayuki Yoshikawa, and Hisashi Matsuda : Acylated oleanane-type triterpene oligoglycosides from the flower buds of *Camellia sinensis* var. *assamica*. *Tetrahedron*, **71**, 846–851 (2015). [第一章第三節, 第二章]
- 3) Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Nami Yokota, Katsuyoshi Fujimoto, Takahiro Matsumoto, Tomoe Ohta, Keiko Ogawa, Sayuri Maeda, Shino Nishida, Hisashi Matsuda, and Masayuki Yoshikawa : Alkaloids from Sri Lankan curry-leaf (*Murraya koenigii*) display melanogenesis inhibitory activity : structures of karapinchamines A and B. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1043–1049 (2013). [第一章第二節, 第二章]
- 4) Souichi Nakashima, Tomoe Ohta, Seikou Nakamura, Yoshimi Oda, Mari Koumoto, Eri Kashiwazaki, Maiko Kado, Atsumi Shimada, Ryogo Akita, and Hisashi Matsuda : Caffeic acid derivatives from *Bacopa monniera* plants as inhibitors of pancreatic lipase activity and their structural requirements. *Nat. Prod. Commun.*, **11**, 1855–1858 (2016). [第二章]

目次

緒 論.....	1
本 論.....	4
第一章 アーユル・ヴェーダ伝承薬物の含有成分探索	4
第一節 オトメアゼナ (<i>Bacopa monniera</i>) 全草の含有成分	4
第一項 本植物について	4
第二項 含有成分の抽出・単離	4
第三項 構造類似体や構造異性体の単離	5
第四項 新規成分の化学構造	7
第五項 小括	17
第二節 オオバゲッキツ (<i>Murraya koenigii</i>) 葉部の含有成分	18
第一項 本植物について	18
第二項 含有成分の抽出・単離	18
第三項 新規成分の化学構造	20
第四項 小括	22
第三節 アッサム種チャ (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>) 花部の含有成分	23
第一項 本植物について	23
第二項 含有成分の抽出・単離	23
第三項 新規成分の化学構造	24
第四項 アッサム種および中国種チャ花部サポニン成分の比較	33
第五項 小括	33
第二章 含有成分の生物活性評価	34
第一項 アシル化グレリンの分泌量変化	34
第二項 メラニン生成抑制作用	36
第三項 腓リパーゼ阻害作用	39
第四項 A β 凝集抑制作用	40
結 論.....	41
謝 辞.....	42
実験の部	43
第一章の実験	44
第一節の実験	44
第二項および第三項の実験	44
第四項の実験	46
第二節の実験	49
第二項の実験	49
第三項の実験	50

第三節の実験	51
第二項の実験	51
第三項の実験	51
第二章の実験	54
第一項の実験	54
第二項の実験	55
第三項の実験	57
第四項の実験	57
引用文献	58

緒論

これまでに市販された医薬品の 50%以上が天然物およびその誘導体，または天然物に関連した化合物であると言われている。¹⁾ 世界で最も売れている薬剤はプラバスタチンなどの抗高脂血症剤であり，天然化合物由来医薬品である．その他，ストレプトマイシン (抗結核薬) などの抗生物質，タクロリムス (免疫抑制薬)，ブレオスタチン，エポチロンなどの抗がん剤，アベルメクチン (駆虫薬)，ミカファンギン (抗真菌薬) など広範な疾患に対応した薬剤が天然物から生み出されてきた．このように天然物由来医薬品が数多く存在することの理由として，植物，動物および微生物等が生産する天然化合物が人智では考えられない多彩な化学構造を有し，生命活動に伴って産生されるため豊富な生物活性を示すものが多いことが挙げられる．また，未だに含有成分が明らかにされていない植物が世界各地に数多く存在することからも，天然物から機能性成分を有する化合物を探索することは，創薬において意義深いと考えられる．

アーユル・ヴェーダ医学はインドおよびスリランカにおける伝統医学であり，サンスクリット語でアーユルは「生命」，ヴェーダは「知識，科学」を意味し，世界保健機構が正式に奨励している東洋医学の一つである．アーユル・ヴェーダ医学で使用される伝承薬物は約 2000 から 2500 種類あるとされ，それらは経験的に取捨選択され，現在まで伝承されていることから，安全性が高く，効果が実証されている医薬素材といえる．アーユル・ヴェーダ伝承薬物から医薬品原料が得られた代表例として，蛇の咬傷や精神疾患に用いられてきたインドジャボクが挙げられる．インドジャボクの根から単離されたレセルピンは，血圧降下剤や精神安定剤として使用されてきた．またウコンから単離されたクルクミンは抗アレルギー，胃粘膜保護および抗がん作用を，コショウから単離されたピペリンは抗肥満作用を期待してサプリメントとして用いられている．このようにアーユル・ヴェーダ伝承薬物は医薬品となる機能性小分子を含有している可能性がある．しかし，アーユル・ヴェーダ伝承薬物の原著論文報告数は代表的な中国伝統薬物の約 10 分の 1 であることから，その科学研究が十分ではない。²⁾ 以上のことから，アーユル・ヴェーダ伝承薬物の有効成分の解明や薬理的知見を得ることは薬学領域において重要な課題の一つであるといえる．

そこで著者はアーユル・ヴェーダ伝承薬物の中でも使用経験が豊富であるにも関わらず，含有成分探索が不十分である素材を用いて研究を行った．すなわち，伝承医学において記憶改善を有するオトメアゼナ (*Bacopa monniera*) 全草，食欲調整作用を有するオオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部およびアッサム種チャ (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 花部について含有成分の探索研究を行った．

1) インド産オトメアゼナ (*Bacopa monniera*) 全草：ゴマノハグサ科オトメアゼナはインド，中国，日本などのアジアに広く自生する湿性の多年草であり，アーユル・ヴェーダ伝承医学においてその全草は記憶力や学習能力の向上を目的に用いられてきた．その全草の含有成分として，フェニルプロパノイド，およびトリテルペン類などが報告されている。³⁾ またオトメ

アゼナ全草の抽出エキ스는高齢者を対象とした二重盲検無作為化プラセボ比較試験において記憶改善効果が認められている。⁴⁾ しかしながら、オトメアゼナの有効成分は不明である。加えて、その全草の含有成分の分離、精製は一般的な逆相 HPLC 用 C18 カラムの使用では困難であった。その理由としてオトメアゼナは多種の構造類似体や構造異性体が含有しているのではないかと推察し、 π - π 相互作用および双極子相互作用を利用した逆相 HPLC 用ペンタフルオロフェニル基結合型カラムを用いるなど成分分離条件の詳細な検討を行った。その結果、アセタール構造を有する珍しい 2 種の新規変形ダンマラン型トリテルペン配糖体 bacomosaponin A (1), B (2) および 5 種の新規フェニルエタノイド配糖体 bacomoside A-C₂ (3-7) を単離、構造決定することができた (Figure 1)。新規成分の化学構造は NMR などの各種スペクトルデータの詳細な解析および化学反応の結果から決定した。単離された化合物である 1, 2 および 8-11 は変形ダンマラン型トリテルペン配糖体であり、オトメアゼナ以外の植物からは単離されておらず、この植物に特有の成分であると推測された。

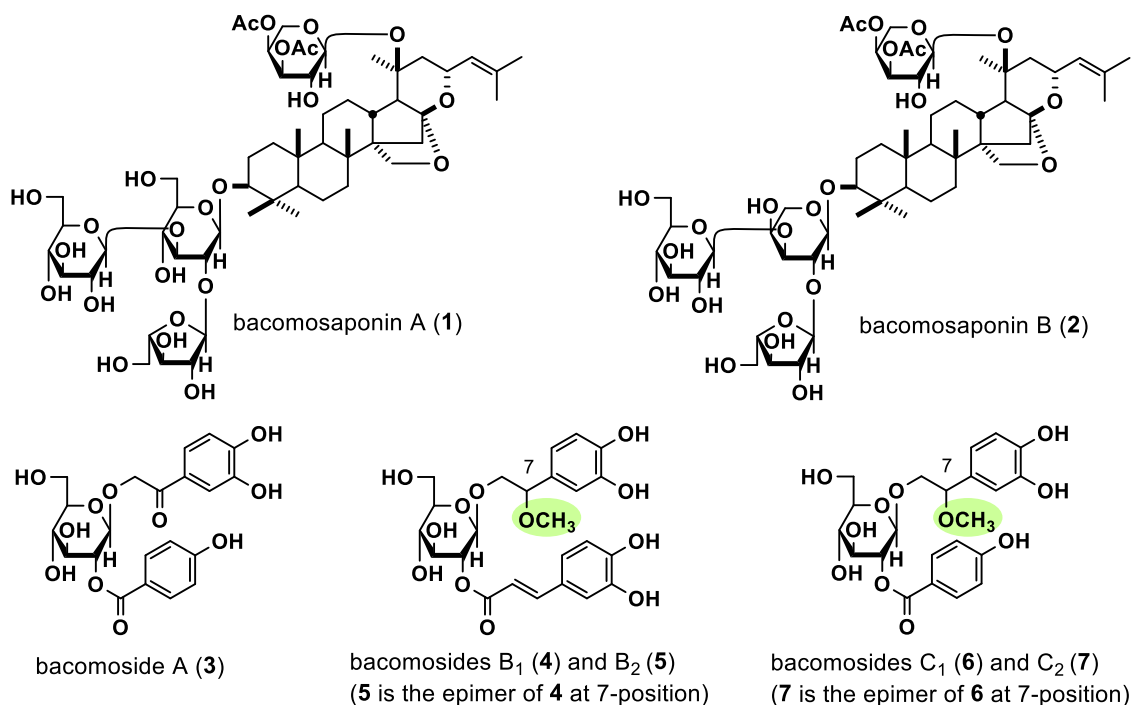


Figure 1. New constituents (1-7) from the whole plant of *B. monniera*

2) スリランカ産オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部：ミカン科オオバゲッキツはインドやスリランカなどの熱帯、亜熱帯地域に自生する多年生木本で、シンハラ語で「カラピンチャ」と言われている。その葉部はカレーリーフと呼ばれており、香辛料として使われ、アーユル・ヴェーダ伝承医学において健胃、消化改善、鎮吐などを期待して用いられる。アルカロイド類に有意な生物活性が認められたことから、それらを中心に成分探索に着手し、2 種の新規カルバゾール型アルカロイド karapinchamine A (20) および B (21) を単離し、それらの化学構造を決定するとともに計 12 種の既知カルバゾール型アルカロイドを単離した (Figure 2)。単離した化合物のうち、化合物 21-23 および 31 は環状構造を有する珍しいアルカロイドであると推定された。

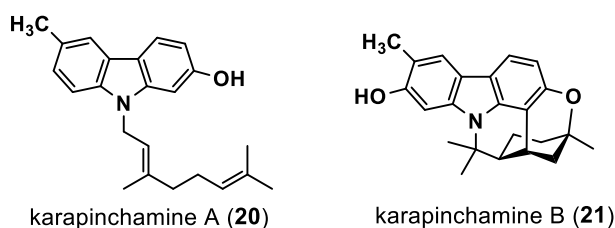


Figure 2. New constituents (**20** and **21**) from the leaves of *M. koenigii*

3) インド産アッサム種チャ (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 花部：ツバキ科植物チャノキは多年生の常緑樹であり、アッサム種はインド、スリランカなどで栽培されている。著者らはこれまでに、中国種茶花 (*C. sinensis*, 花部) 由来サポニン成分にマウスの摂餌量抑制作用を見出した.⁵⁾ 一方、アッサム種茶花は中国種茶花と異なり、これまでにアッサム種茶花の含有成分の報告はされていなかった。種々検討の結果、アッサム種茶花は多様な構成糖を有するサポニンを含有していることがわかった。そこで、逆相 HPLC 用コレステリル基結合型 C18 カラム等を用いて詳細に分離条件を検討し成分研究を行ったところ、8 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 floraassamsaponin I–VIII (**34–41**) および 3 種の既知成分を単離することができた (Figure 3)。

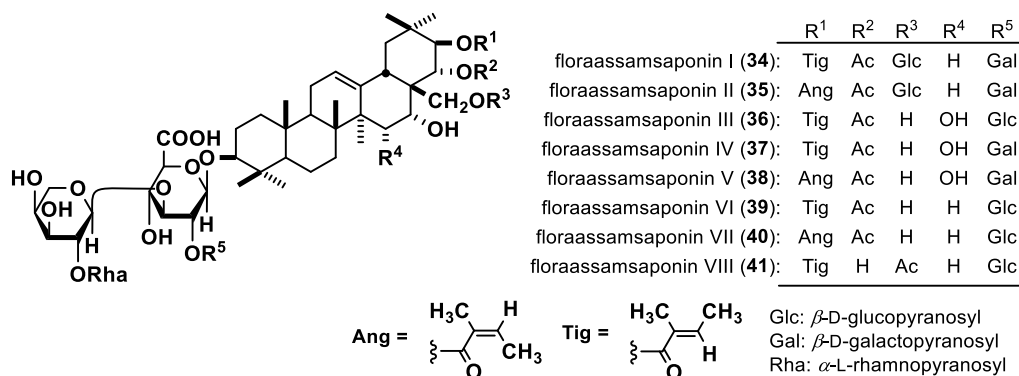


Figure 3. New constituents (**34–41**) from the flower buds of *C. sinensis* var. *assamica*

4) 含有成分の生物活性評価

オトメアゼナ、オオバゲッキツおよびアッサム種チャに含まれる主要成分およびその関連化合物について、伝承薬効に関連した生物活性評価として食欲調整作用（胃内分泌細胞におけるアシル化グレリン量の分泌量変化）の検討を行った。その結果、オオバゲッキツ葉部の成分 **24** [促進率：193.7% (10 μM)] に有意なグレリン分泌促進作用が認められた。その他、B16 melanoma 4A5 細胞におけるメラニン生成抑制作用の検討を行った。その結果、オオバゲッキツ葉部の成分 **25** (IC₅₀ : ca. 1.4 μM) および **32** (IC₅₀ : 1.2 μM) に比較対照物質であるアルブチン (IC₅₀ = 174 μM) と比較して強いメラニン生成抑制作用を見出した。

本論

第一章 アーユル・ヴェーダ伝承薬物の含有成分探索

第一節 オトメアゼナ (*Bacopa monniera*) 全草の含有成分

第一項 本植物について

アジアに広く自生する湿性の多年草であるオトメアゼナは日本では水草として使用されている。アーユル・ヴェーダ伝承医学においてその全草は記憶力や学習能力を向上させるハーブとして用いられてきた。その全草の含有成分として、monnieraside I-III などのフェニルプロパノイド、bacobitacin A-D, bacoside A₁-A₅ などトリテルペン類が報告されている。³⁾ これまでの研究において、健常成人を対象として、オトメアゼナ全草の抽出エキスを 3 か月間摂取させたところ、記憶改善作用が認められている。⁴⁾ その他、高齢者を対象とした二重盲検無作為化プラセボ比較試験においてオトメアゼナ全草の抽出エキスを 12 週間摂取させたところ、言語に関する記憶能力が向上したことが報告されている。⁶⁾ このようにオトメアゼナ全草の抽出エキスの記憶力や学習能力を改善させる効果について多数の研究がなされている。一方、オトメアゼナ全草の有効成分の生物活性評価については報告がほとんどなく、体系化されていないことから含有成分の探索を行うこととした。

第二項 含有成分の抽出・単離

インド産オトメアゼナ (2 kg) の乾燥全草を MeOH で 3 回熱時抽出後、溶媒を減圧留去し、MeOH 抽出エキス (608.82 g, 30.4%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H₂O (1:1) で分配し、次いで H₂O 移行部を *n*-BuOH (1:1) で分配し、EtOAc 移行部 (31.8 g, 4.8%), *n*-BuOH 移行部 (57.94 g, 8.8%), H₂O 移行部 (110.3 g, 16.8%) を得た。新規化合物が含有すると考えられる有機層を中心に単離を行い、EtOAc 移行部および *n*-BuOH 移行部を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC で繰り返し分離精製し、2 種の新規ダンマラン型トリテルペン配糖体 bacomosaponin A (**1**, 0.012%) および B (**2**, 0.00078%), 5 種の新規フェニルエタノイド配糖体 bacomoside A (**3**, 0.016%), B₁ (**4**, 0.0051%), B₂ (**5**, 0.0046%), C₁ (**6**, 0.0020%), および C₂ (**7**, 0.0017%) を単離、構造決定した。また既知化合物である、bacoside A₃ (**8**, 0.097%),⁷⁾ bacopaside VII (**9**, 0.012%),⁸⁾ bacopaside II (**10**, 0.062%),⁹⁾ bacopasaponin C (**11**, 0.0061%),¹⁰⁾ monnieraside III (**12**, 0.0022%),¹¹⁾ plantaionoside B (**13**, 0.012%),¹¹⁾ desrhamnosyl isoacteoside (**14**, 0.20%),¹²⁾ 1-(2-hydroxy-4-hydroxymethyl)phenyl-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (**15**, 0.010%),¹³⁾ (*E*)-4-hydroxymethylphenyl-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (**16**, 0.037%),¹³⁾ cucurbitacin E (**17**, 0.0011%),¹⁴⁾ cucurbitacin I (**18**, 0.00041%),¹⁵⁾ および cucurbitacin E 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**19**, 0.012%)¹⁶⁾ を単離、同定した (Figure 4)。既知化合物については、質量分

析 (MS) および核磁気共鳴 (NMR) などのスペクトルデータおよび旋光度を、標品のデータと直接または文献値と比較することにより同定した。

なお、これらの単離成分の収率は、*B. monniera* 全草 (乾燥品) からの単離収率である。今回単離した既知化合物のうち、desrhamnosyl isoacteoside (**14**), 1-(2-hydroxy-4-hydroxymethyl)phenyl-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (**15**) および (*E*)-4-hydroxymethylphenyl-6-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (**16**) は今回本植物からの初めて単離された。

第三項 構造類似体や構造異性体の単離

構造類似体や構造異性体が混合しているフラクションについて頻用されている逆相 HPLC 用 C18 カラム (ナカライテスク C18-MS-II カラム) で分析を行ったところ、**13** と **15** のピーク、**14** と **16** のピークが混合し、分離が困難であった。このフラクションは、UV スペクトルや NMR スペクトルから水酸基に富む芳香族配糖体の混合物であると予想された。そこで、C18-MS-II カラムがもつ疎水性相互作用だけでなく、双極子-双極子相互作用と π - π 相互作用を有する逆相 HPLC 用ペンタフルオロフェニル基結合型カラム (ナカライテスク 5-PFP カラム) を用いたところ、良好に分離可能であることが分かった (Figure 5)。

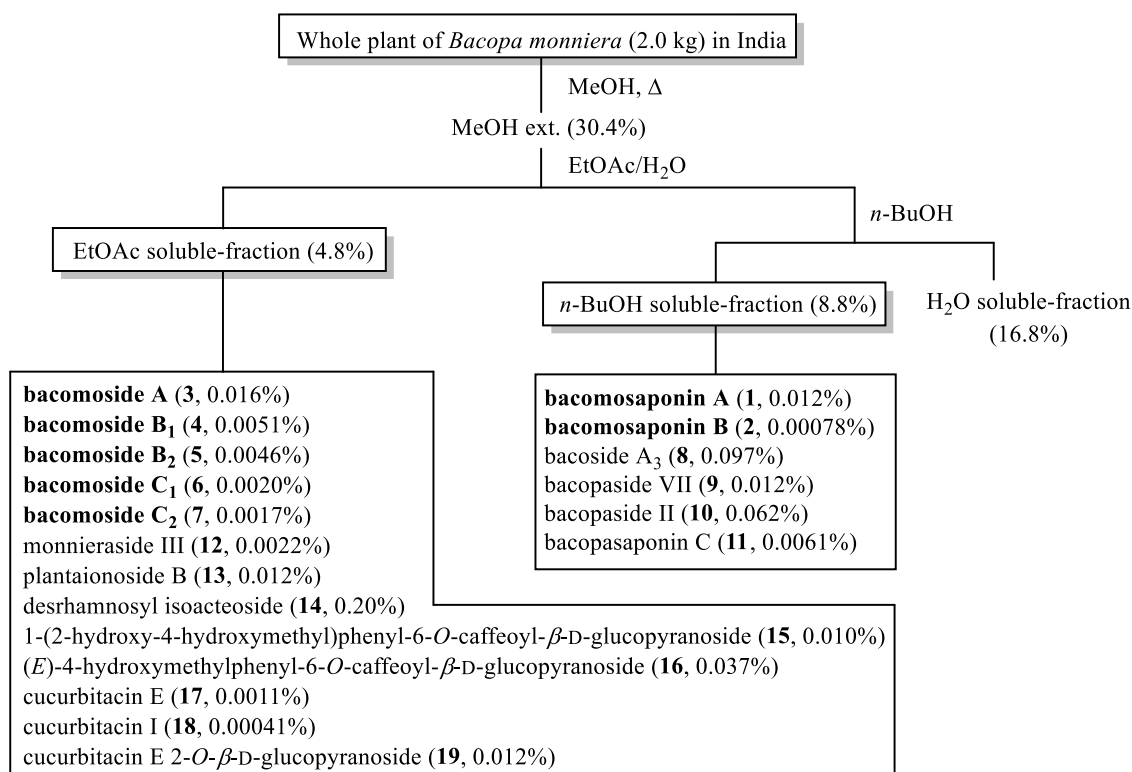


Chart 1. Isolation procedure of constituents (**1–19**) from the whole plant of *B. monniera*

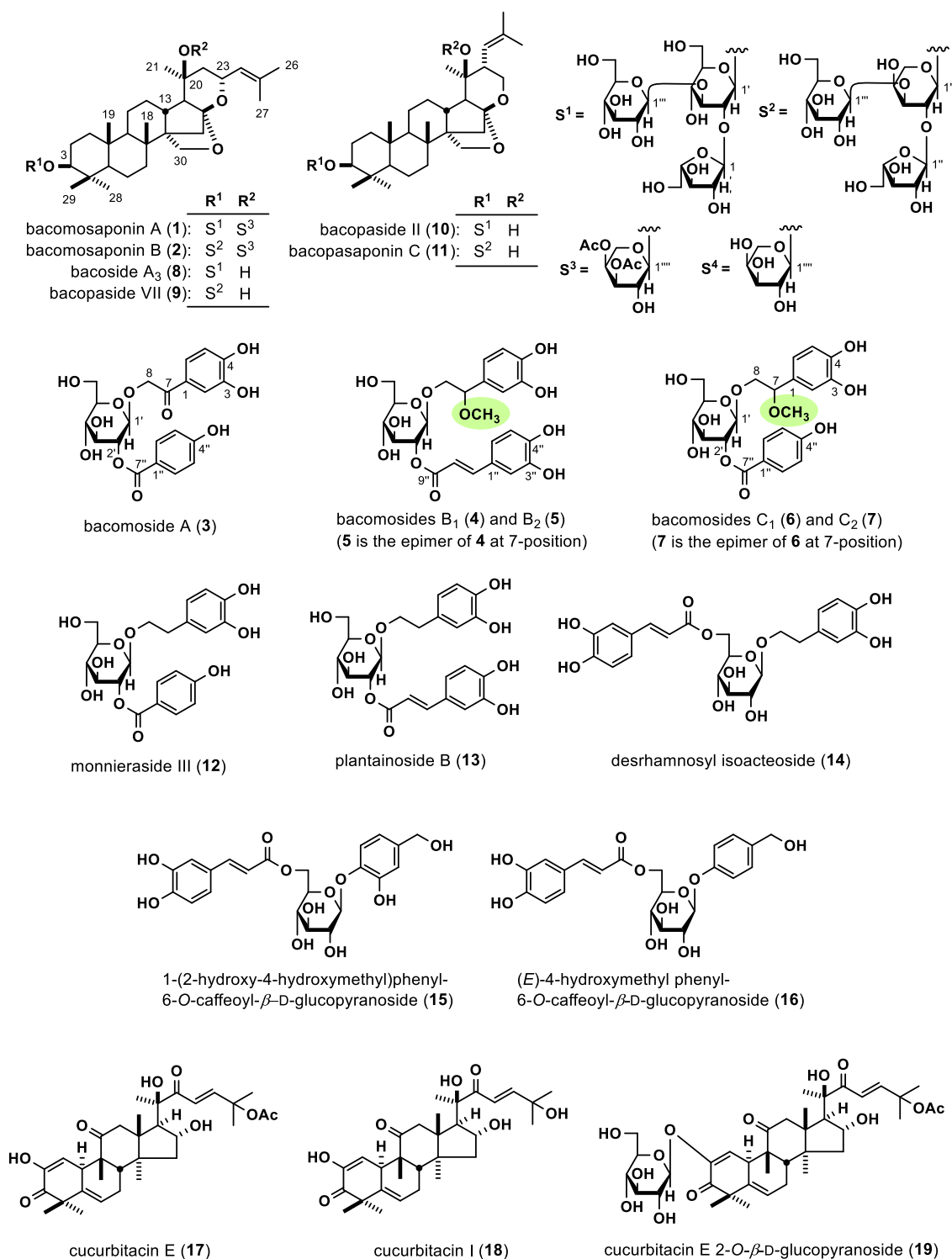
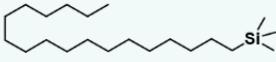
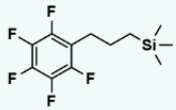
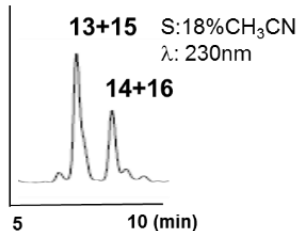
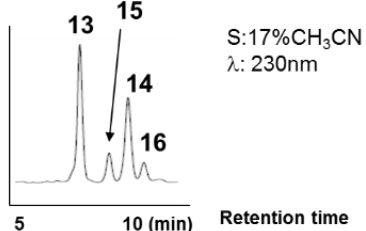


Figure 4. Isolated constituents (1–19) from *B. monniera*

使用HPLCカラム	C ₁₈ -MS-II	5PFP
固定相構造		
化学結合基	オクタデシル基	ペンタフルオロフェニルプロピル基
主な相互作用	疎水性相互作用	疎水性, 双極子-双極子, π - π 相互作用
分析結果		

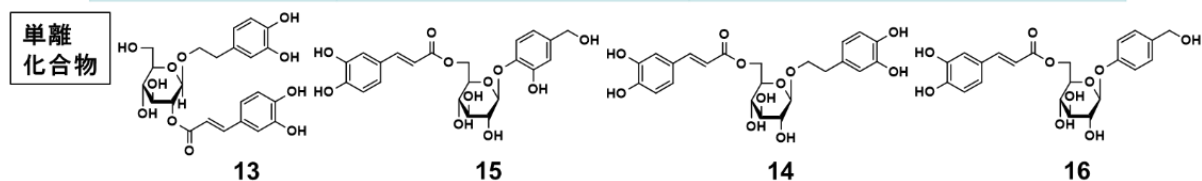


Figure 5. Isolated method of Fr. 16-8

第四項 新規成分の化学構造

Bacomosaponins A (**1**) および B (**2**) は負の旋光性 (**1**: $[\alpha]_D^{19} -2.9$; **2**: $[\alpha]_D^{19} -3.8$, in MeOH) を示す白色の非結晶性粉末として得られた. IR スペクトルから水酸基, アセチル基および芳香族 (**1**: 3400, 1743, 1635, 1083 cm^{-1} , **2**: 3392, 1745, 1643, 1076 cm^{-1}) の存在が示唆された. さらに FAB-MS において擬似分子イオンピーク [**1**: m/z 1167 ($M+Na$)⁺, **2**: m/z 1137 ($M+Na$)⁺] が観測され, 高分解能 FAB-MS から分子式 (**1**: C₅₆H₈₈O₂₄, **2**: C₅₅H₈₆O₂₃) を有する化合物であることが判明した. 化合物 **1** を 9% HCl-dry MeOH (1.0 mL) で処理すると,¹⁷⁾ ebelin lactone¹⁸⁾ を得たことから, **1** のアグリコンが jujubogenin 型トリテルペンであることが示唆された (Figure 6). なお jujubogenin 型トリテルペンから ebelin lactone の反応は Kawai らが報告するように, アセタール構造を有する **1** の脱水による開環反応によって ebelin lactone が生成すると考えられる (Figure 7).^{19,20)} また, **1** および **2** を 5% K₂CO₃ 水溶液でのアルカリ加水分解を行うことにより, **1** から bacopasaponin F, **2** から bacopasaponin E を得た (Figure 8).²¹⁾ 化合物 **1** および **2** の ¹H-NMR (Table 1), ¹³C-NMR (Table 2) スペクトル (pyridine-*d*₅), および各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果, アグリコン部位 [**1**: δ 0.58, 1.03, 1.04, 1.26, 1.38, 1.69, 1.81 (3H each, all s, H₃-19, 18, 29, 28, 21, 26, 27), 3.25 (1H, dd like, H-3), 5.30 (1H, t-like, H-23), 5.50 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-24), **2**: δ 0.55, 0.97, 0.99, 1.25, 1.33, 1.63, 1.75 (3H each, all s, H₃-19, 18, 29, 28, 21, 26, 27), 3.17 (1H, dd-like, H-3), 5.24 (1H, t-like, H-23), 5.47 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-24)], 2 つのアセチル基 [**1**: δ 1.99, 2.08 (3H each, both s, H₃-2''', 2'''), **2**: δ 1.93, 1.97 (3H each, both s, H₃-2''', 2''')], および糖鎖構造 {**1**: β -D-glucopyranose [δ 5.00 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1'), 5.22 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-

1'''), α -L-arabinofuranose [δ 6.24 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-1''), α -L-arabinopyranose [δ 4.99 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-1'''), 2: α -L-arabinopyranose [δ 4.70 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-1'), 4.93 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-1'''), α -L-arabinofuranose [δ 6.04 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-1''), β -D-glucopyranose [δ 5.08 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1'')]]}の存在が明らかとなった. さらに, アグリコン, アセチル基, および糖の結合位置は HMBC 相関により決定した. すなわち, H-1' と C-3; H-1' と C-2'; H-1'' と C-3'; H-1'' と C-20; H-3'' と C-1''; そして H-4'' と C-1'' の間に HMBC 相関がみられたことから, その結合位置を決定した(Figure 9). そして, bacomosaponins A および B の構造を 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)[α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl}-20-O-(3,4-diacetyl- α -L-arabinopyranosyl) jujubogenin (1) および 3-O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)[α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl}-20-O-(3,4-diacetyl- α -L-arabinopyranosyl) jujubogenin (2) と決定した.

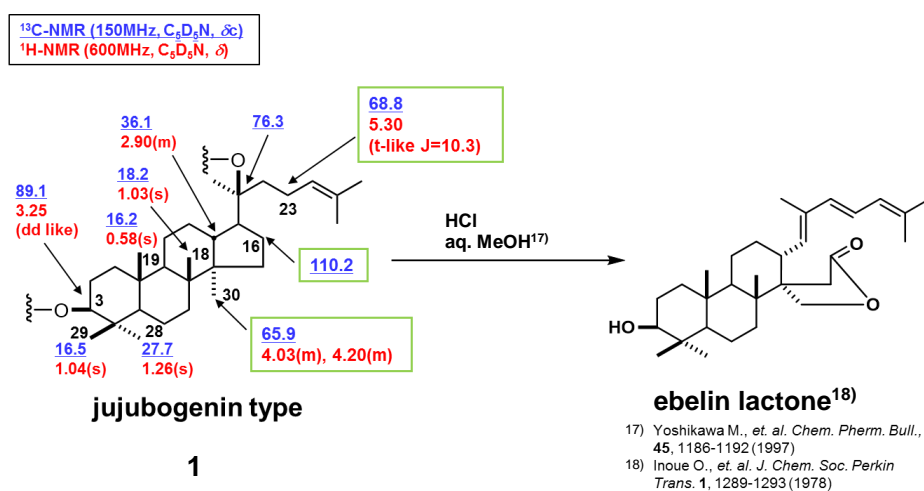


Figure 6. Decomposition reaction of 1

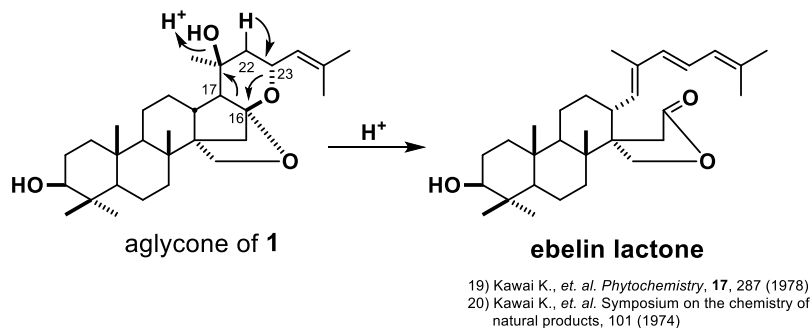


Figure 7. Reaction pathway for decomposition of aglycone of 1

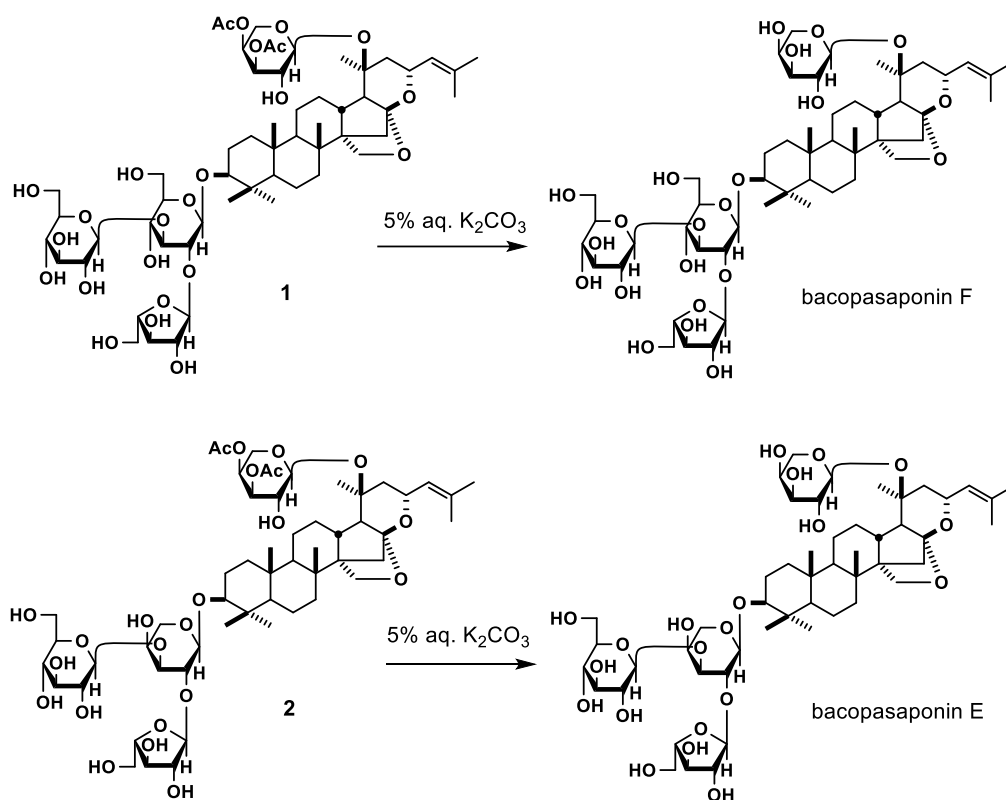


Figure 8. Alkaline hydrolysis of **1** and **2**

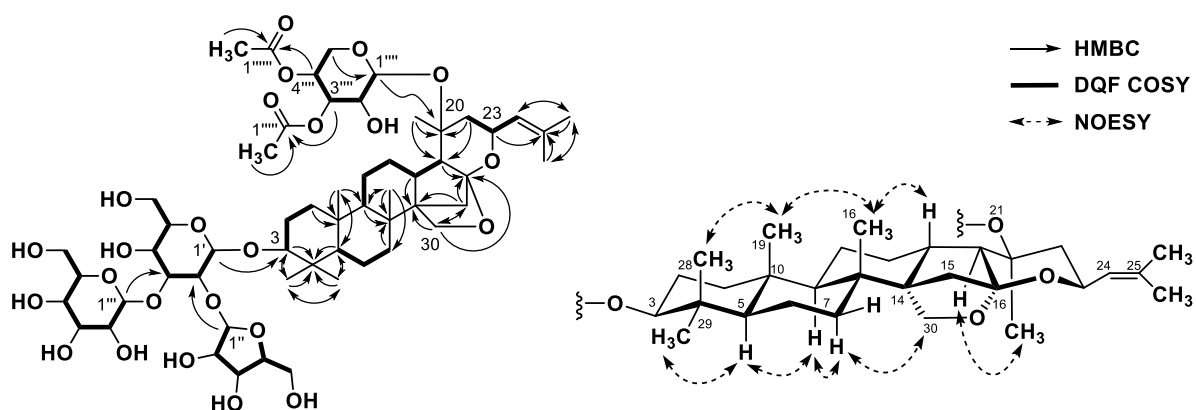


Figure 9. Important 2D NMR correlations of **1**

Table 1. ¹H NMR (600 MHz) data of compounds **1** and **2** (pyridine-*d*₅)

Position	1	2
3	3.25 (dd-like)	3.17 (dd-like)
13	2.90 (m)	2.87 (m)
18	1.03 (s)	0.97 (s)
19	0.58 (s)	0.55 (s)
21	1.38 (s)	1.33 (s)
23	5.30 (t-like)	5.24 (t-like)
24	5.50 (d, <i>J</i> = 8.2)	5.47 (d, <i>J</i> = 8.2)
26	1.69 (s)	1.63 (s)
27	1.81 (s)	1.75 (s)
28	1.26 (s)	1.25 (s)
29	1.04 (s)	0.99 (s)
30	4.03 (m)	4.05 (m)
	4.20 (m)	4.18 (m)
3- <i>O</i> -glycoside	Glc	Ara (p)
1'	5.00 (d, <i>J</i> = 6.8)	4.70 (d, <i>J</i> = 6.8)
2'- <i>O</i> -Ara (f)		
1''	6.24 (d, <i>J</i> = 2.7)	6.04 (d, <i>J</i> = 2.8)
3'- <i>O</i> -Glc		
1'''	5.22 (d, <i>J</i> = 7.6)	5.08 (d, <i>J</i> = 7.6)
20- <i>O</i> -Ara (p)		
1''''	4.99 (d, <i>J</i> = 6.9)	4.93 (d, <i>J</i> = 6.9)
3''''- <i>O</i> -Ac		
2'''''	2.08 (s)	1.97 (s)
4''''- <i>O</i> -Ac		
2''''''	1.99 (s)	1.93 (s)

Table 2. ^{13}C -NMR (150 MHz) data of compounds **1** and **2** (pyridine- d_5)

Position	1	2	Position	1	2
1	38.6	38.7	3- <i>O</i> -glycoside	Glc	Ara (p)
2	26.7	26.7	1'	105.0	105.6
3	89.1	88.6	2'	79.1	77.1
4	39.7	39.8	3'	88.5	83.6
5	56.0	56.1	4'	70.2	68.6
6	18.2	18.2	5'	77.8	65.8
7	35.9	35.9	6'	62.6	
8	37.4	37.1	2'- <i>O</i> -Ara (f)		
9	52.8	52.9	1''	109.8	110.1
10	37.0	37.3	2''	83.8	83.8
11	21.6	21.6	3''	77.6	77.8
12	28.3	28.3	4''	84.8	84.8
13	36.1	36.1	5''	62.5	62.1
14	53.7	53.7	3'- <i>O</i> -Glc		
15	37.4	37.4	1'''	104.6	104.9
16	110.1	110.2	2'''	75.5	75.2
17	54.9	55.0	3'''	78.3	78.1
18	18.8	18.8	4'''	71.5	71.4
19	16.2	16.3	5'''	78.5	78.4
20	76.3	76.3	6'''	62.3	62.5
21	24.5	24.6	20- <i>O</i> -Ara (p)		
22	41.9	41.9	1''''	98.6	98.6
23	68.8	68.7	2''''	70.0	70.0
24	127.2	127.3	3''''	74.5	74.5
25	133.7	133.7	4''''	69.0	69.0
26	25.6	25.6	5''''	63.5	63.5
27	18.2	18.2	3''''- <i>O</i> -Ac		
28	27.7	27.7	1'''''	170.5	170.5
29	16.5	16.5	2'''''	20.8	20.8
30	65.9	65.8	4''''- <i>O</i> -Ac		
			1'''''	170.5	170.5
			2'''''	20.7	20.7

Bacomoside A (**3**) は負の旋光性 ($[\alpha]_D^{27} -3.9^\circ$ in MeOH) を示す非結晶性粉末として得られた。IR スペクトルから水酸基 (3415 cm^{-1}), エステル (1705 cm^{-1}) および芳香族 (1609 cm^{-1}) の存在が示唆された。さらに FAB-MS において擬似分子イオンピークが $m/z\ 473\ (M + Na)^+$ に観測され、高分解能 FAB-MS の解析により分子式 $C_{21}H_{22}O_{11}$ を有する化合物であることが判明した。化合物 **3** をさらに 5% aqueous H_2SO_4 -1,4-dioxane (1:1) で酸加水分解し、標品と HPLC の保持時間を比較することで D-glucose および *p*-ヒドロキシ安息香酸を含むことが確認された (Figure 10)。構成糖の絶対立体配置を含めた同定は、tolylthiocarbamoyl thiazolidine へと誘導し、HPLC 分析することで行った。²²⁾ 化合物 **3** の 1H -NMR, ^{13}C -NMR スペクトル (methanol- d_4 , Table 3) および各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、アグリコン部位 [δ 4.88, 4.94 (1H each, both d, $J = 15.8\text{ Hz}$, H₂-8), 6.66 (1H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-5), 7.31 (1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-2), 7.33 (1H, dd, $J = 8.9, 1.8\text{ Hz}$, H-6)], 1 つの D-glucose [δ 4.75 (1H, d, $J = 8.2\text{ Hz}$, H-1')] および 1 つの *p*-ベンゾイル基 [δ 6.81 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-3'', 5''), 7.89 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-2'', 6'')] の存在が明らかとなった。化合物 **3** の 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルは既知化合物である monnieraside III¹²⁾ と類似していたが、7 位周辺のスペクトルのみ異なっていた。そこで HMBC 相関により D-glucose および *p*-ベンゾイル基の結合位置について確認した (Figure 13)。すなわち、H-1' と C-8 および H-2' と C-7'' の間に HMBC 相関がみられたことから、その結合位置を決定した。以上の結果から、**3** の化学構造を決定した。

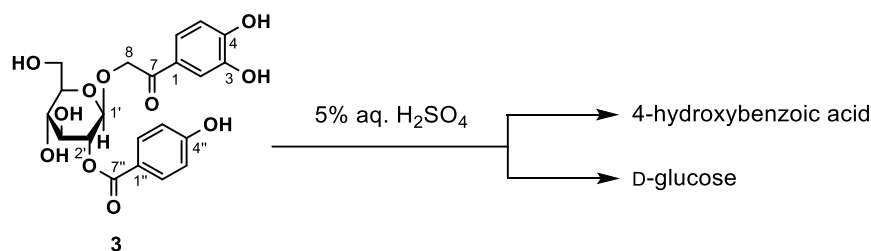


Figure 10. Acid hydrolysis of **3**

Bacomosides B₁ (**4**) および B₂ (**5**) は正の旋光性 (**4**: $[\alpha]_D^{27} +5.1$, **5**: $[\alpha]_D^{27} +22.0$ in MeOH) を示す白色非結晶性粉末として得られた。IR スペクトルから水酸基, エステル, 芳香族の存在が示唆された。FAB-MS において共通の擬似分子イオンピーク [$m/z\ 531\ (M+Na)^+$] が観測され、高分解能 FAB-MS により分子式 $C_{24}H_{28}O_{12}$ を有する化合物であることが明らかとなった。化合物 **4** および **5** を 5% aqueous H_2SO_4 -1,4-dioxane (1:1) で酸加水分解し、標品と HPLC の保持時間を比較することで D-glucose および *trans*-カフェ酸を含むことが確認された (Figure 11)。構成糖の絶対立体配置を含めた同定は、前述の **3** と同様に行った。化合物 **4** および **5** の 1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトル (methanol- d_4 , Table 3) および各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により、アグリコン部位 {**4**: δ 3.13 (3H, s, 7-OCH₃), [3.52 (1H, m), 3.93 (1H, dd, $J = 11.0, 8.2\text{ Hz}$, H₂-8), 4.15 (1H, dd-like, H-7), 6.56 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8\text{ Hz}$, H-6), 6.68 (1H, d, $J = 1.8\text{ Hz}$, H-2), 6.77 (1H, d, $J = 8.2\text{ Hz}$, H-5), **5**: δ 3.14 (3H, s, 7-OCH₃), [3.66 (1H, m), 3.77 (1H, dd, $J =$

11.6, 3.4 Hz), H₂-8], 4.17 (1H, dd-like, H-7), 6.58 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6), 6.68 (1H, m, H-2), 6.72 (1H, m, H-5)}, 1 つの D-glucose [4: δ 4.50 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 5: δ 4.63 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1')], 1 つの *trans*-カフェオイル基 [4: δ 6.29 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.94 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6''), 7.05 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2''), 7.57 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7''), 5: δ 6.34 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8''), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.97 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6''), 7.06 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2''), 7.61 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'')] の存在が示唆された. 化合物 4 および 5 の ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルは既知化合物である plantainoside B¹¹⁾ と良い一致を示したが, 7 位のメトキシ基の周辺のみ異なっていた. また, 4 と 5 は互いに 7 位のエピマーであることが分かったが, それらの絶対立体配置を決定することはできなかった. なお, *trans*-カフェオイル基 と D-glucose の結合位置は HMBC 相関により決定した (Figure 13). 以上の結果から, bacomosides B₁ (4) と B₂ (5) の化学構造を決定した.

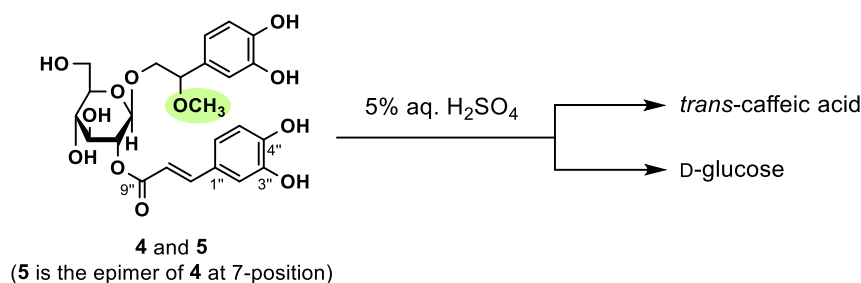


Figure 11. Acid hydrolysis of 4 and 5

Bacomosides C₁ (6) および C₂ (7) は正の旋光性 (6: $[\alpha]_D^{27} +2.4$, 7: $[\alpha]_D^{27} +9.1$, both in MeOH) を示す白色非結晶性粉末として得られた. IR スペクトルから水酸基, エステル, 芳香族の存在が示唆された. FAB-MS において共通の擬似分子イオンピーク [m/z 489 (M+Na)⁺] が観測され, 高分解能 FAB-MS の解析により分子式 C₂₂H₂₆O₁₁ を有する化合物であることが判明した. 化合物 6 および 7 を 5% aqueous H₂SO₄-1,4-dioxane (1:1) で酸加水分解し, 標品と HPLC の保持時間を比較することで D-glucose および *p*-ヒドロキシ安息香酸を含むことが確認された (Figure 12). 構成糖の絶対立体配置を含めた同定は, 前述の 3 と同様に行った. 化合物 6, 7 の ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトル (methanol-*d*₄, Table 4) および各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により, アグリコン部位 {6: δ 3.02 (3H, s, 7-OCH₃), [3.51 (1H, m), 3.92 (1H, m), H₂-8], 4.10 (1H, m, H-7), 6.51 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6), 6.61 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.66 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 7: δ 2.89 (3H, s, 7-OCH₃), [3.66 (1H, m), 3.75 (1H, m), H₂-8], 4.00 (1H, m, H-7), 6.43 (1H, dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, H-6), 6.54 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 6.56 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2)}, 1 つの D-glucose [6: δ 4.61 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-1'), 7: δ 4.62 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1')], 1 つの *p*-ベンゾイル基 [6: δ 6.81 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3'', 5''), 7.89 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2'', 6''), 7: 6.75 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3'', 5''), 7.86 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2'', 6'')] の存在が示唆された. 化合物 6, 7 の ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルは 3 と良い一致を示したが, 7 位のメトキシ基の周辺のみ異なっ

ていた。また、**6** と **7** は互いに 7 位のエピマーであることが分かったが、それらの絶対立体配置を決定することはできなかった。なお、*p*-ヒドロキシベンゾイル基 と D-glucose の結合位置は HMBC 相関により決定した (Figure 13)。以上の結果から, bacomosides C₁ (**6**) と C₂ (**7**) の化学構造を決定した。

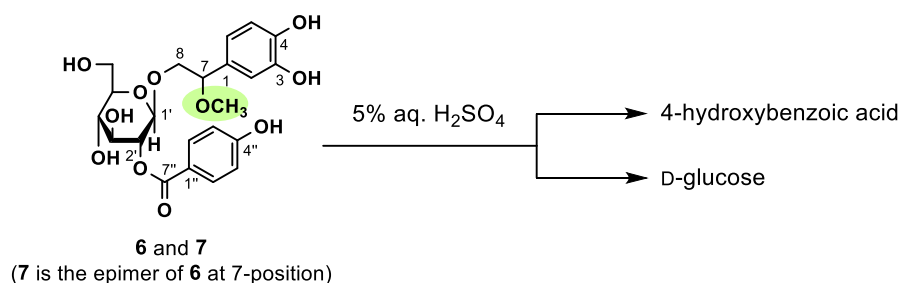


Figure 12. Acid hydrolysis of **6** and **7**

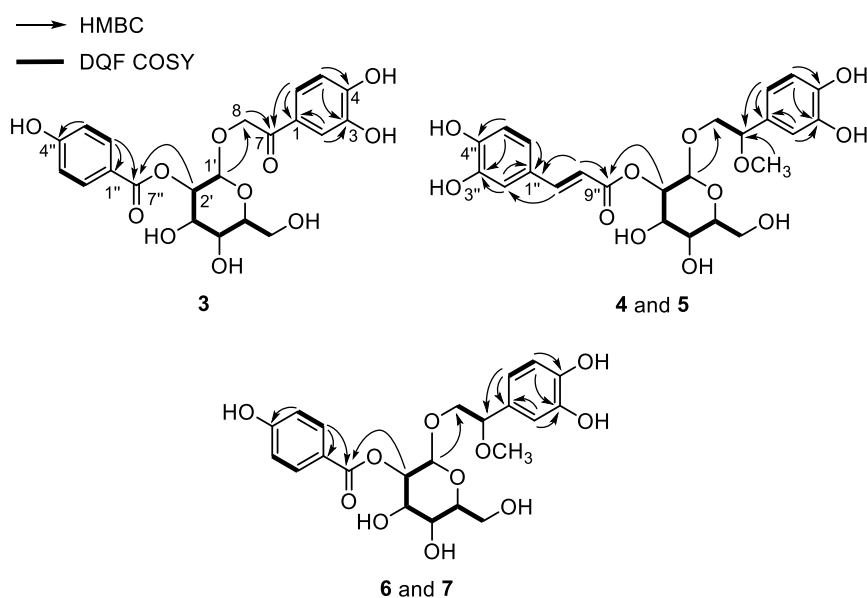


Figure 13. Important 2D NMR correlations of **3–7**

Table 3. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **3–5** (methanol- d_4)

Position	3		4		5	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		128.4		131.3		131.2
2	7.31 (d, $J = 1.8$)	115.8	6.68 (d, $J = 1.8$)	115.0	6.68 (m)	116.2
3		152.5		146.4		146.4
4		146.5		146.3		146.2
5	6.66 (d, $J = 8.9$)	115.7	6.77 (d, $J = 8.2$)	116.2	6.72 (m)	114.8
6	7.33 (dd, $J = 8.9, 1.8$)	123.2	6.56 (dd, $J = 8.2, 1.8$)	120.0	6.58 (dd, $J = 8.2, 1.8$)	119.7
7		196.1	4.15 (dd-like)	83.5	4.17 (dd-like)	84.6
7-OCH ₃			3.13 (s)	56.9	3.14 (s)	57.2
8	4.88 (d, $J = 15.8$)	71.3	3.93 (dd, $J = 11.0, 8.2$)	74.3	3.77 (dd, $J = 11.6, 3.4$)	74.9
	4.94 (d, $J = 15.8$)		3.52 (m)		3.66 (m)	
8-O-Glc						
1'	4.75 (d, $J = 8.2$)	101.7	4.50 (d, $J = 7.6$)	102.1	4.63 (d, $J = 7.6$)	103.0
2'	5.00 (dd, $J = 9.6, 8.2$)	75.1	4.78 (m)	75.1	4.82 (m)	75.2
3'	3.66 (m)	76.3	3.58 (m)	76.2	3.51 (m)	76.2
4'	3.44 (m)	71.7	3.37 (m)	71.7	3.39 (m)	71.7
5'	3.38 (m)	78.3	3.28 (m)	78.1	3.33 (m)	78.1
6'	3.71 (dd, $J = 12.4, 6.2$)	62.7	3.68 (dd, $J = 12.4, 6.2$)	62.6	3.68 (m)	62.6
	3.91 (dd, $J = 12.4, 2.0$)		3.87 (dd, $J = 12.4, 2.0$)		3.88 (dd, $J = 12.4, 2.0$)	
2'-O-acyl						
1''		122.4		127.8		127.8
2''	7.89 (d, $J = 8.9$)	133.1	7.05 (d, $J = 1.8$)	115.2	7.06 (d, $J = 1.8$)	115.1
3''	6.81 (d, $J = 8.9$)	116.0		146.8		146.8
4''		163.4		149.5		149.5
5''	6.81 (d, $J = 8.9$)	116.0	6.78 (d, $J = 8.2$)	116.5	6.79 (d, $J = 8.2$)	116.5
6''	7.89 (d, $J = 8.9$)	133.1	6.94 (dd, $J = 8.2, 1.8$)	123.0	6.97 (dd, $J = 8.2, 1.8$)	122.9
7''		167.5	7.57 (d, $J = 15.8$)	147.0	7.61 (d, $J = 15.8$)	147.0
8''			6.29 (d, $J = 15.8$)	115.4	6.34 (d, $J = 15.8$)	115.4
9''				168.3		168.5

Table 4. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) data of compounds **6** and **7** (methanol- d_4)

Position	6		7	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		131.2		131.2
2	6.66 (d, $J = 1.8$)	114.8	6.56 (d, $J = 1.8$)	114.8
3		146.4		146.4
4		146.3		146.2
5	6.61 (d, $J = 8.2$)	115.1	6.54 ($J = 8.6$)	116.2
6	6.51 (dd, $J = 8.2, 1.8$)	120.0	6.43 (dd, $J = 8.6, 1.8$)	119.7
7	4.10 (m)	83.5	4.00 (m)	84.7
7-OCH ₃	3.02 (s)	56.7	2.89 (s)	57.0
8	3.92 (m)	74.4	3.75 (m)	75.0
	3.51 (m)		3.66 (m)	
8- <i>O</i> -Glc				
1'	4.61 (d, $J = 8.2$)	102.2	4.62 (d, $J = 8.3$)	103.1
2'	4.94 (m)	75.4	4.83 (m)	75.5
3'	3.64 (m)	76.3	3.57 (m)	76.2
4'	3.42 (m)	71.7	3.32 (m)	71.8
5'	3.35 (m)	78.2	3.25 (m)	78.1
6'	3.68 (m)	62.7	3.67 (m)	62.7
	3.91 (m)		3.81 (m)	
2'- <i>O</i> -acyl				
1''		122.4		122.6
2''	7.89 (d, $J = 8.9$)	133.1	7.86 (d, $J = 8.6$)	133.1
3''	6.81 (d, $J = 8.9$)	116.0	6.75 (d, $J = 8.6$)	116.0
4''		163.4		163.4
5''	6.81 (d, $J = 8.9$)	116.0	6.75 (d, $J = 8.6$)	116.0
6''	7.89 (d, $J = 8.9$)	133.1	7.86 (d, $J = 8.6$)	133.1
7''		167.5		167.5

第五項 小括

インド産オトメアゼナ全草 MeOH 抽出エキスより、2 種の新規変形ダンマラン型トリテルペン配糖体 bacomosaponin A (1), B (2) および 5 種のフェニルエタノイド配糖体 bacomoside A–C₂ (3–7) を単離し、その化学構造を決定した。単離化合物である 1, 2 および 8–11 は変形ダンマラン型トリテルペン配糖体であり、オトメアゼナ以外の植物からは単離されておらず、この植物に特有の成分であると考えられた。

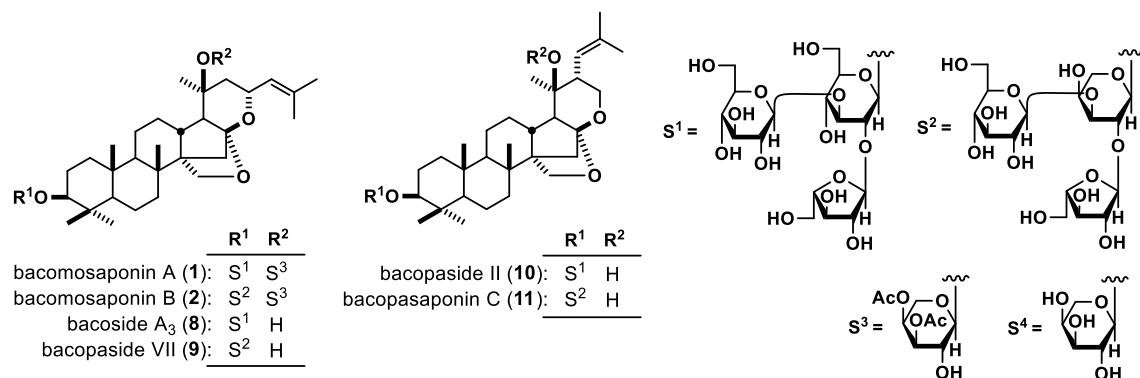


Figure 14. Isolated constituents (1, 2, 8–11) from *B. monniera*

第二節 オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部の含有成分

第一項 本植物について

ミカン科オオバゲッキツは東南アジアの多くの熱帯、亜熱帯雨林を原産とする常緑の樹木で、シンハラ語では「カラピンチャ」と言われている。その葉部はカレーリーフと呼ばれ、テルペノイド系精油成分に富み芳香があることから、香辛料として使用されている。アーユル・ヴェーダ伝承医学ではその煎汁が健胃、消化改善、鎮吐などを期待して用いられてきた。葉部の含有成分として kaemferol, quercetin, rutin などのフラボノイド類, hexadecanoic acid や ethyl palmitate などの脂肪酸類, gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid などの芳香族化合物, tryptophan や glutamic acid などのアミノ酸が報告されている。²³⁾ オオバゲッキツ葉部の MeOH 抽出エキスおよび EtOAc 分画に有意な生物活性が認められたことから、葉部の含有成分探索に着手した。

第二項 含有成分の抽出・単離

オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*, 3.0 kg) の乾燥葉を MeOH で熱時抽出後、溶媒を減圧留去し、MeOH 抽出エキス (290.6 g, 収率 9.7 %) を得た。得られた MeOH 抽出エキスのうち 269.3 g を、EtOAc と H₂O で分配抽出後、H₂O 移行部を *n*-BuOH で分配抽出し、EtOAc 移行部 (174.0 g, 6.3 %), *n*-BuOH 移行部 (20.1 g, 0.7 %), H₂O 移行部 (79.6 g, 2.7 %) を得た。得られた EtOAc 移行部 (153.6 g) を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離精製し、2 種の新規カルバゾール型アルカロイド karapinchamine A (**20**, 0.0006%) および karapinchamine B (**21**, 0.0020%) を単離、構造決定した。また既知化合物である bicyclomahanimbicine (**22**, 0.0003%),²⁴⁻²⁶⁾ bicyclomahanimbine (**23**, 0.0006%),^{24,27,28)} mahanimbicine (**24**, 0.0263%),²⁹⁾ mahanimbine (**25**, 0.0812%),²⁹⁾ murrayamine-B (**26**, 0.0032%),³⁰⁾ *O*-methylnahanine (**27**, 0.0021%),³¹⁾ pyrayafoline-D (**28**, 0.0012%),³²⁾ eustifoline-C (**29**, 0.0012%),³³⁾ euchrestine-B (**30**, 0.0239%),^{29,32)} murrayamine-E (**31**, 0.0016%),³⁴⁾ koenimbine (**32**, 0.0013%)³⁵⁾ および girinimbine (**33**, 0.0001%)^{36,37)} を単離、同定した (Figure 15)。既知化合物については、MS および NMR などのスペクトルデータおよび旋光度を、標品のデータと直接または文献値と比較することにより同定した。但し、これらの単離成分の収率は *M. koenigii* 葉部 (乾燥品) からの単離収率である。

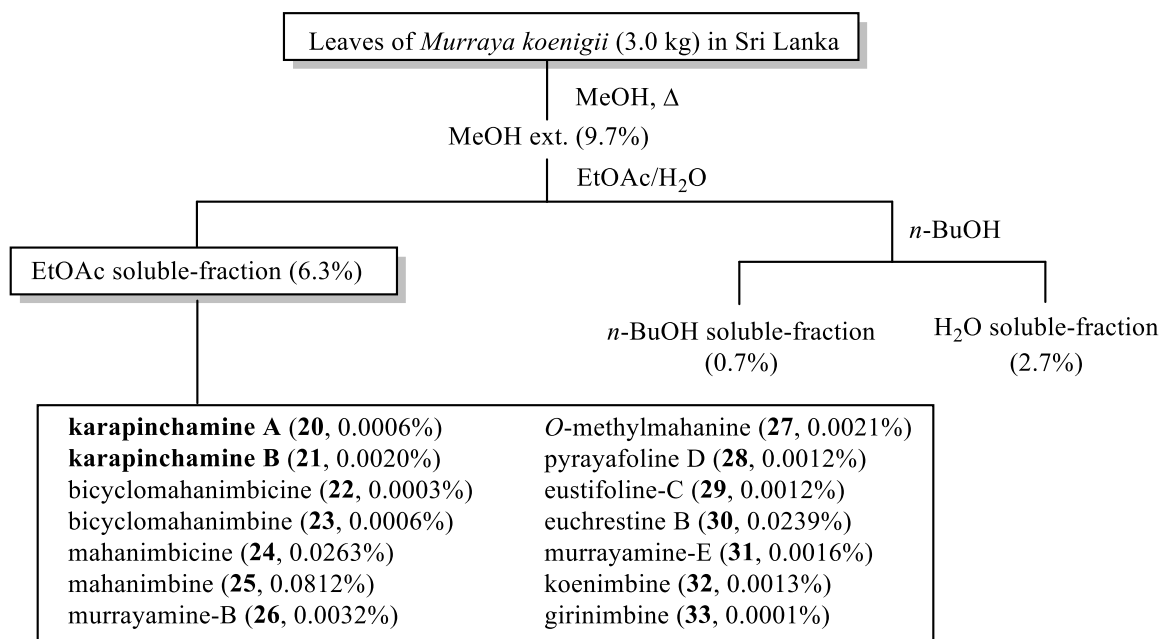


Chart 2. Isolation procedure of constituents (20–33) from the whole plant of *M. koenigii*

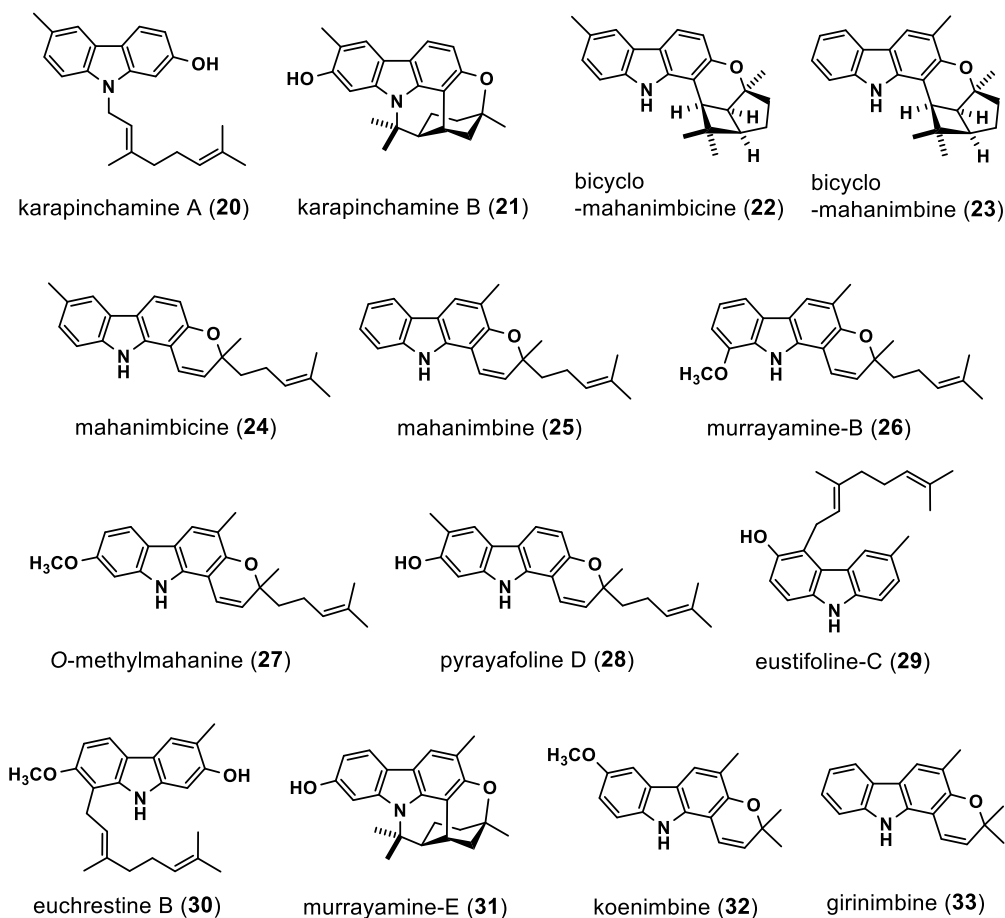


Figure 15. Isolated constituents (20–33) from *M. koenigii*

第三項 新規成分の化学構造

Karapinchamine A (**20**) は正の旋光度 ($[\alpha]_D^{24} + 12.4^\circ$ in MeOH) を示す黄色粉末として得られ、その EI-MS において分子イオンピークが m/z 333 (M^+) に観測され、**20** は高分解能 EI-MS により分子式 $C_{23}H_{27}NO$ を有する化合物であることが明らかになった。また IR スペクトルにおいて水酸基 (3400 cm^{-1}), 芳香環 (1509 cm^{-1}) の存在を示唆する吸収が認められた。化合物 **20** の ^1H -NMR スペクトルおよび ^{13}C -NMR (Table 5) スペクトルから、1 個のメチル基 [δ 2.51 (3H, s, 6- CH_3)] の存在が示唆された。次に、DQF-COSY, HMQC, HMBC スペクトルにおいて、Figure 22 に太線で示すプロトン-プロトン間に DQF-COSY スペクトルの相関が、また矢印で示すプロトン-カーボン間に HMBC スペクトルの ^1H - ^{13}C long range 相関が見られた。以上のことから **20** は geranyl 基を持つカルバゾール型アルカロイドであることが明らかとなり、その構造を決定した。

Karapinchamine B (**21**) は正の旋光度 ($[\alpha]_D^{24} + 5.64^\circ$ in MeOH) を示す黄色粉末として得られ、その EI-MS において分子イオンピークが m/z 347 (M^+) に観測され、**21** は高分解能 EI-MS により分子式 $C_{23}H_{25}NO_2$ を有する化合物であることが明らかになった。また IR スペクトルにおいて水酸基 (3400 cm^{-1}), 芳香環 ($1601, 1507\text{ cm}^{-1}$) の存在を示唆する吸収が認められた。化合物 **21** の ^1H -NMR スペクトルおよび ^{13}C -NMR (Table 5) スペクトルから、4 個のメチル基 [δ 1.26, 1.43, 1.85, 2.37 (3H, s, H-8', 3', 9', 6)] の存在が示唆された。また **21** の ^1H -NMR および ^{13}C -NMR のケミカルシフト値は 3 位および 6 位付近を除いて既知アルカロイド murrayamine-E (**31**)³⁴⁾ と類似していた。次に、DQF-COSY, HMQC, HMBC スペクトルにおいて、Figure 22 に太線で示すプロトン-プロトン間に DQF-COSY スペクトルの相関が、また矢印で示すプロトン-カーボン間に HMBC スペクトルの ^1H - ^{13}C long range 相関が見られた。このことから **21** はカルバゾール型アルカロイドであり、その平面構造を以下のように決定した。次に、**21** の相対立体配置は NOESY スペクトル測定により決定した。すなわち、H-3 と H-4; H-5 と 6- CH_3 ; H-8 と H-8', 9'; H-1' と H-8'; H-6' と H-8', 9'; H-2' と 3'- CH_3 間に NOESY 相関が観測されたことから、その相対立体配置を決定した (Figure 16)。以上の結果、**21** の化学構造を決定した。

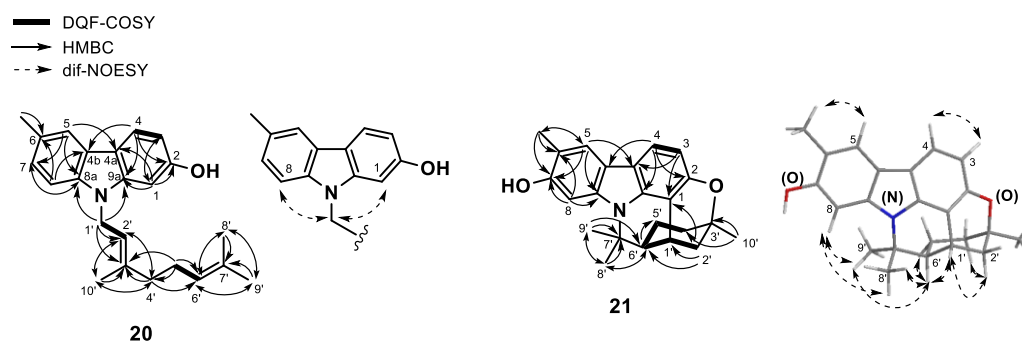


Figure 16. Important 2D NMR correlations of **20** and **21**

Table 5. ^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3) data for **20** and **21**

Position	20	21
1	95.0	107.8
2	154.4	155.5
3	107.5	108.7
4	121.0	118.1
4a	116.9	114.7
4b	123.2	121.2
5	119.4	121.3
6	128.2	115.5
7	125.6	150.6
8	108.2	100.3
8a	138.7	140.4
9a	141.9	144.0
1'	41.1	28.1
2'	119.7	36.1
3'	138.5	76.1
4'	16.6	36.5
5'	39.3	21.7
6'	27.1	48.5
7'	123.6	60.5
8'	131.7	29.9
9'	25.6	22.7
10'	17.6	
6-CH ₃	21.3	16.0
3'-CH ₃		29.1

第四項 小括

スリランカ産オオバゲツキツ葉部 MeOH 抽出エキスより, 2 種の新規カルバゾール型アルカロイド karapinchamine A (**20**) および B (**21**) を単離し, それらの化学構造を決定するとともに計 12 種の既知カルバゾール型アルカロイドを単離した. 単離化合物のうち, 化合物 **21**–**23** および **31** は環状構造を有する珍しいアルカロイドであると推定された.

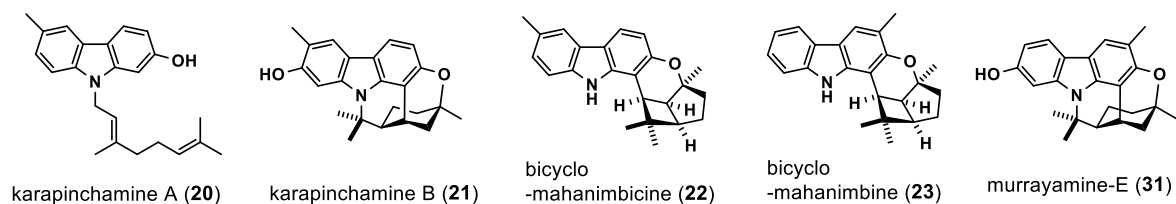


Figure 17. Isolated constituents (**20**–**23**, **31**) from *M. koenigii*

第三節 アッサム種チャ (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 花部の含有成分

第一項 本植物について

チャはツバキ科植物に属する多年生の常緑樹であり, 中国種 (*C. sinensis*) とアッサム種 (*C. sinensis* var. *assamica*) に大別される. 著者らはこれまでに, 中国種チャ花部から floratheasaponin A-J, chakasaponin I-VI などのサポニンを単離し, サポニン成分にマウスの摂餌量抑制作用を見出した.⁵⁾ 一方, アッサム種チャ花部は中国種チャ花部と異なり, 含有成分の報告はされていなかったことから研究に着手した.

第二項 含有成分の抽出・単離

インド産アッサム種チャ (*C. sinensis* var. *assamica*) の花蕾乾燥品 (687.4 g) を MeOH で 3 回熱時抽出後, 減圧留去し, MeOH 抽出エキスを (280.4 g, 40.8%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H₂O (1:1) で分配し, EtOAc 移行部 (17.3 g, 2.6%) と H₂O 移行部を得た. さらに H₂O 移行部を *n*-BuOH (1:1) で分配し, *n*-BuOH 移行部 (92.1 g, 13.9%) と H₂O 移行部 (144.8 g, 21.9%) を得た. マウスの摂餌量抑制作用を有するサポニンを中心に単離するために, *n*-BuOH 移行部を順相シリカゲル, 逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより, 8 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 floraassamsaponin I (**34**, 0.007%), II (**35**, 0.014%), III (**36**, 0.003%), IV (**37**, 0.005%), V (**38**, 0.004%), VI (**39**, 0.022%), VII (**40**, 0.018%), および VIII (**41**, 0.035%) を単離, 構造決定した. また 3 種の既知サポニン floratheasaponins D (**42**, 0.060%),³⁷⁾ G (**43**, 0.039%)³⁷⁾ および I (**44**, 0.042%)³⁷⁾ を単離, 同定した (Figure 18). 既知化合物については, MS および NMR などのスペクトルデータおよび旋光度を, 標品のデータと直接または文献値と比較することにより同定した. なお, これらの単離成分の収率は, *C. sinensis* var. *assamica* 花部 (乾燥品) からの単離収率である.

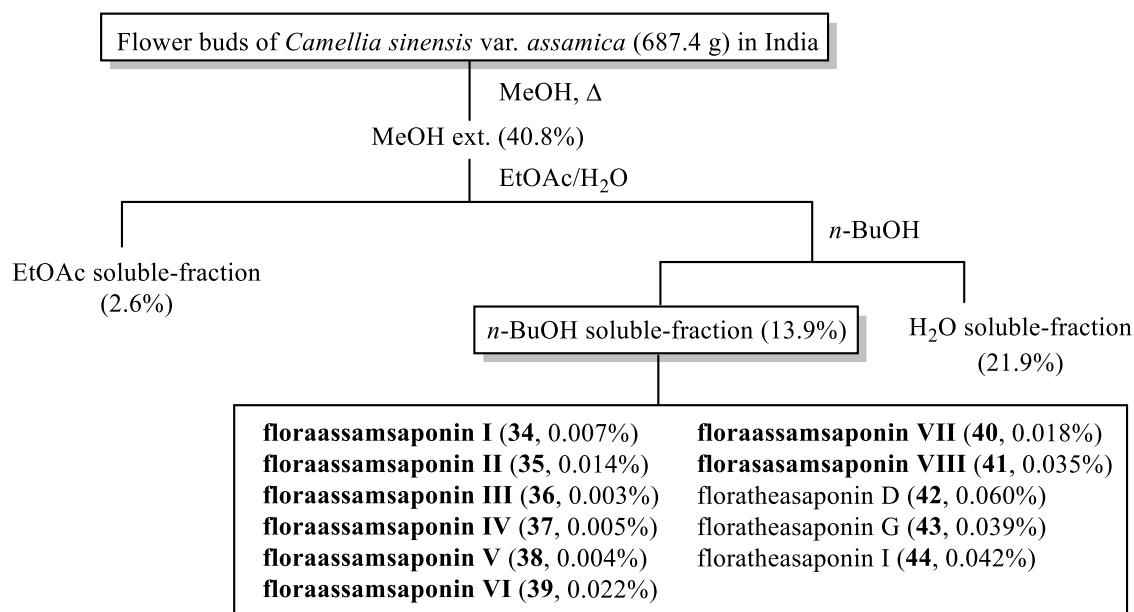


Chart 3. Isolation procedure of constituents (**34–44**) from the flower buds of *C. sinensis* var. *assamica*

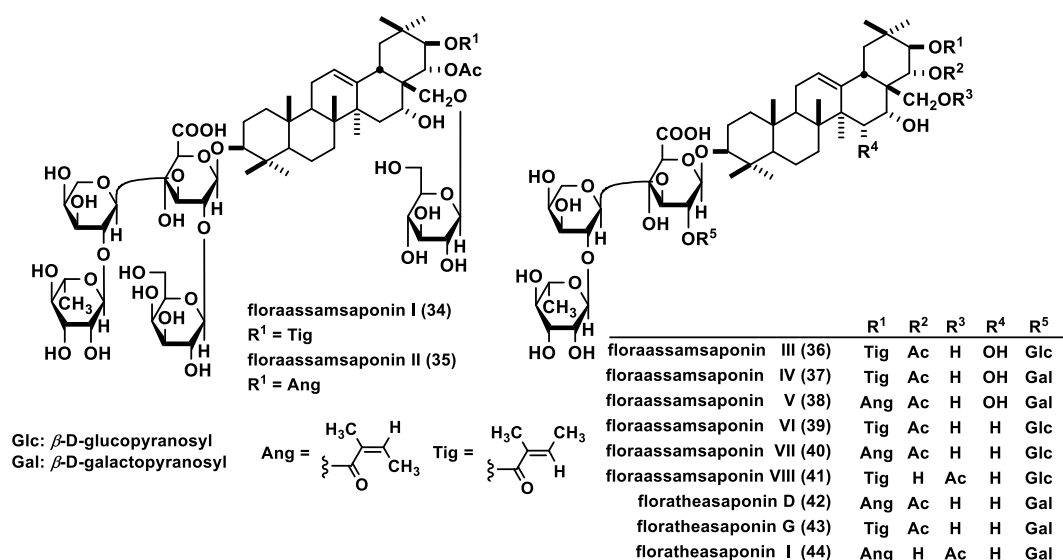


Figure 18. Structures of isolated constituents (**34–44**) from the flower buds of *C. sinensis* var. *assamica*

第三項 新規成分の化学構造

Floraassamsaponin I (**34**) および II (**35**) はいずれも負の旋光性 (**34**: $[\alpha]_D^{21} -18.3$, **35**: $[\alpha]_D^{21} -12.2$ in MeOH) を示す白色非結晶性粉末として得られ, IR スペクトルから水酸基, エステル, α, β -不飽和エステル, カルボン酸およびエーテルに由来する吸収 (**34**: 3400, 1734, 1717, 1698, 1078 cm^{-1} , **35**: 3400, 1734, 1716, 1697, 1078 cm^{-1}) が認められた. 次に, FAB-MS において, 共通の擬似分子イオンピークが m/z 1415 ($M+Na$)⁺ に観測された. また, 高分解能 FAB-MS によりいずれも分子式 $C_{66}H_{104}O_{31}$ を有することが明らかとなった. 構成糖の絶対立体配置を含めた同定は, 5% aqueous H_2SO_4 -1,4-dioxane (1:1) による酸加水分解後, tolylthiocarbamoyl thiazolidine 誘導体化し, D-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-glucuronic acid, D-rhamnose, L-arabinose, L-galactose, L-glucose, L-glucuronic acid および L-rhamnose と HPLC の保持時間を比較することで行い, L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-glucuronic acid および L-rhamnose であると決定した (Figure 19).²² 化合物 **34** および **35** の 1H -NMR (Table 6) と ^{13}C -NMR (Table 7) スペクトル (pyridine- d_5), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果, アグリコン部位 {7 つのメチルプロトン [**34**: δ 0.83, 1.02, 1.08, 1.19, 1.27, 1.28, 1.82 (3H each, all s, H₃-25, 26, 29, 24, 30, 23, 27), **35**: δ 0.80, 0.98, 1.04, 1.12, 1.21, 1.29, 1.80 (3H each, all s, H₃-25, 26, 29, 24, 30, 23, 27)], 酸素官能基に結合した 4 つのメチンプロトン [**34**: δ 3.26 (1H, dd-like, H-3), 4.74 (1H, m, H-16), 6.10 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-22), 6.58 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-21), **35**: δ 3.22 (1H, dd-like, H-3), 4.75 (1H, m, H-16), 6.03 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-22), 6.57 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-21)] および 1 つのオレフィンプロトン [**34**: δ 5.38 (1H, br-s, H-12), **35**: δ 5.33 (1H, br-s, H-12)]}, 糖鎖構造 {1 つの β -D-glucose [**34**: δ 4.76 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-1'''), **35**: δ 4.77 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-1''')], 1 つの β -D-glucuronic acid [**34**: δ 4.97 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'), **35**: δ 4.93 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1')], 1 つの β -D-galactose [**34**: δ 5.71 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1''), **35**: δ 5.68 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'')], 1 つの α -L-rhamnose [**34**: δ 6.05 (1H, s, H-1'''), **35**: δ 6.02 (1H, s, H-1''')], 1 つの α -L-arabinose

[**34**: δ 6.14 (1H, d-like, H-1'''), **35**: δ 6.13 (1H, d-like, H-1''')] および 2 つのアシル基 {**34**: 1 つのチグロイル基 [δ 1.63 (3H, d-like, H₃-4'''), 1.93 (3H, br-s, H₃-5'''), 7.09 (1H, m, H-3''')] および 1 つのアセチル基 [δ 1.92 (3H, s, H₃-2''')], **35**: 1 つのアンゲロイル基 [δ 1.96 (3H, br-s, H₃-5'''), 2.05 (3H, d-like, H₃-4'''), 5.92 (1H, m, H-3''')] および 1 つのアセチル基 [δ 1.91 (3H, s, H₃-2''')]} の存在が明らかとなった. また, **34** および **35** のアグリコン, 糖鎖構造およびアシル基の結合位置は HMBC 相関により決定した. すなわち, H-21 と C-1'''' および H-22 と C-1'''' および H-1' と C-3 および H-1'' と C-2' および H-1''' と C-3' および H-1'''' と C-2''' および H-1''''' と C-28 の間に HMBC 相関が見られたことから (Figure 20), その結合位置を決定した. 28 位のグルコースを含むアグリコンの ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトル値は既知化合物である foenumoside E³⁹⁾ の文献値とよく一致した. 一方, 21 と 22 位のアシル基および 3 位の糖鎖構造の ¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトル値について, **34** は floratheasaponins G,³⁸⁾ **35** は floratheasaponin D³⁸⁾ のものとほぼ一致していた. アグリコンの相対立体配置は NOESY スペクトル測定により決定した. すなわち, H-3 と H-23; H-5 と H-23, H-27; H-15 α と H-27; H-15 β と H-16, 26; H-16 と H-22; H-18 と H-26; H-21 と H-2''''; H-22 と H-30; H-24 と H-25; H-26 と H-28; H-28 と H-30 間に NOESY 相関が観測されたことから, その相対立体配置を決定した (Figure 20). したがって, アグリコン部位は barringtogenol C⁴⁰⁾ であると決定した. 以上の結果より, florassamsaponin I は 3-*O*-{[β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)][α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl}-21-*O*-tigloyl-22-*O*-acetylbarringtogenol C 28-*O*- β -D-glucopyranoside (**34**), florassamsaponin II は 3-*O*-{[β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 2)][α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl}-21-*O*-angeloyl-22-*O*-acetylbarringtogenol C 28-*O*- β -D-glucopyranoside (**35**) であると決定した.

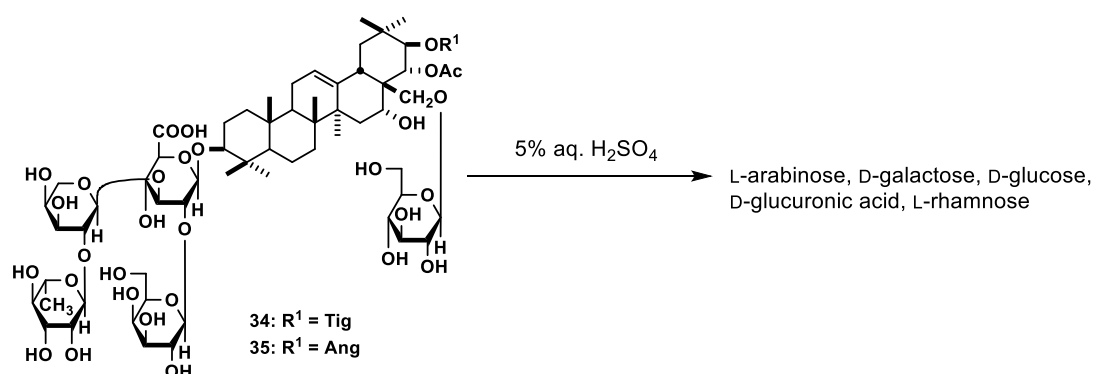


Figure 19. Acid hydrolysis of **34** and **35**

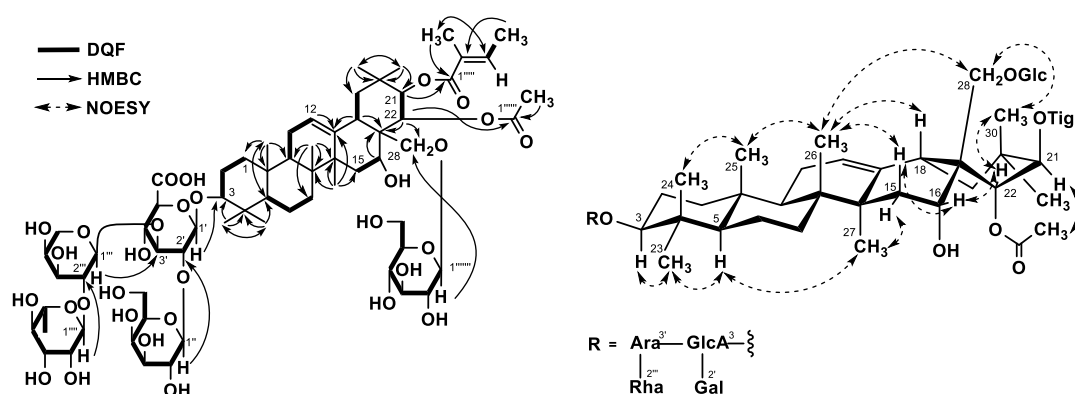


Figure 20. Important 2D NMR correlations of **34**

Floraassamsaponin III (**36**), IV (**37**) および V (**38**) は負の旋光性 (**36**: $[\alpha]_D^{21} -11.6$, **37**: $[\alpha]_D^{21} -21.3$, **38**: $[\alpha]_D^{22} -15.8$ in MeOH) を示す白色非結晶性粉末として得られ, IR スペクトルから水酸基, エステル, α, β -不飽和エステル, カルボン酸およびエーテルに由来する吸収が認められた. 次に, FAB-MS において, 擬似分子イオンピークが m/z 1269 ($M+Na$)⁺ に観測された. また, 高分解能 FAB-MS により共通の分子式 $C_{60}H_{94}O_{27}$ を有することが明らかとなった. 構成糖の絶対立体配置を含めた同定は, **34** および **35** と同様の方法を用いることで行い, L-arabinose, D-galactose, D-glucuronic acid および L-rhamnose であると決定した (Figure 21).²²⁾ 化合物 **36**, **37** および **38** の 1H -NMR (Table 6, 8) と ^{13}C -NMR (Table 7, 9) スペクトル (pyridine- d_5), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果, R_1 -barrigenol⁴³⁾ に由来するシグナル, 糖鎖構造 {1 つの β -D-glucose [**36**: $\delta 5.87$ (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'')] または 1 つの β -D-galactose [**37**: $\delta 5.71$ (1H, d, $J = 6.8$ Hz H-1''), **38**: $\delta 5.71$ (1H, d, $J = 7.0$ Hz H-1'')], それぞれ 1 つの α -L-arabinose, β -D-glucuronic acid, α -L-rhamnose} および 2 つのアシル基 {1 つのチグロイル基 [**36**: $\delta 1.66$ (3H, d-like, H₃-4'''), 1.97 (3H, br-s, H₃-5'''), 7.13 (1H, m, H-3'''), **37**: $\delta 1.66$ (3H, d-like, H₃-4'''), 1.97 (3H, br-s, H₃-5'''), 7.13 (1H, m, H-3''')] または 1 つのアンゲロイル基 [**38**: $\delta 2.03$ (3H, br-s, H₃-5'''), 2.13 (3H, d-like, H₃-4'''), 6.00 (1H, m, H-3''')] それぞれ 1 つのアセチル基} の存在が明らかとなった. 化合物 **37** および **38** における, 2 つのアシル基を含むアグリコンの 1H - および ^{13}C -NMR スペクトル値について, **37** は chakasaponin III,⁴⁰⁾ **38** は saniculasaponin III⁴¹⁾ の文献値と類似しており, 化合物 **37** および **38** における, 3 位の糖鎖構造の 1H - および ^{13}C -NMR スペクトル値は floratheasaponin E³⁸⁾ の文献値とよく一致した. 一方, **36** における, 2' 位に結合する糖付近以外の 1H - および ^{13}C -NMR スペクトル値は, **37** のものとほぼ一致していた. また, アシル基および糖鎖構造の結合位置は HMBC 相関により決定した. さらに, **36** の糖鎖構造は DQF COSY, HMBC スペクトルの詳細な解析および 3 位に β -D-glucuronic acid, 2' 位に β -D-glucose を有する既知化合物 yuchasaponin A⁴²⁾ と 1H - および ^{13}C -NMR スペクトル値を比較により決定した. 以上の結果より, floraassamsaponin III (**36**), IV (**37**) および V (**38**) の構造を決定した.

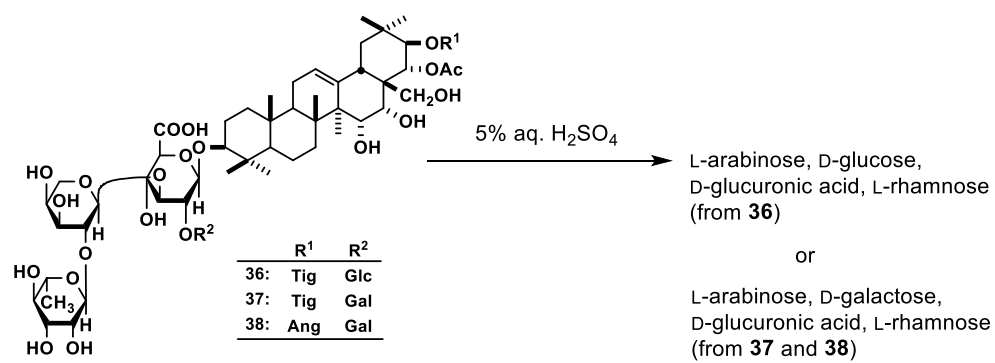


Figure 21. Acid hydrolysis of **36–38**

Table 6. ¹H NMR (600 MHz) data for **34–37** (pyridine-*d*₅)

Position	34	35	36	37
3	3.26 (dd-like)	3.22 (dd-like)	3.25 (dd-like)	3.28 (dd-like)
12	5.38 (br-s)	5.33 (br-s)	5.51 (br-s)	5.51 (br-s)
15	1.62 (m)	1.60 (m)	4.40 (m)	4.40 (m)
	2.05 (m)	2.05 (m)		
16	4.74 (m)	4.75 (m)	4.16 (m)	4.19 (m)
21	6.58 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.57 (d, <i>J</i> = 9.7)	6.61 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.60 (d, <i>J</i> = 10.3)
22	6.10 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.03 (d, <i>J</i> = 9.7)	6.28 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.23 (d, <i>J</i> = 10.3)
23	1.28 (s)	1.29 (s)	1.16 (s)	1.26 (s)
24	1.19 (s)	1.12 (s)	1.08 (s)	1.19 (s)
25	0.83 (s)	0.80 (s)	0.83 (s)	0.83 (s)
26	1.02 (s)	0.98 (s)	1.16 (s)	1.01 (s)
27	1.82 (s)	1.80 (s)	1.86 (s)	1.84 (s)
28	3.46 (m)	3.44 (m)	3.46 (d-like)	3.47 (d-like)
	3.98 (m)	3.95 (m)	3.72 (d-like)	3.73 (d-like)
29	1.08 (s)	1.04 (s)	1.12 (s)	1.12 (s)
30	1.27 (s)	1.21 (s)	1.34 (s)	1.33 (s)
21- <i>O</i> -Acyl	(Tig)	(Ang)	(Tig)	(Tig)
3''''	7.09 (m)	5.92 (m)	7.13 (m)	7.13 (m)
4''''	1.63 (d-like)	2.05 (d-like)	1.66 (d-like)	1.66 (d-like)
5''''	1.93 (br-s)	1.96 (br-s)	1.97 (br-s)	1.97 (br-s)
22- <i>O</i> -Ac				
2''''	1.92 (s)	1.91 (s)	1.77 (s)	1.78 (s)
3- <i>O</i> -GlcA				
1'	4.97 (d, <i>J</i> = 6.8)	4.93 (d, <i>J</i> = 6.7)	4.92 (d, <i>J</i> = 7.1)	4.96 (d, <i>J</i> = 7.1)
2'- <i>O</i> - Glycoside	(Gal)	(Gal)	(Glc)	(Gal)
1''	5.71 (d, <i>J</i> = 7.7)	5.68 (d, <i>J</i> = 7.6)	5.87 (d, <i>J</i> = 6.8)	5.71 (d, <i>J</i> = 6.8)
3'- <i>O</i> -Ara				
1'''	6.14 (d-like)	6.13 (d-like)	6.15 (d-like)	6.15 (d-like)
2'''- <i>O</i> -Rha				
1''''	6.05 (s)	6.02 (s)	6.06 (s)	6.06 (s)
28- <i>O</i> -Glc				
1'''''	4.76 (d, <i>J</i> = 5.8)	4.77 (d, <i>J</i> = 5.8)		

Table 7. ^{13}C NMR (150 MHz) data for **34–37** (pyridine- d_5)

Position	34	35	36	37	Position	34	35	36	37
1	38.8	38.8	39.0	39.0	3- <i>O</i> -GlcA				
2	26.5	26.5	26.6	26.6	1'	105.5	105.6	105.4	105.4
3	89.9	89.9	89.7	89.8	2'	79.3	79.3	79.3	79.2
4	39.7	39.7	39.7	39.6	3'	82.8	82.8	82.9	83.0
5	55.8	55.8	55.6	55.6	4'	71.3	71.3	71.4	71.3
6	18.5	18.5	18.8	18.7	5'	77.5	77.5	77.6	77.6
7	33.1	33.1	36.7	36.6	6'	172.0	172.2	172.0	171.9
8	40.2	40.2	41.4	41.3	2'- <i>O</i> -Glycoside	(Gal)	(Gal)	(Glc)	(Gal)
9	46.9	46.9	47.1	47.0	1''	103.8	103.8	103.0	103.7
10	36.8	36.8	37.0	36.9	2''	73.6	73.7	76.5	73.6
11	23.9	23.9	24.0	23.9	3''	75.3	75.2	78.3	75.3
12	124.3	124.3	125.3	125.4	4''	70.0	70.0	72.6	70.0
13	142.3	142.3	143.7	143.7	5''	76.9	77.0	78.2	76.9
14	41.7	41.7	48.3	48.3	6''	62.5	62.6	63.5	62.5
15	34.6	34.6	72.7	72.6	3'- <i>O</i> -Ara				
16	67.3	67.2	67.5	67.4	1'''	101.2	101.3	101.3	101.2
17	46.9	46.9	47.7	47.8	2'''	77.0	77.1	77.1	77.0
18	41.0	41.1	40.9	40.8	3'''	73.5	73.5	73.8	73.5
19	46.9	46.9	46.9	46.9	4'''	69.1	69.2	68.8	68.9
20	36.4	36.2	36.4	36.3	5'''	65.6	65.6	65.4	65.7
21	78.8	78.6	79.3	79.2	2'''- <i>O</i> -Rha				
22	75.7	76.0	74.0	74.1	1''''	102.4	102.5	102.3	102.4
23	28.0	28.0	28.1	28.0	2''''	72.6	72.6	72.5	72.4
24	16.9	16.9	16.8	16.9	3''''	72.7	72.7	72.6	72.6
25	15.7	15.8	15.8	15.8	4''''	73.9	74.0	74.0	74.1
26	16.8	16.9	17.5	17.5	5''''	70.2	70.1	70.2	70.0
27	27.5	27.5	21.1	21.1	6''''	18.3	18.4	18.4	18.3
28	73.7	74.0	63.1	63.1	28- <i>O</i> -Glc				
29	29.5	29.5	29.5	29.5	1'''''	104.5	104.5		
30	20.3	20.3	20.0	20.0	2'''''	75.2	75.3		
21- <i>O</i> -Acyl	(Tig)	(Ang)	(Tig)	(Tig)	3'''''	78.5	78.4		
1'''''	168.0	167.8	168.1	168.1	4'''''	71.6	71.6		
2'''''	129.4	128.9	129.4	129.5	5'''''	78.1	78.3		
3'''''	137.0	137.2	137.0	137.0	6'''''	62.9	62.9		
4'''''	14.2	15.9	14.2	14.2					
5'''''	12.4	21.0	12.4	12.4					
22- <i>O</i> -Ac									
1'''''	171.5	171.3	170.8	170.8					
2'''''	21.1	21.1	20.7	20.7					

Floraassamsapoinin VI (**39**), VII (**40**) および VIII (**41**) は負の旋光性 (**39**: $[\alpha]_D^{22} -13.2$, **40**: $[\alpha]_D^{22} -22.7$, **41**: $[\alpha]_D^{22} -35.9$ in MeOH) を示す白色非結晶性粉末として得られた. 次に, FAB-MS において, 擬似分子イオンピークが m/z 1253 ($M+Na$)⁺ に観測され, 高分解能 FAB-MS により共通の分子式 $C_{60}H_{94}O_{26}$ を有することが明らかとなった. 構成糖の絶対立体配置を含めた同定は, **34** および **35** と同様の方法を用いることで行い, L-arabinose, D-glucose, D-glucuronic acid および L-rhamnose であると決定した (Figure 22).²²⁾ 化合物 **39**, **40** および **41** の ¹H-NMR (Table 8) と ¹³C-NMR (Table 9) スペクトル (pyridine-*d*₅), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果, barringtonenol C⁴⁴⁾, 糖鎖構造および 2 つのアシル基 {1 つのチグロイル基 [**39**: δ 1.67 (3H, d-like, H₃-4'''), 1.97 (3H, br-s, H₃-5'''), 7.11 (1H, m, H-3'''), **41**: δ 1.70 (3H, d-like, H₃-4'''), 1.96 (3H, br-s, H₃-5'''), 7.04 (1H, m, H-3'''),] または 1 つのアングロイル基 [**40**: δ 2.03 (3H, br-s, H₃-5'''), 2.13 (3H, d-like, H₃-4'''), 6.00 (1H, m, H-3''')] それぞれ 1 つのアセチル基} の存在が明らかとなった. 化合物 **39** および **40** における, 2 つのアシル基を含むアグリコンの ¹H- および ¹³C-NMR スペクトル値について, **39** は floratheasaponin G,³⁸⁾ **40** は floratheasaponin D³⁸⁾ の文献値と類似しており, 一方 3 位の糖鎖構造の ¹H- および ¹³C-NMR スペクトル値は **36** のものとよく一致した. また **41** における, 22 および 28 位付近以外の ¹H- および ¹³C-NMR スペクトル値は, **39** のものとほぼ一致していた. また, アシル基および糖鎖構造の結合位置は HMBC 相関により決定した. すなわち (**39**, **40**: H-21 と C-1'''; H-22 と C-1'''; H-1' と C-3; H-1'' と C-2'; H-1''' と C-3'; H-1''' と C-2'', **41**: H-21 と C-1'''; H-28 と C-1'''; H-1' と C-3; H-1'' と C-2'; H-1''' と C-3'; H-1''' と C-2'') に HMBC 相関が観測されたことから, その結合位置を決定した. 以上の結果より, floraassamsaponin VI (**39**), VII (**40**) および VIII (**41**) の構造を決定した.

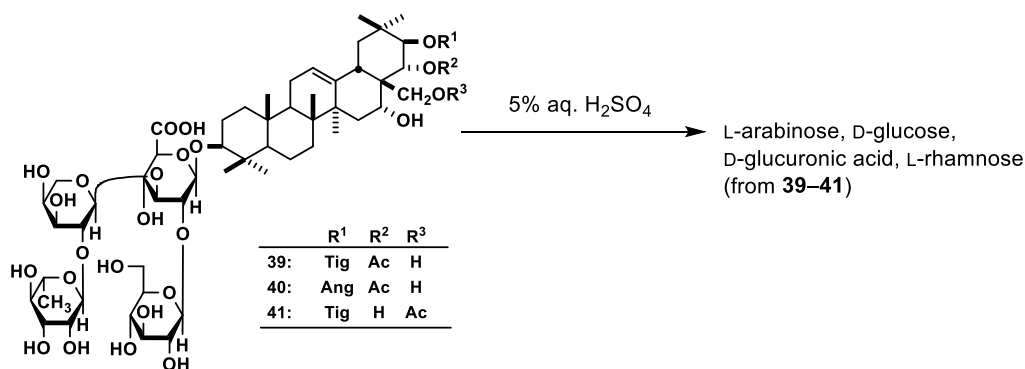


Figure 22. Acid hydrolysis of **39–41**

Table 8. ¹H NMR (600 MHz) data for **38–41** (pyridine-*d*₅)

Position	38	39	40	41
3	3.23 (dd-like)	3.25 (dd-like)	3.27 (dd-like)	3.23 (dd-like)
12	5.50 (br. s)	5.42 (br. s)	5.41 (br. s)	5.46 (br. s)
15	4.40 (m)	1.63 (m)	1.66 (m)	1.69 (m)
		1.90 (m)	1.88 (m)	1.91 (m)
16	4.19 (m)	4.47 (m)	4.48 (m)	4.42 (m)
21	6.62 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.61 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.64 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.49 (d, <i>J</i> = 9.6)
22	6.23 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.28 (d, <i>J</i> = 10.3)	6.24 (d, <i>J</i> = 10.3)	4.54 (d, <i>J</i> = 9.6)
23	1.26 (s)	1.18 (s)	1.18 (s)	1.17 (s)
24	1.19 (s)	1.10 (s)	1.09 (s)	1.08 (s)
25	0.82 (s)	0.80 (s)	0.80 (s)	0.82 (s)
26	1.00 (s)	0.85 (s)	0.85 (s)	0.98 (s)
27	1.85 (s)	1.87 (s)	1.85 (s)	1.84 (s)
28	3.46 (d-like)	3.41 (d-like)	3.41 (d-like)	3.25 (d-like)
	3.72 (d-like)	3.65 (d-like)	3.64 (d-like)	4.21 (d-like)
29	1.11 (s)	1.11 (s)	1.10 (s)	1.12 (s)
30	1.31 (s)	1.34 (s)	1.32 (s)	1.30 (s)
21- <i>O</i> -Acyl	(Ang)	(Tig)	(Ang)	(Tig)
3''''	6.00 (m)	7.11 (m)	6.00 (m)	7.04 (m)
4''''	2.13 (d-like)	1.67 (d-like)	2.13 (d-like)	1.70 (d-like)
5''''	2.03 (br-s)	1.97 (br-s)	2.03 (br-s)	1.96 (br-s)
22- <i>O</i> -Ac				
2''''	1.78 (s)	1.92 (s)	1.94 (s)	
28- <i>O</i> -Ac				
2''''				1.93 (s)
3- <i>O</i> -GlcA				
1'	4.96 (d, <i>J</i> = 7.1)	4.91 (d, <i>J</i> = 7.1)	4.91 (d-like)	4.92 (d-like)
2'- <i>O</i> -Glycoside	(Gal)	(Glc)	(Glc)	(Glc)
1''	5.71 (d, <i>J</i> = 7.0)	5.86 (d, <i>J</i> = 6.2)	5.86 (d, <i>J</i> = 6.0)	5.84 (d, <i>J</i> = 6.0)
3'- <i>O</i> -Ara				
1'''	6.14 (d-like)	6.15 (d-like)	6.17 (d-like)	6.16 (d-like)
2'''- <i>O</i> -Rha				
1''''	6.06 (s)	6.08 (s)	6.09 (s)	6.05 (s)

Table 9. ^{13}C NMR (150 MHz) data for **38–41** (pyridine- d_5)

Position	38	39	40	41	Position	38	39	40	41
1	39.0	38.9	38.8	38.8	3- <i>O</i> -GlcA				
2	26.6	26.5	26.5	26.5	1'	105.5	105.4	105.6	105.5
3	89.5	89.9	89.9	89.7	2'	79.3	79.1	79.4	79.0
4	39.7	39.8	39.7	39.6	3'	82.7	83.0	82.8	82.8
5	55.6	55.7	55.7	55.7	4'	71.4	71.3	71.3	71.2
6	18.8	18.4	18.4	18.4	5'	77.6	77.6	77.4	77.5
7	36.7	33.1	33.1	33.1	6'	171.9	172.0	172.1	172.0
8	41.4	40.1	40.1	40.0	2'- <i>O</i> -Glycoside	(Gal)	(Glc)	(Glc)	(Glc)
9	47.1	46.9	46.9	46.9	1''	103.7	102.9	103.0	103.0
10	37.0	36.7	36.7	36.7	2''	73.6	76.4	76.4	76.4
11	24.0	23.8	23.8	23.8	3''	75.2	78.3	78.3	78.4
12	125.4	124.0	124.0	123.7	4''	70.1	72.5	72.7	72.6
13	143.7	142.7	142.8	142.7	5''	76.9	78.2	78.3	78.2
14	48.3	41.7	41.7	41.8	6''	62.6	63.6	63.6	63.5
15	72.6	34.7	34.6	34.6	3'- <i>O</i> -Ara				
16	67.5	68.1	68.1	67.6	1'''	101.2	101.1	101.3	101.2
17	47.8	48.0	48.0	47.0	2'''	76.9	77.0	77.0	76.6
18	40.9	40.1	40.0	40.5	3'''	73.5	73.5	73.4	73.6
19	46.8	47.2	47.2	47.2	4'''	69.0	69.1	68.9	69.0
20	36.2	36.5	36.3	36.3	5'''	65.7	65.8	65.4	65.4
21	78.8	79.4	79.1	81.6	2'''- <i>O</i> -Rha				
22	74.0	74.3	74.4	71.4	1''''	102.4	102.2	102.3	102.2
23	28.0	27.8	27.8	27.4	2''''	72.6	72.5	72.5	72.5
24	16.9	16.7	16.8	17.0	3''''	72.7	72.7	72.7	72.6
25	15.8	15.6	15.6	15.7	4''''	74.0	74.0	74.0	74.0
26	17.5	16.9	16.7	17.0	5''''	70.0	70.0	70.2	70.0
27	21.2	27.5	27.5	27.4	6''''	18.3	18.3	18.3	18.3
28	63.2	63.7	63.8	66.5					
29	29.4	29.6	29.5	29.8					
30	20.1	20.2	20.3	20.1					
21- <i>O</i> -Acyl	(Ang)	(Tig)	(Ang)	(Tig)					
1''''	167.9	168.0	167.9	168.5					
2''''	128.9	129.5	129.0	129.8					
3''''	137.1	137.0	137.2	136.8					
4''''	15.9	14.3	15.9	14.1					
5''''	20.7	12.4	21.0	12.4					
22- <i>O</i> -Ac									
1''''	170.7	171.1	171.0						
2''''	21.0	20.9	20.9						
28- <i>O</i> -Ac									
1''''				170.7					
2''''				20.8					

第四項 アッサム種および中国種チャ花部サポニン成分の比較

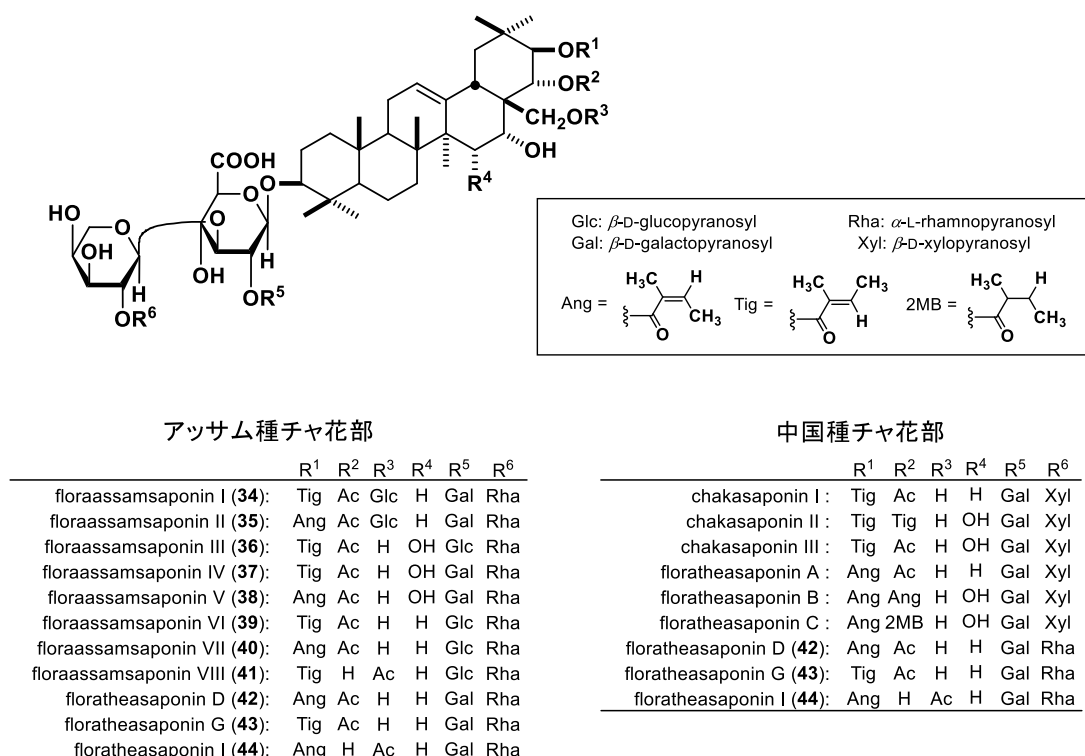


Figure 23. Structures of saponons from the flower buds of *C. sinensis* var. *assamica* and *C. sinensis*

アッサム種チャ花部と中国種チャ花部のサポニン成分の比較を行った。アッサム種チャ花部は 28 位にグルコースが結合した構造を有する 34 および 35 を含有していた。28 位に糖鎖構造を持つサポニンのツバキ科植物からの単離は本植物が初めてであった。またグルクロン酸の 2 位に結合する糖がグルコースであることも、中国種チャ花部の成分には見られず、アッサム種チャ花部サポニン成分の特徴と言える。以上のことから、アッサム種チャ花部サポニン成分は中国種チャ花部サポニン成分比べ、多様な糖鎖構造を有することが明らかとなった (Figure 23)。

第五項 小括

インド産アッサム種チャ花部 MeOH 抽出エキスをより、8 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 floraassamsaponin I–VIII (34–41) および 3 種の既知成分 (42–44) を単離した。アッサム種チャ花部のサポニン成分は中国種チャ花部のサポニン成分に比べ、多様な構成糖を有することが明らかとなった。

第二章 含有成分の生物活性評価

第一項 アシル化グレリンの分泌量変化

グレリンは胃から産生される摂食亢進作用を有するペプチドホルモンであり、アシル化されることにより活性型となることが知られている。中枢においてグレリンは視床下部弓状核のニューロン（ニューロペプチド Y/ アグーチ関連タンパク質ニューロン）を活性化して、摂食亢進作用を発揮する。これまでにグレリンは動物実験において中枢性あるいは末梢性に投与されることで消化器症状や食欲低下を改善することが知られている。⁴⁵⁾ しかし、内因性のグレリンを増加させる治療薬としては六君子湯が報告されているのみであり、グレリンの分泌に関与する化合物は知られていない。⁴⁶⁾

今回、含有成分の探索研究を行ったオオバゲッキツ葉部およびアッサム種チャ花部はいずれも伝承薬効などで食欲に関与すると考えられることから、単離化合物のグレリンの分泌量に与える影響について検討を行った (Figure 24)。まず、アシル化グレリンの分泌量を測定する目的で、ラットの胃内分泌細胞を含む初代培養胃細胞を調製した。続いて調整した細胞を 96 well プレートに播種し、Ghrelin ELISA kit を用いてアシル化グレリンの分泌量を測定した (Table 10)。⁴⁷⁾ 比較対照物質には metformin を用いた。Metformin は AMPK を介してグレリン分泌を抑制することが報告されている。⁴⁸⁾

その結果、オオバゲッキツ葉部の成分 mahanimbicine (24) にアシル化グレリンの分泌促進作用が認められたが、濃度依存性は見られなかった。一方で、アッサム種茶花の成分である floratheasaponin D (42) にアシル化グレリンの分泌抑制作用が認められた。

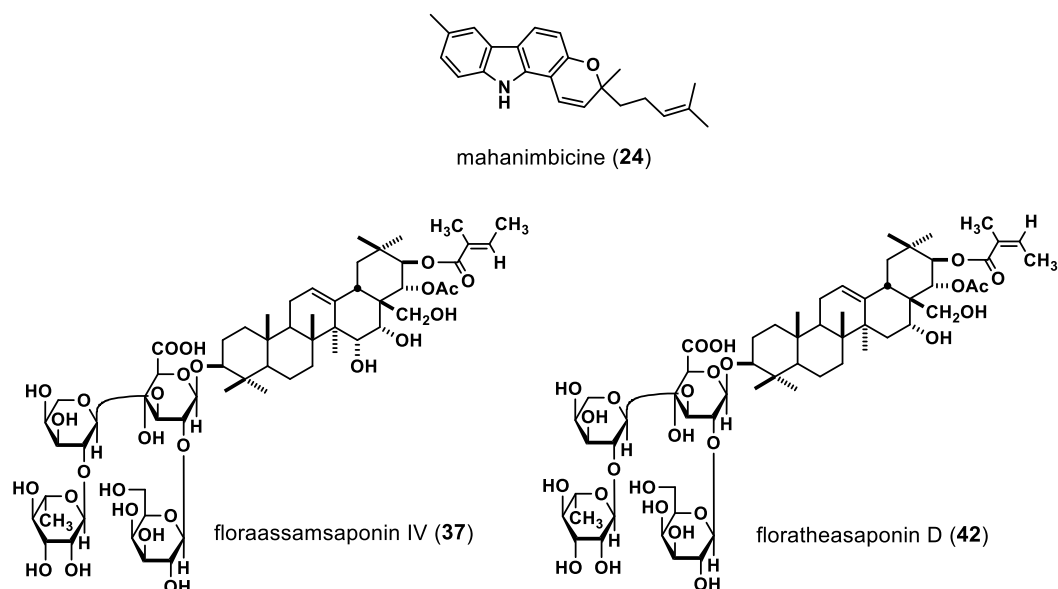


Figure 24. Isolated constituents 24 from *M. koenigii* and 37 and 42 from *C. sinensis* var. *assamica*

Table 10. The effects of **24**, **37** and **42** on the amount of acylated ghrelin secretion from primary gastric cells of SD rats

	Conc.(μ M)	Secretion (%)			
		control	0.1	1	10
24		100.0 \pm 3.1	162.8 \pm 9.0**	193.7 \pm 13.7**	139.9 \pm 1.8*
37		100.0 \pm 7.0	109.4 \pm 2.6	98.1 \pm 3.7	115.7 \pm 6.6
42		100.0 \pm 7.4	81.3 \pm 3.9	65.5 \pm 13.9*	57.7 \pm 2.0**

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N=3$). Statistical differences were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Metformin [Secretion (%): 57.2 \pm 0.5 ($p < 0.05$) at 100 μ M ($n = 3$)] was used as a reference compound for inhibitor on the ghrelin secretion.

第二項 メラニン生成抑制作用

メラニンとはヒトを始めとする動物界に広く分布する天然色素の一つであり、メラノサイト細胞内に存在するメラノソームにおいて、チロシナーゼの働きにより、チロシンからドーパ、ドーパキノンを経て生合成されることが知られている。メラニンは紫外線から DNA を守るなど重要な役割を果たすと同時に、肌、髪、および瞳を色付ける物質である。⁴⁹⁾ 近年では、チロシナーゼ阻害物質を始めとするメラニン生成抑制物質の探索が行われ、美白効果が期待される化合物を含有した化粧水や内服薬が販売されている。オトメアゼナ全草、オオバゲッキツ葉部およびアッサム種チャ花部の含有成分についてマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 を用いて、メラニン生成抑制作用の評価を行ったところ、オオバゲッキツ葉部の成分に有意な抑制活性が認められた (Figure 25)。単離した化合物共存下で、B16 melanoma 4A5 細胞をテオフィリン刺激してインキュベートし、生成されたメラニン量を測定することで、メラニン生成抑制作用を評価した (Table 11)。加えて、サンプルとともに 70 時間インキュベートした際の細胞生存率を WST-8 アッセイ法で測定をした (Table 12)。その結果、**24, 25, 26, 27, 29, 30, 31** および **32** にメラニン生成抑制活性が認められ、**32** [IC_{50} (μM): 1.2 ($p < 0.01$)] は活性が強かった。化合物 **25** [IC_{50} (μM): ca. 1.4 ($p < 0.01$)] も活性を示したが、 $10 \mu M$ で細胞毒性が認められた。一方、**29** および **30** は $30 \mu M$ で細胞毒性が認められた。化合物 **24, 26, 31** および **32** は $10 \mu M$ または $30 \mu M$ で細胞毒性を示した。

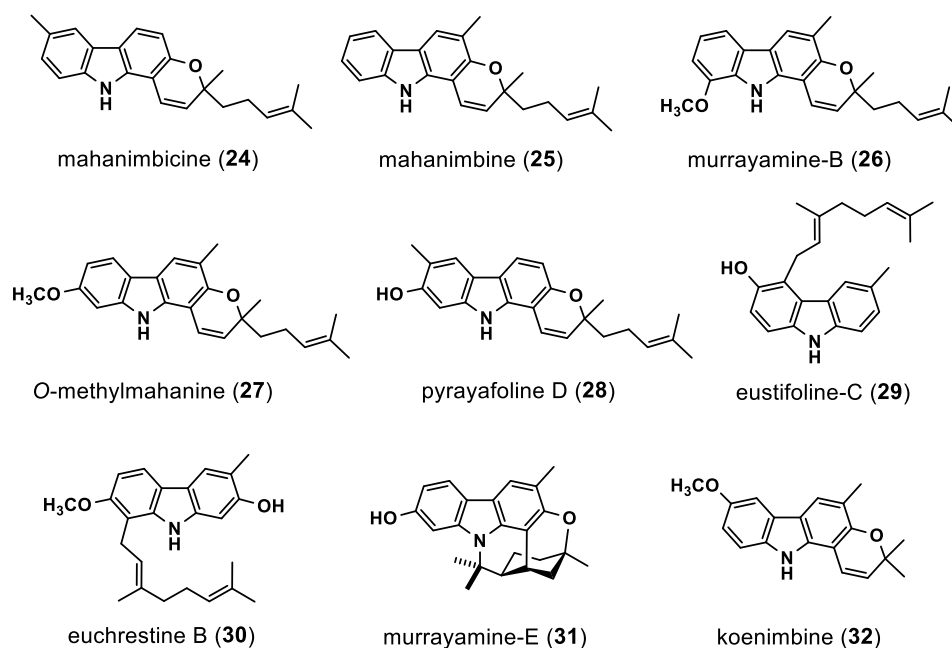


Figure 25. Isolated constituents **24–32** from *M. koenigii*.

Table 11. Inhibitory effects of constituents from the leaves of *M. koenigii* on melanogenesis in B16 melanoma 4A5 cells

	Conc. (μ M)	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
		control	1	3	10	30	
24		0.0 \pm 3.6	25.9 \pm 2.0**	60.0 \pm 2.7**	85.2 \pm 1.9**	78.4 \pm 3.2**	2.2
25		0.0 \pm 2.2	43.3 \pm 1.6**	63.9 \pm 0.2**	33.7 \pm 1.2**	59.7 \pm 5.1**	ca. 1.4
26		0.0 \pm 2.4	6.8 \pm 1.8	40.4 \pm 3.2**	71.8 \pm 0.8**	67.2 \pm 0.7**	3.8
27		0.0 \pm 4.3	10.9 \pm 3.1	8.7 \pm 4.1	40.8 \pm 3.0**	58.3 \pm 1.7**	15.7
28		0.0 \pm 2.5	10.0 \pm 1.2	5.5 \pm 2.2	0.0 \pm 4.0	17.7 \pm 2.6	>100
29		0.0 \pm 2.3	19.7 \pm 2.7**	25.2 \pm 2.2**	55.9 \pm 1.5**	—	8.3
30		0.0 \pm 1.3	18.2 \pm 2.6**	40.6 \pm 2.4**	74.2 \pm 1.1**	—	4.1
31		0.0 \pm 0.4	26.9 \pm 2.0**	50.8 \pm 2.5**	66.0 \pm 1.8**	74.3 \pm 2.7**	2.9
32		0.0 \pm 1.6	42.5 \pm 1.7**	77.0 \pm 1.0**	86.2 \pm 2.8**	72.6 \pm 2.4**	1.2
	Conc. (μ M)	Inhibition (%)					
		control	10	30	100	300	
Arbutin		0.0 \pm 1.4	10.6 \pm 0.6**	20.4 \pm 0.5**	38.1 \pm 0.9**	61.5 \pm 0.6**	83.7 \pm 0.5**

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N=4$). Significantly different from the control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Table 12. Inhibitory effects of the several constituents from the leaves of *M. koenigii* on proliferation of B16 melanoma 4A5 cells

	Conc. (μ M)	Viability (%)				
		control	1	3	10	30
24		100.0 \pm 2.4	109.9 \pm 1.2*	117.3 \pm 1.4*	102.7 \pm 0.8	63.9 \pm 1.4**
25		100.0 \pm 6.8	94.3 \pm 5.8	68.7 \pm 2.2**	34.4 \pm 1.3**	35.1 \pm 0.5**
26		100.0 \pm 3.0	100.6 \pm 1.9	97.3 \pm 1.8	73.8 \pm 0.7**	46.3 \pm 2.0**
27		100.0 \pm 2.2	104.7 \pm 1.7	98.7 \pm 1.1	94.9 \pm 3.3	66.3 \pm 1.3**
28		100.0 \pm 4.7	99.1 \pm 0.6	96.6 \pm 2.3	90.0 \pm 2.0*	90.9 \pm 0.7
29		100.0 \pm 1.1	104.5 \pm 1.3	96.5 \pm 1.2	79.2 \pm 2.1**	9.9 \pm 1.8**
30		100.0 \pm 3.1	104.9 \pm 0.8	102.4 \pm 0.6	83.7 \pm 1.4**	1.9 \pm 0.1**
31		100.0 \pm 1.7	100.9 \pm 2.2	94.4 \pm 2.6	76.8 \pm 2.8**	71.1 \pm 1.6**
32		100.0 \pm 2.4	114.4 \pm 4.0*	92.4 \pm 3.0	66.6 \pm 3.7**	37.9 \pm 0.8**

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N=4$).

Significantly different from the control group, * $p<0.05$, ** $p<0.01$

さらに、これら 9 種のアルカロイド (**24—32**) のマッシュルーム由来チロシナーゼ阻害活性について検討した (Table 13). その結果, pyrayafoline-D (**28**), eustifoline-C (**29**), murrayamine-E (**31**) に活性が認められた. 以上の結果から, 水酸基の存在が活性の発現において重要であることが明らかになった. 最近, 数種のチロシナーゼ阻害物質に関する研究からマッシュル

ーム由来のチロシナーゼに対する阻害率とマウス由来チロシナーゼに対する阻害率とでは大きく異なることが示されており、今後はこれらの成分のマウス由来チロシナーゼ阻害活性について検討する必要がある。

Table 13. Inhibitory effects of the several constituents from the leaves of *M. koenigii* on the activity of tyrosinase from mushroom

Conc.(μ M)	Inhibition (%)					
	control	1	3	10	30	100
24	0.0 \pm 1.7	7.4 \pm 1.2*	-0.7 \pm 0.3	-1.1 \pm 2.4	-0.3 \pm 1.9	-3.4 \pm 1.2
25	0.0 \pm 1.1	-1.3 \pm 2.0	-3.2 \pm 0.6	-0.4 \pm 1.2	2.7 \pm 1.5	6.2 \pm 1.5*
26	0.0 \pm 1.5	-1.0 \pm 1.3	-2.8 \pm 1.1	-2.8 \pm 1.4	2.7 \pm 1.7	-0.8 \pm 1.6
27	0.0 \pm 1.1	0.1 \pm 1.2	0.1 \pm 0.3	0.1 \pm 1.0	0.9 \pm 1.3	4.2 \pm 2.9
28	0.0 \pm 1.6	-3.3 \pm 1.0	-2.1 \pm 1.8	-1.5 \pm 0.4	3.6 \pm 1.6	18.8 \pm 2.3**
29	0.0 \pm 0.7	1.0 \pm 0.8	2.7 \pm 0.7	2.3 \pm 1.3	5.9 \pm 1.7	16.1 \pm 3.0**
30	0.0 \pm 0.7	-6.5 \pm 3.1	-4.4 \pm 2.5	-4.3 \pm 1.8	-6.4 \pm 0.7	-1.1 \pm 2.3
31	0.0 \pm 1.5	-1.3 \pm 1.6	-0.6 \pm 1.5	3.5 \pm 1.7	15.3 \pm 2.0**	20.2 \pm 1.5**
32	0.0 \pm 1.2	0.7 \pm 1.2	-1.0 \pm 1.1	-0.1 \pm 1.8	1.0 \pm 0.3	4.3 \pm 1.0

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=4).

Significantly different from the control group, * p <0.05, ** p <0.01

第三項 膵リパーゼ阻害作用

膵リパーゼは消化管における脂質の消化酵素であり，トリグリセリドをモノアシルグリセロールと脂肪酸に分解する.⁵⁰⁾ 膵リパーゼの活性を阻害する化合物は，消化管からの脂質吸収を阻害し，肥満の予防または改善に有効であると考えられる．オルリスタットは膵リパーゼ阻害薬として広く使用されているが，長期連用による胃腸障害および油性便などの重篤な副作用が報告されていることから，副作用が少ない，安全性の高い薬剤の開発が望まれている．オトメアゼナ全草の含有成分 (Figure 26) の膵リパーゼ阻害作用について検討した結果，**13** [IC₅₀ (μM): 32.5 (*p* < 0.01)] および **14** [IC₅₀ (μM): 33.0 (*p* < 0.01)] に有意な膵リパーゼ阻害活性が認められたが，**12, 17** および **19** においては活性が見られなかった (Table 14). 以上の結果から，カフェオイル基の存在が作用の発現に重要であることが示唆された．

Table 14. Inhibitory effects of compounds from *B. monniera* whole plants on pancreatic lipase activity

	Inhibition (%)						IC ₅₀	
	Conc.(μ M)	control	6.25	12.5	25	50	100	(μ M)
12		0.0 \pm 0.8	1.5 \pm 3.1	3.6 \pm 2.5	4.4 \pm 1.4	14.5 \pm 1.7**	21.4 \pm 3.2**	>100
13		0.0 \pm 0.7	7.0 \pm 3.0*	29.9 \pm 4.0**	35.5 \pm 2.6**	65.5 \pm 7.2**	87.4 \pm 1.7**	32.5
14		0.0 \pm 0.6	9.3 \pm 2.3*	12.2 \pm 1.7**	37.0 \pm 3.9**	67.9 \pm 4.6**	83.4 \pm 1.0**	33.0
17		0.0 \pm 3.0	-2.9 \pm 4.4	1.5 \pm 1.4	-3.4 \pm 4.4	-9.2 \pm 4.8	-4.2 \pm 3.3	>100
19		0.0 \pm 0.9	-9.2 \pm 1.6	-4.5 \pm 1.1	-4.2 \pm 3.0	-1.1 \pm 8.3	0.7 \pm 1.0	>100

Each value represents the mean ± S.E.M. (*N*=4).

Significantly different from the control group, **p*<0.05, ***p*<0.01

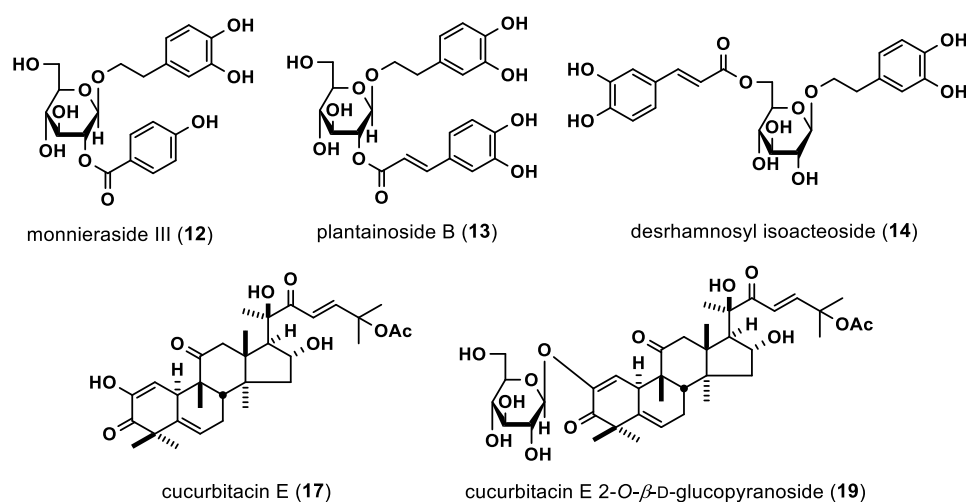


Figure 26. Isolated constituents **12–14, 17** and **19** from *B. monniera*.

第四項 Aβ凝集抑制作用

アルツハイマー病は、加齢とともに起こる進行型認知症を主な特徴とする、大脳皮質が萎縮する原因不明の進行性神経疾患である。記憶の形成に重要とされる海馬から神経細胞の脱落が始まり、側頭葉、頭頂葉、後頭葉へと脱落が広がってゆく。また、 β セクレターゼおよび γ セクレターゼによってアミロイド前駆タンパクから生成されるアミロイド β タンパクが凝集したアミロイド β オリゴマーの蓄積により出現する老人斑も大きな特徴である。オトメアゼナ全草およびアッサム種チャ花部の含有成分 (Figure 27) の A β 凝集抑制活性について検討した結果、オトメアゼナ全草の成分 **1** [100 μ M における抑制率 (%): 44.0 ± 16.9 ($p < 0.05$)], **9** [100 μ M における抑制率 (%): 39.5 ± 11.6 ($p < 0.05$)], **10** [100 μ M における抑制率 (%): 67.7 ± 14.7 ($p < 0.01$)] および **11** [100 μ M における抑制率 (%): 98.2 ± 14.5 ($p < 0.01$)] が有意な活性を示した。加えて、アッサム種チャ花部の成分 **36** [100 μ M における抑制率 (%): 73.4 ± 8.0 ($p < 0.01$)], **37** [100 μ M における抑制率 (%): 68.8 ± 8.4 ($p < 0.01$)] および **40** [100 μ M における抑制率 (%): 56.9 ± 13.2 ($p < 0.01$)] に A β 凝集抑制活性が認められた (Table 15)。

Table 15. Inhibitory effects of **1**, **9–11**, **54**, **37** and **58** on A β_{42} aggregation

Conc. (μ M)	Inhibition (%)	
	control	100
1	0.0 ± 1.6	$44.0 \pm 16.9^*$
9	0.0 ± 1.3	$39.5 \pm 11.6^*$
10	0.0 ± 1.3	$67.7 \pm 14.7^{**}$
11	0.0 ± 1.3	$98.2 \pm 14.5^{**}$
36	0.0 ± 5.0	$73.4 \pm 8.0^{**}$
37	0.0 ± 5.0	$68.8 \pm 8.4^{**}$
40	0.0 ± 5.0	$56.9 \pm 13.2^{**}$

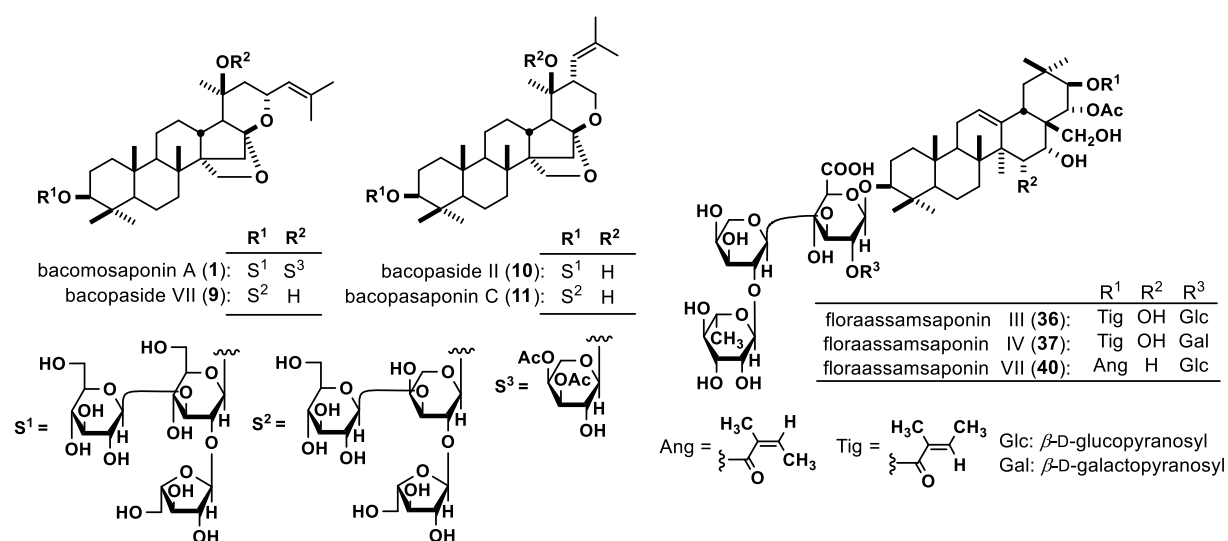


Figure 27. Isolated constituents **1**, **9–11** from *B. monniera* and **36**, **37** and **40** from *C. sinensis* var. *assamica*

結論

1. アーユルヴェーダ伝承薬物の含有成分探索

1) インド産オトメアゼナ (*Bacopa monniera*) 全草

インド産オトメアゼナ全草 MeOH 抽出エキスをより、2 種の新規変形ダンマラン型トリテルペン配糖体 bacomosaponins A (1), B (2) および 5 種のフェニルエタノイド配糖体 bacomosides A–C₂ (3–7) を単離し、その化学構造を決定した。単離化合物である 1, 2 および 8–11 は変形ダンマラン型トリテルペン配糖体であり、オトメアゼナ以外の植物からは単離されておらず、この植物に特有の成分であると考えられた。

2) スリランカ産オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部

スリランカ産オオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキスをより、2 種の新規カルバゾール型アルカロイド karapinchamine A (20) および B (21) を単離し、その化学構造を決定した。

3) インド産アッサム種チャ (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 花部

インド産アッサム種チャ花部 MeOH 抽出エキスをより、8 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 floraassamsaponin I–VIII (34–41) を単離し、その化学構造を決定した。

2. 含有成分の生物活性評価

オオバゲッキツ葉部の成分 mahanimbicine (24) にアシル化グレリンの分泌促進作用が認められた。一方で、アッサム種茶花の成分である floratheasaponin D (42) にアシル化グレリンの分泌抑制作用が認められた。また、オオバゲッキツ葉部のカルバゾール型アルカロイドが有意なメラニン生成抑制活性を有することを明らかにした。テルペン構造および水酸基の存在が活性の発現に重要であることが示唆された。加えて、オトメアゼナ全草の成分 plantainoside B (13) および desrhamnosyl isoacteoside (14) に有意な腓りパーゼ阻害活性を見出した。またオトメアゼナ全草の変形ダンマラン型トリテルペン配糖体 bacomosaponin A (1), bacopaside VII (9), bacopaside II (10) および bacopasaponin C (11) およびアッサム種茶花のオレアナン型トリテルペン配糖体 floraassamsaponin III (36), floraassamsaponin IV (37) および floraassamsaponin VII (40) に有意な A β 凝集抑制活性が認められた。

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 生薬学分野 松田久司教授、ならびに中村誠宏准教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

高分解能質量測定におきまして、大変お世話になりました 京都薬科大学 共同利用機器センター織田佳代子講師（当時）ならびに照屋千香子技術専門職員に深く感謝申し上げます。

本研究に際し御助言、御協力を賜りました生薬学分野 吉川雅之名誉教授、生薬学分野研究員 藤本勝好博士 ならびに 中嶋聡一博士に深謝致します。

また、本研究に際しご協力下さいました諸先生方、大学院生および学生諸氏の皆様に深く感謝致します。

実験の部

融点は、柳本微量融点測定装置 MP-500D を用いて測定し、未補正である。

ECD スペクトルは、日本分光円二色性分散計 J-720WI spectrometer を用いて測定した。

旋光度は、Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter ($l=0.5$) を用いて測定した。

高分解能質量分析 (High resolution FAB-MS, EI-MS, ESI-MS) および質量分析 (FAB-MS, EI-MS, ESI-MS) は、JEOL JMS-SX 102, JMS-GCMATE および Shimadzu LCMS-IT-TOF 型質量分析装置を用いて測定した。

赤外吸収スペクトル (IR) は、Shimadzu FT-IR DR-8000 spectrometer および Thermo Electron Nexus 470 を用いて測定した。

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR) および炭素核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR) は、JEOL JNM-LA500 (500 MHz) および JEOL JNM-ECA 600K (600 MHz) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、ポンプは Shimadzu LC-6AD を、紫外可視分光光度計検出器は、Shimadzu SPD-20A および SPD-10A を用いた。

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は、順相系はシリカゲル Silica Gel 60N (関東化学)、逆相系はクロマトレックス ODS DM1020T (富士シリシア) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には、silica gel 60F₂₅₄ (Merck, 順相), RP-18 60F₂₅₄ (Merck, 逆相) を使用し、スポットの検出は、UV (254nm), ニンヒドリンスプレー (和光純薬株式会社), および 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/10\%\text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液, N,N -dimethyl-1,4-phenylenediammonium dichloride を噴霧し、加熱時の呈色により行った。

ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) は Sigma-Aldrich より購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 株式会社ニチレイバイオサイエンスより購入した。24 well マイクロプレートおよび 96 well マイクロプレート株式会社グライナージャパンより購入した。

試薬は特に明記しないものは和光純薬株式会社製試薬 (特級) を用いた。

実験で得られた数値は平均±標準誤差で表記し、対照群との平均値の有意差の検定には Dunnett の方法を用い、 p 値が 0.05 以下のものを有意とみなした。

第一章の実験

第一節の実験

第二項および第三項の実験

インド産オトメアゼナ全草からの含有成分の抽出・単離および構造類似体や構造異性体の単離

インド産オトメアゼナ (*Bacopa monniera*, 2.0 kg) 全草を MeOH で熱時抽出 (3h) 後, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を計 5 回行った. MeOH 抽出液を合わせ, 減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキスを (608.82g, 植物から収率 30.4%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H₂O で分配抽出し, さらに *n*-BuOH と H₂O で分配抽出し, *n*-BuOH 移行部 (57.94 g, 8.8%), H₂O 移行部 (110.3g, 16.8%), および EtOAc 移行部 (31.8g, 4.8%)を得た.

得られた EtOAc 移行部エキスを (31.8 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [1.25 kg, Hexane-CHCl₃ (10:1 → 1:1 → 1:10, v/v) → CHCl₃-MeOH (100:1 → 50:1 → 30:1 → 15:1 → 7:1 → 5:1, v/v) → MeOH] で分画し, Fr. E1 (0.15 g), Fr. E2 (11 mg), Fr. E3 (5.4 mg), Fr. E4 (15.4 g), Fr. E5 (8.9 mg), Fr. E6 (0.48 g), Fr. E7 (92.7 mg), Fr. E8 (60.3 mg), Fr. E9 (4.0 g), Fr. E10 (0.8 g), Fr. E11 (1.4 g), Fr. E12 (0.63 g), Fr. E13 (1.4 g), Fr. E14 (2.4 g), Fr. E15 (4.2 g), Fr. E16 (4.6 g), Fr. E17 (4.7 g), Fr. E18 (0.5 g) を得た. Fraction E9 (4.02 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [200 g, *n*-hexane-EtOAc (50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1 → 1:2, v/v) → MeOH] により分離し, Fr. E9-1 (71.5 mg), Fr. E9-2 (40.7 mg), Fr. E9-3 (249.6 mg), Fr. E9-4 (303.1 mg), Fr. E9-5 (250.1 mg), Fr. E9-6 (163.8 mg), Fr. E9-7 (253.3 mg), Fr. E9-8 (209.6 mg), Fr. E9-9 (183.2 mg), Fr. E9-10 (83.1 mg), Fr. E9-11 (107.3 mg), Fr. E9-12 (222.4 mg), Fr. E9-13 (208.8 mg), Fr. E9-14 (226.6 mg), Fr. E9-15 (142.6 mg), Fr. E9-16 (228.4 mg), Fr. E9-17 (137.1 mg), Fr. E9-18 (131.3 mg), Fr. E9-19 (111.0 mg), Fr. E9-20 (114.1 mg), Fr. E9-21 (49.2 mg), Fr. E9-22 (510.0 mg), Fr. E9-23 (270.3 mg), および Fr. E9-24 (181.2 mg) を得た. Fraction E9-19 (111.0 mg) から, HPLC [mobile phase: MeCN-H₂O (50:50, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] により **17** (5.5 mg) が単離された. Fraction E11 (1.2 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [60 g, CHCl₃ → CHCl₃-MeOH (200:1 → 100:1 → 50:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1, v/v) → MeOH] により分離し, Fr. E11-1 (16.4 mg), Fr. E11-2 (42.1 mg), Fr. E11-3 (38.6 mg), Fr. E11-4 (43.1 mg), Fr. E11-5 (345.7 mg), Fr. E11-6 (293.8 mg), Fr. E11-7 (88.0 mg), Fr. E11-8 (151.3 mg), Fr. E11-9 (58.6 mg), Fr. E11-10 (66.3 mg), および Fr. E11-11 (25.2 mg) を得た. Fr. E11-6 (293.8 mg) から, HPLC [mobile phase: MeCN-H₂O (30:70, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] により **18** (1.8 mg) を単離した. Fraction E13 (1.35 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [60 g, MeOH-H₂O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH] により分離し, Fr. E13-1 (53.7 mg), Fr. E13-2 (22.1 mg), Fr. E13-3 (38.2 mg), Fr. E13-4 (26.0 mg), Fr. E13-5 (132.6 mg), Fr. E13-6 (70.2 mg), Fr. E13-7 (186.8 mg), Fr. E13-8 (62.5 mg), Fr. E13-9 (38.8 mg), Fr.

E13-10 (21.3 mg), Fr. E13-11 (33.5 mg), Fr. E13-12 (17.6 mg), Fr. E13-13 (41.5 mg), Fr. E13-14 (28.7 mg), Fr. E13-15 (107.9 mg), Fr. E13-16 (48.6 mg), Fr. E13-17 (218.6 mg), Fr. E13-18 (32.2 mg), Fr. E13-19 (15.6 mg), および Fr. E13-20 (6.1 mg) を得た. Fraction E13-7 (186.8 mg) から, HPLC [mobile phase: MeOH-H₂O (30:70, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] により **19** (62.0 mg) を単離した. Fraction E16 (4.6 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [60 g, MeOH-H₂O (10:90 → 20:80 → 30:70 → 40:60 → 60:40 → 80:20, v/v) → MeOH] により分画し, Fr. E16-1 (195.7 mg), Fr. E16-2 (39.2 mg), Fr. E16-3 (38.2 mg), Fr. E16-4 (355.8 mg), Fr. E16-5 (535.2 mg), Fr. E16-6 (479.3 mg), Fr. E16-7 (231.4 mg), Fr. E16-8 (623.1 mg), Fr. E16-9 (364.1 mg), Fr. E16-10 (227.4 mg), Fr. E16-11 (63.3 mg), Fr. E16-12 (254.4 mg), Fr. E16-13 (154.5 mg), Fr. E16-14 (142.8 mg), Fr. E16-15 (85.9 mg), Fr. E16-16 (366 mg) を得た. Fr. E16-4 (355.8 mg) を HPLC [(1) mobile phase: MeCN-H₂O in 0.3% AcOH (12:88, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.), (2) mobile phase: MeCN-H₂O in 0.3% AcOH (10:90, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **13** (62.0 mg), **3** (7.7 mg), **12** (10.5mg), **4** (24.5mg), **5** (22.3mg), **6** (10.3mg), **7** (8.2mg) を得た.

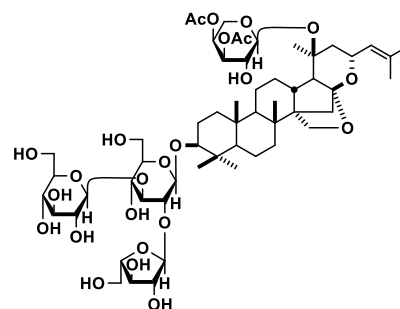
また, Fr. E16-8 (623.1 mg) を HPLC [mobile phase: MeCN-H₂O (17:83, v/v), COSMOSIL 5PFP (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, 1-(2-hydroxy-4-hydroxymethyl)phenyl-6-*O*-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (**15**, 5.9mg), (*E*)-4-hydroxymethylphenyl-6-*O*-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (**16**, 16.6mg), desrhamnosyl isoacteoside (**14**, 89.1mg) を単離した.

n-BuOH 移行部エキスの一部 (30.0 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー[900 g, CHCl₃ → CHCl₃-MeOH (100:1 → 20:1 → 10:1 → 8:1 → 6:1 → 4:1, v/v) → CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0.03 → 10:3:1 → 7:3:1 → 6:4:1, v/v/v, 下層) → MeOH] により分離し, Fr. B1 (219.5 mg), Fr. B2 (696.3 mg), Fr. B3 (1.51 g), Fr. B4 (8.70 g), Fr. B5 (4.28 g), Fr. B6 (11.01 g) および Fr. B7 (328.5 mg) を得た. Fraction B4 (8.70 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [425 g, MeOH-H₂O (30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30, v/v) → MeOH] により分離し, Fr. B4-1 (3.55 g), Fr. B4-2 (312.3 mg), Fr. B4-3 (396.6 mg), Fr. B4-4 (3.65 g) および Fr. B4-5 (1.09 g) を得た. Fr. B4-4 (3.65 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [180 g, MeCN-H₂O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50, v/v) → MeOH] により分離し, Fr. B4-4-1 (39.7 mg), Fr. B4-4-2 (168.8 mg), Fr. B4-4-3 (320.9 mg), Fr. B4-4-4 (103.5 mg), Fr. B4-4-5 (1.09 g), Fr. B4-4-6 (913.6 mg), Fr. B4-4-7 (178.3 mg), Fr. B4-4-8 (4.9 mg), Fr. B4-4-9 (5.9 mg), および Fr. B4-4-10 (18.4 mg) を得た. Fr. B4-4-5 (1.09 g) から, HPLC [mobile phase: MeCN-H₂O in 0.3% AcOH (31:69, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] により **8** (145.7 mg), **10** (88.0 mg) および **1** (18.5 mg) を単離した. Fr. B4-4-7 (178.3 mg) から, HPLC [mobile phase: MeCN-H₂O in 0.3% AcOH (33:67, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] により化合物 **10** (8.8 mg), **9** (40.0 mg), **11** (19.6 mg) および **2** (25.1 mg) を単離した.

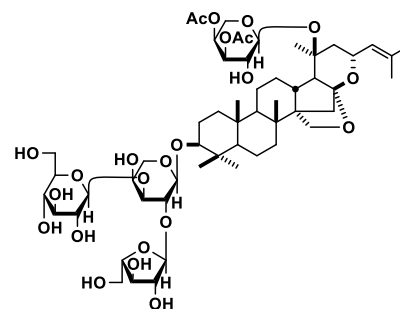
第四項の実験

新規化合物の構造解析

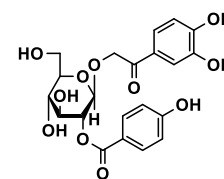
Bacomosaponin A (**1**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{19} -2.9$ ($c = 0.1$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1743, 1635, 1083 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 1 に記載; $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 2 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 1167 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS: m/z 1167.5560 (Calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{88}\text{O}_{24}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 1167.5563).



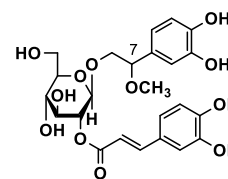
Bacomosaponin B (**2**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{19} -3.8$ ($c = 0.1$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3392, 1745, 1643, 1076 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 1 に記載; $^{13}\text{C-NMR}$ (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 2 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 1137 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS: m/z 1137.5461 (Calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{86}\text{O}_{23}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 1137.5458).



Bacomoside A (**3**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{27} -3.9$ ($c = 0.7$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3415, 1705, 1609 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 3 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 473 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS: m/z 473.1064 (Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 473.1060).

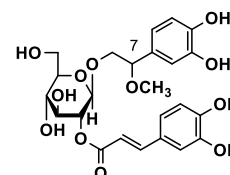


Bacomoside B₁ (**4**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{27} +5.1$ ($c = 0.7$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3450, 1705, 1605 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 3 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS: m/z 531.1473 (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 531.1478).



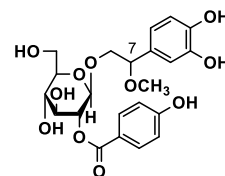
4 is the epimer of 5 at 7-position

Bacomoside B₂ (**5**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{27} +22.0$ ($c = 0.2$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3455, 1690, 1614 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 3 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-FAB-MS: m/z 531.1483 (Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 531.1478).



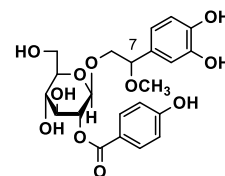
5 is the epimer of 4 at 7-position

Bacomoside C₁ (**6**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{27} +2.4^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3400, 1711, 1609 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 4 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 489 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRFAB-MS: m/z 489.1379 (Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 489.1373).



6 is the epimer of **7** at 7-position

Bacomoside C₂ (**7**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{27} +9.1^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3420, 1709, 1608 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 4 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 489 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRFAB-MS: m/z 489.1378 (Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 489.1373).



7 is the epimer of **6** at 7-position

Bacomosaponin A (**1**) および B (**2**) の分解反応

化合物 **1**, **2** (各 3.0 mg) 水溶液に 9% HCl-dry MeOH 水溶液 (1 ml) を加え, 1h 加熱した. 反応溶液に H_2O および CHCl_3 を加え, CHCl_3 溶液を得た. 得られた CHCl_3 溶液を炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し, 硫酸マグネシウムで乾燥させ, CHCl_3 溶液を減圧下で蒸発させ **1** および **2** より ebelin lactone (1.0 mg) を主成分として得た. 化合物 **1** および **2** から得た ebelin lactone の $[\alpha]_D$, $^1\text{H-NMR}$ および MS を測定し, 文献値と比較することにより同定した.

Bacomosaponin A (**1**) および B (**2**) のアルカリ加水分解

化合物 **1**, **2** (各 1.0 mg) 水溶液に 5% K_2CO_3 水溶液 (0.2 ml) を加え, 室温で 1h 攪拌した. 反応溶液をイオン交換樹脂 Dowex HCR W \times 2 (H^+ form) で中和し, その後, 濾過により樹脂を取り除いた. 濾液を減圧下で蒸発させ **1** より bacopasaponin F (0.8 mg), また **2** より bacopasaponin E (0.8 mg) を得た. 得られた bacopasaponin F および bacopasaponin E の $[\alpha]_D$, $^1\text{H-NMR}$ および MS を測定し, 文献値と比較することにより同定した.

Bacomoside A–C₂ (**3–7**)の酸加水分解と構成糖の同定

化合物 **3–7** それぞれ 3.0 mg を 5% aqueous H_2SO_4 –1,4-dioxane (1:1, v/v, 1.0 mL) に溶解し, 90 $^\circ\text{C}$ で 3 時間攪拌した. 反応液を陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 (OH^- form) で中和し, 樹脂を濾別後, 減圧下溶媒留去し, 粗生成物を得た. 粗生成物を EtOAc– H_2O (1:1, v/v) で分配抽出し, EtOAc 移行部と H_2O 移行部を得た. EtOAc 移行部を HPLC [column: COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque), 250 \times 4.6 mm i.d. (5 μm); mobile phase: MeCN– H_2O in 0.3% AcOH (15:85, v/v); detection: UV (254 nm); flow rate: 1.0 ml/min; column temperature: 35 $^\circ\text{C}$] にて分析を行ったところ, 4-hydroxybenzoic acid (t_R 8.3 min from **3**, **5** and **6**) と *trans*-caffeic acid (t_R 9.2 min from **4** and **5**) を得た. H_2O 移行部を pyridine (0.5 mL) に溶解した. 続いて, L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.5 mg) を加えた後 60 $^\circ\text{C}$ で 1 時間攪拌した. さらに, *o*-tolylisothiocyanate (0.5 mg) を pyridine (0.1 mL) に溶解させたものを加え, 60 $^\circ\text{C}$ でさらに 1 時間攪拌した. 生成物を HPLC [column: COSMOSIL 5C18-AR-II (Nacalai Tesque), 250 \times 4.6 mm i.d. (5 μm); mobile phase: MeCN– H_2O in 1% AcOH (18:82, v/v); detection: UV (250 nm); flow rate: 0.8 mL/min; column

temperature: 35°C] にて分析したところ, **3-7** から D-glucose を由来とするピークが検出された (t_R : D-glucose; 48.9 min, L-glucose; 41.2 min).

第二節の実験

第二項の実験

インド産オオバゲッキツ葉部から含有成分の抽出・単離

オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) の葉部 (3.0 kg) を MeOH で熱時抽出した。抽出液を濾過し、得られた抽出液を減圧下溶媒留去し、MeOH 抽出エキスを (290.6 g, 収率 9.7%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスのうち 269.3 g を AcOEt と H₂O で分配抽出後、得られた H₂O 移行部を *n*-BuOH でさらに分配抽出し、各移行部を減圧下溶媒留去して、EtOAc 移行部 (174.0 g, 6.3%), *n*-BuOH 移行部 (20.1 g, 0.7%), H₂O 移行部 (79.6 g, 2.9%) を得た。そのうち、EtOAc 移行部について含有成分の探索を行った。

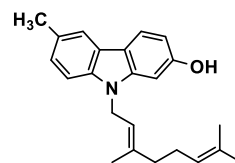
得られた EtOAc 移行部 (153.6 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [3.5 kg, Hex → Hex-EtOAc (50:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1 → 1:2, v/v) → EtOAc → MeOH] で分離精製することにより、Fr. 1 (5.67 g), Fr. 2 (11.25 g), Fr. 3 (11.00 g), Fr. 4 (4.67 g), Fr. 5 (16.14 g), Fr. 6 (9.08 g), Fr. 7 (82.61 g) を得た。Fr. 2 (11.25 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [337 g, MeOH-H₂O (70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → EtOAc] にて分画し、Fr. 2-1 (35.7 mg), Fr. 2-2 (27.4 mg), Fr. 2-3 (80.9 mg), Fr. 2-4 (29.9 mg), Fr. 2-5 (47.4 mg), Fr. 2-6 (70.5 mg), Fr. 2-7 (192.9 mg), Fr. 2-8 (180.7 mg), Fr. 2-9 (612.8 mg), Fr. 2-10 (293.6 mg), Fr. 2-11 (85.0 mg), Fr. 2-12 (323.6 mg), Fr. 2-13 (144.6 mg), Fr. 2-14 (2855.7 mg) を得た。得られた Fr. 2-3,4 (110.8 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH-H₂O (90:10, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**22** (7.2 mg), **23** (15.2 mg), **24** (37.5 mg) を単離した。Fr. 3 (11.00 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [330 g, MeOH-H₂O (70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → EtOAc] にて分画し、Fr. 3-1 (17.9 mg), Fr. 3-2 (13.8 mg), Fr. 3-3 (183.6 mg), Fr. 3-4 (54.0 mg), Fr. 3-5 (2519.3 mg), Fr. 3-6 (444.1 mg), Fr. 3-7 (62.2 mg), Fr. 3-8 (364.5 mg), Fr. 3-9 (4443.7 mg) を得た。得られた Fr. 3-3 (183.6 mg) を HPLC [MeOH-H₂O = (80:20)] を用いて分離精製し、**33** (2.0 mg) を単離した。Fr. 3-5 (317.7 mg) を HPLC [MeOH-H₂O = (90:10)] を用いて分離精製し、**24**, (37.4 mg), **25** (184.4 mg) を単離した。Fr. 3-8 (163.7 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH-H₂O (98:2, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**28** (13.0 mg) を単離した。Fr. 4 (4.67 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [140 g, MeOH-H₂O (90:10 → 95:5, v/v) → MeOH → EtOAc] にて分画し、Fr. 4-1 (61.7 mg), Fr. 4-2 (1224.8 mg), Fr. 4-3 (92.7 mg), Fr. 4-4 (13.4 mg), Fr. 4-5 (3.7 mg), Fr. 4-6 (83.0 mg), Fr. 4-7 (33.7 mg), Fr. 4-8 (51.0 mg), Fr. 4-9 (18.2 mg), Fr. 4-10 (23.4 mg), Fr. 4-11 (569.9 mg), Fr. 4-12 (2362.1 mg) を得た。得られた Fr. 4-2 (612.4 mg) を HPLC [MeOH-H₂O (90:10, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**24** (173.9 mg), **25** (246.2 mg), **26** (39.5 mg) を単離した。Fr. 5 (16.14 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [484 g, MeOH-H₂O (80:20 → 85:15 → 90:10 → 95:5, v/v) → MeOH → EtOAc] にて分画し、Fr. 5-1 (77.2 mg), Fr. 5-2 (1222.6 mg), Fr. 5-3 (816.3 mg), Fr. 5-4 (1288.6 mg), Fr. 5-5 (707.3 mg), Fr. 5-6 (1064.0 mg), Fr. 5-7 (1002.7 mg), Fr. 5-8 (239.9 mg), Fr. 5-9 (2489.4 mg), Fr. 5-10 (550.3 mg), Fr. 5-11 (355.4 mg), Fr. 5-12 (416.0 mg), Fr. 5-13 (1033.0 mg) を得た。得

られた Fr. 5-2 (250.0 mg) を HPLC [MeOH–H₂O (80:20, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **32** (6.3 mg) を単離した. Fr. 4-3 (322.0 mg) を HPLC [MeOH–H₂O (90 : 10, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **20** (6.2 mg), **27** (11.2 mg) を単離した. Fr. 4-4 (500.0 mg) を HPLC [MeOH–H₂O = (90:10, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **27** (9.1 mg) を単離した. Fr. 6 (9.08 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [272 g, MeOH–H₂O (80:20 → 90:10, v/v)→MeOH → EtOAc] にて分画し, Fr. 6-1 (53.3 mg), Fr. 6-2 (33.9 mg), Fr. 6-3 (35.8 mg), Fr. 6-4 (58.3 mg), Fr. 6-5 (1156.5 mg), Fr. 6-6 (239.0 mg), Fr. 6-7 (100.0 mg), Fr. 6-8 (61.8 mg), Fr. 6-9 (591.8 mg), Fr. 6-10 (468.6 mg), Fr. 6-11 (206.2 mg), Fr. 6-12 (4483.3 mg) を得た. 得られた Fr. 6-5 (350.0 mg) を HPLC [MeOH–H₂O = (90:10, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **21** (14.9 mg), **29** (11.8 mg), **31** (11.6 mg) および **26** (177.1 mg) を単離した.

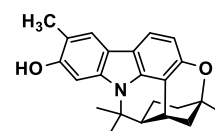
第三項の実験

新規化合物の構造解析

Karapinchamine A (**20**): 黄色粉末; $[\alpha]_D^{24} + 12.4^\circ$ ($c = 0.31$, MeOH); IR (film) ν_{\max} 3400, 1509 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz): δ 1.54 (3H, s, H-10'), 1.60 (3H, s, H-9'), 1.89 (3H, s, H-4'), 2.00 (2H, m, H-5'), 2.05 (2H, m, H-6'), 2.51 (3H, s, 6-CH₃), 4.79 (2H, d, $J=6.2$ Hz, H-1'), 5.00 (1H, t, $J=6.9$ Hz, H-7'), 5.23 (1H, t, $J=6.2$ Hz, H-2'), 6.69 (1H, dd, $J=2.0, 8.3$ Hz, H-3), 6.77 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-1), 7.18 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-7), 7.21 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-8), 7.77 (1H, s, H-5), 7.86 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-4); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150MHz): Table 5 に記載; EIMS: m/z 333 (M^+); HREIMS: m/z 333.2099 (Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}$ [M^+]: m/z 333.2093).



Karapinchamine B (**21**): 黄色粉末; $[\alpha]_D^{24} + 5.64^\circ$ ($c = 0.21$, MeOH); IR (film): ν_{\max} 3400, 1601, 1507 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600MHz): δ 1.26 (3H, s, H-9'), 1.43 (3H, s, 3'-CH₃), 1.45 (1H, m, H-4'), 1.70 (1H, m, H-4'), 1.85 (3H, s, H-8'), 1.90 (1H, m, H-2'), 1.94 (1H, m, H-6'), 2.37 (3H, s, 6-CH₃), 2.39 (1H, m, H-2'), 2.51 (1H, m, H-5'), 3.26 (1H, m, H-1'), 6.61 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-3), 6.95 (1H, s, H-8), 7.48 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.62 (1H, s, H-5); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150MHz): Table 5 に記載; EIMS: m/z 347 (M^+); HREIMS: m/z 347.1878 (Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_2$ [M^+]: m/z 347.1885).



第三節の実験

第二項の実験

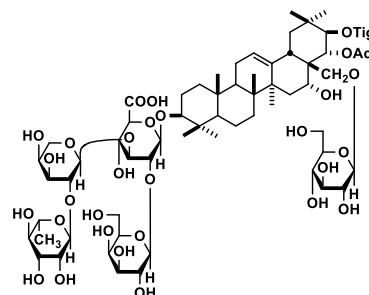
インド産アッサム種チャ花部から含有成分の抽出・単離

インド産アッサム種茶花 (*Camellia sinensis* var. *assamica*, 花蕾部, 687.4 g) を MeOH で熱時抽出 (3 h) 後, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を計 3 回行った. MeOH 抽出液を合わせ, 減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキスを (280.4 g, 植物から収率 40.8 %) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H₂O で分配抽出し, さらに *n*-BuOH と H₂O で分配抽出し, EtOAc 移行部 (17.3 g, 2.6 %), H₂O 移行部 (144.8 g, 21.9 %) および *n*-BuOH 移行部 (92.1 g, 13.9 %) を得た. 得られた *n*-BuOH 移行部を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [2.4 kg, CHCl₃→CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1 → 65:35:10) → MeOH] にて分画し, Fr. 1 (10.3 g), Fr. 2 (2.9 g), Fr. 3 (31.6 g), Fr. 4 (22.9 g), Fr. 5 (5.1 g) を得た. Fraction 3 (30.3 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [600 g, MeOH-H₂O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH] を用いて分画し, Fr. 3-1 (20.7 mg), Fr. 3-2 (18.6 g), Fr. 3-3 (1.3 g), Fr. 3-4 (419.7 mg), Fr. 3-5 (1.3 g), Fr. 3-6 (238.2 mg), Fr. 3-7 (568.2 g), Fr. 3-8 (1.0 g), Fr. 3-9 (5.7 g), Fr. 3-10 (282.9 mg), Fr. 3-11 (172.3 mg), Fr. 3-12 (392.2 mg), Fr. 3-13 (899.4 mg), Fr. 3-14 (471.2 mg), Fr. 3-15 (148.3 mg), Fr. 3-16 (80.5 mg), Fr. 3-17 (30.7 mg) を得た. Fraction 3-8 (1.0 g) はさらに HPLC [mobile phase: MeOH-H₂O in 1% AcOH (70:30, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, **34** (35.4 mg), **35** (77.8 mg), **36** (18.0 mg), **37** (29.6 mg), **38** (19.9 mg), **39** (23.2 mg), **42** (58.6 mg) および **43** (62.5 mg) を得た. Fraction 3-9 (1.0 g) はさらに HPLC [mobile phase: MeOH-H₂O in 1% AcOH (70:30, v/v), COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, **39** (17.1 mg), **40** (18.1 mg), **41** (34.7 mg), **42** (49.3 mg), **43** (17.1 mg) および **44** (41.7 mg) を得た.

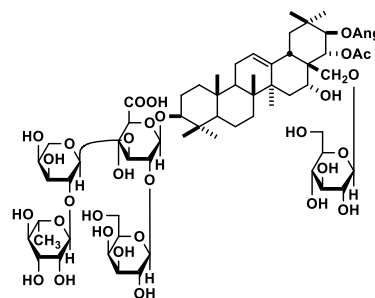
第三項の実験

新規化合物の構造解析

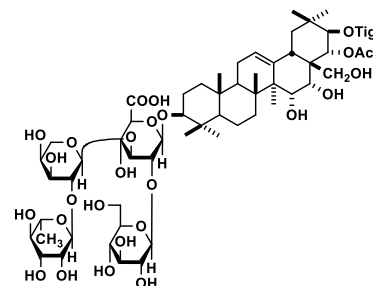
Floraassamsaponin I (**34**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{21} -18.3^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1717, 1698, 1078 cm⁻¹; ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz): Table 6 に記載; ¹³C NMR (pyridine-*d*₅, 150 MHz): Table 7 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1415 [M + Na]⁺; HRFABMS: m/z 1415.6458 (Calcd for C₆₆H₁₀₄O₃₁Na [M + Na]⁺: 1415.6459).



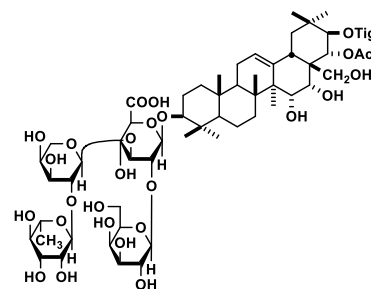
Floraassamsaponin II (**35**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{21} -12.2^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1716, 1697, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 6 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 7 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1415 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1415.6462 (Calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{104}\text{O}_{31}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1415.6459).



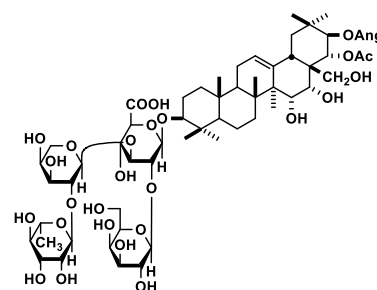
Floraassamsaponin III (**36**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{21} -11.6^\circ$ ($c = 0.5$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1718, 1700, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 6 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 7 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1269 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1269.5885 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{27}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1269.5880).



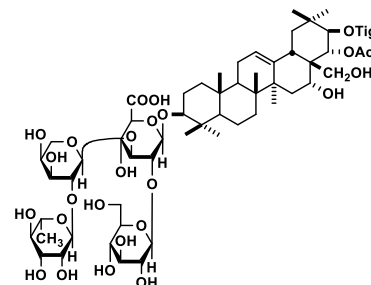
Floraassamsaponin IV (**37**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{21} -21.3^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1716, 1698, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 6 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 7 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1269 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1269.5876 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{27}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1269.5880).



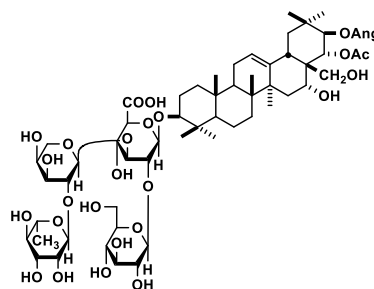
Floraassamsaponin V (**38**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{22} -15.8^\circ$ ($c = 1.1$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1717, 1700, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 8 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 9 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1269 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1269.5890 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{27}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1269.5880).



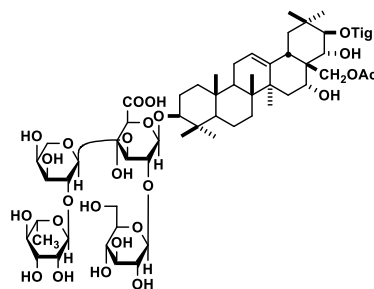
Floraassamsaponin VI (**39**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{22} -13.2^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1719, 1700, 1076 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 8 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 9 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1253 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1253.5941 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{26}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1253.5931).



Floraassamsaponin VII (**40**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{22} -22.7^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1732, 1717, 1700, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 8 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 9 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1253 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1253.5917 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{26}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1253.5931).



Floraassamsaponin VIII (**41**). 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{22} -35.9^\circ$ ($c = 0.2$, MeOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1734, 1716, 1698, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz): Table 8 に記載; ^{13}C NMR (pyridine- d_5 , 150 MHz): Table 9 に記載; positive-ion FABMS: m/z 1253 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; HRFABMS: m/z 1253.5935 (Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{O}_{26}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 1253.5931).



Floraassamsaponin I–VIII (**34–41**) の酸加水分解および構成糖の同定

化合物 **34–41** それぞれ 1.0 mg を 5% aqueous H_2SO_4 –1,4-dioxane (1:1, v/v, 2.0 mL) に溶解し, 90°C で 3 時間撹拌した. 反応液に EtOAc を加えて 3 回分液を行った. 水相をとり, 陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 (OH^- form) で中和し, 樹脂を濾別後, 減圧下溶媒留去し, 粗生成物を得た. 粗生成物を pyridine (0.1 mL) に溶解し, L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.5 mg) を加えた後 60°C で 1 時間撹拌した. さらに, *o*-tolylisothiocyanate (0.5 mg) を pyridine (0.1 mL) に溶解させたものを加え, 60°C でさらに 1 時間撹拌した. 生成物を HPLC [column: COSMOSIL 5C18-AR-II (Nacalai Tesque), 250×4.6 mm i.d. (5 μm); mobile phase: MeCN–0.05M H_3PO_4 (18:82, v/v); detection: UV (250 nm); flow rate: 0.8 mL/min; column temperature: 35°C] にて分析し, 標品との保持時間を比較 (t_R : D-galactose; 44.1 min, L-galactose; 46.9 min, D-glucose; 51.6 min, L-glucose; 50.0 min, D-glucuronic acid; 52.7 min, L-glucuronic acid; 44.0 min, D-arabinose; 63.4 min, L-arabinose; 58.4 min, D-rhamnose; 88.4 min, L-rhamnose; 92.7 min). により **34–41** の絶対立体配置を含めた構成糖の同定を行った.

第二章の実験

第一項の実験

含有成分の胃内分泌細胞のアシル化グレリン濃度の測定

実験には胃内分泌細胞を含む初代培養胃細胞を用いて実験を行った。初代培養胃細胞は Gagnon らの方法⁴⁷⁾を一部変更して調製した。すなわち Sprague Dawley 系雄性ラット (5 週齢) をゲージで飼育し、飲水は水道水を自由摂取させた状態で約 1 週間の馴化させた。実験開始前日には、絶食を行った。ラットの胃を摘出し、胃粘膜細胞を切り取り洗浄バッファー (0.1% BSA を含むハanks緩衝液) 8 mL 中に入れ、1 時間室温でインキュベートした。洗浄バッファーに溶解した 6 mg/mL コラゲナーゼ タイプ I を 2 mL 加え、37°C 20 分間恒温槽で浸透しながらインキュベートした。さらに洗浄バッファー 10 mL を加え、10 分間室温でインキュベートした。上清のみを 200 ×g, 20°C 10 分間遠心分離した (得られた上清を i とする)。

上清を除いた沈殿物に 3 mg/mL コラゲナーゼ タイプ I を加え、37°C, 20 分間恒温槽で浸透しながらインキュベートした。PBS に溶解した 200 μM EDTA・2 ナトリウムで反応を停止させ、5 分間インキュベートした (反応液を ii とする)。

i を ii に入れ、10 mL DMEM を加え、35 μm ナイロンセルストレーナー (Corning 社) に通した。通した溶液を 200 ×g にて、10 分間遠心分離した。0.5% FBS 入りフェノールレッドフリー DMEM (4500 mg/L グルコース含有) 10 mL で沈殿物を洗い、再度 200 ×g にて、10 分間遠心分離した。沈殿物をフェノールレッドフリー DMEM (1000 mg/L グルコース, 10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 units/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシン含有) 20 mL で懸濁した。96 well マイクロプレートに 5 ×10⁴ cells/100 μL/well ずつ播種した。続けてサンプルを 100 μL/well ずつ添加した。1 時間インキュベート後、1 well ごとに 1.5 mL サンプリングチューブに移し、4°C で 5 分間、200 ×g で遠心した。上清に 0.6 units/mL アプロチニン (phoenix pharmaceuticals, INC) および EDTA・2 ナトリウム (1.83 mM) を 20 μL ずつ添加し、-80°C で保存した。活性型グレリン量は Ghrelin, Acylated, Rat EIA kit (SPB 社, A05117) を用いて測定した。

第二項の実験

マウスメラノーマ細胞におけるメラニン生成抑制の判定

理研細胞バンクより分譲されたマウスメラノーマ B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557) を 10% FBS, 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ ストリプトマイシン含有 DMEM (4500 mg/L グルコース含有) で培養 (5%CO₂, 37°C) した。

次に, 24 well マルチプレートに 2.0×10^4 cells/400 $\mu\text{L/well}$ を播種し, 24 時間前培養した後, 被験物質およびテオフィリン (終濃度 1 mM) を添加した。72 時間培養後, トリプシン溶液 (0.25% トリプシン および 0.02% EDTA・2 ナトリウム 含有 PBS) 処理により細胞を剥離, 回収後, PBS 洗浄し, 1M 水酸化ナトリウム水溶液にて溶解 (120 $\mu\text{L/well}$, 80°C, 30 分) し, 96 well マイクロプレートに細胞溶解液を分取 (100 $\mu\text{L/well}$) し, 生成したメラニンの吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000, コロナ電気) にて測定した (測定波長 : 405 nm)。なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%)。

$$\text{Inhibition (\%)} = \{ [A - B / (C/100)] / A \} \times 100$$

[A : 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験試料添加の吸光度, C : 細胞生存率 (%)]

マウスメラノーマ細胞における WST-8 アッセイ法による細胞増殖阻害・細胞毒性の判定

B16 melanoma 4A5 細胞を 10% ウシ胎児血清 (FBS), 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ ストリプトマイシン含有 DMEM (4500 mg/L glucose) 培地で培養 (5%CO₂, 37°C) した。

次に, 96 well マイクロプレートに 5.0×10^3 cells/100 $\mu\text{L/well}$ を播種し, 24 時間前培養した後, 被験物質およびテオフィリン (終濃度 1 mM) を添加した。70 時間培養後, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] (同仁化学) を 10 μL ずつ添加した。2 時間培養後, 生成した WST-8 ホルマザンの吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000, コロナ電気) にて測定した (測定波長 : 450 nm)。なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%)。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

[A : 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験試料添加の吸光度]

チロシナーゼ阻害活性試験

96 well マイクロプレートに 2.5 mM L-DOPA (Sigma-Aldrich) 含有リン酸緩衝溶液 (0.1 M, pH 6.5) 70 μ L/well を分注し, 調製した試料溶液 (DMSO 溶液) 20 μ L を添加した. 次に, 終濃度 46 units/mL チロシナーゼ (Sigma-Aldrich) リン酸緩衝溶液 120 μ L を添加し, 酵素反応 (室温, 5 分) を開始した. また, ブランクにはリン酸緩衝溶液を用いた. 生成されたメラニンの吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000, コロナ電気) にて測定した (測定波長 : 405 nm).

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B: 被験試料添加の吸光度]

第三項の実験

含有成分の腓リパーゼ阻害試験

実験で使用するトリオレイン-ホスファチジルコリン基質液は、トリオレインとホスファチジルコリン、タウロコール酸ナトリウム、0.1 M Tris-HCl NaCl 緩衝液 (pH 7.0) をホモジナイズした。酵素液は、Lipase (EC 3.1.1.3) Type II. From Porcine Pancreas (Sigma-Aldrich) 2.5 mg を 0.1 M 塩化ナトリウムを含む 10 mL の 0.1 M Tris-HCl 緩衝液に溶かした。

基質溶液 100 μ L, サンプル溶液 5 μ L, 0.1 M Tris-HCl NaCl 緩衝液 95 μ L を 1.5 mL チューブに入れて混合し、3 分間 37°C 水浴で加温し、15 秒間隔ごとに酵素溶液を 50 μ L 加えた。ただし、ブランクには 0.1 M Tris-HCl NaCl 緩衝液を加えた。これらを 30 分間 37°C 水浴で加温した。その後、2 分間沸水浴 (90 - 100°C) し、氷冷した。

次に、96 well マイクロプレートに反応液 (30 μ L/well) を分注し、NEFAC-テスト ワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて、血清中の遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度を測定した。すなわち、発色液 A (50 μ L/well) を加えて 10 分間 37°C で加温した。その後、発色液 B (100 μ L/well) を加え 10 分間 37°C で加温し、血清中の遊離脂肪酸 (NEFA) の吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000, CORONA ELECTRIC) にて測定した (測定波長: 570/655 nm)。なお、被験物質は DMSO に溶解した (終濃度 100 μ g/mL)。

第四項の実験

含有成分の A β 凝集抑制活性

被験物質の A β_{42} 凝集抑制作用の検討においては、SensoLyte Thioflavin T β -Amyloid Aggregation Kit (ANA SPEC) を用い、Thioflavin T (Th-T) 法により検討を行った。2 μ L の Th-T (2 mM) を 384 穴のブラックプレートに播種し、1 μ L の被験物質および 17 μ L の A β_{42} ペプチド溶液を加えた。37°C で 30 分間インキュベートした後、蛍光強度を測定した (ex: 440 nm and em: 480 nm, FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies)。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の蛍光強度, B: 被験試料添加の蛍光強度]

参考文献

- 1) Newman D. J., Cragg G. M., *J. Nat. Prod.*, **79**, 629–661 (2016).
- 2) Patwardhan B., Warude D., Pushpangadan P., Bhatt N., *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2**, 465–473 (2005).
- 3) Russo A., Borrelli F., *Phytomedicine*, **12**, 305–317 (2005).
- 4) Roodenrys S., Booth D., Bulzomi S., Phipps A., Micaller C., Smoker J., *Neuropsychopharmacology*, **27**, 279–281 (2002).
- 5) Matsuda H., Nakamura S., Morikawa T., Muraoka O., Yoshikawa M., *J. Nat. Med.* **70**, 689–701 (2016).
- 6) Calabrese C., Gregory W. L., Leo M., Kraemer D., Bone K., Oken B., *J Altern Complement Med.*, 707–713 (2008).
- 7) Rastogi S., Pal R., Kulshreshtha D. K., *Phytochemistry*, **36**, 133–137 (1994).
- 8) Zhou Y., Shen Y. H., Zhang C., Su J., Liu R. H., Zhang W.D., *J. Nat. Prod.*, **70**, 652–655 (2007).
- 9) Chakravarty A. K., Sarkar T., Masuda K., Shiojima K., Nakane T., Kawahara N., *Phytochemistry*, **58**, 553–556 (2001).
- 10) Garai S., Mahato S.B., Ohtani K., Yamasaki K., *Phytochemistry*, **42**, 815–820 (1996).
- 11) Chakaravarty A. K., Sarkar T., Takahisa N., Kawahara N., Masuda K., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1616–1618 (2002).
- 12) Schlauer J., Budzianowski J., Kukulczanka K., Ratajczak L., *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **73**, 9–15 (2004).
- 13) Mohan R., Birari R., Karmasr A., Jagtap S., Bhutani K. K., *Food Chemistry*, **132**, 244–251 (2012).
- 14) Yoshikawa M., Morikawa T., Kobayashi H., Nakamura A., Matsuhira K., Nakamura S., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 428–434 (2007).
- 15) Vande V. V., Lavie D., *Tetrahedron*, **39**, 317–321 (1983).
- 16) Hatam N. A. R., Whiting D. A., Yousif N. J., *Phytochemistry*, **28**, 1268–1271 (1989).
- 17) Yoshikawa M., Murakami T., Ikebata A., Wakao S., Murakami N., Matsuda H., Yamahara J., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1186–1192 (1997).
- 18) Inoue O., Takeda T., Ogihara Y., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1289–1293 (1978).
- 19) Kawai K., Shibata S., *Phytochemistry*, **17**, 287 (1978).
- 20) Kawai K., Ogiwara Y., Akiyama T., Iitaka Y., Shibata S., Symposium on the chemistry of natural products, 101 (1974).
- 21) Mahato S. B., Garai S., Chakravarty A. K., *Phytochemistry*, **53**, 711–714 (2000).
- 22) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899–901 (2007).

- 23) Handral H. K., Pandith A., SD S., *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **5**, 5–14 (2002).
- 24) The plane structures of bicyclomahanimbicine (**22**)²⁵ and bicyclomahanimbine (**23**)²⁶ were speculated by the chemical evidence on related compounds.^{25,27} In this paper, **22** and **23** were identified by the analysis of their spectral data {[α]_D, UV, MS, NMR [¹H, ¹³C, difference NOESY, distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), DQF COSY, heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy (HMQC), HMBC]}.
- 25) Kureel, S. P.; Kapil, R. S.; Popli, S. P., *Chem. Ind.*, 958 (1970).
- 26) Bandaranayake, W. M.; Begley, M. J.; Brown, B. O.; Clarke, D. G.; Crombies, L.; Whiting, D. A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 998–1007 (1974).
- 27) Kureel, S. P.; Kapil, R. S.; Popli, S. P., *Tetrahedron Lett.*, **10**, 3857–3862 (1969).
- 28) Begley, M. J.; Clarke, D. G.; Crombie, L.; Whiting, D. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1547–1548 (1970).
- 29) Yukari T., Hiroe K., Nordin H. L., Nobiji N., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5589–5594 (2001).
- 30) Tian-Shung W., *Phytochemistry*, **30**, 1048–1051 (1991).
- 31) Yukari T., Hiroe K., Nordin H. L., Nobiji N., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6461–6467 (2003).
- 32) Chihiro I., Mayumi N., Tian-Shung W., Hiroshi F., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1668–1671 (1991)
- 33) Terry P. L., Michael A. K., *Org. Lett.*, **9**, 1883–1886 (2007).
- 34) Tian-Shung W., Meei-Ling W., Pei-Lin W., Ting-Ting J., *Phytochemistry*, **40**, 1817–1819 (1995).
- 35) Narasimhan N. S., Paradkar M. V., Chitguppi V. P., *Tetrahedron Lett.*, **53**, 5501–5504 (1968).
- 36) Hiroshi F., Tian-Shung W., Tomoko O., Chang-Sheng K., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4132–4138 (1985).
- 37) Konstanze K. G., Hans-Joachim K., *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 3902–3904 (2008).
- 38) Yoshikawa M., Nakamura S., Kato Y., Matsuhira K., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 598–605 (2007).
- 39) Shen Y., Weng Z., Zhao Q., Zeng Y., Rios J., Xiao W., Xu G., Sun H., *Planta Med.*, **71**, 770–775 (2005).
- 40) Yoshioka I., Nishimura T., Matsuda A., Kitagawa I., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1610–1620 (1970).
- 41) Nakamura S., Moriura T., Park S., Fujimoto K., Matsumoto T., Ohta T., Matsuda H., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **75**, 1425–1430 (2012).
- 42) Sugimoto S., Chi G., Kato Y., Nakamura S., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 269–275 (2009).
- 43) Yoshioka I., Hino K., Matsuda A., Kitagawa I., *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1499–1506 (1972).
- 44) Yoshioka I., Nishimura T., Matsuda A., Kitagawa I., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1610–1620 (1970).
- 45) Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., *Nature*, **402**, 656–660 (1999).
- 46) Matsumura T., Arai M., Yonemitsu Y., Maruoka D., Tanaka T., Suzuki T., Yoshikawa M.,

- Imazeki F., Yokosuka O., *J. Gastroenterol.*, **45**, 300–307 (2010).
- 47) Gagnon J., Anini Y., *Endocrinology.*, **153**, 3646–3656 (2012).
- 48) Gagnon J., Sheppard E., Anini Y., *Obesity and Metabolism.*, **15**, 276–279 (2013).
- 49) Tukamoto T., Taniguchi T., *Yakugakuzasshi*, **77**, 462–466 (1957).
- 50) Shi Y, Burn P., *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 695–710 (2004).