

2015 年度 課程博士学位論文

メディシナルフラワーを素材として用いた  
新規生体機能性成分の探索研究

松本 崇宏

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Takahiro Matsumoto, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Tomoe Ohta, Mamiko Yano, Junichiro Tsujihata, Junko Tsukioka, Keiko Ogawa, Masashi Fukaya, Masayuki Yoshikawa, and Hisashi Matsuda:  $\gamma$ -Lactam alkaloids from the flower buds of daylily. *J. Nat. Med.*, in press (2016). [第三章]
- 2) Takahiro Matsumoto, Seikou Nakamura, Tomoe Ohta, Katsuyoshi Fujimoto, Masayuki Yoshikawa, Keiko Ogawa, and Hisashi Matsuda: A rare glutamine derivative from the flower buds of daylily. *Org. Lett.*, **16**, 3076–3078 (2014). [第三章]
- 3) Takahiro Matsumoto, Seikou Nakamura, Katsuyoshi Fujimoto, Tomoe Ohta, Keiko Ogawa, Masayuki Yoshikawa, and Hisashi Matsuda: Structure of constituents isolated from the flower buds of *Cananga odorata* and their inhibitory effects on aldose reductase. *J. Nat. Med.*, **68**, 709–716 (2014). [第一章]
- 4) Takahiro Matsumoto, Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Katsuyoshi Fujimoto, Masayuki Yoshikawa, Tomoe Ohta, Keiko Ogawa, and Hisashi Matsuda: Lignan dicarboxylates and terpenoids from the flower buds of *Cananga odorata* and their inhibitory effects on melanogenesis. *J. Nat. Prod.*, **77**, 990–999 (2014). [第一章]
- 5) Seikou Nakamura, Souichi Nakashima, Genzo Tanabe, Yoshimi Oda, Nami Yokota, Katsuyoshi Fujimoto, Takahiro Matsumoto, Rika Sakuma, Tomoe Ohta, Keiko Ogawa, Shino Nishida, Hisako Miki, Hisashi Matsuda, Osamu Muraoka, and Masayuki Yoshikawa: Alkaloid constituents from flower buds and leaves of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*, *Nymphaeaceae*) with melanogenesis inhibitory activity in B16 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 779–787 (2013). [第二章]

## 目次

緒 論.....	1
本 論.....	6
第一章 タイ産イランイランノキ ( <i>Cananga odorata</i> ) 花部の生体機能成分 .....	6
第一節 含有成分の抽出・単離 .....	6
第二節 新規成分の化学構造 .....	8
第三節 抽出エキス, 含有成分, および誘導体のメラニン生成抑制作用 .....	16
第四節 抽出エキスおよび含有成分のアルドース還元酵素阻害作用 .....	20
第二章 タイ産蓮花および蓮葉 ( <i>Nelumbo nucifera</i> , 花部および葉部) の生体機能性成分 ..	22
第一節 含有成分の抽出・単離 .....	22
第二節 新規成分の化学構造とイソキノリン型アルカロイドの合成 .....	24
第三節 含有成分および合成アルカロイドのメラニン生成抑制作用 .....	27
第三章 中国産金針花の生体機能性成分 .....	30
第一節 含有成分の抽出・単離 .....	30
第二節 新規成分の化学構造 .....	31
第三節 含有成分の PC12 細胞突起伸長促進作用および A $\beta$ 凝集抑制作用.....	38
結 論.....	40
謝 辞.....	41
実験の部.....	42
第一章の実験.....	43
第一節の実験.....	43
第二節の実験.....	44
第三節の実験.....	51
第四節の実験.....	52
第二章の実験.....	52
第一節の実験.....	52
第二節の実験.....	55
第三節の実験.....	59
第三章の実験.....	60
第一節の実験.....	60
第二節の実験.....	61
第三節の実験.....	64
引用文献.....	65

## 緒論

天然物からの生体機能性成分の探索研究は世界各国で盛んに行われており、医薬品リード化合物の発見など、人類の医薬品開発に大きく貢献している。医薬品として用いられている化合物の多くが天然物由来であることに加え、過去 30 年間に世界で新規医薬品となった化合物においても、その約 40% が天然物そのもの、もしくは天然物をリード化合物として設計されたものである。<sup>1)</sup> 加えて、クロマトグラフィーを用いた単離手法は長年の試行錯誤の末に効率化されている上、中でも HPLC を用いた分析、分離技術は近年大幅に進歩がみられ、これまでに分離に膨大な時間を費やす必要のあった成分についても、迅速に精製することができる。よって、最新の技術および蓄積された手法を応用し、天然物から医薬品リード化合物の探索を行うことは医薬品リード、リード化合物の探索において非常に有意義であると考えられる。また、世界で最も高齢化の進んでいる日本において、予防医学領域における最終的な目標である抗老化作用を示す機能性素材の開発は社会的意義が大きく、また抗酸化作用や美白作用を有するスキンケア剤の開発はニーズが高い。

薬用植物の根や葉については古くから盛んに研究が行われている一方、花部は限られた季節にしか入手できない事や、量の確保が困難であるといった理由から、研究例は多くなかった。しかしながら、植物にとっては非常に重要な器官であることから、興味深い生体機能性を有する化合物を含有している可能性は高い。そして、花部そのものを医薬品として利用することを前提とした研究とは異なり、医薬品リード化合物探索研究という観点においては、量的確保が困難であることは問題とはならない。そこで、我々の研究室ではこれまでにメディシナルフラワー研究と題し、薬用植物の中でも特に花部に着目し、含有成分の探索研究を行ってきた。それらの結果から、花部は根や葉とは異なった化学構造や生体機能性を有する化合物を含有しており、新規生体機能性素材の探索原料として有用であることが明らかとなってきた。<sup>2-5)</sup>

そこで著者はメディシナルフラワーの中でも、葉部からその植物特有の化学構造を有する化合物が報告されている一方で、花においては研究が行われていない薬用植物を選択し、含有成分の探索を行った。また、研究を行うに当たっては、これまでは報告されていないものの、過去の報告から見て植物が生合成可能と考えられる成分の化学構造を推察することで、より新規性の高い化合物の探索を試みた。そして、それらを単離および構造解析し、メラニン生成抑制活性を始めとした生体機能性評価を行うことで、新規医薬品リード化合物の探索を行った。

**1) タイ産イランイランノキ (*Cananga odorata*) 花部**：バンレイシ科植物イランイランノキ (*Cananga odorata*) 花部はタイ伝承薬の 1 つであり、降圧、鎮静薬等として用いられてきた。また、花から得られる精油はアロマオイルとして使用されている。葉部の含有成分としては、フェニルプロパノイド、およびセスキテルペン類などが<sup>6)</sup> 果実からはアルカロイドなどが報告されている。<sup>7-10)</sup> しかしながら、これまでにイランイランノキ葉部や果実について数多く報告されている一方で、実際に伝承薬として用いられている花部の含有成分に

関する報告はなされておらず、生体機能性評価も行われていない。そこで、タイ伝承薬研究およびメディシナルフラワー研究の一環として MeOH 抽出エキスを作成し、種々のスクリーニングを実施したところ、マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞におけるメラニン生成抑制作用およびアルドース還元酵素阻害作用が見られた。そのことから、生体機能性を有する花部に特有の中～高極性リグナン、セスキテルペン、およびモノテルペンの発見が可能と考え、含有成分の探索を行った。その結果、17 種の既知化合物とともに 2 種の新規リグナンおよび 6 種の新規テルペノイドを単離した。新規成分はイランイランノキの学名にちなんで、リグナンを **canangalignan I** および **II (1 および 2)**、そしてテルペノイドを **canangaterpene I–VI (3–8)** と命名し、その化学構造を決定した (Figure 1)。次に、得られた化合物について、メラニン生成抑制作用およびアルドース還元酵素阻害作用の検討を行った。その結果、セスキテルペン類が低濃度で有意なメラニン生成抑制作用を示す事が明らかとなった。それらのセスキテルペン類は、メラニン生成抑制作用成分として用いられているアルブチンと比べ、低濃度で活性を示すとともに、高濃度においてもほとんど細胞毒性を示さなかった。また、含有成分に加え **canangalignan I (1)** からの誘導化により得られた化合物においても活性の測定を行うことで、種々の構造活性相関を明らかとした。加えて、モノテルペン誘導体 **3–5, 10**、および **11** やフラボノイド類 **28–25** は有意なアルドース還元酵素阻害作用を示した。中でも、カフェオイル基を有する化合物 **3, 10**、および **11** はクマロイル基を有する **4** やフェルロイル基を有する **5** と比べ、より低濃度で有意な阻害活性を示し、比較対照薬として用いたクロロゲン酸と同程度の IC<sub>50</sub> 値を示した。フラボノイド類においては、構造中に 1 つのアシル基を有するフラボノイド配糖体 **22** が最も低濃度で阻害活性を示した一方で、アシル基を有さない化合物 **18** には活性の減弱が見られ、アシル基を 2 つ有する化合物 **23** には活性が見られないなど、興味深い構造活性相関を明らかとした。

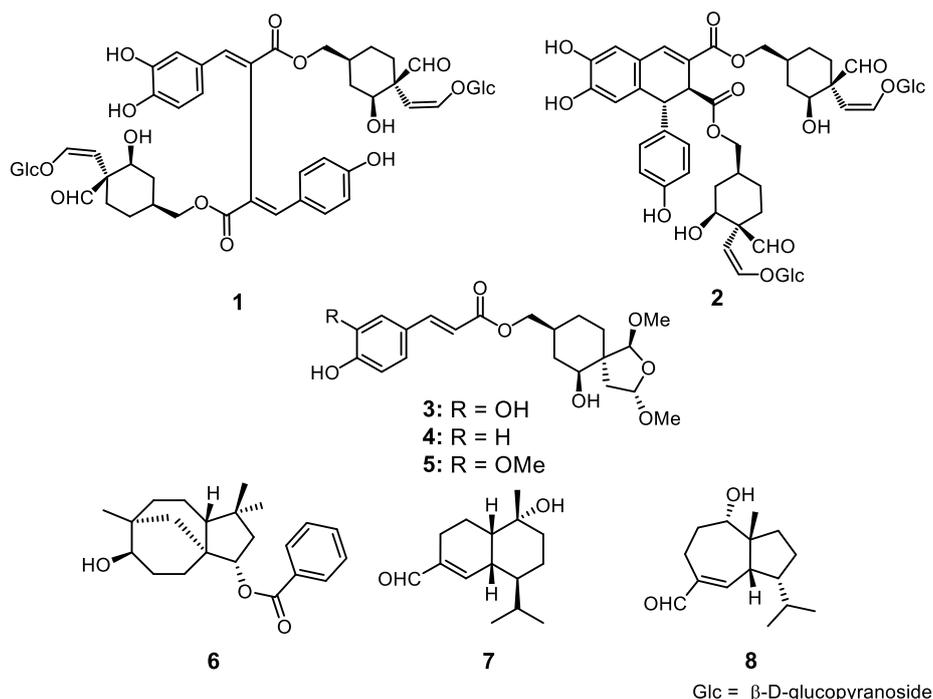


Figure 1. New constituents (1–8) from the flower buds of *C. odorata*.

2) タイ産蓮花および蓮葉 (*Nelumbo nucifera*, 花部および葉部) : ハス (*N. nucifera*) はハス科に分類されるインド, 中国原産の大型多年生水生草本である. 根茎はレンコンとして食用にされる他, その節部は止血薬として用いられる. その花部はベトナムなど東南アジア地域で健康茶などの飲料素材として広く利用されている. また, 葉部の含有成分としては, フラボノイド, アポルフィン型アルカロイド, およびベンジルイソキノリンアルカロイドが報告されている.<sup>11-13)</sup> タイ産蓮葉部, 花部, おしべ, 種子, そして根の MeOH 抽出エキスにおいて, イランイランノキ花部と同様に種々のスクリーニングを実施したところ, 花部および葉部 MeOH 抽出エキスに有意なメラニン生成抑制作用がみられた. 興味深いことに, 花部抽出エキスは葉部抽出に比べ, 強いメラニン生成抑制作用がみられた. そこで, 蓮含有アルカロイド成分がメラニン生成抑制作用を有すると考え, 花部および葉部からの含有成分の探索を行った. その結果, 蓮花より 6 種のアルカロイド **27**, **29**, **30**, **32**, **35**, および **37** を単離した. また, 蓮花の成分探索と同様の方法を用い, 蓮葉の成分探索を行った. その結果, 蓮花から得られた 6 種のアルカロイド成分に加え, 1 種の新規アルカロイド **26** および 5 種の既知アルカロイド **28**, **31**, **33**, **34**, および **36** を単離した. 得られた成分のメラニン生成抑制作用の検討を行ったところ, *N* 位にメチル基を有するアポルフィン型アルカロイドが有意な抑制作用を示すことが明らかとなった. 次に, 構造活性相関研究を目的とし, イソキノリン型アルカロイドの合成を簡便な方法を用いて行い, それらのメラニン生成抑制作用の検討を行った.

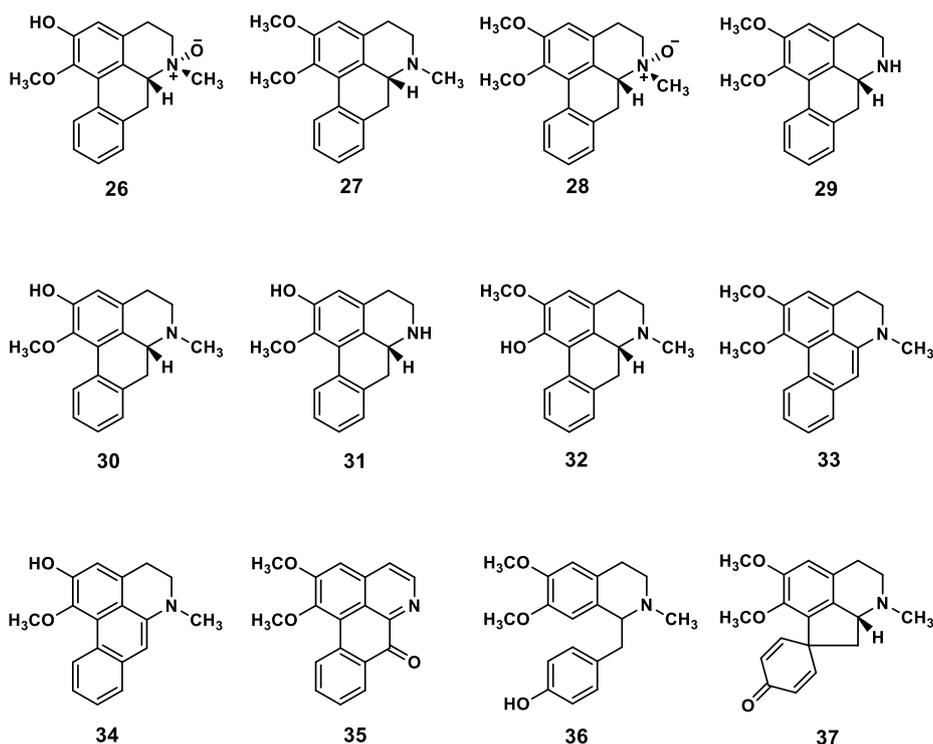
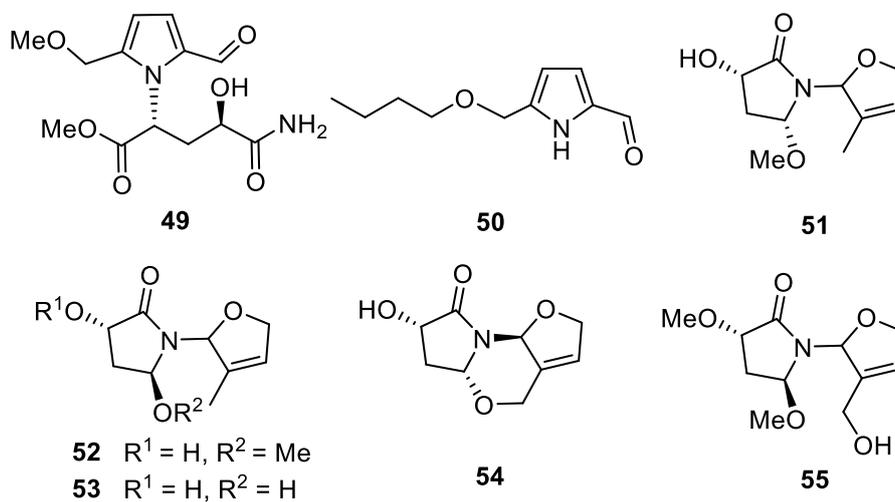


Figure 2. Isolated constituents (26–37) from *N. nucifera*.

3) 中国産金針花 (*Hemerocallis fulva* var. *kwanso*, *H. flava*, *H. minor*): ススキノキ科植物ワスレグサ花部は金針花と呼ばれ、沖縄、台湾、および中国などではその蕾をスープや炒め物に利用するなど、食用に用いられている。また、沖縄では睡眠を改善する作用がある食品として伝承されている。<sup>14-16)</sup> これまでにワスレグサ (*Hemerocallis fulva* var. *kwanso*) 葉部より、種々のフラボノイド、トリテルペン、ステロイドサポニン、および  $\gamma$ -ラクタム環を構造中に有する興味深い化合物などが単離、報告されている。<sup>17-20)</sup> しかしながら、葉部に関して報告がなされている一方で、伝承的に食品として扱われている花部含有成分に関する報告はなく、また薬理活性についても検討されていない。加えて、高極性アルカロイド類はこれまで盛んに用いられてきた順相カラムクロマトグラフィーでの分離は不可能であり、逆相カラムクロマトグラフィーにおいても保持の小ささから、分離は困難であった。そこで、分子排除型クロマトグラフィー、HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) カラムを用いた HPLC、そしてイオンペア試薬を応用した水 100% 系での逆相カラムクロマトグラフィーを活用し、花部から高極性アルカロイド類を重点的に単離することで、より新規性の高い化合物を得ることができるのではないかと考え、中国産金針花 (*Hemerocallis fulva* var. *kwanso*, *H. flava*, *H. minor*) を素材として用い、単離を行った。その結果、ヌクレオシド類などを含む 7 種の既知化合物とともに 7 種の新規アルカロイド **21**–**27** を単離、構造決定することができた。新規化合物はワスレグサの学名にちなみ、*hemerocallisamine* I–VII (**21**–**27**) と命名した。得られた成分中において、*hemerocallisamine* I (**21**) は構造中にピロール環を有するグルタミン酸誘導体であり、類似化合物が報告されていない珍しい化

化合物であった。得られた成分について、PC12細胞における神経分化促進様作用の検討を行ったところ、ヌクレオシド類に有意な活性がみられた。また、得られたアルカロイド類の一部は有意な  $A\beta$  凝集抑制作用を有することを明らかとした。



**Figure 3.** New constituents (49–55) from the flower buds of daylily.

# 本論

## 第一章 タイ産イランイランノキ (*Cananga odorata*) 花部の生体機能成分

### 第一節 含有成分の抽出・単離

タイ産イランイランノキの花蕾乾燥品 (4.0 kg) を MeOH (10 L) で 3 回熱時抽出し、MeOH 抽出エキス (1575.0 g, 39.4%) を得た. この MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O (1:1) で分配し、EtOAc 移行部 (52.0 g, 9.8%) と H<sub>2</sub>O 移行部を得た. さらに H<sub>2</sub>O 移行部を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O (1:1) で分配し、*n*-BuOH 移行部 (100.0 g, 18.8%) と H<sub>2</sub>O 移行部 (58.0 g, 10.9%) を得た. EtOAc および *n*-BuOH 移行部を順相、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより、2 種の新規リグナン canangalignan I (**1**, 0.052 %) および II (**2**, 0.0015 %), 5 種の新規テルペノイド誘導体 canangaterpene I (**3**, 0.0012%), II (**6**, 0.00087 %), III (**7**, 0.00061 %), IV (**4**, 0.0014 %), V (**5**, 0.0008%), VI (**8**, 0.0027%), を単離、構造決定するとともに、1 種の既知リグナン (1*R*,2*S*)-1,2-dihydro-5,6-dihydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2,3-naphthalenedicarboxylic acid 2,3-bis(10-canangafruiticoside A) ester (**9**, 0.0038 %) <sup>6)</sup>, 8 種の既知テルペノイド (*E*)-[(1*R*,3*R*,5*S*,6*S*,8*S*)-6-hydroxy-1,3-dimethoxy-2-oxaspiro[4.5]decan-8-yl]methyl] caffeate (**10**, 0.0015 %), <sup>6)</sup> canangafruiticoside E (**11**, 0.0039 %), <sup>6)</sup> 15-oxo- $\alpha$ -cadinol (**12**, 0.0029 %), <sup>21)</sup> 10 $\beta$ -hydroxyisodauc-6-en-14-al (**13**, 0.0028 %), <sup>22)</sup> (3*R*,3*aR*,8*aS*)-3-isopropyl-8*a*-methyl-8-oxo-1,2,3,3*a*,6,7,8,8*a*-octahydroazulene-5-carbaldehyde (**14**, 0.0042 %), <sup>23)</sup> aphanamol II (**15**, 0.0017 %), <sup>24)</sup> voleneol (**16**, 0.0019 %), <sup>25)</sup> (1*R*,5*E*,7*S*)-4,10-bis(methylene)-7-(1-methylethyl)-5-cyclodecen-1-ol (**17**, 0.0055 %), <sup>26)</sup> および 8 種の既知フラボノイド kaempferol 3- $\beta$ -robinobioside (**18**, 0.0016%), <sup>27)</sup> quercetin 3- $\beta$ -robinobioside (**19**, 0.00029%), <sup>28)</sup> kaempferol 3- $\beta$ -rutinoside (**20**, 0.011%), <sup>29)</sup> isorhamnetin 3-*O*-rutinoside (**21**, 0.00061%), <sup>30)</sup> isorhamnetin 3-*O*-(6"-*p*-coumaroyl)-glucoside (**22**, 0.0011%), <sup>31)</sup> kaempferol 3-*O*-(2",3"-di-*O*-*p*-coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**23**, 0.0013%), <sup>32)</sup> kaempferol (6"-*O*-*p*-coumaroyl)-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside (**24**, 0.0014%), <sup>33)</sup> and kaempferol (6"-*O*-*cis*-*p*-coumaroyl)-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**25**, 0.0039%) <sup>34)</sup> を単離、同定した (Figure 4). 既知化合物については、MS および NMR スペクトルなどの物理化学データ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、*C. odorata* 花蕾 (乾燥品) からの単離収率である.

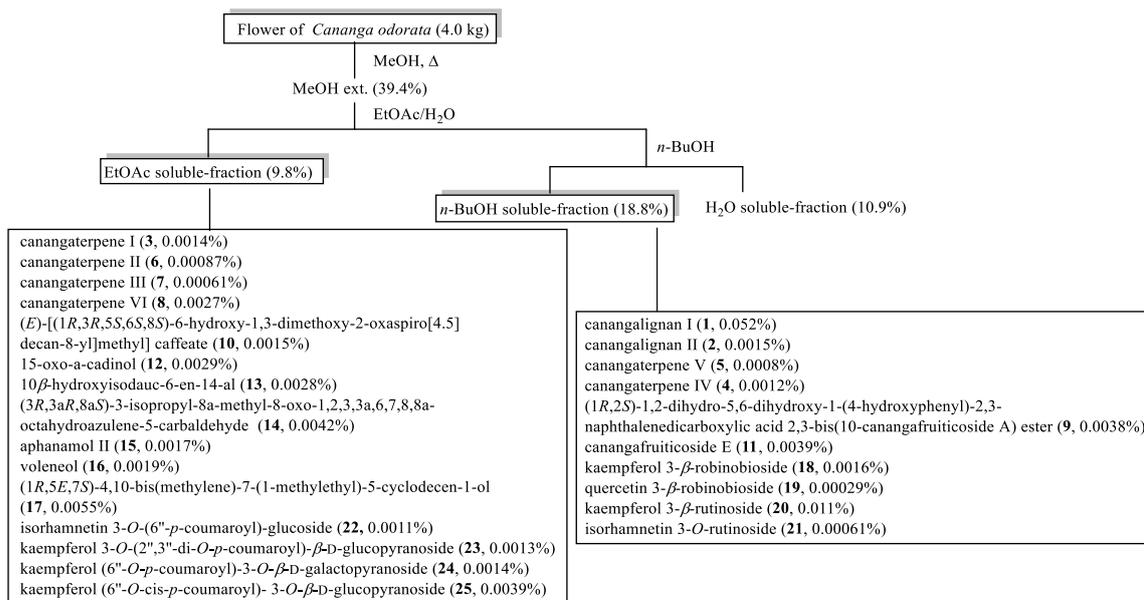


Chart 1. Isolation procedure of constituents (1–25) from the flower buds of *C. odorata*.

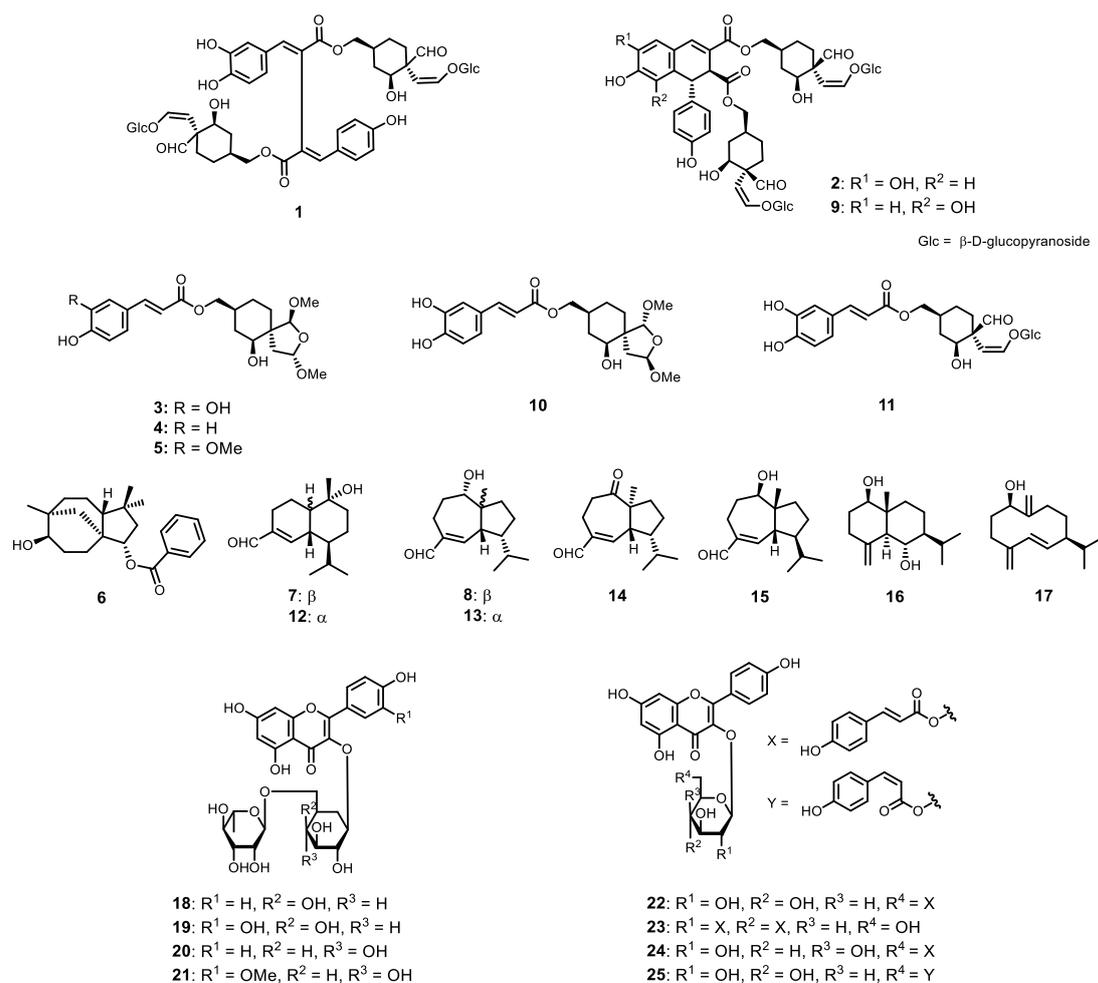
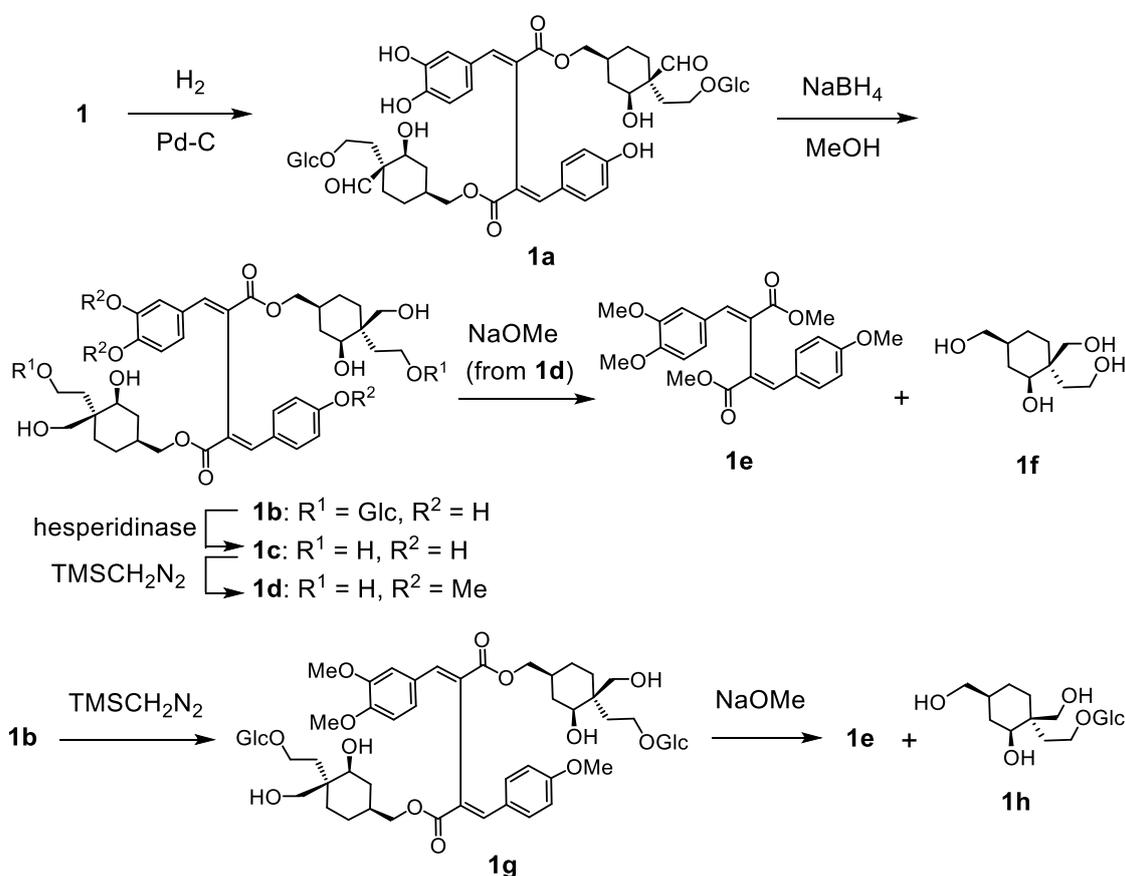


Figure 4. Structures of isolated constituents (1–25) from the flower buds of *C. odorata*.

## 第二節 新規成分の化学構造

Canangalignan I (**1**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +25$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られ、IR スペクトルからヒドロキシ基、エステル、アルデヒド、芳香環、およびエーテルに由来する吸収 (3400, 1703, 1682, 1601, 1512, and 1075  $\text{cm}^{-1}$ ) 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  $m/z$  1053 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) に観測された。また、炭素核磁気共鳴 (以下、 $^{13}\text{C}$ -NMR) スペクトルおよび高分解能 FAB-MS により分子式  $\text{C}_{50}\text{H}_{62}\text{O}_{23}$  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  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -1,4-dioxane (1:1) による酸加水分解後、tolylthiocarbamoyl thiazolidine 誘導体化し、D-glucose, D-galactose, L-glucose, および L-galactose と HPLC の保持時間を比較することで D-glucose であると決定した。**1** の水素核磁気共鳴 (以下、 $^1\text{H}$ -NMR) と  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (methanol- $d_4$ , Table 1), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), リグナン {2つのオレフィンプロトン [ $\delta$ 7.73 (s, H-7), 7.80 (s, H-7')], 7つの芳香環由来プロトン [ $\delta$ 6.68 (d,  $J=8.6$  Hz, H-5'), 6.71 (d,  $J=8.6$  Hz, H-3'',5''), 6.92 (dd,  $J=8.6, 1.9$  Hz, H-6'), 7.07 (d,  $J=1.9$  Hz, H-2'), 7.41 (d,  $J=8.6$  Hz, H-2'',6'')], および2つのカルボニルカーボン [ $\delta$ 169.0, 169.0]}, 2つのモノテルペン {酸素官能基に結合した2つのメチレンプロトン [ $\delta$ 3.86 (2H, m, H-10''a, 10''''a), 3.96 (2H, m, H-10''b, 10''''b)], 酸素官能基に結合した2つのメチンのプロトン [ $\delta$ 3.70 (2H, m, H-2'', 2''')], 4つのオレフィンプロトン [ $\delta$ 4.56 (2H, d,  $J=6.2$  Hz, H-8''', 8''''), 6.42 (2H, d,  $J=6.2$  Hz, H-9'', 9''')], および2つのアルデヒド由来プロトン [ $\delta$ 9.76 (2H, s, H-7'', 7''')]}}, および2つのグルコース [ $\delta$ 4.46 (2H, m, H-1''', 1''''')] の存在が明らかとなった。また、リグナン、モノテルペン、およびグルコースの結合位置は HMBC 相関により決定した。すなわち、H-7 と C-8' および 9; H-7' と C-8 および 9'; H-10'' と C-9; H-10'' と C-9; H-10'''' と C-9''''; そして H-10'''' と C-9'''' の間に HMBC 相関がみられたことから (Figure 5), その結合位置を決定した。リグナン部位の7, 8位および7', 8'位のジオメトリーは**1**からの誘導化により得られた**1e**のNOESYスペクトル測定により決定した。すなわち、**1**をPd-Cにより接触還元することで、**1a**を得た。次に、 $\text{NaBH}_4$ を用いた還元を行うことで**1a**から**1b**を得、ヘスペリジナーゼにより、**1b**の糖を加水分解することで**1c**を得た。Trimethylsilyldiazomethaneを用いて、**1c**のフェノール性水酸基をメトキシ化した後、 $\text{NaOMe}$ によってエステルを分解することで**1e**を得た。**1e**において、NOESY相関がH-7とC-2', H-6' および H-7' と H-2 および H-6 間に見られたことから、そのジオメトリーを*E*であると決定した。加えて、**1b**のフェノール性水酸基のメトキシ化およびエステル加水分解を経て既知化合物**1h**を得、その $^1\text{H}$ -NMRを文献値<sup>2)</sup>と比較することで、モノテルペン部位の絶対立体配置を決定した (Scheme 1)。なお、モノテルペン部位の8'', 8''''位のジオメトリーは、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルにおける8'' および 8''''位と9'' および 9''''位のスピン結合定数 ( $J=6.2$  Hz) の解析から*cis*配置であると決定した。以上の結果より、canangalignan I (**1**)の化学構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4)。次に、リグナン部位における回転がモノテルペン部位による立体障害によって障害される事により、回転異性体が生じるのではないかと考えた。2010年に報告されているcannabisin Gの全合成過程において、canangalignan I (**1**)と同様の炭素骨格を有するリグナンに4-エチルフェノ

ールがエステル結合した化合物や、リグナンのフェニル基に *tert*-ブチル 基が結合した化合物が中間体として報告されている<sup>35)</sup> が、回転障害については言及されていない。そこで、様々なカラム温度において HPLC 分析を行った。まず、溶媒およびカラムを氷冷し、低温にて分析を行ったところ、保持時間 15.6 分に 1 つのピークが観測された [column: COSMOSIL 5C18 MS-II (250 × 4.6 mm i.d.); mobile phase: MeCN–H<sub>2</sub>O (22:78, v/v); detection: 260 nm]。次に、溶媒温度を室温に戻した後、カラムオープンに 40°C および 50°C とし、同一の溶媒にて分析を行った。その結果、保持時間 10.2 分 (40°C) および 9.8 分 (50°C) に低温時と比べ鋭い単一のピークが観測された。また、よって、4-エチルフェノールエステル体から canangalignan I (**1**) の構造においては、室温において回転が可能なのではないかと推察した。

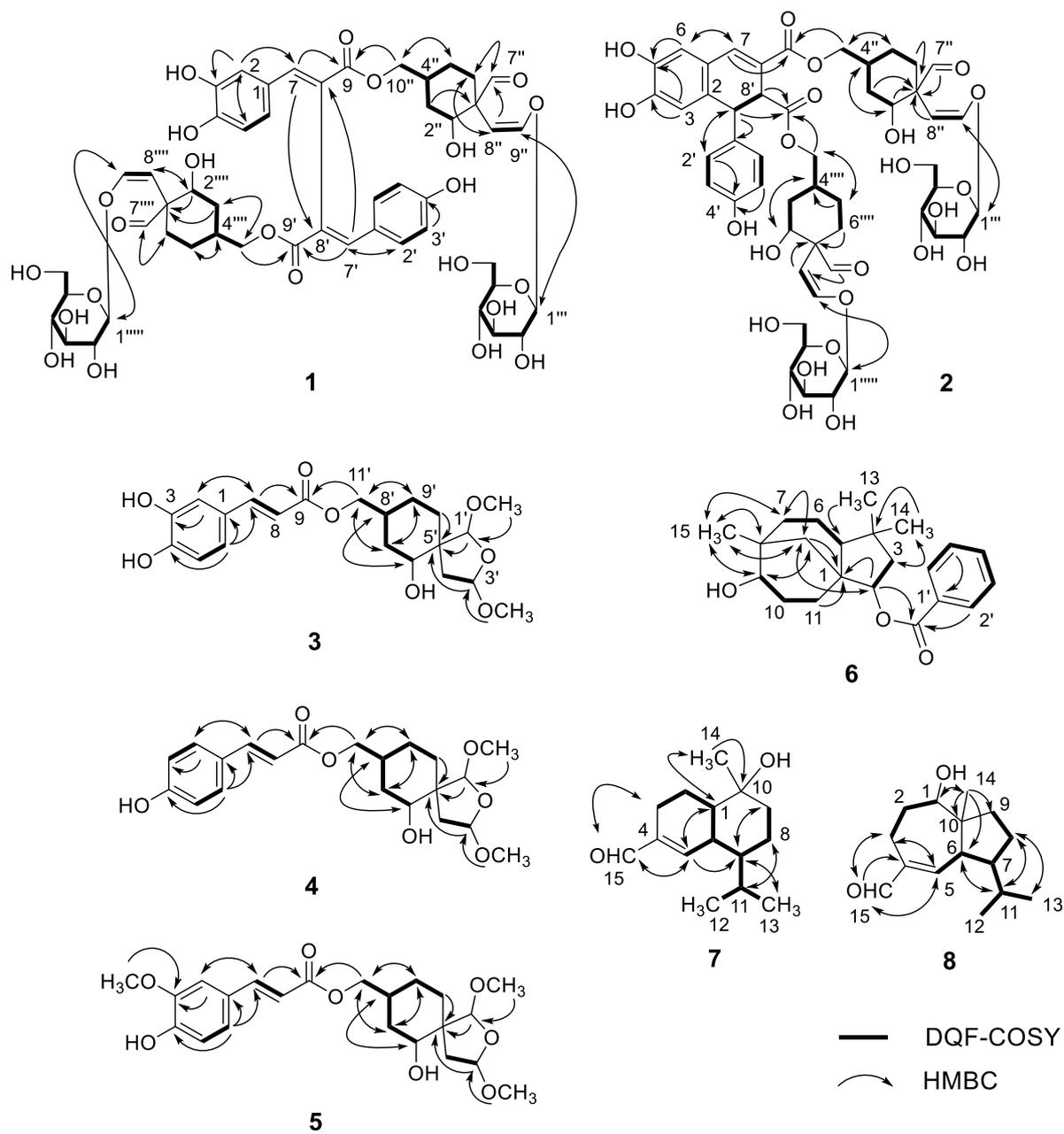


Scheme 1. Derivatization from canangalignan I (**1**).

Canangalignan II (**2**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +33$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られ、IR スペクトルからヒドロキシ基、エステル、アルデヒド、芳香環、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  $m/z$  1053 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup> に観測された。また、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 FAB-MS により分子式 C<sub>50</sub>H<sub>62</sub>O<sub>23</sub> 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、

canangalignan I (**1**) と同様の方法を用いることで D-glucose であると決定した. **2** の  $^1\text{H-NMR}$  と  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (methanol- $d_4$ , Table 1), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), リグナン {2 つのメチン [ $\delta$ 3.80 (d,  $J=2.2$  Hz, H-8'), 4.37 (d,  $J=2.2$  Hz, H-7')], オレフィンプロトン [ $\delta$ 7.52 (s, H-7)], および 6 つの芳香環由来プロトン [ $\delta$  6.46 (s, H-3), 6.59 (d,  $J=8.5$  Hz, H-3', 5'), 6.78 (d,  $J=8.5$  Hz, H-2', 6'), 6.80 (s, H-2')], そして 2 つのカルボニルカーボン [ $\delta_c$  168.5, 174.5]} およびモノテルペン配糖体の存在が明らかとなった. また, リグナン, モノテルペン, およびグルコースの結合位置は HMBC 相関により決定した (Figure 5). リグナン部位における 7', 8' 位の絶対立体配置については, 既知化合物である **9** と circular dichroism (CD) スペクトルの比較を行うことにより決定した. すなわち, canangalignan II (**2**) と **9** が共に 257 nm において正のコットン効果を示したため, その絶対立体配置をそれぞれ 7'-*R*, および 8'-*S* であると決定した. 以上の結果より, canangalignan II (**2**) の構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).

Canangaterpene I (**3**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -2$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, エステル, および芳香環に由来する吸収 (3400, 1716, and 1508  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  408 ( $\text{M}^+$ ) に観測された. また,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_8$  を有することが明らかとなった. **3** の  $^1\text{H-NMR}$  と  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (methanol- $d_4$ , Table 2), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), caffeoyl 基 [ $\delta$  6.23 (d,  $J=15.5$  Hz, H-8), 6.76 (d,  $J=8.3$  Hz, H-5), 6.92 (d,  $J=8.3$  Hz, H-6), 7.03 (s, H-2), 7.51 (d,  $J=15.5$  Hz, H-7)] およびモノテルペン部位 {酸素官能基に結合したメチレン [ $\delta$ 4.03 (2H, m, H<sub>2</sub>-11')], 酸素官能基に結合した 3 つのメチン [ $\delta$ 3.39 (m, H-6'), 4.89 (s, H-1'), 5.07 (dd,  $J=4.2, 6.2$  Hz, H-3')], そして 2 つのメトキシ基 [ $\delta$ 3.37 (s, 3'-OMe), 3.38 (s, 1'-OMe)]} に由来するシグナルが認められた. また, HMBC 相関が H-2 と C-7 および 3; H-6 と C-7, 1, および 4; H-7 と C-2; H-1' と C-5'; H-3' と C-5'; H-6' と C-8'; H-7' と C-9' および 11'; H-8' と C-6'; H-9' と C-11'; H-10' と C-5'; H-11' と C-9; そして  $\text{OCH}_3 \times 2$  と C-1'; 3' の間に観測されたことから, その平面構造を **10** と同様であると決定した. 次に, **3** の相対立体配置は NOESY スペクトルにより決定した. すなわち, H-4 $\beta$  と H-3'; H-6' と H-4 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 8'; および H-8' と H-7 $\alpha$ , 9 $\alpha$  の間に 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 6). 以上の結果より, canangaterpene I (**3**) の構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4). また, canangaterpene I (**3**) は, メタノールを用いて抽出した過程において, 化合物 **11** のアグリコンとメタノールの反応により生成された可能性があると考えられる.



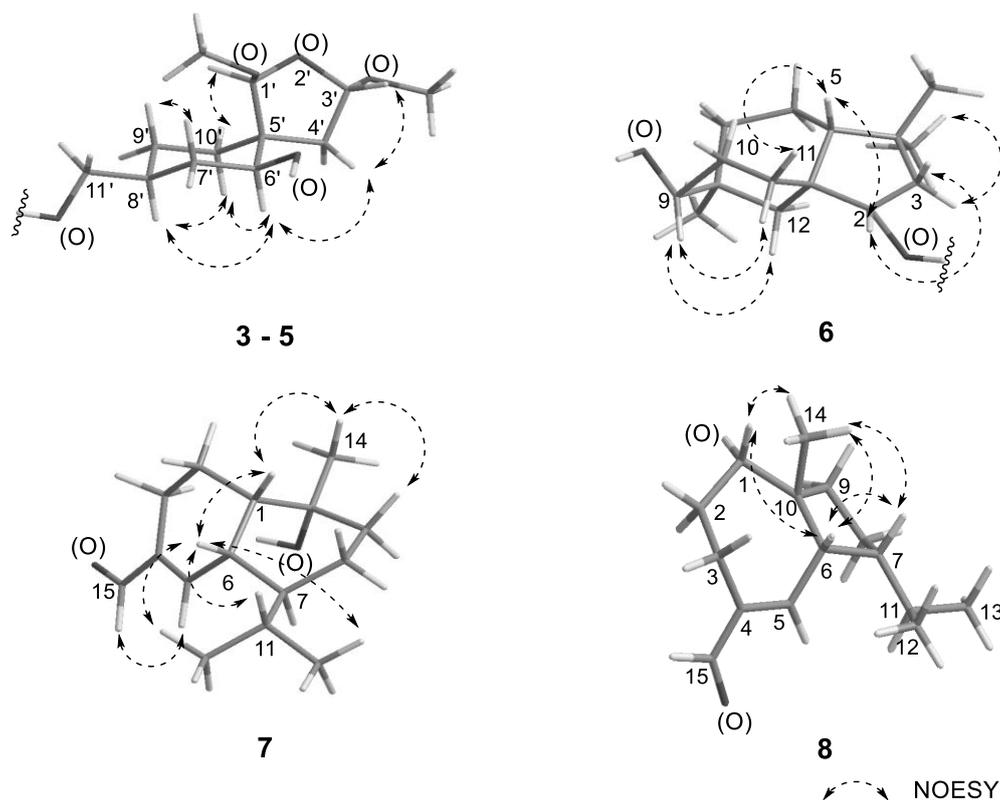
**Figure 5.** Important 2D NMR correlations of new compounds (1–8).

**Table 1.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, methanol- $d_4$ ) data for 1 and 2.

Position	1	Position	1	Position	2	Position	2
1	128.1	9"	146.1	1	131.3	9"	146.2
2	117.5	10"	70.2	2	124.9	10"	69.8
3	146.4	1'''	104.1	3	117.1	1'''	104.2
4	148.67	2'''	74.5	4	149.3	2'''	74.5
5	116.4	3'''	78.4	5	145.7	3'''	78.5
6	124.7	4'''	71.1	6	117.1	4'''	71.2
7	144.4	5'''	77.8	7	139.6	5'''	77.9
8	124.9	6'''	62.5	8	124.9	6'''	62.6
9	169.0	1''''	56.1	9	168.5	1''''	56.2
1'	127.6	2''''	75.8	1'	134.8	2''''	75.7
2'	133.1	3''''	35.7	2'	129.7	3''''	35.8
3'	116.6	4''''	37.3	3'	116.2	4''''	37.3
4'	160.6	5''''	25.9	4'	157.2	5''''	26.0
5'	116.6	6''''	31.2	5'	116.2	6''''	31.2
6'	133.1	7''''	206.8	6'	129.7	7''''	206.8
7'	144.1	8''''	110.1	7'	47.0	8''''	110.1
8'	124.9	9''''	146.1	8'	49.6	9''''	146.3
9'	169.0	10''''	70.2	9'	174.5	10''''	70.1
1''	56.1	1''''''	104.1	1''	56.2	1''''''	104.2
2''	75.8	2''''''	74.5	2''	75.8	2''''''	74.5
3''	35.7	3''''''	78.4	3''	35.6	3''''''	78.5
4''	37.3	4''''''	71.1	4''	37.3	4''''''	71.2
5''	26.0	5''''''	77.8	5''	25.9	5''''''	77.9
6''	31.2	6''''''	62.5	6''	31.2	6''''''	62.6
7''	206.8			7''	206.8		
8''	110.1			8''	110.1		

Canangaterpene II (**6**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +25$  in MeOH) を示す白色結晶として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, エステル, および芳香環に由来する吸収が認められた. 次に, EI-MSにおいて, 分子イオンピークが  $m/z$  342 ( $M$ )<sup>+</sup> に観測された. また, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式 C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> を有することが明らかとなった. **6** の <sup>1</sup>H-NMR と <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (Chloroform-*d*, Table 1), および各種二次元NMRスペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), 3 つのメチルプロトン [ $\delta$  0.96 (3H, s, H-15), 0.98 (3H, s, H-14), 1.11 (3H, s, H-13)], 酸素官能基に結合した 2 つのメチン [ $\delta$  3.34 (1H, m, H-9), 5.09 (1H, dd,  $J$  = 6.2, 8.2 Hz, H-2)], そして 5 つのフェニルプロトン [ $\delta$  7.43 (2H, dd,  $J$  = 7.6, 7.6 Hz, H-3', 5'), 7.55 (1H, t,  $J$  = 7.6 Hz, H-4'), 8.03 (2H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-2', 6')] に由来するシグナルが認められた. 各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析により, ベンゾイル基およびクロバン型セスキテルペンの存在が明らかとなった. また, HMBC 相関が H-2とカルボニルカーボンの間に観測されたことから, ベンゾイル基の結合位置を決定した. また, クロバン骨格の相対立体配置は NOESY 相関により決定した. すなわち, NOESY 相関がH-2 と H-3 $\beta$ , 5; H-3 $\alpha$  と H<sub>3</sub>-14; H-5 と H-11 $\beta$ , 13; H-9 と H-11 $\alpha$ , 12 $\beta$ , 15; および H-11 $\alpha$  と H-12 $\beta$  の間に観測されたことから, その相対立体配置を決定した (Figure 6). 絶対立体配置については, 9 位の水酸基に改良モッシャー法を適応することで決定した. すなわち, まず **6** をピリジンに溶解し, (-)-methoxy-(-)-trifluoromethyl phenylacetyl chloride [(-)-MTPA-Cl] とともに一晩攪拌させることで, 誘導体 **6a** を得, 同様に [(+)-MTPA-Cl] と反応させることで誘導体 **6b** を得た. それぞれの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した結果, **6a** と比べ, **6b** の 10 および 11 位の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは高磁場へのシフトが見られた一方で, **6a** と比べ, **6b** の 6, 7, 12, および 15 位の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは低磁場側へのシフトが観測された. そのことから, **6** における 9 位の絶対立体配置は *R* であると決定した (Figure 7). 以上の結果より, canangaterpene II (**6**) の構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).

Canangaterpene III (**7**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} -2$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基およびエステルに由来する吸収が認められた. 次に, EI-MSにおいて, 分子イオンピークが  $m/z$  236 ( $M$ )<sup>+</sup> に観測され, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式 C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> を有することが明らかとなった. **7** の <sup>1</sup>H-NMR と <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (Chloroform-*d*, Table 2), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), 3 つのメチル基 [ $\delta$  0.91, 0.95 (3H each, both d,  $J$  = 6.7 Hz, H<sub>3</sub>-12, 13), 1.25 (3H, s, H<sub>3</sub>-14)], 1 つのオレフィン [ $\delta$  6.96 (1H, d,  $J$  = 5.7 Hz, H-5)], そして 1 つのアルデヒド基 [ $\delta$  9.44 (1H, s, H-15)] に由来するシグナルが認められた. 詳細な 2D NMR スペクトルの解析の結果, カジナン型セスキテルペンである 15-oxo- $\alpha$ -cadinol (**12**) と同様の平面構造を有することが示唆された. また, NOESY 相関が H-1 と H-6, H<sub>3</sub>-14; H-6 と H-11, H<sub>3</sub>-12, 13 の間に観測されたことから, その相対立体配置を決定した (Figure 6). よって, canangaterpene III (**7**) の化学構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).



**Figure 6.** Important NOESY correlations of new compounds (3-8).

Canangaterpene IV (**4**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} -3$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  392 ( $M$ )<sup>+</sup> に観測され, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式 C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub> を有することが明らかとなった. **4** の <sup>1</sup>H-NMR と <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (methanol-*d*<sub>4</sub>, Table 2), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5) (*E*)-*p*-coumaroyl 基 [ $\delta$  6.30 (d,  $J$  = 15.9 Hz, H-8), 6.79 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3, 5), 7.44 (d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2, 6), 7.58 (d,  $J$  = 15.9 Hz, H-7)] および **3** と同様の構造であるモノテルペンに由来するシグナルが認められた. 詳細な二次元 NMR スペクトルの解析により, canangaterpene IV (**4**) の化学構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).

Canangaterpene V (**5**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} -3$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  422 ( $M$ )<sup>+</sup> に観測され, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式 C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub> を有することが明らかとなった. **5** の <sup>1</sup>H-NMR と <sup>13</sup>C-NMR スペクトル (methanol-*d*<sub>4</sub>, Table 2), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5) (*E*)-feruloyl 基 [ $\delta$  3.88 (s, 3-OMe), 6.34 (d,  $J$  = 15.9 Hz,

H-8), 6.79 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 7.05 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 7.18 (s, H-2), 7.58 (d,  $J = 15.9$  Hz, H-7)] および **3** と同様の構造であるモノテルペンに由来するシグナルが認められた. 詳細な 2D NMR スペクトルの解析により, canangaterpene V (**5**) の化学構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).

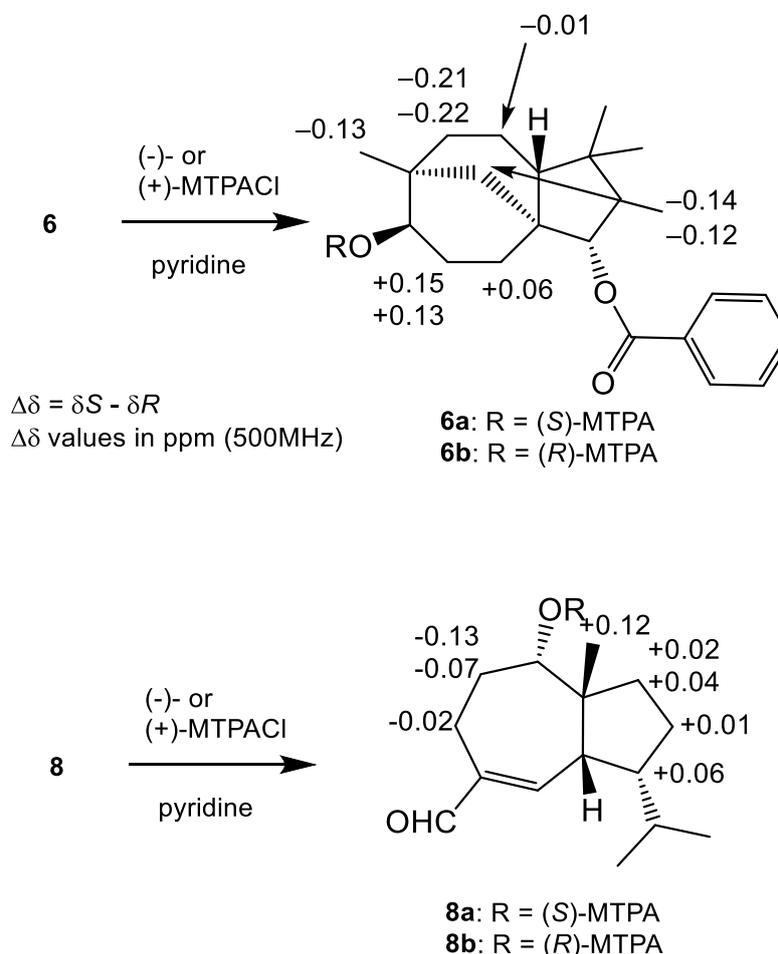


Figure 7. Determination of the absolute configuration of **6** and **8**.

Canangaterpene VI (**8**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +13$  in MeOH) を示す白色非結晶粉末として得られ, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  236 ( $M^+$ ) に観測され,  $^{13}C$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $C_{15}H_{24}O_2$  を有することが明らかとなった. **8** の  $^1H$ -NMR と  $^{13}C$ -NMR スペクトル (methanol- $d_4$ , Table 2), および各種二次元 NMR スペクトルの詳細な解析の結果 (Figure 5), 3 つのメチル基 [ $\delta$ 0.67 (s, H<sub>3</sub>-14), 0.95 (d,  $J=6.2$  Hz, H<sub>3</sub>-12), 0.97 (d,  $J=6.2$  Hz, H<sub>3</sub>-13)], 1 つのオレフィン [ $\delta$ 6.88 (d,  $J = 6.2$  Hz, H-5)], 1 つのアルデヒド基 [ $\delta$ 9.40 (s, H-15)] に由来するシグナルが認められた. 次に, HMBC 相関が H-1 と C-2, 10, 14; H-5 と C-3, 4, 6; H-7 と C-5, 6, 11; H<sub>3</sub>-14 と C-1, 6, 9, 10; H-15 と C-3, 4, 5 の間に観測されたことから, その平面構造を **10** および **11** と同様であると決定した. 相対立体配置については, NOESY 相関が H-1 と H-6, H-6 と H-7, 14 の間に観測されたことから, 図

中に示したように決定した (Figure 6). **6** と同じように, 絶対立体配置は改良モッシャー法により決定した. すなわち, **8** の水酸基において, (-)-MTPACI および (+)-MTPACI を反応させることで, (*S*)-MTPA ester (**8a**) および (*R*)-MTPA ester (**8b**) へと誘導化を行ったのち, それぞれの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの比較を行った結果, 1 位が *S* 配置であることが明らかとなった (Figure 7). 以上の結果より, canangaterpene VI (**8**) の化学構造を図中に示したものであると決定した (Figure 4).

**Table 2.** <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub><sup>a</sup>, chloroform-*d*<sup>b</sup>) data for 3–8.

Position	<b>3</b> <sup>a</sup>	<b>4</b> <sup>a</sup>	<b>5</b> <sup>a</sup>	Position	<b>6</b> <sup>b</sup>	<b>7</b> <sup>b</sup>	<b>8</b> <sup>b</sup>
1	127.7	127.1	127.7	1	45.1	45.8	83.1
2	115.1	131.2	111.2	2	82.8	19.6	28.6
3	146.8	116.8	149.4	3	44.5	22.5	19.3
4	149.6	161.3	150.7	4	38.4	140.7	143.1
5	116.6	116.8	116.5	5	50.4	154.8	157.1
6	123.0	131.2	124.1	6	20.9	35.9	46.7
7	146.9	146.5	146.8	7	33.1	43.8	47.5
8	115.2	115.2	115.5	8	34.6	19.6	24.3
9	169.2	169.2	169.2	9	74.8	34.5	39.4
1'	106.7	106.7	106.7	10	27.5	71.9	49.6
3'	107.6	107.5	107.5	11	26.6	27.3	29.6
4'	44.8	44.8	44.8	12	35.5	21.4	23.6
5'	53.2	53.2	53.2	13	31.6	15.6	20.2
6'	76.8	76.8	76.8	14	25.4	29.5	14.1
7'	36.3	36.3	36.3	15	28.2	194.5	193.1
8'	37.5	37.5	37.5	1'	130.8		
9'	27.3	27.3	27.3	2'	129.7		
10'	32.4	32.4	32.4	3'	128.3		
11'	69.6	69.6	69.6	4'	132.7		
3-OMe			56.5	5'	128.3		
7'-OMe	55.5	55.4	55.4	6'	129.7		
9'-OMe	55.7	55.6	55.6	1'-COO	166.3		

### 第三節 抽出エキスおよび含有成分のメラニン生成抑制作用

メラニンは我々人間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, これまでの研究の結果, メラノサイト細胞内に存在するメラノソーム (melanosome) 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.<sup>36)</sup> メラニンは紫外線から DNA を守るといった重要な役割を果たしている

と同時に、我々の肌、髪、そして瞳を色付ける物質である。加えて、美白効果を有するとされる化合物を含有した化粧水や内服薬が薬局に並んでいる他、チロシナーゼ阻害物質を始めとするさらなるメラニン生成抑制物質の探索が行われている。そこで、新規構造を有するメラニン生成抑制物質の探索を目的として、マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 を指標として用いた、メラニン生成抑制作用の評価を行った。

*C. odorata* 花部 MeOH 抽出エキス共存下、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結果、MeOH 抽出エキスに有意な活性が見られた [inhibition (%):  $43.8 \pm 1.9$  ( $P < 0.01$ ) at  $3 \mu\text{g/mL}$ ]. 各移行部 (EtOAc, *n*-BuOH, および  $\text{H}_2\text{O}$ ) において同様に活性の測定を行ったところ、EtOAc および *n*-BuOH 移行部に活性の集約が見られた [inhibition (%):  $37.5 \pm 3.4$  ( $P < 0.01$ ),  $46.9 \pm 6.8$  ( $P < 0.01$ ), respectively at  $3 \mu\text{g/mL}$ ] ことから、両フラクションにおいて含有成分の探索を行った結果として得られた 19 成分 (**1-7**, **9-18**, **20**, および **21**)のメラニン生成抑制作用の測定を行った (Table 3). 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の測定も行った (Table 4).

その結果、Table 3 に示したようにモノテルペン誘導体 **3**、セスキテルペン類 **7**, **12-14**, **16**, および **17** が低濃度で有意な阻害作用を示した。中でも、**3**, **12**, および **14** は  $10 \mu\text{M}$  以下の  $\text{IC}_{50}$  値であり特に強い活性を有していると同時に、ほとんど細胞毒性を示さなかった。次に、caffeoyleyl 基を有するモノテルペン **3** は (*E*)-*p*-coumaroyl 基を有する **4** や (*E*)-feruloyl 基を有する **5** に比べ、低濃度で阻害作用を示したことから、(*E*)-*p*-coumaroyl 基の存在は、単離したモノテルペン誘導体類において、活性の発現に重要であることが示唆された。また、**13** と **14** を比較した結果、セスキテルペン類において、環上にカルボニル基を有する化合物は  $\alpha$  水酸基を有する化合物に比べ、低濃度で活性を発現することが明らかとなった。加えて、活性の測定を行った成分について、Chem Bio Draw Ultra を用いた水/オクタノール分配係数の推察を行った。その結果、低濃度で活性の見られた化合物 **3**, **12**, および **14** [Log P, **3** : 2.29, **12** : 2.30, and **14** : 3.11] は 2-3 の Log P 値を有する事が明らかとなった。一般的に医薬品の Log P の理想値は 1-4 程度であるといわれており、これらの化合物の細胞膜透過性が良好であることが示唆された。一方、活性のほとんど見られなかった化合物 **11**, **18**, **20**, および **21** [Log P, **11** : 0.78, **18**, **20** : -1.85, and **21** : -1.97] は 1 未満の Log P 値を有しており、これらの化合物が活性を持たない原因として、その極性の高さが示唆された。

**Table 3.** Inhibitory effects of constituents from *C. odorata* and derivatized compounds from canangalignan I (1) on B16 Melanoma 4A5 Cells.

	Inhibition (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Log P
	Control	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M		
1	0.0 $\pm$ 2.1	28.6 $\pm$ 1.6**	30.2 $\pm$ 2.2**	31.8 $\pm$ 1.1**	34.8 $\pm$ 1.8**	16.7 $\pm$ 1.9**	>100	
2	0.0 $\pm$ 4.0	9.2 $\pm$ 3.8	8.7 $\pm$ 2.1	3.6 $\pm$ 5.8	2.9 $\pm$ 4.1	8.7 $\pm$ 4.6	>100	
3	0.0 $\pm$ 6.8	34.7 $\pm$ 4.2**	42.8 $\pm$ 2.2**	65.2 $\pm$ 2.6**	62.8 $\pm$ 0.8**	66.8 $\pm$ 0.5**	3.6	2.29
4	0.0 $\pm$ 3.1	-12.9 $\pm$ 8.1	8.2 $\pm$ 3.1	11.1 $\pm$ 8.9	17.1 $\pm$ 4.8	49.4 $\pm$ 8.8**	ca. 100	2.68
5	0.0 $\pm$ 6.5	14.4 $\pm$ 4.0	26.6 $\pm$ 2.8**	35.2 $\pm$ 2.5**	47.1 $\pm$ 3.0**	65.1 $\pm$ 1.5**	31.6	2.56
6	0.0 $\pm$ 1.3	45.3 $\pm$ 1.1**	40.2 $\pm$ 1.4**	66.7 $\pm$ 0.8**	–	–	ca. 3	5.02
7	0.0 $\pm$ 4.4	19.2 $\pm$ 3.8**	29.9 $\pm$ 4.1**	35.8 $\pm$ 1.0**	50.8 $\pm$ 1.7**	66.3 $\pm$ 1.5**	26.2	2.30
9	0.0 $\pm$ 5.2	12.8 $\pm$ 3.7	14.9 $\pm$ 2.8	9.4 $\pm$ 5.0	8.4 $\pm$ 3.7	-27.9 $\pm$ 5.9	>100	
10	0.0 $\pm$ 5.4	13.5 $\pm$ 2.3*	16.9 $\pm$ 3.7**	36.4 $\pm$ 2.6**	60.0 $\pm$ 0.8**	81.2 $\pm$ 0.6**	19.3	2.29
11	0.0 $\pm$ 4.2	-3.8 $\pm$ 3.0	-8.5 $\pm$ 4.1	9.3 $\pm$ 5.5	11.4 $\pm$ 3.4	12.2 $\pm$ 5.6	>100	0.78
12	0.0 $\pm$ 5.0	25.0 $\pm$ 3.1**	45.5 $\pm$ 1.0**	64.0 $\pm$ 2.7**	65.9 $\pm$ 3.0**	48.8 $\pm$ 1.4**	5.1	2.30
13	0.0 $\pm$ 3.5	-4.4 $\pm$ 11.3	9.2 $\pm$ 5.6	14.7 $\pm$ 3.1	37.7 $\pm$ 4.2**	58.8 $\pm$ 1.3**	57.5	2.62
14	0.0 $\pm$ 7.8	45.5 $\pm$ 5.7**	50.3 $\pm$ 2.1**	57.6 $\pm$ 3.7**	68.5 $\pm$ 1.9**	80.6 $\pm$ 2.6**	2.5	3.11
15	0.0 $\pm$ 6.9	37.6 $\pm$ 6.3**	34.3 $\pm$ 6.9**	32.9 $\pm$ 7.7**	28.3 $\pm$ 7.8**	42.1 $\pm$ 2.6**	>100	2.62
16	0.0 $\pm$ 4.8	42.3 $\pm$ 4.5**	39.7 $\pm$ 4.2**	53.8 $\pm$ 2.7**	54.7 $\pm$ 1.9**	59.2 $\pm$ 2.4**	8.4	2.77
17	0.0 $\pm$ 7.3	28.9 $\pm$ 2.5**	30.5 $\pm$ 3.0**	40.6 $\pm$ 2.3**	61.2 $\pm$ 5.2**	62.2 $\pm$ 1.6**	17.3	3.65
18	0.0 $\pm$ 1.4	19.3 $\pm$ 5.0	19.0 $\pm$ 2.2	20.1 $\pm$ 4.6	12.2 $\pm$ 5.6**	11.2 $\pm$ 5.5	>100	-1.85
20	0.0 $\pm$ 3.4	20.4 $\pm$ 3.0**	17.3 $\pm$ 2.5*	30.7 $\pm$ 5.5**	17.9 $\pm$ 3.3*	1.1 $\pm$ 3.7	>100	-1.85
21	0.0 $\pm$ 2.8	18.4 $\pm$ 4.2*	34.2 $\pm$ 4.7**	35.9 $\pm$ 2.8**	40.2 $\pm$ 3.2**	43.9 $\pm$ 1.5**	>100	-1.97
	Inhibition (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	Control	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M		
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**	174	

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

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

IC<sub>50</sub> values were determined graphically.

**Table 4.** Inhibitory effects of constituents from *C. odorata* on proliferation in B16 Melanoma 4A5 Cells.

	Viability (%)					
	Control	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>1</b>	100.0 $\pm$ 2.0	111.5 $\pm$ 4.7	117.7 $\pm$ 3.8	113.8 $\pm$ 2.1	114.0 $\pm$ 2.7	114.4 $\pm$ 5.7
<b>2</b>	100.0 $\pm$ 3.5	97.0 $\pm$ 2.3	94.1 $\pm$ 2.6	93.8 $\pm$ 2.1	89.8 $\pm$ 3.2	79.7 $\pm$ 1.3
<b>3</b>	100.0 $\pm$ 1.5	104.8 $\pm$ 7.7	116.3 $\pm$ 8.3	127.7 $\pm$ 13.4	95.2 $\pm$ 4.6	70.8 $\pm$ 3.9
<b>4</b>	100.0 $\pm$ 6.5	93.7 $\pm$ 6.6	90.2 $\pm$ 4.9	82.4 $\pm$ 4.2	69.9 $\pm$ 3.2**	63.6 $\pm$ 2.4**
<b>5</b>	100.0 $\pm$ 1.1	105.8 $\pm$ 6.6	107.6 $\pm$ 3.1	104.5 $\pm$ 2.2	106.0 $\pm$ 3.4	75.9 $\pm$ 3.3**
<b>6</b>	100.0 $\pm$ 9.8	64.5 $\pm$ 4.1**	66.6 $\pm$ 1.0**	75.9 $\pm$ 4.2**	7.9 $\pm$ 2.8**	0.2 $\pm$ 0.2**
<b>7</b>	100.0 $\pm$ 6.5	98.5 $\pm$ 5.4	101.3 $\pm$ 2.8	90.9 $\pm$ 2.4	83.4 $\pm$ 1.6*	83.8 $\pm$ 2.1*
<b>9</b>	100.0 $\pm$ 1.2	95.4 $\pm$ 1.9	93.8 $\pm$ 1.6*	91.4 $\pm$ 1.5**	88.2 $\pm$ 1.4**	74.1 $\pm$ 1.0**
<b>10</b>	100.0 $\pm$ 4.5	100.8 $\pm$ 3.8	99.3 $\pm$ 1.9	96.8 $\pm$ 2.1	82.0 $\pm$ 2.3**	84.1 $\pm$ 2.1**
<b>11</b>	100.0 $\pm$ 3.7	94.8 $\pm$ 1.6	94.8 $\pm$ 1.1	98.1 $\pm$ 1.0	98.5 $\pm$ 1.9	93.6 $\pm$ 2.0
<b>12</b>	100.0 $\pm$ 6.4	97.2 $\pm$ 6.0	98.2 $\pm$ 5.9	89.8 $\pm$ 3.6	80.3 $\pm$ 4.8*	66.1 $\pm$ 2.2**
<b>13</b>	100.0 $\pm$ 1.5	84.6 $\pm$ 2.8*	88.1 $\pm$ 4.4	83.3 $\pm$ 3.2*	82.0 $\pm$ 5.0**	98.9 $\pm$ 2.8
<b>14</b>	100.0 $\pm$ 2.2	124.5 $\pm$ 7.8**	131.5 $\pm$ 5.3**	127.6 $\pm$ 6.2*	114.6 $\pm$ 2.6	114.6 $\pm$ 4.9
<b>15</b>	100.0 $\pm$ 6.7	111.3 $\pm$ 5.7	105.7 $\pm$ 6.1	94.1 $\pm$ 8.9	77.6 $\pm$ 7.3	71.0 $\pm$ 5.9*
<b>16</b>	100.0 $\pm$ 7.4	98.0 $\pm$ 3.4	87.6 $\pm$ 3.0	82.6 $\pm$ 4.4*	74.5 $\pm$ 1.1**	70.1 $\pm$ 2.2**
<b>17</b>	100.0 $\pm$ 3.6	109.1 $\pm$ 3.3	115.7 $\pm$ 4.2	109.8 $\pm$ 6.1	110.7 $\pm$ 5.5	79.8 $\pm$ 4.7*
<b>18</b>	100.0 $\pm$ 2.4	107.3 $\pm$ 3.1	109.1 $\pm$ 1.8*	108.8 $\pm$ 1.1*	104.1 $\pm$ 2.7	102.7 $\pm$ 0.9
<b>20</b>	100.0 $\pm$ 3.0	102.3 $\pm$ 4.3	111.2 $\pm$ 1.2	118.9 $\pm$ 2.4	117.1 $\pm$ 6.7	109.1 $\pm$ 9.7
<b>21</b>	100.0 $\pm$ 2.2	103.7 $\pm$ 2.0	102.7 $\pm$ 2.4	103.7 $\pm$ 2.0	101.2 $\pm$ 1.1	99.4 $\pm$ 3.0

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

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

IC<sub>50</sub> values were determined graphically.

#### 第四節 抽出エキスおよび含有成分のアルドース還元酵素阻害作用

アルドース還元酵素は、グルコース代謝経路の一つであるポリオール経路において、グルコースをソルビトールへ還元する酵素である。糖尿病の病態においては、細胞内のグルコース濃度が過剰となり、ポリオール経路が亢進される結果、慢性的なソルビトール濃度の上昇および NADPH の低下が引き起こされ、糖尿病性白内障などの糖尿病合併症の要因となることが知られている。アルドース還元酵素を標的とした糖尿病合併症薬として、エパルレスタット等が使用されている。MeOH 抽出エキスおよび各種可溶分画をテストサンプルとして、ラット水晶体ホモジネートをアルドース還元酵素の素分画、DL-glyceraldehyde を基質として用い、試料共存下で酵素反応させたのち、溶液中の NADP 量を指標として酵素活性を算出したところ、イランイラン花部 MeOH 抽出エキス [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M)=6.0] に阻害作用が見られるとともに、EtOAc 可溶分画 [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M)=6.2] および 1-butanol 可溶分画 [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M)=16.8] に阻害作用の集約が見られたことから、得られた成分においても、アルドース還元酵素阻害作用の検討を行った (Table 5)。その結果、リグナン **1**、モノテルペン誘導体 **3-5, 10, 11** および フラボノイド類 **18-25** に有意な活性が見られた。

モノテルペン誘導体の中でも、構造中にカフェオイル基を有する化合物 **3** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 1.2], **10** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 1.5], および **11** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 0.8] は比較対照薬として用いたクロロゲン酸 [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 0.7] と同程度の阻害作用を示した。一方で、構造中にクマロイル基を有するモノテルペン誘導体 **4** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 8.1] やフェルロイル基を有する **5** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 8.0] は、低濃度で阻害活性を示さなかったことから、カフェオイル基の存在が活性の発現には重要であることが示唆された。加えて、カフェイン酸 [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 30.9] 単独では低濃度で活性を持たないことから、カフェオイル基がモノテルペンに結合していることも、活性の発現に重要であることが明らかとなった。

フラボノイド類においては、構造中に 1 つのアシル基を有する **22** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 2.2], **24** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 4.6], および **25** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 6.0] が低濃度で活性を示した一方で、アシル基を有していない **18** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 17.5], **19** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 24.5], **20** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 17.3], および **21** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) = 18.0] には活性の減弱が見られ、2 つのアシル基を有する **23** [IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) > 100] においては活性が見られなかった。そのことから、フラボノイド配糖体のアルドース還元酵素阻害作用の発現には、アシル基の数が大きく寄与していた。そして、低濃度で活性を示したアシル化フラボノイド配糖体が約 1 の Log P 値を持つことが、計算の結果明らかとなった。そのことから、アシル基が結合することで極性に変化が生まれた結果、これらの化合物間においてアルドース還元酵素阻害活性に違いが生じたと考えられる。

Table 5. Inhibitory activity on aldose reductase of isolated compounds

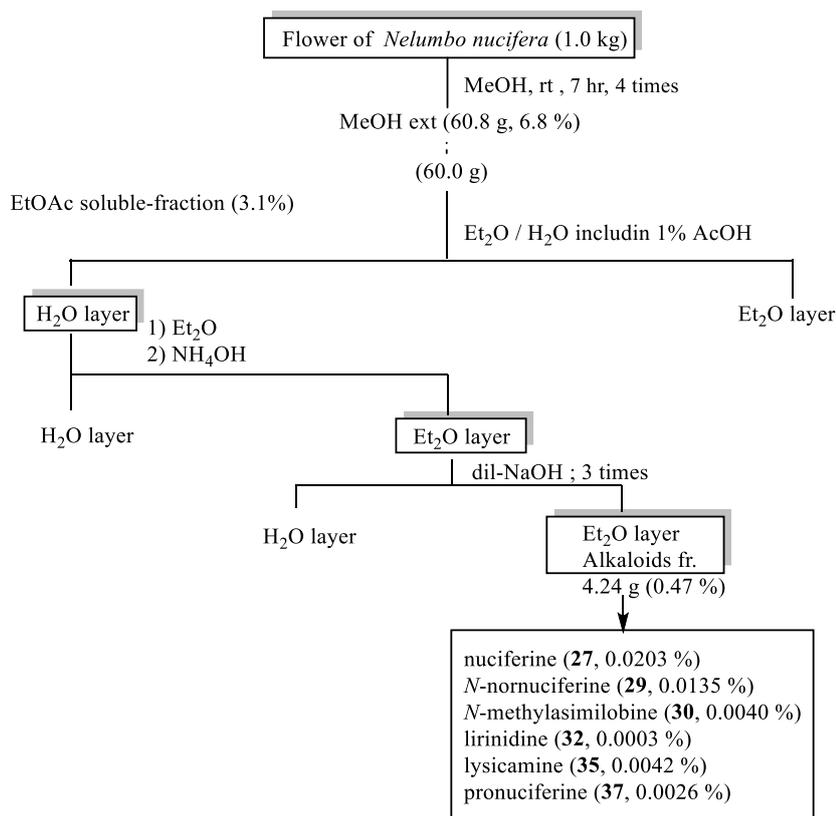
Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Log P
canangalignan I ( <b>1</b> )	9.9	
canangaterpene I ( <b>3</b> )	1.2	2.29
canangaterpene IV ( <b>4</b> )	8.1	2.68
canangaterpene V ( <b>5</b> )	8.0	2.56
canangaterpene II ( <b>6</b> )	>100	5.02
canangaterpene III ( <b>7</b> )	>100	2.30
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-1,2-dihydro-5,6-dihydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-2,3-naphthalenedicarboxylic acid 2,3-bis(10-canangafruiticoside A) ester ( <b>9</b> )	>100	
( <i>E</i> )-[(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> )-6-hydroxy-1,3-dimethoxy-2-oxaspiro[4.5]decan-8-yl]methyl] caffeate ( <b>10</b> )	1.5	2.29
canangafruiticoside E ( <b>11</b> )	0.8	0.78
15-oxo- $\alpha$ -cadinol ( <b>12</b> )	>100	2.30
10 $\beta$ -hydroxyisodauc-6-en-14-al ( <b>13</b> )	>100	2.62
(3 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i> )-3-isopropyl-8 <i>a</i> -methyl-8-oxo-1,2,3,3 <i>a</i> ,6,7,8,8 <i>a</i> -octahydroazulene-5-carbaldehyde ( <b>14</b> )	>100	3.11
aphanamol II ( <b>15</b> )	>100	2.62
voleneol ( <b>16</b> )	>100	2.77
(1 <i>R</i> ,5 <i>E</i> ,7 <i>S</i> )-4,10-bis(methylene)-7-(1-methylethyl)-5-cyclodecen-1-ol ( <b>17</b> )	>100	3.65
kaempferol 3- $\beta$ -robinobioside ( <b>18</b> )	17.5	-1.85
quercetin 3- $\beta$ -robinobioside ( <b>19</b> )	24.5	-2.24
kaempferol 3- $\beta$ -rutinoside ( <b>20</b> )	17.3	-1.85
isorhamnetin 3- <i>O</i> -rutinoside ( <b>21</b> )	18.0	-1.97
isorhamnetin 3- <i>O</i> -(6"- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside ( <b>22</b> )	2.2	1.08
kaempferol 3- <i>O</i> -(2",3"-di- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside ( <b>23</b> )	>100	3.16
kaempferol (6"- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl)-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopyranoside ( <b>24</b> )	4.6	1.08
kaempferol (6"- <i>O</i> - <i>cis</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside ( <b>25</b> )	6.0	1.08
chlorogenic acid (positive control)	0.7	
caffeic acid	30.9	

## 第二章 タイ産蓮花および蓮葉 (*Nelumbo nucifera*, 花部および葉部) の生体機能性成分

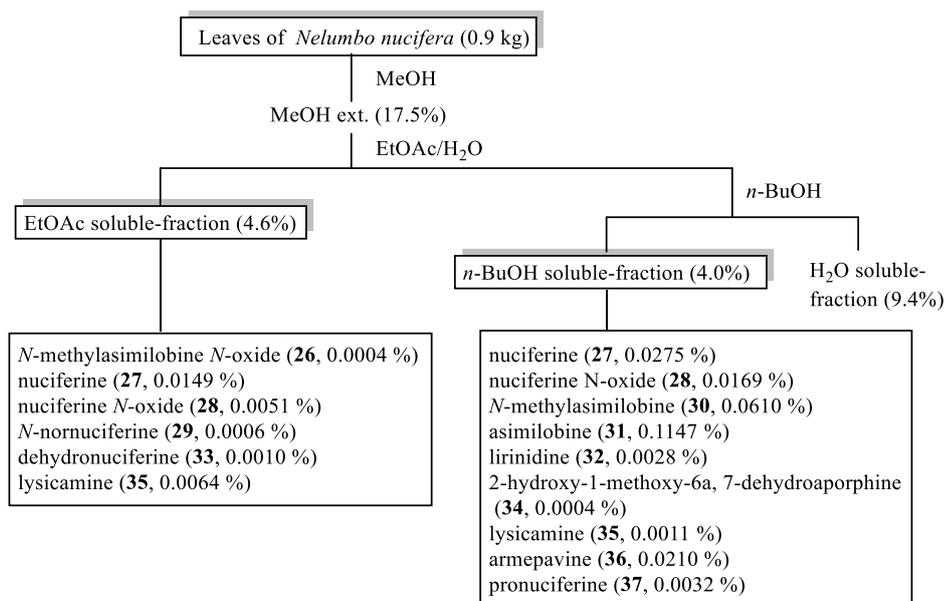
### 第一節 含有成分の抽出・単離

タイ産蓮花 (0.9 kg) を室温下にて MeOH 抽出した。その後、溶媒を減圧留去し、MeOH 抽出エキス (60.8 g, 収率 6.8%) を得た。得られた MeOH 抽出エキス 60.0 g を, Et<sub>2</sub>O と 1%AcOH で分配抽出後, 1%AcOH 移行部をアンモニア水により塩基性とし, Et<sub>2</sub>O で抽出した。次に, Et<sub>2</sub>O 移行部をさらに 10%NaOH 水溶液により洗浄し, Et<sub>2</sub>O 溶解部を Alkaloids rich 分画 (4.21 g, 0.47%) として得た (Chart 2)。得られた Alkaloids rich 分画を順相, 逆相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより, 6 種の既知アポルフィン型アルカロイド nuciferine (**27**, 183.1 mg, 0.0203%),<sup>37, 38)</sup> nornuciferine (**29**, 121.3 mg, 0.0135%),<sup>39)</sup> *N*-methyl asimilobine (**30**, 36.0 mg, 0.0040%),<sup>37, 38)</sup> (-)-lirinidine (**32**, 3.0 mg, 0.0003%),<sup>40, 41)</sup> lysicamine (**35**, 38.2 mg, 0.0042%),<sup>42, 43)</sup> および pronuciferine (**37**, 23.0 mg, 0.0026%)<sup>43)</sup> を単離, 同定した (Chart 2)。

タイ産蓮葉 (0.9 kg) を MeOH (10 L) で 3 回熱時抽出し, MeOH 抽出エキス (157.4 g; 17.5 %) を得た。この MeOH 抽出エキス (150.6 g) を EtOAc と H<sub>2</sub>O (1:1) で分配し, EtOAc 移行部 (39.9 g; 4.6 %) と H<sub>2</sub>O 移行部を得た。さらに H<sub>2</sub>O 移行部を *n*-BuOH と分配し, *n*-BuOH 移行部 (34.3 g; 4.0 %), H<sub>2</sub>O 移行部 (76.4 g; 9.4 %) を得た。EtOAc 移行部 (36.9 g) および *n*-BuOH 移行部 (34.3 g) を順相, 逆相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより, 葉部から 1 種の新規アルカロイド *N*-methylassimilobine *N*-oxide (**26**, 3.3 mg, 0.0004%), および 11 種の既知アルカロイド nuciferine (**27**, 150.3 mg, 0.0424%) nuciferine *N*-oxide (**28**, 62.8 mg, 0.0220%),<sup>44, 45)</sup> *N*-nornuciferine (**29**, 2.3 mg, 0.0006%), *N*-methylassimilobine (**30**, 281.9 mg, 0.0610%), asimilobine (**31**, 149.8 mg, 0.1147%),<sup>46)</sup> (-)-lirinidine (**32**, 7.2 mg, 0.0028%), dehydronuciferine (**33**, 3.9 mg, 0.0010%),<sup>37, 38)</sup> 2-hydroxy-1-methoxy-6a,7-dehydroaporphine (**34**, 2.9 mg, 0.0004%),<sup>37, 38)</sup> lysicamine (**35**, 44.8 mg, 0.0075%), D,L-armepavine (**36**, 27.4 mg, 0.0210%),<sup>37)</sup> および pronuciferine (**37**, 8.3 mg, 0.0032%) を単離, 同定した (Chart 3)。



**Chart 2.** Isolation procedure (**27**, **29**, **30**, **35**, and **37**) from the flower buds of *N. nucifera*.



**Chart 3.** Isolation procedure (**26–37**) from the leaves of *N. nucifera*.

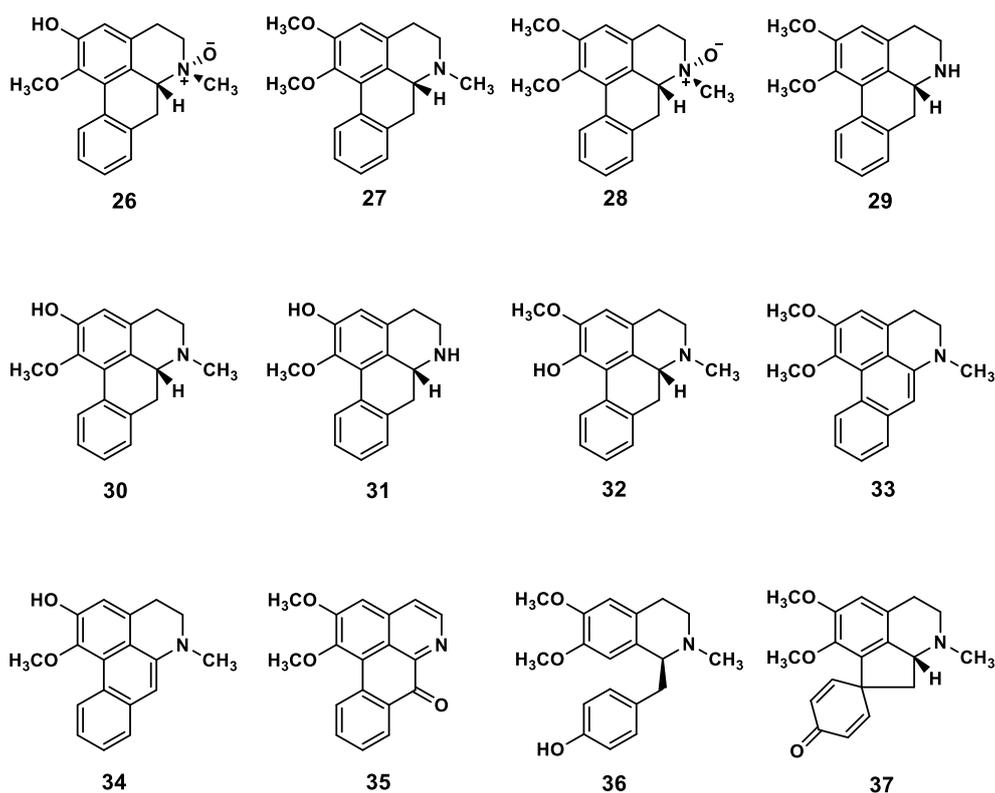
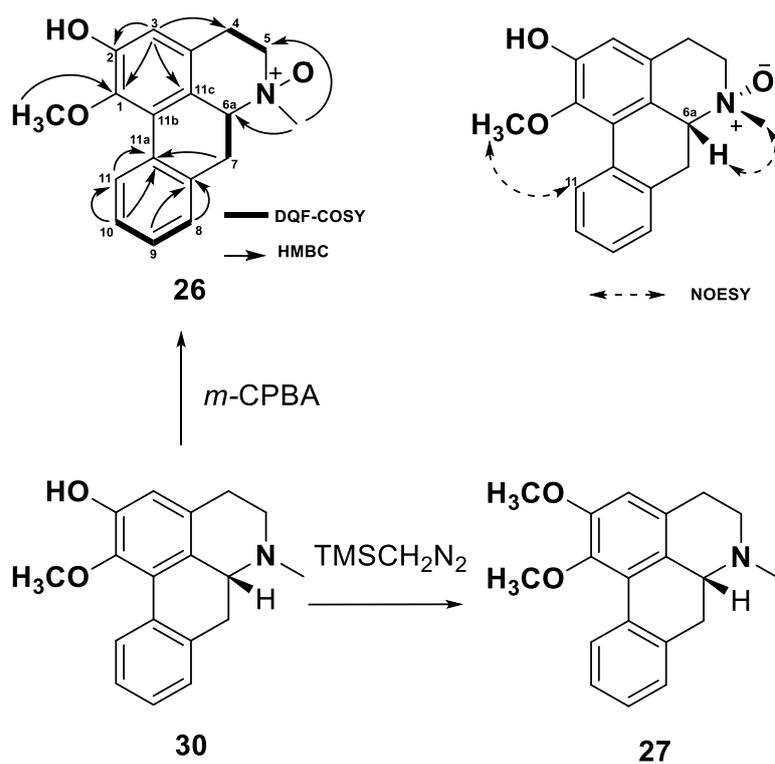


Figure 8. Isolated constituents (26–37) from *N. nucifera*.

## 第二節 新規成分の化学構造とイソキノリン型アルカロイドの合成

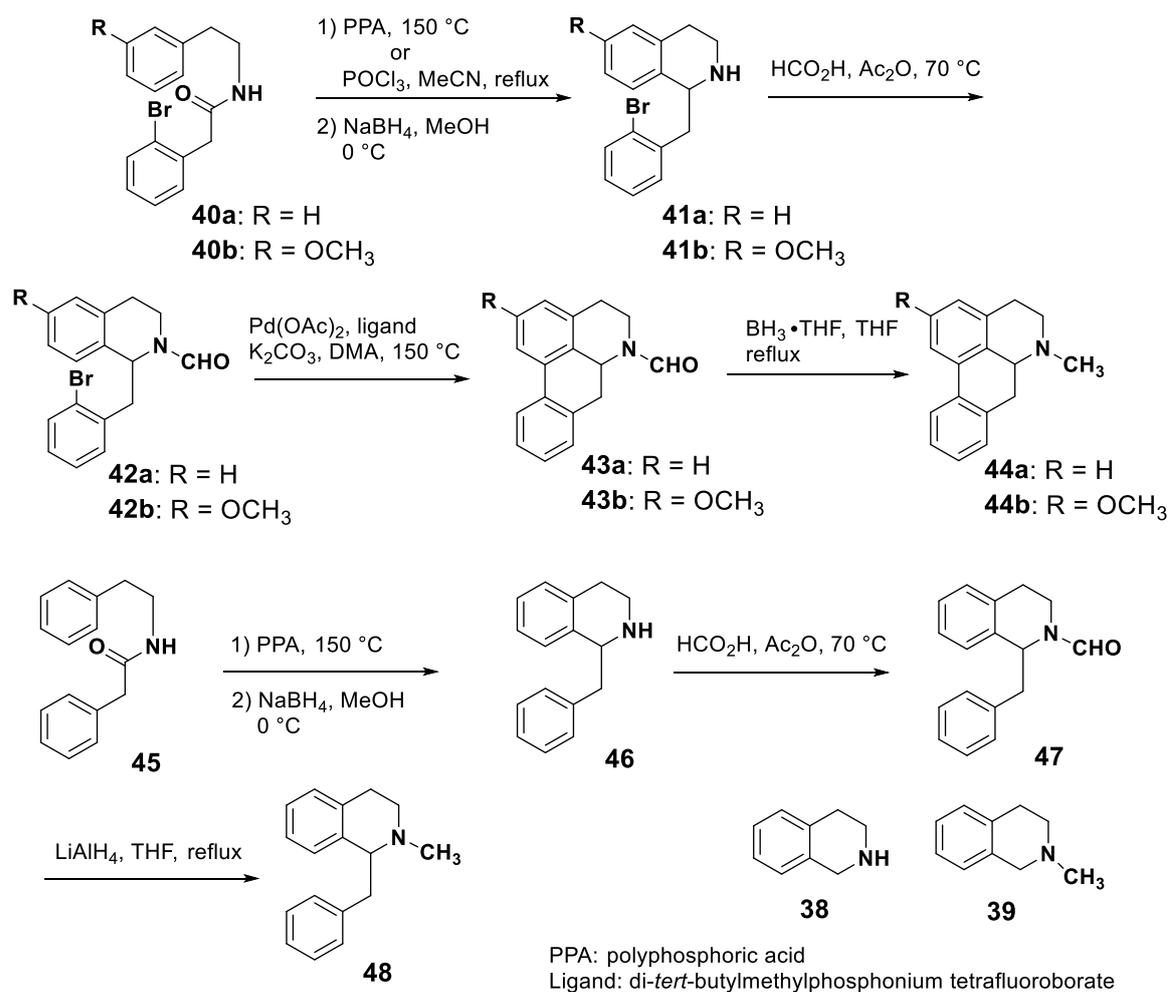
*N*-methylasimilobine *N*-oxide (**26**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25}$  -56 in MeOH) を示す淡黄色油状物質として得られた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  297 ( $M$ )<sup>+</sup> に観測され, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式 C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> を有することが明らかとなった. また IR スペクトルにおいて水酸基および芳香環の存在を示唆する吸収が認められた. <sup>1</sup>H- 及び <sup>13</sup>C-NMR スペクトルから, 1つのメトキシ [ $\delta$ 3.56 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>)] および 1つメチル [ $\delta$ 3.39 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)] の存在が示唆された. 2位付近以外の <sup>1</sup>H- および <sup>13</sup>C-NMR のケミカルシフトが既知アルカロイド *nuciferine N*-oxide (**28**) のものとほぼ一致していた (Table 6). 次に, HMBC および DQF スペクトルの詳細な解析により, 平面構造を決定した. 次に, NOESY 相関が 1-O CH<sub>3</sub> と H-11 および N-CH<sub>3</sub> と H-6a 間に観測されたことから, 相対配置を図中に示したものであると決定した. 絶対立体配置の決定を目的とし, *N*-methylasimilobine (**30**) を *m*-chloroperbenzoic acid と反応させ, 酸化させた結果 **26** を得ることができた. 加えて, Trimethylsilyldiazomethane を用いて *nuciferine N*-oxide (**30**) のフェノール性水酸基をメチル化し, 生成物の NMR スペクトルおよび旋光度を *niciferine* (**27**) と比較したところ, よく一致したことから, 6a 位の絶対立体配置を *R* と決定した (Figure 8). 以上の結果より, **26** はアポルフィン型アルカロイドの *N*-oxide であり, Figure 9 に示すようにその構造を決定した.



**Figure 9.** Structure determination of new compound (**26**).

**Table 6.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, methanol- $d_4$ ) data for **26**.

position	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $J$ in Hz)	position	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $J$ in Hz)
1	146.1		8	129.6	7.37 (d-like, 7.6)
2	151.8	5.33 (br-s)	9	128.5	7.25 (dd-like, 7.6, 7.6)
3	116.1	6.71 (s)	10	129.0	7.30 (dd-like, 7.6, 7.6)
3a	128.3		11	128.9	8.31 (d-like, 7.6)
4	25.3	2.76 (m)	11a	135.5	
		3.50 (m)	11b	128.4	
5	65.3	3.56 (m)	11c	122.1	
		3.73 (m)	N-CH <sub>3</sub>	58.1	3.39 (s)
6a	72.2	4.44 (dd, 4.0, 14.0)	O-CH <sub>3</sub>	60.6	3.56 (s)
7	30.8	a 3.20 (dd, 4.0, 13.7)			
		b 3.28 (m)			
7a	132.8				



**Scheme 2.** Synthesis of isoquinoline-type alkaloids.

次に、構造活性相関研究を目的とし、アポルフィン型アルカロイドおよびイソキノリンアルカロイドの合成を行った。すなわち、2-(bromophenyl)-*N*-(2-phenylethyl)acetamide (**40a**)あるいは2-(bromophenyl)-*N*-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]acetamide (**40b**)を出発原料に用い、ビシュラーナピエラルスキー反応および二重結合の還元を行い、**41a** および **41b** を得、ホルミル化を経てベンジルイソキノリン中間体 **42a**, **42b** を得た。さらに分子内にて溝呂木-ヘック反応および還元を行うことで、**44a** および **44b** をそれぞれ通算 5 行程、通算収率 26%、30% で合成することができた。また、アルカロイド **48** は、*N*-(2-phenylethyl)benzeneacetamide (**45**) から 4 行程、通算収率 79% で合成した (Scheme 2)。

### 第三節 含有成分および合成アルカロイドのメラニン生成抑制作用

蓮花、蓮葉、根部、おしべ、および種子 MeOH 抽出エキスを作成し、エキス共存下、メラニン生成抑制作用を評価した結果、蓮花および蓮葉 MeOH 抽出エキスに有意な活性が見られた [inhibition (%):  $29.8 \pm 3.2$  ( $P < 0.01$ ), および  $10.3 \pm 1.0$  ( $P < 0.01$ ) at  $10 \mu\text{g/mL}$ ]. そこで、蓮花および蓮葉において含有成分の探索を行い、結果として得られた 11 成分 (27–37) および合成により得られた 5 成分 (38, 39, 44a, 44b, および 48) のメラニン生成抑制作用の測定を行った (Table 7). 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の測定も行った (Table 8).

その結果、*N* 位にメチル基を有するアポルフィン型アルカロイド 27 ( $\text{IC}_{50}$  値 =  $15.8 \mu\text{M}$ ), 30 ( $14.5 \mu\text{M}$ ), 32 ( $19.3 \mu\text{M}$ ), 34 ( $13.3 \mu\text{M}$ ) が有意な抑制作用を示すことが明らかとなった. 一方, 28 (ca.  $43 \mu\text{M}$ ), 29 ( $62.9 \mu\text{M}$ ) は弱い活性しか示さず, 31 ( $>100 \mu\text{M}$ ) においてはほとんど作用が認められなかった. このことから、アポルフィン型アルカロイドにおいて、*N* 位のメチル基の存在は活性の発現に重要であることが明らかとなった. 合成アルカロイド 44a ( $\text{IC}_{50}$  値 =  $5.9 \mu\text{M}$ ) および 48 ( $5.0 \mu\text{M}$ ) は、強いメラニン抑制作用を示すことが明らかとなった. また、2 位にメトキシ基を有する 44b ( $2.0 \mu\text{M}$ ) は、36a および 38 に比べて強い抑制作用を示すことが分かった. 一方, 40 および 41 においては活性が認められなかった. これらの活性の比較から、ベンジルイソキノリンおよびアポルフィン骨格が作用の発現において必須であることやアポルフィン骨格の 2 位の酸素官能基の存在は作用を高めることが明らかとなった.

**Table 7.** Inhibitory effects of constituents from *N.nucifera* and synthesized compounds.

	Inhibition (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	Control	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	
<b>27</b>	0.0 $\pm$ 2.9	11.5 $\pm$ 0.2**	16.5 $\pm$ 1.7**	32.1 $\pm$ 1.5**	72.3 $\pm$ 2.8**	89.3 $\pm$ 0.5**	15.8
<b>28</b>	0.0 $\pm$ 5.8	-4.8 $\pm$ 4.2	-3.2 $\pm$ 7.5	-0.1 $\pm$ 5.7	33.7 $\pm$ 2.5**	88.4 $\pm$ 0.8**	-
<b>29</b>	0.0 $\pm$ 2.3	5.8 $\pm$ 1.7	16.2 $\pm$ 4.9**	12.1 $\pm$ 2.7*	17.6 $\pm$ 1.8**	91.9 $\pm$ 1.9**	62.9
<b>30</b>	0.0 $\pm$ 1.9	15.4 $\pm$ 3.8**	19.7 $\pm$ 2.5**	37.9 $\pm$ 1.7**	70.6 $\pm$ 1.0**	90.5 $\pm$ 1.2**	14.5
<b>31</b>	0.0 $\pm$ 2.1	7.4 $\pm$ 0.9	-7.4 $\pm$ 3.4	12.1 $\pm$ 4.5*	39.7 $\pm$ 1.8**	36.2 $\pm$ 1.8**	>100
<b>32</b>	0.0 $\pm$ 2.8	-2.6 $\pm$ 2.0	11.1 $\pm$ 2.0**	27.3 $\pm$ 1.1**	65.9 $\pm$ 0.7**	-	19.3
<b>33</b>	0.0 $\pm$ 7.2	14.5 $\pm$ 4.2	4.8 $\pm$ 2.3	11.8 $\pm$ 1.9	8.0 $\pm$ 5.1	78.4 $\pm$ 0.8**	84.7
<b>34</b>	0.0 $\pm$ 1.9	10.9 $\pm$ 1.3	13.2 $\pm$ 3.3*	37.6 $\pm$ 2.7**	87.4 $\pm$ 5.0**	78.7 $\pm$ 0.5**	13.3
<b>35</b>	0.0 $\pm$ 6.0	4.8 $\pm$ 3.7	8.7 $\pm$ 3.7	-1.5 $\pm$ 2.0	65.3 $\pm$ 0.9**	-	-
<b>36</b>	0.0 $\pm$ 2.8	7.5 $\pm$ 1.3	18.2 $\pm$ 3.5**	34.0 $\pm$ 1.5**	50.4 $\pm$ 1.9**	80.3 $\pm$ 1.2**	25.6
<b>37</b>	0.0 $\pm$ 2.4	4.0 $\pm$ 4.1	16.8 $\pm$ 2.7**	18.3 $\pm$ 2.6**	40.3 $\pm$ 0.9**	66.4 $\pm$ 0.6**	47.9
<b>38</b>	0.0 $\pm$ 0.8	-12.6 $\pm$ 3.1	-41.5 $\pm$ 4.4	-54.2 $\pm$ 2.3	2.8 $\pm$ 2.6	26.1 $\pm$ 3.4**	-
<b>39</b>	0.0 $\pm$ 4.2	10.6 $\pm$ 0.9	9.7 $\pm$ 3.5	9.4 $\pm$ 2.8	16.5 $\pm$ 2.0**	15.9 $\pm$ 0.8**	-
<b>44a</b>	0.0 $\pm$ 2.8	30.0 $\pm$ 1.9	42.7 $\pm$ 2.7	59.2 $\pm$ 1.4	72.2 $\pm$ 0.4	22.3 $\pm$ 3.0	5.9
<b>44b</b>	0.0 $\pm$ 1.8	39.1 $\pm$ 2.7**	54.7 $\pm$ 5.9**	76.0 $\pm$ 2.0**	82.5 $\pm$ 2.1**	-	2.0
<b>48</b>	0.0 $\pm$ 3.7	24.5 $\pm$ 1.0	40.5 $\pm$ 3.4	59.7 $\pm$ 1.6	51.8 $\pm$ 1.1	75.4 $\pm$ 0.8	5.0
	Inhibition (%)						
	Control	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	
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**	174

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

IC<sub>50</sub> values were determined graphically.

**Table 8.** Inhibitory effects of constituents from *N.nucifera* and synthesized compounds on proliferation.

	Inhibition (%)					
	Control	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>27</b>	100.0 $\pm$ 2.2	103.8 $\pm$ 2.8	105.4 $\pm$ 2.9	102.5 $\pm$ 3.5	92.4 $\pm$ 1.4	55.8 $\pm$ 2.1**
<b>28</b>	100.0 $\pm$ 3.9	99.5 $\pm$ 3.4	100.5 $\pm$ 2.7	95.9 $\pm$ 3.4	94.6 $\pm$ 1.9	88.2 $\pm$ 1.1*
<b>29</b>	100.0 $\pm$ 1.6	98.8 $\pm$ 3.5	101.2 $\pm$ 2.6	96.9 $\pm$ 1.9	87.4 $\pm$ 2.5**	89.3 $\pm$ 2.1*
<b>30</b>	100.0 $\pm$ 4.8	99.2 $\pm$ 2.7	98.2 $\pm$ 2.1	102.8 $\pm$ 2.7	114.9 $\pm$ 0.5**	82.5 $\pm$ 1.0**
<b>31</b>	100.0 $\pm$ 1.0	108.9 $\pm$ 8.7	96.9 $\pm$ 1.5	102.9 $\pm$ 2.2	105.0 $\pm$ 1.3	52.3 $\pm$ 1.0**
<b>32</b>	100.0 $\pm$ 2.2	98.7 $\pm$ 2.4	98.0 $\pm$ 3.5	103.4 $\pm$ 2.1	114.1 $\pm$ 3.2**	39.7 $\pm$ 0.7**
<b>33</b>	100.0 $\pm$ 2.0	103.6 $\pm$ 0.9**	98.9 $\pm$ 1.3	93.9 $\pm$ 4.2**	73.9 $\pm$ 1.5**	77.7 $\pm$ 2.2**
<b>34</b>	100.0 $\pm$ 1.6	106.3 $\pm$ 2.4	105.0 $\pm$ 3.9	105.6 $\pm$ 2.0	110.9 $\pm$ 1.7*	55.3 $\pm$ 2.2**
<b>35</b>	100.0 $\pm$ 1.9	97.4 $\pm$ 1.4	98.2 $\pm$ 1.3	82.2 $\pm$ 2.4**	69.6 $\pm$ 0.9*	22.5 $\pm$ 0.7**
<b>36</b>	100.0 $\pm$ 1.6	102.4 $\pm$ 1.9	108.3 $\pm$ 2.5	121.0 $\pm$ 2.1**	126.0 $\pm$ 2.7**	135.2 $\pm$ 6.9**
<b>37</b>	100.0 $\pm$ 1.1	100.9 $\pm$ 2.7	108.9 $\pm$ 2.6	104.5 $\pm$ 2.7	109.1 $\pm$ 6.4	93.0 $\pm$ 2.2
<b>38</b>	100.0 $\pm$ 1.0	101.8 $\pm$ 4.1	88.5 $\pm$ 2.6**	84.1 $\pm$ 2.4**	86.1 $\pm$ 1.7**	46.2 $\pm$ 1.0**
<b>39</b>	100.0 $\pm$ 1.7	106.9 $\pm$ 0.5	103.3 $\pm$ 4.4	103.8 $\pm$ 2.1	108.4 $\pm$ 1.5	103.3 $\pm$ 2.9
<b>44a</b>	100.0 $\pm$ 1.8	100.2 $\pm$ 3.8	105.9 $\pm$ 1.7	108.6 $\pm$ 2.2	95.1 $\pm$ 1.5	41.1 $\pm$ 2.1
<b>44b</b>	100.0 $\pm$ 0.4	100.2 $\pm$ 0.4	100.5 $\pm$ 1.2	98.0 $\pm$ 1.8	76.7 $\pm$ 1.3**	
<b>48</b>	100.0 $\pm$ 3.3	98.8 $\pm$ 2.2	97.6 $\pm$ 3.1	93.3 $\pm$ 1.1	68.8 $\pm$ 0.6	79.9 $\pm$ 3.7

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

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

IC<sub>50</sub> values were determined graphically.

### 第三章 中国産金針花の生体機能成分

#### 第一節 含有成分の抽出・単離

中国産ワスレグサの花蕾乾燥品 (800 g) を MeOH (3 L) で 3 回熱時抽出し, MeOH 抽出エキス (345.0 g, 49.3%) を得た. この MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O (1:1) で分配し, EtOAc 移行部 (26.0 g, 3.7%) と H<sub>2</sub>O 移行部を得た. さらに H<sub>2</sub>O 移行部を *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O (1:1) で分配し, *n*-BuOH 移行部 (30.0 g, 4.3%) と H<sub>2</sub>O 移行部 (288.0 g, 41.1%) を得た. *n*-BuOH 移行部を順相, 逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相 HPLC を用いて繰り返し分離精製することにより, 7 種の新規アルカロイド hemerocallisamine I (**49**, 0.001%), II (**50**, 0.00035%), III (**51**, 0.00085%), IV (**52**, 0.0024%), V (**53**, 0.00093%), VI (**54**, 0.00017%), および VII (**55**, 0.00047%) を単離, 構造決定 (Figure 10) するとともに, 7 種の既知化合物 fulvanine D (**56**, 0.0023%),<sup>47)</sup> methyl L-pyroglutamate (**57**, 0.0011%),<sup>48)</sup> 2-hydroxymethyl-5-furfural (**58**, 0.00013%),<sup>49)</sup> adenosine (**59**, 0.0029%),<sup>50)</sup> 2-deoxyadenosine (**60**, 0.00021%),<sup>51)</sup> uridine (**61**, 0.0028%),<sup>52)</sup> および thymidine (**62**, 0.0039%)<sup>53)</sup> を単離, 同定した (Figure 10, Chart 4).

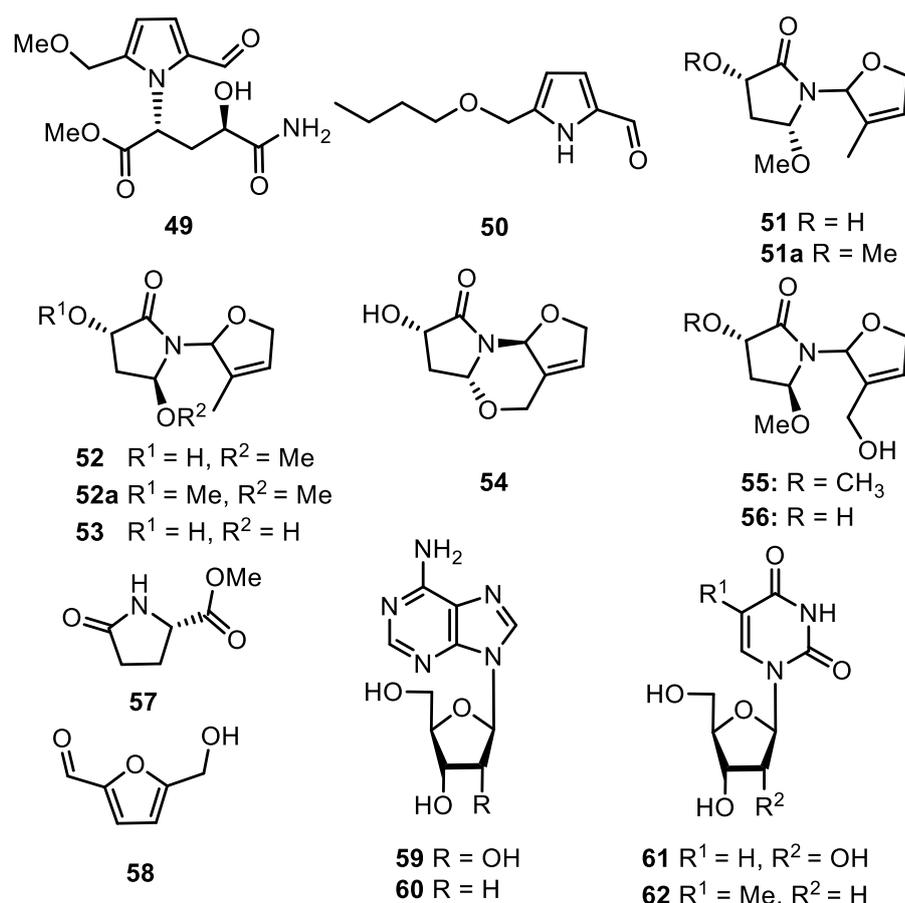
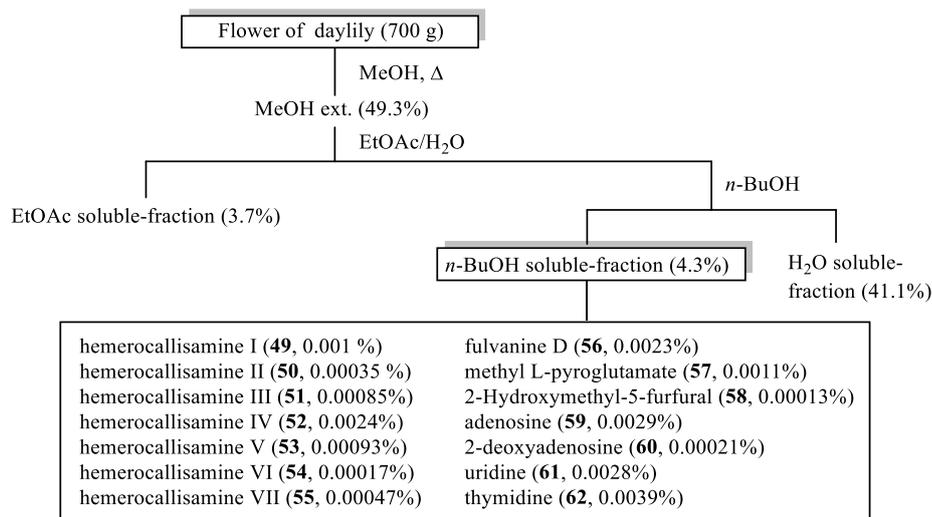


Figure 10. Constituents and derivatives from the flower buds of daylily (**56**–**62**).



**Chart 4.** Isolation procedure of constituents (**49–62**) from the flower buds of daylily.

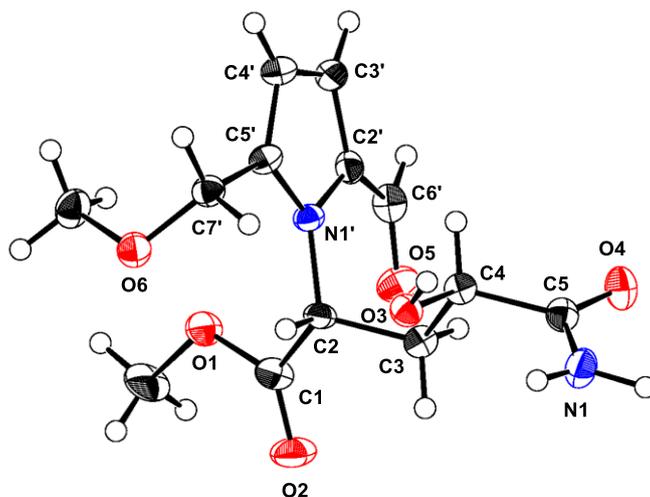
## 第二節 新規成分の化学構造

Hemerocallisamine I (**49**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25}$  -34 in MeOH) を示す無色の結晶として得られ、IR スペクトルからヒドロキシ基、ピロール、エステル、アルデヒド、アミド、およびエーテルに由来する吸収 (3400, 1745, 1730, 1684, 1074  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた。次に、EI-MS において、分子イオンピークが  $m/z$  298 ( $M^+$ ) に観測された。また、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$  を有することが明らかとなった。次に、 $^1\text{H}$  NMR (acetone- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ ) および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 9) データにおいて、4-ヒドロキシグルタミン {窒素原子に結合した1つのメチン [ $\delta$  5.33 (br-s, H-2)], 2つのメチレン [ $\delta$  2.42 (dd,  $J$  = 12.1, 12.1 Hz, H-3a), 2.51 (dd,  $J$  = 12.1, 12.1 Hz, H-3b)], および酸素官能基に結合した1つのメチン [ $\delta$  3.30 (m, H-4)]}, 2,5-置換ピロール {1つのオレフィン [ $\delta$  7.12 (d,  $J$  = 3.8 Hz, H-3') および 6.32 (d,  $J$  = 3.8 Hz, H-4')]}}, 2つのメトキシ基 [ $\delta$  3.58 (s, 1- $\text{OCH}_3$ ) および 3.23 (s, 7'- $\text{OCH}_3$ )], およびアルデヒド基 [ $\delta$  9.32 (s, H-6')] に由来するシグナルが観測された。2つのメトキシ、アルデヒド、2,5-置換ピロール、および4-ヒドロキシグルタミンの間の結合位置に関しては、DQF COSY, HMBC, および NOESY スペクトルの詳細な解析により決定した。すなわち、HMBC 相関が H-2 と C-1; H-3 と C-2, 4; H-4 と C-3, 5; H-3 と C-2', 5'; H-4' と C-7'; H-6' と C-2'; H-7' と C-5'; 1- $\text{OCH}_3$  と C-1; そして 7'- $\text{OCH}_3$  と C-7' 間に観測された。加えて、NOESY 相関が H-3 と H-6', 7' 間に観測された (Figure 12)。また、EtOH 溶液より、単結晶を得ることができたので、Mo- $K\alpha$  単結晶 X 線結晶構造解析を行った (Figure 11)。その結果から、相対立体配置を  $2R',4R'$  であると決定した。加えて、Flack parameter {absolute structure parameter = -0.0 (16)} から、絶対立体配置は  $2R,4R$  であることが示唆された。<sup>54)</sup> しかしながら、Mo- $K\alpha$  単結晶 X 線結晶構造解析においては、構造中に重原子を含まないことから誤差も大きく、信頼性に乏しい。一方で、同様に4-ヒドロキシグルタミンから生合成されたと考えられる化合物 **51–54** においては、グルタミンにおける4位の絶対

立体配置は改良モッシャー法によりすべて *S* であると決定している。よって、絶対立体配置の決定に関しては、確証を得るまでには至らなかった。これらの結果から、hemerocallisamide I (**49**) の化学構造を (2*R*',4*R*')-methyl-5-amino-2-(2-formyl-5-(methoxymethyl)-1*H*-pyrrol-1-yl)-4-hydroxy-5-oxopentanoate であると決定した。

**Table 9.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) and  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **49**. Measured in acetone- $d_6$  +  $\text{D}_2\text{O}$ .

Position	<b>49</b>	
	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J in Hz)
1	171.1	
2	56.2	5.33 (br-s)
3	37.3	2.42 (dd, 12.1, 12.1)
4	68.6	3.30 (m)
5	177.9	
2'	133.0	
3'	127.1	7.12 (d, 3.8)
4'	112.4	6.32 (d, 3.8)
5'	141.5	
6'	180.1	9.32 (s)
7'	65.7	4.41 (d, 13.1)
		4.72 (br-s)
1-OCH <sub>3</sub>	52.7	3.58 (s)
7'-OCH <sub>3</sub>	57.5	3.23 (s)



**Figure 11.** X-ray crystal structure of **49**.

Hemerocallisamine II (**50**) は白色非結晶粉末として得られ, IR スペクトルからピロール, アルデヒド, およびエーテルに由来する吸収 (3402, 1732, 1074  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  181 ( $\text{M}^+$ ) に観測された. また,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2$  を有することが明らかとなった. 次に,  $^1\text{H}$  NMR (chloroform-*d*) および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 10) データの詳細な解析により, 5-ヒドロキシピロール-2-カルボアルデヒドおよびブトキシ基の存在が明らかとなった. 5-ヒドロキシピロール-2-カルボアルデヒド部位における  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは, 6' 位を除いて hemerocallisamide I (**49**) の同一構造部位と良く一致した. ブトキシ基, アルデヒド, および 2,5-置換ピロールの結合位置は DQF COSY, HMBC, および NOESY スペクトルの詳細な解析により決定した. すなわち, HMBC 相関が H-3 と C-2, 5; H-4 と C-3, 5, 7; H-6 と C-2, 3; H-7 と C-5, 1'; H-1' と C-7, 2', 3'; および H-4' と C-2', 3' 間に観測されたことから, その平面構造を決定した (Figure 12). 以上の結果より, hemerocallisamine II (**50**) の化学構造が 5-(butoxymethyl)-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde であると決定した.

**Table 10.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) and  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **50**. Measured in chloroform-*d*.

Position	<b>50</b>	
	$\delta$ C	$\delta$ H (J in Hz)
2	132.7	
3	121.4	6.90 (d, 3.8)
4	109.2	6.19 (d, 3.8)
5	138.2	
6	178.8	9.47 (s)
7	65.4	4.52 (s)
1'	70.9	3.47 (dd, 8.3, 8.3)
2'	31.7	1.58 (m)
3'	19.3	1.36 (m)
4'	13.9	0.91 (dd, 7.3, 7.3)

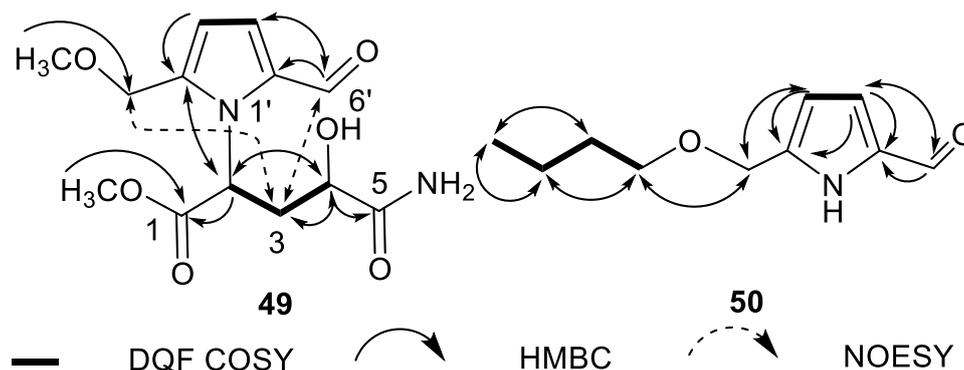
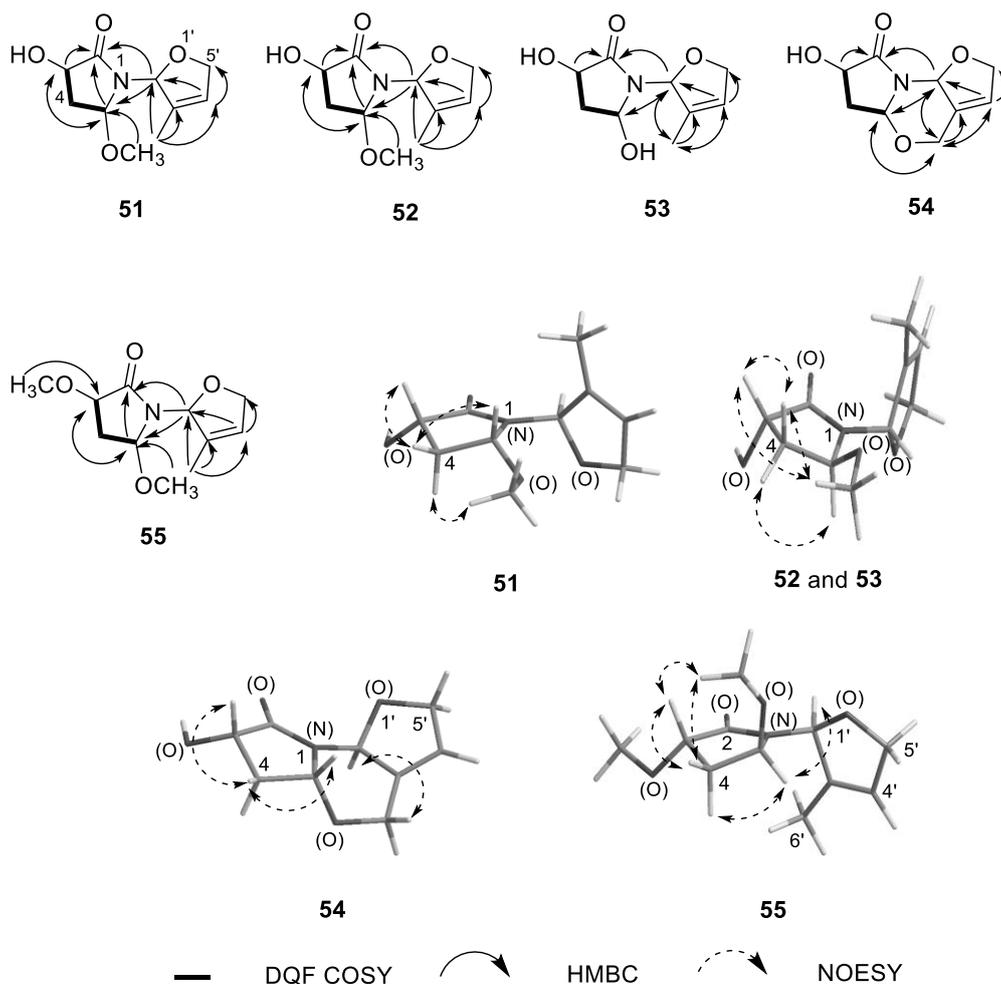


Figure 12. Important 2D NMR correlations of new compounds (**49** and **50**).

Hemerocallisamine III (**51**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} -112$  in MeOH) を示す無色の油状物質として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, アミド, およびエーテルに由来する吸収 ( $3635, 1716, 1105 \text{ cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z 213 (\text{M})^+$  に観測され,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  を有することが明らかとなった. 次に,  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ) および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 11, 12) データの詳細な解析により, 3,5-ジヒドロキシ- $\gamma$ -ラクタム {メチレン [ $\delta 1.75$  (ddd,  $J = 3.2, 5.0, 8.0$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 2.57 (ddd,  $J = 6.4, 5.0, 8.5$  Hz, H-4 $\beta$ )], 酸素原子に結合したメチン [ $\delta 4.18$  (dd,  $J = 8.5, 5.0$  Hz, H-3)], そして酸素および窒素原子に結合したメチン [ $\delta 4.89$  (dd,  $J = 3.2, 6.4$  Hz, H-3)]}, 2,5-ジヒドロフラン {メチレン [ $\delta 4.53$  (m, H-5' $\beta$ ), 4.70 (m, H-5' $\alpha$ )], メチル [ $\delta 1.69$  (s, H $_3$ -6')], 1 つのオレフィン [ $\delta 5.76$  (br-s, H-4')], そして酸素および窒素原子に結合したメチン [ $\delta 6.24$  (br-s, H-2')]}}, そしてメトキシ [ $\delta 3.23$  (s, 5-OCH $_3$ )] の存在が示唆された. 相対立体配置は, NOESY 相関が: H-3 と H-4 $\beta$ , 5-OCH $_3$ ; H-4 $\beta$  と 5-OCH $_3$ ; そして H-4 $\alpha$  と H-5, 間に観測されたことから, (3*S*',5*R*') であると決定した (Figure 13). 絶対立体配置は 3 位の水酸基に改良モッシャー法を適応させた結果, *S* 配置であることが明らかとなった (Figure 14). これらの結果から, hemerocallisamide III (**51**) の化学構造を (3*S*,5*R*)-1-(3-methyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-3-hydroxy-5-methoxypyrrolidin-2-one であると決定した.

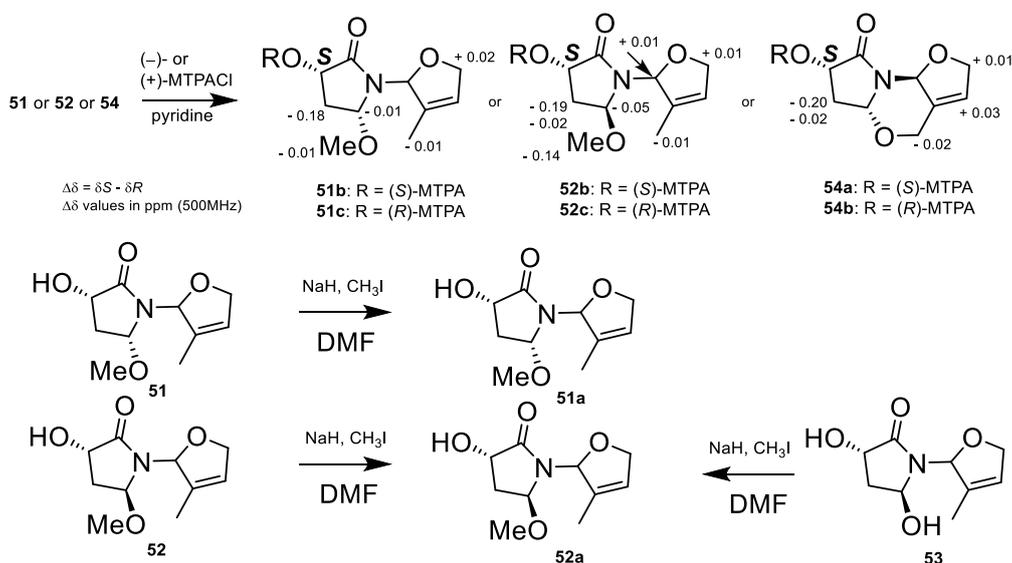


**Figure 13.** Important 2D NMR correlations of new compounds (**51**–**55**).

Hemerocallisamine IV (**52**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -35.2 in MeOH) を示す無色の油状物質として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, アミド, およびエーテルに由来する吸収 (3635, 1716, 1110  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  213 ( $\text{M}^+$ ) に観測され,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  を有することが明らかとなった. 次に,  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 11, 12) データの詳細な解析により, **51** と同様の平面構造を有することが明らかとなった. 相対立体配置は, NOESY 相関が: H-3 と H-4 $\beta$ ; H-4 $\beta$  と 5-OCH<sub>3</sub>; そして H-3 と 5-OCH<sub>3</sub>, 間に観測されたことから, (3*S*',5*S*') であると決定した (Figure 13). 絶対立体配置は 3 位の水酸基に改良モッシャー法を適応させた結果, *S* 配置であることが明らかとなった (Figure 14). これらの結果から, hemerocallisamide III (**52**) の化学構造を (3*S*, 5*S*)-1-(3-methyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-3-hydroxy-5-methoxypyrrolidin-2-one であると決定した.

Hemerocallisamine V (**53**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -25.2 in MeOH) を示す無色の油状物質として得られ, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  199 ( $\text{M}^+$ ) に観測され,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_4$  を有することが明らかとなった.

次に,  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 11, 12) データの詳細な解析により, fulvanine B<sup>55)</sup> と同様の平面構造を有することが明らかとなった. 相対立体配置は, NOESY 相関が: H-3 と H-4 $\beta$  および H-4 $\alpha$  と H-5 間に観測されたことから, (3*S'*,5*S'*) であると決定した (Figure 13). 絶対立体配置は 3 および 5 位の水酸基をメトキシ化した後, **51** および **52** の 3 位の水酸基をメトキシ化したものと, HPLC の保持時間および旋光度を比較することで決定した (Figure 14). すなわち, **51**, **52**, および **53** を 1,4-Dioxane 溶媒中にて NaH 共存下, Iodomethane と反応させることで, それぞれの化合物において 3 および 5 位 がメトキシ化された, 同一平面構造を有する化合物 **51a**, **52a**, **53a** を得た. 次に, それらの化合物を HPLC を用いて分析したところ, **52a** と **53a** は同一の保持時間を有している一方で, **51a** の保持時間は異なっていた. 加えて, それらの化合物はすべて負の旋光度を有していたことから, **53** の絶対立体配置を (3*S*,5*S*) であると決定した. これらの結果から, hemerocallisamide V (**53**) の化学構造を (3*S*,5*S*)-1-(3-methyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-3,5-dihydroxypyrrolidin-2-one であると決定した.



**Figure 14.** Determination of the absolute configuration of **51** – **54**.

Hemerocallisamine VI (**54**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +80.2$  in MeOH) を示す無色の油状物質として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, アミド, およびエーテルに由来する吸収 (3629, 1700, 1167  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  197 ( $\text{M}^+$ ) に観測され,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$  を有することが明らかとなった. 次に,  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 11, 12) データの詳細な解析により, fulvanine E ( $[\alpha]_{\text{D}} +1.35$  ( $c=0.2$ , in MeOH)<sup>17)</sup> と同様の平面構造および相対立体配置を有することが明らかとなった. 絶対立体配置は 3 位の水酸基に改良モッシャー法を適応させた結果, *S* 配置であることが明らかとなった (Figure 14). これらの結果から, hemerocallisamide VI (**54**) の化学構造を図中に示したのもであると決定した (Figure 10).

Hemerocallisamine VII (**55**) は負の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25}$  -26.0 in MeOH) を示す無色の油状物質として得られ, IR スペクトルからヒドロキシ基, アミド, およびエーテルに由来する吸収 (3635, 1717, 1108  $\text{cm}^{-1}$ ) が認められた. 次に, EI-MS において, 分子イオンピークが  $m/z$  243 ( $\text{M}^+$ ) に観測され,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルおよび高分解能 EI-MS により分子式  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_4$  を有することが明らかとなった. 次に,  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ) および  $^{13}\text{C}$  NMR (Table 11, 12) データの詳細な解析により, 3,5-ジヒドロキシ- $\gamma$ -ラクタム {2 つのメチレン [ $\delta$  1.77 (dd-like,  $J=7.6, 9.0$  Hz, H-4 $\alpha$ ), 2.38 (dd-like,  $J=5.8, 7.6$  Hz, H-4 $\beta$ )], 酸素原子に結合したメチン [ $\delta$  4.16 (d-like,  $J=9.0$  Hz, H-3)], そして酸素および窒素原子に結合したメチン [ $\delta$  4.73 (d-like,  $J=5.8$  Hz, H-3)]}, 2,5-ジヒドロフラン {メチレン [ $\delta$  4.50 (m, H-5'a), 4.73 (m, H-5'b)], 酸素官能基の結合したメチレン [ $\delta$  4.07 (s, H<sub>3</sub>-6')], オレフィン [ $\delta$  5.98 (br-s, H-4')], そして酸素および窒素原子に結合したメチン [ $\delta$  6.32 (br-s, H-2')]}}, そして 2 つのメトキシ [ $\delta$  3.15 (s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.42 (s, 3-OCH<sub>3</sub>)] の存在が示唆された. 次に, 3,5-ジヒドロキシ- $\gamma$ -ラクタム, 2,5-ジヒドロフラン, および 2 つのメトキシ基の位置は, 各種 2D-NMR スペクトルの詳細な解析により決定した. また, 相対立体配置は, NOESY 相関が: H-3 と H-4 $\beta$ ; H-4 $\beta$  と 5-OCH<sub>3</sub>; H-4 $\alpha$  と H-5; および 3-OCH<sub>3</sub> と H-4 $\alpha$  の間に観測されたことから, (3*S'*, 5*R'*) であると決定した (Figure 14). これらの結果から, hemerocallisamide VI (**55**) の化学構造が, (3*S'*, 5*S'*)-1-(3-hydroxymethyl-2,5-dihydrofuran-2-yl)-3,5-dimethoxypyrrolidin-2-one であると決定した.

**Table 11.**  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) spectroscopic data for compound **51** – **55**. Measured in methanol- $d_4$ .

Position	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>
2	176.9	178.5	178.1	177.0	176.1
3	70.0	69.5	69.6	68.9	77.7
4	35.8	36.1	40.3	36.4	34.1
5	87.8	86.6	78.8	81.7	86.7
2'	91.4	90.7	91.1	87.8	88.5
3'	136.4	132.7	132.8	132.5	140.7
4'	127.8	128.2	127.8	129.1	125.9
5'	75.4	75.4	75.4	76.7	76.2
6'	11.7	11.8	11.7	64.3	58.3
3-OMe					58.5
5-OMe	55.4	54.1			55.6

**Table 12.** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **51** – **55**. Measured in methanol-*d*<sub>4</sub>.

	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>
Position	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)				
3	4.18 (dd, 8.5, 5.0)	4.56 (d-like, 6.1)	4.18 (dd, 8.5, 5.0)	4.27 (dd, 9.9, 4.0)	4.16 (d-like, 9.0)
4 $\alpha$	1.75 (ddd, 8.0, 5.0, 3.2)	1.84 (dd-like, 6.1, 8.0)	1.75 (ddd, 3.2, 5.0, 8.0)	1.68 (ddd, 3.7, 7.4, 9.9)	1.77 (dd-like, 7.6, 9.0)
4 $\beta$	2.57(ddd, 8.5, 8.0, 6.4)	2.45 (ddd, 5.8, 6.0, 8.0)	2.52 (ddd, 6.4, 8.0, 8.5)	2.76 (ddd, 4.0, 7.4, 9.9)	2.38 (dd-like, 5.8, 7.6)
5	4.89 (dd, 6.4, 3.2)	5.05 (d-like, 5.8)	4.89 (dd, 6.4, 3.2)	5.05 (dd, 9.9, 3.7)	4.73 (d-like, 5.8)
2'	6.24 (br-s)	6.29 (br-s)	6.24 (br-s)	6.13 (br-s)	6.32 (br-s)
4'	5.76 (br-s)	5.98 (br-s)	5.76 (br-s)	6.19 (br-s)	5.98 (br-s)
5'a	4.70 (m)	4.57 (m)	4.70 (m)	4.72 (d-like, 13.0)	4.73 (m)
5'b	4.53 (m)	4.46 (m)	4.53 (m)	4.58 (d-like, 13.0)	4.50 (m)
6'	1.69 (s)	1.69 (s)	1.69 (s)	4.69 (s)	4.07 (d, 5.4)
3-OMe					3.42 (s)
5-OMe	3.23 (s)	3.24 (s)			3.15 (s)

### 第三節 含有成分の PC12 細胞突起伸長促進様作用および A $\beta$ 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。加えて、 $\beta$ セクレターゼおよび  $\gamma$ 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  $\beta$ タンパクが凝集したアミロイド  $\beta$ 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。また、金針花は沖縄において古来より睡眠を改善する作用があると伝承されていることから、含有成分の一部が脳に移行して作用を発現している可能性があるとともに、得られた 1-butanol 可溶分画が有意な A $\beta$ 凝集抑制作用 [inhibition (%): 12.2 $\pm$ 0.6 ( $p$ <0.01) at 100  $\mu$ g/mL]を示したことから、含有成分の PC12 細胞分化促進作用および A $\beta$ 凝集抑制作用の検討を行った。PC12 細胞はラット褐色細胞腫から得られ、神経分化の研究におけるモデルとして用いられている。<sup>56)</sup>

1 ng/mL の NGF 共存下、各種濃度のテストサンプルとともに 2 日間インキュベートした後、細胞の直系以上の突起伸長が見られたものを分化したとみなし、その割合を算出した。比較対照薬としては、神経細胞分化促進作用の報告されているドネペジルを用いた。その結果、新規アルカロイド類には有意な活性が見られなかった一方で、ヌクレオシドには有意な活性が見られた。中でも、糖の 2 位がデオキシ化された化合物 **60** [Ratio vs control: 3.88 $\pm$ 0.61 ( $p$ <0.05) at 100  $\mu$ M] および **62** [Ratio vs control: 1.87 $\pm$ 0.07 ( $p$ <0.01) at 1  $\mu$ M, 1.99 $\pm$ 0.24 ( $p$ <0.01) at 10  $\mu$ M, and 2.47 $\pm$ 0.21 ( $p$ <0.01) at 100  $\mu$ M] は化合物 **59** [Ratio vs control: 1.45 $\pm$ 0.10 ( $p$ <0.05) at 100  $\mu$ M] および **61** [Ratio vs control: 1.44 $\pm$ 0.27 at 100  $\mu$ M]と比較して、より高い割合での分化が見られた。加えて、デオキシヌクレオシド共存化の分化率は、同濃度でのド

ネペジル [Ratio vs control: 1.23±0.16 at 1  $\mu$ M, 1.89±0.28 ( $p<0.05$ ) at 10  $\mu$ M, and 2.42±0.70 ( $p<0.05$ ) at 100  $\mu$ M] よりも高い割合であった (Table 13).

**Table 13.** Neurite outgrowth in PC12 cells (VS control) of nucleoside constituents of daylily.

NGF (ng/mL)	0	1	1	1	1	50
Sample ( $\mu$ M)	0	0	1	10	100	0
<b>59</b>	0.29±0.05	1.00±0.13	1.03±0.09	0.88±0.06	1.44±0.27	2.66±0.18**
<b>60</b>	0.05±0.05	1.00±0.42	1.03±0.09	1.29±0.19	3.88±0.61*	12.21±1.28**
<b>61</b>	0.49±0.06	1.00±0.08	1.45±0.08*	1.30±0.04	1.45±0.10*	3.01±0.17**
<b>62</b>	0.52±0.11	1.00±0.19	1.87±0.07**	1.99±0.24**	2.47±0.21**	4.35±0.15**

次に、得られたアルカロイド **49**, **52**, **56**, および **57** の  $A\beta$  凝集抑制作用の検討を行った。すなわち、終濃度 0.1 mM のチオフラビンおよび各種濃度のテストサンプルとともに  $A\beta_{42}$  を30分間インキュベートした後、蛍光強度を測定することで凝集率の指標とした。その結果、 $\gamma$ ラクタム環を構造中に有する化合物 **52**, **56**, および **57** が有意な活性を示した [inhibition (%) **52**: 29.0±12.9 ( $p<0.01$ ), **56**: 28.6±11.8 ( $p<0.01$ ), および **57**: 55.7±8.0 ( $p<0.01$ ) at 100  $\mu$ M, respectively]. 中でも、化合物 **57** の活性は比較対象薬として用いた morin [inhibition (%): 34.0±7.8 ( $p<0.01$ ) at 100  $\mu$ M] と同程度の阻害率を示した。

## 結論

### 1. タイ産イランイランノキ (*Cananga odorata*) 花部

1) タイ産イランイランノキ花部 MeOH 抽出エキスより, 8 種の新規化合物 canangalignans I, II (**1, 2**) および canangaterpene I–VI (**3–8**) を単離し, その化学構造を決定した.

2) MeOH 抽出エキスおよび含有成分であるセスキテルペン類に, マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 を指標として用いたメラニン生成抑制作用が見られた. 構造活性相関から, 含有する二環式セスキテルペン類において, 環の結合様式がトランス体であることや, 環上のカルボニル基の存在が活性の発現には重要であることが明らかとなった. 加えて, Log P の計算値と活性の比較検討を行った結果, 活性の発現には Log P=2–3 である必要があると示唆された.

3) MeOH 抽出エキス, モノテルペン誘導体, およびフラボノイド類に有意なアルドース還元酵素阻害作用が見いだされた. また, クマロイル基を有するモノテルペンやカフェ酸と比較して, カフェオイル基を有するモノテルペン誘導体が低濃度で活性を発現することや, フラボノイド配糖体の活性の発現にアシル基の数が寄与していることを見出した.

### 2. タイ産蓮花および蓮葉 (*Nelumbo nucifera*, 花部および葉部)

1) タイ産蓮葉 MeOH 抽出エキスより, 1 種の新規アポルフィン型アルカロイド *N*-methylasimilobine *N*-oxide (**26**) を単離し, その化学構造を決定した.

2) 単離したアポルフィン型アルカロイド類および合成により得られたイソキノリン型アルカロイドは, 有意なメラニン生成抑制作用を有することを明らかとした. アポルフィン型アルカロイドにおける *N* 位のメチル基や, イソキノリン型アルカロイド類におけるベンジル基は, 低濃度で活性を発現する上で重要であることが示唆された.

### 3. 中国産金針花

1) 金針花 MeOH 抽出エキスより, 7 種の新規アルカロイド hemerocallisamine I–VI (**49–55**) を単離し, その化学構造を決定した. 中でも, hemerocallisamine I (**49**) は, 類似した構造を有する化合物が報告されていない珍しいアルカロイド成分であった.

2) 含有成分であるヌクレオシド類が有意な PC12 細胞分化促進作用を,  $\gamma$ -ラクタム環を有するアルカロイド類が A $\beta$  凝集抑制作用を有することを見出した.

## 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 吉川雅之名誉教授、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。

X 線結晶構造解析および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 小川俊次郎講師、織田佳代子講師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) 及び質量分析 (FAB-MS, EI-MS) は、JEOL JMS-SX 102 及び JMS-GCMATE 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 ( $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$ ) は、JEOL JNM-LA500 (500 MHz) 及び JEOLK-600 (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 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 60F<sub>254</sub> (Merck, 順相), RP-18 60F<sub>254</sub> (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 (和光純薬社製試薬), 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。

試薬は特に明記しないものは和光純薬社製試薬 (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

#### タイ産イランイランノキ (*Cananga odorata*, 4.0 kg) 花部含有成分の抽出・単離

タイ産イランイランノキ (*Cananga odorata*, 4.0 kg) 花部を 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 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 (1575 g, 花蕾乾燥品から収率 39.4 %) を得た。得られた MeOH 抽出エキスの一部 (210 g) を EtOAc と H<sub>2</sub>O で分配抽出し、さらに *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O で分配抽出し、EtOAc 移行部 (52 g, 9.8 %), H<sub>2</sub>O 移行部 (58 g, 10.9 %) および *n*-BuOH 移行部 (100 g, 18.8 %) を得た。

得られた *n*-BuOH 移行部 (100.0 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [2.5 kg, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:0 → 50:1 → 10:1 → 5:1 → 1:1 → 1:2, v/v) → MeOH] にて分画し、[Fr.B1 (1.4 g), Fr.B2 (6.2 g), Fr.B3 (1.2 g), Fr.B4 (6.6 g), Fr.B5 (8.4 g), Fr.B6 (6.2 g), Fr.B7 (30.1 g), Fr.B8 (6.8 g), Fr.B9 (2.3 g)] を得た。Fraction B4 (6.6 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [150 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1, v/v) → MeOH] を用いて分画し、[Fr.B4-1, Fr.B4-2, Fr.B4-3, Fr.B4-4, Fr.B4-5, Fr.B4-6, Fr.B4-7, Fr.B4-8 (463.7 mg)] を得た。Fraction B4-4 (463.7 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (60:40, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し、**4** (12.8 mg) および **5** (11.1 mg) を得た。Fraction B7 (30.1 g) をさらに逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [1 kg, MeOH-H<sub>2</sub>O (3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3, v/v) → MeOH] にて分画し、[Fr.B7-1, Fr.B7-2, Fr.B7-3 (6.2 g), Fr.B7-4 (573 mg), Fr.B7-5, Fr.B7-6, Fr.B7-7, Fr.B7-8] を得た。Fraction B7-3 (6.2 g) をさらに逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [180.0 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5, v/v) → MeOH] にて分画し、[Fr.B7-3-1, Fr.B7-3-2, Fr.B7-3-3, Fr.B7-3-4, Fr.B7-3-5 (1.5 g), Fr.B7-3-6] を得た。Fraction B7-3-5 (1.5 g) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH (80:20, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] により精製することで、**1** (275.5 mg), **2** (8.1 mg), **9** (20.5 mg), **11** (21.3 mg) を得た。Fraction B7-4 (573 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH (80:20, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し、**18** (8.6 mg), **19** (1.6 mg), **20** (57.4 mg) および **21** (3.3 mg) を得た。EtOAc 移行部 (50.0 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [3.0 kg, *n*-hexane → *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub> (5:1 → 2:1, v/v) → CHCl<sub>3</sub>-MeOH (200:1 → 100:1 → 50:1 → 10:1 → 3:1, v/v) → MeOH] により分画することで、7 つの分画 [Fr.E1 (7.5 g), Fr.E2 (3.9 g), Fr.E3 (3.6 g), Fr.E4 (27.6 g), Fr.E5 (6.6 g), Fr.E6 (16.8 g), Fr.E7 (10.0 g)] を得た。Fraction E4 (27.6 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [900.0 g, MeCN-H<sub>2</sub>O (4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1, v/v) → MeCN] にて分画し、7 つのフラクション [Fr.E4-1, Fr.E4-2 (0.73g), Fr.E4-3 (1.0 g), Fr.E4-4 (0.84g), Fr.E4-5, Fr.E4-6 (1.5 g), Fr.E4-7] を得た。Fraction E4-2 (0.73 g) をさらに、HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN-AcOH (650:350:3, v/v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] によって精製し

**16** (10.0 mg) を得た. Fraction E4-3 (1.0 g) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH-AcOH (800: 200: 3, v/v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] によって精製し, **7** (6.3 mg), **8** (8.1 mg), **12** (15.2 mg), **13** (14.8 mg) および **15** (8.9 mg) を得た. Fraction E4-4 (0.84 g) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH-AcOH (500: 500: 3, v/v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] により精製し, **14** (22.3 mg) および **17** (29.2 mg) を得た. Fraction E4-6 (1.5 g) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH-AcOH (320: 680: 3, v/v/v)] を用いて精製し, **6** (8.9 mg) を得た. Fraction E6 (16.8 g) をさらに逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [500 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1, v/v) → MeOH] を用いて精製し, [Fr.E6-1, Fr.E6-2, Fr.E6-3, Fr.E6-4 (1.2 g), Fr.E6-5, Fr.E6-6 (1.6 g), Fr.E6-7] を得た. Fraction E6-4 (1.2 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.2 g, *n*-hexane- EtOAc (2:1 → 1:1 → 1:2, v/v) → EtOAc-MeOH (1:1, v/v) → MeOH] により分画し, [Fr.E6-4-1, Fr.E6-4-2, Fr.E6-4-3 (130 mg), Fr.E6-4-4 (225 mg), Fr.E6-4-5 (399 mg)] を得た. Fraction E6-4-2 (399.0 mg) を HPLC [H<sub>2</sub>O-MeOH (45: 55, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] により精製し, **24** (7.4 mg) を得た. Fraction E6-4-3 (225.0 mg) を HPLC [H<sub>2</sub>O-MeOH (45: 55, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を用いて精製し, **22** (5.8 mg) および **25** (21.2 mg) を得た. Fraction E6-4-5 (399 mg) を HPLC [H<sub>2</sub>O-MeCN-AcOH (670: 330: 3, v/v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] により精製することで **3** (14.0 mg) および **10** (8.2 mg) を得た. Fraction E6-6 (1.55 g) はさらに逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [150 g, H<sub>2</sub>O-MeOH (5:5 → 4:6 → 2:8, v/v) → MeOH] により分画し, [Fr.E6-6-1, Fr.E6-6-2, Fr.E6-6-3 (88.5 mg), Fr.E6-6-4] を得た. Fraction E6-6-3 (88.5 mg) を HPLC [H<sub>2</sub>O-MeCN (6: 4, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] により精製し, **23** (7.1 mg) を得た.

## 第二節の実験

### 新規成分の化学構造

Canangalignan I (**1**): amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +25.3$  (*c* 0.61, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  200.0 nm (log  $\epsilon$  4.20), 314.0 nm (log  $\epsilon$  4.22); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3400, 1703, 1682, 1601, 1512, 1075  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 600 MHz,  $\delta$ ) 1.21 (2H, m, H-6<sup>'''</sup> $\alpha$ , 6<sup>''''</sup> $\alpha$ ), 1.28 (2H, m, H-5<sup>'''</sup> $\beta$ , 5<sup>''''</sup> $\beta$ ), 1.62 (2H, m, H-4<sup>'''</sup>, 4<sup>''''</sup>), 1.76 (2H, m, H-3<sup>'''</sup> $\alpha$ , 3<sup>''''</sup> $\alpha$ ), 2.29 (2H, dd-like, H-6<sup>'''</sup> $\beta$ , 6<sup>''''</sup> $\beta$ ), 3.24 (2H, m, H-2<sup>'''</sup>, 2<sup>''''</sup>), 3.30 (4H, m, H-5<sup>'''</sup> $\alpha$ , 5<sup>''''</sup> $\alpha$ , 4<sup>'''</sup>, 4<sup>''''</sup>), 3.34 (4H, m, H-3<sup>'''</sup> $\beta$ , 3<sup>''''</sup> $\beta$ , 5<sup>'''</sup>, 5<sup>''''</sup>), 3.70 (2H, m, H-2<sup>'''</sup>, 2<sup>''''</sup>), 3.84 (4H, d, *J* = 12.4 Hz, H-6<sup>'''</sup>, 6<sup>''''</sup>), 3.86 (2H, m, H-10<sup>'''</sup>a, 10<sup>''''</sup>a), 3.96 (2H, m, H-10<sup>'''</sup>b, 10<sup>''''</sup>b), 4.46 (2H, d, *J* = 7.8, H-1<sup>'''</sup>, 1<sup>''''</sup>), 4.56 (2H, d, *J* = 6.2 Hz, H-8<sup>'''</sup>, 8<sup>''''</sup>), 6.42 (2H, d, *J* = 6.2, H-9<sup>'''</sup>, 9<sup>''''</sup>), 6.68 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.71 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3'', 5''), 6.92 (1H, dd, *J* = 1.9, 8.6 Hz, H-6'), 7.07 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2'), 7.41 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2'', 6''), 7.73 (1H, s, H-1), 7.80 (1H, s, H-4), 9.76 (2H, s, H-7<sup>'''</sup>, 7<sup>''''</sup>); <sup>13</sup>C NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz)  $\delta$  given in Table 1; positive-ion FABMS *m/z* 1053 [M + Na]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 1053.3580 (calcd for C<sub>50</sub>H<sub>62</sub>O<sub>23</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>, 1053.3574).

Canangalignan II (**2**): amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +32.8$  (*c* 0.51, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  226.0 nm (log  $\epsilon$  4.20), 331.0 nm (log  $\epsilon$  4.33); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3400, 1701, 1685, 1508, 1075  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.21 (2H, m, H-6'' $\alpha$ , 6''' $\alpha$ ), 1.27 (2H, m, H-5'' $\beta$ , 5''' $\beta$ ), 1.62 (2H, m, H-4'', 4'''), 1.87 (2H, m, H-3'' $\alpha$ , 3''' $\alpha$ ), 2.27 (2H, m, H-6'' $\beta$ , 6''' $\beta$ ), 3.22 (2H, m, H-2''', 2'''), 3.27 (4H, m, H-5'' $\alpha$ , 5''' $\alpha$ , 4''', 4'''), 3.30 (4H, m, H-3'' $\beta$ , 3''' $\beta$ , 5''', 5'''), 3.60 (2H, m, H-2'', 2'''), 3.80 (4H, d, *J* = 10.4 Hz, H-6''', 6'''), 3.82 (2H, m, H-10''b, 10'''b), 3.86 (2H, m, H-10''a, 10'''a), 4.42 (2H, d, *J* = 7.8, H-1''', 1'''), 4.56 (2H, d, *J* = 6.5 Hz, H-8'', 8'''), 6.38 (2H, d, *J* = 6.5, H-9'', 9'''), 6.46 (1H, s, H-5), 6.59 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 6.78 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.80 (1H, s, H-8), 7.52 (1H, s, H-1), 7.78 (2H, d, *J* = 8.55 Hz, H-2', 6'), 9.74, 9.77 (2H, s, H-7'', 7''');  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz)  $\delta$  given in Table 1; CD  $\Delta\epsilon$  (nm) -1.6 (203), -2.1 (230), +2.2 (257), -0.2 (293), +0.1(311), -2.7 (340) (*c*  $8.00 \times 10^{-5}$  M, MeOH); positive-ion FABMS *m/z* 1053 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 1053.3573 (calcd for C<sub>50</sub>H<sub>62</sub>O<sub>23</sub>Na [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 1053.3574).

Canangaterpene I (**3**): Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -2.1^\circ$  (*c* 0.43, MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3400, 1716, 1508, 1456  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.11 (m, H-9 $\beta$ ), 1.26 (m, H-10 $\alpha$ ), 1.33 (m, H-7 $\beta$ ), 1.52 (m, H-9 $\alpha$ ), 1.68 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4 $\alpha$ ), 1.84 (m, H-8), 1.91 (m, H-7 $\alpha$ ), 2.12 (m, H-10 $\beta$ ), 2.22 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4 $\beta$ ), 3.37 (s, 3-OMe), 3.38 (s, 1-OMe), 3.39 (m, H-6), 4.03 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-11), 4.89 (s, H-1), 5.07 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-3), 6.23 (d, *J* = 15.5 Hz, H-8'), 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.92 (d, *J* = 8.3 Hz, H-6'), 7.03 (s, H-2'), 7.51 (d, *J* = 15.5 Hz, H-7');  $^{13}\text{C}$  NMR: given in Table 2; EI-MS: *m/z* 408 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HR-EI-MS: *m/z* 408.1788 (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>: *m/z* 408.1784).

Canangaterpene II (**6**): colorless crystal;  $[\alpha]_D^{25} +25.2$  (*c* 0.45, MeOH); IR (film)  $\nu_{\max}$  3400, 1716, 1508  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$  0.96 (3H, s, H-15), 0.98 (3H, s, H-14), 1.11 (3H, s, H-13), 1.26 (1H, m, H-10 $\beta$ ), 1.40 (1H, m, H-6 $\beta$ ), 1.46 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 1.53 (1H, m, H-6 $\alpha$ ), 1.58 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 1.59 (1H, m, H-5), 1.64 (1H, m, H-11 $\alpha$ ), 1.65 (1H, m, H-12 $\beta$ ), 1.68 (1H, m, H-3 $\alpha$ ), 1.69 (1H, m, H-10 $\alpha$ ), 1.92 (1H, dd, *J* = 6.2, 8.2 Hz, H-3 $\beta$ ), 2.03 (1H, m, H-11 $\beta$ ), 2.30 (1H, m, H-7 $\alpha$ ), 3.34 (1H, m, H-9), 5.09 (1H, dd, *J* = 6.2, 8.2, H-2), 7.43 (2H, dd, *J* = 7.6, 7.6 Hz, H-3', 5'), 7.55 (1H, dd, *J* = 7.6, 7.6, H-4'), 8.03 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2', 6');  $^{13}\text{C}$  NMR (chloroform-*d*, 125 MHz)  $\delta$  given in Table 2; EIMS *m/z* 342 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS *m/z* 342.21981 (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, 342.21948).

Canangaterpene III (**7**): colorless oil;  $[\alpha]_D^{25} +25.2$  (*c* 0.45, MeOH); IR (film)  $\nu_{\max}$  3410, 1684, 1509  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$  0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz H-12), 0.95 (3H, d, *J* = 6.7, H-13), 1.25 (3H, s, H-14), 1.39 (1H, m, H-7), 1.46 (2H, m, H-2 $\beta$ , 8 $\beta$ ), 1.51 (1H, m, H-9 $\alpha$ ), 1.52 (2H, m, H-2 $\alpha$ , 8 $\alpha$ ), 1.63 (1H, m, H-9 $\beta$ ), 1.75 (1H, m, H-1), 1.96 (1H, m, H-11), 2.43 (1H, dd, *J* = 5.7, 17.6 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.47 (1H, m, H-3 $\beta$ ), 2.76 (1H, m, H-6), 6.96 (1H, d, *J* = 5.7 Hz, H-5), 9.44 (1H, s, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR (chloroform-*d*, 125 MHz)  $\delta$  given in Table 2; EIMS *m/z* 236 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS *m/z* 236.1780 (calcd for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, 236.1776).

Canangaterpene IV (**4**): Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -2.99^\circ$  (*c* 0.64, MeOH) IR(film):  $\nu_{\max}$  3400, 1716, 1558, 1508, 1458  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.13 (m, H-9' $\beta$ ), 1.25 (m, H-10' $\alpha$ ), 1.33 (m, H-7' $\beta$ ), 1.54 (m, H-9' $\alpha$ ), 1.71 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4' $\alpha$ ), 1.84 (m, H-8'), 1.94 (m, H-7' $\alpha$ ), 2.13 (m, H-10' $\beta$ ), 2.24 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4' $\beta$ ), 3.37 (s, 3'-OMe), 3.38 (s, 1'-OMe), 3.39 (m, H-6'), 4.03 (d-like, *J* = 4.9 Hz, H-11'), 4.89 (s, H-1'), 5.08 (m, H-3'), 6.30 (d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, H-3, 5), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, H-2, 6), 7.58 (d, *J* = 15.9 Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$ -NMR: given in Table 2; EIMS: *m/z* 392 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 392.1833 (Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>: *m/z* 392.1825).

Canangaterpene V (**5**): Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -2.71^\circ$  (*c* 0.56, MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3405, 1716, 1558, 1508, 1458  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.13 (m, H-9' $\beta$ ), 1.26 (m, H-10' $\alpha$ ), 1.33 (m, H-7' $\beta$ ), 1.54 (m, H-9' $\alpha$ ), 1.70 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4' $\alpha$ ), 1.84 (m, H-8'), 1.94 (m, H-7' $\alpha$ ), 2.13 (m, H-10' $\beta$ ), 2.22 (dd, *J* = 4.2, 6.2 Hz, H-4' $\beta$ ), 3.41 (s, 3'-OMe), 3.43 (s, 1'-OMe), 3.39 (m, H-6'), 3.88 (s, 3-OMe), 4.04 (d-like, *J* = 4.9 Hz, H-11'), 4.89 (s, H-1'), 5.08 (m, H-3'), 6.34 (d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 7.18 (s, H-2), 7.58 (d, *J* = 15.9 Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$  NMR: given in Table 2; EIMS: *m/z* 422 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 422.1942 (Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>: *m/z* 422.1941).

Canangaterpene VI (**8**): Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +13.0^\circ$  (*c* 0.32, MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3415, 1680, 1508  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$  0.67 (s, H-14), 0.95 (d, *J* = 6.2, H-12), 0.97 (d, *J* = 6.2, H-13), 1.22 (m, H-2 $\alpha$ , 9 $\beta$ , 11), 1.60 (m, H-8a), 1.79 (m, H-2b), 1.88 (m, H-3b), 1.89 (m, H-9a), 1.94 (m, H-8b), 2.04 (m, H-7), 2.79 (dd, *J* = 6.2, 10.9, H-6), 2.96 (dd-like, *J* = 5.2, 14.5, H-3a), 3.48 (dd, *J* = 4.1, 11.3, H-1), 6.88 (d, *J* = 6.2, H-5), 9.40 (s, H-15);  $^{13}\text{C}$  NMR: given in Table 2; EIMS: *m/z* 236 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 236.1774 (Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>: *m/z* 236.1776).

### Canangalignan I (**1**) の接触還元

Canangalignan I (**1**) (178 mg, 0.17 mmol) を MeOH (16 mL) 溶液中で 10% Pd-C (10 mg) とともに H<sub>2</sub> 環境下 18 時間室温にて攪拌した. 反応生成物をフィルターにてろ過し, **1a** (178 mg) を得た.

**1a**: amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} -27.4$  (*c* 0.19, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  207.0 nm (log  $\epsilon$  4.22), 316.0 nm (log  $\epsilon$  4.33);  $^1\text{H}$  NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.02 (2H, m, H-5''' $\beta$ , 5'''' $\beta$ ), 1.06 (2H, m, H-8'''a, 8''''a), 1.08 (2H, m, H-6''' $\alpha$ , 6'''' $\alpha$ ), 1.18 (2H, m, H-5''' $\alpha$ , 5'''' $\alpha$ ), 1.48 (2H, m, H-4''', 4''''), 1.69-1.72 (4H, m, H-3''' $\alpha$ , 3'''' $\alpha$ , H-8'''b, 8''''b), 1.90 (2H, m, H-6''' $\beta$ , 6'''' $\beta$ ), 2.12 (2H, m, H-3''' $\beta$ , 3'''' $\beta$ ), 3.05 (2H, t, *J* = 9.0 Hz, H-2''', 2''''), 3.16-3.18 (4H, m, 3''', 3''''', 4''', 4'''''), 3.25 (2H, m, 5''', 5'''''), 3.46 (2H, m, H-9'''a, 9''''a), 3.51 (2H, m, H-2''', 2''''), 3.55 (2H, m, H-6'''a, 6''''a), 3.76 (4H, m, H-6'''b, 6''''b, 10'''a, 10''''a), 3.84-3.90 (4H, m, H-9'''b, 9''''b, 10'''b, 10''''b), 4.12 (2H, d, *J* = 7.75 Hz, H-1''', 1''''), 6.61 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5'), 6.62 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3'', 5''), 6.84 (1H, dd, *J* = 2.1,

8.6 Hz, H-6'), 6.97 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.33 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-2'', 6''), 7.63 (1H, s, H-1), 7.70 (1H, s, H-4), 9.71 (2H, s, H-7''', 7''''');  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  144.5 (C-1), 124.9 (C-2, 3), 144.1 (C-4), 169.0 (C-2a, 3a), 128.1 (C-1'), 117.5 (C-2'), 146.5 (C-3'), 149.3 (C-4'), 116.4 (C-5'), 124.7 (C-6'), 127.6 (C-1''), 133.1 (C-2'', 6''), 116.6 (C-3'', 5''), 160.7 (C-4''), 59.3 (C-1''', 1'''''), 75.1 (C-2''', 2'''''), 35.6 (C-3''', 3'''''), 37.5 (C-4''', 4'''''), 26.2 (C-5''', 5'''''), 30.1 (C-6''', 6'''''), 210.0 (C-7''', 7'''''), 36.6 (C-8''', 8'''''), 66.5 (C-9''', 9'''''), 70.1 (C-10''', 10'''''), 104.4 (C-1''''', 1'''''''), 75.1 (C-2''''', 2'''''''), 78.1 (C-3''''', 3'''''''), 71.6 (C-4''''', 4'''''''), 77.9 (C-5''''', 5'''''''), 62.8 (C-6''''', 6'''''''); positive-ion FABMS  $m/z$  1057  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; HRFABMS  $m/z$  1057.3885 (calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{66}\text{O}_{23}\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1057.3893).

### NaBH<sub>4</sub> を用いた **1a** の還元

**1a** (174 mg, 0.17 mmol) の MeOH (16 mL) 溶液に NaBH<sub>4</sub> (13 mg, 0.34 mmol) を加え、2 時間室温にて攪拌した。中和、減圧乾燥後、順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [CHCl<sub>3</sub>-MeOH] および HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeOH (50: 50, v/v)] にて精製し、**1b** (115 mg, 66%) を得た。

**1b**: amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  -13.2 ( $c$  0.05, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  204.2 nm (log  $\epsilon$  4.26), 316.2 nm (log  $\epsilon$  4.36);  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz,  $\delta$ ) 1.02 (2H, m, H-5'''\beta, 5'''''\beta), 1.07 (2H, m, H-6'''\alpha, 6'''''\alpha), 1.25 (4H, m, H-3'''\alpha, 3'''''\alpha, 5'''\alpha, 5'''''\alpha), 1.27 (2H, m, H-6'''\beta, 6'''''\beta), 1.28 (2H, m, H-4''', 4'''''), 1.65 (2H, m, H-3'''\beta, 3'''''\beta), 1.81 (2H, m, H-8'''\a, 8'''''\a), 1.88 (H-8'''\b, 8'''''\b), 3.16 (2H, t,  $J = 7.7$  Hz, H-2''', 2'''''), 3.28-3.29 (4H, m, 3''', 3''''', 4''', 4'''''), 3.34 (2H, m, 5''', 5'''''), 3.54 (2H, m, H-9'''\b, 9'''''\b), 3.54-3.58 (4H, m, H-7''', 7'''''), 3.56 (2H, m, H-2''', 2'''''), 3.65 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-6'''\a, 6'''''\a), 3.81 (2H, m, H-9'''\a, 9'''''\a), 3.86 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-6'''\b, 6'''''\b), 3.91 (2H, m, H-10'''\a, 10'''''\a), 3.96 (2H, m, H-10'''\b, 10'''''\b), 4.28 (2H, d,  $J = 7.75$  Hz, H-1''', 1'''''), 6.70 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.71 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-3'', 5''), 6.92 (1H, dd,  $J = 2.1, 8.0$  Hz, H-6'), 7.07 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.41 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-2'', 6''), 7.74 (1H, s, H-1), 7.81 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  144.5 (C-1), 124.9 (C-2, 3), 144.1 (C-4), 169.0 (C-2a, 3a), 128.2 (C-1'), 117.5 (C-2'), 146.5 (C-3'), 149.1 (C-4'), 116.4 (C-5'), 124.9 (C-6'), 127.6 (C-1''), 133.1 (C-2'', 6''), 116.7 (C-3'', 5''), 160.7 (C-4''), 42.0 (C-1''', 1'''''), 76.4 (C-2''', 2'''''), 34.5 (C-3''', 3'''''), 37.8 (C-4''', 4'''''), 25.1 (C-5''', 5'''''), 31.6 (C-6''', 6'''''), 76.4 (C-7''', 7'''''), 37.1 (C-8''', 8'''''), 63.4 (C-9''', 9'''''), 70.3 (C-10''', 10'''''), 104.2 (C-1''''', 1'''''''), 75.1 (C-2''''', 2'''''''), 78.2 (C-3''''', 3'''''''), 71.7 (C-4''''', 4'''''''), 78.0 (C-5''''', 5'''''''), 62.9 (C-6''''', 6'''''''); positive-ion FABMS  $m/z$  1061  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ; HRFABMS  $m/z$  1061.4202 (calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{70}\text{O}_{23}\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 1061.4206).

### **1b** の酵素加水分解

**1b** (75 mg, 0.072 mmol) を 20 mM acetate buffer (20 mL, pH = 3.70) に溶解し、hesperidinase (10 mg, from *Penicillium sp.* Sigma-Aldrich) を加え、12 時間 37 °C で攪拌した。生成物に EtOH を加えた後、4,000 rpm にて 10 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄みを HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (70:30, v/v)] を用いて精製し、**1c** (13.5 mg) を得た。

**1c**: amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  -5.1 ( $c$  0.5, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  208.4 nm (log  $\epsilon$  4.19), 316.4

nm (log  $\epsilon$  4.36);  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz,)  $\delta$  0.95 (2H, m, H-6'' $\alpha$ , 6'''' $\alpha$ ), 1.06 (2H, m, H-5'' $\beta$ , 5'''' $\beta$ ), 1.22 (4H, m, H-3'' $\alpha$ , 3'''' $\alpha$ , 5'' $\alpha$ , 5'''' $\alpha$ ), 1.57 (2H, m, H-4''', 4''''), 1.64 (2H, m, H-8'' $a$ , 8'''' $a$ ), 1.65 (2H, m, H-3'' $\beta$ , 3'''' $\beta$ ), 1.71 (2H, m, H-6'' $\beta$ , 6'''' $\beta$ ), 1.78 (H-8'' $b$ , 8'''' $b$ ), 3.43 (2H, m, H-2'', 2''''), 3.57 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-7'' $a$ , 7'''' $a$ ), 3.65 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-6'' $a$ , 6'''' $a$ ), 3.67 (2H, m H-9'' $a$ , 9'''' $a$ ), 3.72 (2H, m H-9'' $b$ , 9'''' $b$ ), 3.79 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-7'' $b$ , 7'''' $b$ ), 3.94 (2H, m, H-10'' $a$ , 10'''' $a$ ), 4.00 (2H, m, H-10'' $b$ , 10'''' $b$ ), 6.68 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'), 6.70 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3'', 5''), 6.92 (1H, dd,  $J = 2.1, 8.3$  Hz, H-6'), 7.07 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.41 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2'', 6''), 7.74 (1H, s, H-1), 7.81 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  144.4 (C-1), 124.9 (C-2, 3), 144.1 (C-4), 128.0 (C-1'), 117.5 (C-2'), 146.6 (C-3'), 149.4 (C-4'), 116.4 (C-5'), 124.8 (C-6'), 127.6 (C-1''), 133.1 (C-2'', 6''), 116.7 (C-3'', 5''), 160.8 (C-4''), 169.2 (C-2a, 3a), 42.4 (C-1''', 1''''), 77.2 (C-2''', 2''''), 34.4 (C-3''', 3''''), 37.8 (C-4''', 4''''), 25.1 (C-5''', 5''''), 32.2 (C-6''', 6''''), 62.1 (C-7''', 7''''), 41.7 (C-8''', 8''''), 58.9 (C-9''', 9''''), 70.4 (C-10''', 10''''); positive-ion FABMS  $m/z$  737 [M+Na] $^+$ ; HRFABMS  $m/z$  737.3145 (calcd for C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>O<sub>13</sub>Na [M+Na] $^+$ , 737.3149).

### 1c のメチル化

**1c** (12.0 mg) を無水 MeOH (1.0 mL) に溶解し, trimethylsilyldiazomethane (2 M in hexane, 0.3 mL) を加えたのち, 15 時間室温で攪拌した. 溶媒を減圧により除いた後, HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (70:30, v/v)] により精製し, **1d** (11.5 mg) を得た.

**1d**: amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25}$  -2.7 (c 0.2, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  207.0 nm (log  $\epsilon$  4.14), 312.8 nm (log  $\epsilon$  4.19);  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz,)  $\delta$  0.91 (2H, m, H-6'' $\alpha$ , 6'''' $\alpha$ ), 1.01 (2H, m, H-5'' $\beta$ , 5'''' $\beta$ ), 1.21 (2H, m, H-5'' $\alpha$ , 5'''' $\alpha$ ), 1.24 (2H, m, H-3'' $\alpha$ , 3'''' $\alpha$ ), 1.57 (2H, m, H-4''', 4''''), 1.65 (2H, m, H-8'' $a$ , 8'''' $a$ ), 1.65 (2H, m, H-3'' $\beta$ , 3'''' $\beta$ ), 1.71 (2H, m, H-6'' $\beta$ , 6'''' $\beta$ ), 1.78 (H-8'' $b$ , 8'''' $b$ ), 3.39 (2H, m, H-2'', 2''''), 3.50 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-6'' $a$ , 6'''' $a$ ), 3.59 (2H, m, H-7'' $a$ , 7'''' $a$ ), 3.60 (2H, m H-9'' $b$ , 9'''' $b$ ), 3.62 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.69 (2H, m H-9'' $a$ , 9'''' $a$ ), 3.71 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>) 3.81 (2H, d-like,  $J = 11.6$  Hz, H-7'' $b$ , 7'''' $b$ ), 3.94 (2H, m, H-10'' $a$ , 10'''' $a$ ), 3.97 (2H, m, H-10'' $b$ , 10'''' $b$ ), 6.79 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3'', 5''), 6.83 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-5'), 7.06 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.7$  Hz, H-6'), 7.12 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.43 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2'', 6''), 7.77 (1H, s, H-1), 7.80 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  143.7 (C-1), 125.9 (C-2), 126.1 (C-3), 143.5 (C-4), 128.6 (C-1'), 113.5 (C-2'), 150.3 (C-3'), 152.3 (C-4'), 112.6 (C-5'), 125.9 (C-6'), 129.0 (C-1''), 132.9 (C-2'', 6''), 115.3 (C-3'', 5''), 162.7 (C-4''), 168.9 (C-2a), 168.7 (C-3a), 42.4 (C-1''', 1''''), 77.1 (C-2''', 2''''), 34.5 (C-3''', 3''''), 37.8 (C-4''', 4''''), 25.0 (C-5''', 5''''), 32.2 (C-6''', 6''''), 61.9 (C-7''', 7''''), 41.7 (C-8''', 8''''), 58.9 (C-9''', 9''''), 70.5 (C-10''', 10''''); positive-ion FABMS  $m/z$  779 [M+Na] $^+$ ; HRFABMS  $m/z$  779.3615 (calcd for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>O<sub>13</sub>Na [M+Na] $^+$ , 779.3619).

### 1d におけるエステルアルカリ分解

**1d** (9.3 mg) を無水 MeOH (1.0 mL) に溶解し, NaOCH<sub>3</sub> (0.1 M in MeOH, 3 mL) を加えた後, 室温にて 3 時間攪拌した. 溶媒を減圧により除いたのち, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.0 g, EtOAc - MeOH (2:1  $\rightarrow$  1:1  $\rightarrow$  1:2  $\rightarrow$  0:1, v/v)] を用いて分離し,

**1e** (2.7 mg) および **1f** (2.0 mg) を得た.

**1e**: amorphous powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  207.0 nm (log  $\epsilon$  4.16), 311.6 nm (log  $\epsilon$  4.32);  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 600 MHz)  $\delta$  3.67 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 6.84 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-3'', 5''), 6.88 (1H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-5'), 7.08 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 8.7 Hz, H-6'), 7.14 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-2'), 7.45 (2H, d,  $J$  = 8.7 Hz, H-2'', 6''), 7.81 (1H, s, H-1), 7.85 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 150 MHz)  $\delta$  143.8 (C-1), 125.6 (C-2, 3), 143.6 (C-4), 128.9 (C-1'), 113.3 (C-2'), 150.2 (C-3'), 152.2 (C-4'), 112.5 (C-5'), 125.9 (C-6'), 128.5 (C-1''), 132.8 (C-2'', 6''), 115.2 (C-3'', 5''), 162.7 (C-4''), 169.3 (C-2a), 168.4 (C-3a); positive-ion EIMS  $m/z$  412 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>; HREIMS  $m/z$  412.1525 (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub> [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>, 412.1522). **1f**: amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -33.6 ( $c$  0.02, MeOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  42.6 (C-1), 77.6 (C-2), 34.7 (C-3), 40.9 (C-4), 25.2 (C-5), 32.4 (C-6), 62.0 (C-7), 41.9 (C-8), 58.9 (C-9), 68.1 (C-10); positive-ion CIMS  $m/z$  205 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>; HRCIMS  $m/z$  205.1442 (calcd for C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 205.1440).

## 1b のメチル化

**1d** のメチル化と同様に, **1b** (20 mg) より得られた **1g** (14.2 mg) trimethylsilyldiazomethane (2 M in hexane, 0.2 mL) を用いてメチル化した. 溶媒を減圧により除いた後, 逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [1.0 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (2:8 → 3:7 → 4:6 → 1:0, v/v)] により精製した.

**1d**: amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -20.5 ( $c$  0.2, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  204.2 nm (log  $\epsilon$  4.31), 313.0 nm (log  $\epsilon$  4.41);  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz)  $\delta$  1.05 (2H, m, H-5'''' $\beta$ , 5'''' $\beta$ ), 1.08 (2H, m, H-6'''' $\alpha$ , 6'''' $\alpha$ ), 1.25 (2H, m, H-3'''' $\alpha$ , 3'''' $\alpha$ ), 1.26 (2H, m, H-5'''' $\alpha$ , 5'''' $\alpha$ ), 1.29 (2H, m, H-4''''), 1.29 (2H, m, H-6'''' $\beta$ , 6'''' $\beta$ ), 1.62 (2H, m, H-3'''' $\beta$ , 3'''' $\beta$ ), 1.81 (2H, m, H-8''''a, 8''''a), 1.88 (H-8''''b, 8''''b), 3.16 (2H, t,  $J$  = 7.7 Hz, H-2''''), 3.27-3.28 (4H, m, 3''''), 3.34 (2H, m, 5''''), 3.55 (2H, m, H-9''''b, 9''''b), 3.55-3.57 (4H, m, H-7''''), 3.56 (2H, m, H-2''''), 3.66 (2H, d-like,  $J$  = 11.6 Hz, H-6''''a, 6''''a), 3.81 (2H, m, H-9''''a, 9''''a), 3.85 (2H, d-like,  $J$  = 11.6 Hz, H-6''''b, 6''''b), 3.91 (2H, m, H-10''''a, 10''''a), 3.96 (2H, m, H-10''''b, 10''''b), 4.27 (2H, d,  $J$  = 8.0 Hz, H-1''''), 6.90 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-5'), 7.49 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-3'', 5''), 7.12 (1H, dd,  $J$  = 2.0, 9.0 Hz, H-6'), 7.18 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-2'), 6.86 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-2'', 6''), 7.83 (1H, s, H-1), 7.87 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  143.5 (C-1), 126.0 (C-2), 126.1 (C-3), 143.5 (C-4), 168.8 (C-2a), 168.9 (C-3a), 129.0 (C-1'), 113.5 (C-2'), 150.3 (C-3'), 152.3 (C-4'), 112.6 (C-5'), 125.9 (C-6'), 128.6 (C-1''), 132.9 (C-2'', 6''), 115.3 (C-3'', 5''), 162.7 (C-4''), 42.0 (C-1'''), 76.4 (C-2''', 2'''), 34.6 (C-3''', 3'''), 37.8 (C-4''', 4'''), 25.1 (C-5''', 5'''), 31.6 (C-6''', 6'''), 76.5 (C-7''', 7'''), 37.2 (C-8''', 8'''), 63.3 (C-9''', 9'''), 70.5 (C-10''', 10'''), 104.2 (C-1''''), 75.1 (C-2''''), 78.2 (C-3''''), 71.7 (C-4''''), 78.1 (C-5''''), 62.9 (C-6''''); positive-ion FABMS  $m/z$  1103 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>; HRFABMS  $m/z$  1103.4668 (calcd for C<sub>53</sub>H<sub>76</sub>O<sub>23</sub>Na [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>, 1103.4675).

## 1g におけるエステルアルカリ分解

**1g** (11.2 mg) を NaOCH<sub>3</sub> (0.1 M in MeOH, 4 mL) に溶解し, 2 時間室温にて攪拌した. 中

和, 乾燥後, 逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [1.0 g, MeOH – H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 5:5 → 7:3, v/v)] にて分離, 精製し **1e** (2.2 mg) および既知化合物である dihydrocanangafruticoside A 7-ol (**1h**, 3.7 mg) を得た. 得られた **1h** は <sup>1</sup>H NMR スペクトルを文献値と比較することで構造を決定した.

**1h**: amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -2.2 (*c* 0.65, MeOH); <sup>1</sup>H NMR data was the same as the reported data.<sup>3</sup> <sup>13</sup>C NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz)  $\delta$ 42.3 (C-1), 76.9 (C-2), 34.9 (C-3), 40.9 (C-4), 25.3 (C-5), 31.9 (C-6), 76.9 (C-7), 37.4 (C-8), 63.4 (C-9), 68.1 (C-10), 104.3 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.8 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.9 (C-6'); positive-ion FABMS *m/z* 389 [M]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 389.1795 (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, 389.1788).

### Canangaterpene II (6) および IV (8) の (S)- and (R)-MTPA エステル化

**7** (2.0 mg, 0.0059 mmol) および **9** (2.0 mg, 0.0085 mmol) をそれぞれ無水ピリジン (0.5 ml) に溶解し, (-)-MTPA-Cl (0.02 mL) を加えた後, 12 時間室温にて攪拌した. 溶媒を減圧環境下取り除いた後, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [H<sub>2</sub>O → MeOH] にて精製し, (S)-MTPA エステル (**6a**, 1.7 mg) および (S)-MTPA エステル (**9a**, 1.2 mg) を得た. 同様に (+)-MTPA-Cl を用いて (R)-MTPA エステル (**6b**, 1.3 mg) および (**8b**, 1.2 mg) を得た.

(S)-MTPA ester (**6a**). <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$ 0.75 (s, H-15), 1.26 (m, H-6 $\beta$ ), 1.27 (m, H-10 $\alpha$ ), 1.36 (m, H-7 $\alpha$ ), 1.45 (m, H-10 $\beta$ ), 1.56 (m, H-12b), 1.69 (m, H-12a), 2.09 (m, H-7 $\beta$ ), 2.10 (m, H-11 $\alpha$ ); FABMS: *m/z* 581 [M+Na]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 581.2498 (calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 581.2491).

(R)-MTPA ester (**6b**). <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$ 0.88 (s, H-15), 1.27 (m, H-6 $\beta$ ), 1.10 (m, H-10 $\alpha$ ), 1.57 (m, H-7 $\alpha$ ), 1.32 (m, H-10 $\beta$ ), 1.68 (m, H-12b), 1.83 (m, H-12a), 2.31 (m, H-7 $\beta$ ), 2.04 (m, H-11 $\alpha$ ); FABMS: *m/z* 581 [M+Na]<sup>+</sup>; HRFABMS *m/z* 581.2498 (calcd for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 581.2491).

(S)-MTPA ester (**8a**). <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$ 0.79 (m, H-14), 0.99 (m, H-2 $\alpha$ ), 0.99 (m, H-7), 1.26 (m, H-9 $\beta$ ), 1.38 (m, H-2 $\beta$ ), 1.59 (m, H-8 $\alpha$ ), 1.82 (m, H-3 $\beta$ ), 1.84 (m, H-9 $\alpha$ ), 2.73 (m, H-6), 6.60 (m, H-5), 9.40 (s, H-15); EIMS: *m/z* 581 [M]<sup>+</sup>; HREIMS *m/z* 452.2174 (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>O<sub>4</sub>F<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>, *m/z* 452.2171).

(R)-MTPA ester (**8b**). <sup>1</sup>H-NMR (chloroform-*d*, 500 MHz)  $\delta$ 0.68 (m, H-14), 1.12 (m, H-2 $\alpha$ ), 0.93 (m, H-7), 1.22 (m, H-9 $\beta$ ), 1.45 (m, H-2 $\beta$ ), 1.58 (m, H-8 $\alpha$ ), 1.84 (m, H-3 $\beta$ ), 1.82 (m, H-9 $\alpha$ ), 2.73 (m, H-6), 6.59 (m, H-5), 9.40 (s, H-15); EIMS: *m/z* 581 [M]<sup>+</sup>; HREIMS *m/z* 452.2174 (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>O<sub>4</sub>F<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>, *m/z* 452.2171).

### Canangalignan I (1) および II (2) の酸加水分解および構成糖の同定

**1** および **2** それぞれ 1.0 mg を 5% aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-1,4-dioxane (1:1, v/v, 1.0 mL) に溶解し, 90 °C で 3 時間攪拌した. 反応液を 5% NaHCO<sub>3</sub> を用いて中和後, 減圧下溶媒留去し, 生成物を pyridine (0.1 mL) に溶解した. 続いて, L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.5 mg)

を加えた後 60 °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 °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 × 4.6 mm i.d. (5 μm); mobile phase: MeCN–H<sub>2</sub>O 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, **1** および **2** 双方から D-glucose を由来とするピークが検出された (*t<sub>R</sub>*: D-glucose; 56.0 min, L-glucose; 50.3 min).

### 第三節の実験

#### 抽出エキスおよび含有成分のメラニン生成抑制作用

マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 (理研細胞バンク, RCB0557) を 10%ウシ胎児血清 (FCS), 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 DMEM (4.5 g/L glucose) 培地 (Sigma-Aldrich) で培養 (5%CO<sub>2</sub>, 37°C) した. 細胞は 1 mM EDTA および 0.25% trypsin を含むリン酸緩衝生理食塩水中 (PBS) で 37°C, 5 分間前培養したのちに採取し, 後述する生物活性に使用した.

24 well マルチプレートに 2.0 × 10<sup>4</sup> cells /400 μL /well を播種し, 24 時間前培養した後, 被験物質および theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 72 時間培養後, 1 mM EDTA および 0.25% trypsin を含む PBS 中で処理して細胞を剥離し回収した. その後, PBS 洗浄し, 1 M NaOH aq.にて溶解 (120 μL/well, 80°C, 30 min) し, 細胞溶解液を得た. 96 well マイクロプレートに細胞溶解液を分取 (100 μL/well) し, 生成したメラニンの吸光度 (光学密度) をマイクロプレートリーダー (model 550, Bio-Rad Laboratories) にて測定した (測定波長: 405 nm, 対照波長: 655 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%).

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

A: 被験物質未添加の試料溶液の吸光度

B: 被験物質添加の試料溶液の吸光度

C: 細胞生存率%

#### マウス B16 メラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞における細胞増殖阻害作用 (細胞毒性) の評価 (WST-8 formazan assay による生存細胞数の評価)

96 well マルチプレートに 5.0 × 10<sup>3</sup> cells /100 μL /well を播種し, 24 時間前培養した後, 被験物質および theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 70 時間培養後, 10 μL の WST-8 溶液 (Cell Counting Kit-8™) を添加した. 2 時間培養後, 試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダー (model 550, Bio-Rad Laboratories) にて測定し (測定波長: 405 nm, 対照波長: 655 nm), 被験物質未添加時に対する被験物質添加時の生存細胞数の比 (Cell viability: %) を算出した. なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度: 0.1%).

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

A: 被験物質未添加の試料溶液の吸光度

B: 被験物質添加の試料溶液の吸光度

## 第四節の実験

### 抽出エキスおよび含有成分のアルドース還元酵素阻害作用

Wistar 系雄性ラットから採取した水晶体を 10 mM 2-mercaptoethanol 含有 135 mM Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でホモジナイズし, 得られたホモジネートを遠心分離 (100,000 × g, 30 min, 4 °C) とした. その上清を酵素分画として用いた. 反応混合液は, 300 mM Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.0) 225 μl, に 1 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μL, 10 mM DL-glyceraldehyde 50 μL, 酵素分画 100 μl, サンプル溶液 (DMSO 溶液) 25 μl 加え予備加温 (3 min, 30 °C) 後, 0.3 mM NADPH を 50 μl 添加し反応を開始 (30 min, 30 °C) した. その後, 0.5 N HCl を 150 μl 加えて反応を停止した. この溶液中に 10 mM imidazole 含有 6 N aqueous NaOH 0.5 mL 加えて反応させ (10 min, 60 °C) し, 蛍光誘導体化した NADP を蛍光分光光度計 (luminescence spectrometer LS50B, PERKIN ELMER 製) を用いて測定 (励起波長: 360 nm, 蛍光波長: 460 nm) した.

## 第二章の実験

### 第一節の実験

#### タイ産蓮花 (*Nelumbo nucifera*, 花部) からの含有成分の抽出・単離

タイ産蓮花 (*Nelumbo nucifera*, 花部, 0.9 kg) を MeOH で室温にて抽出後, 抽出液を濾過し, 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を 3 回行った. MeOH 抽出液を合わせて, 溶媒を減圧留去し, MeOH 抽出エキス (60.8 g, 花蕾乾燥品から収率 6.8%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキス 60.0 g を, Et<sub>2</sub>O と 1% AcOH で分配抽出後, 1% AcOH 酸性水層を NH<sub>4</sub>OH 塩基性とし, Et<sub>2</sub>O で抽出した. Et<sub>2</sub>O 移行部をさらに 10% NaOH 水溶液により分配抽出し, Et<sub>2</sub>O 溶出部を Alkaloids rich 分画 (4.21 g, 0.47%) として得た. Alkaloids rich 分画 (3.52 g) を順相 silica-gel column chromatography [120.0 g, Hexane–Acetone (8:1 → 5:1 → 1:2, v/v) → CHCl<sub>3</sub> – MeOH (10:1 → 5:1, v/v) → MeOH] で分画し, [Fr. 1 (48.0 mg), Fr. 2 (79.7 mg), Fr. 3 (1337.8 mg), Fr. 4 (1279.8 mg), Fr. 5 (76.2 mg), Fr. 6 (79.6 mg)] を得た. Fr. 2 (79.7 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH] を用いて分離精製し, [Fr. 2-1 (38.5 mg), Fr. 2-2 (13.7 mg), Fr. 2-3 (1.8 mg)] を得た. Fr. 3 (450.0 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O including 1% AcOH -MeOH (35: 65, v/v)] を用いて分離精製し, [Fr. 3-1 (344.8 mg), Fr. 3-2 (2.0 mg), **35** (13.7 mg)] を得た. Fr. 3-1 (344.8 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O including 1% AcOH -MeOH (30:70, v/v)] を用いて分離

精製し, **30** (36.0 mg), **32** (3.0 mg), **27** (183.1 mg), および **37** (23.0 mg) を単離した. Fr. 4 (420.0 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O including 1% AcOH -MeOH (70:30, v/v)] を用いて分離精製し, [Fr. 4-1 (15.8 mg), Fr. 4-2 (31.3 mg), Fr. 4-3 (4.0 mg), Fr. 4-4 (189.9 mg)] を得た. Fr. 4-4 (189.9 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O including 1% AcOH -MeOH (35: 65, v/v)] を用いて分離精製し, [Fr. 4-4-1 (163.9 mg), **35** (11.5 mg)] を得た. Fr. 4-4-1 (163.9 mg) を HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O including 1% AcOH -MeOH (25:75, v/v)] を用いて分離精製し, **29** (121.3 mg), Fr. 4-4-1-2 (3.0 mg), **35** (8.0 mg) を得た.

#### タイ産蓮葉 (*Nelumbo nucifera*, 葉部) からの含有成分の抽出・単離

タイ産蓮葉 (*Nelumbo nucifera*, 葉部, 0.9 kg) を MeOH で熱時抽出し, 抽出液を濾過し, 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を 3 回行った. MeOH 抽出液を合わせて減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (157.4 g, 乾燥品から収率 17.5%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスのうち 150.6 g を AcOEt と H<sub>2</sub>O で分配抽出後, 得られた H<sub>2</sub>O 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, AcOEt 移行部 (39.9 g, 4.64%), *n*-BuOH 移行部 (34.3 g, 3.98%), H<sub>2</sub>O 移行部 (81.2 g, 9.43%) を得た. 得られた AcOEt 移行部 (36.9 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.6 kg, CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100 : 1 → 50 : 1 → 30 : 1 → 10 : 1 → 5 : 1 → 1 : 1) → MeOH → CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = (5 : 5 : 1), v/v] で分画し, [Fr. 1 (3763.2 mg), Fr. 2 (7912.6 mg), Fr. 3 (1873.6 mg), Fr. 4 (2277.1 mg), Fr. 5 (2095.5 mg), Fr. 6 (1234.0 mg), Fr. 7 (3060.3 mg), Fr. 8 (7648.7 mg), Fr. 9 (6699.5 mg)] を得た. Fr. 5 (2095.5 mg) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [100 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10) → MeOH → AcOEt, v/v] にて分画し, [Fr. 5-1 (30.0 mg), Fr. 5-2 (77.3 mg), Fr. 5-3 (35.3 mg), Fr. 5-4 (20.2 mg), Fr. 5-5 (17.6 mg), Fr. 5-6 (114.8 mg), Fr. 5-7 (91.4 mg), Fr. 5-8 (82.3 mg), Fr. 5-9 (127.1 mg), Fr. 5-10 (110.2 mg), Fr. 5-11 (203.4 mg), Fr. 5-12 (286.0 mg), Fr. 5-13 (69.8 mg), Fr. 5-14 (217.5 mg)] を得た. 得られた Fr. 5-7 (91.4 mg) を HPLC [MeOH-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (40 : 60 v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し, **28** (21.7 mg) を単離した. Fr. 5-9 (127.1 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (70:30 v/v)] を用いて分離精製し, **27** (15.6 mg), **35** (13.9 mg) を単離した. Fr. 5-10 (110.2 mg) を HPLC [MeOH-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (70 : 30 v/v)] を用いて分離精製し, **35** (6.1 mg) を単離した. Fr. 6 (1234.0 mg) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [50 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (20 : 80 → 30 : 70 → 40 : 60 → 50 : 50 → 60 : 40 → 70 : 30 → 80 : 20 → 90 : 10) → MeOH → AcOEt, v/v] にて分画し, [Fr. 6-1 (33.2 mg), Fr. 6-2 (19.4 mg), Fr. 6-3 (10.5 mg), Fr. 6-4 (2.8 mg), Fr. 6-5 (20.2 mg), Fr. 6-6 (8.1 mg), Fr. 6-7 (14.3 mg), Fr. 6-8 (16.6 mg), Fr. 6-9 (18.2 mg), Fr. 6-10 (67.2 mg), Fr. 6-11 (44.0 mg), Fr. 6-12 (52.4 mg), Fr. 6-13 (169.1 mg), Fr. 6-14 (85.9 mg), Fr. 6-15 (98.4 mg), Fr. 6-16 (336.6 mg), Fr. 6-17 (200.4 mg), Fr. 6-18 (74.3 mg)] を得た. 得られた Fr. 6-10 (67.2 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (55:45, v/v)] を用いて分離精製し, **28** (5.0 mg) を単離した. Fr. 6-11 (44.0 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH mobile phase-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (60 : 40 v/v)] を用いて分離精製し **28** (14.0 mg) を単離した.

Fr. 6-13 (169.1 mg) を HPLC [MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (80:20 v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**35** (12.8 mg) を単離した。Fr. 7 (3060.3 mg) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [190 g, CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O (100:3:1 → 50:3:1 → 30:3:1 → 20:3:1 → 10:3:1 → 7:3:1 → 6:4:1 → 5:5:1, v/v) → MeOH] にて分画し、[Fr. 7-1 (81.8 mg), Fr. 7-2 (284.9 mg), Fr. 7-3 (1843.5 mg), Fr. 7-4 (2643.9 mg), Fr. 7-5 (314.5 mg)] を得た。得られた Fr. 7-2 (126.0 mg) を HPLC [MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (80 : 20 v/v)] を用いて分離精製し、**27** (51.7 mg), **29** (2.3 mg), **33** (3.9 mg), **35** (9.0 mg) を単離した。Fr. 7-4 (2643.9 mg) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [159 g, MeOH–H<sub>2</sub>O = (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → AcOEt] にて分画し、Fr. 7-4-1 (64.6 mg), Fr. 7-4-2 (40.5 mg), Fr. 7-4-3 (53.5 mg), Fr. 7-4-4 (914.6 mg), Fr. 7-4-5 (169.9 mg), Fr. 7-4-6 (188.1 mg), Fr. 7-4-7 (153.0 mg), Fr. 7-4-8 (218.9 mg), Fr. 7-4-9 (169.3 mg), Fr. 7-4-10 (123.9 mg), Fr. 7-4-11 (339.7 mg), Fr. 7-4-12 (116.9 mg) を得た。得られた Fr. 7-4-2 より **15** (40.5 mg) を単離した。Fr. 7-4-5 (169.9 mg) を HPLC [MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH = (50:50, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**26** (3.3 mg) を単離した。さらに、*n*-BuOH 移行部 (31.3 g) を順相オープンカラムクロマトグラフィー [1.3 kg, CHCl<sub>3</sub>–MeOH = (100:1 → 70:1 → 50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1, v/v) → CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O = (5:5:1, v/v) → MeOH] で分画し、Fr. 1 (220.7 mg), Fr. 2 (740.6 mg), Fr. 3 (2074.3 mg), Fr. 4 (2104.9 mg), Fr. 5 (7944.5 mg), Fr. 6 (18366.0 mg) を得た。そのうち Fr. 3, Fr. 4 及び Fr. 5 を合わせた分画を新たに Fr. 3 とし、Fr. 3 (12123.7 mg) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [730 g, Hex–AcOEt = (3:1, v/v) → AcOEt → CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O = (100:3:1 → 70:3:1 → 50:3:1 → 30:3:1 → 20:3:1 → 10:3:1 → 7:3:1 → 6:4:1 → 5:5:1, v/v) → MeOH] にて分画し、Fr. 3-1 (181.8 mg), Fr. 3-2 (684.6 mg), Fr. 3-3 (1505.4 mg), Fr. 3-4 (1227.8 mg), Fr. 3-5 (1149.0 mg), Fr. 3-6 (3151.3 mg), Fr. 3-7 (1350.7 mg), Fr. 3-8 (322.8 mg), Fr. 3-9 (2458.8 mg) を得た。得られた Fr. 3-3 (1505.4 mg) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [200 g, CHCl<sub>3</sub>–MeOH–H<sub>2</sub>O = (100:3:1 → 30:3:1 → 6:4:1, v/v) → MeOH] にて分画し、Fr. 3-3-1 (34.0 mg), Fr. 3-3-2 (23.4 mg), Fr. 3-3-3 (1003.0 mg), Fr. 3-3-4 (259.2 mg), Fr. 3-3-5 (22.4 mg), Fr. 3-3-6 (19.3 mg), Fr. 3-3-7 (193.3 mg) を得た。さらに得られた Fr. 3-3-3 (330.0 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (95:5 v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**27** (66.5 mg), **30** (97.8 mg), **35** (3.0 mg) を単離した。また、Fr. 3-3-3 (330.0 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (40:60v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**32** (7.2 mg), **37** (8.3 mg) を単離した。Fr. 3-3-4 (259.2 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (95:5 v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**27** (16.5 mg), **30** (184.1 mg), **44** (2.9 mg) を単離した。Fr. 3-4 (400.0 mg) を HPLC [mobile phase: MeOH–H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (50:50 v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 20 mm i.d.)] を用いて分離精製し、**28** (22.1 mg), **31** (149.1 mg), **36** (27.4 mg) を単離した。

## 第二節の実験

### 新規成分の化学構造とイソキノリン型アルカロイドの合成

***N*-methylasimilobine *N*-oxide (26)** : yellow oil;  $[\alpha]_D^{24} -56.3^\circ$  (*c* 0.16, MeOH); IR (film)  $\nu_{\max}$  3400, 1509  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (methanol-*d*<sub>4</sub>, 600MHz)  $\delta$  2.76 (2H, dd, *J*=4.1, 17.2 Hz, H-4), 3.20 (2H, dd, *J*=4.1, 14.0 Hz, H-7), 3.39 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3.56 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (2H, dd, *J*=4.1, 12.4 Hz, H-5), 4.44 (1H, dd, *J*=3.5, 14.0 Hz, H-6a), 6.71 (1H, s, H-3), 7.25 (1H, td, *J*=1.4, 7.9 Hz, H-10), 7.30 (1H, t, *J*=6.9 Hz, H-9), 7.37 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-8), 8.31 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-11);  $^{13}\text{C-NMR}$  (methanol-*d*<sub>4</sub>, 150MHz)  $\delta$  given in Table 6; EIMS *m/z* 297 [M]<sup>+</sup>; HREIMS *m/z* 297.1369 (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>, 297.1365).

#### ***N*-methylasimilobine (30) における水酸基のメチル化**

**30** (5.0 mg) を無水 MeCN および MeOH の混合溶液 (0.5 mL ずつ) に溶解し, *N,N*-diisopylethylamine (0.006mL, 0.036 mmol) および trimethylsilyldiazomethane (2 M in hexane, 0.3 mL) を加えたのち, 15 時間室温で攪拌した. 溶媒を減圧により除いた後, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = (7:3:1) v/v] を用いて精製することで, nuciferin (**27**, 4.0 mg) を得た. Nuciferin (**27**) の構造は  $[\alpha]_D$ ,  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , および MS の詳細な解析により決定した.

#### ***N*-methylasimilobine (30) における *N* 位の水酸化**

CHCl<sub>3</sub> (1.0 ml) に溶解した *N*-methylasimilobine (**30**, 4.0 mg) に *m*-CPBA (75 %, wet with H<sub>2</sub>O, 9.8 mg, 0.043 mmol) を加えた後, 2 時間室温にて攪拌した. 溶媒を減圧により除いた後, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [MeOH-H<sub>2</sub>O in 1% AcOH (50:50, v/v)] および HPLC [mobile phase: MeOH-H<sub>2</sub>O including 1% AcOH (50:50, v/v)] を用いて精製することで, *N*-methylasimirobine (**26**, 1.9 mg) を得た. 生成物と単離により得られた化合物は  $[\alpha]_D$ ,  $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , および MS がよく一致したことから, 同一の構造を有すると決定した.

**30** より得られた ***N*-methylasimilobine *N*-oxide**: yellow powder;  $[\alpha]_D^{24} -49.1^\circ$  (*c* 0.19, MeOH);  $^1\text{H-NMR}$  (methanol-*d*<sub>4</sub>, 400MHz)  $\delta$  2.76 (2H, dd, *J*=4.4, 16.8 Hz, H-4), 3.19 (2H, dd, *J*=4.0, 13.6 Hz, H-7), 3.39 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3.56 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.72 (2H, dd, *J*=4.4, 12.4 Hz, H-5), 4.44 (1H, dd, *J*=4.4, 13.6 Hz, H-6a), 6.71 (1H, s, H-3), 7.25 (1H, m, H-10), 7.30 (1H, m, H-9), 7.37 (1H, d, *J*=6.8 Hz, H-8), 8.31 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-11).

### イソキノリンアルカロイドの合成

#### **1-[(2-Bromophenyl)methyl]-3,4-dihydro-1*H*-isoquinoline-2-carboxaldehyde (42a) の合成**

過去に報告されている手法に従い,<sup>57, 58</sup>) 2-(bromophenyl)-*N*-(2-phenylethyl)acetamide (**40a**, 2.9 g, 9.1 mmol) を polyphosphoric acid (19 g) とともに 150 °C で 12 時間攪拌した. 室温へと

冷却した後、50 ml の水にて希釈し、NaOH を用いて中和した後、ジエチルエーテルで抽出した。得られた pale brown oil (2.8 g) を MeOH (10 ml) に溶解し、NaBH<sub>4</sub> (830 mg, 22 mmol) を加え、0 °C で 3 時間攪拌した。反応物に水 (50 ml) を加えた後、ジクロロメタンを用いて抽出した。その結果、1-[(2-bromophenyl)methyl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**41a**, 2.6 g) を pale yellow oil として得た。無水酢酸 (8.1 ml) とギ酸 (6.4 ml) の混合物の過熱により得た酢酸ギ酸無水物に **41a** を加え、70 °C で 3 時間攪拌した。冷却後、溶媒を減圧下除いた後、クロロホルムを用いて生成物を抽出した。続いて、炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、pale yellow oil (3.0 g) を得、順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>) を用いて精製することで **42a** (2.4 g, 80% from **40a**) を得た。

**42a**: Viscous oil; IR (neat):  $\nu_{\max}$  1668, 1431, 1292, 1196, 1157, 1026 cm<sup>-1</sup>; アミドの回転異性体の影響により、<sup>1</sup>H NMR スペクトルはそれぞれのプロトンに由来するピークが 3.5:1 の割合で 2 つ観測された。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  2.83–2.90 (0.22 H, m, 4a-H), 2.87 (0.78 H, ddd-like, *J* = ca. 16.3, 4.6, 2.6, 4a-H), 2.92–2.98 (0.22 H, m, 4b-H), 2.98 (0.78H, ddd, *J* = 16.3, 11.5, 6.3, 4b-H), 3.11 (0.78H, dd, *J* = 14.0, 10.9, benzylic methylene), 3.17 (0.22H, dd, *J* = 14.0, 9.4, benzylic methylene), 3.27 (0.78H, ddd, *J* = 13.2, 11.5, 4.6, 3a-H), 3.37 (0.78H, dd, *J* = 14.0, 3.5, benzylic methylene), 3.39 (0.22H, dd, *J* = 14.0, 4.9, benzylic methylene), 3.68–3.72 (0.44H, m, 3a-H and 3b-H), 4.52 (0.78H, ddd, *J* = 13.2, 6.3, 2.6, 3b-H), 4.89 (0.78H, dd, *J* = 10.9, 3.5, H-1), 5.79 (0.22H, dd, *J* = 9.4, 4.9, H-1), 7.03–7.63 (8H, m, arom.), 7.50 (0.78H, s, CHO), 8.02 (0.22H, s, CHO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Chloroform-*d*, major rotamer/minor rotamer)  $\delta$  28.1/29.7 (4-C), 34.3/40.2 (3-C), 43.4/41.9 (benzylic methylene), 56.8/51.1 (1-C), 126.6/126.9/127.0/127.2/127.4/127.5/127.9/128.4/129.0/129.1/129.3/131.4/132.1/132.8/133.2(d, arom.), 124.4/125.3/133.0/133.9/135.5/135.6/136.6/137.0 (s, arom.), 161.3 (CHO).

### 5,6,6a,7-Tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline-6-carboxaldehyde (**43a**) の合成

既報に従い,<sup>57, 58</sup> **42a** (1.0 g, 3.0 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (836 mg, 6.1 mmol), *tert*-butylmethylphosphonium tetrafluoroborate (226 mg, 0.9 mmol), および Pd(OAc)<sub>2</sub> (137 mg, 0.6 mmol) を DMA (5 ml) に溶解し 150 °C で 12 時間攪拌した。反応生成物を減圧下濃縮し、クロロホルムに溶解した。クロロホルムに溶解しない物質をフィルターにて取り除き、濾液を濃縮し brown oil (893 mg) を得た。順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>) により精製し、**43a** (350 mg, 46%) を得た。

**43a** : Pale brown solid; mp 133–135 °C; IR (neat):  $\nu_{\max}$  1662, 1427, 1392, 1256, 1242, 1184, 1123, 1041 cm<sup>-1</sup>; アミドの回転異性体の影響により、<sup>1</sup>H NMR スペクトルはそれぞれのプロトンに由来するピークが 2:1 の割合で 2 つ観測された。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  2.83 (0.66H, dd, *H* = 14.3, 14.1, 7a-H), 2.86 (0.66H, br d-like, *J* = ca. 15.8, 4a-H), 2.81–2.91 (1.02H, m, 4a-H, 4b-H and 7a-H), 2.96 (0.66H, ddd-like, *J* = ca. 15.8, 12.6, 4.6, 4b-H), 3.16 (0.34H, *J* = 12.6, 10.3, 4.0, 5a-H), 3.19 (0.34H, dd, *J* = 14.6, 14.6, 7b-H), 3.27 (0.66H, dd, *J* = 14.1, 4.6, 7b-H), 3.43

(0.66H, ddd,  $J = 12.6, 12.6, 2.9$ , 5a-H), 3.87 (0.66H, ddd,  $J = 12.6, 4.6, 2.0$ , 5b-H), 4.50 (0.34H, ddd,  $J = 12.6, 4.3, 3.5$ , 5b-H), 4.70 (0.34H, dd,  $J = 14.6, 4.6$ , 6a-H), 5.13 (0.66H, dd,  $J = 14.3, 4.6$ , 6a-H), 7.08–7.81 (6H, m, arom.), 8.29 (0.66H, s, CHO), 8.42 (0.34H, s, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, *Chloroform-d*, major rotamer/minor rotamer)  $\delta$  31.0/29.6 (4-C), 33.0/37.1 (7-C), 42.1/36.1 (5-C), 49.3/53.1 (6a-C), 122.7/122.8/123.7/124.0/127.3/127.5/127.6/127.7/ 127.9/128.1/128.2/128.6/129.1 (d, arom.), 130.9/131.4/133.5/133.7/133.8/134.2/134.3/134.5 /134.6/ 134.9 (s, arom.), 162.2/162.0 (CHO); positive-ion FABMS:  $m/z$  250  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 6-Methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline (44a) の合成

**43a** (70 mg, 0.28 mmol), 0.9 M の tetrahydrofuran-boran THF (1 ml, 0.9 mmol) 溶液, および THF (4 ml) を過熱還流下 6 時間攪拌した. 2N の hydrochloric acid (1ml) により反応を停止させ, NaOH (30 ml) により塩基性とした. 混合物を過熱還流下 4 時間攪拌し, 酢酸エチルにより抽出した. 水により洗浄後, 濃縮することで pale brown oil を得た. 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ ) により精製し, **44a** (47 mg, 71%) を得た.

**44a**: Pale yellow oil;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, *Chloroform-d*)  $\delta$  2.54 (1H, ddd-like,  $J = ca. 11.5, 11.5, 3.8$ , 5a-H), 2.56 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ), 2.70 (1H, dd,  $J = 14.0, 14.0$ , 7a-H), 2.76 (1H, br dd,  $J = ca. 15.0, 3.8$ , 4a-H), 3.07 (1H, ddd,  $J = 11.5, 5.8, 1.5$ , 5b-H), 3.17 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.6$ , 7b-H), 3.17–3.23 (1H, m, 4b-H), 3.23 (1H, dd,  $J = 14.0, 4.6$ , 6a-H), 7.07 (1H, d-like,  $J = 7.5$ , arom.), 7.21–7.28 (3H, m, arom.), 7.31 (1H, ddm,  $J = ca. 7.8, 7.0$ , arom.), 7.76 (1H, d,  $J = 7.8$ , arom.), 7.71 (1H, d,  $J = 7.6$ , arom.);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, *Chloroform-d*)  $\delta$  29.1 (4-C), 34.1 (7-C), 44.0 ( $\text{NCH}_3$ ), 53.4 (5-C), 62.0 (6a-C), 121.8/123.7/126.8/127.3/127.5/128.0/128.4 (d, arom.), 133.4/133.5/133.8/134.3/135.3 (s, arom.).

#### 1-[(2-Bromophenyl)methyl]-3,4-dihydro-6-methoxy-1H-isoquinoline-2-carboxaldehyde (42b) の合成

既報に従い,<sup>58)</sup> 2-(bromophenyl)-*N*-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]acetamide (**40b**, 500 mg, 1.43 mmol), phosphorous oxychloride (0.5 ml, 0.53 mmol), および acetonitrile (7 ml) を 12 時間過熱還流した. 反応生成物を冷却後, 炭酸水素ナトリウムを用いて中和し, ジエチルエーテルで抽出を行った. 水による洗浄後, 濃縮し pale brown oil (537 mg) を得た.  $\text{CH}_3\text{OH}$  (7 ml) に溶解した  $\text{NaBH}_4$  (82 mg, 2.16 mmol) を加え, 0 °C で 3 時間攪拌した. 生成物に水 (20 ml) を加え, ジクロロメタンで抽出を行った. 水による洗浄後, 濃縮することで 1-[(2-bromophenyl)methyl]-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**41b**, 478 mg) を pale yellow oil として得た. 無水酢酸 (1.3 ml) と ギ酸 (1.0 ml) の混合物の過熱により得た酢酸ギ酸無水物に **41b** を加え, 70 °C で 3 時間攪拌した. 冷却後, 溶媒を減圧により除いた後, クロロホルムを用いて生成物を抽出した. 続いて, 炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し, pale yellow oil (438 mg) を得, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane-EtOAc = 10:1→5:1) を用いて精製し, **42b** (385 mg, 96% from **40b**) を得た.

**42b**: Viscous oil; IR (neat):  $\nu_{\text{max}}$  1670, 1612, 1504, 1431, 1284, 1257, 1234, 1157, 1022  $\text{cm}^{-1}$ ; アミドの回転異性体の影響により,  $^1\text{H}$  NMR スペクトルはそれぞれのプロトンに由来するピ

ークが 4:1 の割合で 2 つ観測された。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *Chloroform-d*)  $\delta$  2.79–2.84 (0.2 H, m, 4a-H), 2.83 (0.8 H, ddd-like,  $J = ca.$  16.3, 5.1, 2.6, 4a-H), 2.88–2.95 (0.2 H, m, 4b-H), 2.95 (0.8H, ddd,  $J = 16.3, 11.5, 6.3, 4b-H$ ), 3.07 (0.8H, dd,  $J = 14.0, 10.6$ , benzylic methylene), 3.13 (0.2H, dd,  $J = 14.0, 9.5$ , benzylic methylene), 3.26 (0.8H, ddd,  $J = 13.2, 11.5, 5.1, 3a-H$ ), 3.33 (0.8H, dd,  $J = 14.1, 3.5$ , benzylic methylene), 3.34 (0.2H, dd,  $J = 14.0, 4.9$ , benzylic methylene), 3.64–3.69 (0.4H, m, 3a-H and 3b-H), 3.79 (0.6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (2.4H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.50 (0.8H, ddd,  $J = 13.2, 6.3, 2.6, 3b-H$ ), 4.83 (0.8H, dd,  $J = 10.6, 3.5, 1-H$ ), 5.73 (0.22H, dd,  $J = 9.5, 4.9, 1-H$ ), 6.72–7.63 (7H, m, arom.), 7.49 (0.8H, s, CHO), 8.01 (0.2H, s, CHO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, *Chloroform-d*, major rotamer/minor rotamer)  $\delta$ : 28.5/30.0 (4-C), 34.1/40.2 (3-C), 43.5/42.0 (benzylic methylene), 55.3/55.2 (OCH<sub>3</sub>), 56.4/50.1 (1-C), 112.9/113.0/113.4/113.5/127.2/127.8/128.0/128.4/128.5/129.0/131.5/132.1/132.7/133.1 (d, arom.), 124.4/125.3/127.7/127.8/134.4/135.3/136.7/137.1/158.3/158.6/ (s, arom.), 161.31/168.28 (CHO).

### 2-Methoxy-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline-6-carboxaldehyde (43b) の合成

**43a** の合成と同様に, **42b** (370 mg, 1.0 mmol) をアポモルヒネ形成反応に供することで, pale yellow oil (356 mg) を得, シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにて精製し(*n*-hexane-Et<sub>2</sub>O, 2:1), **43b** (131 mg, 46%) を得た。

**43b**: Pale yellow solid; mp 171–173 °C; IR (KBr):  $\nu_{\max}$  1662, 1608, 1427, 1400, 1319, 1246, 1195, 1161, 1049 cm<sup>-1</sup>; アミドの回転異性体の影響により, <sup>1</sup>H NMR スペクトルはそれぞれのプロトンに由来するピークが 2:1 の割合で 2 つ観測された。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *Chloroform-d*)  $\delta$  2.79 (0.66H, dd,  $J = 14.0, 14.0, 7a-H$ ), 2.79–2.85 (0.66H, m, 4a-H), 2.85–2.87 (0.68H, m, 4a-H and 4b-H), 2.89 (0.34H, dd,  $J = 14.3, 4.6, 7a-H$ ), 2.95 (0.66H, ddd-like,  $J = ca.$  16.0, 12.3, 4.6, 4b-H), 3.14 (0.34H, dd,  $J = 14.6, 14.3, 7b-H$ ), 3.18 (0.34H,  $J = 12.9, 10.6, 4.0, 5a-H$ ), 3.27 (0.66H, dd,  $J = 14.0, 4.6, 7b-H$ ), 3.43 (0.66H, ddd,  $J = 12.3, 12.3, 2.6, 5a-H$ ), 3.85 (0.66H, ddd,  $J = 12.3, 4.6, 1.8, 5b-H$ ), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.47 (0.34H, ddd,  $J = 12.9, 4.6, 2.9, 5b-H$ ), 4.66 (0.34H, dd,  $J = 14.6, 4.6, 6a-H$ ), 5.07 (0.66H, dd,  $J = 14.0, 4.6, 6a-H$ ), 6.63–7.77 (6H, m, arom.), 8.29 (0.66H, s, CHO), 8.42 (0.33H, s, CHO); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, *Chloroform-d*, major rotamer/minor rotamer)  $\delta$ : 31.3/30.0 (4-C), 33.3/37.4 (7-C), 42.2/36.2 (5-C), 49.1/52.8 (6a-C), 109.0/109.1/112.6/112.8/123.7/124.0/127.4/127.9/128.2/128.3/128.7/129.2 (d, arom.), 123.4/123.8/133.5/133.7/134.5/135.1/135.2/135.5/135.90/135.94/158.8/159.2 (s, arom.), 162.3/162.0 (CHO).

### 6-Methyl-2-methoxy-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline (44b) の合成

**44a** の合成と同様に, **43b** (70 mg, 0.25 mmol) を tetrahydrofuran-boran complex により還元し, pale yellow oil (72 mg) を得た。シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにて精製し(*n*-hexane-acetone = 2:1→1:1), **44b**<sup>59, 60)</sup> (46 mg, 69%) を得た。

**44b**: Pale yellow oil; IR (neat):  $\nu_{\max}$  1608, 1454, 1453, 1357, 1319, 1246, 1123, 1072 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *Chloroform-d*)  $\delta$  2.54 (1H, ddd-like,  $J = ca.$  11.7, 11.7, 4.0, 5a-H), 2.56 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 2.69 (1H, dd,  $J = 13.5, 13.5, 7a-H$ ), 2.73 (1H, br dd,  $J = ca.$  15.0, 4.0 4a-H), 3.08 (1H, ddd,  $J = 11.7,$

6.1, 1.5, 5b-H), 3.16 (1H, dd,  $J = 13.5$ , 4.6, 7b-H), 3.19 (1H, dd,  $J = 13.5$ , 4.6, 6a-H), 3.21 (1H, ddd-like,  $J = ca.$  15.0, 11.7, 6.1, 4b-H), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.63 (1H, d,  $J = 2.6$ , arom.), 7.12 (1H, d,  $J = 2.6$ , arom.), 7.22–7.34 (3H, m, arom.), 7.69 (1H, dd,  $J = ca.$  7.5, arom.); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 29.7 (4-C), 34.4 (7-C), 43.7 (NCH<sub>3</sub>), 53.4 (5-C), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 61.7 (6a-C), 108.2/112.5/123.7/127.3/127.7/128.5 (d, arom.), 126.4/134.1/134.8/134.9/135.6/158.6 (s, arom.). positive-ion FABMS:  $m/z$  266 [M+H]<sup>+</sup>, FABHRMS  $m/z$  266.1548 (Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  266.1545).

### 1-Phenylmethyl-3,4-dihydro-1H-isoquinoline-2-carboxaldehyde (47) の合成

**41a** の合成と同様に, (**45**, 460 mg, 1.93 mmol) を polyphosphoric acid を用いたビシュラーナピエラルスキー反応に供した. そして, NaBH<sub>4</sub> による還元を行うことでジヒドロイソキノリン誘導体 1-phenylmethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**46**) を得た. さらに, 酢酸ギ酸無水物によるホルミル化により **47** (490 mg) を得た. 構造の確認は, <sup>1</sup>H NMR の文献値との比較により行った.<sup>61, 62)</sup>

### 2-Methyl-1-phenylmethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (48)

既報に従い<sup>58)</sup>, **47** (100 mg) および LiAlH<sub>4</sub> (30 mg, 0.8 mmol) を THF (1 ml) に溶解し, 過熱還流下 1 時間攪拌した. 得られた pale brown oil (84 mg) をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 100:1) を用いて精製し, **48**<sup>62)</sup> (74 mg, 79% from **45**) を得た.

**48**: Pale yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  2.66 (1H, ddd,  $J = 16.3$ , 4.9, 4.9, 4a-H), 2.76 (1H, ddd,  $J = 12.6$ , 5.2, 4.9, 3a-H), 2.88 (1H, ddd,  $J = 16.3$ , 8.6, 5.2, 4b-H), 2.89 (1H, dd,  $J = 13.8$ , 6.3, benzylic methylene), 3.15 (1H,  $J = 13.7$ , 5.7, benzylic methylene), 3.20 (1H,  $J = 12.6$ , 8.6, 4.9, 3b-H), 3.81 (1H, dd,  $J = 6.3$ , 5.7, 6a-H), 6.75 (1H, d,  $J = 7.4$ , arom.), 7.00–7.26 (8H, m, arom.); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  25.9 (4-C), 41.5 (benzylic methylene), 42.8 (NCH<sub>3</sub>), 47.0 (3-C), 65.1 (1-C), 125.3/125.9/126.0/127.9/128.0/128.7/129.6 (d, arom.), 134.3/137.8/140.0 (s, arom.).

## 第三節の実験

### 含有成分および合成アルカロイドのメラニン生成抑制作用

「第一章第三節の実験」を参照

## 第三章の実験

### 第一節の実験

#### 中国産金針花からの含有成分の抽出・単離

中国産金針花 (800 g) 花部を 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 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 (345 g, 花蕾乾燥品から収率 49.3 %) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O で分配抽出し, さらに *n*-BuOH と H<sub>2</sub>O で分配抽出し, EtOAc 移行部 (26.0 g, 3.7 %), H<sub>2</sub>O 移行部 (288 g, 41.1 %) および *n*-BuOH 移行部 (30.0 g, 4.3 %) 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 [900 g, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:0 → 9:1 → 8:2 → 7:3 → 6:4 → 1:1 → 4:6 → 3:7 → 2:8, v/v) → MeOH] にて分画し, [Fr.B1 (150 mg), Fr.B2 (93.0 mg), Fr.B3 (1.58 g), Fr.B4 (1.68 g), Fr.B5 (2.91 g), Fr.B6 (4.58 g), Fr.B7 (9.44 g), Fr.B8 (3.33 g), Fr.B9 (4.80 g)] を得た. Fraction B3 (1.58 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [45.0 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 6:4 → 7:3 → 1:0, v/v) → MeOH] を用いて分画し, [Fr.B3-1 (564.5 mg), Fr.B3-2, Fr.B3-3 (56.5 mg), Fr.B3-4, Fr.B3-5, Fr.B3-6 (115.5 mg), Fr.B3-7, Fr.B3-8] を得た. Fraction B3-1 (564.5 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, Fr.B3-1-1 (5.6 mg), Fr.B 3-1-2 (6.6 mg), **53** (6.5 mg), **57** (6.5 mg) を得た. Fraction B3-1-1 (5.6 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, YMC-pack Ph (250 × 10 mm i.d.)] を用いて精製し, **54** (1.2 mg) を得た. Fraction B3-1-2 (6.6 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, **58** (2.5 mg) を得た. Fraction B3-3 (56.5 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (3:7, v/v) COSMOSIL 5C18-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を用いて精製し, **50** (2.5 mg) を得た. Fraction B4 (1.68 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [45.0 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 1:1, v/v) → MeOH] を用いて分画し, [Fr.B4-1, Fr.B4-2, Fr.B4-3 (184.2 mg), Fr.B4-4 (76.2 mg), Fr.B4-5, Fr.B4-6, Fr.B4-7, Fr.B4-8, Fr.B4-9, Fr.B4-10] を得た. Fraction B4-3 (184.2 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, **52** (17.0 mg), **56** (3.3 mg), **51** (6.0 mg) を得た. Fraction B5 (2.91 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [80.0 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 1:1 → 6:4 → 7:3 → 8:2, v/v) → MeOH] を用いて分画し, [Fr.B5-1, Fr.B5-2 (763.0 mg), Fr.B5-3 (266.8 mg), Fr.B5-4 (144.2 mg), Fr.B5-5, Fr.B5-6, Fr.B5-7] を得た. Fraction B5-3 (268.8 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 20 mm i.d.)] を用いて精製し, **55** (16.3 mg), **62** (28.2 mg) を得た. Fraction B5-4 (144.2 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O, COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 10 mm i.d.)] を用いて精製し, **49** (7.1 mg) を得た. Fraction B6 (4.58 g) を LH-20 [MeOH] を用いて分画し, [Fr.B6-1, Fr.B6-2, Fr.B6-3, Fr.B6-4, Fr.B6-5 (370 mg)] を得た. Fraction B5-4 (370 mg) はさらに HPLC [mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (5:95, v/v) COSMOSIL HILIC (250 × 10 mm i.d.)] を用いて精製し, **59** (20.8 mg), **60** (1.5 mg),

および **61** (19.7 mg) を得た.

## 第二節の実験

### 新規成分の構造解析

Hemerocallisamine I (**49**): colorless crystals (EtOH); melting point = 176.8, UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  200.8 nm (log  $\epsilon$  6.93), 257.4 nm (log  $\epsilon$  6.56), and 291.4 nm (log  $\epsilon$  6.78);  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -34.6 (MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3628, 3400, 1745, 1730, and 1074  $\text{cm}^{-1}$ ; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table. 9; EIMS:  $m/z$  298  $[\text{M}]^+$ ; HREIMS:  $m/z$  298.1165 (Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}]^+$ :  $m/z$  298.1165).

hemerocallisamine I (**49**) における単結晶 X 線結晶構造解析: A colorless platelet crystal of  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$  having approximate dimensions of 0.350×0.250×0.080 mm was mounted in a loop. All measurements were made on a Rigaku R-AXIS RAPID diffractometer using graphite monochromated Mo-K $\alpha$  radiation. The crystal-to-detector distance was 127.40 mm. MW 298.29, T = 108 K,  $\lambda$  = 0.71075 Å, monoclinic, space group C2 (#5), a = 12.068(1) Å, b = 12.471(1) Å, c = 10.649(4) Å,  $\beta$  = 117.236(2)°, V = 1425.0(2) Å<sup>3</sup>, Z = 4, D<sub>calcd</sub> = 1.390 g/cm<sup>3</sup>,  $\mu(\text{Mo K}\alpha)$  = 1.107  $\text{cm}^{-1}$ , F(000) = 632.00, crystal size. No. of reflections measured: total, 17202; unique, 3145 (R<sub>int</sub> = 0.0613); Friedel pairs, 1438. Refinement method: full-matrix least-squares on F<sup>2</sup>, goodness of fit indicator 1.059, flack parameter -0.0(16), final R<sub>1</sub>[I > 2.00 $\sigma$ (I)] = 0.0493 maximum peak in final Diff. Map and minimum peak 0.28 e<sup>-</sup>/Å<sup>3</sup> and -0.32 e<sup>-</sup>/Å<sup>3</sup>, Max Shift/Error in Final Cycle 0.000.

Hemerocallisamine II (**50**): Colorless oil; IR(film):  $\nu_{\max}$  3402 and 1732  $\text{cm}^{-1}$ ; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table. 10; EIMS:  $m/z$  181  $[\text{M}]^+$ ; HREIMS:  $m/z$  181.1101 (Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2$   $[\text{M}]^+$ :  $m/z$  181.1103).

Hemerocallisamine III (**51**): Colorless oil;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -112.3 (MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3635, 1716, and 1105  $\text{cm}^{-1}$ ; for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see table. 11 and 12; EIMS:  $m/z$  213  $[\text{M}]^+$ ; HREIMS:  $m/z$  213.0996 (Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$   $[\text{M}]^+$ :  $m/z$  213.1001).

Hemerocallisamine IV (**52**): Amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -35.2 ( $c$  = 0.8, MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3635, 1716 and 1110  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz)  $\delta$  given in Table 1;  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  given in Table 11 and 12; EIMS:  $m/z$  213  $[\text{M}]^+$ ; HREIMS:  $m/z$  213.1006 (Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_4$   $[\text{M}]^+$ :  $m/z$  213.1001).

Hemerocallisamine V (**53**): Amorphous powder;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -25.2 ( $c$  = 0.7, MeOH); IR(film):  $\nu_{\max}$  3646, 1716, and 1120  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ , 500 MHz)  $\delta$  given in Table 1;  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ , 125 MHz)  $\delta$  given in Table 11 and 12; EIMS:  $m/z$  199  $[\text{M}]^+$ ; HREIMS:  $m/z$

199.0849 (Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 199.0845).

Hemerocallisamine VI (**54**): Amorphous powder; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +80.2 (*c* = 0.6, MeOH); IR(film): ν<sub>max</sub> 3629, 1700, and 1167 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) δ; <sup>13</sup>C NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz) δ given in Table 11 and 12; EIMS: *m/z* 197 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 197.0690 (Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 197.0688).

Hemerocallisamine VII (**55**): Amorphous powder; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -26.0 (*c* = 0.3, MeOH); IR(film): ν<sub>max</sub> 3635, 1717, and 1108 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) δ; <sup>13</sup>C NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 125 MHz) δ given in Table 11 and 12; EIMS: *m/z* 243 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 243.1112 (Calcd for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 243.1107).

### Hemerocallisamine III (**51**), IV (**52**), および VI (**54**) の (*S*)- and (*R*)-MTPA エステル化

**51** (1.0 mg, 0.0051 mmol), **52** (1.0 mg, 0.0047 mmol) および **54** (1.0 mg, 0.0051 mmol) をそれぞれ無水ピリジン (0.5 ml) に溶解し, (-)-MTPA-Cl (0.02 mL) を加えた後, 12 時間室温にて攪拌した. 溶媒を減圧環境下取り除いた後, 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィ [H<sub>2</sub>O → MeOH] にて精製し, (*S*)-MTPA エステル (**51b**, 1.3 mg), (*S*)-MTPA エステル (**52b**, 1.3 mg) および (*S*)-MTPA エステル (**54a**, 1.3 mg) を得た. 同様に (+)-MTPA-Cl を用いて (*R*)-MTPA エステル (**51c**, 1.0 mg), (*R*)-MTPA エステル (**52c**, 1.0 mg) および (**54b**, 1.0 mg) を得た.

**51b**: amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) δ 1.69 (3H, s, H-6'), 1.81 (1H, dd-like, *J* = 8.0 6.4, H-4α), 2.69 (1H, dd-like, *J* = 8.0, 6.0, H-4β), 3.10 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 4.31 (1H, m, *J* = 6.1, H-3), 4.33 (1H, m, H-5'a), 4.53 (1H, m, H-5'b), 4.71 (1H, d-like, *J* = 6.4, H-5), 5.77 (1H, br-s, H-4'), 6.23 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 429 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 429.1395 (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 429.1399).

**51c**: amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) δ 1.66 (3H, s, H-6'), 1.99 (1H, dd-like, *J* = 8.0 6.4, H-4α), 2.69 (1H, dd-like, *J* = 8.0, 6.0, H-4β), 3.21 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 4.31 (1H, m, *J* = 6.1, H-3), 4.31 (1H, m, H-5'a), 4.54 (1H, m, H-5'b), 4.72 (1H, d-like, *J* = 6.4, H-5), 5.77 (1H, br-s, H-4'), 6.23 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 429 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 429.1404 (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 429.1399).

**52b**: Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz) δ 1.64 (3H, s, H-6'), 2.00 (1H, dd-like, *J* = 8.0 6.1, H-4α), 2.52 (1H, dd-like, *J* = 13.8, 8.4, H-4β), 3.22 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 4.25 (1H, d-like, *J* = 6.1, H-3), 4.43 (1H, m, H-5'a), 4.54 (1H, m, H-5'b), 4.80 (1H, d-like, *J* = 6.0, H-5), 5.95 (1H, br-s, H-4'), 6.24 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 429 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 429.1403 (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub>

[M]<sup>+</sup>: *m/z* 429.1399).

**52c:** Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.65 (3H, s, H-6'), 2.19 (1H, dd-like, *J* = 8.0, 6.1, H-4 $\alpha$ ), 2.54 (1H, dd-like, *J* = 13.8, 8.4, H-4 $\beta$ ), 3.36 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 4.24 (1H, d-like, *J* = 6.1, H-3), 4.42 (1H, m, H-5'a), 4.54 (1H, m, H-5'b), 4.85 (1H, d-like, *J* = 6.0, H-5), 5.95 (1H, br-s, H-4'), 6.23 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 429 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 429.1393 (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 429.1399).

**54a:** Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.66 (1H, ddd, *J* = 10.0, 6.8, 3.2, H-4 $\alpha$ ), 2.88 (1H, ddd, *J* = 10.0, 9.3, 6.4, H-4 $\beta$ ), 4.25 (1H, m, H-3), 4.24 (1H, m, H-5'a), 4.50 (1H, m, H-5'b), 4.64 (2H, s, H-6'), 5.66 (1H, m, H-5), 6.11 (1H, br-s, H-4'), 6.18 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 413 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 413.1083 (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 413.1086).

**54b:** Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.86 (1H, ddd, *J* = 10.0, 6.8, 3.2, H-4 $\alpha$ ), 2.90 (1H, ddd, *J* = 10.0, 9.3, 6.4, H-4 $\beta$ ), 4.25 (1H, m, H-3), 4.23 (1H, m, H-5'a), 4.50 (1H, m, H-5'b), 4.66 (2H, s, H-6'), 5.66 (1H, m, H-5), 6.08 (1H, br-s, H-4'), 6.18 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 413 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 413.1091 (Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 413.1086).

#### Hemerocallisamines IV and V (51 and 52) のメチル化

**51** および **52** (each 3.0 mg) をそれぞれ無水 1,4-Dioxane (1.5 ml) に溶解し, NaH (60% dispersion in oil, 2.0mg, 0.05 mmol) を加えた後, 30 分間室温にて攪拌した. その後, Iodomethane (0.1 mL, 1.63 mmol) を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応生成物を NH<sub>4</sub>Cl を用いて中和し, BuOH (3 × 5 ml) で抽出した. HPLC {mobile phase: H<sub>2</sub>O-MeCN (9:1, v/v) [COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 10 mm i.d.)]} を用いて精製することで, **51a** (1.9 mg, 59.4%) および **52a** (1.9 mg, 59.4%) を得た.

**51a:** Amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -20.0 (*c* = 0.2, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.69 (3H, s, H-6'), 1.87 (1H, ddd, *J* = 13.6, 7.8, 6.1, H-4 $\alpha$ ), 2.47 (1H, dd-like, *J* = 6.1, 6.0, H-4 $\beta$ ), 3.23 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.52 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.25 (1H, dd, *J* = 13.6, 7.8, H-3), 4.46 (1H, m, H-5'a), 4.60 (1H, m, H-5'b), 4.80 (1H, d-like, *J* = 5.95, H-5), 5.98 (1H, br-s, H-4'), 6.28 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 227 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 227.1154 (Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 227.1158).

**52a:** Amorphous powder; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -49.5 (*c* = 0.2, MeOH); <sup>1</sup>H NMR (methanol-*d*<sub>4</sub>, 500 MHz)  $\delta$  1.73 (3H, s, H-6'), 1.84 (1H, dd-like, *J* = 14.6, 2.5, H-4 $\alpha$ ), 2.48 (1H, ddd, *J* = 8.6, 6.3, 5.1, H-4 $\beta$ ), 3.22 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.48 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.90 (1H, *J* = 8.5, 3.6, H-3), 4.53 (1H, m, H-5'a), 4.71 (1H, m, H-5'b), 4.81, (1H, m, H-5), 5.78 (1H, br-s, H-4'), 6.25 (1H, br-s, H-2'); EIMS: *m/z* 227 [M]<sup>+</sup>; HREIMS: *m/z* 227.1152 (Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: *m/z* 227.1158).

### HPLC を用いた hemerocallisamine V (53) の 3 位の絶対立体配置の決定

53 (2.0 mg) を無水 1,4-Dioxane (1.5 ml) に溶解し, NaH (60% dispersion in oil, 2.0mg, 0.05 mmol) を加えた後, 30 分間室温にて攪拌した. その後, iodomethane (0.1 mL, 1.63 mmol) を加え, 室温にて 12 時間攪拌した. 反応生成物を NH<sub>4</sub>Cl を用いて中和し, BuOH (3 × 5 ml) で抽出した. 有機層を MeCN に溶解し, HPLC [column: COSMOSIL 5C18-PAQ (250 × 4.6 mm i.d.); mobile phase: MeCN–H<sub>2</sub>O (1:9, v/v); detection: optical rotation [Shodex OR-2 (Showa Denko Co., Ltd., Tokyo, Japan); flow rate: 1.0 ml/min; column temperature: ambient] を用いて分析したところ, 52a を 53 からの生成物として検出した. 52a ( $t_R = 20.2$  min with negative rotation) and 51a ( $t_R = 23.8$  min with negative rotation).

### 第三節の実験

#### 含有成分の PC12 細胞突起伸長促進様作用および A $\beta$ 凝集抑制作用

##### PC12 細胞における突起伸長促進作用

**細胞培養:** ラット副腎褐色細胞腫 PC12 細胞を 10%ウシ胎児血清 (FBS), 5%ウマ血清 (HS), 100 units/mL ペニシリン, 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン含有 RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich) で培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) した.

**NGF 共存下における PC12 細胞分化促進作用の検討:** Collagen Type I coated Microplate 24 well (IWAKI, 4820-010) に PC12 細胞  $1.0 \times 10^5$  cells/400  $\mu$ L/well を播種し, 24 時間培養後, 被験物質および NGF (Rat beta-NGF MAb, R&D, 終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) を添加した. 72 時間培養後, 検鏡を行った (OLYMPUS).

なお, 分化率は, 細胞の直径以上の突起進展を認めたものを分化したものとしてその割合を算出した. 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

ポジティブコントロールにはドネペジル塩酸塩 (東京化成) を使用した.

##### A $\beta$ 凝集抑制作用

被験物質の A $\beta$ 42 凝集抑制作用の検討においては, SensoLyte Thioflavin T  $\beta$ -Amyloid Aggregation Kit (ANA SPEC) を用い, Thioflavin T (Th-T) 法により検討を行った. 2  $\mu$ L の Th-T (2 mM) を 384 穴のブラックプレートに播種し, 1  $\mu$ L の被験物質および 17  $\mu$ L の A $\beta$ 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).

## 参考文献

- 1) Newman D. J., Cragg M. G., *J. Nat. Prod.* **75**, 311–335 (2012).
- 2) Nakamura S., Fujimoto K., Nakashima S., Matsumoto T., Miura T., Uno K., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 752–758 (2012).
- 3) Fujimoto K., Nakamura S., Nakashima S., Matsumoto T., Uno K., Ohta T., Miura T., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 1188–1194 (2012).
- 4) Nakamura S., Moriura T., Park S., Fujimoto K., Matsumoto T., Ohta T., Matsuda H., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **75**, 1425–1430, (2012)
- 5) Matsuda H., Hamao M., Nakamura S., Kon'i H., Murata M., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 674–680 (2012)
- 6) Nagashima J., Matsunami K., Otsuka H., Lhieochaiphant D., Lhieochaiphant S., *Phytochemistry*, **71**, 1564–1572 (2010).
- 7) Rao, M. U. J., Giri, S. G. Hanumaiah, T., Rao, J. V. K., *J. Nat. Prod.* **49**, 346–347 (1986).
- 8) Guinaudeau H., Leboeuf M., Cave A., *J. Nat. Prod.* **51**, 389–474 (1988).
- 9) Orabi Y. K., Walker A. L., Clark. M. A., Hufford D. C., *J. Nat. Prod.* **63**, 685–687 (2000).
- 10) Hsieh T., Chang F., Chia Y., Chen C., Chiu., Wu Y., *J. Nat. Prod.* **64**, 616–619 (2001).
- 11) Luo X., Chen B., Liu J., Yao S., *Anal. Chem. Act.* **538**, 129–133 (2005).
- 12) Mukherjee, P. K.; Mukherjee, D.; Maji, A. K.; Rai, S.; Heinrich, M. *J. Pharm. Pharmacol*, **61**, 407–422 (2009).
- 13) Huang C., Chen Y., Yang C., Lin H., Way T., Chiang W., Liu S., *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1087–1094 (2011).
- 14) Ogawa Y., Konishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1110–1112 (2009).
- 15) Zhang Y., Cichewicz H R., Nair G M., *Life Sciences*, **75**, 753–763 (2004).
- 16) Inoue T., Konishi T., Kiyosawa S., Fujiwara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 154–155 (1994).
- 17) Inoue T., Iwagoe K., Konishi T., Kiyosawa S., Fujiwara Y., *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 3187–3189 (1990).
- 18) Ogawa Y., Kawai M., Kinoshita A., Konishi T., *Chem. Nat. Compounds*, **49**, 991–995 (2013).
- 19) Konishi T., Fujiwara I., Konoshima T., Kiyosawa S., Nishi M., Miyahara K., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 318–320 (2001).
- 20) Islam S., Tahir I., Shahri W., Bhat M., *J. Plant Sci.*, **6**, 14–25 (2011).
- 21) Zhang H., Tan Ghee T., Santarsiero B., Mesecar A., Van Hung N., Cuong N., Soejarto D., Pezzuto J., Fong H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 609–615 (2003).
- 22) Xie W.-D., Niu Y.-F., Lai P.-X., Row K.-H., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 991–994 (2010).
- 23) Zdero C., Bohlmann F., Niemeyer H. M., *Phytochemistry*, **30**, 3683–3691 (1991).
- 24) Nishizawa M., Inoue A., Hayashi Y., Sastrapradja S., Kosela S., Iwashita T., *J. Org. Chem.*, **49**, 3660–3662 (1984).
- 25) Ohmoto T., Ikeda K., Nomura S., Shimizu M., Saito S., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2272–2279 (1987).

- 26) Brown G. D., Liang G.-Y., Sy L.-K., *Phytochemistry*, **64**, 303–323, (2003).
- 27) Nowak S., Wolbis M., **59**, 275–280 (2002).
- 28) Markham K. R., Ternai B., *Tetrahedron*, **32**, 565–569 (1976).
- 29) Chaurasia N., Wichtl M., *Planta Medica*, **53**, 432–434 (1987).
- 30) Karl C., Mueller G., Pedersen P. A., *J. Nat. Prod.*, **45**, 557–559 (1982).
- 31) Rayyan S., Fossen T., Solheim Nateland H., Andersen O. M., *Phytochem. Anal.*, **16**, 334–341(2005).
- 32) Romussi G., Sancassan F., Parodi B., Bignardi G., *Lieb. Annal. Chem.*, **11**, 1864–1866 (1984).
- 33) Beck M-A., Haberlein H., *Phytochemistry*, **50**, 329–332 (1998).
- 34) Tsukamoto S., Tomise K., Aburatani M., Onuki H., Hirorta H., Ishiharajima E., Ohta T., *J. Nat. Prod.*, **67**, 1839–1841(2004).
- 35) Li D., Li W., Wang Q., Yang Z., Hou Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5095–5098 (2010).
- 36) Matsuki M., Watanabe T., Ogasawara A., Mikami T., Matsumoto T., *Yakugakuzasshi*, **128**, 1203–1207 (2008).
- 37) Jackman, L. M.; Trewella, J. C.; Moniot, J. L.; Shamma, M. *J. Nat. Prod.* **42**, 437–449 (1979).
- 38) Peter P., Adek Z. A., Will G., *Planta Med.* **58**, 184–187, (1992).
- 39) Zheng Z., Wang M., Wang D., Duan W., Wang X., Zheng C., *J. Chromatography B*, **878**, 1647–1651 (2010).
- 40) Gregory D. C., *Tetrahedron Lett.*, **44**, 8149–8152 (2003).
- 41) Zhizhen Z., Hala N. E., Melissa R. J., David S. P., Larry A. W., Alice M. C., *J. Nat. Prod.* **65**, 856–859 (2002)
- 42) Byung H. H., Myung, H. P., *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 208–211(1987).
- 43) Fajardo V., Araya M., Cuadra P., Oyarzun A., Gallardo A., Cueto M., Diaz-Marrero A. R., Darias J., Villarroel L., Álvarez C., Mora-Pérez Y., Joseph-Nathan P., *J. Nat. Prod.*, **72**, 1355–1356 (2009).
- 44) Sheng-The L., Yang-Chang W., *Heterocycles*, **23**, 3085–3094 (1985).
- 45) Sheng-The L., Yang-Chang W., Shiow-Piaw L., *J. Chin. Chem. Soc.*, **34**, 33–42 (1987).
- 46) Judith M. R., Daniela S., Elisabeth B., Ernst P. E., Thierry L., Hermann S., *J. Nat. Prod.*, **69**, 1341–1346 (2006).
- 47) Iturriaga-Vasquez P., Miquel R., Ivorra M. D., D'Ocon M. P., Cassels B. K., *J. Nat. Prod.*, **66**, 954–957 (2003).
- 48) Suchy M., Elehriki A. A. H., Hudson R. H. E., *Org Lett*, **13**, 3952–3955 (2011).
- 49) Patching S. G., Baldwin S. A., Baldwin A. D., Young J. D., Gallagher M. P., Henderson P. J. F., Herbert R. B., *Org. Biomol. Chem.* **3**, 462–470 (2005).
- 50) Ciuffreda P., Casati S., Manzocchi A., **45**, 781–784 (2007).
- 51) Shuto S., Itoh H., Ueda S., Imamura S., Fukukawa K., Tsujino M., Matsuda A., Ueda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 209–217(1988).
- 52) Stueber D., Grant D. M., *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10539–10551 (2002)
- 53) Murai N., Yonaga M., Tanaka K., *Org. Lett.*, **14**, 3812–3813 (2012).
- 54) Flack H. D., *Acta. Cryst.*, **A39**, 876–881 (1983).

- 55) Miyamae Y., Kurisu M., Murakami K., Han J., Isoda H., Irie K., Shigemori H., *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 5844–5849 (2012).
- 56) Oda T., Kume T., Katsuki H., Niidome T., Sugimoto H., Akaike A., *J. Pharmacol Sci.* **104**, 349–354 (2007).
- 57) Lafrance M., Blaquièrè N., Fagnou K., *Chem. Commun.*, 2874–28751 (2004).
- 58) Lafrance M., Blaquièrè N., Fagnou K., *Eur. J. Org. Chem.*, 811–825 (2007).
- 59) Kunimoto J., Kamimura M., *Yakugaku Zasshi*, **84**, 1100–1104 (1964).
- 60) Si Y.-G., Gardner M. P., Tarazi F. I., Baldessarini R. J., Neumeyer J. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3971–3973 (2008).
- 61) Meuzelaar G. J., Maat L., Sheldon R. A., *Tetrahedron*, **55**, 4481–4488 (1999).
- 62) Shinohara T., Takeda A., Toda J., Terasawa N., Sano T., *Heterocycles*, **46**, 555–565 (1997).